(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115894689 A
(43)申请公布日 2023.04.04

(21)申请号 202211197926.5

(22)申请日 2022.09.29

(66)本国优先权数据
202111158382.7 2021.09.30 CN

(71)申请人 百奥泰生物制药股份有限公司
地址 510530 广东省广州市广州高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第五层

(72)发明人 苏华飞 钟钰婷 梁金婵 梁世德 俞金泉 李胜峰

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 13/00(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 19/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

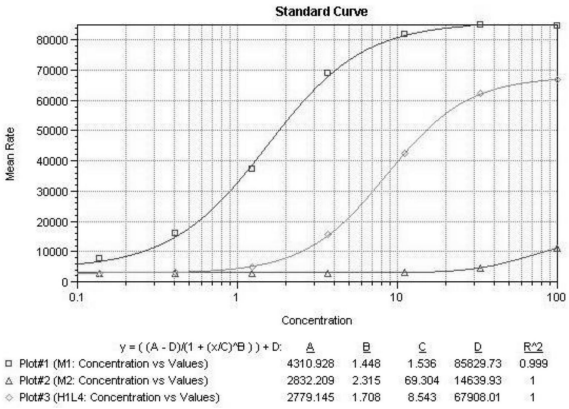
权利要求书4页 说明书44页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

抗B7-H3抗体及其应用

(57)摘要

本发明提供了抗B7-H3抗体及其应用，本发明的抗B7-H3抗体或抗原结合片段可以特异性结合B7-H3，具有高亲和力和很强的内化能力，可用于肿瘤(包括癌症和良性肿瘤)的诊断和/或治疗。



CN 115894689 A

1.一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段特异性结合B7-H3,并且包含(a)-(f)中的一个或多个氨基酸序列:

(a)VH CDR1,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;

(b)VH CDR2,其包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;

(c)VH CDR3,其包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

(d)VL CDR1,其包含如SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列;

(e)VL CDR2,其包含如SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列;

(f)VL CDR3,其包含如SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列。

2.如权利要求1所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2和如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3。

3.如权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:9-13中任一项所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:14-18中任一项所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:19-23中任一项所示的VL CDR3。

4.如权利要求1-3任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:9所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:14所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:19所示的VL CDR3;或

所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:10所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:15所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:20所示的VL CDR3;或

所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:11所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:16所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:21所示的VL CDR3;或

所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:12所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:17所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:22所示的VL CDR3;或

所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:13所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:18所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:23所示的VL CDR3。

5.如权利要求1-4任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24、35-38中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24、35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24、35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:25-29、39-41中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25-29、39-41中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25-29、39-41中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

6.一种抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列;或

所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

7.如权利要求1-6任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段为IgG同种型;或者,所述抗体或抗原结合片段为IgG1或IgG4同种型。

8.如权利要求1-7任一项所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区,所述重链恒定区包含如SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

所述轻链恒定区包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有至少80%或至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

9.一种抗体,其特征在于,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID

NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区;或

所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

10.一种生物材料,为:

一种多聚核苷酸,其特征在于,所述多聚核苷酸编码如权利要求1-8任一项所述的抗体或抗原结合片段或如权利要求9所述的抗体的部分或全部;或,

一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包含编码如权利要求1-8任一项所述的抗体或抗原结合片段或如权利要求9所述的抗体的部分或全部的多聚核苷酸;或,

一种细胞,其特征在于,所述细胞包含编码如权利要求1-8任一项所述的抗体或抗原结合片段或如权利要求9所述的抗体的部分或全部的多聚核苷酸。

11.一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含如权利要求1-8任一项所述的抗体或抗原结合片段、如权利要求9所述的抗体的部分或全部或如权利要求10所述的生物材料,以及药学上可接受的载体。

12.如权利要求1-8任一项所述的抗体或抗原结合片段、如权利要求9所述的抗体的部分或全部、如权利要求10所述的生物材料或如权利要求11所述的药物组合物在制备诊断和/或治疗疾病的药物中的应用;

或者,所述疾病选自肿瘤、呼吸系统疾病、皮肤和肌肉骨骼疾病、泌尿生殖系统疾病、神经系统疾病和消化系统疾病;或者,所述肿瘤为良性肿瘤或癌症;或者,所述肿瘤为血液肿瘤或实体瘤;或者,所述肿瘤为B7-H3表达阳性的肿瘤;或者,所述肿瘤选自黑色素瘤、肺癌

如非小细胞肺癌、结直肠癌、头颈癌、肾癌、前列腺癌如去势抵抗性前列腺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌如肝细胞癌、宫颈癌、卵巢癌如卵巢上皮癌、胶质瘤如小儿脑干胶质瘤、胰腺癌如胰腺导管癌、白血病、间皮瘤、鳞状细胞癌、神经母细胞瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、腹膜恶性肿瘤、肉瘤、脑癌、中枢神经系统肿瘤、脑转移瘤。

抗B7-H3抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,尤其涉及抗B7-H3抗体及其应用。

背景技术

[0002] B7-H3(B7 homolog 3protein)又名CD276,属于B7配体家族的I型跨膜糖蛋白。

[0003] 目前发现B7-H3有两种存在形式:2Ig-B7-H3和4Ig-B7-H3。2Ig-B7-H3表达于鼠与人的细胞中,其有细胞外的IgV-IgC结构;4Ig-B7-H3仅表达于人细胞中,由串联重复的IgV-IgC-IgV-IgC结构组成。人类B7-H3的主要存在形式为4IgB7-H3。

[0004] B7-H3在正常组织中的表达水平有限,但在多种人类晚期实体瘤中异常高表达,包括但不限于头颈癌、肾癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌、胃癌和肝癌。它的过度表达通常与患者较差的预后和较差的临床结果相关。因此,B7-H3被认为是某些肿瘤的诊断标志物,可作为抗肿瘤药物开发的有效的靶点。

发明内容

[0005] 本发明提供了抗B7-H3抗体或抗原结合片段,这些抗体或抗原结合片段可以特异性结合B7-H3。在一些实施方案中,所述抗B7-H3抗体或抗原结合片段具有高亲和力和强的内化能力。

[0006] 一些实施方案提供了抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段特异性结合B7-H3,并且包含(a)-(f)中的一个或多个氨基酸序列:

[0007] (a)VH CDR1,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;

[0008] (b)VH CDR2,其包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;

[0009] (c)VH CDR3,其包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;

[0010] (d)VL CDR1,其包含如SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;

[0011] (e)VL CDR2,其包含如SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;

[0012] (f)VL CDR3,其包含如SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成。

[0013] 在一些实施方案,所述抗体或抗原结合片段特异性结合B7-H3,并且包含:

[0014] (a)VH CDR1,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6所示的

氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0015] (b)VH CDR2,其包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0016] (c)VH CDR3,其包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成。

[0017] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2和如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3。

[0018] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合B7-H3,并且包含:

[0019] (d)VL CDR1,其包含如SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0020] (e)VL CDR2,其包含如SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0021] (f)VL CDR3,其包含如SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成。

[0022] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:9所示的VL CDR1,如SEQ ID NO:14所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:19所示的VL CDR3。

[0023] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:10所示的VL CDR1,如SEQ ID NO:15所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:20所示的VL CDR3。

[0024] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:11所示的VL CDR1,如SEQ ID NO:16所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:21所示的VL CDR3。

[0025] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:12所示的VL CDR1,如SEQ ID NO:17所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:22所示的VL CDR3。

[0026] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:13所示的VL CDR1,如SEQ ID NO:18所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:23所示的VL CDR3。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段特异性结合B7-H3,并且包含:

[0028] (a)VH CDR1,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0029] (b)VH CDR2,其包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0030] (c)VH CDR3,其包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0031] (d)VL CDR1,其包含如SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成;和

[0032] (e)VL CDR2,其包含如SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸

序列,或由其组成;和

[0033] (f)VL CDR3,其包含如SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个位点取代、缺失或插入的氨基酸序列,或由其组成。

[0034] 在一些实施方案中,所述取代为保守氨基酸取代。

[0035] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段特异性结合B7-H3,并且包含:

[0036] (a)VH CDR1,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列;和

[0037] (b)VH CDR2,其包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列;和

[0038] (c)VH CDR3,其包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;和

[0039] (d)VL CDR1,其包含如SEQ ID NO:9-13中任一项所示的氨基酸序列;和

[0040] (e)VL CDR2,其包含如SEQ ID NO:14-18中任一项所示的氨基酸序列;和

[0041] (f)VL CDR3,其包含如SEQ ID NO:19-23中任一项所示的氨基酸序列。

[0042] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:9所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:14所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:19所示的VL CDR3。

[0043] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:10所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:15所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:20所示的VL CDR3。

[0044] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:11所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:16所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:21所示的VL CDR3。

[0045] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:12所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:17所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:22所示的VL CDR3。

[0046] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:6所示的VH CDR1、如SEQ ID NO:7所示的VH CDR2、如SEQ ID NO:8所示的VH CDR3、如SEQ ID NO:13所示的VL CDR1、如SEQ ID NO:18所示的VL CDR2和如SEQ ID NO:23所示的VL CDR3。

[0047] VH CDR的氨基酸序列(Kabat编号)

[0048]

类型	氨基酸序列	序列号
VHCDR1	DYDIN	6
VHCDR2	WIFPGDDTTKYNEKFKG	7
VHCDR3	SPSFDY	8

[0049] VL CDR的氨基酸序列(Kabat编号)

[0050]

类型	氨基酸序列	序列号
VL CDR1	SASSTIGFMY	9
	KASQDINRFLS	10
	RASKSVSTSGYSYMH	11
	RATGNIHNYLA	12
	RASKNIYSFLG	13
VL CDR2	DTSKLAS	14
	RANRLRD	15
	LVSNLES	16
	SAKTLAD	17
	NAKTLAE	18

[0051]

VL CDR3	HQRSSYPT	19
	LQYDEFPPFT	20
	QHIRELT	21
	QHFWSIPWT	22
	QHHYGTPPYT	23

[0052] 在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区、轻链恒定区、Fc区或其组合。在一些实施方案中，轻链恒定区是κ或λ链恒定区。在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段是IgG、IgM、IgA、IgE或IgD其中一种同种型。在一些实施方案中，同种型是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段是鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

[0053] 在一些实施方案中，Fc是变体Fc区。在一些实施方案中，相对于亲本Fc区，变体Fc区具有一个或多个氨基酸修饰，如取代、缺失或插入。在一些实施方案中，相对于亲本Fc区活性，Fc区的氨基酸修饰改变了效应功能活性。在一些实施方案中，变体Fc区可以具有改变的(即，增加的或降低的)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体介导的细胞毒性(CDC)、吞噬作用、调理作用或细胞结合。在一些实施方案中，相对于亲本Fc区，Fc区氨基酸修饰可以改变变体Fc区对FcγR(Fcγ受体)的亲和力。在一些实施方案中，所述Fc区来源于IgG1或IgG4。在一些实施方案中，Fc区突变是N297A、L234A或L235A(Eu编号)。在一些实施方案中，Fc区突变是E345R或S440Y(Eu编号)。

[0054] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段为scFV、Fab、Fab'或$F(ab)_2$。在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段为单克隆抗体。

[0055] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24和35-38中任一项所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:24和35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80％或90％同一性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:24和35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列；和/或

[0056] 所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:25-29和39-41中任一项所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:25-29和39-41中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80％或90％同一性的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:25-29和39-41中任一项所示的氨基

酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0057] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

[0058] 所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:25-29中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25-29中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25-29中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0059] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列。

[0061] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

[0063] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列。

[0064] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:35-38中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

[0065] 所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:39-41中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:39-41中任一项所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:39-41中任一项所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0066] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列,所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

[0068] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:36

所示的氨基酸序列，所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列。

[0069] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列，所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

[0070] 在一些实施方案中，所述抗体或抗原结合片段的重链可变区包含如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列，所述抗体或抗原结合片段的轻链可变区包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

[0071] 可变区的氨基酸序列(Kabat编号)

[0072]

类型	氨基酸序列	序列号
VH	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFT**DYDIN**WVQQR PGQGLEWIG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**RATLTADKSSNTA YMQLNGLTSENSAVYFCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	24
	EVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKASGYTFT**DYDIN**WVRQM PGKGLEWMG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**QVTISADKSTNT AYLQWSSLKASDTAMYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	35
	EVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKASGYTFT**DYDIN**WVRQM PGKGLEWIG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**QVTLSADKSTNTA YMQWSSLKASDTAMYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	36
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**DYDIN**WVRQA PGKGLEWVG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**RFTISADKSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	37
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**DYDIN**WVRQ APGQRLEWIG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**RATLTADKSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	38
VL	QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTC**SASSTIGFMY**WYQQKPG TSPKRWIY**DTSKLAS**GVPARFSVSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYC**HQRSSYPT**FGGGTKLEIK	25
	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC**KASQDINRFLS**WFQQKP GKSPKTLIY**RANRLRD**GVPSRFSGNGSGQDYSLTISSLEYE DMGIYYC**LQYDEFPPFT**FGSGTKLEIK	26
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASKSVSTSGYSYMH**WN QQKPGQPPRLLIY**LVSNLES**GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPV EEEDAATYYC**QHIRELT**FGAGTKLELK	27
	DIQMTQSTASLSAFVGETVTITC**RATGNIHNYLA**WYHQKQ GKSPHLLVY**SAKTLAD**GVPSRFSGSGSGTQYSLQINSLHPE	28

[0073]

	DFGTYYC**QHFWSIPWT**FGGGTKLEIK	
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC**RASKNIYSFLG**WIQQRQG KSPQSLVY**NAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPED FGNYYC**QHHYGTPPYT**FGGGTKLEIK	29
	QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**SASSTIGFMY**WYQQKPGQ APRRWIY**DTSKLAS**GVPDRFSVSGSGTDYTLTISRLEPEDFA VYYC**HQRSSYPT**FGQGTKVEIK	39
	QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**SASSTIGFMY**WYQQKPGQ APRRWIY**DTSKLAS**GVPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFA VYYC**HQRSSYPT**FGQGTKVEIK	40
	QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSTIGFMY**WYQQKPGK APKRWIY**DTSKLAS**GVPSRFSVSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYC**HQRSSYPT**FGQGTKVEIK	41

[0074] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段的重链恒定区包含如SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列相比具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列;和/或

[0075] 所述抗体或抗原结合片段的轻链恒定区包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有至少80%或至少90%同一性的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有一个或多个保守氨基酸取代的氨基酸序列。

[0076] 在一些实施方案提供了特异性结合B7-H3的抗体,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0077] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0078] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0079] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0080] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重

链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0081] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0082] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0083] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0084] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0085] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的重链恒定区;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区和如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0086] 恒定区的氨基酸序列

[0087]

名称	氨基酸序列	序列号
IgG1重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH	32

[0088]

	EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
IgG4重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	33
轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	34

[0089] 在一些实施方案中,所述抗体的重链包含如SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列;所述抗体的轻链包含如SEQ ID NO:52所示的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段为单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多特异性抗体或抗原结合片段(例如双特异性抗体或抗原结合片段)。

[0091] 在一些实施方案中,所述抗体具有两条序列相同的重链和两条序列相同的轻链。在一些实施方案中,Fc区配对形成二硫键。

[0092] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段为分离的抗体或抗原结合片段。

[0093] 本发明还提供了编码所述抗体或抗原结合片段的多聚核苷酸。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸为分离的多聚核苷酸。在一些实施方案中,所述多聚核苷酸序列选自SEQ ID NO:49和51所示的核酸序列。

[0094] 本发明还提供了包含所述多聚核苷酸的表达载体。在一些实施方案中,包含所述多聚核苷酸的表达载体为核酸片段、质粒、噬菌体或病毒。在一些实施方案中,所述表达载体为分离的表达载体。

[0095] 本发明还提供了包含所述多聚核苷酸或表达载体的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞为分离的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞为CHO细胞、HEK293细胞(如HEK293F细胞)、BHK细胞、Cos1细胞、Cos7细胞、CV1细胞或鼠L细胞。

[0096] 本发明还提供了药物组合物,所述药物组合物包含所述抗体或抗原结合片段或生物材料,以及药学上可接受的载体。

[0097] 本发明还提供所述抗体或抗原结合片段、所述生物材料或所述药物组合物在制备诊断和/或治疗疾病的药物中的应用。在一些实施方案中,本发明提供所述抗体或抗原结合片段、所述生物材料或所述药物组合物在诊断和/或治疗疾病中的应用。在一些实施方案中,本发明提供诊断和/或治疗疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者给予有效剂量的

所述抗体或抗原结合片段、所述生物材料或所述药物组合物。

[0098] 在一些实施方案中，所述药物为抑制B7-H3活性的药物。在一些实施方案中，所述疾病选自肿瘤、呼吸系统疾病、皮肤和肌肉骨骼疾病、泌尿生殖系统疾病、神经系统疾病和消化系统疾病。在一些实施方案中，所述肿瘤为良性肿瘤或癌症。在一些实施方案中，所述肿瘤为血液肿瘤或实体瘤。在一些实施方案中，所述疾病包括B7-H3表达阳性的肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自黑色素瘤、肺癌(例如，小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、卵巢癌(例如，卵巢上皮癌)、胶质瘤(例如，胶质母细胞瘤和小儿脑干胶质瘤)、前列腺癌(例如，去势抵抗性前列腺癌)、胰腺癌(例如，胰腺导管癌)、头颈癌、白血病(例如，急性髓性白血病(AML))、宫颈癌、肾癌、鳞状细胞肿瘤、鳞状细胞癌(例如鳞状肺癌或鳞状头颈癌)、结直肠癌、胃癌、肝癌、间皮瘤、肛门癌、皮肤癌、外阴癌、神经母细胞瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、腹膜恶性肿瘤、肉瘤、脑癌、中枢神经系统肿瘤、脑转移瘤。

