(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119546643 A
(43)申请公布日 2025.02.28

(21)申请号 202380053588.4

(22)申请日 2023.05.10

(30)优先权数据
63/341,944 2022.05.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066819 2023.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/220626 EN 2023.11.16

(71)申请人 埃克塞里艾克西斯公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 邦妮·哈默 杰佛瑞·N·希加基 西玛·坎塔克 查尔斯·凯佩兰

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 梁非非 张奎燕

(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书59页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

5T4结合剂及其用途

(57)摘要

本公开提供了5T4结合剂(例如,抗体,包括多特异性抗体如双特异性抗体和抗体-药物缀合物)及其用途。



CN 119546643 A

1.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

(ii)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;或者

(iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

2.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(a)包含以下的VH区:

(1)具有选自由SEQ ID NO:1、7、12、13和18组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;

(2)具有选自由SEQ ID NO:2、8、14、19和24组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;和

(3)具有选自由SEQ ID NO:3、9、15和20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;

以及

(b)包含以下的VL区:

(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;

(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;和

(3)具有选自由SEQ ID NO:6、17和23组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

3.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VLCDR2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3;

(ii)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VLCDR2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3;

(iii)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VLCDR2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3;

(iv)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3;

(v)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR3;或者

(vi)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:24

的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VLCDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3。

4.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(a)包含以下的VH区:

(1)具有选自由SEQ ID NO:27、31、34、35和39组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;

(2)具有选自由SEQ ID NO:28、32、36、40和43组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;和

(3)具有选自由SEQ ID NO:29、33、37和41组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;

以及

(b)包含以下的VL区:

(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;

(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;和

(3)具有选自由SEQ ID NO:30、38和42组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

5.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3;

(ii)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3;

(iii)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3;

(iv)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VL CDR3;

(v)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VL CDR3;或者

(vi)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

6.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(a)包含以下的VH区:

(1)具有选自由SEQ ID NO:46、50、53、13和57组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;

(2)具有选自由SEQ ID NO:47、51、54、58和61组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;和

(3)具有选自由SEQ ID NO:48、52、55和59组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;

以及

(b)包含以下的VL区:

(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21的氨基酸序列组成的组的VL CDR1;

(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22的氨基酸序列组成的组的VL CDR2;和

(3)具有选自由SEQ ID NO:49、56和60的氨基酸序列组成的组的VL CDR3。

7.一种结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3;

(ii)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3;

(iii)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3;

(iv)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3;

(v)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR3;或者

(vi)包含以下的VH区:含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1、含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VH CDR2、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;和包含以下的VL区:含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2和含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段还包含SEQ ID NO:25、26、44、45、62和63中任一项所示的框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列。

9.根据权利要求1至7中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段还包含人框架序列。

10.根据权利要求1至8中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:

(i)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL;

(ii)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VL;或者

(iii)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体是人源化抗体、人抗体或嵌合抗体。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段是Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fv、scFv、$(scFv)_2$、单链抗体分子、双可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区或由抗体片段形成的多特异性抗体。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的抗体或其片段,所述抗体或其片段与诊断剂、可检测剂或治疗剂缀合或重组融合。

15.根据权利要求14所述的抗体或其片段,其中所述治疗剂是化疗剂、细胞毒素或药物。

16.一种结合剂,所述结合剂与权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段结合基本相同的表位。

17.根据权利要求16所述的结合剂,所述结合剂为抗体或其片段。

18.根据权利要求16所述的结合剂,所述结合剂包含非抗体蛋白支架。

19.根据权利要求18所述的结合剂,其中所述非抗体蛋白支架包括纤连蛋白支架、anticalin、adnectin、亲和体、DARPin、fynomer、affitin、affilin、avimer、富含半胱氨酸的结蛋白肽或工程化的Kunitz型抑制剂。

20.一种结合剂,所述结合剂与权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段竞争结合人5T4。

21.根据权利要求20所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其片段。

22.一种或更多种载体,所述载体包含编码权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段的一种或更多种多核苷酸或互补多核苷酸。

23.一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段或权利要求16-21中任一项所述的结合剂,以及药学上可接受的载体。

24.一种治疗受试者的癌症或肿瘤的方法,包括向所述受试者施用权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段或权利要求23所述的药物组合物。

25.一种用于减轻受试者中与癌症或肿瘤相关的一种或更多种症状的方法,包括向所述受试者施用权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段或权利要求23所述的药物组合物。

26.一种用于减小患有肿瘤的受试者的肿瘤尺寸的方法,包括向所述受试者施用权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段或权利要求23所述的药物组合物。

27.一种用于增强患有肿瘤的受试者中的肿瘤细胞去除的方法,包括向所述受试者施用权利要求1-15中任一项所述的抗体或其片段或权利要求23所述的药物组合物。

28.一种治疗受试者中5T4相关疾病、紊乱或状况的方法,包括向所述受试者施用权利

要求1-15中任一项所述的抗体或其片段或权利要求23所述的药物组合物。

29.根据权利要求24-28中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用与所述抗体或其片段或所述药物组合物组合的一种或更多种治疗剂。

30.根据权利要求24-29中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类受试者。

5T4结合剂及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年5月13日提交的美国临时专利申请第63/341,944号的权益,该申请的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含以XML文件格式与本申请一起提交的计算机可读序列表,其全部内容通过引用整体并入本文。与本申请一起提交的序列表XML文件名为“14529-107-228_SEQ_LISTING.xml”,创建于2023年5月8日,大小为102,425字节。

[0005] 领域

[0006] 本公开内容总体上涉及结合剂,例如结合5T4(包括人5T4)的抗体或其片段,及其使用方法。

[0007] 背景

[0008] 5T4是N-糖基化跨膜72kDa糖蛋白,含有8个富含亮氨酸的重复序列。5T4,也称为Wnt活化的抑制因子1或WAIF1,由于其在胎儿滋养层(其首次被发现处)中表达,通常被称为癌胚抗原或称为滋养层糖蛋白(TPBG)。5T4存在于肿瘤包括结肠直肠肿瘤、卵巢肿瘤和胃肿瘤中。其表达被用作预后辅助。5T4在正常组织中的表达非常有限,但在恶性肿瘤的整个发展过程中广泛存在。尽管其受限的表达似乎使5T4有可能成为癌症治疗中的靶,但尚未实现靶向5T4的结合剂和疫苗的治疗成功。

[0009] 因此,本领域仍然需要可以靶向5T4以治疗、预防或缓解5T4介导的疾病、紊乱或状况,包括涉及表达5T4的肿瘤细胞的那些疾病、紊乱或状况的剂。

[0010] 概述

[0011] 本公开内容提供了5T4结合剂,包括人5T4结合剂。此类试剂包括结合5T4的抗体,例如单特异性或多特异性(例如,双特异性)抗体和结合5T4的抗体-药物缀合物(ADC)。在一些实施方案中,此类结合剂与包含本文所述CDR(例如,表1-3)的抗体结合人5T4的相同表位。在一些实施方案中,此类结合剂与包含本文所述的重链可变区和轻链可变区(例如,表1-3)的抗体结合人5T4的相同表位。

[0012] 本公开内容还提供了包含5T4结合剂的组合物。在一些实施方案中,此类组合物包括结合5T4的抗体,例如单特异性或多特异性(例如,双特异性)抗体和结合5T4的ADC。在一些实施方案中,此类组合物包括与包含本文所述CDR(例如,表1-3)的抗体结合人5T4的基本上相同表位的抗体和ADC。在一些实施方案中,此类组合物包括与包含本文所述的重链可变区和轻链可变区(例如,表1-3)的抗体结合人5T4的基本上相同表位的抗体和ADC。

[0013] 本公开内容还提供了用5T4结合剂或包含所述剂的组合物治疗、预防或缓解5T4介导的疾病、紊乱或状况(包括5T4介导的疾病、紊乱或状况的一种或更多种症状)的方法。此类组合物包括结合5T4的抗体,例如单特异性或多特异性(例如,双特异性)抗体和结合5T4的ADC。

[0014] 附图简述

[0015] 图1A和图1B示出了mAbA4、mAbA15和mAbA17的重链可变区和轻链可变区(包括VH

CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的序列比对。CDR的边界由Kabat、AbM、Chothia、Contact、IMGT和AHon编号指示。

[0016] 详细描述

[0017] 本公开内容提供了5T4结合剂。此类剂包括结合5T4的抗体(例如,单特异性或多特异性,包括双特异性)和ADC,包括结合人5T4的抗体和ADC。此类结合剂可用于治疗、预防或缓解5T4介导的疾病、紊乱或状况(包括疾病、紊乱或状况的一种或更多种症状)的组合物和方法。5T4介导的疾病、紊乱和状况包括多种癌症,包括但不限于其中肿瘤细胞表达或过表达5T4的任何癌症。如本文所用,术语"过表达"意指比正常(诸如正常细胞中)转录和翻译更多的遗传产物,其过程通常是癌细胞的特征。此外,本文所述的5T4结合剂,诸如5T4结合抗体(例如,单特异性或多特异性抗体,包括双特异性抗体)和5T4结合ADC可用于杀伤和/或去除肿瘤细胞。本文所述的5T4结合剂,诸如5T4结合抗体(例如,单特异性或多特异性抗体,包括双特异性抗体)和5T4结合ADC可用于治疗癌症的组合物和方法。

[0018] 除非另有说明,否则术语"5T4"是指多肽("多肽"和"蛋白质"在本文中可互换使用)或来自任何脊椎动物来源(包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如人、食蟹猴(cyno))、犬和啮齿动物(例如小鼠和大鼠))的任何天然5T4。5T4,也称为"5T4癌胚滋养层糖蛋白"或"Wnt活化抑制因子1"或"5T4癌滋养层糖蛋白"或"5T4癌胚抗原"或"WAIF1"或"M6P1"或"5T4-AG"或"5T4AG"或"TPBG",是由TPBG基因编码的糖蛋白。术语5T4涵盖"全长"5T4,以及由细胞中加工产生的任何形式的5T4或其任何片段。在一些实施方案中,5T4包含信号序列。在一些实施方案中,5T4不包括信号序列。在一些实施方案中,术语5T4是指全长5T4的片段,其包含5T4胞外结构域。术语5T4还涵盖天然存在的5T4变体,诸如SNP变体、剪接变体和等位基因变体。

[0019] 人5T4的全长氨基酸序列提供如下(示例性信号序列=斜体文本;示例性胞外结构域=下划线文本):

[0020] *MPGGCSRGPA AGDGRLRLAR LALVLLGWVS S*SSPTSSASS FSSSAPFLAS AVSAQPPLPD QCPALCECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP AYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL AALNLSGSRL DEVRAGAFEH LPSLRQLDLS HNPLADLSPF AFSGSNASVS APSPLVELIL NHIVPPEDER QNRSFEGMVV AALLAGRALQ GLRRLELASN HFLYLPRDVL AQLPSLRHLD LSNNSLVSLT YVSFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNGTLAE LQGLPHIRVF LDNNPWVCDC HMADMVTWLK ETEVVQGKDR LTCAYPEKMR NRVLLELNSA DLDCDPILPP SLQTSYVFLG IVLALIGAIF LLVLYLNRKG IKKWMHNIRD ACRDHMEGYH YRYEINADPR LTNLSSNSDV (SEQ ID NO:64)

[0021] 食蟹猴(cyno)5T4的全长氨基酸序列提供如下(示例性信号序列=斜体文本;示例性胞外结构域=下划线文本):

[0022] *MPGGCSRGPA AGDGRLRLAR LALVLLGWVS S*SSSTSSASS SSSSAPFLAS AASAQPPLPD QCPALCECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP LYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL AALNLSGSRL DEVRGGAFEH LPSLRQLDLS HNPLAYLSPF AFSGSNASIS APSPLVELIL NHIVPPDDKR QNRSFEGMVA AALVAGRALQ GLHLLELASN HFLYLPRDVL AQLPSLRYLD LSNNSLVSLT YVSFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNGTLAE LQGLPHVRVF LDNNPWVCDC HMADMVTWLK QTGVVQGKDR LTCAFPEKMR NRVLLELNSA DLDCDPILPP SLQTSYVFLG

IVLALIGAIF LLVLYLNRKG IKKWMHNIRD ACRDHMEGYH YRYEINADPR LTNLSSNSDV (SEQ ID NO:65)

[0023] 小鼠5T4的全长氨基酸序列提供如下(示例性信号序列＝斜体文本;示例性胞外结构域＝下划线文本):

[0024] *MPGAGSRGPS AGDGRLRLAR LALVLLGWVS A*SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT SYVFLGIVLA LIGAIFLLVL YLNRKGIKKW MHNIRDACRD HMEGYHYRYE INADPRLTNL SSNSDV (SEQ ID NO:66)

[0025] 如本文所用,术语“结合剂”或其语法等同物是指具有一个或更多个结合抗原的抗原结合位点的分子(例如抗体)。在一些实施方案中,如本文所述的5T4结合剂是结合5T4(诸如人5T4)的抗体、抗体片段或其他基于肽的分子,以及抗体、抗体片段或基于肽的分子的缀合物(例如,ADC)。

[0026] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换使用,并且以最广泛的意义使用,并且特别涵盖例如多克隆抗体、单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、重组产生的抗体、单结构域(例如VHH)抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、合成抗体、嵌合抗体、人源化抗体或具有全长重链和/或轻链的人抗体形式。如本文所用,VHH是指衍生自仅重链抗体的可变区的结构域抗体。示例性单结构域抗体包括但不限于天然缺乏轻链的抗体,例如来自骆驼科物种(例如美洲驼)的那些,衍生自常规4链抗体的单结构域抗体,工程化抗体和除衍生自抗体的那些以外的单结构域支架。单结构域抗体可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、美洲驼、山羊、兔和牛。VHH也可以衍生自除骆驼科以外的其他物种,其可以产生天然缺乏轻链的重链抗体。抗体还包括保留5T4结合特征的抗体片段(和/或包含抗体片段的多肽)。抗体片段的非限制性实例包括抗体的抗原结合区和/或效应子区,例如,Fab,Fab′,F(ab′)$_2$、Fv、scFv、(scFv)$_2$、单链抗体分子、双可变结构域抗体、单可变结构域、线性抗体、V区、由抗体片段形成的多特异性抗体、F(ab)$_2$、Fd、Fc、双抗体、双双抗体、二硫键连接的Fv(dsFv)、单结构域抗体(例如纳米抗体)或其他片段(例如,由非共价偶联的重链和轻链的可变区组成的片段)。一般而言,可变(V)区结构域可以是免疫球蛋白重链(VH)和/或轻链(VL)可变结构域的任何合适排列。例如,抗体还包括包含两个重链和两个轻链分子、抗体轻链单体和抗体重链单体的四聚体抗体。因此,例如,V区结构域可以是二聚体并且含有结合5T4的VHH-VHH、VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。如果需要,VH和VL可以直接或通过接头共价偶联以形成单链Fv(scFv)。为了便于参考,scFv蛋白在本文中被称为包括在类别“抗体片段”中。抗体片段的另一种形式是包含抗体的一个或更多个互补决定区(CDR)的肽。CDR(也称为“最小识别单元”或“高变区”)可以通过构建编码一个或更多个目的CDR的多核苷酸来获得。这样

的多核苷酸例如通过使用聚合酶链式反应以使用抗体产生细胞的mRNA作为模板合成可变区来制备(参见例如Larrick等,Methods:A Companion to Methods in Enzymology,2:106(1991);Courtenay-Luck,“Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”,载于Monoclonal Antibodies Production,Engineering and Clinical Application,Rittere et al.(eds.),第166页,Cambridge University Press(1995);和Ward等,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”,载于Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch et al.,(eds.),第137页,Wiley-Liss,Inc.(1995))。抗体片段可以掺入例如单结构域抗体、大抗体(maxibody)、小抗体(minibody)、内抗体(intrabody)、双抗体、三抗体、四抗体、新抗原受体的可变结构域(v-NAR)和双单链Fv区(参见例如Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology,23(9):1126-1136,2005)。在一些实施方案中,包含VH和/或VL的抗体含有轻链和/或重链恒定区,例如一个或更多个恒定区,包括一个或更多个IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4恒定区。在一些实施方案中,抗体可包括上述任一项的表位结合片段。本文描述的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或任何亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0027] 当涉及如本文所用的结合剂(例如,抗体或ADC)时,术语“单特异性”表示具有一个或更多个结合位点的结合剂,所述结合位点中的每一个结合至相同抗原的相同表位。

[0028] 当关于结合剂(例如,抗体或ADC)使用时,术语“双特异性”是指结合剂能够特异性结合至少两个不同的抗原决定簇,例如两个结合位点,每个结合位点由一对抗体重链可变结构域(VH)和抗体轻链可变结构域(VL)形成,或者每个结合位点由一对结合不同抗原或相同抗原上的不同表位的VHH结构域形成。此类双特异性结合剂(例如,抗体或ADC)可具有1+1形式(包含针对第一抗原或表位的一个结合位点和针对第二抗原或表位的一个结合位点)。其他双特异性结合剂(例如,抗体或ADC)形式可以是2+1或1+2形式(包含针对第一抗原或表位的两个结合位点和针对第二抗原或表位的一个结合位点)或2+2形式(包含针对第一抗原或表位的两个结合位点和针对第二抗原或表位的两个结合位点)。当双特异性结合剂(例如,抗体或ADC)包含两个抗原结合位点时,每个可以结合不同的抗原决定簇。此类双特异性结合剂(例如,抗体或ADC)可结合同一抗原上的两个不同表位(例如,5T4上的表位)。

[0029] 在两个或更多个核酸或多肽的上下文中,术语“相同”或百分比“同一性”是指两个或更多个序列或子序列,当比较和比对(如果需要,引入缺口)以获得最大对应性时,相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,不考虑任何保守氨基酸取代作为序列同一性的一部分。百分比同一性可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量。可用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法和软件是本领域熟知的。这些包括但不限于BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package及其变体。在一些实施方案中,当使用序列比较算法或通过目视检查测量的最大对应性进行比较和比对时,两个核酸或多肽基本上相同,意味着它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%,并且在一些实施方案中至少95%、96%、97%、98%或99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方案中,同一性存在于氨基酸序列的长度为至少约10个残基、至少约20个残基、至少约40-60个残基、至少约60-80个残基或其间的任何整数值的区域上。在一些实施方案中,同一性存在于比60-80个残基更长的区域上,例如至少约80-100个残基,并且在一些实施方案中,序列在被比较的序列的全长上基本上相同,例如靶蛋白或抗体的编码区。在一些实施方案

中,同一性存在于核苷酸序列的长度为至少约10个碱基、至少约20个碱基、至少约40-60个碱基、至少约60-80个碱基或其间的任何整数值的区域上。在一些实施方案中,同一性存在于比60-80个碱基更长的区域上,例如至少约80-1000个碱基或更多,并且在一些实施方案中,所述序列在所比较的序列(例如编码目的蛋白的核苷酸序列)的全长上基本上相同。

[0030] “保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被具有相似化学特性的侧链的另一个氨基酸残基替换。本领域中已经普遍定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族,所述侧链包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸或谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸或半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸或色氨酸)、β-支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸是保守取代。通常,本公开内容的多肽、可溶性蛋白质和/或抗体的序列中的保守取代不会消除含有氨基酸序列的多肽、可溶性蛋白质或抗体与靶结合位点的结合。鉴定不消除结合的氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的。

[0031] 术语“多肽”是指任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链或支链的,其可以包含修饰的氨基酸,并且其可以包括非氨基酸(例如,被非氨基酸中断)。所述术语还涵盖天然或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,例如与诸如标记组分或药物(例如毒素)的部分(直接或间接)连接或缀合。该定义还包括例如含有一个或更多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸)以及本领域已知的其他修饰的多肽。应当理解,因为本公开内容的多肽可以基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,所以在一些实施方案中,多肽可以作为单链或单链的二聚体存在。

[0032] 如本文所用,“抗原”是含有结合剂(例如,抗体或ADC)可以结合的表位的部分或分子。因此,抗原可以被抗体结合。在一些实施方案中,本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)结合的抗原是5T4(例如,人5T4)或其片段,包括包含5T4的一个或更多个结构域的片段。

[0033] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语,并且是指抗体可以结合的抗原的局部区域。表位可以是线性表位或构象、非线性或不连续表位。例如,在多肽抗原的情况下,表位可以是多肽的连续氨基酸(“线性”表位),或者表位可以包含来自多肽的两个或更多个非连续区域的氨基酸(“构象”、“非线性”或“不连续”表位),例如人5T4。本领域技术人员将理解,通常,线性表位可以或可以不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方案中,抗体结合一组氨基酸,无论它们是否以天然三维蛋白质结构折叠。在其他实施方案中,抗体需要构成表位的氨基酸残基表现出特定构象(例如,弯曲(bend)、扭曲(twist)、转角(curn)或折叠(fold))以便识别和结合表位。

[0034] 当两种抗体在三维空间中识别相同、重叠或相邻的表位时,抗体与参考抗体结合“表位”或“基本上相同的表位”或“相同表位”。用于确定两种抗体是否在三维空间中结合相同、重叠或相邻的表位的最广泛使用和最快速的方法是竞争测定,其可以以许多不同的格式配置,例如,使用标记的抗原或标记的抗体。在一些测定中,抗原被固定在96孔板上,或在细胞表面上表达,并且使用放射性、荧光或酶标记来测量未标记的抗体阻断标记的抗体的结合的能力。

[0035] “表位分箱(Epitope binning)”是基于抗体识别的表位对抗体进行分组的过程。更具体地,表位分箱包括用于区分不同抗体的表位识别性质的方法和系统,使用与计算过

程相组合的竞争测定,用于基于抗体的表位识别性质对抗体进行聚类并鉴定具有不同结合特异性的抗体。如实施例5中所示,本文描述了关于表位分箱和确定抗体的表位结合的方法的其他细节。

