(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119256010 A
(43)申请公布日 2025.01.03

(21)申请号 202380041130.7
(22)申请日 2023.05.17
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/093524 2022.05.18 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/094711 2023.05.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/222017 EN 2023.11.23
(71)申请人 上海药明生物技术有限公司
地址 200131 上海市浦东新区富特中路299号
(72)发明人 荣乃燕 王卓智 李婕 顾继杰
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 胡志君 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书41页
序列表（电子公布） 附图8页

(54)发明名称

抗B7H3抗体及其用途

(57)摘要

本公开提供了结合B7H3的抗体或其抗原结合部分、产生该抗体的方法、以及使用该抗体或其抗原结合部分治疗B7H3相关疾病的方法。

CN 119256010 A

1.一种结合B7H3的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含以下CDR:

含有SEQ ID No:1的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1);含有SEQ ID No:2的氨基酸序列的HCDR2;含有SEQ ID No:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

含有SEQ ID No:4或7的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1);含有SEQ ID No:5的氨基酸序列的LCDR2;和含有SEQ ID No:6的氨基酸序列的LCDR3。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中所述VH包含:

(A)如SEQ ID No:8或10所示的氨基酸序列;

(B)与SEQ ID No:8或10至少85%、至少90%或至少95%同一的氨基酸序列;或

(C)与SEQ ID No:8或10相比在构架区中具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸添加、缺失和/或取代的氨基酸序列;

和/或所述VL包含:

(A)如SEQ ID No:9或11所示的氨基酸序列;

(B)与SEQ ID No:9或11至少85%、至少90%或至少95%同一的氨基酸序列;或

(C)与SEQ ID No:9或11相比在构架区中具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

3.根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述VH和/或VL在所述构架区中包含一个或多个氨基酸取代。

4.根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述氨基酸取代中的至少一个氨基酸取代是回复突变,其中来自人种系序列的氨基酸被亲本抗体中对应位置处的不同氨基酸取代。

5.根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述氨基酸取代中的至少一个氨基酸取代去除了潜在的翻译后修饰位点。

6.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述B7H3是人B7H3蛋白质、小鼠B7H3蛋白质、食蟹猴B7H3蛋白质或其胞外结构域。

7.根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述B7H3是人4IgB7H3蛋白质或其胞外结构域。

8.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分是全长抗体、scFv、Fab、F(ab')2或Fv片段。

9.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体包含免疫球蛋白恒定区,例如人IgG恒定区。

10.根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述免疫球蛋白恒定区是人IgG1恒定区,任选地包含一个或多个修饰诸如L234A/L235A(LALA)突变。

11.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分是嵌合抗体或人源化抗体。

12.根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含:

(a)SEQ ID No:12的氨基酸序列的重链和SEQ ID No:13的氨基酸序列的轻链;或

(b)SEQ ID No:14的氨基酸序列的重链和SEQ ID No:15的氨基酸序列的轻链。

13.一种分离的核酸分子,所述分离的核酸分子包含编码根据权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分的所述VH和/或VL区的核酸序列。

14.根据权利要求13所述的分离的核酸分子,其包含SEQ ID No:16和/或17所示的核酸序列。

15.一种载体,所述载体包含根据权利要求13或14所述的核酸分子。

16.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求13或权利要求14所述的核酸分子或根据权利要求15所述的载体。

17.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体。

18.一种用于产生抗体或其抗原结合部分的方法,所述方法包括以下步骤:

-在适于表达所述抗体或其抗原结合部分的条件下培养根据权利要求16所述的宿主细胞;以及

-从所述宿主细胞分离出所述抗体或其抗原结合部分。

19.一种用于调节受试者中B7H3相关免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分或根据权利要求17所述的药物组合物。

20.一种用于预防或治疗受试者中B7H3相关疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分或根据权利要求15所述的药物组合物。

21.根据权利要求20所述的方法,其中所述B7H3相关疾病选自癌症、自身免疫性疾病和感染性疾病。

22.根据权利要求21所述的方法,其中所述癌症选自乳腺癌、神经肿瘤、黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤诸如非霍奇金淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤、白血病诸如慢性淋巴细胞性白血病、和多发性骨髓瘤。

23.权利要求21或22所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分与细胞免疫疗法、化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或用于癌症免疫疗法的其他药剂联合施用。

24.根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分用于治疗或预防受试者中的B7H3相关疾病。

25.根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分的用途,用于制备诊断、治疗或预防受试者中的B7H3相关疾病的药物。

26.一种试剂盒,所述试剂盒包含根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合部分。

抗B7H3抗体及其用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2022年5月18日提交的国际申请PCT/CN2022/093524的优先权,优先权申请通过引用完整并入本文作为参考。

[0003] 序列表

[0004] 本申请提交了电子形式的序列表。序列表的全部内容在此以引用方式并入。

技术领域

[0005] 本公开总体上涉及抗B7H3抗体或其抗原结合部分、其制备方法及其用途。

背景技术

[0006] B7H3也称为CD276和B7RP-2,是B7家族成员并与其他B7家族成员具有20%-27%氨基酸同一性。虽然B7H3转录物遍在表达,但它在正常组织和免疫细胞上有限并维持低水平表达,并在多种人恶性肿瘤(包括黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌等)中过量表达。据报道,B7-H3在癌细胞的膜上、细胞质中或细胞核内表达,但也在肿瘤相关的脉管系统上表达。B7H3不在T细胞、NK细胞和APC(包括DC和巨噬细胞)上组成型表达,但其在APC上的表达可由GM-CSF、IFNγ等诱导。

[0007] B7-H3是有前景的抗癌靶标。B7-H3的确切功能尚不清楚,但已经证实其不同的免疫功能,包括刺激、抑制T-细胞增殖以及抑制NK细胞功能。推测在免疫细胞上存在不同的受体,这些受体可竞争结合肿瘤上的B7H3。除了其免疫检查点功能外,据报道B7H3高表达水平与癌症的不良预后相关,并且还增强细胞增殖、迁移、侵入、血管生成、转移能力和抗癌药物耐药性。

[0008] 与其他B7家族分子类似,B7H3是1型跨膜糖蛋白,其胞外结构域含有IgV-IgC结构域对。与只具有单一拷贝IgV-IgC结构域对的小鼠B7H3基因不同,发现人B7H3具有两种同种型。一种同种型含有单一拷贝IgV-IgC结构域对(命名为2IgB7H3),另一种同种型具有两个IgV-IgC结构域对(命名为4IgB7H3),这两个结构域对由基因重复和差别剪接产生。4IgB7H3是在免疫细胞以及恶性细胞上表达的主要同种型,而不是2IgB7H3,这表明4IgB7H3在肿瘤发育和癌症免疫中可能起到显著的重要作用。

[0009] 由于B7H3在许多肿瘤细胞上过表达,因此正在开发靶向B7H3的治疗分子以治疗相关适应症。然而,开发新型抗B7H3抗体仍然具有改进空间和临床需要。

发明内容

[0010] 本公开提供了这些和其他目的,在广义上涉及提供具有改善疗效的抗体的化合物、方法、组合物和制品。本公开提供的有益效果广泛地适用于抗体治疗和诊断领域,并且可以组合与多种靶标反应的抗体来使用。

[0011] 在一个方面,本公开提供了特异性结合B7H3的抗体或其抗原结合部分。B7H3抗原可以是人B7H3、小鼠B7H3和/或食蟹猴B7H3或其片段(例如胞外结构域)。优选地,B7H3抗原

是人4IgB7H3蛋白质或其胞外结构域。

[0012] 在一些实施方案中,如本文公开的抗体或其抗原结合部分包含:

[0013] 含有SEQ ID No:1的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1);含有SEQ ID No:2的氨基酸序列的HCDR2;含有SEQ ID No:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0014] 含有SEQ ID No:4或7的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1);含有SEQ ID No:5的氨基酸序列的LCDR2;和含有SEQ ID No:6的氨基酸序列的LCDR3。

[0015] 在一些实施方案中,如本文公开的抗体或其抗原结合部分包含:

[0016] 含有SEQ ID No:1的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1);含有SEQ ID No:2的氨基酸序列的HCDR2;含有SEQ ID No:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0017] 含有KSSQSLLX$_1$SSNQKNYLA的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1),其中X$_1$可为除N之外的任何氨基酸;含有SEQ ID No:5的氨基酸序列的LCDR2;含有SEQ ID No:6的氨基酸序列的LCDR3。

[0018] 优选地,如上所述的X$_1$为Q,并且LCDR1包含SEQ ID No:4的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,如本文公开的抗体或其抗原结合部分包含:

[0020] 含有SEQ ID No:1的氨基酸序列的重链CDR1(HCDR1);含有SEQ ID No:2的氨基酸序列的HCDR2;含有SEQ ID No:3的氨基酸序列的HCDR3;以及

[0021] 含有KSSQSLLNX$_2$SNQKNYLA的氨基酸序列的轻链CDR1(LCDR1),其中X可为除S之外的任何氨基酸;含有SEQ ID No:5的氨基酸序列的LCDR2;含有SEQ ID No:6的氨基酸序列的LCDR3。

[0022] 优选地,如上所述的X$_2$为P,并且LCDR1包含SEQ ID No:18的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含:

[0024] (A)如SEQ ID No:8或10所示的氨基酸序列;

[0025] (B)与SEQ ID No:8或10具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;或

[0026] (C)与SEQ ID No:8或10相比在构架区中具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸添加、缺失和/或取代的氨基酸序列;

[0027] 和/或VL包含:

[0028] (A)如SEQ ID No:9或11所示的氨基酸序列;

[0029] (B)与SEQ ID No:9或11具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;或

[0030] (C)与SEQ ID No:9或11相比在构架区中具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分包含在构架区中包含一个或多个氨基酸取代的VH和/或VL。在一些实施方案中,氨基酸取代中的至少一个氨基酸取代是回复突变,其中来自人种系序列的氨基酸被亲本抗体中对应位置处的不同氨基酸取代。

[0032] 在一些实施方案中,氨基酸取代中的至少一个氨基酸取代去除潜在的翻译后修饰位点或糖基化位点。此类氨基酸修饰可以在CDR区或构架区。

[0033] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是全长抗体、ScFv、Fab、F(ab′)2或Fv

片段。

[0034] 在一些实施方案中,抗体还包含免疫球蛋白恒定区,诸如人IgG恒定区,任选地人IgG1恒定区。在一些实施方案中,IgG1恒定区包含一个或多个修饰,诸如LALA突变。

[0035] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是嵌合抗体或人源化抗体。

[0036] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分包含:

[0037] (a)含有SEQ ID No:12的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID No:13的氨基酸序列的轻链;或

[0038] (b)含有SEQ ID No:14的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID No:15的氨基酸序列的轻链。

[0039] 在一个方面,本公开提供了分离的核酸分子,其包含编码如上文所定义的抗体或其抗原结合部分的核酸序列。

[0040] 在一个方面,本公开提供了包含如上文所定义的核酸分子的载体。

[0041] 在一个方面,本公开提供了包含如上文所定义的核酸分子或载体的宿主细胞。

[0042] 在一个方面,本公开提供了包含如上文所定义的抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0043] 在一个方面,本公开提供了用于产生如上文所定义的抗体或其抗原结合部分的方法,该方法包括以下步骤:

[0044] -在适于表达抗体或其抗原结合部分的条件下培养宿主细胞;以及

[0045] -从宿主细胞分离出抗体或其抗原结合部分。

[0046] 在一个方面,本公开提供了用于调节受试者中B7H3相关免疫应答的方法,该方法包括向受试者施用如上文所定义的抗体或其抗原结合部分或药物组合物。

[0047] 在一个方面,本公开提供了用于预防或治疗受试者中B7H3相关疾病的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如上文所定义的抗体或其抗原结合部分或药物组合物。

[0048] 在一些实施方案中,B7H3相关疾病选自癌症、自身免疫性疾病和感染性疾病。所述癌症可以选自乳腺癌、神经肿瘤、黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、成胶质细胞瘤、食道癌、膀胱癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、皮肤癌、睾丸癌、甲状腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤诸如非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0049] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分与细胞免疫疗法、化疗剂、放射疗法、靶向疗法和/或用于癌症免疫疗法的其他药剂联合施用。

[0050] 在一个方面,本公开提供了如上文所定义的抗体或其抗原结合部分,用于治疗或预防受试者中的B7H3相关疾病。

[0051] 在一个方面,本公开提供了如上文所定义的抗体或其抗原结合部分用于制备治疗或预防受试者中的B7H3相关疾病的药物的用途。

[0052] 在一个方面,本公开提供了包含如上文所定义的抗体或其抗原结合部分的试剂盒。

[0053] 前述是概述,因此必然包括细节的简化、概括和省略;因此,本领域技术人员将理解,该概述仅是例示性的,而不旨在以任何方式进行限制。该概述不旨在确定要求保护的主题的关键特征或必要特征,也不旨在用于帮助确定要求保护的主题的范围。

附图说明

[0054] 图1示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的SDS-PAGE结果。M:PageRuler™未染色蛋白梯;泳道1:W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320,非还原性;泳道2:W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320,还原性;凝胶信息:NuPAGE,Novex 4-12%Bis-Tris凝胶。

[0055] 图2示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的HLPC-SEC结果。

[0056] 图3示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的DSF曲线。

[0057] 图4示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的HIC-HPLC曲线。

[0058] 图5示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的DLS-k_D图。

[0059] 图6示出了抗体对表达人B7H3的细胞MCF-7的FACS结合结果。

[0060] 图7示出了抗体对食蟹猴B7H3转染的细胞的FACS结合结果。

[0061] 图8A-图8C示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320(A)、W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(B)和MacroGenics的依诺妥珠单抗(C)与人4IgB7H3的结合。

[0062] 图9A-图9C示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320(A)、W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(B)和MacroGenics的依诺妥珠单抗(C)与人2IgB7H3的结合。

[0063] 图10A-图10C示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320(A)、W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(B)和MacroGenics的依诺妥珠单抗(C)与食蟹猴B7H3的结合。

[0064] 图11示出了不同抗体被表达人B7H3的细胞MCF-7的内化。

[0065] 图12A-图12B示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320和W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320之间的VH区和VL区的比对。

具体实施方式

[0066] 虽然本公开可以以许多不同的形式实施,但是本文所公开的是举例说明本公开的原理的其具体例示性实施方案。应强调,本公开不限于所例示的具体实施方案。此外,本文所用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0067] 除非本文另有定义,否则与本公开结合使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语应包括单数。更具体地,如本说明书和所附权利要求中所用,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”以及“该”、“所述”包括复数指代。因此,例如,提及“一种蛋白质”包括多种蛋白质;提及“一个细胞”包括细胞的混合物等。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。此外,术语“包含”以及其他形式(诸如“包括”和“含有”)的使用不具有限制性。另外,说明书和所附权利要求书中提供的范围包括两端点和端点之间的所有点。

[0068] 在本公开的上下文中,术语“约”表示精度区间,本领域普通技术人员理解在该精度区间仍然确保所讨论特征的技术效果。该术语通常表示与指示数值的偏离为±5%,例如±4%、±3%、±2%、±1%、±0.9%、±0.8%、±0.7%、±0.6%、±0.5%、±0.4%、±0.3%、±0.2%、±0.1%、±0.05%,以及例如±0.01%。本领域普通技术人员将理解,给定技术效果的数值的此种具体偏离将取决于技术效果的性质。例如,天然技术效果或生物技术效果通常可能比人为或工程化技术效果具有更大的此种偏离。

[0069] 一般来说,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传

学、蛋白质和核酸化学以及杂交结合使用的命名法和这些技术是本领域熟知和常用的那些。除非另有说明,否则本公开的方法和技术通常根据本领域熟知的常规方法来执行,并且如在本说明书通篇引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所描述的。参见例如,Abbas等人,《Cellular and Molecular Immunology》,第6版,W.B.Saunders Company(2010年);Sambrook J.和Russell D.,《Molecular Cloning:A Laboratory Manual》,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2000年);Ausubel等人,《Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology》,Wiley,John&Sons,Inc.(2002年);Harlow和Lane,《Using Antibodies:A Laboratory Manual》,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1998年);以及Coligan等人,《Short Protocols in Protein Science》,Wiley,John&Sons,Inc.(2003年)。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及医药和药物化学结合使用的命名法、实验室程序和这些技术是本领域熟知和常用的那些。此外,本申请全文中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用方式并入本文作为参考。

[0070] 定义

[0071] 为了更好地理解本公开,提供如下相关术语的定义和解释。

[0072] 本文的术语“抗体”或“Ab”在最广泛的意义上使用,其涵盖各种抗体结构,包括多克隆抗体、单特异性和多特异性抗体(例如双特异性抗体)。天然完整抗体通常是Y形四聚体蛋白质,其包含通过共价二硫键和非共价相互作用保持在一起的两条重链(H)和两条轻链(L)多肽链。抗体的轻链可分类成κ轻链和λ轻链。重链可分类成μ、δ、γ、α和ε,它们分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链中,可变区经由大约12个或更多个氨基酸的“J”区与恒定区连接,并且重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由3个结构域(C_H1、C_H2和C_H3)组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。VH区和VL区可进一步分成高变区(称为互补决定区(CDR)),它们之间间隔相对保守的区域(称为构架区(FR))。每个V_H和V_L由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从N末端至C末端的3个CDR和4个FR组成。每个重链/轻链对的可变区(V_H和V_L)分别形成抗原结合位点。构架区和CDR的范围可以使用本领域已知的方法来精确鉴定,例如通过Kabat定义、Dr.Martin网站的定义、Chothia定义、AbM定义、EU定义和Contact定义,所有这些方法都是本领域熟知的。参见例如,Kabat,E.A.等人(1991年)《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公告号91-3242;Martin A,“Antibody bioinformatics website ofDr.Andrew Martin’s lab at UCL”,最后更新于2018年7月31日;Chothia等人(1989年),Nature,第342卷:第877页;Chothia,C.等人(1987年),J.Mol.Biol.,第196卷:第901-917页;Al-lazikani等人(1997年),J.Molec.Biol.,第273卷:第927-948页;Edelman等人,Proc Natl Acad Sci U S A,1969年5月,第63卷第1期:第78-85页;以及Almagro,J.Mol.Recognit.,第17卷:第132-143页(2004年)。还可参见hgmp.mrc.ac.uk and bioinf.org.uk/abs。根据不同定义的编号之间的对应或比对例如可见于http://www.imgt.org/(也参见Giudicelli V等人,“IMGT,the international ImMunoGeneTics database”,Nucleic Acids Res.,(1997年)第25卷:第206-211页;Lefranc MP等人,

"Unique database numbering system for immunogenetic analysis",Immunol Today (1997年),第18卷:第509页;以及Lefranc MP等人,"IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variabledomains and Ig superfamily V-like domains",Dev Comp Immunol.(2003年),第27卷:第55-77页)。抗体可以是不同的抗体同种型,例如IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗体。

[0073] 术语抗体的"抗原结合部分"或"抗原结合片段"在本申请的上下文中可互换使用,是指包含全长抗体片段的多肽,其保留了特异性结合与全长抗体特异性结合的抗原的能力和/或与全长抗体竞争结合相同抗原。通常,参见《Fundamental Immunology》,第7章,Paul,W.编辑,第二版,Raven Press,N.Y.(1989年),其以引用方式并入本文以用于所有目的。抗体的抗原结合片段可以例如使用任何合适的标准技术(诸如蛋白水解消化或涉及对编码抗体可变结构域和任选的恒定结构域的DNA的操纵和表达的重组基因工程技术)衍生自全长抗体分子。这种DNA是已知的和/或容易从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)获得,或者可以合成。DNA可以测序和通过例如化学方式或通过使用分子生物学技术操纵,以将一个或多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0074] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i)Fab片段;(ii)F(ab′)2片段;(iii)Fd片段;(iv)Fv片段;(v)单链Fv(scFv)分子;(vi)dAb片段;和(vii)由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用,其他工程化分子,诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也涵盖在表述"抗原结合片段"内。在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可变结构域和恒定结构域可以直接彼此连接,或者可以通过全部或部分铰链区或连接区连接。铰链区可以由至少2个(例如5、10、15、20、40、60个或更多个)氨基酸组成,这导致单个多肽分子中相邻的可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。

