

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 7 月 7 日 (07.07.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/143670 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/142095

(22) 国际申请日: 2021 年 12 月 28 日 (28.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011611968.X 2020 年 12 月 30 日 (30.12.2020) CN

(71) 申请人: 和铂医药 (苏州) 有限公司 (HARBOUR BIOMED (SUZHOU) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街 218 号 A3 楼 202 单元, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 吕强 (LV, Qiang); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街 218 号 A3 楼 202 单元, Jiangsu 215123 (CN)。 黄冰 (HUANG, Bing); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街 218 号 A3 楼 202 单元, Jiangsu 215123 (CN)。 戎一平 (RONG, Yiping); 中国江苏省苏州市苏州工业园区星湖街 218 号 A3 楼 202 单元, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU&PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: ANTIBODY CAPABLE OF BINDING TO TROP2, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合 TROP2 的抗体及其用途

(57) Abstract: Provided is an isolated monoclonal antibody capable of specifically binding to Trop2. Also provided are a nucleic acid molecule encoding the antibody, an expression vector for expressing the antibody, a host cell, and a method. Further provided are an immunoconjugate, a bispecific molecule, a chimeric antigen receptor, an oncolytic virus, and a pharmaceutical composition containing the antibody, and a diagnostic or therapeutic method using the antibody.

(57) 摘要: 提供了一种与 Trop2 特异结合的分离的单克隆抗体。还提供编码该抗体的核酸分子, 以及用于表达该抗体的表达载体、宿主细胞和方法。还提供包含该抗体的免疫偶联物、双特异性分子、嵌合抗原受体、溶瘤病毒和药物组合物, 以及使用抗体的诊断或治疗方法。



WO 2022/143670 A1

结合 TROP2 的抗体及其用途

技术领域

5 本发明涉及一种与 Trop2 特异结合的抗体、及其制备和用途，尤其是其在诊断、预防和治疗与 Trop2 相关的疾病中的用途，疾病包括肿瘤，例如乳癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肠癌等。

背景技术

10 滋养层细胞表面抗原 2(Trop2)，又称为肿瘤关联钙信号转导因子 2(TACSTD2)、膜组分 1 表面标记 1(M1S1)、上皮糖蛋白 1(EGP1)或肠胃抗原 733-1(GA733-1)，是一种 I 型跨膜细胞表面糖蛋白。

经无内含子基因的编码，Trop2 共有 323 个氨基酸残基。该蛋白可以转导胞内钙信号，且含有保守的 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP(2))结合基序以及与蛋白激酶 C 相互作用的丝氨酸磷酸化位点。Trop2 还与 IGF-1、Claudin-1、Claudin-7、以及细胞周期
15 蛋白 D1 相互作用。例如，Trop2 经由周期蛋白 D1 和 ERK-MAPK 通路激活 CREB1、NF-κB、STAT1 和 STAT3，促成肿瘤细胞发展。

Trop2 在很多正常组织中表达，在器官发生和干细胞维持方面起到重要作用。同时，Trop2 也在很多人的癌细胞中大量表达，例如乳癌、胃癌、胰腺癌和卵巢癌细胞，且 Trop2 的过表达与增加的肿瘤生长、肿瘤侵袭性、肿瘤转移以及较差的预后相关。
20 例如，肠肿瘤细胞和卵巢肿瘤细胞中的 Trop2 低表达抑制细胞增殖。Trop2 过表达增加胰腺癌细胞的迁移。因此，Trop2 被认为是潜在的治疗靶点。

研究表明，Trop2 抗体抑制体内肿瘤生长，减少肠癌细胞和乳腺癌细胞的体内细胞迁移。已经证实 Sacituzumab govitecan(IMMU-132)，一种 Trop2 抗体-SN-38 耦联药物，在一些肿瘤细胞系移植模型中有效果，且正在患有顽固三阴乳癌、转移性尿路上皮癌和耐受去势的转移前列腺癌的病人中做临床试验，中性粒细胞缺乏和腹泻是最常见的副作用。
25

因此，本领域迫切需要开发一种具有较佳的抗肿瘤效果并且毒性低的 Trop2 单克隆抗体。

30 发明内容

本发明的目的就是提供一种具有较佳的抗肿瘤效果并且毒性低的 Trop2 单克隆抗体。

在本发明的第一方面，提供了一种 Trop-2 的抗体或抗原结合片段，包含如下
35 的互补决定区（CDR）：

(a) SEQ ID NO: 192-220 中任一所示的重链可变区 (VH) 中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体、以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或

(b) SEQ ID NO: 221-240 中任一所示的轻链可变区 (VL) 中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体、以及 LCDR3 或其序列的变体；

优选地，所述序列的变体为与其来源 CDR 相比为具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加）的 CDR；优选地，所述的置换为保守置换。

在另一优选例中，所述抗体或抗原结合蛋白的重链可变区 VH 具有选自下组的互补决定区 CDR 组合：

(1) 如 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 47 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 86 所示的 CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 20 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 87 所示的 CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 20 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 48 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 87 所示的 CDR3；

(4) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 49 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 88 所示的 CDR3；

(5) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 50 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 89 所示的 CDR3；

(6) 如 SEQ ID NO: 22 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 90 所示的 CDR3；

(7) 如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 91 所示的 CDR3；

(8) 如 SEQ ID NO: 24 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 53 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 92 所示的 CDR3；

(9) 如 SEQ ID NO: 25 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 54 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 87 所示的 CDR3；

(10) 如 SEQ ID NO: 26 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 93 所示的 CDR3；

(11) 如 SEQ ID NO: 24 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 53 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 92 所示的 CDR3；

(12) 如 SEQ ID NO: 21 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 50 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 89 所示的 CDR3；

(13) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 94 所示的 CDR3；

(14) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 95 所示的 CDR3;

(15) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 94 所示的 CDR3;

5 (16) 如 SEQ ID NO: 19 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 52 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 96 所示的 CDR3;

(17) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 95 所示的 CDR3;

10 (18) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 95 所示的 CDR3;

(19) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 97 所示的 CDR3;

(20) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 94 所示的 CDR3;

15 (21) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 94 所示的 CDR3;

(22) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 56 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 95 所示的 CDR3;

20 (23) 如 SEQ ID NO: 28 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 57 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 98 所示的 CDR3;

(24) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 95 所示的 CDR3;

(25) 如 SEQ ID NO: 29 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 58 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 99 所示的 CDR3;

25 (26) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 94 所示的 CDR3;

(27) 如 SEQ ID NO: 23 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 59 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 100 所示的 CDR3;

30 (28) 如 SEQ ID NO: 30 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 51 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 101 所示的 CDR3;

(29) 如 SEQ ID NO: 31 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 59 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 100 所示的 CDR3; 或

(30) 如 SEQ ID NO: 27 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 55 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 94 所示的 CDR3;

35 其中, 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修

饰和/或取代至少一个氨基酸残基的，并能够保留 Trop2 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 192-220 中任一项所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体或抗原结合蛋白的重链还包括重链恒定区。

5 在另一优选例中，所述重链恒定区为人源的。

在另一优选例中，所述重链恒定区为人抗体的重链恒定区 Fc 结构域；所述人抗体的重链恒定区 Fc 结构域包括人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区 Fc 结构域。

在另一优选例中，所述重链恒定区包含 SEQ ID NO: 292 所示的氨基酸序列。

10 在另一优选例中，所述抗体或抗原结合蛋白的重链具有如 SEQ ID NO: 241-269 中任一项所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体或抗原结合蛋白还包括一轻链，所述轻链中包含一轻链可变区，所述的轻链可变区具有选自下组的互补决定区 CDR 组合：

(1) 如 SEQ ID NO: 115 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 144 所示的 CDR2，和如
15 SEQ ID NO: 169 所示的 CDR3；

(2) 如 SEQ ID NO: 116 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 145 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 170 所示的 CDR3；

(3) 如 SEQ ID NO: 117 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 146 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 171 所示的 CDR3；

20 (4) 如 SEQ ID NO: 118 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 147 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 172 所示的 CDR3；

(5) 如 SEQ ID NO: 119 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 148 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 173 所示的 CDR3；

25 (6) 如 SEQ ID NO: 120 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 146 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 174 所示的 CDR3；

(7) 如 SEQ ID NO: 121 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 145 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 175 所示的 CDR3；

(8) 如 SEQ ID NO: 122 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 149 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 176 所示的 CDR3；

30 (9) 如 SEQ ID NO: 123 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 145 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 177 所示的 CDR3；

(10) 如 SEQ ID NO: 120 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 146 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 174 所示的 CDR3；

35 (11) 如 SEQ ID NO: 124 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 149 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 178 所示的 CDR3；

(12) 如 SEQ ID NO: 125 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 148 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 179 所示的 CDR3；

(13) 如 SEQ ID NO: 126 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

5 (14) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 151 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(15) 如 SEQ ID NO: 126 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

10 (16) 如 SEQ ID NO: 128 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 152 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 181 所示的 CDR3；

(17) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 151 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(18) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 151 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

15 (19) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(20) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

20 (21) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(22) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 151 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(23) 如 SEQ ID NO: 129 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 144 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 182 所示的 CDR3；

25 (24) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 151 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(25) 如 SEQ ID NO: 130 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 146 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 183 所示的 CDR3；

30 (26) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3；

(27) 如 SEQ ID NO: 131 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 153 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 184 所示的 CDR3；

(28) 如 SEQ ID NO: 132 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 154 所示的 CDR2，和如 SEQ ID NO: 185 所示的 CDR3；

35 (29) 如 SEQ ID NO: 133 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 153 所示的 CDR2，和如

SEQ ID NO: 184 所示的 CDR3;

(30) 如 SEQ ID NO: 127 所示的 CDR1、如 SEQ ID NO: 150 所示的 CDR2, 和如 SEQ ID NO: 180 所示的 CDR3;

5 其中, 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸残基的, 并能够保留 Trop2 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中, 所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 221-240 任一项所示的氨基酸序列。

在另一优选例中, 所述抗体或抗原结合蛋白的轻链还包括轻链恒定区。

在另一优选例中, 所述轻链恒定区为人抗体恒定区。

10 在另一优选例中, 所述轻链恒定区为人抗体轻链 κ 恒定区。

在另一优选例中, 所述轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 293 的氨基酸序列。

在另一优选例中, 所述的轻链具有如 SEQ ID NO: 270-289 任一项所示的氨基酸序列。

15 在另一优选例中, 所述抗体或抗原结合蛋白还包括上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的, 并能够保留 Trop2 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中, 具有所述的衍生序列的抗体与 TROP2 结合的亲和力 F1 与相应非衍生的抗体与 TROP2 结合的亲和力 F0 之比(F1/F0)为 0.5-2, 较佳地为 0.7-1.5, 和更佳地 0.8-1.2。

20 在另一优选例中, 所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为 1-5 个(如 1-3 个, 较佳地 1-2 个, 更佳地 1 个)。

在另一优选例中, 所述的经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的, 并能够保留 TROP2 结合亲和力的衍生序列为同源性或序列相同性为至少 96%的氨基酸序列。

25 在另一优选例中, 所述抗体的重链可变区还包括人源的框架区, 和/或所述抗体的轻链可变区还包括人源的框架区。

在另一优选例中, 所述抗体选自下组: 动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、或其组合。

30 在另一优选例中, 所述的嵌合抗体在人中的免疫原性 Z1 与非嵌合的抗体(如鼠源抗体)在人中的免疫原性 Z0 之比(Z1/Z0)为 0-0.5, 较佳地 0-0.2, 更佳地 0-0.05(如 0.001-0.05)。

在另一优选例中, 所述的抗体是全人的单克隆抗体。

在另一优选例中, 所述的抗体为双链抗体。

在另一优选例中, 所述抗体为抗体全长蛋白、或抗原结合片段。

35 在另一优选例中, 所述的抗体为药物偶联物形式。

在另一优选例中, 所述抗体具有选自下组的一个或多个特性:

- (a) 在 FACS 测定中, 能与过表达人 Trop2 的 HEK293 细胞结合;
- (b) 在 FACS 测定中, 能与过表达猴 Trop2 的 CHO- K1 结合;
- (c) 在 ELISA 测定中, 能与小鼠 Trop2 蛋白结合;
- (d) 能内化到过表达人 Trop2 的 HEK293 细胞或 BxPC-3 细胞中;
- (e) 对 BxPc-3 细胞具有 ADCC 活性; 和/或
- (f) 对 BxPc-3 细胞具有 ADCP 活性。

在另一优选例中, 所述的抗体是具有表 A 所示的各重链 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3, 以及轻链 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 的组合的抗体之一:

表 A

抗体编号	抗体名称	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
(1)	PR001128	115	144	169	19	47	86
(2)	PR001130	116	145	170	20	48	87
(3)	PR001131	117	146	171	20	48	87
(4)	PR001132	118	147	172	21	49	88
(5)	PR001133	119	148	173	21	50	89
(6)	PR001134	120	146	174	22	51	90
(7)	PR001138	121	145	175	23	52	91
(8)	PR001139	122	149	176	24	53	92
(9)	PR001142	123	145	177	25	54	87
(10)	PR001143	120	146	174	26	51	93
(11)	PR001145	124	149	178	24	53	92
(12)	PR001147	125	148	179	21	50	89
(13)	PR001150	126	150	180	27	55	94
(14)	PR001151	127	151	180	27	55	95
(15)	PR001152	126	150	180	27	55	94
(16)	PR001153	128	152	181	19	52	96
(17)	PR001154	127	151	180	27	55	95
(18)	PR001155	127	151	180	27	55	95
(19)	PR001156	127	150	180	27	55	97
(20)	PR001158	127	150	180	27	55	94
(21)	PR001159	127	150	180	27	55	94
(22)	PR001160	127	151	180	27	56	95
(23)	PR001162	129	144	182	28	57	98
(24)	PR001163	127	151	180	27	55	95
(25)	PR001164	130	146	183	29	58	99
(26)	PR001165	127	150	180	27	55	94
(27)	PR001166	131	153	184	23	59	100
(28)	PR001168	132	154	185	30	51	101
(29)	PR001170	133	153	184	31	59	100
(30)	PR001171	127	150	180	27	55	94

其中, 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的, 并能够保留 TROP2 结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中, 所述的抗体是表 A 中选自下组的编号的抗体: (1)、(2)、(5)、(8)、(9)、(23)、(26)或(27)。(分别对应于实施例中的抗体编号 PR001128、PR001130、PR001133、PR001139、PR001142、PR001162、PR001165、PR001166)

在另一优选例中，所述的抗体是表 A 中选自下组的编号的抗体：(9)、(23)、(26)或(27)。(分别对应于实施例中的抗体编号 PR001142、PR001162、PR001165、PR001166)

在另一优选例中，所述的抗体是表 A 中编号为(27)的抗体。(对应于实施例中的抗体编号 PR001166)

5 在另一优选例中，所述重链可变区具有 SEQ ID NO: 192~220 中任一项所示的氨基酸序列，或与其至少有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同源性的氨基酸序列；和/或所述轻链可变区具有 SEQ ID NO: 221~240 中任一项所示的氨基酸序列，或与其至少有 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的序列同源性的氨基酸序列。

10 在另一优选例中，所述的抗体是具有表 B 所示的各重链可变区、轻链可变区的组合的抗体之一：

表 B

抗体编号	抗体名称	VL	VH
(1)	PR001128	221	192
(2)	PR001130	222	193
(3)	PR001131	223	193
(4)	PR001132	224	194
(5)	PR001133	225	195
(6)	PR001134	226	196
(7)	PR001138	227	197
(8)	PR001139	228	198
(9)	PR001142	229	199
(10)	PR001143	226	200
(11)	PR001145	230	201
(12)	PR001147	231	202
(13)	PR001150	232	203
(14)	PR001151	233	204
(15)	PR001152	232	205
(16)	PR001153	234	206
(17)	PR001154	233	207
(18)	PR001155	233	208
(19)	PR001156	235	209
(20)	PR001158	235	210
(21)	PR001159	235	211
(22)	PR001160	233	212
(23)	PR001162	236	213
(24)	PR001163	233	214
(25)	PR001164	237	215
(26)	PR001165	235	216
(27)	PR001166	238	217
(28)	PR001168	239	218
(29)	PR001170	240	219
(30)	PR001171	235	220

在另一优选例中，所述的抗体是表 B 中选自下组的编号的抗体：(1)、(2)、(5)、(8)、(9)、(23)、(26)或(27)。(分别对应于实施例中的抗体编号 PR001128、PR001130、

15 PR001133、PR001139、PR001142、PR001162、PR001165、PR001166)

在另一优选例中，所述的抗体是表 B 中选自下组的编号的抗体：(9)、(23)、(26)或(27)。(分别对应于实施例中的抗体编号 PR001142、PR001162、PR001165、PR001166)

在另一优选例中，所述的抗体是表 B 中编号为(27)的抗体。(对应于实施例中的抗体编号 PR001166)

5 在另一优选例中，所述的抗体是具有表 C 所示的各重链、轻链的组合的抗体之一：

表 C

抗体编号	抗体名称	LC	HC
(1)	PR001128	270	241
(2)	PR001130	271	242
(3)	PR001131	272	242
(4)	PR001132	273	243
(5)	PR001133	274	244
(6)	PR001134	275	245
(7)	PR001138	276	246
(8)	PR001139	277	247
(9)	PR001142	278	248
(10)	PR001143	275	249
(11)	PR001145	279	250
(12)	PR001147	280	251
(13)	PR001150	281	252
(14)	PR001151	282	253
(15)	PR001152	281	254
(16)	PR001153	283	255
(17)	PR001154	282	256
(18)	PR001155	282	257
(19)	PR001156	284	258
(20)	PR001158	284	259
(21)	PR001159	284	260
(22)	PR001160	282	261
(23)	PR001162	285	262
(24)	PR001163	282	263
(25)	PR001164	286	264
(26)	PR001165	284	265
(27)	PR001166	287	266
(28)	PR001168	288	267
(29)	PR001170	289	268
(30)	PR001171	284	269

在另一优选例中，所述的抗体是表 B 中选自下组的编号的抗体：(1)、(2)、(5)、(8)、(9)、(23)、(26)或(27)。(分别对应于实施例中的抗体编号 PR001128、PR001130、
10 PR001133、PR001139、PR001142、PR001162、PR001165、PR001166)

在另一优选例中，所述的抗体是表 B 中选自下组的编号的抗体：(9)、(23)、(26)或(27)。(分别对应于实施例中的抗体编号 PR001142、PR001162、PR001165、PR001166)

在另一优选例中，所述的抗体是表 B 中编号为(27)的抗体。(对应于实施例中的抗体编号 PR001166)

在本发明的第二方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白包括：

(i) 如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白；和

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括 6His 标签。

5 在另一优选例中，所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

在另一优选例中，所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

在本发明的第三方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码选自下组的多肽：
如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白，和/或如本发明第二方面所述的重组
10 蛋白。

在本发明的第四方面，提供了一种载体，所述载体含有本发明第三方面所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的载体包括：细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。
15

在另一优选例中，所述的载体为溶瘤病毒载体。

在本发明的第五方面，提供了一种遗传工程化的宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明第四方面所述的载体或基因组中整合有本发明第三方面所述的多核苷酸。
20

在本发明的第六方面，提供了制备第一方面的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养第五方面的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

25 在本发明的第七方面，提供了一种抗体偶联物，所述抗体偶联物含有：

(a) 抗体部分，所述抗体部分包括如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白；
和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

30 在另一优选例中，所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

在另一优选例中，偶联部分包括：细胞毒素、烷化剂、DNA 小沟结合分子、DNA 嵌入剂、DNA 交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 的抑制剂、热激蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂，优选为 SN-38。

35

在本发明的第八方面，提供了一种嵌合抗原受体(CAR)，所述 CAR 包括本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白。

在本发明的第九方面，提供了一种免疫细胞，所述免疫细胞表达或在细胞膜外暴露有如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白。在另一优选例中，所述的免疫细胞包括 NK 细胞、T 细胞。

在另一优选例中，所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物(如鼠)。

在另一优选例中，所述的免疫细胞包括本发明第八方面所述的嵌合抗原受体，所述免疫细胞优选地是嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T 细胞)或嵌合抗原受体 NK 细胞(CAR-NK 细胞)。

在本发明的第十方面，提供了一种多特异性抗体，其包含本发明第一方面的结合 Trop-2 的抗体或抗原结合片段的，和另外的抗体或其片段或抗体类似物。

在另一优选例中，所述多特异性抗体由第一抗体或其抗原结合片段与其他抗体或其抗原结合片段或抗体类似物通过偶联形成，并且其中各抗体或其抗原结合片段或抗体类似物保持其原结合特异性，所述第一抗体或其抗原结合片段为本发明所述的抗体或其抗原结合片段。

在另一优选例中，所述多特异性抗体为双特异性抗体或三特异性抗体或四特异性抗体。

在本发明的第十一方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第七方面所述的抗体偶联物、本发明第九方面所述的免疫细胞、本发明第十方面所述的多特异性抗体或其组合；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的药物组合物为液态制剂。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂。

在另一优选例中，所述的药物组合物包括 0.01~99.99%的如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第七方面所述的抗体偶联物、如本发明第九方面所述的免疫细胞、第十方面所述的多特异性抗体或其组合和 0.01~99.99%的药用载体，所述百分比为占所述药物组合物的质量百分比。

在另一优选例中，所述的药物组合物还包括第二治疗剂。

在另一优选例中，第二治疗剂包括第二抗体、或化疗剂。

在另一优选例中，所述第二抗体包括：LAG-3 抗体、PD-1 抗体或 CTLA-4 抗体等。

在另一优选例中，所述化疗剂选自下组：多西他赛、卡铂、卡培他滨、长春瑞滨，或其组合。

在另一优选例中，所述化疗剂是细胞毒性剂，包括：SN-38、表阿霉素、奥沙利铂，或 5-FU。

5

在本发明的第十二方面，提供了一种治疗、预防或减轻肿瘤的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白，第二方面所述的重组蛋白，第七方面所述的抗体偶联物，第九方面所述的免疫细胞，第十方面所述的多特异性抗体及第十一方面所述的药物组合物。

10

在另一优选例中，所述肿瘤可以是实体瘤或非实体瘤。

在另一优选例中，所述实体瘤选自下组：乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肠癌、肺癌、子宫颈癌，或其他 Trop2 表达阳性的肿瘤。

在另一优选例中，所述方法进一步包括第二治疗剂的施用。

在另一优选例中，第二治疗剂包括第二抗体、或化疗剂。

15

在另一优选例中，所述第二抗体包括：LAG-3 抗体、PD-1 抗体或 CTLA-4 抗体。

在另一优选例中，所述化疗剂选自下组：多西他赛、卡铂、卡培他滨、长春瑞滨，或其组合。

在另一优选例中，所述化疗剂是细胞毒性剂，包括：SN-38、表阿霉素、奥沙利铂，或 5-FU。

20

在本发明的第十三方面，提供了一种活性成分的用途，所述活性成分选自下组：如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第七方面所述的抗体偶联物、如本发明第九方面所述的免疫细胞、第十方面所述的多特异性抗体或其组合，其中所述活性成分被用于：(a)制备与 TROP2 表达异常相关的疾病的诊断试剂或试剂盒；和/或(b)制备预防和/或治疗与 TROP2 表达异常相关的疾病的药物。