[0036] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”、“免疫特异性结合”、“选择性结合”、“免疫特异性识别”和“免疫特异性”在抗体的上下文中是类似的术语,并且是指结合抗原(例如,表位)的分子,因为这种结合是本领域技术人员所理解的。在一些实施方案中,“特异性结合”意指例如多肽或分子与表位、蛋白质或靶分子的相互作用比与替代物质(包括相关和不相关的蛋白质)更频繁、更快速、以更长的持续时间、以更大的亲和力或以上的一些组合相互作用。例如,特异性结合抗原的分子可以结合其他肽或多肽,通常具有较低的亲和力,如通过例如免疫测定、Biacore™、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,Boise,ID)、OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)或本领域已知的其他测定所确定的。在一些实施方案中,当抗体或抗原结合结构域以比任何交叉反应性抗原更高的亲和力结合抗原时,如使用实验技术如放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)所确定的,抗体或抗原结合结构域结合或特异性结合抗原。通常,特异性或选择性反应将是背景信号或噪声的至少两倍,并且可以是背景的10倍以上。参见例如,Fundamental Immunology 332-36(Paul编著,第2版1989)关于抗体特异性的论述。在一些实施方案中,抗体或抗原结合结构域与“非靶”蛋白的结合程度小于抗体或抗原结合结构域与其特定靶抗原的结合的约10%,例如,如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或RIA所测定的。在一些实施方案中,特异性结合抗原的分子结合抗原的Ka为该分子结合另一抗原的Ka的至少2log、2.5log、3log、4log或更大。在一些实施方案中,特异性结合抗原的分子不与其他蛋白质交叉反应。在另一个具体实施方案中,特异性结合抗原的分子不与其他非5T4蛋白交叉反应。在一些实施方案中,“特异性结合”意指,例如,多肽或分子以约0.1mM或更小,但更通常小于约1μM的K_D结合蛋白质或靶。在一些实施方案中,“特异性结合”意指多肽或分子以至少约0.1μM或更小、至少约0.01μM或更小、或至少约1nM或更小的K_D结合靶。由于不同物种中的同源蛋白之间的序列同一性,特异性结合可以包括识别多于一个物种中的蛋白或靶的多肽或分子。同样,由于不同蛋白质的多肽序列的某些区域内的同源性,特异性结合可包括识别多于一种蛋白质或靶的多肽或分子。应当理解,在一些实施方案中,特异性结合第一靶的多肽或分子可以或可以不特异性结合第二靶。因此,“特异性结合”不一定需要(尽管其可以包括)排他性结合,例如与单个靶的结合。因此,在一些实施方案中,多肽或分子可以特异性结合多于一个靶。在一些实施方案中,多个靶可以被多肽或分子上的相同抗原结合位点结合。例如,在某些情况下,抗体可以包含两个相同的抗原结合位点,每个抗原结合位点特异性结合两种或更多种蛋白质上的相同表位。在某些替代实施方案中,抗体可以是双特异性的并且包含至少两个具有不同特异性的抗原结合位点。通常,但不一定,提及“结合”意指“特异性结合”。

[0037] “结合亲和力”通常是指分子(例如结合剂,诸如抗体或ADC)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原,诸如5T4)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则如本文使用的,“结合亲和力”是指固有结合亲和力,其反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用。结合分子X对其结合配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(K_D)来表示。亲和力可以通过本领域已知的常用方法来测量,包括本文描述的方法。低亲和力抗体通常较慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常较快地结合抗原并且倾

向于保持结合更长时间。本领域已知多种测量结合亲和力的方法,其中任一种都可以用于本公开内容内容的目的。在一个实施方案中,“K_D”或“K_D值”可以通过生物层干涉法(BLI)使用例如OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)测量。或者,也可以在放射性标记的抗原结合测定(RIA)中测量K_D,例如,用目的抗体的Fab形式与其抗原进行(Chen等人,(1999)J.Mol Biol293:865-881),或使用Biacore™的表面等离子体共振(SPR)测定,使用例如Biacore™-2000或Biacore™-3000(Biacore™,Inc.,Piscataway,NJ)。“结合速率(on-rate)”或“结合的速率”或“结合速率(association rate)”或“k_{on}”以及“解离速率(off-rate)”或“解离的速率(rate of dissociation)”或“解离速率(dissociation rate)”或“k_{off}”也可以分别使用例如OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)或Biacore™-2000或Biacore™-3000(Biacore™,Inc.,Piscataway,NJ)用上述相同的SPR或BLI技术测定。

[0038] 当在5T4结合剂(例如,抗体或ADC)的上下文中使用时,术语“竞争”意指竞争靶上的相同表位或结合位点的结合剂,其包括如通过其中所研究的结合剂阻止或抑制参考分子(例如,参考配体或参考抗原结合蛋白,例如参考抗体)与共同抗原(例如,5T4)的特异性结合的测定所确定的此类结合剂之间的竞争。许多类型的竞争性结合测定可用于确定测试结合剂是否与参考分子竞争结合5T4(例如人5T4)。可以采用的测定的实例包括固相直接或间接放射免疫测定(RIA);固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见,例如,Stahli等人,(1983)Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(参见,例如,Kirkland等,(1986)J.Immunol.137:3614-3619或Cheung等,(1990)Virology 176:546-552);固相直接标记测定;固相直接标记夹心测定(参见,例如,Harlow和Lane,(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring HarborPress);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见,例如,Morel等人,(1988)Molec.Immunol.25:7-15)和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,(1990)Scand.J.Immunol.32:77-82)。通常,此类测定涉及使用与固体表面或细胞结合的纯化抗原(例如,5T4,如人5T4),所述固体表面或细胞携带未标记的测试抗原结合蛋白(例如,测试5T4抗体或ADC)或标记的参考抗原结合蛋白(例如,参考5T4抗体或ADC)。竞争抑制可以通过在存在测试抗原结合蛋白的情况下确定与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常,测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定鉴定出的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合相同表位的抗体和/或结合与参考抗体结合的表位足够近的相邻表位(例如,相似表位或重叠表位)以发生抗体空间位阻的抗体。通常,当竞争性抗体过量存在时,其将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少20%,例如至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情况下,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0039] 如本文所用,术语“恒定区”或“恒定结构域”是本领域公知的抗体术语,并且是指抗体部分,例如轻链和/或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但可以表现出各种效应子功能,例如与Fc受体的相互作用。该术语包括免疫球蛋白分子的具有相对于免疫球蛋白可变结构域通常更保守的氨基酸序列的部分。

[0040] 在一些实施方案中,抗体“效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区(例如,天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)并且随抗体同种型而变化的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;下调细胞表面受体(例如B细胞受体);和B细胞活化。

[0041] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,包括例如天然序列Fc区、重组Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能不同,但人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226(根据EU编号系统)或从Pro230(根据EU编号系统)的氨基酸残基延伸至其羧基末端。例如,在抗体的生产或纯化期间,或者通过重组工程化编码抗体的重链的核酸,可以去除Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)。下面提供了示例性Fc区序列(CH2结构域=粗体文本;CH3结构域=下划线文本):

[0042] CPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK**GQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:67)。

[0043] “功能Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;下调细胞表面受体(如B细胞受体;BCR)等。此类效应子功能通常需要Fc区与结合区或结合结构域(例如,抗体可变区或结构域)组合,并且可以使用如所公开的各种测定来评估。

[0044] “天然序列Fc区”包括与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列,并且未被人类操作、修饰和/或改变(例如,分离、纯化、选择,包括或组合其他序列,诸如可变区序列)。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A同种异型和A同种异型);天然序列人IgG2Fc区;天然序列人IgG3Fc区;和天然序列人IgG4Fc区以及其天然存在的变体。

[0045] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(例如,取代、添加或缺失),优选一个或更多个氨基酸取代而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列。在一些实施方案中,与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如在天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中约一个至约十个氨基酸取代,并且优选地约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区可以与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%的同源性,或者与其具有至少约90%的同源性,例如,与其具有至少约95%的同源性。本文所述的变体Fc区可具有效应子功能的丧失(例如,沉默Fc)。下面提供了示例性变体Fc区(“沉默Fc”)序列(CH2结构域=粗体文本,氨基酸变化加下划线;CH3结构域=下划线文本):

[0046] CPPCP**APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALKAPIEKTISKAK**GQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:68)。

[0047] 如本文所用,术语“重链”,当用于指抗体时,是指约50kDa-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约120个至130个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基末端部分包括一个或更多个恒定区。“重链”可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何不同类型,例如alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)和mu(μ),其分别产生IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别的抗体,包括IgG的亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0048] 如本文所用,术语“轻链”,当用于指抗体时,是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约100个至约110个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基末端部分包括恒定区。轻链的大约长度是211个至217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列存在两种不同的类型,例如kappa(K)或lambda(λ)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。

[0049] 术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗原结合区”和相似术语是指抗体的包含与抗原相互作用并赋予结合片段、结合结构域或结合区对抗原的特异性和亲和力的氨

基酸残基(例如CDR)的部分。如本文所用,“抗原结合片段”包括“抗体片段”,其包含抗体的一部分,所述抗体包括一个或更多个CDR,例如抗体的抗原结合区或可变区。

[0050] 本文所述的抗体包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如,包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、内抗体、单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性、双特异性等)、骆驼化抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体和上述中任一项的表位结合片段。

[0051] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,包括含有与5T4抗原结合的一个或更多个抗原结合位点的分子。

[0052] 抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何亚类(例如IgG2a或IgG2b)。在一些实施方案中,本文所述的抗体是IgG抗体(例如,人IgG)或其类别(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或亚类。

[0053] 在一些实施方案中,抗体是包含两个重(H)链/轻(L)链对的4链抗体单元,其中H链的氨基酸序列相同且L链的氨基酸序列相同。在一些实施方案中,抗体是包含VHH-VHH对的2链抗体单元,其中VHH的氨基酸序列是相同的。在一些实施方案中,H链和/或L链包含恒定区,例如人恒定区。在一些实施方案中,此类抗体的L链恒定区是K或λ轻链恒定区,例如人K或λ轻链恒定区。在一些实施方案中,此类抗体的H链恒定区包含γ重链恒定区,例如人γ重链恒定区。在一些实施方案中,此类抗体包含IgG恒定区,例如人IgG恒定区(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4恒定区)。

[0054] 抗体或其片段可以优先结合5T4,如人5T4,这意味着抗体或其片段以比其结合无关对照蛋白更大的亲和力结合5T4和/或以比其结合无关对照蛋白更大的亲和力结合人5T4。例如,抗体或其片段可以特异性识别和结合5T4或其部分。“特异性结合”意指抗体或其片段结合5T4的亲和力比对无关对照蛋白(例如,鸡卵清溶菌酶)的亲和力的大至少5、10、15、20、25、50、100、250、500、1000或10,000倍。在一些实施方案中,抗体或其片段可以基本上排他地结合5T4(例如,能够例如通过结合亲和力的可测量差异将5T4与其他已知多肽区分开)。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体或ADC)可以与除人5T4序列之外的5T4序列(例如食蟹猴5T4序列)反应。

[0055] 术语“可变区”、“可变结构域”是指抗体的轻链或重链的一部分,其通常位于轻链或重链的氨基末端,并且在重链中具有约120个至130个氨基酸的长度且在轻链中具有约100个至110个氨基酸的长度,并且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。重链的可变区可以被称为“VH”。轻链的可变区可以被称为“VL”。术语“可变”是指可变区的某些区段的序列在抗体之间广泛不同的事实。V区介导抗原结合,并且限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性并不均匀地分布在可变区的110个氨基酸范围内。相反,V区由以下组成:约15-30个氨基酸的被称为框架区(FR)的较少可变(例如,相对不变)的区段,所述区段被称为“高变区”或可选地称为“互补决定区”的具有较大可变性(例如,极端可变性)的较短区域隔开。重链和轻链的可变区各自包含四个框架(FR1、FR2、FR3和FR4),主要采用由三个高变区连接的β折叠构型,所述三个高变区形成连接β折叠结构的环,并且在一些情况下形成β折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过框架紧密地保持在一起,并且与来自另一条链的高变区一起,贡献于抗体的抗原结合位点的形成(参见例如Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health,Bethesda,MD,(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,诸如参与抗体的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。可变区的序列在不同抗体之间广泛不同。序列的可变性集中在CDR中,而可变区中较少可变的部分被称为框架区(FR)。轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用。在具体实施方案中,可变区是人可变区。

[0056] 当本文使用时,术语“高变区”、“HVR”、“HV”、“互补决定区”或“CDR”是指抗体可变区的序列高变和/或形成结构上确定的环的区域。通常,抗体包含六个高变区:三个在VH中(H1或VH CDR1、H2或VH CDR2、H3或VH CDR3),并且三个在VL中(L1或VL CDR1、L2或VL CDR2、L3或VL CDR3)。许多高变区的描述正在使用中,并且涵盖在本文中。Kabat CDR基于序列变异性并且是最常用的(参见例如Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。而Chothia是指结构环的位置(参见例如Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端根据环的长度在H32与H34之间变化(这是因为Kabat编号方案将插入放在H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,则环在32结束;如果仅35A存在,则环在33结束;如果35A和35B两者都存在,则环在34结束)。AbM高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且用于OxfordMolecular的AbM抗体建模软件(参见例如Martin,Antibody Engineering,Vol.2,Chapter 3,Springer Verlag)。“contact”高变区是基于对可用的复杂晶体结构的分析。来自这些高变区或CDR中的每一个的残基在下文提到。

[0057] 已经开发并广泛采用了通用编号系统,ImMunoGeneTics(IMGT®)信息系统(Lefranc et al.,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003))。IMGT是专用于人类和其他脊椎动物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TR)和主要组织相容性复合体(MHC)的集成的信息系统。在本文中,CDR关于轻链或重链中的氨基酸序列和位置方面被提及。由于CDR在免疫球蛋白可变结构域的结构内的“位置”在物种之间是保守的并且存在于称为环的结构中,通过使用根据结构特征比对可变结构域序列的编号系统,CDR和框架残基很容易被识别。该信息可以用于将来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基移植(grafting)和替换到通常来自人类抗体的受体框架中。Honegger和Plückthun,J.Mol.Biol.309:657-670(2001)已经开发了一种另外的编号系统(AHon)。包括例如Kabat编号和IMGT独特编号系统的编号系统之间的对应关系对于本领域技术人员来说是熟知的(参见例如,Kabat,同上;Chothia和Lesk,同上;Martin,同上;Lefranc等人,同上)并也示于下文。本领域已知或本文所述的各种系统代表描绘CDR的不同方式,并且当它们用于定义相同的抗体时,它们通常被认为是等同的。本文所示的示例性系统组合了Kabat和Chothia。

[0058]

	示例性的	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
V_HCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V_HCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V_HCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V_LCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V_LCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55

V_LCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

[0059] 高变区可包含如下“延伸的高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)以及VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、“HV”、“互补决定区”或“CDR”可互换使用。

[0060] 术语“载体”是指用于携带或包含核酸序列的物质,包括例如将核酸序列引入宿主细胞。适用的载体包括例如表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,它们可以包括可操作用于稳定整合到宿主细胞染色体中的选择序列或标志物。此外,载体可以包括一个或更多个选择性标志物基因和适当的表达控制序列。例如,可以被包括的选择性标志物基因提供对抗生素或毒素的抗性,补充营养缺陷型缺陷,或提供培养基中没有的关键营养物。表达控制序列可以包括本领域熟知的组成型和/或诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当两个或更多个核酸分子要共表达时(例如,抗体重链和轻链或抗体VH和VL),两个核酸分子都可以例如插入到单个表达载体或单独的表达载体中。对于单个载体表达,编码核酸可以可操作地连接至一个共同的表达控制序列或连接至不同的表达控制序列,诸如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可使用本领域熟知的方法确认将核酸分子引入宿主细胞。此类方法包括,例如,核酸分析如RNA印迹或mRNA的聚合酶链式反应(PCR)扩增,或用于基因产物表达的免疫印迹,或用于测试引入的核酸序列或其相应基因产物的表达的其他合适的分析方法。本领域技术人员应理解,核酸分子以足够的量表达以产生期望的产物(例如,如本文描述的5T4结合剂),并且还应理解,可以使用本领域熟知的方法来优化表达水平以获得足够的表达。

[0061] “5T4介导的疾病”、“5T4介导的紊乱”和“5T4介导的状况”可互换使用,并且是指与表达5T4的细胞(诸如表达5T4的肿瘤细胞)相关或以其为特征的任何疾病、紊乱或状况。5T4介导的疾病包括癌症,包括但不限于表达或过表达5T4的癌症。

[0062] “有效量”通常是足以降低症状的严重性和/或频率、消除症状和/或潜在原因、预防症状和/或其潜在原因的发生、和/或改善或补救由疾病、紊乱或状况引起或与之相关的损害的量。在一些实施方案中,有效量是治疗有效量或预防有效量。

[0063] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指足以降低和/或改善给定疾病、紊乱或状况和/或与其相关的症状的严重性和/或持续时间的剂(例如,本文所述的抗体或ADC或本文所述的任何其他剂)的量。剂(包括治疗剂)的治疗有效量可以是(i)减少或改善给定疾病、紊乱或状况的发展或进展,(ii)减少或改善给定疾病、紊乱或状况的复发、发展或发作,和/或(iii)改善或增强另一疗法(例如,除施用本文所述的抗体或ADC之外的疗法)的预防或治疗效果所必需的量。本公开内容的物质/分子/剂(例如,5T4抗体或ADC)的“治疗有效量”可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及物质/分子/剂在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量涵盖其中物质/分子/试剂的任何毒性或有害作用被治疗有益作用超过的量。在某些实施方案中,术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物中的疾病、紊乱或状况的抗体或其他剂(例如,ADC或药物)的量。

[0064] “预防有效量”是当施用于受试者时将具有预期预防效果的药物组合物的量,例如预防或延迟疾病、紊乱或状况的发作(或复发),或降低疾病、紊乱或状况或相关症状的发作(或复发)的可能性。

[0065] 完全的治疗或预防效果不一定通过施用一个剂量而发生,并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此,可以在一次或多次施用中施用治疗或预防有效量。

[0066] 如本文使用的术语“药学上可接受的”意指联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典、欧洲药典或其他一般公认的药典中列出的用于动物并且更特别地用于人类。

[0067] 本文所用的“载体”包括在所用剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒的载体、赋形剂、稳定剂或防腐剂。载体通常是水性pH缓冲溶液。载体的实例包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,少于约10个氨基酸残基)的多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐平衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。术语“载体”还可以指稀释剂、佐剂(例如,弗氏佐剂(完全或不完全))、赋形剂或与治疗剂一起施用的媒介物。这样的载体可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如药物组合物)时,水是示例性的载体。盐水溶液以及右旋糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的赋形剂(例如药物赋形剂)包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩(chalk)、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以包含少量润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等的形式。口服组合物(包括制剂)可以包括标准载体,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适载体的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co.,Easton,PA。包括药物化合物的组合物可含有预防或治疗有效量的5T4结合剂(例如抗体或ADC),例如以分离或纯化的形式,与合适量的载体一起,以提供用于适当施用至受试者(例如患者)的形式。制剂应该适于施用模式。

[0068] 在一些实施方案中,本公开内容提供了可在本文中用作治疗剂的5T4结合剂。此类试剂包括结合5T4的抗体(例如,单特异性或多特异性,包括双特异性)和ADC。示例性抗体包括多克隆、单克隆、人源化、人、双特异性和异源缀合抗体,以及其具有增加或降低的亲和力或其他特性的变体。

[0069] 在一些实施方案中,本文描述了结合5T4(包括5T4多肽、5T4多肽片段、5T4肽或5T4表位)的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)。在一些实施方案中,5T4结合剂是结合5T4(包括5T4多肽、5T4多肽片段、5T4肽或5T4表位)的人或人源化抗体(例如,包含人恒定区)。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体或ADC),诸如人5T4结合剂,可以结合在哺乳动物(例如人)细胞(包括表达5T4的肿瘤细胞)的表面上表达的5T4。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体或ADC)结合暴露于细胞(例如肿瘤细胞)上的5T4胞外表位(例如5T4表位)。在一些实施方案中,本文描述了结合5T4(诸如人5T4或其部分)的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)。在一些实施方案中,5T4是人5T4。在一些实施方案中,5T4结合剂是人5T4结合剂(例如,结合人5T4的抗体或ADC)。本文描述了人5T4的示例性氨基酸序列。

[0070] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)与包含本文所述的任一抗体的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3的5T4

结合剂(例如,抗体或ADC)竞争结合5T4(例如人5T4),例如表1-3中描绘的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体或ADC)与包含来自以下的一个、两个和/或三个VH CDR和/或一个、两个和/或三个VL CDR的5T4结合剂(例如抗体或ADC)竞争结合5T4(诸如人5T4):(a)命名为mAbA4的抗体;(b)命名为mAbA15的抗体;和(c)命名为mAbA17的抗体,如表1-3中所示。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体或ADC)与包含来自以下的一个、两个和/或三个VH CDR和一个、两个和/或三个VL CDR的5T4结合剂(例如抗体或ADC)竞争结合5T4(诸如人5T4):(a)命名为mAbA4的抗体;(b)命名为mAbA15的抗体;和(c)命名为mAbA17的抗体;如表1-3所示。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体或ADC)与包含来自以下的VH区和VL区的5T4结合剂(例如抗体或ADC)竞争结合5T4(诸如人5T4):(a)命名为mAbA4的抗体;(b)命名为mAbA15的抗体;和(c)命名为mAbA17的抗体,如表1-3中所示。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体或ADC)与包含以下的5T4结合剂(例如抗体或ADC)竞争结合5T4(诸如人5T4):(a)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH区和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的VL区;(b)包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的VH区和包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VL区;和(c)包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的VH区和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的VL区。

[0071] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)包含本文所述的任一抗体的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3,诸如表1-3中描绘的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含来自以下的一个、两个和/或三个重链CDR和/或一个、两个和/或三个轻链CDR:(a)命名为mAbA4的抗体;(b)命名为mAbA15的抗体;和(c)命名为mAbA17的抗体,如表1-3中所示。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含来自以下的一个、两个和/或三个重链CDR和一个、两个和/或三个轻链CDR:(a)命名为mAbA4的抗体;(b)命名为mAbA15的抗体;和(c)命名为mAbA17的抗体,如表1-3中所示。

[0072] 在一些实施方案中,5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含本文所述的任何一种结合剂的VH区,其包含VH CDR1、VH CDR2和/或VH CDR3,和/或VL区,其包含VL CDR1、VLCDR2和/或VL CDR3(参见例如表1-3中的任一个)。因此,在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含来自表1的一个、两个和/或三个重链CDR和/或一个、两个和/或三个轻链CDR。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含来自表2的一个、两个和/或三个重链CDR和/或一个、两个和/或三个轻链CDR。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含来自表3的一个、两个和/或三个重链CDR和/或一个、两个和/或三个轻链CDR。

[0073] 命名为mAbA4的抗体包含SEQ ID NO:25的VH序列和SEQ ID NO:26的VL序列。

[0074] 命名为mAbA15的抗体包含SEQ ID NO:44的VH序列和SEQ ID NO:45的VL序列。

[0075] 命名为mAbA17的抗体包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。

[0076]