[0075] 关于如本文所用的抗体的术语"可变区"或"可变结构域"是指包含一个或多个CDR的抗体可变区或其片段。虽然可变结构域可包含完整的可变区(诸如HCVR或LCVR),但也可能包含少于完整的可变区但仍保留与抗原结合或形成抗原结合位点的能力。

[0076] 如本文所用的术语"恒定区"是指免疫球蛋白恒定区,其包含重链中的CH1、CH2和CH3结构域(和任选的铰链区),以及轻链中的恒定结构域。抗体重链和轻链恒定区是本领域熟知的,例如IMGT数据库(www.imgt.org)中或www.vbase2.org/vbstat.php.处提供的那些恒定区,这两处来源以引用方式并入本文作为参考。关于抗体的"Fc"是指抗体的包含第一重链的第二(CH2)和第三(CH3)恒定区经由二硫键键合与第二重链的第二和第三恒定区结合的部分。Fc区也可以包含部分或全部的铰链区。抗体的Fc区负责各种效应子功能,诸如ADCC和CDC,但不在抗原结合中起作用。抗体通过其Fc结构域启动和调节效应子功能的能力是其体内保护活性的关键组分。虽然先前认为抗体的中和活性仅是Fab-抗原相互作用的结果,但已经变得明显的是,它们的体内活性高度依赖于IgG Fc结构域与在效应白细胞表面上表达的其相应受体Fcγ受体(FcγR)的相互作用。

[0077] 术语“B7H3”(也称为CD276抗原)是指1型跨膜蛋白质,其为B7家族的具有由单个IgV-IgC结构域对构成的胞外结构域的成员。B7家族蛋白质包含具有短胞质尾的胞外IgV样和IgC样结构域。B7H3是免疫检查点分子,并在许多类型的癌症中异常过表达。当提及B7H3蛋白质的氨基酸序列时,其包括全长B7H3蛋白质(诸如人4IgB7H3蛋白质或人2IgB7H3蛋白质)或B7H3的胞外结构域(B7H3 ECD)或含有B7H3 ECD的片段;B7H3 ECD的融合蛋白质。B7H3蛋白质的示例性序列可见于Uniprot ID:Q5ZPR3(人4IgB7H3),Genebank登录号NP_001019907(人)、NP_001316557(人)、NP_001316558(人)、NP_079516(人)和NP_598744(小鼠)。食蟹猴B7H3分别与人和小鼠B7H3具有大约97％和88％的氨基酸序列同一性。

[0078] 如本文所用,术语“结合B7H3的抗体”或“抗B7H3抗体”包括特异性识别B7H3蛋白质的抗体及其抗原结合片段,以及特异性结合B7H3蛋白质的抗体及其抗原结合片段。如本文所用,术语“抗B7H3抗体”包括具有单特异性的单价抗体以及包含结合B7H3的第一抗原结合位点和结合第二(靶)抗原的第二抗原结合位点的双特异性抗体两者。

[0079] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“mAb”是指单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体显示出对特定表位的单结合特异性和亲和力。

[0080] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指由抗体的原始抗原结合可变结构域(例如鼠)与来自不同物种(例如人)的恒定结构域组成的抗体。优选地,本文使用的术语“嵌合抗体”是指由抗体的原始抗原结合可变结构域(例如鼠)和来自不同物种(例如人)的恒定结构域组成的抗体。

[0081] 术语“人源化抗体”旨在指这样的抗体,其中衍生自另一种哺乳动物物种(诸如大鼠/小鼠)种系的CDR序列已经被移植到人构架序列上。可以在人构架序列内进行额外的构架区修饰。例如,可以将构架区中的某些残基回复突变为原始序列以保持亲和力。

[0082] 术语“可操作地连接”是指两个或多个感兴趣的生物序列以使得它们处于允许它们以预期方式起作用的关系的方式在具有或不具有间隔物或接头的情况下并置。当用于多肽时,其旨在表示多肽序列以允许连接的产物具有预期生物学功能的方式连接。例如,抗体可变区可以可操作地连接到恒定区,以便提供具有抗原结合活性的稳定产物。该术语也可用于多核苷酸。例如,当编码多肽的多核苷酸可操作地连接到调控序列(例如启动子、增强子、沉默子序列等)时,其旨在表示多核苷酸序列以允许多肽从多核苷酸受调节地表达的方式连接。

[0083] 如本文所用,术语“K_D”旨在是指特定抗体-抗原相互作用的解离常数,其由k_d与k_a的比率(即k_d/k_a)获得,并表示为摩尔浓度(M)。如本文所用,术语“k_a”旨在是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所用,术语“k_d”旨在是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。抗体的K_D值可以使用本领域众所周知的方法来测定。用于测定抗体K_D的优选方法是通过使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统诸如Biacore®系统。

[0084] 如本文所用,术语对IgG抗体的“高亲和力”是指抗原和抗体之间的结合相互作用的强度。本领域已建立多种用于测量亲和力的方法,诸如表面等离子体共振(SPR)、FACS亲和力测试、FACS结合测试和ELISA结合。在一些实施方案中,如通过SPR测定的,如本文所公开的抗体对靶抗原的K_D为1×10^{-9}M或更低,更优选5×10^{-10}M或更低,甚至更优选1×10^{-10}M或更低,甚至更优选9×10^{-11}M或更低,并且甚至更优选8×10^{-11}M或更低。

[0085] 如本文所用,术语“EC_{50}”(也称为“半最大有效浓度”)是指在指定的暴露时间后诱

导基线和最大值之间的中值应答的药物、抗体或毒剂的浓度。在本申请的上下文中，EC_{50}以“nM”为单位表示。

[0086] 如本文所用，术语“分离的”是指从天然状态下通过人工手段获得的状态。如果自然界中存在某一种“分离的”物质或组分，则可能是因为其天然环境改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况兼有。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多核苷酸或多肽即称之为分离的多核苷酸或多肽。术语“分离的”既不排除混合的人工或合成物质，也不排除不影响分离的物质活性的其他不纯物质。

[0087] 如本文所用，术语“分离的抗体”旨在是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如，分离的特异性地结合B7H3蛋白质的抗体基本上不含有特异性地结合除B7H3蛋白质以外的抗原的抗体)。然而，特异性结合人B7H3蛋白质的分离的抗体可具有与其他抗原(诸如来自其他物种的B7H3蛋白质)的交叉反应性。此外，分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0088] 如本文所用，术语“载体”是指可具有插入其中的多核苷酸的核酸运载工具。当载体允许插入其中的多核苷酸编码的蛋白质表达时，载体称为表达载体。载体可以具有携带的遗传物质元件，这些遗传物质元件通过转化、转导或转染到宿主细胞中表达。载体是本领域技术人员熟知的，包括但不限于：质粒；噬菌体；粘粒；人工染色体，诸如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1衍生的人工染色体(PAC)；噬菌体诸如λ噬菌体或M13噬菌体；以及动物病毒。可用作载体的动物病毒包括但不限于：逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(诸如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(诸如SV40)。载体可以包含多种用于控制表达的元件，包括但不限于：启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。此外，载体可以包含复制起点。

[0089] 如本文所用，术语“宿主细胞”是指可经工程化改造以产生目的蛋白质、蛋白质片段或肽的细胞系统。宿主细胞包括但不限于：培养细胞，例如衍生自啮齿动物(大鼠、小鼠、豚鼠或仓鼠)的哺乳动物培养细胞，诸如CHO、BHK、NSO、SP2/0、YB2/0；或人组织或杂交瘤细胞、酵母细胞和昆虫细胞，以及包含在转基因动物或培养组织内的细胞。该术语不仅涵盖特定的受试细胞，而且涵盖这种细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境的影响在后代中出现，所以这种后代可能与亲本细胞不同，但仍包括在术语“宿主细胞”的范围内。

[0090] 如本文所用，术语“同一性”是指两个或更多个多肽分子或者两个或更多个核酸分子的序列之间的关系，如通过比对和比较所述序列所确定的。“同一性百分比”意指在被比较的分子中的氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比，并且基于被比较的分子中的最小分子的大小来计算。对于这些计算，优选地通过特定数学模型或计算机程序(即，“算法”)解决比对中的空位(如果存在的话)。可用于计算所比对的核酸或多肽的同一性的方法包括在以下文献中描述的那些：《Computational Molecular Biology》(Lesk,A.M.编辑)，1988年，New York:Oxford University Press;《Biocomputing Informatics and Genome Projects》(Smith,D.W.编辑)1993年，New York:Academic Press;《Computer Analysis of Sequence Data》，第I部分(Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑)，1994年，New Jersey:Humana Press;von Heinje,G.,1987年，《Sequence Analysis in Molecular Biology》，New York:Academic Press;《Sequence Analysis Primer》(Gribskov,M.和Devereux,J.编

辑),1991年,New York:M.Stockton Press;以及Carillo等人,1988年,SIAMJ.Applied Math.,第48卷:第1073页。

[0091] 如本文所用,术语“免疫原性”是指刺激机体中特异性抗体或致敏淋巴细胞形成的能力。它不仅是指抗原刺激特异性免疫细胞激活、增殖、分化以最终产生免疫效应物质诸如抗体和致敏淋巴细胞的特性,而且是指抗原刺激机体后,机体的免疫系统中可形成抗体或致敏T淋巴细胞的特异性免疫应答。免疫原性是抗原最重要的特性。抗原是否能够成功地诱导宿主中免疫应答的产生取决于三个因素:抗原的特性、宿主的反应性和免疫手段。

[0092] 如本文所用,术语“转染”是指将核酸引入真核细胞,特别是哺乳动物细胞中的过程。用于转染的方案和技术包括但不限于脂质转染以及化学和物理方法(诸如电穿孔)。许多转染技术是本领域熟知的,并在本文中公开。参见例如,Graham等人,1973年,Virology,第52卷:第456页;Sambrook等人,2001年,《Molecular Cloning:A Laboratory Manual》,出处同上;Davis等人,1986年,《Basic Methods in Molecular Biology》,Elsevier;Chu等人,1981年,Gene,第13卷:第197页。在本公开的一个具体实施方案中,可以将人B7H3基因转染到293F或CHO细胞中。

[0093] 如本文所用,术语“SPR”或“表面等离子体共振”是指并包括这样的光学现象:其允许通过例如使用BIAcore系统(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden和Piscataway,N.J.)检测生物传感器基质内蛋白质浓度的变化来分析实时生物特异性相互作用。关于进一步的描述,参见Jönsson,U.等人(1993年)Ann.Biol.Clin.第51卷:第19-26页;Jönsson,U.等人(1991年),Biotechniques,第11卷:第620-627页;Johnsson,B.等人(1995年),J.Mol.Recognit.第8卷:第125-131页;以及Johnnson,B.等人(1991年),Anal.Biochem.,第198卷:第268-277页。

[0094] 如本文所用,术语“荧光激活的细胞分选”或“FACS”是指特殊类型的流式细胞术。提供了将生物细胞的非均质混合物一次一个细胞地分选到两个或更多个容器中的方法,该方法基于每个细胞的特定光散射和荧光特征(FlowMetric,“Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting”,于2017-11-09检索)。用于执行FACS的仪器是本领域技术人员已知的,并且是公众可商购获得的。此类仪器的实例包括来自Becton Dickinson(Foster City,Calif.)的FACS Star Plus、FACScan和FACSort仪器;来自Coulter Epics Division(Hialeah,Fla.)的Epics C;以及来自Cytomation(Colorado Springs,Colo.)的MoFlo。

[0095] 术语“受试者”包括任何人或非人动物,在一些实施方案中,受试者优选地是人。

[0096] 如本文所用,术语“B7H3相关疾病”是指由B7H3(例如人B7H3)的表达或活性增加或降低(通常增加)引起、加剧或以其他方式与之相关的任何病况或疾病。

[0097] 如本文所用,术语“癌症”是指任何肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移介导的实体瘤和非实体瘤诸如白血病并引发医学病况。

[0098] 如本文在治疗疾病的上下文中所用,术语“治疗”(“treatment”、“treating”或“treated”)一般涉及实现某种期望的治疗效果的治疗和疗法(无论是人还是动物的),例如疾病进展的抑制,并且包括进展率的降低、进展率的停止、疾病的消退、疾病的改善和疾病的治愈。还包括作为预防性措施(即预防、防止)的治疗。对于癌症,“治疗”可以指抑制或减慢肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移,或它们的某种组合。对于肿瘤,“治疗”包括去除全部或部分肿瘤、抑制或减慢肿瘤生长和转移、预防或延迟肿瘤的发展,或它们的某种组合。

[0099] 如本文所用,术语“有效量”涉及当根据期望的治疗方案施用时,有效产生某些期望治疗效果的与合理效益/风险比相称的活性化合物或包含活性化合物的材料、组合物或剂型的量。例如,当结合B7H3相关疾病或病况的治疗使用时,“有效量”是指抗体或其抗原结合部分有效治疗所述疾病或病况的量或浓度。

[0100] 如本文所用,当谈及哺乳动物中的某些疾病病况,术语“预防”(“prevent”、“prevention”或“preventing”)是指预防或延迟疾病的发作,或预防其临床或亚临床症状的表现。

[0101] 如本文所用,术语“药学上可接受的”意指溶媒、稀释剂、赋形剂和/或其盐在化学上和/或物理上与制剂中的其他成分相容并且在生理上与接受者相容。

[0102] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性剂相容的载体和/或赋形剂,其为本领域熟知的(参见例如,《Remington's Pharmaceutical Sciences》,由Gennaro AR编辑,第1 9版,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1995年),并且包括但不限于:pH调节剂、表面活性剂、佐剂和离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子、阴离子或者非离子型表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂可以包括但不限于氯化钠。

[0103] 如本文所用,术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂,当其与抗原一起递送到机体或预先递送到机体时,其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。存在多种佐剂,包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝)、弗氏佐剂(例如弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂)、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂更常用于临床试验。

[0104] 特异性结合B7H3的抗体

[0105] 本公开提供了特异性结合B7H3诸如人B7H3、小鼠B7H3、食蟹猴B7H3及其ECD结构域的抗体。如本文所用,术语“抗体”包括全长免疫球蛋白及其结合相同抗原的抗体部分。抗体可以是例如单克隆、多克隆、嵌合、人源化或单链抗体。在一些实施方案中,抗体部分是Fab片段或F(ab′)2片段。在一些实施方案中,抗体部分保留特异性结合B7H3的能力。

[0106] 可使用标准重组DNA技术制备的重组抗B7H3抗体(诸如包含人和非人部分两者的嵌合和人源化单克隆抗体)在本公开的范围内。此类嵌合和人源化单克隆抗体可通过重组DNA技术产生,诸如以下文献中描述的方法:美国专利号7,112,421;Better等人(1988年),Science,第240卷:第1041-1043页;或Liu等人(1987年),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第84卷:第3439-3443页。本公开中还包括例如经由亲和力成熟、回复突变和翻译后修饰位点的去除而进一步修饰/优化的人源化单克隆抗体。

[0107] 优选地,如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可以以高亲和力结合人4IgB7H3。如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可以以低得多的亲和力结合人2IgB7H3。如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可以以高亲和力结合人4IgB7H3,但以低得多的亲和力结合人2IgB7H3。

[0108] 本公开的抗体与B7H3的结合可使用本领域熟知的一种或多种技术,例如ELISA或流式细胞术来评估。在一些实施方案中,可通过流式细胞术测定来测试抗体,在流式细胞术测定中抗体与表达人B7H3的细胞系(诸如已经转染以在其细胞表面上表达B7H3的MCF-7癌

细胞或CHOK1细胞)反应。额外地或备选地,可以在BIAcore结合测定中测试抗体的结合,包括结合动力学(例如K_D值)。在一些其他实施方案中,通过ELISA测试抗体,在ELISA中抗体与可溶性B7H3蛋白反应。

[0109] 本公开提供了以1×10^{-8}M或更低的K_D、1×10^{-9}M或更低的K_D、5×10^{-10}M或更低的K_D、1×10^{-10}M或更低的K_D、9×10^{-11}M或更低的K_D、8×10^{-11}M或更低的K_D、或7×10^{-11}M或更低的K_D结合人4IgB7H3蛋白的抗体,如通过表面等离子体共振(SPR)所测量的。如通过表面等离子体共振(SPR)所测量的,如本文所公开的抗体还可以以5×10^{-9}M或更高的K_D、1×10^{-8}M或更高的K_D、2×10^{-8}M或更高的K_D、3×10^{-8}M或更高的K_D、或4×10^{-8}M或更高的K_D结合人2IgB7H3蛋白。在一些实施方案中,本文的抗体以比结合人2IgB7H3的K_D值小500倍以上、小100倍以上或小50倍以上的K_D值结合人4IgB7H3。这些用于比较的K_D值可以通过表面等离子体共振(SPR)来测量。

[0110] 在一些实施方案中,如通过FACS测定的,本公开的抗体能够以小于5nM、小于4nM、小于3nM或小于2nM的EC_{50}结合表达人或食蟹猴B7H3的细胞系。

[0111] 抗体可变结构域和CDR

[0112] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分是特异性结合B7H3,优选地人4IgB7H3的嵌合抗体或鼠抗体。在一些另外的实施方案中,抗体或其抗原结合部分是特异性结合B7H3,优选地人4IgB7H3的人源化抗体。在一些另外的实施方案中,人源化抗体或其抗原结合部分在构架区中包含一个或多个回复突变。在一些另外的实施方案中,人源化抗体或其抗原结合部分在潜在的翻译后修饰(PTM)位点处包含一个或多个修饰,例如以去除CDR中的NG、NS和DG、以在整个长度上去除NXS和NXT(X可以是除P以外的任何氨基酸)。

[0113] 在一些实施方案中,如本文所公开的抗体或其抗原结合部分包含:选自下组中至少一者的一个或多个重链CDR(HCDR):

[0114] (i)包含SEQ ID No:1的HCDR1或与SEQ ID No:1的氨基酸序列相差不超过2个氨基酸(例如2个氨基酸或1个氨基酸)的氨基酸添加、缺失或取代的HCDR1;

[0115] (ii)包含SEQ ID No:2的HCDR2或与SEQ ID No:2的氨基酸序列相差不超过2个氨基酸(例如2个氨基酸或1个氨基酸)的氨基酸添加、缺失或取代的HCDR2;和

[0116] (iii)包含SEQ ID No:3的HCDR3或与SEQ ID No:3的氨基酸序列相差不超过2个氨基酸(例如2个氨基酸或1个氨基酸)的氨基酸添加、缺失或取代的HCDR3;和/或

[0117] 选自下组中至少一者的一个或多个轻链CDR(LCDR):

[0118] (i)包含SEQ ID No:4、7或18的LCDR1或与SEQ ID No:4、7或18的氨基酸序列相差不超过2个氨基酸(例如2个氨基酸或1个氨基酸)的氨基酸添加、缺失或取代的LCDR1;

[0119] (ii)包含SEQ ID No:5的LCDR2或与SEQ ID No:5的氨基酸序列相差不超过2个氨基酸(例如2个氨基酸或1个氨基酸)的氨基酸添加、缺失或取代的LCDR2;以及

[0120] (iii)包含SEQ ID No:6的LCDR3或与SEQ ID No:6的氨基酸序列相差不超过2个氨基酸(例如2个氨基酸或1个氨基酸)的氨基酸添加、缺失或取代的LCDR3。

[0121] 在一些实施方案中,CDR中的氨基酸取代是保守取代。在一些实施方案中,如上所述的抗体或其抗原结合部分可含有:包含SEQ ID NO:1或由其组成的HCDR1;包含SEQ ID NO:2或由其组成的HCDR2;包含SEQ ID NO:3或由其组成的HCDR3;包含SEQ ID NO:7或由其组成的LCDR1;包含SEQ ID NO:5或由其组成的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:6或由其组成的

