(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120239708 A
(43)申请公布日 2025.07.01

(21)申请号 202380067225.6
(22)申请日 2023.09.19
(30)优先权数据
63/408,106 2022.09.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2023/051016 2023.09.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/062476 EN 2024.03.28
(71)申请人 耐科廷疗法有限公司
地址 以色列耶路撒冷
(72)发明人 皮恩卡斯·茨克尔曼
阿纳斯·阿提耶
阿克拉姆·奥贝达特
A·维特恩斯坦 盖伊·西纳蒙
(74)专利代理机构 北京汉智嘉成知识产权代理有限公司 11682
专利代理师 方珉 鲁山
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

权利要求书3页 说明书30页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

针对黏连蛋白4的人源化抗体及其药物偶联物

(57)摘要

本发明提供了针对黏连蛋白4(Nectin-4)的人源化抗体和所述人源化抗体的抗体-药物偶联物(ADC)及其在治疗疾病、特别是癌症中的用途。

CN 120239708 A

1.一种特异性结合人黏连蛋白-4的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约90%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

2.根据权利要求1所述的人源化抗体,其中所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约95%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

3.根据权利要求1或2中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:13中所示的序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:14中所示的序列。

4.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含一组六个CDR序列,其中所述重链CDR1包含序列SYY(SEQ ID NO:26),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

5.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYYIH(SEQ ID NO:15),重链CDR2包含序列WIYPGNVNTKYNERF(K/Q)G(SEQ ID NO:16),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列(K/R)ASQSVNNDVA(SEQ ID NO:18),轻链CDR2包含序列YASNRFT(SEQ ID NO:19),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

6.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含含有序列WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:27)或WIYPGNVNTKYNERFQG(SEQ ID NO:28)的重链CDR2。

7.根据权利要求1至5中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含含有序列KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:29)或RASQSVNNDVA(SEQ ID NO:30)的轻链CDR1。

8.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含一组四个重链(HC)构架(FR)序列:(A)FR-H1选自SEQ ID NO:31、32和33;(B)FR-H2选自SEQ ID NO:34、35和36;(C)FR-H3选自SEQ ID NO:37、38、39和40;(D)FR-H4是SEQ ID NO:41;并且所述轻链可变区包含一组四个轻链(LC)构架(FR)序列:(A)FR-L1选自SEQ ID NO:42、43和44;(B)FR-L2选自SEQ ID NO:45和46;(C)FR-L3选自SEQ ID NO:47、48和49;(D)FR-L4是SEQ ID NO:50。

9.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含选自SEQ ID NO:2、3、4、5和6的序列;并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含选自SEQ ID NO:8、9、10、11和12的序列。

10.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:5,并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:12。

11.一种偶联物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体。

12.根据权利要求11所述的偶联物,其包含细胞毒性部分、放射活性部分或标记标签。

13.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至10中任一项所述的人源化抗体或抗原结合片段,或包含所述抗体的偶联物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

14.根据权利要求13所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

15.一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含与毒素偶联的人源化抗黏连蛋白4抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYY(SEQ ID NO:26),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

16.根据权利要求15所述的抗体-药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合部分包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYYIH(SEQ ID NO:15),重链CDR2包含序列WIYPGNVNTKYNERF(K/Q)G(SEQ ID NO:16),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列(K/R)ASQSVNNDVA(SEQ ID NO:18),轻链CDR2包含序列YASNRFT(SEQ ID NO:19),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

17.根据权利要求15或16中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约90%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

18.根据权利要求15至17中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中所述人源化抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列,并且所述人源化抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列。

19.根据权利要求15至17中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中所述人源化抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列,并且所述人源化抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:12中所示的氨基酸序列。

20.根据权利要求15至19中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

21.根据权利要求20所述的抗体-药物偶联物,其中所述毒素选自单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)、皂苷、DM4、DM1、依喜替康和SN-38。

22.根据权利要求15至21中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中所述抗体和所述毒素通过接头连接。

23.一种药物组合物,其包含根据权利要求15-22中任一项所述的抗体-药物偶联物和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

24.根据权利要求23所述的药物组合物,其用于在个体中治疗癌症。

25.根据权利要求24所述的用途的药物组合物,其中所述癌症选自膀胱癌、肝癌、肺癌、结肠癌、成胶质细胞瘤、肾上腺癌、子宫癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌和乳腺癌。

26.一种在需要治疗的个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的根据权利要求13或23中任一项所述的药物组合物。

27.根据权利要求26所述的方法,其中所述治疗癌症的方法包括施用或进行至少一种额外的抗癌疗法。

28.根据权利要求27所述的方法,其中所述额外的抗癌疗法是手术、化疗、放疗或免疫疗法。

29.根据权利要求24所述的方法,其包括施用选自免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂和化学治疗剂的额外的抗癌药剂。

30.根据权利要求1至4中任一项所述的人源化抗体或其片段或根据权利要求11所述的抗体-药物偶联物,其中所述人源化抗体包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列GYTFTSYY(SEQ ID NO:21),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列ARSNPYVMDY(SEQ ID NO:23),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

31.根据权利要求1至10中任一项所述的人源化抗体,其包含SEQ ID NO:51中所述的重链序列和SEQ ID NO:52中所示的轻链序列。

针对黏连蛋白4的人源化抗体及其药物偶联物

技术领域

[0001] 本发明属于免疫疗法领域,并涉及人源化抗黏连蛋白4(Nectin-4)抗体和抗体偶联物以及包含它们的治疗和诊断组合物,用于治疗疾病,特别是癌症。

背景技术

[0002] 癌症免疫疗法用于产生和增强抗肿瘤免疫应答,例如通过用特异性针对肿瘤细胞上的抗原的抗体治疗,或通过特异性激活抗肿瘤T细胞。在患者中召集针对肿瘤细胞的免疫细胞(例如T细胞)的能力提供了对抗原本被认为是不可治愈的癌症类型和转移的治疗模式。

[0003] 也被称为脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白4(PVRL4)的细胞黏附分子黏连蛋白4是一种I型跨膜蛋白,并且是相关免疫球蛋白样黏附分子的黏连蛋白家族的成员。黏连蛋白4是包括膀胱癌、乳腺癌、肺癌和其他恶性肿瘤在内的许多肿瘤的肿瘤相关标志物。

[0004] Chailta-Eid等,2016(Cancer Res.2016;76:3003-13)公开了作为多种临床前癌症模型中的高效治疗剂的抗黏连蛋白4(恩诺单抗)抗体-药物偶联物。与微管抑制剂vedotin偶联的所述抗体结合人、大鼠和猴的黏连蛋白4,并抑制表达黏连蛋白4的几种细胞系和异种移植物的生长。

[0005] 国际专利申请公开号WO 2019/215728公开了以高亲和力和特异性识别人黏连蛋白4并抑制其与含Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)的结合的单克隆抗体。

[0006] 抗体-药物偶联物(ADC)是用于直接杀死肿瘤细胞和随后激活旁观免疫细胞的有前景的工具。这些治疗性实体由与细胞毒性药物(有效载荷)相连的mAb组成,并在原理上被设计成通过限制这些药物向表达靶抗原的细胞的特异性递送来拓宽它们的治疗窗口,从而减少其全身暴露和毒性。

[0007] 澳瑞他汀(Auristatin)是一种破坏微管的药物。它衍生自海洋无壳软体动物龙骨海鹿(Dolabella auricularia),被称为尾海兔素(dolastatins)。已经合成了澳瑞他汀的各种衍生物,例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)和单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。MMAE和MMAF由Seattle Genetics开发并用作ADC的有效载荷。MMAF和MMAE各有优缺点。MMAE的膜渗透性更强,IC50值低于MMAF。然而,与MMAE相比,MMAF更加亲水,聚集倾向更低,显示出更低的全身毒性(park等,Molecules 2019,24,2754)。

[0008] 国际专利申请公开号WO 2018/158398公开了对黏连蛋白4具有特异性的抗体例如14A5.2,以及它们在治疗癌症中的用途。

[0009] 国际专利申请公开号WO 2017/042210公开了与MMAE偶联的抗黏连蛋白4抗体,其比恩诺单抗-vedotin(PADCEV)更加高效。在该申请中使用的抗体来源于鼠类,使其不太适合于临床使用。

[0010] 对提供改进、安全和有效的并且可用于治疗表达黏连蛋白4的癌症的识别人黏连蛋白4的人源化抗体和包含它们的ADC,存在着尚未满足的需求。

发明内容

[0011] 本发明提供了特异性结合黏连蛋白4的人源化抗体或其抗原结合部分。从较大量抗体克隆中选择的本发明的人源化抗体与其他抗黏连蛋白4抗体相比具有改进的特性。根据一些实施方案,本发明进一步提供了包含所述抗体和治疗或诊断剂的偶联物。在一些实施方案中,所述偶联物包含细胞毒性部分,并可用于治疗具有在表面上呈递黏连蛋白4受体的肿瘤细胞的癌症。

[0012] 值得注意的是,本发明证实了NTX1105 ADC比迄今为止发表的携带抗黏连蛋白4抗体的最先进ADC(PADCEV或基于恩诺单抗的ADC)更加高效。现在表明,基于NTX1105的ADC在PADCEV或其他基于恩诺单抗的ADC在其中没有活性的治疗方案中具有显著的抗肿瘤活性。

[0013] 通过将特定的成组互补决定区(CDR)序列和人构架(FW)序列组合,并在这些序列中引入特定突变以产生具有修饰的可变区和改进的特性的抗体,产生了大量的人源化抗体。本文公开的抗体在包括同源性、T细胞表位、关键残基和预测结构在内的因素的基础上设计。有利的是,本文描述的新设计的人源化可变区保留了对维持抗体构象和结合亲和力至关重要的残基,同时具有较低的潜在T细胞表位发生率,从而将对抗体产生不良免疫应答的风险降至最低。

[0014] 本文公开的人源化抗体具有优异的生产率特征和改进的可展性(例如通过改进的Tagg所测量的更高的抗聚集性)。已发现本文公开的人源化抗体非常适合用作使用治疗性毒素的靶向疗法。现在公开的是,与细胞毒性部分偶联的本文描述的抗黏连蛋白4单克隆人源化抗体对各种肿瘤细胞系表现出强大的杀伤。使用本文描述的抗体将毒素直接靶向具有提高这些毒素的抗肿瘤活性和提高癌症患者生存率的潜力。本发明的一些ADC包含对其Fc区的序列修饰,这显著降低了它们被携带Fc γ R的正常细胞的结合,从而提高了它们的安全性。

[0015] 根据一个方面,本发明提供了一种特异性结合人黏连蛋白4的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约90%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0016] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链,所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:2具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链,所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:3具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链,所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:4具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链,所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:5具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链,所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:6具有至少约95%同一性的可变区。

[0017] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:8具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:9具有至少约95%同一性的可变

区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:10具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:11具有至少约95%同一性的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含轻链,所述轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:12具有至少约95%同一性的可变区。

[0018] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:13具有至少约95%同一性的可变区,并且所述轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:14具有至少约95%同一性的可变区。

[0019] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链,所述重链包含具有SEQ ID NO:13中阐述的氨基酸的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含轻链,所述轻链包含具有SEQ ID NO:14中阐述的氨基酸的可变区。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:13中阐述的序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:14中阐述的序列。

[0020] 本领域中已知有几种方法用于确定给定抗体分子的CDR序列,但不存在标准的明确方法。从抗体重链和轻链可变区确定CDR序列可以根据本领域中已知的任何方法来进行,包括但不限于被称为KABAT、Chothia和IMGT的方法。一组选定的CDR可能包括通过一种以上的方法鉴定的序列,即例如一些CDR序列可以使用KABAT确定,另一些可以使用IMGT确定。根据一些实施方案,所述mAb可变区的CDR序列使用IMGT方法确定。

[0021] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含一组六个CDR序列,其中所述重链CDR1包含序列SYY(SEQ ID NO:26),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0022] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYYIH(SEQ ID NO:15),重链CDR2包含序列WIYPGNVNTKYNERF(K/Q)G(SEQ ID NO:16),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列(K/R)ASQSVNNDVA(SEQ ID NO:18),轻链CDR2包含序列YASNRFT(SEQ ID NO:19),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0023] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:27)的重链CDR2。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列WIYPGNVNTKYNERFQG(SEQ ID NO:28)的重链CDR2。

[0024] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:29)的轻链CDR1。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列RASQSVNNDVA(SEQ ID NO:30)的轻链CDR1。

[0025] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列GYTFTSYY(SEQ ID NO:21),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列ARSNPYVMDY(SEQ ID NO:23),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0026] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含一组四个重链(HC)构架(FR)序列:(A)FR-H1选自SEQ ID NO:31、32和33;(B)FR-H2选自SEQ ID NO:34、35和36;(C)FR-H3选自SEQ ID NO:37、38、39和40;(D)FR-H4是SEQ ID NO:41;并且所述轻链可变区包含一组四个轻链(LC)构架(FR)序列:(A)FR-L1选自SEQ ID NO:42、43和44;(B)FR-L2选自SEQ ID NO:45和46;(C)FR-L3选自SEQ ID NO:47、48和49;并且(D)FR-L4是SEQ ID NO:50。构架的每种可能性或组合代表一个独立实施方案。

[0027] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含与选自SEQ ID NO:2、3、4、5和6的序列具有至少约97%同一性的氨基酸序列;并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:8、9、10、11和12的序列具有至少约97%同一性的氨基酸序列。重链和轻链的每种可能性或组合代表本发明的一个独立实施方案。

[0028] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含选自SEQ ID NO:2、3、4、5和6的序列;并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含选自SEQ ID NO:8、9、10、11和12的序列。重链和轻链可变区的每种组合代表本发明的一个独立实施方案。根据某些示例性实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:5,并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:12(在本文中被表示为NTX1105(H4/k5))。根据其他示例性实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:6,并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:12。

[0029] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段是单克隆抗体、Fab、$F(ab)_2$、单域抗体或单链可变片段(scFv)。

[0030] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段是IgG单克隆抗体。根据一些实施方案,所述人源化抗体具有选自IgG1、IgG4和IgG2的重链恒定区。在某些实施方案中,所述人源化抗体或其片段是IgG4亚类。在某些实施方案中,所述人源化抗体或其抗原结合片段是IgG1亚类。根据一些实施方案,所述抗体具有κ轻链恒定区。

[0031] 根据一些实施方案,所述人源化抗体具有阻止Fc γR介导的内化的突变Fc结构域。

[0032] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含Fc无效结构域。根据某些实施方案,所述Fc结构域对于与免疫细胞上存在的Fc γ受体的结合是无效的。根据某些示例性实施方案,所述Fc结构域对于与CD64、CD32a、CD32b、CD16a和/或CD16b的结合是无效的。

[0033] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含具有LALAPG突变体的Fc无效结构域。

[0034] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含SEQ ID NO:51中所示的重链序列和SEQ ID NO:52中所示的轻链序列(具有LALAPG突变体($FcgR^{null}$)的NTX1105(H4/k5))。

