202233670

(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 202233670 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：110133915 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 09 月 11 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K47/68 (2017.01)*
A61P35/00 (2006.01) *G01N33/68 (2006.01)*

(30)優先權：2020/09/11 美國 63/077,207

(71)申請人：英商梅迪繆思有限公司 (英國) MEDIMMUNE LIMITED (GB)
英國

(72)發明人：金尼爾 克里斯塔 琳恩 KINNEER, KRISTA LYNNE (US)；雀賽布魯 瓊恩 CHESEBROUGH, JON (US)；戴維斯 賈里斯 查爾斯 DAVIES, GARETH CHARLES (GB)；利斯 大衛 賈里斯 REES, DAVID GARETH (GB)；波希伯 奧爾溫 珍妮佛 路易絲 PERCIVAL-ALWYN, JENNIFER LOUISE (GB)；安德魯 強恩 愛德華 ANDREWS, JOHN EDWARD (GB)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：45 項 圖式數：63 共 356 頁

(54)名稱

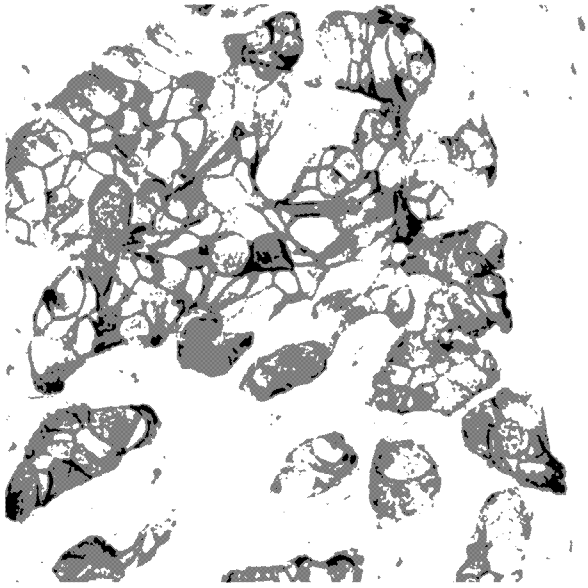
治療性結合分子

(57)摘要

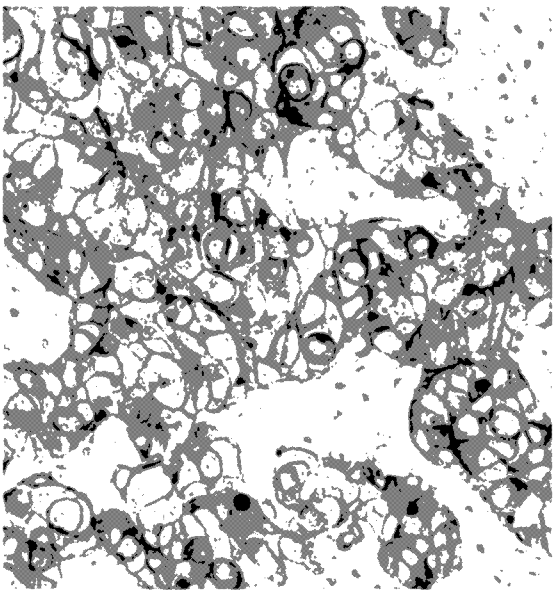
本發明關於用於治療癌症的結合分子（例如，抗體）和相關的抗體-藥物軛合物。

The present invention relates to binding molecules (e.g. antibodies) for the treatment of cancer, and related antibody-drug conjugates.

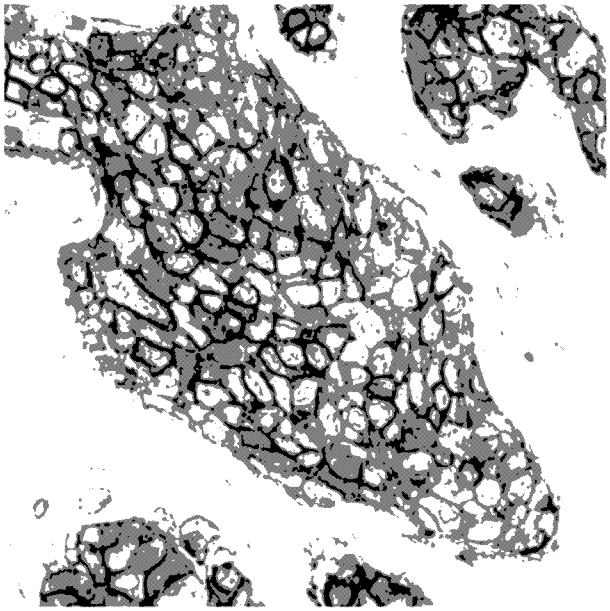
指定代表圖：



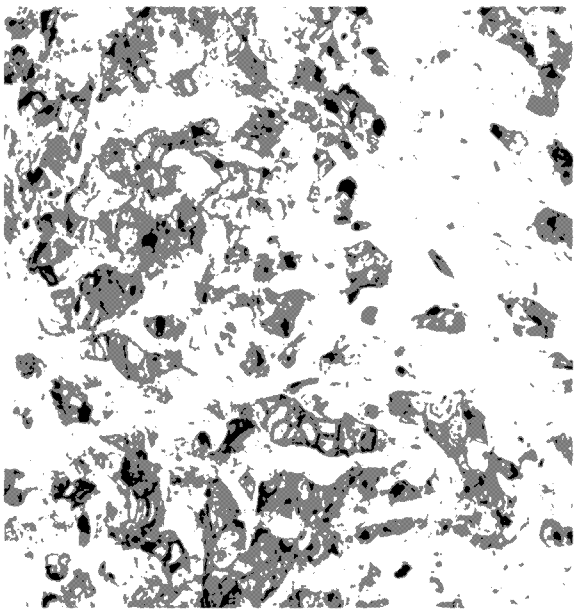
【圖1A】



【圖1B】



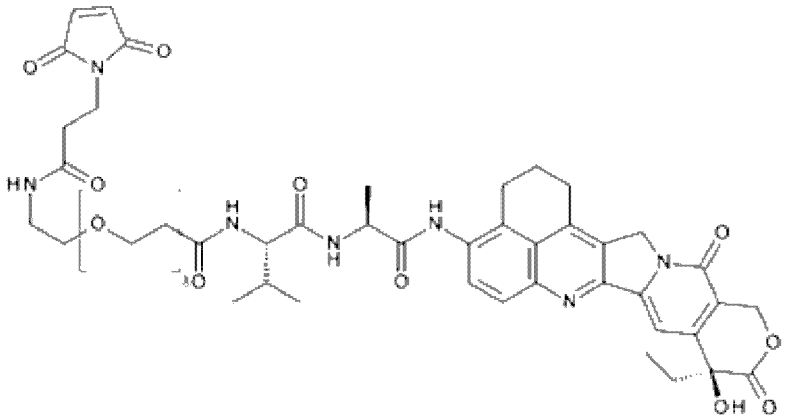
【圖1C】



【圖1D】

特徵化學式：

TW 202233670 A



2022.2.3 5670
2022.2.3 5670
專利案號：110133915

【發明摘要】

【中文發明名稱】 治療性結合分子

【英文發明名稱】 THERAPEUTIC BINDING MOLECULES

【中文】

本發明關於用於治療癌症的結合分子（例如，抗體）和相關的抗體-藥物軛合物。

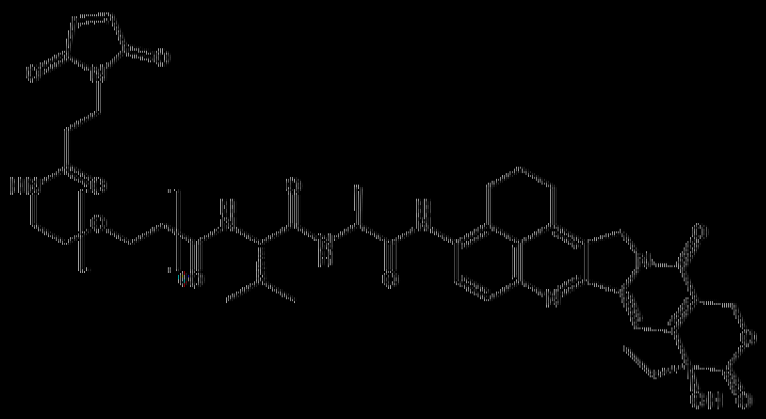
【英文】

The present invention relates to binding molecules (e.g. antibodies) for the treatment of cancer, and related antibody-drug conjugates.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】　治療性結合分子

【英文發明名稱】　THERAPEUTIC BINDING MOLECULES

【技術領域】

【0001】 本發明關於用於治療癌症的結合分子（例如，抗體）和相關的抗體-藥物軛合物。

【先前技術】

【0002】 儘管對可能的抗癌藥物進行了多年的研究和開發，但癌症仍然係全球主要疾病之一，其中三分之一的人在其一生中會患上某種形式的癌症。兩種最常見的癌症類型係乳癌和肺癌。

【0003】 癌症的主要療法仍然係化學療法和放射療法。然而，該等療法與多種不良副作用有關，從疲勞到疾病和脫髮。該等問題由於所使用的化學療法的療程通常很長而得到加劇。

【0004】 在過去的幾十年中，已經開發並推銷了多種針對癌症的抗體療法，導致對多種癌症類型的苛刻治療形式（例如，手術和化學療法）的需求減少。儘管在此期間生產抗體（例如，單株抗體）的方法的可用性已大大提高，但臨床上可用的抗癌抗體相對較少，可用於靶向廣譜癌症類型的抗體甚至更少。此外，需要增加治療性抗體的效力，其通常受到靶抗原和抗體結合後對癌細胞的後續作用的限制。

【0005】 本發明解決了上述問題中的一或多個。

【發明內容】

【0006】 發明人驚奇地發現跨膜多肽B7-H4在多種細胞類型（例如，乳癌、肺癌和胰臟癌）中高度表現，其與癌抗原的作用一致。發明人已經成功地生成在體外和體內均顯示出與表現B7-H4的細胞的高度結合（例如，與可商購的抗體相比更好的結合）的抗體。有利地，該等抗體可以靶向表現B7-H4的多種不同癌細胞類型，這例示了該等抗體作為抗癌療法之廣泛效用。

【0007】 此外，該等抗體可以有利地連接/軛合至合適的藥物/細胞毒素（例如，以提供抗體-藥物軛合物（ADC）），從而藉由允許靶向毒素遞送至癌細胞來增加該等抗體作為療法的效力。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0008】 本申請要求2020年9月11日提交的美國臨時專利申請案號63/077,207之優先權權益，將其出於所有目的藉由引用以其全文併入本文。

以電子方式提交的材料藉由引用而併入

【0009】 藉由引用以其全文併入本文的電腦可讀的核苷酸/胺基酸序列表，該序列表在此同時提交，並確定如下：名為「B7H4-100-WO-PCT.txt」、創建於2021年9月8日、50,724位元組的ASCII（文本）文件。

【0010】 因此，在一方面，本發明提供了結合至B7-H4（例如B7-H4表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0011】抗體或其抗原結合片段可適當地包含在藥物組成物中，例如包含在適於向患者投與的配製物中。

【0012】在另一方面，提供了包含抗體或其抗原結合片段的藥物組成物，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0013】 術語「藥物組成物」係指如下製劑，該製劑處於允許活性成分的生物活性有效的形式，並且不含有另外的、對組成物將要投與的受試者具有不可接受的毒性的組分。這種組成物可為無菌的並且可以包含藥學上可接受的媒介物，如生理鹽水。合適的藥物組成物可以包含一或多種緩衝液（例如，乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、界面活性劑（例如，聚山梨酯）、穩定劑（例如，人白蛋白）、防腐劑（例如，苄醇）、以及增強生物可用度的吸收促進劑、和/或其他常規的增溶劑或分散劑。

【0014】 此外，已證明本發明之抗體或其抗原結合片段靶向和抑制體內B7-H4陽性腫瘤的生長。因此，本發明包括在用於治療癌症之方法中使用的上述定義的抗體或其抗原結合片段和上述定義的藥物組成物。較佳的是，所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

【0015】在一方面，提供了用於治療癌症（例如，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞）的抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0016】換言之，本發明之一個方面提供了治療癌症之方法（例如，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞），該方法包括向受試者投與有效量的抗體或抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈

CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0017】 又換言之，在另一方面，本發明包括抗體或其抗原結合片段在製造用於治療癌症（例如，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞）的藥物中之用途，所述抗體或抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0018】 現在將概述某些定義和較佳的實施方式。應當理解，以下定義和實施方式可涉及本文所述之任何方面，例如，用於在本文所述療法中使用的任何方法、組成物和/或組成物。

【0019】 術語「表位」係指能夠結合至（例如，被結合）本發明之抗體或抗原結合片段的靶蛋白區域（例如，多肽）。

【0020】 B7-H4（也稱為包含V組結構域的T細胞激活抑制劑1，由*VTCN1*基因編碼）係共刺激蛋白B7家族的跨膜多肽。B7-H4被理解為在抗原呈現細胞的表面上表現，用於與免疫細胞（例如，T淋巴細胞，CD28為潛在的配體）的配體相互作用。不希望受理論束縛，本發明人觀察到B7-H4在各種癌症類型的細胞上高度表現，這表明該分子係腫瘤相關抗原。因此，要求保護的抗體靶向（以及視需要將細胞毒素遞送至）表現B7-H4的能力使得所述抗體特別適合用於在癌症治療中使用。此外，B7-H4的表現不限於特定的癌症類型，因此它代表了用於治療廣譜癌症類型的靶抗原。

【0021】 B7-H4的RNA、DNA、和胺基酸序列係熟悉該項技術者已知的，並且可以在許多數據庫中（例如，在美國國家生物技術資訊中心（NCBI）

和UniProt的數據庫中）發現。在UniProt找到的該等序列的實例係人B7-H4的Q7Z7D3（VTCN1_HUMAN）；和小鼠B7-H4的Q7TSP5（VTCN1_MOUSE）。編碼人B7-H4的核苷酸序列可為SEQ ID NO: 53，更較佳的是SEQ ID NO: 54。人B7-H4的多肽序列較佳的是SEQ ID NO: 55。

【0022】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EPQ-E02」或「EPQ-E02」。

【0023】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EOB-F05」或「EOB-F05」。

【0024】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EO5-E07」或「EO5-E07」。

【0025】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EP0-C07」或「EP0-C07」。

【0026】在一個特別較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EQD-E02」或「EQD-E02」。

【0027】換言之，該抗體或其抗原結合片段可較佳地包含：

- 含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及
- 含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0028】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；
ii. 含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；
iii. 含有SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；
iv. 含有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；
v. 含有SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及
vi. 含有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0029】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；
ii. 含有SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；
iii. 含有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；
iv. 含有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 17之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0030】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

iii. 含有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 22之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0031】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

iii. 含有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0032】另外或可替代地，本文所述之抗體或其抗原結合片段可以藉由其可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈來描述。

【0033】合適的可變重（VH）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）以個體化的方式概述如下：

- SEQ ID NO: 31，或其功能變體；
- SEQ ID NO: 33，或其功能變體
- SEQ ID NO: 43，或其功能變體
- SEQ ID NO: 45，或其功能變體

- SEQ ID NO: 46，或其功能變體
- SEQ ID NO: 47，或其功能變體
- SEQ ID NO: 35，或其功能變體
- SEQ ID NO: 37，或其功能變體
- SEQ ID NO: 39，或其功能變體

【0034】特別合適的可變重（VH）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）以個體化的方式概述如下：

- SEQ ID NO: 45，或其功能變體
- SEQ ID NO: 33，或其功能變體
- SEQ ID NO: 43，或其功能變體
- SEQ ID NO: 46，或其功能變體
- SEQ ID NO: 47，或其功能變體

【0035】合適的可變輕（VL）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）以個體化的方式概述如下：

- SEQ ID NO: 32，或其功能變體
- SEQ ID NO: 34，或其功能變體
- SEQ ID NO: 36，或其功能變體
- SEQ ID NO: 38，或其功能變體
- SEQ ID NO: 40，或其功能變體

【0036】較佳的可變輕（VL）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）可包含SEQ ID NO: 34的胺基酸序列（或其功能變體）。

【0037】例如，在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 31、33、35、37或39的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 32、34、36、38或40的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0038】 例如，在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 31、33、35、37、39、43、45、46或47的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 32、34、36、38或40的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0039】 合適地，該抗體或其抗原結合片段可包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 33的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 34的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0040】 更合適地，該抗體或其抗原結合片段可包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 45的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 34的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0041】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

- 分別含有SEQ ID NO: 31和SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 43和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 46和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 47和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 35和SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 37和SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；或

- 分別含有SEQ ID NO: 39和SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

【0042】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 45、33、43、46或47之胺基酸序列的可變重（VH）鏈（或其功能變體）；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕（VL）鏈（或其功能變體）。例如，SEQ ID NO: 33、45、46和/47的VH可以對應於SEQ ID NO: 33的VH的「種系化」版本（例如，都具有相同的CDR序列，但具有框架變異）。有利地，每個變體保留等效的結合特性。

【0043】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EPD-E02」或「EPD-E02」。

【0044】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 35之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EOB-F05」或「EOB-F05」。

【0045】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 37之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EO5-E07」或「EO5-E07」。

【0046】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EP0-C07」或「EP0-C07」。

【0047】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EQD-E02」或「EQD-E02」。

【0048】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0049】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0050】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0051】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「EQD-E02_GL」。

【0052】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 43具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的可變重鏈。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的可變重鏈以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈。

【0053】另外或可替代地，本文所述之抗體或其抗原結合片段可以藉由其重鏈和/或輕鏈來描述。

【0054】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含輕鏈（例如，包含VL和恒定輕鏈），該輕鏈包含與SEQ ID NO: 44的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈（例如，包含VL和恒定輕鏈）。

【0055】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 48具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO:48之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GL-Maia-重鏈」。

【0056】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 49具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO:49之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GLY-Maia-重鏈」。

【0057】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 50具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO:50之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GLQ-Maia-重鏈」。

【0058】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 51具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個更較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GL-WT-重鏈」。

【0059】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含輕鏈恒定區，該輕鏈恒定區包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 42具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個較佳的實施方式

中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

【0060】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。更較佳的是，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

【0061】 在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（例如，包含VL和恒定輕鏈）以及含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。

【0062】 有利地，發明人已經證明，與報導的靶向B7-H4的現有（商業上）可獲得的抗體相比，所要求保護的抗體或抗原結合片段可以靶向更廣譜的表現B7-H4的細胞。因此，發明人不僅提供了對臨床相關靶標具有親和力和特異性的抗體（或其抗原結合片段），而且證明了與其相關的獨特優勢（例如，意想不到的技術效果）。

【0063】 例如，圖4證明了要求保護的示例性抗體以以下抗體無法實現的親和力結合廣譜的癌細胞類型：Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG；US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG；R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1；以及Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1。

【0064】 較佳的是，本文所述之抗體或其抗原結合片段能夠結合作為癌細胞的組成成分的B7-H4（例如，B7-H4作為癌細胞的細胞膜的組成成分）。

【0065】 本文所述之抗體或其抗原結合片段可結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。例如，該抗體或其抗原結合片段結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）的B7-H4（例如，B7-H4表位）。合適地，本文所述之抗體

或其抗原結合片段可結合至OVCAR4細胞系和CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。

【0066】在一個實施方式中，與一或多種選自E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG、US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG、R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1、Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1、同種型1 CAT004 SP06-003、同種型2 R and D正常山羊IgG對照（AB-108C）、AdD serotec MCA2632、Epitomics 2516-1、eBiosciences 145972-82、eBioscience 145970-85的抗體、或其組合相比，該抗體或其抗原結合片段以更高的親和力結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。例如，與一或多種選自E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG、US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG、R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1和Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1的抗體、或其組合相比，該抗體或其抗原結合片段可以以更高的親和力結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。

【0067】在一個較佳的實施方式中，與E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG相比，該抗體或其抗原結合片段以更高的親和力結合至OVCAR4細胞系。

【0068】提及「E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG」可與本文的術語「B7-H4單株抗體（H74），eBioscience」互換使用。所述抗體可從賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）（目錄號14-5949-82）獲得。

【0069】在另一個較佳的實施方式中，與US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG相比，該抗體或其抗原結合片段以更高的親和力結合OVCAR4細胞系。

【0070】 所述親和力（例如，結合親和力）可以藉由本文所述之任何合適的測量結合親和力的方法來測量。

【0071】 OVCAR4細胞系係人卵巢癌細胞系。OVCAR4細胞系可從美國國家癌症研究所（the National Cancer Institute）獲得，從癌症治療和診斷部腫瘤庫（the Division of Cancer Treatment and Diagnosis Tumor Repository）轉移細胞系。中國倉鼠卵巢（CHO）細胞系係源自中國倉鼠的卵巢的上皮細胞系，可廣泛獲得。

【0072】 如以上所述，本發明之抗體或其抗原結合片段可包含在藥物組成物中。該藥物組成物可以包含一或多種藥物上可接受的賦形劑。在一個實施方式中，本發明之藥物組成物可以包含藥學上可接受的無毒的無菌載體，如生理鹽水、無毒緩衝劑、防腐劑等。在本文揭露的治療方法中使用的合適的配製物描述於Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓藥物科學], 第22版, Lloyd V. Allen, Jr.編輯 (2012)中。

【0073】 在一個實施方式中，本發明之藥物組成物可包含在一或多種配製物中，該配製物選自膠囊、片劑、水性懸浮液、溶液、鼻氣霧劑、或其組合。

【0074】 在一個實施方式中，該藥物組成物包含多於一種類型的本發明之抗體或抗原結合片段。例如，藥物組成物可包含選自抗體、抗原結合片段、軛合至細胞毒素的抗體或其抗原結合片段、或其組合中的兩種或更多種。

【0075】 術語抗體或抗原結合片段的「藥學上有效的量」意指足以實現與靶標的有效結合並實現益處（例如，改善疾病或病症的症狀，或者檢測物質或細胞）的量。

【0076】在一個實施方式中，藥物組成物可以包含緩衝液（例如，乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、界面活性劑（例如，聚山梨酯）、視需要的穩定劑試劑（例如，人白蛋白）等。

【0077】合適地，本發明之抗體或抗原結合片段以足夠的親和力結合B7-H4分子，使得該抗體可用作靶向B7-H4的治療劑或診斷試劑。

【0078】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以如下解離常數（KD）結合B7-H4（較佳的人B7-H4）：≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1 nM、≤0.1 nM、≤10 pM、≤1 pM、或≤0.1 pM。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以如下KD結合B7-H4（較佳的人B7-H4）：約0.1 nM至約40 nM之間、約0.5 nM至約30 nM之間、約1 nM至約20 nM之間、或約1.5 nM至約20 nM之間。

【0079】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以約23 nM至約27 nM之間的KD結合B7-H4（較佳的人B7-H4）。在一個更較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以約1 nM至約1.5 nM之間的KD結合B7-H4（較佳的人B7-H4）。

【0080】KD測量（結合親和力）可以藉由本領域已知的任何合適的測定法進行。合適的測定法包括可經由KinExA系統（例如，KinExA 3100、KinExA 3200或KinExA 4000）（賽必因儀器公司（Sapidyne Instruments），愛達荷州（Idaho））或ForteBio Octet系統進行的親和力測定法。

【0081】在一個實施方式中，本發明之抗體或其抗原結合片段與無關的非B7-H4蛋白的結合程度比該抗體（或其抗原結合片段）與B7-H4（較佳的人B7-H4）的結合少約10%、5%、2%或1%（較佳的少約10%）。所述結合可以例如藉由放射免疫測定法（RIA）、BIACORE®（使用重組B7-H4作為分析物並

且抗體作為配體，或反之亦然）、KINEXA®、ForteBio Octet系統或本領域已知的其他結合測定法來測量。

【0082】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合選自人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子、人BTN3A2分子、或其組合中的一或多種。在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合選自人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、或其組合中的一或多種。

【0083】術語「不結合」意指本文所述之抗體或其抗原結合片段基本上不結合一或多種所述分子（例如，人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子、人BTN3A2分子、或其組合）。當在本文的結合背景下使用時，術語「基本上沒有」可表示細胞培養物中表現一或多種所述分子的細胞的少於5%、2%、1%、0.5%或0.1%被本文所述之抗體或其抗原結合片段結合（在接觸時）。合適地，當在本文的結合背景下使用時，術語「基本上沒有」可表示沒有這樣的細胞被結合。

【0084】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子或人BTN3A2分子。在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合人B7-H1分子、人B7-H2分子、或人B7-H3分子。

【0085】在一個實施方式中，該B7-H4多肽包含在B7-H4多肽序列或其片段內。

【0086】「B7-H4多肽」可包含B7-H4的全長多肽序列（例如，SEQ ID NO.: 55），或可包含B7-H4的全長多肽序列的任何長度的B7-H4片段（例如，包含B7-H4的全長多肽序列的5%、15%、25%、35%、45%、55%、65%、75%、85%或95%的多肽序列），該片段包含可以結合（例如，被結合）本發

明之抗體或抗原結合片段的表位。該B7-H4多肽可包含與SEQ ID NO.: 55的序列具有75%、80%、85%、90%或90%序列同一性的序列。較佳的是，該B7-H4多肽包含SEQ ID NO.: 55的序列。

【0087】 該抗體或抗原結合片段在體外和體內均對B7-H4具有高親和力，因此可有利地用於檢測B7-H4表位的方法和相關的診斷方法中。

【0088】 「治療」係指治癒、減慢已診斷的病理性病症或障礙，減輕已診斷的病理性病症或障礙的症狀，和/或停止已診斷的病理性病症或障礙的進展的治療性措施。因此，需要治療的人包括已患有該障礙的那些人。在一個實施方式中，如果患者顯示例如全部、部分或者暫態減輕或消除了與疾病或障礙（較佳的是癌症）相關的症狀，則受試者根據本文提供的方法成功地「治療」了該疾病或障礙（較佳的是癌症）。

【0089】 在一個實施方式中，本發明之方法可用於預防包含表現B7-H4的癌細胞的癌症之發作。「預防」係指預防和/或減緩靶標病理性病症或障礙的發展的防禦性或預防性措施。因此，需要預防的人包括傾向於患有或易患該障礙的那些人。在一個實施方式中，如果相比於未經受本發明方法的患者，患者暫態或永久地表現出例如與疾病或障礙相關的更少或不太嚴重的症狀，或與該疾病或障礙相關的症狀的更遲的發作，則根據本文提供的方法成功地預防了該疾病或障礙（較佳的癌症）。

【0090】 術語「受試者」、「個體」和「患者」在本文中可互換使用以指哺乳動物受試者。在一個實施方式中，該「受試者」係人、家畜、農場動物、競賽動物和動物園動物，例如人、非人靈長類動物、狗、貓、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、馬、牛等。在一個實施方式中，該受試者係食蟹猴（cynomolgus monkey/*Macaca fascicularis*）。在一個較佳的實施方式中，該受試者係人。在本發明之方法中，該受試者先前可能未被診斷為患有癌症。可替代地，該受試

者可能先前已被診斷為患有癌症。該受試者也可為表現出疾病風險因素的人，或沒有癌症症狀的人。該受試者也可為患有癌症或有患癌症的風險的人。因此，在一個實施方式中，本發明之方法可用於確認受試者中癌症的存在。例如，該受試者可能先前已藉由替代性方式被診斷出患有癌症。在一個實施方式中，該受試者先前已經投與癌症療法。

【0091】在一個實施方式中，本發明之治療方法包括一或多個投與步驟，該一或多個投與步驟選自口服、靜脈內、動脈內、腹膜內、肌內、皮下、直腸或陰道、吸入、局部、或其組合。在一個較佳的實施方式中，投與是靜脈內或動脈內（例如，藉由注射或滴注）投與或其組合。

【0092】在一個實施方式中，將該抗體或其抗原結合片段直接遞送至有害細胞群的位點處（例如，從而增加患病組織對治療劑的暴露）。在一個實施方式中，直接投與至氣道，例如藉由吸入或鼻內投與。

【0093】在一個較佳的實施方式中，本文提及的癌症係以B7-H4分子的表現（較佳的過度表現）為特徵的癌症。換言之，本文提及的癌症可包含表現B7-H4的癌細胞。所述癌細胞可包含在腫瘤內。

【0094】在一個實施方式中，癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、膽管癌、NSCLC（鱗癌和腺癌）、胰臟癌和胃癌中的一或多種。

【0095】在一個實施方式中，癌症選自結直腸癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌（例如，NSCLC或SCLC）、乳癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、膽管癌、黑色素瘤、子宮內膜癌、血液學癌症（AML、MM、DLBCL）以及包含CSC的癌症中的一或多種。

【0096】在一個較佳的實施方式中，癌症係肺癌、乳癌、或其組合。例如，癌症可為肺癌。癌症可為乳癌。癌症可為卵巢癌。

【0097】在一個實施方式中，癌症係一或多種乳癌，其選自激素受體（HR）陽性（HR+）乳癌、人表皮生長因子受體2陽性（HER2+）乳癌、三陰性乳癌（TNBC）。該受試者可能符合赫賽汀（Herceptin）的治療條件。該受試者可能已接受赫賽汀治療。

【0098】在一個實施方式中，癌症係一或多種非小細胞肺癌（NSCLC），其較佳的是選自鱗狀NSCLC、腺癌NSCLC、或其組合。

【0099】抗體或其抗原結合片段也可用於檢測癌細胞，例如作為診斷方法的一部分。

【0100】在另一方面，提供了用於檢測樣本中B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）是否存在之方法，該方法包括：

a. 使樣本與抗體或其抗原結合片段或包含抗體或其抗原結合片段的藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

b. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；以及

c. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的存在；或

d. 其中該抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的不存在。

【0101】在一個相關方面，提供了用於檢測樣本中表現B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的癌細胞是否存在之方法，該方法包括：

a. 使樣本與抗體或其抗原結合片段或包含抗體或其抗原結合片段的藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

b. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；以及

c. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的存在；或

d. 其中該抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的不存在。

【0102】 本發明包括本發明之抗體或其抗原結合片段用於檢測B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的相應用途。

【0103】 在一個實施方式中，抗體-抗原複合物的存在指示癌細胞的存在，並且抗體-抗原複合物的不存在指示癌細胞的不存在。例如，該方法可以包括在檢測到抗體-抗原複合物的情況下確認癌症的存在，或在未檢測到抗體-抗原複合物的情況下不確認癌症的存在。

【0104】 在一個較佳的實施方式中，癌細胞係表現B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的癌細胞。

【0105】 因此，本發明包括本文所述之方法步驟在診斷患有癌症的受試者的方法中的相應用途，較佳的是其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

【0106】在一個實施方式中，檢測方法或診斷方法可以包括測量B7-H4在可從受試者獲得的細胞（或組織）上的表現水平，並將測量的表現水平與對照細胞（或組織）中的標準B7-H4表現進行比較，其中與對照相比表現水平的增加指示癌症的存在。較佳的是，所述對照樣本包含非癌（例如，正常）細胞。

【0107】「抗體-抗原複合物」意指包含已與抗體結合的B7-H4抗原的複合物（例如，大分子複合物）。術語「抗體-抗原複合物」可以與術語「結合的B7-H4-抗體複合物」和「與B7-H4結合的抗體」同義使用。

【0108】可以藉由技術者已知的任何方式檢測抗體-抗原複合物。在一個實施方式在，將該抗體（或其抗原結合片段）用可檢測標記進行標記。所述標記可為落射式螢光標記。在一個較佳的實施方式中，將該抗體用800CW標記。

【0109】在一個實施方式中，藉由結合該抗體和/或抗體-抗原複合物的第二（例如，檢測）抗體來檢測抗體-抗原複合物。

【0110】合適地，所述第二抗體包含檢測工具，如標籤/標記以輔助檢測。所述檢測工具較佳的是軛合至第二抗體。合適的標記之實例包括可檢測標記，如放射性標記或螢光分子或有色分子、酶標記物或顯色標記物（例如，在檢測抗體與抗原結合時提供可見顏色變化的染料）。舉例來說，標記可為異硫氰酸螢光素（FITC）、R-藻紅素、Alexa 532、CY3或地高辛（digoxigenin）。標記可為報告分子，其被直接檢測，如藉由檢測其螢光信號、或藉由將標記暴露於照相膠片或X射線膠片。可替代地，標記不能被直接檢測，但可以例如在兩相系統中被檢測。間接標記檢測的一個實例係抗體與該標記的結合。

【0111】在一個較佳的實施方式中，所述第二抗體包含螢光標籤，並且藉由由抗體-抗原-第二抗體複合物發出的螢光檢測抗體-抗原複合物。「抗體-抗原-第二抗體複合物」意指包含已經與抗體結合的抗原（例如，B7-H4）的複合

物，其中所述複合物進一步被第二抗體結合，該第二抗體結合所述抗體和/或抗體-抗原複合物。

【0112】 合適地，當由檢測標記發出的信號（較佳的螢光）大於在不包含抗體（例如，不包含結合B7-H4的抗體）的對照中檢測到的信號時，檢測到抗體-抗原複合物。所述對照可以替代性地包含B7-H4，但樣本不應用於所述對照。

【0113】 合適地，「樣本」係從受試者（例如，活檢）、細胞系、組織培養物或其他潛在表現B7-H4的細胞來源獲得的樣本。在較佳的實施方式中，樣本係來自受試者的活檢。所述活檢可以取自腫瘤、或有患腫瘤的風險的部位。

【0114】 在一個較佳的實施方式中，該樣本係可獲得（例如，獲得）自受試者的分離的樣本。

【0115】 在一個較佳的實施方式中，該B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）係癌細胞的組成成分，更較佳的是癌細胞的細胞膜的組成成分。

【0116】 本發明涵蓋本文定義的具有所述CDR序列或可變重鏈和可變輕鏈序列的抗體（參考抗體）（例如，抗體或抗原結合片段）及其功能變體。功能變體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性。當與參考抗體相比時，該等功能變體對於靶抗原可以具有不同的親和力，但基本上相同的親和力係較佳的。

【0117】 相比之下，術語「參考抗體」用於方便地指代本發明之抗體或其抗原。因此，術語「參考抗體」係指本發明之抗體或其抗原。例如，參考抗體可以意指如下抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、

LCDR2和LCDR3。更特別地，參考抗體可以意指如下抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈。較佳的是，參考抗體可以意指如下抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈。

【0118】在一個實施方式中，當與相應的參考CDR序列相比時，參考抗體的功能變體在一或多個CDR處顯示序列變異。因此，功能抗體變體可以包含CDR的功能變體。在CDR序列的背景下使用術語「功能變體」時，這意味著當與相應的參考CDR序列相比時，該CDR具有最多2個、較佳的最多1個胺基酸差異，並且當與其餘5個CDR（或其變體）組合時，使該變體抗體能夠結合與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是展現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性。功能變體可以稱為「變體抗體」。

【0119】在一個實施方式中，變體抗體（或其抗原結合片段）包含：

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0120】較佳的是，變體抗體（或其抗原結合片段）包含：

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0121】 例如，該抗體或抗原結合片段的變體可以包含：

當與SEQ ID NO: 7相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 8相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與SEQ ID NO: 9相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR3；

當與SEQ ID NO: 10相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 11相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與SEQ ID NO: 12相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位），並且較佳的是表現出與參考抗體或抗原結合片段相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0122】 例如，該抗體或抗原結合片段的變體可以（較佳的是）包含：

當與SEQ ID NO: 7相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 8相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與SEQ ID NO: 9相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR3；

當與SEQ ID NO: 10相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 11相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與SEQ ID NO: 12相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位），並且較佳的是表現出與參考抗體或抗原結合片段相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0123】 前述內容可以類似地應用於本文所述之其他抗體的變體，其中胺基酸差異是相對於其CDR序列定義的，並且其中該變體抗體結合與所述抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出相同的抗原交叉反應性。

【0124】 在一個實施方式中，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體可以在其CDR中具有總計最多5、4或3個胺基酸差異，條件是每個CDR存在最多2個（較佳的是最多1個）胺基酸差異。較佳的是，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體在其CDR中具有總計最多2個（更較佳的是最多1個）胺基酸差異，條件是每個CDR存在最多2個胺基酸差異。更較佳的是，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體在其CDR中具有總計最多2個（更較佳的是最多1個）胺基酸差異，條件是每個CDR存在最多1個胺基酸差異。

【0125】 該胺基酸差異可為胺基酸取代、插入或缺失。在一個實施方式中，該胺基酸差異是如本文所述之保守胺基酸取代。

【0126】 在一個實施方式中，變體抗體具有與本文所述之示例性抗體相同的框架序列。在另一個實施方式中，變體抗體可包含具有最多2個、較佳的是最多1個胺基酸差異的框架區（當與相應的參考框架序列相比時）。因此，每個框架區可具有最多2個、較佳的是最多1個胺基酸差異（當與相應的參考框架序列相比時）。

【0127】 在一個實施方式中，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體可以在其框架區中具有總計最多5、4或3個胺基酸差異，條件是每個框架區存在最多2個（較佳的最多1個）胺基酸差異。較佳的是，當與相應的參考抗體相比

時，變體抗體在其框架區中具有總計最多2個（更較佳的最多1個）胺基酸差異，條件是每個框架區存在最多2個胺基酸差異。更較佳的是，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體在其框架區中具有總計最多2個（更較佳的最多1個）胺基酸差異，條件是每個框架區存在最多1個胺基酸差異。

【0128】因此，變體抗體可以包含如本文所述之可變重鏈和可變輕鏈，其中：

當與本文的重鏈序列相比時，該重鏈具有最多14個胺基酸差異（每個CDR中最多2個胺基酸差異，並且每個框架區中最多2個胺基酸差異）；並且

當與本文的輕鏈序列相比時，該輕鏈具有最多14個胺基酸差異（每個CDR中最多2個胺基酸差異，並且每個框架區中最多2個胺基酸差異）；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0129】所述變體重鏈或輕鏈可以被稱為參考重鏈或輕鏈的「功能等效物」。

【0130】在一個實施方式中，變體抗體可以包含如本文所述之可變重鏈和可變輕鏈，其中：

當與本文的重鏈序列相比時，該重鏈具有最多7個胺基酸差異（每個CDR中最多1個胺基酸差異，並且每個框架區中最多1個胺基酸差異）；並且

當與本文的輕鏈序列相比時，該輕鏈具有最多7個胺基酸差異（每個CDR中最多1個胺基酸差異，並且每個框架區中最多1個胺基酸差異）；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

抗體-藥物軛合物（ADC）

【0131】有利地，本發明之抗體或其抗原結合片段可以包含異源藥劑。在一個實施方式中，本發明之抗體或抗原結合片段連接至異源藥劑。在一個較佳的實施方式中，該抗體或抗原結合片段軛合至異源藥劑。合適地，「軛合」意指經由共價鍵或離子鍵連接。較佳的是，所述異源藥劑係細胞毒素。

【0132】異源藥劑可以簡稱為「藥劑」或「活性劑」。例如，換言之，本發明之抗體或其抗原結合片段可以包含活性劑。在一個實施方式中，本發明之抗體或抗原結合片段連接至活性劑。在一個較佳的實施方式中，該抗體或抗原結合片段軛合至活性劑。

【0133】該異源藥劑/活性劑可為藥物。較佳的是，該異源藥劑/活性劑係細胞毒素。

【0134】特別較佳的是，本發明之抗體或其抗原結合片段連接（例如，軛合）至治療方法中的異源藥劑/活性劑，如下所述。

【0135】本發明之藥劑和/或細胞毒素可以藉由間隔物（例如，至少一個間隔物）軛合至該抗體或其抗原結合片段。在一個實施方式中，該間隔物係肽間隔物。在一個實施方式中，該間隔物係非肽（例如，化學的）間隔物。

【0136】細胞毒性劑或細胞毒素可以係本領域中已知的任何分子，該分子抑制或阻止細胞的功能和/或造成細胞破壞（細胞死亡）、和/或發揮抗腫瘤/抗增生作用。已知許多類別的細胞毒性劑在ADC分子中具有潛在效用。該等包括但不限於：拓撲異構酶I抑制劑、蠅蕈素、奧瑞斯他汀（auristatin）、道諾黴素（daunomycin）、多柔比星（duocarmycin）、尾海兔素、朵拉司他汀（enediyne）、烯二炔、來紅黴素（lexitropsin）、紫杉烷類、嘌呤黴素、美登木素生物鹼（maytansinoid）、長春花鹼、微管溶素（tubulysin ）以及吡咯并苯并二氮呯（PBD）。此類細胞毒性劑的實例係AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奧瑞斯他汀E、紫杉醇、多西他賽、CC-1065、SN-38、拓撲替康、味

啉代多柔比星、根黴素、氰基味啉代多柔比星、朵拉司他汀-10、棘黴素、康普瑞汀、杯形生長抑制素（chalicheamicin）、美登素、DM-1、長春鹼、甲胺蝶呤和紡錘菌素、以及其衍生物和類似物。關於適合在ADC中使用的細胞毒素的另外的揭露內容可以例如在國際專利申請公開案號WO 2015/155345和WO 2015/157592中發現，將其藉由引用以其全文併入本文。

【0137】 例如，該抗體或抗原結合片段可以軛合至此類異源藥劑以提供「抗體-藥物軛合物」（ADC）。

【0138】 該藥劑通常連接至該抗體或抗原結合片段或「載入到」該抗體或抗原結合片段上。藥劑載入量（p）係每個抗體或抗原結合片段（例如，配體單元）上的平均藥劑數量。

【0139】 來自軛合反應的ADC製劑中每個抗體（或抗原結合片段）上的平均藥劑數量可以藉由常規方式進行表徵，該等方式例如UV、逆相HPLC、HIC、質譜、ELISA測定和電泳。也可以確定依據p的ADC的定量分佈。藉由ELISA，可以確定特定ADC製劑中p的平均值（Hamblett等人 (2004) Clin. Cancer Res.[臨床癌症研究] 10:7063-7070；Sanderson等人 (2005) Clin. Cancer Res.[臨床癌症研究] 11:843-852）。在一些情況下，均質ADC（其中p係來自具有其他載藥量的ADC的確定值）的分離、純化和表徵可以藉由例如逆相HPLC或電泳來實現。此類技術也適用於其他類型的軛合物。

【0140】 半胱胺酸胺基酸可在抗體（或其抗原結合片段）中的反應位點處被工程化，並且較佳的是不形成鏈內或分子間二硫鍵（Junutula等人, 2008b Nature Biotech.[自然生物技術], 26(8):925-932；Dornan等人 (2009) Blood [血液] 114(13):2721-2729；US 7521541；US 7723485；WO 2009/052249）。工程化的半胱胺酸硫醇可以與藥劑（例如，具有以下式I）內的連接子反應以形成具有半胱胺酸工程化的抗體的ADC，該連接子具有硫醇反應性親電基團（如馬來醯亞

胺或α-鹵代醯胺）。因此，可以設計、控制和已知藥物單元的位置。由於工程化的半胱胺酸硫醇基團通常以高產率與藥物連接子試劑反應，因此可以控制載藥量。藉由在重鏈或輕鏈上的單個位點處進行取代而對IgG抗體進行工程化以引入半胱胺酸胺基酸，從而在對稱抗體上給出了兩個新的半胱胺酸。可以達到載藥量接近2，其中軛合物產物ADC接近均質性。

【0141】在該抗體或其抗原結合片段的多於一個親核或親電基團與藥劑反應的情況下，所得產物可為如下ADC化合物的混合物，在該等ADC化合物中，附接抗體的藥劑單元的分佈例如為1、2、3個等。液相層析法（如聚合物逆相（PLRP）和疏水相互作用（HIC））可以藉由藥劑負載值來分離混合物中的化合物。可以分離具有單一藥劑負載值（p）的ADC製劑。

【0142】因此，本發明之抗體-藥物軛合物組成物可以包括抗體-藥物軛合物的混合物，其中該抗體或其抗原結合片段具有一或多個藥劑部分，並且其中該等藥劑部分可以在各種胺基酸殘基處附接該抗體或其抗原結合片段。

【0143】在一個實施方式中，每個抗體（或其抗原結合片段）上的平均藥劑數量在1至20之範圍內。在一些實施方式中，該範圍選自1至10、2至10、2至8、2至6、以及4至10。在一些實施方式中，每個抗體（或其抗原結合片段）上存在一個藥劑。在一些實施方式中，每個抗體（或其抗原結合片段）上的藥劑數量可以表示為藥劑（即，藥物）與抗體的比率。這個比率被稱為藥物與抗體比率（DAR）。DAR係連接至每個抗體的藥物（即，藥劑）的平均數量。在本發明之一個實施方式中，DAR在1至20之範圍內。在一些實施方式中，DAR的範圍選自1至10、2至10、2至8、2至6、以及4至10。在本發明之一個特定實施方式中，DAR約為8。在本發明之一個特定實施方式中，DAR為8。

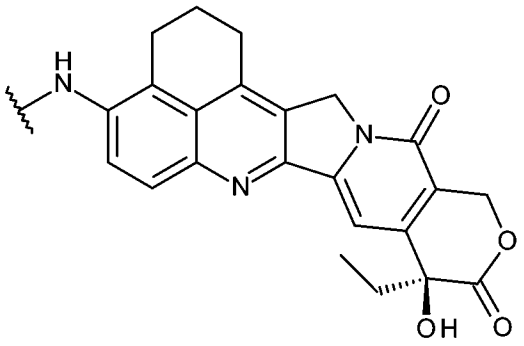
【0144】在一個實施方式中，該抗體或抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑、微

管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、抗微生物劑、治療劑、前驅藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物響應調節劑、藥學試劑、淋巴介質、異源抗體、異源抗體的片段、可檢測標記、聚乙二醇（PEG）、放射性同位素、或其組合。

【0145】在一個實施方式中，該抗體抗原結合片段軛合至一或多種細胞毒素，該一或多種細胞毒素選自拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、或其組合。例如，該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種細胞毒素，該一或多種細胞毒素選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑SG3932、SG4010、SG4057或SG4052（其結構如下提供）；微管溶素AZ1508；吡咯并苯并二氮呼SG3315；吡咯并苯并二氮呼SG3249；或其組合。

【0146】較佳的是，該抗體或其抗原結合片段可以軛合至拓撲異構酶I抑制劑。拓撲異構酶抑制劑係阻斷拓撲異構酶（拓撲異構酶I和II）作用的化學化合物，拓撲異構酶是在正常細胞週期中藉由催化DNA鏈的磷酸二酯骨架的斷裂和重新連接來控制DNA結構變化的一種類型的酶。

【0147】合適的拓撲異構酶I抑制劑的一般實例由以下化合物表示：

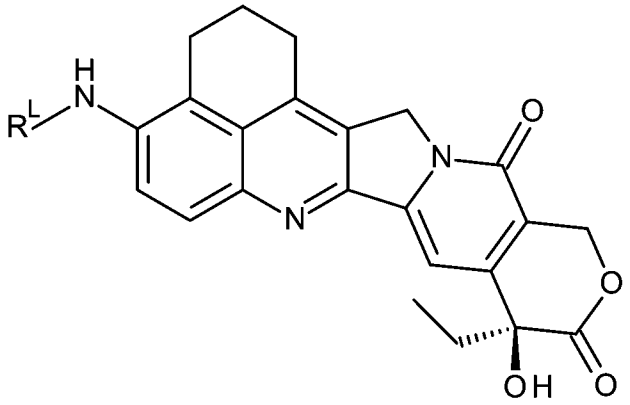


A*

所述化合物表示為A*，並且可以在本文中稱為「藥物單元」。

【0148】該化合物（例如，A*）較佳的是提供有用於連接（較佳的軛合）至本文所述之抗體或抗原結合片段（其可稱為「配體單元」）的連接子。合適地，該連接子以可裂解的方式附接（例如，軛合）至胺基殘基，例如，本文所述之抗體或抗原結合片段的胺基酸。

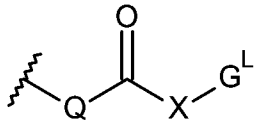
【0149】 更特別地，合適的拓撲異構酶I抑制劑的實例由具有式「I」的以下化合物表示：



I

及其鹽和溶劑化物，其中R^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中所述連接子較佳的是選自：

(ia)：

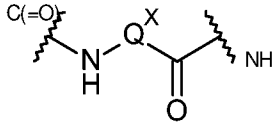


Ia

，

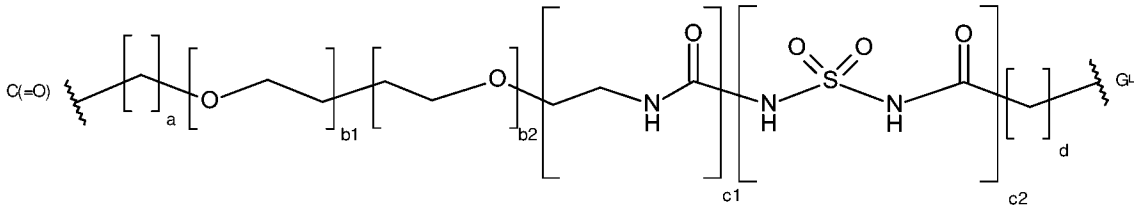
其中

Q係：



，其中Q^X使得Q為胺基酸殘基、二肽殘基、三肽殘基或四肽殘基；

X是：

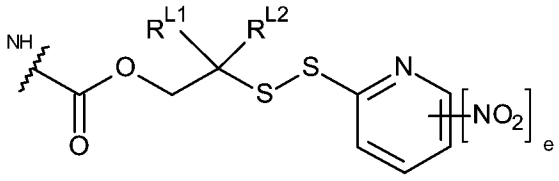


，

其中a = 0至5，b1 = 0至16，b2 = 0至16，c1 = 0或1，c2 = 0或1，d = 0至5，其中至少b1或b2 = 0（即b1和b2中只有一個可以不是0）並且至少c1或c2 = 0（即c1和c2中只有一個可以不是0）；

G^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；或

(ib)：



Ib

，

其中R^{L1}和R^{L2}獨立地選自H和甲基，或與它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團；並且

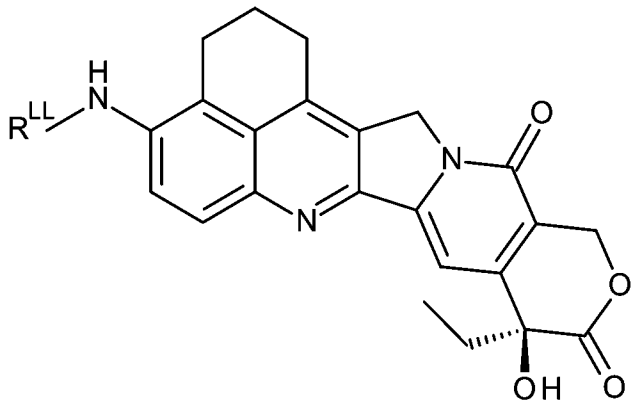
e係0或1。

【0150】熟悉該項技術者將理解，所述藥劑（例如，拓撲異構酶I抑制劑）中的多於一種可以軛合至該抗體或其抗原結合片段。

【0151】例如，本發明之軛合物（例如，抗體-藥物軛合物）可以具有通式IV：

$$L - (D^L)_p \quad \textbf{(IV)}$$

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中L係本文所述之抗體或抗原結合片段（例如，配體單元），D^L係具有連接子的拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物連接子單元）並且其具有式III：

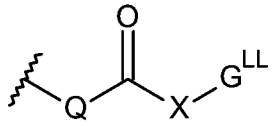


III

。

R^{LL}係連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中該連接子較佳的係選自

(ia')：

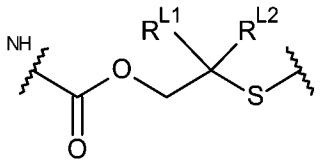


Ia'

，

其中Q和X如以上所定義，並且G^{LL}係連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；並且

(ib')：



Ib'

，

其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定義；並且

p係從1至20的整數。

【0152】 載藥量由p表示，即每個抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）上的拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物單元）的數量。載藥量可以在1至20個藥物單元（D）/配體單元之範圍內。對於組成物，p表示組成物中軛合物的平均載藥量，並且p的範圍為1至20。

【0153】因此，本發明包括軛合物，該軛合物包含共價連接至至少一種拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物單元，如以上說明的A*）的本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）。所述抑制劑較佳的地藉由連接子（例如，連接子單元，如以上描述為R^L和/或R^{LL}的連接子）連接至該抗體或其抗原結合片段。換言之，本發明包括附接有（較佳的經由連接子）一或多種拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物-連接子單元）的本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）。以上更全面描述的抗體或其抗原結合片段（代表配體單元）係結合靶標部分的靶向劑。更特別地，該配體單元可以例如特異性結合靶細胞上的B7-H4，由此將藥物單元遞送至該靶細胞。因此，本發明還提供了用ADC治療例如各種癌症和其他障礙（例如，與表現B7-H4的細胞、較佳的癌細胞的存在相關的癌症/障礙）的方法。

進一步的偏好

【0154】上述拓撲異構酶I抑制劑的某些特徵是特別較佳的並且可以如下所示更詳細地定義。舉例來說，將概述特徵Q^X（例如，在上述1a的連接子內）的較佳的實施方式。

【0155】以下偏好可以應用於如上所述之本發明之所有方面，或者可以涉及單個方面。該等偏好能以任何組合被組合在一起。

【0156】在下文提供的標題「定義」下提供了涉及本節中的某些術語的各種定義。

Q^X

【0157】在一個實施方式中，Q係胺基酸殘基。胺基酸可為天然胺基酸或非天然胺基酸。例如，Q可以選自：Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Leu、Ile、Arg和Trp，其中Cit係瓜胺酸。

【0158】在一個實施方式中，Q包含二肽殘基。二肽中的胺基酸可為天然胺基酸和非天然胺基酸的任何組合。在一些實施方式中，二肽包含天然胺基酸。當連接子係組織蛋白酶不穩定連接子時，二肽係組織蛋白酶介導的切割的作用位點。然後，二肽係組織蛋白酶的識別位點。

【0159】在一個實施方式中，Q選自：

^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Phe-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Leu-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Ile-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Phe-Arg-$^{C=O}$、

^{NH}-Trp-Cit-$^{C=O}$、和

^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$；

其中Cit係瓜胺酸。

【0160】較佳的是，Q選自：

^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$、和

^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$。

【0161】 更較佳的是，Q選自^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$或^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$。

【0162】 其他合適的二肽組合包括：

^{NH}-Gly-Gly-$^{C=O}$、

^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$

^{NH}-Pro-Pro-$^{C=O}$、和

^{NH}-Val-Glu-$^{C=O}$。

【0163】 可以使用其他二肽組合，包括由Dubowchik等人, *Bioconjugate Chemistry* [生物軛合物化學], 2002, 13,855-869描述的那些，將其藉由引用併入本文。

【0164】 在一些實施方式中，Q係三肽殘基。三肽中的胺基酸可為天然胺基酸和非天然胺基酸的任何組合。在一些實施方式中，三肽包含天然胺基酸。當連接子係組織蛋白酶不穩定連接子時，三肽係組織蛋白酶介導的切割的作用位點。然後，三肽係組織蛋白酶的識別位點。特別感興趣的三肽連接子係：

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

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

^{NH}-αGlu-Val-Ala-$^{C=O}$

^{NH}-αGlu-Val-Cit-$^{C=O}$

【0165】 在一些實施方式中，Q係四肽殘基。四肽中的胺基酸可為天然胺基酸和非天然胺基酸的任何組合。在一些實施方式中，四肽包含天然胺基酸。當連接子係組織蛋白酶不穩定連接子時，四肽係組織蛋白酶介導的切割的作用位點。然後，四肽係組織蛋白酶的識別位點。特別感興趣的四肽連接子係：

^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly$^{C=O}$；和

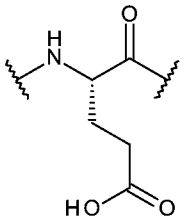
^{NH}-Gly-Phe-Gly-Gly$^{C=O}$。

【0166】在一些實施方式中，四肽係：

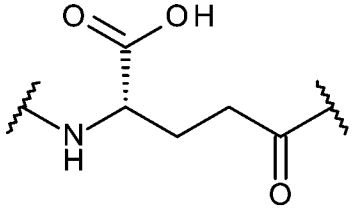
^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly$^{C=O}$。

【0167】在以上肽殘基的表示中，^{NH}-表示殘基的N-末端，並且-$^{C=O}$表示殘基的C-末端。C-末端結合A*的NH。

【0168】Glu表示麩胺酸的殘基，即：



αGlu表示當經由α鏈結合時的麩胺酸的殘基，即：

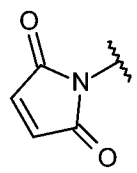
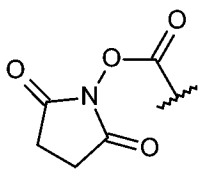
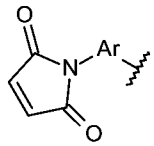
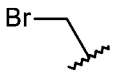


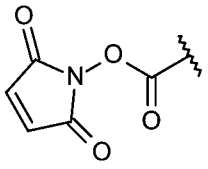
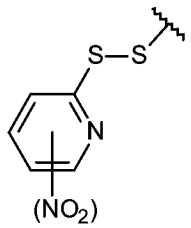
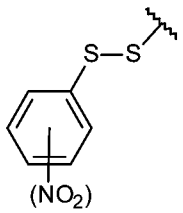
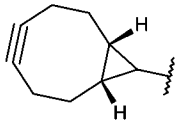
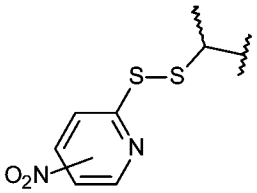
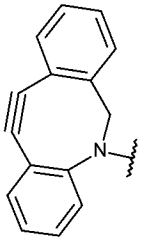
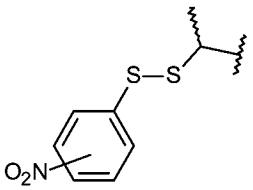
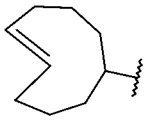
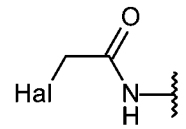
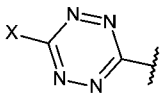
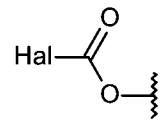
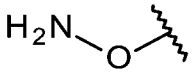
【0169】在一個實施方式中，在適當的情況下，胺基酸側鏈被化學保護。側鏈保護基團可為如上所論述的基團。被保護的胺基酸序列可被酶切割。例如，包含Boc側鏈保護的Lys殘基的二肽序列可被組織蛋白酶切割。

【0170】胺基酸側鏈的保護基團係本領域熟知的，並且描述於Novabiochem公司目錄中，並且如上所述。

G^L

【0171】G^L可以選自：

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	

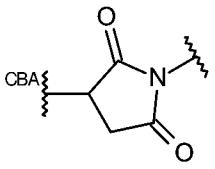
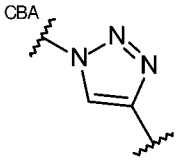
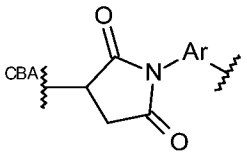
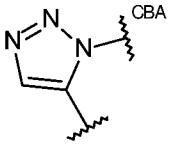
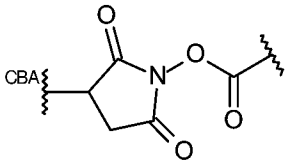
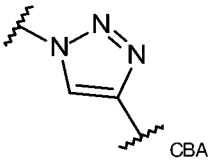
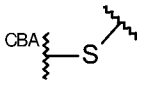
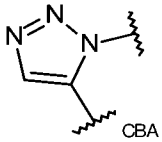
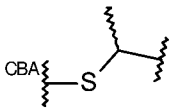
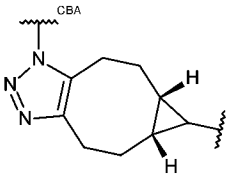
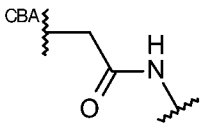
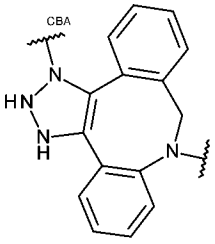
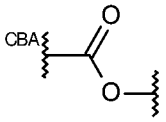
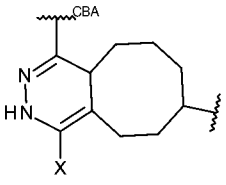
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L9})	
(G^{L3-2})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L10})	
(G^{L3-3})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L11})	
(G^{L3-4})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L12})	
(G^{L4})	 其中Hal = I、Br、Cl	(G^{L13})	
(G^{L5})		(G^{L14})	

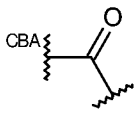
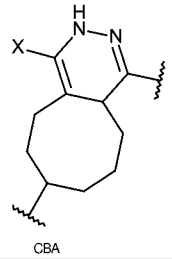
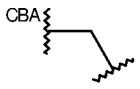
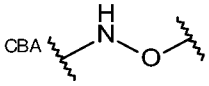
其中Ar表示C_{5-6}伸芳基基團，例如伸苯基，且X表示C_{1-4}烷基。

【0172】在一些實施方式中，G^L選自G^{L1-1}和G^{L1-2}。在該等實施方式的一些中，G^L係G^{L1-1}。

G^{LL}

【0173】G^{LL}可以選自：

(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	
(G^{LL-4})		(G^{LL11})	
(G^{LL5})		(G^{LL12})	

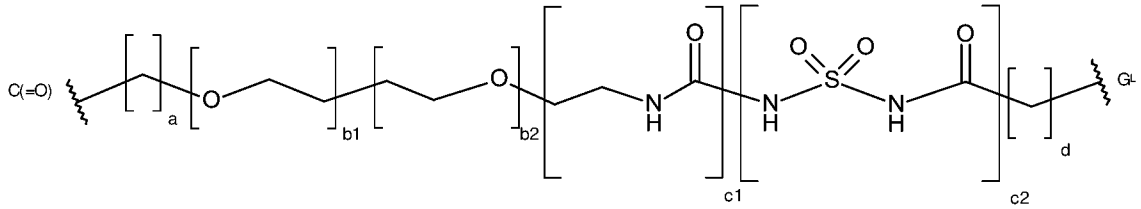
(G^{LL6})		(G^{LL13})	
(G^{LL7})		(G^{LL14})	

其中Ar表示C_{5-6}伸芳基基團，例如伸苯基，且X表示C_{1-4}烷基。

【0174】在一些實施方式中，G^{LL}選自G^{LL1-1}和G^{LL1-2}。在該等實施方式的一些中，G^{LL}係G^{LL1-1}。

X

【0175】X較佳的是：



，

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

a可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，a係0至3。在該等實施方式的一些中，a係0或1。在另外的實施方式中，a係0。

b1可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b1係0至12。在該等實施方式的一些中，b1係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。

b2可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b2係0至12。在該等實施方式的一些中，b2係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。較佳的是，b1和b2中只有一個可以不是0。

c1可為0或1。c2可為0或1。較佳的是，c1和c2中只有一個可以不是0。

d可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，d係0至3。在該等實施方式的一些中，d係1或2。在另外的實施方式中，d係2。在另外的實施方式中，d係5。

【0176】在X的一些實施方式中，a係0，b1係0，c1係1，c2係0並且d係2，並且b2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2係0、2、3、4、5或8。在X的一些實施方式中，a係1，b2係0，c1係0，c2係0並且d係0，並且b1可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b1係0、2、3、4、5或8。在X的一些實施方式中，a係0，b1係0，c1係0，c2係0並且d係1，並且b2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2係0、2、3、4、5或8。在X的一些實施方式中，b1係0，b2係0，c1係0，c2係0並且a和d之一係0。a和d中另一個係從1至5。在該等實施方式的一些中，a和d中另一個係1。在該等實施方式的另一些中，a和d中另一個係5。在X的一些實施方式中，a係1，b2係0，c1係0，c2係1，d係2，並且b1可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2係0、2、3、4、5或8。

【0177】在一些實施方式中，R^L具有式Ib。在一些實施方式中，R^{LL}具有式Ib’。

【0178】R^{L1}和R^{L2}可以獨立地選自H和甲基，或與它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團。

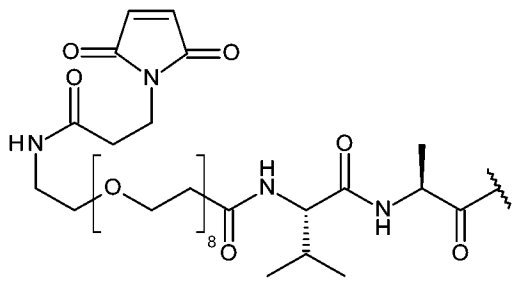
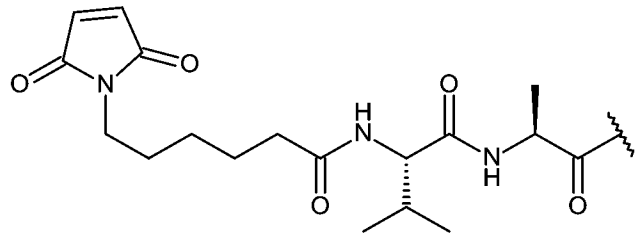
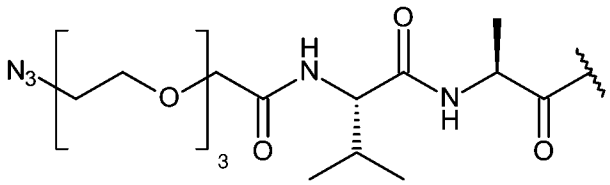
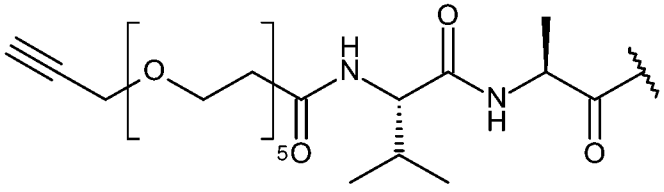
【0179】在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}兩者均為H。在一些實施方式中，R^{L1}係H並且R^{L2}係甲基。在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}兩者均為甲基。

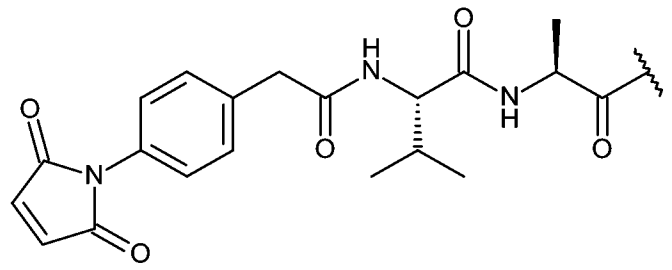
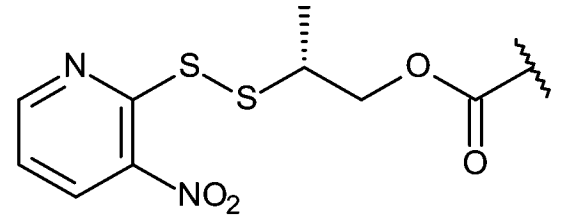
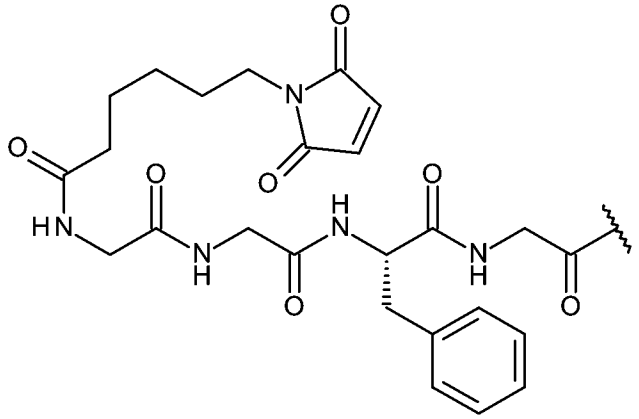
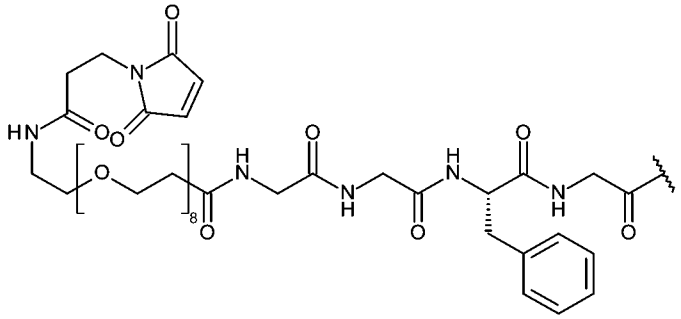
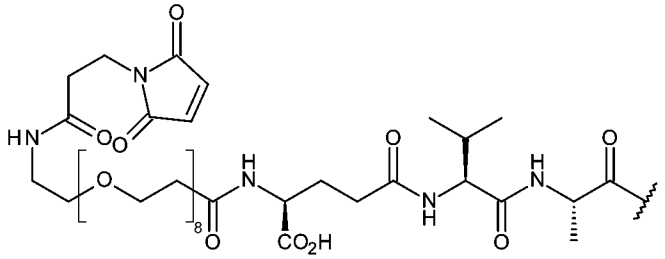
【0180】在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}與它們所結合的碳原子一起形成環丙烯基團。在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}與它們所結合的碳原子一起形成環丁烯基團。

【0181】在基團Ib中，在一些實施方式中，e係0。在其他實施方式中，e係1並且硝基基團可以在環的任何可用位置上。在該等實施方式的一些中，它位於鄰位。在該等實施方式的另一些中，它位於對位。

【0182】在其中以單一鏡像異構物或以鏡像異構物富集的形式提供本文所述之化合物的一些實施方式中，鏡像異構物富集形式具有大於60:40、70:30、80:20或90:10的鏡像異構物比率。在另外的實施方式中，鏡像異構物比率大於95:5、97:3或99:1。

【0183】在一些實施方式中，R^L選自：

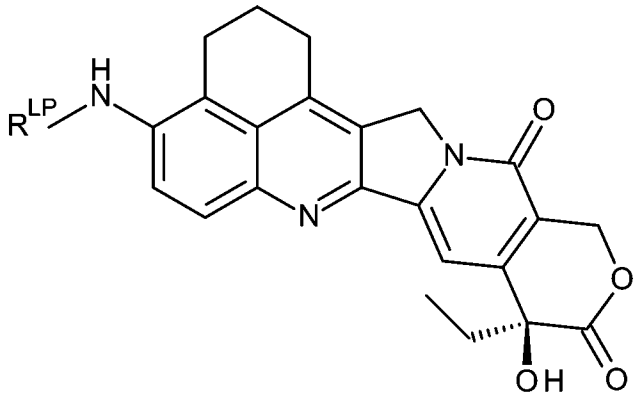
(i)	
(ii)	
(iii)	
(iv)	

(v)	
(vi)	
(vii)	
(viii)	
(ix)	

【0184】在一些實施方式中，R^{LL}係衍生自上述R^{L}基團的基團。

【0185】已經概述了上述偏好，現在描述某些較佳的拓撲異構酶I-連接子（例如，藥物連接子單元）式。

【0186】在一些實施方式中，具有式**I**之化合物具有式$\mathbf{I^P}$：

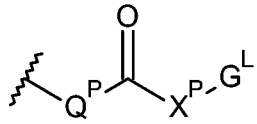


$\mathbf{I^P}$

；

及其鹽和溶劑化物，其中R^{LP}係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段的連接子，其中所述連接子選自：

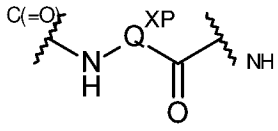
(ia)：



$\mathbf{Ia^P}$，

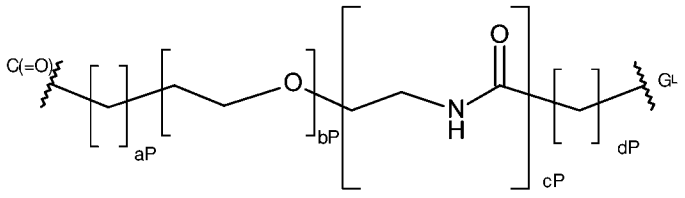
其中

Q^P係：



，其中Q^{XP}使得Q^P為胺基酸殘基、二肽殘基或三肽殘基；

X^P係：

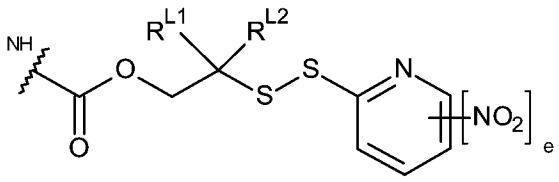


，

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

G^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；

(ib)：



Ib

，

其中R^{L1}和R^{L2}獨立地選自H和甲基，或與 它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團；並且

e係0或1。

aP可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，aP係0至3。在該等實施方式的一些中，aP係0或1。在另外的實施方式中，aP係0。

bP可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b係0至12。在該等實施方式的一些中，bP係0至8，並且可為0、2、4或8。

cP可為0或1。

dP可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，dP係0至3。在該等實施方式的一些中，dP係1或2。在另外的實施方式中，dP係2。

【0187】 在X^P的一些實施方式中，aP係0，cP係1並且dP係2，並且bP可為從0至8。在該等實施方式的一些中，bP係0、4或8。

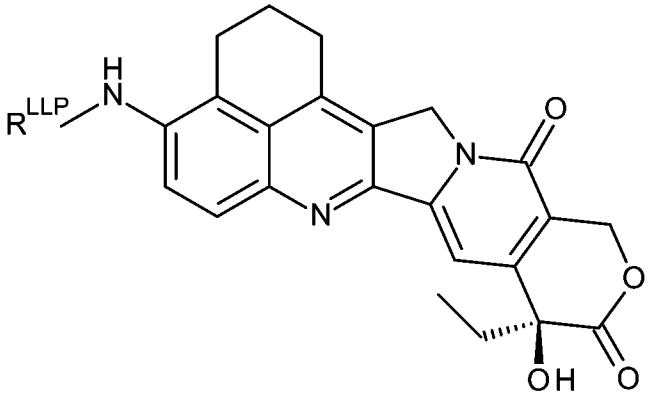
【0188】 上述對於具有式**I**之化合物的Q^X的偏好可以適用於Q^{XP}（例如，在適當的情況下）。

【0189】 上述對於具有式**I**之化合物的G^L、R^{L1}、R^{L2}和e的偏好可以適用於具有式$\mathbf{I}^P$之化合物。

【0190】 在一些實施方式中，具有式**IV**之軛合物具有式$\mathbf{IV}^P$：

$$L - (D^{LP})_p \quad (\mathbf{IV^P})$$

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中L係本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元），D^{LP}係拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物連接子單元）並且具有式III^P：

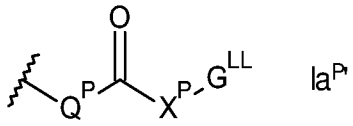


$\mathbf{III^P}$

；

R^{LLP}係連接至該抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中所述連接子選自

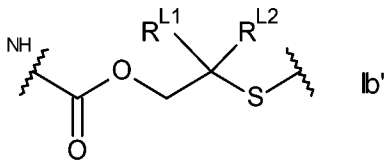
(ia')：



$\mathbf{Ia^P}$，

其中Q^P和X^P如以上所定義，並且G^{LL}係連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；以及

(ib')：



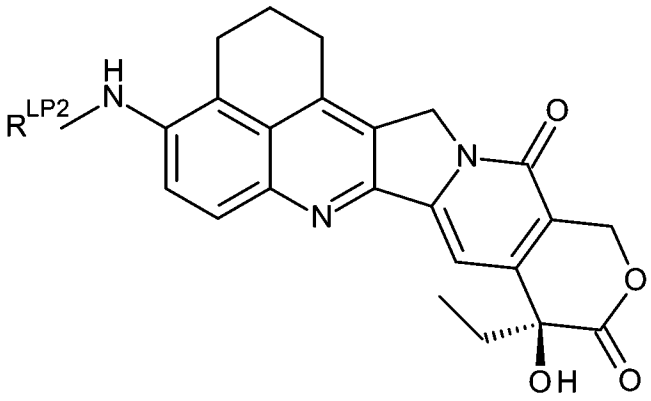
$\mathbf{Ib'}$

，

其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定義；並且

p係從1至20的整數。

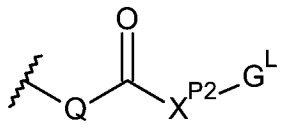
【0191】在一些實施方式中，具有式I之化合物具有式$\mathbf{I^{P2}}$：



I^{P2} ;

及其鹽和溶劑化物，其中R^{LP2}係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段的連接子，其中所述連接子選自：

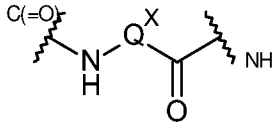
(ia)：



Ia^{P2} ，

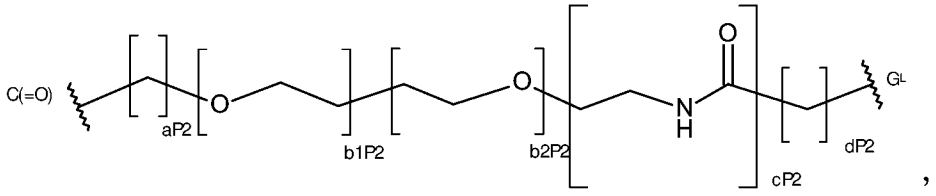
其中

Q係：



，其中Q^X使得Q為胺基酸殘基、二肽殘基、三肽殘基或四肽殘基；

X^{P2}係：

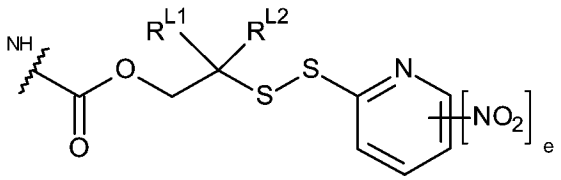


，

其中aP2 = 0至5，b1P2 = 0至16，b2P2 = 0至16，cP2 = 0或1，dP2 = 0至5，其中至少b1P2或b2P2 = 0（即b1和b2中只有一個可以不是0）；

G^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；

(ib)：



Ib

，

其中R^{L1}和R^{L2}獨立地選自H和甲基，或與 它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團；並且

e係0或1。

【0192】 aP2可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，aP2係0至3。在該等實施方式的一些中，aP2係0或1。在另外的實施方式中，aP2係0。

【0193】 b1P2可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b1P2係0至12。在該等實施方式的一些中，b1P2係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。

【0194】 b2P2可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b2P2係0至12。在該等實施方式的一些中，b2P2係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。

【0195】 較佳的是，b1P2和b2P2中只有一個可以不是0。

【0196】 cP2可為0或1。

【0197】 dP2可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，dP2係0至3。在該等實施方式的一些中，dP2係1或2。在另外的實施方式中，dP2係2。在另外的實施方式中，dP2係5。

【0198】 在X^{P2}的一些實施方式中，aP2係0，b1P2係0，cP2係1並且dP2係2，並且b2P2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2P2係0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些實施方式中，aP2係1，b2P2係0，cP2係0並且dP2係0，並且b1P2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b1P2係0、2、3、4、5或8。在

X^{P2}的一些實施方式中，aP2係0，b1P2係0，cP2係0並且dP2係1，並且b2P2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2P2係0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些實施方式中，b1P2係0，b2P2係0，cP2係0並且aP2和dP2之一係0。aP2和d中另一個係從1至5。在該等實施方式的一些中，aP2和d中另一個係1。在該等實施方式的另一些中，aP2和dP2中另一個係5。

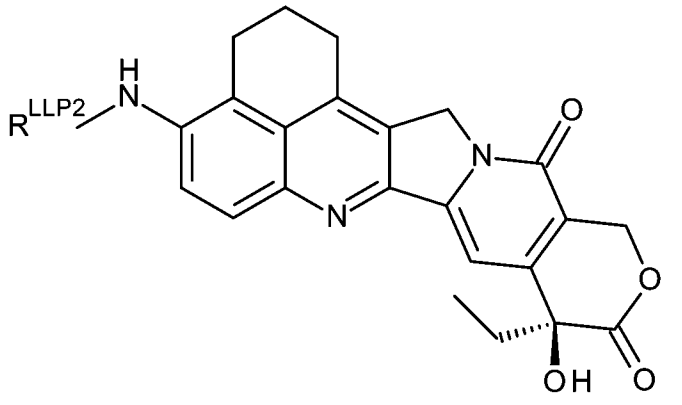
【0199】 上述對於具有式**I**之化合物的Q^X的偏好可以適用於式Ia^{P2}中的Q^X（例如，在適當的情況下）。

【0200】 上述對於具有式**I**之化合物的G^L、R^{L1}、R^{L2}和e的偏好可以適用於具有式$\mathbf{I}^{P2}$之化合物。

【0201】 在一些實施方式中，具有式**IV**之軛合物具有式$\mathbf{IV}^{P2}$：

$$L - (D^{LP2})_p(\mathbf{IV}^{P2})$$

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中L係本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元），D^{LP2}係拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物連接子單元）並且具有式III^{P2}：

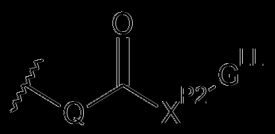


$\mathbf{III}^{P2}$

；

R^{LLP2}係連接至該抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中所述連接子選自

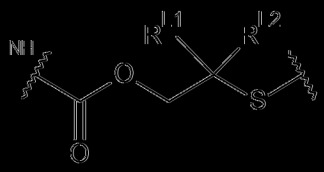
(ia')：



$Ia^{P2'}$，

其中Q和X^{P2}如以上所定義，並且G^{LL}係連接至該抗體或其抗原結合片段的連接子；以及

(ib')：

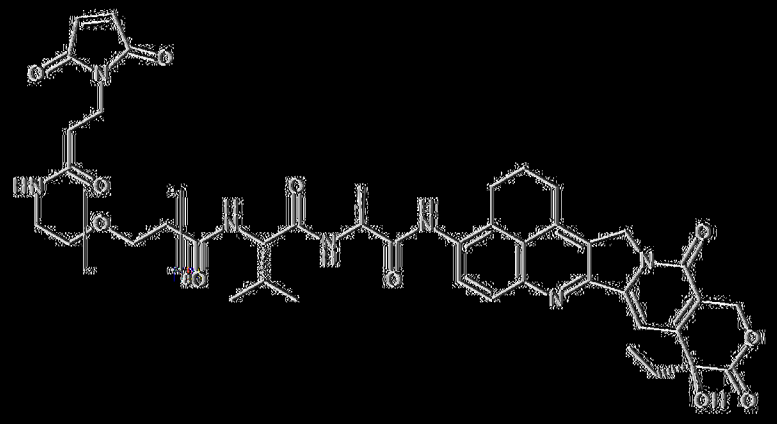


Ib'，

其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定義；並且

p係從1至20的整數。

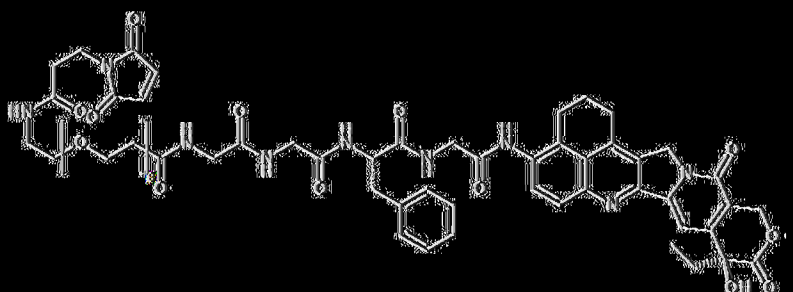
[0202] 特別合適的拓撲異構酶I抑制劑包括具有以下式的那些：



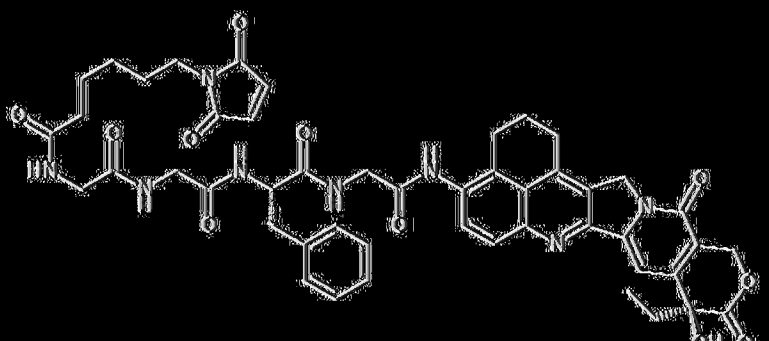
（SG3932）；



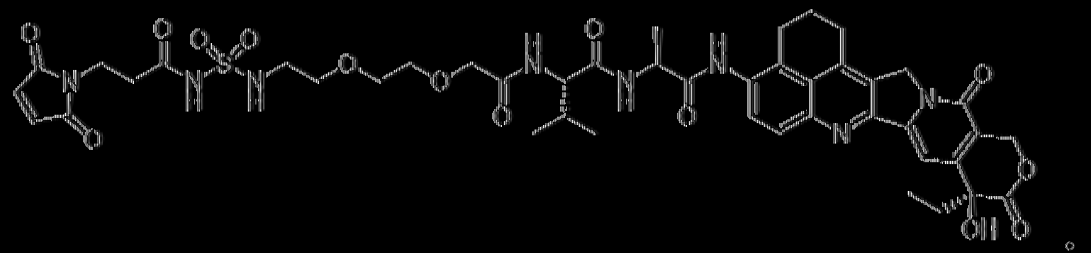
（SG4010）；



（SG4057）；

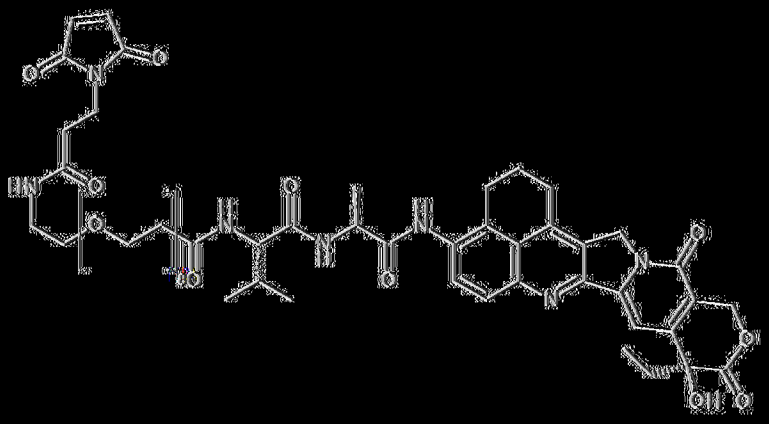


（SG4052）；和/或



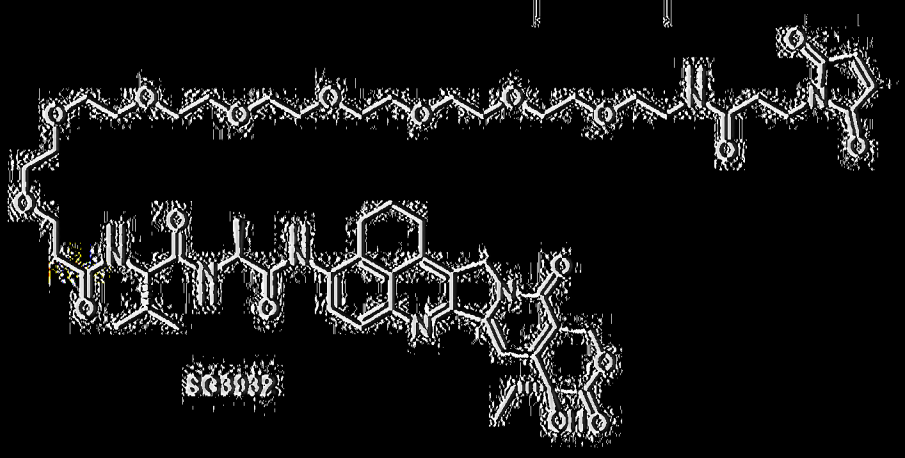
。

|(0203)| SG3932係特別較佳的。因此，在較佳的實施方式中，本文所述之抗體或其抗原結合片段輒合至具有以下式的拓撲異構酶I抑制劑（例如，SG3932）：



（SG3932）。

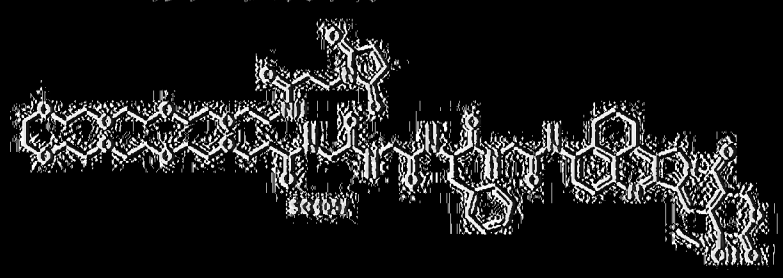
|(0204)| 為了避免疑問，數字「8」指定，方括號內的結構重複八次。因此，SG3932的另一種表示係：



[0205] SG4010的另一種表示係：



[0206] SG4057的另一種表示係：



[0207] SG4052的另一種表示係：



[0208] 本文所述之任何抗體或其抗原結合片段可以輒合至所述拓撲異構酶II抑制劑中的一或多種。

[0209] 在一個較佳的方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

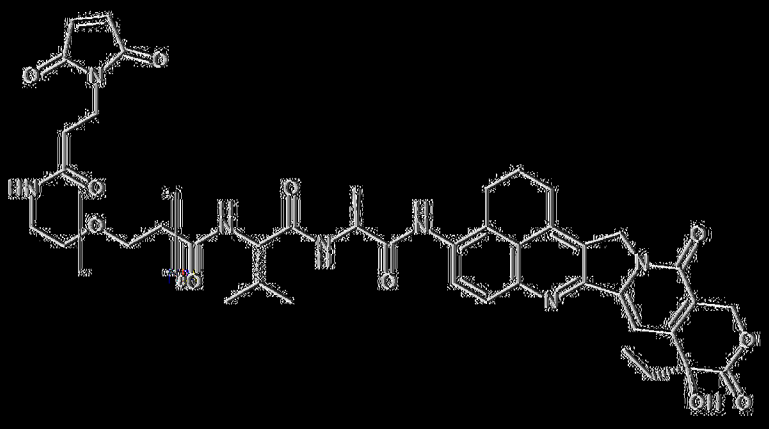
iii. 含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體；

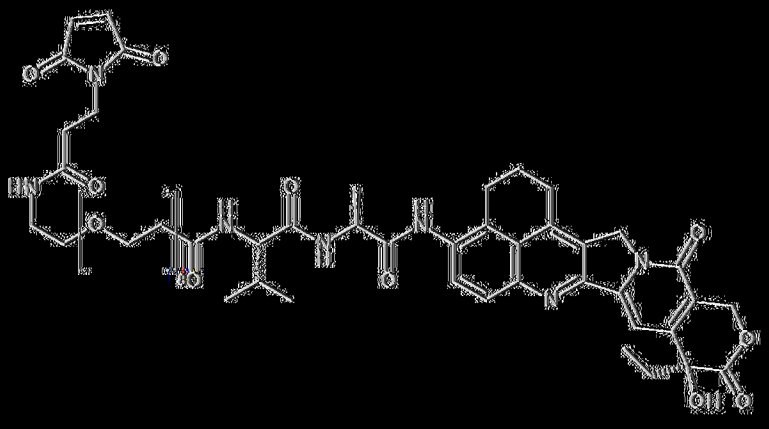
其中該抗體或其抗原結合片段連合至SG3932：



（SG3932）。

[0210] 另一個較佳的方面提供了抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；

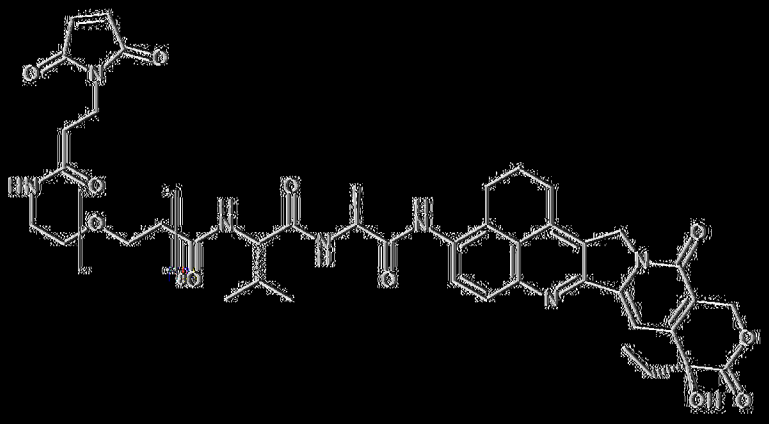
其中該抗體或其抗原結合片段連合至SG3932：



（SG3932）。

[0211] 一個特別較佳的方面提供了抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；

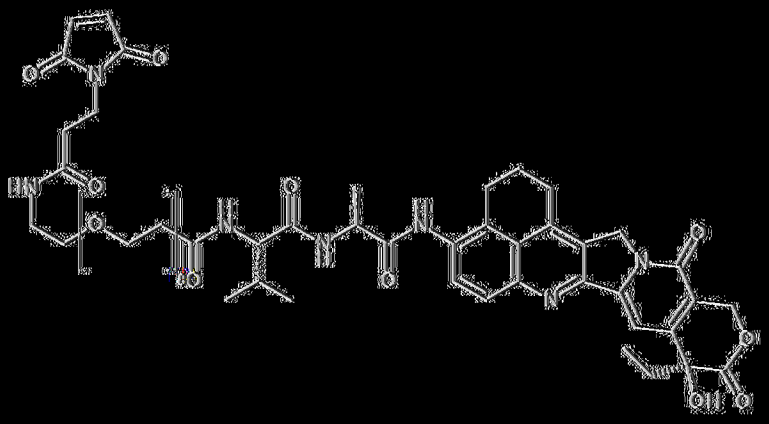
其中該抗體或其抗原結合片段軛合至SG3932：



（SG3932）。

[0212] 另一個較佳的方面提供了抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈，或其功能變體；

其中該抗體或其抗原結合片段軛合至SG3932：

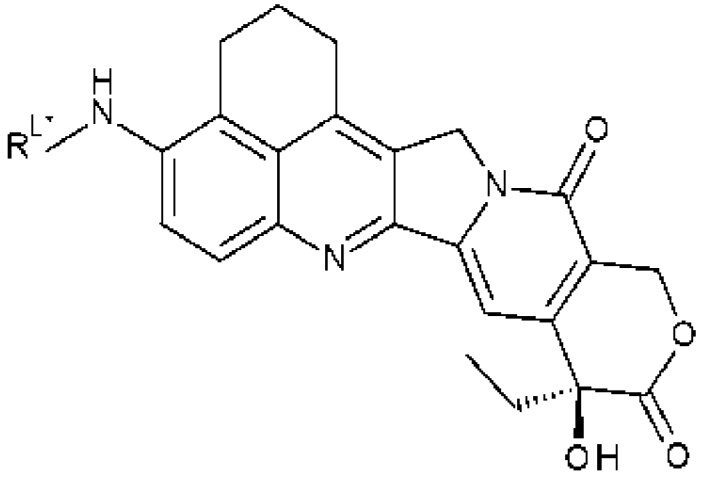


（SG3932）。

拓撲異構酶I抑制劑的合成

[0213] 為了完成，現在將描述用於製備一或多種較佳的拓撲異構酶I抑制劑的某些通用合成路線。更多詳情可以在實例部分中找到。

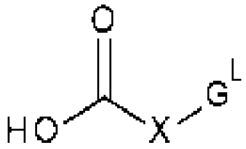
[0214] 具有式I之化合物（其中R^L具有式Ia）可以從具有式2之化合物：



式2

；

（其中R^{L*}係-QH）藉由連接具有式3之化合物：



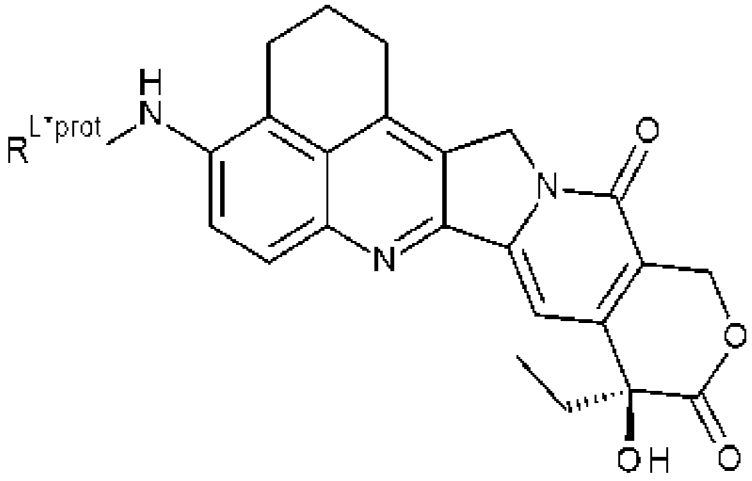
式3

，

或其活化版本來合成。

【0215】 這樣的反應可以在醯胺偶合條件下進行。

【0216】 具有式2之化合物可以藉由具有式4之化合物：

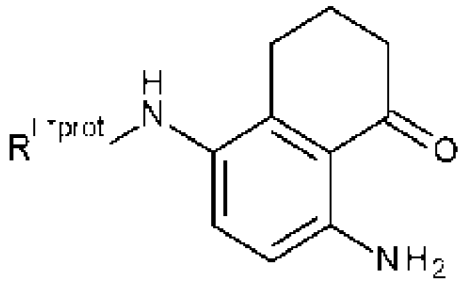


式4

；

（其中R^{L*prot}係-Q-$Prot^N$，其中$Prot^N$係胺保護基團）的去保護來合成。

【0217】 具有式4之化合物可以藉由具有式5之化合物：

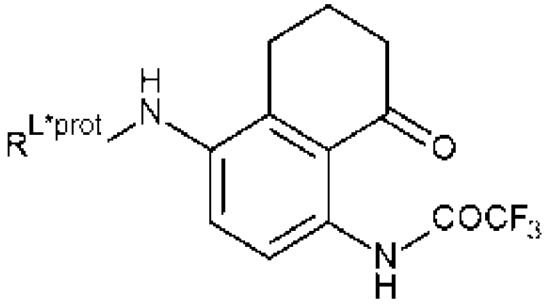


式5

;

與化合物A3的偶合，使用弗裡德蘭德反應（Friedlander reaction）來合成。

【0218】具有式5之化合物可以從具有式6之化合物：



式6

;

藉由除去三氟乙醯胺保護基團來合成。

【0219】具有式6之化合物可以藉由以下偶合來合成：R^{L*prot}-OH至化合物I7。

【0220】具有式I之化合物（其中R^L具有式Ia或Ib）可以從化合物I11藉由化合物R^L-OH或其活化形式的偶合來合成。

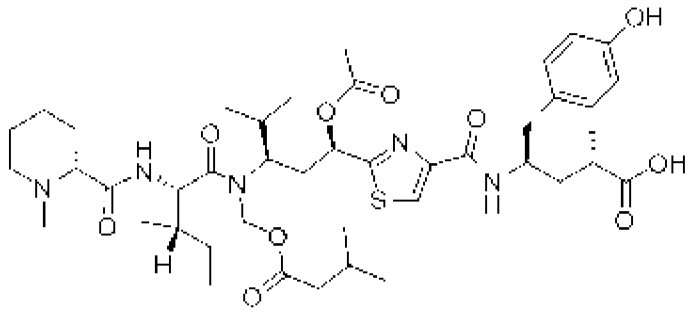
胺保護基團：

【0221】胺保護基團係熟悉該項技術者熟知的。特別參考以下文獻中的合適的保護基團的揭露內容：Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis [有機合成中的格林氏保護基團], 第四版, John Wiley & Sons [約翰威利父子公司], 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), 第696-871頁。

另外的ADC

【0222】儘管如上所述較佳的拓撲異構酶I抑制劑，但應注意任何合適的藥劑（例如，藥物/細胞毒素）可連接至本發明之抗體或其抗原結合片段。下文概述了其他合適的藥劑的實例。

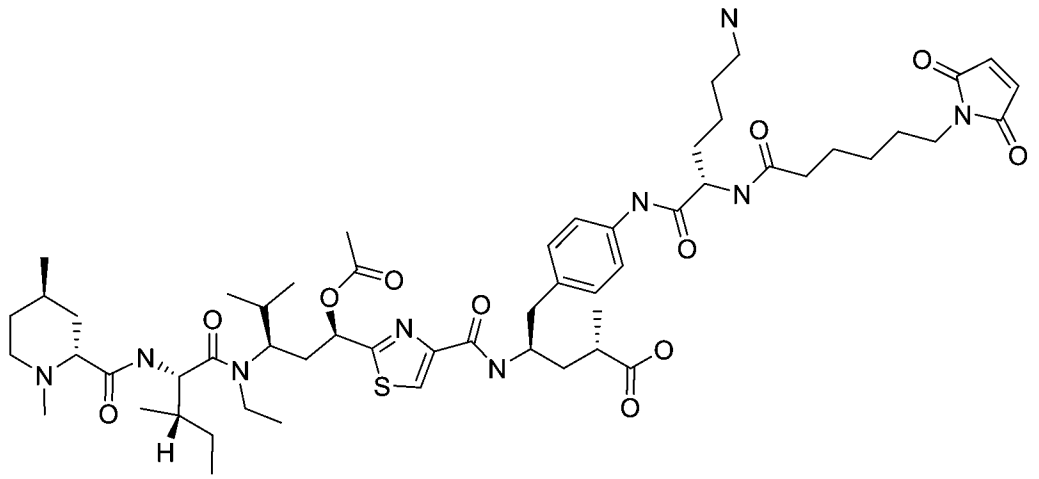
【0223】在一個實施方式中，細胞毒素係微管溶素或微管溶素衍生物。在一個實施方式中，細胞毒素係微管溶素A，其具有以下化學結構：



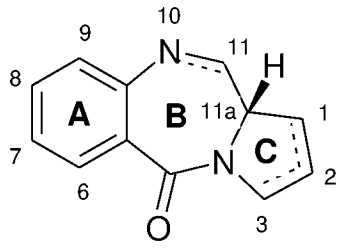
。

【0224】微管溶素係從黏細菌物種分離出的一類天然產物中的成員。作為細胞骨架相互作用劑，微管溶素係抑制微管蛋白聚合並導致細胞週期停滯和細胞凋亡的有絲分裂毒物。如本文所使用之，術語「微管溶素」共同地和單獨地係指天然存在的微管溶素以及微管溶素的類似物和衍生物。微管溶素的示例性實例例如揭露於WO 2004005326 A2、WO 2012019123 A1、WO 2009134279 A1、WO 2009055562 A1、WO 2004005327 A1、US 7776841、US 7754885、US 20100240701、US 7816377、US 20110021568和US 20110263650中，將其藉由引用併入本文。將理解的是，此類衍生物包括例如包含一或多個保護基團（protection/protecting group）、一或多個連接部分的微管溶素前驅藥或微管溶素。

【0225】在一個實施方式中，細胞毒素係微管溶素1508，其在本文中又稱為「AZ1508」並且更詳細地描述於WO 2015157594（將其藉由引用併入本文）中，並具有以下結構：



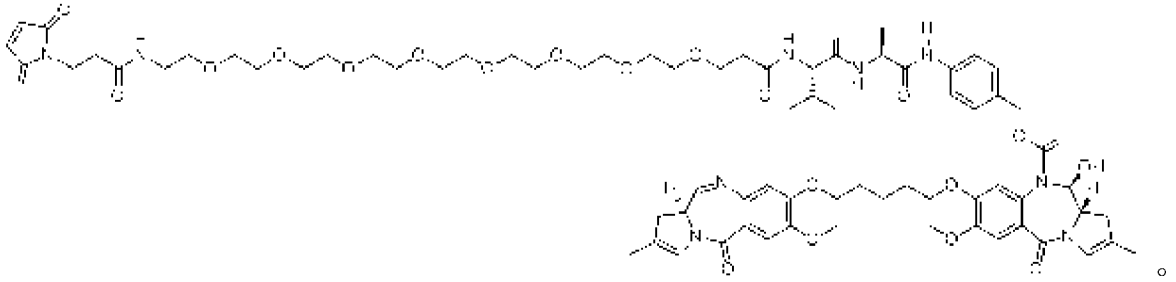
【0226】在另一個實施方式中，細胞毒素可為吡咯并苯并二氮呯（PBD）或PBD衍生物。PBD轉運至其中其交聯DNA的細胞核中，阻止有絲分裂期間的複製，藉由誘導單鏈斷裂來損壞DNA，並且隨後導致細胞凋亡。一些PBD具有識別和結合至DNA特定序列的能力；較佳的序列係PuGPu。PBD具有以下通用結構：



【0227】PBD在取代基的數目、類型和位置方面，在它們的芳香族A環和吡咯并C環二者方面，以及在C環的飽和度方面不同。在B環中，在N10-C11位置處存在亞胺（N=C）、甲醇胺（NH-CH(OH)）、或甲醇胺甲基醚（NH-CH(OMe)），其係負責使DNA烷基化的親電中心。所有已知的天然產物具有在手性C11a位置處的(S)-構型，當從C環向A環觀察時，該構型向其提供了右旋扭曲。這為它們提供了合適的三維形狀以與B型DNA的小溝具有等螺旋性（isohelicity），從而在結合位點處緊密配合。它們在小溝中形成加合物的能力使得它們能夠干擾DNA加工，因此將它們用作抗腫瘤劑。

【0228】第一種PBD抗腫瘤抗生素，即胺茴黴素（anthramycin），於1965年被發現。從那時起，已經報導了許多種天然存在的PBD，並且已經針對多種類似物開發了10多種合成路線。家族成員包括阿比黴素（abbeymycin）、奇卡黴素（chicamycin）、DC-81、甲基胺茴黴素（mazethramycin）、新胺茴黴素（neothramycin）A和B、波羅斯拉黴素（porothramycin）、prothracarcin、西班米星（sibanomicin）（DC-102）、西伯利亞黴素和托馬黴素。包含它們的PBD和ADC還被描述於WO 2015/155345和WO 2015/157592中，將其藉由引用以其全文併入本文。

【0229】在一個實施方式中，細胞毒素係PBD 3249，其在本文中又稱為「SG3249」並且更詳細地描述於WO 2014/057074（將其藉由引用併入本文）中，並具有以下結構：



【0230】因此，該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素。

【0231】例如，在一方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

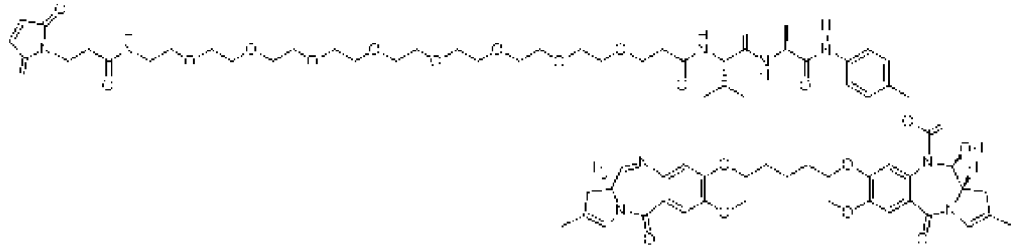
iii. 含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

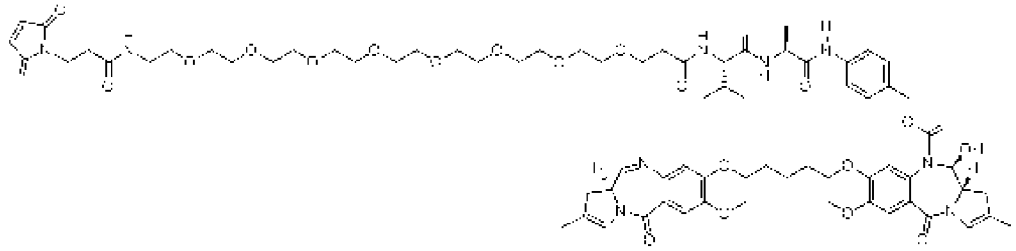
vi. 含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體；

其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素：



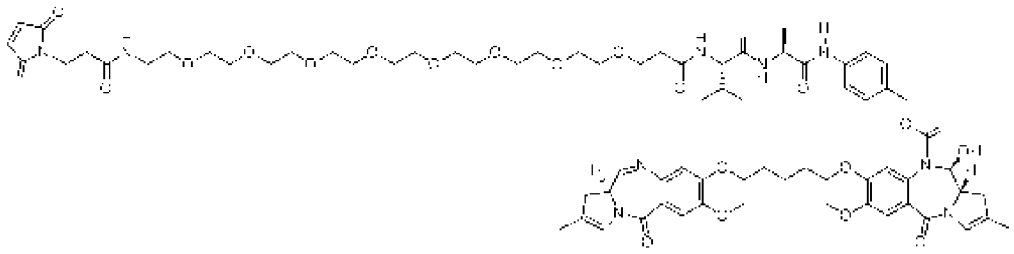
（SG3249）。

【0232】在另一方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：抗體或其抗原結合片段包含，含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素：



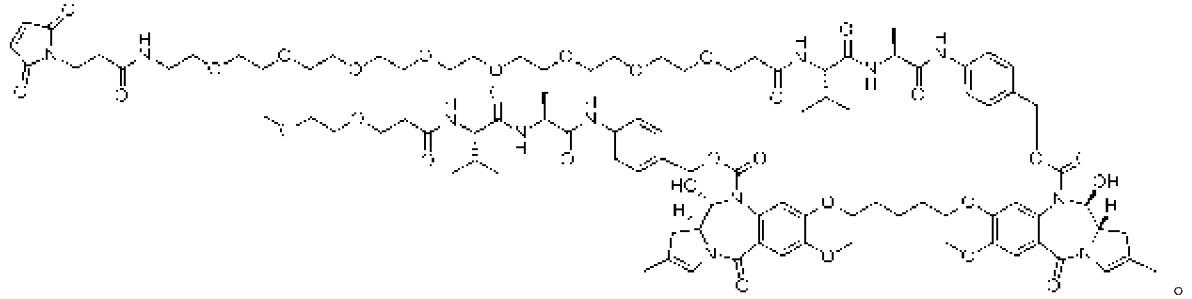
（SG3249）。

【0233】在另一方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：抗體或其抗原結合片段包含，含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素：



（SG3249）。

【0234】在一個實施方式中，細胞毒素係PBD 3315，其在本文中又稱為「SG3315」並且更詳細地描述於WO 2015/052322（將其藉由引用併入本文）中，並具有以下結構：



。

【0235】該抗體或其抗原結合片段較佳的是通過半胱胺酸殘基軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素。

【0236】本發明之抗體或其抗原片段可以使用位點特異性或非位點特異性軛合方法軛合至異源藥劑（較佳的是細胞毒素）。在一個實施方式中，該等抗體及其抗原片段包含一個、兩個、三個、四個或更多個治療部分。在一個實施方式中，所有治療部分係相同的。

【0237】用於抗體或其抗原結合片段的常規的軛合策略依賴於通過離胺酸或半胱胺酸將有效載荷隨機軛合至抗體或片段。在一個實施方式中，將該抗體或其抗原結合片段隨機軛合至異源藥劑（較佳的細胞毒素），例如，藉由對該抗體或片段進行部分還原，隨後與所希望的藥劑反應，其中連接子部分被附接或不被附接。使用DTT或相似的還原劑可以還原該抗體或片段。然後可以在DMSO的存在下，將連接子部分附接或未附接的藥劑以莫耳過量添加至經還原

的抗體或片段中。軛合後，可以添加過量的游離半胱胺酸以淬滅未反應的藥劑。然後可以將反應混合物進行純化，並且緩衝液更換為PBS。

【0238】在一個實施方式中，藥劑（例如，細胞毒素）藉由位點特異性軛合與抗體或其抗原結合片段軛合。在一個實施方式中，使用在具體位置處的反應性胺基酸殘基進行治療部分與抗體的位點特異性軛合產生了具有一致化學計量的均質ADC製劑。

【0239】該位點特異性軛合可以通過半胱胺酸、殘基或非天然胺基酸進行。在一個較佳的實施方式中，該異源藥劑（較佳的細胞毒素）通過至少一個半胱胺酸殘基軛合至該抗體或其抗原結合片段。

【0240】在一個實施方式中，該異源藥劑（較佳的細胞毒素）化學地軛合至胺基酸的側鏈上（較佳的在Fc區中的具體Kabat位置處）。在一個實施方式中，該藥劑（例如，細胞毒性劑或顯像劑）通過位置239、248、254、273、279、282、284、286、287、289、297、298、312、324、326、330、335、337、339、350、355、356、359、360、361、375、383、384、389、398、400、413、415、418、422、440、441、442、443和446中至少一個的半胱胺酸取代而軛合至該抗體或其抗原結合片段，其中編號對應於Kabat中的EU索引。在一個實施方式中，具體的Kabat位置係239、442、或二者。在一個實施方式中，具體的位置係Kabat位置442，Kabat位置239和240之間的胺基酸插入，或二者。在一個實施方式中，該異源藥劑（較佳的細胞毒素）通過硫醇-馬來醯亞胺鍵軛合至該抗體或其抗原結合片段。在一些方面中，該胺基酸側鏈係巰基側鏈。

【0241】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（例如，較佳的是包含VL和恒定輕鏈）以及含有SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）；其中該抗

體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素；較佳的是，其中該吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素軛合至所述重鏈的胺基酸位置240處的半胱胺酸殘基。

【0242】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（例如，較佳的是包含VL和恒定輕鏈）以及含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）；其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素。

【0243】本文提及的軛合至細胞毒素的抗體或抗原結合片段與術語「抗體藥物軛合物（ADC）」或「抗B7-H4 ADC」同義。

【0244】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段（例如，抗B7-H4 ADC）向細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）遞送細胞毒性有效載荷，並且相對於不存在該抗體或其抗原結合片段（例如，抗B7-H4 ADC）下的抑制或阻抑水平，抑制或阻抑增殖（例如，腫瘤的增殖）至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%或約100%（較佳的至少40%）。細胞增殖可以使用本領域公認的技術測定，該等技術測量細胞分裂速率、和/或經歷細胞分裂的細胞在細胞群中的分數、和/或由於終末分化或細胞死亡（例如，胸苷摻入）自細胞群的細胞損失的速率。

【0245】在一個實施方式中，本發明之抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）與細胞表面上的B7-H4結合，並被內化到細胞中。在一個實施方式中，該抗原或其抗體片段以10分鐘時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約100 ng/ml至約1 μg/ml、約100 ng/ml至約500 ng/ml、約100 ng/ml至約250 ng/ml、約250 ng/ml至約500 ng/ml、約350 ng/ml至約450

ng/ml、約500 ng/ml至約1 μg/ml、約500 ng/ml至約750 ng/ml、約750 ng/ml至約850 ng/ml、或約900 ng/ml至約1 μg/ml。

【0246】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）以30分鐘時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約100 ng/ml至約1 μg/ml、約100 ng/ml至約500 ng/ml、約100 ng/ml至約250 ng/ml、約250 ng/ml至約500 ng/ml、約250 ng/ml至約350 ng/ml、約350 ng/ml至約450 ng/ml、約500 ng/ml至約1 μg/ml、約500 ng/ml至約750 ng/ml、約750 ng/ml至約850 ng/ml、或約900 ng/ml至約1 μg/ml。

【0247】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）以120分鐘時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約50 ng/ml至約500 ng/ml、約50 ng/ml至約100 ng/ml、約100 ng/ml至約200 ng/ml、約200 ng/ml至約300 ng/ml、約300 ng/ml至約400 ng/ml、或約400 ng/ml至約500 ng/ml。

【0248】 在一些實施方式中，該抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）以8小時時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約5 ng/ml至約250 ng/ml、約10 ng/ml至約25 ng/ml、約25 ng/ml至約50 ng/ml、約50 ng/ml至約100 ng/ml、約100 ng/ml至約150 ng/ml、約150 ng/ml至約200 ng/ml、或約200 ng/ml至約250 ng/ml。

【0249】 為避免疑義，本文提及的「軛合物」意指與異源藥劑（包括上述的任何此類藥劑，較佳的是細胞毒素）軛合的抗體或抗原結合片段。

【0250】 除了上述本發明之抗體或抗原結合片段的治療性應用之外，本發明之「軛合物」還可用於治療方法中。因此，還提供了治療方法，該治療方法包括向需要治療的受試者投與治療有效量的本文所述之軛合物（例如，具有式IV之軛合物）。術語「治療有效量」係足夠向患者顯示益處的量。這種益處

可為至少減輕至少一種症狀。投與的實際量以及投與的速率和時程將取決於正治療的疾病的性質和嚴重程度。治療處方（例如劑量的確定）屬於全科醫生和其他醫生的職責。

【0251】 取決於待治療的病症，軛合物可單獨或與其他治療組合，同時或順序地投與。治療和療法之實例包括但不限於化學療法（包括例如藥物的活性劑的投與）；手術；和放射療法。

【0252】 根據本發明並且用於根據本發明使用的藥物組成物除了活性成分（即本發明之軛合物/ADC（例如，式IV））以外，還可以包含藥學上可接受的賦形劑、載體、緩衝液、穩定劑或熟悉該項技術者熟知的其他材料。該等材料應無毒並且不應干擾活性成分的功效。載體或其他材料的確切性質將取決於投與途徑，該投與途徑可為口服、或藉由注射，例如皮膚、皮下或靜脈內注射。

【0253】 用於口服投與的藥物組成物可為片劑、膠囊、粉末或液體形式。片劑可包含固體載體或輔助劑。液體藥物組成物通常包含液體載體，如水、石油、動物油或植物油、礦物油或合成油。可包括生理鹽水溶液、右旋糖或其他糖類溶液或二醇，如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。膠囊可包含固體載體，例如明膠。

【0254】 對於靜脈內、皮膚或皮下注射，或病痛部位的注射，活性成分將處於腸胃外可接受的水性溶液形式，該水性溶液為無熱原的並且具有合適pH、等滲性以及穩定性。熟悉該項技術者完全能夠使用例如等滲媒介物，如氯化鈉注射液、林格氏注射液、乳酸鹽林格氏注射液來製備合適溶液。需要時，可以包括防腐劑、穩定劑、緩衝液、抗氧化劑和/或其他添加劑。

【0255】 較佳的是，軛合物可用於治療增殖性疾病。術語「增殖性疾病」涉及過量或異常細胞的不想要的或不受控制的細胞增殖，無論是體外還是

體內，其均為不希望的，例如贅生性或增生性生長。術語「增殖性疾病」可替代地稱為「癌症」。

【0256】 合適的增殖性疾病（例如癌症）將較佳的是被表徵為表現B7-H4的癌細胞的存在。

【0257】 增殖性病症之實例包括但不限於良性、癌前和惡性細胞增殖，包括但不限於贅生物和腫瘤（例如組織細胞瘤、神經膠質瘤、星形細胞瘤、骨瘤）、癌症（例如肺癌、小細胞肺癌、胃腸癌、腸癌、大腸癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、睪丸癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、胰臟癌、腦癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤、黑色素瘤）、白血病、牛皮癬、骨骼疾病、纖維增殖性障礙（例如結締組織的障礙）和動脈粥樣硬化。其他所關注的癌症包括但不限於血液惡性腫瘤，如白血病和淋巴瘤，如非何杰金氏淋巴瘤及亞型（如DLBCL、緣帶淋巴瘤、套區淋巴瘤和濾泡淋巴瘤）、何杰金氏淋巴瘤、AML以及其他B或T細胞來源的癌症。可以治療任何類型的細胞，該等細胞包括但不限於肺、胃腸道（例如包括腸、結腸）、乳腺（breast或mammary）、卵巢、前列腺、肝（liver或hepatic）、腎（kidney或renal）、膀胱、胰腺、腦和皮膚細胞。

【0258】 可以標記該抗體-藥物軛合物，例如以幫助檢測細胞結合（體外或體內）。該標記可為生物素標記。在另一個實施方式中，該標記可為放射性同位素。

【0259】 在另一方面，提供了多核苷酸，該多核苷酸包含編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸序列。

【0260】 在一個實施方式中，該多核苷酸可為分離的多核苷酸。

【0261】 本發明之一或多個序列（例如一或多個多核苷酸序列）包括已經從其天然存在的環境中取出的序列、重組或選殖的（例如DNA）分離物、以及化學合成的類似物或藉由異源系統生物合成的類似物。

【0262】本發明之一或多個序列（例如一或多個多核苷酸序列）可以藉由本領域已知的任何方式製備。例如，可以藉由在合適的宿主細胞中複製和/或表現來產生大量的該一或多個序列。編碼所需片段的天然或合成的DNA片段通常會摻入重組核酸構建體中，該等重組核酸構建體通常是DNA構建體並且能夠引入原核或真核細胞並在其中複製。通常，DNA構建體將適於在單細胞宿主（如酵母或細菌）中自主複製，但也可用於引入到培養的細菌、昆蟲、哺乳動物、植物或其他真核細胞系的基因組中並在該基因組中整合。

【0263】本發明之一或多個序列（例如一或多個多核苷酸序列）還可以藉由化學合成產生（例如藉由亞磷醯胺法或三酯法合成多核苷酸），並且可以在商業自動化寡核苷酸合成儀上進行。雙鏈（例如DNA）片段可以從化學合成的單鏈產物中獲得，該化學合成是藉由合成互補鏈並在適當條件下使鏈退火在一起或者藉由使用具有適當引物序列的DNA聚合酶添加互補鏈而進行的。

【0264】當應用於本發明之序列（例如多核苷酸序列）時，術語「分離的」較佳的表示該序列已從其天然遺傳環境中取出，因此不含其他外來或不需要的編碼序列（但可以包括天然存在的5'和3'非翻譯區，如啟動子和終止子），並且其形式適合在基因工程蛋白質生產系統中使用。此類分離的分子係那些從其自然環境中分離的分子。

【0265】本文提供的另一方面是包含多核苷酸的宿主細胞，所述多核苷酸包含編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸序列。

【0266】在一個實施方式中，多核苷酸編碼抗體或其抗原結合片段的VH鏈。在一個實施方式中，本發明之多核苷酸可以編碼抗體或其抗原結合片段的VL鏈。在一個實施方式中，多核苷酸可編碼抗體或其抗原結合片段的VH和VL鏈。在一個實施方式中，多核苷酸可以進一步編碼前導序列（例如，其用作控制多肽從細胞的轉運的分泌序列）。

【0267】 在另一方面，提供了包含本發明之多核苷酸的載體（例如質體）。

【0268】 本發明包括上述多核苷酸的變體。多核苷酸變體可以在編碼區、非編碼區或兩者中含有改變。在一個實施方式中，多核苷酸變體包含產生緘默取代、添加、或缺失而不改變所編碼的多肽的性質或活性的改變。在一個實施方式中，多核苷酸變體由歸因於遺傳密碼的簡並性的緘默取代產生。多核苷酸變體可以因為各種原因而產生，例如，為了優化特定宿主的密碼子表現（將人mRNA中的密碼子改變成細菌宿主如大腸桿菌較佳的那些密碼子）。還提供了包含所述多核苷酸變體的載體和細胞。

【0269】 本發明包括用於產生結合B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段的方法，該等方法包括在宿主細胞中表現多核苷酸，所述多核苷酸包含編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸序列。

【0270】 本發明進一步包括可藉由所述用於產生結合B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段的方法獲得的抗體或其抗原結合片段。

【0271】 在一個較佳的實施方式中，用於產生抗體或其抗原結合片段的方法包括 (a) 培養宿主細胞和 (b) 從該細胞中分離所表現的抗體或其抗原結合片段。

【0272】 用於表現本發明之抗體或其抗原結合片段的合適宿主細胞包括原核細胞、酵母細胞、昆蟲細胞或高等真核細胞（較佳的其中多核苷酸處於合適啟動子的控制之下）。原核細胞包括革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如大腸桿菌或桿菌。高等真核細胞包括如本文所述之哺乳動物來源的已建立的細胞系。還可以採用無細胞翻譯系統。

【0273】在一方面，提供了包含本文所述之抗原或抗體結合片段的套組（kit）。進一步包括所述套組在本發明之方法中之用途。

【0274】在一個實施方式中，套組包含本發明之分離的（例如純化的）抗原或抗體結合片段。在一個實施方式中，套組包含本發明之分離的（例如純化的）抗原或抗體結合片段，其中該抗原或抗體結合片段包含本文所述之藥劑（例如軛合的細胞毒素）。在一個實施方式中，該套組包含一或多個容器。該套組可單獨提供抗原或抗體結合片段以及藥劑（例如，該試劑未與抗原或抗體結合片段軛合，而是處於適合與其軛合的形式）；視需要，其中該套組進一步提供了用於將該藥劑與該抗原或抗體結合片段軛合的說明書和/或試劑。在一個實施方式中，該套組包含進行檢測測定的必要和/或足夠的所有元件，該等元件包括所有對照、用於進行測定的指導、以及用於分析和呈現結果的任何必要的軟體。

【0275】本發明之抗體或其抗原結合片段可用於藉由本領域已知的任何方法進行的免疫特異性結合的測定中。可使用的免疫測定包括但不限於使用如以下技術的競爭性和非競爭性測定系統：蛋白質印跡、RIA、ELISA、ELISPOT、「夾心」免疫測定、免疫沈澱測定、沈澱素反應、凝膠擴散沈澱素反應、免疫擴散測定、凝集測定、補體固定測定、免疫放射測定、螢光免疫測定、以及蛋白質A免疫測定。

【0276】可以在組織學上使用本發明之抗體或其抗原結合片段，如在免疫螢光法、免疫電子顯微術、或非免疫學測定中，例如用於原位檢測B7-H4或其保守變體或肽片段。原位檢測可藉由以下來實現：從患者取出組織學樣本並對其施加經標記的本發明之抗體或其抗原結合片段，例如，藉由使經標記的抗體或其抗原結合片段覆蓋在生物樣本而施加。通過使用這一程序，不僅可確定B7-H4或保守變體或肽片段的存在，還可確定其在檢查的組織中的分佈。使用

本發明，普通技術者將容易地知道，可修改多種組織學方法（如染色程序）中的任一種以實現這種原位檢測。

抗體

【0277】術語「抗體」涵蓋單株抗體及其片段（例如表現出所需的生物活性的片段）。在一個較佳的實施方式中，本發明之抗體係單株抗體。在一個更較佳的實施方式中，該抗體係完全人單株抗體。在一個實施方式中，本發明之方法可以使用多株抗體。

【0278】特別地，抗體係包含至少一個或兩個重（H）鏈可變區（本文縮寫為VHC）以及至少一個或兩個輕（L）鏈可變區（本文縮寫為VLC）的蛋白質。VHC和VLC區可以進一步細分為被稱為「互補決定區」（「CDR」）的高變區，其間插有被稱為「框架區」（FR）的更保守的區域。框架區和CDR的範圍已經被精確確定（參見，Kabat, E. A.等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質序列], 第5版, U.S. Department of Health and Human Services [美國衛生與公眾服務部], NIH公開案號91-3242, 1991，以及Chothia, C等人, J. MoI.Biol.[分子生物學雜誌] 196:901-917, 1987）。較佳的是，每個VHC和VLC由三個CDR和四個FR構成，從胺基末端到羧基末端按照以下順序排列：FRl、CDRl、FR2、DR2、FR3、CDR3、FR4。抗體的VHC或VLC鏈可以進一步包含所有的或部分的重鏈或輕鏈恒定區。在一個實施方式中，抗體係兩個重免疫球蛋白鏈和兩個輕免疫球蛋白鏈的四聚體，其中重和輕免疫球蛋白鏈由例如二硫鍵相互連接。重鏈恒定區包括三個結構域，即CH1、CH2和CH3。輕鏈恒定區由一個結構域CL構成。重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原相互作用的結合結構域。術語「抗體」包括類型IgA、IgG、IgE、IgD、IgM（及其亞型）的完整免疫球蛋白，其中免疫球蛋白的輕鏈可為κ或λ類型。如本文所使用之，術語抗體還指與上述標記物之一結合的抗體的一部分，

例如，其中一或多個免疫球蛋白鏈不是全長但與標記物結合的分子。涵蓋在術語抗體中的「結合部分」之實例包括 (i) Fab片段：由VLC、VHC、CL和CH1結構域組成的單價片段；(ii) F(ab')2片段：包含兩個在絞鏈區由二硫橋連接的Fab片段的二價片段；(iii) 由VHC和CH1結構域組成的Fc片段；(iv) 由抗體單臂的VLC和VHC結構域組成的Fv片段；(v) 由VHC結構域組成的dAb片段（Ward等人, Nature [自然] 341:544-546, 1989）；以及 (vi) 具有足以發生結合的框架的分離的互補決定區（CDR），例如，可變區的抗原結合部分。輕鏈可變區的抗原結合部分和重鏈可變區的抗原結合部分（例如Fv片段的兩個域VLC和VHC）可以使用重組方法藉由合成連接子連接，該合成連接子允許它們成為單個蛋白鏈，其中VLC和VHC區配對形成單價分子（稱為單鏈Fv（scFv）；參見例如，Bird等人 (1988) Science [科學] lAl-ATi-Alβ；以及Huston等人 (1988) Proc. Proc. Natl. Acad. ScL USA [美國國家科學院院刊] 85:5879-5883）。此類單鏈抗體也涵蓋在術語抗體內。該等部分可使用熟悉該項技術者已知的常規技術獲得，並且以與完整抗體相同的方式針對實用性來篩選該等部分。

【0279】 在一個實施方式中，該抗體或抗原結合片段係選自以下中的一或多種：鼠抗體、人源化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多株抗體、重組抗體、多特異性抗體、或其組合。

【0280】 在一個實施方式中，該抗原結合片段係選自以下中的一或多種：Fv片段、Fab片段、F(ab')2片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段、sc(Fv)2片段、或其組合。

【0281】 在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段係單株抗體（mAb）。

【0282】 在一個實施方式中，本發明之抗體或其抗原結合片段（例如mAb）係scFV。

【0283】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以跨物種結合B7-H4分子，例如，該抗體或片段可以結合小鼠B7-H4、大鼠B7-H4、兔、人B7-H4和/或食蟹猴B7-H4。在一個實施方式中，該抗體或片段可以結合人B7-H4和食蟹猴B7-H4。在一個實施方式中，該抗體或抗原結合片段還可以結合小鼠B7-H4。

【0284】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以特異性結合B7-H4，例如人B7-H4和食蟹猴B7-H4，但不特異性結合人B7-H1、B7-H2和/或B7-H3。

【0285】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段除了VH和VL之外還可以包含重鏈恒定區或其片段。在一個實施方式中，該重鏈恒定區係人重鏈恒定區，例如人IgG恒定區，例如人IgG1恒定區。在一個實施方式（特別是在該抗體或其抗原結合片段軛合至藥劑（如細胞毒性劑）的情況下）中，將半胱胺酸殘基插入到IgG1的CH2區中的胺基酸S239和V240之間。該半胱胺酸被稱為「239插入」或「239i」。

【0286】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。較佳的是，該抗體或其抗原結合片段可以包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

【0287】在一個實施方式中，重鏈恒定區或其片段（例如，人IgG恒定區或其片段）可相對於野生型IgG恒定結構域包括一或多個胺基酸取代，其中與具有野生型IgG恒定結構域的IgG的半衰期相比，該經修飾的IgG具有增加的半衰期。例如，IgG恒定結構域可以含有在位置251-257、285-290、308-314、385-389、和428-436處的胺基酸殘基的一或多個胺基酸取代，其中根據如Kabat中所闡明的EU索引進行胺基酸位置編號。在一個實施方式中，IgG恒定結構域可以含有以下中的一或多個取代：Kabat位置252處的胺基酸被酪胺酸（Y）、苯丙

胺酸（F）、色胺酸（W）、或蘇胺酸（T）取代，Kabat位置254處的胺基酸被蘇胺酸（T）取代，Kabat位置256處的胺基酸被絲胺酸（S）、精胺酸（R）、麩醯胺酸（Q）、麩胺酸（E）、天冬胺酸（D）、或蘇胺酸（T）取代，Kabat位置257處的胺基酸被白胺酸（L）取代，Kabat位置309處的胺基酸被脯胺酸（P）取代，Kabat位置311處的胺基酸被絲胺酸（S）取代，Kabat位置428處的胺基酸被蘇胺酸（T）、白胺酸（L）、苯丙胺酸（F）、或絲胺酸（S）取代，Kabat位置433處的胺基酸被精胺酸（R）、絲胺酸（S）、異白胺酸（I）、脯胺酸（P）、或麩醯胺酸（Q）取代，或Kabat位置434處的胺基酸被色胺酸（W）、甲硫胺酸（M）、絲胺酸（S）、組胺酸（H）、苯丙胺酸（F）、或酪胺酸取代。在一個較佳的實施方式中，IgG恒定結構域可相對於野生型人IgG恒定結構域含有胺基酸取代，包括Kabat位置252處的胺基酸被酪胺酸（Y）取代、Kabat位置254處的胺基酸被蘇胺酸（T）取代、以及Kabat位置256處的胺基酸被麩胺酸（E）取代。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈，其中該重鏈係人IgG1 YTE突變體。

【0288】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段除了VH和VL以外，還可以視需要包含重鏈恒定區或其片段、輕鏈恒定區或其片段。在一個實施方式中，該輕鏈恒定區係κ λ輕鏈恒定區，例如，人κ恒定區或人λ恒定區。

【0289】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

【0290】在一個實施方式中，VH和/或VL胺基酸序列可以與本文所述之序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的相似性。在一個實施方式中，VH和/或VL胺基酸序列可相對於本文所述之序列包含1、2、3、4、5或更多個取代，例如保守取代。含有與VH區或VL區具有一定百分比相似性或具有一或多個取代（例如，保守取代）的VH和VL區的B7-H4抗體可以藉由編碼

本文所述之VH和/或VL區的核酸分子的誘變（例如，定點誘變或PCR介導的誘變）獲得，隨後測試所編碼的改變的抗體對B7-H4的結合，並且視需要使用本文所述之功能測定測試保留的功能。

【0291】 抗體或其抗原結合片段對抗原的親和力或親合力可以使用本領域熟知的任何合適的方法（例如，流動式細胞分析術、酶聯免疫吸附測定（ELISA）、或放射免疫測定（RIA）、或動力學（例如KINEXA®或BIACORE™分析））經實驗確定。可以容易地採用直接結合測定以及競爭性結合測定形式。（參見例如, Berzofsky等人, Antibody-Antigen Interactions [抗體-抗原相互作用], 於Fundamental Immunology [基礎免疫學], Paul, W. E., 編輯, Raven Press [雷文出版社]: 紐約, 紐約州(1984)；Kuby, Immunology [免疫學], W. H. Freeman和Company出版商: 紐約, 紐約州(1992)；以及本文所述之方法。） 如果在不同條件（例如，鹽濃度、pH、溫度）下測量，特定抗體-抗原相互作用的所測量的親和力可以變化。因此，用如本領域中已知的抗體和抗原的標準化溶液和標準化緩衝液進行親和力和其他抗原結合參數（例如，KD或Kd、Kon、Koff）的測量。

【0292】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段能以以下IC50結合表現B7-H4的細胞：低於約500 nM、低於約350 nM、低於約250 nM、低於約150 nM、低於約100 nM、低於約75 nM、低於約60 nM、低於約50 nM、低於約40 nM、低於約30 nM、低於約20 nM、低於約15 nM、低於約10 nM、低於約5 nM、低於約1 nM、低於約500 pM、低於約350 pM、低於約250 pM、低於約150 pM、低於約100 pM、低於約75 pM、低於約60 pM、低於約50 pM、低於約40 pM、低於約30 pM、低於約20 pM、低於約15 pM、低於約10 pM、或低於約5 pM。較佳的是，藉由流動式細胞分析術測量所述IC50。

【0293】「單株抗體」（mAb）係指涉及單一表位或表位的高度特異性識別和結合的同源抗體群。這與典型地包括針對不同表位的不同抗體的多株抗體相反。術語「單株抗體」涵蓋完整和全長單株抗體以及抗體片段（如Fab、Fab'、F(ab')2、Fv）、單鏈（scFv）突變體、包含抗體部分的融合蛋白和包含抗原識別位點的任何其他修飾的免疫球蛋白分子。此外，「單株抗體」係指以任何數目的方式製備的此類抗體，該等方式包括但不限於融合瘤、噬菌體選擇、重組表現、和轉基因動物。

【0294】在一個較佳的實施方式中，本發明之抗體或其抗原結合片段（例如mAb）係人源化抗體或其抗原結合片段。合適地，所述人源化抗體或其抗原結合片段係IgG。

【0295】術語「人源化抗體」係指源自非人（例如鼠）免疫球蛋白的抗體，其被工程化成含有最小的非人（例如鼠）序列。典型地，人源化抗體係人免疫球蛋白，其中來自互補決定區（CDR）的殘基被來自非人物種（例如，小鼠、大鼠、兔子或倉鼠）的CDR的具有所希望特異性、親和性和能力的殘基替換（Jone等人, 1986, Nature [自然], 321:522-525；Riechmann等人, 1988, Nature [自然], 332:323-327；Verhoeyen等人, 1988, Science [科學], 239:1534-1536）。在一些情況下，人免疫球蛋白的Fv框架區（FW）殘基被來自非人物種的具有所希望特異性、親和性和能力的抗體中的相應殘基替換。

【0296】人源化抗體可以藉由在Fv框架區和/或替換的非人殘基內的另外殘基的取代來進一步修飾，以改善和優化抗體特異性、親和力和/或能力。通常，人源化抗體將包含基本上所有至少一個（並且通常係兩個或三個）可變結構域，該可變結構域含有對應於非人免疫球蛋白的所有或基本上所有CDR區，而所有或基本上所有FR區係人免疫球蛋白一致序列的FR區。人源化抗體還可以包含免疫球蛋白恒定區或結構域（Fc）的至少一部分，通常係人免疫球蛋白

的恒定區或結構域的至少一部分。用於產生人源化抗體的方法的實例描述於美國專利案號5,225,539或5,639,641中。

【0297】 抗體的「可變區」係指單獨的抗體輕鏈的可變區或抗體重鏈的可變區或它們的組合。重鏈和輕鏈的該等可變區各自由藉由三個互補決定區（CDR）（也稱為高變區）連接的四個框架區（FW）組成。每條鏈中的CDR由FW區緊密靠近地保持在一起，並且與來自另一條鏈的CDR促成了抗體的抗原結合位點的形成。存在至少兩種用於確定CDR的技術：(1) 基於種間序列變異性的方法（即，Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質序列]（第5版, 1991, National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 貝塞斯達（Bethesda）, 馬里蘭州（Md））；和 (2) 基於抗原-抗體複合物的晶體學研究的方法（Al-lazikani等人 (1997) J. Molec.Biol.[分子生物學雜誌] 273:927-948）。此外，本領域有時使用這兩種方法之組合來確定CDR。

【0298】 當提及可變結構域中的殘基（大約輕鏈的殘基1-107和重鏈的殘基1-113）時，通常使用「Kabat編號系統」（例如，Kabat等人, Sequences of Immunological Interest [免疫學感興趣的序列], 第5版, Public Health Service [美國公共衛生服務部], National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 貝塞斯達, 馬里蘭州 (1991)）。

【0299】 在Kabat中的胺基酸位置編號係指在Kabat等人, Sequences of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質序列], 第5版 Public Health Service [美國公共衛生服務部], National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 貝塞斯達, 馬里蘭州 (1991) 中用於彙編抗體的重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域的編號系統。使用這個編號系統，實際的線性胺基酸序列可以含有更少或另外的胺基酸，其對應於可變結構域的FW或CDR的截短或插入。例如，重鏈可變結構域可以包括在H2的殘基52之後的單個胺基酸插入（根據Kabat的殘基52a）以

及在重鏈FW殘基82之後的插入的殘基（例如，根據Kabat的殘基82a、82b和82c等）。

【0300】 可以藉由在抗體序列與「標準」Kabat編號序列的同源性區域進行比對來確定給定抗體的殘基的Kabat編號。而Chothia係指結構環的位置（Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 196:901-917 (1987)）。Chothia CDR-H1環的末端在利用Kabat編號慣例編號時在H32與H34之間變化，這取決於環的長度（這是因為Kabat編號方案將插入放在H35A和H35B；如果35A和35B都不存在，那麼環端點在32；如果只存在35A，那麼環端點在33；如果35A和35B都存在，那麼環端點在34）。AbM高變區表示Kabat CDR和Chothia結構環之間的折衷，並且被Oxford Molecular的AbM抗體建模軟體使用。下表列出了構成每個系統中的抗體可變區的胺基酸的位置。

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

[1]Kabat編號

[2]Chothia編號

【0301】 免疫遺傳學（IMGT）還提供了一種用於免疫球蛋白可變區（包括CDR）的編號系統。參見例如，Lefranc, M.P.等人, Dev. Comp.Immunol.[發育與比較免疫學] 27: 55-77(2003)。IMGT編號系統係基於高變環的多於5,000個序列的比對、結構數據和表徵，並且允許容易地比較所有物種的可變區和CDR區。根據IMGT編號方案，VH-CDR1處於位置26至35，VH-CDR2處於位置51至

57，VH-CDR3處於位置93至102，VL-CDR1處於位置27至32，VL-CDR2處於位置50至52，並且VL-CDR3處於位置89至97。

【0302】 如貫穿本說明書使用的，所述之VH CDR序列對應於經典的Kabat編號位置，即Kabat VH-CDR1在位置31-35處，VH-CDR2在位置50-65處，並且VH-CDR3在位置95-102處。VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3也對應於經典的Kabat編號位置，即分別對應於位置24-34、50-56和89-97。

【0303】 在一個實施方式中，本發明之抗體係人抗體。

【0304】 術語「人抗體」意指在人體中產生的抗體或具有與使用本領域已知的任何技術製備的在人體中產生的抗體對應之胺基酸序列的抗體。人抗體的這種定義包括完整或全長抗體、其片段、和/或包含至少一個人重鏈和/或輕鏈多肽的抗體，例如像包含鼠輕鏈和人重鏈多肽的抗體。

【0305】 在一個實施方式中，本發明之抗體係嵌合抗體。

【0306】 術語「嵌合抗體」係指其中免疫球蛋白分子的胺基酸序列衍生自兩種或更多種物種的抗體。典型地，輕鏈和重鏈的可變區與源自具有所需特異性、親和力和能力的一種哺乳動物（例如小鼠、大鼠、兔等）的抗體的可變區對應，而恒定區與衍生自另一種哺乳動物（通常為人）的抗體中的序列同源以避免在該物種中引起免疫反應。

【0307】 術語「YTE」或「YTE突變體」係指IgG1 Fc中的突變，其導致與人FcRn的結合增加並且提高了具有該突變的抗體的血清半衰期。YTE突變體包含引入IgG1的重鏈中的三個突變M252Y/S254T/T256E之組合（EU編號，Kabat等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白序列], U.S. Public Health Service [美國公共衛生服務部], National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 華盛頓, 哥倫比亞特區（D.C.））。參見美國專利案號7,658,921，將其藉由引用併入本文。與相同抗體的野生型相比，YTE

突變體顯示出增加了抗體的血清半衰期大約四倍（Dall'Acqua等人, J. Biol. Chem.[生物化學雜誌] 281:23514-24 (2006); Robbie等人, (2013) Antimicrob.Agents Chemother.[抗微生物藥劑與化學療法]57, 6147-6153）。還參見美國專利案號7,083,784，將其藉由引用以其全文特此併入。

【0308】「結合親和力」通常係指分子（例如抗體）的單個結合位點與其結合配偶體（例如抗原）之間的非共價相互作用的總和的強度。除非另有說明，如本文所使用之，「結合親和力」係指反映結合對（例如，抗體和抗原）的成員之間的1：1相互作用的固有結合親和力。分子X對其配偶體Y的親和力通常可以用解離常數（KD）表示。親和力可以藉由本領域已知的通常方法測量，包括本文所述之那些方法。低親和力抗體通常緩慢地結合抗原並且傾向於容易解離，而高親和力抗體通常更快地結合抗原並且傾向於保持更長時間的結合。測量結合親和力的多種方法係本領域中已知的，其中的任何方法均可以用於本發明之目的。

【0309】除非另有說明，否則抗體或其抗原結合片段的效力通常表示為以ng/ml計的IC50值。IC50是抗體分子的半數抑制濃度。在功能測定中，IC50是將生物響應降低其最大值的50%的濃度。在配體結合研究中，IC50係減少受體結合達最大特異性結合水平的50%的濃度。IC50可以藉由本領域已知的任何數目的方法來計算。

【0310】與參考抗體相比，本發明之抗體或其抗原結合片段的效力的改進倍數可為至少約2倍、至少約4倍、至少約6倍、至少約8倍、至少約10倍、至少約20倍、至少約30倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、或至少約180倍或更多。

【0311】 除非另有說明，抗體的結合效力通常表示為以nM或pM計的EC50值。EC50是在具體暴露時間後誘導基線和最大值之間的中值響應的藥物濃度。EC50可以藉由本領域已知的任何數目的方法來計算。

抗體製備

【0312】 本發明之抗體可以使用熟悉該項技術者已知的常規技術獲得，並且它們的效用藉由常規結合研究來證實—示例性方法描述於實例2中。舉例來說，簡單的結合測定是用抗體孵育表現抗原的細胞。如果將抗體用螢光團標記，則可以藉由FACS分析來檢測抗體與抗原的結合。

【0313】 本發明之抗體可以在多種動物中產生，包括小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊、猴或馬。可以在用單個莢膜多糖或用多種莢膜多糖進行免疫後產生抗體。從該等動物中分離出的血液含有多株抗體—與同一抗原結合的多種抗體。也可以將抗原注射到雞中以在蛋黃中產生多株抗體。為了獲得對抗原的單個表位具有特異性的單株抗體，從動物中分離出分泌抗體的淋巴細胞，並藉由將它們與癌細胞系融合而使其永生化。融合的細胞被稱為融合瘤，並且在培養中會不斷生長並分泌抗體。藉由稀釋選殖法分離單個融合瘤細胞以生成均產生同一抗體的細胞選殖；該等抗體被稱為單株抗體。用於生產單株抗體的方法係熟悉該項技術者已知的常規技術（參見例如，Making and Using Antibodies: A Practical Handbook.[製備和使用抗體：實用手冊] GC Howard. CRC Books. 2006. ISBN 0849335280）。通常使用蛋白A/G或抗原親和層析法純化多選殖和單株抗體。

【0314】 本發明之抗體或其抗原結合片段可製備為單選殖抗B7-H4抗體，其可使用融合瘤方法製備，如Kohler和Milstein, Nature [自然] 256:495 (1975)描述的那些方法。使用融合瘤方法，如上所述對小鼠、倉鼠、或其他適當的宿主動物進行免疫，以引發淋巴細胞產生會特異性地結合免疫抗原的抗體。淋巴細

胞也可以在體外被免疫。免疫後，分離淋巴細胞，並利用例如聚乙二醇與合適骨髓瘤細胞系融合，以形成可隨後從未融合的淋巴細胞和骨髓瘤細胞選擇出的融合瘤細胞。然後可以在體外培養物中使用標準方法（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice [單株抗體：原理和實踐], Academic Press [學術出版社], 1986）或在體內作為動物的腹水腫瘤繁殖融合瘤，該等融合瘤產生特異性針對選定的抗原的單株抗體，如藉由免疫沈澱法、免疫印跡法、或體外結合測定（例如，放射免疫測定（RIA）或酶聯免疫吸附測定（ELISA））所測定的。然後可以使用已知的方法從培養基或腹水中純化單株抗體。

【0315】 可替代地，該抗體或其抗原結合片段（例如，單株抗體）還可以使用如在美國專利案號4,816,567中所述之重組DNA方法製備。從成熟B細胞或融合瘤細胞、例如藉由使用寡核苷酸引物（其特異性擴增編碼抗體的重鏈和輕鏈的基因）的RT-PCR分離編碼單株抗體的多核苷酸，並且使用常規程序測定它們的序列。然後將編碼重鏈和輕鏈的分離的多核苷酸選殖到合適的表現載體中，該等表現載體在轉染到不產生免疫球蛋白的宿主細胞（如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢（CHO）細胞、或骨髓瘤細胞）中時，由該等宿主細胞生產單株抗體。此外，所希望物種的重組單株抗體或其抗原結合片段可從表現所希望物種的CDR的噬菌體展示文庫中分離，如以下文獻所述：McCafferty等人, Nature [自然] 348:552-554 (1990)；Clackson等人, Nature [自然], 352:624-628 (1991)；和Marks等人, J. Mol. Biol [分子生物學雜誌] 222:581-597 (1991)。

【0316】 編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的一或多種多核苷酸可進一步使用重組DNA技術以多種不同的方式被修飾以產生替代性抗體。在一些實施方式中，例如，小鼠單株抗體的輕鏈和重鏈的恒定結構域可以被 (1) 例如人抗體的那些區域取代以產生嵌合抗體，或被 (2) 非免疫球蛋白多肽取代以產生

融合抗體。在一些實施方式中，截短或去除該等恒定區以產生所希望的單株抗體的抗體片段。定點誘變或高密度誘變可變區可以用於優化單株抗體的特異性、親和力等。

【0317】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段係人抗體或其抗原結合片段。可以使用本領域已知的不同技術來直接製備人抗體。可以產生在體外免疫的或從產生針對靶抗原的抗體的免疫個體分離的永生化人B淋巴細胞。參見例如，Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy [單株抗體和癌症治療], Alan R. Liss, 第77頁 (1985)；Boemer等人, J. Immunol. [免疫學雜誌] 147 (1):86-95 (1991)；美國專利5,750,373。

【0318】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可選自噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表現人抗體，如以下文獻所述：例如，Vaughan等人, Nat. Biotech. [自然生物技術] 14:309-314 (1996)；Sheets等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊], 95:6157-6162 (1998)；Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 227:381 (1991)；以及Marks等人, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 222:581 (1991)。用於產生和使用抗體噬菌體文庫的技術還描述於美國專利案號5,969,108、6,172,197、5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915、6,593,081、6,300,064、6,653,068、6,706,484和7,264,963；以及Rothe等人, J. Molec. Biol. [分子生物學雜誌] 376:1182-1200 (2008)中，將該等專利各自藉由引用以其全文併入。

【0319】 親和力成熟策略和鏈改群組原則係本領域已知的，並且可用於產生高親和力人抗體或其抗原結合片段。參見Marks等人, BioTechnology [生物技術] 10:779-783 (1992)，將其藉由引用以其全文併入。

【0320】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段（例如，單株抗體）可為人源化抗體。用於工程化、人源化或表面重修非人抗體或人抗體的方

法也可以使用並且係本領域熟知的。人源化、表面重修或類似工程化的抗體可以具有來自非人來源的一或多個胺基酸殘基，該來源例如但不限於小鼠、大鼠、兔、非人靈長類動物或其他哺乳動物。該等非人胺基酸殘基被通常稱為「輸入」殘基的殘基替換，該等殘基典型地取自已知人序列的「輸入」可變結構域、恒定結構域或其他結構域。此類輸入序列可以用於降低免疫性或減小、增強或改變結合、親和力、結合速率、解離速率、親合力、特異性、半衰期、或如本領域已知的任何其他合適的特徵。合適地，CDR殘基可直接且最實質性地參與影響B7-H4結合。因此，較佳的是保持部分或全部非人或人CDR序列，同時可變區和恒定區的非人序列可以被人胺基酸或其他胺基酸替換。

【0321】 抗體還可以視需要被人源化、表面重修、工程化或人抗體工程化，其中保留針對抗原B7-H4的高親和力以及其他有利生物性質。為實現這個目標，人源化（或人）或工程化的抗B7-H4抗體以及表面重修的抗體可視需要藉由使用親本、工程化和人源化序列的三維模型分析親本序列和各種概念性人源化和工程化產物的方法來製備。三維免疫球蛋白模型通常是可獲得的並且對於熟悉該項技術者而言係熟悉的。說明並展示所選定的候選免疫球蛋白序列的可能三維構象結構的電腦程序係可獲得的。檢查該等展示允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列功能中的可能作用，即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原如B7-H4的能力的殘基。按照此方式，可以從一致序列和輸入的序列中選擇並且組合FW殘基，這樣使得所希望的抗體特徵（如增加對一或多種靶抗原的親和力）得以實現。

【0322】 本發明之抗B7-H4抗體或其抗原結合片段的人源化、表面重修或工程化可使用任何已知方法進行，例如但不限於描述於以下文獻中的那些：Jones等人, Nature [自然] 321:522 (1986)；Riechmann等人, Nature [自然] 332:323 (1988)；Verhoeyen等人, Science [科學] 239:1534 (1988)；Sims等人, J.