25

在另一优选例中，所述的诊断试剂为检测片或检测板。

在另一优选例中，所述 TROP2 表达或功能异常相关的疾病主要包括肿瘤。

在另一优选例中，所述肿瘤可以是实体瘤或非实体瘤。

30

在另一优选例中，所述实体瘤选自下组：乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肠癌、肺癌、子宫颈癌，或其他 Trop2 表达阳性的肿瘤。

在另一优选例中，所述诊断试剂或试剂盒用于：

(1) 检测样品中 TROP2 蛋白；

(2) 检测细胞中内源性的 TROP2 蛋白；和/或

35

(3) 检测表达 TROP2 蛋白的细胞。

在另一优选例中，所述的抗体为药物偶联物(ADC)形式。

在本发明的第十四方面，提供了一种体外检测(包括诊断性或非诊断性)样品中 TROP2 蛋白的方法，所述方法包括步骤：

- 5 (1) 在允许本发明第一方面所述的抗体或抗原结合片段与 Trop-2 之间形成复合物的条件下，将样品与所述的抗体或抗原结合蛋白接触；
- (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 TROP2 蛋白。

10 在另一优选例中，所述检测用于非诊断目的。在另一优选例中，所述非诊断目的包括将第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白用于途径研究、药物筛选、组化分析等。

在本发明的第十五方面，提供了一种检测板，所述的检测板包括：基片(支撑板)和测试条，所述的测试条含有如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第七方面所述的抗体偶联物、如本发明第九方面所述的免疫细胞、或其组合。

在本发明的第十六方面，提供了一种试剂盒，所述试剂盒中包括：

- (1) 第一容器，所述第一容器中含有本发明的抗体或抗原结合片段；和任选地
- (2) 第二容器，所述第二容器中含有抗本发明抗体的二抗；
- 20 在另一优选例中，所述试剂盒含有如本发明第十五方面所述的检测板。
- 在另一优选例中，所述试剂盒进一步含有使用说明书。

在本发明的第十七方面，提供了一种给药装置，所述装置包括：

- (i) 输注模块，所述输注模块用于对受试者施用包括具有一活性成分的药物组合
- 25 物；

(ii) 用于输注的药物组合物，所述药物组合物中含有一活性成分，所述活性成分选自下组：如本发明第一方面所述的抗体或抗原结合蛋白、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第七方面所述的抗体偶联物、本发明第九方面所述的免疫细胞、或其组合；以及

- 30 (iii) 任选的药效监控模块。

在另一优选例中，所述的施用包括肠道外施用和非肠道外施用。

在另一优选例中，所述肠道外施用包括注射施用，所用的注射的路径包括：静脉内、肌肉内、动脉内、膜内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬脑膜上和胸骨内注射和推注。

35 在另一优选例中，所述非肠道外施用包括外用、表皮施用或粘膜施用，例如鼻内、

经口、阴道、直肠、舌下、或局部外用。

在另一优选例中，所述的输注模块为无针皮下注射设备、微量输液泵、经皮给药设备、推注设备，或渗透设备。

- 5 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

- 10 图 1 显示了本发明抗体与 293T-人 Trop2 细胞的结合能力。
图 2 显示了本发明抗体经 MMAF 偶联后对 BxPC-3 肿瘤细胞的内化杀伤活性。
图 3 显示了本发明抗体与肿瘤细胞 BxPC-3 的结合能力。
图 4 显示了本发明抗体与过表达猴 Trop2 的 CHO-K1 细胞的结合能力。
图 5 显示了本发明抗体与鼠 Trop2 蛋白的结合能力。
15 图 6 显示了本发明抗体介导的 ADCC 活性。
图 7 显示了本发明抗体的 ADCP 活性。
图 8 显示了本发明抗体的 CDC 活性。
图 9 显示了本发明抗体分别在 4℃ 和 37℃ 的 HEK293/hTrop2 细胞上的内吞情况。
图 10 显示了本发明抗体分别在 4℃ 和 37℃ 的肿瘤细胞 BxPC-3 上的内吞情况。

20

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，经过大量的筛选，首次开发了一种靶向 Trop2 的结合蛋白及其应用。在此基础上完成了本发明。

- 25 本发明所要解决的技术问题是为克服现有技术中抗体药物缺乏抗肿瘤疗效，以及安全性欠佳等缺陷，提供一种靶向 Trop2 结合蛋白及其应用。

为更好理解本发明，首先定义一些术语。其他定义则贯穿具体实施方式部分而列出。

- 30 术语“Trop2”是滋养层细胞表面抗原 2。该术语包括变体、同源物、类似物、直向同源物和/或平行同源物。例如，对人 Trop2 特异的抗体可以在某些情况下与另一物种例如猴的 Trop2 蛋白交叉反应。在其他实施方式中，对人 Trop2 蛋白特异的抗体可以完全地对人 Trop2 蛋白特异而不与其他物种或其他类型的蛋白交叉反应，或者可以与一些其他物种而非所有其他物种的 Trop2 蛋白交叉反应。

- 35 术语“人 Trop2”是指具有人氨基酸序列的 Trop2 蛋白，例如 Genbank 登录号为 NP_002344.2 的氨基酸序列。

术语“猴 Trop2”是指具有猴氨基酸序列的 Trop2 蛋白，例如 Genbank 登录号为 XP_005543292.1 的氨基酸序列。

术语“小鼠 Trop2”是指具有小鼠氨基酸序列的 Trop2 蛋白，例如 Genbank 登录号为 NP_064431.2 的氨基酸序列。

5 本文中的术语“抗体”意在包括全长抗体及其任何抗原结合片段(即，抗原结合部分)或单链。全长抗体是包含至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白，重链和轻链由二硫键连接。各重链由重链可变区(简称 V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域构成，即 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。各轻链由轻链可变区(简称 V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 构成。 V_H 和 V_L 区还可以划分为称作互补决定区(CDR)的高变区，其由较为保守的框架区(FR)区分隔开。各 V_H 和 V_L 由三个 CDR 以及四个 FR 构成，从氨基端到羧基端以 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 的顺序排布。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括多种免疫系统细胞(例如，效应细胞)和传统补体系统的第一组分($C1q$)。

15 本文中的术语，抗体的“抗原结合部分”(或简称为抗体部分)，是指抗体的保持有特异结合抗原(例如，Trop2 蛋白)能力的一个或多个片段。已证实，抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来实施。包含在抗体的“抗原结合部分”中的结合片段的例子包括(i)Fab 片段，由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 构成的单价片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，包含铰链区二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii)由 V_H 和 C_{H1} 构成的 Fd 片段；(iv)
20 由抗体单臂 V_L 和 V_H 构成的 Fv 片段；(v)由 V_H 构成的 dAb 片段；(vi)分离的互补决定区(CDR)；以及(vii)纳米抗体，一种包含单可变结构域和两个恒定结构域的重链可变区。此外，尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由不同的基因编码，它们可以通过重组法经由使两者成为单蛋白链的合成接头而连接，其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链 Fc(scFv))。这些单链抗体也意在包括在术语涵义中。这些抗体片段可以通过
25 过本领域技术人员已知的常用技术而得到，且片段可以通过与完整抗体相同的方式进行功能筛选。

本文所用的术语“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。例如，与 Trop2 蛋白特异结合的分离抗体基本不含特异结合 Trop2 蛋白之外抗原的抗体。但是，特异结合人 Trop2 蛋白的分离抗体可能对其他抗原例如其他物种的
30 Trop2 蛋白具有交叉结合性。此外，分离的抗体基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

术语“单克隆抗体”或“单抗”或“单克隆抗体组成”是指单一分子组成的抗体分子制品。单克隆抗体组成呈现出对于特定表位的单一结合特异性和亲和力。

术语“人源抗体”是指可变区框架和 CDR 区得自人种系免疫球蛋白序列的抗体。此外，如果抗体包含恒定区，其也得自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人源抗体可以
35 包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基，例如通过体外随机突变或点突

变或通过体内体细胞突变而导入的突变。然而，术语“人源抗体”不包括在人框架序列中插入得自其他哺乳动物物种的 CDR 序列的抗体。

术语“识别抗原的抗体”以及“对抗原特异的抗体”在本文中与术语“特异结合抗原的抗体”交替使用。

5 在本文中，“特异结合人 Trop2”的抗体是指与人 Trop2(还可能是其他非人物种的 Trop2)结合但是基本不与非 Trop2 蛋白结合的抗体。优选地，抗体以“高亲和力”结合人 Trop2 蛋白，即 K_D 值为 1.0×10^{-8} M 以下，更优选为 5.0×10^{-9} M 以下。

10 术语“基本不结合”蛋白或细胞是指，不与蛋白或细胞结合，或者不以高亲和力与其结合，即结合蛋白或细胞的 K_D 为 1.0×10^{-6} M 以上，更优选 1.0×10^{-5} M 以上，更优选 1.0×10^{-4} M 以上、 1.0×10^{-3} M 以上，更优选 1.0×10^{-2} M 以上。

术语“高亲和性”对于 IgG 抗体而言，是指对于抗原的 K_D 为 1.0×10^{-6} M 以下，优选 5.0×10^{-8} M 以下，更优选 1.0×10^{-8} M 以下、 5.0×10^{-9} M 以下，更优选 1.0×10^{-9} M 以下。对于其他抗体亚型，“高亲和性”结合可能会变化。例如，IgM 亚型的“高亲和性”结合是指 K_D 为 10^{-6} M 以下，优选 10^{-7} M 以下，更优选 10^{-8} M 以下。

15 术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率，而术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的离解速率。术语“ K_D ”是指解离常数，由 K_d 与 K_a 比(K_d/K_a)得到，并以摩尔浓度(M)表示。抗体的 K_D 值可以通过领域内已知的方法确定。优选的确定抗体 K_D 的方式是使用表面等离子共振仪(SPR)测得的，优选使用生物传感系统例如 Biacore™ 或 Octet Red96e 系统测得。

20 术语“ EC_{50} ”，又叫半数最大效应浓度，是指引起 50%最大效应的抗体浓度。

术语“抗体依赖的细胞毒性”、“抗体依赖的细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的免疫防御，其中免疫系统效应细胞主动地将细胞膜表面抗原与抗体，例如 Trop2 抗体，结合的靶细胞例如癌细胞裂解。

25 术语“抗体依赖的细胞介导的吞噬作用”或“ADCP”是指抗体与靶细胞上相应的抗原结合后，抗体的 Fc 段与效应细胞如吞噬细胞上的 Fc 受体结合，从而诱导效应细胞吞噬靶细胞的作用。

术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳类和非哺乳类，例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类、和爬行类，优选哺乳动物，例如非人灵长类、羊、狗、猫、牛和马。

30 术语“治疗有效量”是指足以防止或减缓与疾病或病症(例如癌症)相关的症状的本发明抗体量。治疗有效量与被治疗的疾病相关，其中本领域技术人员可以方便地判别出实际的有效量。

本发明的多个方面在以下更加具体地加以描述。

35 Trop2 抗体对 Trop2 的结合特异性以及其他有益的功能特征

本发明的抗体特异性地结合人或猴 Trop2，也与小鼠 Trop2 结合。具体而言，本发明的抗体以与 hRS7 相当或更低的 EC₅₀ 值与人、猴 Trop2 结合。此外，本发明的抗体还具有与 hRS7 相当或更好的内化活性、ADCC 或 ADCP 活性。

5 优选的本发明抗体是单克隆抗体。此外，抗体可以是例如鼠源的、嵌合的或人源的单克隆抗体，优选为人源抗体。

Trop2 单克隆抗体

10 优选的本发明抗体是结构和化学特性在以下描述的单克隆抗体。Trop2 抗体的 V_H 包含 SEQ ID NO: 192-220 中的任一氨基酸序列。Trop2 抗体的 V_L 包含 SEQ ID NO: 221-240 中的任一氨基酸序列。抗体的重链/轻链可变区序列列于以下表 1a 和表 1b 中。所有抗体的重链恒定区和轻链恒定区分别包含 SEQ ID NO: 292 和 293 的氨基酸序列。抗体还可以包含其他合适的重链恒定区和轻链恒定区序列。

表 1a. 重链/轻链可变区及 CDR 的氨基酸序列总结(SEQ ID NO)

抗体编号	轻链	重链	VL	VH	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR001128	270	241	221	192	115	144	169	19	47	86
PR001130	271	242	222	193	116	145	170	20	48	87
PR001131	272	242	223	193	117	146	171	20	48	87
PR001132	273	243	224	194	118	147	172	21	49	88
PR001133	274	244	225	195	119	148	173	21	50	89
PR001134	275	245	226	196	120	146	174	22	51	90
PR001138	276	246	227	197	121	145	175	23	52	91
PR001139	277	247	228	198	122	149	176	24	53	92
PR001142	278	248	229	199	123	145	177	25	54	87
PR001143	275	249	226	200	120	146	174	26	51	93
PR001145	279	250	230	201	124	149	178	24	53	92
PR001147	280	251	231	202	125	148	179	21	50	89
PR001150	281	252	232	203	126	150	180	27	55	94
PR001151	282	253	233	204	127	151	180	27	55	95
PR001152	281	254	232	205	126	150	180	27	55	94
PR001153	283	255	234	206	128	152	181	19	52	96
PR001154	282	256	233	207	127	151	180	27	55	95
PR001155	282	257	233	208	127	151	180	27	55	95
PR001156	284	258	235	209	127	150	180	27	55	97
PR001158	284	259	235	210	127	150	180	27	55	94
PR001159	284	260	235	211	127	150	180	27	55	94
PR001160	282	261	233	212	127	151	180	27	56	95
PR001162	285	262	236	213	129	144	182	28	57	98
PR001163	282	263	233	214	127	151	180	27	55	95
PR001164	286	264	237	215	130	146	183	29	58	99
PR001165	284	265	235	216	127	150	180	27	55	94
PR001166	287	266	238	217	131	153	184	23	59	100
PR001168	288	267	239	218	132	154	185	30	51	101
PR001170	289	268	240	219	133	153	184	31	59	100
PR001171	284	269	235	220	127	150	180	27	55	94
hRS7	291	290								

表 1b 重链/轻链可变区框架区的氨基酸序列总结(SEQ ID NO)

抗体编号	HFWR1	HFWR2	HFWR3	HFWR4	LFWR1	LFWR2	LFWR3	LFWR4
PR001128	1	32	60	102	105	134	155	186
PR001130	1	32	61	102	106	135	156	187
PR001131	1	32	61	102	107	136	157	188
PR001132	2	33	62	102	108	135	158	187
PR001133	3	34	63	102	109	135	159	187
PR001134	4	35	64	103	109	137	160	189
PR001138	5	36	65	102	106	138	161	187
PR001139	6	37	66	102	110	139	162	187
PR001142	1	32	67	102	106	135	163	190
PR001143	7	35	68	102	109	137	160	189
PR001145	6	38	66	102	111	140	162	187
PR001147	3	39	69	102	109	135	158	187
PR001150	8	40	70	104	112	141	164	186
PR001151	6	35	71	104	112	135	164	186
PR001152	9	35	72	104	112	141	164	186
PR001153	1	32	73	102	113	142	165	188
PR001154	10	35	74	104	112	135	164	186
PR001155	11	35	75	104	112	135	164	186
PR001156	12	35	76	104	112	135	164	186
PR001158	13	35	77	104	112	135	164	186
PR001159	10	35	78	104	112	135	164	186
PR001160	10	35	79	104	112	135	164	186
PR001162	14	41	80	102	105	140	166	186
PR001163	15	42	75	104	112	135	164	186
PR001164	16	43	81	102	112	135	164	189
PR001165	10	35	82	104	112	135	164	186
PR001166	17	44	83	102	111	143	167	189
PR001168	18	45	84	102	114	140	168	191
PR001170	17	46	83	102	111	143	167	189
PR001171	6	35	85	104	112	135	164	186

与人 Trop2 结合的其他 Trop2 抗体的 V_H 和/或 V_L 序列(或 CDR 序列)可以与本发明抗体的 V_H 和/或 V_L 序列(或 CDR 序列)“混合并配对”。优选地,当 V_H 和 V_L(或其中的 CDR)混合并配对时,特定 V_H/V_L 配对中的 V_H 序列可以由结构近似的 V_H 序列取代。相似地,优选特定 V_H/V_L 配对中的 V_L 序列由结构近似的 V_L 序列取代。

因此,在一个实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合部分包括:

(a)包含列于表 1a 中氨基酸序列的重链可变区; 以及

(b)包含列于表 1a 中氨基酸序列的轻链可变区,或者另一 Trop2 抗体的 V_L, 其中该抗体特异结合人 Trop2。

在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合部分包括:

(a)列于表 1a 中的重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3; 以及

(b)列于表 1a 中的轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或者另一 Trop2 抗体的 CDR, 其中该抗体特异结合人 Trop2。

在另一实施方式中,本发明的抗体或其抗原结合部分包括 Trop2 抗体的重链可变

区 CDR 以及其他结合人 Trop2 的抗体的 CDR，例如重链可变区 CDR1、CDR2 和/或 CDR3，和/或另一 Trop2 抗体的轻链可变区 CDR1、CDR2 和/或 CDR3。

此外，领域内公知的是，CDR3 结构域，独立于 CDR1 和/或 CDR2，可单独确定抗体对同种抗原的结合特异性，且可以预测到基于该 CDR3 序列可生成具有相同结合特异性的多种抗体。

在另一实施方式中，本发明的抗体包含 Trop2 抗体的重链可变区的 CDR2 以及至少 Trop2 抗体的重链和/或轻链可变区的 CDR3，或另一 Trop2 抗体的重链和/或轻链可变区的 CDR3，其中该抗体能够特异结合人 Trop2。优选这些抗体(a)竞争结合 Trop2；(b)保留功能特性；(c)结合相同表位；和/或(d)具有与本发明 Trop2 抗体相似的结合亲和力和力。在另一实施方式中，抗体还可以包含 Trop2 抗体的轻链可变区 CDR2，或者另一 Trop2 抗体的轻链可变区 CDR2，其中该抗体特异结合人 Trop2。在另一实施方式中，本发明的抗体可以包括 Trop2 抗体的重链/轻链可变区 CDR1，或另一 Trop2 抗体的重链和/或轻链可变区 CDR1，其中该抗体特异结合人 Trop2。

保守修饰

在另一实施方式中，本发明的抗体包含与本发明 Trop2 抗体存在一个或多个保守修饰的重链和/或轻链可变区序列或 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。本领域知道，一些保守序列修改不会使抗原结合性消失。参见，例如，Brummell *et al.*, (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt *et al.*, (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall *et al.*, (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy *et al.*, (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 and Beers *et al.*, (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43。

因此，在一个实施方式中，抗体包含重链可变区和/或轻链可变区，重链可变区和轻链可变区分别包含 CDR1、CDR2 和 CDR3，其中：

(a)重链可变区 CDR1 包含表 1a 列出的序列，和/或其保守修改；和/或
(b)重链可变区 CDR2 包含表 1a 列出的序列，和/或其保守修改；和/或
(c)重链可变区 CDR3 包含表 1a 列出的序列，和/或其保守修改；和/或
(d)轻链可变区 CDR1、和/或 CDR2、和/或 CDR3 包含表 1a 列出的序列，和/或其保守修改；且

(e)该抗体特异结合人 Trop2。

本发明的抗体具有一个或多个以下功能特征，例如对人 Trop2 的高亲和力，以及引发对 Trop2 表达细胞的 ADCC 或 CDC 的能力。

在多个实施方式中，抗体可以是例如鼠源、人源、嵌合或人源化抗体。

本文所用的术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变抗体结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替换、添加和删除。可以通过领域内已知的标准

技术，例如点突变和 PCR 介导的突变，将修饰引入本发明抗体中。保守氨基酸替换是氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基进行替换。具有相似侧链的氨基酸残基组在领域内已知。这些氨基酸残基组包括具有碱性侧链(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -支链侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，本发明抗体的 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基可以用同侧链组的其他氨基酸残基替换，且得到的抗体可以使用本文所述的功能检测对其进行保留功能(即，上述的功能)的测试。

基因修饰的抗体

本发明的抗体可以以具备本发明 Trop2 抗体的一个或多个 V_H/V_L 序列的抗体作为起始材料，制备成基因修饰的抗体。抗体可以通过修饰一个或两个可变区(即， V_H 和/或 V_L)内(例如，在一个或多个 CDR 区和/或一个或多个框架区)的一个或多个残基来进行基因修饰，以改善结合亲和力和/或增加与某些物种天然产生的抗体的相似性。例如，框架区经修饰成提供人源化的抗体。此外，或者抗体可以通过修饰恒定区中的残基进行基因修饰，例如改变抗体的效应功能。

在某些实施方式中，CDR 区植入可以用来基因修饰抗体的可变区。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶标抗原进行相互作用。出于这个原因，CDR 内的氨基酸残基比起 CDR 外的序列在个体抗体之间更加地多样。因为 CDR 序列负责主要的抗体-抗原相互作用，可以通过构建含有特定天然抗体的 CDR 序列植入到不同特性的不同抗体的框架序列的表达载体，来表达模拟特定天然抗体的特性的重组抗体(Riechmann *et al.*, (1998) *Nature* 332:323-327; Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525; Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad.* U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Pat. Nos. 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370)。

因此，本发明的另一实施方式涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含重链可变区和/或轻链可变区，重链可变区包含具有本发明上述序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3，轻链可变区包含具有本发明上述序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3。尽管这些抗体包含本发明单克隆抗体的 V_H 和 V_L CDR 序列，它们可以含有不同的框架序列。

这样的框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开 DNA 数据库或公开参考文献中获得。例如，用于人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在 Vbase 人种系序列数据库(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)以及 Kabat *et al.*, (1991), 同上; Tomlinson *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 和 Cox *et al.*, (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:827-836 中获得。作为另一实施方式，用于人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在

Genbank 数据库中得到。例如, 下列 HCo7 HuMAb 小鼠中的重链种系序列的 Genbank 登录号为 1-69 (NG--0010109, NT--024637 & BC070333)、3-33 (NG--0010109 & NT--024637)和 3-7 (NG--0010109 & NT--024637)。作为另一例子, 以下来自 Hco12 HuMAb 小鼠的重链种系序列的 Genbank 登录号为 1-69 (NG--0010109, NT--024637 & BC070333)、5-51 (NG--0010109 & NT--024637)、4-34 (NG--0010109 & NT--024637)、3-30.3 (CAJ556644)和 3-23 (AJ406678)。

通过使用本领域公知的称为空格(gap)BLAST 的序列相似性搜索方法之一 (Altschul *et al.*, (1997), 同上), 将抗体蛋白序列与蛋白序列数据库进行比较。

用于本发明抗体的优选框架序列是结构上与本发明抗体所用的框架序列相似的那些。V_H CDR1、CDR2、和 CDR3 序列可以植入到与得到该框架序列的种系免疫球蛋白基因具有相同序列的框架区中, 或者 CDR 序列可以植入到包含有与种系序列相比具有一个或多个突变的框架区中。例如, 在一些情况下, 将框架区中的残基进行突变是有益的, 以保持或增强抗体的抗原结合性(参见例如 U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370)。