表 1：抗体 mAbA4

		示例性的	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFTFSRYYIH (SEQ ID NO:1)	GFTFSRYY (SEQ ID NO:7)	RYYIH (SEQ ID NO:12)	GFTFSRY (SEQ ID NO:13)	SRYYIH (SEQ ID NO:18)	GFTFSRYYIH (SEQ ID NO:1)
	VH CDR2	FISPGGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	ISPGGSYT (SEQ ID NO:8)	FISPGGSYTYYADSVKG (SEQ ID NO:2)	PGGS (SEQ ID NO:14)	WVAFISPGGSYTY (SEQ ID NO:19)	FISPGGSYTY (SEQ ID NO:24)
	VH CDR3	EYYSMGVLDY (SEQ ID NO:3)	AREYYSMGVLDY (SEQ ID NO:9)	EYYSMGVLDY (SEQ ID NO:3)	YYSMGVLD (SEQ ID NO:15)	AREYYSMGVLD (SEQ ID NO:20)	EYYSMGVLDY (SEQ ID NO:3)
VL CDR Seq.	VL CDR1	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)	QSVSSA (SEQ ID NO:10)	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)	SQSVSSA (SEQ ID NO:16)	SSAVAWY (SEQ ID NO:21)	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)
	VL CDR2	SASSLYS (SEQ ID NO:5)	SAS (SEQ ID NO:11)	SASSLYS (SEQ ID NO:5)	SAS (SEQ ID NO:11)	LLIYSASSLY (SEQ ID NO:22)	SASSLYS (SEQ ID NO:5)
	VL CDR3	QQAYESPYT (SEQ ID NO:6)	QQAYESPYT (SEQ ID NO:6)	QQAYESPYT (SEQ ID NO:6)	AYESPY (SEQ ID NO:17)	QQAYESPY (SEQ ID NO:23)	QQAYESPYT (SEQ ID NO:6)
VH 序列： EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYIHWVRQAPGKGLEWVAFISPGGSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCAREYYSMGVLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25)							
VL 序列： DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYESP YTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:26)							

[0077]

表 2：抗体 mAbA15

		示例性的	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFTFSSYYIH (SEQ ID NO:27)	GFTFSSYY (SEQ ID NO:31)	SYYIH (SEQ ID NO:34)	GFTFSSY (SEQ ID NO:35)	SSYYIH (SEQ ID NO:39)	GFTFSSYYIH (SEQ ID NO:27)
	VH CDR2	YITSTGSYTEYAD SVKG (SEQ ID NO:28)	ITSTGSYT (SEQ ID NO:32)	YITSTGSYTEYAD SVKG (SEQ ID NO:28)	STGS (SEQ ID NO:36)	WVAYITSTGSY TE (SEQ ID NO:40)	YITSTGSYTE (SEQ ID NO:43)
	VH CDR3	YDRSTRYSGLDY (SEQ ID NO:29)	ARYDRSTRYSG LDY (SEQ ID NO:33)	YDRSTRYSGLDY (SEQ ID NO:29)	DRSTRYSGLD (SEQ ID NO:37)	ARYDRSTRYSG LD (SEQ ID NO:41)	YDRSTRYSGLD Y (SEQ ID NO:29)
VL CDR Seq.	VL CDR1	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)	QSVSSA (SEQ ID NO:10)	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)	SQSVSSA (SEQ ID NO:16)	SSAVAWY (SEQ ID NO:21)	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)
	VL CDR2	SASSLYS (SEQ ID NO:5)	SAS (SEQ ID NO:11)	SASSLYS (SEQ ID NO:5)	SAS (SEQ ID NO:11)	LLIYSASSLY (SEQ ID NO:22)	SASSLYS (SEQ ID NO:5)
	VL CDR3	QQAYATPVT (SEQ ID NO:30)	QQAYATPVT (SEQ ID NO:30)	QQAYATPVT (SEQ ID NO:30)	AYATPV (SEQ ID NO:38)	QQAYATPV (SEQ ID NO:42)	QQAYATPVT (SEQ ID NO:30)
VH 序列： EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYIHWVRQAPGKGLEWVAYITSTGSYTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARYDRSTRYSGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:44)							
VL 序列： DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYATP VTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:45)							

[0078]

表3：抗体 mAbA17

		示例性的	IMGT	Kabat	Chothia	Contact	AbM
VH CDR Seq.	VH CDR1	GFTFSRYWIH (SEQ ID NO:46)	GFTFSRYW (SEQ ID NO:50)	RYWIH (SEQ ID NO:53)	GFTFSRY (SEQ ID NO:13)	SRYWIH (SEQ ID NO:57)	GFTFSRYWIH (SEQ ID NO:46)
	VH CDR2	AIFPYSGSTLYADSVKG (SEQ ID NO:47)	IFPYSGST (SEQ ID NO:51)	AIFPYSGSTLYADSVKG (SEQ ID NO:47)	PYSG (SEQ ID NO:54)	WVAAIFPYSGSTL (SEQ ID NO:58)	AIFPYSGSTL (SEQ ID NO:61)
	VH CDR3	SPSRSILPSGLDY (SEQ ID NO:48)	ARSPSRSILPSGLDY (SEQ ID NO:52)	SPSRSILPSGLDY (SEQ ID NO:48)	PSRSILPSGLD (SEQ ID NO:55)	ARSPSRSILPSGLD (SEQ ID NO:59)	SPSRSILPSGLDY (SEQ ID NO:48)
VL CDR Seq.	VL CDR1	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)	QSVSSA (SEQ ID NO:10)	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)	SQSVSSA (SEQ ID NO:16)	SSAVAWY (SEQ ID NO:21)	RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4)
	VL CDR2	SASSLYS (SEQ ID NO:5)	SAS (SEQ ID NO:11)	SASSLYS (SEQ ID NO:5)	SAS (SEQ ID NO:11)	LLIYSASSLY (SEQ ID NO:22)	SASSLYS (SEQ ID NO:5)
	VL CDR3	QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49)	QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49)	QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49)	GDGSPY (SEQ ID NO:56)	QQGDGSPY (SEQ ID NO:60)	QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49)
VH 序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWIHWVRQAPGKGLEWVAAIFPYSGSTLYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSRSILPSGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62)						
VL 序列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDGSPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:63)						

[0079] 在一些实施方案中，本文所述的5T4结合剂(例如，抗体，诸如双特异性抗体或ADC)，包括人5T4结合剂，包含VH区或VH结构域。另外或可选地，在一些实施方案中，本文所

述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含VL区或VL结构域。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,具有以下的组合:(i)VH结构域或VH区;和/或(ii)VL结构域或VL区。

[0080] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含具有以下组合的重链:(i)表1-3中任一项所述的VH;和(ii)一个或更多个重链恒定结构域(例如CH1、铰链、CH2和CH3)。示例性IgG重链包含如本文所述的任何VH序列和以下CH1、铰链、CH2和CH3氨基酸序列:

[0081] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:69)。

[0082] 另一示例性IgG重链包含如本文所述的任何VH序列和以下CH1、铰链、CH2和CH3氨基酸序列:

[0083] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALKAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:70)。

[0084] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含具有以下组合的轻链:(i)表1-3中任一项所述的VL结构域;和(ii)轻链恒定结构域(CL)。示例性轻链(例如,用于与IgG重链配对)包含本文所述的任何VL序列和以下CL氨基酸序列:

[0085] RTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:71)。

[0086] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含(a)重链,其具有(i)表1-3中任一项所述的VH和(ii)一个或更多个重链恒定结构域(例如,CH1、铰链、CH2和CH3)的组合;和(b)轻链,其具有(i)表1-3中任一项所述的VL和(ii)IgG形式的轻链恒定结构域(CL或CL1)的组合。示例性5T4结合剂(例如,抗体或ADC)包含IgG重链和轻链,所述IgG重链包含如本文所述的任何VH序列和SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列,所述轻链包含如本文所述的任何VL序列和SEQ ID NO:71的氨基酸序列。

[0087] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括六个CDR,例如表1中鉴定的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括六个CDR,例如表2中鉴定的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括六个CDR,例如表3中鉴定的VH CDR1、VH CDR2、VH

CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括六个CDR,例如表1、2和/或3中鉴定的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0088] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表1中列出的三个VH CDR,例如VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表1中列出的三个VLCDR,例如VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表1中列出的三个VH CDR,例如VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3,以及一个或更多个CDR,包括表1中列出的三个VL CDR,例如VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0089] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表2中列出的三个VH CDR,例如VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表2中列出的三个VLCDR,例如VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表2中列出的三个VH CDR,例如VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3,以及一个或更多个CDR,包括表2中列出的三个VL CDR,例如VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0090] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表3中列出的三个VH CDR,例如VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表3中列出的三个VLCDR,例如VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC),包括人5T4结合剂,包含一个或更多个CDR,包括表3中列出的三个VH CDR,例如VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3,以及一个或更多个CDR,包括表3中列出的三个VL CDR,例如VL CDR1、VL CDR2和/或VL CDR3。

[0091] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体)包含一个或更多个互补决定区(CDR),其包含选自由SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含两个或更多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自由SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含三个或更多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自由SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含四个或更多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自由SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含五个或更多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自由SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或

ADC)包含六个或更多个互补决定区(CDR),所述互补决定区包含选自由SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61组成的组的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含表1-3中列出的一个或更多个(例如,一个、两个或三个)VH CDR。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含表1-3中列出的一个或更多个(例如,一个、两个或三个)VL CDR。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含表1-3中列出的一个或更多个(例如,一个、两个或三个)VH CDR和表1-3中列出的一个或更多个VL CDR。因此,在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含具有SEQ ID NO:1、7、12、13、18、27、31、34、35、39、46、50、53和57中任一个的氨基酸序列的VH CDR1。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含具有SEQ ID NO:2、8、14、19、24、28、32、36、40、43、47、51、54、58和61中任一项的氨基酸序列的VH CDR2。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含具有SEQ ID NO:3、9、15、20、29、33、37、41、48、52、55和59中任一项的氨基酸序列的VHCDR3。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含独立地选自如表1-3中所描绘的氨基酸序列中的任一个中所描绘的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3的VH CDR1和/或VH CDR2和/或VH CDR3。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含具有SEQ ID NO:4、10、16和21中任一项的氨基酸序列的VL CDR1。在另一个实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含具有SEQ ID NO:5、11和22中任一个的氨基酸序列的VLCDR2。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含具有SEQ ID NO:6、17、23、30、38、42、49、56和60中任一项的氨基酸序列的VL CDR3。在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含独立地选自如表1-3中所描绘的氨基酸序列中的任一个中所描绘的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3的VL CDR1和/或VL CDR2和/或VL CDR3。

[0093] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VHCDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46,(ii)SEQ ID NO:7、31或50,(iii)SEQ ID NO:12、34或53,(iv)SEQ ID NO:13或35,和(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47,(ii)SEQ ID NO:8、32或51,(iii)SEQ ID NO:14、36或54,(iv)SEQ ID NO:19、40或58,和(v)SEQ ID NO:24、43或61;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48,(ii)SEQ ID NO:9、33或52,(iii)SEQ ID NO:15、37或55,和(iv)SEQ ID NO:20、41或59;和/或轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4,(ii)SEQ ID NO:10,(iii)SEQ ID NO:16,和(iv)SEQ ID NO:21;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5,(ii)SEQ ID NO:11,和(iii)SEQ ID NO:22;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49,(ii)SEQ ID NO:17、38或56,和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0094] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序

列的VHCDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46,(ii)SEQ ID NO:7、31或50,(iii)SEQ ID NO:12、34或53,(iv)SEQ ID NO:13或35,和(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47,(ii)SEQ ID NO:8、32或51,(iii)SEQ ID NO:14、36或54,(iv)SEQ ID NO:19、40或58,和(v)SEQ ID NO:24、43或61;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48,(ii)SEQ ID NO:9、33或52,(iii)SEQ ID NO:15、37或55,和(iv)SEQ ID NO:20、41或59。

[0095] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体,诸如双特异性抗体或ADC)包含轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VLCDR1:(i)SEQ ID NO:4,(ii)SEQ ID NO:10,(iii)SEQ ID NO:16,和(iv)SEQ ID NO:21;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5,(ii)SEQ ID NO:11,和(iii)SEQ ID NO:22;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49,(ii)SEQ ID NO:17、38或56,和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0096] 在一些实施方案中,本文描述了结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46,(ii)SEQ ID NO:7、31或50,(iii)SEQ ID NO:12、34或53,(iv)SEQ ID NO:13或35,和(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47,(ii)SEQ ID NO:8、32或51,(iii)SEQ ID NO:14、36或54,(iv)SEQ ID NO:19、40或58,和(v)SEQ ID NO:24、43或61;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48,(ii)SEQ ID NO:9、33或52,(iii)SEQ ID NO:15、37或55,和(iv)SEQ ID NO:20、41或59;和/或轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4,(ii)SEQ ID NO:10,(iii)SEQ ID NO:16,和(iv)SEQ ID NO:21;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5,(ii)SEQ ID NO:11,和(iii)SEQ ID NO:22;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VLCDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49,(ii)SEQ ID NO:17、38或56,和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0097] 在一些实施方案中,本文描述了结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VHCDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46,(ii)SEQ ID NO:7、31或50,(iii)SEQ ID NO:12、34或53,(iv)SEQ ID NO:13或35,和(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47,(ii)SEQ ID NO:8、32或51,(iii)SEQ ID NO:14、36或54,(iv)SEQ ID NO:19、40或58,和(v)SEQ ID NO:24、43或61;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48,(ii)SEQ ID NO:9、33或52,(iii)SEQ ID NO:15、37或55,和(iv)SEQ ID NO:20、41或59。

[0098] 在一些实施方案中,本文描述了结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含:(1)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VLCDR1:(i)SEQ ID NO:4,(ii)SEQ ID NO:10,(iii)SEQ ID NO:16,和(iv)SEQ ID NO:21;(2)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5,(ii)SEQ ID NO:11,和(iii)SEQ ID NO:22;和(3)具有选自由以下组成的组的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49,(ii)SEQ ID NO:17、38或56,和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0099] 在一些实施方案中,本文描述了结合5T4的抗体或其片段,其包含来自以下的所有三个重链互补决定区(CDR)和/或所有三个轻链CDR:命名为mAbA4的抗体,其包含为SEQ ID NO:25的VH序列和为SEQ ID NO:26的VL序列;命名为mAbA15的抗体,其包含为SEQ ID NO:44的VH序列和为SEQ ID NO:45的VL序列;或命名为mAbA17的抗体,其包含SEQ ID NO:62的VH序列和SEQ ID NO:63的VL序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包含来自命名为mAbA4的抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR。在一些实施方案中,抗体或其片段包含来自命名为mAbA15的抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR。在一些实施方案中,抗体或其片段包含来自命名为mAbA17的抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR。

[0100] 在一些实施方案中,本文描述了结合5T4的抗体或其片段,其中所述抗体包含:(a)包含表1-3中描绘的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列的重链可变(VH)区;和/或(b)包含表1-3中描绘的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列的轻链可变(VL)区。在一些实施方案中,抗体包含重链可变(VH)区,所述重链可变(VH)区包含表1-3中描绘的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含轻链可变(VL)区,所述轻链可变(VL)区包含表1-3中描绘的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列。

[0101] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有选自由SEQ ID NO:1、7、12、13和18组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:2、8、14、19和24组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自由SEQ ID NO:3、9、15和20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有选自由SEQ ID NO:6、17和23组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0102] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3。

[0103] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3。

[0104] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3。

[0105] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:

(1)具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR3。

[0106] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的VL CDR3。

[0107] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VL CDR3。

[0108] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有选自由SEQ ID NO:27、31、34、35和39组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:28、32、36、40和43组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自由SEQ ID NO:29、33、37和41组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2和(3)具有选自由SEQ ID NO:30、38和42组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0109] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

[0110] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

[0111] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

[0112] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的VL CDR3。

[0113] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的VL CDR3。

[0114] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的VL CDR3。

[0115] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有选自由SEQ ID NO:13、46、50、53和57组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:47、51、54、58和61组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有选自由SEQ ID NO:48、52、55和59组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有选自由SEQ ID NO:49、56和60组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0116] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3。

[0117] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3。

[0118] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3。

[0119] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的VL CDR3。

[0120] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的VH

CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的VL CDR3。

[0121] 在一些实施方案中,本文描述了一种抗体,其包含:(a)重链可变(VH)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VH CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH CDR3;和(b)轻链可变(VL)区,其包含:(1)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL CDR2;和(3)具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL CDR3。

[0122] 在一些实施方案中,本文描述了包含本文所述的VH区和/或VL区的抗体,其中VH和/或VL包含人框架序列。在一些实施方案中,VH区和/或VL区包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列,例如人FR1、人FR2、人FR3和/或人FR4。

[0123] 在一些实施方案中,本文公开的抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,单克隆抗体是人源化、人或嵌合抗体。在一些实施方案中,本文所述的抗体是Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fv、scFv、$(scFv)_2$、单链抗体分子、双可变区抗体、单可变区抗体、线性抗体、V区或由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0124] 在一些实施方案中,本文描述了结合剂,所述结合剂与本文所述的任何一种抗体的抗体或其片段基本上相同的表位结合。在一些实施方案中,本文描述了与本文所述抗体中任一种的抗体或其片段竞争结合人5T4的结合剂。在一些实施方案中,结合剂是抗体或其片段或包含抗体或其片段的ADC。

[0125] 在某些方面,5T4结合剂(例如,抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的CDR可以根据Kabat系统确定(Kabat et al.(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391和Kabat et al.(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。

[0126] 在某些方面,5T4结合剂(例如抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的CDR可以根据Chothia系统确定,其在本文中将被称为“Chothia CDR”(参见例如Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.,196:901-917;Al-Lazikani et al.,1997,J.Mol.Biol.,273:927-948;Chothia et al.,1992,J.Mol.Biol.,227:799-817;Tramontano A et al.,1990,J.Mol.Biol.215(1):175-82;和美国专利第7,709,226号)。

[0127] 在某些方面,5T4结合剂(例如,抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的CDR可以根据ImMunoGeneTics(IMGT®)系统来确定,例如,如描述于Lefranc,M.-P.,1999,The Immunologist,7:132-136和Lefranc,M.-P.et al.,1999,Nucleic Acids Res.,27:209-212(“IMGT CDRs”)。

[0128] 在某些方面,5T4结合剂(例如,抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的CDR可以根据AbM系统确定,其在本文中将被称为“AbM CDR”,例如,如描述于MacCallum et al.,1996,J.Mol.Bipl.,262:732-745。另参见例如Martin,A.,“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”Antibody Engineering,Kontermann and Dübel,eds.,Chapter 31,pp.422-439,Springer-Verlag,Berlin(2001)。

[0129] 在某些方面,5T4结合剂(例如抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的CDR可以根据Contact系统来确定,其在本文中将被称为“Contact CDR”(参见例如MacCallum RM et

al.,1996,J Mol Biol 5:732-745)。Contact CDR基于对可用的复杂晶体结构的分析。

[0130] 在一些实施方案中,沿着本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的VH(例如,CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如,CDR1、CDR2或CDR3)区的一个或更多个CDR的位置可以变化一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸位置,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。例如,在一些实施方案中,定义表1、表2或表3中任一项的CDR的位置可以通过相对于当前CDR位置将CDR的N-末端和/或C-末端边界移位一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸来改变,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。在其他实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)(包括人5T4结合剂)的VH(例如,CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如,CDR1、CDR2或CDR3)区的一个或更多个CDR的长度可以变化(例如,更短或更长)一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。例如,在一些实施方案中,本文所述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3可以比SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的CDR中的一个或更多个短一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。在其他实施方案中,本文所述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3可以比SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或更多个CDR长一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或更多个CDR相比,本文所述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基末端可以缩短或延长一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。另外或可选地,在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或更多个CDR相比,本文所述的VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3的羧基末端可以缩短或延长一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,只要与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。可以使用本领域已知的任何方法来确定与5T4(例如,人5T4)的结合是否得以维持,例如本文所述的“实施例”部分中描述的结合测定和条件。例如,本文所述的实施例2描述了用于测量与5T4(例如人5T4)的结合的测定。

[0131] 在其他实施方案中,本文提出的结合5T4的5T4结合剂(例如抗体或ADC),包括人5T4结合剂,还包含保守序列修饰。对于作为5T4结合剂(例如抗体)的多肽,诸如人5T4结合剂,保守序列修饰包括保守氨基酸取代,所述保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的那些。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。因此,在一些实施方案中,5T4中预测的非必需氨基酸残基被来自相同侧链家族的另一氨基酸残基替换。鉴定不消除抗原结合的氨基酸保守取代和编码其的核苷酸的方法是本领域熟知的(参见例如Brummell et al.,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi et al.Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。在一些实施方案中,本文所述的保守序列修饰将5T4结合剂(例如抗体或

ADC)(包括人5T4结合剂)的氨基酸序列修饰50%、或55%、或60%、或65%、或70%、或75%、或80%、或85%、或90%、或95%、或98%、或99%。在一些实施方案中,氨基酸序列修饰是指对CDR(诸如表1-3中任一项所述的那些)的至多1、2、3、4、5或6个氨基酸取代。因此,例如,每个此类CDR可含有至多5个保守氨基酸取代,例如至多(不超过)4个保守氨基酸取代,例如至多(不超过)3个保守氨基酸取代,例如至多(不超过)2个保守氨基酸取代,或不超过1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体)(包括人5T4结合剂)含有一个或更多个(包括六个)与mAbA4、mAbA15或mAbA17的CDR(参见例如表1、表2或表3)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的CDR。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,含有包含与mAbA4、mAbA15或mAbA17的CDR(参见例如表1、表2或表3)相同的CDR的VH和VL。在一些实施方案中,氨基酸序列修饰不包括SDR内的任何修饰。在一些实施方案中,氨基酸序列修饰不包括CDR(诸如CDR1、CDR2、CDR3或其任何组合)内的任何修饰。在另外的实施方案中,氨基酸序列修饰在框架区或恒定区中。

[0132] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗体或其片段,其含有包含与SEQ ID NO:25具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VH和包含与SEQ ID NO:26具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VL,并且所述抗体或其片段与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0133] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗体或其片段,其含有包含与SEQ ID NO:44具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VH和包含与SEQ ID NO:45具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VL,并且所述抗体或其片段与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0134] 在一些实施方案中,本文提供了一种抗体或其片段,其含有包含与SEQ ID NO:62具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VH和包含与SEQ ID NO:63具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的VL,并且所述抗体或其片段与5T4(例如,人5T4)的结合得以维持(例如,基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)。

[0135] 本公开内容提供了具有掩蔽部分和/或可裂解部分的5T4结合剂(例如,抗体),其中5T4结合剂(例如,抗体)的一个或更多个5T4结合结构域被掩蔽(例如,经由掩蔽部分)和/或可活化(例如,经由可裂解部分)。用于掩蔽5T4结合剂(例如抗体)的技术是本领域熟知的,包括SAFEbody掩蔽技术(参见例如美国专利申请公布第2019/0241886号)和Probody掩蔽技术(参见例如美国专利申请公布第2015/0079088号)。此类技术可用于产生掩蔽和/或可活化的5T4结合剂(例如抗体)。此类掩蔽的和/或可活化的5T4结合剂(例如,抗体)可用于制备包含本公开内容的任何一种5T4结合剂(例如,抗体),如人5T4结合剂的缀合物,包括免疫缀合物、ADC、掩蔽的ADC和可活化的抗体-药物缀合物(AADC),包括直接或间接连接另一种试剂如药物的那些。例如,本公开内容的5T4结合剂(例如,抗体)如人5T4结合剂可以通过合成接头与一种或更多种剂如药物共价结合。