[0035] 根据一些实施方案,提供了一种包含上述人源化抗体或其片段的偶联物。

[0036] 根据本发明的抗体或其片段可以被附连到细胞毒性部分、放射活性部分或标记标签。

[0037] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段被偶联到毒素(有效载荷)。

[0038] 根据一些实施方案,所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

[0039] 根据某些实施方案,所述毒素是微管破坏药物。根据某些示例性实施方案,所述毒素是澳瑞他汀或其衍生物。根据某些实施方案,所述澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀E

(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

[0040] 根据一些实施方案,所述毒素是皂苷。

[0041] 根据一些实施方案,所述毒素是美登素衍生物。根据某些实施方案,所述美登素衍生物是DM4或DM1。

[0042] 根据一些实施方案,所述毒素是喹啉生物碱。根据某些实施方案,所述喹啉生物碱是SN-38。

[0043] 根据一些实施方案,所述毒素被直接连接到所述抗体。根据其他实施方案,所述抗体和毒素通过接头连接。根据一些实施方案,所述毒素被直接地或通过接头共价连接到所述人源化抗体。

[0044] 根据一些实施方案,所述接头是可切割的。根据其他实施方案,所述接头是不可切割的。根据一些实施方案,所述接头是酶可切割接头。根据某些实施方案,所述接头是pH敏感性接头。根据一些实施方案,所述接头是可还原接头(sulfo-SPDB)。

[0045] 根据一些实施方案,所述接头选自马来酰亚胺基己酰基(MC)、马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)、马来酰亚胺基甲基环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)和Lys-PAB-CO(赖氨酸-对氨基苯甲基-C=O)。

[0046] 根据一些实施方案,药物与抗体比率(DAR)是4-8。根据某些实施方案,所述DAR是4(DAR-4)。根据某些实施方案,所述DAR是8(DAR-8)。

[0047] 根据一些实施方案,提供了编码如上所述的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0048] 在另一方面,本发明提供了一种核酸构建体,其包含编码至少一个本文描述的人源化抗体链或其片段的核酸分子。根据一些实施方案,所述核酸构建体是质粒。

[0049] 根据一些实施方案,提供了一种用于表达本文描述的人源化抗体或其片段的质粒,所述质粒包含编码所述抗体的核酸分子。

[0050] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文描述的人源化抗体或抗原结合片段或包含所述抗体的偶联物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0051] 根据一些实施方案,所述药物组合物用于治疗癌症。

[0052] 任何施用方式均可用于将本发明的组合物递送到有需要的受试者,包括肠胃外和肠内施用方式。

[0053] 根据一些实施方案,所述药物组合物被配制成用于注射或输注。根据一些实施方案,所述药物组合物被配制成用于静脉内施用。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制成用于肿瘤内施用。

[0054] 根据另一个方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的至少一种本文所述的人源化抗体、其片段或其偶联物。

[0055] 根据一些实施方案,所述癌症包括实体瘤。

[0056] 根据某些实施方案,所述癌症选自前列腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌、甲状腺癌、类癌瘤、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、睾丸癌、尿路上皮癌、宫颈癌、黑色素瘤、淋巴瘤和肺癌。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0057] 根据某些实施方案,所述癌症选自胰腺导管腺癌、肾透明细胞癌和皮肤黑色素瘤。

[0058] 根据其他实施方案,所述癌症是血液学癌症。根据一些实施方案,所述血液学癌症选自:白血病,包括急性髓系白血病(AML)、慢性髓系白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL);淋巴瘤,包括霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤;和多发性骨髓瘤。

[0059] 根据一些实施方案,所述受试者是人。

[0060] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用或进行至少一种额外的抗癌疗法。根据某些实施方案,所述额外的抗癌疗法是手术、化疗、放疗或免疫疗法。

[0061] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用本文描述的人源化抗体或偶联物和额外的抗癌药剂。根据一些实施方案,所述额外的抗癌药剂选自免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂和化学治疗剂。

[0062] 根据一些实施方案,所述抗癌药剂选自爱必妥、阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨、长春新碱、长春碱、长春瑞滨、卡莫司汀、洛莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺铂、卡铂、异环磷酰胺、氮芥、美法仑、噻替派、达卡巴嗪、博来霉素、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、依托泊苷、替尼泊苷及其任何组合。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0063] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法涉及在受试者中阻止或减少转移的形成、生长或扩散。

[0064] 根据另一个方面,本发明提供了一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含与毒素(有效载荷)偶联的人源化抗黏连蛋白4抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYY(SEQ ID NO:26),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0065] 根据一些实施方案,所述抗体-药物偶联物(ADC)包含一种人源化抗黏连蛋白4抗体或其抗原结合部分,其包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYYIH(SEQ ID NO:15),重链CDR2包含序列WIYPGNVNTKYNERF(K/Q)G(SEQ ID NO:16),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列(K/R)ASQSVNNDVA(SEQ ID NO:18),轻链CDR2包含序列YASNRFT(SEQ ID NO:19),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0066] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:27)的重链CDR2。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列WIYPGNVNTKYNERFQG(SEQ ID NO:28)的重链CDR2。

[0067] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:29)的轻链CDR1。根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含含有序列RASQSVNNDVA(SEQ ID NO:30)的轻链CDR1。

[0068] 根据一些实施方案,所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约90%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0069] 根据一些实施方案,所述人源化抗体的重链可变区包含SEQ ID NO.13中所示的氨基酸序列,并且所述人源化抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列。

[0070] 根据一些实施方案,所述人源化抗体的重链可变区包含与选自SEQ ID NO:2、3、4、5和6的序列具有至少约97%同一性的氨基酸序列;并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:8、9、10、11和12的序列具有至少约97%同一性的氨基酸序列。

[0071] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:5中所示的序列,并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:12中所示的序列。根据其他实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:6中所示的序列,并且所述人源化单克隆抗体的轻链可变区包含SEQ ID NO:12中所示的序列。

[0072] 根据一些实施方案,所述抗体-药物偶联物包含上文中所述的毒素。

[0073] 能够在体内杀死肿瘤细胞或抑制其生长的任何化学或生物实体均可作为毒素与本发明的ADC一起使用。根据一些实施方案,所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

[0074] 根据某些实施方案,所述毒素是微管破坏药物。根据某些示例性实施方案,所述毒素是澳瑞他汀或其衍生物。根据某些实施方案,所述澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

[0075] 根据一些实施方案,所述毒素是皂苷。

[0076] 根据一些实施方案,所述毒素是美登素衍生物。根据某些实施方案,所述美登素衍生物是DM4或DM1。

[0077] 根据一些实施方案,所述毒素是喹啉生物碱。根据某些实施方案,所述喹啉生物碱是SN-38。

[0078] 根据一些实施方案,所述毒素选自DM4、MMAE和SN-38。根据某些实施方案,所述毒素是DM4或MMAE。

[0079] 根据一些实施方案,所述毒素是拓扑异构酶I抑制剂。根据一些实施方案,所述毒素是喜树碱的衍生物。根据某些实施方案,所述毒素是依喜替康。

[0080] 根据一些实施方案,所述毒素被直接连接到所述抗体。根据其他实施方案,所述抗体和毒素通过接头连接。根据一些实施方案,所述毒素被直接地或通过接头共价连接到所述人源化抗体。

[0081] 根据一些实施方案,所述接头是可切割的。根据其他实施方案,所述接头是不可切割的。根据一些实施方案,所述可切割接头选自酶可切割接头、pH敏感性接头和可还原接头。根据一些实施方案,所述接头是酶可切割接头。根据某些实施方案,所述接头是pH敏感性接头。根据一些实施方案,所述接头是可还原接头。

[0082] 根据一些实施方案,所述接头选自马来酰亚胺基己酰基(MC)、马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)、马来酰亚胺基甲基环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(sulfo-SPDB)、缬氨酸-丙氨酸接头和Lys-PAB-CO(赖氨酸-对氨基苯甲基-C=O)。

[0083] 根据一些实施方案,所述偶联物包含毒素MMAE和接头MC-VC-PAB(在本文中被表示为NTX1105-MMAE)。根据一些实施方案,所述偶联物包含毒素MMAF和接头MC(在本文中被表示为NTX1105-MMAF)。根据一些实施方案,所述偶联物包含毒素DM1和接头SMCC(在本文中被

表示为NTX1105-DM1)。根据一些实施方案,所述偶联物包含毒素DM4和接头SPDB(在本文中被表示为NTX1105-DM4)。根据一些实施方案,所述偶联物包含毒素SN38和接头Lys-PAB-CO(在本文中被表示为NTX1105-SN38)。

[0084] 根据一些实施方案,所述ADC包含与本文描述的抗体竞争与黏连蛋白4分子特异性结合的抗黏连蛋白4抗体。根据某些实施方案,所述ADC包含与下述抗体竞争与黏连蛋白4分子的特异性结合的抗黏连蛋白4抗体:所述抗体包含重链和轻链可变区,其中重链CDR1包含序列SYYIH(SEQ ID NO:15),重链CDR2包含序列WIYPGNVNTKYNERF(K/Q)G(SEQ ID NO:16),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列(K/R)ASQSVNNDVA(SEQ ID NO:18),轻链CDR2包含序列YASNRFT(SEQ ID NO:19),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0085] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文描述的抗体-药物偶联物和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0086] 任何施用方式均可用于将本发明的组合物递送到有需要的受试者,包括肠胃外和肠内施用方式。

[0087] 根据一些实施方案,所述药物组合物被配制成用于注射或输注。根据一些实施方案,所述药物组合物被配制成用于静脉内(IV)施用。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制成用于肿瘤内(IT)施用。

[0088] 根据一些实施方案,所述偶联物或药物组合物用于在个体中治疗癌症。

[0089] 所述癌症如上文中所述。在某些实施方案中,所述癌症包括实体瘤。在某些实施方案中,所述癌症选自肝癌、肺癌、结肠癌、成胶质细胞瘤、肾上腺癌、子宫癌、睾丸癌、头颈癌、胰腺癌和乳腺癌。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0090] 根据本发明的一些实施方案,所述用途进一步包括与额外的ADC联合使用。

[0091] 根据另一个方面,本发明提供了一种在需要治疗的个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的本文描述的偶联物或药物组合物。在某些实施方案中,所述癌症是实体瘤。根据其他实施方案,所述癌症是非实体瘤。在某些实施方案中,所述癌症选自成胶质细胞瘤、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、头颈癌、卵巢癌、结肠癌、宫颈癌、前列腺癌和肺癌。在某些实施方案中,所述治疗癌症的方法包括阻止或减少受试者中转移的形成、生长或扩散。

[0092] 根据其他实施方案,所述癌症是血液学癌症。根据一些实施方案,所述血液学癌症选自:白血病,包括急性髓系白血病(AML)、慢性髓系白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL);淋巴瘤,包括霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤;和多发性骨髓瘤。

[0093] 根据一些实施方案,所述个体是人。

[0094] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用或进行至少一种额外的抗癌疗法。根据某些实施方案,所述额外的抗癌疗法是手术、化疗、放疗或免疫疗法。

[0095] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用本文描述的偶联物和额外的抗癌药剂。根据一些实施方案,所述额外的抗癌药剂选自免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂和化学治疗剂。

[0096] 本文还描述了制备用于在患有癌症的个体中治疗癌症的组合物的方法,所述方法

包括将本文描述的ADC与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0097] 根据另一个方面,本发明提供了一种将至少一种本文所描述的人源化抗体、其片段或偶联物递送到细胞的方法,所述方法包括将所述细胞与所述人源化抗体、其片段或偶联物接触。

[0098] 根据一些实施方案,所述方法包括向受试者的细胞施用所述人源化抗体、其片段或偶联物。根据某些实施方案,所述受试者是人类受试者。

[0099] 根据另一个方面,本发明提供了一种将至少一种本文所描述的人源化抗体、其片段或其偶联物递送到受试者的细胞的方法,所述方法包括向所述受试者施用所述至少一种人源化抗体、其片段或偶联物。根据一些实施方案,所述细胞是肿瘤细胞。

[0100] 根据一个方面,本发明进一步提供了一种在受试者中诊断或预后癌症的方法,所述方法包括使用至少一种本文描述的抗体偶联物测定所述受试者的生物样品中黏连蛋白4的表达水平。

[0101] 根据一些实施方案,所述方法包括检测被结合的抗体或抗体片段,并确定所述样品中黏连蛋白4的表达水平。根据某些实施方案,所述方法包括将所述表达水平与对照进行比较。根据一些实施方案,所述对照是预先定义的值。根据某些实施方案,所述对照是相应的非癌组织。根据一些实施方案,所述比较指示或表明所述受试者是否患有癌症。

[0102] 根据一些实施方案,所述方法用于癌症亚型的诊断。根据一些实施方案,所述方法用于确定患者接受抗癌疗法的资格。根据某些实施方案,所述抗癌疗法是抗体-药物偶联物。根据一些实施方案,所述方法用于确定患者接受使用本文所描述的ADC的疗法的资格。

[0103] 根据另一个方面,本发明进一步提供了一种诊断、确定或量化黏连蛋白4表达的方法,所述方法包括将生物样品与本文所描述的抗体偶联物接触,并测量复合物形成的水平。

[0104] 根据一些实施方案,所述检测或量化黏连蛋白4的表达的方法包括下述步骤:

[0105] i.将样品与本文描述的抗体偶联物温育;

[0106] ii.使用所述偶联物检测结合的黏连蛋白4。

[0107] 根据一些实施方案,所述方法进一步包括下述步骤:

[0108] iii.将步骤(ii)的量与从含有已知量的黏连蛋白4的参比样品获得的标准曲线进行比较;和

[0109] iv.从所述标准曲线计算所述样品中黏连蛋白4的量。

[0110] 根据一些特定实施方案,所述样品是体液或固体组织。在一些实施方案中,所述方法在体外或离体进行。

[0111] 还提供了一种用于测量生物样品中黏连蛋白4的表达的试剂盒,其包含至少一种本文所描述的偶联物和测量黏连蛋白4表达的手段。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含指导所述试剂盒的使用的说明材料。

[0112] 从下文给出的详细描述,本发明的进一步实施方案和全部适用范围将变得显而易见。然而,应当理解,所述详细描述和具体实施例尽管指示了本发明的优选实施方案,但仅通过说明的方式给出,因为对于本领域技术人员而言,从该详细描述,本发明的精神和范围内的各种变化和修改将变得显而易见。

附图说明

[0113] 图1A-1C示出了黏连蛋白4表达mRNA水平(如所示的高或低)与胰腺导管腺癌(图1A)、肾透明细胞癌(图1B)和皮肤黑色素瘤(图1C)患者的生存概率的相关性。数据集从TCGA网站获得,并使用oncolnc.org网站(https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67)进行分析。N表示分析时包含的患者的数量。

[0114] 图2示出了显示黏连蛋白4表达阳性的肿瘤的百分比的图。数据从proteinatlas.com获得,使用HPA010775mAb(抗黏连蛋白4抗体,Sigma-Aldrich®)。在13/20的适应症中,观察到黏连蛋白4的膜表达呈中高水平。