[0099] 本发明还提供了诊断方法和用途。在一些实施方案中，提供了检测样品中B7-H3表达的方法，使样品与所述抗体或抗原结合片段进行接触，使得所述抗体或抗原结合片段结合B7-H3，并检测其结合，即样品中B7-H3的含量。在一些实施方案中，提供了所述抗体或抗原结合片段在制备用于诊断或预后肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)试剂盒中的应用。在一些实施方案中，提供了一种包含所述抗体或抗原结合片段的诊断或预后试剂盒。

[0100] 本发明提供抗B7-H3抗体或抗原结合片段及其应用，本发明的抗B7-H3抗体或抗原结合片段可以特异性结合B7-H3，具有高特异性、高亲和力以及很强的内化能力，可用于ADC药物开发有望获得更佳的抗肿瘤活性和功效，也可用于肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)的诊断和预后。

附图说明

[0101] 图1显示了嵌合抗体与MDA-MB-468细胞的结合能力；其中，H1L4为对照抗体M30-H1-L4。

[0102] 图2显示了嵌合抗体与Lag3-CHO细胞、VISTA-CHO细胞、Tim3-CHO细胞和Raji细胞的结合能力。

[0103] 图3显示了人源化抗体与hB7-H3-Fc的结合能力；其中，H1L4表示对照抗体M30-H1-L4。

[0104] 图4显示了人源化抗体与MDA-MB-468细胞的结合能力；其中，H1L4表示对照抗体M30-H1-L4。

[0105] 图5显示了人源化抗体与VISTA-CHO细胞、Tim3-CHO细胞和Lag3-CHO细胞的结合能力；其中，H1L4表示对照抗体M30-H1-L4。

具体实施方式

[0106] 除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0107] 定义

[0108] 应当注意的是，术语“一种”实体是指一种或多种该实体，例如“一种抗体”应当被

理解为一种或多种抗体，因此，术语“一种”(或“一个”)、“一种或多种”和“至少一种”可以在本文中互换使用。

[0109] 本文所用的术语“包含”或“包括”意味着抗体、组合物或方法等包括所列举的元素，例如组份或步骤，但不排除其它。“基本上由……组成”意味着抗体、组合物或方法等排除对组合的特征有根本影响的其它元素，但不排除对抗体、组合物或方法等无本质上影响的元素。“由……组成”意味着排除未特别列举的元素。

[0110] 术语“多肽”旨在涵盖单数的“多肽”以及复数的“多肽”，并且是指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的氨基酸单体形成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何单条链或多条链，并且不涉及产物的特定长度。因此，“多肽”的定义中包括肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或多个氨基酸链的任何其他术语，并且术语“多肽”可以用来代替上述任何一个术语，或者与上述任何一个术语交替使用。术语“多肽”也意在指多肽表达后修饰的产物，包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割或非天然发生的氨基酸修饰。多肽可以源自天然生物来源或通过重组技术产生，但其不必从指定的核酸序列翻译所得，它可能以包括化学合成的任何方式产生。

[0111] “氨基酸”是指既含氨基又含羧基的有机化合物，比如α-氨基酸，其可直接或以前体的形式由核酸编码。单个氨基酸由三个核苷酸(所谓的密码子或碱基三联体)组成的核酸编码。每一个氨基酸由至少一个密码子编码。相同氨基酸由不同密码子编码称为“遗传密码的简并性”。氨基酸包括天然氨基酸和非天然氨基酸。

[0112] 如本文所用，二十种常规氨基酸及其缩写遵循常规用法。二十种常规氨基酸的立体异构体(例如，D-氨基酸)、非天然氨基酸(诸如α-、α-二取代氨基酸)、N-烷基氨基酸、乳酸及其它非常规氨基酸也可为适用于本公开多肽的组分。非常规氨基酸的示例包括：4-羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸盐、ε-N,N,N-三甲基赖氨酸、ε-N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟赖氨酰、σ-N-甲基精氨酸及其它类似的氨基酸和亚氨基酸(例如4-羟脯氨酸)。在本文所用的多肽表示方法中，左手方向为氨基末端方向，并且右手方向为羧基末端方向，与标准用法和惯例一致。常规(或天然)氨基酸包括丙氨酸(三字母代码：Ala，一字母代码：A)、精氨酸(Arg，R)、天冬酰胺(Asn，N)、天冬氨酸(Asp，D)、半胱氨酸(Cys，C)、谷氨酰胺(Gln，Q)、谷氨酸(Glu，E)、甘氨酸(Gly，G)、组氨酸(His，H)、异亮氨酸(Ile，I)、亮氨酸(Leu，L)、赖氨酸(Lys，K)、甲硫氨酸(Met，M)、苯丙氨酸(Phe，F)、脯氨酸(Pro，P)、丝氨酸(Ser，S)、苏氨酸(Thr，T)、色氨酸(Trp，W)、酪氨酸(Tyr，Y)和缬氨酸(Val，V)。

[0113] 抗体或免疫球蛋白分子的氨基酸序列的微小变化都涵盖在本公开之内，条件是氨基酸序列的同一性保持至少75％、如至少80％、90％、95％并又如99％。在一些实施方案中，变化为保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是在其侧链中相关的氨基酸家族内发生的取代。基因编码的氨基酸大致分以下类：(1)酸性氨基酸为天冬氨酸盐、谷氨酸盐；(2)碱性氨基酸为赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3)非极性氨基酸为丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)；以及(4)无电荷的极性氨基酸为甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。其它家族的氨基酸包括(i)脂肪族-羟基家族的丝氨酸和苏氨酸；(ii)含酰胺家族的天冬酰胺和谷氨酰胺；(iii)脂肪族家族的丙氨酸、缬氨酸、

亮氨酸和异亮氨酸;以及(iv)芳族家族的苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。在一些实施方案中,保守氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸、以及天冬酰胺-谷氨酰胺。例如,可以合理地预测用异亮氨酸或缬氨酸单独的置换亮氨酸,用谷氨酸盐置换天冬氨酸盐,用丝氨酸置换苏氨酸,或用一个结构相关的氨基酸类似的置换一个氨基酸,且对所得分子的结合或特性不会有重要影响,特别是该置换不涉及结合位点内的氨基酸。氨基酸改变是否产生功能性肽可以容易地通过测定多肽衍生物的比活性来确定。抗体或免疫球蛋白分子的片段或类似物可由本领域普通技术人员容易地制备。

[0114] 在一些实施方案中,氨基酸取代具有如下效果:(1)降低对蛋白水解作用的敏感性,(2)降低对氧化作用的敏感性,(3)改变用于形成蛋白复合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,和(5)赋予或改进此类类似物的其它物理化学或功能特性。类似物可包括序列不同于天然存在的肽序列的各种突变蛋白。例如,可在天然存在的序列(优选在形成分子间接触的结构域之外的多肽部分中)中进行单个或多个氨基酸取代(优选保守氨基酸取代)。保守氨基酸取代不应当显著改变亲本序列的结构特性(例如,置换的氨基酸不应当趋于破坏亲本序列中存在的螺旋结构,或破坏表征亲本序列的其它类型二级结构)。

[0115] VL、VH的保守氨基酸取代的氨基酸数目为约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约8个、约9个、约10个、约11个、约13个、约14个、约15个保守氨基酸取代,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括端值)或其中任何值。重链恒定区、轻链恒定区、重链或轻链的保守氨基酸取代的氨基酸数目为约1个、约2个、约3个、约4个、约5个、约6个、约8个、约9个、约10个、约11个、约13个、约14个、约15个、约18个、约19个、约22个、约24个、约25个、约29个、约31个、约35个、约38个、约41个、约45个保守氨基酸取代,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括端值)或其中任何值。

[0116] 本发明中关于细胞、核酸、多肽、抗体等所使用的术语“分离的”,例如“分离的”DNA、RNA、多肽、抗体是指分别于细胞天然环境中的其它组分如DNA或RNA中的一种或多种所分离的分子。本发明使用的术语“分离的”还指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或细胞培养基的核酸或肽,或化学合成时的化学前体或其他化学品。此外,“分离的核酸”意在包括不以天然状态存在的核酸片段,并且不会以天然状态存在。术语“分离的”在本发明中也用于指从其他细胞蛋白质或组织分离的细胞或多肽。分离的多肽意在包括纯化的和重组的多肽。分离的多肽、抗体等通常通过至少一个纯化步骤制备。在一些实施方案中,分离的核酸、多肽、抗体等的纯度至少为约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%,或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括端值)或其中任何值。

[0117] 术语“编码”应用于多聚核苷酸时,是指被称为“编码”多肽的多聚核苷酸,在其天然状态或当通过本领域技术人员公知的方法操作时,经转录和/或翻译可以产生该多肽和/或其片段。

[0118] 术语“重组”涉及多肽或多聚核苷酸,意指天然不存在的多肽或多聚核苷酸的形式,不受限制的实施例可以通过组合产生通常并不存在的多聚核苷酸或多肽。

[0119] “同源性”、“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较每个序列中可以比对的位置来确定同源性或同一性。当被比较的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则分子在该位置是同源的或同一的。序列之间的同

源程度是由序列共有的匹配或同源位置的数目组成的一个函数。“至少80％同一性”为约80％同一性、约81％同一性、约82％同一性、约83％同一性、约85％同一性、约86％同一性、约87％同一性、约88％同一性、约90％同一性、约91％同一性、约92％同一性、约94％同一性、约95％同一性、约98％同一性、约99％同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括端值)或其中任何值。“至少90％同一性”为约90％同一性、约91％同一性、约92％同一性、约93％同一性、约95％同一性、约96％同一性、约97％同一性、约98％同一性、约99％同一性，或这些数值中的任何两个值之间的范围(包括端值)或其中任何值。

[0120] 多聚核苷酸是由四个碱基的特定序列组成:腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)，或当多聚核苷酸是RNA时胸腺嘧啶换为尿嘧啶(U)。“多聚核苷酸序列”可以以多聚核苷酸分子的字母表示。该字母表示可以被输入到具有中央处理单元的计算机中的数据库中，并用于生物信息学应用，例如用于功能基因组学和同源性搜索。

[0121] 术语“多核苷酸”、“多聚核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用，是指任何长度的核苷酸的聚合形式，无论是脱氧核糖核苷酸还是核糖核苷酸或其类似物。多聚核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是不受限制的多聚核苷酸的实施例:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多聚核苷酸、分支的多聚核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多聚核苷酸可以包含修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在该修饰，则对核苷酸的结构修饰可以在组装多聚核苷酸之前或之后进行。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。聚合后可以进一步修饰多聚核苷酸，例如通过与标记组分缀合。这个术语也指双链和单链分子。除另有说明或要求外，本公开的任何多聚核苷酸的实施例包括双链形式和已知或预测构成双链形式的两种可互补单链形式中的每一种。

[0122] 核酸或多聚核苷酸序列(或多肽或抗体序列)与另一序列有具有一定百分比(例如90％、95％、98％或者99％)的“同一性或序列同一性”是指当序列比对时，所比较的两个序列中该百分比的碱基(或氨基酸)相同。可以使用目测或本领域已知的软件程序来确定该比对和同一性百分比或序列同一性，比如Ausubel et al.eds.(2007)在Current Protocols in Molecular Biology中所述的软件程序。优选使用默认参数进行比对。其中一种比对程序是使用默认参数的BLAST，例如BLASTN和BLASTP，两者使用下列默认参数:Geneticcode＝standard;filter＝none;strand＝both;cutoff＝60;expect＝10;Matrix＝BLOSUM62;Descriptions＝50sequences;sortby＝HIGHSCORE;Databases＝non-redundant;GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBankCDStranslations+SwissProtein+SPupdate+PIR。生物学上等同的多聚核苷酸是具有上述指定百分比的同一性并编码具有相同或相似生物学活性的多肽的多聚核苷酸。

[0123] “抗体”、“抗原结合片段”是指特异性识别和结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整的抗体及其任何抗原结合片段或其单链。因此术语“抗体”包括分子中含有具有与抗原结合的生物学活性的免疫球蛋白分子的至少一部分的任何蛋白质或肽。抗体和抗原结合片段包括但不局限重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)、重链恒定区(CH)、轻链恒定区(CL)、框架区(FR)或其任何部分，或结合蛋白的至少一部分。CDR区包括轻链可变区的CDR区(VLCDR1-3)和重链可变区的CDR区(VH

CDR1-3)。抗体或抗原结合片段可以特异性识别和结合一个或多个(如两个)抗原的多肽或多肽复合物。特异性识别和结合多个(如两个)抗原的抗体或抗原结合片段可以被称为多特异性(如双特异性)抗体或抗原结合片段。

[0124] 术语“抗体片段”或“抗原结合片段”指抗体的一部分,本发明抗体片段的组成形式可类似于单特异性抗体片段中的$F(ab')_2$、$F(ab)_2$、Fab'、Fab、Fv、scFv等。不管其结构如何,抗体片段与被完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜像异构体和双价抗体。术语“抗原结合片段”还包括通过与特定抗原结合形成复合物起抗体作用的任何合成或基因工程蛋白质。

[0125] “单链可变片段”或“scFv”是指免疫球蛋白的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的融合蛋白。在一些方面,这些区域与约10个至约25个氨基酸的短接头肽连接。接头可以富含甘氨酸以增加柔韧性,以及富含丝氨酸或苏氨酸以增加溶解性,并且可以连接VH的N端和VL的C端,反之亦然。尽管该蛋白质被除去了恒定区和引入了接头,但其保留了原始免疫球蛋白的特异性。ScFv分子通常是本领域中已知的,例如在美国专利5,892,019中有相关描述。

[0126] 术语“抗体”包括可以在生物化学上区分的各种广泛种类的多肽。本领域技术人员将会理解,重链的类别包括gamma、mu、alpha、delta或epsilon(γ、μ、α、δ、ε),其中还有一些亚类(例如γ1-γ4)。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等已被充分表征并且赋予的功能特异性也已知。所有的免疫球蛋白种类都在本发明公开的保护范围内。在一些实施方案中,免疫球蛋白分子为IgG种类。两条重链和两条轻链通过二硫键以“Y”构型连接,其中轻链从“Y”口开始并延续通过可变区包围重链。

[0127] 本发明公开的抗体、抗原结合片段或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、全人源、人源化、灵长类化、嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段(例如类Fab、类Fab'和类$F(ab')_2$)、类单链Fvs(scFv)。

[0128] 轻链可以分为kappa(κ)或lambda(λ)。每个重链可以与κ或λ轻链结合。一般来说,当由杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞生产免疫球蛋白时,其轻链和重链通过共价键结合,两条重链的“尾巴”部分通过共价二硫键或非共价键结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉状末端的N末端延伸至每条链底部的C末端。免疫球蛋白κ轻链可变区为V_κ;免疫球蛋白λ轻链可变区为V_λ。

[0129] 术语“恒定的”和“可变的”根据功能被使用。轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)决定了抗原识别和特异性。轻链恒定区(CL)和重链恒定区(CH)赋予重要的生物学性质,如分泌、经胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区的编号随着它们变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N端部分是可变区,C端部分是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

[0130] 在天然存在的抗体中,假设抗体在含水环境中呈现其三维构型时,存在于每个抗原结合域中的六个“互补决定区”或“CDR”是形成抗原结合结构域的短的、非连续的与抗原特异性结合的氨基酸序列。抗原结合结构域中被称为“框架”区域的剩余其它氨基酸显示出较小的分子间可变性。框架区大部分采用β-折叠构象,CDR形成与之连接的环状结构,或在某些情况下形成β折叠结构的一部分。因此,框架区通过形成支架从而通过链间非共价相互

作用使CDR定位在正确的方位上。具有特定位置的CDR的抗原结合域形成了与抗原上的表位互补的表面，该互补表面促进抗体和其抗原表位的非共价结合。对于给定的重链或轻链可变区，本领域普通技术人员都可以通过已知方法鉴定出包含CDR和框架区的氨基酸。

[0131] 如本文使用的，术语“CDR”是指在抗体可变区内的互补决定区。重链及轻链的可变区中各自存在三个CDR，针对各可变区，命名为CDR1、CDR2及CDR3(或具体地，VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、和VL CDR3)。同一抗体的可变区的CDR的边界，根据不同的指派系统，可能有所差异。因此，在涉及用本发明定义的具体CDR序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体：其可变区序列包含本发明的CDR序列，但是由于应用了不同的方案而导致其所声称的CDR边界与本发明所定义的具体CDR边界不同。根据Kabat和Chothia定义的CDR包括相互比较时的氨基酸残基的重叠或子集。尽管如此，应用任一定义来指代抗体或其变体的CDR都在本发明范围内。包含特定CDR的确切残基编号将根据CDR的序列和大小而变化。本领域技术人员通常可以根据抗体的可变区氨基酸序列确定出CDR包含哪些特定的残基。

