(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116829592 A
(43)申请公布日 2023.09.29

(21)申请号 202180075676.5
(22)申请日 2021.09.10
(30)优先权数据
63/077207 2020.09.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.05.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/075005 2021.09.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/053650 EN 2022.03.17
(71)申请人 免疫医疗有限公司
地址 英国剑桥郡
(72)发明人 K·L·金妮尔 G·C·戴维斯
D·G·里斯
J·L·珀西瓦尔-阿尔文
J·E·安德鲁斯 J·切斯伯勒
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 罗文锋 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)

权利要求书5页 说明书131页
序列表28页 附图111页

(54)发明名称

治疗性B7-H4结合分子

(57)摘要

本发明涉及用于治疗癌症的结合分子(例如,抗体)和相关的抗体-药物缀合物。

CN 116829592 A

1.一种结合至B7-H4的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

i.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

ii.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

2.根据权利要求1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包含:

i.分别含有SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

ii.分别含有SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

iii.分别含有SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

iv.分别含有SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

v.分别含有SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

vi.分别含有SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

vii.分别含有SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

viii.分别含有SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;或

ix.分别含有SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体。

3.根据权利要求1或权利要求2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包含:

i.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

4.根据前述权利要求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

合片段包含：

i.分别含有SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链，或其功能变体。

5.根据前述权利要求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结合OVCAR4细胞系。

6.根据前述权利要求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包含含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链恒定区。

7.根据权利要求1-5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包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链恒定区。

8.根据前述权利要求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包含含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链恒定区。

9.根据权利要求1-5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包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链；以及含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链。

10.根据权利要求1-5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包含含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链；以及含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链。

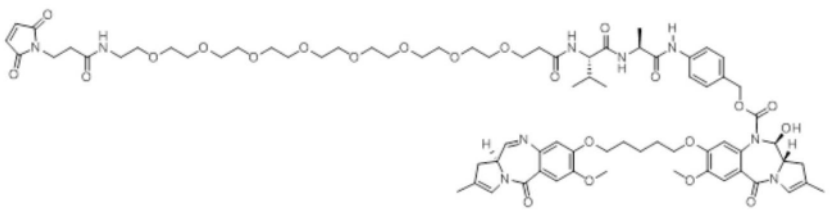
11.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中该抗体或其抗原结合片段与异源药剂缀合。

12.根据前述权利要求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缀合至一种或多种异源药剂，该一种或多种异源药剂选自由以下组成的组：拓扑异构酶I抑制剂、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮杂䓬、抗微生物剂、治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、脂质、生物应答调节剂、药学试剂、淋巴因子、异源抗体、异源抗体的片段、可检测标记、聚乙二醇(PEG)、放射性同位素、或其组合。

13.根据前述权利要求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缀合至一种或多种异源药剂，该一种或多种异源药剂选自拓扑异构酶I抑制剂、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮杂䓬、或其组合。

14.根据前述权利要求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缀合至异源药剂，该异源药剂选自由以下组成的组：微管溶素AZ1508、吡咯并苯并二氮杂䓬SG3315、吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249、或其组合。

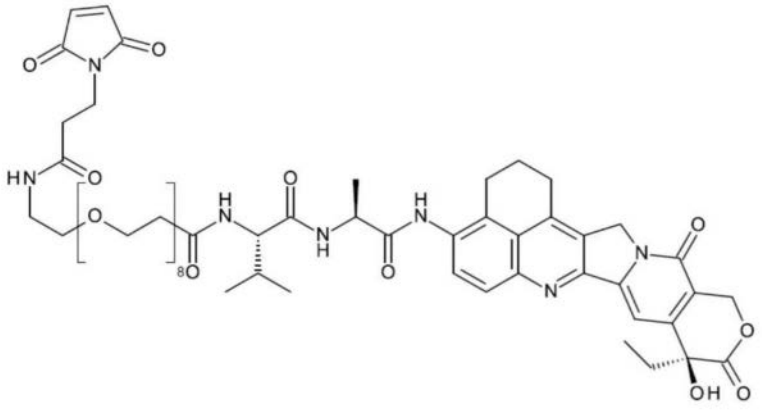
15.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素：



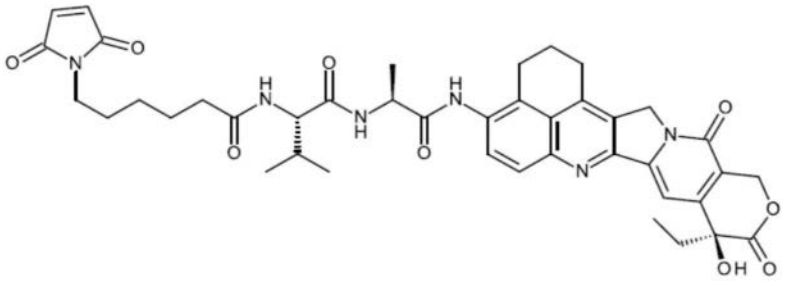
(SG3249)。

16.根据权利要求1-14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

结合片段缀合至：

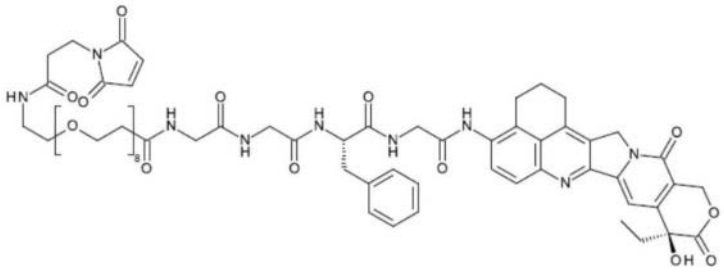


（SG3932）；

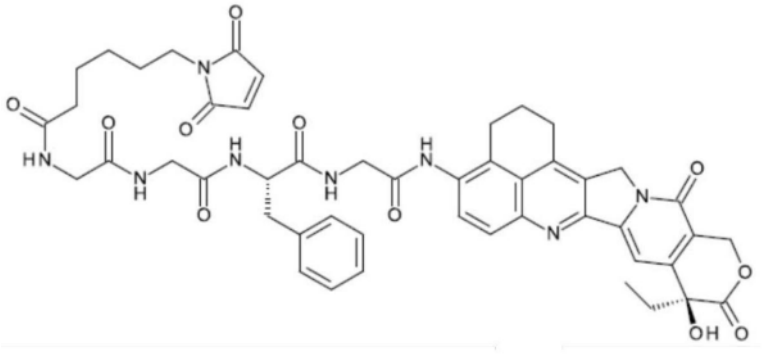


（SG4010）；

和/或

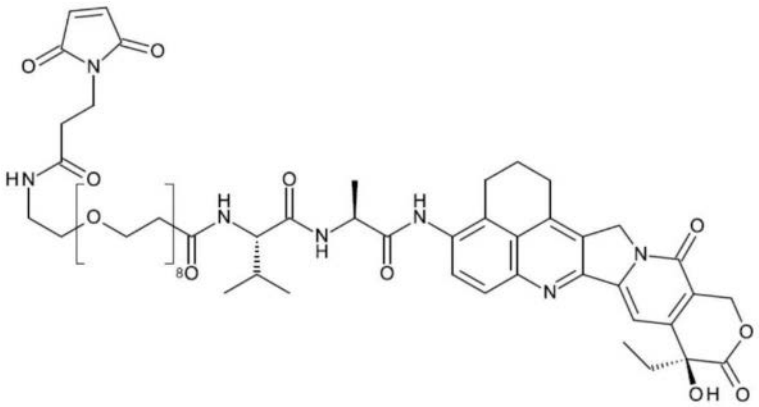


（SG4057）；



（SG4052）。

17.根据权利要求1-14或16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缀合至：



（SG3932）。

18.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

19.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化单克隆抗体。

20.一种药物组合物，该药物组合物包含根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

21.一种多核苷酸，该多核苷酸编码根据权利要求1-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

22.一种宿主细胞，该宿主细胞包含根据权利要求21所述的多核苷酸。

23.一种用于产生结合至B7-H4的抗体或其抗原结合片段的方法，该方法包括在宿主细胞中表达根据权利要求22所述的多核苷酸。

24.一种可通过根据权利要求23所述的方法获得的抗体或其抗原结合片段。

25.一种治疗包含表达B7-H4的癌细胞的癌症的方法，该方法包括向受试者施用根据权利要求1-19或24中任一项所述的抗体或抗原结合片段、根据权利要求20所述的药物组合物、或其组合。

26.根据权利要求1-19或24中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求20所述的药物组合物，用于治疗癌症，其中所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞。

27.根据权利要求25所述的方法，或根据权利要求26所述使用的抗体或其抗原结合片段或药物组合物，其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、NSCLC(鳞癌和/或腺癌)、胰腺癌和胃癌。

28.根据权利要求25-27中任一项所述的方法、或抗体或其抗原结合片段或药物组合物，其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌和胆管癌。

29.根据权利要求25-28中任一项所述的方法、或抗体或其抗原结合片段或药物组合物，其中所述癌症是乳腺癌，该乳腺癌选自激素受体阳性(HR+)乳腺癌、人表皮生长因子受体2阳性(HER2+)乳腺癌和三阴性乳腺癌(TNBC)。

30.一种用于检测样品中是否存在B7-H4多肽的方法，该方法包括：

i.使样品与根据权利要求1-19或24中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求20所述的药物组合物接触，以提供抗体-抗原复合物；

ii.检测所述抗体-抗原复合物是否存在；

iii.其中该抗体-抗原复合物的存在证实了B7-H4多肽的存在；

iv.其中抗体-抗原复合物的不存在证实了B7-H4多肽的不存在。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述抗体-抗原复合物的存在指示癌细胞的存在,并且其中所述抗体-抗原复合物的不存在指示癌细胞的不存在。

32.根据权利要求30或权利要求31所述的方法,其中该样品是可从受试者获得的分离的样品。

33.根据权利要求30-32中任一项所述的方法,其中该B7-H4多肽是癌细胞的组成成分。

34.一种抗体-药物缀合物(ADC),该抗体-药物缀合物包含:

(i)结合至B7-H4多肽的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1;含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2;含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3;以及含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1;含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2;和含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3;

(ii)可裂解的mp-PEG8-val-ala接头;以及

(iii)细胞毒性剂,其中该细胞毒性剂是SG3932,

并且其中该ADC具有约8的药物与抗体比率(DAR)。

35.根据权利要求34所述的ADC,其中该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的可变重(VH)链和含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻(VL)链。

36.根据权利要求34或35所述的ADC,该ADC包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链(LC)。

37.一种药物组合物,该药物组合物包含根据权利要求34-37中任一项所述的ADC。

38.一种治疗包含表达B7-H4的癌细胞的癌症的方法,该方法包括向受试者施用根据权利要求34-37中任一项所述的ADC、或根据权利要求37所述的药物组合物、或其组合。

39.如权利要求25或权利要求38所述的方法,其中该癌细胞具有同源DNA修复缺陷。

40.如权利要求39所述的方法,其中该同源DNA修复缺陷由BRCA1突变的存在定义。

41.如权利要求39或权利要求40所述的方法,其中该同源DNA修复缺陷由RAD51病灶形成测定中的负评分定义。

42.一种用于减小表达B7-H4的肿瘤体积的方法,该方法包括向受试者施用根据权利要求1-19或24中任一项所述的抗体或抗原结合片段、根据权利要求20所述的药物组合物、根据权利要求34-37中任一项所述的ADC、根据权利要求37所述的药物组合物、或其组合。

43.如权利要求42所述的方法,其中该肿瘤具有同源DNA修复缺陷。

44.如权利要求43所述的方法,其中该同源DNA修复缺陷由BRCA1突变的存在定义。

45.如权利要求43或44所述的方法,其中该同源DNA修复缺陷由RAD51病灶形成测定中的负评分定义。

治疗性B7-H4结合分子

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年9月11日提交的美国临时专利申请号63/077,207的优先权权益,将其出于所有目的通过引用以其全文并入本文。

[0003] 以电子方式提交的材料通过引用而并入

[0004] 通过引用以其全文并入本文的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表,该序列表在此同时提交,并确定如下:名为"B7H4-100-WO-PCT.txt"、创建于2021年9月8日、50,724字节的ASCII(文本)文件。

技术领域

[0005] 本发明涉及用于治疗癌症的结合分子(例如,抗体)和相关的抗体-药物缀合物。

背景技术

[0006] 尽管对可能的抗癌药物进行了多年的研究和开发,但癌症仍然是全球主要疾病之一,其中三分之一的人在其一生中会患上某种形式的癌症。两种最常见的癌症类型是乳腺癌和肺癌。

[0007] 癌症的主要疗法仍然是化学疗法和放射疗法。然而,这些疗法与多种不良副作用有关,从疲劳到疾病和脱发。这些问题由于所使用的化学疗法的疗程通常很长而得到加剧。

[0008] 在过去的几十年中,已经开发并推销了多种针对癌症的抗体疗法,导致对多种癌症类型的苛刻治疗形式(例如,手术和化学疗法)的需求减少。尽管在此期间生产抗体(例如,单克隆抗体)的方法的可用性已大大提高,但临床上可用的抗癌抗体相对较少,可用于靶向广谱癌症类型的抗体甚至更少。此外,需要增加治疗性抗体的效力,其通常受到靶抗原和抗体结合后对癌细胞的后续作用的限制。

[0009] 本发明解决了上述问题中的一个或多个。

发明内容

[0010] 发明人惊奇地发现跨膜多肽B7-H4在多种细胞类型(例如,乳腺癌、肺癌和胰腺癌)中高度表达,其与癌抗原的作用一致。发明人已经成功地生成在体外和体内均显示出与表达B7-H4的细胞的高度结合(例如,与可商购的抗体相比更好的结合)的抗体。有利地,这些抗体可以靶向表达B7-H4的多种不同癌细胞类型,这例示了这些抗体作为抗癌疗法的广泛效用。

[0011] 此外,这些抗体可以有利地连接/缀合至合适的药物/细胞毒素(例如,以提供抗体-药物缀合物(ADC)),从而通过允许靶向毒素递送至癌细胞来增加这些抗体作为疗法的效力。

具体实施方式

[0012] 因此,在一方面,本发明提供了结合至B7-H4(例如B7-H4表位)的抗体或其抗原结

合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0013] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0014] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0015] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0016] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0017] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[0018] 抗体或其抗原结合片段可适当地包含在药物组合物中,例如包含在适于向患者施用的配制品中。

[0019] 在另一方面,提供了包含抗体或其抗原结合片段的药物组合物,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0020] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0021] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0022] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0023] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0024] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[0025] 术语“药物组合物”是指如下制剂,该制剂处于允许活性成分的生物活性有效的形式,并且不含有另外的、对组合物将要施用的受试者具有不可接受的毒性的组分。这种组合物可以是无菌的并且可以包含药学上可接受的运载体,如生理盐水。合适的药物组合物可以包含一种或多种缓冲液(例如,乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如,聚

山梨酯)、稳定剂(例如,人白蛋白)、防腐剂(例如,苄醇)、以及增强生物利用度的吸收促进剂、和/或其他常规的增溶剂或分散剂。

[0026] 此外,已证明本发明的抗体或其抗原结合片段靶向和抑制体内B7-H4阳性肿瘤的生长。因此,本发明包括在用于治疗癌症的方法中使用的上述定义的抗体或其抗原结合片段和上述定义的药物组合物。优选地,所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞。

[0027] 在一方面,提供了用于治疗癌症(例如,其中所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞)的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或其抗原结合片段包含:

[0028] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0029] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0030] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0031] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0032] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[0033] 换言之,本发明的一个方面提供了治疗癌症的方法(例如,其中所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞),该方法包括向受试者施用有效量的抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含:

[0034] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0035] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0036] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0037] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0038] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功

能变体。

[0039] 又换言之,在另一方面,本发明包括抗体或其抗原结合片段在制造用于治疗癌症(例如,其中所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞)的药物中的用途,所述抗体或抗原结合片段包含:

[0040] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0041] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0042] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0043] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0044] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[0045] 现在将概述某些定义和优选实施例。应当理解,以下定义和实施例可涉及本文所述的任何方面,例如,用于在本文所述疗法中使用的任何方法、组合物和/或组合物。

[0046] 术语“表位”是指能够结合至(例如,被结合)本发明的抗体或抗原结合片段的靶蛋白区域(例如,多肽)。

[0047] B7-H4(也称为包含V组结构域的T细胞激活抑制剂1,由VTCN1基因编码)是共刺激蛋白B7家族的跨膜多肽。B7-H4被理解为在抗原呈递细胞的表面上表达,用于与免疫细胞(例如,T淋巴细胞,CD28为潜在的配体)的配体相互作用。不希望受理论束缚,本发明人观察到B7-H4在各种癌症类型的细胞上高度表达,这表明该分子是肿瘤相关抗原。因此,要求保护的抗体靶向(以及任选地将细胞毒素递送至)表达B7-H4的能力使得所述抗体特别适合用于在癌症治疗中使用。此外,B7-H4的表达不限于特定的癌症类型,因此它代表了用于治疗广谱癌症类型的靶抗原。

[0048] B7-H4的RNA、DNA、和氨基酸序列是本领域技术人员已知的,并且可以在许多数据库中(例如,在美国国家生物技术信息中心(NCBI)和UniProt的数据库中)发现。在UniProt找到的这些序列的实例是人B7-H4的Q7Z7D3(VTCN1_HUMAN);和小鼠B7-H4的Q7TSP5(VTCN1_MOUSE)。编码人B7-H4的核苷酸序列可以是SEQ ID NO:53,更优选地是SEQ ID NO:54。人B7-H4的多肽序列优选地是SEQ ID NO:55。

[0049] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段在本文中可称为“ZYOEPQ-E02”或“EPQ-E02”。

[0050] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段在本文中可称为“ZY0E0B-F05”或“E0B-F05”。

[0051] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段在本文中可称为“ZY0E05-E07”或“E05-E07”。

[0052] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段在本文中可称为“ZY0EP0-C07”或“EP0-C07”。

[0053] 在一个特别优选的实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为“ZY0EQD-E02”或“EQD-E02”。

[0054] 换言之，该抗体或其抗原结合片段可优选地包含：

[0055] -含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1，或其功能变体；

[0056] -含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2，或其功能变体；

[0057] -含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3，或其功能变体；

[0058] -含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1，或其功能变体；

[0059] -含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2，或其功能变体；以及

[0060] -含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3，或其功能变体。

[0061] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含：

[0062] i.含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCDR1，或其功能变体；

[0063] ii.含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HCDR2，或其功能变体；

[0064] iii.含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR3，或其功能变体；

[0065] iv.含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的LCDR1，或其功能变体；

[0066] v.含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCDR2，或其功能变体；以及

[0067] vi.含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的LCDR3，或其功能变体。

[0068] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含：

[0069] i.含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR1，或其功能变体；

[0070] ii.含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HCDR2，或其功能变体；

[0071] iii.含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HCDR3，或其功能变体；

[0072] iv.含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR1，或其功能变体；

[0073] v.含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LCDR2，或其功能变体；以及

[0074] vi.含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的LCDR3，或其功能变体。

[0075] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含：

[0076] i.含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HCDR1，或其功能变体；

[0077] ii.含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HCDR2,或其功能变体;

[0078] iii.含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HCDR3,或其功能变体;

[0079] iv.含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的LCDR1,或其功能变体;

[0080] v.含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的LCDR2,或其功能变体;以及

[0081] vi.含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的LCDR3,或其功能变体。

[0082] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0083] i.含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HCDR1,或其功能变体;

[0084] ii.含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HCDR2,或其功能变体;

[0085] iii.含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HCDR3,或其功能变体;

[0086] iv.含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的LCDR1,或其功能变体;

[0087] v.含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的LCDR2,或其功能变体;以及

[0088] vi.含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的LCDR3,或其功能变体。

[0089] 另外或可替代地,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以通过其可变重(VH)链和可变轻(VL)链来描述。

[0090] 合适的可变重(VH)链序列(抗体或其抗原结合片段可包含)以个体化的方式概述如下:

[0091] -SEQ ID NO:31,或其功能变体;

[0092] -SEQ ID NO:33,或其功能变体

[0093] -SEQ ID NO:43,或其功能变体

[0094] -SEQ ID NO:45,或其功能变体

[0095] -SEQ ID NO:46,或其功能变体

[0096] -SEQ ID NO:47,或其功能变体

[0097] -SEQ ID NO:35,或其功能变体

[0098] -SEQ ID NO:37,或其功能变体

[0099] -SEQ ID NO:39,或其功能变体

[0100] 特别合适的可变重(VH)链序列(抗体或其抗原结合片段可包含)以个体化的方式概述如下:

[0101] -SEQ ID NO:45,或其功能变体

[0102] -SEQ ID NO:33,或其功能变体

[0103] -SEQ ID NO:43,或其功能变体

[0104] -SEQ ID NO:46,或其功能变体

[0105] -SEQ ID NO:47,或其功能变体

[0106] 合适的可变轻(VL)链序列(抗体或其抗原结合片段可包含)以个体化的方式概述如下:

[0107] -SEQ ID NO:32,或其功能变体

[0108] -SEQ ID NO:34,或其功能变体

[0109] -SEQ ID NO:36,或其功能变体

[0110] -SEQ ID NO:38,或其功能变体

[0111] -SEQ ID NO:40,或其功能变体

[0112] 优选的可变轻(VL)链序列(抗体或其抗原结合片段可包含)可包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列(或其功能变体)。

[0113] 例如,在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0114] i.含有与SEQ ID NO:31、33、35、37或39的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及

[0115] ii.含有与SEQ ID NO:32、34、36、38或40的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0116] 例如,在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0117] i.含有与SEQ ID NO:31、33、35、37、39、43、45、46或47的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及

[0118] ii.含有与SEQ ID NO:32、34、36、38或40的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0119] 合适地,该抗体或其抗原结合片段可包含:

[0120] i.含有与SEQ ID NO:33的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及

[0121] ii.含有与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0122] 更合适地,该抗体或其抗原结合片段可包含:

[0123] i.含有与SEQ ID NO:45的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及

[0124] ii.含有与SEQ ID NO:34的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0125] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0126] -分别含有SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

[0127] -分别含有SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[0128] -分别含有SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[0129] -分别含有SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[0130] -分别含有SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[0131] -分别含有SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[0132] -分别含有SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[0133] -分别含有SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能

变体;或

[0134] -分别含有SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体。

[0135] 在一个优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:45、33、43、46或47的氨基酸序列的可变重(VH)链(或其功能变体);以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻(VL)链(或其功能变体)。例如,SEQ ID NO:33、45、46和/47的VH可以对应于SEQ ID NO:33的VH的"种系化"版本(例如,都具有相同的CDR序列,但具有框架变异)。有利地,每个变体保留等效的结合特性。

[0136] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为"ZYOEPD-E02"或"EPD-E02"。

[0137] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为"ZYOEOB-F05"或"EOB-F05"。

[0138] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为"ZYOE05-E07"或"E05-E07"。

[0139] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为"ZYOEP0-C07"或"EP0-C07"。

[0140] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为"ZYOEQD-E02"或"EQD-E02"。

[0141] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0142] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0143] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。

[0144] 在一个优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体。包含所述序列的抗体或其抗原结合片段可称为"EQD-E02_GL"。

[0145] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含可变重链,该可变重链包含与参考氨基酸序列SEQ ID NO:43具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的可变重链。例如,该抗体或其抗原结合片段可包含含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的

可变重链以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链。

[0146] 另外或可替代地,本文所述的抗体或其抗原结合片段可以通过其重链和/或轻链来描述。

[0147] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含轻链(例如,包含VL和恒定轻链),该轻链包含与SEQ ID NO:44的氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一个优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链(例如,包含VL和恒定轻链)。

[0148] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含重链(例如,包含VH和恒定重链),该重链包含与参考氨基酸序列SEQ ID NO:48具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。例如,该抗体或其抗原结合片段可包含含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链(例如,包含VH和恒定重链)。这种重链可称为“E02-GL-Maia-重链”。

[0149] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含重链(例如,包含VH和恒定重链),该重链包含与参考氨基酸序列SEQ ID NO:49具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。例如,该抗体或其抗原结合片段可包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链(例如,包含VH和恒定重链)。这种重链可称为“E02-GLY-Maia-重链”。

[0150] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含重链(例如,包含VH和恒定重链),该重链包含与参考氨基酸序列SEQ ID NO:50具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。例如,该抗体或其抗原结合片段可包含含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的重链(例如,包含VH和恒定重链)。这种重链可称为“E02-GLQ-Maia-重链”。

[0151] 在一个优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含重链(例如,包含VH和恒定重链),该重链包含与参考氨基酸序列SEQ ID NO:51具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一个更优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(例如,包含VH和恒定重链)。这种重链可称为“E02-GL-WT-重链”。

[0152] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含轻链恒定区,该轻链恒定区包含与参考氨基酸序列SEQ ID NO:42具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一个优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0153] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链恒定区。更优选地,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链恒定区。

[0154] 在一个优选的实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链(例如,包含VL和恒定轻链)以及含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(例如,包含VH和恒定重链)。

[0155] 有利地,发明人已经证明,与报道的靶向B7-H4的现有(商业上)可获得的抗体相比,所要求保护的抗体或抗原结合片段可以靶向更广谱的表达B7-H4的细胞。因此,发明人不仅提供了对临床相关靶标具有亲和力和特异性的抗体(或其抗原结合片段),而且证明了与其相关的独特优势(例如,意想不到的技术效果)。

[0156] 例如,图4证明了要求保护的示例性抗体以以下抗体无法实现的亲和力结合广谱

的癌细胞类型:Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG;US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG;R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1;以及Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1。

[0157] 优选地,本文所述的抗体或其抗原结合片段能够结合作为癌细胞的组成成分的B7-H4(例如,B7-H4作为癌细胞的细胞膜的组成成分)。

[0158] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可结合至OVCAR4细胞系和/或CHO细胞系(例如,其可缺乏编码B7-H4的外源核酸)。例如,该抗体或其抗原结合片段结合至OVCAR4细胞系和/或CHO细胞系(例如,其可缺乏编码B7-H4的外源核酸)的B7-H4(例如,B7-H4表位)。合适地,本文所述的抗体或其抗原结合片段可结合至OVCAR4细胞系和CHO细胞系(例如,其可缺乏编码B7-H4的外源核酸)。

[0159] 在一个实施例中,与一种或多种选自E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG、US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG、R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1、Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1、同种型1CAT004 SP06-003、同种型2R and D正常山羊IgG对照(AB-108C)、AdD serotec MCA2632、Epitomics 2516-1、eBiosciences 145972-82、eBioscience 145970-85的抗体、或其组合相比,该抗体或其抗原结合片段以更高的亲和力结合至OVCAR4细胞系和/或CHO细胞系(例如,其可缺乏编码B7-H4的外源核酸)。例如,与一种或多种选自E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG、US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG、R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1和Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1的抗体、或其组合相比,该抗体或其抗原结合片段可以以更高的亲和力结合至OVCAR4细胞系和/或CHO细胞系(例如,其可缺乏编码B7-H4的外源核酸)。

[0160] 在一个优选的实施例中,与E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG相比,该抗体或其抗原结合片段以更高的亲和力结合至OVCAR4细胞系。

[0161] 提及"E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG"可与本文的术语"B7-H4单克隆抗体(H74),eBioscience"互换使用。所述抗体可从赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific)(目录号14-5949-82)获得。

[0162] 在另一个优选的实施例中,与US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG相比,该抗体或其抗原结合片段以更高的亲和力结合OVCAR4细胞系。

[0163] 所述亲和力(例如,结合亲和力)可以通过本文所述的任何合适的测量结合亲和力的方法来测量。

[0164] OVCAR4细胞系是人卵巢癌细胞系。OVCAR4细胞系可从美国国家癌症研究所(the National Cancer Institute)获得,从癌症治疗和诊断部肿瘤库(the Division of Cancer Treatment and Diagnosis Tumor Repository)转移细胞系。中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系是源自中国仓鼠的卵巢的上皮细胞系,可广泛获得。

[0165] 如以上所述,本发明的抗体或其抗原结合片段可包含在药物组合物中。该药物组合物可以包含一种或多种药物上可接受的赋形剂。在一个实施例中,本发明的药物组合物可以包含药学上可接受的无毒的无菌载体,如生理盐水、无毒缓冲剂、防腐剂等。在本文披露的治疗方法中使用的合适的配制品描述于Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第22版,Lloyd V.Allen,Jr.编辑(2012)中。

[0166] 在一个实施例中,本发明的药物组合物可包含在一种或多种配制品中,该配制品

选自胶囊、片剂、水性悬浮液、溶液、鼻气雾剂、或其组合。

[0167] 在一个实施例中，该药物组合物包含多于一种类型的本发明的抗体或抗原结合片段。例如，药物组合物可包含选自抗体、抗原结合片段、缀合至细胞毒素的抗体或其抗原结合片段、或其组合中的两种或更多种。

[0168] 术语抗体或抗原结合片段的“药学上有效的量”意指足以实现与靶标的有效结合并实现益处(例如，改善疾病或病症的症状，或者检测物质或细胞)的量。

[0169] 在一个实施例中，药物组合物可以包含缓冲液(例如，乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如，聚山梨酯)、任选的稳定剂试剂(例如，人白蛋白)等。

[0170] 合适地，本发明的抗体或抗原结合片段以足够的亲和力结合B7-H4分子，使得该抗体可用作靶向B7-H4的治疗剂或诊断试剂。

[0171] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段以如下解离常数(KD)结合B7-H4(优选人B7-H4)：≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤10pM、≤1pM、或≤0.1pM。在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段以如下KD结合B7-H4(优选人B7-H4)：约0.1nM至约40nM之间、约0.5nM至约30nM之间、约1nM至约20nM之间、或约1.5nM至约20nM之间。

[0172] 在一个优选的实施例中，该抗体或其抗原结合片段以约23nM至约27nM之间的KD结合B7-H4(优选人B7-H4)。在一个更优选的实施例中，该抗体或其抗原结合片段以约1nM至约1.5nM之间的KD结合B7-H4(优选人B7-H4)。

[0173] KD测量(结合亲和力)可以通过本领域已知的任何合适的测定法进行。合适的测定法包括可经由KinExA系统(例如，KinExA 3100、KinExA 3200或KinExA 4000)(赛必因仪器公司(Sapidyne Instruments)，爱达荷州(Idaho))或ForteBio Octet系统进行的亲和力测定法。

[0174] 在一个实施例中，本发明的抗体或其抗原结合片段与无关的非B7-H4蛋白的结合程度比该抗体(或其抗原结合片段)与B7-H4(优选人B7-H4)的结合少约10％、5％、2％或1％(优选少约10％)。所述结合可以例如通过放射免疫测定法(RIA)、BIACORE®(使用重组B7-H4作为分析物并且抗体作为配体，或反之亦然)、KINEXA®、ForteBio Octet系统或本领域已知的其他结合测定法来测量。

[0175] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段不结合选自人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子、人BTN3A2分子、或其组合中的一种或多种。在一个优选的实施例中，该抗体或其抗原结合片段不结合选自人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、或其组合中的一种或多种。

[0176] 术语“不结合”意指本文所述的抗体或其抗原结合片段基本上不结合一种或多种所述分子(例如，人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子、人BTN3A2分子、或其组合)。当在本文的结合背景下使用时，术语“基本上没有”可表示细胞培养物中表达一种或多种所述分子的细胞的少于5％、2％、1％、0.5％或0.1％被本文所述的抗体或其抗原结合片段结合(在接触时)。合适地，当在本文的结合背景下使用时，术语“基本上没有”可表示没有这样的细胞被结合。

[0177] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段不结合人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子或人BTN3A2分子。在一个优选的实施例中，该抗体或其抗原结合片段不结合人B7-H1分子、人B7-H2分子、或人B7-H3分子。

[0178] 在一个实施例中，该B7-H4多肽包含在B7-H4多肽序列或其片段内。

[0179] “B7-H4多肽”可包含B7-H4的全长多肽序列(例如，SEQ ID NO.:55)，或可包含B7-H4的全长多肽序列的任何长度的B7-H4片段(例如，包含B7-H4的全长多肽序列的5％、15％、25％、35％、45％、55％、65％、75％、85％或95％的多肽序列)，该片段包含可以结合(例如，被结合)本发明的抗体或抗原结合片段的表位。该B7-H4多肽可包含与SEQ ID NO.:55的序列具有75％、80％、85％、90％或90％序列同一性的序列。优选地，该B7-H4多肽包含SEQ ID NO.:55的序列。

[0180] 该抗体或抗原结合片段在体外和体内均对B7-H4具有高亲和力，因此可有利地用于检测B7-H4表位的方法和相关的诊断方法中。

[0181] “治疗”是指治愈、减慢已诊断的病理性病症或障碍，减轻已诊断的病理性病症或障碍的症状，和/或停止已诊断的病理性病症或障碍的进展的治疗性措施。因此，需要治疗的人包括已患有该障碍的那些人。在一个实施例中，如果患者显示例如全部、部分或者瞬时减轻或消除了与疾病或障碍(优选癌症)相关的症状，则受试者根据本文提供的方法成功地“治疗”了该疾病或障碍(优选癌症)。

[0182] 在一个实施例中，本发明的方法可用于预防包含表达B7-H4的癌细胞的癌症的发作。“预防”是指预防和/或减缓靶标病理性病症或障碍的发展的防御性或预防性措施。因此，需要预防的人包括倾向于患有或易患该障碍的那些人。在一个实施例中，如果相比于未经受本发明方法的患者，患者瞬时或永久地表现出例如与疾病或障碍相关的更少或不太严重的症状，或与该疾病或障碍相关的症状的更迟的发作，则根据本文提供的方法成功地预防了该疾病或障碍(优选癌症)。

[0183] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换使用以指哺乳动物受试者。在一个实施例中，该“受试者”是人、家畜、农场动物、竞赛动物和动物园动物，例如人、非人灵长类动物、狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛等。在一个实施例中，该受试者是食蟹猴(cynomolgus monkey/Macaca fascicularis)。在一个优选的实施例中，该受试者是人。在本发明的方法中，该受试者先前可能未被诊断为患有癌症。可替代地，该受试者可能先前已被诊断为患有癌症。该受试者也可以是表现出疾病风险因素的人，或没有癌症症状的人。该受试者也可以是患有癌症或有患癌症的风险的人。因此，在一个实施例中，本发明的方法可用于确认受试者中癌症的存在。例如，该受试者可能先前已通过替代性方式被诊断出患有癌症。在一个实施例中，该受试者先前已经施用癌症疗法。

[0184] 在一个实施例中，本发明的治疗方法包括一个或多个施用步骤，该一个或多个施用步骤选自口服、静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道、吸入、局部、或其组合。在一个优选的实施例中，施用是静脉内或动脉内(例如，通过注射或滴注)施用或其组合。

[0185] 在一个实施例中，将该抗体或其抗原结合片段直接递送至有害细胞群的位点处(例如，从而增加患病组织对治疗剂的暴露)。在一个实施例中，直接施用至气道，例如通过吸入或鼻内施用。

[0186] 在一个优选的实施例中，本文提及的癌症是以B7-H4分子的表达(优选过度表达)为特征的癌症。换言之，本文提及的癌症可包含表达B7-H4的癌细胞。所述癌细胞可包含在肿瘤内。

[0187] 在一个实施例中，癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、NSCLC(鳞癌和腺

癌)、胰腺癌和胃癌中的一种或多种。

[0188] 在一个实施例中,癌症选自结直肠癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌(例如,NSCLC或SCLC)、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、胆管癌、黑色素瘤、子宫内膜癌、血液学癌症(AML、MM、DLBCL)以及包含CSC的癌症中的一种或多种。

[0189] 在一个优选的实施例中,癌症是肺癌、乳腺癌、或其组合。例如,癌症可以是肺癌。癌症可以是乳腺癌。癌症可以是卵巢癌。

[0190] 在一个实施例中,癌症是一种或多种乳腺癌,其选自激素受体(HR)阳性(HR+)乳腺癌、人表皮生长因子受体2阳性(HER2+)乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)。该受试者可能符合赫赛汀的治疗条件。该受试者可能已接受赫赛汀治疗。

[0191] 在一个实施例中,癌症是一种或多种非小细胞肺癌(NSCLC),其优选地选自鳞状NSCLC、腺癌NSCLC、或其组合。

[0192] 抗体或其抗原结合片段也可用于检测癌细胞,例如作为诊断方法的一部分。

[0193] 在另一方面,提供了用于检测样品中B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)是否存在的方法,该方法包括:

[0194] a.使样品与抗体或其抗原结合片段或包含抗体或其抗原结合片段的药物组合物接触,以提供抗体-抗原复合物;其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0195] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0196] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0197] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0198] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0199] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[0200] b.检测所述抗体-抗原复合物是否存在;以及

[0201] c.其中该抗体-抗原复合物的存在证实了B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的存在;或

[0202] d.其中该抗体-抗原复合物的不存在证实了B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的不存在。

[0203] 在一个相关方面,提供了用于检测样品中表达B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的癌细胞是否存在的方法,该方法包括:

[0204] a.使样品与抗体或其抗原结合片段或包含抗体或其抗原结合片段的药物组合物

接触,以提供抗体-抗原复合物;其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0205] i.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[0206] ii.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0207] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0208] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[0209] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[0210] b.检测所述抗体-抗原复合物是否存在;以及

[0211] c.其中该抗体-抗原复合物的存在证实了B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的存在;或

[0212] d.其中该抗体-抗原复合物的不存在证实了B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的不存在。

[0213] 本发明包括本发明的抗体或其抗原结合片段用于检测B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的相应用途。

[0214] 在一个实施例中,抗体-抗原复合物的存在指示癌细胞的存在,并且抗体-抗原复合物的不存在指示癌细胞的不存在。例如,该方法可以包括在检测到抗体-抗原复合物的情况下确认癌症的存在,或在未检测到抗体-抗原复合物的情况下不确认癌症的存在。

[0215] 在一个优选的实施例中,癌细胞是表达B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的癌细胞。

[0216] 因此,本发明包括本文所述的方法步骤在诊断患有癌症的受试者的方法中的相应用途,优选其中所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞。

[0217] 在一个实施例中,检测方法或诊断方法可以包括测量B7-H4在可从受试者获得的细胞(或组织)上的表达水平,并将测量的表达水平与对照细胞(或组织)中的标准B7-H4表达进行比较,其中与对照相比表达水平的增加指示癌症的存在。优选地,所述对照样品包含非癌(例如,正常)细胞。

[0218] “抗体-抗原复合物”意指包含已与抗体结合的B7-H4抗原的复合物(例如,大分子复合物)。术语“抗体-抗原复合物”可以与术语“结合的B7-H4-抗体复合物”和“与B7-H4结合的抗体”同义使用。

[0219] 可以通过技术人员已知的任何方式检测抗体-抗原复合物。在一个实施例在,将该抗体(或其抗原结合片段)用可检测标记进行标记。所述标记可以是落射式荧光标记。在一

个优选的实施例中，将该抗体用800CW标记。

[0220] 在一个实施例中，通过结合该抗体和/或抗体-抗原复合物的第二(例如，检测)抗体来检测抗体-抗原复合物。

[0221] 合适地，所述第二抗体包含检测工具，如标签/标记以辅助检测。所述检测工具优选地缀合至第二抗体。合适的标记的实例包括可检测标记，如放射性标记或荧光分子或有色分子、酶标记物或显色标记物(例如，在检测抗体与抗原结合时提供可见颜色变化的染料)。举例来说，标记可以是异硫氰酸荧光素(FITC)、R-藻红蛋白、Alexa 532、CY3或地高辛。标记可以是报告分子，其被直接检测，如通过检测其荧光信号、或通过将标记暴露于照相胶片或X射线胶片。可替代地，标记不能被直接检测，但可以例如在两相系统中被检测。间接标记检测的一个实例是抗体与该标记的结合。

[0222] 在一个优选的实施例中，所述第二抗体包含荧光标签，并且通过由抗体-抗原-第二抗体复合物发出的荧光检测抗体-抗原复合物。“抗体-抗原-第二抗体复合物”意指包含已经与抗体结合的抗原(例如，B7-H4)的复合物，其中所述复合物进一步被第二抗体结合，该第二抗体结合所述抗体和/或抗体-抗原复合物。

[0223] 合适地，当由检测标记发出的信号(优选荧光)大于在不包含抗体(例如，不包含结合B7-H4的抗体)的对照中检测到的信号时，检测到抗体-抗原复合物。所述对照可以替代性地包含B7-H4，但样品不应用于所述对照。

[0224] 合适地，“样品”是从受试者(例如，活检)、细胞系、组织培养物或其他潜在表达B7-H4的细胞来源获得的样品。在优选的实施例中，样品是来自受试者的活检。所述活检可以取自肿瘤、或有患肿瘤的风险的部位。

[0225] 在一个优选的实施例中，该样品是可获得(例如，获得)自受试者的分离的样品。

[0226] 在一个优选的实施例中，该B7-H4多肽(例如，B7-H4多肽表位)是癌细胞的组成成分，更优选地是癌细胞的细胞膜的组成成分。

[0227] 本发明涵盖本文定义的具有所述CDR序列或可变重链和可变轻链序列的抗体(参考抗体)(例如，抗体或抗原结合片段)及其功能变体。功能变体结合至与参考抗体相同的靶抗原，并且优选地表现出与参考抗体相同的抗原交叉反应性。当与参考抗体相比时，这些功能变体对于靶抗原可以具有不同的亲和力，但基本上相同的亲和力是优选的。

[0228] 相比之下，术语“参考抗体”用于方便地指代本发明的抗体或其抗原。因此，术语“参考抗体”是指本发明的抗体或其抗原。例如，参考抗体可以意指如下抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段包含分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3。更特别地，参考抗体可以意指如下抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的可变重链；以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链。优选地，参考抗体可以意指如下抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的可变重链；以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链。

[0229] 在一个实施例中，当与相应的参考CDR序列相比时，参考抗体的功能变体在一个或多个CDR处显示序列变异。因此，功能抗体变体可以包含CDR的功能变体。在CDR序列的背景下使用术语“功能变体”时，这意味着当与相应的参考CDR序列相比时，该CDR具有最多2个、

优选最多1个氨基酸差异，并且当与其余5个CDR(或其变体)组合时，使该变体抗体能够结合与参考抗体相同的靶抗原，并且优选地展现出与参考抗体相同的抗原交叉反应性。功能变体可以称为“变体抗体”。

[0230] 在一个实施例中，变体抗体(或其抗原结合片段)包含：

[0231] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多2个氨基酸差异的轻链CDR1；

[0232] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多2个氨基酸差异的轻链CDR2；

[0233] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多2个氨基酸差异的轻链CDR3；

[0234] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多2个氨基酸差异的重链CDR1；

[0235] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多2个氨基酸差异的重链CDR2；以及

[0236] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多2个氨基酸差异的重链CDR3；

[0237] 其中该变体抗体结合至与参考抗体相同的靶抗原，并且优选地表现出与参考抗体相同的抗原交叉反应性(或缺乏抗原交叉反应性)。

[0238] 优选地，变体抗体(或其抗原结合片段)包含：

[0239] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多1个氨基酸差异的轻链CDR1；

[0240] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多1个氨基酸差异的轻链CDR2；

[0241] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多1个氨基酸差异的轻链CDR3；

[0242] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多1个氨基酸差异的重链CDR1；

[0243] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多1个氨基酸差异的重链CDR2；以及

[0244] 当与相应的参考CDR序列相比时具有最多1个氨基酸差异的重链CDR3；

[0245] 其中该变体抗体结合至与参考抗体相同的靶抗原，并且优选地表现出与参考抗体相同的抗原交叉反应性(或缺乏抗原交叉反应性)。

[0246] 例如，该抗体或抗原结合片段的变体可以包含：

[0247] 当与SEQ ID NO:7相比时具有最多2个氨基酸差异的重链CDR1；

[0248] 当与SEQ ID NO:8相比时具有最多2个氨基酸差异的重链CDR2；以及

[0249] 当与SEQ ID NO:9相比时具有最多2个氨基酸差异的重链CDR3；

[0250] 当与SEQ ID NO:10相比时具有最多2个氨基酸差异的轻链CDR1；

[0251] 当与SEQ ID NO:11相比时具有最多2个氨基酸差异的轻链CDR2；

[0252] 当与SEQ ID NO:12相比时具有最多2个氨基酸差异的轻链CDR3；

[0253] 其中该变体抗体结合至B7-H4多肽(例如，B7-H4多肽表位)，并且优选地表现出与参考抗体或抗原结合片段相同的抗原交叉反应性(或缺乏抗原交叉反应性)。

[0254] 例如，该抗体或抗原结合片段的变体可以(优选地)包含：

[0255] 当与SEQ ID NO:7相比时具有最多1个氨基酸差异的重链CDR1；

[0256] 当与SEQ ID NO:8相比时具有最多1个氨基酸差异的重链CDR2；以及

[0257] 当与SEQ ID NO:9相比时具有最多1个氨基酸差异的重链CDR3；

[0258] 当与SEQ ID NO:10相比时具有最多1个氨基酸差异的轻链CDR1；

[0259] 当与SEQ ID NO:11相比时具有最多1个氨基酸差异的轻链CDR2；

[0260] 当与SEQ ID NO:12相比时具有最多1个氨基酸差异的轻链CDR3；

[0261] 其中该变体抗体结合至B7-H4多肽(例如，B7-H4多肽表位)，并且优选地表现出与参考抗体或抗原结合片段相同的抗原交叉反应性(或缺乏抗原交叉反应性)。

[0262] 前述内容可以类似地应用于本文所述的其他抗体的变体，其中氨基酸差异是相对于其CDR序列定义的，并且其中该变体抗体结合与所述抗体相同的靶抗原，并且优选地表现出相同的抗原交叉反应性。

[0263] 在一个实施例中，当与相应的参考抗体相比时，变体抗体可以在其CDR中具有总计最多5、4或3个氨基酸差异，条件是每个CDR存在最多2个(优选最多1个)氨基酸差异。优选地，当与相应的参考抗体相比时，变体抗体在其CDR中具有总计最多2个(更优选最多1个)氨基酸差异，条件是每个CDR存在最多2个氨基酸差异。更优选地，当与相应的参考抗体相比时，变体抗体在其CDR中具有总计最多2个(更优选最多1个)氨基酸差异，条件是每个CDR存在最多1个氨基酸差异。

[0264] 该氨基酸差异可以是氨基酸取代、插入或缺失。在一个实施例中，该氨基酸差异是如本文所述的保守氨基酸取代。

[0265] 在一个实施例中，变体抗体具有与本文所述的示例性抗体相同的框架序列。在另一个实施例中，变体抗体可包含具有最多2个、优选最多1个氨基酸差异的框架区(当与相应的参考框架序列相比时)。因此，每个框架区可具有最多2个、优选最多1个氨基酸差异(当与相应的参考框架序列相比时)。

[0266] 在一个实施例中，当与相应的参考抗体相比时，变体抗体可以在其框架区中具有总计最多5、4或3个氨基酸差异，条件是每个框架区存在最多2个(优选最多1个)氨基酸差异。优选地，当与相应的参考抗体相比时，变体抗体在其框架区中具有总计最多2个(更优选最多1个)氨基酸差异，条件是每个框架区存在最多2个氨基酸差异。更优选地，当与相应的参考抗体相比时，变体抗体在其框架区中具有总计最多2个(更优选最多1个)氨基酸差异，条件是每个框架区存在最多1个氨基酸差异。

[0267] 因此，变体抗体可以包含如本文所述的可变重链和可变轻链，其中：

[0268] 当与本文的重链序列相比时，该重链具有最多14个氨基酸差异(每个CDR中最多2个氨基酸差异，并且每个框架区中最多2个氨基酸差异)；并且

[0269] 当与本文的轻链序列相比时，该轻链具有最多14个氨基酸差异(每个CDR中最多2个氨基酸差异，并且每个框架区中最多2个氨基酸差异)；

[0270] 其中该变体抗体结合至与参考抗体相同的靶抗原，并且优选地表现出与参考抗体相同的抗原交叉反应性(或缺乏抗原交叉反应性)。

[0271] 所述变体重链或轻链可以被称为参考重链或轻链的“功能等效物”。

[0272] 在一个实施例中，变体抗体可以包含如本文所述的可变重链和可变轻链，其中：

[0273] 当与本文的重链序列相比时，该重链具有最多7个氨基酸差异(每个CDR中最多1个氨基酸差异，并且每个框架区中最多1个氨基酸差异)；并且

[0274] 当与本文的轻链序列相比时，该轻链具有最多7个氨基酸差异(每个CDR中最多1个氨基酸差异，并且每个框架区中最多1个氨基酸差异)；

[0275] 其中该变体抗体结合至与参考抗体相同的靶抗原，并且优选地表现出与参考抗体相同的抗原交叉反应性(或缺乏抗原交叉反应性)。

[0276] 抗体-药物缀合物(ADC)

[0277] 有利地，本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含异源药剂。在一个实施例中，本发明的抗体或抗原结合片段连接至异源药剂。在一个优选的实施例中，该抗体或抗原结合

片段缀合至异源药剂。合适地，“缀合”意指经由共价键或离子键连接。优选地，所述异源药剂是细胞毒素。

[0278] 异源药剂可以简称为“药剂”或“活性剂”。例如，换言之，本发明的抗体或其抗原结合片段可以包含活性剂。在一个实施例中，本发明的抗体或抗原结合片段连接至活性剂。在一个优选的实施例中，该抗体或抗原结合片段缀合至活性剂。

[0279] 该异源药剂/活性剂可以是药物。优选地，该异源药剂/活性剂是细胞毒素。

[0280] 特别优选的是，本发明的抗体或其抗原结合片段连接(例如，缀合)至治疗方法中的异源药剂/活性剂，如下所述。

[0281] 本发明的药剂和/或细胞毒素可以通过间隔物(例如，至少一个间隔物)缀合至该抗体或其抗原结合片段。在一个实施例中，该间隔物是肽间隔物。在一个实施例中，该间隔物是非肽(例如，化学的)间隔物。

[0282] 细胞毒性剂或细胞毒素可以是本领域中已知的任何分子，该分子抑制或阻止细胞的功能和/或造成细胞破坏(细胞死亡)、和/或发挥抗肿瘤/抗增生作用。已知许多类别的细胞毒性剂在ADC分子中具有潜在效用。这些包括但不限于：拓扑异构酶I抑制剂、鹅膏蕈碱、奥瑞斯他汀(auristatin)、道诺霉素、多柔比星、多卡米新、多拉司他汀、烯二炔、来红霉素(lexitropsin)、紫杉烷类、嘌呤霉素、美登木素生物碱、长春花碱、微管溶素以及吡咯并苯并二氮杂䓬(PBD)。此类细胞毒性剂的实例是AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奥瑞斯他汀E、紫杉醇、多西他赛、CC-1065、SN-38、拓扑替康、吗啉代多柔比星、根霉素、氰基吗啉代多柔比星、多拉司他汀-10、棘霉素、康普瑞汀、杯形生长抑制素(chalicheamicin)、美登素、DM-1、长春碱、甲氨蝶呤和纺锤菌素、以及其衍生物和类似物。关于适合在ADC中使用的细胞毒素的另外的披露内容可以例如在国际专利申请公开号WO 2015/155345和WO 2015/157592中发现，将其通过引用以其全文并入本文。

[0283] 例如，该抗体或抗原结合片段可以缀合至此类异源药剂以提供“抗体-药物缀合物”(ADC)。

[0284] 该药剂通常连接至该抗体或抗原结合片段或“加载到”该抗体或抗原结合片段上。药剂加载量(p)是每个抗体或抗原结合片段(例如，配体单元)上的平均药剂数量。

[0285] 来自缀合反应的ADC制剂中每个抗体(或抗原结合片段)上的平均药剂数量可以通过常规方式进行表征，这些方式例如UV、反相HPLC、HIC、质谱、ELISA测定和电泳。也可以确定依据p的ADC的定量分布。通过ELISA，可以确定特定ADC制剂中p的平均值(Hamblett等人(2004)Clin.Cancer Res.[临床癌症研究]10:7063-7070;Sanderson等人(2005)Clin.Cancer Res.[临床癌症研究]11:843-852)。在一些情况下，均质ADC(其中p是来自具有其他载药量的ADC的确定值)的分离、纯化和表征可以通过例如反相HPLC或电泳来实现。此类技术也适用于其他类型的缀合物。

[0286] 半胱氨酸氨基酸可在抗体(或其抗原结合片段)中的反应位点处被工程化，并且优选地不形成链内或分子间二硫键(Junutula等人，2008b Nature Biotech.[自然生物技术]，26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood[血液]114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;WO 2009/052249)。工程化的半胱氨酸硫醇可以与药剂(例如，具有以下式I)内的接头反应以形成具有半胱氨酸工程化的抗体的ADC，该接头具有硫醇反应性亲电基团(如马来酰亚胺或α-卤代酰胺)。因此，可以设计、控制和已知药物单元的位置。由于工程化的半胱

氨酸硫醇基团通常以高产率与药物接头试剂反应,因此可以控制载药量。通过在重链或轻链上的单个位点处进行取代而对IgG抗体进行工程化以引入半胱氨酸氨基酸,从而在对称抗体上给出了两个新的半胱氨酸。可以达到载药量接近2,其中缀合物产物ADC接近均质性。

[0287] 在该抗体或其抗原结合片段的多于一个亲核或亲电基团与药剂反应的情况下,所得产物可以是如下ADC化合物的混合物,在这些ADC化合物中,附接抗体的药剂单元的分布例如为1、2、3个等。液相色谱法(如聚合物反相(PLRP)和疏水相互作用(HIC))可以通过药剂负载值来分离混合物中的化合物。可以分离具有单一药剂负载值(p)的ADC制剂。

[0288] 因此,本发明的抗体-药物缀合物组合物可以包括抗体-药物缀合物的混合物,其中该抗体或其抗原结合片段具有一个或多个药剂部分,并且其中这些药剂部分可以在各种氨基酸残基处附接该抗体或其抗原结合片段。

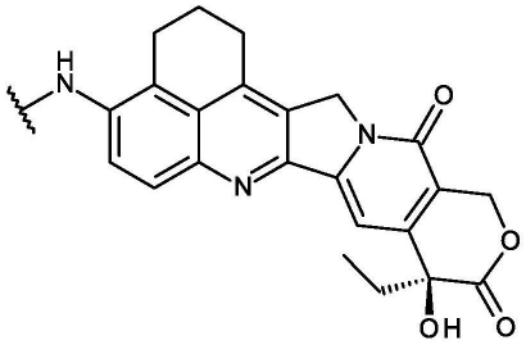
[0289] 在一个实施例中,每个抗体(或其抗原结合片段)上的平均药剂数量在1至20的范围内。在一些实施例中,该范围选自1至10、2至10、2至8、2至6、以及4至10。在一些实施例中,每个抗体(或其抗原结合片段)上存在一个药剂。在一些实施例中,每个抗体(或其抗原结合片段)上的药剂数量可以表示为药剂(即,药物)与抗体的比率。这个比率被称为药物与抗体比率(DAR)。DAR是连接至每个抗体的药物(即,药剂)的平均数量。在本发明的一个实施例中,DAR在1至20的范围内。在一些实施例中,DAR的范围选自1至10、2至10、2至8、2至6、以及4至10。在本发明的一个特定实施例中,DAR约为8。在本发明的一个特定实施例中,DAR为8。

[0290] 在一个实施例中,该抗体或抗原结合片段缀合至一种或多种异源药剂,该一种或多种异源药剂选自由以下组成的组:拓扑异构酶I抑制剂、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮杂䓬、抗微生物剂、治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、脂质、生物应答调节剂、药学试剂、淋巴因子、异源抗体、异源抗体的片段、可检测标记、聚乙二醇(PEG)、放射性同位素、或其组合。

[0291] 在一个实施例中,该抗体抗原结合片段缀合至一种或多种细胞毒素,该一种或多种细胞毒素选自拓扑异构酶I抑制剂、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮杂䓬、或其组合。例如,该抗体或其抗原结合片段缀合至一种或多种细胞毒素,该一种或多种细胞毒素选自由以下组成的组:拓扑异构酶I抑制剂SG3932、SG4010、SG4057或SG4052(其结构如下提供);微管溶素AZ1508;吡咯并苯并二氮杂䓬SG3315;吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249;或其组合。

[0292] 优选的是,该抗体或其抗原结合片段可以缀合至拓扑异构酶I抑制剂。拓扑异构酶抑制剂是阻断拓扑异构酶(拓扑异构酶I和II)作用的化学化合物,拓扑异构酶是在正常细胞周期中通过催化DNA链的磷酸二酯骨架的断裂和重新连接来控制DNA结构变化的一种类型的酶。

[0293] 合适的拓扑异构酶I抑制剂的一般实例由以下化合物表示:

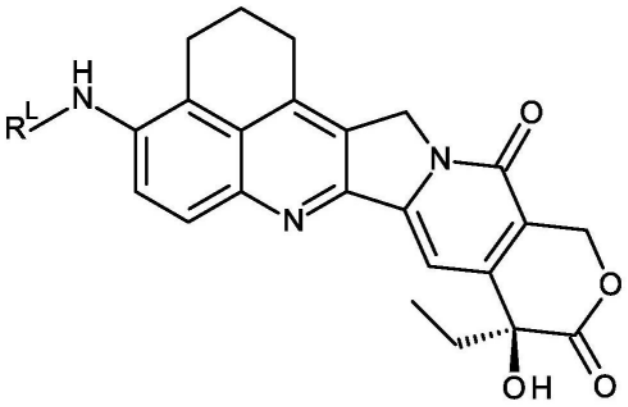
[0294] 

A*

[0295] 所述化合物表示为A*，并且可以在本文中称为“药物单元”。

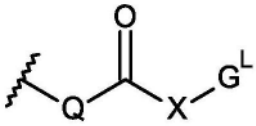
[0296] 该化合物(例如，A*)优选提供有用于连接(优选缀合)至本文所述的抗体或抗原结合片段(其可称为“配体单元”)的接头。合适地，该接头以可裂解的方式附接(例如，缀合)至氨基残基，例如，本文所述的抗体或抗原结合片段的氨基酸。

[0297] 更特别地，合适的拓扑异构酶I抑制剂的实例由具有式“I”的以下化合物表示：

[0298]  I

[0299] 及其盐和溶剂化物，其中R^L是用于连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如，配体单元)的接头，其中所述接头优选地选自：

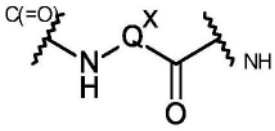
[0300] (ia)：

[0301]  Ia

，

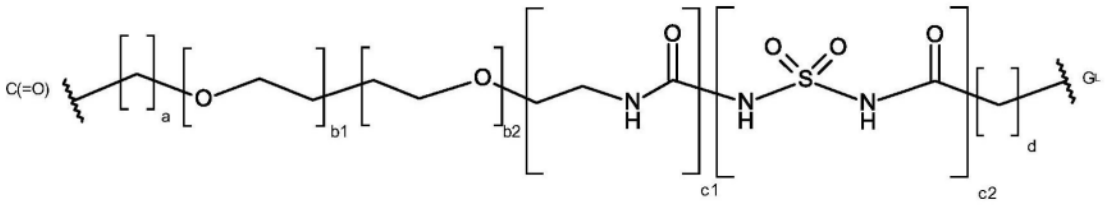
[0302] 其中

[0303] Q是：

[0304]  其中Q^X使得Q为氨基酸残基、二肽残基、三肽残基或四肽残基；

，

[0305] X是：

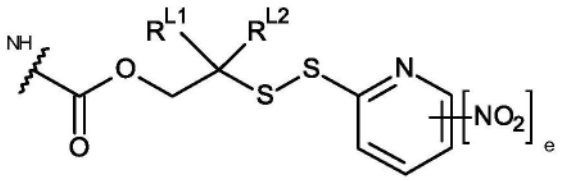
[0306] 

,

[0307] 其中a＝0至5,b1＝0至16,b2＝0至16,c1＝0或1,c2＝0或1,d＝0至5,其中至少b1或b2＝0(即b1和b2中只有一个可以不是0)并且至少c1或c2＝0(即c1和c2中只有一个可以不是0);

[0308] G^L是用于连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)的接头;或

[0309] (ib):

[0310]  Ib

,

[0311] 其中R^{L1}和R^{L2}独立地选自H和甲基,或与它们所结合的碳原子一起形成环丙烯或环丁烯基团;并且

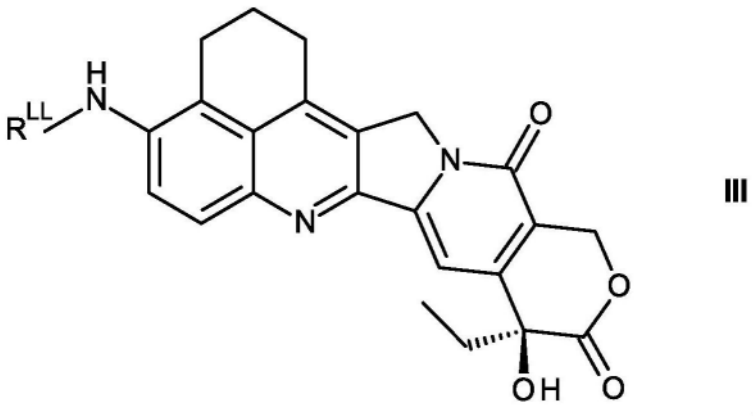
[0312] e是0或1。

[0313] 本领域技术人员将理解,所述药剂(例如,拓扑异构酶I抑制剂)中的多于一种可以缀合至该抗体或其抗原结合片段。

[0314] 例如,本发明的缀合物(例如,抗体-药物缀合物)可以具有通式IV:

[0315] $L-(D^L)_p$ (IV)

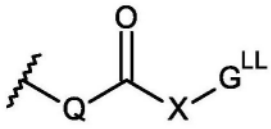
[0316] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中L是本文所述的抗体或抗原结合片段(例如,配体单元),D^L是具有接头的拓扑异构酶I抑制剂(例如,药物接头单元)并且其具有式III:

[0317]  III

。

[0318] R^{LL}是连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)的接头,其中该接头优选地选自

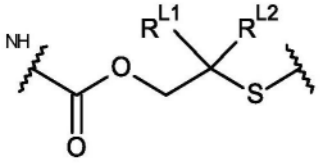
[0319] (ia'):

[0320]  Ia'

,

[0321] 其中Q和X如以上所定义,并且G^{LL}是连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)的接头;并且

[0322] (ib'):

[0323]  Ib'

,

[0324] 其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定义;并且

[0325] p是从1至20的整数。

[0326] 载药量由p表示,即每个抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)上的拓扑异构酶I抑制剂(例如,药物单元)的数量。载药量可以在1至20个药物单元(D)/配体单元的范围内。对于组合物,p表示组合物中缀合物的平均载药量,并且p的范围为1至20。

[0327] 因此,本发明包括缀合物,该缀合物包含共价连接至至少一种拓扑异构酶I抑制剂(例如,药物单元,如以上说明的A*)的本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)。所述抑制剂优选通过接头(例如,接头单元,如以上描述为R^{L}和/或R^{LL}的接头)连接至该抗体或其抗原结合片段。换言之,本发明包括附接有(优选经由接头)一种或多种拓扑异构酶I抑制剂(例如,药物-接头单元)的本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)。以上更全面描述的抗体或其抗原结合片段(代表配体单元)是结合靶标部分的靶向剂。更特别地,该配体单元可以例如特异性结合靶细胞上的B7-H4,由此将药物单元递送至该靶细胞。因此,本发明还提供了用ADC治疗例如各种癌症和其他障碍(例如,与表达B7-H4的细胞、优选癌细胞的存在相关的癌症/障碍)的方法。

[0328] 进一步的偏好

[0329] 上述拓扑异构酶I抑制剂的某些特征是特别优选的并且可以如下所示更详细地定义。举例来说,将概述特征Q^{X}(例如,在上述1a的接头内)的优选实施例。

[0330] 以下偏好可以应用于如上所述的本发明的所有方面,或者可以涉及单个方面。这些偏好能以任何组合被组合在一起。

[0331] 在下文提供的标题"定义"下提供了涉及本节中的某些术语的各种定义。

[0332] Q^{X}

[0333] 在一个实施例中,Q是氨基酸残基。氨基酸可以是天然氨基酸或非天然氨基酸。例如,Q可以选自:Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Leu、Ile、Arg和Trp,其中Cit是瓜氨酸。

[0334] 在一个实施例中,Q包含二肽残基。二肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施例中,二肽包含天然氨基酸。当接头是组织蛋白酶不稳定接头时,二肽是组织蛋白酶介导的切割的作用位点。然后,二肽是组织蛋白酶的识别位点。

[0335] 在一个实施例中,Q选自:

[0336] ^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、

[0337] ^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$、

[0338] ^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$、

[0339] ^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$、

[0340] ^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$、

[0341] ^{NH}-Phe-Cit-$^{C=O}$、

[0342] ^{NH}-Leu-Cit-$^{C=O}$、

[0343] ^{NH}-Ile-Cit-$^{C=O}$、

[0344] ^{NH}-Phe-Arg-$^{C=O}$、

[0345] ^{NH}-Trp-Cit-$^{C=O}$、和

[0346] ^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$；

[0347] 其中Cit是瓜氨酸。

[0348] 优选地，Q选自：

[0349] ^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、

[0350] ^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$、

[0351] ^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$、

[0352] ^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$、和

[0353] ^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$。

[0354] 更优选地，Q选自^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$或^{NH}-Val-Ala-C=O。

[0355] 其他合适的二肽组合包括：

[0356] ^{NH}-Gly-Gly-$^{C=O}$、

[0357] ^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$

[0358] ^{NH}-Pro-Pro-$^{C=O}$、和

[0359] ^{NH}-Val-Glu-$^{C=O}$。

[0360] 可以使用其他二肽组合，包括由Dubowchik等人，Bioconjugate Chemistry[生物缀合物化学],2002,13,855-869描述的那些，将其通过引用并入本文。

[0361] 在一些实施例中，Q是三肽残基。三肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施例中，三肽包含天然氨基酸。当接头是组织蛋白酶不稳定接头时，三肽是组织蛋白酶介导的切割的作用位点。然后，三肽是组织蛋白酶的识别位点。特别感兴趣的三肽接头是：

[0362] ^{NH}-Glu-Val-Ala-$^{C=O}$

[0363] ^{NH}-Glu-Val-Cit-$^{C=O}$

[0364] ^{NH}-αGlu-Val-Ala-$^{C=O}$

[0365] ^{NH}-αGlu-Val-Cit-$^{C=O}$

[0366] 在一些实施例中，Q是四肽残基。四肽中的氨基酸可以是天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合。在一些实施例中，四肽包含天然氨基酸。当接头是组织蛋白酶不稳定接头时，四肽是组织蛋白酶介导的切割的作用位点。然后，四肽是组织蛋白酶的识别位点。特别感兴趣的四肽接头是：

[0367] ^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly $^{C=O}$；和

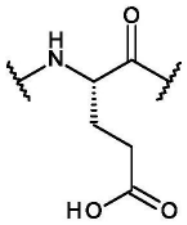
[0368] ^{NH}-Gly-Phe-Gly-Gly $^{C=O}$。

[0369] 在一些实施例中,四肽是:

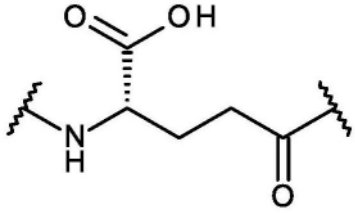
[0370] ^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly $^{C=O}$。

[0371] 在以上肽残基的表示中,^{NH}-表示残基的N-末端,并且-$^{C=O}$表示残基的C-末端。C-末端结合A*的NH。

[0372] Glu表示谷氨酸的残基,即:

[0373] 

[0374] αGlu表示当经由α链结合时的谷氨酸的残基,即:

[0375] 

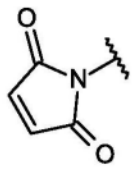
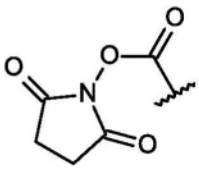
[0376] 在一个实施例中,在适当的情况下,氨基酸侧链被化学保护。侧链保护基团可以是如上所论述的基团。被保护的氨基酸序列可被酶切割。例如,包含Boc侧链保护的Lys残基的二肽序列可被组织蛋白酶切割。

[0377] 氨基酸侧链的保护基团是本领域熟知的,并且描述于Novabiochem公司目录中,并且如上所述。

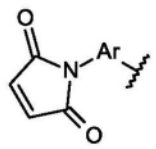
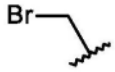
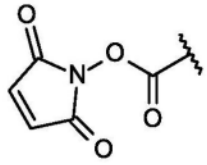
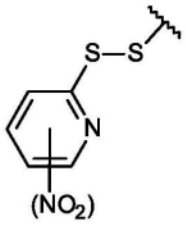
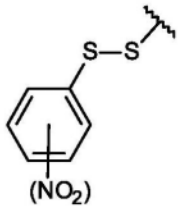
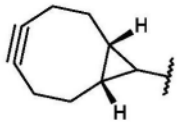
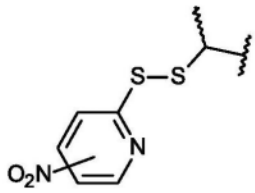
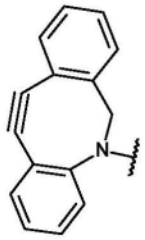
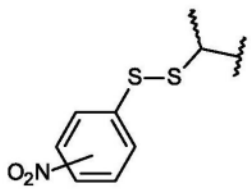
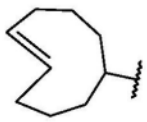
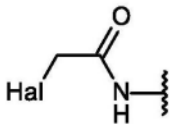
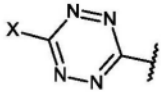
[0378] G^L

[0379] G^L可以选自:

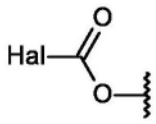
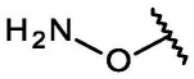
[0380]

(G^{L1-1})		(G^{L6})	

[0381]

(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 其中 NO_2 基团是任选的	(G^{L9})	
(G^{L3-2})	 其中 NO_2 基团是任选的	(G^{L10})	
(G^{L3-3})	 其中 NO_2 基团是任选的	(G^{L11})	
(G^{L3-4})	 其中 NO_2 基团是任选的	(G^{L12})	
(G^{L4})		(G^{L13})	

[0382]

	其中 Hal = I、Br、Cl		
(G^{L5})		(G^{L14})	

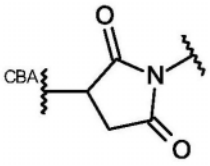
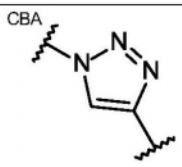
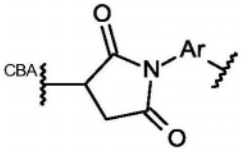
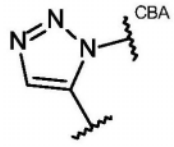
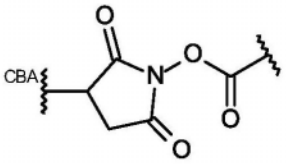
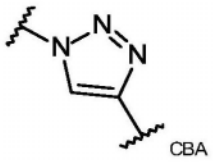
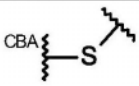
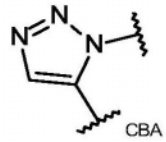
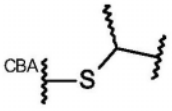
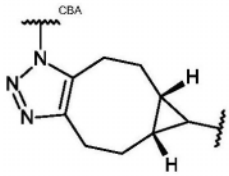
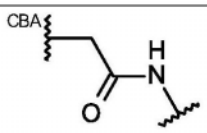
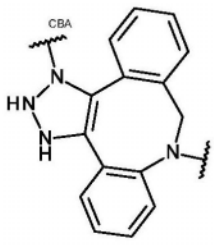
[0383] 其中Ar表示C_{5-6}亚芳基基团，例如亚苯基，且X表示C_{1-4}烷基。

[0384] 在一些实施例中，G^{L}选自G^{L1-1}和G^{L1-2}。在这些实施例的一些中，G^{L}是G^{L1-1}。

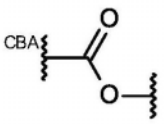
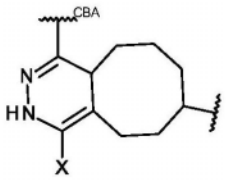
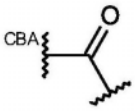
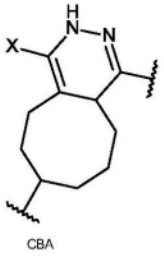
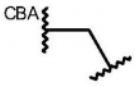
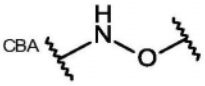
[0385] G^{LL}

[0386] G^{LL}可以选自：

[0387]

(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	
(G^{LL-4})		(G^{LL11})	

[0388]

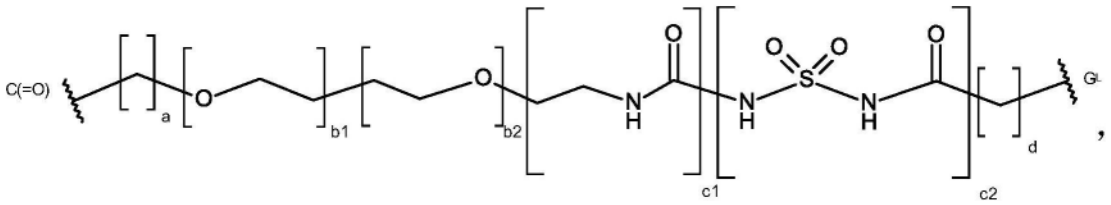
(G^{LL5})		(G^{LL12})	
(G^{LL6})		(G^{LL13})	
(G^{LL7})		(G^{LL14})	

[0389] 其中Ar表示C_{5-6}亚芳基基团，例如亚苯基，且X表示C_{1-4}烷基。

[0390] 在一些实施例中，G^{LL}选自G^{LL1-1}和G^{LL1-2}。在这些实施例的一些中，G^{LL}是G^{LL1-1}。

[0391] X

[0392] X优选为：

[0393] 

[0394] 其中a＝0至5，b1＝0至16，b2＝0至16，c＝0或1，d＝0至5，其中至少b1或b2＝0并且至少c1或c2＝0。

[0395] a可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施例中，a是0至3。在这些实施例的一些中，a是0或1。在另外的实施例中，a是0。

[0396] b1可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些实施例中，b1是0至12。在这些实施例的一些中，b1是0至8，并且可以是0、2、3、4、5或8。

[0397] b2可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些实施例中，b2是0至12。在这些实施例的一些中，b2是0至8，并且可以是0、2、3、4、5或8。优选地，b1和b2中只有一个可以不是0。

[0398] c1可以是0或1。c2可以是0或1。优选地，c1和c2中只有一个可以不是0。

[0399] d可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施例中，d是0至3。在这些实施例的一些中，d是1或2。在另外的实施例中，d是2。在另外的实施例中，d是5。

[0400] 在X的一些实施例中，a是0，b1是0，c1是1，c2是0并且d是2，并且b2可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b2是0、2、3、4、5或8。在X的一些实施例中，a是1，b2是0，c1是0，c2是0并且d是0，并且b1可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b1是0、2、3、4、5或8。在X的一些实施例中，a是0，b1是0，c1是0，c2是0并且d是1，并且b2可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b2是0、2、3、4、5或8。在X的一些实施例中，b1是0，b2是0，c1是0，c2是0并且a和d之一是0。a和d中另一个是从1至5。在这些实施例的一些中，a和d中另一个是1。在这些实施例的另一

些中，a和d中另一个是5。在X的一些实施例中，a是1，b2是0，c1是0，c2是1，d是2，并且b1可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b2是0、2、3、4、5或8。

[0401] 在一些实施例中，R^{L}具有式Ib。在一些实施例中，R^{LL}具有式Ib'。

[0402] R^{L1}和R^{L2}可以独立地选自H和甲基，或与它们所结合的碳原子一起形成环丙烯或环丁烯基团。

[0403] 在一些实施例中，R^{L1}和R^{L2}两者均为H。在一些实施例中，R^{L1}是H并且R^{L2}是甲基。在一些实施例中，R^{L1}和R^{L2}两者均为甲基。

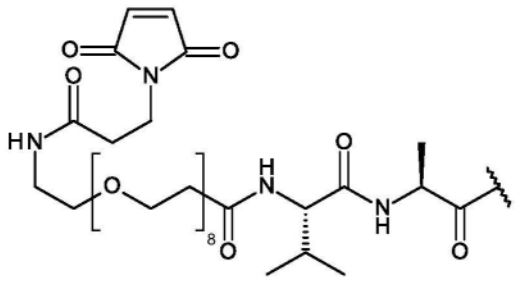
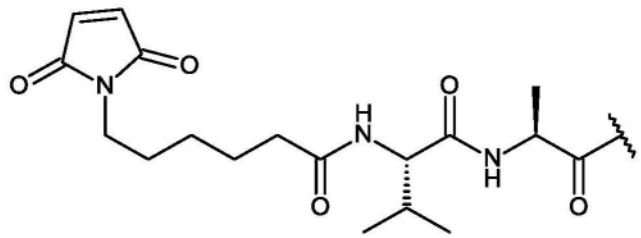
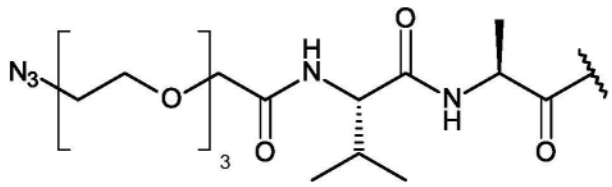
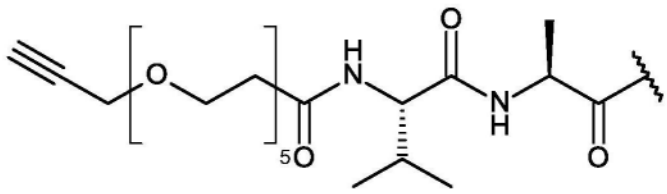
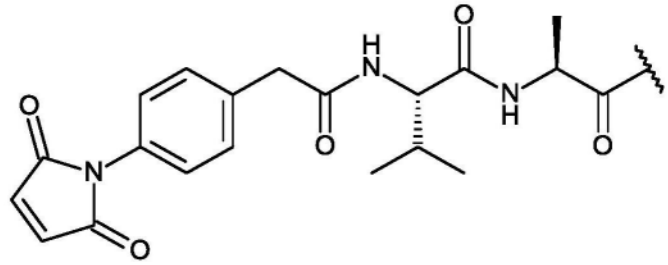
[0404] 在一些实施例中，R^{L1}和R^{L2}与它们所结合的碳原子一起形成环丙烯基团。在一些实施例中，R^{L1}和R^{L2}与它们所结合的碳原子一起形成环丁烯基团。

[0405] 在基团Ib中，在一些实施例中，e是0。在其他实施例中，e是1并且硝基基团可以在环的任何可用位置上。在这些实施例的一些中，它位于邻位。在这些实施例的另一些中，它位于对位。

[0406] 在其中以单一对映异构体或以对映异构体富集的形式提供本文所述的化合物的一些实施例中，对映异构体富集形式具有大于60:40、70:30、80:20或90:10的对映异构体比率。在另外的实施例中，对映异构体比率大于95:5、97:3或99:1。

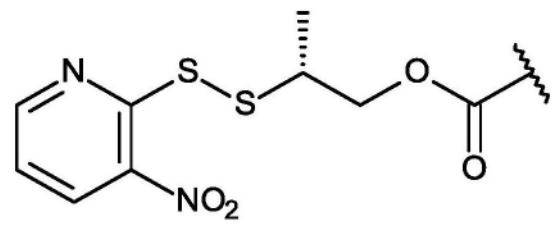
[0407] 在一些实施例中，R^{L}选自：

[0408]

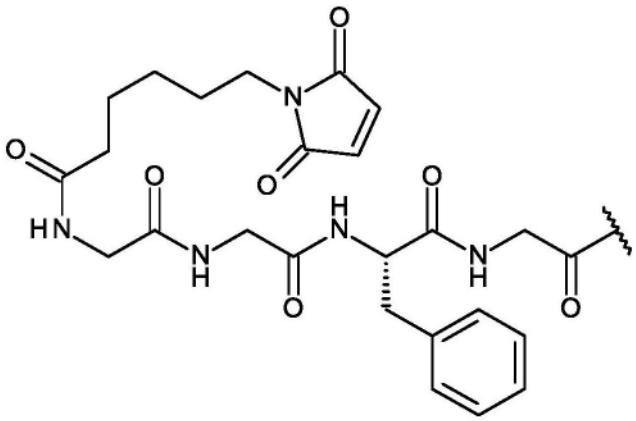
(i)	
(ii)	
(iii)	
(iv)	
(v)	

[0409]

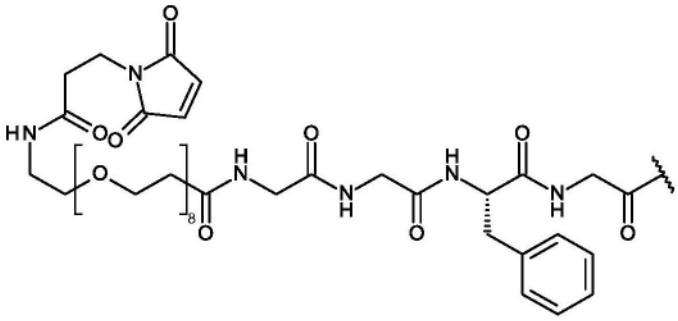
(vi)



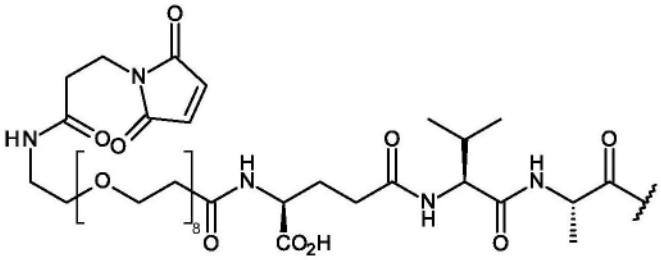
(vii)



(viii)



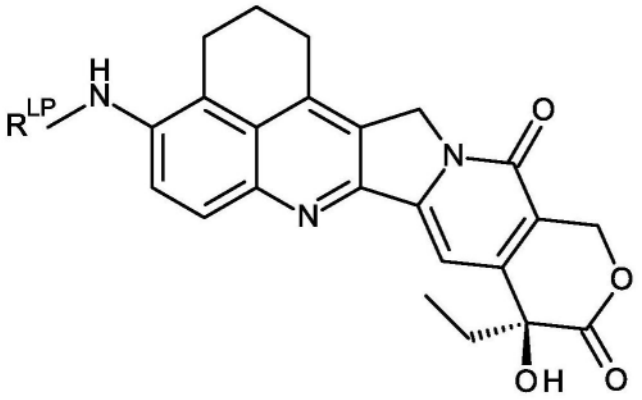
(ix)



[0410] 在一些实施例中，R^{LL}是衍生自上述R^{L}基团的基团。

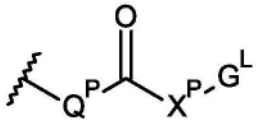
[0411] 已经概述了上述偏好，现在描述某些优选的拓扑异构酶I-接头(例如，药物接头单元)式。

[0412] 在一些实施例中，具有式I的化合物具有式I^{P}：

[0413]  I^P ;

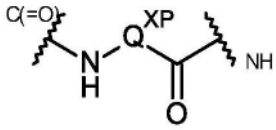
[0414] 及其盐和溶剂化物,其中R^{LP}是用于连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段的接头,其中所述接头选自:

[0415] (ia):

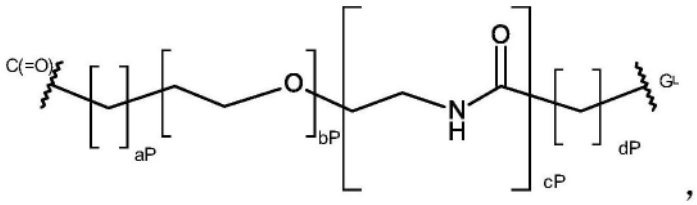
[0416]  Ia^P ,

[0417] 其中

[0418] Q^P是:

[0419]  其中Q^{XP}使得Q^P为氨基酸残基、二肽残基或三肽残基;

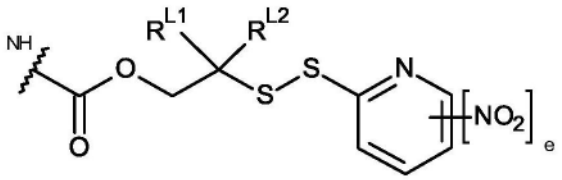
[0420] X^P是:

[0421]  ,

[0422] 其中aP=0至5,bP=0至16,cP=0或1,dP=0至5;

[0423] G^L是用于连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)的接头;

[0424] (ib):

[0425]  Ib ,

[0426] 其中R^{L1}和R^{L2}独立地选自H和甲基,或与它们所结合的碳原子一起形成环丙烯或环丁烯基团;并且

[0427] e是0或1。

[0428] aP可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施例中,aP是0至3。在这些实施例的一些中,aP是0或1。在另外的实施例中,aP是0。

[0429] bP可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些实施例中，b是0至12。在这些实施例的一些中，bP是0至8，并且可以是0、2、4或8。

[0430] cP可以是0或1。

[0431] dP可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施例中，dP是0至3。在这些实施例的一些中，dP是1或2。在另外的实施例中，dP是2。

[0432] 在X^P的一些实施例中，aP是0，cP是1并且dP是2，并且bP可以是从0至8。在这些实施例的一些中，bP是0、4或8。

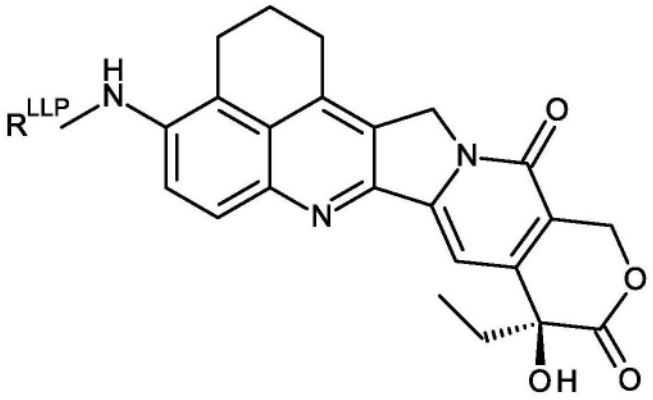
[0433] 上述对于具有式I的化合物的Q^X的偏好可以适用于Q^{XP}(例如，在适当的情况下)。

[0434] 上述对于具有式I的化合物的G^L、R^{L1}、R^{L2}和e的偏好可以适用于具有式I^P的化合物。

[0435] 在一些实施例中，具有式IV的缀合物具有式IV^P：

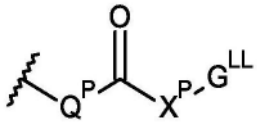
[0436] $L-(D^{LP})_p(IV^P)$

[0437] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中L是本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如，配体单元)，D^{LP}是拓扑异构酶I抑制剂(例如，药物接头单元)并且具有式III^P：

[0438]  III^P ；

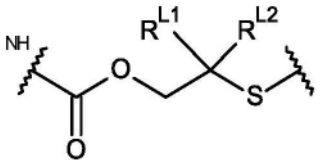
[0439] R^{LLP}是连接至该抗体或其抗原结合片段(例如，配体单元)的接头，其中所述接头选自

[0440] (ia')：

[0441]  Ia^P ，

[0442] 其中Q^P和X^P如以上所定义，并且G^{LL}是连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如，配体单元)的接头；以及

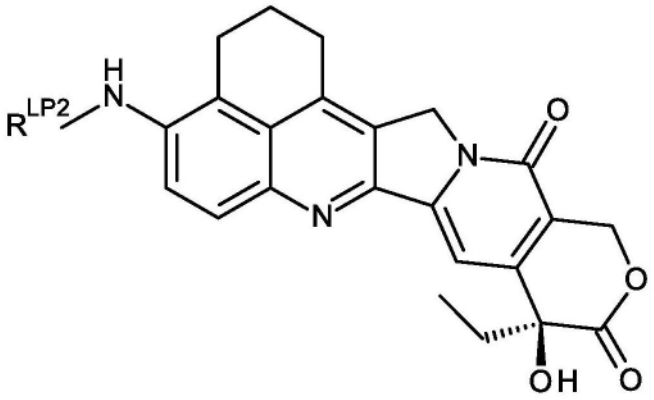
[0443] (ib')：

[0444]  Ib' ，

[0445] 其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定义；并且

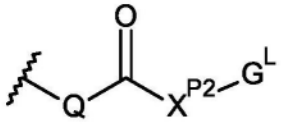
[0446] p是从1至20的整数。

[0447] 在一些实施例中，具有式I的化合物具有式I^{P2}：

[0448]  I^{P2} ;

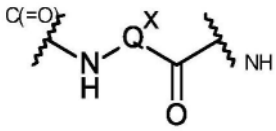
[0449] 及其盐和溶剂化物,其中R^{LP2}是用于连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段的接头,其中所述接头选自:

[0450] (ia):

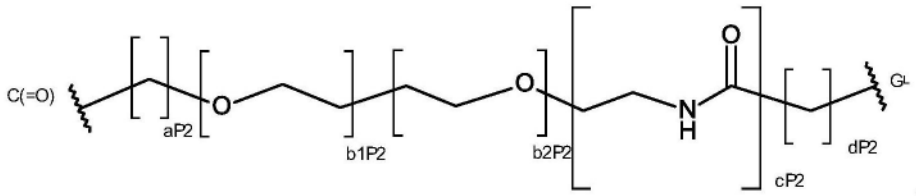
[0451]  Ia^{P2} ,

[0452] 其中

[0453] Q是:

[0454]  其中Q^X使得Q为氨基酸残基、二肽残基、三肽残基或四肽残基;

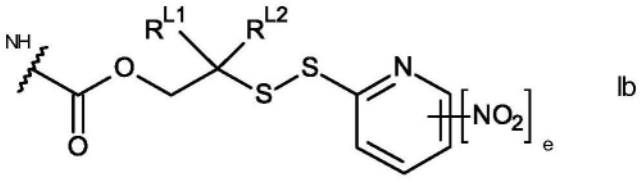
[0455] X^{P2}是:

[0456]  ,

[0457] 其中aP2=0至5,b1P2=0至16,b2P2=0至16,cP2=0或1,dP2=0至5,其中至少b1P2或b2P2=0(即b1和b2中只有一个可以不是0);

[0458] G^L是用于连接至本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如,配体单元)的接头;

[0459] (ib):

[0460]  Ib ,

[0461] 其中R^{L1}和R^{L2}独立地选自H和甲基,或与它们所结合的碳原子一起形成环丙烯或环丁烯基团;并且

[0462] e是0或1。

[0463] aP2可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施例中，aP2是0至3。在这些实施例的一些中，aP2是0或1。在另外的实施例中，aP2是0。

[0464] b1P2可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些实施例中，b1P2是0至12。在这些实施例的一些中，b1P2是0至8，并且可以是0、2、3、4、5或8。

[0465] b2P2可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些实施例中，b2P2是0至12。在这些实施例的一些中，b2P2是0至8，并且可以是0、2、3、4、5或8。

[0466] 优选地，b1P2和b2P2中只有一个可以不是0。

[0467] cP2可以是0或1。

[0468] dP2可以是0、1、2、3、4或5。在一些实施例中，dP2是0至3。在这些实施例的一些中，dP2是1或2。在另外的实施例中，dP2是2。在另外的实施例中，dP2是5。

[0469] 在X^{P2}的一些实施例中，aP2是0，b1P2是0，cP2是1并且dP2是2，并且b2P2可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b2P2是0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些实施例中，aP2是1，b2P2是0，cP2是0并且dP2是0，并且b1P2可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b1P2是0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些实施例中，aP2是0，b1P2是0，cP2是0并且dP2是1，并且b2P2可以是从0至8。在这些实施例的一些中，b2P2是0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些实施例中，b1P2是0，b2P2是0，cP2是0并且aP2和dP2之一是0。aP2和d中另一个是从1至5。在这些实施例的一些中，aP2和d中另一个是1。在这些实施例的另一些中，aP2和dP2中另一个是5。

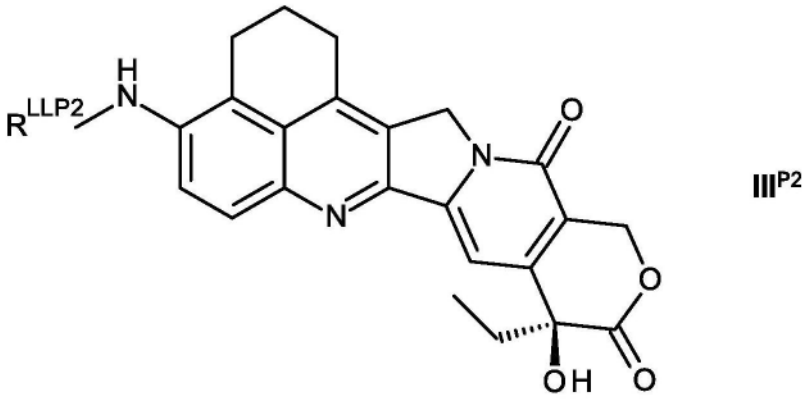
[0470] 上述对于具有式I的化合物的Q^X的偏好可以适用于式Ia^{P2}中的Q^X(例如，在适当的情况下)。

[0471] 上述对于具有式I的化合物的G^L、R^{L1}、R^{L2}和e的偏好可以适用于具有式I^{P2}的化合物。

[0472] 在一些实施例中，具有式IV的缀合物具有式IV^{P2}：

[0473] $L-(D^{LP2})_p(IV^{P2})$

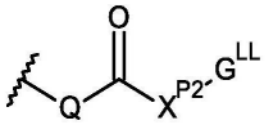
[0474] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中L是本文所述的抗体或其抗原结合片段(例如，配体单元)，D^{LP2}是拓扑异构酶I抑制剂(例如，药物接头单元)并且具有式III^{P2}：

[0475] 

III^{P2}；

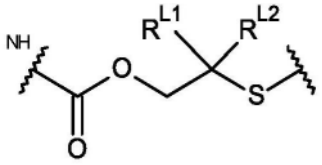
[0476] R^{LLP2}是连接至该抗体或其抗原结合片段(例如，配体单元)的接头，其中所述接头选自

[0477] (ia')：

[0478]  $Ia^{P2'}$,

[0479] 其中Q和X^{P2}如以上所定义,并且G^{LL}是连接至该抗体或其抗原结合片段的接头;以及

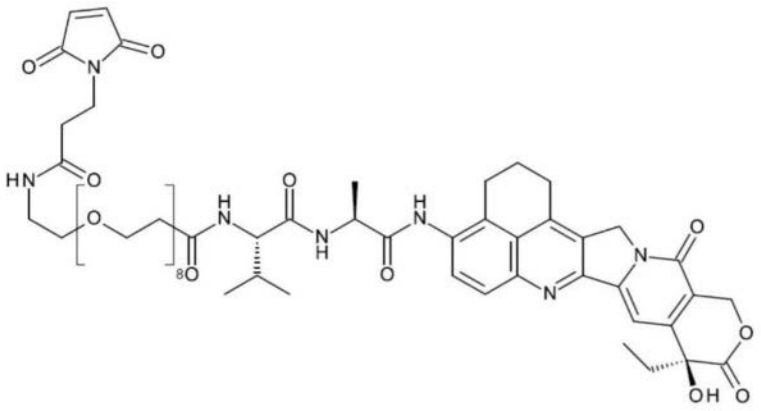
[0480] (ib'):

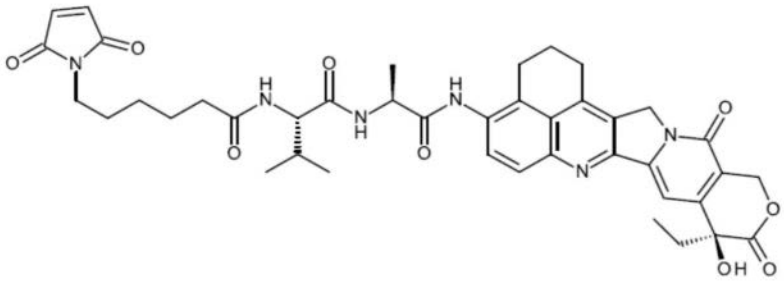
[0481]  Ib' ,

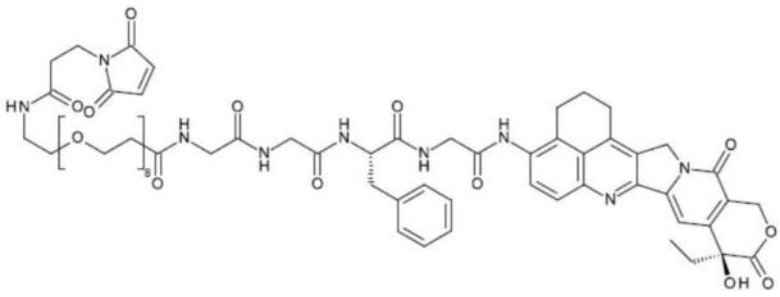
[0482] 其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定义;并且

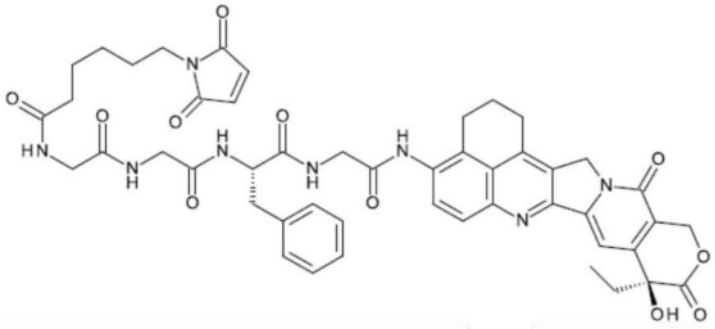
[0483] p是从1至20的整数。

[0484] 特别合适的拓扑异构酶I抑制剂包括具有以下式的那些:

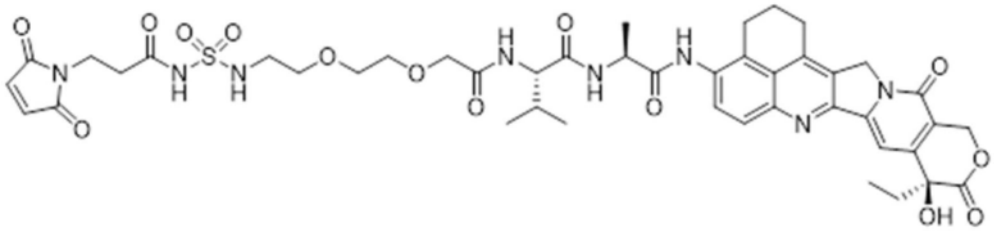
 (SG3932);

 (SG4010);

 (SG4057);

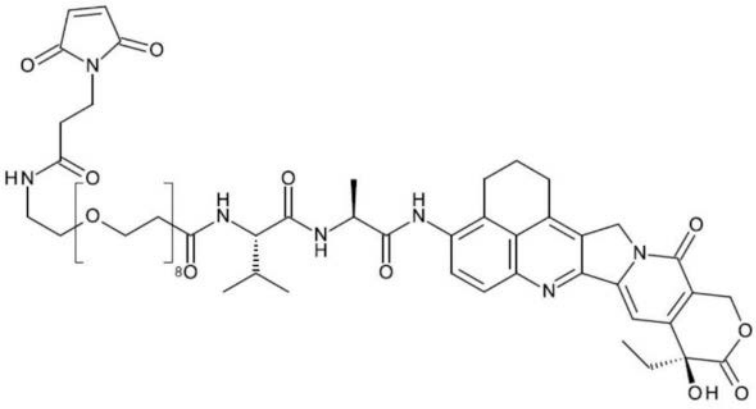
[0485]  和/或

（SG4052）；

[0486] 