[0115] 图3描绘了在体外使用NTX1105(VH0/Vκ0)的各种接头-有效载荷组合对MDA-MB-468细胞系(乳腺腺癌细胞)的剂量依赖性杀伤。

[0116] 图4描绘了NTX1105(VH0/Vκ0)ADC对皮下(s.c.)植入到NOD-SCID雌性小鼠的三阴性乳腺癌(TNBC)肿瘤细胞系MDA-MB-468的体内功效。示出了使用NTX1105的所有接头-有效载荷(LP)组合的治疗的效果。

[0117] 图5证实了一些人源化变体的改进的特征。评估了亲本/嵌合(VH0/Vκ0)抗体和六种纯化的先导人源化变体的生产率。

[0118] 图6A-6B示出了人源化变体的强大体内活性。评估了以约为4(~4)的DAR与MC-VC-PAB-MMAE偶联的先导人源化NTX1105(VH4/Vκ5和VH5/Vκ5)ADC对TNBC肿瘤细胞系MDA-MB-468的体内功效。结果被显示为肿瘤体积(图6A)和肿瘤体积随时间的倍数变化(图6B)。

[0119] 图7A-7B示出了NTX1105(H4κ5)ADC与恩诺单抗-vedotin(PADCEV)相比的差异体外活性。测试了两种ADC的细胞上结合(图7A)和体外杀伤活性(图7B)。

[0120] 图8A-8B示出了以约为4(~4)的DAR与MC-VC-PAB-MMAE偶联的NTX1105(H4κ5)的体内抗肿瘤活性优于恩诺单抗-vedotin(PADCEV)。为了将所述ADC与PADCEV进行比较,使用H322(NSCLC模型)在体内评估了两种ADC的活性。所述ADC以1mg/kg的6剂(图8A)或3mg/kg的3剂(图8B)给药。

[0121] 图9描绘了具有DAR-4MMAE或DAR-8依喜替康有效载荷的人源化NTX1105(H4κ5-FcgR^{null})ADC对抗雌性裸小鼠中的H322M(肺癌模型)s.c.肿瘤模型的体内功效。

[0122] 图10描绘了具有DAR-4依喜替康的人源化NTX1105(H4κ5-FcgR^{null})抗黏连蛋白4ADC与恩诺单抗-DAR-4依喜替康相比,对抗雌性裸小鼠中的大(>450mm^3)H322M肿瘤模型的体内优势。

具体实施方式

[0123] 本发明提供了可用于治疗癌症的人源化抗黏连蛋白4抗体和包含它们的抗体-药物偶联物或ADC。有利的是,本文描述的ADC包含几乎完全人源化的抗体,从而避免了对所述抗体产生不良免疫应答的风险,因此可能在人体中使用是安全的。发现本文描述的ADC是高度有效的,并优于其他已知的抗黏连蛋白4-ADC。

[0124] 在下面的描述中阐述了某些具体细节,以便提供对各种实施方案的全面理解。然而,本领域技术人员将理解,所提供的实施方案可以在没有这些细节的情况下实践。除非上下文另有要求,否则在整个本说明书和随后的权利要求书中,词语“包含”及其变化形式应当以开放、包容的意义解释,即解释为“包括但不限于”。在本说明书和随附的权利要求书中

使用的没有具体数目的指称包括复数指称物,除非内容另有明确规定。还应注意的是,除非内容另有明确规定,否则术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用。此外,本文提供的标题仅为方便起见,并不解释所要求保护的实施方案的范围或含义。本文所使用的术语“约”是指与所陈述的量相差10%或更少的量。

[0125] 本文使用的术语“黏连蛋白4(Nectin-4)”或“黏连蛋白细胞黏附分子4”是指一种510个氨基酸、分子量为55454Da的单次跨膜I型膜蛋白,也被称为PVRL4、LNIR、PRR4和EDSS1。黏连蛋白4蛋白含有两个免疫球蛋白样(Ig样)C2型结构域和一个Ig样V型结构域。它通过反式同嗜性和异嗜性相互作用参与细胞黏附。可溶性形式由金属蛋白酶ADAM17/TACE在细胞表面处的蛋白水解切割产生,且分泌形式在乳腺肿瘤细胞系和乳腺肿瘤患者中都有发现。根据本发明的示例性黏连蛋白4被阐述在下述SwissPort、UniPort和GenBank符号或登录号中:Q96NY8-NECT4_HUMAN、Q96NY8、B4DQW3、Q96K15、Q96NY8-1、Q96NY8-2、ENSP00000356991、NP_112178.2、XP_005245565.1、XP_011508323.1、XP_011508324.1或XP_011508325.1。

[0126] 根据一个方面,本发明提供了一种特异性结合人黏连蛋白4的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约90%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0127] 根据另一个方面,本发明提供了一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含与毒素(有效载荷)偶联的人源化抗黏连蛋白4抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含一组六个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYY(SEQ ID NO:26),重链CDR2包含序列IYPGNVNT(SEQ ID NO:22),重链CDR3包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),轻链CDR1包含序列QSVNND(SEQ ID NO:24),轻链CDR2包含氨基酸序列YAS(SEQ ID NO:25),并且轻链CDR3包含序列QQAYRSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0128] 根据另一个方面,本发明包含一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含与选自MMAE、SN-38、DM1、DM4和MMAFA的毒素偶联的人源化抗黏连蛋白4抗体或其抗原结合部分,所述人源化抗体或其抗原结合部分包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约90%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0129] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含含有氨基酸序列QVQL(Q/V)QSG(P/S)ELKKP(E/G)ASVK(I/V)SCKASGYTFTSYY IHWV(K/R)QAPGQGLEW(I/M)GWIYPGNVNTKYNERF(K/Q)GR(A/V)T(L/I)TA DKST(N/S)TA(H/Y)MELSSL(T/R)SED(S/T)AVY(F/Y)CARSNPYVMDYWGQGT SVTVSS(SEQ ID NO:13)的重链可变区,和包含氨基酸序列(S/D)I(V/Q)MTQSPS(F/T)L(L/S)AS(A/V)GDRVTITC(K/R)ASQSVNNDVAWYQQKPG(L/K)AP(E/K)LLMYYASNRFTGVPDRF(T/S)GSGYGTDFTLTISSLQAED(L/V)A(I/V)YFCQQAYRSPYTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:14)的轻链可变区。

[0130] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包

含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的序列具有至少约95%同一性的可变区,并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的序列具有至少约95%同一性的可变区。SEQ ID NO:2-6、8-12是在改进的可展性和低免疫原性的基础上选择的NTX1105的人源化变体。

[0131] 一般而言,根据上下文,"NTX1105"包括嵌合抗体和/或其人源化变体。所述母体嵌合抗体公开在WO 2019/215728中(克隆11)。所述母体嵌合抗体在本文中被命名为NTX1105(VH0/Vk0)。

[0132] NTX1105的人源化变体包括五种重链(VH1至VH5)和五种轻链(Vκ1至Vκ5)。根据一些实施方案,所述人源化变体包含SEQ ID NO:13(重链)和SEQ ID NO:14(轻链)中所示的序列式。

[0133] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:5的可变区,并且所述轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的可变区(在本文中被表示为NTX1105(VH5/Vk5)。

[0134] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含重链可变区和轻链可变区的组合,其中所述组合选自:SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:11以及SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:12。重链和轻链的每种可能性或组合代表本发明的一个独立实施方案。

[0135] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含重链可变区和轻链可变区的组合,其中所述组合选自:

[0136] i.SEQ ID NO:5中所示的重链可变区序列和SEQ ID NO:12中所示的轻链可变区序列;和

[0137] ii.SEQ ID NO:6中所示的重链可变区序列和SEQ ID NO:12中所示的轻链可变区序列。

[0138] 本发明的偶联物包含本文所描述的人源化抗体。所述抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体和多反应性抗体)和抗体片段。因此,抗体包括但不限于全长及其保留结合特异性的片段和部分,例如其任何特异性结合部分,包括具有任何免疫球蛋白类别和/或同种型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE和IgM)的那些特异性结合部分;以及生物学相关(抗原结合)片段或其特异性结合部分,包括但不限于Fab、F(ab')2、Fv和scFv(单链或相关实体)。单克隆抗体通常是基本上均质的抗体组合物中的一种;因此,除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变之外,单克隆抗体组合物中包含的任何单个抗体都是相同的。所述抗体可以包含人IgG1恒定区。所述抗体可以包含人

IgG4恒定区。所述抗体可以包含人κ轻链。

[0139] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体及其功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')2片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链抗体片段(包括单链可变片段(sFv或scFv))和单域抗体(例如sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖遗传工程改造和/或以其他方式修饰的免疫球蛋白形式,例如胞内抗体、肽体、全人抗体、人源化抗体和异源偶联抗体、多特异性(例如双特异性)抗体、双体抗体、三体抗体和四体抗体、串联di-scFv、串联tri-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应当被理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。所述抗体可以包含人IgG1恒定区。所述抗体可以包含人IgG4恒定区。所述抗体可以包含人κ轻链。

[0140] 在本领域中已知有几种方法可用于确定给定抗体分子的CDR序列,但不存在标准的明确方法。从抗体重链和轻链可变区确定CDR序列可以根据本领域中已知的任何方法来进行,包括但不限于被称为KABAT、Chothia和IMGT的方法。一组选定的CDR可能包括通过一种以上的方法鉴定的序列,即例如一些CDR序列可以使用KABAT确定,另一些可以使用IMGT确定。根据一些实施方案,所述mAb可变区的CDR序列使用IMGT方法确定。例如,CDR确定根据Kabat(Wu T.T和Kabat E.A.,JExp Med,1970;132:211-50)和IMGT(Lefranc M-P等,Dev Comp Immunol,2003,27:55-77)来进行。

[0141] 当使用术语“具有某个序列的CDR”或类似术语时,它包括其中所述CDR包含所述指定序列的选项,以及其中所述CDR由所述指定序列组成的选项。

[0142] 所述提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,所述部分与所述完整抗体结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv或sFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,所述抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,例如scFv。

[0143] “人源化”抗体是其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基均源自非人CDR,并且所有或基本上所有构架区(FR)氨基酸残基均源自人FR的抗体。人源化抗体任选地可以包括至少一部分源自人抗体的抗体恒定区。非人抗体的“人源化形式”是指非人抗体的经历人源化的变体,通常是为了降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。根据一些实施方案,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如CDR残基所源自的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或提高抗体的特异性或亲和力。

[0144] 所述Fc结构域中的氨基酸残基可以被替换为无效,这意味着所述Fc结构域不结合Fc受体,或者可以以如此低的亲和力和/或亲合力结合,从而不会因结合而引起任何Fc受体信号传导。所述Fc结构域可以对与Fcγ受体的结合无效。Fc结构域可以对其结合无效的一些示例Fcγ受体可以是但不限于FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32a)、FcγRIIB(CD32b)、FcγRIIIA(CD16a)、FcγRIIIA(CD16a)F158变体、FcγRIIIA(CD16a)V158变体或FcγRIIIB(CD16b)。Fc结构域可以具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个或四个或更多个降低所述Fc结构域与Fc受体的结合的氨基酸替换。

[0145] 根据一些实施方案,所述人源化抗体具有阻止FcγR介导的内化的突变Fc结构域。

[0146] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含Fc无效结构域。根据某些实施方案,所述Fc结构域对与Fcγ受体的结合是无效的。

[0147] 本文所使用的"Fc无效"是指与一种或多种Fcγ受体结合弱或没有结合的结构域。

[0148] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含Fc无效结构域。根据某些实施方案,所述Fc结构域对与免疫细胞上存在的Fcγ受体的结合是无效的。根据某些示例性实施方案,所述Fc结构域对与CD64、CD32a、CD32b、CD16a和/或CD16b的结合是无效的。

[0149] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含具有LALAPG突变体的Fc无效结构域。

[0150] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含SEQ ID NO:51中所示的重链序列和SEQ ID NO:52中所示的轻链序列(具有LALAPG突变体($FcgR^{null}$)的NTX1105(H4/k5))。

[0151] 本发明提供了一种偶联物,其包含本文公开的人源化抗体和毒素。

[0152] 根据一些实施方案,所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0153] 根据某些实施方案,所述毒素是微管破坏药物。根据某些示例性实施方案,所述毒素是澳瑞他汀或其衍生物。根据某些实施方案,所述澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。根据一些实施方案,所述毒素是依喜替康(Exatecan)。

[0154] 根据一些实施方案,所述毒素是皂苷。

[0155] 根据一些实施方案,所述毒素是美登素衍生物。根据某些实施方案,所述美登素衍生物是DM4或DM1。

[0156] 根据一些实施方案,所述毒素是喹啉生物碱。根据某些实施方案,所述喹啉生物碱是SN-38。

[0157] 根据其他实施方案,所述毒素选自MMAE、MMAF、皂苷、DM4、DM1、SN-38、卡利奇霉素、DXd、PBD、倍癌霉素、山卓霉素、α-鹅膏蕈碱、毛壳素、CYT997、柔红霉素、17-AAG、农螯菌素A(Agrochelin A)、多柔比星、甲氨蝶呤、秋水仙素、虫草素、埃博霉素B、潮菌素(Hygrolidin)、草环氧菌素(Herboxidiene)、阿魏醇、弯孢菌素(Curvulin)、紫杉醇、恩格勒素A(Englerin A)、他托布林(Taltobulin)、雷公藤内酯、念珠藻素和奈莫柔比星。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0158] 根据一些实施方案,所述毒素是SN-38。根据一些实施方案,所述毒素是DM1。根据一些实施方案,所述毒素是DM4。根据一些实施方案,所述毒素是MMAE。根据一些实施方案,所述毒素是MMAF。根据一些实施方案,所述毒素是依喜替康。

[0159] 根据一些实施方案,所述抗体被直接连接到所述毒素。根据其他实施方案,所述抗体和毒素通过接头连接。根据一些实施方案,本文描述的人源化被共价连接到所述毒素。

[0160] 根据一些实施方案,所述接头是可切割的。根据其他实施方案,所述接头是不可切割的。

[0161] 根据一些实施方案,所述接头对pH或氧化还原电位的变化做出响应而被切割。根据一些实施方案,所述接头在与溶酶体酶接触时被切割。

[0162] 根据一些实施方案,所述接头包含选自6-马来酰亚胺基己酰基(MC)、马来酰亚胺基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苯甲氧基羰基(PAB)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯

(SLAB)、6-马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲氧基羰基(MC-vc-PAB)、Val-Cit-PABC、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基3-(吡啶-2-基二硫代)-丙酸酯(SPDP)、Phe-Lys(Fmoc)-PAB、Aloc-D-Ala-Phe-Lys(Aloc)-PAB-PNP、Boc-Phe-(Alloc)Lys-PAB-PNP和全氟代苯基3-(吡啶-2-基二硫烷基)丙酸酯的部分。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0163] 根据一些实施方案,所述抗体与两个或更多个毒素分子偶联。

[0164] 根据另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文描述的偶联物和药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0165] 根据其他实施方案,根据本发明的药物组合物用于治疗癌症。