另一类的可变区修饰是将 V_H 和/或 V_L CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变, 从而改进目标抗体的一种或多种结合特性(例如, 亲和力)。可以进行点突变或 PCR 介导的突变来引入突变, 且其对于抗体结合或其他功能特性的影响可以在本领域所知的体外或体内检测中进行评价。优选地, 引入本领域所知的保守修饰。突变可以是氨基酸替换、添加或缺失, 但优选为替换。此外, 通常改变 CDR 区内的不多于一个、两个、三个、四个或五个的残基。

此外, 在另一实施方式中, 本发明提供分离的 Trop2 单克隆抗体或其抗原结合部分, 包含重链可变区和轻链可变区, 其包含: (a)V_H CDR1 区, 包含本发明的序列, 或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列; (b)V_H CDR2 区, 包含本发明的序列, 或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列; (c)V_H CDR3 区, 包含本发明的序列, 或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列; (d)V_L CDR1 区, 包含本发明的序列, 或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列; (e)V_L CDR2 区, 包含本发明的序列, 或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列; 和(f)V_L CDR3 区, 包含本发明的序列, 或一个、两个、三个、四个或五个氨基酸替换、缺失或添加的氨基酸序列。

本发明的基因改造抗体包括在 V_H 和/或 V_L 的框架残基中做出基因修饰以例如改变抗体特性的那些。通常而言, 这些框架修饰用来降低抗体的免疫原性。例如, 一种方法是将一个或多个框架残基“回复突变”成相应的种系序列。更加具体而言, 经历体细胞突变的抗体可能包含不同于得到抗体的种系序列的框架残基。这些残基可以通过将抗体框架序列与得到抗体的种系序列相比较而识别出来。

另一类的框架修饰包括对框架区的、或者甚至一个或多个 CDR 区的一个或多个残基进行突变，以去除 T 细胞表位，从而减少抗体的可能导致的免疫原性。该方法也称为“去免疫化”，在美国专利公开 20030153043 中有更加详细的描述。

5 本发明还包括抗 Trop2 抗体的活性片段、衍生物和类似物。如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持 Trop2 结合亲和力功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或几个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii) CDR3-P1 多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(与前导序列、分泌序列或 6His 等标签序列融合而形成的然后蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

15 一类优选的活性衍生物指与表 1 的氨基酸序列相比，有至多 3 个，较佳地至多 2 个，更佳地至多 1 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 2 进行氨基酸替换而产生。

表 2

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

此外，作为框架或 CDR 区内修饰之外的另一种选择，本发明的抗体可以基因改

造成在 Fc 区包括基因修饰，通常来改变抗体的一个或多个功能特性，例如血清半衰期、补体结合、Fc 受体结合、和/或抗体依赖的细胞毒性。此外，本发明的抗体可以进行化学修饰(例如，可以向抗体附加一个或多个化学功能基团)，或者修饰成改变其糖基化，来改变抗体的一个或多个功能特性。

5 在一个实施方式中，C_{H1} 的铰链区进行修饰，改变，例如增加或减少铰链区的半胱氨酸残基的数量。该方法在美国专利 5,677,425 中进一步描述。改变 C_{H1} 铰链区的半胱氨酸残基，来例如促进重链轻链的组装或增加/降低抗体的稳定性。

在另一个实施方式中，对抗体的 Fc 铰链区进行突变，以降低抗体的生物半衰期。更加具体地，将一个或多个氨基酸突变引入 Fc 铰链片段的 C_{H2}-C_{H3} 连接区，从而抗体
10 相对于天然 Fc-铰链结构域 SpA 结合而言，具有减弱的 SpA 结合力。该方法在美国专利 6,165,745 中有更详细的描述。

在另一实施方式中，修饰抗体的糖基化。例如，可以制备去糖基化的抗体(即，抗体缺少糖基化)。可以改变糖基化，来例如增加抗体对抗原的亲合性。这样的糖化修饰可以通过例如改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来达成。例如，可以做出
15 一个或多个氨基酸替换，以消除一个或多个可变区框架糖基化位点，从而消除该位置的糖基化。这样的去糖基化可以增加抗体对抗原的亲合性。参见，例如美国专利 5,714,350 和 6,350,861。

此外，可以制备具有改变的糖基化类型的抗体，例如岩藻糖残基量减少的低岩藻糖基抗体，或者具有增加的平头型 GlcNac 结构的抗体。改变的糖基化形式被证明能
20 增加抗体的 ADCC 活性。这样的糖化修饰可以通过例如在糖基化系统改变的宿主细胞中表达抗体而进行。具有改变的糖基化系统的细胞在领域中已知，且可以用作表达本发明重组抗体的宿主细胞，以制备具有改变的糖基化的抗体。例如，细胞系 Ms704、Ms705 和 Ms709 缺少岩藻糖基转移酶基因 FUT8(α (1,6)-岩藻糖基转移酶)，从而在 Ms704、Ms705 和 Ms709 细胞系中表达的抗体在其糖中缺失岩藻糖。Ms704、Ms705
25 和 Ms709 FUT8^{-/-}细胞系通过在 CHO/DG44 细胞中使用两种替换载体定向破坏 FUT8 基因而制备(参见美国专利公开 20040110704 和 Yamane-Ohnuki *et al.*, (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22)。作为另一个例子，EP 1,176,195 记载了 FUT8 基因功能破坏的细胞系，其编码岩藻糖基转移酶，从而在该细胞系中表达的抗体通过降低或消除 α -1,6 键相关酶而表现出低岩藻糖基化。EP 1,176,195 也描述了一种细胞系，其具
30 有较低的用于向结合抗体 Fc 区的 N-乙酰葡萄糖胺添加岩藻糖的酶活性，或者不具有这种酶的活性，例如大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/O(ATCC CRL 1662)。WO 03/035835 描述了 CHO 变体细胞系，Lec13 细胞，其具有降低的向 Asn(297)-相关糖添加岩藻糖的能力，从而使得宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(参见 Shields *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。具有改变的糖基化图谱的抗体也可以在鸡蛋中制备，如 WO
35 06/089231 中所述的。或者，具有改变的糖基化图谱的抗体可以在植物细胞如浮萍中

制备。WO 99/54342 公开了一种细胞系，其基因改造成表达修饰糖蛋白的糖基转移酶（例如， $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III(GnTIII)，从而在基因改造细胞系中表达的抗体表现出增加的平分型 GlcNac 结构，其引起抗体增强的 ADCC 活性(Umana *et al.*, (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180)。或者，抗体的岩藻糖残基可以使用岩藻糖苷酶来切
5 除抗体的岩藻糖残基，例如 α -L-岩藻糖苷酶从抗体移除岩藻糖残基(Tarentino *et al.*, (1975) *Biochem.* 14:5516-23)。

本文抗体的另一修饰是聚乙二醇化(PEG 化)。抗体可以 PEG 化，例如来增加抗体的生物(例如，血清)半衰期。为使抗体 PEG 化，抗体或其片段通常与聚乙二醇(PEG)，例如 PEG 的反应性酯或醛类衍生物，在使一个或多个 PEG 基团附于抗体或抗体片段的条件下反应。优选地，PEG 化通过与反应性 PEG 分子(或类似的有反应性的水溶性聚合物)的酰化反应或烷化反应进行。本文中所用的术语“聚乙二醇”包括任何形式的用于衍生其他蛋白的 PEG，例如单(C₁-C₁₀)烷氧基-或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇马来酰亚胺。在某些实施方式中，需要 PEG 化的抗体是去糖基化的抗体。PEG 化蛋白的方法在领域内已知，且可以应用到本发明的抗体。参见，例如 EPO 154 316 和 EP 0 401
10 384。

抗体的物理特性

本发明的抗体可以用它们的多种物理特性进行表征，以检测和/或区别其分类。

例如，抗体可以在轻链或重链可变区包含一个或多个糖基化位点。这些糖基化位点可能引起增加的抗体免疫原性，或由于改变的抗原结合而引起改变的抗体 pK 值
20 (Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.*, (2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。糖基化已知发生在含有 N-X-S/T 序列的基序中。在一些情况下，优选 Trop2 抗体不包含可变区糖基化。这可以通过选择不在可变区包含糖基化基序的抗体或通过突变糖基化区域的残基来实现。

在优选实施方式中，抗体不包含天冬酰胺异构位点。天冬酰胺的脱酰胺可能出现在 N-G 或 D-G 序列，创建出异天冬氨酸残基，其向多肽链中引入扭结并降低其稳定性(异天冬氨酸效果)。

各抗体将具有独特的等电点(pI)，基本落在 6-9.5 的 pH 范围内。IgG1 抗体的 pI 通常落在 7-9.5 的 pH 范围内，而 IgG4 抗体的 pI 基本落在 6-8 的 pH 范围内。推测 pI 在正常范围外的抗体可能在体内条件下具有一些展开结构且不稳定。因此，优选 Trop2 抗体的 pI 值落在正常范围内。这可以通过选择 pI 在正常范围内的抗体或通过突变不带电的表面残基来实现。

编码本发明抗体的核酸分子

在另一方面，本发明提供编码本发明抗体的重链和/或轻链可变区或 CDR 的核酸分子。核酸可以存在整细胞中，在细胞裂解液中，或处于部分纯化或基本纯的形式。当通过标准技术从其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白中纯化出来
5 后，核酸是“分离的”或“基本纯的”。本发明的核酸可以为例如 DNA 或 RNA，且可能包含或可能不包含内含子序列。在优选实施方式中，核酸是 cDNA 分子。

本发明的核酸可以使用标准的分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(例如，由携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤)表达的抗体，编码杂交瘤制备的抗体的轻链和重链的 cDNA 可以通过标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得。对于(例如
10 使用噬菌体展示技术)从免疫球蛋白基因库获得的抗体，编码这类抗体的核酸可以从基因库中收集。

优选的本发明核酸分子包括编码 Trop2 单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列或 CDR 的那些。一旦获得了编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段，这些 DNA 片段可以进一步通过标准的重组 DNA 技术进行操作，例如将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab 片段基因
15 或 scFv 基因。在这些操作中，编码 V_H 或 V_L 的 DNA 片段与编码另一蛋白的另一 DNA 片段，例如抗体恒定区或柔性接头，可操作地连接。术语“可操作地连接”是指两个 DNA 片段连接在一起，从而两个 DNA 片段编码的氨基酸序列都在阅读框内。

编码 V_H 区的分离 DNA 可以通过可操作地连接 V_H 编码 DNA 与编码重链恒定区(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})的另一 DNA 分子而转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列
20 在领域内已知，且包括这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增而获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区，但是优选为 IgG1 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因，编码 V_H 区的 DNA 可以可操作地与仅编码重链 C_{H1} 恒定区的另一 DNA 分子连接。

编码 V_L 区的分离 DNA 可以通过可操作地连接 V_L 编码 DNA 与编码轻链恒定区
25 C_L 的另一 DNA 分子而转变成全长轻链基因。人轻链恒定区基因的序列在领域内已知，且包括这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增而获得。在优选实施方式中，轻链恒定区可以是 κ 和 λ 恒定区。

为创建 scFv 基因，编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段可以可操作地与编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly4-Ser)₃ 的另一片段连接，从而 V_H 和 V_L 序列可以作为连续的单
30 链蛋白进行表达，其中 V_H 和 V_L 区域通过该柔性接头连接(参见，例如 Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554)。

本发明单克隆抗体的制备

35 本发明使用和铂生物 H2L2 转基因小鼠来制备具有全人源可变区的两重链和两

轻链免疫球蛋白抗体。利用基因工程改造,在小鼠体内引入人源重链和轻链转基因位点以产生人源抗体。根据引入的抗体重链基因座的设计不同,特定抗原的免疫刺激可以产生一类具有特定功能效应的传统抗体(如 IgG 或 IgA)或多类抗体(如 IgM 和 IgG)。

抗原特异性的 H2L2 单克隆抗体可以使用 Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495 的体细胞杂交(杂交瘤)技术进行制备。制备单克隆抗体的其他实施方式包括 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化以及噬菌体展示技术。嵌合或人源化抗体也在领域内熟知。参见,例如美国专利 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370。

制备本发明单克隆抗体的转染瘤的生成

本发明的抗体还可以使用例如重组 DNA 技术结合基因转染方法,在宿主细胞转染瘤中生成(例如 Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202)。在一个实施方式中,将由标准分子生物技术得到的编码部分或全长轻链和重链的 DNA 插入一个或多个表达载体中,从而基因与转录和翻译调控序列可操作地连接。在该情况下,术语“可操作地连接”是指抗体基因连接到载体中,从而载体内的转录和翻译控制序列行使它们既定的调控抗体基因转录和翻译的功能。

术语“调控序列”包括控制抗体基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调控序列在例如 Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))中有过描述。优选的用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列包括引导在哺乳动物细胞中的高水平蛋白表达的病毒元件,例如得自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒 40(SV40)、腺病毒的启动子和/或增强子,如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)和多瘤病毒。或者,可以使用非病毒调控序列,例如泛素启动子或 β -珠蛋白启动子。另外,调控元件由不同来源的序列构成,例如 SR α 启动子系统,其包含来自 SV40 早期启动子的序列和人 T 细胞白血病 I 型病毒的长末端重复(Takebe *et al.*, (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472)。表达载体和表达控制序列选为与所使用的表达宿主细胞相容。

抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入到同一或不同的表达载体中。在优选实施方式中,可变区通过插入到已经编码所需亚型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中而构建全长抗体基因,从而 V_H 与载体中的 C_H 可操作地连接, V_L 与载体中的 C_L 可操作地连接。或者,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。抗体链基因可以克隆到载体中,从而信号肽在阅读框内连接到抗体链基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。

除抗体链基因和调控序列外,本发明的重组表达载体可以携带其他序列,例如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起始点)和可选择标记物基因。可选择标记物基因可用于选择已导入载体的宿主细胞(参见,例如,美国专利 4,399,216; 4,634,665 和 5,179,017)。例如,通常可选择标记物基因赋予已导入载体的宿主细胞以

药物抗性,例如 G418、潮霉素、或氨甲喋呤抗性。优选的可选择标记物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于 dhfr 宿主细胞的氨甲喋呤选择/扩增)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

对于轻链和重链的表达,编码重链和轻链的表达载体通过标准技术转染到宿主细胞中。多个形式的术语“转染”包括多种常用于将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞的技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖转染等。尽管在原核或真核宿主细胞中表达本发明抗体在理论上是可行的,优选抗体在真核细胞中表达,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达,因为真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能组装并分泌适当折叠且有免疫活性的抗体。

优选的用于表达本发明重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO 细胞)(包括与 DHFR 可选择标记物一起施用的 dhfr-CHO 细胞,在 Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 中有过描述, DHFR 可选择标记物在例如 R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621 中描述)、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别在使用 NSO 骨髓瘤细胞时,另一优选的表达系统是 GS 基因表达系统,记载于 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338,841。当编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时,通过将宿主细胞培养足以使得宿主细胞中抗体表达、或优选地足以使得抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的一段时间,从而制备抗体。抗体可以使用蛋白纯化方法从培养基中回收。

重组蛋白及其制备方法

本发明还涉及包含本发明抗体或抗原结合蛋白,或包含与本发明抗体或抗原结合蛋白具有至少 50%, 较佳地至少 70%, 更佳地至少 80% 序列相同性的氨基酸序列的重组蛋白。此外,本发明的重组蛋白还可包括本发明纳米抗体与表达标签(如 6His)融合在一起所形成的融合蛋白。

一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明重组蛋白(或其片段,或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明重组蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。代表性例子有:大肠杆菌,链霉菌属;鼠伤寒沙门

氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS7、293 细胞的动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

免疫偶联物

本发明的抗体可以与治疗剂交联，形成免疫偶联物，例如抗体-药物偶联物(ADC)。合适的治疗剂包括细胞毒素、烷化剂、DNA 小沟结合分子、DNA 嵌入剂、DNA 交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 的抑制剂、热激蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂，优选为 SN-38。在 ADC 中，抗体和治疗剂优选地通过接头交联，该接头可切割，例如肽类接头、二硫类接头或胺类接头。更优选地，接头是肽类接头，例如 Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser 或 Glu。ADC 可以如美国专利 7,087,600; 6,989,452; 和 7,129,261; PCT 公开 WO 02/096910; WO 07/038,658; WO 07/051,081; WO 07/059,404; WO 08/083,312; 和 WO 08/103,693; 美国专利公开 20060024317; 20060004081; 和 20060247295 中描述般进行制备。

多特异性抗体

另一方面，本发明涉及包含与至少一个其他功能分子如另一种肽或蛋白(例如，另一抗体或受体配体)相连接的一种或多种本发明抗体的多特异性抗体，以生成与至少两个不同结合位点或靶向分子结合的多特异性抗体。术语“多特异性抗体”包括具有

三种或更多种特异性的抗体。

在实施方式中，除 Fc 结合特异性和 Trop2 结合特异性外，双特异性分子还具有第三特异性。第三特异性可以是针对增强因子(EF)，例如与参与细胞毒性活性的表面蛋白结合并从而增加针对靶细胞的免疫应答的分子。例如，增强因子抗体可以与细胞毒性 T 细胞(例如，通过 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40 或 ICAM-1)或其他免疫细胞结合，引起增强的针对靶细胞的免疫应答。

多特异性抗体可以以多种形式和尺寸出现。在尺寸谱的一端，多特异性抗体保持传统抗体形式，除其具有两个结合臂且各臂具有不同特异性外，替代具有两个特异性相同的结合臂的情况。在另一极端的是双特异性分子，由两个经肽链连接的单链抗体片段(scFv)构成，称为 Bs(scFv)₂ 构建体。中间尺寸的双特异性分子包括由肽类接头连接的两个不同的 F(ab)片段。这些和其他形式的双特异性分子可以通过基因改造、体细胞杂交或化学法进行制备。参见，例如 Kufer et al, cited supra; Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998);和 van Spriël et al., *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000)。

编码抗体或携带抗体的溶瘤病毒

溶瘤病毒偏好地侵染并杀灭癌细胞。本发明的抗体与溶瘤病毒一起使用。此外，编码本发明抗体的溶瘤病毒可以引入人体中。

药物组合物

在另一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含本发明的一种或多种抗体，与药学上可接受的载体配制在一起。组合物可以任选地包含一种或多种其他药学上的有效成分，例如另一抗体、化疗剂等。本发明的药学组合物可以在与例如另一抗癌剂、另一抗炎剂或疫苗的联合疗法中进行施用。

药学组合物可以包含任何数量的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠或乳化剂、固体粘合剂、分散或混悬剂、增溶剂、染色剂、矫味剂、涂层、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂及其组合。合适赋形剂的选择和使用在 Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)中有教导。

优选地，药物组合物适合于静脉内、肌内、皮下、肠道外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或推注)。基于施用途径的不同，有效成分可以包在材料中，以保护其不受酸和可能使其失活的其他自然条件的影响。“肠道外施用”是指不同于肠道和局部外用的方式，通常通过注射进行，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、膜内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬脑膜上和胸骨内注射和推注。或者，本发明的抗体可以通过非肠道外路径

施用，例如外用、表皮施用或粘膜施用，例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下、或局部外用。

药物组合物可以为无菌水溶液或分散液的形式。它们也可以配制在微乳剂、脂质体或其他适于高浓度药物的有序结构中。

5 与载体材料一起制备成单剂型的有效成分的量将随着治疗主体和特定施用模式而变，且基本上而言是产生疗效的组合物的量。以百分比计，该量为约 0.01-约 99% 的与药学上可接受载体结合的有效成分，优选为约 0.1%-约 70%，最优选为约 1%-约 30% 的有效成分。

10 给药方案经调整提供最佳的所需反应(例如，治疗反应)。例如，可以施用快速灌注剂，可以随时间推移施用多个分剂量，或者剂量可以随治疗情况的危急程度成比例降低或提高。特别有利的是，以方便施用和剂量均匀的剂量单位型配置肠道外组合物。剂量单位型是指物理上分开的单位，适于治疗主体的单次给药；各单位包含计算出来与药学载体一起产生所需疗效的预定量的有效成分。或者，抗体可以以缓释剂施用，这种情况下所需的施用频率降低。

15 对于抗体的施用，剂量可以为约 0.001-100 mg/kg 宿主体重，更常见的为 0.01-5 mg/kg。例如，剂量可以为 0.3 mg/kg 体重、1 mg/kg 体重、3 mg/kg 体重、5 mg/kg 体重或 10 mg/kg 体重，或在 1-10 mg/kg 范围内。示例性的治疗方案涉及每周施用一次、两周一次、三周一次、四周一次、一个月一次、3 个月一次、或 3-6 个月一次。本发明 Trop2 的优选给药方案包括静脉内施用，1 mg/kg 体重或 3 mg/kg 体重，抗体以以下
20 给药时间表中的一个进行给药：(i)每四周给药六次，然后每三个月一次；(ii)每三周一次；(iii)3 mg/kg 体重一次，之后 1 mg/kg 体重每三周一次。在一些方法中，剂量调整成实现约 1-1000 µg/ml 的血药浓度，在一些方法中为约 25-300 µg/ml。

“治疗有效量”的本发明 Trop2 抗体引起疾病症状严重程度的降低、无症状期频率和持续时间的增加、或对感病性引起的损伤或无能的预防能力。例如，对于带瘤受试
25 者的治疗，“治疗有效量”优选地，与未治疗受试者相比，将肿瘤生长抑制至少约 20%、更优选抑制至少约 40%，甚至更优选地抑制至少约 60%，且更优选地抑制至少约 80%。治疗有效量的治疗抗体可以减小肿瘤尺寸，或者减轻受试者的症状，受试者可以是人或另一哺乳动物。

药物组合物可以是缓释试剂，包括植入体、透皮贴剂、和微胶囊递送系统。可以
30 使用生物可降解、生物相容的聚合物，例如乙烯-醋酸乙烯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、和聚乳酸。参见，例如，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

药学组合物可以经医学设备来给药，例如(1)无针皮下注射设备(例如，美国专利
35 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824;和 4,596,556)；(2)微量输液泵(美国专利 4,487,603)；(3)经皮给药设备(美国专利 4,486,194)；(4)推注设备(美

国专利 4,447,233 和 4,447,224); 和(5)渗透设备(美国专利 4,439,196 和 4,475,196)。

在某些实施方式中, 本发明的单抗可以经配制, 以确保合适的体内分布。例如, 为确保本发明的治疗抗体穿越血脑屏障, 抗体可以配制在脂质体中, 其还可以额外地包含靶向功能基团, 以增强对特定细胞或器官的选择性输送。参见, 例如美国专利

4,522,811; 5,374,548; 5,416,016;和 5,399,331; V. V. Ranade (1989) *J.*

*Clin.Pharmacol.*29:685; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

153:1038; Bloeman *et al.*, (1995) *FEBS Lett.*357:140; M. Owais *et al.*, (1995) *Antimicrob.*

Agents Chemother. 39:180; Briscoe *et al.*, (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134; Schreier *et al.*,

(1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090; Keinanen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123;和

Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273。

本发明的用途和方法

本发明的抗体(组合物、双特异性分子和免疫偶联物)具有多种体外和外内应用, 涉及例如癌症的诊断、和/或治疗。抗体可以施用至人受试者, 以例如体内抑制肿瘤生长。在癌症的诊断中, 可以收集目标组织样本, 并与本发明抗体接触, 其中, 如果在某些区域或细胞类中检测到高水平的 Trop2, 则诊断该受试者可能患有癌症, 且 Trop2 表达的增加/减少表示癌症发展/减轻。

