



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118946590 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 12

(21) 申请号 202380030049.9

高珊 蒋雯卿 方磊

(22) 申请日 2023.02.21

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理

(66) 本国优先权数据

事务所(普通合伙) 44348

PCT/CN2022/077113 2022.02.21 CN

专利代理师 何锦标 张玉颖

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2024.09.24

C07K 16/32 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/30 (2006.01)

PCT/CN2023/077493 2023.02.21

C07K 16/46 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 19/00 (2006.01)

W02023/155925 EN 2023.08.24

G12N 15/02 (2006.01)

(71) 申请人 乐普创一生物科技(上海)有限公司

A61K 39/395 (2006.01)

地址 201112 上海市闵行区浦江联恒路651
号4号楼3层

A61P 35/00 (2006.01)

申请人 乐普生物科技股份有限公司

权利要求书4页 说明书55页

(72) 发明人 刘芳 巩文词 蔡知见 杨柳

序列表(电子公布) 附图21页

(54) 发明名称

抗5T4抗体及其用途

(57) 摘要

本公开提供了抗5T4抗体、其变体和人源化形式。新公开的抗体表现出对5T4蛋白的高亲和力,并且可用于治疗癌症。

1. 一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段对人5T4癌胚滋养层糖蛋白(5T4)蛋白具有特异性,并且包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述轻链可变区包括VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其中所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含如下氨基酸序列:

SEQ ID NO:41、42(或47-53中的任一者)、43、44、45和46(或264或265);

SEQ ID NO:54、55(或60-63中的任一者或266或267)、56、57、58和59;

SEQ ID NO:64-69;

SEQ ID NO:70、71(或76)、72、73、74和75;

SEQ ID NO:77-82;

SEQ ID NO:83-88;

SEQ ID NO:89-94;

SEQ ID NO:95、96(或101-104中的任一者)、97、98、99和100;

SEQ ID NO:105-110;

SEQ ID NO:111-116;

SEQ ID NO:117-122;

SEQ ID NO:123、124或129、125、126、127和128;

SEQ ID NO:130-135;

SEQ ID NO:136-141;

SEQ ID NO:142-147;

SEQ ID NO:148-153;

SEQ ID NO:154-159;

SEQ ID NO:160、161或166、162、163、164和165;

SEQ ID NO:167、168或173、169、170、171和172;或

SEQ ID NO:174、175或180、176、177、178和179。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含选自SEQ ID NO:55、60-63和266-267的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含选自SEQ ID NO:3、215-221和248-256的氨基酸序列,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:4和222-226的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含选自SEQ ID NO:124和129的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

5. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含选自SEQ ID NO:23、236-241和259-261的氨基酸序列,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:24和242-247的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含选自SEQ ID NO:42和47-53的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:46、264或265的氨基酸序列。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:264或265的氨基酸序列。

8. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263的氨基酸序列。

9. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:262或263的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含选自SEQ ID NO:71和76的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

11. 根据权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含选自SEQ ID NO:7、227-229和257的氨基酸序列,并且所述VL包含选自SEQ ID NO:8、230-235和258的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含选自SEQ ID NO:96和101-104的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

13.根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

14.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列。

15.根据权利要求14所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。

16.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含SEQ ID NO:155的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:158的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列。

17.根据权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段是二价Fab抗体,或选自F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv和scFv的片段。

19.一种抗体-药物缀合物,所述抗体-药物缀合物包含与药物部分缀合的根据权利要求1-18中任一项所述的抗体或其片段。

20.根据权利要求19所述的抗体-药物缀合物,其中所述药物部分是细胞毒性剂或细胞抑制剂。

21.根据权利要求20所述的抗体-药物缀合物,其中所述药物部分是美登素、澳瑞他汀或大环酮类似物。

22.根据权利要求21所述的抗体-药物缀合物,其中所述药物部分包括单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

23.根据权利要求19-23中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中所述药物部分通过在酸性条件下可水解的接头连接到所述抗体或其片段。

24.根据权利要求19-23中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中:

所述VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;

所述VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;

所述VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;

所述VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;

所述VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且

所述VL CDR3包含SEQ ID NO:264或265的氨基酸序列。

25.一种多特异性抗体,所述多特异性抗体包含权利要求1-18中任一项所述的抗原结合片段和对非5T4的靶抗原具有结合特异性的一种或多种抗体或抗原结合片段。

26.一种嵌合抗原受体(CAR),所述CAR包含根据权利要求1-8中任一项所述的抗原结合片段、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ξ 胞内结构域。

27.一种或多种多核苷酸,所述一种或多种多核苷酸编码根据权利要求1-18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求26所述的CAR。

28.根据权利要求27所述的多核苷酸,所述多核苷酸是一种或多种mRNA。

29.根据权利要求28所述的多核苷酸,其中所述mRNA是经化学修饰的。

30.一种细胞,所述细胞包含根据权利要求27-29中任一项所述的多核苷酸。

31.一种组合物,所述组合物包含根据权利要求1-18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求19-24中任一项所述的抗体-药物缀合物、根据权利要求25所述的多特异性抗体、根据权利要求26所述的CAR、根据权利要求27-29中任一项所述的多核苷酸或根据权利要求30所述的细胞,以及药学上可接受的载体。

32.一种治疗有需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的根据权利要求1-18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求19-24中任一项所述的抗体-药物缀合物、根据权利要求25所述的多特异性抗体、根据权利要求26所述的CAR、根据权利要求27-29中任一项所述的多核苷酸或根据权利要求30所述的细胞。