[0166] 可以通过本发明治疗的癌症包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴系恶性肿瘤。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈癌,以及B细胞淋巴瘤(包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级别/滤泡性NHL、中级别弥漫性NHL、高级别成免疫细胞性NHL、高级别成淋巴细胞性NHL、高级别小非核裂细胞性NHL、大肿块NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性成髓细胞白血病和移植后淋巴增生性障碍(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病、水肿(例如与脑肿瘤相关的)和梅格斯综合征相关的异常血管增殖。优选地,所述癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西肉瘤、类癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。本发明的适合于治疗的癌性病症包括转移性癌症。

[0167] 根据其他实施方案,根据本发明的药物组合物用于治疗以黏连蛋白4的过表达为特征的癌症。可以使用已知数据库例如癌症基因组图谱(TCGA)来鉴定与黏连蛋白4的过表达相关的癌症类型。根据某些实施方案,可以使用根据本发明的组合物治疗的癌症选自肾上腺皮质癌(ACC)、嫌色性肾细胞癌(KICH)、肝细胞癌(LIHC)、结肠和直肠腺癌(COAD和READ)、胰腺导管腺癌(PAAD)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PCPG)、乳头状肾癌(KIRP)、肺腺癌(LUAD)、头颈部鳞状细胞癌(HNSC)、前列腺腺癌(PRAD)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、宫颈癌(CESC)、皮肤黑色素瘤(SKCM)、间皮瘤(MESO)、尿路上皮膀胱癌(BLCA)、透明细胞肾癌(KIRC)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、子宫癌肉瘤(UCS)、肉瘤(SARC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)、乳头状甲状腺癌(THCA)、多形性成胶质细胞瘤(GBM)、乳腺癌(BRCA)、低级别神经胶质瘤(LGG)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBC)。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0168] 作为活性成分的本发明的分子被溶解、分散或混合在赋形剂中,众所周知,所述赋形剂是药学上可接受的并且与所述活性成分相容。适合的赋形剂是例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。本领域技术人员熟知其他适合的载体。此外,如果需要,所述组合物可以含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂。

[0169] 根据本发明的药物组合物可以与抗肿瘤组合物一起施用。

[0170] 本文使用的术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性或预防性措施两者。需要治疗的

人包括已经患有所述障碍的人以及将要预防所述障碍的人。术语“治疗”还涉及缓解或预防与疾病相关的症状和/或减轻疾病的严重程度。

[0171] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体实例包括黑色素瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、髓细胞癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆道癌或子宫内膜癌。

[0172] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括作为包含施用至少一种额外的抗癌药剂的治疗方案的一部分施用所述药物组合物。

[0173] 本文所使用的术语“个体”、“患者”或“受试者”是指被诊断患有、疑似患有或有风险发生可使用所述组合物和方法治疗的至少一种疾病的个体。根据一些实施方案,所述个体是哺乳动物。根据一些实施方案,所述哺乳动物是小鼠、大鼠、兔、狗、猫、马、奶牛、绵羊、猪、山羊、美洲驼、羊驼或牦牛。根据一些实施方案,所述个体是人。

[0174] 本文所使用的术语“有效量”是指当施用到哺乳动物时引起生物效应的治疗剂的量。生物效应包括但不限于减少肿瘤生长、减少肿瘤转移或延长携带肿瘤的动物的存活期。“治疗量”是为发挥治疗效果而计算的药物浓度。治疗量涵盖能够在个体的群体中诱导治疗反应的剂量范围。所述哺乳动物可以是人类个体。所述人类个体可能患有或疑似患有肿瘤。

[0175] 作为活性成分的本发明的分子被溶解、分散或混合在赋形剂中,众所周知,所述赋形剂是药学上可接受的并且与所述活性成分相容。适合的赋形剂是例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。本领域技术人员熟知其他适合的载体。此外,如果需要,所述组合物可以含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂。

[0176] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括作为包含施用至少一种额外的抗癌药剂的治疗方案的一部分施用所述药物组合物。

[0177] 根据一些实施方案,所述抗癌药剂选自抗代谢剂、有丝分裂抑制剂、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、天冬酰胺酶、烷基化剂、抗肿瘤抗生素及其组合。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0178] 根据一些实施方案,抗代谢剂选自阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨和羟基脲。根据一些实施方案,所述有丝分裂抑制剂选自长春新碱、长春花碱和长春瑞滨。根据一些实施方案,所述拓扑异构酶抑制剂选自拓扑替康和伊立替康。根据一些实施方案,所述烷基化剂选自白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺铂、卡铂、异环磷酰胺、氮芥、美法仑、噻替哌、达卡巴嗪和丙卡巴肼。根据一些实施方案,所述抗肿瘤抗生素选自博莱霉素、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、丝裂霉素、米托蒽醌和普卡霉素。根据一些实施方案,所述拓扑异构酶II抑制剂选自依托泊苷和替尼泊苷。每种可能性代表本发明的一个独立实施方案。

[0179] 本文还描述了一种制备用于在患有癌症的个体中治疗癌症的组合物的方法,所述方法包括将本文所描述的人源化抗体或ADC与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。在某些实施方案中,所述癌症包括实体瘤。在某些实施方案中,所述癌症选自成胶质细胞瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、前列腺癌和肺癌。

[0180] 实施例

[0181] 现在参考下述实施例,所述实施例与上述描述一起以非限制性方式说明本发明。

[0182] 通常,本文使用的命名法和本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学、免疫学和重组DNA技术。此类技术在本领域中是众所周知的。为了方便读者,在整个本文件中提供了引用公知程序的其他通用参考文献。

[0183] 实施例1.黏连蛋白4mRNA的高表达与各种癌症患者的低生存概率相关

[0184] 在来自TCGA网站的数据上检查黏连蛋白4mRNA表达与生存概率之间的相关性,使用oncolnc.org网站(https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67)进行分析,并呈现在图1A-1C中。黏连蛋白4mRNA表达水平是将患者分为低表达者和高表达者两个亚组的基础,如方框所示,低表达患者的生存优势证实了黏连蛋白4发挥的有害作用以及通过靶向该蛋白质提高生存率的潜力。

[0185] 实施例2.黏连蛋白4在大多数实体瘤上在蛋白质水平上表达

[0186] 在Proteinatlas.com数据库中搜索黏连蛋白4的所有别名(NECTIN4、PVRL4)。在病理学标题下,发现了使用单一mAb的数据(HPA010775)。不同肿瘤之间的表达水平数据描绘在图2中。所述图显示了黏连蛋白4表达阳性的肿瘤的百分比。在所有适应症中,至少一名患者具有黏连蛋白4的表面表达,并且在13/20的适应症中,观察到黏连蛋白4的膜表达处于中高水平。

[0187] 实施例3.各种细胞毒性剂可以被高效偶联到靶向黏连蛋白4的mAb,以产生黏连蛋白4ADC

[0188] 描述了用于偶联抗黏连蛋白4抗体克隆-11(VH0/Vκ0)-hIgG1(也被描述在属于本发明的发明人的WO 2019/215728中)以产生NTX1105(VH0/Vκ0)黏连蛋白4ADC的各种接头-有效载荷组合和药物抗体比率(DAR)(表1)。表1中描述的细胞毒性剂包括微管蛋白和TOPO1靶向剂,并且DAR根据使用所提及的有效载荷的已批准的ADC来选择。

[0189] 表1.用于偶联克隆-11(VH0/Vκ0)-hIgG1以产生NTX1105(VH0/Vκ0)黏连蛋白4ADC的各种接头-有效载荷组合和药物抗体比率(DAR)

[0190]

接头	有效载荷	释放机制	平均DAR(LC-MS)
MC-VC-PAB	MMAE	蛋白水解切割	4.2
MC	MMAF	降解	3.8
SMCC	DM1	降解	3.6
SPDB	DM4	氧化还原	3.5
Lys-PAB-CO	SN38	pH	7.5

[0191] 实施例4.当与靶向黏连蛋白4的mAb偶联时,各种细胞毒性剂可以在体外诱导肿瘤细胞杀伤

[0192] 接下来,检查了NTX1105(VH0/Vκ0)的各种接头-有效载荷组合的剂量依赖性杀伤活性。TNBC模型的体外测定法使用了MDA-MB-468细胞系。将靶细胞以每孔$2*10^3$个细胞的密度铺板,并允许其黏附4-6小时的时长。使用2倍稀释以30-1.9nM的浓度添加ADC,然后将细胞与ADC继续温育72小时。72小时后收获测定体系,并使用CellTiter-Glo®2.0细胞存活测定体系(Promega G9242)按照标准方案评估肿瘤细胞杀伤。杀伤数据显示了强大的效力,对于大多数有效载荷而言未达到EC-50(DM1/4除外,其在~3.8nM下达到EC-50),表明无论选择何种接头-有效载荷组合,ADC均具有高效力(图3)。

[0193] 实施例5.当与靶向黏连蛋白4的mAb偶联时,各种细胞毒性剂可以在体内诱导肿瘤

细胞杀伤

[0194] 评估了NTX1105(VH0/Vκ0)抗黏连蛋白4ADC对抗s.c.植入到6周龄NOD-SCID雌性小鼠的TNBC肿瘤细胞系MDA-MB-468(5M个细胞/小鼠)的体内功效。当肿瘤达到140mm^{3}的平均体积时开始治疗,动物接受3剂(Q4D)5mg/kg的具有所指示的接头-有效载荷的NTX1105。图4比较了使用NTX1105的所有接头-有效载荷(LP)组合的治疗的效果。其中三种LP组合具有显著效果:SN38和DM4导致显著的肿瘤生长抑制(TGI,$p<0.05$),而对MMAE观察到肿瘤完全消退。5种测试的LP中的3种导致显著的抗肿瘤活性,这一事实表明了NTX1105作为用于ADC的Ab的独特用途。基于这些实验的结果,在NTX1105 mAb的基础上进行了人源化抗黏连蛋白4ADC的进一步开发。

[0195] 实施例6.首选的人源化黏连蛋白4mAb保留了人黏连蛋白4的结合和与食蟹猴黏连蛋白4的交叉反应性

[0196] 为了评估所有变体与人或食蟹猴黏连蛋白4抗原的结合并选择与嵌合(VH0/Vκ0)抗体的亲和力最接近的先导人源化IgG,对来自转染细胞培养物的上清液进行了单循环动力学。动力学实验在25℃下,在运行Biacore T200控制软件V2.0.1和评估软件V3.0(Cytiva,Marlborough,USA)的Biacore T200上进行。使用重组人(Acro Biosystems,Newark,USA)或食蟹猴黏连蛋白4(Acro Biosystems,Newark,USA)作为分析物,以40μl/min的流速进样以最小化任何潜在的传质效应,获得单循环动力学数据。使用抗原在运行缓冲液中的四点两倍稀释(范围为1.25nM至10nM),在每种浓度之间不进行再生。对于四次浓度逐渐增加的抗原进样中的每次而言,监测结合阶段150秒,并在最后一次抗原进样后测量单个解离阶段250秒(为了提高拟合度,对于人黏连蛋白4而言将解离缩短至175秒)。使用单次进样3M $MgCl_2$进行传感器芯片表面的再生。基于来自对上清液的Biacore单循环动力学分析的相对KD,选择了六种人源化变体(VH4/Vκ1、VH4/Vκ3、VH4/Vκ4、VH4/Vκ5、VH5/Vκ4和VH5/Vκ5)作为扩大生产和纯化的先导IgG。所有选定的变体都在亲本(VH0/Vκ0)克隆的2.5倍范围内,表明所述人源化变体具有相似的活性特性(表2)。

[0197] 表2.在人源化后排名靠前的NTX1105克隆相对于亲本mAb(VH0/Vκ0)的亲和力值

[0198]

变体	人黏连蛋白 4 K_D (M)	食蟹猴黏连蛋白 4 K_D (M)
VH0/Vκ0	1.09E-08	1.21E-08

[0199]

VH4/Vκ1	1.54E-08	1.93E-08
VH4/Vκ3	1.55E-08	1.94E-08
VH4/Vκ4	1.80E-08	2.13E-08
VH4/Vκ5	1.22E-08	1.37E-08
VH5/Vκ4	1.77E-08	1.92E-08
VH5/Vκ5	1.15E-08	1.27E-08

[0200] 实施例7.人源化抗黏连蛋白4mAb的改进特征(降低的免疫原性)

[0201] 正如通过应用Abzena专有的计算机技术iTope™(Perry等,2008)所确定的,分析了所设计的VH和Vκ序列是否存在潜在的T细胞表位。iTope™软件预测肽的氨基酸侧链与34个人II类MHC等位基因的开放式结合沟内的特异性结合口袋(特别是口袋位置p1、p4、p6、p7和p9)之间的有利相互作用。这些等位基因代表了世界范围内发现的最常见的HLA-DR等位基因,没有对任何特定种族群体中最常见的等位基因进行加权。所述等位基因中的20个含有"开放的"p1构型,14个含有"封闭的"构型,其中第83位处的甘氨酸被缬氨酸替换。关键结合残基的位置通过跨越所测试的蛋白质序列的重叠8个氨基酸的9mer肽的计算机模拟产生来实现。然而,结果应考虑到所有II类MHC结合的预测方法都固有地高估了T细胞表位的数量这一事实来评估,因为它们不允许在抗原呈递过程中进行其他重要过程,例如蛋白质/肽加工、被T细胞受体识别或T细胞对肽的耐受。iTope™分析使用重叠的9mer肽(每个肽与最后一个肽重叠8个残基)进行。基于与34种II类MHC同种异型中的每一者的潜在"拟合"和相互作用对每个9mer进行评分,得到的肽评分在0到1的范围内。然后如下所述通过iTope™定义II类MHC表位:

[0202] (1)混杂的高亲和力II类MHC结合肽结合>50%的等位基因,其中大多数(34个等位基因中的17个)的结合评分>0.6。

[0203] (2)混杂的中等亲和力II类MHC结合肽结合>50%的等位基因,结合评分>0.55(但没有大多数>0.6)。

[0204] 在p1锚定位置中出现大芳香族氨基酸(即F、W、Y)的情况下,这些标准被改变,其中34个等位基因中的20个的开放p1口袋允许大芳香族残基的结合。当这种情况发生时,混杂肽被定义为与20个等位基因的子集中的10个或更多个等位基因结合。在亲本抗体和设计的变体中鉴定到许多种系混杂高和中亲和力II类MHC结合配体,然而由于T细胞耐受,这些表位不可能具有免疫原性潜力,因此被排除在任何进一步分析之外。总体而言,人源化过程产生显著改善的mAb,具有较低的免疫原性评分,从而降低了相关风险。在该步骤后免疫原性最低的变体包括重链变体3-5和轻链变体5(表3)。表3.人源化抗黏连蛋白4mAb的改进特征。人源化变体与亲本相比免疫原性降低,正如通过预测的MHCII表位所衡量的(预测的表位较少与免疫原性较低相关)(iTope评分)。VH0和人源化重链(VH1-5)和轻链(Vκ1-5)用于产生用于先导药物选择的人源化变体。能够产生<6个高亲和力表位的组合的重链和轻链以粗体