[0132] 如本文使用的，术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR后剩余的序列。因为CDR序列的精确限定可借由不同系统确定，所以框架序列的含义相对应地需要不同解释。六个CDR(轻链的CDR1、CDR2及CDR3及重链的CDR1、CDR2及CDR3)将轻链及重链上的框架区在各链上分成四个子区(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位于FR1与FR2之间，CDR2位于FR2与FR3之间，CDR3位于FR3与FR4之间。在不指定具体子区为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下，如借由其他所提及的框架区表示单一天然产生的免疫球蛋白链的可变区内的组合的FR。如本文所用，FR表示四个子区之一，且FRs表示构成框架区的四个子区中的两者或两者以上。

[0133] 人源化抗体的框架区及CDR区不必准确对应于亲本序列，例如供体抗体CDR或共有框架可通过至少一个氨基酸残基的取代、插入和/或缺失而突变诱发，使得该位点的CDR或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。通常，至少80％、至少85％、更至少90％或至少95％的人源化抗体残基将对应于亲本FR及CDR序列的那些残基。如本文使用的，术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文使用的，术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最频繁出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列。在免疫球蛋白家族中，共有序列中的各位置由该家族中最频繁出现于该位置的氨基酸占据。若两个氨基酸同等频繁地出现，则共有序列中可包括任一个。

[0134] 在本领域中使用和/或接受的术语有两个或多个定义的情况下，除非明确地对立指出，否则本文使用的术语的定义包括所有这些含义。一个具体的例子是使用“互补决定区”(“CDR”)一词来描述在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续的抗原结合位点。

[0135] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的可变区序列的编号系统。本领域普通技术人员可以不依赖于序列本身以外的其他实验数据将该“Kabat编号”系统应用到任何可变区序列。“Kabat编号”是指由Kabat et al.,U.S.Dept.of Health and Human Services在“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)提出的编号系统。抗体还可以用EU或Chothia编号系统。

[0136] 本发明公开的抗体可以来源于任何动物，包括但不限于鱼类、鸟类和哺乳动物。较佳地，抗体是人源、鼠源、驴源、兔源、山羊源、骆驼源、美洲驼源、马源或鸡源抗体。在另一实施方案中，可变区可以是软骨鱼纲(condricthoid)来源(例如来自鲨鱼)。

[0137] “重链恒定区”包括CH1结构域、铰链(例如上、中和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域,或变体或片段中的至少一种。抗体的重链恒定区可以来源于不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链恒定区可以包括源自IgG1分子的CH1结构域和源自IgG3分子的铰链区。在另一实施方案中,重链恒定区可以包括部分源自IgG1分子和部分源自IgG3分子的铰链区。在另一实施方案中,部分重链可以包括部分源自IgG1分子和部分源自IgG4分子的嵌合铰链区。

[0138] “轻链恒定区”包括来自抗体轻链的一部分氨基酸序列。较佳地,轻链恒定区包含恒定κ结构域或恒定λ结构域中的至少一个。“轻链-重链对”是指可通过轻链的CL结构域和重链的CH1结构域之间的二硫键形成二聚体的轻链和重链的集合。

[0139] “VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域。“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一个恒定区。CH2结构域不与其它结构域紧密配对,而是在完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间插入两个N-连接的分支碳水化合物链。CH3结构域从CH2结构域开始延伸到IgG分子的C-末端,大约包含108个残基。“铰链区”包括连接CH1结构域和CH2结构域的部分重链区域。所述铰链区包含约25个残基并且是有韧性的,从而使得两个N端抗原结合区能够独立移动。铰链区可以被细分为三个不同的结构域:上、中和下铰链结构域。

[0140] “二硫键”指两个硫原子之间形成的共价键。半胱氨酸的硫醇基团可以与第二个硫醇基团形成二硫键或桥接。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1和CL区通过二硫键连接。

[0141] “嵌合抗体”指其可变区从第一个物种中获得或衍生,而其恒定区(可以是完整的、部分的或修饰过的)来源于第二个物种的任何抗体。某些实施方案中,可变区来自非人源(例如小鼠或灵长类动物),而恒定区来自人源。

[0142] “特异性结合”通常是指抗体或抗原结合片段与特定抗原通过其抗原结合结构域与表位互补性结合形成相对稳定的复合物。“特异性”可以用抗体或抗原结合片段与特定抗原或表位结合的相对亲和力表达。例如,如果抗体“A”比抗体“B”与同一抗原的相对亲和力大,可以认为抗体“A”比抗体“B”对该抗原具有更高的特异性。特异性结合可以用平衡解离常数(KD)来描述,较小的KD意味着较紧密的结合。确定两个分子是否特异性结合的方法是本领域内众所周知的,并包括例如平衡透析、表面等离子共振、生物膜层光学干涉测量法等。“特异性结合”抗原a的抗体包括与抗原a平衡解离常数KD小于或等于约100nM、小于或等于约10nM、小于或等于约5nM。

[0143] “治疗”是指治疗性治疗和预防性或防治性措施,其目的是预防、减缓、改善或停止不良的生理改变或紊乱,例如疾病的进程,包括但不限于以下无论是可检测还是不可检测的结果,症状的缓解、疾病程度的减小、疾病状态的稳定(即不恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善、缓和、减轻或消失(无论是部分还是全部)、延长与不接受治疗时预期的生存期限等。需要治疗的患者包括已经患有病症或紊乱的患者,容易患有病症或紊乱的患者,或者需要预防该病症或紊乱的患者,可以或预期从施用本发明公开的抗体或药物组合物用于检测、诊断过程和/或治疗中受益的患者。

[0144] 术语“癌症”意指或意在描述哺乳动物的生理状态,其典型特征是细胞生长失控。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。此类癌症的更具体实例包括胶质母细胞瘤、急性髓性白血病(AML)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、非小细胞肺癌、肺癌、结肠癌、结肠直肠癌、头颈癌、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、胰腺癌、鳞状细胞肿

瘤、鳞状细胞癌(例如鳞状细胞肺癌或鳞状细胞头颈癌)、肛门癌、皮肤癌、和外阴癌。

[0145] 术语“过表达”或“过表达的”可互换地指一种基因,与正常细胞相比,其通常在某些细胞,如癌细胞中以可检测到的更高水平的转录或翻译。过表达可以是蛋白质或RNA的过表达(由于增加的转录,转录后加工,翻译,翻译后加工,改变的稳定性和改变的蛋白质降解),以及蛋白质运输模式改变导致的局部过表达(核定位增加)和增强的功能活性,例如,如增加底物的酶水解。与正常细胞或比较细胞相比,过表达可以是50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些实施例中,本发明的抗B7-H3抗体用于治疗可能过表达B7-H3的实体瘤。

[0146] 如本文所用的,术语“给予”意指递送物质(例如,抗B7-H3抗体)以实现治疗目的(例如,治疗B7-H3相关失调)。给予方式可以是肠胃外、肠内和局部。肠胃外给予通常是通过注射,并且包括但不限于静脉、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、以及胸骨内注射和输注。

[0147] 如本文所用,术语“有效量”或“治疗有效量”是指药物,例如抗体的量,该量足以降低或改善病症(例如癌症)或其一种或多种症状的严重程度和/或持续时间;预防病症进展;引起病症消退;预防与病症相关的一种或多种症状复发、发展、发作或进展;检测病症;或增强或改善另一疗法(例如预防剂或治疗剂)的预防或治疗效果的量。例如,抗体的有效量可以抑制肿瘤生长(例如,抑制肿瘤体积的增加);减少肿瘤生长(例如,减小肿瘤体积);减少癌细胞的数量;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。例如,有效量可以改善无病生存(DFS)、改善总体存活(OS)或降低复发的可能性。

[0148] 术语“患者”和“受试者”可互换使用,是指需要诊断、预后或治疗的任何哺乳动物,包括但不限于人类、狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、牛等。在一些实施方案中,患者是人患者。

[0149] 如本文所用,术语“有需要”是指已将患者鉴定为需要特定方法或治疗。在一些实施例中,可以通过任何诊断方式进行识别。在本文描述的任何方法和治疗中,患者可能需要。

[0150] 本文所用术语“给药”是指施用一种物质以实现治疗目的(例如,治疗肿瘤)。

[0151] 本文所用术语“试剂”表示化学化合物、化学化合物混合物、生物大分子或由生物材料制得的提取物。

[0152] 术语“药剂”或“药物”是指适当施用于患者时能够诱导期望的治疗效果的化合物或组合物。

[0153] “约”指相关技术领域技术人员容易知道的相应数值的常规误差范围。在一些实施方式中,本文中提到“约”指所描述的数值以及其±10%、±5%或±1%的范围。

[0154] “EC_{50}”即半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect,EC_{50})是指能引起50%最大效应的浓度。

[0155] 如本文所用,术语“标记”或“经标记的”是指掺入可检测标记,例如,通过掺入放射性标记的氨基酸,或者附着于可由标记的亲和素(例如,含有荧光标记或可由光学方法或量热法检测的酶活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下,标记物或标记也可为治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。用于多肽的标记物的示例包括但不限于以下项:放射性同位素或放射性核素(例如,^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I),荧光标记物(例如,FITC、罗丹明、镧系磷光体),酶标记物(例

如,辣根过氧化酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶),化学发光标记,生物素酰基,被二级报告基因识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二级抗体结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中,标记通过各种长度的间隔臂连接以减小可能的空间位阻。

[0156] 术语"抗体药物偶联物"或"ADC"是指与一个或多个化学药物连接的结合蛋白(如抗体或抗原结合片段),其可以任选地为治疗剂或细胞毒性剂。在优选的实施例中,ADC包括抗体,药物(例如细胞毒性药物)和能够使药物与抗体附接或偶联的接头。ADC中一个抗体与小分子药物的结合个数,即抗体的药物结合数,称为药物抗体偶联比(DAR)。在一些实施方案中,其值选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。当考虑小分子药物的平均结合个数时,即抗体的药物平均结合数,或称为平均药物抗体偶联比,其值选自约0至10,或2至8。在一些实施方案中,药物抗体偶联比为约3至约6,在另一些实施例中,药物抗体偶联比为约6至约8,或约7至约8。可包含在ADC中的药物的非限制性实例是有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因治疗的载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化学保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光活性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、激酶抑制剂(例如,TEC-家族激酶抑制剂和丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂)和放射增敏剂。

[0157] 术语"抗体药物偶联物"和"ADC"可互换使用。术语"抗B7-H3抗体药物偶联物"和"抗B7-H3 ADC"可互换使用,是指包含特异性结合B7-H3的抗体的ADC,其中抗体与一种或多种化学药物偶联。在优选的实施例中,抗B7-H3 ADC与人B7-H3(hB7-H3)结合。

[0158] 本文中的其它化学术语根据本领域的常规用法使用。

[0159] 本文中引用的所有出版物,专利,和专利申请全部内容通过参考并入本文用于所有目的。

[0160] 抗B7-H3抗体

[0161] 本发明提供了抗B7-H3抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,本发明提供了抗B7-H3鼠抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,本发明提供了抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,本发明提供了人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段。

[0162] 本发明的抗B7-H3抗体或抗原结合片段具有包括但不限于与B7-H3体外结合、与表达B7-H3的细胞结合、以及强的内化能力。

[0163] 在一些实施方案中,抗B7-H3抗体的抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体或双抗体。在一些实施方案中,抗B7-H3抗体是多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。

[0164] 在一些实施方案中,抗原结合片段如Fab、$F(ab')_2$和Fv可通过裂解完整的蛋白质来制备,例如通过蛋白酶或者化学裂解。包括但不限于:(i)用胃蛋白酶消化抗体分子得到$F(ab')_2$片段;(ii)通过还原$F(ab')_2$片段的二硫键得到Fab片段;(iii)用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子生成Fab片段,以及(iv)Fv片段。

[0165] 在一些实施方案中,抗体包含重链恒定区,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。在一些实施方案中,抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含选自人IgG恒定结构域、人IgA恒定结构域、人IgE恒定结构域、人IgM恒定结构域和人IgD恒定结构域的免疫球蛋白重链恒定结构域。在一些实施方案中,抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含IgG1重链恒定区、IgG2重链恒定区、IgG3重链恒定区或IgG4重链恒定区。在一些实施方案中,重链恒定区

为IgG1重链恒定区或IgG4重链恒定区。在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段包含轻链恒定区，例如κ轻链恒定区或λ轻链恒定区。在一些实施方案中，抗体或抗原结合片段包含κ轻链恒定区。

[0166] 抗体的Fc部分介导若干种重要的效应功能(例如，细胞因子诱导、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、补体依赖的细胞毒性(CDC)和抗体和抗原-抗体复合物的半衰期/清除率)。在一些情况下，这些效应功能为治疗性抗体所需的，但在其他情况下，视治疗目标而定，可能为不必要的或甚至有害的。某些人IgG同种型，尤其IgG1及IgG3，分别经由结合至FcγRs及补体C1q来介导ADCC及CDC。新生的Fc受体(FcRn)为决定抗体的循环半衰期的关键组分。在另一些实施方案中，抗体恒定区(例如抗体的Fc区)中的至少一个氨基酸残基发生置换，使得抗体的效应功能更改。抗体的Fc区中的氨基酸残基的替换以改变抗体效应功能在美国专利号5,648,260和5,624,821中有所描述，其通过引入并入本文。

[0167] 在一些实施方案中，本发明包括标记的抗B7-H3抗体或抗原结合片段，其中抗体衍生或连接于一种或多种功能分子(例如，另一种肽或蛋白质)。例如，经标记抗体可以通过将本发明抗体或抗原结合片段(通过化学偶联、基因融合、非共价结合或以其他方式)功能上连接至一种或多种其他分子实体来衍生，该一种或多种其他分子实体诸如另一种抗体(例如双特异性抗体或双功能抗体)、可检测试剂、药物制剂、可以介导抗体或抗原结合片段与另一种分子(诸如抗生蛋白链菌素核心区或多聚组氨酸标签)的结合的蛋白质或肽和/或选自由以下组成的组的细胞毒性剂或治疗剂：有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、基因治疗用载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢产物、含硼剂、化学保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光活性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、激酶抑制剂、放射增敏剂及其组合。

[0168] 在一些实施方案中，将本发明抗体或抗原结合片段连接至可检测试剂，例如，通过掺入放射性标记的氨基酸，或者附着于可由标记的亲和素(例如，含有荧光标记或可由光学方法或量热法检测的酶活性的链霉亲和素)检测的生物素基部分的多肽。在某些情况下，标记物或标记也可为治疗性的。标记多肽和糖蛋白的各种方法是本领域已知的并且可以使用。用于多肽的标记物的示例包括但不限于以下项：放射性同位素或放射性核素(例如，^{3}H、^{14}C、^{15}N、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I)，荧光标记物(例如，FITC、罗丹明、镧系磷光体)，酶标记物(例如，辣根过氧化酶、β-半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶)，化学发光标记，生物素酰基，被二级报告基因识别的预定多肽表位(例如，亮氨酸拉链对序列、二级抗体结合位点、金属结合结构域、表位标签)。在一些实施方案中，标记通过各种长度的间隔臂连接以减小可能的空间位阻。

[0169] 在另一些实施方案中，本发明的抗体或抗原结合片段可用作检测样品中B7-H3(例如人B7-H3)或其片段是否存在。在一些实施方案中，抗体包含可检测试剂。抗体为多克隆抗体，或更优选单克隆抗体。可使用完整的抗体或抗原结合片段(例如Fab、scFv或F(ab')2)。所述检测方法可用于在体外及体内检测生物样品中的分析物mRNA、蛋白质或基因组DNA。例如，分析物mRNA体外检测技术包括Norhtern杂交和原位杂交；分析物蛋白质体外检测技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western印迹、免疫沉淀、以及免疫荧光；分析物基因组DNA体外检测技术包括Southern杂交。此外，分析物蛋白质的体内检测技术包括向患者体内导入标记的抗分析物蛋白抗体。例如，可以用放射性标记标记抗体，然后可以通过标准成像技

术检测患者体内该放射性标记物的存在和位置。

[0170] 本文公开的抗B7-H3抗体可以为单克隆抗体。

[0171] 本发明公开的抗体或抗原结合片段的结合特异性可以通过体外实验，例如免疫共沉淀、放射免疫实验(RIA)、表面等离子共振、流式细胞术(Facs)或酶联免疫吸附实验(ELISA)来检测。

[0172] 本发明还包括与本文所述抗B7-H3抗体结合同一表位的抗体。例如，本发明的抗体特异性结合包括人B7-H3上一个或多个氨基酸残基的表位。

[0173] 下面提供了一种示例性人B7-H3的氨基酸序列SEQ ID NO:44(GenBank登录号NP_001019907.1，其通过引用纳入本文)。信号序列(氨基酸1-28)用下划线+斜体表示。

[0174] SEQ ID NO:44：

[0175] *MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGA*LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPG
FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRV
ADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYP
EAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVL
QQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIW
QLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFV
SIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDG
QGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVT
ITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGE
GSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

[0176] 1)抗B7-H3鼠抗体

[0177] 本发明示例性抗B7-H3鼠抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列，比如具有至少80％序列同一性，或者至少90％序列同一性，或者至少95％序列同一性，或者至少99％序列同一性；轻链可变区包含如SEQ ID NO:25-29中任一项所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:25-29中任一项所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列，比如具有至少80％序列同一性，或者至少90％序列同一性，或者至少95％序列同一性，或者至少99％序列同一性。在一些实施方案中，这些具有合适的序列同一性的氨基酸序列至少CDR不变。