LCDR3。具体地,抗体还可以在CDR中包含一个或多个修饰,以去除潜在的PTM位点。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:7(“KSSQSLLNSSNQKNYLA”)所示的LCDR1相比,抗体包含LCDR1中的一个或多个修饰以去除序列中的潜在PTM位点“NS”。在一些优选的实施方案中,与SEQ ID NO:7(“KSSQSLLNSSNQKNYLA”)所示的LCDR1相比,抗体在LCDR1的氨基酸序列的位置8或9处包含一个取代。在一些更优选的实施方案中,抗体在LCDR1(SEQ ID NO:4,“KSSQSLLQSSNQKNYLA”)的氨基酸序列的位置8处包含N至Q取代。在一些其他实施方案中,抗体在LCDR1(即SEQ ID NO:18,“KSSQSLLNPSNQKNYLA”)的氨基酸序列的位置9处包含S至P取代。本领域技术人员将理解,可选择其他类型的取代,只要基本上保留对B7H3的结合亲和力。

[0122] 在一些实施方案中,如本文所公开的抗体或其抗原结合部分可含有:包含SEQ ID NO:1或由其组成的HCDR1;包含SEQ ID NO:2或由其组成的HCDR2;包含SEQ ID NO:3或由其组成的HCDR3;包含SEQ ID NO:4或由其组成的LCDR1;包含SEQ ID NO:5或由其组成的LCDR2;以及包含SEQ ID NO:6或由其组成的LCDR3。

[0123] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中重链可变区和轻链可变区分别包含如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3。

[0124] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分的重链可变区包含:

[0125] (i)SEQ ID No:8或10的氨基酸序列;(ii)与SEQ ID No:8或10至少85%、90%或95%同一的氨基酸序列;或(iii)与SEQ ID No:8或10相比具有一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中,氨基酸取代可以是保守取代。

[0127] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包含:

[0128] (i)SEQ ID No:9或11的氨基酸序列;(ii)与SEQ ID No:9或11至少85%、至少90%或至少95%同一的氨基酸序列;或(iii)与SEQ ID No:9或11相比具有一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0129] 在一些实施方案中,氨基酸取代可以是保守取代。

[0130] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH包含:

[0131] (i)SEQ ID No:8或10的氨基酸序列;或(ii)与SEQ ID No:8或10相比在构架区中具有一个或多个(例如1、2、3、4、5个或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列;

[0132] 和/或VL包含:

[0133] (i)SEQ ID No:9或11的氨基酸序列;或(ii)与SEQ ID No:9或11相比在构架区中具有一个或多个(例如1、2、3、4、5个或更多个)氨基酸取代的氨基酸序列;

[0134] 在一些实施方案中,氨基酸取代可以是保守取代。

[0135] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分包含SEQ ID No:8或10所示的VH区的HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及SEQ ID No:9或11所示的VL区的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0136] 本领域人员将理解,CDR的精确编号和位置在不同的编号系统中可以不同。然而,应该理解,可变重链和/或可变轻链序列的公开内容包括相关(固有)CDR的公开内容。因此,每个可变重链区的公开内容是重链CDR(例如HCDR1、HCDR2和HCDR3)的公开内容,并且每个可变轻链区的公开内容是轻链CDR(例如LCDR1、LCDR2和LCDR3)的公开内容。CDR编号的可用

比较如下,参见Lafranc等人,Dev.Comp.Immunol.第27卷(第1期):第55-77页(2003年):

[0137]

CDR	Kabat	IMGT	Chothia	AbM	Kabat+ Chothia	Dr. Martin网站（关于详细信息，参见Martin，2018年，出处同上）
HCDR1	31-35	27-38	26-32	26-35	26-35	CXXX+HCDR1+W
HCDR2	50-65	56-65	52-56	50-58	50-65	LEWG+HCDR2
HCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	CAR+HCDR3+WGXG
LCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	C+LCDR1+W
LCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	LCDR1后的16个残基
LCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	C+LCDR3+ FGXG

[0138]

[0139] 可以根据以上提供的编号方案中的一种或组合方案将氨基酸分配给每个CDR,所有这些方案都是本领域熟知的。参见Kabat等人(1991年),《Sequences of Proteins of Immunological Interest》(第5版),US Dept.of Health and Human Services,PHS,NIH,NIH公告号91-3242;Chothia等人,1987年,PMID:3681981;Martin A,“Amibody bioinformatics website of Dr.Andrew Martin's lab at UCL″,最后更新于2018年7月31日;Chothia等人,1989年,PMID:2687698;MacCallum等人,1996年,PMID:8876650;Dubel编辑(2007年)《Handbook of Therapeutic Antibodies》,第3版,Wily-VCH Verlag GmbH and Co;以及http://www.imgt.org/。

[0140] 抗体序列中的可变区和CDR可根据本领域已开发的一般规则(如上所述,诸如Kabat、Martin和IMGT编号系统)或通过将序列与已知可变区的数据库比对来鉴定。用于鉴定这些区域的方法描述于Kontermann和Dubel编辑,Antibody Engineering,Springer,New York,NY,2001年以及Dinarello等人,Current Protocols in Immunology,John Wiley and Sons Inc.,Hoboken,NJ,2000年。抗体序列的示例性数据库描述于″Abysis″网站:www.bioinf,org.uk/abs(由A.C.Martin维护,Department of Biochemistry&Molecular Biology University College London,London,England)和VBASE2网站:www.vbase2.org,如Retter等人,Nucl.Acids Res.,第33期(数据库期号):第D671—D674页(2005年)中所述,并可通过这些网站访问。例如,可以使用Abysis数据库分析序列,该数据库将来自Kabat、IMGT和蛋白质资料库(PDB)的序列数据与来自PDB的结构数据整合。参见Dr.Andrew C.R.Martin的书籍《Antibody Engineering Lab Manual》(Duebel,S.和Kontermann,R.编辑,Springer-Verlag,Heidelberg,ISBN—13:978—3540413547,也可见于网站bioinforg.uk/abs)中的章节“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains″。Abysis数据库网站还包括已经开发的用于鉴定CDR的一般规则,这些规则可以根据本文的教导内容使用。具有相同VH和/或VL CDR的两种抗体意指当通过相同方法(例如,如本领域已知的Kabat方法、Dr Martin方法、Chothia方法或IMGT编号)确定时,它们的CDR是相同的。

[0141] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers和w.Miller的算法(Comput.Appl.Biosci.,第4卷:第11-17页(1988年)),使用PAM120重量残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定。此外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可通过已并入GCG软件包(可参见http://www.gcg.com)中的GAP程序的Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.,第48卷:第444-453页(1970年)),使用Blossum

62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6来确定。

[0142] 额外地或备选地,本公开的蛋白质序列还可用作“查询序列”以针对公共数据库执行检索,以例如鉴定相关序列。这种检索可以使用Altschul等人(1990年),J.Mol.Biol.,第215卷:第403-410页的XBLAST程序(2.0版)执行。BLAST蛋白质检索可以用XBLAST程序、评分=50、字长度=3执行,以获得与本公开的抗体分子同源的氨基酸序列。为了出于比较目的获得带空位的比对,可以如Altschul等人(1997年),Nucleic Acids Res.,第25卷(第17期):第3389-3402页中所述那样利用空位BLAST。当利用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0143] 在其他实施方案中,CDR氨基酸序列可以与上述相应序列至少80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一。在其他实施方案中,可变区的氨基酸序列可以与上文所示的相应序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一。

[0144] 如上所述,VH或VL区中的氨基酸中的至少一个氨基酸的添加、缺失和/或取代可以不在CDR序列中的任何序列中,而是在构架(FRW)序列中。例如,分离的抗体或其抗原结合部分可以在构架序列中包含一个或多个氨基酸取代,所述构架序列例如VH或VL区的FRW1、FRW2、FRW3和/或FRW4。

[0145] 在一些实施方案中,6个CDR组可具有总共0、1、2、3、4或5个氨基酸修饰(优选氨基酸取代),以及可变重链和轻链区的构架区中的变化,只要构架(不包括CDR)保持与亲本抗体(例如W301088-1.145.16)至少约80%、85%或90%的同一性。因此,例如,如本文所述的相同CDR可与来自人种系序列的不同构架序列组合,只要构架区保持与人种系序列具有至少80%、85%或90%同一性。

[0146] 在某些实施方案中,如本文提供的分离的抗体或其抗原结合部分包含任何合适的构架区(FR)序列,只要抗原结合结构域可特异性结合B7H3,优选地人Ig4B7H3。

[0147] 分离的抗体或其抗原结合部分的构架区可含有一个或多个回复突变,其中来自人种系的构架氨基酸在相应位置被原始鼠氨基酸置换。分离的抗体或其抗原结合部分的构架区也可包含一个或多个保守取代。如本文所用,术语“保守取代”是指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白质/多肽的基本特性的氨基酸取代。例如,可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和PCR介导的诱变引入保守取代。保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的另一个氨基酸残基例如在物理上或在功能上与对应氨基酸残基相似(诸如具有相似的大小、形状、电荷、化学特性,包括形成共价键或氢键的能力等)的残基取代的取代。已在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(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)、具有非极性侧链的氨基酸(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)、具有β-分支侧链的氨基酸(诸如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,对应的氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基取代。用于鉴定氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的(参见例如,Brummell等人,Biochem.,第32卷:第1180-1187页;Kobayashi等人,Protein Eng.,第12卷第10期:第879-884页(1999年);以及Burks等人,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第94卷:第412-417页(1997年),这些文献以引用方式并入本文作为参考)。

[0148] IgG恒定区

[0149] 在一些实施方案中,抗体还包含免疫球蛋白恒定区,诸如人IgG、IgA、IgM、IgE或IgD恒定区。如本文所公开的抗体可以是各种IgG同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。优选地,抗体是IgG1同种型,并包含人IgG1恒定区。如本文所述的IgG恒定区包含Fc区和任选的IgG分子的部分或全部铰链区。

[0150] 与野生型Fc区相比,Fc区可包含一个或多个氨基酸改变(例如插入、缺失或取代),而不改变期望的功能。例如,本公开包括在Fc区中包含一个或多个修饰的抗体,该抗体可具有在Fc和FcRn之间的修饰的(例如增强或减弱的)结合相互作用。Fc修饰的非限制性实例还包括例如:IgG1 Fc区中Leu234Ala/Leu235Ala(或LALA)的氨基酸修饰,其改变抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或其他效应子功能;在人IgG4 Fc区的氨基酸序列的228位置处丝氨酸(“S”)至脯氨酸(“P”)的突变。S228P突变通过使IgG4分子的核心铰链中的二硫键稳定而减少Fab臂交换,因此属于IgG4稳定化突变,其有助于防止半抗体形成。已知与Fcγ RIIIa结合的增加通常导致ADCC的增加。类似地,与Fcγ RIIb(抑制性受体)的结合降低在某些情况下可以是有益的。用于本发明抗体的氨基酸取代包括美国专利号8,188,321(特别是图41)和8,084,582以及美国公开的申请号20060235208和20070148170中列出的那些,所有这些专利全文以引用方式明确地并入本文作为参考。可用的特定变体包括但不限于236A、239D、239E、332E、332D、239D/332E、267D、267E、328F、267E/328F、236A/332E、239D/332E/330Y、239D、332E/330L、243A、243L、264A、264V和299T。这种修饰可以包含在如本文所公开的抗体的一个或两个Fc结构域中。

[0151] 可变区分别在重链和轻链中可操作地连接到IgG恒定区。在一些实施方案中,可变区直接与IgG恒定区连接。在一些其他实施方案中,可变区经由可包含少至一个氨基酸的接头与IgG恒定区连接。用于构建多肽序列的肽接头在本领域中是熟知的,诸如(GS)n、(GSGGS)n、(GGGGS)n和(GGGS)n接头,其中n至少是一(通常3至4至5)的整数;或衍生自免疫球蛋白重链或轻链的接头(诸如铰链区衍生的序列),以及允许可变区重组附接到恒定区的具有足够长度和柔性以允许每个区域执行其生物学功能的任何肽序列。

[0152] 除非另外指明,否则本文抗体恒定区的编号基于Kabat的EU编号。因此,IgG的上下文中的“CH”结构域如下:“CH1”是指根据Kabat的EU索引的位置118-215,“铰链”是指根据Kabat的EU索引的位置216-230,“CH2”是指根据Kabat的EU索引的位置231-340,并且“CH3”是指根据Kabat的EU索引的位置341-447。

[0153] 抗B7H3抗体的功能性

[0154] 如本文所公开的抗体或其抗原结合部分的特征在于特定的功能特征或特性。在一些实施方案中,抗体(包括嵌合抗体和人源化抗体两者)具有以下特性中的一种或多种特性:

[0155] (a)以高亲和力(例如小于2nM,如通过FACS测量的)特异性结合表达人4IgB7H3的细胞;

[0156] (b)以与人4IgB7H3结合的亲和力相比显著更低的亲和力结合人2IgB7H3,抗体结合2IgB7H3和结合4IgB7H3之间的差异是显著的;

[0157] (c)以优于基准抗体的高亲和力(例如小于5nM,如通过FACS测量的)特异性结合食蟹猴B7H3;以及

[0158] (d)对表达B7H3的癌细胞显示良好的内化能力。

[0159] 编码本公开的抗体的核酸分子

[0160] 在一些方面,本公开涉及分离的核酸分子,其包含编码如本文所公开的分离的抗体的重链可变区和/或轻链可变区的核酸序列。在一些实施方案中,本文的分离的核酸分子包含SEQ ID No:16所示的核酸序列。在一些实施方案中,本文的分离的核酸分子包含SEQ ID No:17所示的核酸序列。

[0161] 本公开的核酸可以使用标准分子生物学技术获得。对于由杂交瘤(例如,从如下进一步描述的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,编码由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,使用噬菌体展示技术)从免疫球蛋白基因文库获得的抗体,可以从基因文库回收编码此类抗体的核酸。

[0162] 可通过将编码VH的核酸与编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一DNA分子可操作地连接来将编码VH区的分离的核酸转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat等人(1991年),出处同上),并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但更优选地是IgG1或IgG4恒定区。

[0163] 可通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另一DNA分子可操作地连接来将编码VL区的分离的核酸转变为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见例如,Kabat等人,出处同上),并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增获得。在优选的实施方案中,轻链恒定区可以是K或λ恒定区。

[0164] 一旦获得编码VH区和VL区段的DNA片段,就可以通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,例如以将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,将编码VL或VH的DNA片段与编码另一种蛋白质(诸如,抗体恒定区或柔性接头)的另一种DNA片段可操作地连接。如本文所用的术语“可操作地连接”意在指两个DNA片段连接,使得由两个DNA片段编码的氨基酸序列保持符合读框。

[0165] 在一些方面,本公开涉及包含如本文所公开的核酸序列的载体。本公开的上下文中的载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体和合成的核酸载体(包含一组合适的表达控制元件的核酸序列)。此类载体的实例包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、衍生自质粒和噬菌体DNA的组合的载体以及病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一些实施方案中,编码B7H3抗体的核酸包含在裸DNA或RNA载体中,该载体包括例如线性表达元件(如在例如Sykes和Johnston,Nat Biotech,第17卷:第355-359页(1997年)中所述);压实的核酸载体(如在例如US 6,077,835和/或WO 00/70087中所述);质粒载体诸如pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119;“Midge”最小尺寸核酸载体(如在例如Schakowski等人,Mol Ther,第3卷:第793-800页(2001年)中所述),或作为沉淀核酸载体构建体,诸如CaP04沉淀构建体(如在例如WO200046147;Benvenisty和Reshef,PNAS USA,第83卷:第9551-9555页(1986年);Wigler等人,Cell,第14卷:第725页(1978年);以及Coraro和Pearson,Somatic Cell Genetics,第7卷:第603页(1981年)中所述)。此类核酸载体及其用途是本领域熟知的

(参见例如US 5,589,466和US 5,973,972)。

[0166] 在一个实施方案中,载体适用于在细菌细胞中表达抗体。此类载体的实例包括表达载体,诸如BlueScript(Stratagene)、pIN载体(Van Heeke&Schuster,J Biol Chem,第264卷:第5503-5509页(1989年))、pET载体(Novagen,Madison WI)等。载体也可以是或备选地是适于在酵母系统中表达的载体。可以使用任何适于在酵母系统中表达的载体。合适的载体包括例如包含组成型或诱导型启动子诸如α因子、醇氧化酶和PGH的载体(综述于:F.Ausubel等人编辑,《Current Protocols in Molecular Biology》,Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987年)以及Grant等人,Methods in Enzymol,第153卷:第516-544页(1987年))。

[0167] 载体也可以是或备选地是适于在哺乳动物细胞中表达的载体,例如包含谷氨酰胺合成酶作为可选择标记的载体,诸如Bebbington(1992年),Biotechnology (NY),第10卷:第169-175页中所述的载体。

[0168] 核酸和/或载体还可以包含编码分泌/定位序列的核酸序列,该分泌/定位序列可以将多肽诸如新生多肽链靶向周质间隙或靶向细胞培养基中。此类序列是本领域v知的,并包括分泌前导肽或信号肽。

[0169] 载体可包含任何合适的启动子、增强子和其他表达促进元件,或与它们相关。这些元件的实例包括强表达启动子(例如,人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL3-3、MMTV和HIV LTR启动子)、有效的多聚腺苷酸终止序列、质粒产物在大肠杆菌中的复制起点、作为可选择标记的抗生素抗性基因和/或方便的克隆位点(例如,多接头)。核酸也可包含诱导型启动子,而不是组成型启动子诸如CMV IE。

[0170] 在一些方面,本公开涉及包含上文所述载体的宿主细胞。

[0171] 因此,本公开还涉及产生本公开的抗体的重组真核或原核宿主细胞,诸如转染瘤。抗体可以在重组真核或原核宿主细胞中表达以产生本公开的抗体。

[0172] 宿主细胞的实例包括酵母、细菌、植物和哺乳动物细胞。用于表达本公开的抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin(1980年),Proc.Natl.Acad.ScL USA,第77卷:第4216-4220页,与DHFR可选择标记一起使用,例如如在R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982年),J.Mol.Biol.第159卷:第601-621页中所述)、COS细胞和SP2细胞。具体地,与NSO骨髓瘤细胞一起使用的另一种表达系统是在WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841中公开的GS基因表达系统。还包括SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚胎肾细胞系(293细胞或用于在悬浮培养物中生长的经亚克隆的293细胞,Graham等人,J.Gen Virol.,第36卷:第59页(1977年));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub等人,1980年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第77卷:第4216页);小鼠睾丸支持细胞(TM4,Mather,1980年,Biol.Reprod.,第23卷:第243-251页);猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TR1细胞(Mather等人,1982年,Annals N.Y.Acad.Sci.,第383卷:第44-68页);MRC 5细胞;FS4细胞;小鼠骨髓瘤细胞,诸如NSO(例如RCB0213,1992年,Bio/Technology,第10卷:第169页)和SP2/0细胞(例如SP2/0-

Ag14细胞,ATCC CRL 1581);大鼠骨髓瘤细胞,诸如YB2/0细胞(例如YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞,ATCC CRL 1662);PER.C6细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。CHO细胞是可用于本文的细胞系中的一种细胞系,其中CHO-K1、DUK-B11、CHO-DP12、CHO-DG44(Somatic Cell and Molecular Genetics,第12卷:第555页(1986年))和Lec13是示例性宿主细胞系。在CHO-K1、DUK-B11、DG44或CHO-DP12宿主细胞的情况下,可以改变这些宿主细胞,以使它们缺乏在细胞中表达岩藻糖基化的蛋白质的能力。在一些实施方案中,本文的宿主细胞选自CHO、CHO-S、HEK、HEK293、HEK-293F、Expi293F、PER.C6或NSO细胞或淋巴细胞。

