202402808

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202402808 A

(43)公開日： 中華民國 113 (2024) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：112118340 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 05 月 17 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/30 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C12N15/13 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*
C12N15/64 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2022/05/18 世界智慧財產權組織 PCT/CN2022/093524

(71)申請人：中國大陸商上海藥明生物技術有限公司 (中國大陸) WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD. (CN)
中國大陸
愛爾蘭商藥明生物技術愛爾蘭有限公司 (愛爾蘭) WUXI BIOLOGICS IRELAND LIMITED (IE)
愛爾蘭

(72)發明人：榮乃燕 RONG, NAIYAN (CN) ；王 卓智 WANG, ZHUOZHI (US) ；李婕 LI, JIE (CN) ；顧 繼杰 GU, JIJIE (US)

(74)代理人：陳長文；張哲倫

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：12 共 111 頁

(54)名稱

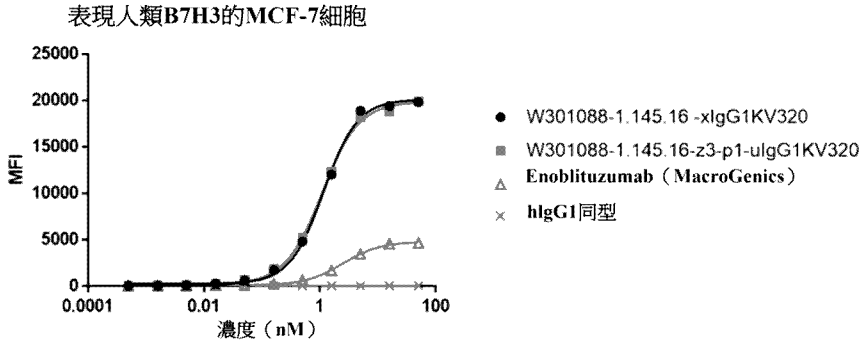
抗-B7H3 抗體及其用途

(57)摘要

本揭露提供了一種結合 B7H3 的抗體或其抗原結合部分、產生該抗體的方法、使用該抗體或其抗原結合部分治療 B7H3 相關病症的方法。

The present disclosure provides an antibody or antigen-binding portion thereof that binds B7H3, methods of producing the antibody, methods of treating B7H3-related disorders using the antibody or antigen-binding portion thereof.

指定代表圖：



【圖6】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗-B7H3抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTI-B7H3 ANTIBODY AND USES THEREOF

【中文】

本揭露提供了一種結合B7H3的抗體或其抗原結合部分、產生該抗體的方法、使用該抗體或其抗原結合部分治療B7H3相關病症的方法。

【英文】

The present disclosure provides an antibody or antigen-binding portion thereof that binds B7H3, methods of producing the antibody, methods of treating B7H3-related disorders using the antibody or antigen-binding portion thereof.

【指定代表圖】

圖6

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗-B7H3抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTI-B7H3 ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭露整體涉及抗B7H3抗體或其抗原結合部分、其製備方法及其用途。

【先前技術】

【0002】 B7H3也稱為CD276和B7RP-2，是B7家族成員並與其他B7家族成員具有20%-27%胺基酸序列同一性。雖然B7H3轉錄本普遍表現，但它在正常組織和免疫細胞上有限並維持低水準表現，並在多種人類惡性腫瘤(包括黑色素瘤、乳癌、前列腺癌等)中過量表現。據報導，B7-H3在癌細胞的膜上、細胞質中或細胞核內表現，但也在腫瘤相關的脈管系統上表現。B7H3不在T細胞、NK細胞和APC(包括DC和巨噬細胞)上組成型表現，但其在APC上的表現可由GM-CSF、IFNγ等誘導。

【0003】 B7-H3是有前景的抗癌標靶。儘管B7-H3的確切功能尚不清楚，但已經證明其不同的免疫功能，包括刺激、抑制T細胞增殖以及抑制NK細胞功能。據推測，免疫細胞上存在不同的受體，這些受體可競爭結合腫瘤上的B7H3。除了其免疫檢查點功能外，據報導B7H3高表現水準與癌症的不良預後相關，並且還增強細胞增殖、遷移、侵入、血管生成、轉移能力和抗癌藥物耐藥性。

【0004】 與其他B7家族分子類似，B7H3是1型跨膜醣蛋白，其胞外

結構域包含IgV-IgC結構域。與只具有單一拷貝IgV-IgC結構域的小鼠B7H3基因不同，人類B7H3具有兩種亞型。一種亞型具有一個IgV-IgC結構域(命名為2IgB7H3)，另一種亞型具有兩個IgV-IgC結構域(命名為4IgB7H3)，這兩個結構域由基因重複和差別剪接產生。4IgB7H3是在免疫細胞以及惡性細胞上表現的主要亞型，而2IgB7H3並不是，這表明4IgB7H3在腫瘤發育和癌症免疫中可能具有顯著的重要作用。

【0005】 由於B7H3在許多腫瘤細胞上過度表現，因此正在開發靶向B7H3的治療分子以治療相關適應症。然而，開發新型抗B7H3抗體仍然具有改進空間和臨床需要。

【發明內容】

【0006】 本揭露提供了這些和其他目的，在廣義上涉及提供具有改善療效的抗體的化合物、方法、組合物和製品。本揭露提供的有益效果可廣泛地適用於抗體治療和診斷領域，並且可以與和多種標靶反應的抗體結合使用。

【0007】 在一個態樣中，本揭露提供了特異性結合B7H3抗原的抗體或其抗原結合部分。B7H3抗原可以是人類B7H3、小鼠B7H3和/或石蟹獼猴B7H3或其片段(例如胞外結構域)。較佳地，B7H3抗原是人類4IgB7H3蛋白質或其胞外結構域。

【0008】 在一些實施例中，如本文揭示的抗體或其抗原結合部分包含：

【0009】 包含SEQ ID No: 1的胺基酸序列的重鏈CDR1(HCDR1)；包含SEQ ID No: 2的胺基酸序列的HCDR2；和包含SEQ ID No: 3的胺基酸序列的HCDR3；以及

【0010】包含SEQ ID No: 4或7的胺基酸序列的輕鏈CDR1(LCDR1)；包含SEQ ID No: 5的胺基酸序列的LCDR2；和包含SEQ ID No: 6的胺基酸序列的LCDR3。

【0011】在一些實施例中，如本文揭示的抗體或其抗原結合部分包含：

包含SEQ ID No: 1的胺基酸序列的重鏈CDR1(HCDR1)；包含SEQ ID No: 2的胺基酸序列的HCDR2；和包含SEQ ID No: 3的胺基酸序列的HCDR3；以及

包含KSSQSLLX$_1$SSNQKNYLA的胺基酸序列的輕鏈CDR1(LCDR1)，其中X$_1$可為除N之外的任何胺基酸；包含SEQ ID No: 5的胺基酸序列的LCDR2；和包含SEQ ID No: 6的胺基酸序列的LCDR3。

【0012】較佳地，如上所述的X$_1$為Q，並且LCDR1包含SEQ ID No: 4的胺基酸序列。

【0013】在一些實施例中，如本文揭示的抗體或其抗原結合部分包含：

包含SEQ ID No: 1的胺基酸序列的重鏈CDR1(HCDR1)；包含SEQ ID No: 2的胺基酸序列的HCDR2；和包含SEQ ID No: 3的胺基酸序列的HCDR3；以及

包含KSSQSLLNX$_2$SNQKNYLA的胺基酸序列的輕鏈CDR1(LCDR1)，其中X可為除S之外的任何胺基酸；包含SEQ ID No: 5的胺基酸序列的LCDR2；包含SEQ ID No: 6的胺基酸序列的LCDR3。

【0014】較佳地，如上所述的X$_2$為P，並且LCDR1包含SEQ ID No: 18的胺基酸序列。

【0015】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含：

抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)，其中VH包含：

(A)如SEQ ID No: 8或10所示的胺基酸序列；

(B)與SEQ ID No: 8或10具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的胺基酸序列；或

(C)與SEQ ID No: 8或10相比在框架區中具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸添加、缺失和/或取代的胺基酸序列；

和/或VL包含：

(A)如SEQ ID No: 9或11所示的胺基酸序列；

(B)與SEQ ID No: 9或11具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的胺基酸序列；或

(C)與SEQ ID No: 9或11相比在框架區中具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸添加、缺失和/或取代的胺基酸序列。

【0016】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含在框架區中包含一個或多個胺基酸取代的VH和/或VL。在一些實施例中，胺基酸取代中的至少一個胺基酸取代是回復突變，其中來自人類生殖細胞序列的胺基酸被親代抗體中對應位置處的不同胺基酸取代。

【0017】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含至少一個去除潛在的轉譯後修飾位點或醣基化位點的胺基酸修飾(例如，胺基酸取代)。這樣的胺基酸修飾可以位於CDR序列或者框架區。

【0018】在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分是全長抗體、scFv、Fab、F(ab')2或Fv片段。

【0019】在一些實施例中，抗體還包含免疫球蛋白恆定區，諸如人類IgG恆定區，任選地是人類IgG1恆定區。在一些實施例中，IgG1恆定區包含一個或多個修飾，諸如LALA突變。

【0020】在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分是嵌合抗體或人源化抗體。

【0021】在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含：

(a) 包含SEQ ID No: 12的胺基酸序列的重鏈和包含SEQ ID No: 13的胺基酸序列的輕鏈；或

(b) 包含SEQ ID No: 14的胺基酸序列的重鏈和包含SEQ ID No: 15的胺基酸序列的輕鏈。

【0022】在一個態樣中，本揭露提供了分離的核酸分子，其包含編碼如上文所定義的抗體或其抗原結合部分的核酸序列。

【0023】在一個態樣中，本揭露提供了包含如上文所定義的核酸分子的載體。

【0024】在一個態樣中，本揭露提供了包含如上文所定義的核酸分子或載體的宿主細胞。

【0025】在一個態樣中，本揭露提供了包含如上文所定義的抗體或其抗原結合部分和藥學上可接受的載體的藥物組合物。

【0026】在一個態樣中，本揭露提供了用於產生如上文所定義的抗體或其抗原結合部分的方法，該方法包括以下步驟：

—在適於表現抗體或其抗原結合部分的條件下培養宿主細胞；以及

—從宿主細胞分離出抗體或其抗原結合部分。

【0027】 在一個態樣中，本揭露提供了用於調節受試者中B7H3相關免疫反應的方法，該方法包括向受試者施用如上文所定義的抗體或其抗原結合部分或藥物組合物。

【0028】 在一個態樣中，本揭露提供了用於預防或治療受試者中B7H3相關病症的方法，該方法包括向受試者施用有效量的如上文所定義的抗體或其抗原結合部分或藥物組合物。

【0029】 在一些實施例中，B7H3相關病症選自癌症、自體免疫疾病和感染性疾病。上述癌症可以選自乳癌、神經腫瘤、黑色素瘤、肺癌、頭頸癌、結腸直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宮頸癌、成膠質細胞瘤、食道癌、膀胱癌、腎細胞癌、子宮內膜癌、皮膚癌、睪丸癌、甲狀腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤諸如非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病、瀰漫性大B細胞淋巴瘤和多發性骨髓瘤。

【0030】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分與細胞免疫治療、化學治療劑、放射治療、標靶治療和/或用於癌症免疫治療的其他藥劑聯合施用。

【0031】 在一個態樣中，本揭露提供了如上文所定義的抗體或其抗原結合部分，用於治療或預防受試者中的B7H3相關病症。

【0032】 在一個態樣中，本揭露提供了如上文所定義的抗體或其抗原結合部分用於製備用於治療或預防受試者中的B7H3相關病症的藥物的用途。

【0033】 在一個態樣中，本揭露提供了包含如上文所定義的抗體或其抗原結合部分的套組。

【0034】 前述是發明內容，因此必然包括細節的簡化、概括和省略；因此，所屬技術領域中具有通常知識者將理解，發明內容僅是示例性的，而不旨在以任何方式進行限制。發明內容不旨在確定要求保護的標的之關鍵特徵或必要特徵，也不旨在用於說明確定要求保護的標的之範圍。

【圖式簡單說明】

【0035】

圖1示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的SDS-PAGE結果。M：PageRuler™未染色蛋白梯；泳道1：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320，非還原性；泳道2：W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320，還原性；凝膠資訊：NuPAGE，Novex 4-12% Bis-Tris凝膠。

圖2示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的HPLC-SEC結果。

圖3示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的DSF曲線。

圖4示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的HIC-HPLC曲線。

圖5示出了W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的DLS-k_D曲線。

圖6示出了抗體對表現人類B7H3的細胞MCF-7的FACS結合結果。

圖7示出了抗體對石蟹獼猴B7H3轉染的細胞的FACS結合結果。

圖8A-圖8C示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320(8A)、W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(8B)和MacroGenics的enoblituzumab(8C)與人類4IgB7H3的結合。

圖9A-圖9C示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320(9A)、

W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(9B) 和 MacroGenics 的 enoblituzumab(9C)與人類2IgB7H3的結合。

圖 10A- 圖 10C 示出了 W301088-1.145.16-xIgG1KV320(10A)、W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(10B) 和 MacroGenics 的 enoblituzumab(10C)與石蟹獼猴B7H3的結合。

圖11示出了不同抗體在表現人類B7H3的細胞MCF-7的內化。

圖12A-圖12B示出了W301088-1.145.16-xIgG1KV320和W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320之間的VH區和VL區的比對。

【實施方式】

交互參照

【0036】本申請主張2022年5月18日提交的國際申請PCT/CN2022/093524的優先權，通過引用方式將其揭示內容完整併入。

序列表

【0037】本申請以電子形式與序列表一起提交。序列表的全部內容據此以參照方式併入。

【0038】雖然本揭露可以以許多不同的形式實施，但是本文所揭示的是舉例說明本揭露的原理的具體示例性實施例。應強調，本揭露不限於所示例的具體實施例。此外，本文所用的章節標題僅用於組織目的，並且不應被解釋為限制所描述的主題。

【0039】除非本文另有定義，否則與本揭露結合使用的科學和技術術語應具有所屬技術領域中具有通常知識者通常理解的含義。此外，除非上下文另有要求，否則單數術語應包括複數，並且複數術語應包括單數。更具體地，如本說明書和所附權利要求中所用，除非上下文另有明確說

明，否則單數形式「一個」、「一種」以及「該」包括複數指稱。因此，例如，提及「一種蛋白質」包括多種蛋白質；提及「一個細胞」包括細胞的混合物等。在本申請中，除非另有說明，否則「或」的使用意指「和/或」。此外，術語「包含」以及其他形式(諸如「包括」和「含有」)的使用不具有限制性。另外，說明書和所附申請專利範圍中提供的範圍包括兩端點和端點之間的所有點。

【0040】 在本揭露的上下文中，術語「大約」表示所屬技術領域中具有通常知識者將理解的仍然確保所討論特徵的技術效果的精度區間。該術語通常表示與指示數值的偏差為±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%，例如±0.01%。正如所屬技術領域中具有通常知識者所理解的那樣，給定技術效果的數值的具體偏差將取決於技術效果的性質。例如，自然或生物技術效果通常可能比人為或工程改造技術效果具有更大的偏差。

【0041】 一般來說，與本文所述的細胞和組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學、蛋白質和核酸化學以及雜合結合使用的命名法和這些技術是本領域熟知和常用的那些。除非另有說明，否則本揭露的方法和技術通常根據本領域熟知的習知方法來執行，並且如在本說明書通篇引用和討論的各種一般和更具體的參考文獻中所描述的。參見例如，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)。與本文所述的分析化學、合成有機化學以及醫藥和藥物化學結合使用的命名法、實驗室程式和這些技術是本領域熟知和常用的那些。此外，本申請全文中引用的所有參考文獻、專利和揭露的專利申請的內容通過參照方式併入本文。

定義

【0042】為了更好地理解本揭露，提供如下相關術語的定義和解釋。

【0043】本文的術語「抗體」或「Ab」在最廣泛的意義上使用，其涵蓋各種抗體結構，包括多株抗體、單特異性和多特異性抗體(例如雙特異性抗體)。天然完整抗體通常是Y形四聚體蛋白質，其包含通過共價二硫鍵和非共價相互作用保持在一起的兩條重鏈(H)和兩條輕鏈(L)多肽鏈。抗體的輕鏈可分類成κ輕鏈和λ輕鏈。重鏈可分類成μ、δ、γ、α和ε，它們分別將抗體的同型定義為IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在輕鏈和重鏈中，可變區經由大約12個或更多個胺基酸的「J」區與恆定區連接，並且重鏈還包含大約3個或更多個胺基酸的「D」區。各重鏈由重鏈可變區(V_H)和重鏈恆定區(C_H)組成。重鏈恆定區由3個結構域(C_H1、C_H2和C_H3)組成。各輕鏈由輕鏈可變區(V_L)和輕鏈恆定區(C_L)組成。V_H和V_L區可進一步分成高變區(稱為互補決定區(CDR))，它們之間間隔相對保留的區域(稱為框

架區(FR))。每個V_H和V_L由按下列順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4從N末端至C末端的3個CDR和4個FR組成。每個重鏈/輕鏈對的可變區(V_H和V_L)分別形成抗原結合位點。框架區和CDR的範圍可以使用本領域已知的方法來精確鑑定，例如通過Kabat定義、Dr. Martin網站的定義、Chothia定義、AbM定義、EU定義和Contact定義，所有這些方法都是本領域熟知的。參見例如，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公告號91-3242；Martin A，「Antibody bioinformatics website of Dr. Andrew Martin's lab at UCL」，最後更新於2018年7月31日；Chothia等人(1989年)，Nature，第342卷：第877頁；Chothia, C.等人(1987年)，J. Mol.Biol.，第196卷：第901-917頁；Al-lazikani等人(1997年)，J. Molec.Biol.，第273卷：第927-948頁；Edelman等人，Proc Natl Acad Sci U S A，1969年五月，第63卷第1期：第78-85頁；以及Almagro，J. Mol.Recognit.，第17卷：第132-143頁(2004年)。還可參見hgmp.mrc.ac.uk and bioinf.org.uk/abs。根據不同定義的編號之間的對應或比對例如可見於http://www.imgt.org/(也參見Giudicelli V等人，「IMGT, the international ImMunoGeneTics database」，Nucleic Acids Res.，(1997年)第25卷：第206-211頁；Lefranc MP等人，「Unique database numbering system for immunogenetic analysis」，Immunol Today(1997年)，第18卷：第509頁；以及Lefranc MP等人，「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」，Dev Comp Immunol.(2003年)，第27卷：第55-77

頁)。抗體可以是不同的抗體同型，例如IgG(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗體。

【0044】術語抗體的「抗原結合部分」或「抗原結合片段」在本申請的上下文中可互換使用，是指包含全長抗體片段的多肽，其保留了特異性結合與全長抗體特異性結合的抗原和/或與全長抗體競爭結合相同抗原的能力。通常，參見《Fundamental Immunology》，第7章，Paul, W.編輯，第二版，Raven Press，N.Y. (1989年)，其以參照方式併入本文以用於所有目的。抗體的抗原結合片段可以例如使用任何合適的標準技術(諸如蛋白水解消化或涉及對編碼抗體可變結構域和任選的恒定結構域的DNA的操縱和表現的重組基因工程改造技術)得自全長抗體分子。這種DNA是已知的和/或容易從例如商業來源、DNA庫(包括例如噬菌體-抗體庫)獲得，或者可以合成。DNA可以通過例如化學方式或通過使用分子生物學技術排序和操縱，以將一個或多個可變結構域和/或恒定結構域排列成合適的構型，或引入密碼子，產生半胱胺酸殘基，修飾、添加或刪除胺基酸等。

【0045】抗原結合片段的非限制性示例包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')2片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v)單鏈Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段；和(vii)由模擬抗體高變區的胺基酸殘基組成的最小識別單位(例如分離的互補決定區(CDR)，諸如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽。如本文所用，其他工程改造分子，諸如結構域特異性抗體、單結構域抗體、結構域缺失抗體、嵌合抗體、CDR移植抗體、雙抗體、三抗體、四抗體、微抗體、奈米抗體(例如單價奈米抗體、二價奈米抗體等)、小模組免疫藥物(SMIP)和鯊魚可變IgNAR結構域也涵蓋在表達「抗原結合片段」

內。在某些實施例中，抗體的抗原結合片段可以包含與至少一個恒定結構域共價連接的至少一個可變結構域。可變結構域和恒定結構域可以直接彼此連接，或者可以通過全部或部分鉸鏈區或連接區連接。鉸鏈區可以由至少2個(例如5、10、15、20、40、60個或更多個)胺基酸組成，這導致單個多肽分子中相鄰的可變結構域和/或恒定結構域之間的柔性或半柔性連接。

【0046】 關於如本文所用的抗體的術語「可變區」或「可變結構域」是指包含一個或多個CDR的抗體可變區或其片段。雖然可變結構域可包含完整的可變區(諸如HCVR或LCVR)，但也可能包含少於完整的可變區但仍保留與抗原結合或形成抗原結合位點的能力。