Immunol.[免疫學雜誌] 151: 2296 (1993)；Chothia和Lesk, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 196:901 (1987)；Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 89:4285 (1992)；Presta 等人, J. Immunol.[免疫學雜誌] 151:2623 (1993)；美國專利案號5,639,641、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567、7,557,189、7,538,195和7,342,110；國際申請案號PCT/US98/16280、PCT/US96/18978、PCT/US91/09630、PCT/US91/05939、PCT/US94/01234、PCT/GB89/01334、PCT/GB91/01134、PCT/GB92/01755；國際專利申請公開案號WO 90/14443、WO 90/14424、WO 90/14430；以及歐洲專利公開案號EP 229246；將其各自藉由引用全部併入本文，包括其中引用的參考文獻。

【0323】 抗B7-H4人源化抗體及其抗原結合片段還可以在含有人免疫球蛋白基因座的轉基因小鼠中製備，該等基因座在免疫時能夠在內源性免疫球蛋白不存在的情況下產生全套人抗體。這種方法描述於美國專利案號5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、以及5,661,016中。

【0324】 在一個實施方式中，提供了抗體（例如抗B7-H4抗體）的片段（例如抗體片段）。已知各種用於生產抗體片段的技術。傳統上，該等片段藉由完整抗體的蛋白水解衍生，例如由Morimoto等人, J. Biochem. Biophys. Meth. [生物化學和生物物理方法雜誌] 24:107-117 (1993)以及Brennan等人, Science [科學] 229:81 (1985)所描述的。在一個實施方式中，重組產生抗B7-H4抗體片段。所有Fab、Fv和scFv抗體片段都可以在大腸桿菌或其他宿主細胞中表現並且從其分泌，因而允許產生大量的該等片段。此類抗B7-H4抗體片段也可以從以上論述的抗體噬菌體文庫分離。該等抗B7-H4抗體片段還可為如美國專利案號

5,641,870中所述之線性抗體。用於產生抗體片段的其他技術對於熟練的從業人員將是清楚的。

【0325】 根據本發明，技術可經改編以產生對B7-H4具有特異性的單鏈抗體。參見例如，美國專利案號4,946,778。此外，方法可經改編以構建Fab表現文庫，以允許快速且有效地鑒定針對B7-H4或其衍生物、片段、類似物或同源物具有所希望特異性的單選殖Fab片段。參見例如，Huse等人, Science [科學] 246:1275-1281 (1989)。抗體片段可藉由本領域已知的技術來產生，包括但不限於：由胃蛋白酶消化抗體分子產生的F(ab')2片段；藉由還原F(ab')2片段的二硫鍵產生的Fab片段；藉由用木瓜酶和還原劑處理抗體分子產生的Fab片段；或Fv片段。

【0326】 在一個實施方式中，可以對本發明之抗體或其抗原結合片段進行修飾以增加其血清半衰期。這可以例如藉由將補救受體結合表位摻入抗體或抗體片段中，藉由使抗體或抗體片段中的適當的區域突變，或藉由將表位併入隨後融合在抗體或抗體片段的末端或中部的肽標籤（例如，藉由DNA或肽合成），或藉由YTE突變來實現。本領域中已知其他增加抗體或其抗原結合片段的血清半衰期的方法，例如，軛合至異源分子如PEG。

【0327】 如本文所提供的經修飾的抗體或其抗原結合片段可以包含任何類型的提供該抗體或多肽與B7-H4的締合的可變區。在這點上，可變區可構成或衍生自可誘導增加體液響應並生成針對所希望抗原的免疫球蛋白的任何類型的哺乳動物。正因如此，抗B7-H4抗體或其抗原結合片段的可變區可為例如人、鼠、非人靈長類動物（例如，食蟹猴、獼猴等）或狼（lupine）來源的。在一個實施方式中，經修飾的抗體或其抗原結合片段的可變區和恒定區均是人的。在一個實施方式中，相容性抗體的可變區（通常衍生自非人來源）可經工

程化或專門定制來改進結合性質或減少分子的免疫性。在這點上，在本發明中有用的可變區可經人源化或另外通過納入輸入的胺基酸序列改變。

【0328】 在一個實施方式中，抗體或其抗原結合片段的重鏈和輕鏈二者中的可變結構域藉由至少部分替換一或多個CDR和/或藉由部分框架區替換和序列改變而被改變。雖然CDR可以衍生自與框架區所衍生自的抗體相同的類別或甚至子類別的抗體，但是設想CDR將衍生自不同類別的抗體並且在某些實施方式中衍生自不同物種的抗體。不必用來自供體可變區的完整CDR來替換所有CDR以將一個可變域的抗原結合能力轉移至另一個。而是，只需要轉移維持抗原結合位點的活性所必需的那些殘基。考慮到在美國專利案號5,585,089、5,693,761、和5,693,762中所闡明的解釋，熟悉該項技術者完全有能力通過進行常規實驗獲得具有減少的免疫性的功能抗體。

【0329】 儘管對可變區進行改變，熟悉該項技術者將理解，本發明之經修飾的抗體或其抗原結合片段將包含抗體（例如，全長抗體或其抗原結合片段），其中至少一或多個恒定區結構域的一部分已被缺失或以其他方式改變，以便提供所希望的生物化學特徵，如當與包含天然或未改變的恒定區的具有大約相同免疫性的抗體相比時增加的腫瘤定位或減少的血清半衰期。在一個實施方式中，經修飾的抗體的恒定區將包含人恒定區。對與本發明相容的恒定區的修飾包括在一或多個結構域中的一或多個胺基酸的添加、缺失或取代。即，本文揭露的經修飾的抗體可包含對三個重鏈恒定結構域（CH1、CH2或CH3）中的一或多個和/或對輕鏈恒定結構域（CL）的改變或修飾。在一個實施方式中，考慮了經修飾的恒定區，其中一或多個結構域部分或全部缺失。在一個實施方式中，經修飾的抗體將包含結構域缺失的構建體或變體，其中整個CH2結構域被去除（ΔCH2構建體）。在一個實施方式中，省略的恒定區結構域可被

短胺基酸間隔子（例如，10個殘基）替換，該間隔子提供通常由不存在的恒定區所賦予的一定分子柔性。

【0330】除它們的構型以外，本領域中已知恒定區介導幾種效應子功能。例如，抗體經由Fc區結合至細胞，其中抗體Fc區上的Fc受體位點結合至細胞上的Fc受體（FcR）。存在許多對於不同類別的抗體具有特異性的Fc受體，包括IgG（γ受體）、IgE（η受體）、IgA（α受體）、以及IgM（μ受體）。抗體與細胞表面上的Fc受體的結合觸發許多重要並且多樣的生物響應，包括抗體包覆的顆粒的吞噬和破環、免疫複合物的清除、殺滅細胞溶解抗體包覆的靶細胞（稱為抗體依賴性細胞介導的細胞毒性，或ADCC）、炎症介體的釋放、胎盤轉移、以及對免疫球蛋白產生的控制。

【0331】在一個實施方式中，抗體或其抗原結合片段提供改變的效應子功能，進而影響投與的抗體或其抗原結合片段的生物學特性。例如，恒定區結構域的缺失或失活（經由點突變或其他手段）可以減少循環的經修飾的抗體的Fc受體結合。在其他情況下，與本發明一致的，恒定區修飾可以緩和補體結合並且因而減少軛合的細胞毒素的血清半衰期和非特異性締合。恒定區的又其他修飾可以用於消除二硫鍵或寡糖部分，從而允許由於抗原特異性或抗體靈活性增加而增強定位。類似地，根據本發明對恒定區的修飾可容易地使用技術者認知範圍內的熟知的生物化學或分子工程技術進行。

【0332】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不具有一種或更多種效應子功能。例如，在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不具有抗體依賴性細胞毒性（ADCC）活性和/或不具有補體依賴性細胞毒性（CDC）活性。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合Fc受體和/或補體因子。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不具有效應子功能。

【0333】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以被工程化以將CH3結構域直接融合到相應的經修飾的抗體或其片段的鉸鏈區。在其他構建體中，可以將肽間隔子插在鉸鏈區與經修飾的CH2和/或CH3結構域之間。例如，可表現相容性構建體，其中CH2結構域已經缺失，且剩餘的CH3結構域（經修飾的或未修飾的）與具有5-20個胺基酸的間隔子的鉸鏈區結合。可添加此間隔子，例如以確保恒定結構域的調節元件保持游離且可接觸，或者鉸鏈區保持柔性。在一些情況中，胺基酸間隔子可被證明具有免疫性，並引發針對構建體的非所需免疫反應。在一個實施方式中，添加至構建體的任何間隔子都可為相對無免疫性的，或甚至被完全省略，以便維持經修飾的抗體的所希望的生物化學性質。

【0334】除了缺失整個恒定區結構域之外，本文提供的抗體或其抗原結合片段可藉由恒定區中的幾個或甚至單個胺基酸的部分缺失或取代來修飾。例如，CH2結構域中的選定區域中的單個胺基酸的突變可足以實質性地減少Fc結合，並且從而增加腫瘤定位。類似地，控制效應子功能（例如，補體C1Q結合）的一或多個恒定區結構域可以完全或部分缺失。恒定區的這類部分缺失可以改進該抗體或其抗原結合片段的選定特徵（例如，血清半衰期），同時使與受試者恒定區結構域相關的其他所希望的功能保持完整。此外，該抗體及其抗原結合片段的恒定區可通過增強所得構建體特性的一或多個胺基酸的突變或取代來修飾。在這個方面，可以干擾保守結合位點所提供的活性（例如，Fc結合），同時基本上維持經修飾的抗體或其抗原結合片段的構型和免疫性特性。在一個實施方式中，可以向恒定區添加一或多個胺基酸以增強期望特徵，如減少或增加效應子功能，或提供更多細胞毒素或碳水化合物附接。在一個實施方式中，可以希望插入或複製衍生自選定的恒定區結構域的特定序列。

【0335】 本發明進一步包括與本發明之抗體或抗原結合片段（例如，鼠、嵌合、人源化或人抗體或其抗原結合片段）基本同源的變體和等效物。該等可以含有例如保守取代突變，即藉由相似的胺基酸取代一或多個胺基酸。例如，保守取代係指用相同通用類別內的另一個胺基酸取代一個胺基酸，例如像，用另一個酸性胺基酸取代一個酸性胺基酸、用另一個鹼性胺基酸取代一個鹼性胺基酸或用另一個中性胺基酸取代一個中性胺基酸。保守胺基酸取代所指的內容在本領域係熟知的。

【0336】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以被進一步修飾為含有通常不是蛋白質的一部分的另外的化學部分。那些衍生的部分可以改進蛋白質的溶解性、生物半衰期、或吸收。該等部分還可以減少或消除蛋白質的任何所希望的副作用等。對那些部分的綜述可以在Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓藥物科學], 第22版, Lloyd V. Allen, Jr.編輯, (2012)中發現。

定義

【0337】 以下定義特別涉及對以上拓撲異構酶I抑制劑的描述，並且甚至可能更特別地涉及標題為「進一步的偏好」的部分。

【0338】 C_{5-6}伸芳基： 如本文所使用之，術語「C_{5-6}伸芳基」涉及藉由從芳香族化合物的芳香族環原子上除去兩個氫原子而獲得的二價部分。

【0339】 在本文中，前綴（例如C_{5-6}）表示環原子的數量或環原子數量的範圍，無論是碳原子還是雜原子。

【0340】 環原子可以均為碳原子，如「碳伸芳基基團」中那樣，在這種情況下，該基團係伸苯基（C_6）。

【0341】 可替代地，環原子可以包括一或多個雜原子，如「雜伸芳基基團」中那樣。雜伸芳基基團之實例包括但不限於衍生自如下的那些：

N_1：吡咯（氮雜茂（azole））（C_5）、吡啶（吖啡（azine））（C_6）；

O_1：呋喃（氧雜環戊二烯（oxole））（C_5）；

S_1：噻吩（硫雜環戊二烯（thiole））（C_5）；

N_1O_1：噁唑（C_5）、異噁唑（C_5）、異噁啡（isoxazine）（C_6）；

N_2O_1：噁二唑（呋咱（furazan））（C_5）；

N_3O_1：噁三唑（C_5）；

N_1S_1：噻唑（C_5）、異噻唑（C_5）；

N_2：咪唑（1,3-二唑）（C_5）、吡唑（1,2-二唑）（C_5）、嗒啡（1,2-二啡）（C_6）、嘧啶（1,3-二啡）（C_6）（例如胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶）、吡啡（1,4-二啡）（C_6）；以及

N_3：三唑（C_5），三啡（C_6）。

【0342】C_{1-4}烷基： 如本文所使用之，術語「C_{1-4}烷基」涉及藉由從具有從1至4個碳原子的碳氫化合物的碳原子上除去氫原子而獲得的單價部分，該碳氫化合物可為脂肪族或脂環族，並且可為飽和或不飽和的（例如部分不飽和、完全不飽和）。如本文所使用之，術語「C_{1-n}烷基」涉及藉由從具有從1至n個碳原子的碳氫化合物的碳原子上除去氫原子而獲得的單價部分，該碳氫化合物可為脂肪族或脂環族，並且可為飽和或不飽和的（例如部分不飽和、完全不飽和）。因此，術語「烷基」包括以下論述的亞類：烯基、炔基、環烷基等。

【0343】飽和烷基基團之實例包括但不限於甲基（C_1）、乙基（C_2）、丙基（C_3）和丁基（C_4）。

【0344】飽和直鏈烷基基團之實例包括但不限於甲基（C_1）、乙基（C_2）、正丙基（C_3）和正丁基（C_4）。

【0345】飽和支鏈烷基基團之實例包括異丙基（C_3）、異丁基（C_4）、二級丁基（C_4）和三級丁基（C_4）。

【0346】C_{2-4}烯基；如本文所使用之，術語「C_{2-4}烯基」涉及具有一或多個碳-碳雙鍵的烷基基團。

【0347】不飽和烯基基團之實例包括但不限於乙烯基（ethenyl、vinyl）（-CH=CH_2）、1-丙烯基（-CH=CH-CH_3）、2-丙烯基（烯丙基，-CH-CH=CH_2）、異丙烯基（1-甲基乙烯基，-C(CH_3)=CH_2）和丁烯基（C_4）。

【0348】C_{2-4}炔基： 如本文所使用之，術語「C_{2-4}炔基」涉及具有一或多個碳-碳三鍵的烷基基團。

【0349】不飽和炔基基團之實例包括但不限於乙炔基（-C≡CH）和2-丙炔基（炔丙基，-CH_2-C≡CH）。

【0350】C_{3-4}環烷基： 如本文所使用之，術語「C_{3-4}環烷基」涉及也是一個環基基團的烷基基團；即，藉由從環狀碳氫（碳環）化合物的脂環族環原子上除去氫原子而獲得的一價部分，該部分具有從3至7個碳原子，包括從3至7個環原子。

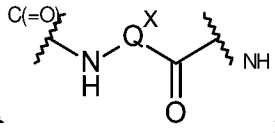
【0351】環烷基基團之實例包括但不限於衍生自如下的那些：

飽和單環碳氫化合物：

環丙烷（C_3）和環丁烷（C_4）；以及

不飽和單環碳氫化合物：

環丙烯（C_3）和環丁烯（C_4）。

【0352】連接標籤： 在式  中，上標$^{C(=O)}$和^{NH}表示原子所鍵合的基團。例如，NH基團顯示與羰基（其不是所示部分的一部分）結合，並且羰基顯示與NH基團（其不是所示部分的一部分）結合。

鹽

【0353】 可以方便地或令人希望地製備、純化、和/或處理活性化合物/藥劑的對應的鹽，例如藥學上可接受的鹽。藥學上可接受的鹽的實例在Berge等人, *J. Pharm. Sci.*[藥物科學雜誌], **66**, 1-19 (1977)中論述。

【0354】 例如，如果化合物係陰離子的、或具有可為陰離子的官能基（例如，-COOH可為-COO^-），則可以與適當的陽離子形成鹽。合適的無機陽離子之實例包括但不限於鹼金屬離子如Na^+和K^+、鹼土金屬陽離子如Ca^{2+}和Mg^{2+}、以及其他陽離子如Al^{+3}。合適的有機陽離子之實例包括但不限於銨離子（即NH_4^+）和經取代的銨離子（例如NH_3R^+、$NH_2R_2^+$、NHR_3^+、NR_4^+）。一些合適的經取代的銨離子的實例係衍生自如下的那些：乙胺、二乙胺、二環己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啉、苄胺、苯基苄胺、膽鹼、葡甲胺和胺丁三醇、以及胺基酸（如離胺酸和精胺酸）。常見的四級銨離子的實例係$N(CH_3)_4^+$。

【0355】 如果化合物係陽離子的、或具有可為陽離子的官能基（例如，-NH_2可為-NH_3^+），則可以與適當的陰離子形成鹽。合適的無機陰離子之實例包括但不限於衍生自以下無機酸的那些：鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硫酸、亞硫酸、硝酸、亞硝酸、磷酸和亞磷酸。

【0356】 合適的有機陰離子之實例包括但不限於衍生自以下有機酸的那些：2-乙醯氧基苯甲酸、乙酸、抗壞血酸、天冬胺酸、苯甲酸、樟腦磺酸、肉桂酸、檸檬酸、乙二胺四乙酸（edetic）、乙二磺酸（ethanedisulfonic）、乙磺酸、延胡索酸、葡庚糖酸（glucheptonic）、葡糖酸、麩胺酸、乙醇酸、羥基馬來酸、羥基萘甲酸、羥基乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、馬來酸、蘋果酸、甲磺酸、黏液酸、油酸、草酸、棕櫚酸、雙羥萘酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水楊酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、酒石酸、甲苯磺酸、三氟

乙酸和戊酸。合適的聚合有機陰離子之實例包括但不限於衍生自以下聚合酸的那些：單寧酸、羧甲基纖維素。

溶劑化物

【0357】 可以方便地或令人希望地製備、純化、和/或處理活性化合物的對應的溶劑化物。術語「溶劑化物」在本文中以常規意義使用，係指溶質（例如活性化合物、活性化合物的鹽）和溶劑的複合物。如果溶劑係水，則溶劑化物可以方便地稱為水合物，例如一水合物、二水合物、三水合物等。

異構物

【0358】 本發明之某些化合物/藥劑能以一或多種特定的幾何、光學、鏡像異構、非鏡像異構、差向異構、阻轉異構、立體異構、互變異構、構象或異頭形式（anomeric form）存在，包括但不限於順式和反式形式；E-和Z-形式；c-、t-、和r-形式；內-和外-形式；R-、S-、和內消旋-形式；D-和L-形式；d-和l-形式；(+) 和 (-) 形式；酮-、烯醇-、和烯醇化物-形式；順式-和反式-形式；向斜-和背斜-形式；α-和β-形式；軸向和赤道形式；船型-、椅型-、扭曲-、信封型-、和半椅型-形式；及其組合，在下文中統稱為「異構物」（或「異組態式」）。

【0359】 術語「手性」係指具有鏡像配偶體的不可重疊性的分子，而術語「非手性」係指可疊加在其鏡像配偶體上的分子。

【0360】 術語「立體異構物」係指具有相同化學組成、但關於原子或基團在空間中的排列上不同之化合物。

【0361】 「非鏡像異構物」係指具有兩個或更多個手性中心並且其分子不是彼此鏡像的立體異構物。非鏡像異構物具有不同的物理特性，例如熔點、沸點、光譜性質和反應性。非鏡像異構物的混合物可以在高解析度分析程序（例如電泳和層析）下分離。

【0362】「鏡像異構物」係指化合物的兩種立體異構物，它們是彼此不可重疊的鏡像。

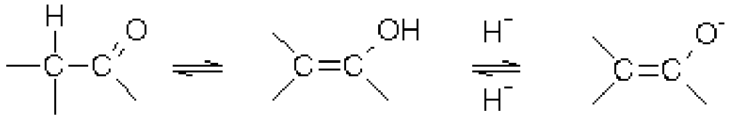
【0363】本文所用的立體化學定義和慣例通常遵循S. P. Parker, 編輯, *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* [麥格勞-希爾化學術語詞典] (1984) 麥格勞-希爾出版社, 紐約；以及Eliel, E.和Wilen, S.,「Stereochemistry of Organic Compound」[有機化合物的立體化學], John Wiley & Sons, Inc.[約翰威利父子公司], 紐約, 1994。本發明之化合物可以含有不對稱或手性中心，因此以不同的立體異組態式存在。意圖係本發明化合物的所有立體異組態式（包括但不限於非鏡像異構物、鏡像異構物和阻轉異構物及其混合物，例如外消旋混合物）均構成本發明之一部分。許多有機化合物以旋光活性形式存在，即它們具有旋轉平面偏振光的平面的能力。在描述光學活性化合物時，前綴D和L、或*R*和*S*用於表示分子圍繞其一或多個手性中心的絕對構型。前綴d和l或 (+) 和 (-) 用來表示該化合物使平面偏振光旋轉的符號，其中 (-) 或l表示該化合物係左旋的。帶有 (+) 或d前綴之化合物係右旋的。對於給定的化學結構，該等立體異構物係相同的，只是它們係彼此的鏡像。特定的立體異構物也可以被稱為鏡像異構物，並且這種異構物的混合物通常被稱為鏡像異構物混合物。鏡像異構物的50 : 50混合物稱為外消旋混合物或外消旋物，它們可以發生在化學反應或過程中沒有立體選擇或立體特異性的地方。術語「外消旋混合物」和「外消旋物」係指兩種鏡像異構物種類的等莫耳混合物，沒有旋光活性。

【0364】「鏡像異構物富集形式」係指手性物質的樣本，其鏡像異構物比率大於50 : 50但小於100 : 0。

【0365】注意，除下文關於互變異組態式所論述的以外，如本文所使用之術語「異構物」特別排除的是結構（或構成）異構物（即，在原子之間的連接而不僅僅是在原子在空間上的位置不同的異構物）。例如，對甲氧基基團（-

OCH_3）的引用不應被解釋為對其結構異構物羥甲基基團（$-CH_2OH$）的引用。類似地，對鄰氯苯基的引用不應被解釋為對其結構異構物間氯苯基的引用。但是，對一類結構的引用很可能包括屬於該類的結構異組態式（例如C_{1-7}烷基包括正丙基和異丙基；丁基包括正、異、二級和三級丁基；甲氧基苯基包括鄰、間和對甲氧基苯基）。

【0366】 上面的排除不涉及互變異構物形式，例如酮、烯醇和烯醇酸酯形式，例如像以下互變異構物對：酮/烯醇（如下所示）、亞胺/烯胺、醯胺/亞胺醇（imino alcohol）、脒/烯二胺（enediamine）、亞硝基/肟、硫酮/烯硫醇（enethiol）、N-亞硝基/羥基偶氮（hyroxyazo）和硝基/酸硝基（aci-nitro）。



酮　　烯醇　　烯醇化物

【0367】 術語「互變異構物」或「互變異組態式」係指經由低能障可相互轉化的不同能量的結構異構物。例如，質子互變異構物（也稱為質子異變互變異構物）包括經由質子遷移的相互轉化，例如酮-烯醇和亞胺-烯胺異構化。效價互變異構物包括藉由一些價電子的重組而進行的相互轉化。

【0368】 注意，術語「異構物」中具體包括的是具有一或多個同位素取代的化合物。例如，H可為任何同位素形式，包括^{1}H、^{2}H（D）、和^{3}H（T）；C可為任何同位素形式，包括^{12}C、^{13}C、和^{14}C；O可為任何同位素形式，包括^{16}O和^{18}O；等。

【0369】 可以摻入本發明化合物的同位素之實例包括氫、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素，例如但不限於^{2}H（氘，D）、^{3}H（氚）、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}F、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{36}Cl、和^{125}I。本發明之各種同位素標記之化合物，例如其中摻入了放射性同位素如3H、13C和14C的那些。此類同位素

標記之化合物可用於代謝研究、反應動力學研究、檢測或成像技術（例如正電子發射斷層掃描（PET）或單光子發射電腦斷層掃描（SPECT），包括藥物或基質組織分佈測定），或用於患者的放射治療。本發明之氘標記的或經取代的治療性化合物可以具有與分佈、代謝和排泄（ADME）有關的改善的DMPK（藥物代謝和藥物動力學）特性。用較重同位素（如氘）取代可能會提供某些治療優勢（由於更高的代謝穩定性），例如增加的體內半衰期或減少的劑量要求。18F標記之化合物可用於PET或SPECT研究。本發明之同位素標記之化合物及其前驅藥通常可以藉由進行以下描述的方案中或實例和製備中揭露的方法來製備，該方法是用容易獲得的同位素標記的試劑取代非同位素標記的試劑。此外，用較重的同位素（尤其是氘（即2H或D））取代可以提供某些治療優勢（由於更高的代謝穩定性而），例如增加的體內半衰期或降低的劑量要求或治療指數的改善。應當理解，在本文中氘被視為取代基。這樣的較重同位素（特別是氘）的濃度可以由同位素富集因子定義。在本發明之化合物中，未特別指定為特定同位素的任何原子均表示該原子的任何穩定同位素。

【0370】除非另有說明，否則對特定化合物的引用包括所有此類異構物形式，包括（全部或部分）外消旋物及其其他混合物。此類異構物形式的製備（例如，不對稱合成）和分離（例如，分級結晶和層析方式）的方法係本領域已知的，或者藉由以已知方式採用本文教導的方法或已知方法是容易地獲得的。

序列同源性

【0371】可以使用多種序列比對方法中的任一種來確定同一性百分比，包括但不限於全域方法、局部方法和混合方法，例如像區段方法。確定同一性百分比的方案係熟悉該項技術者範圍內的常規程序。全域方法從分子的開頭到結尾比對序列，並藉由將單個殘基對的評分相加以及施加空位罰分來確定最佳

比對。非限制性方法包括例如CLUSTAL W，參見例如Julie D. Thompson等人, CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice [CLUSTAL W：藉由序列加權、位置特定空位罰分和權重矩陣選擇來提高漸進式多序列比對的靈敏度], 22(22) Nucleic Acids Research [核酸研究] 4673-4680 (1994)；以及反覆運算細化，參見例如Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments [藉由利用參考結構比對而評估的反覆運算細化，多種蛋白質序列比對的準確度顯著提高], 264(4) J. MoI. Biol.[分子生物學雜誌] 823-838 (1996)。局部方法藉由鑒定所有輸入的序列共用的一或多個保守模體來比對序列。非限制性方法包括例如Match-box，參見例如Eric Depiereux和Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences [Match-Box：一種用於同時比對多個蛋白質序列的全新演算法], 8(5) CABIOS 501 -509 (1992)；吉布斯採樣，參見例如，C. E. Lawrence等人, Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment [檢測細微序列信號：用於多重比對的吉布斯採樣策略], 262(5131) Science [科學] 208-214 (1993)；Align-M，參見例如，Ivo Van WaIIe等人, Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences [Align-M - 高度發散序列的多重比對的新演算法], 20(9) Bioinformatics [生物資訊學]:1428-1435 (2004)。

【0372】 因此，藉由常規方法確定序列同一性百分比。參見例如，Altschul等人, Bull. Math. Bio.[數學生物學通報] 48: 603-16, 1986，以及Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 89:10915-19,

1992。簡而言之，使用空位開放罰分10、空位延伸罰分1、以及如下所示的Henikoff和Henikoff（如前所述）的「blosum 62」評分矩陣比對兩個胺基酸序列以優化比對評分（胺基酸由標準的單字母代碼表示）。

【0373】 兩個或更多個核酸或胺基酸序列之間的「序列同一性百分比」係序列共有的相同位置數目的函數。因此，%同一性可以計算為相同核苷酸/胺基酸的數量除以核苷酸/胺基酸的總數，再乘以100。%序列同一性的計算還可以考慮空位的數量，以及需要引入以優化兩個或更多個序列的比對的每個空位的長度。可以使用技術者熟悉的特定數學演算法（如BLAST）進行兩個或更多個序列之間的序列比較和同一性百分比確定。

用於確定序列同一性的比對評分

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

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

【0374】 然後計算同一性百分比：

$$\frac{\text{相同匹配的總數}}{\text{[較長序列的長度加上 引入較長 序列以對齊兩個序列的空位的數量]}} \times 100$$

【0375】 基本上同源的多肽之特徵在於具有一或多個胺基酸取代、缺失或添加。該等變化較佳的是具有微小的性質，即，保守胺基酸取代（參見下文）和不顯著影響多肽的折疊或活性的其他取代；小的缺失，通常為1至約30個胺基酸；以及小的胺基或羧基末端延伸，如胺基末端甲硫胺酸殘基、最多約20-25個殘基的小連接子肽、或親和標籤。

保守胺基酸取代

【0376】 鹼性： 精胺酸；離胺酸；組胺酸

【0377】 酸性： 麩胺酸；天冬胺酸

【0378】 極性： 麩醯胺酸；天冬醯胺

【0379】 疏水性： 白胺酸；異白胺酸；纈胺酸

【0380】 芳香族： 苯丙胺酸；色胺酸；酪胺酸

【0381】小的：　甘胺酸；丙胺酸；絲胺酸；蘇胺酸；甲硫胺酸

【0382】除20種標準胺基酸外，非標準胺基酸（如4-羥基脯胺酸、6-N-甲基離胺酸、2-胺基異丁酸、異纈胺酸和α-甲基絲胺酸）可以取代本發明多肽的胺基酸殘基。有限數量的非保守胺基酸、不由遺傳密碼編碼的胺基酸和非天然胺基酸可以取代多肽胺基酸殘基。本發明之多肽還可包含非天然存在的胺基酸殘基。

【0383】非天然存在的胺基酸包括但不限於反式-3-甲基脯胺酸、2,4-橋亞甲基-脯胺酸、順式-4-羥基脯胺酸、反式-4-羥基-脯胺酸、N-甲基甘胺酸、別蘇胺酸、甲基-蘇胺酸、羥基-乙基半胱胺酸、羥基乙基高半胱胺酸、硝基-麩醯胺酸、高麩醯胺酸、六氫菸生僉酸、叔白胺酸、正纈胺酸、2-氮雜苯丙胺酸、3-氮雜苯丙胺酸、4-氮雜苯丙胺酸和4-氟苯丙胺酸。用於將非天然存在的胺基酸殘基摻入蛋白質中的幾種方法係本領域已知的。例如，可以使用體外系統，其中使用化學胺醯化的抑制型tRNA抑制無義突變。用於合成胺基酸和胺醯化tRNA的方法係本領域已知的。含有無義突變的質體的轉錄和翻譯在無細胞系統中進行，該無細胞系統包含大腸桿菌S30提取物以及可商購的酶和其他試劑。藉由層析法純化蛋白質。參見例如，Robertson等人, J. Am. Chem. Soc.[美國化學會誌] 113:2722, 1991；Ellman等人, Methods Enzymol.[酶學方法] 202:301, 1991；Chung等人, Science [科學] 259:806-9, 1993；以及Chung等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 90:10145-9, 1993）。在第二種方法中，藉由顯微注射突變的mRNA和化學胺醯化的抑制型tRNA在爪蟾卵母細胞中進行翻譯（Turcatti等人, J. Biol. Chem.[生物化學雜誌] 271:19991-8, 1996）。在第三種方法中，在不存在要替換的天然胺基酸（例如苯丙胺酸）和存在所需的一或多個非天然存在的胺基酸（例如，2-氮雜苯丙胺酸、3-氮雜苯丙胺酸、4-氮雜苯丙胺酸或4-氟苯丙胺酸）的情況下，培養大腸桿菌細胞。將非天然存在的胺

基酸代替其天然對應物摻入多肽中。參見，Koide等人, Biochem.[生物化學] 33:7470-6, 1994。天然存在的胺基酸殘基可以藉由體外化學修飾轉化為非天然存在的種類。化學修飾可以與定點誘變相結合，以進一步擴大替代範圍（Wynn和Richards, Protein Sci.[蛋白質科學] 2:395-403, 1993）。

【0384】 有限數量的非保守胺基酸、不由遺傳密碼編碼的胺基酸、非天然存在的胺基酸和非天然胺基酸可以替代本發明多肽的胺基酸殘基。

【0385】 本發明多肽中的必需胺基酸可以根據本領域已知的方法鑒定，如定點誘變或丙胺酸掃描誘變（Cunningham和Wells, Science [科學] 244: 1081-5, 1989）。生物學相互作用位點還可藉由對結構的物理分析來確定，如藉由以下技術確定：核磁共振、晶體學、電子繞射或光親和標記，連同對推定的接觸位點胺基酸進行突變。參見例如，de Vos等人, Science [科學] 255:306-12, 1992；Smith等人, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 224:899-904, 1992；Wlodaver等人, FEBS Lett.[歐洲生化學會聯合會快報] 309:59-64, 1992。必需胺基酸的同一性還可以從與本發明多肽的相關組分（例如易位組分或蛋白酶組分）的同源性分析中推斷出來。

【0386】 可以使用已知的誘變和篩選方法來製造和測試多個胺基酸取代，該等方法如Reidhaar-Olson和Sauer（Science [科學] 241:53-7, 1988）或者Bowie和Sauer（Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 86:2152-6, 1989）所揭露的那些。簡而言之，該等作者揭露了用於同時隨機化多肽中的兩個或更多個位置、選擇功能性多肽、然後對誘變的多肽進行定序以確定每個位置上允許的取代的範圍的方法。可以使用的其他方法包括噬菌體展示（例如，Lowman等人, Biochem.[生物化學] 30:10832-7, 1991；Ladner等人, 美國專利案號5,223,409；Huse, WIPO公開WO 92/06204）和區域定向誘變（Derbyshire等人, Gene [基因] 46:145, 1986；Ner等人, DNA 7:127, 1988）。

【0387】 可以使用已知的誘變和篩選方法來製造和測試多個胺基酸取代，該等方法如Reidhaar-Olson和Sauer（Science [科學] 241:53-7, 1988）或者Bowie和Sauer（Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 86:2152-6, 1989）所揭露的那些。簡而言之，該等作者揭露了用於同時隨機化多肽中的兩個或更多個位置、選擇功能性多肽、然後對誘變的多肽進行定序以確定每個位置上允許的取代的範圍的方法。可以使用的其他方法包括噬菌體展示（例如，Lowman等人, Biochem.[生物化學] 30:10832-7, 1991；Ladner等人, 美國專利案號5,223,409；Huse, WIPO公開WO 92/06204）和區域定向誘變（Derbyshire等人, Gene [基因] 46:145, 1986；Ner等人, DNA 7:127, 1988）。

【0388】 除非另外定義，本文所使用的所有技術和科學術語具有與本揭露內容所屬領域的技術者通常所理解的相同的意義。Singleton等人, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY [微生物學和分子生物學詞典], 第20版, John Wiley and Sons [約翰威利父子公司], 紐約(1994)，以及Hale和Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY [哈珀柯林斯生物學詞典], Harper Perennial [哈珀永久出版社], 紐約州(1991) 為技術者提供了本揭露內容中所使用的許多術語的通用詞典。

【0389】 本揭露內容並不受本文揭露的示例性方法和材料的限制，並且與本文所述之那些方法和材料相似或等同的任何方法和材料都可以用於本揭露內容的實施方式的實踐或測試。數值範圍包括限定該範圍的數位。除非另外指明，否則分別地，任何核酸序列以5'到3'方向從左至右書寫；胺基酸序列以胺基到羧基方向從左至右書寫。

【0390】 本文提供的標題不是對本揭露內容的各個方面或實施方式的限制。

【0391】在本文中使用胺基酸的名稱、三字母縮寫或單字母縮寫來指代胺基酸。如本文所使用之，術語「蛋白質」包括蛋白質、多肽和肽。如本文所使用之，術語「胺基酸序列」與術語「多肽」和/或術語「蛋白質」同義。在一些情況下，術語「胺基酸序列」與術語「肽」同義。在一些情況下，術語「胺基酸序列」與術語「酶」同義。術語「蛋白質」和「多肽」在本文中可互換地使用。在本揭露內容和申請專利範圍中，可以使用胺基酸殘基的常規一字母和三字母代碼。胺基酸的3字母代碼遵照IUPACIUB生物化學命名聯合委員會（Joint Commission on Biochemical Nomenclature，JCBN）的定義。還應當理解，由於遺傳密碼的簡並性，多肽可以由多於一種核苷酸序列編碼。

【0392】術語的其他定義可在整個本說明書中出現。在更詳細地描述示例性實施方式之前，應理解本揭露內容並不限於所描述的實施方式，因而該等實施方式可以變化。還應當理解，本文使用的術語僅係為了描述實施方式之目的，而並不意圖係限制性的，因為本揭露內容的範圍僅由所附請求項限定。

【0393】在提供數值範圍的情況中，應理解，該範圍的上限和下限之間的每個中間值（至下限的個位的十分之一，除非上下文另有清楚規定）也被具體揭露。在所陳述的範圍中的任何規定值或中間值與所陳述的範圍中的任何其他規定值或中間值之間的每個較小範圍，被涵蓋在本揭露內容內。該等較小範圍的上限和下限可獨立地被包括或排除在該範圍中，而且其中任一個、沒有一個或兩個極限值被包括在較小範圍中的每個範圍也被涵蓋在本揭露內容中，但依據所陳述的範圍中的任何被具體排除的極限值而定。在所陳述的範圍包含極限值的一個或兩個的情況下，將那些所包含的極限值的一個或兩個排除在外的範圍也包含在本揭露內容中。

【0394】必須注意的是，如本文和所附請求項所使用的，單數形式「一個/種（a/an）」和「該（the）」包括複數指示物，除非上下文另有明確規定。

因此，例如，提及「一種藥劑」包括多種這樣的藥劑並且提及「該藥劑」包括提及熟悉該項技術者已知的一或多種藥劑及其等效物，等等。

【0395】 本文所論述的出版物只是針對它們在本申請的提交日之前的揭露內容而提供。本文中的任何內容均不應被解釋為承認此類出版物構成所附請求項的先前技術。

【圖式簡單說明】

【0396】 現在將參考以下附圖和實例，僅以舉例的方式描述本發明之實施方式。

【0397】 **[圖1A-1D]**顯示了B7-H4在乳癌中的過表現。(A) TNBC（再處理）；(B) HR+（處理前）；(C) HER2+（處理前，符合赫賽汀治療）；(D) HER2+ve（赫賽汀治療的）。

【0398】 **[圖2A-2L]**顯示了物種交叉反應性ELISA分析的結果。

【0399】 **[圖3A-3G]**顯示了選殖與B7-H4家族成員和同源物結合的ELISA分析的結果。

【0400】 **[圖4A-4B]**顯示了所選選殖（和商業抗體）與多種細胞類型結合的細胞蛋白質印跡分析的結果。E = E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG；U = US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG；R = R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1；S = Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1

【0401】 **[圖5A-5F]**顯示了選定的選殖的體外細胞毒性測定的結果。

【0402】 **[圖6]**顯示了對選殖ZY0EQD_E02（以及其多種變體）進行的ELISA分析的結果，其證明了與人、食蟹猴、小鼠和大鼠B7-H4的結合。

【0403】 **[圖7]**顯示了對選殖E02_GL進行的ELISA分析的結果，與1D11相比，表明E02_GL與人B7-H4的結合得到改善。

【0404】 **[圖8A-8B]**顯示了對選殖E02_GL進行的流動式細胞分析術分析的結果，與1D11相比，表明E02_GL與存在於細胞上的人B7-H4的結合得到改善。HT29細胞的結果顯示在 (A) 中，SKBR-3細胞的結果顯示在 (B) 中。符號◊表示『E02-GL部分』，符號□表示『1D11部分』。符號「●」表示（陰性）對照『R347組分』。

【0405】 **[圖9A-9B]**顯示了用E02-GL-SG3932軛合物處理後人B7-H4轉染的（和未轉染的對照）Ad293細胞的細胞毒性。空心圓 = 同種型對照ADC（例如NIP228-SG3932）；實心圓 = E02-GL-SG3932。

【0406】 **[圖10A-10B]**顯示了體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷（E02-GL-SG3932）。

【0407】 **[圖11]**顯示了體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷（E02-GL-SG3932）。

【0408】 **[圖12]**顯示E02-GL-SG3932在患者源性異種移植（PDX）模型中具有有效的體內活性。空心圓 = 僅媒介物對照；實心圓 = E02-GL-SG3932（7 mg/kg）。

【0409】 **[圖13]**顯示了以7 mg/kg單次i.v.注射後，E02-GL-SG3932在PDX模型中的抗腫瘤活性。

【0410】 **[圖14A-14B]**顯示E02-GL-topo I抑制劑ADC在體外和體內的MX-1細胞 (A)；以及在體外和體內的HT29源性模型 (B) 中具有相似的效力。

【0411】 **[圖15A-15B]**顯示了用E02-GL-SG3249軛合物處理後食蟹猴B7-H4轉染的（和未轉染的對照）HEK293細胞的細胞毒性。

【0412】 **[圖16A-16C]**顯示了內化實驗的結果，證明了結合的E02-GL-抗原複合物在活細胞中的內化。

【0413】 **[圖17A-17B]**顯示蛋白質印跡分析，證明E02-GL-SG3932治療導致體外雙鏈DNA斷裂；（**圖17C**）顯示在用軛合至SG3249的抗B7-H4抗體（更具體地為E02-GL-SG3249）處理HCC1569細胞後，關鍵雙鏈斷裂標記物的蛋白質印跡分析。

【0414】 **[圖18]**顯示了用E02-GL-SG3249處理後SKBR3細胞中的半胱天冬酶3/7活性。

【0415】 **[圖19]**顯示了E02-GL-SG3249和彈頭SG3199對腫瘤細胞的體外活性。

【0416】 **[圖20A-20D]**顯示了體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷（E02-GL-SG3249）。

【0417】 **[圖21A-21C]**顯示與1D11 ADC相比，E02_GL ADC具有改進的細胞毒性/效力。顯示了針對表現人B7-H4的HT29細胞系 (A)、SKBR3細胞系 (B) 和HCC1569細胞系 (C) 的比較性細胞毒性。

【0418】 **[圖22A-22C]**顯示了E02-GL-SG3249對 (A) OVCAR4細胞（順鉑難治性卵巢癌，高B7-H4）、(B) HCC1569細胞（HER2+乳癌，B7-H4的異源表現）和 (C) MDA-MB-468細胞（三陰性乳癌，低B7-H4表現）的腫瘤移植物的體內活性。

【0419】 **[圖23]**顯示了體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷。

【0420】 **[圖24A-24O]**顯示E02-GL-SG3249在患者源性異種移植（PDX）模型中具有有效的體內活性。圓 = 僅媒介物控制；正方形 = E02-GL-SG3249（0.3 mg/kg）；三角形 = E02-GL-SG3249（1.0 mg/kg）。

【0421】 **[圖25A-25B]**顯示了在HCC1954腫瘤異種移植物（有和沒有E02-GL-SG3249）中的 (A) γ-H2AX免疫組織化學（IHC）的結果，在 (B) 中量化為γ-H2AX陽性細胞的數量/mm^2（在目的組織區域內）（+/- S.E.M.）。使用

HALO軟體（利用CRO-OracleBio）進行圖像分析。在E02-GL-SG3249處理後長達10天，觀察到γ-H2AX陽性腫瘤細胞的數量增加。

【0422】 **[圖26A-26D]**顯示了B7-H4 Ab在表現B7H4的腫瘤（HT29細胞）中的滯留。強度標度顯示落射螢光強度。輻射效率 = (p/sec/cm^2/sr)/(μW/cm^2)；強度標度，最小值 = 1.20e8，最大值 = 1.50e9。

【0423】 **[圖27A-27D]**顯示了B7-H4 Ab在表現B7H4的腫瘤（CT26細胞）中的滯留。強度標度顯示落射螢光強度。輻射效率 = (p/sec/cm^2/sr)/(μW/cm^2)；強度標度，最小值 = 1.20e8，最大值 = 1.50e9。

【0424】 **[圖28A-28B]**顯示了五個示例性抗體選殖的序列比對。

【0425】 **[圖29A]**係靶向B7-H4的TOP1i-ADC的示意圖。**圖29B**顯示了靶向B7-H4的TOP1i-ADC E02-GL-SG3249的主要特性。

【0426】 **[圖30]**顯示了正常人和正常食蟹猴乳腺、胰腺、子宮頸、子宮內膜、輸卵管（fallopian tube/oviduct）和腎組織中B7-H4表現的代表性免疫組織化學染色的示例圖像。

【0427】 **[圖31]**顯示了人腫瘤組織中B7-H4表現的代表性免疫組織化學染色的示例圖像，該等腫瘤組織包括乳癌（TNBC和ER+，參見個別圖1A-1B）、膽管癌、NSCLC-SCC、子宮內膜腫瘤和卵巢腫瘤。

【0428】 **[圖32]**係B7-H4異種同源比對。

【0429】 **[圖33]**顯示了抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932藉由DELFIA-ELISA方法和抗人IgG (H+L)與人B7 H4的結合。E02-INT：E02-GL-SG3932的抗體中間體；NIP228：同種型匹配的對照；huB7-H4：重組人B7-H4。

【0430】 **[圖34]**顯示抗體中間體E02-INT與穩定表現人、鼠或食蟹猴B7-H4的HEK 293細胞的結合。E02-INT：E02-GL-SG3932的抗體中間體；HEK293

JI TREX：未轉導的HEK293 JI TREX細胞；HEK293 JI TREX cynoB7-H4：穩定表現食蟹猴B7-H4的HEK 293細胞；HEK293 JI TREX huB7-H4：穩定表現人B7-H4的HEK 293細胞；HEK293 JI TREX muB7-H4：穩定表現鼠B7-H4的HEK 293細胞；MFI：平均螢光強度。Y軸係平均螢光強度幾何平均值。數據表現為三次重複測定的平均值 ± SD。

【0431】 **[圖35]**顯示抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932與人乳癌細胞系以及與穩定表現人B7-H4的HT29細胞的結合。E02-INT：E02-GL-SG3932的抗體中間體；HT29-huB7-H4選殖4和HT29-huB7-H4選殖26：穩定表現人B7-H4的HT29細胞；MFI：平均螢光強度。y軸係平均螢光強度幾何平均值。

【0432】 **[圖36A-36C]**顯示了E02-GL-SG3932在細胞系HT29、HT29-huB7-H4選殖26和MX-1中的體外細胞毒性活性。數據表現為三次重複測定的平均值 ± SD。

【0433】 **[圖37]**顯示了E02-GL-SG3932的體外抗體依賴性細胞介導的細胞毒性活性。該圖顯示了六個實驗的平均倍數變化 ± SEM。

【0434】 **[圖38]**顯示了以圖像序列形式呈現的E02-INT內化的時程。將人大腸癌細胞HT29-huB7-H4選殖26（第一行）和人乳癌細胞MX-1（第二行）用5 μg/mL的與Alexa Fluor™ 568（紅色）軛合的E02-INT進行標記。比例尺為20 μm。

【0435】 **[圖39A-39C]**顯示了E02-INT在人癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26和MX-1中內化的活細胞成像。(A) 每個點代表平均內化百分比 ± 3個獨立孔的標準差，間隔為10分鐘，持續480分鐘。(B) 8小時後的內化百分比，以及 (C) 顯示了3個獨立孔的預測半衰期。該等值係使用解離 - 單相指數式衰減方程得出的。水平條表示組內算術平均值；藉由單向方差分析、Tukeys多重比較檢驗來評估統計顯著性。ns：不顯著；$p > 0.05$；** $p < 0.05$。

【0436】 **[圖40A-40B]**顯示抗體E02-INT與HT29-huB7-H4選殖26細胞中的溶酶體共定位。(A) 將HT29-huB7-H4選殖26細胞與5 μg/mL的軛合Alexa Fluor™ 568抗體的E02-INT一起孵育24小時 [(A) 紅色 - 左上和左下]。將溶酶體用小鼠抗人LAMP1-Alexa Fluor™ 488抗體染色 [(A) 綠色 - 中上]。將內含體用兔抗人EEA1抗體染色，並用山羊抗兔IgG1-DyLight™ 650檢測 [(A) 綠色 - 中下]。E02-INT與LAMP1或EEA1的共定位顯示在合併圖像中。(B) 藉由皮爾森相關係數、使用Zeiss Zen軟體分析E02-INT與EEA1和LAMP1的共定位。每個點代表單個細胞測量結果。藉由單向方差分析、Tukeys多重比較檢驗來評估統計顯著性。ns：不顯著；$p > 0.05$；**** $p < 0.0001$。

【0437】 **[圖41]**係凝膠圖片，顯示了用E02-GL-SG3932或TOP1i彈頭SG3924處理的MX-1細胞中的DNA損傷響應信號。呈現的數據代表n：2個實驗。

【0438】 **[圖42]**係凝膠圖片，顯示了用E02-GL-SG3932或TOP1i彈頭SG3924處理的HT29-huB7-H4細胞中的DNA損傷響應信號。呈現的數據代表n：2個實驗。

【0439】 **[圖43A-43F]**係用E02-GL-SG3932處理後在HT29-huB7-H4選殖26異種移植腫瘤中的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶3的免疫組織化學（IHC）染色圖像。該等圖像代表在單次IV投與7 mg/kg E02-GL-SG3932（43D-43F）或同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932（43A-43C）後168小時，在HT29-huB7-H4選殖26腫瘤異種移植模型中的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3的IHC 染色。

【0440】 **[圖44A-44D]**顯示了在HT29 huB7 H4選殖26異種移植研究中跨所有時間點和處理的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3 IHC 染色的圖像分析數據。頂部小圖（44A）：上皮細胞分析，顯示所有上皮細胞中人IgG陽性上皮

細胞的比例隨時間的變化。第二小圖（44B）：γH2AX分析，顯示在γH2AX測定中發現對病灶呈陽性的上皮細胞的比例。第三小圖（44C）：裂解的半胱天冬酶3（CC-3），顯示了樣本中裂解的半胱天冬酶-3陽性腫瘤細胞的隨時間變化的百分比。底部小圖（44D）：樣本中所有上皮細胞隨時間變化的細胞密度，表明與同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932相比，E02-GL-SG3932處理導致的細胞死亡。

【0441】 **[圖45A-45B]**顯示E02-GL-SG3932在B7-H4陰性HT29異種移植模型中的功效（還參見圖11）。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組8隻動物。虛線表示給藥日。

【0442】 **[圖46A-46C]**顯示E02-GL-SG3932在HT29-huB7-H4選殖26異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組10或8隻動物。虛線表示給藥日。

【0443】 **[圖47A和47B]**顯示E02-GL-SG3932、NIP228-SG3932和E02-INT在MX-1異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組8隻動物。虛線表示給藥日。

【0444】 **[圖48]**顯示E02-GL-SG3932和NIP228-SG3932在MX-1異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組3或6隻動物。

【0445】 **[圖49]**顯示了E02-GL-SG3932和NIP228-SG3932在MDA-MB-468異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組3或6隻動物。

【0446】 **[圖50]**顯示了患者源性異種移植（PDX）模型中B7-H4表現數據的定量圖像分析，按細胞膜OD平均值的案例平均值排序。表現是由IHC細胞強度等級編碼的顏色（陰性：黑色，1+：白色，2+：淺灰色，3+：深灰色。

【0447】 **[圖51]**顯示了在患者源性異種移植模型中單次投與1.25 mg/kg E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932所產生的抗腫瘤活性。

【0448】 **[圖52A和52B]**顯示了在根據對1.25 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932的腫瘤響應而分組的PDX模型中的B7-H4表現。如果腫瘤體積自基線的百分比變化為-30%至-100%（含端值），則認為模型對測試藥劑有響應（R）。如果腫瘤體積自基線的百分比變化大於-30%，則模型被認為是非響應者（NR）。y軸表示每個模型中B7-H4的水平，如由H評分所確定的。

【0449】 **[圖53A]**顯示了在患者源性異種移植模型中單次投與3.5 mg/kg E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932所產生的抗腫瘤活性。**圖53B-53E**顯示了在(A) 1.25 mg/kg E02-GL-SG3932、(B) 3.5 mg/kg E02-GL-SG3932、(C) 1.25 mg/kg同種型對照ADC、以及 (D) 3.5 mg/kg同種型對照ADC下，用於確定E02-GL-SG3932投與、B7-H4表現水平和HR缺陷的相互關係的研究方案的結果。在**圖53B-53E**中，三角形「△」符號表示同源重組缺陷（如由BRCA突變或RAD51病灶測定所確定的）的模型。圓圈「●」符號表示沒有同源重組缺陷的模型。

【0450】

【0451】 **[圖54A和54B]**顯示了在根據對3.5 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932的腫瘤響應而分組的PDX模型中的B7-H4表現。如果腫瘤體積自基線的百分比變化為-30%至-100%（含端值），則認為模型對測試藥劑有響應（R）。如果腫瘤體積自基線的百分比變化大於-30%，則模型被認為是NR。y軸表示每個模型中B7 H4的水平，如由H評分所確定的。

【0452】 **[圖55A-55G]**顯示了與未處理的小鼠相比，用1.25 mg/kg或3.5 mg/kg單劑量的E02-GL-SG3932處理的第一組膽管癌PDX小鼠模型的隨時間變化的平均腫瘤體積。

【0453】 **[圖56A-56K]**顯示了與未處理的小鼠相比，用1.25 mg/kg或3.5 mg/kg單劑量的E02-GL-SG3932處理的第二組膽管癌PDX小鼠模型的隨時間變化的平均腫瘤體積。

【0454】 **[圖57A-57B]**顯示，與ADC 2-4相比，用可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-彈頭製備的ADC在體內活性最高。**圖57A係圖57B**的關鍵。

【0455】 **[圖58]**顯示，與ADC 2-4相比，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-彈頭ADC在大鼠毒性研究中表現出最乾淨的安全性。

【0456】 **[圖59A-59B]**顯示，與ADC 2-4相比，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-彈頭ADC具有良好的PK特性和最寬的相對TI。相對TI = 在大鼠中測試的最高劑量（NOAEL而非HNSTD）下的AUC與提供腫瘤停滯的AUC的暴露比率（MX-1模型）。**圖59A係圖59B**的關鍵。

【0457】 **[圖60A-60B]**顯示E02-GL-SG3932在乳腺和卵巢PDX小鼠模型中具有強大的活性。

【0458】 **[圖61]**顯示E02-GL-SG3932在HR缺陷型腫瘤和具有升高的B7-H4的HR精通型腫瘤中具有強大的活性。

【0459】 **[圖62A-62B]**顯示了在根據對3.5 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932的腫瘤響應而分組的HR缺陷型（A）和HR精通型（B）PDX模型中的腫瘤響應。(R) 表示模型被認為對測試藥劑有響應。(NR) 表示模型被認為是非響應者。y軸表示每個模型中B7-H4的水平，如由H評分所確定的。

【0460】 **[圖62C-62D]**顯示了在根據對1.25 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932的腫瘤響應而分組的HR缺陷型（A）和HR精通型（B）PDX模型中的腫瘤響應。(R) 表示模型被認為對測試藥劑有響應。(NR) 表示模型被認為是非響應者。y軸表示每個模型中B7-H4的水平，如由H評分所確定的。

【0461】 **[圖63]**顯示了不同彈頭在DLD1 wt或BRCA2-/-細胞中的6天細胞毒性測定的結果。MMAE = 陰性對照，微管抑制劑彈頭。

實例

材料與方法

蛋白質試劑

【0462】 產生的蛋白質試劑（例如構建體）如表1所示。該表表明蛋白質來自哪個物種（人、小鼠或食蟹猴）、用於選殖構建體的載體以及所使用的前導序列係天然的還是人CD33前導序列。

[表1].為B7H4項目製作的蛋白質構建體

選殖的插入物	載體	注釋
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	天然前導序列
小鼠B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	天然前導序列
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前導序列
小鼠B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前導序列
食蟹猴B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前導序列
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前導序列 三重突變型Fc
小鼠B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前導序列 三重突變型Fc
食蟹猴B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前導序列 三重突變型Fc
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	人CD33前導序列
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_C_mIgG2a_Fc_10His	人CD33前導序列
人B7H4 ECD（SV）	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	人CD33前導序列 剪接變體

【0463】「三重突變型Fc」（TM）包含Fc區內的三重突變L234F/L235E/P331S，如先前在Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.[晶體學報部分D：生物晶體學] 2008年6月1日; 64(Pt 6): 700-704（藉由引用併入本文）中所述。為避免任何疑問，本發明人使下文描述的抗體在不存在這樣的TM的情況下（例如，存在WT Fc的情況下）也保留其有利的結合特性/特徵。

【0464】表中的所有蛋白質均使用標準條件進行純化。簡而言之，在HEK EBNA中進行表現，使用TFF濃度設置濃縮，使用His trap層析柱或蛋白G層析柱純化（取決於是否存在10His Flag標籤或Fc標籤），然後是SEC S200層析柱的最終拋光步驟。

ELISA

【0465】藉由ELISA測量抗B7-H4抗體（例如，中間體ZY0EQD-E02-GL和抗B7-H4 mAB D11）與B7-H4（例如，人和小鼠B7-H4）的結合。將重組B7-H4-Fc（例如，人B7-H4-Fc和小鼠B7-H4-Fc）蛋白稀釋到DPBS中，得到5 ug/ml的溶液。然後將50 μL稀釋的儲備液添加到Nunc Maxisorp 96孔板中。將50 μL/孔DPBS添加到對照孔中。使抗原在4°C吸附到板上過夜，用DPBS洗滌一次，並在室溫下與封閉緩衝液（3% w/v Marvel，在DPBS中）一起孵育1小時。然後將板用PBS洗滌一次，並與在含有1% BSA、0.3%曲通X-100的DPBS中稀釋的6.4 pM-100 nM抗B7-H4抗體（例如，中間體ZY0EQD-E02-GL或抗B7-H4 mAb D11）一起孵育1小時。然後將板用含有0.1%吐溫的PBS洗滌三次，並在室溫與過氧化物酶軛合的山羊抗人輕鏈抗體（西格瑪奧德里奇公司（Sigma Aldrich），普爾（Poole），英國）一起孵育1小時。然後將板用含有0.1%吐溫的PBS洗滌五次。在與TMB過氧化物酶底物一起孵育5分鐘後，藉由添加0.5 M H_2SO_4終止反應。使用Envision多標籤酶標儀（珀金埃爾默公司（Perkin Elmer），Seer Green，英國）測量450 nm處的吸光度（A450）。

流動式細胞分析術（用於檢測與B7-H4陽性細胞結合的抗體）

【0466】藉由accutase（Gibco公司，佩斯利（Paisley），英國）使細胞從組織培養瓶中分離，藉由離心使其沈澱，並重懸於冰冷的DPBS（Gibco公司，佩斯利，英國）中。使用血細胞計數器藉由台盼藍排除法計數活細胞。在DPBS中將細胞密度調整為5x10^6個細胞/mL。將100 μL細胞懸液（5x10^5個細胞）添加到96孔V型底板中並置於冰上。然後，將細胞與Live/Dead可固定紫色染色劑（賽默飛世爾科學公司，拉夫伯勒（Loughborough），英國）一起在冰上孵育20分鐘。用流動式細胞分析術緩衝液（eBiosciences公司，哈特菲爾德（Hatfield），英國）洗滌後，將細胞在僅100 μL流動式細胞分析術緩衝液中（未染色的對照細胞）或者補充有濃度範圍為10 μg/ml至78 ng/ml的AF647標記的抗B7H4抗體（例如E02-GL或1D11）或同種型R347的該緩衝液中在冰上孵育30分鐘。然後將細胞用200 μL冰冷的流動式細胞分析術緩衝液洗滌三次，用200 μL 4%多聚甲醛（西格瑪奧德里奇公司，普爾，英國）固定20分鐘，然後懸浮在冰上的DPBS中以用於在FACSCanto II儀（BD生物科學公司（BD Bioscience），聖約瑟（San Jose），加利福尼亞州（CA），美國）上進行流動式細胞分析術分析。如下使用FlowJo細胞計數分析軟體（Treestar公司，阿什蘭（Ashland），俄勒岡州（OR），美國）來量化抗體與細胞的結合。基於前向散射、側向散射和Live/Dead紫色螢光強度，對活的單細胞進行門控，並確定AF647幾何平均螢光強度（MFI）。

細胞毒性測定

【0467】藉由accutase（Gibco公司，佩斯利，英國）使細胞系從組織培養瓶中分離，藉由離心使其沈澱，並重懸於生長培養基（針對HT29-hB7H4選殖44為McCoy's 5A、10% FBS、400 μg/mL G418；針對SKBR3為McCoys'5A、10% FBS；以及針對HCC1569為RPMI-1640、10% FBS）中。使用血細胞計數

器藉由台盼藍排除法計數活細胞。在生長培養基中將細胞密度調整為2.7x10^4個細胞/mL。將75 μL/孔的細胞懸液（2x10^3個細胞）添加到96孔白壁透明底部組織培養處理板中，並在37°C、5% CO_2下在加濕的組織培養箱中培養過夜。

【0468】將ADC（例如，1D11-MMAE、E02-GL-MMAE和E02-GL-SG3249）稀釋到DPBS中，分別得到400 μg/mL或16 μg/mL儲備液。在DPBS中製備了四倍連續稀釋的儲備液。然後將25 μL的稀釋的儲備液添加到培養的細胞的一式二份孔中，同時將抗體（例如，1D11-MMAE或E02-GL-MMAE或E02-GL-SG3249）進行十點、四倍連續稀釋。將25 μL/孔DPBS添加到模擬處理的對照細胞中。

【0469】將細胞在ADC或DPBS（模擬處理的對照細胞）存在下培養六天。使用CellTiter-Glo®測定評估細胞活力：將100 μL CellTiter-Glo®（普洛麥格公司（Promega），南安普敦（Southampton），英國）添加到每個孔中。將板在臺式搖床上攪拌2分鐘，然後在室溫再孵育10分鐘。使用Envision多標籤酶標儀（珀金埃爾默公司，Seer Green，英國）測量發光。藉由使用第7版GraphPad Prism（GraphPad軟體公司（GraphPad Software），拉荷亞（La Jolla），加利福尼亞州（CA））中的非線性回歸模型 [log促效劑相對於響應 - 可變斜率（三個參數）]產生半數最大抑制濃度（IC_{50}）值來測定測試品抗體（例如，1D11-MMAE或E02-GL-MMAE或E02-GL-SG3249）的效力，並表示為相對於模擬處理的對照細胞的細胞活力百分比 -

([(處理的細胞 - 背景) / (模擬處理的對照細胞 - 背景)] x 100)。

細胞上蛋白質印跡

【0470】開發了細胞上蛋白質印跡方法，並將其用於利用以下細胞運行5個示例性抗體選殖：SKBR3、A549、OVCAR4（全部減去用B7-H4載體進行的轉染）、CHO和HEK細胞（加上和減去用全長B7-H4載體進行的轉染）。

【0471】除了示例性抗體選殖之外，還使用了以下抗體（用於比較目的）：

- E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG
- US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG
- *R and D systems* AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1
- Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1
- 同種型1 CAT004 SP06-003
- 同種型2 R and D正常山羊IgG對照（AB-108C）

親和力分析KinExA 3200

【0472】EO2_GL Fab：E02_GL Fab SEC組分（33.4-34.5 min，07031802.D），

【0473】B7H4：hB7H4-ECD-Flag-His10（4.34 mg mL-1，J Watson，2017年10月31日）。

KinExA緩衝液：

【0474】添加了0.02%疊氮化鈉的D-PBS（VWR/Merck 103692K，批次：K35580906），1升，0.20 μm無菌過濾的。

【0475】添加了0.02%疊氮化鈉的D-PBS（VWR/Merck 103692K，批次：K35580906）和1 mg mL^{-1}牛血清白蛋白（Sigma A-2058，批次：108H0573）。1.0升，0.20 μm無菌過濾的。

第二檢測試劑：

【0476】使用DyLight649標記的小鼠抗人H+L鏈第二檢測試劑（傑克孫免疫研究公司（Jackson Immunoresearch），209-495-088，批次91003）檢測全IgG或Fab。用800 μL Milli-Q水重構的小瓶（約1 mg）。

r人B7H4 ECD的最小胺生物素醯化：

- 蛋白質：r人B7H4 ECD-FlagHis10（4.34 mg mL^{-1}，第1批，2017年10月31日）
- 來源： JWPur006
- 體積/緩衝液：0.100 mL /PBS
- 蛋白質品質（Da）： 29,053.57 Da
- 要生物素醯化的蛋白質品質 = 0.434 mg
- 要生物素醯化的蛋白質的量（皮莫耳）0.000434 g/29,054 Da = 1.494 E-8莫耳（14,938皮莫耳）

生物素醯化：

- 添加在D-PBS中的10 μL飽和NaHCO3。
- 試劑：EZ link Sulfo-NHS-LC-生物素（Perbio/皮爾斯公司，產品編號21335），以（1.0 mg mL-1，在DMF中）計。
- 第一脈衝蛋白: 生物素比例： 1:0.5　　14,938 × 0.5 = 14,938
  - 7,468/1,797 pmol μL-1 = 4.16 μL
- 起始：下午16:07；取樣：下午16:35
- 所有該等都應用於Dulbecco's PBS平衡PD-10柱上。

體內成像研究

【0477】將抗體選殖（例如E02_GL）用800CW（LI-COR生物科學公司（LI-COR Biosciences））標記。將800 CW標記的R347用於對照實驗中。

【0478】將表現B7-H4的CT26/4TI/HT29癌細胞移植（例如，皮下接種）到3-5天大的裸小鼠（查理斯河實驗室（Charles River Laboratories），威爾明頓（Wilmington），麻塞諸塞州（MA））的左腹，並且將不表現B7-H4的CT26/4TI/HT29癌細胞移植到右腹以提供內部對照。飼養小鼠一週以形成腫瘤，注射800CW標記的E02_GL。將800CW標記的R347注射到對照小鼠中。在

注射標記的抗體後第1、3、7和9天，藉由對來自該標記的輻射進行成像，對腫瘤進行體內成像。

實例1

B7-H4在多種細胞類型中過表現

【0479】 對取自人受試者的多個腫瘤切片中的切片進行免疫組織化學，該等切片代表多種腫瘤類型（如表2中所述）。發現B7-H4的表現在乳癌（例如激素受體陽性（HR+）乳癌）以及非小細胞肺癌（NSCLC）中特別顯著（參見圖1A-1D）。有趣的是，大多數腫瘤表現出異源表現。

【0480】 治療後一部分患者中的表現保持不變（其中，將HER2+乳癌患者用赫賽汀治療；並且將卵巢癌患者用基於鉑的化學療法治療）。

[表2].

腫瘤類型		**% Pos[1]**	**% 高Pos[2]**	**% 低Pos[3]**	**評估的N**
乳癌	HR+	85	23	51	39
	TNBC	70	32	23	230
	HER2+	87	42	28	98
	- 符合赫賽汀治療	83	43	20	30
	- 赫賽汀治療的	88	41	31	68
卵巢癌（漿液性）		72	24	33	71
子宮內膜癌		84	35	48	39
NSCLC	鱗狀	63	15	48	160
	腺癌	19	2	15	143
胰臟癌		31	1	18	90
胃癌		10	0	10	21
膽管癌		13	38	38	13

[1]陽性：以任何強度和頻率染色的腫瘤

[2]高陽性：在>50%的腫瘤細胞中膜染色強度>2+的腫瘤

[3]低陽性：在<50%的腫瘤細胞中膜染色強度≤2+的腫瘤

基於組織微陣列分析的數據

實例2

抗B7-H4抗體的產生

【0481】採用多位點重複免疫（RIMS）策略，在該策略中如下使VelocImmune II小鼠（再生元公司（Regeneron），柏油村（Tarrytown），紐約州（NY））免疫：

- -4天：出血前
- 0天：初始免疫
- 7天：第二次加強
- 13天：第一次出血
- 15天：第三次加強
- 20天：第二次出血
- 22天：第四次加強
- 24天：第五次加強
- 28天：最後一次出血，以及spl和LN融合

【0482】對於免疫，將十六隻V2小鼠分成4組，每組含有4隻動物。用人和小鼠重組B7-H4以及SkBr3細胞（例如表現B7-H4）使動物免疫。免疫原的詳情可以在以下表3中找到（TT = 破傷風毒素；DTA = 白喉毒素；KLH = 鑰孔戚血藍蛋白）。

[表3].

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

融合瘤的產生

【0483】從10隻小鼠中收穫淋巴樣細胞，從第3隻和第9隻小鼠的細胞中富集B細胞，沒有對來自其他8隻小鼠的細胞進行選擇。將淋巴樣細胞和Sp2/0 Ag14骨髓瘤細胞以5:1的比例混合，在無血清培養基中洗滌，並使用PEG手動地或藉由tecan機器人進行融合。融合後，將細胞重懸於200 ml完全HM20培養基中，並將100 µl添加到20個板的第1-11列中。3天後，再向每個孔中添加100 µl培養基。每隻小鼠的融合詳情如表4所示。

[表4].

小鼠	組	脾細胞 x 10^6	LN細胞 x 10^6	總計 x 10^6	% LNC	融合類型	選擇
1	1	57.72	13.78	71.50	19.27	Tecan	無
3	1	73.42	10.35	83.77	12.36	手動	B細胞
4	1	27.78	11.47	39.25	29.21	Tecan	無
5	2	67.92	23.45	91.37	25.66	Tecan	無
7	2	78.20	25.70	103.90	24.74	Tecan	無
9	3	62.47	11.98	74.45	16.09	手動	B細胞
10	3	53.43	5.25	58.68	8.95	手動	無
11	3	50.80	9.25	60.05	15.40	Tecan	無
13	4	41.33	11.98	53.30	22.47	手動	無
14	4	38.20	34.30	72.50	47.31	Tecan	無

融合瘤篩選和選殖

【0484】將融合後13天收穫的上清液藉由融合瘤組以及人、食蟹猴和小鼠B7H4 HTRF生化結合測定，在基於珠粒的IgG/IgM篩選中進行篩選，並在SkBr3 FMAT測定中藉由HTS進行篩選。

【0485】篩選後，挑出陽性命中，其中58個被選殖到半固體培養基中。使用ClonePix-FL從每個孔株系中挑選IgG陽性選殖，隨後在初級測定中進行篩選。然後從每個孔株系中挑選最多4個選殖，使其生長並進行小規模IgG純化（Phytip-蛋白A）。

【0486】在對Phytip材料進行生物篩選後，選擇了5種示例性抗體進行進一步表徵（其詳情可以在表5中找到）。

[表5].

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

【0487】ZY0EPQ-E02（及其種系化形式，例如由縮寫「GL」表示）包含SEQ ID NO: 1-3的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 4-6的CLDR1-3（分別）。ZY0EPQ-E02包含SEQ ID NO: 31的VH鏈和SEQ ID NO: 32的VL。

【0488】ZY0EQD-E02包含SEQ ID NO: 7-9的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 10-12的CLDR1-3（分別）。ZY0EQD-E02包含SEQ ID NO: 33的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL。ZY0EQD-E02的種系化形式在稍後例如藉由包含縮寫「GL」被稱為例如EQD-E02_GL（具有SEQ ID NO: 45的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL）。

【0489】 ZY0EOB-F05包含SEQ ID NO: 13-15的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 16-18的CLDR1-3（分別）。ZY0EOB-F05包含SEQ ID NO: 35的VH鏈和SEQ ID NO: 36的VL。

【0490】 ZY0EO5-E07包含SEQ ID NO: 19-21的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 22-24的CLDR1-3（分別）。ZY0EO5-E07包含SEQ ID NO: 37的VH鏈和SEQ ID NO: 38的VL。

【0491】 ZY0EP0-C07包含SEQ ID NO: 25-27的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 28-30的CLDR1-3（分別）。ZY0EP0-C07包含SEQ ID NO: 39的VH鏈和SEQ ID NO: 40的VL。

【0492】 將這5種示例性抗體重新格式化到人IgG1、人IgG1-TM（三重突變）和鼠IgG1骨架上。

【0493】 對這5種重新格式化的示例性抗體的序列分析顯示了ZY0EPQ-E02和ZY0EQD-E02以及選殖ZY0EOB-F05和ZY0EO5-E07之間的同一性（參見圖28）。

實例3

用選定選殖進行的抗原結合測定

【0494】 通過HTRF測定，使用人、食蟹猴和鼠B7-H4-Fc進行這5種示例性抗體（如鼠IgG1、人IgG1和人IgG1-TM）的濃度-效應結合。對於鼠IgG1抗體，使用與Dylight-649軛合的抗鼠IgG進行檢測。用人IgG1和IgG1-TM抗體進行類似的測定形式；然而，與Dylight-649軛合的抗人κ用於檢測。

【0495】 與對人或食蟹猴B7-H4-Fc的結合相比，抗體ZY0EPQ-E02和ZY0EQD-E02對鼠B7-H4-Fc具有更高的EC_{50}和更低的最大結合，這表明對鼠B7-H4的親和力較低。所有其他抗體對人、食蟹猴和鼠B7-H4-Fc都具有相似的EC50和最大結合（參見表6-8）。

[表6]. 使用人B7-H4-Fc得到的HTRF數據

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

[表7]. 使用食蟹猴B7-H4-Fc得到的HTRF數據

抗體	食蟹猴B7-H4-Fc					
	鼠IgG1		人IgG1		人IgG1-TM	
	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值
ZY0EPQ-E02	0.38	2236	0.33	987	0.35	934
ZY0EQD-E02	0.22	2494	0.28	1127	0.28	1100
ZY0EOB-F05	0.32	2398	0.14	1483	0.15	1483
ZY0E05-E07	0.71	1698	0.18	1359	NT	NT
ZY0EP0-C07	1.28	1247	0.33	946	0.39	890

[表8]. 使用鼠B7-H4-Fc得到的HTRF數據

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

結合親和力測量

【0496】使用ForteBio Octet系統測量抗體對人、鼠和剪接變體B7-H4 ECD的親和力。人IgG1-TM抗體被蛋白G捕獲，並測量了單體物質B7-H4-FLAG ECD與該抗體的結合。對人B7-H4的親和力在10-25 nM範圍內，而對鼠的親和力在10-600 nM之間。除ZY0EP0-C07以外的所有抗體都可以結合剪接變體，親和力在200-1600 nM之間。動力學結合數據匯總於以下表9中。

[表9].Octet親和力匯總

		hIgG1-TM（n=4-7）			hIgG1（n=1）		
抗體	蛋白質	KD（nM）	kon（1/Ms）	kdis（1/s）	KD（nM）	kon（1/Ms）	kdis（1/s）
ZY0EPQ-E02	人B7-H4	25.7	7.09E+04	1.82E-03	24	8.59E+04	2.08E-03
	鼠B7-H4	396	7.67E+04	3.04E-02	498	1.00E+05	4.98E-02
	B7-H4-SV	1660	1.38E+03	2.29E-03	1030	2.46E+03	2.52E-03
ZY0EQD-E02	人B7-H4	14.4	1.93E+05	2.78E-03	14.9	2.16E+05	3.21E-03
	鼠B7-H4	621	2.03E+05	1.26E-01	625	3.41E+05	2.13E-01
	B7-H4-SV	801	3.36E+03	2.69E-03	834	4.19E+03	3.49E-03
ZY0EOB-F05	人B7-H4	13.4	2.65E+04	3.55E-04	11.7	3.10E+04	3.62E-04
	鼠B7-H4	25	1.87E+04	4.76E-04	19.8	2.49E+04	4.93E-04
	B7-H4-SV	174	3.35E+03	5.84E-04	127	4.71E+03	5.98E-04
ZY0E05-E07	人B7-H4	19.8	1.71E+04	3.38E-04	14.6	2.17E+04	3.18E-04
	鼠B7-H4	30	1.21E+04	3.61E-04	23.2	1.79E+04	4.15E-04
	B7-H4-SV	264	1.89E+03	4.99E-04	182	2.91E+03	5.28E-04
ZY0EP0-C07	人B7-H4	9.4	4.16E+04	3.97E-04	7	4.88E+04	3.63E-04
	鼠B7-H4	11	4.30E+04	5.24E-04	9	6.02E+04	5.51E-04
	B7-H4-SV	無結合			無結合		

表位分組

【0497】使用結合單體B7-H4-FLAG ECD、與DyLight-649軛合的示例性抗體（IgG1-TM）以HTRF測定形式進行表位分組，並用銪軛合的抗FLAG抗體進行檢測。

【0498】 組1被定義為ZY0EPQ-E02、ZY0EQD-E02和ZY0E05-E07抗體完全相互抑制，並且僅部分抑制ZY0EPO-C07。組2被定義為ZY0EOB-F05抗體與所有抗體完全競爭並且所有抗體與其完全競爭。組3被定義為ZY0EP0-C07與抗體ZY0EPQ-E02、ZY0EQD-E02和ZY0E05-E07（組1）部分競爭。

[表10].HTRF表位匯總表

競爭抗體	Dy649軛合的抗體				
	ZY0EPQ-E02	ZY0EQD-E02	ZY0EOB-F05	ZY0EO5-E07	ZY0EP0-C07
ZY0EPQ-E02	**完全**	完全	完全	**未測試**	部分
ZY0EQD-E02	完全	**完全**	完全		部分
ZY0EOB-F05	完全	完全	**完全**		完全
ZY0EO5-E07	完全	完全	完全		部分
ZY0EP0-C07	部分	部分	完全		**完全**

物種交叉反應性ELISA

【0499】 測試上述5種VelocImmune來源的抗B7-H4示例性抗體中的每一種與內部來源的鼠B7-H4（ECD）的結合。所有示例性抗體均作為人IgG1-TM以及4/5鼠IgG1進行測試（此時，ZY0EP0-C07不可用作鼠IgG1）。比較了與單體和二聚體鼠和人B7-H4變體的結合（分別標記了FlagHis10或FcHis6）。

【0500】 無論哪種同種型，所有IgG均保留對鼠和人B7-H4抗原的交叉反應性。二聚體性質的、FcHis6標記的B7-H4抗原產生的結合曲線均勻地移動到由相應單體FlagHis10 B7-H4抗原提供的那些曲線的左側。這種效果對於鼠B7-H4更為顯著。

【0501】 使用任何VelocImmune示例性抗體未觀察到與無關抗原對照的顯著結合。同種型對照IgG不與B7-H4抗原非特異性結合（NIP228 - 人IgG1-TM，以及MOPC-21 - 鼠IgG1） - 參見圖2。

商用抗B7-H4多選殖和單選殖特異性ELISA

【0502】藉由ELISA測試了一組商用單選殖和多選殖抗血清與人和鼠B7-H4抗原的結合。還測試了每種抗血清與截短的人B7-H4剪接變體（基本上缺少其細胞外IgV結構域）的結合。無論使用FlagHis10還是FcHis6 B7-H4抗原，都獲得了等效數據。表11和12中匯總了不同的交叉反應性概況。

[表11].單選殖

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

[表12].多選殖

			B7-H4		
公司	***目錄號***	***批號***	***人***	***鼠***	***剪接變體***
Santa Cruz	sc68872 (H108)	L1008	Y	Y	n/a
Santa Cruz	sc68254 (G-18)	C1910	N	N	n/a
R & D	AF2154	WVP016011	Y	Y	Y
Abbiotec	250473	10051104	N	N	n/a
Sigma Aldrich	SAB2500141	7942P1	Y	Y	N

B7-H4同源物特異性ELISA

【0503】測試了五個選定的選殖（VelocImmune IgG）中的每一個與B7-H4家族成員和同源物的非特異性結合（鼠IgG1 ZY0EP0-C07可用於測試）。藉由使用人B7-H4的ECD作為測試序列進行BLASTP搜索來指導選擇要測試的抗原。然後使用CLUSTALW分析對來自該列表的有利命中進行比對，並且獲得在一級胺基酸水平顯示最高同一性百分比的那些抗原（參見表13）。

[表13].

同一性百分比

差異	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1		132	215	214	259	216	207	254	252	258	1	人 B7-H4 ECD pro
2	3770		117	121	131	103	110	137	97	84	2	人 MOG1 pro
3	2290	4260		192	278	215	201	182	181	138	3	人 B7-H1 pro
4	2290	4140	2550		212	208	177	214	182	134	4	人 B7-H2 pro
5	1905	3770	1749	2310		256	195	234	241	201	5	人 B7-H3 pro
6	2280	4980	2290	2360	1925		423	458	348	150	6	人 BTN1A1 pro
7	2380	4610	2440	2790	2530	1030		410	336	158	7	人 BTN2A1 pro
8	1944	3620	2700	2290	2090	919	1076		325	175	8	人 BTN3A2 pro
9	1964	5380	2710	2700	2030	1337	1393	1453		118	9	人 BTNL3 pro
10	1913	6610	3600	3680	2450	3300	3110	2820	4260		10	人 HHLA2 pro
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

【0504】 五種示例性抗體不與同源物huB7-H1、huB7-H2、huB7-H3、huBTN1A1、huHHLA2或huBTN3A2以可測量的程度結合，而無論哪種抗體同種型。請注意，在測試huMOG1、huBTN2A1或huBTNL3抗原時未觀察到結合（參見圖3）。

細胞上蛋白質印跡結合分析

【0505】 使用Accutase將細胞從T175燒瓶上分離，並對其計數。所使用的轉染方法基本上是Invitrogen Lipofectamine LTX方案（使用反向轉染方法的高通量方案）中所述之方法。將100 µl細胞（4.5 x 10^4個/100 µl）添加到含有DNA-脂質體轉染混合物的96孔板中。將板在37°C孵育18小時，並使用10%緩衝福馬林固定過夜。將板用Odyssey封閉緩衝液封閉，與適當的第一抗體一起孵育過夜，然後洗滌並用適當的Odyssey第二抗體進行檢測。

【0506】 將板風乾，並使用Odyssey成像儀、使用製造商提供的推薦掃描水平進行掃描。

【0507】 QD-E02和PQ-E02具有高水平的非特異性結合，因此抗體以超出對照抗體（泳道E、U、R、S）的方式出人意料地結合廣泛的細胞類型 - 參見圖

4。OB-F05和O5-E07對轉染的HEK產生良好的結果，並且還與轉染的CHO結合。示例性抗體QD-E02、OB-F05和O5-E07以及PQ-E02與OVCAR4細胞結合。

概述

【0508】 表14顯示了五種示例性抗體的特性的匯總。

[表14].

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

實例4

藉由流動式細胞分析術篩選用於B7-H4表面表現的細胞系

【0509】 已使用示例性抗體和/或商用抗B7-H4抗體測試出以下人細胞系對B7-H4表現呈陽性（相對B7-H4表現水平由「+」表示）：

- SK-BR-3（+++）
- T47D（+）
- MDA-MB-468（++）

- OVCAR4（+++）
- NIH:OVCAR3（+）
- Calu-3（+）

【0510】以下人細胞系已被測試為陰性：NCI-H322、Raji（+/- IFNg激活）、Ramos（+/- IFNg激活）和Du145。

實例5

體外細胞毒性測定

【0511】表現B7-H4的細胞系對五種人IgG1-TM示例性抗體的內化已經藉由實驗得到證實（SK-BR-3、MDA-MB-468、OVCAR4和JumpIn CHO Fl-B7H4）。使用皂草素軛合的抗人IgG第二抗體證明了五種IgG1-TM示例性抗體的ADC細胞毒性（參見圖5）。20 μg/ml『單獨抗體』對照下的細胞活力約為100%。

實例6

選殖ZY0EQD_E02特異性ELISA

【0512】由於選殖ZY0EQD_E02的優越性能，選擇該選殖進行更詳細的分析。ZY0EQD_E02包含SEQ ID NO: 7的CHDR1；SEQ ID NO: 8的CHDR2；SEQ ID NO: 9的CHDR3；SEQ ID NO: 10的CLDR1；SEQ ID NO: 11的CLDR1；SEQ ID NO: 12的CLDR1。所述選殖包含SEQ ID NO: 33的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL鏈。所述選殖包含SEQ ID NO: 48的重鏈和SEQ ID NO: 44的輕鏈。種系化形式（E02-GL）包含SEQ ID NO: 45的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL鏈；例如，SEQ ID NO: 51的重鏈和SEQ ID NO: 44的輕鏈。

【0513】進行ELISA分析以確定與來自人（包括剪接變體）、食蟹猴（cyno）、小鼠和大鼠的B7-H4的結合。所述物種中的人B7-H4的序列同一性百分比為：結構域FL - 食蟹猴（98.6%）；兔（91.6%）；小鼠（87.9%）；大鼠

（86.9%）；結構域ECD - 食蟹猴（99.6%）；兔（94.3%）；小鼠（90%）；大鼠（89.6%）。

【0514】 測試選殖的Maia形式mAb（例如，包含C插入，如例如SEQ ID NO.: 41所示）的結合。測定了野生型以及多種變體（種系化（GL）、GLQ、GLY），連同作為對照的R347-maia人IgG1（參見圖6）。

【0515】 R347-maia同種型對照顯示不與任何測試的抗原結合。E02-maia結合概況與之前的實驗相似。E02-maia和E02-GL-maia具有相似的結合概況。有利地，這證明了種系化（GL）和非種系化（例如WT）形式的抗體都保留了該抗體的有利結合特性/概況。

實例7

E02-GL的結合與mAb「1D11」的結合的比較

【0516】 藉由ELISA，將種系化的選殖ZY0EQD_E02（在此稱為E02-GL）的結合親和力與已知的抗B7-H4抗體「1D11」（基因泰克公司（Genentech）；描述於WO 2016040724中，將其藉由引用併入本文）的結合親和力直接比較（參見上面的材料與方法）。

【0517】 「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。例如，該等實例中的E02-GL包含SEQ ID NO: 45的VH鏈序列，例如SEQ ID NO: 43的種系化形式。

【0518】 直接比較表明，選殖E02-GL比1D11表現出顯著更好的結合（親和力）（參見圖7）。與實例7一致，R347-maia同種型對照顯示不與任何測試的抗原結合。

【0519】 此外，與1D11相比，E02-GL顯示（通過流動式細胞分析術實驗，參見上文材料與方法）與癌細胞上表現的B7-H4具有更好的結合。因此，E02-GL不僅表現出優異的結合，而且還表現出優異的癌細胞靶向性。測試了與

表現hB7-H4的HT29細胞和SK-BR-3細胞（表現B7-H4）的結合。測試了濃度為31 ng/ml、156 ng/ml和78 ng/ml的抗體的結合。HT29細胞的結果如圖8A所示，SK-BR-3細胞的結果如圖8B所示。符號◊表示『E02-GL部分』，符號□表示『1D11部分』。符號「●」表示（陰性）對照『R347組分』。

【0520】 從圖8A-8B中可以看出，「E02-GL部分」中染色的細胞數量明顯高於「1D11部分」中染色的細胞數量。

實例8

Ad293細胞的體外細胞毒性，

在有和沒有B7-H4轉染的情況下（E02-GL-SG3932）

【0521】 選殖E02-GL以平均藥物抗體比率（DAR）為8軛合至拓撲異構酶I有效載荷SG3932（提供E02-GL-SG3932），並測試了靶向和殺死人B7-H4轉染的和未轉染的Ad293細胞的能力（例如，後者代表陰性對照）。將軛合至SG3932的抗體NIP228用作對照。轉染的細胞很容易被E02-GL-SG3932軛合物（其IC50為53.3 ng/ml）靶向並殺死（參見圖9A）。在未轉染的細胞中未觀察到添加E02-GL-SG3932軛合物後的顯著殺傷作用（參見圖9B）。在本文描述的涉及軛合至拓撲異構酶抑制劑的E02-GL的所有實驗中，所使用的E02-GL選殖通常具有SEQ ID NO.: 51的重鏈序列。

方法：

【0522】 藉由TrypLE Express（Gibco公司，佩斯利，英國）使細胞系從組織培養瓶中分離，藉由離心使其沈澱，並重懸於生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）中。藉由台盼藍排除法、使用Vi-CELL XR細胞活力分析儀（貝克曼·庫爾特生命科學公司（Beckman Coulter Life Sciences），印弟安納波里斯（Indianapolis），印第安那州（Indiana））對活細胞進行計數。在生長培養基中將細胞密度調整為3.33 x10^4個細胞/mL。將75 μL/孔的細胞懸液（2.5x10^3個細

胞）添加到96孔白壁透明底部組織培養處理板中，並在37°C、5% CO_2下在加濕的組織培養箱中培養過夜。

【0523】將ADC（例如，NIP228-SG3932和E02-GL-SG3932）稀釋到生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）中，濃度為240 μg/mL。在生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）中製備五倍連續稀釋液，然後將25 μL添加到培養的細胞的一式三份孔中，同時九點、五倍連續稀釋抗體（例如，NIP228-SG3932或E02-GL-SG3932）。將25 μL/孔的生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）添加到模擬處理的對照細胞中。將細胞在加濕的組織培養箱中於37°C、5% CO_2下培養六天，此時根據製造商的方案使用CellTiter-Glo®測定（普洛麥格公司，南安普敦，英國）評估細胞活力。使用Envision多標籤酶標儀（珀金埃爾默公司，Seer Green，英國）測量發光。藉由使用第8版GraphPad Prism（GraphPad軟體公司，拉荷亞，加利福尼亞州）中的非線性回歸模型 [log促效劑相對於響應 - 可變斜率（四個參數）]產生半數最大抑制濃度（IC50）值來測定測試品抗體（例如，NIP228-SG3932或E02-GL-SG3932）的效力，並表示為相對於模擬處理的對照細胞的細胞活力百分比 - ([(處理的細胞 - 背景) / (模擬處理的對照細胞 - 背景)] x 100)。

實例9

E02-GL-SG3932引起體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0524】將HT29-huB7-H4選殖26靶標陽性細胞和GFP標記的HT29靶標陰性細胞（單獨鋪板或以1:1的比例混合鋪板並培養1天）用200 ng/mL E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932同種型對照ADC處理6天。在處理結束時，使用流動式細胞分析術測定活的GFP陰性HT29-huB7-H4選殖26細胞或GFP陽性HT29細胞的數量。結果示於圖10中：A) 點圖顯示了來自單獨或一起培養的HT29-GFP細胞和HT29+huB7-H4選殖26細胞的培養基處理樣本的處理結束時流動式細胞分

析術分析的代表性圖像。左上和左下象限中顯示的數位分別反映了HT29-GFP細胞和HT29+huB7-H4選殖26細胞的百分比。B) 當單獨鋪板時，在用E02-GL-SG3932處理後在HT29+huB7H4選殖26細胞中觀察到細胞計數減少，這在靶標陰性HT29-GFP細胞中未觀察到。當在共培養中鋪板細胞時，靶標陰性HT29-GFP細胞和靶標陽性HT29+huB7H4選殖26細胞的細胞計數均減少，這證明了旁觀者殺傷作用。

方法：

【0525】 使用慢病毒表現系統製備穩定表現綠色螢光蛋白（GFP）的HT29-GFP細胞系。將細胞以15,000個細胞/孔的總細胞密度鋪板在24孔板中，單獨培養或以1:1的比例混合培養1天。然後移除培養基並用單獨的新鮮培養基或含有200 ng/mL NIP228-SG3932 ADC或E02-GL-SG3932 ADC的培養基更換，並將細胞再孵育6天。在處理結束時，使用流動式細胞分析術和FlowJo軟體測定活的GFP陰性HT29+huB7-H4選殖26細胞或GFP陽性HT29細胞的數量。

實例10

E02-GL-SG3932引起體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0526】 將腫瘤細胞皮下植入8至10週齡的雌性SCID小鼠體內。當腫瘤達到適當的腫瘤體積範圍（通常為150-250 mm^3）時，將動物隨機分為治療組和對照組並開始給藥。通過靜脈內注射向荷瘤小鼠投與單劑量的測試品。每天觀察動物，每週測量並記錄腫瘤尺寸和體重兩到三次。結果示於圖11中。藉由卡尺測量腫瘤體積且使用以下公式計算腫瘤體積：腫瘤體積 = 長（mm） x 寬（mm）^{2}/2，其中長和寬分別為腫瘤的最長和最短直徑。

實例11

E02-GL-SG3932在患者源性異種移植

（PDX）模型中具有有效的體內活性

【0527】將腫瘤組織碎片皮下植入6至8週齡的雌性無胸腺裸小鼠體內。當腫瘤達到適當的腫瘤體積範圍（通常為150-300 mm^3）時，將動物隨機分為治療組和對照組並開始給藥。通過靜脈內注射向荷瘤小鼠投與單劑量的測試品。每天觀察動物，每週測量並記錄腫瘤尺寸和體重兩次。結果示於圖12中，並且表明E02-GL-SG3932在患者源性異種移植（PDX）模型中具有有效的體內活性。藉由數顯卡尺測量腫瘤體積且使用以下公式計算腫瘤體積：腫瘤體積 = 長（mm） x 寬（mm）^{2} x 0.52，其中長和寬分別為腫瘤的最長和最短直徑。

【0528】圖13顯示了藉由確定處理後腫瘤體積變化進一步評估對E02-GL-SG3932的體內抗腫瘤響應的結果，再次證明了E02-GL-SG3932在單次i.v.注射後在PDX模型中的抗腫瘤活性。處理開始時的腫瘤體積稱為初始腫瘤體積（ITV）；對ADC處理顯示最大響應時的腫瘤體積稱為最終腫瘤體積（ETV）。如果ETV小於ITV，則如下計算抗腫瘤響應：[(ETV-ITV)/ITV] x 100。否則，抗腫瘤響應表示為處理組相對於媒介物對照組的腫瘤體積變化百分比：100-[1-((ETV-ITV)處理/(ETV-ITV)媒介物) x 100]。

實例12

E02-GL-topo I抑制劑ADC

在體外和體內MX-1細胞模型和HT29源性模型中具有相似的效力

MX-1模型

【0529】MX-1異種移植模型在冠科生物技術公司（Crown Biosciences）（太倉，中國）中進行。該研究係根據CRO和阿斯利康IACUC指南進行的。將MX-1腫瘤細胞在37ºC、在空氣中5% CO2氛圍下、在補充有10%胎牛血清的RPMI-1640培養基中保持體外培養。收穫呈指數生長的細胞並將5×10^6個細胞（在0.1 ml體積的PBS:基質膠 = 1:1中）植入雌性BALB/c裸小鼠的右腹。在處理開始之前，立即使用「匹配過分佈」隨機化方法（Study Director™軟體）將小

鼠隨機分到治療組中（平均腫瘤體積 = 153 mm^3）。在投與前，將所有抗體-藥物軛合物立即在緩衝液（25 mM組胺酸、7%蔗糖、0.02% PS80、pH 6.0）中稀釋。以單次i.v.劑量投與ADC。每週記錄兩次腫瘤和體重測量結果，並使用等式長度（mm） x 寬度（mm）^{2}/2計算腫瘤體積。每天監測動物的發病率和死亡率。結果示於圖14A中。

HT29+huB7-H4（選殖4）

【0530】 將HT29+huB7-H4選殖4細胞系在37ºC、在空氣中5% CO^2氛圍下、在補充有10%胎牛血清的McCoy's改良5A培養基中保持體外培養。收穫呈指數生長的HT29+B7-H4選殖4細胞並將5×10^6個細胞（在0.2 ml體積的PBS:Cultrex = 1:1中）植入雌性CB-17 SCID小鼠的右腹。在處理前，立即使用「確定性」隨機化方法（Study Director™軟體）將小鼠隨機分到治療組中（平均腫瘤體積 = 250 mm^3）。在投與前，將所有抗體-藥物軛合物立即在緩衝液（25 mM組胺酸、7%蔗糖、0.02% PS80、pH 6.0）中稀釋。以單一劑量i.v.投與ADC。每週記錄兩次腫瘤和體重測量結果，並使用等式長度（mm） x 寬度（mm）^{2}/2計算腫瘤體積。每天監測動物的發病率和死亡率。結果示於圖14B中。

實例13

食蟹猴B7-H4轉染的細胞的體外細胞毒性（E02-GL-SG3249）

【0531】 將選殖E02-GL軛合至細胞毒素SG3249（提供E02-GL-SG3249），並測試其靶向和殺死食蟹猴B7-H4轉染的細胞和未B7-H4轉染的細胞的能力。為方便起見，使用此實例中測試的包含Maia重鏈骨架（例如，具有半胱胺酸插入，這提供了SG3249可軛合的額外位點，參見SEQ ID NO: 48）的抗體。在使用其他重鏈骨架（例如，缺少這種半胱胺酸插入，例如參見SEQ ID NO: 52）的情況下不會發生功效損失。將軛合至SG3249的抗體R347用作對照。

【0532】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。例如，該等實例中的E02-GL包含SEQ ID NO: 45的VH鏈序列，例如SEQ ID NO: 43的種系化形式。

【0533】轉染的細胞很容易被E02-GL-SG3249軛合物（其IC50為0.6721 ng/ml）靶向並殺死。在未轉染的細胞中未觀察到添加E02-GL-SG3249軛合物後的顯著殺傷作用（參見圖15）。

實例14

E02-GL作用方式

監測E02-GL在活細胞中的內化動力學

【0534】使用軛合至螢光標記物AF647的E02-GL處理活細胞。在處理後0 min時，在細胞膜上注意到螢光簇（表明與膜上存在的B7-H4結合）。時程分析表明，細胞內螢光點的數量隨時間穩定增加，這表明抗體與受體抗原一起內化。與Lamp1-AF488（溶酶體的標記物）的共同視覺化顯示出顯著的重疊，這表明所結合的抗體藉由胞吞作用被內化（參見圖16A-16C）。

【0535】在與靶抗原結合後觀察到的抗體的內化係非常有利的，因為這種內化通常被認為是實現所需ADC效果的先決條件。

【0536】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。例如，該等實例中的E02-GL包含SEQ ID NO: 45的VH鏈序列，例如SEQ ID NO: 43的種系化形式。

E02-GL-SG3932 ADC：作用機制

【0537】在用NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932、E02-GL-SG3932、或彈頭SG3924（作為對照）（mAb或ADC為10 ug/ml，彈頭為10 nM）處理HT29+huB7-H4選殖26細胞後，製備裂解物並用針對pATR、ATR、pChk1、Chk1、pATM、ATM、pChk2、ChK2、pH2AX、H2AX和肌動蛋白（上樣對

照）的抗體進行蛋白質印跡分析 - 參見圖17A。結果表明E02-GL-SG3932的拓撲異構酶I毒彈頭（SG3924）激活ATM和ATR傳訊，這表明E02-GL-SG3932處理導致體外雙鏈DNA斷裂。

【0538】 在用NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932、E02-GL-SG3932、或彈頭SG3924（作為對照）（mAb或ADC為10 ug/ml，彈頭為10 nM）處理MX-1細胞後，製備裂解物並用針對pATR、ATR、pATM、ATM、pH2AX、H2AX和肌動蛋白（上樣對照）的抗體進行蛋白質印跡分析 - 參見圖17B。結果表明E02-GL-SG3932的拓撲異構酶I毒彈頭（SG3924）激活ATM和ATR傳訊，這表明E02-GL-SG3932處理導致體外雙鏈DNA斷裂。

方法：

【0539】 將HT29+huB7-H4選殖26和MX-1細胞分別以500,000個和1,500,000個細胞/孔的密度鋪板在6孔板中的含有10%熱滅活FBS的培養基中。第二天，去除鋪板培養基，並將細胞與HT29+huB7-H4選殖26細胞、NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932和E02-GL-SG3932（濃度為10 μg/mL）在完全培養基中一起孵育。將10 nM的彈頭SG3924用作對照。72小時後，將細胞用磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）洗滌一次，然後藉由添加Laemmil還原緩衝液（上樣緩衝液，波士頓生物產品公司（Boston BioProducts））進行裂解。短暫孵育後，收集細胞裂解物，將等量的細胞裂解物載入到Bis NuPAGE Novex Bis-Tris凝膠（英傑公司）上，並將蛋白質轉移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（英傑公司）上。用5%脫脂奶粉和在Tris緩衝鹽水（pH 7.4）中的0.1%吐溫20（西格馬公司）（TBST）封閉膜，並在4°C與來自細胞傳訊公司（Cell Signaling）的針對pATM-Ser1981（#4526）、ATM（#2873）、pATR-Thr1989（#58014）、ATR（#13934）、pChk1-Ser345（#2348）、Chk1（#2360）、pChk2-Thr68（#2197）、Chk2（#3440）pH2AX-Ser139（#2577）和H2AX（#2595）的抗體

一起孵育過夜。使用針對肌動蛋白的抗體（A1978，西格瑪公司）以確保在所有孔中載入等量的蛋白質。將膜在於TBS中的0.1%吐溫20中洗滌，然後與山葵過氧化物酶（HRP）軛合的鏈黴抗生物素蛋白第二抗體（GE醫療集團（GE Healthcare））一起孵育1小時。洗滌後，藉由使用SuperSignal West Femto化學發光底物和SuperSignal West Pico化學發光底物（皮爾斯公司（Pierce）/賽默科學公司（Thermo Scientific））檢測蛋白質條帶。使用ImageQuant LAS4000儀（GE醫療集團）捕獲和分析圖像。

E02-GL-SG3249 ADC：作用機制

【0540】在用E02-GL-SG3249、以及SG3199（作為對照）（分別為100 ng/ml和100 pM）處理HCC1569細胞後，製備裂解物並使用針對以下的抗體進行蛋白質印跡分析：pATR、ATR、pChk1、Chk1、pRPA32、RPA32、pATM、ATM（均參與ATR傳訊），pChk2、ChK2、pKAP1、KAP1（均參與ATM傳訊），pDNA-PK、DNA-PK、pH2AX、H2AX、pBRCA1、BRCA1（均參與DNA雙鏈斷裂），pFANCD2和GAPDH（上樣對照）。陰性對照係僅PBS處理。

【0541】結果表明E02-GL-SG3249的PBD二聚體彈頭（SG3199）激活ATM和ATR傳訊，這表明E02-GL-SG3249處理導致體外雙鏈DNA斷裂（參見圖17C）。

半胱天冬酶3/7活性

【0542】將SKBR-3細胞用E02-GL-SG3249、SG3199和奧拉帕尼（對照）處理，並藉由IncuCyte監測半胱天冬酶3/7活性（例如細胞凋亡）。觀察到半胱天冬酶3/7活性水平的劑量依賴性增加（參見圖18）。

實例15

E02-GL-SG3249和彈頭SG3199對腫瘤細胞的體外活性

【0543】將多種癌細胞系用選殖E02-GL-SG3249（例如，軛合至細胞毒素）處理，如表15所示。結果示於圖19中。

[表15].

細胞系	注釋	E02-GL MESF
HT29	B7-H4陰性	2,101
HT29 hB7H4選殖4		71,928
HT29 hB7H4選殖44		147,125
HT29 hB7H4選殖26		429,398
HEK293 JI親本	B7-H4陰性	3,266
HEK 293 JI hB7H4池	在池中有一些陰性細胞	2,481,266
HCC1954		47,173
SKBr3		78,343
Zr75-1		80,699
HCC1569		112,608
MDA-MB-468		92,157
OVCAR4		261,997

實例16

E02-GL-SG3249引起體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0544】將HT29 B7-H4表現細胞用E02-GL-SG3249處理4天，之後取出條件培養基並添加到HT29 WT（即，不表現B7-H4）中。在添加條件培養基後觀察到細胞活力快速降低，這在未處理的對照中未觀察到（參見圖20）。

【0545】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

實例17

E02-GL-SG3249抑制腫瘤異種移植物的生長

【0546】使用以下癌細胞系在小鼠上製備腫瘤異種移植物：

- OVCAR4（順鉑難治性卵巢癌；B7-H4高表現）
- HCC1569（HER2陽性乳癌；異源性B7-H4表現）

- MDA-MB-468（三陰性乳癌；B7-H4低表現）

【0547】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0548】與對照（僅媒介物）相比，觀察到腫瘤體積顯著減少，令人驚訝地，這對於低水平表現B7-H4的TNBC腫瘤也是如此（參見圖22），表明E02-GL-SG3249在抑制腫瘤生長方面具有較高的效力。

實例18

E02-GL-SG3249引起體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0549】藉由共同移植表現B7-H4的HT29細胞系與不表現其的HT29細胞（1:1的比例）產生B7-H4異源性腫瘤。該等異種移植物的異源性並沒有阻止E02-GL-SG3249對它們的生長抑制，這一點很明顯（參見圖23）。這是非常有利的，因為發明人已經發現B7-H4會在腫瘤內異源表現。

實例19

與「1D11」相比，E02-GL ADC對表現B7-H4的細胞具有優越的體外細胞毒性

【0550】將選殖E02-GL（ZY0EQD_E02種系化的（GL））軛合至細胞毒素SG3249（提供E02-GL-SG3249 ADC）或AZ1508（提供E02-GL-AZ1508），並與Genentech「1D11」ADC（1D11與（A114C-）MMAE軛合）進行比較，比較其靶向和殺傷表現B7-H4的細胞的能力。

【0551】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0552】細胞毒性測定（參見上文材料與方法）表明，與1D11 ADC（1D11與（A114C-）MMAE軛合）相比，E02-GL ADC（E02-GL-SG3249）具有優越的細胞毒性效力 - 參見圖21。

【0553】如下進行ADC滴定：

1D11-A114C-MMAE	100 μg/ml	25 μg/ml	6.25 μg/ml	1.56 μg/ml	390 ng/ml	98 ng/ml	24.5 ng/ml	6.12 ng/ml	1.53 ng/ml	382 pg/ml
E02-maia-GL-SG3249	4 μg/ml	1 μg/ml	250 ng/ml	65 ng/ml	16 ng/ml	4 ng/ml	1 ng/ml	250 pg/ml	62.5 pg/ml	16 pg/ml

實例20

E02-GL-SG3249在患者源性異種移植

（PDX）模型中具有有效的體內活性

【0554】使用具有不同的B7-H4表現水平的癌細胞系生成患者源性異種移植模型，如表16中所述。在所有模型中都觀察到腫瘤生長受到抑制（參見圖24）。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

[表16].

模型	癌症類型	%腫瘤生長抑制（TGI）*
HBCx-10	乳癌（三陰性）	90
CTG-012	乳癌（三陰性）	90
HBCx-11	乳癌（三陰性）	80
T330	乳癌（三陰性）	70
HBCx-9	乳癌（三陰性）	70
T168	乳癌（HR+）	60
T272	乳癌（HR+）	30
CTG-1106	乳癌（三陰性）	30
CTG-052	乳癌（三陰性）	30
CTG-1086	卵巢癌	20
CTG-1153	乳癌（三陰性）	<10
CTG-0897	卵巢癌	<10
CTG-017	乳癌（三陰性）	<10
T226	乳癌（Her2+）	<10
CTG-0992	卵巢癌	0

* %腫瘤生長抑制（TGI），0.3 mg/kg E02-GL-SG3249與媒介物；最小二乘均數（LSM） & TGI = 100*(LSM媒介物 - LSM『E02-GL-SG3249』)/LSM媒介物
+++ = 高陽性表現；++和+ = 低陽性表現

實例21

E02-GL-SG3249在腫瘤異種移植物中引起雙鏈斷裂

【0555】 生成腫瘤異種移植模型（使用HCC1954細胞），並將其用E02-GL-SG3249處理。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0556】 然後進行免疫組織化學以確定處理後的γ H2AX（雙鏈斷裂的標誌物）。在E02-GL-SG3249處理後長達10天，觀察到γ H2AX陽性腫瘤細胞的數量增加（參見圖25）。

實例22

使用KinExA 3200分析E02_GL的親和力

【0557】 使用KinExA技術進行以下實驗，該實驗用於獲得選殖E02_GL抗B7H4 Fab與人B7H4的親和力（KD）的估計值。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0558】 在25℃，在5、10或45 nM固定濃度的Fab存在下，對一系列人B7H4濃度進行平衡過夜。在KinExA 3200上分析了該等濃度，並全域擬合了數據集（N曲線分析）。結果匯總在表17中。

[表17].

抗體	B7H4	K_D的最佳估計值	N曲線分析，注釋
E02_GL	人	1.2 nM	K_D = 1.21 nM，95%信賴間隔 = 0.556 - 2.22 nM。 62%的h B7H4具有表位活性，95%信賴間隔 = 51%-77%

【0559】 62%的h B7H4活性數字與Rmax計算以及E02_GL的基於Biacore的親和力評估非常匹配。

實例23

E02_GL結合B7-H4與mAb「1D11」結合B7-H4的比較

【0560】 對選殖E02_GL進行ELISA分析，以確定與人和小鼠B7-H4的結合。將結合直接與mAb 1D11（基因泰克公司）和R347同種型對照進行比較。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0561】 與小鼠B7-H4相比，E02_GL對人B7-H4顯示出更高的結合親和力（參見例如圖2E）。有利的是，與Genentech「1D11」 mAb（顯示出更弱的結合）相比，E02-GL顯示出對人B7-H4的結合（親和力）顯著更強，如藉由ELISA和FACs分析所證明的 - 分別參見圖7和圖8。事實上，Genentech「1D11」 mAb以與小鼠B7-H4相似的水平（低）結合人B7-H4（這表明與E02_GL相比，「1D11」對人蛋白質的特異性較低）。

實例24

顯示E02_GL的腫瘤定位的影像學研究

【0562】 體內成像研究按照材料與方法（上文）中所述地進行，即使用800CW標記的抗體（E02_GL）。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0563】 對於HT29，在第3、7、14天；對於CT26，在第3天和第7天，以及在第10天的p=0.06；對於4T1，在第7天，均觀察到與WT腫瘤相比，B7-H4 Ab（E02_GL）優先定位於表現B7-H4的腫瘤 - 參見圖26和27。

【0564】總輻射效率產生了最清晰的結果。當相對於腫瘤體積標準化時，觀察到類似的趨勢。

實例25

使用E02-GL-SG3249進行毒理學研究

【0565】將E02-GL-SG3249投與於雄性食蟹猴（N = 2/劑量水平）。該「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0566】未觀察到異常毒性，並且毒性與其他類似的PBD-ADC一致（藉由監測標準靶器官：腎、骨髓、皮膚；沒有證據表明與靶標有關的影響）。

藥理學研究

【0567】進行體外和體內藥理學研究以進一步表徵E02-GL抗體（E02-GL抗體及其抗原結合Fab中間體，後者在本文中稱為「E02-INT」）的作用和作用機制。E02-GL-SG3932 ADC -GL-SG3932係一種針對B7-H4的ADC，並且包含經由可裂解的馬來醯亞胺-PEG8-纈胺酸-丙胺酸連接子（可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子）軛合至TOP1i彈頭的抗B7-H4人IgG1κ單株抗體（即，E02-GL）。TOP1i彈頭在本文中稱為SG3924。TOP1i藥物通過硫代琥珀醯亞胺鍵聯與抗體中的天然半胱胺酸共價結合，每個抗體結合大約8個藥物（即，DAR為8）。E02-GL-SG3932 ADC的示意圖示於圖29A中。E02-GL-SG3932 ADC與競爭對手ADC的主要差異特徵示於如圖29B中。

【0568】E02-GL-SG3932的特症在下文闡述並在本文其他地方進一步描述：

- mAb E02-INT：與人和食蟹猴B7-H4的特異性結合（親和力分別為3.7 nM、3.94 nM）
- 彈頭SG3932

- 連接子-彈頭：可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932

體外研究

實例26

藉由免疫組織化學進行B7-H4表現譜分析

【0569】使用經驗證的IHC方案評估B7-H4的表現譜，以證明B7-H4在FFPE正常食蟹猴和人組織以及人腫瘤組織中表現。

【0570】B7-H4顯示在有限數量的正常人組織中表現，並且當存在時，通常在樣本的 < 10%的總細胞中表現（輸卵管和肺支氣管除外），僅限於導管或管狀上皮，並且主要位於腔頂膜上（表18）。在正常食蟹猴組織中檢測到類似的B7-H4表現譜（表2和表19），其中B7-H4顯示在有限數量的組織中表現，表現譜僅限於導管或管狀上皮並且主要位於腔頂膜和細胞質內。圖30顯示了在選定的正常人和食蟹猴組織中B7-H4的免疫組織化學染色的代表性圖像。

[表18]. B7-H4在人正常組織中表現的免疫組織化學結果

組織	**顯示B7-H4 IHC染色的供體數**	**顯示陽性B7-H4染色的組織的相對比例**	**強度[a]**	**細胞定位**	**詳情**
乳腺	6/6	< 10%	+/+++	腔m	導管上皮細胞
附睪	3/3	< 5%	++	腔m	導管中的腔膜
輸卵管	3/3	< 30%	++/+++	腔m	導管上皮染色
腎	11/11	< 5%	++/+++	腔m > c	腔膜和偶見小管中的一些細胞質染色
肝	2/3	1%	+/++	腔m	偶見小膽管的腔膜
肺 - 支氣管	7/7	< 20%	++/+++	腔m > c	支氣管上皮中的基底細胞和來自支氣管腺的偶見導管上皮

組織	**顯示B7-H4 IHC染色的供體數**	**顯示陽性B7-H4染色的組織的相對比例**	**強度[a]**	**細胞定位**	**詳情**
食管	1/3	1%	+	腔m	黏膜下腺中偶見上皮細胞的基底外側膜
卵巢	3/6	1%	+/++	c > m	顯示顆粒細胞的單個成熟卵母細胞
胰腺	8/8	< 5%	+/+++	腔m	泡心細胞（centroacinar cell）的腔膜和細胞質，以及間管的腔染色
垂體	3/3	< 5%	++/+++	m > c	中間部細胞中的偶見的定位細胞，其顯示在毛囊和Rathke's裂上皮細胞中的膠體的染色
前列腺	3/3	< 10%	++/+++	m > c	一些導管中的基底上皮細胞
精腺	3/3	< 10%	++/+++	腔m	幾個導管上皮細胞
皮膚	15/16	< 5%	++/+++	腔m	偶見汗腺導管上皮膜、毛囊上皮膜
輸尿管	3/3	< 5%	+/++	m > c	一些基底尿路上皮細胞中的細胞質染色
膀胱	8/8	< 10%	++/+++	腔m > c	尿路上皮細胞的頂端
所有其他組織均未顯示陽性B7-H4 IHC染色			腎上腺、主動脈、動脈、骨髓、腦、盲腸、結腸、十二指腸、眼睛、心臟、回腸、空腸、肺、淋巴結、神經、直腸、唾液腺、骨骼肌、脊髓、脾、胃、睪丸、胸腺、甲狀腺、舌、陰道		

c：細胞質；m：膜。

[a]所有染色的載玻片均由病理學家審查並評分，評估表現B7-H4的細胞比例、染色強度和染色的細胞定位。強度報告為弱（+）、

中等（++）或強（+++）。

【0571】使用IHC在一系列人腫瘤組織中評估B7-H4表現並由病理學家評分。表19詳述了人腫瘤組織表現的匯總，代表性圖像顯示在圖31中。

[表19]. B7-H4在人腫瘤組織中表現的免疫組織化學結果

腫瘤適應症	**具有高B7-H4+腫瘤的供體比例（%）[a]**	**具有低B7-H4+腫瘤的供體比例（%）[b]**	**具有陽性B7-H4+腫瘤的供體比例（%）[c]**	**具有B7-H4+腫瘤的供體的總比例（%）[d]**	**供體總數**
子宮內膜腺癌	42.4	45.5	6.1	93.9	66
乳癌（TNBC）	28.8	35.1	12.6	76.6	111
乳癌（ER+）	32.6	32.3	10.8	75.7	288
乳癌（HER2+）	46.7	23.3	13.3	83.3	30
卵巢癌（漿液性乳頭狀）	49.3	28.0	6.7	84.0	75
膽管癌	33.3	30.3	21.2	84.8	66
NSCLC-SCC	15.0	27.5	23.5	66.0	153

[a] 高B7-H4：含有50%至100%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本。

[b] 低B7-H4：含有5%至49%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本。

[c] 陽性B7-H4：含有1%至4%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本。

[d] 表示含有1%至100%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本的比例。

【0572】此實例表明B7-H4在多種類型的人癌症中表現，包括乳癌、膽管癌、子宮內膜癌、非小細胞肺癌鱗狀細胞癌和卵巢漿液性癌。

實例27

食蟹猴、恒河猴、小鼠和大鼠中人B7-H4與異種同源物的序列同源性比較

【0573】鑒定了人B7-H4的胺基酸序列，並與食蟹猴、恒河猴、小鼠和大鼠中的異種同源物進行比對。基於該等比對的結果計算同一性百分比。B7-H4在非人靈長類動物中非常保守；對於全長結構域區域和細胞外結構域區域，人B7-H4（hB7-H4）與食蟹猴（cyB7 H4）和恒河猴（rhB7-H4）分別具有98%和99%的序列同一性（圖32）。齧齒動物物種保守性較差；對於全長B7-H4，小鼠和大鼠B7-H4與hB7-H4分別具有87%和86%的序列同一性，與hB7-H4在細胞外結構域方面具有分別為90%和89%的序列同一性。

【0574】此實例證明，人和非人靈長類動物中B7-H4的高胺基酸序列同一性表明E02-GL-SG3932可能與食蟹猴和恒河猴B7-H4結合。相比之下，人、小鼠和大鼠B7-H4之間的胺基酸同一性比較低，這表明E02-GL-SG3932與鼠或大鼠B7-H4的結合不太可能。

實例28

E02-GL-SG3932在小鼠、大鼠、食蟹猴和人血清中孵育十五天後的穩定性

【0575】已知攜帶經由硫代琥珀醯亞胺與半胱胺酸連接的藥物的ADC在生理環境中會由於逆邁克爾反應而表現出一些藥物損失。該過程會再生用於軛合的半胱胺酸和攜帶馬來醯亞胺的藥物，從而隨著時間的推移降低ADC的DAR。這種去軛合過程係含有通過硫代琥珀醯亞胺與抗體連接的藥物的ADC的已知特性。

【0576】藉由免疫沈澱然後藉由還原逆相質譜法（rLCMS）評估E02-GL-SG3932在食蟹猴、小鼠和大鼠血清中的穩定性。測量結果表明，在小鼠、大鼠和食蟹猴血清中孵育後，E02-GL-SG3932發生低於20%的藥物損失，第15天時分別在小鼠、大鼠和食蟹猴血清樣本中，84.5%、83.5%和82.0%的SG3924仍然附著在E02-GL-SG3932上。藉由使用人B7-H4塗覆的樹脂進行免疫捕獲、然後

藉由rLCMS來評估E02-GL-SG3932在人血清中的穩定性。測量結果表明，在人血清中孵育後藥物損失不大，第15天時81%的SG3924仍附著在E02-GL-SG3932上。

【0577】 此實例表明藥物釋放的機制係藉由逆邁克爾反應去軛合而不是連接子裂解，這與藉由馬來醯亞胺與鏈間二硫化物包含的半胱胺酸胺基酸軛合而製備的其他ADC一致。

實例29

抗體中間體E02-INT Fab對重組B7-H4抗原的結合親和力

【0578】 藉由表面電漿共振（SPR）測定抗B7-H4抗體E02-INT Fab對重組人、食蟹猴和小鼠B7-H4變體的結合親和力。表20中顯示的解離常數（K_D）值證明E02-INT Fab以相似的親和力結合固定化的人和食蟹猴B7-H4。相比之下，E02-INT Fab對小鼠B7-H4抗原的親和力比對人B7-H4抗原的親和力低大約100倍。

[表20]. 藉由SPR測定的抗B7-H4抗體中間體E02-INT Fab對人、食蟹猴和小鼠B7-H4的結合親和力

物種	**K_D**
人	3.70 nM
食蟹猴	3.94 nM
小鼠	405（± 15） nM

Fab：抗原結合片段

實例30

E02-GL-SG3932對人FcRn和Fcγ受體的結合親和力

【0579】 藉由SPR評估E02-GL-SG3932對人FcRn和Fcγ受體的結合親和力。人FcRn對E02-GL-SG3932的穩態結合親和力（K_D）為4360 nM。E02-GL-SG3932對huFcγRI的平衡KD為4.35 nM。E02-GL-SG3932對huFcγRIIa、

huFcγRIIb、huFcγRIIIA-158V和huFcγRIIIA-158F的平衡K_D的範圍為3307至21640 nM。

實例31

抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932對重組人B7-H4抗原的結合親和力的比較

【0580】 為了評估拓撲異構酶1連接子-彈頭的軛合是否影響E02-INT抗體的結合特性，使用DELFIA-ELISA方法和SPR方法測量了E02-INT和E02-GL-SG3932的結合親和力。如圖33所示，DELFIA-ELISA測定的結果表明，E02-INT和E02-GL-SG3932與固定化的重組人B7-H4類似地結合，EC50值分別為1.98 nM和1.71 nM。還藉由SPR、使用抗體捕獲方法測定E02-INT和E02-GL-SG3932對人B7-H4抗原的動力學速率常數（k_{on}和k_{off}）和平衡解離常數（K_D）。如表21所示，E02-INT和E02-GL-SG3932與人B7-H4類似地結合，KD值分別為31.1 nM和29.3 nM。

[表21].藉由SPR測定的抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932對人B7-H4的結合親和力

種類	**K_a（$M^{-1}s^{-1}$）**	**K_d（s^{-1}）**	**K_D（nM）**	**R_{max}（RU）**
E02-INT	9.38×10^4	2.92×10^{-3}	31.1	56.8
E02-GL-SG3932	9.55×10^4	2.80×10^{-3}	29.3	49.7

RU：共振單位

【0581】 實例30和31的結果表明，E02-INT抗體的結合特性在與拓撲異構酶1連接子-彈頭軛合後保持不變。

實例32

抗體中間體E02-INT與表現人、食蟹猴或小鼠B7-H4的工程化HEK 293細胞的細胞結合

【0582】使用流動式細胞分析術測量抗體E02-INT與非轉導的HEK 293 Jump In TREX細胞和穩定表現人、鼠或食蟹猴B7-H4的HEK 293 Jump In TREX細胞的結合。抗體E02-INT結合穩定表現人、鼠和食蟹猴B7-H4的HEK 293 Jump In TREX細胞，但不結合B7-H4陰性非轉導的HEK 293 Jump In TREX細胞（圖34）。與表現人或食蟹猴B7-H4的細胞相比，與表現鼠B7-H4的HEK 293 Jump In TREX細胞的結合減少。

實例33

抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932與人乳癌細胞系以及與穩定表現人B7-H4的HT29細胞的細胞結合

【0583】使用流動式細胞分析術測量抗體E02-INT和E02-GL-SG3932與人乳癌細胞系MX-1和MDA-MB-468以及與穩定表現人B7-H4的工程化HT29大腸癌細胞的結合。如圖35所示，E02-INT和E02-GL-SG3932與穩定表現人B7-H4的HT29細胞（HT29-huB7-H4選殖4和HT29-huB7-H4選殖26）類似地結合，但不結合B7-H4陰性非轉導的HT29。E02-INT和E02-GL-SG3932還與MX-1細胞和MDA-MB-468細胞結合，這表明抗體中間體和ADC可以識別人癌細胞系中內源性表現的B7-H4。E02-INT和E02-GL-SG3932的結合係相當的。

【0584】實例32和33證明，親本抗體的細胞結合特性在與拓撲異構酶1連接子-彈頭軛合後保持不變。

實例34

E02-GL-SG3932的體外細胞毒性

【0585】使用CellTiter-Glo測定，使用靶標陰性人大腸癌細胞系HT29、工程化人大腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26和人乳癌細胞系MX-1來測定E02-GL-SG3932處理對細胞活力的影響。如圖36所示，E02-GL-SG3932對表現B7-H4的HT29-huB7-H4選殖26和MX-1細胞具有細胞毒性，IC_{50}值分別為0.036

μg/mL和0.029 μg/mL。相比之下，在B7-H4陰性HT29細胞系中，在E02-GL-SG3932和同種型匹配的對照ADC（NIP228-SG3932）之間沒有觀察到活性差異，這表明E02-GL-SG3932可以特異性殺傷表現人B7-H4的癌細胞。

實例35

E02-GL-SG3932的體外細胞毒性

【0586】 當IgG抗體經由其Fab結構域結合細胞表面抗原時，抗體的Fc部分可以與自然殺手細胞上的FcγRIIIa結合。Fc結構域與FcγRIIIa的相互作用誘導FcγR的交聯，從而觸發含有穿孔素和顆粒酶的細胞毒性顆粒的釋放，導致靶細胞死亡，這一過程稱為抗體依賴性細胞毒性（ADCC）。使用分離的原代人NK細胞和人乳癌SKBR3細胞系作為靶細胞來評估抗體E02-INT和E02-GL-SG3932激活ADCC活性的潛力。在該測定中，E02-INT和E02-GL-SG3932產生的ADCC活性均比未處理的共培養細胞顯著增加（圖36A-36C）。與E02-INT相比，E02-GL-SG3932的活性略有降低，但這種差異在統計學上不顯著，表明E02-INT和E02-GL-SG3932都可以引發體外ADCC活性。

【0587】 接下來，在1 μg/mL E02-GL-SG3932、抗體中間體E02-INT、同種型匹配的對照抗體NIP228和同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932存在下，將人乳癌SK-BR-3細胞與從六名健康供體中分離的NK細胞共培養（圖37）。藉由Incycte®膜聯蛋白V染料結合凋亡細胞上的細胞外表面暴露的磷脂醯絲胺酸、產生明亮且穩定的紅色螢光信號來評估ADCC活性。倍數變化基於非藥物處理的NK/SK-BR-3共培養細胞的最大細胞死亡。藉由將實驗孔中的平均紅色目標物除以星孢菌素處理的SK-BR-3細胞中的平均最大細胞死亡來計算最大細胞死亡。

實例36

抗體E02-INT的內化和溶酶體運輸

【0588】 使用定量活細胞成像測定在MX-1人乳癌細胞和過表現B7-H4的HT29 huB7-H4選殖26人大腸癌細胞中評估抗體E02-INT的內化和細胞內運輸特性。延時序列圖像顯示，在人乳癌（MX-1）和大腸癌（HT29-huB7-H4選殖26）細胞系中，強烈的E02-INT膜信號從0分鐘持續到120分鐘，E02-INT的內化到240分鐘時持續增加（圖38、圖39A和圖39B）。兩種細胞系的內化動力學測量結果顯示，HT29-huB7-H4選殖26和MX-1細胞的內化半衰期分別為127（± 35 SD）分鐘和102（± 18 SD）分鐘（圖39C）。

【0589】 使用共聚焦顯微鏡，藉由測量與早期內體標記物即早期內體抗原1（EEA1）和溶酶體標記物即溶酶體相關膜蛋白1（LAMP1）的共定位來確定E02-INT的細胞內運輸。如圖40所示，E02-INT在LAMP1修飾的亞細胞區室中富集，而與EEA1的共定位有限，這表明內化後，E02-INT被運輸到細胞的溶酶體區室中。

實例37

由E02-GL-SG3932和SG3924進行的DNA損傷響應傳訊的體外激活

【0590】 在用E02-GL-SG3932或其TOP1i彈頭SG3924處理後，使用蛋白質印跡來評估MX-1人乳癌細胞系和工程化大腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26中的DDR通路激活。如圖41所示，用10 μg/mL E02-GL-SG3932或10 nM SG3924處理MX-1細胞導致ATM傳訊通路的激活，明顯可見的是，ATM（Ser 1981）的磷酸化早在24小時時增加並在72小時的處理期內持續增加。類似地，E02-GL-SG3932和SG3924誘導了ATR的激活（Thr 1989磷酸化），在48小時和72小時的時間點觀察到。在處理24小時後觀察到γH2AX增加，並持續到72小時處理期，這表明DNA損傷。

【0591】 E02-GL-SG3932或其TOP1i彈頭對DDR傳訊的影響也在結腸直腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26（被工程化以表現B7-H4）中進行了檢查。如圖

42所示，用10 μg/mL E02-GL-SG3932或10 nM SG3924處理導致DDR傳訊通路的激活，這由ATR（Thr 1989）、其下游靶標Chk1（Ser 345）和Chk2（Thr 68）的磷酸化增加證明。這種磷酸化的增加在72小時的處理期內持續存在。類似地，在用E02-GL-SG3932和TOPli彈頭處理後，在48小時和72小時時間點觀察到ATM（Ser 1981）及其下游靶標KAP1（Ser 824）的激活。在處理48小時後觀察到γH2AX增加，並持續到72小時處理期，這表明DNA損傷。

【0592】 總之，該等結果證實，在兩種不同的細胞系中，E02-GL-SG3932激活了與其TOP1i彈頭的作用機制一致的DDR通路。

體內研究

【0593】 體外研究證明E02-GL-SG3932能夠以相似的親和力結合人和食蟹猴B7-H4，即E02-GL-SG3932特異性結合表現B7-H4的腫瘤細胞並且對其具有細胞毒性，並可以在分離的原代NK細胞共培養測定中引發適度的ADCC活性，即E02-GL-SG3932的抗體中間體（E02-INT）被內化到腫瘤細胞中並被運輸到溶酶體區室中，並且用E02-GL-SG3932或其TOP1i彈頭處理激活了表現B7-H4的細胞系中的DDR傳訊通路。為了進一步闡明E02-GL-SG3932的作用機制並確定該等體外發現是否轉化為抗腫瘤活性，使用了體內小鼠模型。

實例38

E02-GL-SG3932在HT29-huB7-H4選殖26異種移植模型中的藥效學研究

【0594】 在使用免疫缺乏CB-17 SCID小鼠的人腫瘤異種移植小鼠模型中評估E02-GL-SG3932處理後的藥效學作用。使動物皮下（SC）接種被工程化以表現人B7-H4的人大腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26，並且在腫瘤體積增長到大約250至300 mm3後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受E02-GL-SG3932或對照品的IV注射。在指定的時間點收集腫瘤，將其固定在10%中性緩衝福馬林中，隨後處理並嵌入石蠟塊中。使用IHC和圖像分析技術檢查腫瘤樣本中隨時間推

移的人IgG、γH2AX病灶、裂解的半胱天冬酶-3和上皮細胞密度。圖43A-43F顯示了在單次IV投與7 mg/kg E02-GL-SG3932或同種型匹配的對照ADC NIP228 SG3932後168小時收集的腫瘤中人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3的代表性IHC圖像。

【0595】 如圖44A-44D所示，在腫瘤細胞中觀察到E02-GL-SG3932隨時間推移的劑量依賴性積累，如藉由人IgG IHC測定所見的。E02-GL-SG3932的積累與γH2AX病灶的陽性染色增加相關，這預示了DNA損傷的誘導。與對照相比，在E02-GL-SG3932處理的腫瘤中，隨時間的推移觀察到裂解的半胱天冬酶-3升高和上皮細胞密度總體降低。

【0596】 總之，該等數據表明E02-GL-SG3932與腫瘤細胞上的B7-H4結合，引起DNA損傷和凋亡性細胞死亡。

實例39

E02-GL-SG3932在皮下人乳癌和大腸癌異種移植模型中的抗腫瘤功效，體內功效，PDX

【0597】 在使用免疫缺乏CB-17 SCID小鼠的人腫瘤異種移植小鼠模型中研究了抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。

HT29或HT29-huB7-H4選殖26異種移植模型

【0598】 首次在一對大腸癌細胞系異種移植模型中以兩項獨立的研究評估了E02-GL-SG3932；HT29係B7-H4陰性的，並且HT29-huB7-H4選殖26來自HT29細胞系並被工程化以表現人B7-H4。在這兩項研究中，使動物SC注射有HT29或HT29-huB7-H4選殖26細胞，並且在腫瘤體積增長到平均178 mm3（HT29）或194 mm3（HT29-huB7-H4選殖26）後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受E02-GL-SG3932或對照品的IV注射。如圖45A和45B所示，與媒介物處理的對照組相比，當以10 mg/kg的單次IV劑量投與時，E02-GL-SG3932和同種型

匹配的對照ADC NIP228-SG3932均未顯著抑制HT29異種移植腫瘤的生長，分別顯示12%（p = 0.7006）和14%（p = 0.6593）TGI。相比之下，與媒介物處理的對照組或同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932相比，當以5 mg/kg、2.5 mg/kg和1.25 mg/kg的單次IV劑量給藥時，E02-GL-SG3932顯著抑制HT29-huB7-H4選殖26異種移植腫瘤的生長（圖46A-46C），相對於媒介物的TGI分別為42%（p < 0.001）、37%（p = 0.0005）和31%（p = 0.0039）。

MX-1乳癌異種移植模型

【0599】 在MX-1乳癌異種移植模型中評估了E02-GL-SG3932、同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932和E02-INT（E02-GL-SG3932的抗體中間體）的作用。使動物SC注射有MX-1細胞，並且在腫瘤體積增長到平均270 mm3後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受測試品或對照品的IV注射。與媒介物處理的對照組相比，當以5 mg/kg、2.5 mg/kg和1.25 mg/kg的單次IV劑量給藥時，E02-GL-SG3932顯著抑制 MX-1異種移植腫瘤的生長（圖47A和47B），產生的TGI分別為100%（p < 0.001）、96%（p < 0.001）和98%（p < 0.001）。

【0600】 以10 mg/kg給藥的抗體中間體E02-INT沒有顯著抑制腫瘤生長（TGI = -1%，p > 0.9999）。在SCID小鼠中在這種高劑量水平下E02-INT活性的缺乏表明，ADCC可能不是體內E02-GL-SG3932活性的重要貢獻者，並且E02-GL-SG3932的抗腫瘤作用是通過其TOP1i彈頭驅動的。

MX-1和MDA-MB-468乳癌異種移植模型

【0601】 為了進一步闡明E02-GL-SG3932處理在體內的劑量依賴性效應，在MX-1和MDA-MB-468乳癌異種移植模型中評估了0.125 mg/kg至2 mg/kg範圍內的劑量水平。在這兩項研究中，使動物SC注射有MX-1或MDA-MB-468細胞，並且在腫瘤體積增長到平均大約138 mm3（MX-1）或120 mm3（MDA-MB-468）後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受E02-GL-SG3932或對照品的IV注

射。如圖48所示，單次靜脈內劑量的E02-GL-SG3932導致對MX-1異種移植物的劑量依賴性抑制。與第40天的未處理組相比，2 mg/kg、1.5 mg/kg和1 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932處理均導致100% TGI。0.75 mg/kg、0.5 mg/kg、0.25 mg/kg和0.125 mg/kg的E02-GL-SG3932劑量導致劑量依賴性%TGI分別為99.7%、80.1%、52.1%和-5.5%。類似地，單次靜脈內劑量的E02-GL-SG3932導致對MDA-MB-468異種移植物的劑量依賴性抑制（圖49）。與第55天的未處理組相比，2 mg/kg、1.5 mg/kg和1 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932處理分別導致97.7%、75.2%和66.6% TGI。0.75 mg/kg、0.5 mg/kg、0.25 mg/kg和0.125 mg/kg的E02-GL-SG3932劑量導致劑量依賴性%TGI分別為52.8%、58.4%、25.5%和31.8%。

實例40

E02-GL-SG3932在患者源性三陰性乳癌異種移植模型中的抗腫瘤功效

【0602】 在使用免疫受損的無胸腺裸小鼠的一組26個人TNBC PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。該等PDX模型係在沒有事先體外培養的情況下由人腫瘤樣本建立的，並且已經研究了其組織學、細胞遺傳學、遺傳標誌物和其他生物標誌物、以及它們對標準治療的響應。將腫瘤碎片皮下移植到小鼠體內，並且一旦腫瘤體積增長到大約94至189 mm3，將動物隨機分組，每隻小鼠接受劑量為1.25 mg/kg或3.5 mg/kg的E02-GL-SG3932或對照品的單次IV注射。為了評估B7-H4表現與功效之間的關係，從每個模型的另外3隻小鼠中收集了體積約為500至1183 mm3的新鮮未處理的腫瘤，將其固定在10%中性緩衝福馬林中，隨後處理並嵌入石蠟塊中。然後使用IHC和圖像分析技術來表徵B7-H4在每個模型中的腫瘤細胞膜上的表現。

【0603】 IHC分析表明，該等PDX模型代表了B7-H4的異源腫瘤表現，具有不同水平的IHC染色強度和腫瘤染色比例，包括一個具有幾乎不可檢測水平的B7-H4的模型（HBCx-15）（圖50）。

【0604】 在單劑量的1.25 mg/kg E02-GL-SG3932後觀察到腫瘤生長抑制，其中46.2%的模型（26個中的12個）表現出腫瘤體積從基線減小30%或更多（圖51）。其中，75%（12個中的9個）表現升高水平的B7-H4，H評分為100或更高（圖52A和52B）。對於1.25 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932，鑒定了H評分分類與響應者狀態之間的顯著相關性（費希爾精確檢驗，$p = 0.047$），這表明B7-H4水平升高與對1.25 mg/kg E02-GL-SG3932的處理的響應相關。

【0605】 與1.25 mg/kg劑量水平相比，單劑量的3.5 mg/kg E02-GL-SG3932後觀察到更大的抗腫瘤活性，其中69.2%（26個中的18個）的測試模型表現出腫瘤生長從基線降低30%或更多（圖53）。其中，66.7%（18個中的12個）表現升高水平的B7-H4，H評分為100或更高（圖54A和54B）。在此劑量水平下，H評分分類與響應者狀態之間的關聯性是統計學上不顯著的（費希爾精確檢驗，$p = 0.073$）。

【0606】 在此劑量水平下，還觀察到NIP228-SG3932同種型ADC的活性增加，其中5個模型（T330、BCX-017-LOP、T168、HBCx-15和HBCx-6）表現出腫瘤生長從基線降低30%或更多（圖53）。這5個模型有一個共同的特點；有缺陷的同源DNA修復，其被定義為存在BRCA1突變或RAD51病灶形成測定中的負評分，建議後者作為同源DNA修復能力的功能量度。

【0607】 此實例表明，在B7-H4表現水平升高且同源DNA修復有缺陷（其被定義為 (1) BRCA1突變的存在，(2) RAD51病灶形成測定中的負評分）的腫瘤中投與E02-GL-SG3932可減小腫瘤體積。圖53B-33E顯示在低劑量下，E02-GL-

SG3932響應與B7-H4表現水平和HR缺陷相關。在另一項研究中，以7 mg/kg處理的PDX模型顯示出高水平的同種型對照ADC活性（圖60A-60B和圖61）。

【0608】 此實例還表明，E02-GL-SG3932在HR缺陷型腫瘤和B7-H4升高的HR精通型腫瘤中顯示出強大的活性，並且HR缺陷型腫瘤對TOP1i產生的損傷更敏感且針對活性具有較低的B7-H4表現閾值。

實例41

E02-GL-SG3932在患者源性膽管癌異種移植模型中的抗腫瘤功效

【0609】 在一組37個人膽管癌PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。在預研究階段，對不同背景的雌性小鼠（無胸腺裸小鼠、Balb/c裸或NOD/SCID）植入人膽管癌PDX碎片，並使其長到大約1000-1500 mm3大小。然後收穫該等腫瘤並重新植入研究小鼠中。然後當腫瘤達到150-300 mm^3的平均腫瘤體積時，將動物按腫瘤體積匹配給處理組或對照組，並在第0天開始給藥。每隻小鼠接受劑量為1.25 mg/kg或3.5 mg/kg的E02-GL-SG3932或對照（未處理）的單次IV注射。圖55A-55G提供了第一個研究小組的結果。圖56A-56K中所示的結果提供了第二個研究小組的結果。

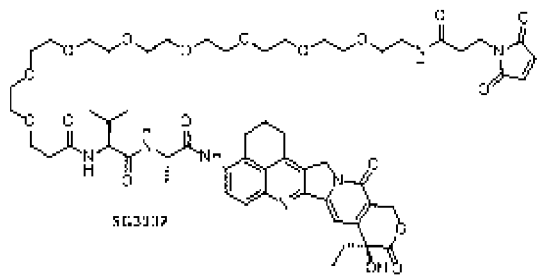
實例42

E02-GL-SG3932 TOP1i連接子-彈頭與更寬的治療指數（TI）有關

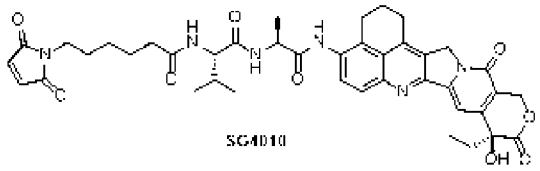
【0610】 對為E02-GL-SG3932選擇的AZ'0133連接子-彈頭進行了頭對頭比較研究，以確定SG3932彈頭與四種替代連接子的功效、藥物動力學和毒性。可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭ADC提供了最寬的相對TI，並且與基準相比具有優勢。下面提供了四種比較性連接子-彈頭。表22中提供了從比較研究中收集的數據。

比較性連接子-彈頭

E02-INT-可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932



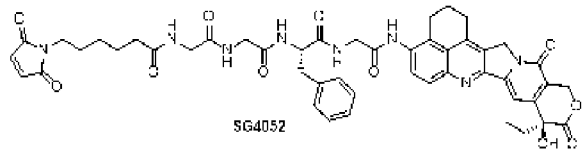
E02-INT-SG4010



E02-INT-SG4057



E02-INT-SG4052



[表22]：E02-INT抗體與四種替代連接子的功效、PK和毒性的頭對頭比較

研究

	E02-INT-SG3932	**E02-INT-SG4010**	**E02-INT-SG4057**	**E02-INT-SG4052**
連接子 + 彈頭	**mp-PEG8-Val-Ala-SG3932**	**mc-Val-Ala-SG3932**	**mp-PEG8-GGFG-SG3932**	**mc-GGFG-SG3932**
疏水性（HIC）、滯留時間（min）	3.41	3.37	3.76	3.53
體外血清穩定性（第15天與第0天的平均去軛合百分比）	24	68.4	28.4	69
體外細胞毒性 IC50 MX1 /	8.81 / 53.3	5.54 / 40.6	14.4 / 44.0	6.21 / 67.6

HT29選殖26（ng/mL）				
體內功效-MX-1，腫瘤停滯/30%消退的劑量（mg/kg）	0.57 / 1.27	0.83 / 1.18	0.92 / 1.02	1.02 / 1.85
體內功效-MDA-MB-468，腫瘤停滯/30%消退的劑量（mg/kg）	0.89 / 1.35	0.71 / 1.47	1.12 / 1.85	1.16 / 1.98
SCID小鼠PK - CL（ml/天/kg），在1.25 mg/kg下	11.3	20.4	14.6	19.0
大鼠PK - CL（ml/天/kg），在60 mg/kg（HNSTD）下	7.57	13.3	10.3	24.3
大鼠毒理學研究（20或60 mg/kg劑量後嚴重程度超過背景/對照的發現結果的數量）	1/7	3/7	3/7	4/7
MX-1中腫瘤停滯的相對TI MX-1中第7天30%腫瘤消退的相對TI	**152 68**	**101 71**	**82 45**	**44 39**

【0611】E02-GL-SG3932的mp-PEG8-Val-Ala- SG3932連接子-彈頭的性能優於每種比較物。當軛合至E02-INT抗體時，用可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭製備的ADC是體內活性最高的（圖57A和57B）。如圖58所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭ADC在大鼠毒性研究中表現出最乾淨的安全性。如圖59所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子

-SG3932連接子-彈頭ADC具有良好的PK特性和最寬的相對TI。相對TI = 在大鼠中測試的最高劑量（NOAEL而非HNSTD）下的AUC與提供腫瘤停滯的AUC的暴露比率（MX-1模型）。

【0612】 如圖29B所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭可以與競爭對手TOP1i軛合的ADC區分開來，並且含有被認為促進TI並提供優勢的關鍵特徵。特別地，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932中的mp-PEG使軛合物穩定並促進ADC的穩定性，並且可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932中的內酯開關可以在附接到ADC時打開，ADC可藉由受體介導的胞吞作用（RME）內化後增加彈頭效力。（圖29B）

【0613】 圖60A-60B顯示E02-GL-SG3932在乳腺和卵巢PDX中具有強大的活性。組A： 在一組乳腺和卵巢PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。每隻小鼠（N=1/組）接受劑量為7 mg/kg或3.5 mg/kg的E02-GL-SG3932或對照（未處理）的單次IV注射。圖60B顯示了一組TNBC PDX模型中的抗腫瘤活性。每隻小鼠接受劑量為3.5 mg/kg或1.25 mg/kg的E02-GL-SG3932或媒介物對照的單次IV注射。

【0614】 E02-GL-SG3932在HR缺陷型腫瘤和具有升高的B7-H4的HR精通型腫瘤中也顯示出強大的活性（圖61和圖62A-62D）。

【0615】 此外，HR缺陷會增加對SG3932彈頭的敏感性。如圖63所示，與二甲亞碸（DMSO）處理和陰性對照微管抑制劑彈頭（MMAE）相比，SG3932彈頭的效力發生了改變。如圖63所示，當用DMSO處理野生型細胞和BRCA2-/-細胞時，細胞存活率超過100%。當用MMAE彈頭處理時，野生型細胞和BRCA2-/-細胞的細胞活力均有所降低。與MMAE彈頭相比，當用SG3932彈頭處理野生型細胞時，觀察到存活率大幅下降。然而，當用SG3932彈頭處理

BRCA2-/-細胞時，觀察到存活率的最大下降（效力改變約349倍）。這表明HR缺陷會增加對SG3932彈頭的敏感性。

拓撲異構酶I抑制劑的合成

一般資訊

【0616】使用Biotage® Isolera™進行快速層析，並使用薄層層析（TLC）檢查級分的純度。使用Merck Kieselgel 60 F254矽膠（鋁板上帶有螢光指示劑）進行TLC。用UV光實現TLC的視覺化。

【0617】從英國VWR購買了萃取和層析溶劑，其無需進一步純化即可使用。

【0618】除非另有說明，否則所有精細化學品均購自西格瑪奧德里奇公司（Sigma-Aldrich）。聚乙二醇化試劑係經由英國Stratech公司從美國Quanta biodesign公司獲得的。

LC/MS條件

方法A

【0619】使用Waters Aquity H級SQD2進行正模式電噴灑質譜分析。使用的流動相係溶劑A（含0.1%甲酸的水）和溶劑B（含0.1%甲酸的乙腈）。初始組分5% B經25秒保持不變，然後經1分鐘35秒的時間從5% B增加到100% B。該組分在100% B保持50秒，然後在5秒內恢復到5% B，並這樣保持5秒。梯度運行的總持續時間為3.0分鐘。流速係0.8 mL/分鐘。在254 nm處進行檢測。柱：Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7µm 2.1 x 50 mm，在50ºC下，裝有Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard前置柱，130A，1.7µm，2.1 mm x 5 mm。

方法B

【0620】使用水（A）（甲酸0.1%）和乙腈（B）（甲酸0.1%）的流動相運行HPLC（Waters Alliance 2695）。初始組分5% B經25秒保持不變，然後經1分鐘35秒的時間從5% B增加到100% B。該組分在100% B保持50秒，然後在5秒內恢復到5% B，並這樣保持5秒。梯度運行的總持續時間為3.0分鐘。流速是0.8 mL/分鐘。波長檢測範圍：190至800 nm。柱：Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7µm 2.1 x 50 mm，在50ºC下，裝有Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard前置柱，130A，1.7µm，2.1 mm x 5 mm。

方法C

【0621】使用水（A）（甲酸0.1%）和乙腈（B）（甲酸0.1%）的流動相運行HPLC（Waters Alliance 2695）。

【0622】初始組分5% B經1分鐘保持不變，然後經9分鐘的時間從5% B增加到100% B。該組分在100% B保持2分鐘，然後在0.10分鐘恢復到5% B，並這樣保持3 min。總梯度執行時間等於15 min。流速0.6 mL/min。波長檢測範圍：190至800 nm。柱溫箱溫度：50ºC。柱：ACE Excel 2 C18-AR，2 µ，3.0 x 100 mm。

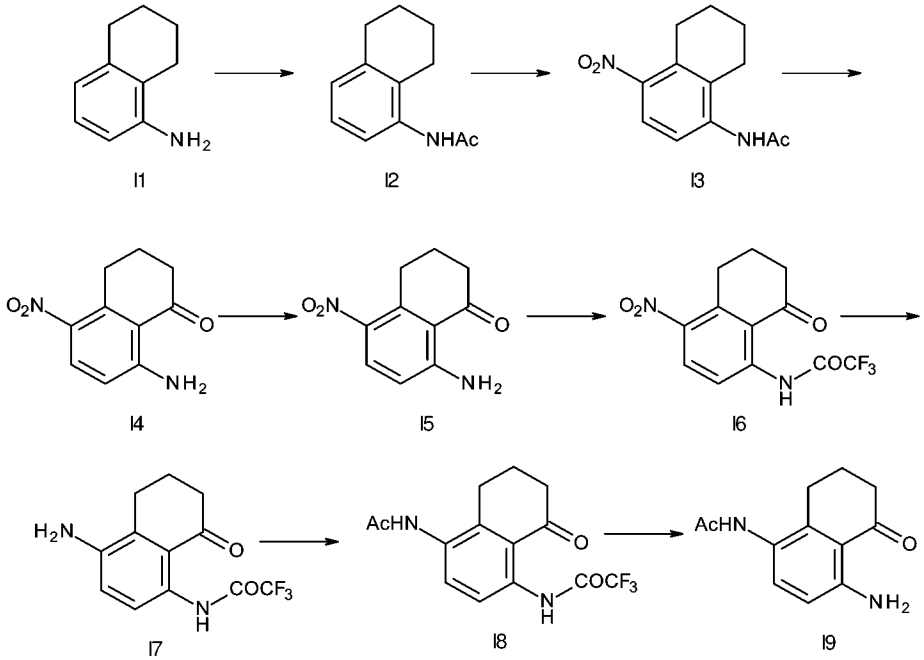
HPLC條件

【0623】逆相超快速高效液相層析（UFLC）在Shimadzu Prominence™機器上使用Phenomenex™ Gemini NX 5µ C18柱（在50ºC下）尺寸：150 x 21.2 mm進行。使用的洗脫液係溶劑A（含0.1%甲酸的H_2O）和溶劑B（含0.1%甲酸的CH_3CN）。所有UFLC實驗均在以下梯度條件下進行：初始組分13% B經3分鐘的時間增加到30% B，然後經8分鐘增加到45% B並且再經6分鐘到100%，然後經2 min恢復到13%並維持1 min。梯度運行的總持續時間為20.0分鐘。流速為20.0 mL/分鐘，並在254和223 nm處檢測。

NMR方法

【0624】使用Bruker AV400在400 MHz的δ級上測量質子NMR化學位移值。已使用以下縮寫：s，單峰；d，二重峰；t，三重峰；q，四重峰；quin，五重峰；m，多重峰；br，寬峰。耦合常數以Hz為單位。

關鍵中間體的合成



a) N-(5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I2**）

【0625】將5,6,7,8-四氫萘-1-胺**I1**（8.54 g，58.0 mmol）溶解於二氯甲烷（80 mL）中。添加三乙胺（18 mL，129 mmol）並將混合物冷卻至0ºC。逐滴添加乙酸酐（11.5 mL，122 mmol），添加完成後，將反應混合物升溫至室溫並攪拌45 min，隨後LCMS表明反應完成。將混合物用CH_2Cl_2稀釋，用H_2O、飽和$NaHCO_3$、10%檸檬酸洗滌，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮。將灰白色固體與1 : 3 Et_2O/異己烷一起研磨，以得到呈白色固體的I2（10.8 g，57.1 mmol，98%產率），無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.44 min（ES+）*m/z* 190 $[M + H]^+$。

b) N-(4-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I3**）

【0626】 在-5ºC下，將*N*-(5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺**I2**（1.00 g，5.2840 mmol）分批添加至硫酸（15 mL，281 mmol）中。將硝酸鈉（450 mg，5.2945 mmol）分批添加至反應混合物中，並在-5ºC下攪拌30 min，隨後LCMS表明無另外的反應進展。將反應混合物在外部冷卻下倒入冰中，將水性混合物用CH_2Cl_2萃取，將有機相經$MgSO_4$乾燥並藉由Isolera（10%-80% EtOAc於異己烷中）純化，以得到呈白色/黃色固體的*N*-(4-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I3和*N*-(2-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺的混合物（956 mg，4.0811 mmol，77%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.53 min（ES+）*m/z* 235 $[M + H]^+$。

c) N-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I4**）

【0627】 將*N*-(4-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I3（1.01 g，4.31 mmol）溶解於丙酮（30 mL）中。添加於水中的硫酸鎂（3.9 mL，5.9 mmol，1.5 mol/L），並將混合物冷卻至0ºC。將高錳酸鉀（2.07 g，13.0 mmol）分批添加至反應混合物並將混合物升溫至室溫並攪拌50 min，隨後TLC表明反應完成。將反應混合物藉由矽藻土過濾，將固體用CHCl3洗滌並將所得有機混合物用H_2O、鹽水洗滌，經$MgSO_4$乾燥並藉由isolera（20%-50% EtOAc於異己烷中）純化，以得到呈白色/黃色固體的N-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I4和*N*-(2-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺的混合物（709 mg，2.86 mmol，66%）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.44 min（ES+）*m/z* 190 $[M + H]^+$

d) 8-胺基-5-硝基-3,4-二氫萘-1(2H)-酮（**I5**）

【0628】 將*N*-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺**I4**和*N*-(2-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺的混合物（709 mg，2.8561 mmol）和6N鹽酸（7 mL）在80ºC下攪拌2.5 h，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物在冰浴中冷卻，並添加6N NaOH溶液直至pH為鹼性。將水性混合物用CH_2Cl_2萃取，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮。Isolera（0%-50% EtOAc於異己烷中）

得到呈黃色/橙色固體的8-胺基-5-硝基-3,4-二氫萘-1(2H)-酮I5（320 mg，1.552 mmol，54%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.54 min（ES+）*m/z* 207 [*M* + H]$^+$

e) 2,2,2-三氟-N-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I6**）

【0629】將8-胺基-5-硝基-3,4-二氫萘-1(2H)-酮**I5**（430 mg，2.0854 mmol）溶解於二氯甲烷（20 mL）中。添加吡啶（340 μL，4.20 mmol）並將混合物冷卻至0ºC。添加三氟乙酸酐（590 μL，4.197 mmol）並攪拌30 min，隨後LCMS表明反應完成。將混合物用CH_2Cl_2稀釋，用H_2O洗滌，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮，以得到呈黃色固體的2,2,2-三氟-*N*-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I6（630 mg，2.0846 mmol，>99%產率），將其無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.86 min（ES+）*m/z* 301X [*M* - H]$^-$

f) N-(4-胺基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)-2,2,2-三氟乙醯胺（**I7**）

【0630】將鋅（2.73 g，41.7 mmol）懸浮於甲醇（80 mL）、甲酸（4 mL）和水（4 mL）中，並將混合物冷卻至0ºC。分批添加2,2,2-三氟-*N*-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺**I6**（568 mg，2.0865 mmol）並將混合物在0ºC下攪拌30分鐘，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物過濾，將濾液用EtOAc稀釋並用飽和$NaHCO_3$洗滌。將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮，以得到呈黃色固體的*N*-(4-胺基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)-2,2,2-三氟乙醯胺I7（568 mg，2.0865 mmol，>99%產率），將其無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.65 min（ES+）*m/z* 273 [*M* + H]$^+$

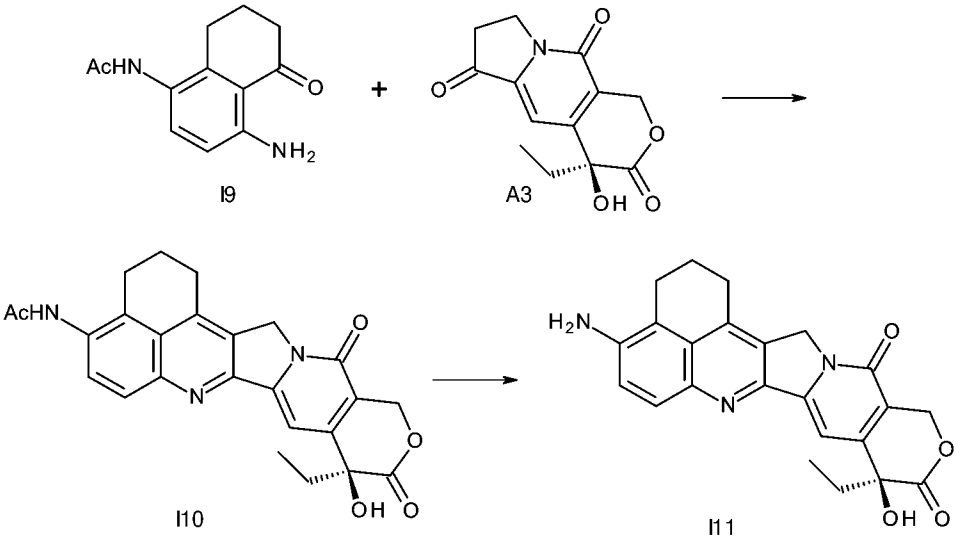
g) N-(4-乙醯胺基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)-2,2,2-三氟乙醯胺（**I8**）

【0631】將*N*-(8-胺基-4-側氧基-四氫化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙醯胺**I7**（568 mg，2.0865 mmol）溶解於二氯甲烷（20 mL）中。添加三乙胺（580 μL，4.16

mmol）然後添加乙醯氯（297 μL，4.173 mmol），並將混合物攪拌30 min，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物用CH_2Cl_2稀釋，用H_2O洗滌，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮以得到呈黃色固體的*N*-(8-乙醯胺基-4-側氧基-四氫化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙醯胺I8（655 mg，2.084 mmol，>99%產率），將其無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.55 min（ES+）*m/z* 315 $[M + H]^+$

h) N-(4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I9**）

【0632】將*N*-(8-乙醯胺基-4-側氧基-四氫化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙醯胺**I8**（2.77 g，8.81 mmol）溶解於甲醇（240 mL）和水（17 mL）中。添加碳酸鉀（4.88 g，35.3 mmol）並將混合物在50ºC下攪拌1.5 h，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物冷卻，在真空中濃縮，溶解於在CH_2Cl_2中的10% MeOH中，並用H_2O洗滌。將有機相經$MgSO_4$乾燥並藉由isolera層析（2%-15% MeOH於CH_2Cl_2中之溶液）純化，以得到呈黃色固體的*N*-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺I9（1.20 g，5.50 mmol，62.3%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間0.98 min（ES+）*m/z* 219 $[M + H]^+$



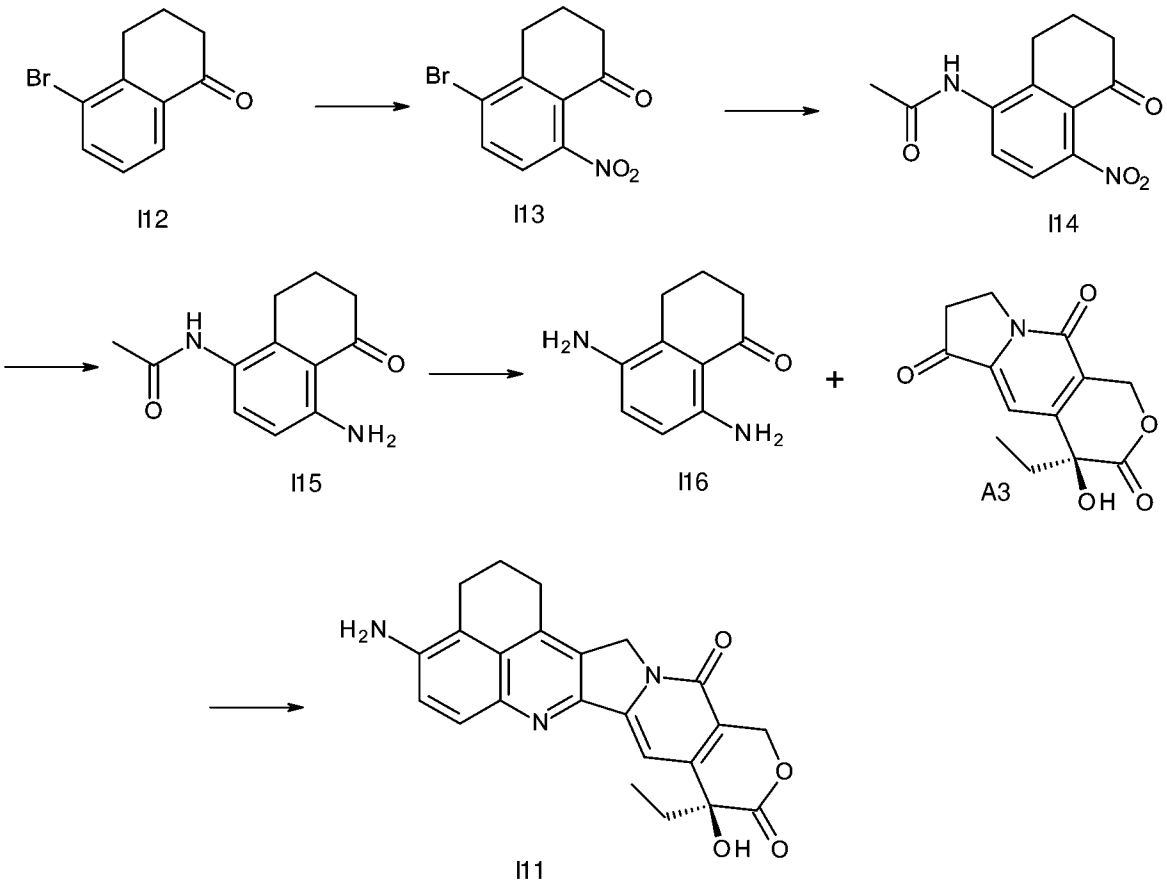
i) (S)-N-(9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)乙醯胺（**I10**）

【0633】將*N*-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺**I9**（641 mg，2.94 mmol，1.0當量）、(*S*)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1*H*-哌喃并[3,4-*f*]吲哚啡-3,6,10(4*H*)-三酮A3（840 mg，3.19 mmol，1.1當量）和PPTS（740 mg，2.95 mmol，1.0當量）溶解於甲苯（60 mL）中並在回流下攪拌3 h，隨後LCMS表明**I9**已經被消耗。將反應混合物冷卻並且在真空中濃縮。將所得固體與乙腈、然後與丙酮一起研磨，以得到呈棕色固體的**I10**，伴隨輕微的TsOH污染（1.26 g，96%）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.32 min（ES+）*m/z* 447 $[M + H]^+$

j) (S)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**I11**）

【0634】將*(S)-N*-(9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1*H*,12*H*-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)乙醯胺（**I10**）（1.26 g，2.83 mmol，1.0當量）溶解於在H_2O（12 mL）中的鹽酸（6 mol/L）中，並將混合物在80ºC下攪拌5 h，隨後LCMS表明**I10**已經被消耗。將反應混合物用H_2O稀釋並在真空中濃縮，以得到呈紅色結晶固體的(*S*)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10*H*,13*H*-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-*b*]喹啉-10,13-二酮**I11**（1.51 g，2.85 mmol，90 品質%，101%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.36 min（ES+）*m/z* 405 $[M + H]^+$。

I11的可替代合成



該合成的IPC、純度和測定方法

儀器	Thermo U-3000		
柱	ACE Excel 3 C18- PFP（3.0 mm×150 mm）		
柱溫箱	40℃		
流動相	A：10 mM甲酸銨於水中pH=3.5		
	B：CAN		
梯度程序	時間（min）	A%	B%
	0.0	90	10
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	再平衡時間：6 min		
流速	1.0 ml/min		
檢測器	UV 220 nm		
稀釋劑	CAN		

a) 5-溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮（**I13**）

【0635】在氮氣下，將溶解於硫酸（濃縮的，5.0相對體積，160 mL）中的硝酸鉀（1.15當量，13.83 g）的溶液添加（添加時間4-12 h，保持溫度低於10ºC）至5-溴四氫化萘-1-酮（**I12**）（1.0當量，26.77 g）於硫酸（濃縮的，5.0相對體積，160 mL）中之溶液中。當反應完成時，將反應混合物轉移至含有水（36相對體積，1.15 L）的燒瓶中，調節轉移速率以保持溫度低於10ºC。將所得固體過濾，用水（4.0相對體積，128 mL）洗滌三次然後在約40ºC下乾燥24 h。將乾燥的濾餅溶解於丙酮（2.5相對體積，80 mL）和水（0.38相對體積，12.2 mL）的混合物（加熱至約75ºC）中，並且然後冷卻至約20ºC。藉由過濾除去所得固體。藉由蒸餾將溶劑交換為乙醇，並將溶液體積減少至2.0相對體積（64 mL）。將溶液冷卻至約25ºC並將所得固體藉由過濾收集。將固體用乙醇（1.0相對體積，32 mL）洗滌，然後在真空下在40ºC下乾燥以給出呈棕色固體的5-溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮**I13**（15.36 g，40%）；RT 14.0 min

方法1 溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮的IPC、純度和測定方法。

儀器	Thermo U-3000		
柱	ACE Excel 3 C18- PFP（3.0 mm×150 mm）		
柱溫箱	40ºC		
流動相	A：10 mM甲酸銨於水中pH=3.5		
	B：CAN		
梯度程序	時間（min）	A%	B%
	0.0	90	10
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	再平衡時間：6 min		
流速	1.0 ml/min		
檢測器	UV 220 nm		
稀釋劑	CAN		

b) N-(8-硝基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（I14）

【0636】將溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮（**I13**）（1.0當量，18.0 g，90.6% ww）、乙醯胺（1.2當量，4.72 g）、三(二亞苄基丙酮)二鈀(0)（0.01當量，0.61 g）磷酸鉀（1.4當量，19.8 g）於二噁烷（15相對體積，270 mL）中之溶液在氮氣下加熱至約70ºC。當反應完成時，將溶液冷卻至約20ºC並用二噁烷（5相對體積，90.0 mL）稀釋並過濾。將溶劑交換為乙醇，並將體積減少至為3相對體積的總反應體積（54.0 mL）。將溶液冷卻至約20ºC並將所得固體藉由過濾收集並用MTBE（甲基三級丁基醚）（1.0相對體積，18.0 mL）洗滌。將固體在真空下在40ºC下乾燥以給出呈暗黃色固體的N-(8-硝基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺**I14**（10.0 g，60.6%）；RT 8.86 min。

c) N-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（I15）

【0637】將氫氧化鈀碳（20% w/w，0.15當量，5.25 g）添加至N-(8-硝基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（**I14**）（1.0當量，32.6 g）於甲醇（40相對體積，1250 mL）中之溶液中。將反應混合物在氫氣氣氛（約40 psi）下在約40ºC下放置8 h。除去氫氣並用氮氣置換，並藉由經纖維素過濾除去催化劑，用甲醇（4.0相對體積，130 mL）洗滌纖維素。藉由蒸餾將溶液體積減少至4.0相對體積並且然後用MTBE（4相對體積，130 mL）稀釋。將所得固體藉由過濾收集，用MTBE（2相對體積，65 mL）洗滌並在真空下在40ºC下乾燥以給出呈灰綠色固體的N-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺**I15**（21.1 g，77.8%）；RT 5.44 min。

d) 5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（I16）

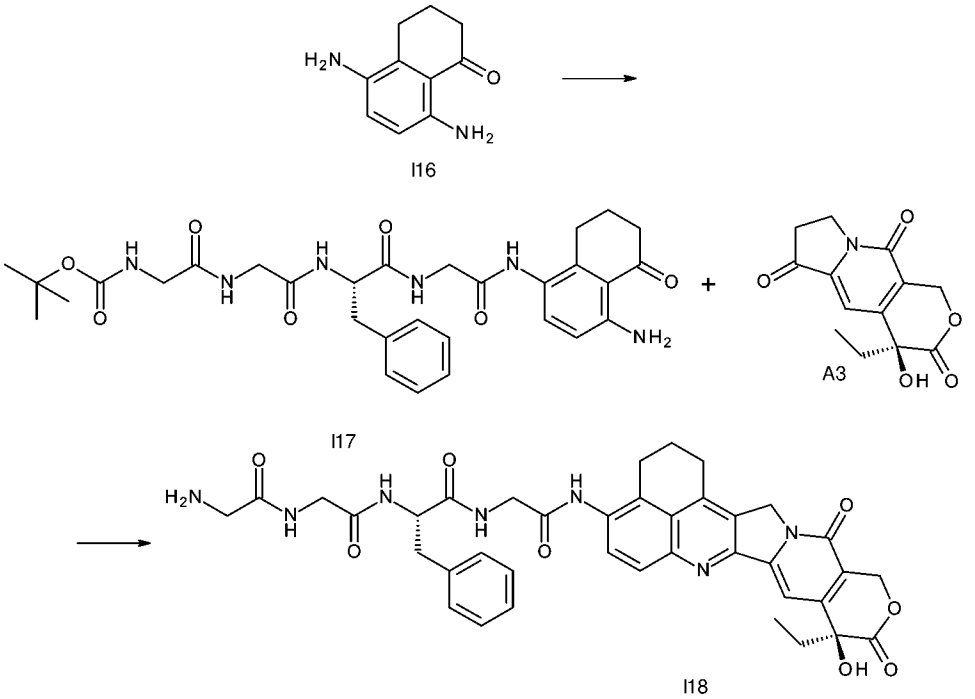
【0638】將N-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（**I15**）（1.0當量，10.0 g）於鹽酸（5M，6.0相對體積，60 mL）中之溶液保持在約90ºC持續3h。將溫度減少至25ºC並添加氫氧化鈉（2M，4.0相對體積，40mL）直至達到pH 10.0，保持溫度為25ºC。將所得固體藉由過濾收集並用水（2.0相對體積，20

mL）洗滌。將濕濾餅溶解於四氫呋喃（60相對體積，600 mL）中並過濾。將溶液濃縮至5.0相對體積並添加庚烷（20相對體積，200 mL）。將溶液濃縮至10.0相對體積並進一步添加庚烷（20相對體積，200 mL），並且然後再次將體積減少至10.0相對體積。將所得固體藉由過濾收集並用庚烷（5.0相對體積，50 mL）洗滌。將固體在真空下在40ºC下乾燥17 h以給出呈黃色固體的5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（**I16**）（6.90 g，82.7%）；1H NMR (400 MHz DMSO-d6) δ ppm 1.82 (m, 2H), 2.38 (t, *J*=2.0 Hz, 2H), 2.47 (t, *J*=2.0 Hz, 2H), 6.34 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.68 (d, *J*=2.0 Hz, 1H)；RT 3.90

e) (S)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（I11）

【0639】將5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（**I16**）（1.0當量，5.0 g）、(4S)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-哌喃并[3,4-f]吲哚啉-3,6,10-三酮（**A3**）（1.06當量，7.9 g）、和對甲苯磺酸吡啶陽離子（1.0當量，7.2 g）於甲苯（50.0相對體積，250 mL）中之溶液保持在120ºC下持續15 h。將溶液的體積減少至2.0相對體積，並且然後用乙腈（20相對體積，100 mL）和水（20相對體積，100 mL）稀釋。將所得漿液過濾並將固體用乙腈水溶液（1:1，20相對體積，100 mL）洗滌。將固體用甲醇水溶液（水:MeOH 3:1，40相對體積，200 mL）漿液化，過濾並用甲醇水溶液（1:1，20相對體積，100 mL）洗滌。將固體用水（60相對體積，300 mL）在50ºC下漿液化，過濾並用水（10相對體積，50 mL）洗滌。將固體用乙腈水溶液（水：乙腈，1：3，40相對體積，200 mL）在30ºC下漿液化，過濾並用乙腈水溶液（水：乙腈，1：3，5相對體積，50 mL）洗滌並且然後在真空下在40ºC下乾燥以給出呈白色固體的(S)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**I11**）（5.0g，43.7%）；RT 5.13。

I18的合成



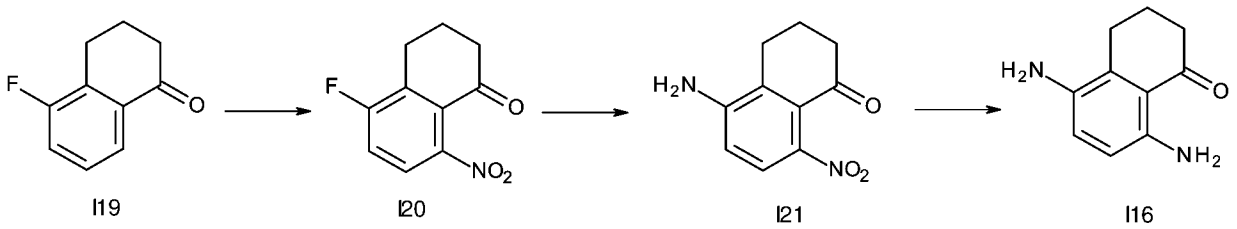
a) 三級丁基 (S)-(2-((2-((1-((2-((4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙烷-2-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯（I17）

【0640】 將Boc-GGFG-OH（227 mg，0.52 mmol）和EEDQ（157 mg，0.634 mmol）溶解在CH_2Cl_2（25 mL）中並將混合物攪拌15 min，直至肽溶解至溶液中。隨後添加化合物**I16**（100 mg，0.56747 mmol）並將混合物攪拌直至完成。1 h後，LVMC顯示反應完成了90%。隨著產物壓出（crashing out），混合物變得更稠。將混合物再放置一個小時，然後抽真空以乾燥。將粗品吸收於Et_2O（50 mL）中。過濾固體並隨後吸收於CH_2Cl_2（50 mL）中以進一步純化。過濾固體並乾燥以給出呈灰色固體的產物**I17**（273 mg，0.459 mmol，80.9%產率）。分析數據：LCMS 3 min：ES^+ = 1.46 min，*m/z* 595.7 $[M + H]^{+}$。

b) (S)-2-(2-(2-胺基乙醯胺基)乙醯胺基)-N-(2-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-2-側氧基乙基)-3-苯基丙醯胺（I18）

【0641】將苯胺**I17**（450 mg，1.045 mMol）、內酯**A5**（280 mg，1.064 mMol）和對甲苯磺酸吡啶陽離子（273 mg，1.086 mMol）溶解於甲苯（20 mL）中並將混合物加熱至150ºC（高回流）。添加MeOH（4 mL）以幫助溶解混合物。7 h，將粗反應物抽真空（vacced down）以乾燥。將粗產物藉由矽膠層析（$CHCl_3$/MeOH，100%至65:35）進行純化，以給出產物**I18**（259 mg，0.359 mMol，78.1產率）。分析數據：LCMS 3 min：ES^+ = 1.17 min，*m/z* 722.8 $[M + H]^{\cdot+}$。

I16的替代合成



a) 5-氟-8-硝基-四氫化萘-1-酮（I20）

【0642】在3頸圓底燒瓶中，將5-氟四氫化萘-1-酮**I19**（4.7 g，29 mmol）溶解於1/2量的硫酸（120 mL）中。攪拌混合物直至所有固體溶解並且然後冷卻至0ºC-5ºC。在滴液漏斗中，在0ºC-5ºC下，溶解硝酸鉀（3 g，29.6730 mmol）至剩餘的一半的硫酸（120 mL）中。緩慢添加至SM混合物，確保保持溶液係冷的（45 min）。在0ºC-5ºC下攪拌直至完成。隨後將反應混合物用水（250 mL）淬滅，並在0ºC-5ºC下攪拌。將固體過濾並用水（50 mL）洗滌。將固體在真空柱溫箱中在50ºC下乾燥2 h。將粗固體在Et_2O中漿液化過夜，然後冷卻至0ºC並過濾。將濕濾餅用更多冷的Et_2O（50 mL）洗滌並在真空柱溫箱中在50ºC下乾燥以給出呈淡粉色細粉末的純的產物**I20**（5.5 g，26 mmol，92%產率）。LCMS（方法B）：ES^+ = 1.55 min，*m/z* 210.1 $[M + H]^{\cdot+}$。

b) 5-胺基-8-硝基-四氫化萘-1-酮（I21）

【0643】將化合物**I20**（2.7 g，13 mmol）溶解於CH_3CN（2.5 mL）中，並將在H_2O（8 mL，40 mmol）中的NH_4OH（21 品質%）添加至密封耐壓管並加熱至185ºC。一旦完成，將混合物轉移至圓底燒瓶中並抽真空。將粗品藉由矽膠柱層析（$CHCl_3$/MeOH；100至99 : 1）進行純化以給出呈黑色固體的純的產物**I21**（1.1 g，5.3 mmol，41%產率）。LCMS（方法B）：ES^+ = 1.34 min，*m/z* 207.1 $[M + H]^{\cdot+}$。

c) 5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（I16）

【0644】在0ºC下，將化合物**I21**（1.35 g，6.55 mmol）溶解於甲醇（20 mL）、H_2O（1 mL）和甲酸（1 mL）的混合物中。緩慢添加鋅（8.5 g，130 mmol），確保將溫度保持在低於40ºC。添加多一些的甲酸/H_2O（0.5 mL）以推動反應完成。將反應混合物過濾，並將濾液用EtOAc和CH_2Cl_2稀釋，然後抽真空。將粗品乾燥載入到矽膠柱層析（$CHCl_3$/EtOAc；100至7:3然後$CHCl_3$/MeOH；99:1至98:2）上以給出純的產物**I16**（1.015 g，5.760 mmol，88.0%產率）。LCMS（方法B）：ES^+ = 0.2 min，未觀察到*m/z*。

合成實例1（例如SG3932的合成）



a) 烯丙基 ((S)-3-甲基-1-側氧基-1-(((S)-1-側氧基-1-((6-側氧基-4-(2,2,2-三氟乙醯胺基)-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)丙-2-基)胺基)丁-2-基)胺基甲酸酯（A1）

[0645] 在25°C下，將DCC（6.54 g，31.7 mMol）和HOPO（3.36 g，30.2 mMol）添加至烯丙氧羰基-Val-Ala-OH（9.09 g，31.7 mmol）和DIPEA（7.85

g，28.8 mMol）於CH_2Cl_2（300 mL）中之溶液中。將所得混合物攪拌過夜。濾出反應期間形成的白色固體，並用冷的CH_2Cl_2洗滌。將濾液用水（150 mL）和鹽水（150 mL）洗滌。將有機層經$MgSO_4$乾燥，過濾並蒸發。將粗產物藉由矽膠層析（Hex/EtOAc，60 : 40）進行純化。分離的產物**A1**被共洗脫的DCU（21.1 g，140%產率）污染。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.81 min，*m/z* 527.6 $[M + H]^{\cdot+}$。

b) 烯丙基 ((S)-1-(((S)-1-((4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸酯（**A2**）

【0646】將保護的苯胺**A1**（18 g，34.19 mMol）溶解於MeOH和H_2O 10:1（165 mL）的混合物中並添加K_2CO_3（10 g，72.36 mMol）。將混合物在50ºC下攪拌直至完成。將混合物抽真空至幾乎乾燥並將殘餘物用CH_2Cl_2吸收並用H_2O和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並蒸發。將粗產物藉由矽膠層析（$CHCl_3$/MeOH，100%至7 : 3）進行純化。分離的產物**A2**被共洗脫的雜質（10.71 g，73%產率）污染。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.46 min，*m/z* 431.7 $[M + H]^{\cdot+}$。

c) 烯丙基 ((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基丁-2-基)胺基甲酸酯（**A4**）

【0647】將苯胺**A2**（450 mg，1.045 mMol）、內酯**A3**（280 mg，1.064 mMol）和對甲苯磺酸吡啶陽離子（273 mg，1.086 mMol）溶解於甲苯（20 mL）中並將混合物加熱至130ºC（高回流）。時不時地添加幾滴MeOH，以幫助溶解混合物。7 h，將粗反應物抽真空（vacced down）以乾燥。將粗產物藉由矽膠層析（$CHCl_3$/MeOH，100%至95 : 5）進行純化以給出產物**A4**（360 mg，52.3%產率）。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.51 min，*m/z* 658.8 $[M + H]^{\cdot+}$。

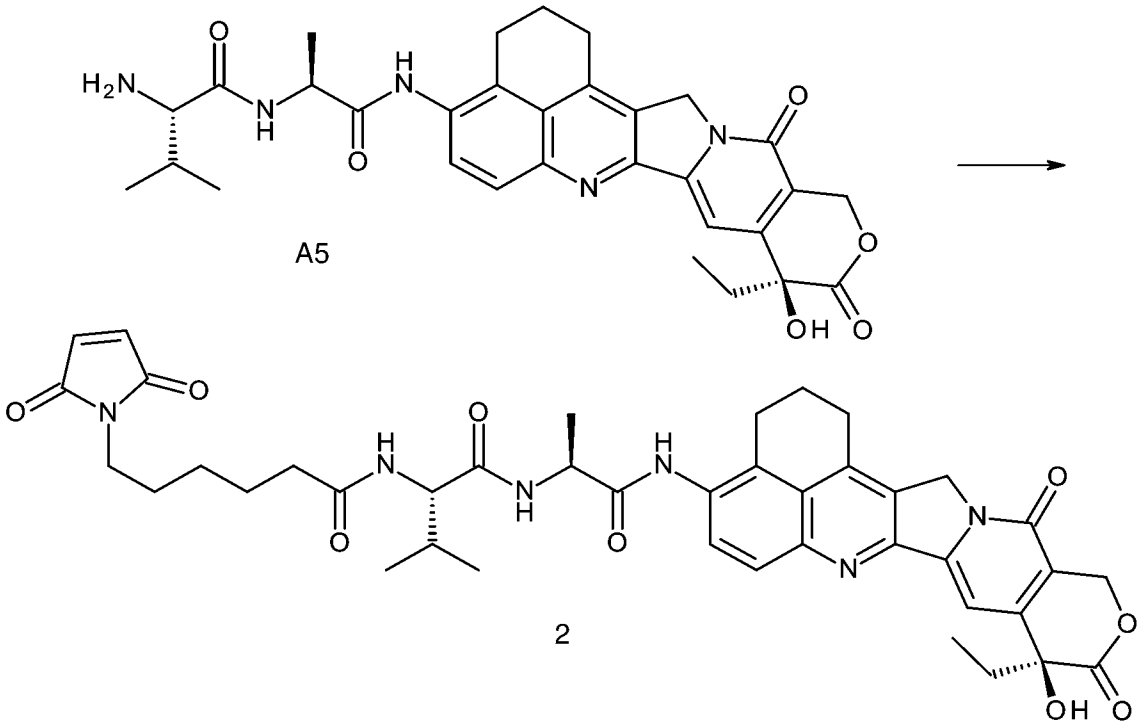
d) 烯丙基 (S)-2-胺基-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-3-甲基丁醯胺（**A5**）

【0648】將過量的哌啶（642 µL）添加至**A4**（543 mg，0.82 mMol）和$PdP(Ph_3)_4$（89 mg，0.08 mMol）於CH_2Cl_2（15 mL）中之溶液中。允許混合物在室溫下攪拌20 min，這時反應已經完成（如藉由LC/MS監測的）。將反應混合物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（25 mL）和鹽水（25 mL）洗滌。將有機相經$MgSO_4$乾燥，過濾，並藉由在減壓下旋轉蒸發除去過量的溶劑，以得到粗產物**A5**，其原樣用於下一步。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.15 min，*m/z* 574.6 $[M + H]^{\cdot+}$。

e) 1-(3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙胺基)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-27-醯胺（**1**）

【0649】在氬氣氣氛下，將吡啶（83 µL，1.03 mMol）和Mal-dPEG$_8$-OTFP（767 mg，1.03 mMol）添加至粗品**A5**（假定為1.03 mMol）於乾CH_2Cl_2（50 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加0.5當量的Mal-dPEG$_8$-OTFP以試圖推動反應。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由逆相HPLC（H_2O/CH_3CN +0.05% FA的梯度）進行純化並冷凍乾燥以給出**1**（1.189 g，31%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.43 min，*m/z* 1149.3 $[M + H]^{\cdot+}$。LC/MS（方法C）：ES^+ = 5.37 min，*m/z* 1149.4 $[M + H]^{\cdot+}$。

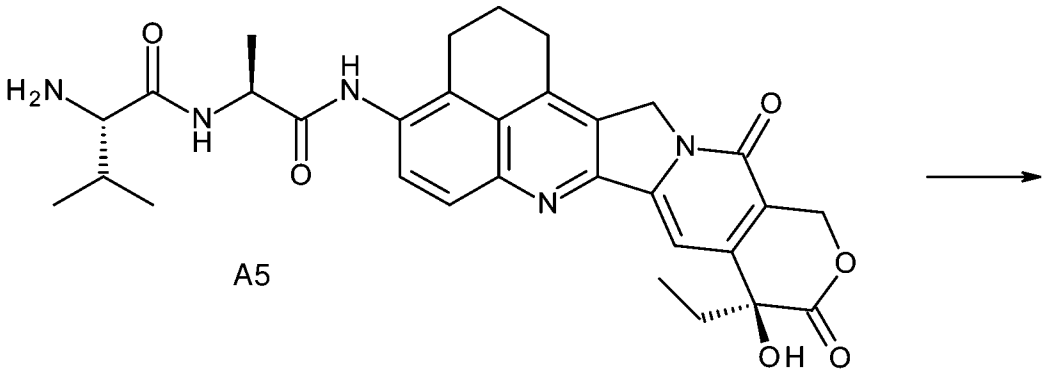
合成實例2（例如SG4010的合成）



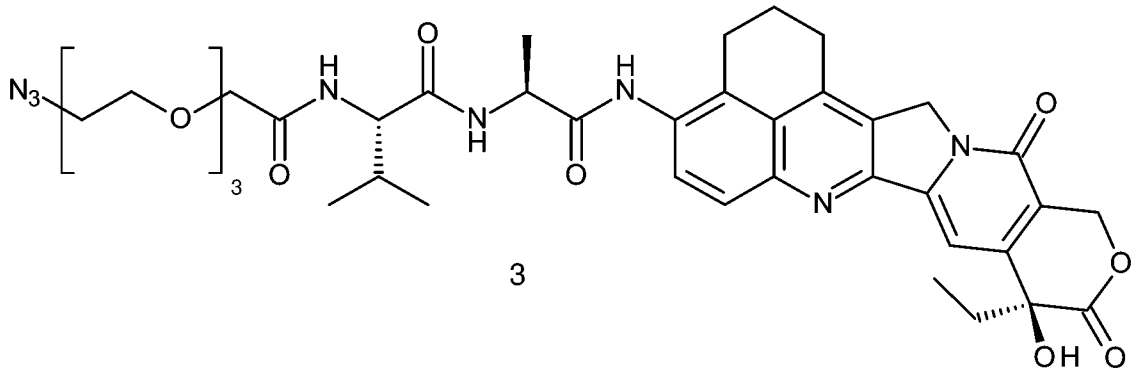
6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)己醯胺（**2**）

【0650】 在氬氣氣氛下，將Mal-己酸（56 mg，0.26 mMol）和EDCI.HCl（51 mg，0.26 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.26 mMol）於無水CH_2Cl_2（20 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加另外0.5當量的Mal-己酸和EDCI.HCl。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由矽膠柱層析（$CHCl_3$/MeOH 95 : 5）進行純化以給出**2**（31.6 mg，20%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.56 min，*m/z* 767.8 $[M + H]^{\cdot+}$。LC/MS（方法C）15 min：ES^+ = 6.05 min，*m/z* 767.8 $[M + H]^{\cdot+}$。

合成實例3



A5

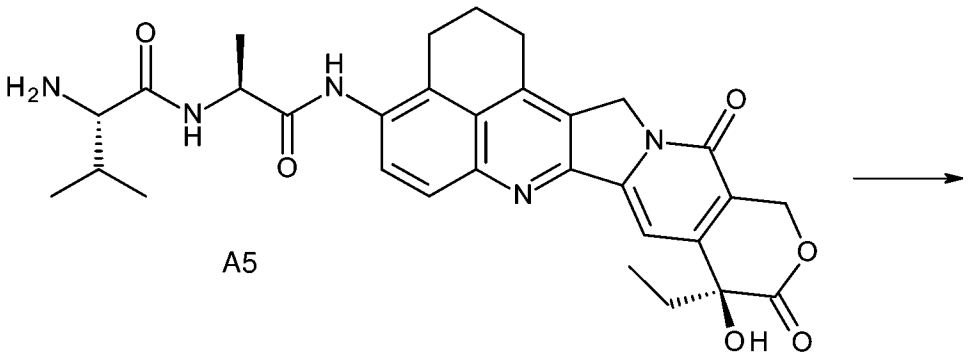


3

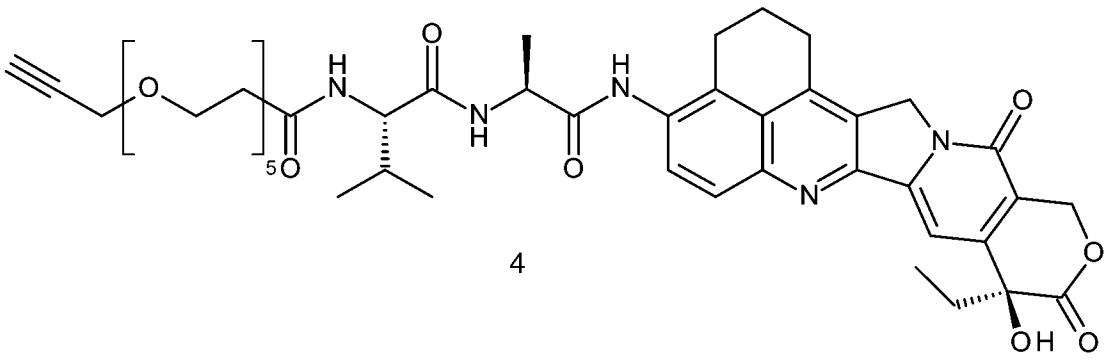
(S)-2-(2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙醯胺基)-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-3-甲基丁醯胺（**3**）

【0651】在氬氣氣氛下，將疊氮-dPEG$_3$-酸（77.5 mg，0.31 mMol）和EDCI.HCl（60 mg，0.31 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.31 mMol）於無水CH_2Cl_2（20 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加另外0.5當量的疊氮-dPEG$_3$-OH和EDCI.HCl。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由製備型HPLC進行純化並將級分冷凍乾燥以給出純的**3**（92.2 mg，24.7%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.69 min，*m/z* 789.9 $[M + H]^{\cdot+}$。LC/MS（方法C）：ES^+ = 6.68 min，*m/z* 790.0 $[M + H]^{\cdot+}$。

合成實例4



A5

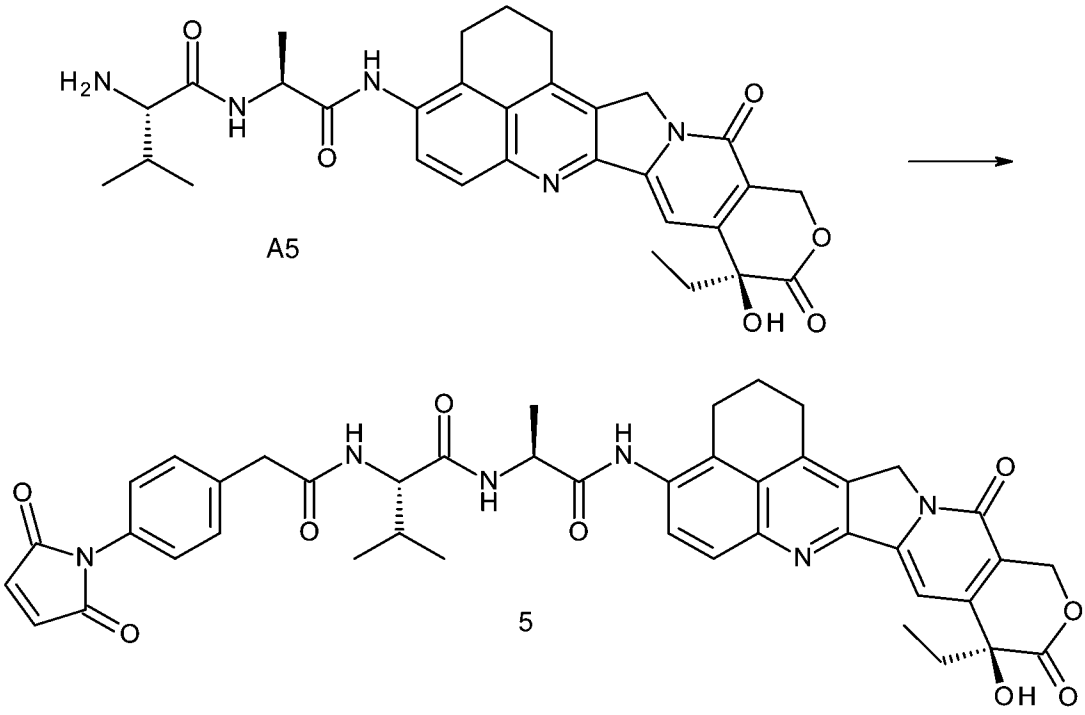


4

N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九烷-18-炔醯胺（**4**）

【0652】 在氬氣氣氛下，將炔丙基-dPEG$_5$-酸（56 mg，0.19 mMol）和EDCI.HCl（37 mg，0.19 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.19 mMol）於無水CH_2Cl_2（10 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加另外0.5當量的炔丙基-dPEG$_5$-OH和EDCI.HCl。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由製備型HPLC進行純化並將級分冷凍乾燥以給出純的**4**（22 mg，16.7%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.54 min，*m/z* 860.9 $[M + H]^{\cdot+}$。LCMS（方法C）：ES^+ = 5.57 min，*m/z* 860.9 $[M + H]^{\cdot+}$。

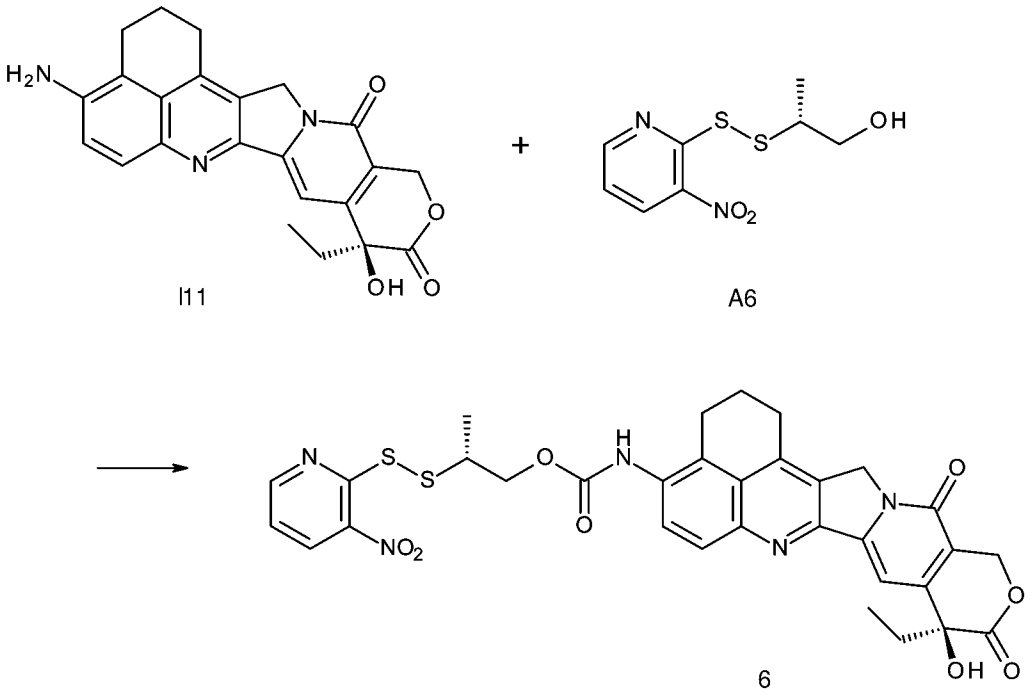
合成實例5



(S)-2-(2-(4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基)乙醯胺基)-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-3-甲基丁醯胺（**5**）

【0653】 在氬氣氣氛下，將PM-乙酸-OSu（64 mg，0.19 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.19 mMol）於無水CH_2Cl_2（10 mL）中之溶液中。反應沒有進行，因此添加DIPEA（51 μL，0.28 mMol）。將反應物攪拌直至完成。將混合物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由製備型HPLC進行純化並將級分冷凍乾燥以給出純的**5**（2.5 mg，1.6%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.54 min，*m/z* 787.7 $[M + H]^{+}$。LC/MS（方法C）：ES^+ = 5.61 min，*m/z* 787.8 $[M + H]^{+}$。

合成實例6



I11 A6 6

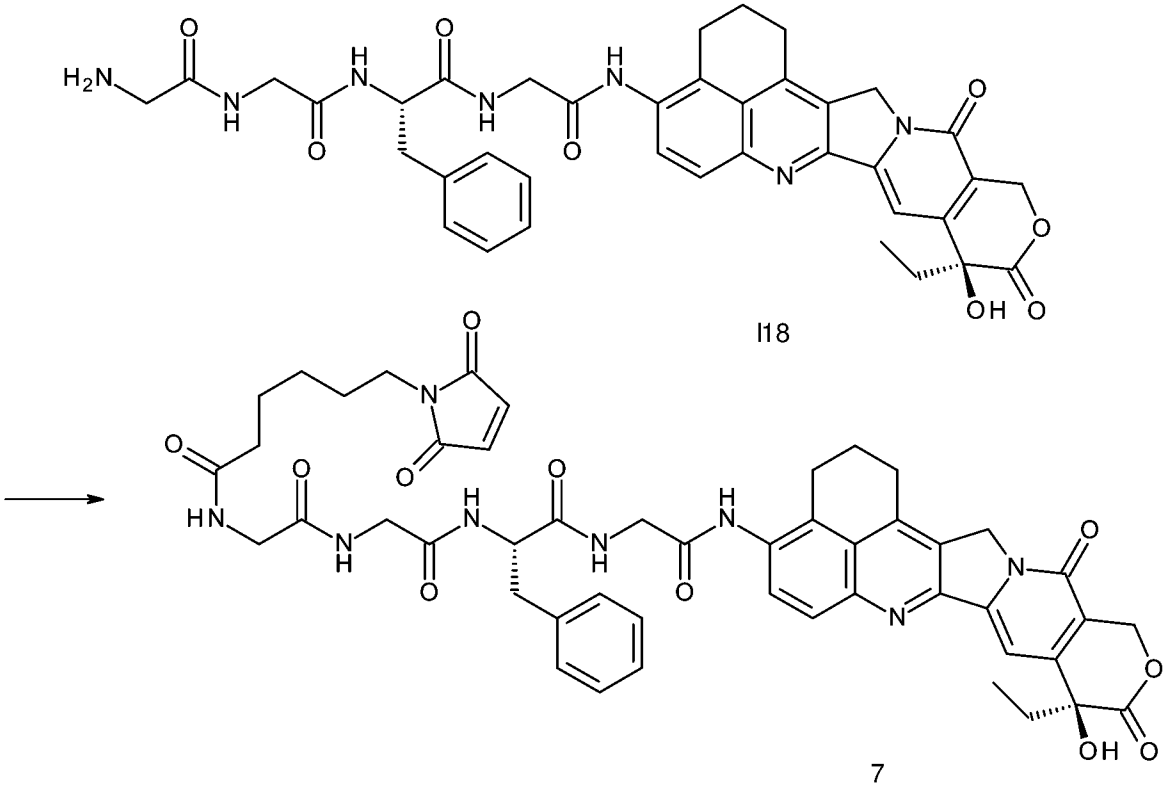
(R)-2-((3-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)丙基((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基甲酸酯（**6**）

【0654】 (i) 將(2R)-2-[(3-硝基-2-吡啶基)二氫硫基]丙-1-醇**A6**（25 mg，0.1015 mmol，1.0當量）溶解於二氯甲烷（1 mL）中。添加吡啶（8.5 μL，0.11 mmol，1.0當量），然後添加三光氣（11 mg，0.0370685 mmol，0.33當量）並將混合物在Ar下攪拌45 min，隨後LCMS（Et_2NH淬滅）表明形成對應的胺基甲酸酯。

【0655】 (ii) 將*(S)*-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**I11**）（43 mg，0.09026 mmol，1.0當量）溶解於二氯甲烷（2 mL）、*N,N*-二異丙基乙胺（42 μL，0.241 mmol，2.7當量）和吡啶（25 μL，0.309 mmol，3.4當量）中。添加來自步驟 (i) 的反應混合物並將混合物攪拌30 min，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物在真空中濃縮並藉由isolera層析（0%-4% MeOH於CH_2Cl_2中）進行純化，以

得到呈黃色固體的**6**（22 mg，0.03256 mmol，36%產率，QC = 96.8%）。LC/MS（方法B）：RT = 1.86 min，676.6 $[M+H]^+$。