考虑到本发明 Trop2 抗体的抑制肿瘤细胞增殖和存活的能力, 本发明提供抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法, 包括向该受试者施用本发明的抗体, 从而在该受试者中肿瘤生长被抑制。可以由本发明抗体治疗的肿瘤的非限制性例子包括但不限于乳癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、和肠癌, 原发或转移的。此外, 难治的或复发的恶性肿瘤可能可以用本发明的抗体抑制。

本发明的这些和其他方法在以下进一步讨论。

联合疗法

本发明提供本发明 Trop2 抗体或其抗原结合部分与一种或多种其他抗体一起施用的联合疗法, 其能有效抑制受试者中的肿瘤生长。在一个实施方式中, 本发明提供在受试者中抑制肿瘤生长的方法, 包括向受试者施用 Trop2 抗体以及一种或多种其他抗体, 例如 LAG-3 抗体、PD-1 抗体和/或 CTLA-4 抗体。在某些实施方式中, 受试者是人。在另一个方面, 本发明提供癌症治疗方法, 其中本发明的 Trop2 抗体或其抗原结合部分与化疗剂一起施用, 化疗剂可以是细胞毒性剂。例如, SN-38、表阿霉素、奥沙利铂、和/或 5-FU 可以施用给接受 Trop2 抗体疗法的患者。

其他可以与 Trop2 抗体联合的疗法包括但不限于免疫原性剂施用、白介素 2(IL-2)施用、放疗、手术或激素去除。

本文讨论的治疗剂的组合可以作为在药学可接受载体中的单一组合物同时施用,

或者作为分开的组合物同时施用，其中各药剂处于药学可接受载体中。在另一个实施方式中，治疗剂的组合可以按序施用。

此外，如果进行多次联合疗法施用，且药剂按序施用，则在各时间点的按序施用的次序可以反转或保持相同，按序施用可以与同时施用或其任何组合相结合。

5

试剂盒

本发明还提供了一种含有本发明的抗体(或其片段)或检测板的试剂盒，在本发明的一个优选例中，所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。

本发明还提供了用于检测 Trop2 水平的检测试剂盒，该试剂盒包括识别 Trop2
10 蛋白的抗体，用于溶解样本的裂解介质，检测所需的通用试剂和缓冲液，如各种缓冲液、检测标记、检测底物等。该检测试剂盒可以是体外诊断装置。

本发明的主要优点包括：

15 本申请提供了一种抗 Trop2 结合蛋白的全人源抗体，其具有至少一种下述性质：

1) FACS 测定中，能够特异性结合过表达人 Trop2 的 HEK293 细胞、过表达猴 Trop2 的 CHO-K1 细胞或 BxPC-3 细胞表面的 Trop2 蛋白。

2) 经 MMAF 偶联后能够内化杀伤 BxPC-3 细胞。

3) 对 BxPC-3 细胞具有 ADCP 活性。

20 4) 对 BxPC-3 细胞具有 ADCC 活性。

5) 结合表位与参照抗体 hRS7 不同。

6) 能够在较短的时间被肿瘤细胞 BxPC-3 或者过表达人 Trop2 的 HEK293 细胞内吞。

25 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

30

实施例 1：H2L2 鼠免疫，杂交瘤细胞融合和抗体筛选

H2L2 转基因小鼠 (WO2010/070263 A1) 能够产生与野生型小鼠(如 BALB/C)相当的免疫应答和抗体滴度。抗人 Trop2 的抗体分别由两种免疫原 (人 Trop2 ECD-hFc 蛋白及 HEK293T/hTrop2 细胞株) 免疫 H2L2 小鼠产生。

35

1.1. Trop2 ECD-hFc 蛋白免疫

用免疫原为重组的糖基化的人 Trop2 ECD-hFc 蛋白(Chempartner, Shanghai)免疫 6-8 周龄的 Harbour H2L2 转基因小鼠, 并将其养殖于无特定的病原条件(SPF)下。在第一次免疫中, 每只小鼠分别在腹腔和腋下淋巴结及腹股沟淋巴结处注射 50 μ g 免疫原蛋白和 0.2 ml 完全弗氏佐剂(CFA, Sigma, #F5881)。为了增强免疫应答, 在第一次免疫接种两周后, 将 25 μ g 免疫原蛋白连同 200 μ l Ribi(Sigma 佐剂系统, Sigma, #S6322), 注射到每只小鼠的腹腔内和皮下淋巴结处, 随后每只老鼠每隔 2 周注射一次 25 μ g 免疫原和 200 μ l Ribi 佐剂, 加上第一次免疫共计 6 次。分别在此免疫期间的第四针及第六针的一周后, 采集小鼠血液, 对血液进行 10 倍稀释取 5 个浓度(1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000), 在包被有人 Trop2 Fc 蛋白(Chempartner, Shanghai)的 ELISA 板进行 ELISA 检测来确定小鼠血液中抗人 Trop2 的滴度, 并经流式细胞术检测 2 个浓度的小鼠血液(1:100、1:1000)对 Trop2 高表达的 CHO-K1/hTrop2 细胞(Chempartner, Shanghai)和 CHO-K1 母细胞的特异反应性。空白对照组(PB)为免疫前老鼠的血清。

1.2. Trop2 的稳转细胞株 HEK293/hTrop2 免疫

用免疫原为高表达人 Trop2 的稳转细胞株 HEK293/hTrop2 (Chempartner, Shanghai)免疫 6-8 周龄的 Harbour H2L2 转基因小鼠, 并将其养殖于无特定的病原条件(SPF)下。在第一次免疫中, 每只小鼠分别在腹腔和腋下及腹股沟共注射 2×10^6 免疫原 HEK293/Trop2 细胞和 0.2 ml 完全弗氏佐剂(CFA, Sigma, #F5881)。为了增强免疫应答, 在第一次免疫接种两周后, 将 2×10^6 免疫原 HEK293/Trop2 细胞连同 200 μ l Ribi(Sigma 佐剂系统, Sigma, #S6322), 注射到每只小鼠的腹腔内和皮下淋巴结处, 随后每只老鼠每隔 2 周注射一次 2×10^6 免疫原和 200 μ l Ribi 佐剂, 加上第一次免疫共计 6 次。分别在此免疫期间的第四针及第六针的一周后, 采集小鼠血液, 对血液进行 10 倍稀释取 5 个浓度(1:100、1:1000、1:10000、1:100000、1:1000000), 在包被有人 Trop2 Fc 蛋白(Chempartner, Shanghai)的 ELISA 板进行 ELISA 检测来确定小鼠血液中抗人 Trop2 的滴度, 并经流式细胞术检测 2 个浓度的小鼠血液(1:100、1:1000)对 Trop2 高表达的 CHO-K1/hTrop2 细胞(Chempartner, Shanghai)和 CHO-K1 母细胞的特异反应性。空白对照组(PB)为免疫前老鼠的血清。

在完成上述步骤之后, 选择具有针对人 Trop2 的特异性免疫应答的小鼠进行融合之前, 在会阴内注射 100 μ g 纯化的人 Trop2 Fc(Chempartner, Shanghai, #151215003)蛋白加强免疫。三天后, 处死小鼠, 并收集其脾细胞和淋巴结细胞。将 NH_4OH 添加到脾细胞和淋巴结样品中, 最终浓度为 1%(w/w), 以溶解样品中的红细胞。样品以 1000 转/分的速度离心, 用 DMEM 培养基洗涤三次, 测定细胞的存活率和数量。小鼠骨髓瘤细胞 sp2/0(ATCC, #CRL-1581) 用无血清的 DMEM 洗涤两次, 测定细胞的存活率和数量。然后用高效电融合法以 4:1 的比例将活脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 sp2/0(ATCC, #CRL-1581) 融合。

将融合细胞重新悬浮于含有 20%超低 IgG FBS(ultra-low IgG, Fetal Bovine Serum, #16250086, Life Technologies)并添加有 1× 次黄嘌呤、氨蝶呤和胸苷(50× HAT supplement, #21060017, Life Technologies)的培养基(Hybridoma-SFM, #12045084, Life Technologies)中, 将浓度调整为 10^5 个细胞/200 μ l。在 96 孔板的每个孔中加入 200 μ l 的融合细胞, 在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养。细胞融合后 14 天, 免疫原为糖基化 Trop2 Fc 蛋白得到的杂交瘤上清液用酶联免疫吸附试验 (ELISA)测定其与人 Trop2 Fc 蛋白结合的能力来筛选; 免疫原为 HEK293/hTrop2 得到的杂交瘤上清液用 Acumen 荧光微孔板检测其与 CHO-K1/hTrop2 及 CHO-K1 母细胞的结合能力。

筛选出的阳性克隆(OD450>2)或者在 Acumen 上阳性百分比>80%的克隆再通过流式细胞仪筛选与 CHO-K1/人 Trop2 细胞, CHO-K1/猴 Trop2 细胞及 CHO-K1/小鼠 Trop2 细胞(Chempartner, Shanghai)特异结合的克隆。在荧光强度评分后, 选择荧光强度最强的 70 个杂交瘤母克隆, 通过有限稀释法进行亚克隆, 经筛选生长起来的亚单克隆通过 ELISA 和 Acumen 及流式细胞术筛选, 找出与人, 猴及小鼠 Trop2 细胞均结合的最强的亚单克隆。经小鼠 Ig 分型 Ready-SET-GO! ELISA (Life technologies, #88-50640-88) 确定为 IgG 亚型的亚单克隆将进行测序分析。

实施例 2: 单克隆 Trop2 抗体的测序、表达和纯化

对单克隆 Trop2 抗体进行测序, 序列总结在表 1a 和表 1b 中。

将 Trop2 抗体的重链可变区序列亚克隆到含有信号肽和人重链 IgG1 恒定区的 pTT5 表达载体中。将 Trop2 抗体的轻链可变区序列亚克隆到含有信号肽和人抗体轻链 kappa 恒定区的表达载体中。重组质粒经测序证实后用大抽试剂盒(Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra Midi) 抽提质粒, 以提高重组质粒的纯度和质量, 质粒通过 0.22 μ m 过滤器(millpore)过滤。纯化后的质粒用于转染。

293-6E 细胞 (Genescript, Nanjing, China) 在 FreeStyle 293 培养基 (Invitrogen, #12338026) 中 37°C, 130rpm, 5%CO₂ 培养箱培养。调整 HEK293-6E 细胞到 $1-1.5 \times 10^6$ /ml 细胞密度后进行转染。用重链质粒和轻链质粒通过 PEI(sigma)共转染 HEK293-6E 细胞, 持续一周。大约在第 5-7 天, 测定抗体的滴度。约在第 6-7 天, 对 HEK293E 培养物进行离心(30 分钟, 3500rpm), 收集上清液, 并通过 0.22 μ m 过滤器过滤纯化。

蛋白 A 柱(GE)用 0.1M NaOH 洗涤 30 分钟或用 5 倍柱体积的 0.5M NaOH 洗涤以去除内毒素。长期未使用的蛋白 A 柱先在 1 M NaOH 中浸泡至少 1 小时, 再用无内毒素水清洗至 pH 为中性值, 最后用 10 倍柱体积的 1%Triton X-100 进行清洗。然后用 5 倍柱体积的磷酸盐缓冲液 PBS(pH7.4)平衡蛋白柱。将上述收集的上清液装载到柱上, 必要时收集流过的液体。用 5 倍柱体积的 PBS 洗涤柱, 然后用 5 倍柱体积的 0.1 M 甘氨酸-HCl (pH3.0)洗脱。含有 Trop2 抗体的洗脱液用 0.5 倍柱体积的 1 M Tris-HCl(NaCl 1.5 M) pH8.5 中和。人抗 Trop2 抗体在 1× PBS 中透析 4 小时, 以避免内毒素污染。

透析后用分光光度法或试剂盒测定抗 Trop2 的抗体浓度，用高效液相色谱-质谱法测定抗体纯度，用便携式内毒素测试仪器(Endosafe® nexgen-PTS™, Charles River)测定内毒素含量。

经上述实验，共得到 29 种具有独特序列的 Trop2 单克隆抗体，抗体的可变区序列列于表 1a。得到的 29 种抗体均为 IgG1 亚型，两条链的种系不同于参照抗体 Tab(hRS7)。

此外，准备了两种对比例抗体，用于后续实施例，一种是对比例 1 抗体 PR001131(自制)，另一种是对比例 2 抗体 Tab(hRS7, ChemPartner, #T07-001)。

具体而言，对比例 1 抗体 PR001131 的恒定区序列，可变区序列，具体地，其 VH 的氨基酸序列如 NO.193 所示，VL 的氨基酸序列如 NO.223 所示，重链的氨基酸序列如 NO.242 所示，轻链的氨基酸序列如 NO.272 所示。

对比例 2 抗体 Tab(hRS7)是在 Immunomedics, Inc.和 Seattle Genetics 公司的 sacituzumab govitecan 基础上制备的对比例抗体，其重链和轻链的氨基酸序列分别如 SEQ NO ID: 290 和 SEQ NO ID: 291 所示。

实施例 3：重组 Trop2 抗体与 293T-人 Trop2 结合能力

用 3 ml TrypLE 酶(Life technologies, #12604-013)消化 293T-人 Trop2 细胞(KyInno, #KC-0995),用 7 ml 相应培养基终止消化。确定细胞密度,用 PBS 重悬细胞至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 每孔取 100ul 细胞悬液至 96 孔 V 型板内。96 孔 V 型板 1000rpm 离心 5 分钟,用 PBS+0.5%BSA(VWR, #0332-100G)清洗一次。将细胞重悬于 100 μl 梯度稀释的抗体中 (5 倍稀释, 起始浓度 66.67 nM), 并于 4℃ 孵育 1 小时, hRS7(ChemPartner, #T07-001) 和 hlgG1 分别作为参考对照和阴性对照。1 小时后用 PBS+0.5%BSA 清洗两次。将细胞与 100 μl Alexa Fluor 488 山羊抗人 IgG(Life technologies, 1:1000, #A-11013)避光 4℃ 孵育 1 小时, 用 PBS+0.5%BSA 清洗两次。将细胞重新悬浮在 200 μl PBS+0.5%BSA 中。用 FACS verse 流式细胞仪分析细胞的荧光强度。所有操作均在冰上进行。

如图 1 和表 3 所示, 本发明的 29 株 Trop2 抗体均能特异性地结合人 Trop2, 且检测到的抗体结合能力与抗体浓度成正相关的关系递增。与之相反, 对比例 1 抗体 PR001131 与人 Trop2 的结合则很弱。与对比例 2 抗体 Tab(hRS7)相比, 在相同浓度下, 本发明的 26 个 Trop2 抗体表现出比参照抗体 hRS7 更高或者相当的 MFI max, 表明了抗体能在 HEK293/hTrop2 细胞上结合更多的 hTrop2 蛋白。其中 14 个抗体的 EC_{50} 比参照抗体更低, 说明这些抗体能以较低的浓度更灵敏得结合 Trop2, 其中以 PR001142, PR001162 和 PR001166 为最佳, 其 EC_{50} 均小于 0.3nM, 比参照抗体的 EC_{50} 小约三倍。

表 3. Trop2 抗体与 293T-人 Trop2 的结合力

抗体	EC ₅₀ (nM)	最高值(MFI)	Top%
PR001128	0.466	6846	105.66
PR001130	2.057	6819	105.25
PR001131	22.62	68.35	1.05
PR001132	0.441	6923	106.85
PR001133	0.995	7198	111.1
PR001134	0.653	6035	93.15
PR001138	0.478	6726	103.81
PR001139	0.325	6846	105.66
PR001142	0.23	6512	100.51
PR001143	0.795	6299	97.22
PR001145	0.48	7026	108.44
PR001147	1.314	7422	114.55
PR001150	0.589	6571	101.42
PR001151	1.608	7511	115.93
PR001152	1.929	7185	110.9
PR001153	2.466	6937	107.07
PR001154	2.106	7470	115.3
PR001155	2.541	7319	112.96
PR001156	1.667	7271	112.22
PR001158	1.257	6952	107.3
PR001159	0.977	6788	104.77
PR001160	1.224	6713	103.61
PR001162	0.158	5847	90.25
PR001163	0.496	5988	92.42
PR001164	2.396	8949	138.12
PR001165	0.414	6457	99.66
PR001166	0.204	7048	108.78
PR001168	0.669	6776	104.58
PR001170	0.352	6961	107.44
PR001171	0.997	6597	101.82
hRS7	0.753	6479	100

对 Trop2 抗体与人 Trop2 稳转株的结合亲和力的 EC₅₀ 和中位荧光强度(MFI)最高值(MFI_{max})进行排序, 选择 EC₅₀<3 nM 且 MFI_{max}>4000 的 29 个 Trop2 抗体进行后续检测。

5

实施例 4: Trop2 抗体对重组人或猴 Trop2 蛋白的结合亲和力和解离常数的测定

按照制造商提供的详细操作和方法,使用 Octet RED96 仪器(Fortiebio)和抗人 IgG Fc 亲和素传感器(AHC 传感器, Pall ForteBio, #18-5060)测定亲和力。具体地,用含有 0.1%(w/w)BSA 和 0.02%(v/v)吐温 20 的 PBS 缓冲液(pH7.4)将人 TROP2 蛋白(Sino Biological, #10428-H08H)或者猴 Trop2 蛋白(Sino Biological, #90893-C08H)稀释至 200 nM, 分别与 AHC 传感器孵育。将 40 nM 的 Trop2 抗体分别与负载人 Trop2 蛋白或猴蛋白的 AHC 传感器在 30℃孵育 3 分钟。该反应混合物在含有 0.1%(v/w)BSA 和 0.02%(v/v)吐温 20 的 PBS 缓冲液(pH7.4)中于 30℃继续孵育 5 分钟。Octet Red 96 实时记录 Trop2 抗体与人 Trop2 蛋白或者猴 Trop2 蛋白的结合和分离信号。亲和力、关联和解离常数由 Octet 使用软件确定,结果如表 4、表 5 和表 6 所示,测试的 29 个 Trop2 抗体中 4 个抗体(PR001128, PR001130, PR001166, PR001170)与人 Trop2 蛋白和猴 Trop2 蛋白的 KD 值均低于参照抗体 Tab(hRS7), 表明其更强的人和猴 Trop2 结合亲和力。在与人 Trop2 蛋白结合亲和力方面,除上述四种抗体外,PR001132、PR001138、PR001150、PR001159、PR001153、PR001165 的 KD 值约低于参照抗体 10 倍;而这些抗体与猴蛋白的亲和力与参照抗体相当。

15

表 4 Trop2 抗体与人 Trop2 蛋白的结合与解离常数

抗原	抗体	应答	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
人 TROP2	PR001128	0.4021	<1.0E-12	1.30E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001130	0.3574	<1.0E-12	5.52E+04	<1.0E-07
人 TROP2	PR001132	0.4167	<1.0E-12	1.21E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001133	0.3864	1.10E-09	8.85E+04	9.72E-05
人 TROP2	PR001134	0.354	5.42E-09	8.31E+04	4.51E-04
人 TROP2	PR001138	0.3381	<1.0E-12	1.48E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001139	0.3362	4.79E-09	8.90E+04	4.26E-04
人 TROP2	PR001142	0.3898	3.23E-10	2.72E+05	8.78E-05
人 TROP2	PR001143	0.3346	6.94E-09	8.01E+04	5.56E-04
人 TROP2	PR001145	0.2897	1.47E-08	9.19E+04	1.35E-03
人 TROP2	PR001147	0.349	4.98E-10	8.50E+04	4.23E-05
人 TROP2	PR001150	0.3823	3.26E-11	1.61E+05	5.25E-06
人 TROP2	PR001151	0.4069	1.12E-09	1.13E+05	1.27E-04
人 TROP2	PR001152	0.3481	1.35E-10	1.54E+05	2.08E-05
人 TROP2	PR001153	0.3809	3.23E-11	7.86E+04	2.53E-06
人 TROP2	PR001154	0.4103	8.55E-10	1.08E+05	9.23E-05
人 TROP2	PR001155	0.4057	1.84E-09	7.81E+04	1.44E-04
人 TROP2	PR001156	0.3536	9.16E-11	1.83E+05	1.67E-05
人 TROP2	PR001158	0.433	1.55E-10	1.32E+05	2.05E-05
人 TROP2	PR001159	0.3802	<1.0E-12	1.76E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001160	0.3903	8.19E-10	1.16E+05	9.48E-05

人 TROP2	PR001162	0.3661	1.70E-09	2.98E+05	5.07E-04
人 TROP2	PR001163	0.3956	7.90E-10	1.06E+05	8.34E-05
人 TROP2	PR001164	0.1942	2.41E-09	1.09E+05	2.62E-04
人 TROP2	PR001165	0.3798	<1.0E-12	1.64E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001166	0.3237	<1.0E-12	4.70E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001168	0.3325	1.59E-09	8.80E+04	1.40E-04
人 TROP2	PR001170	0.3683	<1.0E-12	4.76E+05	<1.0E-07
人 TROP2	PR001171	0.3257	2.51E-11	1.49E+05	3.74E-06
人 TROP2	Tab(hRS7)	0.3492	1.99E-10	1.66E+05	3.30E-05

表 5 Trop2 抗体与猴 Trop2 蛋白的结合与解离常数

抗原	抗体	应答	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
猴 Trop2	PR001128	0.3835	<1.0E-12	8.35E+04	<1.0E-07
猴 Trop2	PR001130	0.3145	<1.0E-12	3.77E+04	<1.0E-07
猴 Trop2	PR001132	0.4181	1.64E-10	8.69E+04	1.43E-05
猴 Trop2	PR001133	0.3691	2.49E-09	5.98E+04	1.49E-04
猴 Trop2	PR001134	0.335	9.33E-09	5.49E+04	5.12E-04
猴 Trop2	PR001138	0.3289	4.09E-10	9.74E+04	3.98E-05
猴 Trop2	PR001139	0.3278	7.75E-09	6.81E+04	5.28E-04
猴 Trop2	PR001142	0.3824	2.60E-10	1.65E+05	4.29E-05
猴 Trop2	PR001143	0.3078	1.24E-08	5.21E+04	6.45E-04
猴 Trop2	PR001145	0.2767	1.91E-08	7.01E+04	1.34E-03
猴 Trop2	PR001147	0.3405	1.92E-09	6.09E+04	1.17E-04
猴 Trop2	PR001150	0.3441	3.19E-10	1.07E+05	3.41E-05
猴 Trop2	PR001151	0.3512	2.38E-09	7.58E+04	1.80E-04
猴 Trop2	PR001152	0.3432	1.02E-09	1.03E+05	1.05E-04
猴 Trop2	PR001153	0.3366	1.81E-10	5.93E+04	1.07E-05
猴 Trop2	PR001154	0.3792	1.91E-09	7.27E+04	1.39E-04
猴 Trop2	PR001155	0.3561	4.26E-09	5.15E+04	2.19E-04
猴 Trop2	PR001156	0.3494	5.36E-10	1.15E+05	6.15E-05
猴 Trop2	PR001158	0.4055	7.08E-10	8.79E+04	6.23E-05
猴 Trop2	PR001159	0.3716	3.07E-10	1.11E+05	3.39E-05
猴 Trop2	PR001160	0.3603	1.82E-09	7.43E+04	1.35E-04
猴 Trop2	PR001162	0.3701	3.66E-09	2.00E+05	7.32E-04
猴 Trop2	PR001163	0.3721	1.96E-09	6.84E+04	1.34E-04
猴 Trop2	PR001164	0.173	2.04E-09	7.94E+04	1.62E-04
猴 Trop2	PR001165	0.3925	2.60E-10	1.01E+05	2.62E-05