显示。

[0205] 重链：

[0206]

预测的亲和力 MHCII	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
中	7	5	4	4	4	4
高	4	4	4	**2**	**2**	**1**

[0207]

[0208] 轻链：

[0209]

预测的亲和力MHCII	Vk0	Vk1	Vk2	Vk3	Vk4	Vk5
中	9	4	3	3	3	4
高	9	7	7	6	5	4

[0210] 实施例8.人源化抗黏连蛋白4mAb的改进特征(改进的可展性)

[0211] 热爬坡稳定性实验(Tm和Tagg)是对蛋白质和制剂进行稳定性排名的成熟方法。蛋白质的变性曲线提供了有关其热稳定性的信息,并代表了用于评估结构和制剂缓冲液修改的结构“指纹”。蛋白质热结构稳定性的一个广泛使用的衡量标准是它从天然状态解折叠到变性状态的温度。

[0212] 对于许多蛋白质而言,这种解折叠过程发生在狭窄的温度范围内,并且这种转变的中点被称为“解链温度”或“Tm”。为了确定蛋白质的解链温度,UNcle测量了当蛋白质经历构象变化时Sypro橙(其与蛋白质暴露的疏水区域结合)的荧光。将纯化的先导抗体(一式两份)在PBS中稀释至0.5mg/ml的最终测试浓度,并向其中添加Sypro橙(160x储用溶液)至20x溶液的最终浓度。将9μL的每种样品混合物一式两份装入Uni微量比色皿中。样品经历25-95℃的热爬坡,爬坡速率为0.3℃/分钟,激发波长为473nm。从250-720nm收集全发射光谱,并使用510-680nm之间的曲线下面积来计算转变曲线的拐点(Tonset和Tm)。在473nm处监测静态光散射(SLS)允许检测蛋白质聚集,并从得到的SLS曲线计算Tagg(聚集的开始)。使用UNcle™软件4.0版进行数据分析。没有观察到TM或Tonset的显著变化,对于两种人源化变体(VH4/Vκ5和VH5/Vκ5)观察到稳定性的显著改善(超过VH0/Vκ0>5℃)(表4)。

[0213] 表4.一些人源化变体的特征。描绘了使用UNcle生物稳定性平台测定的亲本/嵌合(VH0/Vκ0)抗体和六种纯化的先导人源化变体的热稳定性值的总结。稳定性Tagg(聚集的测量)提高超过5摄氏度被认为是显著的,并以粗体标记。

[0214]

变体	平均 Tonset（℃）	平均 Tm1（℃）	（聚集）平均 Tagg（℃）
VH0/Vκ0	61.4	68.7	76.3
VH4/Vκ1	61.0	68.3	74.6
VH4/Vκ3	60.6	67.9	79.6
VH4/Vκ4	60.4	67.7	78.4
VH4/Vκ5	59.8	67.7	**81.5**
VH5/Vκ4	60.5	68.2	80.1
VH5/Vκ5	60.7	68.8	**82**

[0215] 实施例9.人源化抗黏连蛋白4mAb的改进特征(改进的生产率)

[0216] mAb的生产是一个复杂的过程,受到所述分子的氨基酸组成和结构的影响。瞬时生产是mAb所具有的“生产率”的一个良好指标。使用PEI转染方法在6孔板中将嵌合(VH0/Vκ0)和人源化重链和轻链DNA构建体的组合瞬时转染到HEK293 EBNA贴壁细胞(LGC Standards,Teddington,UK)中,并在转染后温育6天。收获样品,使用蛋白A生物传感器(Molecular Devices,Wokingham,Berkshire,UK)在Octet QK 384上测量抗体浓度,使用IgG1抗体作为标准品。人源化过程通常提高所有mAb的生产率(通过用相关人源化变体的滴度(mg/ml)除以亲本/嵌合(VH0/Vκ0)的滴度来计算),如图5中所示,先导克隆(VH4/Vκ5和VH5/Vκ5)的生产率提高>10倍。

[0217] 实施例10.先导人源化mAb的强大体内抗肿瘤活性

[0218] 评估了先导人源化NTX1105(VH4/Vκ5和VH5/Vκ5)抗黏连蛋白4ADC对抗s.c.植入到6周龄NOD-SCID雌性小鼠的TNBC肿瘤细胞系MDA-MB-468(5M个细胞/小鼠)的体内功效。根据之前的结果,选择了MMAE有效载荷。动物被给药5mg/kg的先导人源化ADC 4次(Q4D)。如图6A中所示,两种先导ADC均导致肿瘤消退(比治疗开始体积减少66％以上)。出乎意料的是,克隆H4κ5在随着时间的推移维持响应方面明显优于克隆H5κ5。在最后一次给药后40天,用克隆H5κ5治疗导致肿瘤体积与治疗开始时相近(p＝0.8)(停滞)。相比之下,即使在最后一次治疗后40天,克隆H4κ5也会导致肿瘤体积显著低于治疗开始日期(p＝0.038)(图6B)。这一结果是出乎意料的,表明人源化抗黏连蛋白4克隆H4κ5优于其他抗黏连蛋白4人源化mAb。

[0219] 实施例11.在体外NTX1105和恩诺单抗-Vedotin之间的差异结合和细胞杀伤

[0220] 恩诺单抗-vedotin(PADCEV)是唯一获批的靶向黏连蛋白4的ADC。尽管具有出色的临床效果,但PADCEV也有严重的不良事件,其中一些可归因于靶上/肿瘤外结合,因为PADCEV即使在某些正常组织中发现的极低密度的黏连蛋白4下也能发挥作用。在这里假设,

其中一些不良事件可以通过具有显著较低的靶上结合/活性的ADC来预防。

[0221] 在MDA-MB-468细胞上评估结合。简而言之,使用PADCEV或以与PADCEV相同的DAR与MMAE偶联的NTX1105对每孔5*10^4个细胞进行染色。ADC以始于3ug/ml的浓度使用3倍稀释进行添加。使用Alexa Fluor®647(AffiniPure Fab片段山羊抗人IgG(H+L))(cat109-607-003Jackson ImmunoResearch)进行检测。两种ADC均表现出相同的最大结合,这与文献一致,PADCEV的EC-50值约为10pM(黑色箭头),比NTX1105(虚线灰色箭头)强约20倍(图7A)。为了评估2种ADC在体外的杀伤能力,将MDA-MB-468细胞以每孔2*10^3个细胞的密度铺板,并允许其黏附4-6小时的时长。ADC以12-0.01μg/ml的浓度使用4倍稀释进行添加,将细胞与ADC继续温育72小时。72小时后,收获测定体系,并使用CellTiter-Glo®2.0细胞存活测定体系(Promega G9242)评估肿瘤细胞杀伤。杀伤数据显示PADCEV的体外效力比NTX1105高出约16倍(图7B)。总的来说,这些结果表明,NTX1105的安全性能优于PADCEV(靶向黏连蛋白4的最先进的ADC)。

[0222] 实施例12.NTX1105先导人源化克隆与恩诺单抗-vedotin(PADCEV)相比体内抗肿瘤活性更高

[0223] 接下来,将NTX1105先导人源化克隆(VH4/Vκ5)的体内活性与恩诺单抗-vedotin(PADCEV)进行比较。恩诺单抗-vedotin是领先的抗黏连蛋白4ADC,已被批准用于治疗尿路上皮癌患者。使用针对NSCLC肿瘤细胞系H322的体内功效测定法,将先导ADC(人源化NTX1105(VH4/Vκ5),抗黏连蛋白4ADC)与PADCEV进行比较。将肿瘤细胞(5M个细胞/小鼠)s.c.植入到6周龄雌性裸小鼠。当肿瘤达到140mm^3时开始治疗,动物接受6剂(Q4D)PBS(载体)或1mg/kg PADCEV或NTX1105-MC-VC-PAB-MMAE DAR4(与PADCEV相同的偶联方法和DAR),或3剂(Q4D)3mg/kg PADCEV或NTX1105-MC-VC-PAB-MMAE DAR4(与PADCEV相同的偶联方法和DAR)。如图8A中所示,在较低剂量下,PADCEV在任何时间点都对肿瘤生长没有影响,在研究结束时,PADCEV治疗组的平均TV略高于PBS治疗组(924相比于693mm^3ns,p=0.48),而NTX1105能够阻止肿瘤生长(220相比于693mm^3,p=0.04)。此外,NTX1105平均TV从治疗开始日期起没有显著增长(与开始治疗日期相比,p=0.28)。在3mg/kg剂量下,NTX1105和PADCEV两者均导致肿瘤消退(到第20天,与治疗开始相比平均TV减少46%和42%)(图8B)。然而,从首次给药后第34天开始,NTX1105ADC在整个研究期间在阻止肿瘤生长方面显著优于PADCEV。值得注意的是,在研究开始后第48天,PADCEV治疗组在肿瘤体积方面不再显著优于PBS。NTX1105 ADC治疗组导致肿瘤生长完全停滞,并且即使在第48天也比研究开始时肿瘤体积更低(第48天110相比于138mm^3)。这些结果是出乎意料的,特别是考虑到PADCEV显著更强的体外活性。此外,这是首次发现靶向黏连蛋白4的ADC(NTX1105)在对PADCEV没有观察到生物活性的模型中表现出显著的抗肿瘤活性。

[0224] 实施例13.具有靶向微管蛋白或TOPO1的有效载荷的人源化NTX1105(H4K5-$FcgR^{null}$)ADC可以在体内逆转H322肿瘤

[0225] 用1:1基质胶中的5x10^6个H322细胞SC注射雌性裸小鼠(每组n=5)。一旦肿瘤达到140mm^3的平均体积,每4天以盲法方式通过i.v.注射PBS、NTX1105-MMAE-DAR4(3mg/kg)或NTX1105-依喜替康-DAR-8(5mg/kg),对小鼠进行2剂治疗。如图9中所示,两种ADC都能将已建立的肿瘤消退到相同的程度,考虑到之前使用靶向TOPO1的有效载荷的尝试,这是一个令人惊讶的结果(图4)。这显示了使用MMAE和TOPO1有效载荷的NTX1105 ADC的潜在效用。

[0226] 实施例14.具有靶向TOPO1的有效载荷的人源化NTX1105(H4K5-FcgR^{null})ADC优于具有相同有效载荷和DAR的恩诺单抗

[0227] 用1:1基质胶中的5x10^{6}个H322细胞SC注射雌性裸小鼠(每组n＝5)。一旦肿瘤达到480mm^{3}的平均体积,以盲法方式通过i.v.注射10mg/kg的PBS(载体)、基于NTX1105或恩诺单抗的ADC(均为DAR-4依喜替康),对小鼠进行两剂治疗,间隔5天。如图10中所示,在两剂10mg/kg给药后,只有NTX1105 ADC能够阻止肿瘤生长,而恩诺单抗-依喜替康与PBS相比没有显示出效果。这表明NTX1105ADC与其他基于抗黏连蛋白4抗体的ADC相比具有潜在优越性。

[0228] 序列

[0229] 表5.嵌合抗体和人源化可变区

[0230]

SEQ ID NO：	序列	链
1	QVQLQQSGPELVKPETSVKISCKASGYTFTSYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGKATLTADKSSNTAHMQLTSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*	重链（VH0）_嵌合
2	QVQLQQSGPELKKPEASVKISCKASGYTFTSYYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGRATLTADKSTNTAHMELSSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS	重链 VH1
3	QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYTFTSYYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYFCARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS	重链 VH2
4	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYFC	重链 VH3

[0231]

	ARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS	
5	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS	**重链 VH4**
6	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGNVNTKYNERFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS	重链 VH5
7	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVNNDVAWYQQKPGLSPELLMYYASNRFTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISSVQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGGGTKLEIQ*RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	轻 链（Vκ0）_嵌合
8	SIVMTQSPSFLLASAGDRVTITCKASQSVNNDVAWYQQKPGLAPELLMYYASNRFTGVPDRFTGSGYGTDFTLTISSLQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGQGTKLEIK	轻链 Vκ1
9	SIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQSVNNDVAWYQQKPGKAPKLLMYYASNRFTGVPDRFTGSGYGTDFTLTISSLQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGQGTKLEIK	轻链 Vκ2
10	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQSVNNDVAWYQQKPGKAPKLLMYYASNRFTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGQGTKLEIK	轻链 Vκ3
11	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVNNDVAWYQQKPGKAPKLLM	轻链 Vκ4

		YYASNRFTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDLAIYFCQQAYRSPY TFGQGTKLEIK	
[0232]	12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVNNDVAWYQQKPGKAPKLLM YYASNRFTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQAYRSPY TFGQGTKLEIK	**轻链 V κ 5**

[0233] SEQ ID NO:13-重链-包括所有人源化变体的通用序列

[0234] QVQL(Q/V)QSG(P/S)ELKKP(E/G)ASVK(I/V)SCKASGYTFTSYYIHWV(K/R)QAPGQGLEW(I/M)GWIYPGNVNTKYNERF(K/Q)GR(A/V)T(L/I)TADKST(N/S)TA(H/Y)MELSSL(T/R)SED(S/T)AVY(F/Y)CARSNPYVMDYWGQGTSVTVSS

[0235] SEQ ID NO:14-轻链-包括所有人源化变体的通用序列

[0236] (S/D)I(V/Q)MTQSPS(F/T)L(L/S)AS(A/V)GDRVTITC(K/R)ASQSVNNDVAWYQQKPG(L/K)AP(E/K)LLMYYASNRFTGVPDRF(T/S)GSGYGTDFTLTISSLQAED(L/V)A(I/V)YFCQQAYRSPYTFGQGTKLEIK

[0237] 表6.CDR序列

描述	KABAT	IMGT	重叠序列
重链 CDR1	SYYIH SEQ ID NO：15	GYTFTSYY SEQ ID NO：21	SYY SEQ ID NO：26
[0238] 重链 CDR2	WIYPGNVNTKYNERF(K/Q)G SEQ ID NO：16 WIYPGNVNTKYNERFKG	IYPGNVNT SEQ ID NO：22	IYPGNVNT SEQ ID NO：22

[0239]

	SEQ ID NO：27 WIYPGNVNTKYNERFQG SEQ ID NO：28		
重链 CDR3	SNPYVMDY SEQ ID NO：17	ARSNPYVMDY SEQ ID NO：23	SNPYVMDY SEQ ID NO：17
轻链 CDR1	(K/R)ASQSVNNDVA SEQ ID NO：18 KASQSVNNDVA_ SEQ ID NO：29 RASQSVNNDVA_ SEQ ID NO：30	QSVNND SEQ ID NO：24	QSVNND SEQ ID NO：24
轻链 CDR2	YASNRFT SEQ ID NO：19	YAS SEQ ID NO：25	YAS SEQ ID NO：25
轻链 CDR3	QQAYRSPYT SEQ ID NO：20	QQAYRSPYT SEQ ID NO：20	QQAYRSPYT SEQ ID NO：20