合成實例7（例如SG4052的合成）



I18

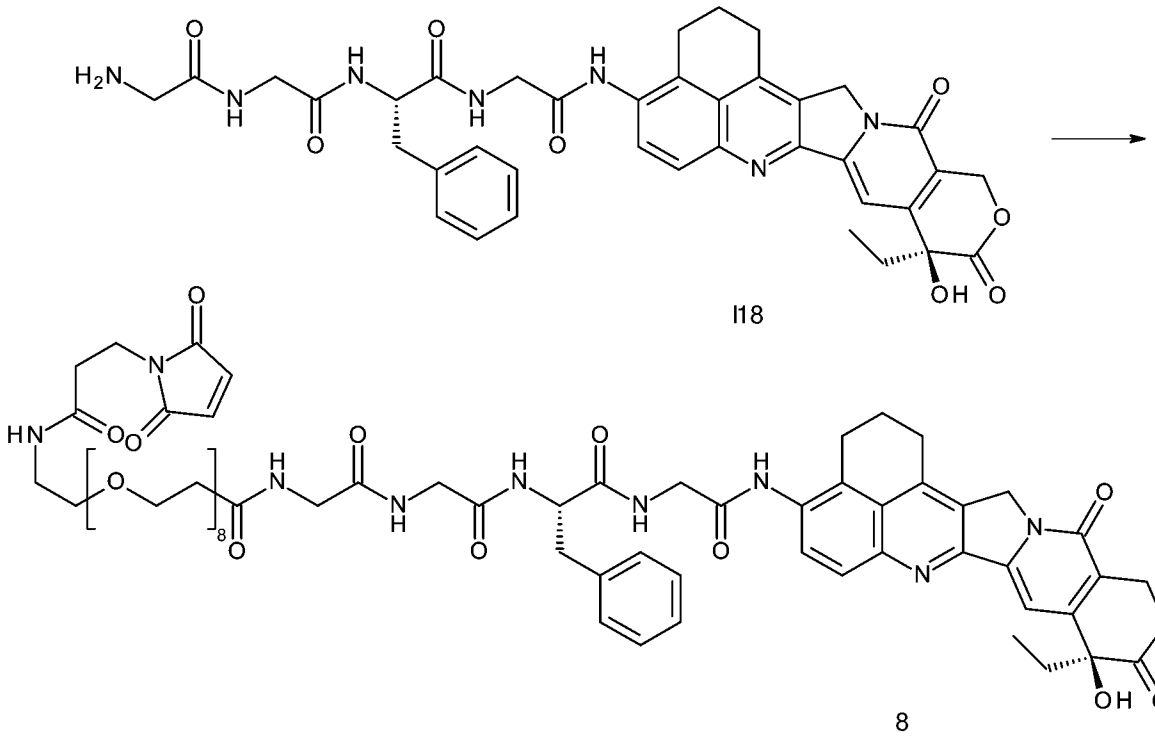
7

6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙-2-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)己醯胺（7）

【0656】將化合物**I18**（259 mg，0.3588 mmol）溶解於CH_2Cl_2（25 mL）中。起始原料完全不溶解，因此添加DMA（1 mL）。由於未觀察到改善，因此添DIPEA（68 μL，0.390 mmol），並且所有固體進入溶液中。添加馬來醯亞胺己酸（69 mg，0.358 mmol）並將混合物在r.t.下攪拌過夜，這時LCMS分析表明反應完成。將反應混合物用MeOH（2 mL）淬滅，並抽真空至乾燥。將粗產物藉由製備型HPLC進行純化並隨後冷凍乾燥以給出呈赭色固體之化合物**7**

（38.2 mg，11%產率）。分析數據：LCMS 3 min：ES^+ = 1.47 min，*m/z* 916.2 $[M + H]^+$ LCMS 15 min：ES^+ = 5.46 min，*m/z* 916.1 $[M + H]^+$。

合成實例8（例如SG4057的合成）



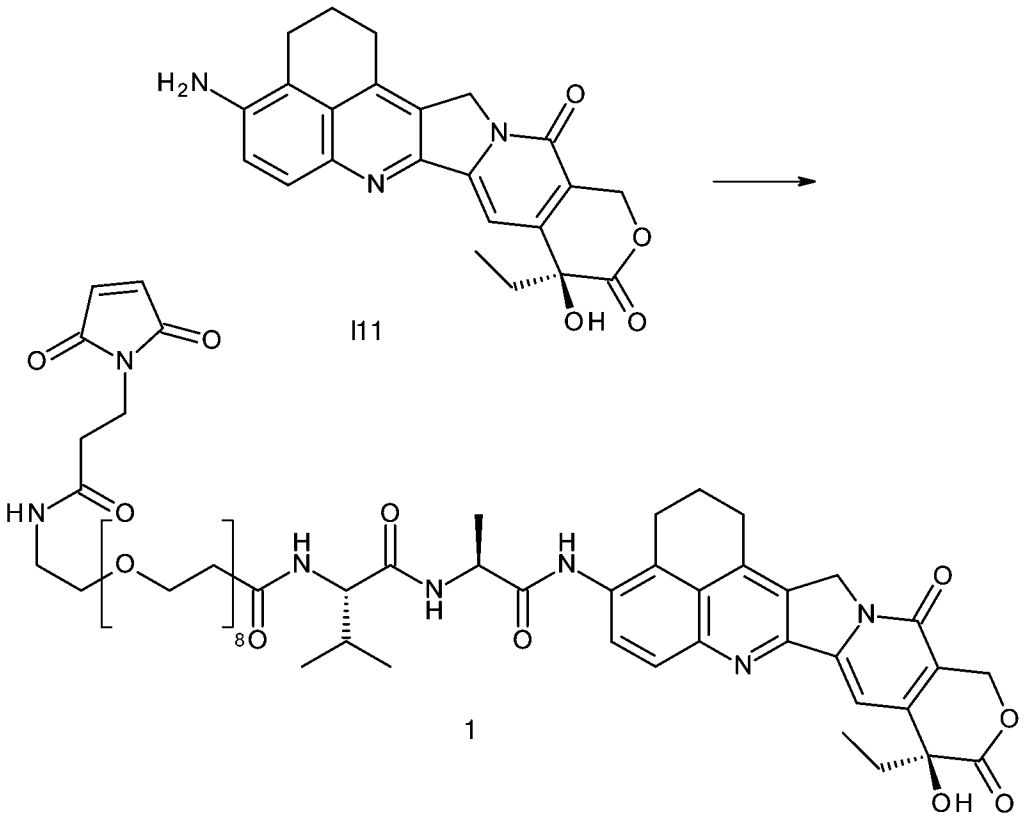
1-(3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙胺基)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙-2-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-27-醯胺（8）

【0657】將化合物**I18**（70 mg，0.096 mmol）溶解於CH_2Cl_2（5 mL）中。起始原料完全不溶，因此添加DMA（0.5 mL）。由於未觀察到改善，因此添DIPEA（19 μL，0.106 mmol），並且所有固體進入溶液中。添加Mal-dPEG$_8$-OH（63 mg，0.106 mmol）和EDCI.HCl（19 mg，0.099 mMol）並將混合物在r.t.下攪拌過夜，這時LCMS分析表明反應完成。將反應混合物用MeOH（2 mL）淬滅，並抽真空至乾燥。將粗產物藉由製備型HPLC進行純化並隨後冷凍

乾燥以給出呈赭色固體的**8**（30 mg，24%產率）。LCMS 3 min：ES^+ = 1.44 min，*m/z* 1297.6 $[M + H]^{\cdot+}$。

合成實例9 - 1的替代合成

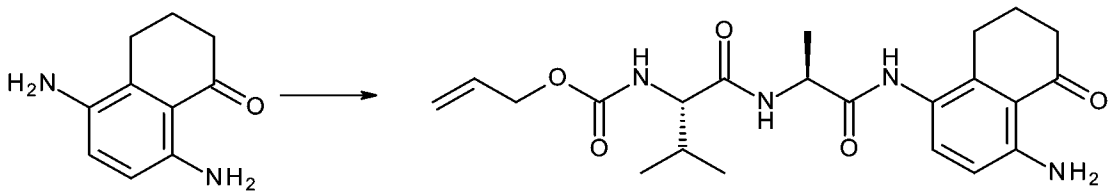
（例如SG3932的替代合成）



【0658】將(*S*)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10*H*,13*H*-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-*b*]喹啉-10,13-二酮**I11**（371 mg，0.779 mmol，1.0當量）溶解於二氯甲烷（30 mL）中。添加在*N*,*N*-二甲基乙醯胺（10 mL）中的*N*,*N*-二異丙基乙胺（69 μL，0.396 mmol，0.51當量）、和(2*S*)-2-[[(2*S*)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)丙醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙醯基胺基]-3-甲基-丁醯基]胺基]丙酸（664 mg，0.871 mmol，1.1當量），隨後添加EDCI.HCl（226 mg，1.18 mmol，1.5當量）並將混合物攪拌2 h，隨後LCMS表明良好的轉化，但反應已停滯。將反應混合物溫熱至30ºC並攪拌30 min，LCMS表明沒有變化，因此在

真空中除去CH_2Cl_2並將Et_2O添加至所得DMA溶液中。收集沈澱的油，在真空中除去Et_2O並重複沈澱過程。將合併的沈澱物藉由HPLC（10%-60% B於A中 經13 min）進行純化，冷凍乾燥後得到為黃色殘餘物的**1**（200 mg，0.174 mmol，98%純度，22%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.44 min（ES+） *m/z* 1149 $[M + H]^+$ ^{1}H NMR (600 MHz, 氯仿-*d*) δ 8.81 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.18 (dd, *J* = 18.7, 7.5 Hz, 2H), 6.69 (s, 2H), 6.43 (s, 1H), 5.68 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.27 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 4.75 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J* = 7.4, 5.8 Hz, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.83 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.78 - 3.68 (m, 3H), 3.68 - 3.57 (m, 31H), 3.53 (t, *J* = 5.1 Hz, 3H), 3.40 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.06 - 2.91 (m, 3H), 2.84 (dt, *J* = 16.3, 6.2 Hz, 1H), 2.63 (ddd, *J* = 14.8, 8.5, 4.2 Hz, 1H), 2.57 - 2.44 (m, 4H), 2.30 (dq, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 2.10 (p, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.91 (ddt, *J* = 16.8, 14.3, 7.2 Hz, 3H), 1.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.02 (dd, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 10H)。

實例10的合成 - A2的替代合成



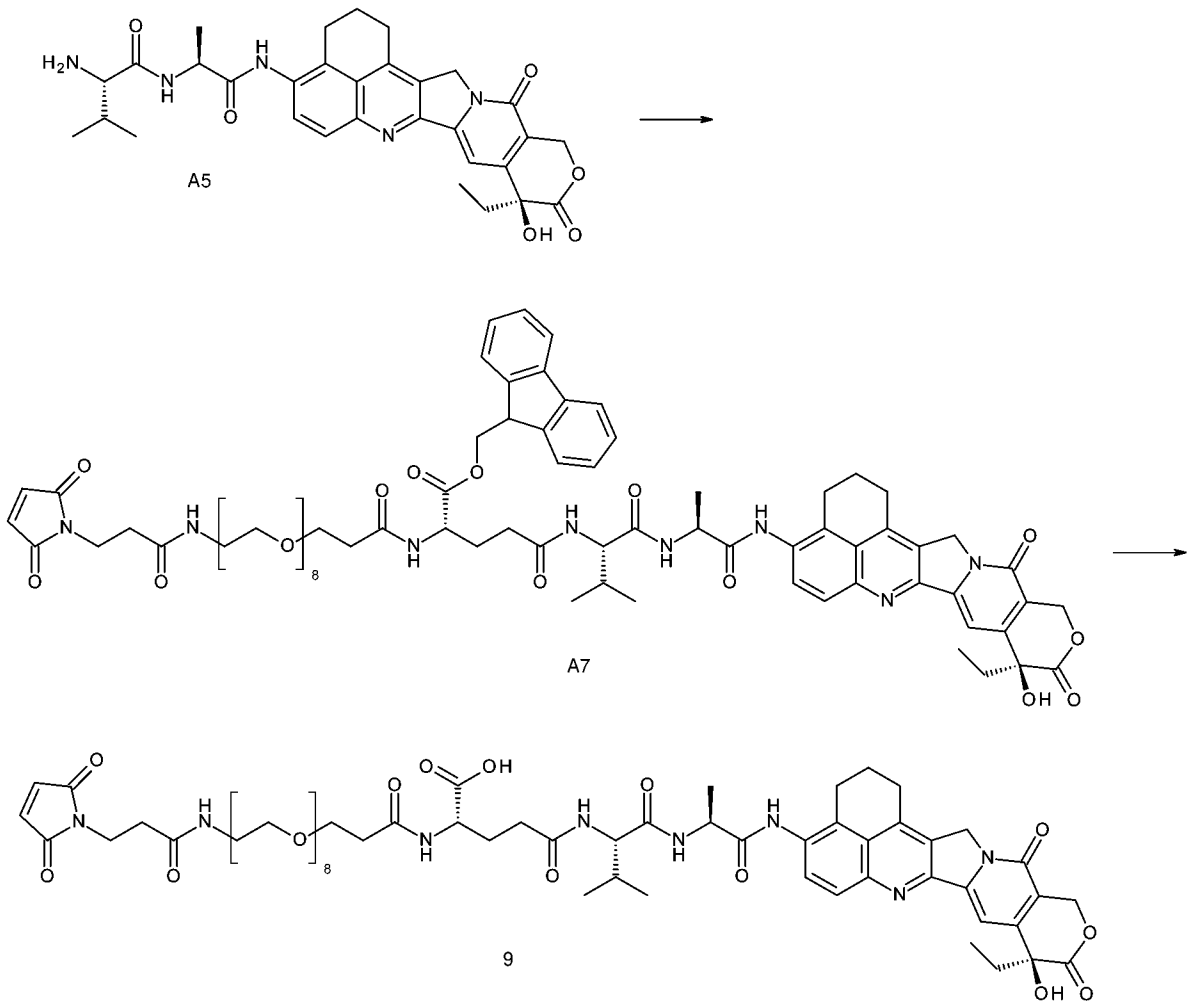
I16　　A2

烯丙基 ((S)-1-(((S)-1-((4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸酯（**A2**）

【0659】將EDCI.HCl（7.71 g，31.2 mMol）添加至烯丙氧羰基-Val-Ala-OH（8.49 g，31.2 mmol）於CH_2Cl_2（200 mL）中之溶液並攪拌15 min或直至溶解。隨後添加**I16**（5 g，28.3 mMol）並將所得混合物攪拌直至反應完成。將揮發物在減壓下去除。將粗產物吸收於Et_2O（50 mL）中並將混合物超音波處理3

min。將固體過濾並再次吸收於CH2Cl2（50 mL）中，超音波處理3 min並再次過濾以給出呈灰色固體的純的產物**A2**（12.21 g，79%產率）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.47 min，*m/z* 431.5 $[M + H]^{\cdot+}$。

合成實例11



a) (9H-芴-9-基)甲基 N2-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3-側氧基-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧-4-氮雜三十一烷-31-醯基)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-L-麩醯胺酸（A7）

【0660】將EDCI.HCl（0.10 mmol，1.2當量）添加至**A5**（0.087 mmol，1.0當量）和Mal-PEG_8-Glu-OH（0.10 mmol，1.2當量）於DCM（5 mL）中之溶

液中並將所得混合物在室溫下攪拌過夜。將反應混合物蒸發至乾燥，並藉由柱（8%-12% MeOH/DCM）進行純化得到呈白色固體的產物。產率 = 80 mg（63%）。LC/MS（方法B） rt 1.66 min *m/z* (1456.2) M+H。

b) N2-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3-側氧基-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧-4-氮雜三十一烷-31-醯基)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-L-麩醯胺酸（9）

【0661】將1-甲基吡咯啶（200 μL）添加至**A7**（0.06 mmol）於DMF（0.8 mL）中之溶液中並在室溫下攪拌10 min。在真空下除去溶劑，並將殘餘物藉由製備型HPLC（30% MeCN/水+ 0.05%甲酸，經8.5 min）純化。將含產物的級分冷凍乾燥以給出呈灰白色固體的產物。產率 = 23 mg（30%）。LC/MS（方法B） rt 1.43 min *m/z* (1278.4) M+H。

【0662】上述說明書中提及的所有出版物藉由引用併入本文。本發明之所描述的方法和系統的各種修改和變化對於熟悉該項技術者將係顯而易見的，而不背離本發明之範圍和精神。雖然已結合特定較佳的實施方式描述了本發明，但應當理解，要求保護的本發明不應不適當地限於這類特定實施方式。實際上，對於生物化學和生物技術或相關領域的技術者顯而易見的、用於執行本發明之所描述的實施方式的各種修改旨在落入如下申請專利範圍之範圍內。

序列

識別字	序列
ZY0EPQ-E02；CHDR1	SEQ ID NO: 1： GYYWN
ZY0EPQ-E02；CHDR2	SEQ ID NO: 2: EINHSGSTNYNPSLKS
ZY0EPQ-E02；CHDR3	SEQ ID NO: 3： NLYNWNLDS
ZY0EPQ-E02；CLDR1	SEQ ID NO: 4： RASQGIRNDLG
ZY0EPQ-E02；CLDR2	SEQ ID NO: 5： VASSLQS

ZY0EPQ-E02；CLDR3	SEQ ID NO: 6： LQHNSYPRT
ZY0EQD-E02；CHDR1	SEQ ID NO: 7： GYYWN
ZY0EQD-E02；CHDR2	SEQ ID NO: 8： EINHSGSTSYNPSLKS
ZY0EQD-E02；CHDR3	SEQ ID NO: 9： VLYNWNVDS
ZY0EQD-E02；CLDR1	SEQ ID NO: 10： RASQDIRNDVG
ZY0EQD-E02；CLDR2	SEQ ID NO: 11： AASRLQS
ZY0EQD-E02；CLDR3	SEQ ID NO: 12： LQHNSYPRT
ZY0EOB-F05；CHDR1	SEQ ID NO: 13： SGGYYWS
ZY0EOB-F05；CHDR2	SEQ ID NO: 14： NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EOB-F05；CHDR3	SEQ ID NO: 15： EKALATVTPSGYENYYTVDV
ZY0EOB-F05；CLDR1	SEQ ID NO: 16： WASQGISSYLA
ZY0EOB-F05；CLDR2	SEQ ID NO: 17： AASTLQS
ZY0EOB-F05；CLDR3	SEQ ID NO: 18： QHLNSYPLT
ZY0EO5-E07；CHDR1	SEQ ID NO: 19： SGGYYWS
ZY0EO5-E07；CHDR2	SEQ ID NO: 20： NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EO5-E07；CHDR3	SEQ ID NO: 21： EKALASVIPSGYENYYVVDV
ZY0EO5-E07；CLDR1	SEQ ID NO: 22： WASQGIAGYLA
ZY0EO5-E07；CLDR2	SEQ ID NO: 23： AASTLQS
ZY0EO5-E07；CLDR3	SEQ ID NO: 24： QHLNSYPLT
ZY0EP0-C07；CHDR1	SEQ ID NO: 25： DYYMS
ZY0EP0-C07；CHDR2	SEQ ID NO: 26： YISSSGSTIYYTDSVKG
ZY0EP0-C07；CHDR3	SEQ ID NO: 27： DGVGFDY
ZY0EP0-C07；CLDR1	SEQ ID NO: 28： RASQSVSSSYLA
ZY0EP0-C07；CLDR2	SEQ ID NO: 29： AASSRAT
ZY0EP0-C07；CLDR3	SEQ ID NO: 30： QQYGSSPLYT

SEQ ID NO: 31（ZY0EPQ-E02，可變重鏈）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTILVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNLYNWNLDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 32（ZY0EPQ-E02，可變輕鏈）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYVASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 33（ZY0EQD-E02，可變重鏈，例如種系化前）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 34（ZY0EQD-E02，可變輕鏈）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 35（ZY0EOB-F05，可變重鏈）

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCATEKALATVTPSGYENYYTVDV
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 36（ZY0EOB-F05，可變輕鏈）

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 37（ZY0EO5-E07，可變重鏈）

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKALASVIPSGYENYYVVDV
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 38（ZY0EO5-E07，可變輕鏈）

DIQLTQSPSFLSASVGGRVTITCWASQGIAGYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 39：（ZY0EP0-C07，可變重鏈）

QVQLVESGGVLVKPGGSLRLSCAASGFTLSDYYMSWIRQAPGMGLEWVSYISSSGSTIY
YTDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGVGFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 40（ZY0EP0-C07，可變輕鏈）

EIVLTQSPGTLSLFPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQSPRLLIYAASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 41（Maia重鏈恒定區，半胱胺酸插入帶下劃線）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 42（輕鏈恒定區）

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 43（ZY0EQD-E02，可變重鏈，例如種系化前，例如*SEQ ID*

***NO: 33/ SEQ ID NO: 45*的變體）**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGRGLEWIGEINHSGSTSY
NPSLKSRITISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 44（ZY0EQD-E02，輕鏈）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 45（EQD-E02_GL，可變重鏈，GL = 種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 46（EQD-E02-GLY，可變重鏈，GLY = 具有Y取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Y**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 47（EQD-E02-GLQ，可變重鏈，GLQ = 具有Q取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Q**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 48（E02-GL-Maia-重鏈，半胱胺酸插入帶下劃線）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49（E02-GLY-Maia-重鏈，GLY = 具有Y取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Y**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50（E02-GLQ-Maia-重鏈，GLQ = 具有Q取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Q**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51（E02-GL-WT-重鏈）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52（重鏈恒定區）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 53（人B7H4核酸序列，包括5'和3' UTR）

GCCACCatggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctttggtatttcagggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacctgacatcaaactttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaaagaaggcaaagatgagctgtcggagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaacgtgcaactcacagatgctggcacctacaaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttcccccagcccacagtggtctgggcatcccaagttgaccagggagccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctctacaatgttacgatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatcaaagtgacagaatcggagatcaaaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttctttctttgccatcagctgggcacttctgcctctcagccctacctgatgctaaaaTAATAA

SEQ ID NO: 54（人B7H4核酸序列，編碼序列）

atggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctttggtatttcaggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacctgacatcaaactttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaaagaaggcaaagatgagctgtcggagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaacgtgcaactcacagatgctggcacctacaaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttcccccagcccacagtggtctgggcatcccaagttgaccagggagccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctctacaatgttacgatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatcaaagtgacagaatcggagatcaaaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttctttctttgccatcagctgggcacttctgcctctcagcccttacctgatgctaaaa

SEQ ID NO: 55（人B7H4多肽序列；UniProt登錄號：Q7Z7D3）
MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSD
IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD
AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

實施方式

E1. 一種結合至B7-H4的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

E2. 根據E1所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 43和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 46和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

v. 分別含有SEQ ID NO: 47和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

vi. 分別含有SEQ ID NO: 31和SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

vii. 分別含有SEQ ID NO: 35和SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

viii. 分別含有SEQ ID NO: 37和SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；或

ix. 分別含有SEQ ID NO: 39和SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

E3. 根據E1或E2所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

E4. 根據E1-E3所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

E5. 根據E1-E4所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合OVCAR4細胞系。

E6. 根據E1-E5所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。

E7. 根據E1-E5所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

E8. 根據E1-E7所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

E9. 根據E1-E5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈；以及含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈。

E10. 根據E1-E5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的重鏈；以及含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈。

E11. 根據E1-E10中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至異源藥劑。

E12. 根據E1-E11中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、抗微生物劑、治療劑、前驅藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物響應調節劑、藥學試劑、淋巴介質、異源抗體、異源抗體的片段、可檢測標記、聚乙二醇（PEG）、放射性同位素、或其組合。

E13. 根據E1-E12中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、或其組合。

E14. 根據E1-E13中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至異源藥劑，該異源藥劑選自由以下組成之群組：微管溶素AZ1508、吡咯并苯并二氮呼SG3315、吡咯并苯并二氮呼SG3249、或其組合。

E15. 根據E1-E14中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素：（SG3249）。

E16. 根據E1-E14中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至：

（SG3932）；（SG4010）；（SG4057）；和/或（SG4052）。

E17. 根據E1-E14或E16中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段靶合至：（SG3932）。

E18. 根據E1-E17中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段係單株抗體。

E19. 根據E1-E18中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段係人源化單株抗體。

E20. 一種藥物組成物，該藥物組成物包含根據E1-E19中任一項所述之抗體或其抗原結合片段。

E21. 一種多核苷酸，該多核苷酸編碼根據E1-E19中任一項所述之抗體或其抗原結合片段。

E22. 一種宿主細胞，該宿主細胞包含根據E21所述之多核苷酸。

E23. 一種用於產生結合B7-H4的抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括在宿主細胞中表現根據E22所述之多核苷酸。

E24. 一種可藉由根據E23所述之方法獲得的抗體或其抗原結合片段。

E25. 一種治療包含表現B7-H4的癌細胞的癌症之方法，該方法包括向受試者投與根據E1-E19或E24中任一項所述之抗體或抗原結合片段、根據E20所述之藥物組成物、或其組合。

E26. 根據E1-E19或24中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，或根據E20所述之藥物組成物，用於治療癌症，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

E27. 根據E25所述之方法，或根據E26所述使用的抗體或其抗原結合片段或藥物組成物，其中所述癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、膽管癌、NSCLC（鱗癌和/或腺癌）、胰臟癌和胃癌。

E28. 用於根據E25-E27中任一項所述使用的方法、或抗體或其抗原結合片段或藥物組成物，其中所述癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌和膽管癌。

E29. 用於根據E25-E28中任一項所述使用的方法、或抗體或其抗原結合片段或藥物組成物，其中所述癌症係選自以下的乳癌：激素受體陽性（HR+）乳癌、人表皮生長因子受體2陽性（HER2+）乳癌和三陰性乳癌（TNBC）。

E30. 一種用於檢測樣本中是否存在B7-H4多肽之方法，該方法包括：

i. 使樣本與根據E1-E19或E24中任一項所述之抗體或其抗原結合片段、或根據E20所述之藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；

ii. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；

iii. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽的存在；

iv. 其中抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽的不存在。

E31. 根據E30所述之方法，其中所述抗體-抗原複合物的存在指示癌細胞的存在，並且其中所述抗體-抗原複合物的不存在指示癌細胞的不存在。

E32. 根據E30或E31所述之方法，其中該樣本係可從受試者獲得的分離的樣本。

E33. 根據E30-E32中任一項所述之方法，其中該B7-H4多肽係癌細胞的組成成分。

E34. 一種抗體-藥物軛合物（ADC），該抗體-藥物軛合物包含：

(i) 結合人B7-H4的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1；含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2；含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3；以及含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1；含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2；和含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3；

(ii) 連接子；以及

(iii) 細胞毒性劑，其中該細胞毒性劑係SG3932，

其中該ADC具有為8的藥物與抗體比率（DAR）。

E35. 根據E34所述之ADC，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕（VL）鏈。

E36. 根據E34或E35所述之ADC，該ADC包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（HC）和含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（LC）。

E37. 一種藥物組成物，該藥物組成物包含根據E34-E37中任一項所述之ADC。

E38. 一種治療包含表現B7-H4的癌細胞的癌症之方法，該方法包括向受試者投與根據E34-E37中任一項所述之ADC、或根據E37所述之藥物組成物、或其組合。

【符號說明】

【0663】 無

【生物材料寄存】

【0664】 無

【序列表】

<110> 英商梅迪繆思有限公司（MedImmune Limited）

<120> 治療性結合分子

<130> B7H4-100-WO-PCT

<140> TW 110133915
<141> 2021-09-11

<150> US 63/077,207
<151> 2020-09-11

<160> 55

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 1

Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 2

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 3

Asn Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Asp Ser
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 5

Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 6

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 7

Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 8

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 9

Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser
1 5

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp Val Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 11

Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 12

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 13

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 14

Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 15

Glu Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Pro Ser Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr
1 5 10 15

Thr Val Asp Val
20

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 16

Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 17

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18

Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 19

Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 20

Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 21

Glu Lys Ala Leu Ala Ser Val Ile Pro Ser Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr
1 5 10 15

Val Val Asp Val
20

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 22

Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 23

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 24

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 24

Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 25

Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 26

Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 27

Asp Gly Val Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 29

Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 30

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Leu Tyr Asn Trp Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Thr Glu Lys Ala Leu Ala Thr Val Thr Pro Ser Gly Tyr Glu
100 105 110

Asn Tyr Tyr Thr Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val

115 120 125

Ser Ser
130

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 36

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Lys Ala Leu Ala Ser Val Ile Pro Ser Gly Tyr Glu
100 105 110

Asn Tyr Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 38

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ala Gly Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 39
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Phe Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 331
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
260 265 270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 42

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 43

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 44
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Val Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 45

<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 45

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 46

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 47

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

```
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
```

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 49
<211> 448
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 49

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175
```

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 50
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Gln His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 51
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 51

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Ala Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Val Leu Tyr Asn Trp Asn Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
        115                 120                 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
    130                 135                 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145                 150                 155                 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
```

195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 52
<211> 331
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 52

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro
115 120 125

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
130 135 140

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
145 150 155 160

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
165 170 175

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
180 185 190

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
195 200 205

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
210 215 220

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
225 230 235 240

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
245 250 255

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
260 265 270

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
275 280 285

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
290 295 300

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

305 310 315 320

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 53
<211> 858
<212> DNA
<213> 智人

<400> 53
gccaccatgg cttccctggg gcagatcctc ttctggagca taattagcat catcattatt 60

ctggctggag caattgcact catcattggc tttggtattt cagggagaca ctccatcaca 120

gtcactactg tcgcctcagc tgggaacatt ggggaggatg gaatcctgag ctgcactttt 180

gaacctgaca tcaaactttc tgatatcgtg atacaatggc tgaaggaagg tgttttaggc 240

ttggtccatg agttcaaaga aggcaaagat gagctgtcgg agcaggatga aatgttcaga 300

ggccggacag cagtgtttgc tgatcaagtg atagttggca atgcctcttt gcggctgaaa 360

aacgtgcaac tcacagatgc tggcacctac aaatgttata tcatcacttc taaaggcaag 420

gggaatgcta accttgagta taaaactgga gccttcagca tgccggaagt gaatgtggac 480

tataatgcca gctcagagac cttgcggtgt gaggctcccc gatggttccc ccagcccaca 540

gtggtctggg catcccaagt tgaccaggga gccaacttct cggaagtctc caataccagc 600

tttgagctga actctgagaa tgtgaccatg aaggttgtgt ctgtgctcta caatgttacg 660

atcaacaaca catactcctg tatgattgaa aatgacattg ccaaagcaac aggggatatc 720

aaagtgacag aatcggagat caaaaggcgg agtcacctac agctgctaaa ctcaaaggct 780

tctctgtgtg tctcttcttt ctttgccatc agctgggcac ttctgcctct cagcccttac 840

ctgatgctaa ataataa 858

<210> 54
<211> 846
<212> DNA
<213> 智人

<400> 54

atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct 60

ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcaggga gacactccat cacagtcact 120

actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct 180

gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc 240

catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg 300

acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg 360

caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat 420

gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat 480

gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tcccccagcc cacagtggtc 540

tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag 600

ctgaactctg agaatgtgac catgaaggtt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac 660

aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagtg 720

acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg 780

tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg 840

ctaaaa 846

<210> 55
<211> 282
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45

```
Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
    50                  55                  60

Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val
65                  70                  75                  80

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
                85                  90                  95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
            100                 105                 110

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
        115                 120                 125

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
    130                 135                 140

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
145                 150                 155                 160

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
                165                 170                 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
            180                 185                 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
        195                 200                 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
    210                 215                 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225                 230                 235                 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
                245                 250                 255
```

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275 280

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種結合至B7-H4的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【請求項2】如請求項1所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 43和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 46和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

v. 分別含有SEQ ID NO: 47和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

vi. 分別含有SEQ ID NO: 31和SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

vii. 分別含有SEQ ID NO: 35和SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

viii. 分別含有SEQ ID NO: 37和SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；或

ix. 分別含有SEQ ID NO: 39和SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

【請求項3】 如請求項1或請求項2所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【請求項4】 如請求項1-3中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

【請求項5】 如請求項1-4中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合OVCAR4細胞系。

【請求項6】 如請求項1-5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。

【請求項7】 如請求項1-5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

【請求項8】 如請求項1-7中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

【請求項9】 如請求項1-5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈；以及含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈。

【請求項10】 如請求項1-5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的重鏈；以及含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈。

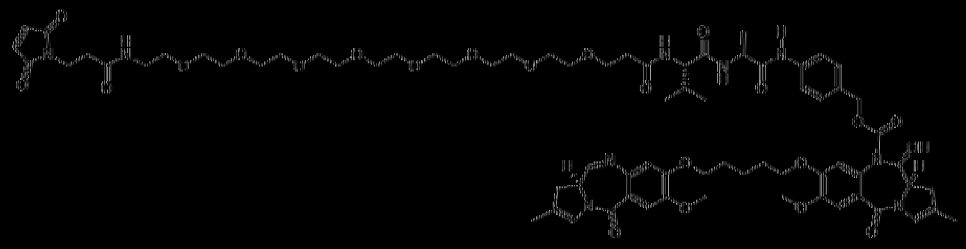
【請求項11】 如請求項1-10中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段與異源藥劑軛合。

【請求項12】 如請求項1-11中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、抗微生物劑、治療劑、前驅藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物響應調節劑、藥學試劑、淋巴介質、異源抗體、異源抗體的片段、可檢測標記、聚乙二醇（PEG）、放射性同位素、或其組合。

〔請求項13〕如請求項1-12中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自拓撲異構酶抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呯、或其組合。

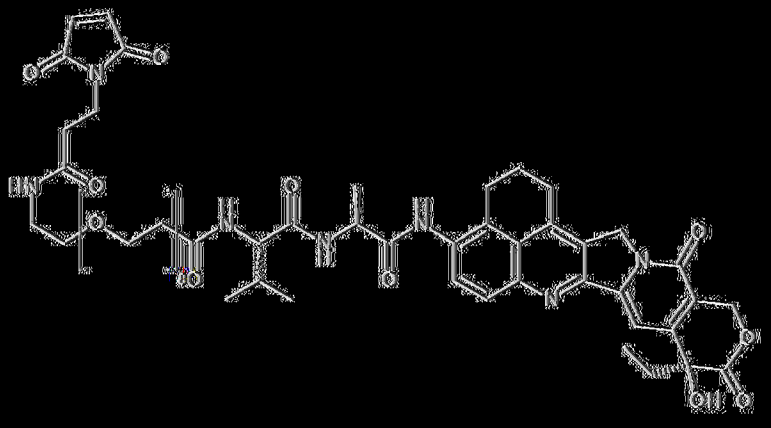
〔請求項14〕如請求項1-13中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至異源藥劑，該異源藥劑選自由以下組成之群組：微管溶素AZ1508、吡咯并苯并二氮呯SG3315、吡咯并苯并二氮呯SG3249、或其組合。

〔請求項15〕如請求項1-14中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素：



（SG3249）。

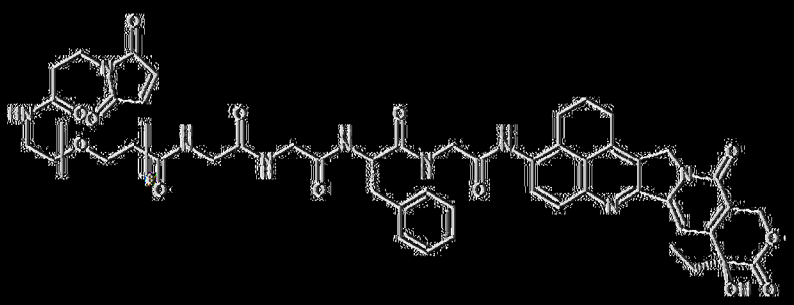
〔請求項16〕如請求項1-14中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至：



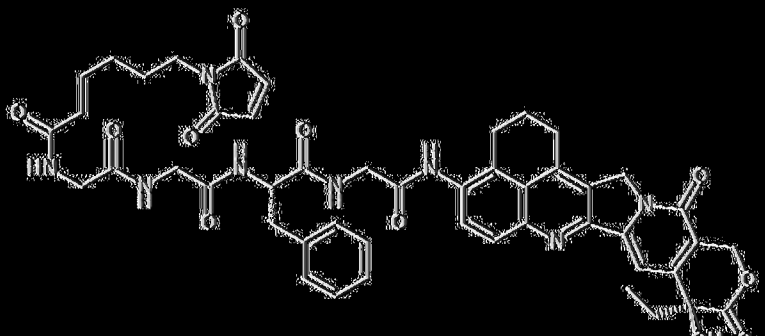
（SG3932）；



（SG4010）；

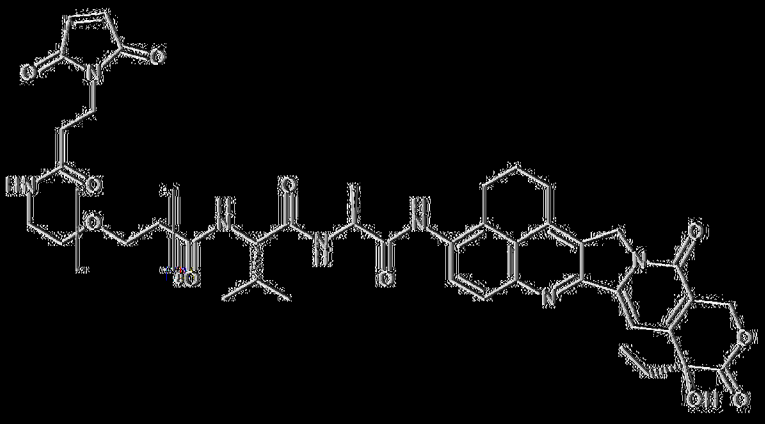


（SG4057）；和/或



（SG4052）。

〔請求項17〕如請求項1-14或16中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段靶合至：



（SG3932）。

〔請求項18〕如請求項1-17中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段係單株抗體。

〔請求項19〕如請求項1-18中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段係人源化單株抗體。

〔請求項20〕一種藥物組成物，該藥物組成物包含如請求項1-19中任一項所述之抗體或其抗原結合片段。

〔請求項21〕一種多核苷酸，該多核苷酸編碼如請求項1-19中任一項所述之抗體或其抗原結合片段。

【請求項22】 一種宿主細胞，該宿主細胞包含如請求項21所述之多核苷酸。

【請求項23】 一種用於產生結合至B7-H4的抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括在宿主細胞中表現如請求項22所述之多核苷酸。

【請求項24】 一種可藉由如請求項23所述之方法獲得的抗體或其抗原結合片段。

【請求項25】 如請求項1-19或24中任一項所述之抗體或抗原結合片段、如請求項20所述之藥物組成物、或其組合在製造用於治療癌症的藥物中之用途。

【請求項26】 如請求項1-19或24中任一項所述之抗體或其抗原結合片段或如請求項20所述之藥物組成物的用途，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

【請求項27】 如請求項25或請求項26所述之用途，其中所述癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、膽管癌、NSCLC（鱗癌和/或腺癌）、胰臟癌和胃癌。

【請求項28】 如請求項25所述之用途，其中所述癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌和膽管癌。

【請求項29】 如請求項25所述之用途，其中所述癌症係乳癌，該乳癌選自激素受體陽性（HR+）乳癌、人表皮生長因子受體2陽性（HER2+）乳癌和三陰性乳癌（TNBC）。

【請求項30】 一種用於檢測樣本中是否存在B7-H4多肽之方法，該方法包括：

i. 使樣本與如請求項1-19或24中任一項所述之抗體或其抗原結合片段、或如請求項20所述之藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；

ii. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；

iii. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽的存在；

iv. 其中抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽的不存在。

【請求項31】 如請求項30所述之方法，其中所述抗體-抗原複合物的存在指示癌細胞的存在，並且其中所述抗體-抗原複合物的不存在指示癌細胞的不存在。

【請求項32】 如請求項30或請求項31所述之方法，其中該樣本係可從受試者獲得的分離的樣本。

【請求項33】 如請求項30-32中任一項所述之方法，其中該B7-H4多肽係癌細胞的組成成分。

【請求項34】 一種抗體-藥物軛合物（ADC），該抗體-藥物軛合物包含：

(i) 結合至B7-H4多肽的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1；含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2；含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3；以及含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1；含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2；和含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3；

(ii) 可裂解的mp-PEG8-val-ala連接子；以及

(iii) 細胞毒性劑，其中該細胞毒性劑係SG3932，

並且其中該ADC具有約8的藥物與抗體比率（DAR）。

【請求項35】 如請求項34所述之ADC，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕（VL）鏈。

【請求項36】 如請求項34或35所述之ADC，該ADC包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（HC）和含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（LC）。

【請求項37】 一種藥物組成物，該藥物組成物包含如請求項34-36中任一項所述之ADC。

【請求項38】 如請求項34-36中任一項所述之ADC、或如請求項37所述之藥物組成物、或其組合在製造用於治療癌症的藥物中之用途。

【請求項39】 如請求項25或請求項38所述之用途，其中該癌細胞具有同源DNA修復缺陷。

【請求項40】 如請求項39所述之用途，其中該同源DNA修復缺陷由BRCA1突變的存在定義。

【請求項41】 如請求項39或請求項40所述之用途，其中該同源DNA修復缺陷由RAD51病灶形成測定中的負評分定義。

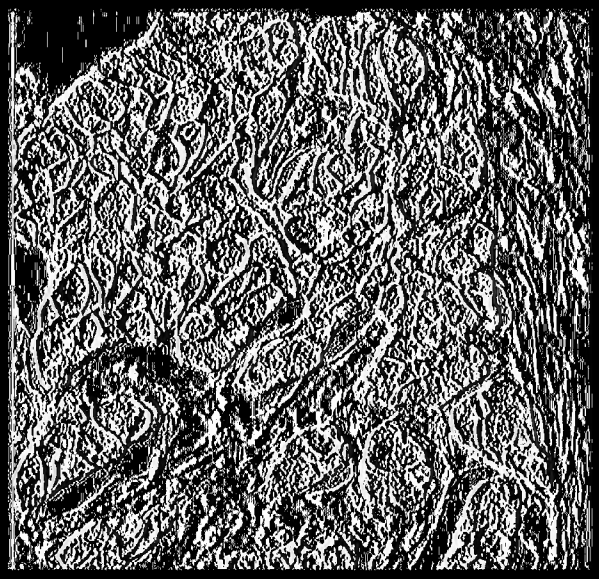
【請求項42】 如請求項1-19或24中任一項所述之抗體或抗原結合片段、如請求項20所述之藥物組成物、如請求項34-36中任一項所述之ADC、如請求項37所述之藥物組成物、或其組合在製造用於減小表現B7-H4的腫瘤的體積的藥物中之用途。

【請求項43】 如請求項42所述之用途，其中該腫瘤具有同源DNA修復缺陷。

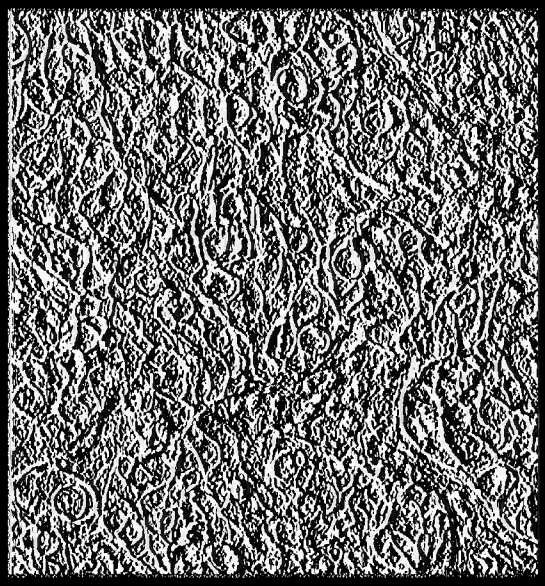
【請求項44】 如請求項43所述之用途，其中該同源DNA修復缺陷由BRCA1突變的存在定義。

【請求項45】 如請求項43或44所述之用途，其中該同源DNA修復缺陷由RAD51病灶形成測定中的負評分定義。

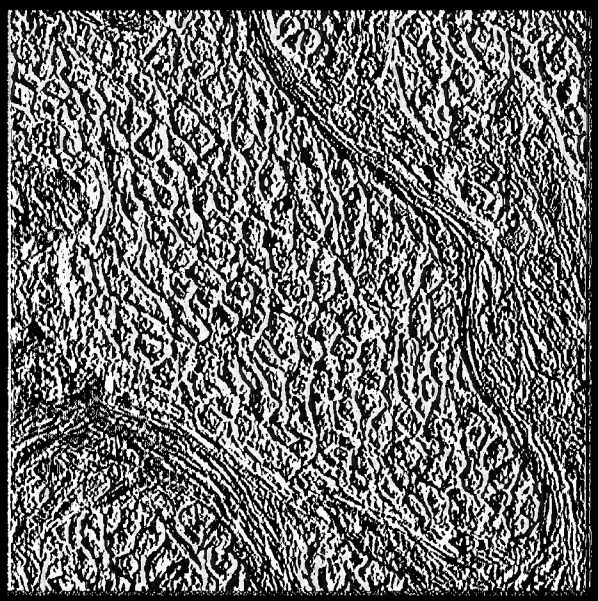
【發明圖式】



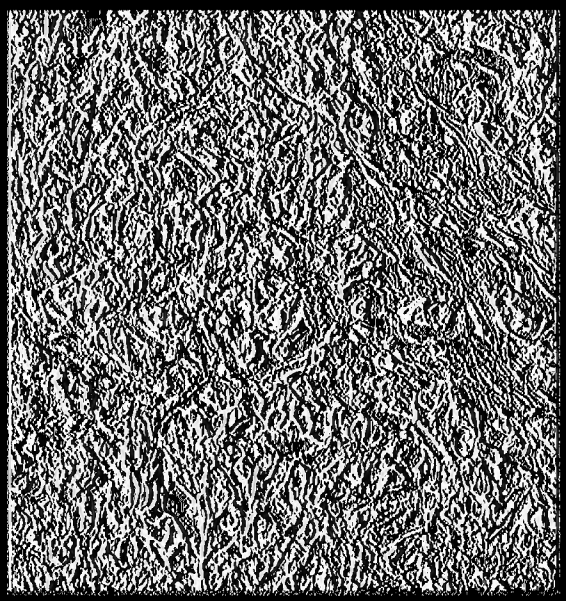
【圖1A】



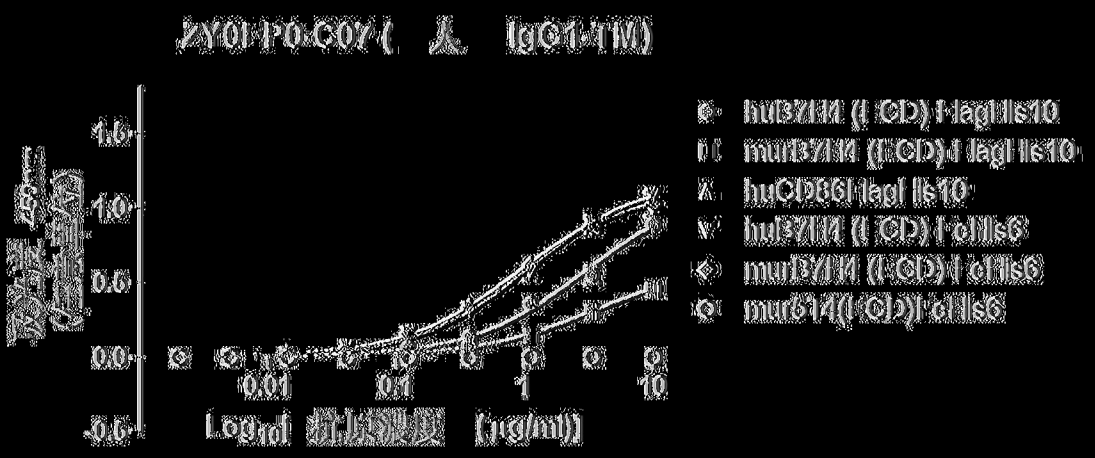
【圖1B】



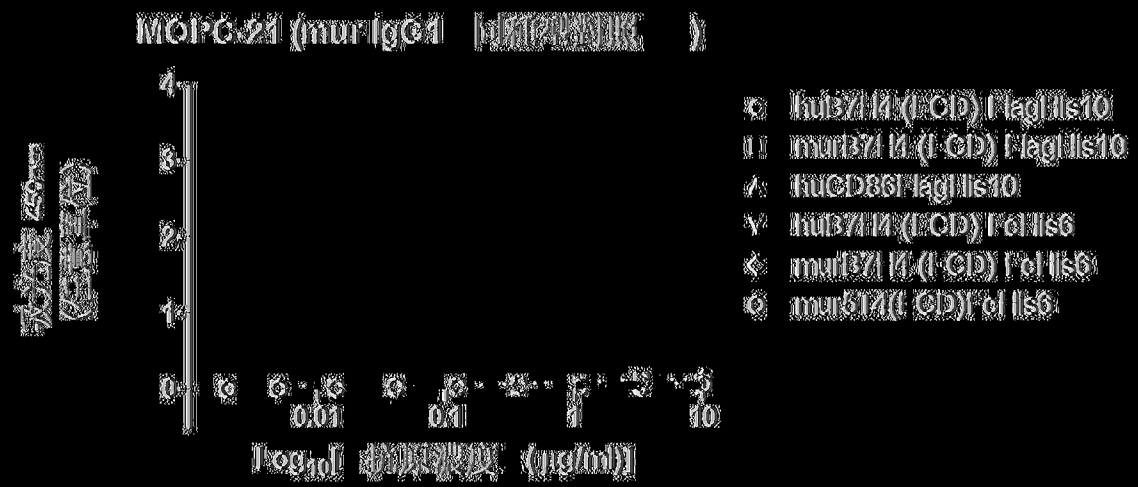
【圖1C】



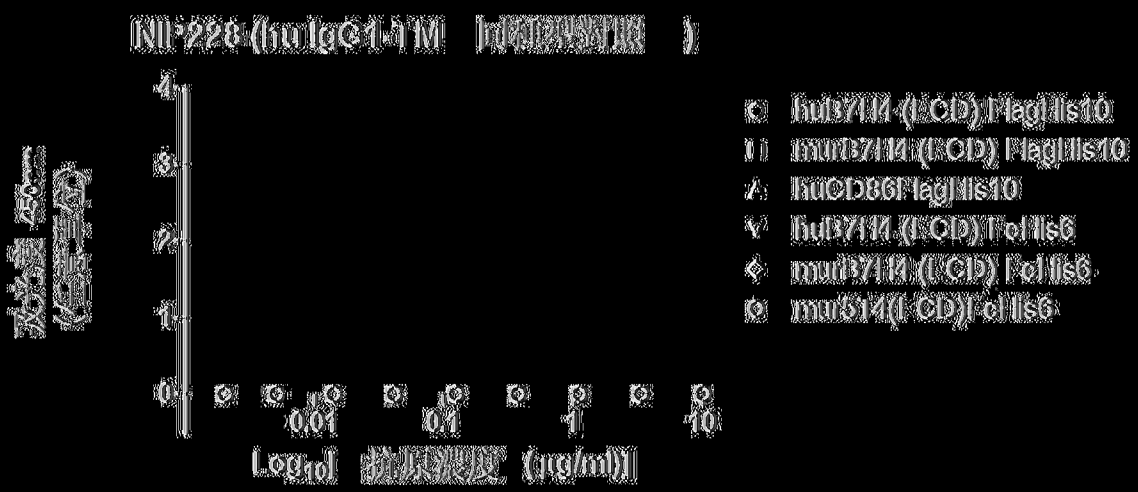
【圖1D】


ZY0I-P0-C07 (人 IgC1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
huB7H4 (I-CD) Flag His10
murB7H4 (I-CD) Flag His10
huCD86 Flag His10
huB7H4 (I-CD) Fc His6
murB7H4 (I-CD) Fc His6
mur514(I-CD)Fc His6

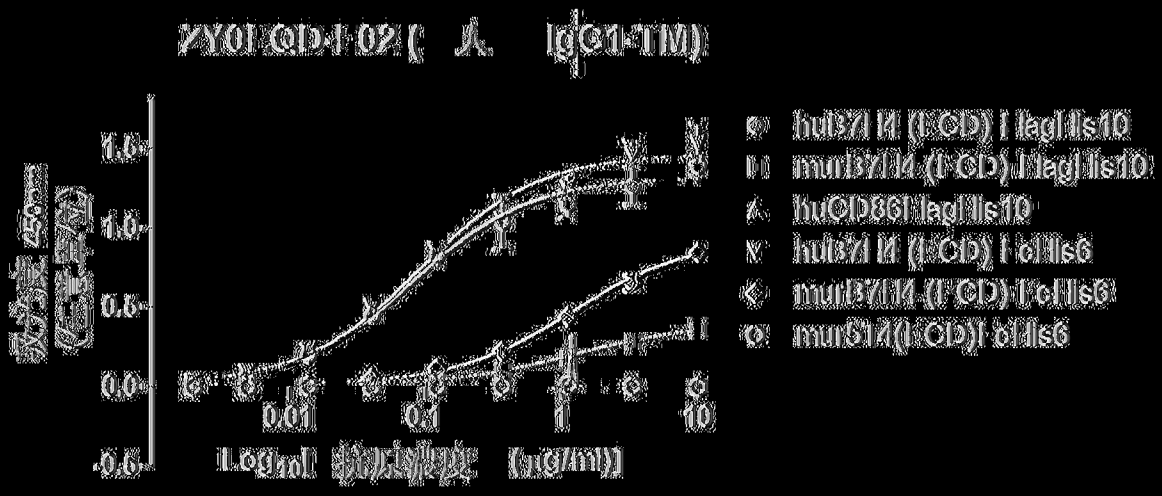
(圖2A)


MOPC-21 (mur IgC1 [illegible])
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
huB7H4 (I-CD) Flag His10
murB7H4 (I-CD) Flag His10
huCD86 Flag His10
huB7H4 (I-CD) Fc His6
murB7H4 (I-CD) Fc His6
mur514(I-CD)Fc His6

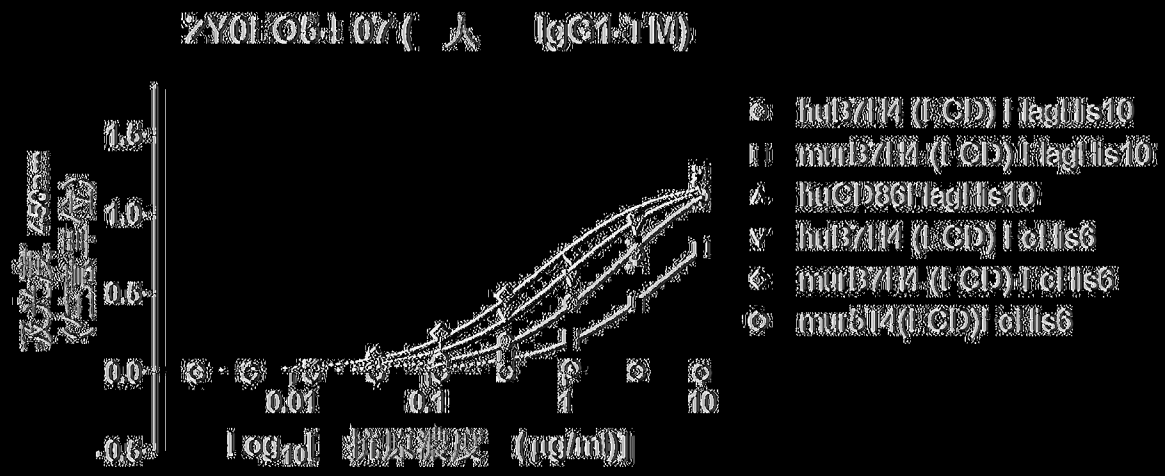
(圖2B)


NIP228 (hu IgC1-TM [illegible])
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
huB7H4 (I-CD) Flag His10
murB7H4 (I-CD) Flag His10
huCD86 Flag His10
huB7H4 (I-CD) Fc His6
murB7H4 (I-CD) Fc His6
mur514(I-CD)Fc His6

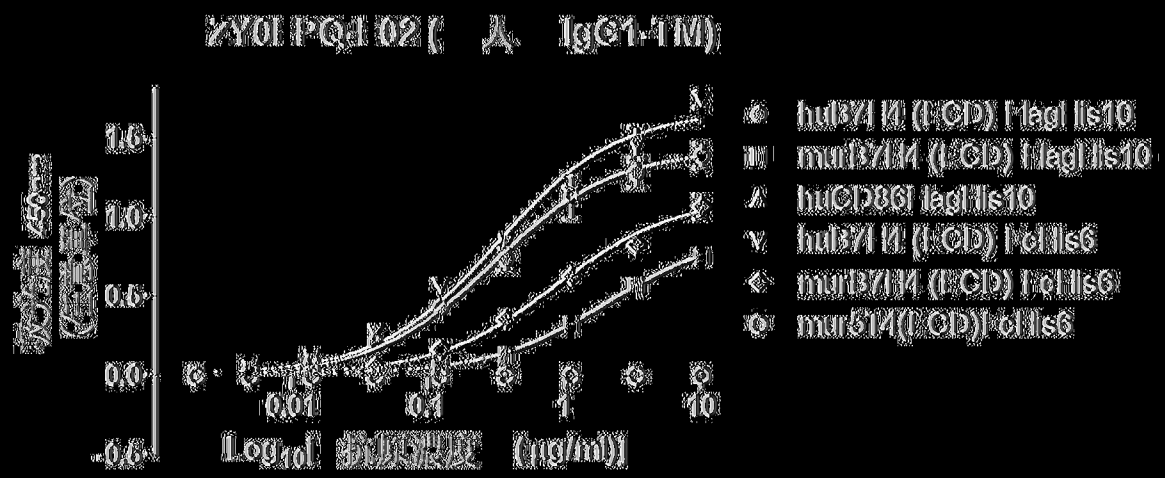
(圖2C)


ZY01 QD-1 02 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (LCD) Flag His10
murB7H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
huB7H4 (LCD) Fc His6
murB7H4 (LCD) Fc His6
mur514(LCD) Fc His6

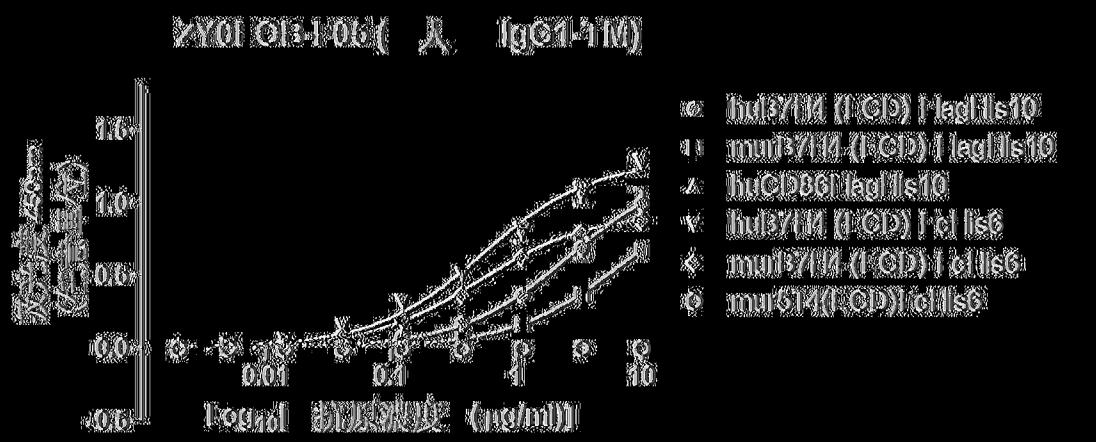
(圖2E)


ZY01 Q5-1 07 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (LCD) Flag His10
murB7H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
huB7H4 (LCD) Fc His6
murB7H4 (LCD) Fc His6
mur514(LCD) Fc His6

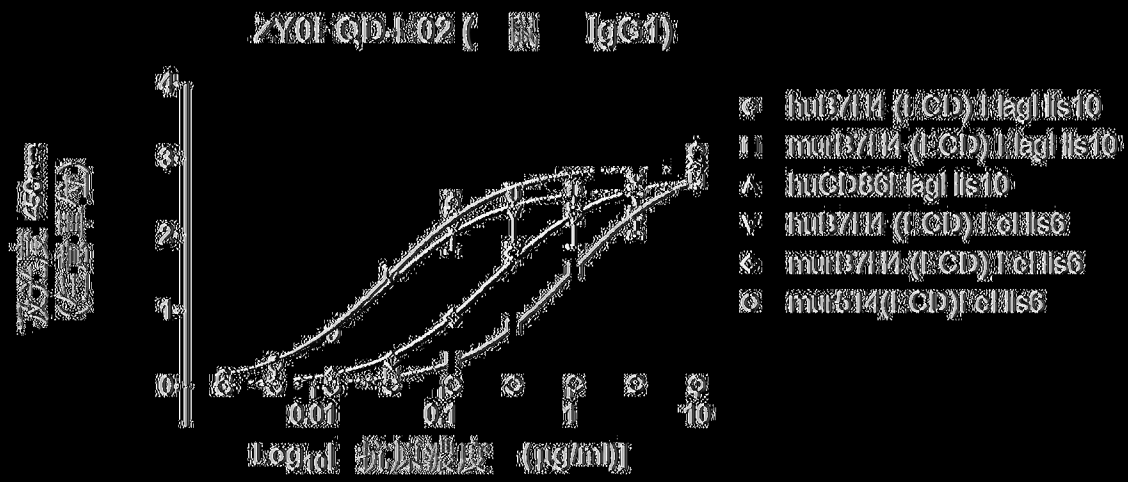
(圖2F)


ZY01 PQ-1 02 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
huB7H4 (LCD) Flag His10
murB7H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
huB7H4 (LCD) Fc His6
murB7H4 (LCD) Fc His6
mur514(LCD) Fc His6

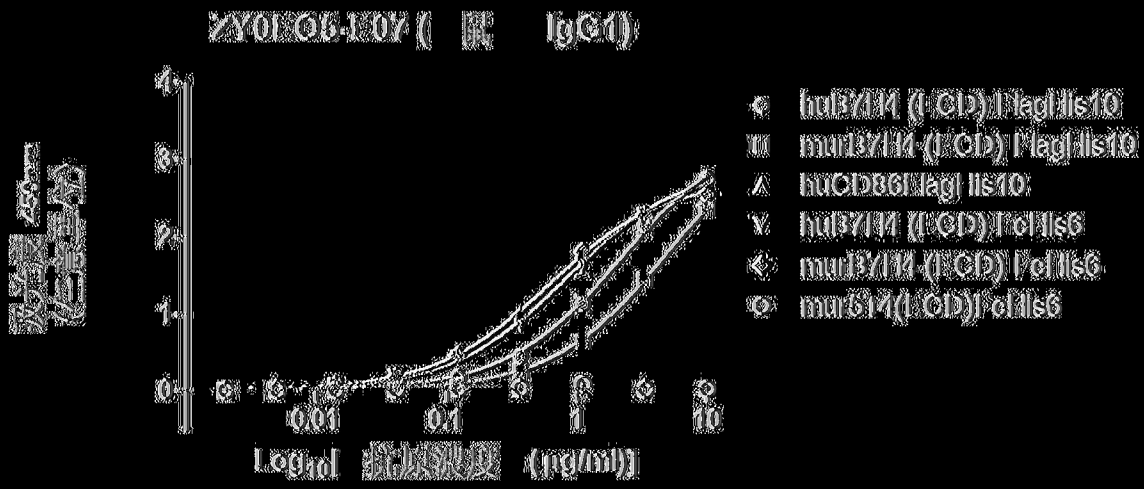
(圖2G)


ZY01-CB-L05 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
hu137H4 (LCD) Flag His10
mu137H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
hu137H4 (LCD) Fc His6
mu137H4 (LCD) Fc His6
mu5T4(LCD) Fc His6

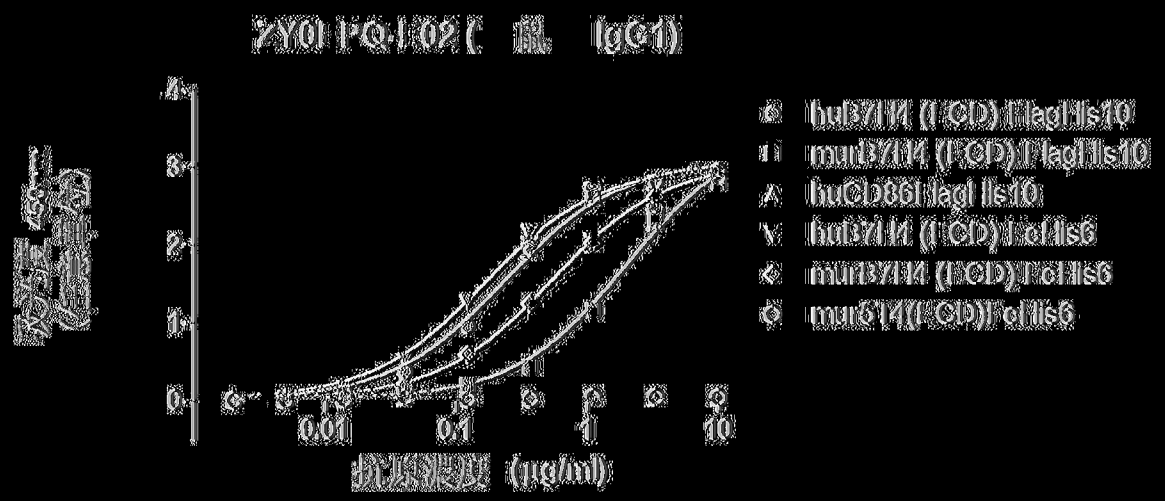
[圖2H]


ZY01-QD-L02 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
hu137H4 (LCD) Flag His10
mu137H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
hu137H4 (LCD) Fc His6
mu137H4 (LCD) Fc His6
mu5T4(LCD) Fc His6

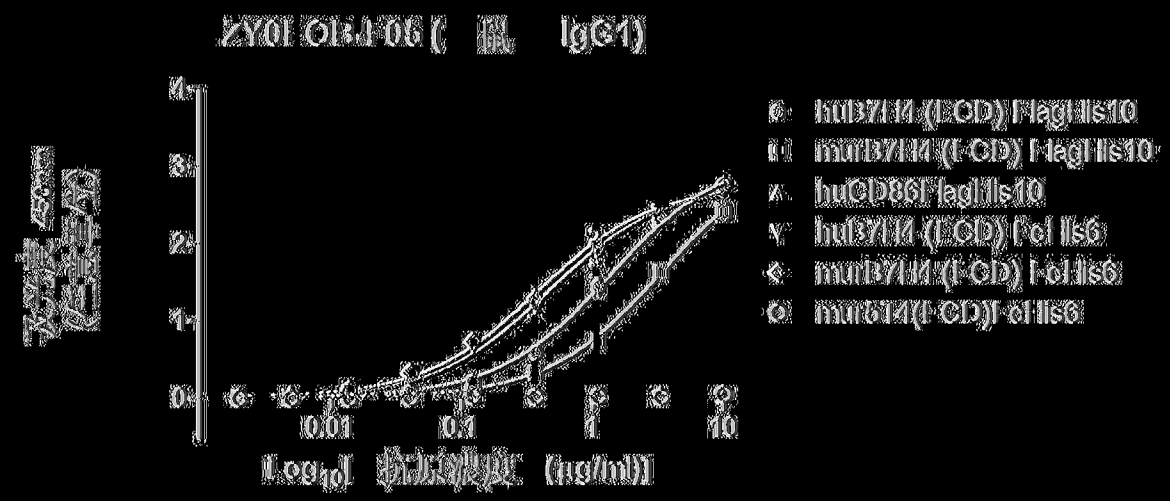
[圖2I]


ZY01-QB-L07 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原浓度 (μg/ml)]
hu137H4 (LCD) Flag His10
mu137H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
hu137H4 (LCD) Fc His6
mu137H4 (LCD) Fc His6
mu5T4(LCD) Fc His6

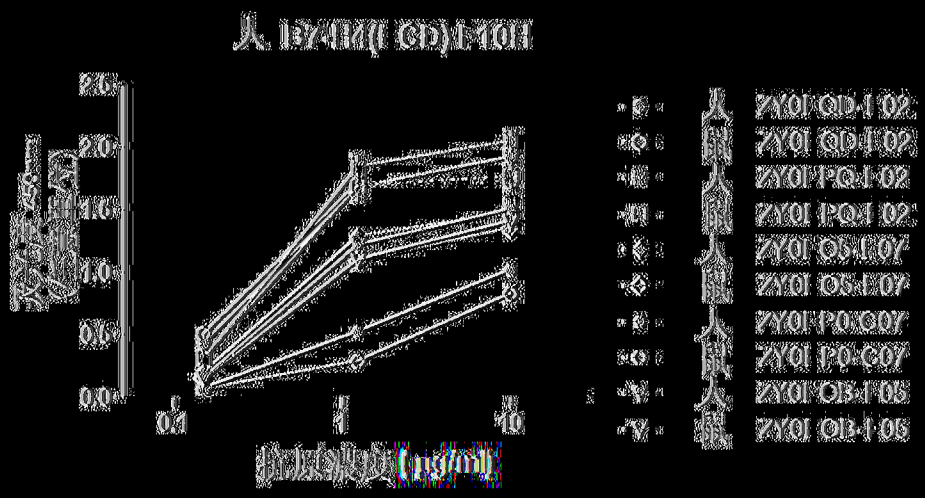
[圖2J]


ZY01 PQ-F02 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
huB7H4 (FCD) FlagHis10
murB7H4 (FCD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (FCD) FcHis6
murB7H4 (FCD) FcHis6
murB14(FCD)FcHis6

[圖2K]


ZY01 OB-F05 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10 抗原濃度 (μg/ml)
huB7H4 (FCD) FlagHis10
murB7H4 (FCD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (FCD) FcHis6
murB7H4 (FCD) FcHis6
murB14(FCD)FcHis6

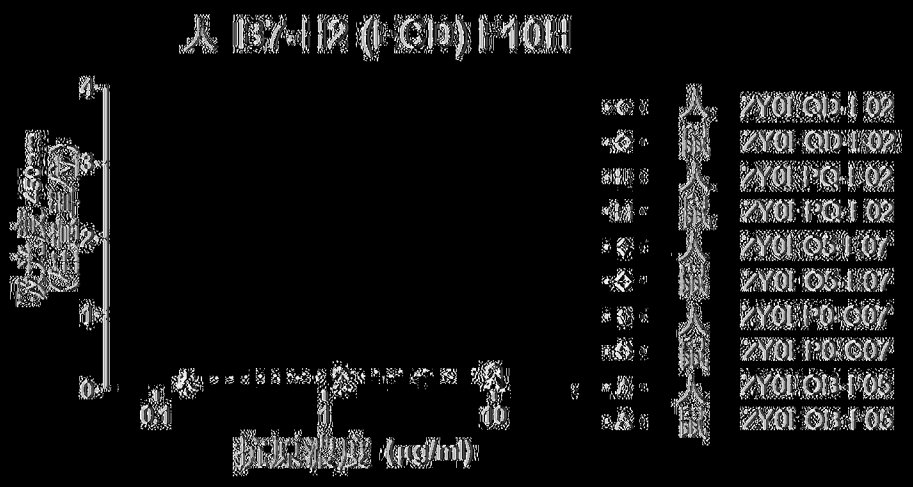
[圖2L]


人 B7-H1(I-CD)1-10H
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
抗原浓度 (ng/ml)
ZY01-QD-1-02
ZY01-QD-1-02
ZY01-PQ-1-02
ZY01-PQ-1-02
ZY01-O5-1-07
ZY01-O5-1-07
ZY01-P0-C07
ZY01-P0-C07
ZY01-OB-1-05
ZY01-OB-1-05

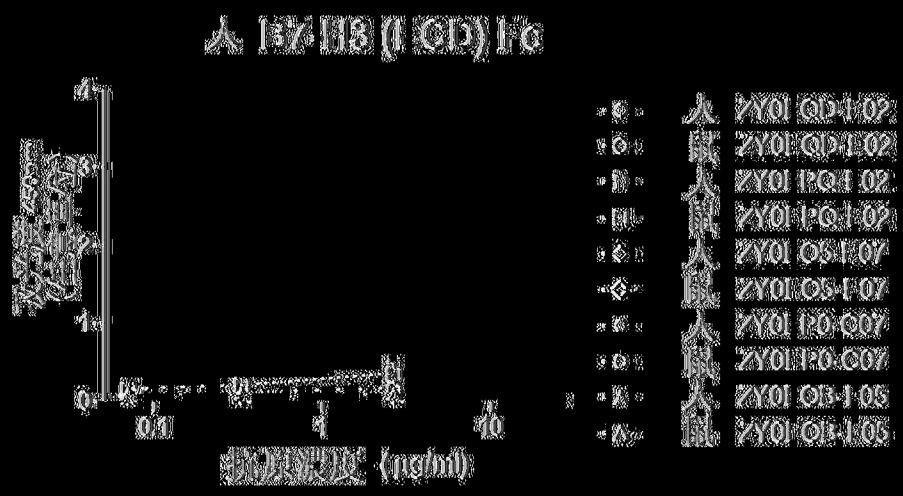
(圖3A)


人 B7-H1(I-CD)1-10H
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原浓度 (ng/ml)
ZY01-QD-1-02
ZY01-QD-1-02
ZY01-PQ-1-02
ZY01-PQ-1-02
ZY01-O5-1-07
ZY01-O5-1-07
ZY01-P0-C07
ZY01-P0-C07
ZY01-OB-1-05
ZY01-OB-1-05

(圖3B)


人 B7-H2 (I-CD) 1-10H
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原浓度 (ng/ml)
ZY01-QD-1-02
ZY01-QD-1-02
ZY01-PQ-1-02
ZY01-PQ-1-02
ZY01-O5-1-07
ZY01-O5-1-07
ZY01-P0-C07
ZY01-P0-C07
ZY01-OB-1-05
ZY01-OB-1-05

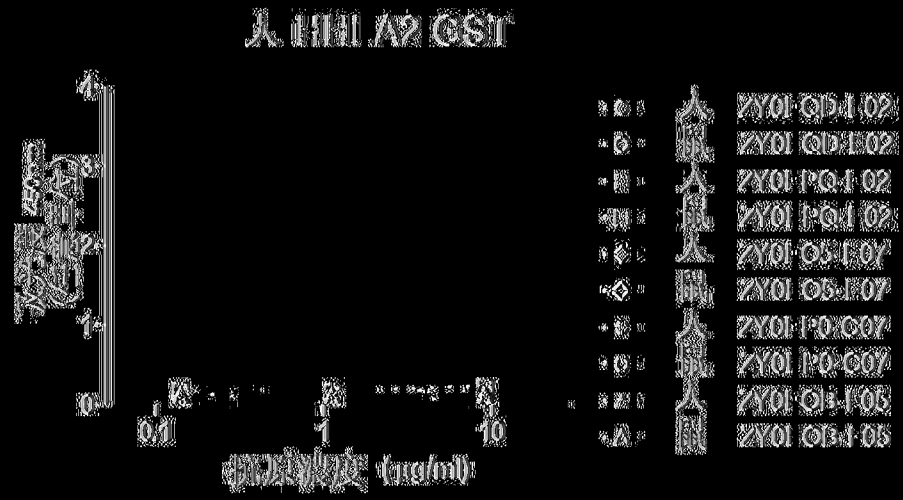
(圖3C)


人 B7 H8 (LCD) Fc
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
C 鼠 ZY01 QD-1-02
B 人 ZY01 PQ-1-02
B 鼠 ZY01 PQ-1-02
C 人 ZY01 O5-1-07
C 鼠 ZY01 O5-1-07
C 人 ZY01 P0-C07
C 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 OB-1-05
A 鼠 ZY01 OB-1-05

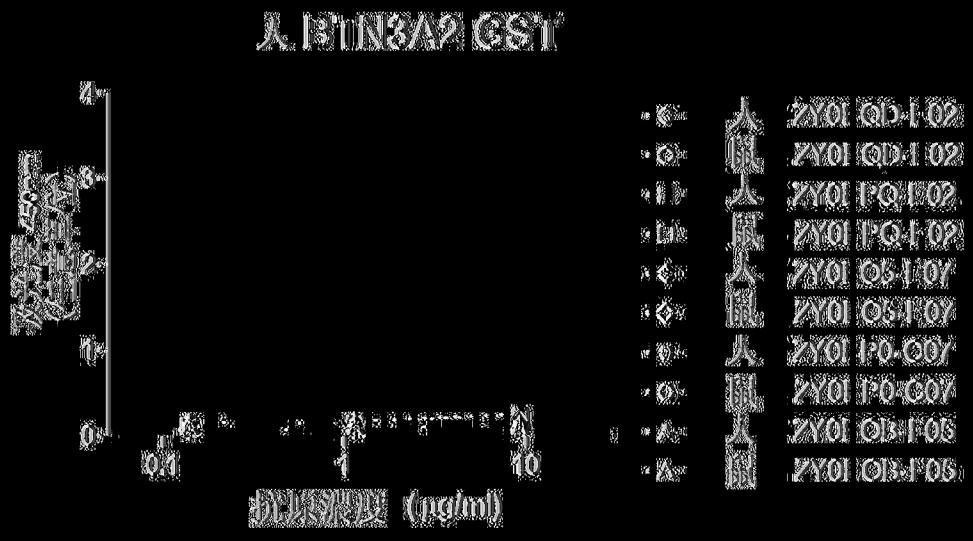
(圖3D)


人 B7N1A1 GST
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
C 鼠 ZY01 QD-1-02
B 人 ZY01 PQ-1-02
B 鼠 ZY01 PQ-1-02
C 人 ZY01 O5-1-07
C 鼠 ZY01 O5-1-07
C 人 ZY01 P0-C07
C 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 OB-1-05
A 鼠 ZY01 OB-1-05

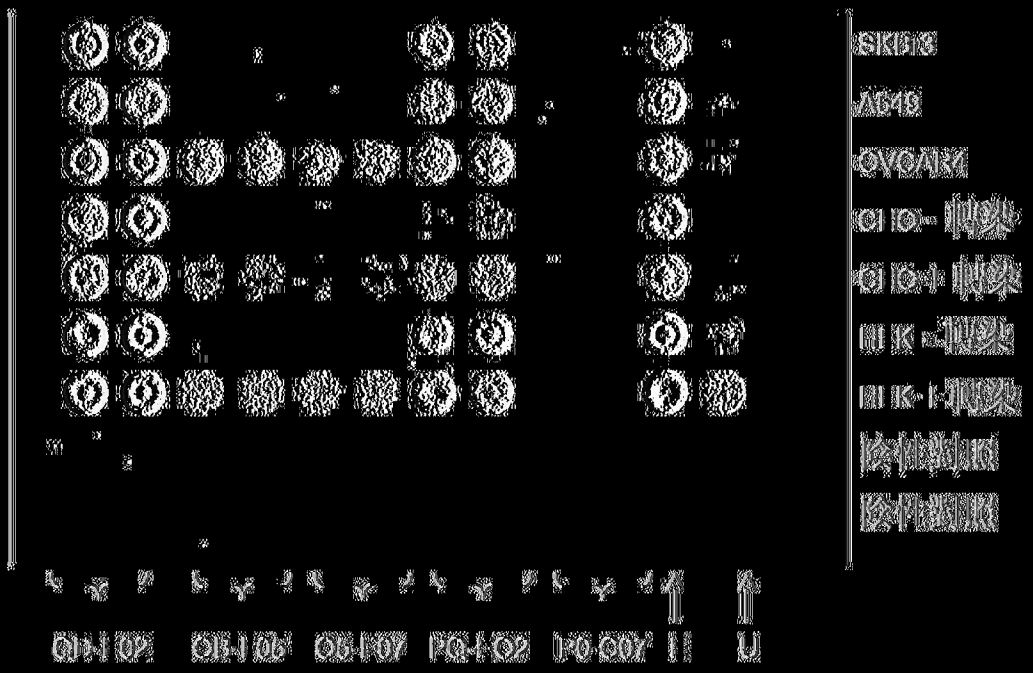
(圖3E)


人 HH1 A2 GST
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
C 鼠 ZY01 QD-1-02
B 人 ZY01 PQ-1-02
B 鼠 ZY01 PQ-1-02
C 人 ZY01 O5-1-07
C 鼠 ZY01 O5-1-07
C 人 ZY01 P0-C07
C 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 OB-1-05
A 鼠 ZY01 OB-1-05

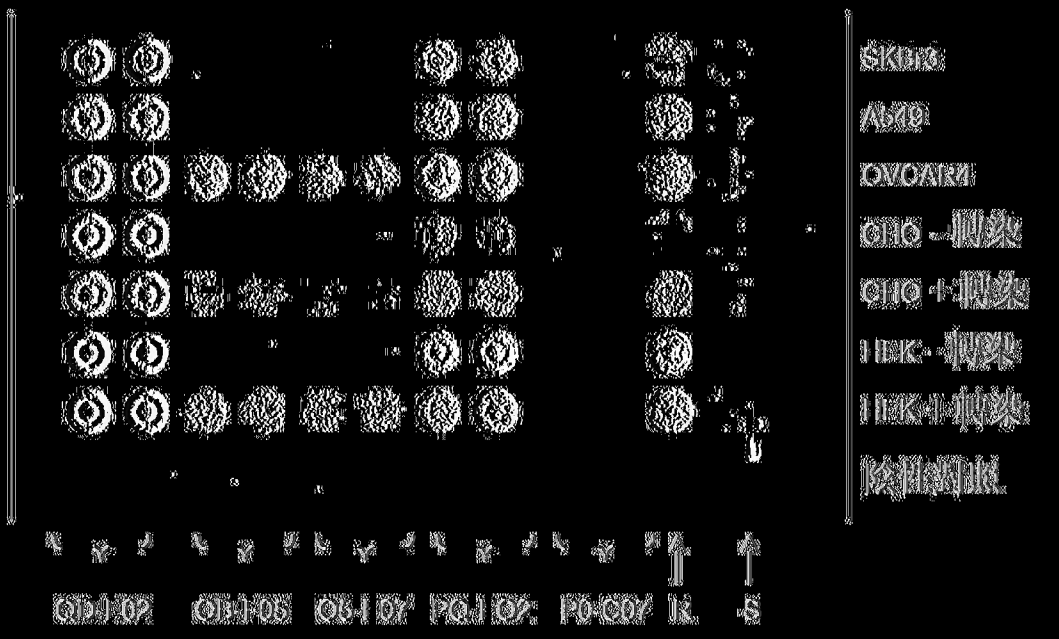
(圖3F)


人 BTN3A2 CST
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
D 鼠 ZY01 QD-1-02
E 人 ZY01 PQ-1-02
F 鼠 ZY01 PQ-1-02
G 人 ZY01 Q5-1-07
H 鼠 ZY01 Q5-1-07
I 人 ZY01 P0-C07
J 鼠 ZY01 P0-C07
K 人 ZY01 Q3-1-05
L 鼠 ZY01 Q3-1-05

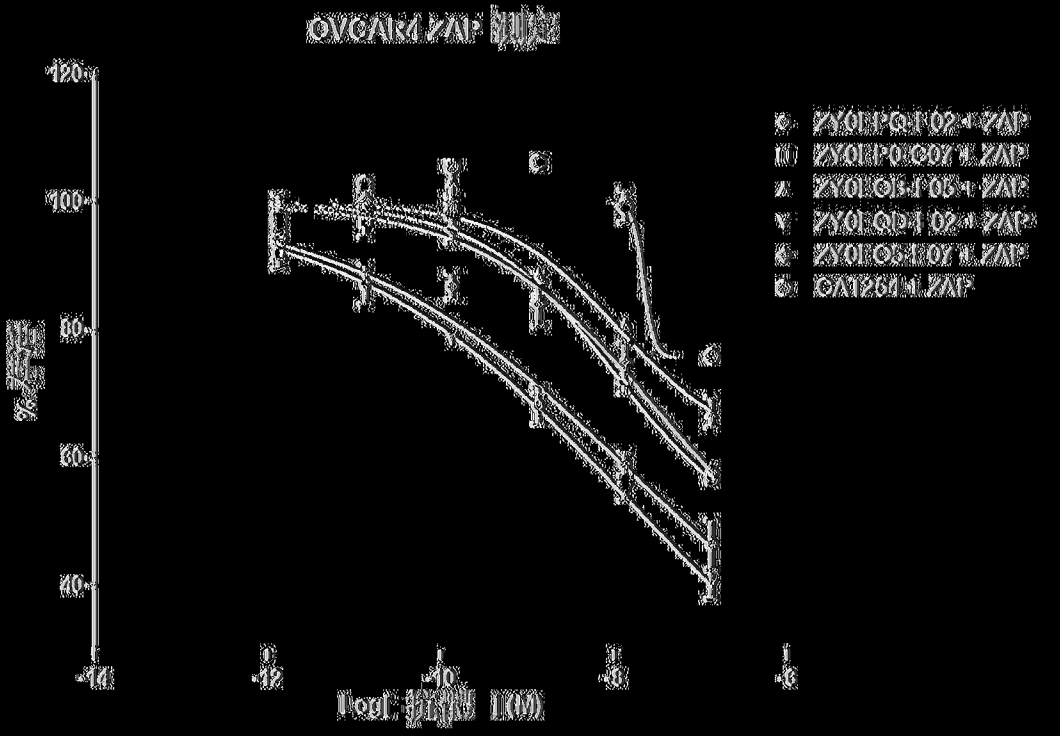
(圖3G)


SKB13
A549
OVCAR4
CHO-軸染
CHO+軸染
HEK-軸染
HEK+軸染
陰性對照
陰性對照
QD-1 02
QB-1 05
Q5-1 07
PQ-1 02
P0-C07
H
U

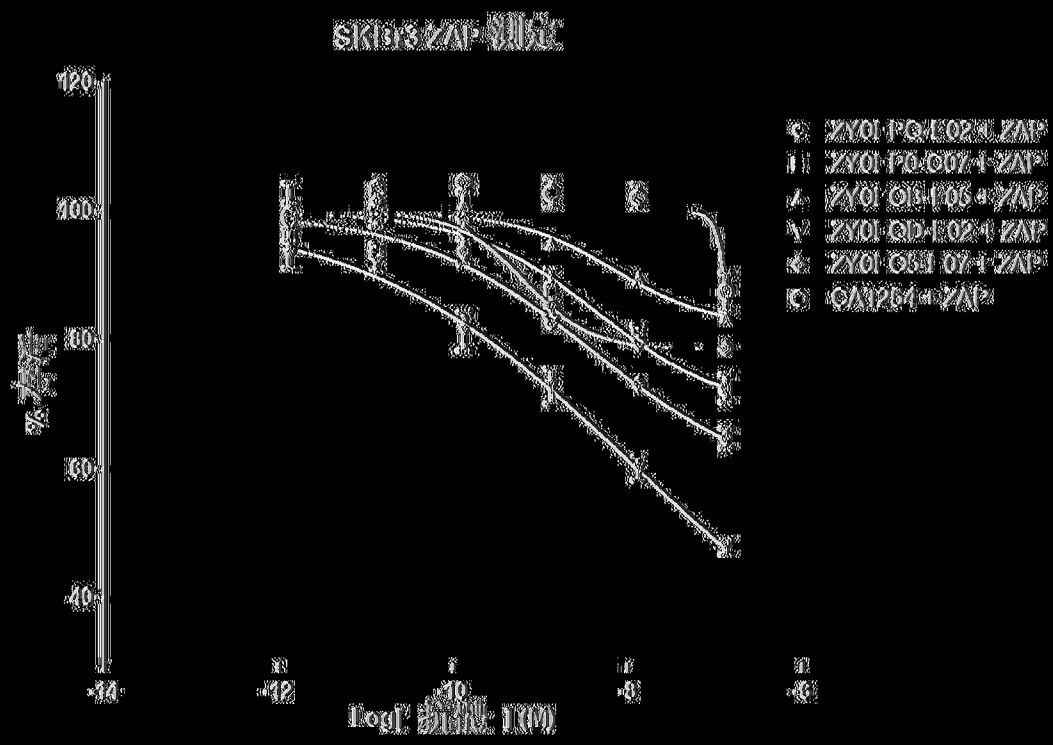
(圖4A)


SKB13
A549
OVCAR4
CHO-軸染
CHO+軸染
HEK-軸染
HEK+軸染
陰性對照
QD-1 02
QB-1 05
Q5-1 07
PQ-1 02
P0-C07
R
S

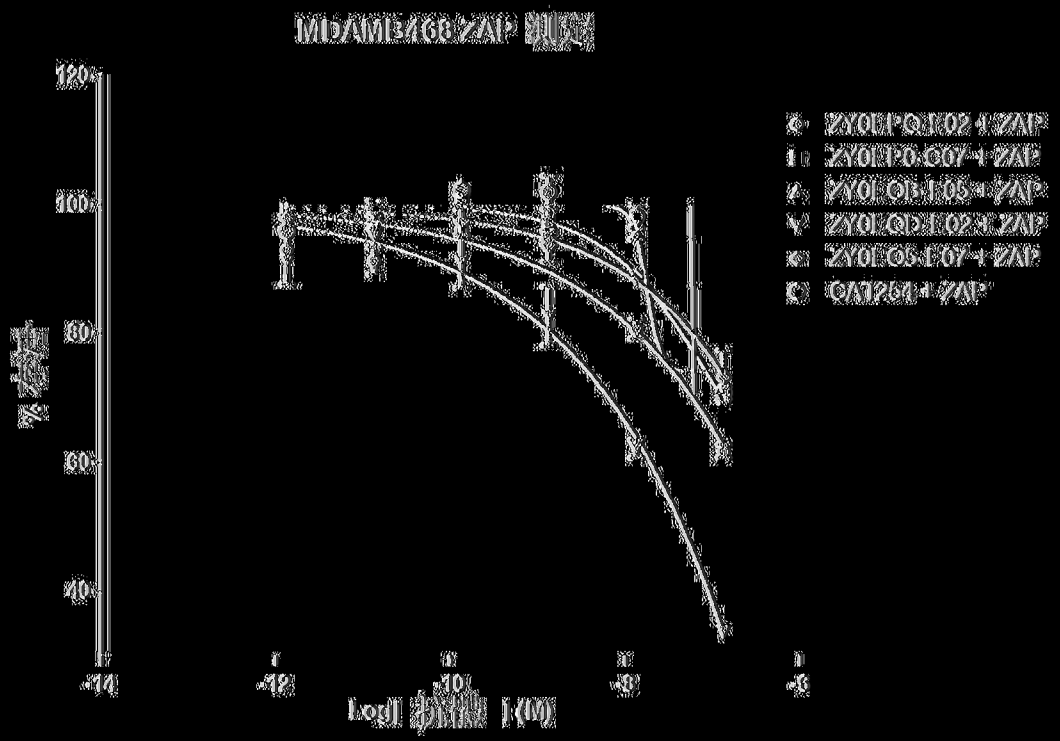
(圖4B)


OVCAR4 ZAP 測定
120
100
80
60
40
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ-L02 + ZAP
ZY01 P0-C07 + ZAP
ZY01 OB-L05 + ZAP
ZY01 QD-L02 + ZAP
ZY01 OB-L07 + ZAP
CA1254 + ZAP

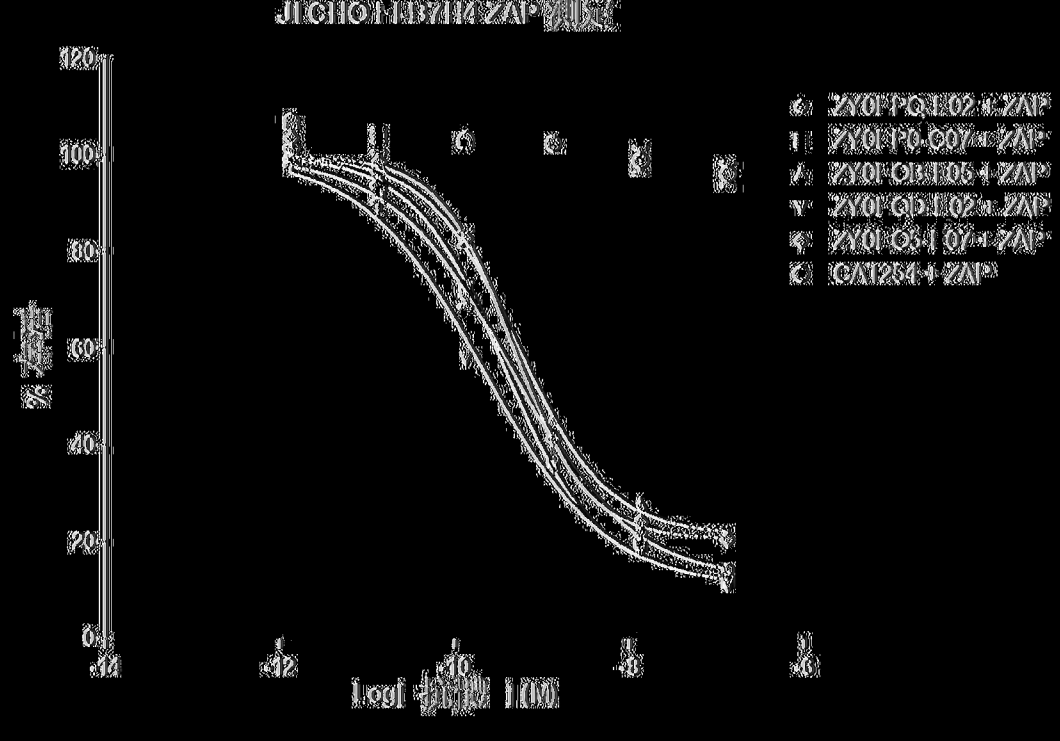
(圖5A)


SKBR3 ZAP 測定
120
100
80
60
40
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ-L02 + ZAP
ZY01 P0-C07 + ZAP
ZY01 OB-L05 + ZAP
ZY01 QD-L02 + ZAP
ZY01 OB-L07 + ZAP
CA1254 + ZAP

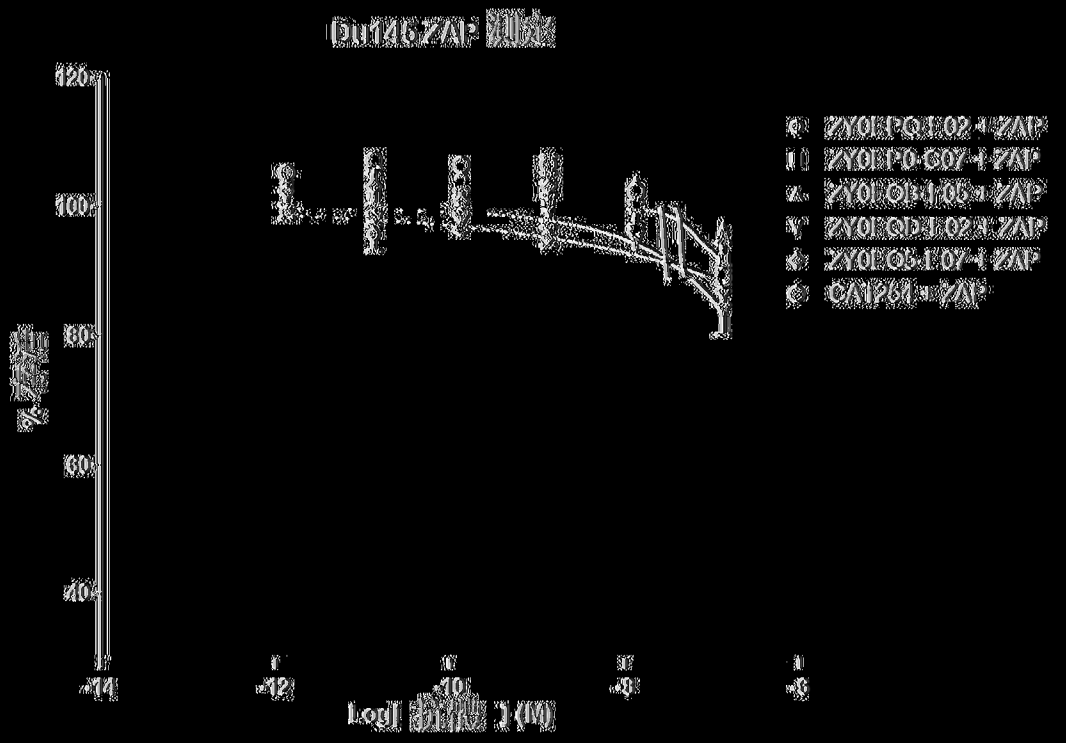
(圖5B)


MDAMB468 ZAP 測定
120
100
80
60
40
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ1.02 + ZAP
ZY01 P0.C07 + ZAP
ZY01 QB1.05 + ZAP
ZY01 QD1.02 + ZAP
ZY01 Q5.1.07 + ZAP
CA1254 + ZAP

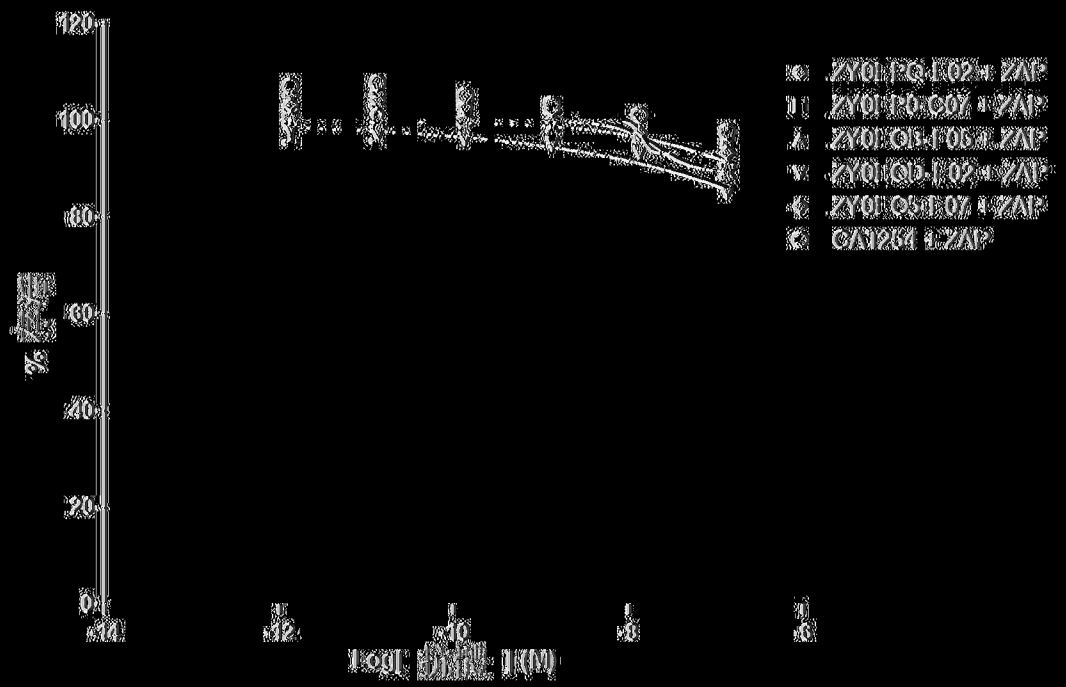
[圖5C]


JIGHOH-B7H4 ZAP 測定
120
100
80
60
40
20
0
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ1.02 + ZAP
ZY01 P0.C07 + ZAP
ZY01 QB1.05 + ZAP
ZY01 QD1.02 + ZAP
ZY01 Q5.1.07 + ZAP
CA1254 + ZAP

[圖5D]

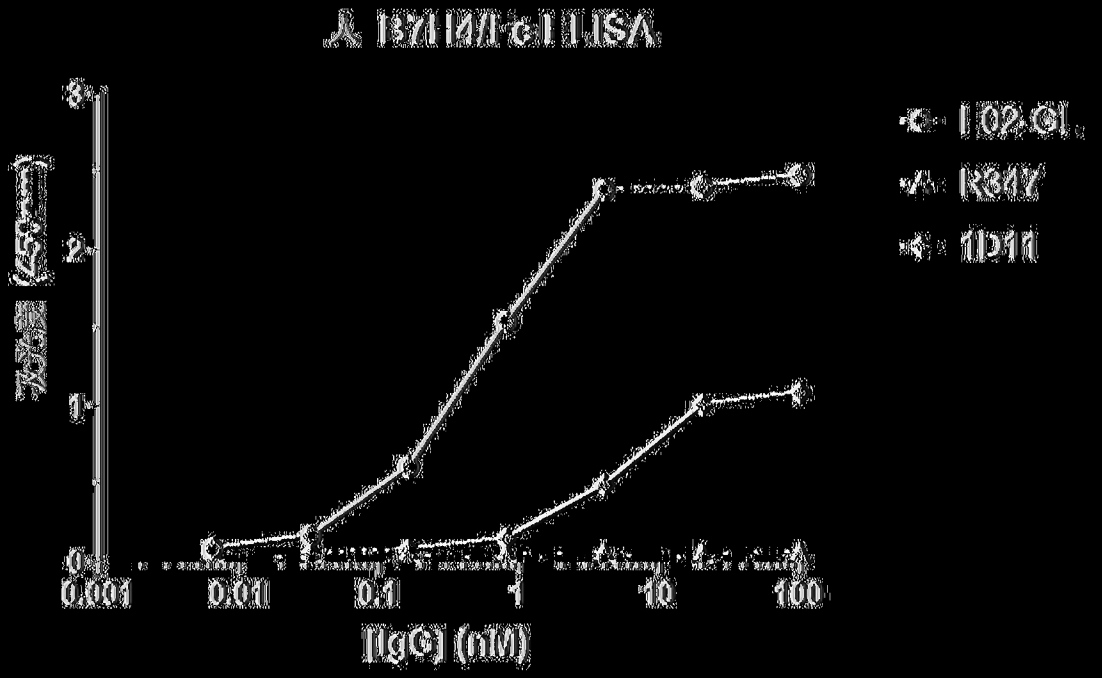

Du146 ZAP 測定
120
100
80
60
40
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY0[PQ-[02 + ZAP
ZY0[P0-C07 + ZAP
ZY0[QB-[05 + ZAP
ZY0[QD-[02 + ZAP
ZY0[Q5-[07 + ZAP
CA1264 + ZAP

(圖5E)


JICHO 親本 ZAP 測定
120
100
80
60
40
20
0
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY0[PQ-[02 + ZAP
ZY0[P0-C07 + ZAP
ZY0[QB-[05 + ZAP
ZY0[QD-[02 + ZAP
ZY0[Q5-[07 + ZAP
CA1264 + ZAP

(圖5F)

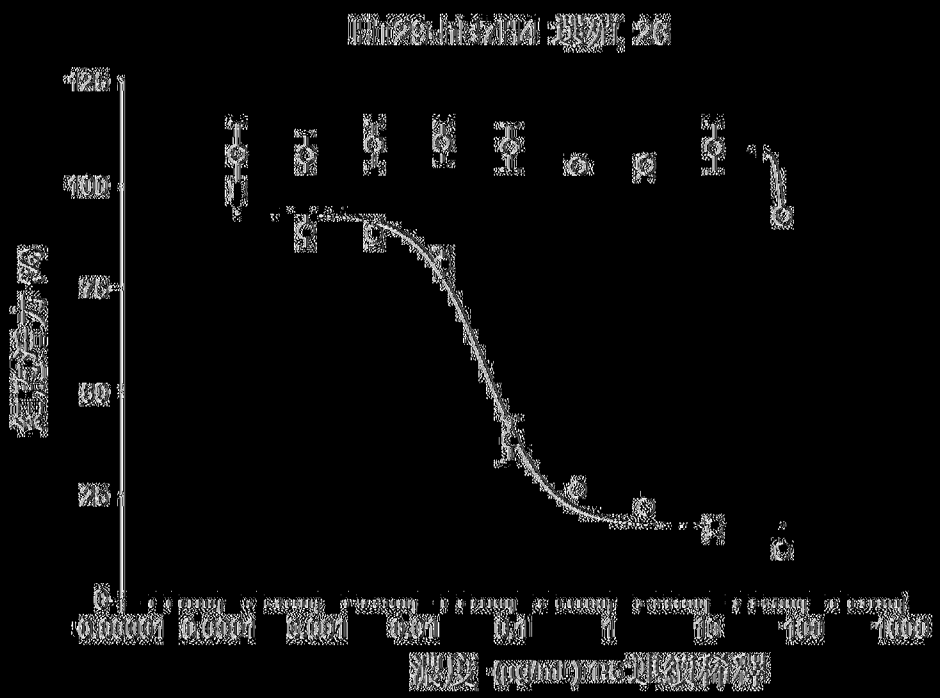
圖 6



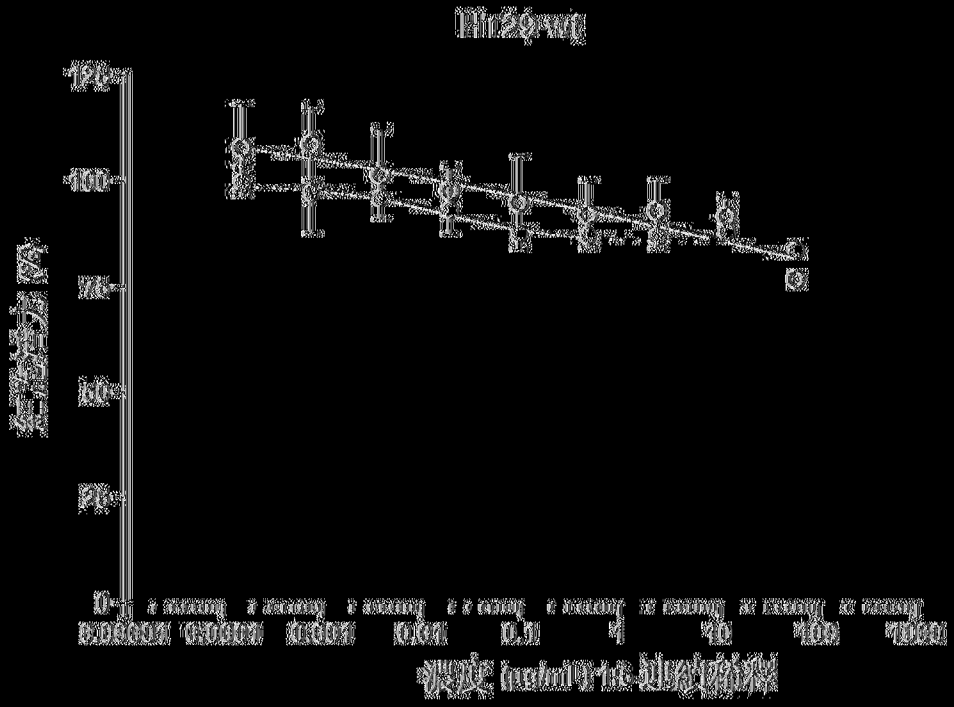
[圖7]

圖 8A

Time
Amp
Amp
Time
Amp
Time
Amp
Time

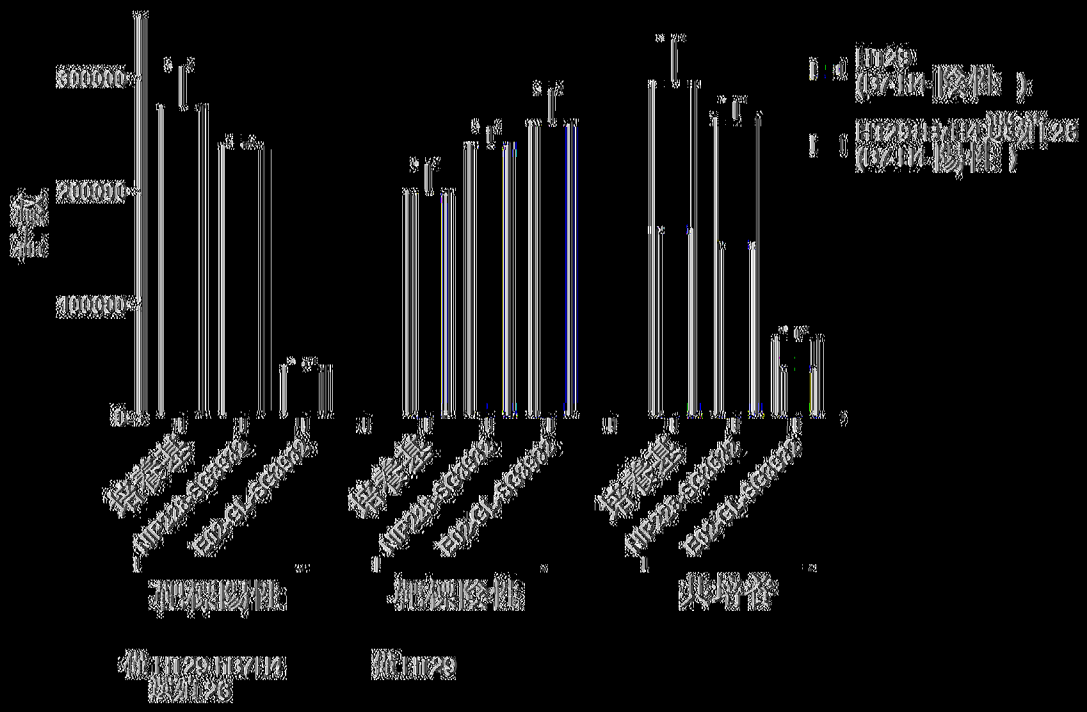

Hn29chi:2114 現列, 26
125
100
75
50
25
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

|(圖9A)|


Hn29wt
125
100
75
50
25
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

|(圖9B)|

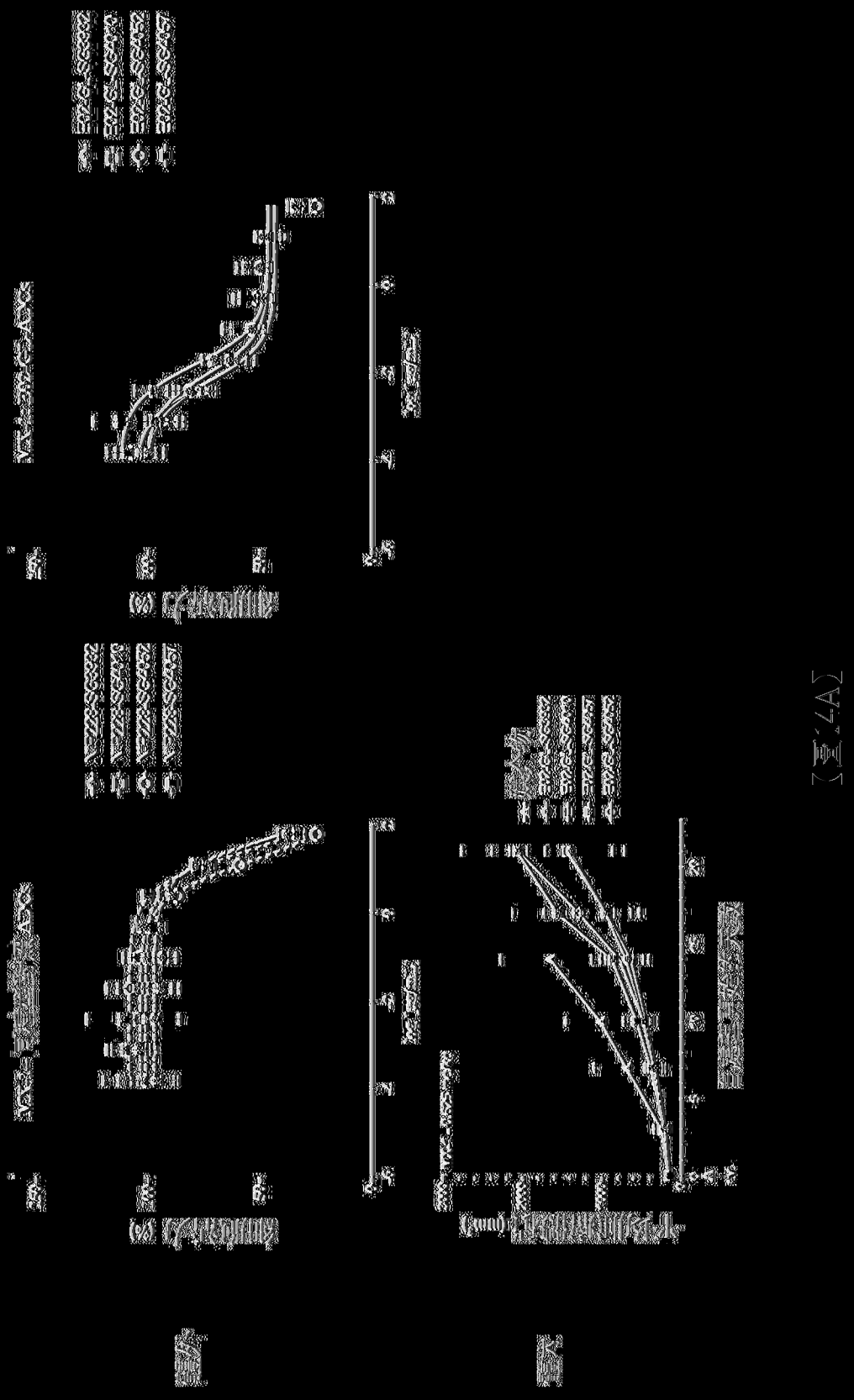
【圖1A】



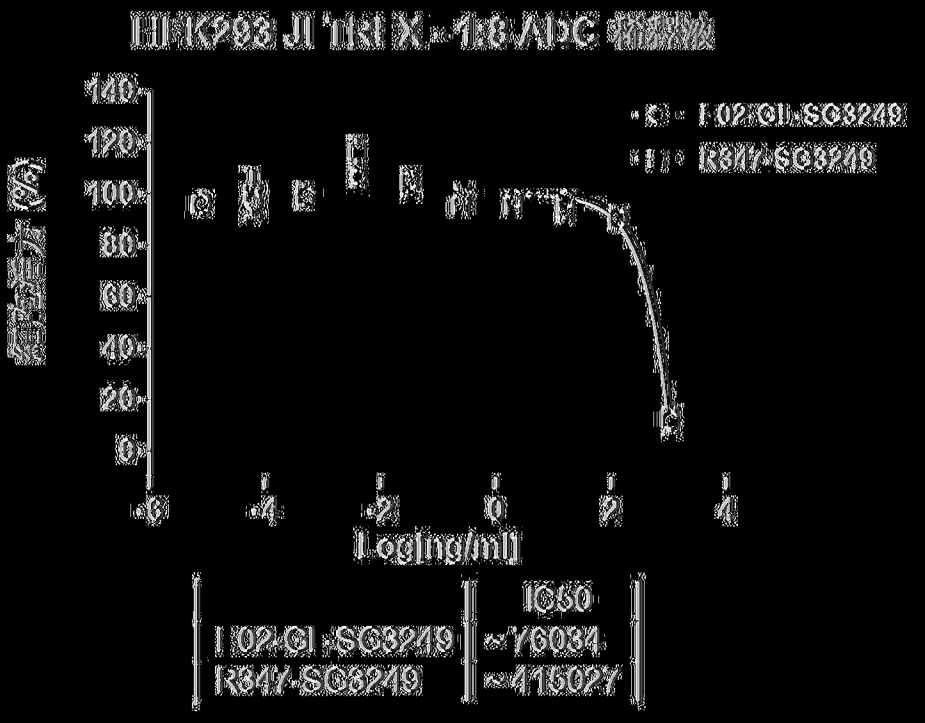
[圖10B]

圖3

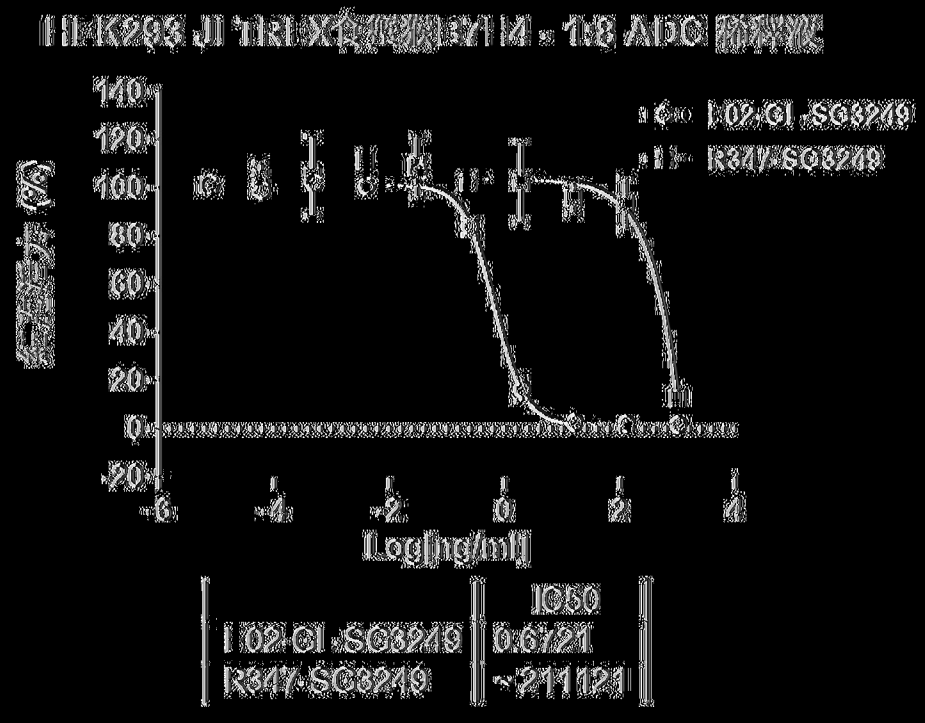
圖 2（b）



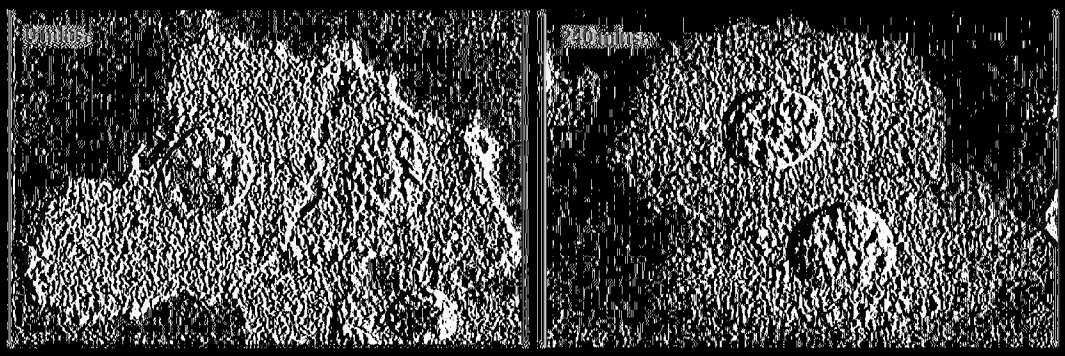
【圖7A】


HEK293 JI TRI X - 1:8 ADC 特殊效
I-02-CI-SC3249
R347-SC3249
Log[ng/ml]
IC50
I-02-CI-SC3249 ~76034
R347-SC3249 ~415027

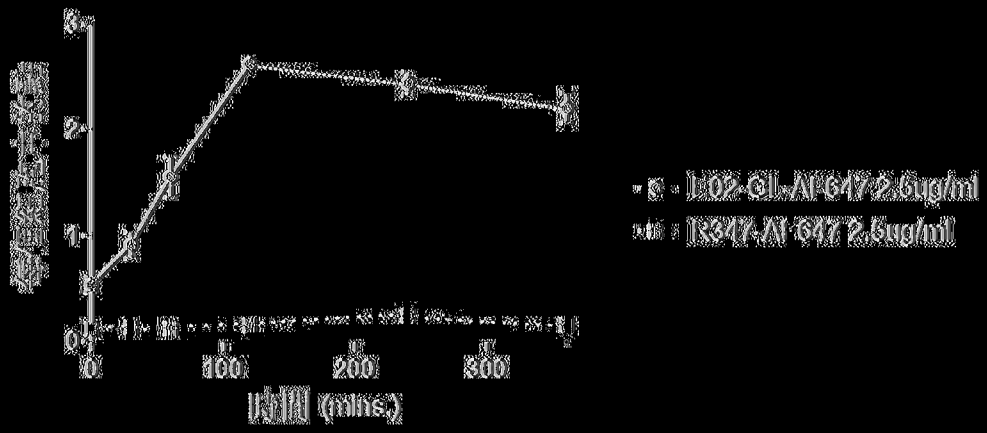
|(圖15A)|


HEK293 JI TRI X1 [illegible] - 1:8 ADC 特殊效
I-02-CI-SC3249
R347-SC3249
Log[ng/ml]
IC50
I-02-CI-SC3249 0.6721
R347-SC3249 ~211121

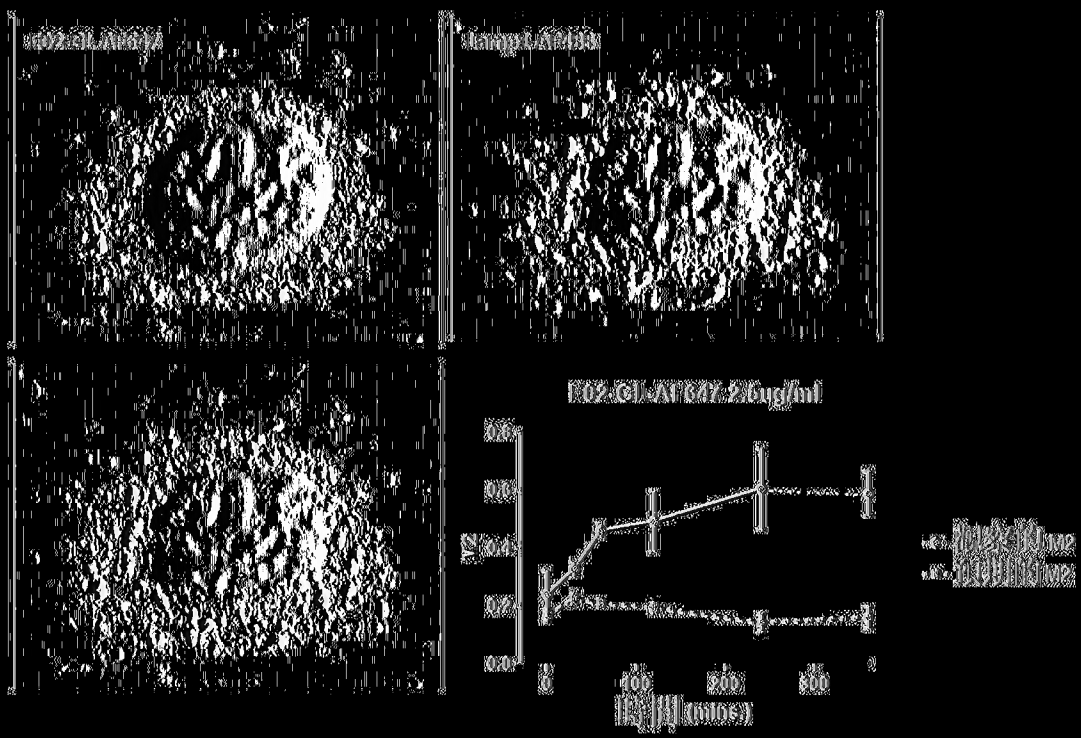
|(圖15B)|



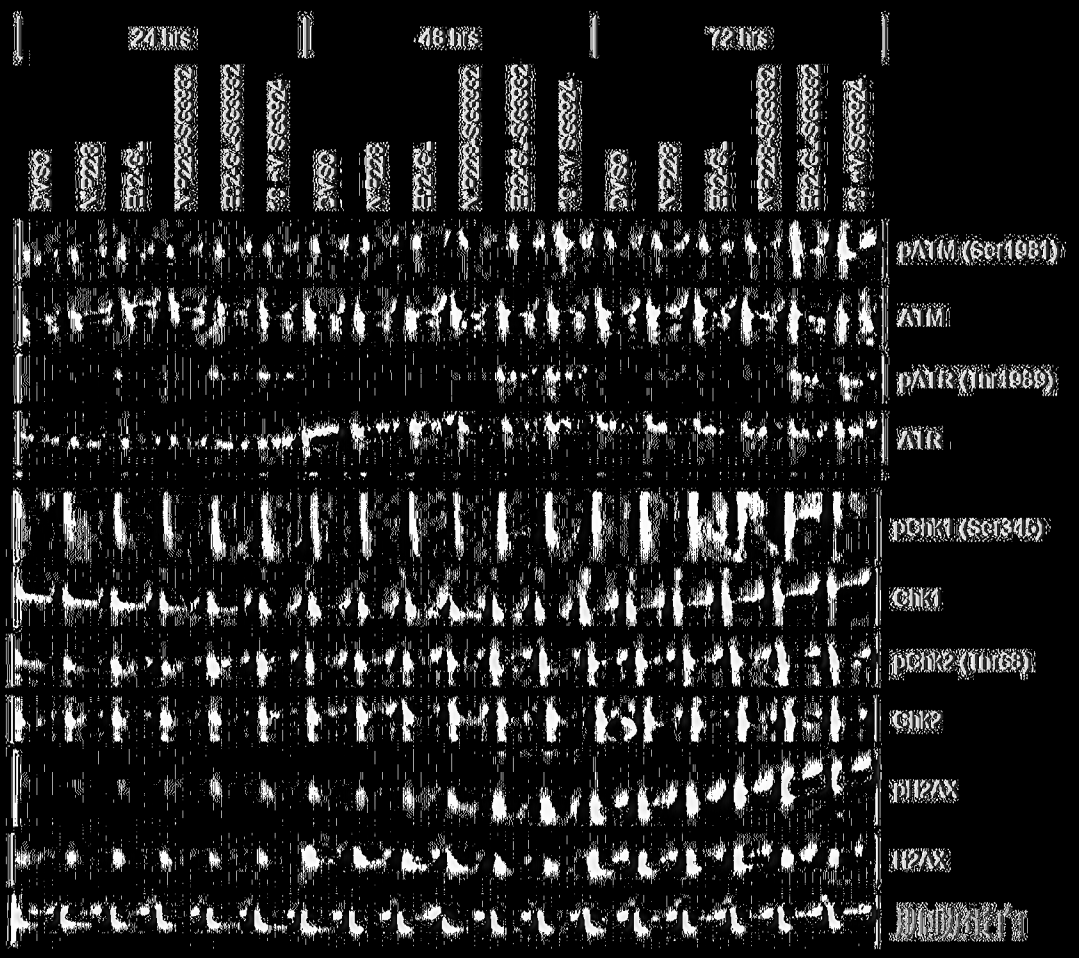
|(圖16A)|



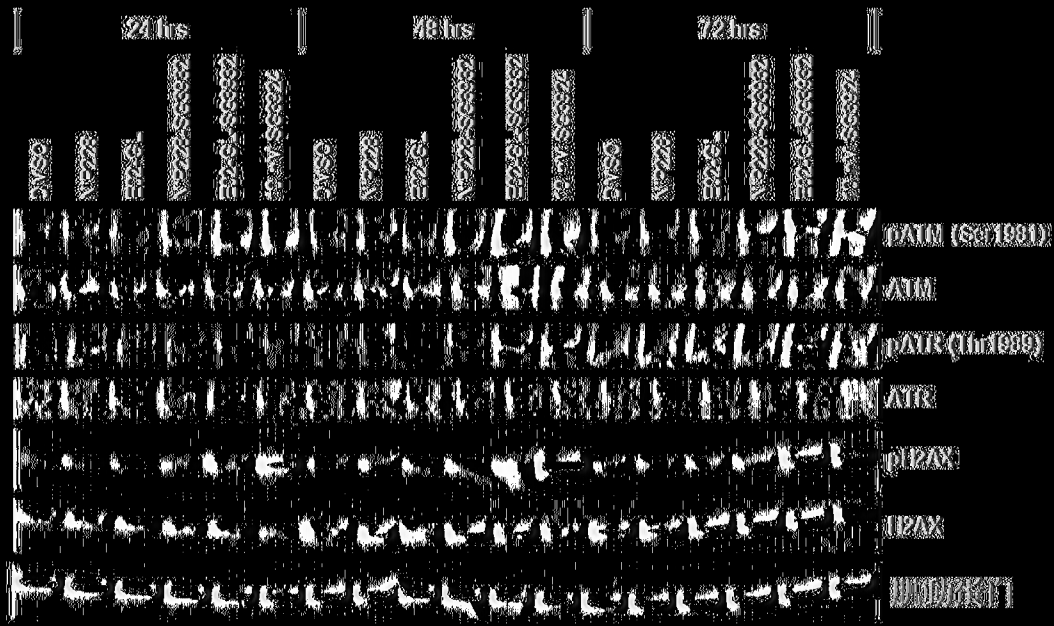
|(圖16B)|



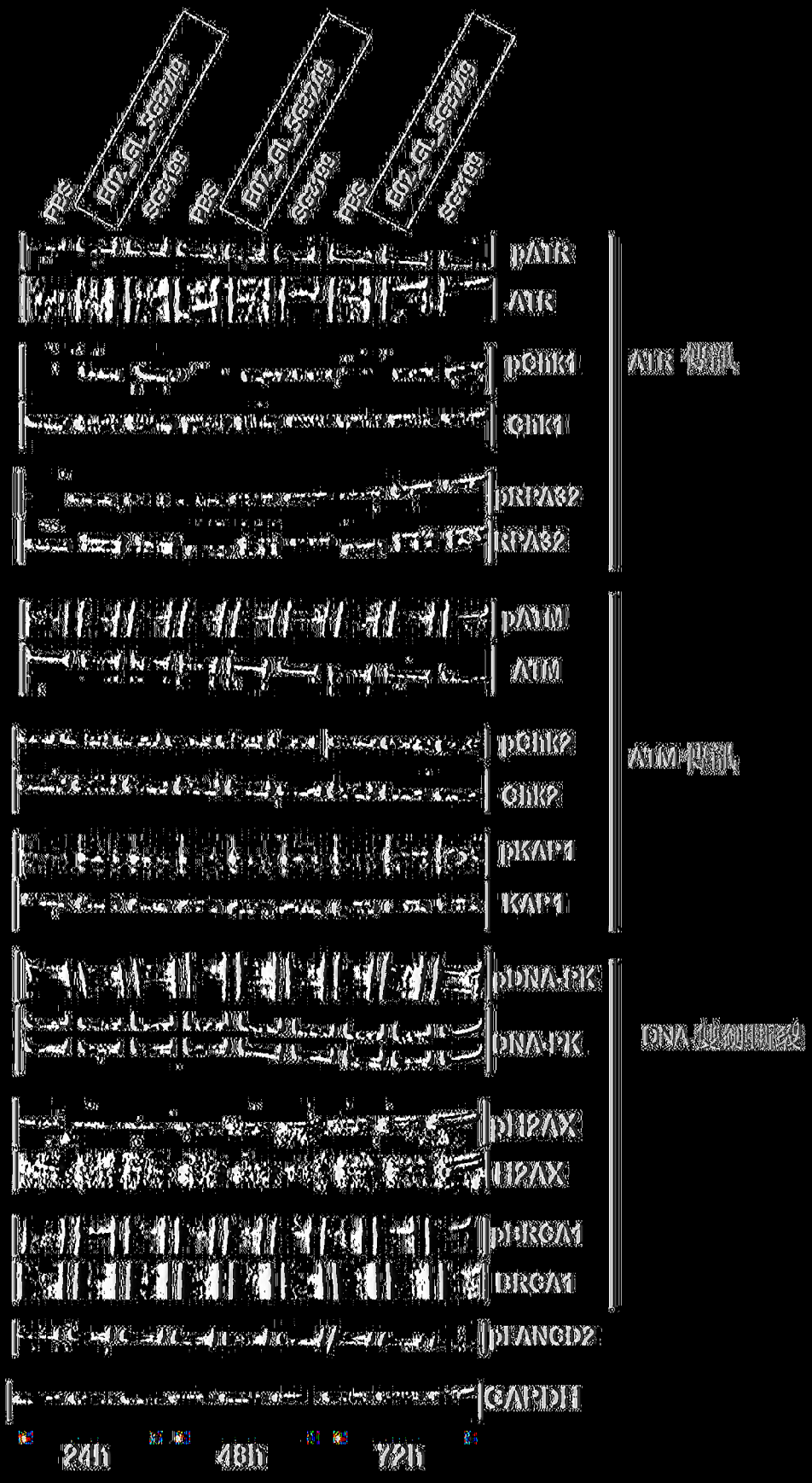
|(圖16C)|


24 hrs
48 hrs
72 hrs
pATM (Ser1981)
ATM
pATR (Thr1989)
ATR
pChk1 (Ser345)
Chk1
pChk2 (Thr68)
Chk2
pH2AX
H2AX

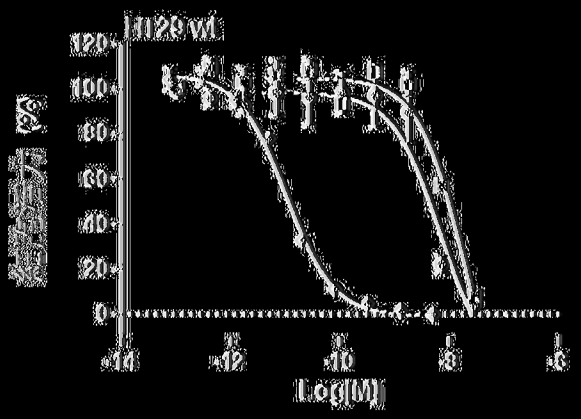
[圖17A]


24 hrs
48 hrs
72 hrs
pATM (Ser1981)
ATM
pATR (Thr1989)
ATR
pH2AX
H2AX

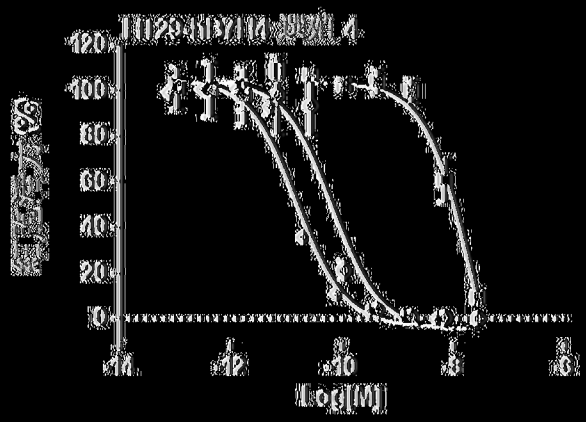
[圖17B]


PBS
E02_G1_SG2/2/g
SG2/1/g
pATR
ATR
pChk1
Chk1
pRPA32
RPA32
ATR 訊號
pATM
ATM
pChk2
Chk2
pKAP1
KAP1
ATM 訊號
pDNA-PK
DNA-PK
pH2AX
H2AX
pBRCA1
BRCA1
DNA 雙鏈斷裂
pFANCD2
GAPDH
24h
48h
72h

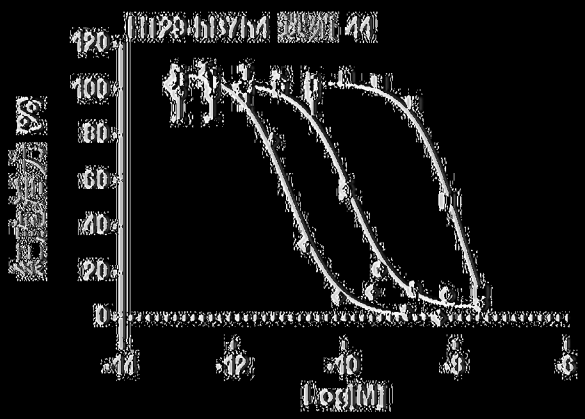
[圖17C]



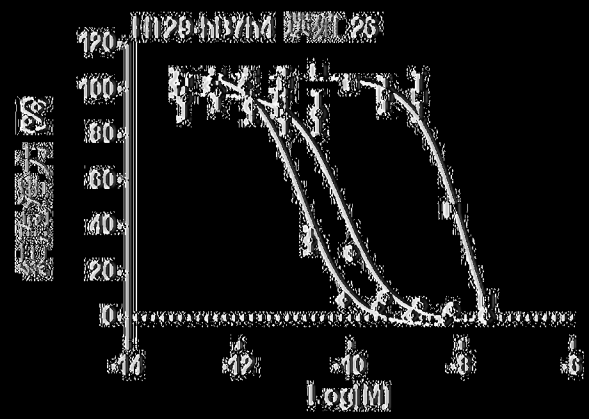
	IC50
IL02_GL_SG8249	6.817e-009
R347-SC3249	2.035e-008
對照 SC3199	1.04e-011



	IC50
IL02_GL_SG8249	6.519e-011
R347-SC3249	2.454e-008
對照 SC3199	1.513e-011

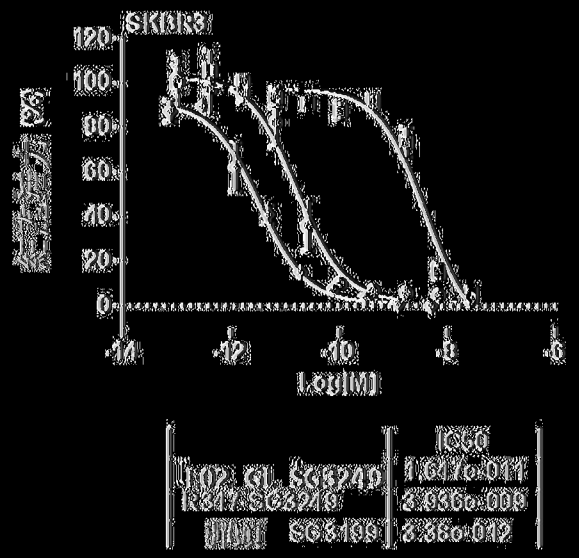


	IC50
IL02_GL_SG8249	1.3e-010
R347-SC3249	1.261e-008
對照 SC3199	9.866e-012

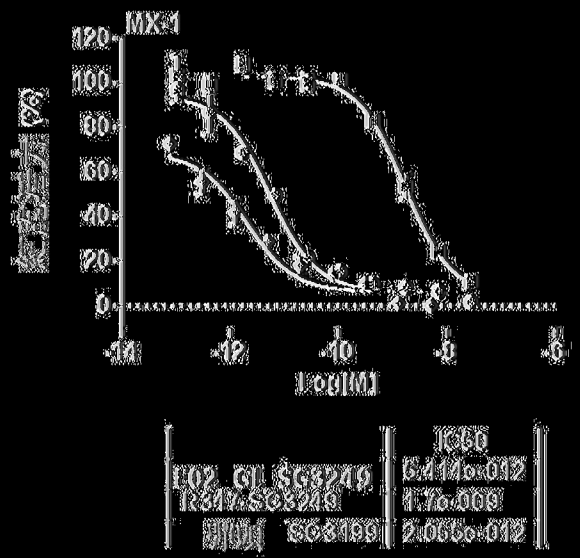


	IC50
IL02_GL_SG8249	7.297e-011
R347-SC3249	1.143e-008
對照 SC3199	1.376e-011

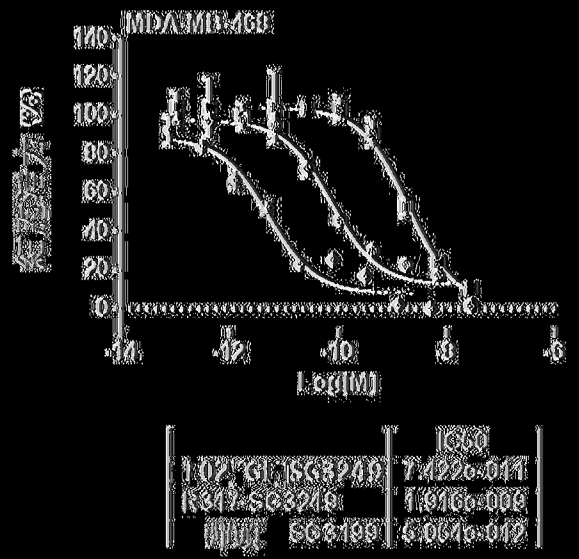
(圖19)



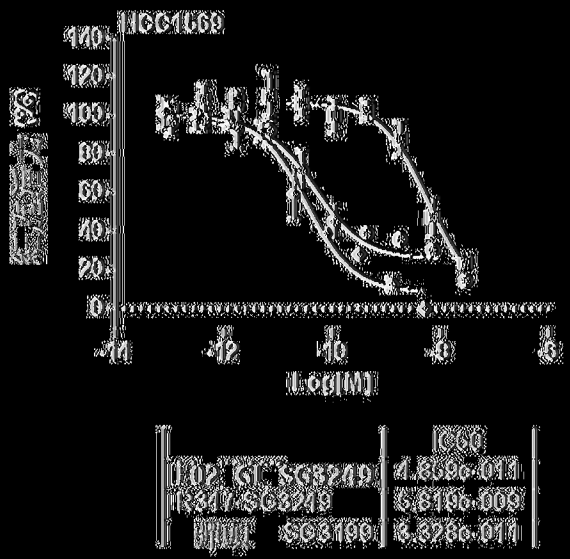
	IC50
102 GL SG8249	1.617e-011
1347-SG8249	2.936e-009
[illegible] SG8199	3.86e-012



	IC50
102 GL SG8249	5.411e-012
1347-SG8249	1.7e-009
[illegible] SG8199	2.055e-012

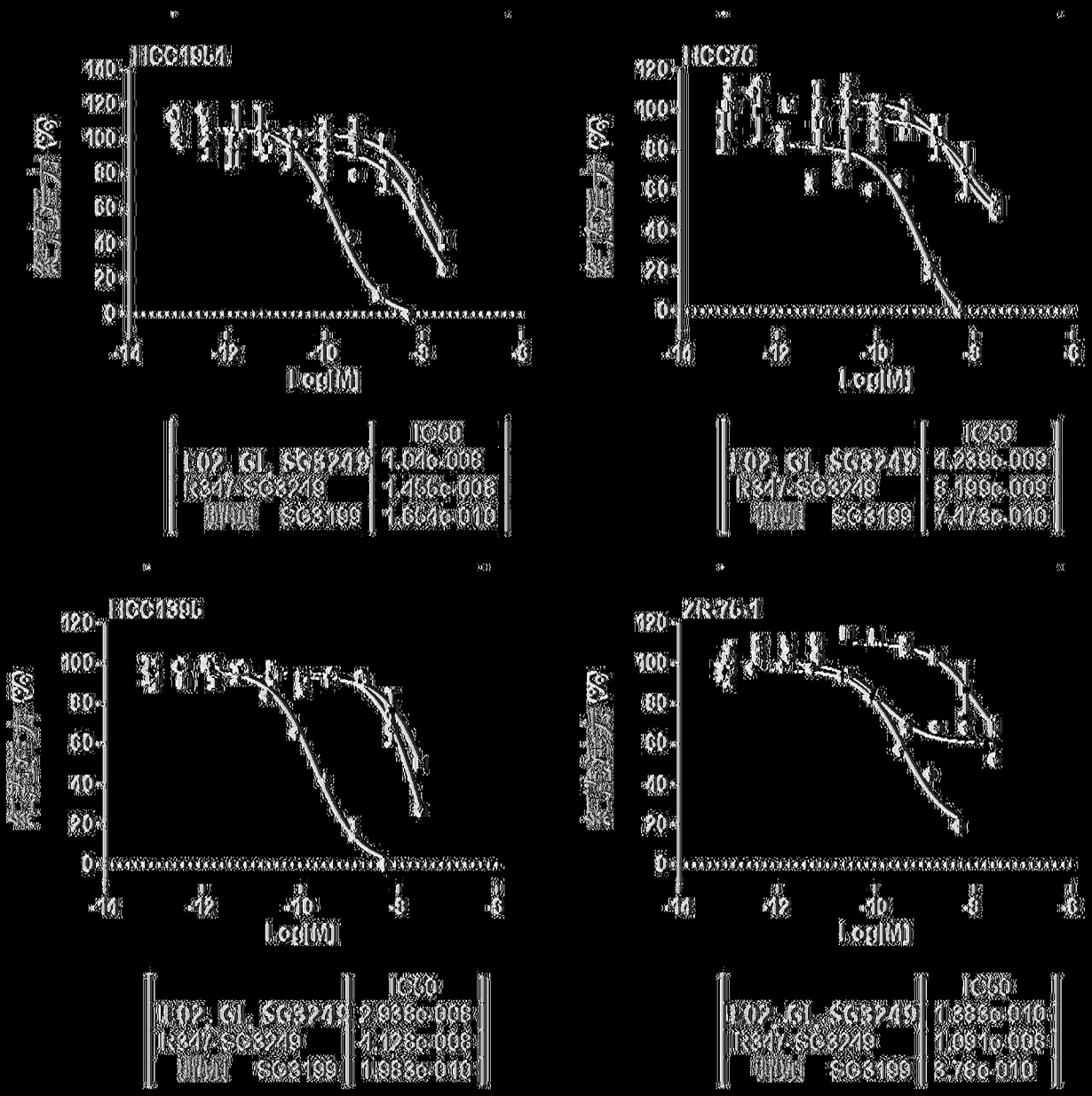


	IC50
102 GL SG8249	7.422e-011
1347-SG8249	1.916e-009
[illegible] SG8199	5.067e-012

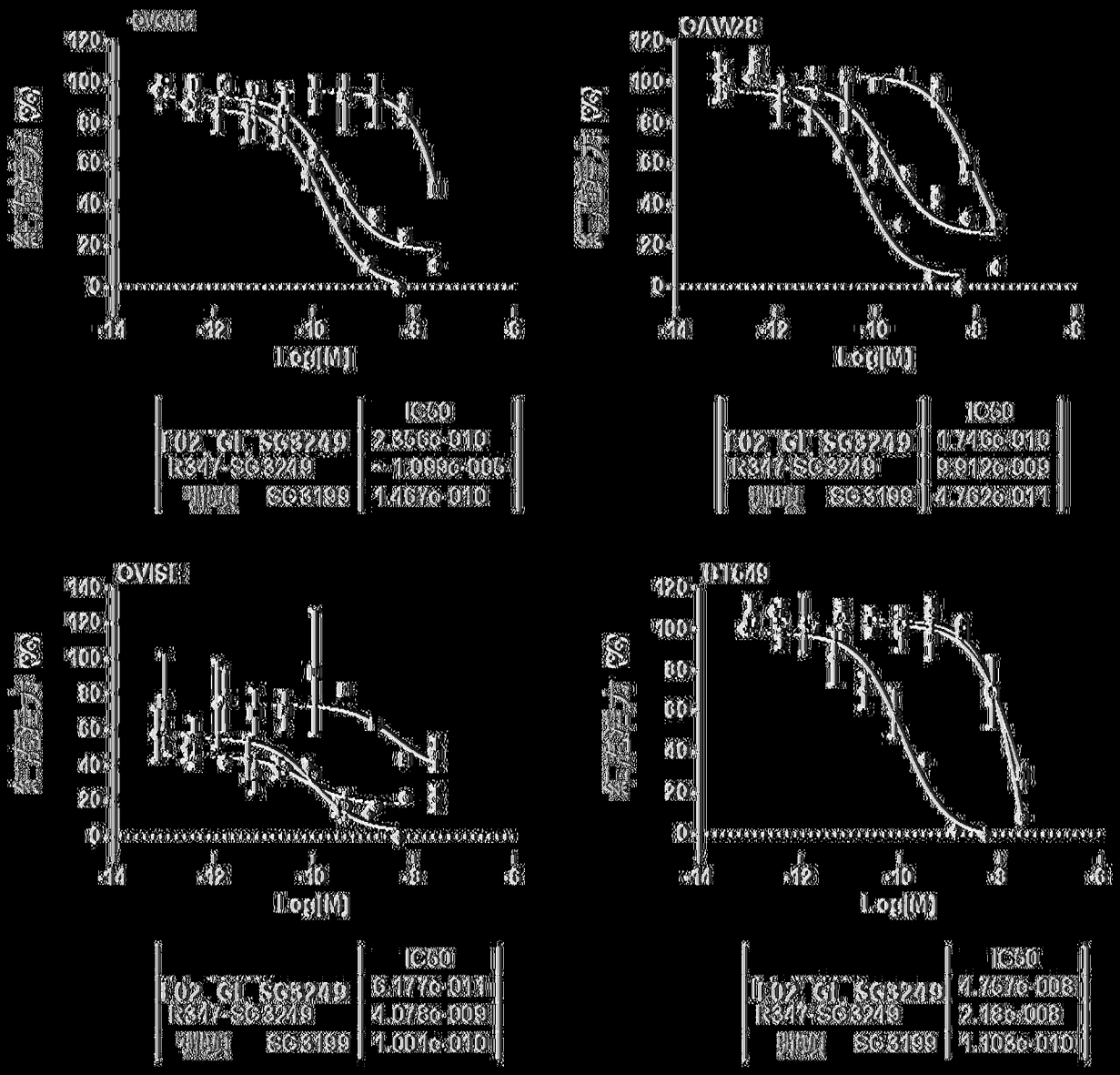


	IC50
102 GL SG8249	4.809e-011
1347-SG8249	5.819e-009
[illegible] SG8199	3.328e-011

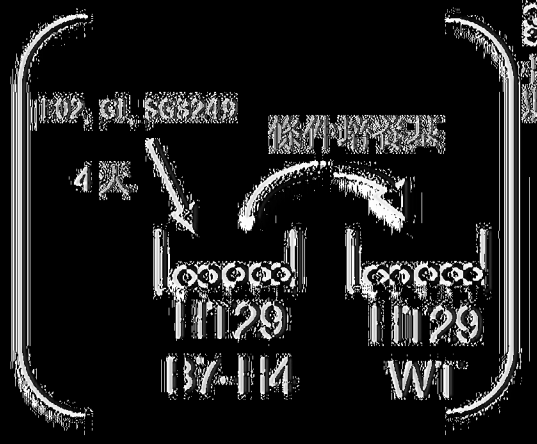
圖19（續）


HCC1954
HCC70
HCC1395
ZR-75-1
Log[M]
IC50
L02 GL SG3249 1.04c-008
R347-SG3249 1.465c-008
SG3199 1.654c-010
L02 GL SG3249 4.238c-009
R347-SG3249 8.199c-009
SG3199 7.473c-010
L02 GL SG3249 2.938c-008
R347-SG3249 4.128c-008
SG3199 1.983c-010
L02 GL SG3249 1.383c-010
R347-SG3249 1.091c-008
SG3199 3.76c-010

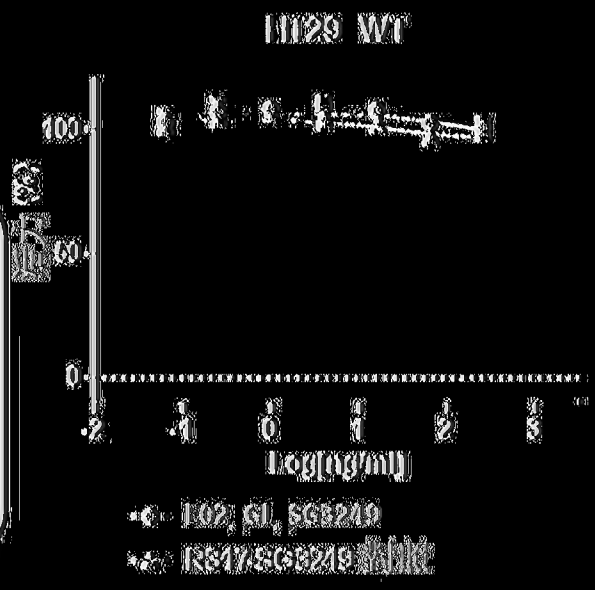
【圖19（續）】


OVCAR
OAW28
OVISE
Log[M]
IC50
L02 GL SG3249
R347-SG3249
SG3199
2.356e-010
~1.099e-005
1.467e-010
1.746e-010
9.912e-009
4.762e-011
6.177e-011
4.078e-009
1.001e-010
4.757e-008
2.18e-008
1.103e-010

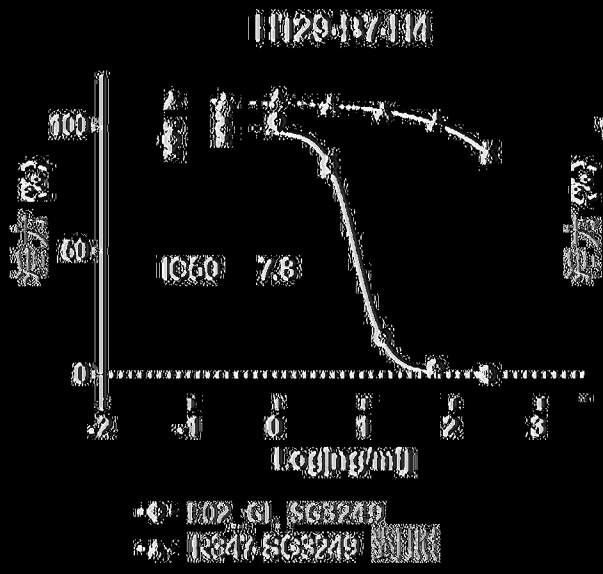
【圖19（續）】



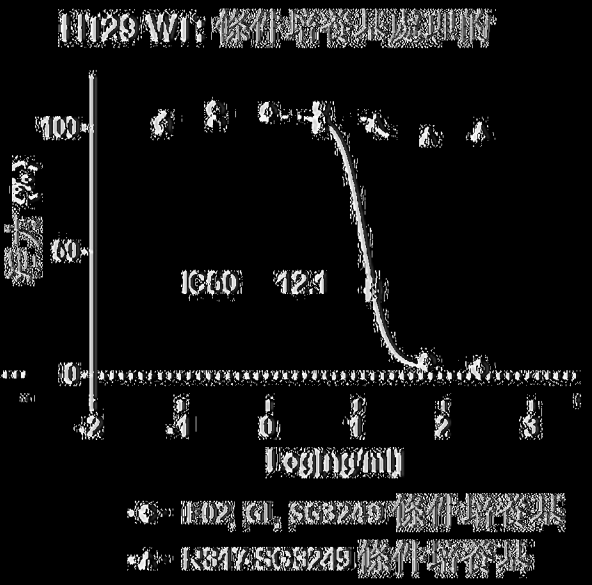
(圖20A)



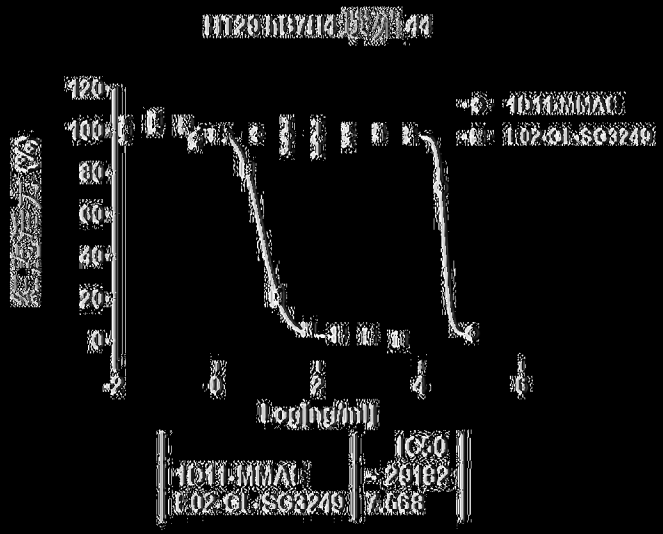
(圖20B)



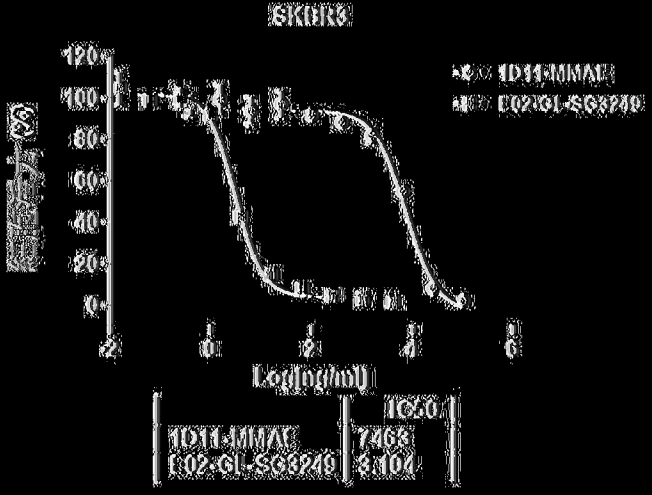
(圖20C)



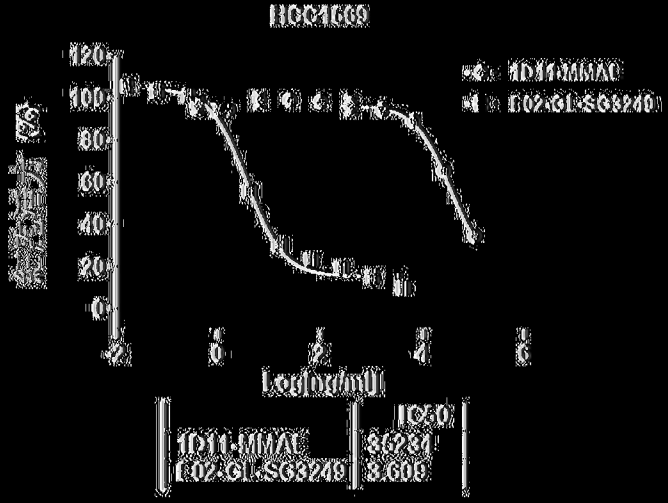
(圖20D)



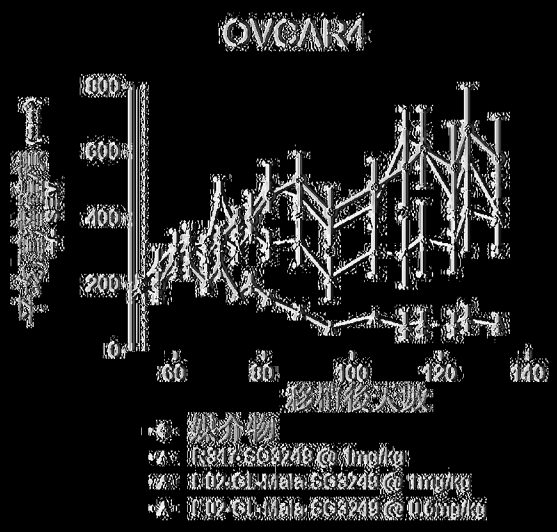
|(圖21A)|



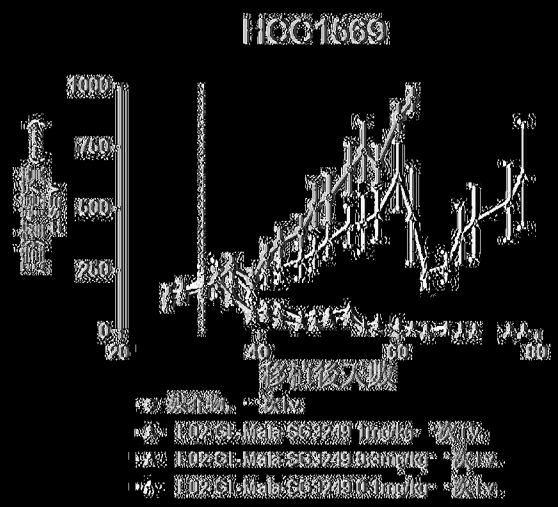
|(圖21B)|



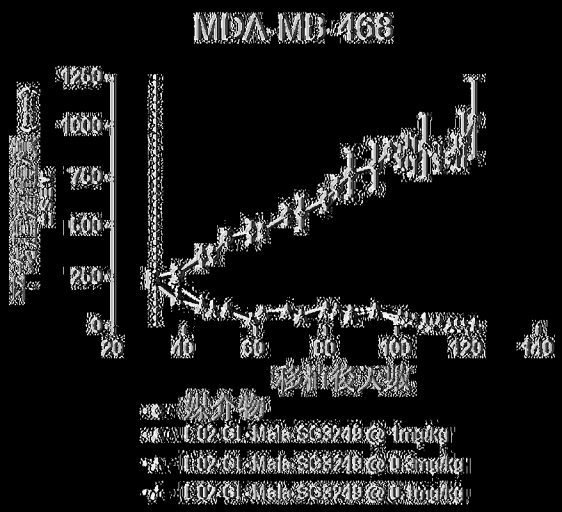
|(圖21C)|



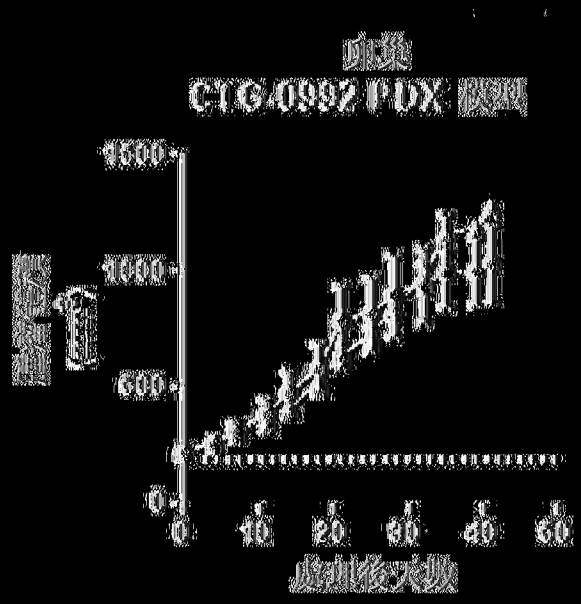
|(圖22A)|



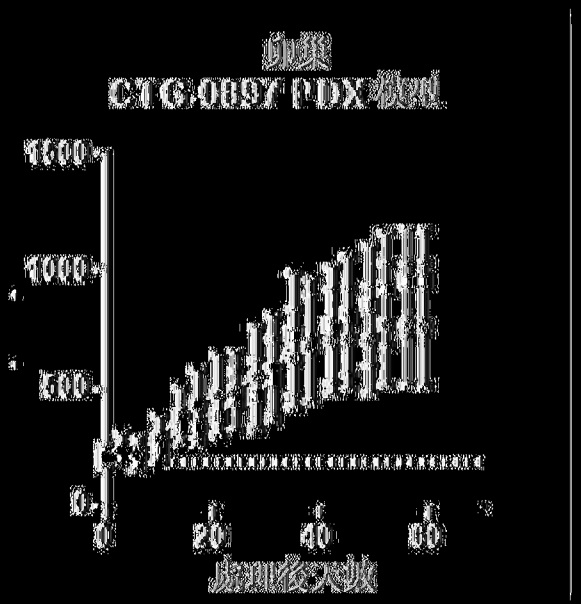
|(圖22B)|



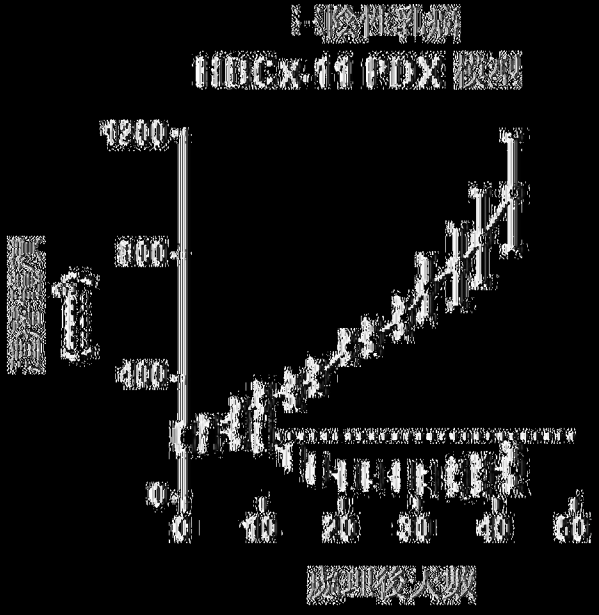
|(圖22C)|



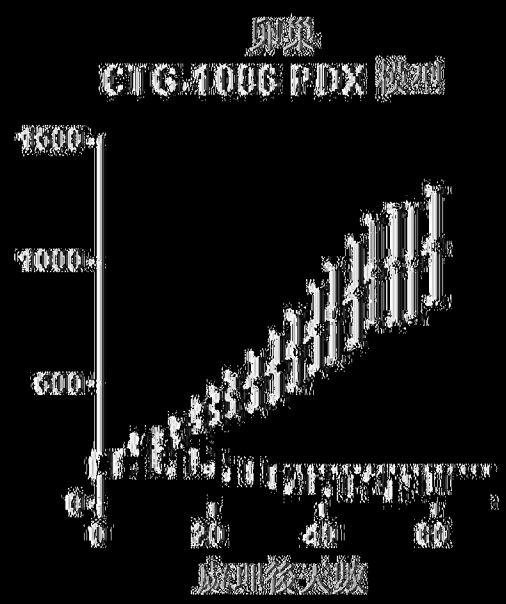
(圖24A)



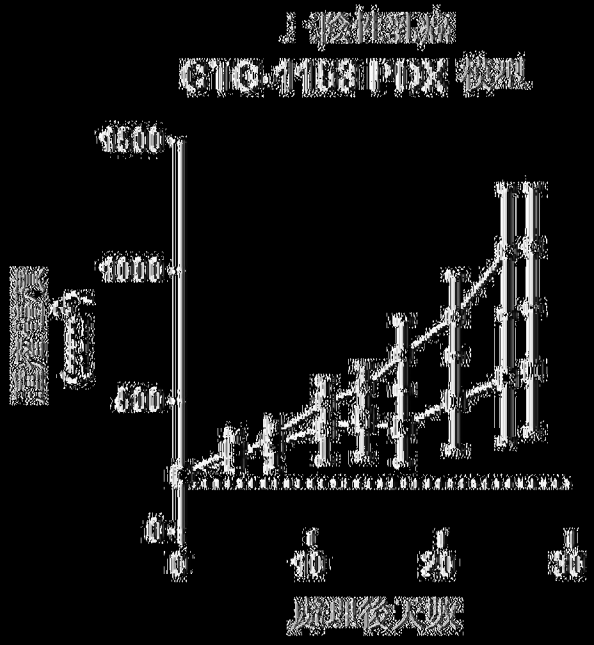
(圖24B)



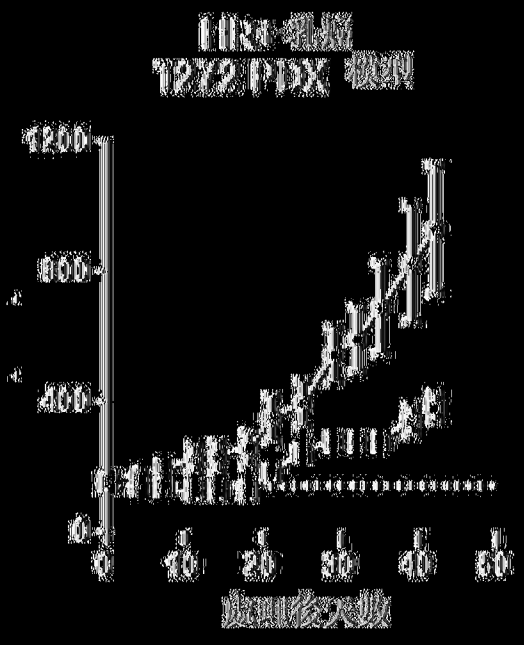
(圖24C)



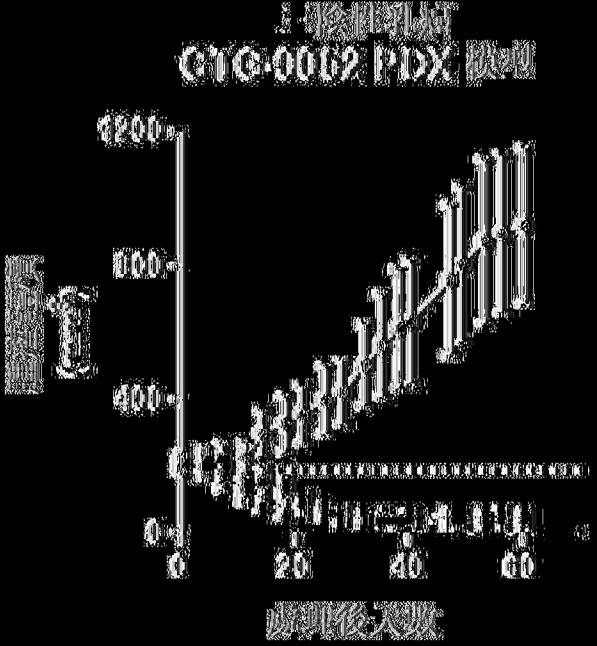
(圖24D)



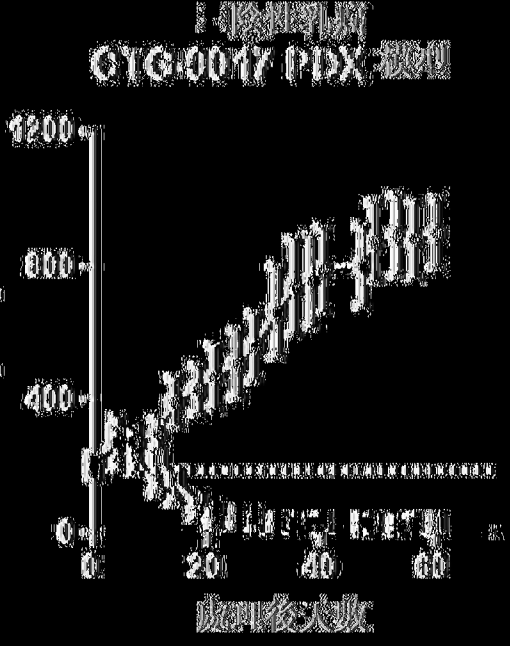
[圖24E]



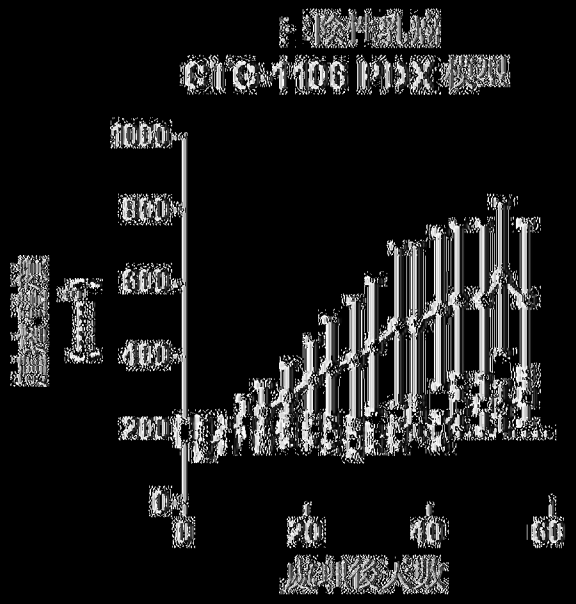
[圖24F]



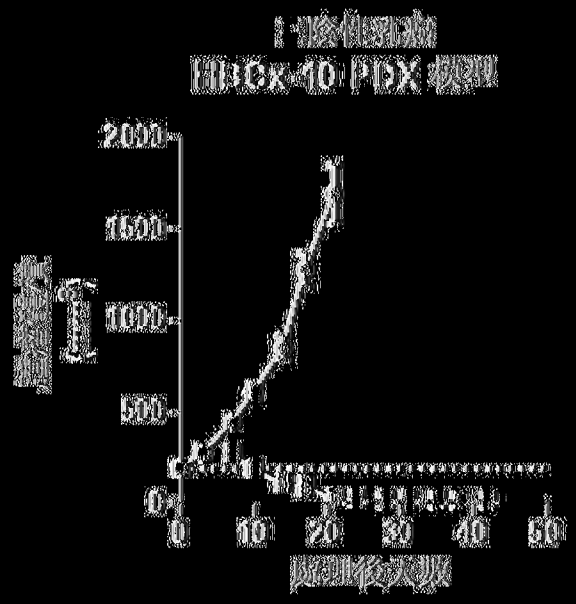
[圖24G]



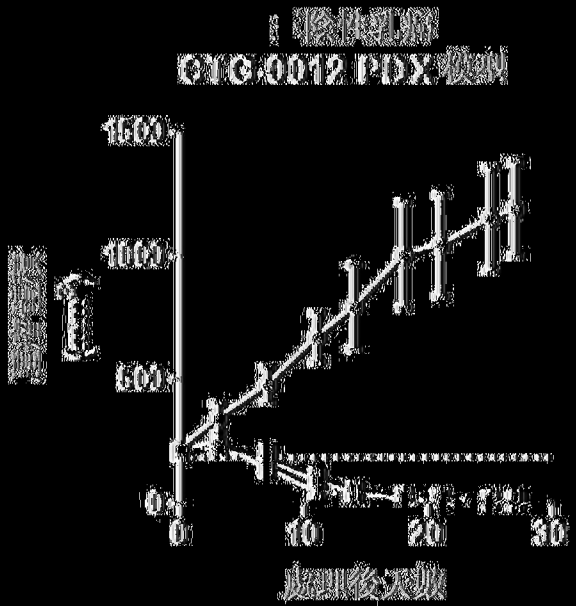
[圖24H]



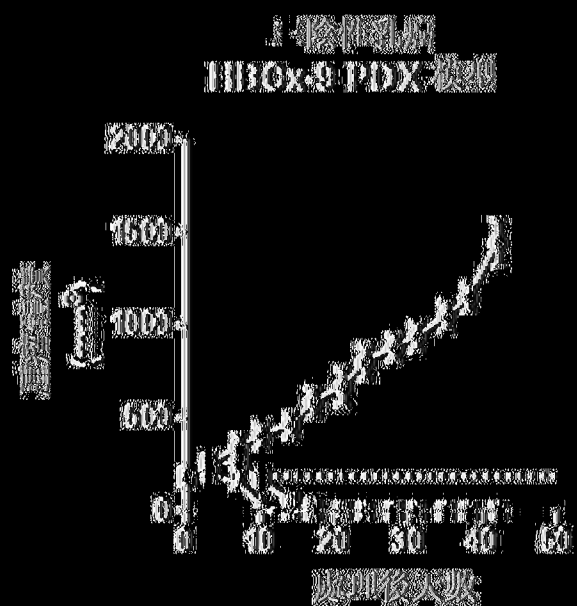
|(圖24I)|



|(圖24J)|



|(圖24K)|



|(圖24L)|

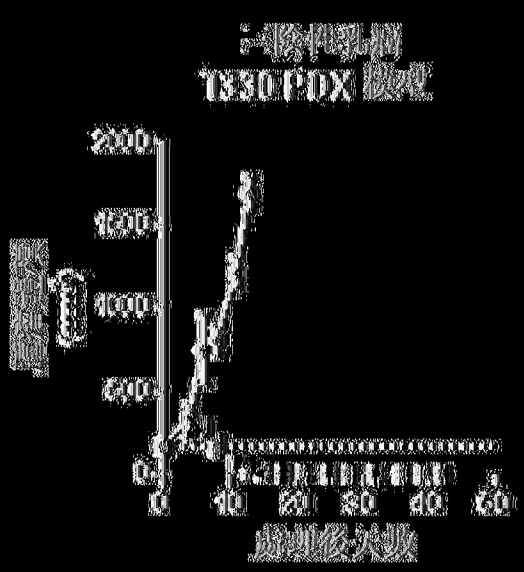


圖24M

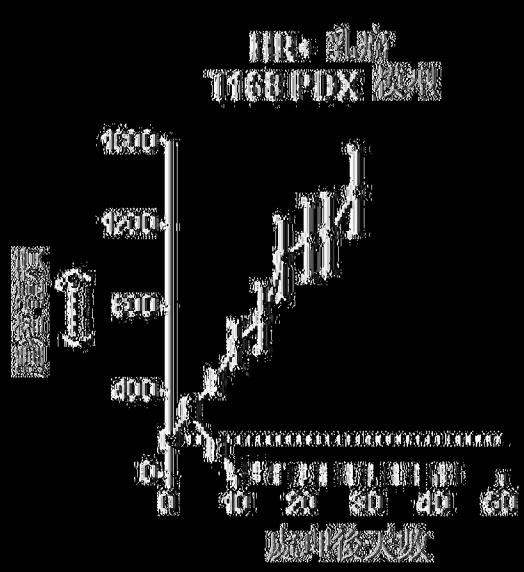


圖24N

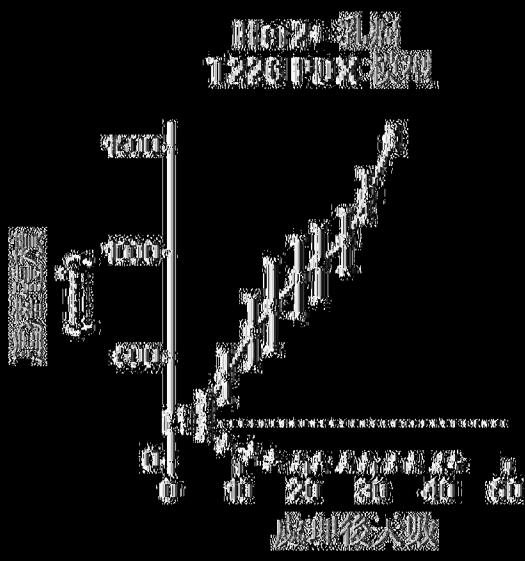
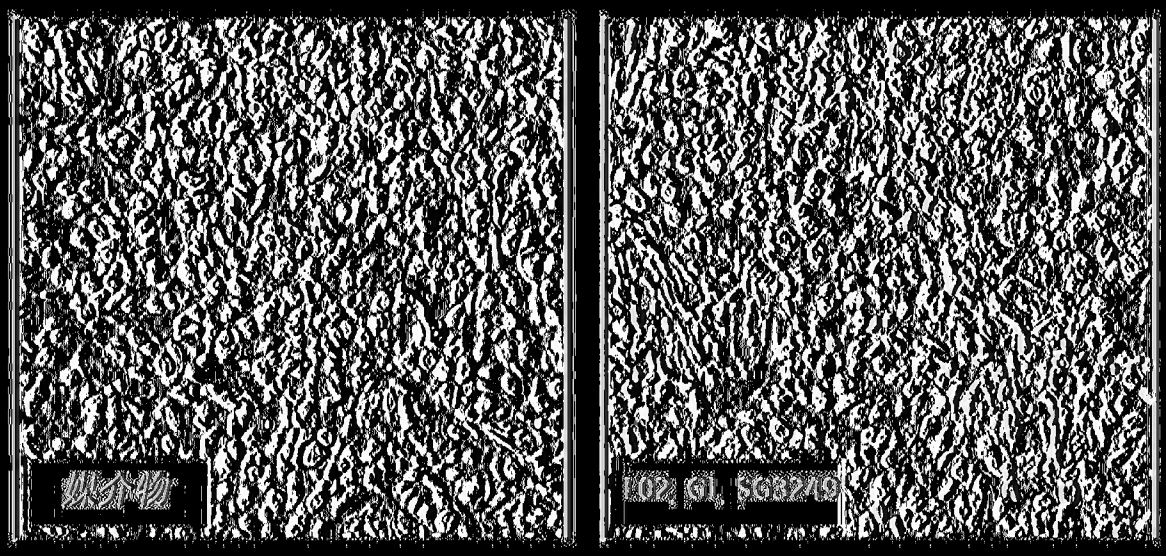
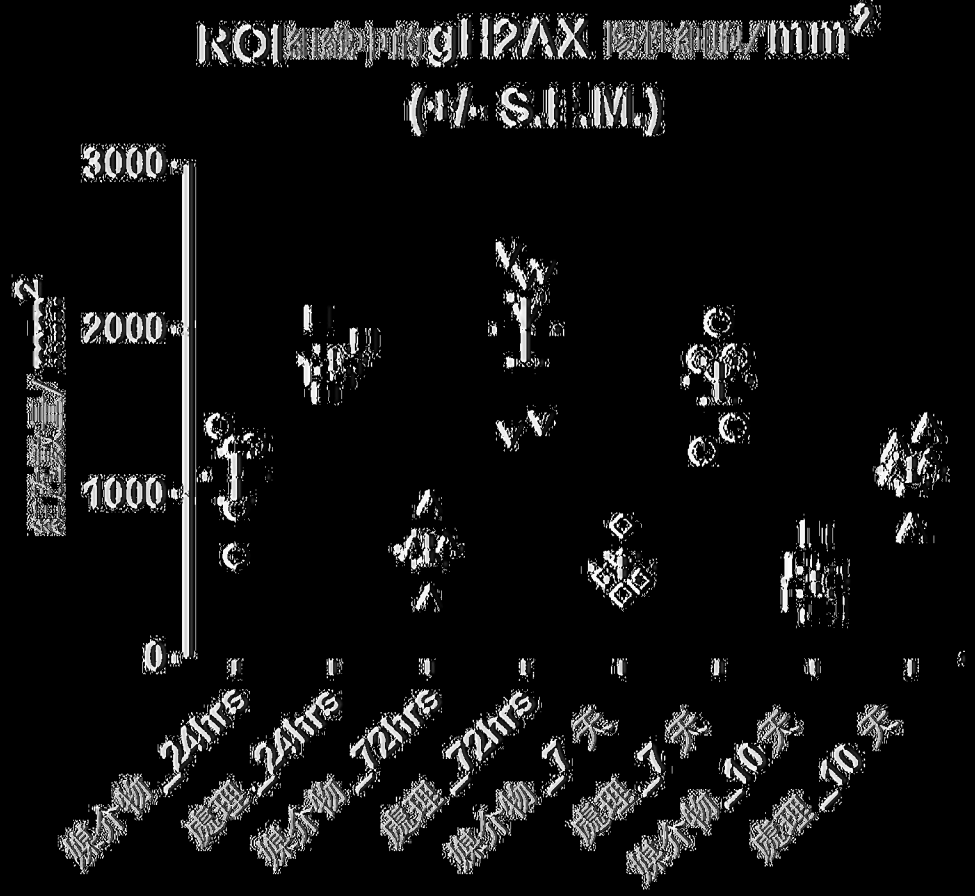


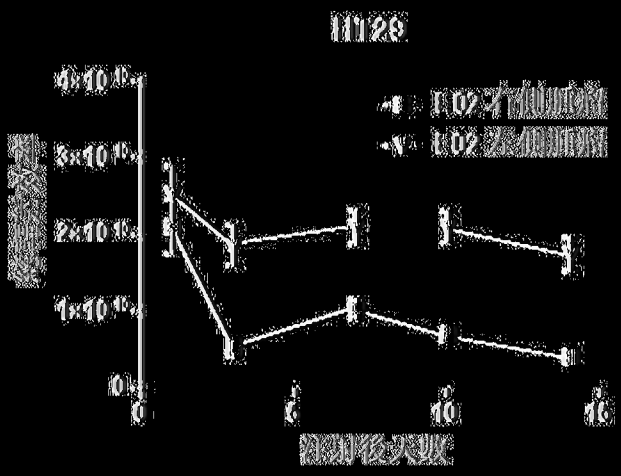
圖24O


媒介物
L02 G1 SG8249

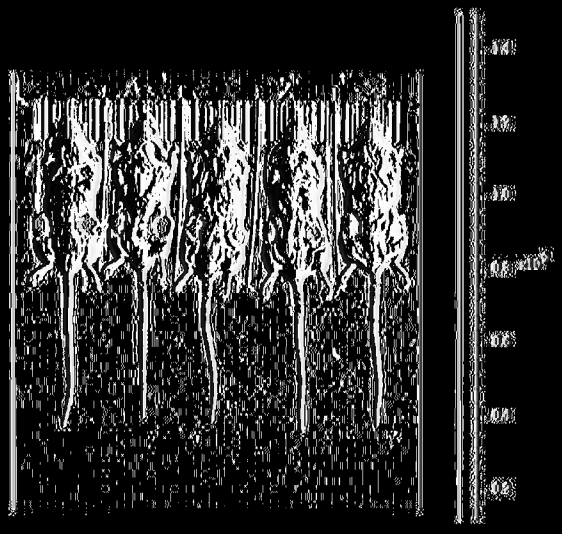
|(圖25A)|


RO[紅色]形gH2AX 陽性細胞/mm2
(+/- S.E.M.)
3000
2000
1000
0
媒介物_24hrs
處理_24hrs
媒介物_72hrs
處理_72hrs
媒介物_7 天
處理_7 天
媒介物_10 天
處理_10 天

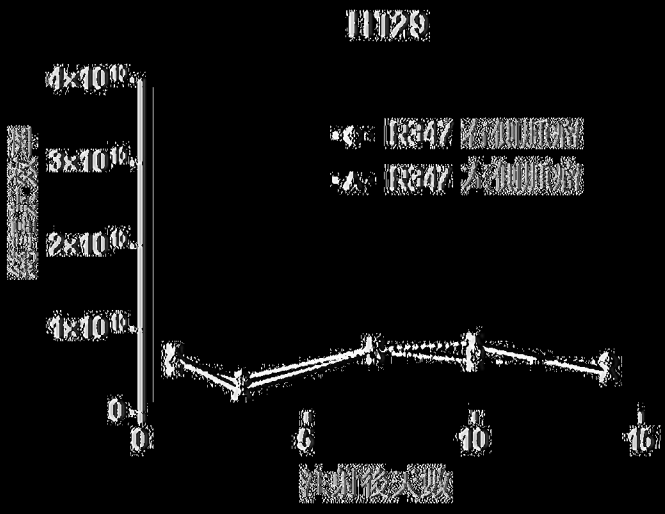
|(圖25B)|



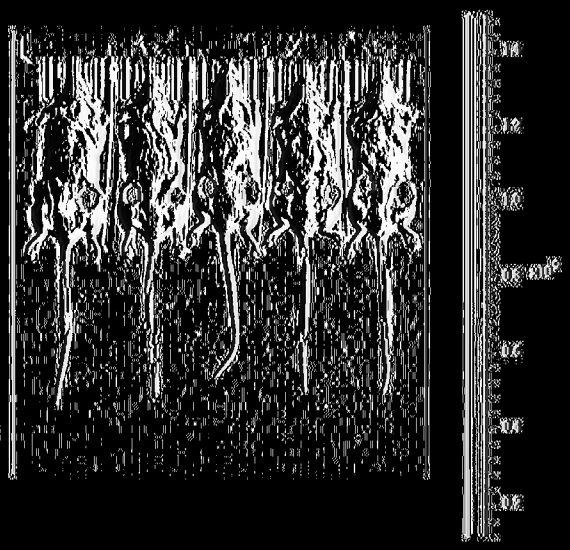
|(圖26A)|



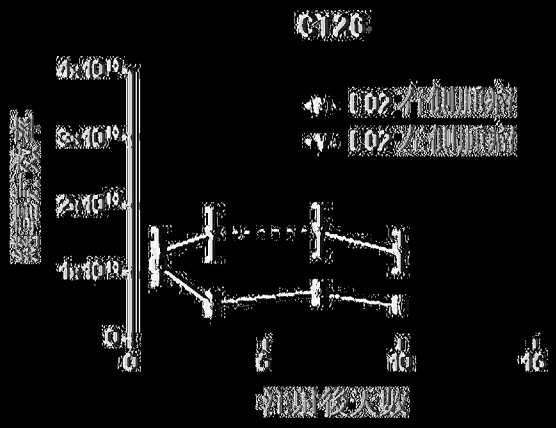
|(圖26B)|



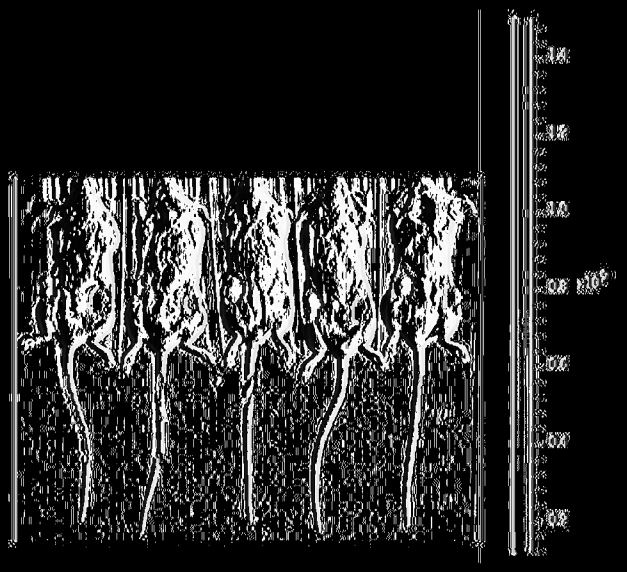
|(圖26C)|



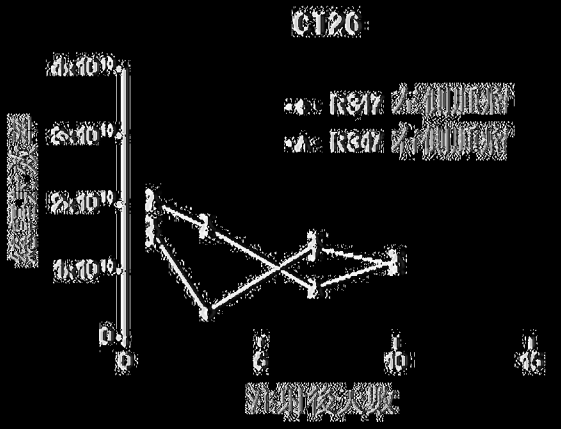
|(圖26D)|



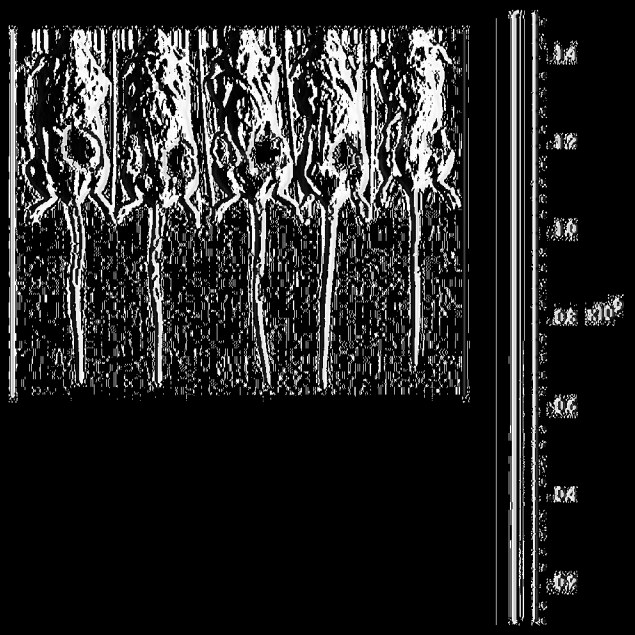
|(圖27A)|



|(圖27B)|



|(圖27C)|



|(圖27D)|

	FW1	CDR1	FW2
ZY0EPQ-E02	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFS	GYYWN	WIRQPPGKGLEWIG
ZY0EQD-E02	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFS	GYYWN	WIRQPPGRGLEWIG
ZY0EP0-C07	QVQLVESGGVLVKPGGSLRLSCAASGFTLS	DYYVS	WIRQAPGVGLEWVS
ZY0EOB-F05	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSIS	SGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG
ZY0EO5-E07	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSIS	SGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG

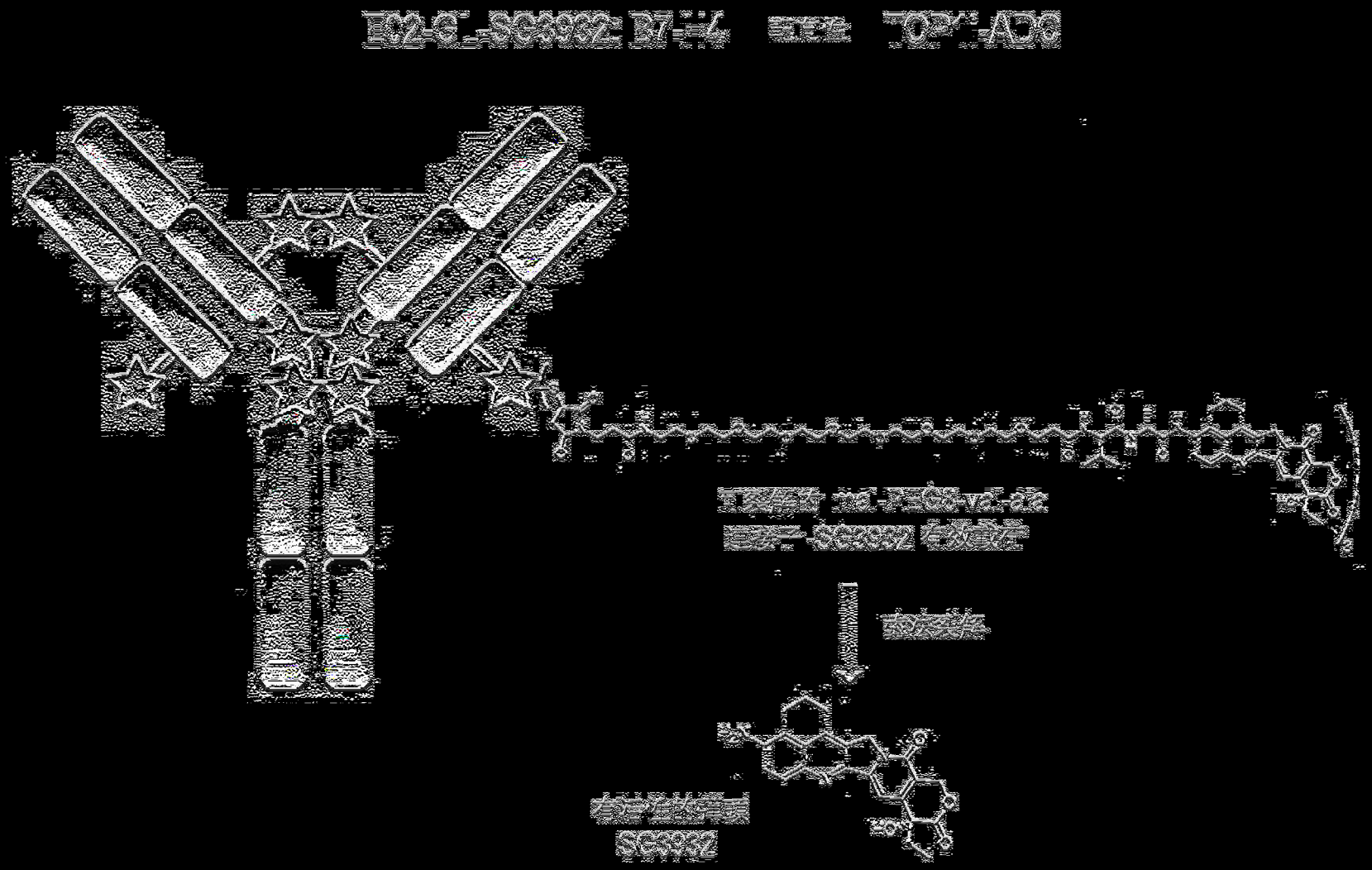
CDR2	FW3	CDR3	FW4
EIN	HSGSTNYNPSLKS	RVTLVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	NLYNWN DS	WGQGTLVTVSS
EIN	HSGSTSYNPSLKS	RTSDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	VLYNWNV DS	WGQGTLVTVSS
YISS	SGSTYYTDSVKG	RFTSRDSAKNSLYLQVNSLRAEDTAVYYCAR	DGVGF DY	WGQGTLVTVSS
NY	YSGSTYYNPSLKS	RVTSVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCAT	EKALATVTPSGYENYYTV DV	WGQGTLVTVSS
NY	YSGSTYYNPSLKS	RVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	EKALASVTPSGYENYYVV DV	WGQGTLVTVSS

【圖28A】

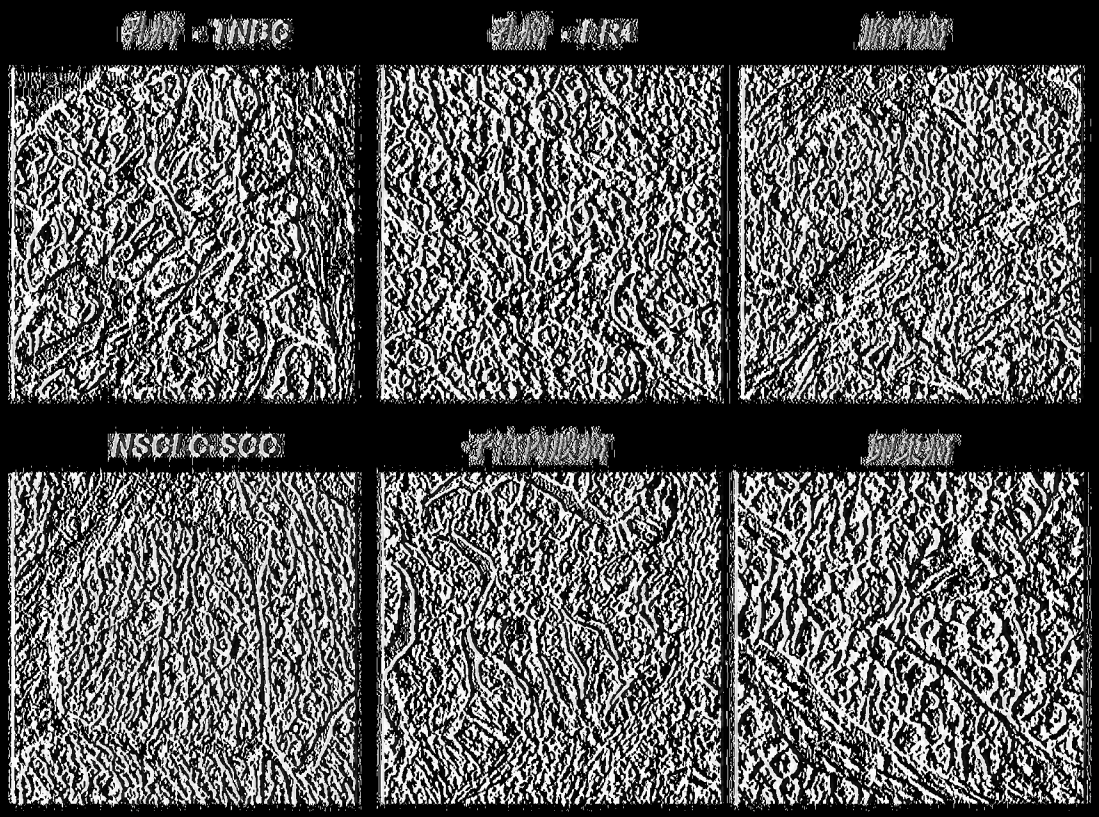
	FW1	CDR1	FW2
ZY0EQD-E02	DIQVTQSPSSLSASVGDRVTTC	RASQ DRNDVG	WYQQKPGKAPKRLLY
ZY0EPQ-E02	DIQVTQSPSSLSASVGDRVTTC	RASQ GRNDLG	WYQQKPGRAPKRLLY
ZY0EP0-C07	EIVLTQSPGTLSLFPGERATLSC	RASQS VSSSYLA	WYQQKPGQSPRLLLY
ZY0EO5-E07	DIQLTQSPSFLSASVGGRVTTC	WASQ GAGYLA	WYQQKPGKAPKLLLY
ZY0EOB-F05	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTC	WASQ GSSYLA	WYQQKPGKAPKLLLY

CDR2	FW3	CDR3	FW4
AA SRLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTSSLQPEDFATYYC	LQHNSYP RT	FGQGTKVELLK
VA SSLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTSSLQPEDFATYYC	LQHNSYP RT	FGQGTKVELLK
AA SSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTSRLEPEDFAVYYC	QQYGSSP YT	FGQGTKLELLK
AA STLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTSSLQPEDFATYYC	QHLNSYP LF	FGGGTKVELLK
AA STLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTSSLQPEDFATYYC	QHLNSYP LF	FGGGTKVELLK

【圖28B】

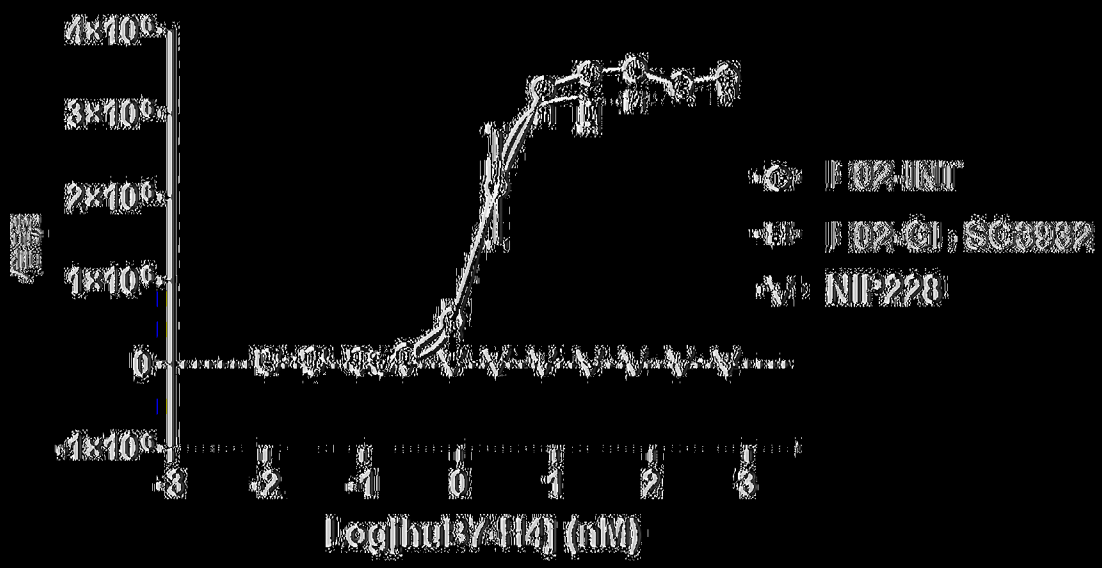


【圖29A】

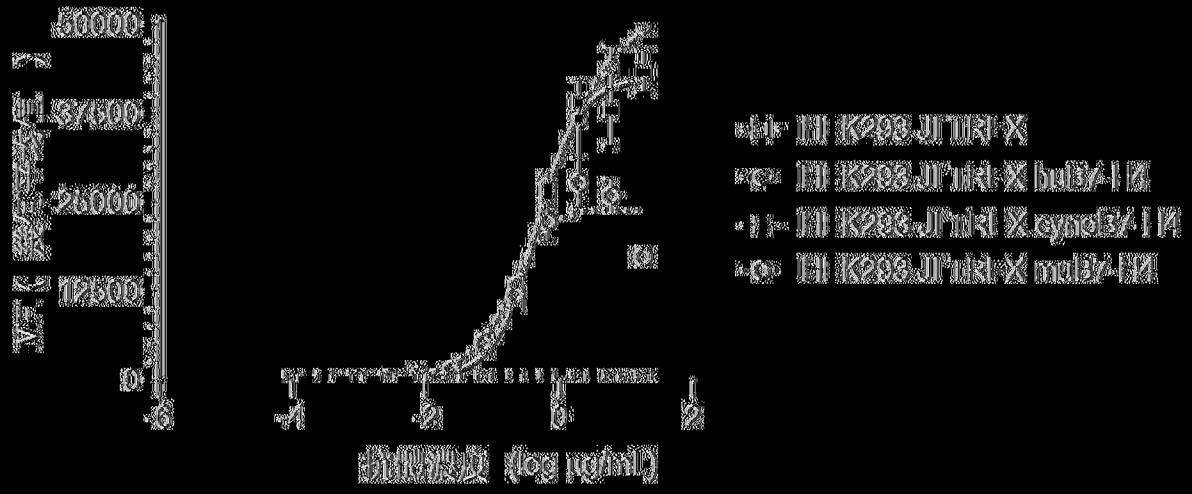


FR: 曲線表示體: NSCLC SCC
非小細胞肺癌, 鱗狀細胞癌; TNBC: 三陰性乳癌.