[0136] 如果需要,将5T4结合剂(例如抗体)(包括人5T4结合剂)连接或缀合(直接或间接)至具有效应子功能的部分,例如细胞毒性活性(例如化疗部分或放射性同位素)或免疫募集

活性。连接或缀合(直接或间接)的部分包括细胞毒性药物(例如,毒素,如奥瑞他汀(aurostatin))或非细胞毒性药物(例如,信号转导调节剂,如激酶);或掩蔽部分,其掩蔽5T4结合剂(例如,抗体)的一个或更多个结合结构域;或可裂解部分,其允许在肿瘤微环境中通过裂解可裂解部分使掩蔽缀合物形式的5T4结合剂(例如,抗体)的一个或更多个结合结构域解掩蔽,从而活化5T4结合剂。促进免疫募集的部分可以包括其他抗原结合剂,例如选择性结合先天和/或适应性免疫系统的细胞的病毒蛋白。或者或另外,5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,任选地(直接或间接)连接或缀合至促进从混合物中分离的部分(例如标签)或具有报告活性的部分(例如检测标记或报告蛋白)。应当理解,本文所述的5T4结合剂(例如抗体)(包括人5T4结合剂)的特征还延伸至包含5T4结合剂片段的多肽。

[0137] 在一些实施方案中,本文所述的结合人5T4的5T4结合剂(例如抗体),包括5T4结合剂,可以(直接或间接)连接或缀合至多肽,这可以导致可活化抗体的产生。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如,抗体)(包括人5T4结合剂)与另外的剂连接或缀合(直接或间接)。在一些实施方案中,另外的剂是药物,产生ADC,或者当ADC的抗体包含掩蔽部分和可裂解部分时,产生AADC。

[0138] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体)(包括人5T4结合剂)与治疗剂(例如细胞毒性剂)或诊断或可检测剂缀合或重组连接(直接或间接)。缀合或重组连接的抗体,包括掩蔽的或可活化的缀合物,可用于例如治疗或预防疾病、紊乱或状况,如5T4介导的疾病、紊乱或状况。缀合或重组连接的5T4结合剂(例如抗体),包括掩蔽的或可活化的缀合物,可用于例如监测或预测5T4介导的疾病、紊乱或状况的发作、发展、进展和/或严重性。

[0139] 此类诊断和检测可以例如通过将5T4结合剂(例如抗体)偶联至可检测物质来完成,所述可检测物质包括例如:酶,包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,包括但不限于链霉亲和素/生物素或亲和素/生物素;荧光材料,包括但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹酰氯或藻红蛋白;发光材料,包括但不限于鲁米诺;生物发光材料,包括但不限于萤光素酶、荧光素或水母发光蛋白;化学发光材料,包括但不限于基于吖啶鎓的化合物或卤代标签;放射性材料,包括但不限于碘(^{131}I、^{125}I、^{123}I和^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、铟(^{115}In、^{113}In、^{112}In和^{111}In)、锝(^{99}Tc)、铊(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga和^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、^{153}Sm、^{177}Lu、^{159}Gd、^{149}Pm、^{140}La、^{175}Yb、^{166}Ho、^{90}Y、^{47}Sc、^{186}Re、^{188}Re、^{142}Pr、^{105}Rh、^{97}Ru、^{68}Ge、^{57}Co、^{65}Zn、^{85}Sr、^{32}P、^{153}Gd、^{169}Yb、^{51}Cr、^{54}Mn、^{75}Se、^{113}Sn、或^{117}Sn;使用各种正电子发射断层扫描的正电子发射金属;和非放射性顺磁性金属离子。

[0140] 本文还描述了与异源蛋白或多肽(或其片段,例如与多肽(例如,约10、约20、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90或约100个氨基酸)重组连接或缀合(共价或非共价缀合,直接或间接)以产生融合蛋白的5T4结合剂(例如,抗体)及其用途。具体地,本文描述了融合蛋白,其包含本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)(包括人5T4结合剂)的抗原结合片段(例如,包含VH和/或VL的CDR1、CDR2和/或CDR3)和异源蛋白、多肽或肽。在一些实施方案中,与5T4结合剂(例如,抗体)连接的异源蛋白、多肽或肽可用于将5T4结合剂靶向特定细胞(例如,表达5T4的细胞,包括肿瘤细胞)。与5T4结合剂(例如抗体)连接的其他非限制性异源蛋白、多肽或肽可用作内化信号或免疫细胞衔接器(engager)。

[0141] 此外,本文所述的5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,可以(直接或间接)连

接至标记物或“标签”序列,例如肽,以促进纯化。在一些实施方案中,标记或标签氨基酸序列是六组氨酸肽,例如在pQE载体(参见例如QIAGEN,Inc.)中提供的标签等,其中许多是可商购获得的。例如,如Gentz等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-24所述,六组氨酸提供了融合蛋白的方便纯化。可用于纯化的其它肽标签包括但不限于血凝素(“HA”)标签(其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson et al.,1984,Cell 37:767-78))和“FLAG”标签。

[0142] 将部分(包括多肽)(直接或间接)连接或缀合至抗体的方法是本领域熟知的,其中任何一种可用于制备本文所述的抗体-药物缀合物或融合蛋白。

[0143] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)是融合蛋白。如本文所用,术语“融合蛋白”是指包含结合剂(例如,抗体)的氨基酸序列和异源多肽或蛋白质(例如,通常不是抗体的一部分的多肽或蛋白质)的氨基酸序列的多肽。在某些实施方案中,融合蛋白保留5T4结合剂的生物活性。在某些实施方案中,融合蛋白包含5T4抗体VH区、VL区、VH CDR(一个、两个或三个VH CDR)和/或VL CDR(一个、两个或三个VL CDR),其中融合蛋白结合5T4表位、5T4片段和/或5T4多肽。

[0144] 融合蛋白可以例如通过基因混编、基序混编、外显子混编和/或密码子混编(统称为“DNA混编”)的技术产生。DNA混编可用于改变5T4结合剂(例如抗体)的活性,包括如本文所述的人5T4结合剂,包括例如具有较高亲和力和较低解离速率的5T4结合剂(参见例如美国专利号5,605,793;5,811,238;5,830,721;5,834,252;和5,837,458;Patten et al.,1997,Curr.Opinion Biotechnol.8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.16(2):76-82;Hansson et al.,1999,J.Mol.Biol.287:265-76;和Lorenzo and Blasco,1998,Biotechniques 24(2):308-13)。在一些实施方案中,5T4结合剂(包括人5T4结合剂)可以通过在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变而改变。编码本文所述的5T4结合剂的多核苷酸可以与一种或更多种异源分子的一种或更多种组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0145] 本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)(包括人5T4结合剂)也可附着于固体支持物,其可用于靶抗原的免疫测定或纯化。此类固体载体包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0146] 本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)(包括人5T4结合剂)也可以与第二抗体连接或缀合(直接或间接)以形成抗体异缀合物。

[0147] 接头可以是促进连接或缀合的试剂在细胞中释放的“可裂解部分”,但本文也涵盖了不可裂解的接头。用于本公开内容的缀合物(例如,ADC或AADC)中的接头包括但不限于酸不稳定接头(例如,腙接头)、含二硫化物的接头、肽酶敏感接头(例如,包含氨基酸,例如缬氨酸和/或瓜氨酸,例如瓜氨酸-缬氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸的肽接头)、光不稳定接头、二甲基接头、硫醚接头或被设计成逃避多药转运蛋白介导的抗性的亲水性接头。

[0148] 抗体和剂的缀合物,包括其中剂是用于制备ADC或AADC的药物,可以使用多种双官能蛋白偶联剂制备,例如N-(β-马来酰亚胺丙氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS);N-ε-马来酰亚胺基己酰基-氧琥珀酰亚胺酯(ECMS);N-γ-马来酰亚胺基己酰基-氧琥珀酰亚胺酯(GMBS);1,6-己烷-双-乙烯基砜(HBVS);琥珀酰亚胺基4(-N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯))(LC-SMCC);间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS);4-(4-N-

马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼(MPBH);琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP);琥珀酰亚胺碘乙酸酯(SIA);琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB);琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC);琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺基-苯基)丁酸酯(SMPB);琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH);N-(ε-马来酰亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-ECMS);N-(γ-马来酰亚胺基丁氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS);N-(K-马来酰亚胺十一烷酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS);间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS);(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB);4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC);磺基琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB);和琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)(SVSB)。

[0149] 本公开还预期,抗体和剂的缀合物,包括其中剂是用于制备ADC或AADC的药物,可以使用本领域公开的任何合适的方法制备(参见例如Bioconjugate Techniques(Hermanson编著,第2版,2008))。

[0150] 抗体和剂(包括其中剂是用于制备ADC或AADC的药物)的常规缀合策略基于涉及Lys残基的ε-氨基或Cys残基的硫醇基团的随机缀合化学,这导致异质缀合物。最近开发的技术允许与抗体的位点特异性缀合,导致均质装载并且避免具有改变的抗原结合或药代动力学的缀合物亚群。这些包括“thiomabs”的工程化,该“thiomabs”包含在重链和轻链上的位置处提供反应性硫醇基团并且不破坏免疫球蛋白折叠和组装或改变抗原结合的半胱氨酸取代(参见例如,Junutula等人,2008,J.Immunol.Meth.332:41-52;和Junutula等人,2008,Nature Biotechnol.26:925-32)。在另一种方法中,通过将终止密码子UGA从终止重新编码为硒代半胱氨酸插入,允许在存在其他天然氨基酸的情况下在硒代半胱氨酸的亲核硒醇基团处的位点特异性共价缀合,将硒代半胱氨酸共翻译插入到抗体序列中(参见例如,Hofer等人,2008,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:12451-56;和Hofer等人,2009,Biochemistry48(50):12047-57)。

[0151] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)(包括人5T4结合剂)与细胞毒性剂缀合。在一些实施方案中,本文公开的5T4结合剂(例如,抗体)(包括人5T4结合剂)可以任选地与本文公开的或本领域已知的一种或更多种细胞毒性剂缀合以产生ADC或AADC。在一些实施方案中,细胞毒性剂是化疗剂,包括但不限于甲氨蝶呤、阿霉素、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂。在一些实施方案中,细胞毒性剂是细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段,包括但不限于白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、莫迪素A链、α-帚曲毒蛋白(sarcin)、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒白蛋白(curcin)、巴豆蛋白、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、多花白树毒蛋白(gelonin)、有丝分裂蛋白(mitogellin)、限制霉素、酚霉素(phenomycin)、enomycin、和tricothecenes。在一些实施方案中,细胞毒性剂是用于产生放射性缀合物或放射性缀合剂的放射性同位素。多种放射性核素可用于制备放射性缀合剂,包括但不限于^{90}Y、^{125}I、^{131}I、^{123}I、^{111}In、^{131}In、^{105}Rh、^{153}Sm、^{67}Cu、^{67}Ga、^{166}Ho、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re和^{212}Bi。也可以使用多肽或分子与一种或更多种小分子毒素(例如加利车霉素、美登木素生物碱、单端孢菌素和CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物)的缀合物。使用多种

双官能蛋白质偶联剂制备多肽或分子与细胞毒性剂的缀合物,所述双官能蛋白质偶联剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫杂环戊烷(1T)、亚氨基酯的双官能衍生物(例如己二亚胺酸二甲酯HCL)、活性酯(例如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮鎓衍生物(例如双(对重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0152] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,与诸如以下的药物缀合:信号转导调节剂、促凋亡剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、用于基因治疗的核酸、烷化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化学保护剂、激素剂、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、放射增敏剂、拓扑异构酶抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中,有丝分裂抑制剂是海兔毒素、奥瑞他汀、美登木素生物碱和植物生物碱。在一些实施方案中,所述药物是海兔毒素、奥瑞他汀、美登木素生物碱和植物生物碱。澳瑞他汀的实例是单甲基澳瑞他汀F(MMAF)或单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。美登木素生物碱的实例包括但不限于DM1、DM2、DM3和DM4。在一些实施方案中,抗肿瘤抗生素选自由放线菌素、蒽环类、加利车霉素和倍癌霉素组成的组。放线菌素的一个实例是吡咯并苯并二氮杂䓬(pyrrolobenzodiazepine,PBD)。蒽环类的实例是PNU-蒽环类,诸如PNU-159682或衍生物。

[0153] 本文所述的5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的或具有更大的多特异性的。此类剂可包括单特异性或多特异性抗体或ADC。多特异性抗体,如双特异性抗体,是对至少两个不同靶标(例如,抗原)或同一靶标上的两个不同表位具有结合特异性的单克隆抗体(例如,针对5T4的双特异性抗体,其具有针对5T4的第一表位的第一结合结构域和针对5T4的第二表位的第二结合结构域)。在一些实施方案中,单特异性和多特异性(例如,双特异性)抗体或ADC可以基于本文所述抗体的序列,例如表1-3中列出的CDR序列来构建。在一些实施方案中,本文所述的多特异性抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体是小鼠、嵌合、人或人源化抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体的一种结合特异性是针对5T4的,另一种是针对任何其他靶标(例如,抗原)的。在一些实施方案中,多特异性(例如,双特异性)抗体可以包含多于一个靶标(例如,抗原)结合结构域,其中不同的结合结构域对不同的靶标具有特异性(例如,结合5T4的第一结合结构域和结合另一靶标(例如,抗原)(诸如免疫检查点调节剂(例如,负检查点调节剂))的第二结合结构域)。在一些实施方案中,多特异性(例如,双特异性)抗体分子可以结合相同靶标(例如,抗原)上的多于一个(例如,两个或更多个)表位。在一些实施方案中,结合特异性中的一种是5T4,而另一种是针对以下中的一种或更多种:细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)、CD80、CD86、程序性细胞死亡1(PD-1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、淋巴细胞活化基因-3(LAG-3;也称为CD223)、半乳糖凝集素-3、B和T淋巴细胞衰减因子(BTLA)、T细胞膜蛋白3(TIM3)、半乳糖凝集素-9(GAL9)、B7-H1、B7-H3、B7-H4、具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT/Vstm3/WUCAM/VSIG9)、V结构域Ig T细胞活化抑制因子(VISTA)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体相关(GITR)蛋白、疱疹病毒进入介质(HVEM)、OX40、CD27、CD28、CD137、CGEN-15001T、CGEN-15022、CGEN-15027、CGEN-15049、CGEN-15052和CGEN-15092。

[0154] 制备多特异性抗体的方法是本领域已知的,例如通过共表达两个免疫球蛋白重链-轻链对,其中两个重链具有不同的特异性(参见例如Milstein和Cuello,1983,Nature 305:537-40)。关于产生多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的进一步细节,参见,例如,双特异性抗体(Kontermann编著,2011)。

[0155] 多特异性抗体的示例性结构是本领域已知的,并且进一步描述于Weidle等人,2013,Cancer Genomics&Proteomics 10:1-18;Brinkman等人,2017,MABS,9:2,182-212;Godar等人,2018,Expert Opinion on Therapeutic Patents,28:3,251-276;和Spiess等人,2015,Mol.Immunol.67:95-106中描述。

[0156] 例如,双特异性抗体分子可以分为不同的结构组:(i)双特异性免疫球蛋白G(BsIgG);(ii)附加有另外的抗原结合部分的IgG;(iii)双特异性抗体片段;(iv)双特异性融合蛋白;和(v)双特异性抗体缀合物。作为非限制性实例,BsIgG形式可包括crossMab、DAF(二合一)、DAF(四合一)、DutaMab、DT-IgG、knobs-in-holes共同LC、knobs-in-holes组装物、电荷对、Fab臂交换、SEEDbody、triomab、LUZ-Y、Fcab、κλ体和/或正交Fab。

[0157] 在一些实施方案中,BsIgG包含被工程化用于异源二聚化的重链。例如,可以使用“knobs-in-holes”策略、SEED平台、共同重链(例如,在κλ体中)和使用异源二聚体Fc区来工程化重链以用于异源二聚化。避免BsIgG中同源二聚体重链配对的策略是本领域已知的,包括knobs-in-holes、双体、不对称、电荷对、HA-TF、SEEDbody和差异蛋白A亲和力。

[0158] 另一种双特异性抗体形式是附加有另外的抗原结合部分的IgG。例如,可以通过将另外的抗原结合单元附加到单特异性IgG上,例如在重链或轻链的N-或C-末端,将单特异性IgG工程化为具有双特异性。示例性另外的抗原结合单元包括单结构域抗体(例如,可变重链或可变轻链)、工程化蛋白支架和配对抗体可变结构域(例如,单链可变片段或可变片段)。附加的IgG形式的非限制性实例包括双可变结构域IgG(DVD-Ig)、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L,H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIHIgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、zybody和DVI-IgG(四合一)。参见Spiess等人,Mol.Immunol.67(2015):95-106)。在一些实施方案中,示例性抗体形式是用于单特异性或多特异性(例如,双特异性抗体)的B-Body形式,如例如国际专利申请公布号WO 2018/075692和美国专利申请公布号2018/0118811中所述。

[0159] 双特异性抗体片段(BsAb)是缺乏一些或全部抗体恒定结构域的双特异性抗体分子的形式。例如,一些BsAb缺乏Fc区。在实施方案中,双特异性抗体片段包括通过允许BsAb在单个宿主细胞中有效表达的肽接头连接的重链和轻链区。双特异性抗体片段的非限制性实例包括但不限于纳米抗体、纳米抗体-HAS、BiTE、双抗体、DART、TandAb、scDiabody、scDiabody-CH3、双抗体-CH3、三体(triple body)、微型抗体(miniantibody)、微型抗体(minibody)、TriBi微型抗体、scFv-CH3KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、$F(ab')_2$、$F(ab')_2$-$scFv_2$、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四价HCAb、scDiabody-Fc、双抗体-Fc、串联scFv-Fc和内抗体。

[0160] 双特异性融合蛋白包括与其他蛋白连接的抗体片段。例如,双特异性融合蛋白可以与其他蛋白连接以增加额外的特异性和/或功能性。在一些实施方案中,对接锁定(dock-and-lock,DNL)方法可用于产生具有更高化合价的双特异性抗体分子。例如,与白蛋白结合蛋白或人血清白蛋白的双特异性抗体融合物可以延长抗体片段的血清半衰期。在实施方案

中,化学缀合,例如抗体和/或抗体片段的化学缀合,可用于产生BsAb分子。示例性双特异性抗体缀合物包括CovX-体(CovX-body)形式,其中低分子量药物位点特异性地缀合至每个Fab臂或抗体或其片段中的单个反应性赖氨酸。在一些实施方案中,缀合改善血清半衰期。

[0161] 生产多特异性抗体(包括双特异性抗体)的方法是本领域已知的。例如,多特异性抗体(包括双特异性抗体)可以通过在不同宿主细胞中单独表达组分抗体并随后纯化/组装或通过在单个宿主细胞中表达组分抗体来产生。多特异性(例如,双特异性)抗体分子的纯化可以通过本领域已知的各种方法(包括亲和色谱)进行。

[0162] 在一些实施方案中,本文公开的5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,可以以本文公开的或本领域已知的任何抗体形式提供。作为非限制性实例,在一些实施方案中,5T4结合剂(例如,抗体),包括人5T4结合剂,可以选自:Fabs-in-tandem-Ig(FIT-Ig);DVD-Ig;杂合杂交瘤(quadroma或tetradoma);anticalin平台(Pieris);双抗体;单链双抗体;串联单链Fv片段;TandAb,三特异性Ab(Affimed);Darts双亲和重靶向(Macrogenics);双特异性Xmab(Xencor);双特异性T细胞衔接器(Bites;Amgen;55kDa);三联体(Triplebody);Tribody=Fab-scFv融合蛋白多功能重组抗体衍生物(CreativeBiolabs);Duobody平台(Genmab);对接锁定(dock and lock)平台;knobs-into-holes(KIH)平台;人源化双特异性IgG抗体(REGN1979)(Regeneron);Mab2双特异性抗体(F-Star);DVD-Ig=双可变结构域免疫球蛋白(Abbott);κ-λ体;TBTI=四价双特异性串联Ig;和CrossMab(Roche)。

[0163] 在一些实施方案中,本文公开的多特异性(例如,双特异性)抗体包含5T4结合结构域和结合一个或更多个非5T4的靶标的一个或更多个另外的结合结构域。在一些实施方案中,本文公开的多特异性(例如,双特异性)抗体包含5T4结合结构域,所述5T4结合结构域包含如本文公开的VH和/或VL氨基酸序列,诸如表1、表2或表3的那些。

[0164] 在一些实施方案中,本文描述了包含结合5T4的结合结构域的多特异性(例如,双特异性)抗体,所述结合结构域包含本文公开的VH和VL CDR,诸如表1、表2或表3中所示的那些。

[0165] 结合5T4的抗体可以通过任何合适的方法获得,例如(但不限于)用包含5T4的全肿瘤细胞免疫和收集抗体、重组技术或使用5T4细胞外结构域表位筛选抗体或抗体片段的文库。可以使用多种已知技术产生单克隆抗体(参见,例如,Coligan等人(编著),Current Protocols in Immunology,1:2.5.12.6.7(John Wiley&Sons 1991);Monoclonal Antibodies,Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyses,Plenum Press,Kennett、McKearn和Bechtol(编著)(1980);Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow and Lane(编著),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988);和Picksley等,"Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E.coli",DNA Cloning 2:Expression Systems,第二版,Glover等人(编著),第93页(Oxford University Press 1995))。用于产生单克隆抗体的一种示例性技术包括用人5T4抗原免疫动物并从取自动物的脾细胞产生杂交瘤。杂交瘤可以产生结合5T4的单克隆抗体或抗体片段。

[0166] 在另一个实施方案中,单克隆抗体或抗体片段可以从使用例如以下中描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离:Antibody Phage Display:Methods and Protocols,P.M.O'Brien和R.Aitken编著,Humana Press,Totawa N.J.,2002。原则上,合成抗体克隆通

过筛选含有展示与噬菌体外壳蛋白融合的抗体可变区(Fv)的各种片段的噬菌体的噬菌体文库来选择。针对所期望的抗原对这样的噬菌体文库进行筛选。表达能够与所期望的抗原结合的Fv片段的克隆被吸附至抗原上,并且因此与文库中的非结合克隆分离。然后从抗原洗脱结合克隆,并且可以通过另外的抗原吸附/洗脱循环进一步富集。

[0167] 可变结构域可以作为单链Fv(scFv)片段(其中VH和VL通过短柔性肽共价连接)或者作为Fab片段(其中它们各自与恒定结构域融合并且非共价相互作用)有功能地展示在噬菌体上,如例如以下中描述的:Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)。

[0168] VH基因和VL基因的谱库可以通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆,并且在噬菌体文库中随机重组,然后可以对其进行抗原结合克隆搜索,如Winter等人(同上)中描述的。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。可选地,可以克隆初始(naive)谱库,以提供针对广泛范围的非自体抗原以及还有自体抗原的人类抗体的单一来源而无需任何免疫,如由Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)描述的。最终,还可以通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并实现体外重排来合成制备初始文库,如例如由Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.227:381-388(1992)描述的。

[0169] 文库的筛选可以通过本领域已知的各种技术来完成。例如,5T4(例如,5T4多肽、片段或表位)可以用于包被吸附板的孔、在附着至吸附板的宿主细胞上表达或用于细胞分选、与生物素缀合以用链霉亲和素包被的珠捕获,或用于淘选展示文库的任何其他方法中。具有缓慢解离动力学(例如,良好的结合亲和力)的抗体的选择可以通过以下来促进:使用长时间洗涤和单价噬菌体展示,如Bass等人,Proteins,8:309-314(1990)和WO 92/09690中描述;以及抗原的低包被密度,如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)。

[0170] 5T4结合剂(例如抗体)可以通过设计合适的抗原筛选程序来选择感兴趣的噬菌体克隆,然后使用来自感兴趣的噬菌体克隆的VH和/或VL序列(例如Fv序列)或来自VH和VL序列的各种CDR序列和合适的恒定区(例如Fc)序列构建全长5T4结合剂(例如抗体)克隆来获得,所述序列描述于Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第五版,NIH Publication91-3242,Bethesda MD(1991),vol.1-3.