【0047】 如本文所用的術語「恆定區」是指免疫球蛋白恆定區，其在重鏈中包含CH1、CH2和CH3結構域(和任選的鉸鏈區)，並且在輕鏈中包含恒定結構域。抗體重鏈和輕鏈恆定區是本領域熟知的，例如IMGT資料庫(www.imgt.org)中或www.vbase2.org/vbstat.php.處提供的那些恆定區，這兩處來源以參照方式併入本文。關於抗體的「Fc」是指抗體的包含經由二硫鍵鍵合與第二重鏈的第二和第三恆定區結合的第一重鏈的第二(CH2)和第三(CH3)恆定區的部分。Fc區也可以包含部分或全部的鉸鏈區。抗體的Fc區負責各種效應子功能，諸如ADCC和CDC，但不在抗原結合中起作用。抗體通過其Fc結構域啟動和調節效應子功能的能力是其體內保護活性的關鍵部分。雖然先前認為抗體的中和活性僅是Fab-抗原相互作用的結果，但已經很明顯，它們的體內活性高度依賴於IgG Fc結構域與在效應白細胞表面上表現的其同源受體Fcγ受體(FcγR)的相互作用。

【0048】 術語「B7H3」(也稱為CD276抗原)是指1型跨膜蛋白質，

其為B7家族的具有由單個IgV-IgC結構域對構成的胞外結構域的成員。B7家族蛋白質包含具有短胞質尾的胞外IgV樣和IgC樣結構域。B7H3是免疫檢查點分子，並在許多類型的癌症中異常過度表現。當提及B7H3蛋白質的胺基酸序列時，其包括全長B7H3蛋白質(諸如人類4IgB7H3蛋白質或人類2IgB7H3蛋白質)或B7H3的胞外結構域(B7H3 ECD)或包含B7H3 ECD的片段；B7H3 ECD的融合蛋白質。B7H3蛋白質的示例性序列可見於Uniprot ID：Q5ZPR3(人類4IgB7H3)，Genebank登錄號NP_001019907(人類)、NP_001316557(人類)、NP_001316558(人類)、NP_079516(人類)和NP_598744(小鼠)。石蟹獼猴B7H3分別與人類和小鼠B7H3具有大約97%和88%的胺基酸序列同一性。

【0049】 如本文所用，術語「結合B7H3的抗體」或「抗B7H3抗體」包括特異性識別B7H3蛋白質的抗體及其抗原結合片段，以及特異性結合B7H3蛋白質的抗體及其抗原結合片段。如本文所用，表達「抗B7H3抗體」包括具有單特異性的單價抗體以及包含結合B7H3的第一抗原結合位點和結合第二(標靶)抗原的第二抗原結合位點的雙特異性抗體兩者。

【0050】 如本文所用，術語「單株抗體」或「mAb」是指單一分子組成的抗體分子的製劑。單株抗體顯示出對特定表位的單結合特異性和親和力。

【0051】 如本文所用，術語「嵌合抗體」是指包含或由抗體的原始抗原結合可變結構域(例如鼠類)與來自不同物種(例如人類)的恒定結構域組成的抗體。如本文所用，術語「嵌合抗體」較佳是指由抗體的原始抗原結合可變結構域(例如鼠類)與來自不同物種(例如人類)的恒定結構域組成的抗體。

【0052】 術語「人源化抗體」旨在是指包括其中來源於另一種哺乳動物物種(諸如大鼠/小鼠)生殖細胞的CDR序列已經被移植到人類框架序列上的抗體。可以在人類框架序列內進行額外的框架區修飾。例如，可以將框架區中的某些殘基回復突變為原始序列以保持親和力。

【0053】 術語「可操作地連接」是指兩個或多個感興趣的生物序列在具有或不具有間隔區或接頭的情況下並置，以使得它們處於允許它們以預期方式起作用的關係的方式。當用於多肽時，其旨在表示多肽序列以允許連接的產物具有預期生物學功能的方式連接。例如，抗體可變區可以可操作地連接到恆定區，以便提供具有抗原結合活性的穩定產物。該術語也可用於多核苷酸。例如，當編碼多肽的多核苷酸可操作地連接到調控序列(例如啟動子、增強子、沉默子序列等)時，其旨在表示多核苷酸序列以允許多肽從多核苷酸調節表現的方式連接。

【0054】 如本文所用，術語「K_D」旨在是指特定抗體-抗原相互作用的解離常數，其由k_d與k_a的比率(即k_d/k_a)獲得，並表示為莫耳濃度(M)。如本文所用，術語「k_a」旨在是指特定抗體-抗原相互作用的結合速率，而如本文所用，術語「k_d」旨在是指特定抗體-抗原相互作用的解離速率。抗體的K_D值可以使用本領域眾所周知的方法來測定。用於測定抗體的K_D的較佳方法是通過使用表面電漿子共振，較佳使用生物感測器系統諸如Biacore®系統。

【0055】 如本文所用，術語對IgG抗體的「高親和力」是指抗原和抗體之間的結合相互作用的強度。本領域已提出多種用於測量親和力的方法，諸如表面電漿子共振(SPR)、FACS親和力測試、FACS結合測試和ELISA結合。在一些實施例中，如通過SPR測定的，如本文所揭示的抗體

對標靶抗原的K_D為1×10^{-9}M或更低，更佳5×10^{-10}M或更低，甚至更佳1×10^{-10}M或更低，甚至更佳9×10^{-11}M或更低，並且甚至更佳8×10^{-11}M或更低。

【0056】 如本文所用，術語「EC_{50}」(也稱為「半最大效應濃度」)是指在指定的暴露時間後誘導基線和最大值之間的中值應答的藥物、抗體或毒劑的濃度。在本申請的上下文中，EC_{50}以「nM」為單位表示。

【0057】 如本文所用，術語「分離的」是指從天然狀態下通過人工手段獲得的狀態。如果自然界中存在某一種「分離的」物質或組分，則可能是其天然環境改變，或從天然環境下分離出該物質，或二者情況兼有。例如，某一活體動物體內天然存在某種未被分離的多核苷酸或多肽，而從這種天然狀態下分離出來的高純度的相同的多核苷酸或多肽即稱之為分離的多核苷酸或多肽。術語「分離的」既不排除混合的人工或合成物質，也不排除不影響分離的物質活性的其他不純物質。

【0058】 如本文所用，術語「分離的抗體」旨在是指基本上不含具有不同抗原特異性的其他抗體的抗體(例如，分離的特異性地結合B7H3蛋白質的抗體基本上不包含特異性地結合除B7H3蛋白質以外的抗原的抗體)。然而，特異性結合人類B7H3蛋白質的分離的抗體可具有與其他抗原(諸如來自其他物種的B7H3蛋白質)的交叉反應性。此外，分離的抗體可以基本上不含其他細胞材料和/或化學物質。

【0059】 如本文所用，術語「載體」是指可具有插入其中的多核苷酸的核酸運載工具。當載體能使插入其中的多核苷酸編碼的蛋白質獲得表現時，載體稱為表現載體。載體可以使攜帶的遺傳物質元件通過轉化、轉導或轉染到宿主細胞中的方式在宿主細胞表現。載體是所屬技術領域中具

有通常知識者熟知的，包括但不限於：質體；噬菌體；柯斯質體；人工染色體，諸如酵母人工染色體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)或P1來源的人工染色體(PAC)；噬菌體諸如λ噬菌體或M13噬菌體；以及動物病毒。可用作載體的動物病毒包括但不限於：反轉錄病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒(諸如單純疱疹病毒)、痘病毒、杆狀病毒、乳頭瘤病毒、乳頭多瘤空泡病毒(諸如SV40)。載體可以包含多種用於控制表現的元件，包括但不限於：啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列、選擇元件及報告基因。此外，載體可以包含複製起點。

【0060】 如本文所用，術語「宿主細胞」是指可經工程改造以產生所需的蛋白質、蛋白質片段或肽的細胞系統。宿主細胞包括但不限於：培養細胞，例如來源於嚙齒動物(大鼠、小鼠、豚鼠或倉鼠)的哺乳動物培養細胞，諸如CHO、BHK、NSO、SP2/0、YB2/0；或人組織或融合瘤細胞、酵母細胞和昆蟲細胞，以及包含在轉基因動物或培養組織內的細胞。該術語不僅涵蓋特定的受試細胞，而且涵蓋這種細胞的後代。因為某些修飾可能由於突變或環境的影響在後代中發生，所以這種後代可能與親代細胞不同，但仍包括在術語「宿主細胞」的範圍內。

【0061】 如本文所用，術語「同一性」是指兩個或更多個多肽分子或者兩個或更多個核酸分子的序列之間的關係，如通過比對和比較序列所確定的。「同一性百分比」意指在被比較的分子中的胺基酸或核苷酸之間相同殘基的百分比，並且基於被比較的分子中的最小分子的大小來計算。對於這些計算，較佳地通過特定數學模型或電腦程式(即，「演算法」)解決比對中的空位(如果存在的話)。可用於計算所比對的核酸或多肽的同一性的方法包括在以下文獻中描述的那些：《Computational Molecular

Biology》(Lesk, A. M.編輯)，1988年，New York：Oxford University Press；《Biocomputing Informatics and Genome Projects》(Smith, D. W.編輯)1993年，New York：Academic Press；《Computer Analysis of Sequence Data》，第I部分(Griffin, A. M.和Griffin, H. G.編輯)，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.編輯)，1991年，New York：M. Stockton Press；以及Carillo等人，1988年，SIAMJ. Applied Math.，第48卷：第1073頁。

【0062】 如本文所用，術語「免疫原性」是指刺激機體中特異性抗體或致敏淋巴細胞形成的能力。它不僅是指抗原刺激特異性免疫細胞活化、增殖、分化以便最終產生免疫效應物質諸如抗體和致敏淋巴細胞的特性，而且是指抗原刺激機體後，機體的免疫系統中可形成抗體或致敏T淋巴細胞的特異性免疫反應。免疫原性是抗原最重要的特性。抗原是否能夠成功地誘導宿主中免疫反應的產生取決於三個因素：抗原的特性、宿主的反應性和免疫手段。

【0063】 如本文所用，術語「轉染」是指將核酸引入真核細胞，特別是哺乳動物細胞中的過程。用於轉染的方案和技術包括但不限於脂質轉染以及化學和物理方法(諸如電穿孔)。許多轉染技術是本領域熟知的，並在本文中揭露。參見例如，Graham等人，1973年，Virology，第52卷：第456頁；Sambrook等人，2001年，《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》，出處同上；Davis等人，1986年，《Basic Methods in Molecular Biology》，Elsevier；Chu等人，1981年，Gene，第13卷：第

197頁。在本揭露的一個具體實施例中，可將人類B7H3基因轉染到293F或CHO細胞中。

【0064】 如本文所用，術語「SPR」或「表面電漿子共振」是指並包括這樣的光學現象：其允許通過例如使用BIAcore系統(Pharmacia Biosensor AB，Uppsala，Sweden和Piscataway，N.J.)檢測生物感測器基質內蛋白質濃度的變化來分析即時生物特異性相互作用。關於進一步的描述，參見Jönsson, U.等人(1993年)，Ann. Biol. Clin.第51卷：第19-26頁；Jönsson, U.等人(1991年)，Biotechniques，第11卷：第620-627頁；Johnsson, B.等人(1995年)，J. Mol. Recognit.第8卷：第125-131頁；以及Johnnson, B.等人(1991年)，Anal. Biochem.，第198卷：第268-277頁。

【0065】 如本文所用，術語「螢光活化的細胞分選」或「FACS」是指特殊類型的流式細胞分析技術。提供了將生物細胞的非均勻混合物一次一個細胞地分選到兩個或更多個容器中的方法，該方法基於每個細胞的特定光散射和螢光特徵(FlowMetric，「Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting」，於2017-11-09檢索)。用於執行FACS的儀器是所屬技術領域中具有通常知識者已知的，並且是公眾可經市售通路獲得的。此類儀器的示例包括來自Becton Dickinson(Foster City，Calif.)的FACS Star Plus、FACScan和FACSort儀器；來自Coulter Epics Division(Hialeah，Fla.)的Epics C；以及來自Cytomation(Colorado Springs，Colo.)的MoFlo。

【0066】 術語「受試者」包括任何人類或非人類動物。在一些實施例中，術語「受試者」較佳的是指人類。

【0067】 如本文所用，術語「B7H3相關病症」是指由B7H3(例如人類B7H3)的表現或活性增加或降低(通常增加)引起、加劇或以其他方式與之相關的任何病況或疾病。

【0068】 如本文所用，術語「癌症」是指任何腫瘤或惡性細胞生長、增殖或轉移介導的實體瘤和非實體瘤，諸如白血病。

【0069】 如本文在治療病況的上下文中所用，術語「治療」(「treatment」、「treating」或「treated」)一般涉及實現某種期望的治療效果的治療和療法(無論是人類還是動物的)，例如病況進展的抑制，並且包括進展率的降低、進展率的停止、病況的消退、病況的改善和病況的治癒。還包括作為預防性措施(即預防、防止)的治療。對於癌症，「治療」可以指抑制或減慢腫瘤或惡性細胞生長、增殖或轉移，或它們的某種組合。對於腫瘤，「治療」包括去除全部或部分腫瘤、抑制或減慢腫瘤生長和轉移、預防或延遲腫瘤的發展，或它們的某種組合。

【0070】 如本文所用，術語「有效量」涉及當根據期望的治療方案施用時，有效產生某些期望治療效果的與合理效益/風險比相稱的活性化合物或包含活性化合物的材料、組合物或劑型的量。例如，當結合B7H3相關疾病或病況的治療使用時，「有效量」是指抗體或其抗原結合部分有效治療或預防該疾病或病況的量或濃度。

【0071】 如本文所用，關於哺乳動物中的某些疾病病況，術語「預防」(「prevent」、「prevention」或「preventing」)是指預防或延遲疾病的發作，或預防其臨床或亞臨床症狀的表現。

【0072】 如本文所用，術語「藥學上可接受的」意指媒液、稀釋劑、賦形劑和/或其鹽在化學上和/或物理上與製劑中的其他成分相容並且

在生理上與接受者相容。

【0073】 如本文所用，術語「藥學上可接受的載體和/或賦形劑」是指在藥理學和/或生理學上與受試者和活性劑相容的載體和/或賦形劑，其為本領域熟知的(參見例如，《Remington's Pharmaceutical Sciences》，由 Gennaro AR 編輯，第 19 版，Pennsylvania：Mack Publishing Company，1995年)，並且包括但不限於：pH調節劑、界面活性劑、佐劑和離子強度增強劑。例如，pH調節劑可包括但不限於磷酸鹽緩衝液；界面活性劑可包括但不限於陽離子、陰離子或者非離子型界面活性劑，例如Tween-80；離子強度增強劑可包括但不限於氯化鈉。

【0074】 如本文所用，術語「佐劑」是指非特異性免疫增強劑，當其與抗原一起遞送到機體或預先遞送到機體時，其可增強機體對抗原的免疫反應或改變免疫反應類型。佐劑有許多種，包括但不限於鋁佐劑(例如氫氧化鋁)、弗氏佐劑(例如弗氏完全佐劑和弗氏不完全佐劑)、短小棒狀桿菌、脂多醣、細胞激素等。弗氏佐劑是目前動物試驗中最常用的佐劑。氫氧化鋁佐劑更常用於臨床試驗。

特異性結合B7H3的抗體

【0075】 本揭露提供了特異性結合B7H3的抗體，例如，特異性結合人類B7H3、小鼠B7H3、石蟹獼猴B7H3及其ECD結構域的抗體。如本文所用，術語「抗體」包括全長免疫球蛋白及其結合相同抗原的抗體部分。抗體可以是例如單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、人源化抗體或單鏈抗體。在一些實施例中，抗體部分是Fab片段或F(ab')2片段。在一些實施例中，抗體部分保留特異性結合B7H3的能力。

【0076】 可使用標準重組DNA技術製備的重組抗B7H3抗體(諸如包

含人類和非人類部分兩者的嵌合抗體和人源化單株抗體)在本揭露的範圍內。此類嵌合和人源化單株抗體可通過重組DNA技術產生，諸如以下文獻中描述的方法：美國專利7,112,421；Better等人(1988年)，Science，第240卷：第1041-1043頁；或Liu等人(1987年)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，第84卷：第3439-3443頁。本揭露中還包括例如經由親和力成熟、回復突變和轉譯後修飾位點的去除而進一步修飾/最佳化的人源化單株抗體。

【0077】 較佳地，如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分可以以高親和力結合人類4IgB7H3。如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分可以以低得多的親和力結合人類2IgB7H3。如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分可以以高親和力結合人類4IgB7H3，但以低得多的親和力結合人類2IgB7H3。

【0078】 本揭露的抗體與B7H3的結合可使用本領域熟知的一種或多種技術，例如ELISA或流式細胞分析技術來評估。在一些實施例中，可通過流式細胞分析技術測定來測試抗體，在流式細胞分析技術測定中抗體與表現人類B7H3的細胞株(諸如已經轉染以在其細胞表面上表現B7H3的MCF-7癌細胞或CHOK1細胞)反應。附加地或另選地，可以在BIAcore結合測定中測試抗體的結合，包括結合動力學(例如K_D值)。在一些其他實施例中，通過ELISA測試抗體，在ELISA中抗體與可溶性B7H3蛋白質反應。

【0079】 本揭露提供了以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結合人類4IgB7H3蛋

白質的抗體，如通過表面電漿子共振(SPR)所測量的。如本文所揭示的抗體還可以以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結合人類2IgB7H3蛋白質，如通過表面電漿子共振(SPR)所測量的。在一些實施例中，本文的抗體以比結合人類2IgB7H3的K_D值小500倍以上、小100倍以上或小50倍以上的K_D值結合人類4IgB7H3。這些用於比較的K_D值可以是通過表面電漿子共振(SPR)所測量得到。

【0080】 在一些實施例中，如通過FACS測定的，本揭露的抗體能夠以小於5nM、小於4nM、小於3nM或小於2nM的EC_{50}結合表現人類或石蟹獼猴B7H3的細胞株。

抗體可變結構域和CDR

【0081】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分是特異性結合B7H3(較佳的是人類4IgB7H3)的嵌合抗體或鼠類抗體。在一些另外的實施例中，抗體或其抗原結合部分是特異性結合B7H3(較佳的是人類4IgB7H3)的人源化抗體。在一些另外的實施例中，人源化抗體或其抗原結合部分在框架區中包含一個或多個回復突變。在一些另外的實施例中，人源化抗體或其抗原結合部分在潛在的轉譯後修飾(PTM)位點處包含一個或多個修飾，例如以在整個長度上去除CDR、NXS和NXT(X可以是除P以外的任何胺基酸)中的NG、NS和DG。

【0082】 在一些實施例中，如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分包含：選自下組中至少一組的一個或多個重鏈CDR(HCDR)：

(i)包含SEQ ID No: 1的HCDR1或與SEQ ID No: 1的胺基酸序列相差不超過2個胺基酸(例如2個胺基酸或1個胺基酸)的胺基酸添加、缺失或取

代的HCDR1；

(ii)包含SEQ ID No: 2的HCDR2或與SEQ ID No: 2的胺基酸序列相差不超過2個胺基酸(例如2個胺基酸或1個胺基酸)的胺基酸添加、缺失或取代的HCDR2；和

(iii)包含SEQ ID No: 3的HCDR3或與SEQ ID No: 3的胺基酸序列相差不超過2個胺基酸(例如2個胺基酸或1個胺基酸)的胺基酸添加、缺失或取代的HCDR3；以及/或者

【0083】 選自下組中至少一組的一個或多個輕鏈CDR(LCDR)：

(i)包含SEQ ID No: 4、7或18的LCDR1或與SEQ ID No: 4、7或18的胺基酸序列相差不超過2個胺基酸(例如2個胺基酸或1個胺基酸)的胺基酸添加、缺失或取代的LCDR1；

(ii)包含SEQ ID No: 5的LCDR2或與SEQ ID No: 5的胺基酸序列相差不超過2個胺基酸(例如2個胺基酸或1個胺基酸)的胺基酸添加、缺失或取代的LCDR2；以及

(iii)包含SEQ ID No: 6的LCDR3或與SEQ ID No: 6的胺基酸序列相差不超過2個胺基酸(例如2個胺基酸或1個胺基酸)的胺基酸添加、缺失或取代的LCDR3。

【0084】 在一些實施例中，CDR中的胺基酸取代為保留取代。在一些實施例中，如上所述的抗體或其抗原結合部分包含：包含SEQ ID NO: 1或由其組成的HCDR1；包含SEQ ID NO: 2或由其組成的HCDR2；包含SEQ ID NO: 3或由其組成的HCDR3；包含SEQ ID NO: 7或由其組成的LCDR1；包含SEQ ID NO: 5或由其組成的LCDR2；以及包含SEQ ID NO: 6或由其組成的LCDR3。具體地，抗體可進一步在CDR上包含一個或