[0240] 表7:人源化重链可变区的构架(非CDR)序列

[0241]

链	FR-H1	FR-H2	FR-H3	FR-H4
VH1	QVQLQQSGPELKKPEAS VKISCKASGYTFT SEQ ID NO：31	WVKQAPGQGLEW IG SEQ ID NO：34	RATLTADKSTNTAH MELSSLTSEDSAVY FCAR SEQ ID NO：37	WGQGTSVTV SS SEQ ID NO： 41

[0242]

VH 2	QVQLVQSGSELKKPGAS VKISCKASGYTFT SEQ ID NO：32	WVKQAPGQGLEW IG SEQ ID NO：34	RATLTADKSTNTAY MELSSLRSEDTAVY FCAR SEQ ID NO：38	WGQGTSVTV SS SEQ ID NO：41
VH 3	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT SEQ ID NO：33	WVRQAPGQGLEW IG SEQ ID NO：35	RATLTADKSTNTAY MELSSLRSEDTAVY FCAR SEQ ID NO：38	WGQGTSVTV SS SEQ ID NO：41
VH 4	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT SEQ ID NO：33	WVRQAPGQGLEW IG SEQ ID NO：35	RVTITADKSTNTAY MELSSLRSEDTAVY YCAR SEQ ID NO：39	WGQGTSVTV SS SEQ ID NO：41
VH 5	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT SEQ ID NO：33	WVRQAPGQGLEW MG SEQ ID NO：36	RVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVY YCAR SEQ ID NO：40	WGQGTSVTV SS SEQ ID NO：41

[0243] 表8.人源化轻链可变区的构架(非CDR)序列

[0244]

链	FR-L1	FR-L2	FR-L3	FR-L4
LK 1	SIVMTQSPSFLLASA GDRVTITC SEQ ID NO：42	WYQQKPGLAPELLM Y SEQ ID NO：45	GVPDRFTGSGYGTD FTLTISSLQAEDLA IYFC	FGQGTKLE IK SEQ ID

[0245]

			SEQ ID NO：47	NO：50
LK 2	SIVMTQSPSTLSASV GDRVTITC SEQ ID NO：43	WYQQKPGKAPKLLM Y SEQ ID NO：46	GVPDRFTGSGYGTD FTLTISSLQAEDLA IYFC SEQ ID NO：47	FGQGTKLE IK SEQ ID NO：50
LK 3	DIQMTQSPSTLSASV GDRVTITC SEQ ID NO：44	WYQQKPGKAPKLLM Y SEQ ID NO：46	GVPDRFSGSGYGTD FTLTISSLQAEDLA IYFC SEQ ID NO：48	FGQGTKLE IK SEQ ID NO：50
LK 4	DIQMTQSPSTLSASV GDRVTITC SEQ ID NO：44	WYQQKPGKAPKLLM Y SEQ ID NO：46	GVPDRFSGSGYGTD FTLTISSLQAEDLA IYFC SEQ ID NO：48	FGQGTKLE IK SEQ ID NO：50
LK 5	DIQMTQSPSTLSASV GDRVTITC SEQ ID NO：44	WYQQKPGKAPKLLM Y SEQ ID NO：46	GVPDRFSGSGYGTD FTLTISSLQAEDVA VYFC SEQ ID NO：49	FGQGTKLE IK SEQ ID NO：50

[0246] 具有LALAPG突变体(FcgR^{null})的NTX1105(H4/k5)的全序列-重链-SEQ ID NO:51:

[0247] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGRVT ITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSNPYVMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0248] NTX1105(H4/k5)的全序列-轻链-SEQ ID NO:52

[0249] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSVNNDVAWYQQKPGKAPKLLMYYASNRFTGVPDRFSGSGYGT DFTLTISSLQAEDVAVYFCQQAYRSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

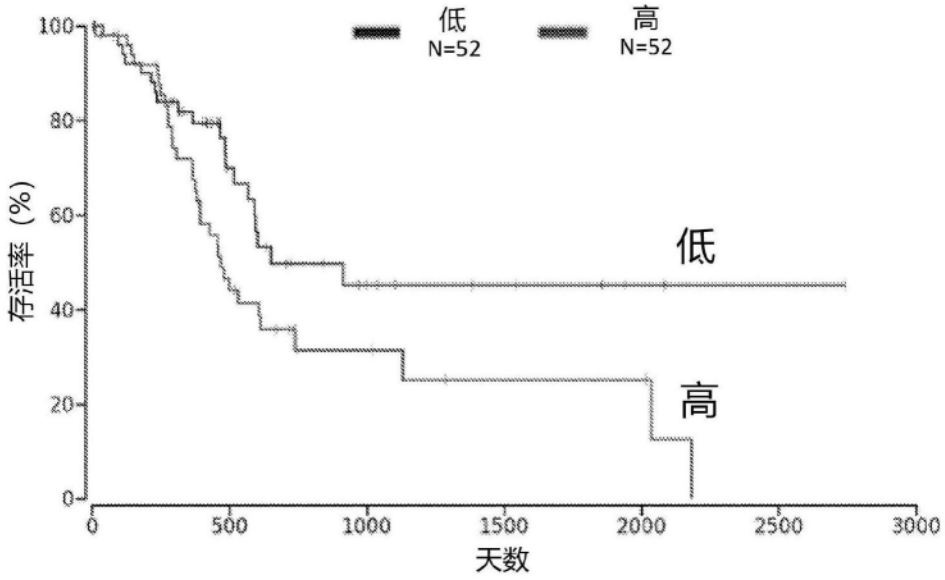
低
N=52
高
N=52
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
低
高
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
天数

图1A

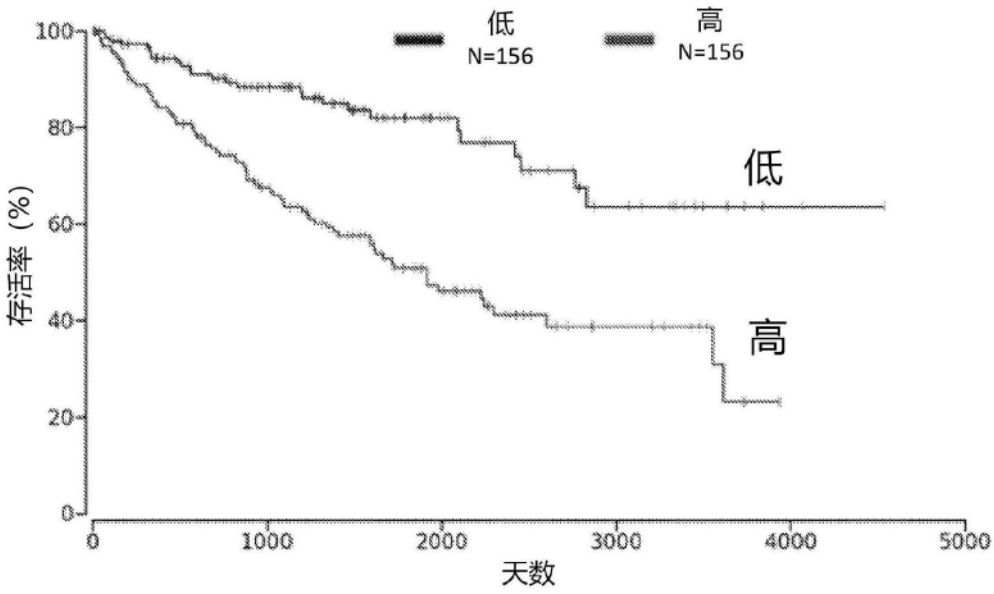
低
N=156
高
N=156
100
80
60
40
20
0
存活率（%）
低
高
0
1000
2000
3000
4000
5000
天数

图1B

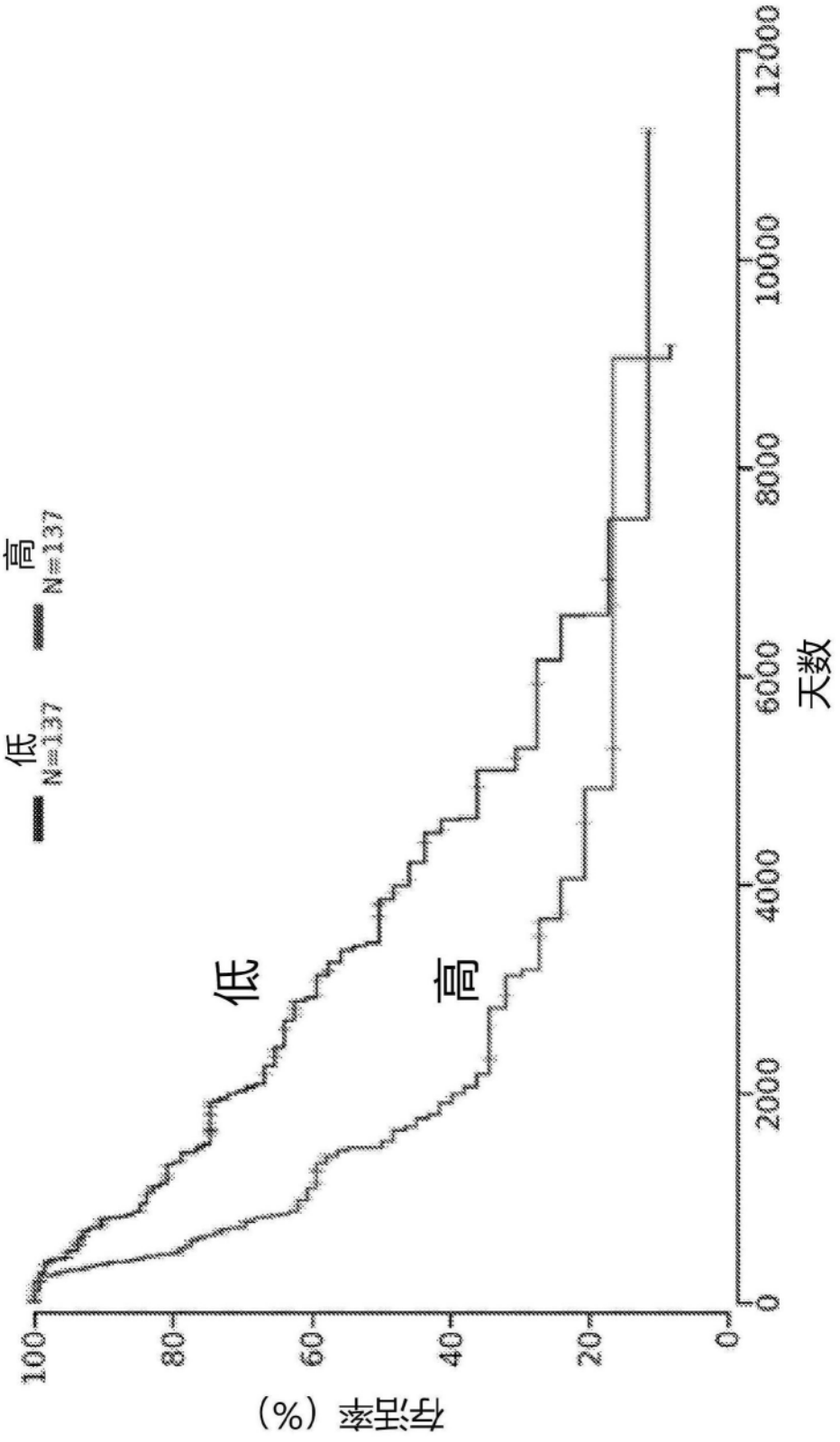
低
N=137
高
N=137
低
高
存活率（%）
100
80
60
40
20
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
天数

图1C

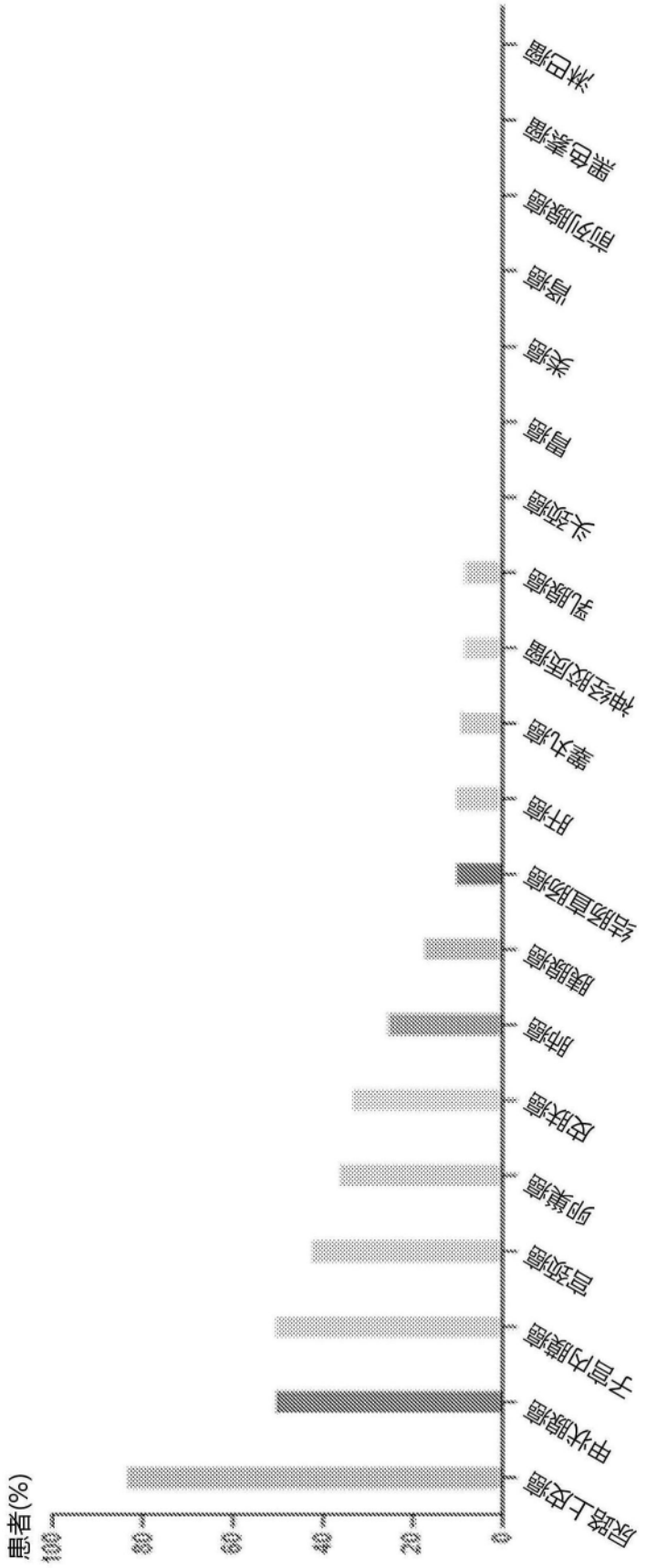
尿路上皮癌
甲状腺癌
子宫内膜癌
宫颈癌
卵巢癌
皮肤癌
肺癌
胰腺癌
结肠直肠癌
肝癌
睾丸癌
神经胶质瘤
乳腺癌
头颈癌
胃癌
类癌
肾癌
前列腺癌
黑色素瘤
淋巴瘤
患者(%)
100
80
60
40
20
0