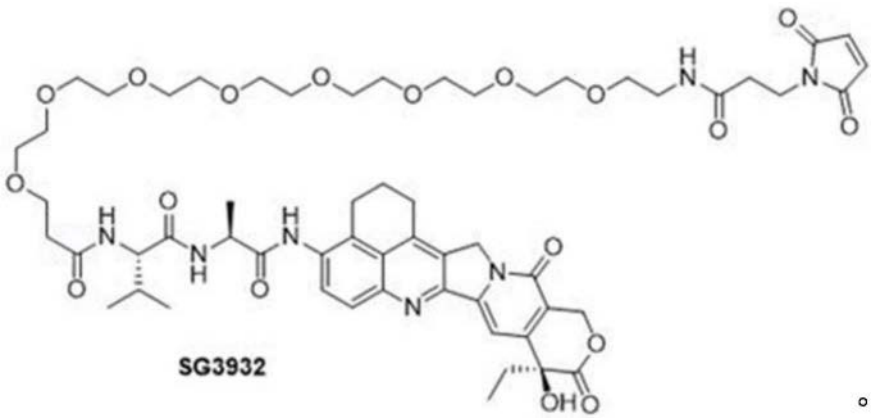
。

[0487] SG3932是特别优选的。因此，在优选的实施例中，本文所述的抗体或其抗原结合片段缀合至具有以下式的拓扑异构酶I抑制剂(例如，SG3932)：

[0488] 

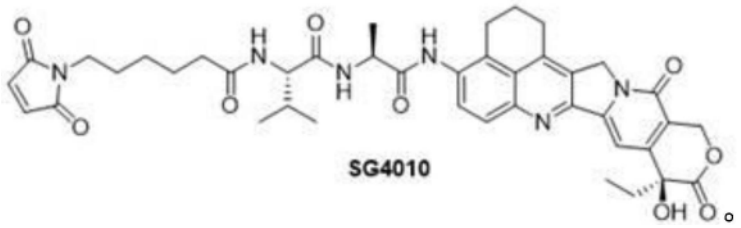
（SG3932）。

[0489] 为了避免疑问，数字“8”指定，方括号内的结构重复八次。因此，SG3932的另一种表示是：

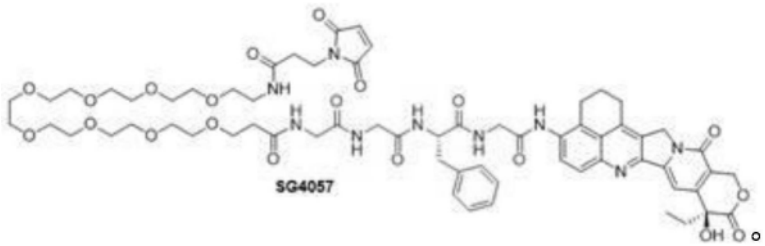
[0490] 

。

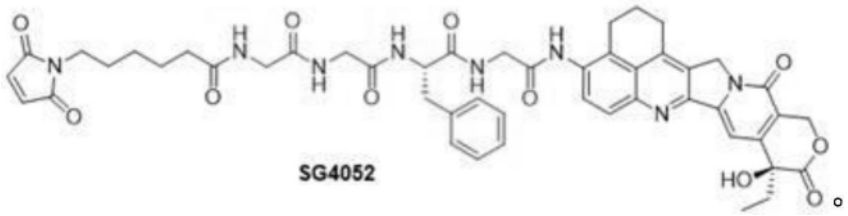
[0491] SG4010的另一种表示是：

[0492] 

[0493] SG4057的另一种表示是：

[0494] 

[0495] SG4052的另一种表示是：

[0496] 

[0497] 本文所述的任何抗体或其抗原结合片段可以缀合至所述拓扑异构酶I抑制剂中的一种或多种。

[0498] 在一个优选的方面，提供了结合至B7-H4多肽(例如，B7-H4多肽表位)的抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段包含：

[0499] i.含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1，或其功能变体；

[0500] ii.含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2，或其功能变体；

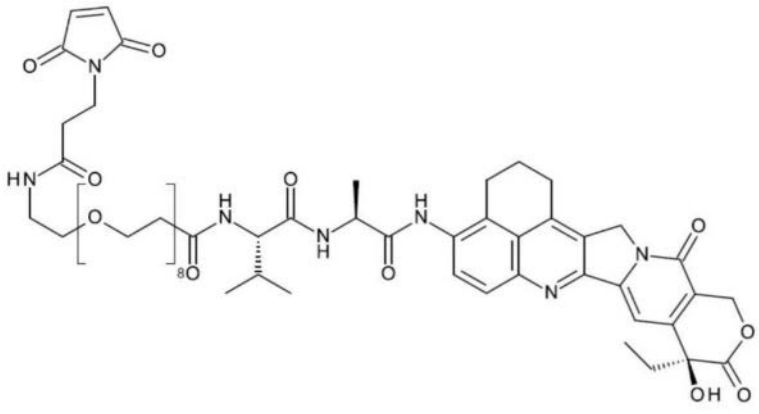
[0501] iii.含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3，或其功能变体；

[0502] iv.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1，或其功能变体；

[0503] v.含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2，或其功能变体；以及

[0504] vi.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3，或其功能变体；

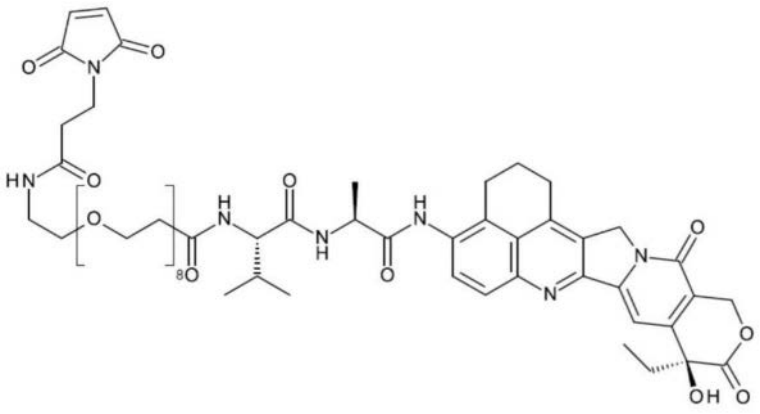
[0505] 其中该抗体或其抗原结合片段缀合至SG3932：

[0506]  (SG3932)。

[0507] 另一个优选的方面提供了抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段包含：含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的可变重链，或其功能变体；以及含有SEQ ID NO:34的

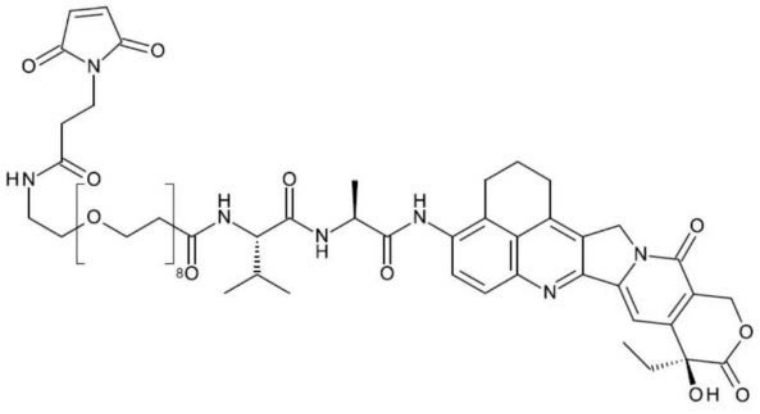
氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体;

[0508] 其中该抗体或其抗原结合片段缀合至SG3932:

[0509]  (SG3932)。

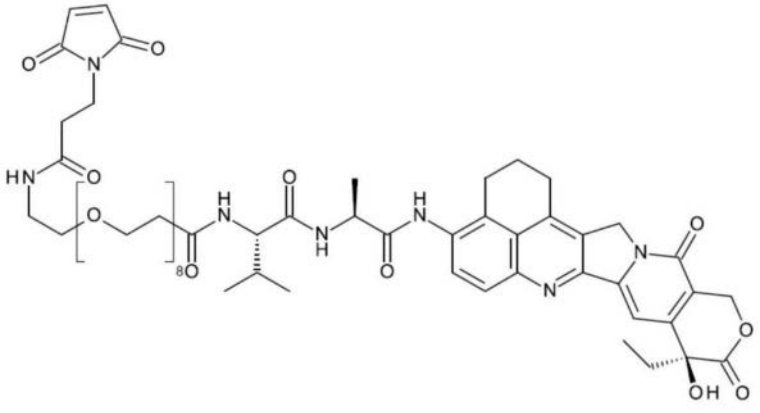
[0510] 一个特别优选的方面提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体;

[0511] 其中该抗体或其抗原结合片段缀合至SG3932:

[0512]  (SG3932)。

[0513] 另一个优选的方面提供了抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链,或其功能变体;

[0514] 其中该抗体或其抗原结合片段缀合至SG3932:

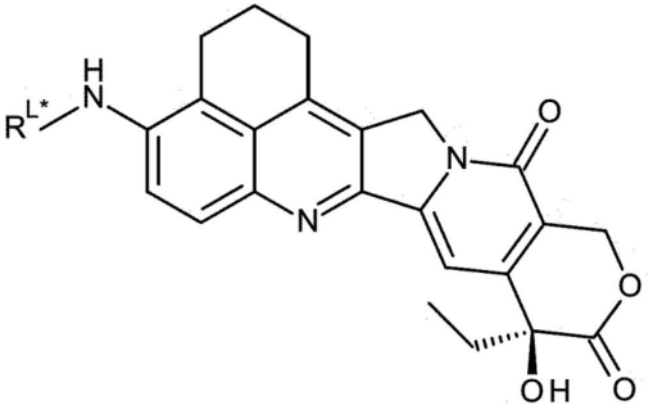
[0515]  (SG3932)。

[0516] 拓扑异构酶I抑制剂的合成

[0517] 为了完成,现在将描述用于制备一种或多种优选的拓扑异构酶I抑制剂的某些通

用合成路线。更多详情可以在实例部分中找到。

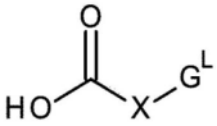
[0518] 具有式I的化合物(其中R^L具有式Ia)可以从具有式2的化合物：

[0519] 

式 2

；

[0520] (其中R^{L*}是-QH)通过连接具有式3的化合物：

[0521] 

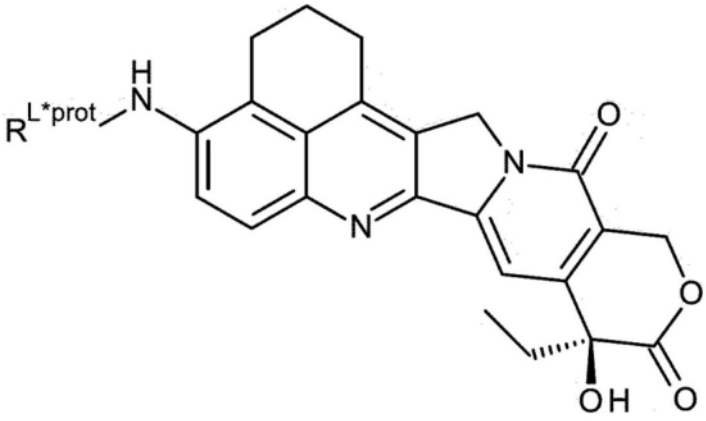
式 3

，

[0522] 或其活化版本来合成。

[0523] 这样的反应可以在酰胺偶联条件下进行。

[0524] 具有式2的化合物可以通过具有式4的化合物：

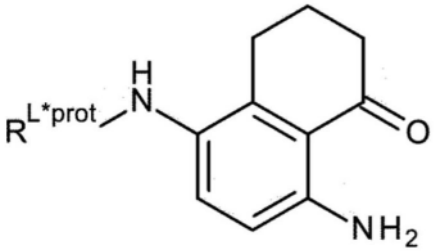
[0525] 

式 4

；

[0526] (其中R^{L*prot}是-Q-$Prot^N$,其中$Prot^N$是胺保护基团)的脱保护来合成。

[0527] 具有式4的化合物可以通过具有式5的化合物：

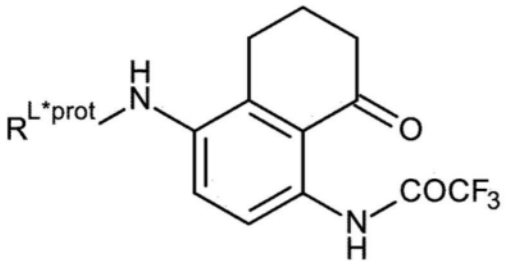
[0528] 

式 5

；

[0529] 与化合物A3的偶联,使用弗里德兰德反应(Friedlander reaction)来合成。

[0530] 具有式5的化合物可以从具有式6的化合物：

[0531]  式 6 ;

[0532] 通过除去三氟乙酰胺保护基团来合成。

[0533] 具有式6的化合物可以通过以下偶联来合成:R^{L*prot}-OH至化合物I7。

[0534] 具有式I的化合物(其中R^L具有式Ia或Ib)可以从化合物I11通过化合物R^L-OH或其活化形式的偶联来合成。

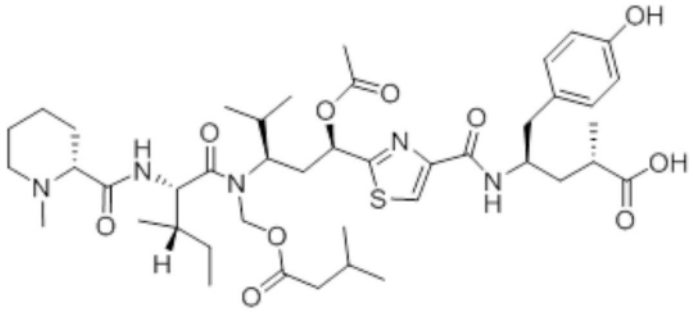
[0535] 胺保护基团:

[0536] 胺保护基团是本领域技术人员熟知的。特别参考以下文献中的合适的保护基团的披露内容:Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis[有机合成中的格林氏保护基团],第四版,John Wiley&Sons[约翰威利父子公司],2007(ISBN 978-0-471-69754-1),第696-871页。

[0537] 另外的ADC

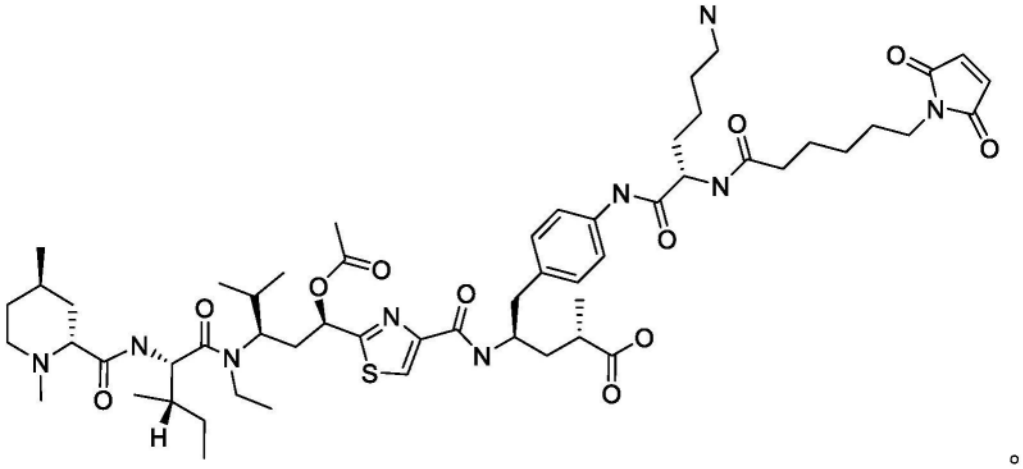
[0538] 尽管如上所述优选拓扑异构酶I抑制剂,但应注意任何合适的药剂(例如,药物/细胞毒素)可连接至本发明的抗体或其抗原结合片段。下文概述了其他合适的药剂的实例。

[0539] 在一个实施例中,细胞毒素是微管溶素或微管溶素衍生物。在一个实施例中,细胞毒素是微管溶素A,其具有以下化学结构:

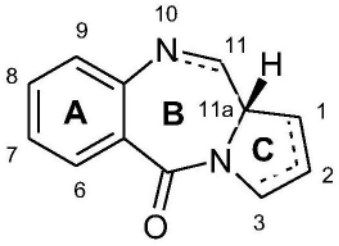
[0540]  。

[0541] 微管溶素是从粘细菌物种分离出的一类天然产物中的成员。作为细胞骨架相互作用剂,微管溶素是抑制微管蛋白聚合并导致细胞周期停滞和细胞凋亡的有丝分裂毒物。如本文所使用的,术语"微管溶素"共同地和单独地是指天然存在的微管溶素以及微管溶素的类似物和衍生物。微管溶素的示例性实例例如披露于WO 2004005326 A2、WO 2012019123A1、WO 2009134279A1、WO 2009055562A1、WO 2004005327A1、US 7776841、US 7754885、US 20100240701、US 7816377、US 20110021568和US 20110263650中,将其通过引用并入本文。将理解的是,此类衍生物包括例如包含一个或多个保护基团(protection/protecting group)、一个或多个连接部分的微管溶素前药或微管溶素。

[0542] 在一个实施例中,细胞毒素是微管溶素1508,其在本文中又称为"AZ1508"并且更详细地描述于WO 2015157594(将其通过引用并入本文)中,并具有以下结构:

[0543] 

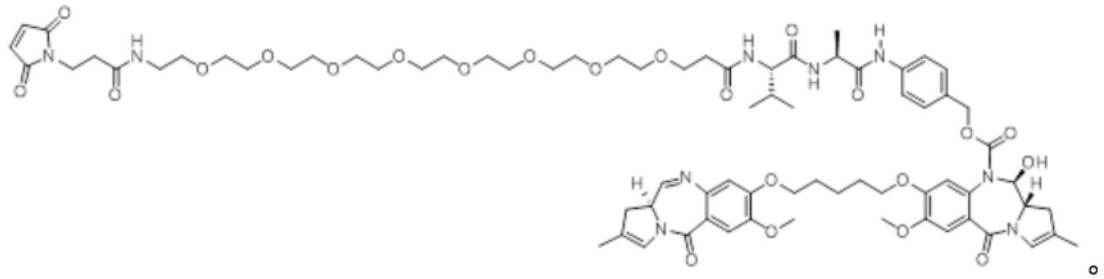
[0544] 在另一个实施例中,细胞毒素可以是吡咯并苯并二氮杂䓬(PBD)或PBD衍生物。PBD转运至其中其交联DNA的细胞核中,阻止有丝分裂期间的复制,通过诱导单链断裂来损坏DNA,并且随后导致细胞凋亡。一些PBD具有识别和结合至DNA特定序列的能力;优选的序列是PuGPu。PBD具有以下通用结构:

[0545] 

[0546] PBD在取代基的数目、类型和位置方面,在它们的芳香族A环和吡咯并C环二者方面,以及在C环的饱和度方面不同。在B环中,在N10-C11位置处存在亚胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))、或甲醇胺甲基醚(NH-CH(OMe)),其是负责使DNA烷基化的亲电中心。所有已知的天然产物具有在手性C11a位置处的(S)-构型,当从C环向A环观察时,该构型向其提供了右旋扭曲。这为它们提供了合适的三维形状以与B型DNA的小沟具有等螺旋性(isohelicity),从而在结合位点处紧密配合。它们在小沟中形成加合物的能力使得它们能够干扰DNA加工,因此将它们用作抗肿瘤剂。

[0547] 第一种PBD抗肿瘤抗生素,即氨茴霉素,于1965年被发现。从那时起,已经报道了许多种天然存在的PBD,并且已经针对多种类似物开发了10多种合成路线。家族成员包括阿比霉素(abbeymycin)、奇卡霉素(chicamycin)、DC-81、甲基氨茴霉素(mazethramycin)、新氨茴霉素(neothramycin)A和B、波罗斯拉霉素(porothramycin)、prothracarcin、西班米星(sibanomicin)(DC-102)、西伯利亚霉素和托马霉素。包含它们的PBD和ADC还被描述于WO 2015/155345和WO 2015/157592中,将其通过引用以其全文并入本文。

[0548] 在一个实施例中,细胞毒素是PBD 3249,其在本文中又称为“SG3249”并且更详细地描述于WO 2014/057074(将其通过引用并入本文)中,并具有以下结构:

[0549]  。

[0550] 因此,该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素。

[0551] 例如,在一方面,提供了结合至B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[0552] i.含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1,或其功能变体;

[0553] ii.含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2,或其功能变体;

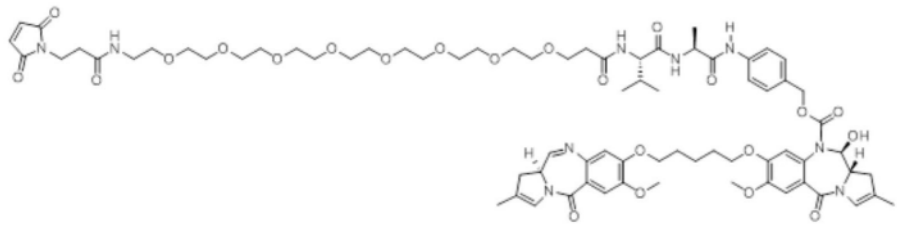
[0554] iii.含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3,或其功能变体;

[0555] iv.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1,或其功能变体;

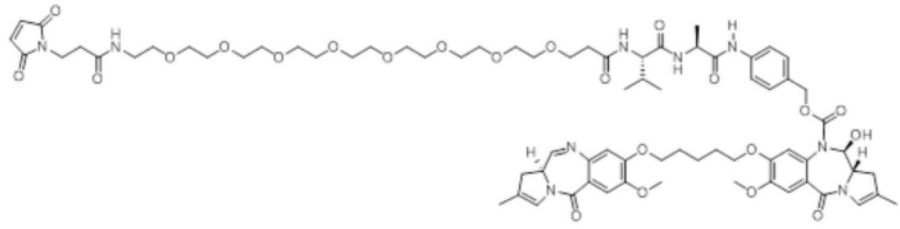
[0556] v.含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2,或其功能变体;以及

[0557] vi.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3,或其功能变体;

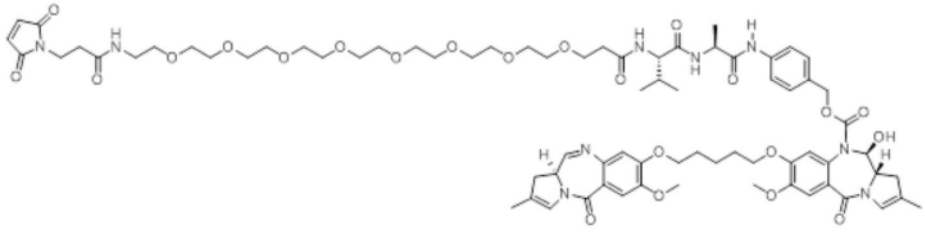
[0558] 其中该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素:

[0559]  (SG3249)。

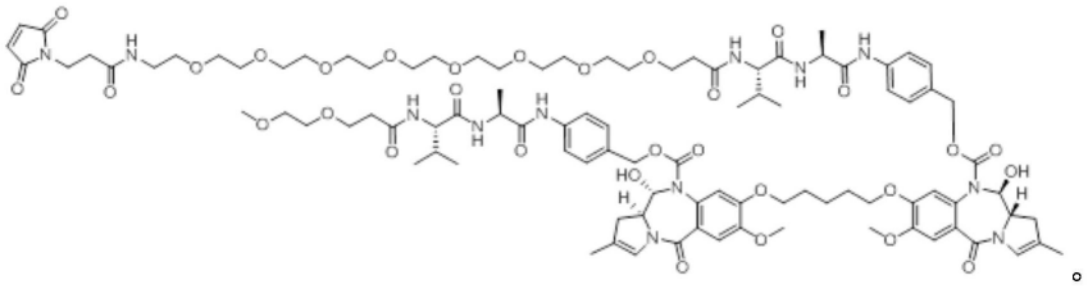
[0560] 在另一方面,提供了结合至B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:抗体或其抗原结合片段包含,含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体;其中该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素:

[0561]  (SG3249)。

[0562] 在另一方面,提供了结合至B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:抗体或其抗原结合片段包含,含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的可变重链,或其功能变体;以及含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻链,或其功能变体;其中该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素:

[0563]  （SG3249）。

[0564] 在一个实施例中，细胞毒素是PBD 3315，其在本文中又称为“SG3315”并且更详细地描述于WO 2015/052322(将其通过引用并入本文)中，并具有以下结构：

[0565]  。

[0566] 该抗体或其抗原结合片段优选地通过半胱氨酸残基缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素。

[0567] 本发明的抗体或其抗原片段可以使用位点特异性或非位点特异性缀合方法缀合至异源药剂(优选细胞毒素)。在一个实施例中，这些抗体及其抗原片段包含一个、两个、三个、四个或更多个治疗部分。在一个实施例中，所有治疗部分是相同的。

[0568] 用于抗体或其抗原结合片段的常规的缀合策略依赖于通过赖氨酸或半胱氨酸将有效载荷随机缀合至抗体或片段。在一个实施例中，将该抗体或其抗原结合片段随机缀合至异源药剂(优选细胞毒素)，例如，通过对该抗体或片段进行部分还原，随后与所希望的药剂反应，其中接头部分被附接或不被附接。使用DTT或相似的还原剂可以还原该抗体或片段。然后可以在DMSO的存在下，将接头部分附接或未附接的药剂以摩尔过量添加至经还原的抗体或片段中。缀合后，可以添加过量的游离半胱氨酸以淬灭未反应的药剂。然后可以将反应混合物进行纯化，并且缓冲液更换为PBS。

[0569] 在一个实施例中，药剂(例如，细胞毒素)通过位点特异性缀合与抗体或其抗原结合片段缀合。在一个实施例中，使用在具体位置处的反应性氨基酸残基进行治疗部分与抗体的位点特异性缀合产生了具有一致化学计量的均质ADC制剂。

[0570] 该位点特异性缀合可以通过半胱氨酸、残基或非天然氨基酸进行。在一个优选的实施例中，该异源药剂(优选细胞毒素)通过至少一个半胱氨酸残基缀合至该抗体或其抗原结合片段。

[0571] 在一个实施例中，该异源药剂(优选细胞毒素)化学地缀合至氨基酸的侧链上(优选在Fc区中的具体Kabat位置处)。在一个实施例中，该药剂(例如，细胞毒性剂或显像剂)通过位置239、248、254、273、279、282、284、286、287、289、297、298、312、324、326、330、335、337、339、350、355、356、359、360、361、375、383、384、389、398、400、413、415、418、422、440、441、442、443和446中至少一个的半胱氨酸取代而缀合至该抗体或其抗原结合片段，其中编号对应于Kabat中的EU索引。在一个实施例中，具体的Kabat位置是239、442、或二者。在一个实施例中，具体的位置是Kabat位置442，Kabat位置239和240之间的氨基酸插入，或二者。在

一个实施例中，该异源药剂(优选细胞毒素)通过硫醇-马来酰亚胺键缀合至该抗体或其抗原结合片段。在一些方面中，该氨基酸侧链是巯基侧链。

[0572] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链(例如，优选地包含VL和恒定轻链)以及含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链(例如，包含VH和恒定重链)；其中该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素；优选地，其中该吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素缀合至所述重链的氨基酸位置240处的半胱氨酸残基。

[0573] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链(例如，优选地包含VL和恒定轻链)以及含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(例如，包含VH和恒定重链)；其中该抗体或其抗原结合片段缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素。

[0574] 本文提及的缀合至细胞毒素的抗体或抗原结合片段与术语“抗体药物缀合物(ADC)”或“抗B7-H4 ADC”同义。

[0575] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段(例如，抗B7-H4ADC)向细胞(优选表达B7-H4的细胞)递送细胞毒性有效载荷，并且相对于不存在该抗体或其抗原结合片段(例如，抗B7-H4 ADC)下的抑制或阻抑水平，抑制或阻抑增殖(例如，肿瘤的增殖)至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％或约100％(优选至少40％)。细胞增殖可以使用本领域公认的技术测定，这些技术测量细胞分裂速率、和/或经历细胞分裂的细胞在细胞群中的分数、和/或由于终末分化或细胞死亡(例如，胸苷掺入)自细胞群的细胞损失的速率。

[0576] 在一个实施例中，本发明的抗体或其抗原片段(例如，抗B7-H4ADC)与细胞表面上的B7-H4结合，并被内化到细胞中。在一个实施例中，该抗原或其抗体片段以10分钟时的以下IC50被内化到细胞(优选表达B7-H4的细胞)中：约100ng/ml至约1μg/ml、约100ng/ml至约500ng/ml、约100ng/ml至约250ng/ml、约250ng/ml至约500ng/ml、约350ng/ml至约450ng/ml、约500ng/ml至约1μg/ml、约500ng/ml至约750ng/ml、约750ng/ml至约850ng/ml、或约900ng/ml至约1μg/ml。

[0577] 在一个实施例中，该抗体或其抗原片段(例如，抗B7-H4 ADC)以30分钟时的以下IC50被内化到细胞(优选表达B7-H4的细胞)中：约100ng/ml至约1μg/ml、约100ng/ml至约500ng/ml、约100ng/ml至约250ng/ml、约250ng/ml至约500ng/ml、约250ng/ml至约350ng/ml、约350ng/ml至约450ng/ml、约500ng/ml至约1μg/ml、约500ng/ml至约750ng/ml、约750ng/ml至约850ng/ml、或约900ng/ml至约1μg/ml。

[0578] 在一个实施例中，该抗体或其抗原片段(例如，抗B7-H4 ADC)以120分钟时的以下IC50被内化到细胞(优选表达B7-H4的细胞)中：约50ng/ml至约500ng/ml、约50ng/ml至约100ng/ml、约100ng/ml至约200ng/ml、约200ng/ml至约300ng/ml、约300ng/ml至约400ng/ml、或约400ng/ml至约500ng/ml。

[0579] 在一些实施例中，该抗体或其抗原片段(例如，抗B7-H4 ADC)以8小时时的以下IC50被内化到细胞(优选表达B7-H4的细胞)中：约5ng/ml至约250ng/ml、约10ng/ml至约25ng/ml、约25ng/ml至约50ng/ml、约50ng/ml至约100ng/ml、约100ng/ml至约150ng/ml、约

150ng/ml至约200ng/ml、或约200ng/ml至约250ng/ml。

[0580] 为避免疑义，本文提及的“缀合物”意指与异源药剂(包括上述的任何此类药剂，优选细胞毒素)缀合的抗体或抗原结合片段。

[0581] 除了上述本发明的抗体或抗原结合片段的治疗性应用之外，本发明的“缀合物”还可用于治疗方法中。因此，还提供了治疗方法，该治疗方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的本文所述的缀合物(例如，具有式IV的缀合物)。术语“治疗有效量”是足够向患者显示益处的量。这种益处可以是至少减轻至少一种症状。施用的实际量以及施用的速率和时程将取决于正治疗的疾病的性质和严重程度。治疗处方(例如剂量的确定)属于全科医生和其他医生的职责。

[0582] 取决于待治疗的病症，缀合物可单独或与其他治疗组合，同时或顺序地施用。治疗和疗法的实例包括但不限于化学疗法(包括例如药物的活性剂的施用)；手术；和放射疗法。

[0583] 根据本发明并且用于根据本发明使用的药物组合物除了活性成分(即本发明的缀合物/ADC(例如，式IV))以外，还可以包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲液、稳定剂或本领域技术人员熟知的其他材料。这些材料应无毒并且不应干扰活性成分的功效。载体或其他材料的确切性质将取决于施用途径，该施用途径可以是口服、或通过注射，例如皮肤、皮下或静脉内注射。

[0584] 用于口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可包含固体载体或辅助剂。液体药物组合物通常包含液体载体，如水、石油、动物油或植物油、矿物油或合成油。可包括生理盐水溶液、右旋糖或其他糖类溶液或二醇，如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。胶囊可包含固体载体，例如明胶。

[0585] 对于静脉内、皮肤或皮下注射，或病痛部位的注射，活性成分将处于肠胃外可接受的水性溶液形式，该水性溶液为无热原的并且具有合适pH、等渗性以及稳定性。本领域技术人员完全能够使用例如等渗媒介物，如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸盐林格氏注射液来制备合适溶液。需要时，可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0586] 优选地，缀合物可用于治疗增殖性疾病。术语“增殖性疾病”涉及过量或异常细胞的不想要的或不受控制的细胞增殖，无论是体外还是体内，其都是不希望的，例如赘生性或增生性生长。术语“增殖性疾病”可替代地称为“癌症”。

[0587] 合适的增殖性疾病(例如癌症)将优选地被表征为表达B7-H4的癌细胞的存在。

[0588] 增殖性病症的实例包括但不限于良性、癌前和恶性细胞增殖，包括但不限于赘生物和肿瘤(例如组织细胞瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、骨瘤)、癌症(例如肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、肠癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤、黑色素瘤)、白血病、银屑病、骨骼疾病、纤维增殖性障碍(例如结缔组织的障碍)和动脉粥样硬化。其他所关注的癌症包括但不限于血液恶性肿瘤，如白血病和淋巴瘤，如非霍奇金淋巴瘤及亚型(如DLBCL、边缘区淋巴瘤、套区淋巴瘤和滤泡淋巴瘤)、霍奇金淋巴瘤、AML以及其他B或T细胞来源的癌症。可以治疗任何类型的细胞，这些细胞包括但不限于肺、胃肠道(例如包括肠、结肠)、乳腺(breast或mammary)、卵巢、前列腺、肝(liver或hepatic)、肾(kidney或renal)、膀胱、胰腺、脑和皮肤细胞。

[0589] 可以标记该抗体-药物缀合物，例如以帮助检测细胞结合(体外或体内)。该标记可以是生物素标记。在另一个实施例中，该标记可以是放射性同位素。

[0590] 在另一方面,提供了多核苷酸,该多核苷酸包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

[0591] 在一个实施例中,该多核苷酸可以是分离的多核苷酸。

[0592] 本发明的一个或多个序列(例如一个或多个多核苷酸序列)包括已经从其天然存在的环境中取出的序列、重组或克隆的(例如DNA)分离物、以及化学合成的类似物或通过异源系统生物合成的类似物。

[0593] 本发明的一个或多个序列(例如一个或多个多核苷酸序列)可以通过本领域已知的任何方式制备。例如,可以通过在合适的宿主细胞中复制和/或表达来产生大量的该一个或多个序列。编码所需片段的天然或合成的DNA片段通常会掺入重组核酸构建体中,这些重组核酸构建体通常是DNA构建体并且能够引入原核或真核细胞并在其中复制。通常,DNA构建体将适于在单细胞宿主(如酵母或细菌)中自主复制,但也可用于引入到培养的细菌、昆虫、哺乳动物、植物或其他真核细胞系的基因组中并在该基因组中整合。

[0594] 本发明的一个或多个序列(例如一个或多个多核苷酸序列)还可以通过化学合成产生(例如通过亚磷酰胺法或三酯法合成多核苷酸),并且可以在商业自动化寡核苷酸合成仪上进行。双链(例如DNA)片段可以从化学合成的单链产物中获得,该化学合成是通过合成互补链并在适当条件下使链退火在一起或者通过使用具有适当引物序列的DNA聚合酶添加互补链而进行的。

[0595] 当应用于本发明的序列(例如多核苷酸序列)时,术语“分离的”优选表示该序列已从其天然遗传环境中取出,因此不含其他外来或不需要的编码序列(但可以包括天然存在的5’和3’非翻译区,如启动子和终止子),并且其形式适合在基因工程蛋白质生产系统中使用。此类分离的分子是那些从其自然环境中分离的分子。

[0596] 本文提供的另一方面是包含多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

[0597] 在一个实施例中,多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段的VH链。在一个实施例中,本发明的多核苷酸可以编码抗体或其抗原结合片段的VL链。在一个实施例中,多核苷酸可编码抗体或其抗原结合片段的VH和VL链。在一个实施例中,多核苷酸可以进一步编码前导序列(例如,其用作控制多肽从细胞的转运的分泌序列)。

[0598] 在另一方面,提供了包含本发明的多核苷酸的载体(例如质粒)。

[0599] 本发明包括上述多核苷酸的变体。多核苷酸变体可以在编码区、非编码区或两者中含有改变。在一个实施例中,多核苷酸变体包含产生沉默取代、添加、或缺失而不改变所编码的多肽的性质或活性的改变。在一个实施例中,多核苷酸变体由归因于遗传密码的简并性的沉默取代产生。多核苷酸变体可以因为各种原因而产生,例如,为了优化特定宿主的密码子表达(将人mRNA中的密码子改变成细菌宿主如大肠杆菌优选的那些密码子)。还提供了包含所述多核苷酸变体的载体和细胞。

[0600] 本发明包括用于产生结合B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的抗体或其抗原结合片段的方法,这些方法包括在宿主细胞中表达多核苷酸,所述多核苷酸包含编码本发明的抗体或其抗原结合片段的核酸序列。

[0601] 本发明进一步包括可通过所述用于产生结合B7-H4多肽(例如,B7-H4多肽表位)的抗体或其抗原结合片段的方法获得的抗体或其抗原结合片段。

[0602] 在一个优选的实施例中，用于产生抗体或其抗原结合片段的方法包括(a)培养宿主细胞和(b)从该细胞中分离所表达的抗体或其抗原结合片段。

[0603] 用于表达本发明的抗体或其抗原结合片段的合适宿主细胞包括原核细胞、酵母细胞、昆虫细胞或高等真核细胞(优选其中多核苷酸处于合适启动子的控制之下)。原核细胞包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体，例如大肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括如本文所述的哺乳动物来源的已建立的细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。

[0604] 在一方面，提供了包含本文所述的抗原或抗体结合片段的试剂盒。进一步包括所述试剂盒在本发明的方法中的用途。

[0605] 在一个实施例中，试剂盒包含本发明的分离的(例如纯化的)抗原或抗体结合片段。在一个实施例中，试剂盒包含本发明的分离的(例如纯化的)抗原或抗体结合片段，其中该抗原或抗体结合片段包含本文所述的药剂(例如缀合的细胞毒素)。在一个实施例中，该试剂盒包含一个或多个容器。该试剂盒可单独提供抗原或抗体结合片段以及药剂(例如，该试剂未与抗原或抗体结合片段缀合，而是处于适合与其缀合的形式)；任选地，其中该试剂盒进一步提供了用于将该药剂与该抗原或抗体结合片段缀合的说明书和/或试剂。在一个实施例中，该试剂盒包含进行检测测定的必要和/或足够的所有组件，这些组件包括所有对照、用于进行测定的指导、以及用于分析和呈现结果的任何必要的软件。

[0606] 本发明的抗体或其抗原结合片段可用于通过本领域已知的任何方法进行的免疫特异性结合的测定中。可使用的免疫测定包括但不限于使用如以下技术的竞争性和非竞争性测定系统：蛋白质印迹、RIA、ELISA、ELISPOT、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、以及蛋白质A免疫测定。

[0607] 可以在组织学上使用本发明的抗体或其抗原结合片段，如在免疫荧光法、免疫电子显微术、或非免疫学测定中，例如用于原位检测B7-H4或其保守变体或肽片段。原位检测可通过以下来实现：从患者取出组织学样品并对其施加经标记的本发明的抗体或其抗原结合片段，例如，通过使经标记的抗体或其抗原结合片段覆盖在生物样品而施加。通过使用这一程序，不仅可确定B7-H4或保守变体或肽片段的存在，还可确定其在检查的组织中的分布。使用本发明，普通技术人员将容易地知道，可修改多种组织学方法(如染色程序)中的任一种以实现这种原位检测。

[0608] 抗体

[0609] 术语“抗体”涵盖单克隆抗体及其片段(例如表现出所需的生物活性的片段)。在一个优选的实施例中，本发明的抗体是单克隆抗体。在一个更优选的实施例中，该抗体是完全人单克隆抗体。在一个实施例中，本发明的方法可以使用多克隆抗体。

[0610] 特别地，抗体是包含至少一个或两个重(H)链可变区(本文缩写为VHC)以及至少一个或两个轻(L)链可变区(本文缩写为VLC)的蛋白质。VHC和VLC区可以进一步细分为被称为“互补决定区”(“CDR”)的高变区，其间插有被称为“框架区”(FR)的更保守的区域。框架区和CDR的范围已经被精确确定(参见，Kabat，E.A.等人Sequences of Proteins ofImmunological Interest[免疫学感兴趣的蛋白质序列]，第5版，U.S.Department of Health and Human Services[美国卫生与公众服务部]，NIH公开号91-3242，1991，以及Chothia，C等人，J.MoI.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917，1987)。优选地，每个VHC和

VLC由三个CDR和四个FR构成，从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、DR2、FR3、CDR3、FR4。抗体的VHC或VLC链可以进一步包含所有的或部分的重链或轻链恒定区。在一个实施例中，抗体是两个重免疫球蛋白链和两个轻免疫球蛋白链的四聚体，其中重和轻免疫球蛋白链由例如二硫键相互连接。重链恒定区包括三个结构域，即CH1、CH2和CH3。轻链恒定区由一个结构域CL构成。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语“抗体”包括类型IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(及其亚型)的完整免疫球蛋白，其中免疫球蛋白的轻链可以是κ或λ类型。如本文所使用的，术语抗体还指与上述标记物之一结合的抗体的一部分，例如，其中一个或多个免疫球蛋白链不是全长但与标记物结合的分子。涵盖在术语抗体中的“结合部分”的实例包括(i)Fab片段：由VLC、VHC、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii)F(ab')2片段：包含两个在绞链区由二硫桥连接的Fab片段的二价片段；(iii)由VHC和CH1结构域组成的Fc片段；(iv)由抗体单臂的VLC和VHC结构域组成的Fv片段；(v)由VHC结构域组成的dAb片段(Ward等人，Nature[自然]341:544-546,1989)；以及(vi)具有足以发生结合的框架的分离的互补决定区(CDR)，例如，可变区的抗原结合部分。轻链可变区的抗原结合部分和重链可变区的抗原结合部分(例如Fv片段的两个域VLC和VHC)可以使用重组方法通过合成接头连接，该合成接头允许它们成为单个蛋白链，其中VLC和VHC区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv)；参见例如，Bird等人(1988)Science[科学]1Al-ATi-Alβ；以及Huston等人(1988)Proc.Proc.Natl.Acad.ScL USA[美国国家科学院院刊]85:5879-5883)。此类单链抗体也涵盖在术语抗体内。这些部分可使用本领域技术人员已知的常规技术获得，并且以与完整抗体相同的方式针对实用性来筛选这些部分。

[0611] 在一个实施例中，该抗体或抗原结合片段是选自以下中的一种或多种：鼠抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、多特异性抗体、或其组合。

[0612] 在一个实施例中，该抗原结合片段是选自以下中的一种或多种：Fv片段、Fab片段、F(ab')2片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段、sc(Fv)2片段、或其组合。

[0613] 在一个优选的实施例中，该抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体(mAb)。

[0614] 在一个实施例中，本发明的抗体或其抗原结合片段(例如mAb)是scFV。

[0615] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段可以跨物种结合B7-H4分子，例如，该抗体或片段可以结合小鼠B7-H4、大鼠B7-H4、兔、人B7-H4和/或食蟹猴B7-H4。在一个实施例中，该抗体或片段可以结合人B7-H4和食蟹猴B7-H4。在一个实施例中，该抗体或抗原结合片段还可以结合小鼠B7-H4。

[0616] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段可以特异性结合B7-H4，例如人B7-H4和食蟹猴B7-H4，但不特异性结合人B7-H1、B7-H2和/或B7-H3。

[0617] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段除了VH和VL之外还可以包含重链恒定区或其片段。在一个实施例中，该重链恒定区是人重链恒定区，例如人IgG恒定区，例如人IgG1恒定区。在一个实施例(特别是在该抗体或其抗原结合片段缀合至药剂(如细胞毒性剂)的情况下)中，将半胱氨酸残基插入到IgG1的CH2区中的氨基酸S239和V240之间。该半胱氨酸被称为“239插入”或“239i”。

[0618] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段可以包含含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链恒定区。优选地，该抗体或其抗原结合片段可以包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链恒定区。

[0619] 在一个实施例中,重链恒定区或其片段(例如,人IgG恒定区或其片段)可相对于野生型IgG恒定结构域包括一个或多个氨基酸取代,其中与具有野生型IgG恒定结构域的IgG的半衰期相比,该经修饰的IgG具有增加的半衰期。例如,IgG恒定结构域可以含有在位置251-257、285-290、308-314、385-389、和428-436处的氨基酸残基的一个或多个氨基酸取代,其中根据如Kabat中所阐明的EU索引进行氨基酸位置编号。在一个实施例中,IgG恒定结构域可以含有以下中的一个或多个取代:Kabat位置252处的氨基酸被酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、或苏氨酸(T)取代,Kabat位置254处的氨基酸被苏氨酸(T)取代,Kabat位置256处的氨基酸被丝氨酸(S)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、或苏氨酸(T)取代,Kabat位置257处的氨基酸被亮氨酸(L)取代,Kabat位置309处的氨基酸被脯氨酸(P)取代,Kabat位置311处的氨基酸被丝氨酸(S)取代,Kabat位置428处的氨基酸被苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)、或丝氨酸(S)取代,Kabat位置433处的氨基酸被精氨酸(R)、丝氨酸(S)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、或谷氨酰胺(Q)取代,或Kabat位置434处的氨基酸被色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、丝氨酸(S)、组氨酸(H)、苯丙氨酸(F)、或酪氨酸取代。在一个优选的实施例中,IgG恒定结构域可相对于野生型人IgG恒定结构域含有氨基酸取代,包括Kabat位置252处的氨基酸被酪氨酸(Y)取代、Kabat位置254处的氨基酸被苏氨酸(T)取代、以及Kabat位置256处的氨基酸被谷氨酸(E)取代。在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含重链,其中该重链是人IgG1 YTE突变体。

[0620] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段除了VH和VL以外,还可以任选地包含重链恒定区或其片段、轻链恒定区或其片段。在一个实施例中,该轻链恒定区是κλ轻链恒定区,例如,人κ恒定区或人λ恒定区。

[0621] 在一个实施例中,该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0622] 在一个实施例中,VH和/或VL氨基酸序列可以与本文所述的序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的相似性。在一个实施例中,VH和/或VL氨基酸序列可相对于本文所述的序列包含1、2、3、4、5或更多个取代,例如保守取代。含有与VH区或VL区具有一定百分比相似性或具有一个或多个取代(例如,保守取代)的VH和VL区的B7-H4抗体可以通过编码本文所述的VH和/或VL区的核酸分子的诱变(例如,定点诱变或PCR介导的诱变)获得,随后测试所编码的改变的抗体对B7-H4的结合,并且任选地使用本文所述的功能测定测试保留的功能。

[0623] 抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力或亲合力可以使用本领域熟知的任何合适的方法(例如,流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、或放射免疫测定(RIA)、或动力学(例如KINEXA®或BIACORE™分析))经实验确定。可以容易地采用直接结合测定以及竞争性结合测定形式。(参见例如,Berzofsky等人,Antibody-Antigen Interactions[抗体-抗原相互作用],于Fundamental Immunology[基础免疫学],Paul,W.E.,编辑,Raven Press[雷文出版社]:纽约,纽约州(1984);Kuby,Immunology[免疫学],W.H.Freeman和Company出版商:纽约,纽约州(1992);以及本文所述的方法。)如果在不同条件(例如,盐浓度、pH、温度)下测量,特定抗体-抗原相互作用的所测量的亲和力可以变化。因此,用如本领域中已知的抗体和抗原的标准化溶液和标准化缓冲液进行亲和力和其他抗原结合参数(例如,KD或Kd、Kon、Koff)的测量。

[0624] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段能以以下IC50结合表达B7-H4的细胞：低于约500nM、低于约350nM、低于约250nM、低于约150nM、低于约100nM、低于约75nM、低于约60nM、低于约50nM、低于约40nM、低于约30nM、低于约20nM、低于约15nM、低于约10nM、低于约5nM、低于约1nM、低于约500pM、低于约350pM、低于约250pM、低于约150pM、低于约100pM、低于约75pM、低于约60pM、低于约50pM、低于约40pM、低于约30pM、低于约20pM、低于约15pM、低于约10pM、或低于约5pM。优选地，通过流式细胞术测量所述IC50。

[0625] “单克隆抗体”(mAb)是指涉及单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的同源抗体群。这与典型地包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')2、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外，“单克隆抗体”是指以任何数目的方式制备的此类抗体，这些方式包括但不限于杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、和转基因动物。

[0626] 在一个优选的实施例中，本发明的抗体或其抗原结合片段(例如mAb)是人源化抗体或其抗原结合片段。合适地，所述人源化抗体或其抗原结合片段是IgG。

[0627] 术语“人源化抗体”是指源自非人(例如鼠)免疫球蛋白的抗体，其被工程化成含有最小的非人(例如鼠)序列。典型地，人源化抗体是人免疫球蛋白，其中来自互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(例如，小鼠、大鼠、兔子或仓鼠)的CDR的具有所希望特异性、亲和性和能力的残基替换(Jone等人，1986，Nature[自然]，321:522-525；Riechmann等人，1988，Nature[自然]，332:323-327；Verhoeyen等人，1988，Science[科学]，239:1534-1536)。在一些情况下，人免疫球蛋白的Fv框架区(FW)残基被来自非人物种的具有所希望特异性、亲和性和能力的抗体中的相应残基替换。

[0628] 人源化抗体可以通过在Fv框架区和/或替换的非人残基内的另外残基的取代来进一步修饰，以改善和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。通常，人源化抗体将包含基本上所有至少一个(并且通常是两个或三个)可变结构域，该可变结构域含有对应于非人免疫球蛋白的所有或基本上所有CDR区，而所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分，通常是人免疫球蛋白的恒定区或结构域的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利号5,225,539或5,639,641中。

[0629] 抗体的“可变区”指单独的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区或它们的组合。重链和轻链的这些可变区各自由通过三个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的四个框架区(FW)组成。每条链中的CDR由FW区紧密靠近地保持在一起，并且与来自另一条链的CDR促成了抗体的抗原结合位点的形成。存在至少两种用于确定CDR的技术：(1)基于种间序列变异性的方法(即，Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学感兴趣的蛋白质序列](第5版，1991，National Institutes of Health[美国国立卫生研究院]，贝塞斯达(Bethesda)，马里兰州(Md))；和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等人(1997)J.Molec.Biol.[分子生物学杂志]273:927-948)。此外，本领域有时使用这两种方法的组合来确定CDR。

[0630] 当提及可变结构域中的残基(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时，通常使用“Kabat编号系统”(例如，Kabat等人，Sequences of Immunological Interest[免疫学

感兴趣的序列],第5版,Public Health Service[美国公共卫生服务部],National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州(1991))。

[0631] 在Kabat中的氨基酸位置编号是指在Kabat等人,Sequences of Immunological Interest[免疫学感兴趣的蛋白质序列],第5版Public Health Service[美国公共卫生服务部],National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州(1991)中用于汇编抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有更少或另外的氨基酸,其对应于可变结构域的FW或CDR的截短或插入。例如,重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)以及在重链FW残基82之后的插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。

[0632] 可以通过在抗体序列与"标准"Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。而Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901-917(1987))。Chothia CDR-H1环的末端在利用Kabat编号惯例编号时在H32与H34之间变化,这取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入放在H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,那么环端点在32;如果只存在35A,那么环端点在33;如果35A和35B都存在,那么环端点在34)。AbM高变区表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。下表列出了构成每个系统中的抗体可变区的氨基酸的位置。

[0633]

区域	Kabat	AbM	Chothia
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1[1]	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
HCDR1[2]	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0634] [1] Kabat编号

[0635] [2] Chothia编号

[0636] 免疫遗传学(IMGT)还提供了一种用于免疫球蛋白可变区(包括CDR)的编号系统。参见例如,Lefranc,M.P.等人,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学]27:55-77(2003)。IMGT编号系统是基于高变环的多于5,000个序列的比对、结构数据和表征,并且允许容易地比较所有物种的可变区和CDR区。根据IMGT编号方案,VH-CDR1处于位置26至35,VH-CDR2处于位置51至57,VH-CDR3处于位置93至102,VL-CDR1处于位置27至32,VL-CDR2处于位置50至52,并且VL-CDR3处于位置89至97。

[0637] 如贯穿本说明书使用的,所述的VH CDR序列对应于经典的Kabat编号位置,即Kabat VH-CDR1在位置31-35处,VH-CDR2在位置50-65处,并且VH-CDR3在位置95-102处。VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3也对应于经典的Kabat编号位置,即分别对应于位置24-34、50-56和89-97。

[0638] 在一个实施例中,本发明的抗体是人抗体。

[0639] 术语“人抗体”意指在人体中产生的抗体或具有与使用本领域已知的任何技术制备的在人体中产生的抗体对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义包括完整或全长抗体、其片段、和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体，例如像包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0640] 在一个实施例中，本发明的抗体是嵌合抗体。

[0641] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列衍生自两种或更多种物种的抗体。典型地，轻链和重链的可变区与源自具有所需特异性、亲和力和能力的一种哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区对应，而恒定区与衍生自另一种哺乳动物(通常为人)的抗体中的序列同源以避免在该物种中引起免疫应答。

[0642] 术语“YTE”或“YTE突变体”是指IgG1 Fc中的突变，其导致与人FcRn的结合增加并且提高了具有该突变的抗体的血清半衰期。YTE突变体包含引入IgG1的重链中的三个突变M252Y/S254T/T256E的组合(EU编号，Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest[免疫学感兴趣的蛋白序列],U.S.Public Health Service[美国公共卫生服务部],National Institutes of Health[美国国立卫生研究院],华盛顿,哥伦比亚特区(D.C.))。参见美国专利号7,658,921，将其通过引用并入本文。与相同抗体的野生型相比，YTE突变体显示出增加了抗体的血清半衰期大约四倍(Dall'Acqua等人，J.Biol.Chem.[生物化学杂志]281:23514-24(2006)；Robbie等人，(2013)Antimicrob.Agents Chemother.[抗微生物药剂与化学疗法]57,6147-6153)。还参见美国专利号7,083,784，将其通过引用以其全文特此并入。

[0643] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明，如本文所使用的，“结合亲和力”是指反映结合对(例如，抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(KD)表示。亲和力可以通过本领域已知的通常方法测量，包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离，而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长时间的结合。测量结合亲和力的多种方法是本领域中已知的，其中的任何方法均可以用于本发明的目的。

[0644] 除非另有说明，否则抗体或其抗原结合片段的效力通常表示为以ng/ml计的IC50值。IC50是抗体分子的半数抑制浓度。在功能测定中，IC50是将生物应答降低其最大值的50％的浓度。在配体结合研究中，IC50是减少受体结合达最大特异性结合水平的50％的浓度。IC50可以通过本领域已知的任何数目的方法来计算。

[0645] 与参考抗体相比，本发明的抗体或其抗原结合片段的效力的改进倍数可以是至少约2倍、至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍、至少约110倍、至少约120倍、至少约130倍、至少约140倍、至少约150倍、至少约160倍、至少约170倍、或至少约180倍或更多。

[0646] 除非另有说明，抗体的结合效力通常表示为以nM或pM计的EC50值。EC50是在具体暴露时间后诱导基线和最大值之间的中值应答的药物浓度。EC50可以通过本领域已知的任何数目的方法来计算。

[0647] 抗体制备

[0648] 本发明的抗体可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得，并且它们的效用通过常规结合研究来证实—示例性方法描述于实例2中。举例来说，简单的结合测定是用抗体孵育表达抗原的细胞。如果将抗体用荧光团标记，则可以通过FACS分析来检测抗体与抗原的结合。

[0649] 本发明的抗体可以在多种动物中产生，包括小鼠、大鼠、兔、山羊、绵羊、猴或马。可以在用单个荚膜多糖或用多种荚膜多糖进行免疫后产生抗体。从这些动物中分离出的血液含有多克隆抗体—与同一抗原结合的多种抗体。也可以将抗原注射到鸡中以在蛋黄中产生多克隆抗体。为了获得对抗原的单个表位具有特异性的单克隆抗体，从动物中分离出分泌抗体的淋巴细胞，并通过将它们与癌细胞系融合而使其永生化。融合的细胞被称为杂交瘤，并且在培养中会不断生长并分泌抗体。通过稀释克隆法分离单个杂交瘤细胞以生成均产生同一抗体的细胞克隆；这些抗体被称为单克隆抗体。用于生产单克隆抗体的方法是本领域技术人员已知的常规技术(参见例如，Making and Using Antibodies:A Practical Handbook.[制备和使用抗体:实用手册]GC Howard.CRC Books.2006.ISBN 0849335280)。通常使用蛋白A/G或抗原亲和色谱法纯化多克隆和单克隆抗体。

[0650] 本发明的抗体或其抗原结合片段可制备为单克隆抗B7-H4抗体，其可使用杂交瘤方法制备，如Kohler和Milstein,Nature[自然]256:495(1975)描述的那些方法。使用杂交瘤方法，如上所述对小鼠、仓鼠、或其他适当的宿主动物进行免疫，以引发淋巴细胞产生会特异性地结合免疫抗原的抗体。淋巴细胞也可以在体外被免疫。免疫后，分离淋巴细胞，并利用例如聚乙二醇与合适骨髓瘤细胞系融合，以形成可随后从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞选择出的杂交瘤细胞。然后可以在体外培养物中使用标准方法(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice[单克隆抗体:原理和实践],Academic Press[学术出版社],1986)或在体内作为动物的腹水肿瘤繁殖杂交瘤，这些杂交瘤产生特异性针对选定的抗原的单克隆抗体，如通过免疫沉淀法、免疫印迹法、或体外结合测定(例如，放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))所测定的。然后可以使用已知的方法从培养基或腹水中纯化单克隆抗体。

[0651] 可替代地，该抗体或其抗原结合片段(例如，单克隆抗体)还可以使用如在美国专利号4,816,567中所述的重组DNA方法制备。从成熟B细胞或杂交瘤细胞、例如通过使用寡核苷酸引物(其特异性扩增编码抗体的重链和轻链的基因)的RT-PCR分离编码单克隆抗体的多核苷酸，并且使用常规程序测定它们的序列。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到合适的表达载体中，这些表达载体在转染到不产生免疫球蛋白的宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞)中时，由这些宿主细胞生产单克隆抗体。此外，所希望物种的重组单克隆抗体或其抗原结合片段可从表达所希望物种的CDR的噬菌体展示文库中分离，如以下文献所述:McCafferty等人,Nature[自然]348:552-554(1990)；Clackson等人,Nature[自然],352:624-628(1991)；和Marks等人,J.Mol.Biol[分子生物学杂志]222:581-597(1991)。

[0652] 编码本发明的抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸可进一步使用重组DNA技术以多种不同的方式被修饰以产生替代性抗体。在一些实施例中，例如，小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可以被(1)例如人抗体的那些区域取代以产生嵌合抗体，或被(2)非免疫球蛋白多肽取代以产生融合抗体。在一些实施例中，截短或去除这些恒定区

以产生所希望的单克隆抗体的抗体片段。定点诱变或高密度诱变可变区可以用于优化单克隆抗体的特异性、亲和力等。

[0653] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段。可以使用本领域已知的不同技术来直接制备人抗体。可以产生在体外免疫的或从产生针对靶抗原的抗体的免疫个体分离的永生化人B淋巴细胞。参见例如，Cole等人，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症治疗]，Alan R.Liss，第77页(1985)；Boemer等人，J.Immunol.[免疫学杂志]147(1):86-95(1991)；美国专利5,750,373。

[0654] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段可选自噬菌体文库，其中该噬菌体文库表达人抗体，如以下文献所述：例如，Vaughan等人，Nat.Biotech.[自然生物技术]14:309-314(1996)；Sheets等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]，95:6157-6162(1998)；Hoogenboom和Winter，J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]227:381(1991)；以及Marks等人，J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]222:581(1991)。用于产生和使用抗体噬菌体文库的技术还描述于美国专利号5,969,108、6,172,197、5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915、6,593,081、6,300,064、6,653,068、6,706,484和7,264,963；以及Rothe等人，J.Molec.Biol.[分子生物学杂志]376:1182-1200(2008)中，将这些专利各自通过引用以其全文并入。

[0655] 亲和力成熟策略和链改组策略是本领域已知的，并且可用于产生高亲和力人抗体或其抗原结合片段。参见Marks等人，BioTechnology[生物技术]10:779-783(1992)，将其通过引用以其全文并入。

[0656] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段(例如，单克隆抗体)可以是人源化抗体。用于工程化、人源化或表面重修非人抗体或人抗体的方法也可以使用并且是本领域熟知的。人源化、表面重修或类似工程化的抗体可以具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基，该来源例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些非人氨基酸残基被通常称为“输入”残基的残基替换，这些残基典型地取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。此类输入序列可以用于降低免疫原性或减小、增强或改变结合、亲和力、结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期、或如本领域已知的任何其他合适的特征。合适地，CDR残基可直接且最实质性地参与影响B7-H4结合。因此，优选地保持部分或全部非人或人CDR序列，同时可变区和恒定区的非人序列可以被人氨基酸或其他氨基酸替换。

[0657] 抗体还可以任选地被人源化、表面重修、工程化或人抗体工程化，其中保留针对抗原B7-H4的高亲和力以及其他有利生物性质。为实现这个目标，人源化(或人)或工程化的抗B7-H4抗体以及表面重修的抗体可任选地通过使用亲本、工程化和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化和工程化产物的方法来制备。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的并且对于本领域普通技术人员而言是熟悉的。说明并展示所选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原如B7-H4的能力的残基。按照此方式，可以从共有序列和输入的序列中选择并且组合FW残基，这样使得所希望的抗体特征(如增加对一种或多种靶抗原的亲和力)得以实现。

[0658] 本发明的抗B7-H4抗体或其抗原结合片段的人源化、表面重修或工程化可使用任

何已知方法进行,例如但不限于描述于以下文献中的那些:Jones等人,Nature[自然]321:522(1986);Riechmann等人,Nature[自然]332:323(1988);Verhoeyen等人,Science[科学]239:1534(1988);Sims等人,J.Immunol.[免疫学杂志]151:2296(1993);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]196:901(1987);Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.[免疫学杂志]151:2623(1993);美国专利号5,639,641、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567、7,557,189、7,538,195和7,342,110;国际申请号PCT/US98/16280、PCT/US96/18978、PCT/US91/09630、PCT/US91/05939、PCT/US94/01234、PCT/GB89/01334、PCT/GB91/01134、PCT/GB92/01755;国际专利申请公开号WO 90/14443、WO 90/14424、WO 90/14430;以及欧洲专利公开号EP 229246;将其各自通过引用全部并入本文,包括其中引用的参考文献。

[0659] 抗B7-H4人源化抗体及其抗原结合片段还可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备,这些基因座在免疫时能够在内源性免疫球蛋白不存在的情况下产生全套人抗体。这种方法描述于美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、以及5,661,016中。

[0660] 在一个实施例中,提供了抗体(例如抗B7-H4抗体)的片段(例如抗体片段)。已知各种用于生产抗体片段的技术。传统上,这些片段通过完整抗体的蛋白水解衍生,例如由Morimoto等人,J.Biochem.Biophys.Meth.[生物化学和生物物理方法杂志]24:107-117(1993)以及Brennan等人,Science[科学]229:81(1985)所描述的。在一个实施例中,重组产生抗B7-H4抗体片段。所有Fab、Fv和scFv抗体片段都可以在大肠杆菌或其他宿主细胞中表达并且从其分泌,因而允许产生大量的这些片段。此类抗B7-H4抗体片段也可以从以上论述的抗体噬菌体文库分离。这些抗B7-H4抗体片段还可以是如美国专利号5,641,870中所述的线性抗体。用于产生抗体片段的其他技术对于熟练的从业人员将是清楚的。

[0661] 根据本发明,技术可经改编以产生对B7-H4具有特异性的单链抗体。参见例如,美国专利号4,946,778。此外,方法可经改编以构建Fab表达文库,以允许快速且有效地鉴定针对B7-H4或其衍生物、片段、类似物或同源物具有所希望特异性的单克隆Fab片段。参见例如,Huse等人,Science[科学]246:1275-1281(1989)。抗体片段可通过本领域已知的技术来产生,包括但不限于:由胃蛋白酶消化抗体分子产生的F(ab')2片段;通过还原F(ab')2片段的二硫键产生的Fab片段;通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的Fab片段;或Fv片段。

[0662] 在一个实施例中,可以对本发明的抗体或其抗原结合片段进行修饰以增加其血清半衰期。这可以例如通过将补救受体结合表位掺入抗体或抗体片段中,通过使抗体或抗体片段中的适当的区域突变,或通过将表位并入随后融合在抗体或抗体片段的末端或中部的肽标签(例如,通过DNA或肽合成),或通过YTE突变来实现。本领域中已知其他增加抗体或其抗原结合片段的血清半衰期的方法,例如,缀合至异源分子如PEG。

[0663] 如本文所提供的经修饰的抗体或其抗原结合片段可以包含任何类型的提供该抗体或多肽与B7-H4的缔合的可变区。在这点上,可变区可构成或衍生自可诱导增加体液应答并生成针对所希望抗原的免疫球蛋白的任何类型的哺乳动物。正因如此,抗B7-H4抗体或其

抗原结合片段的可变区可以是例如人、鼠、非人灵长类动物(例如,食蟹猴、猕猴等)或狼来源的。在一个实施例中,经修饰的抗体或其抗原结合片段的可变区和恒定区均是人的。在一个实施例中,相容性抗体的可变区(通常衍生自非人来源)可经工程化或专门定制来改进结合性质或减少分子的免疫原性。在这点上,在本发明中有用的可变区可经人源化或另外通过纳入输入的氨基酸序列改变。

[0664] 在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段的重链和轻链二者中的可变结构域通过至少部分替换一个或多个CDR和/或通过部分框架区替换和序列改变而被改变。虽然CDR可以衍生自与框架区所衍生自的抗体相同的类别或甚至子类别的抗体,但是设想CDR将衍生自不同类别的抗体并且在某些实施例中衍生自不同物种的抗体。不必用来自供体可变区的完整CDR来替换所有CDR以将一个可变域的抗原结合能力转移至另一个。而是,只需要转移维持抗原结合位点的活性所必需的那些残基。考虑到在美国专利号5,585,089、5,693,761、和5,693,762中所阐明的解释,本领域技术人员完全有能力通过进行常规实验获得具有减少的免疫原性的功能抗体。

[0665] 尽管对可变区进行改变,本领域技术人员将理解,本发明的经修饰的抗体或其抗原结合片段将包含抗体(例如,全长抗体或其抗原结合片段),其中至少一个或多个恒定区结构域的一部分已被缺失或以其他方式改变,以便提供所希望的生物化学特征,如当与包含天然或未改变的恒定区的具有大约相同免疫原性的抗体相比时增加的肿瘤定位或减少的血清半衰期。在一个实施例中,经修饰的抗体的恒定区将包含人恒定区。对与本发明兼容的恒定区的修饰包括在一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文披露的经修饰的抗体可包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。在一个实施例中,考虑了经修饰的恒定区,其中一个或多个结构域部分或全部缺失。在一个实施例中,经修饰的抗体将包含结构域缺失的构建体或变体,其中整个CH2结构域被去除(ΔCH2构建体)。在一个实施例中,省略的恒定区结构域可被短氨基酸间隔子(例如,10个残基)替换,该间隔子提供通常由不存在的恒定区所赋予的一定分子柔性。

[0666] 除它们的构型以外,本领域中已知恒定区介导几种效应子功能。例如,抗体经由Fc区结合至细胞,其中抗体Fc区上的Fc受体位点结合至细胞上的Fc受体(FcR)。存在许多对于不同类别的抗体具有特异性的Fc受体,包括IgG(γ受体)、IgE(η受体)、IgA(α受体)、以及IgM(μ受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合触发许多重要并且多样的生物应答,包括抗体包覆的颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、杀灭细胞溶解抗体包覆的靶细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介体的释放、胎盘转移、以及对免疫球蛋白产生的控制。

[0667] 在一个实施例中,抗体或其抗原结合片段提供改变的效应子功能,进而影响施用的抗体或其抗原结合片段的生物学特性。例如,恒定区结构域的缺失或失活(经由点突变或其他手段)可以减少循环的经修饰的抗体的Fc受体结合。在其他情况下,与本发明一致的,恒定区修饰可以缓和补体结合并且因而减少缀合的细胞毒素的血清半衰期和非特异性缔合。恒定区的又其他修饰可以用于消除二硫键或寡糖部分,从而允许由于抗原特异性或抗体灵活性增加而增强定位。类似地,根据本发明对恒定区的修饰可容易地使用技术人员认知范围内的熟知的生物化学或分子工程技术进行。

[0668] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段不具有一种或更多种效应子功能。例如，在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段不具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性和/或不具有补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段不结合Fc受体和/或补体因子。在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段不具有效应子功能。

[0669] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段可以被工程化以将CH3结构域直接融合到相应的经修饰的抗体或其片段的铰链区。在其他构建体中，可以将肽间隔子插在铰链区与经修饰的CH2和/或CH3结构域之间。例如，可表达相容性构建体，其中CH2结构域已经缺失，且剩余的CH3结构域(经修饰的或未修饰的)与具有5-20个氨基酸的间隔子的铰链区结合。可添加此间隔子，例如以确保恒定结构域的调节元件保持游离且可接触，或者铰链区保持柔性。在一些情况中，氨基酸间隔子可被证明具有免疫原性，并引发针对构建体的非所需免疫应答。在一个实施例中，添加至构建体的任何间隔子都可以是相对无免疫原性的，或甚至被完全省略，以便维持经修饰的抗体的所希望的生物化学性质。

[0670] 除了缺失整个恒定区结构域之外，本文提供的抗体或其抗原结合片段可通过恒定区中的几个或甚至单个氨基酸的部分缺失或取代来修饰。例如，CH2结构域中的选定区域中的单个氨基酸的突变可足以实质性地减少Fc结合，并且从而增加肿瘤定位。类似地，控制效应子功能(例如，补体C1Q结合)的一个或多个恒定区结构域可以完全或部分缺失。恒定区的这类部分缺失可以改进该抗体或其抗原结合片段的选定特征(例如，血清半衰期)，同时使与受试者恒定区结构域相关的其他所希望的功能保持完整。此外，该抗体及其抗原结合片段的恒定区可通过增强所得构建体特性的一个或多个氨基酸的突变或取代来修饰。在这个方面，可以干扰保守结合位点所提供的活性(例如，Fc结合)，同时基本上维持经修饰的抗体或其抗原结合片段的构型和免疫原性特性。在一个实施例中，可以向恒定区添加一个或多个氨基酸以增强期望特征，如减少或增加效应子功能，或提供更多细胞毒素或碳水化合物附接。在一个实施例中，可以希望插入或复制衍生自选定的恒定区结构域的特定序列。

[0671] 本发明进一步包括与本发明的抗体或抗原结合片段(例如，鼠、嵌合、人源化或人抗体或其抗原结合片段)基本同源的变体和等效物。这些可以含有例如保守取代突变，即通过相似的氨基酸取代一个或多个氨基酸。例如，保守取代是指用相同通用类别内的另一个氨基酸取代一个氨基酸，例如像，用另一个酸性氨基酸取代一个酸性氨基酸、用另一个碱性氨基酸取代一个碱性氨基酸或用另一个中性氨基酸取代一个中性氨基酸。保守氨基酸取代所指的内容在本领域是熟知的。

[0672] 在一个实施例中，该抗体或其抗原结合片段可以被进一步修饰为含有通常不是蛋白质的一部分的另外的化学部分。那些衍生的部分可以改进蛋白质的溶解性、生物半衰期、或吸收。这些部分还可以减少或消除蛋白质的任何所希望的副作用等。对那些部分的综述可以在Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]，第22版，Lloyd V.Allen,Jr.编辑，(2012)中发现。

[0673] 定义

[0674] 以下定义特别涉及对以上拓扑异构酶I抑制剂的描述，并且甚至可能更特别地涉及标题为“进一步的偏好”的部分。

[0675] C_{5-6}亚芳基：如本文所使用的，术语“C_{5-6}亚芳基”涉及通过从芳香族化合物的芳香族环原子上除去两个氢原子而获得的二价部分。

[0676] 在本文中，前缀(例如C_{5-6})表示环原子的数量或环原子数量的范围，无论是碳原子还是杂原子。

[0677] 环原子可以都是碳原子，如“碳亚芳基基团”中那样，在这种情况下，该基团是亚苯基(C_6)。

[0678] 可替代地，环原子可以包括一个或多个杂原子，如“杂亚芳基基团”中那样。杂亚芳基基团的实例包括但不限于衍生自如下的那些：

[0679] N_1：吡咯(氮杂茂(azole))(C_5)、吡啶(吖嗪(azine))(C_6)；

[0680] O_1：呋喃(氧杂环戊二烯(oxole))(C_5)；

[0681] S_1：噻吩(硫杂环戊二烯(thiole))(C_5)；

[0682] N_1O_1：噁唑(C_5)、异噁唑(C_5)、异噁嗪(isoxazine)(C_6)；

[0683] N_2O_1：噁二唑(呋咱)(C_5)；

[0684] N_3O_1：噁三唑(C_5)；

[0685] N_1S_1：噻唑(C_5)、异噻唑(C_5)；

[0686] N_2：咪唑(1,3-二唑)(C_5)、吡唑(1,2-二唑)(C_5)、哒嗪(1,2-二嗪)(C_6)、嘧啶(1,3-二嗪)(C_6)(例如胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶)、吡嗪(1,4-二嗪)(C_6)；以及

[0687] N_3：三唑(C_5)，三嗪(C_6)。

[0688] C_{1-4}烷基：如本文所使用的，术语“C_{1-4}烷基”涉及通过从具有从1至4个碳原子的碳氢化合物的碳原子上除去氢原子而获得的单价部分，该碳氢化合物可以是脂肪族或脂环族，并且可以是饱和或不饱和的(例如部分不饱和、完全不饱和)。如本文所使用的，术语“C_{1-n}烷基”涉及通过从具有从1至n个碳原子的碳氢化合物的碳原子上除去氢原子而获得的单价部分，该碳氢化合物可以是脂肪族或脂环族，并且可以是饱和或不饱和的(例如部分不饱和、完全不饱和)。因此，术语“烷基”包括以下论述的亚类：烯基、炔基、环烷基等。

[0689] 饱和烷基基团的实例包括但不限于甲基(C_1)、乙基(C_2)、丙基(C_3)和丁基(C_4)。

[0690] 饱和直链烷基基团的实例包括但不限于甲基(C_1)、乙基(C_2)、正丙基(C_3)和正丁基(C_4)。

[0691] 饱和支链烷基基团的实例包括异丙基(C_3)、异丁基(C_4)、仲丁基(C_4)和叔丁基(C_4)。

[0692] C_{2-4}烯基：如本文所使用的，术语“C_{2-4}烯基”涉及具有一个或多个碳-碳双键的烷基基团。

[0693] 不饱和烯基基团的实例包括但不限于乙烯基(ethenyl、vinyl)(-CH=CH_2)、1-丙烯基(-CH=CH-CH_3)、2-丙烯基(烯丙基，-CH-CH=CH_2)、异丙烯基(1-甲基乙烯基，-C(CH_3)=CH_2)和丁烯基(C_4)。

[0694] C_{2-4}炔基：如本文所使用的，术语“C_{2-4}炔基”涉及具有一个或多个碳-碳三键的烷基基团。

[0695] 不饱和炔基基团的实例包括但不限于乙炔基(-C≡CH)和2-丙炔基(炔丙基，-CH_2-C≡CH)。

[0696] C_{3-4}环烷基：如本文所使用的，术语“C_{3-4}环烷基”涉及也是一个环基基团的烷基基团；即，通过从环状碳氢(碳环)化合物的脂环族环原子上除去氢原子而获得的一价部分，该部分具有从3至7个碳原子，包括从3至7个环原子。

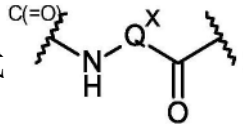
[0697] 环烷基基团的实例包括但不限于衍生自如下的那些：

[0698] 饱和单环碳氢化合物：

[0699] 环丙烷(C_3)和环丁烷(C_4)；以及

[0700] 不饱和单环碳氢化合物：

[0701] 环丙烯(C_3)和环丁烯(C_4)。

[0702] 连接标签：在式  中，上标C(=O)和NH表示原子所键合的基团。

例如，NH基团显示与羰基(其不是所示部分的一部分)结合，并且羰基显示与NH基团(其不是所示部分的一部分)结合。

[0703] 盐

[0704] 可以方便地或令人希望地制备、纯化、和/或处理活性化合物/药剂的对应的盐，例如药学上可接受的盐。药学上可接受的盐的实例在Berge等人，J.Pharm.Sci.[药物科学杂志]，66，1-19(1977)中论述。

[0705] 例如，如果化合物是阴离子的、或具有可以是阴离子的官能团(例如，-COOH可以是-COO^-)，则可以与适当的阳离子形成盐。合适的无机阳离子的实例包括但不限于碱金属离子如Na^+和K^+、碱土金属阳离子如Ca^{2+}和Mg^{2+}、以及其他阳离子如Al^{+3}。合适的有机阳离子的实例包括但不限于铵离子(即NH_4^+)和经取代的铵离子(例如NH_3R^+、$NH_2R_2^+$、NHR_3^+、NR_4^+)。一些合适的经取代的铵离子的实例是衍生自如下的那些：乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇、以及氨基酸(如赖氨酸和精氨酸)。常见的季铵离子的实例是$N(CH_3)_4^+$。

[0706] 如果化合物是阳离子的、或具有可以是阳离子的官能团(例如，-NH_2可以是-NH_3^+)，则可以与适当的阴离子形成盐。合适的无机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下无机酸的那些：盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸和亚磷酸。

[0707] 合适的有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下有机酸的那些：2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、乙二胺四乙酸(edetic)、乙二磺酸(ethanedisulfonic)、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸(glucheptonic)、葡糖酸、谷氨酸、乙醇酸、羟基马来酸、羟基萘甲酸、羟基乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘液酸、油酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、酒石酸、甲苯磺酸、三氟乙酸和戊酸。合适的聚合有机阴离子的实例包括但不限于衍生自以下聚合酸的那些：单宁酸、羧甲基纤维素。

[0708] 溶剂化物

[0709] 可以方便地或令人希望地制备、纯化、和/或处理活性化合物的对应的溶剂化物。术语“溶剂化物”在本文中以常规意义使用，是指溶质(例如活性化合物、活性化合物的盐)和溶剂的复合物。如果溶剂是水，则溶剂化物可以方便地称为水合物，例如一水合物、二水合物、三水合物等。

[0710] 异构体

[0711] 本发明的某些化合物/药剂能以一种或多种特定的几何、光学、对映异构、非对映异构、差向异构、阻转异构、立体异构、互变异构、构象或异头形式(anomeric form)存在，包

括但不限于顺式和反式形式;E-和Z-形式;c-、t-、和r-形式;内-和外-形式;R-、S-、和内消旋-形式;D-和L-形式;d-和l-形式;(+)和(-)形式;酮-、烯醇-、和烯醇化物-形式;顺式-和反式-形式;向斜-和背斜-形式;α-和β-形式;轴向和赤道形式;船型-、椅型-、扭曲-、信封型-、和半椅型-形式;及其组合,在下文中统称为"异构体"(或"异构形式")。

[0712] 术语"手性"是指具有镜像配偶体的不可重叠性的分子,而术语"非手性"是指可叠加在其镜像配偶体上的分子。

[0713] 术语"立体异构体"是指具有相同化学组成、但关于原子或基团在空间中的排列上不同的化合物。

[0714] "非对映异构体"是指具有两个或更多个手性中心并且其分子不是彼此镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理特性,例如熔点、沸点、光谱性质和反应性。非对映异构体的混合物可以在高分辨率分析程序(例如电泳和色谱)下分离。

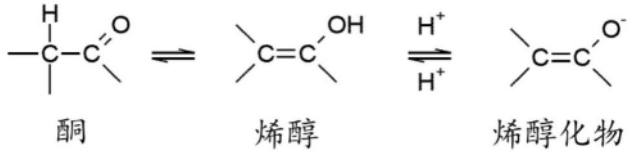
[0715] "对映异构体"是指化合物的两种立体异构体,它们是彼此不可重叠的镜像。

[0716] 本文所用的立体化学定义和惯例通常遵循S.P.Parker,编辑,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms[麦格劳-希尔化学术语词典](1984)麦格劳-希尔出版社,纽约;以及Eliel,E.和Wilen,S.,"Stereochemistry of Organic Compound"[有机化合物的立体化学],John Wiley&Sons,Inc.[约翰威利父子公司],纽约,1994。本发明的化合物可以含有不对称或手性中心,因此以不同的立体异构形式存在。意图是本发明化合物的所有立体异构形式(包括但不限于非对映异构体、对映异构体和阻转异构体及其混合物,例如外消旋混合物)均构成本发明的一部分。许多有机化合物以旋光活性形式存在,即它们具有旋转平面偏振光的平面的能力。在描述光学活性化合物时,前缀D和L、或R和S用于表示分子围绕其一个或多个手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用来表示该化合物使平面偏振光旋转的符号,其中(-)或l表示该化合物是左旋的。带有(+)或d前缀的化合物是右旋的。对于给定的化学结构,这些立体异构体是相同的,只是它们是彼此的镜像。特定的立体异构体也可以被称为对映异构体,并且这种异构体的混合物通常被称为对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物称为外消旋混合物或外消旋体,它们可以发生在化学反应或过程中没有立体选择或立体特异性的地方。术语"外消旋混合物"和"外消旋物"是指两种对映异构体种类的等摩尔混合物,没有旋光活性。

[0717] "对映异构体富集形式"是指手性物质的样品,其对映体比率大于50:50但小于100:0。

[0718] 注意,除下文关于互变异构形式所论述的以外,如本文所使用的术语"异构体"特别排除的是结构(或构成)异构体(即,在原子之间的连接而不仅仅是在原子在空间上的位置不同的异构体)。例如,对甲氧基基团(-OCH_3)的引用不应被解释为对其结构异构体羟甲基基团(-CH_2OH)的引用。类似地,对邻氯苯基的引用不应被解释为对其结构异构体间氯苯基的引用。但是,对一类结构的引用很可能包括属于该类的结构异构形式(例如C_{1-7}烷基包括正丙基和异丙基;丁基包括正、异、仲和叔丁基;甲氧基苯基包括邻、间和对甲氧基苯基)。

[0719] 上面的排除不涉及互变异构体形式,例如酮、烯醇和烯醇酸酯形式,例如像以下互变异构体对:酮/烯醇(如下所示)、亚胺/烯胺、酰胺/亚胺醇(imino alcohol)、脒/烯二胺(enediamine)、亚硝基/肟、硫酮/烯硫醇(enethiol)、N-亚硝基/羟基偶氮(hyroxyazo)和硝基/酸硝基(aci-nitro)。

[0720] 

[0721] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指经由低能障可相互转化的不同能量的结构异构体。例如,质子互变异构体(也称为质子异变互变异构体)包括经由质子迁移的相互转化,例如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。效价互变异构体包括通过一些价电子的重组而进行的相互转化。

[0722] 注意,术语“异构体”中具体包括的是具有一个或多个同位素取代的化合物。例如,H可以是任何同位素形式,包括^{1}H、^{2}H(D)、和^{3}H(T);C可以是任何同位素形式,包括^{12}C、^{13}C、和^{14}C;O可以是任何同位素形式,包括^{16}O和^{18}O;等。

[0723] 可以掺入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素,例如但不限于^{2}H(氘,D)、^{3}H(氚)、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}F、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{36}Cl、和^{125}I。本发明的各种同位素标记的化合物,例如其中掺入了放射性同位素如3H、13C和14C的那些。此类同位素标记的化合物可用于代谢研究、反应动力学研究、检测或成像技术(例如正电子发射断层扫描(PET)或单光子发射计算机断层扫描(SPECT),包括药物或基质组织分布测定),或用于患者的放射治疗。本发明的氘标记的或经取代的治疗性化合物可以具有与分布、代谢和排泄(ADME)有关的改善的DMPK(药物代谢和药代动力学)特性。用较重同位素(如氘)取代可能会提供某些治疗优势(由于更高的代谢稳定性),例如增加的体内半衰期或减少的剂量要求。18F标记的化合物可用于PET或SPECT研究。本发明的同位素标记的化合物及其前药通常可以通过进行以下描述的方案中或实例和制备中披露的方法来制备,该方法是用容易获得的同位素标记的试剂取代非同位素标记的试剂。此外,用较重的同位素(尤其是氘(即2H或D))取代可以提供某些治疗优势(由于更高的代谢稳定性而),例如增加的体内半衰期或降低的剂量要求或治疗指数的改善。应当理解,在本文中氘被视为取代基。这样的较重同位素(特别是氘)的浓度可以由同位素富集因子定义。在本发明的化合物中,未特别指定为特定同位素的任何原子均表示该原子的任何稳定同位素。

[0724] 除非另有说明,否则对特定化合物的引用包括所有此类异构体形式,包括(全部或部分)外消旋体及其其他混合物。此类异构体形式的制备(例如,不对称合成)和分离(例如,分级结晶和色谱方式)的方法是本领域已知的,或者通过以已知方式采用本文教导的方法或已知方法是容易地获得的。

[0725] 序列同源性

[0726] 可以使用多种序列比对方法中的任一种来确定同一性百分比,包括但不限于全局方法、局部方法和混合方法,例如像区段方法。确定同一性百分比的方案是本领域技术人员范围内的常规程序。全局方法从分子的开头到结尾比对序列,并通过将单个残基对的评分相加以及施加空位罚分来确定最佳比对。非限制性方法包括例如CLUSTAL W,参见例如Julie D.Thompson等人,CLUSTAL W:Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting,Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice[CLUSTAL W:通过序列加权、位置特定空位罚分和权重矩阵选择来提高渐进式多序列比对的灵敏度],22(22)Nucleic Acids Research[核酸

研究]4673-4680(1994);以及迭代细化,参见例如Osamu Gotoh,Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein.Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments[通过利用参考结构比对而评估的迭代细化,多种蛋白质序列比对的准确度显著提高],264(4)J.MoI.Biol.[分子生物学杂志]823-838(1996)。局部方法通过鉴定所有输入的序列共享的一个或多个保守基序来比对序列。非限制性方法包括例如Match-box,参见例如Eric Depiereux和Ernest Feytmans,Match-Box:AFundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences[Match-Box:一种用于同时比对多个蛋白质序列的全新算法],8(5)CABIOS 501 -509(1992);吉布斯采样,参见例如,C.E.Lawrence等人,Detecting Subtle Sequence Signals:A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment[检测细微序列信号:用于多重比对的吉布斯采样策略],262(5131)Science[科学]208-214(1993);Align-M,参见例如,Ivo Van WaIIe等人,Align-M-A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences[Align-M-高度发散序列的多重比对的新算法],20(9)Bioinformatics[生物信息学]:1428-1435(2004)。

[0727] 因此,通过常规方法确定序列同一性百分比。参见例如,Altschul等人,Bull.Math.Bio.[数学生物学通报]48:603-16,1986,以及Henikoff和Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915-19,1992。简而言之,使用空位开放罚分10、空位延伸罚分1、以及如下所示的Henikoff和Henikoff(如前所述)的“blosum 62”评分矩阵比对两个氨基酸序列以优化比对评分(氨基酸由标准的单字母代码表示)。

[0728] 两个或更多个核酸或氨基酸序列之间的“序列同一性百分比”是序列共有的相同位置数目的函数。因此,%同一性可以计算为相同核苷酸/氨基酸的数量除以核苷酸/氨基酸的总数,再乘以100。%序列同一性的计算还可以考虑空位的数量,以及需要引入以优化两个或更多个序列的比对的每个空位的长度。可以使用技术人员熟悉的特定数学算法(如BLAST)进行两个或更多个序列之间的序列比较和同一性百分比确定。

[0729] 用于确定序列同一性的比对评分

[0730] A R N D C Q E G H I L K M F P S T W Y V

[0731] A 4

[0732] R -1 5

[0733] N -2 0 6

[0734] D -2 -2 1 6

[0735] C 0 -3-3 -3 9

[0736] Q-1 1 0 0 -3 5

[0737] E-1 0 0 2 -4 2 5

[0738] G 0 -2 0 -1-3 -2-2 6

[0739] H-2 0 1 -1-3 0 0 -2 8

[0740] I-1 -3-3 -3-1 -3-3 -4-3 4

[0741] L-1 -2-3 -4-1 -2-3 -4-3 2 4

[0742] K-1 2 0-1 -3 1 1 -2-1 -3-2 5

[0743] M-1 -1-2 -3-1 0 -2-3 -2 1 2 -1 5

[0744] F-2 -3-3 -3-2 -3-3 -3-1 0 0 -3 0 6

[0745] P-1 -2-2 -1-3 -1-1 -2-2 -3-3 -1-2 -4 7

[0746] S 1-1 1 0 -1 0 0 0-1 -2-2 0 -1-2 -1 4

[0747] T 0 -1 0 -1-1 -1-1 -2-2-1 -1-1 -1-2 -1 1 5

[0748] W-3 -3-4 -4-2 -2-3 -2-2 -3-2 -3-1 1 -4-3 -2 11

[0749] Y-2 -2-2 -3-2 -1-2 -3 2 -1-1 -2-1 3 -3-2 -2 2 7

[0750] V 0 -3-3 -3-1 -2-2 -3-3 3 1 -2 1-1 -2-2 0 -3-1 4

[0751] 然后计算同一性百分比：

[0752] $$\frac{\text{相同匹配的总数}}{[\text{较长序列的长度加上引入较长序列以对齐两个序列的空位的数量}]} \times 100$$

[0753] 基本上同源的多肽的特征在于具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。这些变化优选地具有微小的性质，即，保守氨基酸取代(参见下文)和不显著影响多肽的折叠或活性的其他取代；小的缺失，通常为1至约30个氨基酸；以及小的氨基或羧基末端延伸，如氨基末端甲硫氨酸残基、最多约20-25个残基的小接头肽、或亲和标签。

[0754] 保守氨基酸取代

[0755] 碱性：精氨酸；赖氨酸；组氨酸

[0756] 酸性：谷氨酸；天冬氨酸

[0757] 极性：谷氨酰胺；天冬酰胺

[0758] 疏水性：亮氨酸；异亮氨酸；缬氨酸

[0759] 芳香族：苯丙氨酸；色氨酸；酪氨酸

[0760] 小的：甘氨酸；丙氨酸；丝氨酸；苏氨酸；甲硫氨酸

[0761] 除20种标准氨基酸外，非标准氨基酸(如4-羟基脯氨酸、6-N-甲基赖氨酸、2-氨基异丁酸、异缬氨酸和α-甲基丝氨酸)可以取代本发明多肽的氨基酸残基。有限数量的非保守氨基酸、不由遗传密码编码的氨基酸和非天然氨基酸可以取代多肽氨基酸残基。本发明的多肽还可包含非天然存在的氨基酸残基。

[0762] 非天然存在的氨基酸包括但不限于反式-3-甲基脯氨酸、2,4-桥亚甲基-脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸、反式-4-羟基-脯氨酸、N-甲基甘氨酸、别苏氨酸、甲基-苏氨酸、羟基-乙基半胱氨酸、羟基乙基高半胱氨酸、硝基-谷氨酰胺、高谷氨酰胺、哌可酸、叔亮氨酸、正缬氨酸、2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸和4-氟苯丙氨酸。用于将非天然存在的氨基酸残基掺入蛋白质中的几种方法是本领域已知的。例如，可以使用体外系统，其中使用化学氨酰化的抑制型tRNA抑制无义突变。用于合成氨基酸和氨酰化tRNA的方法是本领域已知的。含有无义突变的质粒的转录和翻译在无细胞系统中进行，该无细胞系统包含大肠杆菌S30提取物以及可商购的酶和其他试剂。通过色谱法纯化蛋白质。参见例如，Robertson等人,J.Am.Chem.Soc.[美国化学会志]113:2722,1991;Ellman等人,Methods Enzymol.[酶学方法]202:301,1991;Chung等人,Science[科学]259:806-9,1993;以及Chung等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:10145-9,1993)。在第二种

方法中,通过显微注射突变的mRNA和化学氨酰化的抑制型tRNA在爪蟾卵母细胞中进行翻译(Turcatti等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]271:19991-8,1996)。在第三种方法中,在不存在要替换的天然氨基酸(例如苯丙氨酸)和存在所需的一个或多个非天然存在的氨基酸(例如,2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸或4-氟苯丙氨酸)的情况下,培养大肠杆菌细胞。将非天然存在的氨基酸代替其天然对应物掺入多肽中。参见,Koide等人,Biochem.[生物化学]33:7470-6,1994。天然存在的氨基酸残基可以通过体外化学修饰转化为非天然存在的种类。化学修饰可以与定点诱变相结合,以进一步扩大替代范围(Wynn和Richards,Protein Sci.[蛋白质科学]2:395-403,1993)。

[0763] 有限数量的非保守氨基酸、不由遗传密码编码的氨基酸、非天然存在的氨基酸和非天然氨基酸可以替代本发明多肽的氨基酸残基。

[0764] 本发明多肽中的必需氨基酸可以根据本领域已知的方法鉴定,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells,Science[科学]244:1081-5,1989)。生物学相互作用位点还可通过对结构的物理分析来确定,如通过以下技术确定:核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲和标记,连同对推定的接触位点氨基酸进行突变。参见例如,de Vos等人,Science[科学]255:306-12,1992;Smith等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]224:899-904,1992;Wlodaver等人,FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]309:59-64,1992。必需氨基酸的同一性还可以从与本发明多肽的相关组分(例如易位组分或蛋白酶组分)的同源性分析中推断出来。

[0765] 可以使用已知的诱变和筛选方法来制造和测试多个氨基酸取代,这些方法如Reidhaar-Olson和Sauer(Science[科学]241:53-7,1988)或者Bowie和Sauer(Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:2152-6,1989)所披露的那些。简而言之,这些作者披露了用于同时随机化多肽中的两个或更多个位置、选择功能性多肽、然后对诱变的多肽进行测序以确定每个位置上允许的取代的范围的方法。可以使用的其他方法包括噬菌体展示(例如,Lowman等人,Biochem.[生物化学]30:10832-7,1991;Ladner等人,美国专利号5,223,409;Huse,WIPO公开WO 92/06204)和区域定向诱变(Derbyshire等人,Gene[基因]46:145,1986;Ner等人,DNA 7:127,1988)。

[0766] 可以使用已知的诱变和筛选方法来制造和测试多个氨基酸取代,这些方法如Reidhaar-Olson和Sauer(Science[科学]241:53-7,1988)或者Bowie和Sauer(Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:2152-6,1989)所披露的那些。简而言之,这些作者披露了用于同时随机化多肽中的两个或更多个位置、选择功能性多肽、然后对诱变的多肽进行测序以确定每个位置上允许的取代的范围的方法。可以使用的其他方法包括噬菌体展示(例如,Lowman等人,Biochem.[生物化学]30:10832-7,1991;Ladner等人,美国专利号5,223,409;Huse,WIPO公开WO 92/06204)和区域定向诱变(Derbyshire等人,Gene[基因]46:145,1986;Ner等人,DNA 7:127,1988)。

[0767] 除非另外定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本披露内容所属领域的技术人员通常所理解的相同的意义。Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY[微生物学和分子生物学词典],第20版,John Wiley and Sons[约翰威利父子公司],纽约(1994),以及Hale和Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY[哈珀柯林斯生物学词典],Harper Perennial[哈珀永久出版社],纽约州(1991)为

技术人员提供了本披露内容中所使用的许多术语的通用词典。

[0768] 本披露内容并不受本文披露的示例性方法和材料的限制,并且与本文所述的那些方法和材料相似或等同的任何方法和材料都可以用于本披露内容的实施例的实践或测试。数值范围包括限定该范围的数字。除非另外指明,否则分别地,任何核酸序列以5'到3'方向从左至右书写;氨基酸序列以氨基到羧基方向从左至右书写。

[0769] 本文提供的标题不是对本披露内容的各个方面或实施例的限制。

[0770] 在本文中使用氨基酸的名称、三字母缩写或单字母缩写来指代氨基酸。如本文所使用的,术语"蛋白质"包括蛋白质、多肽和肽。如本文所使用的,术语"氨基酸序列"与术语"多肽"和/或术语"蛋白质"同义。在一些情况下,术语"氨基酸序列"与术语"肽"同义。在一些情况下,术语"氨基酸序列"与术语"酶"同义。术语"蛋白质"和"多肽"在本文中可互换地使用。在本披露内容和权利要求书中,可以使用氨基酸残基的常规一字母和三字母代码。氨基酸的3字母代码遵照IUPACIUB生物化学命名联合委员会(Joint Commission on Biochemical Nomenclature,JCBN)的定义。还应当理解,由于遗传密码的简并性,多肽可以由多于一种核苷酸序列编码。

[0771] 术语的其他定义可在整个本说明书中出现。在更详细地描述示例性实施例之前,应理解本披露内容并不限于所描述的具体实施例,因而这些实施例可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅是为了描述具体实施例的目的,而并不意图是限制性的,因为本披露内容的范围仅由所附权利要求限定。

[0772] 在提供数值范围的情况中,应理解,该范围的上限和下限之间的每个中间值(至下限的个位的十分之一,除非上下文另有清楚规定)也被具体披露。在所陈述的范围中的任何规定值或中间值与所陈述的范围中的任何其他规定值或中间值之间的每个较小范围,被涵盖在本披露内容内。这些较小范围的上限和下限可独立地被包括或排除在该范围中,而且其中任一个、没有一个或两个极限值被包括在较小范围中的每个范围也被涵盖在本披露内容中,但依据所陈述的范围中的任何被具体排除的极限值而定。在所陈述的范围包含极限值的一个或两个的情况下,将那些所包含的极限值的一个或两个排除在外的范围也包含在本披露内容中。

[0773] 必须注意的是,如本文和所附权利要求所使用的,单数形式"一个/种(a/an)"和"该(the)"包括复数指示物,除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及"一种药剂"包括多种这样的药剂并且提及"该药剂"包括提及本领域技术人员已知的一种或多种药剂及其等效物,等等。

[0774] 本文所论述的出版物只是针对它们在本申请的提交日之前的披露内容而提供。本文中的任何内容均不应被解释为承认此类出版物构成所附权利要求的现有技术。

附图说明

[0775] 现在将参考以下附图和实例,仅以举例的方式描述本发明的实施例。

[0776] 图1A-1D显示了B7-H4在乳腺癌中的过表达。(A)TNBC(再处理);(B)HR+(处理前);(C)HER2+(处理前,符合赫赛汀治疗);(D)HER2+ve(赫赛汀治疗的)。

[0777] 图2A-2K显示了物种交叉反应性ELISA分析的结果。

[0778] 图3A-3G显示了克隆与B7-H4家族成员和同源物结合的ELISA分析的结果。

[0779] 图4A-4B显示了所选克隆(和商业抗体)与多种细胞类型结合的细胞蛋白质印迹分析的结果。E＝E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG;U＝US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG;R＝R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1;S＝Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1

[0780] 图5A-5F显示了选定的克隆的体外细胞毒性测定的结果。

[0781] 图6显示了对克隆ZYOEQD_EO2(以及其多种变体)进行的ELISA分析的结果,其证明了与人、食蟹猴、小鼠和大鼠B7-H4的结合。

[0782] 图7显示了对克隆EO2_GL进行的ELISA分析的结果,与1D11相比,表明EO2_GL与人B7-H4的结合得到改善。

[0783] 图8A-8B显示了对克隆EO2_GL进行的流式细胞术分析的结果,与1D11相比,表明EO2_GL与存在于细胞上的人B7-H4的结合得到改善。HT29细胞的结果显示在(A)中,SKBR-3细胞的结果显示在(B)中。符号◇表示'EO2-GL部分',符号□表示'1D11部分'。符号"●"表示(阴性)对照'R347组分'。

[0784] 图9A-9B显示了用EO2-GL-SG3932缀合物处理后人B7-H4转染的(和未转染的对照)Ad293细胞的细胞毒性。空心圆＝同种型对照ADC(例如NIP228-SG3932);实心圆＝EO2-GL-SG3932。

[0785] 图10A-10B显示了体外肿瘤细胞的旁观者杀伤(EO2-GL-SG3932)。

[0786] 图11显示了体内肿瘤细胞的旁观者杀伤(EO2-GL-SG3932)。

[0787] 图12显示EO2-GL-SG3932在患者源性异种移植(PDX)模型中具有有效的体内活性。空心圆＝仅媒介物对照;实心圆＝EO2-GL-SG3932(7mg/kg)。

[0788] 图13显示了以7mg/kg单次i.v.注射后,EO2-GL-SG3932在PDX模型中的抗肿瘤活性。

[0789] 图14A-14B显示EO2-GL-topo I抑制剂ADC在体外和体内的MX-1细胞(A);以及在体外和体内的HT29源性模型(B)中具有相似的效力。