多個修飾以去除潛在的PTM位點。在一些實施例中，抗體在LCDR1(SEQ ID NO: 7，「KSSQSLLNSSNQKNYLA」)上包含一個或多個修飾，以去除序列中的潛在PTM位點「NS」。在一些較佳的實施例中，抗體在LCDR1(SEQ ID NO: 7，「KSSQSLLNSSNQKNYLA」)的胺基酸序列的位置8或9處包含一個取代。在一些更佳的實施例中，抗體在LCDR1的胺基酸序列的位置8處包含N至Q取代(即SEQ ID NO: 4，「KSSQSLLQSSNQKNYLA」)。在一些其他實施例中，抗體在LCDR1的胺基酸序列的位置9處包含S至P取代(即SEQ ID NO: 18，「KSSQSLLNPSNQKNYLA」)。所屬技術領域中具有通常知識者將理解，可選擇其他類型的取代，只要基本上保留對B7H3的結合親和力。

【0085】 在一些實施例中，如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分可包含：包含SEQ ID NO: 1或由其組成的HCDR1；包含SEQ ID NO: 2或由其組成的HCDR2；包含SEQ ID NO: 3或由其組成的HCDR3；包含SEQ ID NO: 4或由其組成的LCDR1；包含SEQ ID NO: 5或由其組成的LCDR2；以及包含SEQ ID NO: 6或由其組成的LCDR3。

【0086】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)，其中重鏈可變區和輕鏈可變區分別包含如上所述的HCDR1-3和LCDR1-3。

【0087】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分的重鏈可變結構域包含：

(i) SEQ ID No: 8或10的胺基酸序列；(ii)與SEQ ID No: 8或10具有至少85%、90%或95%同一性的胺基酸序列；或(iii)與SEQ ID No: 8或10相比具有一個或多個(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)胺

基酸的添加、缺失和/或取代的胺基酸序列。

【0088】 在一些實施例中，胺基酸取代可為保留取代。

【0089】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分的輕鏈可變結構域包含：

(i) SEQ ID No: 9或11的胺基酸序列；(ii)與SEQ ID No: 9或11具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的胺基酸序列；或(iii)與SEQ ID No: 9或11相比具有一個或多個(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多個)胺基酸的添加、缺失和/或取代的胺基酸序列。

【0090】 在一些實施例中，胺基酸取代可為保留取代。

【0091】 在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)，其中VH包含：

(i) SEQ ID No: 8或10的胺基酸序列；或(ii)與SEQ ID No: 8或10相比在框架區中具有一個或多個(例如1、2、3、4、5個或更多個)胺基酸取代的胺基酸序列；

和/或VL包含：

(i) SEQ ID No: 9或11的胺基酸序列；或(ii)與SEQ ID No: 9或11相比在框架區中具有一個或多個(例如1、2、3、4、5個或更多個)胺基酸取代的胺基酸序列；

【0092】 在一些實施例中，胺基酸取代可為保留取代。

【0093】 在一些實施例中，抗體或抗原結合部分包含SEQ ID No:8或10的重鏈可變區(VH)的HCDR1、HCDR2和HCDR3，包含SEQ ID No: 9或11的輕鏈可變區(VL)的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0094】 所屬技術領域中具有通常知識者將理解，CDR的精確編號

和位置在不同的編號系統中可以不同。然而，應該理解，可變重鏈和/或可變輕鏈序列的揭露內容包括相關(固有)CDR的揭露內容。因此，每個可變重鏈區的揭露內容是重鏈CDR(例如HCDR1、HCDR2和HCDR3)的揭露內容，並且每個可變輕鏈區的揭露內容是輕鏈CDR(例如LCDR1、LCDR2和LCDR3)的揭露內容。CDR編號的可用比較如下，參見Lafranc等人，Dev. Comp. Immunol.第27卷(第1期)：第55-77頁(2003年)：

CDR	Kabat	IMGT	Chothia	AbM	Kabat+ Chothia	Dr. Martin網站（關於詳細資訊，參見Martin，2018年，出處同上）
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後的16個殘基
LCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	C+LCDR3+ FGXG

【0095】 可以根據以上提供的編號方案中的一種或組合方案將胺基酸分配給每個CDR，所有這些方案都是本領域熟知的。參見Kabat等人(1991年)，《Sequences of Proteins of Immunological Interest》(第5版)，US Dept. of Health and Human Services，PHS，NIH，NIH公告號91-3242；Chothia等人，1987年，PMID：3681981；Martin A，「Antibody bioinformatics website of Dr. Andrew Martin's lab at UCL」，最後更新於2018年7月31日；Chothia等人，1989年，PMID：2687698；MacCallum等人，1996年，PMID：8876650；Dubel編輯(2007年)《Handbook of Therapeutic Antibodies》，第3版，Wily-VCH Verlag GmbH and Co；以及http://www.imgt.org/。

【0096】 抗體序列中的可變區和CDR可根據本領域已開發的一般規

則(如上所述，諸如Kabat、Martin和IMGT編號系統)或通過將序列與已知可變區的資料庫比對來鑑定。用於鑑定這些區域的方法描述於Kontermann和Dubel編輯，《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。抗體序列的示例性資料庫描述於「Abysis」網站：www.bioinf.org.uk/abs(由A.C.Martin維護，Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London，London，England)和VBASE2網站：www.vbase2.org，如Retter等人，Nucl. Acids Res.，第33期(資料庫期號)：第D671-D674頁(2005年)中所述，並可通過該網站加以存取。例如，可以使用Abysis資料庫分析序列，該資料庫將來自Kabat、IMGT和蛋白質資料庫(PDB)的序列資料與來自PDB的結構資料整合。參見Dr. Andrew C. R. Martin的書籍《Antibody Engineering Lab Manual》(Duebel, S.和Kontermann, R.編輯，Springer-Verlag，Heidelberg，ISBN-13：978-3540413547，也可見於網站bioinforg.uk/abs)中的章節「*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*」。Abysis資料庫網站還包括已經開發的用於鑑定CDR的一般規則，這些規則可以根據本文的教導內容使用。具有相同VH和/或VL CDR的兩種抗體意指當通過相同方法(例如，如本領域已知的Kabat方法、Dr Martin方法、Chothia方法或IMGT編號)測定時，它們的CDR是相同的。

【0097】兩個胺基酸序列之間的同一性百分比可以使用已併入ALIGN程式(2.0版)的E. Meyers和W. Miller的演算法(Comput. Appl.

Biosci.，第4卷：第11-17頁(1988年))，使用PAM120重量殘基表、空位長度償罰為12和空位償罰為4來確定。此外，兩個胺基酸序列之間的同一性百分比可通過已併入GCG套裝軟體(可參見http://www.gcg.com)中的GAP程式的Needleman和Wunsch的演算法(J. Mol.Biol.，第48卷：第444-453頁(1970年))，使用Blossum 62矩陣或PAM250矩陣以及空位權重為16、14、12、10、8、6或4和長度權重為1、2、3、4、5或6來確定。

【0098】 附加地或另選地，本揭露的蛋白質序列還可用作「查詢序列」以針對公共資料庫執行檢索，例如鑑定相關序列。這種檢索可以使用Altschul等人(1990年)，J. Mol. Biol.，第215卷：第403-410頁的XBLAST程式(2.0版)執行。BLAST蛋白質檢索可以用XBLAST程式、評分=50、字長度=3執行，以獲得與本揭露的抗體分子同源的胺基酸序列。為了出於比較目的獲得帶空位的比對，可以如Altschul等人(1997年)，Nucleic Acids Res.，第25卷(第17期)：第3389-3402頁中所述那樣利用空位BLAST。當利用BLAST和空位BLAST程式時，可以使用相應程式(例如XBLAST和NBLAST)的默認參數。參見www.ncbi.nlm.nih.gov。

【0099】 在其他實施例中，CDR胺基酸序列可以與上述相應序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在其他實施例中，可變區的胺基酸序列可以與上文所示的相應序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

【0100】 如上所述，VH或VL區中的胺基酸中的至少一個胺基酸的添加、缺失和/或取代可以不在CDR序列中的任何序列中，而是在框架

(FRW)序列中。例如，分離的抗體或其抗原結合部分可以在框架序列中包含一個或多個胺基酸取代，例如VH或VL區的FRW1、FRW2、FRW3和/或FRW4。在一些實施例中，VH區的框架區包含一個或多個如下取代：S025T、V071R、Y091F、V089T。

【0101】 在一些實施例中，6個CDR組可具有總共0、1、2、3、4或5個胺基酸修飾(較佳的是胺基酸取代)，以及可變重鏈和輕鏈區的框架區中的變化，只要框架(不包括CDR)保持與親代抗體(例如W301088-1.145.16)至少約80%、85%或90%的同一性。因此，例如，如本文所述的相同CDR可與來自人生殖細胞序列的不同框架序列組合，只要框架區保持與人類生殖細胞序列具有至少80%、85%或90%同一性。

【0102】 在某些實施例中，如本文提供的分離的抗體或其抗原結合部分包含任何合適的框架區(FR)序列，只要抗原結合結構域可特異性結合B7H3，較佳的是人類Ig4B7H3。

【0103】 分離的抗體或其抗原結合部分的框架區可包含一個或多個回復突變，其中來自人類生殖細胞的框架胺基酸在相應位置被原始鼠類胺基酸置換。分離的抗體或其抗原結合部分的框架區也可包含一個或多個保留取代。如本文所用，術語「保留取代」是指不會不利地影響或改變包含胺基酸序列的蛋白質/多肽的基本特性的胺基酸取代。例如，可通過本領域內已知的標準技術例如定點誘變和PCR介導的誘變引入保留取代。保留胺基酸取代包括其中胺基酸殘基被具有相似支鏈的另一個胺基酸殘基例如在物理上或在功能上與對應胺基酸殘基相似(諸如具有相似的大小、形狀、電荷、化學特性，包括形成共價鍵或氫鍵的能力等)的殘基取代的取代。已在本領域中定義了具有相似支鏈的胺基酸殘基的家族。這些家族包

括具有鹼性支鏈的胺基酸(例如，離胺酸、精胺酸和組胺酸)、具有酸性支鏈的胺基酸(例如，天門冬胺酸和麩胺酸)、具有不帶電極性支鏈的胺基酸(例如，甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有非極性支鏈的胺基酸(例如，丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、具有β-分支支鏈的胺基酸(諸如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)和具有芳族支鏈的胺基酸(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，對應的胺基酸殘基較佳被來自相同支鏈家族的另一個胺基酸殘基取代。用於鑑定胺基酸保留取代的方法是本領域熟知的(參見例如，Brummell等人，Biochem.，第32卷：第1180-1187頁；Kobayashi等人，Protein Eng.，第12卷第10期：第879-884頁(1999年)；以及Burks等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，第94卷：第412-417頁(1997年)，這些文獻以參照方式併入本文)。

IgG恆定區

【0104】 在一些實施例中，抗體還包含免疫球蛋白恆定區，諸如人類IgG、IgA、IgM、IgE或IgD恆定區。如本文所揭示的抗體可以是各種IgG同型，例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。較佳地，抗體是IgG1同型，並包含人類IgG1恆定區。如本文所述的IgG恆定區包含Fc區和任選的IgG分子的部分或全部鉸鏈區。

【0105】 與野生型Fc區相比，Fc區可包含一個或多個胺基酸改變(例如插入、缺失或取代)，而不改變期望的功能。例如，本揭露包括在Fc區中包含一個或多個修飾的抗體，該抗體可具有在Fc和FcRn之間的修飾的(例如增強或減弱的)結合相互作用。Fc修飾的非限制性示例還包括例如：IgG1 Fc區中Leu234Ala/Leu235Ala(或LALA)的胺基酸修飾，其改變

抗體依賴性細胞毒性(ADCC)或其他效應子功能；在人類IgG4 Fc區的胺基酸序列的228位置處絲胺酸(「S」)至脯胺酸(「P」)的突變。S228P突變通過使IgG4分子的核心鉸鏈中的二硫鍵穩定而減少Fab臂交換，因此屬於IgG4穩定化突變，其有助於防止半抗體形成。已知與FcγRIIIa結合的增加通常導致ADCC的增加。類似地，與FcγRIIb(抑制性受體)的結合降低在某些情況下也是有益的。可用於本發明抗體的胺基酸取代包括美國專利8,188,321號(特別是圖41)和8,084,582號以及美國專利揭露申請20060235208號和20070148170號中列出的那些，所有這些專利全文以參照方式明確地併入本文。可用的特定變體包括但不限於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。這種修飾可以包含在如本文所揭示的抗體的一個或兩個Fc結構域中。

【0106】 可變區分別在重鏈和輕鏈中可操作地連接到IgG恆定區。在一些實施例中，可變區直接與IgG恆定區連接。在一些其他實施例中，可變區經由可包含少至一個胺基酸的接頭與IgG恆定區連接。用於構建多肽序列的肽接頭在本領域中是熟知的，諸如(GS)n、(GSGGS)n、(GGGGS)n和(GGGS)n接頭，其中n是至少一(通常3至4至5)的整數；或來源於免疫球蛋白重鏈或輕鏈的接頭(諸如鉸鏈區來源的序列)，以及允許可變區重組附接到恆定區的具有足夠長度和柔性以允許每個區域執行其生物學功能的任何肽序列。

【0107】 除非另外指明，否則本文抗體恆定區的編號基於Kabat的EU編號。因此，IgG的上下文中的「CH」結構域如下：「CH1」是指根

據Kabat的EU索引的位置118-215，「鉸鏈」是指根據Kabat的EU索引的位置216-230，「CH2」是指根據Kabat的EU索引的位置231-340，並且「CH3」是指根據Kabat的EU索引的位置341-447。

抗B7H3抗體的功能性

【0108】 如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分的特徵在於特定的功能特徵或特性。在一些實施例中，抗體(包括嵌合抗體和人源化抗體兩者)具有以下特性中的一種或多種特性：

【0109】 (a)以高親和力(例如小於2nM，如通過FACS測量的)特異性結合表現人類4IgB7H3的細胞；

【0110】 (b)以與人類4IgB7H3結合的親和力相比顯著更低的親和力結合人類2IgB7H3，抗體結合2IgB7H3和結合4IgB7H3之間的差異是顯著的；

【0111】 (c)以優於基準抗體的高親和力(例如小於5nM，如通過FACS測量的)特異性結合石蟹獼猴B7H3；以及

【0112】 (d)對表現B7H3的癌細胞顯示良好的內化能力。

編碼本揭露的抗體的核酸分子

【0113】 在一些態樣中，本揭露涉及分離的核酸分子，其包含編碼如本文所揭示的分離的抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區的核酸序列。在一些實施例中，本文所揭示的分離的核酸分子包含SEQ ID No: 16所示的核酸序列。在一些實施例中，本文所揭示的分離的核酸分子包含SEQ ID No: 17所示的核酸序列。

【0114】 本揭露的核酸可以使用標準分子生物學技術獲得。對於由融合瘤(例如，從如下進一步描述的攜帶人免疫球蛋白基因的轉基因小鼠

製備的融合瘤)表現的抗體，編碼由融合瘤製備的抗體的輕鏈和重鏈的cDNA可以通過標準PCR擴增或cDNA複製技術獲得。對於(例如，使用噬菌體展示技術)從免疫球蛋白基因文庫獲得的抗體，可以從基因庫回收編碼此類抗體的核酸。

【0115】 可通過將編碼VH的核酸與編碼重鏈恆定區(CH1、CH2和CH3)的另一DNA分子可操作地連接來將編碼VH區的分離的核酸轉變成全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因的序列是本領域已知的(參見例如，Kabat等人(1991年)，出處同上)，並且涵蓋這些區域的DNA片段可通過標準PCR擴增獲得。重鏈恆定區可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但更佳地是IgG1或IgG4恆定區。

【0116】 可通過將編碼VL的DNA與編碼輕鏈恆定區CL的另一DNA分子可操作地連接來將編碼VL區的分離的核酸轉變為全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因的序列是本領域已知的(參見例如，Kabat等人，出處同上)，並且涵蓋這些區域的DNA片段可通過標準PCR擴增獲得。在較佳的實施例中，輕鏈恆定區可以是κ或λ恆定區。

【0117】 一旦獲得編碼VH和VL區段的DNA片段，就可以通過標準重組DNA技術進一步操作這些DNA片段，例如以將可變區基因轉變為全長抗體鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。在這些操作中，將編碼VL或VH的DNA片段與編碼另一種蛋白質(諸如，抗體恆定區或柔性接頭)的另一種DNA片段可操作地連接。如本文所用的術語「可操作地連接」意在指兩個DNA片段連接，使得由兩個DNA片段編碼的胺基酸序列保持在框架內。

【0118】 在一些態樣中，本揭露涉及包含如本文所揭示的核酸序列

的載體。本揭露的上下文中的載體可以是任何合適的載體，包括染色體、非染色體和合成的核酸載體(包含一組合適的表現控制元件的核酸序列)。此類載體的示例包括SV40的衍生物、細菌質體、噬菌體DNA、杆狀病毒、酵母質體、衍生自質體和噬菌體DNA的組合的載體以及病毒核酸(RNA或DNA)載體。在一些實施例中，編碼B7H3抗體的核酸包含在裸DNA或RNA載體中，該載體包括例如線性表現元件(如在例如Sykes和Johnston，Nat Biotech，第17卷：第355-359頁(1997年)中所述)；壓縮的核酸載體(如在例如US 6,077,835和/或WO 00/70087中所述)；質體載體諸如pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119；「midge」最小尺寸核酸載體(如在例如Schakowski等人，Mol Ther，第3卷：第793-800頁(2001年)中所述)，或作為沉澱核酸載體構築體，諸如CaP04沉澱構築體(如在例如WO200046147；Benvenisty和Reshef，PNAS USA，第83卷：第9551-9555頁(1986年)；Wigler等人，Cell，第14卷：第725頁(1978年)；以及Coraro和Pearson，Somatic Cell Genetics，第7卷：第603頁(1981年)中所述)。此類核酸載體及其用途是本領域熟知的(參見例如US 5,589,466和US 5,973,972)。

【0119】 在一個實施例中，載體適於抗體在細菌細胞中的表現。此類載體的示例包括表現載體，諸如BlueScript(Stratagene)、pIN載體(Van Heeke& Schuster，J Biol Chem，第264卷：第5503-5509頁(1989年))、pET載體(Novagen，Madison WI)等。載體可以也是或另選地是適於在酵母系統中表現的載體。可以使用任何適於在酵母系統中表現的載體。合適的載體包括例如包含組成型或誘導型啟動子諸如α因子、醇氧化酶和PGH的載體(綜述於：F. Ausubel等人編輯，《Current Protocols in Molecular

Biology》，Greene Publishing及Wiley InterScience New York(1987年)以及Grant等人，Methods in Enzymol，第153卷：第516-544頁(1987年))。

【0120】載體可以也是或另選地是適於在哺乳動物細胞中表現的載體，例如包含麩醯胺酸合成酶作為可選擇標記的載體，諸如Bebbington(1992年)，Biotechnology (NY)，第10卷：第169-175頁中所述的載體。

【0121】核酸和/或載體還可以包含編碼分泌/定位序列的核酸序列，該分泌/定位序列可以將多肽諸如新生多肽鏈靶向周質間隙或靶向細胞培養基中。此類序列是本領域已知的，並包括分泌前導肽或訊號肽。

【0122】載體可包含任何合適的啟動子、增強子和其他表現促進元件，或與它們相關。這些元件的示例包括強表現啟動子(例如，人類CMV IE啟動子/增強子以及RSV、SV40、SL3-3、MMTV和HIV LTR啟動子)、有效的多聚(A)腺苷酸終止序列、質體產物在大腸桿菌中的複製起點、作為可選擇標記的抗生素抗性基因和/或方便的複製位點(例如，多接頭)。核酸也可包含誘導型啟動子，而不是組成型啟動子諸如CMV IE。

【0123】在甚至另一態樣中，本揭露涉及包含上文指定的載體的宿主細胞。

【0124】因此，本揭露還涉及產生本揭露的抗體的重組真核或原核宿主細胞，諸如轉染瘤。抗體可以在重組真核或原核宿主細胞中表現以產生本揭露的抗體。

【0125】宿主細胞的示例包括酵母、細菌、植物和哺乳動物細胞。用於表現本揭露的抗體的哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞

(包括dhfr CHO細胞，描述於Urlaub和Chasin(1980年)，Proc. Natl. Acad. ScL USA，第77卷：第4216-4220頁，與DHFR可選擇標記一起使用，例如如在R. J. Kaufman和P. A. Sharp(1982年)，J. MoI. Biol.第159卷：第601-621頁中所述)、COS細胞和SP2細胞。具體地，與NSO骨髓瘤細胞一起使用的另一種表現系統是在WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841中揭露的GS基因表現系統。還包括SV40轉化的猴腎CV1系(COS-7，ATCC CRL 1651)；人胚胎腎細胞株(為在懸浮培養物中生長而次選殖的293或293細胞，Graham等人，J. Gen Virol.，第36卷：第59頁(1977年))；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等人，1980年，Proc. Natl. Acad. Sci. USA，第77卷：第4216頁)；小鼠睾丸支援細胞(TM4，Mather，1980年，Biol. Reprod.，第23卷：第243-251頁)；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；水牛大鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳房瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TR1細胞(Mather等人，1982年，Annals N.Y. Acad. Sci.，第383卷：第44-68頁)；MRC 5細胞；FS4細胞；小鼠骨髓瘤細胞，諸如NSO(例如RCB0213，1992年，Bio/Technology，第10卷：第169頁)和SP2/0細胞(例如SP2/0-Ag14細胞，ATCC CRL 1581)；大鼠骨髓瘤細胞，諸如YB2/0細胞(例如YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞，ATCC CRL 1662)；PER.C6細胞；以及人類肝癌細胞株(Hep G2)。CHO細胞是可用於本文的細胞株中的一種細胞株，其中CHO-K1、DUK-B11、CHO-DP12、CHO-

DG44(Somatic Cell and Molecular Genetics，第12卷：第555頁(1986年))和Lec13是示例性宿主細胞株。在CHO-K1、DUK-B11、DG44或CHO-DP12宿主細胞的情況下，可以改變這些宿主細胞，以使它們缺乏使其中表現的蛋白質岩藻醣基化的能力。在一些實施例中，本文的宿主細胞選自CHO、CHO-S、HEK、HEK293、HEK-293F、Expi293F、PER.C6或NSO細胞或淋巴細胞。

【0126】 適用於此目的的原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)例如大腸桿菌(*E. coli*)、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)例如鼠傷寒沙門氏菌(*S. typhimurium*)、沙雷氏菌屬(*Serratia*)例如黏質沙雷氏菌(*S. marcescans*)和志賀氏菌屬(*Shigella*)，以及芽孢桿菌屬(*Bacilli*)諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)諸如銅綠假單胞菌(*P. aeruginosa*)和鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。

【0127】 除了原核生物之外，真核微生物諸如絲狀真菌或酵母是用於雙特異性抗體編碼載體的合適的複製或表現宿主。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通麵包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而，許多其他屬、物種和菌株通常是可獲得的並且可用於本文，諸如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)宿主，諸如例如乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)、脆壁克魯維酵母(*K. fragilis*；ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(*K. bulgaricus*；ATCC 16,045)、柳葉克魯維酵母(*K. wickeramii*；ATCC 24,178)、克魯

雄酵母(*K. waltii*；ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(*K. drosophilarum*；ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母(*K. thermotolerans*)和馬克斯克魯維酵母(*K. marxianus*)；耶式酵母屬(*Yarrowia*；EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*；EP 183,070)；假絲酵母屬(*Candida*)；裡氏木黴(*Trichoderma reesia*；EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母屬(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomycesoccidentalis*)；以及絲狀真菌，諸如例如脈孢菌屬(*Neurospora*)、青黴菌屬(*Penicillium*)、彎頸黴屬(*Tolypocladium*)和麴菌屬(*Aspergillus*)宿主，諸如小巢狀麴菌(*A. nidulans*)和黑色麴菌(*A. niger*)。

【0128】在一些實施例中，宿主細胞可包含穩定整合到細胞基因組中的第一核酸和第二核酸構築體。在另一個實施例中，本揭露提供了包含非整合核酸諸如質體、黏粒、噬菌粒或線性表現元件的細胞，其包含如上指定的第一核酸和第二核酸構築體。

【0129】在甚至另一個態樣中，本揭露涉及包含編碼一組或兩組人重鏈和人輕鏈的核酸的轉基因非人動物或植物，其中該動物或植物產生本揭露的抗體。

【0130】在另一個態樣中，本揭露涉及產生如本文所定義的本揭露的抗體的融合瘤。在甚至另一個態樣中，本揭露涉及包含編碼一組或兩組人重鏈和人輕鏈的核酸的轉基因非人動物或植物，其中該動物或植物產生本揭露的抗體。

【0131】在一個態樣中，本揭露涉及表現載體，該表現載體包含：

(i)編碼根據本文所揭示的實施例中的任一個實施例的抗體或其抗原

結合部分，或抗體的VH或VL結構域的核酸序列；

(ii)編碼重鏈或輕鏈的胺基酸序列的核酸序列；

(iii)編碼恆定區的胺基酸序列的核酸序列；或

(iv)上述核酸序列中兩者或更多者的組合。

【0132】 在一個態樣中，本揭露涉及編碼序列表中所示的一個或多個胺基酸序列的核酸構築體。

【0133】 在一個態樣中，本揭露涉及用於產生根據如本文所揭示的實施例中的任一個實施例的抗體的方法，該方法包括以下步驟：培養包含如本文所揭示的表現載體或多於一種表現載體的宿主細胞、表現抗體以及從培養基純化所述抗體。在一個態樣中，本揭露涉及包含如上文所定義的表現載體的宿主細胞。在一個實施例中，宿主細胞是重組真核、重組原核或重組微生物宿主細胞。

藥物組合物

【0134】 在一些態樣中，本揭露涉及包含至少一種如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分和藥學上可接受的載體的藥物組合物。

組合物的組分

【0135】 藥物組合物可任選地包含一種或多種附加的藥物活性成分，諸如另一種抗體或藥物。本揭露的藥物組合物還可以與例如另一種免疫刺激劑、抗癌劑、抗病毒劑或疫苗以聯合治療施用，使得可以實現附加或協同效果。藥學上可接受的載體可以包括例如，藥學上可接受的液體、凝膠或固體載體、水性介質、非水性介質、抗微生物劑、等滲劑、緩衝劑、抗氧化劑、麻醉劑、懸浮/分散劑、螯合劑、稀釋劑、佐劑、賦形劑或無毒的輔料，或本領域已知組分的各種組合。

【0136】 合適的組分可以包括例如抗氧化劑、填料、黏結劑、崩解劑、緩衝劑、防腐劑、潤滑劑、調味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或穩定劑諸如糖和環糊精。合適的抗氧化劑可以包括例如甲硫胺酸、抗壞血酸、EDTA、硫代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱胺酸、巰基甘油、巰基乙酸、巰基山梨醇、丁基甲基苯甲醚、丁基化羥基甲苯和/或沒食子酸丙酯。如本揭露中所述，包含本揭露的抗體或抗原結合片段的溶劑可包含一種或多種抗氧化劑諸如甲硫胺酸，還原性抗體或其抗原結合片段可被氧化。氧化還原可防止或減少結合親和力的降低，從而增強抗體穩定性和延長儲存壽命。因此，在一些實施例中，本揭露提供了包含一種或多種抗體或其抗原結合片段以及一種或多種抗氧化劑(諸如甲硫胺酸)的組合物。本揭露還提供了多種方法，其中將抗體或其抗原結合片段與一種或多種抗氧化劑(諸如甲硫胺酸)混合，使得可以防止抗體或其抗原結合片段氧化，以延長它們的儲存壽命和/或增加活性。

【0137】 為了進一步說明，藥學上可接受的載體可以包括例如：水性載體，諸如氯化鈉注射液、林格氏注射液、等滲葡萄糖注射液、無菌水注射液或葡萄糖和乳酸林格氏注射液；非水性載體，諸如植物來源的不揮發性油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油；抑菌或抑真菌濃度的抗微生物劑；等滲劑諸如氯化鈉或葡萄糖；緩衝液諸如磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液；抗氧化劑諸如硫酸氫鈉；局部麻醉劑諸如鹽酸普魯卡因；懸浮和分散劑諸如羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙烯吡咯烷酮；乳化劑諸如聚山梨醇酯80(TWEEN-80)；螯合劑諸如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸)；乙醇；聚乙二醇；丙二醇；氫氧化鈉；鹽酸；檸檬酸或乳酸。用作載體的抗微生物劑可以添加到多劑量容器中的藥物組合

物中，包括苯酚或甲酚、汞製劑、苯甲醇、氯丁醇、對羥基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、氯化苄烷銨和氯化苯索寧。合適的賦形劑可以包括例如水、鹽水、葡萄糖、甘油或乙醇。合適的無毒輔助物質可以包括例如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝劑、穩定劑、增溶劑或諸如乙酸鈉、脫水山梨醣醇單月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或環糊精的試劑。

施用、製劑和劑量

【0138】 本揭露的藥物組合物可以通過各種途徑體內施用給有需要的受試者，這些途徑包括但不限於口服、靜脈內、動脈內、皮下、腸胃外、鼻內、肌內、顱內、心內、心室內、氣管內、口腔、直腸、腹膜內、皮內、局部、透皮和鞘內，或以其他方式通過植入或吸入。本標的組合物可以被配製成固體、半固體、液體或氣體形式的製劑，包括但不限於片劑、膠囊、粉劑、顆粒劑、軟膏劑、溶液、栓劑、灌腸劑、注射劑、吸入劑和氣霧劑。可以根據預期的應用和治療方案選擇合適的製劑和施用途徑。

【0139】 適於腸內施用的製劑包括硬或軟明膠膠囊、丸劑、片劑(包括包衣片劑)、酏劑、懸浮液、糖漿或吸入劑及其控釋形式。

【0140】 適於(例如，通過注射)腸胃外施用的製劑包括水性或非水性、等滲、無熱原、無菌液體(例如，溶液、懸浮液)，其中活性成分溶解、懸浮或以其他方式提供(例如，在脂質體或其他微粒中)。此類液體還可以包含其他藥學上可接受的成分，諸如抗氧化劑、緩衝劑、防腐劑、穩定劑、抑菌劑、懸浮劑、增稠劑以及使製劑與預期接受者的血液(或其他相關體液)等滲的溶質。賦形劑的示例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。適用於此類製劑的等滲載體的示例包括氯化鈉注射液、林格氏

溶液或乳酸林格氏注射液。類似地，特定的給藥方案(包括劑量、時間和重複)將取決於特定的個體和該個體的病史，以及經驗考慮諸如藥物動力學(例如半衰期、清除率等)。

【0141】 施用頻率可以在治療過程中確定和調整，並且基於減少增殖性或致瘤性細胞的數量、維持此類腫瘤細胞的減少、降低腫瘤細胞的增殖或延遲轉移的發展。在一些實施例中，可以調整或減少所施用的劑量以控制潛在的副作用和/或毒性。另選地，本發明治療組合物的連續緩釋製劑可能是合適的。

【0142】 所屬技術領域中具有通常知識者應理解，適當的劑量可能因患者而異。確定最佳劑量通常將涉及治療有益效果水準與任何風險或有害副作用的平衡。選定的劑量水準將取決於多種因素，包括但不限於特定化合物的活性；施用途徑；施用時間；化合物的排泄速率；治療持續時間；聯合使用的其他藥物、化合物和/或材料；病況的嚴重性；以及患者的物種、性別、年齡、體重、病況、一般健康狀況和先前病史。化合物的量和施用途徑將最終由醫師、獸醫或臨床醫師決定，但是通常將選擇在作用部位達到局部濃度，從而實現期望效果而不引起顯著的不利或有害的副作用的劑量。

【0143】 通常，本揭露的抗體或其抗原結合部分可以在各種範圍內施用。這些範圍包括每劑約5μg/kg體重至約100mg/kg體重；每劑約50μg/kg體重至約5mg/kg體重；每劑約100μg/kg體重至約10mg/kg體重。其他範圍包括每劑約100μg/kg體重至約20mg/kg體重和約0.5mg/kg體重至約20mg/kg體重。在某些實施例中，劑量為每劑至少約100μg/kg體重、至少約250μg/kg體重、至少約750μg/kg體重、至少約3mg/kg體重、至少約

5mg/kg體重、至少約10mg/kg體重。

【0144】 在任何情況下，本揭露的抗體或其抗原結合部分較佳地根據需要施用給有需要的受試者。施用頻率的確定可以由所屬技術領域中具有通常知識者諸如主治醫師基於對所治療的病況、所治療的受試者的年齡、所治療的病況的嚴重性、所治療的受試者的一般健康狀態等的考慮來進行。

【0145】 在某些較佳的實施例中，涉及本揭露的抗體或其抗原結合部分的治療過程將包括在數週或數月的時期內多劑量的選定藥物產品。更具體地，本揭露的抗體或其抗原結合部分可以每天施用一次、每兩天施用一次、每四天施用一次、每週施用一次、每十天施用一次、每兩週施用一次、每三週施用一次、每月施用一次、每六週施用一次、每兩個月施用一次、每十週施用一次或每三個月施用一次或更久一次。就這一點而言，應理解，可以基於患者應答和臨床實踐來改變劑量或調整間隔。

【0146】 對於已給予一次或多次施用的個體，也可以根據經驗確定所揭示的治療組合物的劑量和方案。例如，可以給予個體遞增劑量的如本文所述產生的治療組合物。在選定的實施例中，可以分別基於根據經驗確定的或觀察到的副作用或毒性而逐漸增加或降低或減少劑量。為了評估選定組合物的功效，可以如前所述跟蹤特定疾病、病症或病況的標記。對於癌症，這些標記包括經由觸診或視覺觀察直接測量腫瘤大小，通過X射線或其他成像技術間接測量腫瘤大小；如通過腫瘤樣本的直接腫瘤活檢和顯微鏡檢查評估的改善；間接腫瘤標記(例如前列腺癌的PSA)或根據本文所述方法鑑定的致瘤抗原的測量，疼痛或麻痺的減輕；與腫瘤相關的言語、視覺、呼吸或其他殘疾的改善；食欲增加；或通過公認的測試測量的生活

品質的提升或生存期的延長。對所屬技術領域中具有通常知識者顯而易見的是，劑量將根據個體、腫瘤病況的類型、腫瘤病況的階段、腫瘤病況是否已經開始轉移至個體的其他位置以及過去和當下使用的治療而變化。

【0147】 用於腸胃外施用(例如，靜脈內注射)的相容製劑將包含濃度為約10μg/mL至約100mg/mL的如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分。在某些選定的實施例中，抗體或其抗原結合部分的濃度將包括約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。在其他較佳的實施例中，抗體或其抗原結合部分的濃度將包括約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。

本揭露的應用

【0148】 在一些態樣中，本揭露提供了預防或治療受試者中B7H3相關疾病、病症或病況的方法，該方法包括向需要治療的受試者(例如人類)施用治療有效量的如本文所揭示的抗體。疾病或病症可以是癌症、自體免疫疾病或感染性疾病。

【0149】 涉及B7H3的多種癌症(無論是惡性的還是良性的並且無論是原發性的還是繼發性的)都可以用本揭露提供的方法治療或預防。癌症可以是實體癌或血液系統惡性腫瘤。此類癌症的實例包括肺癌諸如支氣管癌(例如，鱗狀細胞癌、小細胞癌、大細胞癌和腺癌)、肺泡細胞癌、支氣

管腺瘤、軟骨瘤型錯構瘤(非癌性)和肉瘤(癌性)；心癌諸如黏液瘤、纖維瘤和橫紋肌瘤；骨癌諸如骨軟骨瘤、軟骨瘤、成軟骨細胞瘤、軟骨黏液樣纖維瘤、骨樣骨瘤、骨巨細胞瘤、軟骨肉瘤、多發性骨髓瘤、骨肉瘤、纖維肉瘤、惡性纖維組織細胞瘤、尤因氏瘤(尤因氏肉瘤)和網狀細胞肉瘤；腦癌諸如神經膠質瘤(例如，多形性成膠質細胞瘤)、間變型星形細胞瘤、星型細胞瘤、少突神經膠質瘤、成神經管細胞瘤、脊索瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、腦膜瘤、垂體腺瘤、松果體瘤、骨瘤、成血管細胞瘤、顱咽管瘤、生殖細胞瘤、畸胎瘤、皮樣囊腫和血管瘤；消化系統中的癌症諸如結腸癌、平滑肌瘤、鱗狀細胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、胃腺癌、腸道脂肪瘤、腸道纖維神經瘤、腸道纖維瘤、大腸巨大息肉和結腸直腸癌；肝癌諸如肝細胞腺瘤、血管瘤、肝細胞癌、纖維板層肝細胞癌、膽管癌、肝母細胞瘤和血管肉瘤；腎癌諸如腎腺癌、腎細胞癌、腎上腺樣瘤和腎盂的移行細胞癌；膀胱癌；血液學癌諸如急性淋巴細胞(淋巴母細胞)白血病、急性髓系(髓細胞、骨髓性、成髓細胞、髓單核細胞)白血病、慢性淋巴細胞白血病(例如，塞紮裡症候群和毛細胞白血病)、慢性粒細胞(骨髓、骨髓性、粒細胞)白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B細胞淋巴瘤、蕈樣肉芽腫和骨髓增殖性病症(包括骨髓增殖性病症諸如真性紅細胞增多症、骨髓纖維化、血小板增多症和慢性粒細胞性白血病)；皮膚癌諸如基底細胞癌、鱗狀細胞癌、黑色素瘤、卡波西肉瘤和佩吉特氏病；頭頸癌；眼部相關癌症諸如成視網膜細胞瘤和眼內黑色素瘤；雄性生殖系統癌症諸如良性前列腺增生、前列腺癌和睪丸癌(例如，精原細胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌和絨毛膜癌)；乳癌；雌性生殖系統癌症諸如子宮癌(子宮內膜癌)、宮頸癌症(宮頸癌)、卵巢的癌症(卵巢癌)、外陰癌、陰道癌、輸卵管

癌和水泡狀胎塊；甲狀腺癌(包括乳突癌、濾泡性癌、未分化癌或髓樣癌)；嗜鉻細胞瘤(腎上腺)；甲狀旁腺的非癌性生長；胰腺癌；以及血液學癌諸如白血病、骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。在一些具體的實施例中，癌症選自神經性腫瘤、黑色素瘤、肺癌、頭頸癌、結腸直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、乳癌和卵巢癌。

【0150】在一些實施例中，癌症的實例包括但不限於B細胞癌症，包括B細胞淋巴瘤(包括低級/濾泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞(SL)NHL；中級/濾泡性NHL；中級瀰漫性NHL；高級免疫母細胞NHL；高級淋巴母細胞NHL；高級小非切割細胞NHL；巨大腫塊NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；華氏巨球蛋白血症；慢性淋巴細胞白血病(CLL)；急性淋巴母細胞白血病(ALL)；毛細胞白血病；慢性成髓細胞白血病；和移植後淋巴增殖性病症(PTLD)，以及與癜痣病(phakomatoses)、水腫(諸如與腦瘤有關的)、B細胞增殖性病症和梅格斯氏症候群(Meigs' syndrome)有關的異常血管增殖。更具體的實例包括但不限於復發性或頑固性NHL、前線低級NHL、III/IV期NHL、化學治療抗性NHL、前體B淋巴母細胞白血病和/或淋巴瘤、小淋巴細胞淋巴瘤、B細胞慢性淋巴細胞白血病和/或幼淋巴細胞白血病和/或小淋巴細胞淋巴瘤、B細胞幼淋巴細胞淋巴瘤、免疫細胞瘤和/或淋巴漿細胞淋巴瘤、淋巴漿細胞淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、結外邊緣區MALT淋巴瘤、結邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、漿細胞瘤和/或漿細胞骨髓瘤、低級/濾泡性淋巴瘤、中級/濾泡性NHL、套細胞淋巴瘤、濾泡中心淋巴瘤(濾泡性)、中級瀰漫性NHL、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、侵襲性NHL(包括侵襲性前線NHL和侵襲性復發性NHL)、自體幹細胞移植後復發或難治性

NHL、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、高級免疫母細胞NHL、高級淋巴母細胞NHL、高級小非切割細胞NHL、巨大腫塊NHL、伯基特淋巴瘤、前體(周圍)大顆粒淋巴細胞白血病、蕈樣真菌病和/或塞紮裡症候群、皮膚淋巴瘤、間變性大細胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

【0151】在一些實施例中，癌症的示例包括但不限於B細胞增殖性病症，其還包括但不限於淋巴瘤(例如B細胞非霍奇金淋巴瘤(NHL))和淋巴細胞白血病。此類淋巴瘤和淋巴細胞白血病包括例如a)濾泡性淋巴瘤、b)小非切割細胞淋巴瘤/伯基特淋巴瘤(包括地方性伯基特淋巴瘤、散發性伯基特淋巴瘤和非伯基特淋巴瘤)、c)邊緣區淋巴瘤(包括結外邊緣區B細胞淋巴瘤(黏膜相關淋巴組織淋巴瘤，MALT)、結邊緣區B細胞淋巴瘤和脾邊緣區淋巴瘤)、d)套細胞淋巴瘤(MCL)、e)大細胞淋巴瘤(包括B細胞瀰漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、瀰漫性混合細胞淋巴瘤、免疫母細胞淋巴瘤、原發性縱隔B細胞淋巴瘤、血管中心淋巴瘤-肺B細胞淋巴瘤)、f)毛細胞白血病、g)淋巴細胞淋巴瘤、華氏巨球蛋白血症、h)急性淋巴細胞白血病(ALL)、慢性淋巴細胞白血病(CLL)/小淋巴細胞淋巴瘤(SLL)、B細胞幼淋巴細胞白血病、i)漿細胞腫瘤、漿細胞骨髓瘤、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤和/或j)霍奇金病。