[0171] 同样地,结合5T4的人抗体可以通过多种技术中的任一种产生,包括但不限于人外周血细胞(例如,含有B淋巴细胞)的爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)转化、人B细胞的体外免疫、来自携带插入的人免疫球蛋白基因的免疫转基因小鼠的脾细胞的融合、从人免疫球蛋白V区噬菌体文库的分离、或本领域已知并基于本文公开的其他程序。从转基因动物获得人抗体的方法进一步描述于例如Bruggemann等人,Curr.Opin.Biotechnol.,8:45558,1997;Jakobovits等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,764:52535,1995;Green等人,Nature Genet.,7:13-21,1994;Lonberg等人,Nature,368:856-859,1994;Taylor等人,Int.Immun.6:579-591,1994;和美国专利第5,877,397号。

[0172] 例如,结合5T4的人抗体可以从已经被工程化以响应抗原攻击产生特异性人抗体的转基因动物获得。例如,国际专利公布号WO 98/24893公开了具有人Ig基因座的转基因动物,其中由于内源性重链和轻链基因座的失活,所述动物不产生功能性内源性免疫球蛋白。还描述了能够对免疫原产生免疫应答的转基因非灵长类哺乳动物宿主,其中抗体具有灵长类恒定区和/或可变区,并且其中内源性免疫球蛋白编码基因座被取代或失活。国际专利公

布号WO 96/30498公开了Cre/Lox系统在哺乳动物中修饰免疫球蛋白基因座的用途,例如替换全部或部分恒定区或可变区以形成修饰的抗体分子。国际专利公布号WO 94/02602公开了具有失活的内源性Ig基因座和功能性人Ig基因座的非人哺乳动物宿主。美国专利第5,939,598号公开了制备转基因小鼠的方法,其中所述小鼠缺乏内源性重链,并表达包含一个或更多个异种恒定区的外源性免疫球蛋白基因座。使用转基因动物,如本文所述的转基因动物,可以产生针对所选抗原分子的免疫应答,并且可以从动物中取出抗体产生细胞并用于产生分泌人源单克隆抗体的杂交瘤。免疫方案、佐剂等是本领域已知的,并且用于例如国际专利公布号WO 96/33735中所述的转基因小鼠的免疫。可以测试单克隆抗体抑制或中和相应蛋白质的生物活性或生理作用的能力。

[0173] 本公开提供了结合5T4(包括人5T4)的人源化抗体。本公开的人源化抗体可以包含来自本文公开的VH和/或VL的一个或更多个CDR,诸如如表1-3中所示的那些。用于人源化非人类抗体的各种方法是本领域已知的。例如,人源化抗体可以具有从非人类来源引入到其中的一个或更多个氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基通常被称为“输入(import)”残基,其通常取自“输入”可变结构域。可以使用本领域技术人员已知的技术产生结合5T4的人源化抗体(Zhang等人,Molecular Immunology,42(12):1445-1451,2005;Hwang等人,Methods,36(1):35-42,2005;Dall′Acqua等人,Methods,36(1):43-60,2005;Clark,Immunology Today,21(8):397-402,2000和美国专利第6,180,370号;第6,054,927号;第5,869,619号;第5,861,155号;第5,712,120号;和第4,816,567号)。

[0174] 在一些情况下,人源化抗体通过CDR移植构建,其中亲本非人抗体(例如啮齿动物)的VH和VL的六个CDR的氨基酸序列被移植到人抗体框架上。例如,Padlan等人(FASEB J.9:133-139,1995)确定CDR中仅约三分之一的残基实际接触抗原,并将这些称为“特异性决定残基”或SDR。在SDR移植技术中,仅SDR残基被移植到人类抗体框架上(参见例如,Kashmiri等人,2005,Methods36:25-34,2005)。

[0175] 在产生人源化抗体中待被使用的人类可变结构域的选择(轻链和重链两者)对减少抗原性可以是重要的。例如,根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人类可变结构域序列的整个文库筛选非人类(例如,啮齿动物)抗体的可变结构域序列。可以选择最接近啮齿动物序列的人序列作为人源化抗体的人框架(Sims等人(1993)J.Immunol.151:2296;Chothia等人等(1987)J.Mol.Biol.196:901)。另一种方法使用衍生自特定亚组的轻链或重链的全部人类抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可以用于若干种不同的人源化抗体(Carter等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285;Presta等人(1993)J.Immunol.,151:2623)。在一些情况下,框架衍生自最丰富的人类亚类,V_L6亚组I(V_L6I)和V_H亚组III(V_HIII)的共有序列。在另一种方法中,人类种系基因被用作框架区的来源。

[0176] 在可选的基于CDR比较的范式(称为超人源化(superhumanization))中,框架同源性是不相关的。该方法由将非人类序列与功能性人类种系基因谱库进行比较组成。然后选择那些编码与鼠序列相同或密切相关的典型结构的基因。接下来,在与非人类抗体共有典型结构的基因内,那些在CDR内具有最高同源性的基因被选择作为框架供体。最后,将非人CDR移植到这些框架上(参见,例如,Tan等人,J.Immunol.169:1119-1125,2002).

[0177] 此外,通常期望抗体被人源化,同时保留它们对抗原的亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现这一目的,根据一种方法,通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分

析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,并且是本领域技术人员所熟悉的。说明和展示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可得的。这些包括例如WAM(Whitelegg和Rees,Protein Eng.13:819-824,2000)、Modeller(Sali和Blundell,J.Mol.Biol.234:779-815,1993)和Swiss PDB Viewer(Guex和Peitsch,Electrophoresis 18:2714-2713,1997).对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用,例如,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从受者和输入序列中选择和组合框架残基,使得实现所期望的抗体特性,诸如增加的对一种或更多种靶抗原的亲和力。通常,高变区残基直接且最大程度上参与影响抗原结合。

[0178] 用于抗体人源化的另一种方法是基于称为人类串含量(Human String Content,HSC)的抗体人源性(humanness)的度量。该方法将小鼠序列与人类种系基因的谱库进行比较,并且将差异评分为HSC。然后通过最大化其HSC而不是使用全局同一性测量来产生多种不同的人源化变体,从而使靶序列人源化。(Lazar等人,Mol.Immunol.44:1986-1998,2007).

[0179] 除了以上描述的方法之外,可以使用经验方法产生和选择人源化抗体。这些方法包括那些基于使用富集技术或高通量筛选技术产生大型人源化变体文库和选择最佳克隆的方法。抗体变体可以从噬菌体、核糖体和酵母展示文库中以及通过细菌菌落筛选来分离(参见例如,Hoogenboom,Nat.Biotechnol.23:1105-1116,2005;Dufner等人,Trends Biotechnol.24:523-529,2006;Feldhaus等人,Nat.Biotechnol.21:163-70,2003;Schlapschy等人,Protein Eng.Des.Sel.17:847-60,2004).

[0180] 在框架文库方法中,在框架的特定位置处引入残基变体的集合,随后筛选文库以选择最支持移植的CDR的框架。将被取代的残基可以包括被鉴定为可能有助于CDR结构的“游标(Vernier)”残基中的一些或所有(参见例如,Foote和Winter,1992,J.Mol.Biol.224:487-499,1992),或来自Baca等人(J.Biol.Chem.272:10678-10684,1997)鉴定的更有限的靶残基组。

[0181] 在框架混编中,完整框架与非人类CDR组合,而不是产生选择的残基变体的组合文库(参见例如,Dall′Acqua等人,2005,Methods 36:43-60)。可以在两步选择方法中对文库进行结合筛选,首先使VL人源化,随后是VH。可选地,可以使用一步框架混编方法。这样的方法已经显示出比两步筛选更有效,因为所得抗体表现出改进的生物化学和物理化学特性,包括增强的表达、增加的亲和力和热稳定性(参见例如,Damschroder等人,Mol.Immunol.44:3049-60,2007).

[0182] “人源工程化(humaneering)”方法是基于必需最小特异性决定簇(MSD)的实验鉴定,并且是基于将非人类片段顺序替换到人类FR文库中并对结合进行评价。它开始于非人类VH链和VL链的CDR3区,并且逐渐将非人类抗体的其他区替换到人类框架中,包括VH和VL两者的CDR1和CDR2。这种方法通常导致表位保留和来自具有不同人类V区段CDR的多个亚类的抗体的鉴定。人源工程化允许分离与人类种系基因抗体91-96%同源的抗体。(参见,例如,Alfenito,剑桥健康技术研究所的第三届年度PEGS,蛋白质工程峰会,2007)。

[0183] “人类工程化(human engineering)”方法包括通过对抗体的氨基酸序列进行特定改变来改变非人类抗体或抗体片段,诸如小鼠或嵌合抗体或抗体片段,以便产生在人类中

免疫原性减少但仍保留原始非人类抗体的期望结合特性的修饰的抗体。通常,该技术包括将非人类(例如,小鼠)抗体的氨基酸残基分类为“低风险”、“中等风险”或“高风险”残基。使用全局风险/回报计算来进行分类,所述全局风险/回报计算针对取代将影响所得抗体的折叠和/或被人残基取代的风险评估进行特定取代(例如,针对在人中的免疫原性)的预测益处。通过将来自非人类抗体的可变区的氨基酸序列与特定或共有人类抗体序列的对应区比对,可以选择在非人类(例如,小鼠)抗体序列的给定位置(例如,低或中等风险)处被取代为的特定人类氨基酸残基。根据比对,非人类序列中低或中等风险位置的氨基酸残基可以被取代为人类抗体序列中的对应残基。在Studnicka等人,Protein Engineering,7:805-814(1994)、美国专利第5,766,886号、第5,770,196号、第5,821,123号和第5,869,619号以及PCT申请公布WO 93/11794中更详细地描述了用于制备人类工程化蛋白的技术。

[0184] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂包含非抗体蛋白支架。此类非抗体蛋白支架的非限制性实例包括纤连蛋白支架、anticalin、adnectin、亲和体(affibody)、DARPin、fynomer、affitin、affilin、avimer、富含半胱氨酸的结蛋白肽(knottin peptide)或工程化的Kunitz型抑制剂。用于产生此类非抗体蛋白支架的方法是本领域熟知的,其中任何一种可用于产生包含非抗体蛋白支架的5T4结合剂(参见例如Simeon和Chen,Protein Cell,9(1):3-14(2018);Yang等人,Annu Rev Anal Chem(Palo Alto Calif).10(1):293-320(2017))。

[0185] 另外提供了编码本文公开的5T4结合剂(例如抗体或抗体片段)或融合多肽的核酸、与其互补的核酸、包含本文公开的核酸的载体、包含本文公开的核酸或载体的细胞。在一些实施方案中,细胞表达5T4结合剂。在一些实施方案中,细胞复制核酸或载体。在一些实施方案中,提供了用于产生5T4结合剂(例如人5T4结合剂)及其片段的材料。例如,分离的细胞可以产生5T4结合剂(例如,抗体或抗体片段)。在这方面,细胞(例如,分离的细胞)可以产生包含本文公开的VH和VL的抗体或其片段。在一些实施方案中,本文所述的多核苷酸可包含编码5T4结合剂(例如,抗体或抗体片段)的一个或更多个核酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸是分离的和/或重组的多核苷酸。在各个方面,分离的多核苷酸包含编码VH和/或VL的核苷酸序列,其中VH和VL包含与本文公开的CDR相同的互补决定区(CDR)。

[0186] 在一些实施方案中,一种或更多种载体(例如,表达载体)可包含一种或更多种多核苷酸,用于在合适的宿主细胞中表达所述一种或更多种多核苷酸。此类载体可用于例如在宿主细胞中扩增多核苷酸以产生有用量的多核苷酸,以及用于使用重组技术表达结合剂如抗体或抗体片段。

[0187] 在一些实施方案中,一种或更多种载体是表达载体,其中一种或更多种多核苷酸可操作地连接至一种或更多种包含表达控制序列的多核苷酸。特别考虑了自主复制的重组表达构建体,如掺入一种或更多种编码结合5T4的抗体序列的多核苷酸的质粒和病毒DNA载体。表达控制DNA序列包括启动子、增强子和操纵子,并且通常基于其中要利用表达构建体的表达系统来选择。启动子和增强子序列通常根据增加基因表达的能力来选择,而操纵子序列通常根据调节基因表达的能力来选择。表达构建体还可以包括编码一种或更多种选择标记的序列,所述选择标记允许鉴定携带该构建体的宿主细胞。表达构建体还可以包括促进和优选促进宿主细胞中同源重组的序列。在一些实施方案中,表达构建体还可以包括在宿主细胞中复制所必需的序列。

[0188] 示例性表达控制序列包括启动子/增强子序列,例如巨细胞病毒启动子/增强子(Lehner等人,J.Clin.Microbiol.,29:2494-2502,1991;Boshart等人,Cell,41:521-530,1985);劳斯肉瘤病毒启动子(Davis等人,Hum.Gene Ther.,4:151,1993);Tie启动子(Korhonen等人,Blood,86(5):1828-1835,1995);猿猴病毒40启动子;DRA(在腺瘤中下调;Alrefai等人,Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.,293:G923-G934,2007);MCT1(单羧酸转运蛋白1;Cuff等人,Am.J.Physiol.Gastrointet.Liver Physiol.,G977-G979.2005);和Math1(小鼠无调性同源物1;Shroyer et al.,Gastroenterology,132:2477-2478,2007),用于在哺乳动物细胞中表达,启动子可操作地连接在多肽编码序列的上游(例如5')。在另一个变型中,启动子是上皮特异性启动子或内皮特异性启动子。多核苷酸还可以任选地包括可操作地连接在多肽编码序列下游(例如,3′)的合适的聚腺苷酸化序列(例如,SV40或人生长激素基因聚腺苷酸化序列)。

[0189] 如果需要,所述一种或更多种多核苷酸还任选地包含编码分泌信号肽的核苷酸序列,所述分泌信号肽与所述多肽序列框内融合。分泌信号肽指导表达一种或更多种多核苷酸的细胞分泌抗体多肽,并被细胞从分泌的多肽切割。所述一种或更多种多核苷酸可进一步任选地包含其唯一预期功能是促进载体的大规模生产的序列。可以使用文献中描述的用于多种转基因的方法来制造和施用用于基因治疗的多核苷酸。参见,例如,Isner等人,Circulation,91:2687-2692,1995;和Isner等人,Human Gene Therapy,7:989-1011,1996.

[0190] 在一些实施方案中,多核苷酸可以还包含额外的序列以促进宿主细胞摄取和抗体或其片段(和/或任何其他肽)的表达。在一些实施方案中,采用编码本文所述的抗体或其片段的"裸"转基因(例如,没有病毒、脂质体或其他载体以促进转染的转基因)。

[0191] 任何合适的载体可用于将编码抗体或其片段的一种或更多种多核苷酸引入宿主。已经描述的示例性载体包括复制缺陷型逆转录病毒载体,包括但不限于慢病毒载体(Kim等人,J.Virol.,72(1):811-816,1998;Kingsman&Johnson,Scrip Magazine,1998年10月,第43-46页);细小病毒载体,如腺相关病毒(AAV)载体(美国专利第5,474,9351号;第5,139,941号;第5,622,856号;第5,658,776号;第5,773,289号;第5,789,390号;第5,834,441号;第5,863,541号;第5,851,521号;第5,252,479号;Gnatenko等人,J.Invest.Med.,45:87-98,1997);腺病毒(AV)载体(美国专利第5,792,453号;第5,824,544号;第5,707,618号;第5,693,509号;第5,670,488号;第5,585,362号;Quantin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:2581-2584,1992;Stratford Perricaudet等人,J.Clin.Invest.,90:626-630,1992;和Rosenfeld等人,Cell,68:143-155,1992);腺病毒腺相关病毒嵌合(美国专利号5,856,152)或痘苗病毒或疱疹病毒载体(美国专利第5,879,934号;第5,849,571号;第5,830,727号;第5,661,033号;第5,328,688号);脂质体(Lipofectin)介导的基因转移(BRL);脂质体载体(美国专利第5,631,237号);及其组合。这些表达载体中的任一种可以使用例如Sambrook等人,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY(1989)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates和John Wiley&Sons,New York,N.Y.(1994)中描述的标准重组DNA技术制备。任选地,通过例如缺失或破坏病毒复制所需的选择基因使病毒载体具有复制缺陷。

[0192] 预期的其它非病毒递送机制包括磷酸钙沉淀(Graham和Van Der Eb,Virology,

52:456-467,1973;Chen and Okayama,Mol.CellBiol.,7:2745-2752,1987;Rippe et al.,Mol.Cell Biol.,10:689-695,1990),DEAE-葡聚糖(Gopal,Mol.Cell Biol.,5:1188-1190,1985),电穿孔(Tur-Kaspa等,Mol.Cell Biol.,6:716-718,1986;Potter等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,,81:7161-7165,1984),直接显微注射(Harland和Weintraub,J.Cell Biol.,101:1094-1099,1985),载有DNA的脂质体(Nicolau和Sene,Biochim.Biophys.Acta,,721:185-190,1982;Fraley等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76:3348-3352,1979;Felgner,Sci Am.,276(6):102-6,1997;Felgner,Hum Gene Ther.,7(15):1791-3,1996),细胞超声处理(Fechheimer等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,84:8463-8467,1987),使用高速微粒的基因轰击(Yang等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:9568-9572,1990)和受体介导的转染(Wu和Wu,J.Biol.Chem.,262:4429-4432,1987;Wu和Wu,Biochemistry,27:887-892,1988;Wu和Wu,Adv.Drug Delivery Rev.,12:159-167,1993)。

[0193] 载体(或如本文所讨论的抗体或其片段或核酸)可以包埋在脂质体中。参见,例如,Ghosh和Bachhawat,见:Liver diseases,targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands,Wu G,Wu C ed.,New York:Marcel Dekker,第87-104页(1991);Radler等人,Science,275(5301):810-814,1997)。还考虑了涉及“脂质转染”技术的各种商业方法。在一些实施方案中,脂质体可以与血凝病毒(HVJ)复合。这已被证明有利于与细胞膜的融合并促进脂质体包封的DNA进入细胞(Kaneda等,Science,243:375-378,1989)。在一些实施方案中,脂质体与核非组蛋白染色体蛋白(HMG-1)复合或结合使用(Kato等人,J.Biol.Chem.,266:3361-3364,1991)。在一些实施方案中,脂质体与HVJ和HMG-1两者复合或结合使用。此类表达构建体已成功用于核酸的体外和体内转移和表达。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体)(包括人5T4结合剂)包含在脂质体中以将脂质体靶向在其表面上表达5T4的细胞(例如肿瘤细胞)。

[0194] 细胞可以包含一种或更多种多核苷酸或一种或更多种载体,例如,细胞用编码5T4结合剂(例如抗体)(包括人5T4结合剂)的一种或更多种多核苷酸或包含该一种或更多种多核苷酸的一种或更多种载体转化或转染。在一些实施方案中,细胞表达5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,其含有一个或更多个(包括六个)与mAbA4、mAbA15或mAbA17的CDR(参见例如表1、2和/或3)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的CDR。在一些实施方案中,细胞表达5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,其含有包含与mAbA4、mAbA15和/或mAbA17的CDR(参见例如表1、2和/或3)相同的CDR的VH和VL。细胞可以是原核细胞,例如大肠杆菌(参见例如Pluckthun等人,MethodsEnzymol.,178:497-515,1989)或真核细胞,如动物细胞(例如骨髓瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或杂交瘤细胞)、酵母(例如酿酒酵母)或植物细胞(例如烟草、玉米、大豆或水稻细胞)。哺乳动物宿主细胞的使用可以提供翻译修饰(例如,糖基化、截短、脂质化和磷酸化),这可能是赋予重组表达产物最佳生物活性所期望的。类似地,多肽(例如,5T4结合剂(例如,抗体),包括人5T4结合剂)可以是糖基化的或非糖基化的和/或已经被共价修饰以包括一个或更多个水溶性聚合物连接,例如聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。

[0195] 用于将DNA或RNA引入宿主细胞的方法是众所周知的,并且包括转化、转染、电穿孔、核注射或与载体如脂质体、胶束、鬼影细胞和原生质体融合。此类宿主细胞可用于扩增多核苷酸,也可用于表达由多核苷酸编码的多肽。在这方面,用于产生5T4结合剂(例如,抗

体)的方法可包括培养宿主细胞并分离5T4结合剂。将裸DNA表达构建体转移到细胞中可以使用粒子轰击来完成,这依赖于将DNA包被的微粒加速到允许它们刺穿细胞膜并进入细胞而不杀死它们的高速的能力(Klein等人,Nature,327:70-73,1987)。已经开发了几种用于加速小粒子的装置。一种这样的装置依靠高电压放电来产生电流,该电流又提供原动力(Yang等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA,87:9568-9572,1990)。所使用的微粒由生物惰性物质如钨或金珠组成。可以分离和/或纯化宿主细胞。宿主细胞也可以是在体内转化以引起多肽在体内瞬时或永久表达的细胞。宿主细胞也可以是离体转化的分离的细胞,并在转化后引入,例如,以在体内产生用于治疗目的的多肽。宿主细胞的定义明确地排除了转基因人类。