[0790] 图15A-15B显示了用EO2-GL-SG3249缀合物处理后食蟹猴B7-H4转染的(和未转染的对照)HEK293细胞的细胞毒性。

[0791] 图16A-16C显示了内化实验的结果,证明了结合的EO2-GL-抗原复合物在活细胞中的内化。

[0792] 图17A-17B显示蛋白质印迹分析,证明EO2-GL-SG3932治疗导致体外双链DNA断裂;(图17C)显示在用缀合至SG3249的抗B7-H4抗体(更具体地为EO2-GL-SG3249)处理HCC1569细胞后,关键双链断裂标记物的蛋白质印迹分析。

[0793] 图18显示了用EO2-GL-SG3249处理后SKBR3细胞中的半胱天冬酶3/7活性。

[0794] 图19显示了EO2-GL-SG3249和弹头SG3199对肿瘤细胞的体外活性。

[0795] 图20A-20D显示了体外肿瘤细胞的旁观者杀伤(EO2-GL-SG3249)。

[0796] 图21A-21C显示与1D11 ADC相比,EO2_GL ADC具有改进的细胞毒性/效力。显示了针对表达人B7-H4的HT29细胞系(A)、SKBR3细胞系(B)和HCC1569细胞系(C)的比较性细胞毒性。

[0797] 图22A-22C显示了EO2-GL-SG3249对(A)OVCAR4细胞(顺铂难治性卵巢癌,高B7-H4)、(B)HCC1569细胞(HER2+乳腺癌,B7-H4的异源表达)和(C)MDA-MB-468细胞(三阴性乳腺

癌,低B7-H4表达)的肿瘤移植物的体内活性。

[0798] 图23显示了体内肿瘤细胞的旁观者杀伤。

[0799] 图24A-24O显示EO2-GL-SG3249在患者源性异种移植(PDX)模型中具有有效的体内活性。圆＝仅媒介物控制;正方形＝EO2-GL-SG3249(0.3mg/kg);三角形＝EO2-GL-SG3249(1.0mg/kg)。

[0800] 图25A-25B显示了在HCC1954肿瘤异种移植物(有和没有EO2-GL-SG3249)中的(A)γ-H2AX免疫组织化学(IHC)的结果,在(B)中量化为γ-H2AX阳性细胞的数量/mm^2(在目的组织区域内)(+/-S.E.M.)。使用HALO软件(利用CRO-OracleBio)进行图像分析。在EO2-GL-SG3249处理后长达10天,观察到γ-H2AX阳性肿瘤细胞的数量增加。

[0801] 图26A-26D显示了B7-H4 Ab在表达B7H4的肿瘤(HT29细胞)中的滞留。强度标度显示落射荧光强度。辐射效率＝(p/sec/cm^2/sr)/(μW/cm^2);强度标度,最小值＝1.20e8,最大值＝1.50e9。

[0802] 图27A-27D显示了B7-H4 Ab在表达B7H4的肿瘤(CT26细胞)中的滞留。强度标度显示落射荧光强度。辐射效率＝(p/sec/cm^2/sr)/(μW/cm^2);强度标度,最小值＝1.20e8,最大值＝1.50e9。

[0803] 图28A-28B显示了五个示例性抗体克隆的序列比对。

[0804] 图29A是靶向B7-H4的TOP1i-ADC的示意图。图29B显示了靶向B7-H4的TOP1i-ADC EO2-GL-SG3249的主要特性。

[0805] 图30显示了正常人和正常食蟹猴乳腺、胰腺、子宫颈、子宫内膜、输卵管(fallopian tube/oviduct)和肾组织中B7-H4表达的代表性免疫组织化学染色的示例图像。

[0806] 图31显示了人肿瘤组织中B7-H4表达的代表性免疫组织化学染色的示例图像,这些肿瘤组织包括乳腺癌(TNBC和ER+,参见个别图1A-1B)、胆管癌、NSCLC-SCC、子宫内膜肿瘤和卵巢肿瘤。

[0807] 图32是B7-H4直系同源比对。

[0808] 图33显示了抗体中间体EO2-INT和EO2-GL-SG3932通过DELFIA-ELISA方法和抗人IgG(H+L)与人B7 H4的结合。EO2-INT:EO2-GL-SG3932的抗体中间体;NIP228:同种型匹配的对照;huB7-H4:重组人B7-H4。

[0809] 图34显示抗体中间体EO2-INT与稳定表达人、鼠或食蟹猴B7-H4的HEK 293细胞的结合。EO2-INT:EO2-GL-SG3932的抗体中间体;HEK293 JI TREX:未转导的HEK293 JI TREX细胞;HEK293 JI TREX cynoB7-H4:稳定表达食蟹猴B7-H4的HEK 293细胞;HEK293 JI TREX huB7-H4:稳定表达人B7-H4的HEK 293细胞;HEK293 JI TREX muB7-H4:稳定表达鼠B7-H4的HEK 293细胞;MFI:平均荧光强度。y轴是平均荧光强度几何平均值。数据表现为三次重复测定的平均值±SD。

[0810] 图35显示抗体中间体EO2-INT和EO2-GL-SG3932与人乳腺癌细胞系以及与稳定表达人B7-H4的HT29细胞的结合。EO2-INT:EO2-GL-SG3932的抗体中间体;HT29-huB7-H4克隆4和HT29-huB7-H4克隆26:稳定表达人B7-H4的HT29细胞;MFI:平均荧光强度。y轴是平均荧光强度几何平均值。

[0811] 图36A-36C显示了EO2-GL-SG3932在细胞系HT29、HT29-huB7-H4克隆26和MX-1中的

体外细胞毒性活性。数据表现为三次重复测定的平均值±SD。

[0812] 图37显示了EO2-GL-SG3932的体外抗体依赖性细胞介导的细胞毒性活性。该图显示了六个实验的平均倍数变化±SEM。

[0813] 图38显示了以图像序列形式呈现的EO2-INT内化的时程。将人结肠癌细胞HT29-huB7-H4克隆26(第一行)和人乳腺癌细胞MX-1(第二行)用5μg/mL的与Alexa Fluor™ 568(红色)缀合的EO2-INT进行标记。比例尺为20μm。

[0814] 图39A-39C显示了EO2-INT在人癌细胞系HT29-huB7-H4克隆26和MX-1中内化的活细胞成像。(A)每个点代表平均内化百分比±3个独立孔的标准偏差,间隔为10分钟,持续480分钟。(B)8小时后的内化百分比,以及(C)显示了3个独立孔的预测半衰期。这些值是使用解离-单相指数式衰减方程得出的。水平条表示组内算术平均值;通过单向方差分析、Tukeys多重比较检验来评估统计显著性。ns:不显著;$p>0.05$;**$p<0.05$。

[0815] 图40A-40B显示抗体EO2-INT与HT29-huB7-H4克隆26细胞中的溶酶体共定位。(A)将HT29-huB7-H4克隆26细胞与5μg/mL的缀合Alexa Fluor™ 568抗体的EO2-INT一起孵育24小时[(A)红色-左上和左下]。将溶酶体用小鼠抗人LAMP1-Alexa Fluor™ 488抗体染色[(A)绿色-中上]。将内含体用兔抗人EEA1抗体染色,并用山羊抗兔IgG1-DyLight™ 650检测[(A)绿色-中下]。EO2-INT与LAMP1或EEA1的共定位显示在合并图像中。(B)通过皮尔逊相关系数、使用Zeiss Zen软件分析EO2-INT与EEA1和LAMP1的共定位。每个点代表单个细胞测量结果。通过单向方差分析、Tukeys多重比较检验来评估统计显著性。ns:不显著;$p>0.05$;****$p<0.0001$。

[0816] 图41是凝胶图片,显示了用EO2-GL-SG3932或TOP1i弹头SG3924处理的MX-1细胞中的DNA损伤应答信号。呈现的数据代表n:2个实验。

[0817] 图42是凝胶图片,显示了用EO2-GL-SG3932或TOP1i弹头SG3924处理的HT29-huB7-H4细胞中的DNA损伤应答信号。呈现的数据代表n:2个实验。

[0818] 图43A-43F是用EO2-GL-SG3932处理后在HT29-huB7-H4克隆26异种移植肿瘤中的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶3的免疫组织化学(IHC)染色图像。这些图像代表在单次IV施用7mg/kg EO2-GL-SG3932(43D-43F)或同种型匹配的对照ADC NIP228-SG3932(43A-43C)后168小时,在HT29-huB7-H4克隆26肿瘤异种移植模型中的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3的IHC染色。

[0819] 图44A-44D显示了在HT29 huB7 H4克隆26异种移植研究中跨所有时间点和处理的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3IHC染色的图像分析数据。顶部小图(44A):上皮细胞分析,显示所有上皮细胞中人IgG阳性上皮细胞的比例随时间的变化。第二小图(44B):γH2AX分析,显示在γH2AX测定中发现对病灶呈阳性的上皮细胞的比例。第三小图(44C):裂解的半胱天冬酶3(CC-3),显示了样品中裂解的半胱天冬酶-3阳性肿瘤细胞的随时间变化的百分比。底部小图(44D):样品中所有上皮细胞随时间变化的细胞密度,表明与同种型匹配的对照ADC NIP228-SG3932相比,EO2-GL-SG3932处理导致的细胞死亡。

[0820] 图45A-45B显示EO2-GL-SG3932在B7-H4阴性HT29异种移植模型中的功效(还参见图11)。值为平均值±SEM肿瘤体积,针对n:每组8只动物。虚线表示给药日。

[0821] 图46A-46C显示EO2-GL-SG3932在HT29-huB7-H4克隆26异种移植模型中的功效。值为平均值±SEM肿瘤体积,针对n:每组10或8只动物。虚线表示给药日。

[0822] 图47A和47B显示EO2-GL-SG3932、NIP228-SG3932和EO2-INT在MX-1异种移植模型中的功效。值为平均值±SEM肿瘤体积,针对n:每组8只动物。虚线表示给药日。

[0823] 图48显示EO2-GL-SG3932和NIP228-SG3932在MX-1异种移植模型中的功效。值为平均值±SEM肿瘤体积,针对n:每组3或6只动物。

[0824] 图49显示了EO2-GL-SG3932和NIP228-SG3932在MDA-MB-468异种移植模型中的功效。值为平均值±SEM肿瘤体积,针对n:每组3或6只动物。

[0825] 图50显示了患者源性异种移植(PDX)模型中B7-H4表达数据的定量图像分析,按细胞膜OD平均值的案例平均值排序。表达是由IHC细胞强度等级编码的颜色(阴性:黑色,1+:白色,2+:浅灰色,3+:深灰色。

[0826] 图51显示了在患者源性异种移植模型中单次施用1.25mg/kg EO2-GL-SG3932或NIP228-SG3932所产生的抗肿瘤活性。

[0827] 图52A和52B显示了在根据对1.25mg/kg剂量水平的EO2-GL-SG3932或NIP228-SG3932的肿瘤应答而分组的PDX模型中的B7-H4表达。如果肿瘤体积自基线的百分比变化为-30%至-100%(含端值),则认为模型对测试药剂有响应(R)。如果肿瘤体积自基线的百分比变化大于-30%,则模型被认为是非响应者(NR)。y轴表示每个模型中B7-H4的水平,如由H评分所确定的。

[0828] 图53A显示了在患者源性异种移植模型中单次施用3.5mg/kg EO2-GL-SG3932或NIP228-SG3932所产生的抗肿瘤活性。图53B-53E显示了在(A)1.25mg/kg EO2-GL-SG3932、(B)3.5mg/kg EO2-GL-SG3932、(C)1.25mg/kg同种型对照ADC、以及(D)3.5mg/kg同种型对照ADC下,用于确定EO2-GL-SG3932施用、B7-H4表达水平和HR缺陷的相互关系的研究方案的结果。在图53B-53E中,三角形“Δ”符号表示同源重组缺陷(如由BRCA突变或RAD51病灶测定所确定的)的模型。圆圈“●”符号表示没有同源重组缺陷的模型。

[0829] 图54A和54B显示了在根据对3.5mg/kg剂量水平的EO2-GL-SG3932或NIP228-SG3932的肿瘤应答而分组的PDX模型中的B7-H4表达。如果肿瘤体积自基线的百分比变化为-30%至-100%(含端值),则认为模型对测试药剂有响应(R)。如果肿瘤体积自基线的百分比变化大于-30%,则模型被认为是NR。y轴表示每个模型中B7 H4的水平,如由H评分所确定的。

[0830] 图55A-55G显示了与未处理的小鼠相比,用1.25mg/kg或3.5mg/kg单剂量的EO2-GL-SG3932处理的第一组胆管癌PDX小鼠模型的随时间变化的平均肿瘤体积。

[0831] 图56A-56K显示了与未处理的小鼠相比,用1.25mg/kg或3.5mg/kg单剂量的EO2-GL-SG3932处理的第二组胆管癌PDX小鼠模型的随时间变化的平均肿瘤体积。

[0832] 图57A-57B显示,与ADC 2-4相比,用可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-弹头制备的ADC在体内活性最高。图57A是图57B的关键。

[0833] 图58显示,与ADC 2-4相比,可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-弹头ADC在大鼠毒性研究中表现出最干净的安全性。

[0834] 图59A-59B显示,与ADC 2-4相比,可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-弹头ADC具有良好的PK特性和最宽的相对TI。相对TI=在大鼠中测试的最高剂量(NOAEL而非HNSTD)下的AUC与提供肿瘤停滞的AUC的暴露比率(MX-1模型)。图59A是图59B的关键。

[0835] 图60A-60B显示EO2-GL-SG3932在乳腺和卵巢PDX小鼠模型中具有强大的活性。

[0836] 图61显示E02-GL-SG3932在HR缺陷型肿瘤和具有升高的B7-H4的HR精通型肿瘤中具有强大的活性。

[0837] 图62A-62B显示了在根据对3.5mg/kg剂量水平的E02-GL-SG3932的肿瘤应答而分组的HR缺陷型(A)和HR精通型(B)PDX模型中的肿瘤应答。(R)表示模型被认为对测试药剂有响应。(NR)表示模型被认为是非响应者。y轴表示每个模型中B7-H4的水平,如由H评分所确定的。

[0838] 图62C-62D显示了在根据对1.25mg/kg剂量水平的E02-GL-SG3932的肿瘤应答而分组的HR缺陷型(A)和HR精通型(B)PDX模型中的肿瘤应答。(R)表示模型被认为对测试药剂有响应。(NR)表示模型被认为是非响应者。y轴表示每个模型中B7-H4的水平,如由H评分所确定的。

[0839] 图63显示了不同弹头在DLD1 wt或BRCA2-/-细胞中的6天细胞毒性测定的结果。MMAE＝阴性对照,微管抑制剂弹头。

[0840] 实例

[0841] 材料与方法

[0842] 蛋白质试剂

[0843] 产生的蛋白质试剂(例如构建体)如表1所示。该表表明蛋白质来自哪个物种(人、小鼠或食蟹猴)、用于克隆构建体的载体以及所使用的前导序列是天然的还是人CD33前导序列。

[0844] 表1.为B7H4项目制作的蛋白质构建体

[0845]

克隆的插入物	载体	注释
人 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	天然前导序列
小鼠 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	天然前导序列
人 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前导序列
小鼠 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前导序列
食蟹猴 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前导序列
人 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前导序列 三重突变型 Fc
小鼠 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前导序列 三重突变型 Fc
食蟹猴 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前导序列 三重突变型 Fc
人 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	人 CD33 前导序列
人 B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_C_mIgG2a_Fc_10His	人 CD33 前导序列
人 B7H4 ECD (SV)	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	人 CD33 前导序列 剪接变体

[0846] “三重突变型Fc”(TM)包含Fc区内的三重突变L234F/L235E/P331S,如先前在Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.[晶体学报部分D:生物晶体学]2008年6月1日;64(Pt 6):700-704(通过引用并入本文)中所述的。为避免任何疑问,本发明人使下文描述的抗体在不存在这样的TM的情况下(例如,存在WT Fc的情况下)也保留其有利的结合特性/特征。

[0847] 表中的所有蛋白质均使用标准条件进行纯化。简而言之,在HEK EBNA中进行表达,使用TFF浓度设置浓缩,使用His trap色谱柱或蛋白G色谱柱纯化(取决于是否存在10His Flag标签或Fc标签),然后是SEC S200色谱柱的最终抛光步骤。

[0848] ELISA

[0849] 通过ELISA测量抗B7-H4抗体(例如,中间体ZYOEQD-EO2-GL和抗B7-H4 mAB D11)与B7-H4(例如,人和小鼠B7-H4)的结合。将重组B7-H4-Fc(例如,人B7-H4-Fc和小鼠B7-H4-Fc)蛋白稀释到DPBS中,得到5ug/ml的溶液。然后将50μL稀释的储备液添加到Nunc Maxisorp 96孔板中。将50μL/孔DPBS添加到对照孔中。使抗原在4℃吸附到板上过夜,用DPBS洗涤一次,并在室温下与封闭缓冲液(3%w/v Marvel,在DPBS中)一起孵育1小时。然后将板用PBS洗涤一次,并与在含有1% BSA、0.3%曲通X-100的DPBS中稀释的6.4pM-100nM抗B7-H4抗体

(例如,中间体ZYOEQD-E02-GL或抗B7-H4 mAb D11)一起孵育1小时。然后将板用含有0.1%吐温的PBS洗涤三次,并在室温与过氧化物酶缀合的山羊抗人轻链抗体(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich),普尔(Poole),英国)一起孵育1小时。然后将板用含有0.1%吐温的PBS洗涤五次。在与TMB过氧化物酶底物一起孵育5分钟后,通过添加0.5M H_2SO_4终止反应。使用Envision多标签酶标仪(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer),Seer Green,英国)测量450nm处的吸光度(A450)。

[0850] 流式细胞术(用于检测与B7-H4阳性细胞结合的抗体)

[0851] 通过accutase(Gibco公司,佩斯利(Paisley),英国)使细胞从组织培养瓶中分离,通过离心使其沉淀,并重悬于冰冷的DPBS(Gibco公司,佩斯利,英国)中。使用血细胞计数器通过台盼蓝排除法计数活细胞。在DPBS中将细胞密度调整为$5x10^6$个细胞/mL。将100μL细胞悬液($5x10^5$个细胞)添加到96孔V型底板中并置于冰上。然后,将细胞与Live/Dead可固定紫色染色剂(赛默飞世尔科学公司,拉夫伯勒(Loughborough),英国)一起在冰上孵育20分钟。用流式细胞术缓冲液(eBiosciences公司,哈特菲尔德(Hatfield),英国)洗涤后,将细胞在仅100μL流式细胞术缓冲液中(未染色的对照细胞)或者补充有浓度范围为10μg/ml至78ng/ml的AF647标记的抗B7H4抗体(例如E02-GL或1D11)或同种型R347的该缓冲液中在冰上孵育30分钟。然后将细胞用200μL冰冷的流式细胞术缓冲液洗涤三次,用200μL 4%多聚甲醛(西格玛奥德里奇公司,普尔,英国)固定20分钟,然后悬浮在冰上的DPBS中以用于在FACSCanto II仪(BD生物科学公司(BD Bioscience),圣何塞(San Jose),加利福尼亚州(CA),美国)上进行流式细胞术分析。如下使用FlowJo细胞计数分析软件(Treestar公司,阿什兰(Ashland),俄勒冈州(OR),美国)来量化抗体与细胞的结合。基于前向散射、侧向散射和Live/Dead紫色荧光强度,对活的单细胞进行门控,并确定AF647几何平均荧光强度(MFI)。

[0852] 细胞毒性测定

[0853] 通过accutase(Gibco公司,佩斯利,英国)使细胞系从组织培养瓶中分离,通过离心使其沉淀,并重悬于生长培养基(针对HT29-hB7H4克隆44为McCoy's 5A、10% FBS、400μg/mL G418;针对SKBR3为McCoys'5A、10% FBS;以及针对HCC1569为RPMI-1640、10% FBS)中。使用血细胞计数器通过台盼蓝排除法计数活细胞。在生长培养基中将细胞密度调整为$2.7x10^4$个细胞/mL。将75μL/孔的细胞悬液($2x10^3$个细胞)添加到96孔白壁透明底部组织培养处理板中,并在37℃、5% CO_2下在加湿的组织培养箱中培养过夜。

[0854] 将ADC(例如,1D11-MMAE、E02-GL-MMAE和E02-GL-SG3249)稀释到DPBS中,分别得到400μg/mL或16μg/mL储备液。在DPBS中制备了四倍连续稀释的储备液。然后将25μL的稀释的储备液添加到培养的细胞的一式二份孔中,同时将抗体(例如,1D11-MMAE或E02-GL-MMAE或E02-GL-SG3249)进行十点、四倍连续稀释。将25μL/孔DPBS添加到模拟处理的对照细胞中。

[0855] 将细胞在ADC或DPBS(模拟处理的对照细胞)存在下培养六天。使用CellTiter-Glo®测定评估细胞活力:将100μLCellTiter-Glo®(普洛麦格公司(Promega),南安普敦(Southampton),英国)添加到每个孔中。将板在台式摇床上搅拌2分钟,然后在室温再孵育10分钟。使用Envision多标签酶标仪(珀金埃尔默公司,Seer Green,英国)测量发光。通过使用第7版GraphPad Prism(GraphPad软件公司(GraphPad Software),拉荷亚(La Jolla),加利福尼亚州(CA))中的非线性回归模型[log激动剂相对于应答-可变斜率(三个参数)]产生半数最大抑制浓度(IC_{50})值来测定测试品抗体(例如,1D11-MMAE或E02-GL-MMAE或E02-

GL-SG3249)的效力,并表示为相对于模拟处理的对照细胞的细胞活力百分比-

[0856] ([(处理的细胞-背景)/(模拟处理的对照细胞-背景)]x100)。

[0857] 细胞上蛋白质印迹

[0858] 开发了细胞上蛋白质印迹方法,并将其用于利用以下细胞运行5个示例性抗体克隆:SKBR3、A549、OVCAR4(全部减去用B7-H4载体进行的转染)、CHO和HEK细胞(加上和减去用全长B7-H4载体进行的转染)。

[0859] 除了示例性抗体克隆之外,还使用了以下抗体(用于比较目的):

[0860] •E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG

[0861] •US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG

[0862] •R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1

[0863] •Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1

[0864] •同种型1CAT004 SP06-003

[0865] •同种型2R and D正常山羊IgG对照(AB-108C)

[0866] 亲和力分析KinExA 3200

[0867] E02_GL Fab:E02_GL Fab SEC组分(33.4-34.5min,07031802.D),

[0868] B7H4:hB7H4-ECD-Flag-His10(4.34mg mL-1,J Watson,2017年10月31日)。

[0869] KinExA缓冲液:

[0870] 添加了0.02%叠氮化钠的D-PBS(VWR/Merck 103692K,批次:K35580906),1升,0.20μm无菌过滤的。

[0871] 添加了0.02%叠氮化钠的D-PBS(VWR/Merck 103692K,批次:K35580906)和1mg mL^{-1}牛血清白蛋白(Sigma A-2058,批次:108H0573)。1.0升,0.20μm无菌过滤的。

[0872] 第二检测试剂:

[0873] 使用DyLight649标记的小鼠抗人H+L链第二检测试剂(杰克逊免疫研究公司(Jackson Immunoresearch),209-495-088,批次91003)检测全IgG或Fab。用800μL Milli-Q水重构的小瓶(约1mg)。

[0874] r人B7H4 ECD的最小胺生物素酰化:

[0875] •蛋白质:r人B7H4 ECD-FlagHis10(4.34mg mL^{-1},第1批,2017年10月31日)

[0876] •来源:JWPur006

[0877] •体积/缓冲液:0.100mL/PBS

[0878] •蛋白质质量(Da):29,053.57Da

[0879] •要生物素酰化的蛋白质质量=0.434mg

[0880] •要生物素酰化的蛋白质的量(皮摩尔)0.000434g/29,054Da=1.494E-8摩尔(14,938皮摩尔)

[0881] 生物素酰化:

[0882] •添加在D-PBS中的10μL饱和$NaHCO_3$。

[0883] •试剂:EZ link Sulfo-NHS-LC-生物素(Perbio/皮尔斯公司,产品编号21335),以(1.0mg mL^{-1},在DMF中)计。

[0884] •第一脉冲蛋白:生物素比例:1:0.5 14,938×0.5=14,938

[0885] o7,468/1,797pmolμL^{-1}=4.16μL

[0886] • 起始:下午16:07;取样:下午16:35

[0887] • 所有这些都应用于Dulbecco's PBS平衡PD-10柱上。

[0888] 体内成像研究

[0889] 将抗体克隆(例如E02_GL)用800CW(LI-COR生物科学公司(LI-COR Biosciences))标记。将800 CW标记的R347用于对照实验中。

[0890] 将表达B7-H4的CT26/4TI/HT29癌细胞移植(例如,皮下接种)到3-5天大的裸小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories),威尔明顿(Wilmington),马萨诸塞州(MA))的左腹,并且将不表达B7-H4的CT26/4TI/HT29癌细胞移植到右腹以提供内部对照。饲养小鼠一周以形成肿瘤,注射800CW标记的E02_GL。将800CW标记的R347注射到对照小鼠中。在注射标记的抗体后第1、3、7和9天,通过对来自该标记的辐射进行成像,对肿瘤进行体内成像。

[0891] 实例1

[0892] B7-H4在多种细胞类型中过表达

[0893] 对取自人受试者的多个肿瘤切片中的切片进行免疫组织化学,这些切片代表多种肿瘤类型(如表2中所述)。发现B7-H4的表达在乳腺癌(例如激素受体阳性(HR+)乳腺癌)以及非小细胞肺癌(NSCLC)中特别显著(参见图1A-1D)。有趣的是,大多数肿瘤表现出异源表达。

[0894] 治疗后一部分患者中的表达保持不变(其中,将HER2+乳腺癌患者用赫赛汀治疗;并且将卵巢癌患者用基于铂的化学疗法治疗)。

[0895] 表2.

[0896]

肿瘤类型		% Pos[1]	% 高 Pos[2]	% 低 Pos[3]	评估的 N
乳腺癌	HR+	85	23	51	39
	TNBC	70	32	23	230
	HER2+	87	42	28	98
	- 符合赫赛汀治疗	83	43	20	30
	- 赫赛汀治疗的	88	41	31	68
卵巢癌（浆液性）		72	24	33	71
子宫内膜癌		84	35	48	39
NSCLC	鳞状	63	15	48	160
	腺癌	19	2	15	143
胰腺癌		31	1	18	90
胃癌		10	0	10	21
胆管癌		13	38	38	13

[0897] [1]阳性:以任何强度和频率染色的肿瘤

[0898] [2]高阳性:在>50%的肿瘤细胞中膜染色强度>2+的肿瘤

[0899] [3]低阳性:在<50%的肿瘤细胞中膜染色强度≤2+的肿瘤

[0900] 基于组织微阵列分析的数据

[0901] 实例2

[0902] 抗B7-H4抗体的产生

[0903] 采用多位点重复免疫(RIMS)策略,在该策略中如下使VelocImmune II小鼠(再生元公司(Regeneron),柏油村(Tarrytown),纽约州(NY))免疫:

[0904] --4天:出血前

[0905] -0天:初始免疫

[0906] -7天:第二次加强

[0907] -13天:第一次出血

[0908] -15天:第三次加强

[0909] -20天:第二次出血

[0910] -22天:第四次加强

[0911] -24天:第五次加强

[0912] -28天:最后一次出血,以及spl和LN融合

[0913] 对于免疫,将十六只V2小鼠分成4组,每组含有4只动物。用人和小鼠重组B7-H4以及SkBr3细胞(例如表达B7-H4)使动物免疫。免疫原的详情可以在以下表3中找到(TT=破伤风毒素;DTA=白喉毒素;KLH=钥孔戚血蓝蛋白)。

[0914] 表3.

[0915]

组 N =4	初免	2	3	4	5
G1	KLH-mB7H4	KLH-hB7H4	KLH-mB7H4	KLH-hB7H4	KLH-hB7H4
G2	KLH-mB7H4	SkBr3	KLH-mB7H4	SkBr3	SkBr3
G3	mB7H4-TT	KLH-hB7H4	mB7H4-TT	KLH-hB7H4	mB7H4-TT
G4	mB7H4-DTA	KLH-hB7H4	mB7H4-DTA	KLH-hB7H4	mB7H4-DTA

[0916] 杂交瘤的产生

[0917] 从10只小鼠中收获淋巴样细胞,从第3只和第9只小鼠的细胞中富集B细胞,没有对来自其他8只小鼠的细胞进行选择。将淋巴样细胞和Sp2/0 Ag14骨髓瘤细胞以5:1的比例混合,在无血清培养基中洗涤,并使用PEG手动地或通过tecan机器人进行融合。融合后,将细胞重悬于200ml完全HM20培养基中,并将100μl添加到20个板的第1-11列中。3天后,再向每个孔中添加100μl培养基。每只小鼠的融合详情如表4所示。

[0918] 表4.

[0919]

小鼠	组	脾细胞 x 10^6	LN 细胞 x 10^6	总计 x 10^6	% LNC	融合类型	选择
1	1	57.72	13.78	71.50	19.27	Tecan	无
3	1	73.42	10.35	83.77	12.36	手动	B 细胞
4	1	27.78	11.47	39.25	29.21	Tecan	无
5	2	67.92	23.45	91.37	25.66	Tecan	无
7	2	78.20	25.70	103.90	24.74	Tecan	无
9	3	62.47	11.98	74.45	16.09	手动	B 细胞
10	3	53.43	5.25	58.68	8.95	手动	无
11	3	50.80	9.25	60.05	15.40	Tecan	无
13	4	41.33	11.98	53.30	22.47	手动	无
14	4	38.20	34.30	72.50	47.31	Tecan	无

[0920] 杂交瘤筛选和克隆

[0921] 将融合后13天收获的上清液通过杂交瘤组以及人、食蟹猴和小鼠B7H4 HTRF生化结合测定，在基于珠粒的IgG/IgM筛选中进行筛选，并在SkBr3 FMAT测定中通过HTS进行筛选。

[0922] 筛选后，挑出阳性命中，其中58个被克隆到半固体培养基中。使用ClonePix-FL从每个孔株系中挑选IgG阳性克隆，随后在初级测定中进行筛选。然后从每个孔株系中挑选最多4个克隆，使其生长并进行小规模IgG纯化(Phytip-蛋白A)。

[0923] 在对Phytip材料进行生物筛选后，选择了5种示例性抗体进行进一步表征(其详情可以在表5中找到)。

[0924] 表5.

[0925]

克隆 ID	小鼠 ID	免疫原
ZY0EPQ-E02	5	组 2（SkBr3 细胞/mB7H4-KLH）
ZY0EQD-E02	7	组 2（SkBr3 细胞/mB7H4-KLH）
ZY0EP0-C07	4	组 1(mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH）
ZY0EOB-F05	1	组 1(mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH）
ZY0EO5-E07	1	组 1(mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH）

[0926] ZY0EPQ-E02(及其种系化形式，例如由缩写“GL”表示)包含SEQ ID NO:1-3的CHDR1-3(分别)和SEQ ID NO:4-6的CLDR1-3(分别)。ZY0EPQ-E02包含SEQ ID NO:31的VH链和SEQ ID NO:32的VL。

[0927] ZY0EQD-E02包含SEQ ID NO:7-9的CHDR1-3(分别)和SEQ ID NO:10-12的CLDR1-3(分别)。ZY0EQD-E02包含SEQ ID NO:33的VH链和SEQ ID NO:34的VL。ZY0EQD-E02的种系化形式在稍后例如通过包含缩写“GL”被称为例如EQD-E02_GL(具有SEQ ID NO:45的VH链和SEQ ID NO:34的VL)。

[0928] ZY0EOB-F05包含SEQ ID NO:13-15的CHDR1-3(分别)和SEQ ID NO:16-18的CLDR1-3(分别)。ZY0EOB-F05包含SEQ ID NO:35的VH链和SEQ ID NO:36的VL。

[0929] ZY0E05-E07包含SEQ ID NO:19-21的CHDR1-3(分别)和SEQ ID NO:22-24的CLDR1-3(分别)。ZY0E05-E07包含SEQ ID NO:37的VH链和SEQ ID NO:38的VL。

[0930] ZY0EP0-C07包含SEQ ID NO:25-27的CHDR1-3(分别)和SEQ ID NO:28-30的CLDR1-3(分别)。ZY0EP0-C07包含SEQ ID NO:39的VH链和SEQ ID NO:40的VL。

[0931] 将这5种示例性抗体重新格式化到人IgG1、人IgG1-TM(三重突变)和鼠IgG1骨架上。

[0932] 对这5种重新格式化的示例性抗体的序列分析显示了ZY0EPQ-E02和ZY0EQD-E02以及克隆ZY0EOB-F05和ZY0E05-E07之间的同一性(参见图28)。

[0933] 实例3

[0934] 用选定克隆进行的抗原结合测定

[0935] 通过HTRF测定,使用人、食蟹猴和鼠B7-H4-Fc进行这5种示例性抗体(如鼠IgG1、人IgG1和人IgG1-TM)的浓度-效应结合。对于鼠IgG1抗体,使用与Dylight-649缀合的抗鼠IgG进行检测。用人IgG1和IgG1-TM抗体进行类似的测定形式;然而,与Dylight-649缀合的抗人κ用于检测。

[0936] 与对人或食蟹猴B7-H4-Fc的结合相比,抗体ZY0EPQ-E02和ZY0EQD-E02对鼠B7-H4-Fc具有更高的EC_{50}和更低的最大结合,这表明对鼠B7-H4的亲和力较低。所有其他抗体对人、食蟹猴和鼠B7-H4-Fc都具有相似的EC50和最大结合(参见表6-8)。

[0937] 表6.使用人B7-H4-Fc得到的HTRF数据

[0938]

抗体	人 B7-H4-Fc					
	鼠 IgG1		人 IgG1		人 IgG1-TM	
	EC50 (nM)	最大值	EC50 (nM)	最大值	EC50 (nM)	最大值
ZY0EPQ-E02	0.38	2741	0.38	1127	0.41	1092
ZY0EQD-E02	0.22	3166	0.35	1237	0.33	1272
ZY0EOB-F05	0.30	3025	0.15	1816	0.15	1873
ZY0E05-E07	0.68	2150	0.19	1708	NT	NT
ZY0EP0-C07	0.95	1736	0.30	1221	0.31	1207

[0939] 表7.使用食蟹猴B7-H4-Fc得到的HTRF数据

[0940]

抗体	食蟹猴 B7-H4-Fc					
	鼠 IgG1		人 IgG1		人 IgG1-TM	
	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值
ZY0EPQ-E02	0.38	2236	0.33	987	0.35	934

[0941]

ZY0EQD-E02	0.22	2494	0.28	1127	0.28	1100
ZY0EOB-F05	0.32	2398	0.14	1483	0.15	1483
ZY0E05-E07	0.71	1698	0.18	1359	NT	NT
ZY0EP0-C07	1.28	1247	0.33	946	0.39	890

[0942] 表8.使用鼠B7-H4-Fc得到的HTRF数据

[0943]

抗体	鼠 B7-H4-Fc					
	鼠 IgG1		人 IgG1		人 IgG1-TM	
	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值
ZY0EPQ-E02	2.03	790	1.49	279	1.76	256
ZY0EQD-E02	3.64	447	1.40	167	1.44	224
ZY0EOB-F05	0.38	2190	0.19	1319	0.19	1342
ZY0E05-E07	0.73	1697	0.21	1300	NT	NT
ZY0EP0-C07	0.49	1910	0.18	1321	0.20	1252

[0944] 结合亲和力测量

[0945] 使用ForteBio Octet系统测量抗体对人、鼠和剪接变体B7-H4 ECD的亲和力。人IgG1-TM抗体被蛋白G捕获，并测量了单体物质B7-H4-FLAG ECD与该抗体的结合。对人B7-H4的亲和力在10-25nM范围内，而对鼠的亲和力在10-600nM之间。除ZY0EP0-C07以外的所有抗体都可以结合剪接变体，亲和力在200-1600nM之间。动力学结合数据汇总于以下表9中。

[0946] 表9.Octet亲和力汇总

[0947]

抗体	蛋白质	hIgG1-TM（n=4-7） KD（nM）	kon（1/Ms）	kdis（1/s）	hIgG1（n=1） KD（nM）	kon（1/Ms）	kdis（1/s）
ZY0EPQ-E02	人 B7-H4	25.7	7.09E+04	1.82E-03	24	8.59E+04	2.08E-03
	鼠 B7-H4	396	7.67E+04	3.04E-02	498	1.00E+05	4.98E-02
	B7-H4-SV	1660	1.38E+03	2.29E-03	1030	2.46E+03	2.52E-03
ZY0EQD-E02	人 B7-H4	14.4	1.93E+05	2.78E-03	14.9	2.16E+05	3.21E-03
	鼠 B7-H4	621	2.03E+05	1.26E-01	625	3.41E+05	2.13E-01
	B7-H4-SV	801	3.36E+03	2.69E-03	834	4.19E+03	3.49E-03

[0948]

ZY0EOB-F05	人 B7-H4	13.4	2.65E+04	3.55E-04	11.7	3.10E+04	3.62E-04
	鼠 B7-H4	25	1.87E+04	4.76E-04	19.8	2.49E+04	4.93E-04
	B7-H4-SV	174	3.35E+03	5.84E-04	127	4.71E+03	5.98E-04
ZY0E05-E07	人 B7-H4	19.8	1.71E+04	3.38E-04	14.6	2.17E+04	3.18E-04
	鼠 B7-H4	30	1.21E+04	3.61E-04	23.2	1.79E+04	4.15E-04
	B7-H4-SV	264	1.89E+03	4.99E-04	182	2.91E+03	5.28E-04
ZY0EP0-C07	人 B7-H4	9.4	4.16E+04	3.97E-04	7	4.88E+04	3.63E-04
	鼠 B7-H4	11	4.30E+04	5.24E-04	9	6.02E+04	5.51E-04
	B7-H4-SV	无结合			无结合		

[0949] 表位分组

[0950] 使用结合单体B7-H4-FLAG ECD、与DyLight-649缀合的示例性抗体(IgG1-TM)以HTRF测定形式进行表位分组，并用铕缀合的抗FLAG抗体进行检测。

[0951] 组1被定义为ZY0EPQ-E02、ZY0EQD-E02和ZY0E05-E07抗体完全相互抑制，并且仅部分抑制ZY0EP0-C07。组2被定义为ZY0EOB-F05抗体与所有抗体完全竞争并且所有抗体与其完全竞争。组3被定义为ZY0EP0-C07与抗体ZY0EPQ-E02、ZY0EQD-E02和ZY0E05-E07(组1)部分竞争。

[0952] 表10.HTRF表位汇总表

[0953]

竞争抗体	Dy649缀合的抗体				
	ZY0EPQ-E02	ZY0EQD-E02	ZY0EOB-F05	ZY0EO5-E07	ZY0EP0-C07
ZY0EPQ-E02	**完全**	完全	完全	**未测试**	部分
ZY0EQD-E02	完全	**完全**	完全		部分
ZY0EOB-F05	完全	完全	**完全**		完全
ZY0EO5-E07	完全	完全	完全		部分
ZY0EP0-C07	部分	部分	完全		**完全**

[0954] 物种交叉反应性ELISA

[0955] 测试上述5种VelocImmune来源的抗B7-H4示例性抗体中的每一种与内部来源的鼠B7-H4(ECD)的结合。所有示例性抗体均作为人IgG1-TM以及4/5鼠IgG1进行测试(此时，

ZYOEPO-C07不可用作鼠IgG1)。比较了与单体和二聚体鼠和人B7-H4变体的结合(分别标记了FlagHis10或FcHis6)。

[0956] 无论哪种同种型,所有IgG均保留对鼠和人B7-H4抗原的交叉反应性。二聚体性质的、FcHis6标记的B7-H4抗原产生的结合曲线均匀地移动到由相应单体FlagHis10 B7-H4抗原提供的那些曲线的左侧。这种效果对于鼠B7-H4更为显著。

[0957] 使用任何VelocImmune示例性抗体未观察到与无关抗原对照的显著结合。同种型对照IgG不与B7-H4抗原非特异性结合(NIP228-人IgG1-TM,以及MOPC-21-鼠IgG1)-参见图2。

[0958] 商用抗B7-H4多克隆和单克隆特异性ELISA

[0959] 通过ELISA测试了一组商用单克隆和多克隆抗血清与人和鼠B7-H4抗原的结合。还测试了每种抗血清与截短的人B7-H4剪接变体(基本上缺少其细胞外IgV结构域)的结合。无论使用FlagHis10还是FcHis6 B7-H4抗原,都获得了等效数据。表11和12中汇总了不同的交叉反应性概况。

[0960] 表11.单克隆

[0961]

			B7-H4		
公司	目录号	批号	人	鼠	剪接变体
AdD serotec	MCA2632	707	Y	N	N
eBioscience	14-5949	E021763	Y	Y	Y
Epitomics	2516-1	YD-08-23-02	N	N	n/a
US Biologicals	B0000-35B	L10061519	Y	N	N
eBioscience	145972-82	E010563	Y	Y	Y
eBioscience	145970-85	E010556	N	N	n/a
R & D	MAB2154	WVP0107101	Y	Y	Y

[0962] 表12.多克隆

[0963]

			B7-H4		
公司	目录号	批号	人	鼠	剪接变体
Santa Cruz	sc68872 (H108)	L1008	Y	Y	n/a
Santa Cruz	sc68254 (G-18)	C1910	N	N	n/a

[0964]

R & D	AF2154	WVP016011	Y	Y	Y
Abbiotec	250473	10051104	N	N	n/a
Sigma Aldrich	SAB2500141	7942P1	Y	Y	N

[0965] B7-H4同源物特异性ELISA

[0966] 测试了五个选定的克隆(VelocImmune IgG)中的每一个与B7-H4家族成员和同源物的非特异性结合(鼠IgG1 ZYOEPO-C07可用于测试)。通过使用人B7-H4的ECD作为测试序

列进行BLASTP搜索来指导选择要测试的抗原。然后使用CLUSTALW分析对来自该列表的有利命中进行比对，并且获得在一级氨基酸水平显示最高同一性百分比的那些抗原(参见表13)。

[0967] 表13.

[0968]

同一性百分比

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1		13.2	21.5	21.4	25.9	21.6	20.7	25.4	25.2	25.8	1	人 B7-H4 ECD.pro
2	377.0		11.7	12.1	13.1	10.3	11.0	13.7	9.7	8.4	2	人 MOG1.pro
3	229.0	426.0		19.2	27.8	21.5	20.1	18.2	18.1	13.8	3	人 B7-H1.pro
4	229.0	414.0	255.0		21.2	20.8	17.7	21.4	18.2	13.4	4	人 B7-H2.pro
5	190.5	377.0	174.9	231.0		25.6	19.5	23.4	24.1	20.1	5	人 B7-H3.pro
6	228.0	498.0	229.0	236.0	192.5		42.3	45.8	34.8	15.0	6	人 BTN1A1.pro
7	238.0	461.0	244.0	279.0	253.0	103.0		41.0	33.6	15.8	7	人 BTN2A1.pro
8	194.4	362.0	270.0	229.0	209.0	91.9	107.6		32.5	17.5	8	人 BTN3A2.pro
9	196.4	538.0	271.0	270.0	203.0	133.7	139.3	145.3		11.8	9	人 BTNL3.pro
10	191.3	661.0	360.0	368.0	245.0	330.0	311.0	282.0	426.0		10	人 HHLA2.pro
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

差异

[0969] 五种示例性抗体不与同源物huB7-H1、huB7-H2、huB7-H3、huBTN1A1、huHHLA2或huBTN3A2以可测量的程度结合，而无论哪种抗体同种型。请注意，在测试huMOG1、huBTN2A1或huBTNL3抗原时未观察到结合(参见图3)。

[0970] 细胞上蛋白质印迹结合分析

[0971] 使用Accutase将细胞从T175烧瓶上分离，并对其计数。所使用的转染方法基本上是Invitrogen Lipofectamine LTX方案(使用反向转染方法的高通量方案)中所述的方法。将100μl细胞($4.5x10^4$个/100μl)添加到含有DNA-脂质体转染混合物的96孔板中。将板在37℃孵育18小时，并使用10％缓冲福尔马林固定过夜。将板用Odyssey封闭缓冲液封闭，与适当的第一抗体一起孵育过夜，然后洗涤并用适当的Odyssey第二抗体进行检测。

[0972] 将板风干，并使用Odyssey成像仪、使用制造商提供的推荐扫描水平进行扫描。

[0973] QD-E02和PQ-E02具有高水平的非特异性结合，因此抗体以超出对照抗体(泳道E、U、R、S)的方式出人意料地结合广泛的细胞类型-参见图4。OB-F05和O5-E07对转染的HEK产生良好的结果，并且还与转染的CHO结合。示例性抗体QD-E02、OB-F05和O5-E07以及PQ-E02与OVCAR4细胞结合。

[0974] 概述

[0975] 表14显示了五种示例性抗体的特性的汇总。

[0976] 表14.

[0977]

抗体	蛋白质	Octet KD (nM)	表位组	ZAP		
ZY0EPQ-E02	人 B7-H4	26	1	细胞	IC50 (M)	%存活
	鼠 B7-H4	396		SKBR3	4.E-09	65
	B7-H4-SV	1660		OVCAR4	2.E-08	46
ZY0EQD-E02	人 B7-H4	14	1	细胞	IC50 (M)	%存活
	鼠 B7-H4	621		SKBR3	1.E-08	48
	B7-H4-SV	801		OVCAR4	2.E-08	40
ZY0EOB-F05	人 B7-H4	13	2	细胞	IC50 (M)	%存活
	鼠 B7-H4	25		SKBR3	4.E-18	84
	B7-H4-SV	174		OVCAR4	3.E-17	67
ZY0E05-E07	人 B7-H4	20	1	细胞	IC50 (M)	%存活
	鼠 B7-H4	30		SKBR3	2.E-16	79
	B7-H4-SV	264		OVCAR4	7.E-17	58
ZY0EP0-C07	人 B7-H4	9	3	细胞	IC50 (M)	%存活
	鼠 B7-H4	11		SKBR3	4.E-09	72
	B7-H4-SV	无结合		OVCAR4	1.E-08	57

[0978] 实例4

[0979] 通过流式细胞术筛选用于B7-H4表面表达的细胞系

[0980] 已使用示例性抗体和/或商用抗B7-H4抗体测试出以下人细胞系对B7-H4表达呈阳性(相对B7-H4表达水平由“+”表示):

[0981] -SK-BR-3(+++)

[0982] -T47D(+)

[0983] -MDA-MB-468(++)

[0984] -OVCAR4(+++)

[0985] -NIH:OVCAR3(+)

[0986] -Calu-3(+)

[0987] 以下人细胞系已被测试为阴性:NCI-H322、Raji(+/-IFNg激活)、Ramos(+/-IFNg激活)和Du145。

[0988] 实例5

[0989] 体外细胞毒性测定

[0990] 表达B7-H4的细胞系对五种人IgG1-TM示例性抗体的内化已经通过实验得到证实(SK-BR-3、MDA-MB-468、OVCAR4和JumpIn CHO F1-B7H4)。使用皂草素缀合的抗人IgG第二抗体证明了五种IgG1-TM示例性抗体的ADC细胞毒性(参见图5)。20μg/ml‘单独抗体’对照下的细胞活力约为100%。

[0991] 实例6

[0992] 克隆ZY0EQD_E02特异性ELISA

[0993] 由于克隆ZYOEQD_EO2的优越性能，选择该克隆进行更详细的分析。ZYOEQD_EO2包含SEQ ID NO:7的CHDR1;SEQ ID NO:8的CHDR2;SEQ ID NO:9的CHDR3;SEQ ID NO:10的CLDR1;SEQ ID NO:11的CLDR1;SEQ ID NO:12的CLDR1。所述克隆包含SEQ ID NO:33的VH链和SEQ ID NO:34的VL链。所述克隆包含SEQ ID NO:48的重链和SEQ ID NO:44的轻链。种系化形式(EO2-GL)包含SEQ ID NO:45的VH链和SEQ ID NO:34的VL链;例如，SEQ ID NO:51的重链和SEQ ID NO:44的轻链。

[0994] 进行ELISA分析以确定与来自人(包括剪接变体)、食蟹猴(cyno)、小鼠和大鼠的B7-H4的结合。所述物种中的人B7-H4的序列同一性百分比为:结构域FL-食蟹猴(98.6%);兔(91.6%);小鼠(87.9%);大鼠(86.9%);结构域ECD-食蟹猴(99.6%);兔(94.3%);小鼠(90%);大鼠(89.6%)。

[0995] 测试克隆的Maia形式mAb(例如，包含C插入，如例如SEQ ID NO.:41所示)的结合。测定了野生型以及多种变体(种系化(GL)、GLQ、GLY)，连同作为对照的R347-maia人IgG1(参见图6)。

[0996] R347-maia同种型对照显示不与任何测试的抗原结合。EO2-maia结合概况与之前的实验相似。EO2-maia和EO2-GL-maia具有相似的结合概况。有利地，这证明了种系化(GL)和非种系化(例如WT)形式的抗体都保留了该抗体的有利结合特性/概况。

[0997] 实例7

[0998] EO2-GL的结合与mAb“1D11”的结合的比较

[0999] 通过ELISA，将种系化的克隆ZYOEQD_EO2(在此称为EO2-GL)的结合亲和力与已知的抗B7-H4抗体“1D11”(基因泰克公司(Genentech);描述于WO 2016040724中，将其通过引用并入本文)的结合亲和力直接比较(参见上面的材料与方法)。

[1000] “EO2-GL”抗体具有ZYOEQD-EO2的CDR序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。例如，这些实例中的EO2-GL包含SEQ ID NO:45的VH链序列，例如SEQ ID NO:43的种系化形式。

[1001] 直接比较表明，克隆EO2-GL比1D11表现出显著更好的结合(亲和力)(参见图7)。与实例7一致，R347-maia同种型对照显示不与任何测试的抗原结合。

[1002] 此外，与1D11相比，EO2-GL显示(通过流式细胞术实验，参见上文材料与方法)与癌细胞上表达的B7-H4具有更好的结合。因此，EO2-GL不仅表现出优异的结合，而且还表现出优异的癌细胞靶向性。测试了与表达hB7-H4的HT29细胞和SK-BR-3细胞(表达B7-H4)的结合。测试了浓度为31ng/ml、156ng/ml和78ng/ml的抗体的结合。HT29细胞的结果如图8A所示，SK-BR-3细胞的结果如图8B所示。符号◇表示‘EO2-GL部分’，符号□表示‘1D11部分’。符号“●”表示(阴性)对照‘R347组分’。

[1003] 从图8A-8B中可以看出，“EO2-GL部分”中染色的细胞数量明显高于“1D11部分”中染色的细胞数量。

[1004] 实例8

[1005] Ad293细胞的体外细胞毒性，在有和没有B7-H4转染的情况下

[1006] (EO2-GL-SG3932)

[1007] 克隆EO2-GL以平均药物抗体比率(DAR)为8缀合至拓扑异构酶I有效载荷SG3932(提供EO2-GL-SG3932)，并测试了靶向和杀死人B7-H4转染的和未转染的Ad293细胞的能力

(例如,后者代表阴性对照)。将缀合至SG3932的抗体NIP228用作对照。转染的细胞很容易被E02-GL-SG3932缀合物(其IC50为53.3ng/ml)靶向并杀死(参见图9A)。在未转染的细胞中未观察到添加E02-GL-SG3932缀合物后的显著杀伤作用(参见图9B)。在本文描述的涉及缀合至拓扑异构酶抑制剂的E02-GL的所有实验中,所使用的E02-GL克隆通常具有SEQ ID NO.:51的重链序列。

[1008] 方法:

[1009] 通过TrypLE Express(Gibco公司,佩斯利,英国)使细胞系从组织培养瓶中分离,通过离心使其沉淀,并重悬于生长培养基(RPMI-1640,10% FBS)中。通过台盼蓝排除法、使用Vi-CELL XR细胞活力分析仪(贝克曼·库尔特生命科学公司(Beckman Coulter Life Sciences),印第安纳波利斯(Indianapolis),印第安纳州(Indiana))对活细胞进行计数。在生长培养基中将细胞密度调整为$3.33x10^4$个细胞/mL。将75μL/孔的细胞悬液($2.5x10^3$个细胞)添加到96孔白壁透明底部组织培养处理板中,并在37℃、5% CO_2下在加湿的组织培养箱中培养过夜。

[1010] 将ADC(例如,NIP228-SG3932和E02-GL-SG3932)稀释到生长培养基(RPMI-1640,10% FBS)中,浓度为240μg/mL。在生长培养基(RPMI-1640,10% FBS)中制备五倍连续稀释液,然后将25μL添加到培养的细胞的一式三份孔中,同时九点、五倍连续稀释抗体(例如,NIP228-SG3932或E02-GL-SG3932)。将25μL/孔的生长培养基(RPMI-1640,10% FBS)添加到模拟处理的对照细胞中。将细胞在加湿的组织培养箱中于37℃、5% CO_2下培养六天,此时根据制造商的方案使用CellTiter-Glo®测定(普洛麦格公司,南安普敦,英国)评估细胞活力。使用Envision多标签酶标仪(珀金埃尔默公司,Seer Green,英国)测量发光。通过使用第8版GraphPad Prism(GraphPad软件公司,拉荷亚,加利福尼亚州)中的非线性回归模型[log激动剂相对于应答-可变斜率(四个参数)]产生半数最大抑制浓度(IC50)值来测定测试品抗体(例如,NIP228-SG3932或E02-GL-SG3932)的效力,并表示为相对于模拟处理的对照细胞的细胞活力百分比-([(处理的细胞-背景)/(模拟处理的对照细胞-背景)]x100)。

[1011] 实例9

[1012] E02-GL-SG3932引起体外肿瘤细胞的旁观者杀伤

[1013] 将HT29-huB7-H4克隆26靶标阳性细胞和GFP标记的HT29靶标阴性细胞(单独铺板或以1:1的比例混合铺板并培养1天)用200ng/mL E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932同种型对照ADC处理6天。在处理结束时,使用流式细胞术测定活的GFP阴性HT29-huB7-H4克隆26细胞或GFP阳性HT29细胞的数量。结果示于图10中:A)点图显示了来自单独或一起培养的HT29-GFP细胞和HT29+huB7-H4克隆26细胞的培养基处理样品的处理结束时流式细胞术分析的代表性图像。左上和左下象限中显示的数字分别反映了HT29-GFP细胞和HT29+huB7-H4克隆26细胞的百分比。B)当单独铺板时,在用E02-GL-SG3932处理后在HT29+huB7H4克隆26细胞中观察到细胞计数减少,这在靶标阴性HT29-GFP细胞中未观察到。当在共培养中铺板细胞时,靶标阴性HT29-GFP细胞和靶标阳性HT29+huB7H4克隆26细胞的细胞计数均减少,这证明了旁观者杀伤作用。

[1014] 方法:

[1015] 使用慢病毒表达系统制备稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的HT29-GFP细胞系。将细胞以15,000个细胞/孔的总细胞密度铺板在24孔板中,单独培养或以1:1的比例混合培养1

天。然后移除培养基并用单独的新鲜培养基或含有200ng/mL NIP228-SG3932 ADC或EO2-GL-SG3932 ADC的培养基更换，并将细胞再孵育6天。在处理结束时，使用流式细胞术和FlowJo软件测定活的GFP阴性HT29+huB7-H4克隆26细胞或GFP阳性HT29细胞的数量。

[1016] 实例10

[1017] EO2-GL-SG3932引起体内肿瘤细胞的旁观者杀伤

[1018] 将肿瘤细胞皮下植入8至10周龄的雌性SCID小鼠体内。当肿瘤达到适当的肿瘤体积范围(通常为150-250mm^3)时，将动物随机分为治疗组和对照组并开始给药。通过静脉内注射向荷瘤小鼠施用单剂量的测试品。每天观察动物，每周测量并记录肿瘤尺寸和体重两到三次。结果示于图11中。通过卡尺测量肿瘤体积且使用以下公式计算肿瘤体积：肿瘤体积＝长(mm)x宽(mm)^2/2，其中长和宽分别为肿瘤的最长和最短直径。

[1019] 实例11

[1020] EO2-GL-SG3932在患者源性异种移植

[1021] (PDX)模型中具有有效的体内活性

[1022] 将肿瘤组织碎片皮下植入6至8周龄的雌性无胸腺裸小鼠体内。当肿瘤达到适当的肿瘤体积范围(通常为150-300mm^3)时，将动物随机分为治疗组和对照组并开始给药。通过静脉内注射向荷瘤小鼠施用单剂量的测试品。每天观察动物，每周测量并记录肿瘤尺寸和体重两次。结果示于图12中，并且表明EO2-GL-SG3932在患者源性异种移植(PDX)模型中具有有效的体内活性。通过数显卡尺测量肿瘤体积且使用以下公式计算肿瘤体积：肿瘤体积＝长(mm)x宽(mm)^{2}x0.52，其中长和宽分别为肿瘤的最长和最短直径。

[1023] 图13显示了通过确定处理后肿瘤体积变化进一步评估对EO2-GL-SG3932的体内抗肿瘤应答的结果，再次证明了EO2-GL-SG3932在单次i.v.注射后在PDX模型中的抗肿瘤活性。处理开始时的肿瘤体积称为初始肿瘤体积(ITV)；对ADC处理显示最大应答时的肿瘤体积称为最终肿瘤体积(ETV)。如果ETV小于ITV，则如下计算抗肿瘤应答：[(ETV-ITV)/ITV]x100。否则，抗肿瘤应答表示为处理组相对于媒介物对照组的肿瘤体积变化百分比：100-[1-((ETV-ITV)处理/(ETV-ITV)媒介物)x100]。

[1024] 实例12

[1025] EO2-GL-topo I抑制剂ADC在体外和体内MX-1细胞模型和HT29源性模型中具有相似的效力

[1026] MX-1模型

[1027] MX-1异种移植模型在冠科生物技术公司(Crown Biosciences)(太仓，中国)中进行。该研究是根据CRO和阿斯利康IACUC指南进行的。将MX-1肿瘤细胞在37℃、在空气中5％CO2氛围下、在补充有10％胎牛血清的RPMI-1640培养基中保持体外培养。收获呈指数生长的细胞并将5×10^6个细胞(在0.1ml体积的PBS:基质胶＝1:1中)植入雌性BALB/c裸小鼠的右腹。在处理开始之前，立即使用“匹配过分布”随机化方法(Study Director™软件)将小鼠随机分到治疗组中(平均肿瘤体积＝153mm^3)。在施用前，将所有抗体-药物缀合物立即在缓冲液(25mM组氨酸、7％蔗糖、0.02％ PS80、pH 6.0)中稀释。以单次i.v.剂量施用ADC。每周记录两次肿瘤和体重测量结果，并使用等式长度(mm)x宽度(mm)^2/2计算肿瘤体积。每天监测动物的发病率和死亡率。结果示于图14A中。

[1028] HT29+huB7-H4(克隆4)

[1029] 将HT29+huB7-H4克隆4细胞系在37℃、在空气中5% CO^2氛围下、在补充有10%胎牛血清的McCoy's改良5A培养基中保持体外培养。收获呈指数生长的HT29+B7-H4克隆4细胞并将5×10^6个细胞(在0.2ml体积的PBS:Cultrex=1:1中)植入雌性CB-17SCID小鼠的右腹。在处理前,立即使用"确定性"随机化方法(Study Director™软件)将小鼠随机分到治疗组中(平均肿瘤体积=250mm^3)。在施用前,将所有抗体-药物缀合物立即在缓冲液(25mM组氨酸、7%蔗糖、0.02% PS80、pH 6.0)中稀释。以单一剂量i.v.施用ADC。每周记录两次肿瘤和体重测量结果,并使用等式长度(mm)x宽度(mm)^2/2计算肿瘤体积。每天监测动物的发病率和死亡率。结果示于图14B中。

[1030] 实例13

[1031] 食蟹猴B7-H4转染的细胞的体外细胞毒性(EO2-GL-SG3249)

[1032] 将克隆EO2-GL缀合至细胞毒素SG3249(提供EO2-GL-SG3249),并测试其靶向和杀死食蟹猴B7-H4转染的细胞和未B7-H4转染的细胞的能力。为方便起见,使用此实例中测试的包含Maia重链骨架(例如,具有半胱氨酸插入,这提供了SG3249可缀合的额外位点,参见SEQ ID NO:48)的抗体。在使用其他重链骨架(例如,缺少这种半胱氨酸插入,例如参见SEQ ID NO:52)的情况下不会发生功效损失。将缀合至SG3249的抗体R347用作对照。

[1033] "EO2-GL"抗体具有ZYOEQD-EO2的CDR序列(例如与其对应)("GL"表示抗体已被种系化)。例如,这些实例中的EO2-GL包含SEQ ID NO:45的VH链序列,例如SEQ ID NO:43的种系化形式。

[1034] 转染的细胞很容易被EO2-GL-SG3249缀合物(其IC50为0.6721ng/ml)靶向并杀死。在未转染的细胞中未观察到添加EO2-GL-SG3249缀合物后的显著杀伤作用(参见图15)。

[1035] 实例14

[1036] EO2-GL作用方式

[1037] 监测EO2-GL在活细胞中的内化动力学

[1038] 使用缀合至荧光标记物AF647的EO2-GL处理活细胞。在处理后0min时,在细胞膜上注意到荧光簇(表明与膜上存在的B7-H4结合)。时程分析表明,细胞内荧光点的数量随时间稳定增加,这表明抗体与受体抗原一起内化。与Lamp1-AF488(溶酶体的标记物)的共同可视化显示出显著的重叠,这表明所结合的抗体通过胞吞作用被内化(参见图16A-16C)。

[1039] 在与靶抗原结合后观察到的抗体的内化是非常有利的,因为这种内化通常被认为是实现所需ADC效果的先决条件。

[1040] "EO2-GL"抗体具有ZYOEQD-EO2的CDR序列(例如与其对应)("GL"表示抗体已被种系化)。例如,这些实例中的EO2-GL包含SEQ ID NO:45的VH链序列,例如SEQ ID NO:43的种系化形式。

[1041] EO2-GL-SG3932 ADC:作用机制

[1042] 在用NIP228、EO2-GL、NIP228-SG3932、EO2-GL-SG3932、或弹头SG3924(作为对照)(mAb或ADC为10ug/ml,弹头为10nM)处理HT29+huB7-H4克隆26细胞后,制备裂解物并用针对pATR、ATR、pChk1、Chk1、pATM、ATM、pChk2、ChK2、pH2AX、H2AX和肌动蛋白(上样对照)的抗体进行蛋白质印迹分析-参见图17A。结果表明EO2-GL-SG3932的拓扑异构酶I毒弹头(SG3924)激活ATM和ATR信号传导,这表明EO2-GL-SG3932处理导致体外双链DNA断裂。

[1043] 在用NIP228、EO2-GL、NIP228-SG3932、EO2-GL-SG3932、或弹头SG3924(作为对照)

(mAb或ADC为10ug/ml,弹头为10nM)处理MX-1细胞后,制备裂解物并用针对pATR、ATR、pATM、ATM、pH2AX、H2AX和肌动蛋白(上样对照)的抗体进行蛋白质印迹分析-参见图17B。结果表明E02-GL-SG3932的拓扑异构酶I毒弹头(SG3924)激活ATM和ATR信号传导,这表明E02-GL-SG3932处理导致体外双链DNA断裂。

[1044] 方法:

[1045] 将HT29+huB7-H4克隆26和MX-1细胞分别以500,000个和1,500,000个细胞/孔的密度铺板在6孔板中的含有10%热灭活FBS的培养基中。第二天,去除铺板培养基,并将细胞与HT29+huB7-H4克隆26细胞、NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932和E02-GL-SG3932(浓度为10μg/mL)在完全培养基中一起孵育。将10nM的弹头SG3924用作对照。72小时后,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤一次,然后通过添加Laemmil还原缓冲液(上样缓冲液,波士顿生物产品公司(Boston BioProducts))进行裂解。短暂孵育后,收集细胞裂解物,将等量的细胞裂解物加载到Bis NuPAGE Novex Bis-Tris凝胶(英杰公司)上,并将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(英杰公司)上。用5%脱脂奶粉和在Tris缓冲盐水(pH 7.4)中的0.1%吐温20(西格马公司)(TBST)封闭膜,并在4℃与来自细胞信号传导公司(Cell Signaling)的针对pATM-Ser1981(#4526)、ATM(#2873)、pATR-Thr1989(#58014)、ATR(#13934)、pChk1-Ser345(#2348)、Chk1(#2360)、pChk2-Thr68(#2197)、Chk2(#3440)pH2AX-Ser139(#2577)和H2AX(#2595)的抗体一起孵育过夜。使用针对肌动蛋白的抗体(A1978,西格玛公司)以确保在所有孔中加载等量的蛋白质。将膜在于TBS中的0.1%吐温20中洗涤,然后与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的链霉抗生物素蛋白第二抗体(GE医疗集团(GE Healthcare))一起孵育1小时。洗涤后,通过使用SuperSignal West Femto化学发光底物和SuperSignal West Pico化学发光底物(皮尔斯公司(Pierce)/赛默科学公司(Thermo Scientific))检测蛋白质条带。使用ImageQuant LAS4000仪(GE医疗集团)捕获和分析图像。

[1046] E02-GL-SG3249 ADC:作用机制

[1047] 在用E02-GL-SG3249、以及SG3199(作为对照)(分别为100ng/ml和100pM)处理HCC1569细胞后,制备裂解物并使用针对以下的抗体进行蛋白质印迹分析:pATR、ATR、pChk1、Chk1、pRPA32、RPA32、pATM、ATM(均参与ATR信号传导),pChk2、ChK2、pKAP1、KAP1(均参与ATM信号传导),pDNA-PK、DNA-PK、pH2AX、H2AX、pBRCA1、BRCA1(均参与DNA双链断裂),pFANCD2和GAPDH(上样对照)。阴性对照是仅PBS处理。

[1048] 结果表明E02-GL-SG3249的PBD二聚体弹头(SG3199)激活ATM和ATR信号传导,这表明E02-GL-SG3249处理导致体外双链DNA断裂(参见图17C)。

[1049] 半胱天冬酶3/7活性

[1050] 将SKBR-3细胞用E02-GL-SG3249、SG3199和奥拉帕尼(对照)处理,并通过IncuCyte监测半胱天冬酶3/7活性(例如细胞凋亡)。观察到半胱天冬酶3/7活性水平的剂量依赖性增加(参见图18)。

[1051] 实例15

[1052] E02-GL-SG3249和弹头SG3199对肿瘤细胞的体外活性

[1053] 将多种癌细胞系用克隆E02-GL-SG3249(例如,缀合至细胞毒素)处理,如表15所示。结果示于图19中。

[1054] 表15.

[1055]

细胞系	注释	E02-GL MESF
HT29	B7-H4阴性	2,101
HT29 hB7H4克隆4		71,928
HT29 hB7H4克隆44		147,125
HT29 hB7H4克隆26		429,398
HEK293 JI亲本	B7-H4阴性	3,266
HEK 293 JI hB7H4池	在池中有一些阴性细胞	2,481,266
HCC1954		47,173
SKBr3		78,343
Zr75-1		80,699
HCC1569		112,608
MDA-MB-468		92,157
OVCAR4		261,997

[1056] 实例16

[1057] E02-GL-SG3249引起体外肿瘤细胞的旁观者杀伤

[1058] 将HT29 B7-H4表达细胞用E02-GL-SG3249处理4天,之后取出条件培养基并添加到HT29 WT(即,不表达B7-H4)中。在添加条件培养基后观察到细胞活力快速降低,这在未处理的对照中未观察到(参见图20)。

[1059] “E02-GL”抗体具有ZY0EQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1060] 实例17

[1061] E02-GL-SG3249抑制肿瘤异种移植物的生长

[1062] 使用以下癌细胞系在小鼠上制备肿瘤异种移植物:

[1063] -OVCAR4(顺铂难治性卵巢癌;B7-H4高表达)

[1064] -HCC1569(HER2阳性乳腺癌;异源性B7-H4表达)

[1065] -MDA-MB-468(三阴性乳腺癌;B7-H4低表达)

[1066] “E02-GL”抗体具有ZY0EQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1067] 与对照(仅媒介物)相比,观察到肿瘤体积显著减少,令人惊讶地,这对于低水平表达B7-H4的TNBC肿瘤也是如此(参见图22),表明E02-GL-SG3249在抑制肿瘤生长方面具有较高的效力。

[1068] 实例18

[1069] E02-GL-SG3249引起体内肿瘤细胞的旁观者杀伤

[1070] 通过共同移植表达B7-H4的HT29细胞系与不表达其的HT29细胞(1:1的比例)产生B7-H4异源性肿瘤。这些异种移植物的异源性并没有阻止E02-GL-SG3249对它们的生长抑制,这一点很明显(参见图23)。这是非常有利的,因为发明人已经发现B7-H4会在肿瘤内异源表达。

[1071] 实例19

[1072] 与“1D11”相比,E02-GL ADC对表达

[1073] B7-H4的细胞具有优越的体外细胞毒性

[1074] 将克隆E02-GL(ZYOEQD_E02种系化的(GL))缀合至细胞毒素SG3249(提供E02-GL-SG3249 ADC)或AZ1508(提供E02-GL-AZ1508),并与Genentech“1D11”ADC(1D11与(A114C-)MMAE缀合)进行比较,比较其靶向和杀伤表达B7-H4的细胞的能力。

[1075] “E02-GL”抗体具有ZYOEQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1076] 细胞毒性测定(参见上文材料与方法)表明,与1D11 ADC(1D11与(A114C-)MMAE缀合)相比,E02-GL ADC(E02-GL-SG3249)具有优越的细胞毒性效力-参见图21。

[1077] 如下进行ADC滴定:

[1078]

1D11-A114C-MMAE	100 µg/ml	25 µg/ml	6.25 µg/ml	1.56 µg/ml	390 ng/ml	98 ng/ml	24.5 ng/ml	6.12 ng/ml	1.53 ng/ml	382 pg/ml
E02-maia-GL-SG3249	4 µg/ml	1 µg/ml	250 ng/ml	65 ng/ml	16 ng/ml	4 ng/ml	1 ng/ml	250 pg/ml	62.5 pg/ml	16 pg/ml

[1079] 实例20

[1080] E02-GL-SG3249在患者源性异种移植

[1081] (PDX)模型中具有有效的体内活性

[1082] 使用具有不同的B7-H4表达水平的癌细胞系生成患者源性异种移植模型,如表16中所述。在所有模型中都观察到肿瘤生长受到抑制(参见图24)。“E02-GL”抗体具有ZYOEQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1083] 表16.

[1084]

模型	癌症类型	%肿瘤生长抑制(TGI)*
HBCx-10	乳腺癌(三阴性)	90
CTG-012	乳腺癌(三阴性)	90
HBCx-11	乳腺癌(三阴性)	80
T330	乳腺癌(三阴性)	70

HBCx-9	乳腺癌（三阴性）	70
T168	乳腺癌（HR+）	60
T272	乳腺癌（HR+）	30
CTG-1106	乳腺癌（三阴性）	30
CTG-052	乳腺癌（三阴性）	30
CTG-1086	卵巢癌	20
CTG-1153	乳腺癌（三阴性）	< 10
CTG-0897	卵巢癌	< 10
CTG-017	乳腺癌（三阴性）	< 10
T226	乳腺癌（Her2+）	< 10
CTG-0992	卵巢癌	0

[1085]

[1086] *%肿瘤生长抑制(TGI),0.3mg/kg E02-GL-SG3249与媒

[1087] 介物;最小二乘均数(LSM)&TGI＝100*(LSM媒介物-LSM

[1088] 'E02-GL-SG3249')/LSM媒介物

[1089] +++＝高阳性表达;++和+＝低阳性表达

[1090] 实例21

[1091] E02-GL-SG3249在肿瘤异种移植物中引起双链断裂

[1092] 生成肿瘤异种移植模型(使用HCC1954细胞),并将其用E02-GL-SG3249处理。"E02-GL"抗体具有ZY0EQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)("GL"表示抗体已被种系化)。

[1093] 然后进行免疫组织化学以确定处理后的γH2AX(双链断裂的标志物)。在E02-GL-SG3249处理后长达10天,观察到γH2AX阳性肿瘤细胞的数量增加(参见图25)。

[1094] 实例22

[1095] 使用KinExA 3200分析E02_GL的亲和力

[1096] 使用KinExA技术进行以下实验,该实验用于获得克隆E02_GL抗B7H4 Fab与人B7H4的亲和力(KD)的估计值。"E02-GL"抗体具有ZY0EQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)("GL"表示抗体已被种系化)。

[1097] 在25℃,在5、10或45nM固定浓度的Fab存在下,对一系列人B7H4浓度进行平衡过夜。在KinExA 3200上分析了这些浓度,并全局拟合了数据集(N曲线分析)。结果汇总在表17中。

[1098] 表17.

[1099]

抗体	B7H4	K_D的最佳估计值	N曲线分析，注释
E02_GL	人	1.2 nM	K_D = 1.21 nM，95%置信区间 = 0.556 - 2.22 nM。 62%的h B7H4具有表位活性，95%置信区间 =51%-77%

[1100] 62%的h B7H4活性数字与Rmax计算以及E02_GL的基于Biacore的亲和力评估非常匹配。

[1101] 实例23

[1102] E02_GL结合B7-H4与mAb“1D11”结合B7-H4的比较

[1103] 对克隆E02_GL进行ELISA分析，以确定与人和小鼠B7-H4的结合。将结合直接与mAb 1D11(基因泰克公司)和R347同种型对照进行比较。“E02-GL”抗体具有ZYOEQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1104] 与小鼠B7-H4相比，E02_GL对人B7-H4显示出更高的结合亲和力(参见例如图2E)。有利的是，与Genentech“1D11”mAb(显示出更弱的结合)相比，E02-GL显示出对人B7-H4的结合(亲和力)显著更强，如通过ELISA和FACs分析所证明的-分别参见图7和图8。事实上，Genentech“1D11”mAb以与小鼠B7-H4相似的水平(低)结合人B7-H4(这表明与E02_GL相比，“1D11”对人蛋白质的特异性较低)。

[1105] 实例24

[1106] 显示E02_GL的肿瘤定位的影像学研究

[1107] 体内成像研究按照材料与方法(上文)中所述地进行，即使用800CW标记的抗体(E02_GL)。“E02-GL”抗体具有ZYOEQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1108] 对于HT29，在第3、7、14天；对于CT26，在第3天和第7天，以及在第10天的p＝0.06；对于4T1，在第7天，均观察到与WT肿瘤相比，B7-H4 Ab(E02_GL)优先定位于表达B7-H4的肿瘤-参见图26和27。

[1109] 总辐射效率产生了最清晰的结果。当相对于肿瘤体积标准化时，观察到类似的趋势。

[1110] 实例25

[1111] 使用E02-GL-SG3249进行毒理学研究

[1112] 将E02-GL-SG3249施用于雄性食蟹猴(N＝2/剂量水平)。该“E02-GL”抗体具有ZYOEQD-E02的CDR/VH序列(例如与其对应)(“GL”表示抗体已被种系化)。

[1113] 未观察到异常毒性，并且毒性与其他类似的PBD-ADC一致(通过监测标准靶器官：肾、骨髓、皮肤；没有证据表明与靶标有关的影响)。

[1114] 药理学研究

[1115] 进行体外和体内药理学研究以进一步表征E02-GL抗体(E02-GL抗体及其抗原结合Fab中间体，后者在本文中称为“E02-INT”)的作用和作用机制。E02-GL-SG3932 ADC-GL-SG3932是一种针对B7-H4的ADC，并且包含经由可裂解的马来酰亚胺-PEG8-缬氨酸-丙氨酸

接头(可裂解的mal-PEG8-val-ala接头)缀合至TOP1i弹头的抗B7-H4人IgG1κ单克隆抗体(即,E02-GL)。TOP1i弹头在本文中称为SG3924。TOP1i药物通过硫代琥珀酰亚胺键联与抗体中的天然半胱氨酸共价结合,每个抗体结合大约8个药物(即,DAR为8)。E02-GL-SG3932 ADC的示意图示于图29A中。E02-GL-SG3932 ADC与竞争对手ADC的主要区别特征示于如图29B中。

[1116] E02-GL-SG3932的特症在下文阐述并在本文其他地方进一步描述:

[1117] ●mAb E02-INT:与人和食蟹猴B7-H4的特异性结合(亲和力分别为3.7nM、3.94nM)

[1118] ●弹头SG3932

[1119] ●接头-弹头:可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932

[1120] 体外研究

[1121] 实例26

[1122] 通过免疫组织化学进行B7-H4表达谱分析

[1123] 使用经验证的IHC方案评估B7-H4的表达谱,以证明B7-H4在FFPE正常食蟹猴和人组织以及人肿瘤组织中表达。

[1124] B7-H4显示在有限数量的正常人组织中表达,并且当存在时,通常在样品的<10%的总细胞中表达(输卵管和肺支气管除外),仅限于导管或管状上皮,并且主要位于腔顶膜上(表18)。在正常食蟹猴组织中检测到类似的B7-H4表达谱(表2和表19),其中B7-H4显示在有限数量的组织中表达,表达谱仅限于导管或管状上皮并且主要位于腔顶膜和细胞质内。图30显示了在选定的正常人和食蟹猴组织中B7-H4的免疫组织化学染色的代表性图像。

[1125] 表18.B7-H4在人正常组织中表达的免疫组织化学结果

[1126]

组织	显示B7-H4 IHC染色的供体数	显示阳性B7-H4染色的组织的相对比例	强度[a]	细胞定位	详情
乳腺	6/6	< 10%	+/+++	腔 m	导管上皮细胞
附睾	3/3	< 5%	++	腔 m	导管中的腔膜
输卵管	3/3	< 30%	++/+++	腔 m	导管上皮染色
肾	11/11	< 5%	++ /+++	腔 m > c	腔膜和偶见小管中的一些细胞质染色
肝	2/3	1%	+/++	腔 m	偶见小胆管的腔膜

[1127]

组织	显示 B7-H4 IHC 染色的供体数	显示阳性 B7-H4 染色的组织的相对比例	强度[a]	细胞定位	详情
肺 - 支气管	7/7	< 20%	++/+++	腔 m > c	支气管上皮中的基底细胞和来自支气管腺的偶见导管上皮
食管	1/3	1%	+	腔 m	黏膜下腺中偶见上皮细胞的基底外侧膜
卵巢	3/6	1%	+/++	c > m	显示颗粒细胞的单个成熟卵母细胞
胰腺	8/8	< 5%	+/+++	腔 m	泡心细胞的腔膜和细胞质，以及闰管的腔染色
垂体	3/3	< 5%	++/+++	m > c	中间部细胞中的偶见的定位细胞，其显示在毛囊和 Rathke's 裂上皮细胞中的胶体的染色
前列腺	3/3	< 10%	++/+++	m > c	一些导管中的基底上皮细胞
精腺	3/3	< 10%	++/+++	腔 m	几个导管上皮细胞
皮肤	15/16	< 5%	++/+++	腔 m	偶见汗腺导管上皮膜、毛囊上皮膜
输尿管	3/3	< 5%	+/++	m > c	一些基底尿路上皮细胞中的细胞质染色
膀胱	8/8	< 10%	++/+++	腔 m > c	尿路上皮细胞的顶端
所有其他组织均未显示阳性 B7-H4 IHC 染色			肾上腺、主动脉、动脉、骨髓、脑、盲肠、结肠、十二指肠、眼睛、心脏、回肠、空肠、肺、淋巴结、神经、直肠、唾液腺、骨骼肌、脊髓、脾、胃、睾丸、胸腺、甲状腺、舌、阴道		

[1128] c:细胞质;m:膜。

[1129] [a]所有染色的载玻片均由病理学家审查并评分,评估表达B7-H4的细胞比例、染色强度和染色的细胞定位。强度报告为弱(+)、

[1130] 中等(++)或强(+++)。

[1131] 使用IHC在一系列人肿瘤组织中评估B7-H4表达并由病理学家评分。表19详述了人肿瘤组织表达的汇总,代表性图像显示在图31中。

[1132] 表19.B7-H4在人肿瘤组织中表达的免疫组织化学结果

[1133]

肿瘤适应症	具有高B7-H4+肿瘤的供体比例（%）[a]	具有低B7-H4+肿瘤的供体比例（%）[b]	具有阳性B7-H4+肿瘤的供体比例（%）[c]	具有B7-H4+肿瘤的供体的总比例（%）[d]	供体总数
子宫内膜腺癌	42.4	45.5	6.1	93.9	66
乳腺癌（TNBC）	28.8	35.1	12.6	76.6	111
乳腺癌（ER+）	32.6	32.3	10.8	75.7	288
乳腺癌（HER2+）	46.7	23.3	13.3	83.3	30
卵巢癌（浆液性乳头状）	49.3	28.0	6.7	84.0	75
胆管癌	33.3	30.3	21.2	84.8	66
NSCLC-SCC	15.0	27.5	23.5	66.0	153

[1134] [a]高B7-H4:含有50%至100%的B7-H4阳性细胞的人肿瘤组织样品。

[1135] [b]低B7-H4:含有5%至49%的B7-H4阳性细胞的人肿瘤组织样品。

[1136] [c]阳性B7-H4:含有1%至4%的B7-H4阳性细胞的人肿瘤组织样品。

[1137] [d]表示含有1%至100%的B7-H4阳性细胞的人肿瘤组织样品的比例。

[1138] 此实例表明B7-H4在多种类型的人癌症中表达,包括乳腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、非小细胞肺癌鳞状细胞癌和卵巢浆液性癌。

[1139] 实例27

[1140] 食蟹猴、恒河猴、小鼠和大鼠中人B7-H4与直向同源物的序列同源性比较

[1141] 鉴定了人B7-H4的氨基酸序列,并与食蟹猴、恒河猴、小鼠和大鼠中的直向同源物进行比对。基于这些比对的结果计算同一性百分比。B7-H4在非人灵长类动物中非常保守;对于全长结构域区域和细胞外结构域区域,人B7-H4(hB7-H4)与食蟹猴(cyB7 H4)和恒河猴(rhB7-H4)分别具有98%和99%的序列同一性(图32)。啮齿动物物种保守性较差;对于全长B7-H4,小鼠和大鼠B7-H4与hB7-H4分别具有87%和86%的序列同一性,与hB7-H4在细胞外结构域方面具有分别为90%和89%的序列同一性。

[1142] 此实例证明,人和非人灵长类动物中B7-H4的高氨基酸序列同一性表明EO2-GL-SG3932可能与食蟹猴和恒河猴B7-H4结合。相比之下,人、小鼠和大鼠B7-H4之间的氨基酸同

一性比较低,这表明E02-GL-SG3932与鼠或大鼠B7-H4的结合不太可能。

[1143] 实例28

[1144] E02-GL-SG3932在小鼠、大鼠、食蟹猴和人血清中孵育十五天后的稳定性

[1145] 已知携带经由硫代琥珀酰亚胺与半胱氨酸连接的药物的ADC在生理环境中会由于逆迈克尔反应而表现出一些药物损失。该过程会再生用于缀合的半胱氨酸和携带马来酰亚胺的药物,从而随着时间的推移降低ADC的DAR。这种脱缀合过程是含有通过硫代琥珀酰亚胺与抗体连接的药物的ADC的已知特性。

[1146] 通过免疫沉淀然后通过还原反相质谱法(rLCMS(ONC8205-012))评估E02-GL-SG3932在食蟹猴、小鼠和大鼠血清中的稳定性。测量结果表明,在小鼠、大鼠和食蟹猴血清中孵育后,E02-GL-SG3932发生低于20%的药物损失,第15天时分别在小鼠、大鼠和食蟹猴血清样品中,84.5%、83.5%和82.0%的SG3924仍然附着在E02-GL-SG3932上。通过使用人B7-H4涂覆的树脂进行免疫捕获、然后通过rLCMS来评估E02-GL-SG3932在人血清中的稳定性。测量结果表明,在人血清中孵育后药物损失不大,第15天时81%的SG3924仍附着在E02-GL-SG3932上。

[1147] 此实例表明药物释放的机制是通过逆迈克尔反应脱缀合而不是接头裂解,这与通过马来酰亚胺与链间二硫化物包含的半胱氨酸氨基酸缀合而制备的其他ADC一致。

[1148] 实例29

[1149] 抗体中间体E02-INT Fab对重组B7-H4抗原的结合亲和力

[1150] 通过表面等离子体共振(SPR)测定抗B7-H4抗体E02-INT Fab对重组人、食蟹猴和小鼠B7-H4变体的结合亲和力。表20中显示的解离常数(K_D)值证明E02-INT Fab以相似的亲和力结合固定化的人和食蟹猴B7-H4。相比之下,E02-INT Fab对小鼠B7-H4抗原的亲和力比对人B7-H4抗原的亲和力低大约100倍。

[1151] 表20.通过SPR测定的抗B7-H4抗体中间体E02-INT Fab对人、食蟹猴和小鼠B7-H4的结合亲和力

[1152]

物种	K_D
人	3.70nM
食蟹猴	3.94nM
小鼠	405(±15)nM

[1153] Fab:抗原结合片段

[1154] 实例30

[1155] E02-GL-SG3932对人FcRn和Fcγ受体的结合亲和力

[1156] 通过SPR评估E02-GL-SG3932对人FcRn和Fcγ受体的结合亲和力。人FcRn对E02-GL-SG3932的稳态结合亲和力(K_D)为4360nM。E02-GL-SG3932对huFcγRI的平衡KD为4.35nM。E02-GL-SG3932对huFcγRIIa、huFcγRIIb、huFcγRIIIA-158V和huFcγRIIIA-158F的平衡K_D的范围为3307至21640nM。

[1157] 实例31

[1158] 抗体中间体E02-INT和E02-GL-SG3932对重组人B7-H4抗原的结合亲和力的比较

[1159] 为了评估拓扑异构酶1接头-弹头的缀合是否影响E02-INT抗体的结合特性,使用DELFIA-ELISA方法和SPR方法测量了E02-INT和E02-GL-SG3932的结合亲和力。如图33所示,

DELFIA-ELISA测定的结果表明,E02-INT和E02-GL-SG3932与固定化的重组人B7-H4类似地结合,EC50值分别为1.98nM和1.71nM。还通过SPR、使用抗体捕获方法测定E02-INT和E02-GL-SG3932对人B7-H4抗原的动力学速率常数(k_{on}和k_{off})和平衡解离常数(K_D)。如表21所示,E02-INT和E02-GL-SG3932与人B7-H4类似地结合,KD值分别为31.1nM和29.3nM。

[1160] 表21.通过SPR测定的抗体中间体E02-INT和E02-GL-SG3932对人B7-H4的结合亲和力

[1161]

种类	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (nM)	R_{max} (RU)
E02-INT	9.38×10^4	2.92×10^{-3}	31.1	56.8
E02-GL-SG3932	9.55×10^4	2.80×10^{-3}	29.3	49.7

[1162] RU:共振单位

[1163] 实例30和31的结果表明,E02-INT抗体的结合特性在与拓扑异构酶1接头-弹头缀合后保持不变。

[1164] 实例32

[1165] 抗体中间体E02-INT与表达人、食蟹猴或小鼠B7-H4的工程化HEK

[1166] 293细胞的细胞结合

[1167] 使用流式细胞术测量抗体E02-INT与非转导的HEK 293Jump In TREX细胞和稳定表达人、鼠或食蟹猴B7-H4的HEK 293Jump In TREX细胞的结合。抗体E02-INT结合稳定表达人、鼠和食蟹猴B7-H4的HEK 293Jump In TREX细胞,但不结合B7-H4阴性非转导的HEK 293Jump In TREX细胞(图34)。与表达人或食蟹猴B7-H4的细胞相比,与表达鼠B7-H4的HEK 293Jump In TREX细胞的结合减少。

[1168] 实例33

[1169] 抗体中间体E02-INT和E02-GL-SG3932与人乳腺癌细胞系以及与稳定表达人B7-H4的HT29细胞的细胞结合

[1170] 使用流式细胞术测量抗体E02-INT和E02-GL-SG3932与人乳腺癌细胞系MX-1和MDA-MB-468以及与稳定表达人B7-H4的工程化HT29结肠癌细胞的结合。如图35所示,E02-INT和E02-GL-SG3932与稳定表达人B7-H4的HT29细胞(HT29-huB7-H4克隆4和HT29-huB7-H4克隆26)类似地结合,但不结合B7-H4阴性非转导的HT29。E02-INT和E02-GL-SG3932还与MX-1细胞和MDA-MB-468细胞结合,这表明抗体中间体和ADC可以识别人癌细胞系中内源性表达的B7-H4。E02-INT和E02-GL-SG3932的结合是相当的。

[1171] 实例32和33证明,亲本抗体的细胞结合特性在与拓扑异构酶1接头-弹头缀合后保持不变。

[1172] 实例34

[1173] E02-GL-SG3932的体外细胞毒性

[1174] 使用CellTiter-Glo测定,使用靶标阴性人结肠癌细胞系HT29、工程化人结肠癌细胞系HT29-huB7-H4克隆26和人乳腺癌细胞系MX-1来测定E02-GL-SG3932处理对细胞活力的影响。如图36所示,E02-GL-SG3932对表达B7-H4的HT29-huB7-H4克隆26和MX-1细胞具有细胞毒性,IC_{50}值分别为0.036μg/mL和0.029μg/mL。相比之下,在B7-H4阴性HT29细胞系中,在

E02-GL-SG3932和同种型匹配的对照ADC(NIP228-SG3932)之间没有观察到活性差异,这表明E02-GL-SG3932可以特异性杀伤表达人B7-H4的癌细胞。

[1175] 实例35

[1176] E02-GL-SG3932的体外细胞毒性

[1177] 当IgG抗体经由其Fab结构域结合细胞表面抗原时,抗体的Fc部分可以与自然杀伤细胞上的FcγRIIIa结合。Fc结构域与FcγRIIIa的相互作用诱导FcγR的交联,从而触发含有穿孔素和颗粒酶的细胞毒性颗粒的释放,导致靶细胞死亡,这一过程称为抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。使用分离的原代人NK细胞和人乳腺癌SKBR3细胞系作为靶细胞来评估抗体E02-INT和E02-GL-SG3932启动ADCC活性的潜力。在该测定中,E02-INT和E02-GL-SG3932产生的ADCC活性均比未处理的共培养细胞显著增加(图36A-36C)。与E02-INT相比,E02-GL-SG3932的活性略有降低,但这种差异在统计学上不显著,表明E02-INT和E02-GL-SG3932都可以引发体外ADCC活性。

[1178] 接下来,在1μg/mL E02-GL-SG3932、抗体中间体E02-INT、同种型匹配的对照抗体NIP228和同种型匹配的对照ADC NIP228-SG3932存在下,将人乳腺癌SK-BR-3细胞与从六名健康供体中分离的NK细胞共培养(图37)。通过Incycte®膜联蛋白V染料结合凋亡细胞上的细胞外表面暴露的磷脂酰丝氨酸、产生明亮且稳定的红色荧光信号来评估ADCC活性。倍数变化基于非药物处理的NK/SK-BR-3共培养细胞的最大细胞死亡。通过将实验孔中的平均红色目标物除以星孢菌素处理的SK-BR-3细胞中的平均最大细胞死亡来计算最大细胞死亡。

[1179] 实例36

[1180] 抗体E02-INT的内化和溶酶体运输

[1181] 使用定量活细胞成像测定在MX-1人乳腺癌细胞和过表达B7-H4的HT29 huB7-H4克隆26人结肠癌细胞中评估抗体E02-INT的内化和细胞内运输特性。延时序列图像显示,在人乳腺癌(MX-1)和结肠癌(HT29-huB7-H4克隆26)细胞系中,强烈的E02-INT膜信号从0分钟持续到120分钟,E02-INT的内化到240分钟时持续增加(图38、图39A和图39B)。两种细胞系的内化动力学测量结果显示,HT29-huB7-H4克隆26和MX-1细胞的内化半衰期分别为127(±35SD)分钟和102(±18SD)分钟(图39C)。

[1182] 使用共聚焦显微镜,通过测量与早期内体标记物即早期内体抗原1(EEA1)和溶酶体标记物即溶酶体相关膜蛋白1(LAMP1)的共定位来确定E02-INT的细胞内运输。如图40所示,E02-INT在LAMP1修饰的亚细胞区室中富集,而与EEA1的共定位有限,这表明内化后,E02-INT被运输到细胞的溶酶体区室中。

[1183] 实例37

[1184] 由E02-GL-SG3932和SG3924进行的DNA损伤应答信号传导的体外激活

[1185] 在用E02-GL-SG3932或其TOP1i弹头SG3924处理后,使用蛋白质印迹来评估MX-1人乳腺癌细胞系和工程化结肠癌细胞系HT29-huB7-H4克隆26中的DDR通路激活。如图41所示,用10μg/mL E02-GL-SG3932或10nM SG3924处理MX-1细胞导致ATM信号传导通路的激活,明显可见的是,ATM(Ser 1981)的磷酸化早在24小时时增加并在72小时的处理期内持续增加。类似地,E02-GL-SG3932和SG3924诱导了ATR的激活(Thr 1989磷酸化),在48小时和72小时的时间点观察到。在处理24小时后观察到γH2AX增加,并持续到72小时处理期,这表明DNA损伤。

[1186] E02-GL-SG3932或其TOP1i弹头对DDR信号传导的影响也在结肠直肠癌细胞系HT29-huB7-H4克隆26(被工程化以表达B7-H4)中进行了检查。如图42所示,用10μg/mL E02-GL-SG3932或10nM SG3924处理导致DDR信号传导通路的激活,这由ATR(Thr 1989)、其下游靶标Chk1(Ser 345)和Chk2(Thr 68)的磷酸化增加证明。这种磷酸化的增加在72小时的处理期内持续存在。类似地,在用E02-GL-SG3932和TOP1i弹头处理后,在48小时和72小时时间点观察到ATM(Ser 1981)及其下游靶标KAP1(Ser 824)的激活。在处理48小时后观察到γH2AX增加,并持续到72小时处理期,这表明DNA损伤。

[1187] 总之,这些结果证实,在两种不同的细胞系中,E02-GL-SG3932激活了与其TOP1i弹头的作用机制一致的DDR通路。

[1188] 体内研究

[1189] 体外研究证明E02-GL-SG3932能够以相似的亲和力结合人和食蟹猴B7-H4,即E02-GL-SG3932特异性结合表达B7-H4的肿瘤细胞并且对其具有细胞毒性,并可以在分离的原代NK细胞共培养测定中引发适度的ADCC活性,即E02-GL-SG3932的抗体中间体(E02-INT)被内化到肿瘤细胞中并被运输到溶酶体区室中,并且用E02-GL-SG3932或其TOP1i弹头处理激活了表达B7-H4的细胞系中的DDR信号传导通路。为了进一步阐明E02-GL-SG3932的作用机制并确定这些体外发现是否转化为抗肿瘤活性,使用了体内小鼠模型。

[1190] 实例38

[1191] E02-GL-SG3932在HT29-huB7-H4克隆26异种移植模型中的药效学研究

[1192] 在使用免疫缺陷CB-17SCID小鼠的人肿瘤异种移植小鼠模型中评估E02-GL-SG3932处理后的药效学作用。使动物皮下(SC)接种被工程化以表达人B7-H4的人结肠癌细胞系HT29-huB7-H4克隆26,并且在肿瘤体积增长到大约250至300mm3后,将动物随机分组,每只小鼠接受E02-GL-SG3932或对照品的IV注射。在指定的时间点收集肿瘤,将其固定在10%中性缓冲福尔马林中,随后处理并嵌入石蜡块中。使用IHC和图像分析技术检查肿瘤样品中随时间推移的人IgG、γH2AX病灶、裂解的半胱天冬酶-3和上皮细胞密度。图43A-43F显示了在单次IV施用7mg/kg E02-GL-SG3932或同种型匹配的对照ADC NIP228 SG3932后168小时收集的肿瘤中人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3的代表性IHC图像。

[1193] 如图44A-44D所示,在肿瘤细胞中观察到E02-GL-SG3932随时间推移的剂量依赖性积累,如通过人IgG IHC测定所见的。E02-GL-SG3932的积累与γH2AX病灶的阳性染色增加相关,这预示了DNA损伤的诱导。与对照相比,在E02-GL-SG3932处理的肿瘤中,随时间的推移观察到裂解的半胱天冬酶-3升高和上皮细胞密度总体降低。

[1194] 总之,这些数据表明E02-GL-SG3932与肿瘤细胞上的B7-H4结合,引起DNA损伤和凋亡性细胞死亡。

[1195] 实例39

[1196] E02-GL-SG3932在皮下人乳腺癌和结肠癌异种移植模型中的抗肿瘤功效,体内功效,PDX

[1197] 在使用免疫缺陷CB-17SCID小鼠的人肿瘤异种移植小鼠模型中研究了抗体中间体E02-INT和E02-GL-SG3932的抗肿瘤活性。

[1198] HT29或HT29-huB7-H4克隆26异种移植模型

[1199] 首次在一对结肠癌细胞系异种移植模型中以两项独立的研究评估了E02-GL-

SG3932;HT29是B7-H4阴性的,并且HT29-huB7-H4克隆26来自HT29细胞系并被工程化以表达人B7-H4。在这两项研究中,使动物SC注射有HT29或HT29-huB7-H4克隆26细胞,并且在肿瘤体积增长到平均178mm3(HT29)或194mm3(HT29-huB7-H4克隆26)后,将动物随机分组,每只小鼠接受E02-GL-SG3932或对照品的IV注射。如图45A和45B所示,与媒介物处理的对照组相比,当以10mg/kg的单次IV剂量施用时,E02-GL-SG3932和同种型匹配的对照ADC NIP228-SG3932均未显著抑制HT29异种移植肿瘤的生长,分别显示12%(p=0.7006)和14%(p=0.6593)TGI。相比之下,与媒介物处理的对照组或同种型匹配的对照ADC NIP228-SG3932相比,当以5mg/kg、2.5mg/kg和1.25mg/kg的单次IV剂量给药时,E02-GL-SG3932显著抑制HT29-huB7-H4克隆26异种移植肿瘤的生长(图46A-46C),相对于媒介物的TGI分别为42%(p<0.001)、37%(p=0.0005)和31%(p=0.0039)。

[1200] MX-1乳腺癌异种移植模型

[1201] 在MX-1乳腺癌异种移植模型中评估了E02-GL-SG3932、同种型匹配的对照ADC NIP228-SG3932和E02-INT(E02-GL-SG3932的抗体中间体)的作用。使动物SC注射有MX-1细胞,并且在肿瘤体积增长到平均270mm3后,将动物随机分组,每只小鼠接受测试品或对照品的IV注射。与媒介物处理的对照组相比,当以5mg/kg、2.5mg/kg和1.25mg/kg的单次IV剂量给药时,E02-GL-SG3932显著抑制MX-1异种移植肿瘤的生长(图47A和47B),产生的TGI分别为100%(p<0.001)、96%(p<0.001)和98%(p<0.001)。

[1202] 以10mg/kg给药的抗体中间体E02-INT没有显著抑制肿瘤生长(TGI=-1%,p>0.9999)。在SCID小鼠中在这种高剂量水平下E02-INT活性的缺乏表明,ADCC可能不是体内E02-GL-SG3932活性的重要贡献者,并且E02-GL-SG3932的抗肿瘤作用是通过其TOP1i弹头驱动的。

[1203] MX-1和MDA-MB-468乳腺癌异种移植模型

[1204] 为了进一步阐明E02-GL-SG3932处理在体内的剂量依赖性效应,在MX-1和MDA-MB-468乳腺癌异种移植模型中评估了0.125mg/kg至2mg/kg范围内的剂量水平。在这两项研究中,使动物SC注射有MX-1或MDA-MB-468细胞,并且在肿瘤体积增长到平均大约138mm3(MX-1)或120mm3(MDA-MB-468)后,将动物随机分组,每只小鼠接受E02-GL-SG3932或对照品的IV注射。如图48所示,单次静脉内剂量的E02-GL-SG3932导致对MX-1异种移植物的剂量依赖性抑制。与第40天的未处理组相比,2mg/kg、1.5mg/kg和1mg/kg剂量水平的E02-GL-SG3932处理均导致100% TGI。0.75mg/kg、0.5mg/kg、0.25mg/kg和0.125mg/kg的E02-GL-SG3932剂量导致剂量依赖性%TGI分别为99.7%、80.1%、52.1%和-5.5%。类似地,单次静脉内剂量的E02-GL-SG3932导致对MDA-MB-468异种移植物的剂量依赖性抑制(图49)。与第55天的未处理组相比,2mg/kg、1.5mg/kg和1mg/kg剂量水平的E02-GL-SG3932处理分别导致97.7%、75.2%和66.6% TGI。0.75mg/kg、0.5mg/kg、0.25mg/kg和0.125mg/kg的E02-GL-SG3932剂量导致剂量依赖性%TGI分别为52.8%、58.4%、25.5%和31.8%。