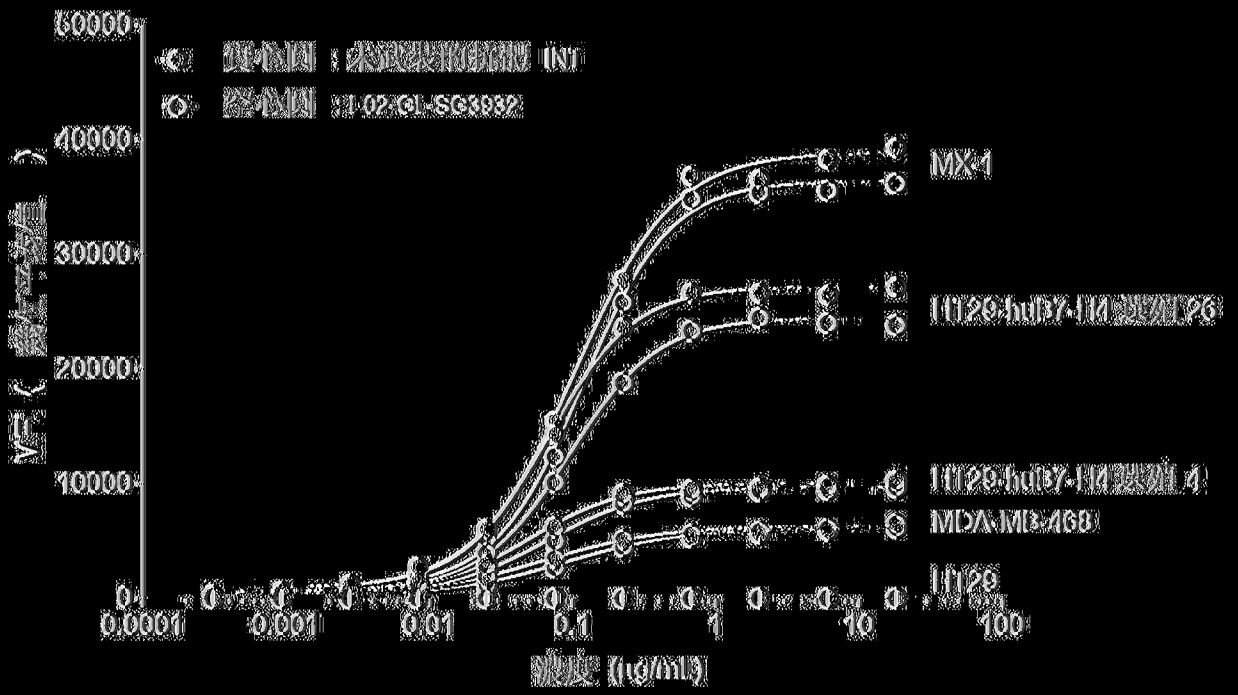
(圖31)


4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
-1×10⁶
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log[huBY-H4] (nM)
F02-INT
F02-Cl, SC3932
NIP228

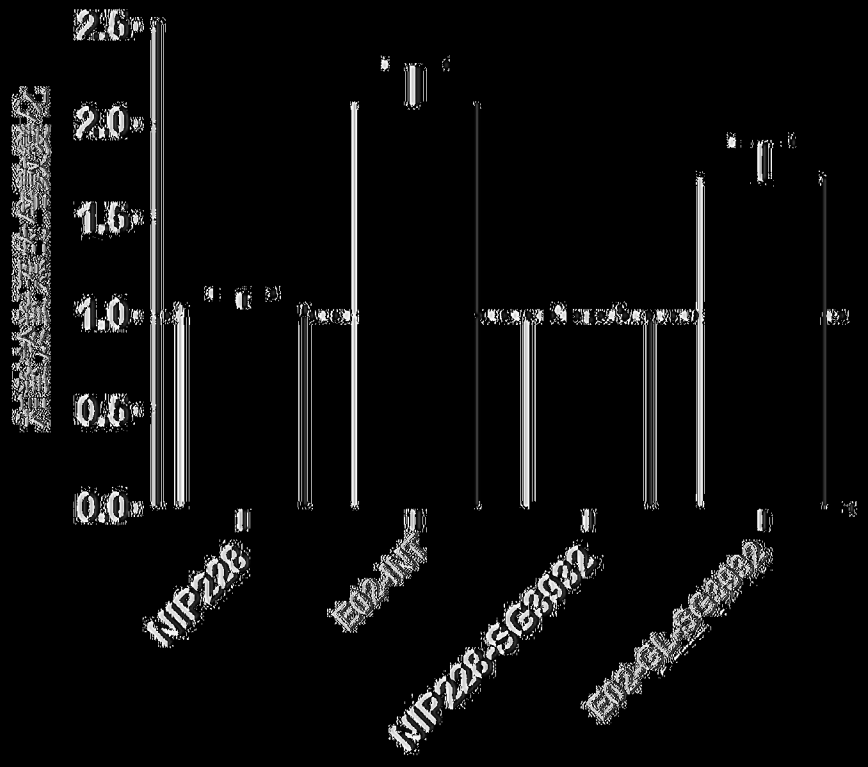
（圖33）


50000
37500
25000
12500
0
-6
-4
-2
0
2
H K293 JT1R1 X
H K293 JT1R1 X bul37 H4
H K293 JT1R1 X cyno37 H4
H K293 JT1R1 X mul37 H4

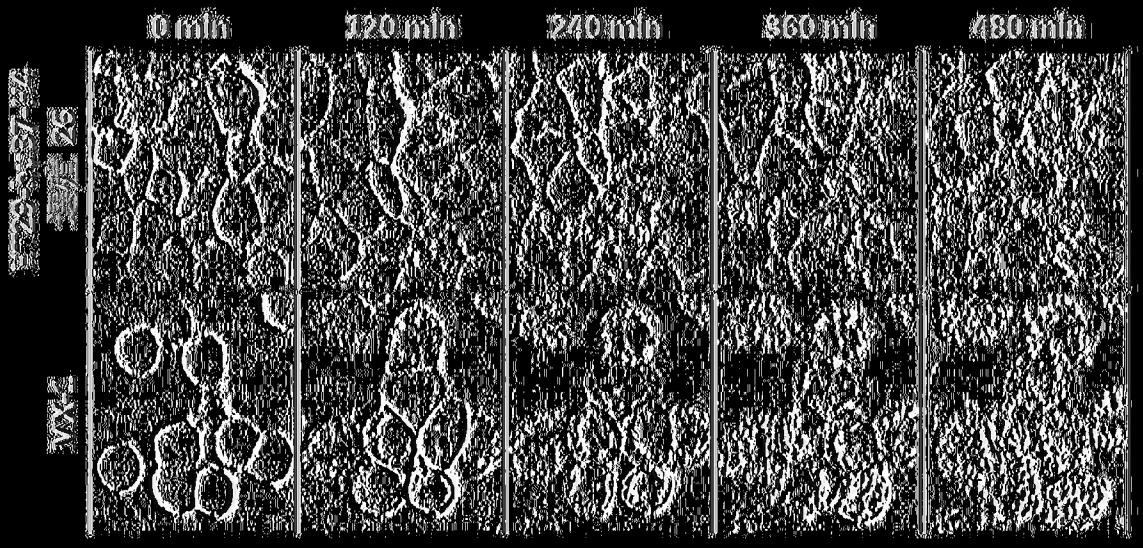
|(圖34)|


60000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
濃度 (ng/mL)
MX-1
MDA-MB-468

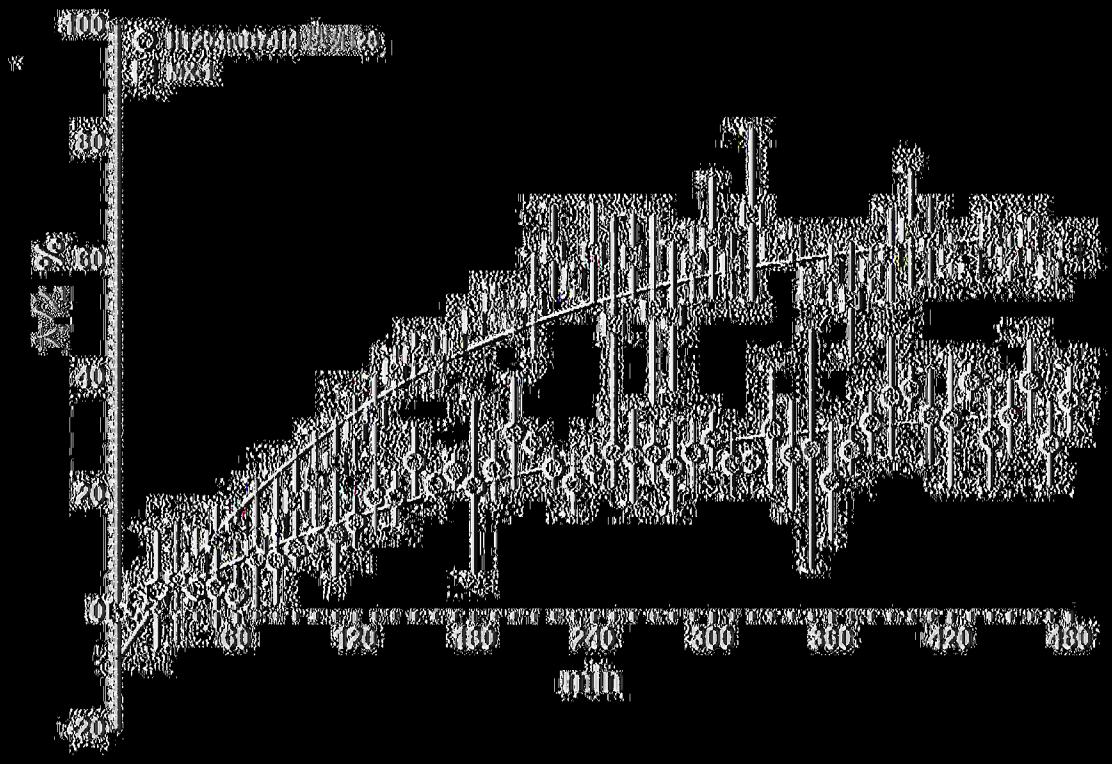
[圖35]



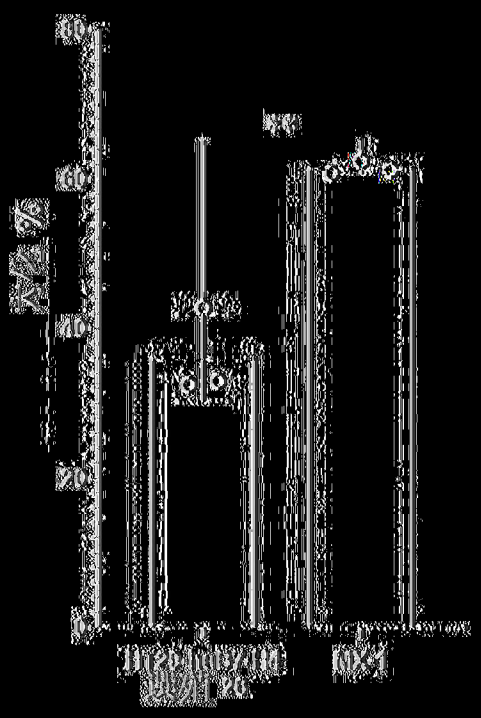
[圖37]



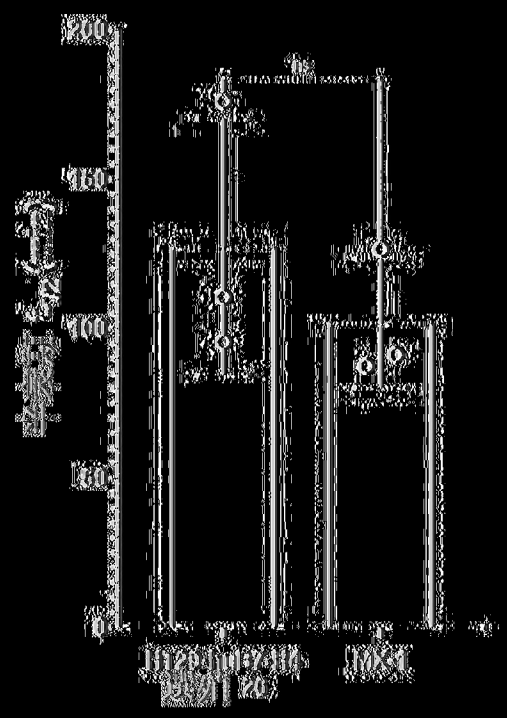
【圖38】



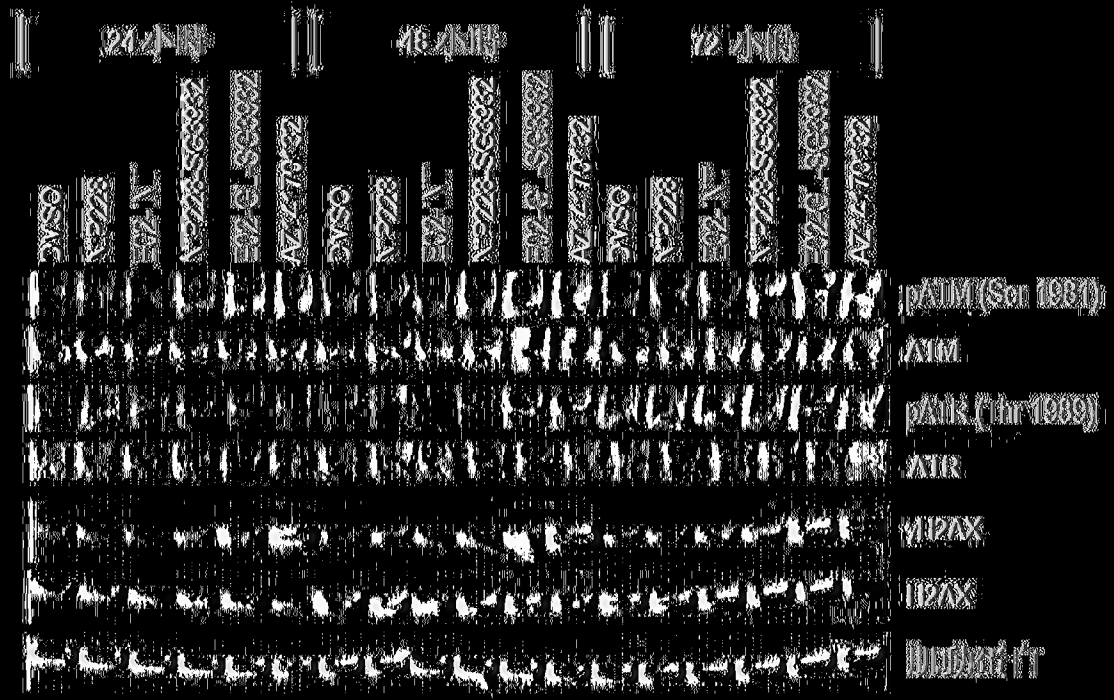
|(圖39A)|



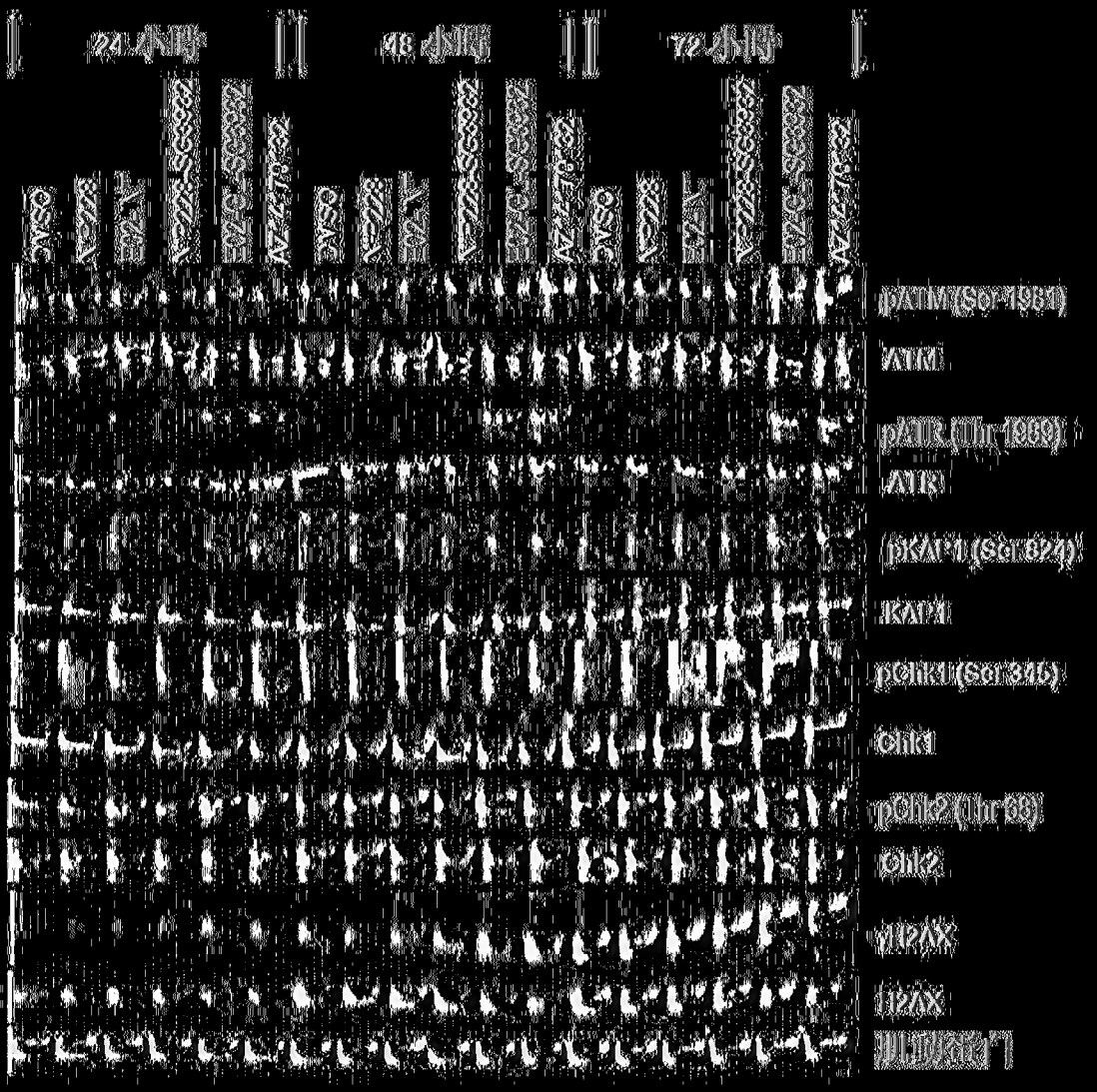
[圖39B]



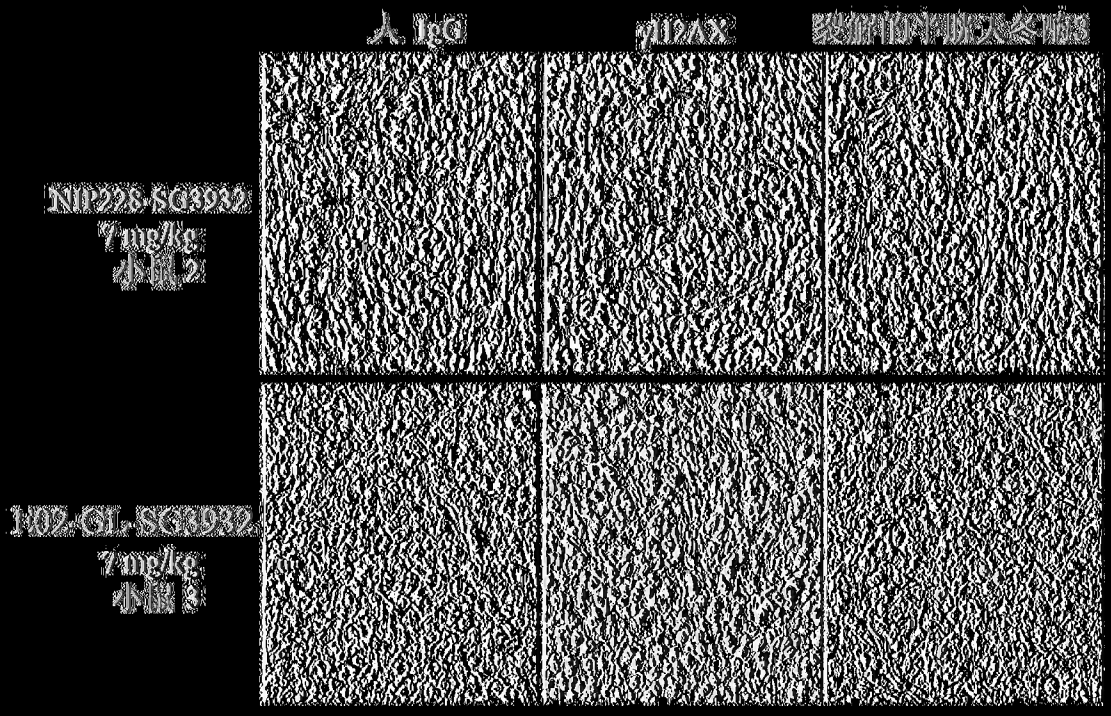
[圖39C]


24小時
48小時
72小時
DWSO
N-228
E92-1T
N-228-SG3932
E92-CL-SG3932
AZ-4470-32
pATM (Sen 1981)
ATM
pATR (Thr 1989)
ATR
γH2AX
H2AX
加速磁行

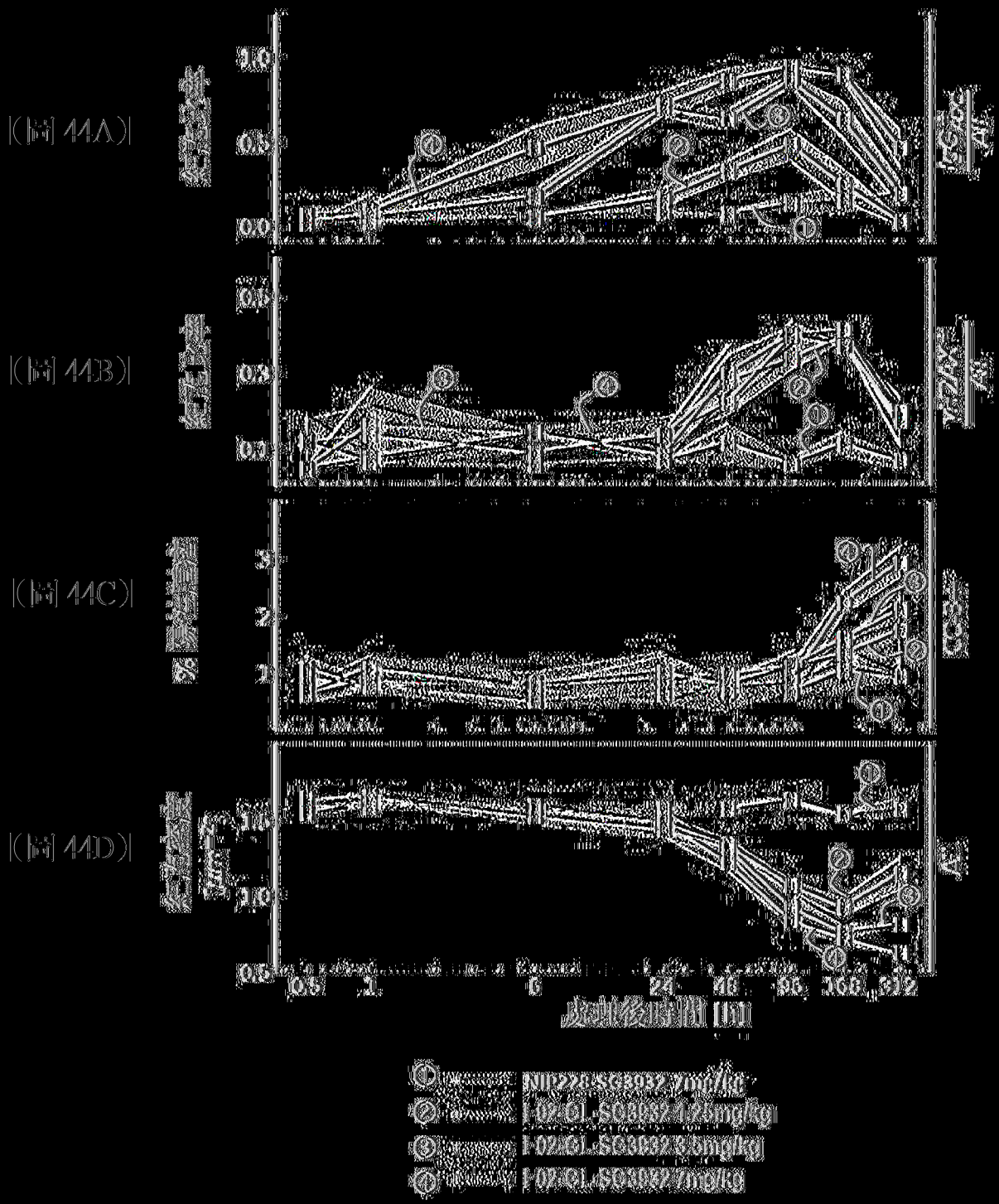
(圖41)

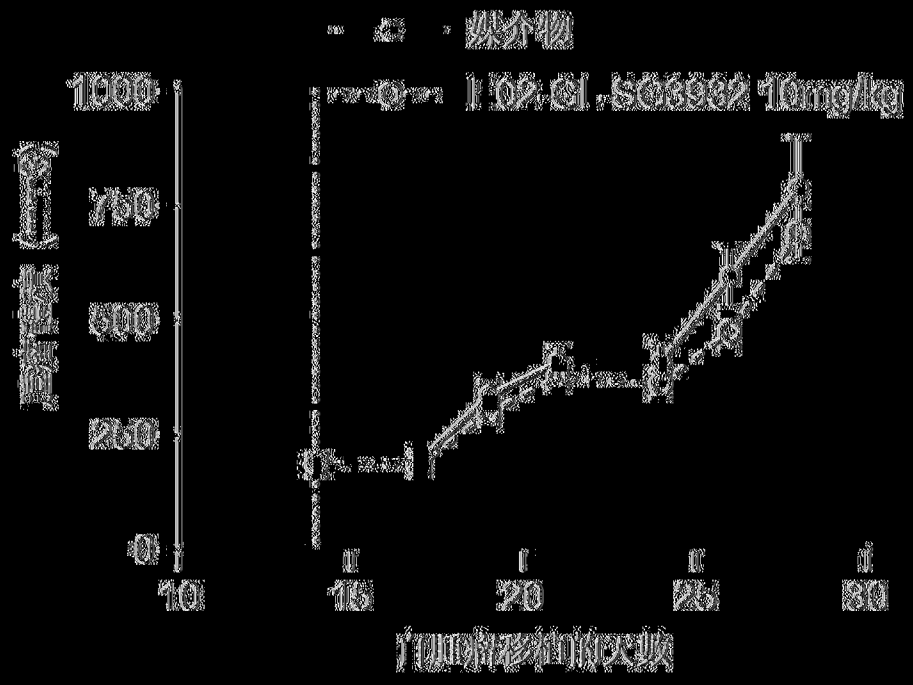

24小時
48小時
72小時
pATM (Ser 1981)
ATM
pATR (Thr 1989)
ATR
pKAP1 (Ser 824)
KAP1
pChk1 (Ser 345)
Chk1
pChk2 (Thr 68)
Chk2
γH2AX
H2AX
地圖發行

【圖42】

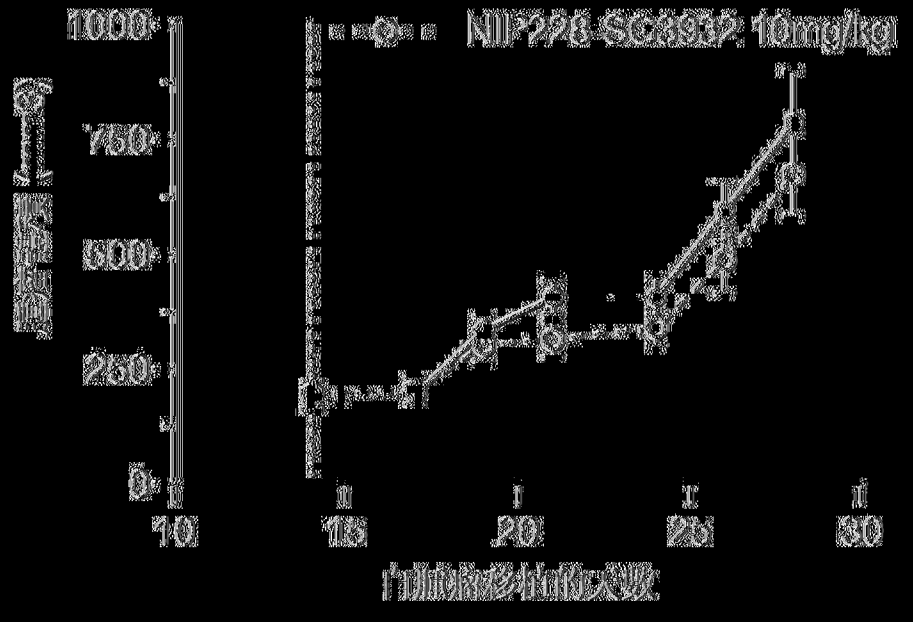


	人 IgG	γH2AX	發暗的神物大冬暗3
	(圖 43A)	(圖 43B)	(圖 43C)
NIP228-SG3932 7 mg/kg 小鼠 2			
1.02-G1-SG3932 7 mg/kg 小鼠 3			
	(圖43D)	(圖43E)	(圖43F)

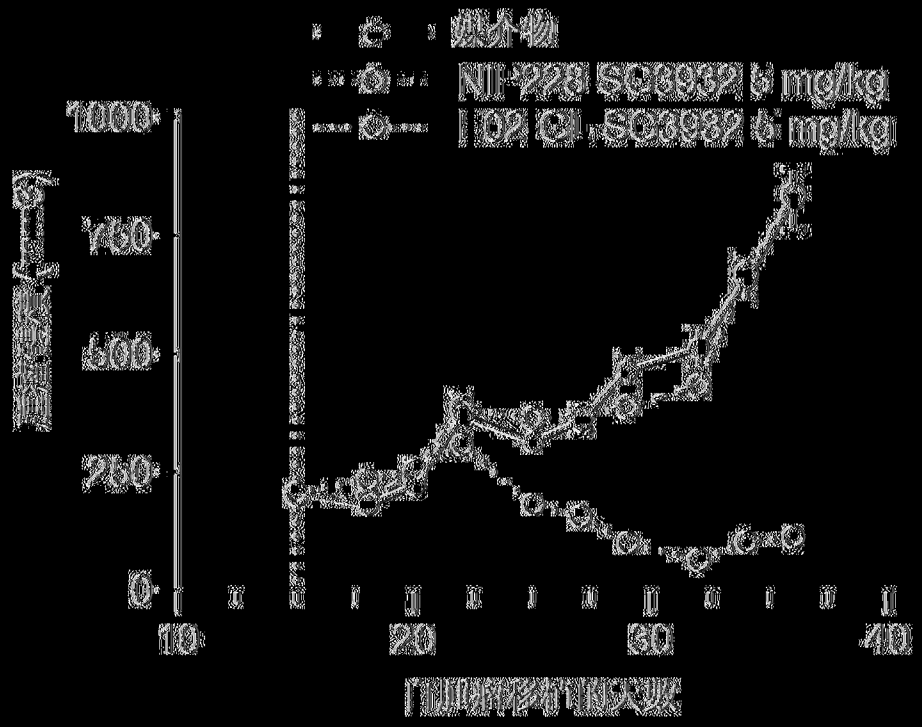

(圖44A)
(圖44B)
(圖44C)
(圖44D)
1.0
0.5
0.0
0.5
0.3
0.1
3
2
1
1.5
1.0
0.5
0.5
1
6
24
48
96
168
312
皮膚後時間 [h]
① NIP228-SG3932 7mg/kg
② I-02-C1-SG3932 4.25mg/kg
③ I-02-C1-SG3932 3.5mg/kg
④ I-02-C1-SG3932 7mg/kg


媒介物
1:02 CI, SC8932 10mg/kg
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
自地移植的天數

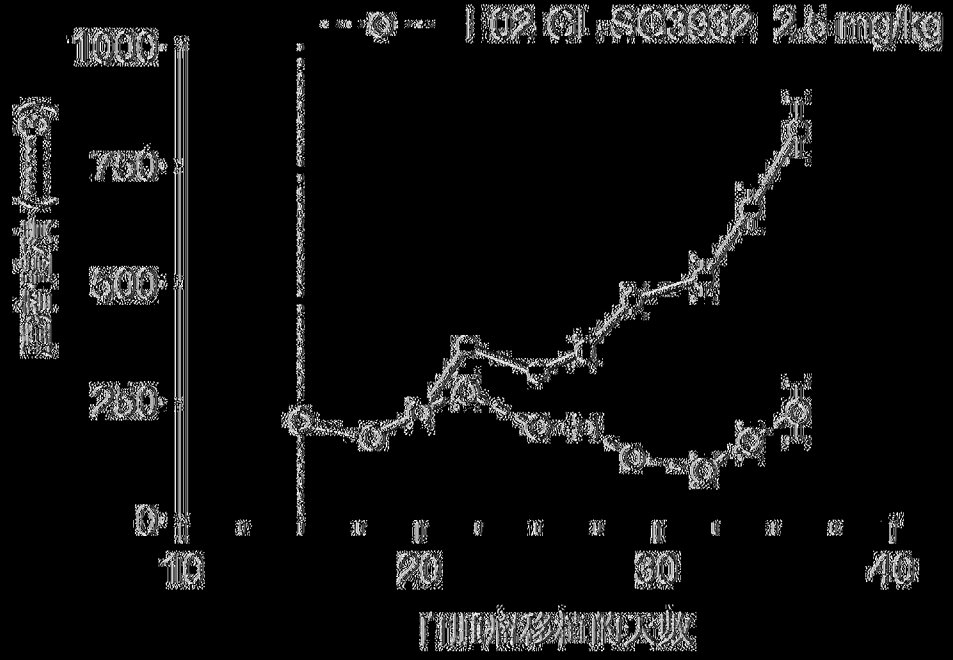
[圖45A]


NIP228 SC8932 10mg/kg
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
自地移植的天數

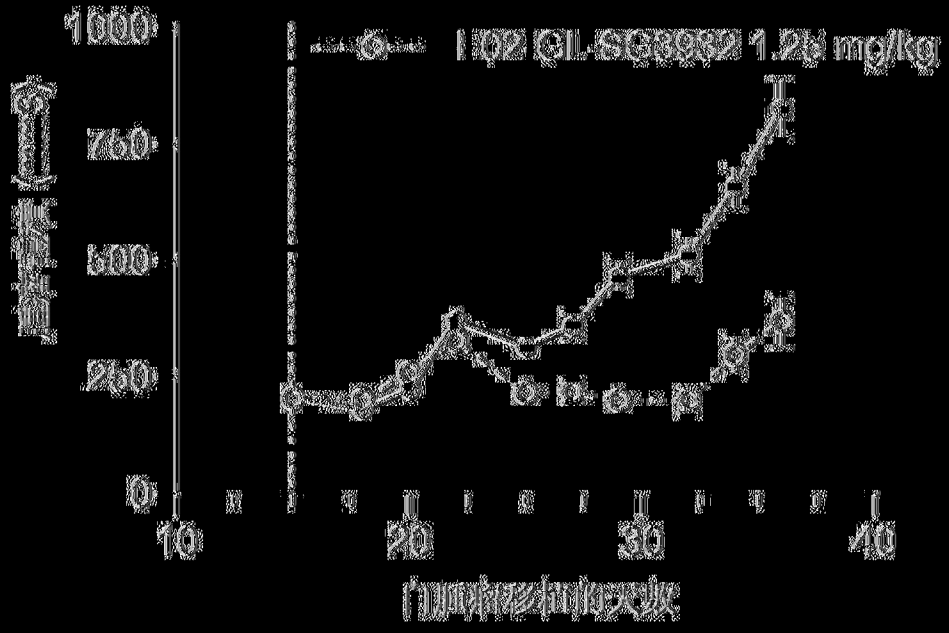
[圖45B]


燃介物
NF-228 SC3932 5 mg/kg
I 02 Cl SC3932 5 mg/kg
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
出現時移行的天數

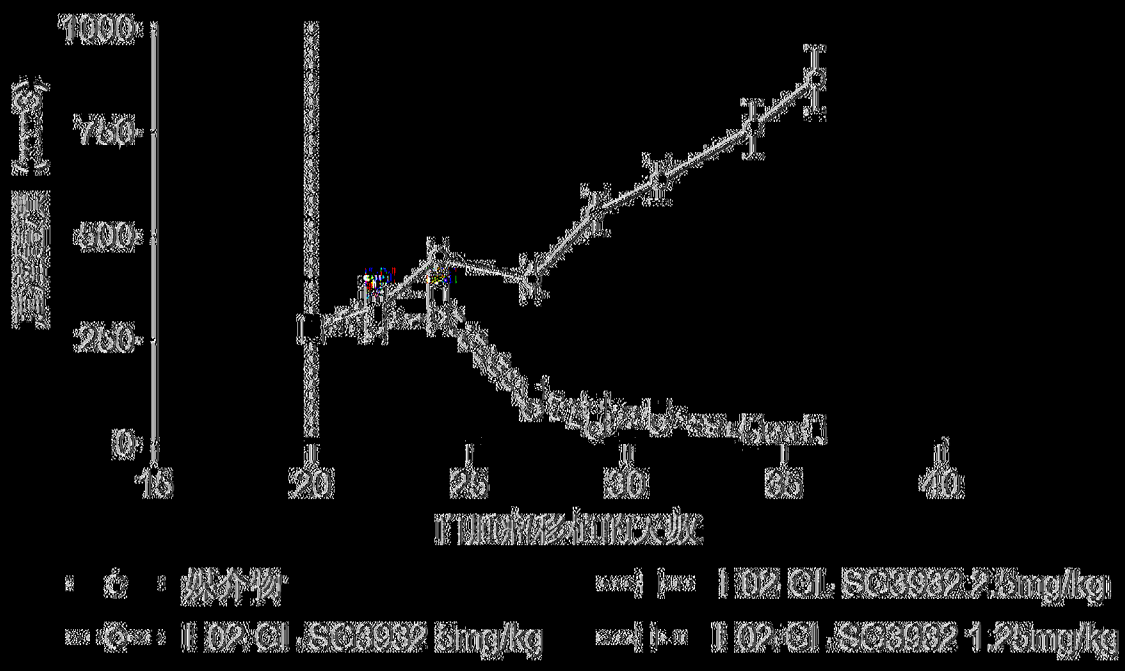
|(圖 46A)|


I 02 Cl SC3932 2.5 mg/kg
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
出現時移行的天數

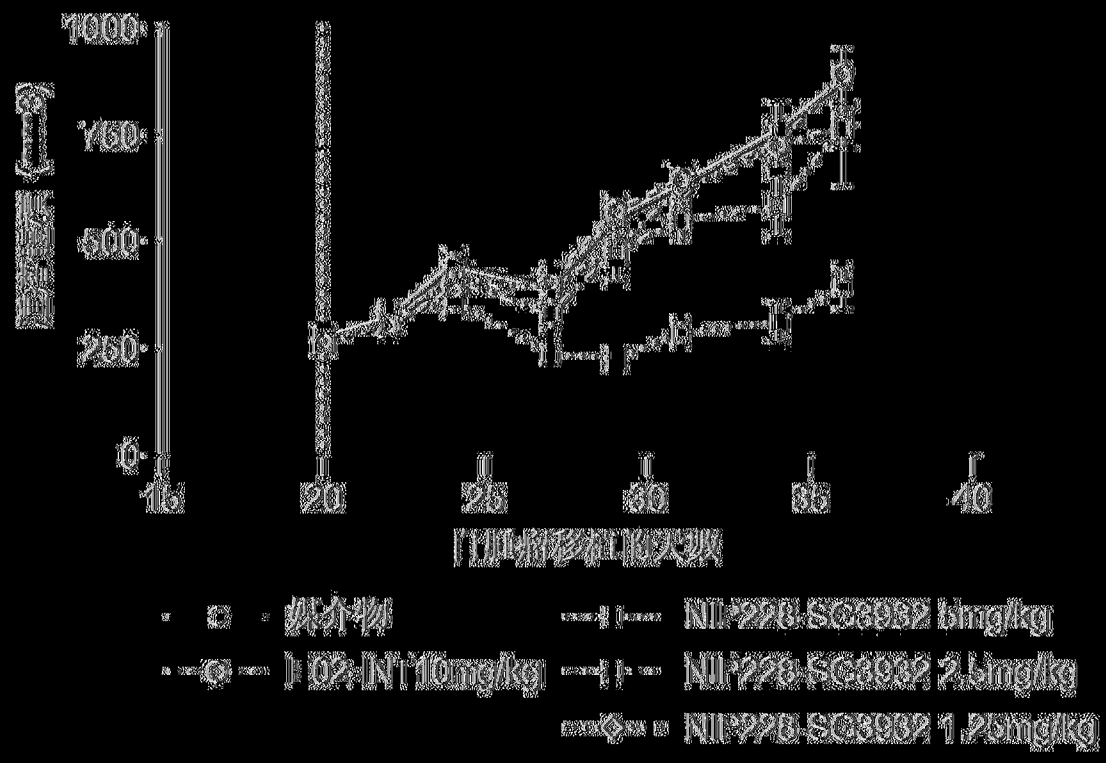
|(圖 46B)|



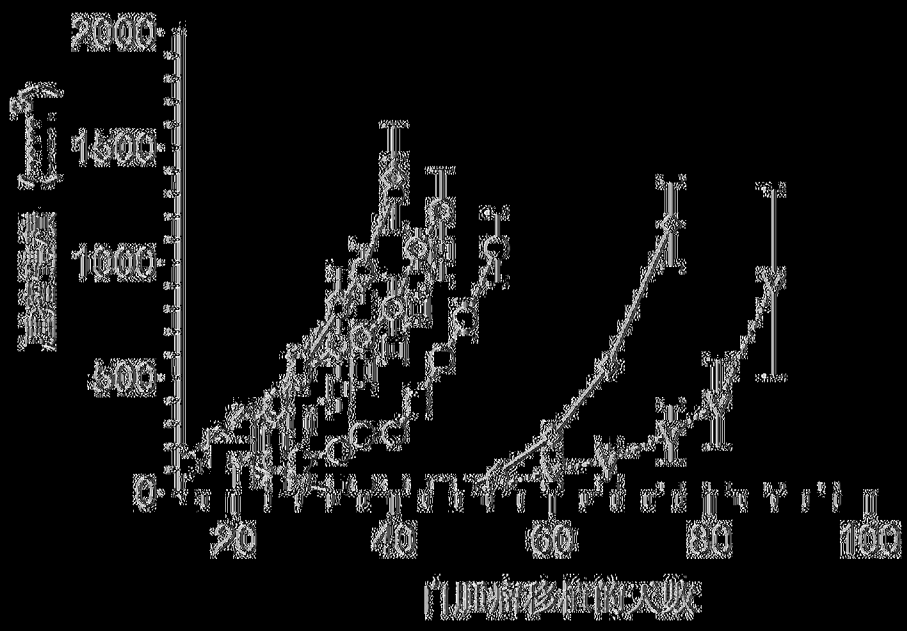
[(圖 46C)]


1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
40
IT加速移植的天數
媒介物
I 02 CL SC3932 2.5mg/kg
I 02 CL SC3932 5mg/kg
I 02 CL SC3932 1.25mg/kg

|(圖 47A)|

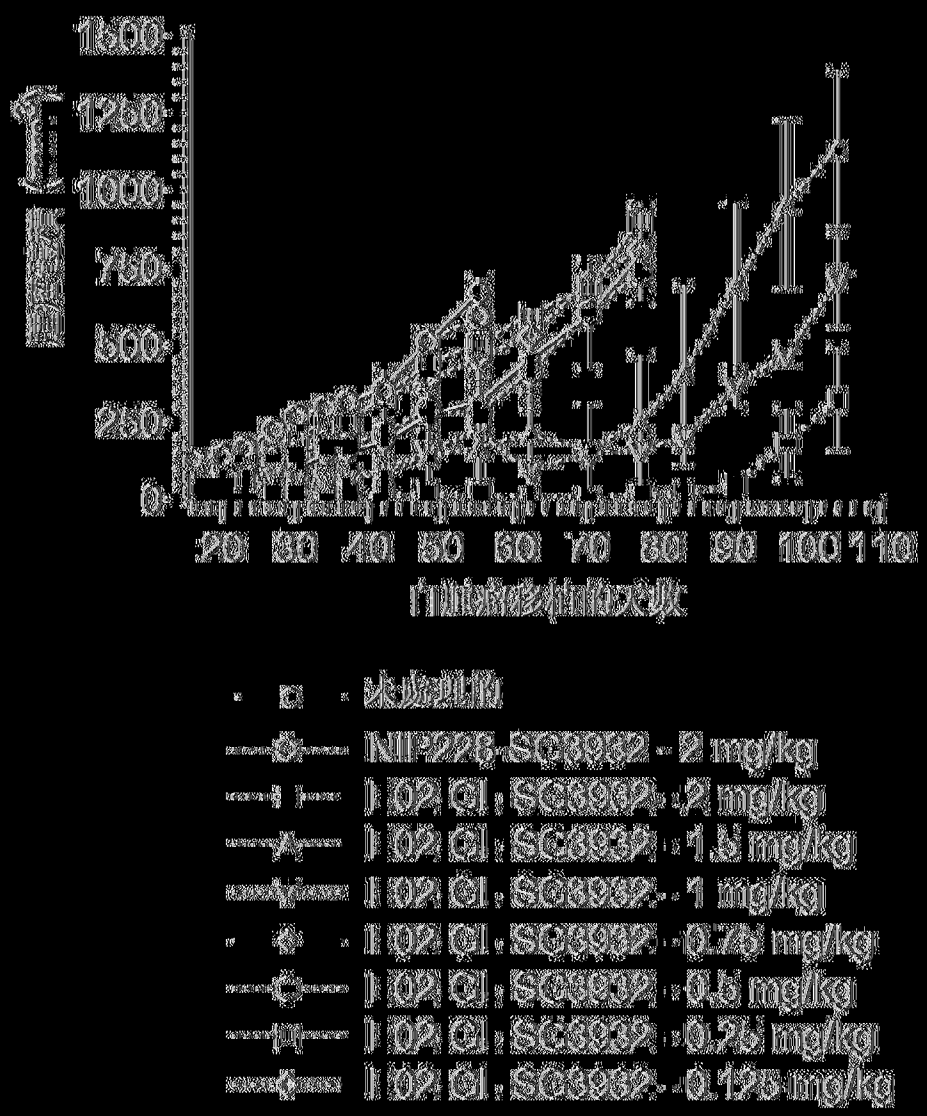

1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
40
IT加速移植的天數
媒介物
I 02 INT 10mg/kg
NIP228 SC3932 5mg/kg
NIP228 SC3932 2.5mg/kg
NIP228 SC3932 1.25mg/kg

|(圖47B)|



- 未處理的
- NIP228-SC3932 - 2 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 2 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 1.5 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 1 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 0.75 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 0.5 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 0.25 mg/kg
- I-02 CL-SC3932 - 0.125 mg/kg

【圖48】

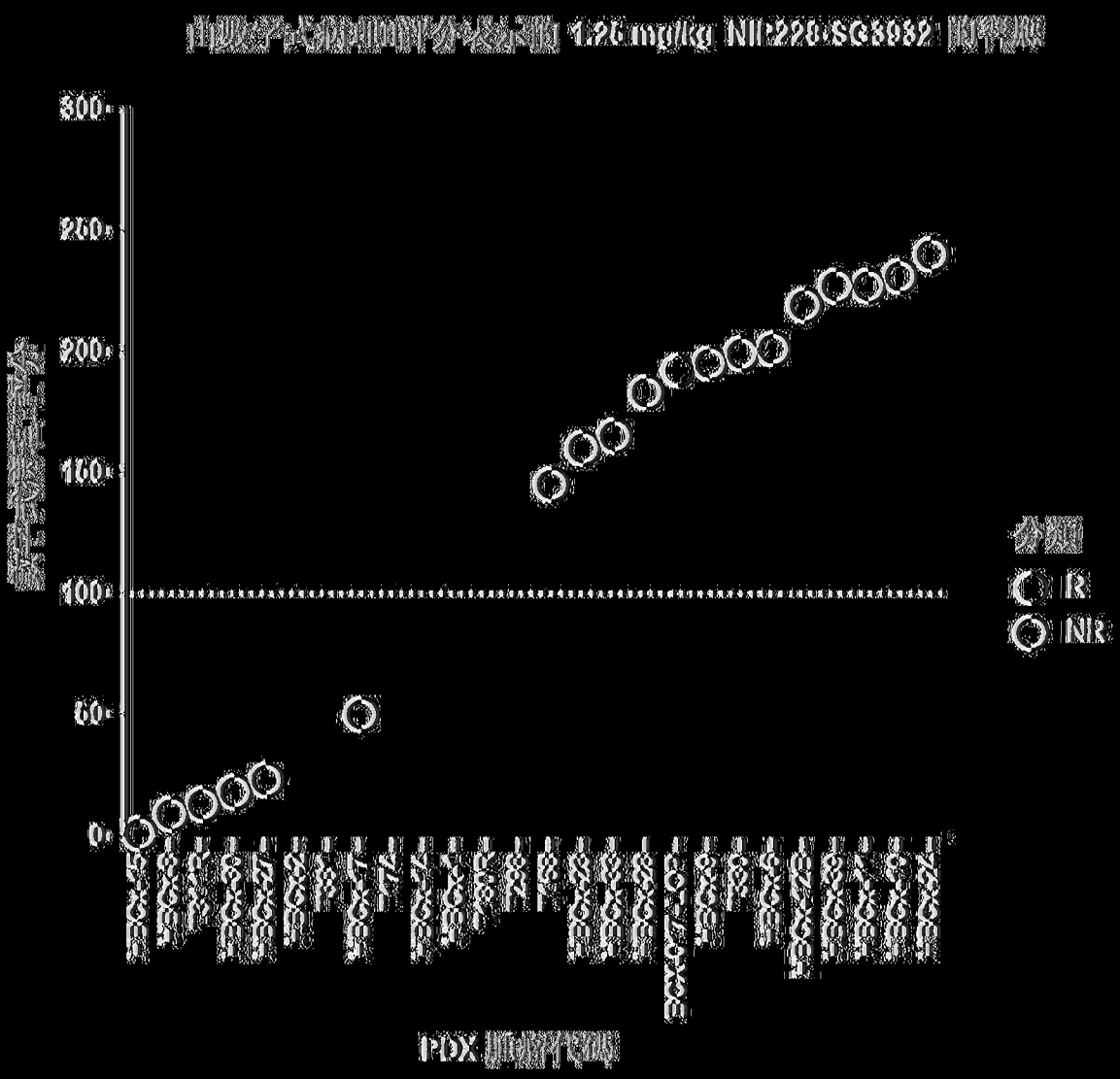

1500
1250
1000
750
500
250
0
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
台灣產物相的交換
未處理的
NIP228-SC8932 - 2 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 2 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 1.5 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 1 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.75 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.5 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.25 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.125 mg/kg

(圖49)

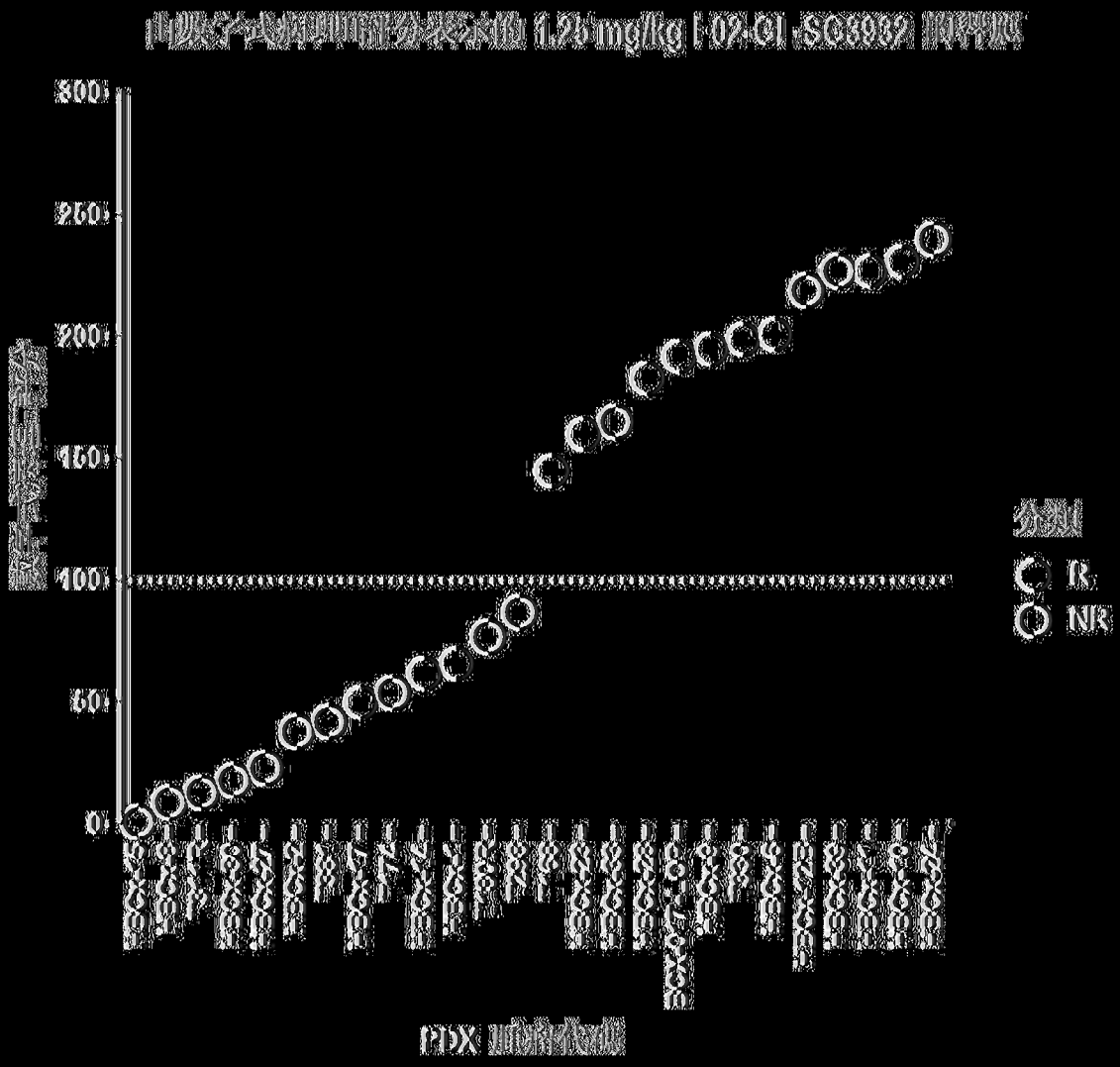
IIBCx-6
IIBCx-39
IIBCx-24
T330
IIBCx-128
IIBCx-10
IIBCx-9
DCX-0LZ-LOP
IIBCx-11
IIBCx-28
IIBCx-33
T168
IIBCx-23
T298
T180R
IIBCx-L
IIBCx-14
T174
IIBCx-17
T381
IIBCx-2
IIBCx-27
IIBCx-30
T31RB
IIBCx-8
IIBCx-15
100
80
60
40
20
0

圖 1(c)

HBGx-2
1381
131HR
HBGx-30
T180R
HBGx-39
HBGx-16
HBGx-21
1274
HBGx-3
HBGx-33
HBGx-37
1230
HBGx-42B
HBGx-47
HBGx-41
HBGx-1
HBGx-11
HBGx-23
HBGx-28
HBGx-10
HBGx-6
BGX-017A1-OP
HBGx-9
1168
1330
圖 5-3

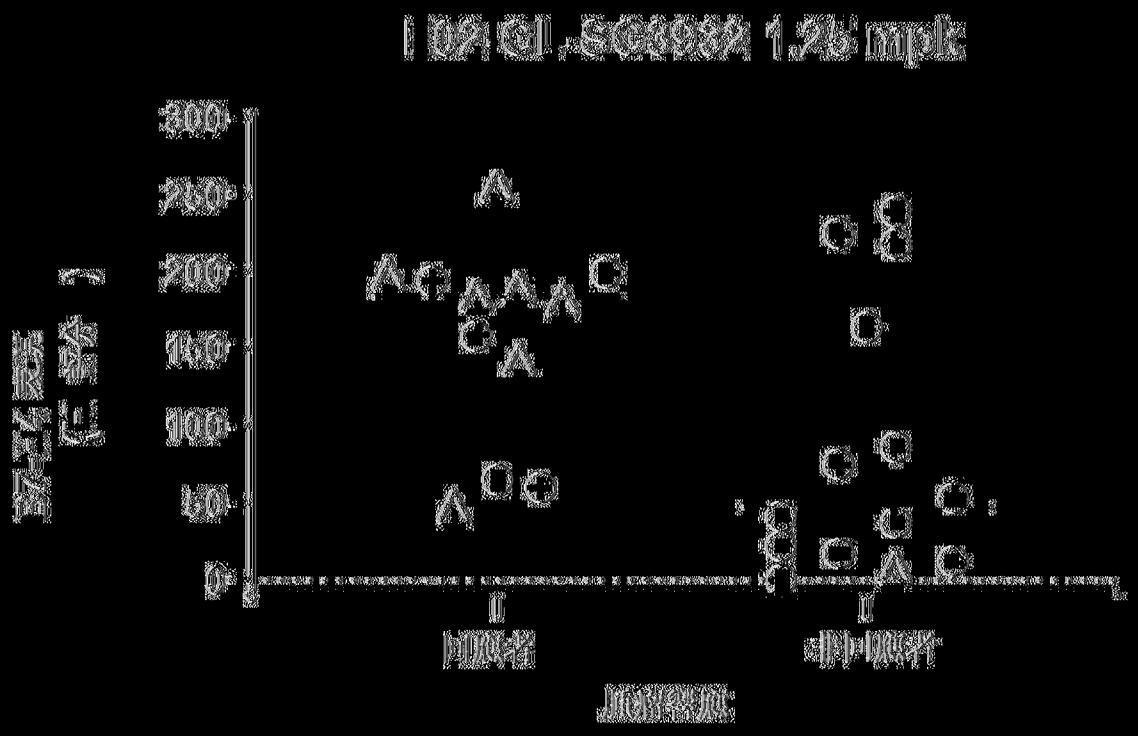

由數字式預期計分表示的 1.25 mg/kg NIP228-SG3932 的響應
300
250
200
150
100
50
0
數字式表示
分類
R
NR
PDX 腫瘤代碼

|(圖52A)|

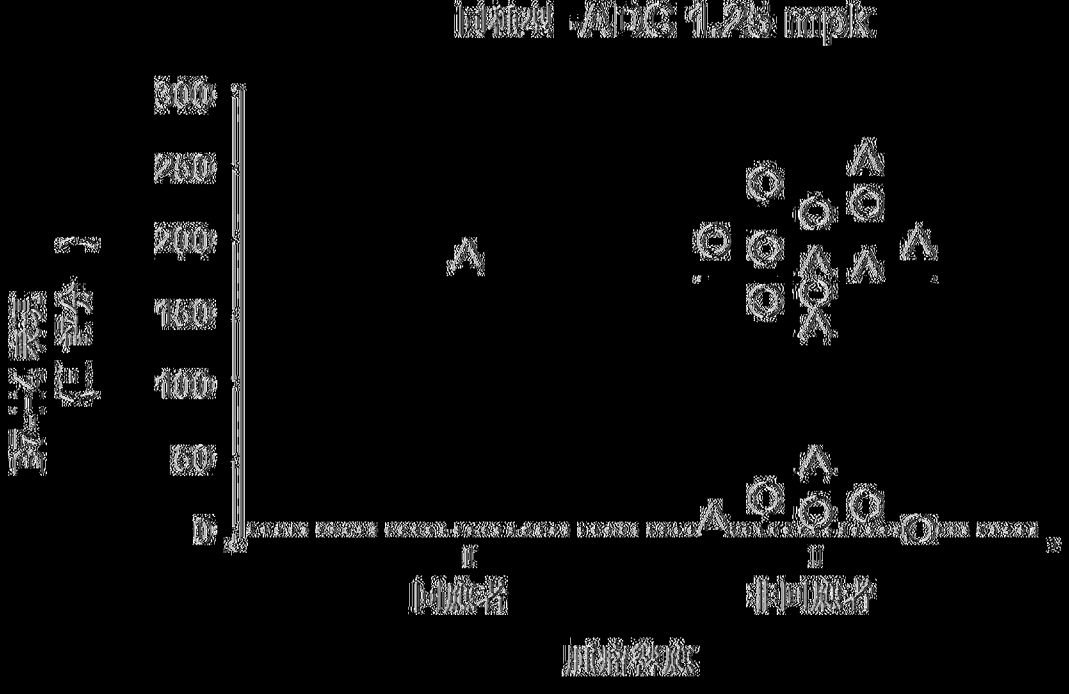

由吸子式病理可評分表示的 1.25 mg/kg [-02-CI -SC3932 的容器
300
250
200
150
100
50
0
分類
R
NR
PDX 試驗代碼

|(圖52B)|

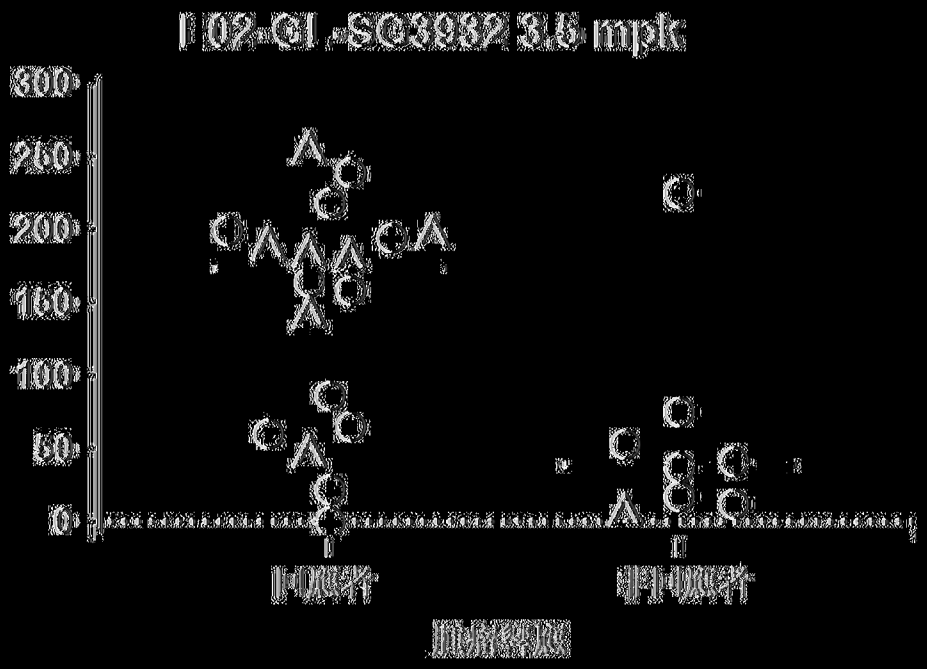
BOX.01A1.OP
IIBOX.11
T168
IIBOX.10
IIBOX.16
IIBOX.33
T330
IIBOX.9
IIBOX.11
IIBOX.6
IIBOX.1
IIBOX.28
IIBOX.21
IIBOX.23
IIBOX.27
IIBOX.12B
T298
IIBOX.17
IIBOX.8
T180A
T131A
T381
IIBOX.30
T721
IIBOX.39
IIBOX.2


I 02 GI -SG3932 1.25 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I
II
II
II

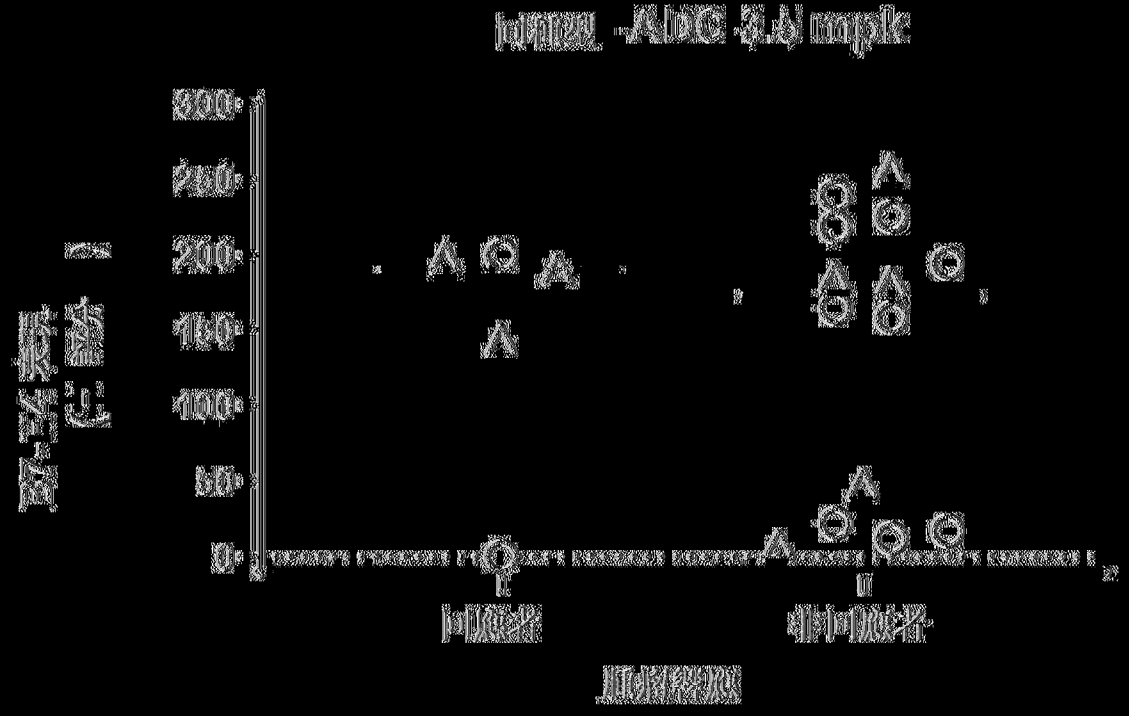
|(圖53B)|


Initial -AHC 1.25 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I
II
II
II

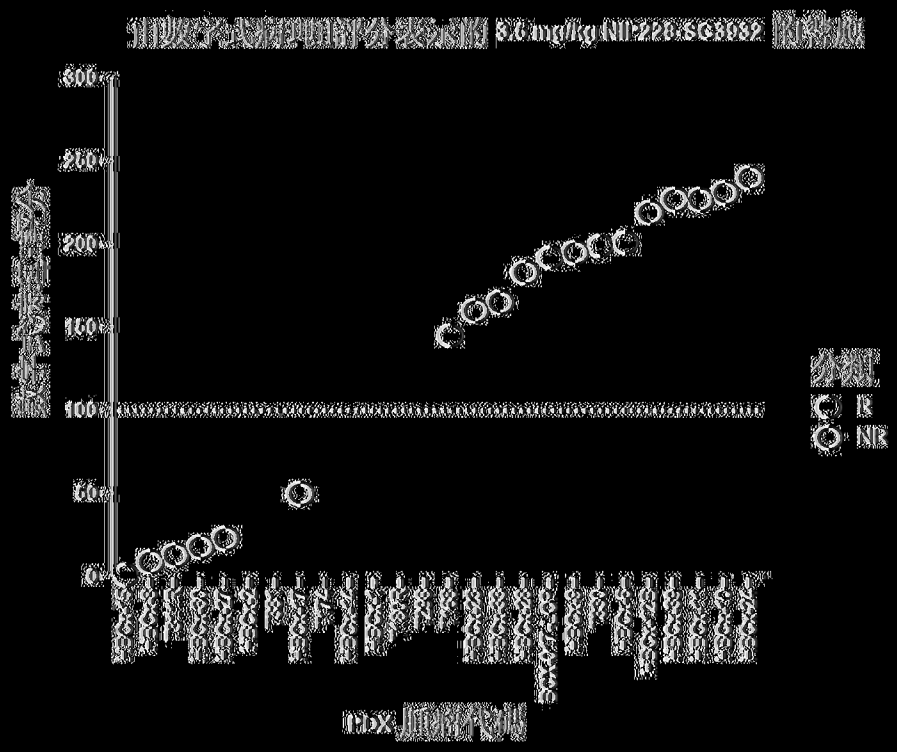
|(圖53C)|


I 02-CI -SC3932 3.5 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I-1 吸者
II-1 吸者
加熱經過

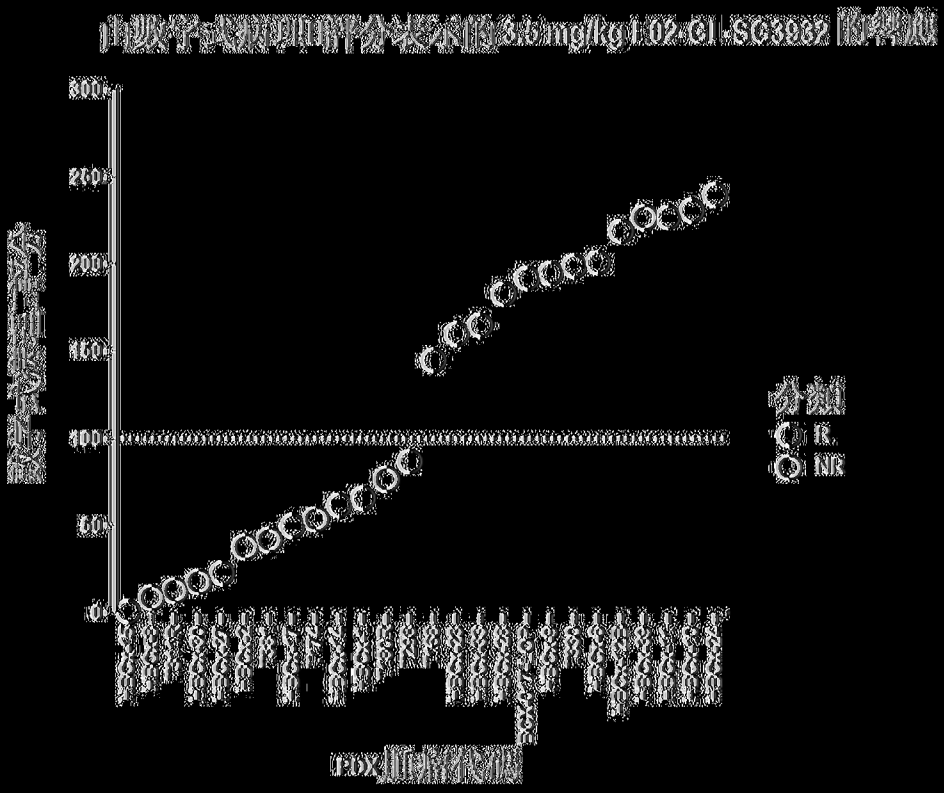
|(圖53D)|


ADC 3.5 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I-1 吸者
II-1 吸者
加熱經過

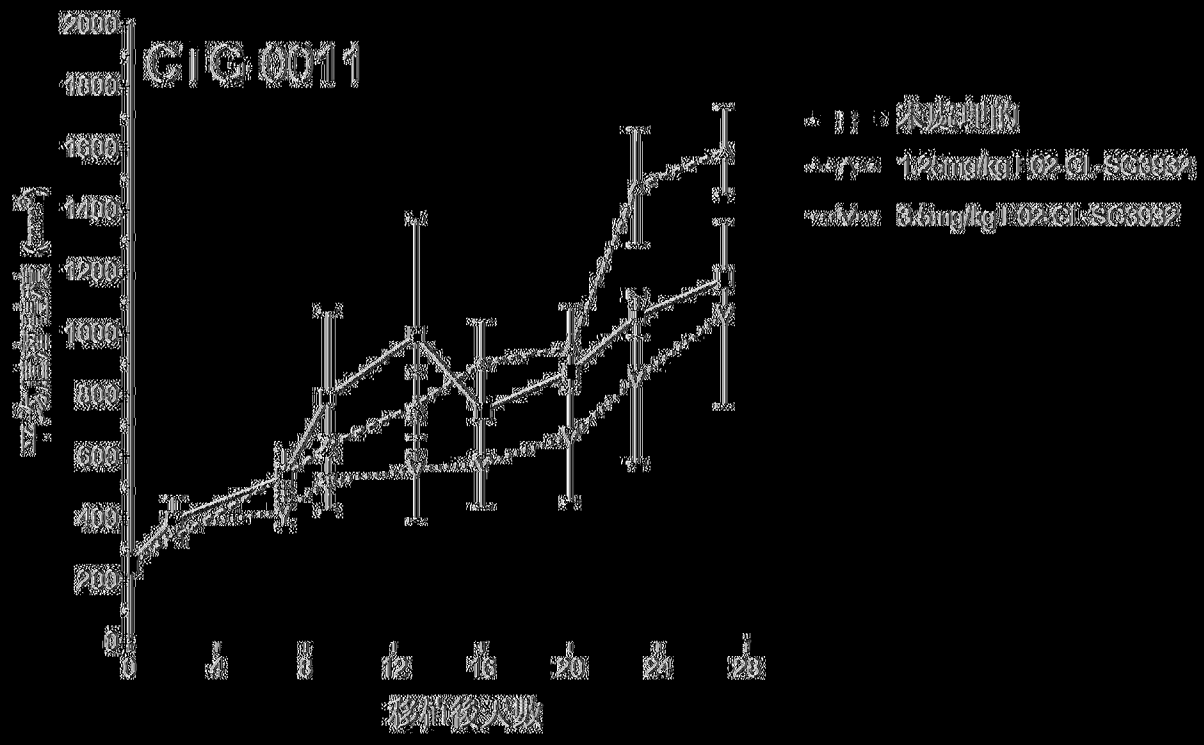
|(圖53E)|


3.5 mg/kg NH-228-SG3982
300
250
200
150
100
50
0
分類
R
NR
PDX

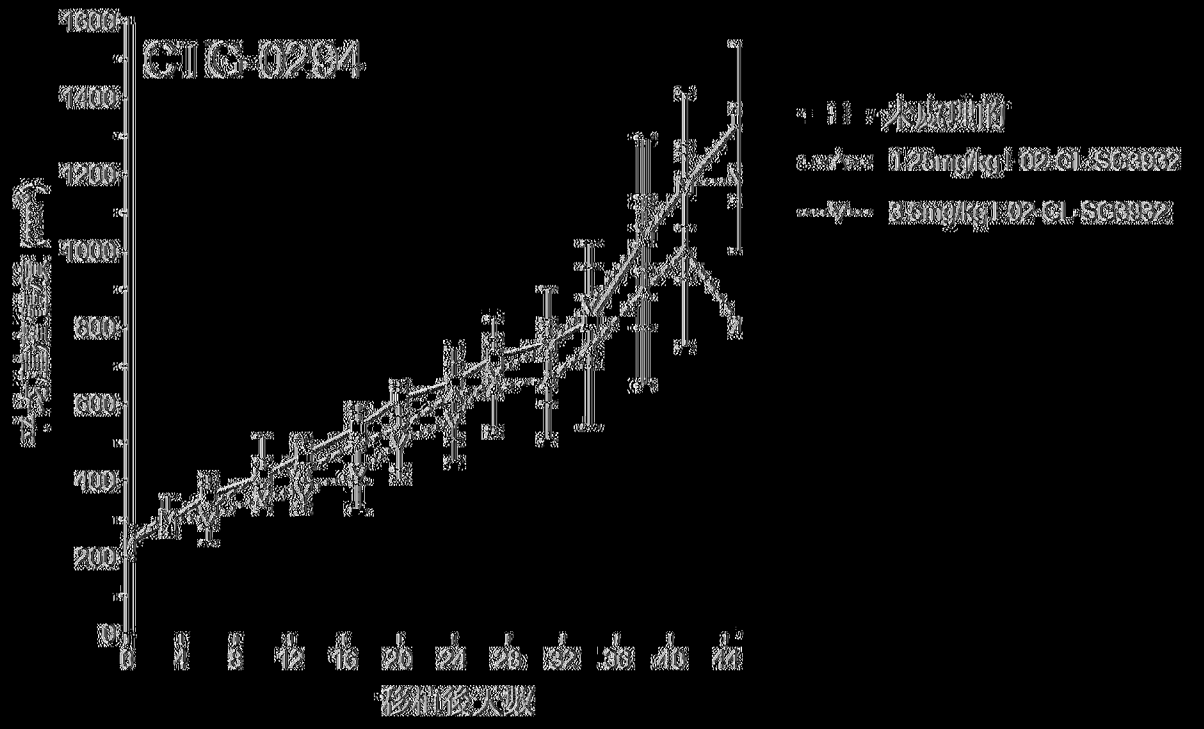
|(圖54A)|


3.5 mg/kg 1.02-CI-SG3982
300
250
200
150
100
50
0
分類
R
NR
PDX

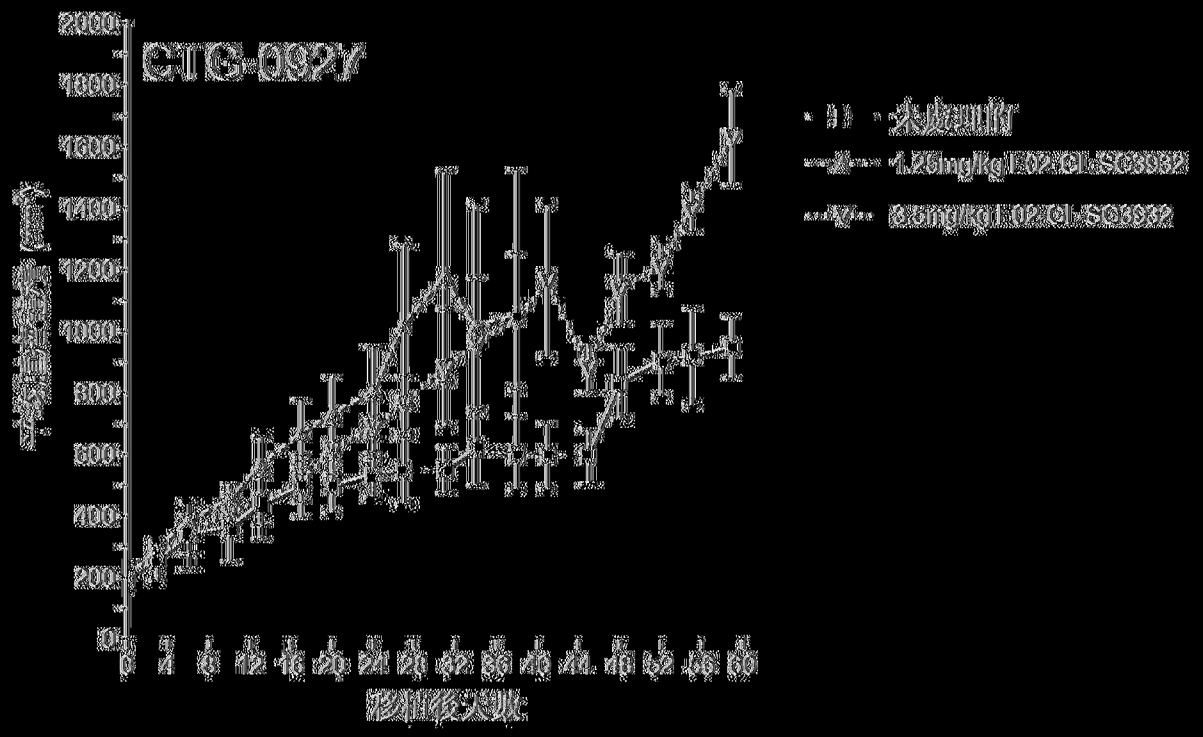
|(圖54B)|


CIG-0011
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-CL-SC3932
3.5mg/kg I-02-CL-SC3932

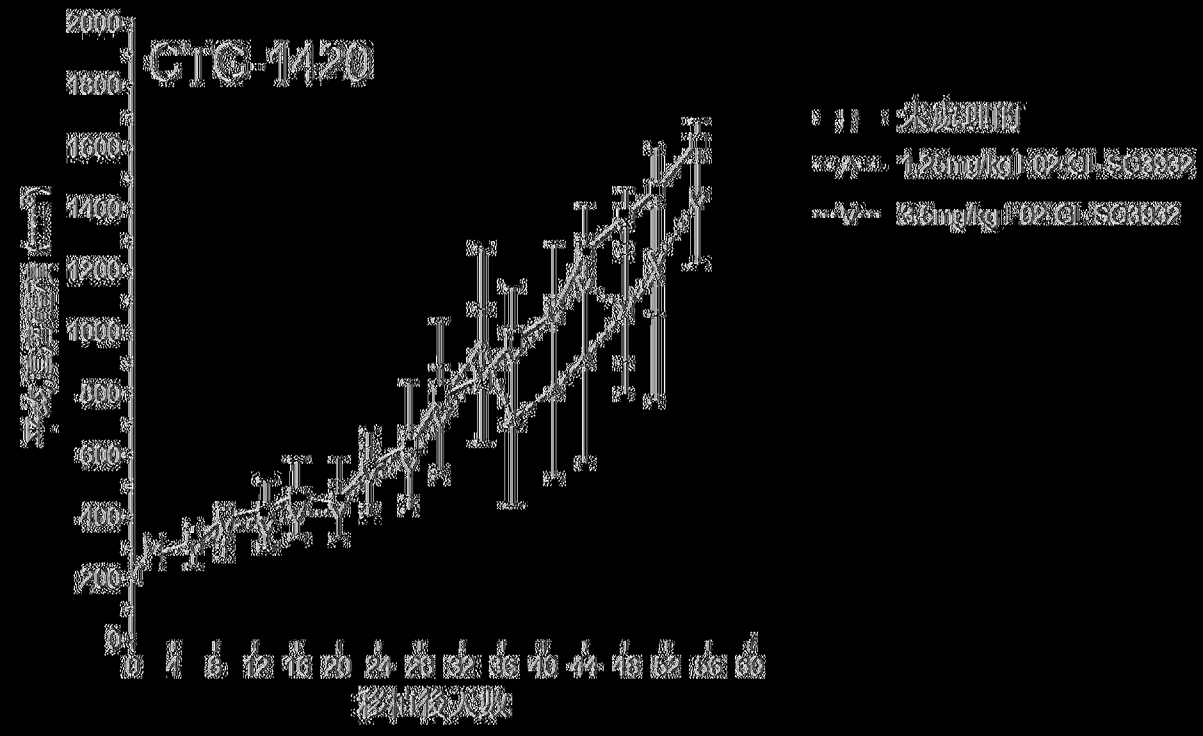
|(圖55A)|


CIG-0294
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-CL-SC3932
3.5mg/kg I-02-CL-SC3932

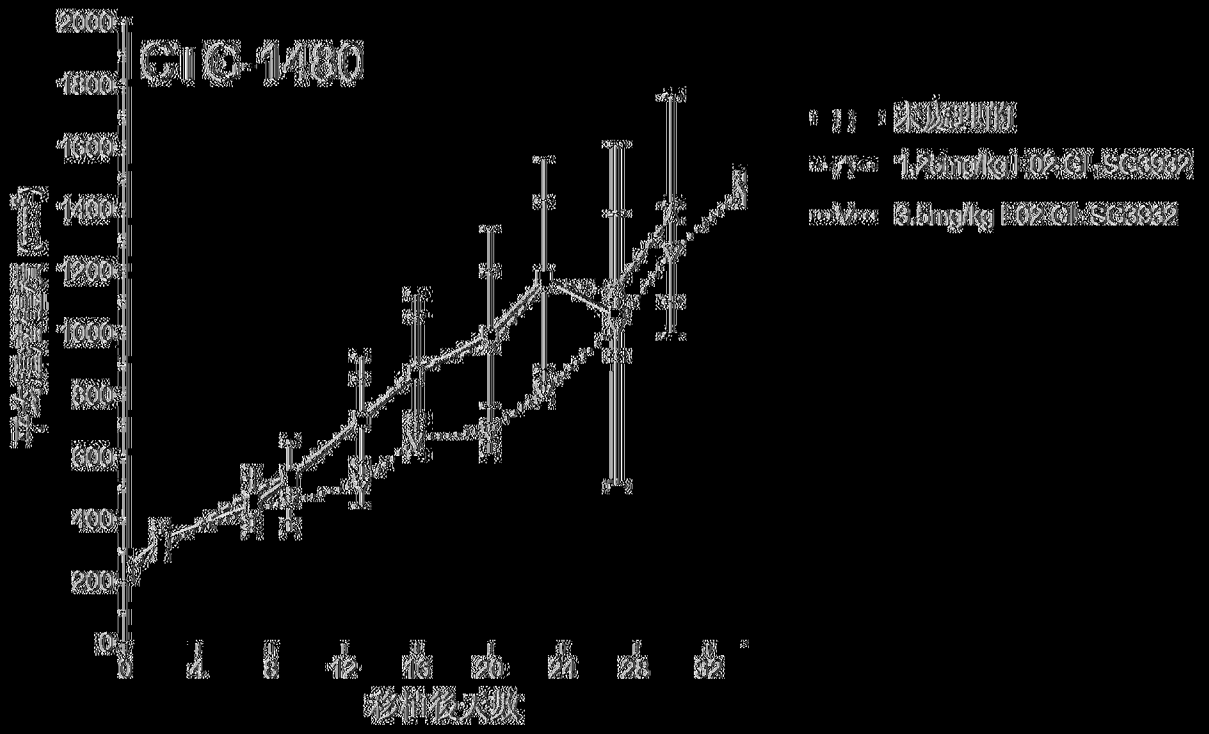
|(圖55B)|


CTG-0927
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02 Cl-SG3932
3.5mg/kg I-02 Cl-SG3932

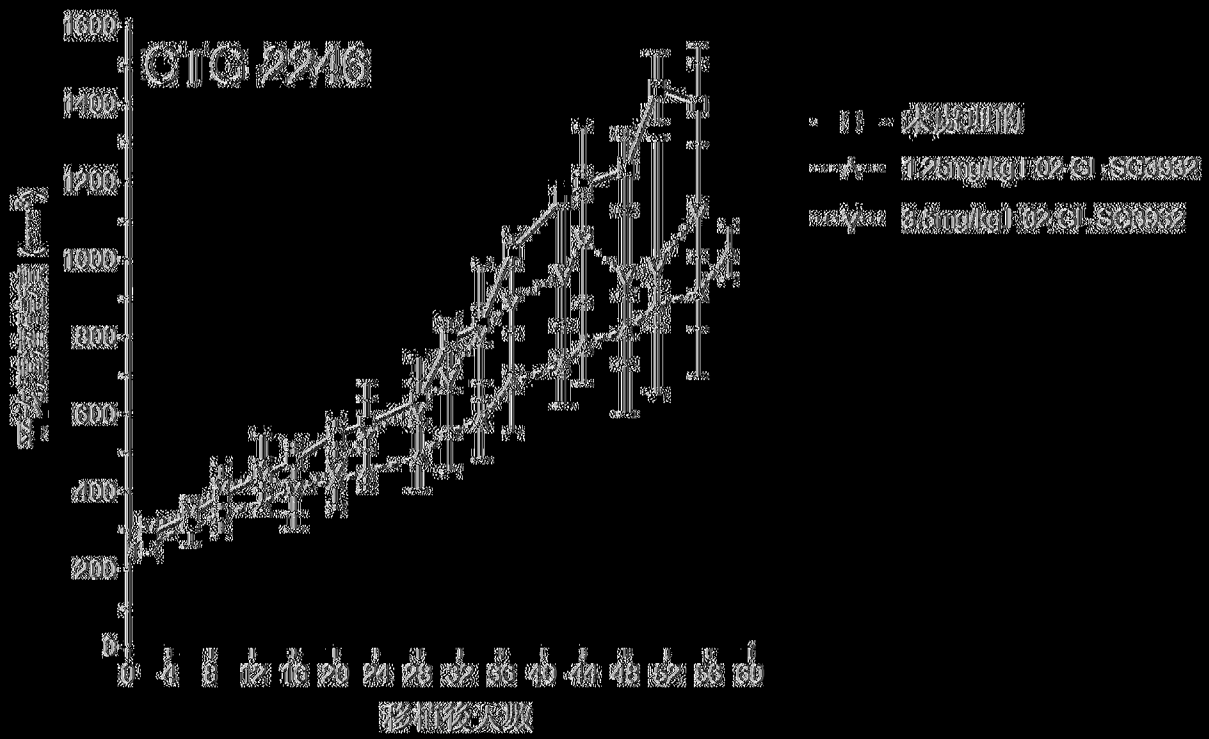
|(圖55C)|


CTG-1420
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02 Cl-SG3932
3.5mg/kg I-02 Cl-SG3932

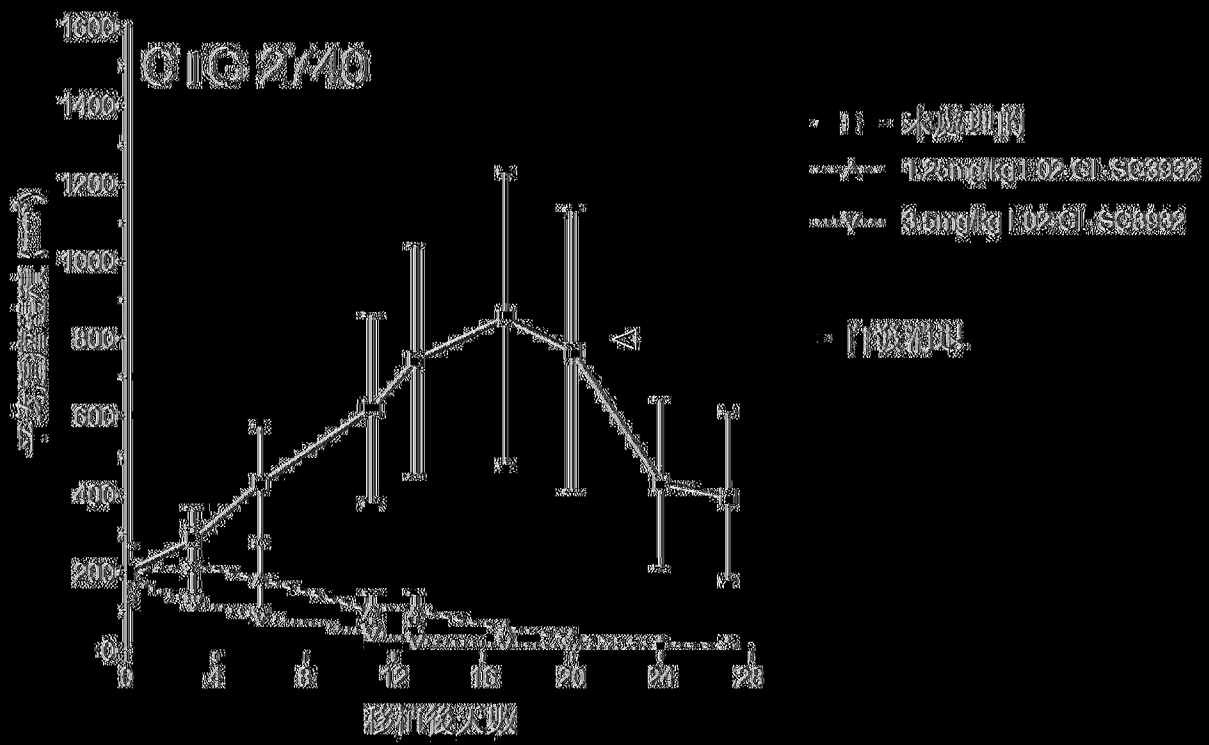
|(圖55D)|


CTC-1480
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
移植後天數
1.25mg/kg
3.5mg/kg

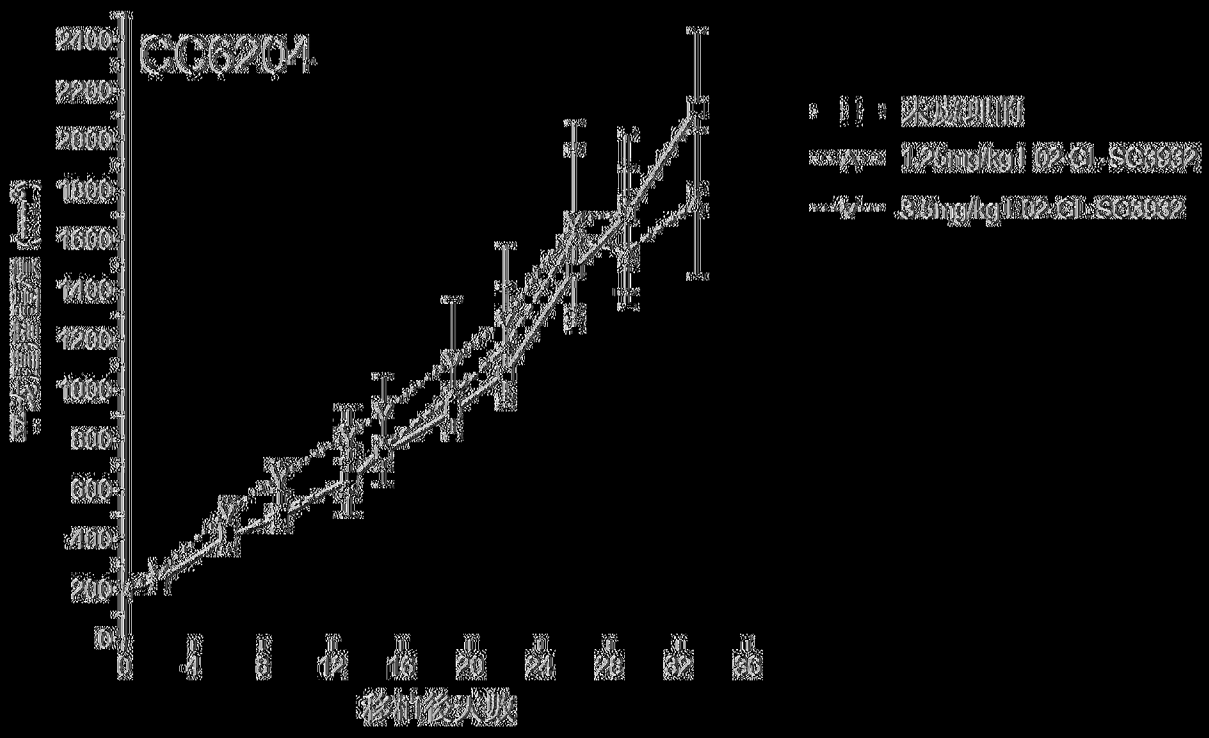
|(圖55E)|


CTC-2246
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後天數
1.25mg/kg
3.5mg/kg

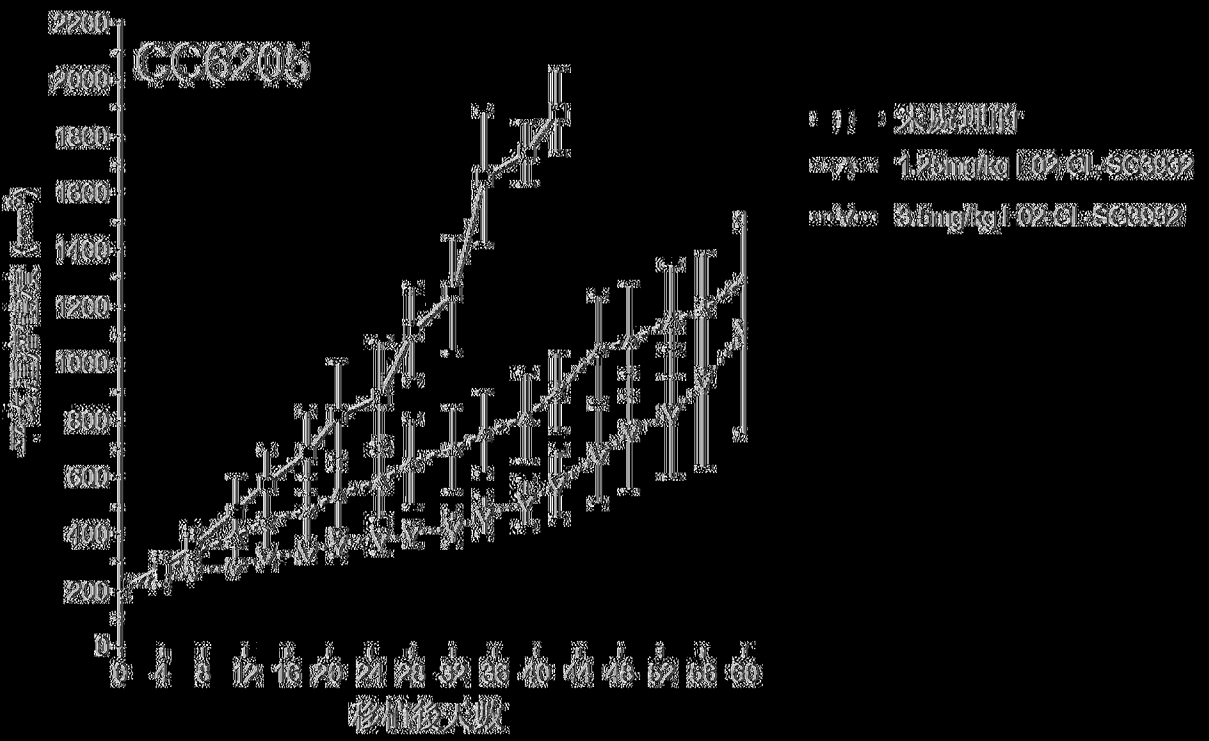
|(圖55F)|


C1G 2740
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植後天數
水處理組
1.25mg/kg 1:02:C1:SC3932
3.5mg/kg 1:02:C1:SC3932
抗發酵基

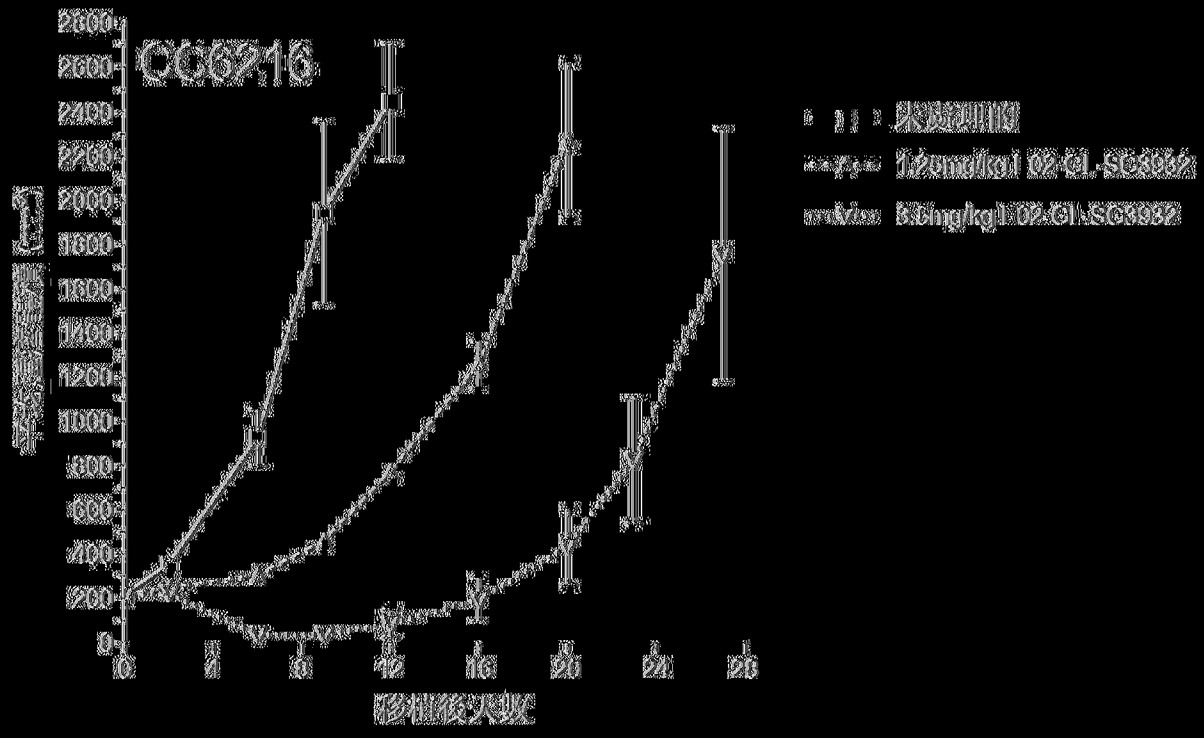
|(圖55G)|


GC6204
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
移植後天數
來源測試
1.25mg/kg I 02-CL-SC3932
3.5mg/kg I 02-CL-SC3932

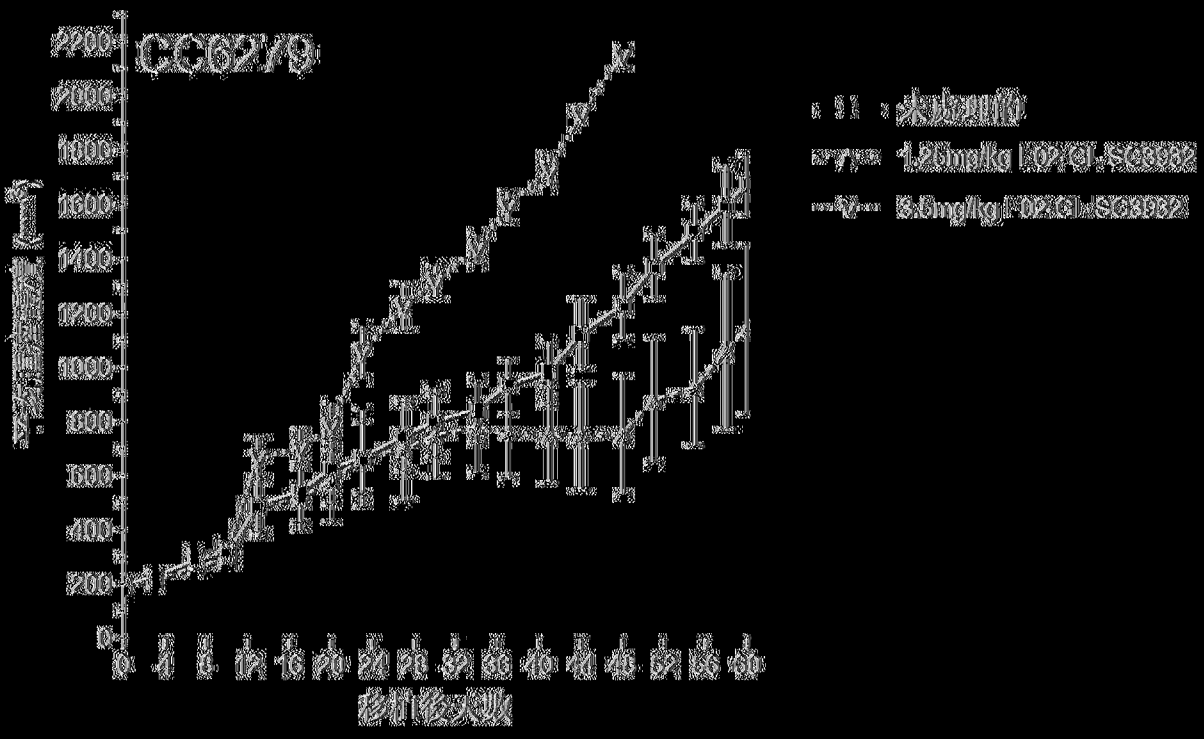
|(圖56A)|


GC6205
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後天數
來源測試
1.25mg/kg I 02-CL-SC3932
3.5mg/kg I 02-CL-SC3932

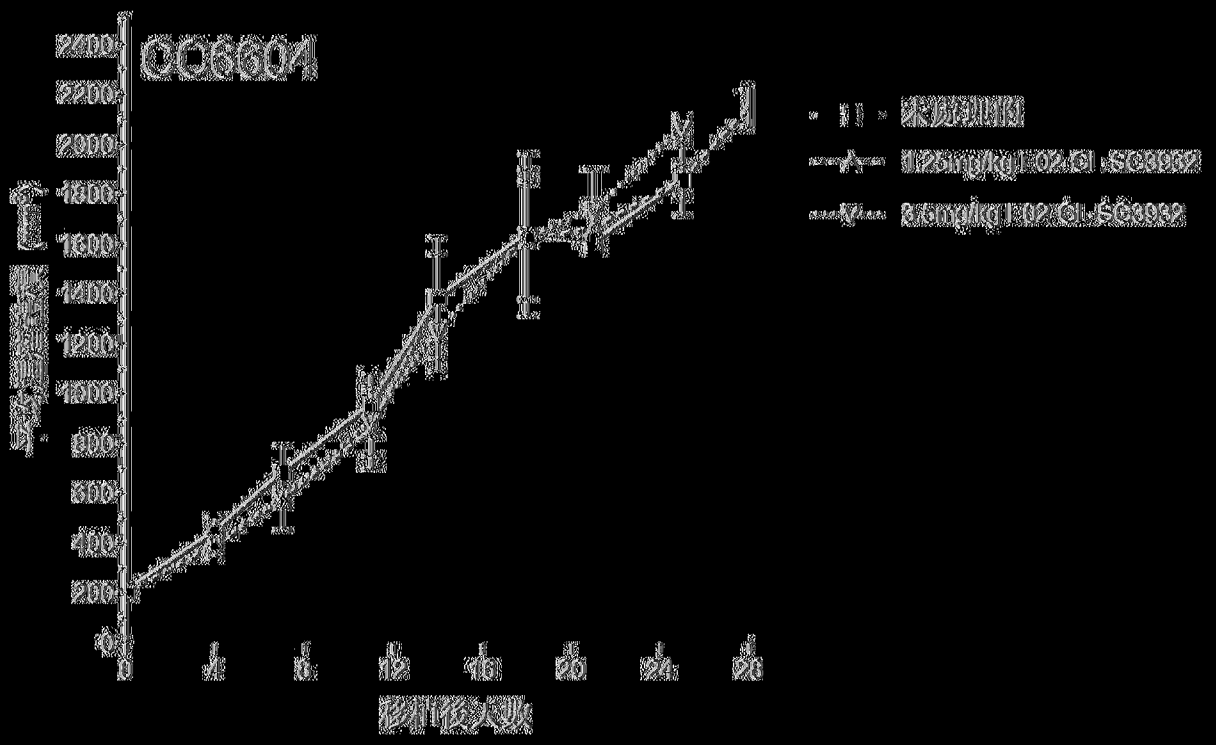
|(圖56B)|


CG6216
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SG3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SG3932

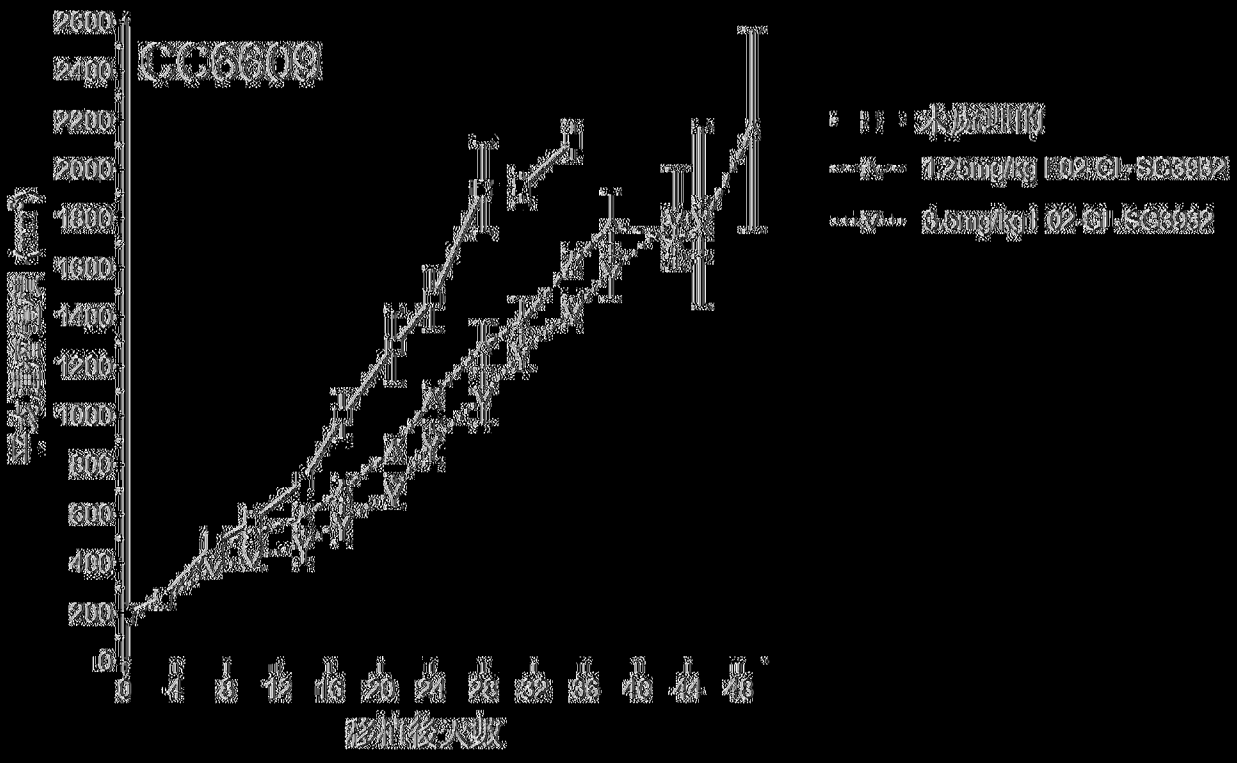
|(圖56C)|


CG6279
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SG3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SG3932

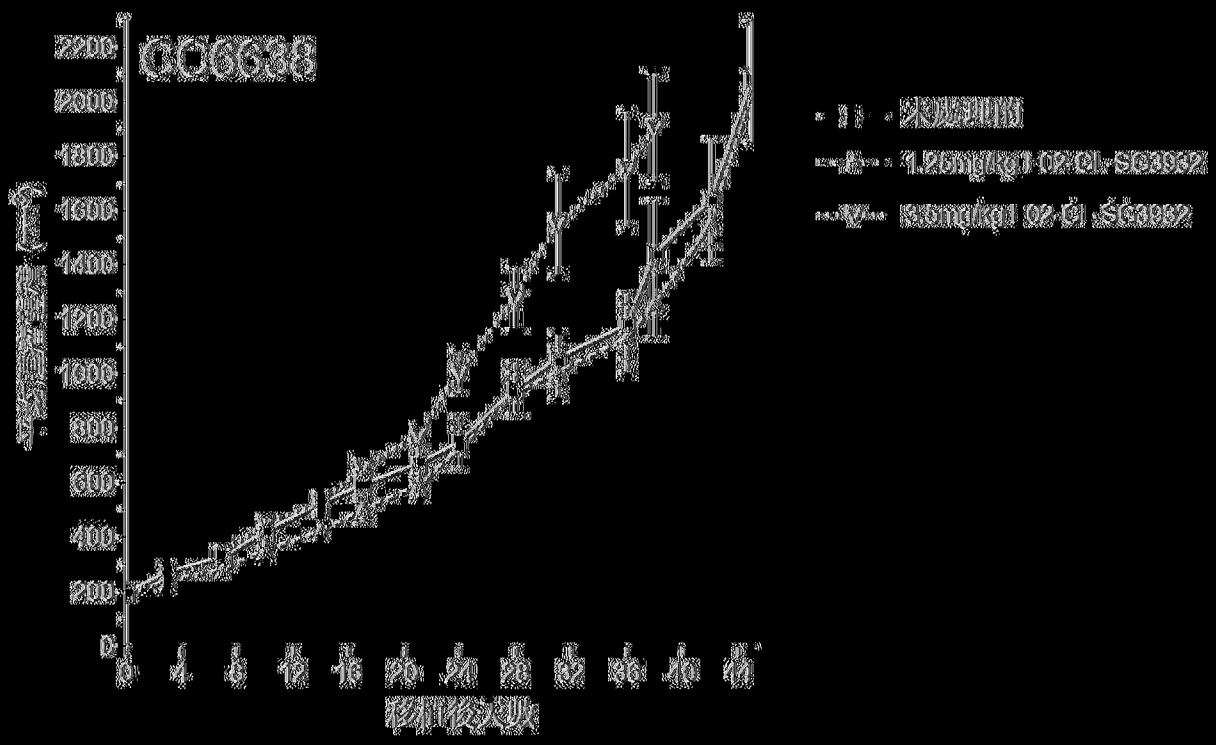
|(圖56D)|


CC6604
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
形柱後大數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SC3932

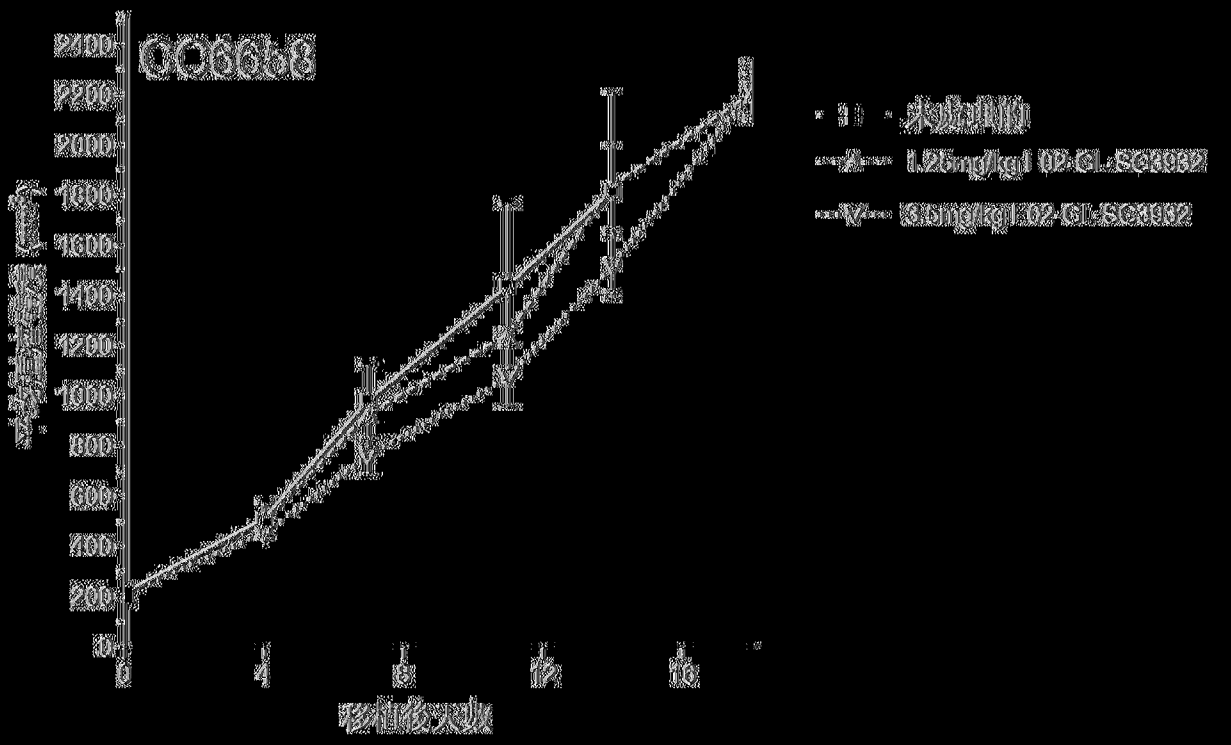
|(圖56E)|


CC6609
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
形柱後大數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SC3932

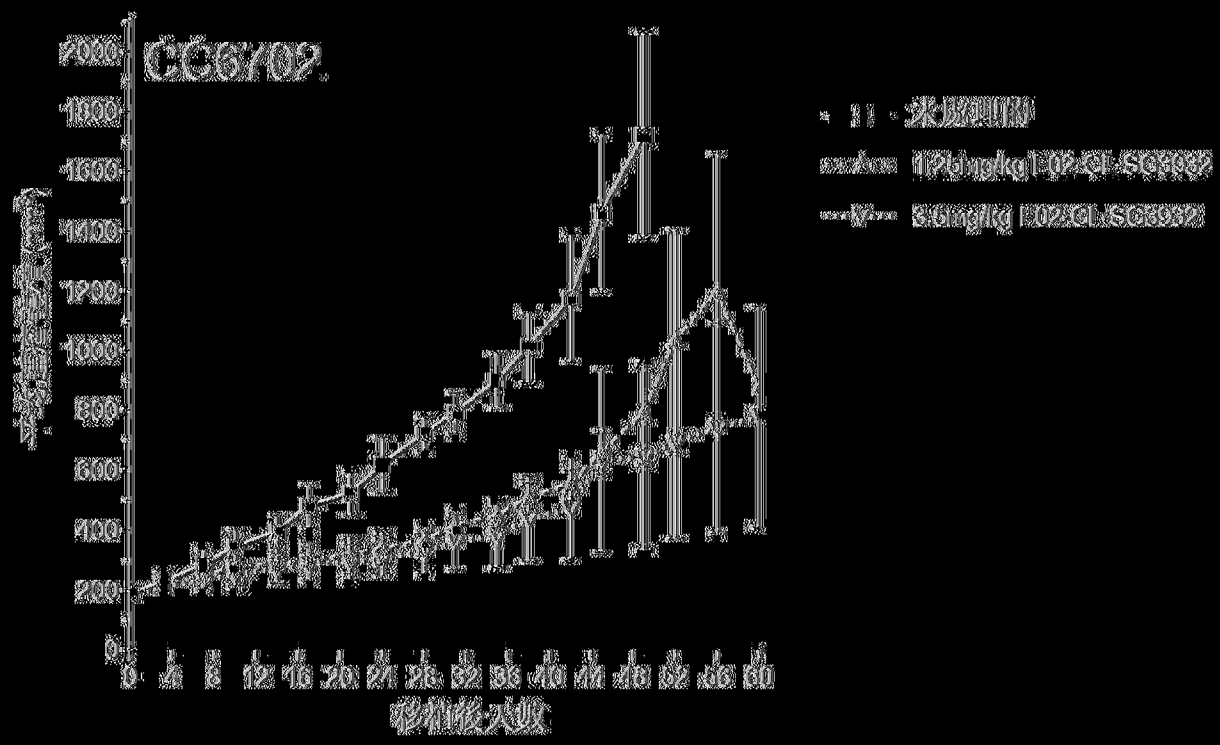
|(圖56F)|


CO6638
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg1 02-CL-SC3932
3.5mg/kg1 02-CL-SC3932

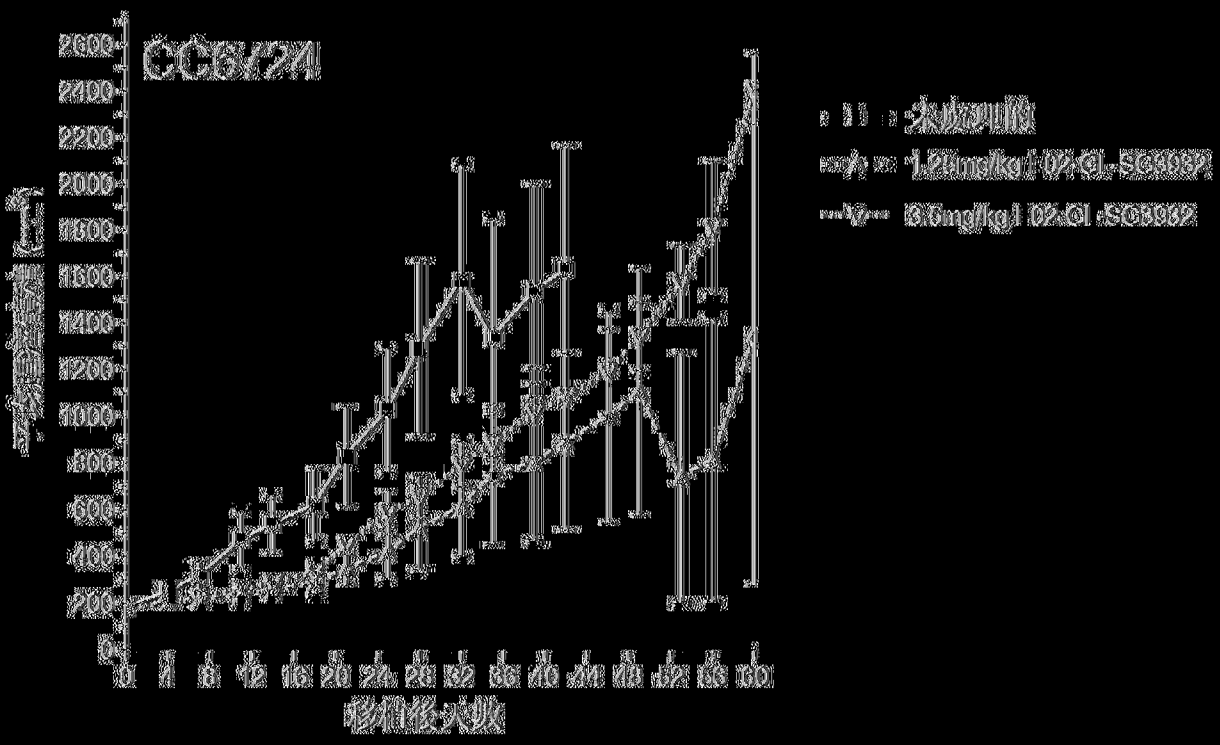
|(圖56G)|


CO6658
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg1 02-CL-SC3932
3.5mg/kg1 02-CL-SC3932

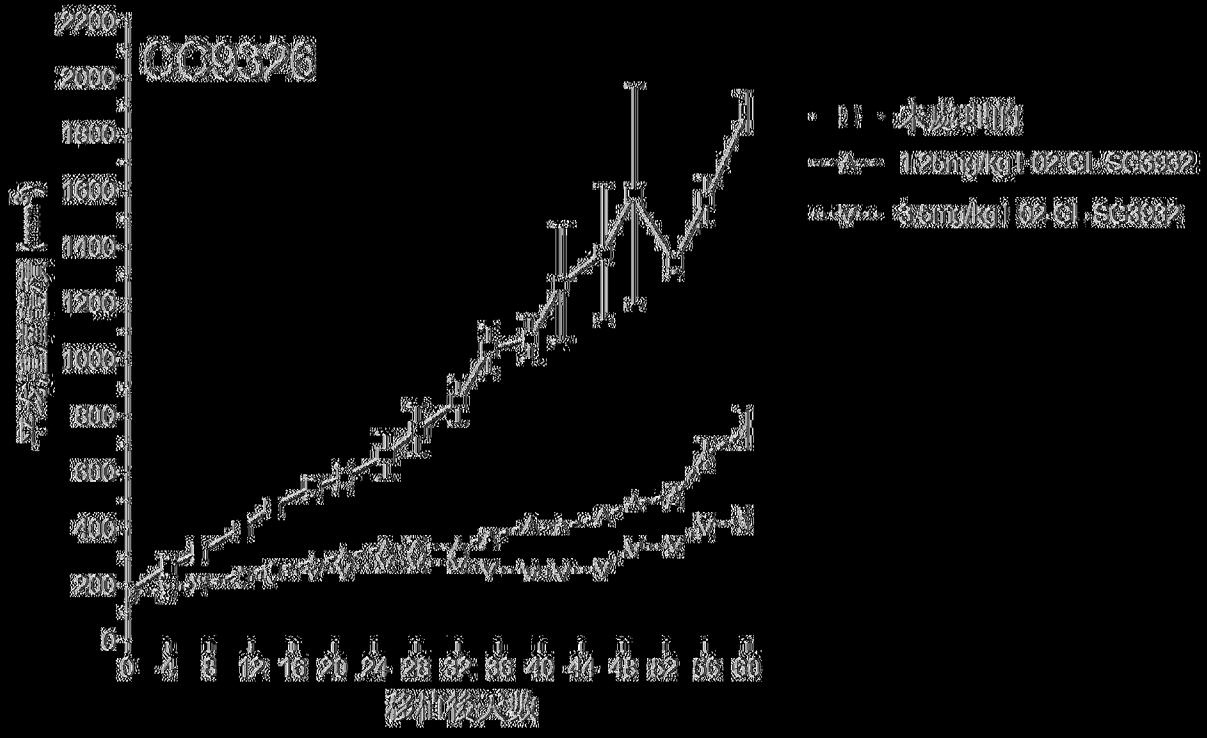
|(圖56H)|


CC6702
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
1.25mg/kg I-02-CL-SC3932
3.5mg/kg I-02-CL-SC3932

[圖56I]


CC6724
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
1.25mg/kg I-02-CL-SC3932
3.5mg/kg I-02-CL-SC3932

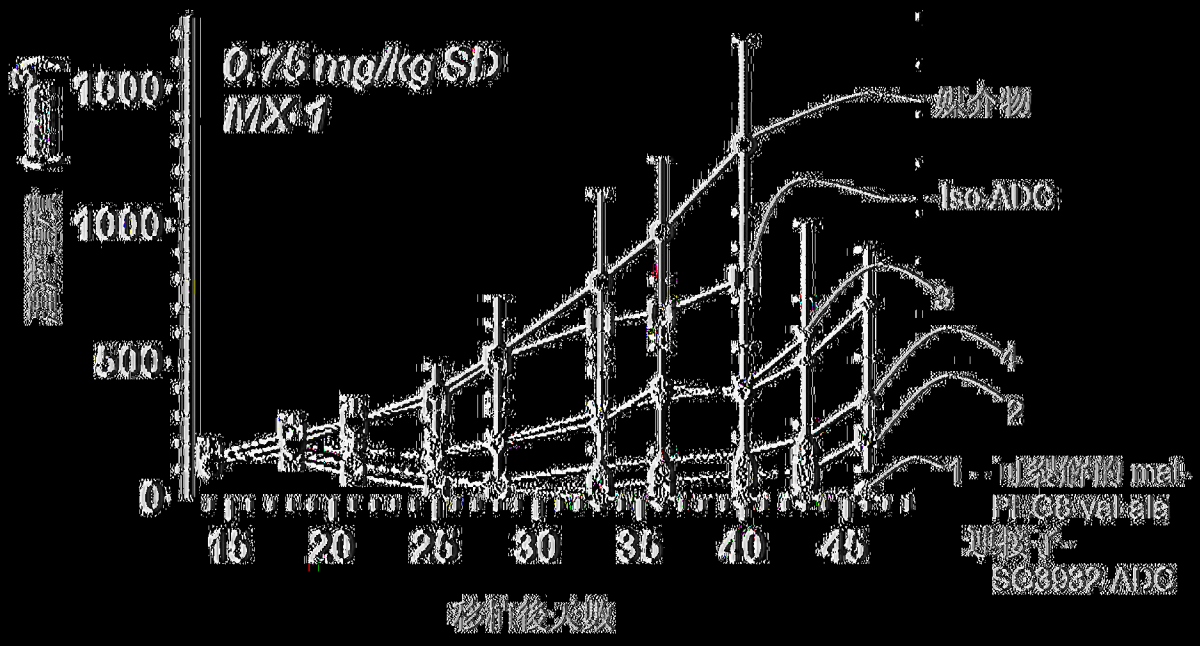
[圖56J]


CC9326
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後天數
水處理的
1.25mg/kg1-02-G1-SC3932
3.5mg/kg1-02-G1-SC3932

|(圖56K)|

	ADC	連接子-排頭
1	E02-INT-甘裂解酶mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	E02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	E02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	E02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

[圖57A]



[圖57B]

目的：評估大鼠的腐蝕性特性和IDE

研究設計：



20 mg/kg
60 mg/kg
Q3W x2 ly

一般中評估
所有主要器官和系統功能，IDE

每種以上的器官的光學組織學檢查，
組織代謝組學、組合體組學分析的樣本

在任一：相比水平觀察到的變化結果的抗經

發現結果	1	2 SG4010	3 SG4057	4 SG4052
10倍				
11倍				
12倍				
GIT				
13倍				
14倍				
15倍				

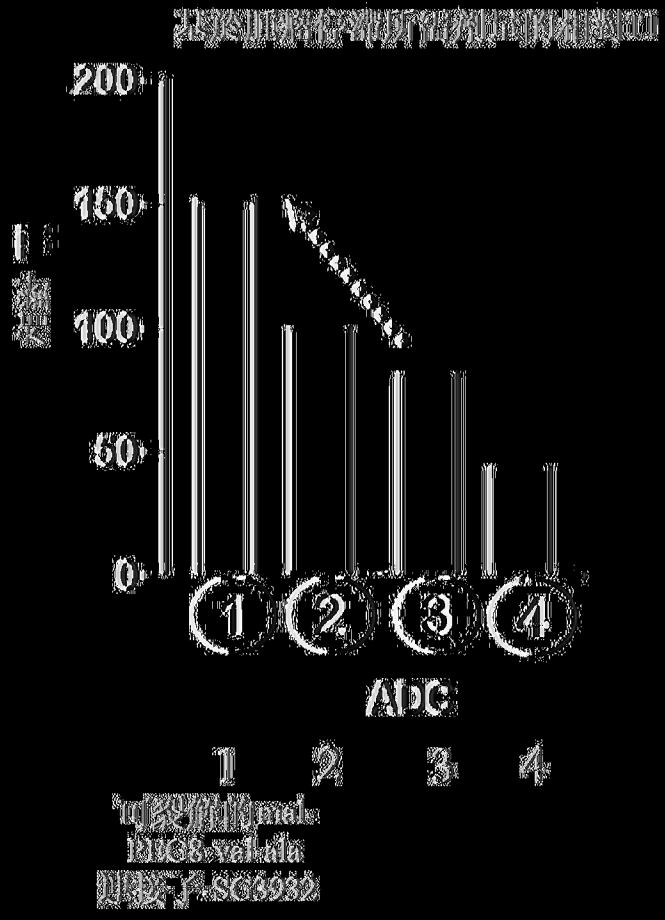
[ ] 表示注意到變化的嚴重程度相關於
特異之對照實驗

[ ] 可裂解的 mal-PI-C8-val-ala 連接了 SG3932

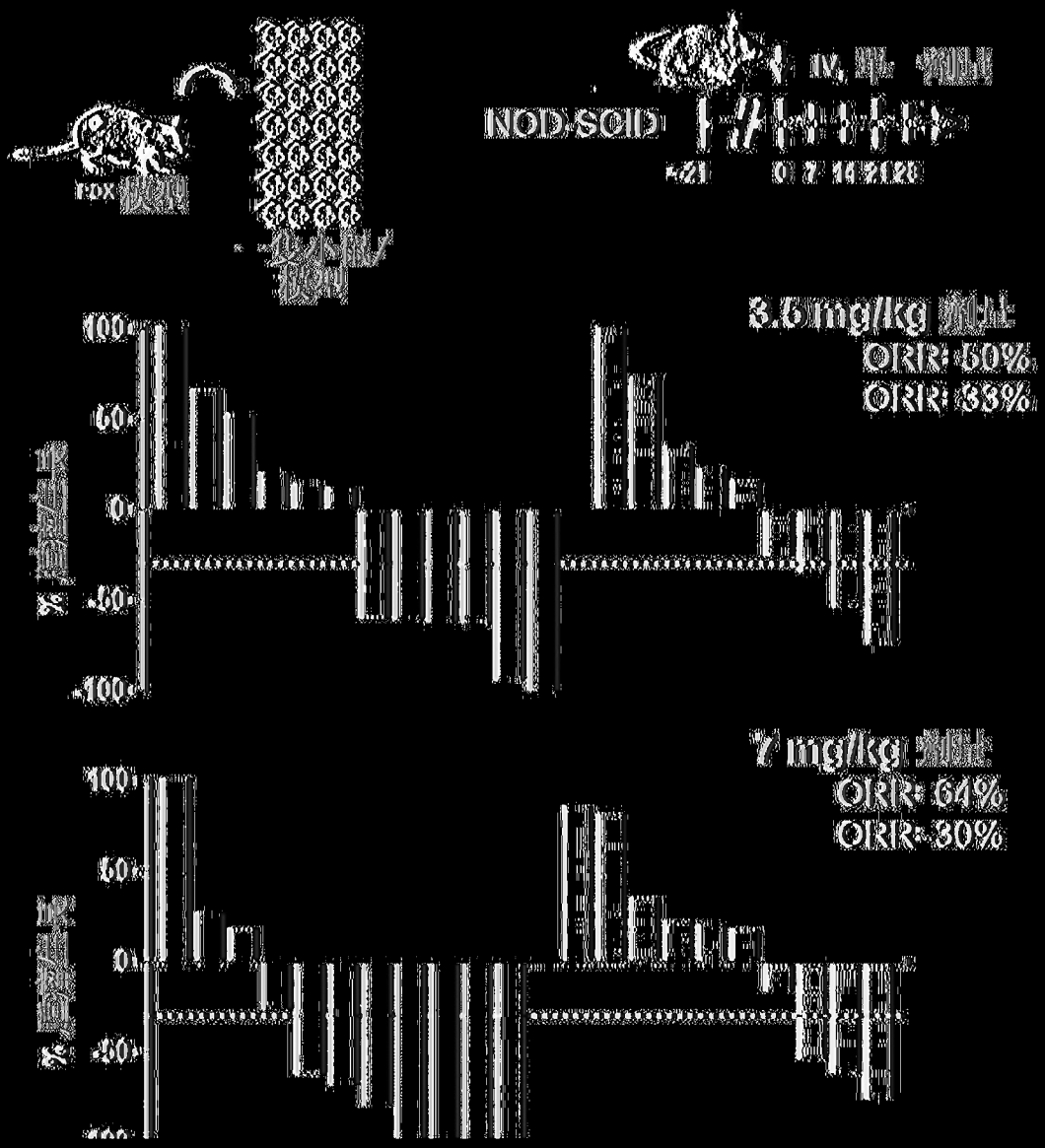
[圖58]

	ADC	連接子-胜肽
1	B02-INT-可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	B02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	B02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	B02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

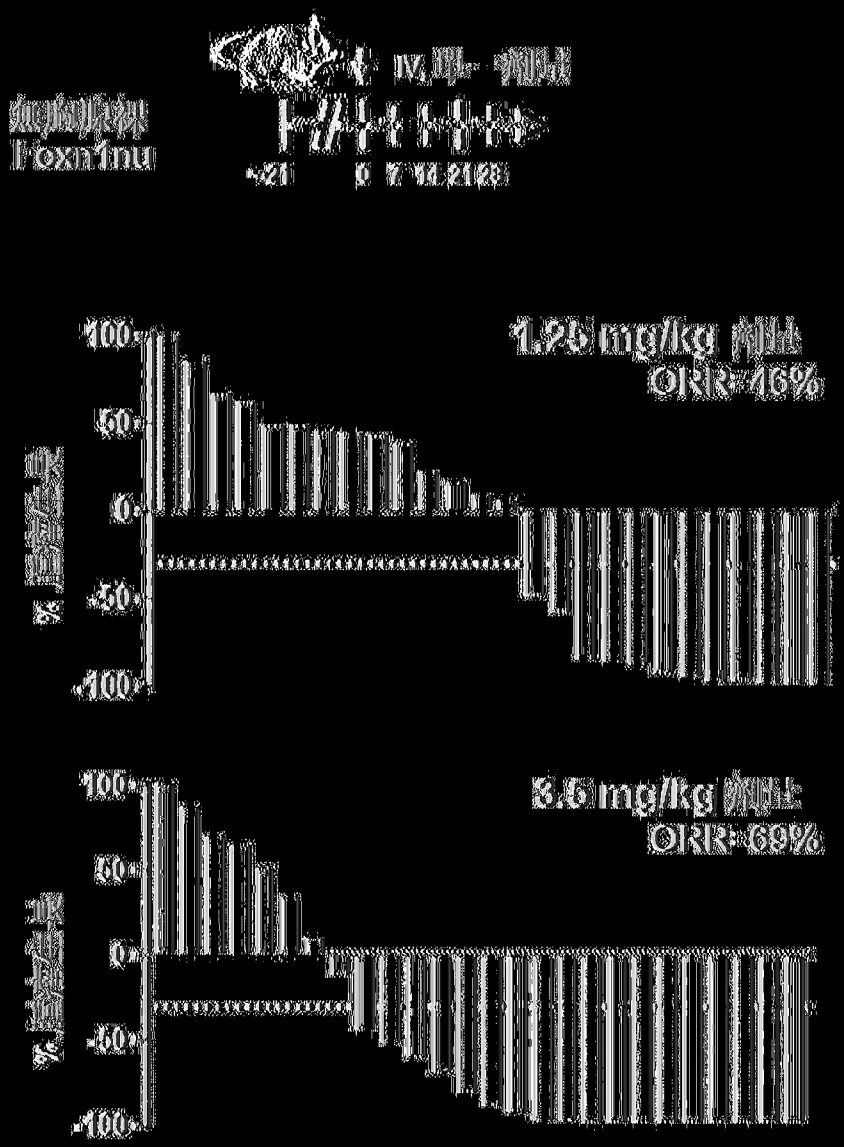
|(圖59A)|



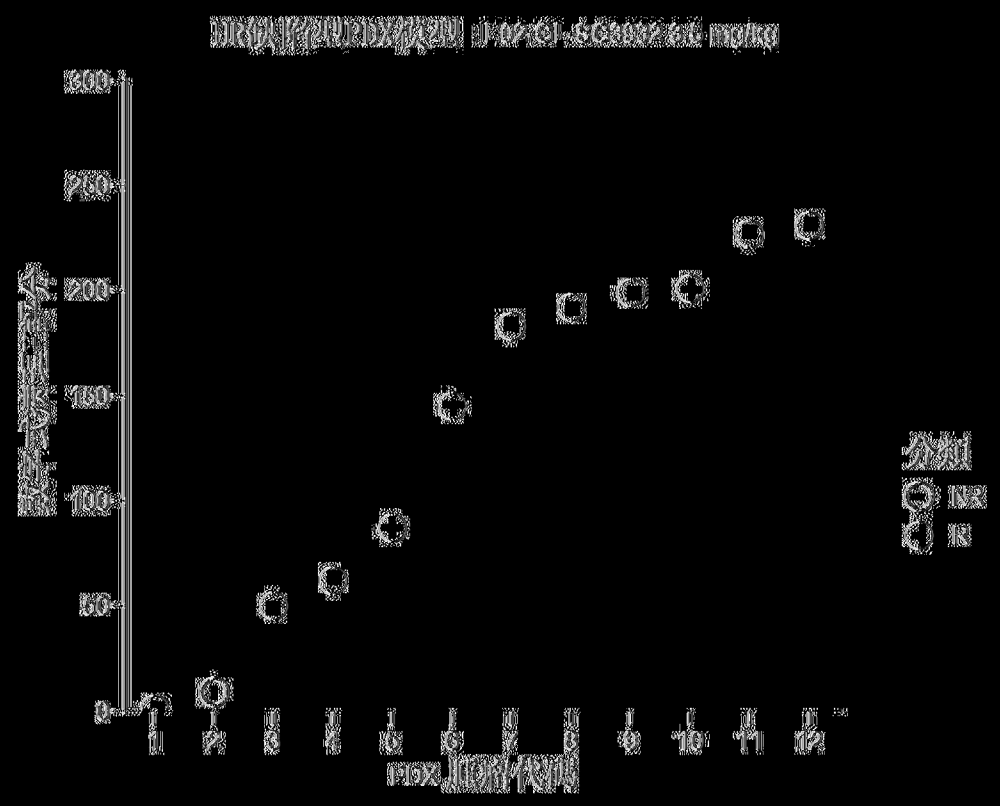
|(圖59B)|


NOD-SCID
IV
-21
0 7 14 21 28
3.5 mg/kg 類比
ORR: 50%
ORR: 33%
100
50
0
-50
-100
7 mg/kg 類比
ORR: 64%
ORR: 30%
100
50
0
-50

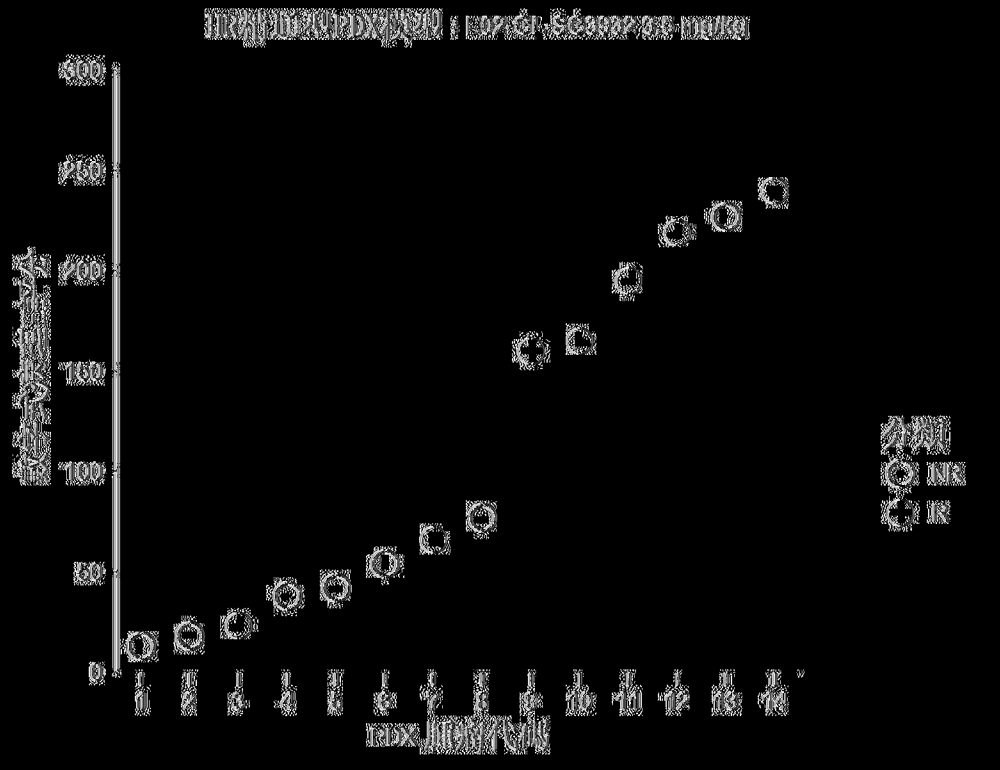
|(圖60A)|


IV.單一劑量
血液腫瘤
Foxn1nu
-21
0
7
14
21
28
1.25 mg/kg 劑量
ORR: 46%
3.5 mg/kg 劑量
ORR: 69%
100
50
0
-50
-100

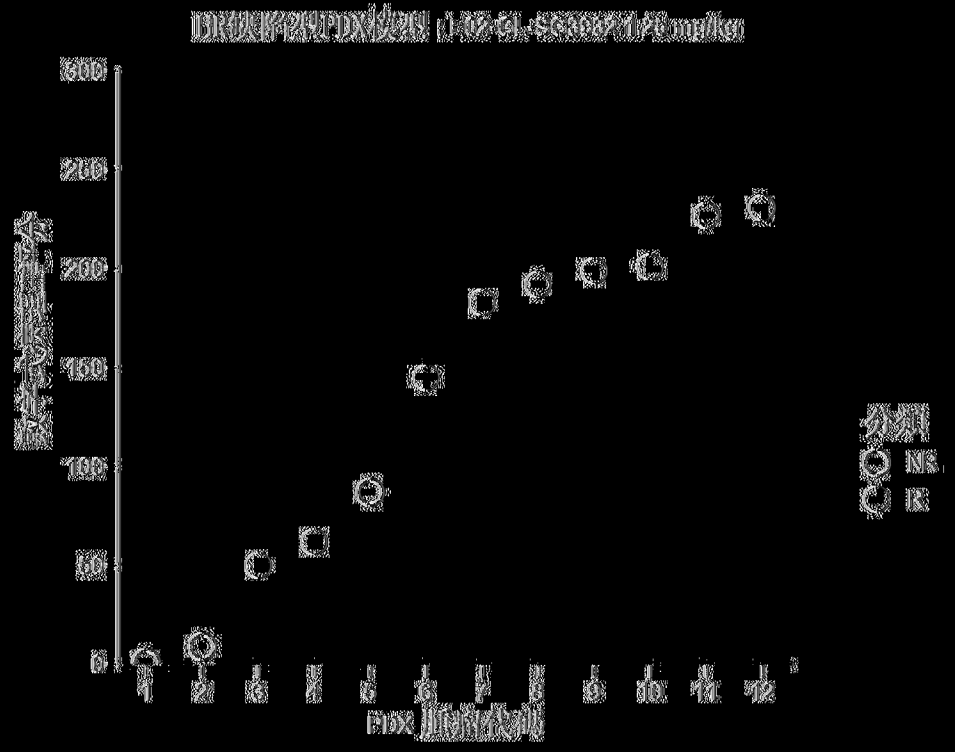
|(圖60B)|


HR快速代謝PDX模型 : E02-CT-SC3932-3.6 mg/kg
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
PDX 加密代謝
分類
NR
R

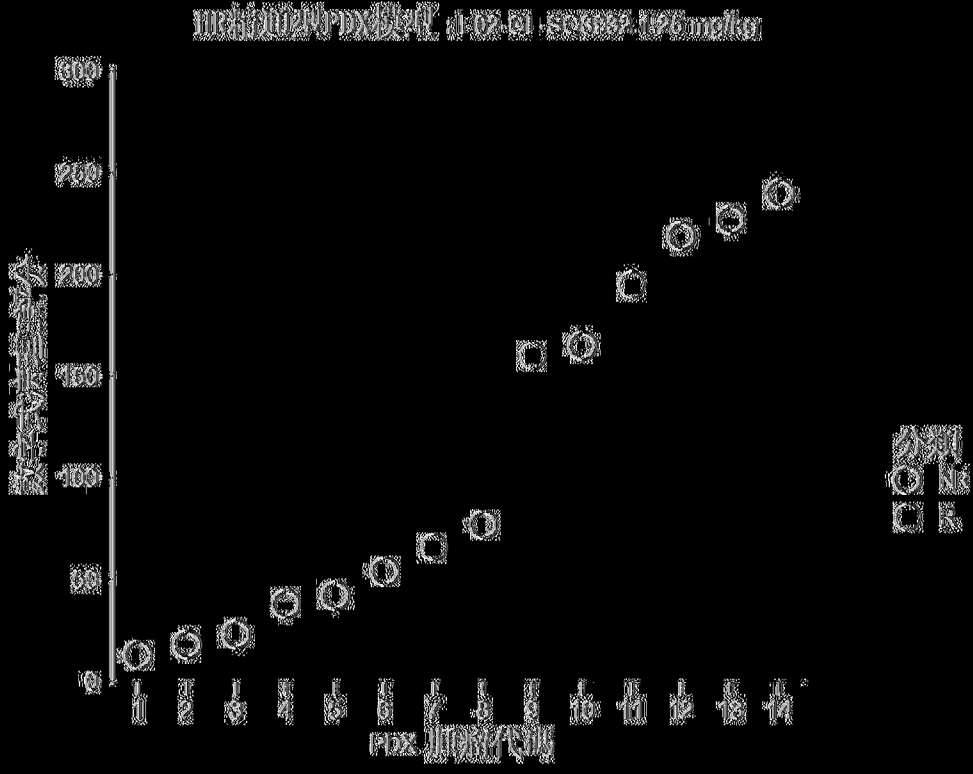
|(圖62A)|


HR快速代謝PDX模型 : E02-CT-SC3932-3.6 mg/kg
300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
PDX 加密代謝
分類
NR
R

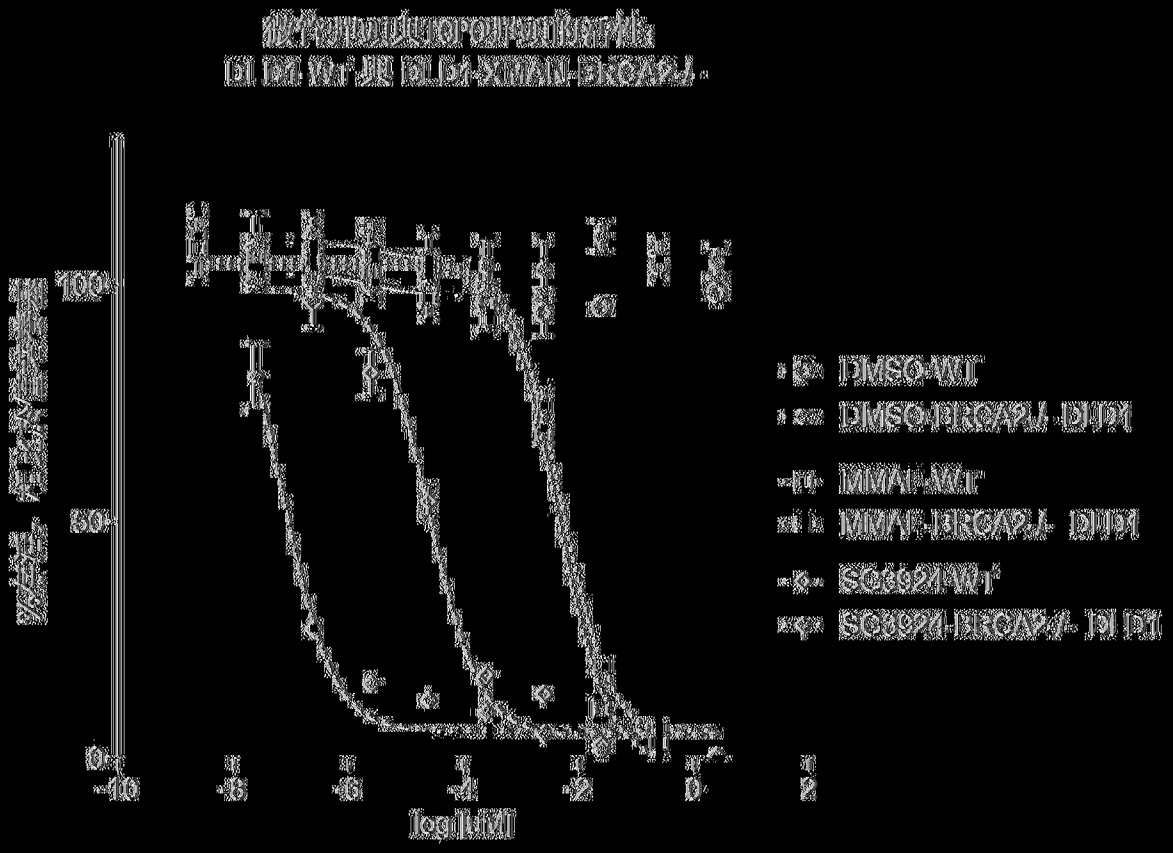
|(圖62B)|


HR抗胸鏡PDX模型 (1-02-01, SC6882-1.26mg/kg)
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
PDX 抵抗代數
分類
NR
R

|(圖62C)|


HR抗胸鏡PDX模型 (1-02-01, SC6882-1.26mg/kg)
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
PDX 抵抗代數
分類
NR
R

|(圖62D)|


微管聚合測試
DJ D1 WT與 DJD1-XMAN-BRCA2J
100
50
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
log[μM]
DMSO-WT
DMSO-BRCA2J-DJD1
MMAF-WT
MMAF-BRCA2J-DJD1
SC3924-WT
SC3924-BRCA2J-DJD1