【0152】在一些其他實施例中，疾病或病症是自體免疫疾病。可以用如本文所揭示的抗體或其抗原結合部分治療的自體免疫疾病的示例包括自體免疫性腦脊髓炎、紅斑狼瘡和類風濕性關節炎等。抗體或其抗原結合部分也可用於治療或預防感染性疾病、炎性疾病(諸如變應性哮喘)和慢性移植物抗宿主疾病。

聯合使用

【0153】 抗體可以與不同的抗癌劑、細胞毒性劑、化療劑或細胞免疫治療聯合使用。例如，本揭露的抗體可以與抗PD-1/PD-L1抗體聯合施用。本揭露的抗體還可以與CART治療聯合施用。

細胞免疫治療

【0154】 在一些實施例中，如本文所揭示的抗體可與細胞免疫治療聯合使用，細胞免疫治療也稱為過繼性細胞治療。如通常已知，細胞免疫治療是一種利用人體免疫系統的細胞來消除癌症的治療形式。這些方法中的一些方法涉及直接分離我們自己的免疫細胞並簡單地擴增它們的數量(例如通過在體外活化和擴增患者的免疫細胞並輸注到患者中來進行)，而其他方法涉及(經由基因治療)對免疫細胞進行基因工程改造以增強它們的抗癌能力。細胞免疫治療可以以不同方式部署，包括但不限於腫瘤浸潤的淋巴細胞(TIL)治療、工程改造T細胞受體(TCR-T)治療、嵌合抗原受體(CAR)T細胞治療、CAR NK細胞治療、自然殺傷(NK)細胞治療。

【0155】 在一些實施例中，抗體可以與附加的抗腫瘤治療諸如腫瘤浸潤的淋巴細胞(TIL)治療、T細胞受體T細胞(TCR-T)治療、嵌合抗原受體(CAR)T細胞治療和NK細胞治療以及標靶治療和化學治療聯合使用。附加的抗腫瘤治療的施用可以在施用如本文所揭示的抗體或藥物組合物之前、之後或同時進行。

化學治療

【0156】 術語「抗癌劑」或「抗增殖劑」意指可用於治療細胞增殖性病症諸如癌症的任何藥劑，並且包括但不限於細胞毒性劑、細胞抑制劑、抗血管生成劑、減積劑、化療劑、放療和放療劑、標靶抗癌劑、

BRM、治療抗體、癌症疫苗、細胞激素、激素治療、放療和抗轉移劑以及免疫治療劑。應理解，在如上所述的選定實施例中，此類抗癌劑可包括綴合物，並且可以在施用之前與所揭示的位點特異性抗體締合。更具體地，在某些實施例中，將選定的抗癌劑連接至工程改造抗體的未配對半胱胺酸以提供如本文所示的工程改造綴合物。因此，明確地設想此類工程改造綴合物在本揭露的範圍內。在其他實施例中，所揭示的抗癌劑將與包含如上所示的不同治療劑的位點特異性綴合物聯合給予。

【0157】 如本文所用，術語「細胞毒性劑」意指對細胞有毒性並且降低或抑制細胞的功能和/或引起細胞破壞的物質。在某些實施例中，該物質是源自活生物體的天然存在的分子。細胞毒性劑的示例包括但不限於小分子毒素或細菌(例如白喉毒素、假單胞菌內毒素和外毒素、葡萄球菌腸毒素A)、真菌(例如α-八疊球菌素、局限麴菌素)、植物(例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白、莫迪素、槲寄生凝集素、美洲商陸抗病毒蛋白質、皂草素、白樹毒素、苦瓜毒素、天花粉蛋白、大麥毒素、油桐蛋白質、石竹素蛋白質、美洲商陸蛋白質(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制劑、瀉果素、巴豆毒素、chlorambu officinalis抑制劑、白樹毒素、米特菌素(mitegellin)、局限麴黴素、酚黴素、新黴素和單端孢黴烯)或動物(例如細胞毒性RNA酶，諸如細胞外胰腺RNA酶；DNA酶I，包括其片段和/或變體)起源的酶促活性毒素。

【0158】 為了本揭露的目的，「化學治療劑」包括非特異性地減少或抑制癌細胞的生長、增殖和/或存活的化合物(例如，細胞毒性劑或細胞抑制劑)。此類化學試劑通常針對細胞生長或分裂所必需的細胞內過程，因此對通常快速生長和分裂的癌細胞特別有效。例如，長春新城使微管解

聚，因此抑制細胞進入有絲分裂。一般而言，化療劑可以包括抑制或被設計成抑制癌細胞或可能變成癌細胞或產生致瘤後代(例如TIC)的細胞的任何化學試劑。此類試劑通常例如在CHOP或FOLFIRI的方案中聯合施用，並且通常是最有效的。

【0159】 可以與本揭露的位點特異性構築體(作為位點特異性綴合物的組分或處於未綴合狀態)聯合使用的抗癌劑的示例包括但不限於烷化劑、烷基磺酸鹽、氮丙啶、乙烯亞胺和甲基蜜胺、多聚乙醯、喜樹堿、苔蘚抑素、卡拉汀、CC-1065、念珠藻素、尾海兔素、倍癌黴素、五加素、水鬼蕉堿、匍枝珊瑚醇、海綿抑制素、氮芥、抗生素、烯二炔類抗生素、達內黴素、雙膦酸酯、埃斯佩拉黴素、色蛋白烯二炔類抗生素發色團、阿克拉黴素、放線菌素、安麴黴素、重氮絲胺酸、博來黴素、放線菌素C、卡拉比星、洋紅黴素、嗜癌黴素、色黴素、放線菌素D、柔紅黴素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®多柔比星、表柔比星、依索比星、伊達比星、麻西羅黴素、絲裂黴素、黴酚酸、諾加黴素、橄欖黴素、培洛黴素、泊非黴素、嘌呤黴素、三鐵阿黴素、羅多比星、鏈黑菌素、鏈脲黴素、殺結核菌素、烏苯美司、淨司他丁、佐柔比星；抗代謝物、埃羅替尼、維羅非尼、克唑替尼、索拉非尼、依魯替尼、恩雜魯胺、葉酸類似物、嘌呤類似物、雄激素、抗腎上腺、葉酸補充物諸如亞葉酸、醋葡醛內酯、醛磷醯胺醣苷、胺基酮戊酸、恩尿嘧啶、安吖啶、阿莫司汀、比生群、依達曲沙、得弗伐胺(defofamine)、秋水仙胺、亞絲醌、依氟烏胺酸、依利醋銨、埃博黴素、乙環氧啶、硝酸鎵、羥基脲、香菇多醣、氯尼達明、美登木素生物鹼、米托胍腙、米托蒽醌、莫呱達醇、二胺硝吖啶、噴司他丁、蛋胺氮芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基醯

肼、甲基苄肼、PSK®多醣複合物(JHS Natural Products，Eugene，OR)、雷佐生；根黴素；西佐喃；鍺螺胺；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醌；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A、桿孢菌素A和蛇形菌素)；胺基甲酸乙酯；長春地辛；達卡巴嗪；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；呱泊溴烷；加西托星(gacytosine)；阿拉伯醣苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；紫杉烷、苯丁酸氮芥；GEMZAR®吉西他濱；6-硫鳥嘌呤；巯嘌呤；甲胺蝶呤；鉑類似物、長春花堿；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新堿；NAVELBINE®長春瑞濱；米托蒽醌；替尼泊苷；依達曲沙；道諾黴素；胺喋呤；卡培他濱；伊班膦酸鹽；伊立替康(Camptosar，CPT-11)、拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸；類維生素A；卡培他濱；康普瑞汀；亞葉酸；奧沙利鉑；降低細胞增殖的PKC-α、Raf、H-Ras、EGFR和VEGF-A的抑制劑；上述物質中任何物質的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。該定義中還包括起調節或抑制激素對腫瘤作用的抗激素劑，諸如抗雌激素和選擇性雌激素受體調節劑、抑制酶芳香酶(其調節腎上腺中雌激素產生)的芳香酶抑制劑和抗雄激素；以及曲沙他濱(1,3-二氧雜環戊烷核苷酸胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，核酶諸如VEGF表現抑制劑和HER2表現抑制劑；疫苗，PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX®rmRH；長春瑞濱和埃斯佩拉黴素以及上述物質中任何物質的藥學上可接受的鹽、酸或衍生物。

與放射治療聯合使用

【0160】本揭露還提供了抗體與放射治療(即，用於在腫瘤細胞內局部誘導DNA損傷的任何機制，諸如γ輻射、X光、UV輻射、微波、電子發

射等)的聯合。還設想了使用將放射性同位素定向遞送至腫瘤細胞的聯合治療，並且所揭示的綴合物可以與標靶抗癌劑或其他標靶手段聯合使用。通常，放射治療以脈衝方式在約1週至約2週的時間段內施用。可以將放射治療施用給患有頭頸癌的受試者，施用約6週至7週。任選地，放射治療可以作為單一劑量或作為多個連續劑量施用。

醫藥包和套組

【0161】 還提供了包括一個或多個容器的醫藥包和套組，該一個或多個容器盛有一個或多個劑量的抗體或其抗原結合部分。在某些實施例中，提供了單位劑量，其中單位劑量包含預定量的組合物，該組合物包含例如抗體或其抗原結合部分，並具有或不具有一種或多種附加藥劑。對於其他實施例，這樣的單位劑量在用於注射的單次使用的預填充注射器中提供。在其他實施例中，單位劑量中包含的組合物可包含鹽水、蔗糖等；緩衝劑，諸如磷酸鹽等；和/或在穩定且有效的pH範圍內配製。另選地，在某些實施例中，組合物可以作為凍幹粉末提供，其可以在添加合適的液體例如無菌水或鹽水溶液後重構。在某些較佳的實施例中，組合物包含抑制蛋白質聚集的一種或多種物質，這些物質包括但不限於蔗糖和精胺酸。容器上的或與容器相關的任何標籤表明，所封裝的綴合物組合物用於治療選擇的腫瘤疾病病況。

【0162】 本揭露還提供了用於產生抗體和任選的一種或多種抗癌劑的單劑量或多劑量施用單位的套組。該套組包括容器和容器上的或與容器相關的標籤或包裝說明書。合適的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可以由多種材料諸如玻璃或塑膠形成，並且盛有藥學上有效量的所揭示的抗體或其抗原結合部分。在其他較佳的實施例中，容器包括無菌入口

(例如，容器可為靜脈注射溶液袋或具有可由皮下注射針頭刺穿的塞子的小瓶)。此類套組通常包含在合適的容器中的抗體的藥學上可接受的製劑以及任選地在相同或不同容器中的一種或多種抗癌劑。套組也可以包含用於診斷或聯合治療的其他藥學上可接受的製劑。例如，除了本揭露的抗體或其抗原結合部分之外，此類套組可以包含一系列抗癌劑中的任何一種或多種抗癌劑，諸如化療或放療藥物；抗血管生成劑；抗轉移劑；標靶抗癌劑；細胞毒性劑；和/或其他抗癌劑。

【0163】 更具體地，套組可具有盛有所揭示的抗體或其抗原結合部分並包含或不包含附加組分的單個容器，或者套組可具有用於每種期望藥劑的不同容器。另選地，套組的抗體和任何任選的抗癌劑可以在施用於患者之前分開保存在不同的容器中。套組還可以包括用於容納無菌的、藥學上可接受的緩衝液或其他稀釋劑諸如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、林格氏溶液和葡萄糖溶液的第二/第三容器裝置。

【0164】 當套組的組分在一種或多種液體溶液中提供時，液體溶液較佳地為水溶液，並且特佳的是無菌水溶液或鹽水溶液。然而，套組的組分可以作為乾燥粉末提供。當試劑或組分作為乾燥粉末提供時，可通過添加合適的溶劑來重構粉末。據設想，溶劑也可以在另一個容器中提供。

【0165】 如上文簡要指出的，套組還可以包含將抗體或其抗原結合部分和任何任選的組分施用於患者的裝置，例如，一個或多個針、靜脈注射袋或注射器，或甚至滴眼管、移液管或其他此類類似設備，製劑可以從該裝置注射或引入到動物體內或施用於身體的患病區域。本揭露的套組通常還包括用於容納小瓶等的裝置，以及用於商業銷售的嚴密封閉的其他部件，諸如例如，將期望的小瓶和其他設備放置並保持在其中的注射或吹塑

塑膠容器。

序列表概要

【0166】本申請所附的序列表包括許多胺基酸序列和核苷酸序列。下表A、B和C提供了本文示例的W301088抗體的序列概述，包括W301088-1.145.16、其嵌合抗體W301088-1.145.16-xIgG1KV320和人源化抗體W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320。W301088-1.145.16-xIgG1KV320具有與W301088-1.145.16親代鼠類複製相同的可變區。

表A. W301088-1.145.16-xIgG1KV320(即嵌合抗體)的胺基酸序列，其中CDR部分加底線

VH SEQ ID No: 8	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA
VL SEQ ID No: 9	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK
Heavy chain SEQ ID No: 14	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
Light chain SEQ ID No: 15	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表B. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(即最終先導抗體)的胺基酸序列，其中CDR部分加底線

VH SEQ ID No: 10	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGL EWIGYISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV YFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSS
VL SEQ ID No: 11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHYSAPWTFGGGTKVEIK
Heavy Chain SEQ ID No: 12	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGL EWIGYISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAV YFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Light Chain SEQ ID No: 13	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表C. 編碼W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的VH和VL區的核苷酸序列

VH SEQ ID No: 16	CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCATC TCAGACACTGAGCCTGACATGTACCGTGACCGATTATAGCATCA CCGGCGACTACGCTTGGAATTGGATCAGACAGCACCCTGGAAAG GGCCTGGAGTGGATTGGATACATCAGCTATTCTGGCAGCACATC TTATAATCCTAGCCTGCAGTCTAGGGTGACAATTTCAAGAGATA CCAGCAAAAATCAGTTTAGCCTGAAACTGAGCTCTGTGACCGCC GCCGATACAGCCGTGTATTTTTGTGCCAGAAGCCTGGGAAGAAG ATGGTATTTTGTGGTGTGGGGACAGGGCACAACAGTGACCGTGT

	CTAGC
VL SEQ ID No: 17	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCT GGGCGAGAGAGCCACAATCAATTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGC TGCAGAGCTCTAATCAGAAAAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACTTTGCCAGCAC AAGGGAATCTGGAGTGCCTGATAGGTTTAGCGGCAGCGGCTCTG GCACAGATTTTACACTGACAATCTCTAGCCTGCAGGCCGAGGAT GTGGCCGTGTATTATTGTCAGCAGCACTATTCTGCCCCTTGGACA TTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAGATTAAG

實例

【0167】 通過參考以下實例，將更容易理解如此一般性描述的本揭露，這些實例是通過舉例說明的方式提供的，並且不旨在限制本揭露。實例並不旨在表示下面的實驗是所執行的全部或唯一實驗。

實例1

抗原、基準抗體和細胞株的製備

1.1 市售材料的製備

表1. 市售材料的資訊

材料	供應商	目錄號
MCF7	ATCC	HTB-22
CHOK1	ATCC	CTL-61
Expi293™表現系統套組	Invitrogen	A14635
Expi293F™表現培養基	Invitrogen	A1435101
Flp-In™-CHO細胞株	Invitrogen	R75807
TMB單一溶液	Invitrogen	002023
Lipofectamine™ 2000轉染試劑	Invitrogen	11668027
FreeStyle™ CHO表現培養基	Gibco	12651014
Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Calcein AM	Invitrogen	C3099
pHrodo iFL Red STP	Invitrogen	P36011
NuPAGE4%-12% Bis-Tris凝膠	Invitrogen	NP0322BOX
10×PBS	Invitrogen	AM9624

RPMI培養基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管柱	Cytiva	173712
蛋白質A管柱	Cytiva	175438
TSKgel G3000SWXL管柱	Tosoh	0008541
山羊抗人類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山羊抗人類抗體	Jackson ImmunoResearch	109-605-098
山羊抗小鼠IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch	115-115-164
山羊抗人類IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch	109-115-098
抗人類Fc IgG	Jackson ImmunoResearch	109-005-098
抗小鼠Fc IgG	SouthernBiotech	1013-01
山羊抗小鼠κ輕鏈HRP	Southern Biotech	A90-119P
山羊抗小鼠λ輕鏈HRP	Southern Biotech	A90-121P
F(ab')2山羊抗人類IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch	109-006-098
F(ab')2-山羊抗小鼠IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch	115-005-064
人類B7-H3/CD276蛋白質，His標籤(2IgB7H3)	ACROBiosystems	B73-H52E2
石蟹獼猴B7-H3/CD276蛋白質，His標籤	ACROBiosystems	B73-C52Ha
S系列感測器晶片CM5	Cytiva	29-1496-03
胺基偶聯套組	Cytiva	BR100050
10×HBS-EP+	Cytiva	BR100669

1.2 抗原產生

【0168】首先對編碼人類4IgB7H3的胞外結構域的胺基酸序列(Uniprot ID：Q5ZPR3，胺基酸29-461)進行密碼子最佳化以用於哺乳動

物表現，然後由Sangon Biotech(上海，中國)合成。將該DNA片段次選殖到在C末端具有6xHis的pcDNA3.3表現載體中，然後將其轉染到Expi293F細胞(Invitrogen，A14635)中。培養五天後，使用Ni管柱(Cytiva，173712)純化上清液。將洗脫的蛋白質經由透析袋(Spectrum，888-10987，MWCO 3.5kDa)透析到PBS中。通過在NanoDrop裝置上280nm處的吸光度確定蛋白質濃度。將2μg純化的蛋白質在含有和不含有還原劑的SDS-PAGE凝膠(Invitrogen)上電泳。利用TSKgel G3000SWXL體積排阻色譜管柱(Tosoh，008541)，通過HPLC-SEC定量純化的蛋白質的純度。將純化的蛋白質保存於-80℃下。人類2IgB7H3購自ACRO(目錄號B73-H52E2)，石蟹獼猴B7H3購自ACRO(目錄號B73-C52Ha)。

1.3 基準抗體(BMK)的產生

【0169】抗 B7H3 抗體 enoblituzumab(MacroGenics，US20120294796A1：Seq 117、119)用作基準抗體。編碼抗體的可變結構域的核酸序列首先進行密碼子最佳化以用於哺乳動物表現，然後由Sangon Biotech(上海，中國)合成。然後將DNA片段次選殖到具有人類IgG1的恆定區的修飾的pcDNA3.4表現載體中。將含有VH和VL基因的質體共轉染到Expi293F細胞(Invitrogen，A14635)中。培養五天後，使用蛋白質A管柱(Cytiva，175438)純化上清液。將洗脫的蛋白質經由透析袋(Spectrum，888-10987)透析到PBS中。通過在NanoDrop裝置上280nm處的吸光度確定蛋白質濃度。將2μg純化的蛋白質在含有和不含有還原劑的SDS-PAGE凝膠(Invitrogen)上電泳。利用TSKgel G3000SWXL體積排阻色譜管柱(Tosoh，008541)，通過HPLC-SEC定量純化的蛋白質的純度。將純化的抗體保存於-80℃下。

1.4 穩定的細胞株/細胞池的建立

【0170】 產生表現人類4IgB7H3的細胞株。簡言之，根據製造商的方案，使用Lipofectamine 2000轉染套組(Invitrogen，11668027)，用含有全長4IgB7H3的pcDNA3.3表現載體轉染CHOK1細胞。在轉染後48小時，將細胞繼代培養至T75培養瓶中的選擇性培養基(含有10% FBS和15μg/mL殺稻瘟菌素的F12-K)中。選擇兩次或三次繼代後，通過殺稻瘟菌素選擇和有限稀釋獲得人類4IgB7H3表現穩定的細胞株(W3XX088-CHOK1.hPro1.2A5)，並使用抗B7H3抗體通過FACS測定表現水準。

【0171】 產生表現石蟹獼猴B7H3的細胞池。簡言之，根據製造商的方案，使用Lipofectamine 2000轉染套組(Invitrogen-11668027)，用含有全長石蟹獼猴B7H3的pcDNA5/pOG44表現載體轉染FlipinCHO細胞。在轉染後48小時，將細胞繼代培養至T75培養瓶中的選擇性培養基(含有10% FBS和600μg/mL潮黴素B的F12)中。選擇兩次或三次繼代後，通過潮黴素B選擇和BD FACSMelody™細胞分選獲得高表現穩定的細胞池(WBP3XX088-FlpinCHO.cPro1.pool)。