[1205] 实例40

[1206] E02-GL-SG3932在患者源性三阴性乳腺癌异种移植模型中的抗肿瘤功效

[1207] 在使用免疫受损的无胸腺裸小鼠的一组26个人TNBC PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗肿瘤活性。这些PDX模型是在没有事先体外培养的情况下由人肿瘤样品建立的,并且已经研究了其组织学、细胞遗传学、遗传标志物和其他生物标志物、以及它们对标准治

疗的应答。将肿瘤碎片皮下移植到小鼠体内，并且一旦肿瘤体积增长到大约94至189mm3，将动物随机分组，每只小鼠接受剂量为1.25mg/kg或3.5mg/kg的EO2-GL-SG3932或对照品的单次IV注射。为了评估B7-H4表达与功效之间的关系，从每个模型的另外3只小鼠中收集了体积约为500至1183mm3的新鲜未处理的肿瘤，将其固定在10％中性缓冲福尔马林中，随后处理并嵌入石蜡块中。然后使用IHC和图像分析技术来表征B7-H4在每个模型中的肿瘤细胞膜上的表达。

[1208] IHC分析表明，这些PDX模型代表了B7-H4的异源肿瘤表达，具有不同水平的IHC染色强度和肿瘤染色比例，包括一个具有几乎不可检测水平的B7-H4的模型(HBCx-15)(图50)。

[1209] 在单剂量的1.25mg/kg EO2-GL-SG3932后观察到肿瘤生长抑制，其中46.2％的模型(26个中的12个)表现出肿瘤体积从基线减小30％或更多(图51)。其中，75％(12个中的9个)表达升高水平的B7-H4，H评分为100或更高(图52A和52B)。对于1.25mg/kg剂量水平的EO2-GL-SG3932，鉴定了H评分分类与响应者状态之间的显著相关性(费希尔精确检验，p＝0.047)，这表明B7-H4水平升高与对1.25mg/kg EO2-GL-SG3932的处理的应答相关。

[1210] 与1.25mg/kg剂量水平相比，单剂量的3.5mg/kg EO2-GL-SG3932后观察到更大的抗肿瘤活性，其中69.2％(26个中的18个)的测试模型表现出肿瘤生长从基线降低30％或更多(图53)。其中，66.7％(18个中的12个)表达升高水平的B7-H4，H评分为100或更高(图54A和54B)。在此剂量水平下，H评分分类与响应者状态之间的关联性是统计学上不显著的(费希尔精确检验，p＝0.073)。

[1211] 在此剂量水平下，还观察到NIP228-SG3932同种型ADC的活性增加，其中5个模型(T330、BCX-017-LOP、T168、HBCx-15和HBCx-6)表现出肿瘤生长从基线降低30％或更多(图53)。这5个模型有一个共同的特点；有缺陷的同源DNA修复，其被定义为存在BRCA1突变或RAD51病灶形成测定中的负评分，建议后者作为同源DNA修复能力的功能量度。

[1212] 此实例表明，在B7-H4表达水平升高且同源DNA修复有缺陷(其被定义为(1)BRCA1突变的存在，(2)RAD51病灶形成测定中的负评分)的肿瘤中施用EO2-GL-SG3932可减小肿瘤体积。图53B-53E显示在低剂量下，EO2-GL-SG3932应答与B7-H4表达水平和HR缺陷相关。在另一项研究中，以7mg/kg处理的PDX模型显示出高水平的同种型对照ADC活性(图60A-60B和图61)。

[1213] 此实例还表明，EO2-GL-SG3932在HR缺陷型肿瘤和B7-H4升高的HR精通型肿瘤中显示出强大的活性，并且HR缺陷型肿瘤对TOP1i产生的损伤更敏感且针对活性具有较低的B7-H4表达阈值。

[1214] 实例41

[1215] EO2-GL-SG3932在患者源性胆管癌异种移植模型中的抗肿瘤功效

[1216] 在一组37个人胆管癌PDX模型中研究了EO2-GL-SG3932的抗肿瘤活性。在预研究阶段，对不同背景的雌性小鼠(无胸腺裸小鼠、Balb/c裸或NOD/SCID)植入人胆管癌PDX碎片，并使其长到大约1000-1500mm3大小。然后收获这些肿瘤并重新植入研究小鼠中。然后当肿瘤达到150-300mm^3的平均肿瘤体积时，将动物按肿瘤体积匹配给处理组或对照组，并在第0天开始给药。每只小鼠接受剂量为1.25mg/kg或3.5mg/kg的EO2-GL-SG3932或对照(未处理)的单次IV注射。图55A-55G提供了第一个研究小组的结果。图56A-56K中所示的结果提供了

第二个研究小组的结果。

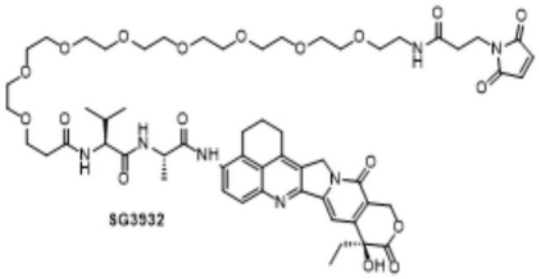
[1217] 实例42

[1218] E02-GL-SG3932 TOP1i接头-弹头与更宽的治疗指数(TI)有关

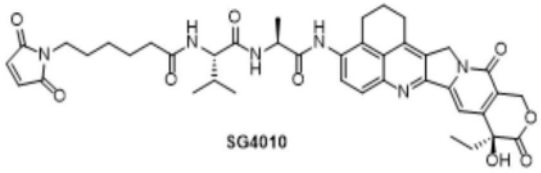
[1219] 对为E02-GL-SG3932选择的AZ'0133接头-弹头进行了头对头比较研究,以确定SG3932弹头与四种替代接头的功效、药代动力学和毒性。可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932接头-弹头ADC提供了最宽的相对TI,并且与基准相比具有优势。下面提供了四种比较性接头-弹头。表22中提供了从比较研究中收集的数据。

[1220] 比较性接头-弹头

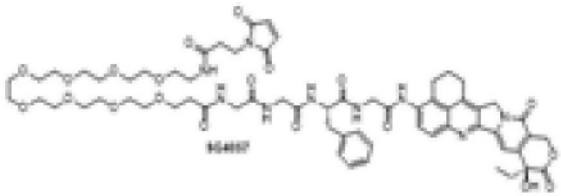
[1221] E02-INT-可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932

[1222] 

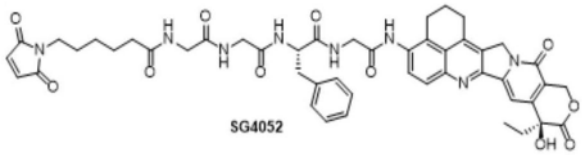
[1223] E02-INT-SG4010

[1224] 

[1225] E02-INT-SG4057

[1226] 

[1227] E02-INT-SG4052

[1228] 

[1229] 表22:E02-INT抗体与四种替代接头的功效、PK和毒性的头对头比较研究

[1230]

	E02-INT-SG3932	E02-INT-SG4010	E02-INT-SG4057	E02-INT-SG4052
接头 + 弹头	mp-PEG8-Val-Ala-SG3932	mc-Val-Ala-SG3932	mp-PEG8-GGFG-SG3932	mc-GGFG-SG3932
疏水性（HIC）、保留时间（min）	3.41	3.37	3.76	3.53
体外血清稳定性（第15天与第0天的平均脱缀合百分比）	24	68.4	28.4	69
体外细胞毒性IC50 MX1 / HT29克隆26（ng/mL）	8.81 / 53.3	5.54 / 40.6	14.4 / 44.0	6.21 / 67.6
体内功效-MX-1，肿瘤停滞 / 30%消退的剂量（mg/kg）	0.57 / 1.27	0.83 / 1.18	0.92 / 1.02	1.02 / 1.85
体内功效-MDA-MB-468，肿瘤停滞/30%消退的剂量（mg/kg）	0.89 / 1.35	0.71 / 1.47	1.12 / 1.85	1.16 / 1.98
SCID小鼠PK - CL（ml/天/kg），在1.25 mg/kg下	11.3	20.4	14.6	19.0
大鼠PK - CL（ml/天/kg），在60 mg/kg（HNSTD）下	7.57	13.3	10.3	24.3
大鼠毒理学研究（20或60 mg/kg剂量后严重程度超过背景/对照的发现结果的数量）	1/7	3/7	3/7	4/7
MX-1中肿瘤停滞的相对TI MX-1中第7天30%肿瘤消退的相对TI	**152** **68**	**101** **71**	**82** **45**	**44** **39**

[1231] E02-GL-SG3932的mp-PEG8-Val-Ala-SG3932接头-弹头的性能优于每种比较物。当缀合至E02-INT抗体时，用可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932接头-弹头制备的ADC是体内活性最高的(图57A和57B)。如图58所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932接头-弹头ADC在大鼠毒性研究中表现出最干净的安全性。如图59所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932接头-弹头ADC具有良好的PK特性和最宽的相对TI。相对TI＝在大鼠中测试的最高剂量(NOAEL而非HNSTD)下的AUC与提供肿瘤停滞的AUC的暴露比率(MX-1模型)。

[1232] 如图29B所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932接头-弹头可以与竞争对手TOP1i缀合的ADC区分开来，并且含有被认为促进TI并提供优势的关键特征。特别地，可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932中的mp-PEG使缀合物稳定并促进ADC的稳定性，并且可裂解的mal-PEG8-val-ala接头-SG3932中的内酯开关可以在附接到ADC时打开，ADC可通过受体介导的胞吞作用(RME)内化后增加弹头效力。(图29B)

[1233] 图60A-60B显示E02-GL-SG3932在乳腺和卵巢PDX中具有强大的活性。组A:在一组乳腺和卵巢PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗肿瘤活性。每只小鼠(N＝1/组)接受剂量为7mg/kg或3.5mg/kg的E02-GL-SG3932或对照(未处理)的单次IV注射。图60B显示了一组TNBC PDX模型中的抗肿瘤活性。每只小鼠接受剂量为3.5mg/kg或1.25mg/kg的E02-GL-SG3932或媒介物对照的单次IV注射。

[1234] E02-GL-SG3932在HR缺陷型肿瘤和具有升高的B7-H4的HR精通型肿瘤中也显示出强大的活性(图61和图62A-62D)。

[1235] 此外,HR缺陷会增加对SG3932弹头的敏感性。如图63所示,与二甲亚砜(DMSO)处理和阴性对照微管抑制剂弹头(MMAE)相比,SG3932弹头的效力发生了改变。如图63所示,当用DMSO处理野生型细胞和BRCA2-/-细胞时,细胞存活率超过100%。当用MMAE弹头处理时,野生型细胞和BRCA2-/-细胞的细胞活力均有所降低。与MMAE弹头相比,当用SG3932弹头处理野生型细胞时,观察到存活率大幅下降。然而,当用SG3932弹头处理BRCA2-/-细胞时,观察到存活率的最大下降(效力改变约349倍)。这表明HR缺陷会增加对SG3932弹头的敏感性。

[1236] 拓扑异构酶I抑制剂的合成

[1237] 一般信息

[1238] 使用Biotage® Isolera™进行快速色谱,并使用薄层色谱(TLC)检查级分的纯度。使用Merck Kieselgel 60 F254硅胶(铝板上带有荧光指示剂)进行TLC。用UV光实现TLC的可视化。

[1239] 从英国VWR购买了萃取和色谱溶剂,其无需进一步纯化即可使用。

[1240] 除非另有说明,否则所有精细化学品均购自西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)。聚乙二醇化试剂是经由英国Stratech公司从美国Quanta biodesign公司获得的。

[1241] LC/MS条件

[1242] 方法A

[1243] 使用Waters Aquity H级SQD2进行正模式电喷雾质谱分析。使用的流动相是溶剂A(含0.1%甲酸的水)和溶剂B(含0.1%甲酸的乙腈)。初始组分5% B经25秒保持不变,然后经1分钟35秒的时间从5% B增加到100% B。该组分在100% B保持50秒,然后在5秒内恢复到5% B,并这样保持5秒。梯度运行的总持续时间为3.0分钟。流速是0.8mL/分钟。在254nm处进行检测。柱:Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7μm 2.1x50mm,在50℃下,装有Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard前置柱,130A,1.7μm,2.1mm x 5mm。

[1244] 方法B

[1245] 使用水(A)(甲酸0.1%)和乙腈(B)(甲酸0.1%)的流动相运行HPLC(Waters Alliance 2695)。初始组分5% B经25秒保持不变,然后经1分钟35秒的时间从5% B增加到100% B。该组分在100%B保持50秒,然后在5秒内恢复到5% B,并这样保持5秒。梯度运行的总持续时间为3.0分钟。流速是0.8mL/分钟。波长检测范围:190至800nm。柱:Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7μm 2.1x50mm,在50℃下,装有Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard前置柱,130A,1.7μm,2.1mm x 5mm。

[1246] 方法C

[1247] 使用水(A)(甲酸0.1%)和乙腈(B)(甲酸0.1%)的流动相运行HPLC(Waters Alliance 2695)。

[1248] 初始组分5% B经1分钟保持不变,然后经9分钟的时间从5% B增加到100% B。该组分在100% B保持2分钟,然后在0.10分钟恢复到5% B,并这样保持3min。总梯度运行时间等于15min。流速0.6mL/min。波长检测范围:190至800nm。柱温箱温度:50℃。柱:ACE Excel 2C18-AR,2μ,3.0x100mm。

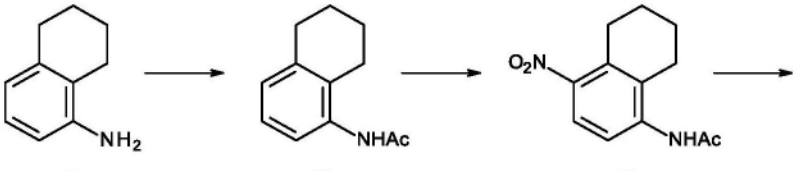
[1249] HPLC条件

[1250] 反相超快速高效液相色谱(UFLC)在Shimadzu Prominence™机器上使用Phenomenex™ Gemini NX 5μC18柱(在50℃下)尺寸:150x21.2mm进行。使用的洗脱液是溶剂A(含0.1%甲酸的H_2O)和溶剂B(含0.1%甲酸的CH_3CN)。所有UFLC实验均在以下梯度条件下进行:初始组分13% B经3分钟的时间增加到30% B,然后经8分钟增加到45% B并且再经6分钟到100%,然后经2min恢复到13%并维持1min。梯度运行的总持续时间为20.0分钟。流速为20.0mL/分钟,并在254和223nm处检测。

[1251] NMR方法

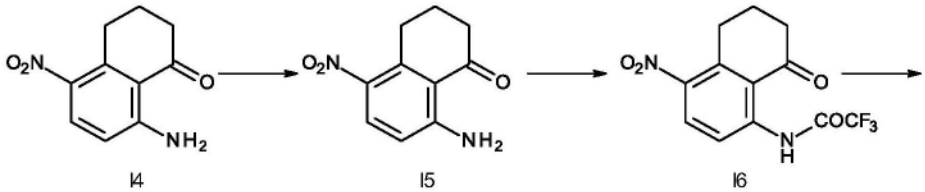
[1252] 使用Bruker AV400在400MHz的δ级上测量质子NMR化学位移值。已使用以下缩写:s,单峰;d,二重峰;t,三重峰;q,四重峰;quin,五重峰;m,多重峰;br,宽峰。耦合常数以Hz为单位。

[1253] 关键中间体的合成

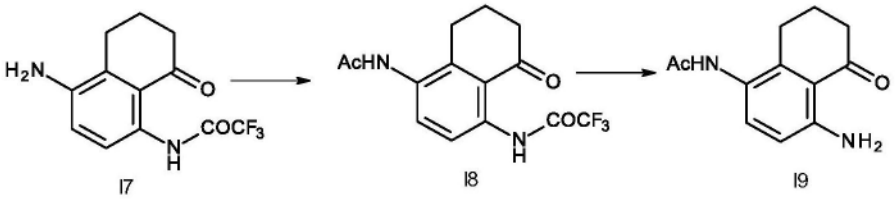


I1 I2 I3

[1254]



I4 I5 I6



I7 I8 I9

[1255] a)N-(5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(I2)

[1256] 将5,6,7,8-四氢萘-1-胺I1(8.54g,58.0mmol)溶解于二氯甲烷(80mL)中。添加三乙胺(18mL,129mmol)并将混合物冷却至0℃。逐滴添加乙酸酐(11.5mL,122mmol),添加完成后,将反应混合物升温至室温并搅拌45min,随后LCMS表明反应完成。将混合物用CH_2Cl_2稀释,用H_2O、饱和$NaHCO_3$、10%柠檬酸洗涤,将有机相经$MgSO_4$干燥并在真空中浓缩。将灰白色固体与1:3Et_2O/异己烷一起研磨,以得到呈白色固体的I2(10.8g,57.1mmol,98%产率),无

需进一步纯化即使用。LC/MS(方法A):保留时间1.44min(ES+)m/z 190[M+H]$^+$。

[1257] b)N-(4-硝基-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(I3)

[1258] 在-5℃下,将N-(5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I2(1.00g,5.2840mmol)分批添加至硫酸(15mL,281mmol)中。将硝酸钠(450mg,5.2945mmol)分批添加至反应混合物中,并在-5℃下搅拌30min,随后LCMS表明无另外的反应进展。将反应混合物在外部冷却下倒入冰中,将水性混合物用CH_2Cl_2萃取,将有机相经$MgSO_4$干燥并通过Isolera(10%-80% EtOAc于异己烷中)纯化,以得到呈白色/黄色固体的N-(4-硝基-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I3和N-(2-硝基-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺的混合物(956mg,4.0811mmol,77%产率)。LC/MS(方法A):保留时间1.53min(ES+)m/z 235[M+H]$^+$。

[1259] c)N-(4-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(I4)

[1260] 将N-(4-硝基-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I3(1.01g,4.31mmol)溶解于丙酮(30mL)中。添加于水中的硫酸镁(3.9mL,5.9mmol,1.5mol/L),并将混合物冷却至0℃。将高锰酸钾(2.07g,13.0mmol)分批添加至反应混合物并将混合物升温至室温并搅拌50min,随后TLC表明反应完成。将反应混合物通过硅藻土过滤,将固体用$CHCl_3$洗涤并将所得有机混合物用H_2O、盐水洗涤,经$MgSO_4$干燥并通过isolera(20%-50% EtOAc于异己烷中)纯化,以得到呈白色/黄色固体的N-(4-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I4和N-(2-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺的混合物(709mg,2.86mmol,66%)。LC/MS(方法A):保留时间1.44min(ES+)m/z 190[M+H]$^+$

[1261] d)8-氨基-5-硝基-3,4-二氢萘-1(2H)-酮(I5)

[1262] 将N-(4-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I4和N-(2-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺的混合物(709mg,2.8561mmol)和6N盐酸(7mL)在80℃下搅拌2.5h,随后LCMS表明反应完成。将反应混合物在冰浴中冷却,并添加6N NaOH溶液直至pH为碱性。将水性混合物用CH_2Cl_2萃取,将有机相经$MgSO_4$干燥并在真空中浓缩。Isolera(0%-50% EtOAc于异己烷中)得到呈黄色/橙色固体的8-氨基-5-硝基-3,4-二氢萘-1(2H)-酮I5(320mg,1.552mmol,54%产率)。LC/MS(方法A):保留时间1.54min(ES+)m/z 207[M+H]$^+$

[1263] e)2,2,2-三氟-N-(4-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(I6)

[1264] 将8-氨基-5-硝基-3,4-二氢萘-1(2H)-酮I5(430mg,2.0854mmol)溶解于二氯甲烷(20mL)中。添加吡啶(340μL,4.20mmol)并将混合物冷却至0℃。添加三氟乙酸酐(590μL,4.197mmol)并搅拌30min,随后LCMS表明反应完成。将混合物用CH_2Cl_2稀释,用H_2O洗涤,将有机相经$MgSO_4$干燥并在真空中浓缩,以得到呈黄色固体的2,2,2-三氟-N-(4-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I6(630mg,2.0846mmol,>99%产率),将其无需进一步纯化即使用。LC/MS(方法A):保留时间1.86min(ES+)m/z 301X[M-H]$^-$

[1265] f)N-(4-氨基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)-2,2,2-三氟乙酰胺(I7)

[1266] 将锌(2.73g,41.7mmol)悬浮于甲醇(80mL)、甲酸(4mL)和水(4mL)中,并将混合物冷却至0℃。分批添加2,2,2-三氟-N-(4-硝基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺I6(568mg,2.0865mmol)并将混合物在0℃下搅拌30分钟,随后LCMS表明反应完成。将反应混合物过滤,将滤液用EtOAc稀释并用饱和$NaHCO_3$洗涤。将有机相经$MgSO_4$干燥并在真空中浓缩,以得到呈黄色固体的N-(4-氨基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)-2,2,2-三氟乙酰胺I7(568mg,2.0865mmol,>99%产率),将其无需进一步纯化即使用。LC/MS(方法A):保留时间

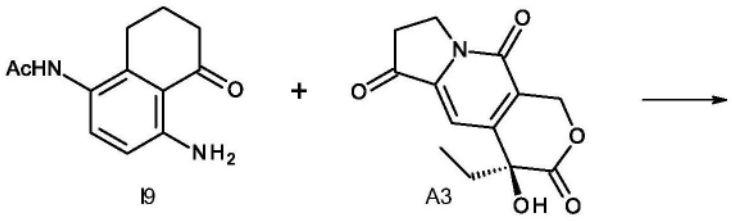
1.65min(ES+)m/z 273[M+H]$^+$

[1267] g)N-(4-乙酰胺基-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)-2,2,2-三氟乙酰胺(I8)

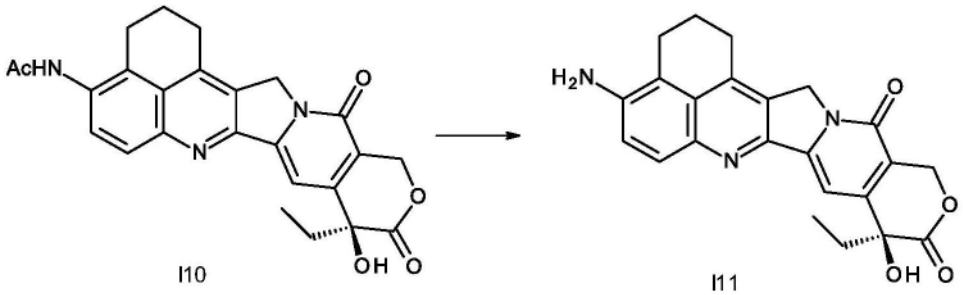
[1268] 将N-(8-氨基-4-氧代-四氢化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙酰胺I7(568mg,2.0865mmol)溶解于二氯甲烷(20mL)中。添加三乙胺(580μL,4.16mmol)然后添加乙酰氯(297μL,4.173mmol),并将混合物搅拌30min,随后LCMS表明反应完成。将反应混合物用CH_2Cl_2稀释,用H_2O洗涤,将有机相经$MgSO_4$干燥并在真空中浓缩以得到呈黄色固体的N-(8-乙酰胺基-4-氧代-四氢化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙酰胺I8(655mg,2.084mmol,>99%产率),将其无需进一步纯化即使用。LC/MS(方法A):保留时间1.55min(ES+)m/z 315[M+H]$^+$

[1269] h)N-(4-氨基-5-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(I9)

[1270] 将N-(8-乙酰胺基-4-氧代-四氢化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙酰胺I8(2.77g,8.81mmol)溶解于甲醇(240mL)和水(17mL)中。添加碳酸钾(4.88g,35.3mmol)并将混合物在50℃下搅拌1.5h,随后LCMS表明反应完成。将反应混合物冷却,在真空中浓缩,溶解于在CH_2Cl_2中的10% MeOH中,并用H_2O洗涤。将有机相经$MgSO_4$干燥并通过isolera色谱(2%-15% MeOH于CH_2Cl_2中的溶液)纯化,以得到呈黄色固体的N-(8-氨基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺I9(1.20g,5.50mmol,62.3%产率)。LC/MS(方法A):保留时间0.98min(ES+)m/z 219[M+H]$^+$



[1271]



[1272] i)(S)-N-(9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)乙酰胺(I10)

[1273] 将N-(8-氨基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺I9(641mg,2.94mmol,1.0当量)、(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10(4H)-三酮A3(840mg,3.19mmol,1.1当量)和PPTS(740mg,2.95mmol,1.0当量)溶解于甲苯(60mL)中并在回流下搅拌3h,随后LCMS表明I9已经被消耗。将反应混合物冷却并且在真空中浓缩。将所得固体与乙腈、然后与丙酮一起研磨,以得到呈棕色固体的I10,伴随轻微的TsOH污染(1.26g,96%)。LC/MS(方法A):保留时间1.32min(ES+)m/z 447[M+H]$^+$

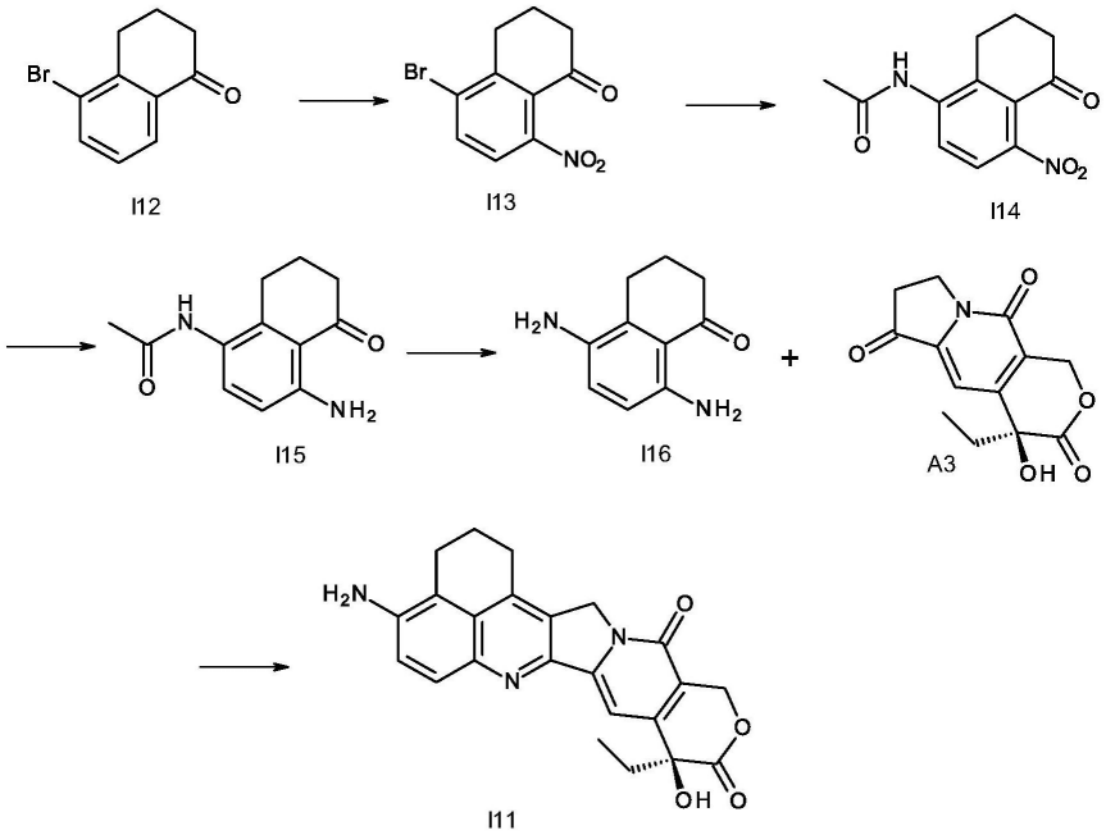
[1274] j)(S)-4-氨基-9-乙基-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮(I11)

[1275] 将(S)-N-(9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并

[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)乙酰胺(I10)(1.26g,2.83mmol,1.0当量)溶解于在H_2O(12mL)中的盐酸(6mol/L)中,并将混合物在80℃下搅拌5h,随后LCMS表明I10已经被消耗。将反应混合物用H_2O稀释并在真空中浓缩,以得到呈红色结晶固体的(S)-4-氨基-9-乙基-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮I11(1.51g,2.85mmol,90质量%,101%产率)。LC/MS(方法A):保留时间1.36min(ES+)m/z 405$[M+H]^+$。

[1276] I11的可替代合成

[1277]



[1278] 该合成的IPC、纯度和测定方法

[1279]

仪器	Thermo U-3000
柱	ACE Excel 3 C18- PFP（3.0 mm × 150 mm）
柱温箱	40°C

[1280]

流动相	A：10 mM 甲酸铵于水中 pH = 3.5
	B：CAN
梯度程序	时间（min） A% B% 0.0 90 10 20.0 10 90 23.0 10 90 24.0 90 10 30.0 90 10 再平衡时间：6 min
流速	1.0 ml/min
检测器	UV 220 nm
稀释剂	CAN

[1281] a)5-溴-8-硝基-四氢化萘-1-酮(I13)

[1282] 在氮气下，将溶解于硫酸(浓缩的，5.0相对体积，160mL)中的硝酸钾(1.15当量，13.83g)的溶液添加(添加时间4-12h，保持温度低于10℃)至5-溴四氢化萘-1-酮(I12)(1.0当量，26.77g)于硫酸(浓缩的，5.0相对体积，160mL)中的溶液中。当反应完成时，将反应混合物转移至含有水(36相对体积，1.15L)的烧瓶中，调节转移速率以保持温度低于10℃。将所得固体过滤，用水(4.0相对体积，128mL)洗涤三次然后在约40℃下干燥24h。将干燥的滤饼溶解于丙酮(2.5相对体积，80mL)和水(0.38相对体积，12.2mL)的混合物(加热至约75℃)中，并且然后冷却至约20℃。通过过滤除去所得固体。通过蒸馏将溶剂交换为乙醇，并将溶液体积减少至2.0相对体积(64mL)。将溶液冷却至约25℃并将所得固体通过过滤收集。将固体用乙醇(1.0相对体积，32mL)洗涤，然后在真空下在40℃下干燥以给出呈棕色固体的5-溴-8-硝基-四氢化萘-1-酮I13(15.36g，40％)；RT 14.0min

[1283] 方法1溴-8-硝基-四氢化萘-1-酮的IPC、纯度和测定方法。

[1284]

仪器	Thermo U-3000		
柱	ACE Excel 3 C18- PFP（3.0 mm × 150 mm）		
柱温箱	40°C		
流动相	A：10 mM 甲酸铵于水中 pH＝3.5		
	B：CAN		
梯度程序	时间（min）	A%	B%
	0.0	90	10
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	再平衡时间：6 min		
流速	1.0 ml/min		
检测器	UV 220 nm		
稀释剂	CAN		

[1285] b)N-(8-硝基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺(I14)

[1286] 将溴-8-硝基-四氢化萘-1-酮(I13)(1.0当量,18.0g,90.6%ww)、乙酰胺(1.2当量,4.72g)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(0.01当量,0.61g)磷酸钾(1.4当量,19.8g)于二噁烷(15相对体积,270mL)中的溶液在氮气下加热至约70℃。当反应完成时,将溶液冷却至约20℃并用二噁烷(5相对体积,90.0mL)稀释并过滤。将溶剂交换为乙醇,并将体积减少至为3相对体积的总反应体积(54.0mL)。将溶液冷却至约20℃并将所得固体通过过滤收集并用MTBE(甲基叔丁基醚)(1.0相对体积,18.0mL)洗涤。将固体在真空下在40℃下干燥以给出呈暗黄色固体的N-(8-硝基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺I14(10.0g,60.6%);RT 8.86min。

[1287] c)N-(8-氨基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺(I15)

[1288] 将氢氧化钯碳(20%w/w,0.15当量,5.25g)添加至N-(8-硝基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺(I14)(1.0当量,32.6g)于甲醇(40相对体积,1250mL)中的溶液中。将反应混合物在氢气气氛(约40psi)下在约40℃下放置8h。除去氢气并用氮气置换,并通过经纤维素过滤除去催化剂,用甲醇(4.0相对体积,130mL)洗涤纤维素。通过蒸馏将溶液体积减少至4.0相对体积并且然后用MTBE(4相对体积,130mL)稀释。将所得固体通过过滤收集,用MTBE(2相对体积,65mL)洗涤并在真空下在40℃下干燥以给出呈灰绿色固体的N-(8-氨基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺I15(21.1g,77.8%);RT 5.44min。

[1289] d)5,8-二氨基四氢化萘-1-酮(I16)

[1290] 将N-(8-氨基-1-氧代-四氢化萘-5-基)乙酰胺(I15)(1.0当量,10.0g)于盐酸(5M,6.0相对体积,60mL)中的溶液保持在约90℃持续3h。将温度减少至25℃并添加氢氧化钠(2M,4.0相对体积,40mL)直至达到pH 10.0,保持温度为25℃。将所得固体通过过滤收集并

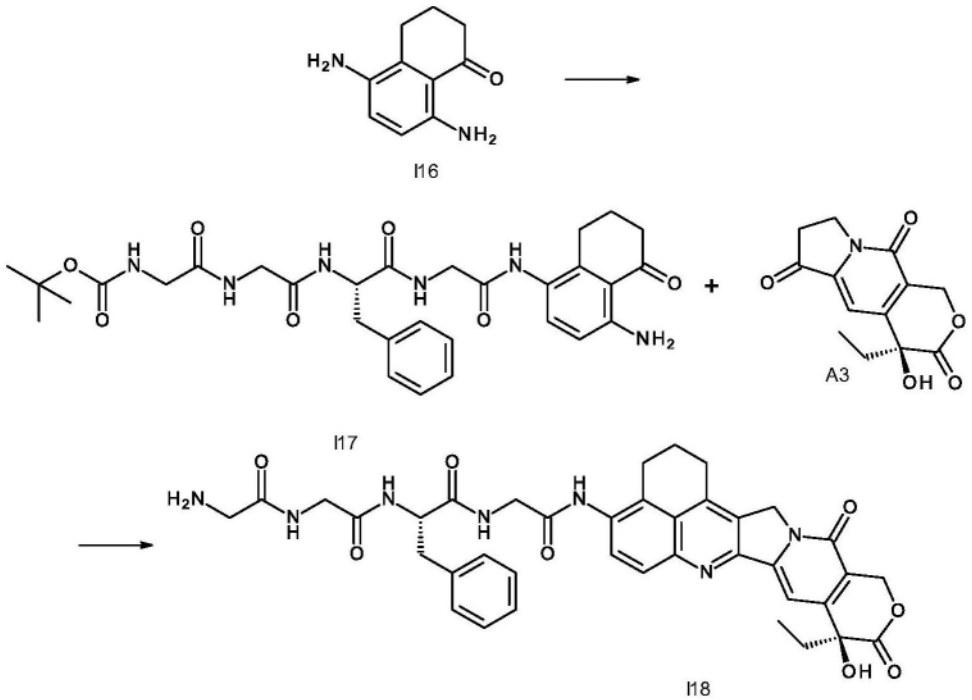
用水(2.0相对体积,20mL)洗涤。将湿滤饼溶解于四氢呋喃(60相对体积,600mL)中并过滤。将溶液浓缩至5.0相对体积并添加庚烷(20相对体积,200mL)。将溶液浓缩至10.0相对体积并进一步添加庚烷(20相对体积,200mL),并且然后再次将体积减少至10.0相对体积。将所得固体通过过滤收集并用庚烷(5.0相对体积,50mL)洗涤。将固体在真空下在40℃下干燥17h以给出呈黄色固体的5,8-二氨基四氢化萘-1-酮(I16)(6.90g,82.7%);1H NMR(400MHz DMSO-d6)δppm 1.82(m,2H),2.38(t,J=2.0Hz,2H),2.47(t,J=2.0Hz,2H),6.34(d,J=2.0Hz,1H),6.68(d,J=2.0Hz,1H);RT 3.90

[1291] e)(S)-4-氨基-9-乙基-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮(I11)

[1292] 将5,8-二氨基四氢化萘-1-酮(I16)(1.0当量,5.0g)、(4S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10-三酮(A3)(1.06当量,7.9g)、和对甲苯磺酸吡啶鎓(1.0当量,7.2g)于甲苯(50.0相对体积,250mL)中的溶液保持在120℃下持续15h。将溶液的体积减少至2.0相对体积,并且然后用乙腈(20相对体积,100mL)和水(20相对体积,100mL)稀释。将所得浆液过滤并将固体用乙腈水溶液(1:1,20相对体积,100mL)洗涤。将固体用甲醇水溶液(水:MeOH 3:1,40相对体积,200mL)浆液化,过滤并用甲醇水溶液(1:1,20相对体积,100mL)洗涤。将固体用水(60相对体积,300mL)在50℃下浆液化,过滤并用水(10相对体积,50mL)洗涤。将固体用乙腈水溶液(水:乙腈,1:3,40相对体积,200mL)在30℃下浆液化,过滤并用乙腈水溶液(水:乙腈,1:3,5相对体积,50mL)洗涤并且然后在真空下在40℃下干燥以给出呈白色固体的(S)-4-氨基-9-乙基-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮(I11)(5.0g,43.7%);RT 5.13。

[1293] I18的合成

[1294]



[1295] a)叔丁基(S)-(2-((2-((1-((2-((4-氨基-5-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙烷-2-基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-2-氧代乙基)氨

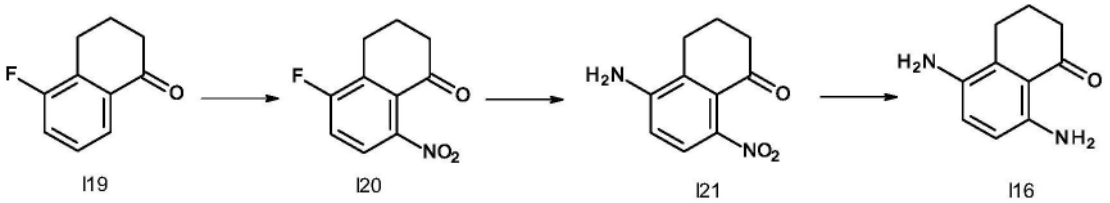
基甲酸酯(I17)

[1296] 将Boc-GGFG-OH(227mg,0.52mmol)和EEDQ(157mg,0.634mmol)溶解在CH_2Cl_2(25mL)中并将混合物搅拌15min,直至肽溶解至溶液中。随后添加化合物I16(100mg,0.56747mmol)并将混合物搅拌直至完成。1h后,LVMC显示反应完成了90%。随着产物压出(crashing out),混合物变得更稠。将混合物再放置一个小时,然后抽真空以干燥。将粗品吸收于Et_2O(50mL)中。过滤固体并随后吸收于CH_2Cl_2(50mL)中以进一步纯化。过滤固体并干燥以给出呈灰色固体的产物I17(273mg,0.459mmol,80.9%产率)。分析数据:LCMS 3min:ES^+=1.46min,m/z 595.7$[M+H]^{\cdot+}$。

[1297] b)(S)-2-(2-(2-氨基乙酰胺基)乙酰胺基)-N-(2-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-2-氧代乙基)-3-苯基丙酰胺(I18)

[1298] 将苯胺I17(450mg,1.045mMol)、内酯A5(280mg,1.064mMol)和对甲苯磺酸吡啶鎓(273mg,1.086mMol)溶解于甲苯(20mL)中并将混合物加热至150℃(高回流)。添加MeOH(4mL)以帮助溶解混合物。7h,将粗反应物抽真空(vacced down)以干燥。将粗产物通过硅胶色谱($CHCl_3$/MeOH,100%至65:35)进行纯化,以给出产物I18(259mg,0.359mMol,78.1产率)。分析数据:LCMS 3min:ES^+=1.17min,m/z 722.8$[M+H]^{\cdot+}$。

[1299] I16的替代合成

[1300] 

[1301] a)5-氟-8-硝基-四氢化萘-1-酮(I20)

[1302] 在3颈圆底烧瓶中,将5-氟四氢化萘-1-酮I19(4.7g,29mmol)溶解于1/2量的硫酸(120mL)中。搅拌混合物直至所有固体溶解并且然后冷却至0℃-5℃。在滴液漏斗中,在0℃-5℃下,溶解硝酸钾(3g,29.6730mmol)至剩余的一半的硫酸(120mL)中。缓慢添加至SM混合物,确保保持溶液是冷的(45min)。在0℃-5℃下搅拌直至完成。随后将反应混合物用水(250mL)淬灭,并在0℃-5℃下搅拌。将固体过滤并用水(50mL)洗涤。将固体在真空柱温箱中在50℃下干燥2h。将粗固体在Et_2O中浆液化过夜,然后冷却至0℃并过滤。将湿滤饼用更多冷的Et_2O(50mL)洗涤并在真空柱温箱中在50℃下干燥以给出呈淡粉色细粉末的纯的产物I20(5.5g,26mmol,92%产率)。LCMS(方法B):ES^+=1.55min,m/z 210.1$[M+H]^{\cdot+}$。

[1303] b)5-氨基-8-硝基-四氢化萘-1-酮(I21)

[1304] 将化合物I20(2.7g,13mmol)溶解于CH_3CN(2.5mL)中,并将在H_2O(8mL,40mmol)中的NH_4OH(21质量%)添加至密封耐压管并加热至185℃。一旦完成,将混合物转移至圆底烧瓶中并抽真空。将粗品通过硅胶柱色谱($CHCl_3$/MeOH;100至99:1)进行纯化以给出呈黑色固体的纯的产物I21(1.1g,5.3mmol,41%产率)。LCMS(方法B):ES^+=1.34min,m/z 207.1$[M+H]^{\cdot+}$。

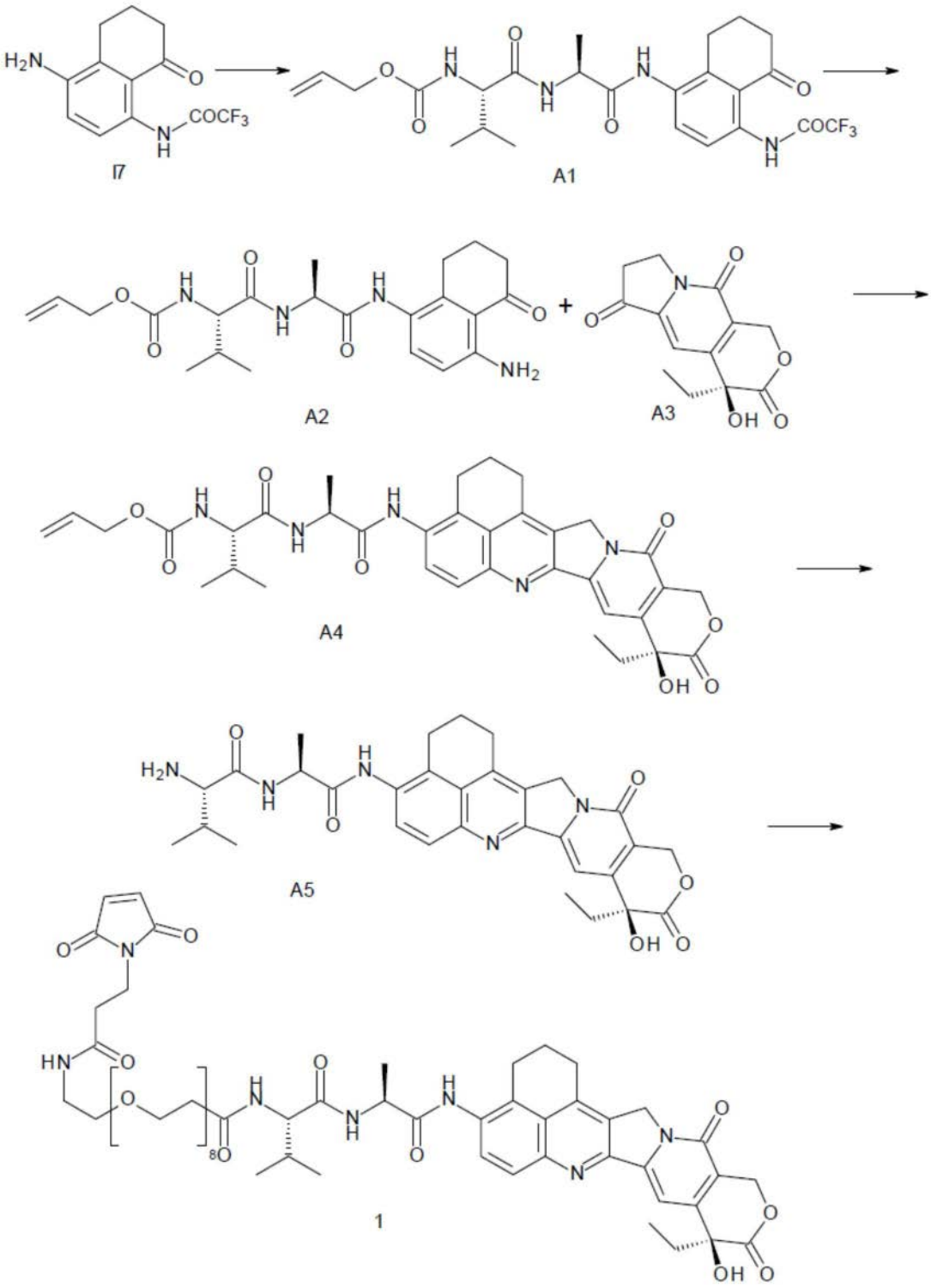
[1305] c)5,8-二氨基四氢化萘-1-酮(I16)

[1306] 在0℃下,将化合物I21(1.35g,6.55mmol)溶解于甲醇(20mL)、H_2O(1mL)和甲酸

(1mL)的混合物中。缓慢添加锌(8.5g,130mmol),确保将温度保持在低于40℃。添加多一些的甲酸/H_2O(0.5mL)以推动反应完成。将反应混合物过滤,并将滤液用EtOAc和CH_2Cl_2稀释,然后抽真空。将粗品干燥加载到硅胶柱色谱($CHCl_3$/EtOAc;100至7:3然后$CHCl_3$/MeOH;99:1至98:2)上以给出纯的产物I16(1.015g,5.760mmol,88.0%产率)。LCMS(方法B):ES^+=0.2min,未观察到m/z。

[1307] 合成实例1(例如SG3932的合成)

[1308]



[1309] a)烯丙基((S)-3-甲基-1-氧代-1-(((S)-1-氧代-1-((5-氧代-4-(2,2,2-三氟乙

酰胺基)-5,6,7,8-四氢萘-1-基)氨基)丙-2-基)氨基)丁-2-基)氨基甲酸酯(A1)

[1310] 在25℃下,将DCC(6.54g,31.7mMol)和HOPO(3.36g,30.2mMol)添加至烯丙氧羰基-Val-Ala-OH(9.09g,31.7mmol)和I7(7.85g,28.8mMol)于CH_2Cl_2(300mL)中的溶液中。将所得混合物搅拌过夜。滤出反应期间形成的白色固体,并用冷的CH_2Cl_2洗涤。将滤液用水(150mL)和盐水(150mL)洗涤。将有机层经$MgSO_4$干燥,过滤并蒸发。将粗产物通过硅胶色谱(Hex/EtOAc,60:40)进行纯化。分离的产物A1被共洗脱的DCU(21.1g,140%产率)污染。LC/MS(方法B):ES^+=1.81min,m/z 527.6$[M+H]^{\cdot+}$。

[1311] b)烯丙基((S)-1-(((S)-1-((4-氨基-5-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(A2)

[1312] 将保护的苯胺A1(18g,34.19mMol)溶解于MeOH和H_2O 10:1(165mL)的混合物中并添加K_2CO_3(10g,72.36mMol)。将混合物在50℃下搅拌直至完成。将混合物抽真空至几乎干燥并将残余物用CH_2Cl_2吸收并用H_2O和盐水洗涤,然后经$MgSO_4$干燥,过滤并蒸发。将粗产物通过硅胶色谱($CHCl_3$/MeOH,100%至7:3)进行纯化。分离的产物A2被共洗脱的杂质(10.71g,73%产率)污染。LC/MS(方法B):ES^+=1.46min,m/z 431.7$[M+H]^{\cdot+}$。

[1313] c)烯丙基((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基丁-2-基)氨基甲酸酯(A4)

[1314] 将苯胺A2(450mg,1.045mMol)、内酯A3(280mg,1.064mMol)和对甲苯磺酸吡啶鎓(273mg,1.086mMol)溶解于甲苯(20mL)中并将混合物加热至130℃(高回流)。时不时地添加几滴MeOH,以帮助溶解混合物。7h,将粗反应物抽真空(vacced down)以干燥。将粗产物通过硅胶色谱($CHCl_3$/MeOH,100%至95:5)进行纯化以给出产物A4(360mg,52.3%产率)。LC/MS(方法B):ES^+=1.51min,m/z 658.8$[M+H]^{\cdot+}$。

[1315] d)烯丙基(S)-2-氨基-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)-3-甲基丁酰胺(A5)

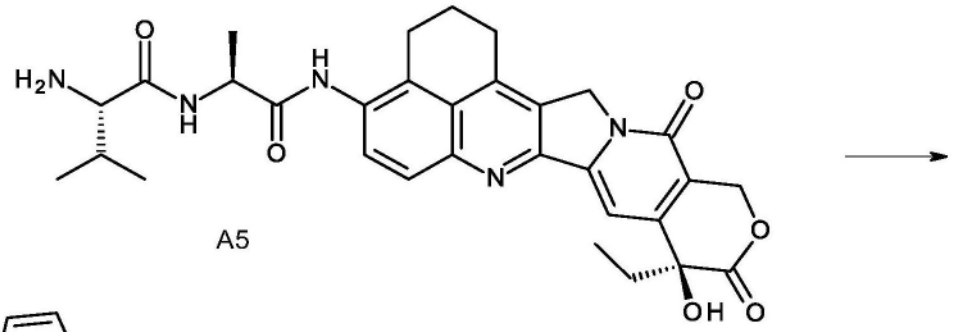
[1316] 将过量的哌啶(642μL)添加至A4(543mg,0.82mMol)和$PdP(Ph_3)_4$(89mg,0.08mMol)于CH_2Cl_2(15mL)中的溶液中。允许混合物在室温下搅拌20min,这时反应已经完成(如通过LC/MS监测的)。将反应混合物用CH_2Cl_2(25mL)稀释并将有机相用H_2O(25mL)和盐水(25mL)洗涤。将有机相经$MgSO_4$干燥,过滤,并通过在减压下旋转蒸发除去过量的溶剂,以得到粗产物A5,其原样用于下一步。LC/MS(方法B):ES^+=1.15min,m/z 574.6$[M+H]^{\cdot+}$。

[1317] e)1-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙氨基)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺(1)

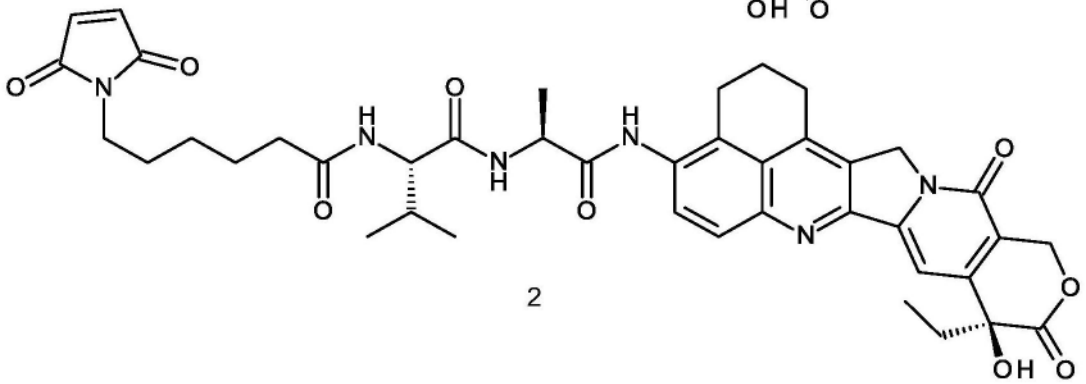
[1318] 在氩气气氛下,将吡啶(83μL,1.03mMol)和Mal-$dPEG_8$-OTFP(767mg,1.03mMol)添加至粗品A5(假定为1.03mMol)于干CH_2Cl_2(50mL)中的溶液中。将反应搅拌过夜,并且由于反应不完全,添加0.5当量的Mal-$dPEG_8$-OTFP以试图推动反应。将反应物用CH_2Cl_2(25mL)稀释并将有机相用H_2O(2x50mL)和盐水洗涤,然后经$MgSO_4$干燥,过滤并将过量的溶剂通过在减压下旋转蒸发除去。将粗品通过反相HPLC(H_2O/CH_3CN+0.05% FA的梯度)进行纯化并冷冻干燥

以给出1(1.189g,31％产率,经2个步骤)。LC/MS(方法B):ES^+＝1.43min,m/z 1149.3$[M+H]^{\cdot+}$。LC/MS(方法C):ES^+＝5.37min,m/z 1149.4$[M+H]^{\cdot+}$。

[1319] 合成实例2(例如SG4010的合成)



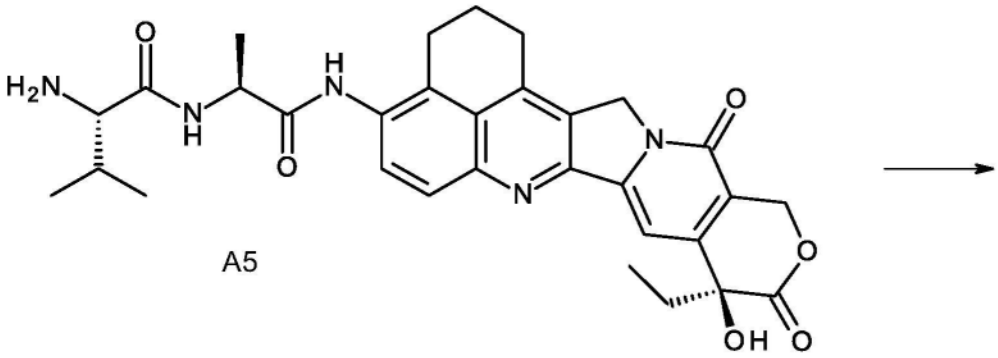
[1320]



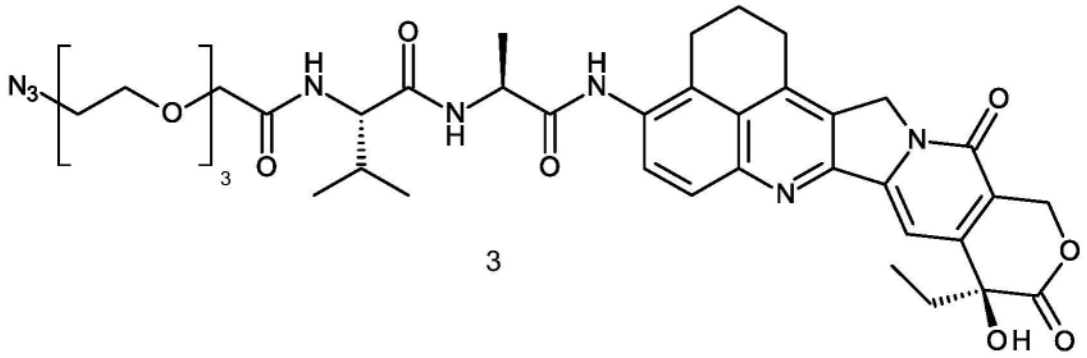
[1321] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)己酰胺(2)

[1322] 在氩气气氛下,将Mal-己酸(56mg,0.26mMol)和EDCI.HCl(51mg,0.26mMol)添加至粗品A5(假定为0.26mMol)于无水CH_2Cl_2(20mL)中的溶液中。将反应搅拌过夜,并且由于反应不完全,添加另外0.5当量的Mal-己酸和EDCI.HCl。将反应物用CH_2Cl_2(25mL)稀释并将有机相用H_2O(2x50mL)和盐水洗涤,然后经$MgSO_4$干燥,过滤并将过量的溶剂通过在减压下旋转蒸发除去。将粗品通过硅胶柱色谱($CHCl_3$/MeOH 95:5)进行纯化以给出2(31.6mg,20％产率,经2个步骤)。LC/MS(方法B):ES^+＝1.56min,m/z 767.8$[M+H]^{\cdot+}$。LC/MS(方法C)15min:ES^+＝6.05min,m/z 767.8$[M+H]^{\cdot+}$。

[1323] 合成实例3



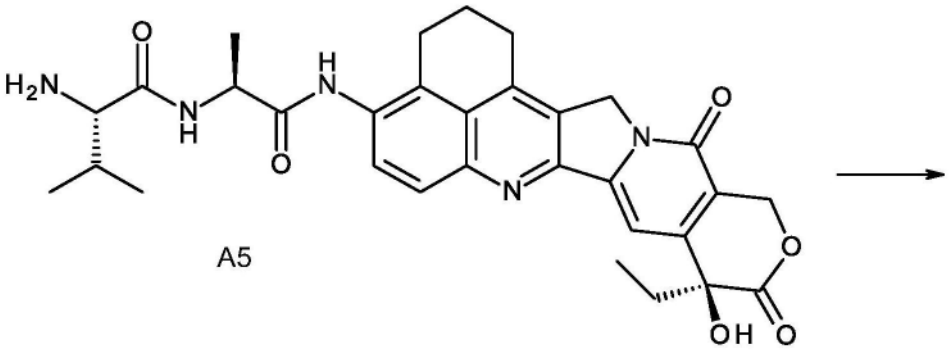
[1324]



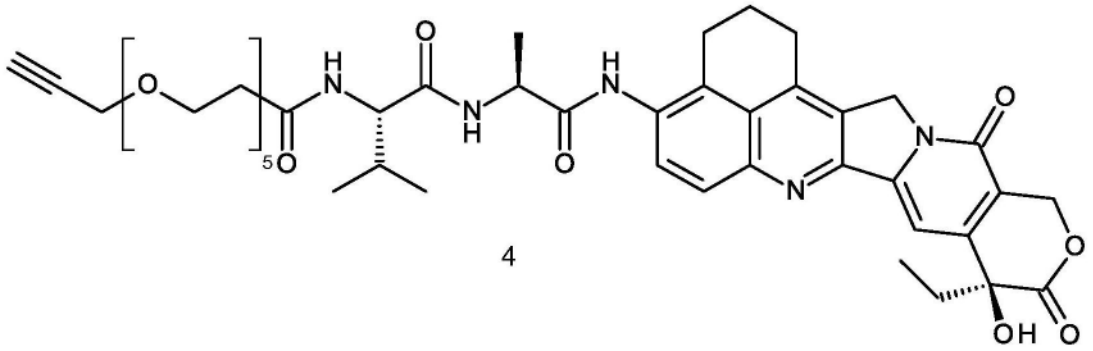
[1325] (S)-2-(2-(2-(2-(2-叠氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酰胺基)-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)-3-甲基丁酰胺(3)

[1326] 在氩气气氛下,将叠氮-dPEG$_3$-酸(77.5mg,0.31mMol)和EDCI.HCl(60mg,0.31mMol)添加至粗品A5(假定为0.31mMol)于无水CH_2Cl_2(20mL)中的溶液中。将反应搅拌过夜,并且由于反应不完全,添加另外0.5当量的叠氮-dPEG$_3$-OH和EDCI.HCl。将反应物用CH_2Cl_2(25mL)稀释并将有机相用H_2O(2x50mL)和盐水洗涤,然后经$MgSO_4$干燥,过滤并将过量的溶剂通过在减压下旋转蒸发除去。将粗品通过制备型HPLC进行纯化并将级分冷冻干燥以给出纯的3(92.2mg,24.7%产率,经2个步骤)。LC/MS(方法B):ES^+=1.69min,m/z 789.9[M+H]$^{\cdot+}$。LC/MS(方法C):ES^+=6.68min,m/z 790.0[M+H]$^{\cdot+}$。

[1327] 合成实例4



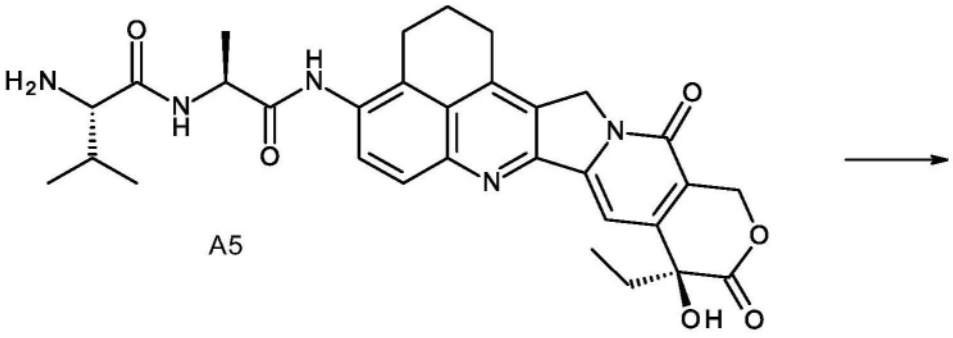
[1328]



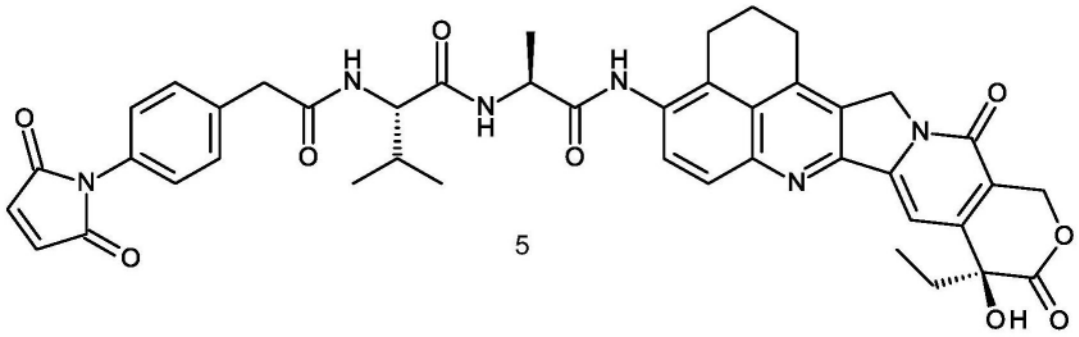
[1329] N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-4,7,10,13,16-五氧杂十九烷-18-炔酰胺(4)

[1330] 在氩气气氛下,将炔丙基-dPEG$_5$-酸(56mg,0.19mMol)和EDCI.HCl(37mg,0.19mMol)添加至粗品A5(假定为0.19mMol)于无水CH_2Cl_2(10mL)中的溶液中。将反应搅拌过夜,并且由于反应不完全,添加另外0.5当量的炔丙基-dPEG$_5$-OH和EDCI.HCl。将反应物用CH_2Cl_2(25mL)稀释并将有机相用H_2O(2x50mL)和盐水洗涤,然后经$MgSO_4$干燥,过滤并将过量的溶剂通过在减压下旋转蒸发除去。将粗品通过制备型HPLC进行纯化并将级分冷冻干燥以给出纯的4(22mg,16.7%产率,经2个步骤)。LC/MS(方法B):ES^+=1.54min,m/z 860.9[M+H]$^{\cdot+}$。LCMS(方法C):ES^+=5.57min,m/z 860.9[M+H]$^{\cdot+}$。

[1331] 合成实例5



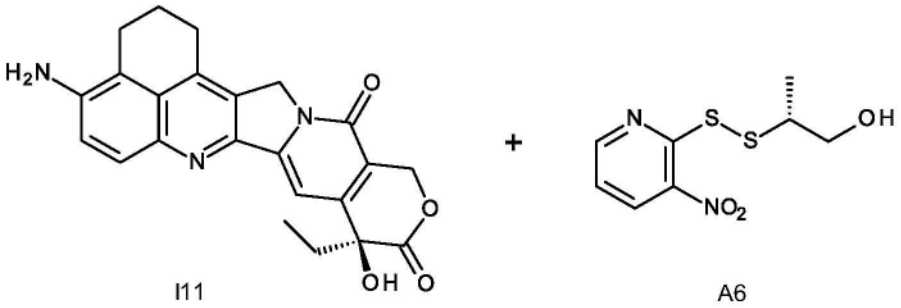
[1332]



[1333] (S)-2-(2-(4-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)苯基)乙酰胺基)-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)-3-甲基丁酰胺(5)

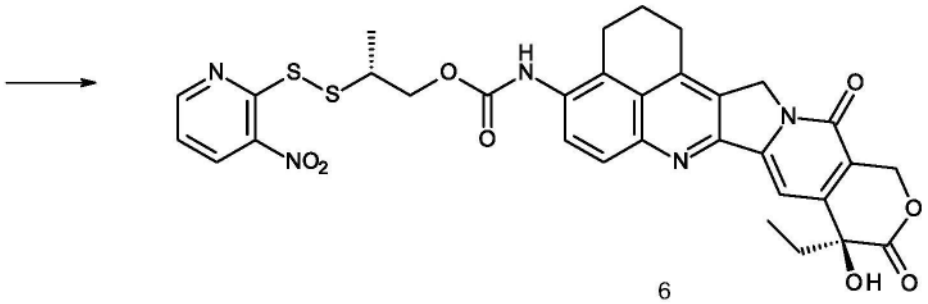
[1334] 在氩气气氛下,将PM-乙酸-OSu(64mg,0.19mMol)添加至粗品A5(假定为0.19mMol)于无水CH_2Cl_2(10mL)中的溶液中。反应没有进行,因此添加DIPEA(51μL,0.28mMol)。将反应物搅拌直至完成。将混合物用CH_2Cl_2(25mL)稀释并将有机相用H_2O(2x50mL)和盐水洗涤,然后经$MgSO_4$干燥,过滤并将过量的溶剂通过在减压下旋转蒸发除去。将粗品通过制备型HPLC进行纯化并将级分冷冻干燥以给出纯的5(2.5mg,1.6%产率,经2个步骤)。LC/MS(方法B):ES^+=1.54min,m/z 787.7$[M+H]^{\cdot+}$。LC/MS(方法C):ES^+=5.61min,m/z 787.8$[M+H]^{\cdot+}$。

[1335] 合成实例6



I11 A6

[1336]



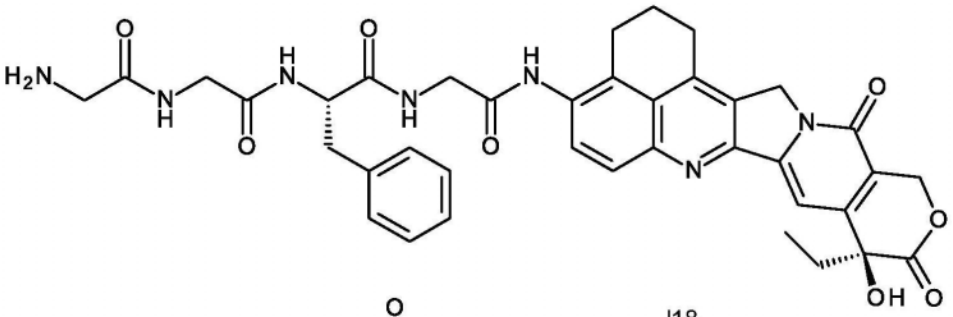
6

[1337] (R)-2-((3-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙基((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基甲酸酯(6)

[1338] (i)将(2R)-2-[(3-硝基-2-吡啶基)二硫烷基]丙-1-醇A6(25mg,0.1015mmol,1.0当量)溶解于二氯甲烷(1mL)中。添加吡啶(8.5μL,0.11mmol,1.0当量),然后添加三光气(11mg,0.0370685mmol,0.33当量)并将混合物在Ar下搅拌45min,随后LCMS(Et_2NH淬灭)表明形成对应的氨基甲酸酯。

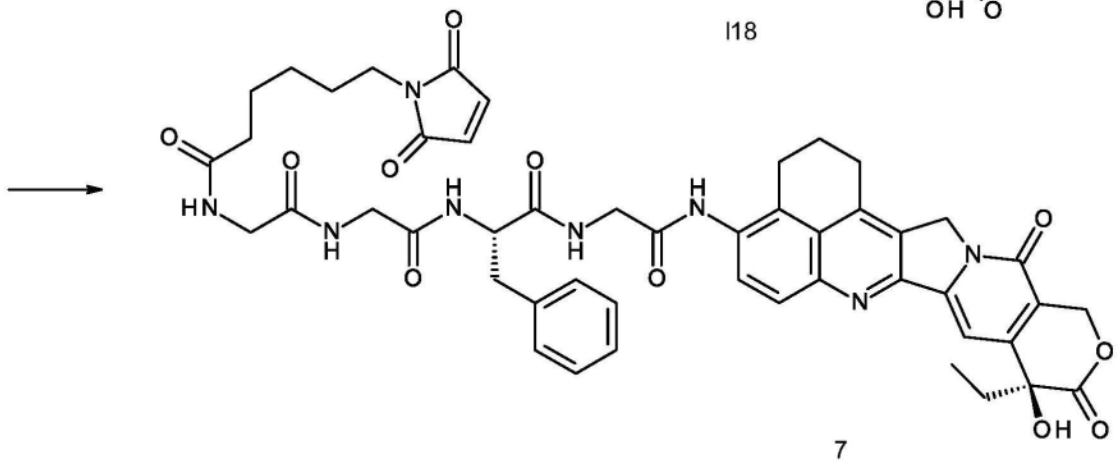
[1339] (ii)将(S)-4-氨基-9-乙基-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮(I11)(43mg,0.09026mmol,1.0当量)溶解于二氯甲烷(2mL)、N,N-二异丙基乙胺(42μL,0.241mmol,2.7当量)和吡啶(25μL,0.309mmol,3.4当量)中。添加来自步骤(i)的反应混合物并将混合物搅拌30min,随后LCMS表明反应完成。将反应混合物在真空中浓缩并通过isolera色谱(0%-4% MeOH于CH_2Cl_2中)进行纯化,以得到呈黄色固体的6(22mg,0.03256mmol,36%产率,QC=96.8%)。LC/MS(方法B):RT=1.86min,676.6$[M+H]^+$。

[1340] 合成实例7(例如SG4052的合成)



I18

[1341]



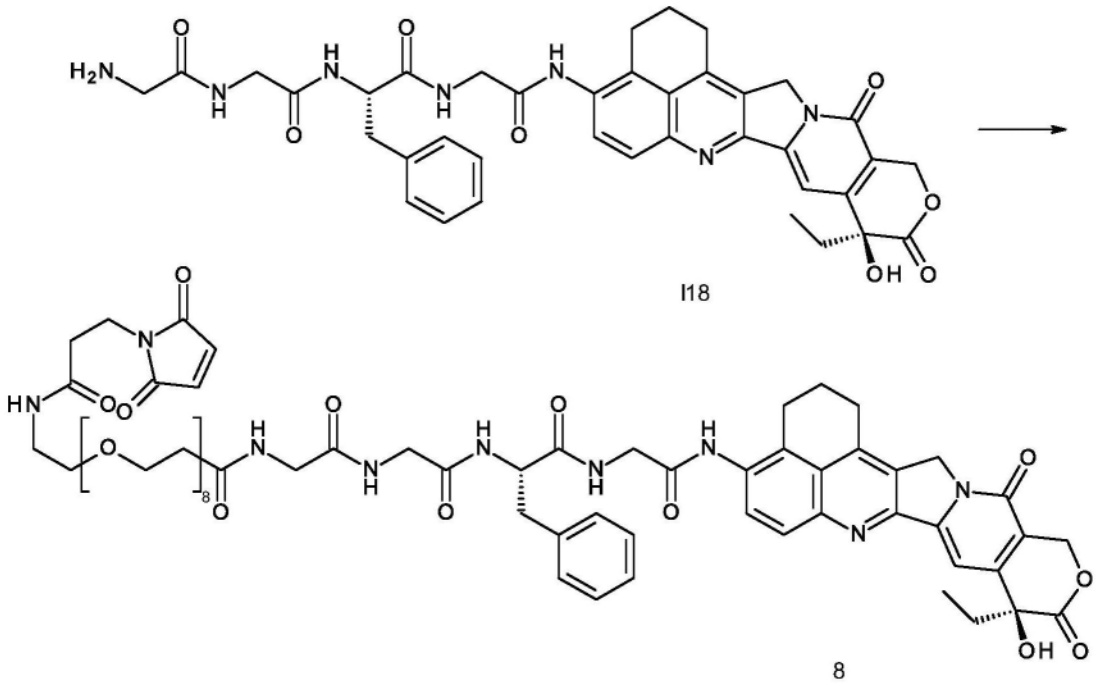
7

[1342] 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-2-氧代乙基)己酰胺(7)

[1343] 将化合物I18(259mg,0.3588mmol)溶解于CH_2Cl_2(25mL)中。起始原料完全不溶解,因此添加DMA(1mL)。由于未观察到改善,因此添DIPEA(68μL,0.390mmol),并且所有固体进入溶液中。添加马来酰亚胺己酸(69mg,0.358mmol)并将混合物在r.t.下搅拌过夜,这时LCMS分析表明反应完成。将反应混合物用MeOH(2mL)淬灭,并抽真空至干燥。将粗产物通过制备型HPLC进行纯化并随后冷冻干燥以给出呈赭色固体的化合物7(38.2mg,11%产率)。分析数据:LCMS 3min:ES^+=1.47min,m/z 916.2$[M+H]^{\cdot+}$LCMS 15min:ES^+=5.46min,m/z 916.1$[M+H]^{\cdot+}$。

[1344] 合成实例8(例如SG4057的合成)

[1345]



I18

8

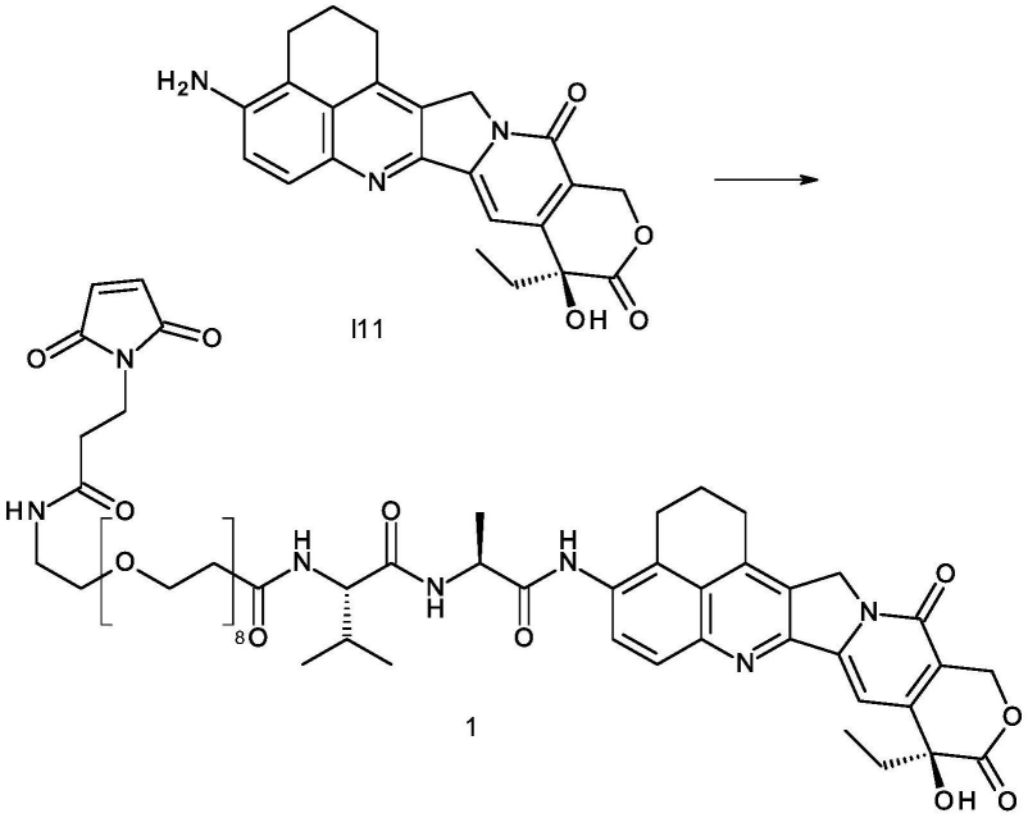
[1346] 1-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙氨基)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-1-氧代-3-苯基丙-2-基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)-2-氧代乙基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧杂二十七烷-27-酰胺(8)

[1347] 将化合物I18(70mg,0.096mmol)溶解于CH_2Cl_2(5mL)中。起始原料完全不溶,因此添加DMA(0.5mL)。由于未观察到改善,因此添DIPEA(19μL,0.106mmol),并且所有固体进入溶液中。添加Mal-$dPEG_8$-OH(63mg,0.106mmol)和EDCI.HCl(19mg,0.099mMol)并将混合物在r.t.下搅拌过夜,这时LCMS分析表明反应完成。将反应混合物用MeOH(2mL)淬灭,并抽真空至干燥。将粗产物通过制备型HPLC进行纯化并随后冷冻干燥以给出呈赭色固体的8(30mg,24%产率)。LCMS 3min:ES^+=1.44min,m/z 1297.6$[M+H]^{\cdot+}$。

[1348] 合成实例9-1的替代合成

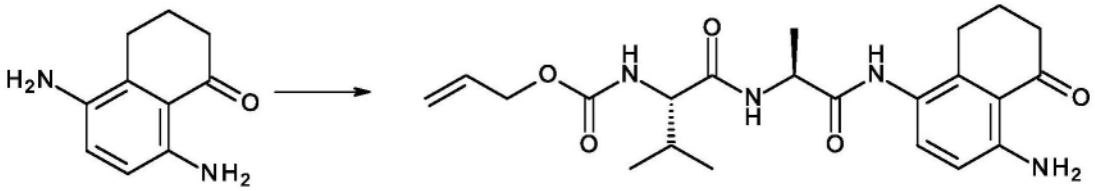
[1349] (例如SG3932的替代合成)

[1350]



[1351] 将(S)-4-氨基-9-乙基-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮I11(371mg,0.779mmol,1.0当量)溶解于二氯甲烷(30mL)中。添加在N,N-二甲基乙酰胺(10mL)中的N,N-二异丙基乙胺(69μL,0.396mmol,0.51当量)、和(2S)-2-[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-二氧代吡咯-1-基)丙酰基氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰基氨基]-3-甲基-丁酰基]氨基]丙酸(664mg,0.871mmol,1.1当量),随后添加EDCI.HCl(226mg,1.18mmol,1.5当量)并将混合物搅拌2h,随后LCMS表明良好的转化,但反应已停滞。将反应混合物温热至30℃并搅拌30min,LCMS表明没有变化,因此在真空中除去CH_2Cl_2并将Et_2O添加至所得DMA溶液中。收集沉淀的油,在真空中除去Et_2O并重复沉淀过程。将合并的沉淀物通过HPLC(10%-60% B于A中经13min)进行纯化,冷冻干燥后得到为黄色残余物的1(200mg,0.174mmol,98%纯度,22%产率)。LC/MS(方法A):保留时间1.44min(ES+)m/z 1149$[M+H]^{+1}$H NMR(600MHz,氯仿-d)δ8.81(s,1H),7.83(s,2H),7.48(s,1H),7.18(dd,J=18.7,7.5Hz,2H),6.69(s,2H),6.43(s,1H),5.68(d,J=16.1Hz,1H),5.27(d,J=16.1Hz,1H),5.03(d,J=18.4Hz,1H),4.90(d,J=18.4Hz,1H),4.75(p,J=7.2Hz,1H),4.32(dd,J=7.4,5.8Hz,1H),4.05(s,1H),3.83(t,J=7.2Hz,3H),3.78-3.68(m,3H),3.68-3.57(m,31H),3.53(t,J=5.1Hz,3H),3.40(q,J=5.3Hz,2H),3.06-2.91(m,3H),2.84(dt,J=16.3,6.2Hz,1H),2.63(ddd,J=14.8,8.5,4.2Hz,1H),2.57-2.44(m,4H),2.30(dq,J=13.4,6.7Hz,1H),2.10(p,J=6.4Hz,3H),1.91(ddt,J=16.8,14.3,7.2Hz,3H),1.54(d,J=7.1Hz,3H),1.02(dd,J=15.5,6.9Hz,10H)。

[1352] 实例10的合成-A2的替代合成

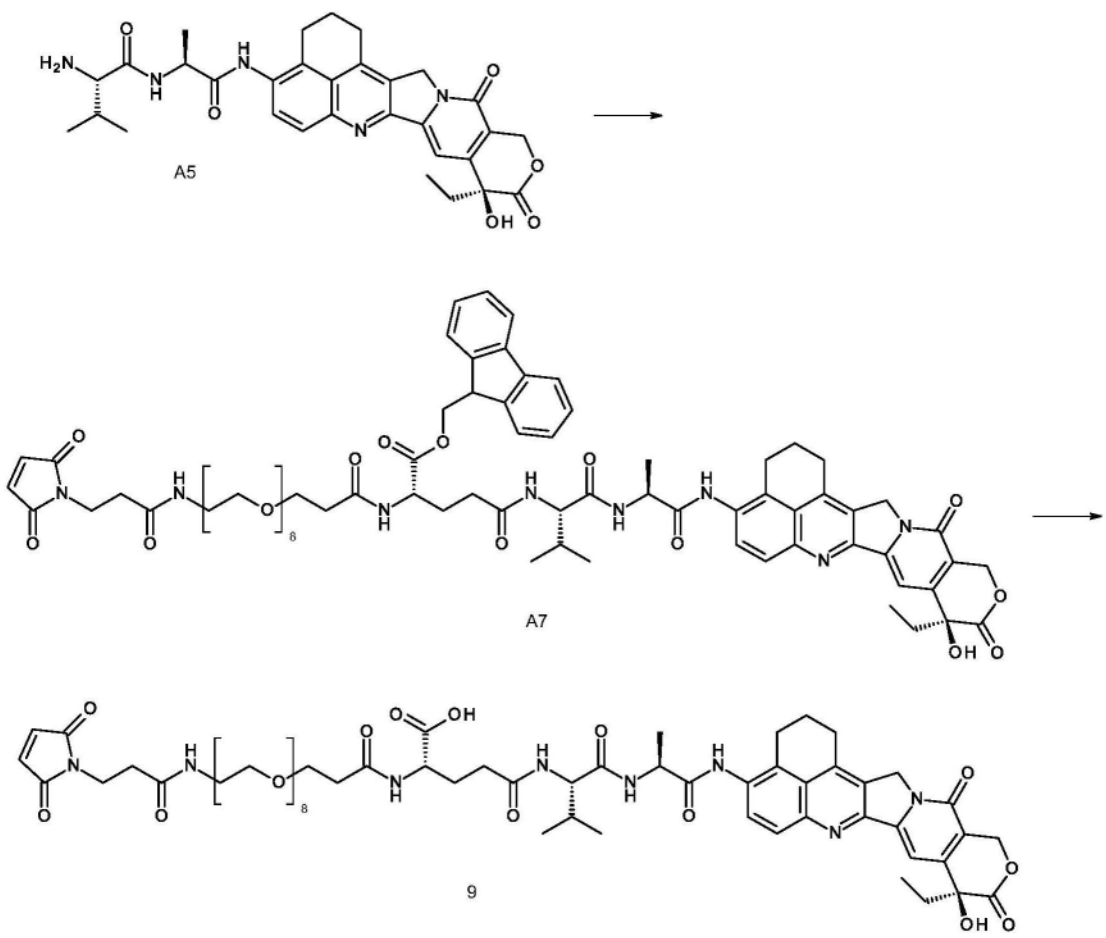
[1353] 

I16 A2

[1354] 烯丙基((S)-1-(((S)-1-((4-氨基-5-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(A2)

[1355] 将EDCI.HCl(7.71g,31.2mMol)添加至烯丙氧羰基-Val-Ala-OH(8.49g,31.2mmol)于CH_2Cl_2(200mL)中的溶液并搅拌15min或直至溶解。随后添加I16(5g,28.3mMol)并将所得混合物搅拌直至反应完成。将挥发物在减压下去除。将粗产物吸收于Et_2O(50mL)中并将混合物超声处理3min。将固体过滤并再次吸收于CH2C12(50mL)中,超声处理3min并再次过滤以给出呈灰色固体的纯的产物A2(12.21g,79%产率)。LC/MS(方法B):ES^+=1.47min,m/z 431.5$[M+H]^{\cdot+}$。

[1356] 合成实例11

[1357] 

A5 A7 9

[1358] a)(9H-芴-9-基)甲基N2-(1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3-氧代-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧-4-氮杂三十一烷-31-酰基)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-L-谷氨酰胺(A7)

[1359] 将EDCI.HCl(0.10mmol,1.2当量)添加至A5(0.087mmol,1.0当量)和Mal-PEG_8-Glu-OH(0.10mmol,1.2当量)于DCM(5mL)中的溶液中并将所得混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物蒸发至干燥,并通过柱(8%-12% MeOH/DCM)进行纯化得到呈白色固体的产物。产率=80mg(63%)。LC/MS(方法B)rt 1.66min m/z(1456.2)M+H。

[1360] b)N2-(1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3-氧代-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧-4-氮杂三十一烷-31-酰基)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-4-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)-L-谷氨酰胺(9)

[1361] 将1-甲基吡咯烷(200μL)添加至A7(0.06mmol)于DMF(0.8mL)中的溶液中并在室温下搅拌10min。在真空下除去溶剂,并将残余物通过制备型HPLC(30% MeCN/水+0.05%甲酸,经8.5min)纯化。将含产物的级分冷冻干燥以给出呈灰白色固体的产物。产率=23mg(30%)。LC/MS(方法B)rt 1.43min m/z(1278.4)M+H。

[1362] 上述说明书中提及的所有出版物通过引用并入本文。本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的,而不背离本发明的范围和精神。虽然已结合特定优选实施例描述了本发明,但应当理解,要求保护的本发明不应不适当地限于这类特定实施例。实际上,对于生物化学和生物技术或相关领域的技术人员显而易见的、用于执行本发明的所描述的实施例的各种修改旨在落入如下权利要求书的范围内。

[1363] 序列

[1364]

标识符	序列
ZY0EPQ-E02; CHDR1	SEQ ID NO: 1: GYYWN
ZY0EPQ-E02; CHDR2	SEQ ID NO: 2: EINHSGSTNYNPSLKS
ZY0EPQ-E02; CHDR3	SEQ ID NO: 3: NLYNWNLDS
ZY0EPQ-E02; CLDR1	SEQ ID NO: 4: RASQGIRNDLG
ZY0EPQ-E02; CLDR2	SEQ ID NO: 5: VASSLQS
ZY0EPQ-E02; CLDR3	SEQ ID NO: 6: LQHNSYPRT
ZY0EQD-E02; CHDR1	SEQ ID NO: 7: GYYWN
ZY0EQD-E02; CHDR2	SEQ ID NO: 8: EINHSGSTSYNPSLKS
ZY0EQD-E02; CHDR3	SEQ ID NO: 9: VLYNWNVDS
ZY0EQD-E02; CLDR1	SEQ ID NO: 10: RASQDIRNDVG
ZY0EQD-E02; CLDR2	SEQ ID NO: 11: AASRLQS
ZY0EQD-E02; CLDR3	SEQ ID NO: 12: LQHNSYPRT

[1365]

ZY0EOB-F05；CHDR1	SEQ ID NO: 13：SGGYYWS
ZY0EOB-F05；CHDR2	SEQ ID NO: 14：NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EOB-F05；CHDR3	SEQ ID NO: 15：EKALATVTPSGYENYYTVDV
ZY0EOB-F05；CLDR1	SEQ ID NO: 16：WASQGISSYLA
ZY0EOB-F05；CLDR2	SEQ ID NO: 17：AASTLQS
ZY0EOB-F05；CLDR3	SEQ ID NO: 18：QHLNSYPLT
ZY0EO5-E07；CHDR1	SEQ ID NO: 19：SGGYYWS
ZY0EO5-E07；CHDR2	SEQ ID NO: 20：NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EO5-E07；CHDR3	SEQ ID NO: 21：EKALASVIPSGYENYYVVDV
ZY0EO5-E07；CLDR1	SEQ ID NO: 22：WASQGIAGYLA
ZY0EO5-E07；CLDR2	SEQ ID NO: 23：AASTLQS
ZY0EO5-E07；CLDR3	SEQ ID NO: 24：QHLNSYPLT
ZY0EP0-C07；CHDR1	SEQ ID NO: 25：DYYMS
ZY0EP0-C07；CHDR2	SEQ ID NO: 26：YISSSGSTIYYTDSVKG
ZY0EP0-C07；CHDR3	SEQ ID NO: 27：DGVGFDY
ZY0EP0-C07；CLDR1	SEQ ID NO: 28：RASQSVSSSYLA
ZY0EP0-C07；CLDR2	SEQ ID NO: 29：AASSRAT
ZY0EP0-C07；CLDR3	SEQ ID NO: 30：QQYGSSPLYT

[1366] SEQ ID NO:31(ZY0EPQ-E02,可变重链)

[1367] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST NYNPSLKSRVTILVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNLYNWNLDSWGQGTLVTV SS

[1368] SEQ ID NO:32(ZY0EPQ-E02,可变轻链)

[1369] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYVASSLQSGV PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

[1370] SEQ ID NO:33(ZY0EQD-E02,可变重链,例如种系化前)

[1371] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SS

[1372] SEQ ID NO:34(ZY0EQD-E02,可变轻链)

[1373] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGV PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

[1374] SEQ ID NO:35(ZY0EOB-F05,可变重链)

[1375] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSG STYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCATEKALATVTPSGYENYYT VDVWGQGTTVTVSS

[1376] SEQ ID NO:36(ZY0EOB-F05,可变轻链)

[1377] DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

[1378] SEQ ID NO:37(ZY0E05-E07,可变重链)

[1379] QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSG STYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKALASVIPSGYENYYV VDVWGQGTTVTVSS

[1380] SEQ ID NO:38(ZY0E05-E07,可变轻链)

[1381] DIQLTQSPSFLSASVGGRVTITCWASQGIAGYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

[1382] SEQ ID NO:39:(ZY0EP0-C07,可变重链)

[1383] QVQLVESGGVLVKPGGSLRLSCAASGFTLSDYYMSWIRQAPGMGLEWVSYISSSGST IYYTDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGVGFDYWGQGTLVTVS S

[1384] SEQ ID NO:40(ZY0EP0-C07,可变轻链)

[1385] EIVLTQSPGTLSLFPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQSPRLLIYAASSRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLYTFGQGTKLEIK

[1386] SEQ ID NO:41(Maia重链恒定区,半胱氨酸插入带下划线):

[1387] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1388] SEQ ID NO:42(轻链恒定区)

[1389] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1390] SEQ ID NO:43(ZY0EQD-E02,可变重链,例如种系化前,例如SEQ ID NO:33/SEQ ID NO:45的变体)

[1391] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGRGLEWIGEINHSGST SYNPSLKSRITISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS S

[1392] SEQ ID NO:44(ZY0EQD-E02,轻链):

[1393] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGV PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1394] SEQ ID NO:45(EQD-E02_GL,可变重链,GL=种系化的)

[1395] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SS

[1396] SEQ ID NO:46(EQD-E02-GLY,可变重链,GLY=具有Y取代的种系化的)

[1397] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Y**HSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SS

[1398] SEQ ID NO:47(EQD-E02-GLQ,可变重链,GLQ=具有Q取代的种系化的)

[1399] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SS

[1400] SEQ ID NO:48(E02-GL-Maia-重链,半胱氨酸插入带下划线)

[1401] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1402] SEQ ID NO:49(E02-GLY-Maia-重链,GLY＝具有Y取代的种系化的)

[1403] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1404] SEQ ID NO:50(E02-GLQ-Maia-重链,GLQ＝具有Q取代的种系化的)

[1405] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIQHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1406] SEQ ID NO:51(E02-GL-WT-重链)

[1407] QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGST SYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1408] SEQ ID NO:52(重链恒定区)

[1409] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1410] SEQ ID NO:53(人B7H4核酸序列,包括5’和3’UTR)

[1411] GCCACCatggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactc atcattggctttggtatttcagggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaa tcctgagctgcacttttgaacctgacatcaaactttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtcca tgagttcaaagaaggcaaagatgagctgtcggagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaa gtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaacgtgcaactcacagatgctggcacctacaaatgttatatcatcacttct aaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaatgtggactataatgcca gctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttcccccagcccacagtggtctgggcatcccaagttgaccaggga gccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctctacaat gttacgatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatcaaagtgacagaatc ggagatcaaaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttctttctttgccatcagctgggc acttctgcctctcagcccttacctgatgctaaaaTAATAA

[1412] SEQ ID NO:54(人B7H4核酸序列,编码序列)

[1413] atggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctt tggtatttcagggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctg cacttttgaacctgacatcaaactttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaaa gaaggcaaagatgagctgtcggagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaagtgatagttg gcaatgcctctttgcggctgaaaaacgtgcaactcacagatgctggcacctacaaatgttatatcatcacttctaaaggcaa ggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaatgtggactataatgccagctcagaga ccttgcggtgtgaggctccccgatggttcccccagcccacagtggtctgggcatcccaagttgaccagggagccaacttct cggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctctacaatgttacgatc aacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatcaaagtgacagaatcggagatca aaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttctttctttgccatcagctgggcacttctgcct ctcagcccttacctgatgctaaaa

[1414] SEQ ID NO:55(人B7H4多肽序列;UniProt登录号:Q7Z7D3)

[1415] MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSD IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVW ASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKV TESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

[1416] 实施例

[1417] E1.一种结合至B7-H4的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

[1418] i.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1)、重链CDR2(HCDR2)、重链CDR3(HCDR3)、轻链CDR1(LCDR1)、轻链CDR2(LCDR2)和轻链CDR3(LCDR3),或其功能变体;

[1419] ii.分别含有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[1420] iii.分别含有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;

[1421] iv.分别含有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体;或

[1422] v.分别含有SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[1423] E2.根据E1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包含:

[1424] i.分别含有SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

[1425] ii.分别含有SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

[1426] iii.分别含有SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

[1427] iv.分别含有SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

[1428] v.分别含有SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变重(VH)链和可变轻(VL)链,或其功能变体;

[1429] vi.分别含有SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[1430] vii.分别含有SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;

[1431] viii.分别含有SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体;或

[1432] ix.分别含有SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体。

[1433] E3.根据E1或E2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包含:

[1434] i.分别含有SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,或其功能变体。

[1435] E4.根据E1-E3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包含:

[1436] i.分别含有SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH链和VL链,或其功能变体。

[1437] E5.根据E1-E4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结合OVCAR4细胞系。

[1438] E6.根据E1-E5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包含含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的重链恒定区。

[1439] E7.根据E1-E5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包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链恒定区。

[1440] E8.根据E1-E7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包含含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的轻链恒定区。

[1441] E9.根据E1-E5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包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链;以及含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链。

[1442] E10.根据E1-E5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包含含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的重链；以及含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链。

[1443] E11.根据E1-E10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缀合至异源药剂。

[1444] E12.根据E1-E11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缀合至一种或多种异源药剂，该一种或多种异源药剂选自由以下组成的组：拓扑异构酶I抑制剂、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮杂䓬、抗微生物剂、治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、脂质、生物应答调节剂、药学试剂、淋巴因子、异源抗体、异源抗体的片段、可检测标记、聚乙二醇(PEG)、放射性同位素、或其组合。

[1445] E13.根据E1-E12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缀合至一种或多种异源药剂，该一种或多种异源药剂选自拓扑异构酶I抑制剂、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮杂䓬、或其组合。

[1446] E14.根据E1-E13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缀合至异源药剂，该异源药剂选自由以下组成的组：微管溶素AZ1508、吡咯并苯并二氮杂䓬SG3315、吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249、或其组合。

[1447] E15.根据E1-E14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缀合至吡咯并苯并二氮杂䓬SG3249细胞毒素：(SG3249)。

[1448] E16.根据E1-E14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缀合至：

[1449] (SG3932)；(SG4010)；(SG4057)；和/或(SG4052)。

[1450] E17.根据E1-E14或E16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缀合至：(SG3932)。

[1451] E18.根据E1-E17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。

[1452] E19.根据E1-E18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段是人源化单克隆抗体。

[1453] E20.一种药物组合物，该药物组合物包含根据E1-E19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[1454] E21.一种多核苷酸，该多核苷酸编码根据E1-E19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[1455] E22.一种宿主细胞，该宿主细胞包含根据E21所述的多核苷酸。

[1456] E23.一种用于产生结合B7-H4的抗体或其抗原结合片段的方法，该方法包括在宿主细胞中表达根据E22所述的多核苷酸。

[1457] E24.一种可通过根据E23所述的方法获得的抗体或其抗原结合片段。

[1458] E25.一种治疗包含表达B7-H4的癌细胞的癌症的方法，该方法包括向受试者施用根据E1-E19或E24中任一项所述的抗体或抗原结合片段、根据E20所述的药物组合物、或其组合。

[1459] E26.根据E1-E19或24中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或根据E20所述的药物组合物，用于治疗癌症，其中所述癌症包含表达B7-H4的癌细胞。

[1460] E27.根据E25所述的方法，或根据E26所述使用的抗体或其抗原结合片段或药物组合物，其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、NSCLC(鳞癌和/或腺癌)、胰腺癌和胃癌。

[1461] E28.用于根据E25-E27中任一项所述使用的方法、或抗体或其抗原结合片段或药物组合物，其中所述癌症选自乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌和胆管癌。

[1462] E29.用于根据E25-E28中任一项所述使用的方法、或抗体或其抗原结合片段或药物组合物，其中所述癌症是选自以下的乳腺癌：激素受体阳性(HR+)乳腺癌、人表皮生长因子受体2阳性(HER2+)乳腺癌和三阴性乳腺癌(TNBC)。

[1463] E30.一种用于检测样品中是否存在B7-H4多肽的方法，该方法包括：

[1464] i.使样品与根据E1-E19或E24中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据E20所述的药物组合物接触，以提供抗体-抗原复合物；

[1465] ii.检测所述抗体-抗原复合物是否存在；

[1466] iii.其中该抗体-抗原复合物的存在证实了B7-H4多肽的存在；

[1467] iv.其中抗体-抗原复合物的不存在证实了B7-H4多肽的不存在。

[1468] E31.根据E30所述的方法，其中所述抗体-抗原复合物的存在指示癌细胞的存在，并且其中所述抗体-抗原复合物的不存在指示癌细胞的不存在。

[1469] E32.根据E30或E31所述的方法，其中该样品是可从受试者获得的分离的样品。

[1470] E33.根据E30-E32中任一项所述的方法，其中该B7-H4多肽是癌细胞的组成成分。

[1471] E34.一种抗体-药物缀合物(ADC)，该抗体-药物缀合物包含：

[1472] (i)结合人B7-H4的抗体或其抗原结合片段，该抗体或其抗原结合片段包含：含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1；含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2；含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR3；以及含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的LCDR1；含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的LCDR2；和含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的LCDR3；

[1473] (ii)接头；以及

[1474] (iii)细胞毒性剂，其中该细胞毒性剂是SG3932，

[1475] 其中该ADC具有为8的药物与抗体比率(DAR)。

[1476] E35.根据E34所述的ADC，其中该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的可变重(VH)链和含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的可变轻(VL)链。

[1477] E36.根据E34或E35所述的ADC，该ADC包含含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的轻链(LC)。

[1478] E37.一种药物组合物，该药物组合物包含根据E34-E37中任一项所述的ADC。

[1479] E38.一种治疗包含表达B7-H4的癌细胞的癌症的方法，该方法包括向受试者施用根据E34-E37中任一项所述的ADC、或根据E37所述的药物组合物、或其组合。

序列表

<110> 免疫医疗有限公司(MedImmune Limited)
<120> 治疗性结合分子
<130> B7H4-100-WO-PCT
<150> US 63/077,207
<151> 2020-09-11
<160> 55
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 1
Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5
<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 2
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 3
Asn Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Asp Ser
1 5
<210> 4
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5
<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 8
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser
1 5
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp Val Gly
1 5 10
<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11
Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 12
Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5
<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 14
Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 15
Glu Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Pro Ser Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr
1 5 10 15
Thr Val Asp Val
20
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 17

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5
<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5
<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 20
Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 21
Glu Lys Ala Leu Ala Ser Val Ile Pro Ser Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr
1 5 10 15
Val Val Asp Val
20
<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5
<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 24
Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 25
Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5
<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 26
Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 27
Asp Gly Val Gly Phe Asp Tyr
1 5
<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 28
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 29

Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 30
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 31
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asn Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 32