(圖63)

【發明說明書】

【中文發明名稱】 治療性結合分子

【英文發明名稱】 THERAPEUTIC BINDING MOLECULES

【技術領域】

【0001】 本發明關於用於治療癌症的結合分子（例如，抗體）和相關的抗體-藥物軛合物。

【先前技術】

【0002】 儘管對可能的抗癌藥物進行了多年的研究和開發，但癌症仍然係全球主要疾病之一，其中三分之一的人在其一生中會患上某種形式的癌症。兩種最常見的癌症類型係乳癌和肺癌。

【0003】 癌症的主要療法仍然係化學療法和放射療法。然而，該等療法與多種不良副作用有關，從疲勞到疾病和脫髮。該等問題由於所使用的化學療法的療程通常很長而得到加劇。

【0004】 在過去的幾十年中，已經開發並推銷了多種針對癌症的抗體療法，導致對多種癌症類型的苛刻治療形式（例如，手術和化學療法）的需求減少。儘管在此期間生產抗體（例如，單株抗體）的方法的可用性已大大提高，但臨床上可用的抗癌抗體相對較少，可用於靶向廣譜癌症類型的抗體甚至更少。此外，需要增加治療性抗體的效力，其通常受到靶抗原和抗體結合後對癌細胞的後續作用的限制。

【0005】 本發明解決了上述問題中的一或多個。

【發明內容】

【0006】 發明人驚奇地發現跨膜多肽B7-H4在多種細胞類型（例如，乳癌、肺癌和胰臟癌）中高度表現，其與癌抗原的作用一致。發明人已經成功地生成在體外和體內均顯示出與表現B7-H4的細胞的高度結合（例如，與可商購的抗體相比更好的結合）的抗體。有利地，該等抗體可以靶向表現B7-H4的多種不同癌細胞類型，這例示了該等抗體作為抗癌療法之廣泛效用。

【0007】 此外，該等抗體可以有利地連接/軛合至合適的藥物/細胞毒素（例如，以提供抗體-藥物軛合物（ADC）），從而藉由允許靶向毒素遞送至癌細胞來增加該等抗體作為療法的效力。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0008】 本申請要求2020年9月11日提交的美國臨時專利申請案號63/077,207之優先權權益，將其出於所有目的藉由引用以其全文併入本文。

以電子方式提交的材料藉由引用而併入

【0009】 藉由引用以其全文併入本文的電腦可讀的核苷酸/胺基酸序列表，該序列表在此同時提交，並確定如下：名為「B7H4-100-WO-PCT.txt」、創建於2021年9月8日、50,724位元組的ASCII（文本）文件。

【0010】 因此，在一方面，本發明提供了結合至B7-H4（例如B7-H4表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0011】抗體或其抗原結合片段可適當地包含在藥物組成物中，例如包含在適於向患者投與的配製物中。

【0012】在另一方面，提供了包含抗體或其抗原結合片段的藥物組成物，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0013】 術語「藥物組成物」係指如下製劑，該製劑處於允許活性成分的生物活性有效的形式，並且不含有另外的、對組成物將要投與的受試者具有不可接受的毒性的組分。這種組成物可為無菌的並且可以包含藥學上可接受的媒介物，如生理鹽水。合適的藥物組成物可以包含一或多種緩衝液（例如，乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、界面活性劑（例如，聚山梨酯）、穩定劑（例如，人白蛋白）、防腐劑（例如，苄醇）、以及增強生物可用度的吸收促進劑、和/或其他常規的增溶劑或分散劑。

【0014】 此外，已證明本發明之抗體或其抗原結合片段靶向和抑制體內B7-H4陽性腫瘤的生長。因此，本發明包括在用於治療癌症之方法中使用的上述定義的抗體或其抗原結合片段和上述定義的藥物組成物。較佳的是，所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

【0015】在一方面，提供了用於治療癌症（例如，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞）的抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0016】換言之，本發明之一個方面提供了治療癌症之方法（例如，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞），該方法包括向受試者投與有效量的抗體或抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈

CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0017】 又換言之，在另一方面，本發明包括抗體或其抗原結合片段在製造用於治療癌症（例如，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞）的藥物中之用途，所述抗體或抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

【0018】 現在將概述某些定義和較佳的實施方式。應當理解，以下定義和實施方式可涉及本文所述之任何方面，例如，用於在本文所述療法中使用的任何方法、組成物和/或組成物。

【0019】 術語「表位」係指能夠結合至（例如，被結合）本發明之抗體或抗原結合片段的靶蛋白區域（例如，多肽）。

【0020】 B7-H4（也稱為包含V組結構域的T細胞激活抑制劑1，由*VTCN1*基因編碼）係共刺激蛋白B7家族的跨膜多肽。B7-H4被理解為在抗原呈現細胞的表面上表現，用於與免疫細胞（例如，T淋巴細胞，CD28為潛在的配體）的配體相互作用。不希望受理論束縛，本發明人觀察到B7-H4在各種癌症類型的細胞上高度表現，這表明該分子係腫瘤相關抗原。因此，要求保護的抗體靶向（以及視需要將細胞毒素遞送至）表現B7-H4的能力使得所述抗體特別適合用於在癌症治療中使用。此外，B7-H4的表現不限於特定的癌症類型，因此它代表了用於治療廣譜癌症類型的靶抗原。

【0021】 B7-H4的RNA、DNA、和胺基酸序列係熟悉該項技術者已知的，並且可以在許多數據庫中（例如，在美國國家生物技術資訊中心（NCBI）

和UniProt的數據庫中）發現。在UniProt找到的該等序列的實例係人B7-H4的Q7Z7D3（VTCN1_HUMAN）；和小鼠B7-H4的Q7TSP5（VTCN1_MOUSE）。編碼人B7-H4的核苷酸序列可為SEQ ID NO: 53，更較佳的是SEQ ID NO: 54。人B7-H4的多肽序列較佳的是SEQ ID NO: 55。

【0022】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EPQ-E02」或「EPQ-E02」。

【0023】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EOB-F05」或「EOB-F05」。

【0024】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EO5-E07」或「EO5-E07」。

【0025】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段在本文中可稱為「ZY0EP0-C07」或「EP0-C07」。

【0026】在一個特別較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EQD-E02」或「EQD-E02」。

【0027】換言之，該抗體或其抗原結合片段可較佳地包含：

- 含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；
- 含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及
- 含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0028】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；
ii. 含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；
iii. 含有SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；
iv. 含有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；
v. 含有SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及
vi. 含有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0029】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；
ii. 含有SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；
iii. 含有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；
iv. 含有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 17之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0030】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

iii. 含有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 22之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 23之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0031】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 25之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 26之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

iii. 含有SEQ ID NO: 27之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 28之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體。

【0032】另外或可替代地，本文所述之抗體或其抗原結合片段可以藉由其可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈來描述。

【0033】合適的可變重（VH）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）以個體化的方式概述如下：

- SEQ ID NO: 31，或其功能變體；
- SEQ ID NO: 33，或其功能變體
- SEQ ID NO: 43，或其功能變體
- SEQ ID NO: 45，或其功能變體

- SEQ ID NO: 46，或其功能變體
- SEQ ID NO: 47，或其功能變體
- SEQ ID NO: 35，或其功能變體
- SEQ ID NO: 37，或其功能變體
- SEQ ID NO: 39，或其功能變體

【0034】特別合適的可變重（VH）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）以個體化的方式概述如下：

- SEQ ID NO: 45，或其功能變體
- SEQ ID NO: 33，或其功能變體
- SEQ ID NO: 43，或其功能變體
- SEQ ID NO: 46，或其功能變體
- SEQ ID NO: 47，或其功能變體

【0035】合適的可變輕（VL）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）以個體化的方式概述如下：

- SEQ ID NO: 32，或其功能變體
- SEQ ID NO: 34，或其功能變體
- SEQ ID NO: 36，或其功能變體
- SEQ ID NO: 38，或其功能變體
- SEQ ID NO: 40，或其功能變體

【0036】較佳的可變輕（VL）鏈序列（抗體或其抗原結合片段可包含）可包含SEQ ID NO: 34的胺基酸序列（或其功能變體）。

【0037】例如，在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 31、33、35、37或39的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 32、34、36、38或40的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0038】 例如，在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 31、33、35、37、39、43、45、46或47的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 32、34、36、38或40的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0039】 合適地，該抗體或其抗原結合片段可包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 33的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 34的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0040】 更合適地，該抗體或其抗原結合片段可包含：

i. 含有與SEQ ID NO: 45的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及

ii. 含有與SEQ ID NO: 34的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0041】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：

- 分別含有SEQ ID NO: 31和SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 43和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 46和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 47和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 35和SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

- 分別含有SEQ ID NO: 37和SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；或

- 分別含有SEQ ID NO: 39和SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

【0042】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 45、33、43、46或47之胺基酸序列的可變重（VH）鏈（或其功能變體）；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕（VL）鏈（或其功能變體）。例如，SEQ ID NO: 33、45、46和/47的VH可以對應於SEQ ID NO: 33的VH的「種系化」版本（例如，都具有相同的CDR序列，但具有框架變異）。有利地，每個變體保留等效的結合特性。

【0043】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 31之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EPD-E02」或「EPD-E02」。

【0044】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 35之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EOB-F05」或「EOB-F05」。

【0045】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 37之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EO5-E07」或「EO5-E07」。

【0046】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 39之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EP0-C07」或「EP0-C07」。

【0047】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「ZY0EQD-E02」或「EQD-E02」。

【0048】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0049】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 46之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0050】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 47之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。

【0051】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體。包含所述序列的抗體或其抗原結合片段可稱為「EQD-E02_GL」。

【0052】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含可變重鏈，該可變重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 43具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的可變重鏈。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO: 43之胺基酸序列的可變重鏈以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈。

【0053】另外或可替代地，本文所述之抗體或其抗原結合片段可以藉由其重鏈和/或輕鏈來描述。

【0054】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含輕鏈（例如，包含VL和恒定輕鏈），該輕鏈包含與SEQ ID NO: 44的胺基酸序列具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈（例如，包含VL和恒定輕鏈）。

【0055】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 48具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO:48之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GL-Maia-重鏈」。

【0056】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 49具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO:49之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GLY-Maia-重鏈」。

【0057】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 50具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。例如，該抗體或其抗原結合片段可包含含有SEQ ID NO:50之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GLQ-Maia-重鏈」。

【0058】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈），該重鏈包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 51具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個更較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。這種重鏈可稱為「E02-GL-WT-重鏈」。

【0059】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含輕鏈恒定區，該輕鏈恒定區包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 42具有至少70%、75%、80%、90%、95%或100%序列同一性的胺基酸序列。在一個較佳的實施方式

中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

【0060】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。更較佳的是，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

【0061】 在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（例如，包含VL和恒定輕鏈）以及含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）。

【0062】 有利地，發明人已經證明，與報導的靶向B7-H4的現有（商業上）可獲得的抗體相比，所要求保護的抗體或抗原結合片段可以靶向更廣譜的表現B7-H4的細胞。因此，發明人不僅提供了對臨床相關靶標具有親和力和特異性的抗體（或其抗原結合片段），而且證明了與其相關的獨特優勢（例如，意想不到的技術效果）。

【0063】 例如，圖4證明了要求保護的示例性抗體以以下抗體無法實現的親和力結合廣譜的癌細胞類型：Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG；US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG；R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1；以及Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1。

【0064】 較佳的是，本文所述之抗體或其抗原結合片段能夠結合作為癌細胞的組成成分的B7-H4（例如，B7-H4作為癌細胞的細胞膜的組成成分）。

【0065】 本文所述之抗體或其抗原結合片段可結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。例如，該抗體或其抗原結合片段結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）的B7-H4（例如，B7-H4表位）。合適地，本文所述之抗體

或其抗原結合片段可結合至OVCAR4細胞系和CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。

【0066】在一個實施方式中，與一或多種選自E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG、US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG、R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1、Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1、同種型1 CAT004 SP06-003、同種型2 R and D正常山羊IgG對照（AB-108C）、AdD serotec MCA2632、Epitomics 2516-1、eBiosciences 145972-82、eBioscience 145970-85的抗體、或其組合相比，該抗體或其抗原結合片段以更高的親和力結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。例如，與一或多種選自E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG、US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG、R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1和Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1的抗體、或其組合相比，該抗體或其抗原結合片段可以以更高的親和力結合至OVCAR4細胞系和/或CHO細胞系（例如，其可缺乏編碼B7-H4的外源核酸）。

【0067】在一個較佳的實施方式中，與E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG相比，該抗體或其抗原結合片段以更高的親和力結合至OVCAR4細胞系。

【0068】提及「E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG」可與本文的術語「B7-H4單株抗體（H74），eBioscience」互換使用。所述抗體可從賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher Scientific）（目錄號14-5949-82）獲得。

【0069】在另一個較佳的實施方式中，與US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG相比，該抗體或其抗原結合片段以更高的親和力結合OVCAR4細胞系。

【0070】所述親和力（例如，結合親和力）可以藉由本文所述之任何合適的測量結合親和力的方法來測量。

【0071】OVCAR4細胞系係人卵巢癌細胞系。OVCAR4細胞系可從美國國家癌症研究所（the National Cancer Institute）獲得，從癌症治療和診斷部腫瘤庫（the Division of Cancer Treatment and Diagnosis Tumor Repository）轉移細胞系。中國倉鼠卵巢（CHO）細胞系係源自中國倉鼠的卵巢的上皮細胞系，可廣泛獲得。

【0072】如以上所述，本發明之抗體或其抗原結合片段可包含在藥物組成物中。該藥物組成物可以包含一或多種藥物上可接受的賦形劑。在一個實施方式中，本發明之藥物組成物可以包含藥學上可接受的無毒的無菌載體，如生理鹽水、無毒緩衝劑、防腐劑等。在本文揭露的治療方法中使用的合適的配製物描述於Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓藥物科學], 第22版, Lloyd V. Allen, Jr.編輯 (2012)中。

【0073】在一個實施方式中，本發明之藥物組成物可包含在一或多種配製物中，該配製物選自膠囊、片劑、水性懸浮液、溶液、鼻氣霧劑、或其組合。

【0074】在一個實施方式中，該藥物組成物包含多於一種類型的本發明之抗體或抗原結合片段。例如，藥物組成物可包含選自抗體、抗原結合片段、軛合至細胞毒素的抗體或其抗原結合片段、或其組合中的兩種或更多種。

【0075】術語抗體或抗原結合片段的「藥學上有效的量」意指足以實現與靶標的有效結合並實現益處（例如，改善疾病或病症的症狀，或者檢測物質或細胞）的量。

【0076】在一個實施方式中，藥物組成物可以包含緩衝液（例如，乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液）、界面活性劑（例如，聚山梨酯）、視需要的穩定劑試劑（例如，人白蛋白）等。

【0077】合適地，本發明之抗體或抗原結合片段以足夠的親和力結合B7-H4分子，使得該抗體可用作靶向B7-H4的治療劑或診斷試劑。

【0078】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以如下解離常數（KD）結合B7-H4（較佳的人B7-H4）：≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1 nM、≤0.1 nM、≤10 pM、≤1 pM、或≤0.1 pM。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以如下KD結合B7-H4（較佳的人B7-H4）：約0.1 nM至約40 nM之間、約0.5 nM至約30 nM之間、約1 nM至約20 nM之間、或約1.5 nM至約20 nM之間。

【0079】在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以約23 nM至約27 nM之間的KD結合B7-H4（較佳的人B7-H4）。在一個更較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段以約1 nM至約1.5 nM之間的KD結合B7-H4（較佳的人B7-H4）。

【0080】KD測量（結合親和力）可以藉由本領域已知的任何合適的測定法進行。合適的測定法包括可經由KinExA系統（例如，KinExA 3100、KinExA 3200或KinExA 4000）（賽必因儀器公司（Sapidyne Instruments），愛達荷州（Idaho））或ForteBio Octet系統進行的親和力測定法。

【0081】在一個實施方式中，本發明之抗體或其抗原結合片段與無關的非B7-H4蛋白的結合程度比該抗體（或其抗原結合片段）與B7-H4（較佳的人B7-H4）的結合少約10%、5%、2%或1%（較佳的少約10%）。所述結合可以例如藉由放射免疫測定法（RIA）、BIACORE®（使用重組B7-H4作為分析物並

且抗體作為配體，或反之亦然）、KINEXA®、ForteBio Octet系統或本領域已知的其他結合測定法來測量。

【0082】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合選自人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子、人BTN3A2分子、或其組合中的一或多種。在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合選自人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、或其組合中的一或多種。

【0083】術語「不結合」意指本文所述之抗體或其抗原結合片段基本上不結合一或多種所述分子（例如，人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子、人BTN3A2分子、或其組合）。當在本文的結合背景下使用時，術語「基本上沒有」可表示細胞培養物中表現一或多種所述分子的細胞的少於5%、2%、1%、0.5%或0.1%被本文所述之抗體或其抗原結合片段結合（在接觸時）。合適地，當在本文的結合背景下使用時，術語「基本上沒有」可表示沒有這樣的細胞被結合。

【0084】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合人B7-H1分子、人B7-H2分子、人B7-H3分子、人BTN1A1分子、人HHLA2分子或人BTN3A2分子。在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合人B7-H1分子、人B7-H2分子、或人B7-H3分子。

【0085】在一個實施方式中，該B7-H4多肽包含在B7-H4多肽序列或其片段內。

【0086】「B7-H4多肽」可包含B7-H4的全長多肽序列（例如，SEQ ID NO.: 55），或可包含B7-H4的全長多肽序列的任何長度的B7-H4片段（例如，包含B7-H4的全長多肽序列的5%、15%、25%、35%、45%、55%、65%、75%、85%或95%的多肽序列），該片段包含可以結合（例如，被結合）本發

明之抗體或抗原結合片段的表位。該B7-H4多肽可包含與SEQ ID NO.: 55的序列具有75%、80%、85%、90%或90%序列同一性的序列。較佳的是，該B7-H4多肽包含SEQ ID NO.: 55的序列。

【0087】 該抗體或抗原結合片段在體外和體內均對B7-H4具有高親和力，因此可有利地用於檢測B7-H4表位的方法和相關的診斷方法中。

【0088】 「治療」係指治癒、減慢已診斷的病理性病症或障礙，減輕已診斷的病理性病症或障礙的症狀，和/或停止已診斷的病理性病症或障礙的進展的治療性措施。因此，需要治療的人包括已患有該障礙的那些人。在一個實施方式中，如果患者顯示例如全部、部分或者暫態減輕或消除了與疾病或障礙（較佳的是癌症）相關的症狀，則受試者根據本文提供的方法成功地「治療」了該疾病或障礙（較佳的是癌症）。

【0089】 在一個實施方式中，本發明之方法可用於預防包含表現B7-H4的癌細胞的癌症之發作。「預防」係指預防和/或減緩靶標病理性病症或障礙的發展的防禦性或預防性措施。因此，需要預防的人包括傾向於患有或易患該障礙的那些人。在一個實施方式中，如果相比於未經受本發明方法的患者，患者暫態或永久地表現出例如與疾病或障礙相關的更少或不太嚴重的症狀，或與該疾病或障礙相關的症狀的更遲的發作，則根據本文提供的方法成功地預防了該疾病或障礙（較佳的癌症）。

【0090】 術語「受試者」、「個體」和「患者」在本文中可互換使用以指哺乳動物受試者。在一個實施方式中，該「受試者」係人、家畜、農場動物、競賽動物和動物園動物，例如人、非人靈長類動物、狗、貓、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、馬、牛等。在一個實施方式中，該受試者係食蟹猴（cynomolgus monkey/*Macaca fascicularis*）。在一個較佳的實施方式中，該受試者係人。在本發明之方法中，該受試者先前可能未被診斷為患有癌症。可替代地，該受試

者可能先前已被診斷為患有癌症。該受試者也可為表現出疾病風險因素的人，或沒有癌症症狀的人。該受試者也可為患有癌症或有患癌症的風險的人。因此，在一個實施方式中，本發明之方法可用於確認受試者中癌症的存在。例如，該受試者可能先前已藉由替代性方式被診斷出患有癌症。在一個實施方式中，該受試者先前已經投與癌症療法。

【0091】在一個實施方式中，本發明之治療方法包括一或多個投與步驟，該一或多個投與步驟選自口服、靜脈內、動脈內、腹膜內、肌內、皮下、直腸或陰道、吸入、局部、或其組合。在一個較佳的實施方式中，投與是靜脈內或動脈內（例如，藉由注射或滴注）投與或其組合。

【0092】在一個實施方式中，將該抗體或其抗原結合片段直接遞送至有害細胞群的位點處（例如，從而增加患病組織對治療劑的暴露）。在一個實施方式中，直接投與至氣道，例如藉由吸入或鼻內投與。

【0093】在一個較佳的實施方式中，本文提及的癌症係以B7-H4分子的表現（較佳的過度表現）為特徵的癌症。換言之，本文提及的癌症可包含表現B7-H4的癌細胞。所述癌細胞可包含在腫瘤內。

【0094】在一個實施方式中，癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、膽管癌、NSCLC（鱗癌和腺癌）、胰臟癌和胃癌中的一或多種。

【0095】在一個實施方式中，癌症選自結直腸癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌（例如，NSCLC或SCLC）、乳癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、膽管癌、黑色素瘤、子宮內膜癌、血液學癌症（AML、MM、DLBCL）以及包含CSC的癌症中的一或多種。

【0096】在一個較佳的實施方式中，癌症係肺癌、乳癌、或其組合。例如，癌症可為肺癌。癌症可為乳癌。癌症可為卵巢癌。

【0097】在一個實施方式中，癌症係一或多種乳癌，其選自激素受體（HR）陽性（HR+）乳癌、人表皮生長因子受體2陽性（HER2+）乳癌、三陰性乳癌（TNBC）。該受試者可能符合赫賽汀（Herceptin）的治療條件。該受試者可能已接受赫賽汀治療。

【0098】在一個實施方式中，癌症係一或多種非小細胞肺癌（NSCLC），其較佳的是選自鱗狀NSCLC、腺癌NSCLC、或其組合。

【0099】抗體或其抗原結合片段也可用於檢測癌細胞，例如作為診斷方法的一部分。

【0100】在另一方面，提供了用於檢測樣本中B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）是否存在之方法，該方法包括：

a. 使樣本與抗體或其抗原結合片段或包含抗體或其抗原結合片段的藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

b. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；以及

c. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的存在；或

d. 其中該抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的不存在。

【0101】在一個相關方面，提供了用於檢測樣本中表現B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的癌細胞是否存在之方法，該方法包括：

a. 使樣本與抗體或其抗原結合片段或包含抗體或其抗原結合片段的藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；其中所述抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

b. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；以及

c. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的存在；或

d. 其中該抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的不存在。

【0102】 本發明包括本發明之抗體或其抗原結合片段用於檢測B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的相應用途。

【0103】 在一個實施方式中，抗體-抗原複合物的存在指示癌細胞的存在，並且抗體-抗原複合物的不存在指示癌細胞的不存在。例如，該方法可以包括在檢測到抗體-抗原複合物的情況下確認癌症的存在，或在未檢測到抗體-抗原複合物的情況下不確認癌症的存在。

【0104】 在一個較佳的實施方式中，癌細胞係表現B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的癌細胞。

【0105】 因此，本發明包括本文所述之方法步驟在診斷患有癌症的受試者的方法中的相應用途，較佳的是其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

【0106】在一個實施方式中，檢測方法或診斷方法可以包括測量B7-H4在可從受試者獲得的細胞（或組織）上的表現水平，並將測量的表現水平與對照細胞（或組織）中的標準B7-H4表現進行比較，其中與對照相比表現水平的增加指示癌症的存在。較佳的是，所述對照樣本包含非癌（例如，正常）細胞。

【0107】「抗體-抗原複合物」意指包含已與抗體結合的B7-H4抗原的複合物（例如，大分子複合物）。術語「抗體-抗原複合物」可以與術語「結合的B7-H4-抗體複合物」和「與B7-H4結合的抗體」同義使用。

【0108】可以藉由技術者已知的任何方式檢測抗體-抗原複合物。在一個實施方式在，將該抗體（或其抗原結合片段）用可檢測標記進行標記。所述標記可為落射式螢光標記。在一個較佳的實施方式中，將該抗體用800CW標記。

【0109】在一個實施方式中，藉由結合該抗體和/或抗體-抗原複合物的第二（例如，檢測）抗體來檢測抗體-抗原複合物。

【0110】合適地，所述第二抗體包含檢測工具，如標籤/標記以輔助檢測。所述檢測工具較佳的是軛合至第二抗體。合適的標記之實例包括可檢測標記，如放射性標記或螢光分子或有色分子、酶標記物或顯色標記物（例如，在檢測抗體與抗原結合時提供可見顏色變化的染料）。舉例來說，標記可為異硫氰酸螢光素（FITC）、R-藻紅素、Alexa 532、CY3或地高辛（digoxigenin）。標記可為報告分子，其被直接檢測，如藉由檢測其螢光信號、或藉由將標記暴露於照相膠片或X射線膠片。可替代地，標記不能被直接檢測，但可以例如在兩相系統中被檢測。間接標記檢測的一個實例係抗體與該標記的結合。

【0111】在一個較佳的實施方式中，所述第二抗體包含螢光標籤，並且藉由由抗體-抗原-第二抗體複合物發出的螢光檢測抗體-抗原複合物。「抗體-抗原-第二抗體複合物」意指包含已經與抗體結合的抗原（例如，B7-H4）的複合

物，其中所述複合物進一步被第二抗體結合，該第二抗體結合所述抗體和/或抗體-抗原複合物。

【0112】 合適地，當由檢測標記發出的信號（較佳的螢光）大於在不包含抗體（例如，不包含結合B7-H4的抗體）的對照中檢測到的信號時，檢測到抗體-抗原複合物。所述對照可以替代性地包含B7-H4，但樣本不應用於所述對照。

【0113】 合適地，「樣本」係從受試者（例如，活檢）、細胞系、組織培養物或其他潛在表現B7-H4的細胞來源獲得的樣本。在較佳的實施方式中，樣本係來自受試者的活檢。所述活檢可以取自腫瘤、或有患腫瘤的風險的部位。

【0114】 在一個較佳的實施方式中，該樣本係可獲得（例如，獲得）自受試者的分離的樣本。

【0115】 在一個較佳的實施方式中，該B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）係癌細胞的組成成分，更較佳的是癌細胞的細胞膜的組成成分。

【0116】 本發明涵蓋本文定義的具有所述CDR序列或可變重鏈和可變輕鏈序列的抗體（參考抗體）（例如，抗體或抗原結合片段）及其功能變體。功能變體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性。當與參考抗體相比時，該等功能變體對於靶抗原可以具有不同的親和力，但基本上相同的親和力係較佳的。

【0117】 相比之下，術語「參考抗體」用於方便地指代本發明之抗體或其抗原。因此，術語「參考抗體」係指本發明之抗體或其抗原。例如，參考抗體可以意指如下抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、

LCDR2和LCDR3。更特別地，參考抗體可以意指如下抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈。較佳的是，參考抗體可以意指如下抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈。

【0118】 在一個實施方式中，當與相應的參考CDR序列相比時，參考抗體的功能變體在一或多個CDR處顯示序列變異。因此，功能抗體變體可以包含CDR的功能變體。在CDR序列的背景下使用術語「功能變體」時，這意味著當與相應的參考CDR序列相比時，該CDR具有最多2個、較佳的最多1個胺基酸差異，並且當與其餘5個CDR（或其變體）組合時，使該變體抗體能夠結合與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是展現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性。功能變體可以稱為「變體抗體」。

【0119】 在一個實施方式中，變體抗體（或其抗原結合片段）包含：

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0120】 較佳的是，變體抗體（或其抗原結合片段）包含：

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與相應的參考CDR序列相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0121】 例如，該抗體或抗原結合片段的變體可以包含：

當與SEQ ID NO: 7相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 8相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與SEQ ID NO: 9相比時具有最多2個胺基酸差異的重鏈CDR3；

當與SEQ ID NO: 10相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 11相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與SEQ ID NO: 12相比時具有最多2個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位），並且較佳的是表現出與參考抗體或抗原結合片段相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0122】 例如，該抗體或抗原結合片段的變體可以（較佳的是）包含：

當與SEQ ID NO: 7相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 8相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR2；以及

當與SEQ ID NO: 9相比時具有最多1個胺基酸差異的重鏈CDR3；

當與SEQ ID NO: 10相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR1；

當與SEQ ID NO: 11相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR2；

當與SEQ ID NO: 12相比時具有最多1個胺基酸差異的輕鏈CDR3；

其中該變體抗體結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位），並且較佳的是表現出與參考抗體或抗原結合片段相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0123】 前述內容可以類似地應用於本文所述之其他抗體的變體，其中胺基酸差異是相對於其CDR序列定義的，並且其中該變體抗體結合與所述抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出相同的抗原交叉反應性。

【0124】 在一個實施方式中，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體可以在其CDR中具有總計最多5、4或3個胺基酸差異，條件是每個CDR存在最多2個（較佳的是最多1個）胺基酸差異。較佳的是，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體在其CDR中具有總計最多2個（更較佳的是最多1個）胺基酸差異，條件是每個CDR存在最多2個胺基酸差異。更較佳的是，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體在其CDR中具有總計最多2個（更較佳的是最多1個）胺基酸差異，條件是每個CDR存在最多1個胺基酸差異。

【0125】 該胺基酸差異可為胺基酸取代、插入或缺失。在一個實施方式中，該胺基酸差異是如本文所述之保守胺基酸取代。

【0126】 在一個實施方式中，變體抗體具有與本文所述之示例性抗體相同的框架序列。在另一個實施方式中，變體抗體可包含具有最多2個、較佳的是最多1個胺基酸差異的框架區（當與相應的參考框架序列相比時）。因此，每個框架區可具有最多2個、較佳的是最多1個胺基酸差異（當與相應的參考框架序列相比時）。

【0127】 在一個實施方式中，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體可以在其框架區中具有總計最多5、4或3個胺基酸差異，條件是每個框架區存在最多2個（較佳的最多1個）胺基酸差異。較佳的是，當與相應的參考抗體相比

時，變體抗體在其框架區中具有總計最多2個（更較佳的最多1個）胺基酸差異，條件是每個框架區存在最多2個胺基酸差異。更較佳的是，當與相應的參考抗體相比時，變體抗體在其框架區中具有總計最多2個（更較佳的最多1個）胺基酸差異，條件是每個框架區存在最多1個胺基酸差異。

【0128】因此，變體抗體可以包含如本文所述之可變重鏈和可變輕鏈，其中：

當與本文的重鏈序列相比時，該重鏈具有最多14個胺基酸差異（每個CDR中最多2個胺基酸差異，並且每個框架區中最多2個胺基酸差異）；並且

當與本文的輕鏈序列相比時，該輕鏈具有最多14個胺基酸差異（每個CDR中最多2個胺基酸差異，並且每個框架區中最多2個胺基酸差異）；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

【0129】所述變體重鏈或輕鏈可以被稱為參考重鏈或輕鏈的「功能等效物」。

【0130】在一個實施方式中，變體抗體可以包含如本文所述之可變重鏈和可變輕鏈，其中：

當與本文的重鏈序列相比時，該重鏈具有最多7個胺基酸差異（每個CDR中最多1個胺基酸差異，並且每個框架區中最多1個胺基酸差異）；並且

當與本文的輕鏈序列相比時，該輕鏈具有最多7個胺基酸差異（每個CDR中最多1個胺基酸差異，並且每個框架區中最多1個胺基酸差異）；

其中該變體抗體結合至與參考抗體相同的靶抗原，並且較佳的是表現出與參考抗體相同的抗原交叉反應性（或缺乏抗原交叉反應性）。

抗體-藥物軛合物（ADC）

【0131】有利地，本發明之抗體或其抗原結合片段可以包含異源藥劑。在一個實施方式中，本發明之抗體或抗原結合片段連接至異源藥劑。在一個較佳的實施方式中，該抗體或抗原結合片段軛合至異源藥劑。合適地，「軛合」意指經由共價鍵或離子鍵連接。較佳的是，所述異源藥劑係細胞毒素。

【0132】異源藥劑可以簡稱為「藥劑」或「活性劑」。例如，換言之，本發明之抗體或其抗原結合片段可以包含活性劑。在一個實施方式中，本發明之抗體或抗原結合片段連接至活性劑。在一個較佳的實施方式中，該抗體或抗原結合片段軛合至活性劑。

【0133】該異源藥劑/活性劑可為藥物。較佳的是，該異源藥劑/活性劑係細胞毒素。

【0134】特別較佳的是，本發明之抗體或其抗原結合片段連接（例如，軛合）至治療方法中的異源藥劑/活性劑，如下所述。

【0135】本發明之藥劑和/或細胞毒素可以藉由間隔物（例如，至少一個間隔物）軛合至該抗體或其抗原結合片段。在一個實施方式中，該間隔物係肽間隔物。在一個實施方式中，該間隔物係非肽（例如，化學的）間隔物。

【0136】細胞毒性劑或細胞毒素可以係本領域中已知的任何分子，該分子抑制或阻止細胞的功能和/或造成細胞破壞（細胞死亡）、和/或發揮抗腫瘤/抗增生作用。已知許多類別的細胞毒性劑在ADC分子中具有潛在效用。該等包括但不限於：拓撲異構酶I抑制劑、蠅蕈素、奧瑞斯他汀（auristatin）、道諾黴素（daunomycin）、多柔比星（duocarmycin）、尾海兔素、朵拉司他汀（enediyne）、烯二炔、來紅黴素（lexitropsin）、紫杉烷類、嘌呤黴素、美登木素生物鹼（maytansinoid）、長春花鹼、微管溶素（tubulysin ）以及吡咯并苯并二氮呯（PBD）。此類細胞毒性劑的實例係AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奧瑞斯他汀E、紫杉醇、多西他賽、CC-1065、SN-38、拓撲替康、味

啉代多柔比星、根黴素、氰基味啉代多柔比星、朵拉司他汀-10、棘黴素、康普瑞汀、杯形生長抑制素（chalicheamicin）、美登素、DM-1、長春鹼、甲胺蝶呤和紡錘菌素、以及其衍生物和類似物。關於適合在ADC中使用的細胞毒素的另外的揭露內容可以例如在國際專利申請公開案號WO 2015/155345和WO 2015/157592中發現，將其藉由引用以其全文併入本文。

【0137】 例如，該抗體或抗原結合片段可以軛合至此類異源藥劑以提供「抗體-藥物軛合物」（ADC）。

【0138】 該藥劑通常連接至該抗體或抗原結合片段或「載入到」該抗體或抗原結合片段上。藥劑載入量（p）係每個抗體或抗原結合片段（例如，配體單元）上的平均藥劑數量。

【0139】 來自軛合反應的ADC製劑中每個抗體（或抗原結合片段）上的平均藥劑數量可以藉由常規方式進行表徵，該等方式例如UV、逆相HPLC、HIC、質譜、ELISA測定和電泳。也可以確定依據p的ADC的定量分佈。藉由ELISA，可以確定特定ADC製劑中p的平均值（Hamblett等人 (2004) Clin. Cancer Res.[臨床癌症研究] 10:7063-7070；Sanderson等人 (2005) Clin. Cancer Res.[臨床癌症研究] 11:843-852）。在一些情況下，均質ADC（其中p係來自具有其他載藥量的ADC的確定值）的分離、純化和表徵可以藉由例如逆相HPLC或電泳來實現。此類技術也適用於其他類型的軛合物。

【0140】 半胱胺酸胺基酸可在抗體（或其抗原結合片段）中的反應位點處被工程化，並且較佳的是不形成鏈內或分子間二硫鍵（Junutula等人, 2008b Nature Biotech.[自然生物技術], 26(8):925-932；Dornan等人 (2009) Blood [血液] 114(13):2721-2729；US 7521541；US 7723485；WO 2009/052249）。工程化的半胱胺酸硫醇可以與藥劑（例如，具有以下式I）內的連接子反應以形成具有半胱胺酸工程化的抗體的ADC，該連接子具有硫醇反應性親電基團（如馬來醯亞

胺或α-鹵代醯胺）。因此，可以設計、控制和已知藥物單元的位置。由於工程化的半胱胺酸硫醇基團通常以高產率與藥物連接子試劑反應，因此可以控制載藥量。藉由在重鏈或輕鏈上的單個位點處進行取代而對IgG抗體進行工程化以引入半胱胺酸胺基酸，從而在對稱抗體上給出了兩個新的半胱胺酸。可以達到載藥量接近2，其中軛合物產物ADC接近均質性。

【0141】在該抗體或其抗原結合片段的多於一個親核或親電基團與藥劑反應的情況下，所得產物可為如下ADC化合物的混合物，在該等ADC化合物中，附接抗體的藥劑單元的分佈例如為1、2、3個等。液相層析法（如聚合物逆相（PLRP）和疏水相互作用（HIC））可以藉由藥劑負載值來分離混合物中的化合物。可以分離具有單一藥劑負載值（p）的ADC製劑。

【0142】因此，本發明之抗體-藥物軛合物組成物可以包括抗體-藥物軛合物的混合物，其中該抗體或其抗原結合片段具有一或多個藥劑部分，並且其中該等藥劑部分可以在各種胺基酸殘基處附接該抗體或其抗原結合片段。

【0143】在一個實施方式中，每個抗體（或其抗原結合片段）上的平均藥劑數量在1至20之範圍內。在一些實施方式中，該範圍選自1至10、2至10、2至8、2至6、以及4至10。在一些實施方式中，每個抗體（或其抗原結合片段）上存在一個藥劑。在一些實施方式中，每個抗體（或其抗原結合片段）上的藥劑數量可以表示為藥劑（即，藥物）與抗體的比率。這個比率被稱為藥物與抗體比率（DAR）。DAR係連接至每個抗體的藥物（即，藥劑）的平均數量。在本發明之一個實施方式中，DAR在1至20之範圍內。在一些實施方式中，DAR的範圍選自1至10、2至10、2至8、2至6、以及4至10。在本發明之一個特定實施方式中，DAR約為8。在本發明之一個特定實施方式中，DAR為8。

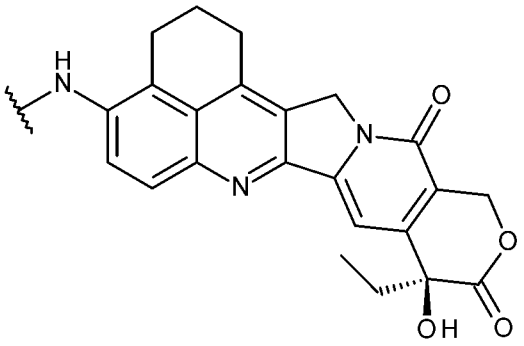
【0144】在一個實施方式中，該抗體或抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑、微

管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、抗微生物劑、治療劑、前驅藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物響應調節劑、藥學試劑、淋巴介質、異源抗體、異源抗體的片段、可檢測標記、聚乙二醇（PEG）、放射性同位素、或其組合。

【0145】在一個實施方式中，該抗體抗原結合片段軛合至一或多種細胞毒素，該一或多種細胞毒素選自拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、或其組合。例如，該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種細胞毒素，該一或多種細胞毒素選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑SG3932、SG4010、SG4057或SG4052（其結構如下提供）；微管溶素AZ1508；吡咯并苯并二氮呼SG3315；吡咯并苯并二氮呼SG3249；或其組合。

【0146】較佳的是，該抗體或其抗原結合片段可以軛合至拓撲異構酶I抑制劑。拓撲異構酶抑制劑係阻斷拓撲異構酶（拓撲異構酶I和II）作用的化學化合物，拓撲異構酶是在正常細胞週期中藉由催化DNA鏈的磷酸二酯骨架的斷裂和重新連接來控制DNA結構變化的一種類型的酶。

【0147】合適的拓撲異構酶I抑制劑的一般實例由以下化合物表示：

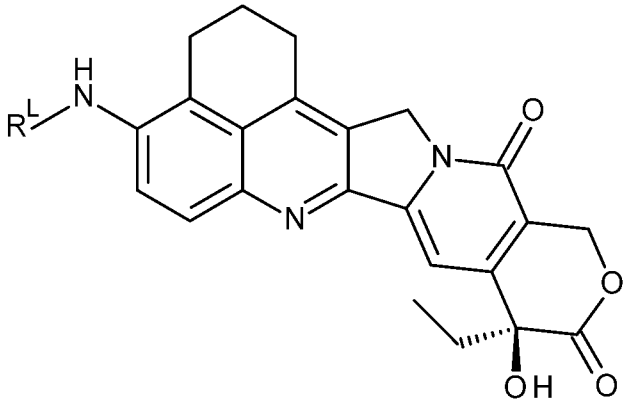


A*

所述化合物表示為A*，並且可以在本文中稱為「藥物單元」。

【0148】該化合物（例如，A*）較佳的是提供有用於連接（較佳的軛合）至本文所述之抗體或抗原結合片段（其可稱為「配體單元」）的連接子。合適地，該連接子以可裂解的方式附接（例如，軛合）至胺基殘基，例如，本文所述之抗體或抗原結合片段的胺基酸。

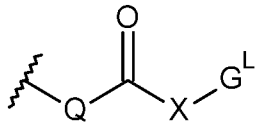
【0149】更特別地，合適的拓撲異構酶I抑制劑的實例由具有式「I」的以下化合物表示：



I

及其鹽和溶劑化物，其中R^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中所述連接子較佳的是選自：

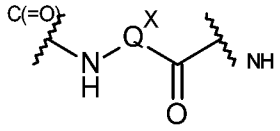
(ia)：



Ia，

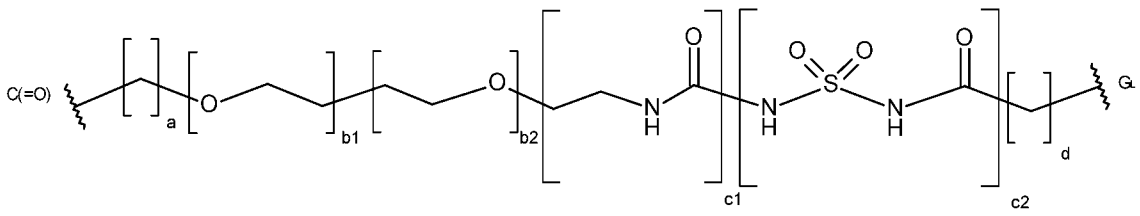
其中

Q係：



，其中Q^X使得Q為胺基酸殘基、二肽殘基、三肽殘基或四肽殘基；

X是：

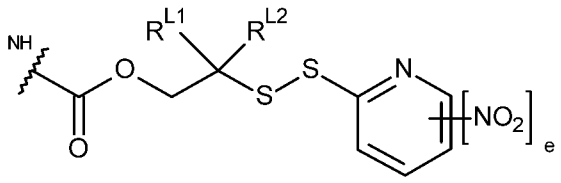


，

其中a = 0至5，b1 = 0至16，b2 = 0至16，c1 = 0或1，c2 = 0或1，d = 0至5，其中至少b1或b2 = 0（即b1和b2中只有一個可以不是0）並且至少c1或c2 = 0（即c1和c2中只有一個可以不是0）；

G^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；或

(ib)：



Ib

，

其中R^{L1}和R^{L2}獨立地選自H和甲基，或與它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團；並且

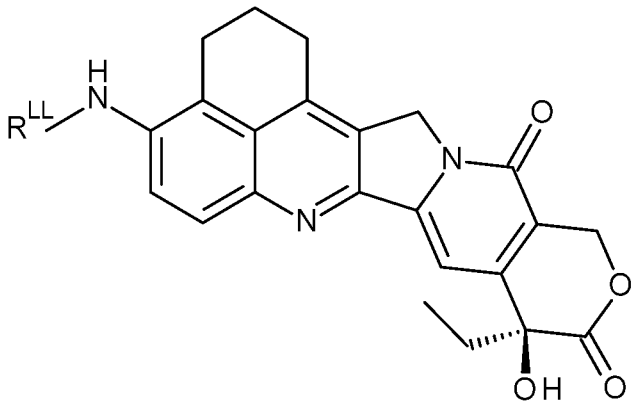
e係0或1。

【0150】 熟悉該項技術者將理解，所述藥劑（例如，拓撲異構酶I抑制劑）中的多於一種可以軛合至該抗體或其抗原結合片段。

【0151】 例如，本發明之軛合物（例如，抗體-藥物軛合物）可以具有通式IV：

$$L - (D^L)_p \quad \textbf{(IV)}$$

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中L係本文所述之抗體或抗原結合片段（例如，配體單元），D^L係具有連接子的拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物連接子單元）並且其具有式III：

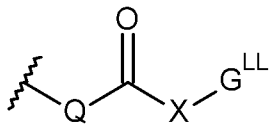


III

。

R^{LL}係連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中該連接子較佳的係選自

(ia')：

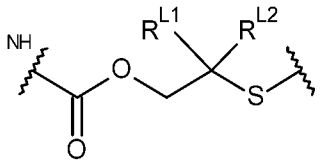


Ia'

，

其中Q和X如以上所定義，並且G^{LL}係連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；並且

(ib')：



Ib'

，

其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定義；並且

p係從1至20的整數。

【0152】 載藥量由p表示，即每個抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）上的拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物單元）的數量。載藥量可以在1至20個藥物單元（D）/配體單元之範圍內。對於組成物，p表示組成物中軛合物的平均載藥量，並且p的範圍為1至20。

【0153】因此，本發明包括軛合物，該軛合物包含共價連接至至少一種拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物單元，如以上說明的A*）的本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）。所述抑制劑較佳的地藉由連接子（例如，連接子單元，如以上描述為R^L和/或R^{LL}的連接子）連接至該抗體或其抗原結合片段。換言之，本發明包括附接有（較佳的經由連接子）一或多種拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物-連接子單元）的本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）。以上更全面描述的抗體或其抗原結合片段（代表配體單元）係結合靶標部分的靶向劑。更特別地，該配體單元可以例如特異性結合靶細胞上的B7-H4，由此將藥物單元遞送至該靶細胞。因此，本發明還提供了用ADC治療例如各種癌症和其他障礙（例如，與表現B7-H4的細胞、較佳的癌細胞的存在相關的癌症/障礙）的方法。

進一步的偏好

【0154】上述拓撲異構酶I抑制劑的某些特徵是特別較佳的並且可以如下所示更詳細地定義。舉例來說，將概述特徵Q^X（例如，在上述1a的連接子內）的較佳的實施方式。

【0155】以下偏好可以應用於如上所述之本發明之所有方面，或者可以涉及單個方面。該等偏好能以任何組合被組合在一起。

【0156】在下文提供的標題「定義」下提供了涉及本節中的某些術語的各種定義。

Q^X

【0157】在一個實施方式中，Q係胺基酸殘基。胺基酸可為天然胺基酸或非天然胺基酸。例如，Q可以選自：Phe、Lys、Val、Ala、Cit、Leu、Ile、Arg和Trp，其中Cit係瓜胺酸。

【0158】在一個實施方式中，Q包含二肽殘基。二肽中的胺基酸可為天然胺基酸和非天然胺基酸的任何組合。在一些實施方式中，二肽包含天然胺基酸。當連接子係組織蛋白酶不穩定連接子時，二肽係組織蛋白酶介導的切割的作用位點。然後，二肽係組織蛋白酶的識別位點。

【0159】在一個實施方式中，Q選自：

^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Phe-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Leu-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Ile-Cit-$^{C=O}$、

^{NH}-Phe-Arg-$^{C=O}$、

^{NH}-Trp-Cit-$^{C=O}$、和

^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$；

其中Cit係瓜胺酸。

【0160】較佳的是，Q選自：

^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$、

^{NH}-Val-Lys-$^{C=O}$、

^{NH}-Ala-Lys-$^{C=O}$、和

^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$。

【0161】 更較佳的是，Q選自^{NH}-Phe-Lys-$^{C=O}$、^{NH}-Val-Cit-$^{C=O}$或^{NH}-Val-Ala-$^{C=O}$。

【0162】 其他合適的二肽組合包括：

^{NH}-Gly-Gly-$^{C=O}$、

^{NH}-Gly-Val-$^{C=O}$

^{NH}-Pro-Pro-$^{C=O}$、和

^{NH}-Val-Glu-$^{C=O}$。

【0163】 可以使用其他二肽組合，包括由Dubowchik等人, *Bioconjugate Chemistry* [生物軛合物化學], 2002, 13,855-869描述的那些，將其藉由引用併入本文。

【0164】 在一些實施方式中，Q係三肽殘基。三肽中的胺基酸可為天然胺基酸和非天然胺基酸的任何組合。在一些實施方式中，三肽包含天然胺基酸。當連接子係組織蛋白酶不穩定連接子時，三肽係組織蛋白酶介導的切割的作用位點。然後，三肽係組織蛋白酶的識別位點。特別感興趣的三肽連接子係：

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

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

^{NH}-αGlu-Val-Ala-$^{C=O}$

^{NH}-αGlu-Val-Cit-$^{C=O}$

【0165】 在一些實施方式中，Q係四肽殘基。四肽中的胺基酸可為天然胺基酸和非天然胺基酸的任何組合。在一些實施方式中，四肽包含天然胺基酸。當連接子係組織蛋白酶不穩定連接子時，四肽係組織蛋白酶介導的切割的作用位點。然後，四肽係組織蛋白酶的識別位點。特別感興趣的四肽連接子係：

^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly$^{C=O}$；和

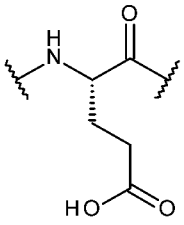
^{NH}-Gly-Phe-Gly-Gly$^{C=O}$。

【0166】在一些實施方式中，四肽係：

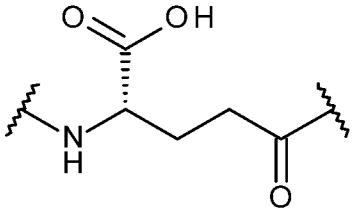
^{NH}-Gly-Gly-Phe-Gly$^{C=O}$。

【0167】在以上肽殘基的表示中，^{NH}-表示殘基的N-末端，並且-$^{C=O}$表示殘基的C-末端。C-末端結合A*的NH。

【0168】Glu表示麩胺酸的殘基，即：



αGlu表示當經由α鏈結合時的麩胺酸的殘基，即：

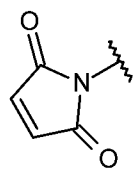
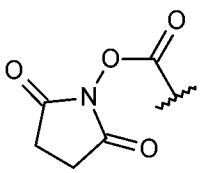
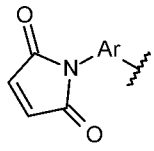
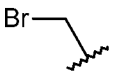


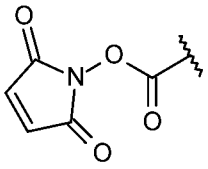
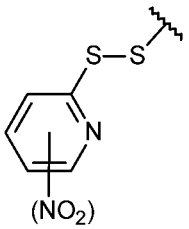
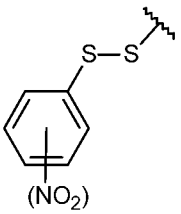
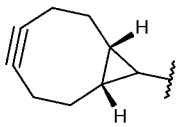
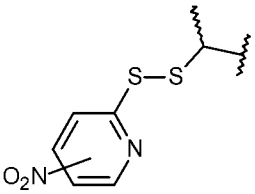
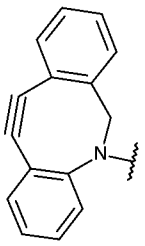
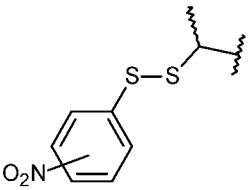
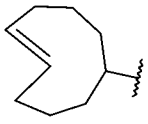
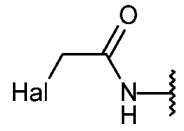
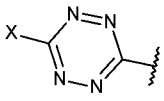
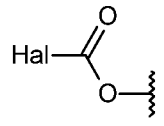
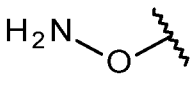
【0169】在一個實施方式中，在適當的情況下，胺基酸側鏈被化學保護。側鏈保護基團可為如上所論述的基團。被保護的胺基酸序列可被酶切割。例如，包含Boc側鏈保護的Lys殘基的二肽序列可被組織蛋白酶切割。

【0170】胺基酸側鏈的保護基團係本領域熟知的，並且描述於Novabiochem公司目錄中，並且如上所述。

G^{L}

【0171】G^{L}可以選自：

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	

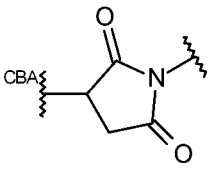
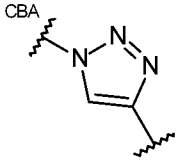
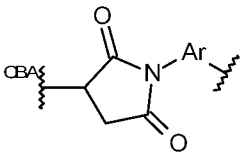
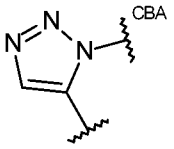
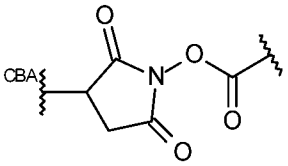
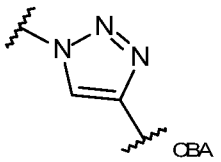
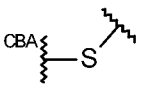
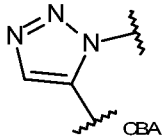
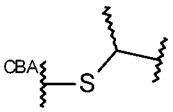
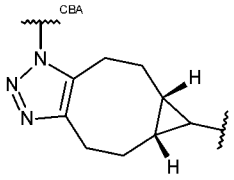
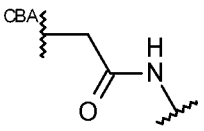
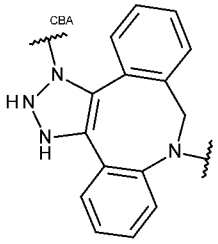
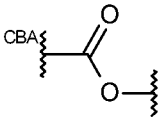
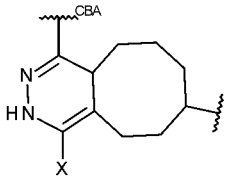
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L9})	
(G^{L3-2})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L10})	
(G^{L3-3})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L11})	
(G^{L3-4})	 其中NO_2基團係視需要的	(G^{L12})	
(G^{L4})	 其中Hal = I、Br、Cl	(G^{L13})	
(G^{L5})		(G^{L14})	

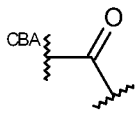
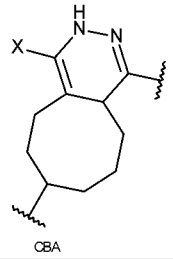
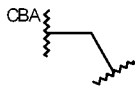
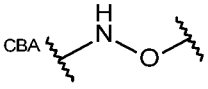
其中Ar表示C_{5-6}伸芳基基團，例如伸苯基，且X表示C_{1-4}烷基。

【0172】在一些實施方式中，G^L選自G^{L1-1}和G^{L1-2}。在該等實施方式的一些中，G^L係G^{L1-1}。

G^{LL}

【0173】G^{LL}可以選自：

(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		(G^{LL10})	
(G^{LL-4})		(G^{LL11})	
(G^{LL5})		(G^{LL12})	

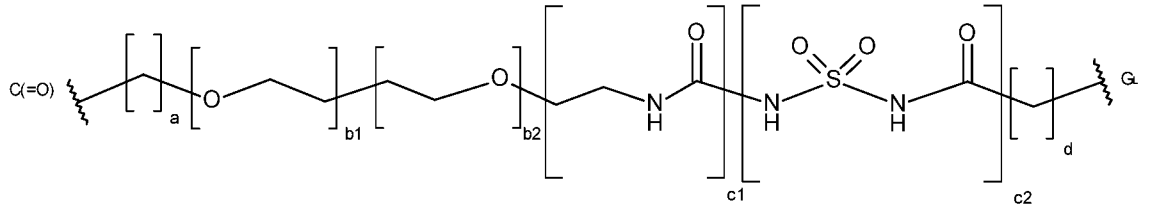
(G^{LL6})		(G^{LL13})	
(G^{LL7})		(G^{LL14})	

其中Ar表示C_{5-6}伸芳基基團，例如伸苯基，且X表示C_{1-4}烷基。

【0174】在一些實施方式中，G^{LL}選自G^{LL1-1}和G^{LL1-2}。在該等實施方式的一些中，G^{LL}係G^{LL1-1}。

X

【0175】X較佳的是：



，

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

a可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，a係0至3。在該等實施方式的一些中，a係0或1。在另外的實施方式中，a係0。

b1可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b1係0至12。在該等實施方式的一些中，b1係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。

b2可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b2係0至12。在該等實施方式的一些中，b2係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。較佳的是，b1和b2中只有一個可以不是0。

c1可為0或1。c2可為0或1。較佳的是，c1和c2中只有一個可以不是0。

d可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，d係0至3。在該等實施方式的一些中，d係1或2。在另外的實施方式中，d係2。在另外的實施方式中，d係5。

【0176】 在X的一些實施方式中，a係0，b1係0，c1係1，c2係0並且d係2，並且b2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2係0、2、3、4、5或8。在X的一些實施方式中，a係1，b2係0，c1係0，c2係0並且d係0，並且b1可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b1係0、2、3、4、5或8。在X的一些實施方式中，a係0，b1係0，c1係0，c2係0並且d係1，並且b2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2係0、2、3、4、5或8。在X的一些實施方式中，b1係0，b2係0，c1係0，c2係0並且a和d之一係0。a和d中另一個係從1至5。在該等實施方式的一些中，a和d中另一個係1。在該等實施方式的另一些中，a和d中另一個係5。在X的一些實施方式中，a係1，b2係0，c1係0，c2係1，d係2，並且b1可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2係0、2、3、4、5或8。

【0177】 在一些實施方式中，R^L具有式Ib。在一些實施方式中，R^{LL}具有式Ib’。

【0178】 R^{L1}和R^{L2}可以獨立地選自H和甲基，或與它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團。

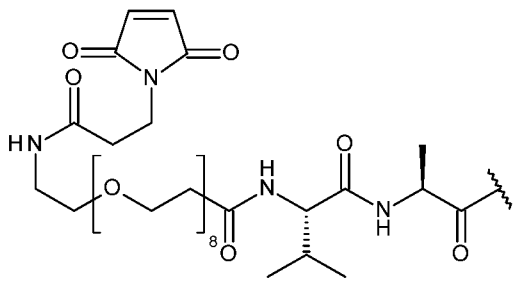
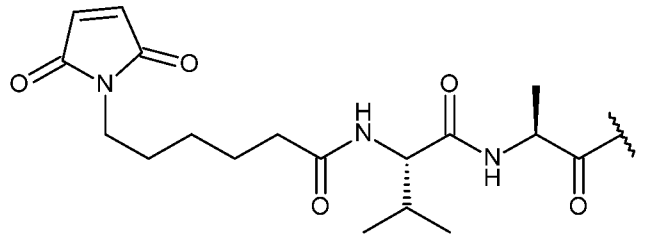
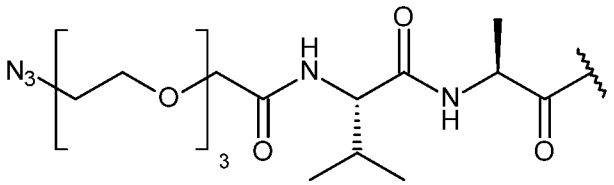
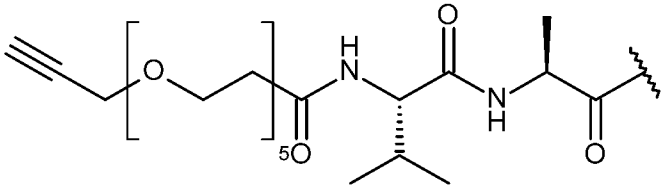
【0179】 在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}兩者均為H。在一些實施方式中，R^{L1}係H並且R^{L2}係甲基。在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}兩者均為甲基。

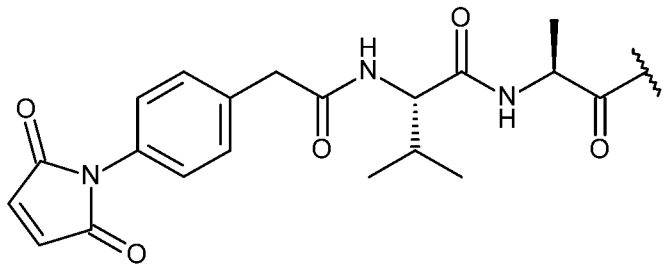
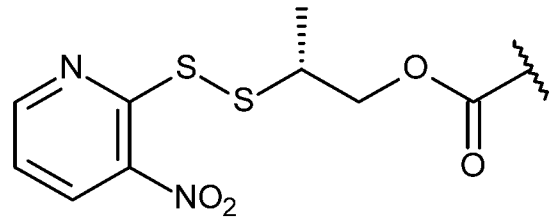
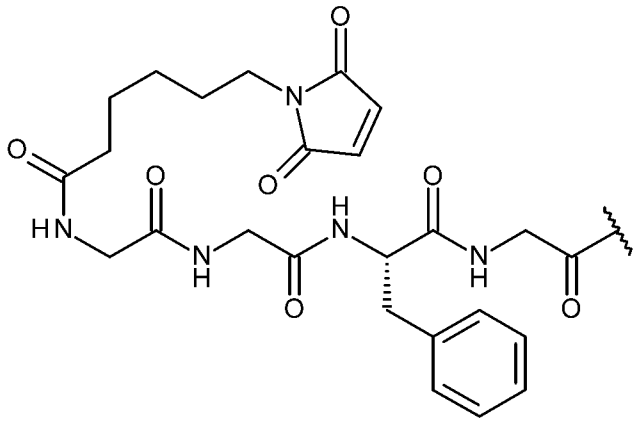
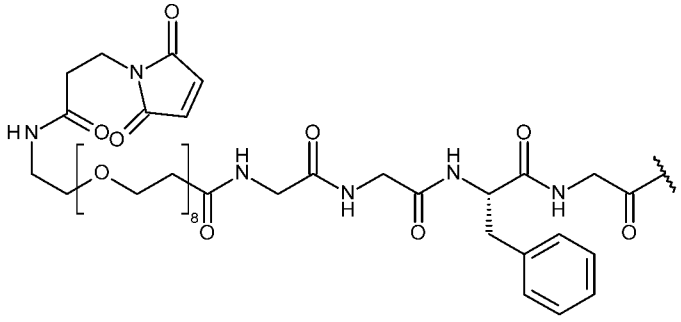
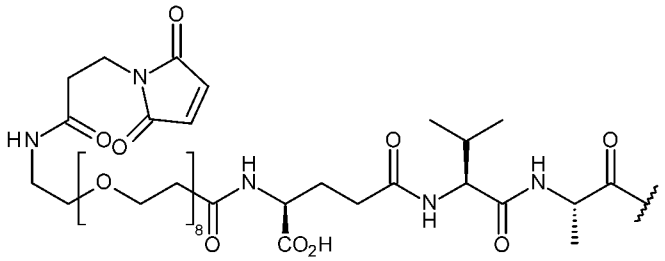
【0180】 在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}與它們所結合的碳原子一起形成環丙烯基團。在一些實施方式中，R^{L1}和R^{L2}與它們所結合的碳原子一起形成環丁烯基團。

【0181】在基團Ib中，在一些實施方式中，e係0。在其他實施方式中，e係1並且硝基基團可以在環的任何可用位置上。在該等實施方式的一些中，它位於鄰位。在該等實施方式的另一些中，它位於對位。

【0182】在其中以單一鏡像異構物或以鏡像異構物富集的形式提供本文所述之化合物的一些實施方式中，鏡像異構物富集形式具有大於60:40、70:30、80:20或90:10的鏡像異構物比率。在另外的實施方式中，鏡像異構物比率大於95:5、97:3或99:1。

【0183】在一些實施方式中，R^L選自：

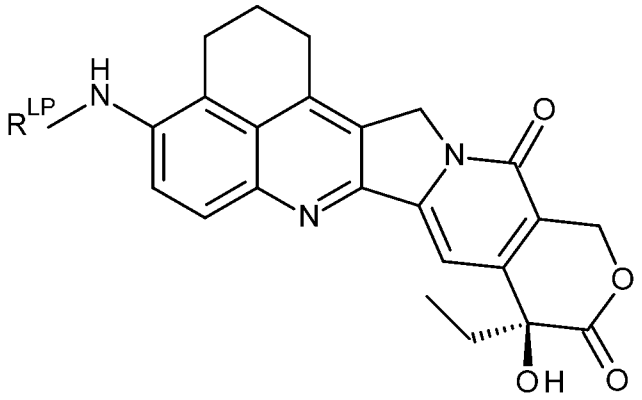
(i)	
(ii)	
(iii)	
(iv)	

(v)	
(vi)	
(vii)	
(viii)	
(ix)	

【0184】在一些實施方式中，R^{LL}係衍生自上述R^{L}基團的基團。

【0185】已經概述了上述偏好，現在描述某些較佳的拓撲異構酶I-連接子（例如，藥物連接子單元）式。

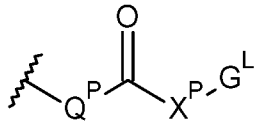
【0186】在一些實施方式中，具有式**I**之化合物具有式$\mathbf{I}^{P}$：



$\mathbf{I}^{P}$；

及其鹽和溶劑化物，其中R^{LP}係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段的連接子，其中所述連接子選自：

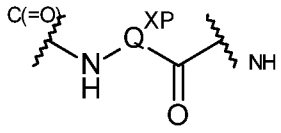
(ia)：



$\mathbf{Ia}^{P}$，

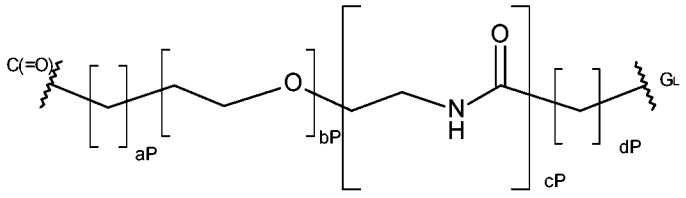
其中

Q^{P}係：



，其中Q^{XP}使得Q^{P}為胺基酸殘基、二肽殘基或三肽殘基；

X^{P}係：

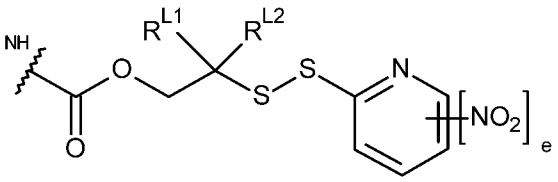


，

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

G^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；

(ib)：



Ib

，

其中R^{L1}和R^{L2}獨立地選自H和甲基，或與 它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團；並且

e係0或1。

aP可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，aP係0至3。在該等實施方式的一些中，aP係0或1。在另外的實施方式中，aP係0。

bP可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b係0至12。在該等實施方式的一些中，bP係0至8，並且可為0、2、4或8。

cP可為0或1。

dP可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，dP係0至3。在該等實施方式的一些中，dP係1或2。在另外的實施方式中，dP係2。

【0187】 在X^P的一些實施方式中，aP係0，cP係1並且dP係2，並且bP可為從0至8。在該等實施方式的一些中，bP係0、4或8。

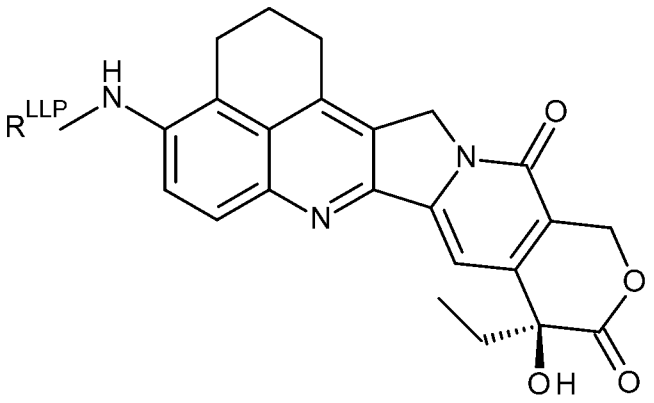
【0188】 上述對於具有式**I**之化合物的Q^X的偏好可以適用於Q^{XP}（例如，在適當的情況下）。

【0189】 上述對於具有式**I**之化合物的G^L、R^{L1}、R^{L2}和e的偏好可以適用於具有式$\mathbf{I}^P$之化合物。

【0190】 在一些實施方式中，具有式**IV**之軛合物具有式$\mathbf{IV}^P$：

$$L - (D^{LP})_p \quad (\mathbf{IV^P})$$

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中L係本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元），D^{LP}係拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物連接子單元）並且具有式III^P：

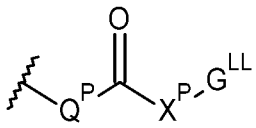


$\mathbf{III^P}$

；

R^{LLP}係連接至該抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中所述連接子選自

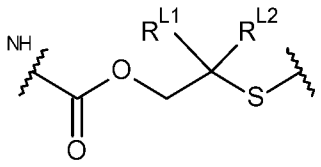
(ia')：



$\mathbf{Ia^P}$，

其中Q^P和X^P如以上所定義，並且G^{LL}係連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；以及

(ib')：



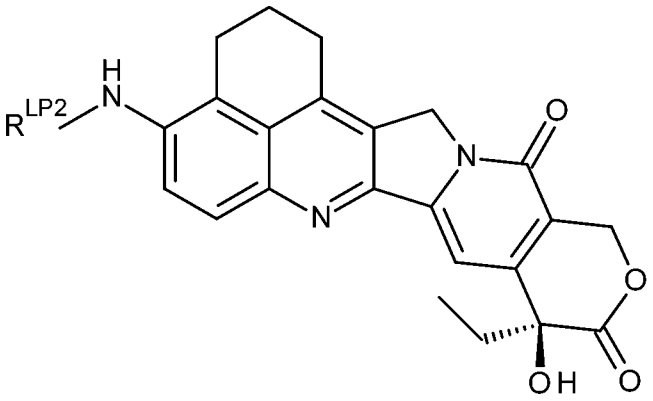
$\mathbf{Ib'}$

，

其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定義；並且

p係從1至20的整數。

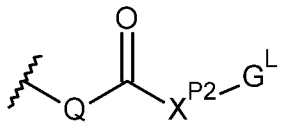
【0191】在一些實施方式中，具有式**I**之化合物具有式$\mathbf{I^{P2}}$：



I^{P2} ;

及其鹽和溶劑化物，其中R^{LP2}係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段的連接子，其中所述連接子選自：

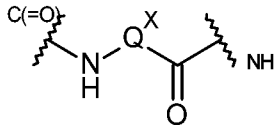
(ia)：



Ia^{P2} ，

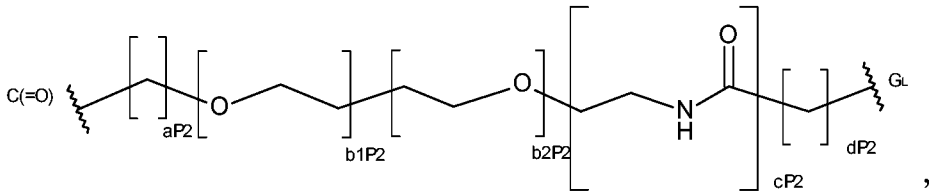
其中

Q係：



，其中Q^X使得Q為胺基酸殘基、二肽殘基、三肽殘基或四肽殘基；

X^{P2}係：

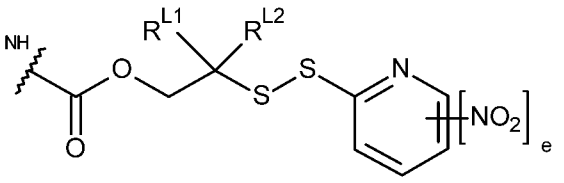


，

其中aP2 = 0至5，b1P2 = 0至16，b2P2 = 0至16，cP2 = 0或1，dP2 = 0至5，其中至少b1P2或b2P2 = 0（即b1和b2中只有一個可以不是0）；

G^L係用於連接至本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子；

(ib)：



Ib

，

其中R^{L1}和R^{L2}獨立地選自H和甲基，或與 它們所結合的碳原子一起形成環丙烯或環丁烯基團；並且

e係0或1。

【0192】 aP2可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，aP2係0至3。在該等實施方式的一些中，aP2係0或1。在另外的實施方式中，aP2係0。

【0193】 b1P2可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b1P2係0至12。在該等實施方式的一些中，b1P2係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。

【0194】 b2P2可為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。在一些實施方式中，b2P2係0至12。在該等實施方式的一些中，b2P2係0至8，並且可為0、2、3、4、5或8。

【0195】 較佳的是，b1P2和b2P2中只有一個可以不是0。

【0196】 cP2可為0或1。

【0197】 dP2可為0、1、2、3、4或5。在一些實施方式中，dP2係0至3。在該等實施方式的一些中，dP2係1或2。在另外的實施方式中，dP2係2。在另外的實施方式中，dP2係5。

【0198】 在X^{P2}的一些實施方式中，aP2係0，b1P2係0，cP2係1並且dP2係2，並且b2P2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2P2係0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些實施方式中，aP2係1，b2P2係0，cP2係0並且dP2係0，並且b1P2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b1P2係0、2、3、4、5或8。在

X^{P2}的一些實施方式中，aP2係0，b1P2係0，cP2係0並且dP2係1，並且b2P2可為從0至8。在該等實施方式的一些中，b2P2係0、2、3、4、5或8。在X^{P2}的一些實施方式中，b1P2係0，b2P2係0，cP2係0並且aP2和dP2之一係0。aP2和d中另一個係從1至5。在該等實施方式的一些中，aP2和d中另一個係1。在該等實施方式的另一些中，aP2和dP2中另一個係5。

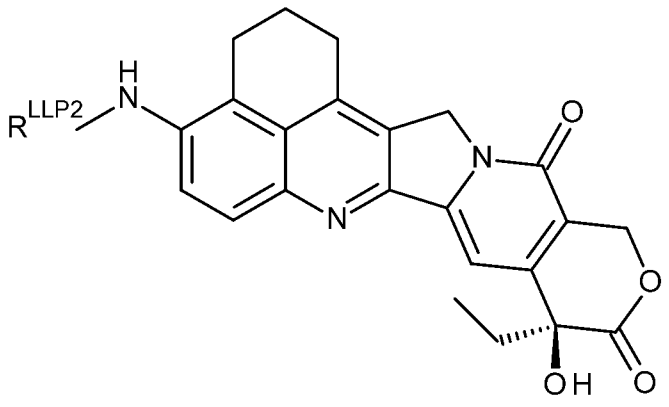
【0199】 上述對於具有式**I**之化合物的Q^X的偏好可以適用於式Ia^{P2}中的Q^X（例如，在適當的情況下）。

【0200】 上述對於具有式**I**之化合物的G^L、R^{L1}、R^{L2}和e的偏好可以適用於具有式$\mathbf{I}^{P2}$之化合物。

【0201】 在一些實施方式中，具有式**IV**之軛合物具有式$\mathbf{IV}^{P2}$：

$$L - (D^{LP2})_p(\mathbf{IV}^{P2})$$

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中L係本文所述之抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元），D^{LP2}係拓撲異構酶I抑制劑（例如，藥物連接子單元）並且具有式III^{P2}：

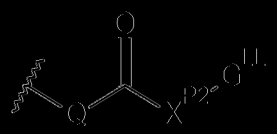


$\mathbf{III}^{P2}$

；

R^{LLP2}係連接至該抗體或其抗原結合片段（例如，配體單元）的連接子，其中所述連接子選自

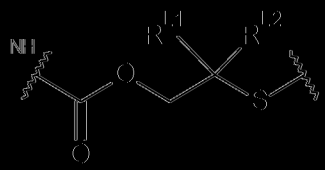
(ia')：



$Ia^{P2'}$，

其中Q和X^{P2}如以上所定義，並且G^{LL}係連接至該抗體或其抗原結合片段的連接子；以及

(ib')：

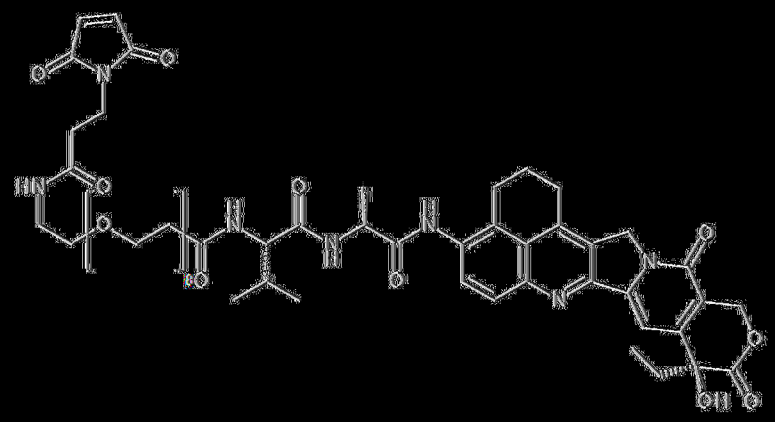


Ib'，

其中R^{L1}和R^{L2}如以上所定義；並且

p係從1至20的整數。

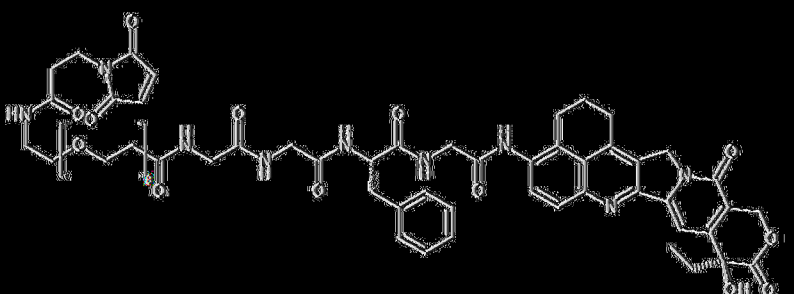
[0202] 特別合適的拓撲異構酶I抑制劑包括具有以下式的那些：



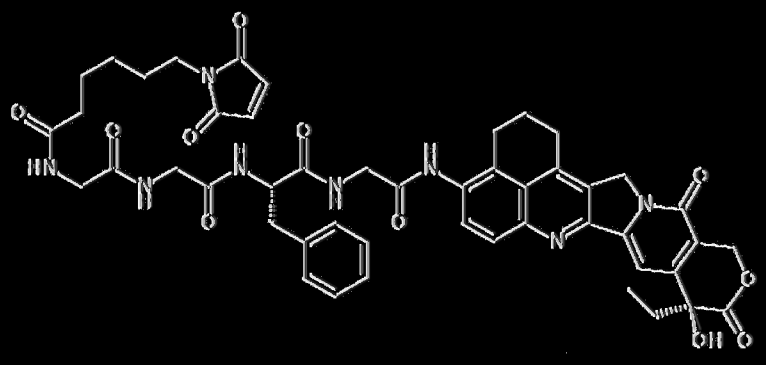
（SG3932）；



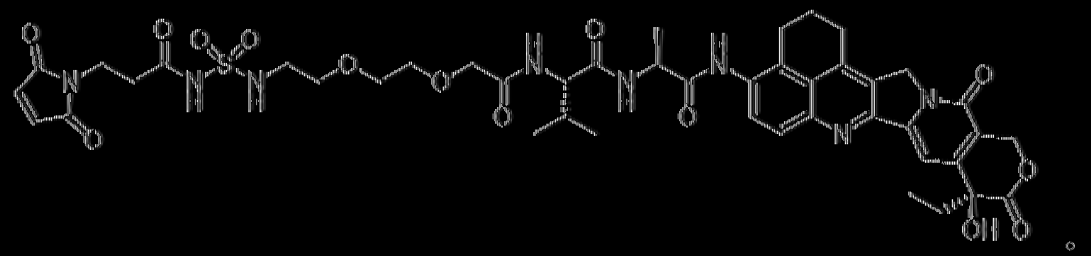
（SG4010）；



（SG4057）；

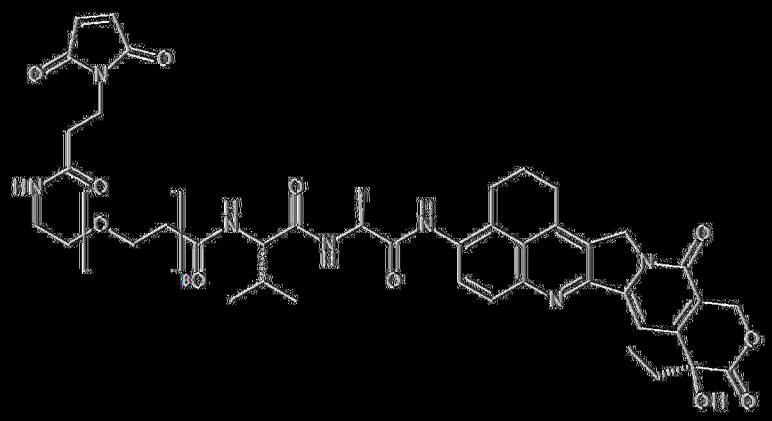


（SG4052）；和/或



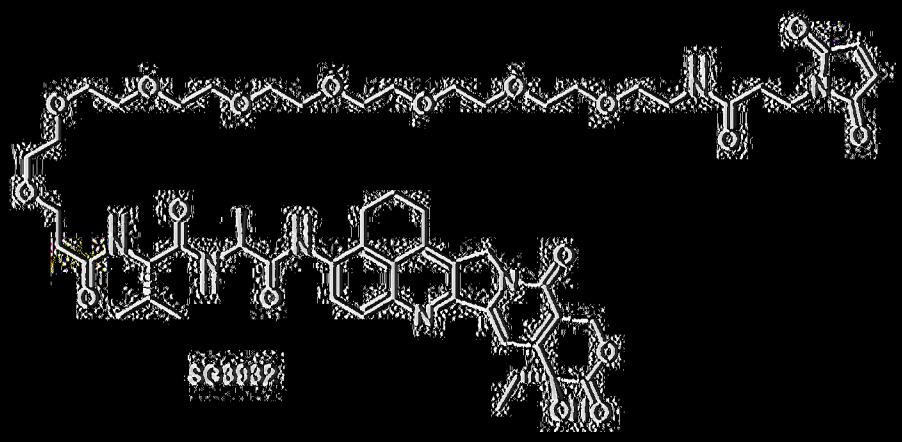
。

[0203] SG3932係特別較佳的。因此，在較佳的實施方式中，本文所述之抗體或其抗原結合片段配合至具有以下式的拓撲異構酶抑制劑（例如，SG3932）：



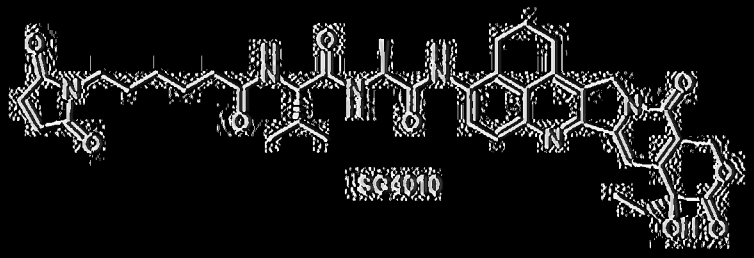
（SG3932）。

[0204] 為了避免疑問，數字「8」指定，方括號內的結構重複八次。因此，SG3932的另一種表示係：



。

[0205] SG4010的另一種表示係：



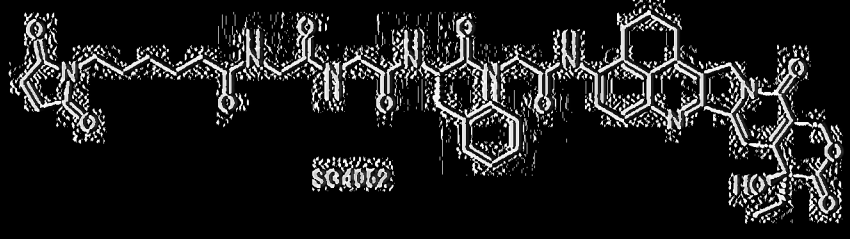
。

[0206] SG4057的另一種表示係：



。

[0207] SG4052的另一種表示係：



。

[0208] 本文所述之任何抗體或其抗原結合片段可以輒合至所述拓撲異構酶I抑制劑中的一或多種。

[0209] 在一個較佳的方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

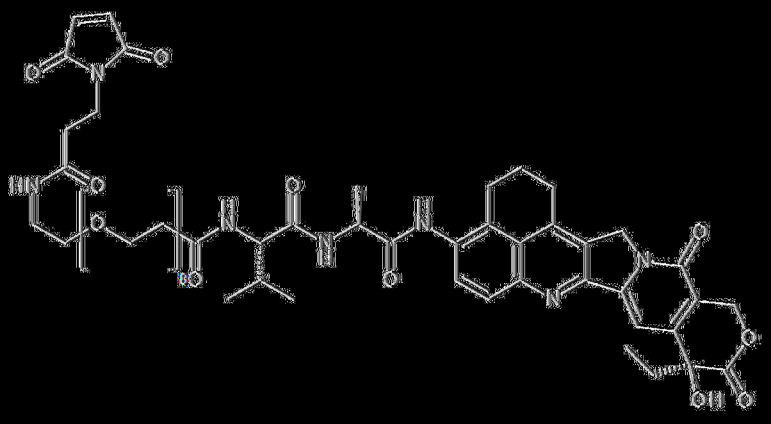
iii. 含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

vi. 含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體；

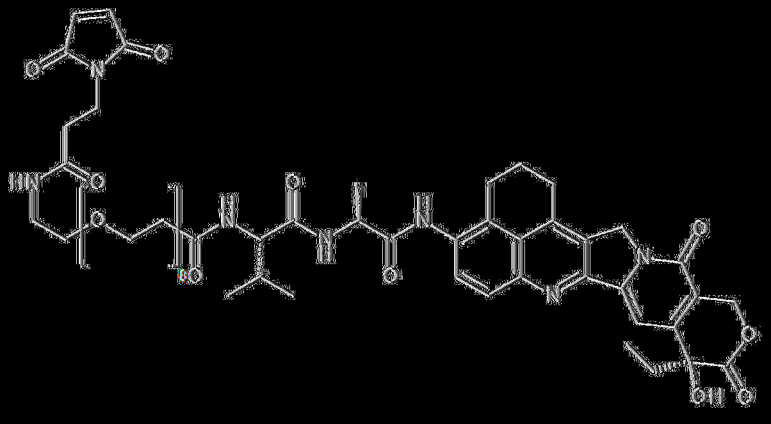
其中該抗體或其抗原結合片段綴合至SG3932：



（SG3932）。

〔0210〕另一個較佳的方面提供了抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；

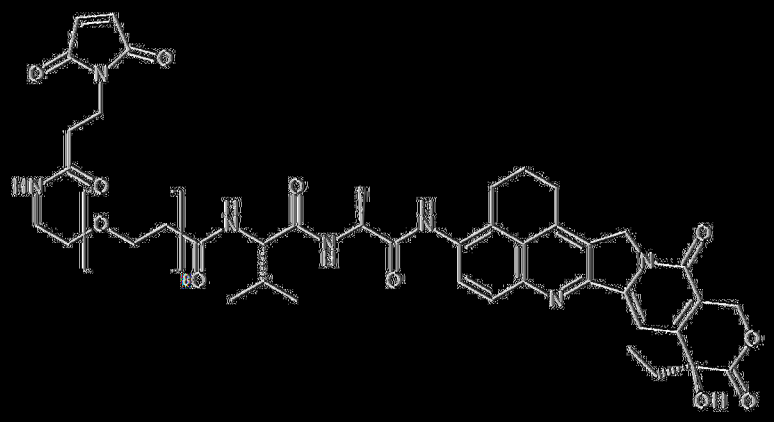
其中該抗體或其抗原結合片段綴合至SG3932：



（SG3932）。

[0211] 一個特別較佳的方面提供了抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；

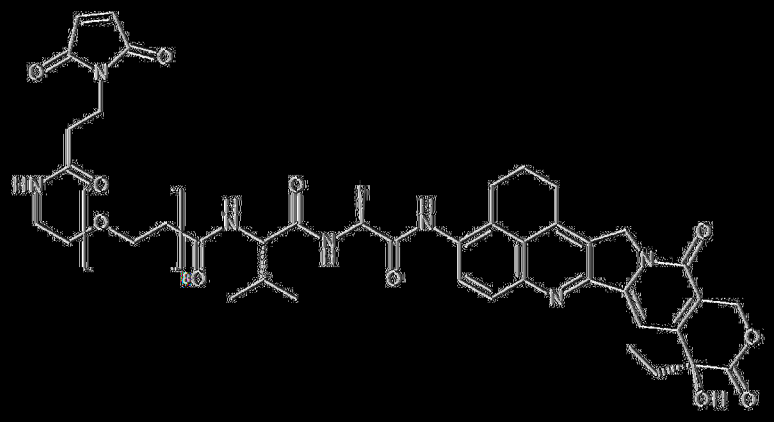
其中該抗體或其抗原結合片段軛合至SG3932：



（SG3932）。

[0212] 另一個較佳的方面提供了抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈，或其功能變體；

其中該抗體或其抗原結合片段軛合至SG3932：

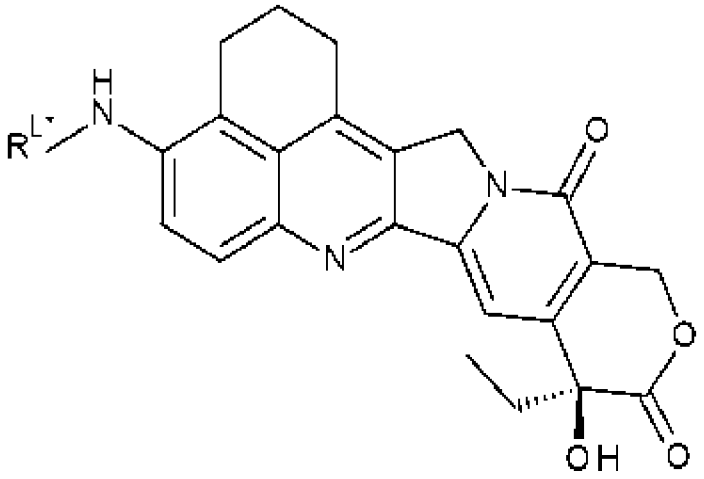


（SG3932）。

拓撲異構酶I抑制劑的合成

[0213] 為了完成，現在將描述用於製備一或多種較佳的拓撲異構酶I抑制劑的某些通用合成路線。更多詳情可以在實例部分中找到。

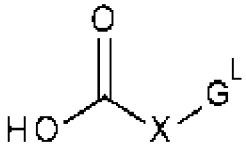
[0214] 具有式I之化合物（其中R^1具有式Ia）可以從具有式2之化合物：



式2

；

（其中R^{L*}係-QH）藉由連接具有式3之化合物：



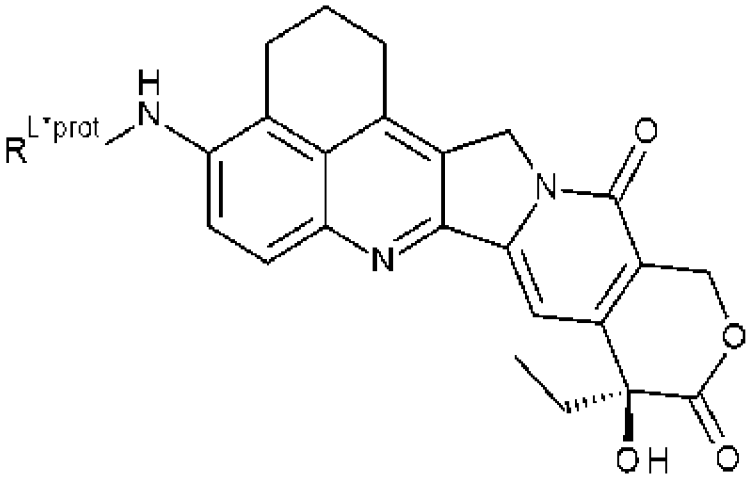
式3

，

或其活化版本來合成。

【0215】 這樣的反應可以在醯胺偶合條件下進行。

【0216】 具有式2之化合物可以藉由具有式4之化合物：

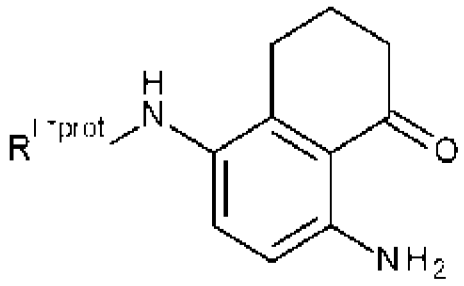


式4

；

（其中R^{L*prot}係-Q-$Prot^N$，其中$Prot^N$係胺保護基團）的去保護來合成。

【0217】 具有式4之化合物可以藉由具有式5之化合物：

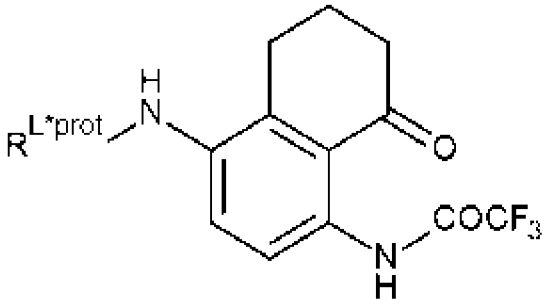


式5

;

與化合物A3的偶合，使用弗裡德蘭德反應（Friedlander reaction）來合成。

【0218】具有式5之化合物可以從具有式6之化合物：



式6

;

藉由除去三氟乙醯胺保護基團來合成。

【0219】具有式6之化合物可以藉由以下偶合來合成：R^{L*prot}-OH至化合物I7。

【0220】具有式I之化合物（其中R^L具有式Ia或Ib）可以從化合物I11藉由化合物R^L-OH或其活化形式的偶合來合成。

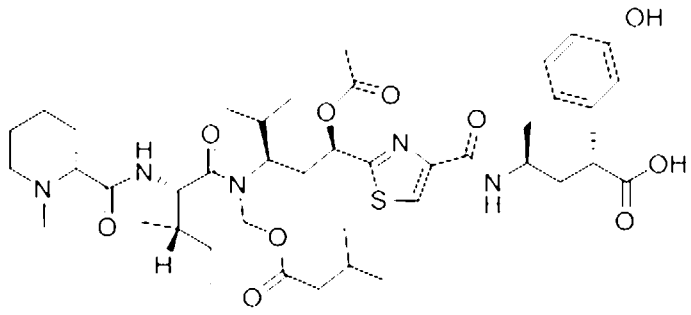
胺保護基團：

【0221】胺保護基團係熟悉該項技術者熟知的。特別參考以下文獻中的合適的保護基團的揭露內容：Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis [有機合成中的格林氏保護基團], 第四版, John Wiley & Sons [約翰威利父子公司], 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), 第696-871頁。

另外的ADC

【0222】儘管如上所述較佳的拓撲異構酶I抑制劑，但應注意任何合適的藥劑（例如，藥物/細胞毒素）可連接至本發明之抗體或其抗原結合片段。下文概述了其他合適的藥劑的實例。

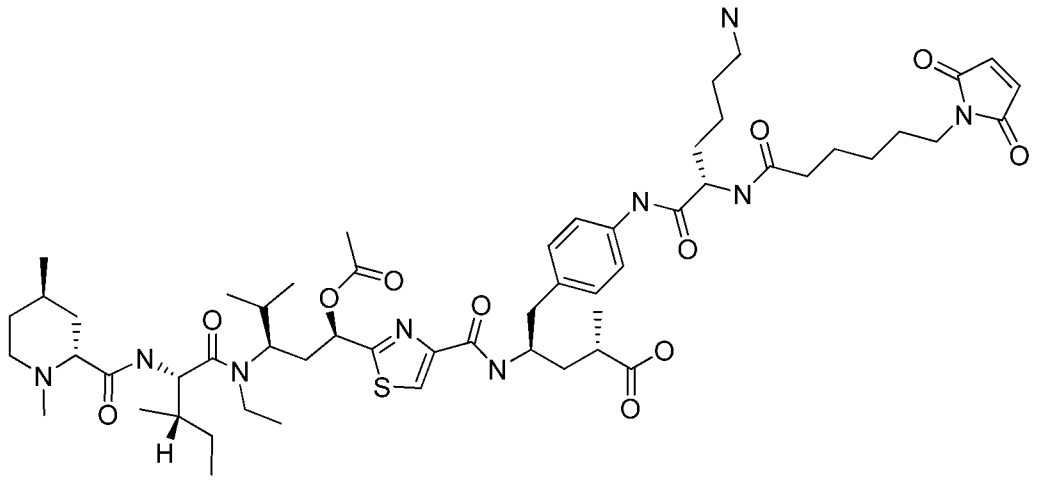
【0223】在一個實施方式中，細胞毒素係微管溶素或微管溶素衍生物。在一個實施方式中，細胞毒素係微管溶素A，其具有以下化學結構：



。

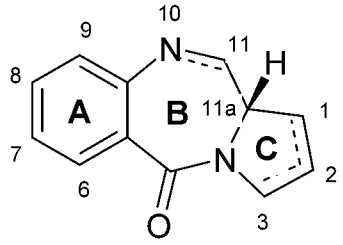
【0224】微管溶素係從黏細菌物種分離出的一類天然產物中的成員。作為細胞骨架相互作用劑，微管溶素係抑制微管蛋白聚合並導致細胞週期停滯和細胞凋亡的有絲分裂毒物。如本文所使用之，術語「微管溶素」共同地和單獨地係指天然存在的微管溶素以及微管溶素的類似物和衍生物。微管溶素的示例性實例例如揭露於WO 2004005326 A2、WO 2012019123 A1、WO 2009134279 A1、WO 2009055562 A1、WO 2004005327 A1、US 7776841、US 7754885、US 20100240701、US 7816377、US 20110021568和US 20110263650中，將其藉由引用併入本文。將理解的是，此類衍生物包括例如包含一或多個保護基團（protection/protecting group）、一或多個連接部分的微管溶素前驅藥或微管溶素。

【0225】在一個實施方式中，細胞毒素係微管溶素1508，其在本文中又稱為「AZ1508」並且更詳細地描述於WO 2015157594（將其藉由引用併入本文）中，並具有以下結構：



。

【0226】在另一個實施方式中，細胞毒素可為吡咯并苯并二氮呯（PBD）或PBD衍生物。PBD轉運至其中其交聯DNA的細胞核中，阻止有絲分裂期間的複製，藉由誘導單鏈斷裂來損壞DNA，並且隨後導致細胞凋亡。一些PBD具有識別和結合至DNA特定序列的能力；較佳的序列係PuGPu。PBD具有以下通用結構：

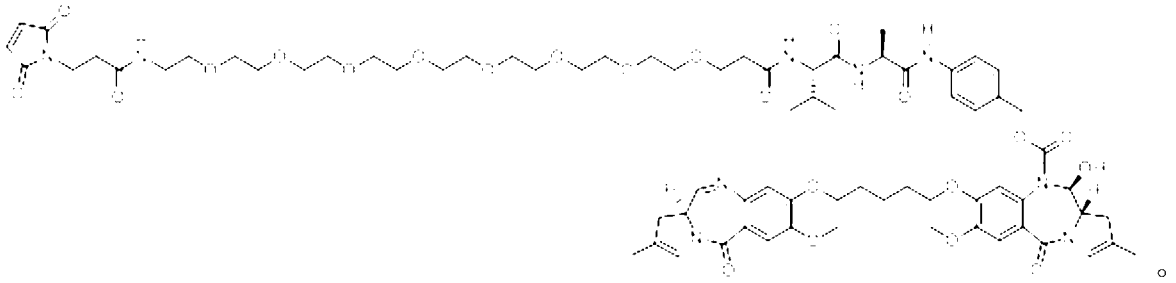


。

【0227】PBD在取代基的數目、類型和位置方面，在它們的芳香族A環和吡咯并C環二者方面，以及在C環的飽和度方面不同。在B環中，在N10-C11位置處存在亞胺（N=C）、甲醇胺（NH-CH(OH)）、或甲醇胺甲基醚（NH-CH(OMe)），其係負責使DNA烷基化的親電中心。所有已知的天然產物具有在手性C11a位置處的(S)-構型，當從C環向A環觀察時，該構型向其提供了右旋扭曲。這為它們提供了合適的三維形狀以與B型DNA的小溝具有等螺旋性（isohelicity），從而在結合位點處緊密配合。它們在小溝中形成加合物的能力使得它們能夠干擾DNA加工，因此將它們用作抗腫瘤劑。

【0228】第一種PBD抗腫瘤抗生素，即胺茴黴素（anthramycin），於1965年被發現。從那時起，已經報導了許多種天然存在的PBD，並且已經針對多種類似物開發了10多種合成路線。家族成員包括阿比黴素（abbeymycin）、奇卡黴素（chicamycin）、DC-81、甲基胺茴黴素（mazethramycin）、新胺茴黴素（neothramycin）A和B、波羅斯拉黴素（porothramycin）、prothracarcin、西班米星（sibanomicin）（DC-102）、西伯利亞黴素和托馬黴素。包含它們的PBD和ADC還被描述於WO 2015/155345和WO 2015/157592中，將其藉由引用以其全文併入本文。

【0229】在一個實施方式中，細胞毒素係PBD 3249，其在本文中又稱為「SG3249」並且更詳細地描述於WO 2014/057074（將其藉由引用併入本文）中，並具有以下結構：



【0230】因此，該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素。

【0231】例如，在一方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1，或其功能變體；

ii. 含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2，或其功能變體；

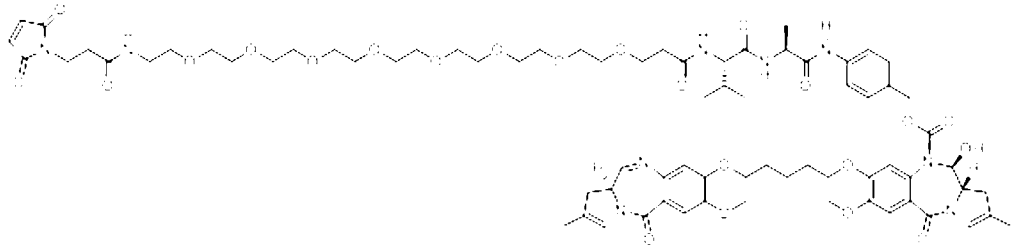
iii. 含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3，或其功能變體；

iv. 含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1，或其功能變體；

v. 含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2，或其功能變體；以及

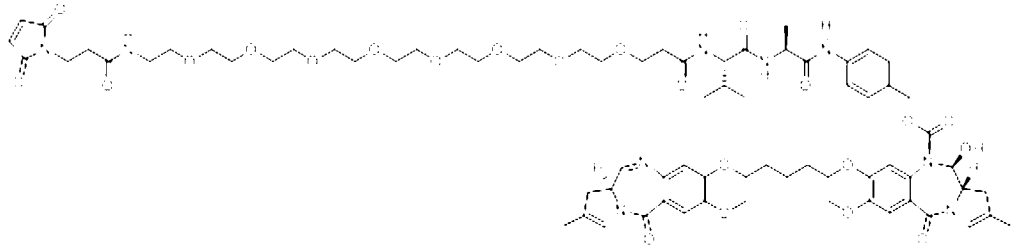
vi. 含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3，或其功能變體；

其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素：



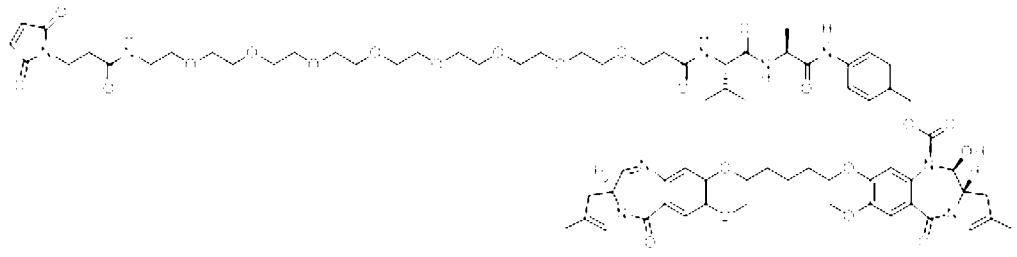
（SG3249）。

【0232】在另一方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：抗體或其抗原結合片段包含，含有SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素：



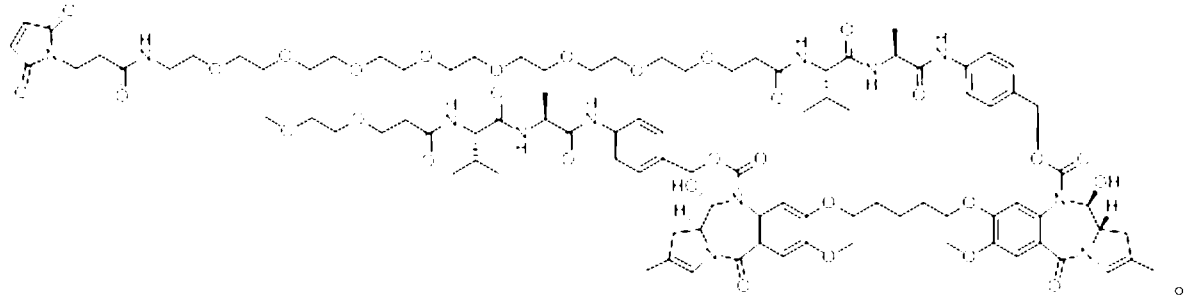
（SG3249）。

【0233】在另一方面，提供了結合至B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：抗體或其抗原結合片段包含，含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重鏈，或其功能變體；以及含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕鏈，或其功能變體；其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素：



（SG3249）。

【0234】在一個實施方式中，細胞毒素係PBD 3315，其在本文中又稱為「SG3315」並且更詳細地描述於WO 2015/052322（將其藉由引用併入本文）中，並具有以下結構：



。

【0235】該抗體或其抗原結合片段較佳的是通過半胱胺酸殘基軛合至吡咯并苯并二氮呯SG3249細胞毒素。

【0236】本發明之抗體或其抗原片段可以使用位點特異性或非位點特異性軛合方法軛合至異源藥劑（較佳的是細胞毒素）。在一個實施方式中，該等抗體及其抗原片段包含一個、兩個、三個、四個或更多個治療部分。在一個實施方式中，所有治療部分係相同的。

【0237】用於抗體或其抗原結合片段的常規的軛合策略依賴於通過離胺酸或半胱胺酸將有效載荷隨機軛合至抗體或片段。在一個實施方式中，將該抗體或其抗原結合片段隨機軛合至異源藥劑（較佳的細胞毒素），例如，藉由對該抗體或片段進行部分還原，隨後與所希望的藥劑反應，其中連接子部分被附接或不被附接。使用DTT或相似的還原劑可以還原該抗體或片段。然後可以在DMSO的存在下，將連接子部分附接或未附接的藥劑以莫耳過量添加至經還原

的抗體或片段中。軛合後，可以添加過量的游離半胱胺酸以淬滅未反應的藥劑。然後可以將反應混合物進行純化，並且緩衝液更換為PBS。

【0238】 在一個實施方式中，藥劑（例如，細胞毒素）藉由位點特異性軛合與抗體或其抗原結合片段軛合。在一個實施方式中，使用在具體位置處的反應性胺基酸殘基進行治療部分與抗體的位點特異性軛合產生了具有一致化學計量的均質ADC製劑。

【0239】 該位點特異性軛合可以通過半胱胺酸、殘基或非天然胺基酸進行。在一個較佳的實施方式中，該異源藥劑（較佳的細胞毒素）通過至少一個半胱胺酸殘基軛合至該抗體或其抗原結合片段。

【0240】 在一個實施方式中，該異源藥劑（較佳的細胞毒素）化學地軛合至胺基酸的側鏈上（較佳的在Fc區中的具體Kabat位置處）。在一個實施方式中，該藥劑（例如，細胞毒性劑或顯像劑）通過位置239、248、254、273、279、282、284、286、287、289、297、298、312、324、326、330、335、337、339、350、355、356、359、360、361、375、383、384、389、398、400、413、415、418、422、440、441、442、443和446中至少一個的半胱胺酸取代而軛合至該抗體或其抗原結合片段，其中編號對應於Kabat中的EU索引。在一個實施方式中，具體的Kabat位置係239、442、或二者。在一個實施方式中，具體的位置係Kabat位置442，Kabat位置239和240之間的胺基酸插入，或二者。在一個實施方式中，該異源藥劑（較佳的細胞毒素）通過硫醇-馬來醯亞胺鍵軛合至該抗體或其抗原結合片段。在一些方面中，該胺基酸側鏈係巰基側鏈。

【0241】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（例如，較佳的是包含VL和恒定輕鏈）以及含有SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）；其中該抗

體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素；較佳的是，其中該吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素軛合至所述重鏈的胺基酸位置240處的半胱胺酸殘基。

【0242】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（例如，較佳的是包含VL和恒定輕鏈）以及含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（例如，包含VH和恒定重鏈）；其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素。

【0243】本文提及的軛合至細胞毒素的抗體或抗原結合片段與術語「抗體藥物軛合物（ADC）」或「抗B7-H4 ADC」同義。

【0244】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段（例如，抗B7-H4 ADC）向細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）遞送細胞毒性有效載荷，並且相對於不存在該抗體或其抗原結合片段（例如，抗B7-H4 ADC）下的抑制或阻抑水平，抑制或阻抑增殖（例如，腫瘤的增殖）至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%或約100%（較佳的至少40%）。細胞增殖可以使用本領域公認的技術測定，該等技術測量細胞分裂速率、和/或經歷細胞分裂的細胞在細胞群中的分數、和/或由於終末分化或細胞死亡（例如，胸苷摻入）自細胞群的細胞損失的速率。

【0245】在一個實施方式中，本發明之抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）與細胞表面上的B7-H4結合，並被內化到細胞中。在一個實施方式中，該抗原或其抗體片段以10分鐘時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約100 ng/ml至約1 μg/ml、約100 ng/ml至約500 ng/ml、約100 ng/ml至約250 ng/ml、約250 ng/ml至約500 ng/ml、約350 ng/ml至約450

ng/ml、約500 ng/ml至約1 μg/ml、約500 ng/ml至約750 ng/ml、約750 ng/ml至約850 ng/ml、或約900 ng/ml至約1 μg/ml。

【0246】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）以30分鐘時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約100 ng/ml至約1 μg/ml、約100 ng/ml至約500 ng/ml、約100 ng/ml至約250 ng/ml、約250 ng/ml至約500 ng/ml、約250 ng/ml至約350 ng/ml、約350 ng/ml至約450 ng/ml、約500 ng/ml至約1 μg/ml、約500 ng/ml至約750 ng/ml、約750 ng/ml至約850 ng/ml、或約900 ng/ml至約1 μg/ml。

【0247】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）以120分鐘時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約50 ng/ml至約500 ng/ml、約50 ng/ml至約100 ng/ml、約100 ng/ml至約200 ng/ml、約200 ng/ml至約300 ng/ml、約300 ng/ml至約400 ng/ml、或約400 ng/ml至約500 ng/ml。

【0248】 在一些實施方式中，該抗體或其抗原片段（例如，抗B7-H4 ADC）以8小時時的以下IC50被內化到細胞（較佳的是表現B7-H4的細胞）中：約5 ng/ml至約250 ng/ml、約10 ng/ml至約25 ng/ml、約25 ng/ml至約50 ng/ml、約50 ng/ml至約100 ng/ml、約100 ng/ml至約150 ng/ml、約150 ng/ml至約200 ng/ml、或約200 ng/ml至約250 ng/ml。

【0249】 為避免疑義，本文提及的「軛合物」意指與異源藥劑（包括上述的任何此類藥劑，較佳的是細胞毒素）軛合的抗體或抗原結合片段。

【0250】 除了上述本發明之抗體或抗原結合片段的治療性應用之外，本發明之「軛合物」還可用於治療方法中。因此，還提供了治療方法，該治療方法包括向需要治療的受試者投與治療有效量的本文所述之軛合物（例如，具有式IV之軛合物）。術語「治療有效量」係足夠向患者顯示益處的量。這種益處

可為至少減輕至少一種症狀。投與的實際量以及投與的速率和時程將取決於正治療的疾病的性質和嚴重程度。治療處方（例如劑量的確定）屬於全科醫生和其他醫生的職責。

【0251】 取決於待治療的病症，軛合物可單獨或與其他治療組合，同時或順序地投與。治療和療法之實例包括但不限於化學療法（包括例如藥物的活性劑的投與）；手術；和放射療法。

【0252】 根據本發明並且用於根據本發明使用的藥物組成物除了活性成分（即本發明之軛合物/ADC（例如，式IV））以外，還可以包含藥學上可接受的賦形劑、載體、緩衝液、穩定劑或熟悉該項技術者熟知的其他材料。該等材料應無毒並且不應干擾活性成分的功效。載體或其他材料的確切性質將取決於投與途徑，該投與途徑可為口服、或藉由注射，例如皮膚、皮下或靜脈內注射。

【0253】 用於口服投與的藥物組成物可為片劑、膠囊、粉末或液體形式。片劑可包含固體載體或輔助劑。液體藥物組成物通常包含液體載體，如水、石油、動物油或植物油、礦物油或合成油。可包括生理鹽水溶液、右旋糖或其他糖類溶液或二醇，如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。膠囊可包含固體載體，例如明膠。

【0254】 對於靜脈內、皮膚或皮下注射，或病痛部位的注射，活性成分將處於腸胃外可接受的水性溶液形式，該水性溶液為無熱原的並且具有合適pH、等滲性以及穩定性。熟悉該項技術者完全能夠使用例如等滲媒介物，如氯化鈉注射液、林格氏注射液、乳酸鹽林格氏注射液來製備合適溶液。需要時，可以包括防腐劑、穩定劑、緩衝液、抗氧化劑和/或其他添加劑。

【0255】 較佳的是，軛合物可用於治療增殖性疾病。術語「增殖性疾病」涉及過量或異常細胞的不想要的或不受控制的細胞增殖，無論是體外還是

體內，其均為不希望的，例如贅生性或增生性生長。術語「增殖性疾病」可替代地稱為「癌症」。

【0256】 合適的增殖性疾病（例如癌症）將較佳的是被表徵為表現B7-H4的癌細胞的存在。

【0257】 增殖性病症之實例包括但不限於良性、癌前和惡性細胞增殖，包括但不限於贅生物和腫瘤（例如組織細胞瘤、神經膠質瘤、星形細胞瘤、骨瘤）、癌症（例如肺癌、小細胞肺癌、胃腸癌、腸癌、大腸癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、睪丸癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、胰臟癌、腦癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤、黑色素瘤）、白血病、牛皮癬、骨骼疾病、纖維增殖性障礙（例如結締組織的障礙）和動脈粥樣硬化。其他所關注的癌症包括但不限於血液惡性腫瘤，如白血病和淋巴瘤，如非何杰金氏淋巴瘤及亞型（如DLBCL、緣帶淋巴瘤、套區淋巴瘤和濾泡淋巴瘤）、何杰金氏淋巴瘤、AML以及其他B或T細胞來源的癌症。可以治療任何類型的細胞，該等細胞包括但不限於肺、胃腸道（例如包括腸、結腸）、乳腺（breast或mammary）、卵巢、前列腺、肝（liver或hepatic）、腎（kidney或renal）、膀胱、胰腺、腦和皮膚細胞。

【0258】 可以標記該抗體-藥物軛合物，例如以幫助檢測細胞結合（體外或體內）。該標記可為生物素標記。在另一個實施方式中，該標記可為放射性同位素。

【0259】 在另一方面，提供了多核苷酸，該多核苷酸包含編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸序列。

【0260】 在一個實施方式中，該多核苷酸可為分離的多核苷酸。

【0261】 本發明之一或多個序列（例如一或多個多核苷酸序列）包括已經從其天然存在的環境中取出的序列、重組或選殖的（例如DNA）分離物、以及化學合成的類似物或藉由異源系統生物合成的類似物。

【0262】本發明之一或多個序列（例如一或多個多核苷酸序列）可以藉由本領域已知的任何方式製備。例如，可以藉由在合適的宿主細胞中複製和/或表現來產生大量的該一或多個序列。編碼所需片段的天然或合成的DNA片段通常會摻入重組核酸構建體中，該等重組核酸構建體通常是DNA構建體並且能夠引入原核或真核細胞並在其中複製。通常，DNA構建體將適於在單細胞宿主（如酵母或細菌）中自主複製，但也可用於引入到培養的細菌、昆蟲、哺乳動物、植物或其他真核細胞系的基因組中並在該基因組中整合。

【0263】本發明之一或多個序列（例如一或多個多核苷酸序列）還可以藉由化學合成產生（例如藉由亞磷醯胺法或三酯法合成多核苷酸），並且可以在商業自動化寡核苷酸合成儀上進行。雙鏈（例如DNA）片段可以從化學合成的單鏈產物中獲得，該化學合成是藉由合成互補鏈並在適當條件下使鏈退火在一起或者藉由使用具有適當引物序列的DNA聚合酶添加互補鏈而進行的。

【0264】當應用於本發明之序列（例如多核苷酸序列）時，術語「分離的」較佳的表示該序列已從其天然遺傳環境中取出，因此不含其他外來或不需要的編碼序列（但可以包括天然存在的5'和3'非翻譯區，如啟動子和終止子），並且其形式適合在基因工程蛋白質生產系統中使用。此類分離的分子係那些從其自然環境中分離的分子。

【0265】本文提供的另一方面是包含多核苷酸的宿主細胞，所述多核苷酸包含編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸序列。

【0266】在一個實施方式中，多核苷酸編碼抗體或其抗原結合片段的VH鏈。在一個實施方式中，本發明之多核苷酸可以編碼抗體或其抗原結合片段的VL鏈。在一個實施方式中，多核苷酸可編碼抗體或其抗原結合片段的VH和VL鏈。在一個實施方式中，多核苷酸可以進一步編碼前導序列（例如，其用作控制多肽從細胞的轉運的分泌序列）。

【0267】在另一方面，提供了包含本發明之多核苷酸的載體（例如質體）。

【0268】本發明包括上述多核苷酸的變體。多核苷酸變體可以在編碼區、非編碼區或兩者中含有改變。在一個實施方式中，多核苷酸變體包含產生緘默取代、添加、或缺失而不改變所編碼的多肽的性質或活性的改變。在一個實施方式中，多核苷酸變體由歸因於遺傳密碼的簡並性的緘默取代產生。多核苷酸變體可以因為各種原因而產生，例如，為了優化特定宿主的密碼子表現（將人mRNA中的密碼子改變成細菌宿主如大腸桿菌較佳的那些密碼子）。還提供了包含所述多核苷酸變體的載體和細胞。

【0269】本發明包括用於產生結合B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段的方法，該等方法包括在宿主細胞中表現多核苷酸，所述多核苷酸包含編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的核酸序列。

【0270】本發明進一步包括可藉由所述用於產生結合B7-H4多肽（例如，B7-H4多肽表位）的抗體或其抗原結合片段的方法獲得的抗體或其抗原結合片段。

【0271】在一個較佳的實施方式中，用於產生抗體或其抗原結合片段的方法包括 (a) 培養宿主細胞和 (b) 從該細胞中分離所表現的抗體或其抗原結合片段。

【0272】用於表現本發明之抗體或其抗原結合片段的合適宿主細胞包括原核細胞、酵母細胞、昆蟲細胞或高等真核細胞（較佳的其中多核苷酸處於合適啟動子的控制之下）。原核細胞包括革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如大腸桿菌或桿菌。高等真核細胞包括如本文所述之哺乳動物來源的已建立的細胞系。還可以採用無細胞翻譯系統。

【0273】在一方面，提供了包含本文所述之抗原或抗體結合片段的套組（kit）。進一步包括所述套組在本發明之方法中之用途。

【0274】在一個實施方式中，套組包含本發明之分離的（例如純化的）抗原或抗體結合片段。在一個實施方式中，套組包含本發明之分離的（例如純化的）抗原或抗體結合片段，其中該抗原或抗體結合片段包含本文所述之藥劑（例如軛合的細胞毒素）。在一個實施方式中，該套組包含一或多個容器。該套組可單獨提供抗原或抗體結合片段以及藥劑（例如，該試劑未與抗原或抗體結合片段軛合，而是處於適合與其軛合的形式）；視需要，其中該套組進一步提供了用於將該藥劑與該抗原或抗體結合片段軛合的說明書和/或試劑。在一個實施方式中，該套組包含進行檢測測定的必要和/或足夠的所有元件，該等元件包括所有對照、用於進行測定的指導、以及用於分析和呈現結果的任何必要的軟體。

【0275】本發明之抗體或其抗原結合片段可用於藉由本領域已知的任何方法進行的免疫特異性結合的測定中。可使用的免疫測定包括但不限於使用如以下技術的競爭性和非競爭性測定系統：蛋白質印跡、RIA、ELISA、ELISPOT、「夾心」免疫測定、免疫沈澱測定、沈澱素反應、凝膠擴散沈澱素反應、免疫擴散測定、凝集測定、補體固定測定、免疫放射測定、螢光免疫測定、以及蛋白質A免疫測定。

【0276】可以在組織學上使用本發明之抗體或其抗原結合片段，如在免疫螢光法、免疫電子顯微術、或非免疫學測定中，例如用於原位檢測B7-H4或其保守變體或肽片段。原位檢測可藉由以下來實現：從患者取出組織學樣本並對其施加經標記的本發明之抗體或其抗原結合片段，例如，藉由使經標記的抗體或其抗原結合片段覆蓋在生物樣本而施加。通過使用這一程序，不僅可確定B7-H4或保守變體或肽片段的存在，還可確定其在檢查的組織中的分佈。使用

本發明，普通技術者將容易地知道，可修改多種組織學方法（如染色程序）中的任一種以實現這種原位檢測。

抗體

【0277】術語「抗體」涵蓋單株抗體及其片段（例如表現出所需的生物活性的片段）。在一個較佳的實施方式中，本發明之抗體係單株抗體。在一個更較佳的實施方式中，該抗體係完全人單株抗體。在一個實施方式中，本發明之方法可以使用多株抗體。

【0278】特別地，抗體係包含至少一個或兩個重（H）鏈可變區（本文縮寫為VHC）以及至少一個或兩個輕（L）鏈可變區（本文縮寫為VLC）的蛋白質。VHC和VLC區可以進一步細分為被稱為「互補決定區」（「CDR」）的高變區，其間插有被稱為「框架區」（FR）的更保守的區域。框架區和CDR的範圍已經被精確確定（參見，Kabat, E. A.等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質序列], 第5版, U.S. Department of Health and Human Services [美國衛生與公眾服務部], NIH公開案號91-3242, 1991，以及Chothia, C等人, J. MoI.Biol.[分子生物學雜誌] 196:901-917, 1987）。較佳的是，每個VHC和VLC由三個CDR和四個FR構成，從胺基末端到羧基末端按照以下順序排列：FRl、CDRl、FR2、DR2、FR3、CDR3、FR4。抗體的VHC或VLC鏈可以進一步包含所有的或部分的重鏈或輕鏈恒定區。在一個實施方式中，抗體係兩個重免疫球蛋白鏈和兩個輕免疫球蛋白鏈的四聚體，其中重和輕免疫球蛋白鏈由例如二硫鍵相互連接。重鏈恒定區包括三個結構域，即CH1、CH2和CH3。輕鏈恒定區由一個結構域CL構成。重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原相互作用的結合結構域。術語「抗體」包括類型IgA、IgG、IgE、IgD、IgM（及其亞型）的完整免疫球蛋白，其中免疫球蛋白的輕鏈可為κ或λ類型。如本文所使用之，術語抗體還指與上述標記物之一結合的抗體的一部分，

例如，其中一或多個免疫球蛋白鏈不是全長但與標記物結合的分子。涵蓋在術語抗體中的「結合部分」之實例包括 (i) Fab片段：由VLC、VHC、CL和CH1結構域組成的單價片段；(ii) F(ab')2片段：包含兩個在絞鏈區由二硫橋連接的Fab片段的二價片段；(iii) 由VHC和CH1結構域組成的Fc片段；(iv) 由抗體單臂的VLC和VHC結構域組成的Fv片段；(v) 由VHC結構域組成的dAb片段（Ward等人, Nature [自然] 341:544-546, 1989）；以及 (vi) 具有足以發生結合的框架的分離的互補決定區（CDR），例如，可變區的抗原結合部分。輕鏈可變區的抗原結合部分和重鏈可變區的抗原結合部分（例如Fv片段的兩個域VLC和VHC）可以使用重組方法藉由合成連接子連接，該合成連接子允許它們成為單個蛋白鏈，其中VLC和VHC區配對形成單價分子（稱為單鏈Fv（scFv）；參見例如，Bird等人 (1988) Science [科學] lAl-ATi-Alβ；以及Huston等人 (1988) Proc. Proc. Natl. Acad. ScL USA [美國國家科學院院刊] 85:5879-5883）。此類單鏈抗體也涵蓋在術語抗體內。該等部分可使用熟悉該項技術者已知的常規技術獲得，並且以與完整抗體相同的方式針對實用性來篩選該等部分。

【0279】 在一個實施方式中，該抗體或抗原結合片段係選自以下中的一或多種：鼠抗體、人源化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多株抗體、重組抗體、多特異性抗體、或其組合。

【0280】 在一個實施方式中，該抗原結合片段係選自以下中的一或多種：Fv片段、Fab片段、F(ab')2片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段、sc(Fv)2片段、或其組合。

【0281】 在一個較佳的實施方式中，該抗體或其抗原結合片段係單株抗體（mAb）。

【0282】 在一個實施方式中，本發明之抗體或其抗原結合片段（例如mAb）係scFV。

【0283】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以跨物種結合B7-H4分子，例如，該抗體或片段可以結合小鼠B7-H4、大鼠B7-H4、兔、人B7-H4和/或食蟹猴B7-H4。在一個實施方式中，該抗體或片段可以結合人B7-H4和食蟹猴B7-H4。在一個實施方式中，該抗體或抗原結合片段還可以結合小鼠B7-H4。

【0284】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以特異性結合B7-H4，例如人B7-H4和食蟹猴B7-H4，但不特異性結合人B7-H1、B7-H2和/或B7-H3。

【0285】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段除了VH和VL之外還可以包含重鏈恒定區或其片段。在一個實施方式中，該重鏈恒定區係人重鏈恒定區，例如人IgG恒定區，例如人IgG1恒定區。在一個實施方式（特別是在該抗體或其抗原結合片段軛合至藥劑（如細胞毒性劑）的情況下）中，將半胱胺酸殘基插入到IgG1的CH2區中的胺基酸S239和V240之間。該半胱胺酸被稱為「239插入」或「239i」。

【0286】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。較佳的是，該抗體或其抗原結合片段可以包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

【0287】在一個實施方式中，重鏈恒定區或其片段（例如，人IgG恒定區或其片段）可相對於野生型IgG恒定結構域包括一或多個胺基酸取代，其中與具有野生型IgG恒定結構域的IgG的半衰期相比，該經修飾的IgG具有增加的半衰期。例如，IgG恒定結構域可以含有在位置251-257、285-290、308-314、385-389、和428-436處的胺基酸殘基的一或多個胺基酸取代，其中根據如Kabat中所闡明的EU索引進行胺基酸位置編號。在一個實施方式中，IgG恒定結構域可以含有以下中的一或多個取代：Kabat位置252處的胺基酸被酪胺酸（Y）、苯丙

胺酸（F）、色胺酸（W）、或蘇胺酸（T）取代，Kabat位置254處的胺基酸被蘇胺酸（T）取代，Kabat位置256處的胺基酸被絲胺酸（S）、精胺酸（R）、麩醯胺酸（Q）、麩胺酸（E）、天冬胺酸（D）、或蘇胺酸（T）取代，Kabat位置257處的胺基酸被白胺酸（L）取代，Kabat位置309處的胺基酸被脯胺酸（P）取代，Kabat位置311處的胺基酸被絲胺酸（S）取代，Kabat位置428處的胺基酸被蘇胺酸（T）、白胺酸（L）、苯丙胺酸（F）、或絲胺酸（S）取代，Kabat位置433處的胺基酸被精胺酸（R）、絲胺酸（S）、異白胺酸（I）、脯胺酸（P）、或麩醯胺酸（Q）取代，或Kabat位置434處的胺基酸被色胺酸（W）、甲硫胺酸（M）、絲胺酸（S）、組胺酸（H）、苯丙胺酸（F）、或酪胺酸取代。在一個較佳的實施方式中，IgG恒定結構域可相對於野生型人IgG恒定結構域含有胺基酸取代，包括Kabat位置252處的胺基酸被酪胺酸（Y）取代、Kabat位置254處的胺基酸被蘇胺酸（T）取代、以及Kabat位置256處的胺基酸被麩胺酸（E）取代。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含重鏈，其中該重鏈係人IgG1 YTE突變體。

【0288】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段除了VH和VL以外，還可以視需要包含重鏈恒定區或其片段、輕鏈恒定區或其片段。在一個實施方式中，該輕鏈恒定區係κ λ輕鏈恒定區，例如，人κ恒定區或人λ恒定區。

【0289】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

【0290】在一個實施方式中，VH和/或VL胺基酸序列可以與本文所述之序列具有85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的相似性。在一個實施方式中，VH和/或VL胺基酸序列可相對於本文所述之序列包含1、2、3、4、5或更多個取代，例如保守取代。含有與VH區或VL區具有一定百分比相似性或具有一或多個取代（例如，保守取代）的VH和VL區的B7-H4抗體可以藉由編碼

本文所述之VH和/或VL區的核酸分子的誘變（例如，定點誘變或PCR介導的誘變）獲得，隨後測試所編碼的改變的抗體對B7-H4的結合，並且視需要使用本文所述之功能測定測試保留的功能。

【0291】 抗體或其抗原結合片段對抗原的親和力或親合力可以使用本領域熟知的任何合適的方法（例如，流動式細胞分析術、酶聯免疫吸附測定（ELISA）、或放射免疫測定（RIA）、或動力學（例如KINEXA®或BIACORE™分析））經實驗確定。可以容易地採用直接結合測定以及競爭性結合測定形式。（參見例如, Berzofsky等人, Antibody-Antigen Interactions [抗體-抗原相互作用], 於Fundamental Immunology [基礎免疫學], Paul, W. E., 編輯, Raven Press [雷文出版社]: 紐約, 紐約州(1984)；Kuby, Immunology [免疫學], W. H. Freeman和Company出版商: 紐約, 紐約州(1992)；以及本文所述之方法。） 如果在不同條件（例如，鹽濃度、pH、溫度）下測量，特定抗體-抗原相互作用的所測量的親和力可以變化。因此，用如本領域中已知的抗體和抗原的標準化溶液和標準化緩衝液進行親和力和其他抗原結合參數（例如，KD或Kd、Kon、Koff）的測量。

【0292】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段能以以下IC50結合表現B7-H4的細胞：低於約500 nM、低於約350 nM、低於約250 nM、低於約150 nM、低於約100 nM、低於約75 nM、低於約60 nM、低於約50 nM、低於約40 nM、低於約30 nM、低於約20 nM、低於約15 nM、低於約10 nM、低於約5 nM、低於約1 nM、低於約500 pM、低於約350 pM、低於約250 pM、低於約150 pM、低於約100 pM、低於約75 pM、低於約60 pM、低於約50 pM、低於約40 pM、低於約30 pM、低於約20 pM、低於約15 pM、低於約10 pM、或低於約5 pM。較佳的是，藉由流動式細胞分析術測量所述IC50。

【0293】「單株抗體」（mAb）係指涉及單一表位或表位的高度特異性識別和結合的同源抗體群。這與典型地包括針對不同表位的不同抗體的多株抗體相反。術語「單株抗體」涵蓋完整和全長單株抗體以及抗體片段（如Fab、Fab'、F(ab')2、Fv）、單鏈（scFv）突變體、包含抗體部分的融合蛋白和包含抗原識別位點的任何其他修飾的免疫球蛋白分子。此外，「單株抗體」係指以任何數目的方式製備的此類抗體，該等方式包括但不限於融合瘤、噬菌體選擇、重組表現、和轉基因動物。

【0294】在一個較佳的實施方式中，本發明之抗體或其抗原結合片段（例如mAb）係人源化抗體或其抗原結合片段。合適地，所述人源化抗體或其抗原結合片段係IgG。

【0295】術語「人源化抗體」係指源自非人（例如鼠）免疫球蛋白的抗體，其被工程化成含有最小的非人（例如鼠）序列。典型地，人源化抗體係人免疫球蛋白，其中來自互補決定區（CDR）的殘基被來自非人物種（例如，小鼠、大鼠、兔子或倉鼠）的CDR的具有所希望特異性、親和性和能力的殘基替換（Jone等人, 1986, Nature [自然], 321:522-525；Riechmann等人, 1988, Nature [自然], 332:323-327；Verhoeyen等人, 1988, Science [科學], 239:1534-1536）。在一些情況下，人免疫球蛋白的Fv框架區（FW）殘基被來自非人物種的具有所希望特異性、親和性和能力的抗體中的相應殘基替換。

【0296】人源化抗體可以藉由在Fv框架區和/或替換的非人殘基內的另外殘基的取代來進一步修飾，以改善和優化抗體特異性、親和力和/或能力。通常，人源化抗體將包含基本上所有至少一個（並且通常係兩個或三個）可變結構域，該可變結構域含有對應於非人免疫球蛋白的所有或基本上所有CDR區，而所有或基本上所有FR區係人免疫球蛋白一致序列的FR區。人源化抗體還可以包含免疫球蛋白恒定區或結構域（Fc）的至少一部分，通常係人免疫球蛋白

的恒定區或結構域的至少一部分。用於產生人源化抗體的方法的實例描述於美國專利案號5,225,539或5,639,641中。

【0297】 抗體的「可變區」係指單獨的抗體輕鏈的可變區或抗體重鏈的可變區或它們的組合。重鏈和輕鏈的該等可變區各自由藉由三個互補決定區（CDR）（也稱為高變區）連接的四個框架區（FW）組成。每條鏈中的CDR由FW區緊密靠近地保持在一起，並且與來自另一條鏈的CDR促成了抗體的抗原結合位點的形成。存在至少兩種用於確定CDR的技術：(1) 基於種間序列變異性的方法（即，Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質序列]（第5版, 1991, National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 貝塞斯達（Bethesda）, 馬里蘭州（Md））；和 (2) 基於抗原-抗體複合物的晶體學研究的方法（Al-lazikani等人 (1997) J. Molec.Biol.[分子生物學雜誌] 273:927-948）。此外，本領域有時使用這兩種方法之組合來確定CDR。

【0298】 當提及可變結構域中的殘基（大約輕鏈的殘基1-107和重鏈的殘基1-113）時，通常使用「Kabat編號系統」（例如，Kabat等人, Sequences of Immunological Interest [免疫學感興趣的序列], 第5版, Public Health Service [美國公共衛生服務部], National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 貝塞斯達, 馬里蘭州 (1991)）。

【0299】 在Kabat中的胺基酸位置編號係指在Kabat等人, Sequences of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白質序列], 第5版 Public Health Service [美國公共衛生服務部], National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 貝塞斯達, 馬里蘭州 (1991) 中用於彙編抗體的重鏈可變結構域或輕鏈可變結構域的編號系統。使用這個編號系統，實際的線性胺基酸序列可以含有更少或另外的胺基酸，其對應於可變結構域的FW或CDR的截短或插入。例如，重鏈可變結構域可以包括在H2的殘基52之後的單個胺基酸插入（根據Kabat的殘基52a）以

及在重鏈FW殘基82之後的插入的殘基（例如，根據Kabat的殘基82a、82b和82c等）。

【0300】 可以藉由在抗體序列與「標準」Kabat編號序列的同源性區域進行比對來確定給定抗體的殘基的Kabat編號。而Chothia係指結構環的位置（Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 196:901-917 (1987)）。Chothia CDR-H1環的末端在利用Kabat編號慣例編號時在H32與H34之間變化，這取決於環的長度（這是因為Kabat編號方案將插入放在H35A和H35B；如果35A和35B都不存在，那麼環端點在32；如果只存在35A，那麼環端點在33；如果35A和35B都存在，那麼環端點在34）。AbM高變區表示Kabat CDR和Chothia結構環之間的折衷，並且被Oxford Molecular的AbM抗體建模軟體使用。下表列出了構成每個系統中的抗體可變區的胺基酸的位置。

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

[1]Kabat編號

[2]Chothia編號

【0301】 免疫遺傳學（IMGT）還提供了一種用於免疫球蛋白可變區（包括CDR）的編號系統。參見例如，Lefranc, M.P.等人, Dev. Comp.Immunol.[發育與比較免疫學] 27: 55-77(2003)。IMGT編號系統係基於高變環的多於5,000個序列的比對、結構數據和表徵，並且允許容易地比較所有物種的可變區和CDR區。根據IMGT編號方案，VH-CDR1處於位置26至35，VH-CDR2處於位置51至

57，VH-CDR3處於位置93至102，VL-CDR1處於位置27至32，VL-CDR2處於位置50至52，並且VL-CDR3處於位置89至97。

【0302】 如貫穿本說明書使用的，所述之VH CDR序列對應於經典的Kabat編號位置，即Kabat VH-CDR1在位置31-35處，VH-CDR2在位置50-65處，並且VH-CDR3在位置95-102處。VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3也對應於經典的Kabat編號位置，即分別對應於位置24-34、50-56和89-97。

【0303】 在一個實施方式中，本發明之抗體係人抗體。

【0304】 術語「人抗體」意指在人體中產生的抗體或具有與使用本領域已知的任何技術製備的在人體中產生的抗體對應之胺基酸序列的抗體。人抗體的這種定義包括完整或全長抗體、其片段、和/或包含至少一個人重鏈和/或輕鏈多肽的抗體，例如像包含鼠輕鏈和人重鏈多肽的抗體。

【0305】 在一個實施方式中，本發明之抗體係嵌合抗體。

【0306】 術語「嵌合抗體」係指其中免疫球蛋白分子的胺基酸序列衍生自兩種或更多種物種的抗體。典型地，輕鏈和重鏈的可變區與源自具有所需特異性、親和力和能力的一種哺乳動物（例如小鼠、大鼠、兔等）的抗體的可變區對應，而恒定區與衍生自另一種哺乳動物（通常為人）的抗體中的序列同源以避免在該物種中引起免疫反應。

【0307】 術語「YTE」或「YTE突變體」係指IgG1 Fc中的突變，其導致與人FcRn的結合增加並且提高了具有該突變的抗體的血清半衰期。YTE突變體包含引入IgG1的重鏈中的三個突變M252Y/S254T/T256E之組合（EU編號，Kabat等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest [免疫學感興趣的蛋白序列], U.S. Public Health Service [美國公共衛生服務部], National Institutes of Health [美國國立衛生研究院], 華盛頓, 哥倫比亞特區（D.C.））。參見美國專利案號7,658,921，將其藉由引用併入本文。與相同抗體的野生型相比，YTE

突變體顯示出增加了抗體的血清半衰期大約四倍（Dall'Acqua等人, J. Biol. Chem.[生物化學雜誌] 281:23514-24 (2006); Robbie等人, (2013) Antimicrob.Agents Chemother.[抗微生物藥劑與化學療法]57, 6147-6153）。還參見美國專利案號7,083,784，將其藉由引用以其全文特此併入。

【0308】「結合親和力」通常係指分子（例如抗體）的單個結合位點與其結合配偶體（例如抗原）之間的非共價相互作用的總和的強度。除非另有說明，如本文所使用之，「結合親和力」係指反映結合對（例如，抗體和抗原）的成員之間的1：1相互作用的固有結合親和力。分子X對其配偶體Y的親和力通常可以用解離常數（KD）表示。親和力可以藉由本領域已知的通常方法測量，包括本文所述之那些方法。低親和力抗體通常緩慢地結合抗原並且傾向於容易解離，而高親和力抗體通常更快地結合抗原並且傾向於保持更長時間的結合。測量結合親和力的多種方法係本領域中已知的，其中的任何方法均可以用於本發明之目的。

【0309】除非另有說明，否則抗體或其抗原結合片段的效力通常表示為以ng/ml計的IC50值。IC50是抗體分子的半數抑制濃度。在功能測定中，IC50是將生物響應降低其最大值的50%的濃度。在配體結合研究中，IC50係減少受體結合達最大特異性結合水平的50%的濃度。IC50可以藉由本領域已知的任何數目的方法來計算。

【0310】與參考抗體相比，本發明之抗體或其抗原結合片段的效力的改進倍數可為至少約2倍、至少約4倍、至少約6倍、至少約8倍、至少約10倍、至少約20倍、至少約30倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍、或至少約180倍或更多。

【0311】 除非另有說明，抗體的結合效力通常表示為以nM或pM計的EC50值。EC50是在具體暴露時間後誘導基線和最大值之間的中值響應的藥物濃度。EC50可以藉由本領域已知的任何數目的方法來計算。

抗體製備

【0312】 本發明之抗體可以使用熟悉該項技術者已知的常規技術獲得，並且它們的效用藉由常規結合研究來證實—示例性方法描述於實例2中。舉例來說，簡單的結合測定是用抗體孵育表現抗原的細胞。如果將抗體用螢光團標記，則可以藉由FACS分析來檢測抗體與抗原的結合。

【0313】 本發明之抗體可以在多種動物中產生，包括小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊、猴或馬。可以在用單個莢膜多糖或用多種莢膜多糖進行免疫後產生抗體。從該等動物中分離出的血液含有多株抗體—與同一抗原結合的多種抗體。也可以將抗原注射到雞中以在蛋黃中產生多株抗體。為了獲得對抗原的單個表位具有特異性的單株抗體，從動物中分離出分泌抗體的淋巴細胞，並藉由將它們與癌細胞系融合而使其永生化。融合的細胞被稱為融合瘤，並且在培養中會不斷生長並分泌抗體。藉由稀釋選殖法分離單個融合瘤細胞以生成均產生同一抗體的細胞選殖；該等抗體被稱為單株抗體。用於生產單株抗體的方法係熟悉該項技術者已知的常規技術（參見例如，Making and Using Antibodies: A Practical Handbook.[製備和使用抗體：實用手冊] GC Howard. CRC Books. 2006. ISBN 0849335280）。通常使用蛋白A/G或抗原親和層析法純化多選殖和單株抗體。

【0314】 本發明之抗體或其抗原結合片段可製備為單選殖抗B7-H4抗體，其可使用融合瘤方法製備，如Kohler和Milstein, Nature [自然] 256:495 (1975)描述的那些方法。使用融合瘤方法，如上所述對小鼠、倉鼠、或其他適當的宿主動物進行免疫，以引發淋巴細胞產生會特異性地結合免疫抗原的抗體。淋巴細

胞也可以在體外被免疫。免疫後，分離淋巴細胞，並利用例如聚乙二醇與合適骨髓瘤細胞系融合，以形成可隨後從未融合的淋巴細胞和骨髓瘤細胞選擇出的融合瘤細胞。然後可以在體外培養物中使用標準方法（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice [單株抗體：原理和實踐], Academic Press [學術出版社], 1986）或在體內作為動物的腹水腫瘤繁殖融合瘤，該等融合瘤產生特異性針對選定的抗原的單株抗體，如藉由免疫沈澱法、免疫印跡法、或體外結合測定（例如，放射免疫測定（RIA）或酶聯免疫吸附測定（ELISA））所測定的。然後可以使用已知的方法從培養基或腹水中純化單株抗體。

【0315】 可替代地，該抗體或其抗原結合片段（例如，單株抗體）還可以使用如在美國專利案號4,816,567中所述之重組DNA方法製備。從成熟B細胞或融合瘤細胞、例如藉由使用寡核苷酸引物（其特異性擴增編碼抗體的重鏈和輕鏈的基因）的RT-PCR分離編碼單株抗體的多核苷酸，並且使用常規程序測定它們的序列。然後將編碼重鏈和輕鏈的分離的多核苷酸選殖到合適的表現載體中，該等表現載體在轉染到不產生免疫球蛋白的宿主細胞（如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢（CHO）細胞、或骨髓瘤細胞）中時，由該等宿主細胞生產單株抗體。此外，所希望物種的重組單株抗體或其抗原結合片段可從表現所希望物種的CDR的噬菌體展示文庫中分離，如以下文獻所述：McCafferty等人, Nature [自然] 348:552-554 (1990)；Clackson等人, Nature [自然], 352:624-628 (1991)；和Marks等人, J. Mol. Biol [分子生物學雜誌] 222:581-597 (1991)。

【0316】 編碼本發明之抗體或其抗原結合片段的一或多種多核苷酸可進一步使用重組DNA技術以多種不同的方式被修飾以產生替代性抗體。在一些實施方式中，例如，小鼠單株抗體的輕鏈和重鏈的恒定結構域可以被 (1) 例如人抗體的那些區域取代以產生嵌合抗體，或被 (2) 非免疫球蛋白多肽取代以產生

融合抗體。在一些實施方式中，截短或去除該等恒定區以產生所希望的單株抗體的抗體片段。定點誘變或高密度誘變可變區可以用於優化單株抗體的特異性、親和力等。

【0317】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段係人抗體或其抗原結合片段。可以使用本領域已知的不同技術來直接製備人抗體。可以產生在體外免疫的或從產生針對靶抗原的抗體的免疫個體分離的永生化人B淋巴細胞。參見例如，Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy [單株抗體和癌症治療], Alan R. Liss, 第77頁 (1985)；Boemer等人, J. Immunol. [免疫學雜誌] 147 (1):86-95 (1991)；美國專利5,750,373。

【0318】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可選自噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表現人抗體，如以下文獻所述：例如，Vaughan等人, Nat. Biotech. [自然生物技術] 14:309-314 (1996)；Sheets等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊], 95:6157-6162 (1998)；Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol. [分子生物學雜誌] 227:381 (1991)；以及Marks等人, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 222:581 (1991)。用於產生和使用抗體噬菌體文庫的技術還描述於美國專利案號5,969,108、6,172,197、5,885,793、6,521,404、6,544,731、6,555,313、6,582,915、6,593,081、6,300,064、6,653,068、6,706,484和7,264,963；以及Rothe等人, J. Molec. Biol. [分子生物學雜誌] 376:1182-1200 (2008)中，將該等專利各自藉由引用以其全文併入。

【0319】 親和力成熟策略和鏈改群組原則係本領域已知的，並且可用於產生高親和力人抗體或其抗原結合片段。參見Marks等人, BioTechnology [生物技術] 10:779-783 (1992)，將其藉由引用以其全文併入。

【0320】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段（例如，單株抗體）可為人源化抗體。用於工程化、人源化或表面重修非人抗體或人抗體的方

法也可以使用並且係本領域熟知的。人源化、表面重修或類似工程化的抗體可以具有來自非人來源的一或多個胺基酸殘基，該來源例如但不限於小鼠、大鼠、兔、非人靈長類動物或其他哺乳動物。該等非人胺基酸殘基被通常稱為「輸入」殘基的殘基替換，該等殘基典型地取自已知人序列的「輸入」可變結構域、恒定結構域或其他結構域。此類輸入序列可以用於降低免疫性或減小、增強或改變結合、親和力、結合速率、解離速率、親合力、特異性、半衰期、或如本領域已知的任何其他合適的特徵。合適地，CDR殘基可直接且最實質性地參與影響B7-H4結合。因此，較佳的是保持部分或全部非人或人CDR序列，同時可變區和恒定區的非人序列可以被人胺基酸或其他胺基酸替換。

【0321】 抗體還可以視需要被人源化、表面重修、工程化或人抗體工程化，其中保留針對抗原B7-H4的高親和力以及其他有利生物性質。為實現這個目標，人源化（或人）或工程化的抗B7-H4抗體以及表面重修的抗體可視需要藉由使用親本、工程化和人源化序列的三維模型分析親本序列和各種概念性人源化和工程化產物的方法來製備。三維免疫球蛋白模型通常是可獲得的並且對於熟悉該項技術者而言係熟悉的。說明並展示所選定的候選免疫球蛋白序列的可能三維構象結構的電腦程序係可獲得的。檢查該等展示允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列功能中的可能作用，即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原如B7-H4的能力的殘基。按照此方式，可以從一致序列和輸入的序列中選擇並且組合FW殘基，這樣使得所希望的抗體特徵（如增加對一或多種靶抗原的親和力）得以實現。

【0322】 本發明之抗B7-H4抗體或其抗原結合片段的人源化、表面重修或工程化可使用任何已知方法進行，例如但不限於描述於以下文獻中的那些：Jones等人, Nature [自然] 321:522 (1986)；Riechmann等人, Nature [自然] 332:323 (1988)；Verhoeyen等人, Science [科學] 239:1534 (1988)；Sims等人, J.

Immunol.[免疫學雜誌] 151: 2296 (1993)；Chothia和Lesk, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 196:901 (1987)；Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 89:4285 (1992)；Presta 等人, J. Immunol.[免疫學雜誌] 151:2623 (1993)；美國專利案號5,639,641、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567、7,557,189、7,538,195和7,342,110；國際申請案號PCT/US98/16280、PCT/US96/18978、PCT/US91/09630、PCT/US91/05939、PCT/US94/01234、PCT/GB89/01334、PCT/GB91/01134、PCT/GB92/01755；國際專利申請公開案號WO 90/14443、WO 90/14424、WO 90/14430；以及歐洲專利公開案號EP 229246；將其各自藉由引用全部併入本文，包括其中引用的參考文獻。

【0323】 抗B7-H4人源化抗體及其抗原結合片段還可以在含有人免疫球蛋白基因座的轉基因小鼠中製備，該等基因座在免疫時能夠在內源性免疫球蛋白不存在的情況下產生全套人抗體。這種方法描述於美國專利案號5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、以及5,661,016中。

【0324】 在一個實施方式中，提供了抗體（例如抗B7-H4抗體）的片段（例如抗體片段）。已知各種用於生產抗體片段的技術。傳統上，該等片段藉由完整抗體的蛋白水解衍生，例如由Morimoto等人, J. Biochem. Biophys. Meth. [生物化學和生物物理方法雜誌] 24:107-117 (1993)以及Brennan等人, Science [科學] 229:81 (1985)所描述的。在一個實施方式中，重組產生抗B7-H4抗體片段。所有Fab、Fv和scFv抗體片段都可以在大腸桿菌或其他宿主細胞中表現並且從其分泌，因而允許產生大量的該等片段。此類抗B7-H4抗體片段也可以從以上論述的抗體噬菌體文庫分離。該等抗B7-H4抗體片段還可為如美國專利案號

5,641,870中所述之線性抗體。用於產生抗體片段的其他技術對於熟練的從業人員將是清楚的。

【0325】 根據本發明，技術可經改編以產生對B7-H4具有特異性的單鏈抗體。參見例如，美國專利案號4,946,778。此外，方法可經改編以構建Fab表現文庫，以允許快速且有效地鑒定針對B7-H4或其衍生物、片段、類似物或同源物具有所希望特異性的單選殖Fab片段。參見例如，Huse等人, Science [科學] 246:1275-1281 (1989)。抗體片段可藉由本領域已知的技術來產生，包括但不限於：由胃蛋白酶消化抗體分子產生的F(ab')2片段；藉由還原F(ab')2片段的二硫鍵產生的Fab片段；藉由用木瓜酶和還原劑處理抗體分子產生的Fab片段；或Fv片段。

【0326】 在一個實施方式中，可以對本發明之抗體或其抗原結合片段進行修飾以增加其血清半衰期。這可以例如藉由將補救受體結合表位摻入抗體或抗體片段中，藉由使抗體或抗體片段中的適當的區域突變，或藉由將表位併入隨後融合在抗體或抗體片段的末端或中部的肽標籤（例如，藉由DNA或肽合成），或藉由YTE突變來實現。本領域中已知其他增加抗體或其抗原結合片段的血清半衰期的方法，例如，軛合至異源分子如PEG。

【0327】 如本文所提供的經修飾的抗體或其抗原結合片段可以包含任何類型的提供該抗體或多肽與B7-H4的締合的可變區。在這點上，可變區可構成或衍生自可誘導增加體液響應並生成針對所希望抗原的免疫球蛋白的任何類型的哺乳動物。正因如此，抗B7-H4抗體或其抗原結合片段的可變區可為例如人、鼠、非人靈長類動物（例如，食蟹猴、獼猴等）或狼（lupine）來源的。在一個實施方式中，經修飾的抗體或其抗原結合片段的可變區和恒定區均是人的。在一個實施方式中，相容性抗體的可變區（通常衍生自非人來源）可經工

程化或專門定制來改進結合性質或減少分子的免疫性。在這點上，在本發明中有用的可變區可經人源化或另外通過納入輸入的胺基酸序列改變。

【0328】 在一個實施方式中，抗體或其抗原結合片段的重鏈和輕鏈二者中的可變結構域藉由至少部分替換一或多個CDR和/或藉由部分框架區替換和序列改變而被改變。雖然CDR可以衍生自與框架區所衍生自的抗體相同的類別或甚至子類別的抗體，但是設想CDR將衍生自不同類別的抗體並且在某些實施方式中衍生自不同物種的抗體。不必用來自供體可變區的完整CDR來替換所有CDR以將一個可變域的抗原結合能力轉移至另一個。而是，只需要轉移維持抗原結合位點的活性所必需的那些殘基。考慮到在美國專利案號5,585,089、5,693,761、和5,693,762中所闡明的解釋，熟悉該項技術者完全有能力通過進行常規實驗獲得具有減少的免疫性的功能抗體。

【0329】 儘管對可變區進行改變，熟悉該項技術者將理解，本發明之經修飾的抗體或其抗原結合片段將包含抗體（例如，全長抗體或其抗原結合片段），其中至少一或多個恒定區結構域的一部分已被缺失或以其他方式改變，以便提供所希望的生物化學特徵，如當與包含天然或未改變的恒定區的具有大約相同免疫性的抗體相比時增加的腫瘤定位或減少的血清半衰期。在一個實施方式中，經修飾的抗體的恒定區將包含人恒定區。對與本發明相容的恒定區的修飾包括在一或多個結構域中的一或多個胺基酸的添加、缺失或取代。即，本文揭露的經修飾的抗體可包含對三個重鏈恒定結構域（CH1、CH2或CH3）中的一或多個和/或對輕鏈恒定結構域（CL）的改變或修飾。在一個實施方式中，考慮了經修飾的恒定區，其中一或多個結構域部分或全部缺失。在一個實施方式中，經修飾的抗體將包含結構域缺失的構建體或變體，其中整個CH2結構域被去除（ΔCH2構建體）。在一個實施方式中，省略的恒定區結構域可被

短胺基酸間隔子（例如，10個殘基）替換，該間隔子提供通常由不存在的恒定區所賦予的一定分子柔性。

【0330】除它們的構型以外，本領域中已知恒定區介導幾種效應子功能。例如，抗體經由Fc區結合至細胞，其中抗體Fc區上的Fc受體位點結合至細胞上的Fc受體（FcR）。存在許多對於不同類別的抗體具有特異性的Fc受體，包括IgG（γ受體）、IgE（η受體）、IgA（α受體）、以及IgM（μ受體）。抗體與細胞表面上的Fc受體的結合觸發許多重要並且多樣的生物響應，包括抗體包覆的顆粒的吞噬和破環、免疫複合物的清除、殺滅細胞溶解抗體包覆的靶細胞（稱為抗體依賴性細胞介導的細胞毒性，或ADCC）、炎症介體的釋放、胎盤轉移、以及對免疫球蛋白產生的控制。

【0331】在一個實施方式中，抗體或其抗原結合片段提供改變的效應子功能，進而影響投與的抗體或其抗原結合片段的生物學特性。例如，恒定區結構域的缺失或失活（經由點突變或其他手段）可以減少循環的經修飾的抗體的Fc受體結合。在其他情況下，與本發明一致的，恒定區修飾可以緩和補體結合並且因而減少軛合的細胞毒素的血清半衰期和非特異性締合。恒定區的又其他修飾可以用於消除二硫鍵或寡糖部分，從而允許由於抗原特異性或抗體靈活性增加而增強定位。類似地，根據本發明對恒定區的修飾可容易地使用技術者認知範圍內的熟知的生物化學或分子工程技術進行。

【0332】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不具有一種或更多種效應子功能。例如，在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不具有抗體依賴性細胞毒性（ADCC）活性和/或不具有補體依賴性細胞毒性（CDC）活性。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不結合Fc受體和/或補體因子。在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段不具有效應子功能。

【0333】在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以被工程化以將CH3結構域直接融合到相應的經修飾的抗體或其片段的鉸鏈區。在其他構建體中，可以將肽間隔子插在鉸鏈區與經修飾的CH2和/或CH3結構域之間。例如，可表現相容性構建體，其中CH2結構域已經缺失，且剩餘的CH3結構域（經修飾的或未修飾的）與具有5-20個胺基酸的間隔子的鉸鏈區結合。可添加此間隔子，例如以確保恒定結構域的調節元件保持游離且可接觸，或者鉸鏈區保持柔性。在一些情況中，胺基酸間隔子可被證明具有免疫性，並引發針對構建體的非所需免疫反應。在一個實施方式中，添加至構建體的任何間隔子都可為相對無免疫性的，或甚至被完全省略，以便維持經修飾的抗體的所希望的生物化學性質。

【0334】除了缺失整個恒定區結構域之外，本文提供的抗體或其抗原結合片段可藉由恒定區中的幾個或甚至單個胺基酸的部分缺失或取代來修飾。例如，CH2結構域中的選定區域中的單個胺基酸的突變可足以實質性地減少Fc結合，並且從而增加腫瘤定位。類似地，控制效應子功能（例如，補體C1Q結合）的一或多個恒定區結構域可以完全或部分缺失。恒定區的這類部分缺失可以改進該抗體或其抗原結合片段的選定特徵（例如，血清半衰期），同時使與受試者恒定區結構域相關的其他所希望的功能保持完整。此外，該抗體及其抗原結合片段的恒定區可通過增強所得構建體特性的一或多個胺基酸的突變或取代來修飾。在這個方面，可以干擾保守結合位點所提供的活性（例如，Fc結合），同時基本上維持經修飾的抗體或其抗原結合片段的構型和免疫性特性。在一個實施方式中，可以向恒定區添加一或多個胺基酸以增強期望特徵，如減少或增加效應子功能，或提供更多細胞毒素或碳水化合物附接。在一個實施方式中，可以希望插入或複製衍生自選定的恒定區結構域的特定序列。

【0335】 本發明進一步包括與本發明之抗體或抗原結合片段（例如，鼠、嵌合、人源化或人抗體或其抗原結合片段）基本同源的變體和等效物。該等可以含有例如保守取代突變，即藉由相似的胺基酸取代一或多個胺基酸。例如，保守取代係指用相同通用類別內的另一個胺基酸取代一個胺基酸，例如像，用另一個酸性胺基酸取代一個酸性胺基酸、用另一個鹼性胺基酸取代一個鹼性胺基酸或用另一個中性胺基酸取代一個中性胺基酸。保守胺基酸取代所指的內容在本領域係熟知的。

【0336】 在一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段可以被進一步修飾為含有通常不是蛋白質的一部分的另外的化學部分。那些衍生的部分可以改進蛋白質的溶解性、生物半衰期、或吸收。該等部分還可以減少或消除蛋白質的任何所希望的副作用等。對那些部分的綜述可以在Remington's Pharmaceutical Sciences [雷明頓藥物科學], 第22版, Lloyd V. Allen, Jr.編輯, (2012)中發現。

定義

【0337】 以下定義特別涉及對以上拓撲異構酶I抑制劑的描述，並且甚至可能更特別地涉及標題為「進一步的偏好」的部分。

【0338】 C_{5-6}伸芳基： 如本文所使用之，術語「C_{5-6}伸芳基」涉及藉由從芳香族化合物的芳香族環原子上除去兩個氫原子而獲得的二價部分。

【0339】 在本文中，前綴（例如C_{5-6}）表示環原子的數量或環原子數量的範圍，無論是碳原子還是雜原子。

【0340】 環原子可以均為碳原子，如「碳伸芳基基團」中那樣，在這種情況下，該基團係伸苯基（C_6）。

【0341】 可替代地，環原子可以包括一或多個雜原子，如「雜伸芳基基團」中那樣。雜伸芳基基團之實例包括但不限於衍生自如下的那些：

N_1：吡咯（氮雜茂（azole））（C_5）、吡啶（吖啡（azine））（C_6）；

O_1：呋喃（氧雜環戊二烯（oxole））（C_5）；

S_1：噻吩（硫雜環戊二烯（thiole））（C_5）；

N_1O_1：噁唑（C_5）、異噁唑（C_5）、異噁啡（isoxazine）（C_6）；

N_2O_1：噁二唑（呋咱（furazan））（C_5）；

N_3O_1：噁三唑（C_5）；

N_1S_1：噻唑（C_5）、異噻唑（C_5）；

N_2：咪唑（1,3-二唑）（C_5）、吡唑（1,2-二唑）（C_5）、嗒啡（1,2-二啡）（C_6）、嘧啶（1,3-二啡）（C_6）（例如胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶）、吡啡（1,4-二啡）（C_6）；以及

N_3：三唑（C_5），三啡（C_6）。

【0342】C_{1-4}烷基： 如本文所使用之，術語「C_{1-4}烷基」涉及藉由從具有從1至4個碳原子的碳氫化合物的碳原子上除去氫原子而獲得的單價部分，該碳氫化合物可為脂肪族或脂環族，並且可為飽和或不飽和的（例如部分不飽和、完全不飽和）。如本文所使用之，術語「C_{1-n}烷基」涉及藉由從具有從1至n個碳原子的碳氫化合物的碳原子上除去氫原子而獲得的單價部分，該碳氫化合物可為脂肪族或脂環族，並且可為飽和或不飽和的（例如部分不飽和、完全不飽和）。因此，術語「烷基」包括以下論述的亞類：烯基、炔基、環烷基等。

【0343】飽和烷基基團之實例包括但不限於甲基（C_1）、乙基（C_2）、丙基（C_3）和丁基（C_4）。

【0344】飽和直鏈烷基基團之實例包括但不限於甲基（C_1）、乙基（C_2）、正丙基（C_3）和正丁基（C_4）。

【0345】飽和支鏈烷基基團之實例包括異丙基（C_3）、異丁基（C_4）、二級丁基（C_4）和三級丁基（C_4）。

【0346】C_{2-4}烯基；如本文所使用之，術語「C_{2-4}烯基」涉及具有一或多個碳-碳雙鍵的烷基基團。

【0347】不飽和烯基基團之實例包括但不限於乙烯基（ethenyl、vinyl）（-CH=CH_2）、1-丙烯基（-CH=CH-CH_3）、2-丙烯基（烯丙基，-CH-CH=CH_2）、異丙烯基（1-甲基乙烯基，-C(CH_3)=CH_2）和丁烯基（C_4）。

【0348】C_{2-4}炔基： 如本文所使用之，術語「C_{2-4}炔基」涉及具有一或多個碳-碳三鍵的烷基基團。

【0349】不飽和炔基基團之實例包括但不限於乙炔基（-C≡CH）和2-丙炔基（炔丙基，-CH_2-C≡CH）。

【0350】C_{3-4}環烷基： 如本文所使用之，術語「C_{3-4}環烷基」涉及也是一個環基基團的烷基基團；即，藉由從環狀碳氫（碳環）化合物的脂環族環原子上除去氫原子而獲得的一價部分，該部分具有從3至7個碳原子，包括從3至7個環原子。

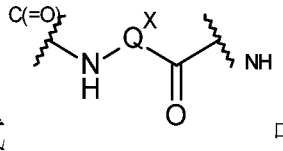
【0351】環烷基基團之實例包括但不限於衍生自如下的那些：

飽和單環碳氫化合物：

環丙烷（C_3）和環丁烷（C_4）；以及

不飽和單環碳氫化合物：

環丙烯（C_3）和環丁烯（C_4）。

【0352】連接標籤： 在式  中，上標C(=O)和NH表示原子所鍵合的基團。例如，NH基團顯示與羰基（其不是所示部分的一部分）結合，並且羰基顯示與NH基團（其不是所示部分的一部分）結合。

鹽

【0353】 可以方便地或令人希望地製備、純化、和/或處理活性化合物/藥劑的對應的鹽，例如藥學上可接受的鹽。藥學上可接受的鹽的實例在Berge等人, *J. Pharm. Sci.*[藥物科學雜誌], **66**, 1-19 (1977)中論述。

【0354】 例如，如果化合物係陰離子的、或具有可為陰離子的官能基（例如，-COOH可為-COO^-），則可以與適當的陽離子形成鹽。合適的無機陽離子之實例包括但不限於鹼金屬離子如Na^+和K^+、鹼土金屬陽離子如Ca^{2+}和Mg^{2+}、以及其他陽離子如Al^{+3}。合適的有機陽離子之實例包括但不限於銨離子（即NH_4^+）和經取代的銨離子（例如NH_3R^+、$NH_2R_2^+$、NHR_3^+、NR_4^+）。一些合適的經取代的銨離子的實例係衍生自如下的那些：乙胺、二乙胺、二環己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌啉、苄胺、苯基苄胺、膽鹼、葡甲胺和胺丁三醇、以及胺基酸（如離胺酸和精胺酸）。常見的四級銨離子的實例係$N(CH_3)_4^+$。

【0355】 如果化合物係陽離子的、或具有可為陽離子的官能基（例如，-NH_2可為-NH_3^+），則可以與適當的陰離子形成鹽。合適的無機陰離子之實例包括但不限於衍生自以下無機酸的那些：鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硫酸、亞硫酸、硝酸、亞硝酸、磷酸和亞磷酸。

【0356】 合適的有機陰離子之實例包括但不限於衍生自以下有機酸的那些：2-乙醯氧基苯甲酸、乙酸、抗壞血酸、天冬胺酸、苯甲酸、樟腦磺酸、肉桂酸、檸檬酸、乙二胺四乙酸（edetic）、乙二磺酸（ethanedisulfonic）、乙磺酸、延胡索酸、葡庚糖酸（glucheptonic）、葡糖酸、麩胺酸、乙醇酸、羥基馬來酸、羥基萘甲酸、羥基乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、馬來酸、蘋果酸、甲磺酸、黏液酸、油酸、草酸、棕櫚酸、雙羥萘酸、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水楊酸、硬脂酸、琥珀酸、磺胺酸、酒石酸、甲苯磺酸、三氟

乙酸和戊酸。合適的聚合有機陰離子之實例包括但不限於衍生自以下聚合酸的那些：單寧酸、羧甲基纖維素。

溶劑化物

【0357】 可以方便地或令人希望地製備、純化、和/或處理活性化合物的對應的溶劑化物。術語「溶劑化物」在本文中以常規意義使用，係指溶質（例如活性化合物、活性化合物的鹽）和溶劑的複合物。如果溶劑係水，則溶劑化物可以方便地稱為水合物，例如一水合物、二水合物、三水合物等。

異構物

【0358】 本發明之某些化合物/藥劑能以一或多種特定的幾何、光學、鏡像異構、非鏡像異構、差向異構、阻轉異構、立體異構、互變異構、構象或異頭形式（anomeric form）存在，包括但不限於順式和反式形式；E-和Z-形式；c-、t-、和r-形式；內-和外-形式；R-、S-、和內消旋-形式；D-和L-形式；d-和l-形式；(+) 和 (-) 形式；酮-、烯醇-、和烯醇化物-形式；順式-和反式-形式；向斜-和背斜-形式；α-和β-形式；軸向和赤道形式；船型-、椅型-、扭曲-、信封型-、和半椅型-形式；及其組合，在下文中統稱為「異構物」（或「異組態式」）。

【0359】 術語「手性」係指具有鏡像配偶體的不可重疊性的分子，而術語「非手性」係指可疊加在其鏡像配偶體上的分子。

【0360】 術語「立體異構物」係指具有相同化學組成、但關於原子或基團在空間中的排列上不同之化合物。

【0361】 「非鏡像異構物」係指具有兩個或更多個手性中心並且其分子不是彼此鏡像的立體異構物。非鏡像異構物具有不同的物理特性，例如熔點、沸點、光譜性質和反應性。非鏡像異構物的混合物可以在高解析度分析程序（例如電泳和層析）下分離。

【0362】「鏡像異構物」係指化合物的兩種立體異構物，它們是彼此不可重疊的鏡像。

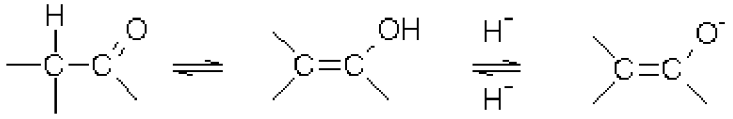
【0363】本文所用的立體化學定義和慣例通常遵循S. P. Parker, 編輯, *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* [麥格勞-希爾化學術語詞典] (1984) 麥格勞-希爾出版社, 紐約；以及Eliel, E.和Wilen, S.,「Stereochemistry of Organic Compound」[有機化合物的立體化學], John Wiley & Sons, Inc.[約翰威利父子公司], 紐約, 1994。本發明之化合物可以含有不對稱或手性中心，因此以不同的立體異組態式存在。意圖係本發明化合物的所有立體異組態式（包括但不限於非鏡像異構物、鏡像異構物和阻轉異構物及其混合物，例如外消旋混合物）均構成本發明之一部分。許多有機化合物以旋光活性形式存在，即它們具有旋轉平面偏振光的平面的能力。在描述光學活性化合物時，前綴D和L、或*R*和*S*用於表示分子圍繞其一或多個手性中心的絕對構型。前綴d和l或 (+) 和 (-) 用來表示該化合物使平面偏振光旋轉的符號，其中 (-) 或l表示該化合物係左旋的。帶有 (+) 或d前綴之化合物係右旋的。對於給定的化學結構，該等立體異構物係相同的，只是它們係彼此的鏡像。特定的立體異構物也可以被稱為鏡像異構物，並且這種異構物的混合物通常被稱為鏡像異構物混合物。鏡像異構物的50 : 50混合物稱為外消旋混合物或外消旋物，它們可以發生在化學反應或過程中沒有立體選擇或立體特異性的地方。術語「外消旋混合物」和「外消旋物」係指兩種鏡像異構物種類的等莫耳混合物，沒有旋光活性。

【0364】「鏡像異構物富集形式」係指手性物質的樣本，其鏡像異構物比率大於50 : 50但小於100 : 0。

【0365】注意，除下文關於互變異組態式所論述的以外，如本文所使用之術語「異構物」特別排除的是結構（或構成）異構物（即，在原子之間的連接而不僅僅是在原子在空間上的位置不同的異構物）。例如，對甲氧基基團（-

OCH_3）的引用不應被解釋為對其結構異構物羥甲基基團（$-CH_2OH$）的引用。類似地，對鄰氯苯基的引用不應被解釋為對其結構異構物間氯苯基的引用。但是，對一類結構的引用很可能包括屬於該類的結構異組態式（例如C_{1-7}烷基包括正丙基和異丙基；丁基包括正、異、二級和三級丁基；甲氧基苯基包括鄰、間和對甲氧基苯基）。

【0366】 上面的排除不涉及互變異構物形式，例如酮、烯醇和烯醇酸酯形式，例如像以下互變異構物對：酮/烯醇（如下所示）、亞胺/烯胺、醯胺/亞胺醇（imino alcohol）、脒/烯二胺（enediamine）、亞硝基/肟、硫酮/烯硫醇（enethiol）、N-亞硝基/羥基偶氮（hyroxyazo）和硝基/酸硝基（aci-nitro）。



酮　　烯醇　　烯醇化物

【0367】 術語「互變異構物」或「互變異組態式」係指經由低能障可相互轉化的不同能量的結構異構物。例如，質子互變異構物（也稱為質子異變互變異構物）包括經由質子遷移的相互轉化，例如酮-烯醇和亞胺-烯胺異構化。效價互變異構物包括藉由一些價電子的重組而進行的相互轉化。

【0368】 注意，術語「異構物」中具體包括的是具有一或多個同位素取代的化合物。例如，H可為任何同位素形式，包括^{1}H、^{2}H（D）、和^{3}H（T）；C可為任何同位素形式，包括^{12}C、^{13}C、和^{14}C；O可為任何同位素形式，包括^{16}O和^{18}O；等。

【0369】 可以摻入本發明化合物的同位素之實例包括氫、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素，例如但不限於^{2}H（氘，D）、^{3}H（氚）、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{18}F、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{36}Cl、和^{125}I。本發明之各種同位素標記之化合物，例如其中摻入了放射性同位素如3H、13C和14C的那些。此類同位素

標記之化合物可用於代謝研究、反應動力學研究、檢測或成像技術（例如正電子發射斷層掃描（PET）或單光子發射電腦斷層掃描（SPECT），包括藥物或基質組織分佈測定），或用於患者的放射治療。本發明之氘標記的或經取代的治療性化合物可以具有與分佈、代謝和排泄（ADME）有關的改善的DMPK（藥物代謝和藥物動力學）特性。用較重同位素（如氘）取代可能會提供某些治療優勢（由於更高的代謝穩定性），例如增加的體內半衰期或減少的劑量要求。18F標記之化合物可用於PET或SPECT研究。本發明之同位素標記之化合物及其前驅藥通常可以藉由進行以下描述的方案中或實例和製備中揭露的方法來製備，該方法是用容易獲得的同位素標記的試劑取代非同位素標記的試劑。此外，用較重的同位素（尤其是氘（即2H或D））取代可以提供某些治療優勢（由於更高的代謝穩定性而），例如增加的體內半衰期或降低的劑量要求或治療指數的改善。應當理解，在本文中氘被視為取代基。這樣的較重同位素（特別是氘）的濃度可以由同位素富集因子定義。在本發明之化合物中，未特別指定為特定同位素的任何原子均表示該原子的任何穩定同位素。

【0370】除非另有說明，否則對特定化合物的引用包括所有此類異構物形式，包括（全部或部分）外消旋物及其其他混合物。此類異構物形式的製備（例如，不對稱合成）和分離（例如，分級結晶和層析方式）的方法係本領域已知的，或者藉由以已知方式採用本文教導的方法或已知方法是容易地獲得的。

序列同源性

【0371】可以使用多種序列比對方法中的任一種來確定同一性百分比，包括但不限於全域方法、局部方法和混合方法，例如像區段方法。確定同一性百分比的方案係熟悉該項技術者範圍內的常規程序。全域方法從分子的開頭到結尾比對序列，並藉由將單個殘基對的評分相加以及施加空位罰分來確定最佳

比對。非限制性方法包括例如CLUSTAL W，參見例如Julie D. Thompson等人, CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position- Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice [CLUSTAL W：藉由序列加權、位置特定空位罰分和權重矩陣選擇來提高漸進式多序列比對的靈敏度], 22(22) Nucleic Acids Research [核酸研究] 4673-4680 (1994)；以及反覆運算細化，參見例如Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments [藉由利用參考結構比對而評估的反覆運算細化，多種蛋白質序列比對的準確度顯著提高], 264(4) J. MoI. Biol.[分子生物學雜誌] 823-838 (1996)。局部方法藉由鑒定所有輸入的序列共用的一或多個保守模體來比對序列。非限制性方法包括例如Match-box，參見例如Eric Depiereux和Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences [Match-Box：一種用於同時比對多個蛋白質序列的全新演算法], 8(5) CABIOS 501 -509 (1992)；吉布斯採樣，參見例如，C. E. Lawrence等人, Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment [檢測細微序列信號：用於多重比對的吉布斯採樣策略], 262(5131) Science [科學] 208-214 (1993)；Align-M，參見例如，Ivo Van WaIIe等人, Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences [Align-M - 高度發散序列的多重比對的新演算法], 20(9) Bioinformatics [生物資訊學]:1428-1435 (2004)。

【0372】 因此，藉由常規方法確定序列同一性百分比。參見例如，Altschul等人, Bull. Math. Bio.[數學生物學通報] 48: 603-16, 1986，以及Henikoff和Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 89:10915-19,

1992。簡而言之，使用空位開放罰分10、空位延伸罰分1、以及如下所示的Henikoff和Henikoff（如前所述）的「blosum 62」評分矩陣比對兩個胺基酸序列以優化比對評分（胺基酸由標準的單字母代碼表示）。

【0373】 兩個或更多個核酸或胺基酸序列之間的「序列同一性百分比」係序列共有的相同位置數目的函數。因此，%同一性可以計算為相同核苷酸/胺基酸的數量除以核苷酸/胺基酸的總數，再乘以100。%序列同一性的計算還可以考慮空位的數量，以及需要引入以優化兩個或更多個序列的比對的每個空位的長度。可以使用技術者熟悉的特定數學演算法（如BLAST）進行兩個或更多個序列之間的序列比較和同一性百分比確定。