图2

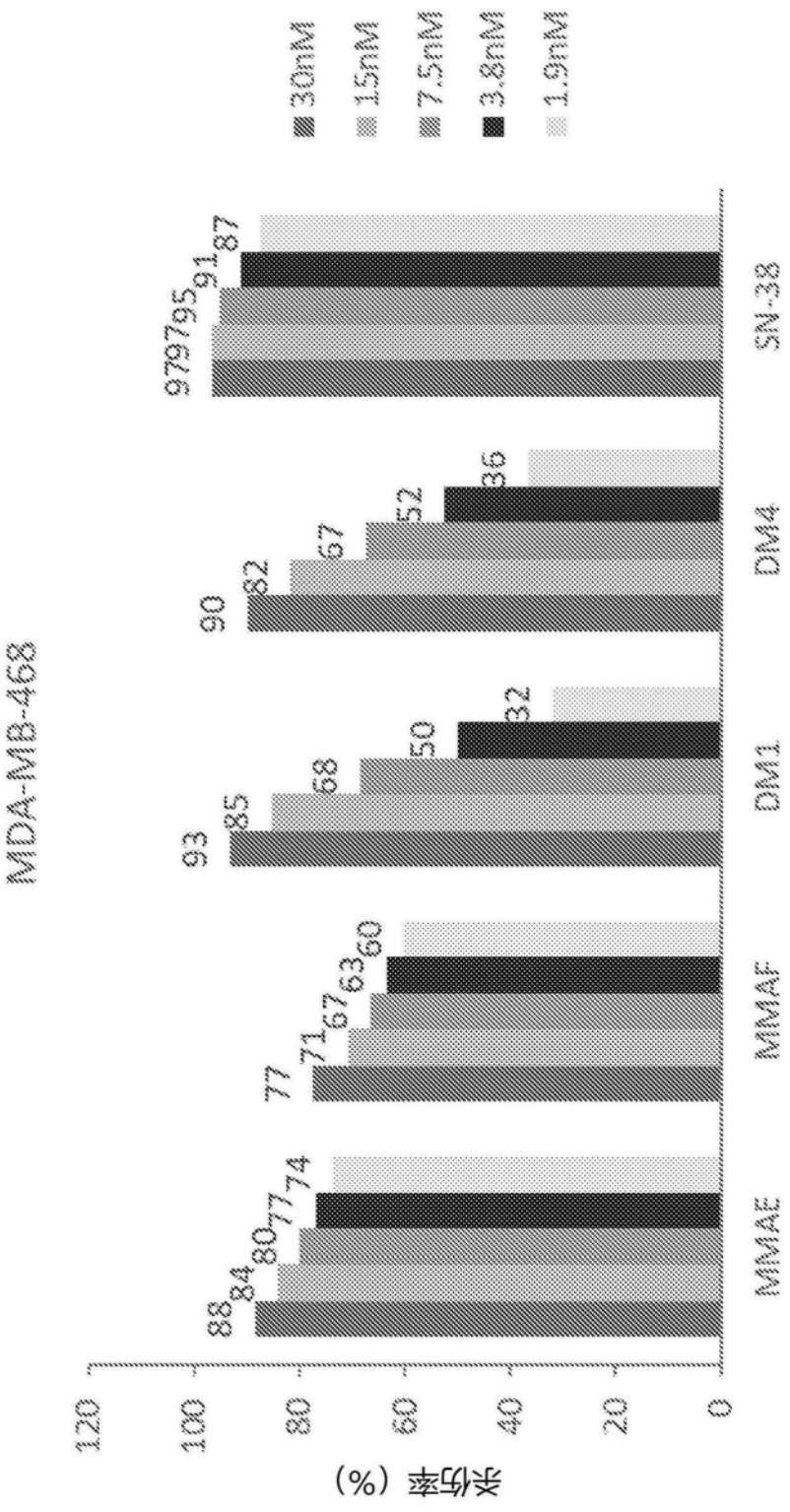
30nM
15nM
7.5nM
3.8nM
1.9nM
MDA-MB-468
杀伤率（%）
0
20
40
60
80
100
120
MMAE
MMAF
DM1
DM4
SN-38
88
84
80
77
74
77
71
67
63
60
93
85
68
50
32
90
82
67
52
36
97
97
95
91
87

图3

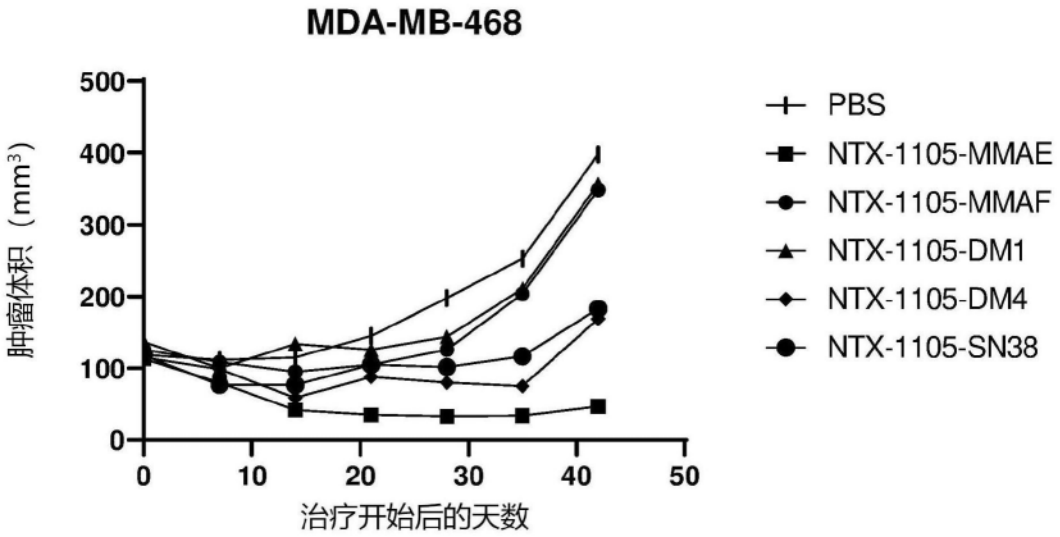
MDA-MB-468
肿瘤体积（mm³）
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
治疗开始后的天数
PBS
NTX-1105-MMAE
NTX-1105-MMAF
NTX-1105-DM1
NTX-1105-DM4
NTX-1105-SN38

图4

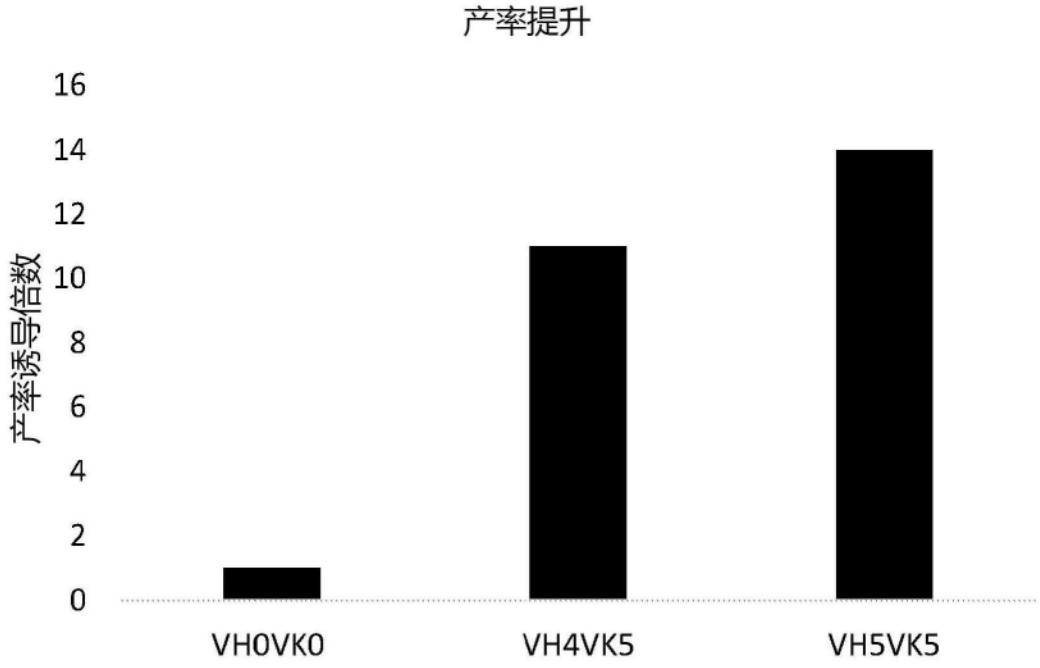
产率提升
产率诱导倍数
16
14
12
10
8
6
4
2
0
VH0VK0
VH4VK5
VH5VK5

图5

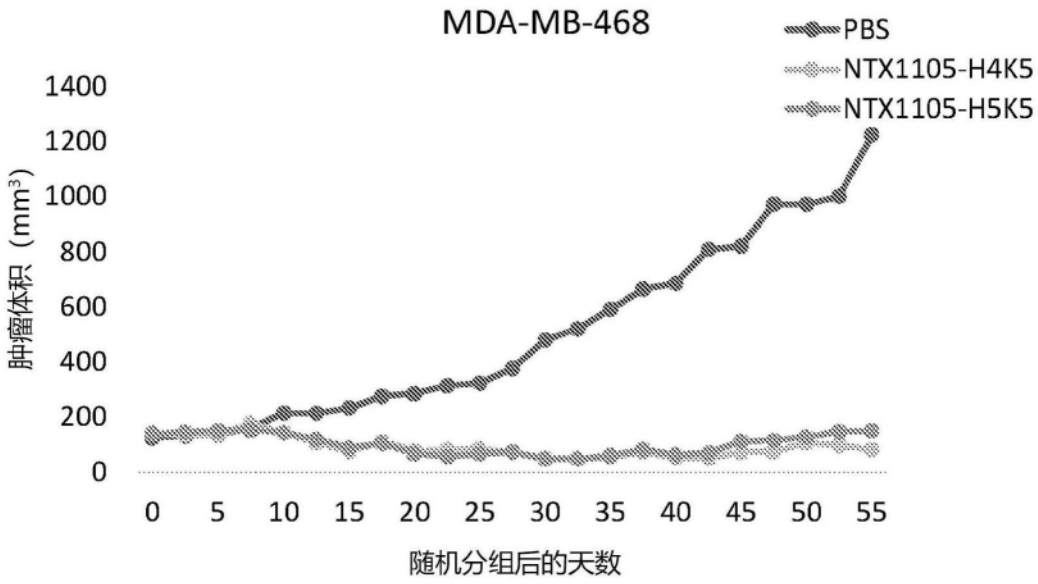
MDA-MB-468
PBS
NTX1105-H4K5
NTX1105-H5K5
肿瘤体积（mm³）
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
随机分组后的天数

图6A

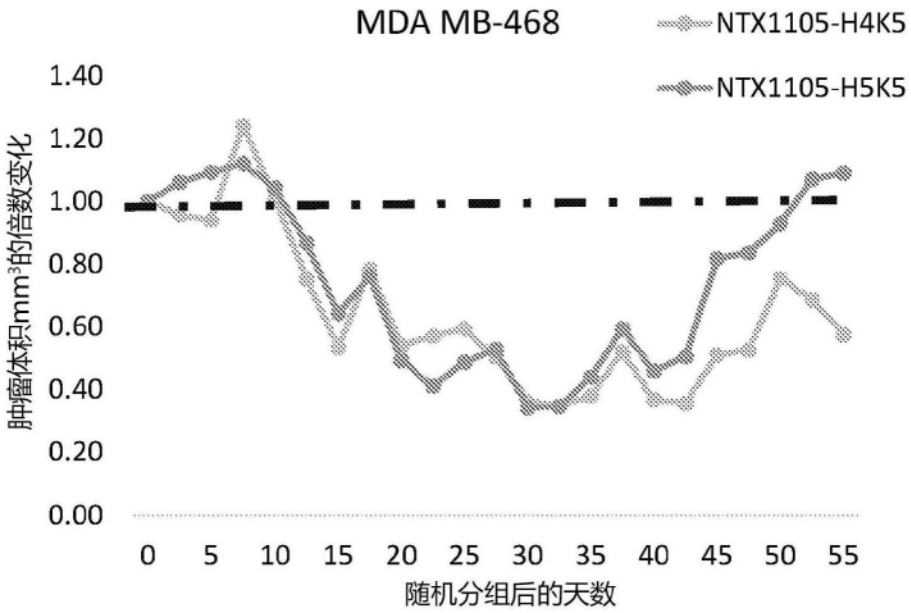
MDA MB-468
NTX1105-H4K5
NTX1105-H5K5
肿瘤体积mm³的倍数变化
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
随机分组后的天数

图6B

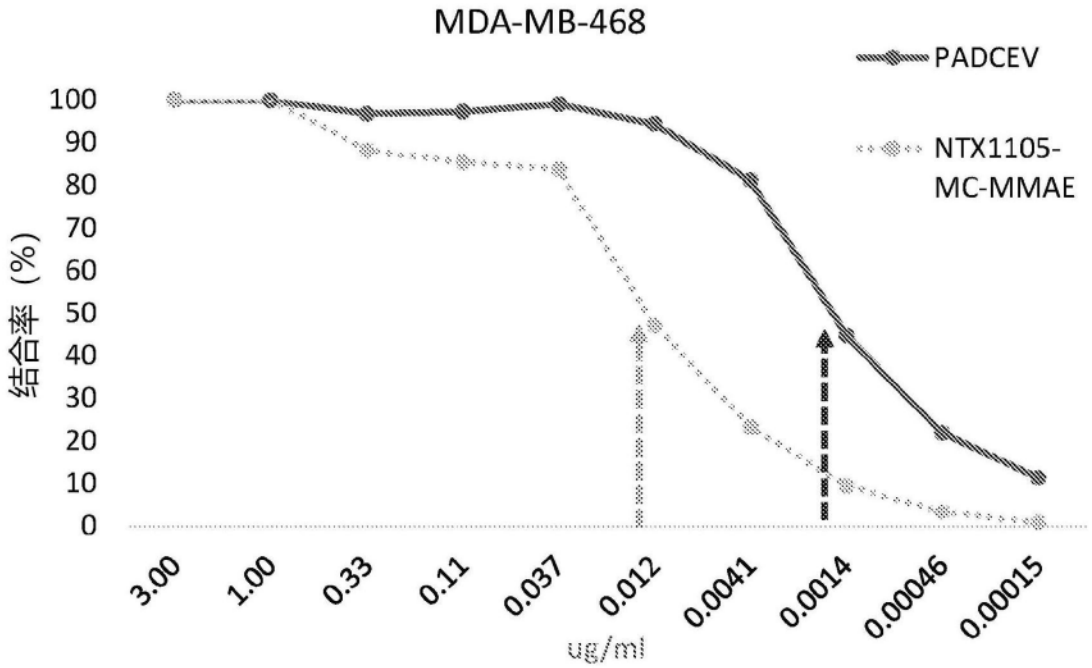
MDA-MB-468
PADCEV
NTX1105-
MC-MMAE
结合率（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3.00
1.00
0.33
0.11
0.037
0.012
0.0041
0.0014
0.00046
0.00015
ug/ml