猴 Trop2	PR001166	0.3224	<1.0E-12	3.16E+05	<1.0E-07
猴 Trop2	PR001168	0.3111	2.45E-09	5.93E+04	1.45E-04
猴 Trop2	PR001170	0.3865	<1.0E-12	3.07E+05	<1.0E-07
猴 Trop2	PR001171	0.3194	1.51E-10	8.83E+04	1.34E-05
猴 Trop2	Tab(hRS7)	0.3224	1.37E-10	1.08E+05	1.48E-05

表 6 抗体与猴 Trop2 蛋白和人 Trop2 蛋白的解离常数的比较

抗体	KD (M) (抗原: 猴 Trop2 蛋白)	KD (M) (抗原: 人 Trop2 蛋白)	KD(猴) / KD(人)
PR001128	<1.0E-12	<1.0E-12	n/a
PR001130	<1.0E-12	<1.0E-12	n/a
PR001132	1.64E-10	<1.0E-12	n/a
PR001133	2.49E-09	1.10E-09	2.27
PR001134	9.33E-09	5.42E-09	1.72
PR001138	4.09E-10	<1.0E-12	n/a
PR001139	7.75E-09	4.79E-09	1.62
PR001142	2.60E-10	3.23E-10	0.81
PR001143	1.24E-08	6.94E-09	1.78
PR001145	1.91E-08	1.47E-08	1.3
PR001147	1.92E-09	4.98E-10	3.86
PR001150	3.19E-10	3.26E-11	9.76
PR001151	2.38E-09	1.12E-09	2.12
PR001152	1.02E-09	1.35E-10	7.57
PR001153	1.81E-10	3.23E-11	5.61
PR001154	1.91E-09	8.55E-10	2.24
PR001155	4.26E-09	1.84E-09	2.32
PR001156	5.36E-10	9.16E-11	5.85
PR001158	7.08E-10	1.55E-10	4.56
PR001159	3.07E-10	<1.0E-12	n/a
PR001160	1.82E-09	8.19E-10	2.22
PR001162	3.66E-09	1.70E-09	2.16
PR001163	1.96E-09	7.90E-10	2.48
PR001164	2.04E-09	2.41E-09	0.85
PR001165	2.60E-10	<1.0E-12	n/a
PR001166	<1.0E-12	<1.0E-12	n/a
PR001168	2.45E-09	1.59E-09	1.54
PR001170	<1.0E-12	<1.0E-12	n/a
PR001171	1.51E-10	2.51E-11	6.02
Tab	1.37E-10	1.99E-10	0.69

实施例 5: MMAF 偶联抗体内化对靶细胞的杀伤

5 Trop2 抗体可以通过结合 Trop2 的胞外部分介导表面表达的 Trop2 蛋白的细胞内

化。在本实施例中,测试 Trop2 抗体内化后 Trop2+细胞对于 Trop2 抗体杀伤的易感性。

BxPC-3 细胞在 T-75 培养瓶中用含 10%血清(BI, 胎牛血清, #04-002-1A)的 DMEM 培养基(Life technologies, #11995-065)培养和扩增, 达到 90%的融合后吸取培养基, 用 PBS 洗涤细胞两次。细胞用胰酶(Invitrogen, #15050065)处理 1 分钟左右, 再用培养基中和胰酶。将细胞转移到 15 ml 无菌离心管中, 1000 rpm 室温离心 5 分钟, 使细胞成团。吸去培养基, 将细胞重新悬浮于各自的培养基。轻柔地吹打细胞, 得到单细胞混悬液。用细胞计数板进行计数, 之后将 2×10^3 BxPC-3 细胞加至黑色 ViewPlate-96 TC(Perkin Elmer, #6005225)板中。37°C、5%CO₂ 孵育箱中孵育过夜。

第二天, 用不含 FBS 的培养基制备 10×起始浓度(100 nM)的抗体溶液, 5 倍稀释, 制备 6 个抗体浓度。将 10 μl 各梯度的抗体样品移至上述细胞板内, 各孔的终体积为 100 μl。每孔加入 2 μl 的 50 μg/ml αHFc-CL-MMAF 培养基(Moradec, αHFc-CL-MMAF 试剂盒, #AH-102AF), 使其终浓度为 1 μg/ml。37°C、5%CO₂ 孵育 4 天。

在第六天, 每孔加入 100 μl CellTiter-Glo®发光细胞活性试剂(Promega, USA, #G7570), 在摇床上混合 2 分钟, 诱导细胞裂解。96 孔板在室温孵育 10 分钟来稳定光信号。使用 PE Enspire 酶标仪(Perkin Elmer, EnSpire)记录发光情况, 存活率 $= (1 - (\text{IgG1 发光值平均值} - \text{抗体样品发光值}) / \text{IgG1 发光值平均值}) \times 100\%$ 。根据存活率确定 EC₅₀ 值。

图 2 和表 7 示出抗体处理下 BxPC-3 细胞的存活率。本发明的 27 个抗体的内化活性的 EC₅₀ 与 hRS7 相当或更好, 除了 PR001163 和 PR001164。具体而言, 绝大部分的 Trop2 抗体的 EC₅₀ 值低于参照抗体, 说明其能够以较低浓度实现最大抗体内化杀伤效应, 而 PR001166 抗体处理下的细胞存活率与参照抗体 Tab(hRS7)相比, 最高存活率明显低于 Tab 处理下的细胞存活率, 说明其在较低浓度下具有最好的抗体内化杀伤效应。

表 7 Trop2 抗体的内化杀伤靶细胞活性

抗体编号	EC ₅₀ (nM)	最低细胞存活%	最高细胞存活%
PR001128	0.2812	5.059	87.77
PR001130	0.346	2.622	103.2
PR001132	0.3855	2.19	93.38
PR001133	0.375	2.454	99.81
PR001134	0.4174	-1.342	111.7
PR001138	0.3242	3.166	101.7
PR001139	0.313	3.269	109.9
PR001142	0.1314	3.344	91.76
PR001143	0.6106	1.921	99.67
PR001145	0.3823	2.107	107.3
PR001147	0.6507	1.712	97.44
PR001150	0.3282	2.32	91.45
PR001151	0.2811	0.7009	103.5
PR001152	0.4276	2.273	92.38

PR001153	0.451	1.201	95.39
PR001154	0.2118	2.462	107.9
PR001155	0.5242	0.8184	92.29
PR001156	0.2243	2.78	89.87
PR001158	0.3612	0.5579	101.5
PR001159	0.4044	1.934	95.9
PR001160	0.4257	3.753	97.68
PR001162	0.3922	3.221	92.52
PR001163	~ 0.3966	3.506	90.94
PR001164	~ 1.186	4.869	98.67
PR001165	0.4608	2.824	91.61
PR001166	0.147	4.528	28.47
PR001168	0.8201	4.947	98.5
PR001170	0.0213	3.396	91.97
PR001171	0.276	2.063	105.9
hRS7	0.709	-1.22	100.9

根据抗体与 HEK293/hTrop2 的结合 EC₅₀ 的高低、抗体序列的种系多样性和翻译后修饰的位点多少(表 8)、与人猴蛋白亲和力的高低以及内吞效应的优劣, 选择出表 8 中的 8 个抗体做后续分析。

5

表 8 Trop2 抗体序列的种系和翻译后修饰位点

抗体编号	重链种系	轻链种系	重链翻译后修饰	轻链翻译后修饰
PR001128	VH4_4*02	Vk3_11*01		
PR001130	VH4_4*02	Vk1_5*01		
PR001133	VH3_30*18	Vk1_39*01	DG (HCDR2), DG (HFR3)	NS (LCDR1)
PR001139	VH3_30*01	Vk3_15*01	DG (HCDR2)	
PR001142	VH4_4*02	Vk1_5*01		
PR001145	VH3_30*01	Vk3_15*01	DG (HCDR2)	
PR001162	VH3_30*01	Vk3_11*01	DG (HCDR1), DG (HCDR2)	
PR001165	VH3_30*01	Vk1_9*01	DG (HCDR2), DG (HFR3)	NS (LCDR3)
PR001166	VH4_38-2*01	Vk3_15*01		

实施例 6: 重组抗体与 BxPC-3 肿瘤细胞系结合

用 3 mL TrypLE 消化 BxPC-3 肿瘤细胞(中国科学院细胞库, #TCHu 12), 用 7 mL 相应培养基终止消化。确定细胞密度, 为每孔的测试样品收集 1×10^5 细胞。细胞液离心, 用 PBS+0.5%BSA 缓冲液清洗一次。将细胞悬浮在 100 μ l 梯度稀释的抗体(5 倍稀
10 释, 起始浓度 100 nM), 并于 4℃ 孵育 1 小时, hRS7 和 hIgG1 用作对照。用 PBS+0.5%BSA 清洗一次。将细胞与 100 μ l 1:1000 稀释的 Alexa Fluor 488 山羊抗人 IgG(Life
technologies, #A-11013)避光 4℃ 孵育 1 小时, 用 PBS+0.5%BSA 清洗两次。将细胞重
15 新悬浮在 200 μ l PBS+0.5%BSA 中。2000 rpm、4℃ 离心 5 分钟, 用 FACS verse 流式

细胞仪或 NovoCyte 流式细胞仪(ACEA Biosciences)测试。所有操作均在冰上进行。

抗体与 BxPC 肿瘤细胞的结合如图 3 和表 9 所示。与对照 hRS7 相比,本发明的这 8 个抗体表现出与参照抗体相当的或者更高的 BxPC 肿瘤细胞的结合力。本发明中的 3 个抗体(PR001142,PR001162 和 PR001166)EC₅₀ 比参照抗体更低,其 EC₅₀ 比参照抗体的 EC₅₀ 小约二倍,说明这些抗体能以较低的浓度更灵敏地结合 Trop2。

表 9 Trop2 抗体与 BxPC-3 肿瘤细胞的结合力

BxPC-3			BxPC-3		
抗体编号	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	抗体编号	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值
PR001128	1.704	8412	PR001165	1.707	1012414
PR001130	3.852	9962	Tab(hRS7)	2.67	1078897
PR001133	2.071	8948	hIgG1	/	670
PR001139	3.145	9361			
PR001142	1.146	10849			
PR001162	1.117	9107			
PR001166	0.7157	8393			
hRS7	2.084	8727			
hIgG1	/	77			

实施例 7: 重组抗体与 CHO-K1/猴 Trop2 结合

分别用 3 mL TrypLE 消化 CHO-K1/猴 Trop2 细胞(Chempartner,Shanghai, China)和 CHO-K1 母细胞,分别用 7 mL 相应培养基终止消化。测定细胞密度,为每孔测试样品收集 2×10⁵ 细胞。细胞液离心,用 PBS+0.5%BSA 清洗一次。将细胞悬浮在 100 μl 梯度稀释的抗体中(5 倍稀释,起始浓度 100 nM),并于 4℃ 孵育 1 小时,hRS7 和 hIgG1 用作对照。用 PBS+0.5%BSA 清洗一次。将细胞与 1:1000 稀释的 100 μl Alexa Fluor 488 山羊抗人 IgG (Life technologies, #A-11013)避光 4℃ 孵育 1 小时,用 PBS+0.5%BSA 清洗两次。将细胞重新悬浮在 200 μl PBS+0.5%BSA 中。2000 rpm、4℃ 离心 5 分钟,用 FACS verse 流式细胞仪或 NovoCyte 流式细胞仪(ACEA Biosciences)测试。所有操作均在冰上进行。

如图 4 和表 10 所示,本发明的 8 个抗体与猴 Trop2 的结合力与参照抗体 hRS7 相当,其中 PR001166 的 EC₅₀ 比参照抗体的 EC₅₀ 小,说明该抗体能以较低的浓度更灵敏地结合 Trop2。但 PR001130 与猴 Trop2 的结合力稍弱一些。

表 10. Trop2 抗体与 CHO-K1/猴 Trop2 及 CHO-K1 的结合力

抗体编号	CHO-K1/猴 Trop2		CHO-K1	
	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值
PR001128	2.573	53221	/	104.5

PR001130	6.256	61693	/	104.5
PR001133	2.866	55333	/	105.9
PR001139	3.329	46430	/	104.5
PR001142	2.101	51218	/	104.5
PR001162	2.245	45496	/	104.5
PR001166	1.97	51463	/	105.9
Tab_hRS7	2.134	53057	/	107.2
hIgG1	~ 1894	277.4	/	105.9

抗体编号	CHO-K1/猴 Trop2		CHO-K1	
	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值	EC ₅₀ (nM)	最高 MFI 值
PR001165	1.8	50254	/	101.4
Tab_hRS7	1.302	49024	/	100
hIgG1	/	109.4	/	98.6

实施例 8: 重组抗体与小鼠 Trop2 结合

用 100 μ l 溶于 PBS 的 1 μ g/ml 小鼠 Trop2-his 蛋白(Sino Biological, #50922-M08H)
 5 对 ELISA 板进行包被, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 200 μ l 溶于 PBST(PBS+0.05%吐温 20)+2%BSA 进行封闭, 37 $^{\circ}$ C, 1 小时。用 PBST 清洗 4 遍。向 ELISA 板加入 100 μ l 梯度稀释的 Trop2 抗体(5 倍稀释, 起始浓度 33.33 nM), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 清洗 4 遍。加入 100 μ l 1:4000 稀释的抗人 IgG(H+L)-HRP (Sigma, #A8667), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用 PBST 清洗 4 遍。加入 100 μ l TMB 底物(Invitrogen, #88-7025-88), 室温孵育 5 分钟,
 10 随后加入 50 μ l 终止缓冲液(BBI life sciences, #E661006-0200)来终止反应。用酶标仪(Perkin Elmer, EnSpire)记录 OD 450 nm 读值。

结果图 5 显示, 抗体 PR001139、PR001166 与小鼠 Trop2 蛋白结合, 参照抗体 hRS7 及其他 6 种 Trop2 抗体均没有小鼠 Trop2 结合活性。

根据上述各种实验结果选择 3 种抗体, 即 PR001142、PR001165 和 PR001166,
 15 进一步测试其抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用、补体依赖的细胞毒性作用和抗体依赖的细胞介导的细胞吞噬作用。

实施例 9: Trop2 抗体介导的 ADCC 活性

细胞裂解后细胞内的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)会随之增加, 因此
 20 可以通过检测 LDH-释放量来判定肿瘤细胞被杀伤的效果。先用 2%FBS 的 RPMI 1640 稀释抗体至 40 nM, 再从 40 nM 做 5 倍稀释, 稀释为不同的 7 个浓度。取 25 μ l 加至 100 μ l 的终体积, 得到终浓度为 10.0、2.0、0.4、0.08、0.016、0.0032、0.00064 nM 的 7 个浓度。收集 BxPC-3 和外周血单核细胞(PBMC, Miaotong, #PB050F), 1200 rpm 离

心 5min, 弃上清, 并分别再悬浮于含 2%FBS 的无酚红的 RPMI-1640 培养基中, PBMC 密度调整为 $4 \times 10^6/\text{ml}$, 取 50 μl /孔加入 96 孔 U 形板(Corning, #3799), BxPC-3 细胞密度调整为 $4 \times 10^5/\text{ml}$, 取 25 μl /孔加入同一 96 孔板内, 效靶比为 20:1, 设三个重复。在同一板内加入 25 μl 相应的稀释抗体(此为 ER: BxPC-3+PBMC+mAb), 37 度二氧化碳培养箱孵育 4 小时。同时在板内设置不同的对照组: ER(0):

BxPC-3+PBMC+2%FBS+1640; ESR: PBMC+2%FBS+1640;

TSR:BxPC-3+2%FBS+1640; CMB: 2%FBS+1640; TMR: BxPC-3+2%FBS+1640+裂解缓冲液(裂解缓冲液于孵育 3 小时后加入); VCC: 2%FBS 1640+裂解缓冲液(裂解缓冲液于孵育 3 小时后加入)。孵育完成后, 取 50 μl 上清液, 加入 96 孔板(Corning, #3599), 并加入 50 μl 细胞毒性检测试剂(CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒, Promega, USA, #G1780), 室温孵育 30 分钟, 加入终止溶液停止反应并用 Enspire (Perkin Elmer) 读取 OD490 值。该读值按照以下公式来计算 ADCC 效果, ADCC 特异性杀伤

$\% = \{(\text{ER}-\text{CMB}) - [(\text{ESR}-\text{CMB}) + (\text{TSR}-\text{CMB})]\} / (\text{TMR}-\text{VCC}) * 100\%$, 重复 2 个不同的 PBMC 供体(Lot#1152 和 Lot#2153)。最高特异性杀伤%和 EC_{50} 值总结在表 11 中。

图 6 显示 3 种 Trop2 抗体在不同的供体的 PBMC 中介导对 BxPC-3 的细胞杀伤作用。从表 11 可以看出, 3 种抗体均显示出对 BxPC-3 细胞的特异杀伤性。其中, 在使用两种不同的供体 1152#和 2153#的 PBMC 的情况下, 从特异性杀伤率的均值和标准误差看, 相比, 抗体 PR001166 和参照抗体 Tab(hRS7)的最高杀伤率相当, 但 EC_{50} 值更低, 说明 PR001166 抗体能够在更低浓度下达到与参照抗体相当的杀伤力。而其他两种抗体 PR001142 和 PR001165 与参照抗体的杀伤程度相当。

表 11. 3 种 Trop2 抗体对 BxPC-3 的 ADCC 效果

抗体编号	ADCC (供体 1152#)			ADCC (供体 2153#)		
	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$	最高细胞杀伤%	最低细胞杀伤%	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$	最高细胞杀伤%	最低细胞杀伤%
Tab(hRS7)	0.03907	42.06	4.321	0.08005	62.65	10.18
PR001142	0.02791	41.58	4.47	0.05466	58.79	9.276
PR001165	0.03236	38.96	5.793	0.06155	70.79	14.02
PR001166	0.01999	36.48	3.255	0.03469	69.1	11.9

实施例 10: Trop2 抗体的 ADCP 活性

抗体依赖的细胞介导的细胞吞噬作用是治疗性抗体对抗病毒感染或者肿瘤疾病的一种重要作用机制。

从 PBMC (Miaotong, #PB050F)中用人 CD14 分选磁珠(Meltenyi Biotech, #130-050-201)分离 CD14+单核细胞, 以密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬于含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基, 加入 100 ng/ml GM-CSF(PeproTech, #300-03-A)。取 2×10^6 个单核

细胞每孔于 6 孔板内, 37 度二氧化碳培养箱培养 9 天, 使其分化为巨噬细胞。每隔 3-4 天换一次液(含 100 ng/ml GM-CSF)。9 天后用胰酶消化巨噬细胞, 用含 10%FBS 的 RPMI1640 终止胰酶反应。收集细胞, 用 PBS 洗涤一次, 用 PBS 重悬为密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。同样收集 BxPC-3 细胞, 用 PBS 重悬为密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。巨噬细胞用 0.1 μM Far-red(溶于 PBS), BxPC-3 细胞用 0.5 μM CFSE(溶于 PBS) 在 4 度染色 10 分钟。离心染色后的细胞, 用 >20 ml 的 RPMI1640+10%FBS 培养基洗涤一次。重悬洗涤后的细胞于 1%BSA+RPMI1640 培养基中, 并调整细胞密度均为 $1.6 \times 10^6/\text{ml}$ 。在 96 孔 V 型板内 (Corning, #3894) 每孔加入 25 μl BxPC-3 细胞(每孔细胞数为 4×10^4)和 25 μl 巨噬细胞(每孔细胞数为 4×10^4)。用 1%BSA+RPMI1640 稀释抗体至中间浓度 20 nM, 再从 20 nM 5 倍稀释成 7 个梯度。含有 BxPC-3 和巨噬细胞的同一 96 孔 V 型板内每孔加入 50 μl 的稀释抗体, 混匀完全。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 小时。使用 NovoCyte 流式细胞仪(ACEA Biosciences) 经流式细胞术识别 FITC+ BxPC-3 细胞和 Alexa647+巨噬细胞双阳性的比例。数据用 FlowJo 软件(Tree Star, Ashland, OR)分析, 双染细胞的百分比用于确定 ADCP 介导的细胞吞噬。

图 7 显示 3 种 Trop2 抗体在不同的供体的巨噬细胞中介导的对 BxPC-3 的吞噬作用。如表 12 所示, 3 种抗体均显示出对 BxPC-3 细胞的 ADCP 效应。其中, 在使用供体 A1925144#的 PBMC 的情况下, 从特异性杀伤率的均值和标准误看, 3 种抗体的最高吞噬%均接近于参照抗体 Tab, 而这些抗体的 EC_{50} 值均小于 Tab, 表明其能够在较低浓度下达到与参照抗体相当或更高的最大杀伤力。而在使用供体 A19143143#的 PBMC 的情况下, 从特异性杀伤率的均值和标准误看, 3 种抗体最高吞噬%与 Tab 没有显著差异, 但 EC_{50} 值更低, 表明其能够在较低浓度下达到与参照抗体相当或更高的最大杀伤力。这两种供体均表明这 3 种抗体能够在更低浓度下达到与参照抗体相当的杀伤力。

表 12 3 种 Trop2 抗体对 BxPC-3 的 ADCP 效果

抗体编号	ADCP(供体 A19143143#)			ADCP(供体 A1925144#)		
	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$	最高吞噬 %	最低吞噬 %	$\text{EC}_{50}(\text{nM})$	最高吞噬 %	最低吞噬 %
Tab(hRS7)	0.2083	44.83	1.041	0.1247	14.83	1.721
PR001142	0.1994	36.4	1.754	0.03618	11.98	0.861
PR001165	0.1777	42.68	1.37	0.06833	12.52	2.245
PR001166	0.1609	40.25	2.045	0.03106	9.333	2.048

实施例 11: Trop2 抗体的 CDC 活性

通过补体介导的细胞杀伤检测来评估 Trop2 抗体的 CDC 活性。用胰酶消化处理 BxPC-3 细胞或 HEK293/hTrop2 细胞, 终止胰酶反应后用无血清的 RPMI-1640 重悬 BxPC-3 细胞或 HEK293/hTrop2 细胞, 在黑色底透 96 孔板(ViewPlate-96 TC, black,

Perkin Elmer, #6005225)铺上每孔 25 μ l 的 1×10^4 BxPC-3 细胞。用无血清的 RPMI-1640 稀释抗体, 每孔加入 25 μ l 不同梯度的抗体。每孔再加入 50 μ l 的人血清, 混匀完全。在 37 度二氧化碳培养箱培养 24 小时。根据制造商提供的方法, 使用 Celltiter Glo 发光细胞活力试剂盒(Promega, #G7573)测试细胞活力。将培养皿在微孔板摇床上以 200 的转速摇动 2 分钟, 然后在室温下培养 10 分钟。用读板机(Perkin Elmer, EnSpire) 读取发光信号。为了进行数据分析, 使用 graphpad prism 7.0 计算细胞毒性百分比。