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

<210> 33
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 33

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

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 34

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

<210> 35
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 35

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

85 90 95
Cys Ala Thr Glu Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Pro Ser Gly Tyr Glu
100 105 110
Asn Tyr Tyr Thr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125
Ser Ser
130

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 36

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

<210> 37
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Glu Lys Ala Leu Ala Ser Val Ile Pro Ser Gly Tyr Glu
100 105 110
Asn Tyr Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125
Ser Ser
130

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 38

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

<210> 39
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 39

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

<210> 40
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 40

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

100 105

<210> 41
<211> 331
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
130 135 140
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
145 150 155 160
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
180 185 190
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
195 200 205
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
210 215 220
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
225 230 235 240
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

245 250 255
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
260 265 270
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
275 280 285
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
290 295 300
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
305 310 315 320
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 42
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 43

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

<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 44

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

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 45
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 45

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

<210> 46
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 46

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

<210> 47
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 47

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

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys

225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 49
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 49

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 50
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 50

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

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
225 230 235 240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 51
<211> 447
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 51

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 52
<211> 331
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 52

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

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

<210> 53
<211> 858
<212> DNA
<213> 智人
<400> 53
gccaccatgg cttccctggg gcagatcctc ttctggagca taattagcat catcattatt 60
ctggctggag caattgcact catcattggc tttggtattt cagggagaca ctccatcaca 120
gtcactactg tcgcctcagc tgggaacatt ggggaggatg gaatcctgag ctgcactttt 180

gaacctgaca tcaaactttc tgatatcgtg atacaatggc tgaaggaagg tgttttaggc 240
ttggtccatg agttcaaaga aggcaaagat gagctgtcgg agcaggatga aatgttcaga 300
ggccggacag cagtgtttgc tgatcaagtg atagttggca atgcctcttt gcggctgaaa 360
aacgtgcaac tcacagatgc tggcacctac aaatgttata tcatcacttc taaaggcaag 420
gggaatgcta accttgagta taaaactgga gccttcagca tgccggaagt gaatgtggac 480
tataatgcca gctcagagac cttgcggtgt gaggctcccc gatggttccc ccagcccaca 540
gtggtctggg catcccaagt tgaccaggga gccaacttct cggaagtctc caataccagc 600
tttgagctga actctgagaa tgtgaccatg aaggttgtgt ctgtgctcta caatgttacg 660
atcaacaaca catactcctg tatgattgaa aatgacattg ccaaagcaac aggggatatc 720
aaagtgacag aatcggagat caaaaggcgg agtcacctac agctgctaaa ctcaaaggct 780
tctctgtgtg tctcttcttt ctttgccatc agctgggcac ttctgcctct cagcccttac 840
ctgatgctaa aataataa 858

<210> 54
<211> 846
<212> DNA
<213> 智人
<400> 54

atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct 60
ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcaggga gacactccat cacagtcact 120
actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180
gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240
catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg 300
acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg 360
caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat 420
gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480
gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tcccccagcc cacagtggtc 540
tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600
ctgaactctg agaatgtgac catgaaggtt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660
aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagtg 720
acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg 780
tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840
ctaaaa 846

<210> 55
<211> 282
<212> PRT
<213> 智人
<400> 55

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30
Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45
Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
50 55 60
Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val
65 70 75 80
His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
85 90 95
Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
100 105 110
Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
115 120 125
Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
130 135 140
Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
145 150 155 160
Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
165 170 175
Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
180 185 190
Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
195 200 205
Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
210 215 220
Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225 230 235 240
Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
245 250 255
Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
260 265 270
Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275 280

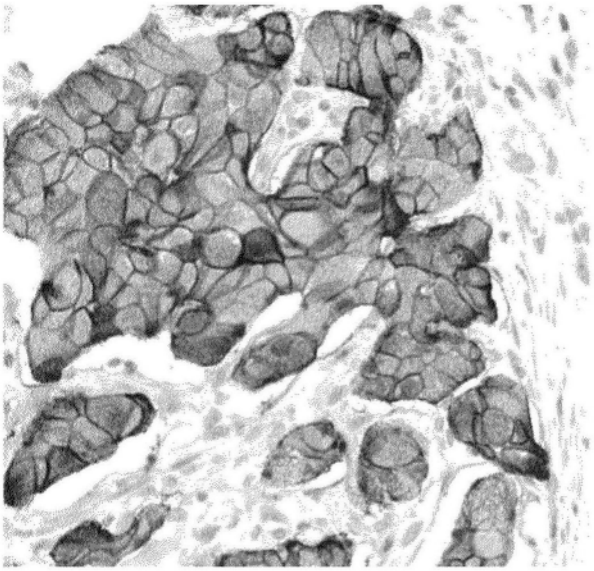


图1A

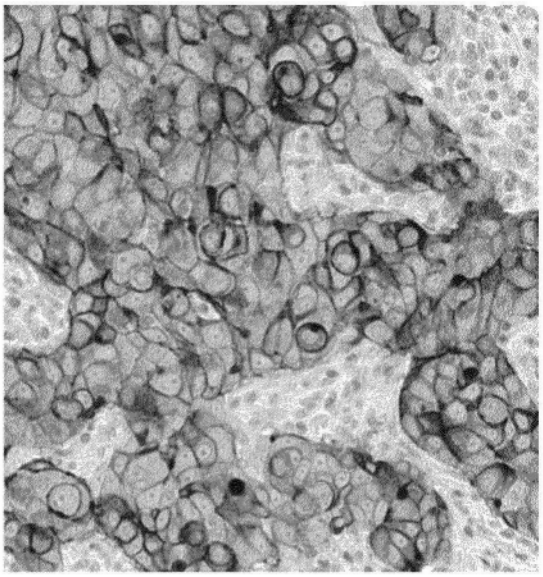


图1B

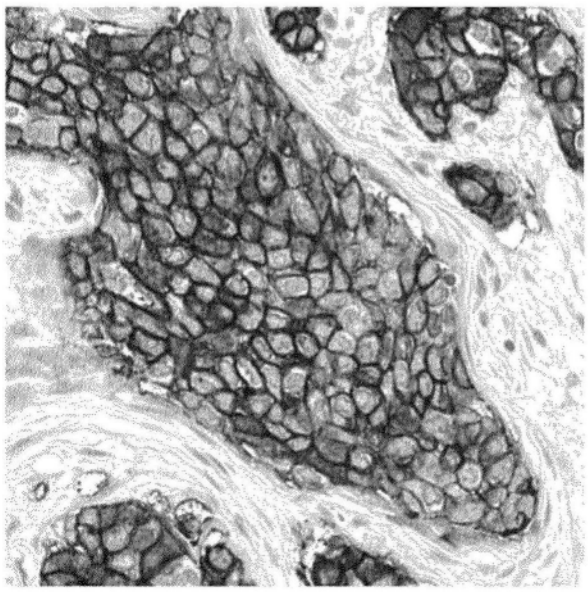


图1C

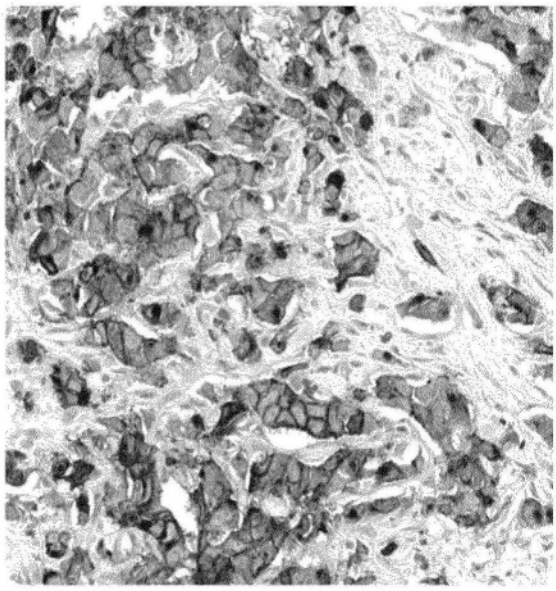


图1D

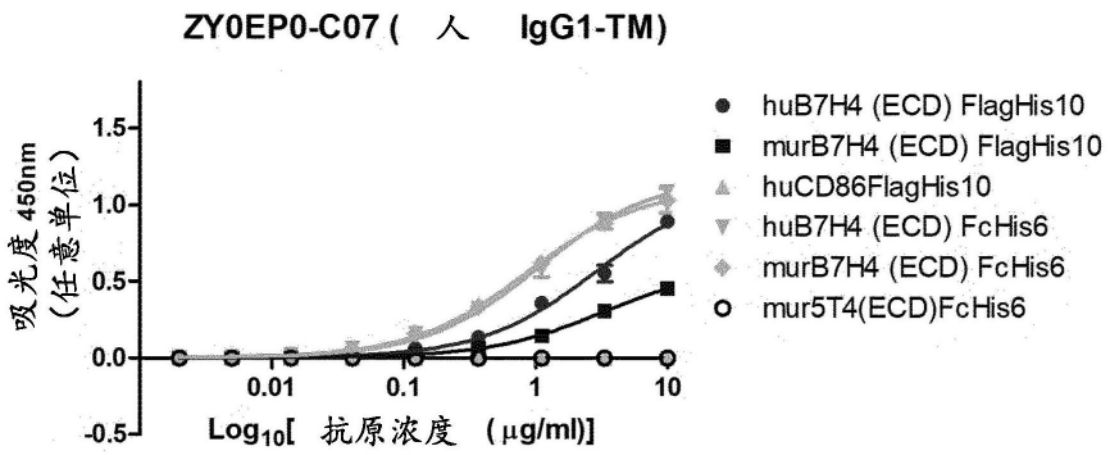

ZY0EP0-C07 (人 IgG1-TM)
吸光度 450nm (任意单位)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2A

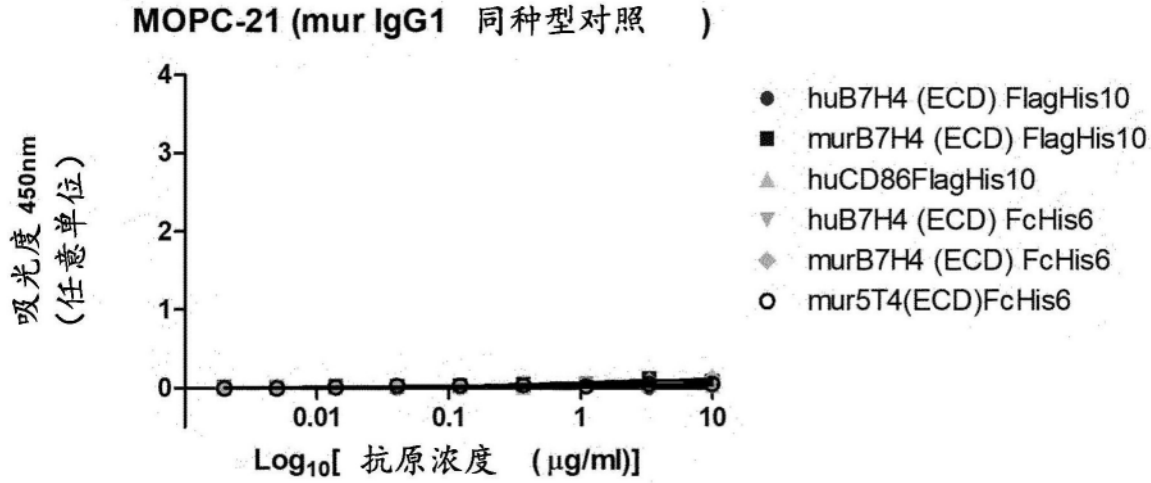

MOPC-21 (mur IgG1 同种型对照)
吸光度 450nm (任意单位)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2B

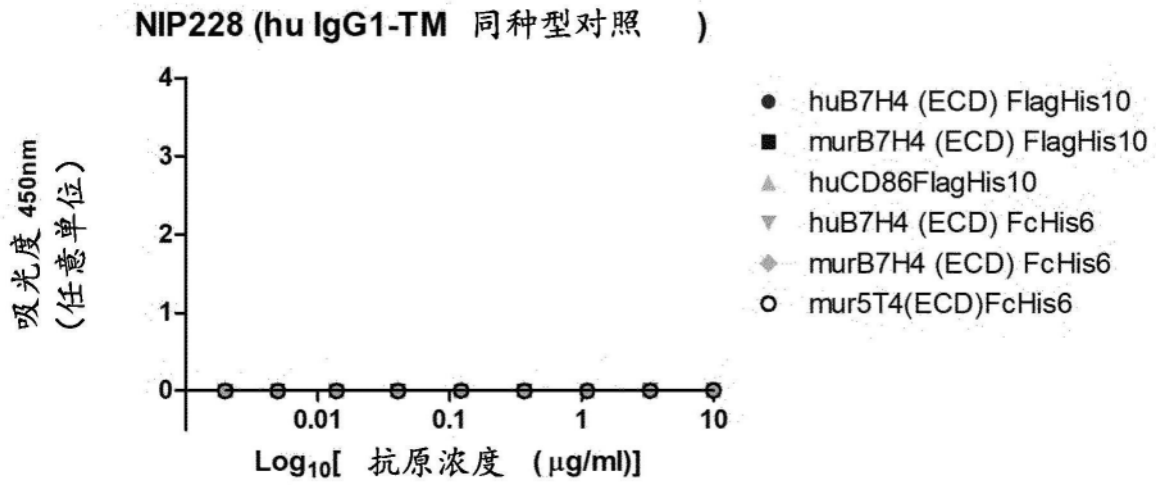

NIP228 (hu IgG1-TM 同种型对照)
吸光度 450nm
(任意单位)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2C

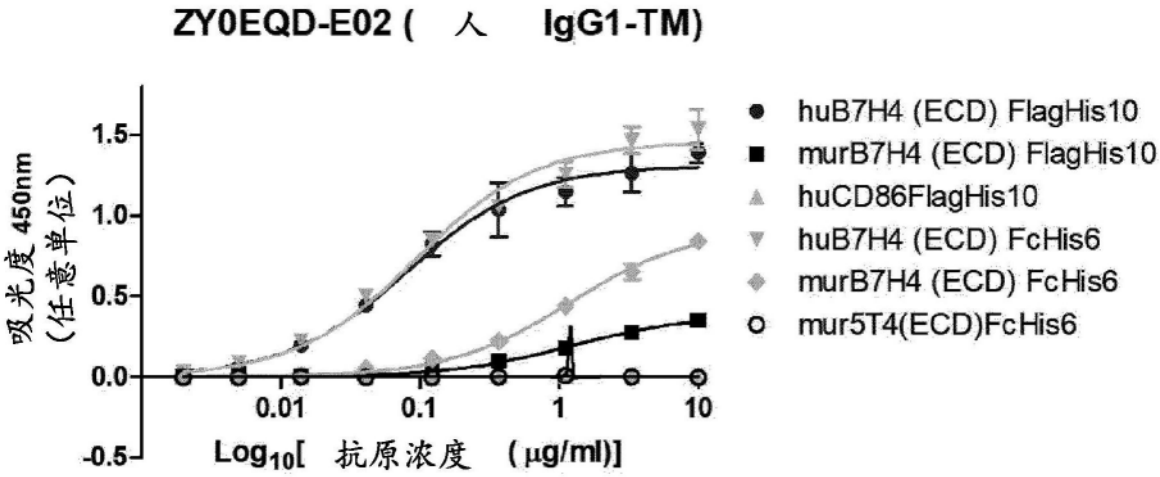

ZY0EQD-E02 (人 IgG1-TM)
吸光度 450nm
(任意单位)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2D

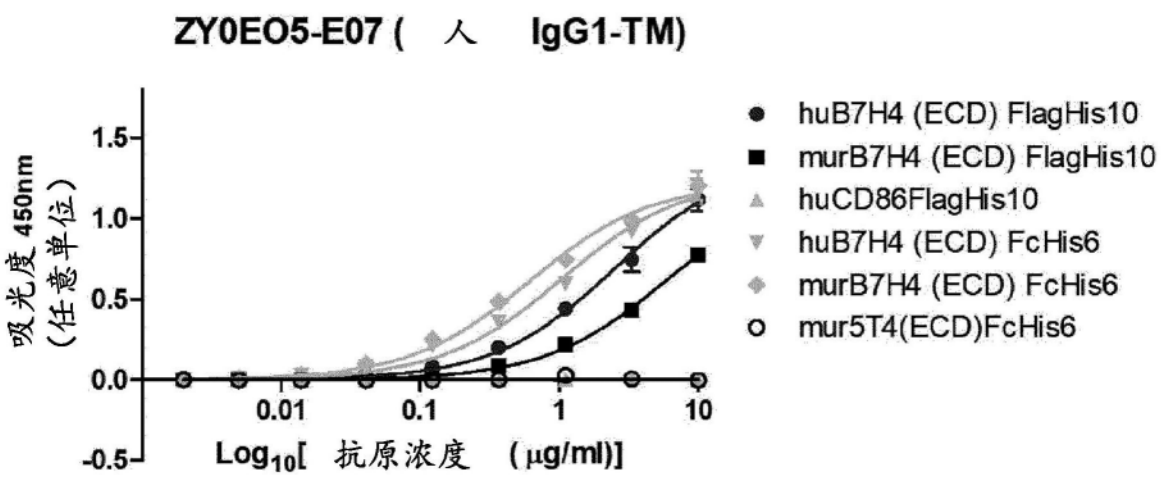

ZY0EO5-E07 (人 IgG1-TM)
吸光度 450nm (任意单位)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2E

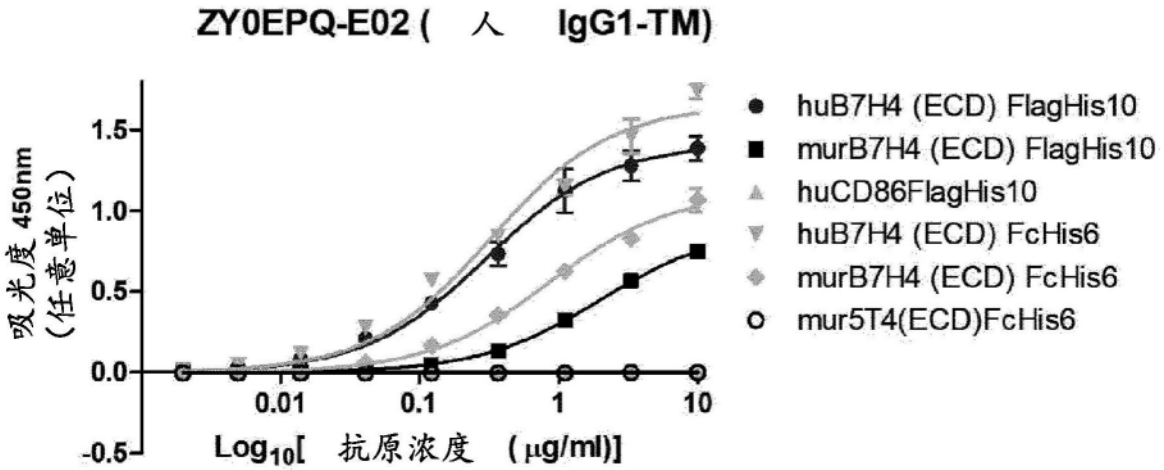

ZY0EPQ-E02 (人 IgG1-TM)
吸光度 450nm (任意单位)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2F

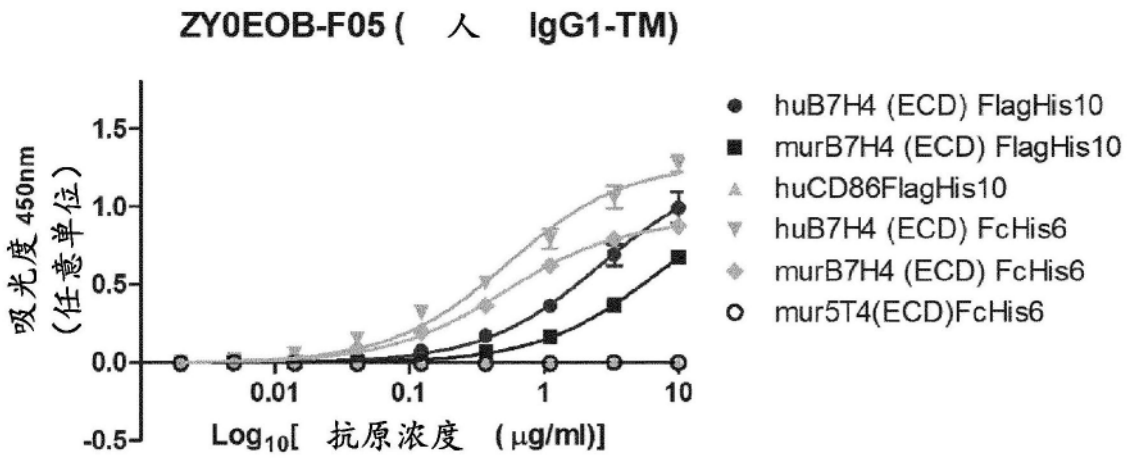

ZY0EOB-F05 (人 IgG1-TM)
吸光度 450nm (任意单位)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2G

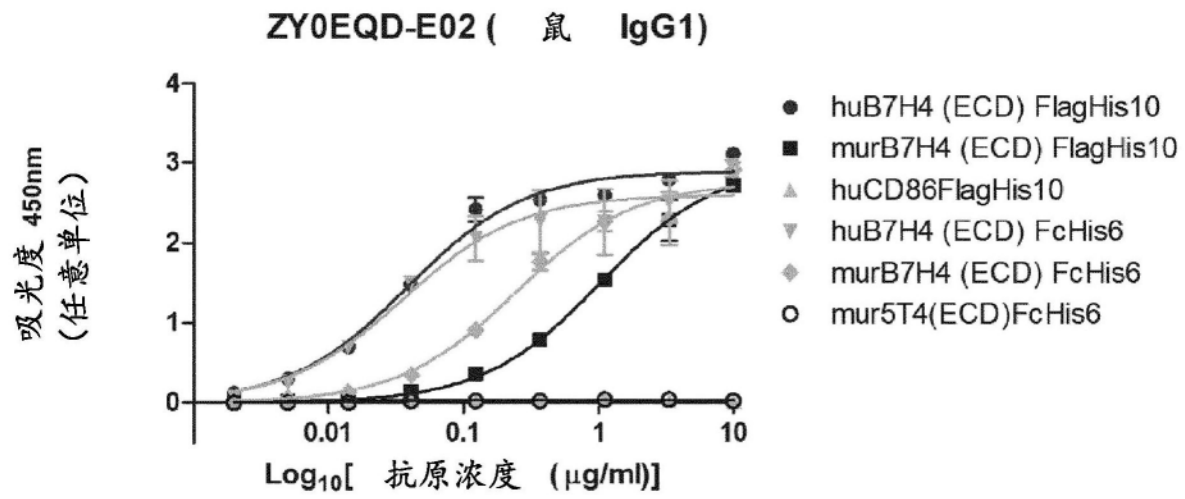

ZY0EQD-E02 (鼠 IgG1)
吸光度 450nm
(任意单位)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2H

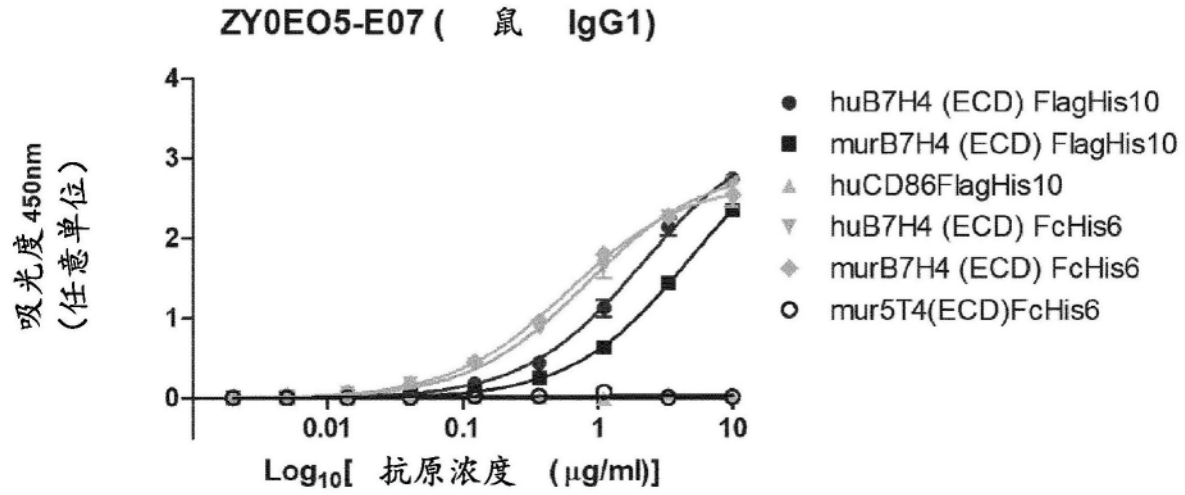

ZY0EO5-E07 (鼠 IgG1)
吸光度450nm
(任意单位)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2I

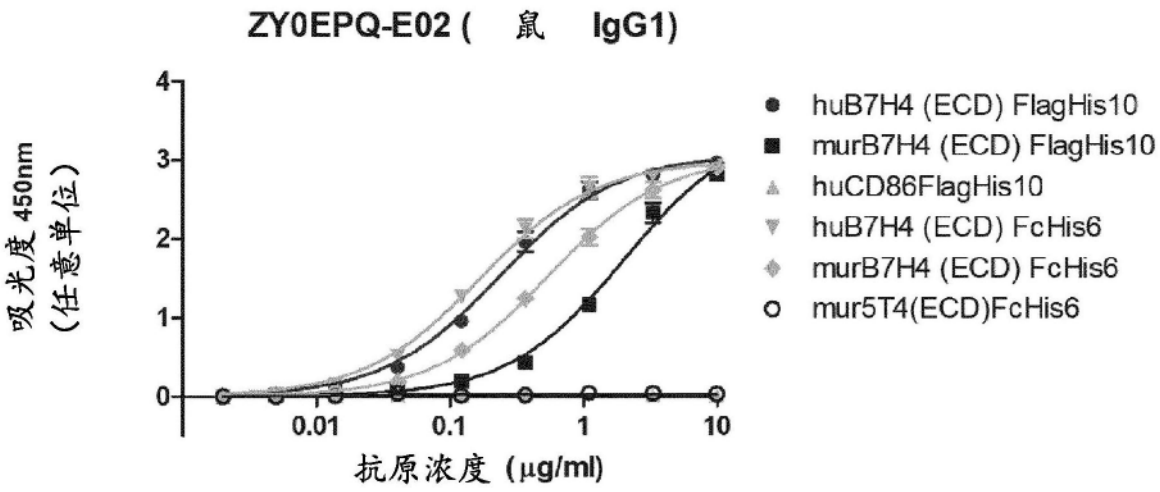

ZY0EPQ-E02 (鼠 IgG1)
吸光度 450nm
(任意单位)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
抗原浓度 (μg/ml)
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2J

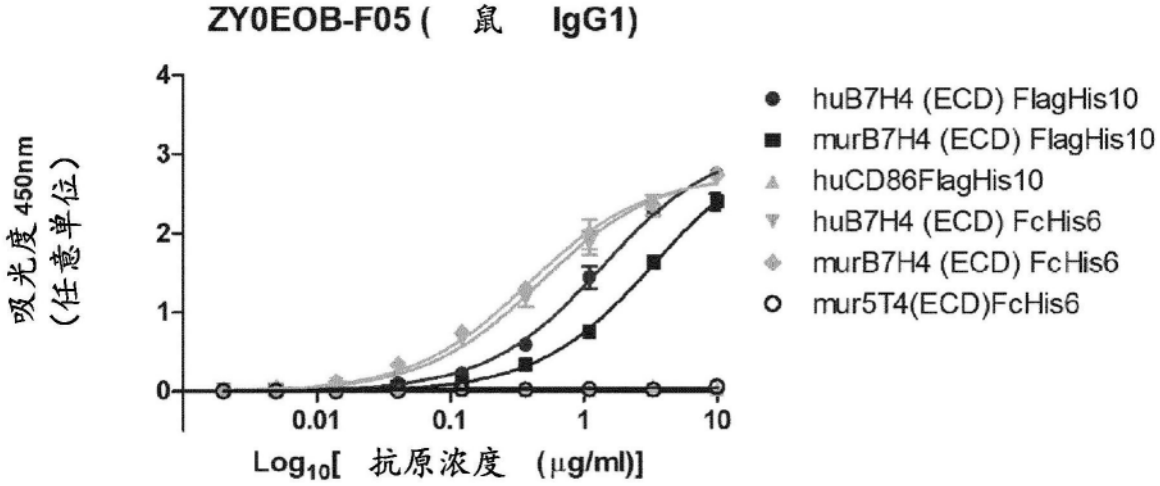

ZY0EOB-F05 (鼠 IgG1)
吸光度 450nm
(任意单位)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (ECD) FlagHis10
murB7H4 (ECD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (ECD) FcHis6
murB7H4 (ECD) FcHis6
mur5T4(ECD)FcHis6

图2K

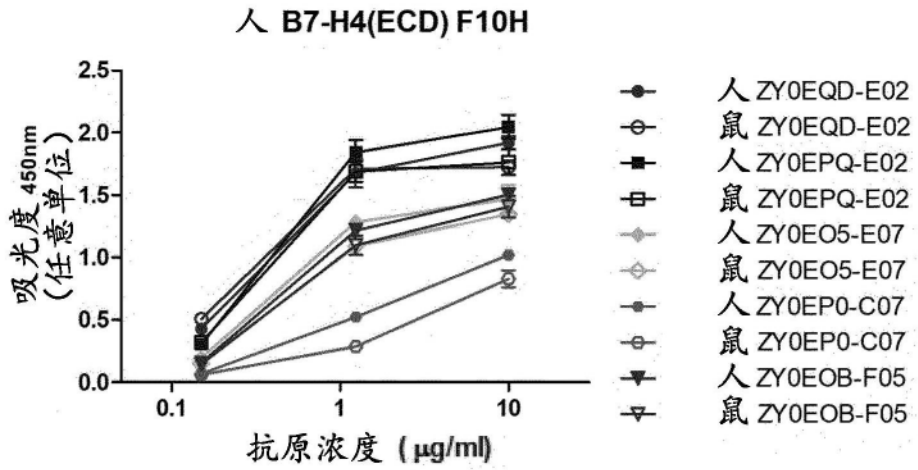

人 B7-H4(ECD) F10H
吸光度 450nm (任意单位)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
抗原浓度 (μg/ml)
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3A

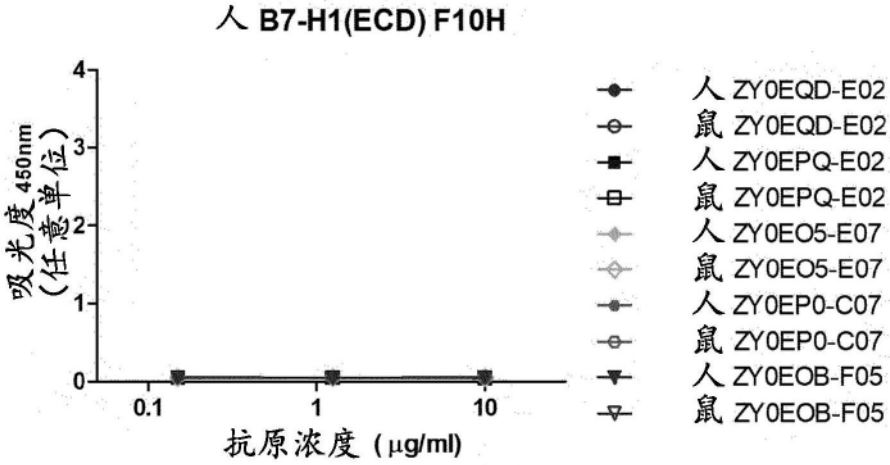

人 B7-H1(ECD) F10H
吸光度 450nm (任意单位)
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原浓度 (μg/ml)
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3B

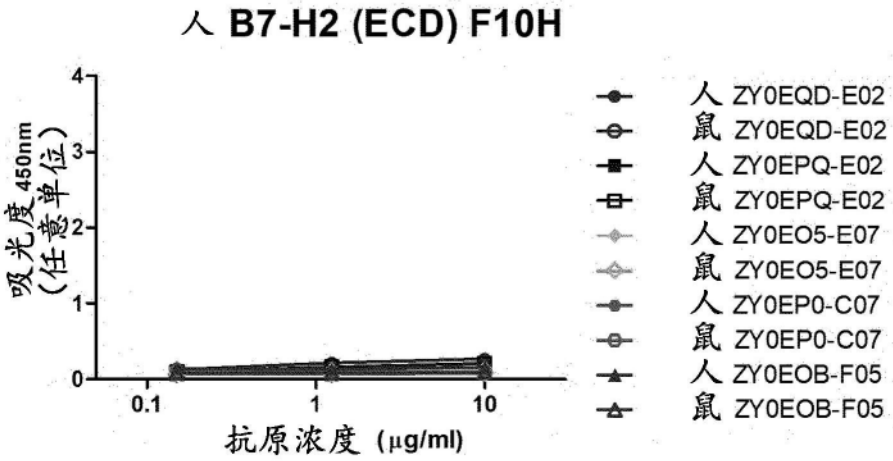

人 B7-H2 (ECD) F10H
吸光度 450nm (任意单位)
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原浓度 (μg/ml)
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3C

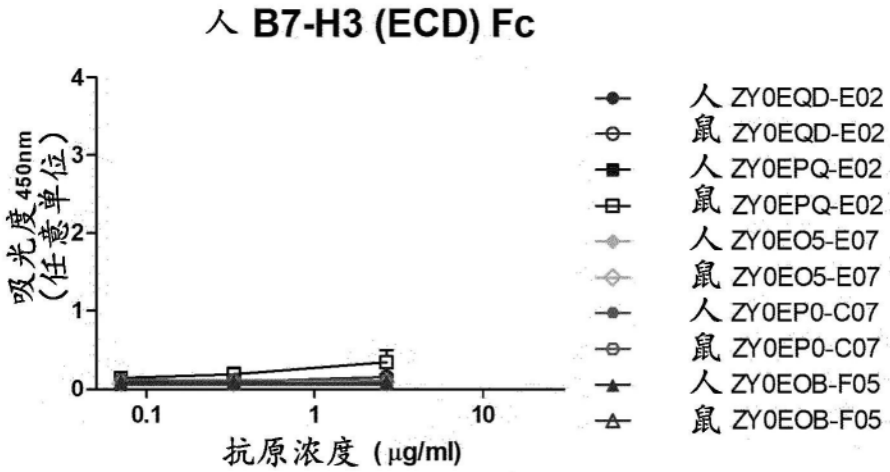

人 B7-H3 (ECD) Fc
吸光度450nm (任意单位)
抗原浓度 (μg/ml)
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3D

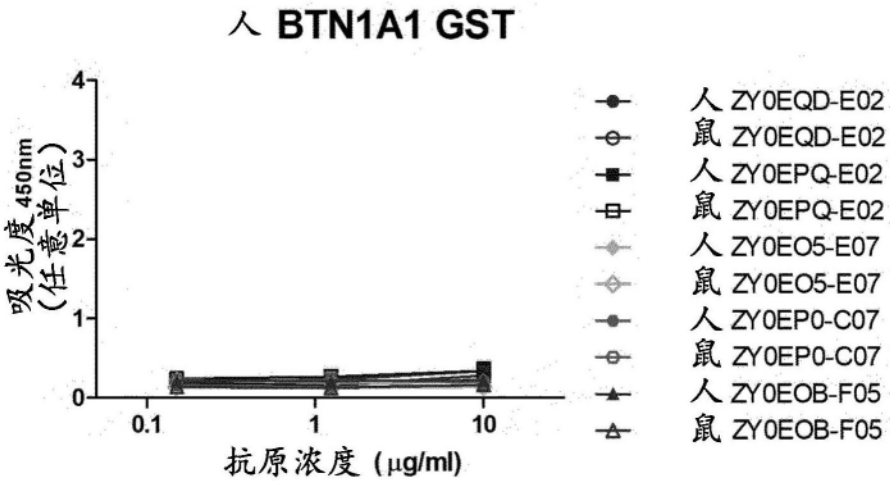

人 BTN1A1 GST
吸光度450nm (任意单位)
抗原浓度 (μg/ml)
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3E

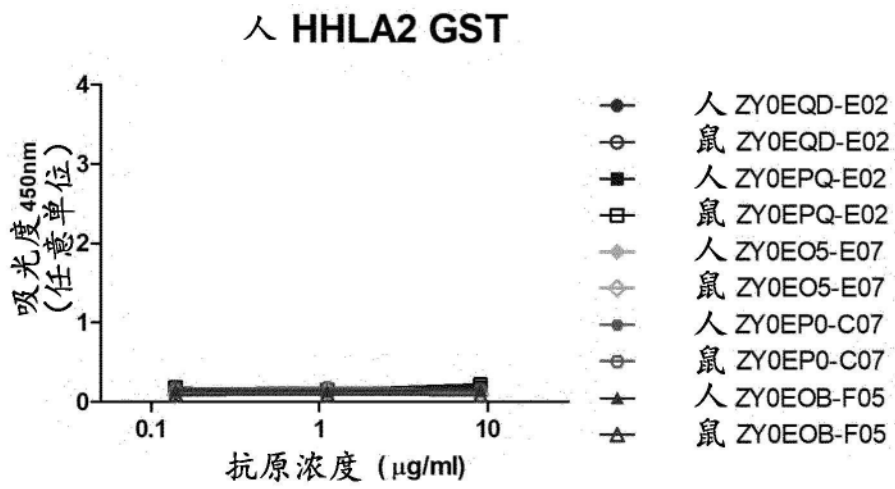

人 HHLA2 GST
吸光度450nm（任意单位）
抗原浓度（μg/ml）
0.1
1
10
0
1
2
3
4
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3F

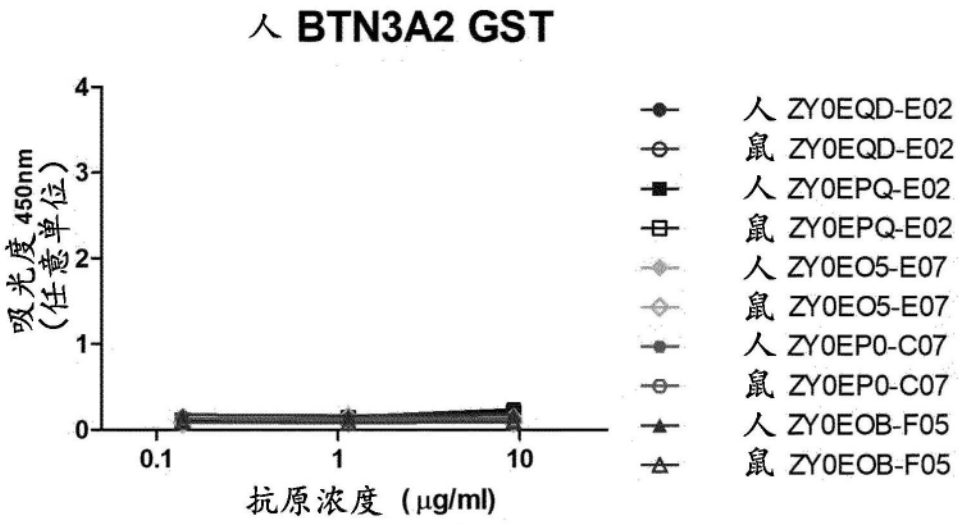

人 BTN3A2 GST
吸光度450nm（任意单位）
抗原浓度（μg/ml）
0.1
1
10
0
1
2
3
4
人 ZY0EQD-E02
鼠 ZY0EQD-E02
人 ZY0EPQ-E02
鼠 ZY0EPQ-E02
人 ZY0EO5-E07
鼠 ZY0EO5-E07
人 ZY0EP0-C07
鼠 ZY0EP0-C07
人 ZY0EOB-F05
鼠 ZY0EOB-F05

图3G

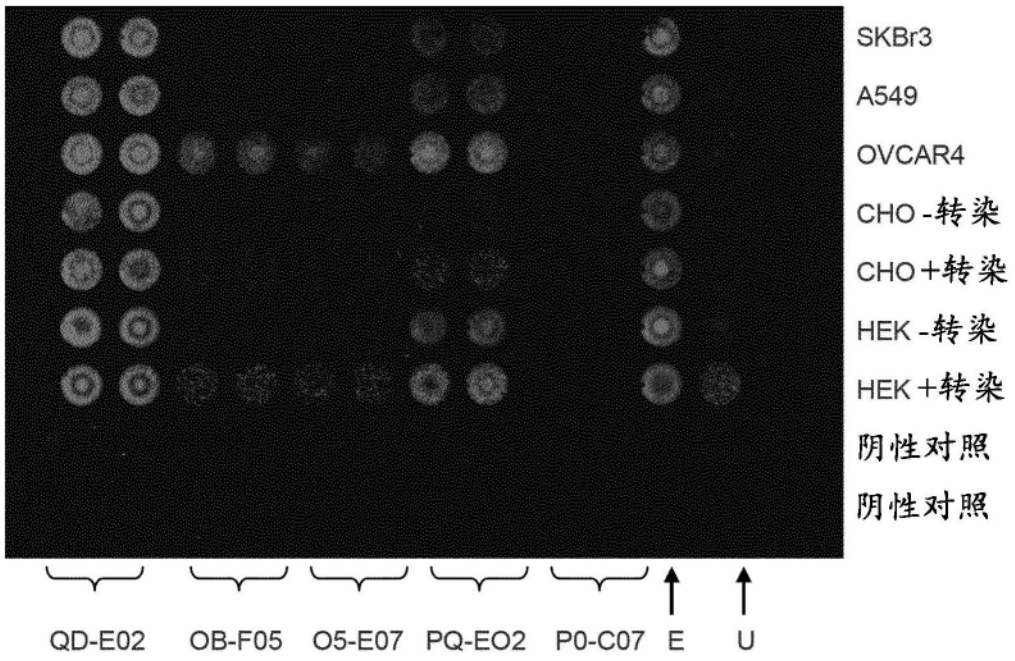

SKBr3
A549
OVCAR4
CHO -转染
CHO +转染
HEK -转染
HEK +转染
阴性对照
阴性对照
QD-E02
OB-F05
O5-E07
PQ-EO2
P0-C07
E
U

图4A

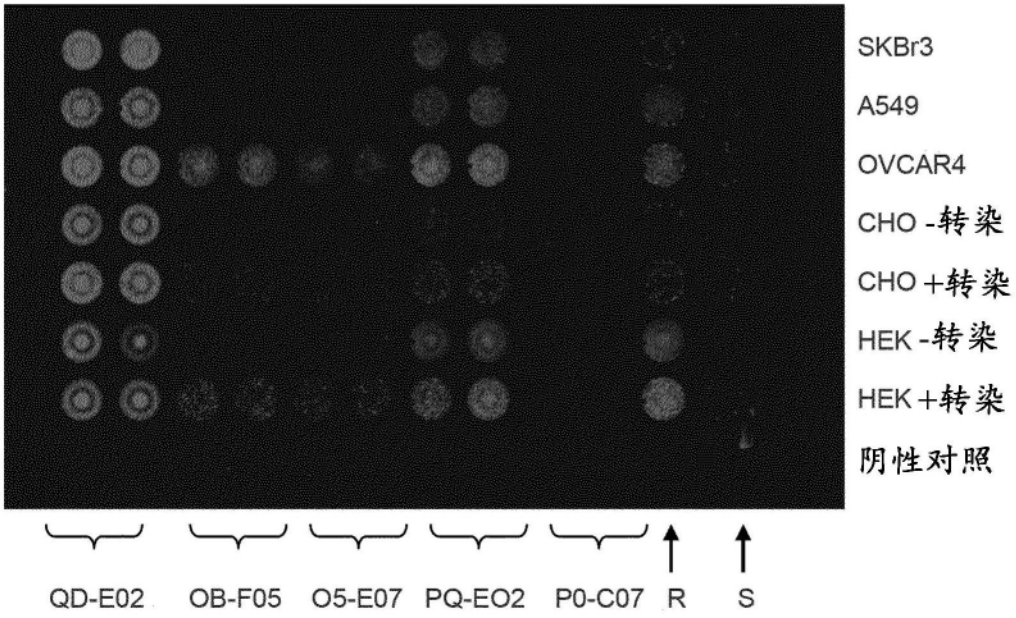

SKBr3
A549
OVCAR4
CHO -转染
CHO +转染
HEK -转染
HEK +转染
阴性对照
QD-E02
OB-F05
O5-E07
PQ-EO2
P0-C07
R
S

图4B

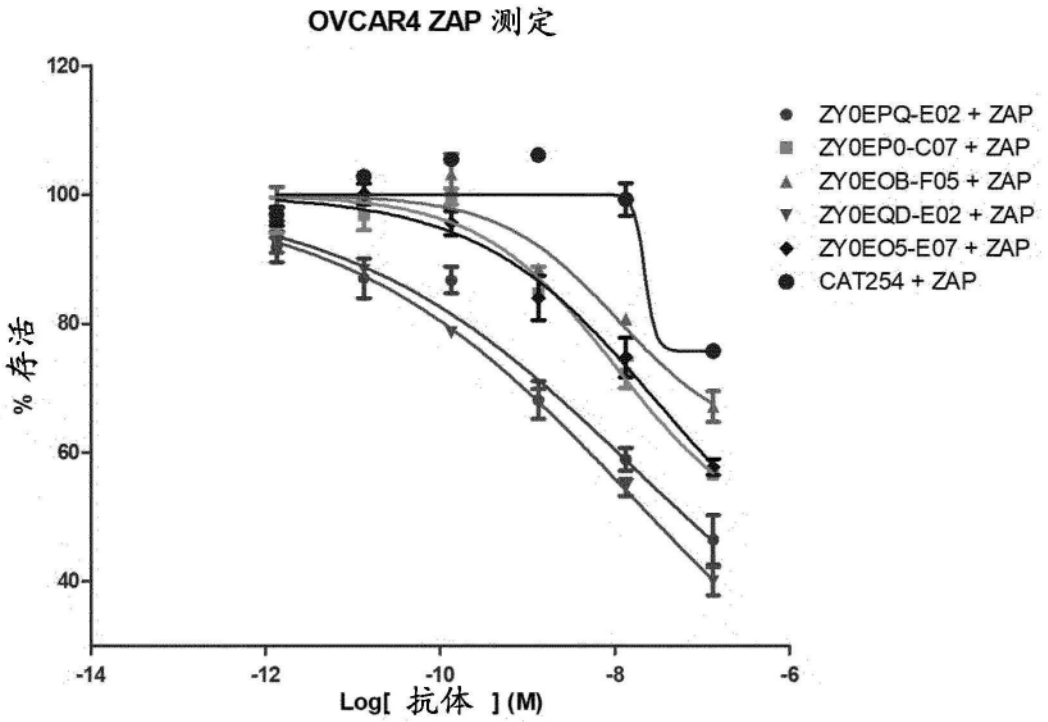

OVCAR4 ZAP 测定
120
100
80
60
40
% 存活
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗体] (M)
ZY0EPQ-E02 + ZAP
ZY0EP0-C07 + ZAP
ZY0EOB-F05 + ZAP
ZY0EQD-E02 + ZAP
ZY0EO5-E07 + ZAP
CAT254 + ZAP

图5A

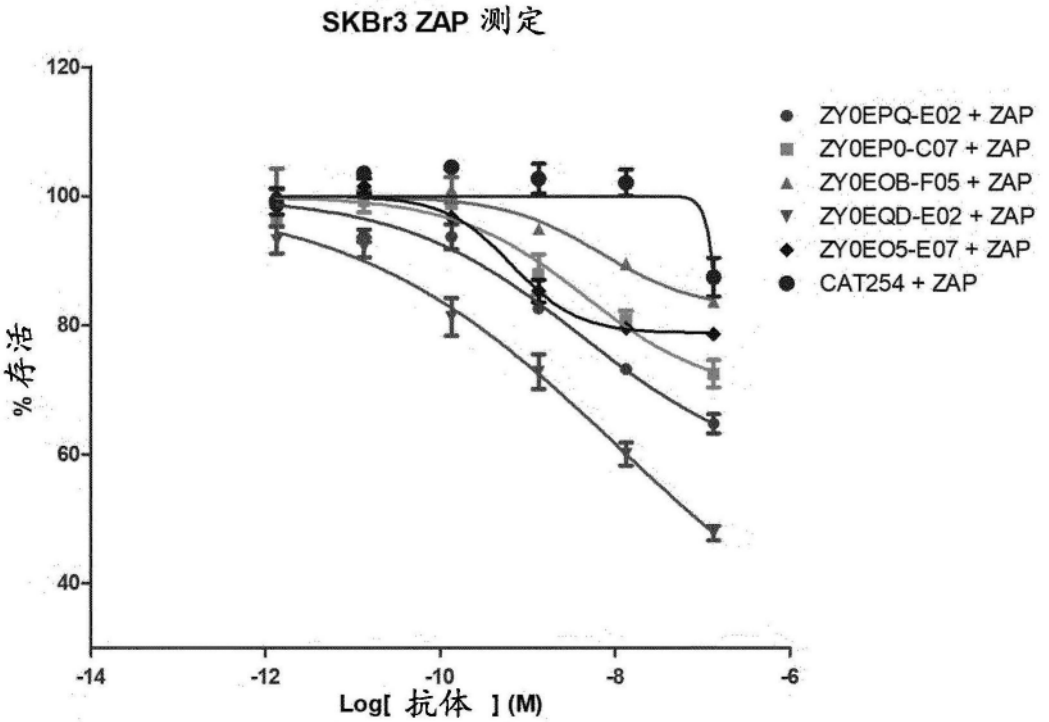

SKBr3 ZAP 测定
120
100
80
60
40
% 存活
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗体] (M)
ZY0EPQ-E02 + ZAP
ZY0EP0-C07 + ZAP
ZY0EOB-F05 + ZAP
ZY0EQD-E02 + ZAP
ZY0EO5-E07 + ZAP
CAT254 + ZAP

图5B

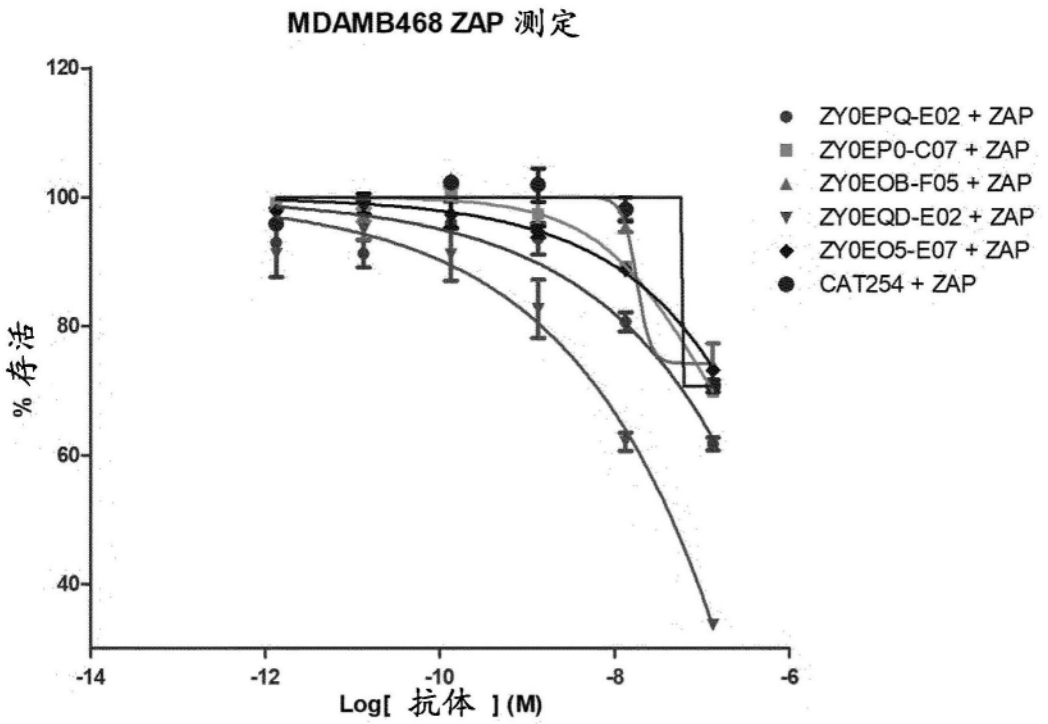

MDAMB468 ZAP 测定
120
100
80
60
40
% 存活
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗体] (M)
ZY0EPQ-E02 + ZAP
ZY0EP0-C07 + ZAP
ZY0EOB-F05 + ZAP
ZY0EQD-E02 + ZAP
ZY0EO5-E07 + ZAP
CAT254 + ZAP

图5C

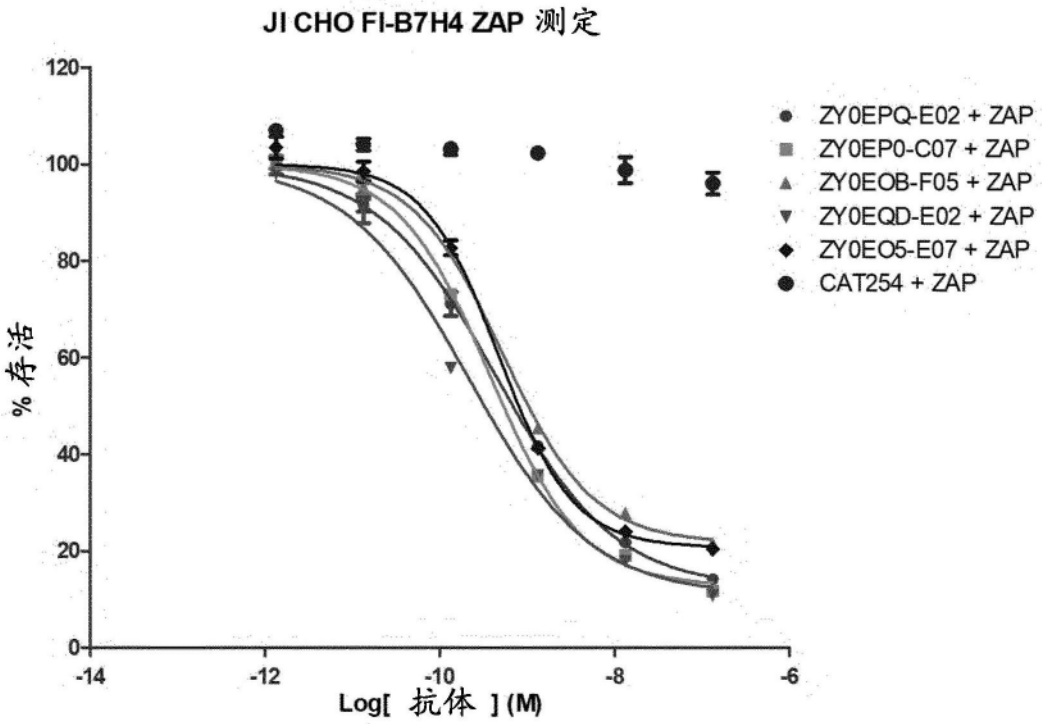

JI CHO FI-B7H4 ZAP 测定
120
100
80
60
40
20
0
% 存活
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗体] (M)
ZY0EPQ-E02 + ZAP
ZY0EP0-C07 + ZAP
ZY0EOB-F05 + ZAP
ZY0EQD-E02 + ZAP
ZY0EO5-E07 + ZAP
CAT254 + ZAP

图5D

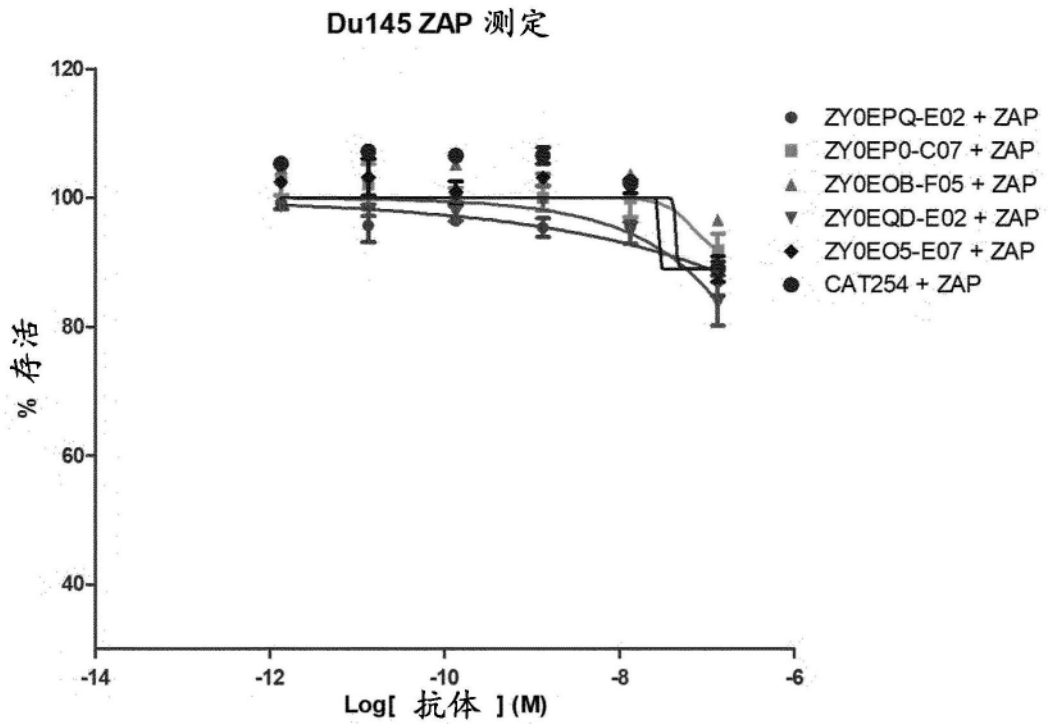

Du145 ZAP 测定
120
100
80
60
40
% 存活
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗体] (M)
ZY0EPQ-E02 + ZAP
ZY0EP0-C07 + ZAP
ZY0EOB-F05 + ZAP
ZY0EQD-E02 + ZAP
ZY0EO5-E07 + ZAP
CAT254 + ZAP

图5E

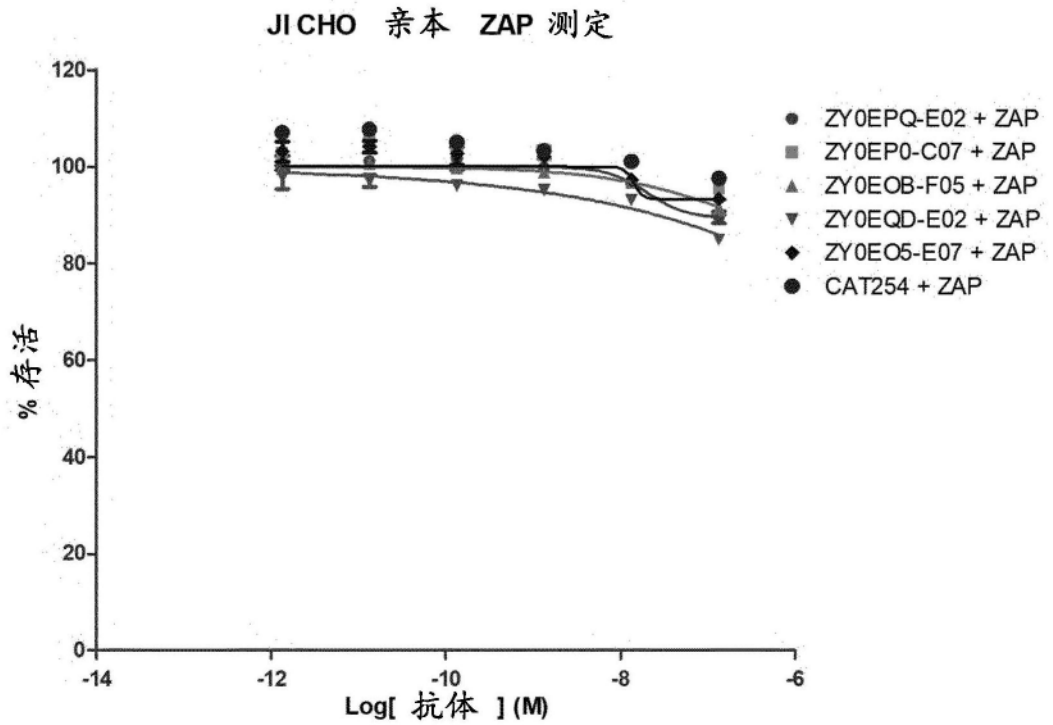

JI CHO 亲本 ZAP 测定
120
100
80
60
40
20
0
% 存活
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗体] (M)
ZY0EPQ-E02 + ZAP
ZY0EP0-C07 + ZAP
ZY0EOB-F05 + ZAP
ZY0EQD-E02 + ZAP
ZY0EO5-E07 + ZAP
CAT254 + ZAP

图5F

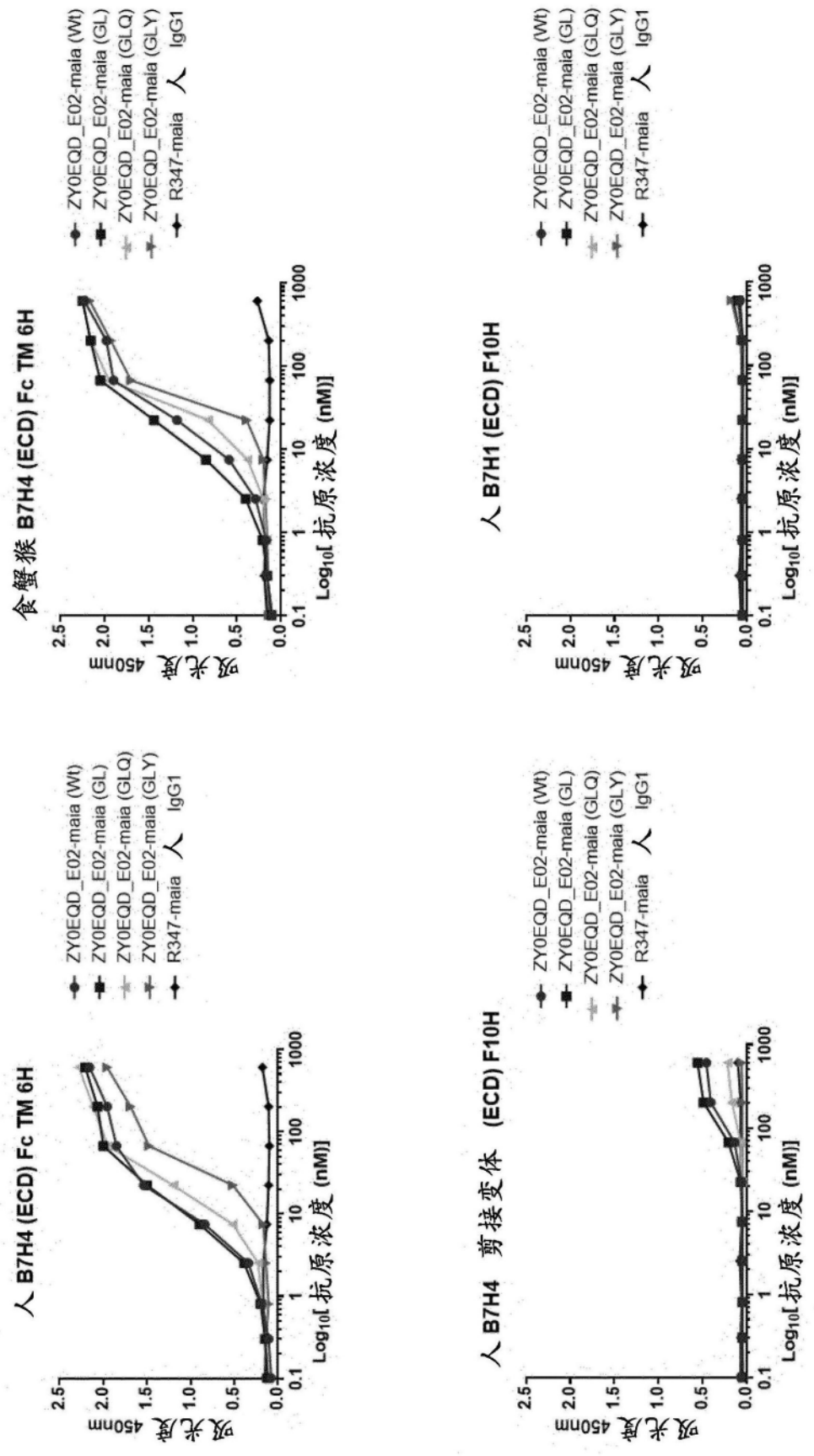

食蟹猴 B7H4 (ECD) Fc TM 6H
人 B7H1 (ECD) F10H
人 B7H4 (ECD) Fc TM 6H
人 B7H4 剪接变体 (ECD) F10H
ZY0EQD_E02-maia (Wt)
ZY0EQD_E02-maia (GL)
ZY0EQD_E02-maia (GLQ)
ZY0EQD_E02-maia (GLY)
R347-maia 人 IgG1
双光波 450nm
Log10[抗原浓度 (nM)]

图6

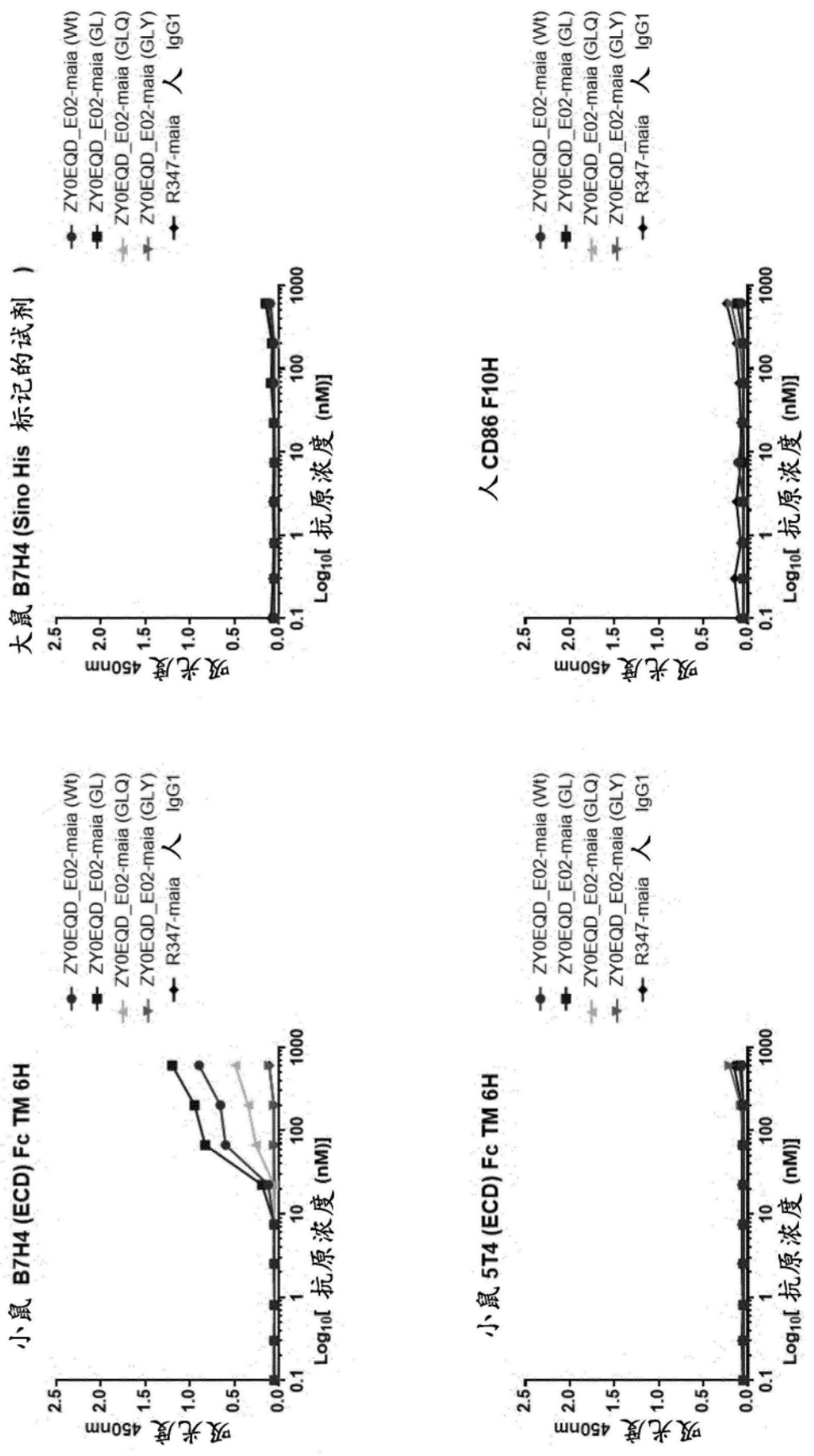

大鼠 B7H4 (Sino His 标记的试剂)
小鼠 B7H4 (ECD) Fc TM 6H
人 CD86 F10H
小鼠 5T4 (ECD) Fc TM 6H
ZY0EQD_E02-maia (Wt)
ZY0EQD_E02-maia (GL)
ZY0EQD_E02-maia (GLQ)
ZY0EQD_E02-maia (GLY)
R347-maia 人 IgG1
双光 450nm
Log10[抗原浓度 (nM)]

图6(续)

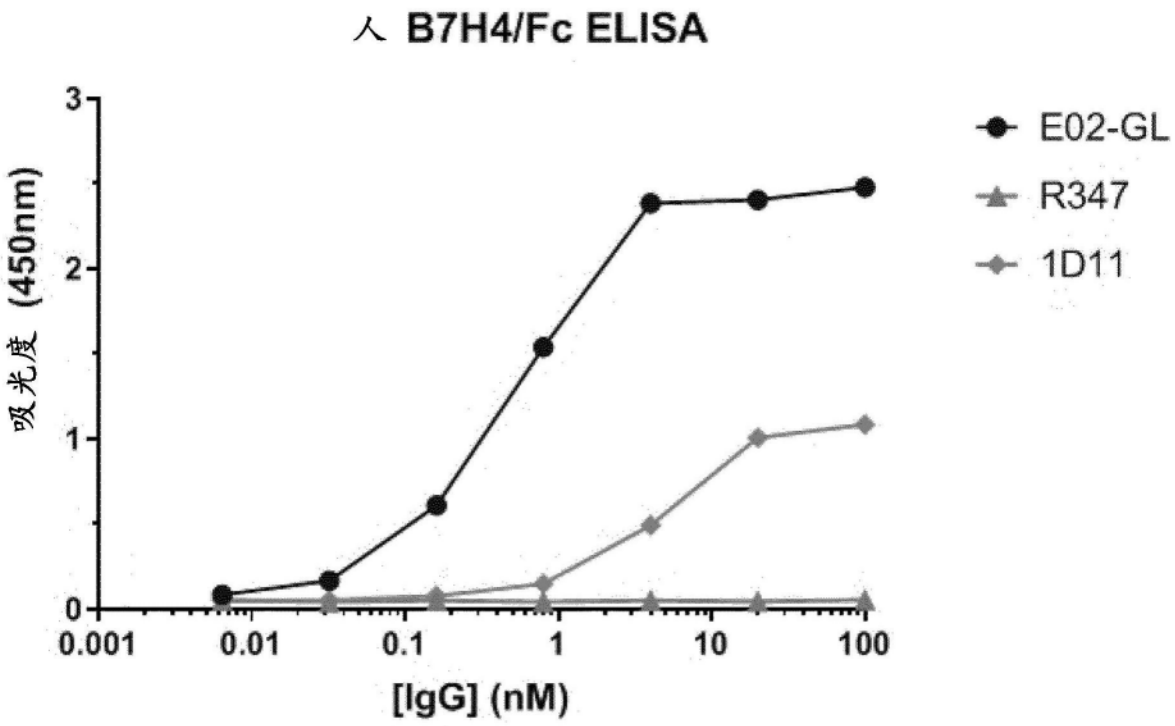

人 B7H4/Fc ELISA
吸光度 (450nm)
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
[IgG] (nM)
E02-GL
R347
1D11

图7

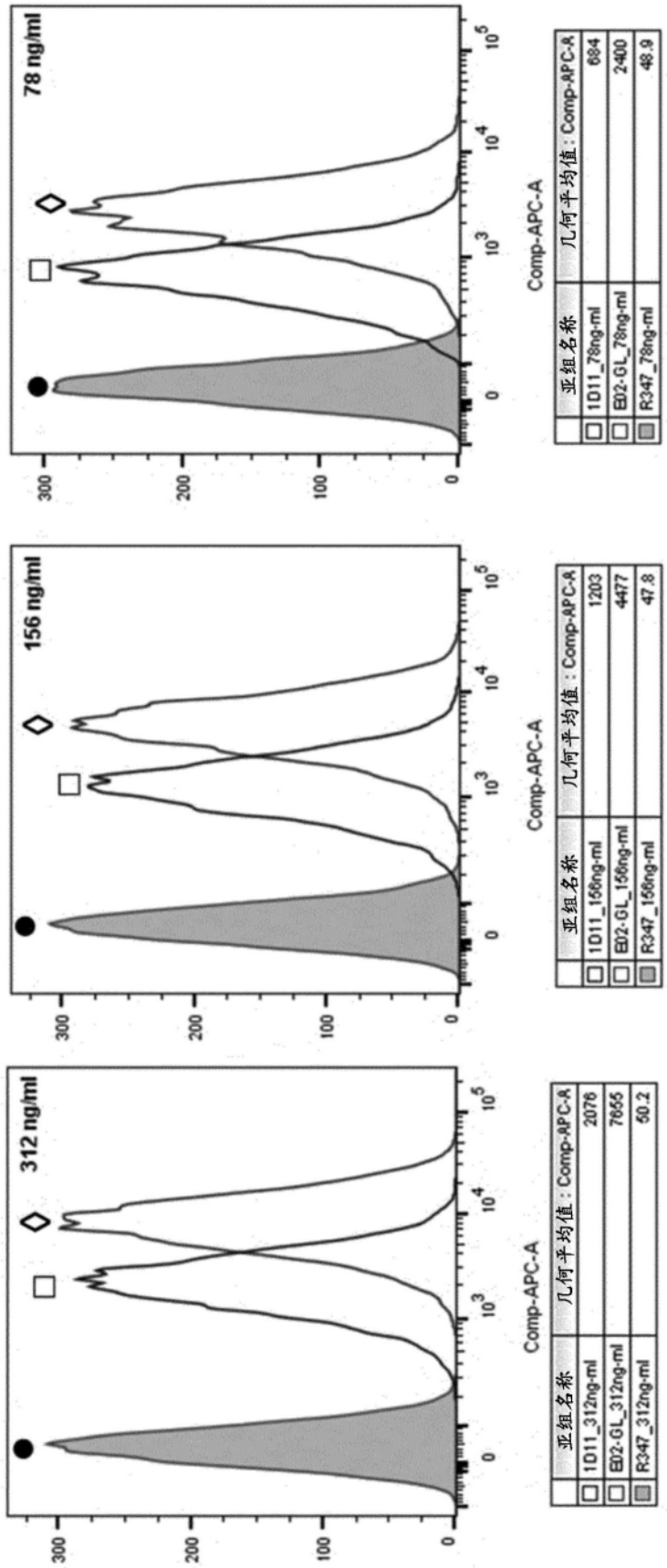

312 ng/ml
156 ng/ml
78 ng/ml
Comp-APC-A
亚组名称
几何平均值 : Comp-APC-A
1D11_312ng-ml 2076
E02-GL_312ng-ml 7655
R347_312ng-ml 50.2
1D11_156ng-ml 1203
E02-GL_156ng-ml 4477
R347_156ng-ml 47.8
1D11_78ng-ml 684
E02-GL_78ng-ml 2400
R347_78ng-ml 48.9

图8A

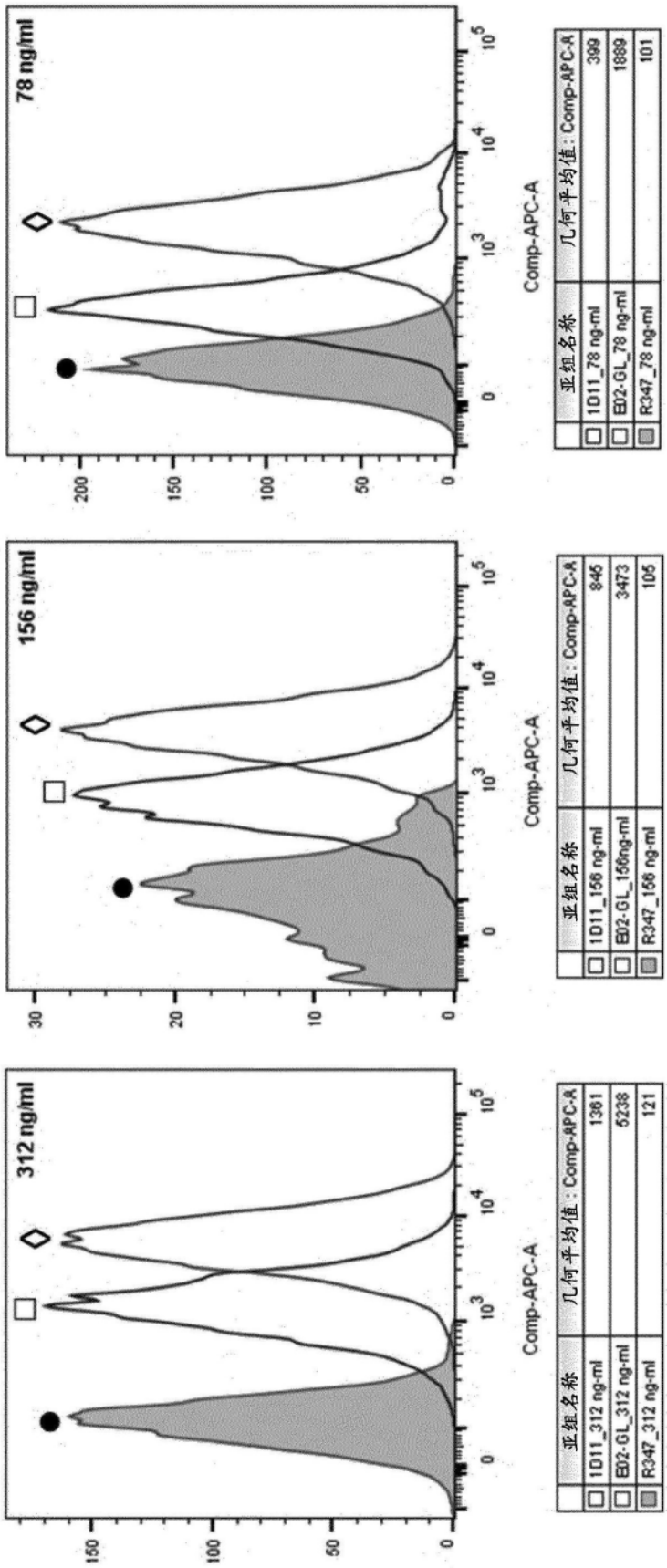

78 ng/ml
156 ng/ml
312 ng/ml
Comp-APC-A
亚组名称
几何平均值 : Comp-APC-A
1D11_312 ng-ml 1361
E02-GL_312 ng-ml 5238
R347_312 ng-ml 121
1D11_156 ng-ml 846
E02-GL_156ng-ml 3473
R347_156 ng-ml 105
1D11_78 ng-ml 399
E02-GL_78 ng-ml 1889
R347_78 ng-ml 101

图8B

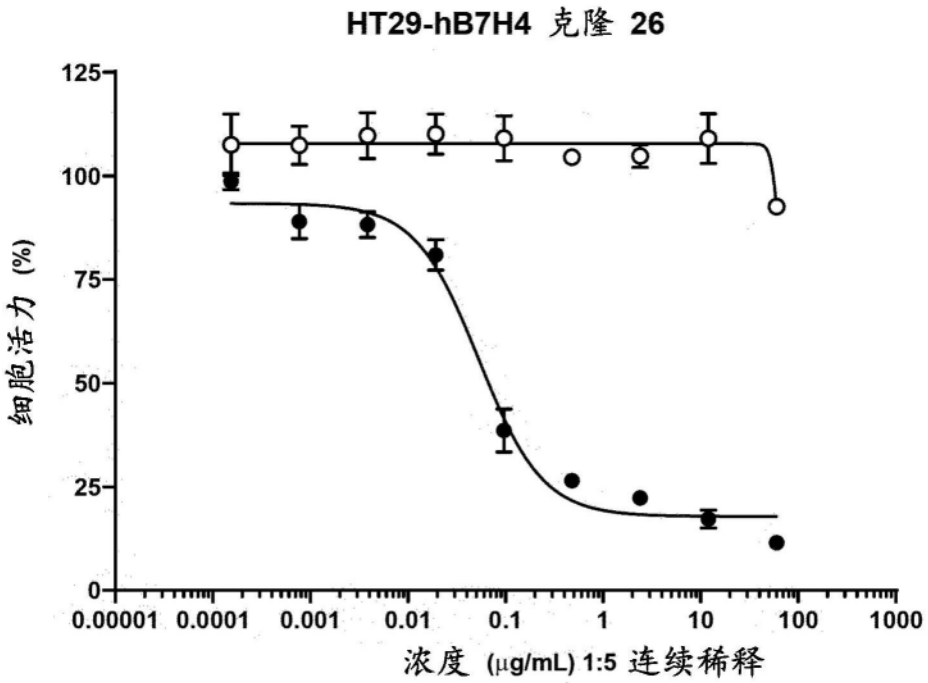

HT29-hB7H4 克隆 26
细胞活力 (%)
125
100
75
50
25
0
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
浓度 (μg/mL) 1:5 连续稀释

图9A

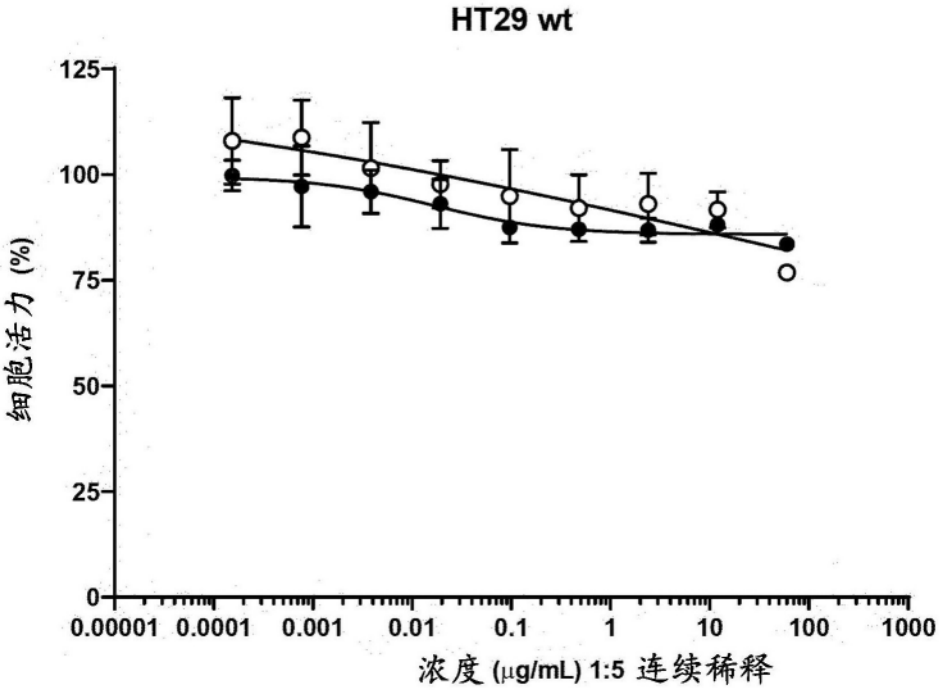

HT29 wt
细胞活力 (%)
125
100
75
50
25
0
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
浓度 (μg/mL) 1:5 连续稀释

图9B

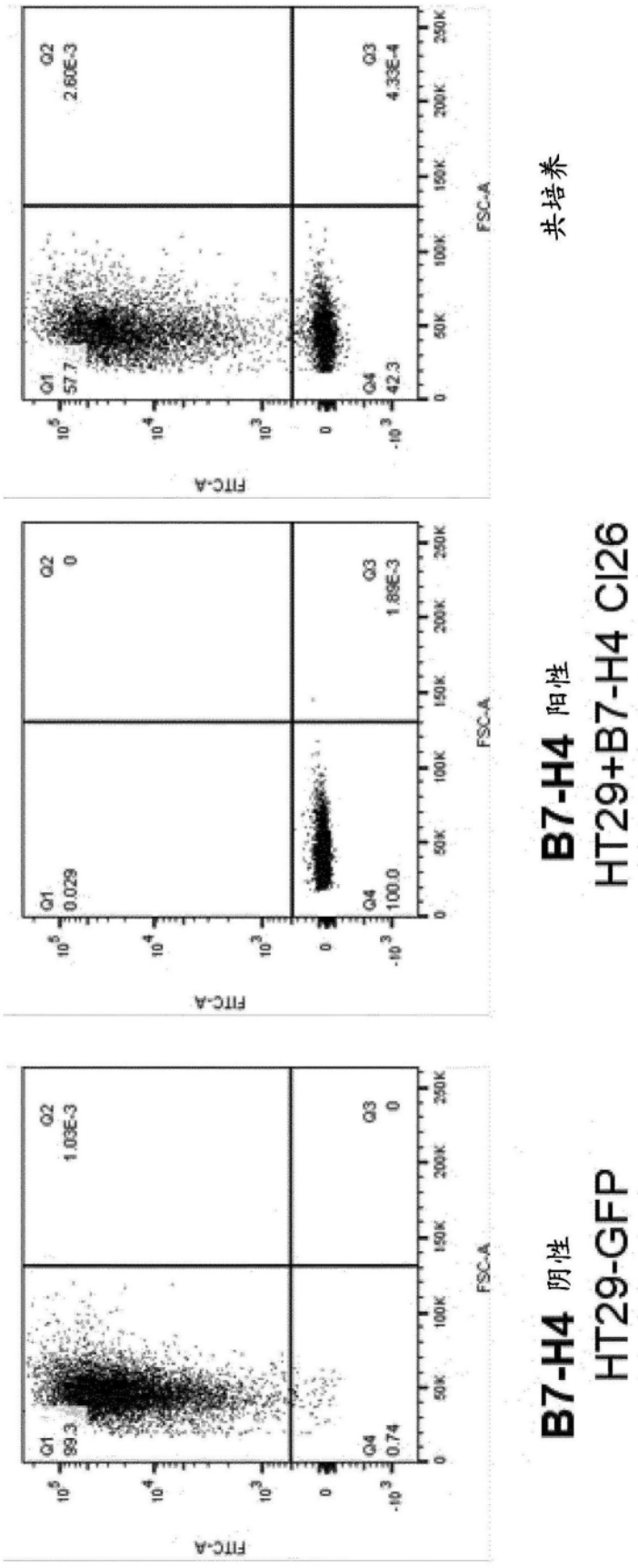

共培养
B7-H4 阳性
HT29+B7-H4 Cl26
B7-H4 阴性
HT29-GFP
FITC-A
FSC-A
Q1
57.7
Q2
2.60E-3
Q3
4.33E-4
Q4
42.3
Q1
0.029
Q2
0
Q3
1.89E-3
Q4
100.0
Q1
99.3
Q2
1.03E-3
Q3
0
Q4
0.74

图10A

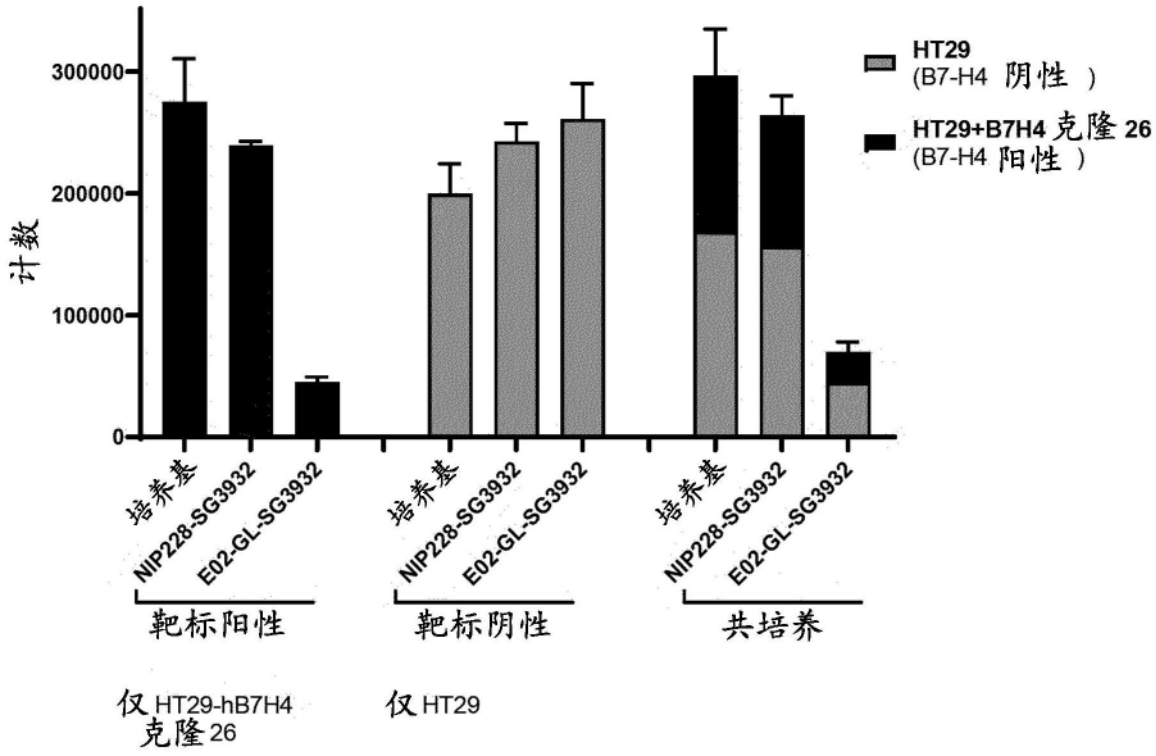

300000
200000
100000
0
计数
HT29
(B7-H4 阴性)
HT29+B7H4 克隆 26
(B7-H4 阳性)
培养基
NIP228-SG3932
E02-GL-SG3932
靶标阳性
靶标阴性
共培养
仅 HT29-hB7H4 克隆 26
仅 HT29

图10B

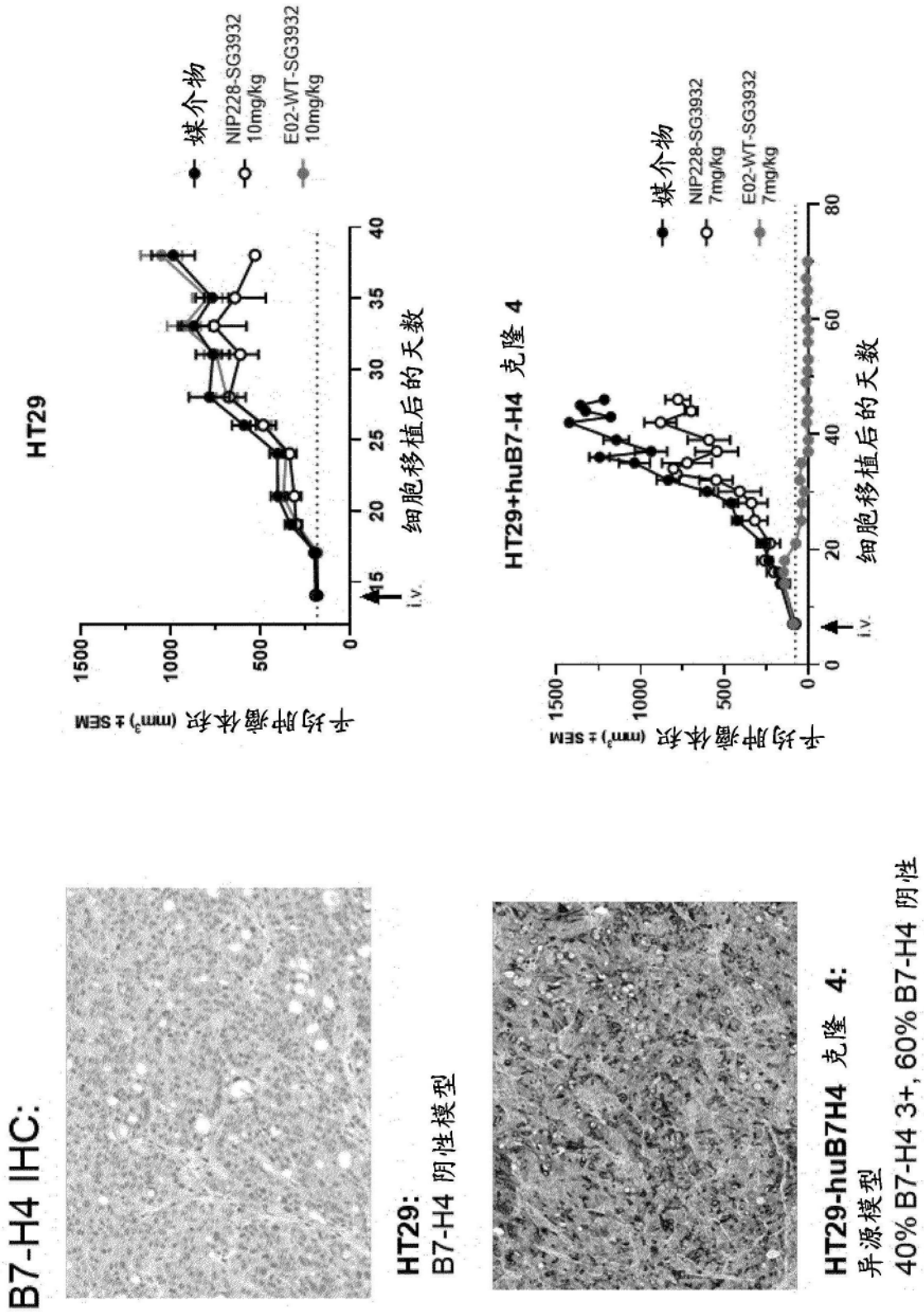

HT29
媒介物
NIP228-SG3932 10mg/kg
E02-WT-SG3932 10mg/kg
平均肿瘤体积 (mm³) ± SEM
细胞移植后的天数
i.v.
HT29+huB7-H4 克隆 4
媒介物
NIP228-SG3932 7mg/kg
E02-WT-SG3932 7mg/kg
B7-H4 IHC:
HT29:
B7-H4 阴性模型
HT29-huB7H4 克隆 4:
异源模型
40% B7-H4 3+, 60% B7-H4 阴性

图11

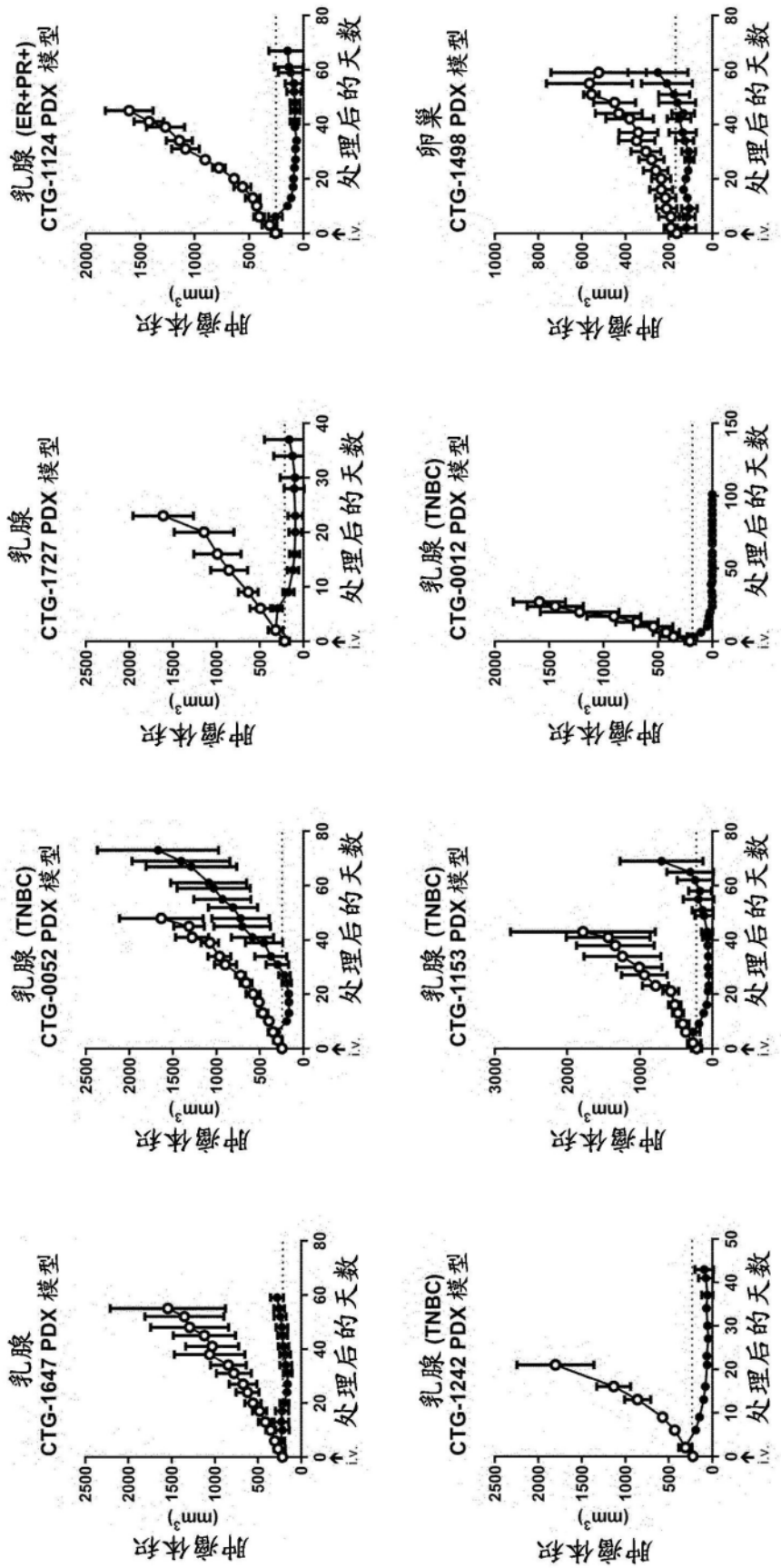

乳腺
CTG-1647 PDX 模型
乳腺 (TNBC)
CTG-0052 PDX 模型
乳腺
CTG-1727 PDX 模型
乳腺 (ER+PR+)
CTG-1124 PDX 模型
乳腺 (TNBC)
CTG-1242 PDX 模型
乳腺 (TNBC)
CTG-1153 PDX 模型
乳腺 (TNBC)
CTG-0012 PDX 模型
卵巢
CTG-1498 PDX 模型
肿瘤体积
(mm³)
处理后的天数
i.v.