[0196] 从多核苷酸产生抗体的多种方法通常是众所周知的。例如,Maniatis等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1989描述了分子生物学程序(还参见Maniatis等人,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2001)。此外,许多出版物描述了适于通过操作DNA、产生表达载体以及转化和培养适当细胞来制备抗体的技术(参见,例如,Mountain和Adair,<< Biotechnology and Genetic Engineering Reviews第1章,Tombs ed.,Intercept,Andover,UK,1992);和Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel编著,Wiley Interscience,New York,1999)。

[0197] 使用任何合适的方法产生5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,例如从免疫动物分离、重组或合成产生、或基因工程化,包括如上所述。衍生自抗体的抗体片段通过例如抗体的蛋白水解获得。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体分别产生称为$F(ab')_2$的5S片段或两个单价Fab片段和一个Fc片段。可以使用硫醇还原剂进一步裂解$F(ab)_2$以产生3.5S Fab单价片段。产生抗体片段的方法进一步描述于例如Edelman等人,Methods in Enzymology,1:422Academic Press(1967);Nisonoff等人,Arch.Biochem.Biophys.,89:230-244,1960;Porter,Biochem.J.,73:119-127,1959;美国专利号4,331,647;以及Andrews,S.M.和Titus J.A.,Current Protocols in Immunology(Coligan等人,编著),John Wiley&Sons,New York(2003),第2.8.1、2.8.10和2.10A.1、2.10A.5页。

[0198] 可以对包括人5T4结合剂的5T4结合剂(例如抗体)进行基因工程化。例如,5T4结合剂(例如抗体),包括人5T4结合剂,包含例如通过重组DNA工程技术产生的可变区结构域。在这方面,可变区任选地通过在抗体的氨基酸序列中的插入、缺失或改变来修饰以产生目的抗体,包括如上所述。编码感兴趣的CDR的多核苷酸例如通过使用聚合酶链式反应以使用抗体产生细胞的mRNA作为模板合成可变区来制备(参见例如Courtenay Luck,“Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies”,Monoclonal Antibodies:Production,Engineering and Clinical Application,Ritter等人(编著),第166页(Cambridge University Press 1995);Ward等人,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”,载于Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等,(编著),137页(Wiley Liss,Inc.,1995);和Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology,2:106-110,1991)。目前的抗体操作技术允许构建工程化的可变区结构域,其包含来自第一抗体的至少一个CDR和任选地一个或更多个框架氨基酸以及来自第二抗体的可变区结构域的剩余部分。此类技术用于例如人源化抗体或改善其对结合靶标的亲和

力。

[0199] “人源化抗体”是其中将非人免疫球蛋白的重可变链和轻可变链的CDR转移到人可变结构域中的抗体。恒定区不需要存在,但如果存在,则在一些实施方案中,它们任选地与人免疫球蛋白恒定区基本上相同,例如至少约85-90%、约95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。因此,在一些情况下,人源化免疫球蛋白的所有部分,除了可能的CDR,都与天然人类免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。例如,人源化抗体是人免疫球蛋白(例如,宿主抗体),其中宿主抗体的高变区残基被来自非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有所需特异性、亲和力和能力的高变区残基取代。

[0200] 在一些实施方案中,本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)可用于治疗、预防或缓解5T4介导的疾病、紊乱或状况(包括所述疾病、紊乱或状况的一种或更多种症状)的组合物和方法中。5T4介导的疾病、紊乱和状况包括癌症,包括但不限于其中肿瘤细胞过表达5T4的任何癌症。

[0201] 在一些实施方案中,本文描述了一种用于治疗受试者的肿瘤免疫的方法,其包括向受试者施用本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如抗体或ADC)的药物组合物,其用于治疗受试者的肿瘤免疫。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物在制备用于治疗受试者的肿瘤免疫的药物中的用途。

[0202] 在一些实施方案中,本文描述了一种用于治疗受试者的癌症或肿瘤的方法,其包括向受试者施用本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物,其用于治疗受试者的癌症或肿瘤。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症或肿瘤的药物中的用途。

[0203] 在一些实施方案中,本文描述了一种用于减轻受试者中与癌症或肿瘤相关的一种或更多种症状的方法,其包括向受试者施用本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物,其用于减轻受试者中与癌症或肿瘤相关的一种或更多种症状。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物在制备用于减轻受试者中与癌症或肿瘤相关的一种或更多种症状的药物中的用途。

[0204] 在一些实施方案中,本文描述了一种用于减小患有肿瘤的受试者的肿瘤尺寸的方法,其包括向受试者施用本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物,其用于减小患有肿瘤的受试者的肿瘤尺寸。在一些实施方案中,本文提供了本文所

述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物在制备用于减小患有肿瘤的受试者的肿瘤尺寸的药物中的用途。

[0205] 在一些实施方案中,本文描述了一种用于增强患有肿瘤的受试者中的肿瘤细胞去除的方法,其包括向受试者施用本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物,其用于增强患有肿瘤的受试者中的肿瘤细胞去除。在一些实施方案中,本文提供了本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物在制备用于增强患有肿瘤的受试者中的肿瘤细胞去除的药物中的用途。

[0206] 可以向本文所述的方法的受试者施用一种或更多种本文所述的治疗剂与本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或其片段或包含本文所述的结合剂(例如,抗体或ADC)的药物组合物。

[0207] 在一些实施方案中,抗体是人抗体,包括但不限于具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区两者均源自人类种系免疫球蛋白序列,如例如描述于Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国Department of Health and Human Services,NIH出版物编号91-3242。如果抗体含有恒定区,则恒定区也优选衍生自人类种系免疫球蛋白序列。人抗体可包含不由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基,例如以增强抗体的活性,但不包含衍生自其他物种的CDR(例如,置于人可变框架区内的小鼠CDR)。

[0208] 在一些实施方案中,本文所述方法的癌症或肿瘤的细胞表达5T4,例如在细胞表面上。在另外的实施方案中,癌症或肿瘤的细胞过表达5T4。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如,抗体或ADC)对细胞培养物中的肿瘤细胞具有细胞毒性。此类细胞培养物可包括表达或过表达5T4的肿瘤细胞。肿瘤细胞包括但不限于乳腺癌细胞、膀胱癌细胞、黑素瘤细胞、前列腺癌细胞、间皮瘤细胞、肺癌细胞、睾丸癌细胞、甲状腺癌细胞、鳞状细胞癌细胞、胶质母细胞瘤细胞、神经母细胞瘤细胞、子宫癌细胞、结肠直肠癌细胞和胰腺癌细胞。

[0209] 在一些实施方案中,本文描述了增强受试者中肿瘤细胞的去除的方法。例如,所述方法包括施用有效增强肿瘤细胞去除的量的5T4结合剂(例如,抗体或ADC),诸如本文所述的人5T4结合剂。在一些实施方案中,所述方法包括施用5T4结合剂(例如抗体或ADC),包括(i)与mAbA4、mAbA15和/或mAbA17(参见例如表1、表2和/或表3的CDR和VH/VL)竞争结合,(ii)结合人5T4和/或(iii)结合由mAbA4、mAbA15和/或mAbA17(参见例如表1、表2和/或表3的CDR和VH/VL)识别的5T4区域的5T4结合剂,导致肿瘤细胞的去除增强。在一些实施方案中,如上所述的一种或更多种结合剂(例如抗体)、多核苷酸、载体和/或细胞可用于增强体内肿瘤细胞去除的方法(例如,用于治疗受试者的癌症的方法)。

[0210] 还提供了调节(例如,抑制、减少、预防)受试者中肿瘤生长的方法。例如,所述方法包括向所述受试者施用包含有效调节所述受试者中肿瘤生长的量的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)的组合物。

[0211] 如本文所用,“肿瘤”是指任何赘生性细胞生长或增殖,无论是恶性的还是良性的,并且是指所有癌前和癌性细胞和组织。术语“癌症”和“癌性(cancerous)”是指或描述哺乳

动物中通常地以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于:乳腺癌、结肠癌、肾癌、肺癌、鳞状细胞骨髓性白血病、血管瘤、黑素瘤、星形细胞瘤和胶质母细胞瘤以及其他细胞增殖性疾病状态,包括但不限于:心脏:肉瘤(血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤)、黏液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤和畸胎瘤;肺:支气管癌(鳞状细胞癌、未分化小细胞癌、未分化大细胞癌、腺癌)、肺泡(细支气管)癌、支气管腺瘤、肉瘤、淋巴瘤、软骨错构瘤(chondromatous hanlartoma)、间皮瘤(inesothelioma);胃肠:食管(鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴瘤)、胃(癌、淋巴瘤、平滑肌肉瘤)、胰腺(导管腺癌、胰岛素瘤、胰高血糖素瘤、胃泌素瘤、类癌肿瘤、血管活性肠肽瘤(vipoma))、小肠(腺癌、淋巴瘤、类癌肿瘤、卡波西肉瘤、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤)、大肠(腺癌、管状腺瘤、绒毛腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤);泌尿生殖道:肾(腺癌、Wilm瘤(肾母细胞瘤)、淋巴瘤、白血病、肾细胞癌)、膀胱和尿道(鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌)、前列腺(腺癌、肉瘤、前列腺小细胞癌)、睾丸(精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎癌、畸胎癌、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞癌、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤、脂肪瘤);肝:肝癌(肝细胞癌)、胆管癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤、血管瘤;骨:成骨肉瘤(骨肉瘤)、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤文肉瘤、恶性淋巴瘤(网状细胞肉瘤)、恶性巨细胞瘤脊索瘤、骨软骨瘤(骨软骨外生骨疣(osteocartilaginous exostoses))、良性软骨瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液纤维瘤、骨样骨瘤和巨细胞瘤;神经系统:颅骨(骨瘤、血管瘤、肉芽肿、黄色瘤、畸形性骨炎),脑膜(脑膜瘤、脑膜肉瘤、神经胶质瘤病)、脑(星形细胞瘤、髓母细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、生殖细胞瘤(松果体瘤)、多形性胶质母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、神经鞘瘤、视网膜母细胞瘤、先天性肿瘤)、脊髓神经纤维瘤、脑膜瘤、神经胶质瘤、肉瘤);妇科:子宫(子宫内膜癌)、子宫颈(宫颈癌、肿瘤前宫颈非典型增生)、卵巢(卵巢癌)浆液性囊腺癌、黏液性囊腺癌、未分类癌、颗粒-卵泡膜(granulosa-thecal)细胞瘤、支持-间质细胞瘤、无性细胞瘤、恶性畸胎瘤)、外阴(鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌、纤维肉瘤、黑素瘤)、阴道(透明细胞癌、鳞状细胞癌、葡萄状肉瘤(胚胎性横纹肌肉瘤)、输卵管(癌);血液学:血液(髓性白血病(急性和慢性)、急性淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增生性疾病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征)、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(恶性淋巴瘤);皮肤:恶性黑素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西肉瘤、发育不良痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕疙瘩、银屑病;和肾上腺:神经母细胞瘤;以及甲状腺癌,包括甲状腺髓样癌。在一些实施方案中,肿瘤或癌症是复发性肿瘤或癌症。在一些实施方案中,肿瘤或癌症是转移性肿瘤或癌症。在一些实施方案中,肿瘤或癌症是原发性肿瘤或癌症。另外或可替代地,肿瘤或癌症对化疗或其他非5T4靶向抗癌疗法具有抗性。

[0212] 还提供了一种通过向有需要的受试者单独或与另一种剂组合施用5T4结合剂(例如抗体)如人5T4结合剂来治疗癌症的方法。

[0213] “增强”肿瘤细胞去除不需要100%增强去除。预期去除速率的任何提高。类似地,“调节”肿瘤生长是指减小肿瘤的尺寸、减缓肿瘤生长或抑制现有肿瘤的尺寸增加。不需要完全消除肿瘤;肿瘤尺寸的任何减小或肿瘤生长的减慢在受试者中构成有益的生物学效应。在这方面,与在不存在该方法的情况下(例如,在未暴露于该方法的剂的生物学匹配的对照受试者或样本中)观察到的去除水平相比,肿瘤细胞去除可以增强例如至少约5%、至少约10%或至少约20%。通过例如肿瘤尺寸的减小、肿瘤标志物水平的降低或维持、或肿瘤

细胞群的降低或维持来检测该效果。在一些实施方案中,与在不存在该方法的5T4结合剂(例如抗体)的情况下去除肿瘤细胞相比,肿瘤细胞的去除增强例如至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多(约100%)。

[0214] 另外,5T4结合剂(例如抗体或ADC)可用于减轻或减少与癌症相关的副作用,例如骨退化、脊椎塌陷和瘫痪。在一个方面,受试者患有骨转移或处于患有骨转移的风险中,并且以减少周围骨的退化的量施用5T4结合剂(例如,抗体或ADC)。因此,在一些方面,5T4结合剂防止由于骨转移引起的骨退化,其中肿瘤细胞增殖减少或不减少。在一些方面,5T4结合剂(例如,抗体或ADC)既防止骨转移引起的骨退化,又减少肿瘤细胞增殖。通常,对肿瘤细胞增殖的影响(例如,抑制增殖或不影响增殖)取决于特定转移的微环境。例如,可以抑制位于具有大量1型胶原的微环境中的转移瘤的增殖。相反,位于缺乏大量1型胶原的微环境中的转移瘤的增殖可能不被抑制,但转移瘤附近的骨退化被减少或防止。

[0215] 针对特定受试者的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)的特定施用方案将部分取决于所使用的剂、施用的剂的量、施用途径以及任何副作用的原因和程度。施用于受试者(例如哺乳动物,如人)的剂(例如抗体或ADC)的量应足以在合理的时间范围内实现期望的响应。因此,在一些实施方案中,向受试者施用的本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)或药物组合物的量是有效量。

[0216] 施用包含5T4结合剂(例如抗体或ADC)如人5T4结合剂(例如抗体或ADC)的组合物的合适途径是本领域熟知的。尽管可以使用多于一种途径来施用剂(例如,抗体或ADC),但特定途径可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0217] 本公开提供了一种组合物,诸如药物组合物,其包含5T4结合剂(例如,抗体或ADC)诸如人5T4结合剂和载体(例如,药学上可接受的载体)。所采用的特定载体可取决于化学-物理考虑,如溶解度和缺乏与结合剂或共疗法的反应性,以及取决于施用途径。药学上可接受的载体是本领域公知的,其实例在本文中描述。适合于可注射使用的示例性药物形式包括无菌水性溶液或分散体以及用于临时制备可注射无菌溶液或分散体的无菌粉末。可注射制剂进一步描述于例如Pharmaceutics and Pharmacy Practice,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia.Pa.Banker and Chalmers.eds.238-250页(1982)和ASHP Handbook on Injectable Drugs,Toissel,第4版,622-630页(1986))。本文提供的药物组合物的制备及其各种施用途径可以根据本领域熟知的方法进行。在本发明上下文中有用的递送系统包括定时释放、延迟释放和持续释放递送系统,使得组合物的递送发生在待治疗部位的致敏之前,并且有足够的时间引起待治疗部位的致敏。许多类型的释放递送系统是可用的并且是本领域普通技术人员已知的。合适的释放递送系统包括聚合物基础系统,例如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酸酐。包含药物的前述聚合物的微胶囊描述于例如美国专利5,075,109中。递送系统还包括非聚合物系统,其为脂质如甾醇如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪如甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规黏合剂和赋形剂的压制片剂;部分融合的植入物;等等。具体实例包括但不限于:(a)侵蚀系统,其中活性组合物以基质中的形式包含,如美国专利4,452,775、4,667,014、4,748,034和5,239,660中所述,和(b)扩散系统,其中活性组分以受控速率从聚合物渗透,如美国专利3,832,253和3,854,480中所述。此外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适于植入。在一个方面,将包含5T4结合剂

(例如,抗体或ADC)如人5T4结合剂的药物组合物与提供关于使用此类药物组合物的说明书的包装材料一起放置在容器内。通常,此类说明书包括描述试剂浓度的有形表达,以及在一些实施方案中,可能是重构药物组合物所必需的赋形剂成分或稀释剂(例如,水、盐水或PBS)的相对量。

[0218] 在一些方面,本文所述的方法还包括施用一种或更多种另外的剂,包括治疗剂,其可以存在于组合物中或可以与5T4结合剂(例如,抗体或ADC)诸如人5T4结合剂一起施用,或使用相同或不同的施用途径在单独的组合物中提供。一种或更多种另外的剂(包括治疗剂)可以与5T4结合剂(例如,抗体或ADC)一起或分开(例如,同时、交替地、顺序地)施用(例如,用于组合疗法)。此类另外的治疗剂包括但不限于治疗性抗体、免疫疗法和免疫治疗剂、细胞毒性剂、化学治疗剂和抑制剂。

[0219] 可与如本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)一起使用(例如,用于组合疗法)的治疗性抗体包括但不限于曲妥珠单抗;阿昔单抗;达利珠单抗;BEC2;IMC-C22;vitaxin;Campath 1H/LDP-03;Smart M195;依帕珠单抗(epratuzumab);贝妥莫单抗;维西珠单抗(visilizumab);CM3,人源化抗ICAM3抗体;IDEC-114;ibritumomab tiuxetan;IDEC-131;IDEC-151;IDEC-152;SMART抗CD3;依库珠单抗;阿达木单抗;赛妥珠单抗;IDEC-151;MDX-CD4;CD20-链霉亲和素;CDP571;LDP-02;OrthoClone OKT4A;卢利珠单抗(ruplizumab);那他珠单抗;和乐德木单抗;或其生物类似物。

[0220] 可与如本文所述的5T4结合剂(例如抗体或ADC)一起使用(例如用于组合疗法)的免疫疗法和免疫治疗剂包括但不限于细胞因子,诸如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞炎性蛋白(MIP)-1-α、白细胞介素(包括IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21和IL-27)、肿瘤坏死因子(包括TNF-α)和干扰素(包括IFN-α、IFN-β和IFN-γ);氢氧化铝(明矾);卡介苗(BCG);匙孔帽贝血蓝蛋白(KLH);不完全弗氏佐剂(IF A);QS-21;DETOX;左旋咪唑;和二硝基苯酚(DNP),以及它们的组合,例如白细胞介素(例如IL-2)与其它细胞因子(例如IFN-α)的组合。在一些实施方案中,免疫疗法包括调节免疫应答的免疫治疗剂,例如检查点抑制剂或检查点激动剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是靶向本领域已知的PD-1、5T4、PD-L2、CEACAM(例如CEACAM-1、-3和/或-5)、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGFβ、OX40、41BB、LIGHT、CD40、GITR、TGF-β、TIM-3、SIRP-α、VSIG8、BTLA、SIGLEC7、SIGLEC9、ICOS、B7H3、B7H4、FAS和/或BTNL2等的抗体调节剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是增加自然杀伤(NK)细胞活性的剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制免疫应答抑制的剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制抑制细胞或抑制细胞活性的剂。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制Treg活性的剂或疗法。在一些实施方案中,免疫治疗剂是抑制抑制性免疫检查点受体的活性的剂。

[0221] 在一些实施方案中,免疫治疗剂包括选自共刺激分子的激动剂或活化剂的T或NK或NKT细胞调节剂。在一个实施方案中,共刺激分子的激动剂选自GITR、OX40、ICOS、SLAM(例如SLAMF7)、HVEM、LIGHT、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、CD30、CD40、BAFFR、CD7、NKG2C、NKp80、CD160、B7-H3或CD83配体的激动剂(例如,激动性抗体或其抗原结合片段或可溶性融合物)。在其他实施方案中,效应细胞组合包括双特异性T细胞衔接器(例如,结合CD3和肿瘤抗原(例如,EGFR、PSCA、PSMA、EpCAM、HER2

等)的双特异性抗体分子)或双特异性NK细胞衔接器。

[0222] 可与如本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)一起使用(例如,用于组合疗法)的细胞毒性剂包括抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。示例性细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212和Lu的放射性同位素);生长抑制剂;酶及其片段,例如核溶解酶;和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。其它示例性细胞毒性剂可选自抗微管剂、铂配位络合物、烷化剂、抗生素剂、拓扑异构酶II抑制剂、抗代谢物、拓扑异构酶I抑制剂、激素和激素类似物、信号转导途径抑制剂、非受体酪氨酸激酶血管生成抑制剂、免疫治疗剂、促凋亡剂、LDH-A抑制剂;脂肪酸生物合成抑制剂;细胞周期信号传导抑制剂;HDAC抑制剂、蛋白酶体抑制剂;和癌症代谢抑制剂。

[0223] 可与如本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)一起使用(例如,用于组合疗法)的化疗剂包括可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括但不限于厄洛替尼、硼替佐米、双硫仑、表没食子儿茶素没食子酸酯、盐孢菌胺A、卡非佐米、17-AAG(格尔德霉素)、根赤壳菌素、乳酸脱氢酶A(LDH-A)、氟维司群、舒尼替尼、来曲唑、甲磺酸伊马替尼、fmasunate、奥沙利铂、5-FET(5-氟尿嘧啶)、亚叶酸(leucovorin)、雷帕霉素、拉帕替尼、Lonafamib(SCH66336)、索拉非尼(Bayer Labs)、吉非替尼、AG1478;烷化剂,如噻替哌和CYTOXAN®;环磷酰胺;烷基磺酸酯,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,如苯并多巴、卡波醌、美妥多巴(meturedopa)和乌瑞多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺、三亚乙基三聚氰胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺;acetogenins(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括拓扑替康和伊立替康);苔藓抑素;cally statin;CC-1065(包括其adozelesin、carzelesin和bizelesin合成类似物);隐藻素(特别是隐藻素1和隐藻素8);肾上腺皮质类固醇(包括泼尼松和泼尼松龙);醋酸环丙孕酮;5α-还原酶,包括非那雄胺和度他雄胺);伏立诺他、罗米地辛、帕比司他、丙戊酸、mocetinostat、海兔毒素;阿地白介素、滑石倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;pancratistatin;sarcodictyin;海绵抑素;氮芥,如苯丁酸氮芥、氯丙嗪、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氮芥、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶芥末;亚硝基脲类,如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素如烯二炔类抗生素(例如加利车霉素,特别是加利车霉素γII和加利车霉素ωI(Angew Chem.Inti.Ed.Engl.199433:183-186);dynemicin,包括dynemicin A;双膦酸盐,如氯膦酸盐;埃斯帕霉素;以及新癌抑素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素、放线菌素、authramycin、偶氮丝胺酸(azaserine)、博来霉素、cactinomycin、carabicin、caminomycin、carzinophilin、色霉素、更生霉素、柔红霉素、detorubicin、6-重氮-5-氧代-L-去甲亮氨酸、多柔比星、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉代-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、艾柔比星、伊达比星、马塞罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,如甲氨蝶呤和