[0173] 适用于此目的的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),诸如埃希氏菌属(Escherichia)例如大肠杆菌、肠杆菌(Enterobacter)、欧文氏菌属(Erwinia)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、变形杆菌属(Proteus)、沙门氏菌属(Salmonella)例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)、沙雷氏菌属(Serratia)例如粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans)和志贺氏菌属(Shigella),以及芽孢杆菌属(Bacilli)诸如枯草芽孢杆菌(B.subtilis)和地衣芽孢杆菌(B.licheniformis)、假单胞菌属(Pseudomonas)诸如铜绿假单胞菌(P.aeruginosa)和链霉菌属(Streptomyces)。

[0174] 除了原核生物之外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是用于双特异性抗体编码载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而,许多其他属、物种和菌株通常是可获得的并且可用于本文,诸如粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe);克鲁维酵母(Kluyveromyces)宿主,诸如例如乳酸克鲁维酵母(K.lactis)、脆壁克鲁维酵母(K.fragilis)(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(K.bulgaricus)(ATCC 16,045)、柳叶克鲁维酵母(K.wickeramii)(ATCC 24,178)、克鲁雄酵母(K.waltii)(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(K.drosophilarum)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(K.thermotolerans)和马克斯克鲁维酵母(K.marxianus);耶式酵母(yarrowia)(EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)(EP 183,070);假丝酵母(Candida);里氏木霉(Trichoderma reesia)(EP 244,234);粗糙脉孢菌(Neurosporacrassa);许旺酵母(Schwanniomyces),诸如西方许旺酵母(Schwanniomycesoccidentalis);以及丝状真菌,诸如例如脉孢菌(Neurospora)、青霉菌(Penicillium)、弯颈霉(Tolypocladium)和曲霉属(Aspergillus)宿主,诸如构巢曲霉(A.nidulans)和黑曲霉(A.niger)。

[0175] 在一些实施方案中,宿主细胞可包含稳定整合到细胞基因组中的第一和第二核酸构建体。在另一个实施方案中,本公开提供了包含非整合核酸诸如质粒、粘粒、噬菌粒或线性表达元件的细胞,其包含如上所述的第一和第二核酸构建体。

[0176] 在甚至另一个方面,本公开涉及包含编码一组或两组人重链和人轻链的核酸的转基因非人动物或植物,其中所述动物或植物产生本公开的抗体。

[0177] 在另一个方面,本公开涉及产生如本文所定义的本公开的抗体的杂交瘤。在甚至另一个方面,本公开涉及包含编码一组或两组人重链和人轻链的核酸的转基因非人动物或植物,其中所述动物或植物产生本公开的抗体。

[0178] 在一个方面,本公开涉及表达载体,该表达载体包含:

[0179] (i)编码根据本文所公开的实施方案中的任一个实施方案的抗体或其抗原结合部

分,或抗体的VH或VL结构域的核酸序列;

[0180] (ii)编码重链或轻链的氨基酸序列的核酸序列;

[0181] (iii)编码恒定区的氨基酸序列的核酸序列;或

[0182] (iv)上述核酸序列中两者或更多者的组合。

[0183] 在一个方面,本公开涉及编码序列表中所示的一个或多个氨基酸序列的核酸构建体。

[0184] 在一个方面,本公开涉及用于产生根据如本文所公开的实施方案中的任一个实施方案的抗体的方法,该方法包括以下步骤:培养包含如本文所公开的表达载体或多于一种表达载体的宿主细胞、表达抗体以及从培养基纯化所述抗体。在一个方面,本公开涉及包含如上文所定义的表达载体的宿主细胞。在一个实施方案中,宿主细胞是重组真核、重组原核或重组微生物宿主细胞。

[0185] 药物组合物

[0186] 在一些方面,本公开涉及包含至少一种如本文所公开的抗体或其抗原结合部分和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0187] 组合物的组分

[0188] 药物组合物可任选地含有一种或多种额外的药物活性成分,诸如另一种抗体或药物。本公开的药物组合物还可以与例如另一种免疫刺激剂、抗癌剂、抗病毒剂或疫苗以联合疗法施用,使得可以实现附加或协同效果。药学上可接受的载体可以包括例如,药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性介质、非水性介质、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮/分散剂、螯合剂、稀释剂、佐剂、赋形剂或无毒的辅料、本领域已知的其他载体、组分或更多载体的各种组合。

[0189] 合适的组分可以包括例如抗氧化剂、填料、粘结剂、崩解剂、缓冲剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂或稳定剂诸如糖和环糊精。合适的抗氧化剂可以包括例如甲硫氨酸、抗坏血酸、EDTA、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、巯基甘油、巯基乙酸、巯基山梨醇、丁基甲基苯甲醚、丁基化羟基甲苯和/或没食子酸丙酯。根据本公开,含有本公开的抗体或抗原结合片段的溶剂可以包括一种或多种抗氧化剂诸如甲硫氨酸,还原性抗体或其抗原结合片段可被氧化。氧化还原可防止或减少结合亲和力的降低,从而增强抗体稳定性和延长的货架期。因此,在一些实施方案中,本公开提供了包含一种或多种抗体或其抗原结合片段以及一种或多种抗氧化剂(诸如甲硫氨酸)的组合物。本公开还提供了多种方法,其中将抗体或其抗原结合片段与一种或多种抗氧化剂(诸如甲硫氨酸)混合,使得可以防止抗体或其抗原结合片段氧化,以延长它们的货架期和/或增加活性。

[0190] 为了进一步说明,药学上可接受的载体可以包括例如:水性载体,诸如氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液或葡萄糖和乳酸林格氏注射液;非水性载体,诸如植物来源的不挥发性油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油;抑菌或抑真菌浓度的抗微生物剂;等渗剂诸如氯化钠或葡萄糖;缓冲液诸如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液;抗氧化剂诸如硫酸氢钠;局部麻醉剂诸如盐酸普鲁卡因;悬浮和分散剂诸如羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮;乳化剂诸如聚山梨醇酯80(TWEEN-80);螯合剂诸如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸);乙醇;聚乙二醇;丙二醇;氢氧化钠;盐酸;柠檬酸或乳酸。用作载体的抗微生物剂可以添加到多剂量容器中的药物组合物中,包括苯酚或甲

酚、汞制剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。合适的赋形剂可以包括例如水、盐水、葡萄糖、甘油或乙醇。合适的无毒辅助物质可以包括例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、增溶剂或诸如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或环糊精的试剂。

[0191] 施用、制剂和剂量

[0192] 本公开的药物组合物可以通过各种途径体内施用给有需要的受试者，这些途径包括但不限于口服、静脉内、动脉内、皮下、肠胃外、鼻内、肌内、颅内、心内、心室内、气管内、口腔、直肠、腹膜内、皮内、局部、透皮和鞘内，或以其他方式通过植入或吸入。本主题组合物可以被配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂，包括但不限于片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、栓剂、灌肠剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。可以根据预期的应用和治疗方案选择合适的制剂和施用途径。

[0193] 适于肠内施用的制剂包括硬或软明胶胶囊、丸剂、片剂(包括包衣片剂)、酏剂、悬浮液、糖浆或吸入剂及其控释形式。

[0194] 适于(例如，通过注射)肠胃外施用的制剂包括水性或非水性、等渗、无热原、无菌液体(例如，溶液、悬浮液)，其中活性成分溶解、悬浮或以其他方式提供(例如，在脂质体或其他微粒中)。此类液体还可以含有其他药学上可接受的成分，诸如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂以及使制剂与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗的溶质。赋形剂的实例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。适用于此类制剂的等渗载体的实例包括氯化钠注射液、林格氏溶液或乳酸林格氏注射液。类似地，特定的给药方案(包括剂量、时间和重复)将取决于特定的个体和该个体的病史，以及经验考虑诸如药代动力学(例如半衰期、清除率等)。

[0195] 施用频率可以在治疗过程中确定和调整，并且基于减少增殖性或致瘤性细胞的数量、维持此类肿瘤细胞的减少、降低肿瘤细胞的增殖或延迟转移的发展。在一些实施方案中，可以调整或减少所施用的剂量以控制潜在的副作用和/或毒性。备选地，本发明治疗组合物的连续缓释制剂可能是合适的。

[0196] 本领域技术人员应当理解，适当的剂量可能因患者而异。确定最佳剂量通常将涉及治疗有益效果水平与任何风险或有害副作用的平衡。选定的剂量水平将取决于多种因素，包括但不限于特定化合物的活性；施用途径；施用时间；化合物的排泄速率；治疗持续时间；联合使用的其他药物、化合物和/或材料；病况的严重性；以及患者的物种、性别、年龄、体重、病况、一般健康状况和先前病史。化合物的量和施用途径将最终由医师、兽医或临床医师决定，但是通常将选择在作用部位达到局部浓度，从而实现期望效果而不引起实质的不利或有害的副作用的剂量。

[0197] 通常，本公开的抗体或其抗原结合部分可以在多种范围内施用。这些范围包括每剂量约5μg/kg体重至约100mg/kg体重；每剂量约50μg/kg体重至约5mg/kg体重；每剂量约100μg/kg体重至约10mg/kg体重。其他范围包括每剂量约100μg/kg体重至约20mg/kg体重和约0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重。在某些实施方案中，剂量为每剂量至少约100μg/kg体重、至少约250μg/kg体重、至少约750μg/kg体重、至少约3mg/kg体重、至少约5mg/kg体重、至少约10mg/kg体重。

[0198] 在任何情况下，本公开的抗体或其抗原结合部分优选地根据需要施用给有需要的

受试者。施用频率的确定可以由本领域技术人员诸如主治医师基于对所治疗的病况、所治疗的受试者的年龄、所治疗的病况的严重性、所治疗的受试者的一般健康状态等的考虑来进行。

[0199] 在某些优选的实施方案中,涉及本公开的抗体或其抗原结合部分的治疗过程将包括在数周或数月的时期内多剂量的选定药物产品。更具体地,本公开的抗体或其抗原结合部分可以每天施用一次、每两天施用一次、每四天施用一次、每周施用一次、每十天施用一次、每两周施用一次、每三周施用一次、每月施用一次、每六周施用一次、每两个月施用一次、每十周施用一次、每三个月施用一次或以更小频率施用。就这一点而言,应当理解,可以基于患者应答和临床实践来改变剂量或调整间隔。

[0200] 对于已给予一次或多次施用的个体,也可以根据经验确定所公开的治疗组合物的剂量和方案。例如,可以给予个体递增剂量的如本文所述产生的治疗组合物。在选定的实施方案中,可以分别基于根据经验确定的或观察到的副作用或毒性而逐渐增加或降低或减少剂量。为了评估选定组合物的功效,可以如前所述跟踪特定疾病、病症或病况的标志物。对于癌症,这些标志物包括经由触诊或视觉观察直接测量肿瘤大小,通过X射线或其他成像技术间接测量肿瘤大小;如通过肿瘤样品的直接肿瘤活检和显微镜检查评估的改善;间接肿瘤标志物(例如前列腺癌的PSA)或根据本文所述方法鉴定的致瘤抗原的测量,疼痛或麻痹的减轻;与肿瘤相关的言语、视觉、呼吸或其他残疾的改善;食欲增加;或通过公认的测试测量的生活质量的提升或生存期的延长。对本领域的技术人员显而易见的是,剂量将根据个体、肿瘤病况的类型、肿瘤病况的阶段、肿瘤病况是否已经开始转移至个体的其他位置以及过去和当下使用的治疗而变化。

[0201] 用于肠胃外施用(例如,静脉内注射)的相容制剂将包含浓度为约10μg/mL至约100mg/mL的如本文所公开的抗体或其抗原结合部分。在某些选定的实施方案中,抗体或其抗原结合部分的浓度将包括约20μg/mL、40μg/mL、60μg/mL、80μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、300μg/mL、400μg/mL、500μg/mL、600μg/mL、700μg/mL、800μg/mL、900μg/mL或1mg/mL。在其他优选的实施方案中,抗体或其抗原结合部分的浓度将包括约2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、8mg/mL、10mg/mL、12mg/mL、14mg/mL、16mg/mL、18mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL或100mg/mL。

[0202] 本公开的应用

[0203] 在一些方面,本公开提供了预防或治疗受试者中B7H3相关疾病、病症或病况的方法,该方法包括向需要治疗的受试者(例如人)施用治疗有效量的如本文所公开的抗体。疾病或病症可以是癌症、自身免疫疾病或感染性疾病。

[0204] 涉及B7H3的多种癌症(无论是恶性的还是良性的并且无论是原发性的还是继发性的)都可以用本公开提供的方法治疗或预防。癌症可以是实体癌或血液系统恶性肿瘤。此类癌症的实例包括肺癌诸如支气管癌(例如,鳞状细胞癌、小细胞癌、大细胞癌和腺癌)、肺泡细胞癌、支气管腺瘤、软骨瘤型错构瘤(非癌性)和肉瘤(癌性);心癌诸如粘液瘤、纤维瘤和横纹肌瘤;骨癌诸如骨软骨瘤、软骨瘤、成软骨细胞瘤、软骨粘液样纤维瘤、骨样骨瘤、骨巨细胞瘤、软骨肉瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、尤因氏瘤(尤因氏肉瘤)和网状细胞肉瘤;脑癌诸如神经胶质瘤(例如,多形性成胶质细胞瘤)、间变型星形

细胞瘤、星型细胞瘤、少突神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、脊索瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、脑膜瘤、垂体腺瘤、松果体瘤、骨瘤、成血管细胞瘤、颅咽管瘤、生殖细胞瘤、畸胎瘤、皮样囊肿和血管瘤;消化系统中的癌症诸如结肠癌、平滑肌瘤、鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、胃腺癌、肠道脂肪瘤、肠道纤维神经瘤、肠道纤维瘤、大肠巨大息肉和结肠直肠癌;肝癌诸如肝细胞腺瘤、血管瘤、肝细胞癌、纤维板层肝细胞癌、胆管癌、肝母细胞瘤和血管肉瘤;肾癌诸如肾腺癌、肾细胞癌、肾上腺样瘤和肾盂的移行细胞癌;膀胱癌;血液学癌诸如急性淋巴细胞(淋巴母细胞)白血病、急性髓系(髓细胞、骨髓性、成髓细胞、髓单核细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病(例如,塞扎里综合征和毛细胞白血病)、慢性粒细胞(骨髓、骨髓性、粒细胞)白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿和骨髓增殖性病症(包括骨髓增殖性病症诸如真性红细胞增多症、骨髓纤维化、血小板增多症和慢性粒细胞性白血病);皮肤癌诸如基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑色素瘤、卡波西肉瘤和佩吉特氏病;头颈癌;眼部相关癌症诸如成视网膜细胞瘤和眼内黑色素瘤;雄性生殖系统癌症诸如良性前列腺增生、前列腺癌和睾丸癌(例如,精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌和绒毛膜癌);乳腺癌;雌性生殖系统癌症诸如子宫癌(子宫内膜癌)、宫颈癌症(宫颈癌)、卵巢的癌症(卵巢癌)、外阴癌、阴道癌、输卵管癌和水泡状胎块;甲状腺癌(包括乳突癌、滤泡性癌、未分化癌或髓样癌);嗜铬细胞瘤(肾上腺);甲状旁腺的非癌性生长;胰腺癌;以及血液学癌诸如白血病、骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。在一些具体的实施方案中,癌症选自神经性肿瘤、黑色素瘤、肺癌、头颈癌、结肠直肠癌、胰腺癌、胃癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌和卵巢癌。

[0205] 在一些实施方案中,癌症的实例包括但不限于B细胞癌症,包括B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中级/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞NHL;高级淋巴母细胞NHL;高级小非切割细胞NHL;巨大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;AIDS相关淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性淋巴母细胞白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性成髓细胞白血病;和移植后淋巴增殖性病症(PTLD),以及与瘢痣病(phakomatoses)、水肿(诸如与脑瘤有关的)、B细胞增殖性病症和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖。更具体的实例包括但不限于复发性或顽固性NHL、前线低级NHL、III/IV期NHL、化学疗法抗性NHL、前体B淋巴母细胞白血病和/或淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病和/或幼淋巴细胞白血病和/或小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞淋巴瘤、免疫细胞瘤和/或淋巴浆细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、结外边缘区MALT淋巴瘤、结边缘区淋巴瘤、毛细胞白血病、浆细胞瘤和/或浆细胞骨髓瘤、低级/滤泡性淋巴瘤、中级/滤泡性NHL、套细胞淋巴瘤、滤泡中心淋巴瘤(滤泡性)、中级弥漫性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤、侵袭性NHL(包括侵袭性前线NHL和侵袭性复发性NHL)、自体干细胞移植后复发或难治性NHL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、高级免疫母细胞NHL、高级淋巴母细胞NHL、高级小非切割细胞NHL、巨大肿块NHL、伯基特淋巴瘤、前体(周围)大颗粒淋巴细胞白血病、蕈样真菌病和/或塞扎里综合征、皮肤淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

[0206] 在一些实施方案中,癌症的实例包括但不限于B细胞增殖性病症,其还包括但不限于淋巴瘤(例如B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL))和淋巴细胞白血病。此类淋巴瘤和淋巴细胞白血病包括例如a)滤泡性淋巴瘤、b)小、非切割细胞淋巴瘤/伯基特淋巴瘤(包括地方性伯基特淋巴瘤、散发性伯基特淋巴瘤和非伯基特淋巴瘤)、c)边缘区淋巴瘤(包括结外边缘区B细

胞淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织淋巴瘤,MALT)、结边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区淋巴瘤)、d)套细胞淋巴瘤(MCL)、e)大细胞淋巴瘤(包括B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、弥漫性混合细胞淋巴瘤、免疫母细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、血管中心淋巴瘤-肺B细胞淋巴瘤)、f)毛细胞白血病、g)淋巴细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、h)急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)/小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、i)浆细胞肿瘤、浆细胞骨髓瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤和/或j)霍奇金病。

[0207] 在一些其他实施方案中,疾病或病症是自身免疫疾病。可以用如本文所公开的抗体或其抗原结合部分治疗的自身免疫疾病的实例包括自身免疫性脑脊髓炎、红斑狼疮和类风湿性关节炎等。抗体或其抗原结合部分也可用于治疗或预防感染性疾病、炎性疾病(诸如变应性哮喘)和慢性移植物抗宿主疾病。

[0208] 联合使用

[0209] 抗体可以与不同的抗癌剂、细胞毒性剂、化疗剂或细胞免疫疗法联合使用。例如,本公开的抗体可以与抗PD-1/PD-L1抗体联合施用。本公开的抗体还可以与CART疗法联合施用。

[0210] 细胞免疫疗法

[0211] 在一些实施方案中,如本文所公开的抗体与细胞免疫疗法联合使用,细胞免疫疗法也称为过继性细胞疗法。如通常已知,细胞免疫疗法是一种利用人体免疫系统的细胞来消除癌症的治疗形式。这些方法中的一些方法涉及直接分离我们自己的免疫细胞并简单地扩增它们的数量(例如通过在体外激活和扩增患者的免疫细胞并输注到患者中来进行),而其他方法涉及(经由基因疗法)对免疫细胞进行基因工程改造以增强它们的抗癌能力。细胞免疫疗法可以以不同方式部署,包括但不限于肿瘤浸润的淋巴细胞(TIL)疗法、工程化T细胞受体(TCR-T)疗法、嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法、CARNK细胞疗法、自然杀伤(NK)细胞疗法。

[0212] 在一些实施方案中,抗体可以与额外的抗肿瘤疗法诸如肿瘤浸润的淋巴细胞(TIL)疗法、T细胞受体T细胞(TCR-T)疗法、嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法和NK细胞疗法以及靶向疗法和化学疗法联合使用。额外的抗肿瘤疗法的施用可以在施用如本文所公开的抗体或药物组合物之前、之后或同时进行。