图7A

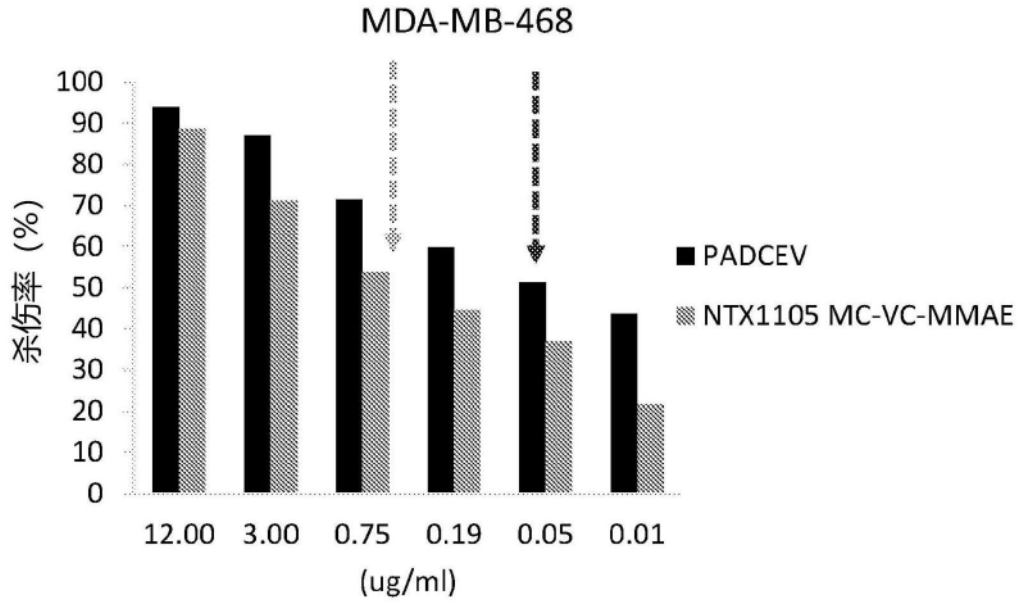
MDA-MB-468
杀伤率（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
12.00
3.00
0.75
0.19
0.05
0.01
(ug/ml)
PADCEV
NTX1105 MC-VC-MMAE

图7B

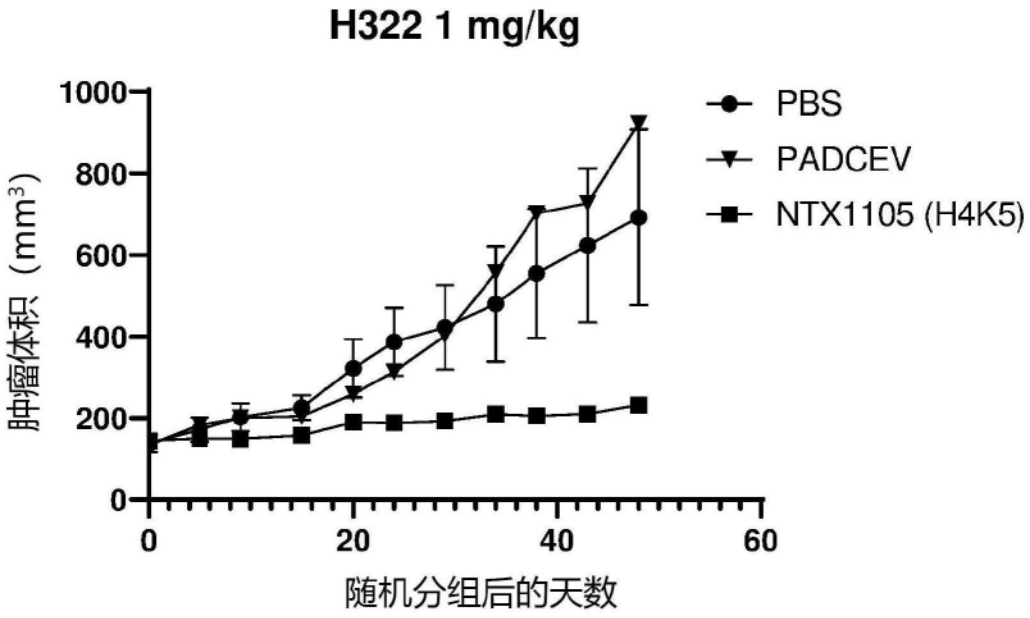
H322 1 mg/kg
肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
随机分组后的天数
PBS
PADCEV
NTX1105 (H4K5)

图8A

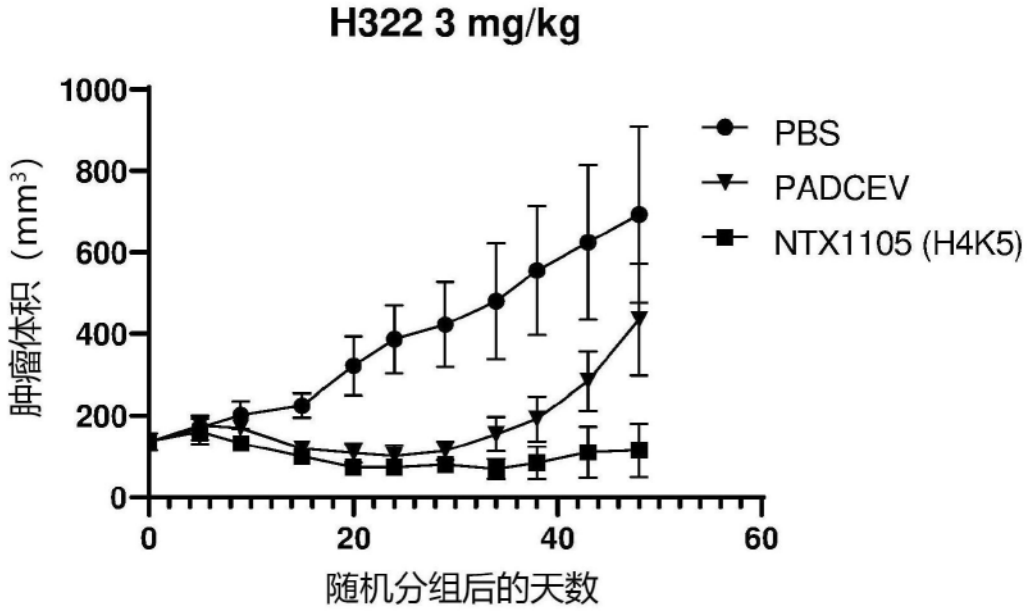
H322 3 mg/kg
肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
随机分组后的天数
PBS
PADCEV
NTX1105 (H4K5)

图8B

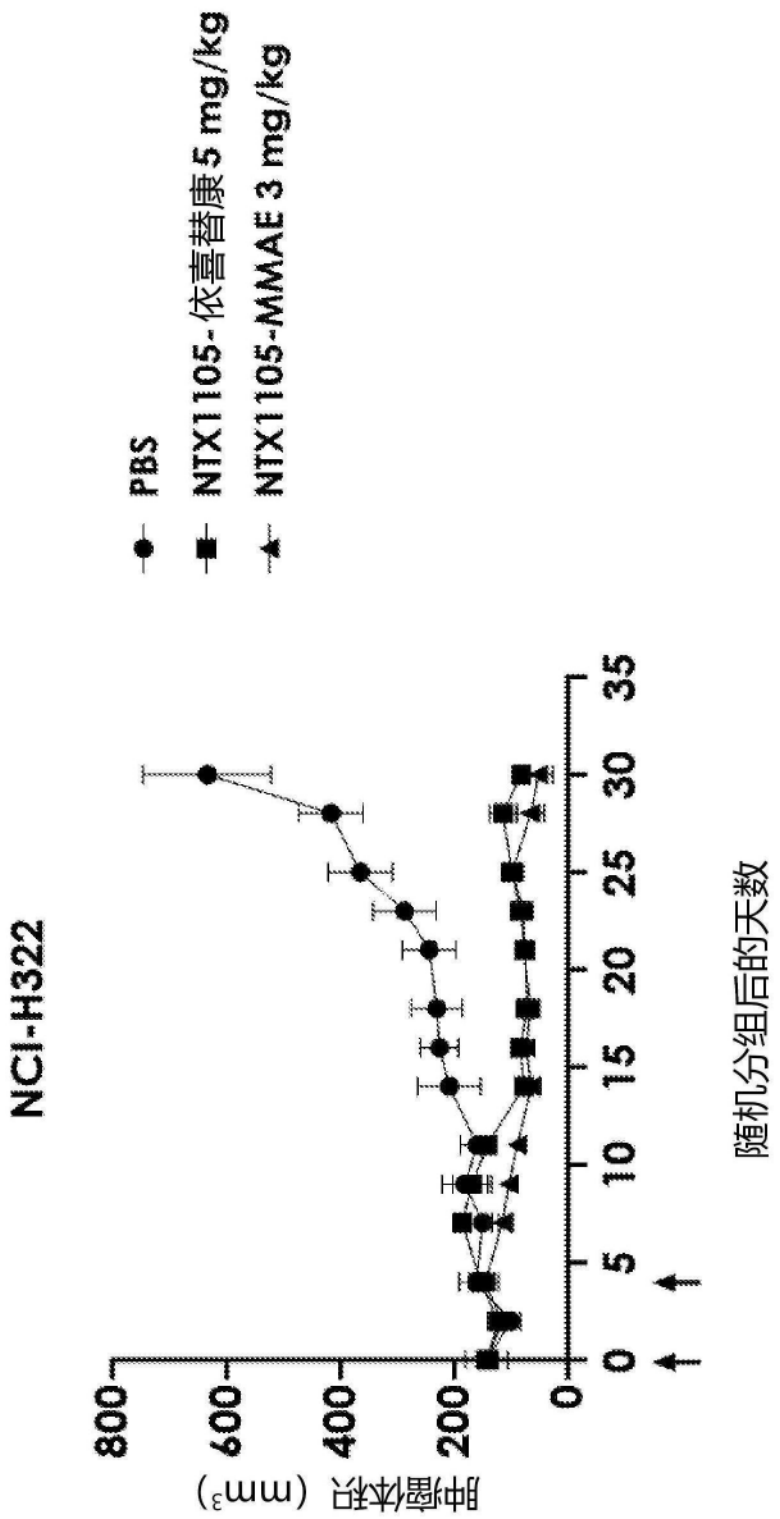
PBS
NTX1105-依喜替康5 mg/kg
NTX1105-MMAE 3 mg/kg
NCI-H322
肿瘤体积 (mm³)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
随机分组后的天数

图9

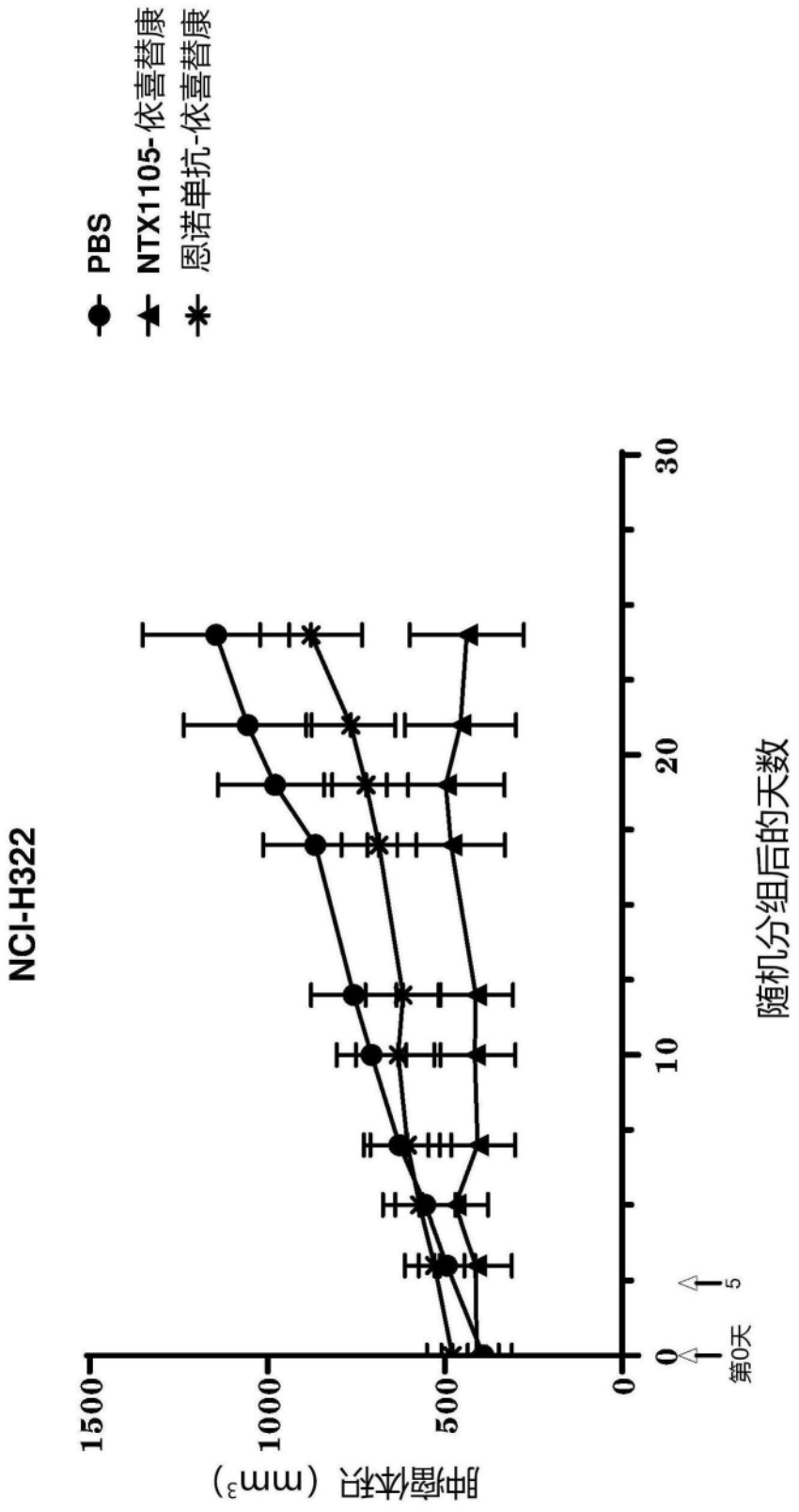
PBS
NTX1105-依喜替康
恩诺单抗-依喜替康
NCI-H322
肿瘤体积 (mm³)
1500
1000
500
0
0
10
20
30
第0天
5
随机分组后的天数

图10