[0178] 2)抗B7-H3嵌合抗体

[0179] 在一些实施方案中，本发明提供抗B7-H3鼠抗体的可变区与人免疫球蛋白恒定区相连的抗B7-H3嵌合抗体。

[0180] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含重链可变区，所述重链可变区包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列具有合适的序列同一性的氨基酸序列，比如具有至少80％序列同一性，或者至少90％序列同一性，或者至少95％序列同一性，或者至少99％序列同一性。在一些实施方案中，这些有序列同一性的氨基酸序列至少CDR不变。

[0181] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:25-29中任一项所示的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:25-

29中任一项所示的氨基酸序列具有合适的序列同一性的氨基酸序列，比如具有至少80％序列同一性，或者至少90％序列同一性，或者至少95％序列同一性，或者至少99％序列同一性。在一些实施方案中，这些有序列同一性的氨基酸序列至少CDR不变。

[0182] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0183] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含：重链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VH CDR1；(b)如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR2；和(c)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR3；和轻链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VL CDR1；(b)如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VL CDR2；和(c)如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0184] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0185] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含：重链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VH CDR1；(b)如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR2；和(c)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR3；和轻链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的VL CDR1；(b)如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的VL CDR2；和(c)如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0186] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0187] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含：重链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VH CDR1；(b)如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR2；和(c)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR3；和轻链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的VL CDR1；(b)如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的VL CDR2；和(c)如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0188] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0189] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含：重链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VH CDR1；(b)如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR2；和(c)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR3；和轻链可变区，包含(a)如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的VL CDR1；(b)如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的VL CDR2；和(c)如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0190] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0191] 在一些实施方案中，本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段包含：重链可变

区,包含(a)如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VH CDR1;(b)如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(c)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR3;和轻链可变区,包含(a)如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的VL CDR1;(b)如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(c)如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0192] 在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区,所述重链恒定区包含如SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列,比如具有至少80%序列同一性,或者至少90%序列同一性,或者至少95%序列同一性,或者至少99%序列同一性。

[0193] 在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段还包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列,比如具有至少80%序列同一性,或者至少90%序列同一性,或者至少95%序列同一性,或者至少99%序列同一性。

[0194] 在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段的重链还包含信号肽,例如MEFGLSWVFLVAILKGVQC(SEQ ID NO:45)或MKHLWFFLLLVAAP RWVLS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段的轻链还包含信号肽,例如MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC(SEQ ID NO:47)或MVLQTQVFISLLLWISGAYG(SEQ ID NO:48)。

[0195] 在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的结合解离平衡常数(KD)为约1μM或更低。在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约1μM至约1pM之间。在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约100nM至约1pM之间。在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约10nM至约1pM之间。在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约1nM至约0.1nM之间。

[0196] 在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与hB7-H3-His(如SEQ ID NO:4所示)结合的KD为约1μM或更低。在一些实施方案中,本发明的抗B7-H3嵌合抗体或抗原结合片段与hB7-H3-His(如SEQ ID NO:4所示)结合的KD在约1μM至约1pM之间;或者,在约100nM至约1pM之间;或者,在约10nM至约1pM之间;或者,在约1nM至约1pM之间;或者,在约1nM至约0.1nM之间;或者,在约0.5nM至约0.3nM之间。

[0197] 本文公开的鼠抗体或嵌合抗体可用于产生人源化抗B7-H3抗体。例如,选择嵌合抗体M1用于人源化。

[0198] 3)人源化抗B7-H3抗体

[0199] 本文所述抗体包括人源化抗体。这些抗体适用于给动物(例如人类)施用,而不会在待治疗的动物(例如人类)中引起有害的免疫应答。

[0200] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段,其包含:重链可变区,包含(a)如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的VH CDR1;(b)如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的VH CDR2;和(c)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的VH CDR3;和轻链可变区,包含(a)如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的VLCDR1;(b)如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的VL CDR2;和(c)如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的VL CDR3。

[0201] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段,其重链可变区

包含如SEQ ID NO:35-38中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35-38中任一项所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列,比如具有至少80%序列同一性,或者至少90%序列同一性,或者至少95%序列同一性,或者至少99%序列同一性;和/或其轻链可变区包含如SEQ ID NO:39-41中任一项所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:39-41中任一项所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列,比如具有至少80%序列同一性,或者至少90%序列同一性,或者至少95%序列同一性,或者至少99%序列同一性。在一些实施方案中,这些有序列同一性的氨基酸序列至少CDR不变。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0203] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0204] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0205] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0206] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段包含如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的重链可变区和如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0207] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区,所述重链恒定区包含如SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32或33所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列,比如具有至少80%序列同一性,或者至少90%序列同一性,或者至少95%序列同一性,或者至少99%序列同一性。

[0208] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段还包含轻链恒定区,所述轻链恒定区包含如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列相比具有合适的序列同一性的氨基酸序列,比如具有至少80%序列同一性,或者至少90%序列同一性,或者至少95%序列同一性,或者至少99%序列同一性。

[0209] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段的重链还包含信号肽,例如MEFGLSWVFLVAILKGVQC(SEQ ID NO:45)或MKHLWFFLLLVAAPRWVLS(SEQ ID NO:46)。在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段的轻链还包含信号肽,例如MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC(SEQ ID NO:47)或MVLQTQVFISLLLWISGAYG(SEQ ID NO:48)。

[0210] 在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的结合解离平衡常数(KD)为约1μM或更低。在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约1μM至约1pM之间。在一些实施方案中,本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约100nM至约1pM之间。在一些实施方案

中，本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约10nM至约1pM之间。在一些实施方案中，本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与B7-H3结合的KD在约1nM至约0.1nM之间。

[0211] 在一些实施方案中，本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与hB7-H3-His(如SEQ ID NO:4所示)结合的KD为约1μM或更低。在一些实施方案中，本发明的人源化抗B7-H3抗体或抗原结合片段与hB7-H3-His(如SEQ ID NO:4所示)结合的KD在约1μM至约1pM之间；或者，在约100nM至约1pM之间；或者，在约10nM至约1pM之间；或者，在约1nM至约1pM之间；或者，在约1nM至约0.1nM之间；或者，在约0.5nM至约0.3nM之间。

[0212] 治疗方法

[0213] 本发明的抗体或抗原结合片段能够在体内和体外中和B7-H3活性。因此，本发明的抗体或抗原结合片段可用于抑制B7-H3活性，例如在含有B7-H3的细胞培养物中，在人患者或具有本发明的抗体与之交叉反应的B7-H3的其他哺乳动物中。在一个实施例中，本发明提供抑制B7-H3活性的方法，其包括使B7-H3与本发明的抗体接触，从而抑制B7-H3活性。例如，在含有或怀疑含有B7-H3的细胞培养物中，可以将本发明的抗体或抗原结合片段添加到培养基中以抑制培养物中的B7-H3活性。在一些实施方案中，B7-H3是人B7-H3，并且是人患者。

[0214] 在一些实施方案中，提供用于降低患者中B7-H3活性的方法，所述患者来自患有B7-H3活性有害的疾病或病症的患者。本发明提供用于降低经受此类疾病或病症的患者中的B7-H3活性的方法，该方法包括向患者给予有效剂量的本发明的抗体或抗原结合片段，使得患者中的B7-H3活性降低。在一些实施方案中，B7-H3是人B7-H3，并且是人患者。或者，患者可以是表达本发明的抗体能够结合的B7-H3的哺乳动物。此外，患者可以是已经引入B7-H3的哺乳动物(例如，通过给予B7-H3或通过表达B7-H3转基因)。可以将本发明的抗体或抗原结合片段出于治疗目的给予人患者。此外，本发明的抗体或抗原结合片段可以给予表达该抗体能够结合的B7-H3的非人哺乳动物(出于兽医学目的或作为人类疾病的动物模型)。所述人类疾病的动物模型可用于评估本发明抗体或抗原结合片段的治疗功效(例如，剂量测试和给药时间过程)。

[0215] 在一些实施方案中，提供了用于预防、治疗或改善各种类型的肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)等相关疾病的方法，所述方法包括向患者施用有效量的所述抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，提供了所述抗体或抗原结合片段在用于预防、治疗或改善肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)等相关疾病中的应用。在一些实施方案中，提供了所述抗体或抗原结合片段在制备用于预防、治疗或改善肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)等相关疾病的药物中的应用。在一些实施方案中，肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)是表达B7-H3的肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)。在一些实施方案中，肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)是过表达B7-H3的肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)。用于鉴定表达B7-H3的肿瘤(例如，过表达B7-H3的肿瘤)的方法是本领域已知的。例如，通过免疫组织化学法检测B7-H3在正常和肿瘤组织中的表达。

[0216] 在一些实施方案中，本发明涉及治疗以B7-H3为治疗靶点的相关疾病的方法，从而改善、减缓、抑制或预防过表达B7-H3相关的任何疾病或病症；涉及提供治疗患者肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)的方法、缓解患者肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)症状的方法、避免患者肿瘤(包括良性肿瘤和癌症)复发的方法，所述方法包括向患者施用有效量的本文所述的任何抗体或抗原结合片段。

[0217] 本发明提供的抗体或抗原结合片段和包含其的药物组合物可以用作治疗剂，用于诊断、预后、监控、治疗、缓解和/或预防患者中异常B7-H3的表达、活性和/或信号传递相关的疾病和病症。通过使用标准方法鉴定患者中存在异常B7-H3的表达、活性和/或信号传递相关的疾病和病症时，可以给药本发明公开的抗体或抗原结合片段和包含其的药物组合物。

[0218] 在一些实施方案中，用本发明所述的抗体或抗原结合片段治疗和/或预防的癌症包括但不限于实体瘤、血液肿瘤及转移性病灶。癌症的实例包括但不限于癌、母细胞瘤、肉瘤或白血病。此类癌症的更具体实例包括但不限于黑色素瘤、肺癌(例如，小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、卵巢癌(例如，卵巢上皮癌)、胶质瘤(例如，胶质母细胞瘤、小儿脑干胶质瘤)、前列腺癌(例如，去势抵抗性前列腺癌)、胰腺癌(例如，胰腺导管癌)、头颈癌、白血病(例如，急性髓性白血病(AML))、宫颈癌、肾癌、鳞状细胞肿瘤、鳞状细胞癌(例如鳞状肺癌或鳞状头颈癌)、结直肠癌、胃癌、肝癌、间皮瘤、肛门癌、皮肤癌、外阴癌、神经母细胞瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、腹膜恶性肿瘤、肉瘤、脑癌、中枢神经系统肿瘤、脑转移瘤。在一些实施方案中，将本发明的抗体或抗原结合片段给予患有一种或多种肿瘤(包括良性肿瘤或癌症)的患者，该患者过表达B7-H3。在一些实施方案中，将本发明的抗体或抗原结合片段给予患有实体瘤的患者，该患者可能过表达B7-H3。在一些实施方案中，向患有鳞状细胞非小细胞肺癌(NSCLC)的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有实体瘤(包括晚期实体瘤)的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有前列腺癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有非小细胞肺癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有胶质母细胞瘤的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有结肠癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有头颈癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有肾癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有透明细胞肾细胞癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有胶质瘤的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有黑色素瘤的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有胰腺癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有胃癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有卵巢癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有结肠直肠癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有小细胞肺癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有下咽鳞状细胞癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有神经母细胞瘤的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有乳腺癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有子宫内膜癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有尿路上皮细胞癌的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，向患有急性髓性白血病(AML)的患者给予本发明的抗体或抗原结合片段。

[0219] 对于任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于各种因素，包括所使用的特定抗体或衍生物、患者的年龄和体重、一般健康状况、性别和饮食，以及给药时间、排泄频率、

药物组合，以及所治疗的特定疾病的严重程度。由包括在本领域普通技术人员范围内的医疗护理人员对这些因素进行判断。所述剂量还将取决于待治疗的个体患者、给药途径、制剂类型、所用化合物的特性、疾病的严重程度以及所需的效果。所用剂量可以通过本领域熟知的药理学和药代动力学原理确定。在一些实施方案中，有效剂量的范围为从约0.01mg/kg到约100mg/kg，可以是例如每天一次或至每月一次。应注意，剂量值可随欲缓解的病状的类型及严重程度变化。此外应了解，对任何特定患者而言，特定给药方案可根据患者需要及给予组合物或监督组合物给予的人员的专业判断而随时调整，且本文所阐述的剂量范围仅为例示性的，且不意欲限制所要求的组合物的范畴或实践。

[0220] 抗体或抗原结合片段的施用方法包括但不限于真皮内、肌肉、腹腔、静脉、皮下、鼻腔、硬脊膜外和口服。药物组合物可以通过任何方便的途径施用，例如通过输注或推注，通过上皮或皮肤粘膜(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收，并且可以与其他生物活性剂共同施用。因此，含有本发明抗体的药物组合物可以口服给药、直肠给药、肠胃外给药、脑池内给药、阴道内给药、腹腔内给药、外敷(如通过粉末，软膏，滴剂或透皮贴剂)、口腔给药或鼻腔喷雾给药。

[0221] 本发明使用的术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌肉内、腹腔内、胸骨内、皮下和关节内注射和输注的施用方式。

[0222] 施用方式可以是全身施用或局部施用。此外，可能需要通过任何合适的途径将本发明的抗体或抗原结合片段引入中枢神经系统，包括脑室内和鞘内注射；脑室内注射可以通过脑室内导管连接到如贮液囊(可以是Ommaya贮液囊)来辅助注射。也可以通过肺部给药，例如通过使用吸入器或喷雾器，以及使用雾化的制剂。

[0223] 本发明抗体或抗原结合片段可以局部施用于需要治疗的区域；可以通过但不限于以下方式：手术期间局部输注，例如与手术后伤口敷料联合的局部应用，通过注射，通过导管，借助栓剂或借助植入物来实现，所述植入物是多孔的、无孔的或凝胶状的材料，包括膜(例如硅橡胶膜)或纤维。优选地，当施用本发明的抗体或抗原结合片段时，必须注意使用不吸收蛋白质的材料。

[0224] 通常在进行体外测试用于治疗疾病的方法，包括施用本发明所述抗体或衍生物，然后在可接受的动物模型中体内测试期望的治疗性或预防性活性，最后施用于人体。合适的动物模型(包括转基因动物)是本领域普通技术人员所公知的。例如，用于证明本发明所述抗体、抗原结合片段的治疗用途的体外测定包括抗体对细胞系或患者组织样品的影响。抗体对细胞系和/或组织样品的作用可以利用本领域技术人员已知的技术进行检测，例如本发明其他部分公开的技术。根据本发明的内容，可用于确定是否施用抗体或抗原结合片段的体外测定实验包括体外细胞培养实验，其中患者组织样品在培养物中培养，并暴露于或以其他方式施用抗体或抗原结合片段，并观察这种抗体或抗原结合片段对组织样品的影响。

[0225] 各种已知输送系统可用于施用本发明抗体或抗原结合片段或编码其的多核苷酸，例如包封于脂质体、微粒、微胶囊、能够表达所述化合物的重组细胞、受体介导的内吞作用、作为逆转录病毒或其它载体的一部分的核酸的构建等。

[0226] 联合疗法

[0227] 在一些实施方案中，本发明抗体或抗原结合片段可以结合其它治疗或预防方案，

包括施用一种或多种本发明抗体或抗原结合片段以及一种或多种其它治疗剂或方法一起使用或组合使用。对于组合治疗，抗体或抗原结合片段可以与其它治疗剂可同时或分开施用。当分开施用时，可以在施用另一种其它治疗剂之前或之后施用本发明抗体或抗原结合片段。

[0228] 在一些实施方案中，在向患者施用本发明的抗体或抗原结合片段时，还可以向患者联合施用本文公开的抗体分子或药物组合物，以及一种或多种其它疗法，例如治疗方式和/或其它制剂(例如治疗剂)。

[0229] 此类组合疗法涵盖同时施用(其中两种或更多种制剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中)，和分开施用，在该情况中，可以在施用别的疗法，例如治疗方式和/或治疗剂之前，同时，和/或之后发生本发明的抗体或抗原结合片段的施用。抗体分子和/或其他疗法，例如治疗剂或治疗方式可以在活动性疾病期间或在缓解或活动度更小的疾病期间施用。抗体分子可以在其他治疗前、与其他治疗同时、治疗后或在疾病缓解期间施用。

[0230] 在一些实施方案中，本发明抗体或抗原结合片段与治疗剂联合施用。治疗剂包括但不限于：细胞因子及生长因子抑制剂、免疫抑制剂、消炎剂(例如全身性消炎剂)、抗纤维化剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和/或细胞毒性或细胞生长抑制剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、基因治疗运载体、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化学保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光活性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、激酶抑制剂或放射增敏剂。