實例2

WBP301088抗體的產生

2.1 動物免疫

【0172】 用編碼人類4IgB7H3的DNA質體免疫6週齡-8週齡的4隻Balb/c小鼠，每隻200μg-400μg。佐劑混合物包括Adju-Phos、CpG-ODN和GM-CSF。每隔一週經由皮下、肌內和流體動力學尾靜脈注射動物一次。在第3次注射(第一次出血)和第5次注射(第二次出血)後從小鼠採血。通過ELISA和FACS測量血清滴度。

【0173】 ELISA測定法用於測量針對4IgB7H3抗原的血清抗體滴度。用100μL His標籤以0.5μg/mL包被板(Nunc)，在4℃下過夜，然後用封閉緩衝液(2% BSA的PBS溶液)在環境溫度下封閉1小時。然後洗滌板，並在環境溫度下與1μg/mL抗原孵育1小時。洗滌後，小鼠血清自1:100稀釋度開始在封閉緩衝液中以1:3連續稀釋，並在環境溫度下孵育2小時。然後洗滌板，隨後與山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP(Bethyl，A90-231P)二抗孵育1小時。洗滌後，加入TMB底物，並用2M HCl終止相互作用。使用微板讀數器(Molecular Device)讀取450nm處的吸光度。血清滴度在2倍背景下測定。

表2. 通過ELISA對人類4IgB7H3結合血清滴度測試的匯總

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

【0174】 FACS測定法用於測量針對4IgB7H3抗原的血清抗體滴度。簡言之，將經工程改造的表現B7H3的細胞以1×10^5個細胞/孔的密度接種到96孔U底板中，在4℃下以1500rpm離心4分鐘，然後去除上清液。將小鼠血清自1:100稀釋度開始在1×PBS/1%BSA中以1:3連續稀釋，以重懸細胞，並在4℃下孵育1小時。用180μL 1×PBS/1%BSA洗滌細胞兩次。將山羊抗小鼠IgG-Fc Alexa 647(Jackson，109-605-098)二抗添加到重懸細胞中並在4℃下避光孵育30分鐘，然後用180μL 1×PBS/1%BSA洗滌。最後，將細胞重懸於100μL 1×PBS/1%BSA中，並通過FACS(BD Canto II)測量螢光強度，並通過FlowJo版本軟體分析。血清滴度在2倍背景下測定。

表3. 通過FACS對人類4IgB7H3細胞株進行血清滴度測試的匯總

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

【0175】 當血清滴度足夠高時，在融合前用400μg DNA經由流體動力學尾靜脈和4×10^6 MCF-7細胞經由足墊和皮下進行最後一次增強免疫。淋巴結和脾用於細胞融合。

2.2 融合瘤產生

【0176】 將來自免疫小鼠的淋巴結和脾均質化並過濾以去除血塊和細胞碎片。收集呈對數生長的Sp2/0骨髓瘤細胞並離心。按照一般的電融合程序，在電融合溶液中以1:1的比例將B細胞與Sp2/0骨髓瘤細胞融合。將融合的細胞懸浮在補充有20% FBS和1X HAT的DMEM培養基中，然後轉移到96孔板(CORNING)中。將融合的細胞在設定為37℃、5% CO_2的培養箱中培養10天～14天。

2.3 抗體篩選

【0177】 第一次篩選：基於細胞的ELISA測定法用作第一次篩選以測試融合瘤上清液與人類4IgB7H3的結合。簡言之，將人類4IgB7H3轉染的CHOK1細胞株以5×10^3個細胞/孔的密度接種於96孔板(CORNING)中，然後在設置為37℃、5% CO_2的培養箱中持續2天。然後洗滌板，並在環境溫度下與融合瘤上清液孵育1小時。然後洗滌板，隨後與山羊抗小鼠IgG-Fc-HRP(Bethyl，A90-231P)二抗孵育1小時。洗滌後，加入TMB底物，並用2M HCl終止相互作用。使用微板讀數器(Molecular Device)讀取450nm處的吸光度。

【0178】 第二次篩選：為了證實融合瘤上清液與人類和石蟹獼猴抗原的結合，進行流式細胞分析實驗(FACS)。親代CHOK1細胞株和

4IgB7H3轉染的CHOK1細胞株用CellTrace染料(分別為Violet和FarRed)染色，而B7H3轉染的FlipinCHO細胞池不用染料製備。在環境溫度下孵育15分鐘並洗滌後，將三種類型的細胞等量混合至1×10^6個細胞/mL。將三種細胞混合物以1×10^5個細胞/孔的密度轉移到96孔U底板(BD)中。然後將融合瘤上清液轉移到板，並在4℃下孵育1小時。洗滌後，加入山羊抗小鼠IgG Fc PE(Jackson，115-115-164)二抗並在4℃下與細胞在黑暗中孵育0.5小時。然後洗滌細胞，並在通過流式細胞分析技術分析之前重懸於1×PBS/1% BSA中。

【0179】 為了測試融合瘤上清液與人類2IgB7H3的結合，使用傳統的ELISA測定法。在環境溫度下，用100μL/孔的人類2IgB7H3(0.2μg/mL)預包被板，持續1小時。用200μL/孔的1×PBS/2% BSA封閉1小時後，用1×PBST將板洗滌3次。將融合瘤上清液以100μL/孔的體積加入到板中，並在環境溫度下孵育2小時。用1×PBST將板洗滌3次後，將100μL/孔的山羊抗小鼠IgG-Fc HRP(Bethyl，A90-231P)加入到板中，並在環境溫度下孵育1小時。洗滌6次後，通過將TMB底物以100μL/孔加入板中5分鐘-10分鐘顯色，然後通過加入100μL/孔的2M HCl使反應停止。使用微板讀數器讀取450nm處的吸光度。

【0180】 通過SPR(表面電漿子共振)進一步證實通過FACS篩選選定的陽性細胞株。SPR允許即時、無標記地檢測生物分子相互作用。當偏振光入射到兩個介質之間的介面處的導電表面時，會發生SPR。這會產生稱為電漿子的電子電荷密度波，以與感測器表面品質成比例的特定角度(稱為共振角)降低反射光的強度。

【0181】 使用Biacore 8K對上清液與人類4IgB7H3的結合分級。通

過在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)來製備活化劑。用活化劑將CM5感測器晶片活化，持續420秒。然後以10μL/min的流速將山羊抗小鼠Fc IgG(30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5)注射到通道，持續420秒。用1M乙醇胺-HCl將晶片去活化。將上清液以10μL/min的流速注射到通道，持續30秒。將200nM人類4IgB7H3的分析物以30μL/min的流速注射到通道，持續120秒的結合期，隨後300秒的解離。在解離期後注射甘胺酸(10mM，pH 1.5)，作為再生緩衝液。將圖譜與參考通道和緩衝液通道相減。然後用1:1的Langmuir結合模型對資料進行擬合。

【0182】 pHrodo iFL染料可以與生物分子(諸如抗體)綴合，並且僅當在存在於酸性環境(諸如細胞溶酶體和核內體)中時才變成高度螢光的。這使得能夠在活細胞測定中檢測綴合的生物分子。用pHrodo iFL Red STP酯胺反應性染料標記AffiniPure F(ab')^{2}片段山羊抗人類IgG Fcγ和抗小鼠IgG Fcγ，並根據製造商的說明書通過Zeba Spin脫鹽管柱純化。將表現人類全長B7H3的MCF-7細胞(2×10^{4}個細胞/孔)接種到用8μg/mL聚-D-離胺酸預包被的96孔透明底部黑色板中。細胞在設定為37°C、5% CO_2的培養箱中生長過夜。第二天，將WBP301088-1陽性細胞株上清液以100μL的體積加入到相應的孔中。將細胞在設定為37°C、5% CO_2的培養箱中培養0.5小時。人類和小鼠IgG1同型抗體用作陰性對照。以100μL/孔的體積加入50nM pHrodo iFL Red/F(ab')^{2}山羊抗小鼠或抗人類IgG Fcγ綴合物(用完全培養基稀釋)。然後將板在設定為37°C、5% CO_2的培養箱中避光孵育5小時。孵育後，棄去上清液。用完全培養基洗滌板。將混合染料溶液(1μg/mL Hoechst 33342和0.5μg/mL在DPBS中稀釋的Calcein AM)以100μL/孔的體積加入到板中，並在環境溫度下持續15分鐘。孵育後，棄

去染料溶液，並用1×PBS/1% BSA將板洗滌一次。通過Perkin Elmer Operetta CLS高含量分析系統讀取和分析MCF-7細胞的螢光強度。

【0183】在初步篩選中測試總共8460個孔，在24孔板中選擇279個融合瘤並擴增。在第二次篩選中，使用來自24孔板的上清液來證實針對人類4IgB7H3和石蟹獼猴B7H3的強結合、針對人類2IgB7H3的弱結合以及對MCF-7的強內化活性。基於第二次篩選結果，選擇WBP301088-1.145融合瘤進行次選殖。

2.4 抗體次選殖

【0184】使用選定的陽性融合瘤細胞進行次選殖。對呈對數生長的細胞計數，並加入1.5mL半固體HAT培養基中。將細胞在渦旋振盪器中輕輕混合5秒-10秒，然後接種在6孔板(CORNING)中。將板在設定為37℃、5% CO_2的培養箱中持續7天～8天。挑取每個可見的單菌落到96孔板(CORNING)中，這些板具有補充有10% FBS的DMEM培養基。2天～3天後，收集細胞上清液，並使用如上所述的抗體篩選方案，通過基於細胞的ELISA(人類4IgB7H3)、一般ELISA(人類2IgB7H3)篩選。在通過FACS對人類4IgB7H3和石蟹獼猴B7H3次選殖確認性篩選後，收集選定的單陽性複製的培養上清液，並純化抗體以供進一步特徵化。在次選殖篩選和確認性篩選後獲得WBP301088-1.145.16。

2.5 抗體分型

【0185】在96孔高結合板(Nunc)中進行ELISA分型。每孔用2μg/mL捕獲抗體(分別為山羊抗小鼠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))包被，在4℃下過夜，並用2%

BSA/1×PBS封閉。將融合瘤上清液在包被的孔中孵育，並使用過氧化物酶綴合的山羊抗小鼠κ/λ輕鏈抗體測量抗體與固定在板上的捕獲抗體的特異性結合。通過加入TMB底物檢測HRP訊號，12分鐘後使用2M HCl終止反應。所有孵育步驟均在環境溫度下進行，並且在各步驟之間用PBS洗滌板。使用微板讀數器(Molecular Device)讀取450nm處的吸光度。

【0186】 WBP301088-1.145.16的分型結果示於下表(表4)。

表4. WBP301088-1.145.16的分型結果

複製編號	同型
WBP301088-1.145.16	IgG2b，κ

2.6 抗體產生

【0187】 當需要少量純化抗體時，T75培養瓶(CORNING)通常用於進行融合瘤細胞培養規模的擴大。將單株融合瘤細胞以5×10^6至1×10^7個細胞/T75培養瓶接種到培養瓶。使細胞連續生長約7天-10天，直到細胞存活率為約30%-40%。收穫培養上清液，並通過離心去除細胞碎片。將上清液無菌過濾並保存用於抗體純化。

2.7 融合瘤定序

【0188】 按照TaKaRa MiniBEST通用型RNA提取套組的說明書，首先提取融合瘤細胞樣本的總RNA。然後使用來自Clonetech的SMART RACE cDNA擴增套組將RNA轉變為cDNA。然後用30個PCR迴圈從cDNA擴增VH和VL結構域DNA序列，每個迴圈在94℃下變性30秒，在60℃下退火30秒，然後在72℃下伸長30秒。然後將PCR產物次選殖到TA複製載體中，然後送往Biosune Biotech(上海，中國)進行定序。

【0189】 一旦定序資料證實融合瘤細胞樣本的單株性，就通過PCR

擴增VH和VL結構域的DNA序列。引子由Sangon Biotech(上海，中國)合成。然後將DNA片段次選殖到具有LALA突變的人類IgG1恆定區的pcDNA3.4表現載體中，然後通過Tsingke Biotechnology(北京，中國)定序。

2.8 IgG轉變

【0190】一旦定序資料證實融合瘤細胞樣本的單株性，VH和VL結構域的胺基酸序列就進行密碼子最佳化以用於哺乳動物表現，然後由Sangon Biotech(上海，中國)合成。然後將DNA片段次選殖到具有L234A/L235A(LALA)突變的人類IgG1恆定區的pcDNA3.4表現載體中。

【0191】以這種方式，將W301088-1.145.16轉變成具有LALA突變形式的人類IgG1，以獲得嵌合抗體W301088-1.145.16-xIgG1KV320。在蛋白質A純化和緩衝液交換後，通過SDS-PAGE和SEC-HPLC特徵化。在還原條件下，該蛋白質在SDS-PAGE上以50kDa和25kDa的表觀分子量遷移，對應於IgG重鏈和輕鏈(資料未示出)。純度高於99%(SEC-HPLC)。

表5. 產生的嵌合抗體匯總

蛋白質名稱	濃度（mg/mL）	緩衝液	純度 SEC-HPLC（%）	理論分子量
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	2.50	PBS	99.64%	147 kDa

2.9 人源化

【0192】運行開源軟體ANARCI(Dunbar J、Deane CM，「ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification」，Bioinformatics，2015年；第32卷第5期：第298-300頁)的本機複本以在W301088-1.145.16上分配Kabat編號。根據Dr. Martin網站的定義鑑定CDR(Martin，2018年，出處同上)，並示於表6中。

表6. 根據Dr. Martin抗體資訊學網站定義的CDR範圍

CDR	Kabat	前面的殘基	後面的殘基	長度
L1	L24-L34	總是C	總是W	10個至17個殘基
L2	L50-L56	L1後的16個殘基	/	7個殘基
L3	L89-L97	總是C	總是F-G-X-G	7個至11個殘基
H1	H31-H35b	總是C-X-X-X	總是W	10個至12個殘基
H2	H50-H65	通常為L-E-W-G	K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A	16個至19個殘基
H3	H95-H102	通常為C-A-R	總是W-G-X-G	3個至25個殘基

表7. W301088-1.145.16的VH和VL胺基酸序列，其中CDR序列加底線

複製ID		胺基酸序列
W301088-1.145.16	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA
	VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGG GTKLEIK

表8. W301088-1.145.16的經鑑定的重鏈和輕鏈CDR序列

抗體	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

【0193】 將鼠類抗體W301088-1.145.16的VH和VL結構域序列分別與IMGT的VH和VL結構域的人類生殖細胞序列庫比對。選擇相對於W301088-1.145.16的VH/VL結構域序列在框架中具有最小數目胺基酸差異的VH/VL結構域的人類生殖細胞序列作為VH/VL結構域的人源化範本。IGHV4-31*02與IGHJ6*01的結合和IGKV4-1*01與IGKJ4*01的結合分別是與W301088-1.145.16的VH和VL結構域序列最同源的人類生殖細

胞序列。將W301088-1.145.16的CDR移植到這兩個人類生殖細胞範本的框架中，以構成生殖細胞序列。

【0194】 根據經驗選擇框架中的幾個「回復突變」位置，以將生殖細胞序列中的胺基酸轉變為它們在原始鼠類序列中的胺基酸對應物。根據經驗設計一組人源化變體以研究這些選定回復突變位元點的不同組合。在VL結構域的16個位置處和VH結構域的20個位置處，生殖細胞序列不同於原始鼠類W301088-1.145.16序列。在總共36個不同的位點中，有14個位點被考慮用於回復突變：VH：Q001D、S025T、H040F、K043N、G044K、I048M、V067I、V071R、A085E、V089T、Y091F，VL：I021M、P043S、Y087F。根據經驗設計一組人源化變體以測試這些回復突變的不同組合。

2.11 PTM去除

【0195】 掃描人源化變體的VH和VL結構域序列的若干類型的關鍵轉譯後修飾(PTM)位點：CDR中的天門冬醯胺酸脫胺(N-G和N-S)、CDR中的天門冬胺酸異構化(D-G)、整個長度上的未配對C和整個長度上的*N*-連接醣基化位點(N-X-S/T，其中X可以是除P以外的任何胺基酸)。根據經驗設計點突變以去除人源化變體中的這些關鍵PTM位點，以避免PTM修飾的潛在風險。最後，我們選擇與親代抗體相比不影響表現、結合和熱穩定性的PTM去除抗體。

【0196】 由於鼠類抗體W301088-1.145.16的VL結構域序列包含N-S-S *N*連接的醣基化位點。設計VL：N027dQ、VL：S027eP和VL：S027fA(根據Kabat編號)三個點突變以去除關鍵PTM位點。它們與人源化變體一起通過k_{off}分級進行測試。

2.12 通過SPR的k_{off}分級

【0197】 在Biacore 8K設備上執行經過濾上清液的k_{off}分級。首先以10μL/min的流速用400mM EDC和100mM NHS(GE)將CM5感測器晶片活化，持續420秒。然後以10μL/min的流速將10mM NaAc(pH 4.5)中的30μg/mL抗人類Fc IgG(Jackson)注射到通道1至8中，持續420秒。然後以10μL/min的流速用1M乙醇胺-HCl(GE)將晶片去活化，持續420秒。以10μL/min的流速將稀釋的抗體上清液注射到通道的Fc2。不具有質體轉染的細胞培養物的上清液用作陰性對照，並以10μL/min的流速注射到通道的Fc1。將100nM人類4IgB7H3和流動緩衝液以30μL/min的流速依次注射到通道的Fc1-Fc2，持續180秒的結合期，隨後3600秒的解離期。每次運行後注射10mM甘胺酸(pH 1.5)以使晶片再生。通過Biacore 8K設備附帶的軟體分析圖譜。將樣本的圖譜與參考通道和緩衝液通道相減。然後用1:1的Langmuir結合模型對資料進行擬合。

2.13 PTM去除突變與人源化變體的組合

【0198】 將k_{off}表現最佳的PTM去除點突變組合到具有最佳k_{off}速率逐點誘變的人源化變體中，以構成用於親和力驗證的最終構築體。

【0199】 根據k_{off}速率，將VL：N027dQ的PTM去除突變與四個選定的人源化突變胺基酸S025T、V071R、Y091F、V089T組合構成最終抗體。將最終抗體稱為W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320。

表9. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的重鏈和輕鏈CDR序列

抗體	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
	DYSITGDYAWN	**YISYSGSTSYNPSLQS**	**SLGRRWYFVV**	**KSSQSLLQSSNQKNYLA**	**FASTRES**	**QQHYSAPWT**

2.14 生產規模的暫態轉染和純化

【0200】使用ExpiFectamine™暫態轉染套組，將最終濃度為1μg/mL的各質體暫態轉染至20mL Expi293F細胞，細胞密度為3.0×10^{6}個細胞/mL，並且細胞存活率超過95%。細胞培養物在加濕水平振盪器中生長，旋轉速度為150rpm。溫度保持在37℃，而CO_2水準保持在8%。

【0201】細胞培養5天後，收集表現標靶抗體的上清液，並過濾，使用GE MabSelect SuRE蛋白質A管柱(Cytiva-175438)純化。所洗脫的抗體經由D-Tube透析器Maxi(EMD Millipore 71508，MWCO 3.5kDa)透析到PBS中。通過在NanoDrop裝置上280nm處的吸光度確定抗體濃度。將2μg純化的抗體樣本在含有和不含有還原劑的SDS-PAGE凝膠(Invitrogen NuPAGE™ 4%-12% Bis-Tris蛋白質凝膠)上電泳。利用TSKgel G3000SWXL體積排阻色譜管柱(Tosoh, 008541)通過HPLC-SEC定量純化的抗體樣本的純度。將純化的抗體保存在-80℃下。

實例3

WBP301088抗體的體外特徵化

3.1 SDS-PAGE和SEC-HPLC純度檢測

【0202】將樣本與加載緩衝液混合，並使用乾燥浴在75℃下加熱10分鐘。加載樣本後，SDS-PAGE在恒定電壓(200V)下電泳35分鐘。將凝膠染色並用eStain™ L1脫色。用BIO-RAD成像系統獲得SDS-PAGE結

果。

【0203】結果匯總於下表10中。在還原條件下，該蛋白質在SDS-PAGE上以50kDa和25kDa的表觀分子量遷移，對應於IgG重鏈和輕鏈，而在非還原條件下，以預期的約150kDa帶遷移(圖1)。