图 8 结果表明 3 种抗体以及参照抗体 Tab(hRS7)在 BxPC-3 和 HEK293/hTrop2 细胞上均未显示出 CDC 活性 ($CDC \leq 20\%$)。

实施例 12: BIACORE 测试的抗体与人及猴 Trop2 蛋白的结合亲和力

整个测试过程中使用 HBS-EP +(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA 和 0.05%P20, pH7.4, GE Healthcare, BR-1001-88)作为运行缓冲液。先使用手动运行模式通过以下程序将抗原人 Trop2 蛋白或猴 Trop2 蛋白固定在芯片表面上, 该程序为 : 1)用新混合的 50mM N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 200mM 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)以 10 μ l/ 分钟活化系列 S CM5 传感器芯片(GE Healthcare, #29-1275-56)的流动池 3 ,该过程持续 420 秒。 2)然后将稀释于 10mM NaOAc(pH 5.0)中的 0.2 μ g/ ml 人 Trop2 或者猴 Trop2 以 10 μ l/分钟注入活化流动池 3 中, 该过程持续 120 秒。 3)用 1M 乙醇胺(pH8.5)以 10 μ L/min 封闭剩余的活性酯基团 120 秒。再将不同浓度的稀释后的抗体(浓度分别为 0、3.125、6.25、12.5、25.0、50.0、100 nM) 以 30 μ l/分钟注入将流体池 1,2,3 和 4 内, 结合时间设定为 180 秒。PR001142、PR001165 和 hRS7 的解离时间为 900 s, PR001166 解离时间设为 1800 s。为了从表面除去测试的抗体, 将 10mM 甘氨酸-HCl pH1.5(GE Life Sciences, #BR-1003-54)以 30 μ L/min 注入流动池 1,2,3 和 4 中 30 秒。使用 Biacore T200(GE Healthcare, T200 model, #BIAC-B20-03) 评估 3.1 软件来分析数据。

如表 13 所示 BIACORE 测试结果, 结果显示不管是与人还是猴的 Trop2 蛋白的结合亲和力上, 抗体 PR001142 和 PR001165 的结合亲和力与 hRS7 相当, 而 PR001166 的结合亲和力高于 hRS7。

表 13. BIACORE 测定的 Trop2 抗体的与人和猴 Trop2 蛋白的结合亲和力

抗体编号	人 Trop2 蛋白抗原(His tag)			猴 Trop2 蛋白抗原(His tag)		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
PR001142	4.75E+05	2.52E-04	5.30E-10	4.79E+05	1.79E-04	3.74E-10
PR001165	3.07E+05	1.52E-04	4.95E-10	2.55E+05	1.25E-04	4.91E-10
PR001166	2.07E+06	5.78E-05	2.79E-11	1.59E+06	1.37E-04	8.56E-11
hRS7	3.24E+05	1.94E-04	6.01E-10	3.64E+05	2.25E-04	6.19E-10

实施例 13: 抗原结合蛋白的表位鉴定(Epitope binning)

使用 ForteBio Octet 平台对得到的抗原结合蛋白(PR001142, PR001165, PR001166)和 hRS7 进行表位鉴定。生物素分子(Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo Fisher, #A39257)与人 Trop2 蛋白(Sino biological, #10428-H08H)按摩尔数 3:1 的比例在室温孵育 2 小时。孵育后的生物素化混合物用 PBS 及 Zeba 离心脱盐柱(Thermo Fisher, #89882)洗涤三次去除多余的生物素。生物素化 Trop2 蛋白由 SA 传感器(Pall ForteBio, #18-5019)捕获,上样基线设置为 0.3nm。传感器浸入含有 50nM 的第一抗体的测定缓冲液的孔,持续 300 秒。再将传感器转移至含有 50nM 的第二抗体的测定缓冲液的孔,持续 300 秒。如果第二抗体表现出明显结合,那么就将它视为非竞争剂(即,在与第一抗体不同的表位区间中)。如果第二抗体不表现明显结合,那么就将它视为竞争剂(即,在与第一抗体相同的表位区间中)。通过比较第二抗体在第一抗体存在下与 Trop2 的结合与第一抗体阻断本身来进行结合测定。

结果如下表 14 所示, PR001142 和 PR001165 与 hRS7 在 Trop2 的结合位点重叠性高,但是 PR001166 与 hRS7 及 PR001165 的结合位点重叠性低。

表 14 本申请抗原结合蛋白与临床抗体的表位鉴定

抑制率(%)		第二抗体			
		PR001142	PR001165	PR001166	hRS7
第一抗体	PR001142	100.7	99.19	85.51	97.78
	PR001165	98.08	97.73	5.24	96.44
	PR001166	85.4	18.5	101.7	21.82
	hRS7	93.27	92.04	7.34	96.49

实施例 14: Trop2 抗体在靶细胞上的短时间内吞效应

Trop2 抗体可以通过结合 Trop2 的胞外部分介导细胞表面表达的 Trop2 蛋白的内化。在本实施例中,测试 Trop2 抗体在短时间(3 小时以内)不同时间点内化的情况。

BxPC-3或HEK293/hTrop2细胞在T-75培养瓶中用含10%血清(BI, 胎牛血清, #04-002-1A)的DMEM培养基(Life technologies, #11995-065)培养和扩增,达到90%的融合后吸取培养基,用PBS洗涤细胞两次。细胞用胰酶(Invitrogen, #15050065)处理1分钟左右,再用培养基中和胰酶。将细胞转移到15 ml无菌离心管中,1000 rpm室温离心5分钟,使细胞成团。吸去培养基,将细胞重新悬浮于各自的培养基。轻柔地吹打细胞,得到单细胞混悬液。用细胞计数板进行计数,之后用冰冷的FACS 缓冲液(PBS+2%FBS)将BxPC-3细胞重悬成 2×10^6 个细胞/ml,取100ul每孔细胞悬液至96孔V型板(Corning, #3894)内,400g离心5分钟。弃上清后,对于无内吞作用的测定按如下流程操作:分别加入100 ul含终浓度为100nM的PR001142或PR001165或PR001166或hIgG1的FACS缓冲液,在4℃ 孵育一小时。用冰冷的FACS缓冲液洗涤两次去除未结合的抗体。而对于内吞作用的测定,则将加入抗体后的细胞分别在37℃放置0/15min/30min/45min/1 hr/1.5hr/2hr/3hr,然后再将细胞转移至4℃,加入预冷的PBS来

阻止抗体的内吞。用冰冷的FACS缓冲液洗涤两次去除未结合的抗体。两种情况下，细胞用2ug/ml的Alexa Fluor 488 goat anti-human IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, #109-545-003)在冰冷的FACS缓冲液中于4℃放置半小时。用冰冷的FACS缓冲液洗涤两次去除未结合的二抗。将细胞重新悬浮在200 μl FACS缓冲液中。用FACS canto II 流式细胞仪分析细胞的荧光强度。内吞率% $= (1 - \text{MFI}_{37^\circ\text{C}} / \text{MFI}_{4^\circ\text{C}}) * 100\%$ 。

结果如图 9 和图 10 所示, PR001142/PR001165/PR001166 在饱和的抗体结合浓度下, 在重组细胞系 HEK293/hTrop2 或者 Trop2 阳性的肿瘤细胞 BxPC-3 中的内吞速率彼此相差不大。然而在 1 小时以内, PR001166 与其他抗体包括参照抗体相比, 具有更好的内吞效应。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1、一种 Trop-2 的抗体或抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包含如下的互补决定区（CDR）：

5 (a) SEQ ID NO: 217、199、216、213、192、193、195 或 198 中任一所示的重链可变区（VH）中含有的 HCDR1 或其序列的变体、HCDR2 或其序列的变体、以及 HCDR3 或其序列的变体；和/或

(b) SEQ ID NO: 238、229、235、236、221、222、225 或 228 中任一所示的轻链可变区（VL）中含有的 LCDR1 或其序列的变体、LCDR2 或其序列的变体、
10 以及 LCDR3 或其序列的变体；

优选地，所述序列的变体为与其来源 CDR 相比为具有一个或几个氨基酸的置换、缺失或添加的 CDR；优选地，所述的置换为保守置换。

2、如权利要求 1 所述的抗体或抗原结合蛋白，其特征在于，所述的抗体或抗原结合蛋白是具有下表所示的各重链 VH-CDR1、VH-CDR2 和 VH-CDR3，以及
15 轻链 VL-CDR1、VL-CDR2 和 VL-CDR3 的組合的抗体之一：

抗体编号	抗体名称	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
(27)	PR001166	131	153	184	23	59	100
(9)	PR001142	123	145	177	25	54	87
(26)	PR001165	127	150	180	27	55	94
(23)	PR001162	129	144	182	28	57	98
(1)	PR001128	115	144	169	19	47	86
(2)	PR001130	116	145	170	20	48	87
(5)	PR001133	119	148	173	21	50	89
(8)	PR001139	122	149	176	24	53	92

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留 TROP2 结合亲和力的衍生序列。

20 3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv 片段、二硫键连接的 Fv(dsFv) 和双抗体(diabody)。

4、一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白包括：

(i) 如权利要求 1 所述的抗体或抗原结合蛋白；和
25 (ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

5、一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的多肽：如权利要求 1-3 任一项所述的抗体或抗原结合蛋白，和/或如权利要求 4 所述的重组蛋白。

6、一种载体，其特征在于，所述载体含有权利要求 5 所述的多核苷酸。

7、一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求 6
30 所述的载体或基因组中整合有权利要求 5 所述的多核苷酸。

8、制备权利要求 1-3 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，其包括，在允许所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 7 所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述抗体或其抗原结合片段。

9、一种抗体偶联物，其特征在于，所述抗体偶联物含有：

5 (a) 抗体部分，所述抗体部分包括如权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白；和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合；

所述抗体部分和偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

10 10、一种嵌合抗原受体(CAR)，其特征在于，所述 CAR 包括权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白。

11、一种免疫细胞，其特征在于，所述免疫细胞表达权利要求 10 所述的嵌合抗原受体 (CAR)。

12、一种多特异性抗体，其特征在于，包含权利要求 1-3 任一项所述的 Trop-2
15 的抗体或抗原结合片段，和另外的抗体或其片段或抗体类似物；优选地，所述多特异性为双特异性、三特异性或四特异性。

13、一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：如权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白、如权利要求 4 所述的重组蛋白、如权利要求 9 所述的抗体偶联物、权利
20 要求 11 所述的免疫细胞、权利要求 12 所述的多特异性抗体或其组合；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

14、一种治疗、预防或减轻肿瘤的方法，其特征在于，所述方法包括向有需要的受试者施用权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白，权利要求 4 所述的重组蛋白，权利要求 9 所述的抗体偶联物，权利要求 11 所述的免疫细胞，权利要求
25 12 所述的多特异性抗体及权利要求 13 所述的药物组合物，优选地所述肿瘤为乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肠癌、肺癌、子宫颈癌，或其他 Trop2 表达阳性的肿瘤。

15、如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，进一步包括第二治疗剂的施用。

16、如权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白、如权利要求 4 所述的重组
30 蛋白、如权利要求 9 所述的抗体偶联物、如权利要求 11 所述的免疫细胞、如权利要求 12 所述的多特异性抗体和/或如权利要求 13 所述的药物组合物在制备预防和/或治疗肿瘤的药物中的用途，其特征在于，所述肿瘤为乳腺癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、肠癌、肺癌、子宫颈癌，或其他 Trop2 表达阳性的肿瘤。

17、一种检测 Trop-2 在样品中存在或其水平的方法，其特征在于，包括在允
35 许权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合片段与 Trop-2 之间形成复合物的条件下，使所述样品与所述抗体或其抗原结合片段接触，并且检测所述复合物的形成；优

选地，所述检测用于非诊断目的。

18、如权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合片段在制备 Trop-2 检测试剂或试剂盒中的用途。

5 19、一种试剂盒，其特征在于，包含权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白、权利要求 4 所述的重组蛋白、权利要求 9 所述的抗体偶联物、权利要求 11 所述的免疫细胞、权利要求 12 所述的多特异性抗体，和/或权利要求 13 所述的药物组合物，以及任选的使用说明书。

20、一种给药装置，其特征在于，包含：

10 (i) 输注模块，所述输注模块用于对受试者施用包括具有一活性成分的药物组合物；

(ii) 用于输注的药物组合物，所述药物组合物中含有一活性成分，所述活性成分选自下组：如权利要求 1-3 所述的抗体或抗原结合蛋白、权利要求 4 所述的重组蛋白、权利要求 9 所述的抗体偶联物、权利要求 11 所述的免疫细胞、权利要求 12 所述的多特异性抗体，和/或权利要求 13 所述的药物组合物；以及