[0231] 在一些实施方案中，本发明抗体或抗原结合片段与抗癌剂或抗肿瘤剂联合施用。术语“抗癌剂”和“抗肿瘤剂”是指用于治疗恶性肿瘤的药物，例如抑制癌性生长。例如，乳腺癌通常由雌激素刺激，并且可以用使性激素失活的药物治疗。类似地，前列腺癌可以用使雄激素失活的药物治疗。抗癌剂的实例包括但不限于：抗PD1抗体(例如，派立珠单抗)、抗PD-L1抗体(例如阿特唑单抗)、抗CTLA-4抗体(例如，伊匹单抗)、MEK抑制剂(例如，曲美替尼)、ERK抑制剂、BRAF抑制剂(例如，达拉菲尼)、奥斯替尼、埃罗替尼、吉非替尼、索拉非尼、CDK9抑制剂(例如，迪那西利)、MCL-1抑制剂、替莫唑胺、Bcl-xL抑制剂、Bcl-2抑制剂(例如维奈托克)、依鲁替尼、mTOR抑制剂(例如，依维莫司)、PI3K抑制剂(例如，布帕利昔)、度维利塞、艾代拉里斯、AKT抑制剂、HER2抑制剂(例如，拉帕替尼)、Herceptin、紫杉烷(例如多西他赛、紫杉醇、纳米白蛋白结合型紫杉醇)、包含澳瑞他汀的ADC、包含PBD(例如，罗武匹妥珠-特西林)的ADC、包含美登木素生物碱(例如，TDM1)的ADC、TRAIL激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如，硼替佐米)、烟酰胺磷酸核糖基转移酶抑制剂、Panorex、利妥昔单抗、吉妥单抗、阿仑单抗、替伊莫单抗、托西莫单抗、西妥昔单抗、阿瓦斯汀和赫塞汀。

[0232] 可以与本发明抗体或抗原结合片段联合施用的细胞因子的实例包括但不限于以下一种或多种：IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21和IL-31等。

[0233] 可以与本发明抗体或抗原结合片段联合施用的其他治疗剂的实例包括但不限于以下一种或多种：吸入性类固醇；β-激动剂，例如，短效或长效β-激动剂；白三烯或白三烯受体的拮抗剂；组合药物，如ADVAIR；IgE抑制剂，例如，抗IgE抗体(例如，奥马珠单抗)；磷酸二酯酶抑制剂(例如，PDE4抑制剂)；黄嘌呤；抗胆碱能药物；肥大细胞稳定剂，如色甘酸；IL-4抑制剂；IL-5抑制剂；嗜酸性粒细胞趋化因子/CCR3抑制剂；组胺或其受体(包括H1、H2、H3和

H4)的拮抗剂,以及前列腺素D或其受体(DP1和CRTH2)的拮抗剂;抗PD1抗体(例如,派立珠单抗)、抗PD-L1抗体(例如阿特唑单抗)、抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗)、MEK抑制剂(例如,曲美替尼)、ERK抑制剂、BRAF抑制剂(例如,达拉菲尼)、奥斯替尼、埃罗替尼、吉非替尼、索拉非尼、CDK9抑制剂(例如,迪那西利)、MCL-1抑制剂、替莫唑胺、Bcl-xL抑制剂、Bcl-2抑制剂(例如维奈托克)、依鲁替尼、mTOR抑制剂(例如,依维莫司)、PI3K抑制剂(例如,布帕利昔)、度维利塞、艾代拉里斯、AKT抑制剂、HER2抑制剂(例如,拉帕替尼)、Herceptin、紫杉烷(例如多西他赛、紫杉醇、纳米白蛋白结合型紫杉醇)、包含澳瑞他汀的ADC、包含的PBD(例如,罗武匹妥珠-特西林)的ADC、包含美登木素生物碱(例如,TDM1)的ADC、TRAIL激动剂、蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米)、和烟酰胺磷酸核糖基转移酶(NAMPT)抑制剂;TNF拮抗剂(例如,TNF受体的可溶性片段,例如p55或p75人TNF受体或其衍生物,例如75kD TNFR-IgG(75kD TNF受体-IgG融合蛋白,ENBREL));TNF酶拮抗剂,例如TNF转化酶抑制剂;毒蕈碱受体拮抗剂;TGF-β拮抗剂;干扰素γ;吡非尼酮;化学治疗剂,例如来氟米特或西罗莫司或其类似物,例如CCI-779;COX2和cPLA2抑制剂;NSAID;免疫调节剂;p38抑制剂,TPL-2、MK-2和NFkB抑制剂等。

[0234] 在一些实施方案中,本发明抗体或抗原结合片段可以与免疫检查点抑制剂一起使用。在一些实施方案中,本发明抗体或抗原结合片段与其它治疗或预防方案联合施用,例如放射性疗法。

[0235] 药物组合物

[0236] 可将本文所述抗体或其衍生物、片段、类似物、同系物掺入适于施用的药物组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑事项以及选择组分的指南在本领域中是熟知的。

[0237] 此类组合物通常包含抗体或抗原结合片段和药学上可接受的载体。在一些实施方案中,使用抗原结合片段为与靶蛋白结合结构域特异性结合的最小抑制片段。如,基于抗体的可变区序列并保留结合靶蛋白质序列能力的肽。在一些实施方案中,药物组合物还包含抗癌剂(例如免疫检查点抑制剂)。

[0238] 在一些实施方案中,术语"药学上可接受的"是指由政府的监管机构批准的或公认药典中列出的用于动物,特别是用于人类的物质。此外,"药学上可接受的载体"通常指是任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂等。

[0239] 术语"载体"是指可以与活性成分一起施用于患者的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。此类载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物静脉内给药时,水是优选的载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如有需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯、抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠、螯合剂如乙二胺四乙酸,以及调节张力的试剂如氯化钠或右旋葡萄糖也是可以预见的。这些组合物可以采取溶液、悬液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、散剂、缓释制剂等形式。该组合物可以用传统的粘合剂和载体如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体,例如药物等级的甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例在E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述,在此通过引用并入本发明。此类组合物将含有临床有效剂量的抗体或

抗原结合片段，优选以纯化后的形式，连同合适数量的载体，以提供适合于患者的给药形式。该制剂应该适用于给药模式。亲本制剂可以封装在安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0240] 在一些实施方案中，根据常规步骤将组合物配制成药物组合物(例如，适合静脉内注射于人体的药物组合物)。用于静脉内给药的组合物通常是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因，从而缓解注射部位的疼痛。药物组合物以剂量单位形式配制，易于施用，剂量均匀。如本文所用，剂量单位形式是指用于待治疗的患者，适合作为单位剂量的物理上可分离的单位；每个单位含有经计算与所需药物载体结合产生期望治疗效果的预定量的一种或多种所述抗体。一般而言，有效成分以单位剂量形式单独供给或混在一起供给，如以干燥的冻干粉末或无水浓缩物的形式装在可指示活性剂份量的密封容器(如安瓿瓶或小袋)中。在通过输注施用组合物的情况下，可以用含有药用级无菌水或盐水的输液瓶来分装组合物。在通过注射施用组合物的情况下，可以使用注射用的无菌水或盐水的安瓿瓶，使得可以在施用之前混合有效成分。

[0241] 在一些实施方案中，待用于体内施用的药物组合物为无菌的。这可通过无菌滤膜过滤容易地实现。

[0242] 药物组合物通常与其预期施用途径相容。给药途径的示例包括肠胃外，例如静脉内、皮内、皮下、经口(例如吸入)、经皮(即局部的)、经粘膜和直肠给药。药物组合物可包括以下组分中的一种或多种：注射用无菌稀释剂，例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抑菌剂，例如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，例如乙二胺四乙酸(EDTA)；缓冲剂，例如组氨酸盐酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；渗透压调节剂，例如氯化钠或右旋糖；稳定剂，例如精氨酸、甲硫氨酸、海藻糖、蔗糖、山梨醇；表面活性剂，例如吐温20、吐温80。pH可用酸或碱进行调节，例如盐酸或氢氧化钠。可将药物组合物包装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制多剂量小瓶内。在一些实施方案中，适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。使用时，组合物必须是无菌的并且应当为流动性达到易于注射的程度。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须能防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。注射用组合物的延长吸收可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来达到。

[0243] 对于经粘膜或透皮给药，在制剂中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域是通常所知的，并且包括如用于经粘膜给药的去污剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用喷鼻剂或栓剂来实现。对于透皮给药，可将一种或多种所述抗体配制成如本领域通常所知的膏剂、软膏、凝胶、或霜膏。

[0244] 所述药物组合物可放于容器或分配器中，并与给药说明书一起包装。

[0245] 本文所述药物组合物还可根据要治疗的具体情况而包含其它活性成分，优选具有互补活性但对彼此无负面影响的那些。在一些实施方案中，组合物可包含增强其功能的试剂，诸如细胞毒素试剂、细胞因子、化学治疗剂、或生长抑制剂。此类活性成分以对预期目的有效的量适当地联合存在。

[0246] 本发明的组合物可以配制成中性的或盐的形式。药学上可接受的盐包括衍生自如盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的阴离子形成的盐，以及衍生自如钠、钾、铵、钙、氢氧化

铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

[0247] 制备方法

[0248] 抗B7-H3抗体可以通过用如膜结合的和/或可溶的B7-H3(例如，人B7-H3或其免疫原性片段、衍生物或变体)免疫动物来产生。或者可使用例如杂交瘤方法来制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中，通常用免疫剂免疫小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物，以引起淋巴细胞产生或能产生特异性结合免疫剂的抗体。另选地，可将淋巴细胞在体外免疫产生抗体。

[0249] 杂交瘤方法中所用免疫剂通常包括蛋白抗原、其片段、或其融合蛋白(例如hB7-H3-Fc，其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)。通常，如果需要人源细胞，则使用外周血淋巴细胞，或者如果需要非人哺乳动物源，则使用脾细胞或淋巴结细胞。然后用适合的融合剂，例如聚乙二醇，将淋巴细胞与永生化细胞系融合，以形成杂交瘤细胞。永生化细胞系通常采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在适当的培养基中培养，该培养基优选含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或存活的物质。例如，如果亲本细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT)，则杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基喋呤和胸腺嘧啶(“HAT培养基”)，所述物质防止HGPRT-缺陷的细胞生长。

[0250] 单克隆抗体还可通过重组DNA方法制备，例如美国专利No.4,816,567中所述的那些。编码本文所述单克隆抗体的DNA可使用常规方法来分离和测序(例如，通过使用能够与编码鼠抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞可充当此类DNA的来源。一旦分离后，可以将DNA置入表达载体中，然后将其转染到宿主细胞例如不另外产生免疫球蛋白的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾293细胞(HEK293细胞)、猿COS细胞、PER.NSO细胞、SP2/0细胞、YB2/0细胞、或骨髓瘤细胞中，从而在重组宿主细胞中获得合成的单克隆抗体。DNA也可通过例如用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列(参见美国专利No.4,816,567)或者通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列共价地连接进行修饰。此类非免疫球蛋白多肽能够取代本文所述抗体的恒定结构域，或者能够取代本文所述抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以产生嵌合二价抗体。

[0251] 单链Fv(scFv)可参见生产单链单元的技术(美国专利4,694,778)。通过氨基酸桥接Fv区的重链和轻链片段形成单链单元，产生单链融合肽。也可以使用在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术。

[0252] 可用于生产scFv和抗体的技术的实例包括如美国专利4,946,778和5,258,498中所述。

[0253] 此外，在美国专利5,658,570、5,693,780和5,756,096中公开了另一种生产重组抗体的高效方法，特别地，该技术能产生含有猴可变区和人恒定区序列的灵长类抗体每个专利的全部内容通过引用并入本文。

[0254] 在一些实施方案中，抗体不会在受治疗的动物(例如人类)中引起有害的免疫应答。在一些实施方案中，本发明公开的抗体、抗原结合片段、或衍生物使用本领域公认的技术修饰以降低其免疫原性。例如，抗体可以被人源化、灵长类化、去免疫化或者可以制备嵌合抗体。这些类型的抗体来源于非人抗体，通常是鼠类或灵长类抗体，其保留或基本保留亲本抗体的抗原结合特性但在人体中免疫原性较低。其可以通过多种方法来实现，包括(a)将整个非人源的可变区移植到人源的恒定区以产生嵌合抗体；生产嵌合抗体的方法是本领域

已知的，参见美国专利5,807,715、4,816,567和4,816,397，其全部内容通过引用并入本文；(b)将一个或多个非人类互补决定区(CDR)的至少一部分移植到人源的框架和恒定区中，保留或不保留关键的框架残基；或(c)移植整个非人源的可变区，但通过用类人源的部分置换表面残基从而“隐藏”它们。通常人框架区中的框架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基取代，比如能够改善抗原结合的残基。这些框架替换可以通过本领域公知的方法鉴定，例如通过模拟CDR和框架残基的相互作用以鉴定对抗原结合起重要作用的框架残基和通过序列对比以鉴定特定位置上异常的框架残基(参考美国专利5,585,089；其全部内容通过引用并入本文)。可以使用本领域公知的多种技术使抗体人源化，例如CDR移植(EP 239,400；WO 91/09967；美国专利5,225,539,5,530,101和5,585,089)，修复或者表面重排(EP592,106；EP519,596)，以及链的重排(美国专利5,565,332)，其全部内容通过引用并入本文。

[0255] 去免疫化也可用于降低抗体的免疫原性。在本发明中，术语“去免疫化”包括改变抗体以修饰T细胞表位(参见例如WO/9852976 A1和WO/0034317 A2)。例如，分析来自起始抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列，并产生来自每个可变区的人T细胞表位“图谱”，显示表位相对于互补决定区(CDRs)和序列内其它关键残基的位置。分析来自T细胞表位图的单个T细胞表位，以鉴定具有较低改变抗体活性风险的可选择的氨基酸取代。设计包含氨基酸取代组合的一系列可选的重链可变区序列和轻链可变区序列，随后将这些序列掺入到一系列结合多肽中。然后将包含修饰过的可变区和人类恒定区的完整重链和轻链的基因克隆到表达载体中，随后将质粒转入细胞系以产生完整的抗体。然后利用合适的生物化学和生物学实验中比较抗体，鉴定出最佳的抗体。

[0256] 抗体可以通过本领域已知的多种方法制备，包括使用来自免疫球蛋白序列的抗体文库进行的噬菌体展示方法。也可参考美国专利4,444,887和4,716,111，以及PCT公布文本WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741，每个专利的全部内容通过引用并入本文。

[0257] 识别选择性表位的全人源抗体可以使用被称为“引导选择”的技术来生产。在该方法中，使用选择的非人单克隆抗体(例如小鼠抗体)来引导识别相同表位的全人源抗体的筛选(参见美国专利5,565,332，其全部内容通过引用并入本文)。

[0258] 在另一实施方案中，使用常规方法(例如使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)，可以分离编码所需单克隆抗体的DNA并对其进行测序。分离的和亚克隆的杂交瘤细胞可以作为此类DNA的来源。一旦分离出来，DNA可以被置于表达载体中，然后被转染到原核或真核宿主细胞(例如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生其他免疫球蛋白的骨髓瘤细胞)中。分离或合成的DNA也可用于制备抗体的恒定区和可变区的序列，如美国专利5,658,570中所述，其全部内容通过引用并入本文。该方法从所选细胞中提取RNA并转化成cDNA，然后使用Ig特异性引物通过PCR技术进行扩增。适于此目的的合适的探针在美国专利5,658,570中也有所提及。

[0259] 此外，使用常规重组DNA技术，可将本发明的抗体的一个或多个CDR插入框架区，例如插入到人类框架区以构建人源化非全人源抗体。框架区可以是天然存在的或共有的框架区，优选人类框架区。一些多核苷酸可以编码框架区和CDR组合产生的与目标抗原的至少一个表位特异性结合的抗体。在框架区内可以进行一个或多个氨基酸取代，可以选择能够改善抗体与其抗原结合的氨基酸取代。另外，可用此法进行参与链间二硫键形成的一个或多

个可变区中半胱氨酸残基的取代或缺失,从而产生缺少一个或多个链间二硫键的抗体分子。本领域技术范围内的对多核苷酸进行的其他改变也涵盖于本发明中。

[0260] 抗体可以通过使用常规重组DNA技术制备。使用本领域技术人员公知的技术可以选择、构建和培养生产抗体的载体及细胞系等。这些技术在各种实验室手册和主要出版物中均有描述。

[0261] 在一些实施方案中,对本发明的抗B7-H3抗体或抗原结合片段进行糖基化修饰。例如,可以制备去糖基化的抗体(即,该抗体缺乏糖基化)。可更改糖基化以例如增加抗体对抗原的亲和力。此类修饰可由例如更改抗体序列内的一或多个糖基化位点来完成。举例而言,可进行一个或多个氨基酸取代,从而消除一个或多个可变区糖基化位点,以借此消除该位点的糖基化。此类去糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。此类方法进一步详细描述于PCT公开案WO 2003016466 A2及美国专利5,714,350及6,350,861中,其各自以全文引用方式并入本文中。