3.2 SEC-HPLC方法檢測純度

【0204】通過配有TSKgel G3000SWXL管柱(Tosoh Bioscience-0008541)的Agilent 1260 Infinity II系統(Agilent Technologics™)檢測每種抗體的純度。將適當體積的樣本(5μL-100μL)注射到管柱中，並以1mL/min的流速分離20分鐘。電泳緩衝液(running buffer)為50mM磷酸鈉，150mM NaCl，pH 7.0。用280nm波長的UV光檢測尖峰滯留。採用SEC-HPLC分析法將從4.5分鐘至10.5分鐘的所有峰面積積分來分析每種抗體的純度。操作分析軟體為OpenLab CDS工作站(v2.3.0.443或v2.2.0.484)。

【0205】結果匯總於下表10中。最終抗體的純度高於99%(SEC-HPLC，圖2)。

3.3 DSF方法檢測熱穩定性(T_m)

【0206】使用QuantStudio® 7 Flex即時PCR系統(Applied Biosystems)研究各抗體的T_m(熔融溫度)。將19μL抗體溶液與1μL SYPRO Orange溶液(Invitrogen)混合並轉移到96孔板(Applied Biosystems)。將板用光學黏合劑膜(Applied Biosystems)密封，並以3,000rpm離心5分鐘以去除任何氣泡。以0.9℃/min的速率將板從26℃加熱至95℃，並收集所得的螢光資料。計算螢光隨不同溫度變化的負導數，將最大值定義為熔融溫度T_m。如果蛋白質具有多個解折疊轉變，則回報第一個T_m，將它命名為

T_m1。資料收集和T_m計算通過QuantStudio®即時PCR軟體(v1.3)自動進行。

【0207】將蛋白質W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的T_m值定義為螢光隨不同溫度變化的負導數的最大值，如下表10所列出的。資料分佈示於圖3，其中虛線表示T_m1值在螢光曲線中的位置。W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的T_m1為70.1℃，這表明它具有良好的熱穩定性。

3.4 HIC-HPLC方法檢測疏水性

【0208】通過HPLC 1260 infinity II系統(Agilent Technologics™)用TSKgel butyl-NPR管柱(Tosoh-0042168)檢測抗體的疏水性特性。用PBS緩衝液將各樣本稀釋至0.5mg/mL，將20μL稀釋的樣本注射到管柱中，並以0.5mL/min的流速分離61分鐘。電泳緩衝液是25mM磷酸鈉，pH 7.0(緩衝液A)和25mM磷酸鈉、1.5M $(NH_4)_2SO_4$，pH 7.0(緩衝液D)。3分鐘至53分鐘的運行梯度為0%至100%緩衝液D。用280nm和230nm波長的UV光檢測尖峰滯留。採用HIC-HPLC分析法將從20分鐘至40分鐘的所有峰面積積分來分析滯留時間。操作分析軟體為OpenLab CDS工作站(v2.6.0.691)。

【0209】蛋白質W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的HIC滯留時間為23.52分鐘(表10和圖4)，這表明它是一種具有良好親水性的抗體。

3.5 DLS方法測定擴散相互作用參數(k_D)

【0210】使用DynaPro讀板機III(Wyatt Technology)研究DLS-k_D測量結果。在樣本製備過程中，在解凍、過濾和濃縮時記錄樣本的外觀。將樣本濃縮至超過20mg/mL，然後用PBS緩衝液稀釋至2.5mg/mL、

5mg/mL、10mg/mL、15mg/mL和20mg/mL的最終濃度。然後將7.5μL樣本溶液加入到1536孔微板(Aurora-ABI1-00110A)中。用ClearSeal膜(Hampton Research-HR4-521)密封板，並以3,000rpm離心5分鐘，使樣本下降到孔的底部。每個樣本一式兩份在孔中測試。將板放到相應位置中，並通過DYNAMICS操作軟體(v7.8.1.3)進行資料收集。收集每個蛋白質樣本的5次採集，同時每次採集時間為5秒。對於每次測量，確定擴散係數並針對蛋白質濃度作圖。k_D值由軟體自動計算(v7.8.1.3)，如表10所列出。資料分佈示於圖5中。蛋白質W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320在PBS中的k_D為-5.17mL/g，這表示它是一種具有高溶解度的抗體。在測定過程中，同時記錄蛋白質的外觀，在解凍並輕輕搖動後觀察到一些顆粒。如果將緩衝液換成20mM His、8%蔗糖、0.02% PS80，pH 6.5，則觀察不到顆粒。

【0211】上述SDS-PAGE、SEC-HPLC、HIC-HPLC、DSF和DLS結果匯總在表10中。

表10. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320的分析資料匯總

抗體名稱	通過SEC-HPLC的純度	產率（mg/L）	分子量	pI	HIC滯留時間（min）	T_m（°C）	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

3.6 與人類B7H3結合活性檢測（FACS）

【0212】使用FACS來檢測抗體與人類B7H3的結合。該方法可以定量分析和鑑定在活細胞表面上表現的特定分子。未標記的細胞用作對照以在檢測前設定閾值，並且分析超過螢光強度閾值的每組的百分比變化。表現人類全長B7H3的MCF-7細胞(1×10^5個細胞/孔)與各種濃度的抗體(用

1×DPBS/1% BSA自50nM至0.0005nM連續稀釋3.16倍)以100μL/孔的體積在設定為4℃的冰箱中孵育1小時。抗人類B7H3參考抗體enoblituzumab(MacroGeneics)用作陽性對照。人類IgG1同型抗體用作陰性對照。在用1×DPBS/1% BSA洗滌細胞後，加入Alexa 647山羊抗人類抗體(在1×DPBS/1% BSA中以1:500稀釋)。將細胞在設定為4℃的冰箱中避光孵育0.5小時。用流式細胞儀測量細胞的平均螢光強度(MFI)，並用FlowJo進行分析。使用GraphPad Prism 7軟體，通過四參數非線性回歸分析計算EC_{50}值。

【0213】 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320與表現B7H3的MCF-7細胞良好結合，EC_{50}為1.08nM且最大MFI為19900，這與嵌合抗體相當並優於參考抗體enoblituzumab(MacroGenics)(表11，圖6)。

表11. 對表現人類B7H3的細胞MCF-7的FACS結合資料

樣本	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
Enoblituzumab（MacroGenics）	2.49	4644
hIgG1同型	N.A.	47.8

註：N.A.表示不適用。

3.7 與石蟹獼猴B7H3結合活性檢測(FACS)

【0214】 使用FACS來檢測抗體與石蟹獼猴B7H3的結合。用石蟹獼猴B7H3(W3XX088-FlpinCHO.cProl.pool)(1×10^5個細胞/孔)轉染FlpinCHO細胞，並將其與各種濃度的抗體(用1×DPBS/1% BSA自50nM至0.0005nM連續稀釋3.16倍)以100μL/孔的體積在設定為4℃的冰箱中孵育1小時。抗人類B7H3參考抗體enoblituzumab(MacroGeneics)用作陽性對照。人類IgG1同型抗體用作陰性對照。在用1×DPBS/1% BSA洗滌細胞

後，加入Alexa 647山羊抗人類抗體(在1×DPBS/1% BSA中以1:500稀釋)。將細胞在設定為4℃的冰箱中避光孵育0.5小時。用流式細胞儀測量細胞的平均螢光強度(MFI)，並用FlowJo進行分析。使用GraphPad Prism 7軟體，通過四參數非線性回歸分析計算EC_{50}值。

【0215】 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320顯示以4.68nM的EC_{50}與石蟹獼猴轉染的細胞良好結合，這與嵌合抗體相當並優於enoblituzumab(MacroGenics)(表12，圖7)。

表12. 對石蟹獼猴B7H3轉染的穩定細胞池的FACS結合資料

樣本	石蟹獼猴B7H3轉染的穩定細胞池	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	5.25	67100
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	4.68	63600
Enoblituzumab（MacroGenics）	9.58	19700
hIgG1同型	N.A.	6.67

註：N.A.表示不適用。

3.8 與人類4IgB7H3結合活性檢測（SPR）

【0216】 使用SPR來測定抗體對人類4IgB7H3的親和力。通過Biacore 8K測定抗體對人類4IgB7H3的親和力。通過在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)來製備活化劑。用活化劑將CM5感測器晶片活化，持續420秒。然後以10μL/min的流速將山羊抗人類Fc IgG(30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5)注射到通道，持續420秒。用1M乙醇胺鹽酸將晶片去活化。將稀釋於流動緩衝液(1×HBS-EP+)中的抗體以10μL/min的流速注射到通道，持續30秒。將7種濃度(100nM、50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、2.125nM和1.563nM)的分析物人類4IgB7H3以30μL/min的流速依次注射到通道，持續180秒的結合期，隨後3600秒的解離。在解離期後注射甘胺酸(10mM，pH 1.5)，作為再生緩衝

液。

【0217】 從測試圖譜中減去參考通道和緩衝液通道的圖譜。用1:1結合模型對實驗資料進行擬合。用於計算的人類4IgB7H3的分子量為47.8kDa。

【0218】 通過Biacore 8K評估軟體附帶的1:1結合模型對實驗資料進行擬合。如表13和圖8A-圖8C所示，W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320顯示對人類4IgB7H3的高結合親和力。K_D值為7.08E-11M，其優於enoblituzumab(MacroGenics)。

表13. 抗體與人類4IgB7H3結合的親和力結果

分析物	配體	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
人類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
	Enoblituzumab（MacroGenics）	1.24E+05	1.26E-04	1.02E-09

3.9 與人類2IgB7H3結合活性檢測(SPR)

【0219】 使用SPR來測定抗體對人類2IgB7H3的親和力。通過Biacore 8K測定抗體對人類2IgB7H3的親和力。通過在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)來製備活化劑。用活化劑將CM5感測器晶片活化，持續420秒。然後以10μL/min的流速將山羊抗人類Fc IgG(30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5)注射到通道，持續420秒。用1M乙醇胺鹽酸將晶片去活化。將稀釋於流動緩衝液(1×HBS-EP+)中的抗體以10μL/min的流速注射到通道，持續30秒。將7種濃度(500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM、15.625nM和7.813nM)的分析物人類2IgB7H3以30μL/min的流速依次注射到通道，持續120秒的結合期，隨

後300秒的解離。在解離期後注射甘胺酸(10mM，pH 1.5)，作為再生緩衝液。

【0220】 從測試圖譜中減去參考通道和緩衝液通道的圖譜。用1:1結合模型對實驗資料進行擬合。用於計算的人類2IgB7H3的分子量為25.2kDa。

【0221】 通過Biacore 8K評估軟體附帶的1:1結合模型對實驗資料進行擬合。如表14和圖9A-圖9C所示，相比於對人類4IgB7H3的結合，W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320顯示對人類2IgB7H3的較弱結合親和力。K_D值為4.64E-08M。

表14. 抗體與人類2IgB7H3結合的親和力結果

分析物	配體	k_a（1/Ms）	k_d（1/s）	K_D（M）
人類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
	Enoblituzumab（MacroGenics）	6.44E+04	1.68E-02	2.61E-07

3.10 與石蟹獼猴B7H3結合活性檢測(SPR)

【0222】 使用SPR來測定抗體對石蟹獼猴B7H3的親和力。通過Biacore 8K測定抗體對石蟹獼猴B7H3的親和力。通過在注射前立即混合400mM EDC和100mM NHS(GE)來製備活化劑。用活化劑將CM5感測器晶片活化，持續420秒。然後以10μL/min的流速將山羊抗人類Fc IgG(30μg/mL，在10mM NaAc中，pH 4.5)注射到通道，持續420秒。用1M乙醇胺鹽酸將晶片去活化。將稀釋於流動緩衝液(1×HBS-EP+)中的抗體以10μL/min的流速注射到通道，持續30秒。將9種濃度(50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM、1.563nM、0.781nM、0.391nM和0.196nM)的分析物石蟹獼猴B7H3以30μL/min的流速依次注射到通道，持

續180秒的結合期，隨後3600秒的解離。在解離期後注射甘胺酸(10mM，pH 1.5)，作為再生緩衝液。

【0223】 從測試圖譜中減去參考通道和緩衝液通道的圖譜。用1:1結合模型對6種分析物濃度(50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.125nM和1.563nM)的實驗資料進行擬合。用於計算的石蟹獼猴B7H3的分子量為49kDa。

【0224】 通過Biacore 8K評估軟體附帶的1:1結合模型對實驗資料進行擬合。如表15和圖10A-圖10C所示，W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320顯示對石蟹獼猴B7H3的高結合親和力，這相當於其對人類4IgB7H3的結合。K_D值為5.74E-11M，其優於enoblituzumab(MacroGenics)。

表15. 抗體與石蟹獼猴B7H3結合的親和力結果

分析物	配體	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
石蟹獼猴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
	Enoblituzumab (MacroGenics)	1.85E+05	8.14E-05	4.41E-10

3.11 內化測試(HCS)

【0225】 抗體內化由operetta CLS(PerkinElmer)測定，operetta CLS是一種可以以高速和高靈敏度收集和分析樣本圖像的高含量成像和分析系統。將表現人類全長B7H3的MCF-7細胞(1.5×10^4個細胞/孔)接種到用8μg/mL聚-D-離胺酸預包被的96孔透明底部黑色板中。在設定為37℃、5% CO_2的培養箱中培養過夜後，將各種濃度的抗體(用1×DPBS/1% BSA自50nM至0.0005nM連續稀釋3.16倍)以100μL/孔的體積在設定為4℃的冰

箱中孵育2小時。抗人類B7H3參考抗體enoblituzumab(MacroGeneics)用作陽性對照。人類IgG1同型抗體用作陰性對照。在用1×DPBS/1% BSA洗滌細胞後，加入Alexa 647山羊抗人類抗體(在1×DPBS/1% BSA中以1:500稀釋)。將細胞在設定為4℃的冰箱中避光培養1小時。然後將細胞洗滌一次，並在37℃下在1×DPBS/1% BSA中重懸2小時。培養後，棄去上清液，並加入100μL/孔Hoechst 33342(在1×DPBS中以1:5000稀釋)並在環境溫度下孵育15分鐘。用1×DPBS洗滌細胞後，加入100μL/孔酸洗緩衝液(100mM甘胺酸、150mM NaCl，pH 2.5)，並在設定為4℃的冰箱中孵育5分鐘。用1×DPBS將細胞洗滌一次，並用60μL 4% PFA固定。通過operetta CLS測量和分析細胞的平均螢光強度(MFI)。使用GraphPad Prism 7軟體，通過四參數非線性回歸分析計算EC_{50}值。

【0226】 W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320顯示以0.51nM的EC_{50}被表現B7H3的MCF-7細胞內化，表明了良好內化能力，這與嵌合抗體相當並優於參考抗體enoblituzumab(MacroGenics)(表16，圖11)。

表16. 表現人類B7H3的細胞MCF-7的內化

樣本	MCF-7的內化	
	EC_{50}（nM）	最大MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	0.51	57180
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	0.44	52315
Enoblituzumab（MacroGenics）	1.95	39777
hIgG1同型	N.A.	21

註：N.A.表示不適用。

【0227】 所屬技術領域中具有通常知識者還應理解，本揭露可以在不脫離其精神或中心屬性的情況下以其他特定形式實施。由於本揭露的前述描述僅揭露了其示例性實施例，因此應理解，設想其他變型也在本揭露

的範圍內。因此，本揭露不限於本文已詳細描述的特定實施例。相反，應參考所附申請專利範圍作為本揭露的範圍和內容的指示。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"  dtdVersion="V1_3"
fileName="C256196SEQA.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2023-07-14">
 <ApplicantFileReference>P127395TW</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>WO</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>PCT/CN2022/00935</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-05-18</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">愛爾蘭商藥明生物技術愛爾蘭有限公司(WUXI
BIOLOGICS IRELAND LIMITED)</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>WUXI BIOLOGICS IRELAND LIMITED</ApplicantNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">抗-B7H3抗體及其用途</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>23</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DYSITGDYAWN</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q4">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>YISYSGSTSYNPSLQS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SLGRRWYFVV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KSSQSLLQSSNQKNYLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FASTRES</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QQHYSAPWT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q14">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KSSQSLLNSSNQKNYLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNP
SLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q18">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRES
GVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q22">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGLEWIGYISYSGSTSYNP
SLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q24">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q26">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPGKGLEWIGYISYSGSTSYNP
SLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seq
uence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>220</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..220</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</
INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q30">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNP
SLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequ
ence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>220</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..220</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q32">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRES
GVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</
INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>357</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..357</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggtgcagctccaggagtctggccctggcctggtgaagccatctcagacactgagcctgac
atgtaccgtgaccgattatagcatcaccggcgactacgcttggaattggatcagacagcaccctggaaagggcctggagt
ggattggatacatcagctattctggcagcacatcttataatcctagcctgcagtctagggtgacaatttcaagagatacc
agcaaaaatcagtttagcctgaaactgagctctgtgaccgccgccgatacagccgtgtatttttgtgccagaagcctggg
aagaagatggtattttgtggtgtggggacagggcacaacagtgaccgtgtctagc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>339</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..339</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q36">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gatattgtgatgacccagtctcctgatagcctggccgtgagcctgggcgagagagccacaat
caattgtaagtctagccagtctctgctgcagagctctaatcagaaaaattacctggcctggtatcagcagaagcctggcc
agcctcctaagctgctgatctactttgccagcacaagggaatctggagtgcctgataggtttagcggcagcggctctggc
acagattttacactgacaatctctagcctgcaggccgaggatgtggccgtgtattattgtcagcagcactattctgcccc
ttggacatttggcggcggcaccaaagtggagattaag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q38">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>KSSQSLLNPSNQKNYLA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q40">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q41">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>X may be any amino acid other than an
N</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KSSQSLLXSSNQKNYLA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="20">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q43">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>VARIANT</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier id="q44">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>X may be any amino acid other than
S</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KSSQSLLNXSNQKNYLA</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q46">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGGS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q48">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GGGGS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>4</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..4</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GGGS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合B7H3的抗體或其抗原結合部分，該抗體或其抗原結合部分包含以下CDR：

包含SEQ ID No: 1的胺基酸序列的重鏈CDR1(HCDR1)；包含SEQ ID No: 2的胺基酸序列的HCDR2；包含SEQ ID No: 3的胺基酸序列的HCDR3；以及

包含SEQ ID No: 4或7的胺基酸序列的輕鏈CDR1(LCDR1)；包含SEQ ID No: 5的胺基酸序列的LCDR2；和包含SEQ ID No: 6的胺基酸序列的LCDR3。

【請求項2】

如請求項1之抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)，其中該VH包含：

(A)如SEQ ID No: 8或10所示的胺基酸序列；

(B)與SEQ ID No: 8或10具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的胺基酸序列；或

(C)與SEQ ID No: 8或10相比在框架區中具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸添加、缺失和/或取代的胺基酸序列；

和/或該VL包含：

(A)如SEQ ID No: 9或11所示的胺基酸序列；

(B)與SEQ ID No: 9或11具有至少85%、至少90%或至少95%同一性的胺基酸序列；或

(C)與SEQ ID No: 9或11相比在框架區中具有一個或多個(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個)胺基酸添加、缺失和/或取代的胺基酸序列。

【請求項3】

如請求項2之抗體或其抗原結合部分，其中該VH和/或VL在該框架區中包含一個或多個胺基酸取代。

【請求項4】

如請求項3之抗體或其抗原結合部分，其中該胺基酸取代中的至少一個胺基酸取代是回復突變，其中來自人類生殖細胞序列的胺基酸被親代抗體中對應位置處的不同胺基酸取代。

【請求項5】

如請求項3之抗體或其抗原結合部分，其中該胺基酸取代中的至少一個胺基酸取代去除了潛在的轉譯後修飾位點。

【請求項6】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合部分，其中該B7H3是人類B7H3蛋白質、小鼠B7H3蛋白質、石蟹獼猴B7H3蛋白質或其胞外結構域。

【請求項7】

如請求項6之抗體或其抗原結合部分，其中該B7H3是人類4IgB7H3蛋白質或其胞外結構域。

【請求項8】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或其抗原結合部分是全長抗體、scFv、Fab、F(ab')2或Fv片段。

【請求項9】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合部分，其中該抗體包含免疫球蛋白恆定區，例如人類IgG恆定區。

【請求項10】

如請求項9之抗體或其抗原結合部分，其中該免疫球蛋白恆定區是人類IgG1恆定區，任選地包含一個或多個修飾諸如L234A/L235A (LALA)突變。

【請求項11】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合部分，其中該抗體或其抗原結合部分是嵌合抗體或人源化抗體。

【請求項12】

如前述請求項中任一項之抗體或其抗原結合部分，該抗體或其抗原結合部分包含：

(a)包含SEQ ID No: 12的胺基酸序列的重鏈和包含SEQ ID No: 13的胺基酸序列的輕鏈；和/或

(b)包含SEQ ID No: 14的胺基酸序列的重鏈和包含SEQ ID No: 15的胺基酸序列的輕鏈。

【請求項13】

一種分離的核酸分子，該分離的核酸分子包含編碼如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分的該VH和/或VL區的核酸序列。