图12

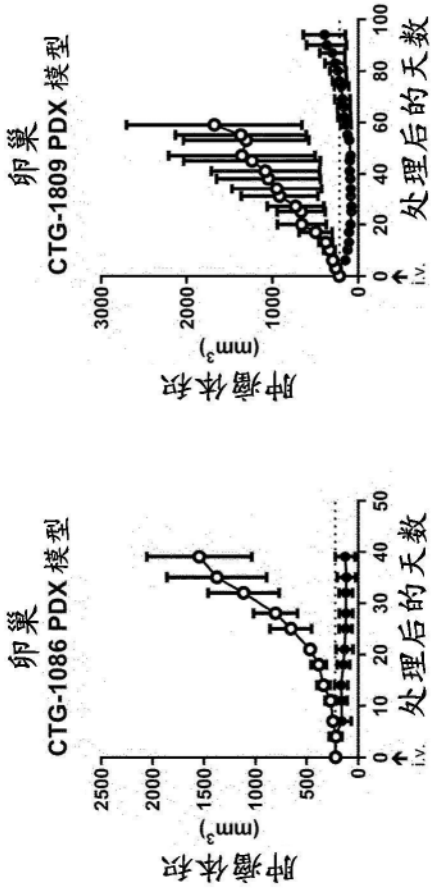

卵巢
CTG-1809 PDX 模型
肿瘤体积
(mm³)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
i.v.
处理后的天数
卵巢
CTG-1086 PDX 模型
肿瘤体积
(mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
i.v.
处理后的天数

图12(续)

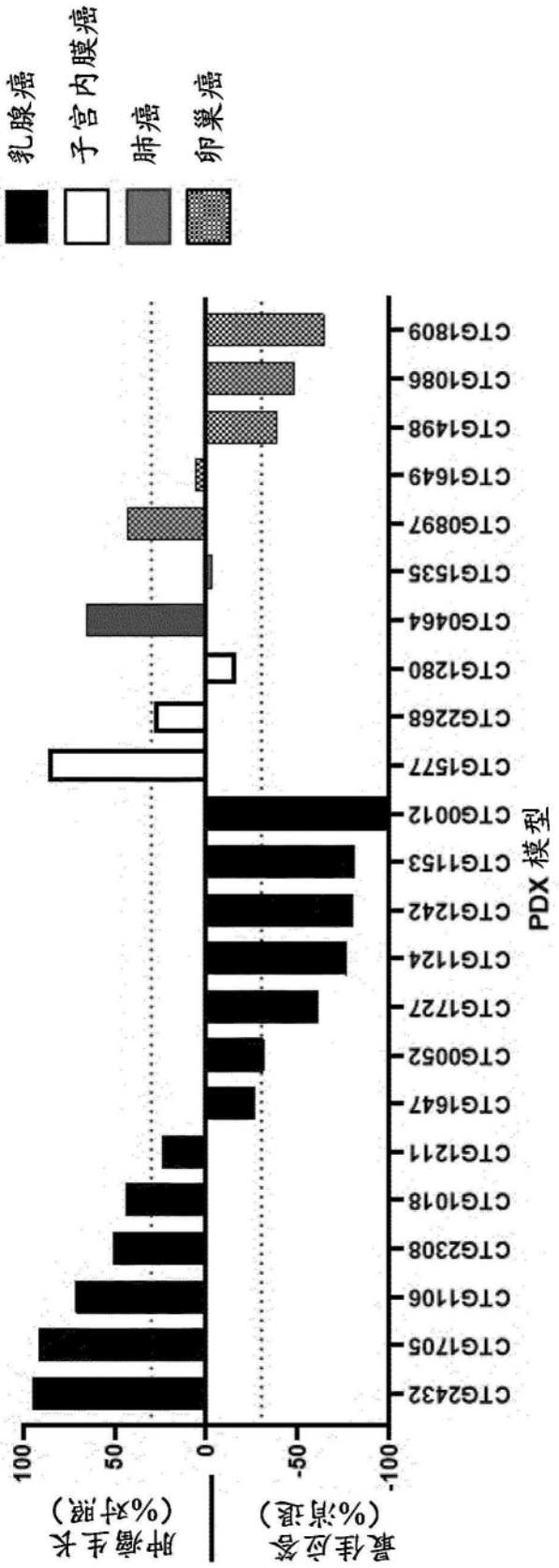

乳腺癌
子宫内膜癌
肺癌
卵巢癌
CTG1809
CTG1086
CTG1498
CTG1649
CTG0897
CTG1535
CTG0464
CTG1280
CTG2268
CTG1577
CTG0012
CTG1153
CTG1242
CTG1124
CTG1727
CTG0052
CTG1647
CTG1211
CTG1018
CTG2308
CTG1106
CTG1705
CTG2432
PDX 模型
100
50
0
-50
-100
肿瘤生长
(%对照)
最佳反答
(%消退)

图13

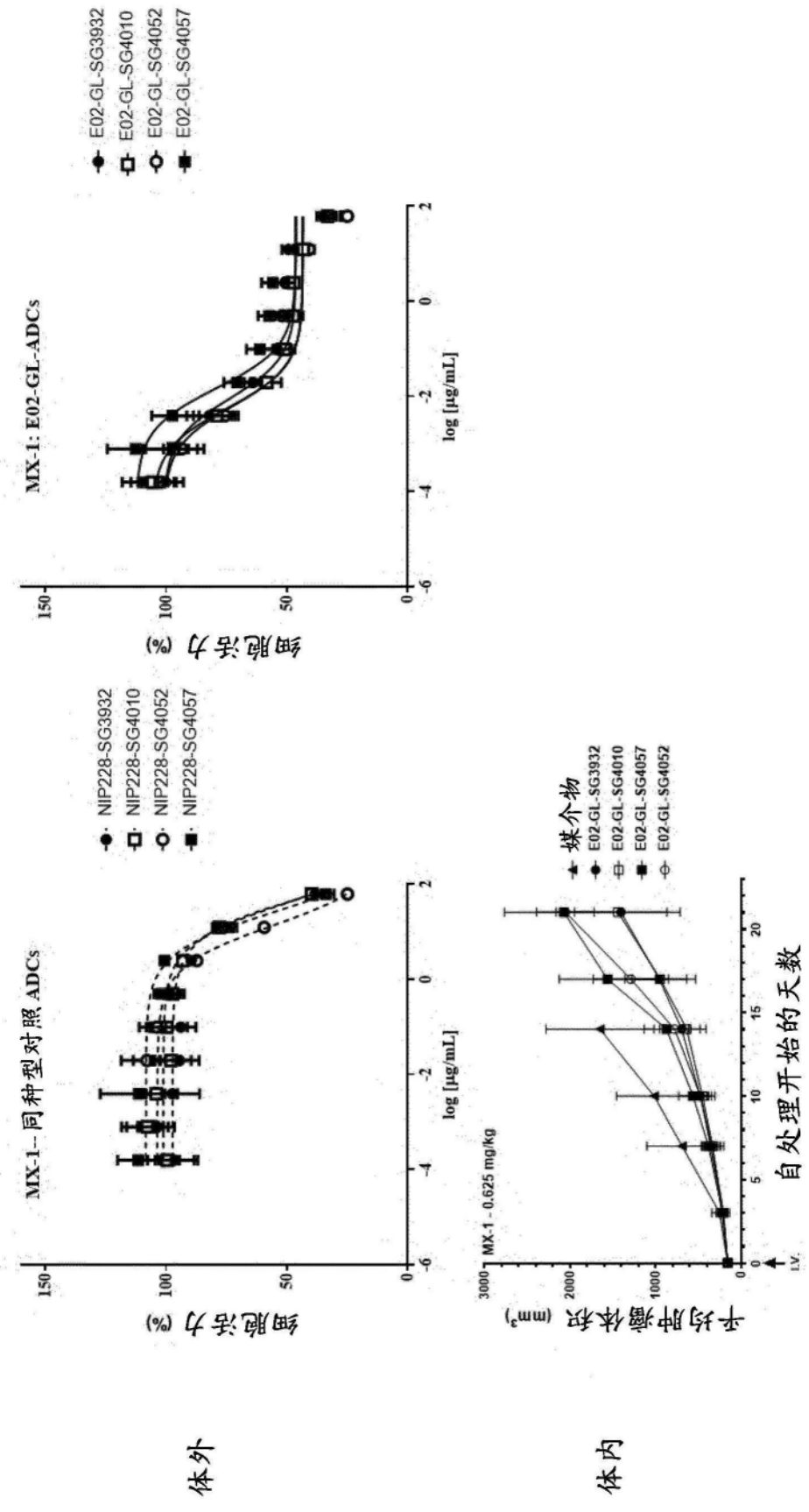

MX-1: E02-GL-ADCs
E02-GL-SG3932
E02-GL-SG4010
E02-GL-SG4052
E02-GL-SG4057
细胞活力 (%)
log [μg/mL]
MX-1– 同种型对照 ADCs
NIP228-SG3932
NIP228-SG4010
NIP228-SG4052
NIP228-SG4057
细胞活力 (%)
log [μg/mL]
MX-1 - 0.625 mg/kg
媒介物
E02-GL-SG3932
E02-GL-SG4010
E02-GL-SG4057
E02-GL-SG4052
平均肿瘤体积 (mm³)
自处理开始的天数
体外
体内

图14A

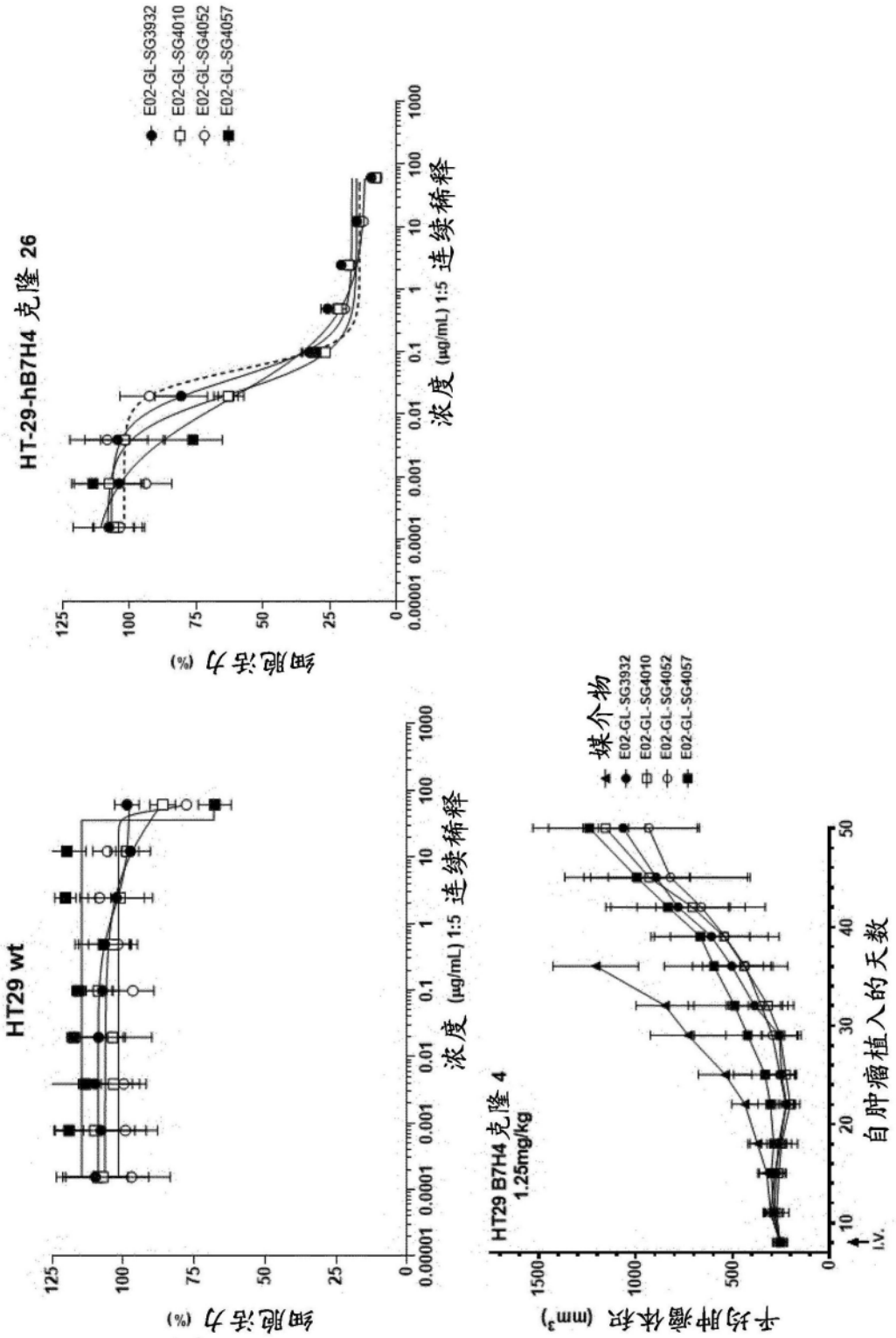
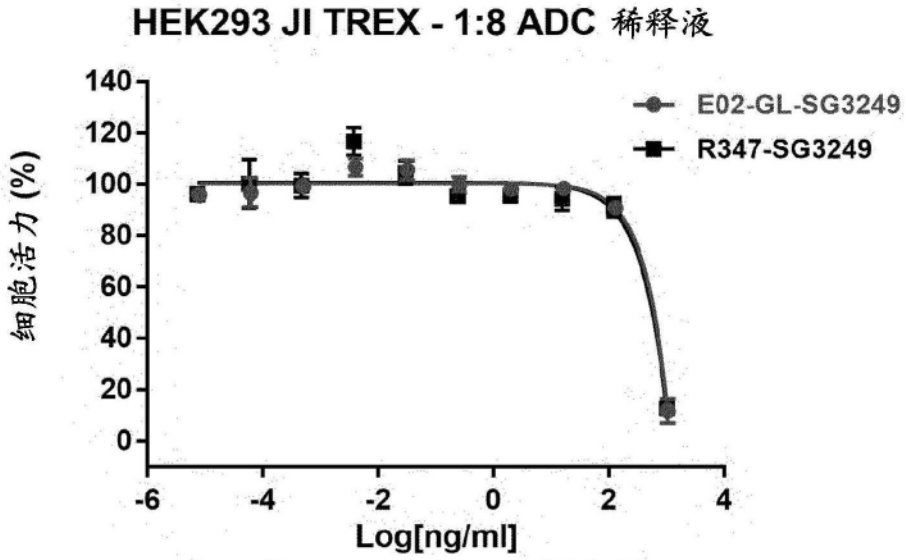
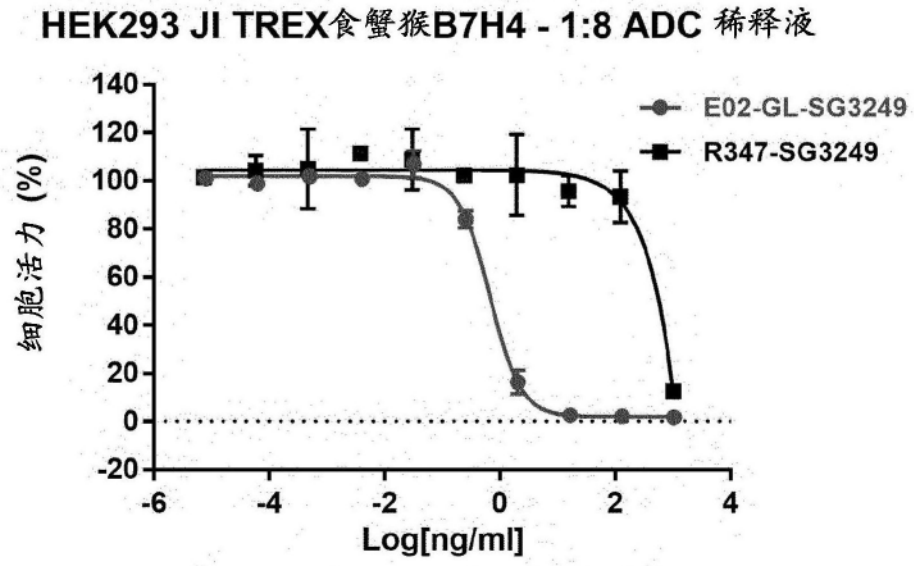

HT-29-hB7H4 克隆 26
E02-GL-SG3932
E02-GL-SG4010
E02-GL-SG4052
E02-GL-SG4057
细胞活力 (%)
浓度 (μg/mL) 1:5 连续稀释
HT29 wt
HT29 B7H4 克隆 4
1.25mg/kg
媒介物
E02-GL-SG3932
E02-GL-SG4010
E02-GL-SG4052
E02-GL-SG4057
I.V.
自肿瘤植入的天数
平均肿瘤体积 (mm³)
体外
体内

图14B



	IC50
E02-GL-SG3249	~76034
R347-SG3249	~415027

图15A



	IC50
E02-GL-SG3249	0.6721
R347-SG3249	~211121

图15B

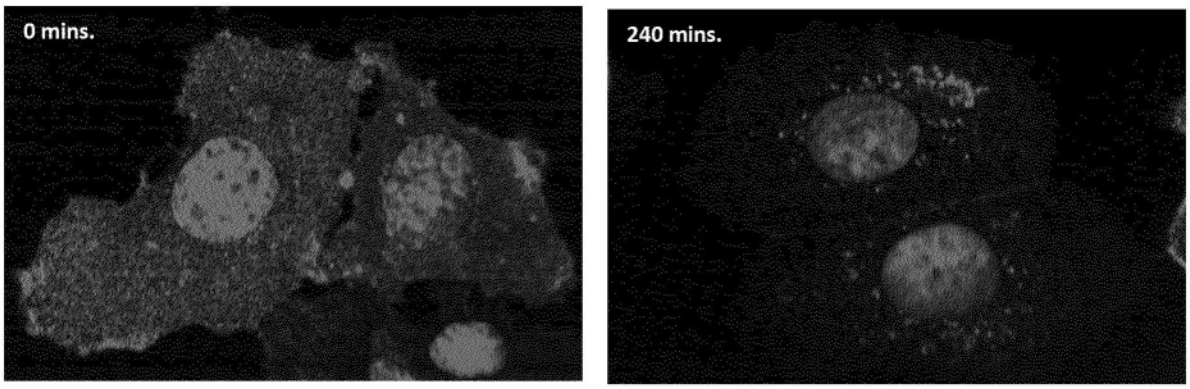

0 mins.
240 mins.

图16A

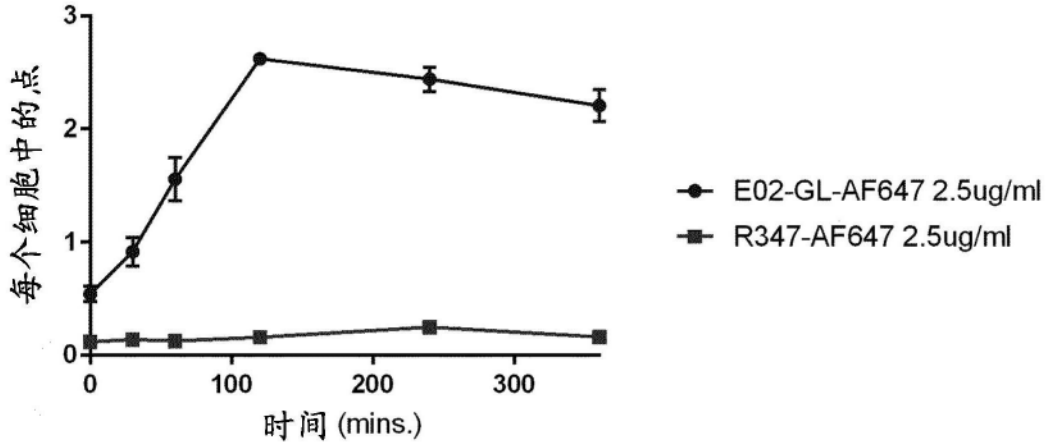

每个细胞中的点
时间 (mins.)
0
1
2
3
0
100
200
300
E02-GL-AF647 2.5ug/ml
R347-AF647 2.5ug/ml

图16B

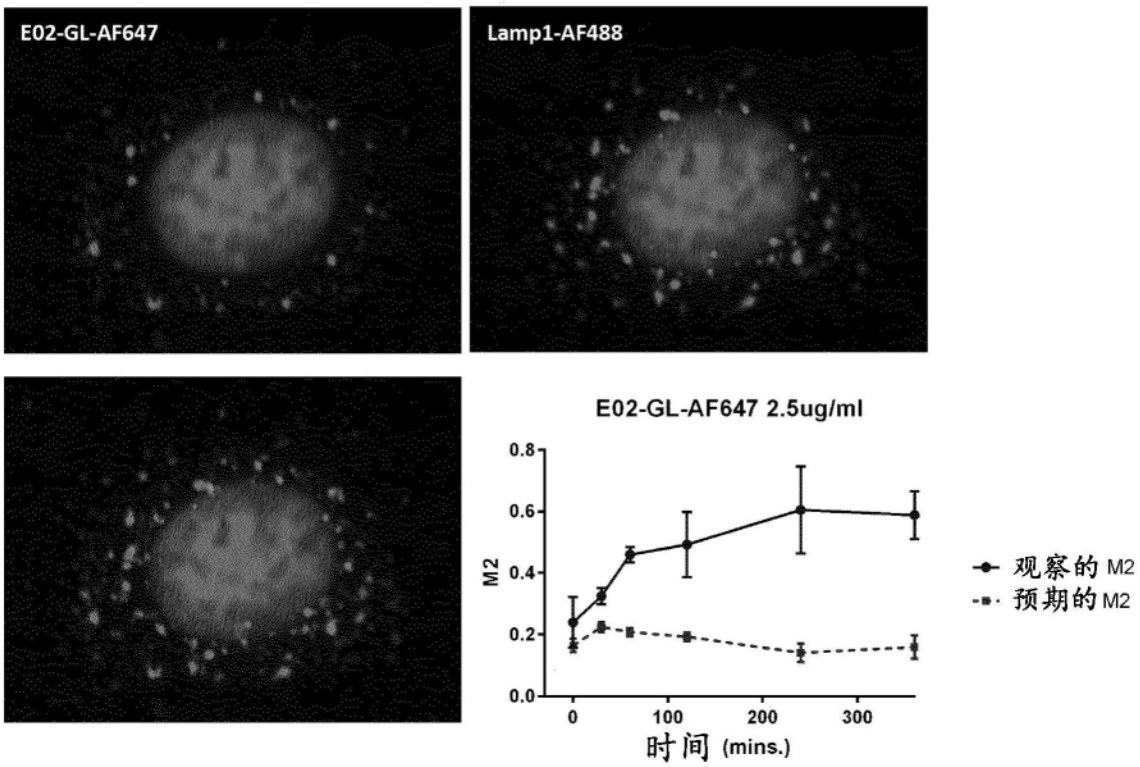

E02-GL-AF647
Lamp1-AF488
E02-GL-AF647 2.5ug/ml
M2
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
100
200
300
时间 (mins.)
观察的 M2
预期的 M2

图16C

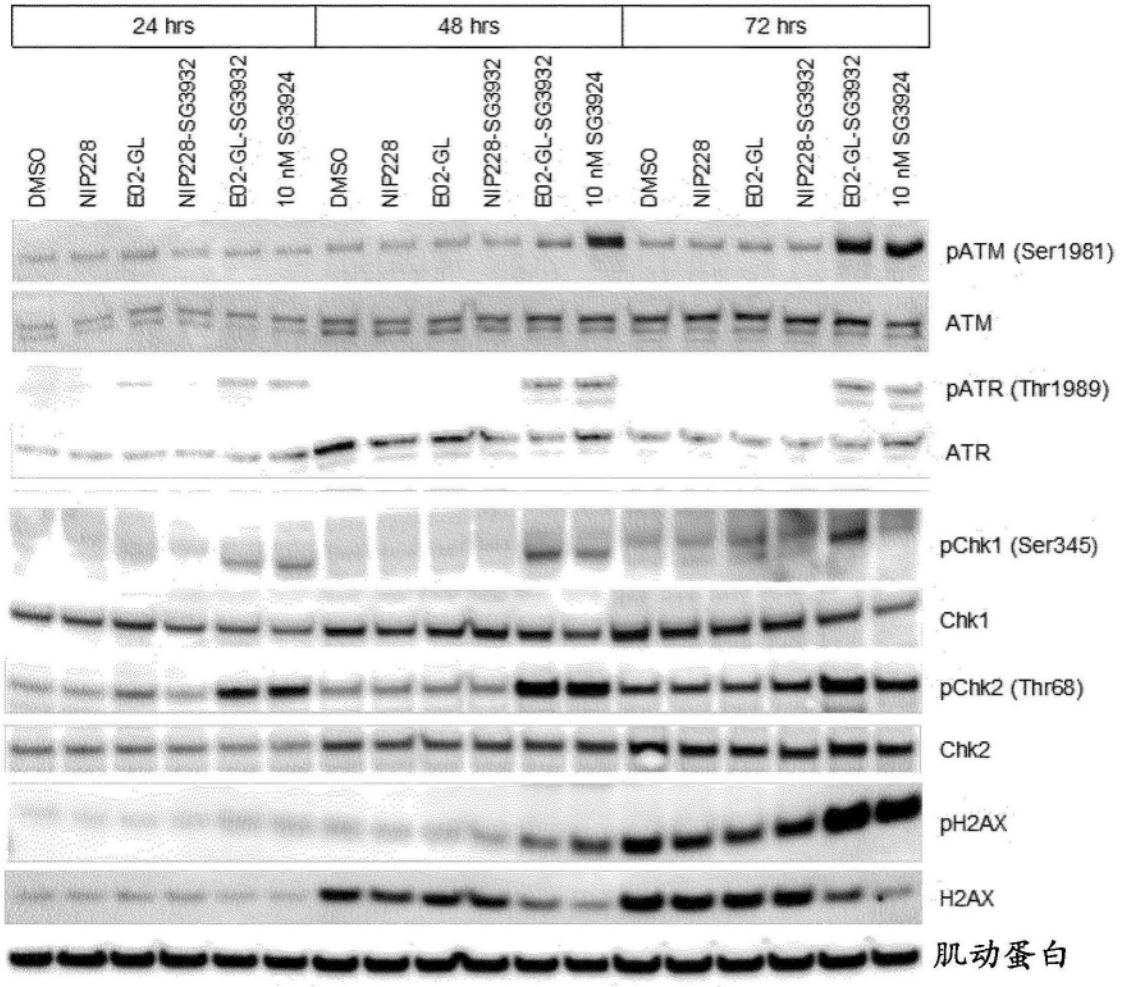

24 hrs
48 hrs
72 hrs
DMSO
NIP228
E02-GL
NIP228-SG3932
E02-GL-SG3932
10 nM SG3924
pATM (Ser1981)
ATM
pATR (Thr1989)
ATR
pChk1 (Ser345)
Chk1
pChk2 (Thr68)
Chk2
pH2AX
H2AX
肌动蛋白

图17A

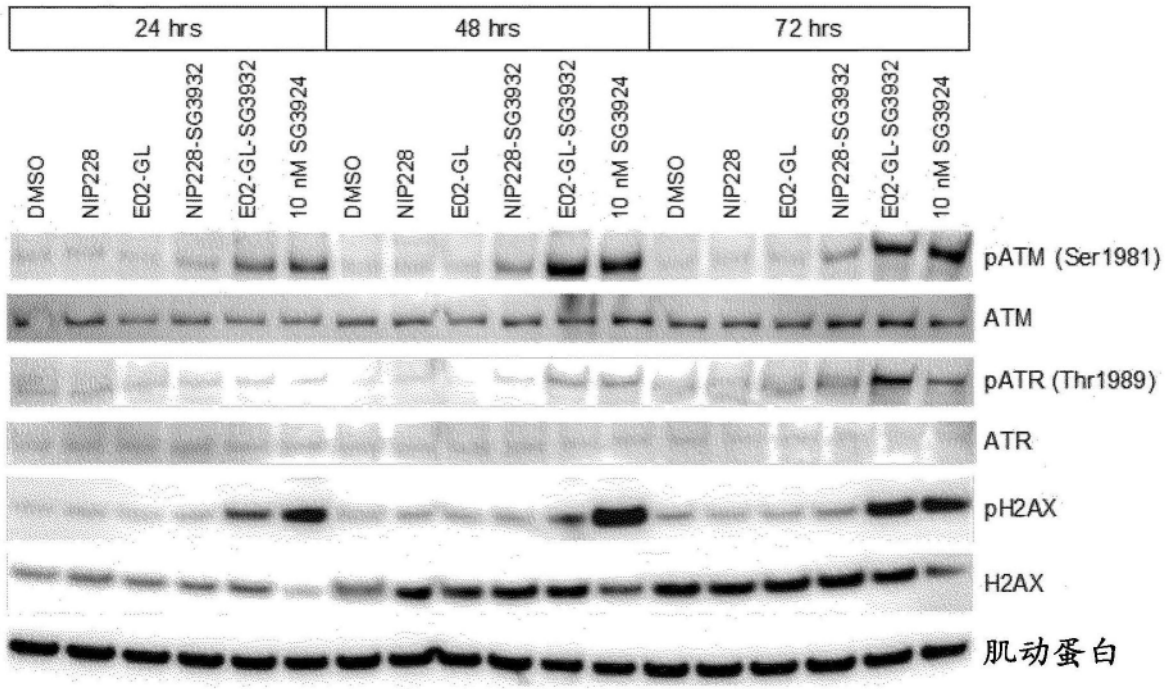

24 hrs
48 hrs
72 hrs
DMSO
NIP228
E02-GL
NIP228-SG3932
E02-GL-SG3932
10 nM SG3924
pATM (Ser1981)
ATM
pATR (Thr1989)
ATR
pH2AX
H2AX
肌动蛋白

图17B

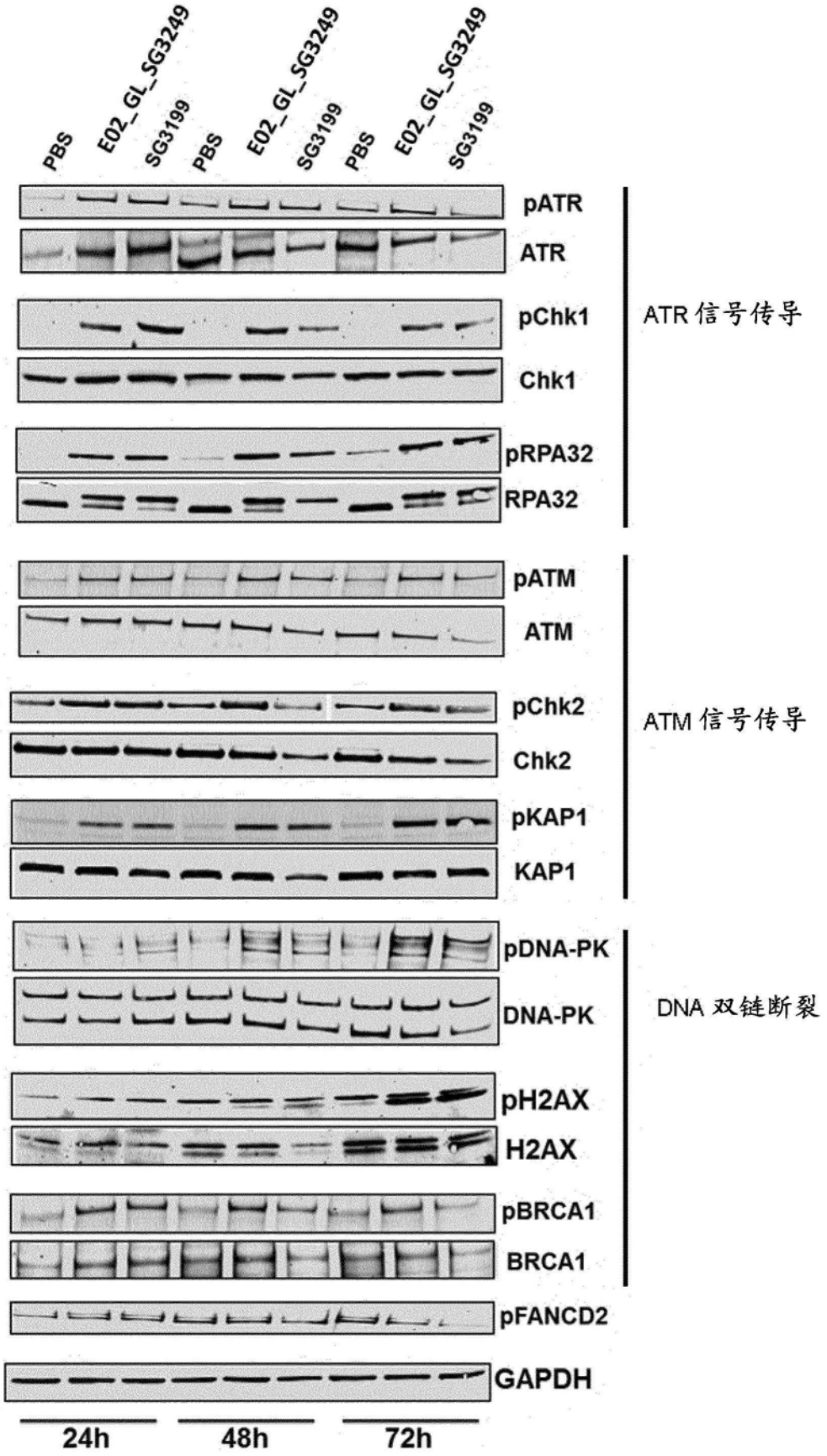

PBS
E02_GL_SG3249
SG3199
PBS
E02_GL_SG3249
SG3199
PBS
E02_GL_SG3249
SG3199
pATR
ATR
pChk1
Chk1
pRPA32
RPA32
ATR 信号传导
pATM
ATM
pChk2
Chk2
pKAP1
KAP1
ATM 信号传导
pDNA-PK
DNA-PK
pH2AX
H2AX
pBRCA1
BRCA1
DNA 双链断裂
pFANCD2
GAPDH
24h
48h
72h

图17C

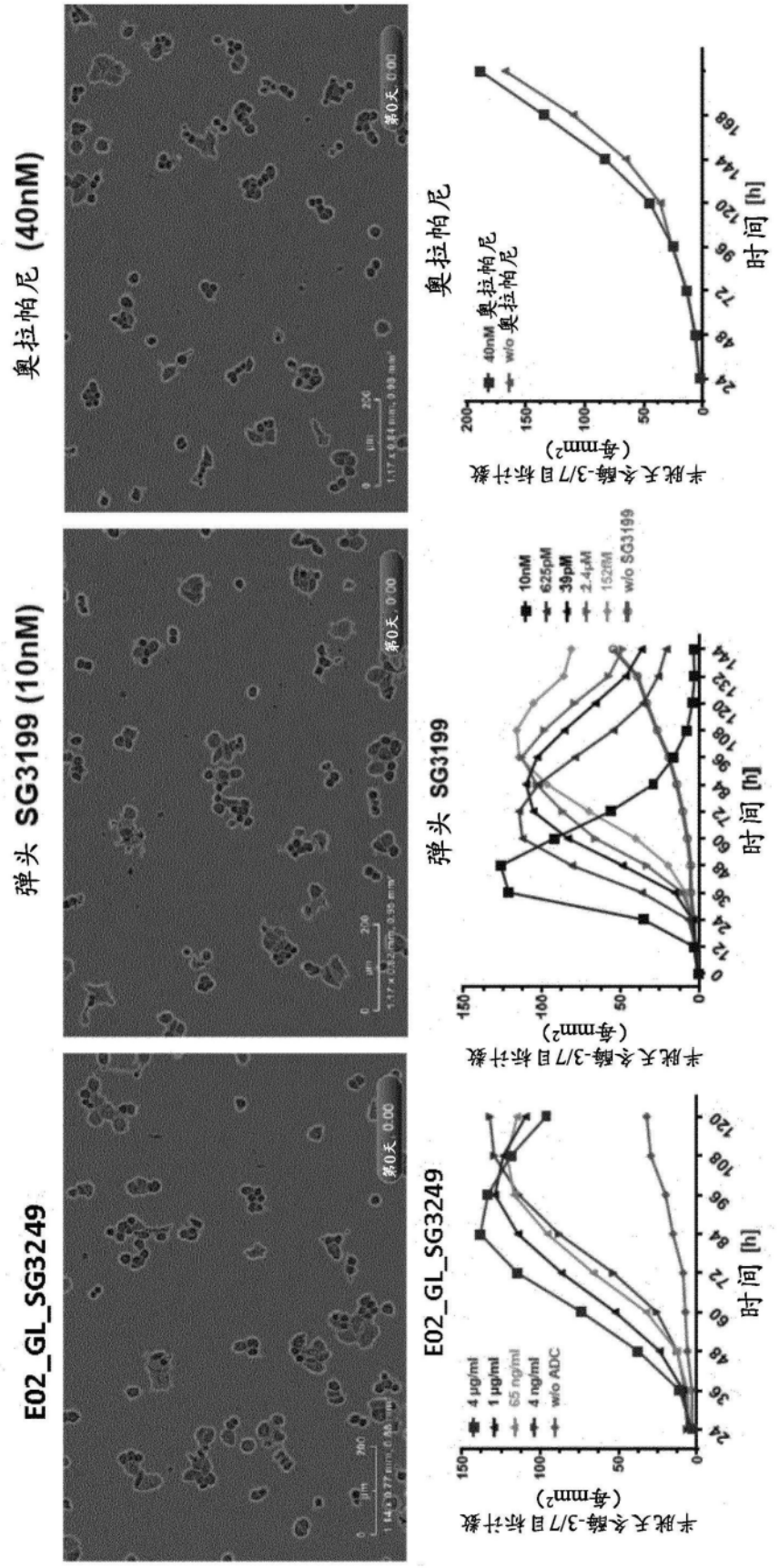
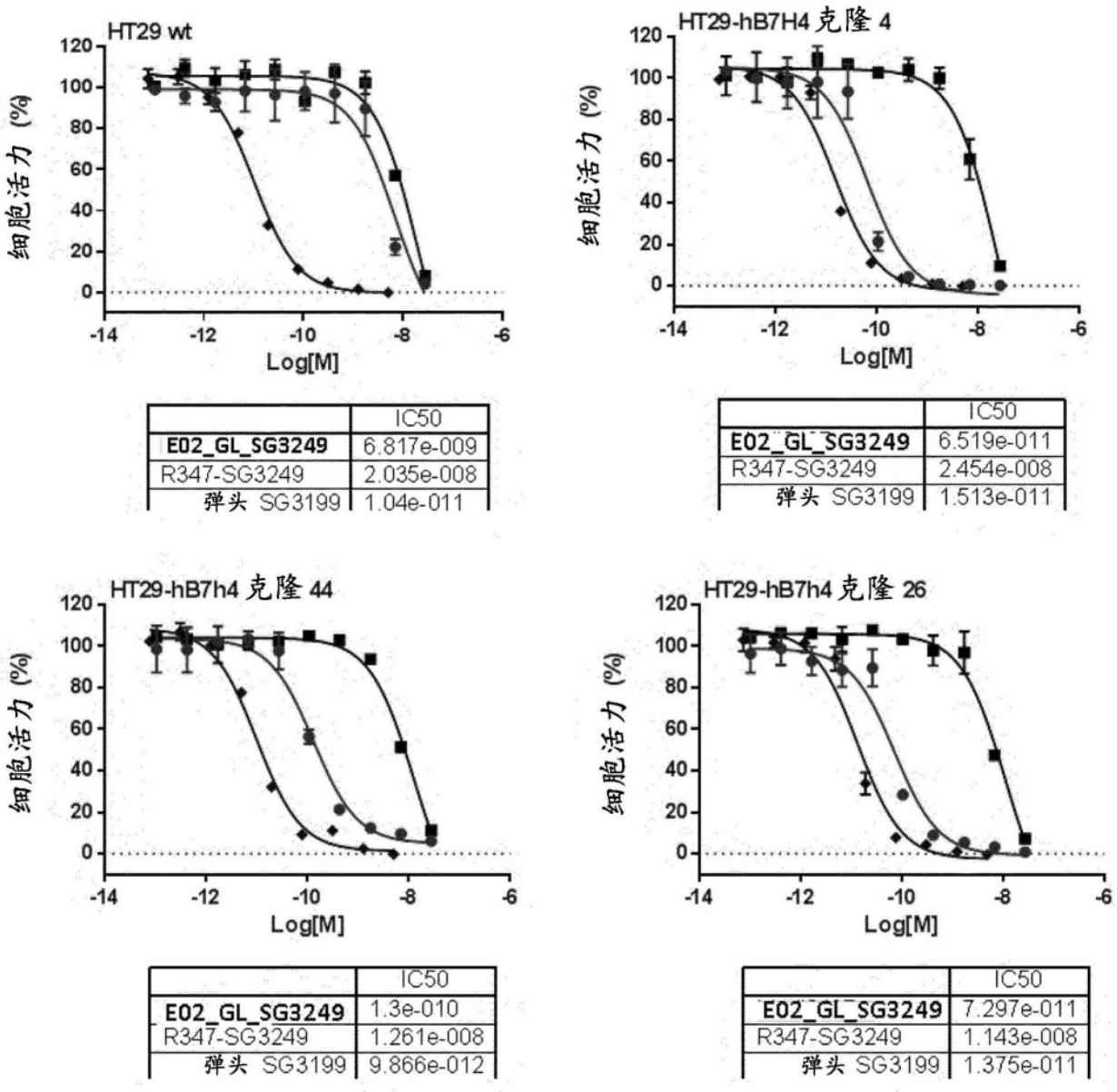

E02_GL_SG3249
弹头 SG3199 (10nM)
奥拉帕尼 (40nM)
第0天 0:00
半胱天冬酶-3/7目标计数 (每mm²)
时间 [h]
4 μg/ml
1 μg/ml
65 ng/ml
4 ng/ml
w/o ADC
10nM
625pM
39pM
2.4pM
152fM
w/o SG3199
40nM 奥拉帕尼
w/o 奥拉帕尼

图18



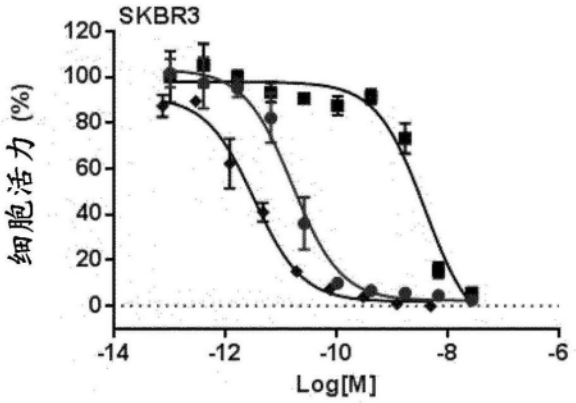
	IC50
E02_GL_SG3249	6.817e-009
R347-SG3249	2.035e-008
弹头 SG3199	1.04e-011

	IC50
E02_GL_SG3249	6.519e-011
R347-SG3249	2.454e-008
弹头 SG3199	1.513e-011

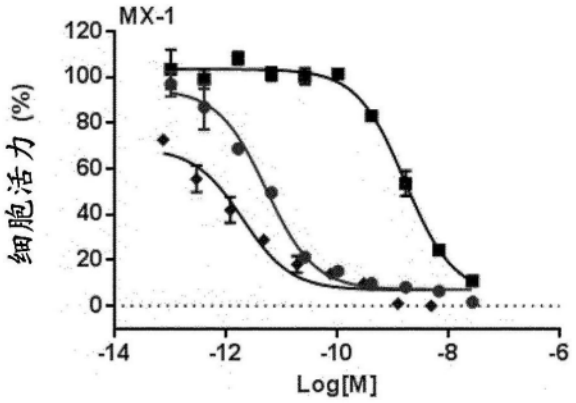
	IC50
E02_GL_SG3249	1.3e-010
R347-SG3249	1.261e-008
弹头 SG3199	9.866e-012

	IC50
E02_GL_SG3249	7.297e-011
R347-SG3249	1.143e-008
弹头 SG3199	1.375e-011

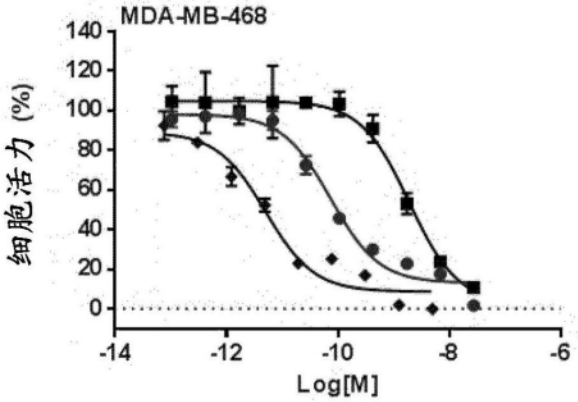
图19



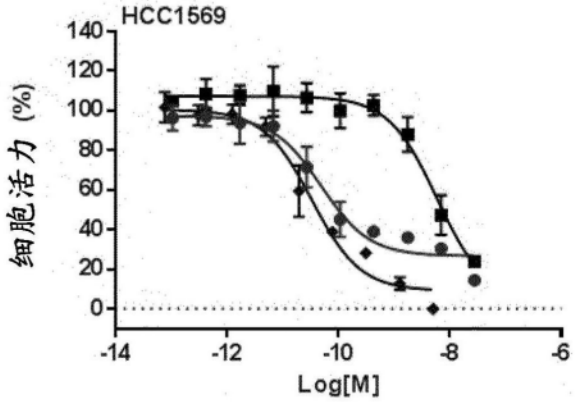
	IC50
E02_GL_SG3249	1.647e-011
R347-SG3249	3.936e-009
弹头 SG3199	3.38e-012



	IC50
E02_GL_SG3249	5.414e-012
R347-SG3249	1.7e-009
弹头 SG3199	2.055e-012

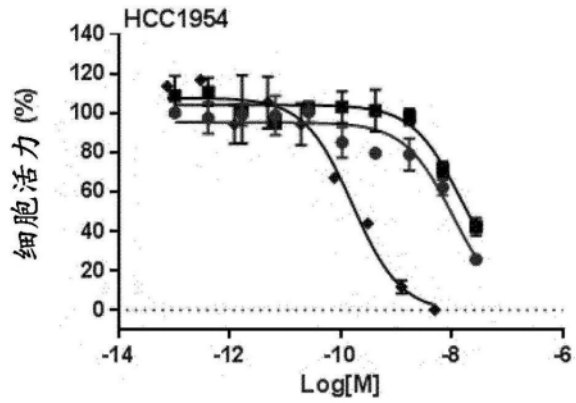


	IC50
E02_GL_SG3249	7.422e-011
R347-SG3249	1.916e-009
弹头 SG3199	5.054e-012

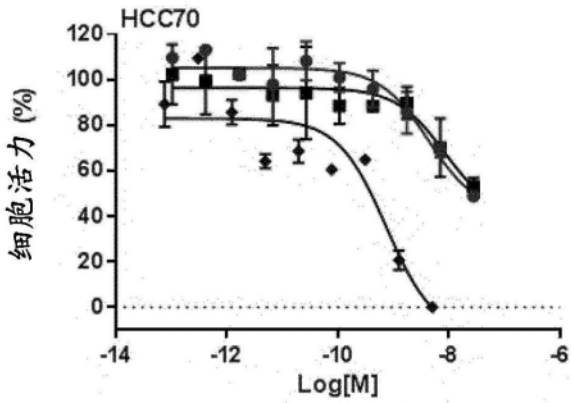


	IC50
E02_GL_SG3249	4.859e-011
R347-SG3249	5.819e-009
弹头 SG3199	3.328e-011

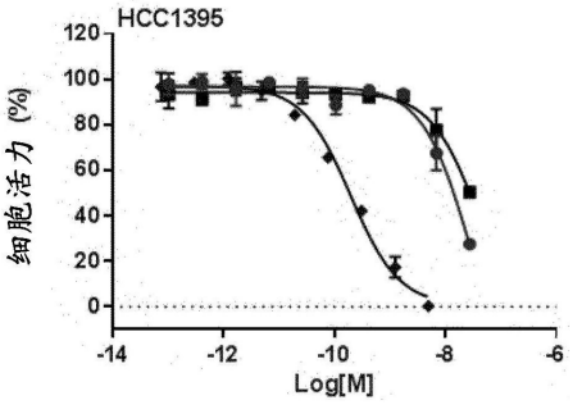
图19(续)



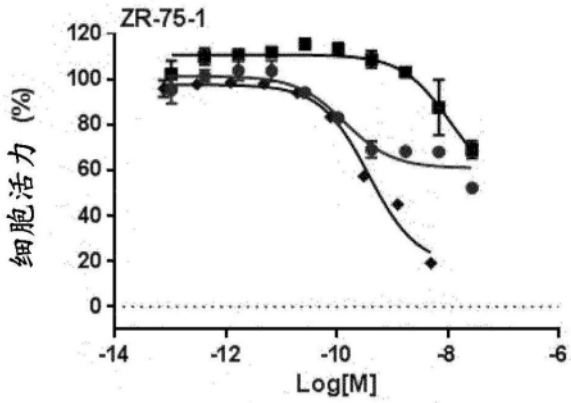
	IC50
E02_GL_SG3249	1.04e-008
R347-SG3249	1.455e-008
弹头 SG3199	1.654e-010



	IC50
E02_GL_SG3249	4.239e-009
R347-SG3249	8.199e-009
弹头 SG3199	7.473e-010

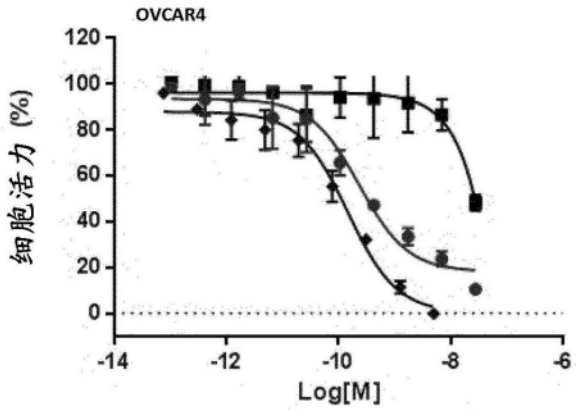


	IC50
E02_GL_SG3249	2.938e-008
R347-SG3249	4.128e-008
弹头 SG3199	1.983e-010

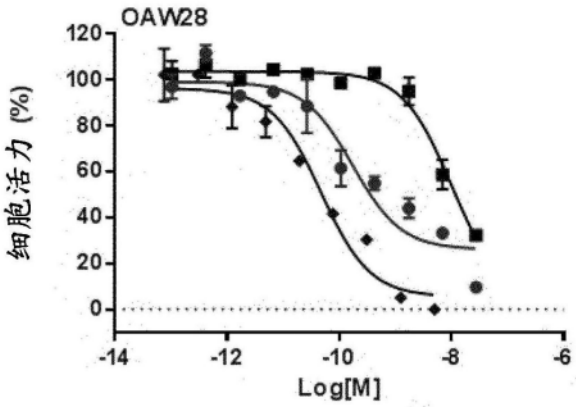


	IC50
E02_GL_SG3249	1.383e-010
R347-SG3249	1.091e-008
弹头 SG3199	3.78e-010

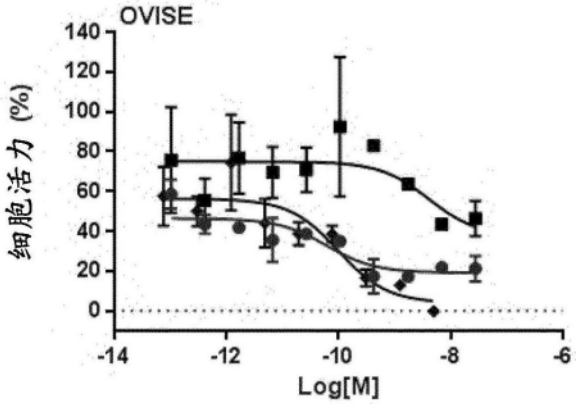
图19(续)



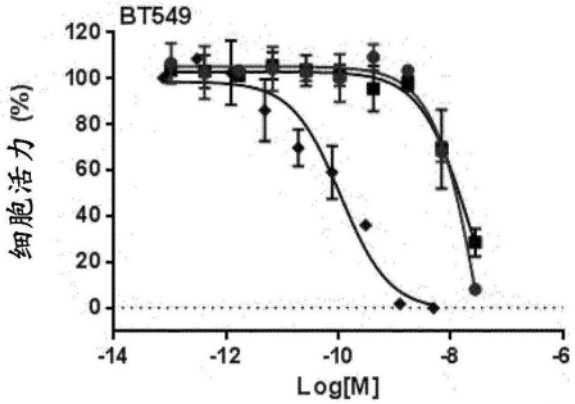
	IC50
E02_GL_SG3249	2.356e-010
R347-SG3249	~ 1.099e-005
弹头 SG3199	1.467e-010



	IC50
E02_GL_SG3249	1.746e-010
R347-SG3249	9.912e-009
弹头 SG3199	4.762e-011



	IC50
E02_GL_SG3249	6.177e-011
R347-SG3249	4.078e-009
弹头 SG3199	1.001e-010



	IC50
E02_GL_SG3249	4.757e-008
R347-SG3249	2.18e-008
弹头 SG3199	1.103e-010

图19(续)

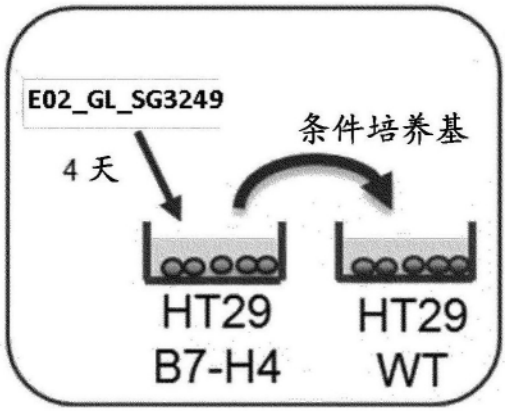

E02_GL_SG3249
4 天
条件培养基
HT29
B7-H4
HT29
WT

图20A

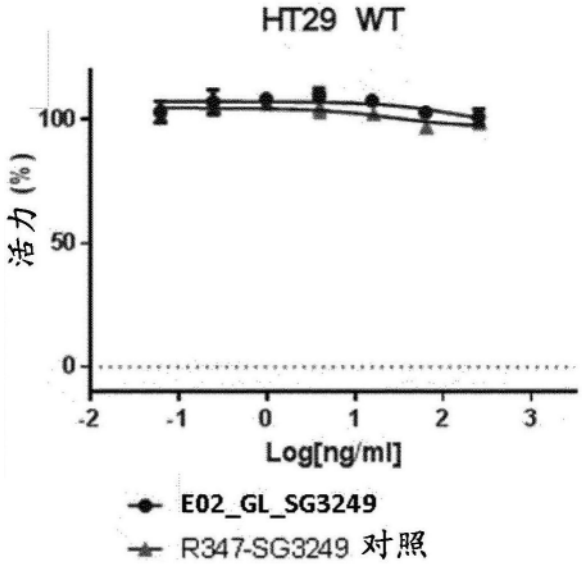

HT29 WT
活力 (%)
100
50
0
-2
-1
0
1
2
3
Log[ng/ml]
E02_GL_SG3249
R347-SG3249 对照

图20B

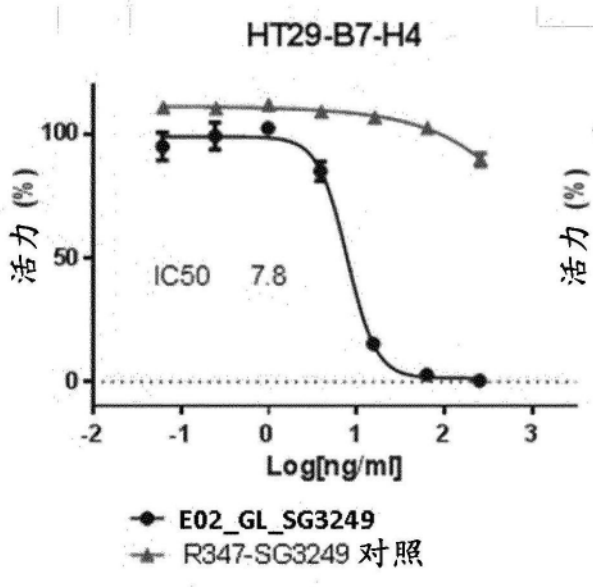


图 20C

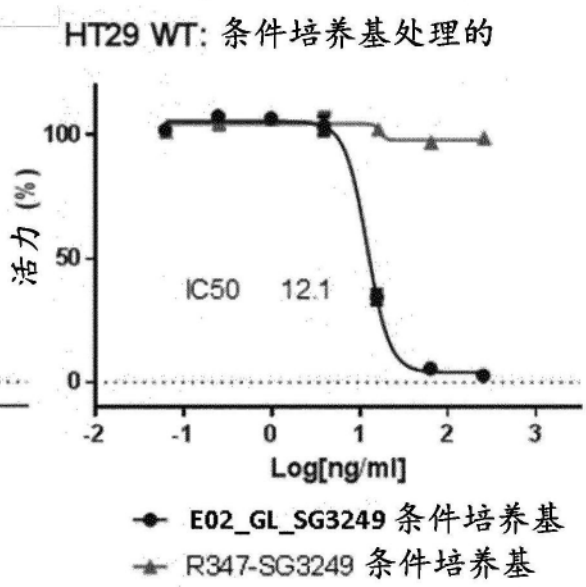
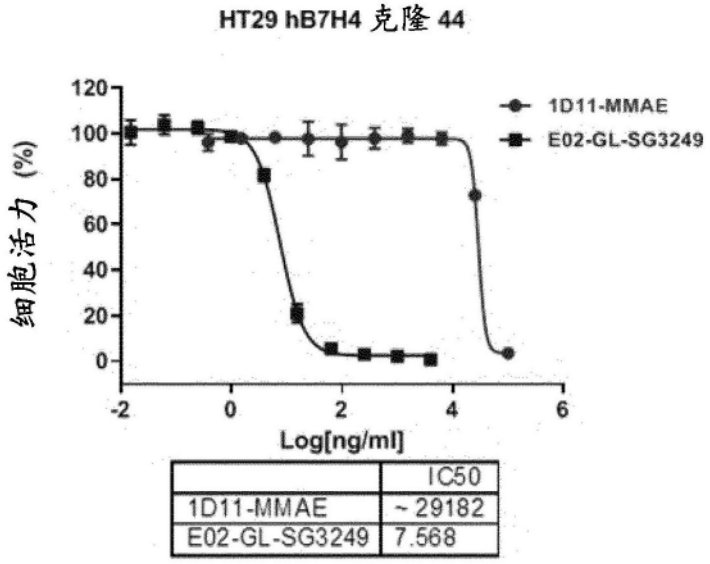
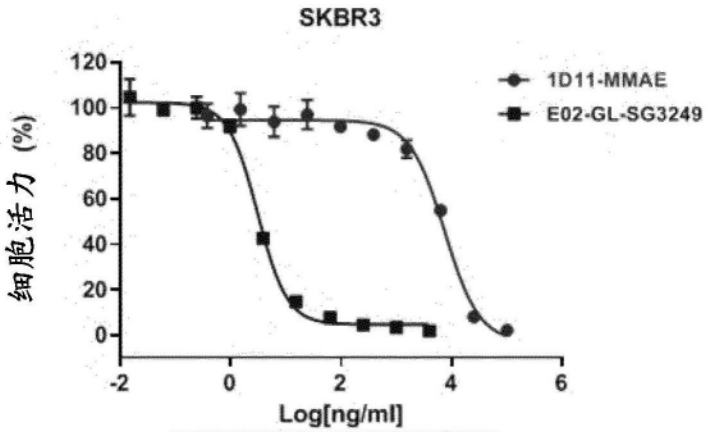


图 20D



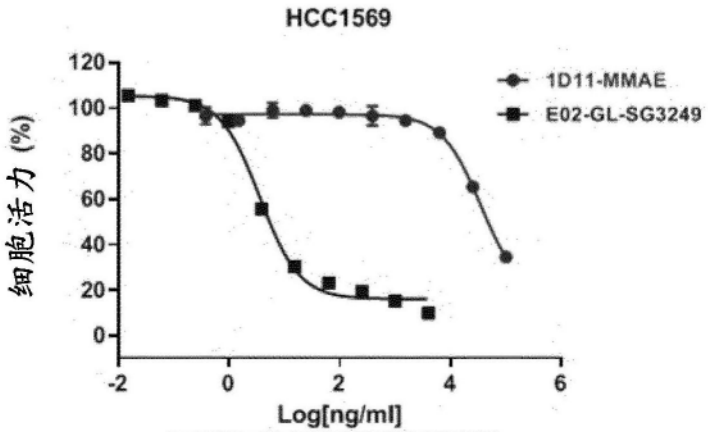
	IC50
1D11-MMAE	~ 29182
E02-GL-SG3249	7.568

图21A



	IC50
1D11-MMAE	7463
E02-GL-SG3249	3.104

图21B



	IC50
1D11-MMAE	35234
E02-GL-SG3249	3.609

图21C

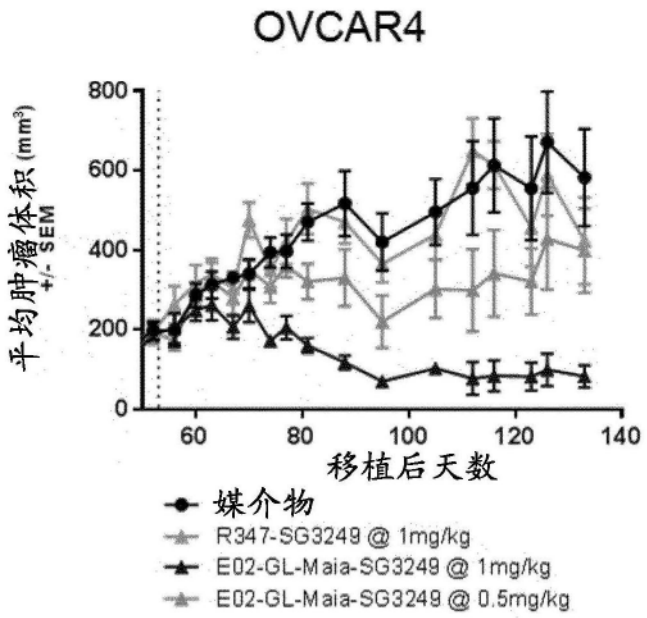

OVCAR4
平均肿瘤体积 (mm³) +/- SEM
800
600
400
200
0
60
80
100
120
140
移植后天数
媒介物
R347-SG3249 @ 1mg/kg
E02-GL-Maia-SG3249 @ 1mg/kg
E02-GL-Maia-SG3249 @ 0.5mg/kg

图22A

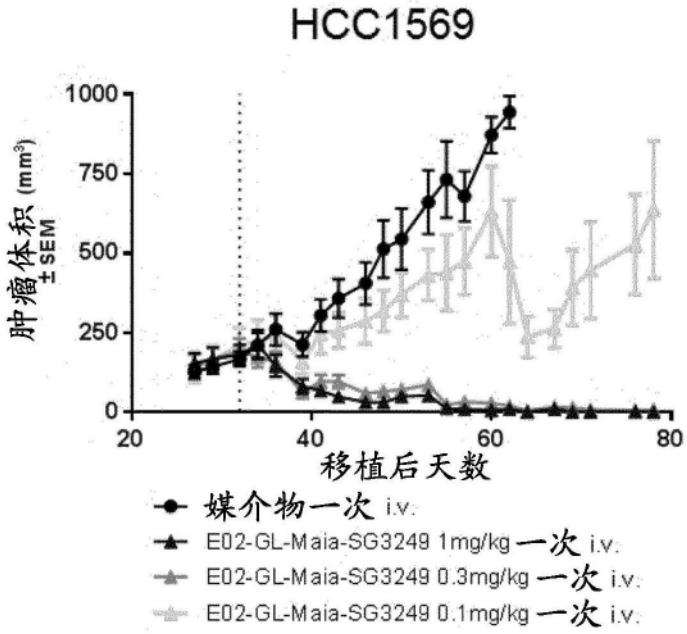

HCC1569
肿瘤体积 (mm³) ±SEM
1000
750
500
250
0
20
40
60
80
移植后天数
媒介物一次 i.v.
E02-GL-Maia-SG3249 1mg/kg 一次 i.v.
E02-GL-Maia-SG3249 0.3mg/kg 一次 i.v.
E02-GL-Maia-SG3249 0.1mg/kg 一次 i.v.

图22B

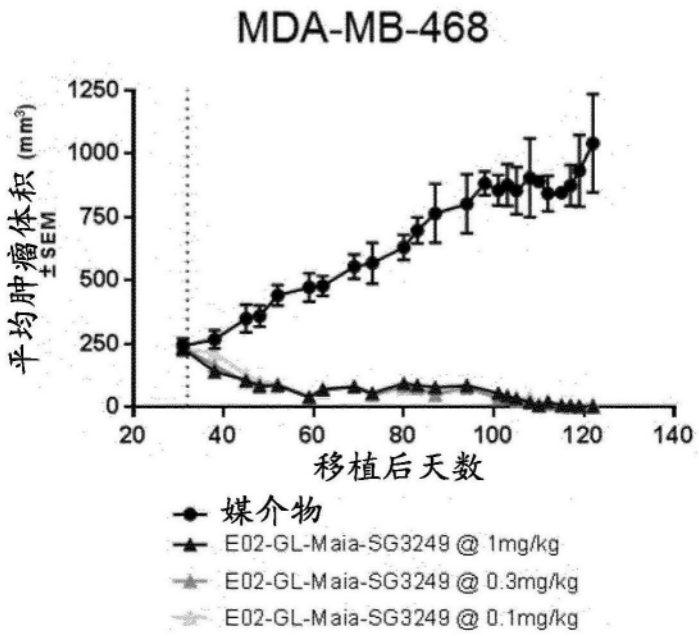

MDA-MB-468
平均肿瘤体积 (mm³) ±SEM
1250
1000
750
500
250
0
20
40
60
80
100
120
140
移植后天数
媒介物
E02-GL-Maia-SG3249 @ 1mg/kg
E02-GL-Maia-SG3249 @ 0.3mg/kg
E02-GL-Maia-SG3249 @ 0.1mg/kg

图22C

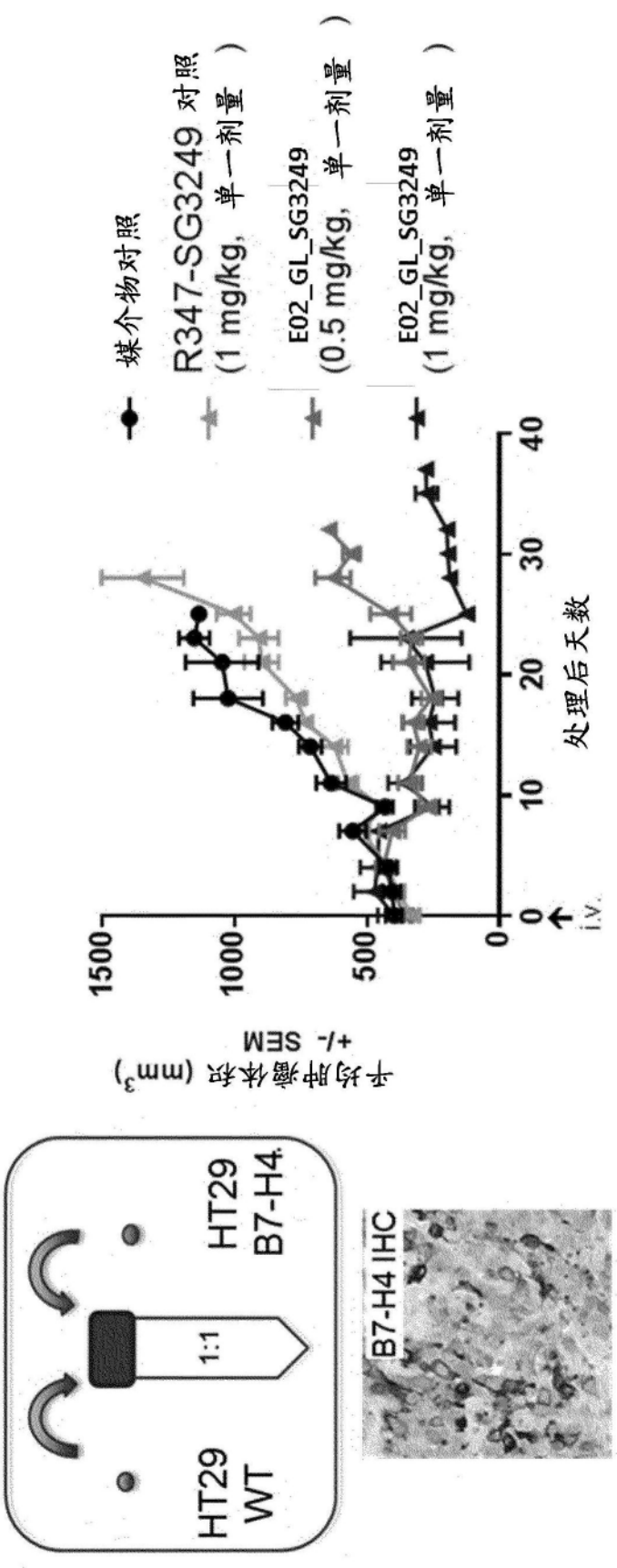

媒介物对照
R347-SG3249 对照
(1 mg/kg，单一剂量)
E02_GL_SG3249
(0.5 mg/kg，单一剂量)
E02_GL_SG3249
(1 mg/kg，单一剂量)
平均肿瘤体积 (mm³)
+/- SEM
处理后天数
i.v.
HT29
WT
1:1
HT29
B7-H4
B7-H4 IHC

图23

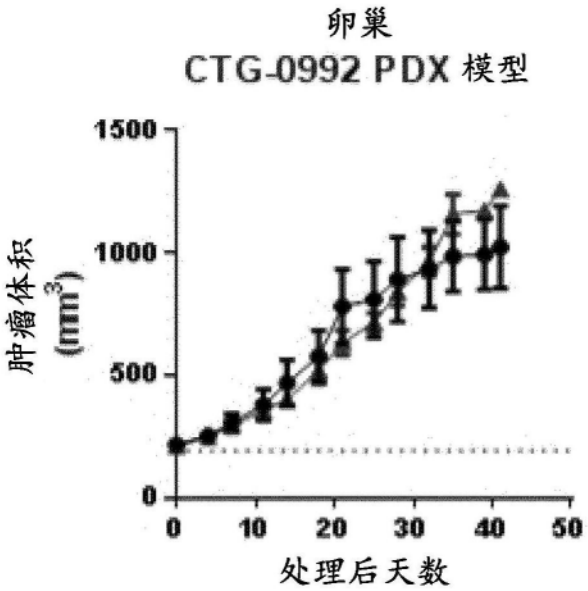

卵巢
CTG-0992 PDX 模型
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24A

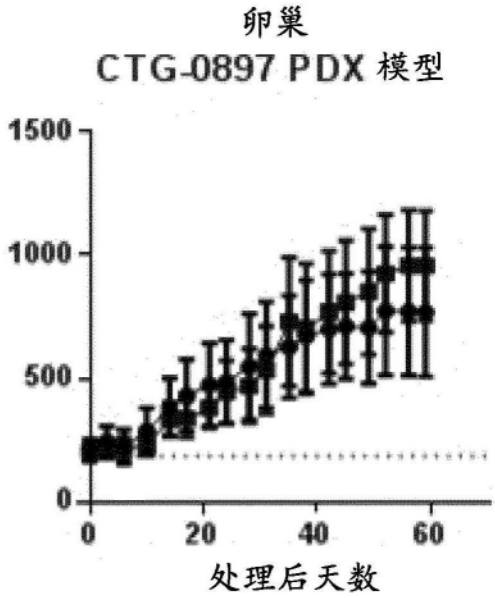

卵巢
CTG-0897 PDX 模型
1500
1000
500
0
0
20
40
60
处理后天数

图24B

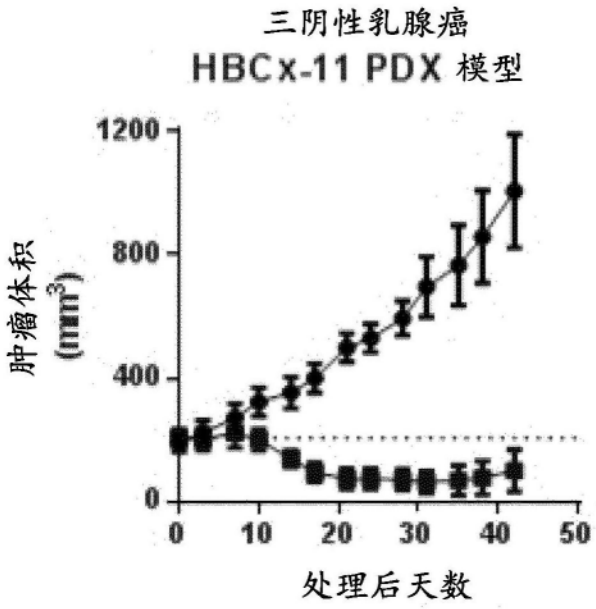

三阴性乳腺癌
HBCx-11 PDX 模型
肿瘤体积 (mm³)
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24C

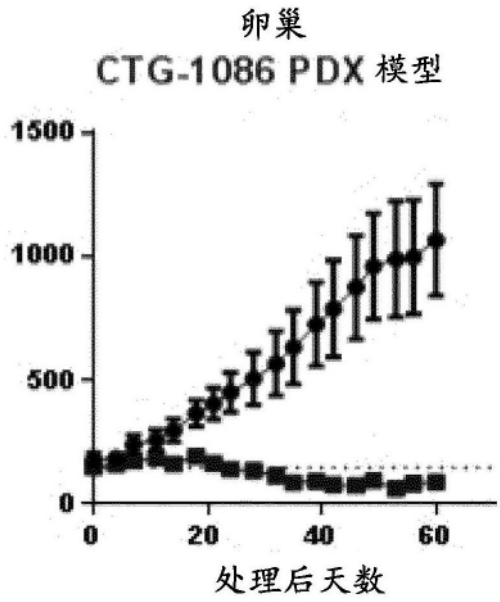

卵巢
CTG-1086 PDX 模型
1500
1000
500
0
0
20
40
60
处理后天数

图24D

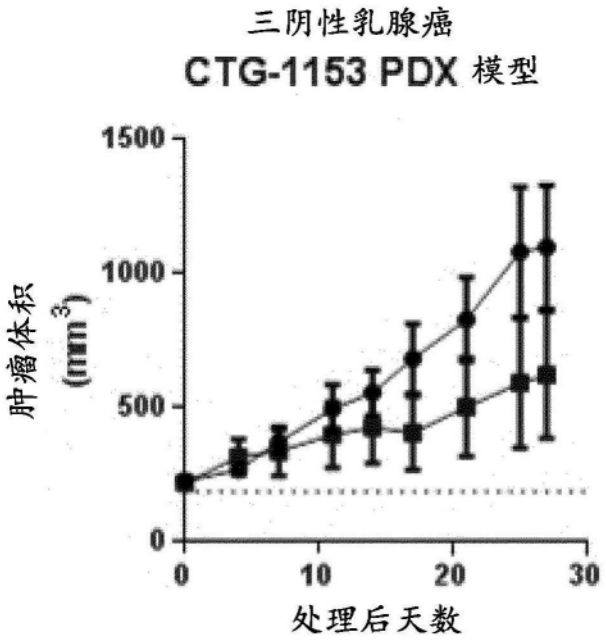

三阴性乳腺癌
CTG-1153 PDX 模型
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
处理后天数

图24E

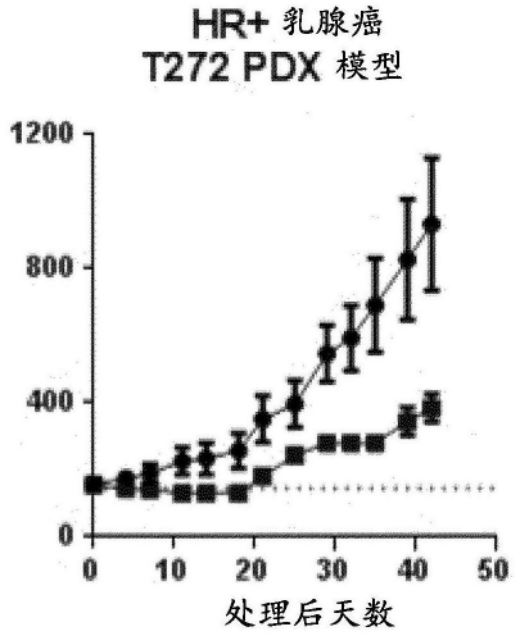

HR+ 乳腺癌
T272 PDX 模型
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24F

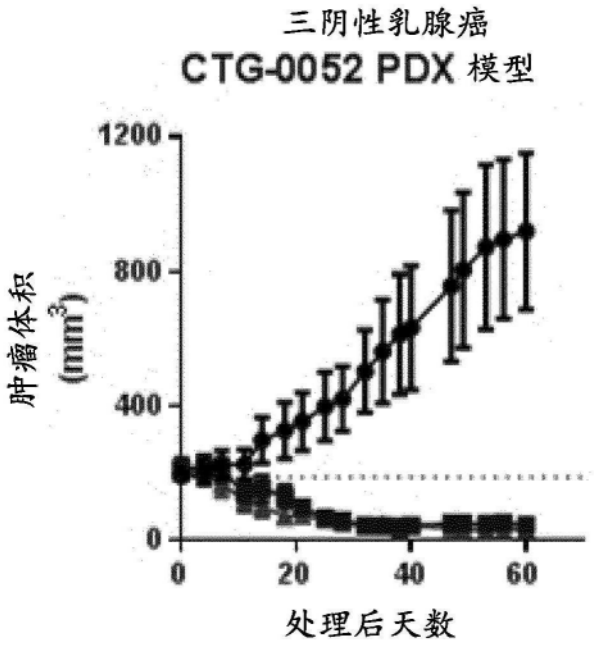

三阴性乳腺癌
CTG-0052 PDX 模型
肿瘤体积
(mm3)
1200
800
400
0
0
20
40
60
处理后天数

图24G

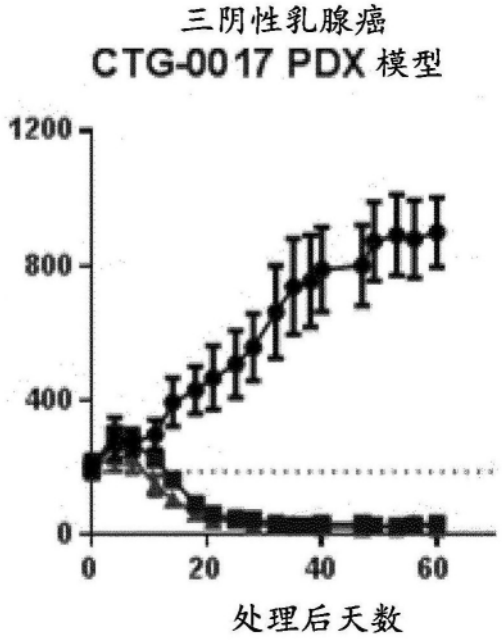

三阴性乳腺癌
CTG-0017 PDX 模型
1200
800
400
0
0
20
40
60
处理后天数

图24H

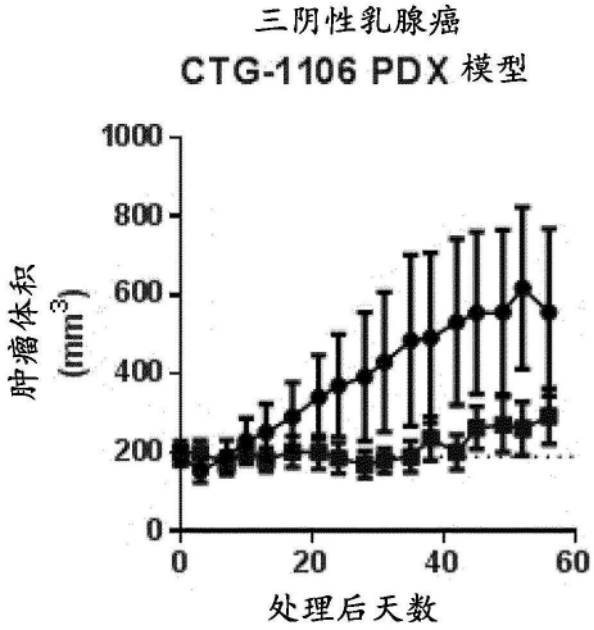

三阴性乳腺癌
CTG-1106 PDX 模型
肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
处理后天数

图24I

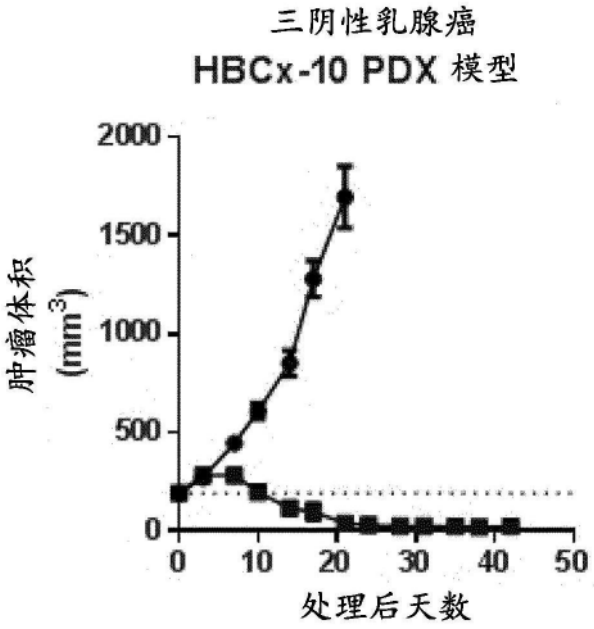

三阴性乳腺癌
HBCx-10 PDX 模型
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24J

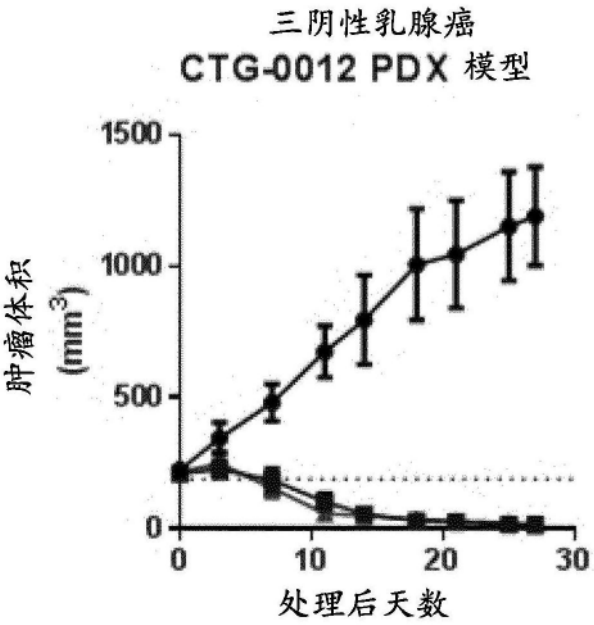

三阴性乳腺癌
CTG-0012 PDX 模型
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
处理后天数

图24K

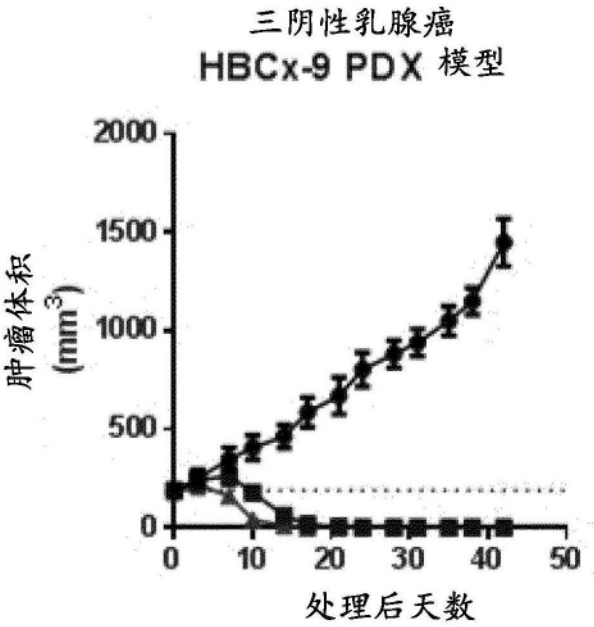

三阴性乳腺癌
HBCx-9 PDX 模型
肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24L

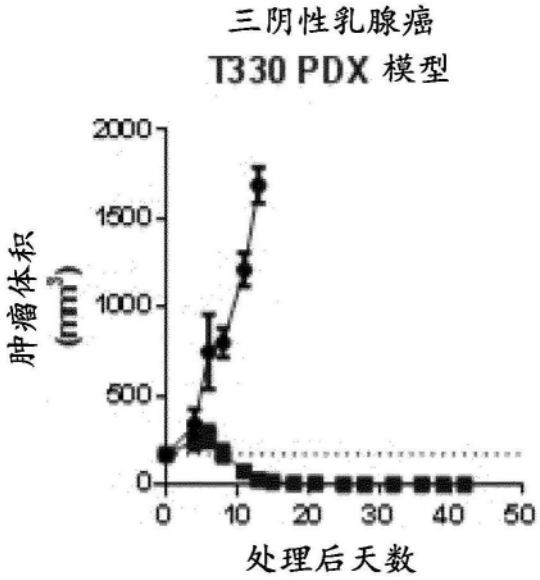

三阴性乳腺癌
T330 PDX 模型
肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24M

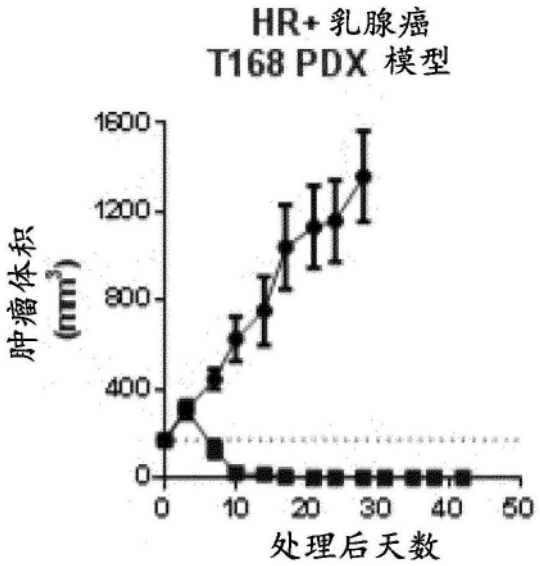

HR+ 乳腺癌
T168 PDX 模型
肿瘤体积 (mm³)
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图24N

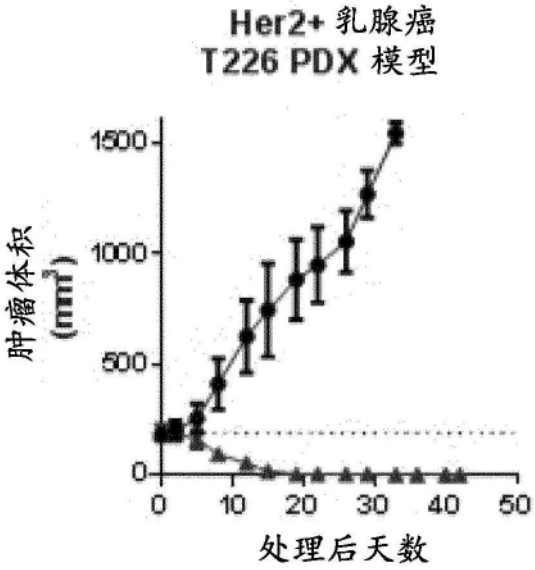

Her2+ 乳腺癌
T226 PDX 模型
肿瘤体积 (mm³)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
处理后天数

图240

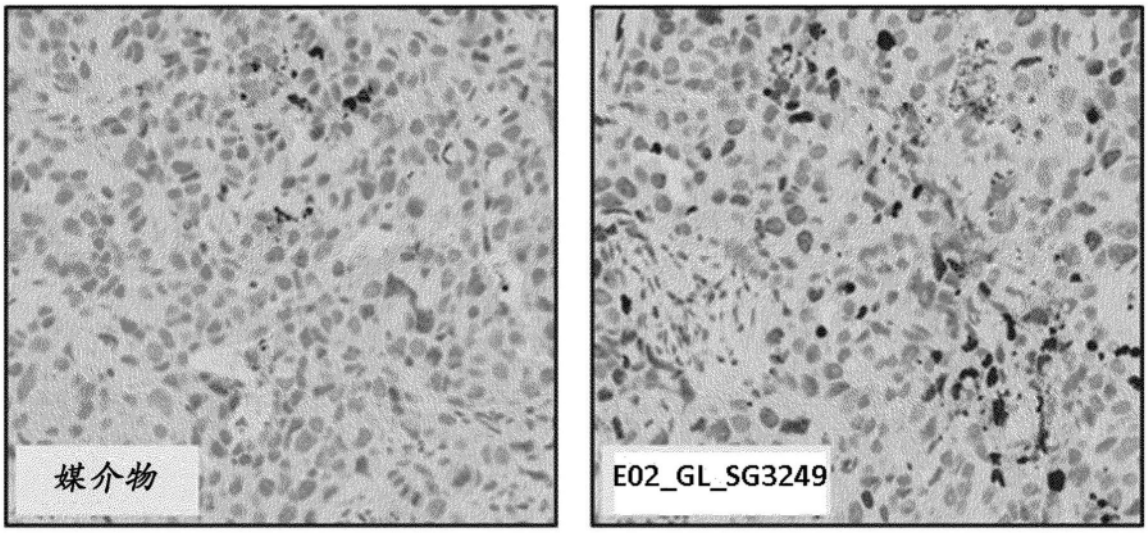

媒介物
E02_GL_SG3249

图25A

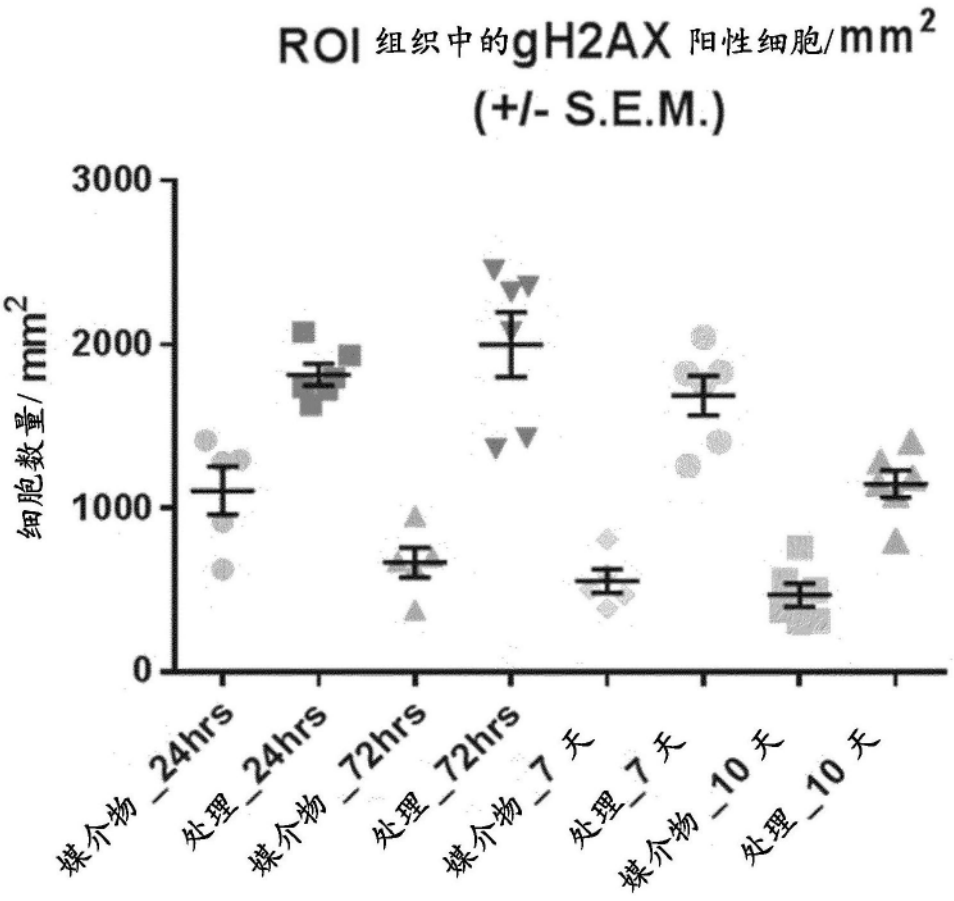

ROI 组织中的gH2AX 阳性细胞/mm²
(+/- S.E.M.)
细胞数量/ mm²
3000
2000
1000
0
媒介物 _24hrs
处理_24hrs
媒介物 _72hrs
处理_72hrs
媒介物 _7 天
处理_7 天
媒介物 _10 天
处理_10 天

图25B

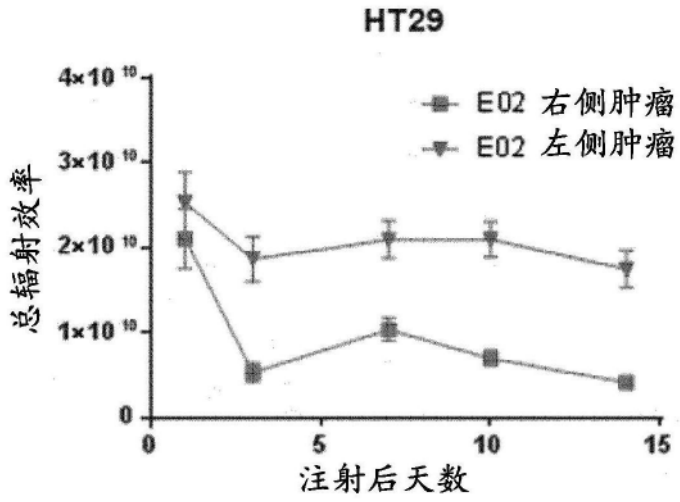

HT29
E02 右侧肿瘤
E02 左侧肿瘤
总辐射效率
4×10 ¹⁰
3×10 ¹⁰
2×10 ¹⁰
1×10 ¹⁰
0
0
5
10
15
注射后天数

图26A

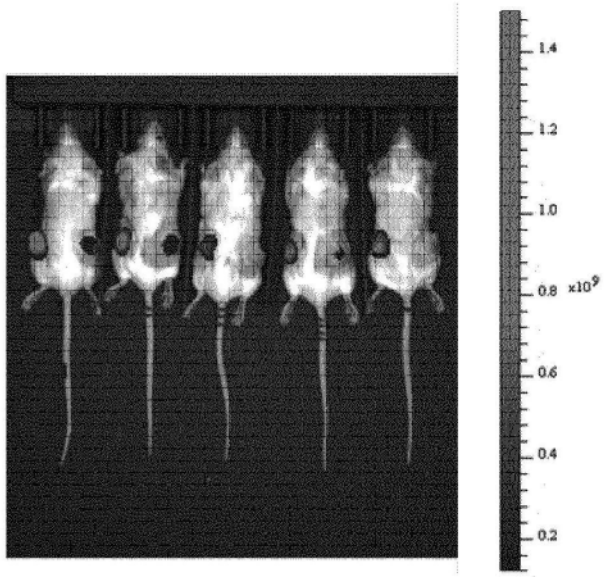

1.4
1.2
1.0
0.8 x10⁹
0.6
0.4
0.2

图26B

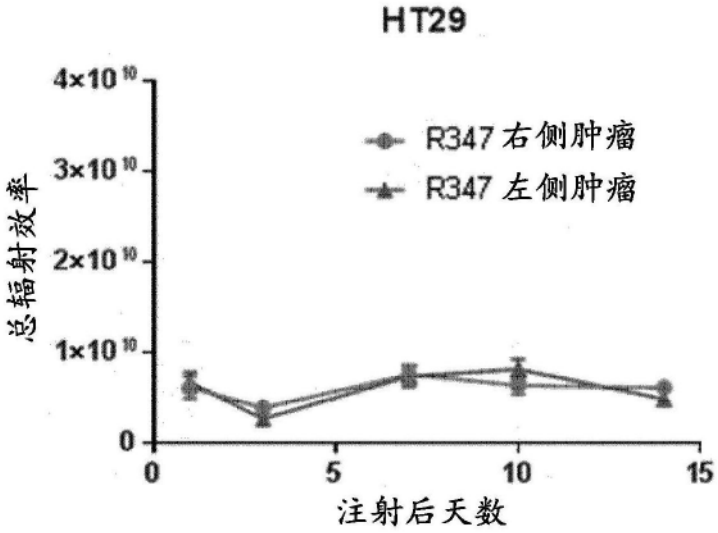

HT29
4×10¹⁰
3×10¹⁰
2×10¹⁰
1×10¹⁰
0
总辐射效率
R347 右侧肿瘤
R347 左侧肿瘤
0
5
10
15
注射后天数

图26C

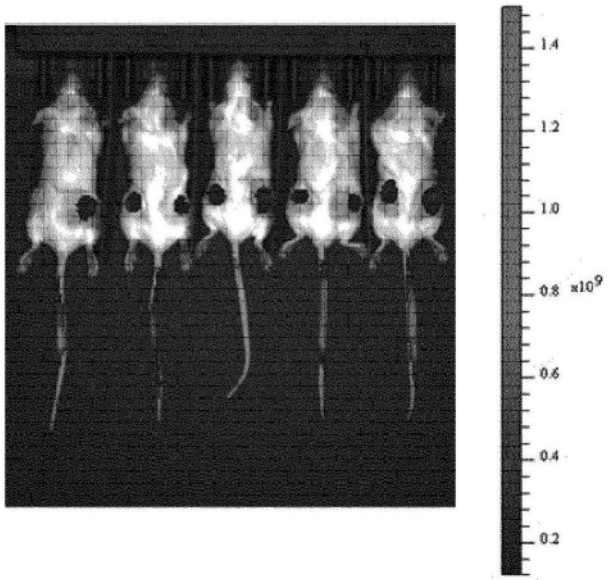

1.4
1.2
1.0
0.8 x10^9
0.6
0.4
0.2

图26D

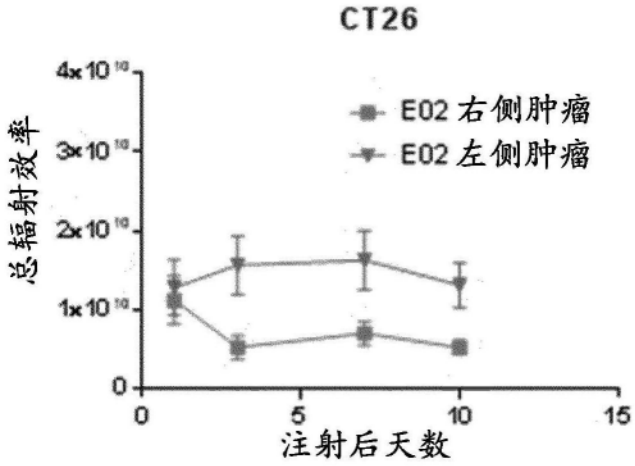

CT26
E02 右侧肿瘤
E02 左侧肿瘤
总辐射效率
4x10^10
3x10^10
2x10^10
1x10^10
0
0
5
10
15
注射后天数

图27A

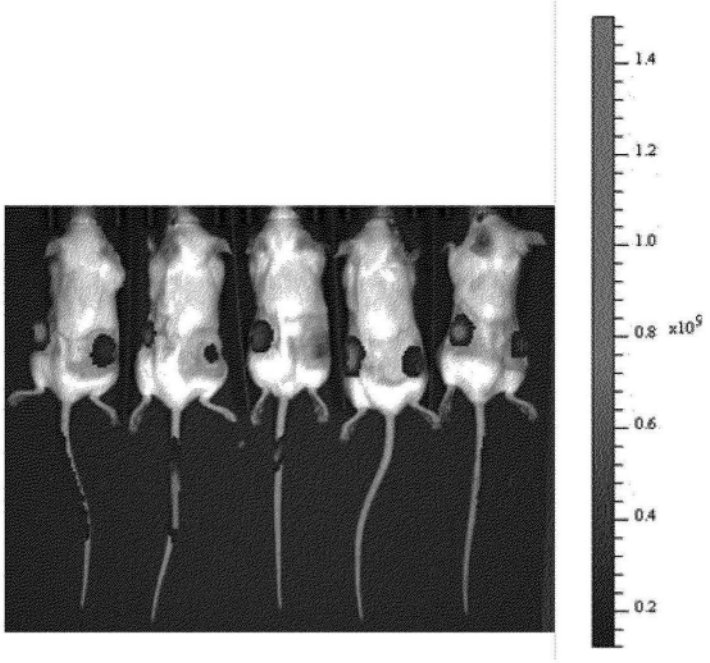

1.4
1.2
1.0
0.8
x10⁹
0.6
0.4
0.2

图27B

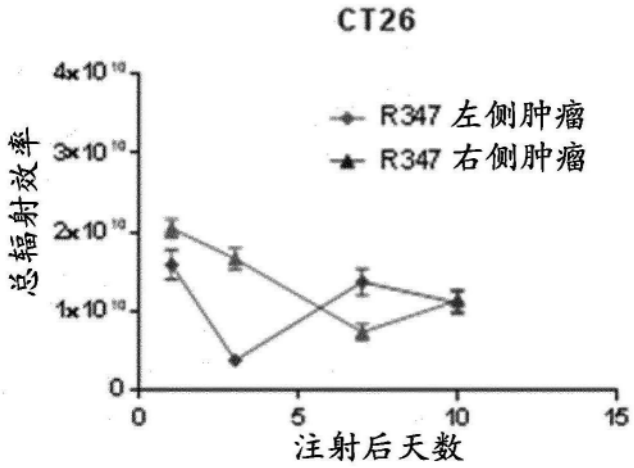

CT26
R347 左侧肿瘤
R347 右侧肿瘤
总辐射效率
4x10¹⁰
3x10¹⁰
2x10¹⁰
1x10¹⁰
0
0
5
10
15
注射后天数

图27C

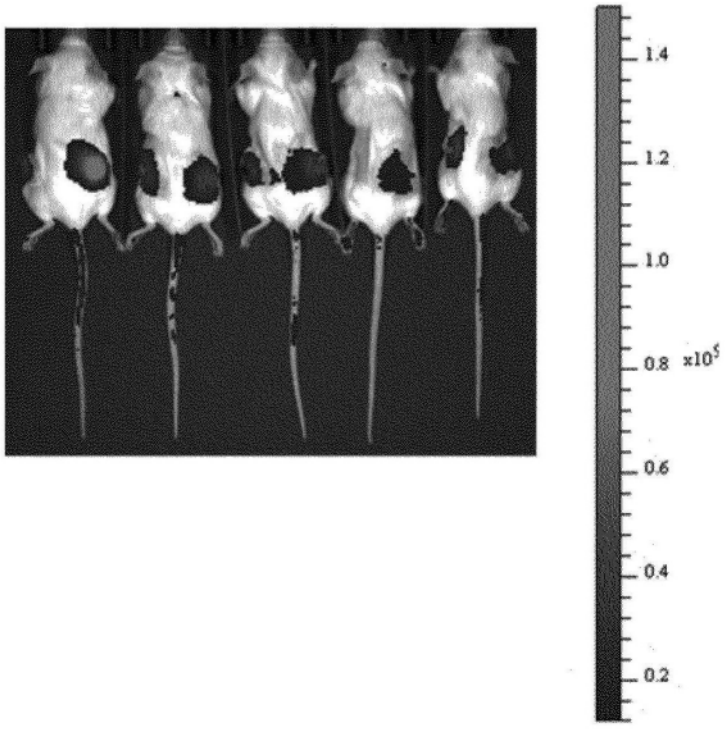


图27D

克隆ID	重链 FW1	重链 CDR1	重链 FW2
ZY0EPQ-E02	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFS	GYYWN....	WIRQPPGKGLEWIG
ZY0EQD-E02	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCTVYGGSFS	GYYWN....	WIRQPPGRGLEWIG
ZY0EP0-C07	QVQLVESGGVLVKPGGSLRLSCAASGFTLS	DYYMS....	WIRQAPGMGLEWVS
ZY0EOB-F05	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSIS	SGGYYWS..	WIRQHPGKGLEWIG
ZY0EO5-E07	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS	SGGYYWS..	WIRQHPGKGLEWIG