用於確定序列同一性的比對評分

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

A 4

R -1 5

N -2 0 6

D -2 -2 1 6

C 0 -3 -3 -3 9

Q -1 1 0 0 -3 5

E -1 0 0 2 -4 2 5

G 0 -2 0 -1 -3 -2 -2 6

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8

I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4

L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4

K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5

M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5

F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6

P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7

S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4

T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5

W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11

Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7

V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

【0374】然後計算同一性百分比：

$$\frac{\text{相同匹配的總數}}{[\text{較長序列的長度加上 引入較長 序列以對齊兩個序列的空位的數量}]} \times 100$$

【0375】基本上同源的多肽之特徵在於具有一或多個胺基酸取代、缺失或添加。該等變化較佳的是具有微小的性質，即，保守胺基酸取代（參見下文）和不顯著影響多肽的折疊或活性的其他取代；小的缺失，通常為1至約30個胺基酸；以及小的胺基或羧基末端延伸，如胺基末端甲硫胺酸殘基、最多約20-25個殘基的小連接子肽、或親和標籤。

保守胺基酸取代

【0376】鹼性： 精胺酸；離胺酸；組胺酸

【0377】酸性： 麩胺酸；天冬胺酸

【0378】極性： 麩醯胺酸；天冬醯胺

【0379】疏水性： 白胺酸；異白胺酸；纈胺酸

【0380】芳香族： 苯丙胺酸；色胺酸；酪胺酸

【0381】小的： 甘胺酸；丙胺酸；絲胺酸；蘇胺酸；甲硫胺酸

【0382】除20種標準胺基酸外，非標準胺基酸（如4-羥基脯胺酸、6-N-甲基離胺酸、2-胺基異丁酸、異纈胺酸和α-甲基絲胺酸）可以取代本發明多肽的胺基酸殘基。有限數量的非保守胺基酸、不由遺傳密碼編碼的胺基酸和非天然胺基酸可以取代多肽胺基酸殘基。本發明之多肽還可包含非天然存在的胺基酸殘基。

【0383】非天然存在的胺基酸包括但不限於反式-3-甲基脯胺酸、2,4-橋亞甲基-脯胺酸、順式-4-羥基脯胺酸、反式-4-羥基-脯胺酸、N-甲基甘胺酸、別蘇胺酸、甲基-蘇胺酸、羥基-乙基半胱胺酸、羥基乙基高半胱胺酸、硝基-麩醯胺酸、高麩醯胺酸、六氫菸生僉酸、叔白胺酸、正纈胺酸、2-氮雜苯丙胺酸、3-氮雜苯丙胺酸、4-氮雜苯丙胺酸和4-氟苯丙胺酸。用於將非天然存在的胺基酸殘基摻入蛋白質中的幾種方法係本領域已知的。例如，可以使用體外系統，其中使用化學胺醯化的抑制型tRNA抑制無義突變。用於合成胺基酸和胺醯化tRNA的方法係本領域已知的。含有無義突變的質體的轉錄和翻譯在無細胞系統中進行，該無細胞系統包含大腸桿菌S30提取物以及可商購的酶和其他試劑。藉由層析法純化蛋白質。參見例如，Robertson等人, J. Am. Chem. Soc.[美國化學會誌] 113:2722, 1991；Ellman等人, Methods Enzymol.[酶學方法] 202:301, 1991；Chung等人, Science [科學] 259:806-9, 1993；以及Chung等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 90:10145-9, 1993）。在第二種方法中，藉由顯微注射突變的mRNA和化學胺醯化的抑制型tRNA在爪蟾卵母細胞中進行翻譯（Turcatti等人, J. Biol. Chem.[生物化學雜誌] 271:19991-8, 1996）。在第三種方法中，在不存在要替換的天然胺基酸（例如苯丙胺酸）和存在所需的一或多個非天然存在的胺基酸（例如，2-氮雜苯丙胺酸、3-氮雜苯丙胺酸、4-氮雜苯丙胺酸或4-氟苯丙胺酸）的情況下，培養大腸桿菌細胞。將非天然存在的胺

基酸代替其天然對應物摻入多肽中。參見，Koide等人, Biochem.[生物化學] 33:7470-6, 1994。天然存在的胺基酸殘基可以藉由體外化學修飾轉化為非天然存在的種類。化學修飾可以與定點誘變相結合，以進一步擴大替代範圍（Wynn和Richards, Protein Sci.[蛋白質科學] 2:395-403, 1993）。

【0384】 有限數量的非保守胺基酸、不由遺傳密碼編碼的胺基酸、非天然存在的胺基酸和非天然胺基酸可以替代本發明多肽的胺基酸殘基。

【0385】 本發明多肽中的必需胺基酸可以根據本領域已知的方法鑒定，如定點誘變或丙胺酸掃描誘變（Cunningham和Wells, Science [科學] 244: 1081-5, 1989）。生物學相互作用位點還可藉由對結構的物理分析來確定，如藉由以下技術確定：核磁共振、晶體學、電子繞射或光親和標記，連同對推定的接觸位點胺基酸進行突變。參見例如，de Vos等人, Science [科學] 255:306-12, 1992；Smith等人, J. Mol. Biol.[分子生物學雜誌] 224:899-904, 1992；Wlodaver等人, FEBS Lett.[歐洲生化學會聯合會快報] 309:59-64, 1992。必需胺基酸的同一性還可以從與本發明多肽的相關組分（例如易位組分或蛋白酶組分）的同源性分析中推斷出來。

【0386】 可以使用已知的誘變和篩選方法來製造和測試多個胺基酸取代，該等方法如Reidhaar-Olson和Sauer（Science [科學] 241:53-7, 1988）或者Bowie和Sauer（Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 86:2152-6, 1989）所揭露的那些。簡而言之，該等作者揭露了用於同時隨機化多肽中的兩個或更多個位置、選擇功能性多肽、然後對誘變的多肽進行定序以確定每個位置上允許的取代的範圍的方法。可以使用的其他方法包括噬菌體展示（例如，Lowman等人, Biochem.[生物化學] 30:10832-7, 1991；Ladner等人, 美國專利案號5,223,409；Huse, WIPO公開WO 92/06204）和區域定向誘變（Derbyshire等人, Gene [基因] 46:145, 1986；Ner等人, DNA 7:127, 1988）。

【0387】 可以使用已知的誘變和篩選方法來製造和測試多個胺基酸取代，該等方法如Reidhaar-Olson和Sauer（Science [科學] 241:53-7, 1988）或者Bowie和Sauer（Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 86:2152-6, 1989）所揭露的那些。簡而言之，該等作者揭露了用於同時隨機化多肽中的兩個或更多個位置、選擇功能性多肽、然後對誘變的多肽進行定序以確定每個位置上允許的取代的範圍的方法。可以使用的其他方法包括噬菌體展示（例如，Lowman等人, Biochem.[生物化學] 30:10832-7, 1991；Ladner等人, 美國專利案號5,223,409；Huse, WIPO公開WO 92/06204）和區域定向誘變（Derbyshire等人, Gene [基因] 46:145, 1986；Ner等人, DNA 7:127, 1988）。

【0388】 除非另外定義，本文所使用的所有技術和科學術語具有與本揭露內容所屬領域的技術者通常所理解的相同的意義。Singleton等人, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY [微生物學和分子生物學詞典], 第20版, John Wiley and Sons [約翰威利父子公司], 紐約(1994)，以及Hale和Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY [哈珀柯林斯生物學詞典], Harper Perennial [哈珀永久出版社], 紐約州(1991) 為技術者提供了本揭露內容中所使用的許多術語的通用詞典。

【0389】 本揭露內容並不受本文揭露的示例性方法和材料的限制，並且與本文所述之那些方法和材料相似或等同的任何方法和材料都可以用於本揭露內容的實施方式的實踐或測試。數值範圍包括限定該範圍的數位。除非另外指明，否則分別地，任何核酸序列以5'到3'方向從左至右書寫；胺基酸序列以胺基到羧基方向從左至右書寫。

【0390】 本文提供的標題不是對本揭露內容的各個方面或實施方式的限制。

【0391】在本文中使用胺基酸的名稱、三字母縮寫或單字母縮寫來指代胺基酸。如本文所使用之，術語「蛋白質」包括蛋白質、多肽和肽。如本文所使用之，術語「胺基酸序列」與術語「多肽」和/或術語「蛋白質」同義。在一些情況下，術語「胺基酸序列」與術語「肽」同義。在一些情況下，術語「胺基酸序列」與術語「酶」同義。術語「蛋白質」和「多肽」在本文中可互換地使用。在本揭露內容和申請專利範圍中，可以使用胺基酸殘基的常規一字母和三字母代碼。胺基酸的3字母代碼遵照IUPACIUB生物化學命名聯合委員會（Joint Commission on Biochemical Nomenclature，JCBN）的定義。還應當理解，由於遺傳密碼的簡並性，多肽可以由多於一種核苷酸序列編碼。

【0392】術語的其他定義可在整個本說明書中出現。在更詳細地描述示例性實施方式之前，應理解本揭露內容並不限於所描述的實施方式，因而該等實施方式可以變化。還應當理解，本文使用的術語僅係為了描述實施方式之目的，而並不意圖係限制性的，因為本揭露內容的範圍僅由所附請求項限定。

【0393】在提供數值範圍的情況中，應理解，該範圍的上限和下限之間的每個中間值（至下限的個位的十分之一，除非上下文另有清楚規定）也被具體揭露。在所陳述的範圍中的任何規定值或中間值與所陳述的範圍中的任何其他規定值或中間值之間的每個較小範圍，被涵蓋在本揭露內容內。該等較小範圍的上限和下限可獨立地被包括或排除在該範圍中，而且其中任一個、沒有一個或兩個極限值被包括在較小範圍中的每個範圍也被涵蓋在本揭露內容中，但依據所陳述的範圍中的任何被具體排除的極限值而定。在所陳述的範圍包含極限值的一個或兩個的情況下，將那些所包含的極限值的一個或兩個排除在外的範圍也包含在本揭露內容中。

【0394】必須注意的是，如本文和所附請求項所使用的，單數形式「一個/種（a/an）」和「該（the）」包括複數指示物，除非上下文另有明確規定。

因此，例如，提及「一種藥劑」包括多種這樣的藥劑並且提及「該藥劑」包括提及熟悉該項技術者已知的一或多種藥劑及其等效物，等等。

【0395】 本文所論述的出版物只是針對它們在本申請的提交日之前的揭露內容而提供。本文中的任何內容均不應被解釋為承認此類出版物構成所附請求項的先前技術。

【圖式簡單說明】

【0396】 現在將參考以下附圖和實例，僅以舉例的方式描述本發明之實施方式。

【0397】 **[圖1A-1D]**顯示了B7-H4在乳癌中的過表現。(A) TNBC（再處理）；(B) HR+（處理前）；(C) HER2+（處理前，符合赫賽汀治療）；(D) HER2+ve（赫賽汀治療的）。

【0398】 **[圖2A-2K]**顯示了物種交叉反應性ELISA分析的結果。

【0399】 **[圖3A-3G]**顯示了選殖與B7-H4家族成員和同源物結合的ELISA分析的結果。

【0400】 **[圖4A-4B]**顯示了所選選殖（和商業抗體）與多種細胞類型結合的細胞蛋白質印跡分析的結果。E = E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG；U = US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG；R = R and D systems AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1；S = Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1

【0401】 **[圖5A-5F]**顯示了選定的選殖的體外細胞毒性測定的結果。

【0402】 **[圖6]**顯示了對選殖ZY0EQD_E02（以及其多種變體）進行的ELISA分析的結果，其證明了與人、食蟹猴、小鼠和大鼠B7-H4的結合。

【0403】 **[圖7]**顯示了對選殖E02_GL進行的ELISA分析的結果，與1D11相比，表明E02_GL與人B7-H4的結合得到改善。

【0404】 **[圖8A-8B]**顯示了對選殖E02_GL進行的流動式細胞分析術分析的結果，與1D11相比，表明E02_GL與存在於細胞上的人B7-H4的結合得到改善。HT29細胞的結果顯示在 (A) 中，SKBR-3細胞的結果顯示在 (B) 中。符號◊表示『E02-GL部分』，符號□表示『1D11部分』。符號「●」表示（陰性）對照『R347組分』。

【0405】 **[圖9A-9B]**顯示了用E02-GL-SG3932軛合物處理後人B7-H4轉染的（和未轉染的對照）Ad293細胞的細胞毒性。空心圓 = 同種型對照ADC（例如NIP228-SG3932）；實心圓 = E02-GL-SG3932。

【0406】 **[圖10A-10B]**顯示了體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷（E02-GL-SG3932）。

【0407】 **[圖11]**顯示了體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷（E02-GL-SG3932）。

【0408】 **[圖12]**顯示E02-GL-SG3932在患者源性異種移植（PDX）模型中具有有效的體內活性。空心圓 = 僅媒介物對照；實心圓 = E02-GL-SG3932（7 mg/kg）。

【0409】 **[圖13]**顯示了以7 mg/kg單次i.v.注射後，E02-GL-SG3932在PDX模型中的抗腫瘤活性。

【0410】 **[圖14A-14B]**顯示E02-GL-topo I抑制劑ADC在體外和體內的MX-1細胞 (A)；以及在體外和體內的HT29源性模型 (B) 中具有相似的效力。

【0411】 **[圖15A-15B]**顯示了用E02-GL-SG3249軛合物處理後食蟹猴B7-H4轉染的（和未轉染的對照）HEK293細胞的細胞毒性。

【0412】 **[圖16A-16C]**顯示了內化實驗的結果，證明了結合的E02-GL-抗原複合物在活細胞中的內化。

【0413】 **[圖17A-17B]**顯示蛋白質印跡分析，證明E02-GL-SG3932治療導致體外雙鏈DNA斷裂；（**圖17C**）顯示在用軛合至SG3249的抗B7-H4抗體（更具體地為E02-GL-SG3249）處理HCC1569細胞後，關鍵雙鏈斷裂標記物的蛋白質印跡分析。

【0414】 **[圖18]**顯示了用E02-GL-SG3249處理後SKBR3細胞中的半胱天冬酶3/7活性。

【0415】 **[圖19]**顯示了E02-GL-SG3249和彈頭SG3199對腫瘤細胞的體外活性。

【0416】 **[圖20A-20D]**顯示了體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷（E02-GL-SG3249）。

【0417】 **[圖21A-21C]**顯示與1D11 ADC相比，E02_GL ADC具有改進的細胞毒性/效力。顯示了針對表現人B7-H4的HT29細胞系 (A)、SKBR3細胞系 (B) 和HCC1569細胞系 (C) 的比較性細胞毒性。

【0418】 **[圖22A-22C]**顯示了E02-GL-SG3249對 (A) OVCAR4細胞（順鉑難治性卵巢癌，高B7-H4）、(B) HCC1569細胞（HER2+乳癌，B7-H4的異源表現）和 (C) MDA-MB-468細胞（三陰性乳癌，低B7-H4表現）的腫瘤移植物的體內活性。

【0419】 **[圖23]**顯示了體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷。

【0420】 **[圖24A-24O]**顯示E02-GL-SG3249在患者源性異種移植（PDX）模型中具有有效的體內活性。圓 = 僅媒介物控制；正方形 = E02-GL-SG3249（0.3 mg/kg）；三角形 = E02-GL-SG3249（1.0 mg/kg）。

【0421】 **[圖25A-25B]**顯示了在HCC1954腫瘤異種移植物（有和沒有E02-GL-SG3249）中的 (A) γ-H2AX免疫組織化學（IHC）的結果，在 (B) 中量化為γ-H2AX陽性細胞的數量/mm^2（在目的組織區域內）（+/- S.E.M.）。使用

HALO軟體（利用CRO-OracleBio）進行圖像分析。在E02-GL-SG3249處理後長達10天，觀察到γ-H2AX陽性腫瘤細胞的數量增加。

【0422】 **[圖26A-26D]**顯示了B7-H4 Ab在表現B7H4的腫瘤（HT29細胞）中的滯留。強度標度顯示落射螢光強度。輻射效率 = (p/sec/cm^2/sr)/(μW/cm^2)；強度標度，最小值 = 1.20e8，最大值 = 1.50e9。

【0423】 **[圖27A-27D]**顯示了B7-H4 Ab在表現B7H4的腫瘤（CT26細胞）中的滯留。強度標度顯示落射螢光強度。輻射效率 = (p/sec/cm^2/sr)/(μW/cm^2)；強度標度，最小值 = 1.20e8，最大值 = 1.50e9。

【0424】 **[圖28A-28B]**顯示了五個示例性抗體選殖的序列比對。

【0425】 **[圖29A]**係靶向B7-H4的TOP1i-ADC的示意圖。**圖29B**顯示了靶向B7-H4的TOP1i-ADC E02-GL-SG3249的主要特性。

【0426】 **[圖30]**顯示了正常人和正常食蟹猴乳腺、胰腺、子宮頸、子宮內膜、輸卵管（fallopian tube/oviduct）和腎組織中B7-H4表現的代表性免疫組織化學染色的示例圖像。

【0427】 **[圖31]**顯示了人腫瘤組織中B7-H4表現的代表性免疫組織化學染色的示例圖像，該等腫瘤組織包括乳癌（TNBC和ER+，參見個別圖1A-1B）、膽管癌、NSCLC-SCC、子宮內膜腫瘤和卵巢腫瘤。

【0428】 **[圖32]**係B7-H4異種同源比對。

【0429】 **[圖33]**顯示了抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932藉由DELFIA-ELISA方法和抗人IgG (H+L)與人B7 H4的結合。E02-INT：E02-GL-SG3932的抗體中間體；NIP228：同種型匹配的對照；huB7-H4：重組人B7-H4。

【0430】 **[圖34]**顯示抗體中間體E02-INT與穩定表現人、鼠或食蟹猴B7-H4的HEK 293細胞的結合。E02-INT：E02-GL-SG3932的抗體中間體；HEK293

JI TREX：未轉導的HEK293 JI TREX細胞；HEK293 JI TREX cynoB7-H4：穩定表現食蟹猴B7-H4的HEK 293細胞；HEK293 JI TREX huB7-H4：穩定表現人B7-H4的HEK 293細胞；HEK293 JI TREX muB7-H4：穩定表現鼠B7-H4的HEK 293細胞；MFI：平均螢光強度。Y軸係平均螢光強度幾何平均值。數據表現為三次重複測定的平均值 ± SD。

【0431】 **[圖35]**顯示抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932與人乳癌細胞系以及與穩定表現人B7-H4的HT29細胞的結合。E02-INT：E02-GL-SG3932的抗體中間體；HT29-huB7-H4選殖4和HT29-huB7-H4選殖26：穩定表現人B7-H4的HT29細胞；MFI：平均螢光強度。y軸係平均螢光強度幾何平均值。

【0432】 **[圖36A-36C]**顯示了E02-GL-SG3932在細胞系HT29、HT29-huB7-H4選殖26和MX-1中的體外細胞毒性活性。數據表現為三次重複測定的平均值 ± SD。

【0433】 **[圖37]**顯示了E02-GL-SG3932的體外抗體依賴性細胞介導的細胞毒性活性。該圖顯示了六個實驗的平均倍數變化 ± SEM。

【0434】 **[圖38]**顯示了以圖像序列形式呈現的E02-INT內化的時程。將人大腸癌細胞HT29-huB7-H4選殖26（第一行）和人乳癌細胞MX-1（第二行）用5 μg/mL的與Alexa Fluor™ 568（紅色）軛合的E02-INT進行標記。比例尺為20 μm。

【0435】 **[圖39A-39C]**顯示了E02-INT在人癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26和MX-1中內化的活細胞成像。(A) 每個點代表平均內化百分比 ± 3個獨立孔的標準差，間隔為10分鐘，持續480分鐘。(B) 8小時後的內化百分比，以及 (C) 顯示了3個獨立孔的預測半衰期。該等值係使用解離 - 單相指數式衰減方程得出的。水平條表示組內算術平均值；藉由單向方差分析、Tukeys多重比較檢驗來評估統計顯著性。ns：不顯著；$p > 0.05$；** $p < 0.05$。

【0436】 **[圖40A-40B]**顯示抗體E02-INT與HT29-huB7-H4選殖26細胞中的溶酶體共定位。(A) 將HT29-huB7-H4選殖26細胞與5 μg/mL的軛合Alexa Fluor™ 568抗體的E02-INT一起孵育24小時 [(A) 紅色 - 左上和左下]。將溶酶體用小鼠抗人LAMP1-Alexa Fluor™ 488抗體染色 [(A) 綠色 - 中上]。將內含體用兔抗人EEA1抗體染色，並用山羊抗兔IgG1-DyLight™ 650檢測 [(A) 綠色 - 中下]。E02-INT與LAMP1或EEA1的共定位顯示在合併圖像中。(B) 藉由皮爾森相關係數、使用Zeiss Zen軟體分析E02-INT與EEA1和LAMP1的共定位。每個點代表單個細胞測量結果。藉由單向方差分析、Tukeys多重比較檢驗來評估統計顯著性。ns：不顯著；$p > 0.05$；**** $p < 0.0001$。

【0437】 **[圖41]**係凝膠圖片，顯示了用E02-GL-SG3932或TOP1i彈頭SG3924處理的MX-1細胞中的DNA損傷響應信號。呈現的數據代表n：2個實驗。

【0438】 **[圖42]**係凝膠圖片，顯示了用E02-GL-SG3932或TOP1i彈頭SG3924處理的HT29-huB7-H4細胞中的DNA損傷響應信號。呈現的數據代表n：2個實驗。

【0439】 **[圖43A-43F]**係用E02-GL-SG3932處理後在HT29-huB7-H4選殖26異種移植腫瘤中的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶3的免疫組織化學（IHC）染色圖像。該等圖像代表在單次IV投與7 mg/kg E02-GL-SG3932（43D-43F）或同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932（43A-43C）後168小時，在HT29-huB7-H4選殖26腫瘤異種移植模型中的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3的IHC 染色。

【0440】 **[圖44A-44D]**顯示了在HT29 huB7 H4選殖26異種移植研究中跨所有時間點和處理的人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3 IHC 染色的圖像分析數據。頂部小圖（44A）：上皮細胞分析，顯示所有上皮細胞中人IgG陽性上皮

細胞的比例隨時間的變化。第二小圖（44B）：γH2AX分析，顯示在γH2AX測定中發現對病灶呈陽性的上皮細胞的比例。第三小圖（44C）：裂解的半胱天冬酶3（CC-3），顯示了樣本中裂解的半胱天冬酶-3陽性腫瘤細胞的隨時間變化的百分比。底部小圖（44D）：樣本中所有上皮細胞隨時間變化的細胞密度，表明與同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932相比，E02-GL-SG3932處理導致的細胞死亡。

【0441】 **[圖45A-45B]**顯示E02-GL-SG3932在B7-H4陰性HT29異種移植模型中的功效（還參見圖11）。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組8隻動物。虛線表示給藥日。

【0442】 **[圖46A-46C]**顯示E02-GL-SG3932在HT29-huB7-H4選殖26異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組10或8隻動物。虛線表示給藥日。

【0443】 **[圖47A和47B]**顯示E02-GL-SG3932、NIP228-SG3932和E02-INT在MX-1異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組8隻動物。虛線表示給藥日。

【0444】 **[圖48]**顯示E02-GL-SG3932和NIP228-SG3932在MX-1異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組3或6隻動物。

【0445】 **[圖49]**顯示了E02-GL-SG3932和NIP228-SG3932在MDA-MB-468異種移植模型中的功效。值為平均值 ± SEM腫瘤體積，針對n：每組3或6隻動物。

【0446】 **[圖50]**顯示了患者源性異種移植（PDX）模型中B7-H4表現數據的定量圖像分析，按細胞膜OD平均值的案例平均值排序。表現是由IHC細胞強度等級編碼的顏色（陰性：黑色，1+：白色，2+：淺灰色，3+：深灰色。

【0447】 **[圖51]**顯示了在患者源性異種移植模型中單次投與1.25 mg/kg E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932所產生的抗腫瘤活性。

【0448】 **[圖52A和52B]**顯示了在根據對1.25 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932的腫瘤響應而分組的PDX模型中的B7-H4表現。如果腫瘤體積自基線的百分比變化為-30%至-100%（含端值），則認為模型對測試藥劑有響應（R）。如果腫瘤體積自基線的百分比變化大於-30%，則模型被認為是非響應者（NR）。y軸表示每個模型中B7-H4的水平，如由H評分所確定的。

【0449】 **[圖53A]**顯示了在患者源性異種移植模型中單次投與3.5 mg/kg E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932所產生的抗腫瘤活性。**圖53B-53E**顯示了在(A) 1.25 mg/kg E02-GL-SG3932、(B) 3.5 mg/kg E02-GL-SG3932、(C) 1.25 mg/kg同種型對照ADC、以及 (D) 3.5 mg/kg同種型對照ADC下，用於確定E02-GL-SG3932投與、B7-H4表現水平和HR缺陷的相互關係的研究方案的結果。在**圖53B-53E**中，三角形「△」符號表示同源重組缺陷（如由BRCA突變或RAD51病灶測定所確定的）的模型。圓圈「●」符號表示沒有同源重組缺陷的模型。

【0450】

【0451】 **[圖54A和54B]**顯示了在根據對3.5 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932的腫瘤響應而分組的PDX模型中的B7-H4表現。如果腫瘤體積自基線的百分比變化為-30%至-100%（含端值），則認為模型對測試藥劑有響應（R）。如果腫瘤體積自基線的百分比變化大於-30%，則模型被認為是NR。y軸表示每個模型中B7 H4的水平，如由H評分所確定的。

【0452】 **[圖55A-55G]**顯示了與未處理的小鼠相比，用1.25 mg/kg或3.5 mg/kg單劑量的E02-GL-SG3932處理的第一組膽管癌PDX小鼠模型的隨時間變化的平均腫瘤體積。

【0453】 **[圖56A-56K]**顯示了與未處理的小鼠相比，用1.25 mg/kg或3.5 mg/kg單劑量的E02-GL-SG3932處理的第二組膽管癌PDX小鼠模型的隨時間變化的平均腫瘤體積。

【0454】 **[圖57A-57B]**顯示，與ADC 2-4相比，用可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-彈頭製備的ADC在體內活性最高。**圖57A係圖57B**的關鍵。

【0455】 **[圖58]**顯示，與ADC 2-4相比，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-彈頭ADC在大鼠毒性研究中表現出最乾淨的安全性。

【0456】 **[圖59A-59B]**顯示，與ADC 2-4相比，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-彈頭ADC具有良好的PK特性和最寬的相對TI。相對TI = 在大鼠中測試的最高劑量（NOAEL而非HNSTD）下的AUC與提供腫瘤停滯的AUC的暴露比率（MX-1模型）。**圖59A係圖59B**的關鍵。

【0457】 **[圖60A-60B]**顯示E02-GL-SG3932在乳腺和卵巢PDX小鼠模型中具有強大的活性。

【0458】 **[圖61]**顯示E02-GL-SG3932在HR缺陷型腫瘤和具有升高的B7-H4的HR精通型腫瘤中具有強大的活性。

【0459】 **[圖62A-62B]**顯示了在根據對3.5 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932的腫瘤響應而分組的HR缺陷型（A）和HR精通型（B）PDX模型中的腫瘤響應。(R) 表示模型被認為對測試藥劑有響應。(NR) 表示模型被認為是非響應者。y軸表示每個模型中B7-H4的水平，如由H評分所確定的。

【0460】 **[圖62C-62D]**顯示了在根據對1.25 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932的腫瘤響應而分組的HR缺陷型（A）和HR精通型（B）PDX模型中的腫瘤響應。(R) 表示模型被認為對測試藥劑有響應。(NR) 表示模型被認為是非響應者。y軸表示每個模型中B7-H4的水平，如由H評分所確定的。

【0461】 **[圖63]**顯示了不同彈頭在DLD1 wt或BRCA2-/-細胞中的6天細胞毒性測定的結果。MMAE = 陰性對照，微管抑制劑彈頭。

實例

材料與方法

蛋白質試劑

【0462】 產生的蛋白質試劑（例如構建體）如表1所示。該表表明蛋白質來自哪個物種（人、小鼠或食蟹猴）、用於選殖構建體的載體以及所使用的前導序列係天然的還是人CD33前導序列。

[表1].為B7H4項目製作的蛋白質構建體

選殖的插入物	載體	注釋
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	天然前導序列
小鼠B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Fc_6His	天然前導序列
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前導序列
小鼠B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前導序列
食蟹猴B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_Flag_10His	天然前導序列
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前導序列 三重突變型Fc
小鼠B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前導序列 三重突變型Fc
食蟹猴B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_FcTM_6His	天然前導序列 三重突變型Fc
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	人CD33前導序列
人B7H4 ECD	pDest12.2 oriP_N_CD33_C_mIgG2a_Fc_10His	人CD33前導序列
人B7H4 ECD （SV）	pDest12.2 oriP_N_CD33_10His_FLAG	人CD33前導序列 剪接變體

【0463】「三重突變型Fc」（TM）包含Fc區內的三重突變L234F/L235E/P331S，如先前在Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.[晶體學報部分D：生物晶體學] 2008年6月1日; 64(Pt 6): 700-704（藉由引用併入本文）中所述。為避免任何疑問，本發明人使下文描述的抗體在不存在這樣的TM的情況下（例如，存在WT Fc的情況下）也保留其有利的結合特性/特徵。

【0464】表中的所有蛋白質均使用標準條件進行純化。簡而言之，在HEK EBNA中進行表現，使用TFF濃度設置濃縮，使用His trap層析柱或蛋白G層析柱純化（取決於是否存在10His Flag標籤或Fc標籤），然後是SEC S200層析柱的最終拋光步驟。

ELISA

【0465】藉由ELISA測量抗B7-H4抗體（例如，中間體ZY0EQD-E02-GL和抗B7-H4 mAB D11）與B7-H4（例如，人和小鼠B7-H4）的結合。將重組B7-H4-Fc（例如，人B7-H4-Fc和小鼠B7-H4-Fc）蛋白稀釋到DPBS中，得到5 ug/ml的溶液。然後將50 μL稀釋的儲備液添加到Nunc Maxisorp 96孔板中。將50 μL/孔DPBS添加到對照孔中。使抗原在4°C吸附到板上過夜，用DPBS洗滌一次，並在室溫下與封閉緩衝液（3% w/v Marvel，在DPBS中）一起孵育1小時。然後將板用PBS洗滌一次，並與在含有1% BSA、0.3%曲通X-100的DPBS中稀釋的6.4 pM-100 nM抗B7-H4抗體（例如，中間體ZY0EQD-E02-GL或抗B7-H4 mAb D11）一起孵育1小時。然後將板用含有0.1%吐溫的PBS洗滌三次，並在室溫與過氧化物酶軛合的山羊抗人輕鏈抗體（西格瑪奧德里奇公司（Sigma Aldrich），普爾（Poole），英國）一起孵育1小時。然後將板用含有0.1%吐溫的PBS洗滌五次。在與TMB過氧化物酶底物一起孵育5分鐘後，藉由添加0.5 M H_2SO_4終止反應。使用Envision多標籤酶標儀（珀金埃爾默公司（Perkin Elmer），Seer Green，英國）測量450 nm處的吸光度（A450）。

流動式細胞分析術（用於檢測與B7-H4陽性細胞結合的抗體）

【0466】藉由accutase（Gibco公司，佩斯利（Paisley），英國）使細胞從組織培養瓶中分離，藉由離心使其沈澱，並重懸於冰冷的DPBS（Gibco公司，佩斯利，英國）中。使用血細胞計數器藉由台盼藍排除法計數活細胞。在DPBS中將細胞密度調整為$5x10^6$個細胞/mL。將100 µL細胞懸液（$5x10^5$個細胞）添加到96孔V型底板中並置於冰上。然後，將細胞與Live/Dead可固定紫色染色劑（賽默飛世爾科學公司，拉夫伯勒（Loughborough），英國）一起在冰上孵育20分鐘。用流動式細胞分析術緩衝液（eBiosciences公司，哈特菲爾德（Hatfield），英國）洗滌後，將細胞在僅100 µL流動式細胞分析術緩衝液中（未染色的對照細胞）或者補充有濃度範圍為10 µg/ml至78 ng/ml的AF647標記的抗B7H4抗體（例如E02-GL或1D11）或同種型R347的該緩衝液中在冰上孵育30分鐘。然後將細胞用200 µL冰冷的流動式細胞分析術緩衝液洗滌三次，用200 µL 4%多聚甲醛（西格瑪奧德里奇公司，普爾，英國）固定20分鐘，然後懸浮在冰上的DPBS中以用於在FACSCanto II儀（BD生物科學公司（BD Bioscience），聖約瑟（San Jose），加利福尼亞州（CA），美國）上進行流動式細胞分析術分析。如下使用FlowJo細胞計數分析軟體（Treestar公司，阿什蘭（Ashland），俄勒岡州（OR），美國）來量化抗體與細胞的結合。基於前向散射、側向散射和Live/Dead紫色螢光強度，對活的單細胞進行門控，並確定AF647幾何平均螢光強度（MFI）。

細胞毒性測定

【0467】藉由accutase（Gibco公司，佩斯利，英國）使細胞系從組織培養瓶中分離，藉由離心使其沈澱，並重懸於生長培養基（針對HT29-hB7H4選殖44為McCoy's 5A、10% FBS、400 µg/mL G418；針對SKBR3為McCoys'5A、10% FBS；以及針對HCC1569為RPMI-1640、10% FBS）中。使用血細胞計數

器藉由台盼藍排除法計數活細胞。在生長培養基中將細胞密度調整為2.7x10^4個細胞/mL。將75 μL/孔的細胞懸液（2x10^3個細胞）添加到96孔白壁透明底部組織培養處理板中，並在37°C、5% CO_2下在加濕的組織培養箱中培養過夜。

【0468】將ADC（例如，1D11-MMAE、E02-GL-MMAE和E02-GL-SG3249）稀釋到DPBS中，分別得到400 μg/mL或16 μg/mL儲備液。在DPBS中製備了四倍連續稀釋的儲備液。然後將25 μL的稀釋的儲備液添加到培養的細胞的一式二份孔中，同時將抗體（例如，1D11-MMAE或E02-GL-MMAE或E02-GL-SG3249）進行十點、四倍連續稀釋。將25 μL/孔DPBS添加到模擬處理的對照細胞中。

【0469】將細胞在ADC或DPBS（模擬處理的對照細胞）存在下培養六天。使用CellTiter-Glo®測定評估細胞活力：將100 μL CellTiter-Glo®（普洛麥格公司（Promega），南安普敦（Southampton），英國）添加到每個孔中。將板在臺式搖床上攪拌2分鐘，然後在室溫再孵育10分鐘。使用Envision多標籤酶標儀（珀金埃爾默公司，Seer Green，英國）測量發光。藉由使用第7版GraphPad Prism（GraphPad軟體公司（GraphPad Software），拉荷亞（La Jolla），加利福尼亞州（CA））中的非線性回歸模型 [log促效劑相對於響應 - 可變斜率（三個參數）]產生半數最大抑制濃度（IC_{50}）值來測定測試品抗體（例如，1D11-MMAE或E02-GL-MMAE或E02-GL-SG3249）的效力，並表示為相對於模擬處理的對照細胞的細胞活力百分比 -

([(處理的細胞 - 背景) / (模擬處理的對照細胞 - 背景)] x 100)。

細胞上蛋白質印跡

【0470】開發了細胞上蛋白質印跡方法，並將其用於利用以下細胞運行5個示例性抗體選殖：SKBR3、A549、OVCAR4（全部減去用B7-H4載體進行的轉染）、CHO和HEK細胞（加上和減去用全長B7-H4載體進行的轉染）。

【0471】除了示例性抗體選殖之外，還使用了以下抗體（用於比較目的）：

- E Biosciences 14-5949抗人B7H4小鼠IgG
- US biological B0000-35B抗人B7H4小鼠IgG
- *R and D systems* AF2514抗小鼠B7H4山羊IgG1
- Sigma SAB2500141抗B7H4山羊IgG1
- 同種型1 CAT004 SP06-003
- 同種型2 R and D正常山羊IgG對照（AB-108C）

親和力分析KinExA 3200

【0472】EO2_GL Fab：E02_GL Fab SEC組分（33.4-34.5 min，07031802.D），

【0473】B7H4：hB7H4-ECD-Flag-His10（4.34 mg mL-1，J Watson，2017年10月31日）。

KinExA緩衝液：

【0474】添加了0.02%疊氮化鈉的D-PBS（VWR/Merck 103692K，批次：K35580906），1升，0.20 μm無菌過濾的。

【0475】添加了0.02%疊氮化鈉的D-PBS（VWR/Merck 103692K，批次：K35580906）和1 mg mL^{-1}牛血清白蛋白（Sigma A-2058，批次：108H0573）。1.0升，0.20 μm無菌過濾的。

第二檢測試劑：

【0476】使用DyLight649標記的小鼠抗人H+L鏈第二檢測試劑（傑克孫免疫研究公司（Jackson Immunoresearch），209-495-088，批次91003）檢測全IgG或Fab。用800 μL Milli-Q水重構的小瓶（約1 mg）。

r人B7H4 ECD的最小胺生物素醯化：

- 蛋白質：r人B7H4 ECD-FlagHis10（4.34 mg mL^{-1}，第1批，2017年10月31日）
- 來源： JWPur006
- 體積/緩衝液：0.100 mL /PBS
- 蛋白質品質（Da）： 29,053.57 Da
- 要生物素醯化的蛋白質品質 = 0.434 mg
- 要生物素醯化的蛋白質的量（皮莫耳）0.000434 g/29,054 Da = 1.494 E-8莫耳（14,938皮莫耳）

生物素醯化：

- 添加在D-PBS中的10 μL飽和NaHCO3。
- 試劑：EZ link Sulfo-NHS-LC-生物素（Perbio/皮爾斯公司，產品編號21335），以（1.0 mg mL-1，在DMF中）計。
- 第一脈衝蛋白: 生物素比例： 1:0.5 14,938 × 0.5 = 14,938
  - 7,468/1,797 pmol μL-1 = 4.16 μL
- 起始：下午16:07；取樣：下午16:35
- 所有該等都應用於Dulbecco's PBS平衡PD-10柱上。

體內成像研究

【0477】將抗體選殖（例如E02_GL）用800CW（LI-COR生物科學公司（LI-COR Biosciences））標記。將800 CW標記的R347用於對照實驗中。

【0478】將表現B7-H4的CT26/4TI/HT29癌細胞移植（例如，皮下接種）到3-5天大的裸小鼠（查理斯河實驗室（Charles River Laboratories），威爾明頓（Wilmington），麻塞諸塞州（MA））的左腹，並且將不表現B7-H4的CT26/4TI/HT29癌細胞移植到右腹以提供內部對照。飼養小鼠一週以形成腫瘤，注射800CW標記的E02_GL。將800CW標記的R347注射到對照小鼠中。在

注射標記的抗體後第1、3、7和9天，藉由對來自該標記的輻射進行成像，對腫瘤進行體內成像。

實例1

B7-H4在多種細胞類型中過表現

【0479】 對取自人受試者的多個腫瘤切片中的切片進行免疫組織化學，該等切片代表多種腫瘤類型（如表2中所述）。發現B7-H4的表現在乳癌（例如激素受體陽性（HR+）乳癌）以及非小細胞肺癌（NSCLC）中特別顯著（參見圖1A-1D）。有趣的是，大多數腫瘤表現出異源表現。

【0480】 治療後一部分患者中的表現保持不變（其中，將HER2+乳癌患者用赫賽汀治療；並且將卵巢癌患者用基於鉑的化學療法治療）。

[表2].

腫瘤類型		**% Pos[1]**	**% 高Pos[2]**	**% 低Pos[3]**	**評估的N**
乳癌	HR+	85	23	51	39
	TNBC	70	32	23	230
	HER2+	87	42	28	98
	- 符合赫賽汀治療	83	43	20	30
	- 赫賽汀治療的	88	41	31	68
卵巢癌（漿液性）		72	24	33	71
子宮內膜癌		84	35	48	39
NSCLC	鱗狀	63	15	48	160
	腺癌	19	2	15	143
胰臟癌		31	1	18	90
胃癌		10	0	10	21
膽管癌		13	38	38	13

[1]陽性：以任何強度和頻率染色的腫瘤

[2]高陽性：在>50%的腫瘤細胞中膜染色強度>2+的腫瘤

[3]低陽性：在<50%的腫瘤細胞中膜染色強度≤2+的腫瘤

基於組織微陣列分析的數據

實例2

抗B7-H4抗體的產生

【0481】採用多位點重複免疫（RIMS）策略，在該策略中如下使VelocImmune II小鼠（再生元公司（Regeneron），柏油村（Tarrytown），紐約州（NY））免疫：

- -4天：出血前
- 0天：初始免疫
- 7天：第二次加強
- 13天：第一次出血
- 15天：第三次加強
- 20天：第二次出血
- 22天：第四次加強
- 24天：第五次加強
- 28天：最後一次出血，以及spl和LN融合

【0482】對於免疫，將十六隻V2小鼠分成4組，每組含有4隻動物。用人和小鼠重組B7-H4以及SkBr3細胞（例如表現B7-H4）使動物免疫。免疫原的詳情可以在以下表3中找到（TT = 破傷風毒素；DTA = 白喉毒素；KLH = 鑰孔戚血藍蛋白）。

[表3].

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

融合瘤的產生

【0483】從10隻小鼠中收穫淋巴樣細胞，從第3隻和第9隻小鼠的細胞中富集B細胞，沒有對來自其他8隻小鼠的細胞進行選擇。將淋巴樣細胞和Sp2/0 Ag14骨髓瘤細胞以5:1的比例混合，在無血清培養基中洗滌，並使用PEG手動地或藉由tecan機器人進行融合。融合後，將細胞重懸於200 ml完全HM20培養基中，並將100 µl添加到20個板的第1-11列中。3天後，再向每個孔中添加100 µl培養基。每隻小鼠的融合詳情如表4所示。

[表4].

小鼠	組	脾細胞 x 10^6	LN細胞 x 10^6	總計 x 10^6	% LNC	融合類型	選擇
1	1	57.72	13.78	71.50	19.27	Tecan	無
3	1	73.42	10.35	83.77	12.36	手動	B細胞
4	1	27.78	11.47	39.25	29.21	Tecan	無
5	2	67.92	23.45	91.37	25.66	Tecan	無
7	2	78.20	25.70	103.90	24.74	Tecan	無
9	3	62.47	11.98	74.45	16.09	手動	B細胞
10	3	53.43	5.25	58.68	8.95	手動	無
11	3	50.80	9.25	60.05	15.40	Tecan	無
13	4	41.33	11.98	53.30	22.47	手動	無
14	4	38.20	34.30	72.50	47.31	Tecan	無

融合瘤篩選和選殖

【0484】將融合後13天收穫的上清液藉由融合瘤組以及人、食蟹猴和小鼠B7H4 HTRF生化結合測定，在基於珠粒的IgG/IgM篩選中進行篩選，並在SkBr3 FMAT測定中藉由HTS進行篩選。

【0485】篩選後，挑出陽性命中，其中58個被選殖到半固體培養基中。使用ClonePix-FL從每個孔株系中挑選IgG陽性選殖，隨後在初級測定中進行篩選。然後從每個孔株系中挑選最多4個選殖，使其生長並進行小規模IgG純化（Phytip-蛋白A）。

【0486】在對Phytip材料進行生物篩選後，選擇了5種示例性抗體進行進一步表徵（其詳情可以在表5中找到）。

[表5].

選殖ID	**小鼠ID**	**免疫原**
ZY0EPQ-E02	5	組2（SkBr3細胞/mB7H4-KLH）
ZY0EQD-E02	7	組2（SkBr3細胞/mB7H4-KLH）
ZY0EP0-C07	4	組1（mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH）
ZY0EOB-F05	1	組1（mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH）
ZY0EO5-E07	1	組1（mB7H4-KLH/h-B7H4-KLH）

【0487】ZY0EPQ-E02（及其種系化形式，例如由縮寫「GL」表示）包含SEQ ID NO: 1-3的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 4-6的CLDR1-3（分別）。ZY0EPQ-E02包含SEQ ID NO: 31的VH鏈和SEQ ID NO: 32的VL。

【0488】ZY0EQD-E02包含SEQ ID NO: 7-9的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 10-12的CLDR1-3（分別）。ZY0EQD-E02包含SEQ ID NO: 33的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL。ZY0EQD-E02的種系化形式在稍後例如藉由包含縮寫「GL」被稱為例如EQD-E02_GL（具有SEQ ID NO: 45的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL）。

【0489】 ZY0EOB-F05包含SEQ ID NO: 13-15的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 16-18的CLDR1-3（分別）。ZY0EOB-F05包含SEQ ID NO: 35的VH鏈和SEQ ID NO: 36的VL。

【0490】 ZY0EO5-E07包含SEQ ID NO: 19-21的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 22-24的CLDR1-3（分別）。ZY0EO5-E07包含SEQ ID NO: 37的VH鏈和SEQ ID NO: 38的VL。

【0491】 ZY0EP0-C07包含SEQ ID NO: 25-27的CHDR1-3（分別）和SEQ ID NO: 28-30的CLDR1-3（分別）。ZY0EP0-C07包含SEQ ID NO: 39的VH鏈和SEQ ID NO: 40的VL。

【0492】 將這5種示例性抗體重新格式化到人IgG1、人IgG1-TM（三重突變）和鼠IgG1骨架上。

【0493】 對這5種重新格式化的示例性抗體的序列分析顯示了ZY0EPQ-E02和ZY0EQD-E02以及選殖ZY0EOB-F05和ZY0EO5-E07之間的同一性（參見圖28）。

實例3

用選定選殖進行的抗原結合測定

【0494】 通過HTRF測定，使用人、食蟹猴和鼠B7-H4-Fc進行這5種示例性抗體（如鼠IgG1、人IgG1和人IgG1-TM）的濃度-效應結合。對於鼠IgG1抗體，使用與Dylight-649軛合的抗鼠IgG進行檢測。用人IgG1和IgG1-TM抗體進行類似的測定形式；然而，與Dylight-649軛合的抗人κ用於檢測。

【0495】 與對人或食蟹猴B7-H4-Fc的結合相比，抗體ZY0EPQ-E02和ZY0EQD-E02對鼠B7-H4-Fc具有更高的EC_{50}和更低的最大結合，這表明對鼠B7-H4的親和力較低。所有其他抗體對人、食蟹猴和鼠B7-H4-Fc都具有相似的EC50和最大結合（參見表6-8）。

[表6]. 使用人B7-H4-Fc得到的HTRF數據

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

[表7]. 使用食蟹猴B7-H4-Fc得到的HTRF數據

抗體	食蟹猴B7-H4-Fc					
	鼠IgG1		人IgG1		人IgG1-TM	
	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值	EC50（nM）	最大值
ZY0EPQ-E02	0.38	2236	0.33	987	0.35	934
ZY0EQD-E02	0.22	2494	0.28	1127	0.28	1100
ZY0EOB-F05	0.32	2398	0.14	1483	0.15	1483
ZY0E05-E07	0.71	1698	0.18	1359	NT	NT
ZY0EP0-C07	1.28	1247	0.33	946	0.39	890

[表8]. 使用鼠B7-H4-Fc得到的HTRF數據

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

結合親和力測量

【0496】使用ForteBio Octet系統測量抗體對人、鼠和剪接變體B7-H4 ECD的親和力。人IgG1-TM抗體被蛋白G捕獲，並測量了單體物質B7-H4-FLAG ECD與該抗體的結合。對人B7-H4的親和力在10-25 nM範圍內，而對鼠的親和力在10-600 nM之間。除ZY0EP0-C07以外的所有抗體都可以結合剪接變體，親和力在200-1600 nM之間。動力學結合數據匯總於以下表9中。

[表9].Octet親和力匯總

		hIgG1-TM（n=4-7）			hIgG1（n=1）		
抗體	蛋白質	KD（nM）	kon（1/Ms）	kdis（1/s）	KD（nM）	kon（1/Ms）	kdis（1/s）
ZY0EPQ-E02	人B7-H4	25.7	7.09E+04	1.82E-03	24	8.59E+04	2.08E-03
	鼠B7-H4	396	7.67E+04	3.04E-02	498	1.00E+05	4.98E-02
	B7-H4-SV	1660	1.38E+03	2.29E-03	1030	2.46E+03	2.52E-03
ZY0EQD-E02	人B7-H4	14.4	1.93E+05	2.78E-03	14.9	2.16E+05	3.21E-03
	鼠B7-H4	621	2.03E+05	1.26E-01	625	3.41E+05	2.13E-01
	B7-H4-SV	801	3.36E+03	2.69E-03	834	4.19E+03	3.49E-03
ZY0EOB-F05	人B7-H4	13.4	2.65E+04	3.55E-04	11.7	3.10E+04	3.62E-04
	鼠B7-H4	25	1.87E+04	4.76E-04	19.8	2.49E+04	4.93E-04
	B7-H4-SV	174	3.35E+03	5.84E-04	127	4.71E+03	5.98E-04
ZY0E05-E07	人B7-H4	19.8	1.71E+04	3.38E-04	14.6	2.17E+04	3.18E-04
	鼠B7-H4	30	1.21E+04	3.61E-04	23.2	1.79E+04	4.15E-04
	B7-H4-SV	264	1.89E+03	4.99E-04	182	2.91E+03	5.28E-04
ZY0EP0-C07	人B7-H4	9.4	4.16E+04	3.97E-04	7	4.88E+04	3.63E-04
	鼠B7-H4	11	4.30E+04	5.24E-04	9	6.02E+04	5.51E-04
	B7-H4-SV	無結合			無結合		

表位分組

【0497】使用結合單體B7-H4-FLAG ECD、與DyLight-649軛合的示例性抗體（IgG1-TM）以HTRF測定形式進行表位分組，並用銪軛合的抗FLAG抗體進行檢測。

【0498】組1被定義為ZY0EPQ-E02、ZY0EQD-E02和ZY0E05-E07抗體完全相互抑制，並且僅部分抑制ZY0EPO-C07。組2被定義為ZY0EOB-F05抗體與所有抗體完全競爭並且所有抗體與其完全競爭。組3被定義為ZY0EP0-C07與抗體ZY0EPQ-E02、ZY0EQD-E02和ZY0E05-E07（組1）部分競爭。

[表10].HTRF表位匯總表

競爭抗體	Dy649軛合的抗體				
	ZY0EPQ-E02	ZY0EQD-E02	ZY0EOB-F05	ZY0EO5-E07	ZY0EP0-C07
ZY0EPQ-E02	**完全**	完全	完全	**未測試**	部分
ZY0EQD-E02	完全	**完全**	完全		部分
ZY0EOB-F05	完全	完全	**完全**		完全
ZY0EO5-E07	完全	完全	完全		部分
ZY0EP0-C07	部分	部分	完全		**完全**

物種交叉反應性ELISA

【0499】測試上述5種VelocImmune來源的抗B7-H4示例性抗體中的每一種與內部來源的鼠B7-H4（ECD）的結合。所有示例性抗體均作為人IgG1-TM以及4/5鼠IgG1進行測試（此時，ZY0EP0-C07不可用作鼠IgG1）。比較了與單體和二聚體鼠和人B7-H4變體的結合（分別標記了FlagHis10或FcHis6）。

【0500】無論哪種同種型，所有IgG均保留對鼠和人B7-H4抗原的交叉反應性。二聚體性質的、FcHis6標記的B7-H4抗原產生的結合曲線均勻地移動到由相應單體FlagHis10 B7-H4抗原提供的那些曲線的左側。這種效果對於鼠B7-H4更為顯著。

【0501】使用任何VelocImmune示例性抗體未觀察到與無關抗原對照的顯著結合。同種型對照IgG不與B7-H4抗原非特異性結合（NIP228 - 人IgG1-TM，以及MOPC-21 - 鼠IgG1） - 參見圖2A-2K。

商用抗B7-H4多選殖和單選殖特異性ELISA

【0502】藉由ELISA測試了一組商用單選殖和多選殖抗血清與人和鼠B7-H4抗原的結合。還測試了每種抗血清與截短的人B7-H4剪接變體（基本上缺少其細胞外IgV結構域）的結合。無論使用FlagHis10還是FcHis6 B7-H4抗原，都獲得了等效數據。表11和12中匯總了不同的交叉反應性概況。

[表11].單選殖

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

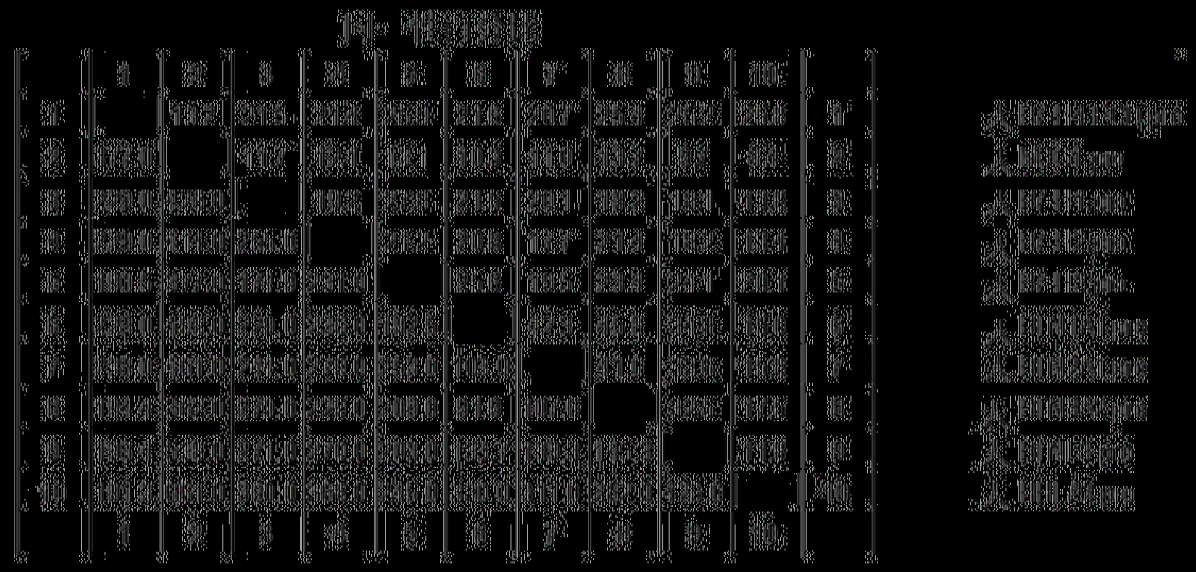
[表12].多選殖

			B7-H4		
公司	***目錄號***	***批號***	***人***	***鼠***	***剪接變體***
Santa Cruz	sc68872 (H108)	L1008	Y	Y	n/a
Santa Cruz	sc68254 (G-18)	C1910	N	N	n/a
R & D	AF2154	WVP016011	Y	Y	Y
Abbiotec	250473	10051104	N	N	n/a
Sigma Aldrich	SAB2500141	7942P1	Y	Y	N

B7-H4同源物特異性ELISA

【0503】測試了五個選定的選殖（VelocImmune IgG）中的每一個與B7-H4家族成員和同源物的非特異性結合（鼠IgG1 ZY0EP0-C07可用於測試）。藉由使用人B7-H4的ECD作為測試序列進行BLASTP搜索來指導選擇要測試的抗原。然後使用CLUSTALW分析對來自該列表的有利命中進行比對，並且獲得在一級胺基酸水平顯示最高同一性百分比的那些抗原（參見表13）。

[表13].



[0504] 7種示例性抗體不與同源物huB7-H1、huB7-H2、huB7-H3、huBTN1A1、huHLA2或huBTN3A2以可測量的程度結合，而無論哪種抗體同種型。請注意，在測試huMOG1、huBTN2A1或huBTNL3抗原時未觀察到結合（參見圖3）。

細胞上蛋白質印跡結合分析

[0505] 使用Accutase將細胞從T175燒瓶上分離，並對其計數。所使用的轉染方法基本上是Invitrogen Lipofectamine LTX方案（使用反向轉染方法的高通量方案）中所述之方法。將100 µl細胞（4.5 x 10^4個/100 µl）添加到含有DNA-脂質體轉染混合物的96孔板中。將板在37°C孵育18小時，並使用10%緩衝福馬林固定過夜。將板用Odyssey封閉緩衝液封閉，與適當的第一抗體一起孵育過夜，然後洗滌並用適當的Odyssey第二抗體進行檢測。

[0506] 將板風乾，並使用Odyssey成像儀、使用製造商提供的推薦掃描水平進行掃描。

[0507] QD-E02和PQ-E02具有高水平的非特異性結合，因此抗體以超出對照抗體（泳道E、U、R、S）的方式出人意料地結合廣泛的細胞類型（參見圖

4。OB-F05和O5-E07對轉染的HEK產生良好的結果，並且還與轉染的CHO結合。示例性抗體QD-E02、OB-F05和O5-E07以及PQ-E02與OVCAR4細胞結合。

概述

【0508】表14顯示了五種示例性抗體的特性的匯總。

[表14].

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

實例4

藉由流動式細胞分析術篩選用於B7-H4表面表現的細胞系

【0509】已使用示例性抗體和/或商用抗B7-H4抗體測試出以下人細胞系對B7-H4表現呈陽性（相對B7-H4表現水平由「+」表示）：

- SK-BR-3（+++）
- T47D（+）
- MDA-MB-468（++）

- OVCAR4（+++）
- NIH:OVCAR3（+）
- Calu-3（+）

【0510】以下人細胞系已被測試為陰性：NCI-H322、Raji（+/- IFNg激活）、Ramos（+/- IFNg激活）和Du145。

實例5

體外細胞毒性測定

【0511】表現B7-H4的細胞系對五種人IgG1-TM示例性抗體的內化已經藉由實驗得到證實（SK-BR-3、MDA-MB-468、OVCAR4和JumpIn CHO Fl-B7H4）。使用皂草素軛合的抗人IgG第二抗體證明了五種IgG1-TM示例性抗體的ADC細胞毒性（參見圖5）。20 μg/ml『單獨抗體』對照下的細胞活力約為100%。

實例6

選殖ZY0EQD_E02特異性ELISA

【0512】由於選殖ZY0EQD_E02的優越性能，選擇該選殖進行更詳細的分析。ZY0EQD_E02包含SEQ ID NO: 7的CHDR1；SEQ ID NO: 8的CHDR2；SEQ ID NO: 9的CHDR3；SEQ ID NO: 10的CLDR1；SEQ ID NO: 11的CLDR1；SEQ ID NO: 12的CLDR1。所述選殖包含SEQ ID NO: 33的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL鏈。所述選殖包含SEQ ID NO: 48的重鏈和SEQ ID NO: 44的輕鏈。種系化形式（E02-GL）包含SEQ ID NO: 45的VH鏈和SEQ ID NO: 34的VL鏈；例如，SEQ ID NO: 51的重鏈和SEQ ID NO: 44的輕鏈。

【0513】進行ELISA分析以確定與來自人（包括剪接變體）、食蟹猴（cyno）、小鼠和大鼠的B7-H4的結合。所述物種中的人B7-H4的序列同一性百分比為：結構域FL - 食蟹猴（98.6%）；兔（91.6%）；小鼠（87.9%）；大鼠

（86.9%）；結構域ECD - 食蟹猴（99.6%）；兔（94.3%）；小鼠（90%）；大鼠（89.6%）。

【0514】 測試選殖的Maia形式mAb（例如，包含C插入，如例如SEQ ID NO.: 41所示）的結合。測定了野生型以及多種變體（種系化（GL）、GLQ、GLY），連同作為對照的R347-maia人IgG1（參見圖6）。

【0515】 R347-maia同種型對照顯示不與任何測試的抗原結合。E02-maia結合概況與之前的實驗相似。E02-maia和E02-GL-maia具有相似的結合概況。有利地，這證明了種系化（GL）和非種系化（例如WT）形式的抗體都保留了該抗體的有利結合特性/概況。

實例7

E02-GL的結合與mAb「1D11」的結合的比較

【0516】 藉由ELISA，將種系化的選殖ZY0EQD_E02（在此稱為E02-GL）的結合親和力與已知的抗B7-H4抗體「1D11」（基因泰克公司（Genentech）；描述於WO 2016040724中，將其藉由引用併入本文）的結合親和力直接比較（參見上面的材料與方法）。

【0517】 「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。例如，該等實例中的E02-GL包含SEQ ID NO: 45的VH鏈序列，例如SEQ ID NO: 43的種系化形式。

【0518】 直接比較表明，選殖E02-GL比1D11表現出顯著更好的結合（親和力）（參見圖7）。與實例7一致，R347-maia同種型對照顯示不與任何測試的抗原結合。

【0519】 此外，與1D11相比，E02-GL顯示（通過流動式細胞分析術實驗，參見上文材料與方法）與癌細胞上表現的B7-H4具有更好的結合。因此，E02-GL不僅表現出優異的結合，而且還表現出優異的癌細胞靶向性。測試了與

表現hB7-H4的HT29細胞和SK-BR-3細胞（表現B7-H4）的結合。測試了濃度為31 ng/ml、156 ng/ml和78 ng/ml的抗體的結合。HT29細胞的結果如圖8A所示，SK-BR-3細胞的結果如圖8B所示。符號◊表示『E02-GL部分』，符號□表示『1D11部分』。符號「●」表示（陰性）對照『R347組分』。

【0520】 從圖8A-8B中可以看出，「E02-GL部分」中染色的細胞數量明顯高於「1D11部分」中染色的細胞數量。

實例8

Ad293細胞的體外細胞毒性，

在有和沒有B7-H4轉染的情況下（E02-GL-SG3932）

【0521】 選殖E02-GL以平均藥物抗體比率（DAR）為8軛合至拓撲異構酶I有效載荷SG3932（提供E02-GL-SG3932），並測試了靶向和殺死人B7-H4轉染的和未轉染的Ad293細胞的能力（例如，後者代表陰性對照）。將軛合至SG3932的抗體NIP228用作對照。轉染的細胞很容易被E02-GL-SG3932軛合物（其IC50為53.3 ng/ml）靶向並殺死（參見圖9A）。在未轉染的細胞中未觀察到添加E02-GL-SG3932軛合物後的顯著殺傷作用（參見圖9B）。在本文描述的涉及軛合至拓撲異構酶抑制劑的E02-GL的所有實驗中，所使用的E02-GL選殖通常具有SEQ ID NO.: 51的重鏈序列。

方法：

【0522】 藉由TrypLE Express（Gibco公司，佩斯利，英國）使細胞系從組織培養瓶中分離，藉由離心使其沈澱，並重懸於生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）中。藉由台盼藍排除法、使用Vi-CELL XR細胞活力分析儀（貝克曼·庫爾特生命科學公司（Beckman Coulter Life Sciences），印弟安納波里斯（Indianapolis），印第安那州（Indiana））對活細胞進行計數。在生長培養基中將細胞密度調整為3.33 x10^4個細胞/mL。將75 μL/孔的細胞懸液（2.5x10^3個細

胞）添加到96孔白壁透明底部組織培養處理板中，並在37°C、5% CO_2下在加濕的組織培養箱中培養過夜。

【0523】將ADC（例如，NIP228-SG3932和E02-GL-SG3932）稀釋到生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）中，濃度為240 μg/mL。在生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）中製備五倍連續稀釋液，然後將25 μL添加到培養的細胞的一式三份孔中，同時九點、五倍連續稀釋抗體（例如，NIP228-SG3932或E02-GL-SG3932）。將25 μL/孔的生長培養基（RPMI-1640，10% FBS）添加到模擬處理的對照細胞中。將細胞在加濕的組織培養箱中於37°C、5% CO_2下培養六天，此時根據製造商的方案使用CellTiter-Glo®測定（普洛麥格公司，南安普敦，英國）評估細胞活力。使用Envision多標籤酶標儀（珀金埃爾默公司，Seer Green，英國）測量發光。藉由使用第8版GraphPad Prism（GraphPad軟體公司，拉荷亞，加利福尼亞州）中的非線性回歸模型 [log促效劑相對於響應 - 可變斜率（四個參數）]產生半數最大抑制濃度（IC50）值來測定測試品抗體（例如，NIP228-SG3932或E02-GL-SG3932）的效力，並表示為相對於模擬處理的對照細胞的細胞活力百分比 - ([(處理的細胞 - 背景) / (模擬處理的對照細胞 - 背景)] x 100)。

實例9

E02-GL-SG3932引起體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0524】將HT29-huB7-H4選殖26靶標陽性細胞和GFP標記的HT29靶標陰性細胞（單獨鋪板或以1:1的比例混合鋪板並培養1天）用200 ng/mL E02-GL-SG3932或NIP228-SG3932同種型對照ADC處理6天。在處理結束時，使用流動式細胞分析術測定活的GFP陰性HT29-huB7-H4選殖26細胞或GFP陽性HT29細胞的數量。結果示於圖10中：A) 點圖顯示了來自單獨或一起培養的HT29-GFP細胞和HT29+huB7-H4選殖26細胞的培養基處理樣本的處理結束時流動式細胞分

析術分析的代表性圖像。左上和左下象限中顯示的數位分別反映了HT29-GFP細胞和HT29+huB7-H4選殖26細胞的百分比。B) 當單獨鋪板時，在用E02-GL-SG3932處理後在HT29+huB7H4選殖26細胞中觀察到細胞計數減少，這在靶標陰性HT29-GFP細胞中未觀察到。當在共培養中鋪板細胞時，靶標陰性HT29-GFP細胞和靶標陽性HT29+huB7H4選殖26細胞的細胞計數均減少，這證明了旁觀者殺傷作用。

方法：

【0525】使用慢病毒表現系統製備穩定表現綠色螢光蛋白（GFP）的HT29-GFP細胞系。將細胞以15,000個細胞/孔的總細胞密度鋪板在24孔板中，單獨培養或以1:1的比例混合培養1天。然後移除培養基並用單獨的新鮮培養基或含有200 ng/mL NIP228-SG3932 ADC或E02-GL-SG3932 ADC的培養基更換，並將細胞再孵育6天。在處理結束時，使用流動式細胞分析術和FlowJo軟體測定活的GFP陰性HT29+huB7-H4選殖26細胞或GFP陽性HT29細胞的數量。

實例10

E02-GL-SG3932引起體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0526】將腫瘤細胞皮下植入8至10週齡的雌性SCID小鼠體內。當腫瘤達到適當的腫瘤體積範圍（通常為150-250 mm^3）時，將動物隨機分為治療組和對照組並開始給藥。通過靜脈內注射向荷瘤小鼠投與單劑量的測試品。每天觀察動物，每週測量並記錄腫瘤尺寸和體重兩到三次。結果示於圖11中。藉由卡尺測量腫瘤體積且使用以下公式計算腫瘤體積：腫瘤體積 = 長（mm） x 寬（mm）^{2}/2，其中長和寬分別為腫瘤的最長和最短直徑。

實例11

E02-GL-SG3932在患者源性異種移植

（PDX）模型中具有有效的體內活性

【0527】將腫瘤組織碎片皮下植入6至8週齡的雌性無胸腺裸小鼠體內。當腫瘤達到適當的腫瘤體積範圍（通常為150-300 mm^3）時，將動物隨機分為治療組和對照組並開始給藥。通過靜脈內注射向荷瘤小鼠投與單劑量的測試品。每天觀察動物，每週測量並記錄腫瘤尺寸和體重兩次。結果示於圖12中，並且表明E02-GL-SG3932在患者源性異種移植（PDX）模型中具有有效的體內活性。藉由數顯卡尺測量腫瘤體積且使用以下公式計算腫瘤體積：腫瘤體積 = 長（mm） x 寬（mm）^{2} x 0.52，其中長和寬分別為腫瘤的最長和最短直徑。

【0528】圖13顯示了藉由確定處理後腫瘤體積變化進一步評估對E02-GL-SG3932的體內抗腫瘤響應的結果，再次證明了E02-GL-SG3932在單次i.v.注射後在PDX模型中的抗腫瘤活性。處理開始時的腫瘤體積稱為初始腫瘤體積（ITV）；對ADC處理顯示最大響應時的腫瘤體積稱為最終腫瘤體積（ETV）。如果ETV小於ITV，則如下計算抗腫瘤響應：[(ETV-ITV)/ITV] x 100。否則，抗腫瘤響應表示為處理組相對於媒介物對照組的腫瘤體積變化百分比：100-[1-((ETV-ITV)處理/(ETV-ITV)媒介物) x 100]。

實例12

E02-GL-topo I抑制劑ADC

在體外和體內MX-1細胞模型和HT29源性模型中具有相似的效力

MX-1模型

【0529】MX-1異種移植模型在冠科生物技術公司（Crown Biosciences）（太倉，中國）中進行。該研究係根據CRO和阿斯利康IACUC指南進行的。將MX-1腫瘤細胞在37℃、在空氣中5% CO2氛圍下、在補充有10%胎牛血清的RPMI-1640培養基中保持體外培養。收穫呈指數生長的細胞並將5×10^6個細胞（在0.1 ml體積的PBS:基質膠 = 1:1中）植入雌性BALB/c裸小鼠的右腹。在處理開始之前，立即使用「匹配過分佈」隨機化方法（Study Director™軟體）將小

鼠隨機分到治療組中（平均腫瘤體積 = 153 mm^3）。在投與前，將所有抗體-藥物軛合物立即在緩衝液（25 mM組胺酸、7%蔗糖、0.02% PS80、pH 6.0）中稀釋。以單次i.v.劑量投與ADC。每週記錄兩次腫瘤和體重測量結果，並使用等式長度（mm） x 寬度（mm）^{2}/2計算腫瘤體積。每天監測動物的發病率和死亡率。結果示於圖14A中。

HT29+huB7-H4（選殖4）

【0530】將HT29+huB7-H4選殖4細胞系在37ºC、在空氣中5% CO^2氛圍下、在補充有10%胎牛血清的McCoy's改良5A培養基中保持體外培養。收穫呈指數生長的HT29+B7-H4選殖4細胞並將5×10^6個細胞（在0.2 ml體積的PBS:Cultrex = 1:1中）植入雌性CB-17 SCID小鼠的右腹。在處理前，立即使用「確定性」隨機化方法（Study Director™軟體）將小鼠隨機分到治療組中（平均腫瘤體積 = 250 mm^3）。在投與前，將所有抗體-藥物軛合物立即在緩衝液（25 mM組胺酸、7%蔗糖、0.02% PS80、pH 6.0）中稀釋。以單一劑量i.v.投與ADC。每週記錄兩次腫瘤和體重測量結果，並使用等式長度（mm） x 寬度（mm）^{2}/2計算腫瘤體積。每天監測動物的發病率和死亡率。結果示於圖14B中。

實例13

食蟹猴B7-H4轉染的細胞的體外細胞毒性（E02-GL-SG3249）

【0531】將選殖E02-GL軛合至細胞毒素SG3249（提供E02-GL-SG3249），並測試其靶向和殺死食蟹猴B7-H4轉染的細胞和未B7-H4轉染的細胞的能力。為方便起見，使用此實例中測試的包含Maia重鏈骨架（例如，具有半胱胺酸插入，這提供了SG3249可軛合的額外位點，參見SEQ ID NO: 48）的抗體。在使用其他重鏈骨架（例如，缺少這種半胱胺酸插入，例如參見SEQ ID NO: 52）的情況下不會發生功效損失。將軛合至SG3249的抗體R347用作對照。

【0532】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。例如，該等實例中的E02-GL包含SEQ ID NO: 45的VH鏈序列，例如SEQ ID NO: 43的種系化形式。

【0533】轉染的細胞很容易被E02-GL-SG3249軛合物（其IC50為0.6721 ng/ml）靶向並殺死。在未轉染的細胞中未觀察到添加E02-GL-SG3249軛合物後的顯著殺傷作用（參見圖15）。

實例14

E02-GL作用方式

監測E02-GL在活細胞中的內化動力學

【0534】使用軛合至螢光標記物AF647的E02-GL處理活細胞。在處理後0 min時，在細胞膜上注意到螢光簇（表明與膜上存在的B7-H4結合）。時程分析表明，細胞內螢光點的數量隨時間穩定增加，這表明抗體與受體抗原一起內化。與Lamp1-AF488（溶酶體的標記物）的共同視覺化顯示出顯著的重疊，這表明所結合的抗體藉由胞吞作用被內化（參見圖16A-16C）。

【0535】在與靶抗原結合後觀察到的抗體的內化係非常有利的，因為這種內化通常被認為是實現所需ADC效果的先決條件。

【0536】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。例如，該等實例中的E02-GL包含SEQ ID NO: 45的VH鏈序列，例如SEQ ID NO: 43的種系化形式。

E02-GL-SG3932 ADC：作用機制

【0537】在用NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932、E02-GL-SG3932、或彈頭SG3924（作為對照）（mAb或ADC為10 ug/ml，彈頭為10 nM）處理HT29+huB7-H4選殖26細胞後，製備裂解物並用針對pATR、ATR、pChk1、Chk1、pATM、ATM、pChk2、ChK2、pH2AX、H2AX和肌動蛋白（上樣對

照）的抗體進行蛋白質印跡分析 - 參見圖17A。結果表明E02-GL-SG3932的拓撲異構酶I毒彈頭（SG3924）激活ATM和ATR傳訊，這表明E02-GL-SG3932處理導致體外雙鏈DNA斷裂。

【0538】 在用NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932、E02-GL-SG3932、或彈頭SG3924（作為對照）（mAb或ADC為10 ug/ml，彈頭為10 nM）處理MX-1細胞後，製備裂解物並用針對pATR、ATR、pATM、ATM、pH2AX、H2AX和肌動蛋白（上樣對照）的抗體進行蛋白質印跡分析 - 參見圖17B。結果表明E02-GL-SG3932的拓撲異構酶I毒彈頭（SG3924）激活ATM和ATR傳訊，這表明E02-GL-SG3932處理導致體外雙鏈DNA斷裂。

方法：

【0539】 將HT29+huB7-H4選殖26和MX-1細胞分別以500,000個和1,500,000個細胞/孔的密度鋪板在6孔板中的含有10%熱滅活FBS的培養基中。第二天，去除鋪板培養基，並將細胞與HT29+huB7-H4選殖26細胞、NIP228、E02-GL、NIP228-SG3932和E02-GL-SG3932（濃度為10 μg/mL）在完全培養基中一起孵育。將10 nM的彈頭SG3924用作對照。72小時後，將細胞用磷酸鹽緩衝鹽水（PBS）洗滌一次，然後藉由添加Laemmil還原緩衝液（上樣緩衝液，波士頓生物產品公司（Boston BioProducts））進行裂解。短暫孵育後，收集細胞裂解物，將等量的細胞裂解物載入到Bis NuPAGE Novex Bis-Tris凝膠（英傑公司）上，並將蛋白質轉移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜（英傑公司）上。用5%脫脂奶粉和在Tris緩衝鹽水（pH 7.4）中的0.1%吐溫20（西格馬公司）（TBST）封閉膜，並在4°C與來自細胞傳訊公司（Cell Signaling）的針對pATM-Ser1981（#4526）、ATM（#2873）、pATR-Thr1989（#58014）、ATR（#13934）、pChk1-Ser345（#2348）、Chk1（#2360）、pChk2-Thr68（#2197）、Chk2（#3440）pH2AX-Ser139（#2577）和H2AX（#2595）的抗體

一起孵育過夜。使用針對肌動蛋白的抗體（A1978，西格瑪公司）以確保在所有孔中載入等量的蛋白質。將膜在於TBS中的0.1%吐溫20中洗滌，然後與山葵過氧化物酶（HRP）軛合的鏈黴抗生物素蛋白第二抗體（GE醫療集團（GE Healthcare））一起孵育1小時。洗滌後，藉由使用SuperSignal West Femto化學發光底物和SuperSignal West Pico化學發光底物（皮爾斯公司（Pierce）/賽默科學公司（Thermo Scientific））檢測蛋白質條帶。使用ImageQuant LAS4000儀（GE醫療集團）捕獲和分析圖像。

E02-GL-SG3249 ADC：作用機制

【0540】 在用E02-GL-SG3249、以及SG3199（作為對照）（分別為100 ng/ml和100 pM）處理HCC1569細胞後，製備裂解物並使用針對以下的抗體進行蛋白質印跡分析：pATR、ATR、pChk1、Chk1、pRPA32、RPA32、pATM、ATM（均參與ATR傳訊），pChk2、ChK2、pKAP1、KAP1（均參與ATM傳訊），pDNA-PK、DNA-PK、pH2AX、H2AX、pBRCA1、BRCA1（均參與DNA雙鏈斷裂），pFANCD2和GAPDH（上樣對照）。陰性對照係僅PBS處理。

【0541】 結果表明E02-GL-SG3249的PBD二聚體彈頭（SG3199）激活ATM和ATR傳訊，這表明E02-GL-SG3249處理導致體外雙鏈DNA斷裂（參見圖17C）。

半胱天冬酶3/7活性

【0542】 將SKBR-3細胞用E02-GL-SG3249、SG3199和奧拉帕尼（對照）處理，並藉由IncuCyte監測半胱天冬酶3/7活性（例如細胞凋亡）。觀察到半胱天冬酶3/7活性水平的劑量依賴性增加（參見圖18）。

實例15

E02-GL-SG3249和彈頭SG3199對腫瘤細胞的體外活性

【0543】將多種癌細胞系用選殖E02-GL-SG3249（例如，軛合至細胞毒素）處理，如表15所示。結果示於圖19中。

[表15].

細胞系	注釋	E02-GL MESF
HT29	B7-H4陰性	2,101
HT29 hB7H4選殖4		71,928
HT29 hB7H4選殖44		147,125
HT29 hB7H4選殖26		429,398
HEK293 JI親本	B7-H4陰性	3,266
HEK 293 JI hB7H4池	在池中有一些陰性細胞	2,481,266
HCC1954		47,173
SKBr3		78,343
Zr75-1		80,699
HCC1569		112,608
MDA-MB-468		92,157
OVCAR4		261,997

實例16

E02-GL-SG3249引起體外腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0544】將HT29 B7-H4表現細胞用E02-GL-SG3249處理4天，之後取出條件培養基並添加到HT29 WT（即，不表現B7-H4）中。在添加條件培養基後觀察到細胞活力快速降低，這在未處理的對照中未觀察到（參見圖20）。

【0545】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

實例17

E02-GL-SG3249抑制腫瘤異種移植物的生長

【0546】使用以下癌細胞系在小鼠上製備腫瘤異種移植物：

- OVCAR4（順鉑難治性卵巢癌；B7-H4高表現）
- HCC1569（HER2陽性乳癌；異源性B7-H4表現）

- MDA-MB-468（三陰性乳癌；B7-H4低表現）

【0547】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0548】與對照（僅媒介物）相比，觀察到腫瘤體積顯著減少，令人驚訝地，這對於低水平表現B7-H4的TNBC腫瘤也是如此（參見圖22），表明E02-GL-SG3249在抑制腫瘤生長方面具有較高的效力。

實例18

E02-GL-SG3249引起體內腫瘤細胞的旁觀者殺傷

【0549】藉由共同移植表現B7-H4的HT29細胞系與不表現其的HT29細胞（1:1的比例）產生B7-H4異源性腫瘤。該等異種移植物的異源性並沒有阻止E02-GL-SG3249對它們的生長抑制，這一點很明顯（參見圖23）。這是非常有利的，因為發明人已經發現B7-H4會在腫瘤內異源表現。

實例19

與「1D11」相比，E02-GL ADC對表現B7-H4的細胞具有優越的體外細胞毒性

【0550】將選殖E02-GL（ZY0EQD_E02種系化的（GL））軛合至細胞毒素SG3249（提供E02-GL-SG3249 ADC）或AZ1508（提供E02-GL-AZ1508），並與Genentech「1D11」ADC（1D11與（A114C-）MMAE軛合）進行比較，比較其靶向和殺傷表現B7-H4的細胞的能力。

【0551】「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0552】細胞毒性測定（參見上文材料與方法）表明，與1D11 ADC（1D11與（A114C-）MMAE軛合）相比，E02-GL ADC（E02-GL-SG3249）具有優越的細胞毒性效力 - 參見圖21。

【0553】如下進行ADC滴定：

1D11-A114C-MMAE	100 μg/ml	25 μg/ml	6.25 μg/ml	1.56 μg/ml	390 ng/ml	98 ng/ml	24.5 ng/ml	6.12 ng/ml	1.53 ng/ml	382 pg/ml
E02-maia-GL-SG3249	4 μg/ml	1 μg/ml	250 ng/ml	65 ng/ml	16 ng/ml	4 ng/ml	1 ng/ml	250 pg/ml	62.5 pg/ml	16 pg/ml

實例20

E02-GL-SG3249在患者源性異種移植

（PDX）模型中具有有效的體內活性

【0554】使用具有不同的B7-H4表現水平的癌細胞系生成患者源性異種移植模型，如表16中所述。在所有模型中都觀察到腫瘤生長受到抑制（參見圖24）。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

[表16].

模型	癌症類型	%腫瘤生長抑制（TGI）*
HBCx-10	乳癌（三陰性）	90
CTG-012	乳癌（三陰性）	90
HBCx-11	乳癌（三陰性）	80
T330	乳癌（三陰性）	70
HBCx-9	乳癌（三陰性）	70
T168	乳癌（HR+）	60
T272	乳癌（HR+）	30
CTG-1106	乳癌（三陰性）	30
CTG-052	乳癌（三陰性）	30
CTG-1086	卵巢癌	20
CTG-1153	乳癌（三陰性）	<10
CTG-0897	卵巢癌	<10
CTG-017	乳癌（三陰性）	<10
T226	乳癌（Her2+）	<10
CTG-0992	卵巢癌	0

* %腫瘤生長抑制（TGI），0.3 mg/kg E02-GL-SG3249與媒介物；最小二乘均數（LSM） & TGI = 100*(LSM媒介物 - LSM『E02-GL-SG3249』)/LSM媒介物
+++ = 高陽性表現；++和+ = 低陽性表現

實例21

E02-GL-SG3249在腫瘤異種移植物中引起雙鏈斷裂

【0555】 生成腫瘤異種移植模型（使用HCC1954細胞），並將其用E02-GL-SG3249處理。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0556】 然後進行免疫組織化學以確定處理後的γ H2AX（雙鏈斷裂的標誌物）。在E02-GL-SG3249處理後長達10天，觀察到γ H2AX陽性腫瘤細胞的數量增加（參見圖25）。

實例22

使用KinExA 3200分析E02_GL的親和力

【0557】 使用KinExA技術進行以下實驗，該實驗用於獲得選殖E02_GL抗B7H4 Fab與人B7H4的親和力（KD）的估計值。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0558】 在25℃，在5、10或45 nM固定濃度的Fab存在下，對一系列人B7H4濃度進行平衡過夜。在KinExA 3200上分析了該等濃度，並全域擬合了數據集（N曲線分析）。結果匯總在表17中。

[表17].

抗體	B7H4	K_D的最佳估計值	N曲線分析，注釋
E02_GL	人	1.2 nM	K_D = 1.21 nM，95%信賴間隔 = 0.556 - 2.22 nM。 62%的h B7H4具有表位活性，95%信賴間隔 = 51%-77%

【0559】 62%的h B7H4活性數字與Rmax計算以及E02_GL的基於Biacore的親和力評估非常匹配。

實例23

E02_GL結合B7-H4與mAb「1D11」結合B7-H4的比較

【0560】 對選殖E02_GL進行ELISA分析，以確定與人和小鼠B7-H4的結合。將結合直接與mAb 1D11（基因泰克公司）和R347同種型對照進行比較。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0561】 與小鼠B7-H4相比，E02_GL對人B7-H4顯示出更高的結合親和力（參見例如圖2D）。有利的是，與Genentech「1D11」 mAb（顯示出更弱的結合）相比，E02-GL顯示出對人B7-H4的結合（親和力）顯著更強，如藉由ELISA和FACs分析所證明的 - 分別參見圖7和圖8。事實上，Genentech「1D11」 mAb以與小鼠B7-H4相似的水平（低）結合人B7-H4（這表明與E02_GL相比，「1D11」對人蛋白質的特異性較低）。

實例24

顯示E02_GL的腫瘤定位的影像學研究

【0562】 體內成像研究按照材料與方法（上文）中所述地進行，即使用800CW標記的抗體（E02_GL）。「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0563】 對於HT29，在第3、7、14天；對於CT26，在第3天和第7天，以及在第10天的p=0.06；對於4T1，在第7天，均觀察到與WT腫瘤相比，B7-H4 Ab（E02_GL）優先定位於表現B7-H4的腫瘤 - 參見圖26和27。

【0564】總輻射效率產生了最清晰的結果。當相對於腫瘤體積標準化時，觀察到類似的趨勢。

實例25

使用E02-GL-SG3249進行毒理學研究

【0565】將E02-GL-SG3249投與於雄性食蟹猴（N = 2/劑量水平）。該「E02-GL」抗體具有ZY0EQD-E02的CDR / VH序列（例如與其對應）（「GL」表示抗體已被種系化）。

【0566】未觀察到異常毒性，並且毒性與其他類似的PBD-ADC一致（藉由監測標準靶器官：腎、骨髓、皮膚；沒有證據表明與靶標有關的影響）。

藥理學研究

【0567】進行體外和體內藥理學研究以進一步表徵E02-GL抗體（E02-GL抗體及其抗原結合Fab中間體，後者在本文中稱為「E02-INT」）的作用和作用機制。E02-GL-SG3932 ADC -GL-SG3932係一種針對B7-H4的ADC，並且包含經由可裂解的馬來醯亞胺-PEG8-纈胺酸-丙胺酸連接子（可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子）軛合至TOP1i彈頭的抗B7-H4人IgG1κ單株抗體（即，E02-GL）。TOP1i彈頭在本文中稱為SG3924。TOP1i藥物通過硫代琥珀醯亞胺鍵聯與抗體中的天然半胱胺酸共價結合，每個抗體結合大約8個藥物（即，DAR為8）。E02-GL-SG3932 ADC的示意圖示於圖29A中。E02-GL-SG3932 ADC與競爭對手ADC的主要差異特徵示於如圖29B中。

【0568】E02-GL-SG3932的特症在下文闡述並在本文其他地方進一步描述：

- mAb E02-INT：與人和食蟹猴B7-H4的特異性結合（親和力分別為3.7 nM、3.94 nM）
- 彈頭SG3932

- 連接子-彈頭：可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932

體外研究

實例26

藉由免疫組織化學進行B7-H4表現譜分析

【0569】使用經驗證的IHC方案評估B7-H4的表現譜，以證明B7-H4在FFPE正常食蟹猴和人組織以及人腫瘤組織中表現。

【0570】B7-H4顯示在有限數量的正常人組織中表現，並且當存在時，通常在樣本的 < 10%的總細胞中表現（輸卵管和肺支氣管除外），僅限於導管或管狀上皮，並且主要位於腔頂膜上（表18）。在正常食蟹猴組織中檢測到類似的B7-H4表現譜（表2和表19），其中B7-H4顯示在有限數量的組織中表現，表現譜僅限於導管或管狀上皮並且主要位於腔頂膜和細胞質內。圖30顯示了在選定的正常人和食蟹猴組織中B7-H4的免疫組織化學染色的代表性圖像。

[表18]. B7-H4在人正常組織中表現的免疫組織化學結果

組織	**顯示B7-H4 IHC染色的供體數**	**顯示陽性B7-H4染色的組織的相對比例**	**強度[a]**	**細胞定位**	**詳情**
乳腺	6/6	< 10%	+/+++	腔m	導管上皮細胞
附睪	3/3	< 5%	++	腔m	導管中的腔膜
輸卵管	3/3	< 30%	++/+++	腔m	導管上皮染色
腎	11/11	< 5%	++ /+++	腔m > c	腔膜和偶見小管中的一些細胞質染色
肝	2/3	1%	+/++	腔m	偶見小膽管的腔膜
肺 - 支氣管	7/7	< 20%	++/+++	腔m > c	支氣管上皮中的基底細胞和來自支氣管腺的偶見導管上皮

組織	**顯示B7-H4 IHC染色的供體數**	**顯示陽性B7-H4染色的組織的相對比例**	**強度[a]**	**細胞定位**	**詳情**
食管	1/3	1%	+	腔m	黏膜下腺中偶見上皮細胞的基底外側膜
卵巢	3/6	1%	+/++	c > m	顯示顆粒細胞的單個成熟卵母細胞
胰腺	8/8	< 5%	+/+++	腔m	泡心細胞（centroacinar cell）的腔膜和細胞質，以及間管的腔染色
垂體	3/3	< 5%	++/+++	m > c	中間部細胞中的偶見的定位細胞，其顯示在毛囊和Rathke's裂上皮細胞中的膠體的染色
前列腺	3/3	< 10%	++/+++	m > c	一些導管中的基底上皮細胞
精腺	3/3	< 10%	++/+++	腔m	幾個導管上皮細胞
皮膚	15/16	< 5%	++/+++	腔m	偶見汗腺導管上皮膜、毛囊上皮膜
輸尿管	3/3	< 5%	+/++	m > c	一些基底尿路上皮細胞中的細胞質染色
膀胱	8/8	< 10%	++/+++	腔m > c	尿路上皮細胞的頂端
所有其他組織均未顯示陽性B7-H4 IHC染色			腎上腺、主動脈、動脈、骨髓、腦、盲腸、結腸、十二指腸、眼睛、心臟、回腸、空腸、肺、淋巴結、神經、直腸、唾液腺、骨骼肌、脊髓、脾、胃、睪丸、胸腺、甲狀腺、舌、陰道		

c：細胞質；m：膜。

[a]所有染色的載玻片均由病理學家審查並評分，評估表現B7-H4的細胞比例、染色強度和染色的細胞定位。強度報告為弱（+）、

中等（++）或強（+++）。

【0571】使用IHC在一系列人腫瘤組織中評估B7-H4表現並由病理學家評分。表19詳述了人腫瘤組織表現的匯總，代表性圖像顯示在圖31中。

[表19]. B7-H4在人腫瘤組織中表現的免疫組織化學結果

腫瘤適應症	**具有高B7-H4+腫瘤的供體比例（%）[a]**	**具有低B7-H4+腫瘤的供體比例（%）[b]**	**具有陽性B7-H4+腫瘤的供體比例（%）[c]**	**具有B7-H4+腫瘤的供體的總比例（%）[d]**	**供體總數**
子宮內膜腺癌	42.4	45.5	6.1	93.9	66
乳癌（TNBC）	28.8	35.1	12.6	76.6	111
乳癌（ER+）	32.6	32.3	10.8	75.7	288
乳癌（HER2+）	46.7	23.3	13.3	83.3	30
卵巢癌（漿液性乳頭狀）	49.3	28.0	6.7	84.0	75
膽管癌	33.3	30.3	21.2	84.8	66
NSCLC-SCC	15.0	27.5	23.5	66.0	153

[a] 高B7-H4：含有50%至100%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本。

[b] 低B7-H4：含有5%至49%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本。

[c] 陽性B7-H4：含有1%至4%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本。

[d] 表示含有1%至100%的B7-H4陽性細胞的人腫瘤組織樣本的比例。

【0572】此實例表明B7-H4在多種類型的人癌症中表現，包括乳癌、膽管癌、子宮內膜癌、非小細胞肺癌鱗狀細胞癌和卵巢漿液性癌。

實例27

食蟹猴、恒河猴、小鼠和大鼠中人B7-H4與異種同源物的序列同源性比較

【0573】鑒定了人B7-H4的胺基酸序列，並與食蟹猴、恒河猴、小鼠和大鼠中的異種同源物進行比對。基於該等比對的結果計算同一性百分比。B7-H4在非人靈長類動物中非常保守；對於全長結構域區域和細胞外結構域區域，人B7-H4（hB7-H4）與食蟹猴（cyB7 H4）和恒河猴（rhB7-H4）分別具有98%和99%的序列同一性（圖32）。齧齒動物物種保守性較差；對於全長B7-H4，小鼠和大鼠B7-H4與hB7-H4分別具有87%和86%的序列同一性，與hB7-H4在細胞外結構域方面具有分別為90%和89%的序列同一性。

【0574】此實例證明，人和非人靈長類動物中B7-H4的高胺基酸序列同一性表明E02-GL-SG3932可能與食蟹猴和恒河猴B7-H4結合。相比之下，人、小鼠和大鼠B7-H4之間的胺基酸同一性比較低，這表明E02-GL-SG3932與鼠或大鼠B7-H4的結合不太可能。

實例28

E02-GL-SG3932在小鼠、大鼠、食蟹猴和人血清中孵育十五天後的穩定性

【0575】已知攜帶經由硫代琥珀醯亞胺與半胱胺酸連接的藥物的ADC在生理環境中會由於逆邁克爾反應而表現出一些藥物損失。該過程會再生用於軛合的半胱胺酸和攜帶馬來醯亞胺的藥物，從而隨著時間的推移降低ADC的DAR。這種去軛合過程係含有通過硫代琥珀醯亞胺與抗體連接的藥物的ADC的已知特性。

【0576】藉由免疫沈澱然後藉由還原逆相質譜法（rLCMS）評估E02-GL-SG3932在食蟹猴、小鼠和大鼠血清中的穩定性。測量結果表明，在小鼠、大鼠和食蟹猴血清中孵育後，E02-GL-SG3932發生低於20%的藥物損失，第15天時分別在小鼠、大鼠和食蟹猴血清樣本中，84.5%、83.5%和82.0%的SG3924仍然附著在E02-GL-SG3932上。藉由使用人B7-H4塗覆的樹脂進行免疫捕獲、然後

藉由rLCMS來評估E02-GL-SG3932在人血清中的穩定性。測量結果表明，在人血清中孵育後藥物損失不大，第15天時81%的SG3924仍附著在E02-GL-SG3932上。

【0577】 此實例表明藥物釋放的機制係藉由逆邁克爾反應去軛合而不是連接子裂解，這與藉由馬來醯亞胺與鏈間二硫化物包含的半胱胺酸胺基酸軛合而製備的其他ADC一致。

實例29

抗體中間體E02-INT Fab對重組B7-H4抗原的結合親和力

【0578】 藉由表面電漿共振（SPR）測定抗B7-H4抗體E02-INT Fab對重組人、食蟹猴和小鼠B7-H4變體的結合親和力。表20中顯示的解離常數（K_D）值證明E02-INT Fab以相似的親和力結合固定化的人和食蟹猴B7-H4。相比之下，E02-INT Fab對小鼠B7-H4抗原的親和力比對人B7-H4抗原的親和力低大約100倍。

[表20]. 藉由SPR測定的抗B7-H4抗體中間體E02-INT Fab對人、食蟹猴和小鼠B7-H4的結合親和力

物種	**K_D**
人	3.70 nM
食蟹猴	3.94 nM
小鼠	405（± 15） nM

Fab：抗原結合片段

實例30

E02-GL-SG3932對人FcRn和Fcγ受體的結合親和力

【0579】 藉由SPR評估E02-GL-SG3932對人FcRn和Fcγ受體的結合親和力。人FcRn對E02-GL-SG3932的穩態結合親和力（K_D）為4360 nM。E02-GL-SG3932對huFcγRI的平衡KD為4.35 nM。E02-GL-SG3932對huFcγRIIa、

huFcγRIIb、huFcγRIIIA-158V和huFcγRIIIA-158F的平衡K_D的範圍為3307至21640 nM。

實例31

抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932對重組人B7-H4抗原的結合親和力的比較

【0580】 為了評估拓撲異構酶1連接子-彈頭的軛合是否影響E02-INT抗體的結合特性，使用DELFIA-ELISA方法和SPR方法測量了E02-INT和E02-GL-SG3932的結合親和力。如圖33所示，DELFIA-ELISA測定的結果表明，E02-INT和E02-GL-SG3932與固定化的重組人B7-H4類似地結合，EC50值分別為1.98 nM和1.71 nM。還藉由SPR、使用抗體捕獲方法測定E02-INT和E02-GL-SG3932對人B7-H4抗原的動力學速率常數（k_{on}和k_{off}）和平衡解離常數（K_D）。如表21所示，E02-INT和E02-GL-SG3932與人B7-H4類似地結合，KD值分別為31.1 nM和29.3 nM。

[表21].藉由SPR測定的抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932對人B7-H4的結合親和力

種類	**K_a（$M^{-1}s^{-1}$）**	**K_d（s^{-1}）**	**K_D（nM）**	**R_{max}（RU）**
E02-INT	9.38×10^4	2.92×10^{-3}	31.1	56.8
E02-GL-SG3932	9.55×10^4	2.80×10^{-3}	29.3	49.7

RU：共振單位

【0581】 實例30和31的結果表明，E02-INT抗體的結合特性在與拓撲異構酶1連接子-彈頭軛合後保持不變。

實例32

抗體中間體E02-INT與表現人、食蟹猴或小鼠B7-H4的工程化HEK 293細胞的細胞結合

【0582】使用流動式細胞分析術測量抗體E02-INT與非轉導的HEK 293 Jump In TREX細胞和穩定表現人、鼠或食蟹猴B7-H4的HEK 293 Jump In TREX細胞的結合。抗體E02-INT結合穩定表現人、鼠和食蟹猴B7-H4的HEK 293 Jump In TREX細胞，但不結合B7-H4陰性非轉導的HEK 293 Jump In TREX細胞（圖34）。與表現人或食蟹猴B7-H4的細胞相比，與表現鼠B7-H4的HEK 293 Jump In TREX細胞的結合減少。

實例33

抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932與人乳癌細胞系以及與穩定表現人B7-H4的HT29細胞的細胞結合

【0583】使用流動式細胞分析術測量抗體E02-INT和E02-GL-SG3932與人乳癌細胞系MX-1和MDA-MB-468以及與穩定表現人B7-H4的工程化HT29大腸癌細胞的結合。如圖35所示，E02-INT和E02-GL-SG3932與穩定表現人B7-H4的HT29細胞（HT29-huB7-H4選殖4和HT29-huB7-H4選殖26）類似地結合，但不結合B7-H4陰性非轉導的HT29。E02-INT和E02-GL-SG3932還與MX-1細胞和MDA-MB-468細胞結合，這表明抗體中間體和ADC可以識別人癌細胞系中內源性表現的B7-H4。E02-INT和E02-GL-SG3932的結合係相當的。

【0584】實例32和33證明，親本抗體的細胞結合特性在與拓撲異構酶1連接子-彈頭軛合後保持不變。

實例34

E02-GL-SG3932的體外細胞毒性

【0585】使用CellTiter-Glo測定，使用靶標陰性人大腸癌細胞系HT29、工程化人大腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26和人乳癌細胞系MX-1來測定E02-GL-SG3932處理對細胞活力的影響。如圖36所示，E02-GL-SG3932對表現B7-H4的HT29-huB7-H4選殖26和MX-1細胞具有細胞毒性，IC_{50}值分別為0.036

μg/mL和0.029 μg/mL。相比之下，在B7-H4陰性HT29細胞系中，在E02-GL-SG3932和同種型匹配的對照ADC（NIP228-SG3932）之間沒有觀察到活性差異，這表明E02-GL-SG3932可以特異性殺傷表現人B7-H4的癌細胞。

實例35

E02-GL-SG3932的體外細胞毒性

【0586】 當IgG抗體經由其Fab結構域結合細胞表面抗原時，抗體的Fc部分可以與自然殺手細胞上的FcγRIIIa結合。Fc結構域與FcγRIIIa的相互作用誘導FcγR的交聯，從而觸發含有穿孔素和顆粒酶的細胞毒性顆粒的釋放，導致靶細胞死亡，這一過程稱為抗體依賴性細胞毒性（ADCC）。使用分離的原代人NK細胞和人乳癌SKBR3細胞系作為靶細胞來評估抗體E02-INT和E02-GL-SG3932激活ADCC活性的潛力。在該測定中，E02-INT和E02-GL-SG3932產生的ADCC活性均比未處理的共培養細胞顯著增加（圖36A-36C）。與E02-INT相比，E02-GL-SG3932的活性略有降低，但這種差異在統計學上不顯著，表明E02-INT和E02-GL-SG3932都可以引發體外ADCC活性。

【0587】 接下來，在1 μg/mL E02-GL-SG3932、抗體中間體E02-INT、同種型匹配的對照抗體NIP228和同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932存在下，將人乳癌SK-BR-3細胞與從六名健康供體中分離的NK細胞共培養（圖37）。藉由Incycte®膜聯蛋白V染料結合凋亡細胞上的細胞外表面暴露的磷脂醯絲胺酸、產生明亮且穩定的紅色螢光信號來評估ADCC活性。倍數變化基於非藥物處理的NK/SK-BR-3共培養細胞的最大細胞死亡。藉由將實驗孔中的平均紅色目標物除以星孢菌素處理的SK-BR-3細胞中的平均最大細胞死亡來計算最大細胞死亡。

實例36

抗體E02-INT的內化和溶酶體運輸

【0588】使用定量活細胞成像測定在MX-1人乳癌細胞和過表現B7-H4的HT29 huB7-H4選殖26人大腸癌細胞中評估抗體E02-INT的內化和細胞內運輸特性。延時序列圖像顯示，在人乳癌（MX-1）和大腸癌（HT29-huB7-H4選殖26）細胞系中，強烈的E02-INT膜信號從0分鐘持續到120分鐘，E02-INT的內化到240分鐘時持續增加（圖38、圖39A和圖39B）。兩種細胞系的內化動力學測量結果顯示，HT29-huB7-H4選殖26和MX-1細胞的內化半衰期分別為127（± 35 SD）分鐘和102（± 18 SD）分鐘（圖39C）。

【0589】使用共聚焦顯微鏡，藉由測量與早期內體標記物即早期內體抗原1（EEA1）和溶酶體標記物即溶酶體相關膜蛋白1（LAMP1）的共定位來確定E02-INT的細胞內運輸。如圖40所示，E02-INT在LAMP1修飾的亞細胞區室中富集，而與EEA1的共定位有限，這表明內化後，E02-INT被運輸到細胞的溶酶體區室中。

實例37

由E02-GL-SG3932和SG3924進行的DNA損傷響應傳訊的體外激活

【0590】在用E02-GL-SG3932或其TOP1i彈頭SG3924處理後，使用蛋白質印跡來評估MX-1人乳癌細胞系和工程化大腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26中的DDR通路激活。如圖41所示，用10 μg/mL E02-GL-SG3932或10 nM SG3924處理MX-1細胞導致ATM傳訊通路的激活，明顯可見的是，ATM（Ser 1981）的磷酸化早在24小時時增加並在72小時的處理期內持續增加。類似地，E02-GL-SG3932和SG3924誘導了ATR的激活（Thr 1989磷酸化），在48小時和72小時的時間點觀察到。在處理24小時後觀察到γH2AX增加，並持續到72小時處理期，這表明DNA損傷。

【0591】E02-GL-SG3932或其TOP1i彈頭對DDR傳訊的影響也在結腸直腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26（被工程化以表現B7-H4）中進行了檢查。如圖

42所示，用10 μg/mL E02-GL-SG3932或10 nM SG3924處理導致DDR傳訊通路的激活，這由ATR（Thr 1989）、其下游靶標Chk1（Ser 345）和Chk2（Thr 68）的磷酸化增加證明。這種磷酸化的增加在72小時的處理期內持續存在。類似地，在用E02-GL-SG3932和TOPli彈頭處理後，在48小時和72小時時間點觀察到ATM（Ser 1981）及其下游靶標KAP1（Ser 824）的激活。在處理48小時後觀察到γH2AX增加，並持續到72小時處理期，這表明DNA損傷。

【0592】 總之，該等結果證實，在兩種不同的細胞系中，E02-GL-SG3932激活了與其TOP1i彈頭的作用機制一致的DDR通路。

體內研究

【0593】 體外研究證明E02-GL-SG3932能夠以相似的親和力結合人和食蟹猴B7-H4，即E02-GL-SG3932特異性結合表現B7-H4的腫瘤細胞並且對其具有細胞毒性，並可以在分離的原代NK細胞共培養測定中引發適度的ADCC活性，即E02-GL-SG3932的抗體中間體（E02-INT）被內化到腫瘤細胞中並被運輸到溶酶體區室中，並且用E02-GL-SG3932或其TOP1i彈頭處理激活了表現B7-H4的細胞系中的DDR傳訊通路。為了進一步闡明E02-GL-SG3932的作用機制並確定該等體外發現是否轉化為抗腫瘤活性，使用了體內小鼠模型。

實例38

E02-GL-SG3932在HT29-huB7-H4選殖26異種移植模型中的藥效學研究

【0594】 在使用免疫缺乏CB-17 SCID小鼠的人腫瘤異種移植小鼠模型中評估E02-GL-SG3932處理後的藥效學作用。使動物皮下（SC）接種被工程化以表現人B7-H4的人大腸癌細胞系HT29-huB7-H4選殖26，並且在腫瘤體積增長到大約250至300 mm3後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受E02-GL-SG3932或對照品的IV注射。在指定的時間點收集腫瘤，將其固定在10%中性緩衝福馬林中，隨後處理並嵌入石蠟塊中。使用IHC和圖像分析技術檢查腫瘤樣本中隨時間推

移的人IgG、γH2AX病灶、裂解的半胱天冬酶-3和上皮細胞密度。圖43A-43F顯示了在單次IV投與7 mg/kg E02-GL-SG3932或同種型匹配的對照ADC NIP228 SG3932後168小時收集的腫瘤中人IgG、γH2AX和裂解的半胱天冬酶-3的代表性IHC圖像。

【0595】 如圖44A-44D所示，在腫瘤細胞中觀察到E02-GL-SG3932隨時間推移的劑量依賴性積累，如藉由人IgG IHC測定所見的。E02-GL-SG3932的積累與γH2AX病灶的陽性染色增加相關，這預示了DNA損傷的誘導。與對照相比，在E02-GL-SG3932處理的腫瘤中，隨時間的推移觀察到裂解的半胱天冬酶-3升高和上皮細胞密度總體降低。

【0596】 總之，該等數據表明E02-GL-SG3932與腫瘤細胞上的B7-H4結合，引起DNA損傷和凋亡性細胞死亡。

實例39

E02-GL-SG3932在皮下人乳癌和大腸癌異種移植模型中的抗腫瘤功效，體內功效，PDX

【0597】 在使用免疫缺乏CB-17 SCID小鼠的人腫瘤異種移植小鼠模型中研究了抗體中間體E02-INT和E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。

HT29或HT29-huB7-H4選殖26異種移植模型

【0598】 首次在一對大腸癌細胞系異種移植模型中以兩項獨立的研究評估了E02-GL-SG3932；HT29係B7-H4陰性的，並且HT29-huB7-H4選殖26來自HT29細胞系並被工程化以表現人B7-H4。在這兩項研究中，使動物SC注射有HT29或HT29-huB7-H4選殖26細胞，並且在腫瘤體積增長到平均178 mm3（HT29）或194 mm3（HT29-huB7-H4選殖26）後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受E02-GL-SG3932或對照品的IV注射。如圖45A和45B所示，與媒介物處理的對照組相比，當以10 mg/kg的單次IV劑量投與時，E02-GL-SG3932和同種型

匹配的對照ADC NIP228-SG3932均未顯著抑制HT29異種移植腫瘤的生長，分別顯示12%（p = 0.7006）和14%（p = 0.6593）TGI。相比之下，與媒介物處理的對照組或同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932相比，當以5 mg/kg、2.5 mg/kg和1.25 mg/kg的單次IV劑量給藥時，E02-GL-SG3932顯著抑制HT29-huB7-H4選殖26異種移植腫瘤的生長（圖46A-46C），相對於媒介物的TGI分別為42%（p < 0.001）、37%（p = 0.0005）和31%（p = 0.0039）。

MX-1乳癌異種移植模型

【0599】 在MX-1乳癌異種移植模型中評估了E02-GL-SG3932、同種型匹配的對照ADC NIP228-SG3932和E02-INT（E02-GL-SG3932的抗體中間體）的作用。使動物SC注射有MX-1細胞，並且在腫瘤體積增長到平均270 mm3後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受測試品或對照品的IV注射。與媒介物處理的對照組相比，當以5 mg/kg、2.5 mg/kg和1.25 mg/kg的單次IV劑量給藥時，E02-GL-SG3932顯著抑制 MX-1異種移植腫瘤的生長（圖47A和47B），產生的TGI分別為100%（p < 0.001）、96%（p < 0.001）和98%（p < 0.001）。

【0600】 以10 mg/kg給藥的抗體中間體E02-INT沒有顯著抑制腫瘤生長（TGI = -1%，p > 0.9999）。在SCID小鼠中在這種高劑量水平下E02-INT活性的缺乏表明，ADCC可能不是體內E02-GL-SG3932活性的重要貢獻者，並且E02-GL-SG3932的抗腫瘤作用是通過其TOP1i彈頭驅動的。

MX-1和MDA-MB-468乳癌異種移植模型

【0601】 為了進一步闡明E02-GL-SG3932處理在體內的劑量依賴性效應，在MX-1和MDA-MB-468乳癌異種移植模型中評估了0.125 mg/kg至2 mg/kg範圍內的劑量水平。在這兩項研究中，使動物SC注射有MX-1或MDA-MB-468細胞，並且在腫瘤體積增長到平均大約138 mm3（MX-1）或120 mm3（MDA-MB-468）後，將動物隨機分組，每隻小鼠接受E02-GL-SG3932或對照品的IV注

射。如圖48所示，單次靜脈內劑量的E02-GL-SG3932導致對MX-1異種移植物的劑量依賴性抑制。與第40天的未處理組相比，2 mg/kg、1.5 mg/kg和1 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932處理均導致100% TGI。0.75 mg/kg、0.5 mg/kg、0.25 mg/kg和0.125 mg/kg的E02-GL-SG3932劑量導致劑量依賴性%TGI分別為99.7%、80.1%、52.1%和-5.5%。類似地，單次靜脈內劑量的E02-GL-SG3932導致對MDA-MB-468異種移植物的劑量依賴性抑制（圖49）。與第55天的未處理組相比，2 mg/kg、1.5 mg/kg和1 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932處理分別導致97.7%、75.2%和66.6% TGI。0.75 mg/kg、0.5 mg/kg、0.25 mg/kg和0.125 mg/kg的E02-GL-SG3932劑量導致劑量依賴性%TGI分別為52.8%、58.4%、25.5%和31.8%。

實例40

E02-GL-SG3932在患者源性三陰性乳癌異種移植模型中的抗腫瘤功效

【0602】 在使用免疫受損的無胸腺裸小鼠的一組26個人TNBC PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。該等PDX模型係在沒有事先體外培養的情況下由人腫瘤樣本建立的，並且已經研究了其組織學、細胞遺傳學、遺傳標誌物和其他生物標誌物、以及它們對標準治療的響應。將腫瘤碎片皮下移植到小鼠體內，並且一旦腫瘤體積增長到大約94至189 mm3，將動物隨機分組，每隻小鼠接受劑量為1.25 mg/kg或3.5 mg/kg的E02-GL-SG3932或對照品的單次IV注射。為了評估B7-H4表現與功效之間的關係，從每個模型的另外3隻小鼠中收集了體積約為500至1183 mm3的新鮮未處理的腫瘤，將其固定在10%中性緩衝福馬林中，隨後處理並嵌入石蠟塊中。然後使用IHC和圖像分析技術來表徵B7-H4在每個模型中的腫瘤細胞膜上的表現。

【0603】 IHC分析表明，該等PDX模型代表了B7-H4的異源腫瘤表現，具有不同水平的IHC染色強度和腫瘤染色比例，包括一個具有幾乎不可檢測水平的B7-H4的模型（HBCx-15）（圖50）。

【0604】 在單劑量的1.25 mg/kg E02-GL-SG3932後觀察到腫瘤生長抑制，其中46.2%的模型（26個中的12個）表現出腫瘤體積從基線減小30%或更多（圖51）。其中，75%（12個中的9個）表現升高水平的B7-H4，H評分為100或更高（圖52A和52B）。對於1.25 mg/kg劑量水平的E02-GL-SG3932，鑒定了H評分分類與響應者狀態之間的顯著相關性（費希爾精確檢驗，$p = 0.047$），這表明B7-H4水平升高與對1.25 mg/kg E02-GL-SG3932的處理的響應相關。

【0605】 與1.25 mg/kg劑量水平相比，單劑量的3.5 mg/kg E02-GL-SG3932後觀察到更大的抗腫瘤活性，其中69.2%（26個中的18個）的測試模型表現出腫瘤生長從基線降低30%或更多（圖53）。其中，66.7%（18個中的12個）表現升高水平的B7-H4，H評分為100或更高（圖54A和54B）。在此劑量水平下，H評分分類與響應者狀態之間的關聯性是統計學上不顯著的（費希爾精確檢驗，$p = 0.073$）。

【0606】 在此劑量水平下，還觀察到NIP228-SG3932同種型ADC的活性增加，其中5個模型（T330、BCX-017-LOP、T168、HBCx-15和HBCx-6）表現出腫瘤生長從基線降低30%或更多（圖53）。這5個模型有一個共同的特點；有缺陷的同源DNA修復，其被定義為存在BRCA1突變或RAD51病灶形成測定中的負評分，建議後者作為同源DNA修復能力的功能量度。

【0607】 此實例表明，在B7-H4表現水平升高且同源DNA修復有缺陷（其被定義為 (1) BRCA1突變的存在，(2) RAD51病灶形成測定中的負評分）的腫瘤中投與E02-GL-SG3932可減小腫瘤體積。圖53B-53E顯示在低劑量下，E02-GL-

SG3932響應與B7-H4表現水平和HR缺陷相關。在另一項研究中，以7 mg/kg處理的PDX模型顯示出高水平的同種型對照ADC活性（圖60A-60B和圖61）。

【0608】 此實例還表明，E02-GL-SG3932在HR缺陷型腫瘤和B7-H4升高的HR精通型腫瘤中顯示出強大的活性，並且HR缺陷型腫瘤對TOP1i產生的損傷更敏感且針對活性具有較低的B7-H4表現閾值。

實例41

E02-GL-SG3932在患者源性膽管癌異種移植模型中的抗腫瘤功效

【0609】 在一組37個人膽管癌PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。在預研究階段，對不同背景的雌性小鼠（無胸腺裸小鼠、Balb/c裸或NOD/SCID）植入人膽管癌PDX碎片，並使其長到大約1000-1500 mm3大小。然後收穫該等腫瘤並重新植入研究小鼠中。然後當腫瘤達到150-300 mm^3的平均腫瘤體積時，將動物按腫瘤體積匹配給處理組或對照組，並在第0天開始給藥。每隻小鼠接受劑量為1.25 mg/kg或3.5 mg/kg的E02-GL-SG3932或對照（未處理）的單次IV注射。圖55A-55G提供了第一個研究小組的結果。圖56A-56K中所示的結果提供了第二個研究小組的結果。

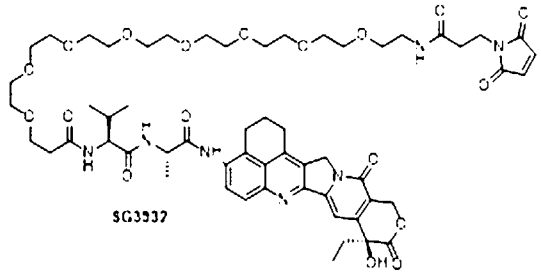
實例42

E02-GL-SG3932 TOP1i連接子-彈頭與更寬的治療指數（TI）有關

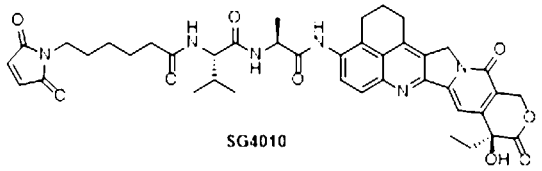
【0610】 對為E02-GL-SG3932選擇的AZ'0133連接子-彈頭進行了頭對頭比較研究，以確定SG3932彈頭與四種替代連接子的功效、藥物動力學和毒性。可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭ADC提供了最寬的相對TI，並且與基準相比具有優勢。下面提供了四種比較性連接子-彈頭。表22中提供了從比較研究中收集的數據。

比較性連接子-彈頭

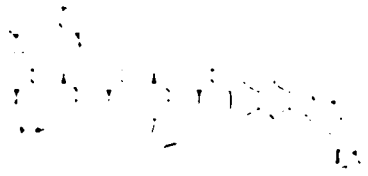
E02-INT-可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932



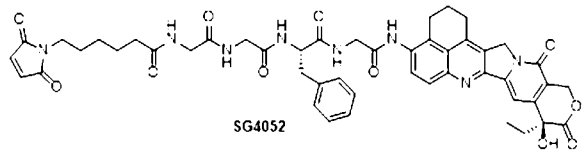
E02-INT-SG4010



E02-INT-SG4057



E02-INT-SG4052



[表22]：E02-INT抗體與四種替代連接子的功效、PK和毒性的頭對頭比較

研究

	E02-INT-SG3932	**E02-INT-SG4010**	**E02-INT-SG4057**	**E02-INT-SG4052**
連接子 + 彈頭	**mp-PEG8-Val-Ala-SG3932**	**mc-Val-Ala-SG3932**	**mp-PEG8-GGFG-SG3932**	**mc-GGFG-SG3932**
疏水性（HIC）、滯留時間（min）	3.41	3.37	3.76	3.53
體外血清穩定性（第15天與第0天的平均去軛合百分比）	24	68.4	28.4	69
體外細胞毒性 IC50 MX1 /	8.81 / 53.3	5.54 / 40.6	14.4 / 44.0	6.21 / 67.6

HT29選殖26（ng/mL）				
體內功效-MX-1，腫瘤停滯/30%消退的劑量（mg/kg）	0.57 / 1.27	0.83 / 1.18	0.92 / 1.02	1.02 / 1.85
體內功效-MDA-MB-468，腫瘤停滯/30%消退的劑量（mg/kg）	0.89 / 1.35	0.71 / 1.47	1.12 / 1.85	1.16 / 1.98
SCID小鼠PK - CL（ml/天/kg），在1.25 mg/kg下	11.3	20.4	14.6	19.0
大鼠PK - CL（ml/天/kg），在60 mg/kg（HNSTD）下	7.57	13.3	10.3	24.3
大鼠毒理學研究（20或60 mg/kg劑量後嚴重程度超過背景/對照的發現結果的數量）	1/7	3/7	3/7	4/7
MX-1中腫瘤停滯的相對TI MX-1中第7天30%腫瘤消退的相對TI	**152 68**	**101 71**	**82 45**	**44 39**

【0611】E02-GL-SG3932的mp-PEG8-Val-Ala- SG3932連接子-彈頭的性能優於每種比較物。當軛合至E02-INT抗體時，用可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭製備的ADC是體內活性最高的（圖57A和57B）。如圖58所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭ADC在大鼠毒性研究中表現出最乾淨的安全性。如圖59所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子

-SG3932連接子-彈頭ADC具有良好的PK特性和最寬的相對TI。相對TI = 在大鼠中測試的最高劑量（NOAEL而非HNSTD）下的AUC與提供腫瘤停滯的AUC的暴露比率（MX-1模型）。

【0612】 如圖29B所示，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932連接子-彈頭可以與競爭對手TOP1i軛合的ADC區分開來，並且含有被認為促進TI並提供優勢的關鍵特徵。特別地，可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932中的mp-PEG使軛合物穩定並促進ADC的穩定性，並且可裂解的mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932中的內酯開關可以在附接到ADC時打開，ADC可藉由受體介導的胞吞作用（RME）內化後增加彈頭效力。（圖29B）

【0613】 圖60A-60B顯示E02-GL-SG3932在乳腺和卵巢PDX中具有強大的活性。組A： 在一組乳腺和卵巢PDX模型中研究了E02-GL-SG3932的抗腫瘤活性。每隻小鼠（N=1/組）接受劑量為7 mg/kg或3.5 mg/kg的E02-GL-SG3932或對照（未處理）的單次IV注射。圖60B顯示了一組TNBC PDX模型中的抗腫瘤活性。每隻小鼠接受劑量為3.5 mg/kg或1.25 mg/kg的E02-GL-SG3932或媒介物對照的單次IV注射。

【0614】 E02-GL-SG3932在HR缺陷型腫瘤和具有升高的B7-H4的HR精通型腫瘤中也顯示出強大的活性（圖61和圖62A-62D）。

【0615】 此外，HR缺陷會增加對SG3932彈頭的敏感性。如圖63所示，與二甲亞碸（DMSO）處理和陰性對照微管抑制劑彈頭（MMAE）相比，SG3932彈頭的效力發生了改變。如圖63所示，當用DMSO處理野生型細胞和BRCA2-/-細胞時，細胞存活率超過100%。當用MMAE彈頭處理時，野生型細胞和BRCA2-/-細胞的細胞活力均有所降低。與MMAE彈頭相比，當用SG3932彈頭處理野生型細胞時，觀察到存活率大幅下降。然而，當用SG3932彈頭處理

BRCA2-/-細胞時，觀察到存活率的最大下降（效力改變約349倍）。這表明HR缺陷會增加對SG3932彈頭的敏感性。

拓撲異構酶I抑制劑的合成

一般資訊

【0616】使用Biotage® Isolera™進行快速層析，並使用薄層層析（TLC）檢查級分的純度。使用Merck Kieselgel 60 F254矽膠（鋁板上帶有螢光指示劑）進行TLC。用UV光實現TLC的視覺化。

【0617】從英國VWR購買了萃取和層析溶劑，其無需進一步純化即可使用。

【0618】除非另有說明，否則所有精細化學品均購自西格瑪奧德里奇公司（Sigma-Aldrich）。聚乙二醇化試劑係經由英國Stratech公司從美國Quanta biodesign公司獲得的。

LC/MS條件

方法A

【0619】使用Waters Aquity H級SQD2進行正模式電噴灑質譜分析。使用的流動相係溶劑A（含0.1%甲酸的水）和溶劑B（含0.1%甲酸的乙腈）。初始組分5% B經25秒保持不變，然後經1分鐘35秒的時間從5% B增加到100% B。該組分在100% B保持50秒，然後在5秒內恢復到5% B，並這樣保持5秒。梯度運行的總持續時間為3.0分鐘。流速係0.8 mL/分鐘。在254 nm處進行檢測。柱：Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7µm 2.1 x 50 mm，在50ºC下，裝有Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard前置柱，130A，1.7µm，2.1 mm x 5 mm。

方法B

【0620】使用水（A）（甲酸0.1%）和乙腈（B）（甲酸0.1%）的流動相運行HPLC（Waters Alliance 2695）。初始組分5% B經25秒保持不變，然後經1分鐘35秒的時間從5% B增加到100% B。該組分在100% B保持50秒，然後在5秒內恢復到5% B，並這樣保持5秒。梯度運行的總持續時間為3.0分鐘。流速是0.8 mL/分鐘。波長檢測範圍：190至800 nm。柱：Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1.7μm 2.1 x 50 mm，在50ºC下，裝有Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard前置柱，130A，1.7μm，2.1 mm x 5 mm。

方法C

【0621】使用水（A）（甲酸0.1%）和乙腈（B）（甲酸0.1%）的流動相運行HPLC（Waters Alliance 2695）。

【0622】初始組分5% B經1分鐘保持不變，然後經9分鐘的時間從5% B增加到100% B。該組分在100% B保持2分鐘，然後在0.10分鐘恢復到5% B，並這樣保持3 min。總梯度執行時間等於15 min。流速0.6 mL/min。波長檢測範圍：190至800 nm。柱溫箱溫度：50ºC。柱：ACE Excel 2 C18-AR，2 μ，3.0 x 100 mm。

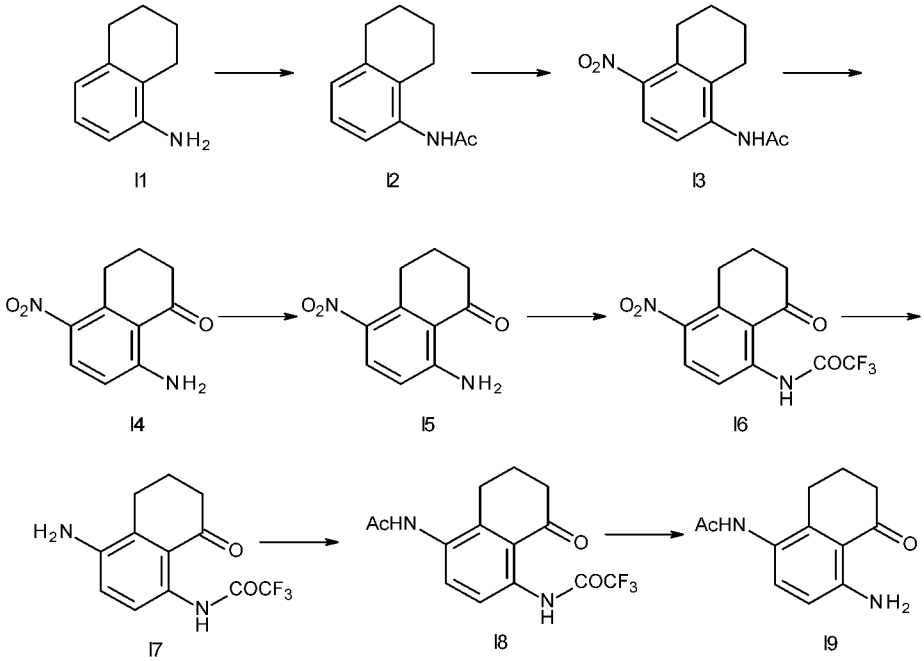
HPLC條件

【0623】逆相超快速高效液相層析（UFLC）在Shimadzu Prominence™機器上使用Phenomenex™ Gemini NX 5μ C18柱（在50ºC下）尺寸：150 x 21.2 mm進行。使用的洗脫液係溶劑A（含0.1%甲酸的H_2O）和溶劑B（含0.1%甲酸的CH_3CN）。所有UFLC實驗均在以下梯度條件下進行：初始組分13% B經3分鐘的時間增加到30% B，然後經8分鐘增加到45% B並且再經6分鐘到100%，然後經2 min恢復到13%並維持1 min。梯度運行的總持續時間為20.0分鐘。流速為20.0 mL/分鐘，並在254和223 nm處檢測。

NMR方法

【0624】使用Bruker AV400在400 MHz的δ級上測量質子NMR化學位移值。已使用以下縮寫：s，單峰；d，二重峰；t，三重峰；q，四重峰；quin，五重峰；m，多重峰；br，寬峰。耦合常數以Hz為單位。

關鍵中間體的合成



a) N-(5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I2**）

【0625】將5,6,7,8-四氫萘-1-胺**I1**（8.54 g，58.0 mmol）溶解於二氯甲烷（80 mL）中。添加三乙胺（18 mL，129 mmol）並將混合物冷卻至0ºC。逐滴添加乙酸酐（11.5 mL，122 mmol），添加完成後，將反應混合物升溫至室溫並攪拌45 min，隨後LCMS表明反應完成。將混合物用CH_2Cl_2稀釋，用H_2O、飽和$NaHCO_3$、10%檸檬酸洗滌，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮。將灰白色固體與1 : 3 Et_2O/異己烷一起研磨，以得到呈白色固體的I2（10.8 g，57.1 mmol，98%產率），無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.44 min（ES+）*m/z* 190 $[M+H]^+$。

b) N-(4-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I3**）

【0626】 在-5ºC下，將*N*-(5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺**I2**（1.00 g，5.2840 mmol）分批添加至硫酸（15 mL，281 mmol）中。將硝酸鈉（450 mg，5.2945 mmol）分批添加至反應混合物中，並在-5ºC下攪拌30 min，隨後LCMS表明無另外的反應進展。將反應混合物在外部冷卻下倒入冰中，將水性混合物用CH_2Cl_2萃取，將有機相經$MgSO_4$乾燥並藉由Isolera（10%-80% EtOAc於異己烷中）純化，以得到呈白色/黃色固體的*N*-(4-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I3和*N*-(2-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺的混合物（956 mg，4.0811 mmol，77%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.53 min（ES+）*m/z* 235 $[M+H]^+$。

c) N-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I4**）

【0627】 將*N*-(4-硝基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I3（1.01 g，4.31 mmol）溶解於丙酮（30 mL）中。添加於水中的硫酸鎂（3.9 mL，5.9 mmol，1.5 mol/L），並將混合物冷卻至0ºC。將高錳酸鉀（2.07 g，13.0 mmol）分批添加至反應混合物並將混合物升溫至室溫並攪拌50 min，隨後TLC表明反應完成。將反應混合物藉由矽藻土過濾，將固體用CHCl3洗滌並將所得有機混合物用H_2O、鹽水洗滌，經$MgSO_4$乾燥並藉由isolera（20%-50% EtOAc於異己烷中）純化，以得到呈白色/黃色固體的N-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I4和*N*-(2-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺的混合物（709 mg，2.86 mmol，66%）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.44 min（ES+）*m/z* 190 $[M+H]^+$

d) 8-胺基-5-硝基-3,4-二氫萘-1(2H)-酮（**I5**）

【0628】 將*N*-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺**I4**和*N*-(2-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺的混合物（709 mg，2.8561 mmol）和6N鹽酸（7 mL）在80ºC下攪拌2.5 h，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物在冰浴中冷卻，並添加6N NaOH溶液直至pH為鹼性。將水性混合物用CH_2Cl_2萃取，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮。Isolera（0%-50% EtOAc於異己烷中）

得到呈黃色/橙色固體的8-胺基-5-硝基-3,4-二氫萘-1(2H)-酮I5（320 mg，1.552 mmol，54%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.54 min（ES+）*m/z* 207 [*M* + H]$^+$

e) 2,2,2-三氟-N-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I6**）

【0629】將8-胺基-5-硝基-3,4-二氫萘-1(2H)-酮**I5**（430 mg，2.0854 mmol）溶解於二氯甲烷（20 mL）中。添加吡啶（340 µL，4.20 mmol）並將混合物冷卻至0ºC。添加三氟乙酸酐（590 µL，4.197 mmol）並攪拌30 min，隨後LCMS表明反應完成。將混合物用CH_2Cl_2稀釋，用H_2O洗滌，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮，以得到呈黃色固體的2,2,2-三氟-*N*-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺I6（630 mg，2.0846 mmol，>99%產率），將其無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.86 min（ES+）*m/z* 301X [*M* - H]$^-$

f) N-(4-胺基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)-2,2,2-三氟乙醯胺（**I7**）

【0630】將鋅（2.73 g，41.7 mmol）懸浮於甲醇（80 mL）、甲酸（4 mL）和水（4 mL）中，並將混合物冷卻至0ºC。分批添加2,2,2-三氟-*N*-(4-硝基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺**I6**（568 mg，2.0865 mmol）並將混合物在0ºC下攪拌30分鐘，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物過濾，將濾液用EtOAc稀釋並用飽和$NaHCO_3$洗滌。將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮，以得到呈黃色固體的*N*-(4-胺基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)-2,2,2-三氟乙醯胺I7（568 mg，2.0865 mmol，>99%產率），將其無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.65 min（ES+）*m/z* 273 [*M* + H]$^+$

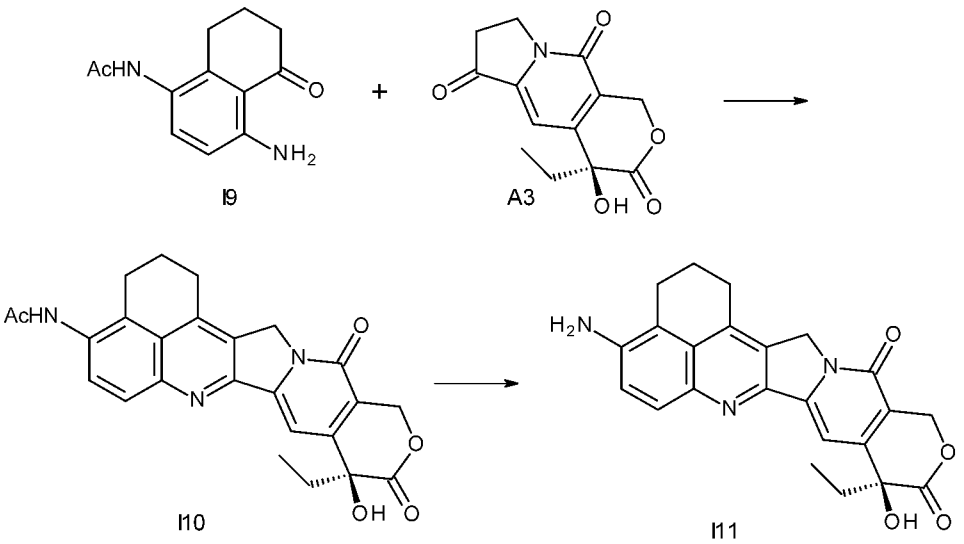
g) N-(4-乙醯胺基-8-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)-2,2,2-三氟乙醯胺（**I8**）

【0631】將*N*-(8-胺基-4-側氧基-四氫化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙醯胺**I7**（568 mg，2.0865 mmol）溶解於二氯甲烷（20 mL）中。添加三乙胺（580 µL，4.16

mmol）然後添加乙醯氯（297 μL，4.173 mmol），並將混合物攪拌30 min，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物用CH_2Cl_2稀釋，用H_2O洗滌，將有機相經$MgSO_4$乾燥並在真空中濃縮以得到呈黃色固體的*N*-(8-乙醯胺基-4-側氧基-四氫化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙醯胺I8（655 mg，2.084 mmol，>99%產率），將其無需進一步純化即使用。LC/MS（方法A）：滯留時間1.55 min（ES+）*m/z* 315 $[M+H]^+$

h) N-(4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)乙醯胺（**I9**）

【0632】將*N*-(8-乙醯胺基-4-側氧基-四氫化萘-5-基)-2,2,2-三氟-乙醯胺**I8**（2.77 g，8.81 mmol）溶解於甲醇（240 mL）和水（17 mL）中。添加碳酸鉀（4.88 g，35.3 mmol）並將混合物在50ºC下攪拌1.5 h，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物冷卻，在真空中濃縮，溶解於在CH_2Cl_2中的10% MeOH中，並用H_2O洗滌。將有機相經$MgSO_4$乾燥並藉由isolera層析（2%-15% MeOH於CH_2Cl_2中之溶液）純化，以得到呈黃色固體的*N*-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺I9（1.20 g，5.50 mmol，62.3%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間0.98 min（ES+）*m/z* 219 $[M+H]^+$



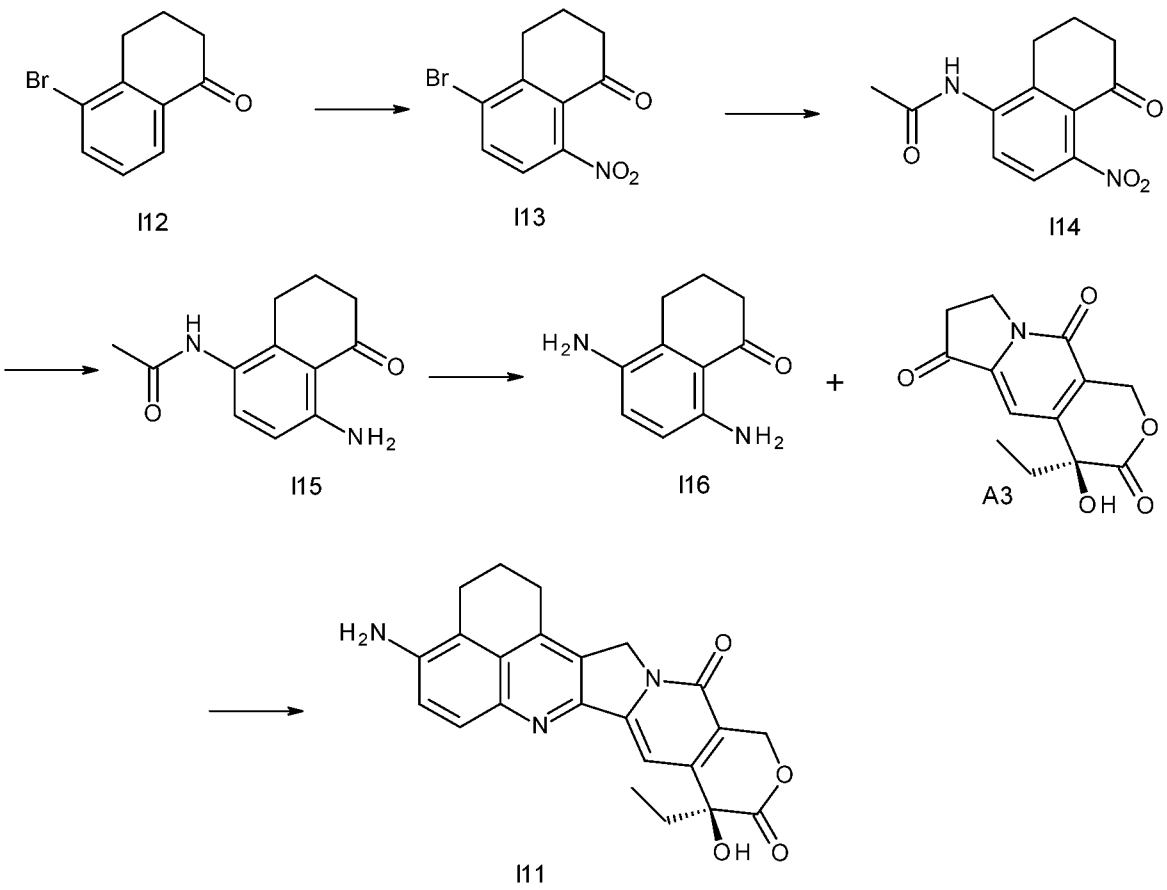
i) (S)-N-(9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)乙醯胺（**I10**）

【0633】將*N*-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺**I9**（641 mg，2.94 mmol，1.0當量）、(*S*)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1*H*-哌喃并[3,4-*f*]吲哚啡-3,6,10(4*H*)-三酮A3（840 mg，3.19 mmol，1.1當量）和PPTS（740 mg，2.95 mmol，1.0當量）溶解於甲苯（60 mL）中並在回流下攪拌3 h，隨後LCMS表明**I9**已經被消耗。將反應混合物冷卻並且在真空中濃縮。將所得固體與乙腈、然後與丙酮一起研磨，以得到呈棕色固體的**I10**，伴隨輕微的TsOH污染（1.26 g，96%）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.32 min（ES+）*m/z* 447 $[M+H]^+$

j) (S)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**I11**）

【0634】將*(S)-N*-(9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1*H*,12*H*-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)乙醯胺（**I10**）（1.26 g，2.83 mmol，1.0當量）溶解於在H_2O（12 mL）中的鹽酸（6 mol/L）中，並將混合物在80ºC下攪拌5 h，隨後LCMS表明**I10**已經被消耗。將反應混合物用H_2O稀釋並在真空中濃縮，以得到呈紅色結晶固體的(*S*)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10*H*,13*H*-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-*b*]喹啉-10,13-二酮**I11**（1.51 g，2.85 mmol，90 品質%，101%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.36 min（ES+）*m/z* 405 $[M+H]^+$。

I11的可替代合成



該合成的IPC、純度和測定方法

儀器	Thermo U-3000		
柱	ACE Excel 3 C18- PFP（3.0 mm×150 mm）		
柱溫箱	40ºC		
流動相	A：10 mM甲酸銨於水中pH=3.5		
	B：CAN		
梯度程序	時間（min）	A%	B%
	0.0	90	10
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	再平衡時間：6 min		
流速	1.0 ml/min		
檢測器	UV 220 nm		
稀釋劑	CAN		

a) 5-溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮（**I13**）

【0635】在氮氣下，將溶解於硫酸（濃縮的，5.0相對體積，160 mL）中的硝酸鉀（1.15當量，13.83 g）的溶液添加（添加時間4-12 h，保持溫度低於10ºC）至5-溴四氫化萘-1-酮（**I12**）（1.0當量，26.77 g）於硫酸（濃縮的，5.0相對體積，160 mL）中之溶液中。當反應完成時，將反應混合物轉移至含有水（36相對體積，1.15 L）的燒瓶中，調節轉移速率以保持溫度低於10ºC。將所得固體過濾，用水（4.0相對體積，128 mL）洗滌三次然後在約40ºC下乾燥24 h。將乾燥的濾餅溶解於丙酮（2.5相對體積，80 mL）和水（0.38相對體積，12.2 mL）的混合物（加熱至約75ºC）中，並且然後冷卻至約20ºC。藉由過濾除去所得固體。藉由蒸餾將溶劑交換為乙醇，並將溶液體積減少至2.0相對體積（64 mL）。將溶液冷卻至約25ºC並將所得固體藉由過濾收集。將固體用乙醇（1.0相對體積，32 mL）洗滌，然後在真空下在40ºC下乾燥以給出呈棕色固體的5-溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮**I13**（15.36 g，40%）；RT 14.0 min

方法1 溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮的IPC、純度和測定方法。

儀器	Thermo U-3000		
柱	ACE Excel 3 C18- PFP（3.0 mm×150 mm）		
柱溫箱	40ºC		
流動相	A：10 mM甲酸銨於水中pH=3.5		
	B：CAN		
梯度程序	時間（min）	A%	B%
	0.0	90	10
	20.0	10	90
	23.0	10	90
	24.0	90	10
	30.0	90	10
	再平衡時間：6 min		
流速	1.0 ml/min		
檢測器	UV 220 nm		
稀釋劑	CAN		

b) N-(8-硝基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（I14）

【0636】將溴-8-硝基-四氫化萘-1-酮（**I13**）（1.0當量，18.0 g，90.6% ww）、乙醯胺（1.2當量，4.72 g）、三(二亞苄基丙酮)二鈀(0)（0.01當量，0.61 g）磷酸鉀（1.4當量，19.8 g）於二噁烷（15相對體積，270 mL）中之溶液在氮氣下加熱至約70ºC。當反應完成時，將溶液冷卻至約20ºC並用二噁烷（5相對體積，90.0 mL）稀釋並過濾。將溶劑交換為乙醇，並將體積減少至為3相對體積的總反應體積（54.0 mL）。將溶液冷卻至約20ºC並將所得固體藉由過濾收集並用MTBE（甲基三級丁基醚）（1.0相對體積，18.0 mL）洗滌。將固體在真空下在40ºC下乾燥以給出呈暗黃色固體的N-(8-硝基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺**I14**（10.0 g，60.6%）；RT 8.86 min。

c) N-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（I15）

【0637】將氫氧化鈀碳（20% w/w，0.15當量，5.25 g）添加至N-(8-硝基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（**I14**）（1.0當量，32.6 g）於甲醇（40相對體積，1250 mL）中之溶液中。將反應混合物在氫氣氣氛（約40 psi）下在約40ºC下放置8 h。除去氫氣並用氮氣置換，並藉由經纖維素過濾除去催化劑，用甲醇（4.0相對體積，130 mL）洗滌纖維素。藉由蒸餾將溶液體積減少至4.0相對體積並且然後用MTBE（4相對體積，130 mL）稀釋。將所得固體藉由過濾收集，用MTBE（2相對體積，65 mL）洗滌並在真空下在40ºC下乾燥以給出呈灰綠色固體的N-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺**I15**（21.1 g，77.8%）；RT 5.44 min。

d) 5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（I16）

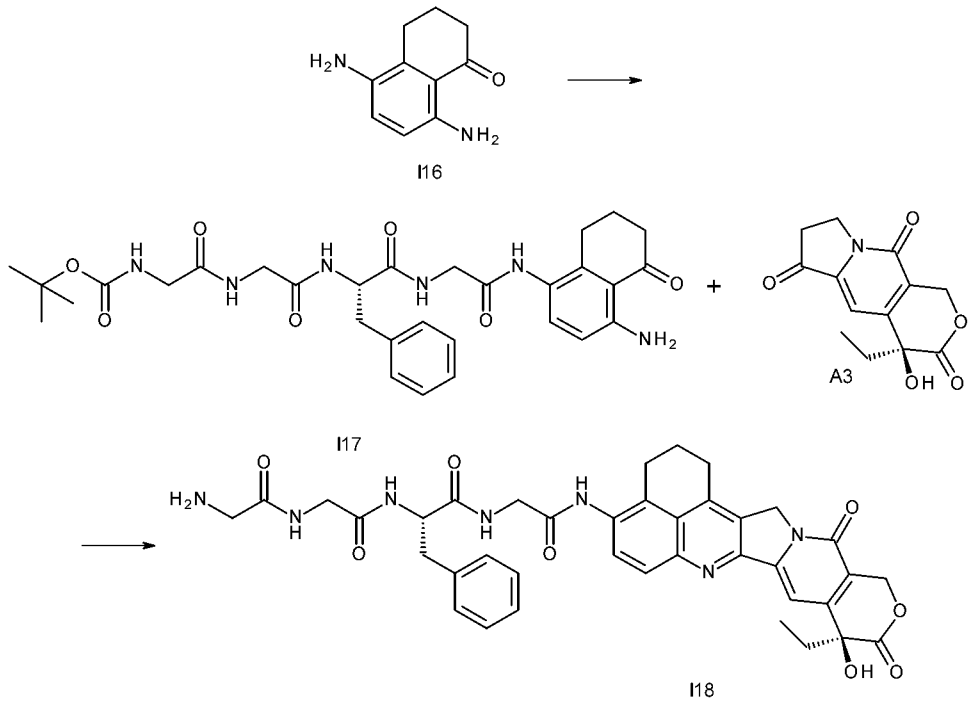
【0638】將N-(8-胺基-1-側氧基-四氫化萘-5-基)乙醯胺（**I15**）（1.0當量，10.0 g）於鹽酸（5M，6.0相對體積，60 mL）中之溶液保持在約90ºC持續3h。將溫度減少至25ºC並添加氫氧化鈉（2M，4.0相對體積，40mL）直至達到pH 10.0，保持溫度為25ºC。將所得固體藉由過濾收集並用水（2.0相對體積，20

mL）洗滌。將濕濾餅溶解於四氫呋喃（60相對體積，600 mL）中並過濾。將溶液濃縮至5.0相對體積並添加庚烷（20相對體積，200 mL）。將溶液濃縮至10.0相對體積並進一步添加庚烷（20相對體積，200 mL），並且然後再次將體積減少至10.0相對體積。將所得固體藉由過濾收集並用庚烷（5.0相對體積，50 mL）洗滌。將固體在真空下在40ºC下乾燥17 h以給出呈黃色固體的5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（**I16**）（6.90 g，82.7%）；1H NMR (400 MHz DMSO-d6) δ ppm 1.82 (m, 2H), 2.38 (t, *J*=2.0 Hz, 2H), 2.47 (t, *J*=2.0 Hz, 2H), 6.34 (d, *J*=2.0 Hz, 1H), 6.68 (d, *J*=2.0 Hz, 1H)；RT 3.90

e) (S)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（I11）

【0639】將5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（**I16**）（1.0當量，5.0 g）、(4S)-4-乙基-4-羥基-7,8-二氫-1H-哌喃并[3,4-f]吲哚啉-3,6,10-三酮（**A3**）（1.06當量，7.9 g）、和對甲苯磺酸吡啶陽離子（1.0當量，7.2 g）於甲苯（50.0相對體積，250 mL）中之溶液保持在120ºC下持續15 h。將溶液的體積減少至2.0相對體積，並且然後用乙腈（20相對體積，100 mL）和水（20相對體積，100 mL）稀釋。將所得漿液過濾並將固體用乙腈水溶液（1:1，20相對體積，100 mL）洗滌。將固體用甲醇水溶液（水:MeOH 3:1，40相對體積，200 mL）漿液化，過濾並用甲醇水溶液（1:1，20相對體積，100 mL）洗滌。將固體用水（60相對體積，300 mL）在50ºC下漿液化，過濾並用水（10相對體積，50 mL）洗滌。將固體用乙腈水溶液（水：乙腈，1：3，40相對體積，200 mL）在30ºC下漿液化，過濾並用乙腈水溶液（水：乙腈，1：3，5相對體積，50 mL）洗滌並且然後在真空下在40ºC下乾燥以給出呈白色固體的(S)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**I11**）（5.0g，43.7%）；RT 5.13。

I18的合成



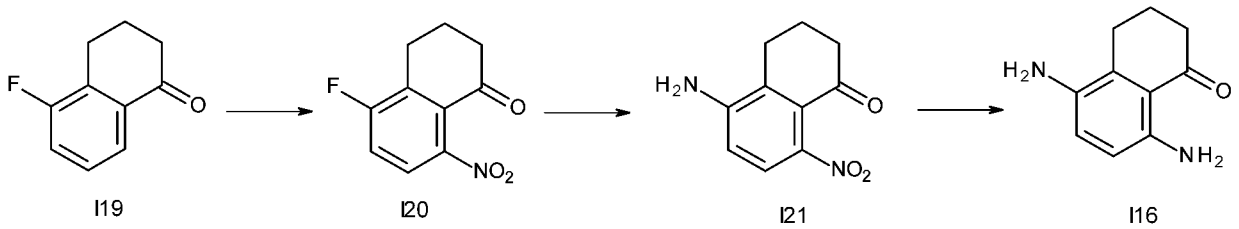
a) 三級丁基 (S)-(2-((2-((1-((2-((4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙烷-2-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基甲酸酯（I17）

【0640】 將Boc-GGFG-OH（227 mg，0.52 mmol）和EEDQ（157 mg，0.634 mmol）溶解在CH_2Cl_2（25 mL）中並將混合物攪拌15 min，直至肽溶解至溶液中。隨後添加化合物**I16**（100 mg，0.56747 mmol）並將混合物攪拌直至完成。1 h後，LVMC顯示反應完成了90%。隨著產物壓出（crashing out），混合物變得更稠。將混合物再放置一個小時，然後抽真空以乾燥。將粗品吸收於Et_2O（50 mL）中。過濾固體並隨後吸收於CH_2Cl_2（50 mL）中以進一步純化。過濾固體並乾燥以給出呈灰色固體的產物**I17**（273 mg，0.459 mmol，80.9%產率）。分析數據：LCMS 3 min：ES^+ = 1.46 min，*m/z* 595.7 $[M + H]^{+}$。

b) (S)-2-(2-(2-胺基乙醯胺基)乙醯胺基)-N-(2-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-2-側氧基乙基)-3-苯基丙醯胺（I18）

【0641】將苯胺**I17**（450 mg，1.045 mMol）、內酯**A5**（280 mg，1.064 mMol）和對甲苯磺酸吡啶陽離子（273 mg，1.086 mMol）溶解於甲苯（20 mL）中並將混合物加熱至150ºC（高回流）。添加MeOH（4 mL）以幫助溶解混合物。7 h，將粗反應物抽真空（vacced down）以乾燥。將粗產物藉由矽膠層析（$CHCl_3$/MeOH，100%至65:35）進行純化，以給出產物**I18**（259 mg，0.359 mMol，78.1產率）。分析數據：LCMS 3 min：ES^+ = 1.17 min，*m/z* 722.8 $[M + H]^{\cdot+}$。

I16的替代合成



I19 I20 I21 I16

a) 5-氟-8-硝基-四氫化萘-1-酮（I20）

【0642】在3頸圓底燒瓶中，將5-氟四氫化萘-1-酮**I19**（4.7 g，29 mmol）溶解於1/2量的硫酸（120 mL）中。攪拌混合物直至所有固體溶解並且然後冷卻至0ºC-5ºC。在滴液漏斗中，在0ºC-5ºC下，溶解硝酸鉀（3 g，29.6730 mmol）至剩餘的一半的硫酸（120 mL）中。緩慢添加至SM混合物，確保保持溶液係冷的（45 min）。在0ºC-5ºC下攪拌直至完成。隨後將反應混合物用水（250 mL）淬滅，並在0ºC-5ºC下攪拌。將固體過濾並用水（50 mL）洗滌。將固體在真空柱溫箱中在50ºC下乾燥2 h。將粗固體在Et_2O中漿液化過夜，然後冷卻至0ºC並過濾。將濕濾餅用更多冷的Et_2O（50 mL）洗滌並在真空柱溫箱中在50ºC下乾燥以給出呈淡粉色細粉末的純的產物**I20**（5.5 g，26 mmol，92%產率）。LCMS（方法B）：ES^+ = 1.55 min，*m/z* 210.1 $[M + H]^{\cdot+}$。

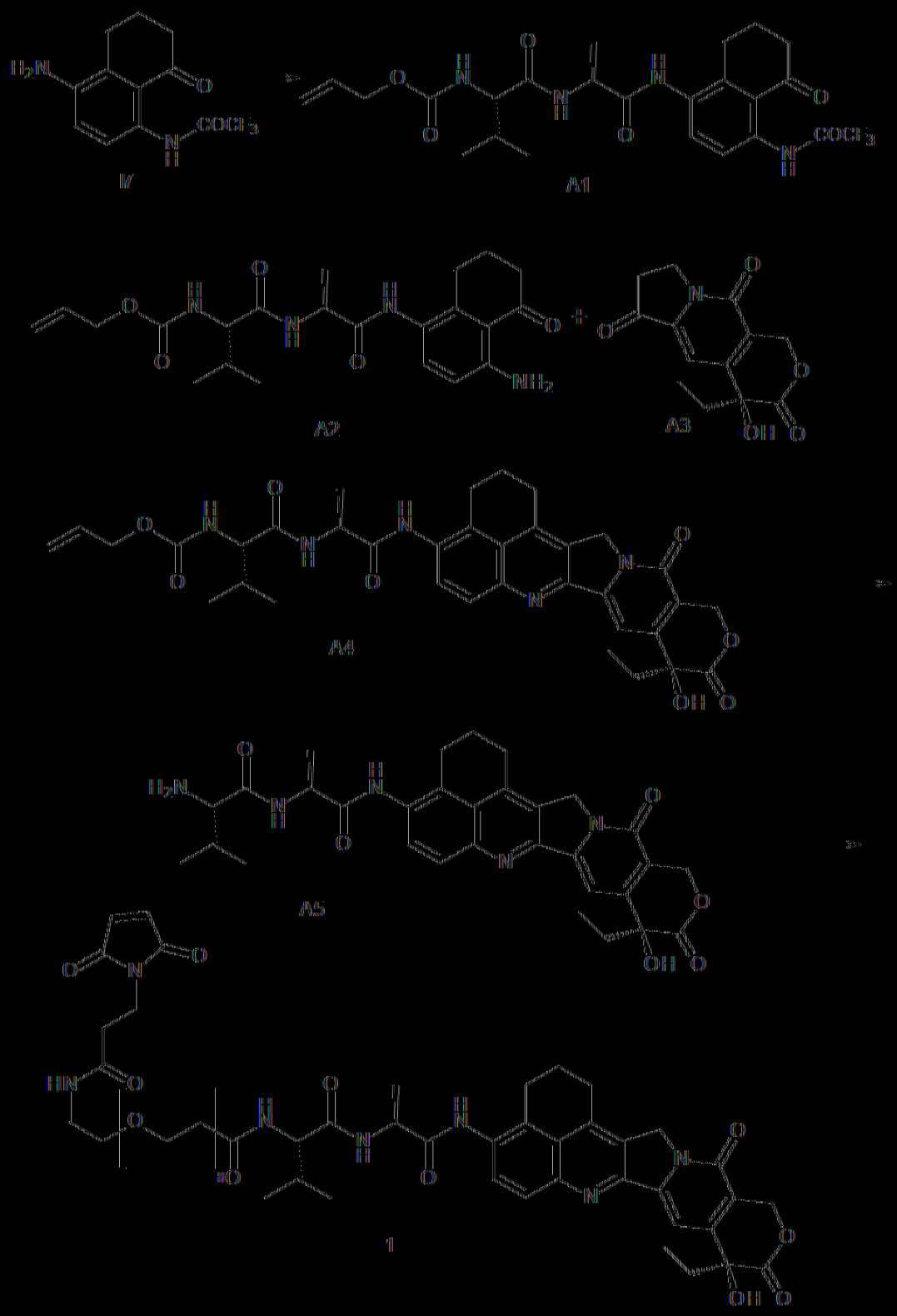
b) 5-胺基-8-硝基-四氫化萘-1-酮（I21）

【0643】將化合物**I20**（2.7 g，13 mmol）溶解於CH_3CN（2.5 mL）中，並將在H_2O（8 mL，40 mmol）中的NH_4OH（21 品質%）添加至密封耐壓管並加熱至185ºC。一旦完成，將混合物轉移至圓底燒瓶中並抽真空。將粗品藉由矽膠柱層析（$CHCl_3$/MeOH；100至99 : 1）進行純化以給出呈黑色固體的純的產物**I21**（1.1 g，5.3 mmol，41%產率）。LCMS（方法B）：ES^+ = 1.34 min，*m/z* 207.1 $[M + H]^{+}$。

c) 5,8-二胺基四氫化萘-1-酮（I16）

【0644】在0ºC下，將化合物**I21**（1.35 g，6.55 mmol）溶解於甲醇（20 mL）、H_2O（1 mL）和甲酸（1 mL）的混合物中。緩慢添加鋅（8.5 g，130 mmol），確保將溫度保持在低於40ºC。添加多一些的甲酸/H_2O（0.5 mL）以推動反應完成。將反應混合物過濾，並將濾液用EtOAc和CH_2Cl_2稀釋，然後抽真空。將粗品乾燥載入到矽膠柱層析（$CHCl_3$/EtOAc；100至7:3然後$CHCl_3$/MeOH；99:1至98:2）上以給出純的產物**I16**（1.015 g，5.760 mmol，88.0%產率）。LCMS（方法B）：ES^+ = 0.2 min，未觀察到*m/z*。

合成實例1（例如SG3932的合成）



a) 烯丙基 ((S) 3 甲基 1 側氧基 1 (((S) 1 側氧基 1 ((5 側氧基 4 (2,2,2 三氟乙醯胺基) 5,6,7,8 四氫萘 1 基)胺基)丙 2 基)胺基)丁 2 基)胺基甲酸酯（A1）

[0645] 在25°C下，將DCC（6.54 g，31.7 mMol）和HOPO（3.36 g，30.2 mMol）添加至烯丙氧羰基 Val Ala OH（9.09 g，31.7 mmol）和I7（7.85

g，28.8 mMol）於CH_2Cl_2（300 mL）中之溶液中。將所得混合物攪拌過夜。濾出反應期間形成的白色固體，並用冷的CH_2Cl_2洗滌。將濾液用水（150 mL）和鹽水（150 mL）洗滌。將有機層經$MgSO_4$乾燥，過濾並蒸發。將粗產物藉由矽膠層析（Hex/EtOAc，60 : 40）進行純化。分離的產物**A1**被共洗脫的DCU（21.1 g，140%產率）污染。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.81 min，*m/z* 527.6 $[M + H]^{\cdot+}$。

b) 烯丙基 ((S)-1-(((S)-1-((4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸酯（**A2**）

【0646】將保護的苯胺**A1**（18 g，34.19 mMol）溶解於MeOH和H_2O 10:1（165 mL）的混合物中並添加K_2CO_3（10 g，72.36 mMol）。將混合物在50ºC下攪拌直至完成。將混合物抽真空至幾乎乾燥並將殘餘物用CH_2Cl_2吸收並用H_2O和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並蒸發。將粗產物藉由矽膠層析（$CHCl_3$/MeOH，100%至7 : 3）進行純化。分離的產物**A2**被共洗脫的雜質（10.71 g，73%產率）污染。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.46 min，*m/z* 431.7 $[M + H]^{\cdot+}$。

c) 烯丙基 ((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基丁-2-基)胺基甲酸酯（**A4**）

【0647】將苯胺**A2**（450 mg，1.045 mMol）、內酯**A3**（280 mg，1.064 mMol）和對甲苯磺酸吡啶陽離子（273 mg，1.086 mMol）溶解於甲苯（20 mL）中並將混合物加熱至130ºC（高回流）。時不時地添加幾滴MeOH，以幫助溶解混合物。7 h，將粗反應物抽真空（vacced down）以乾燥。將粗產物藉由矽膠層析（$CHCl_3$/MeOH，100%至95 : 5）進行純化以給出產物**A4**（360 mg，52.3%產率）。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.51 min，*m/z* 658.8 $[M + H]^{\cdot+}$。

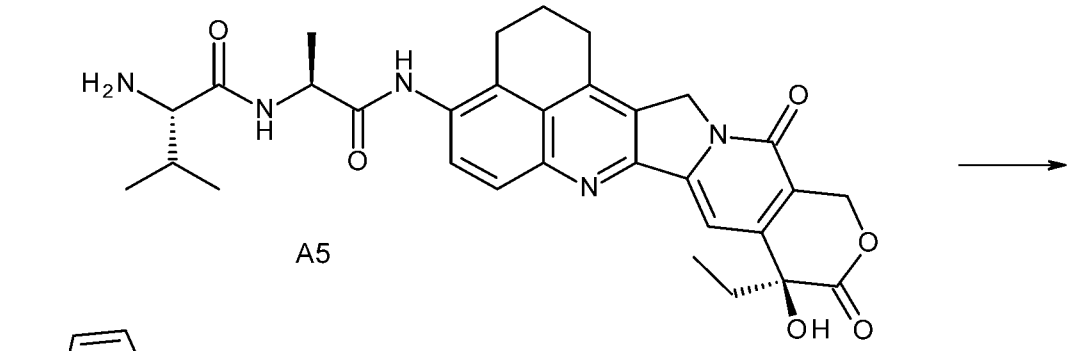
d) 烯丙基 (S)-2-胺基-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-3-甲基丁醯胺（**A5**）

【0648】 將過量的哌啶（642 µL）添加至**A4**（543 mg，0.82 mMol）和$PdP(Ph_3)_4$（89 mg，0.08 mMol）於CH_2Cl_2（15 mL）中之溶液中。允許混合物在室溫下攪拌20 min，這時反應已經完成（如藉由LC/MS監測的）。將反應混合物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（25 mL）和鹽水（25 mL）洗滌。將有機相經$MgSO_4$乾燥，過濾，並藉由在減壓下旋轉蒸發除去過量的溶劑，以得到粗產物**A5**，其原樣用於下一步。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.15 min，*m/z* 574.6 $[M + H]^{\cdot+}$。

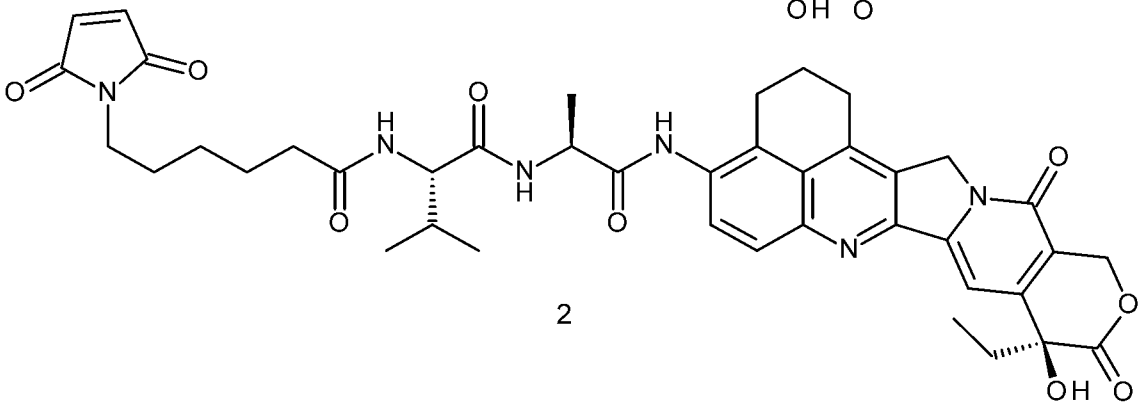
e) 1-(3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙胺基)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-27-醯胺（**1**）

【0649】 在氬氣氣氛下，將吡啶（83 µL，1.03 mMol）和Mal-dPEG$_8$-OTFP（767 mg，1.03 mMol）添加至粗品**A5**（假定為1.03 mMol）於乾CH_2Cl_2（50 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加0.5當量的Mal-dPEG$_8$-OTFP以試圖推動反應。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由逆相HPLC（H_2O/CH_3CN +0.05% FA的梯度）進行純化並冷凍乾燥以給出**1**（1.189 g，31%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.43 min，*m/z* 1149.3 $[M + H]^{\cdot+}$。LC/MS（方法C）：ES^+ = 5.37 min，*m/z* 1149.4 $[M + H]^{\cdot+}$。

合成實例2（例如SG4010的合成）



A5

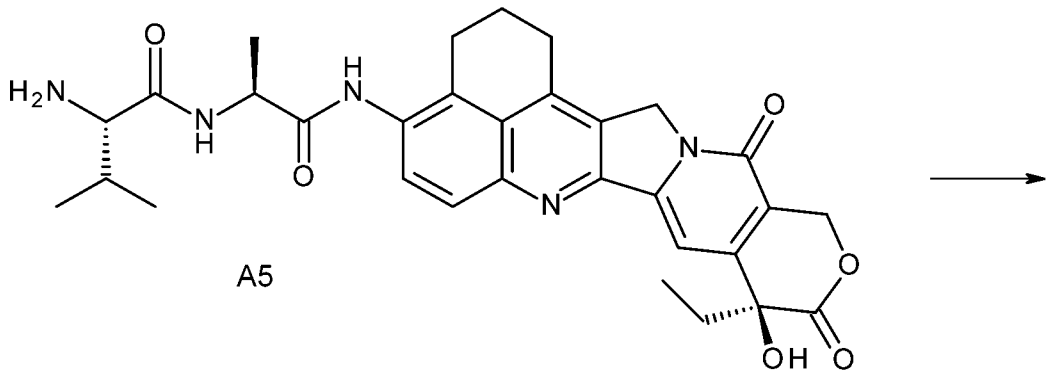


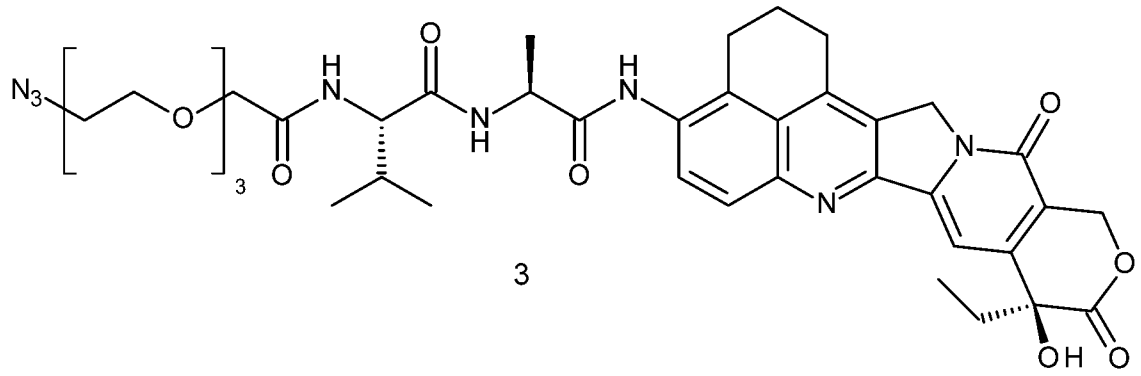
2

6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)己醯胺（**2**）

【0650】 在氬氣氣氛下，將Mal-己酸（56 mg，0.26 mMol）和EDCI.HCl（51 mg，0.26 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.26 mMol）於無水CH_2Cl_2（20 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加另外0.5當量的Mal-己酸和EDCI.HCl。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由矽膠柱層析（$CHCl_3$/MeOH 95 : 5）進行純化以給出**2**（31.6 mg，20%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.56 min，*m/z* 767.8 $[M + H]^{+}$。LC/MS（方法C）15 min：ES^+ = 6.05 min，*m/z* 767.8 $[M + H]^{+}$。

合成實例3

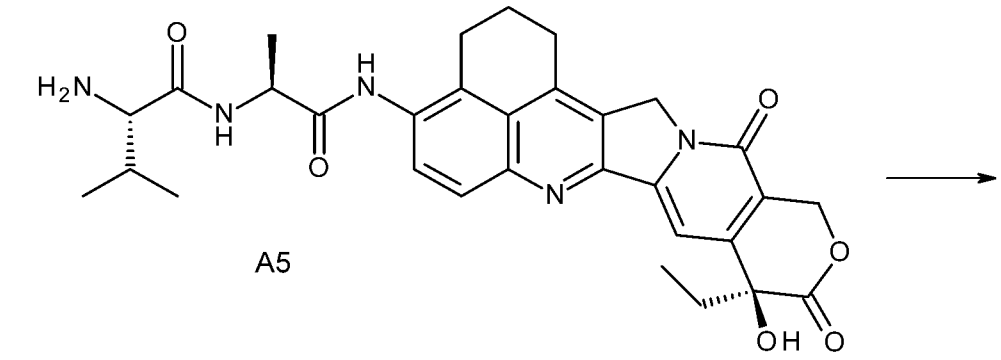


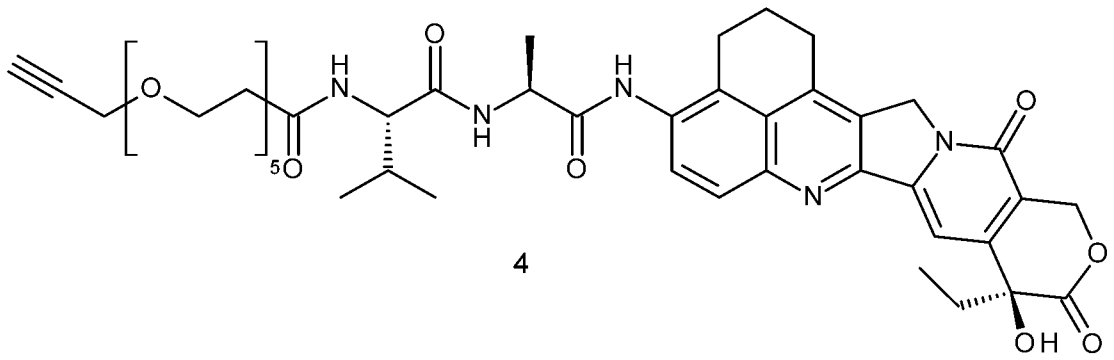


(S)-2-(2-(2-(2-(2-疊氮乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙醯胺基)-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-3-甲基丁醯胺（**3**）

【0651】在氬氣氣氛下，將疊氮-dPEG$_3$-酸（77.5 mg，0.31 mMol）和EDCI.HCl（60 mg，0.31 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.31 mMol）於無水CH_2Cl_2（20 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加另外0.5當量的疊氮-dPEG$_3$-OH和EDCI.HCl。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由製備型HPLC進行純化並將級分冷凍乾燥以給出純的**3**（92.2 mg，24.7%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.69 min，*m/z* 789.9 $[M + H]^{.+}$。LC/MS（方法C）：ES^+ = 6.68 min，*m/z* 790.0 $[M + H]^{.+}$。

合成實例4

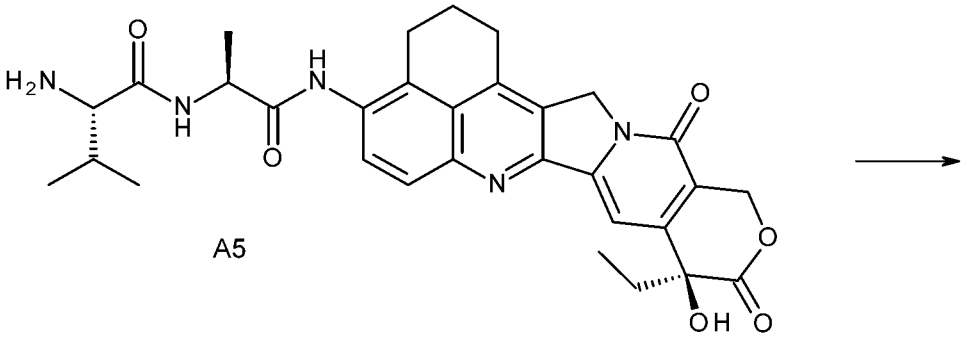


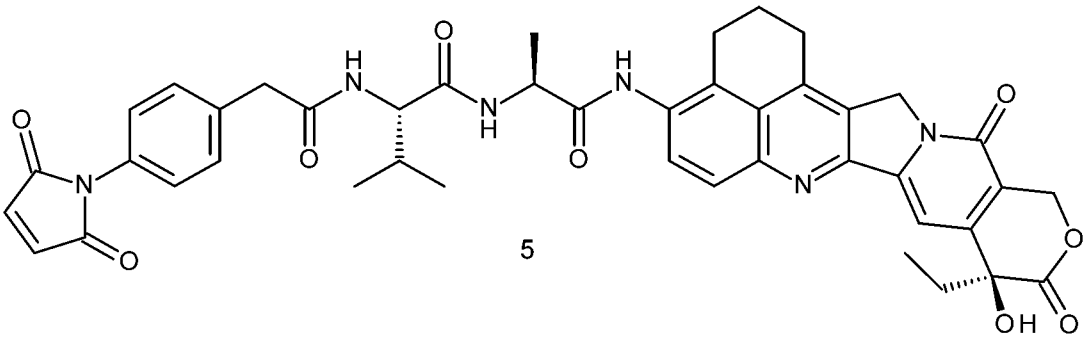


N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-4,7,10,13,16-五氧雜十九烷-18-炔醯胺（**4**）

【0652】 在氬氣氣氛下，將炔丙基-dPEG$_5$-酸（56 mg，0.19 mMol）和EDCI.HCl（37 mg，0.19 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.19 mMol）於無水CH_2Cl_2（10 mL）中之溶液中。將反應攪拌過夜，並且由於反應不完全，添加另外0.5當量的炔丙基-dPEG$_5$-OH和EDCI.HCl。將反應物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由製備型HPLC進行純化並將級分冷凍乾燥以給出純的**4**（22 mg，16.7%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.54 min，*m/z* 860.9 $[M + H]^{+}$。LCMS（方法C）：ES^+ = 5.57 min，*m/z* 860.9 $[M + H]^{+}$。

合成實例5

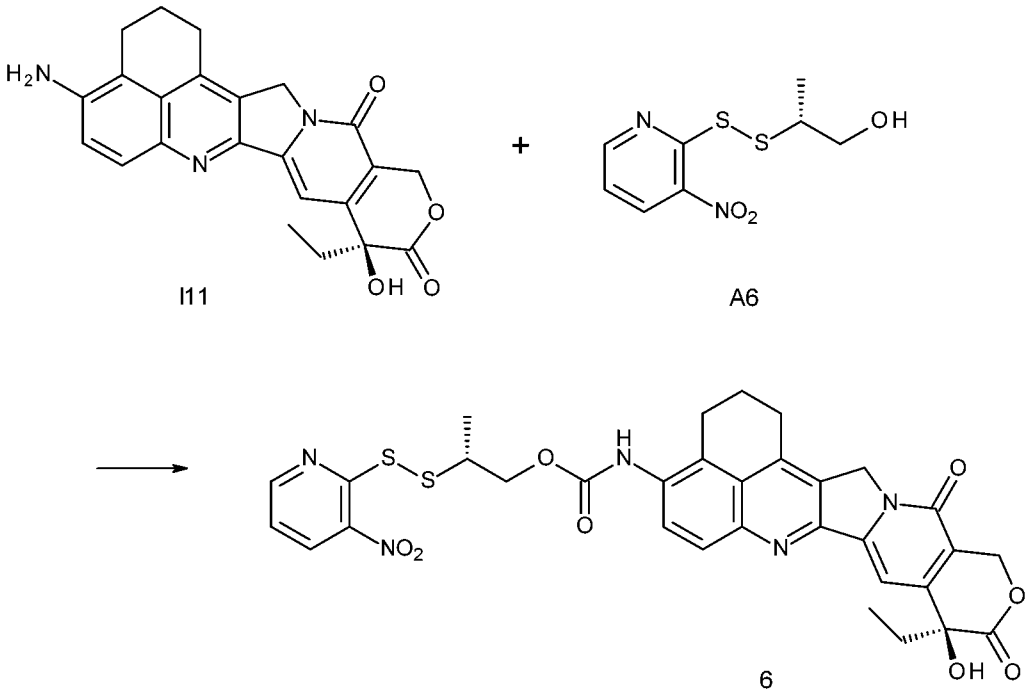




(S)-2-(2-(4-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)苯基)乙醯胺基)-N-((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)-3-甲基丁醯胺（**5**）

【0653】 在氬氣氣氛下，將PM-乙酸-OSu（64 mg，0.19 mMol）添加至粗品**A5**（假定為0.19 mMol）於無水CH_2Cl_2（10 mL）中之溶液中。反應沒有進行，因此添加DIPEA（51 μL，0.28 mMol）。將反應物攪拌直至完成。將混合物用CH_2Cl_2（25 mL）稀釋並將有機相用H_2O（2 x 50 mL）和鹽水洗滌，然後經$MgSO_4$乾燥，過濾並將過量的溶劑藉由在減壓下旋轉蒸發除去。將粗品藉由製備型HPLC進行純化並將級分冷凍乾燥以給出純的**5**（2.5 mg，1.6%產率，經2個步驟）。LC/MS（方法B）：ES^+ = 1.54 min，*m/z* 787.7 $[M + H]^{+}$。LC/MS（方法C）：ES^+ = 5.61 min，*m/z* 787.8 $[M + H]^{+}$。

合成實例6



(R)-2-((3-硝基吡啶-2-基)二氫硫基)丙基((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基甲酸酯（**6**）