【請求項14】

如請求項13之分離的核酸分子，其中該分離的核酸分子包含SEQ ID No: 16和/或17所示的核酸序列。

【請求項15】

一種載體，該載體包含如請求項13或14之核酸分子。

【請求項16】

一種宿主細胞，該宿主細胞包含如請求項13或14之核酸分子或如請求項15之載體。

【請求項17】

一種藥物組合物，該藥物組合物包含如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分和藥學上可接受的載體。

【請求項18】

一種用於產生抗體或其抗原結合部分的方法，該方法包括以下步驟：

在適於表現該抗體或其抗原結合部分的條件下培養如請求項16之宿主細胞；以及

從該宿主細胞分離出該抗體或其抗原結合部分。

【請求項19】

一種用於調節受試者中B7H3相關免疫反應的方法，該方法包括向該受試者施用如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分或如請求項17之藥物組合物。

【請求項20】

一種用於預防或治療受試者中B7H3相關病症的方法，該方法包括向該受試者施用有效量的如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分或如請求項17之藥物組合物。

【請求項21】

如請求項20之方法，其中該B7H3相關病症選自癌症、自體免疫疾病和感染性疾病。

【請求項22】

如請求項21之方法，其中該癌症選自乳癌、神經腫瘤、黑色素瘤、肺癌、頭頸癌、結腸直腸癌、胰腺癌、胃癌、腎癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、宮頸癌、成膠質細胞瘤、食道癌、膀胱癌、腎細胞癌、子宮內膜癌、皮膚癌、睪丸癌、甲狀腺癌、尿路上皮癌、淋巴瘤諸如非霍奇金淋巴瘤和瀰漫性大B細胞淋巴瘤、白血病如慢性淋巴細胞性白血病，和多發性骨髓瘤。

【請求項23】

如請求項21至22中任一項之方法，其中該抗體或其抗原結合部分與細胞免疫治療、化學治療、放射治療、標靶治療和/或用於癌症免疫治療的其他藥劑聯合施用。

【請求項24】

如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分，該抗體或其抗原結合部分用於治療或預防受試者中的B7H3相關病症。

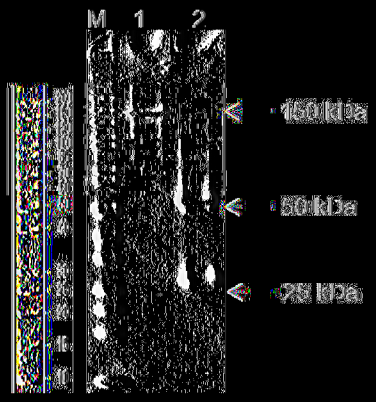
【請求項25】

一種如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分在製造用於診斷、治療或預防受試者中的B7H3相關病症的藥物中的用途。

【請求項26】

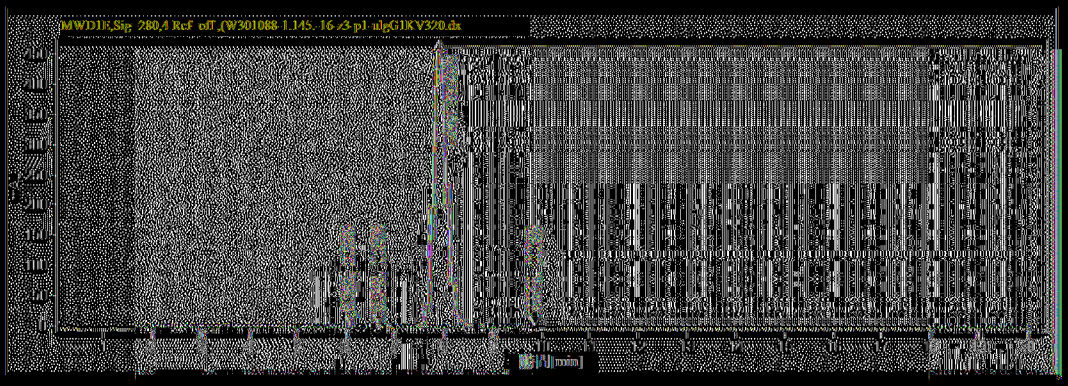
一種套組，該套組包含如請求項1至12中任一項之抗體或其抗原結合部分。

[(發明)]

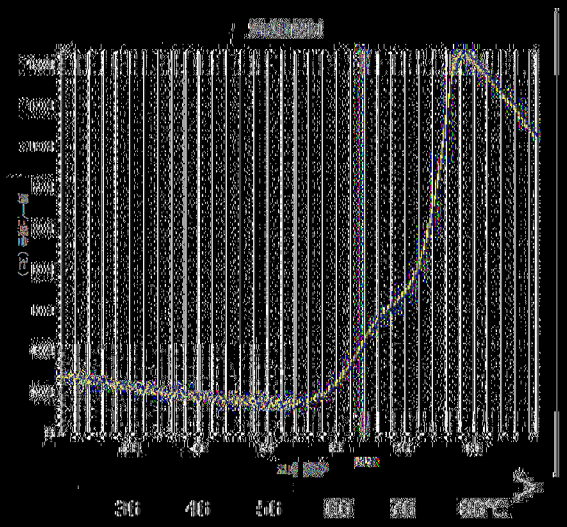


凝膠資訊：NuPAGE，Novex 4-12% Bis-Tris凝膠

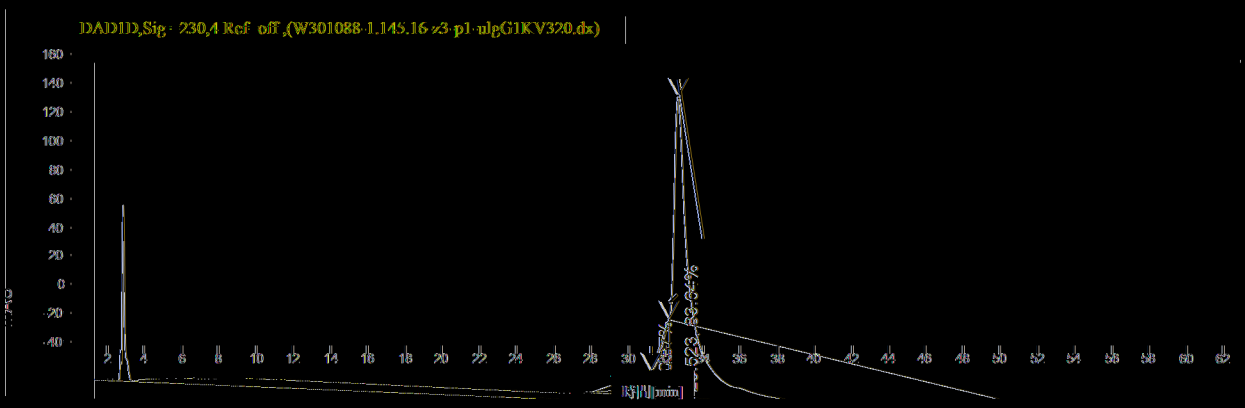
[(圖1)]



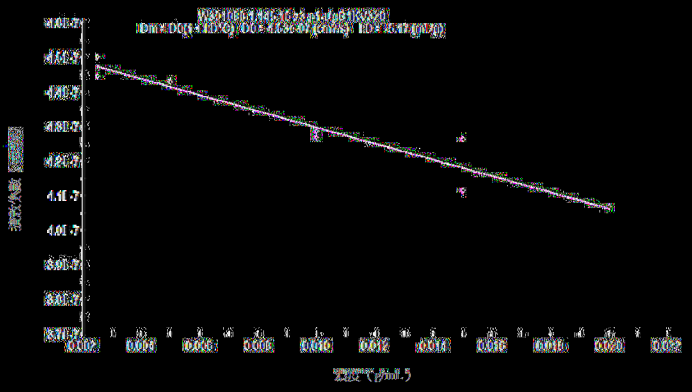
[(圖2)]



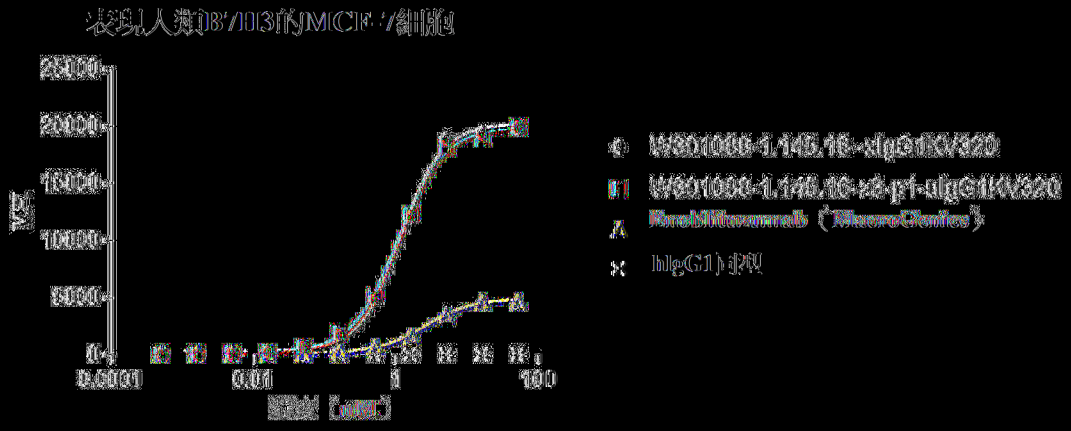
[(圖3)]


DAD1D,Sig=230,4 Ref=off,(W301088\1.145.16 z3 p1 ulgG1KV320.dx)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
mAU
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
35
36
38
40
42
44
46
48
50
52
54
56
58
60
62
時間[min]

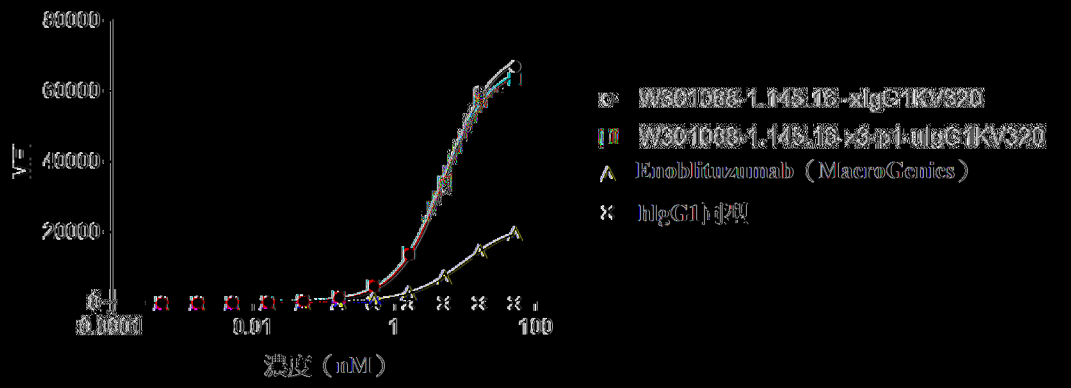
圖(圖4)


W301088\1.145.16 z3 p1 ulgG1KV320
Dm=D0[1-(1-D)^0]/D0=4.3e-07[cm^2/s] R^2=0.97[0.9]
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
Time^(0.5)

(圖5)


表現人源B7H3的MCF-7細胞
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.01
1
100
濃度 (nM)
W301088-1.145.15-xIgG1KV320
W301088-1.145.15-x3-p1-uIgG1KV320
EnoblituzumabMacroGenics
hIgG1h非靶

(圖6)


食蟹猴B7H3轉染細胞
80000
60000
40000
20000
0
0.0001
0.01
1
100
濃度（nM）
W301088-1.145.15-xIgG1KV320
W301088-1.145.15-x3-p1-uIgG1KV320
Enoblituzumab（MacroGenics）
hIgG1h非靶

(圖7)

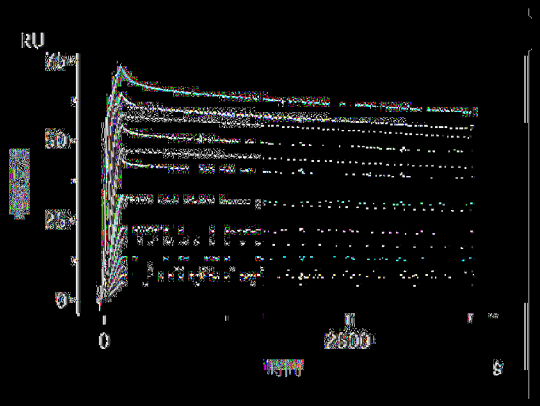

RU
75
50
25
0
0
2500
時間
s

圖8A

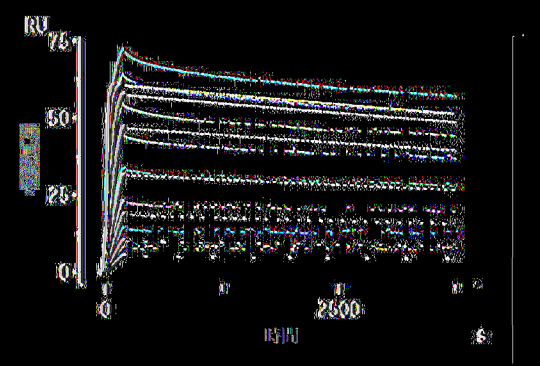

RU
75
50
25
0
0
2500
時間
s

圖8B

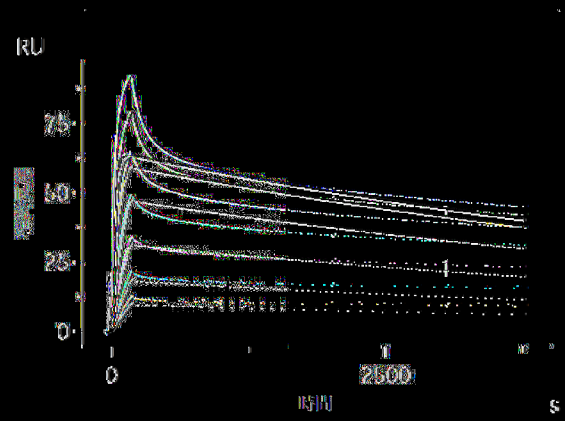

RU
75
50
25
0
0
2500
時間
s

圖8C

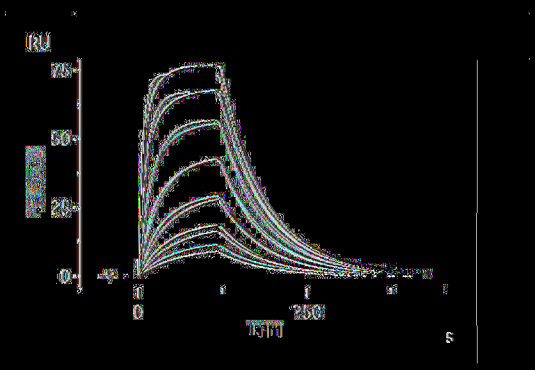

RU
75
50
25
0
0
250
時間
s

圖9A

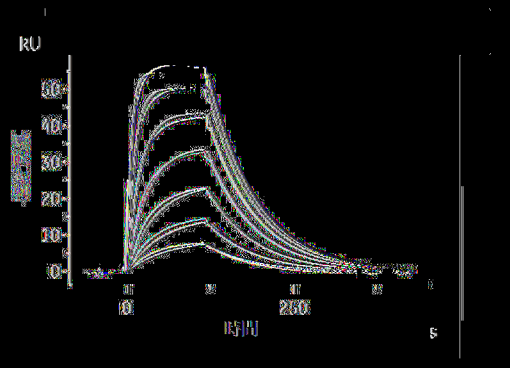

RU
50
40
30
20
10
0
0
250
時間
s

圖9B

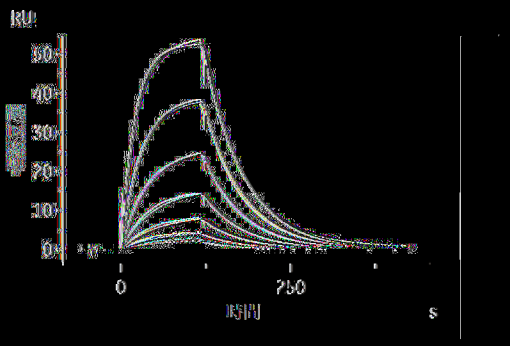
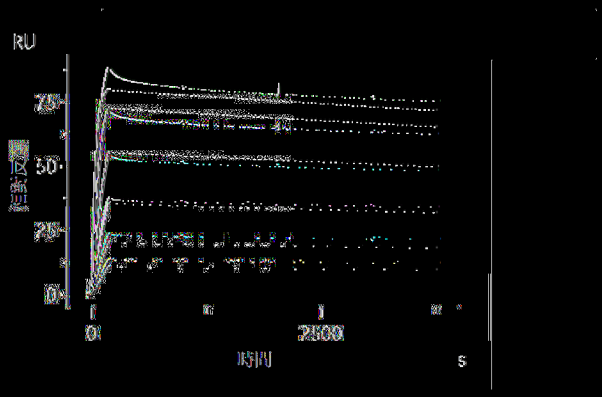
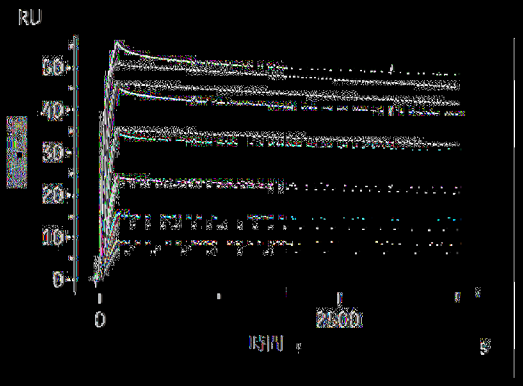

RU
50
40
30
20
10
0
0
250
時間
s

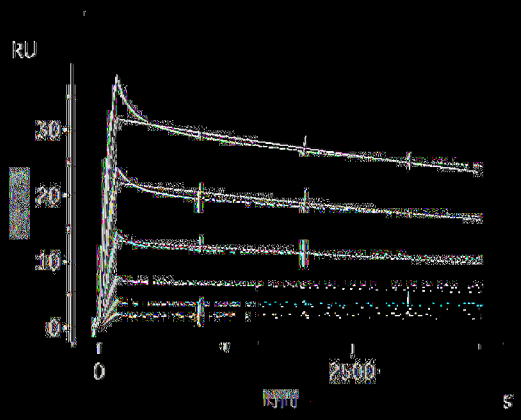
圖9C



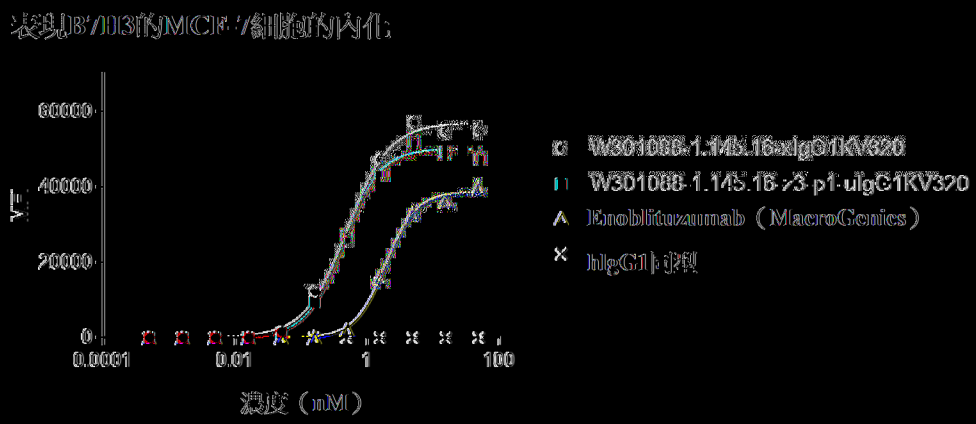
(圖10A)



(圖10B)



(圖10C)



（圖11）

W301088-1.145.16-xIgG1KV320（「1」）和W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320（「2」）的VH區

```
1          1 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMG      50
             .|||||||||||:|||||||||||||||.||-|||:|
2          1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQIPGKGLEWIG      50

1         51 YISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSL|     100
             ||||||||||||::|||||.|:|||:.||.|||||
2         51 YISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARSL|     100

1        101 GRRWYFVVWGAGTTVTVSA      119
             |||||||-|||||:
2        101 GRRWYFVVWGQGTTVTVSS      119
```

（圖12A）

W301088-1.145.16-xIgG1KV320（1）和W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320（2）的VL比

```
1                1 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSP      50
                   |||||||.||:|:|:::.|::|||||.||||||||||||.|
2                1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQKPGQPP      50

1               51 KLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSA      100
                   ||||||||||||.|||||||||:|||:..|:|||||
2               51 KLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSA      100

1              101 PWTFGGGTKLEIK       113
                   ||||||:||
2              101 PWTFGGGTKVEIK       113
```

（共12B）