15 (iii) 任选的药效监控模块。

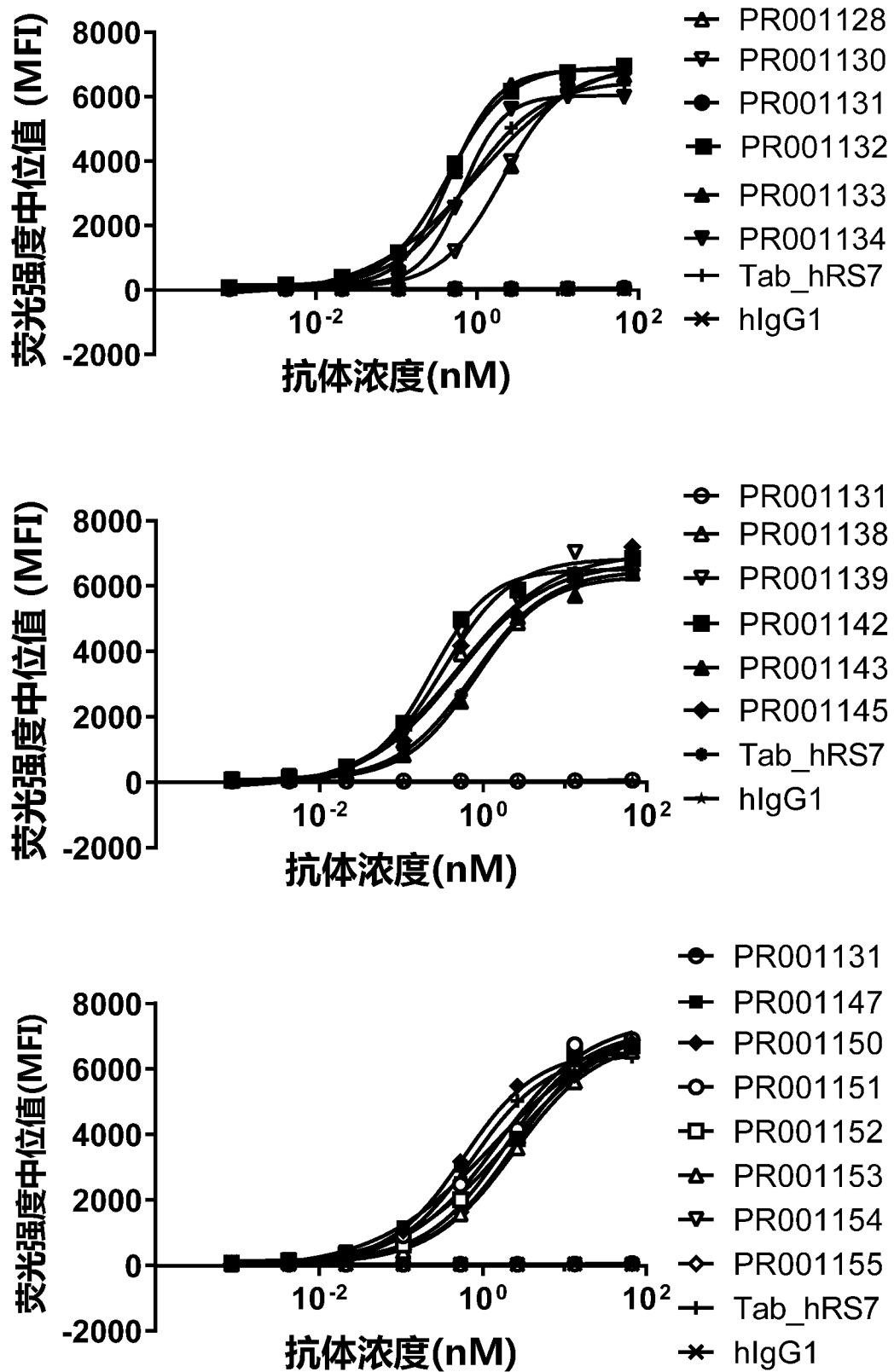


图 1

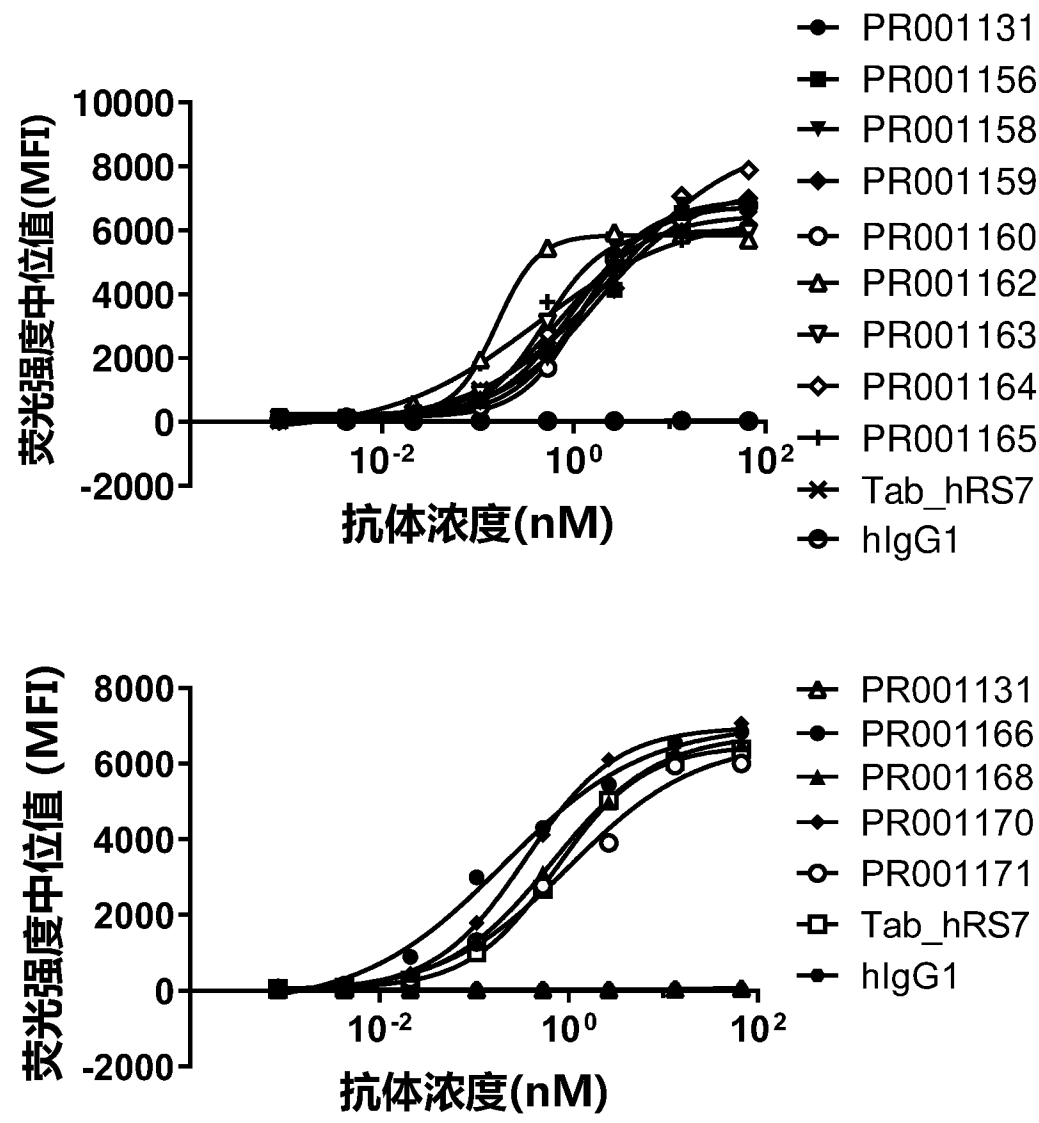


图 1 续

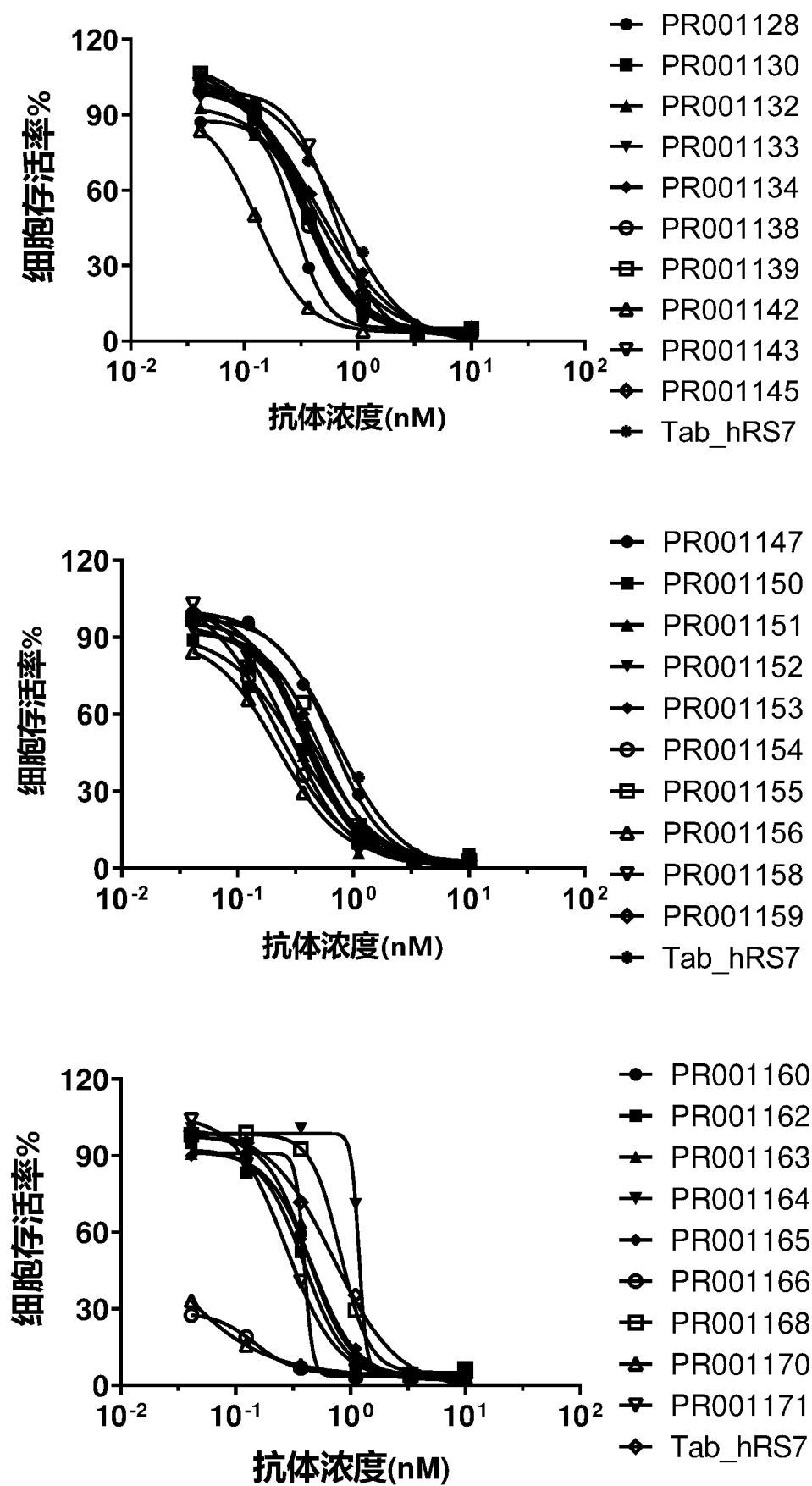


图 2

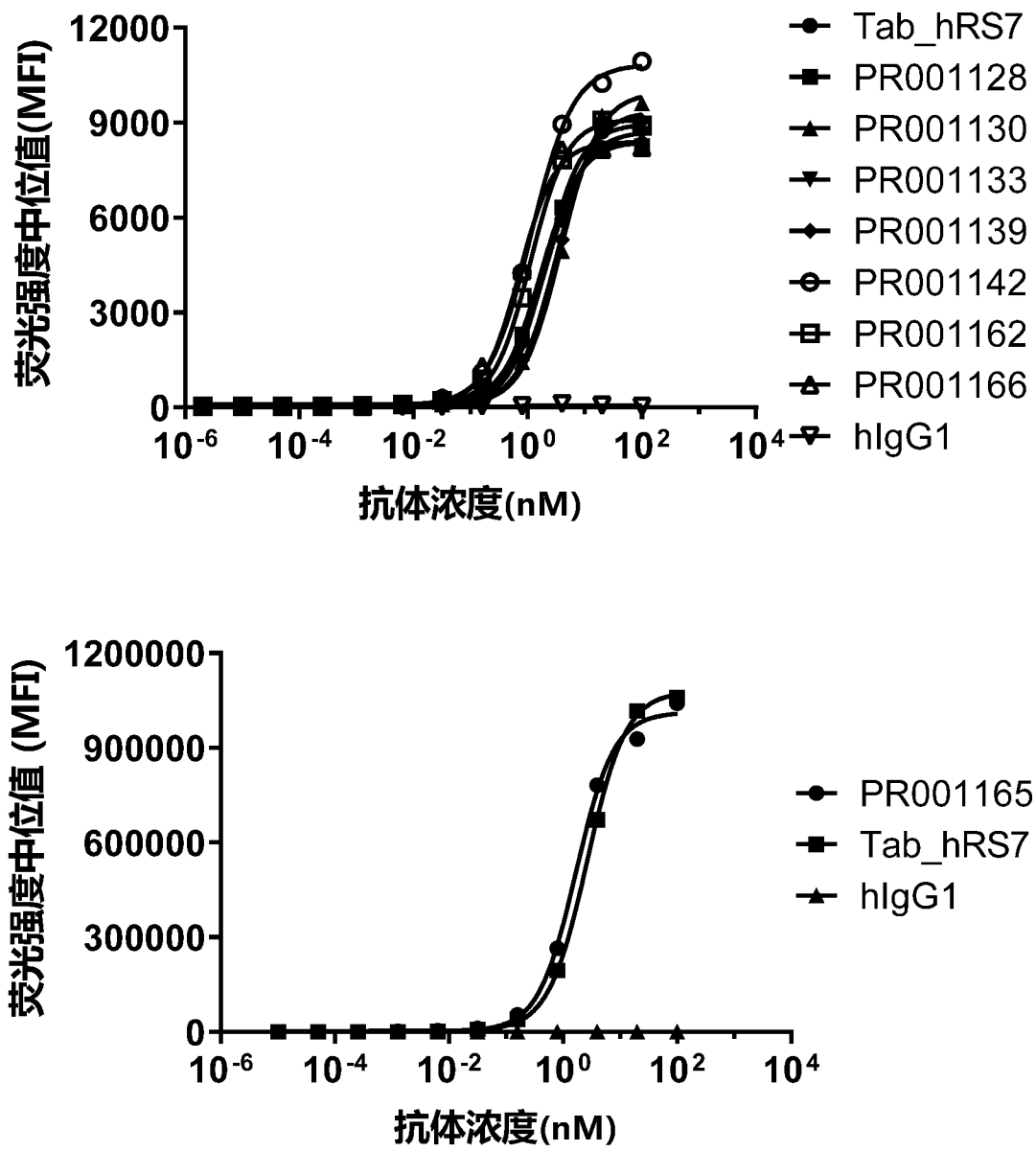


图 3

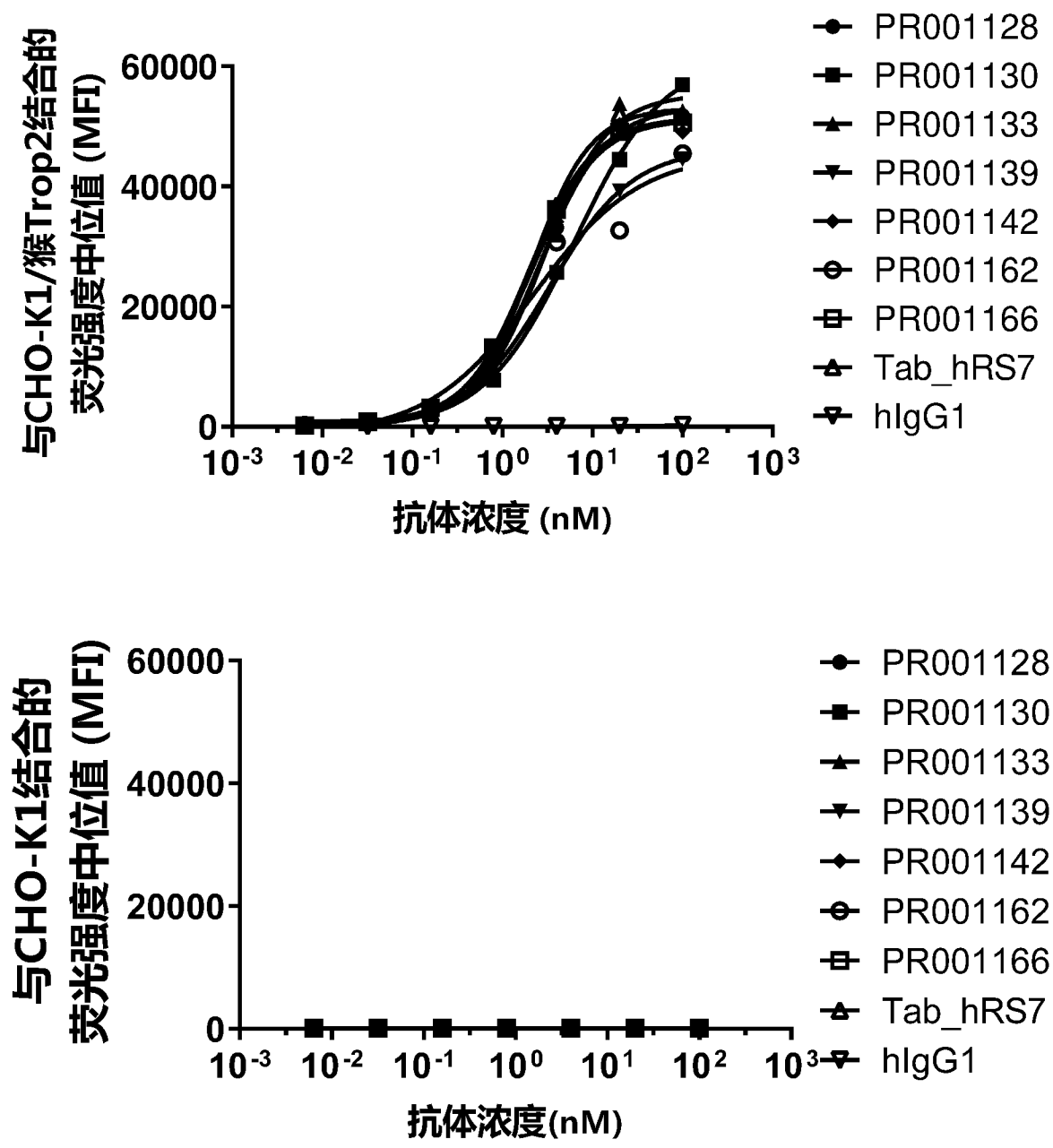


图 4

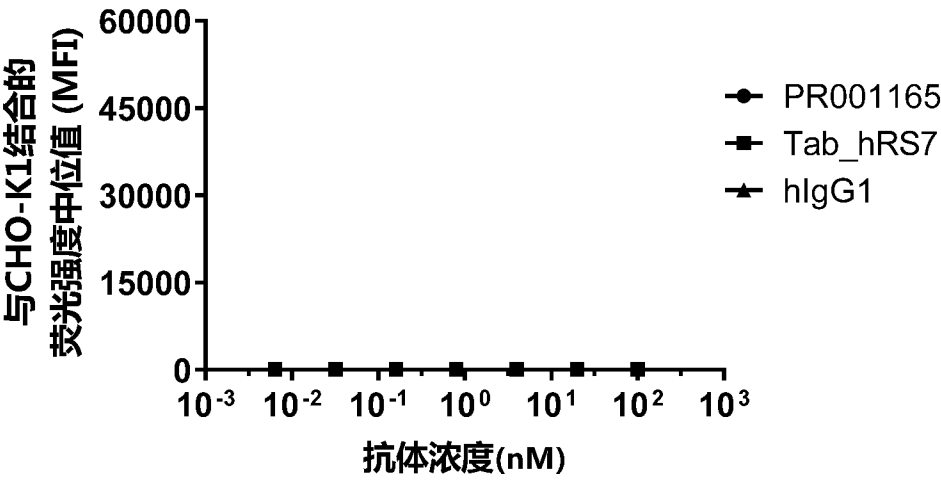
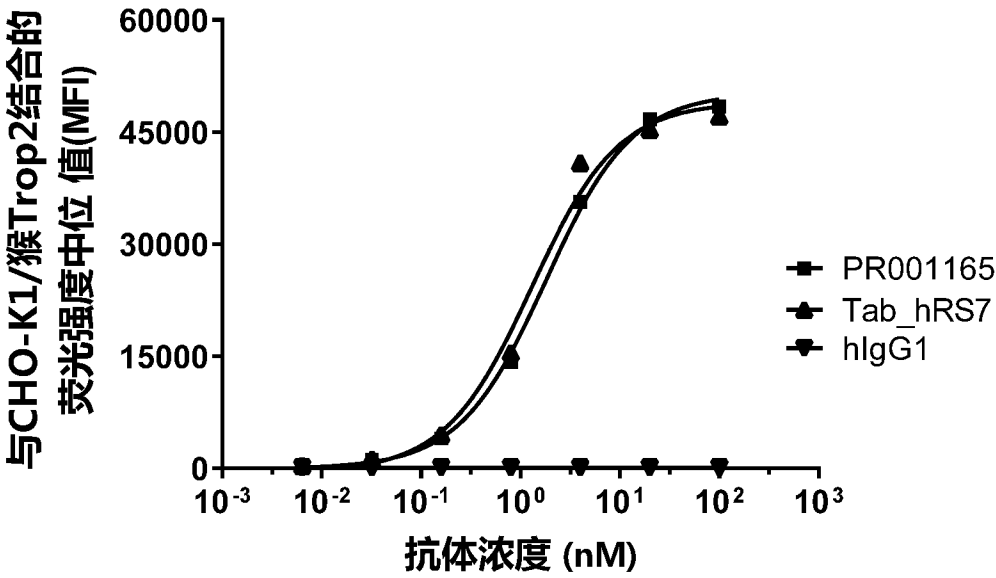