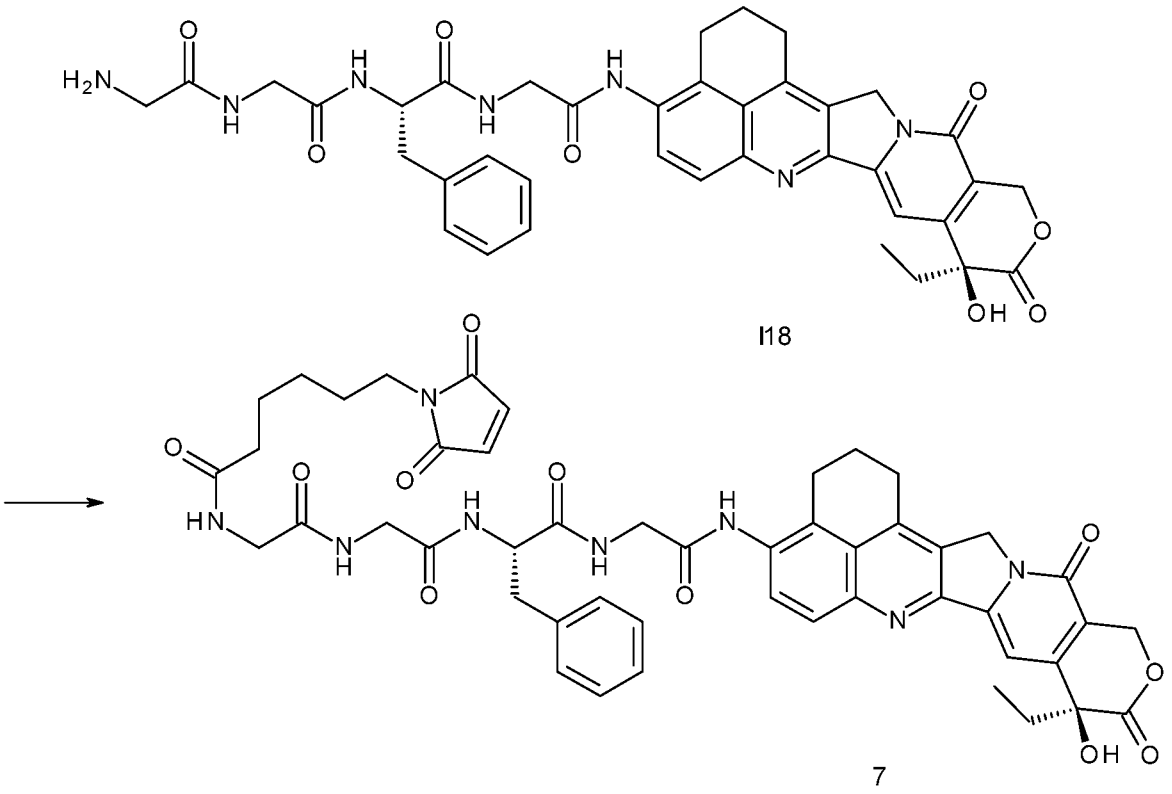
【0654】(i) 將(2R)-2-[(3-硝基-2-吡啶基)二氫硫基]丙-1-醇**A6**（25 mg，0.1015 mmol，1.0當量）溶解於二氯甲烷（1 mL）中。添加吡啶（8.5 μL，0.11 mmol，1.0當量），然後添加三光氣（11 mg，0.0370685 mmol，0.33當量）並將混合物在Ar下攪拌45 min，隨後LCMS（Et_2NH淬滅）表明形成對應的胺基甲酸酯。

【0655】(ii) 將*(S)*-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10H,13H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮（**I11**）（43 mg，0.09026 mmol，1.0當量）溶解於二氯甲烷（2 mL）、*N,N*-二異丙基乙胺（42 μL，0.241 mmol，2.7當量）和吡啶（25 μL，0.309 mmol，3.4當量）中。添加來自步驟 (i) 的反應混合物並將混合物攪拌30 min，隨後LCMS表明反應完成。將反應混合物在真空中濃縮並藉由isolera層析（0%-4% MeOH於CH_2Cl_2中）進行純化，以

得到呈黃色固體的**6**（22 mg，0.03256 mmol，36%產率，QC = 96.8%）。

LC/MS（方法B）：RT = 1.86 min，676.6 $[M+H]^+$。

合成實例7（例如SG4052的合成）



I18

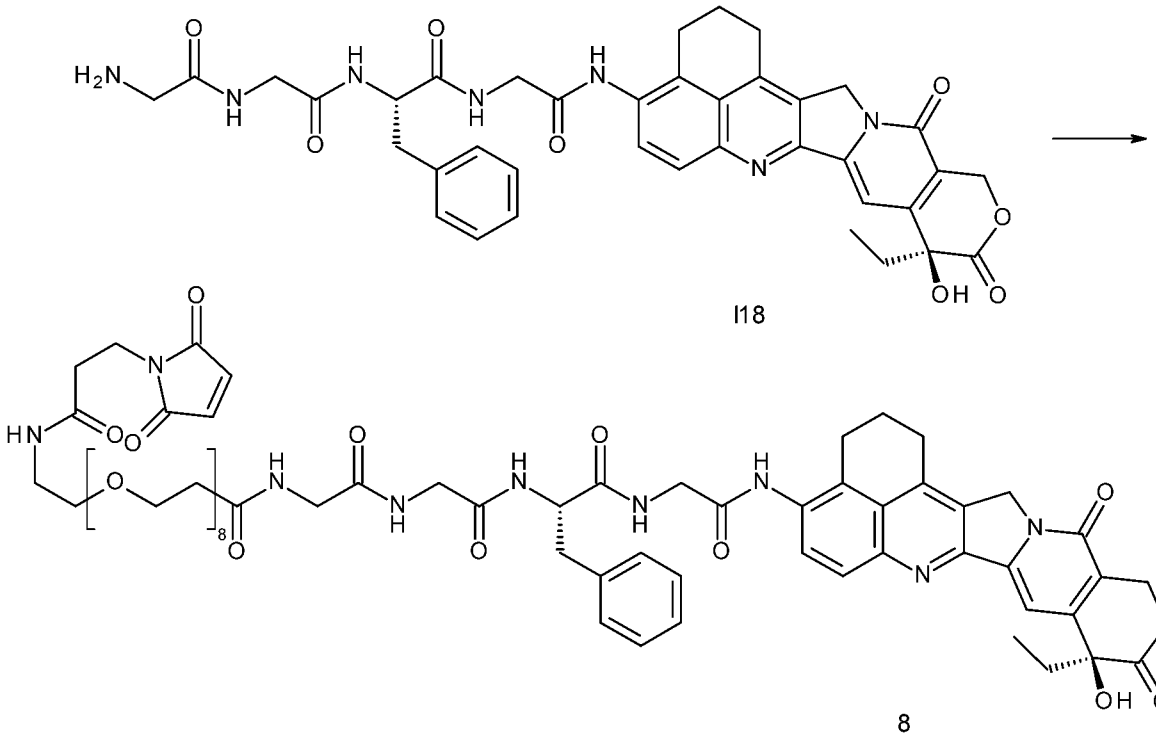
7

6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙-2-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)己醯胺（7）

【0656】將化合物**I18**（259 mg，0.3588 mmol）溶解於CH_2Cl_2（25 mL）中。起始原料完全不溶解，因此添加DMA（1 mL）。由於未觀察到改善，因此添DIPEA（68 μL，0.390 mmol），並且所有固體進入溶液中。添加馬來醯亞胺己酸（69 mg，0.358 mmol）並將混合物在r.t.下攪拌過夜，這時LCMS分析表明反應完成。將反應混合物用MeOH（2 mL）淬滅，並抽真空至乾燥。將粗產物藉由製備型HPLC進行純化並隨後冷凍乾燥以給出呈赭色固體之化合物**7**

（38.2 mg，11%產率）。分析數據：LCMS 3 min：ES^+ = 1.47 min，*m/z* 916.2 $[M + H]^{+}$ LCMS 15 min：ES^+ = 5.46 min，*m/z* 916.1 $[M + H]^{+}$。

合成實例8（例如SG4057的合成）



I18

8

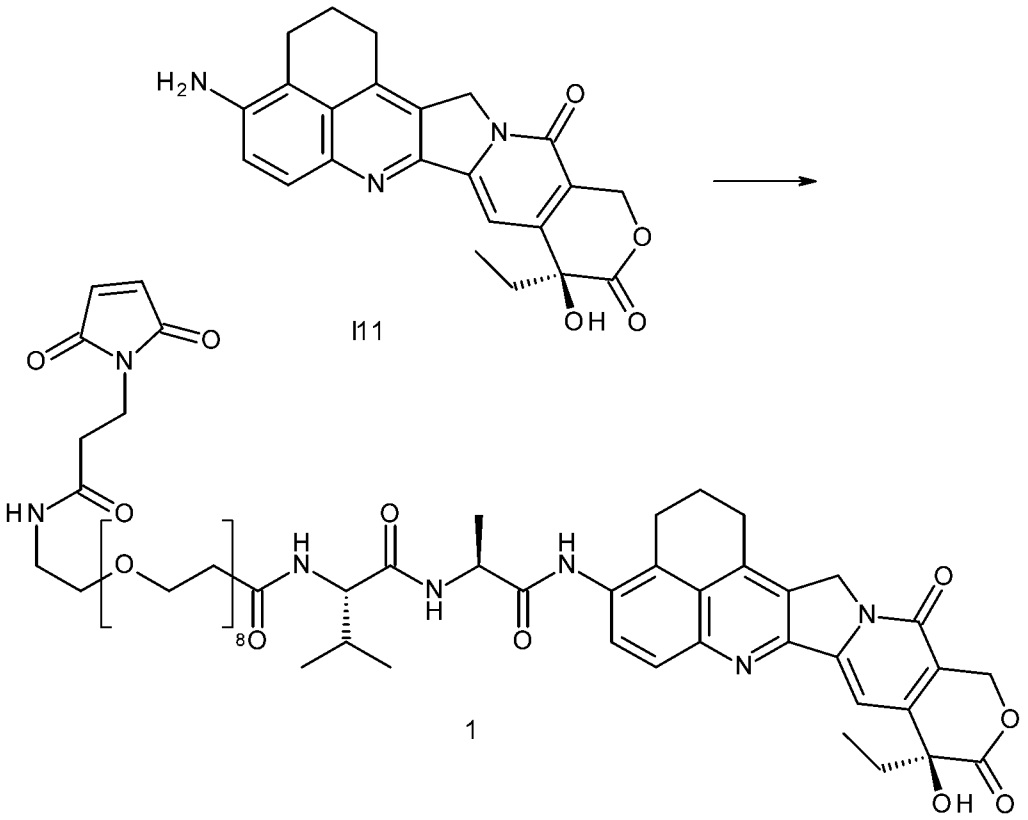
1-(3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙胺基)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-1-側氧基-3-苯基丙-2-基)胺基)-2-側氧基乙基)胺基)-2-側氧基乙基)-3,6,9,12,15,18,21,24-八氧雜二十七烷-27-醯胺（8）

【0657】將化合物**I18**（70 mg，0.096 mmol）溶解於CH_2Cl_2（5 mL）中。起始原料完全不溶，因此添加DMA（0.5 mL）。由於未觀察到改善，因此添DIPEA（19 μL，0.106 mmol），並且所有固體進入溶液中。添加Mal-dPEG$_8$-OH（63 mg，0.106 mmol）和EDCI.HCl（19 mg，0.099 mMol）並將混合物在r.t.下攪拌過夜，這時LCMS分析表明反應完成。將反應混合物用MeOH（2 mL）淬滅，並抽真空至乾燥。將粗產物藉由製備型HPLC進行純化並隨後冷凍

乾燥以給出呈赭色固體的**8**（30 mg，24%產率）。LCMS 3 min：ES^+ = 1.44 min，*m/z* 1297.6 $[M + H]^{+}$。

合成實例9 - 1的替代合成

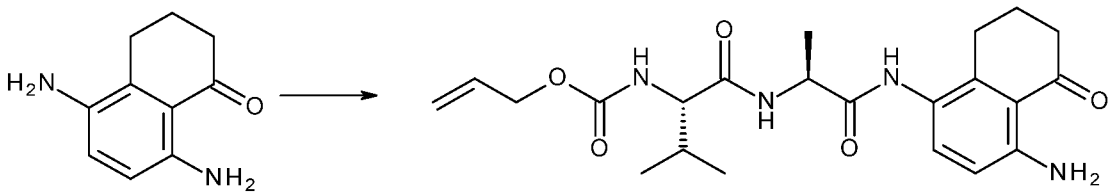
（例如SG3932的替代合成）



【0658】將(*S*)-4-胺基-9-乙基-9-羥基-1,2,3,9,12,15-六氫-10*H*,13*H*-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-*b*]喹啉-10,13-二酮**I11**（371 mg，0.779 mmol，1.0當量）溶解於二氯甲烷（30 mL）中。添加在*N*,*N*-二甲基乙醯胺（10 mL）中的*N*,*N*-二異丙基乙胺（69 µL，0.396 mmol，0.51當量）、和(2*S*)-2-[[(2*S*)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)丙醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙醯基胺基]-3-甲基-丁醯基]胺基]丙酸（664 mg，0.871 mmol，1.1當量），隨後添加EDCI.HCl（226 mg，1.18 mmol，1.5當量）並將混合物攪拌2 h，隨後LCMS表明良好的轉化，但反應已停滯。將反應混合物溫熱至30ºC並攪拌30 min，LCMS表明沒有變化，因此在

真空中除去CH_2Cl_2並將Et_2O添加至所得DMA溶液中。收集沈澱的油，在真空中除去Et_2O並重複沈澱過程。將合併的沈澱物藉由HPLC（10%-60% B於A中 經13 min）進行純化，冷凍乾燥後得到為黃色殘餘物的**1**（200 mg，0.174 mmol，98%純度，22%產率）。LC/MS（方法A）：滯留時間1.44 min（ES+） *m/z* 1149 $[M+H]^+$ ^{1}H NMR (600 MHz, 氯仿-*d*) δ 8.81 (s, 1H), 7.83 (s, 2H), 7.48 (s, 1H), 7.18 (dd, *J* = 18.7, 7.5 Hz, 2H), 6.69 (s, 2H), 6.43 (s, 1H), 5.68 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.27 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.03 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 18.4 Hz, 1H), 4.75 (p, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J* = 7.4, 5.8 Hz, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.83 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.78 - 3.68 (m, 3H), 3.68 - 3.57 (m, 31H), 3.53 (t, *J* = 5.1 Hz, 3H), 3.40 (q, *J* = 5.3 Hz, 2H), 3.06 - 2.91 (m, 3H), 2.84 (dt, *J* = 16.3, 6.2 Hz, 1H), 2.63 (ddd, *J* = 14.8, 8.5, 4.2 Hz, 1H), 2.57 - 2.44 (m, 4H), 2.30 (dq, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 2.10 (p, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.91 (ddt, *J* = 16.8, 14.3, 7.2 Hz, 3H), 1.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.02 (dd, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 10H)。

實例10的合成 - A2的替代合成



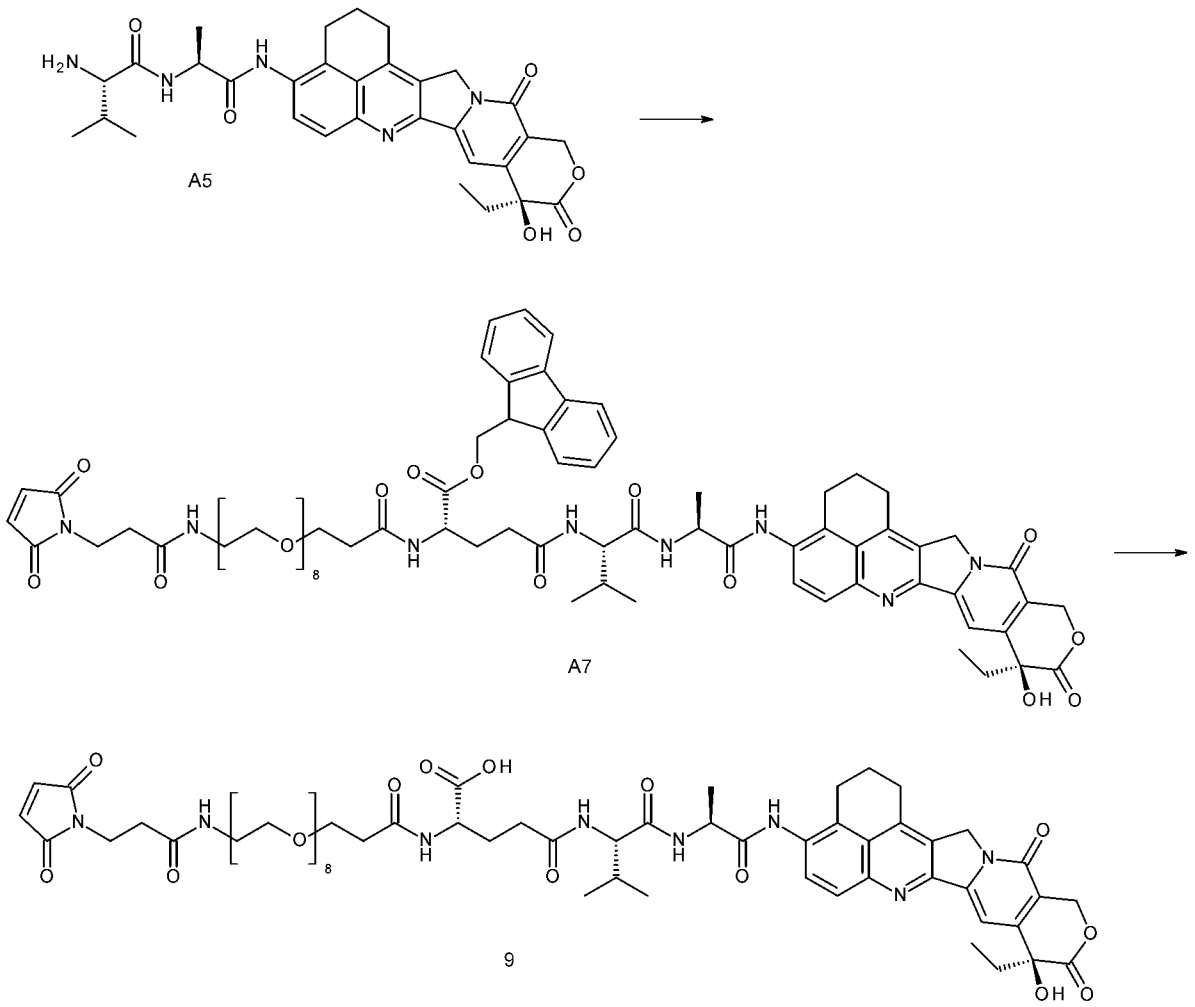
I16 A2

烯丙基 ((S)-1-(((S)-1-((4-胺基-5-側氧基-5,6,7,8-四氫萘-1-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸酯（**A2**）

【0659】將EDCI.HCl（7.71 g，31.2 mMol）添加至烯丙氧羰基-Val-Ala-OH（8.49 g，31.2 mmol）於CH_2Cl_2（200 mL）中之溶液並攪拌15 min或直至溶解。隨後添加**I16**（5 g，28.3 mMol）並將所得混合物攪拌直至反應完成。將揮發物在減壓下去除。將粗產物吸收於Et_2O（50 mL）中並將混合物超音波處理3

min。將固體過濾並再次吸收於CH2Cl2（50 mL）中，超音波處理3 min並再次過濾以給出呈灰色固體的純的產物**A2**（12.21 g，79%產率）。LC/MS（方法B）：ES^+ =1.47 min，*m/z* 431.5 $[M + H]^{\cdot+}$。

合成實例11



a) (9H-芴-9-基)甲基 N2-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3-側氧基-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧-4-氮雜三十一烷-31-醯基)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-L-麩醯胺酸（A7）

【0660】將EDCI.HCl（0.10 mmol，1.2當量）添加至**A5**（0.087 mmol，1.0當量）和Mal-PEG_8-Glu-OH（0.10 mmol，1.2當量）於DCM（5 mL）中之溶

液中並將所得混合物在室溫下攪拌過夜。將反應混合物蒸發至乾燥，並藉由柱（8%-12% MeOH/DCM）進行純化得到呈白色固體的產物。產率 = 80 mg（63%）。LC/MS（方法B） rt 1.66 min *m/z* (1456.2) M+H。

b) N2-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-3-側氧基-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧-4-氮雜三十一烷-31-醯基)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-乙基-9-羥基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-4-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)-L-麩醯胺酸（9）

【0661】 將1-甲基吡咯啶（200 μL）添加至**A7**（0.06 mmol）於DMF（0.8 mL）中之溶液中並在室溫下攪拌10 min。在真空下除去溶劑，並將殘餘物藉由製備型HPLC（30% MeCN/水+ 0.05%甲酸，經8.5 min）純化。將含產物的級分冷凍乾燥以給出呈灰白色固體的產物。產率 = 23 mg（30%）。LC/MS（方法B） rt 1.43 min *m/z* (1278.4) M+H。

【0662】 上述說明書中提及的所有出版物藉由引用併入本文。本發明之所描述的方法和系統的各種修改和變化對於熟悉該項技術者將係顯而易見的，而不背離本發明之範圍和精神。雖然已結合特定較佳的實施方式描述了本發明，但應當理解，要求保護的本發明不應不適當地限於這類特定實施方式。實際上，對於生物化學和生物技術或相關領域的技術者顯而易見的、用於執行本發明之所描述的實施方式的各種修改旨在落入如下申請專利範圍之範圍內。

序列

識別字	序列
ZY0EPQ-E02；CHDR1	SEQ ID NO: 1： GYYWN
ZY0EPQ-E02；CHDR2	SEQ ID NO: 2: EINHSGSTNYNPSLKS
ZY0EPQ-E02；CHDR3	SEQ ID NO: 3： NLYNWNLDS
ZY0EPQ-E02；CLDR1	SEQ ID NO: 4： RASQGIRNDLG
ZY0EPQ-E02；CLDR2	SEQ ID NO: 5： VASSLQS

ZY0EPQ-E02；CLDR3	SEQ ID NO: 6： LQHNSYPRT
ZY0EQD-E02；CHDR1	SEQ ID NO: 7： GYYWN
ZY0EQD-E02；CHDR2	SEQ ID NO: 8： EINHSGSTSYNPSLKS
ZY0EQD-E02；CHDR3	SEQ ID NO: 9： VLYNWNVDS
ZY0EQD-E02；CLDR1	SEQ ID NO: 10： RASQDIRNDVG
ZY0EQD-E02；CLDR2	SEQ ID NO: 11： AASRLQS
ZY0EQD-E02；CLDR3	SEQ ID NO: 12： LQHNSYPRT
ZY0EOB-F05；CHDR1	SEQ ID NO: 13： SGGYYWS
ZY0EOB-F05；CHDR2	SEQ ID NO: 14： NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EOB-F05；CHDR3	SEQ ID NO: 15： EKALATVTPSGYENYYTVDV
ZY0EOB-F05；CLDR1	SEQ ID NO: 16： WASQGISSYLA
ZY0EOB-F05；CLDR2	SEQ ID NO: 17： AASTLQS
ZY0EOB-F05；CLDR3	SEQ ID NO: 18： QHLNSYPLT
ZY0EO5-E07；CHDR1	SEQ ID NO: 19： SGGYYWS
ZY0EO5-E07；CHDR2	SEQ ID NO: 20： NIYYSGSTYYNPSLKS
ZY0EO5-E07；CHDR3	SEQ ID NO: 21： EKALASVIPSGYENYYVVDV
ZY0EO5-E07；CLDR1	SEQ ID NO: 22： WASQGIAGYLA
ZY0EO5-E07；CLDR2	SEQ ID NO: 23： AASTLQS
ZY0EO5-E07；CLDR3	SEQ ID NO: 24： QHLNSYPLT
ZY0EP0-C07；CHDR1	SEQ ID NO: 25： DYYMS
ZY0EP0-C07；CHDR2	SEQ ID NO: 26： YISSSGSTIYYTDSVKG
ZY0EP0-C07；CHDR3	SEQ ID NO: 27： DGVGFDY
ZY0EP0-C07；CLDR1	SEQ ID NO: 28： RASQSVSSSYLA
ZY0EP0-C07；CLDR2	SEQ ID NO: 29： AASSRAT
ZY0EP0-C07；CLDR3	SEQ ID NO: 30： QQYGSSPLYT

SEQ ID NO: 31（ZY0EPQ-E02，可變重鏈）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTILVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNLYNWNLDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 32（ZY0EPQ-E02，可變輕鏈）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGRAPKRLIYVASSLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 33（ZY0EQD-E02，可變重鏈，例如種系化前）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 34（ZY0EQD-E02，可變輕鏈）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 35（ZY0EOB-F05，可變重鏈）

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCATEKALATVTPSGYENYYTVDV
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 36（ZY0EOB-F05，可變輕鏈）

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 37（ZY0EO5-E07，可變重鏈）

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGNIYYSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKALASVIPSGYENYYVVDV
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 38（ZY0EO5-E07，可變輕鏈）

DIQLTQSPSFLSASVGGRVTITCWASQGIAGYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQHLNSYPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 39：（ZY0EP0-C07，可變重鏈）

QVQLVESGGVLVKPGGSLRLSCAASGFTLSDYYMSWIRQAPGMGLEWVSYISSSGSTIY
YTDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGVGFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 40（ZY0EP0-C07，可變輕鏈）

EIVLTQSPGTLSLFPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQSPRLLIYAASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 41（Maia重鏈恒定區，半胱胺酸插入帶下劃線）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 42（輕鏈恒定區）

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 43（ZY0EQD-E02，可變重鏈，例如種系化前，例如*SEQ ID*

***NO: 33/ SEQ ID NO: 45*的變體）**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGRGLEWIGEINHSGSTSY
NPSLKSRITISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 44（ZY0EQD-E02，輕鏈）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDVGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 45（EQD-E02_GL，可變重鏈，GL = 種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 46（EQD-E02-GLY，可變重鏈，GLY = 具有Y取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Y**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 47（EQD-E02-GLQ，可變重鏈，GLQ = 具有Q取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Q**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
S

SEQ ID NO: 48（E02-GL-Maia-重鏈，半胱胺酸插入帶下劃線）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPS**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49（E02-GLY-Maia-重鏈，GLY = 具有Y取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Y**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50（E02-GLQ-Maia-重鏈，GLQ = 具有Q取代的種系化的）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEI**Q**HSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51（E02-GL-WT-重鏈）

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLACTVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTS
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARVLYNWNVDSWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52（重鏈恒定區）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 53（人B7H4核酸序列，包括5'和3' UTR）

GCCACCatggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggcttt
ggtatttcagggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacct
gacatcaaactttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaaagaaggcaaagatgagctgtcg
gagcaggatgaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaacgtgcaact
cacagatgctggcacctacaaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgcc
ggaagtgaatgtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttcccccagcccacagtggtctgggcatcc
caagttgaccagggagccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctct
acaatgttacgatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatcaaagtgacagaatcggagatc
aaaaggcggagtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttctttctttgccatcagctgggcacttctgcctctcagccct
tacctgatgctaaaaTAATAA

SEQ ID NO: 54（人B7H4核酸序列，編碼序列）

atggcttccctggggcagatcctcttctggagcataattagcatcatcattattctggctggagcaattgcactcatcattggctttggtatttcag
ggagacactccatcacagtcactactgtcgcctcagctgggaacattggggaggatggaatcctgagctgcacttttgaacctgacatcaaa
ctttctgatatcgtgatacaatggctgaaggaaggtgttttaggcttggtccatgagttcaaagaaggcaaagatgagctgtcggagcaggat
gaaatgttcagaggccggacagcagtgtttgctgatcaagtgatagttggcaatgcctctttgcggctgaaaaacgtgcaactcacagatgct
ggcacctacaaatgttatatcatcacttctaaaggcaaggggaatgctaaccttgagtataaaactggagccttcagcatgccggaagtgaat
gtggactataatgccagctcagagaccttgcggtgtgaggctccccgatggttcccccagcccacagtggtctgggcatcccaagttgacc
agggagccaacttctcggaagtctccaataccagctttgagctgaactctgagaatgtgaccatgaaggttgtgtctgtgctctacaatgttac
gatcaacaacacatactcctgtatgattgaaaatgacattgccaaagcaacaggggatatcaaagtgacagaatcggagatcaaaaggcgg
agtcacctacagctgctaaactcaaaggcttctctgtgtgtctcttctttctttgccatcagctgggcacttctgcctctcagcccttacctgatgct
aaaa

SEQ ID NO: 55（人B7H4多肽序列；UniProt登錄號：Q7Z7D3）
MASLGQILFWSIISIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSD
IVIQWLKEGVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTD
AGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTGAFSMPEVNVDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWA
SQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSVLYNVTINNTYSCMIENDIAKATGDIKVT
ESEIKRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYLMLK

實施方式

E1. 一種結合至B7-H4的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的重鏈CDR1（HCDR1）、重鏈CDR2（HCDR2）、重鏈CDR3（HCDR3）、輕鏈CDR1（LCDR1）、輕鏈CDR2（LCDR2）和輕鏈CDR3（LCDR3），或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17和SEQ ID NO: 18之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23和SEQ ID NO: 24之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體；或

v. 分別含有SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29和SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

E2. 根據E1所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

ii. 分別含有SEQ ID NO: 33和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

iii. 分別含有SEQ ID NO: 43和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

iv. 分別含有SEQ ID NO: 46和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

v. 分別含有SEQ ID NO: 47和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和可變輕（VL）鏈，或其功能變體；

vi. 分別含有SEQ ID NO: 31和SEQ ID NO: 32之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

vii. 分別含有SEQ ID NO: 35和SEQ ID NO: 36之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；

viii. 分別含有SEQ ID NO: 37和SEQ ID NO: 38之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體；或

ix. 分別含有SEQ ID NO: 39和SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

E3. 根據E1或E2所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3，或其功能變體。

E4. 根據E1-E3所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

i. 分別含有SEQ ID NO: 45和SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的VH鏈和VL鏈，或其功能變體。

E5. 根據E1-E4所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合OVCAR4細胞系。

E6. 根據E1-E5所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的重鏈恒定區。

E7. 根據E1-E5所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 52之胺基酸序列的重鏈恒定區。

E8. 根據E1-E7所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 42之胺基酸序列的輕鏈恒定區。

E9. 根據E1-E5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈；以及含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈。

E10. 根據E1-E5中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 48之胺基酸序列的重鏈；以及含有SEQ ID NO:44之胺基酸序列的輕鏈。

E11. 根據E1-E10中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至異源藥劑。

E12. 根據E1-E11中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自由以下組成之群組：拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、抗微生物劑、治療劑、前驅藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物響應調節劑、藥學試劑、淋巴介質、異源抗體、異源抗體的片段、可檢測標記、聚乙二醇（PEG）、放射性同位素、或其組合。

E13. 根據E1-E12中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至一或多種異源藥劑，該一或多種異源藥劑選自拓撲異構酶I抑制劑、微管溶素衍生物、吡咯并苯并二氮呼、或其組合。

E14. 根據E1-E13中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至異源藥劑，該異源藥劑選自由以下組成之群組：微管溶素AZ1508、吡咯并苯并二氮呼SG3315、吡咯并苯并二氮呼SG3249、或其組合。

E15. 根據E1-E14中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至吡咯并苯并二氮呼SG3249細胞毒素：（SG3249）。

E16. 根據E1-E14中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段軛合至：

（SG3932）；（SG4010）；（SG4057）；和/或（SG4052）。

E17. 根據E1-E14或E16中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段靶合至：（SG3932）。

E18. 根據E1-E17中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段係單株抗體。

E19. 根據E1-E18中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，其中所述抗體或其抗原結合片段係人源化單株抗體。

E20. 一種藥物組成物，該藥物組成物包含根據E1-E19中任一項所述之抗體或其抗原結合片段。

E21. 一種多核苷酸，該多核苷酸編碼根據E1-E19中任一項所述之抗體或其抗原結合片段。

E22. 一種宿主細胞，該宿主細胞包含根據E21所述之多核苷酸。

E23. 一種用於產生結合B7-H4的抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包括在宿主細胞中表現根據E22所述之多核苷酸。

E24. 一種可藉由根據E23所述之方法獲得的抗體或其抗原結合片段。

E25. 一種治療包含表現B7-H4的癌細胞的癌症之方法，該方法包括向受試者投與根據E1-E19或E24中任一項所述之抗體或抗原結合片段、根據E20所述之藥物組成物、或其組合。

E26. 根據E1-E19或24中任一項所述之抗體或其抗原結合片段，或根據E20所述之藥物組成物，用於治療癌症，其中所述癌症包含表現B7-H4的癌細胞。

E27. 根據E25所述之方法，或根據E26所述使用的抗體或其抗原結合片段或藥物組成物，其中所述癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌、膽管癌、NSCLC（鱗癌和/或腺癌）、胰臟癌和胃癌。

E28. 用於根據E25-E27中任一項所述使用的方法、或抗體或其抗原結合片段或藥物組成物，其中所述癌症選自乳癌、卵巢癌、子宮內膜癌和膽管癌。

E29. 用於根據E25-E28中任一項所述使用的方法、或抗體或其抗原結合片段或藥物組成物，其中所述癌症係選自以下的乳癌：激素受體陽性（HR+）乳癌、人表皮生長因子受體2陽性（HER2+）乳癌和三陰性乳癌（TNBC）。

E30. 一種用於檢測樣本中是否存在B7-H4多肽之方法，該方法包括：

i. 使樣本與根據E1-E19或E24中任一項所述之抗體或其抗原結合片段、或根據E20所述之藥物組成物接觸，以提供抗體-抗原複合物；

ii. 檢測所述抗體-抗原複合物是否存在；

iii. 其中該抗體-抗原複合物的存在證實了B7-H4多肽的存在；

iv. 其中抗體-抗原複合物的不存在證實了B7-H4多肽的不存在。

E31. 根據E30所述之方法，其中所述抗體-抗原複合物的存在指示癌細胞的存在，並且其中所述抗體-抗原複合物的不存在指示癌細胞的不存在。

E32. 根據E30或E31所述之方法，其中該樣本係可從受試者獲得的分離的樣本。

E33. 根據E30-E32中任一項所述之方法，其中該B7-H4多肽係癌細胞的組成成分。

E34. 一種抗體-藥物軛合物（ADC），該抗體-藥物軛合物包含：

(i) 結合人B7-H4的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的HCDR1；含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的HCDR2；含有SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的HCDR3；以及含有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的LCDR1；含有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的LCDR2；和含有SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的LCDR3；

(ii) 連接子；以及

(iii) 細胞毒性劑，其中該細胞毒性劑係SG3932，

其中該ADC具有為8的藥物與抗體比率（DAR）。

E35. 根據E34所述之ADC，其中該抗體或其抗原結合片段包含含有SEQ ID NO: 45之胺基酸序列的可變重（VH）鏈和含有SEQ ID NO: 34之胺基酸序列的可變輕（VL）鏈。

E36. 根據E34或E35所述之ADC，該ADC包含含有SEQ ID NO: 51之胺基酸序列的重鏈（HC）和含有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的輕鏈（LC）。

E37. 一種藥物組成物，該藥物組成物包含根據E34-E37中任一項所述之ADC。

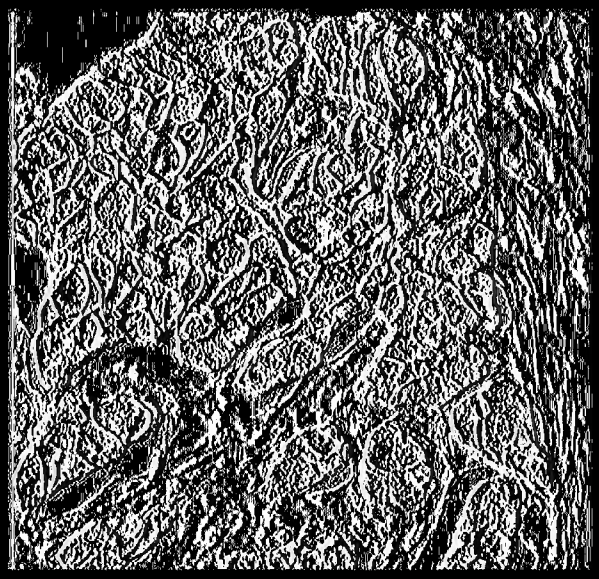
E38. 一種治療包含表現B7-H4的癌細胞的癌症之方法，該方法包括向受試者投與根據E34-E37中任一項所述之ADC、或根據E37所述之藥物組成物、或其組合。

【符號說明】

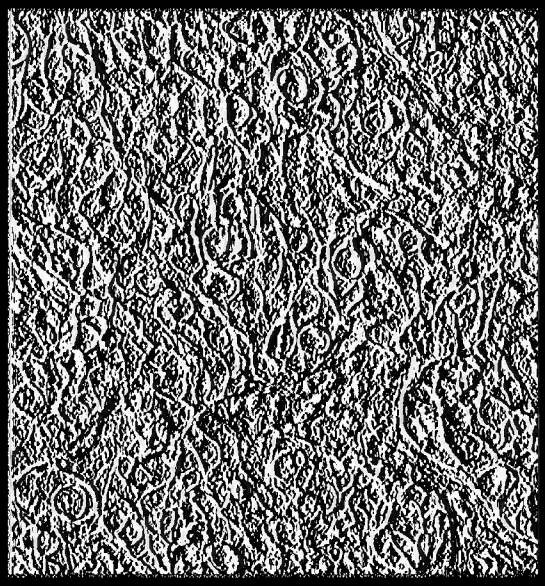
【0663】 無

【生物材料寄存】

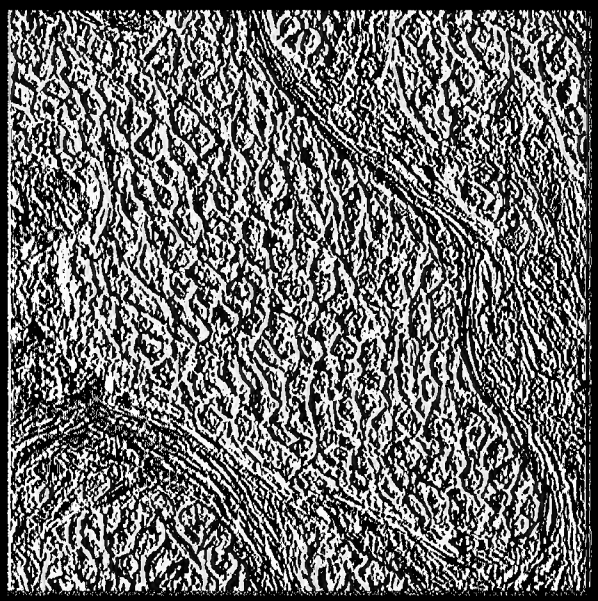
【0664】 無



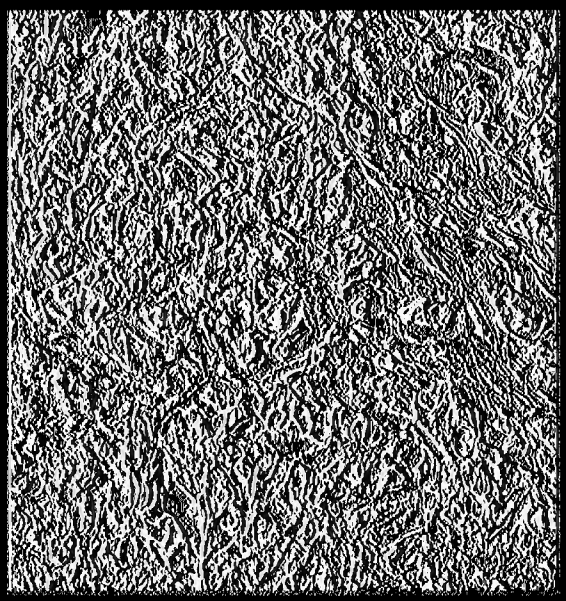
[(圖1A)]



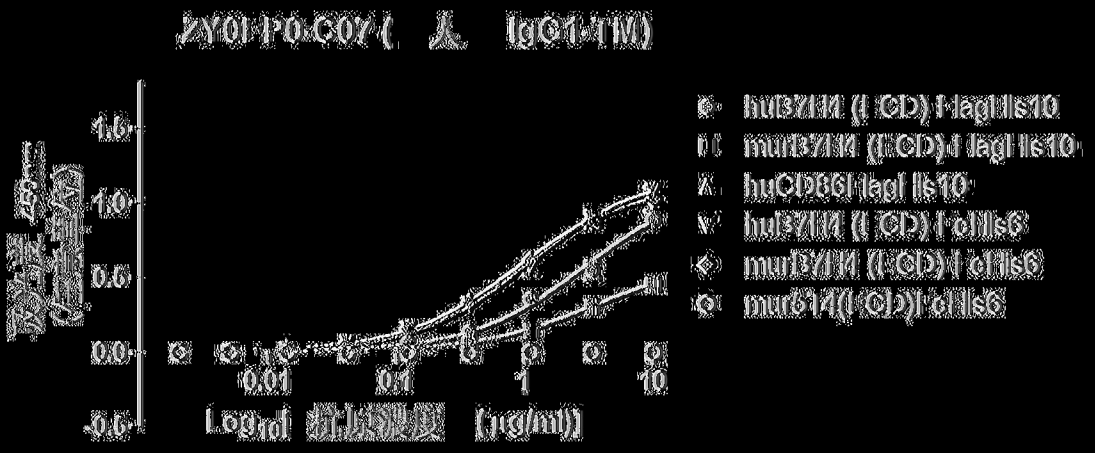
[(圖1B)]



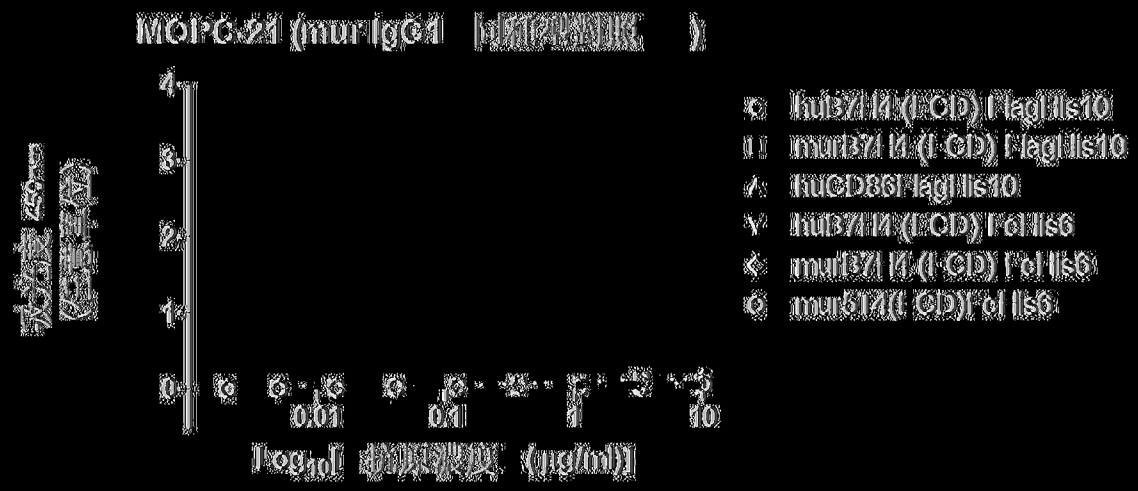
[(圖1C)]



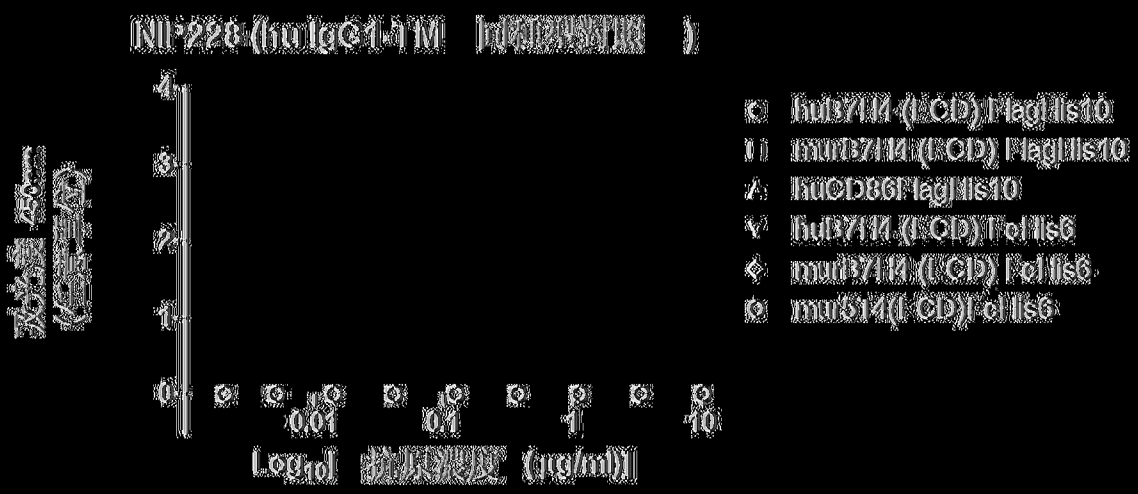
[(圖1D)]


ZY0I-P0-C07 (人 IgC1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
huB7H4 (I-CD) Flag Ils10
murB7H4 (I-CD) Flag Ils10
huCD86 Flag Ils10
huB7H4 (I-CD) Fc Ils6
murB7H4 (I-CD) Fc Ils6
mur514(I-CD)Fc Ils6

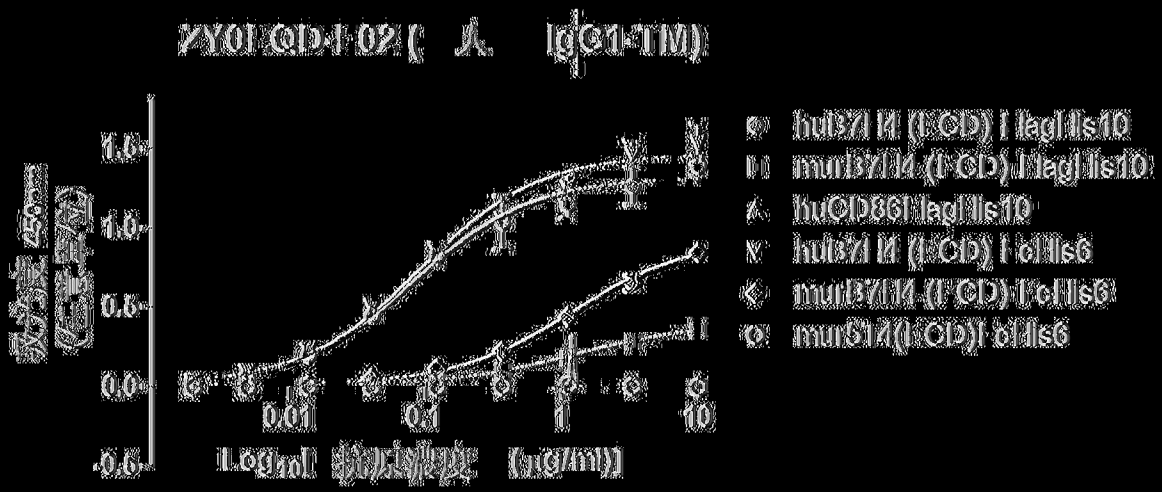
(圖2A)


MOPC-21 (mur IgC1 [illegible])
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
huB7H4 (I-CD) Flag Ils10
murB7H4 (I-CD) Flag Ils10
huCD86 Flag Ils10
huB7H4 (I-CD) Fc Ils6
murB7H4 (I-CD) Fc Ils6
mur514(I-CD)Fc Ils6

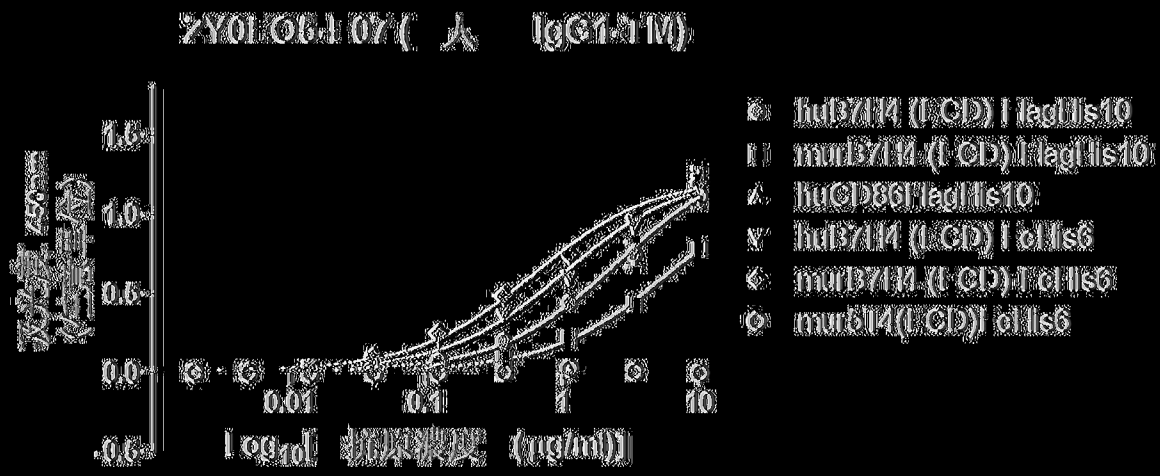
(圖2B)


NIP-228 (hu IgC1-TM [illegible])
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
huB7H4 (I-CD) Flag Ils10
murB7H4 (I-CD) Flag Ils10
huCD86 Flag Ils10
huB7H4 (I-CD) Fc Ils6
murB7H4 (I-CD) Fc Ils6
mur514(I-CD)Fc Ils6

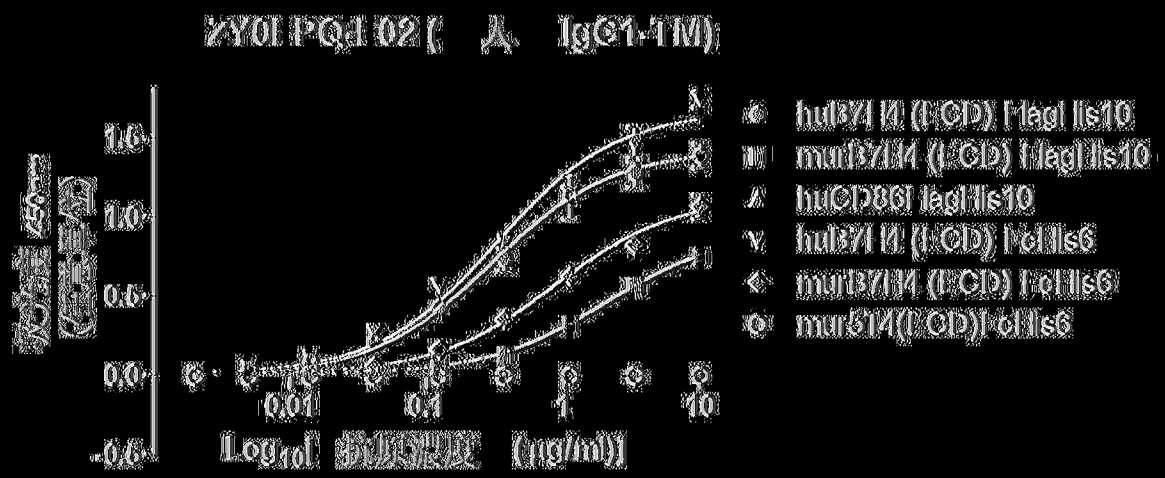
(圖2C)


ZY01 QD-1 02 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
hu137H4 (LCD) I lagI lis10
mur137H4 (LCD) I lagI lis10
huCD86I lagI lis10
hu137H4 (LCD) I cI lis6
mur137H4 (LCD) I cI lis6
mur514(LCD)I cI lis6

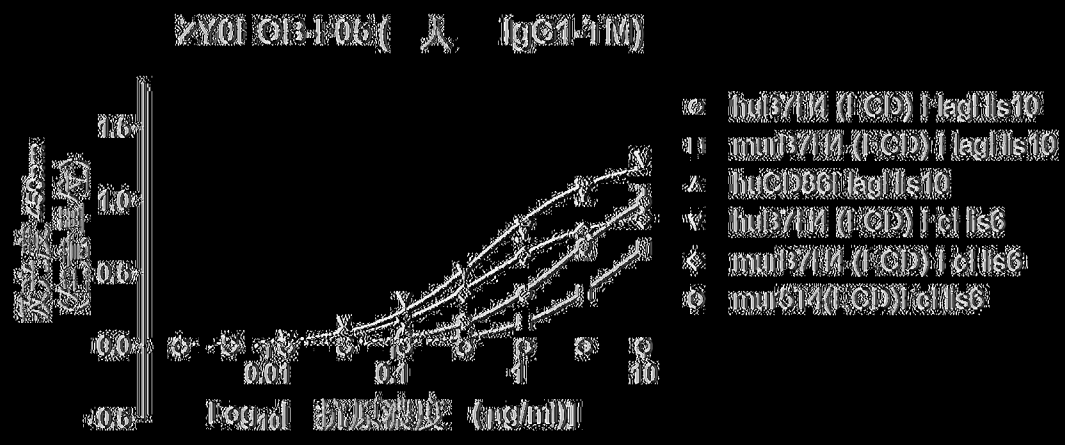
(圖2D)


ZY01 Q5-1 07 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
hu137H4 (LCD) I lagI lis10
mur137H4 (LCD) I lagI lis10
huCD86I lagI lis10
hu137H4 (LCD) I cI lis6
mur137H4 (LCD) I cI lis6
mur514(LCD)I cI lis6

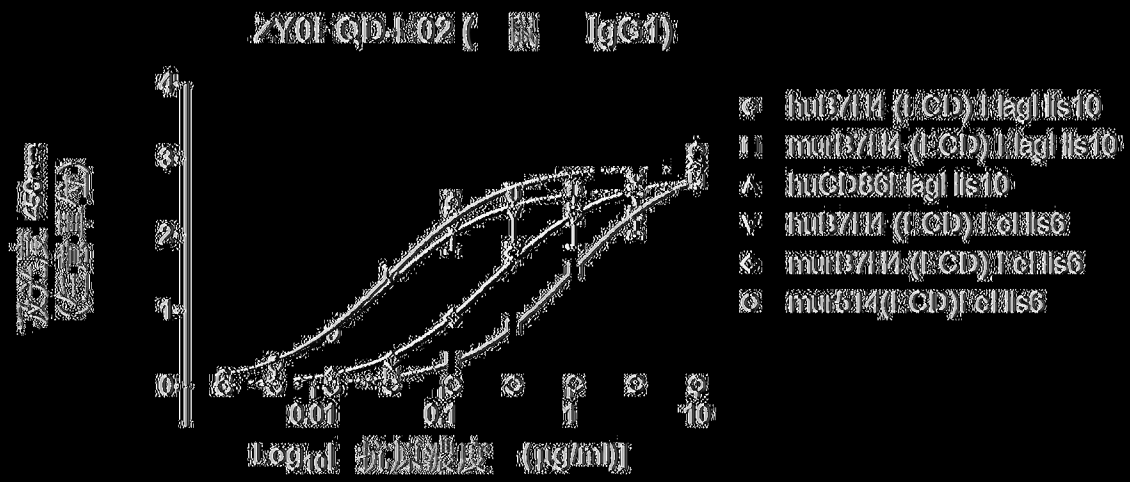
(圖2E)


ZY01 PQ-1 02 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
hu137H4 (LCD) I lagI lis10
mur137H4 (LCD) I lagI lis10
huCD86I lagI lis10
hu137H4 (LCD) I cI lis6
mur137H4 (LCD) I cI lis6
mur514(LCD)I cI lis6

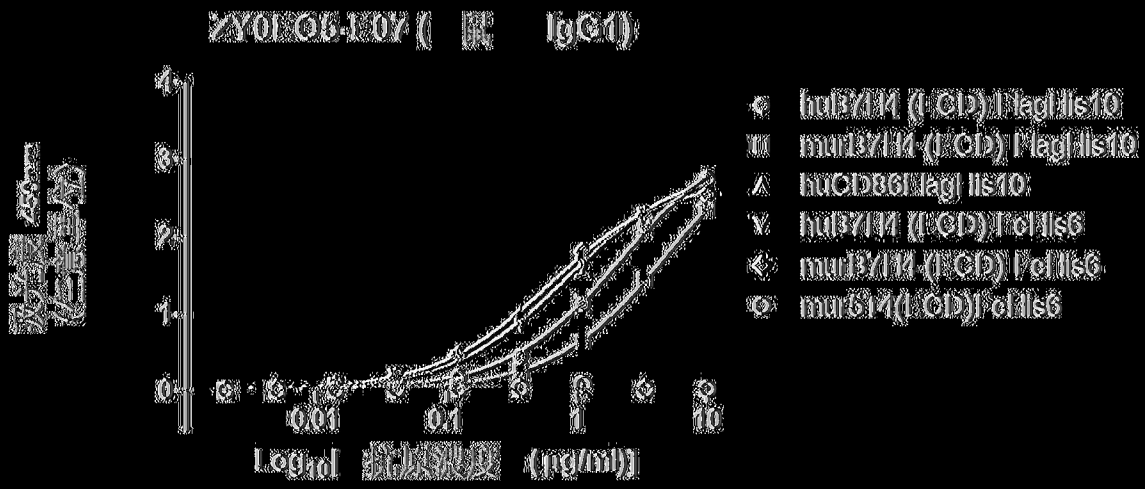
(圖2F)


ZY01-Q3-L05 (人 IgG1-TM)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
hu37H4 (LCD) Flag His10
mu37H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
hu37H4 (LCD) Fc His6
mu37H4 (LCD) Fc His6
mu514(LCD) Fc His6

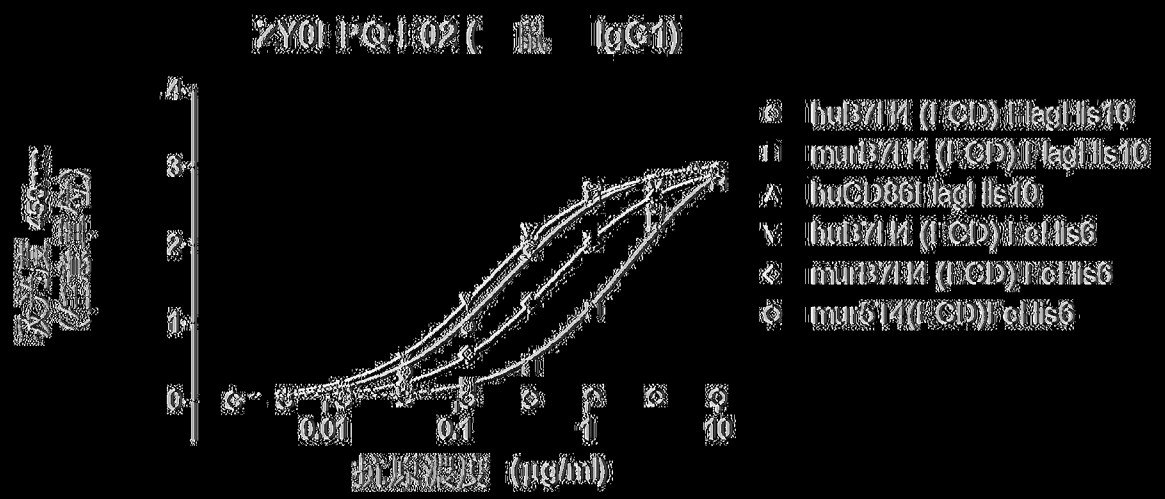
[圖2G]


ZY01-QD-L02 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
hu37H4 (LCD) Flag His10
mu37H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
hu37H4 (LCD) Fc His6
mu37H4 (LCD) Fc His6
mu514(LCD) Fc His6

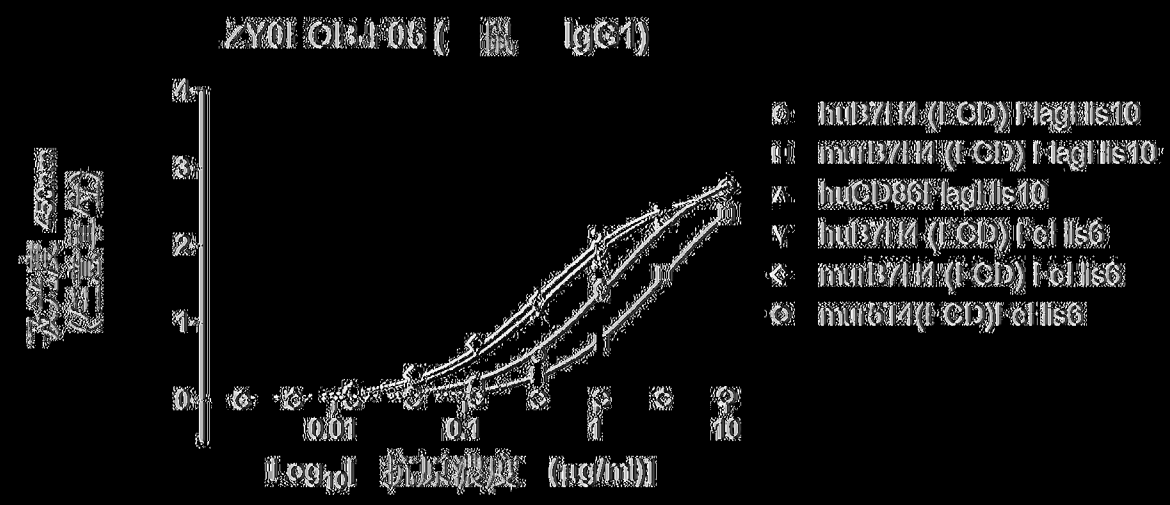
[圖2H]


ZY01-Q5-L07 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10[抗原濃度 (μg/ml)]
hu37H4 (LCD) Flag His10
mu37H4 (LCD) Flag His10
huCD86 Flag His10
hu37H4 (LCD) Fc His6
mu37H4 (LCD) Fc His6
mu514(LCD) Fc His6

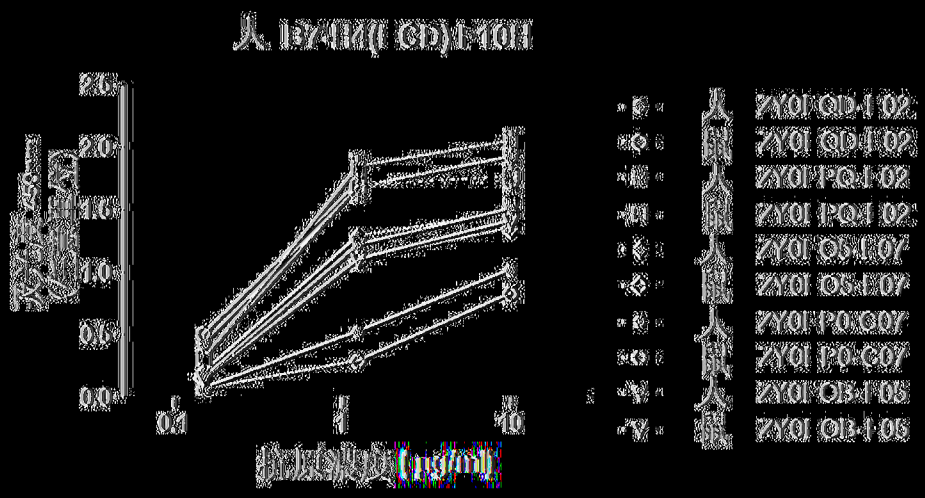
[圖2I]


ZY01 PQ-F02 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
huB7H4 (FCD) FlagHis10
murB7H4 (FCD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (FCD) FcHis6
murB7H4 (FCD) FcHis6
mur514(FCD)FcHis6

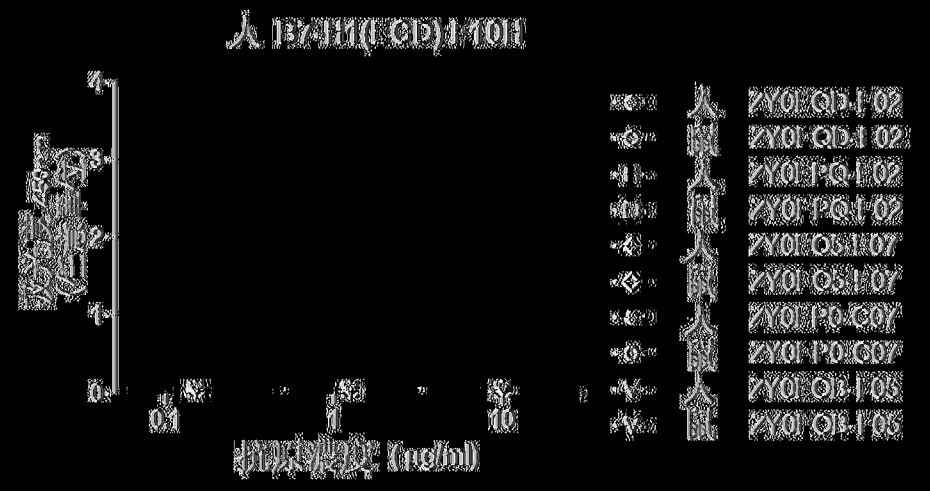
(圖2J)


ZY01 OB-F05 (鼠 IgG1)
4
3
2
1
0
0.01
0.1
1
10
Log10 抗原濃度 (μg/ml)
huB7H4 (FCD) FlagHis10
murB7H4 (FCD) FlagHis10
huCD86FlagHis10
huB7H4 (FCD) FcHis6
murB7H4 (FCD) FcHis6
mur514(FCD)FcHis6

(圖2K)


人 B7-H1(L CD)1-10H
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
抗原濃度 (ng/ml)
ZY01 QD-1 02
ZY01 QD-1 02
ZY01 PQ-1 02
ZY01 PQ-1 02
ZY01 O5-1 07
ZY01 O5-1 07
ZY01 P0-C07
ZY01 P0-C07
ZY01 OB-1 05
ZY01 OB-1 05

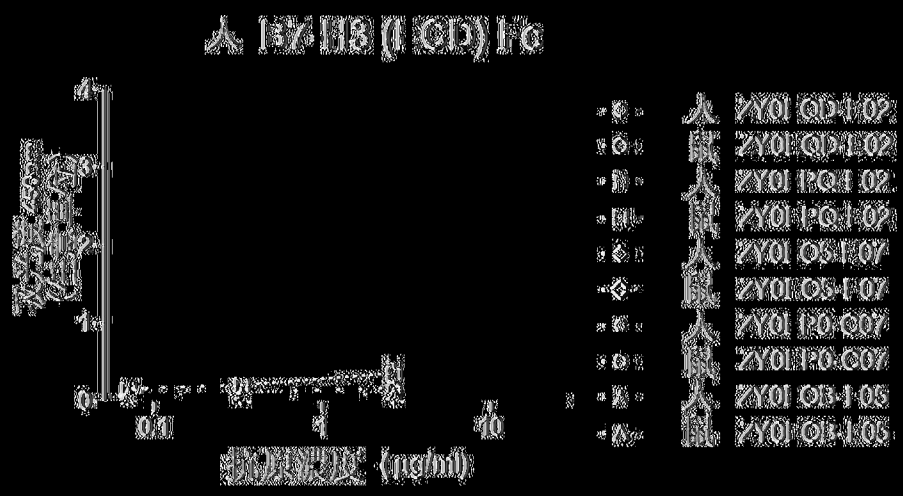
(圖3A)


人 B7-H1(L CD)1-10H
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (ng/ml)
ZY01 QD-1 02
ZY01 QD-1 02
ZY01 PQ-1 02
ZY01 PQ-1 02
ZY01 O5-1 07
ZY01 O5-1 07
ZY01 P0-C07
ZY01 P0-C07
ZY01 OB-1 05
ZY01 OB-1 05

(圖3B)


人 B7-H2 (L CD) 1-10H
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (ng/ml)
ZY01 QD-1 02
ZY01 QD-1 02
ZY01 PQ-1 02
ZY01 PQ-1 02
ZY01 O5-1 07
ZY01 O5-1 07
ZY01 P0-C07
ZY01 P0-C07
ZY01 OB-1 05
ZY01 OB-1 05

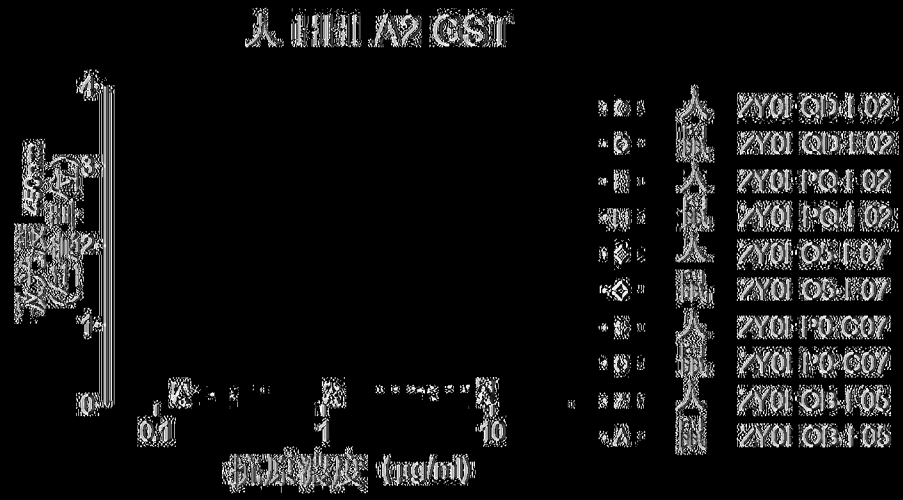
(圖3C)


人 B7 H8 (LCD) Fc
4
3
2
1
0
0.1
1
10
(μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
C 鼠 ZY01 QD-1-02
B 人 ZY01 PQ-1-02
B 鼠 ZY01 PQ-1-02
C 人 ZY01 O5-1-07
C 鼠 ZY01 O5-1-07
C 人 ZY01 P0-C07
C 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 OB-1-05
A 鼠 ZY01 OB-1-05

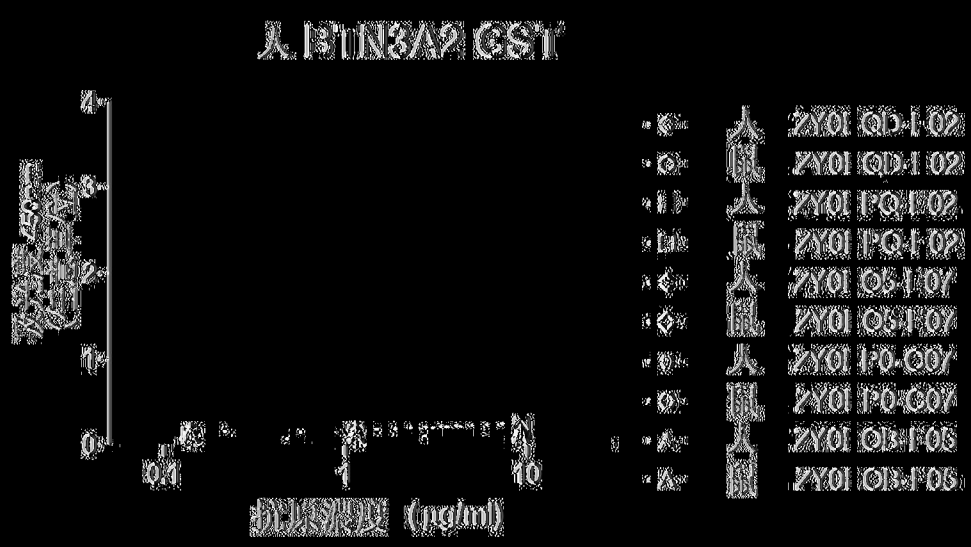
(圖3D)


人 B7N1A1 GST
4
3
2
1
0
0.1
1
10
(μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
C 鼠 ZY01 QD-1-02
B 人 ZY01 PQ-1-02
B 鼠 ZY01 PQ-1-02
C 人 ZY01 O5-1-07
C 鼠 ZY01 O5-1-07
C 人 ZY01 P0-C07
C 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 OB-1-05
A 鼠 ZY01 OB-1-05

(圖3E)


人 HHI A2 GST
4
3
2
1
0
0.1
1
10
(μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
C 鼠 ZY01 QD-1-02
B 人 ZY01 PQ-1-02
B 鼠 ZY01 PQ-1-02
C 人 ZY01 O5-1-07
C 鼠 ZY01 O5-1-07
C 人 ZY01 P0-C07
C 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 OB-1-05
A 鼠 ZY01 OB-1-05

(圖3F)


人 BTN3A2 GST
4
3
2
1
0
0.1
1
10
抗原濃度 (μg/ml)
C 人 ZY01 QD-1-02
O 鼠 ZY01 QD-1-02
L 人 ZY01 PQ-1-02
L 鼠 ZY01 PQ-1-02
◇ 人 ZY01 Q5-1-07
◇ 鼠 ZY01 Q5-1-07
0 人 ZY01 P0-C07
O 鼠 ZY01 P0-C07
A 人 ZY01 Q3-1-05
A 鼠 ZY01 Q3-1-05

(圖3G)

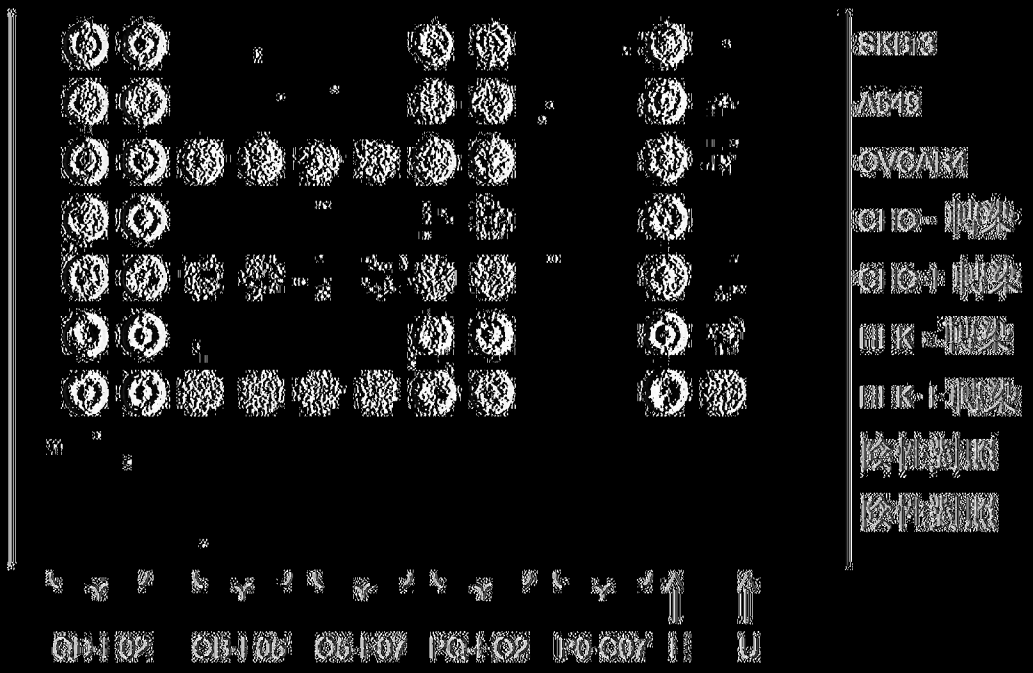


圖4A

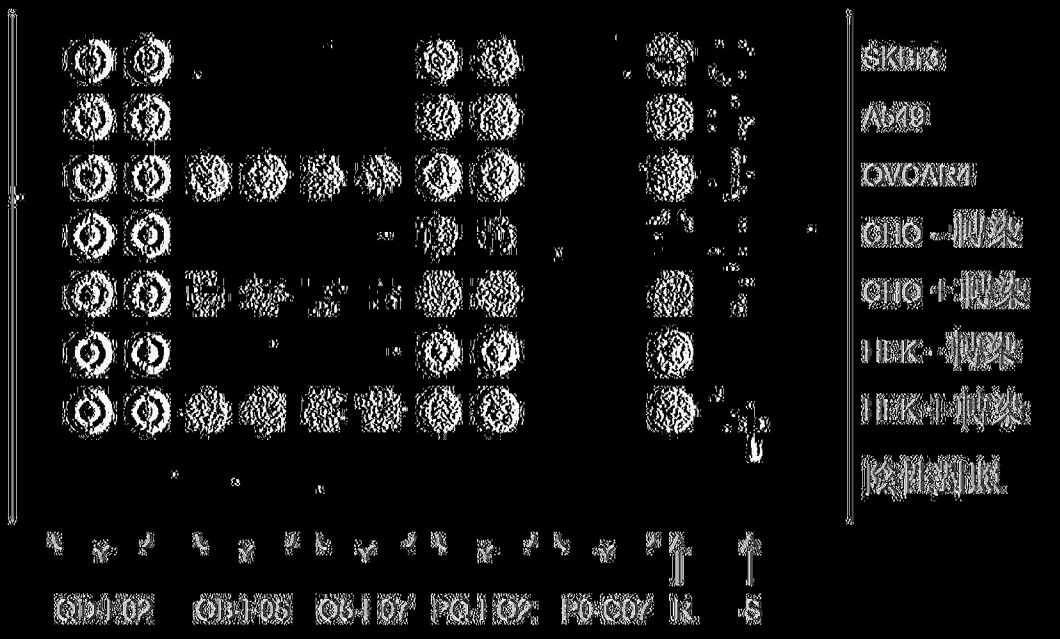
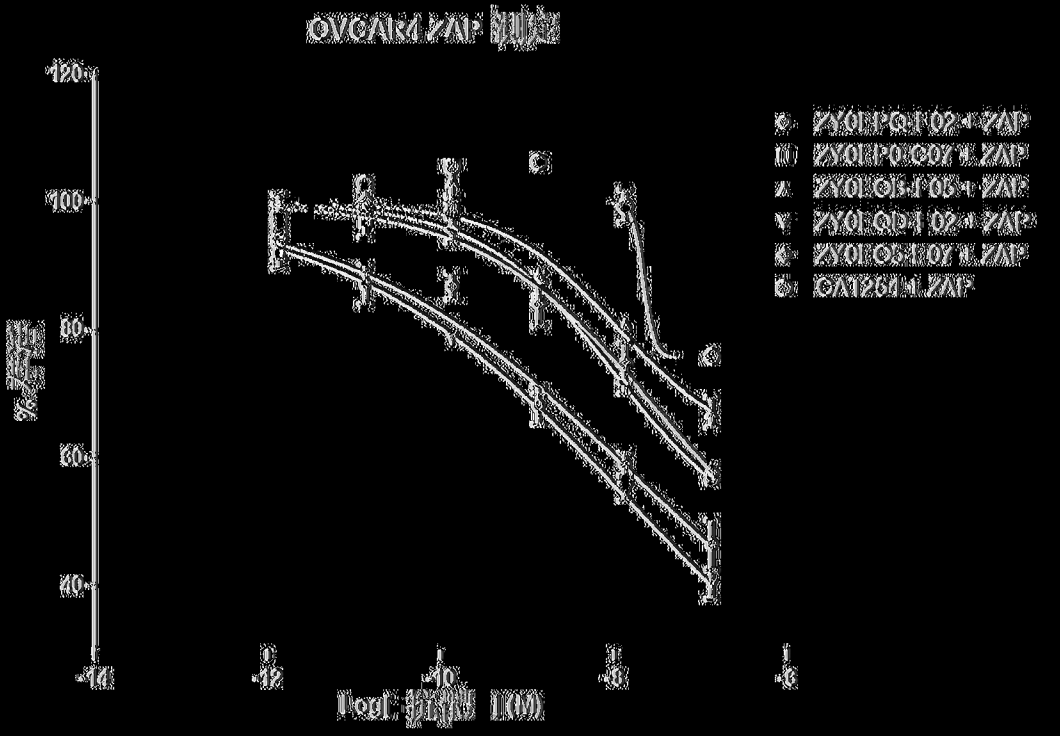
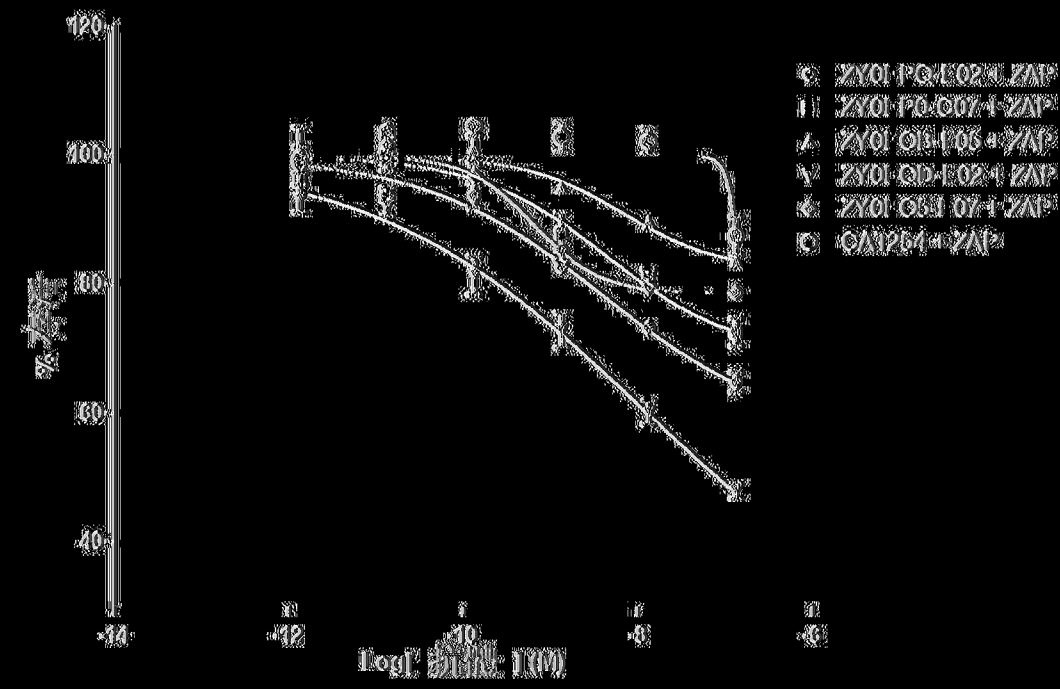


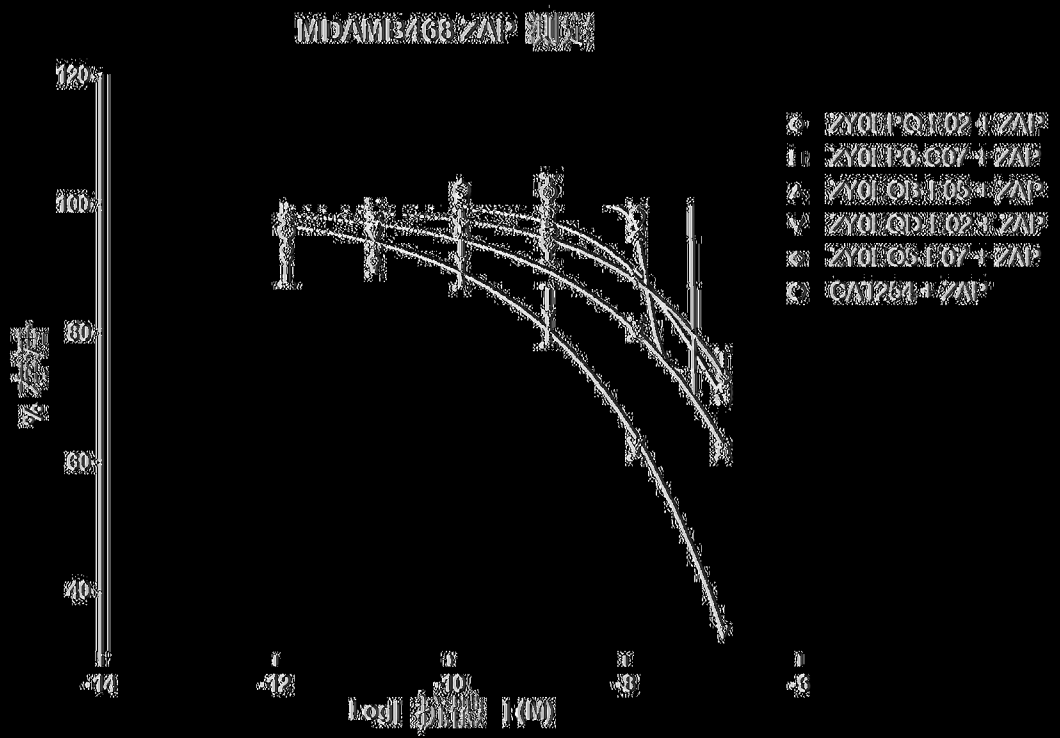
圖4B


OVCAR4 ZAP 測定
120
100
80
60
40
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ-L02 + ZAP
ZY01 P0-C07 + ZAP
ZY01 OB-L05 + ZAP
ZY01 QD-L02 + ZAP
ZY01 OB-L07 + ZAP
CA1254 + ZAP

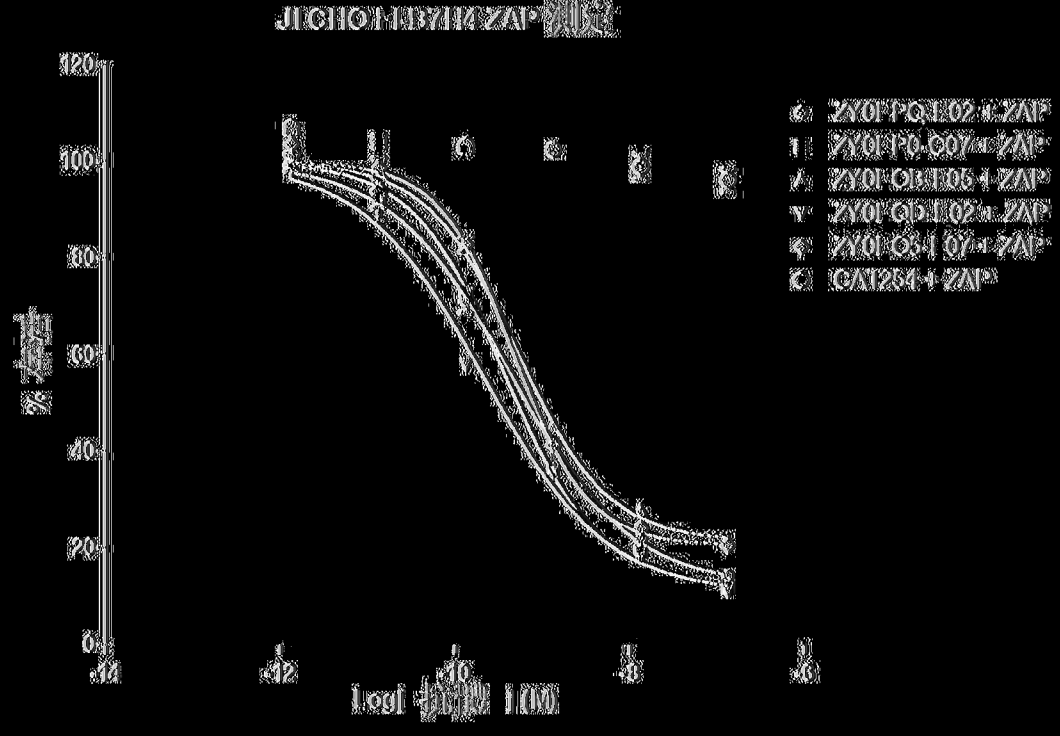
(圖5A)


SKBR3 ZAP 測定
120
100
80
60
40
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ-L02 + ZAP
ZY01 P0-C07 + ZAP
ZY01 OB-L05 + ZAP
ZY01 QD-L02 + ZAP
ZY01 OB-L07 + ZAP
CA1254 + ZAP

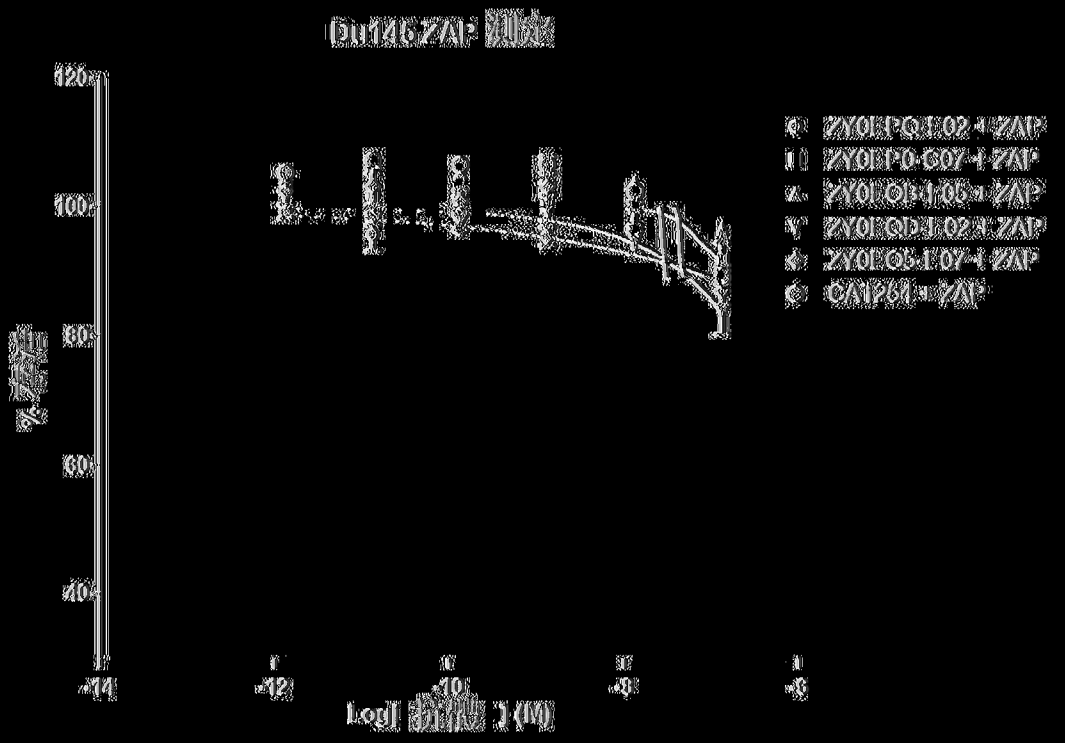
(圖5B)


MDAMB468 ZAP 測定
120
100
80
60
40
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ1.02 + ZAP
ZY01 P0.C07 + ZAP
ZY01 QB1.05 + ZAP
ZY01 QD1.02 + ZAP
ZY01 Q5.1.07 + ZAP
CA1254 + ZAP

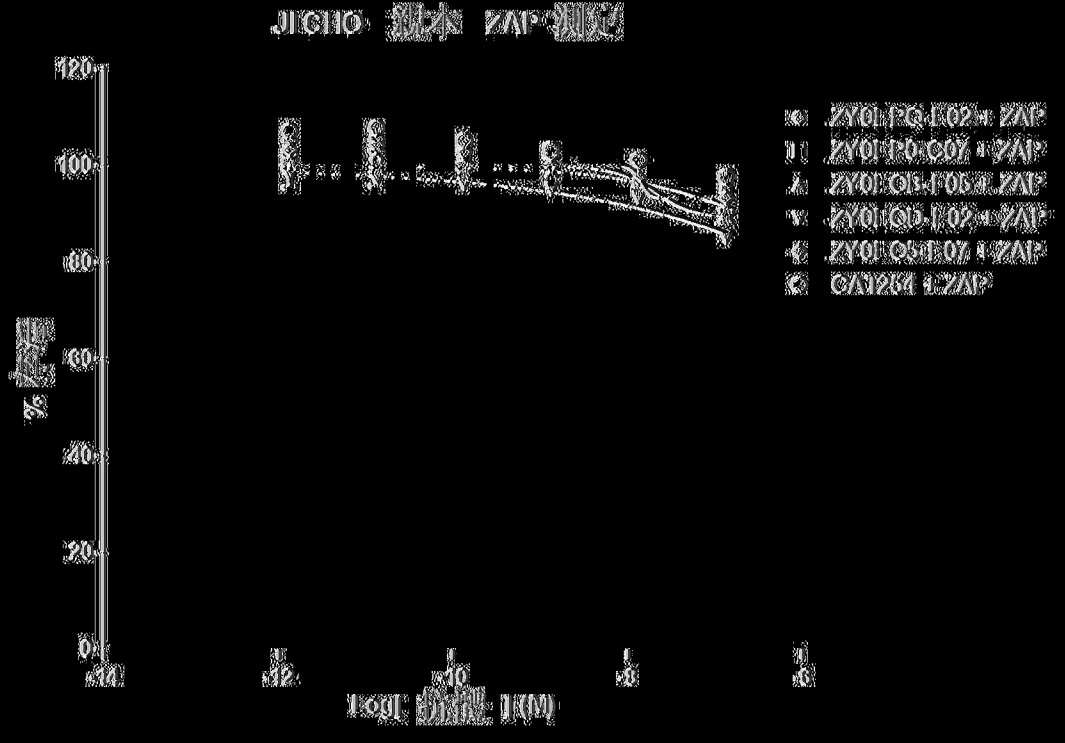
[圖5C]


JIGHOH-B7H4 ZAP 測定
120
100
80
60
40
20
0
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY01 PQ1.02 + ZAP
ZY01 P0.C07 + ZAP
ZY01 QB1.05 + ZAP
ZY01 QD1.02 + ZAP
ZY01 Q5.1.07 + ZAP
CA1254 + ZAP

[圖5D]


Du146 ZAP 測定
120
100
80
60
40
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY0LPQ-L02 + ZAP
ZY0LP0-C07 + ZAP
ZY0LQB-L05 + ZAP
ZY0LQD-L02 + ZAP
ZY0LQ5-L07 + ZAP
CA1254 + ZAP

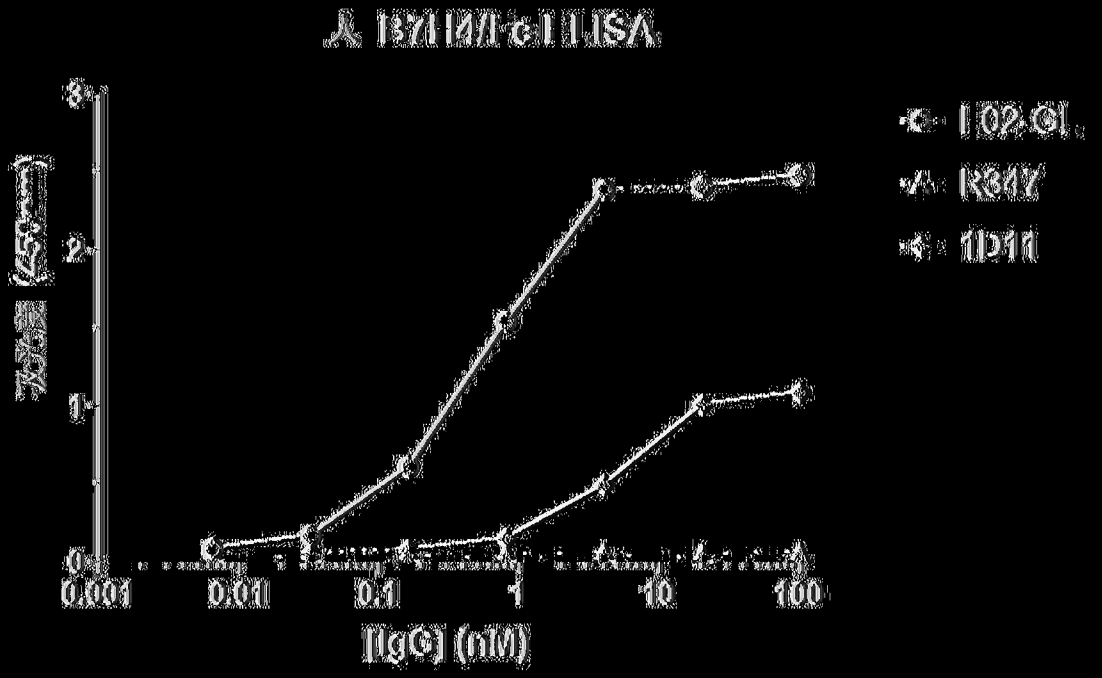
(圖5E)


JICHO 親本 ZAP 測定
120
100
80
60
40
20
0
%
-14
-12
-10
-8
-6
Log[抗體] (M)
ZY0LPQ-L02 + ZAP
ZY0LP0-C07 + ZAP
ZY0LQB-L05 + ZAP
ZY0LQD-L02 + ZAP
ZY0LQ5-L07 + ZAP
CA1254 + ZAP

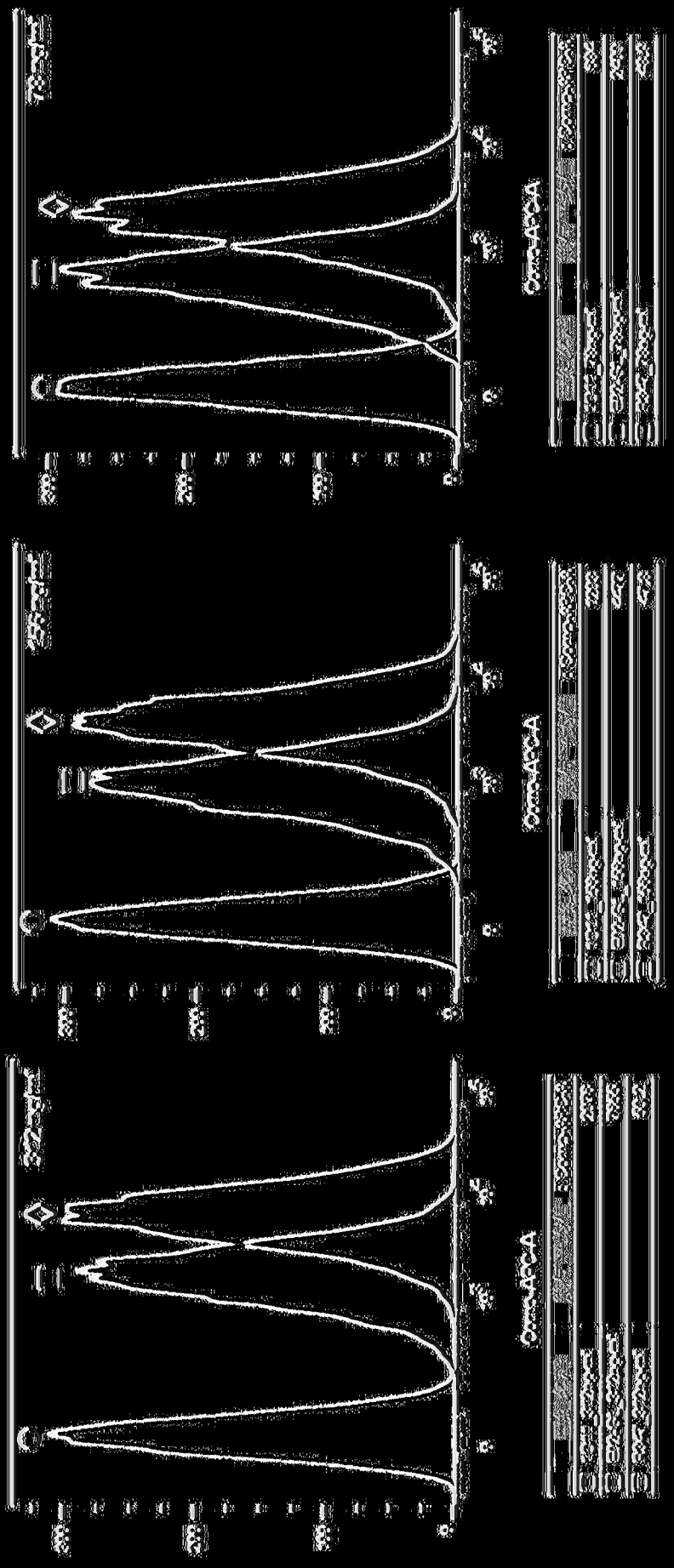
(圖5F)

圖7

圖 2（續）

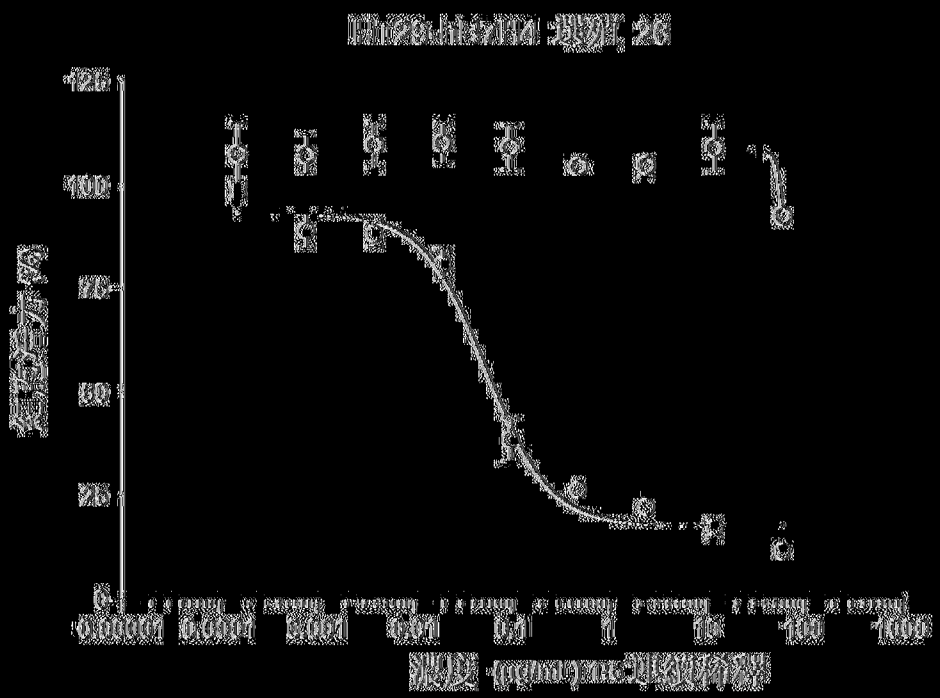


[圖7]

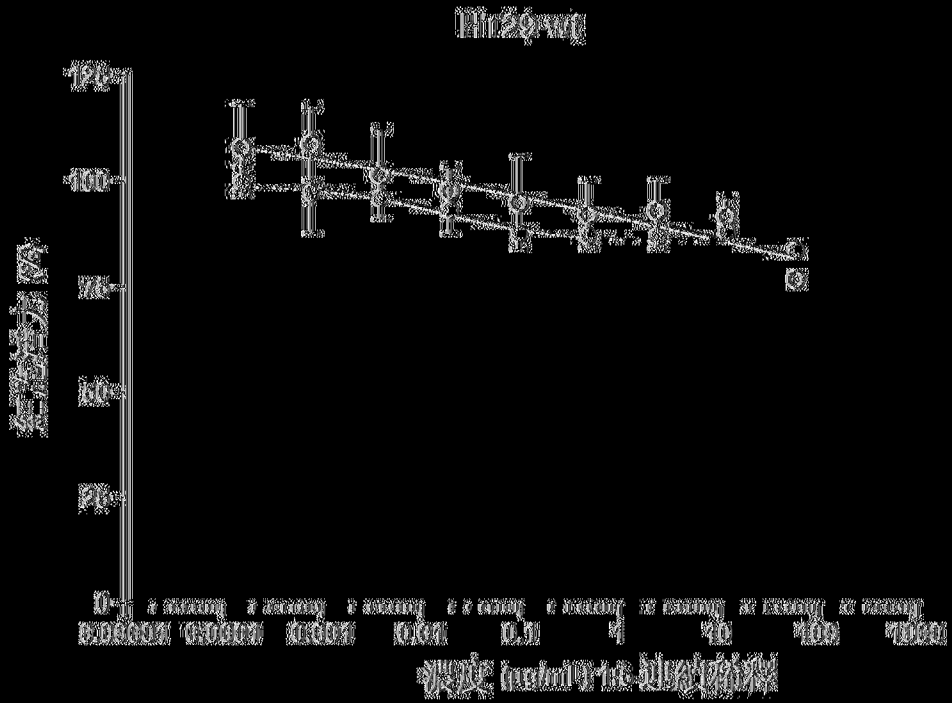


【圖8A】

圖3(B)


Hr28chia2T4 現列 26
125
100
75
50
25
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

|(圖9A)|


Hr29wt
125
100
75
50
25
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

|(圖9B)|

S100
S200
S300
S400
S500
S600
S700
S800
S900
S1000
S1100
S1200
S1300
S1400
S1500
S1600
S1700
S1800
S1900
S2000
S2100
S2200
S2300
S2400
S2500
S2600
S2700
S2800
S2900
S3000
S3100
S3200
S3300
S3400
S3500
S3600
S3700
S3800
S3900
S4000
S4100

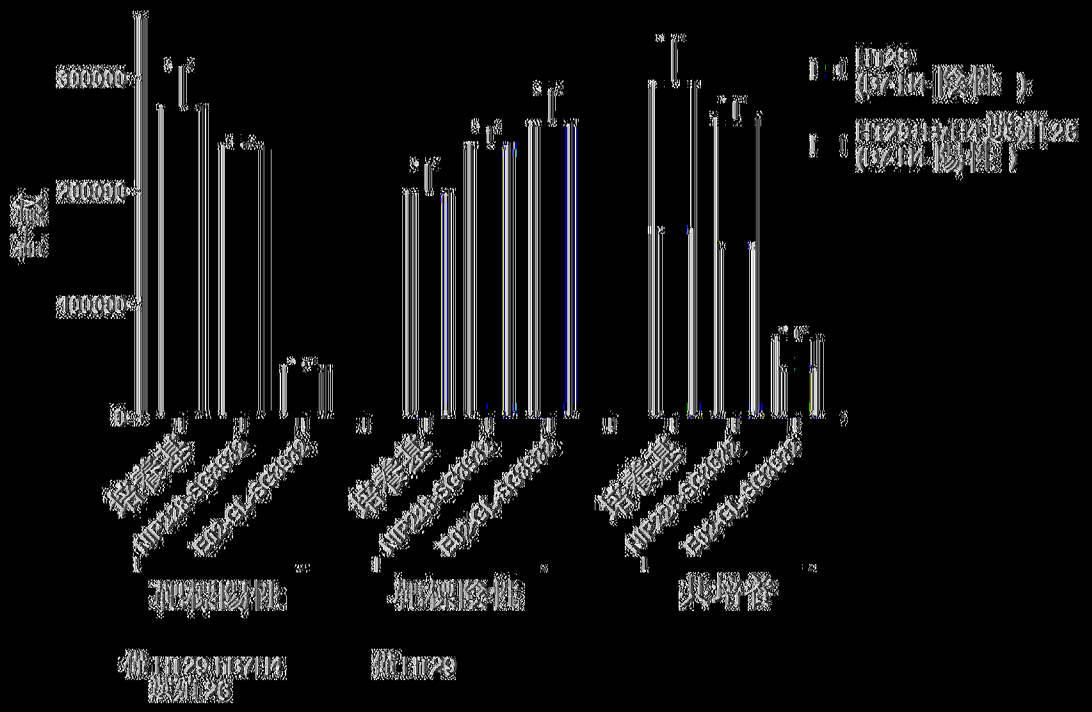

500000
200000
100000
0
營業額
營業成本
營業毛利
營業費用
營業利益
營業外收入及支出
稅前淨利
所得稅費用
稅後淨利
111年度
110年度
111年度每股盈餘
110年度每股盈餘

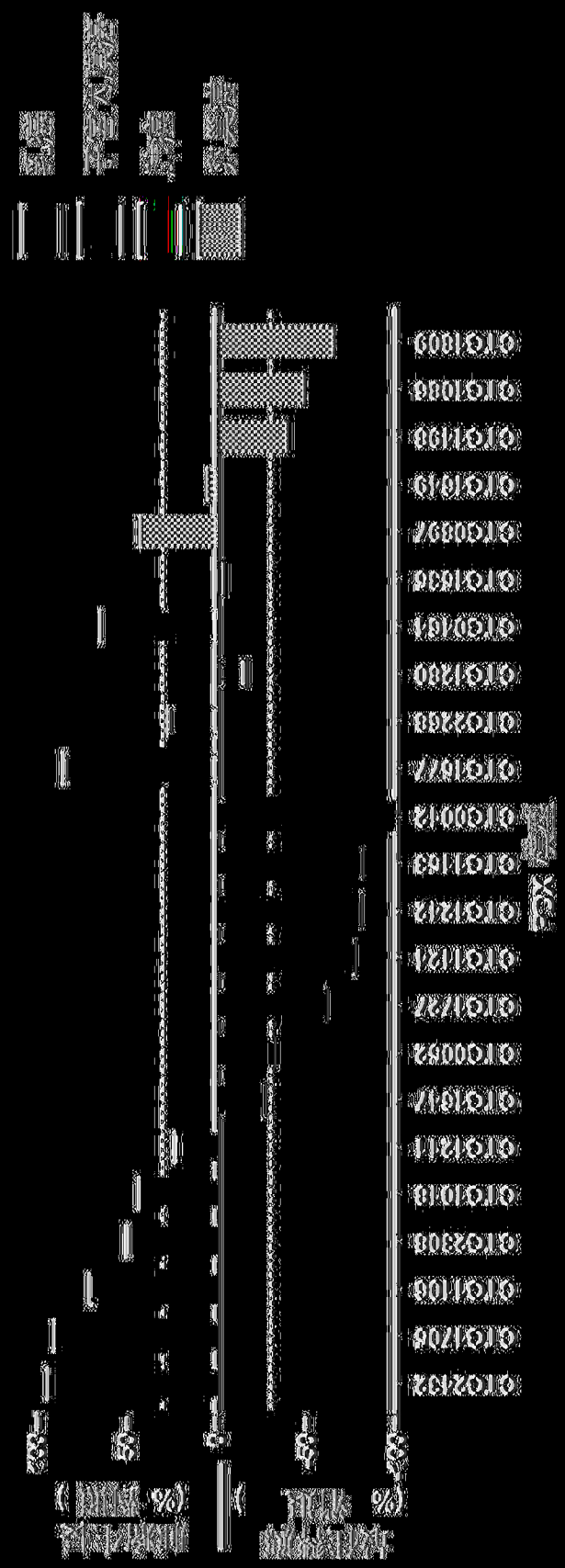
圖10B

圖 3

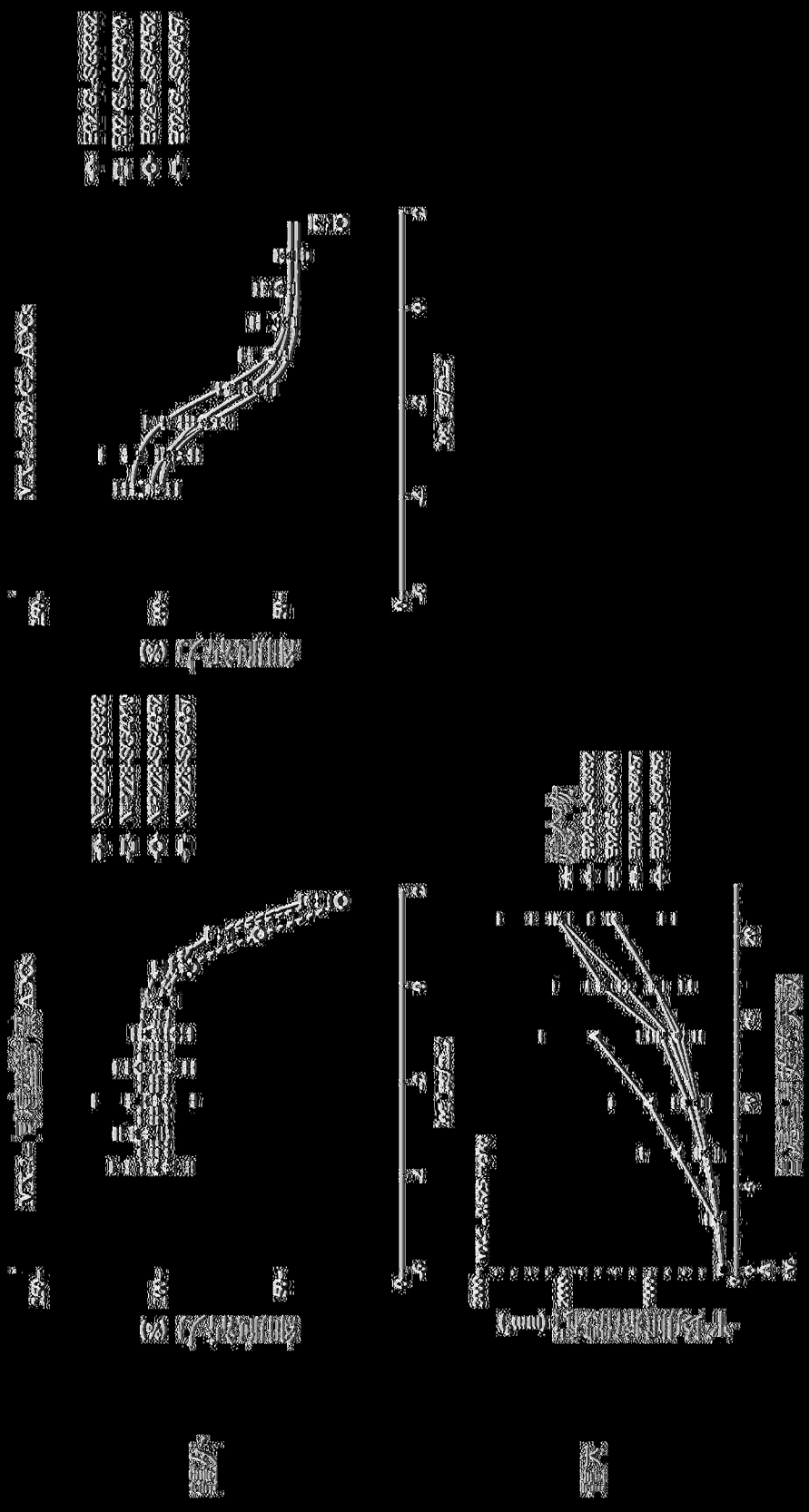
圖 4

圖 2-2

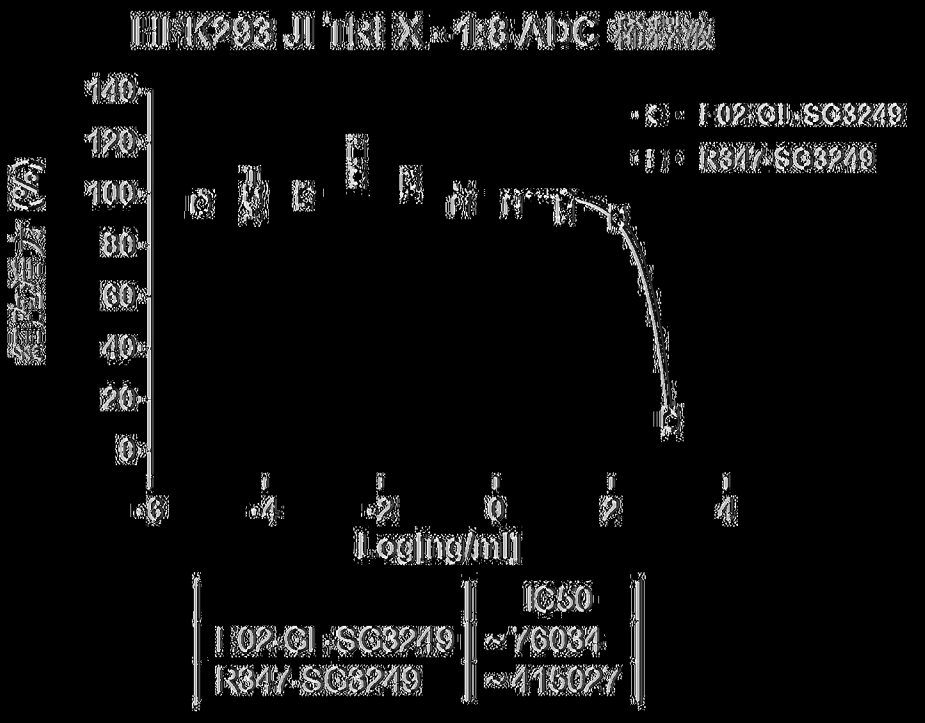
【圖2】



【圖3】



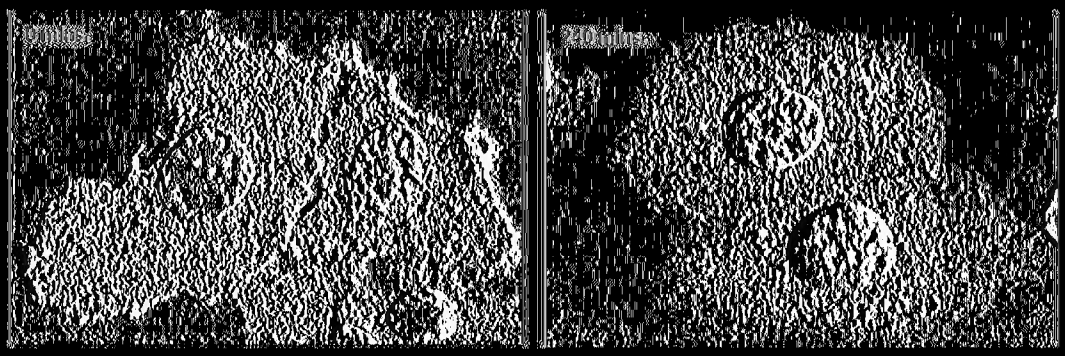
【圖7A】


HI-K293 JI TRI X - 1:8 ADC 特殊效
I-02-CI-SG3249
R347-SG3249
Log[ng/ml]
IC50
I-02-CI-SG3249 ~76034
R347-SG3249 ~415027

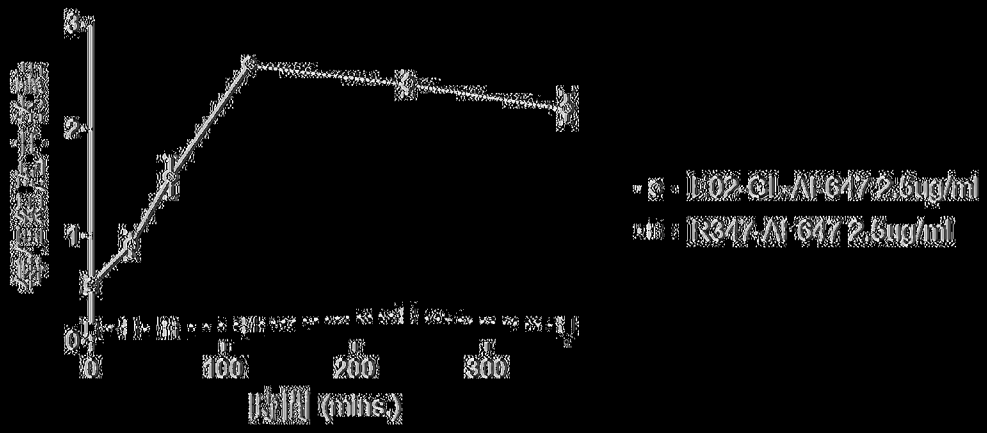
|(圖15A)|


HI-K293 JI TRI X 1:8 ADC 特殊效
I-02-CI-SG3249
R347-SG3249
Log[ng/ml]
IC50
I-02-CI-SG3249 0.6721
R347-SG3249 ~211121

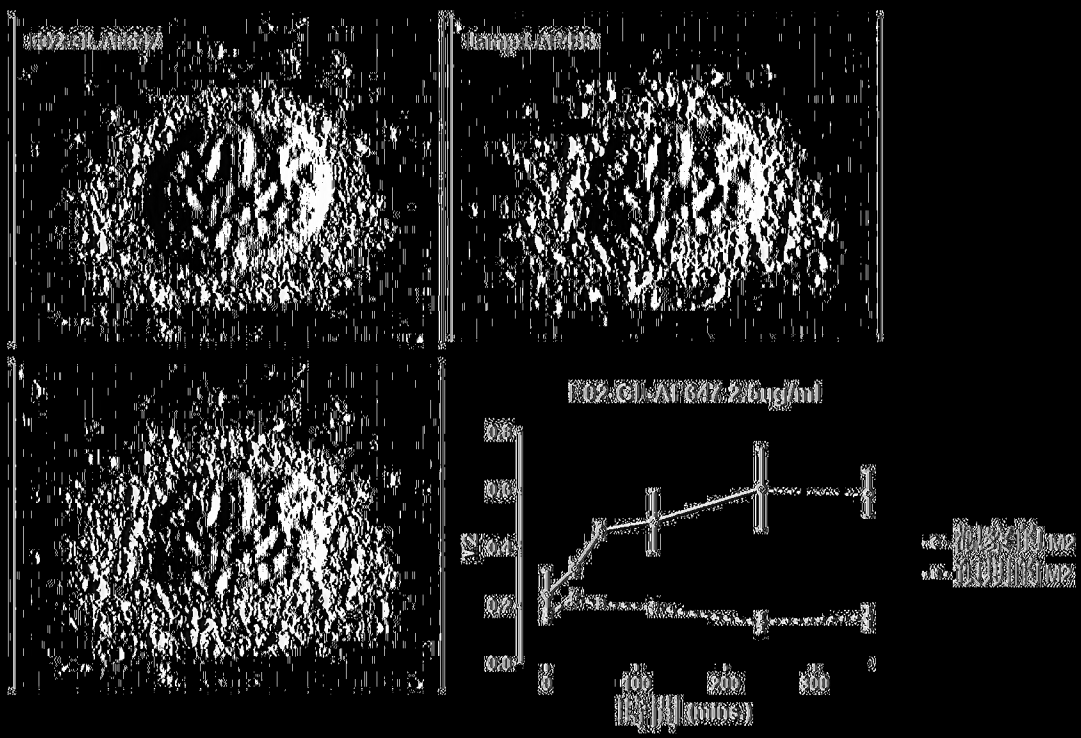
|(圖15B)|



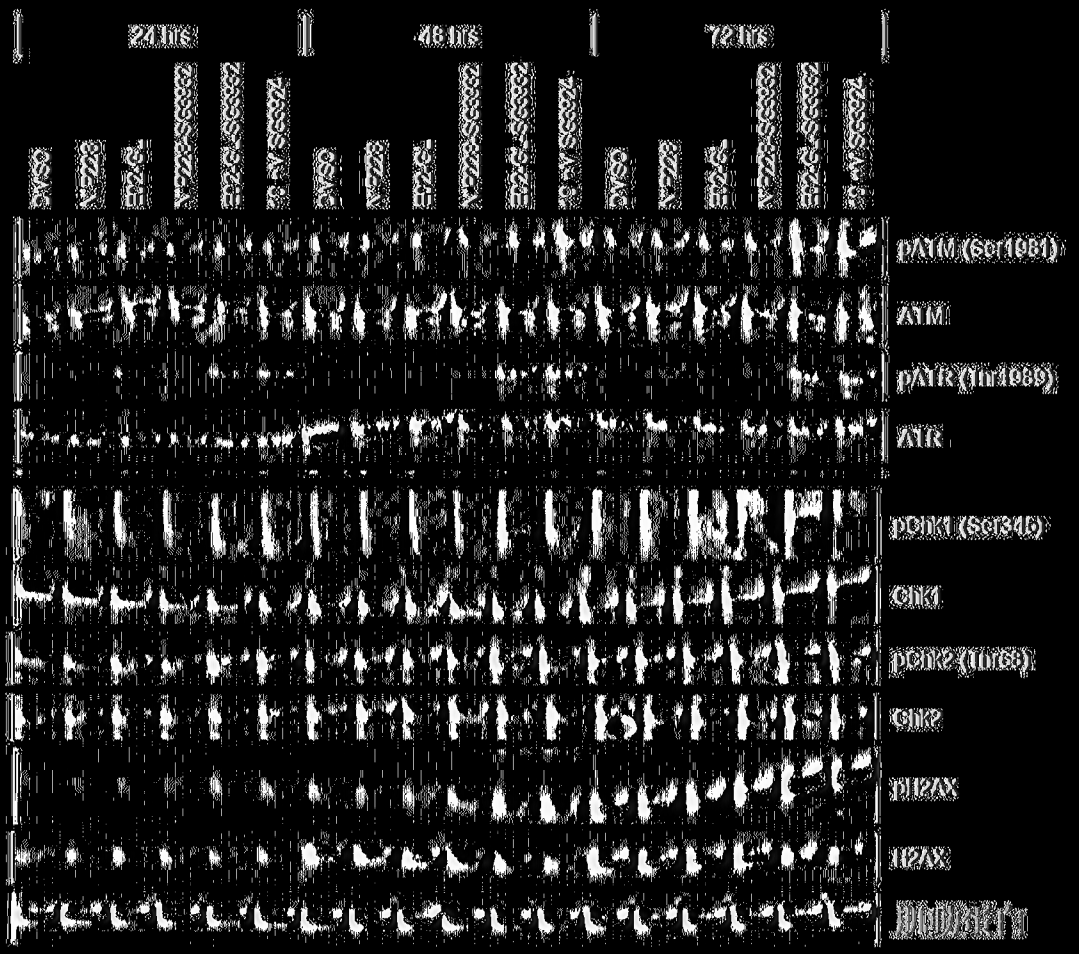
|(圖16A)|



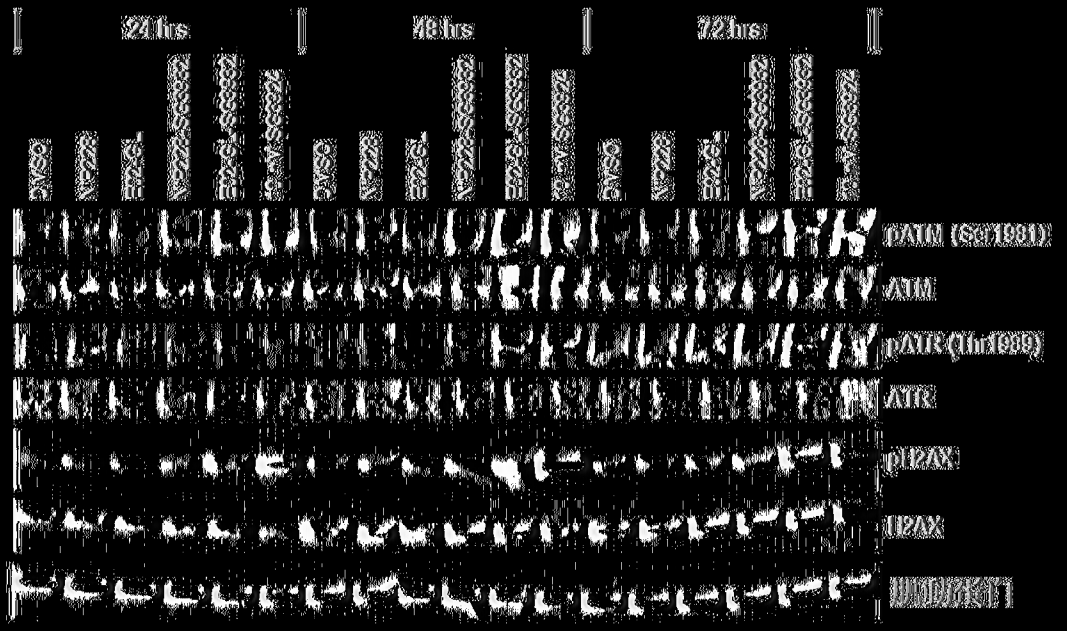
|(圖16B)|



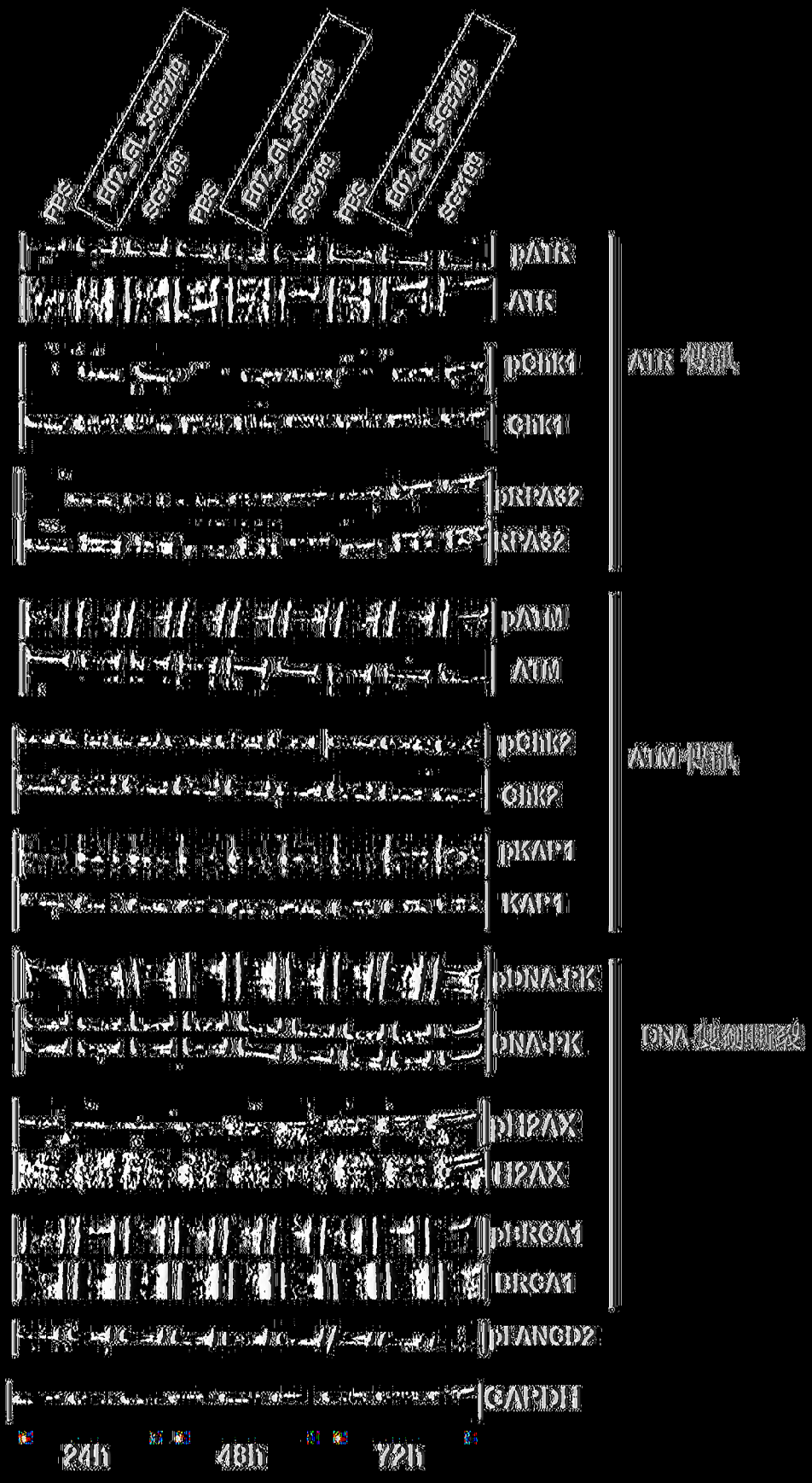
|(圖16C)|


24 hrs
48 hrs
72 hrs
pATM (Scr1981)
ATM
pATR (Thr1989)
ATR
pChk1 (Scr345)
Chk1
pChk2 (Thr68)
Chk2
pH2AX
H2AX
肺癌表情

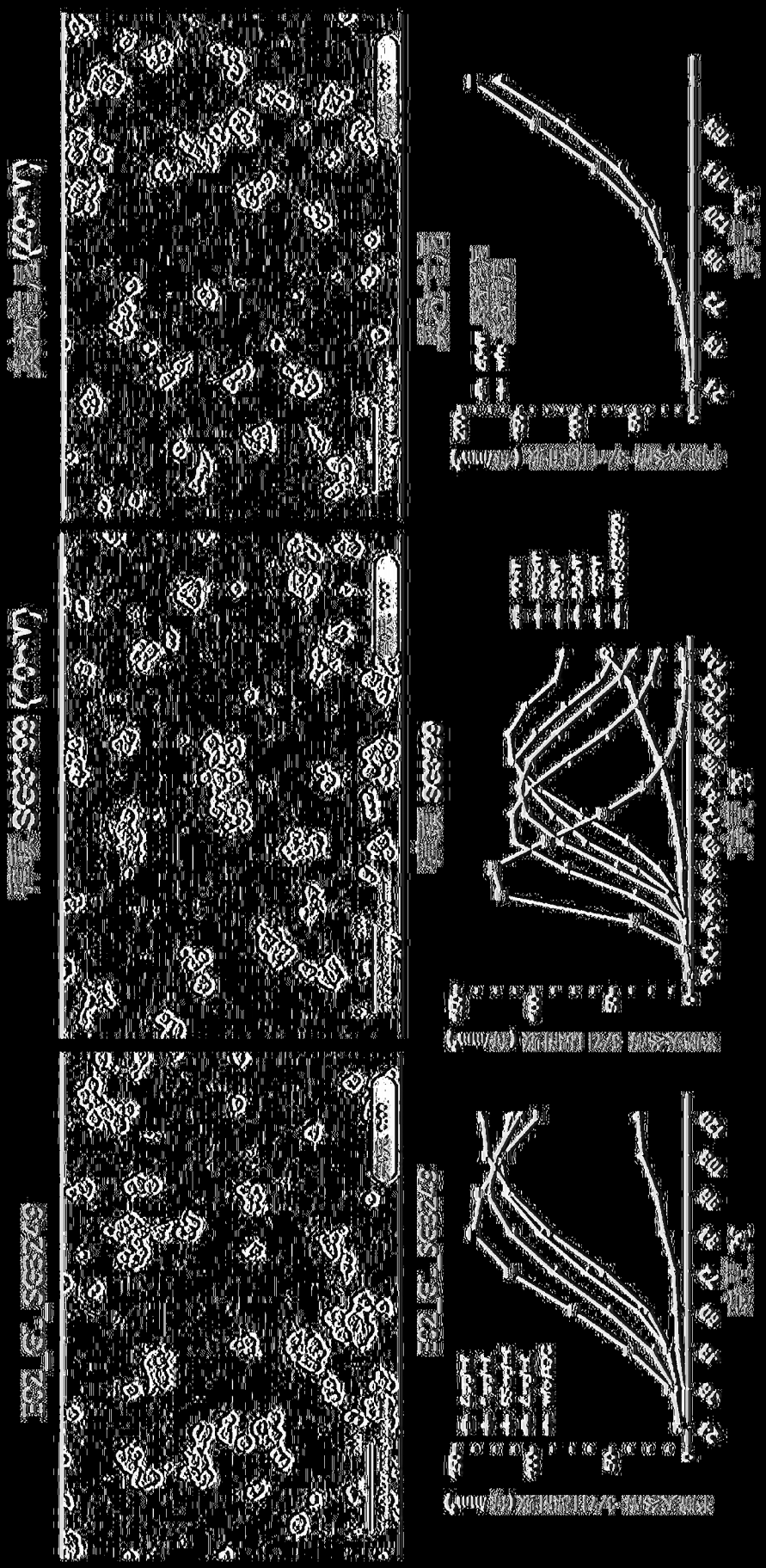
(圖17A)


24 hrs
48 hrs
72 hrs
pATM (Scr1981)
ATM
pATR (Thr1989)
ATR
pH2AX
H2AX
肺癌表情

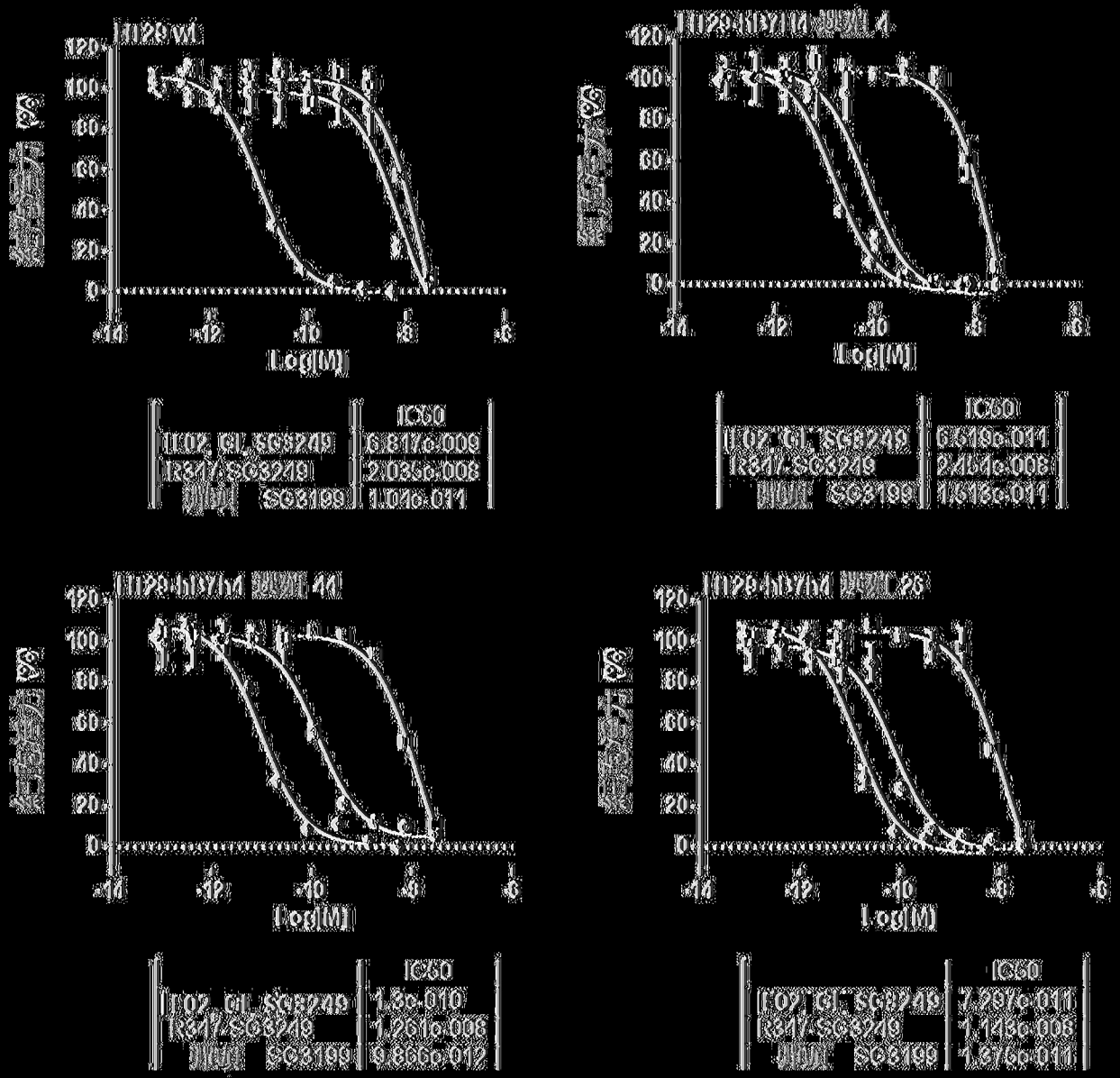
(圖17B)


PBS
E02_G1_SG2/2g
SG2/1g
pATR
ATR
pChk1
Chk1
pRPA32
RPA32
ATR 訊
pATM
ATM
pChk2
Chk2
pKAP1
KAP1
ATM 訊
pDNA-PK
DNA-PK
pH2AX
H2AX
pBRCA1
BRCA1
DNA 雙鏈斷裂
pFANCD2
GAPDH
24h
48h
72h

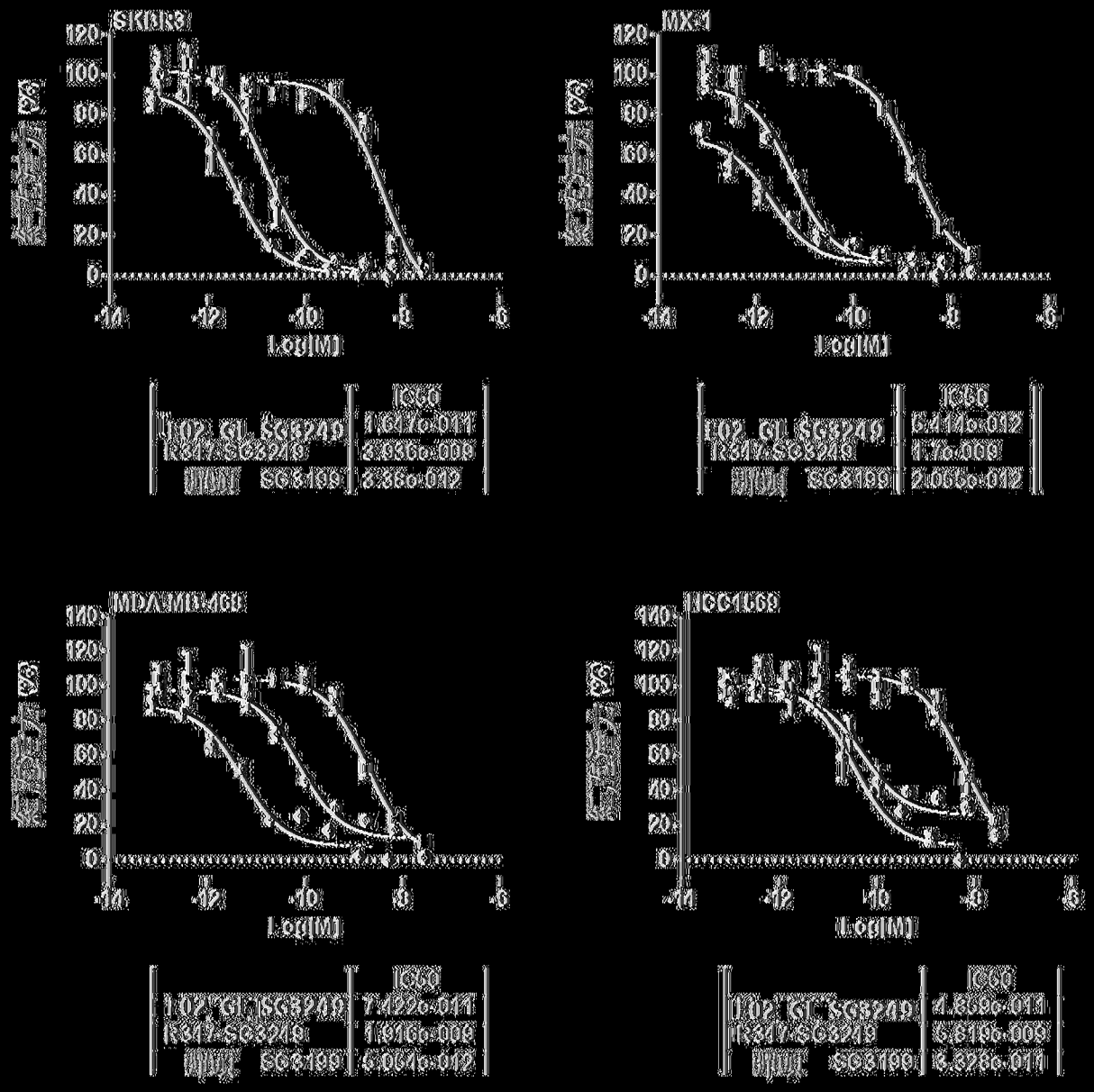
[圖17C]



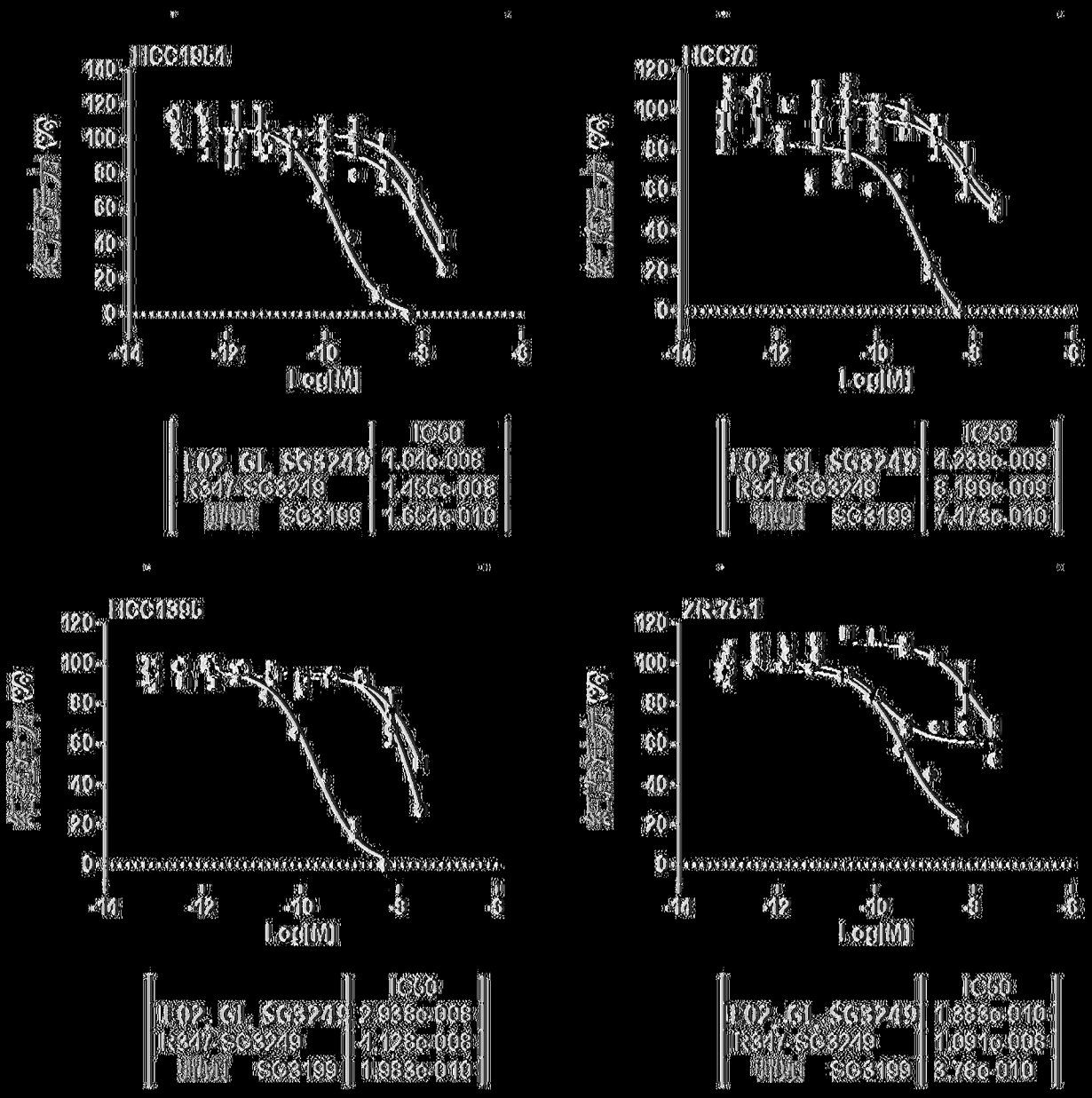
【圖8】


H129 wt
H129-hB7H4 變異 4
H129-hB7h4 變異 44
H129-hB7h4 變異 26
Log[M]
IC50
IL02_GL_SG8249 6.817e-009
R347-SG3249 2.035e-008
SG3199 1.04e-011
IL02_GL_SG8249 6.519e-011
R347-SG3249 2.454e-008
SG3199 1.513e-011
IL02_GL_SG8249 1.3e-010
R347-SG3249 1.261e-008
SG3199 9.866e-012
IL02_GL_SG8249 7.297e-011
R347-SG3249 1.143e-008
SG3199 1.376e-011

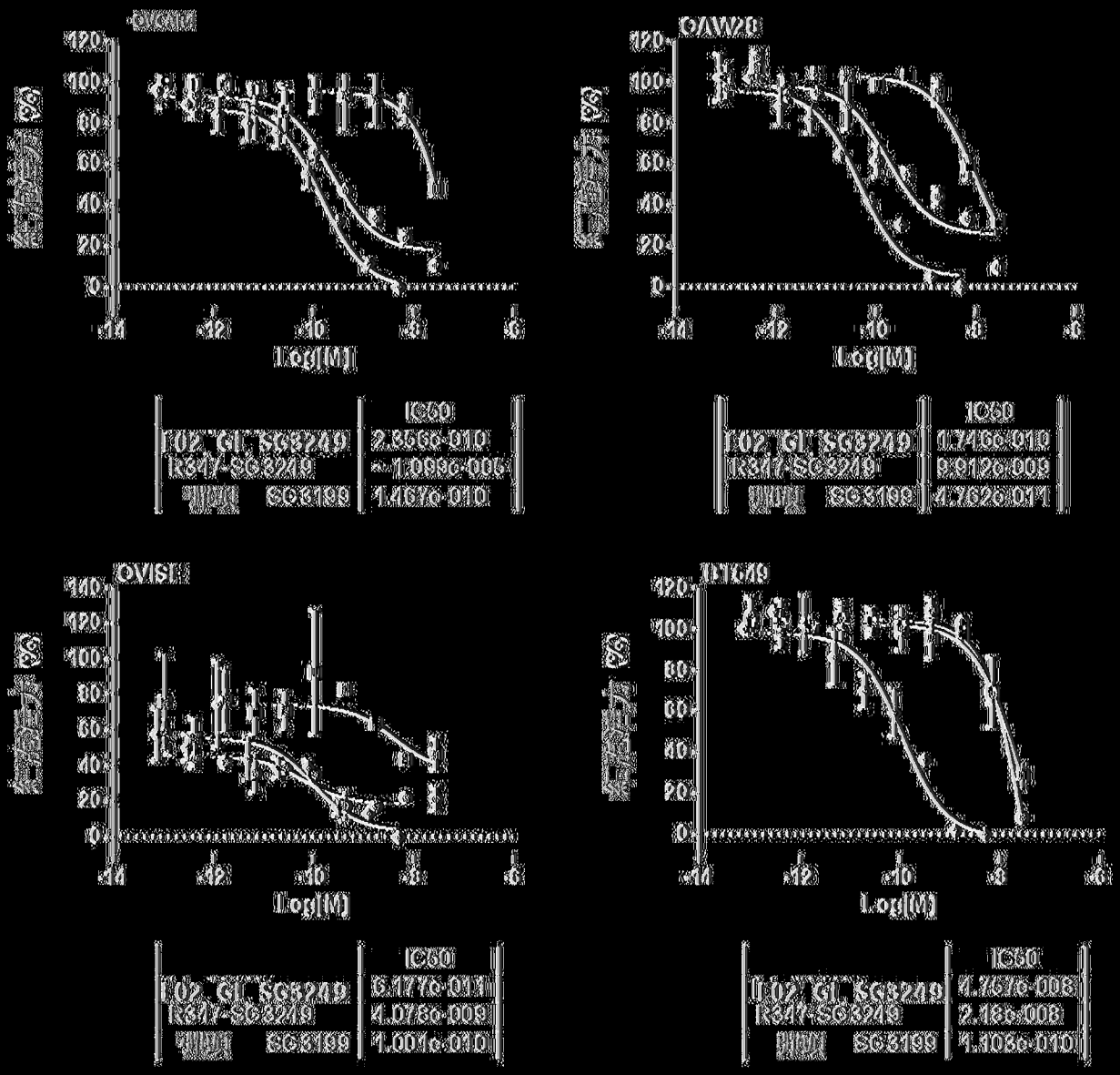
(圖19)


SKBR3
MX-1
MDA-MB-468
HCC1569
Log[M]
IC50
1.02 GI SG3249 1.617e-011
R347 SG3249 3.936e-009
SG3199 3.38e-012
1.02 GI SG3249 6.414e-012
R347 SG3249 1.7e-009
SG3199 2.055e-012
1.02 GI SG3249 7.422e-011
R347 SG3249 1.916e-009
SG3199 5.064e-012
1.02 GI SG3249 4.869e-011
R347 SG3249 5.819e-009
SG3199 3.328e-011

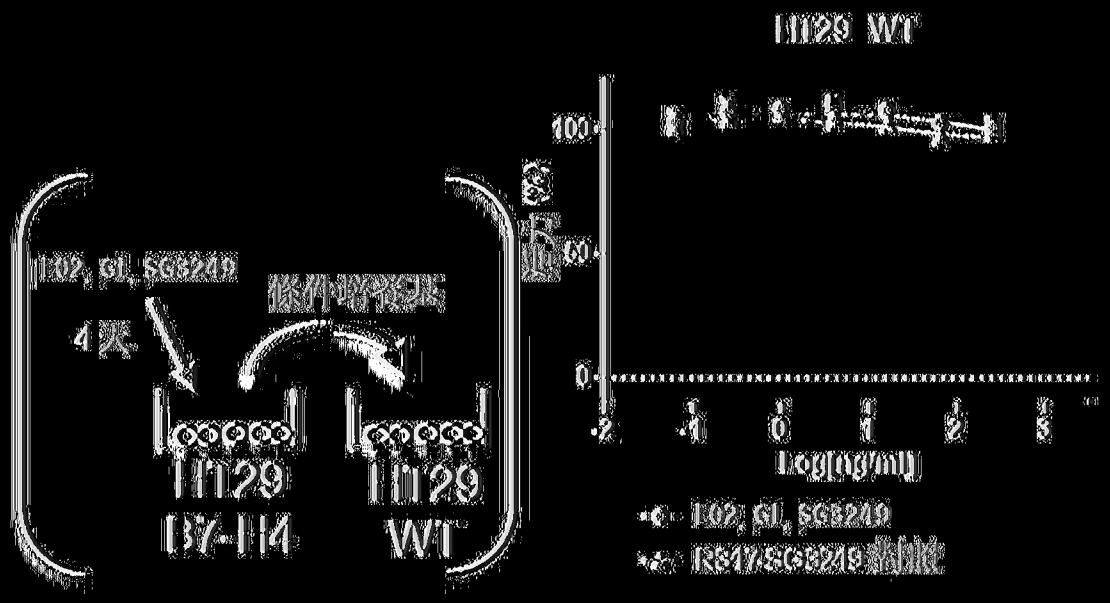
（圖19（續））


HCC1954
HCC70
HCC1395
ZR-75-1
Log[M]
IC50
L02 GL SG3249 1.04c-008
R347-SG3249 1.465c-008
SG3199 1.654c-010
L02 GL SG3249 4.238c-009
R347-SG3249 8.199c-009
SG3199 7.473c-010
L02 GL SG3249 2.938c-008
R347-SG3249 4.128c-008
SG3199 1.983c-010
L02 GL SG3249 1.883c-010
R347-SG3249 1.091c-008
SG3199 3.76c-010

【圖19（續）】

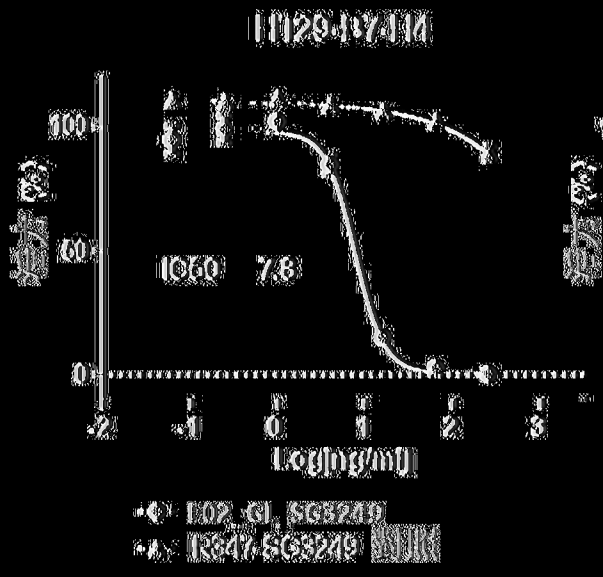

OVCAR
OAW28
OVISE
Log[M]
IC50
L02 GL SG3249
R347-SG3249
SG3199
2.356e-010
~1.099e-005
1.467e-010
1.746e-010
9.912e-009
4.762e-011
6.177e-011
4.078e-009
1.001e-010
4.757e-008
2.18e-008
1.103e-010

【圖19（續）】

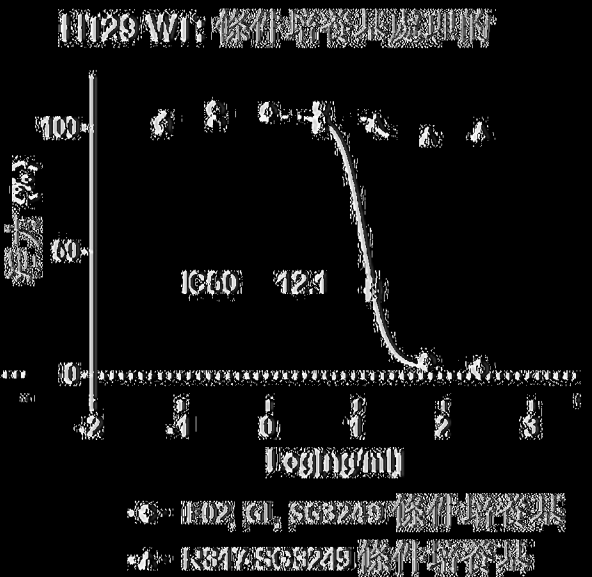


[圖20A]

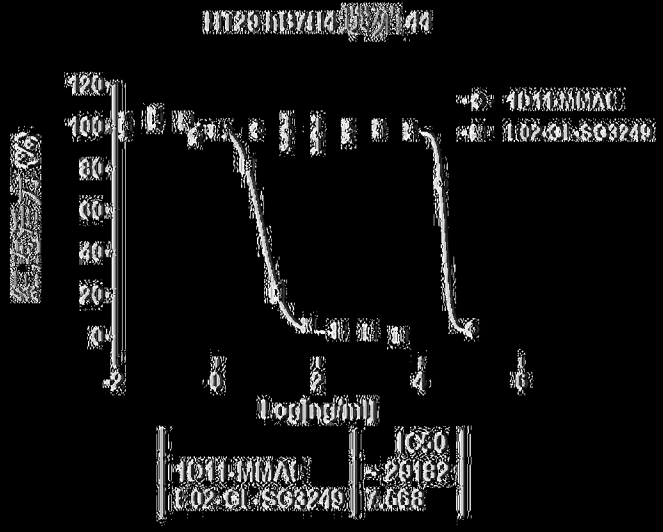
[圖20B]



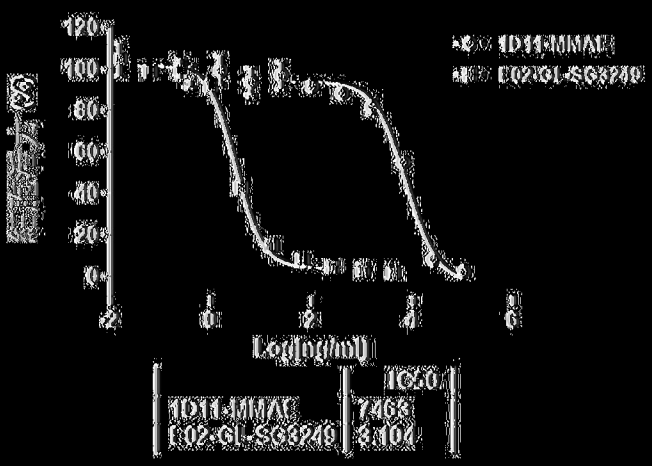
[圖20C]



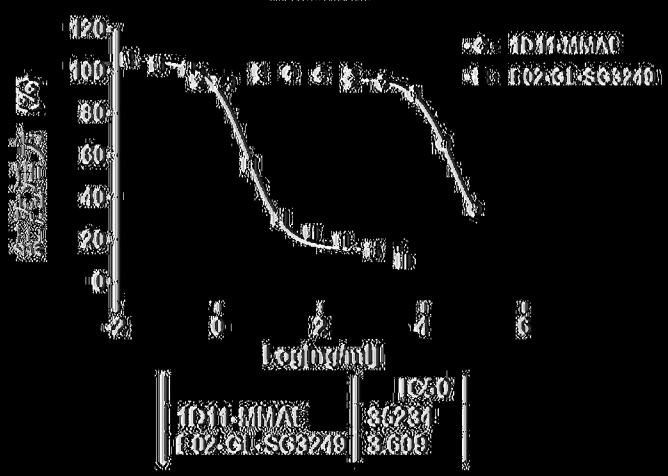
[圖20D]



|(圖21A)|



|(圖21B)|



|(圖21C)|

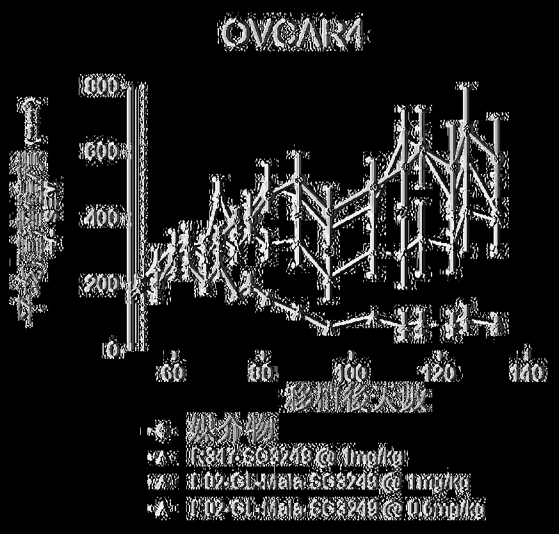


圖22A

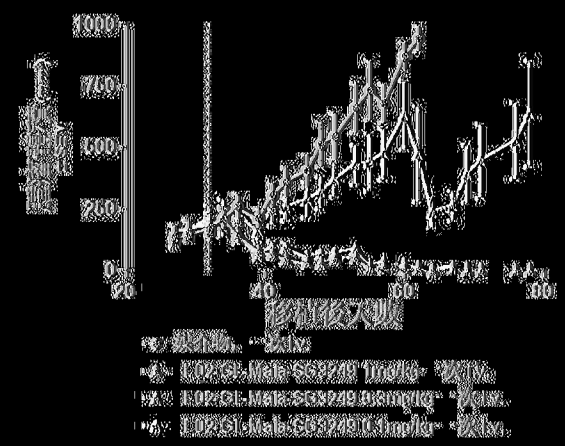


圖22B

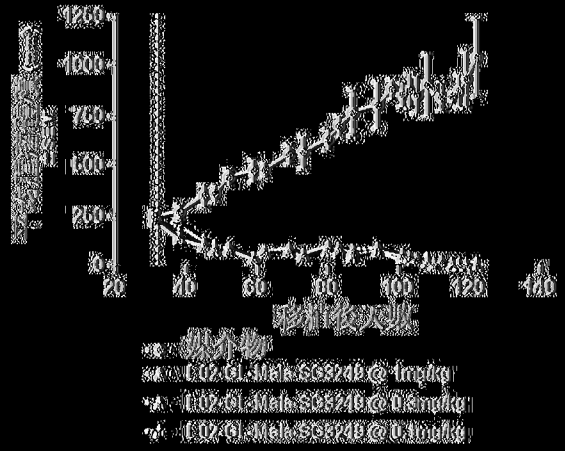
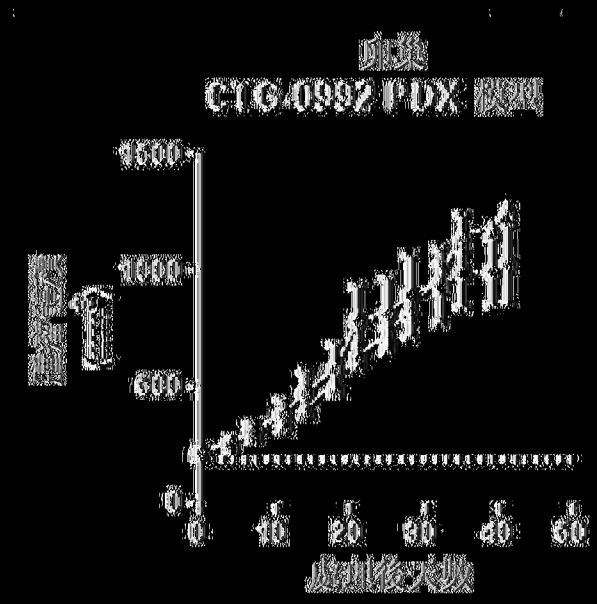
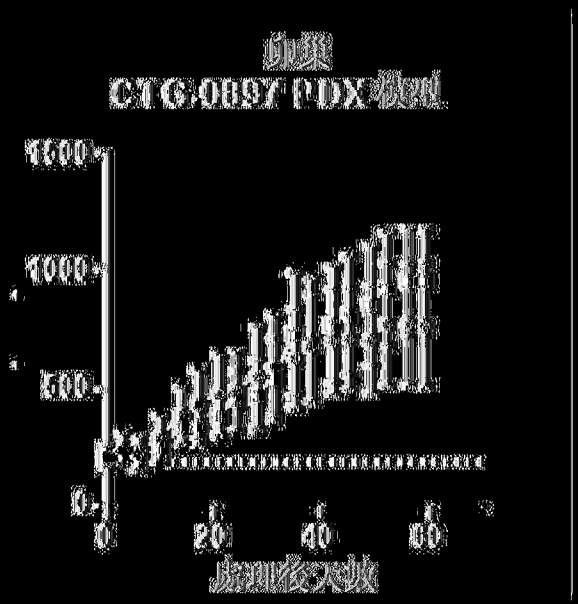


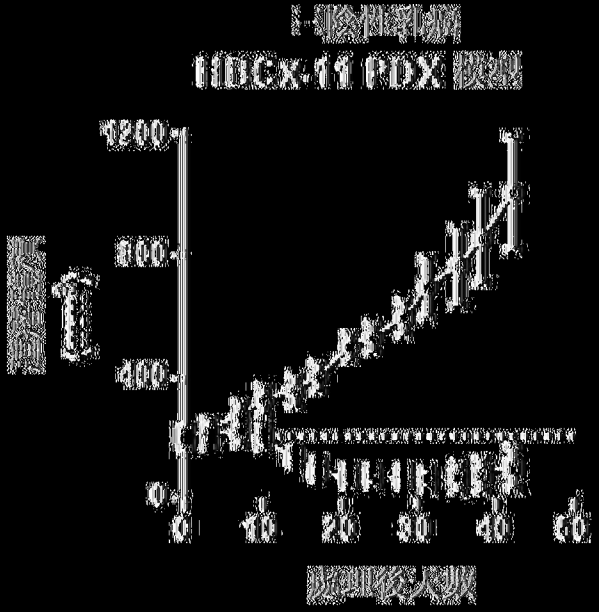
圖22C



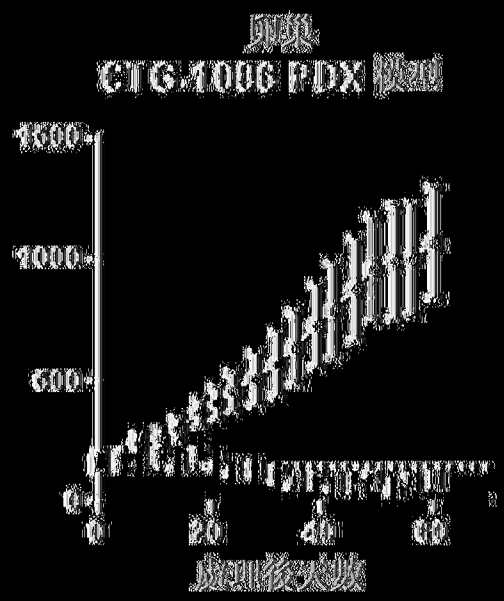
(圖24A)



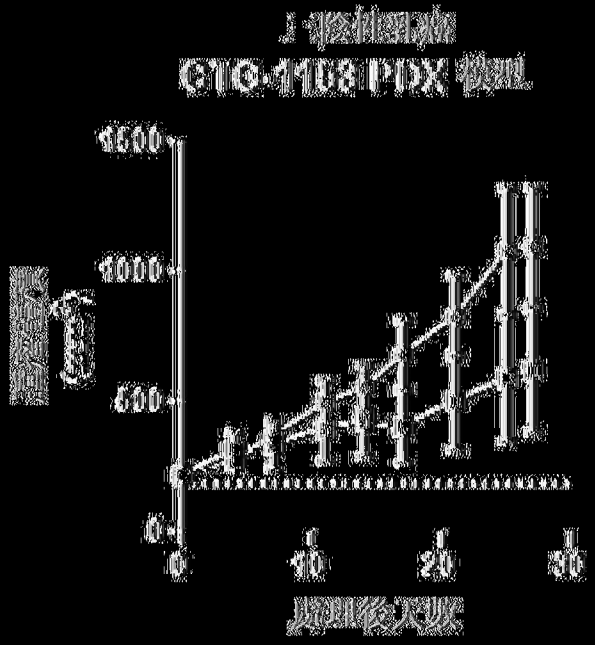
(圖24B)



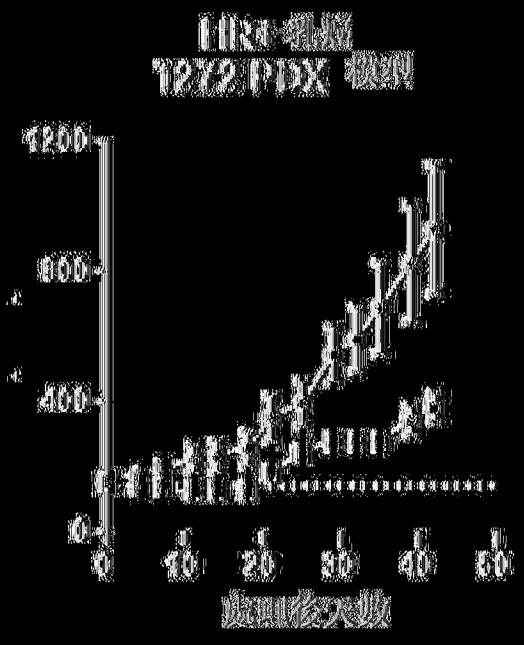
(圖24C)



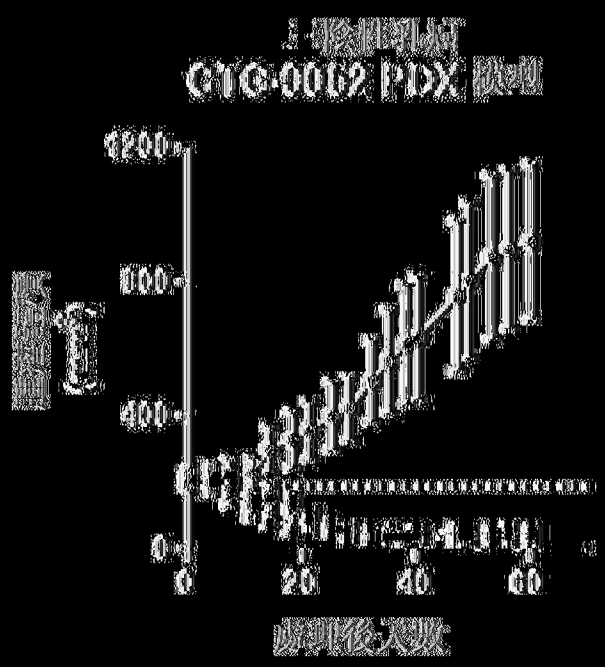
(圖24D)



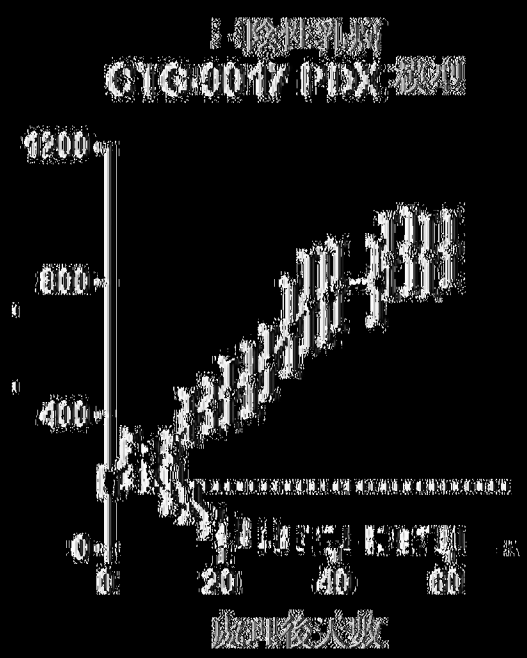
[圖24E]



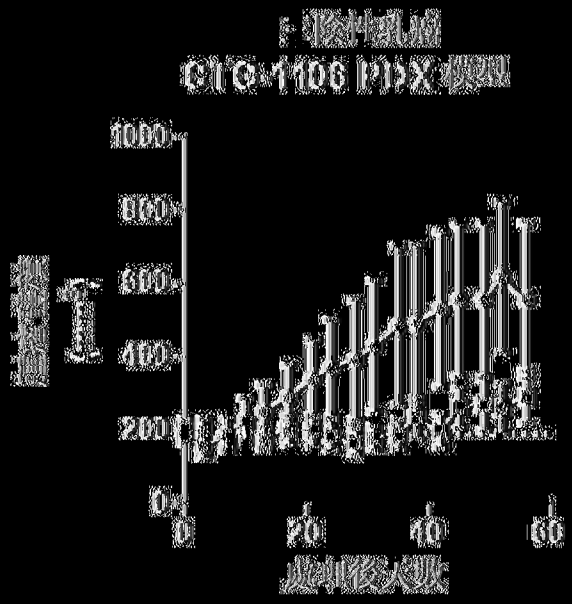
[圖24F]



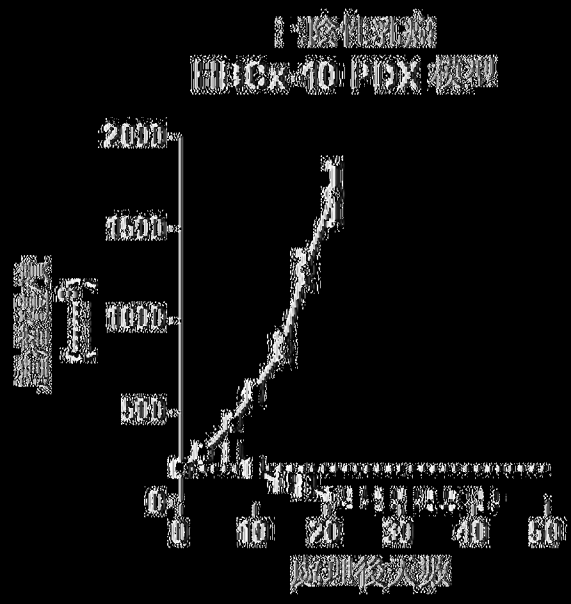
[圖24G]



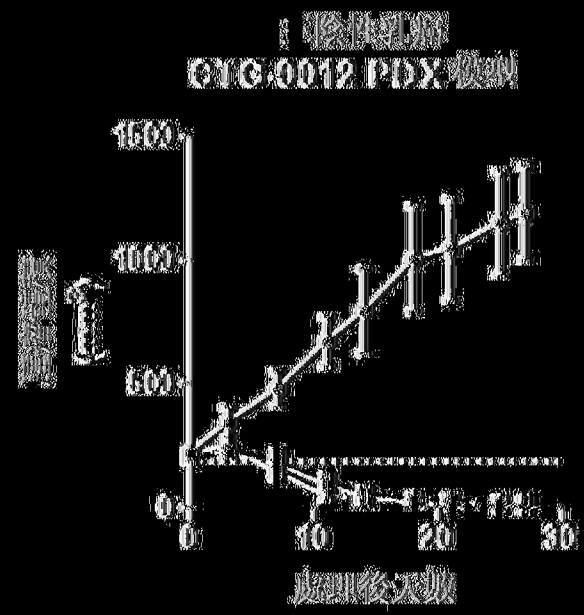
[圖24H]



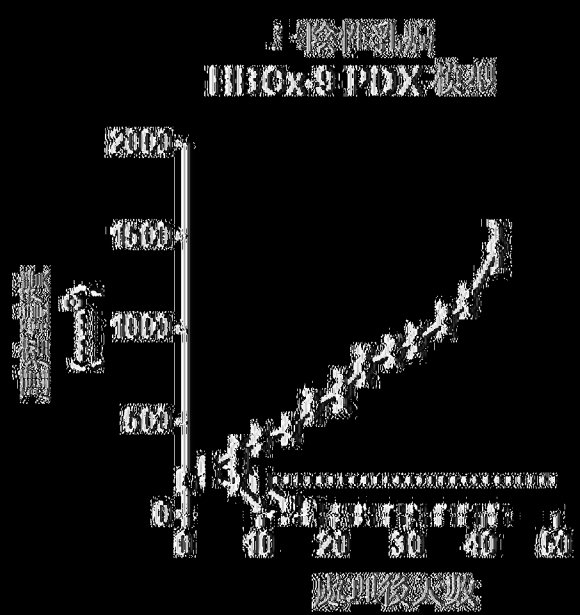
|(圖24I)|



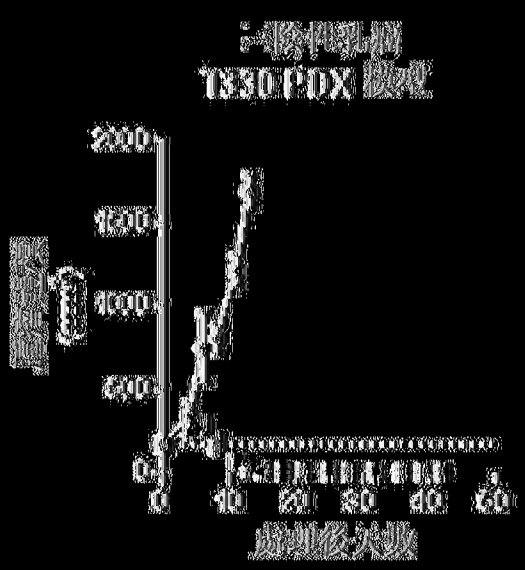
|(圖24J)|



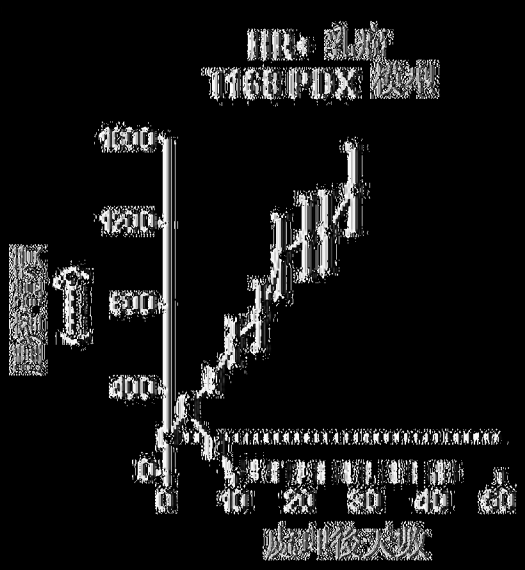
|(圖24K)|



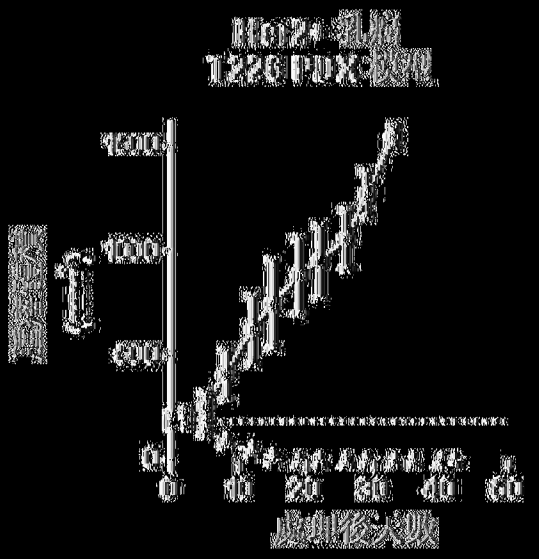
|(圖24L)|



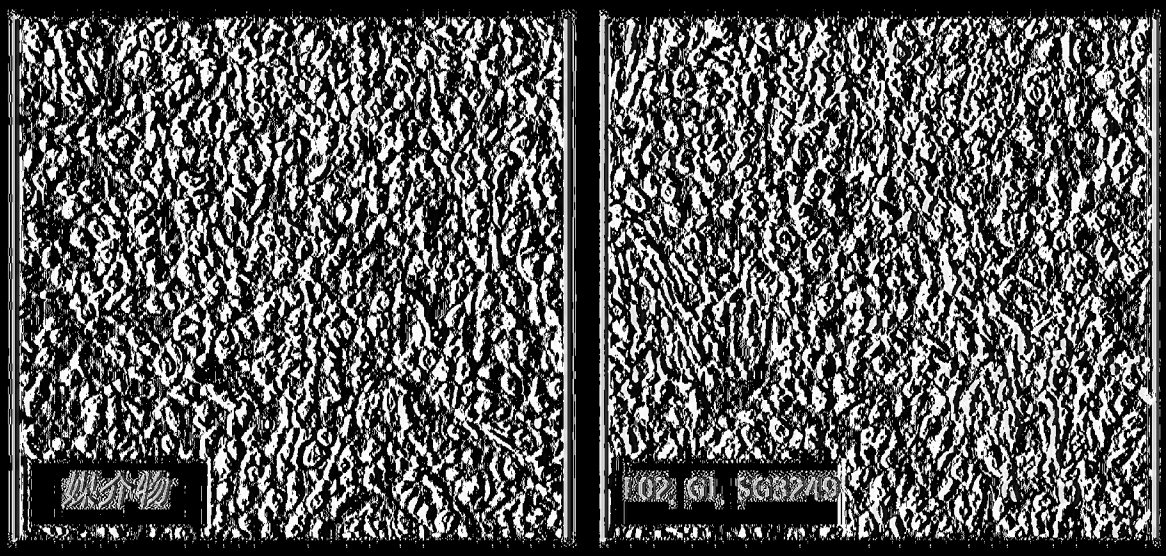
(圖24M)



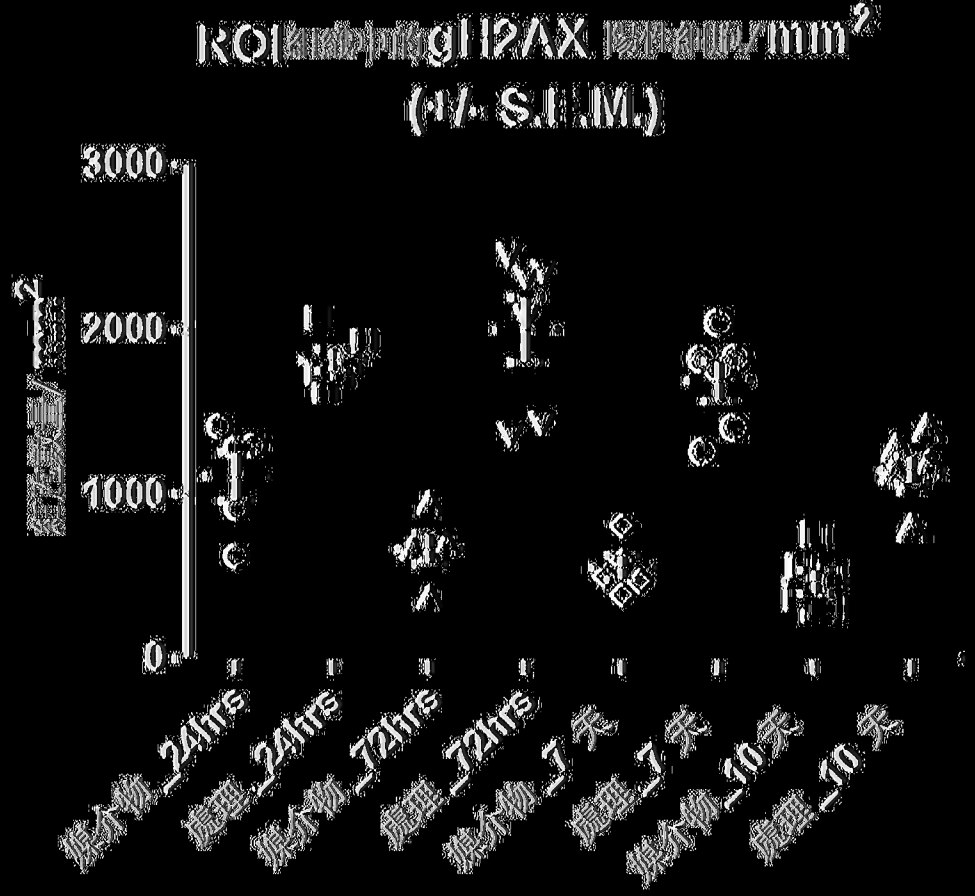
(圖24N)



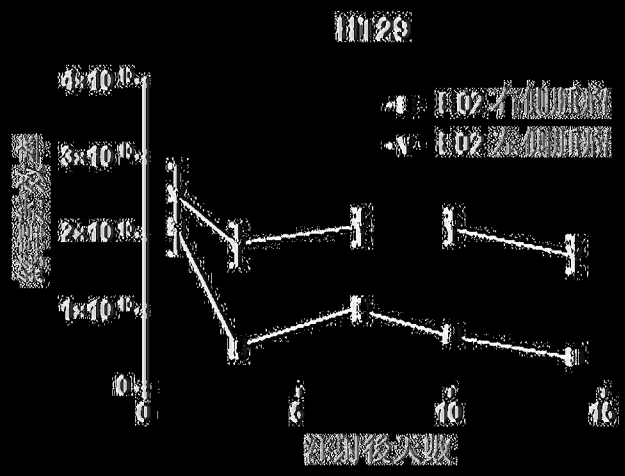
(圖24O)


娛介物
L02 G1 SG8249

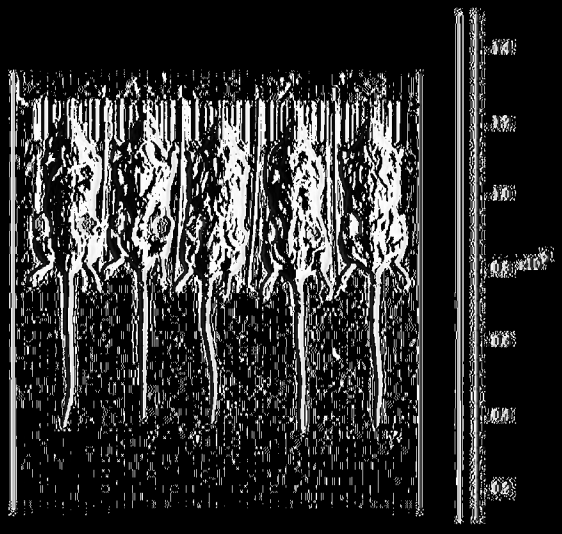
|(圖25A)|


RO[illegible]gH2AX 陽性細胞/mm²
(+/- S.E.M.)
3000
2000
1000
0
娛介物_24hrs
處理_24hrs
娛介物_72hrs
處理_72hrs
娛介物_7 天
處理_7 天
娛介物_10 天
處理_10 天

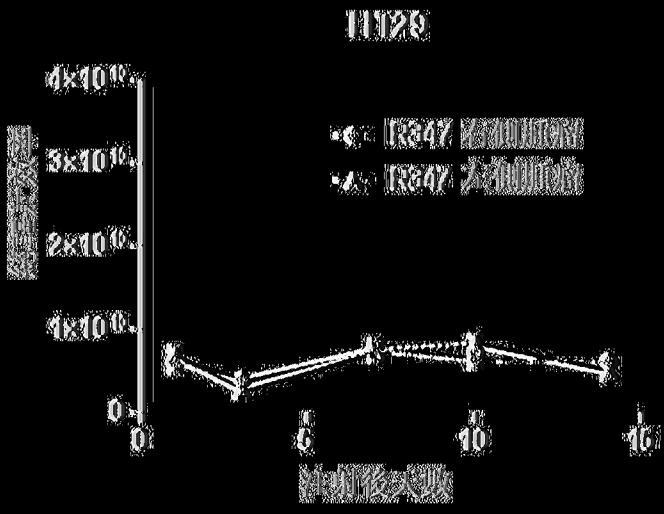
|(圖25B)|



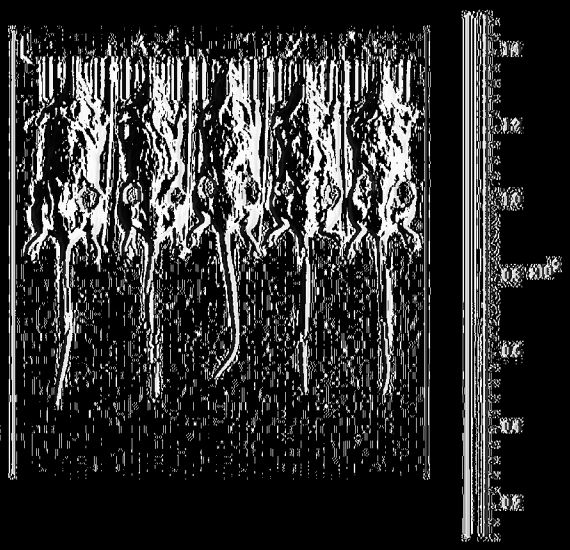
[圖26A]



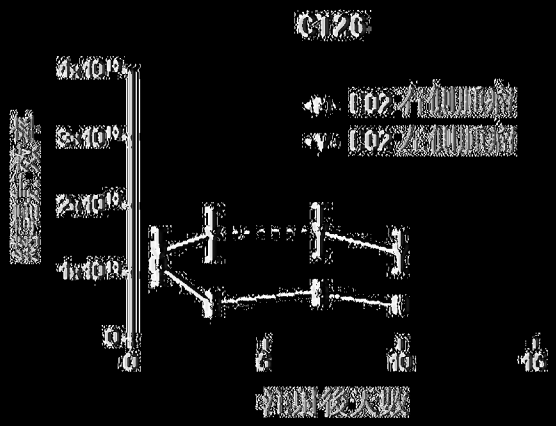
[圖26B]



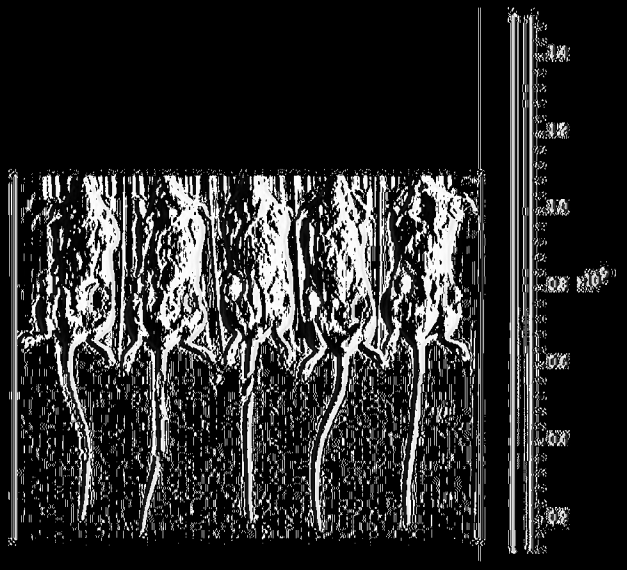
[圖26C]



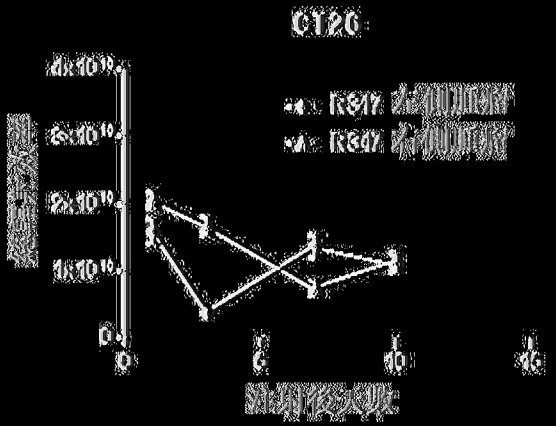
[圖26D]



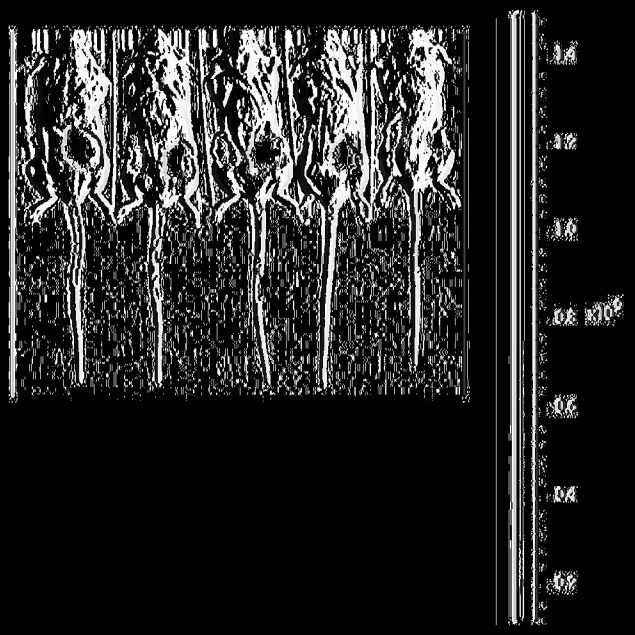
|(圖27A)|



|(圖27B)|



|(圖27C)|



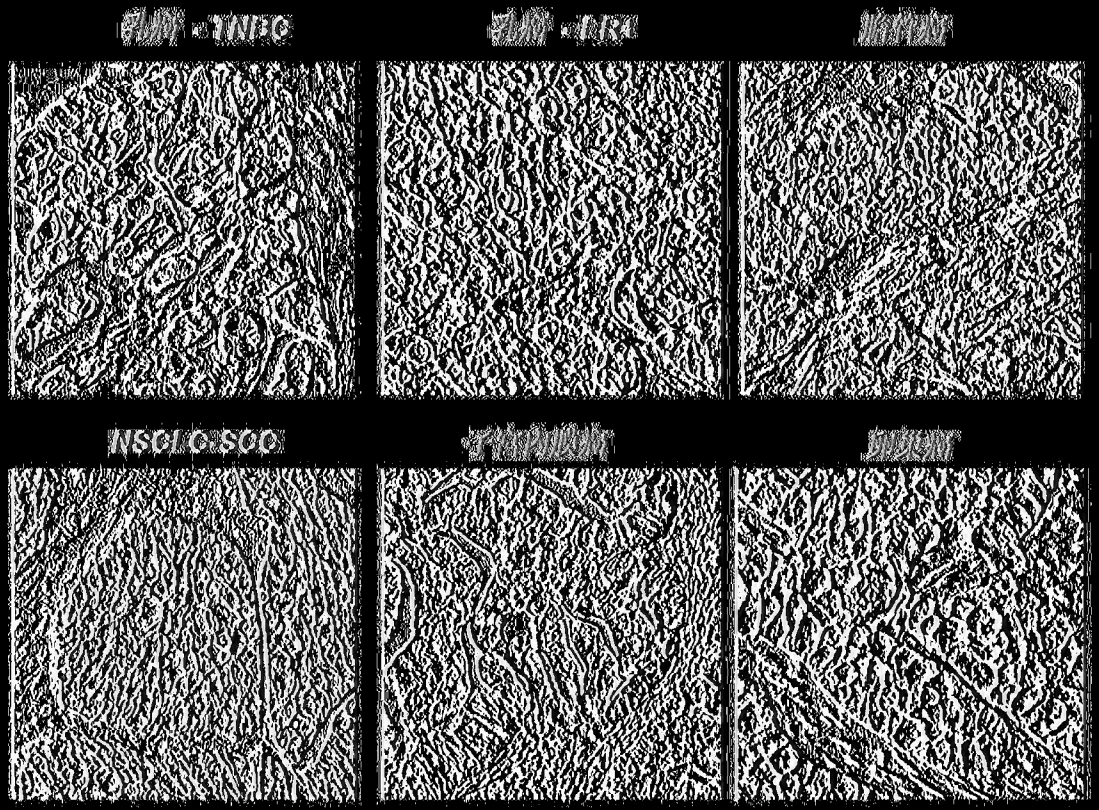
|(圖27D)|

【圖28A】

【圖28B】

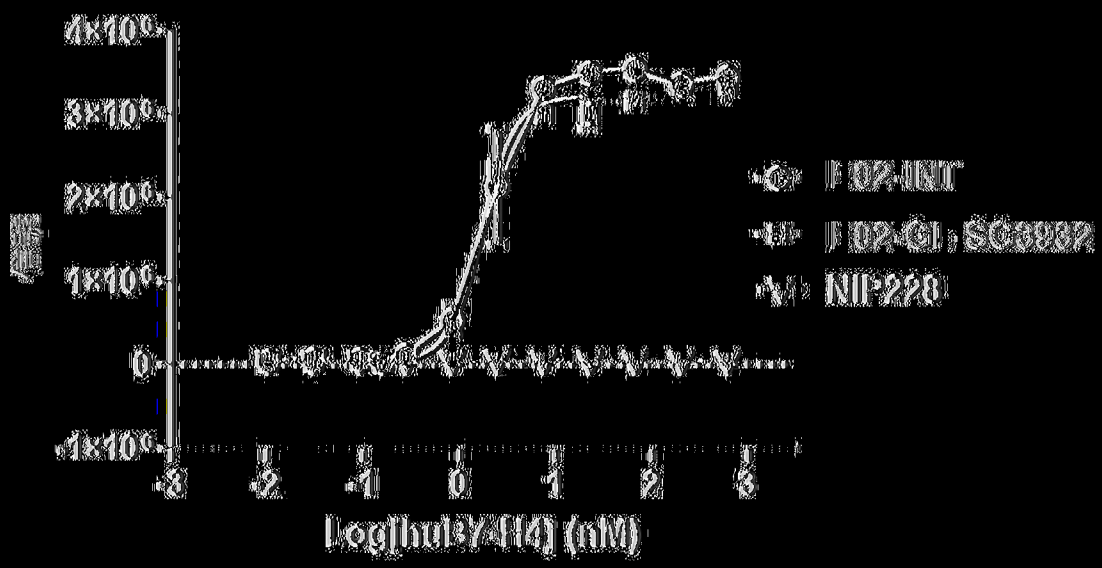
[化29A]

【圖1】

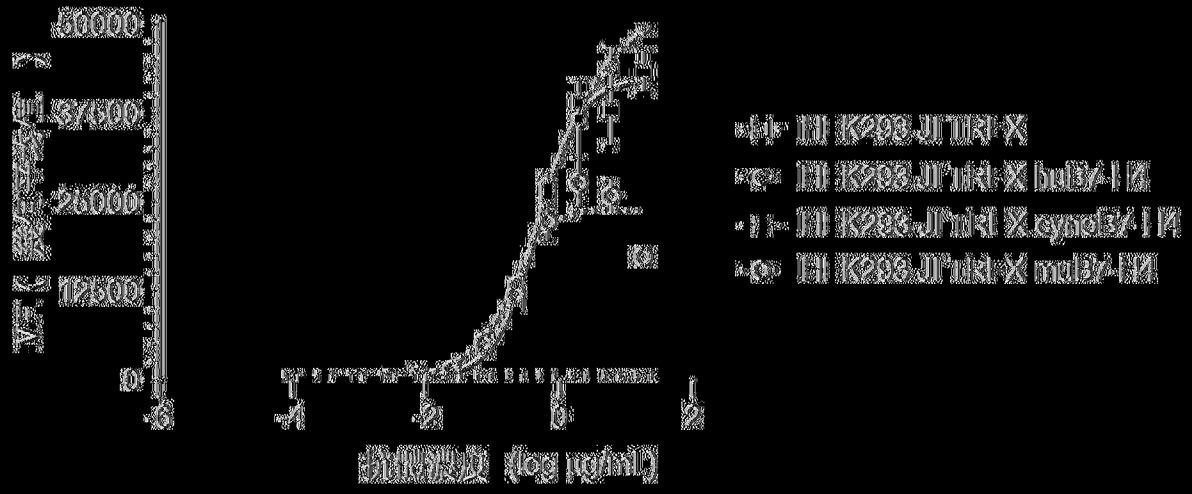


FR: 曲線表示體: NSCLC SCC
非小細胞肺癌, 鱗狀細胞癌; TNBC: 三陰性乳癌.