[0262] 另外,可以制备糖基化类型改变的经修饰的抗B7-H3抗体或抗原结合片段,例如低岩藻糖基化抗体或具有增加的等分GlcNAc结构的抗体。已证明这些改变可增加抗体的ADCC能力。此类修饰可由例如在糖基化机制更改的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制更改的细胞在本领域中已有描述且可用作表达本发明的重组抗体以借此产生糖基化更改的抗体的宿主细胞。参见例如欧洲专利号:EP 1,176,195;PCT公开WO 03/035835;WO 99/5434280,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0263] 本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体)可以通过在宿主细胞中重组表达抗体的重链和轻链基因来制备。例如,用一种或多种携带编码抗体的重链和轻链DNA片段的重组表达载体转染宿主细胞,使得重链和轻链在宿主细胞中表达,表达的抗体可以分泌到培养宿主细胞的培养基内,从所述培养基中可以回收抗体。“转染”指通常用于将外源DNA引入真核宿主细胞内的广泛多样的技术,例如电穿孔、脂转染、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等等。用于获得抗体重链和轻链基因,将这些基因掺入表达载体内并将载体引入宿主细胞内的标准重组DNA方法在本领域众所周知,例如美国专利号4,816,397中描述的那些。表达抗体重链和轻链的DNA可以置入同一载体中或置入不同载体中;若置入不同载体中,表达抗体重链的载体和表达抗体轻链的载体可以以适当比例转染宿主细胞。在一些实施方案中,抗体表达载体包括至少一个启动子元件,抗体编码序列,转录终止信号和polyA尾巴。其他元件可以包括增强子,Kozak序列(GCCACC,如SEQ ID NO:53所示)及插入序列两侧RNA剪接的供体和受体位点。可以通过SV40的前期和后期启动子,来自逆转录病毒的长末端重复序列如RSV、HTLV1、HIVI及巨细胞病毒的早期启动子来获得高效的转录,也可应用其它一些细胞的启动子如肌动蛋白启动子。合适的表达载体可包括pIRES1neo,pRetro-Off,pRetro-On,pLXSN,pLNCX,pcDNA3.1(+/-),pcDNA/Zeo(+/-),pcDNA3.1/Hygro(+/-),pSVL,pMSG,pRSVcat,pSV2dhfr,pBC12MI,pCS2或pCHO1.0等。常使用的哺乳动物细胞(宿主细胞)包括HEK293细胞(例如HEK293F细胞),Cos1细胞,Cos7细胞,CV1细胞,鼠L细胞和CHO细胞等。

[0264] 为了表达本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体),可将编码全长轻链和重链的DNA插入表达载体内,使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。“可操作地连接”意指抗体基因连接到载体内,使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。

[0265] 抗体(例如抗B7-H3抗体)基因可以通过标准方法(例如,连接抗体基因片段和载体上的互补限制性位点,或者如果不存在限制性位点,则平端连接)插入表达载体内。在插入抗体相关的轻链或重链基因序列之前,表达载体可以已经携带抗体恒定区序列。例如,将抗B7-H3抗体相关的VH和VL序列转换为全长抗体基因的一种方法是将它们分别插入已经编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体内,使得VH区段可操作地连接至载体内的CH区段,并且VL区段可操作地连接至载体内的CL区段。或者,重组表达载体可以编码促进宿主细胞分泌抗体重链和轻链的信号肽。或者,可以将抗体重链和轻链基因克隆到编码促进宿主细胞分泌抗体重链和轻链的信号肽的载体中,使得信号肽与抗体重链和轻链基因的氨基末端框内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白蛋白的信号肽),例如,MEFGLSWVFLVAILKGVQC(SEQ ID NO:45)、MKHLWFFLLLVAAPRWVLS(SEQ ID NO:46)、MDMRVLAQLLGLLLLCFPGARC(SEQ ID NO:47)或MVLQTQVFISLLLWISGAY G(SEQ ID NO:48)。

[0266] 除抗体重链和轻链基因之外,重组表达载体还可以携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。调节序列包括控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子和其它表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。本领域技术人员了解表达载体的设计,包括调节序列的选择可以取决于待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的合适调节序列包括指导哺乳动物细胞中的高水平蛋白质表达的病毒元件,如衍生自巨细胞病毒(CMV)(如CMV启动子/增强子)、猿猴病毒40(SV40)(如SV40启动子/增强子)、腺病毒(如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤的启动子和/或增强子。关于病毒调节元件及其序列的进一步描述,参见例如美国专利5,168,062,4,510,245和4,968,615。

[0267] 除抗体链基因和调节序列之外,重组表达载体可以携带另外的序列,例如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和可选择标记物基因。可选择标记物基因促进载体已引入其内的宿主细胞的选择(参见例如,美国专利4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常可选择赋予已引入载体的宿主细胞针对药物(例如G418、潮霉素或氨甲蝶呤)的抗性的标记物基因。合适的可选择标记物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于在具有氨甲蝶呤选择/扩增的DHFR-宿主细胞中使用)、neo基因(用于G418选择)和GS基因。对于重链和轻链的表达,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞内。

[0268] 本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体)能够在真核宿主细胞中表达。在某些实施方案中,抗体的表达在真核细胞例如哺乳动物宿主细胞中进行。用于表达本发明抗体的示例性宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)或从CHO细胞修饰的CHO-S、CHO-dhfr-、CHO/DG44或ExpiCHO、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞、SP2细胞、CV1细胞、鼠L细胞、人胚肾细胞HEK293或从HEK293细胞修饰的HEK293T、HEK293F或HEK293E细胞。将编码抗体链基因的重组表达载体引入宿主细胞内后,将宿主细胞在培养基内培养允许抗体在宿主细胞中表达或抗体分泌到培养基的一段时间来产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

[0269] 对于本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体)的重组表达,可以用两种重组表达载体共转染宿主细胞,第一重组表达载体编码抗体重链,第二重组表达载体编码抗体轻链。两个重组表达载体可以含有相同的可选择标记物,或者它们可以各自含有分开的可选择标记物。可替代地,可以使用编码抗体重链和轻链的重组表达载体转染宿主细胞。

[0270] 本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体)还可以通过化学合成来生产。还可以使用无细

胞平台生成变体抗体。

[0271] 通过重组表达产生的本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体),可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法将它纯化,例如通过层析(例如,离子交换、亲和层析和分级柱层析)、离心、差异溶解度、或纯化蛋白质的任何其它标准技术。例如利用蛋白A或蛋白G进行亲和层析,其主要提供了免疫血清中的IgG级分。另外,可将免疫球蛋白所靶向的特异抗原或其表位固定于柱上,以通过免疫亲和色谱来纯化免疫特异性抗体。本发明的抗体(例如抗B7-H3抗体)可以与本领域已知的异源多肽序列融合,以促进纯化。免疫球蛋白的纯化可参考D.Wilkinson的文章(The Scientist,由The Scientist,Inc.,Philadelphia Pa.出版,第14卷,第8期(2000年4月17日),第25-28页)。

[0272] 此外,可以使用本领域技术人员已知的标准技术在编码本发明的抗体的核苷酸序列中引入突变,包括但不限于导致氨基酸取代的定点突变和PCR介导的突变。变体(包括衍生物)编码相对于原重链可变区VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3和轻链可变区VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3来说少于50个氨基酸的取代、少于40个氨基酸的取代、少于30个氨基酸的取代、少于25个氨基酸的取代、少于20个氨基酸的取代、少于15个氨基酸的取代、少于10个氨基酸的取代、少于5个氨基酸的取代、少于4个氨基酸的取代、少于3个氨基酸的取代或少于2个氨基酸的取代。或者可以沿着全部或部分编码序列随机引入突变,例如通过饱和突变,以及可以筛选所得突变体的生物活性以鉴定保留活性的突变体。

[0273] 在一些实施方案中,本文所述取代为保守氨基酸取代。

[0274] 在一些实施方案中,编码抗体V3重链的基因序列如SEQ ID NO:49所示,其中,下划线部分编码VH CDR;抗体V3的重链氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示,其中,下划线部分为VH CDR。

[0275] SEQ ID NO:49如下:

[0276] GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGAGCGGCGAGTCCCTGAAGATCTCCTGTAAG
GCTAGCGGCTATACCTTTACCGATTACGATATCAACTGGGTGCGGCAGATGCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGG
CTGGATCTTTCCCGGCGATGACACCACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGCCAGGTGACCCTGAGCGCTGATAAGT
CCACCAACACCGCCTACATGCAGTGGTCCTCCCTGAAGGCCTCCGACACCGCCATGTATTATTGCGCCCGGTCCCCC
AGCTTCGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTGGTTACCGTTAGCAGCGCGAGCACCAAAGGCCCGAGCGTGTTTCCGCT
GGCCCCGAGCAGCAAAAGCACCAGCGGTGGCACCGCAGCGCTGGGTTGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGGAACCGG
TGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA
GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG
CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG
TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC
CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA

CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0277] SEQ ID NO:50如下：

[0278] EVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKASGYTFTDYDINWVRQMPGKGLEWIGWIFPGDDTTKYNEKFKGQVTLSADKSTNTAYMQWSSLKASDTAMYYCARSPSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0279] 在一些实施方案中，编码抗体V3轻链的基因序列如SEQ ID NO:51所示，其中，下划线部分编码VL CDR；抗体V3的轻链氨基酸序列如SEQ ID NO:52所示，其中，下划线部分为VL CDR。

[0280] SEQ ID NO:51如下：

[0281] CAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCACCCTGTCCCTGAGCCCTGGAGAGAGGGCCACCCTGAGCTGTAGCGCTAGCTCCACCATCGGCTTTATGTATTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCCCCCGGAGATGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGTGCCTGACAGGTTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTATACCCTGACCATCAGCAGGCTGGAGCCCGAGGATTTCGCCGTGTATTATTGCCACCAGCGGAGCAGCTATCCTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0282] SEQ ID NO:52如下：

[0283] QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSASSTIGFMYWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCHQRSSYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0284] 实施例

[0285] 以下通过具体的实施例进一步说明本发明的技术方案，具体实施例不代表对本发明保护范围的限制。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改或调整仍属于本发明的保护范围。

[0286] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径或已知方法得到。

[0287] VISTA-CHO细胞构建流程：将编码VISTA(NCBI Reference Sequence:NP_071436.1)的基因序列插入到表达载体中，然后稳转CHO细胞，获得VISTA-CHO细胞。

[0288] Tim3-CHO细胞构建流程：将编码Tim3(NCBI Reference Sequence:NP_116171.3)的基因序列插入到表达载体中，然后稳转CHO细胞，获得Tim3-CHO细胞。

[0289] Lag3-CHO细胞构建流程：将编码Lag3(NCBI Reference Sequence:NP_002277.4)的基因序列插入到表达载体中，然后稳转CHO细胞，获得Lag3-CHO细胞。

[0290] 实施例1抗原的制备

[0291] 抗原hB7-H3-Fc的制备：将编码抗原hB7-H3-Fc(抗原hB7-H3-Fc的氨基酸序列如

SEQ ID NO:1所示,由人B7-H3胞外域(如SEQ ID NO:2所示)C-末端添加IgG1的Fc(如SEQ ID NO:3所示)构建而成)的基因序列克隆至表达载体,然后瞬时转染HEK293F细胞,经ProteinA亲和层析纯化后获得抗原hB7-H3-Fc。

[0292] 抗原hB7-H3-His制备:将编码抗原hB7-H3-His(抗原hB7-H3-His的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,由人B7-H3胞外域(如SEQ ID NO:2所示)C-末端添加10×HIS标签(HHHHHHHHHH,如SEQ ID NO:5所示)构建而成)的基因序列克隆至表达载体,然后瞬时转染HEK293F细胞,经镍柱纯化后获得抗原hB7-H3-His。

[0293] 抗原hB7-H3-Fc的氨基酸序列:

[0294] MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(如SEQ ID NO:1所示)。

[0295] 人B7-H3胞外域的氨基酸序列:

[0296] MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMT(如SEQ ID NO:2所示)。

[0297] IgG1的Fc的氨基酸序列:

[0298] DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(如SEQ ID NO:3所示)。

[0299] 抗原hB7-H3-His的氨基酸序列:

[0300] MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTHHHHHHHHHH(如SEQ ID NO:4所示)。

[0301] 实施例2嵌合抗体

[0302] 鼠抗体的VH CDR、VL CDR、VH和VL的氨基酸序列见表1-3。

[0303] 表1 VH CDR的氨基酸序列(Kabat编号)

[0304]

编号	类型	氨基酸序列	序列号
MH	VH CDR1	DYDIN	6
	VH CDR2	WIFPGDDTTKYNEKFKG	7
	VH CDR3	SPSFDY	8

[0305] 表2 VL CDR的氨基酸序列(Kabat编号)

[0306]

编号	类型	氨基酸序列	序列号
ML-1	VL CDR1	SASSTIGFMY	9
ML-2		KASQDINRFLS	10
ML-3		RASKSVSTSGYSYMH	11
ML-4		RATGNIHNYLA	12
ML-5		RASKNIYSFLG	13

[0307]

ML-1	VL CDR2	DTSKLAS	14
ML-2		RANRLRD	15
ML-3		LVSNLES	16
ML-4		SAKTLAD	17
ML-5		NAKTLAE	18
ML-1	VL CDR3	HQRSSYPT	19
ML-2		LQYDEFPPFT	20
ML-3		QHIRELT	21
ML-4		QHFWSIPWT	22
ML-5		QHHYGTPPYT	23

[0308] 表3鼠抗可变区的氨基酸序列(Kabat编号)

[0309]

编号	类型	氨基酸序列	序列号
MH	VH	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFT**DYDIN**WVQQR PGQGLEWIG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**RATLTADKSSNTA YMQLNGLTSENSAVYFCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	24
ML-1	VL	QIVLTQSPAIMSASPGERVTMTC**SASSTIGFMY**WYQQKPG TSPKRWIY**DTSKLAS**GVPARFSVSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYC**HQRSSYPT**FGGGTKLEIK	25
ML-2		DIKMTQSPSSMYASLGERVTITC**KASQDINRFLS**WFQQKP GKSPKTLIY**RANRLRD**GVPSRFSGNGSGQDYSLTISSLEYE DMGIYYC**LQYDEFPPFT**FGSGTKLEIK	26
ML-3		DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASKSVSTSGYSYMH**WN QQKPGQPPRLLIY**LVSNLES**GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPV EEEDAATYYC**QHIRELT**FGAGTKLELK	27
ML-4		DIQMTQSTASLSAFVGETVTITC**RATGNIHNYLA**WYHQKQ GKSPHLLVY**SAKTLAD**GVPSRFSGSGSGTQYSLQINSLHPE DFGTYYC**QHFWSIPWT**FGGGTKLEIK	28
ML-5		DIQMTQSPASLSASVGETVTITC**RASKNIYSFLG**WIQQRQG KSPQSLVY**NAKTLAE**GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPED FGNYYC**QHHYGTPPYT**FGGGTKLEIK	29

[0310] 嵌合抗体的组装方案见表4，VH与CH组成抗体的重链，VL和CL组成抗体的轻链；用“抗体”+抗体编号表示，如抗体M1的重链由如SED ID NO:24所示的VH和如SED ID NO:32所示的CH组成，抗体M1的轻链由如SED ID NO:25所示的VL和如SED ID NO:34所示的CL组成。对照抗体M30-H1-L4的重链如SEQ ID NO:30所示，轻链如SEQ ID NO:31所示(见表5)。嵌合抗体的CDR见表6，IgG恒定区的氨基酸序列见表7。

[0311] 将编码抗体的重链和轻链的基因序列分别克隆至表达载体中，获得重组表达载体，然后瞬转HEK293F细胞，培养后经ProteinA亲和层析纯化获得抗体，测序后与预期序列一致。

[0312] 表4嵌合抗体编号、组装方案

[0313]

抗体编号	VH SEQ ID NO:	CH SEQ ID NO:	VL SEQ ID NO:	CL SEQ ID NO:
M1	24	32	25	34
M2	24	32	26	34
M3	24	32	27	34
M4	24	32	28	34
M5	24	32	29	34

[0314] 表5对照抗体M30-H1-L4的氨基酸序列

[0315]

编号	类型	氨基酸序列	序列号
M30-H1-L4	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHW VRQAPGQGLEWMGYINPYNDDVKYNEKFKGRVTITA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWGYYGSPLYYF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	30
	轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKP GQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP	31

[0316]

		PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	

[0317] 表6嵌合抗体的CDR

[0318]

编号	VH CDR1 SEQ ID NO:	VH CDR2 SEQ ID NO:	VH CDR3 SEQ ID NO:	VL CDR1 SEQ ID NO:	VL CDR2 SEQ ID NO:	VL CDR3 SEQ ID NO:
M1	6	7	8	9	14	19
M2	6	7	8	10	15	20
M3	6	7	8	11	16	21
M4	6	7	8	12	17	22
M5	6	7	8	13	18	23

[0319] 实施例3嵌合抗体的亲和力和特异性

[0320] 1、嵌合抗体亲和力验证-1Biacore

[0321] 采用BiaCore T200(GE Healthcare)进行检测:用ProteinA芯片(GE Healthcare,Cas#29127556)进行检测,抗体使用1×HBS-EP+(1×HBS-EP+的制备:取HBS-EP+(10×)(GE Healthcare,cat#BR-1006-69)50mL,加超纯水450mL,混匀)稀释至5μg/mL,以10μL/min的流速通过实验流路(Fc2、Fc4),捕获20秒(s)使捕获量约为235RU;之后流速调为30μL/min,依次进不同浓度的hB7-H3-His稀释液(0nM、3.125nM、6.25nM、12.5nM、25nM、50nM,用1×HBS-EP+稀释),同时经过实验流路(Fc2、Fc4)和参比流路(Fc1、Fc3)表面,结合时间180s,解离时