5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫乌嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素,如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、表硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸(folinic acid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶;bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defosfamide);地美可辛(demecolcine);地吖醌(diaziquone);elfornithine;依利醋铵(elliptinium acetate);埃坡霉素;依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidamine);美登木素生物碱,如美登素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇;二胺硝吖啶(nitracrine);喷司他丁;蛋氨氮芥(phenamet);吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Ore.);雷佐生;根霉素;西佐呋喃;螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢菌素,特别是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin)A、杆孢菌素(roridin)A和anguidine;乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉醇类(taxoids),例如紫杉醇(paclitaxel)、ABRAXANE®(不含Cremophor)、紫杉醇的白蛋白工程纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Ill.)和多西他赛(docetaxel/doxetaxel);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;novantrone;替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤(aminopterin);卡培他滨(capecitabine);伊本膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄酸(retinoid),诸如视黄酸(retinoic acid);以及上述任一种的药学上可接的受盐、酸和衍生物。化学治疗剂还包括(i)用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,例如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括枸橼酸他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、碘昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY117018、奥那司酮和枸橼酸托瑞米芬;(ii)抑制调节肾上腺中雌激素产生的芳香酶的芳香酶抑制剂,例如4(5)-咪唑类、氨鲁米特、醋酸甲地孕酮、依西美坦、福美坦、法曲唑、伏罗唑、来曲唑和阿那曲唑;(iii)抗雄激素,如氟他胺、尼鲁他胺、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;布舍瑞林、曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己烯雌酚、倍美力、氟甲睾酮、全反式视黄酸、芬维胺(fenretinide)以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);(iv)蛋白激酶抑制剂;(v)脂质激酶抑制剂;(vi)反义寡核苷酸,特别是抑制涉及异常细胞增殖的信号传导途径中的基因表达的那些,例如PKC-α、Ralf和H-Ras;(vii)核酶,如VEGF表达抑制剂(例如,ANGIOZYME®)和HER2表达抑制剂;(viii)疫苗,例如基因治疗疫苗,例如ALLOVECTIN®、LEUVECTIN®和VAXID®; PROLEUKIN®,rIL-2;拓扑异构酶1抑制剂,如LEIRTOTECAN®; ABARELIX®;和(ix)上述任一种的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0224] 化学治疗剂还包括如上所述的抗体,包括阿仑珠单抗、贝伐单抗;西妥昔单抗;帕

尼单抗、利妥昔单抗、帕妥珠单抗、托西莫单抗和抗体药物缀合物吉妥珠单抗奥佐米星。作为与如本文所述的5T4结合剂(例如抗体)组合的剂具有治疗潜力的另外的人源化单克隆抗体包括:阿泊珠单抗、阿塞珠单抗、atlizumab、巴匹珠单抗、比伐珠单抗美登素、坎妥珠单抗美登素、培塞利珠单抗、cidfusituzumab、cidtuzumab、达利珠单抗、依库珠单抗(eculizumab)、依法利株单抗、依帕珠单抗、厄利珠单抗(erlizumab)、泛维珠单抗(felvizumab)、芳妥珠单抗(fontolizumab)、吉妥珠单抗奥佐米星、伊妥珠单抗奥佐米星、伊匹木单抗、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗(lintuzumab)、马妥珠单抗(matuzumab)、美泊利珠单抗、莫维珠单抗(motavizumab)、莫维珠单抗(motovizumab)、那他珠单抗、尼妥珠单抗、纳武利尤单抗、诺洛珠单抗(nolovizumab)、努马珠单抗(numavizumab)、奥瑞利珠单抗(ocrelizumab)奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕考珠单抗(pascolizumab)、帕氟珠单抗(pecfusituzumab)、帕妥珠单抗(pectuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、ralivizumab、雷珠单抗(ranibizumab)、热利维珠单抗(reslivizumab)、瑞利珠单抗(reslizumab)、热西维珠单抗(resyvizumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、卢利珠单抗、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、西利珠单抗(siplizumab)、索土珠单抗(sontuzumab)、tacatuzumab tetraxetan、他度珠单抗(tadocizumab)、他利珠单抗(talizumab)、特非珠单抗(tefibazumab)、托珠单抗、托利珠单抗(toralizumab)、tucotuzumab celmoleukin、图库斯珠单抗(tucusituzumab)、乌吗维珠单抗(umavizumab)、乌珠单抗(ustekinumab)、维西珠单抗(visilizumab),和抗白细胞介素-12(ABT-8744695,Wyeth Research and AbbottLaboratories),其是经遗传修饰以识别白细胞介素-12p40蛋白的重组纯人序列全长IgG1λ抗体。化疗剂还包括地塞米松、干扰素、秋水仙碱、氯苯氨啶、环孢素、两性霉素、甲硝唑、阿仑珠单抗、alitretinoin、别嘌呤醇、氨磷汀、三氧化二砷、天冬酰胺酶、活卡介苗、贝伐珠单抗、贝沙罗汀(bexarotene)、克拉屈滨、氯法拉滨(clofarabine)、darbepoetinα、地尼白介素、右雷佐生(dexrazoxane)、依泊汀α、elotinib、非格司亭、醋酸组氨瑞林、ibritumomab、干扰素α-2a、干扰素α-2b、来那度胺、左旋咪唑、美司钠、甲氧沙林、诺龙(nandrolone)、奈拉滨(nelarabine)、诺非妥莫单抗(nofetumomab)、奥普瑞白介素(oprelvekin)、帕利夫明(palifermin)、帕米膦酸(pamidronate)、培加酶pegademase、培门冬酶(pegaspargase)、PEG非格司亭(pegfilgrastim)、培美曲塞二钠、普卡霉素、卟吩姆钠(porfimer sodium)、喹纳克林(quinacrine)、拉布立酶(rasburicase)、沙格司亭、替莫唑胺(temozolomide)、VM-26、6-TG、托瑞米芬、tretinoin、ATRA、戊柔比星(valrubicin)、唑来膦酸盐(zoledronate)和唑来膦酸(zoledronic acid),及其药学上可接受的盐。

[0225] 化学治疗剂还包括氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松、新戊酸替可的松(tixocortol pivalate)、曲安奈德、曲安西龙醇、莫米松、安西奈德、布地奈德、地奈德、氟轻松、缩丙酮氟轻松、倍他米松、倍他米松磷酸钠、地塞米松、地塞米松磷酸钠、氟可龙、氢化可的松-17-丁酸酯、氢化可的松-17-戊酸酯、阿氯米松双丙酸酯、戊酸倍他米松、二丙酸倍他米松、泼尼卡酯、氯倍他松-17-丁酸酯、氯倍他松-17-丙酸酯、己酸氟可龙、新戊酸氟可龙和醋酸氟泼尼定;免疫选择性抗炎肽(ImSAID),例如苯丙氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸(FEG)及其D-异构形式(feG)(IMULAN BioTherapeutics,LLC);抗风湿药物如硫唑嘌呤、环孢素(环孢素A)、D-青霉胺、金盐、羟氯喹、来氟米特(leflunomide)米诺环素(minocycline)、柳氮磺胺吡啶、肿瘤坏死因子α(TNFα)阻断剂如依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、

certolizumabpegol、戈利木单抗(Simponi)、白细胞介素1(IL-1)阻断剂如阿那白滞素、T细胞共刺激阻断剂如阿巴西普、白细胞介素6(IL-6)阻断剂如托珠单抗;白细胞介素13(IL-13)阻断剂,如lebrikizumab;干扰素α(IFN)阻断剂,如Rontalizumab;β7整联蛋白阻断剂,如rhuMAbβ7;IgE途径阻断剂,如抗-Ml prime;分泌型同源三聚体LTa3和膜结合型异源三聚体LTal/132阻断剂,如抗淋巴毒素α(LTa);杂项研究剂,如硫铂、PS-341、丁酸苯酯、Et-I8-OCH3或法呢基转移酶抑制剂(L-739749、L-744832);多酚类,如槲皮素、白藜芦醇、白皮杉醇、表没食子儿茶素没食子酸酯、茶黄素、黄烷醇、原花青素、桦木酸及其衍生物;自噬抑制剂,如氯喹;δ-9-四氢大麻酚(屈大麻酚);β-拉帕酮;拉帕醇;秋水仙碱类;桦木酸;乙酰喜树碱、东莨菪碱和9-氨基喜树碱;鬼臼毒素;替加氟;贝沙罗汀;双膦酸盐如氯膦酸盐、依替膦酸盐、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐、阿仑膦酸盐、帕米膦酸盐、替鲁膦酸盐或利塞膦酸盐;和表皮生长因子受体(EGF-R);疫苗,如THERATOPE®疫苗;哌立福辛、COX-2抑制剂(例如塞来昔布或依托考昔)、蛋白体抑制剂(例如PS341);CCI-779;替吡法尼(R11577);orafenib,ABT510;Bcl-2抑制剂,如奥利默森钠(oblimersen sodium)吡蒽醌(pixantrone);法呢基转移酶抑制剂,如洛那法尼(SCH 6636);和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及上述两种或更多种的组合,例如CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙的组合疗法的缩写);和FOLFOX(奥沙利铂联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写)。化学治疗剂还包括聚ADP核糖聚合酶(PARP)抑制剂:奥拉帕尼(olaparib)、rucaprib、尼拉帕利(niraparib)、他拉唑帕利(talzoparib)。

[0226] 可与如本文所述的5T4结合剂(例如,抗体)一起使用(例如,用于组合疗法)的抑制剂包括但不限于激酶抑制剂,例如伊马替尼、巴瑞替尼、吉非替尼、厄洛替尼、索拉非尼、达沙替尼、舒尼替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、吡非尼酮、帕唑帕尼、克唑替尼、维罗替尼、克罗替尼、凡德他尼、鲁索替尼、阿昔替尼、博舒替尼、瑞戈非尼、托法替尼、卡博替尼、普纳替尼、曲美替尼、达拉非尼、阿法替尼、依鲁替尼、色瑞替尼、Idelalisib、尼达尼布、帕博西尼、乐伐替尼、考比替尼、阿贝西利(abemaciclib)、阿卡替尼、艾乐替尼、比美替尼(binimetinib)、布加替尼(brigatinib)、恩曲替尼(encorafenib)、厄达替尼(erdafitinib)、依维莫司、福他替尼(fostamatinib)、gilter、拉罗替尼(larotrectinib)、洛拉替尼(lorlatinib)、奈塔舒地尔(netarsudil)、奥希替尼(osimertinib)、佩米替尼、培西达替尼(pexidartinib)、瑞博西尼(ribociclib)、替西罗莫司(temsirolimus)、XL-092、XL-147、XL-765、XL-499和XL-880。在一些实施方案中,如本文所述的化合物可以与HSP90抑制剂(例如,XL888)、肝X受体(LXR)调节剂、类视黄醇相关孤儿受体γ(RORy)调节剂、检查点抑制剂如CK1抑制剂或CK1α抑制剂、Wnt途径抑制剂(例如,SST-215)或盐皮质激素受体抑制剂(例如,依沙塞酮)或XL-888组合使用,用于治疗本文所公开的疾病如癌症。在一些实施方案中,如本文公开的5T4结合剂(例如,抗体)可以与一种或更多种以下激酶的抑制剂组合用于治疗癌症:Akt1、Akt2、Akt3、TGF-βR、PKA、PKG、PKC、CaM-激酶、磷酸化酶激酶、MEKK、ERK、MAPK、mTOR、EGFR、HER2、HER3、HER4、1NS-R、IGF-1R、IR-R、PDGFαR、PDGFβ/R、CSFIR、KIT、FLK-II、KDR/FLK-1、FLK-4、flt-1、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、Ron、Sea、TRKA、TRKB、TRKC、FLT3、VEGFR/Flt2、Flt4、EphA1、EphA2、EphA3、EphB2、EphB4、Tie2、Src、Fyn、Lck、Fgr、Btk、Fak、SYR、FRK、JAK(JAK1和/或JAK2)、ABL、ALK、CDK7、CDK12、KRAS和B-Raf。

[0227] 可与如本文所述的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)一起使用例如用于治疗癌症(例

如,用于组合疗法)的抑制剂的其他非限制性实例包括FGFR抑制剂(FGFR1、FGFR2、FGFR3或FGFR4,例如佩米替尼(pemigatinib)、EGFR抑制剂(也称为ErB-1或HER-1;例如厄洛替尼、吉非替尼、凡德他尼、奥希替尼、西妥昔单抗、耐昔妥珠单抗(necitumumab)或帕尼单抗)、VEGFR抑制剂或途径阻断剂(例如贝伐单抗、帕唑帕尼、舒尼替尼、索拉非尼、阿西替尼、瑞戈非尼、普纳替尼、凡德他尼、雷莫芦单抗、乐伐替尼、ziv-阿柏西普(ziv-aflibercept))、PARP抑制剂(例如奥拉帕尼(olaparib)、rucaparib、维利帕尼(veliparib)或尼拉帕利(niraparib))、和JAK抑制剂(例如鲁索替尼、巴瑞替尼、伊他替尼)、IDO抑制剂(例如epacadostat、NLG919或BMS-986205、MK7162)、LSD1抑制剂、TDO抑制剂、P13K-δ抑制剂(例如parsaclisib)、PI3K-γ抑制剂如PI3K-γ选择性抑制剂、Pim抑制剂、CS F1R抑制剂、TAM受体酪氨酸激酶(Tyro-3、Axl和Mer)、腺苷受体拮抗剂(例如A2a/A2b受体拮抗剂)、HPK1抑制剂、趋化因子受体抑制剂(例如CCR2或CCR5抑制剂)、SHP1/2磷酸酶抑制剂、组蛋白去乙酰化酶(HDAC)如HDAC8抑制剂、血管生成抑制剂、白细胞介素受体抑制剂、布罗莫和额外末端家族(bromo and extra terminal family)成员抑制剂(例如布罗莫结构域抑制剂或BET抑制剂)或其组合。

[0228] 在一些实施方案中,如本文公开的5T4结合剂(例如,抗体或ADC)可以与PD-1抑制剂或5T4抑制剂组合使用,例如抗PD-1单克隆抗体或抗5T4单克隆抗体,例如纳武利尤单抗(Opdivo)、帕博利珠单抗(Keytruda,MK-3475)、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、西米普利单抗(cemiplimab)、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab)、西曲利单抗(cetrelimab)、特瑞普利单抗(toripalimab)、信迪利单抗(sintilimab)、AB122、JTX-4014、BGB-108、BCD-100、BAT1306、LZM009、AK105、HLX10和TSR-042、AMP-224、AMP-514、PDR001、度伐利尤单抗、匹地利珠单抗(pidilizumab,Imfinzi®,CT-011)、CK-301、BMS 936559、MPDL3280A、替雷利珠单抗、BMS-935559、MEDI4736、FAZ053、KN035、CS1001、CBT-502、A167、STI-A101、BGB-A333、MSB-2311、HLX20、AUNP12、CA-170、BMS-986189、LY3300054和MSB0010718C。

[0229] 在一些实施方案中,如本文公开的多特异性结合剂可以与CTLA-4抑制剂组合使用,例如抗CTLA-4抗体,例如伊匹木单抗(Yervoy)、曲美木单抗和AGEN1884,或与磷脂酰丝氨酸抑制剂,例如巴维昔单抗(bavituximab)(PGN401),或与细胞因子(IL-10、TGF-b等)的抗体,或与结合5T4和CTLA-4(例如AK104)或PD-1和CTLA-4的双特异性抗体,或与其他抗癌剂如西米普利单抗组合使用。

[0230] 另外的剂可以是上述任何这些治疗剂或其它剂的药学上可接受的盐、酯、酰胺、水合物和/或前药。

[0231] 应当理解,在本文描述的主题的定义内还提供了基本上不影响本文描述的各种实施方案的活性的修改。因此,以下实施例旨在说明而不是限制本公开。

实施例

[0232] 实施例1.抗体生成

[0233] 为了获得人5T4的结合剂,通过噬菌体展示进行抗体发现。

[0234] A.噬菌体展示

[0235] 为了获得人5T4的结合剂,通过人Fab文库的噬菌体展示进行抗体发现,并使用标

准方案进行。人5T4的胞外结构域购自Acro Biosystems(生物素化的人5T4His-Avitag Acro,目录号TPG-H83Eb)或被产生。产生的抗原由人5T4、食蟹猴5T4和小鼠5T4组成,全部克隆到含有C-末端6-his-Avi标签的载体中,并在可能的情况下使用标准程序使用共表达的生物素连接酶在体外生物素化。

[0236] 筛选噬菌体克隆结合生物素化人5T4的能力。简言之,使用能够在噬菌体中复制和表达的表达载体(也称为噬菌粒)构建Fab格式的噬菌体文库。在相同的表达载体中编码重链和轻链,其中重链与噬菌体外壳蛋白pIII的截短变体融合。将轻链和重链-pIII融合体表达为单独的多肽并在细菌周质中组装,其中氧化还原电位使得能够形成二硫键,以形成候选抗体的抗原结合结构域(Fab)。

[0237] 使用衍生自特定人重链可变结构域和特定人轻链可变结构域的序列创建文库。产生筛选文库内的轻链可变结构域,将多样性引入VL CDR3(L3)中,并且其中轻链VL CDR1(L1)和CDR2(L2)保留人种系序列。对于筛选的文库,使VH结构域的所有三个CDR多样化,以按照在人抗体谱库中发现的CDR长度匹配位置氨基酸频率。下面列出了文库中使用的噬菌体展示重链(SEQ ID NO:72)和轻链(SEQ ID NO:73)支架,其中“x”代表被改变以创建文库的CDR氨基酸,并且粗斜体代表恒定的CDR序列。

[0238] SEQ ID NO:72的序列是

[0239] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXXXXXWVRQAPGKGLEWVAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC。

[0240] SEQ ID NO:73的序列是

[0241] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQSVSSAVA***WYQQKPGKAPKLLIY***SASSLYS***GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**XXXXXXXXX**FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0242] 通过使用简并DNA寡核苷酸引物的诱变产生多样性,以将多样性引入VL CDR3(L3)和VH CDR1(H1)、CDR2(H2)和CDR3(H3)中,以模拟在天然抗体谱库中发现的多样性,如在Kunkel,TA(PNAS1985年1月1日,82(2)488-492),其全部内容通过引用并入本文。简而言之,使用标准程序从分离的噬菌体制备掺入尿嘧啶的单链环状DNA,并进行Kunkel诱变以将多样性引入四个CDR。然后将化学合成的DNA电穿孔到TG1细胞中,随后回收。将回收的细胞传代培养并用M13K07辅助噬菌体感染以产生噬菌体文库。

[0243] 使用标准程序进行噬菌体淘选。简言之,第一轮噬菌体淘选是用固定在链霉亲和素磁珠上的靶进行的,所述磁珠经受大约1×10^{12}来自制备文库的噬菌体,体积为1ml,在PBST-2%BSA中。孵育1小时后,使用磁性支架将珠结合的噬菌体与上清液分离。将珠洗涤三次以除去非特异性结合的噬菌体,然后以OD_{600}为大约0.6加入到ER2738细胞(5mL)中。在室温孵育20分钟后,将感染的细胞在25ml 2xYT+氨苄青霉素和M13K07辅助噬菌体(终浓度约为1×10^{10}pfu/ml)中传代培养,并允许在37℃伴随剧烈摇动生长过夜。第二天,使用标准程序通过PEG沉淀制备噬菌体。在淘选之前进行对SAV包被的珠具有特异性的噬菌体的预清除。第二轮淘选使用KingFisher磁珠处理器和50或100nM珠固定的5T4抗原,使用标准程序(100nM 5T4用于第3轮,50nM 5T4用于第4轮)进行。总共进行3-4轮噬菌体淘选以富集展示

对5T4抗原特异性的Fab的噬菌体。使用多克隆ELISA确认5T4特异性富集,分离单个克隆并通过进行单克隆噬菌体ELISA进一步验证。DNA测序用于确定含有候选抗体的分离的Fab克隆的CDR的序列。

[0244] 将编码候选抗体的重链和轻链可变结构域的基因分别克隆到哺乳动物表达载体中,用于在哺乳动物细胞中表达为全长IgG。

[0245] 对于全长IgG,重链恒定区(例如,CH1=常规文本;铰链=斜体文本;CH2=粗体文本;和CH3=下划线文本)包括以下氨基酸序列:

[0246] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC*DKTHTCPPCP***APELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (SEQ ID NO:74)。

[0247] 对于全长IgG,轻链恒定区(例如CL)包括以下氨基酸序列:

[0248] RTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:75)。

[0249] 使用蛋白A树脂从培养上清液中纯化IgG抗体。

[0250] 实施例2.筛选测定

[0251] 使用二价结合测定来提供关于通过实施例1中的噬菌体展示获得的具有VH/VL的抗体是否结合来自所有三个临床相关物种的固定化5T4的数据:人、食蟹猴(cyno)和小鼠。对于二价结合和交叉反应性测定,使用来自蛋白质数据库的序列合成5T4人、食蟹猴和小鼠抗原,并使用his-avi标签和用共表达的BirA酶进行体内生物素化表达为生物素化蛋白质。

[0252] 使用标准的基于Octet的测定来定性地确定每种抗体是否与每种抗原结合。对于这些测定,将200nM生物素化抗原固定在1X动力学缓冲液(ForteBio)中的链霉亲和素生物传感器上。然后将加载的传感器浸入含有500nM感兴趣抗体的孔中,并监测缔合结合信号。在缔合步骤期间高于阴性对照的信号增加被认为是与抗原的结合。

[0253] 对于使用Octet的定性结合亲和力,测试的所有27种抗体显示与人5T4的结合,13种抗体还显示与食蟹猴5T4的结合,并且13种抗体还显示与小鼠5T4的结合。示例性抗体的数据示于下表4中。

[0254] 表4.通过Octet的定性二价结合亲和力

[0255]

抗体	人 5T4 Octet (二价)	食蟹猴 5T4 Octet (二价)	小鼠 5T4 Octet (二价)
mAbA4	+	+	-
mAbA15	+	+	+
mAbA17	+	+	+

[0256] 采用单价结合测定法测定通过实施例1中的噬菌体展示获得的每种5T4结合剂对人5T4的相对亲和力。人5T4购自Acro Biosystems(Acro目录号TPGH52E)并且也单独生产。使用Octet(Pall ForteBio)仪器监测结合剂与人5T4的单价相互作用。对于这些测定,将36nM抗体固定在1X动力学缓冲液(ForteBio)中的抗人Fc(AHC)传感器上。然后将传感器浸入含有范围为1μM至1.37nM的人5T4的3X系列稀释液的孔中。使缔合达到平衡。然后将传感

器移至仅含有1X动力学缓冲液的孔中,并使其解离至平衡。测量缔合和解离速率,并使用板载分析软件(ForteBio)从这些计算单价K_D。

[0257] 在所有27种测试抗体中,大多数在单价结合亲和力-内部(Lot 20-019-62)测定中显示弱结合。mAbA4、mAbA15和mAbA17在所有三个批次中均表现出强或中等结合。数据示于下表5中。