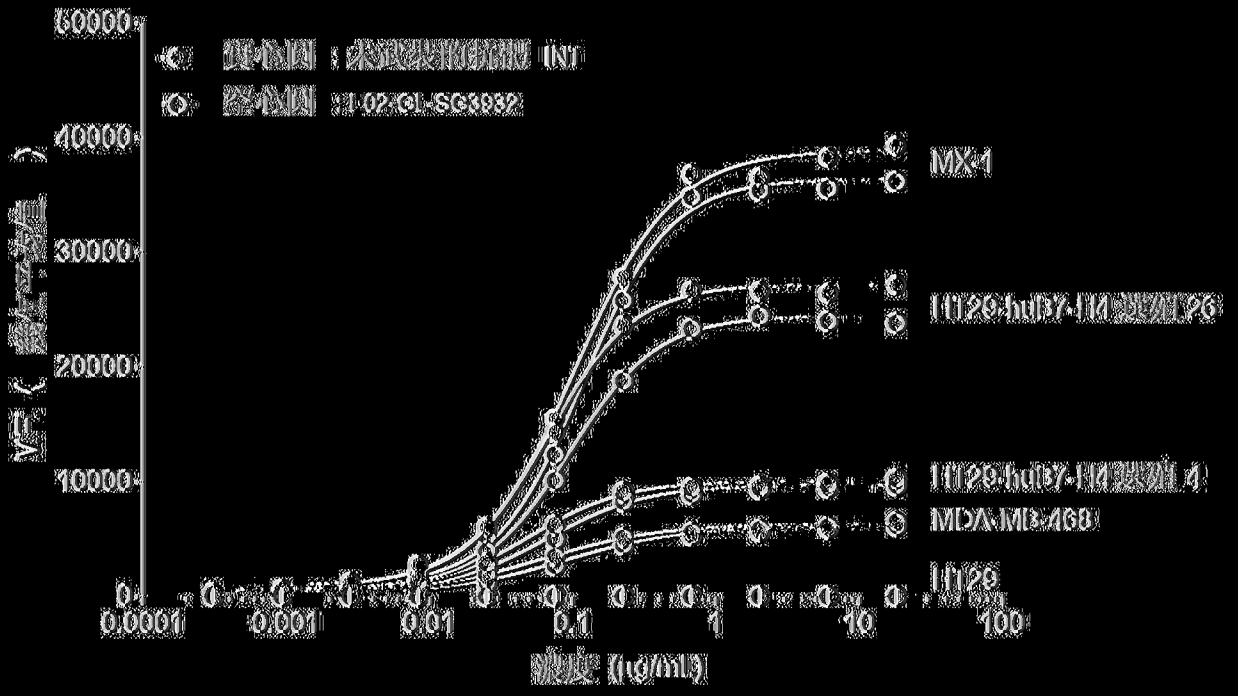
(圖31)


4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
-1×10⁶
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log[huBY-H4] (nM)
F02-INT
F02-Cl, SC3932
NIP228

（圖33）

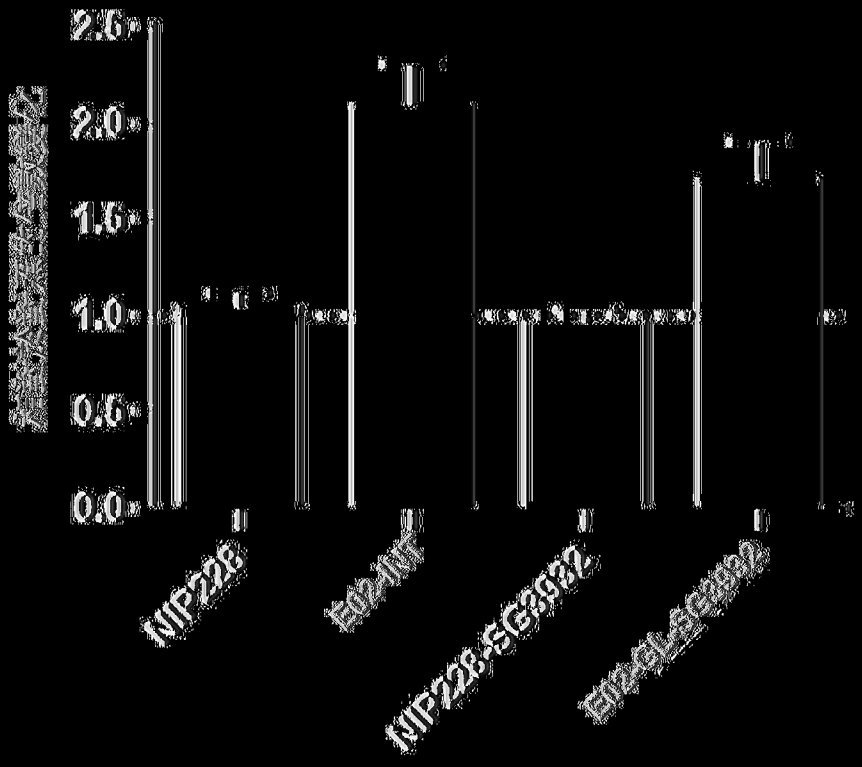

50000
37500
25000
12500
0
-6
-4
-2
0
2
抗體濃度 (log μg/ml)
H K293 JT1R1 X
H K293 JT1R1 X bul37-H4
H K293 JT1R1 X cynol37-H4
H K293 JT1R1 X mul37-H4

(圖34)

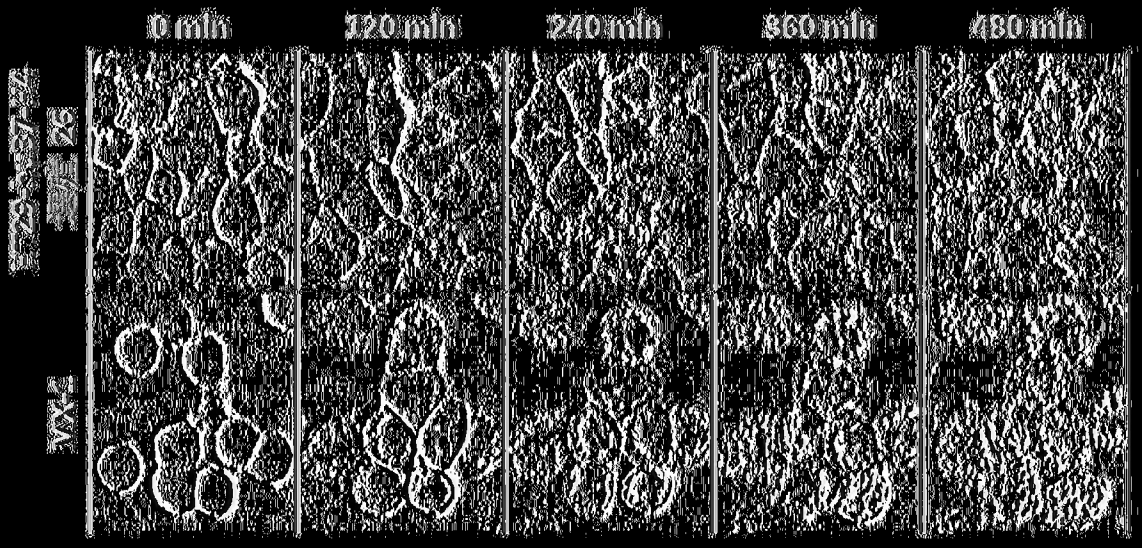

50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
INT
1-02-CL-SG3982
MX-1
MDA-MB-468
HT29

[圖35]

【圖36C】
【圖36B】
【圖36A】



【圖37】



【圖38】

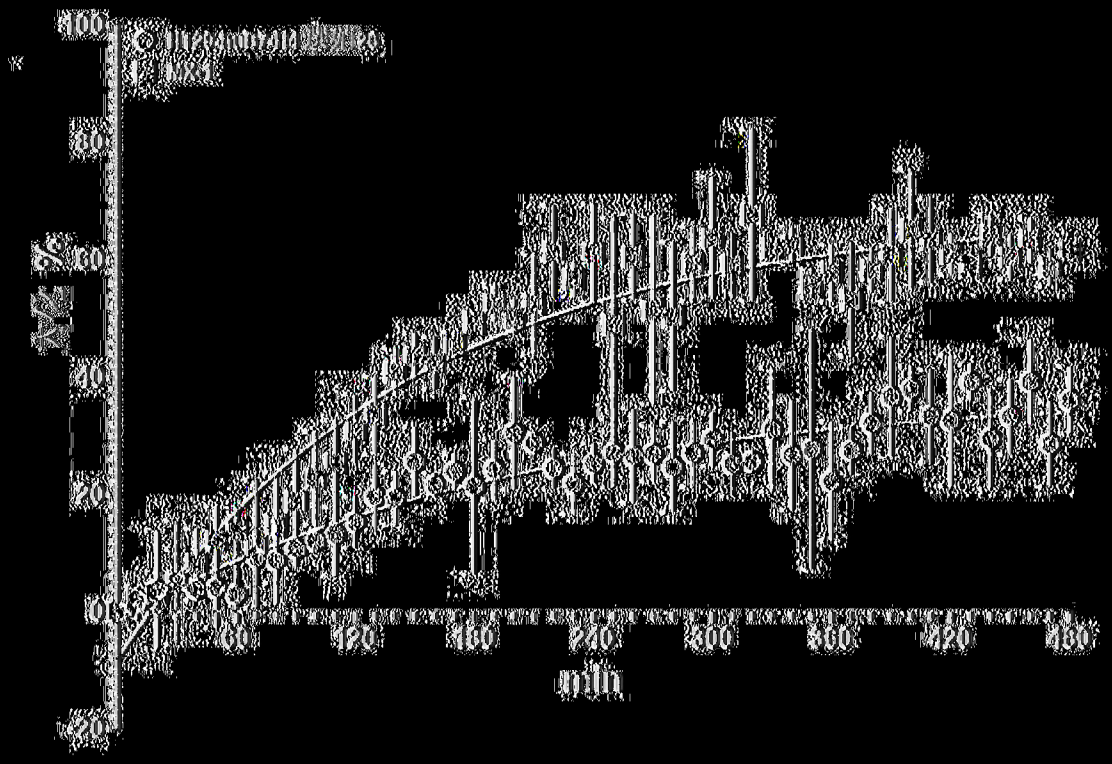


圖39A

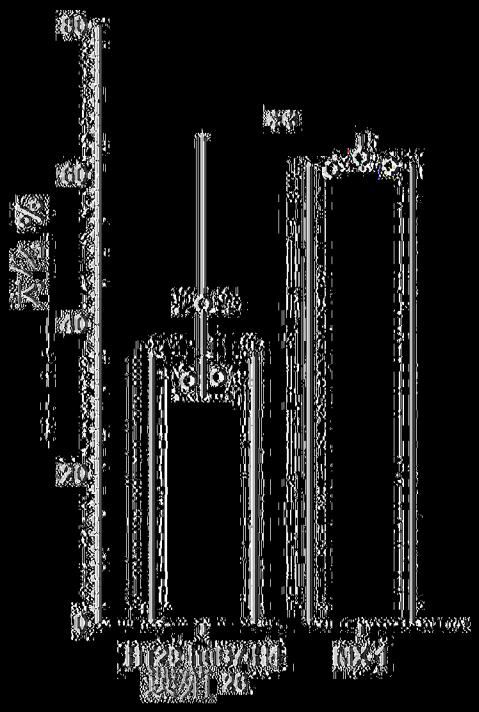


圖39B

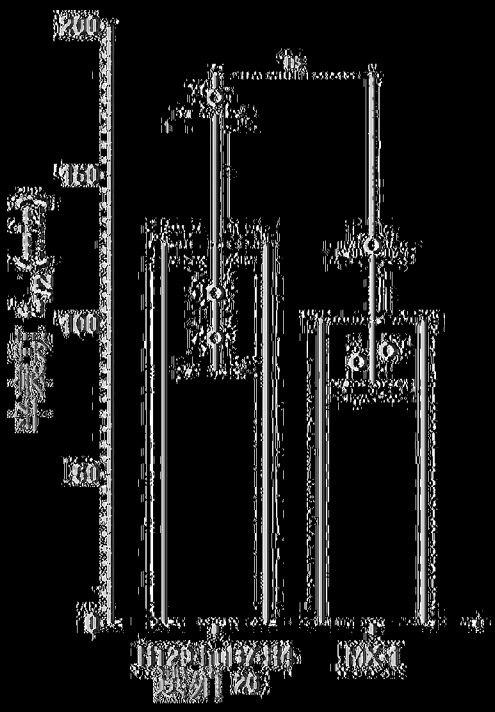
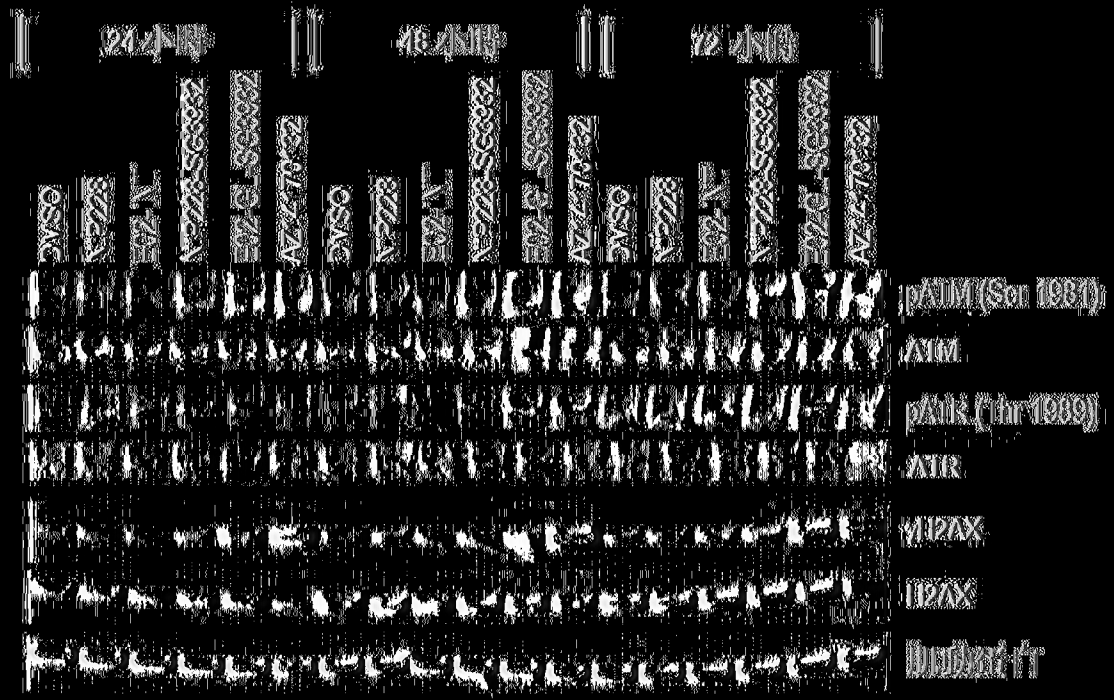
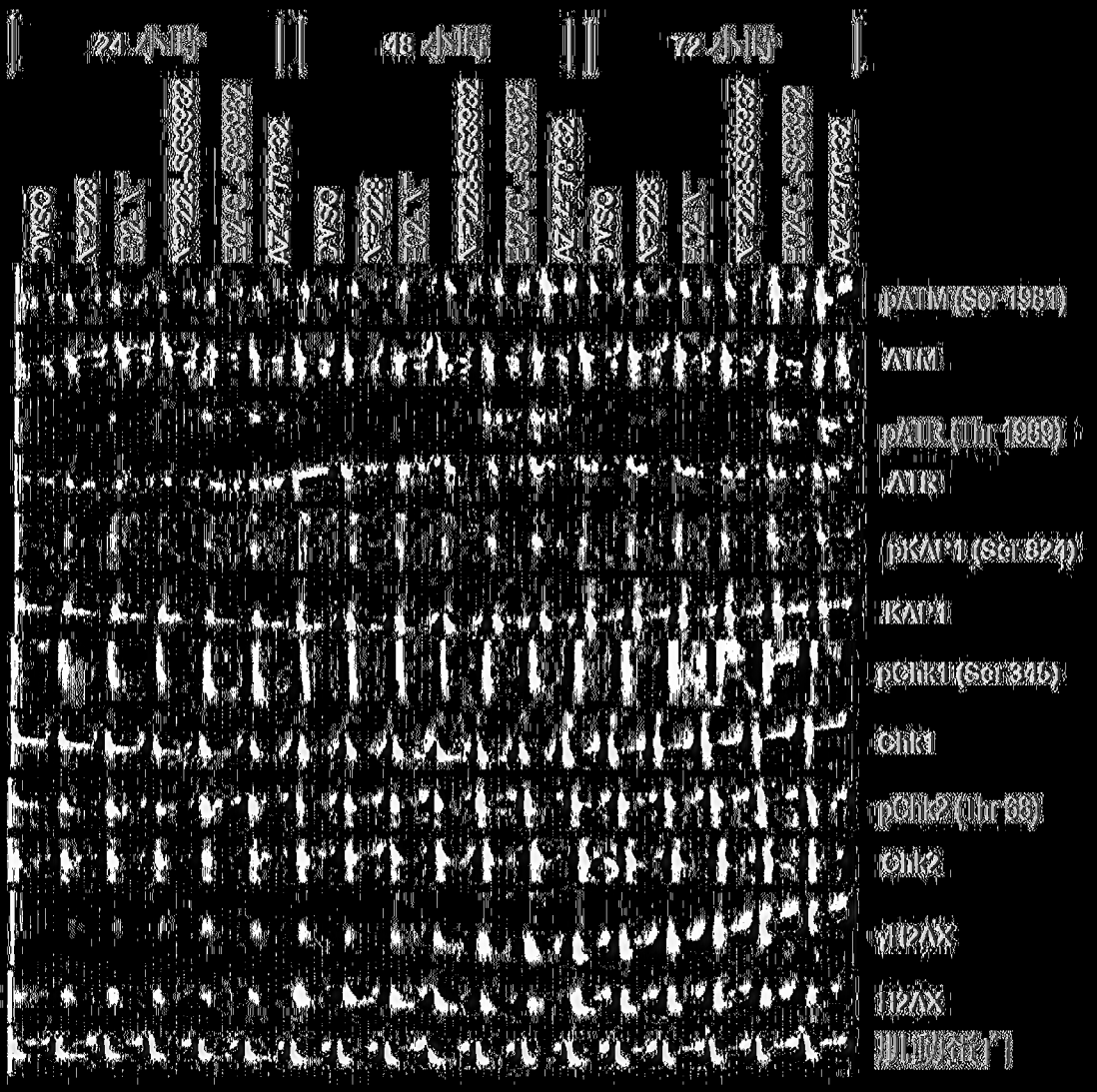


圖39C

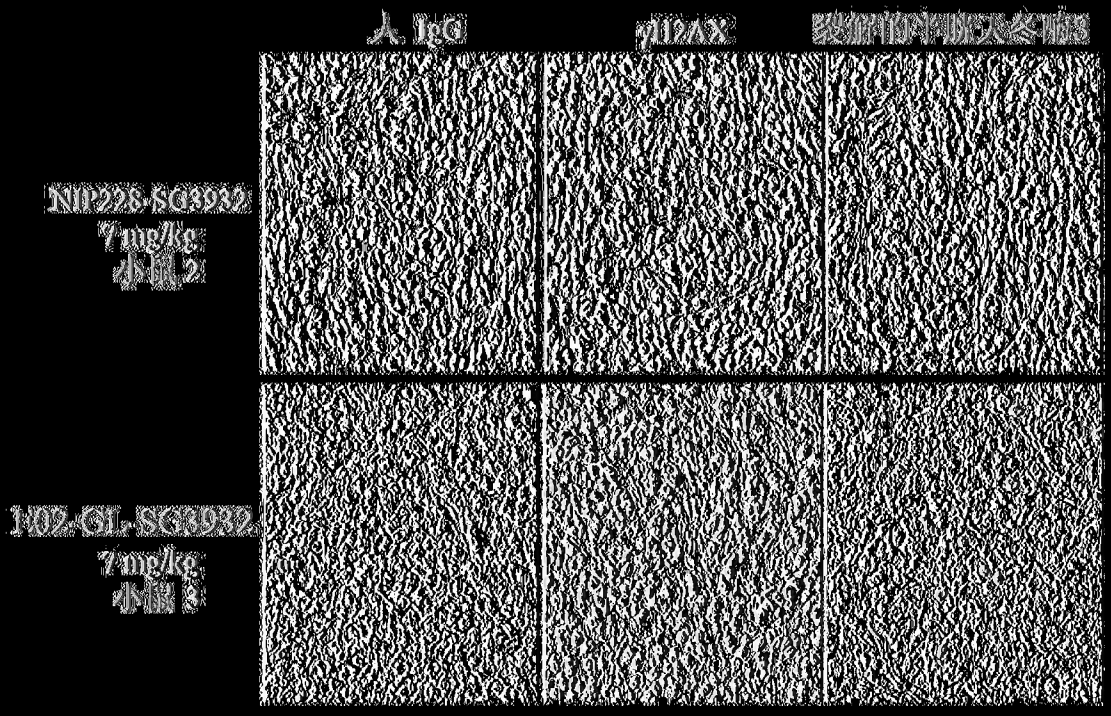
【圖4B】
【圖4A】


24小時
48小時
72小時
pATM (Sen 1981)
ATM
pATR (Thr 1989)
ATR
γH2AX
H2AX
加成蛋白

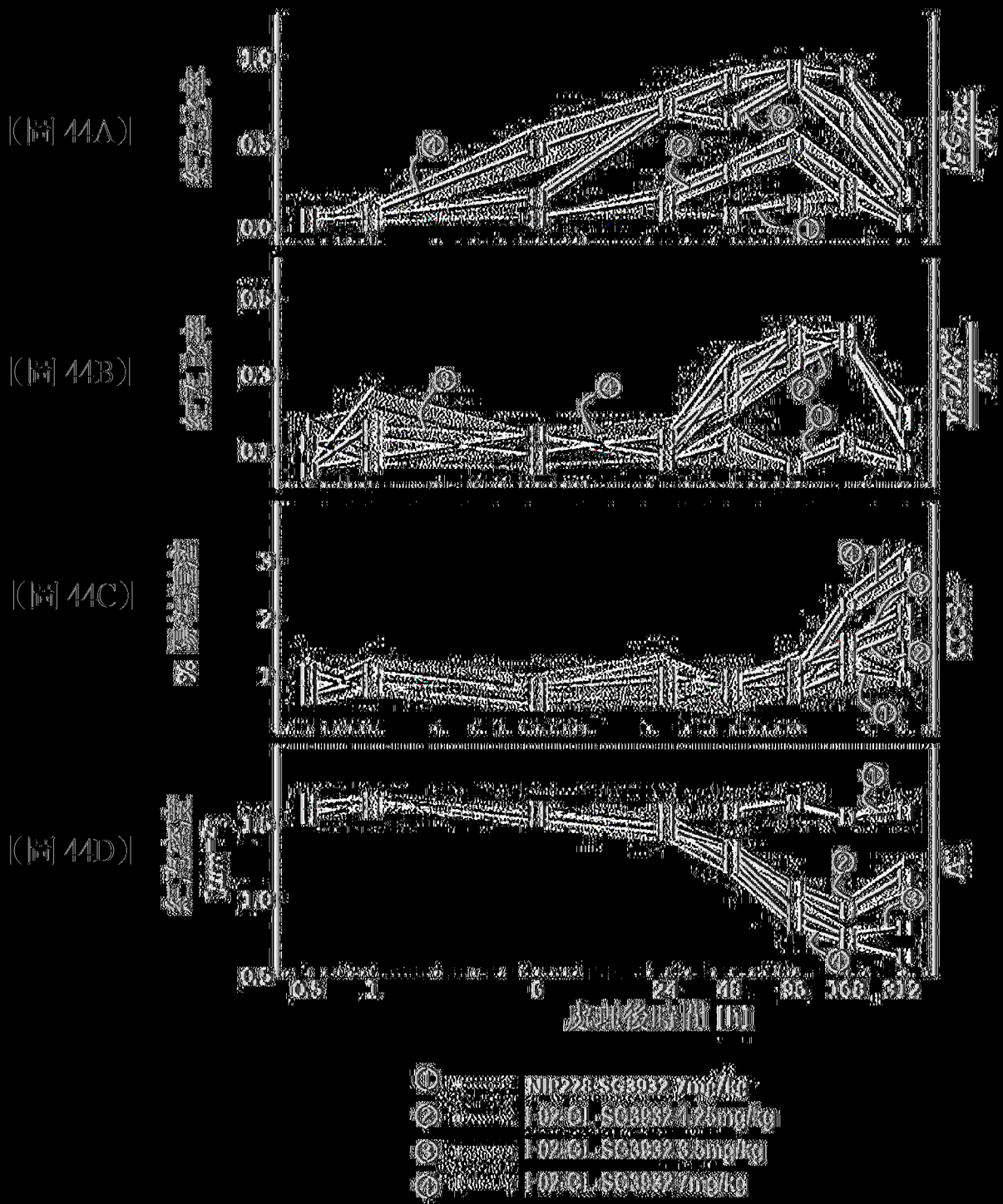
【圖41】

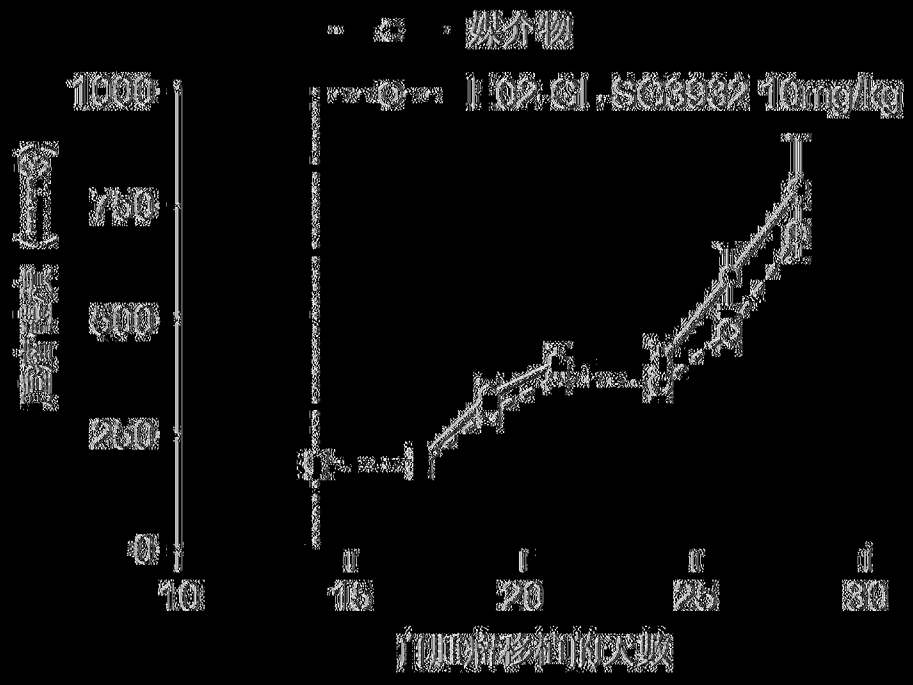

24小時
48小時
72小時
pATM (Ser 1981)
ATM
pATR (Thr 1989)
ATR
pKAP1 (Ser 824)
KAP1
pChk1 (Ser 345)
Chk1
pChk2 (Thr 68)
Chk2
γH2AX
H2AX
此頁簽字

【圖42】

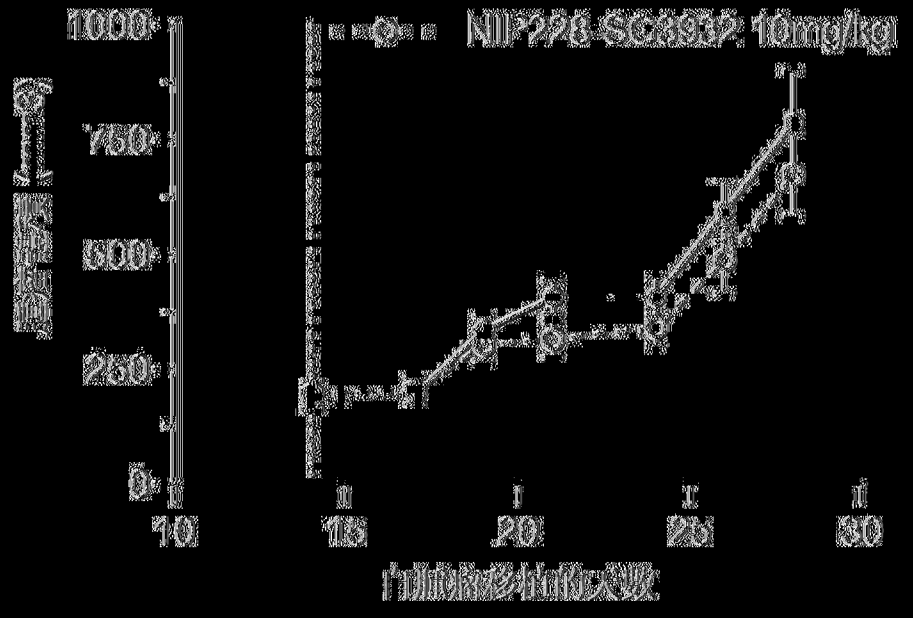


	人 IgG	γH2AX	發明的半抗人冬瓜8
	【圖 43A】	【圖 43B】	【圖 43C】
NIP228-SG3932 7 mg/kg 小鼠 2			
1.02-GL-SG3932 7 mg/kg 小鼠 3			
	【圖43D】	【圖43E】	【圖43F】

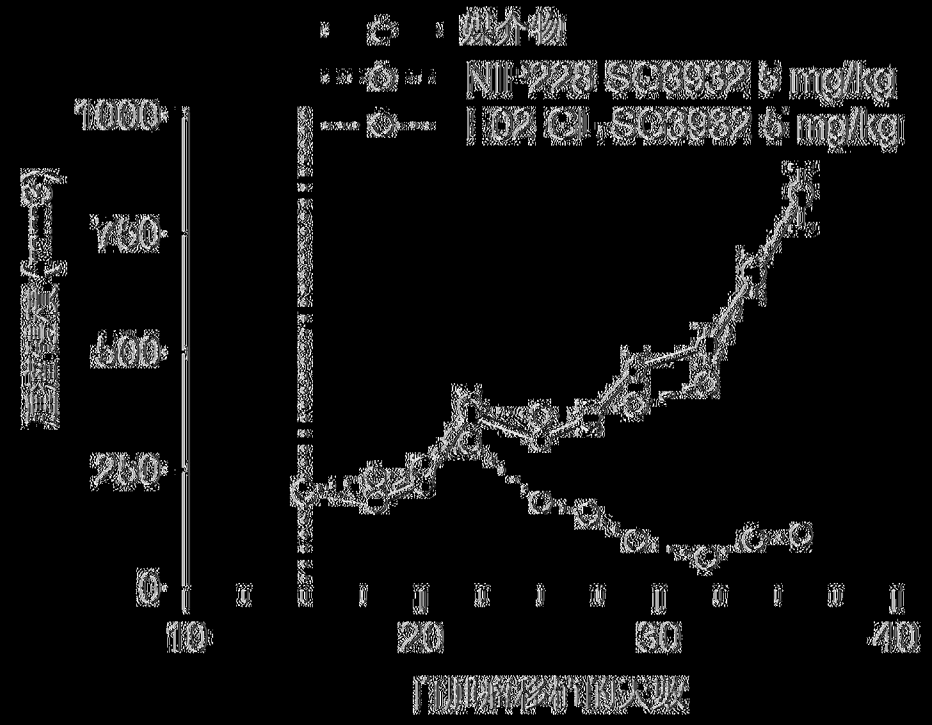

(圖44A)
(圖44B)
(圖44C)
(圖44D)
1.0
0.5
0.0
0.5
0.3
0.1
3
2
1
1.5
1.0
0.5
0.5
1
6
24
48
96
168
312
皮膚後時間 [h]
① NIP228-SG3932 7mg/kg
② I-02-CL-SG3932 4.25mg/kg
③ I-02-CL-SG3932 3.5mg/kg
④ I-02-CL-SG3932 7mg/kg


媒介物
1:02 CL-SC8932 10mg/kg
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
自加速移植的天數

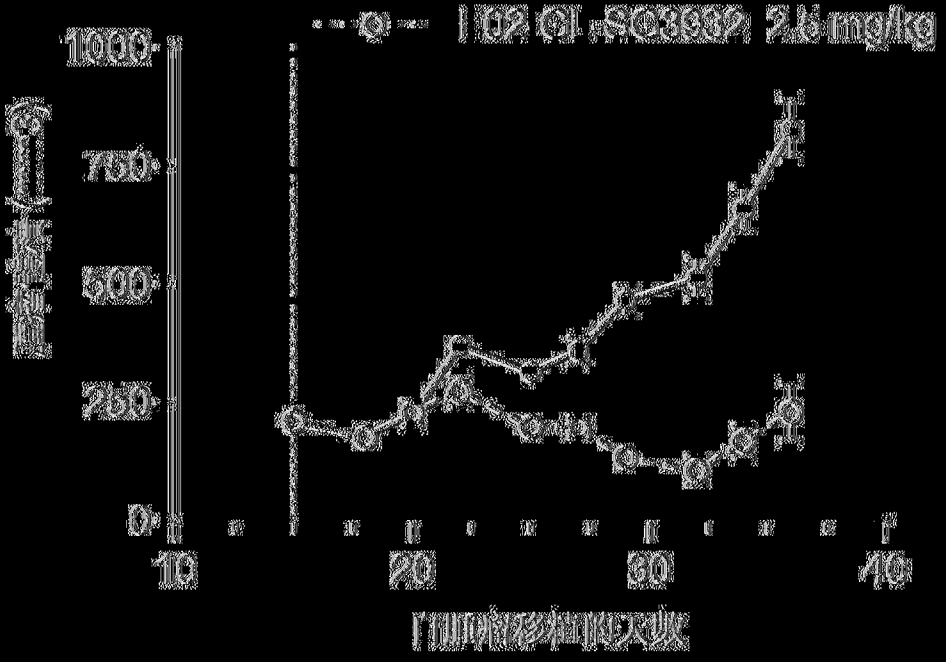
[圖45A]


NIP228-SC8932 10mg/kg
1000
750
500
250
0
10
15
20
25
30
自加速移植的天數

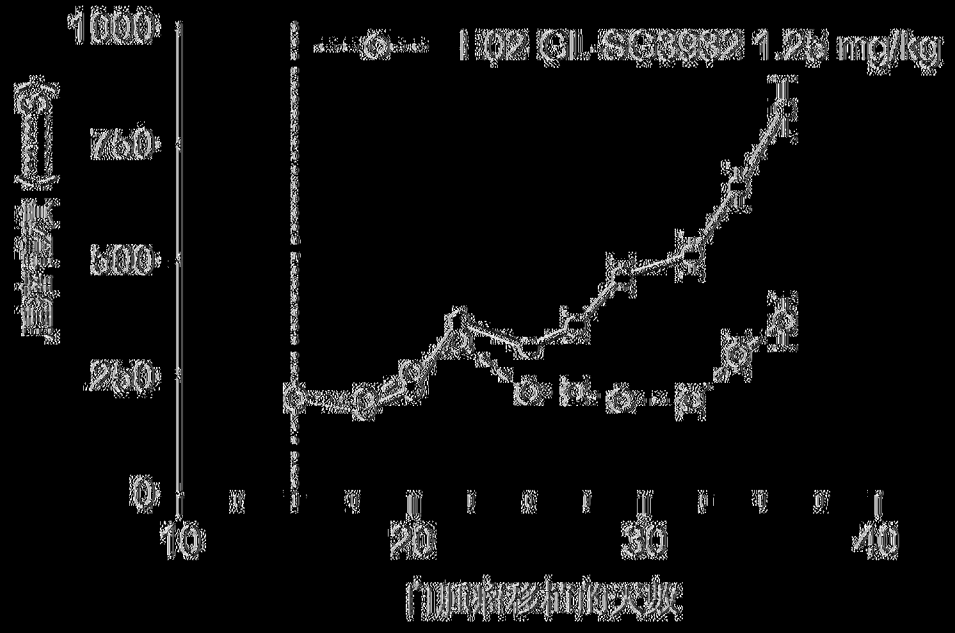
[圖45B]


燃料物
NF-228 SC3932 5 mg/kg
I 02 Cl SC3932 5 mg/kg
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
自加速移植的天數

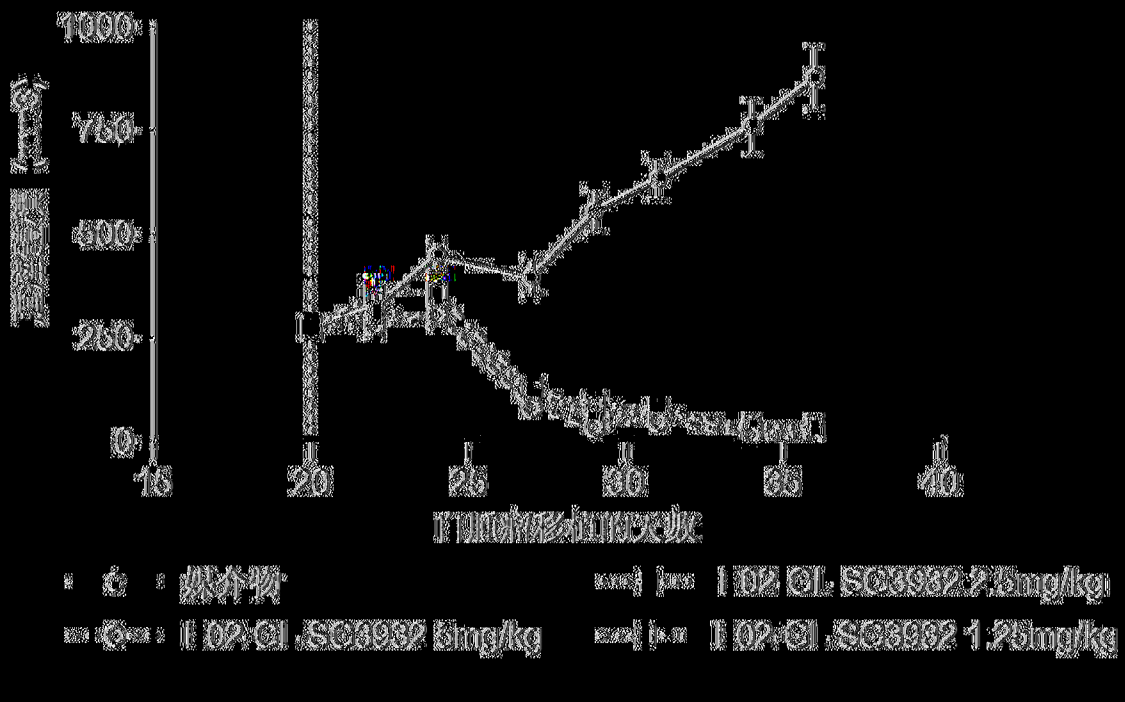
|(圖 46A)|


I 02 Cl SC3932 2.5 mg/kg
1000
750
500
250
0
10
20
30
40
自加速移植的天數

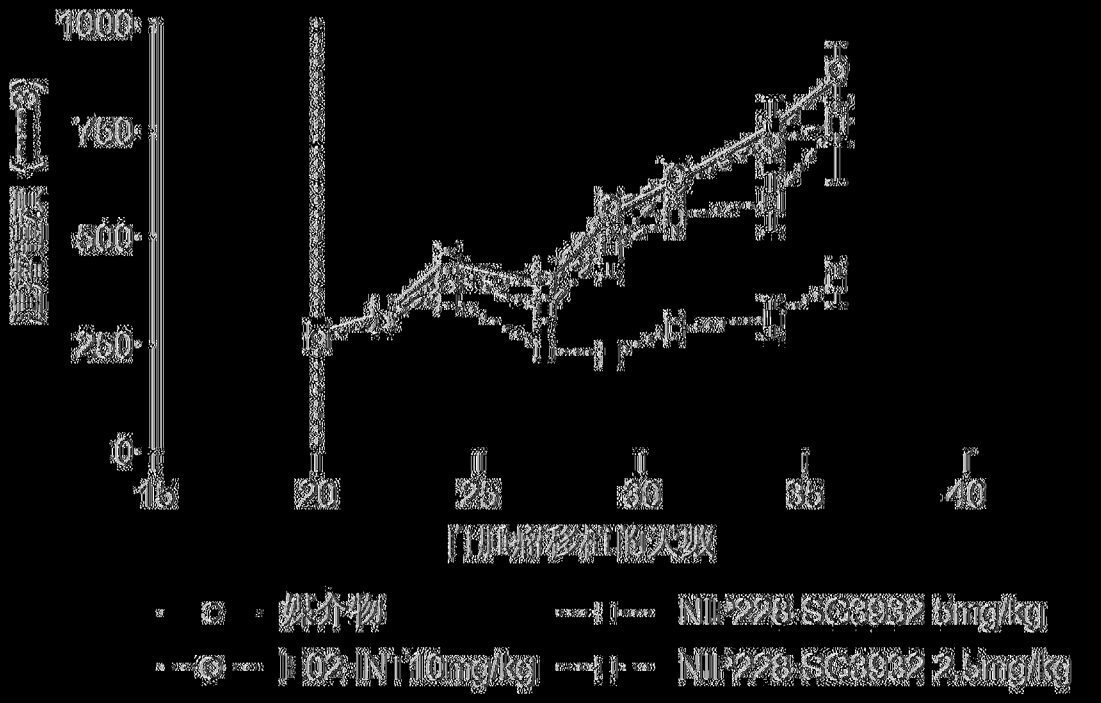
|(圖 46B)|



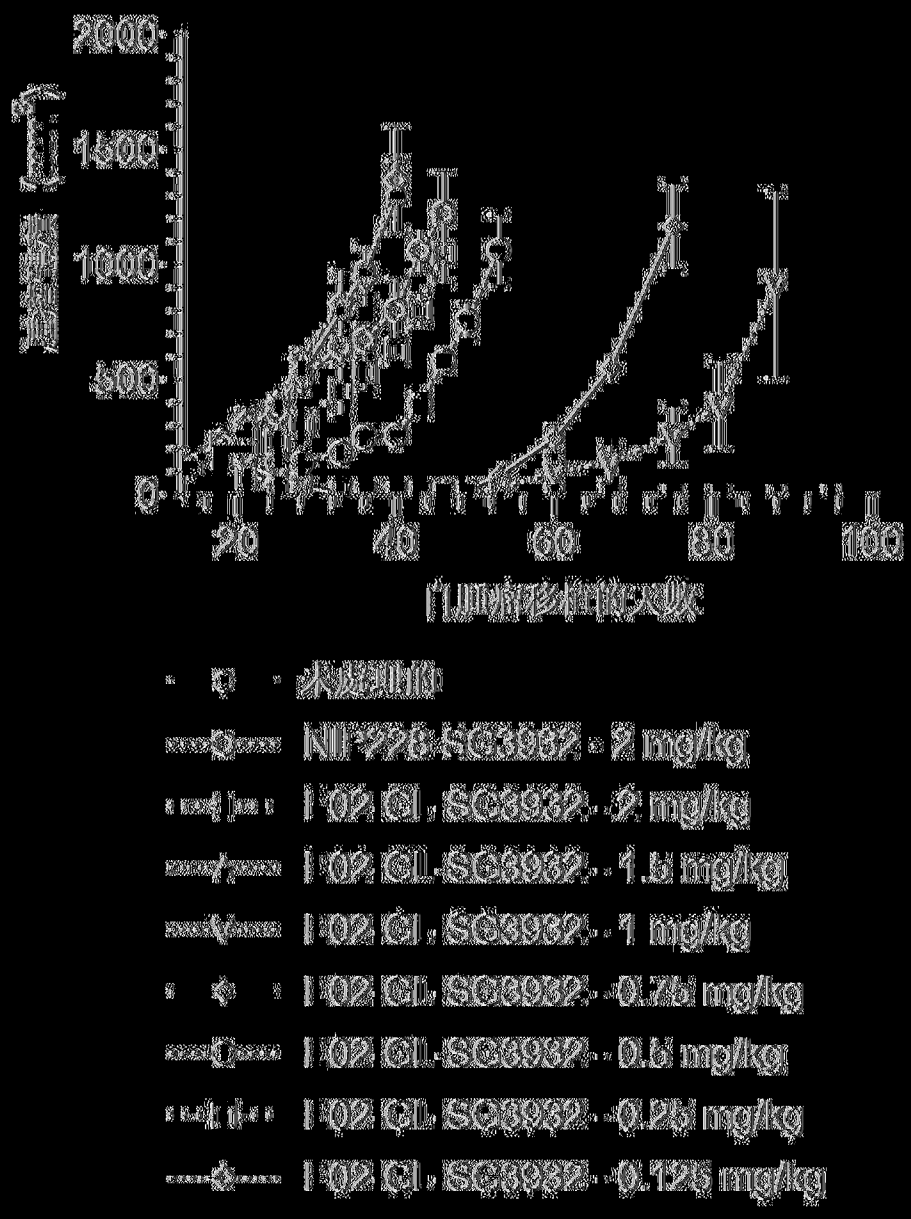
[圖 46C]


1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
40
IT加速移植的天數
媒介物
I 02 CL SC3932 2.5mg/kg
I 02 CL SC3932 5mg/kg
I 02 CL SC3932 1.25mg/kg

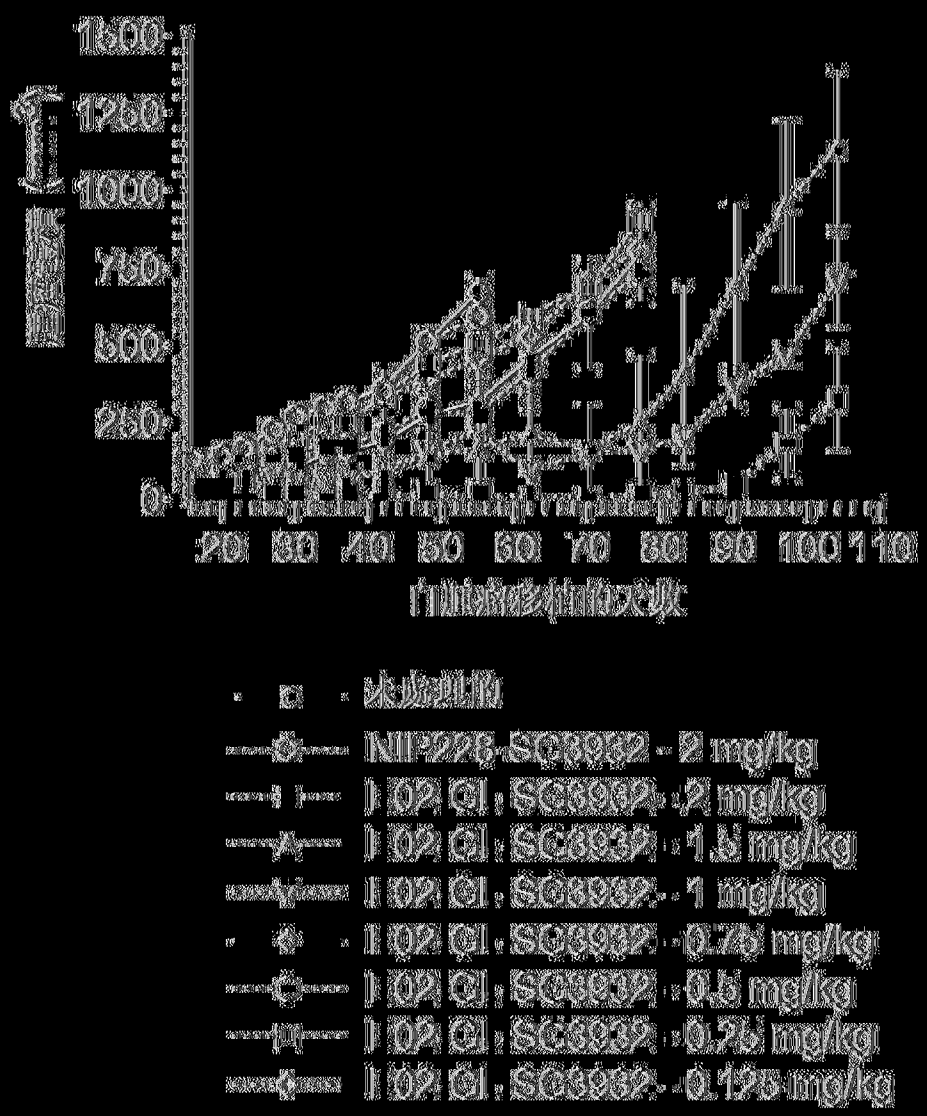
|(圖 47A)|


1000
750
500
250
0
15
20
25
30
35
40
IT加速移植的天數
媒介物
I 02 INT 10mg/kg
NIP228 SC3932 5mg/kg
NIP228 SC3932 2.5mg/kg
NIP228 SC3932 1.25mg/kg

|(圖47B)|


2000
1500
1000
500
0
20
40
60
80
100
白血癌移植的天數
未處理的
NIP228 SC3932 - 2 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 2 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 1.5 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 1 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 0.75 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 0.5 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 0.25 mg/kg
I-02 CL SC3932 - 0.125 mg/kg

【圖48】

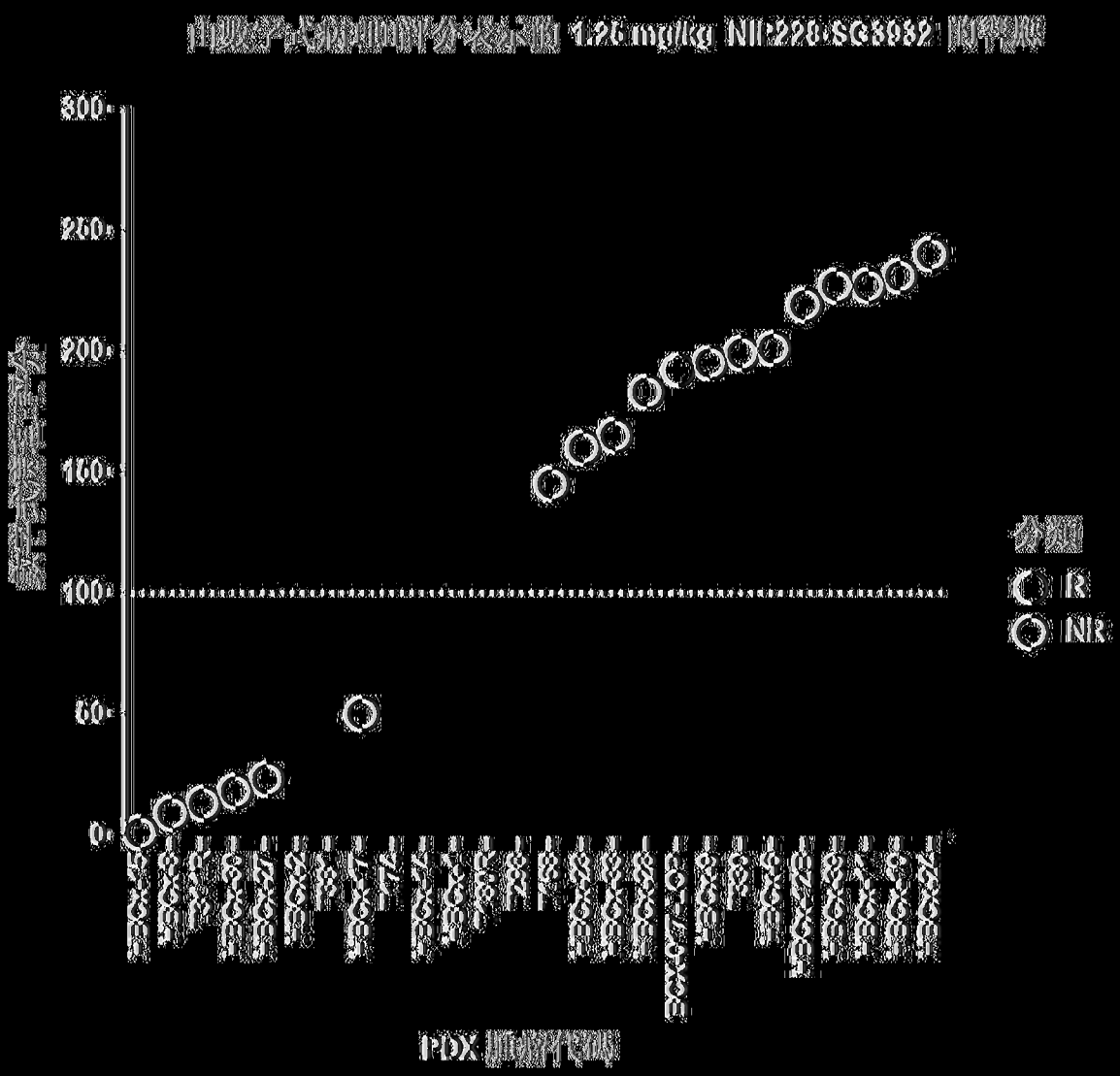

1500
1250
1000
750
500
250
0
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
白油溶移植的天數
未處理的
NIP228-SC8932 - 2 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 2 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 1.5 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 1 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.75 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.5 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.25 mg/kg
I 02 Cl - SC8932 - 0.125 mg/kg

(圖49)

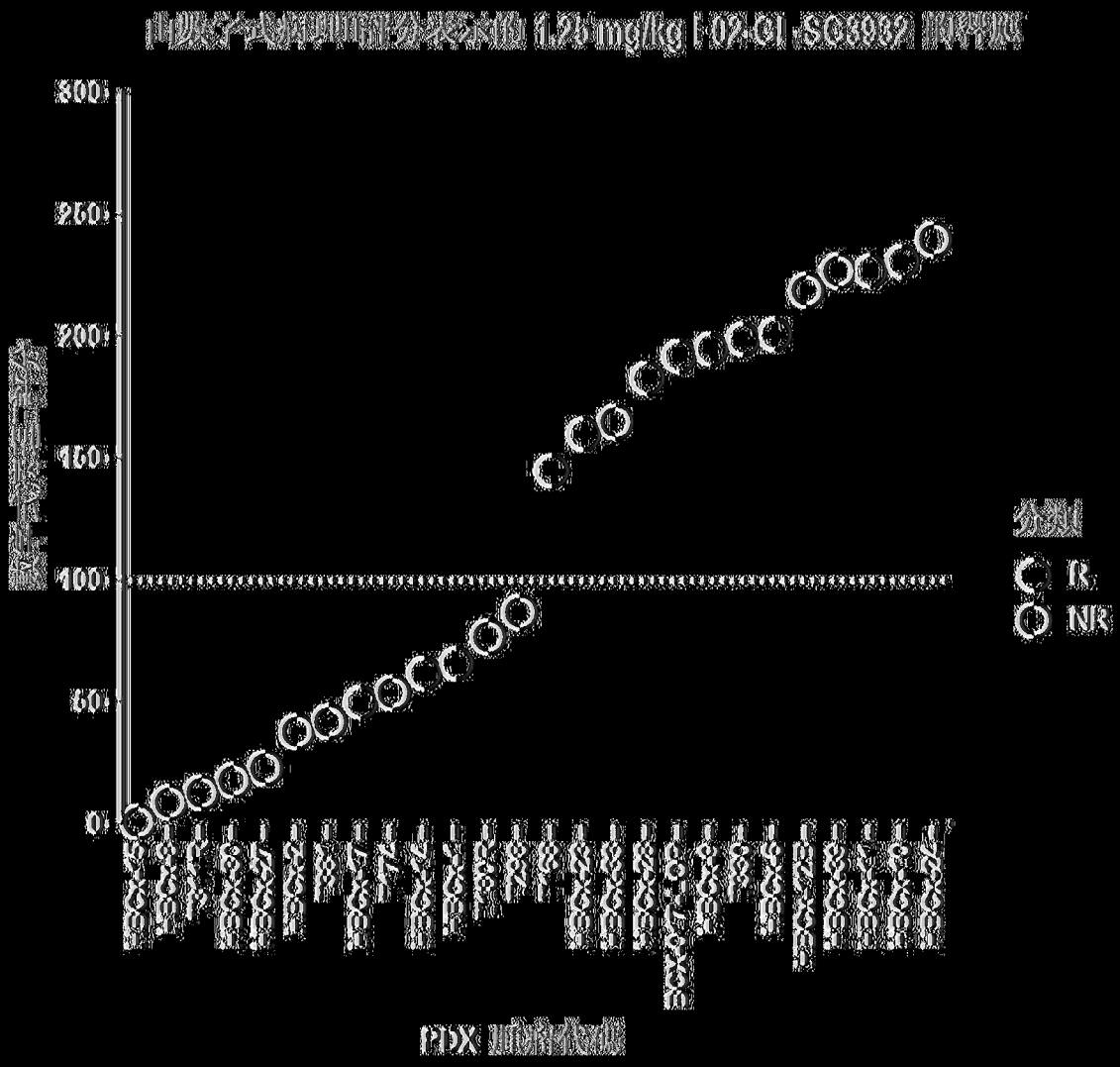
HBC-6
HBC-39
HBC-24
T330
HBC-128
HBC-10
HBC-9
BCX.0LV.LOP
HBC-11
HBC-28
HBC-33
T168
HBC-23
T298
T180R
HBC-1
HBC-14
T174
HBC-17
T381
HBC-2
HBC-27
HBC-30
T314R
HBC-8
HBC-15
100
80
60
40
20
0
時間(秒)

圖 [5]

圖式
(%)
330
168
BOX-9
BOX-01/1-OP
BOX-6
BOX-10
BOX-28
BOX-23
BOX-11
BOX-1
BOX-11
BOX-17
BOX-12B
230
BOX-37
BOX-33
BOX-3
17
BOX-21
BOX-16
BOX-39
180R
BOX-30
131R
381
BOX-2

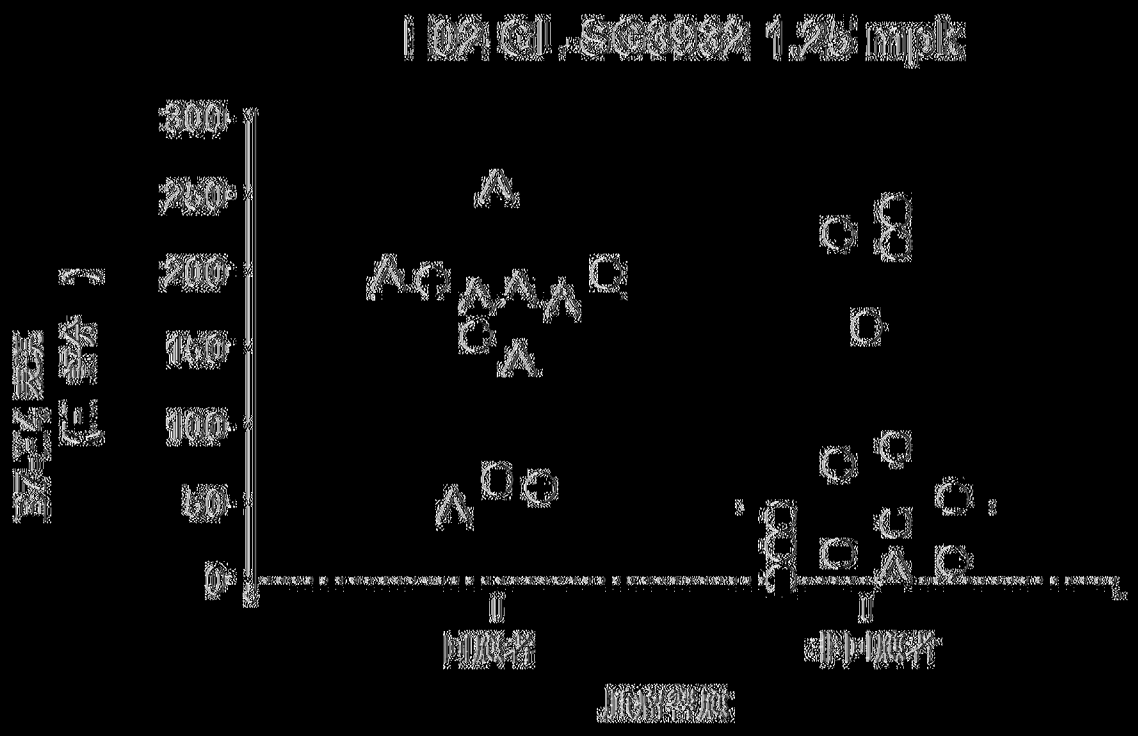


[圖52A]

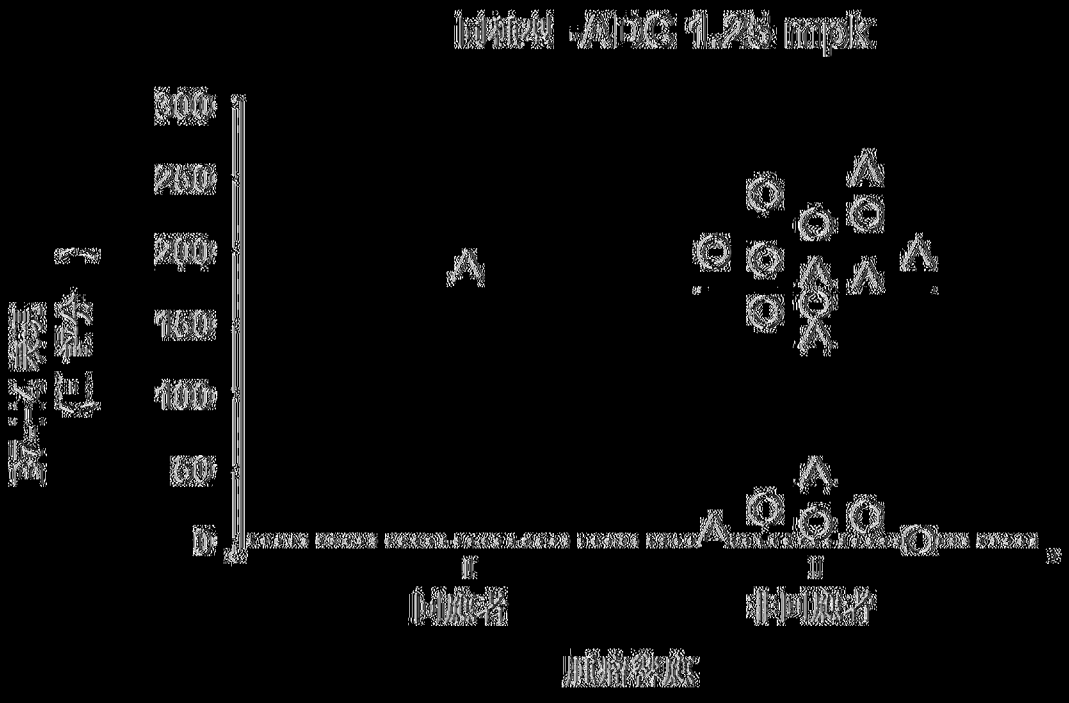

由數字式病理印證分表示的 1.25 mg/kg [-02-CI -SC3932 [圖零點
300
250
200
150
100
50
0
數字式表示之數
分類
R
NR
PDX 試驗代碼

[圖52B]

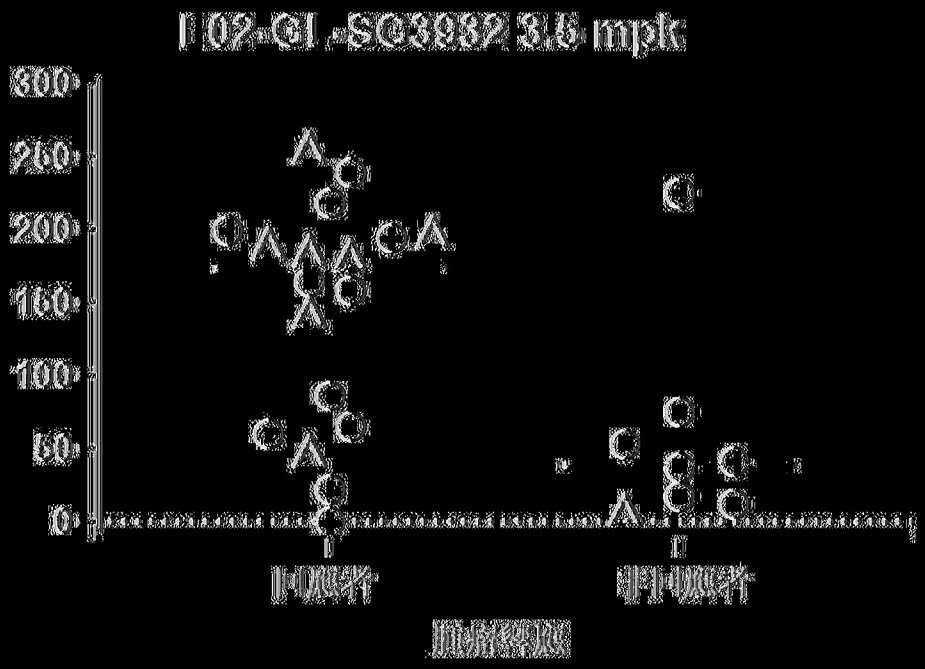
(%) 含量相對強度
BOX.01A1.OP
IIBOX.11
T168
IIBOX.10
IIBOX.16
IIBOX.33
T330
IIBOX.9
IIBOX.11
IIBOX.6
IIBOX.1
IIBOX.28
IIBOX.21
IIBOX.23
IIBOX.27
IIBOX.12B
T298
IIBOX.17
IIBOX.8
T180B
T131B
T381
IIBOX.30
T171
IIBOX.39
IIBOX.2
(式53A)


I 02 CL-SG3932 1.25 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I
II
I
II

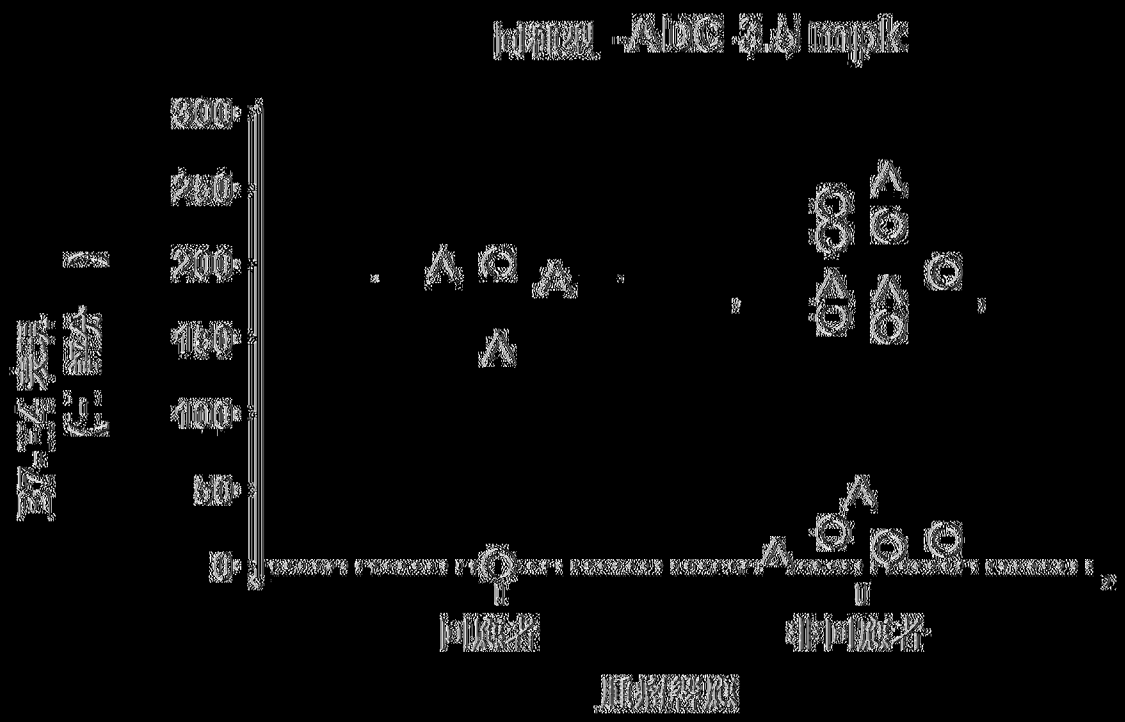
|(圖53B)|


Initial -AHC 1.25 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I
II
I
II

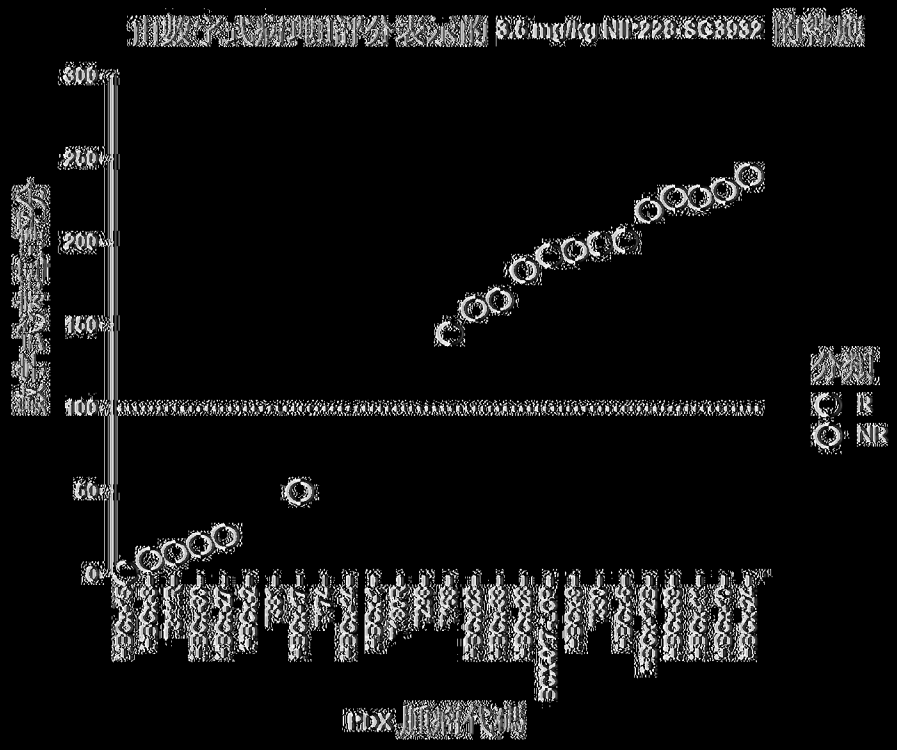
|(圖53C)|


I 02-CI -SC3932 3.5 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I-1吸者
II-1吸者
加熱經過

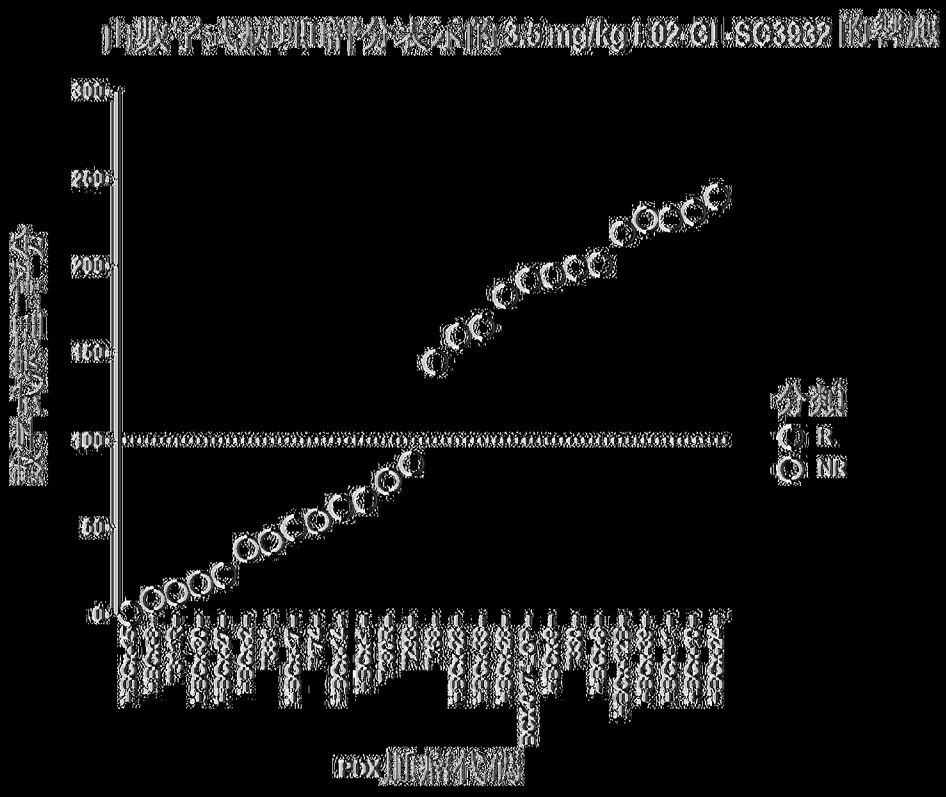
|(圖53D)|


I-0202 -ADC 3.5 mpk
300
250
200
150
100
50
0
I-1吸者
II-1吸者
加熱經過

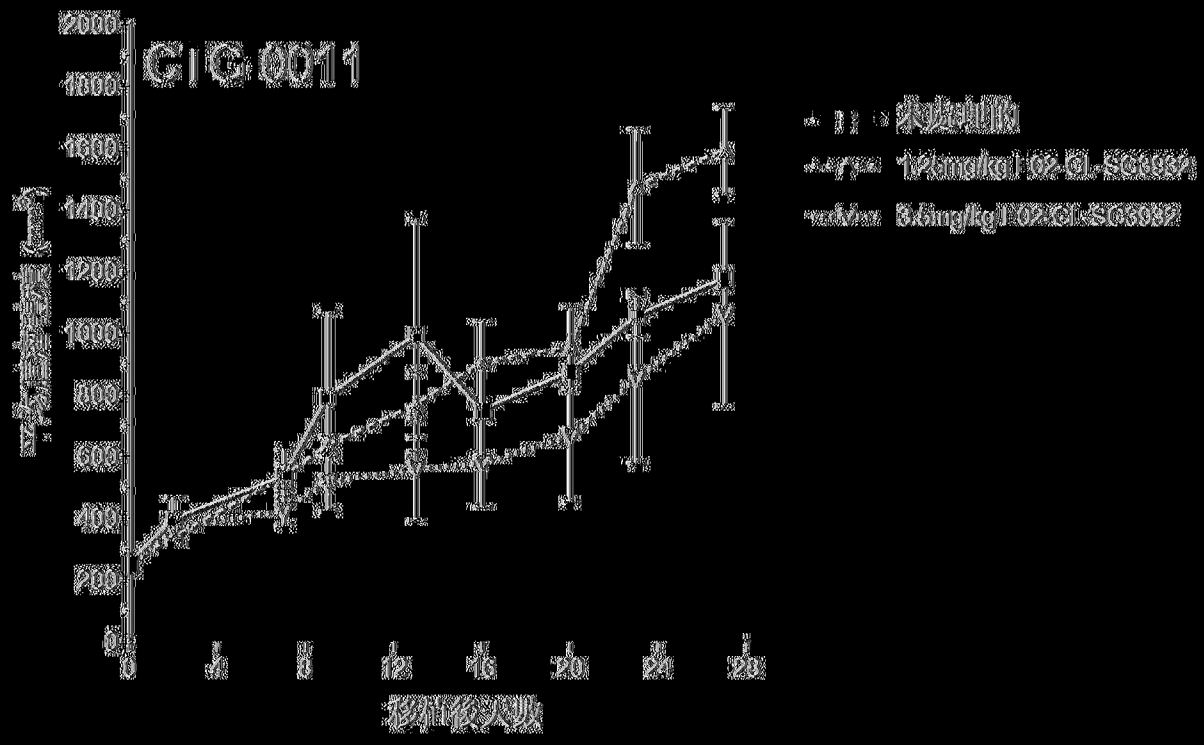
|(圖53E)|


由數字式病理中評分表示的 3.6 mg/kg NH-228-SG3982 的響應
300
250
200
150
100
50
0
分類
R
NR
PDX 腫瘤代碼

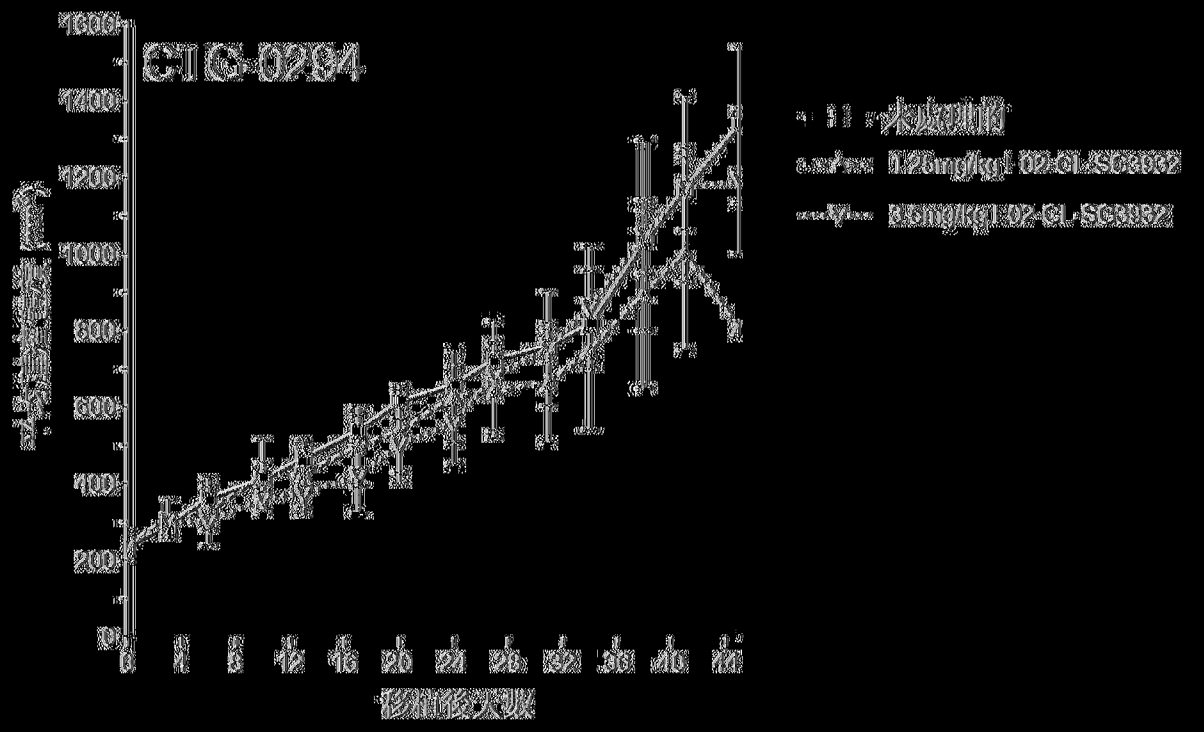
|(圖54A)|


由數字式病理中評分表示的 3.6 mg/kg 1-02-CI-SG3982 的響應
300
250
200
150
100
50
0
分類
R
NR
PDX 腫瘤代碼

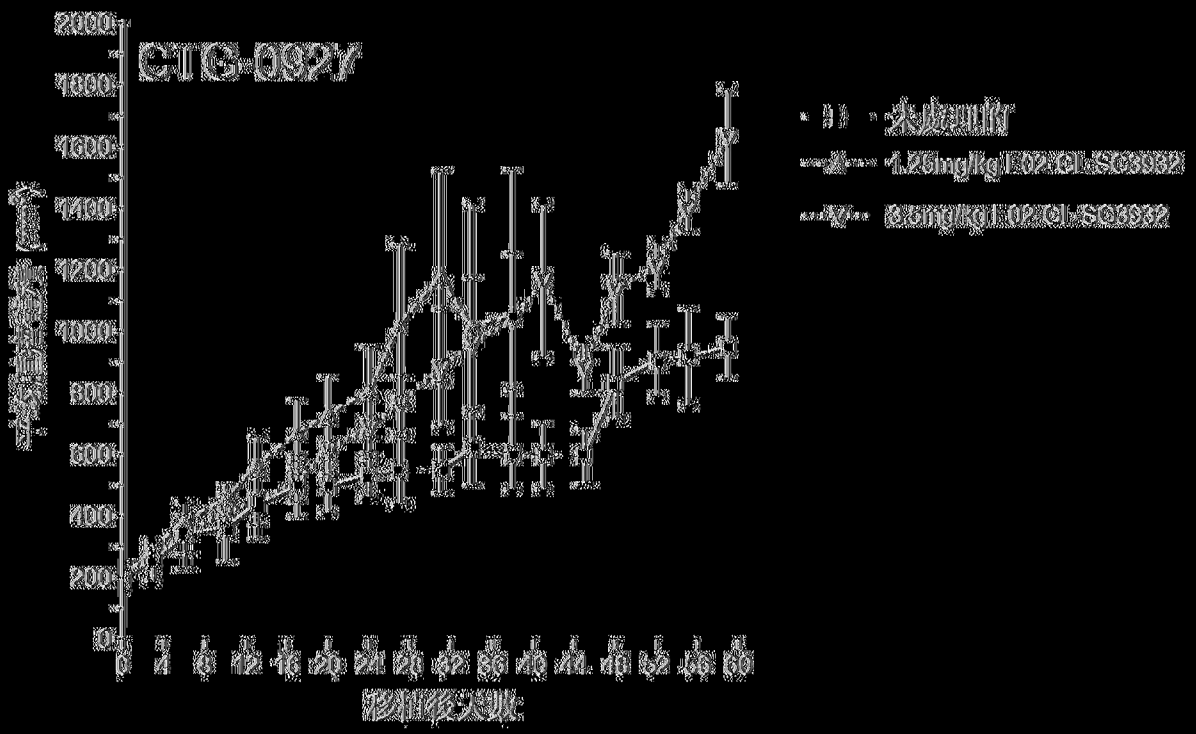
|(圖54B)|


CIG-0011
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植後天數
1.25mg/kg
3.5mg/kg

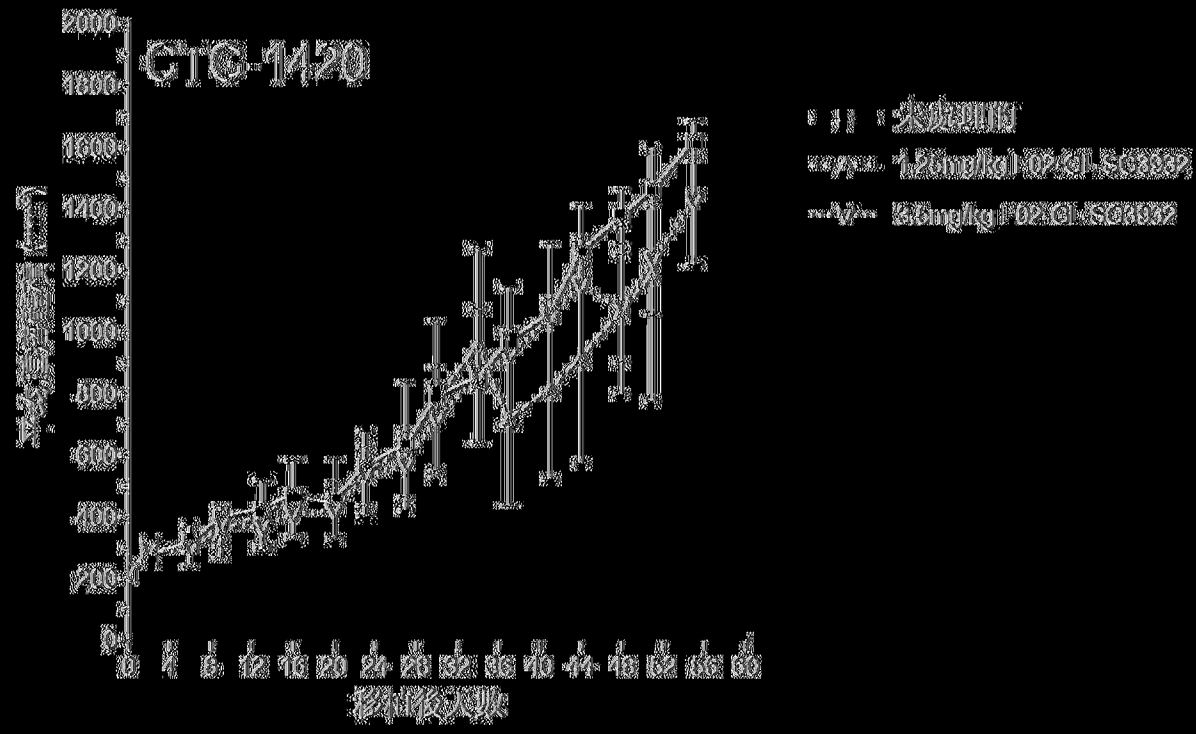
|(圖55A)|


CIG-0294
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
移植後天數
1.25mg/kg
3.5mg/kg

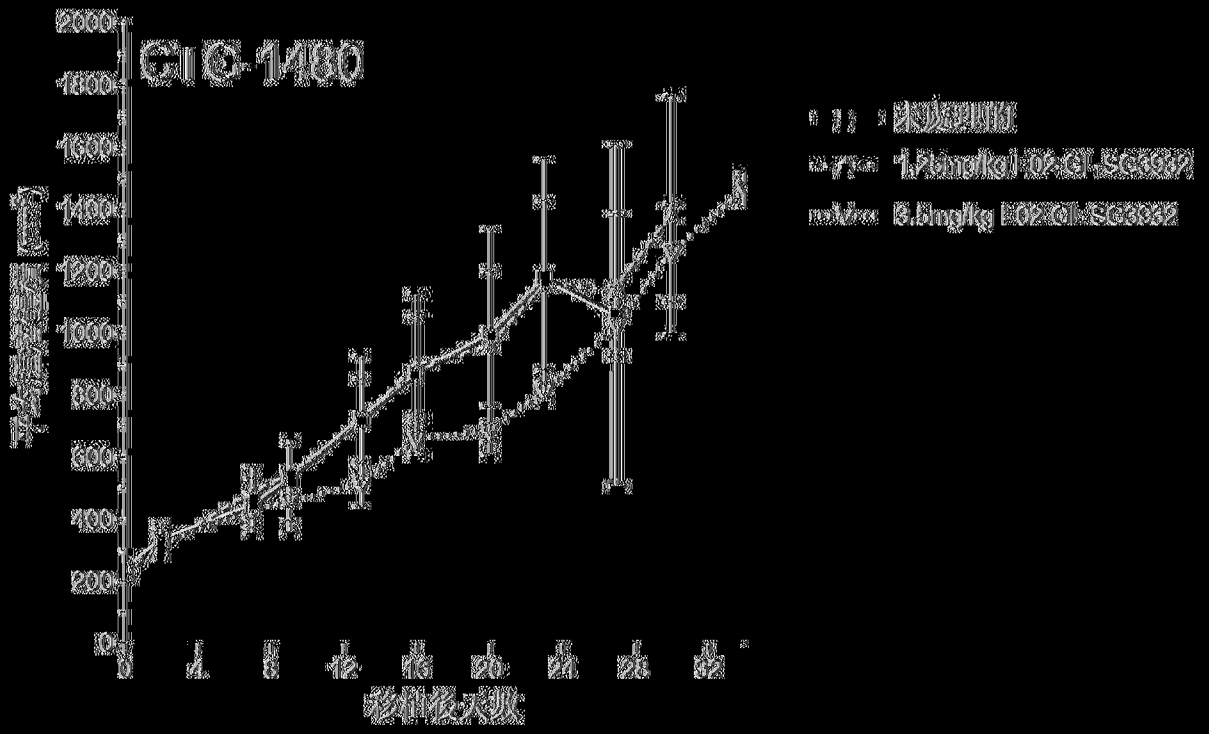
|(圖55B)|


CTG-0927
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
H 未處理的
1.25mg/kg I-02 Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02 Cl-SC3932

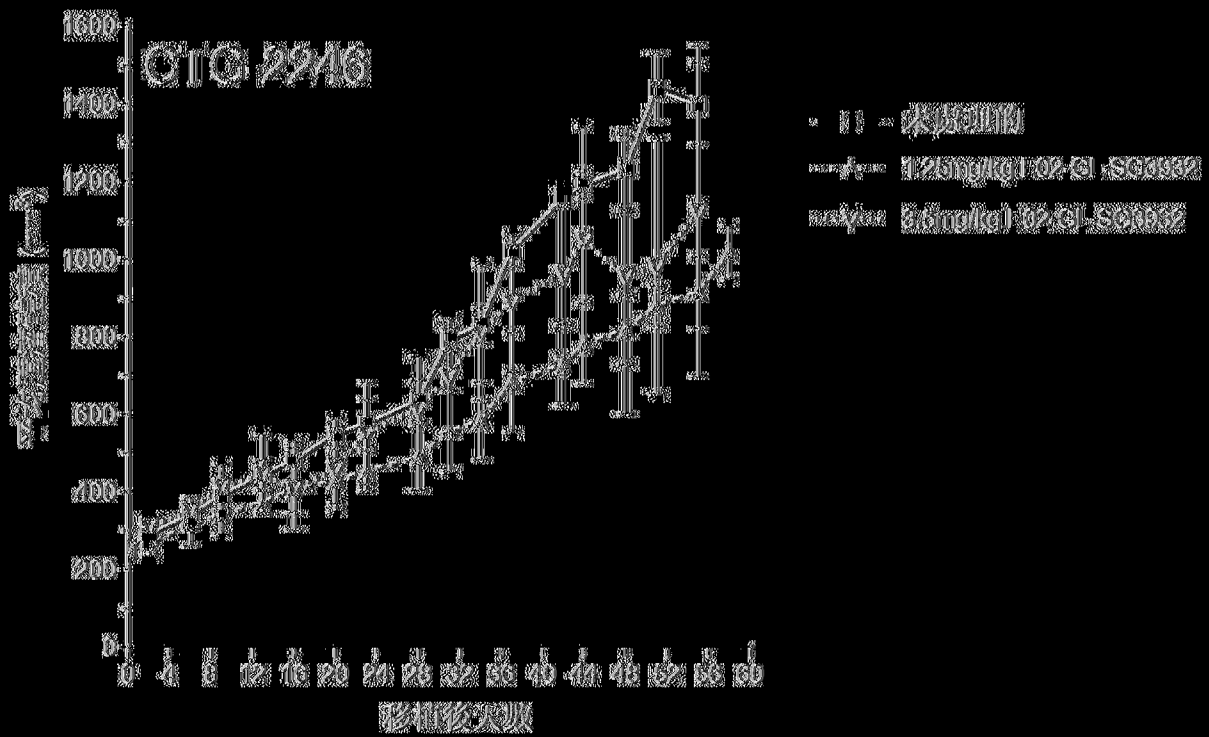
|(圖55C)|


CTG-1420
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
H 未處理的
1.25mg/kg I-02 Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02 Cl-SC3932

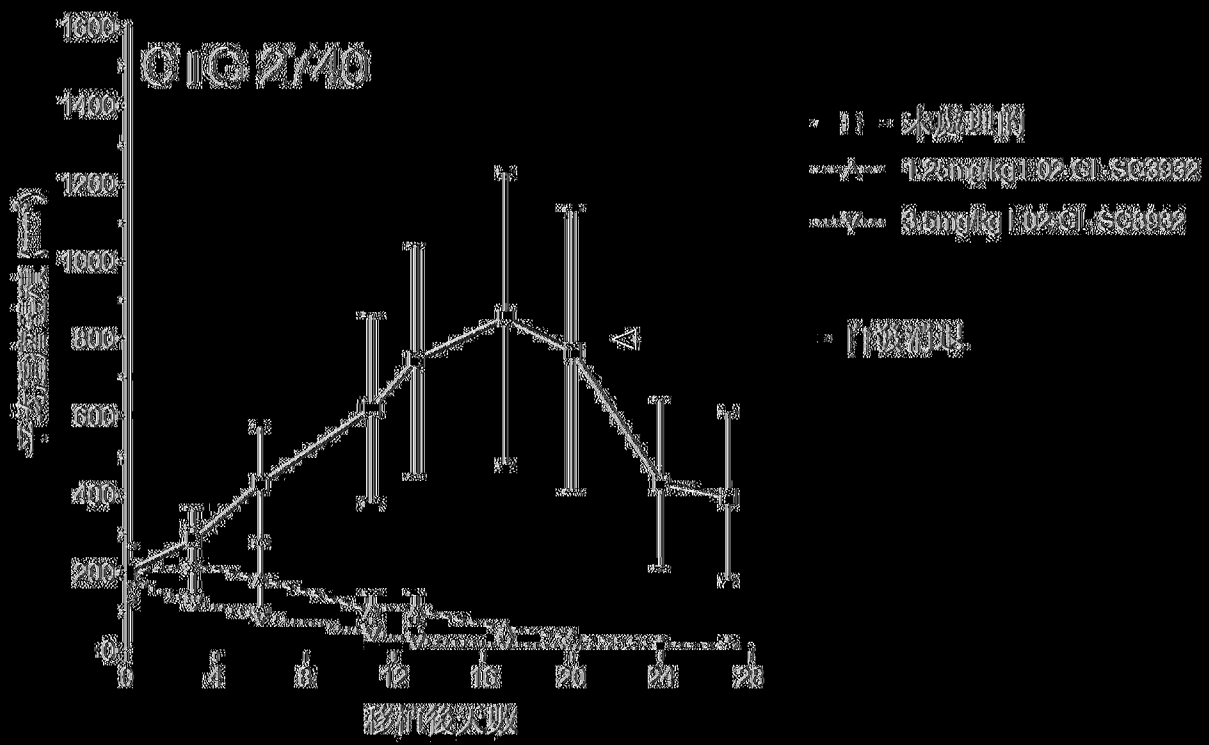
|(圖55D)|


GTC-1480
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
移植後天數
未處理物
1.25mg/kg I-02-GI-SG3932
3.5mg/kg I-02-GI-SG3932

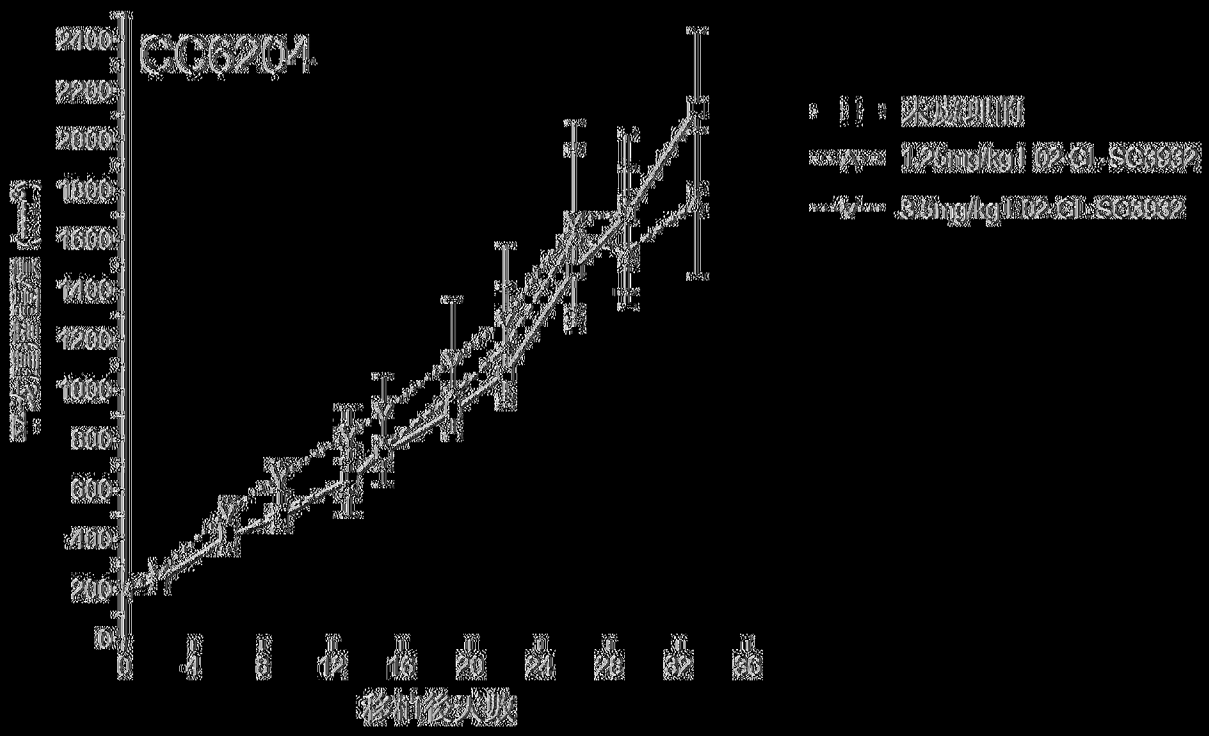
|(圖55E)|


GTC-2246
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後天數
未處理物
1.25mg/kg I-02-GI-SG3932
3.5mg/kg I-02-GI-SG3932

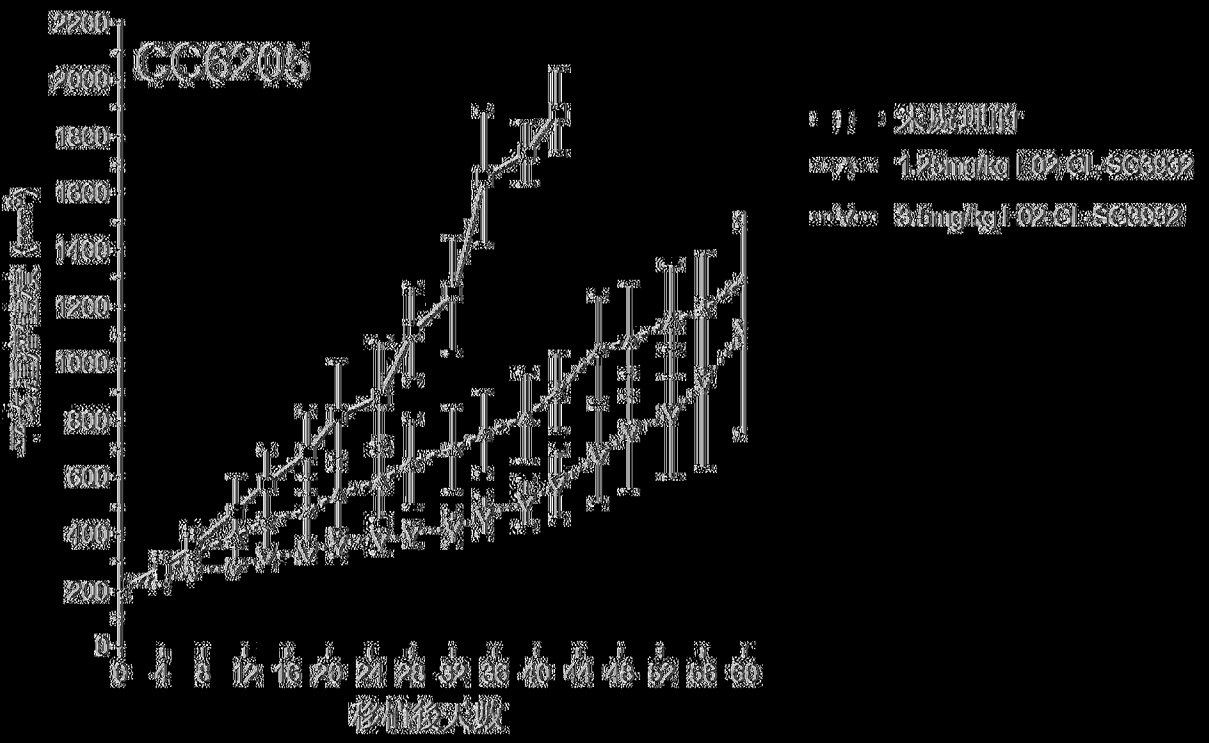
|(圖55F)|


CIG 2740
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植後天數
水處理組
1.25mg/kg I-02-CI-SC3932
3.5mg/kg I-02-CI-SC3932
自發消退

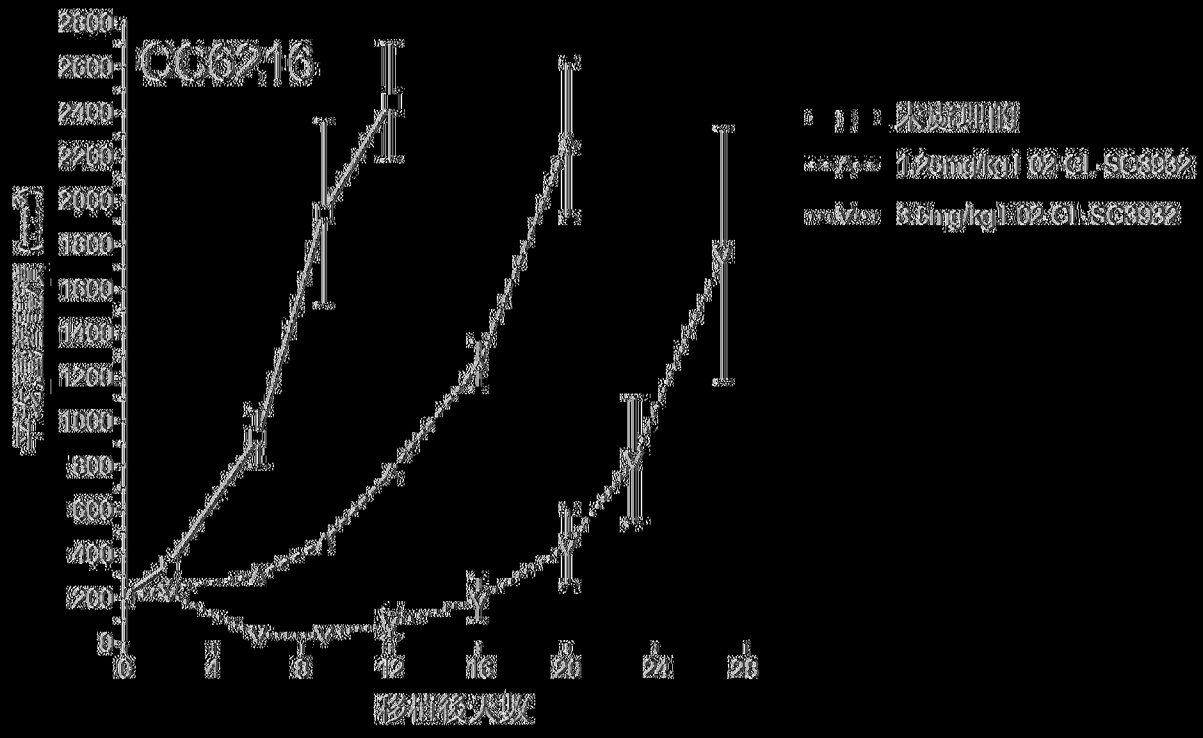
[圖55G]


GC6204
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36
移植後天數
來源細胞
1.25mg/kg I 02-CL-SC3932
3.5mg/kg I 02-CL-SC3932

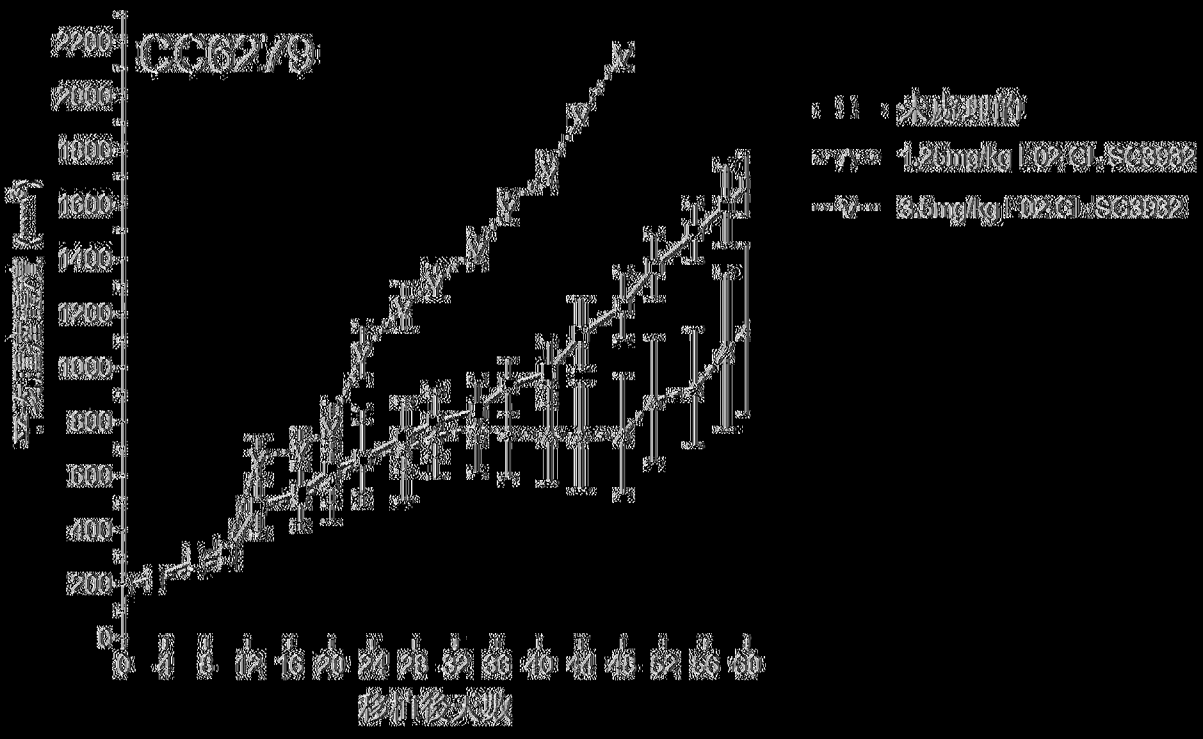
|(圖56A)|


GC6205
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
來源細胞
1.25mg/kg I 02-CL-SC3932
3.5mg/kg I 02-CL-SC3932

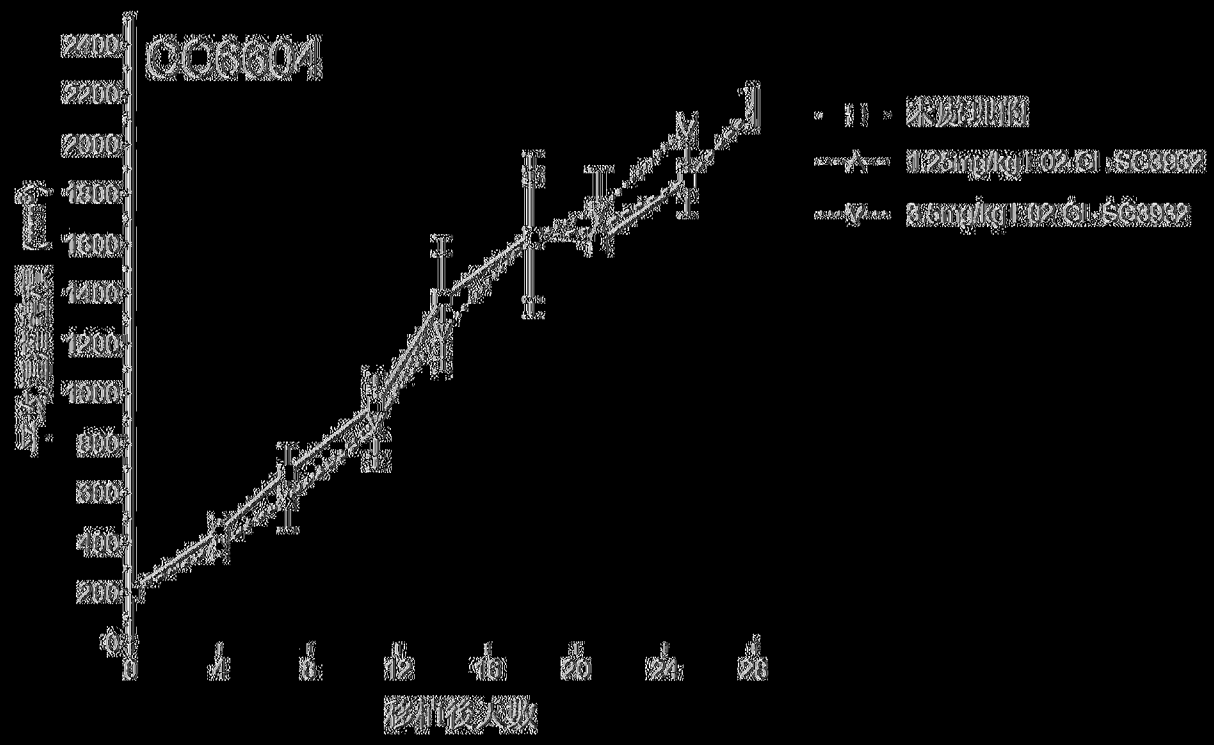
|(圖56B)|


CG6216
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I 02 Cl-SG3982
3.5mg/kg I 02 Cl-SG3982

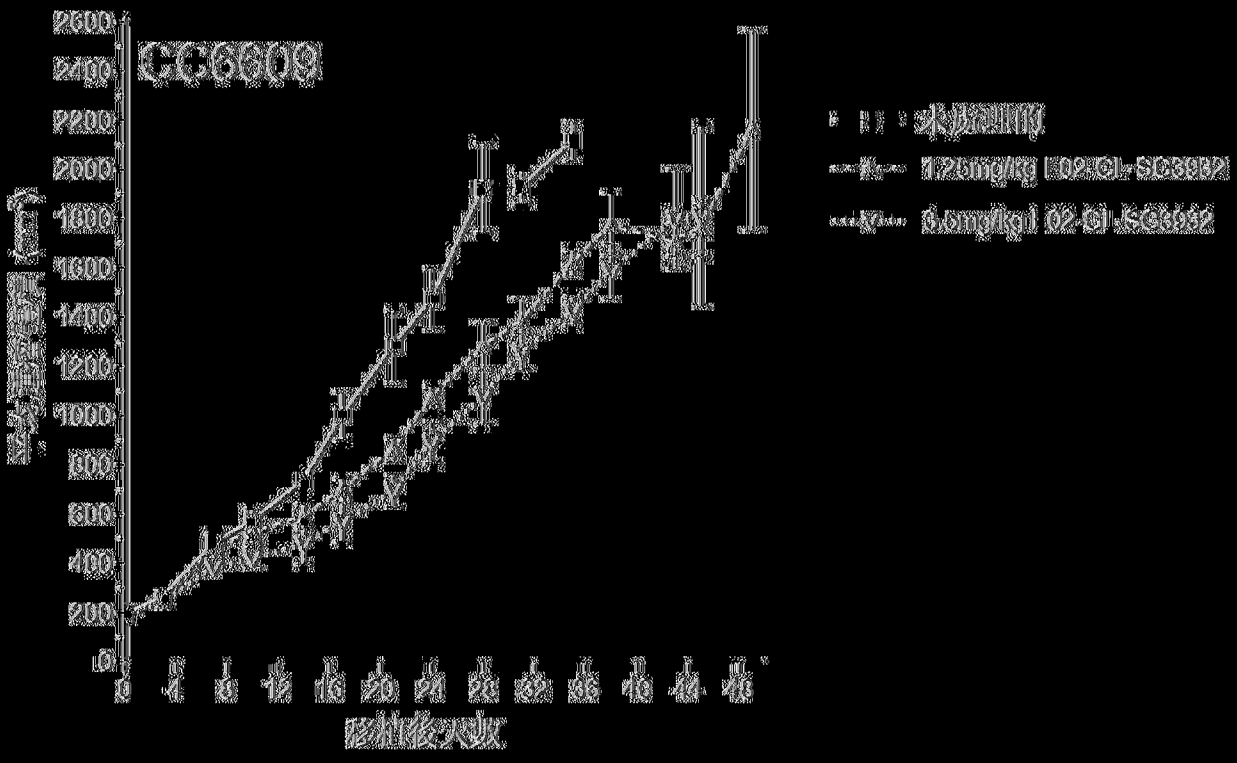
|(圖56C)|


CG6279
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
52
56
60
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I 02 Cl-SG3982
3.5mg/kg I 02 Cl-SG3982

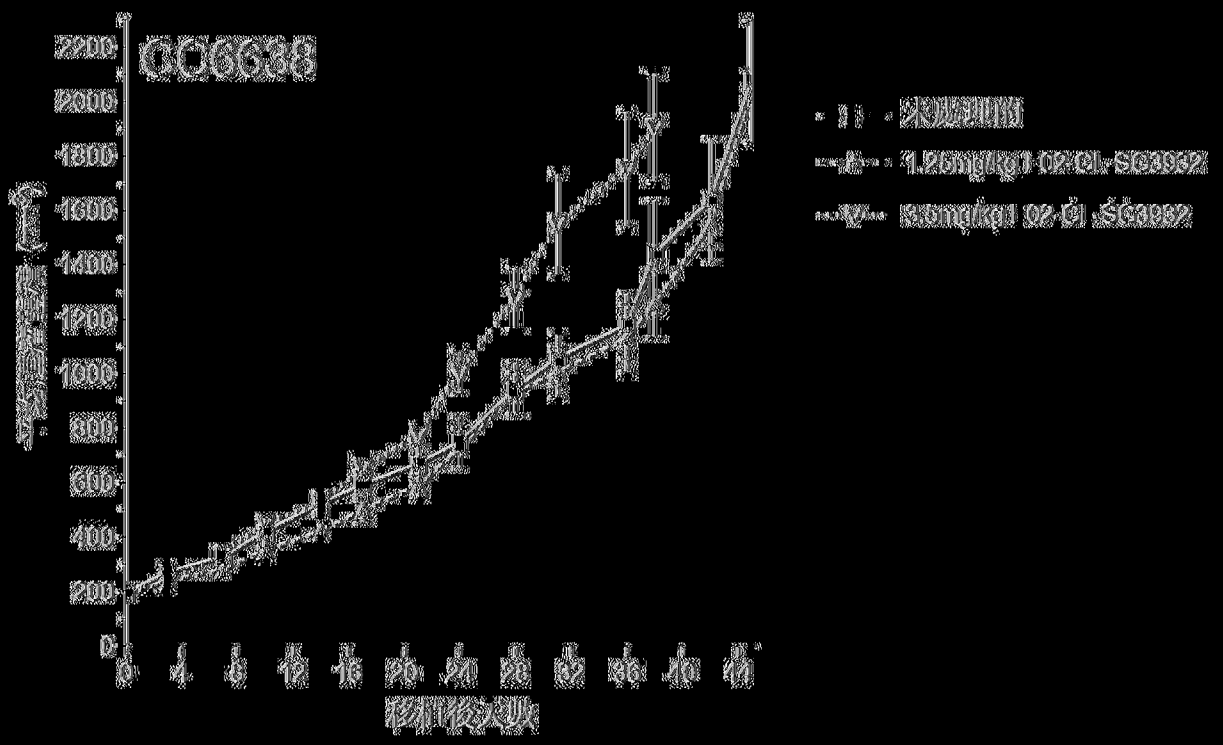
|(圖56D)|


CC6604
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
形植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SC3932

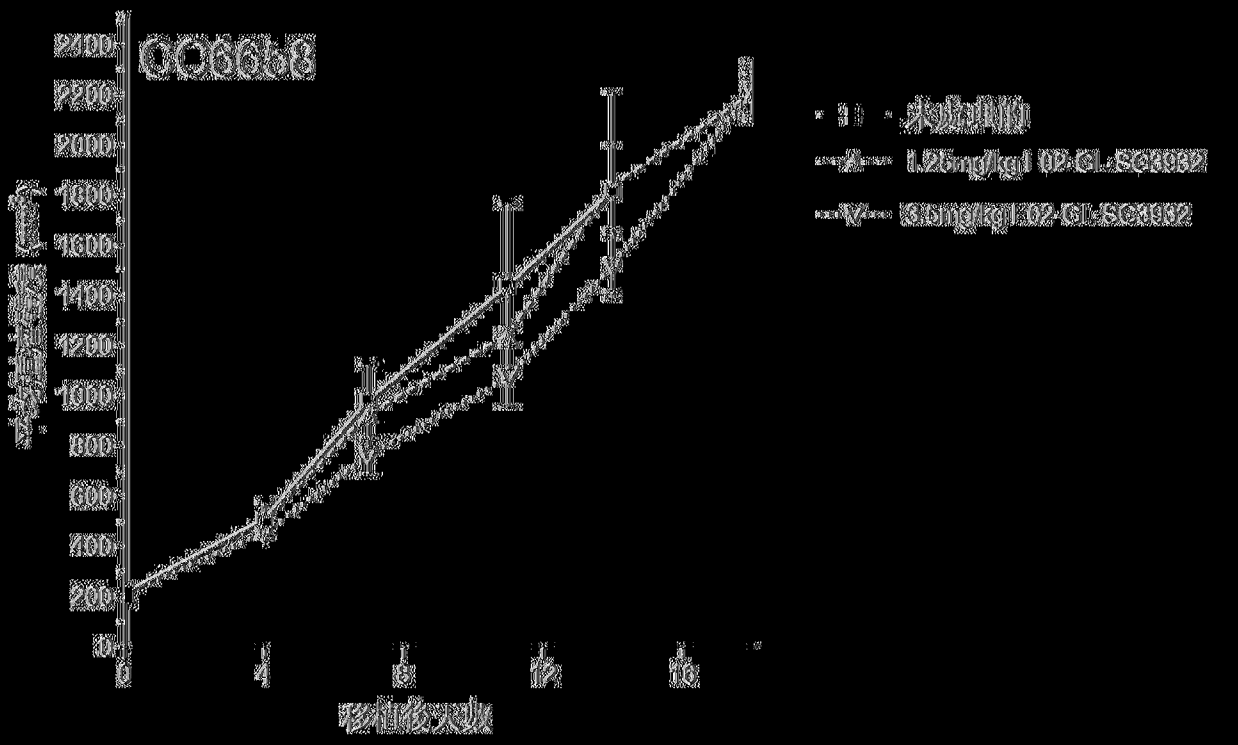
|(圖56E)|


CC6609
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
48
形植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SC3932

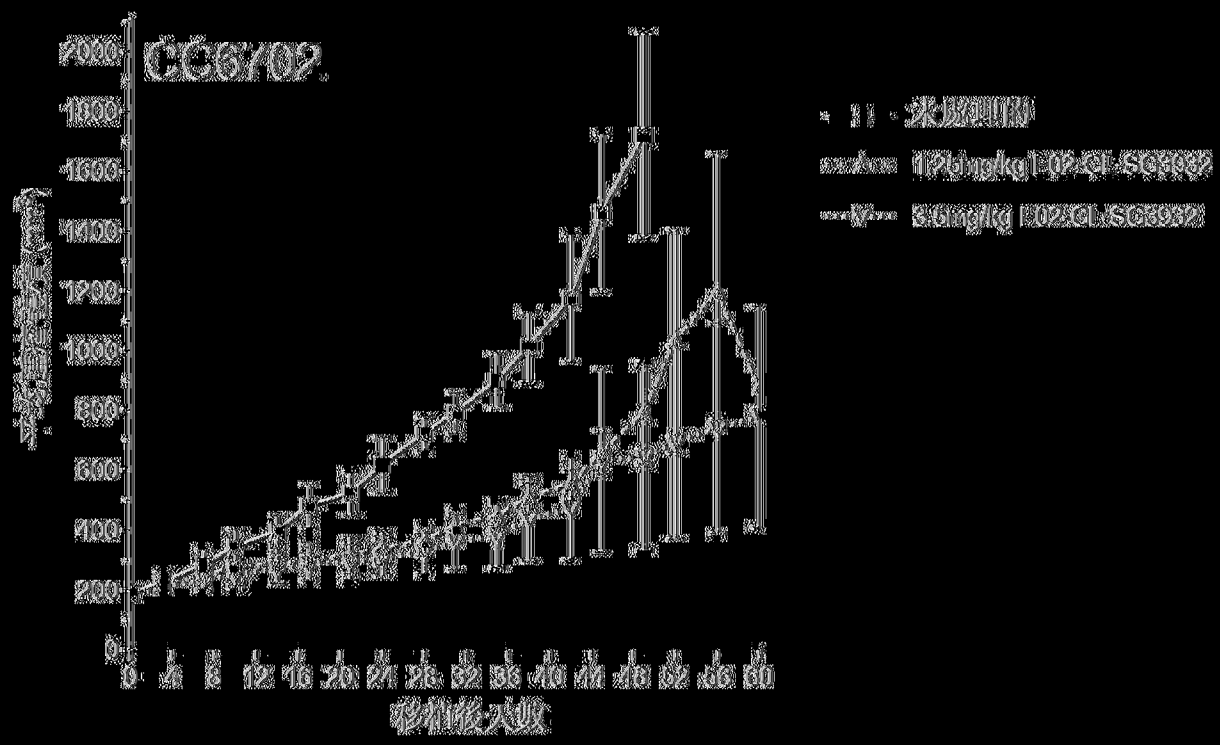
|(圖56F)|


CO6638
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg1 02-CL-SC3932
3.5mg/kg1 02-CL-SC3932

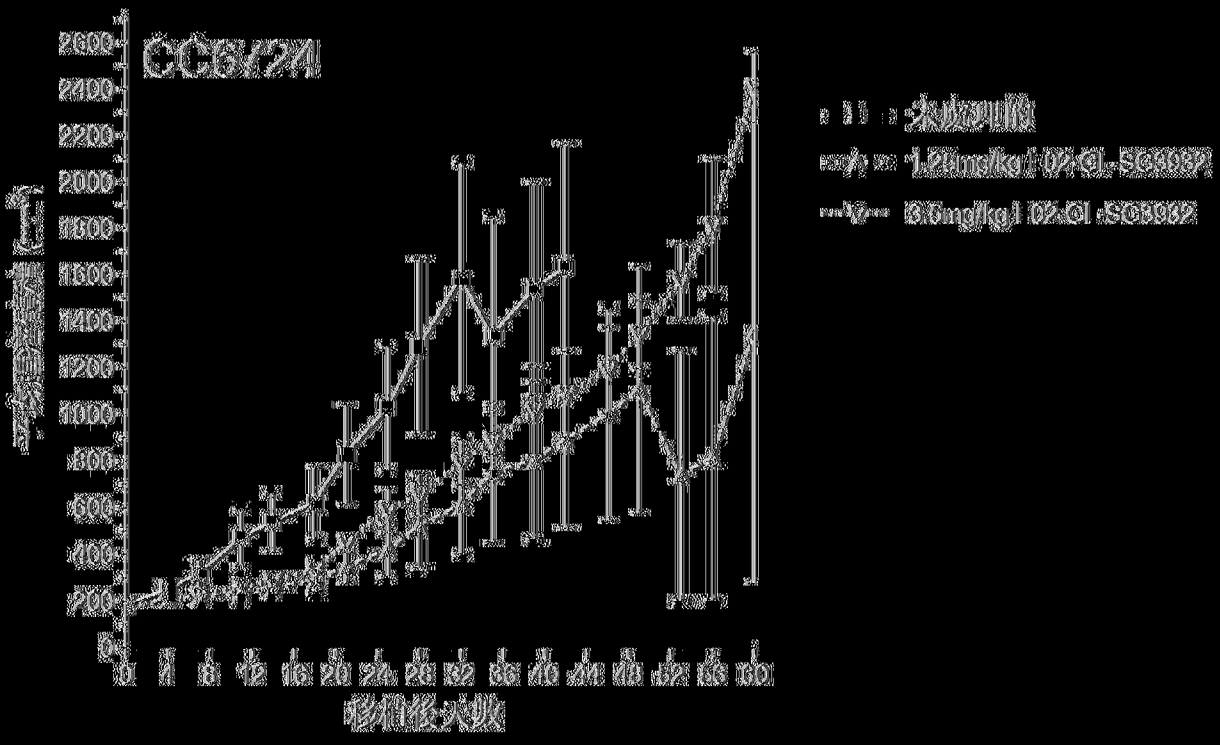
|(圖56G)|


CO6658
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg1 02-CL-SC3932
3.5mg/kg1 02-CL-SC3932

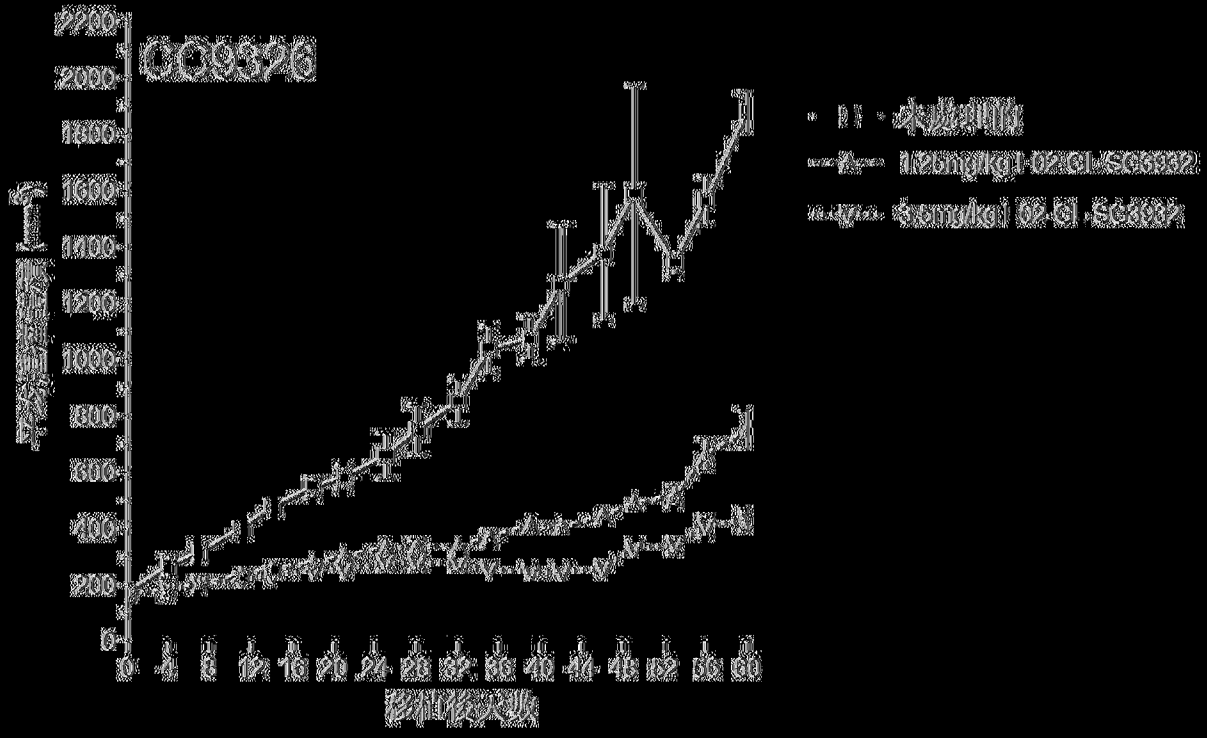
|(圖56H)|


CC6702
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SC3932

[圖56I]


CC6724
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
未處理的
1.25mg/kg I-02-Cl-SC3932
3.5mg/kg I-02-Cl-SC3932

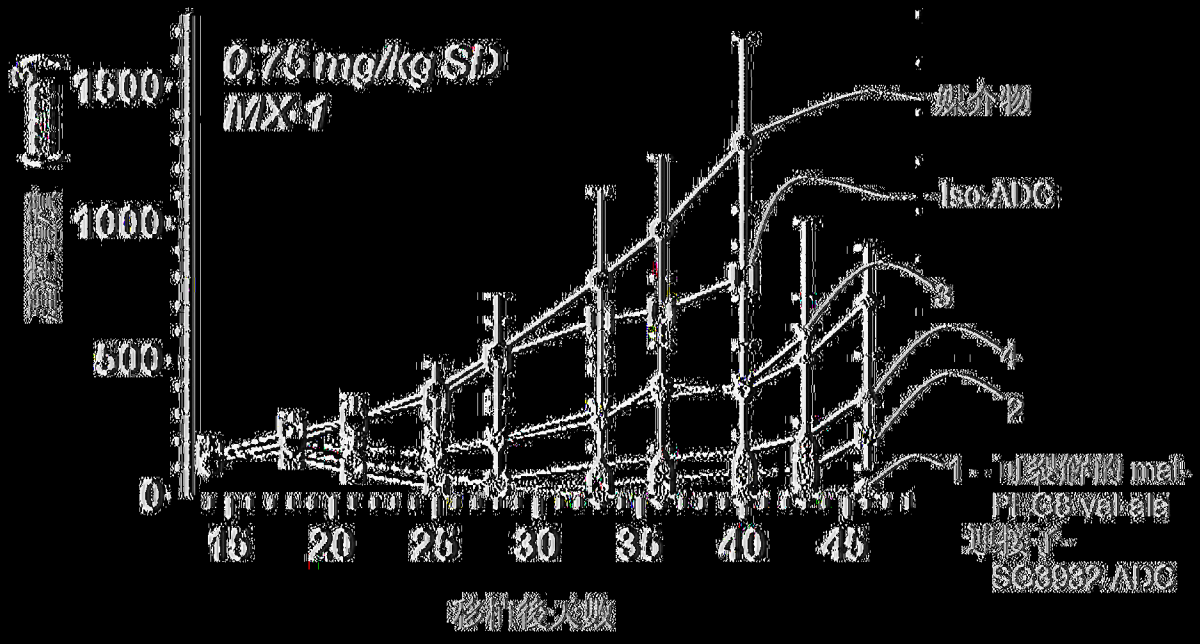
[圖56J]


CC9326
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52 56 60
移植後天數
1.25mg/kg 02-G1 SC6932
3.5mg/kg 02-G1 SC6932

|(圖56K)|

	ADC	連接子-酬頭
1	B02-INT-甘裂解酶mal-PEG8-val-ala連接子-SG3932	mp PEG8 Val-Ala SG3932
2	B02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	B02-INT-SG4057	mp PEG8 GGFG SG3932
4	B02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

[圖57A]



[圖57B]

目的：評估大鼠的嬉鬧與焦慮和運
研究設計：



20 mg/kg
60 mg/kg
Q3W x2 ly

一、生物試驗
所有主要器官和系統功能，正

每種以上的器官的光學組織學檢查，
用於代謝組學、組合體組學分析的樣本

在任一種最大劑量組織的發現結果的情況

發現結果	1	2 SG4010	3 SG4057	4 SG4052
10倍				
11倍				
12倍				
GIT				
13倍				
14倍				
15倍				

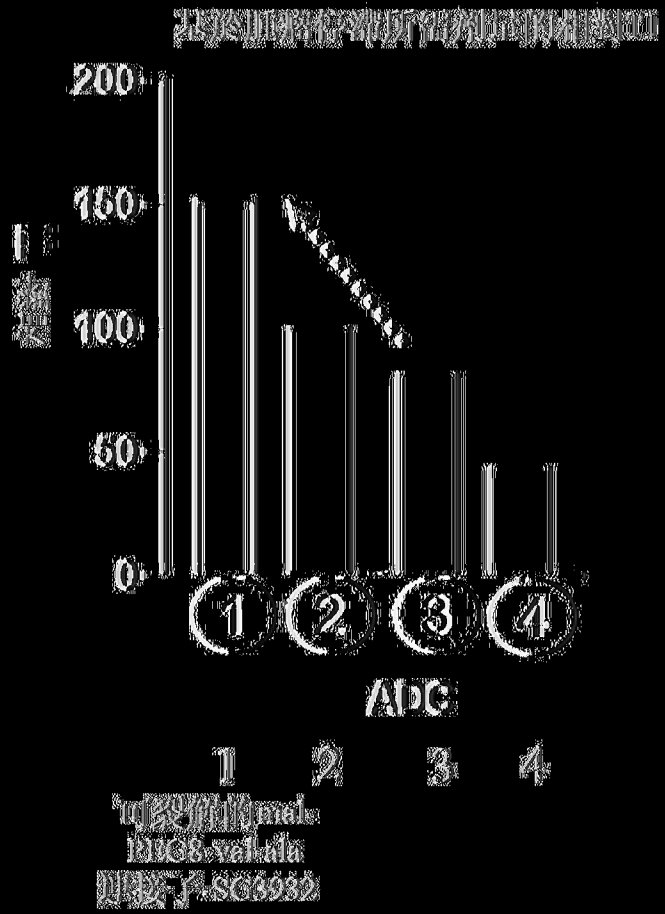
[illegible]表示注意到變化的嚴重程度相關於
特異之對照項目

[illegible] 可裂解的 mal-PT-C8-val-ala 連接了 SG3932

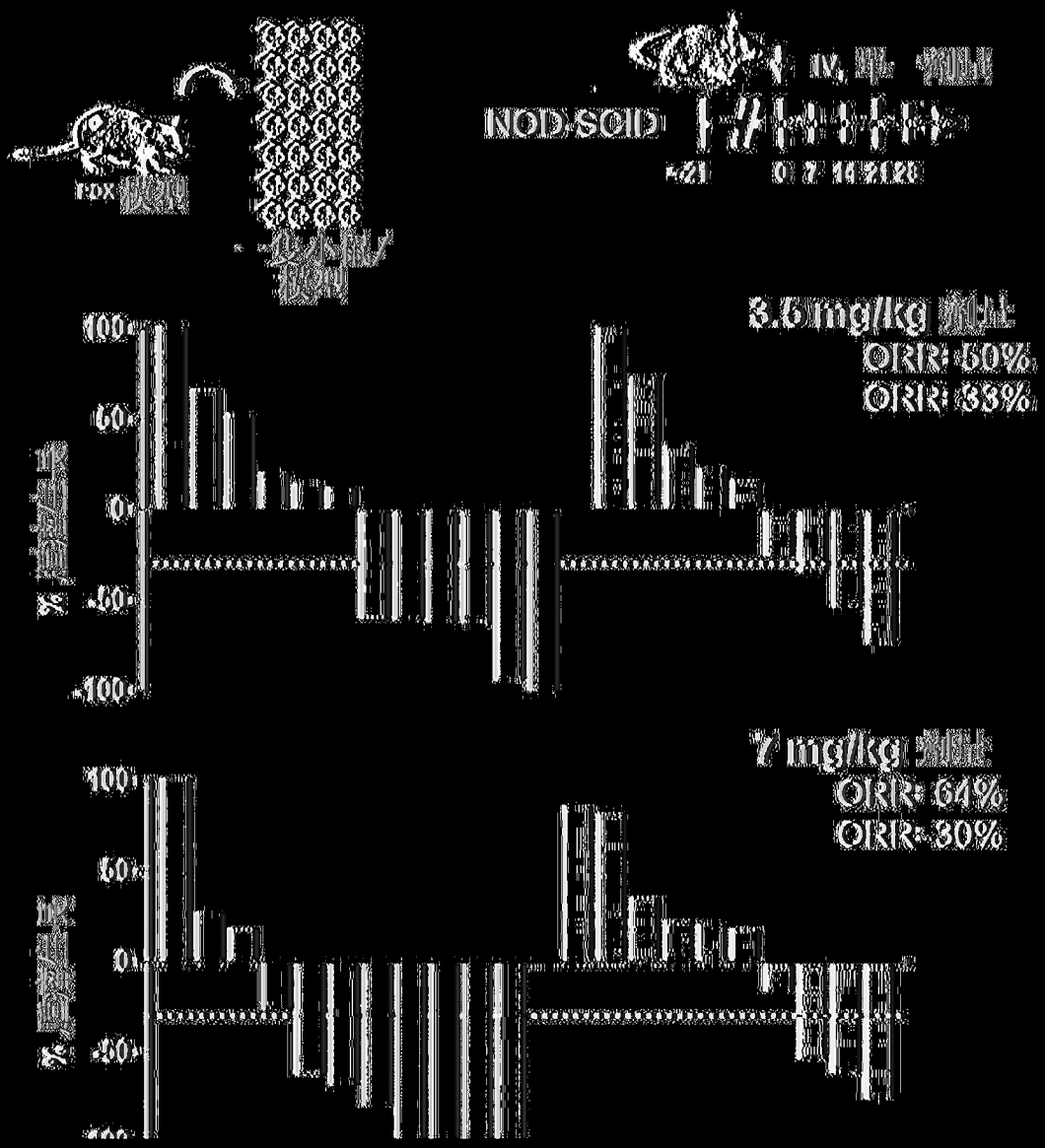
[圖58]

	ADC	連接子-胜肽
1	B02-INT-可裂解的mal-PBG8-val-ala連接子-SG3932	mp PBG8 Val-Ala SG3932
2	B02-INT-SG4010	mc Val-Ala SG3932
3	B02-INT-SG4057	mp PBG8 GGFG SG3932
4	B02-INT-SG4052	mc GGFG SG3932

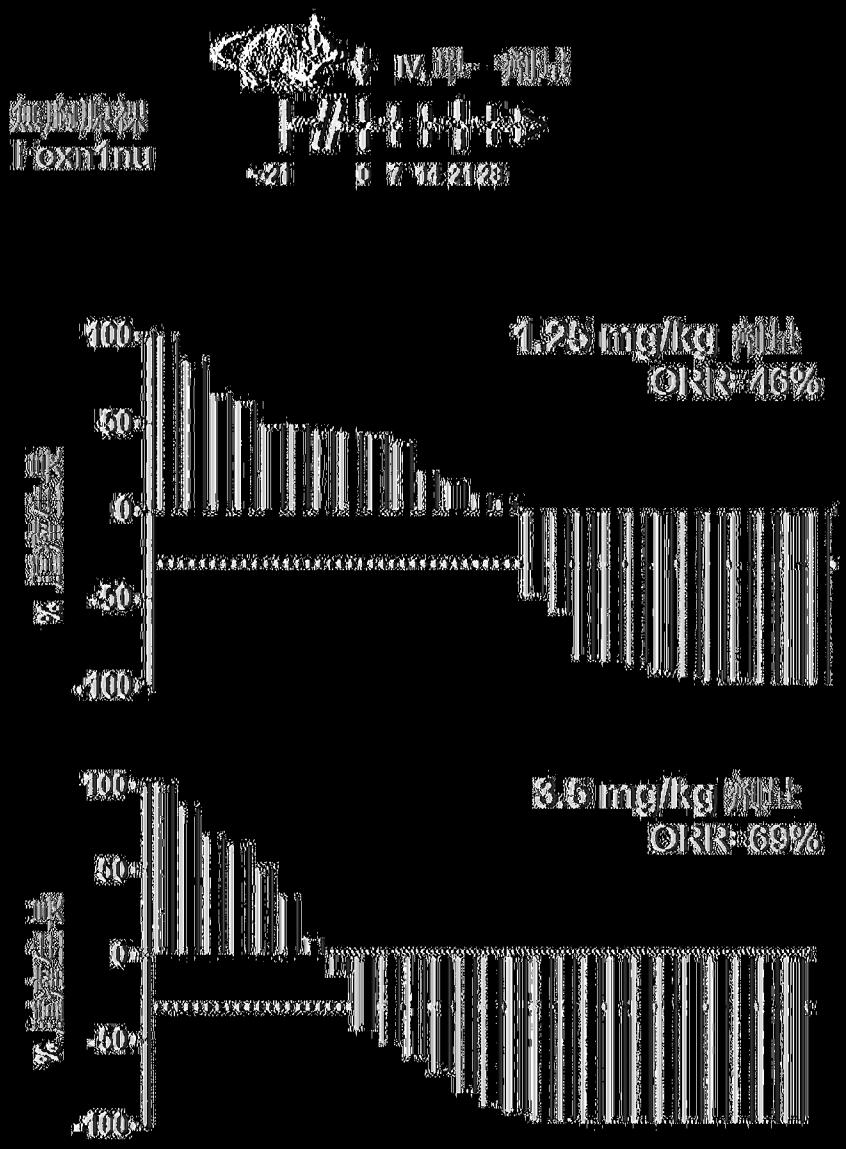
|(圖59A)|



|(圖59B)|


NOD-SCID
IV, 單 劑量
-21 0 7 14 21 28
3.5 mg/kg 劑量
ORR: 50%
ORR: 33%
7 mg/kg 劑量
ORR: 64%
ORR: 30%
100
50
0
-50
-100

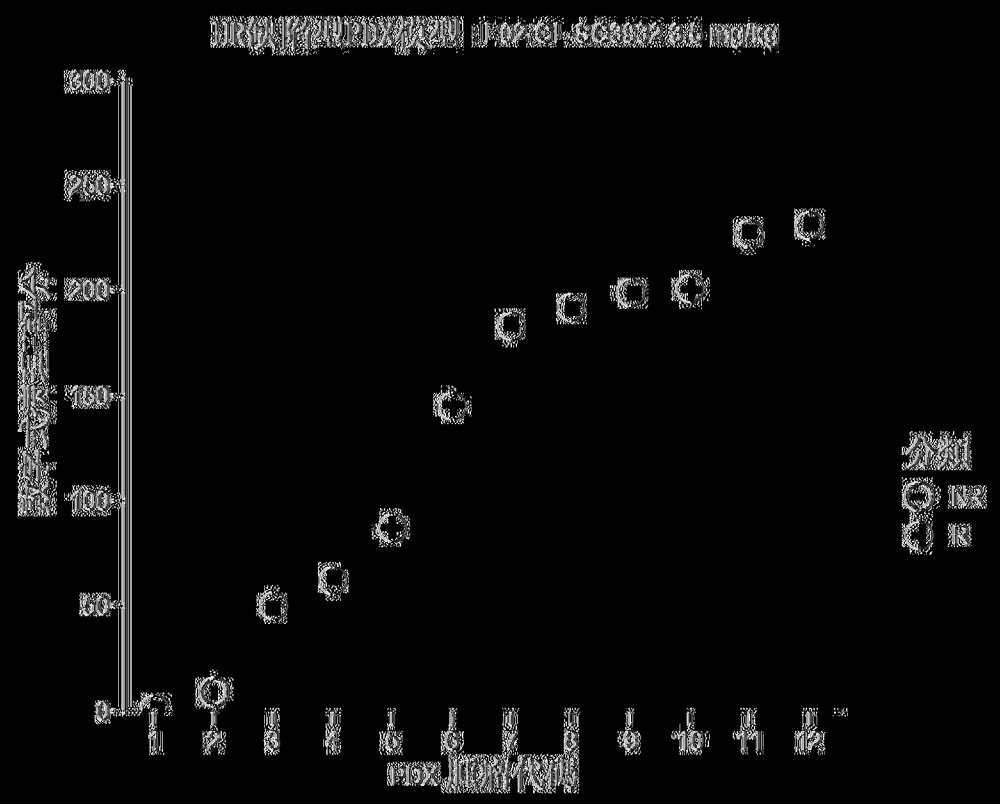
|(圖60A)|


血血脈裸
Foxn1nu
IV.單一劑量
-21
0
7
14
21
28
1.25 mg/kg 劑量
ORR: 46%
3.5 mg/kg 劑量
ORR: 69%
100
50
0
-50
-100

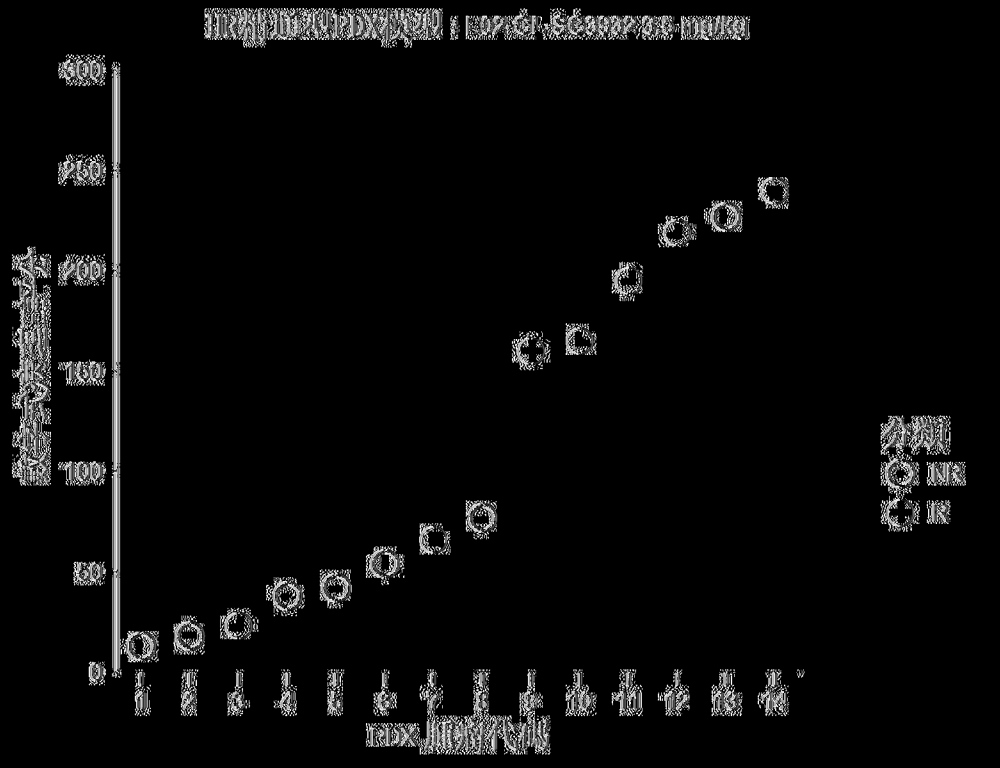
|(圖60B)|



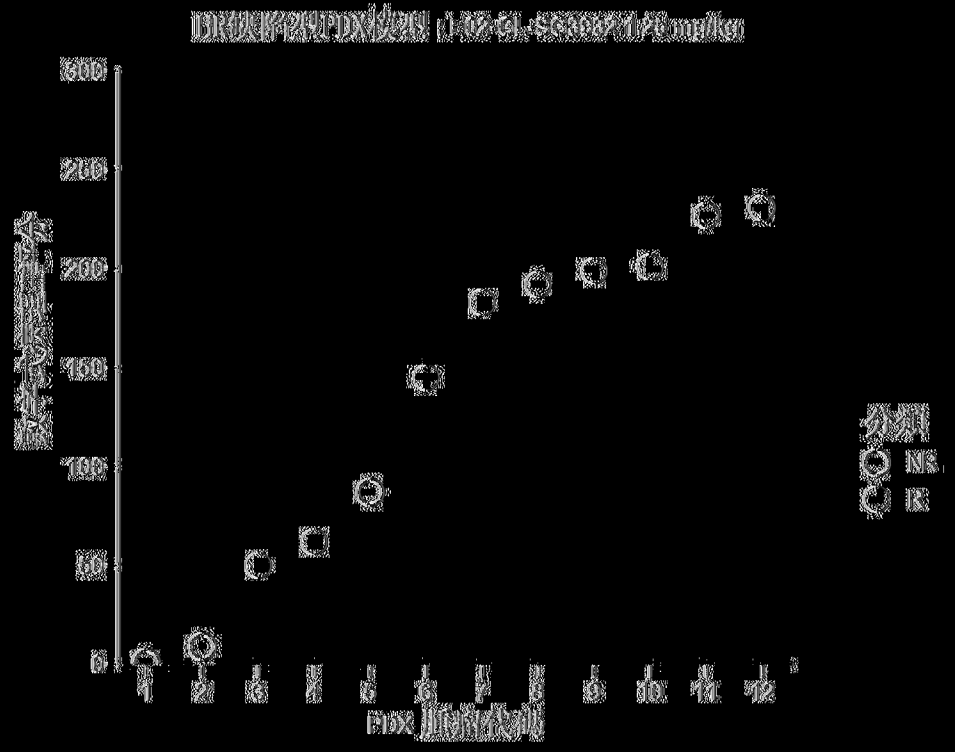
【圖6】


300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
分類
NR
IR

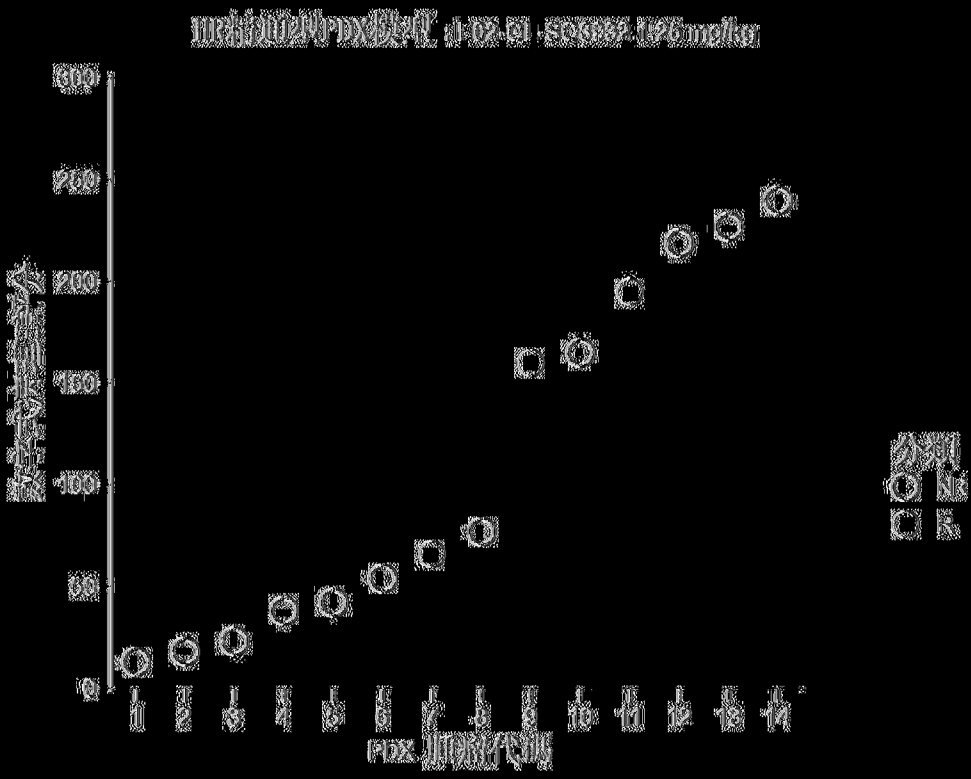
|(圖62A)|


300
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
分類
NR
IR

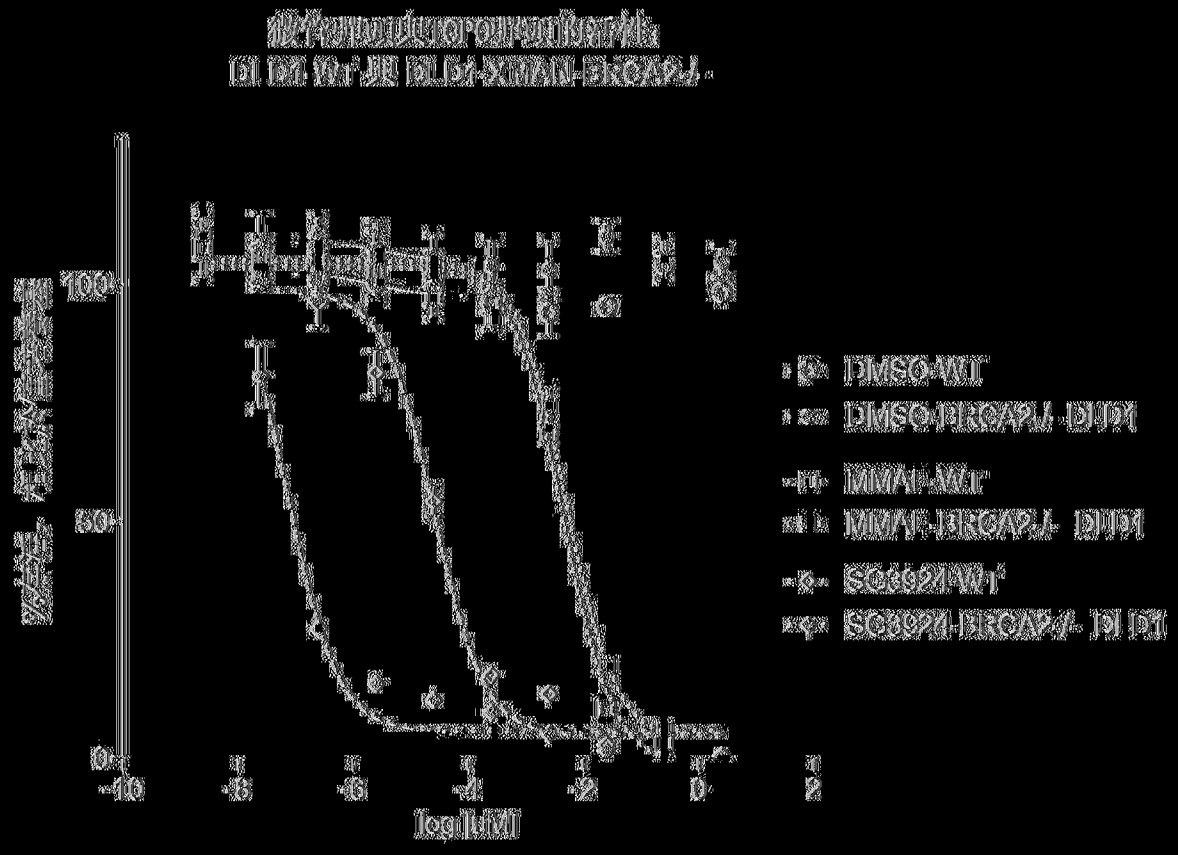
|(圖62B)|


HR抗胸腺型PDX模型 (1.02-5) SG6882-1.26mg/kg
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
PDX加藥代數
分類
NR
R

|(圖62C)|


HR抗胸腺型PDX模型 (1.02-5) SG6882-1.26mg/kg
600
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
PDX加藥代數
分類
NR
R

|(圖62D)|


微管抑制與Topoisomerase
DI D1 WT與 DI D1-XMAN-BRCA2-/-
100
50
0
-10
-8
-6
-4
-2
0
2
log[μM]
DMSO-WT
DMSO-BRCA2-/- DI D1
MMAF-WT
MMAF-BRCA2-/- DI D1
SC3924-WT
SC3924-BRCA2-/- DI D1

(圖63)