[0213] 化学疗法

[0214] 术语“抗癌剂”或“抗增殖剂”意指可用于治疗细胞增殖性病症诸如癌症的任何药剂,并且包括但不限于细胞毒性剂、细胞抑制剂、抗血管生成剂、减积剂、化疗剂、放疗和放疗剂、靶向抗癌剂、BRM、治疗抗体、癌症疫苗、细胞因子、激素疗法、放疗和抗转移剂以及免疫治疗剂。应当理解,在如上所述的选定实施方案中,此类抗癌剂可包含缀合物,并且可以在施用之前与所公开的位点特异性抗体缔合。更具体地,在某些实施方案中,将选定的抗癌剂连接至工程化抗体的未配对半胱氨酸以提供如本文所示的工程化缀合物。因此,明确地设想此类工程化缀合物在本公开的范围内。在其他实施方案中,所公开的抗癌剂将与包含如上所示的不同治疗剂的位点特异性缀合物联合给予。

[0215] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”意指对细胞有毒性并且降低或抑制细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。在某些实施方案中,该物质是源自活生物体的天然存在的分子。细胞毒性剂的实例包括但不限于小分子毒素或细菌的酶促活性毒素(例如白喉毒素、假

单胞菌内毒素和外毒素、葡萄球菌肠毒素A)、真菌的酶促活性毒素(例如α-八叠球菌素、局限曲菌素)、植物的酶促活性毒素(例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白、莫迪素、槲寄生凝集素、美洲商陆抗病毒蛋白质、皂草素、白树毒素、苦瓜毒素、天花粉蛋白、大麦毒素、油桐蛋白质、石竹素蛋白质、美洲商陆蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、chlorambu officinalis抑制剂、白树毒素、mitegellin、局限曲霉素、酚霉素、新霉素和单端孢霉烯)或动物的酶促活性毒素(例如细胞毒性RNA酶,诸如细胞外胰腺RNA酶;DNA酶I,包括其片段和/或变体)。

[0216] 为了本公开的目的,“化学治疗剂”包含非特异性地减少或抑制癌细胞的生长、增殖和/或存活的化合物(例如,细胞毒性剂或细胞抑制剂)。此类化学试剂通常针对细胞生长或分裂所必需的细胞内过程,因此对通常快速生长和分裂的癌细胞特别有效。例如,长春新碱使微管解聚,因此抑制细胞进入有丝分裂。一般来讲,化疗剂可以包括抑制或被设计成抑制癌细胞或可能变成癌细胞或产生致瘤后代(例如TIC)的细胞的任何化学试剂。此类化疗剂通常例如在CHOP或FOLFIRI的方案中联合施用,并且通常是最有效的。

[0217] 可以与本公开的位点特异性构建体(作为位点特异性缀合物的组分或处于未缀合状态)联合使用的抗癌剂的实例包括但不限于烷化剂、烷基磺酸盐、氮丙啶、乙烯亚胺和甲基蜜胺、多聚乙酰、喜树碱、苔藓抑素、卡拉汀、CC-1065、念珠藻素、尾海兔素、倍癌霉素、五加素、水鬼蕉碱、匍枝珊瑚醇、海绵抑制素、氮芥、抗生素、烯二炔类抗生素、达内霉素、双膦酸酯、埃斯佩拉霉素、色蛋白烯二炔类抗生素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡拉比星、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物、埃罗替尼、维罗非尼、克唑替尼、索拉非尼、依鲁替尼、恩杂鲁胺、叶酸类似物、嘌呤类似物、雄激素、抗肾上腺、叶酸补充物诸如亚叶酸、醋葡醛内酯、醛磷酰胺糖苷、氨基酮戊酸、恩尿嘧啶、安吖啶、阿莫司汀、比生群、依达曲沙、defofamine、秋水仙胺、亚丝醌、依氟乌氨酸、依利醋铵、埃博霉素、乙环氧啶、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、氯尼达明、美登木素生物碱、米托胍腙、米托蒽醌、莫哌达醇、二胺硝吖啶、喷司他丁、蛋氨氮芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基酰肼、甲基苄肼、PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR)、雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2’,2”-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其是T-2毒素、疣疱菌素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷(“Ara-C”);环磷酰胺;噻替派;紫杉烷、苯丁酸氮芥;GEMZAR®吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物、长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;NAVELBINE®长春瑞滨;米托蒽醌;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨喋呤;卡培他滨;伊班膦酸盐;伊立替康(Camptosar,CPT-11)、拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸;类维生素A;卡培他滨;康普瑞汀;亚叶酸;奥沙利铂;降低细胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR和VEGF-A的抑制剂;上述物质中任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。该定义中还包括起调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂,诸如抗雌激素和选择性雌激素受体调节

剂、抑制酶芳香酶(其调节肾上腺中雌激素产生)的芳香酶抑制剂和抗雄激素;以及曲沙他滨(1,3-二氧杂环戊烷核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,核酶诸如VEGF表达抑制剂和HER2表达抑制剂;疫苗,PROLEUKIN® rIL-2;LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂;ABARELIX®rmRH;长春瑞滨和埃斯佩拉霉素以及上述物质中任何物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0218] 与放疗法联合使用

[0219] 本公开还提供了抗体与放疗法(即,用于在肿瘤细胞内局部诱导DNA损伤的任何机制,诸如γ辐射、X-射线、UV辐射、微波、电子发射等)的联合。还设想了使用将放射性同位素定向递送至肿瘤细胞的联合疗法,并且所公开的抗体可以与靶向抗癌剂或其他靶向手段联合使用。通常,放射疗法以脉冲方式在约1周至约2周的时间段内施用。可以将放射疗法施用给患有头颈癌的受试者,施用约6周至7周。任选地,放射疗法可以作为单一剂量或作为多个剂量依次施用。

[0220] 药物包和试剂盒

[0221] 还提供了包含一个或多个容器的药物包和试剂盒,该一个或多个容器包含一个或多个剂量的抗体或其抗原结合部分。在某些实施方案中,提供了单位剂量,其中单位剂量含有预定量的组合物,该组合物包含例如抗体或其抗原结合部分,并具有或不具有一种或多种附加药剂。对于其他实施方案,这样的单位剂量在用于注射的单次使用的预填充注射器中提供。在其他实施方案中,单位剂量中含有的组合物可包含盐水、蔗糖等;缓冲剂,诸如磷酸盐等;和/或在稳定且有效的pH范围内配制。备选地,在某些实施方案中,组合物可以作为冻干粉末提供,其可以在添加合适的液体例如无菌水或盐水溶液后重构。在某些优选的实施方案中,组合物包含抑制蛋白质聚集的一种或多种物质,这些物质包括但不限于蔗糖和精氨酸。容器上的或与容器相关的任何标签表明,所封装的组合物用于治疗选择的肿瘤疾病病况。

[0222] 本公开还提供了用于产生抗体和任选的一种或多种抗癌剂的单剂量或多剂量施用单位的试剂盒。该试剂盒包含容器和容器上的或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成,并且盛有药学上有效量的所公开的抗体或其抗原结合部分。在其他优选的实施方案中,容器包含无菌入口(例如,容器可为静脉注射溶液袋或具有可由皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。此类试剂盒通常含有在合适的容器中的抗体的药学上可接受的制剂以及任选地在相同或不同容器中的一种或多种抗癌剂。试剂盒也可以含有用于诊断或联合治疗的其他药学上可接受的制剂。例如,除了本公开的抗体或其抗原结合部分之外,此类试剂盒可以含有一系列抗癌剂中的任何一种或多种抗癌剂,诸如化疗或放疗药物;抗血管生成剂;抗转移剂;靶向抗癌剂;细胞毒性剂;和/或其他抗癌剂。

[0223] 更具体地,试剂盒可具有盛有所公开的抗体或其抗原结合部分并含有或不含有额外组分的单个容器,或者试剂盒可具有用于每种期望药剂的不同容器。备选地,试剂盒的抗体和任何任选的抗癌剂可以在施用于患者之前分开保存在不同的容器中。试剂盒还可以包括用于容纳无菌的、药学上可接受的缓冲液或其他稀释剂诸如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、林格氏溶液和葡萄糖溶液的第二/第三容器装置。

[0224] 当试剂盒的组分在一种或多种液体溶液中提供时,液体溶液优选地为水溶液,并

且特别优选的是无菌水溶液或盐水溶液。然而,试剂盒的组分可以作为干燥粉末提供。当试剂或组分作为干燥粉末提供时,可通过添加合适的溶剂来重构粉末。考虑了溶剂也可以在另一个容器中提供。

[0225] 如上文简要指出的,试剂盒还可以含有将抗体或其抗原结合部分和任何任选的组分施用于患者的装置,例如,一个或多个针、静脉注射袋或注射器,或甚至滴眼管、移液管或其他此类类似设备,制剂可以从该装置注射或引入到动物体内或施用于身体的患病区域。本公开的试剂盒通常还包括用于容纳小瓶等的装置,以及用于商业销售的严密封闭的其他部件,诸如例如,将期望的小瓶和其他设备放置并保持在其中的注射或吹塑塑料容器。

[0226] 序列表概要

[0227] 本申请所附的序列表包括许多氨基酸序列和核苷酸序列。下表A、B和C提供了本文示例的抗体的序列概述,包括W301088-1.145.16、其嵌合形式W301088-1.145.16-xlgG1KV320和人源化形式W301088-1.145.16-z3-p1-ulgG1KV320。W301088-1.145.16-xlgG1KV320具有与W301088-1.145.16亲本鼠克隆相同的可变区。

[0228] 表A.W301088-1.145.16-xIgG1KV320(即嵌合抗体)的氨基酸序列,其中CDR部分加下划线

[0229]

VH SEQ ID No: 8	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFP GNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSV TSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA
VL SEQ ID No: 9	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAW YQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK
重链 SEQ ID No: 14	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFP GNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSV TSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
轻链 SEQ ID No: 15	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAW YQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQ AEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0230] 表B.W301088-1.145.16-z3-pl-uIgG1KV320(即最终先导抗体)的氨基酸序列,其中CDR部分加下划线

[0231]

VH SEQ ID No: 10	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHP GKGLEWIGYISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSS
VL SEQ ID No: 11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIK

[0232]

重链 SEQ ID No: 12	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHP GKGLEWIGYISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
轻链 SEQ ID No: 13	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC

[0233] 表C.编码W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的VH区和VL区的核苷酸序列

[0234]

VH SEQ ID No: 16	CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCATCTCAGA CACTGAGCCTGACATGTACCGTGACCGATTATAGCATCACCGGCGACTA CGCTTGGAATTGGATCAGACAGCACCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGAT TGGATACATCAGCTATTCTGGCAGCACATCTTATAATCCTAGCCTGCAG TCTAGGGTGACAATTTCAAGAGATACCAGCAAAAATCAGTTTAGCCTGA AACTGAGCTCTGTGACCGCCGCCGATACAGCCGTGTATTTTTGTGCCAG AAGCCTGGGAAGAAGATGGTATTTTGTGGTGTGGGGACAGGGCACAAC AGTGACCGTGTCTAGC
VL SEQ ID No: 17	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCG AGAGAGCCACAATCAATTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGCAGAGCTC TAATCAGAAAAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCT CCTAAGCTGCTGATCTACTTTGCCAGCACAAGGGAATCTGGAGTGCCTG ATAGGTTTAGCGGCAGCGGCTCTGGCACAGATTTTACACTGACAATCTC TAGCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTATTATTGTCAGCAGCACTAT TCTGCCCCTTGGACATTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAGATTAAG

[0235] 实施例

[0236] 通过参考以下实施例,将更容易理解如此一般性描述的本公开,这些实施例是通过举例说明的方式提供的,并且不旨在限制本公开。实施例并不旨在表示下面的实验是所实施的全部实验或是仅实施了的实验。

[0237] 实施例1

[0238] 抗原、基准抗体和细胞系的制备

[0239] 1.1商业材料的制备

[0240] 表1.市售材料的信息

[0241]

材料	供应商	目录号
MCF7	ATCC	HTB-22
CHOK1	ATCC	CTL-61
Expi293™表达系统试剂盒	Invitrogen	A14635
Expi293F™表达培养基	Invitrogen	A1435101
Flp-In™-CHO细胞系	Invitrogen	R75807
TMB单一溶液	Invitrogen	002023
Lipofectamine™ 2000转染试剂	Invitrogen	11668027
FreeStyle™ CHO表达培养基	Gibco	12651014
Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Calcein AM	Invitrogen	C3099
pHrodo iFL Red STP	Invitrogen	P36011
NuPAGE4%-12% Bis-Tris凝胶	Invitrogen	NP0322BOX
10×PBS	Invitrogen	AM9624
RPMI培养基1640（1×）	Gibco	22400089
0.25%胰蛋白酶-EDTA（1×）	Gibco	25200072
FBS	ExCell Bio	FND500
4% PFA	DING GUO	AR-0211
BSA	BOVOGEN	BSAS 1.0
DPBS	CORNING	21-031-CVC
Ni柱	Cytiva	173712
蛋白A柱	Cytiva	175438
TSKgel G3000SWXL柱	Tosoh	0008541
山羊抗人IgG-Fc-HRP	Bethyl	A80-304P
山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP	Bethyl	A90-231P
山羊抗小鼠IgG1	Bethyl	A90-205A
山羊抗小鼠IgG2a	Bethyl	A90-207A
山羊抗小鼠IgG2b	Bethyl	A90-209A
山羊抗小鼠IgG3	Bethyl	A90-211A
山羊抗小鼠IgG-Fc Alexa 647	Jackson ImmunoResearch	115-605-164
Alexa 647山羊抗人抗体	Jackson ImmunoResearch	109-605-098

[0242]

山羊抗小鼠IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch	115-115-164
山羊抗人IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch	109-115-098
抗人Fc IgG	Jackson ImmunoResearch	109-005-098
抗小鼠Fc IgG	SouthernBiotech	1013-01
山羊抗小鼠κ轻链HRP	Southern Biotech	A90-119P
山羊抗小鼠λ轻链HRP	Southern Biotech	A90-121P
F(ab')2山羊抗人IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch	109-006-098
F(ab')2-山羊抗小鼠IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch	115-005-064
人B7-H3/CD276蛋白质，His标签（2IgB7H3）	ACROBiosystems	B73-H52E2
食蟹猴B7-H3/CD276蛋白质，His标签	ACROBiosystems	B73-C52Ha
S系列传感器芯片CM5	Cytiva	29-1496-03
胺偶联试剂盒	Cytiva	BR100050
10×HBS-EP+	Cytiva	BR100669

[0243] 1.2抗原产生

[0244] 编码人4IgB7H3的胞外结构域的氨基酸序列(Uniprot ID:Q5ZPR3,氨基酸29-461)首先进行密码子优化以用于哺乳动物表达,然后由Sangon Biotech(中国上海)合成。将该DNA片段亚克隆到在C末端具有6xHis的pcDNA3.3表达载体中,然后将其转染到Expi293F细胞(Invitrogen,A14635)中。温育五天后,使用Ni柱(Cytiva,173712)纯化上清液。将洗脱的蛋白质经由透析袋(Spectrum-888-10987,MWCO 3.5kDa)透析到PBS中。通过在NanoDrop装置上280nm处的吸光度确定蛋白质浓度。将2μg纯化的蛋白质在含有和不含有还原剂的SDS-PAGE凝胶(Invitrogen)上电泳。利用TSKgel G3000SWXL尺寸排阻柱(Tosoh,008541),通过HPLC-SEC定量纯化的蛋白质的纯度。将纯化的抗体保存于-80℃。人2IgB7H3和食蟹猴B7H3购自ACRO(目录号B73-H52E2)和ACRO(目录号B73-C52Ha)。

[0245] 1.3基准抗体(BMK)的产生

[0246] 抗B7H3抗体依诺妥珠单抗(MacroGenics,US20120294796A1:Seq 117、119)用作基准抗体。编码抗体的可变结构域的核酸序列首先进行密码子优化以用于哺乳动物表达,然后由Sangon Biotech(中国上海)合成。然后将DNA片段亚克隆到具有人IgG1的恒定区的修饰的pcDNA3.4表达载体中。将含有VH和VL基因的质粒共转染到Expi293F细胞(Invitrogen,A14635)中。温育五天后,使用蛋白A柱(Cytiva,175438)纯化上清液。将洗脱的蛋白质经由透析袋(Spectrum,888-10987)透析到PBS中。通过在NanoDrop装置上280nm处的吸光度确定蛋白质浓度。将2μg纯化的蛋白质在含有和不含有还原剂的SDS-PAGE凝胶(Invitrogen)上电泳。利用TSKgel G3000SWXL尺寸排阻柱(Tosoh,008541),通过HPLC-SEC定量纯化的抗体的纯度。将纯化的抗体保存于-80℃。

[0247] 1.4稳定的细胞系/细胞池的建立

[0248] 产生表达人4IgB7H3的细胞系。简言之,根据制造商的方案,使用Lipofectamine2000转染试剂盒(Invitrogen,11668027),用含有全长4IgB7H3的pcDNA3.3表达载体转染CHOK1细胞。在转染后48小时,将细胞传代培养至T75烧瓶中的选择性培养基(含有10％FBS和15μg/mL杀稻瘟菌素的F12-K)中。两次或三次传代选择后,通过杀稻瘟菌素选择和有限稀释获得人4IgB7H3表达稳定的细胞系(W3XX088-CHOK1.hPro 1.2A5),并使用抗B7H3抗体通过FACS测定表达水平。

[0249] 产生表达食蟹猴B7H3的细胞池。简言之,根据制造商的方案,使用Lipofectamine 2000转染试剂盒(Invitrogen-11668027),用含有全长食蟹猴B7H3的pcDNA5/pOG44表达载体转染FlipinCHO细胞。在转染后48小时,将细胞传代培养至T75烧瓶中的选择性培养基(含有10％FBS和600μg/mL潮霉素B的F12)中。两次或三次传代选择后,通过潮霉素B选择和BD FACSMelody™细胞分选获得高表达稳定的细胞池(WBP3XX088-FlpinCHO.cProl.pool)。

[0250] 实施例2

[0251] WBP301088抗体的产生

[0252] 2.1动物免疫

[0253] 用编码人4IgB7H3的DNA质粒免疫6周龄-8周龄的4只Balb/c小鼠,每只小鼠免疫200μg-400μg编码人4IgB7H3的DNA质粒。佐剂混合物包括Adju-Phos、CpG-ODN和GM-CSF。每隔一周经由皮下、肌内和流体动力学尾静脉注射动物一次。在3次注射后(第一次取血)和5次注射后(第二次取血)自小鼠采集血液。通过ELISA和FACS测量血清滴度。

[0254] ELISA测定法用于测量针对4IgB7H3抗原的血清抗体滴度。用100μL His标签以0.5

μg/mL包被板(Nunc),在4℃过夜,然后用封闭缓冲液(2％BSA的PBS溶液)在环境温度封闭1小时。然后洗涤板,并在环境温度与1μg/mL抗原温育1小时。洗涤后,小鼠血清自1:100稀释度开始在封闭缓冲液中以1:3系列稀释,并在环境温度温育2小时。然后洗涤板,随后与二抗山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP(Bethyl,A90-231P)温育1小时。洗涤后,加入TMB底物,并用2M HCl终止相互作用。使用微板读数器(Molecular Device)读取450nm处的吸光度。血清滴度在2倍背景下测定。

[0255] 表2.通过ELISA对人4IgB7H3结合的血清滴度测试的汇总

[0256]

滴度	小鼠#1	小鼠#2	小鼠#3	小鼠#4
第2次取血	218700	1968300	656100	1968300
第1次取血	218700	218700	656100	218700
取血前	<100	<100	<100	<100