[0258] 表5.通过Octet的定性单价结合亲和力

[0259]

抗体	单价结合亲和力-Acro TPGH52E5 (Lot B465-87AF1-K2)	单价结合亲和力-内部 (Lot 20-019-62)	单价结合亲和力-Acro TPGH52E5 (Lot B465-87AF1-JP)
	Octet	Octet	Octet
	K_D [nM]	K_D [nM]	K_D [nM]
mAbA4	0.01	83	30.2
mAbA15	3.62	10.4	11.2
mAbA17	2.81	9.34	21.1

[0260] 实施例3:另外的筛选和选择

[0261] 评估选择用于结合5T4的抗体,例如,诸如实施例2中所述的那些抗体与表达5T4的细胞的结合。

[0262] 在测定当天收获70%-90%汇合的细胞。在v形底96孔板(Costar 3897)中,每孔100,000个细胞与每孔50μL、8点或12点抗体稀释系列在+4℃孵育30分钟。孵育后,通过以200xg离心5分钟,用PBS洗涤细胞一次。然后将细胞与每孔50μL以1:100稀释的Alexa Fluor 488山羊抗人IgG Fab(Jackson Immuno Research 109-547-003)在+4℃孵育30分钟。通过以200xg离心5分钟,用PBS洗涤细胞两次,并在iQue Screener Plus(Sartorius)上采集。将BL1(Alexa-Fluor-488)通道的平均荧光强度相对于抗体浓度作图,以产生剂量响应曲线和EC50值。

[0263] 在测试的27种抗体中,26种抗体显示出对HEK-5T4细胞的结合亲和力,16种抗体显示出对MCF-7细胞的结合亲和力,26种抗体显示出对HEK-cyno-5T4细胞的结合亲和力。

[0264] 在HEK-5T4和MCF-7细胞的内化测定中进一步评估了选择的结合所有三种HEK-5T4、MCF-7和HEK-cyno-5T4细胞系的抗体(包括mAbA4、mAbA15和mAbA17)。

[0265] 收获70%-90%汇合的贴壁细胞,并在37℃在96孔黑色透明/平底半面积板(Corning 3882)中以20,000个细胞/孔在50μL培养基中铺板过夜。对于悬浮细胞系,在37℃用聚-L-鸟氨酸溶液(Millipore-Sigma)包被96孔板1小时,并在测定前约1-2小时将细胞以40,000个细胞/孔密度接种在50μL培养基中。将抗体在细胞培养基中稀释,与3X摩尔浓度的Incucyte人FabFluor-pH红色抗体标记试剂混合,并在室温孵育15分钟。制备2X终浓度的抗体/FabFluor混合物的所有稀释液。然后将50μL的2X抗体/Fab-Fluor混合物一式两份直接添加到每个具有预接种细胞的孔中,并将板快速转移至Incucyte。然后每30分钟扫描一次板,持续长达24小时。注意在向细胞添加抗体/FabFluor混合物的2-3分钟内开始第一次扫

描(0小时)。通过读取随时间产生的红色信号来分析平板,针对该孔中细胞的%汇合进行归一化。少量抗体在靶细胞系上以不同浓度测试,并且基于良好的信噪比选择最佳浓度。

[0266] 在内化测定中,6种抗体(包括mAbA4和mAbA15)在HEK-5T4细胞中显示强内化,一种抗体在HEK-5T4细胞中显示中等内化,并且7种抗体在HEK-5T4细胞中显示无内化或非特异性内化。在另外的测定中,2种抗体在MCF 7细胞中显示强内化,4种抗体在HEK-5T4细胞中显示中等内化,并且8种抗体在MCF-7细胞中显示无内化或非特异性内化。

[0267] 实施例4:可开发性测定

[0268] 在各种可开发性方法中测试选择用于结合5T4的抗体,例如,如实施例2和3中描述的那些。例如,采用各种色谱方法,包括尺寸排阻色谱(SEC)、疏水相互作用色谱(HIC)和直立单层吸附色谱(SMAC)来评估可开发性因素,例如单体百分比、溶解度和抗体聚集或沉淀。

[0269] 使用7.8mm ID×30cm TSKgel G3000SWXL柱(Tosoh Bioscience LLC,PN 08541)和6mm×4cm保护柱(PN 08543)在Agilent 1100HPLC上进行尺寸排阻色谱(SEC)分析。将抗体在Dulbecco PBS(pH 7.4,不含Ca^{2+}/Mg^{2+})中标准化至1mg/mL浓度并通过离心澄清以沉淀颗粒,同时仍保留可溶性聚集体。流动相缓冲液为从10X储备液浓度稀释的2X浓度的Dulbecco PBS(pH 7.4,不含Ca^{2+}/Mg^{2+})。对于每个样品,上样10μL,并在环境温度以1.0mL/min等度洗脱20分钟。在280nm处监测吸光度。对色谱峰进行积分以确定均一性百分比和保留时间。除了分子尺寸分析(sizing)之外,柱固定相以及流动相的选择还支持疏水和静电相互作用(次级相互作用比SMAC温和得多)。使用Agilent ChemStation B.04.03S P1进行数据分析。

[0270] 结果显示,基于SEC分析,mAbA4、mAbA15和mAbA17(以及其他测试的抗体)具有强的可开发性。

[0271] 使用4.6mm ID×3.5cm TSKgel Butyl-NPR柱(Tosoh Bioscience LLC,PN 14947)在Agilent 1100HPLC上进行疏水相互作用色谱(HIC)分析。将抗体在Dulbecco PBS(pH 7.4,不含钙Ca^{2+}/Mg^{2+})中标准化至1mg/mL浓度。在环境温度,用100%流动相缓冲液A(2M硫酸铵/20mM磷酸钠,pH 7.0)以1mL/min的流量平衡柱。对于每个样品,上样10μL,并使用从100%流动相缓冲液A到100%流动相缓冲液B(20mM磷酸钠,pH 7.0)的梯度以1.0mL/min洗脱15分钟,在100%B保持3分钟以洗涤柱,并返回100%A持续2分钟以平衡。在280nm处监测吸光度。计算样品保留时间并与一组标准对照进行比较,以鉴定具有增加的保留时间(增加的疏水性)的抗体和多种物质的存在。使用Agilent ChemStation B.04.03S P1进行数据分析。

[0272] 疏水相互作用色谱(HIC)分析的结果表明,某些抗体具有强的可开发性,而其他抗体具有中等的可开发性。基于HIC分析,mAbA4、mAbA15和mAbA17是具有强可开发性的那些。抗体疏水性可影响抗体聚集、溶解度和黏度。结果表明这些抗体的聚集和沉淀倾向低。

[0273] 使用4.6mm ID x 300mm Zenix SEC 300柱iSepax Technologies,PN 213300P-4630)和4.6mm x 50mm保护柱(PN 213300P-4605)在Agilent 1100HPLC上进行立式单层吸附色谱(SMAC)分析。将抗体在Dulbecco PBS(pH 7.4,不含Ca2+/Mg2+)中标准化至1mg/mL浓度,并通过离心澄清以沉淀颗粒,同时仍保留可溶性聚集体。流动相缓冲液为Dulbecco PBS(pH 7.4,不含Ca2+/Mg2+),浓度为2X(从10X储备液浓度稀释)。对于每个样品,上样10μL,并在环境温度以0.4mL/min等度洗脱32分钟。在280nm处监测吸光度。计算样品保留时间并与

一组标准对照进行比较,以鉴定具有增加的保留时间(增加的形成聚集体的倾向和/或增加的疏水/静电相互作用)的抗体,因为柱固定相连同流动相选择除了分子尺寸分析之外还促进了次级相互作用。使用Agilent ChemStation B.04.03SP1进行数据分析。

[0274] 来自直立单层吸附色谱(SMAC)分析的结果显示,某些抗体具有强开发性,而其他抗体具有中等开发性。基于SMAC分析,mAbA4、mAbA15和mAbA17是具有强可开发性的那些。该测定基于良好的保留时间,这表明胶体稳定性和低聚集倾向。

[0275] 实施例5:表位分箱测定

[0276] 表位分箱测定用于确定实施例1中通过噬菌体展示获得的每种抗体结合5T4的哪些表位。

[0277] 为了保持5T4蛋白的整体结构,同时仍然能够进行表位结合确定,通过克隆人5T4的七个连续序列(表位1-7)中的每一个以替换相应的小鼠序列中的每一个来产生小鼠-人嵌合体。为了产生嵌合体,全长人和小鼠5T4基因由GenScript合成并克隆到具有6-His-Avi标签的哺乳动物载体中。然后将如本文所述的七个序列(表位1-7)中的每一个从人基因中取出,并使用适当的引物分别克隆到小鼠基因中。人5T4的表位1(H1)对应于SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAART(SEQ ID NO:76);人5T4的表位2(H2)对应于VKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEVR(SEQ ID NO:77);人5T4的表位3(H3)对应于AGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSG(SEQ ID NO:78);人5T4的表位4(H4)对应于SNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGLRRLE(SEQ ID NO:79);人5T4的表位5(H5)对应于LASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESL(SEQ ID NO:80);人5T4的表位6(H6)对应于HLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL(SEQ ID NO:81);并且人5T4的表位7(H7)对应于DNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPILPPSLQTS(SEQ ID NO:82)。使用Expi293蛋白表达系统(Thermo Fisher)瞬时表达抗原,并使用共表达的BirA生物素连接酶在体外生物素化,并使用Ni-NTA亲和层析纯化。如表6所示,产生的人(H)和小鼠(M)序列的七个嵌合构建体是:(1)H1 M2 M3 M4 M5 M6 M7(SEQ ID NO:83);(2)M1 H2 M3 M4 M5 M6 M7(SEQ ID NO:84);(3)M1 M2 H3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:85);(4)M1 M2 M3 H4 M5 M6 M7(SEQ ID NO:86);(5)M1 M2 M3 M4 H5 M6 M7(SEQ ID NO:87);(6)M1 M2 M3 M4 M5 H6 M7(SEQ ID NO:88);和(7)M1 M2 M3 M4 M5 M6 H7(SEQ ID NO:89)。然后测试每种抗体与每种嵌合构建体和全长人蛋白的结合。与嵌合体的任何显著结合信号指示抗体特异性结合的区域。

[0278] 表6. 5T4嵌合构建体

[0279]

人5T4表位1	H1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:83)	SSPTSSASS FSSSAPFLAS AVSAQPPLPD QCPALCECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
人5T4表位2	M1 H2 M3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:84)	SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP AYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL AALNLSGSRL DEVRAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
人5T4表位3	M1 M2 H3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:85)	SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPSLRQLDLS HNPLADLSPF AFSGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
人5T4表位4	M1 M2 M3 H4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:86)	SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLVELIL NHIVPPEDER QNRSFEGMVV AALLAGRALQ GLRRLELASN HFLFLPRDLL AQLPSLRYLD LRNNSLVSLT YASFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNSTLAE WHGLAHVKVF LDNNPWVCDC YMADMVAWLK ETEVVPDKAR LTCAFPEKMR NRGLLDLNSS DLDCDAVLPQ SLQTS

[0280]

人5T4表位5	M1 M2 M3 M4 H5 M6 M7 (SEQ ID NO:87)	SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLY LPRDVLAQLP SLRHLDLSNN SLVSLTYVSF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
人5T4表位6	M1 M2 M3 M4 M5 H6 M7 (SEQ ID NO:88)	SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NGTLAELQGL PHIRVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S
人5T4表位7	M1 M2 M3 M4 M5 M6 H7 (SEQ ID NO:89)	SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCHMAD MVTWLKETEV VQGKDRLTCA YPEKMRNRVL LELNSADLDC DPILPPSLQT S

[0281] 基于标准Octet的测定用于表位分箱测定,以建立每种抗体的表位分箱。对于这些测定,将50nM生物素化抗原固定在1X动力学缓冲液(ForteBio)中的链霉亲和素传感器上。然后将传感器浸入含有100nM的所讨论抗体的孔中,并监测缔合信号。有效敲除抗体结合的嵌合体对应于抗体结合的特异性表位。全长人5T4包括在测定中以作参考。

[0282] 结果显示,9种抗体特异性结合5T4的表位4,3种抗体特异性结合5T4的表位7,3种抗体特异性结合5T4的表位2,1种抗体特异性结合5T4的表位4和表位6,11种抗体结合全长5T4(FL)。表7总结了示例性表位分箱结果(针对mAbA4、mAbA15和mAbA17)。

[0283] 表7.表位分箱测定

[0284]

抗体	表位分箱
mAbA4	4
mAbA15	2
mAbA17	7

[0285] 实施例6:抗体选择

[0286] 如上所述,在如实施例1所述从噬菌体文库筛选的所有抗体中,如实施例2-5所述进一步测试了在格式化为IgG后仍能够结合5T4的27种抗体。基于多种活性选择了命名为mAbA4、mAbA15和mAbA17的三种抗体,包括它们对人5T4结合的特异性、它们与食蟹猴5T4的结合、它们的细胞表面结合信号以及它们通过多种方法如SEC、HIC和SMAC评估的强可开发性。这些抗体的VH、VL和CDR序列示于表1-3中。

[0287] 实施例7.抗体与人5T4的结合(ELISA)

[0288] A.正常结合

[0289] 使用ELISA测试所选抗体结合hu5T4的能力。在第1天,将具有C末端多组氨酸和Avi(AVITAG™)标签的未缀合的人TPBG/5T4蛋白(AcroBiosystems(Newark,DE,USA),目录号TPG-H52E5)在PBS中稀释2μg/mL,充分混合,以每孔100μL铺板在96孔板(Nunc MAXISORP®)中,并在4℃孵育过夜。

[0290] 在第2天,用PBS中的0.1％Tween®-20(“PBS-T”)洗涤板四次。用200μL PBS中的酪蛋白(Blocker™酪蛋白,购自ThermoFisher Scientific)封闭孔,并在室温摇动孵育2小时。

[0291] 在PBS中制备IgG-ADC的1:3稀释系列,并以每孔100μL的体积添加到96孔板中。将板在室温摇动孵育1小时。

[0292] 将山羊抗人IgG Fcγ特异性HRP缀合物(Jackson Immunoresearch,目录号109-035-098)在PBS中稀释至1∶15000的因子。将ELISA板用PBS-T用洗板机(BioTek ELx405)洗涤六次,之后将100μL山羊抗人IgG Fcγ特异性HRP缀合物添加到每个孔中。然后将板在室温孵育30分钟,同时摇动。

[0293] 使用洗板机(BioTek ELx405)用PBS-T洗涤ELISA板六次,之后向每个孔中加入100μL3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)。使板显影直至深蓝色变得可见。然后加入H_2SO_4(2N,100μL)以猝灭反应,并在读板仪(配备SoftMaxPro软件的SpetraMax M5,可从Molecular Devices获得)上读取每个孔的吸光度。

[0294] B.压力测试

[0295] 1.高pH压力测试.在碱性(高pH)条件下使用ELISA测试抗体结合5T4的能力。将在0.1％w/w H_2O_2/1x PBS中的1mg/mL抗体在室温在黑暗中储存24-48小时,之后加入50mM甲硫氨酸。在分析之前,将样品冷冻储存,所述分析通过如上文A部分所述的ELISA进行。下面的表8报告了针对每种测试抗体计算的EC_{50}。

[0296] 表8.在高pH下抗体与hu5T4的结合

[0297]

mAb	条件	EC_{50}(nM)
mAbA4	pH 8.5第0天	0.120
mAbA4	pH 8.5第1天	0.127
mAbA4	pH 8.5第4天	0.114
mAbA4	pH 8.5第7天	0.128
mAbA4	pH 8.5第14天	0.136
mAbA15	pH 8.5第0天	0.134
mAbA15	pH 8.5第1天	0.128
mAbA15	pH 8.5第4天	0.133
mAbA15	pH 8.5第7天	0.143
mAbA15	pH 8.5第14天	0.131
mAbA17	pH 8.5第0天	0.153
mAbA17	pH 8.5第1天	0.174
mAbA17	pH 8.5第4天	0.150
mAbA17	pH 8.5第7天	0.158

mAbA17	pH 8.5第14天	0.167

[0298] 2.低pH压力测试.还使用ELISA在酸性(低pH)条件下测试抗体结合5T4的能力。制备1mg/mL至10mg/mL抗体在pH 8.5的20mM Tris/10mM EDTA中的溶液,并在37℃储存1至2周。在分析之前,将样品冷冻储存,所述分析通过如上文A部分所述的ELISA进行。下面的表9报告了针对每种测试抗体计算的EC_{50}。

[0299] 表9.在低pH下抗体与hu5T4的结合

[0300]

mAb	条件	EC_{50}(nM)
mAbA4	pH 5.5第0天	0.133
mAbA4	pH 5.5第1天	0.132
mAbA4	pH 5.5第4天	0.125
mAbA4	pH 5.5第7天	0.124
mAbA4	pH 5.5第14天	0.122
mAbA15	pH 5.5第0天	0.124
mAbA15	pH 5.5第1天	0.134
mAbA15	pH 5.5第4天	0.123
mAbA15	pH 5.5第7天	0.132
mAbA15	pH 5.5第14天	0.138
mAbA17	pH 5.5第0天	0.164
mAbA17	pH 5.5第1天	0.159
mAbA17	pH 5.5第4天	0.157
mAbA17	pH 5.5第7天	0.190
mAbA17	pH 5.5第14天	0.153

[0301] 3.氧化应激.在氧化环境中使用ELISA测试抗体结合5T4的能力。制备1mg/mL至10mg/mL抗体在pH 5.5的20mM柠檬酸盐/50mM NaCl中的溶液,并在37℃储存1至2周。在分析之前,将样品冷冻储存,所述分析通过如上文A部分所述的ELISA进行。下面的表10报告了针对每种测试抗体计算的EC_{50}。

[0302] 表10.在氧化应激下抗体与hu5T4的结合

[0303]

mAb	条件	EC_{50}(nM)
mAbA4	PBS时间0	0.182
mAbA4	PBS时间24小时	0.200
mAbA4	PBS时间48小时	0.189
mAbA4	PBS+H_2O_2时间0	0.225
mAbA4	PBS+H_2O_2时间24小时	0.393
mAbA4	PBS+H_2O_2时间48小时	0.386
mAbA15	PBS时间0	0.229
mAbA15	PBS时间24小时	0.212
mAbA15	PBS时间48小时	0.203
mAbA15	PBS+H_2O_2时间0	0.191
mAbA15	PBS+H_2O_2时间24小时	0.190

mAbA15	PBS+H_2O_2时间48小时	0.189
mAbA17	PBS时间0	0.198
mAbA17	PBS时间24小时	0.186
mAbA17	PBS时间48小时	0.185
mAbA17	PBS+H_2O_2时间0	0.188
mAbA17	PBS+H_2O_2时间24小时	0.183
mAbA17	PBS+H_2O_2时间48小时	0.207

[0304] 实施例8.抗体与食蟹猴、大鼠和小鼠5T4的交叉反应性(ELISA和Octet)

[0305] 使用ELISA和Octet测试所选抗体结合非人5T4-Ts的能力。使用实施例7中描述的ELISA方案,将人5T4抗原替换为:重组食蟹猴5T4-Fc(来源于R&D Systems(明尼阿波利斯,明尼苏达州,美国),目录号2280-TG-100或LSBio(西雅图,华盛顿州,美国),目录号LS-G137131),重组小鼠5T4-Fc(R&D Systems,目录号5049-TG-100),具有6His-SUMO、N-末端标签的重组大鼠TPBG/5T4(LSBio目录号G56592),具有His、N-末端标签的重组小鼠TPBG/5T4(LSBio,目录号G12168)抗原。对于Octet分析,用抗体包被蛋白A生物芯片,用PBS洗涤,然后与抗原反应,如上所述。所有测试的抗体均与人、食蟹猴和大鼠5T4结合。未观察到与小鼠5T4的显著结合交叉反应性。

[0306] 实施例9.抗体与5T4转染的CHO和HEK293细胞的细胞结合

[0307] 测试所选抗体结合转染以表达人、食蟹猴、大鼠或小鼠5T4的HEK293和CHO细胞的能力。将未转染的细胞用作对照以观察非特异性结合。mAbA4、mAbA15和mAbA17对转染以表达人和食蟹猴5T4的HEK293和CHO细胞有反应,但对转染以表达大鼠或小鼠5T4的细胞无反应。

[0308] *****

[0309] 在整个本申请中,参考了各种出版物、专利、专利申请和其他文献。出于所有目的,包括为了更全面地描述本文公开的主题所涉及的现有技术,将这些出版物、专利、专利申请和其他文献的公开内容全部通过引用并入本申请中。尽管已经参考上面提供的示例描述了所公开的主题,但是应当理解,在不脱离所公开的主题的精神的情况下,可以进行各种修改。在回顾本说明书后,本发明的许多变型对于本领域技术人员来说将变得明显。

```
VH结构域
Kabat      1    10        22          31--35    40          50--a------60---65
AbM        1    10        22     26---------35  40          50--a----58      65
Chothia    1    10        22     26----32       40             a-55          65
Contact    1    10        22          30---35   40      47------a----58      65
IMGT       1              23     27-----38  41                56-----65      74
mAbA4      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYYIH WVRQAPGKGLEWVA FISPGGSYTYYADSVKG
mAbA15     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYYIH WVRQAPGKGLEWVA YITSTGSYTEYADSVKG
mAbA17     EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWIH WVRQAPGKGLEWVA AIFPYSGSTLYADSVKG

Kabat      70        80  abc       90    95-----------102      110
AbM        70        80  abc       90    95-------------102    110
Chothia    70        80  abc       90       96----------101    110
Contact    70        80  abc       90 93-----------101         110
IMGT    75       89          105-----------------117
mAbA4      RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EYYSMGVL----DY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25)
mAbA15     RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR YDRSTRYSGL---DY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:44)
mAbA17     RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SPSRSILPSGL--DY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62)
```

图1A

```
VL结构域
Kabat      1      10        20   24-27-----34      40          50----56
AbM        1      10        20   24----30--34      40          50----56
Chothia    1      10        20      26----32       40          50--
Contact    1      10        20           30-----36  40   46----------55
IMGT       1                      23   27---38  41                56-65 69
                                                                   | |
mAbA4      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSVSSAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASSLYS
mAbA15     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSVSSAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASSLYS
mAbA17     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSVSSAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASSLYS

           60        70        80        89------97
Kabat      60        70        80        89------97
AbM        60        70        80          91---96
Chothia    60        70        80        89-----96
Contact    60        70        80      105-----117
IMGT    70        89
mAbA4      GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQAYESPYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
mAbA15     GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQAYATPVT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:45)
mAbA17     GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGDGSPYT FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:63)
```

图1B