图 4 续

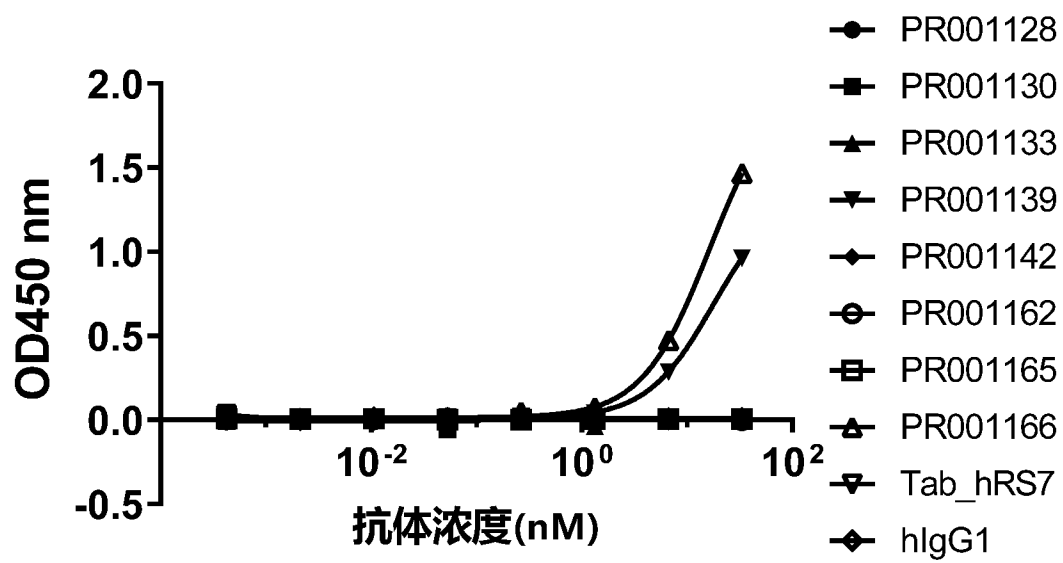


图 5

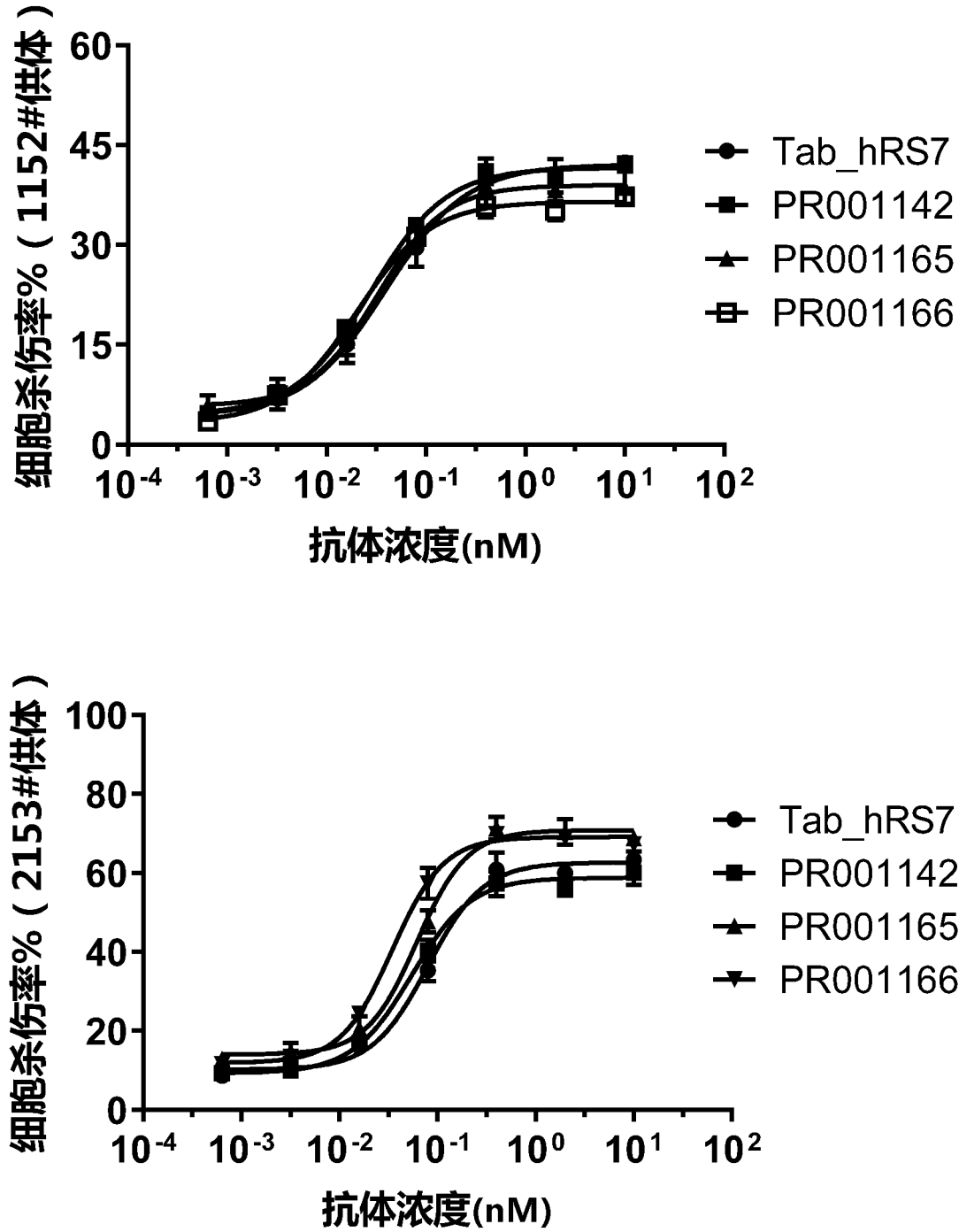


图 6

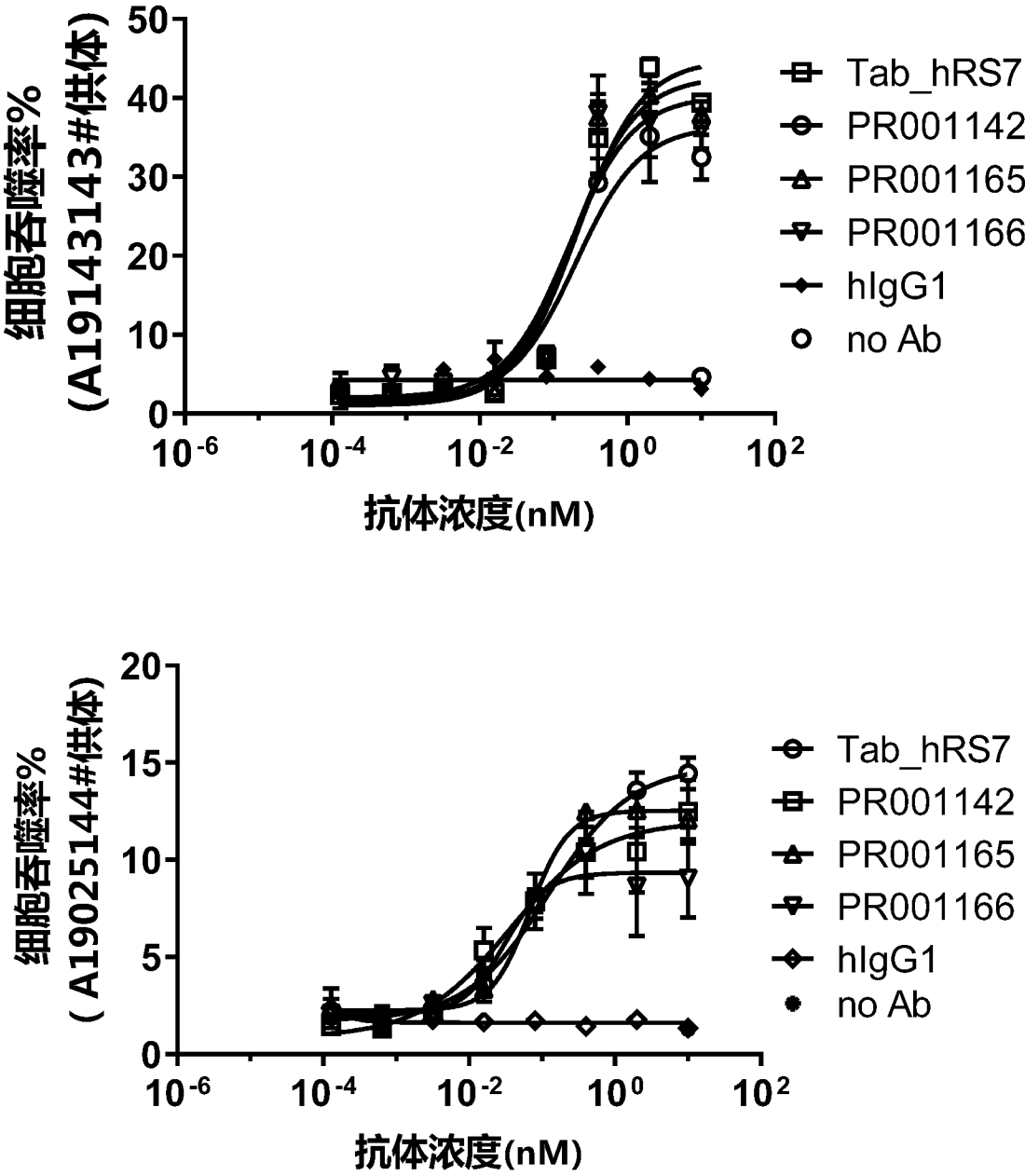


图 7

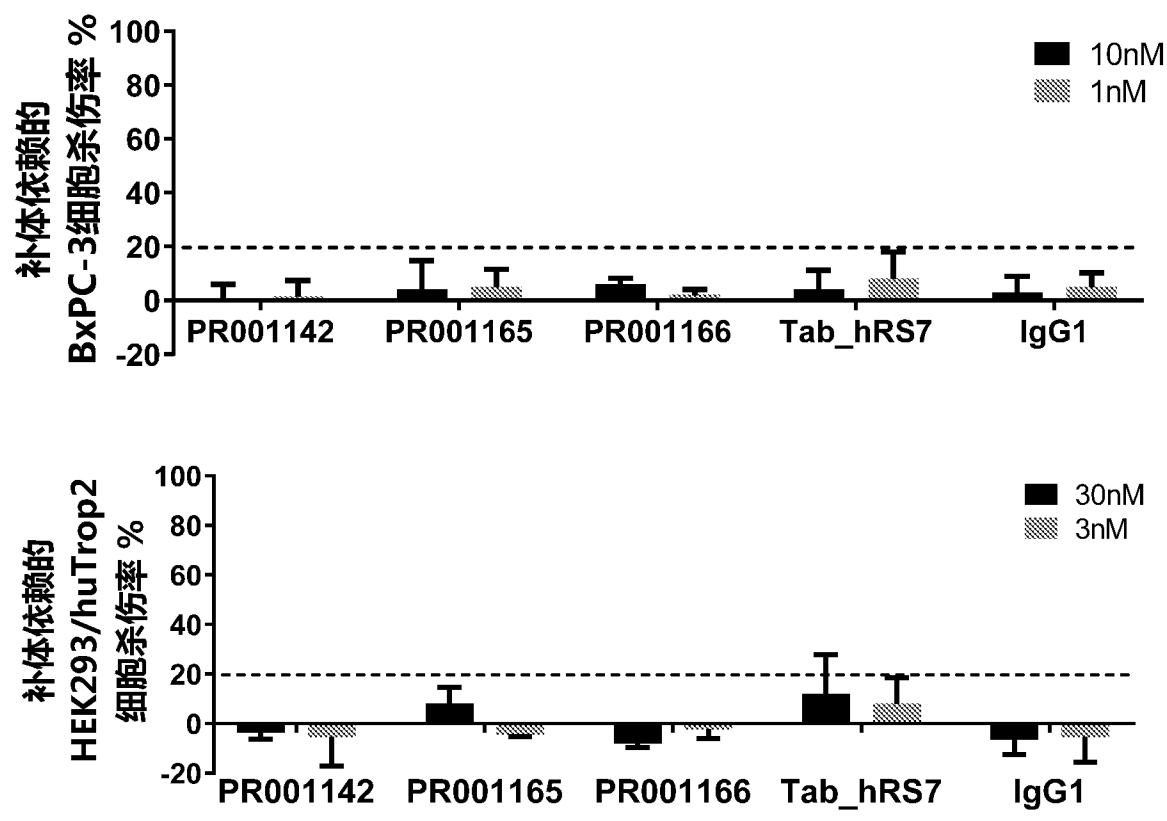


图 8

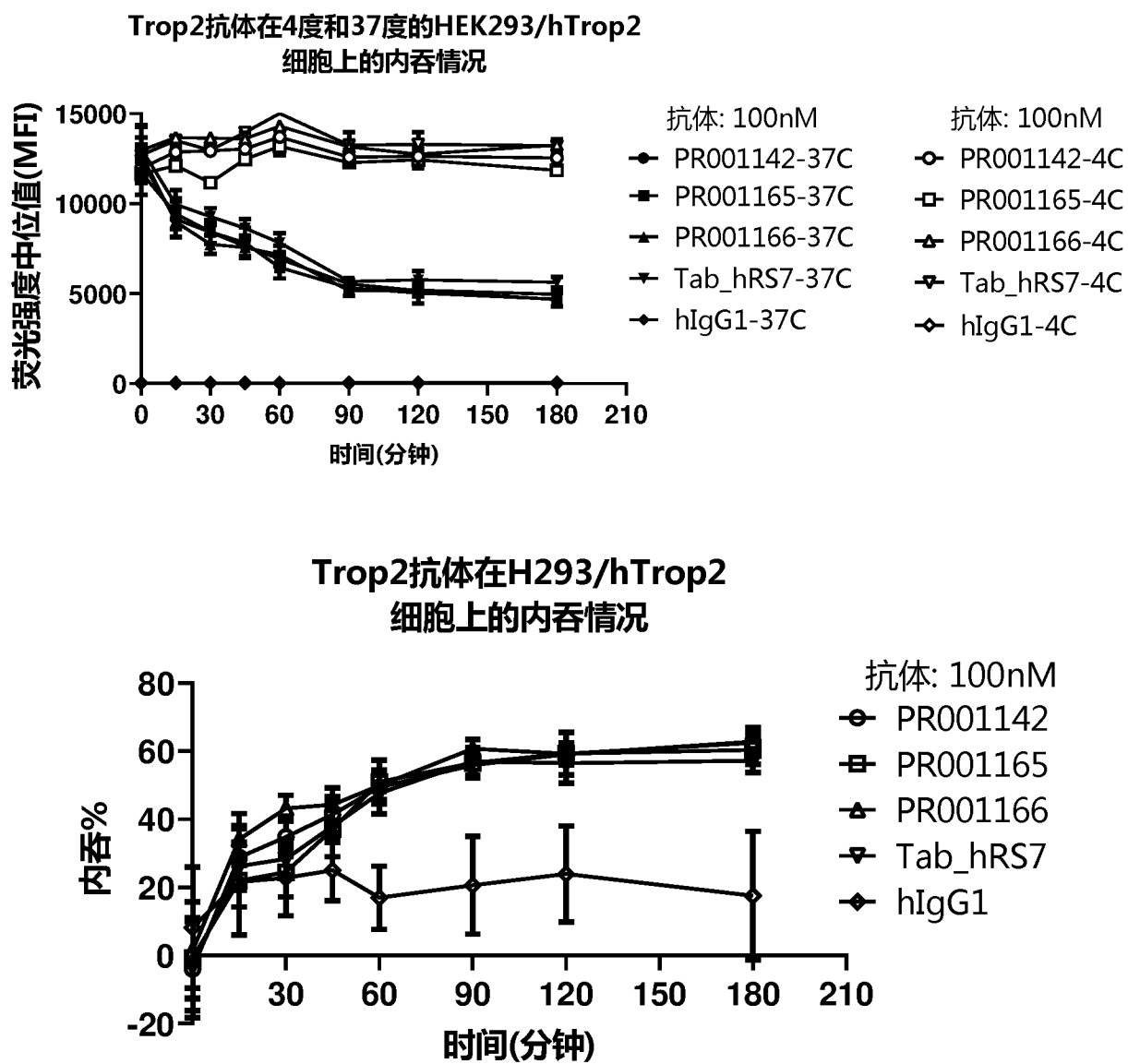


图 9

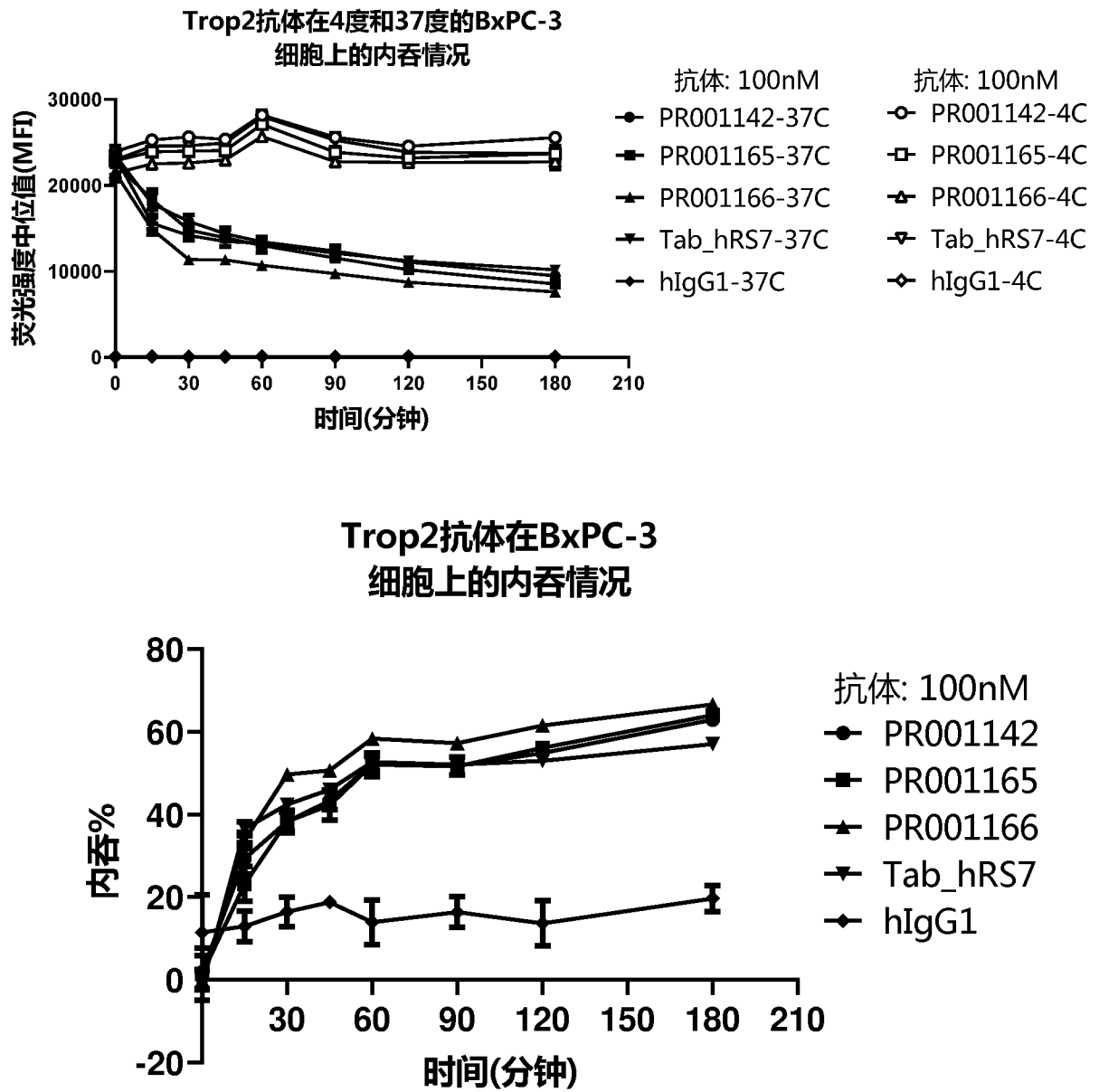


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/142095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/30(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX, WPABSC, ENTXTX, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀, DUXIU: SEQ ID Nos: 1-293, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, antibody +, Trop-2, Trop2, 滋养层细胞表面抗原, 肿瘤关联钙信号转导因子2, TACSTD2, 膜组分1表面标记1, M1S1, 上皮糖蛋白1, EGPI, 肠胃抗原733-1, GA733-1, I型跨膜细胞表面糖蛋白, 肿瘤, 癌症, cancer, tumor, CAR, 嵌合抗原受体, 缀合物, 偶联物, 输注, 注射.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013122020 A1 (RINAT NEUROSCIENCE CORP.) 16 May 2013 (2013-05-16) claims 1-41	1-20
A	CN 103228673 A (LIVTECH INC.) 31 July 2013 (2013-07-31) entire document	1-20
A	CN 110317822 A (YINGWEIFUSAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 11 October 2019 (2019-10-11) entire document	1-20
A	CN 107236043 A (CHIOME BIOSCIENCE INC) 10 October 2017 (2017-10-10) entire document	1-20
A	WO 2020191092 A1 (CSPC DOPHEN CORPORATION) 24 September 2020 (2020-09-24) entire document	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2022

Date of mailing of the international search report

02 April 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/142095

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOLDENBERG, D. M. et al. "Antibody-drug conjugates targeting TROP-2 and incorporating SN-38: A case study of anti-TROP-2 sacituzumab govitecan." <i>MABS</i> , Vol. 11, No. 6, 31 December 2019 (2019-12-31), pp. 987-995	1-20
A	林红等 (LIN, Hong et al.). "人源抗滋养层细胞表面抗原-2基因工程抗体Fab的制备及特性分析 (Preparation and Characterization of Human Anti-Trop-2 Engineering Antibody Fab)" <i>生物化学与生物物理进展 (Progress in Biochemistry and Biophysics)</i> , Vol. 37, No. 10, 31 December 2010 (2010-12-31), pp. 1101-1107	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/142095

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/142095

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter set forth in claims 14 and 15 relates to a method for treatment of a human or animal body. Therefore, no international search is made according to PCT Rule 39.1(iv). The search is made on the basis of the antibodies of claims 14 and 15 and a pharmaceutical use of a related product in the treatment of a drug for treating tumors.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/142095

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2013122020	A1	16 May 2013	RU	2014116406	A	20 December 2015
				US	2014357844	A1	04 December 2014
				US	9399074	B2	26 July 2016
				CA	2954166	A1	16 May 2013
				WO	2013068946	A2	16 May 2013
				WO	2013068946	A3	25 July 2013
				KR	20140091040	A	18 July 2014
				JP	2016104751	A	09 June 2016
				JP	6157575	B2	05 July 2017
				US	2016257746	A1	08 September 2016
				US	10100114	B2	16 October 2018
				CA	2854720	A1	16 May 2013
				CA	2854720	C	18 December 2018
				BR	112014011331	A2	25 April 2017
				IL	232426	D0	30 June 2014
				TW	201333036	A	16 August 2013
				TW	I495644	B	11 August 2015
				SA	112330988	B1	22 July 2015
				CO	7010785	A2	31 July 2014
				US	2019002559	A1	03 January 2019
				US	11091544	B2	17 August 2021
				AR	088693	A1	25 June 2014
				HK	1201851	A1	11 September 2015
				JP	2014534233	A	18 December 2014
				JP	5936702	B2	22 June 2016
				MX	2014005728	A	30 May 2014
				US	8871908	B2	28 October 2014
				JP	2017141249	A	17 August 2017
				JP	6475277	B2	27 February 2019
				EP	2776470	A2	17 September 2014
				ZA	201403492	B	26 April 2017
				MX	317088	B	13 January 2014
				MX	328905	B	30 January 2015
				SG	11201401699 W	A	26 September 2014
				AU	2012335205	A1	29 May 2014
				CN	104053672	A	17 September 2014
CN	103228673	A	31 July 2013	KR	20130038278	A	17 April 2013
				KR	101624381	B1	25 May 2016
				EP	2573120	A1	27 March 2013
				EP	2573120	A4	16 October 2013
				EP	2573120	B1	17 January 2018
				ES	2664809	T3	23 April 2018
				IL	222812	D0	31 December 2012
				IL	222812	A	28 June 2018
				SG	185583	A1	28 December 2012
				SG	10201503904 X	A	29 June 2015
				US	2013089872	A1	11 April 2013
				US	9062100	B2	23 June 2015
				WO	2011145744	A1	24 November 2011
				CA	2798778	A1	24 November 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/142095

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 2798778 C	05 January 2016
		EA 201500219 A1	30 October 2015
		EA 035852 B1	20 August 2020
		AU 2001255870 A1	31 January 2002
		US 2016053018 A1	25 February 2016
		US 9670287 B2	06 June 2017
		BR 112012029281 A2	29 November 2016
		BR 112012029281 B1	08 December 2020
		NZ 702053 A	29 January 2016
		EA 201291260 A1	30 May 2013
		EA 031043 B1	30 November 2018
		MX 2012013327 A	05 December 2012
		MX 350781 B	18 September 2017
		AU 2011255870 A1	17 January 2013
		AU 2011255870 A8	24 January 2013
		AU 2011255870 B2	28 May 2015
		JP WO2011145744 A1	22 July 2013
		JP 5859434 B2	10 February 2016
		NZ 603455 A	30 January 2015
		EA 201500220 A1	30 October 2015
		JP 2015221793 A	10 December 2015
		MX 369106 B	29 October 2019
CN 110317822 A	11 October 2019	None	
CN 107236043 A	10 October 2017	EA 201692042 A1	30 January 2017
		EA 035947 B1	04 September 2020
		CA 2855699 A1	30 May 2013
		CA 2855699 C	20 July 2021
		US 2013344509 A1	26 December 2013
		US 9427464 B2	30 August 2016
		ES 2750358 T3	25 March 2020
		AU 2012341450 A1	08 May 2014
		AU 2012341450 B2	30 March 2017
		NZ 623464 A	27 May 2016
		JP WO2013077458 A1	27 April 2015
		JP 6043725 B2	14 December 2016
		CN 104114580 A	22 October 2014
		MX 2014006037 A	22 September 2014
		MX 362720 B	31 October 2018
		CA 3027417 A1	30 May 2013
		BR 112014012119 A2	27 October 2020
		WO 2013077458 A1	30 May 2013
		EP 3521313 A1	07 August 2019
		EA 201491006 A1	30 October 2014
		EA 035953 B1	04 September 2020
		US 2016333110 A1	17 November 2016
		US 10202461 B2	12 February 2019
		KR 20140102677 A	22 August 2014
		KR 101972625 B1	16 August 2019
		EP 2799452 A1	05 November 2014
		EP 2799452 A4	15 July 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/142095

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)			Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)		
							EP	2799452	B1	21 August 2019		
WO	2020191092	A1	24 September 2020				CN	113631577	A	09 November 2021		
							EP	3941945	A1	26 January 2022		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/142095

A. 主题的分类

C07K 16/30(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; C12P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNXT, WPABSC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀:SEQ ID Nos: 1-293, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, antibod+, Trop-2, Trop2, 滋养层细胞表面抗原, 肿瘤关联钙信号转导因子2, TACSTD2, 膜组分1表面标记1, M1S1, 上皮糖蛋白1, EGP1, 肠胃抗原 733-1, GA733-1, I型跨膜细胞表面糖蛋白, 肿瘤, 癌症, cancer, tumor, CAR, 嵌合抗原受体, 缀合物, 偶联物, 输注, 注射。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2013122020 A1 (RINAT NEUROSCIENCE CORP.) 2013年5月16日 (2013 - 05 - 16) 权利要求1-41	1-20
A	CN 103228673 A (株式会社立富泰克) 2013年7月31日 (2013 - 07 - 31) 全文	1-20
A	CN 110317822 A (英威福赛生物技术有限公司) 2019年10月11日 (2019 - 10 - 11) 全文	1-20
A	CN 107236043 A (凯奥目生物科学株式会社) 2017年10月10日 (2017 - 10 - 10) 全文	1-20
A	WO 2020191092 A1 (CSPC DOPHEN CORPORATION) 2020年9月24日 (2020 - 09 - 24) 全文	1-20
A	GOLDENBERG, D. M. 等. "Antibody-drug conjugates targeting TROP-2 and incorporating SN-38: A case study of anti-TROP-2 sacituzumab govitecan." MABS., 第11卷, 第6期, 2019年12月31日 (2019 - 12 - 31), 第987-995页	1-20

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年3月15日

国际检索报告邮寄日期

2022年4月2日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

沈晶晶

电话号码 86-(10)-53961944

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/142095

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	林红等. “人源抗滋养层细胞表面抗原-2基因工程抗体Fab的制备及特性分析” 生物化学与生物物理进展, 第37卷, 第10期, 2010年12月31日 (2010 - 12 - 31), 第1101-1107页	1-20

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 14-15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求14-15的保护主题涉及对人体或者动物体进行治疗的方法, 因此依据PCT实施细则39.1(iv)不进行国际检索。检索是基于权利要求14-15的抗体及其相关产品制备治疗肿瘤的药物用途作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求， 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/142095

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	2013122020	A1	2013年5月16日	RU	2014116406	A	2015年12月20日
				US	2014357844	A1	2014年12月4日
				US	9399074	B2	2016年7月26日
				CA	2954166	A1	2013年5月16日
				WO	2013068946	A2	2013年5月16日
				WO	2013068946	A3	2013年7月25日
				KR	20140091040	A	2014年7月18日
				JP	2016104751	A	2016年6月9日
				JP	6157575	B2	2017年7月5日
				US	2016257746	A1	2016年9月8日
				US	10100114	B2	2018年10月16日
				CA	2854720	A1	2013年5月16日
				CA	2854720	C	2018年12月18日
				BR	112014011331	A2	2017年4月25日
				IL	232426	D0	2014年6月30日
				TW	201333036	A	2013年8月16日
				TW	1495644	B	2015年8月11日
				SA	112330988	B1	2015年7月22日
				CO	7010785	A2	2014年7月31日
				US	2019002559	A1	2019年1月3日
				US	11091544	B2	2021年8月17日
				AR	088693	A1	2014年6月25日
				HK	1201851	A1	2015年9月11日
				JP	2014534233	A	2014年12月18日
				JP	5936702	B2	2016年6月22日
				MX	2014005728	A	2014年5月30日
				US	8871908	B2	2014年10月28日
				JP	2017141249	A	2017年8月17日
				JP	6475277	B2	2019年2月27日
				EP	2776470	A2	2014年9月17日
				ZA	201403492	B	2017年4月26日
				MX	317088	B	2014年1月13日
				MX	328905	B	2015年1月30日
				SG	11201401699W	A	2014年9月26日
				AU	2012335205	A1	2014年5月29日
				CN	104053672	A	2014年9月17日
CN	103228673	A	2013年7月31日	KR	20130038278	A	2013年4月17日
				KR	101624381	B1	2016年5月25日
				EP	2573120	A1	2013年3月27日
				EP	2573120	A4	2013年10月16日
				EP	2573120	B1	2018年1月17日
				ES	2664809	T3	2018年4月23日
				IL	222812	D0	2012年12月31日
				IL	222812	A	2018年6月28日
				SG	185583	A1	2012年12月28日
				SG	10201503904X	A	2015年6月29日
				US	2013089872	A1	2013年4月11日
				US	9062100	B2	2015年6月23日
				WO	2011145744	A1	2011年11月24日
				CA	2798778	A1	2011年11月24日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/142095

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CA 2798778 C	2016年1月5日
		EA 201500219 A1	2015年10月30日
		EA 035852 B1	2020年8月20日
		AU 2001255870 A1	2002年1月31日
		US 2016053018 A1	2016年2月25日
		US 9670287 B2	2017年6月6日
		BR 112012029281 A2	2016年11月29日
		BR 112012029281 B1	2020年12月8日
		NZ 702053 A	2016年1月29日
		EA 201291260 A1	2013年5月30日
		EA 031043 B1	2018年11月30日
		MX 2012013327 A	2012年12月5日
		MX 350781 B	2017年9月18日
		AU 2011255870 A1	2013年1月17日
		AU 2011255870 A8	2013年1月24日
		AU 2011255870 B2	2015年5月28日
		JP W02011145744 A1	2013年7月22日
		JP 5859434 B2	2016年2月10日
		NZ 603455 A	2015年1月30日
		EA 201500220 A1	2015年10月30日
		JP 2015221793 A	2015年12月10日
		MX 369106 B	2019年10月29日
CN 110317822 A	2019年10月11日	无	
CN 107236043 A	2017年10月10日	EA 201692042 A1	2017年1月30日
		EA 035947 B1	2020年9月4日
		CA 2855699 A1	2013年5月30日
		CA 2855699 C	2021年7月20日
		US 2013344509 A1	2013年12月26日
		US 9427464 B2	2016年8月30日
		ES 2750358 T3	2020年3月25日
		AU 2012341450 A1	2014年5月8日
		AU 2012341450 B2	2017年3月30日
		NZ 623464 A	2016年5月27日
		JP W02013077458 A1	2015年4月27日
		JP 6043725 B2	2016年12月14日
		CN 104114580 A	2014年10月22日
		MX 2014006037 A	2014年9月22日
		MX 362720 B	2018年10月31日
		CA 3027417 A1	2013年5月30日
		BR 112014012119 A2	2020年10月27日
		WO 2013077458 A1	2013年5月30日
		EP 3521313 A1	2019年8月7日
		EA 201491006 A1	2014年10月30日
		EA 035953 B1	2020年9月4日
		US 2016333110 A1	2016年11月17日
		US 10202461 B2	2019年2月12日
		KR 20140102677 A	2014年8月22日
		KR 101972625 B1	2019年8月16日
		EP 2799452 A1	2014年11月5日
		EP 2799452 A4	2015年7月15日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/142095

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
						EP 2799452 B1		2019年8月21日	
W0	2020191092	A1	2020年9月24日	CN 113631577 A		2021年11月9日			
				EP 3941945 A1		2022年1月26日			