重链 CDR2	重链 FW3	重链 CDR3	重链 FW4
EIN.....HSGSTNYNPSLKS	RVTILVDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	NLYNWNL.....DS	WGQGTLVTVSS
EIN.....HSGSTSYNPSLKS	RITISIDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	VLYNWNV.....DS	WGQGTLVTVSS
YISS.....SGSTIYYTDSVKG	RFTISRDSAKNSLYLQMNSL..RAEDTAVYYCAR	DGVGF.....DY	WGQGTLVTVSS
NIY.....YSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLNSV..TAADTAVYYCAT	EKALATVTPSGYENYYTV.....DV	WGQGTTVTVSS
NIY.....YSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSV..TAADTAVYYCAR	EKALASVIPSGYENYYVV.....DV	WGQGTTVTVSS

图28A

克隆ID	轻链 FW1	轻链 CDR1	轻链 FW2
ZY0EQD-E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQ.....DIRNDVG	WYQQKPGKAPKRLIY
ZY0EPQ-E02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQ.....GIRNDLG	WYQQKPGRAPKRLIY
ZY0EP0-C07	EIVLTQSPGTLSLFPGERATLSC	RASQS.....VSSSYLA	WYQQKPGQSPRLLIY
ZY0EO5-E07	DIQLTQSPSFLSASVGGRVTITC	WASQ.....GIAGYLA	WYQQKPGKAPKLLIY
ZY0EOB-F05	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC	WASQ.....GISSYLA	WYQQKPGKAPKLLIY

轻链 CDR2	轻链 FW3	轻链 CDR3	轻链 FW4
AA.....SRLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYP.....RT	FGQGTKVEI...K
VA.....SSLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNSYP.....RT	FGQGTKVEI...K
AA.....SSRAT	GIPDRFSGSGSG..TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPL.....YT	FGQGTKLEI...K
AA.....STLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QHLNSYP.....LT	FGGGTKVEI...K
AA.....STLQS	GVPSRFSGSGSG..TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QHLNSYP.....LT	FGGGTKVEI...K

图28B

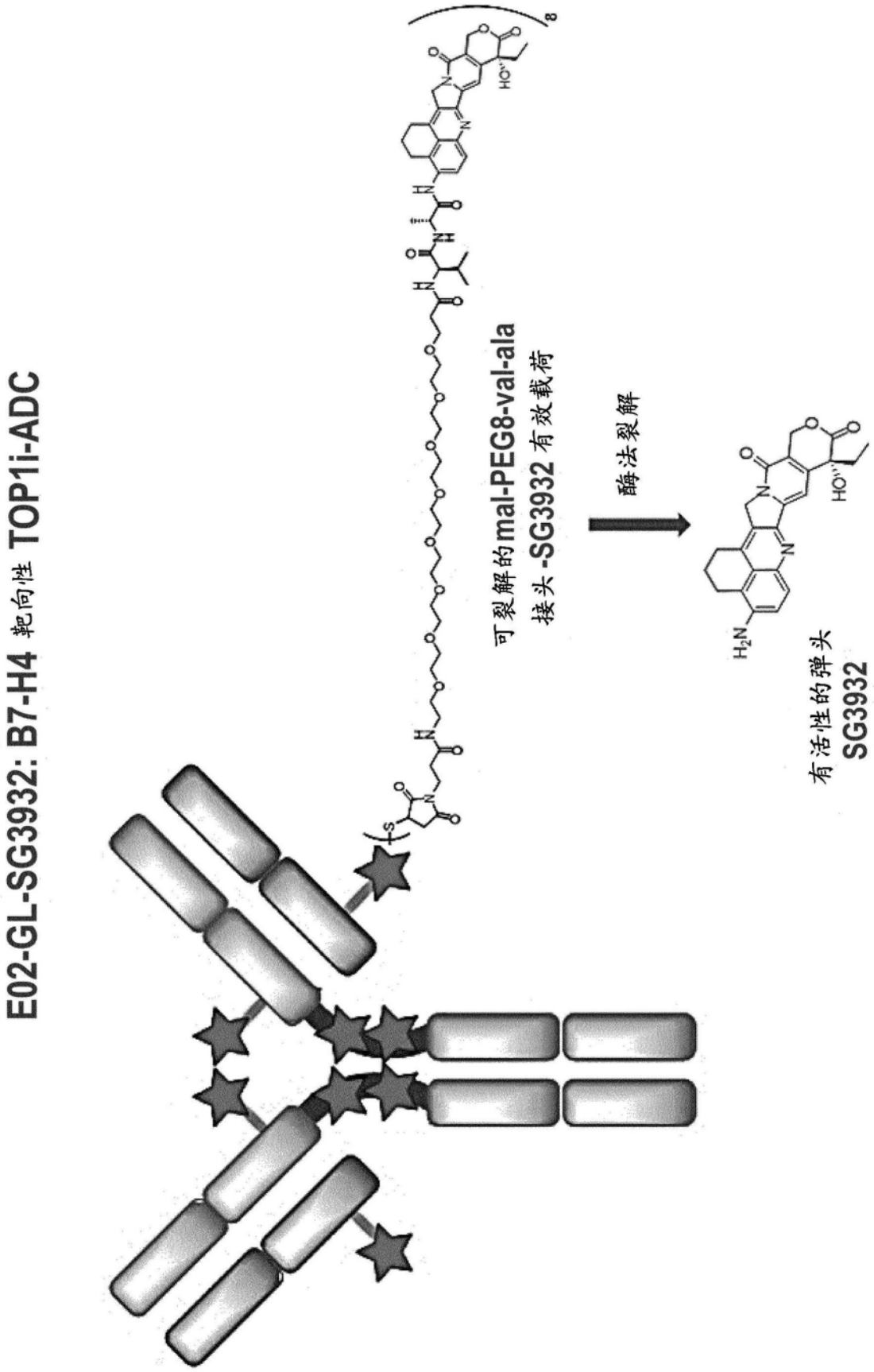

E02-GL-SG3932: B7-H4 靶向性 TOP1i-ADC
可裂解的mal-PEG8-val-ala
接头 -SG3932 有效载荷
酶法裂解
有活性的弹头
SG3932

图29A

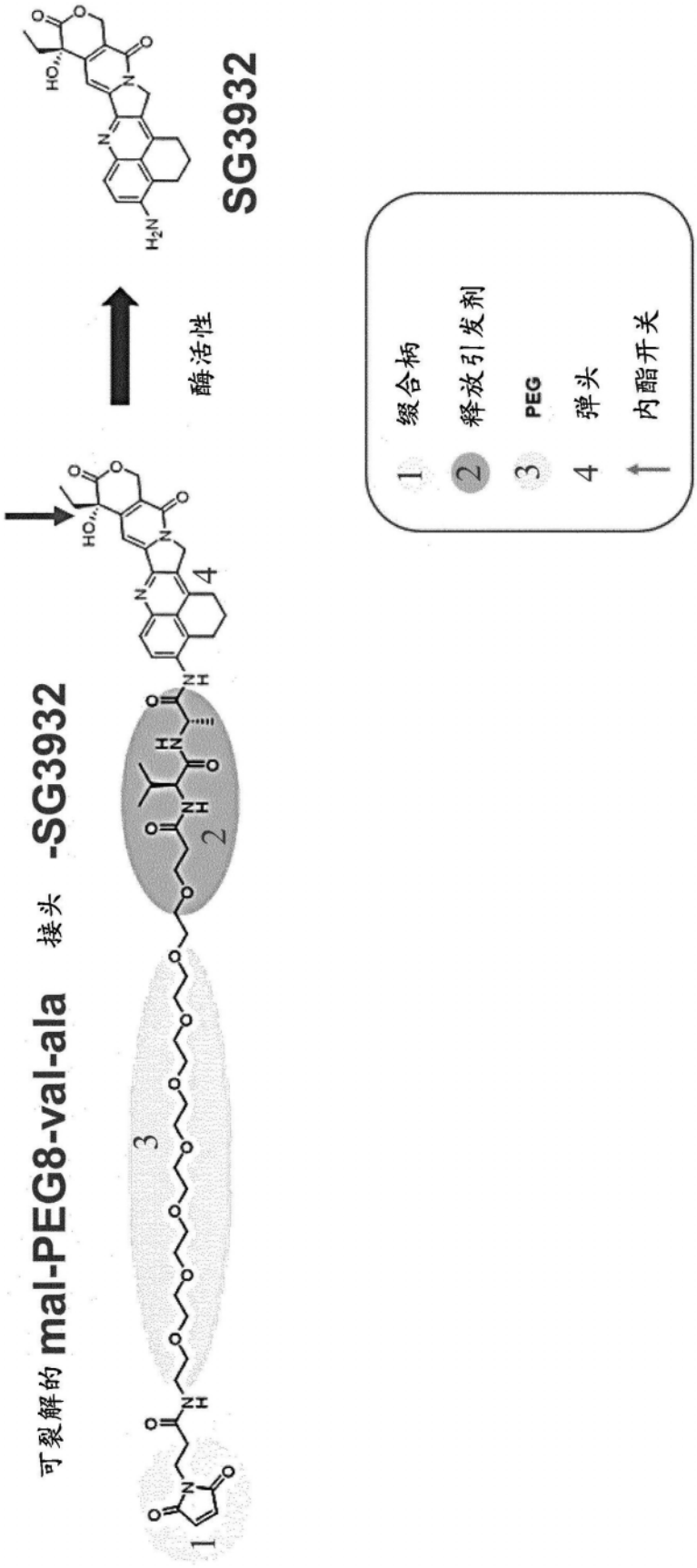

可裂解的 mal-PEG8-val-ala 接头 -SG3932
酶活性
SG3932
1 缀合柄
2 释放引发剂
3 PEG
4 弹头
内酯开关

图29B

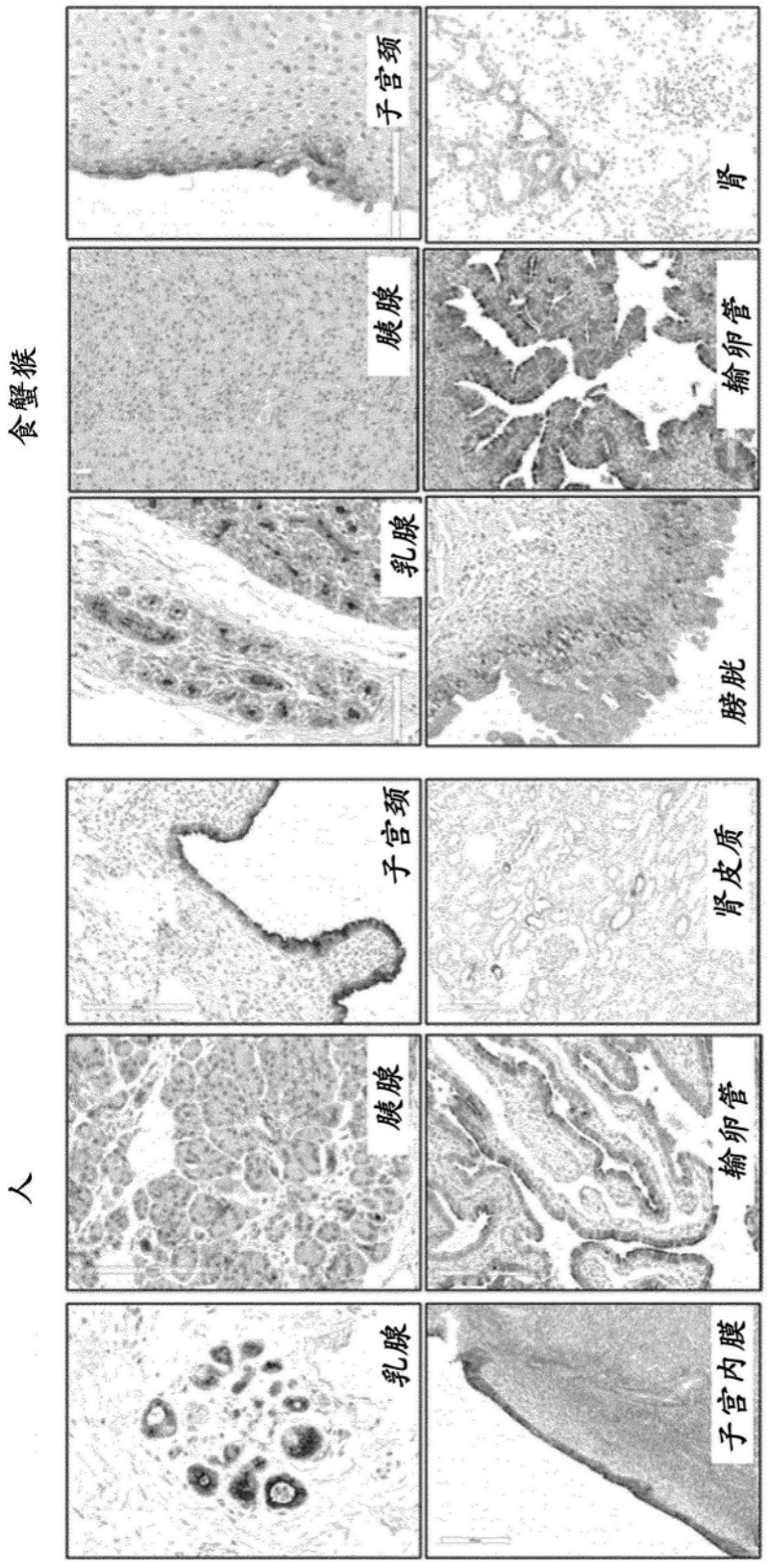
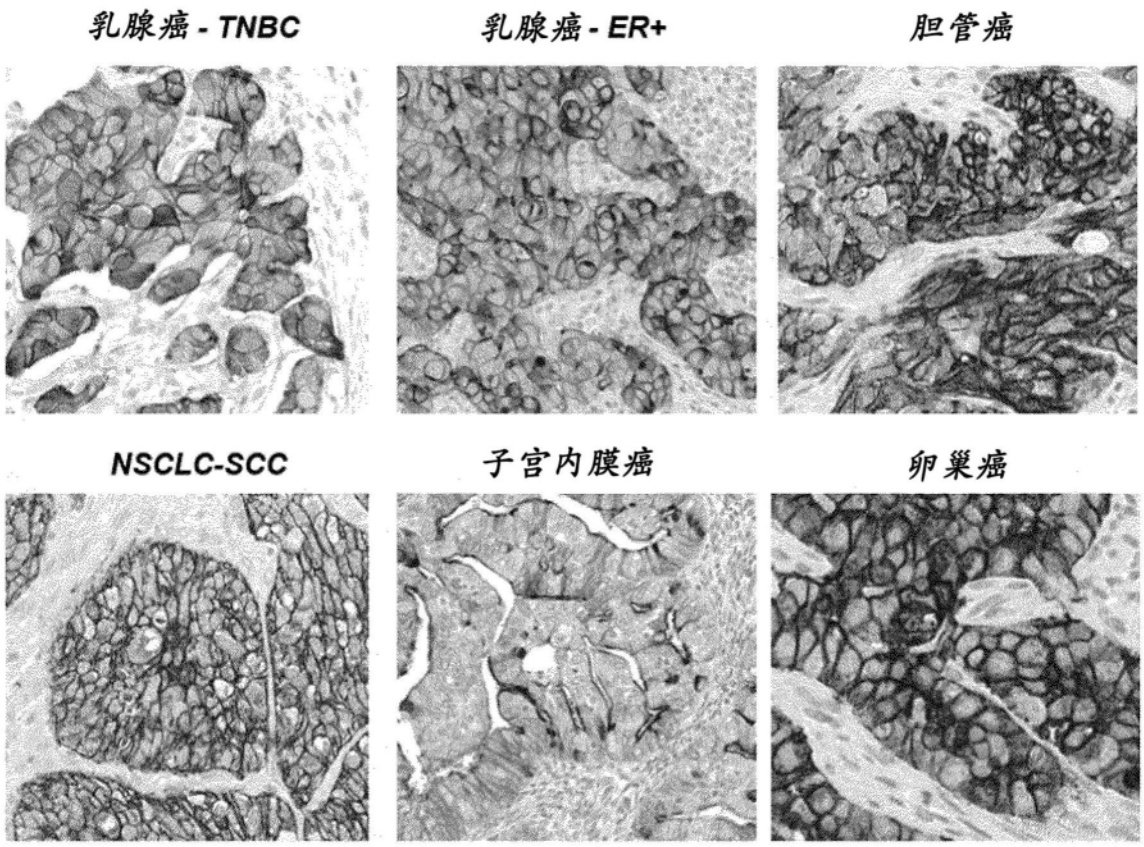


图30



ER: 雌激素受体; NSCLC-SCC: 非小细胞肺癌, 鳞状细胞癌; TNBC: 三阴性乳腺癌。

图31

以方框表示的ECD。h：人；cy：食蟹猴；rh：恒河猴；m：小鼠；r：大鼠。

图32

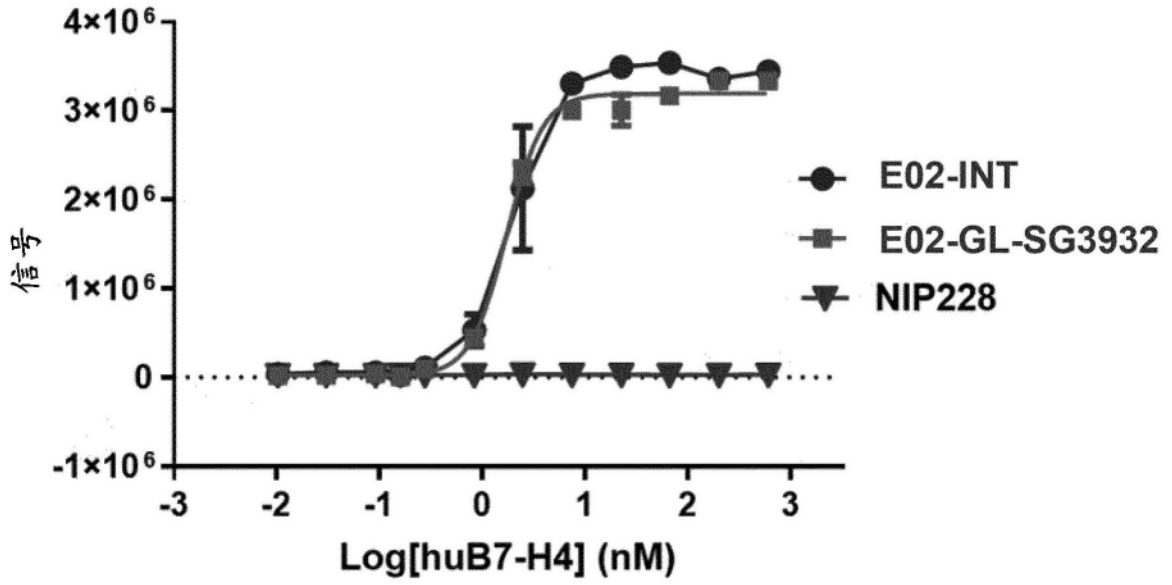

4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
-1×10⁶
信号
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log[huB7-H4] (nM)
E02-INT
E02-GL-SG3932
NIP228

图33

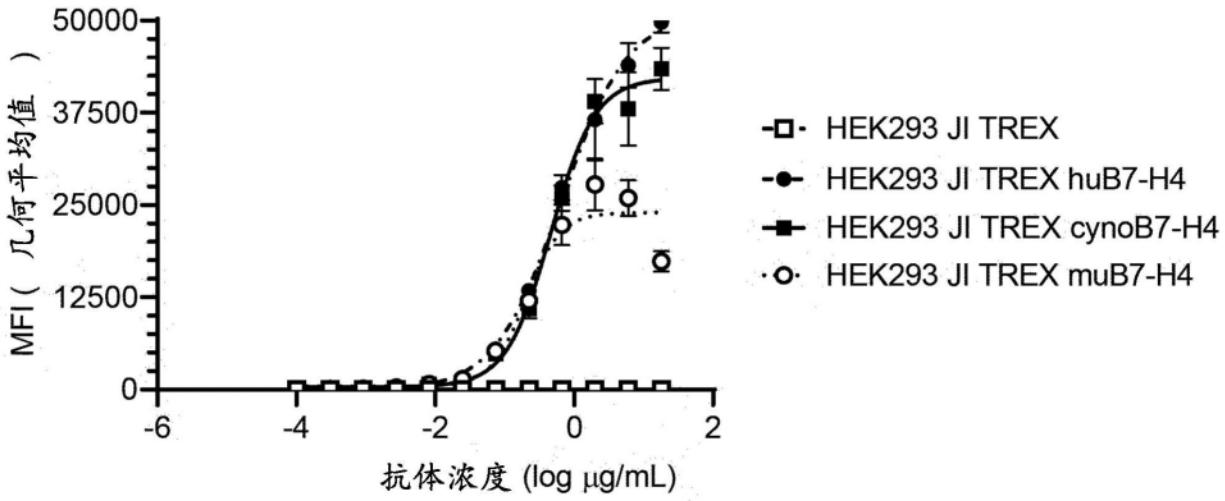

50000
37500
25000
12500
0
MFI（ 几何平均值 ）
-6
-4
-2
0
2
抗体浓度 (log μg/mL)
HEK293 JI TREX
HEK293 JI TREX huB7-H4
HEK293 JI TREX cynoB7-H4
HEK293 JI TREX muB7-H4

图34

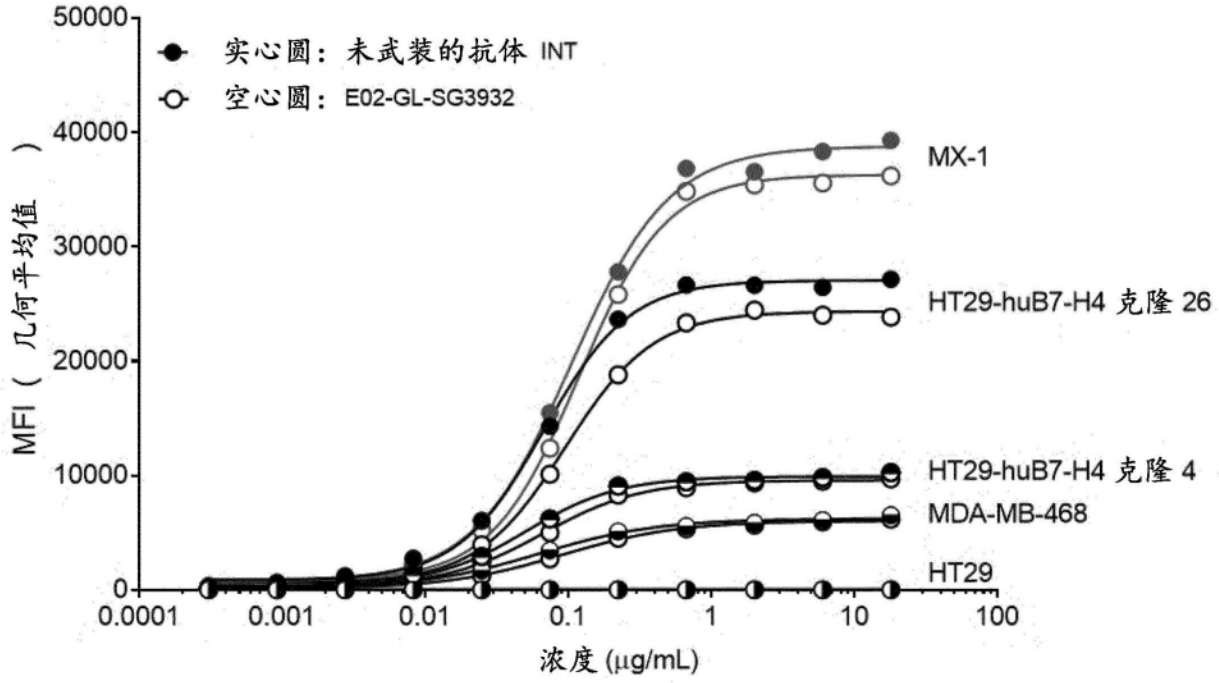

实心圆：未武装的抗体 INT
空心圆：E02-GL-SG3932
MFI（几何平均值）
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (μg/mL)
MX-1
HT29-huB7-H4 克隆 26
HT29-huB7-H4 克隆 4
MDA-MB-468
HT29

图35

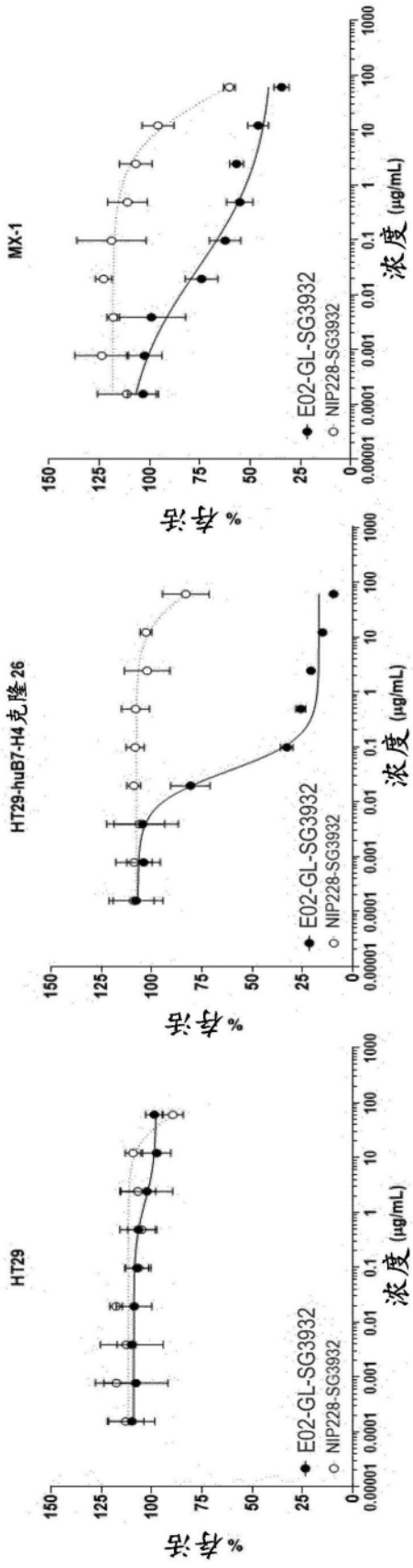


图 36A

图 36B

图 36C

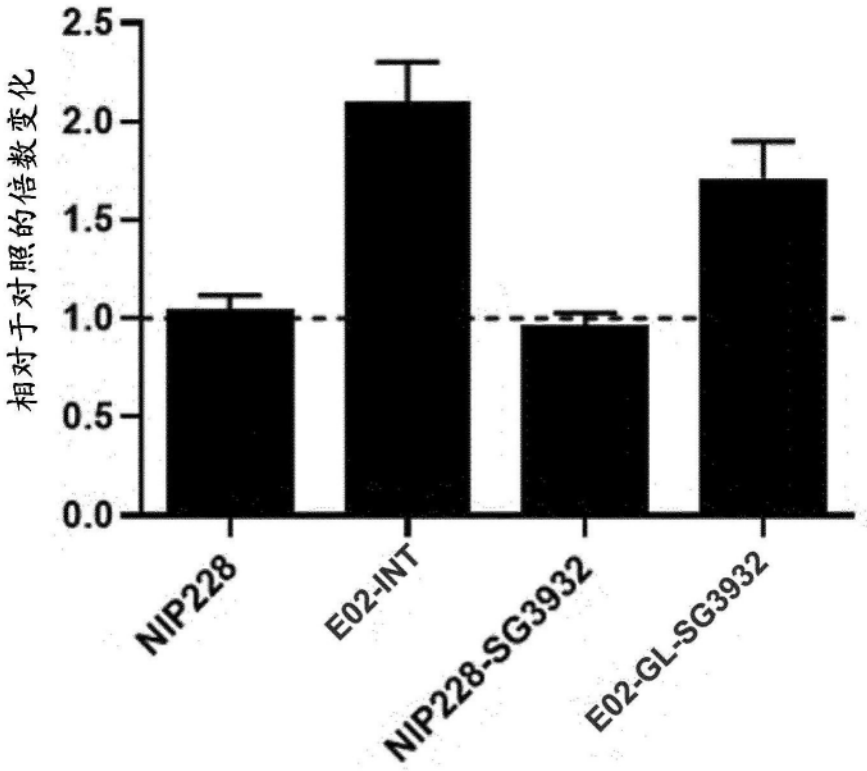

相对于对照的倍数变化
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NIP228
E02-INT
NIP228-SG3932
E02-GL-SG3932

图37

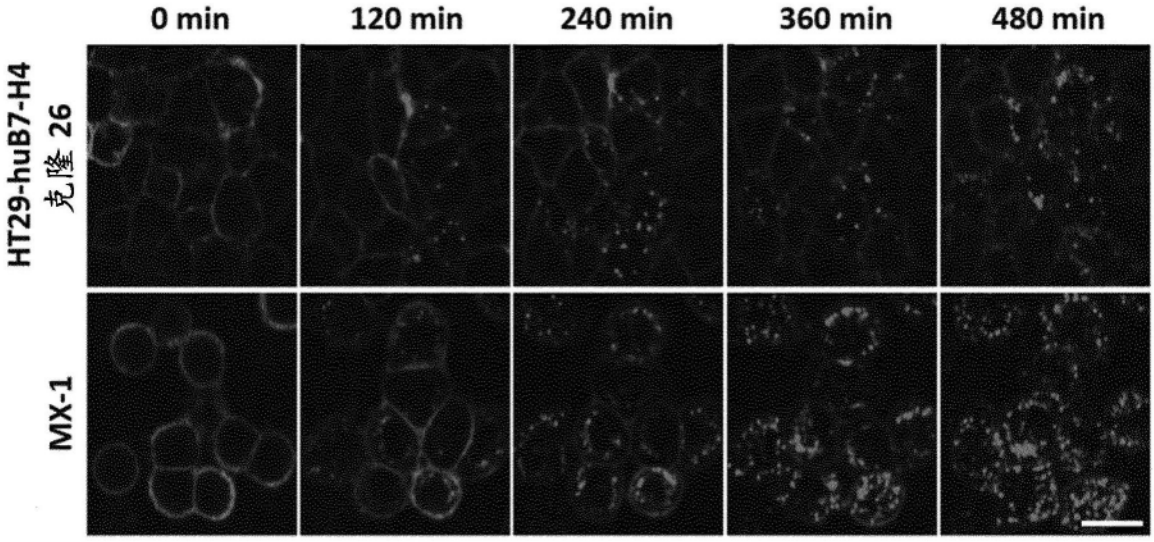

0 min
120 min
240 min
360 min
480 min
HT29-huB7-H4 克隆 26
MX-1

图38

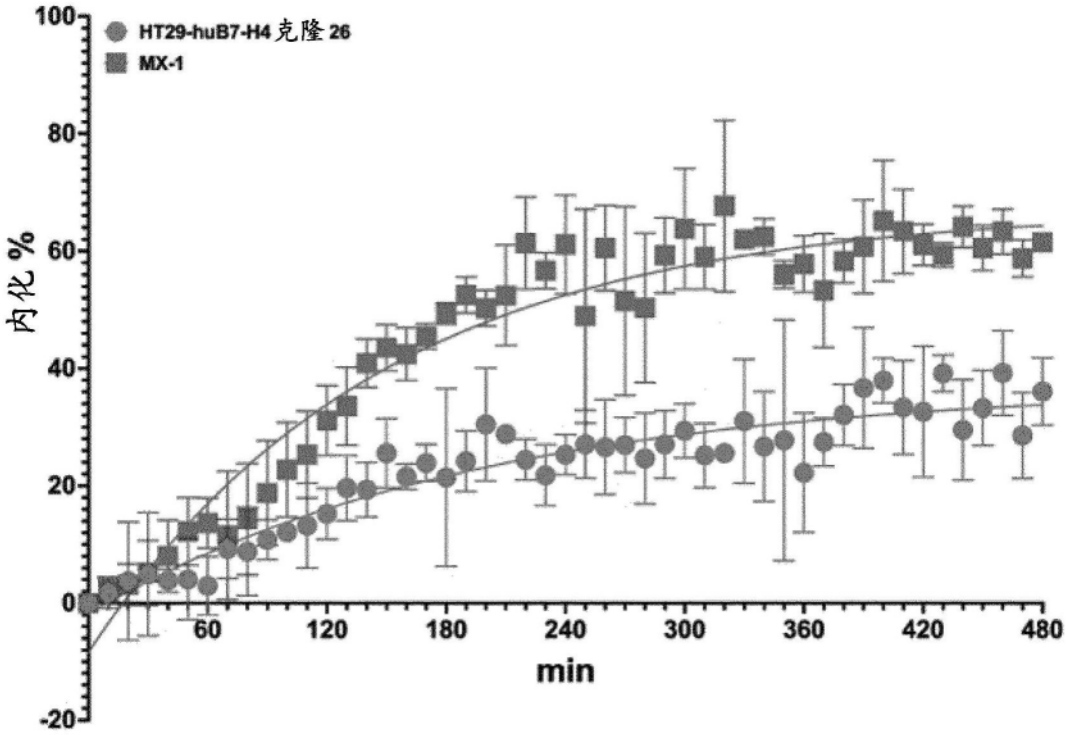

HT29-huB7-H4 克隆 26
MX-1
内化 %
100
80
60
40
20
0
-20
60
120
180
240
300
360
420
480
min

图39A

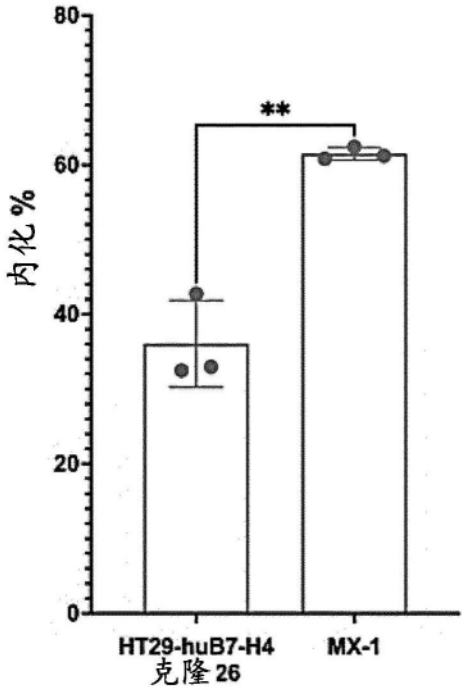

**
内化 %
80
60
40
20
0
HT29-huB7-H4
克隆 26
MX-1

图39B

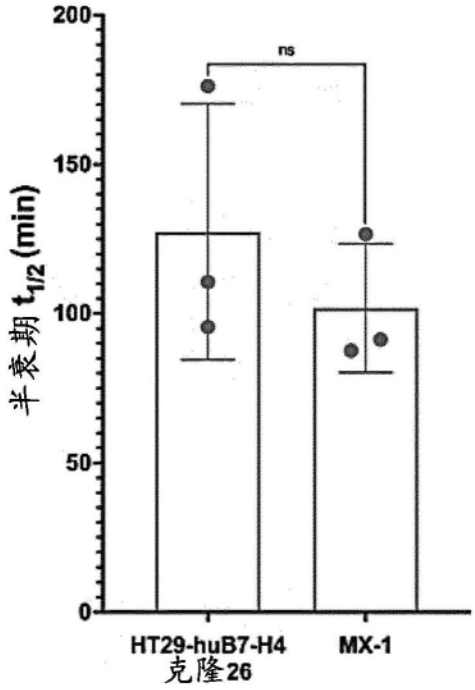


图39C

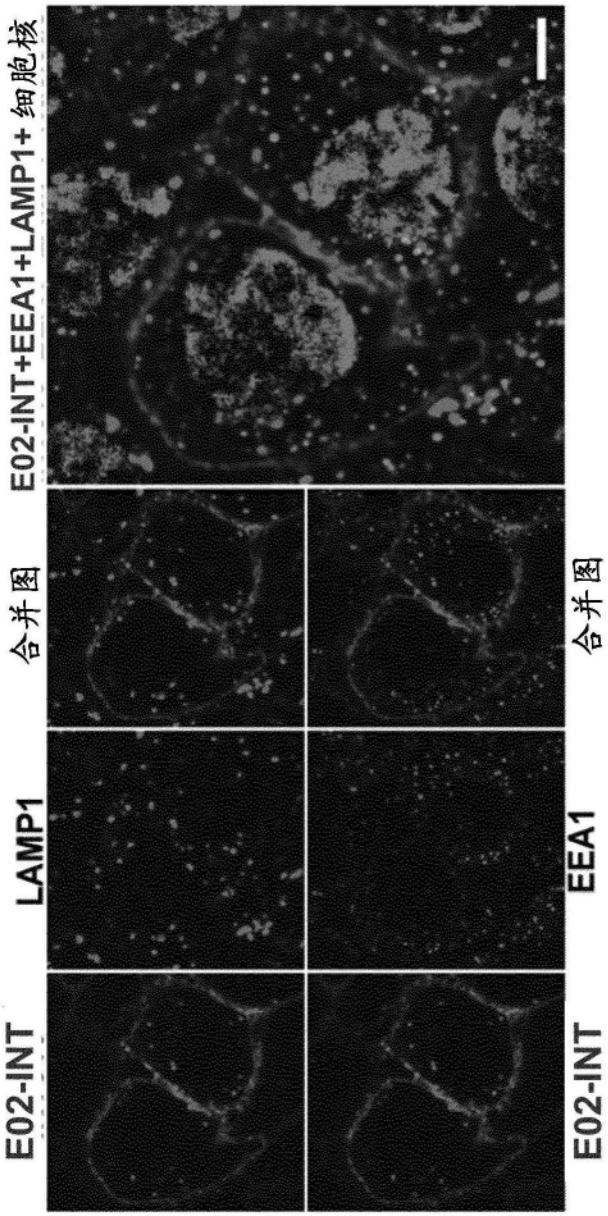


图40A

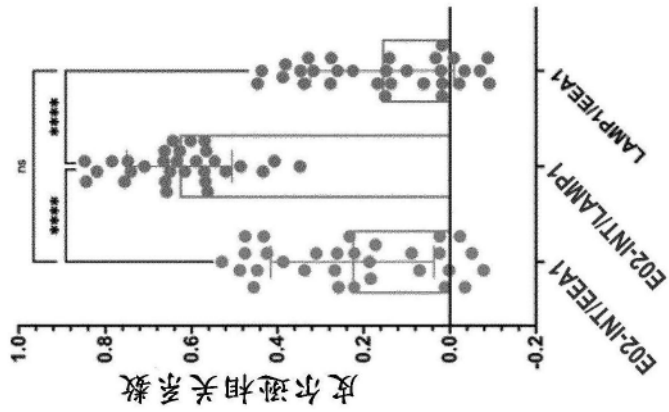

皮尔逊相关系数
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
ns
****
****
E02-INT/EEA1
E02-INT/LAMP1
LAMP1/EEA1

图40B

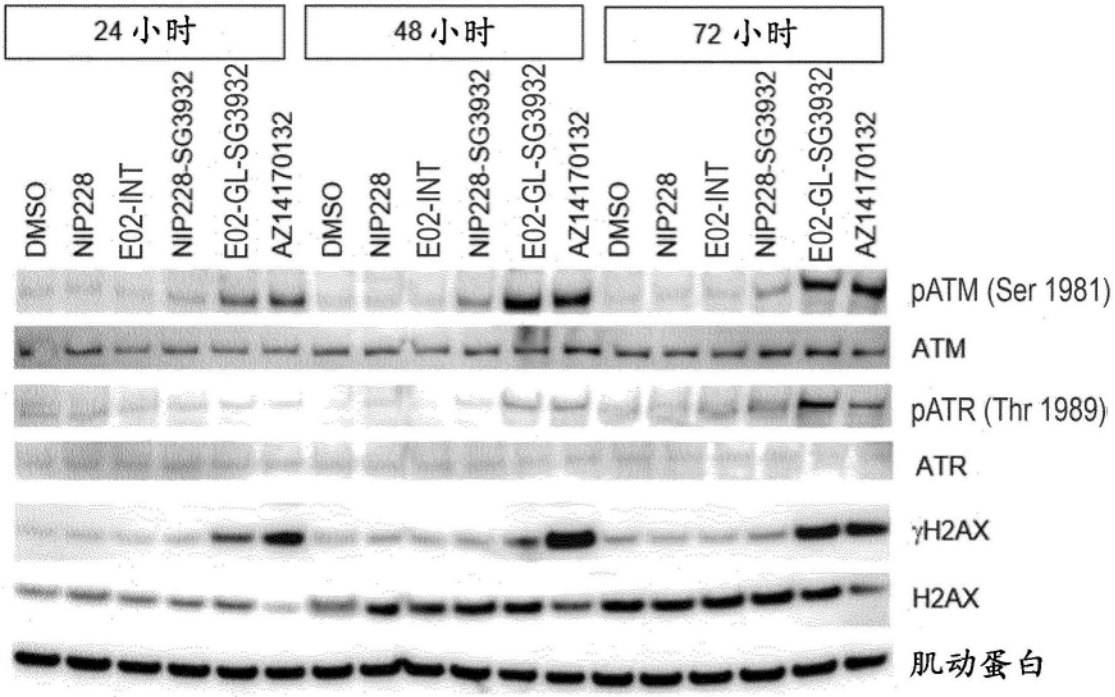

24 小时
48 小时
72 小时
DMSO
NIP228
E02-INT
NIP228-SG3932
E02-GL-SG3932
AZ14170132
pATM (Ser 1981)
ATM
pATR (Thr 1989)
ATR
γH2AX
H2AX
肌动蛋白

图41

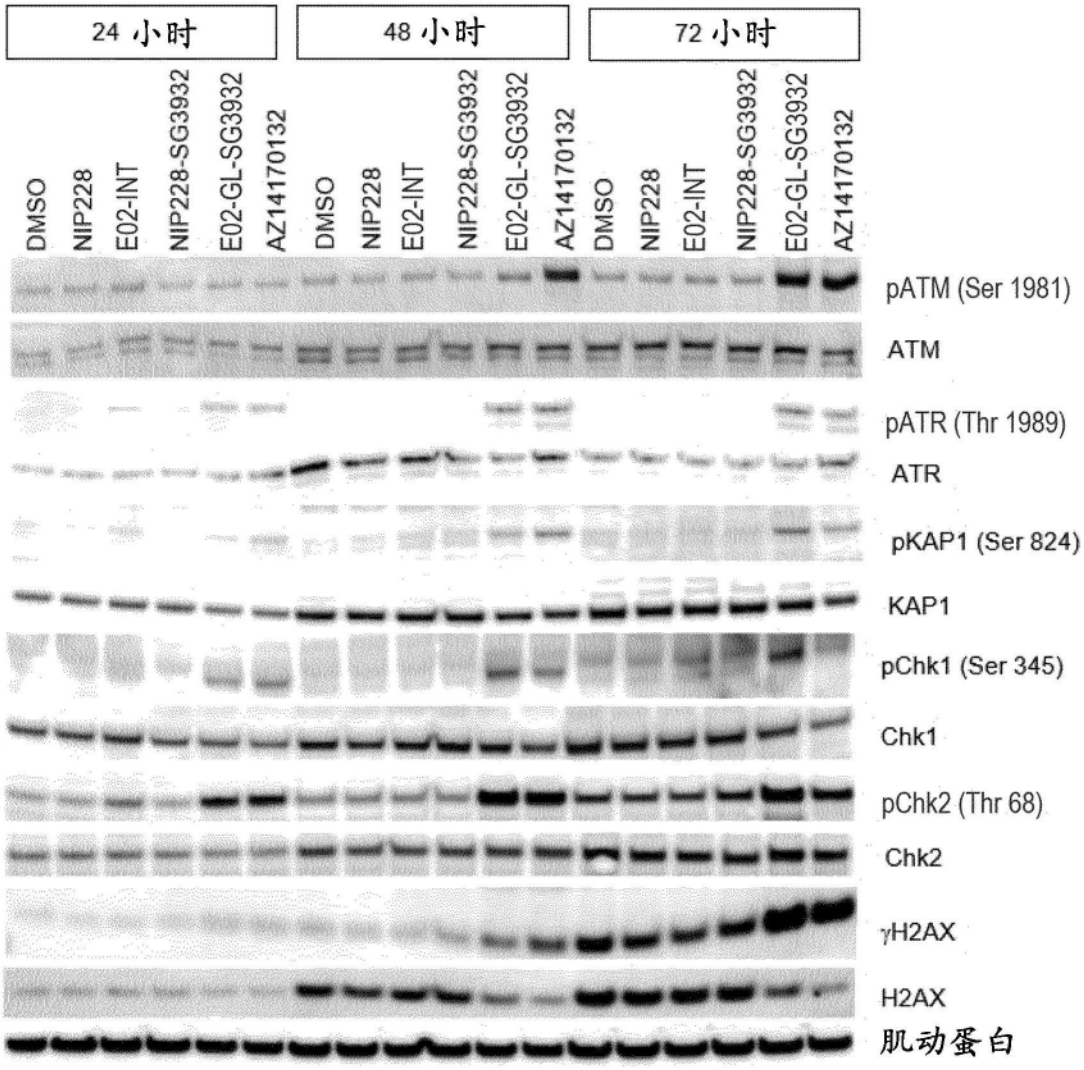

24 小时
48 小时
72 小时
DMSO
NIP228
E02-INT
NIP228-SG3932
E02-GL-SG3932
AZ14170132
pATM (Ser 1981)
ATM
pATR (Thr 1989)
ATR
pKAP1 (Ser 824)
KAP1
pChk1 (Ser 345)
Chk1
pChk2 (Thr 68)
Chk2
γH2AX
H2AX
肌动蛋白

图42

图 43A 图 43B 图 43C

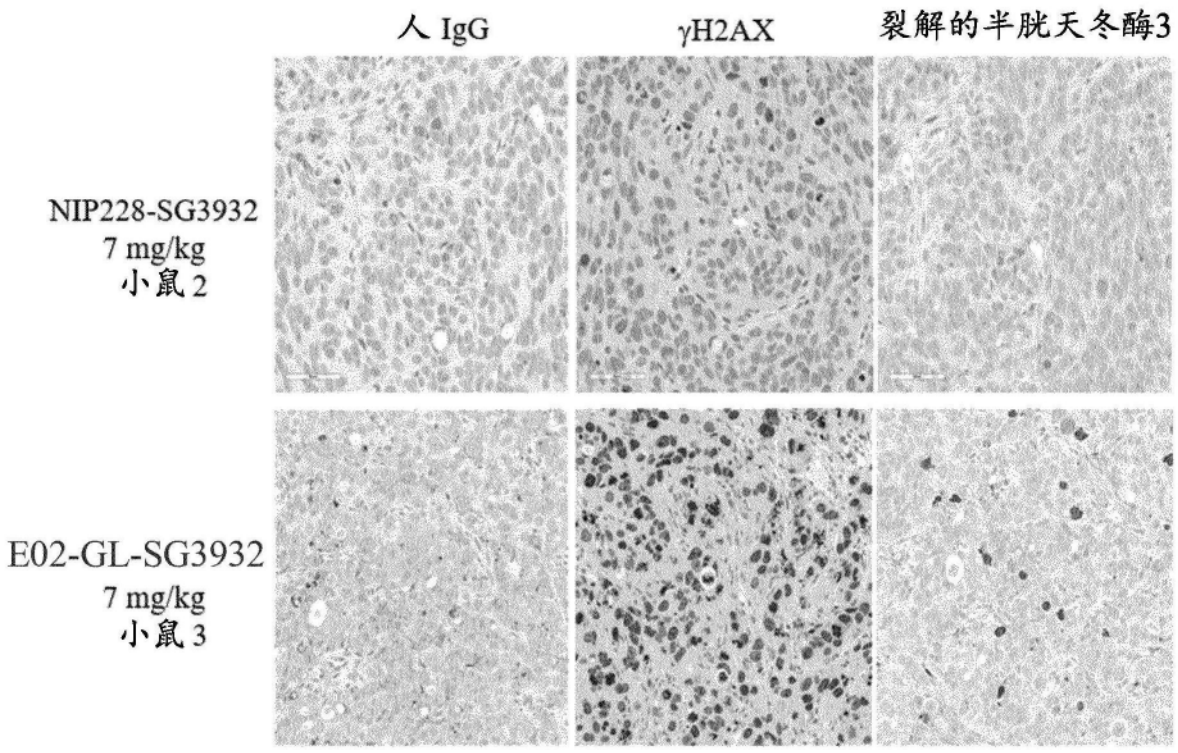


图 43D 图 43E 图 43F

图 44A

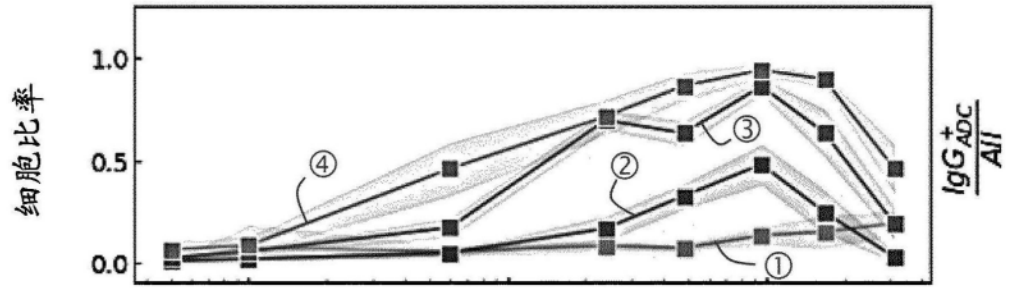


图 44B

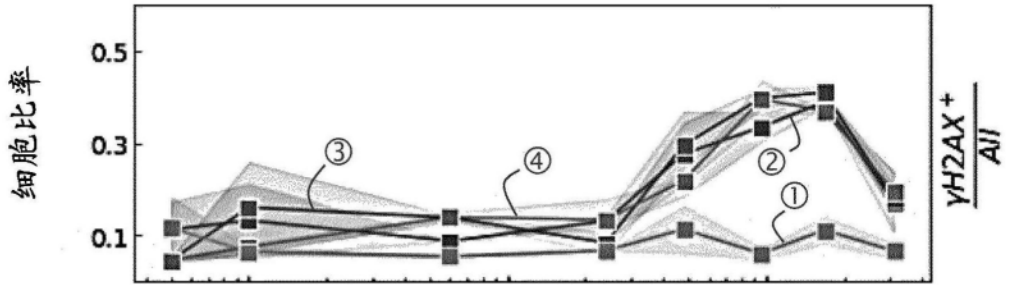


图 44C

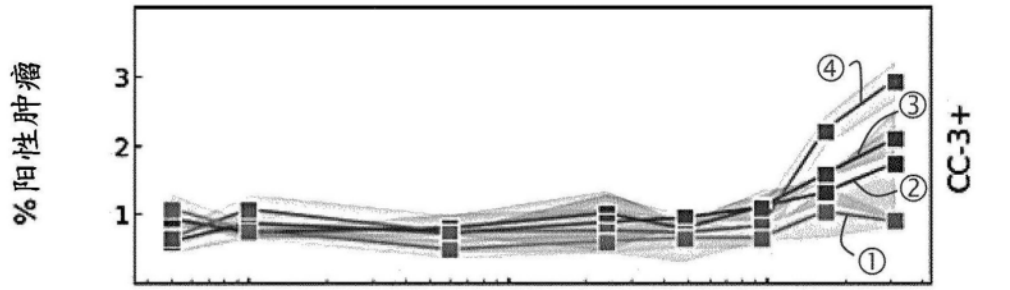
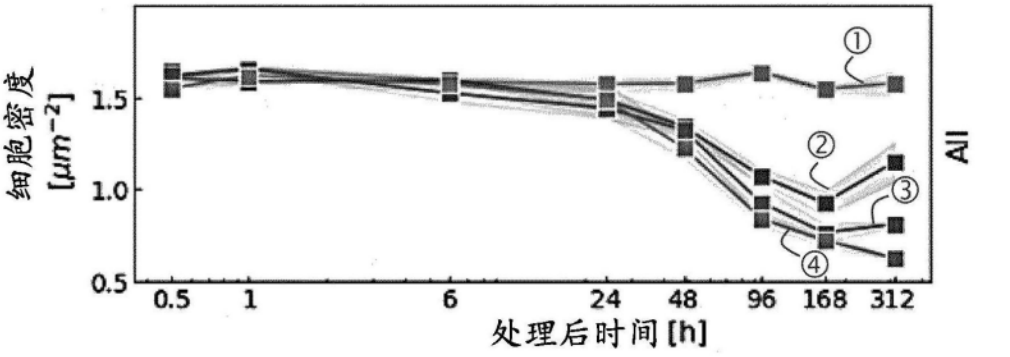


图 44D



① NIP228-SG3932 7mg/kg
② E02-GL-SG3932 1.25mg/kg
③ E02-GL-SG3932 3.5mg/kg
④ E02-GL-SG3932 7mg/kg

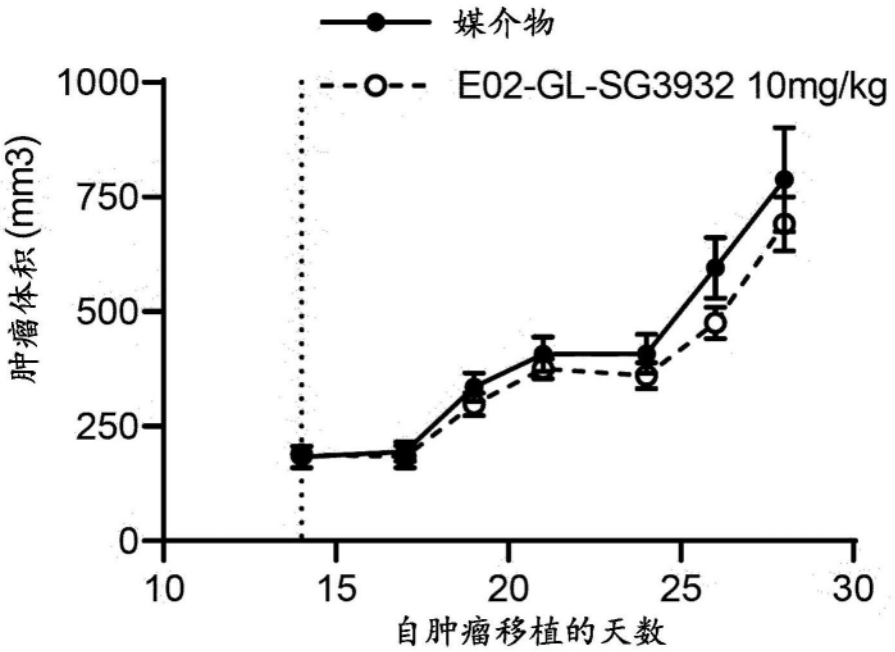

媒介物
E02-GL-SG3932 10mg/kg
肿瘤体积(mm3)
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
自肿瘤移植的天数

图45A

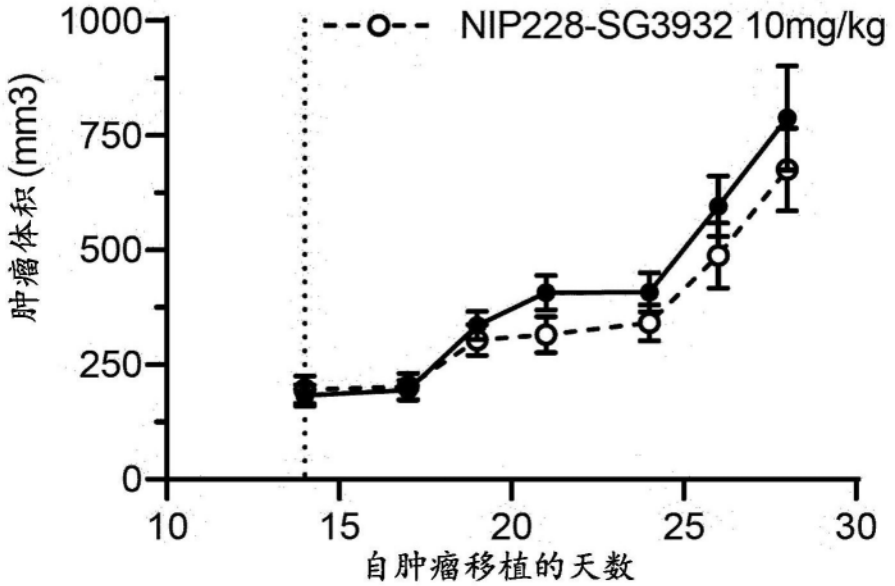

NIP228-SG3932 10mg/kg
肿瘤体积(mm3)
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
自肿瘤移植的天数

图45B

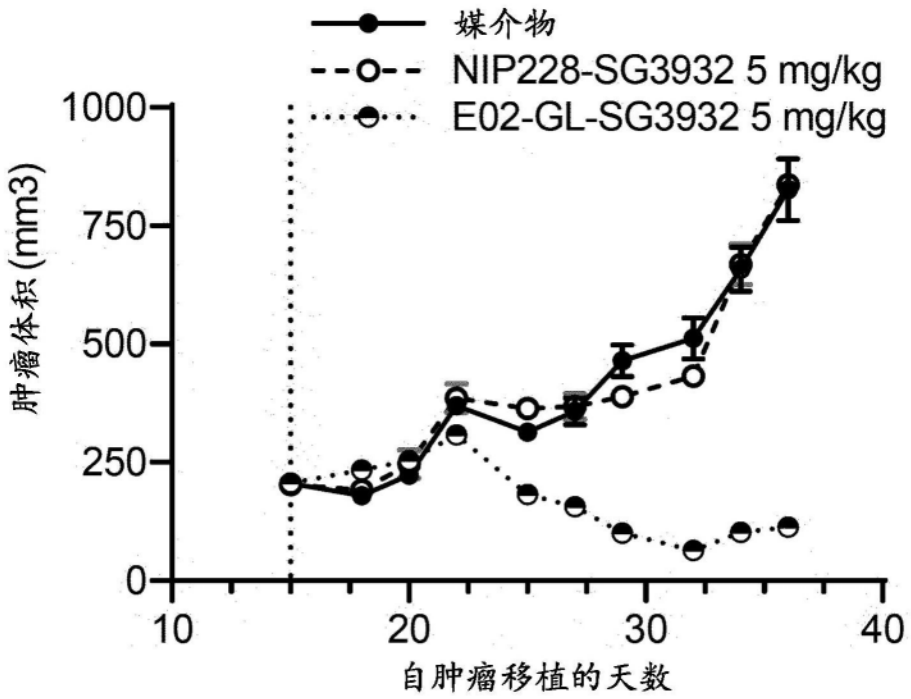

媒介物
NIP228-SG3932 5 mg/kg
E02-GL-SG3932 5 mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
自肿瘤移植的天数

图46A

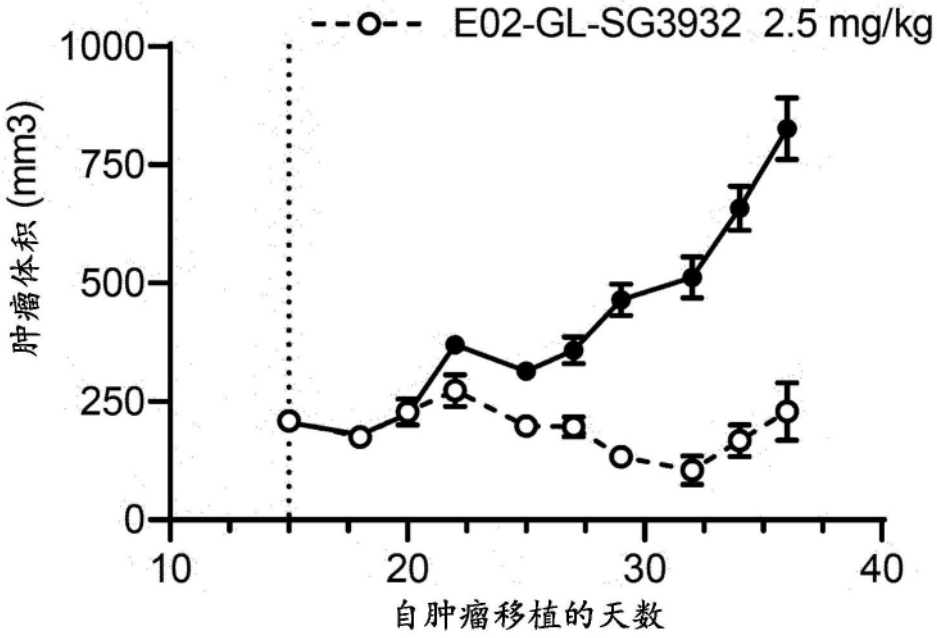

E02-GL-SG3932 2.5 mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
自肿瘤移植的天数

图46B

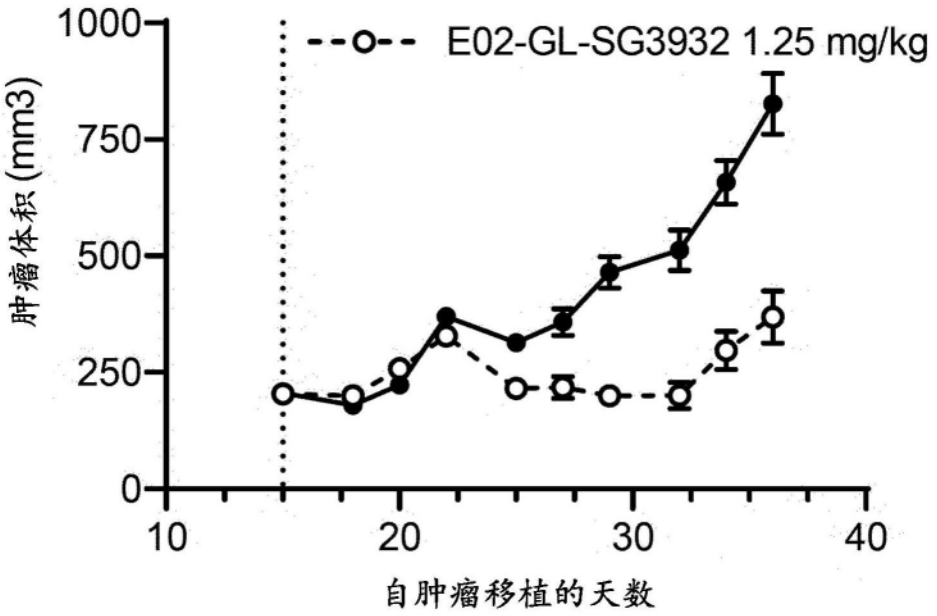

E02-GL-SG3932 1.25 mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
自肿瘤移植的天数

图46C

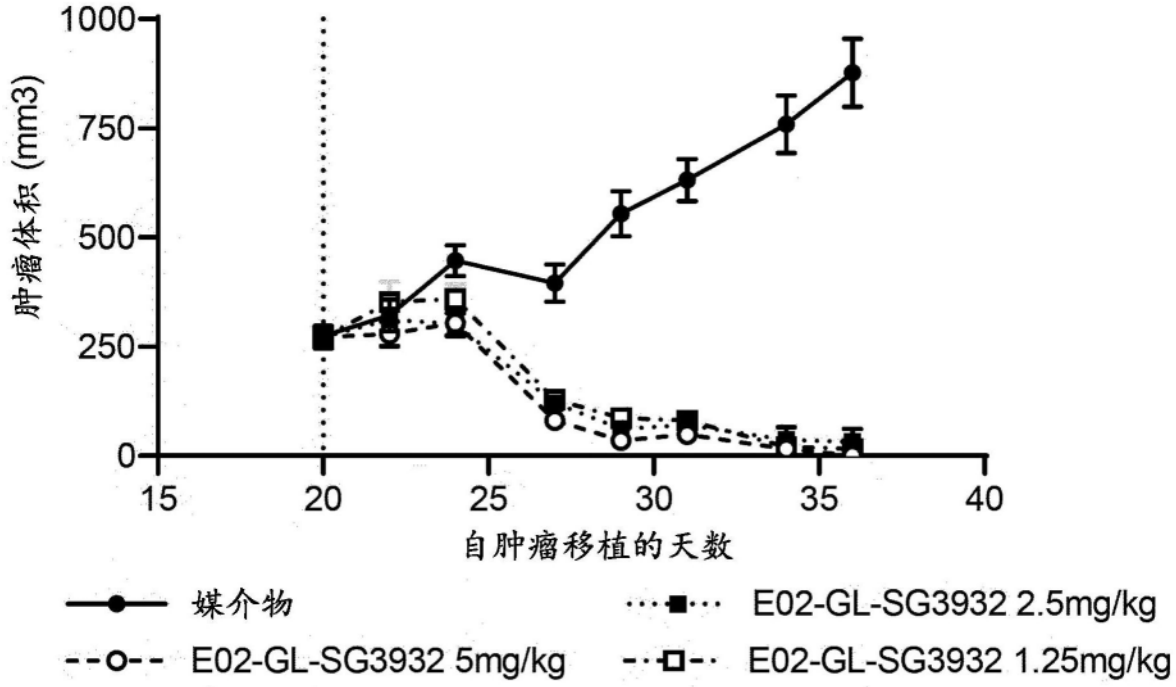

肿瘤体积 (mm3)
1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
40
自肿瘤移植的天数
媒介物
E02-GL-SG3932 2.5mg/kg
E02-GL-SG3932 5mg/kg
E02-GL-SG3932 1.25mg/kg

图47A

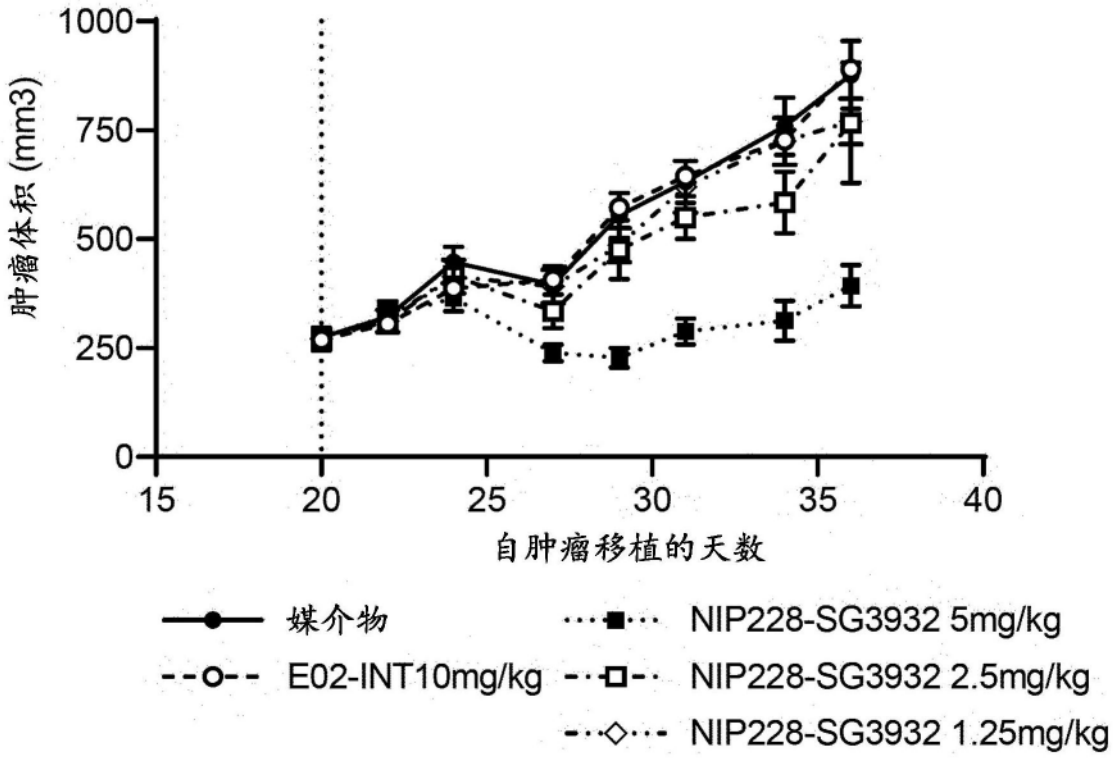

1000
750
500
250
0
肿瘤体积 (mm3)
15
20
25
30
35
40
自肿瘤移植的天数
媒介物
E02-INT10mg/kg
NIP228-SG3932 5mg/kg
NIP228-SG3932 2.5mg/kg
NIP228-SG3932 1.25mg/kg

图47B

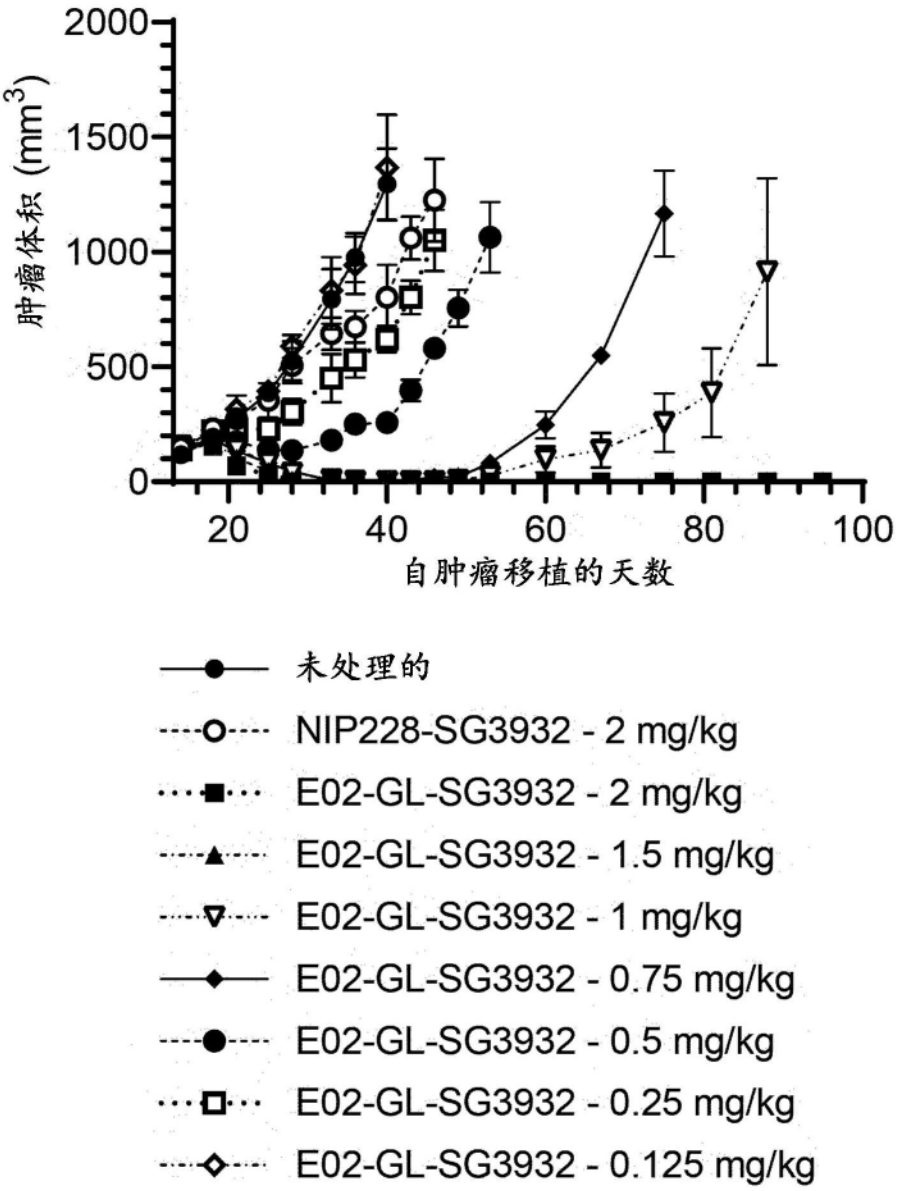

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
20
40
60
80
100
自肿瘤移植的天数
未处理的
NIP228-SG3932 - 2 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 2 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 1.5 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 1 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.75 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.5 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.25 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.125 mg/kg

图48

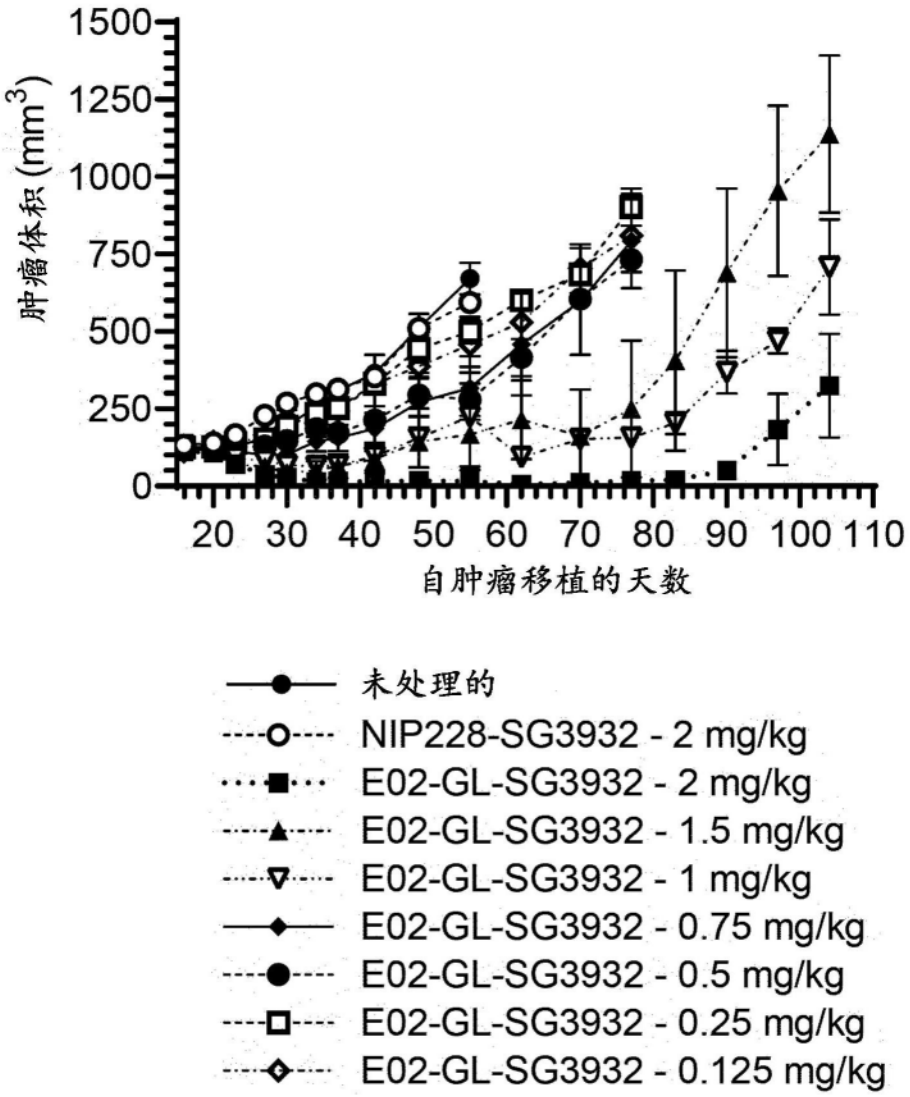

肿瘤体积 (mm^3)
1500
1250
1000
750
500
250
0
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
自肿瘤移植的天数
未处理的
NIP228-SG3932 - 2 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 2 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 1.5 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 1 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.75 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.5 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.25 mg/kg
E02-GL-SG3932 - 0.125 mg/kg

图49

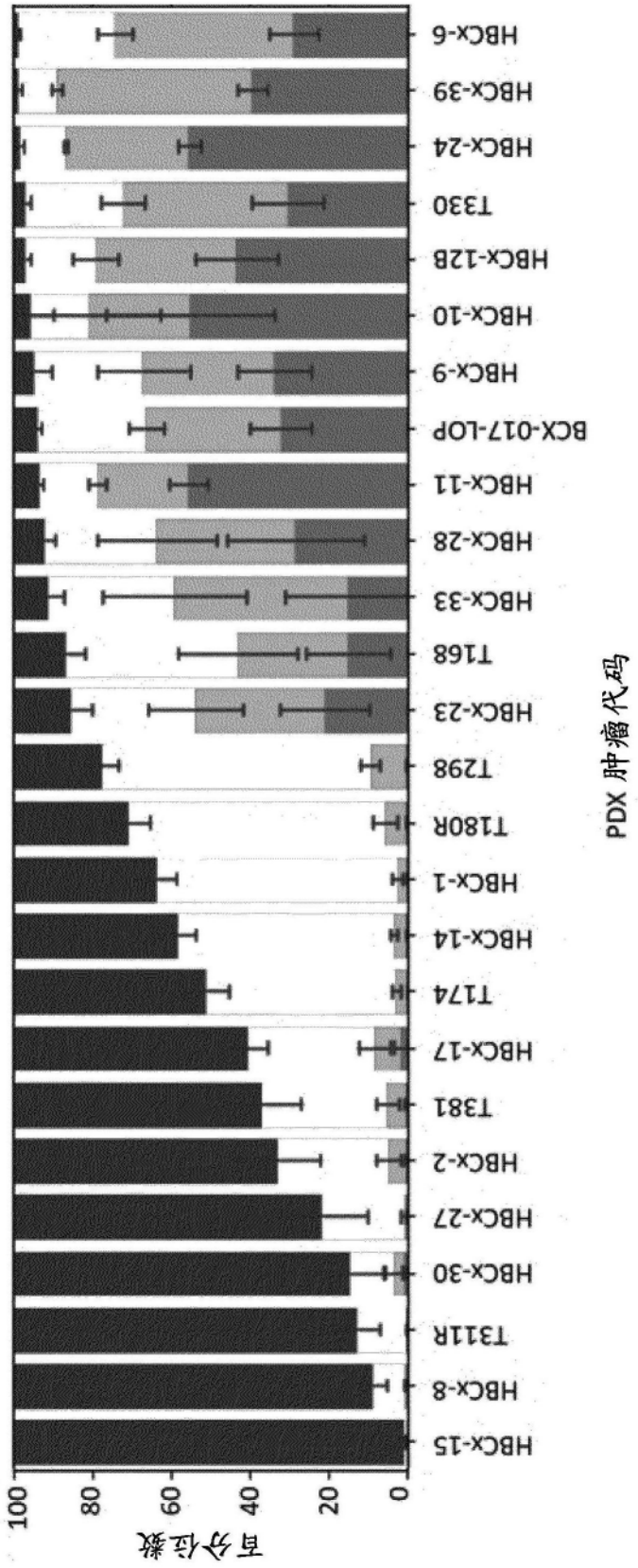

HBCx-15
HBCx-8
T311R
HBCx-30
HBCx-27
HBCx-2
T381
HBCx-17
T174
HBCx-14
HBCx-1
T180R
T298
HBCx-23
T168
HBCx-33
HBCx-28
HBCx-11
BCX-017-LOP
HBCx-9
HBCx-10
HBCx-12B
T330
HBCx-24
HBCx-39
HBCx-6
PDX 肿瘤代码
0
20
40
60
80
100
百分位数

图50

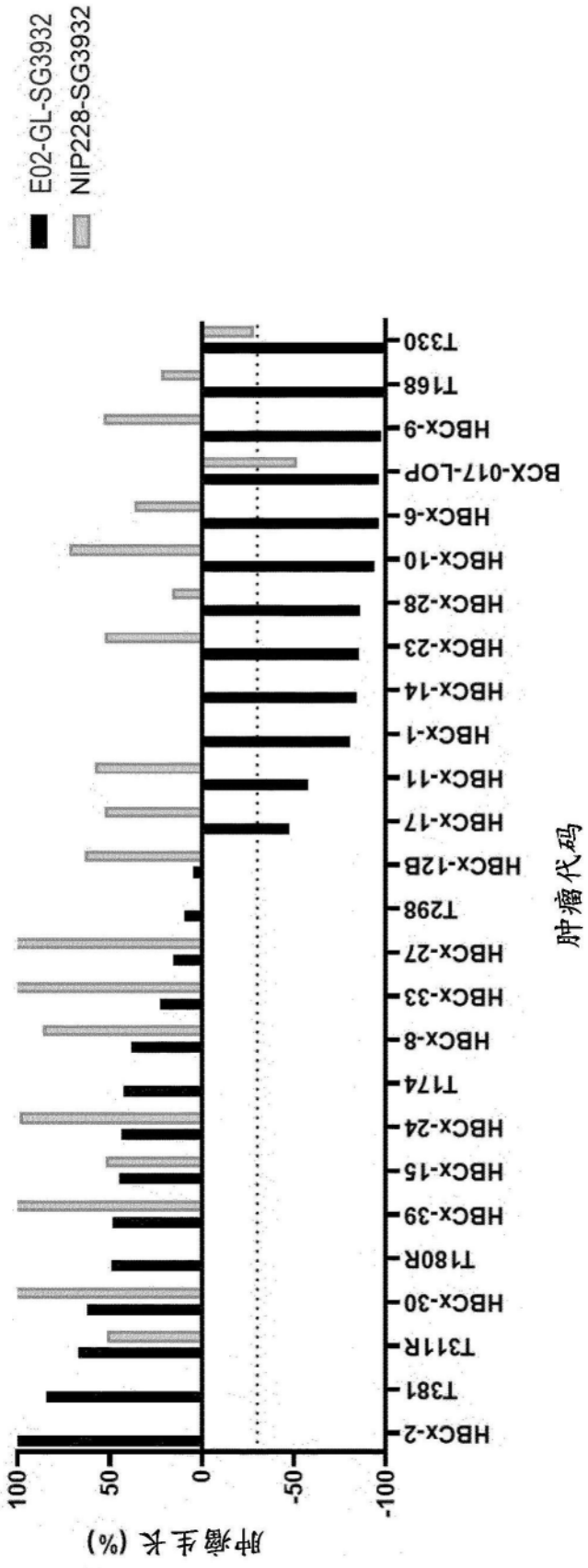

E02-GL-SG3932
NIP228-SG3932
肿瘤生长 (%)
100
50
0
-50
-100
肿瘤代码
HBCx-2
T381
T311R
HBCx-30
T180R
HBCx-39
HBCx-15
HBCx-24
T174
HBCx-8
HBCx-33
HBCx-27
T298
HBCx-12B
HBCx-17
HBCx-11
HBCx-1
HBCx-14
HBCx-23
HBCx-28
HBCx-10
HBCx-6
BCX-017-LOP
HBCx-9
T168
T330

图51

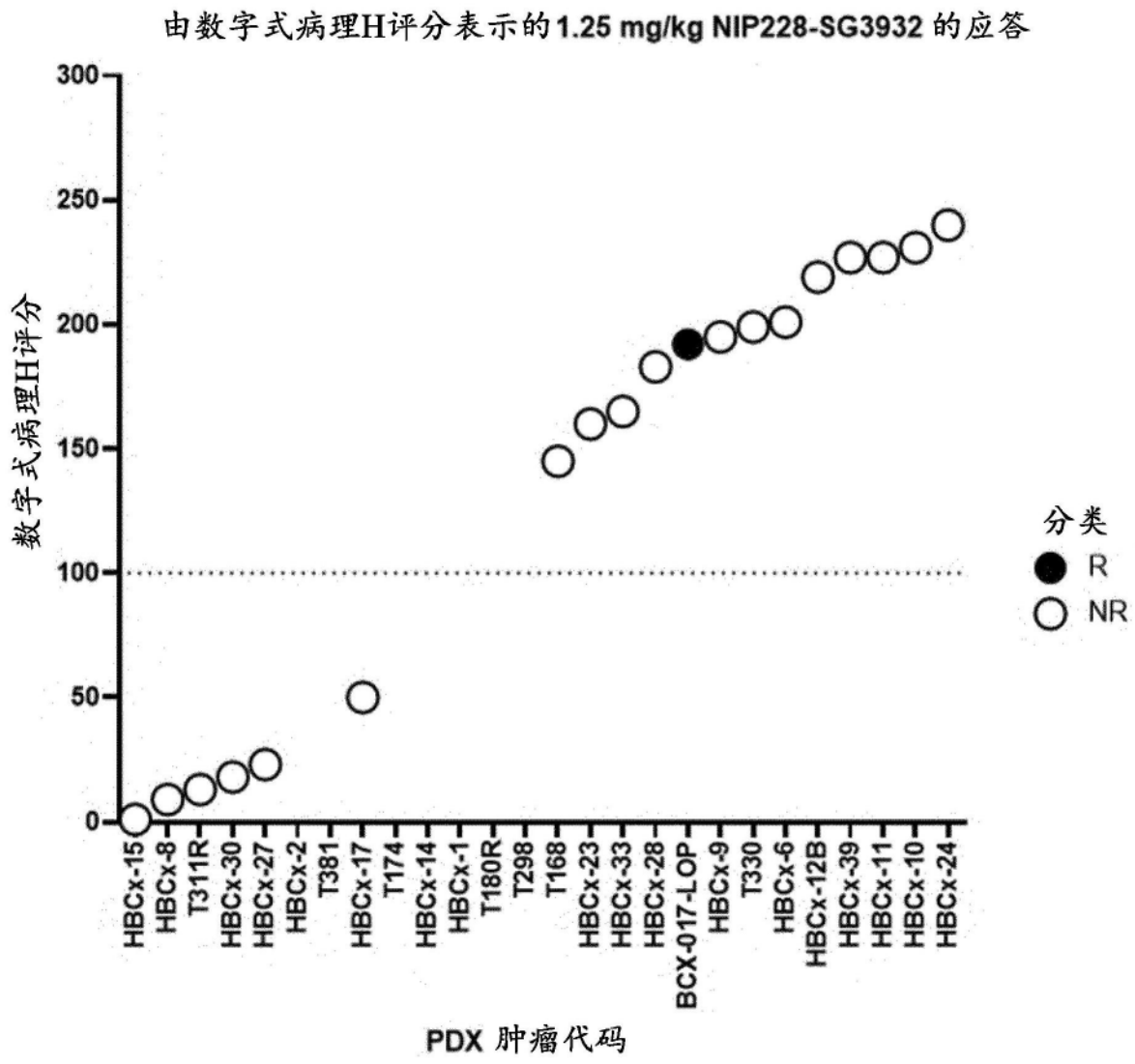

由数字式病理H评分表示的1.25 mg/kg NIP228-SG3932 的应答
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
HBCx-15
HBCx-8
T311R
HBCx-30
HBCx-27
HBCx-2
T381
HBCx-17
T174
HBCx-14
HBCx-1
T180R
T298
T168
HBCx-23
HBCx-33
HBCx-28
BCX-017-LOP
HBCx-9
T330
HBCx-6
HBCx-12B
HBCx-39
HBCx-11
HBCx-10
HBCx-24
PDX 肿瘤代码
分类
R
NR

图52A

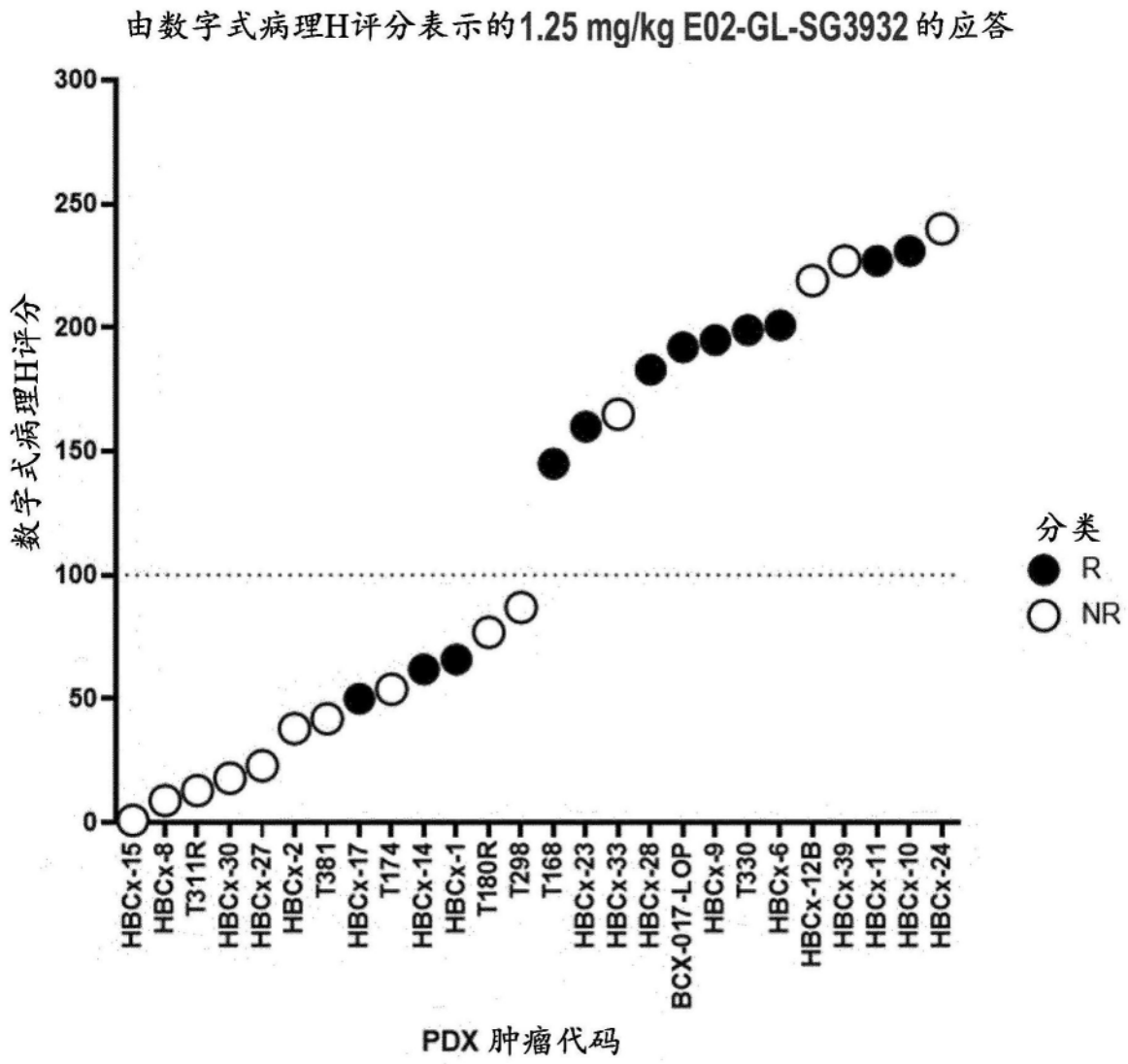

由数字式病理H评分表示的1.25 mg/kg E02-GL-SG3932 的应答
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
HBCx-15
HBCx-8
T311R
HBCx-30
HBCx-27
HBCx-2
T381
HBCx-17
T174
HBCx-14
HBCx-1
T180R
T298
T168
HBCx-23
HBCx-33
HBCx-28
BCX-017-LOP
HBCx-9
T330
HBCx-6
HBCx-12B
HBCx-39
HBCx-11
HBCx-10
HBCx-24
PDX 肿瘤代码
分类
R
NR

图52B

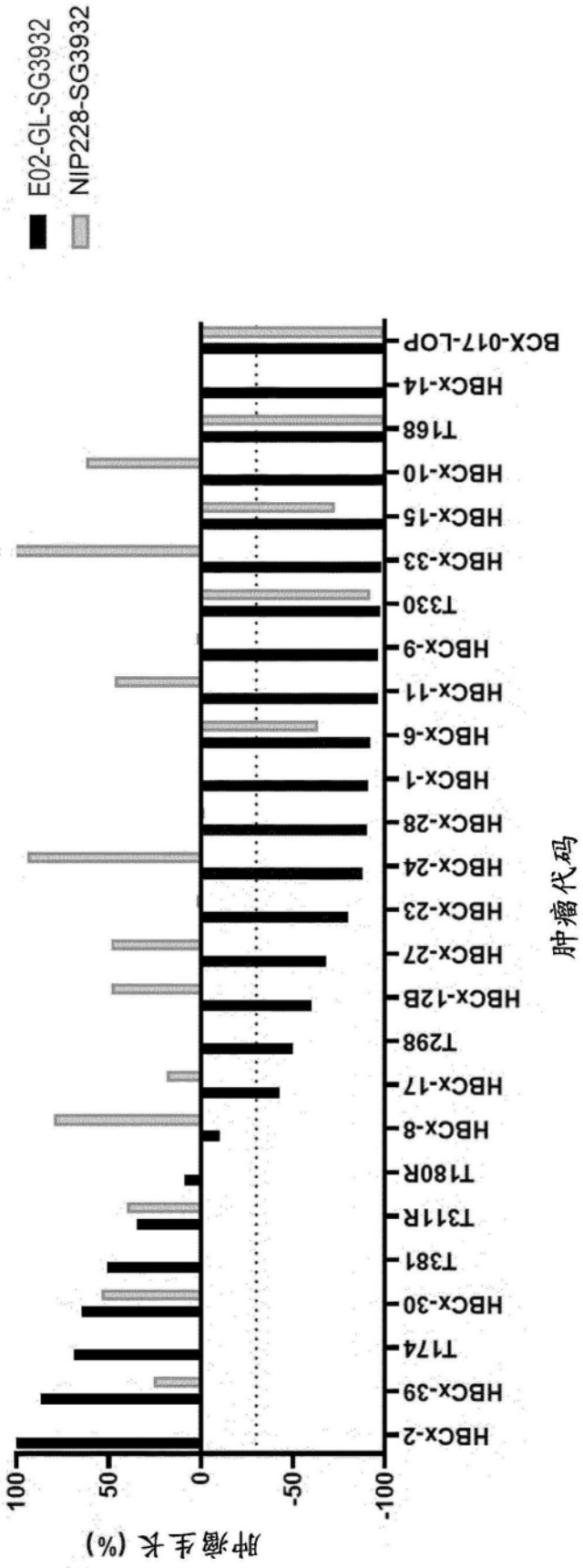

E02-GL-SG3932
NIP228-SG3932
肿瘤生长 (%)
100
50
0
-50
-100
肿瘤代码
HBCx-2
HBCx-39
T174
HBCx-30
T381
T311R
T180R
HBCx-8
HBCx-17
T298
HBCx-12B
HBCx-27
HBCx-23
HBCx-24
HBCx-28
HBCx-1
HBCx-6
HBCx-11
HBCx-9
T330
HBCx-33
HBCx-15
HBCx-10
T168
HBCx-14
BCX-017-LOP