间600s,最后用Glycine pH1.5(GE Healthcare,cat#BR100354)对芯片进行再生60s,然后进行下一个循环。用数据分析软件Evaluation Software 3.1对试验结果进行分析,将样品试验流路采集所得传感信号进行参比流路、样品空白双扣减,并选用动力学"1:1"模型进行拟合,得出各样品同hB7-H3-His结合的动力学参数(ka:结合速率;kd:解离速率;kD:结合解离平衡常数)。

[0322] 表8嵌合抗体与hB7-H3-His结合的结合速率、解离速率和结合解离平衡常数

[0323]

抗体	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
M1	7.504E+5	2.794E-4	3.723E-10
M2	1.282E+5	0.04906	3.828E-7
M30-H1-L4	2.437E+5	2.403E-4	9.860E-10

[0324] 结果如表8所示,抗体M1和M2都能结合hB7-H3-His,抗体M1与hB7-H3-His结合的亲和力更高。

[0325] 2、嵌合抗体亲和力验证-2流式

[0326] 取对数生长期的MDA-MB-468细胞,1500rpm离心5分钟(min),去掉上清,用1×PBS重悬,1500rpm离心5分钟,去掉上清,重复一次。将MDA-MB-468细胞加入V型96孔板,50μL/孔(20万个细胞),1500rpm离心5分钟并弃去PBS;100μL/孔加入梯度稀释的嵌合抗体(初始浓度为100nM,3倍梯度稀释,溶媒为1×PBS),重悬细胞;冰上孵育1小时(h);孵育结束之后,2000rpm离心5分钟,去掉上清,用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心,去掉上清,重复两次;100μL/孔加入PE标记山羊抗人IgG Fc二抗(Invitrogen,货号12-4998-82;用1×PBS稀释至1:500),重悬细胞;避光,冰上孵育30分钟;孵育结束之后,2000rpm离心5分钟,去掉上清,用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心,去掉上清,重复两次;200μL/孔加入1×PBS重悬细胞;在cytoflex流式细胞仪(Beckman)上进行检测。

[0327] 检测结果如图1所示。

[0328] 3、嵌合抗体特异性验证-流式

[0329] 取对数生长期的细胞(Lag3-CHO细胞、VISTA-CHO细胞、Tim3-CHO细胞或Raji细胞),1500rpm离心5分钟,去掉上清,用1×PBS重悬,1500rpm离心5分钟,去掉上清,重复一次。将细胞加入V型96孔板,50μL/孔(50万个细胞),1500rpm离心5分钟并弃去PBS;100μL/孔加入抗体M1(浓度为100nM),重悬细胞;冰上孵育1小时;孵育结束之后,2000rpm离心5分钟,去掉上清,用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心,去掉上清,重复两次;100μL/孔加入PE标记山羊抗人IgG Fc二抗(Invitrogen,货号12-4998-82;用1×PBS稀释至1:500),重悬细胞;避光,冰上孵育30分钟;孵育结束之后,2000rpm离心5分钟,去掉上清,用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心,去掉上清,重复两次;200μL/孔加入1×PBS重悬细胞;在cytoflex流式细胞仪(Beckman)上进行检测。

[0330] 结果如图2所示,抗体M1不结合Lag3-CHO细胞、VISTA-CHO细胞、Tim3-CHO细胞和Raji细胞。

[0331] 实施例4人源化抗体

[0332] 人源化抗体VH和VL的氨基酸序列见表9。人源化抗体的组装方案见表10,VH与CH组成抗体的重链,VL和CL组成抗体的轻链;用"抗体"+抗体编号表示,如抗体V3的重链由如SED ID NO:36所示的VH和如SED ID NO:32所示的CH组成,抗体V3的轻链由如SED ID NO:40所示

的VL和如SED ID NO:34所示的CL组成。对照抗体M30-H1-L4的重链如SEQ ID NO:30所示，轻链如SEQ ID NO:31所示。对照抗体Trop2的重链如SEQ ID NO:42所示，轻链如SEQ ID NO:43所示(见表11)。

[0333] 表9人源化VH和VL的氨基酸序列

[0334]

编号	类型	氨基酸序列	序列号
hMH-1	VH	EVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKASGYTFT**DYDIN**WVRQMPGKGLEWMG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**QVTISADKSTNTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	35
hMH-2		EVQLVQSGAEVKKSGESLKISCKASGYTFT**DYDIN**WVRQMPGKGLEWIG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**QVTLSADKSTNTAYMQWSSLKASDTAMYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	36
hMH-3		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**DYDIN**WVRQAPGKGLEWVG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**RFTISADKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	37
hMH-4		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**DYDIN**WVRQAPGQRLEWIG**WIFPGDDTTKYNEKFKG**RATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**SPSFDY**WGQGTLVTVSS	38
hML-1	VL	QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**SASSTIGFMY**WYQQKPGQAPRRWIY**DTSKLAS**GVPDRFSVSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYC**HQRSSYPT**FGQGTKVEIK	39
hML-2		QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC**SASSTIGFMY**WYQQKPGQAPRRWIY**DTSKLAS**GVPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYC**HQRSSYPT**FGQGTKVEIK	40
hML-3		QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSTIGFMY**WYQQKPGKAPKRWIY**DTSKLAS**GVPSRFSVSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC**HQRSSYPT**FGQGTKVEIK	41

[0335] 注:CDR(Kabat编号)用加粗+下划线标出

[0336] 表10人源化抗体编号、组装方案

[0337]

抗体编号	VH SEQ ID	CH SEQ ID	VL SEQ ID	CL SEQ ID

[0338]

	NO:	NO:	NO:	NO:
V1	35	32	39	34
V2	36	32	39	34
V3	36	32	40	34
V4	37	32	41	34
V5	38	32	41	34

[0339] 表11对照抗体Trop2的氨基酸序列

[0340]

抗体编号	类型	氨基酸序列	序列号
Trop2	重链	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNW VKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLD TSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	42
Trop2	轻链	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	43

[0341] 将抗体的重链和轻链的基因序列分别克隆至表达载体中，获得重组表达载体，然后瞬转HEK293F细胞，培养后经Protein A亲和层析纯化获得人源化抗体，测序后与预期序列一致。

[0342] 实施例5人源化抗体的亲和力、内化能力和特异性

[0343] 1、人源化抗体亲和力验证-1 ELISA

[0344] 实验前一天，将目标抗原hB7-H3-Fc用1×PBS稀释到2μg/mL，然后100μL/孔加入ELISA板(96孔板)，4℃包被过夜；第二天，甩干包被液，用洗涤液PBST洗涤2次，拍干之后，200μL/孔加入封闭液(含1％BSA的PBST)，37℃封闭2小时；甩干封闭液，用洗涤液PBST洗涤2次，拍干之后，100μL/孔加入梯度稀释的人源化抗体(初始浓度为300nM，3倍梯度稀释，溶媒为1×PBS)，37℃反应1小时；甩干人源化抗体，用洗涤液PBST洗涤5次，拍干之后，100μL/孔加入HRP标记山羊抗人Kappa轻链二抗(Invitrogen，货号A18853；用1×PBS稀释至1:2000)，

37℃反应1小时;甩干二抗,用洗涤液PBST洗涤8次,拍干之后,加入TMB显色液,100μL/孔,37℃反应5-10分钟;加入ELISA终止液,100μL/孔,15分钟内用酶标仪在450nm波长下读取吸光度值。

[0345] 结果如图3所示。

[0346] 2、人源化抗体亲和力验证-2流式

[0347] 取对数生长期的MDA-MB-468细胞,1500rpm离心5分钟,去掉上清,用1×PBS重悬,1500rpm离心5分钟,去掉上清,重复一次。将MDA-MB-468细胞加入V型96孔板,50μL/孔(20万个细胞),1500rpm离心5分钟并弃去PBS;100μL/孔加入梯度稀释的人源化抗体(初始浓度为100nM,3倍梯度稀释,溶媒为1×PBS),重悬细胞;冰上孵育1小时;孵育结束之后,2000rpm离心5分钟,去掉上清,用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心,去掉上清,重复两次;100μL/孔加入PE标记山羊抗人IgG Fc二抗(Invitrogen,货号12-4998-82;用1×PBS稀释至1:500),重悬细胞;避光,冰上孵育30分钟;孵育结束之后,2000rpm离心5分钟,去掉上清,用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心,去掉上清,重复两次;200μL/孔加入1×PBS重悬细胞;在cytoflex流式细胞仪(Beckman)上进行检测。

[0348] 结果如图4所示。

[0349] 3、流式细胞术检测人源化抗体内化

[0350] 用冰预冷的细胞洗液(含2%FBS的PBS)配制30μg/mL的人源化抗体,然后按体积比为1:1与细胞(MDA-MB-468细胞或N87细胞,50万个细胞)混合(终体积100μL),混匀后冰浴1h;4℃ 1200r/min离心5min,弃上清;用冰预冷的细胞洗涤液重悬细胞,4℃ 1200r/min离心5min,去掉上清,重复两次;加入200μL冰预冷的细胞洗液重悬细胞,于37℃孵育2h,使结合细胞表面的抗体内化,然后移至冰浴,并加入冰预冷的细胞洗液终止内化,4℃ 1200r/min离心5min,弃上清,加入100μL PE标记山羊抗人IgG Fc二抗稀释液(Invitrogen,货号12-4998-82;以冰预冷的细胞洗液:PE标记山羊抗人IgG Fc二抗=500:1配制PE标记山羊抗人IgG Fc二抗稀释液),重悬细胞,4℃避光孵育30min,4℃ 1200r/min离心5min,弃上清;用冰预冷的细胞洗液重悬细胞,4℃ 1200r/min离心5min,弃上清,用冰预冷的1×PBS重悬细胞,4℃ 1200r/min离心5min,弃上清,加入200μL冰预冷的1×PBS重悬细胞,用流式细胞仪测平均荧光强度。

[0351] 表12人源化抗体内化能力

[0352]

细胞	MDA-MB-468 细胞			N87 细胞		
抗体	Trop2	V1	V3	Trop2	V1	V3
内吞后荧光强度	69153.17	47449.34	36060.02	174366.53	222436.23	193742.47
对照组(内吞前)荧光强度	165668.35	53567.67	47757.42	334120.58	236990.73	246249.85
内吞比例	58.26%	11.42%	24.49%	47.81%	6.14%	21.32%

[0353] 4、人源化抗体特异性验证-流式

[0354] 取对数生长期的细胞(VISTA-CHO细胞、Tim3-CHO细胞或Lag3-CHO细胞),1500rpm离心5分钟,去掉上清,用1×PBS重悬,1500rpm离心5分钟,去掉上清,重复一次。将细胞加入V型96孔板,50μL/孔(50万个细胞),1500rpm离心5分钟并弃去PBS;100μL/孔加入人源化抗体(浓度为100nM,溶媒为1×PBS),重悬细胞;冰上孵育1小时;孵育结束之后,2000rpm离心5

分钟，去掉上清，用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心，去掉上清，重复两次；100μL/孔加入PE标记山羊抗人IgG Fc二抗(Invitrogen，货号12-4998-82；用1×PBS稀释至1:500)，重悬细胞；避光，冰上孵育30分钟；孵育结束之后，2000rpm离心5分钟，去掉上清，用200μL/孔的1×PBS重悬细胞之后再次进行离心，去掉上清，重复两次；200μL/孔加入1×PBS重悬细胞；在cytoflex流式细胞仪(Beckman)上进行检测。

[0355] 检测结果见图5，抗体V1-V5均不结合VISTA-CHO细胞、Tim3-CHO细胞或Lag3-CHO细胞。

[0356] 5、人源化抗体的种属特异性

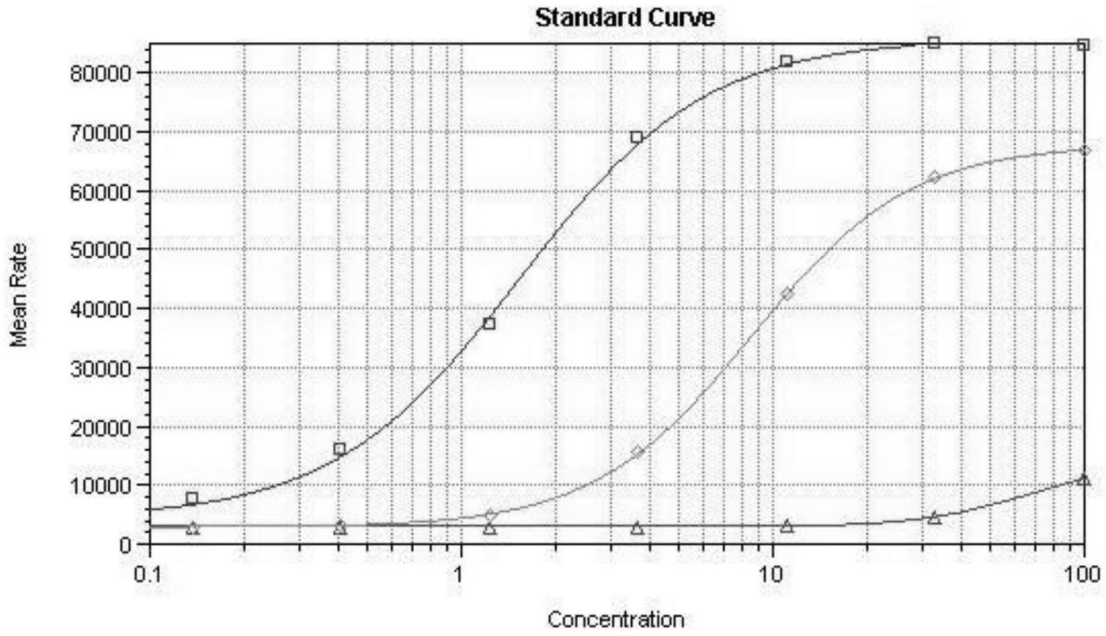
[0357] 实验前一天，将目标抗原食蟹猴B7-H3(novoprotein CA61)、小鼠B7-H3(SinoBiological，50973-M08H)和hB7-H3-his用1×PBS稀释到2μg/mL，然后100μL/孔加入ELISA板(96孔板)，各两行，4℃包被过夜。第二天，甩干包被液，用洗涤液PBS T洗涤2次，拍干之后，200μL/孔加入封闭液，37℃封闭2小时；甩干封闭液，用洗涤液PBST洗涤2次，拍干之后，100μL/孔加入梯度稀释的抗体V3(初始浓度为2μg/mL，2倍梯度稀释)，37℃反应2小时；甩干抗体V3，用洗涤液PBST洗涤5次，拍干之后，100μL/孔加入anti-human kappa light Chains HRP(Sigma，A7164；用1×PBS稀释至1:10000)，37℃反应1h；甩干二抗，用洗涤液PBST洗涤8次，拍干之后，加入TMB显色液，100μL/孔，37℃反应10分钟；加入0.1M H_2SO_4终止液，100μL/孔，15分钟内用酶标仪在450nm波长下读取吸光度值。

[0358] 表13抗体V3与B7-H3结合的亲和力

[0359]

抗原	EC_{50}(μg/mL)
小鼠B7-H3	NA
食蟹猴B7-H3	0.042
hB7-H3-his	0.042

[0360] 从表13可以看出，抗体V3可结合人、食蟹猴B7-H3，不结合小鼠B7-H3。



y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D:	A	B	C	D	R^2
□ Plot#1 (M1: Concentration vs Values)	4310.928	1.448	1.536	85829.73	0.999
△ Plot#2 (M2: Concentration vs Values)	2832.209	2.315	69.304	14639.93	1
◇ Plot#3 (H1L4: Concentration vs Values)	2779.145	1.708	8.543	67908.01	1