[0257] FACS测定法用于测量针对4IgB7H3抗原的血清抗体滴度。简言之,将经工程改造的表达B7H3的细胞以1×10^5个细胞/孔的密度接种到96孔U底板中,在4℃以1500rpm离心4分钟,然后去除上清液。将小鼠血清白1:100稀释度开始以1:3系列稀释在1×PBS/1％BSA中,以重悬细胞,并在4℃温育1小时。用180μL 1×PBS/1％BSA洗涤细胞两次。将二抗山羊抗小鼠IgG-Fc Alexa 647(Jackson,109-605-098)添加到重悬细胞中并在4℃避光温育30分钟,然后用180μL 1xPBS/1％BSA洗涤。最后,将细胞重悬于100μL 1xPBS/1％BSA中,并通过FACS(BD Canto II)测量荧光强度,并通过FlowJo版本软件分析。血清滴度在2倍背景下测定。

[0258] 表3.通过FACS对人4IgB7H3细胞系的血清滴度测试的汇总

[0259]

滴度	小鼠#1	小鼠#2	小鼠#3	小鼠#4
第2次取血	218700	1968300	1968300	接近1968300

[0260] 当血清滴度足够高时,在融合前用400μg DNA经由流体动力学尾静脉和4×10^6个MCF-7细胞经由足垫和皮下进行最后一次增强免疫。淋巴结和脾用于细胞融合。

[0261] 2.2杂交瘤产生

[0262] 将来自免疫小鼠的淋巴结和脾均质化并过滤以去除血块和细胞碎片。收集呈对数生长的Sp2/0骨髓瘤细胞并离心。按照一般的电融合程序,在电融合溶液中以1:1的比例将B细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合。将融合的细胞悬浮在补充有20％FBS和1X HAT的DMEM培养基中,然后转移到96孔板(CORNING)中。将融合的细胞在设定为37℃、5％CO_2的培养箱中培养10天～14天。

[0263] 2.3抗体筛选

[0264] 第一次筛选:基于细胞的ELISA测定法用作第一次筛选以测试杂交瘤上清液与人4IgB7H3的结合。简言之,将人4IgB7H3转染的CHOK1细胞系以5×10^3个细胞/孔的密度接种于96孔板(CORNING)中,然后在设置为37℃、5％CO_2的培养箱中保持2天。然后洗涤板,并在环境温度与杂交瘤上清液温育1小时。然后洗涤板,随后与二抗山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP(Bethyl,A90-231P)温育1小时。洗涤后,加入TMB底物,并用2M HCl终止相互作用。使用微板读数器(Molecular Device)读取450nm处的吸光度。

[0265] 第二次筛选:为了证实杂交瘤上清液与人和食蟹猴抗原的结合,进行FACS。亲本CHOK1细胞系和4IgB7H3转染的CHOK1细胞系用CellTrace染料(分别为Violet和FarRed)染

色,而B7H3转染的FlipinCHO细胞池不用染料制备。在环境温度温育15分钟并洗涤后,将三种类型的细胞等量混合至1×10^{6}个细胞/mL。将三种细胞混合物以1×10^{5}个细胞/孔的密度转移到96孔U底板(BD)中。然后将杂交瘤上清液转移到板,并在4℃温育1小时。洗涤后,加入二抗山羊抗小鼠IgG Fc PE(Jackson,115-115-164)并在4℃与细胞在黑暗中温育0.5小时。然后洗涤细胞,重悬于1×PBS/1%BSA中,然后通过流式细胞术分析。

[0266] 为了测试杂交瘤上清液与人2IgB7H3的结合,使用常规的ELISA测定法。在环境温度,用100μL/孔的人2IgB7H3(0.2μLg/mL)预包被板,保持1小时。用200μL/孔的1×PBS/2%BSA封闭1小时后,用1×PBST将板洗涤3次。将杂交瘤上清液以100μL/孔的体积加入到板中,并在环境温度温育2小时。用1×PBST将板洗涤3次后,将100μL/孔的山羊抗小鼠IgG-Fc HRP(Bethyl,A90-231P)加入到板中,并在环境温度温育1小时。洗涤6次后,通过将TMB底物以100μL/孔分配5分钟-10分钟来使颜色显色,然后通过加入100μL/孔的2M HCl使反应停止。使用微板读数器读取450nm处的吸光度。

[0267] 通过SPR(表面等离子体共振)进一步证实通过FACS筛选的选定的阳性细胞系。SPR允许实时、无标记地检测生物分子相互作用。当偏振光撞击两种介质之间的界面处的导电表面时,发生SPR。这产生了称为等离子体的电子电荷密度波,以与传感器表面上的质量成比例地降低称为共振角的特定角度下的反射光强度。

[0268] 使用Biacore 8K对上清液与人4IgB7H3的结合分级。通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活,保持420秒。然后以10μL/分钟的流速将山羊抗小鼠Fc IgG(30μg/mL,在10mM NaAc中,pH 4.5)注射到通道,保持420秒。用1M乙醇胺-HCl将芯片去激活。将上清液以10μL/分钟的流速注射到通道,保持30秒。将200nM人4IgB7H3分析物以30μL/分钟的流速注射到通道,保持120秒的结合期,随后300秒的解离。在解离期后注射甘氨酸(10mM,pH 1.5),作为再生缓冲液。将传感图与参考通道和缓冲液通道相减。然后用1:1的Langmuir结合模型对数据进行拟合。

[0269] pHrodo iFL染料可以与生物分子(诸如抗体)缀合,并且仅当在存在于酸性环境(诸如细胞溶酶体和核内体)中时才变成高度荧光的。这使得能够在活细胞测定中检测缀合的生物分子。用pHrodo iFL Red STP酯胺反应性染料标记AffiniPure F(ab′)^{2}片段山羊抗人IgG Fcγ和抗小鼠IgG Fcγ,并根据制造商的说明书通过Zeba Spin脱盐柱纯化。将表达人全长B7H3的MCF-7细胞(2×10^{4}个细胞/孔)接种到用8μg/mL聚-D-赖氨酸预包被的96孔透明底黑色板中。细胞在设定为37℃、5%CO_2的培养箱中生长过夜。第二天,将WBP301088-1阳性细胞系上清液以100μL的体积加入到相应的孔中。将细胞在设定为37℃、5%CO_2的培养箱中温育0.5小时。人和小鼠IgG1同种型抗体用作阴性对照。以100μL/孔的体积加入50nM pHrodo iFL Red/F(ab′)^{2}山羊抗小鼠或抗人IgG Fcγ缀合物(用完全培养基稀释)。然后将板在设定为37℃、5%CO_2的培养箱中避光温育5小时。温育后,弃去上清液。用完全培养基洗涤板。将混合染料溶液(1μg/mL Hoechst 33342和0.5μg/mL在DPBS中稀释的Calcein AM)以100μL/孔的体积加入到板中,并在环境温度保持15分钟。温育后,弃去染料溶液,并用1 × PBS/1%BSA将板洗涤一次。通过Perkin Elmer Operetta CLS高含量分析系统读取和分析MCF-7细胞的荧光强度。

[0270] 在初步筛选中测试总共8460个孔,在24孔板中选择279个杂交瘤并扩增。在第二次筛选中,使用来自24孔板的上清液来证实针对人4IgB7H3和食蟹猴B7H3的强结合、针对人

2IgB7H3的弱结合以及被MCF-7的强内化活性。基于第二次筛选结果,选择WBP301088-1.145杂交瘤用于亚克隆。

[0271] 2.4抗体亚克隆

[0272] 使用选定的阳性杂交瘤细胞进行亚克隆。对呈对数生长的细胞计数,并加入1.5mL半固体HAT培养基中。将细胞在涡旋振荡器中轻轻混合5秒-10秒,然后接种在6孔板(CORNING)中。将板在设定为37℃、5%CO_2的培养箱中保持7天～8天。挑取每个可见的单菌落到96孔板(CORNING)中,这些板具有补充有10%FBS的DMEM培养基。2天～3天后,收集细胞上清液,并使用如上所述的抗体筛选方案,通过基于细胞的ELISA筛选(人4IgB7H3)、基于常规ELISA筛选(人2IgB7H3)。在通过FACS对人4IgB7H3和食蟹猴B7H3亚克隆确认性筛选后,收集选定的单阳性克隆的培养上清液,并纯化抗体以供进一步表征。在亚克隆筛选和确认性筛选后获得WBP301088-1.145.16。

[0273] 2.5抗体同种型分型

[0274] 在96孔高结合板(Nunc)中进行了ELISA同种型分型。每个孔分别用2μg/mL捕获抗体山羊抗小鼠IgG1(Bethvl,A90-205A)、山羊抗小鼠IgG2a(Bethyl,A90-207A)、山羊抗小鼠IgG2b(Bethvl,A90-209A)、山羊抗小鼠IgG3(Bethyl,A90-211A)包被,在4℃过夜,并用1×PBS/2%BSA封闭。将杂交瘤上清液在包被的孔中温育,并使用过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠r/k轻链抗体测量抗体与固定在板上的捕获抗体的特异性结合。通过加入TMB底物检测HRP信号,12分钟后使用2M HCl终止反应。所有温育步骤均在环境温度进行,并且在各步骤之间用PBS洗涤板。使用微板读数器(Molecular Device)读取450nm处的吸光度。

[0275] WBP301088-1.145.16的同种型分型结果示于下表(表4)。

[0276] 表4.WBP301088-1.145.16的同种型分型结果

[0277]

克隆编号	同种型
WBP301088-1.145.16	IgG2b,κ

[0278] 2.6抗体产生

[0279] 当需要少量纯化抗体时,T75烧瓶(CORNING)通常用于进行杂交瘤细胞培养规模的扩大。将单克隆杂交瘤细胞以5×10^6至1×10^7个细胞/T75烧瓶接种到烧瓶。使细胞连续生长约7天-10天,直到细胞成活力达到约30%-40%。收获培养上清液,并通过离心去除细胞碎片。将上清液无菌过滤并保存用于抗体纯化。

[0280] 2.7杂交瘤测序

[0281] 按照TaKaRa MiniBEST通用型RNA提取试剂盒的说明书,首先提取杂交瘤细胞样品的总RNA。然后使用来自Clonetech的SMART RACE cDNA扩增试剂盒将RNA转变为cDNA。然后用30个PCR循环从cDNA扩增VH和VL结构域DNA序列,每个循环在94℃变性30秒,在60℃退火30秒,然后在72℃延伸30秒。然后将PCR产物亚克隆到TA克隆载体中,然后送往Biosune Biotech(中国上海)进行测序。

[0282] 一旦测序数据证实杂交瘤细胞样品的单克隆性,就通过PCR扩增VH和VL结构域的DNA序列。引物由Sangon Biotech(中国上海)合成。然后将DNA片段亚克隆到具有LALA突变的人IgG1恒定区的pcDNA3.4表达载体中,然后通过Tsingke Biotechnology(中国北京)测序。

[0283] 2.8 IgG转变

[0284] 一旦测序数据证实杂交瘤细胞样品的单克隆性,则将VH和VL结构域的氨基酸序列进行密码子优化以用于哺乳动物表达,然后由Sangon Biotech(中国上海)合成。然后将DNA片段亚克隆到具有LALA突变的人IgG1恒定区的pcDNA3.4表达载体中。

[0285] 以这种方式,将W301088-1.145.16转变成具有LALA突变形式的人IgG1,以获得嵌合抗体W301088-1.145.16-xIgG1KV320。在蛋白A纯化和缓冲液交换后,通过SDS-PAGE和SEC-HPLC表征。在还原条件下,该蛋白质在SDS-PAGE上以50kDa和25kDa的表观分子量迁移,对应于IgG重链和轻链(数据未示出)。纯度高于99%(SEC-HPLC)。

[0286] 表5.嵌合抗体产生的汇总

[0287]

蛋白质名称	浓度(mg/mL)	缓冲液	通过SEC-HPLC测定的纯度(%)	理论分子量
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	2.50	PBS	99.64%	147 kDa

[0288] 2.9人源化

[0289] 运行开源软件ANARCI(Dunbar J、Deane CM,“ANARCI:antigen receptor numbering and receptor classification”,Bioinformatics,2015年;第32卷第5期:第298-300页)的本地副本以在W301088-1.145.16上分配Kabat编号。根据Dr.Martin网站的定义鉴定CDR(Martin,2018年,出处同上),并示于表6中。

[0290] 表6.根据Dr.Martin抗体信息学网站定义的CDR范围

[0291]

CDR	Kabat	前面的残基	后面的残基	长度
L1	L24-L34	总是C	总是W	10个至17个残基
L2	L50-L56	L1后的16个残基	/	7个残基
L3	L89-L97	总是C	总是F-G-X-G	7个至11个残基
H1	H31-H35b	总是C-X-X-X	总是W	10个至12个残基
H2	H50-H65	通常为L-E-W-G	K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A	16个至19个残基
H3	H95-H102	通常为C-A-R	总是W-G-X-G	3个至25个残基

[0292] 表7.W301088-1.145.16的VH和VL氨基酸序列,其中CDR序列加下划线

[0293]

克隆ID		氨基酸序列
W301088-1.145.16	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA
	VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK

[0294] 表8.W301088-1.145.16的经鉴定的重链和轻链CDR序列

[0295]

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
W301088-1.145.16	SEQ ID No: 1	SEQ ID No: 2	SEQ ID No: 3	SEQ ID No: 7	SEQ ID No: 5	SEQ ID No: 6
	DYSITGDYAWN	YISYSGSTSYNPSLQS	SLGRRWYFVV	KSSQSLLNSSNQKNYLA	FASTRES	QQHYSAPWT

[0296] 将鼠抗体W301088-1.145.16的VH和VL结构域序列分别与IMGT的VH和VL结构域的人种系序列库比对。选择相对于W301088-1.145.16的VH/VL结构域序列在构架中具有最小数目氨基酸差异的VH/VL结构域的人种系序列作为VH/VL结构域的人源化模板。IGHV4-31*02与IGHJ6*01的组合和IGKV4-1*01与IGKJ4*01的组合分别是与W301088-1.145.16的VH和VL结构域序列最同源的人种系序列。将W301088-1.145.16的CDR移植到这两个人种系模板的构架中,以构成种系序列。

[0297] 根据经验选择构架中的几个“回复突变”位置,以将种系序列中的氨基酸转变为它们在原始鼠序列中的对应氨基酸。根据经验设计一组人源化变体以研究这些选定回复突变位点的不同组合。在VL结构域的16个位置处和VH结构域的20个位置处,种系序列不同于原始鼠W301088-1.145.16序列。对于回复突变考虑总共36个不同位点中的14个位点:VH:Q001D、S025T、H040F、K043N、G044K、I048M、V067I、V071R、A085E、V089T、Y091F,VL:I021M、P043S、Y087F。根据经验设计一组人源化变体以测试这些回复突变的不同组合。

[0298] 2.11 PTM去除

[0299] 扫描人源化变体的VH和VL结构域序列的若干类型的关键翻译后修饰(PTM)位点:CDR中的天冬酰胺脱氨(N-G和N-S)、CDR中的天冬氨酸异构化(D-G)、整个长度上的未配对C和整个长度上的N-连接糖基化位点(N-X-S/T,其中X可以是除P以外的任何氨基酸)。根据经验设计点突变以去除人源化变体中的这些关键PTM位点,以避免PTM修饰的潜在风险。最后,我们选择与亲本抗体相比不影响表达、结合和热稳定性的PTM去除抗体。

[0300] 由于鼠抗体W301088-1.145.16的VL结构域序列含有N-S-S N连接的糖基化位点。设计了三个点突变,为VL:N027dQ;VL:S027eP和VL:S027fA(根据Kabat编号),以去除关键的PTM位点。它们与人源化变体一起进一步通过k_{off}分级表征。

[0301] 2.12通过SPR的koff分级

[0302] 在Biacore 8K设备上执行经过滤上清液的k_{off}分级。首先以10μL/分钟的流速用400mM EDC和100mM NHS(GE)将CM5传感器芯片激活,保持420秒。然后以10μL/分钟的流速将10mM NaAc(pH 4.5)中的30μg/mL抗人Fc IgG(Jackson)注射到通道1至8中,保持420秒。然后以10μL/分钟的流速用1M乙醇胺-HCl(GE)将芯片去激活,保持420秒。以10μL/分钟的流速将稀释的抗体上清液注射到通道的Fc2。不具有质粒转染的细胞培养物的上清液用作阴性对照,并以10μL/分钟的流速注射到通道的Fc1。将100nM人4IgB7H3和运行缓冲液以3%L/分钟的流速依次注射到通道的Fc1-Fc2,保持180秒的结合期,随后3600秒的解离期。每次运行后注射10mM甘氨酸(pH 1.5)以使芯片再生。通过Biacore 8K设备附带的软件分析传感图。将样品的传感图与参考通道和缓冲液通道相减。然后用1:1的Langmuir结合模型对数据进行拟合。

[0303] 2.13 PTM去除突变与人源化变体的组合

[0304] 将示出最佳k_{off}速率的PTM去除点突变组合到具有最优k_{off}速率逐点诱变的人源化变体中,以构成用于亲和力验证的最终构建体。

[0305] 根据k_{off}速率,将VL:N027dQ的PTM去除突变与四个选定的人源化突变氨基酸S025T、V071R、Y091F、V089T组合构成最终先导。将最终先导称为W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320。

[0306] 表9.W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的重链和轻链CDR序列

[0307]

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	SEQ ID No: 1	SEQ ID No: 2	SEQ ID No: 3	SEQ ID No: 4	SEQ ID No: 5	SEQ ID No: 6
	DYSITG DYAWN	**YISYSGS TSYNPS LQS**	**SLGRRW YFVV**	**KSSQSLL QSSNQKN YLA**	**FASTRES**	**QQHYSAP WT**

[0308] 2.14生产规模的瞬时转染和纯化

[0309] 使用ExpiFectamine™瞬时转染试剂盒,将最终浓度为1μg/mL的各质粒瞬时转染至20mL Expi293F细胞,细胞密度为3.0×10^6个细胞/mL,并且细胞成活力超过95%。细胞培养物在加湿水平振荡器中生长,旋转速度为150rpm。温度保持在37℃,而CO_2水平保持在8%。

[0310] 细胞培养物温育5天后,收集表达靶抗体的上清液,并过滤,使用GE MabSelect SuRE蛋白A柱(Cytiva,175438)纯化。所洗脱的抗体经由D-Tube透析器Maxi(EMDMillipore 71 508,MWCO 3.5kDa)透析到PBS中。通过在NanoDrop装置上280nm处的吸光度确定抗体浓度。将2μg纯化的抗体样品在含有和不含有还原剂的SDS-PAGE凝胶(Invitrogen NuPAGE™ 4%-12%Bis-Tris蛋白质凝胶)上电泳。利用TSKgel G3000SWXL尺寸排阻柱(Tosoh,008541)通过HPLC-SEC定量纯化的抗体样品的纯度。将纯化的抗体保存在-80℃。

[0311] 实施例3

[0312] WBP301088抗体的体外表征

[0313] 3.1 SDS-PAGE和通过SEC-HPLC的纯度检测

[0314] 将样品与上样缓冲液混合,并使用干燥浴在75℃加热10分钟。样品上样后,SDS-PAGE在恒定电压(200V)下电泳35分钟。将凝胶染色并用eStain™ L1脱色。使用BIO-RAD成像系统获得SDS-PAGE结果。

[0315] 结果汇总于下表10中。在还原条件下,该蛋白质在SDS-PAGE上以50kDa和25kDa的表观分子量迁移,对应于IgG重链和轻链,而在非还原条件下,以预期的约150kDa带迁移(图1)。

[0316] 3.2通过SEC-HPLC的纯度检测

[0317] 通过配有TSKgel G3000SWXL柱(Tosoh Bioscience,0008541)的Agilem 1260Infinity II系统(Agilent Technologics™)检测每种抗体的纯度。将适当体积的样品(5μL-100μL)注射到柱中,并以1mL/分钟的流速分离20分钟。运行缓冲液为50mM磷酸钠,150mM NaCl,pH 7.0。用280nm波长的UV光检测峰保留。采用SEC-HPLC分析法将从4.5分钟至10.5分钟的所有峰面积积分来分析每种抗体的纯度。操作和分析软件为OpenLab CDS工作站(v2.3.0.443或v2.2.0.484)。