图53A

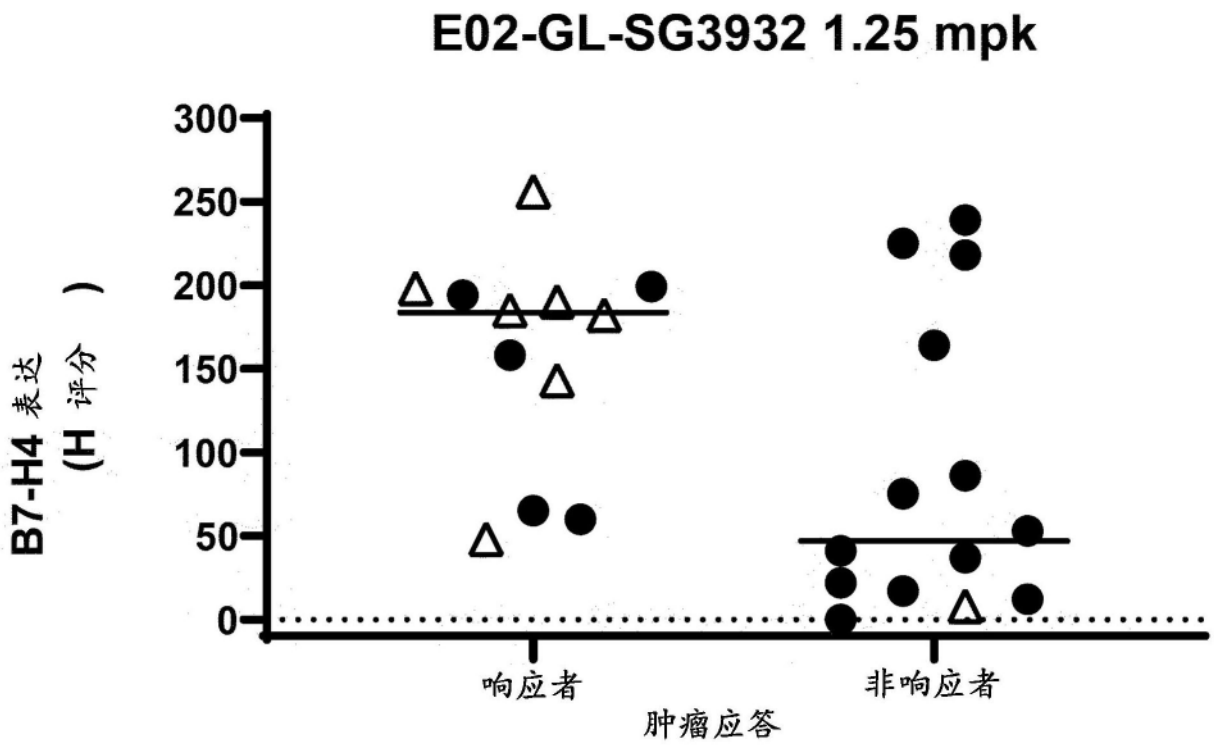

E02-GL-SG3932 1.25 mpk
B7-H4 表达 (H 评分)
300
250
200
150
100
50
0
响应者
非响应者
肿瘤应答

图53B

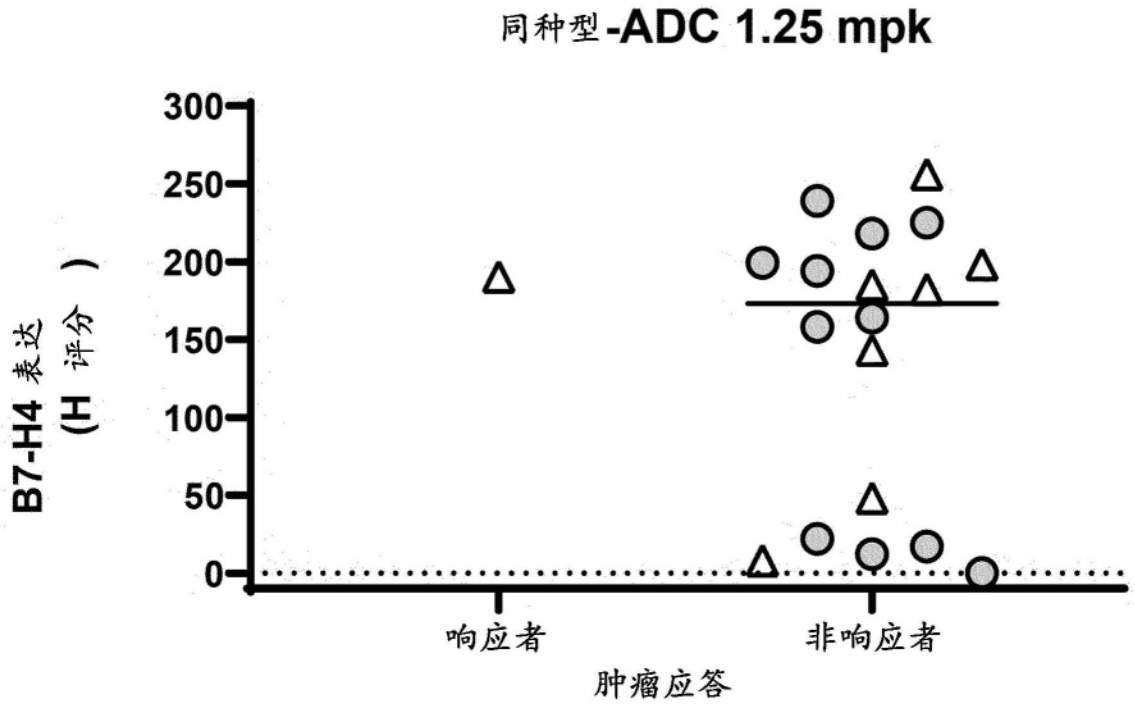

同种型-ADC 1.25 mpk
B7-H4 表达 (H 评分)
300
250
200
150
100
50
0
响应者
非响应者
肿瘤应答

图53C

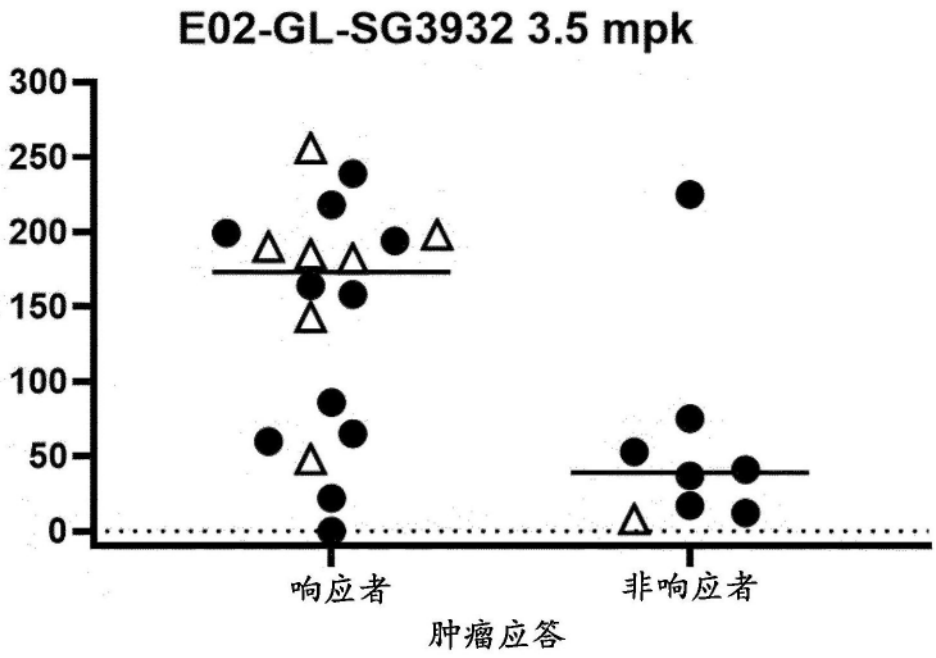

E02-GL-SG3932 3.5 mpk
300
250
200
150
100
50
0
响应者
非响应者
肿瘤应答

图53D

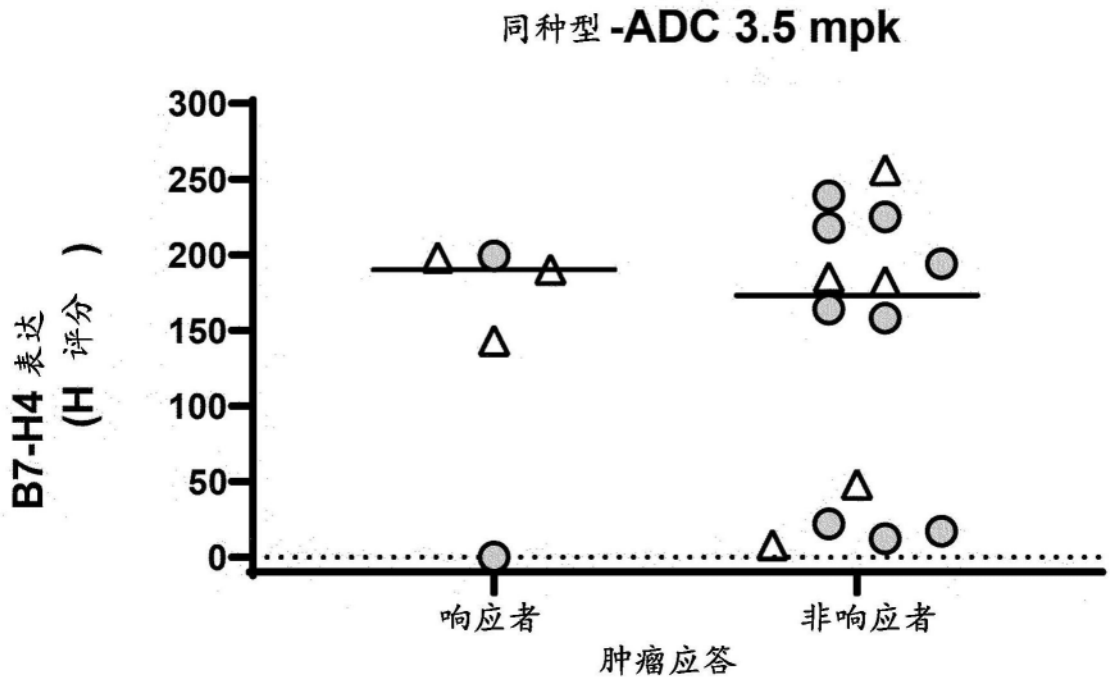

同种型-ADC 3.5 mpk
B7-H4 表达 (H 评分)
300
250
200
150
100
50
0
响应者
非响应者
肿瘤应答

图53E

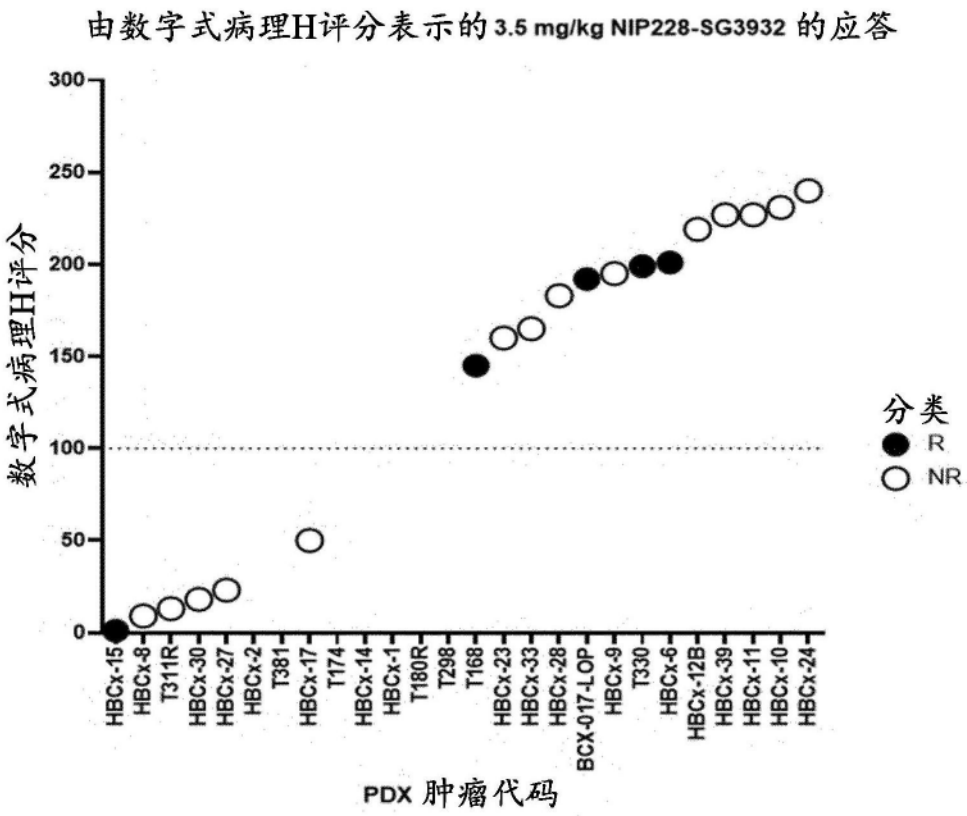

由数字式病理H评分表示的3.5 mg/kg NIP228-SG3932 的应答
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
HBCx-15
HBCx-8
T311R
HBCx-30
HBCx-27
HBCx-2
T381
HBCx-17
T174
HBCx-14
HBCx-1
T180R
T298
T168
HBCx-23
HBCx-33
HBCx-28
BCX-017-LOP
HBCx-9
T330
HBCx-6
HBCx-12B
HBCx-39
HBCx-11
HBCx-10
HBCx-24
PDX 肿瘤代码
分类
R
NR

图54A

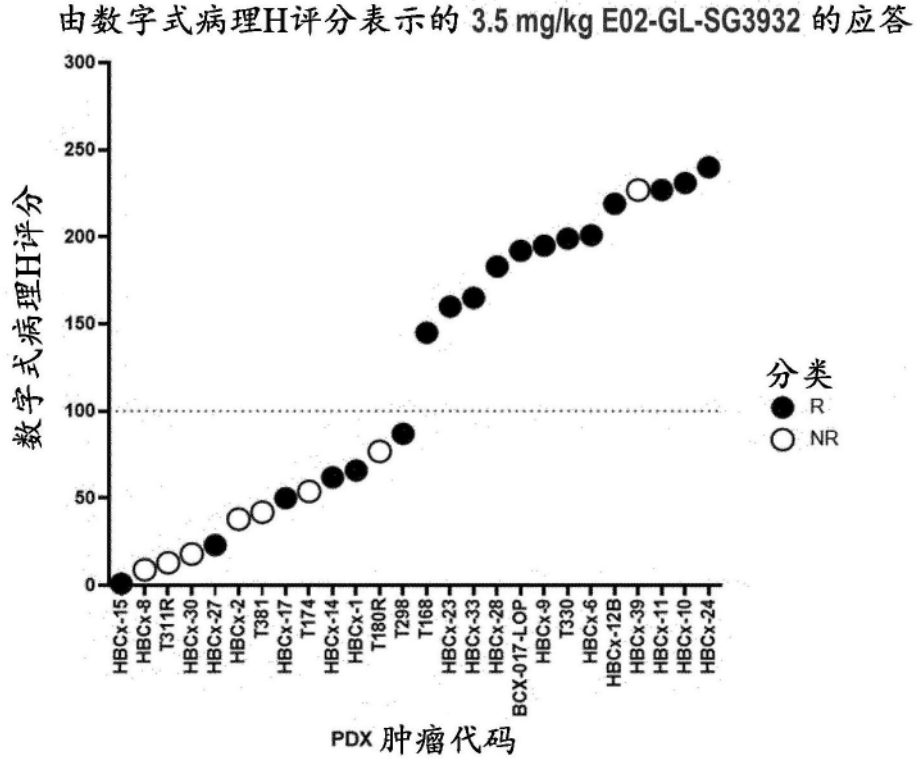

由数字式病理H评分表示的 3.5 mg/kg E02-GL-SG3932 的应答
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
HBCx-15
HBCx-8
T311R
HBCx-30
HBCx-27
HBCx-2
T381
HBCx-17
T174
HBCx-14
HBCx-1
T180R
T298
T168
HBCx-23
HBCx-33
HBCx-28
BCX-017-LOP
HBCx-9
T330
HBCx-6
HBCx-12B
HBCx-39
HBCx-11
HBCx-10
HBCx-24
PDX 肿瘤代码
分类
R
NR

图54B

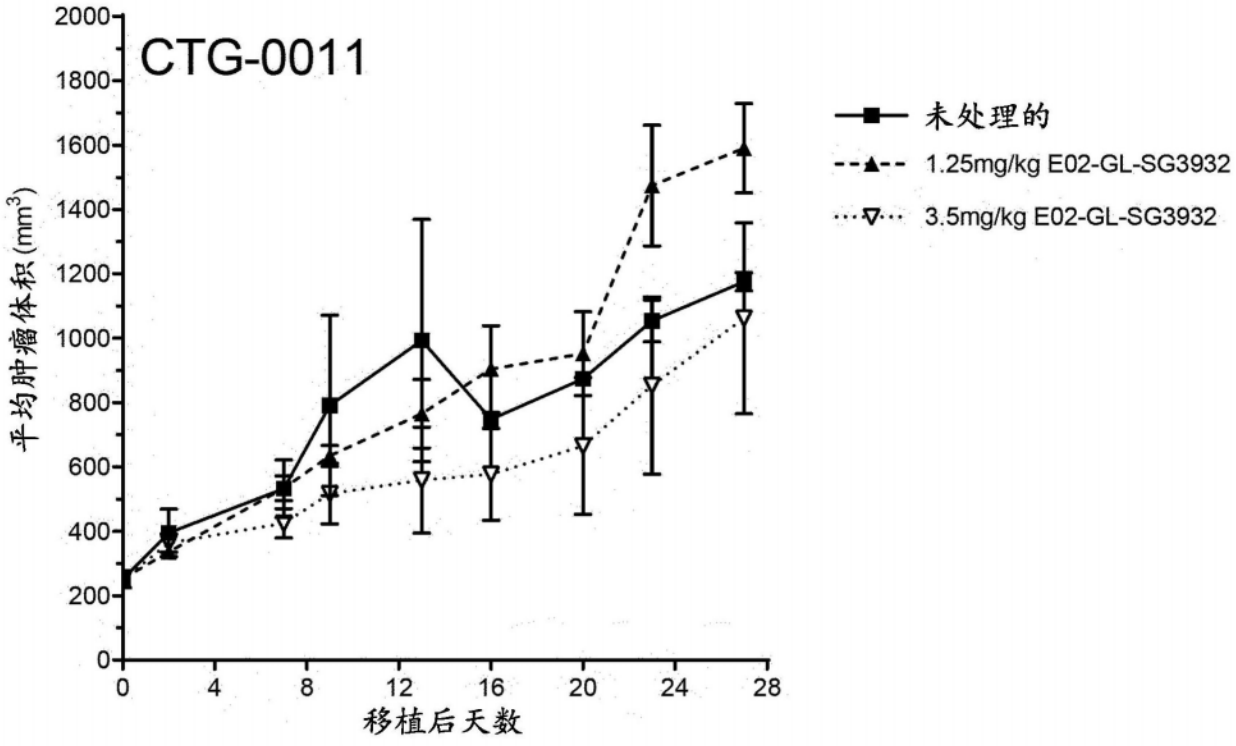

CTG-0011
平均肿瘤体积 (mm3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图55A

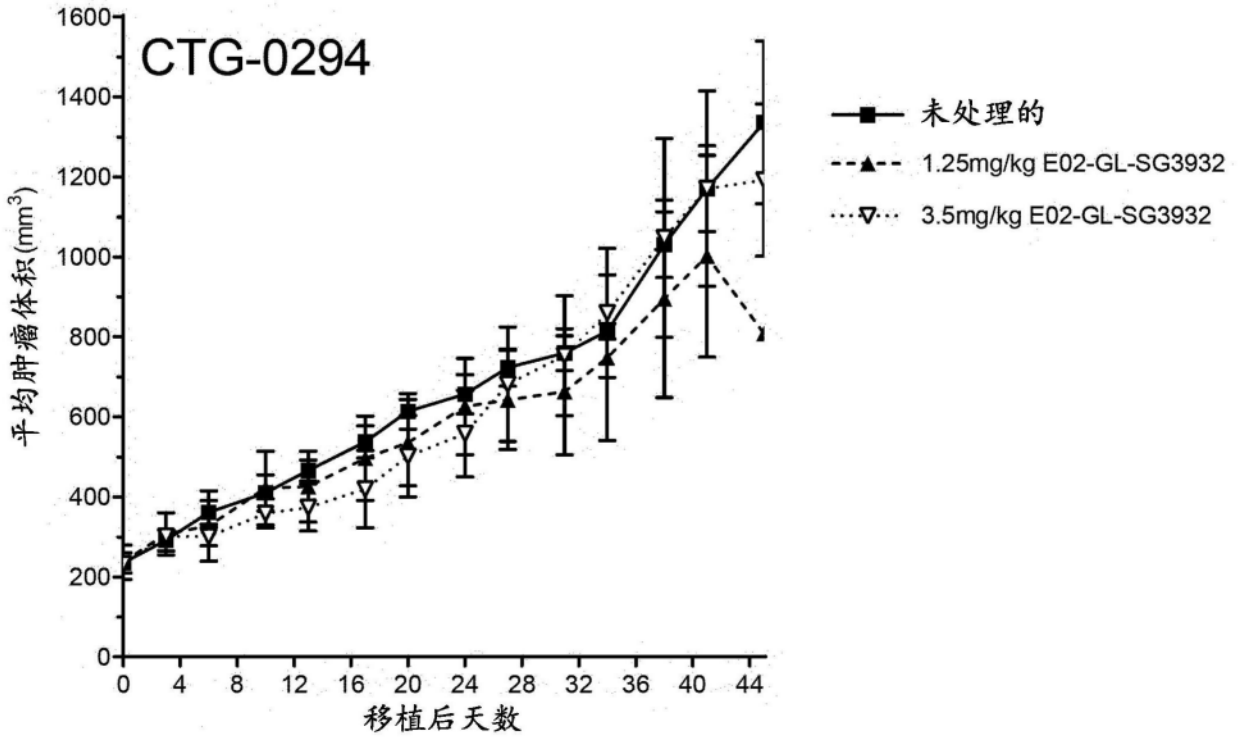

CTG-0294
平均肿瘤体积(mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图55B

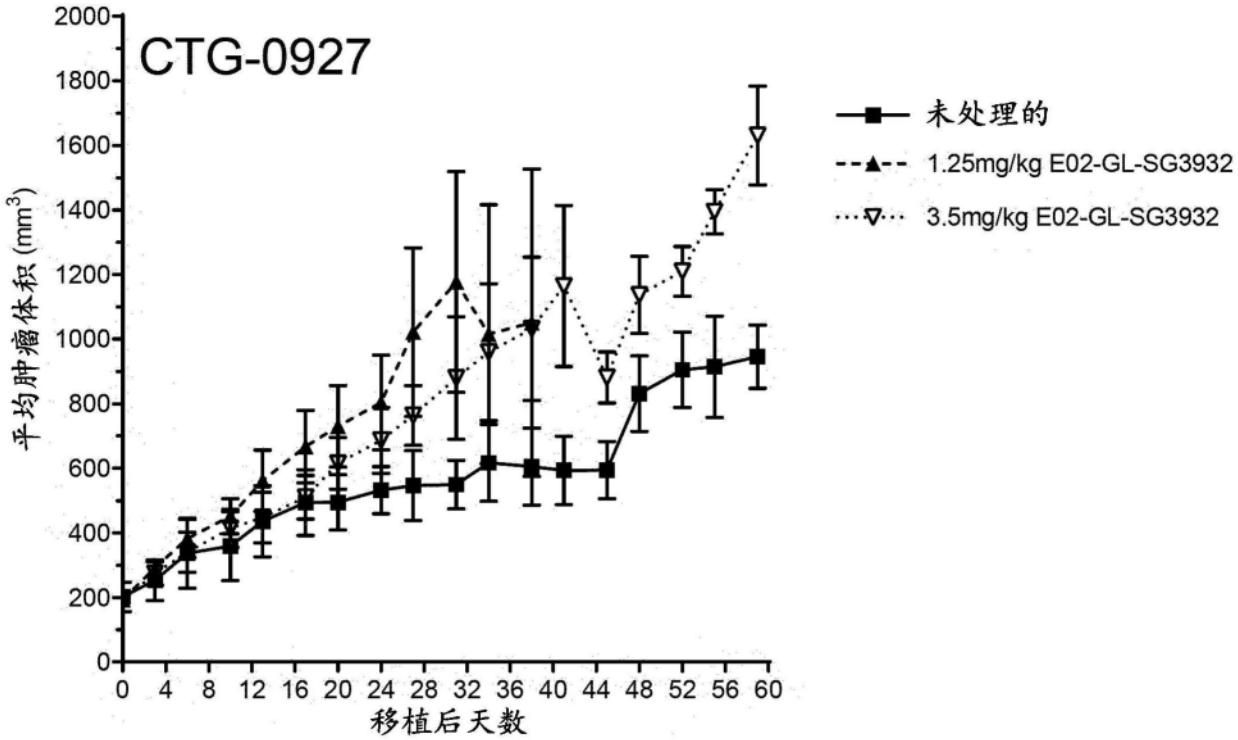

CTG-0927
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图55C

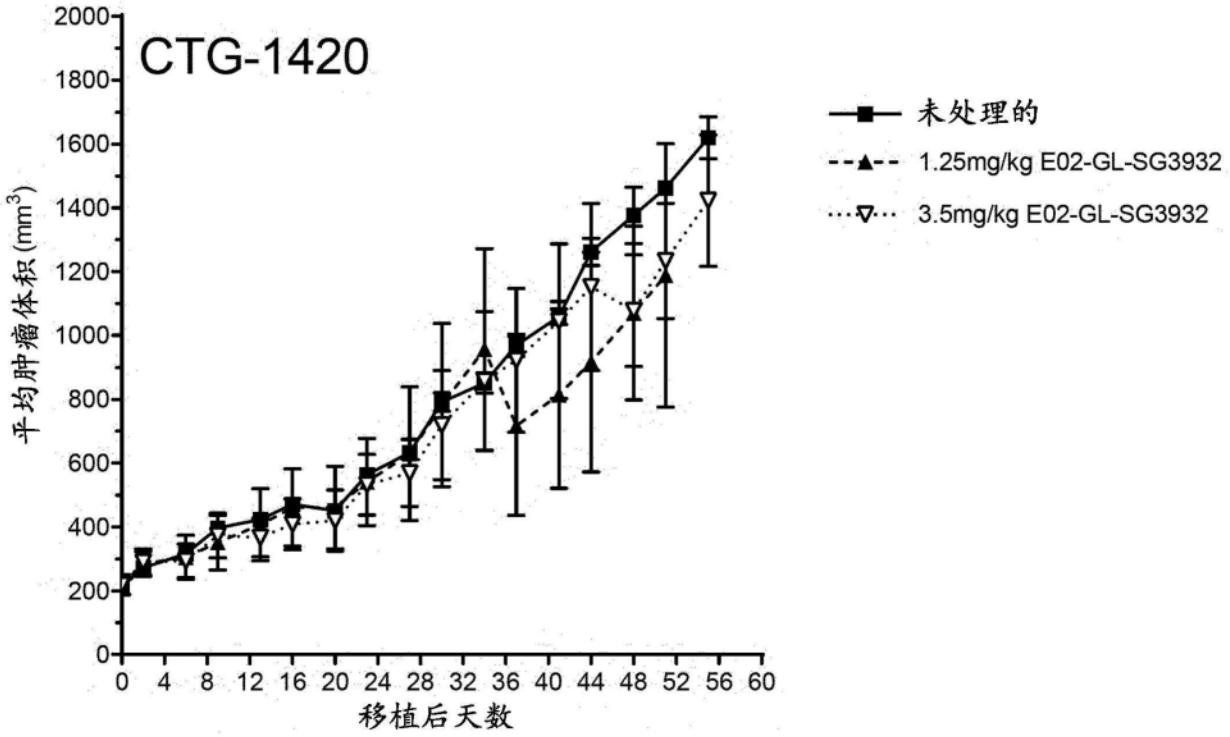

CTG-1420
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图55D

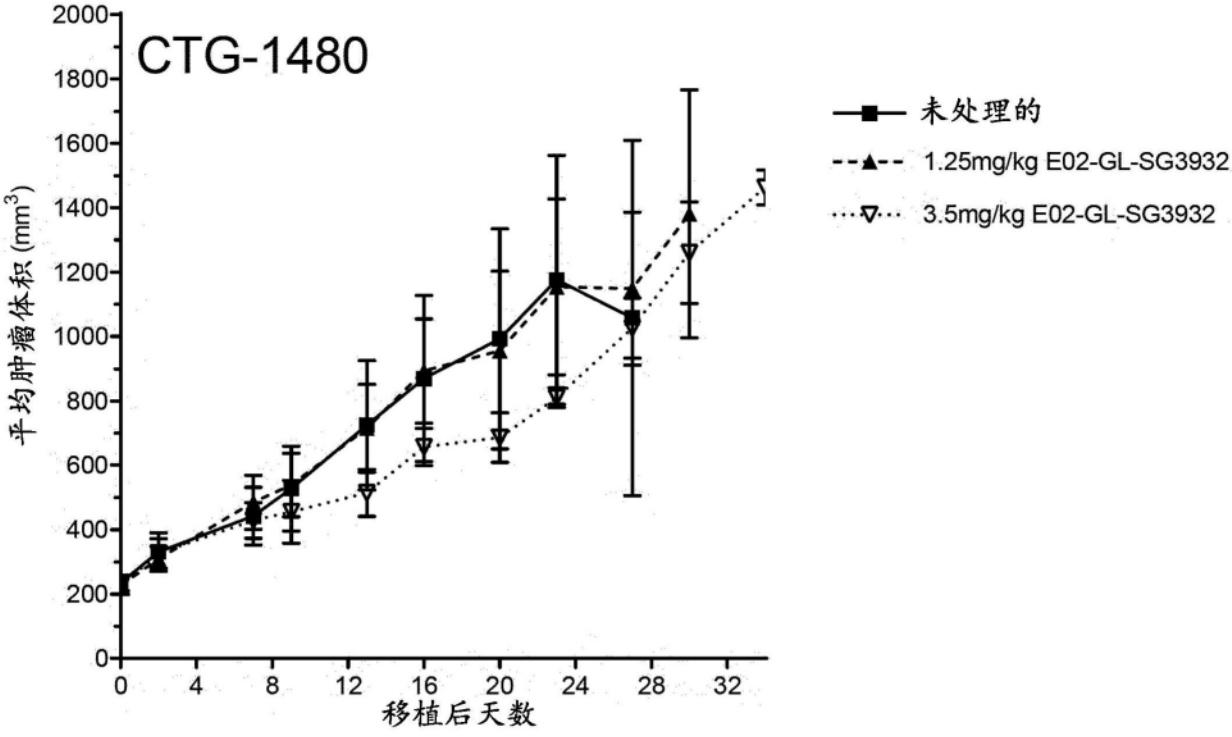

CTG-1480
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图55E

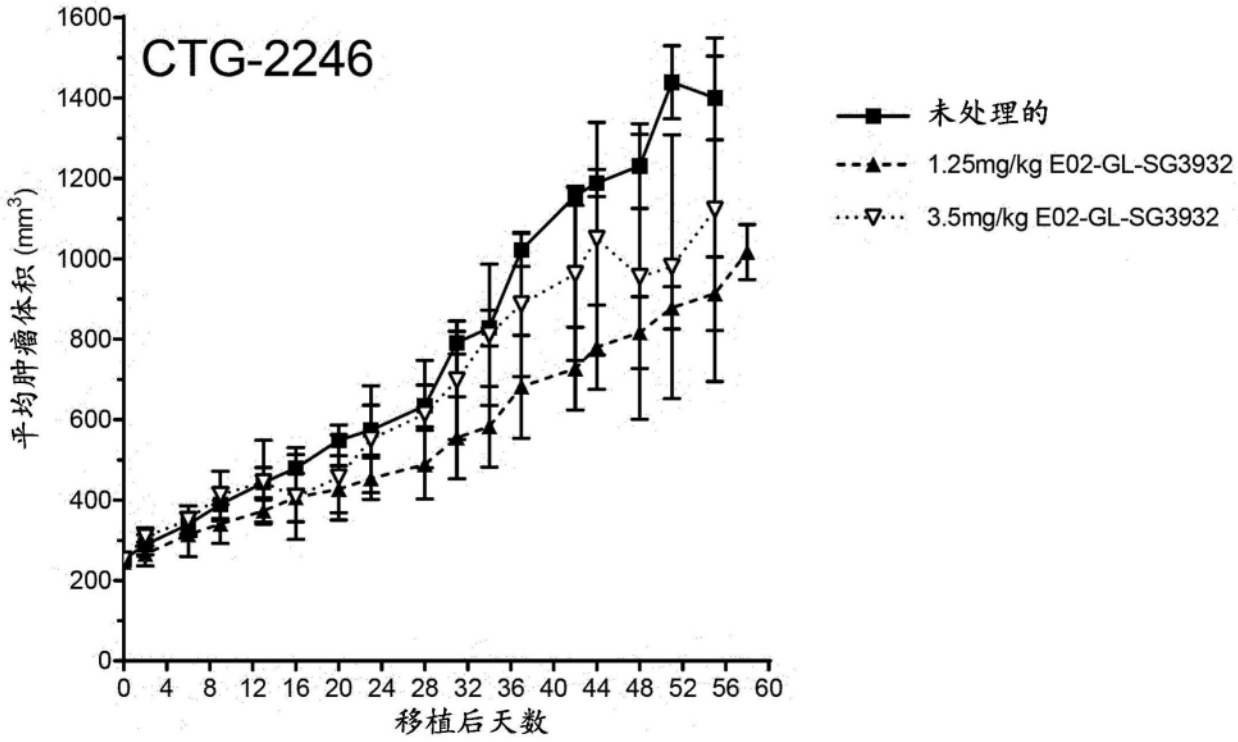

CTG-2246
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图55F

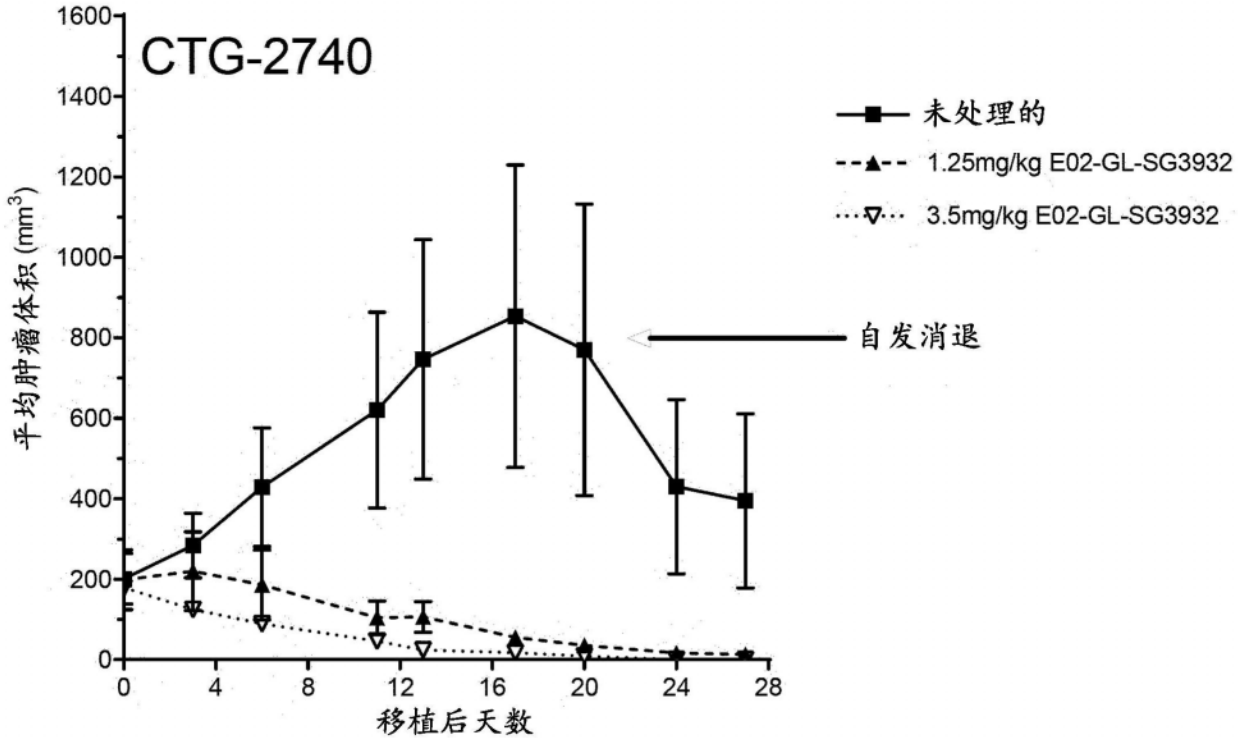

CTG-2740
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932
自发消退

图55G

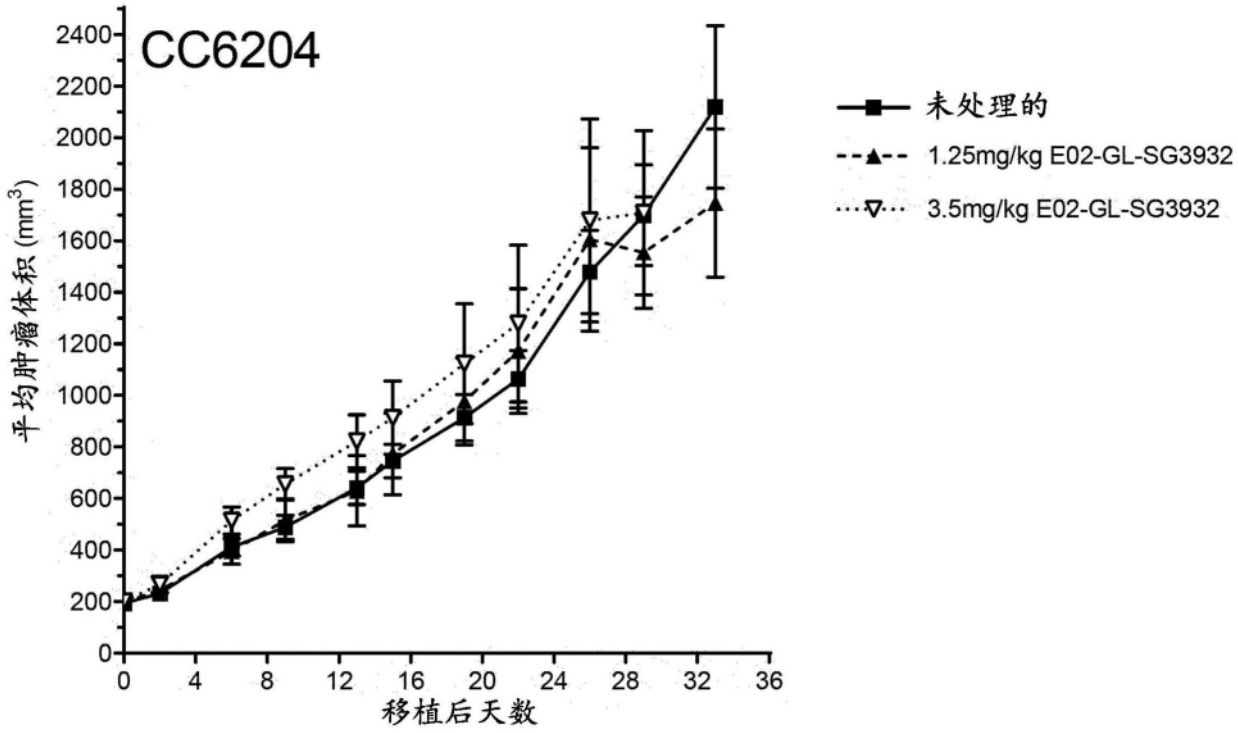

CC6204
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56A

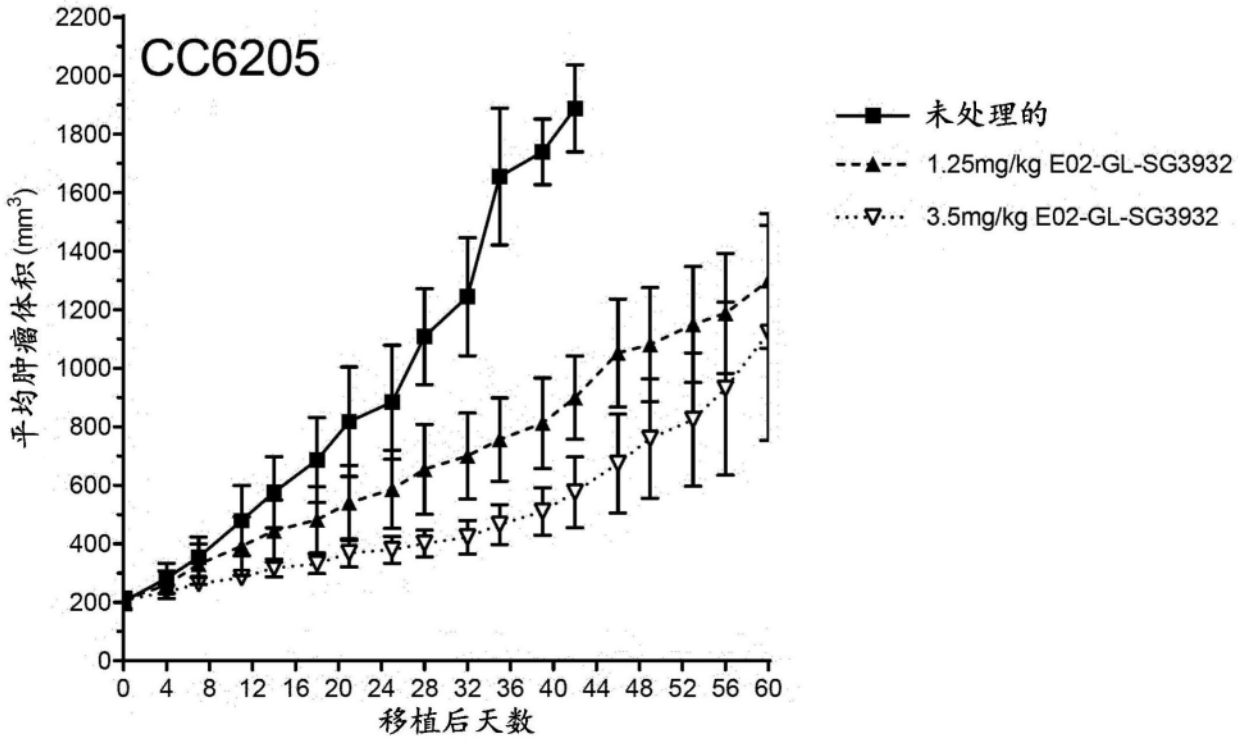

CC6205
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56B

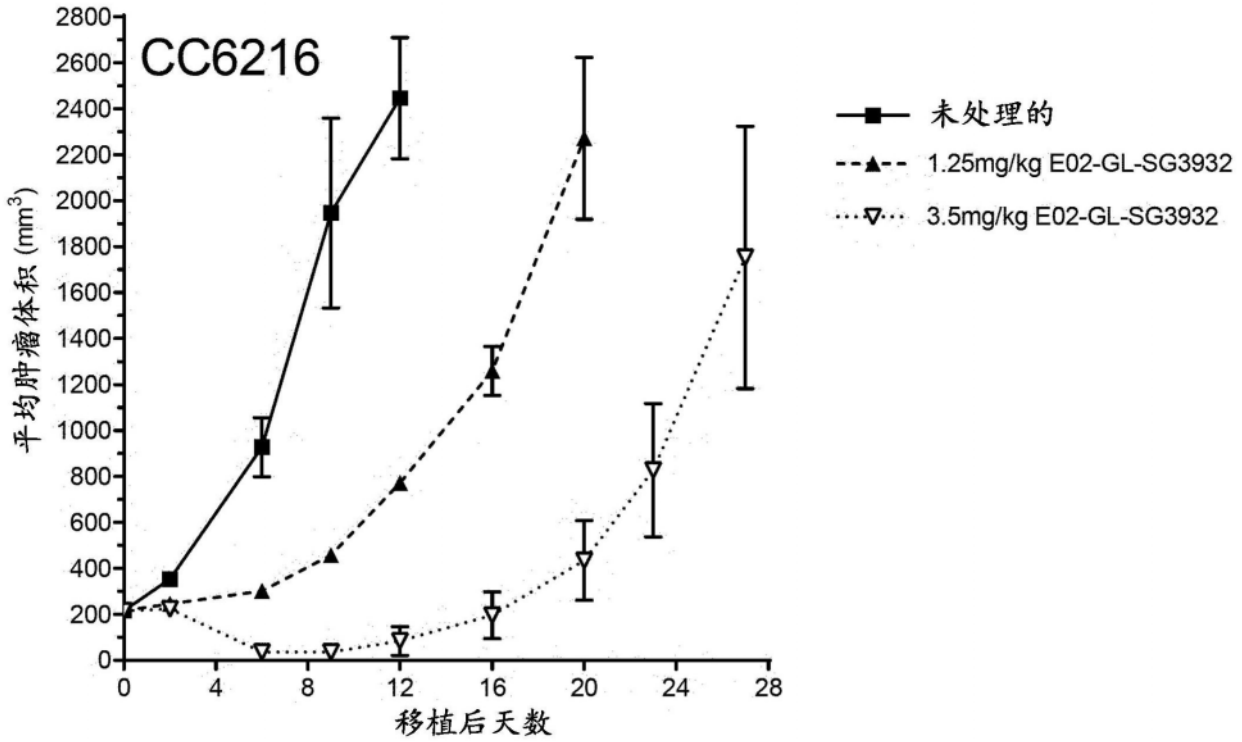

CC6216
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56C

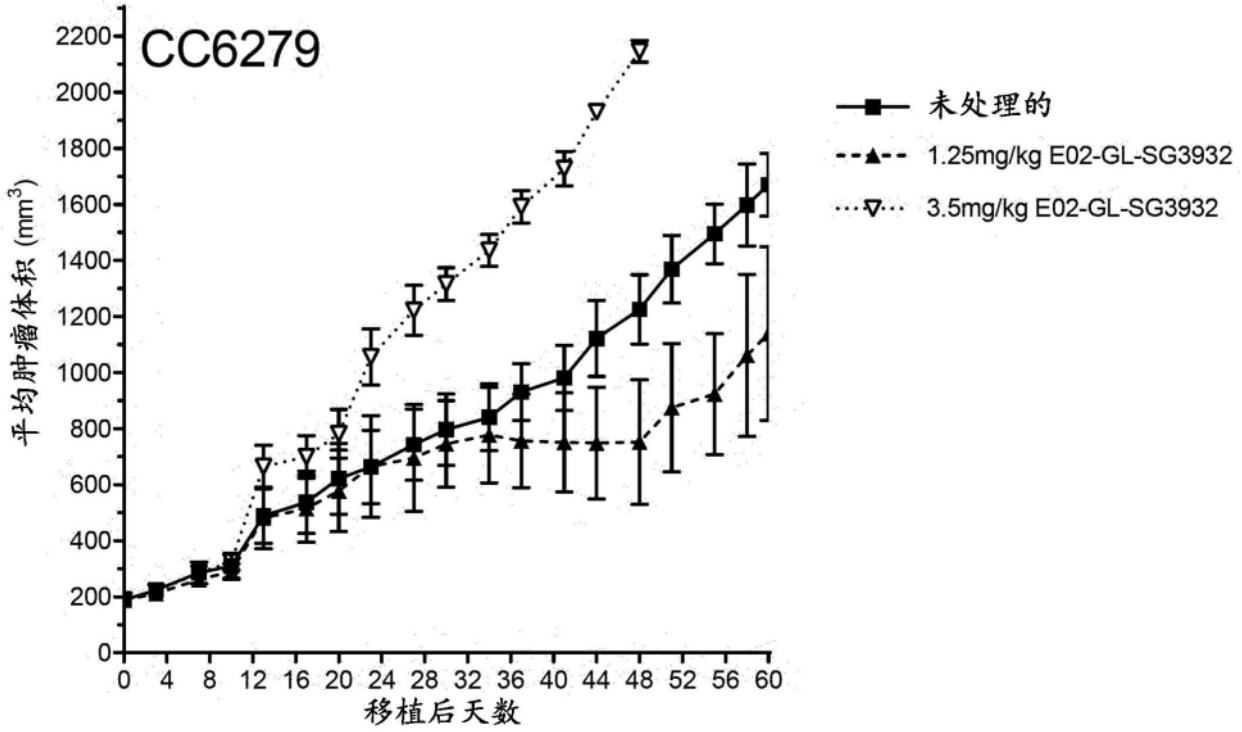

CC6279
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56D

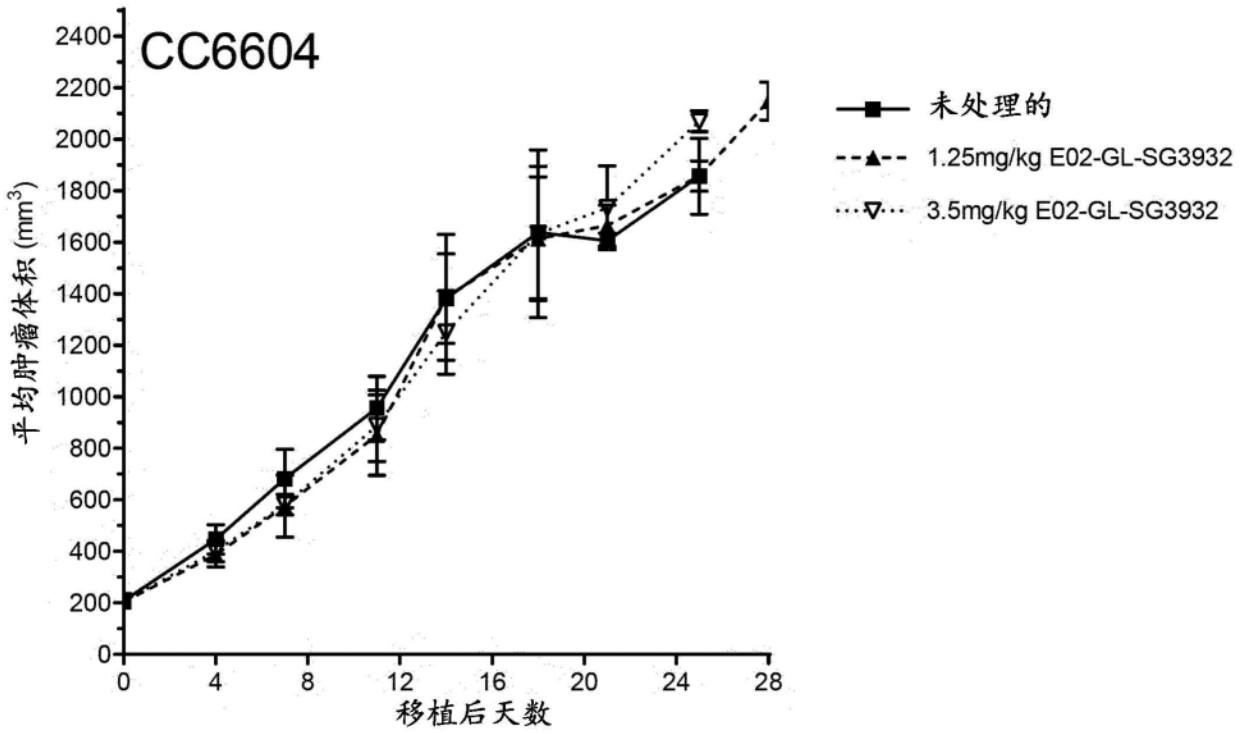

CC6604
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56E

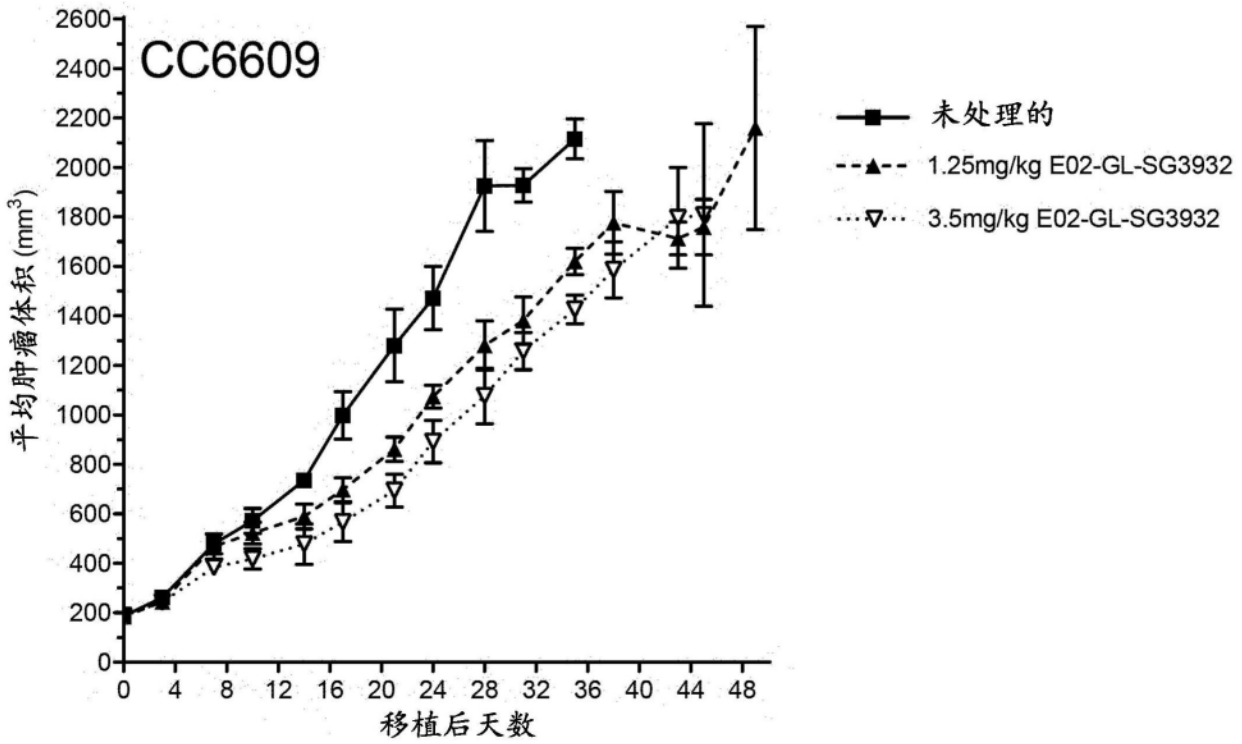

CC6609
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56F

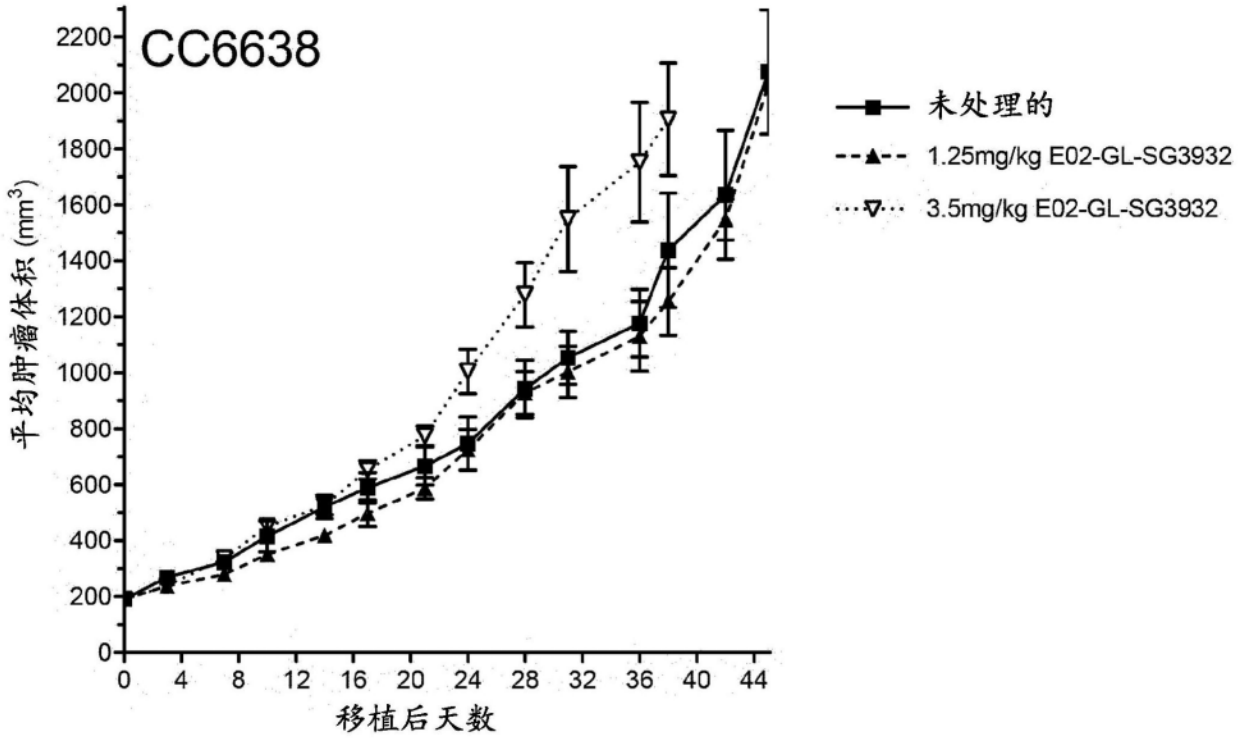

CC6638
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56G

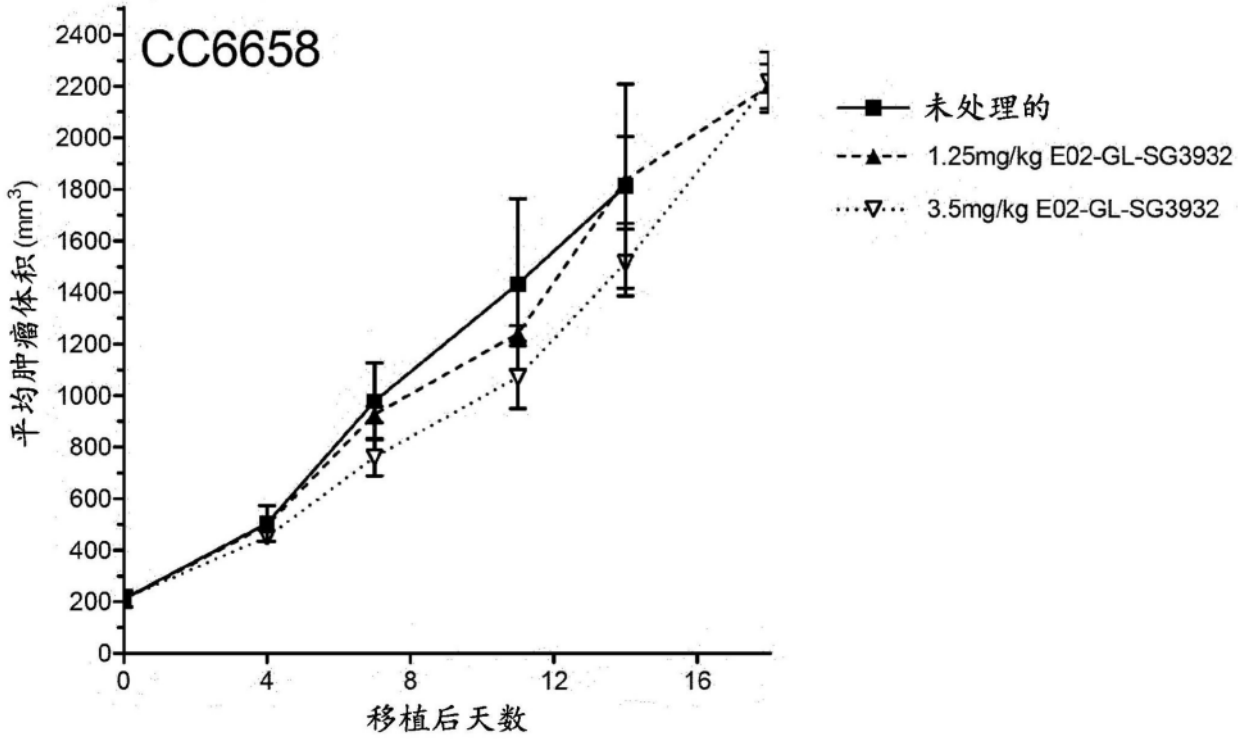

CC6658
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56H

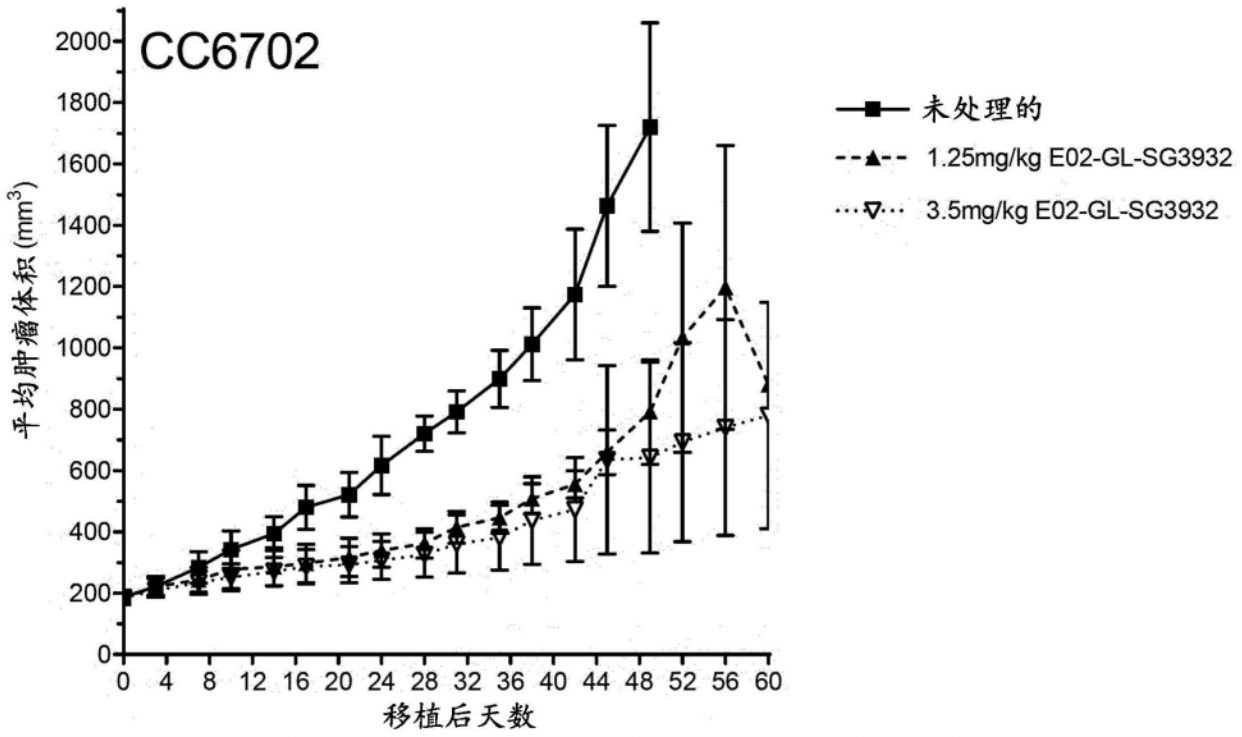

CC6702
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56I

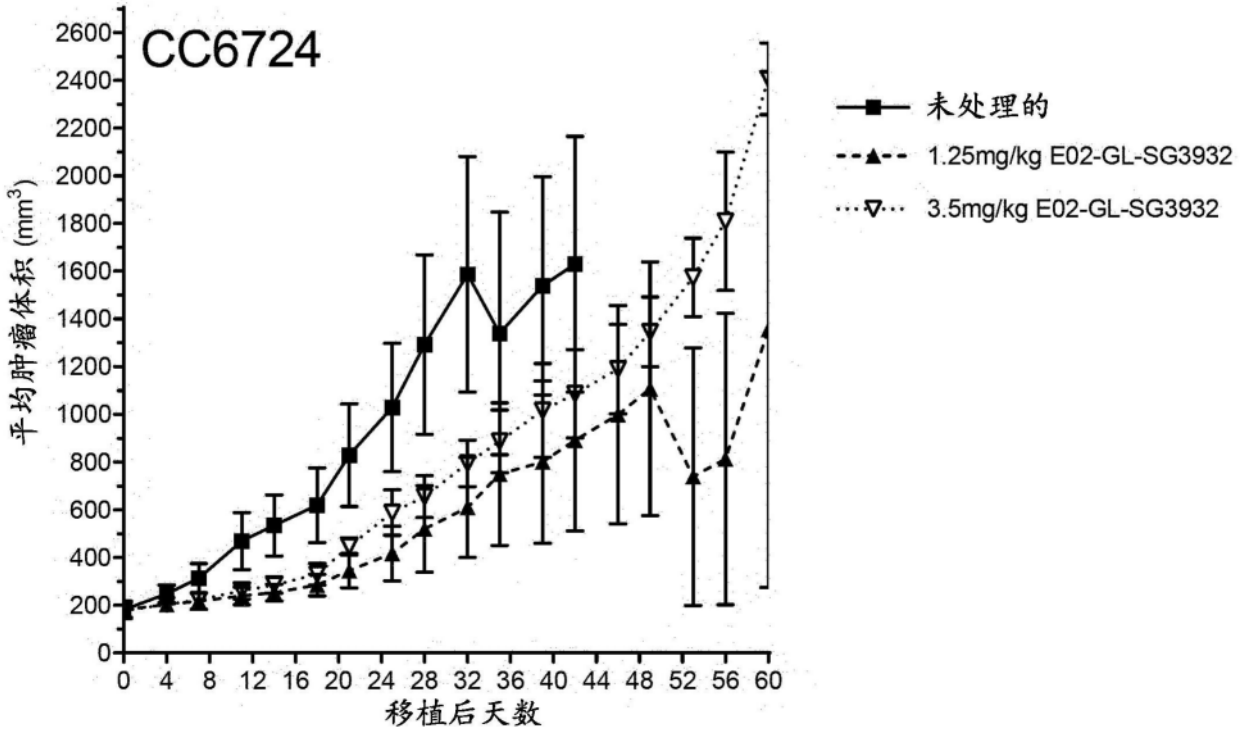

CC6724
平均肿瘤体积 (mm3)
移植后天数
未处理的
1.25mg/kg E02-GL-SG3932
3.5mg/kg E02-GL-SG3932

图56J

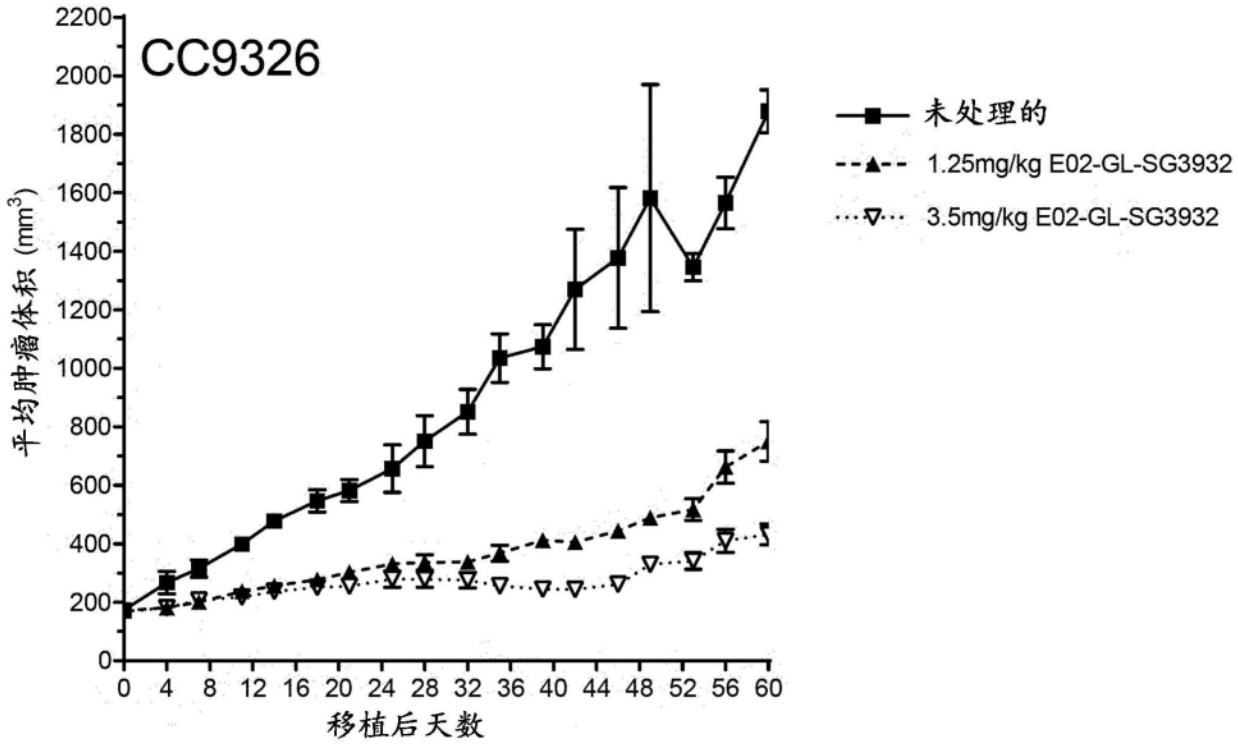


图56K

	ADC	接头 - 弹头
1	E02-INT-可裂解的 mal-PEG8-val-ala 接头 -SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

图57A

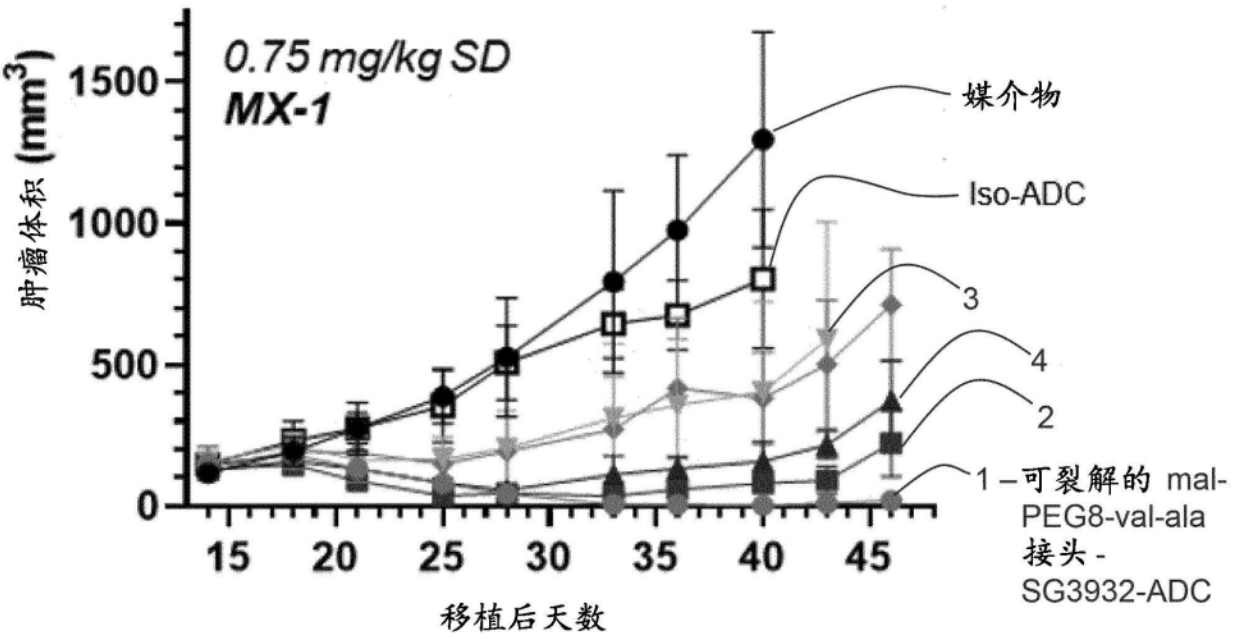
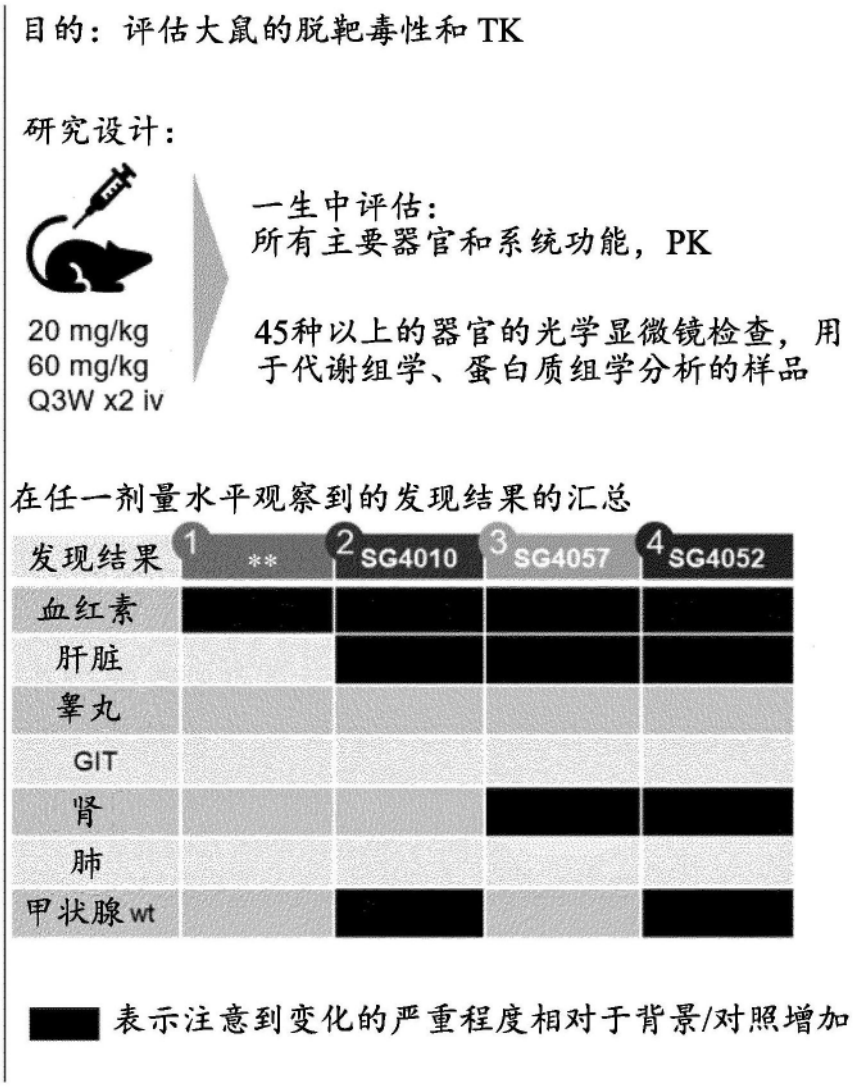

0.75 mg/kg SD
MX-1
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
15
20
25
30
35
40
45
移植后天数
媒介物
Iso-ADC
3
4
2
1 –可裂解的 mal-PEG8-val-ala 接头 - SG3932-ADC

图57B



** 可裂解的 mal- PEG8-val-ala 接头 -SG3932

图58

	ADC	接头 - 弹头
1	E02-INT-可裂解的 mal-PEG8-val-ala 接头 -SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

图59A

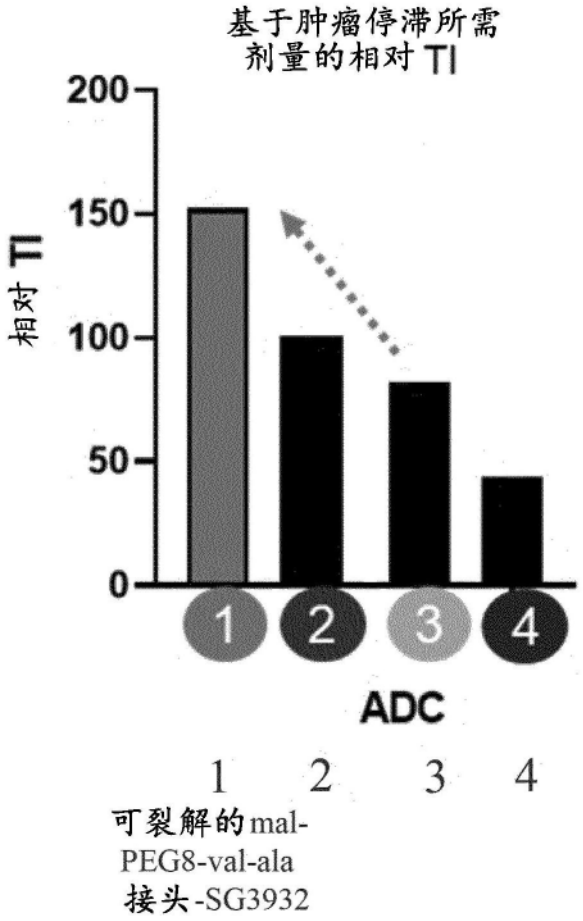


图59B

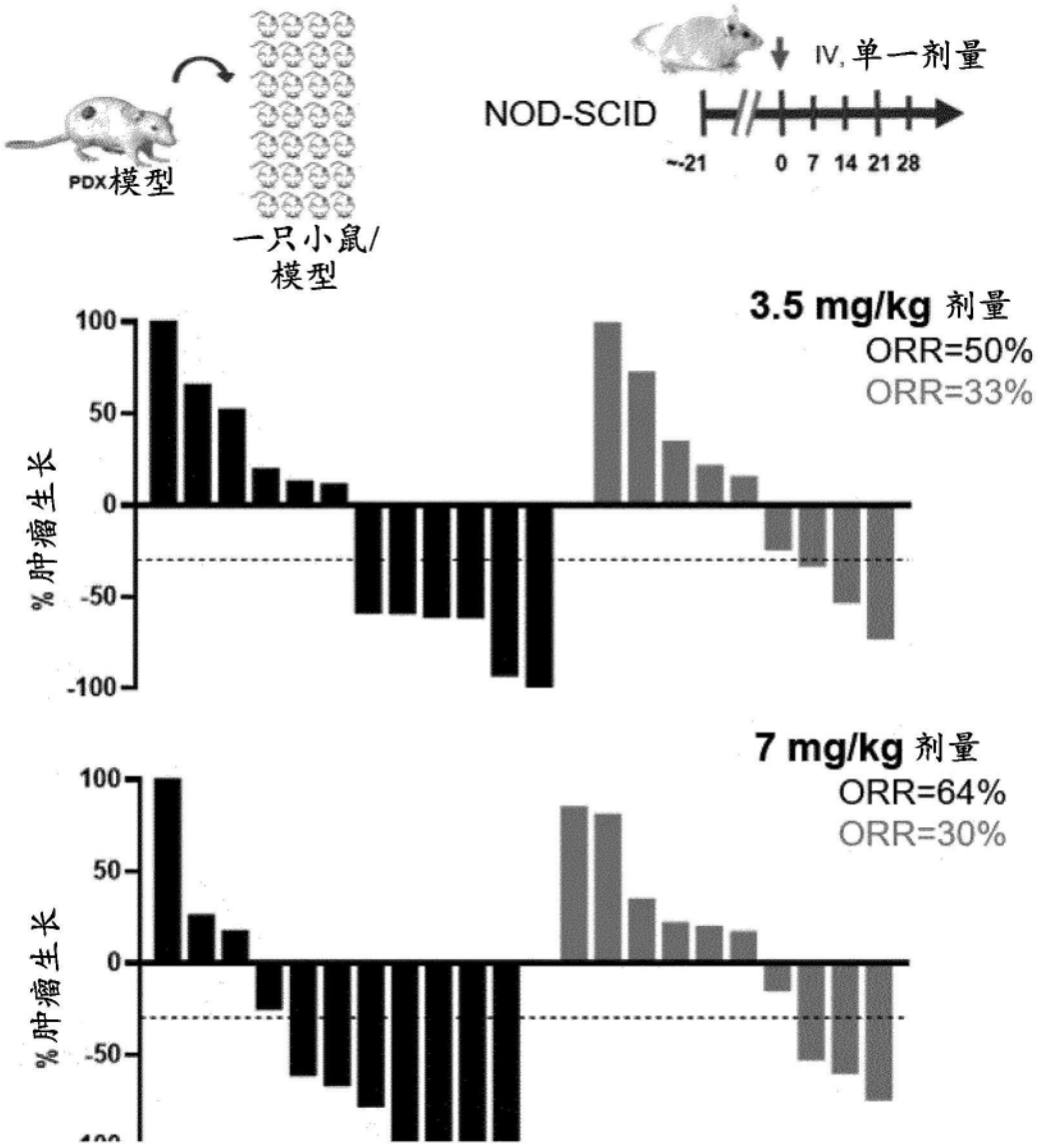

PDX模型
一只小鼠/
模型
IV, 单一剂量
NOD-SCID
~-21
0 7 14 21 28
3.5 mg/kg 剂量
ORR=50%
ORR=33%
% 肿瘤生长
100
50
0
-50
-100
7 mg/kg 剂量
ORR=64%
ORR=30%
% 肿瘤生长
100
50
0
-50

图60A

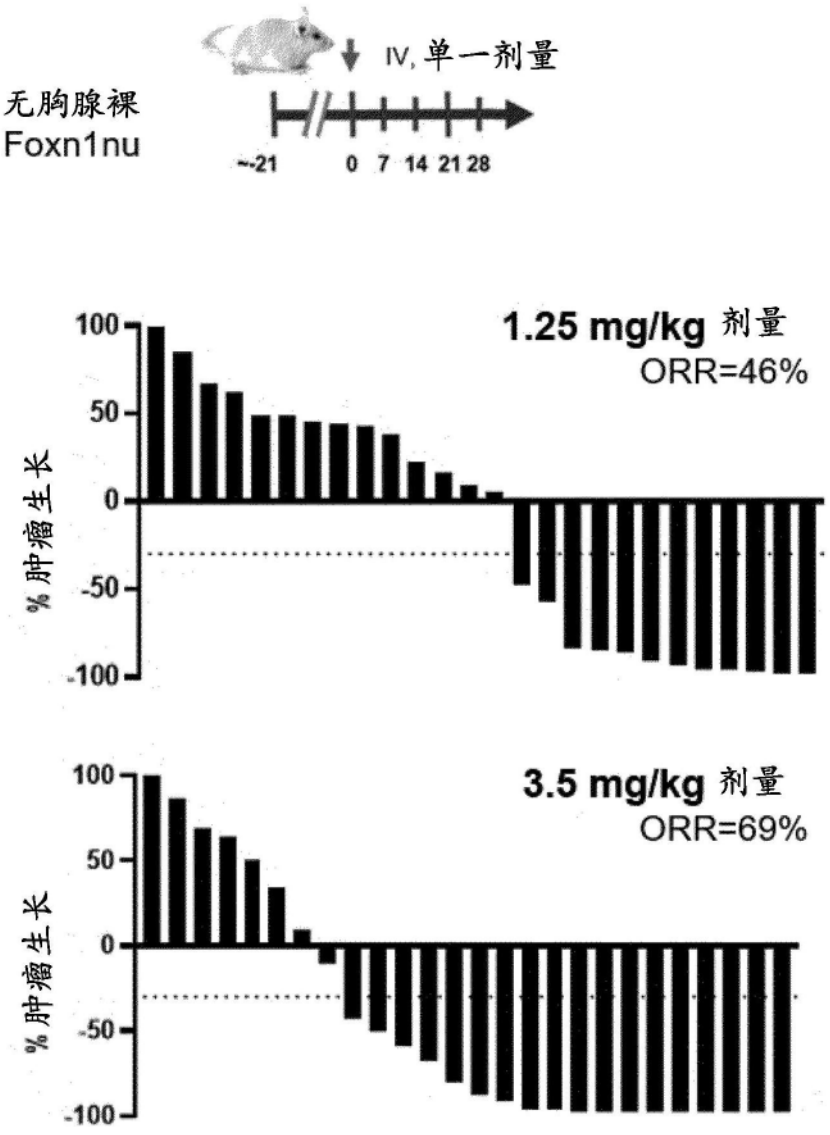

无胸腺裸
Foxn1nu
IV,单一剂量
-21
0 7 14 21 28
1.25 mg/kg 剂量
ORR=46%
% 肿瘤生长
100
50
0
-50
-100
3.5 mg/kg 剂量
ORR=69%
% 肿瘤生长
100
50
0
-50
-100

图60B

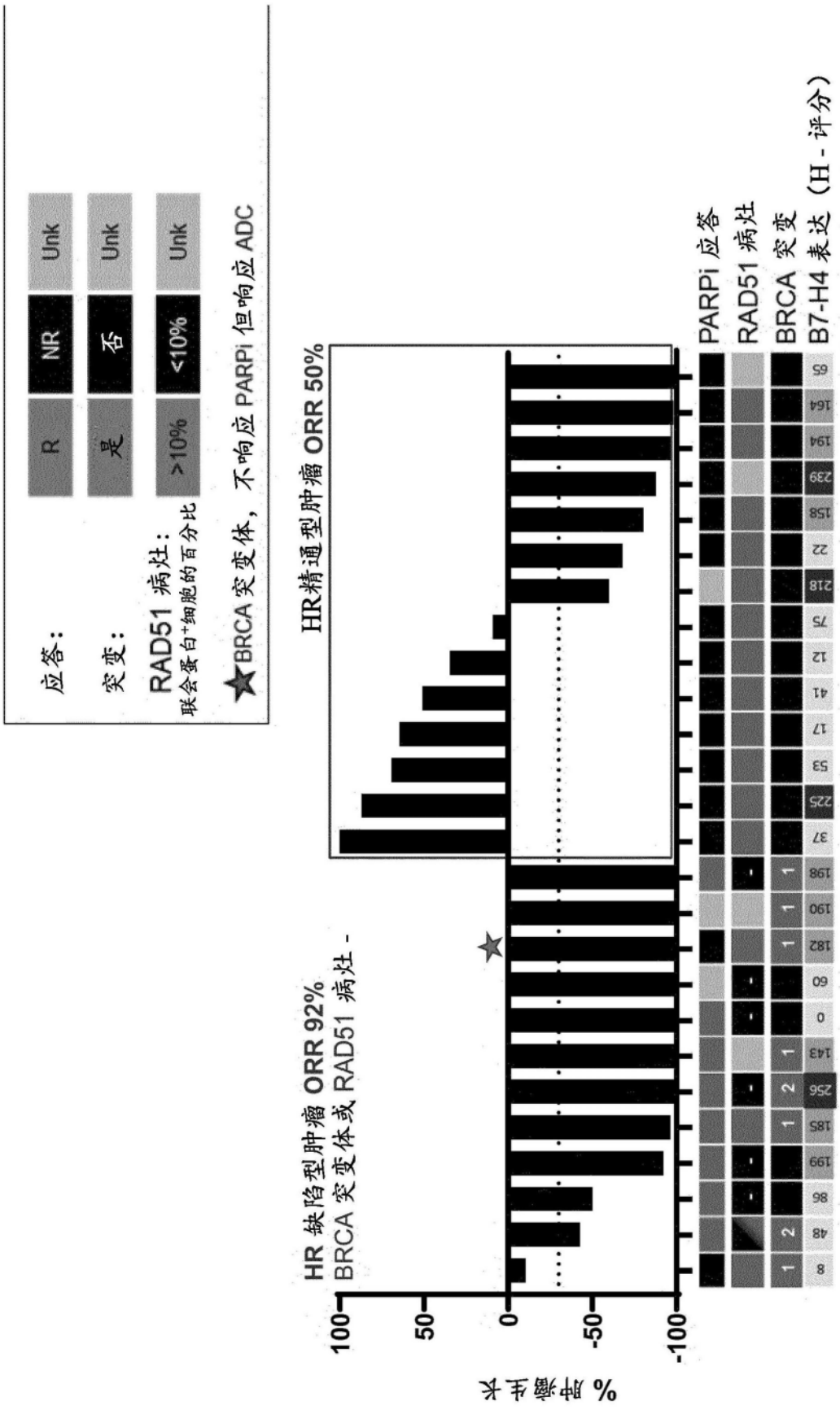

应答：
R
NR
Unk
突变：
是
否
Unk
RAD51 病灶：
联合蛋白+细胞的百分比
>10%
<10%
Unk
★BRCA 突变体，不响应 PARPi 但响应 ADC
HR精通型肿瘤 ORR 50%
HR 缺陷型肿瘤 ORR 92%
BRCA 突变体或 RAD51 病灶 -
100
50
0
-50
-100
% 肿瘤生长
PARPi 应答
RAD51 病灶
BRCA 突变
B7-H4 表达（H - 评分）
8
48
86
199
185
256
143
0
60
182
190
198
37
225
53
17
41
12
75
218
22
158
239
194
164
65

图61

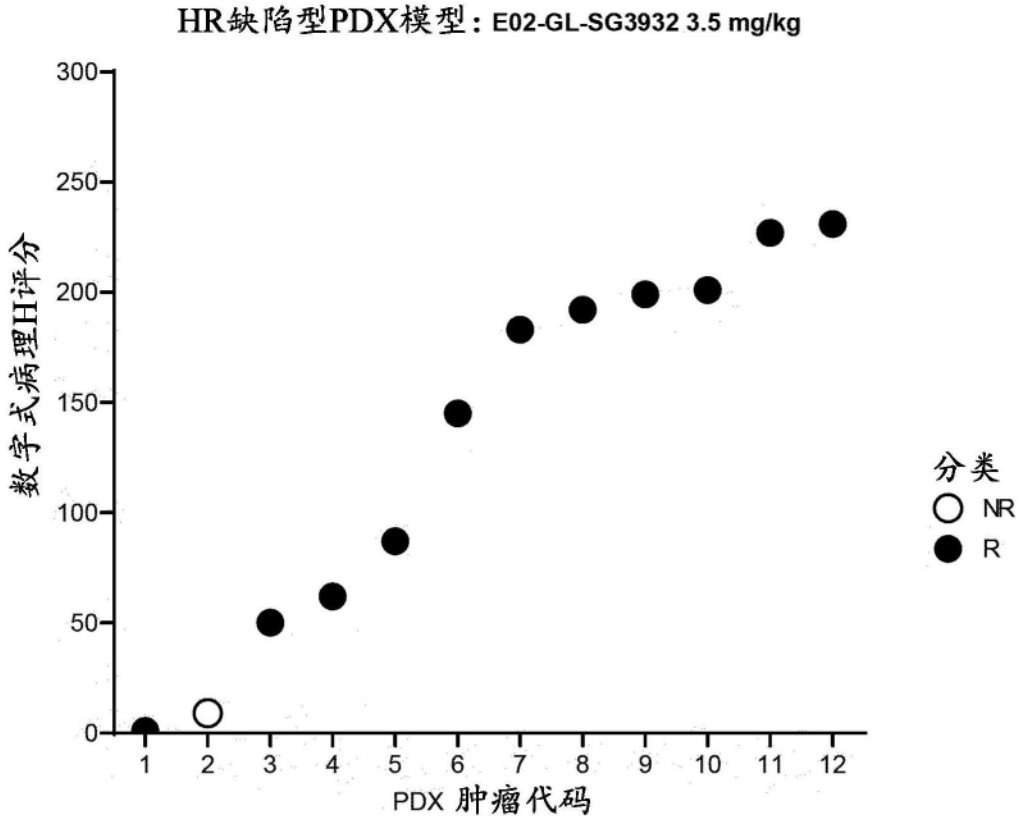

HR缺陷型PDX模型：E02-GL-SG3932 3.5 mg/kg
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
PDX 肿瘤代码
分类
NR
R

图62A

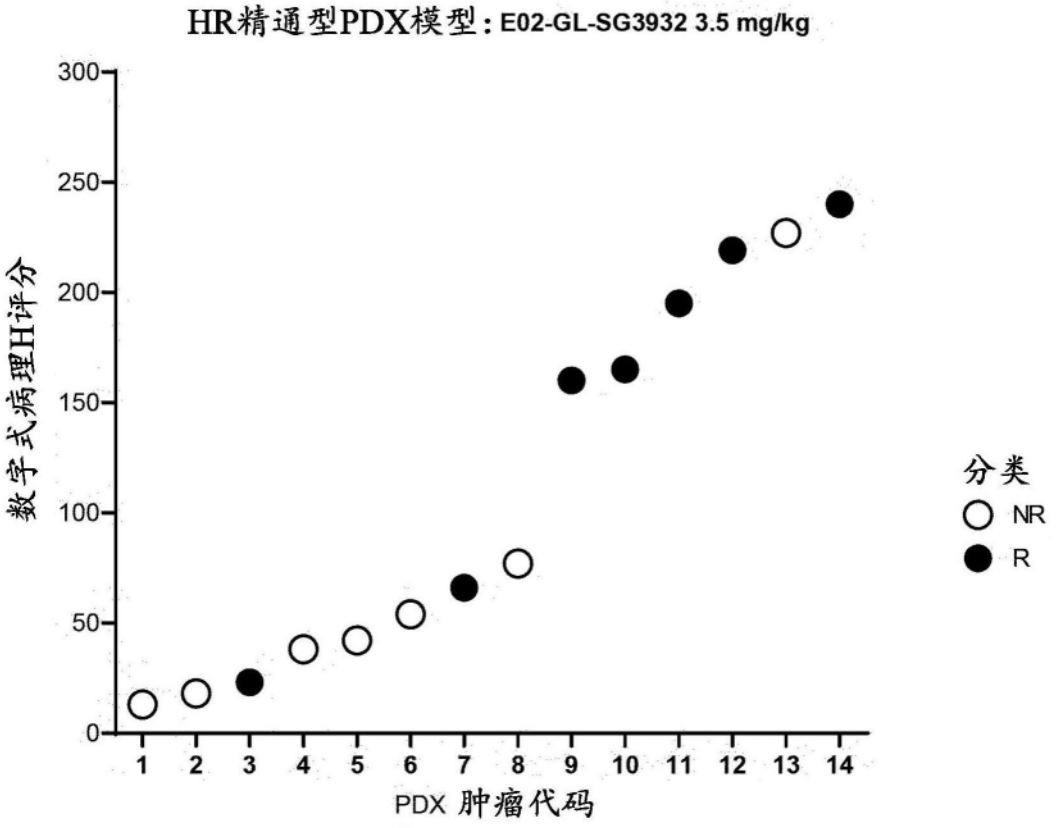

HR精通型PDX模型：E02-GL-SG3932 3.5 mg/kg
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
PDX 肿瘤代码
分类
NR
R

图62B

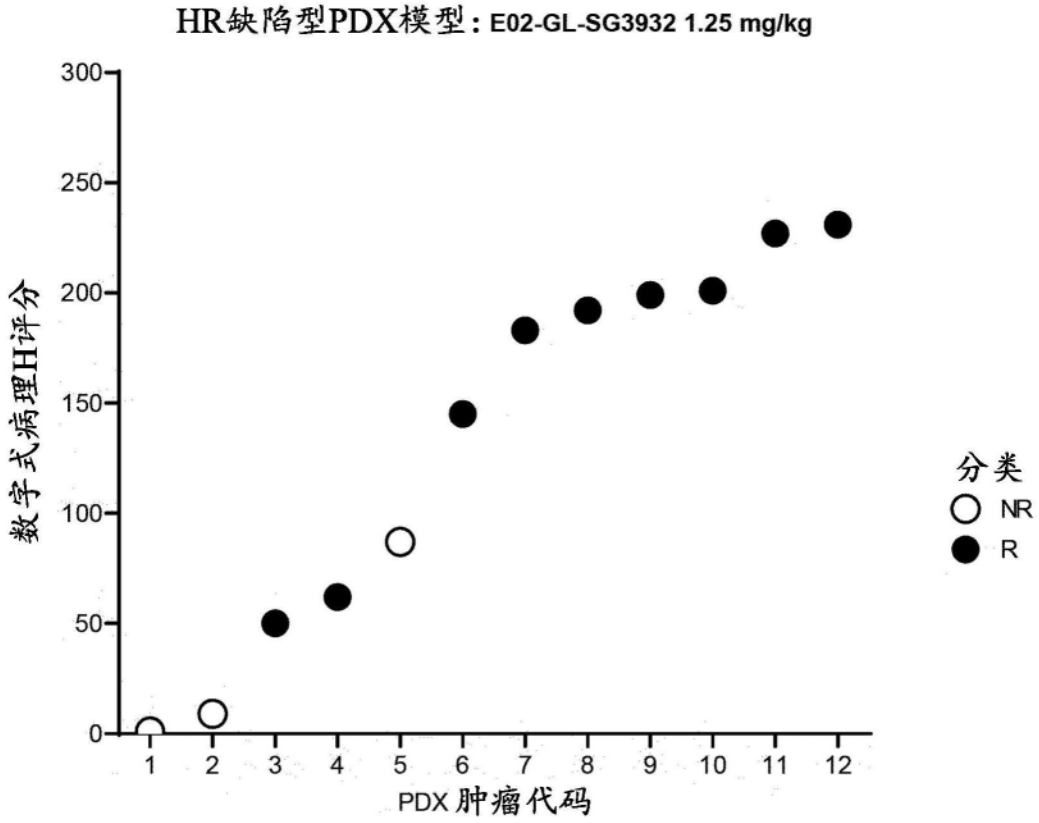

HR缺陷型PDX模型：E02-GL-SG3932 1.25 mg/kg
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
PDX肿瘤代码
分类
NR
R

图62C

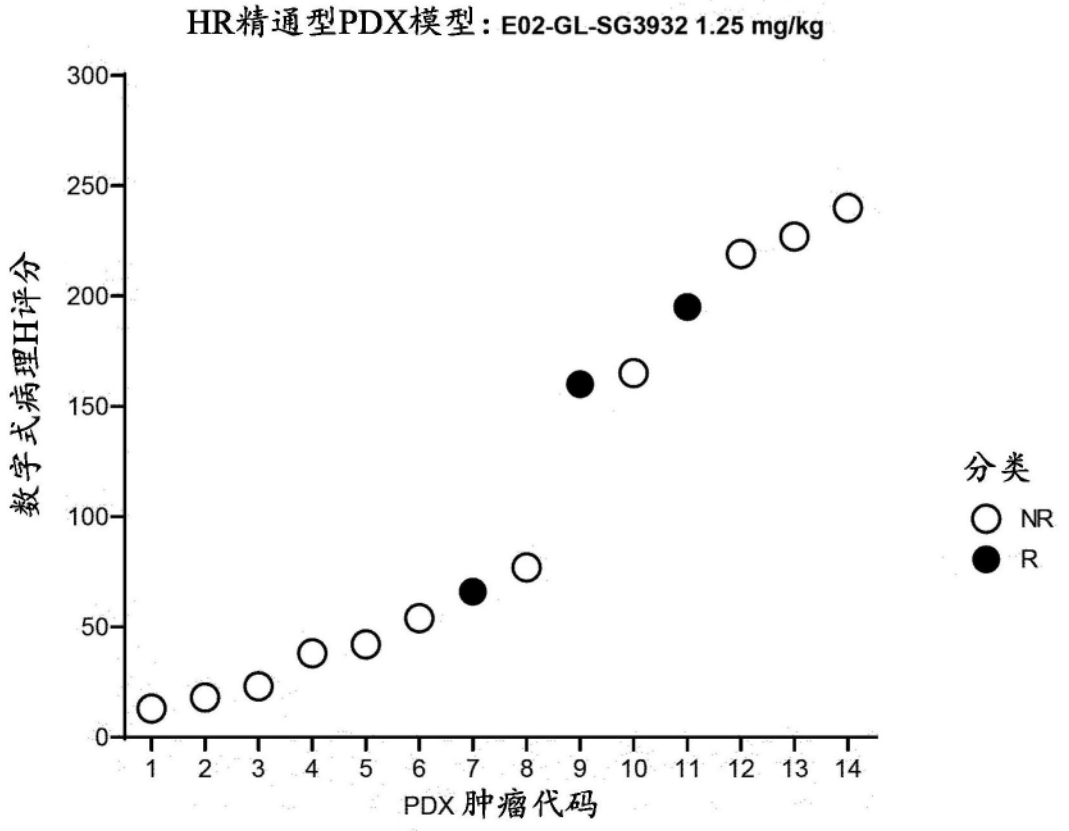

HR精通型PDX模型：E02-GL-SG3932 1.25 mg/kg
数字式病理H评分
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
PDX 肿瘤代码
分类
NR
R

图62D

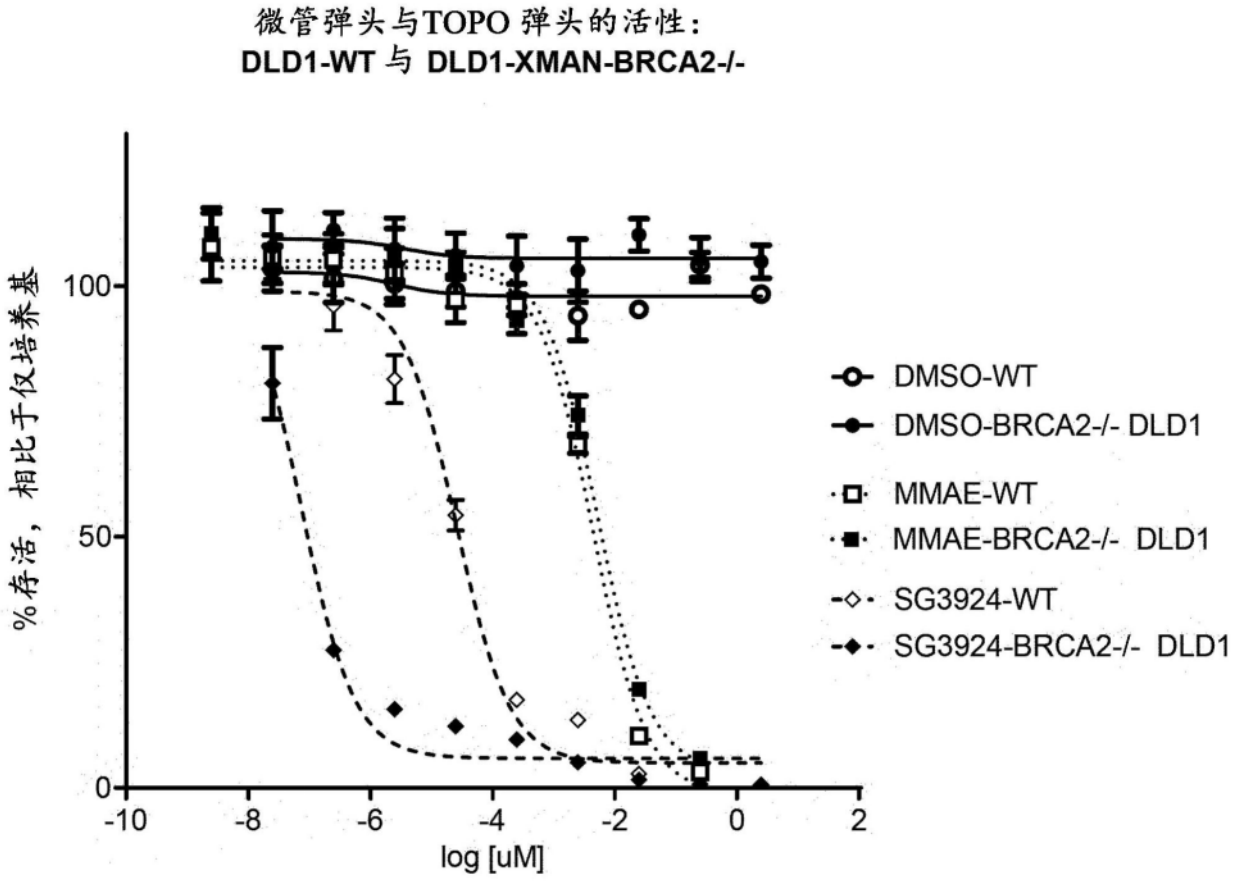

微管弹头与TOPO 弹头的活性：
DLD1-WT 与 DLD1-XMAN-BRCA2-/-
%存活，相比于仅培养基
100
50
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
log [uM]
DMSO-WT
DMSO-BRCA2-/- DLD1
MMAE-WT
MMAE-BRCA2-/- DLD1
SG3924-WT
SG3924-BRCA2-/- DLD1

图63