图1

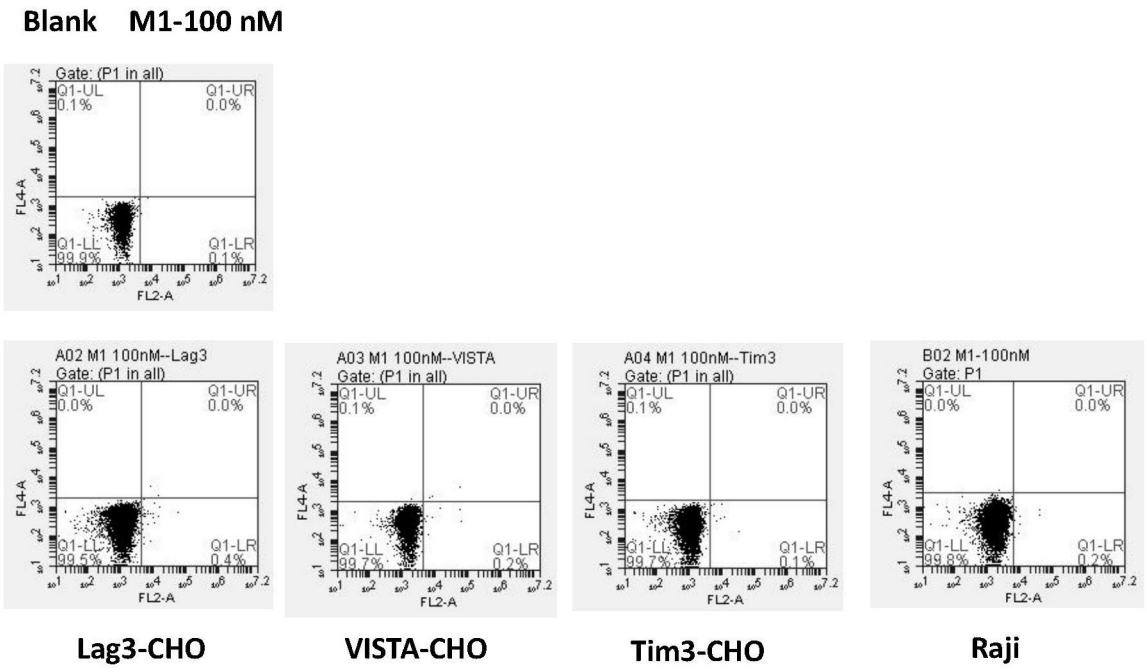
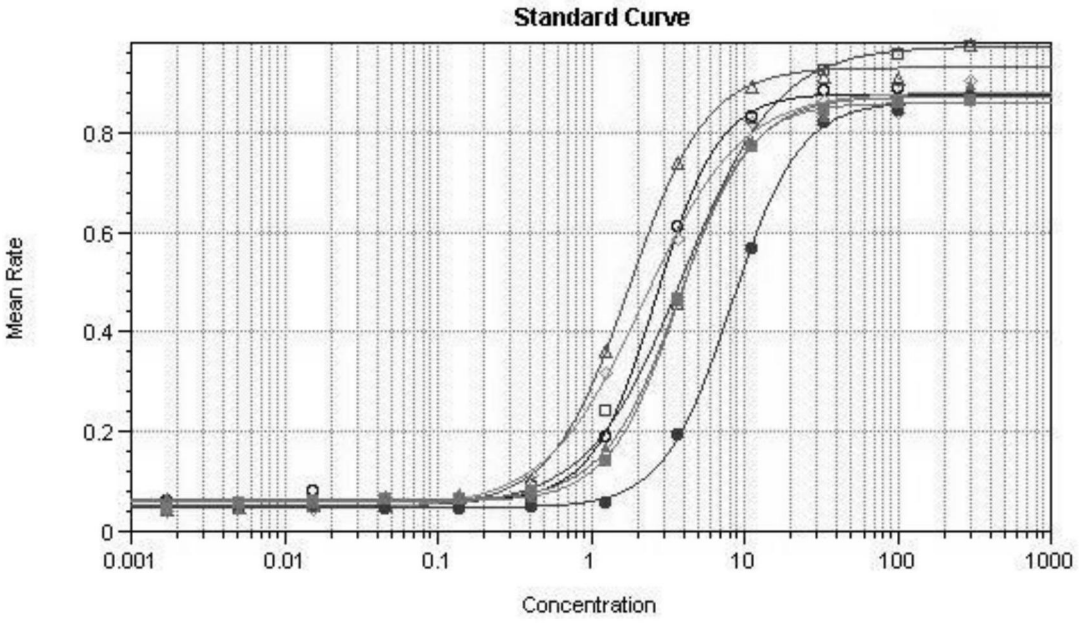


图2



y = ((A - D)/(1 + (x/C)^B)) + D:	A	B	C	D	R^2
□ Plot#1 (V1: Concentration vs Values)	0.049	1.401	3.949	0.974	0.998
○ Plot#2 (V2: Concentration vs Values)	0.061	2.101	2.661	0.88	0.999
△ Plot#3 (V3: Concentration vs Values)	0.049	1.716	1.774	0.932	0.998
◇ Plot#4 (V4: Concentration vs Values)	0.045	1.358	2.217	0.882	0.998
● Plot#5 (V5: Concentration vs Values)	0.047	1.954	8.243	0.863	1
■ Plot#6 (M1: Concentration vs Values)	0.059	1.925	3.694	0.86	1
▲ Plot#7 (H1L4: Concentration vs Values)	0.062	1.783	3.728	0.873	0.999

图3

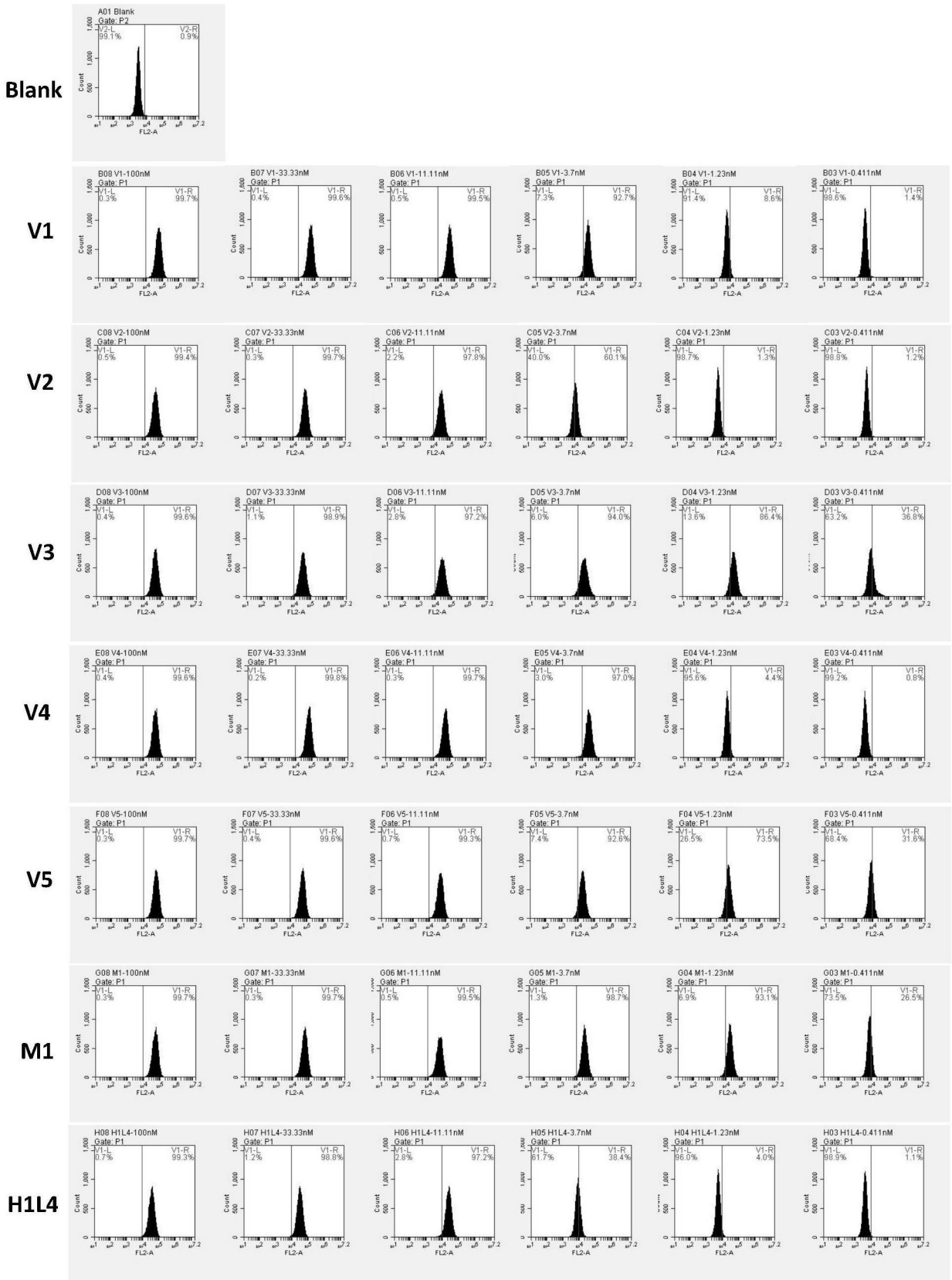

Blank
A01 Blank
Gate: P2
V2-L 99.1%
V2-R 0.9%
V1
B08 V1-100nM Gate: P1 V1-L 0.3% V1-R 99.7%
B07 V1-33.33nM Gate: P1 V1-L 0.4% V1-R 99.6%
B06 V1-11.11nM Gate: P1 V1-L 0.5% V1-R 99.5%
B05 V1-3.7nM Gate: P1 V1-L 7.3% V1-R 92.7%
B04 V1-1.23nM Gate: P1 V1-L 91.4% V1-R 8.6%
B03 V1-0.411nM Gate: P1 V1-L 98.6% V1-R 1.4%
V2
C09 V2-100nM Gate: P1 V1-L 0.5% V1-R 99.4%
C07 V2-33.33nM Gate: P1 V1-L 0.3% V1-R 99.7%
C06 V2-11.11nM Gate: P1 V1-L 2.2% V1-R 97.8%
C05 V2-3.7nM Gate: P1 V1-L 40.0% V1-R 60.1%
C04 V2-1.23nM Gate: P1 V1-L 98.7% V1-R 1.3%
C03 V2-0.411nM Gate: P1 V1-L 98.8% V1-R 1.2%
V3
D08 V3-100nM Gate: P1 V1-L 0.4% V1-R 99.6%
D07 V3-33.33nM Gate: P1 V1-L 1.1% V1-R 98.9%
D06 V3-11.11nM Gate: P1 V1-L 2.8% V1-R 97.2%
D05 V3-3.7nM Gate: P1 V1-L 6.0% V1-R 94.0%
D04 V3-1.23nM Gate: P1 V1-L 13.6% V1-R 86.4%
D03 V3-0.411nM Gate: P1 V1-L 63.2% V1-R 36.8%
V4
E08 V4-100nM Gate: P1 V1-L 0.4% V1-R 99.6%
E07 V4-33.33nM Gate: P1 V1-L 0.2% V1-R 99.8%
E06 V4-11.11nM Gate: P1 V1-L 0.3% V1-R 99.7%
E05 V4-3.7nM Gate: P1 V1-L 3.0% V1-R 97.0%
E04 V4-1.23nM Gate: P1 V1-L 95.6% V1-R 4.4%
E03 V4-0.411nM Gate: P1 V1-L 99.2% V1-R 0.8%
V5
F08 V5-100nM Gate: P1 V1-L 0.3% V1-R 99.7%
F07 V5-33.33nM Gate: P1 V1-L 0.4% V1-R 99.6%
F06 V5-11.11nM Gate: P1 V1-L 0.7% V1-R 99.3%
F05 V5-3.7nM Gate: P1 V1-L 7.4% V1-R 92.6%
F04 V5-1.23nM Gate: P1 V1-L 26.5% V1-R 73.5%
F03 V5-0.411nM Gate: P1 V1-L 68.4% V1-R 31.6%
M1
G08 M1-100nM Gate: P1 V1-L 0.3% V1-R 99.7%
G07 M1-33.33nM Gate: P1 V1-L 0.3% V1-R 99.7%
G06 M1-11.11nM Gate: P1 V1-L 0.5% V1-R 99.5%
G05 M1-3.7nM Gate: P1 V1-L 1.3% V1-R 98.7%
G04 M1-1.23nM Gate: P1 V1-L 6.9% V1-R 93.1%
G03 M1-0.411nM Gate: P1 V1-L 73.5% V1-R 26.5%
H1L4
H08 H1L4-100nM Gate: P1 V1-L 0.7% V1-R 99.3%
H07 H1L4-33.33nM Gate: P1 V1-L 1.2% V1-R 98.8%
H06 H1L4-11.11nM Gate: P1 V1-L 2.8% V1-R 97.2%
H05 H1L4-3.7nM Gate: P1 V1-L 61.7% V1-R 38.4%
H04 H1L4-1.23nM Gate: P1 V1-L 96.0% V1-R 4.0%
H03 H1L4-0.411nM Gate: P1 V1-L 98.9% V1-R 1.1%
Count
FL2-A

图4

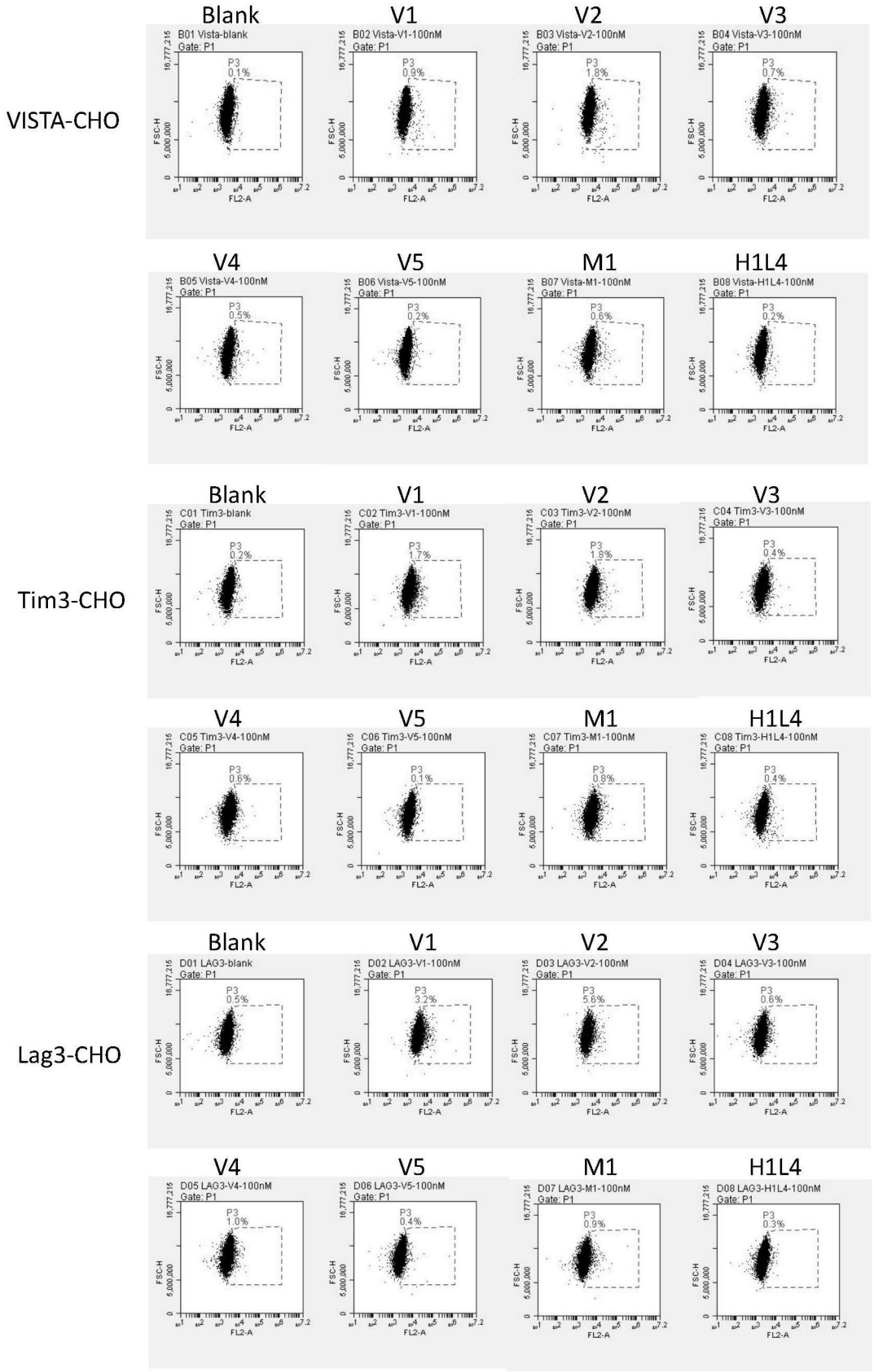

VISTA-CHO
Blank
B01 Vista-blank
Gate: P1
P3
0.1%
V1
B02 Vista-V1-100nM
Gate: P1
P3
0.9%
V2
B03 Vista-V2-100nM
Gate: P1
P3
1.8%
V3
B04 Vista-V3-100nM
Gate: P1
P3
0.7%
V4
B05 Vista-V4-100nM
Gate: P1
P3
0.5%
V5
B06 Vista-V5-100nM
Gate: P1
P3
0.2%
M1
B07 Vista-M1-100nM
Gate: P1
P3
0.8%
H1L4
B08 Vista-H1L4-100nM
Gate: P1
P3
0.2%
Tim3-CHO
Blank
C01 Tim3-blank
Gate: P1
P3
0.2%
V1
C02 Tim3-V1-100nM
Gate: P1
P3
1.7%
V2
C03 Tim3-V2-100nM
Gate: P1
P3
1.8%
V3
C04 Tim3-V3-100nM
Gate: P1
P3
0.4%
V4
C05 Tim3-V4-100nM
Gate: P1
P3
0.6%
V5
C06 Tim3-V5-100nM
Gate: P1
P3
0.1%
M1
C07 Tim3-M1-100nM
Gate: P1
P3
0.8%
H1L4
C08 Tim3-H1L4-100nM
Gate: P1
P3
0.4%
Lag3-CHO
Blank
D01 LAG3-blank
Gate: P1
P3
0.5%
V1
D02 LAG3-V1-100nM
Gate: P1
P3
3.2%
V2
D03 LAG3-V2-100nM
Gate: P1
P3
5.6%
V3
D04 LAG3-V3-100nM
Gate: P1
P3
0.6%
V4
D05 LAG3-V4-100nM
Gate: P1
P3
1.0%
V5
D06 LAG3-V5-100nM
Gate: P1
P3
0.4%
M1
D07 LAG3-M1-100nM
Gate: P1
P3
0.9%
H1L4
D08 LAG3-H1L4-100nM
Gate: P1
P3
0.3%
FSC-H
FL2-A

图5