[0318] 结果汇总于下表10中。最终先导的纯度高于99%(SEC-HPLC,图2)。

[0319] 3.3通过DSF的热稳定性(T_m)

[0320] 使用QuantStudio® 7Flex实时PCR系统(Applied Biosystems)研究各抗体的T_m(熔融温度)。将19μL抗体溶液与1μL SYPRO Orange溶液(Invitrogen)混合并转移到96孔板(Applied Biosystems)。将板用光学粘合膜(Applied Biosystems)密封,并以3,000rpm离心5分钟以去除任何气泡。以0.9℃/分钟的速率将板从26℃加热至95℃,并收集所得的荧光数据。计算荧光随不同温度变化的负导数,将最大值定义为熔融温度T_m。如果蛋白质具有多

个解折叠转变,则报道第一个T_m,将它命名为T_m1。数据收集和T_m计算通过QuantStudio®实时PCR软件(v1.3)自动进行。

[0321] 将蛋白质W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的T_m值定义为荧光随不同温度变化的负导数的最大值,如下表10所列出的。数据分布示于图3,其中虚线表示T_m1值在荧光曲线中的位置。W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的T_m1为70.1℃,这表明它具有良好的热稳定性。

[0322] 3.4通过HIC-HPLC的疏水性检测

[0323] 通过HPLC 1260 Infinity II系统(Agilent Technologics™)用TSKgel丁基-NPR柱(Tosoh-0042168)检测抗体的疏水性特性。用PBS缓冲液将各样品稀释至0.5mg/mL,将20μL稀释的样品注射到柱中,并以0.5mL/分钟的流速分离61分钟。运行缓冲液是25mM磷酸钠,pH 7.0(缓冲液A)和25mM磷酸钠、1.5M$(NH_4)_2SO_4$,pH 7.0(缓冲液D)。3分钟至53分钟的运行梯度为0%至100%缓冲液D。用280nm和230nm波长的UV光检测峰保留。采用HIC-HPLC分析法将从20分钟至40分钟的所有峰面积积分来分析保留时间。操作和分析软件为OpenLab CDS工作站(v2.6.0.691)。

[0324] 蛋白质W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的HIC保留时间为23.52分钟(表10和图4),这表明它是一种具有良好亲水性的抗体。

[0325] 3.5通过DLS的扩散相互作用参数(k_D)

[0326] 使用DynaPro读板机III(Wyatt Technology)研究DLS-k_D测量结果。在样品制备过程中,在解冻、过滤和浓缩时记录样品的外观。将样品浓缩至超过20mg/mL,然后用PBS缓冲液稀释至2.5mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL和20mg/mL的最终浓度。然后将7.5μL样品溶液加入到1536孔微板(Aurora,ABI1-00110A)中。用ClearSeal膜(Hampton Research,HR4-521)密封板,并以3,000rpm离心5分钟,使样品下降到孔的底部。每个样品一式两份在孔中测试。将板放到相应位置中,并通过DYNAMICS操作软件(v7.8.1.3)进行数据收集。收集每个蛋白质样品的5次采集,同时每次采集时间为5秒。对于每次测量,确定扩散系数并针对蛋白质浓度作图。k_D值由软件(v7.8.1.3)自动计算,如表10所列出的。数据分布示于图5中。蛋白质W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320在PBS中的k_D为-5.17mL/g,这表示它是一种具有高溶解度的抗体。在测定过程中,同时记录蛋白质的外观,在解冻并轻轻摇动后观察到一些颗粒。如果将缓冲液换成20mM His、8%蔗糖、0.02%PS80,pH 6.5,则观察不到颗粒。

[0327] 上述SDS-PAGE、SEC-HPLC、HIC-HPLC、DSF和DLS结果汇总在表10中。

[0328] 表10.W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的分析数据汇总

[0329]

抗体名称	通过SEC-HPLC的纯度	产率(mg/L)	分子量	pI	HIC保留时间(分钟)	T_m(℃)	DLS-k_D(mL/g)
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	99.26%	416.0	147 kDa	8.54	23.52	70.1	-5.17

[0330] 3.6人B7H3结合(FACS)

[0331] 使用FACS来检测抗体与人B7H3的结合。该方法可以定量分析和鉴定在活细胞表面上表达的特定分子。未标记的细胞用作对照以在检测前设定阈值,并且分析超过荧光强度

阈值的每组的百分比变化。表达人全长B7H3的MCF-7细胞(1×10^5个细胞/孔)与各种浓度的抗体(用1 ×DPBS/1%BSA自50nM至0.0005nM系列稀释3.16倍)以100μL/孔的体积在设定为4℃的冰箱中温育1小时。抗人B7H3参考抗体依诺妥珠单抗(MacroGeneics)用作阳性对照。人IgG1同种型抗体用作阴性对照。在用1×DPBS/1%BSA洗涤细胞后,加入Alexa 647山羊抗人抗体(在1×DPBS/1%BSA中以1:500稀释)。将细胞在设定为4℃的冰箱中避光温育0.5小时。用流式细胞仪测量细胞的平均荧光强度(MFI),并用FlowJo进行分析。使用GraphPad Prism 7软件,通过四参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0332] W301088-1.145.16-z3-p1-ulgG1KV320示出以1.08nM的EC_{50}和19900的最大MFI与表达B7H3的MCF-7细胞良好结合,并且最大MFI为19900,这与嵌合抗体相当并优于参考抗体依诺妥珠单抗(MacroGenics)(表11,图6)。

[0333] 表11.对表达人B7H3的细胞MCF-7的FACS结合数据

[0334]

样品	MCF-7	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	1.16	19800
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	1.08	19900
依诺妥珠单抗（MacroGenics）	2.49	4644
hIgG1同种型	N.A.	47.8

[0335] 注:N.A.是指不可获得。

[0336] 3.7食蟹猴B7H3结合(FACS)

[0337] 使用FACS来检测抗体与食蟹猴B7H3的结合。用食蟹猴B7H3转染FlpinCHO细胞(W3XX088-FlpinCHO.cProl.pool)(1×10^5个细胞/孔),并将其与各种浓度的抗体(用1×DPBS/1%BSA自50nM至0.0005nM系列稀释3.16倍)以100μL/孔的体积在设定为4℃的冰箱中温育1小时。抗人B7H3参考抗体依诺妥珠单抗(MacroGeneics)用作阳性对照。人IgG1同种型抗体用作阴性对照。在用1×DPBS/1%BSA洗涤细胞后,加入Alexa 647山羊抗人抗体(在1×DPBS/1%BSA中以1:500稀释)。将细胞在设定为4℃的冰箱中避光温育0.5小时。用流式细胞仪测量细胞的平均荧光强度(MFI),并用FlowJo进行分析。使用GraphPad Prism 7软件,通过四参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0338] W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320示出以4.68nM的EC_{50}与食蟹猴转染的细胞良好结合,这与嵌合抗体相当并优于依诺妥珠单抗(MacroGenics)(表12,图7)。

[0339] 表12.对食蟹猴B7H3转染的稳定细胞池的FACS结合数据

[0340]

样品	食蟹猴B7H3转染的稳定细胞池	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	5.25	67100
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	4.68	63600
依诺妥珠单抗（MacroGenics）	9.58	19700
hIgG1同种型	N.A.	6.67

[0341] 注:N.A.是指不可获得。

[0342] 3.8人4IgB7H3结合(SPR)

[0343] 使用SPR来测定抗体对人4IgB7H3的亲和力。通过Biacore 8K测定抗体对人

4IgB7H3的亲和力。通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活,保持420秒。然后以10μL/分钟的流速将山羊抗人Fc IgG(30μg/mL,在10mM NaAc中,pH 4.5)注射到通道,保持420秒。用1M乙醇胺盐酸将芯片去激活。将稀释于运行缓冲液(1×HBS-EP+)中的抗体以10μL/分钟的流速注射到通道,保持30秒。将七种浓度(100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、2.125nM和1.563nM)的分析物人4IgB7H3以30μL/分钟的流速依次注射到通道,保持180秒的结合期,随后3600秒的解离。在解离期后注射甘氨酸(10mM,pH1.5),作为再生缓冲液。

[0344] 从测试传感图中减去参考通道和缓冲液通道的传感图。用1:1结合模型对实验数据进行拟合。用于计算的人4IgB7H3的分子量为47.8kDa。

[0345] 通过Biacore 8K评估软件附带的1:1结合模型对实验数据进行拟合。如表13和图8A-图8C所示,W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320示出对人4IgB7H3的高结合亲和力。K_D值为7.08E-11M,其优于依诺妥珠单抗(MacroGenics)。

[0346] 表13.与人4IgB7H3结合的抗体亲和力结果

[0347]

分析物	配体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
人4IgB7H3	W301088-1.145.16-xIgG1KV320	6.57E+05	3.39E-05	5.15E-11
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	6.57E+05	4.65E-05	7.08E-11
	依诺妥珠单抗(MacroGenics)	1.24E+05	1.26E-04	1.02E-09

[0348] 3.9人2IgB7H3结合(SPR)

[0349] 使用SPR来测定抗体对人2IgB7H3的亲和力。通过Biacore 8K测定抗体对人2IgB7H3的亲和力。通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活,保持420秒。然后以10μL/分钟的流速将山羊抗人Fc IgG(30μg/mL,在10mM NaAc中,pH 4.5)注射到通道,保持420秒。用1M乙醇胺盐酸将芯片去激活。将稀释于运行缓冲液(1×HBS-EP+)中的抗体以10μL/分钟的流速注射到通道,保持30秒。将七种浓度(500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM、15.625nM和7.813nM)的分析物人2IgB7H3以30μL/分钟的流速依次注射到通道,保持120秒的结合期,随后300秒的解离。在解离期后注射甘氨酸(10mM,pH 1.5),作为再生缓冲液。

[0350] 从测试传感图中减去参考通道和缓冲液通道的传感图。用1:1结合模型对实验数据进行拟合。用于计算的人2IgB7H3的分子量为25.2kDa。

[0351] 通过Biacore 8K评估软件附带的1:1结合模型对实验数据进行拟合。如表14和图9A-图9C所示,相比于对人4IgB7H3的结合,W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320示出对人2IgB7H3的较弱结合亲和力。K_D值为4.64E-08M。

[0352] 表14.与人2IgB7H3结合的抗体亲和力结果

[0353]

分析物	配体	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
人2IgB7H3	W301088-1.145.16 -xIgG1KV320	2.35E+05	1.36E-02	5.77E-08
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	3.03E+05	1.41E-02	4.64E-08
	依诺妥珠单抗（MacroGenics）	6.44E+04	1.68E-02	2.61E-07

[0354] 3.10食蟹猴B7H3结合(SPR)

[0355] 使用SPR来测定抗体对食蟹猴B7H3的亲和力。通过Biacore 8K测定抗体对食蟹猴B7H3的亲和力。通过在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)来制备激活剂。用激活剂将CM5传感器芯片激活,保持420秒。然后以10μL/分钟的流速将山羊抗人Fc IgG(30μg/mL,在10mM NaAc中,pH 4.5)注射到通道,保持420秒。用1M乙醇胺盐酸将芯片去激活。将稀释于运行缓冲液(1×HBS-EP+)中的抗体以10μL/分钟的流速注射到通道,保持30秒。将九种浓度(50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.563nM、0.781nM、0.391nM和0.196nM)的分析物食蟹猴B7H3以30μL/分钟的流速依次注射到通道,保持180秒的结合期,随后3600秒的解离。在解离期后注射甘氨酸(10mM,pH 1.5),作为再生缓冲液。

[0356] 从测试传感图中减去参考通道和缓冲液通道的传感图。用1:1结合模型对6种分析物浓度(50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM和1.563nM)的实验数据进行拟合。用于计算的食蟹猴B7H3的分子量为49kDa。

[0357] 通过Biacore 8K评估软件附带的1:1结合模型对实验数据进行拟合。如表15和图10A-图10C所示,W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320示出对食蟹猴B7H3的高结合亲和力,这相当于其对人4IgB7H3的结合。K_D值为5.74E-1 1M,其优于依诺妥珠单抗(MacroGenics)。

[0358] 表15.与食蟹猴B7H3结合的抗体亲和力结果

[0359]

分析物	配体	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
食蟹猴B7H3	W301088-1.145.16 -xIgG1KV320	5.21E+05	2.94E-05	5.64E-11
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	5.27E+05	3.02E-05	5.74E-11
	依诺妥珠单抗（MacroGenics）	1.85E+05	8.14E-05	4.41E-10

[0360] 3.11内化测试(HCS)

[0361] 抗体内化由operetta CLS(PerkinElmer),一种可以以高速和高灵敏度收集和分析样品图像的高含量成像和分析系统,测定。将表达人全长B7H3的MCF-7细胞(1.5×10^4个细胞/孔)接种到用8μg/mL聚-D-赖氨酸预包被的96孔透明底黑色板中。在设定为37℃、5% CO_2的培养箱中温育过夜后,将各种浓度的抗体(用1 ×DPBS/1%BSA自50nM至0.0005nM系列稀释3.16倍)以100μL/孔的体积在设定为4℃的冰箱中温育2小时。抗人B7H3参考抗体依诺妥珠单抗(MacroGeneics)用作阳性对照。人IgG1同种型抗体用作阴性对照。在用1×DPBS/1%BSA洗涤细胞后,加入Alexa 647山羊抗人抗体(在1×DPBS/1%BSA中以1:500稀释)。将细胞在设定为4℃的冰箱中避光温育1小时。然后将细胞洗涤一次,并在37℃在1×DPBS/1%BSA中重悬2小时。温育后,弃去上清液,并加入100μL/孔Hoechst 33342(在1×

DPBS中以1:5000稀释)并在环境温度温育15分钟。用1×DPBS洗涤细胞后,加入100μL/孔酸洗缓冲液(100mM甘氨酸、150mM NaCl,pH 2.5),并在设定为4℃的冰箱中温育5分钟。用1×DPBS将细胞洗涤一次,并用60μL 4%PFA固定。通过operetta CLS测量和分析细胞的平均荧光强度(MFI)。使用GraphPad Prism 7软件,通过四参数非线性回归分析计算EC_{50}值。

[0362] W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320示出以0.51nM的EC_{50}被表达B7H3的MCF-7细胞的良好内化能力,这与嵌合抗体相当并优于参考抗体依诺妥珠单抗(MacroGenics)(表16,图11)。

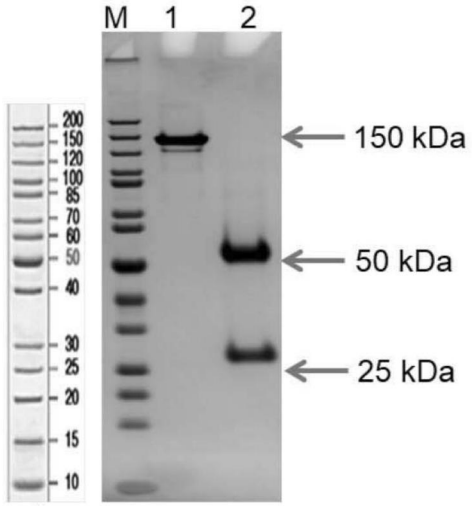
[0363] 表16.被表达人B7H3的细胞MCF-7的内化

[0364]

样品	对MCF-7的内化	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	0.51	57180
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	0.44	52315
依诺妥珠单抗（MacroGenics）	1.95	39777
hIgG1同种型	N.A.	21

[0365] 注:N.A.是指不可获得。

[0366] 本领域的技术人员还应当理解,本公开可以以其他特定形式实施而不脱离其精神或中心属性。由于本公开的前述描述仅公开了其示例性实施方案,因此应当理解,设想其他变型也在本公开的范围内。因此,本公开不限于本文已详细描述的特定实施方案。相反,应当参考所附权利要求书作为本公开的范围和内容的指示。



凝胶信息: NuPAGE, Novex 4-12% Bis-Tris 凝胶

图1

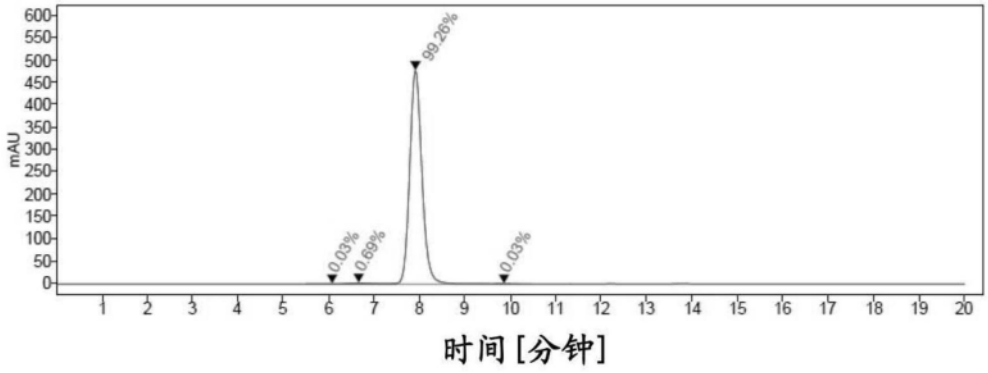


图2

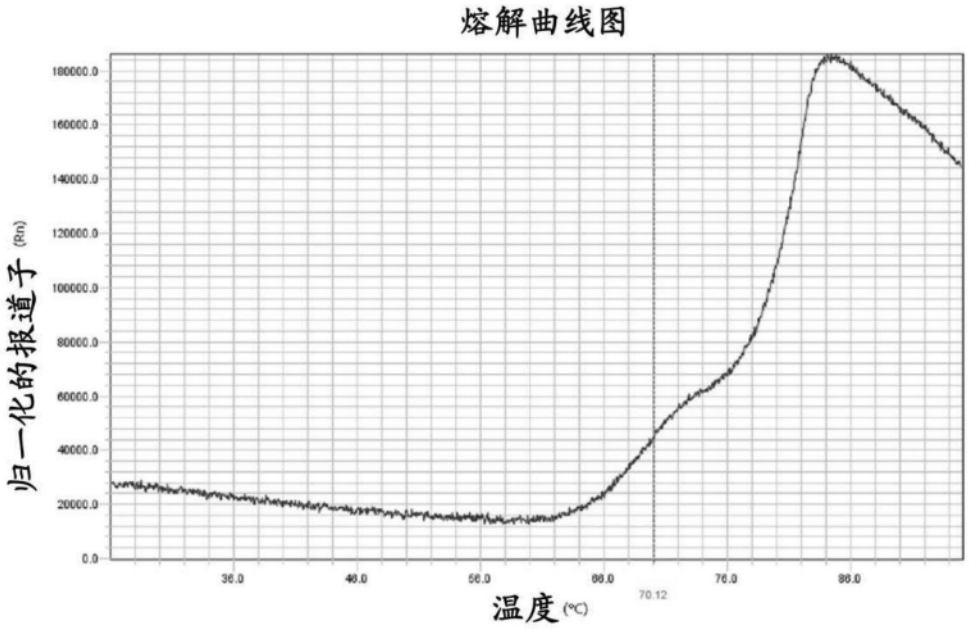

熔解曲线图
归一化的报道子 (Rn)
180000.0
160000.0
140000.0
120000.0
100000.0
80000.0
60000.0
40000.0
20000.0
0.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
80.0
70.12
温度 (℃)

图3

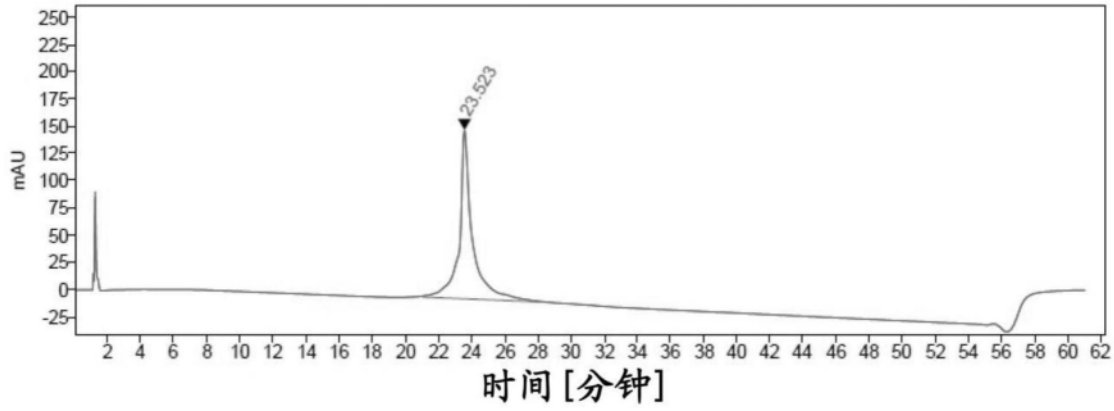

mAU
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
-25
23.523
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62
时间 [分钟]

图4

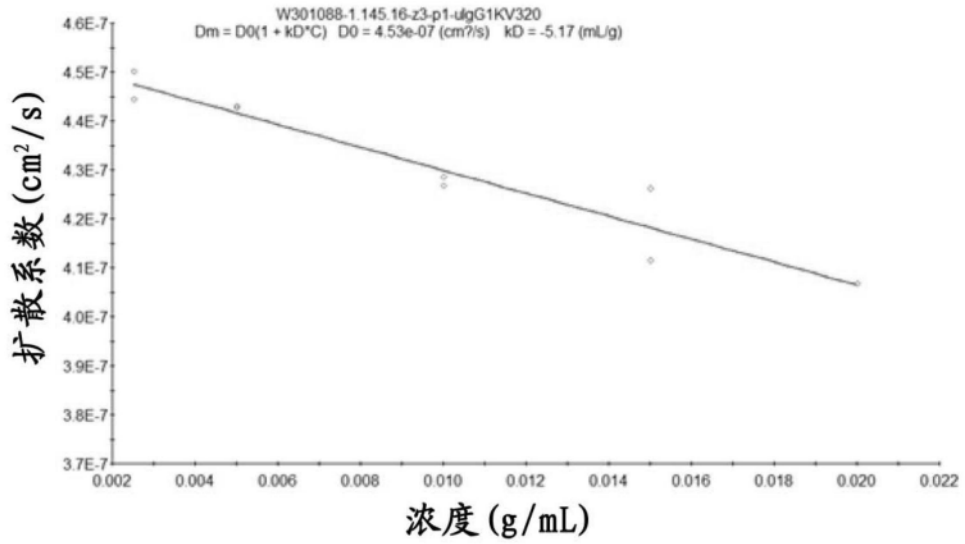

W301088-1.145.16-z3-p1-ulgG1KV320
Dm = D0(1 + kD*C) D0 = 4.53e-07 (cm?/s) kD = -5.17 (mL/g)
扩散系数 (cm²/s)
4.6E-7
4.5E-7
4.4E-7
4.3E-7
4.2E-7
4.1E-7
4.0E-7
3.9E-7
3.8E-7
3.7E-7
0.002
0.004
0.006
0.008
0.010
0.012
0.014
0.016
0.018
0.020
0.022
浓度 (g/mL)

图5

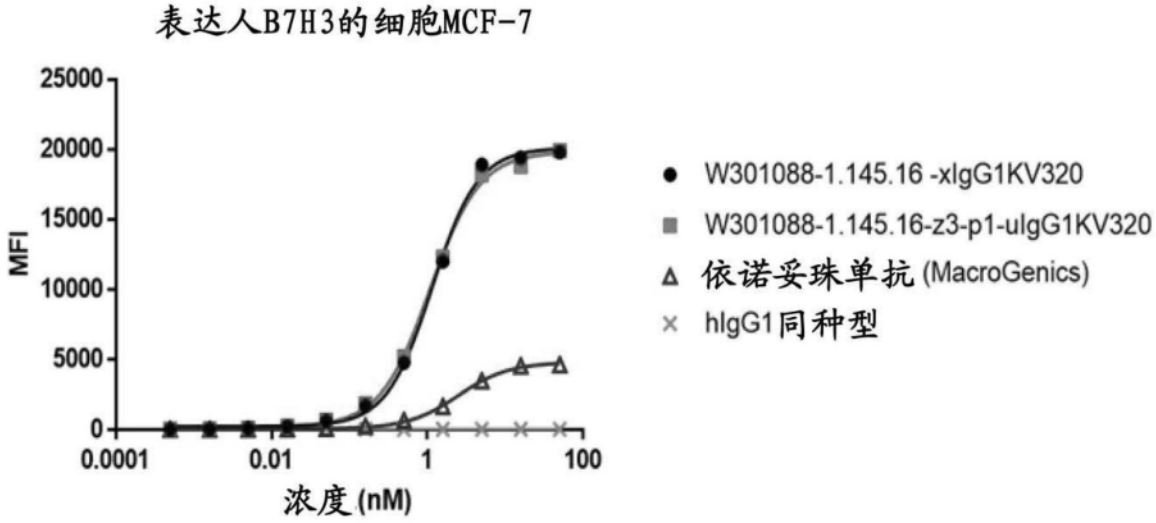

表达人B7H3的细胞MCF-7
MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.01
1
100
浓度 (nM)
W301088-1.145.16 -xlgG1KV320
W301088-1.145.16-z3-p1-ulgG1KV320
依诺妥珠单抗 (MacroGenics)
hlgG1同种型

图6

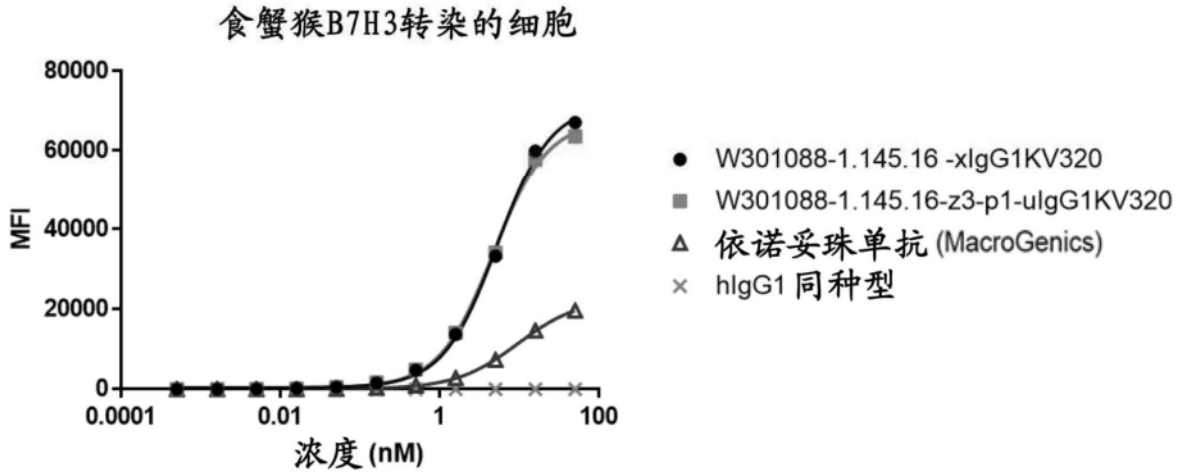

食蟹猴B7H3转染的细胞
MFI
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.01
1
100
浓度(nM)
W301088-1.145.16 -xIgG1KV320
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320
依诺妥珠单抗 (MacroGenics)
hIgG1 同种型

图7

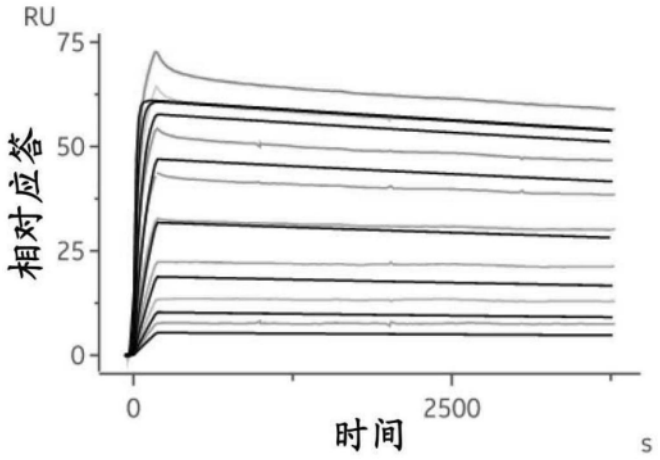

RU
75
50
25
0
相对应答
0
2500
时间
s

图8A

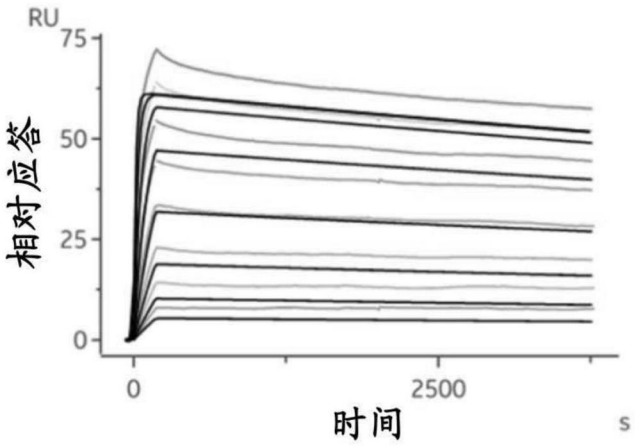

RU
75
50
25
0
相对应答
0
2500
时间
s

图8B

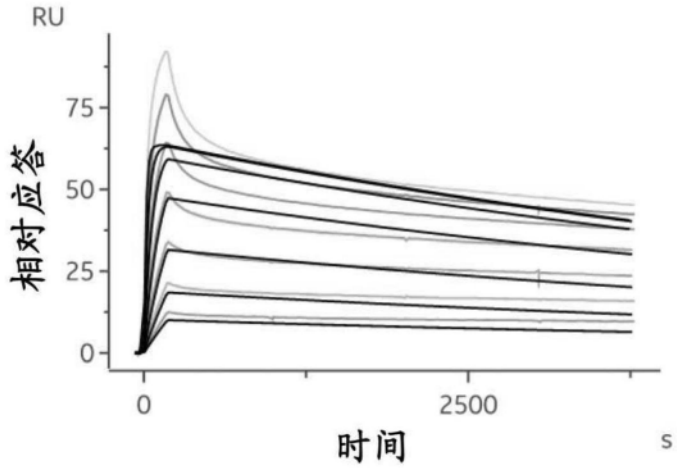

RU
75
50
25
0
相对应答
0
2500
时间
s

图8C

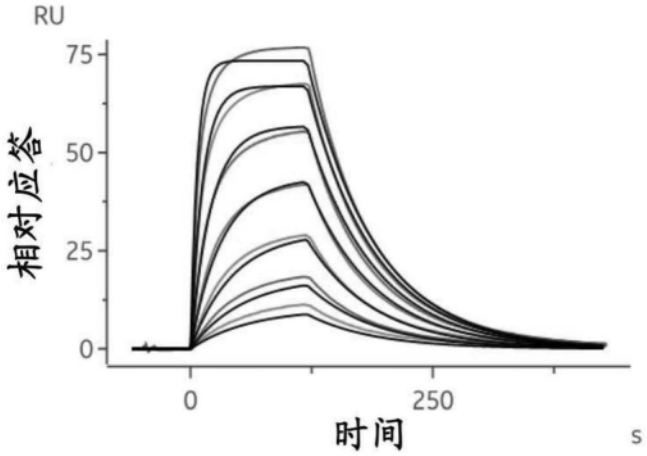

RU
75
50
25
0
相对应答
0
250
时间
s

图9A

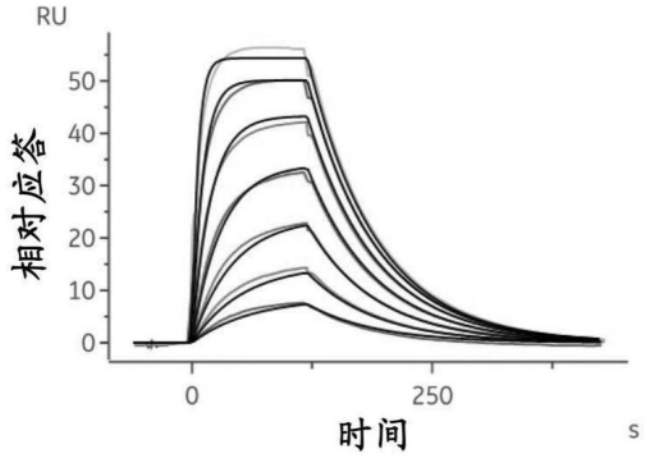

RU
50
40
30
20
10
0
相对应答
0
250
时间
s

图9B

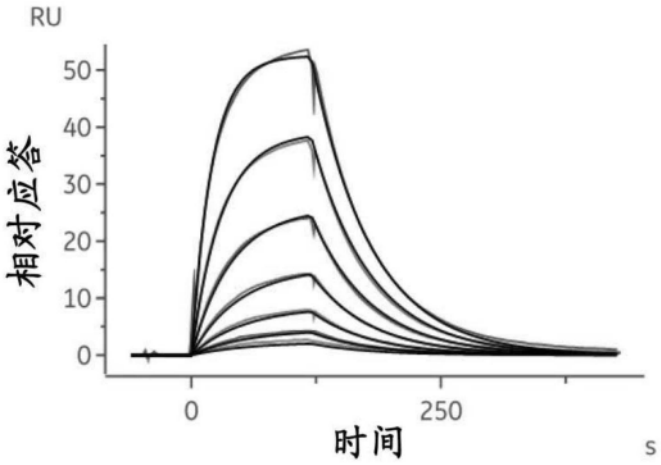


图9C

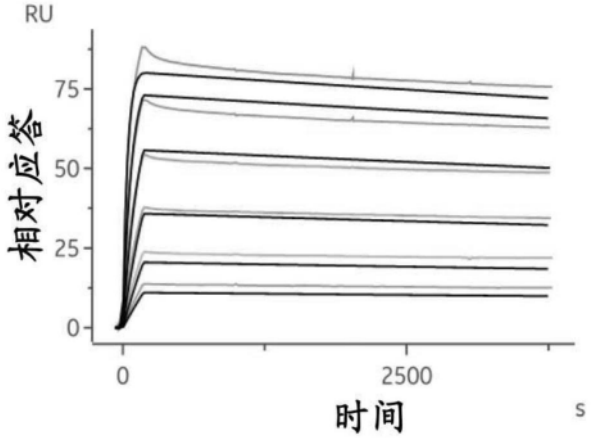


图10A

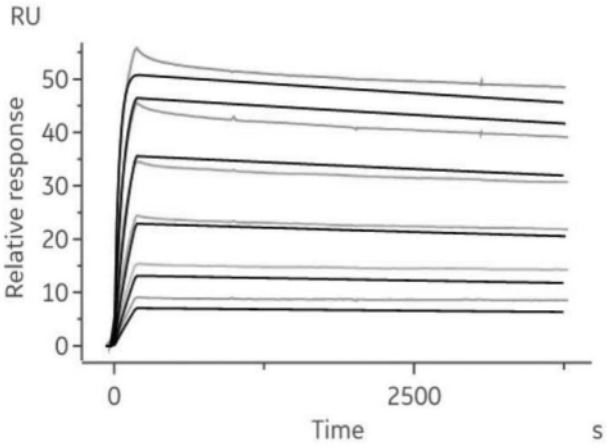


图10B

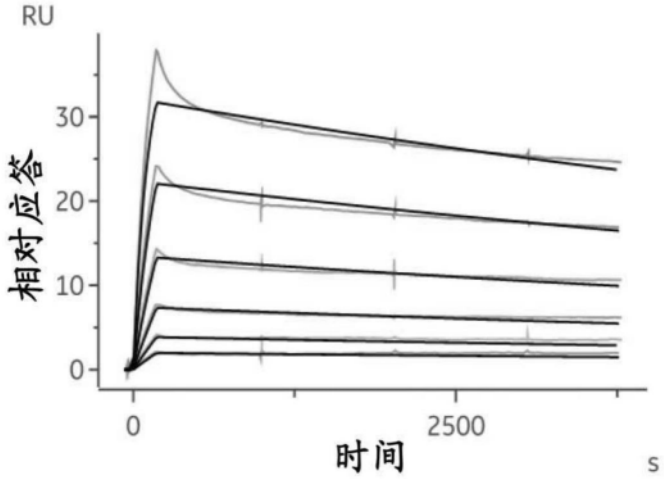

RU
30
20
10
0
相对应答
0
2500
时间
s

图10C

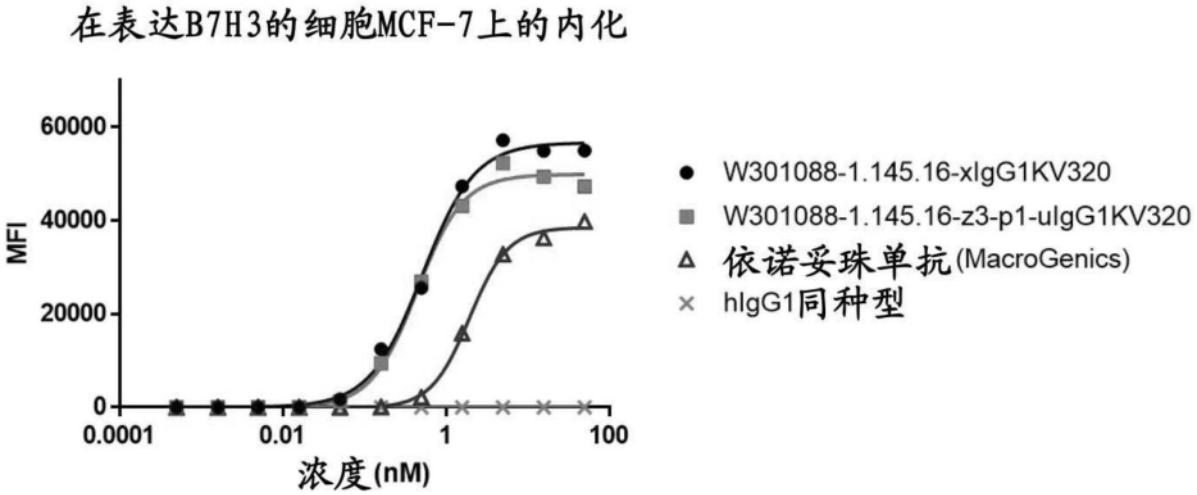

在表达B7H3的细胞MCF-7上的内化
60000
40000
20000
0
MFI
0.0001
0.01
1
100
浓度(nM)
W301088-1.145.16-xIgG1KV320
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320
依诺妥珠单抗(MacroGenics)
hIgG1同种型

图11

W301088-1.145.16-xIgG1KV320 (“1”) 和
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 (“2”) 的VH 区

```
1   DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMG     50
    .|||||||||||||||:|||||||||||||||||||||.||..|||:|
1   QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGLEWIG     50

51  YISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSL     100
    ||||||||||||||::|:||||||||.|:|:|||:.|||.|||||||
51  YISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSL     100

101 GRRWYFVVWGAGTTVTVSA     119
    ||||||||||.|||||||:
101 GRRWYFVVWGQGTTVTVSS     119
```

图12A

W301088-1.145.16-xIgG1KV320 (“1”) 和
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 (“2”) 的VL区

```
1   DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSP     50
    ||||||||.|||:|:|::.|::||||||||.||||||||||||||||.|
1   DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPP     50

51  KLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSA     100
    ||||||||||||||||.|||||||||||||:||||:..|:|||||||
51  KLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSA     100

101 PWTFGGGTKLEIK     113
    |||||||||:|||
101 PWTFGGGTKVEIK     113
```

图12B