33.根据权利要求1-18中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求19-24中任一项所述的抗体-药物缀合物、根据权利要求25所述的多特异性抗体、根据权利要求26所述的CAR、根据权利要求27-29中任一项所述的多核苷酸或根据权利要求30所述的细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

抗5T4抗体及其用途

背景技术

[0001] 5T4 (又名滋养层糖蛋白, TPBG; 5T4癌胚滋养层糖蛋白; 和Wnt激活抑制因子1, WAIF1) 是一种脊椎动物特异性的单程跨膜蛋白, 首次在人类胎盘组织中鉴定。5T4含有高度糖基化的刚性核心, 包括胞外结构域中的八个富含亮氨酸的重复序列 (LRR)、跨膜螺旋和胞质区。据报道, 5T4的胞质PDZ结合基序Ser-Asp-Val与TIP-2/GIPC的PDZ结构域相互作用, TIP-2/GIPC是与位于细胞膜附近的囊泡缔合的胞质蛋白。信号转导的其他下游机制仍然未知。还发现5T4抑制Wnt/ β -连环蛋白信号传导通路, 这是胚胎发育中的关键通路和抗癌治疗的主要靶点。

[0002] 5T4在正常成人组织中很少表达, 但在胎盘和大多数常见肿瘤中以高水平存在, 通常在肾癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和卵巢癌中占超过80%。因此, 5T4具有癌胚抗原的特征, 突出了其作为用作癌症治疗的诊断标志物或靶点的可能候选物。

发明内容

[0003] 在多个实施方案中, 本公开提供了对人5T4蛋白具有特异性的抗体和抗原结合片段。实验测试表明, 这些新鉴定的抗体可有效且特异性地结合人5T4蛋白。与含有靶向5T4的Fab片段的融合蛋白并且已在临床试验中进行了评估的那普妥莫单抗相反, 这些新鉴定的抗体也可以相当的效力结合食蟹猴5T4蛋白。

[0004] 根据本公开的一个实施方案, 提供了抗体或其抗原结合片段, 该抗体或其抗原结合片段对人5T4癌胚滋养层糖蛋白 (5T4) 蛋白具有特异性, 并且包括重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 该重链可变区包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3, 该轻链可变区包括VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0005] 在一些实施方案中, VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 41、42 (或47-53中的任一者)、43、44、45和46 (或264或265) 的氨基酸序列。在一些实施方案中, VH CDR1包含SEQ ID NO: 41的氨基酸序列, VH CDR2包含SEQ ID NO: 42的氨基酸序列, VH CDR3包含SEQ ID NO: 43的氨基酸序列, VL CDR1包含SEQ ID NO: 44的氨基酸序列, VL CDR2包含SEQ ID NO: 45的氨基酸序列, 并且VL CDR3包含SEQ ID NO: 264或265的氨基酸序列。在一些实施方案中, VH包含SEQ ID NO: 197的氨基酸序列, 并且VL包含SEQ ID NO: 262或263的氨基酸序列。

[0006] 在一些实施方案中, VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 54、55 (或60-63中的任一者或266或267)、56、57、58和59的氨基酸序列。在一些实施方案中, VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 64-69的氨基酸序列。在一些实施方案中, VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 70、71或76、72、73、74或75的氨基酸序列。在一些实施方案中, VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 77-82的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方案中, VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别

包含SEQ ID NO:83-88的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:89-94的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:95、96 (或101-104中的任一者)、97、98、99和100的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:105-110的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:111-116的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:117-122的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:123、124或129、125、126、127和128的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:130-135的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:136-141的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:142-147的氨基酸序列。

[0009] 在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:148-153的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:154-159的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:160、161或166、162、163、164和165的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:167、168或173、169、170、171和172的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:174、175或180、176、177、178和179的氨基酸序列。

[0010] 还提供了包含与药物部分缀合的本公开的抗体或其片段的抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,药物部分是细胞毒性剂或细胞抑制剂。在一些实施方案中,药物部分是美登素(maytansinoid)、澳瑞他汀(auristatin)或大环酮类似物。在一些实施方案中,药物部分包括单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。在一些实施方案中,药物部分通过在酸性条件下可水解的接头连接到抗体或其片段。

[0011] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列,VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列,VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列,VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列,VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列,并且VL CDR3包含SEQ ID NO:264或265的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:197的氨基酸序列,并且VL包含SEQ ID NO:262或263的氨基酸序列。

[0012] 还提供了多特异性抗体,这些多特异性抗体包含本公开的抗原结合片段和对非5T4的靶抗原具有结合特异性的一种或多种抗体或抗原结合片段。

[0013] 在另一个实施方案中,还提供了嵌合抗原受体(CAR),该嵌合抗原受体包含本公开的抗原结合片段、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ξ 胞内结构域。

[0014] 还提供了多核苷酸,这些多核苷酸编码本公开的抗体或其抗原结合片段或CAR。在一些实施方案中,多核苷酸是任选地被化学修饰的mRNA。

[0015] 还提供了使用本公开的抗体或其抗原结合片段治疗癌症和炎症病症的方法和用途。

附图说明

[0016] 图1示出了测试的抗5T4嵌合单特异性抗体对人5T4蛋白的ELISA结合活性。

[0017] 图2示出了测试的抗5T4嵌合单特异性抗体对食蟹猴5T4蛋白的ELISA结合活性。

[0018] 图3至图8示出了通过竞争性ELISA测定测试的抗5T4嵌合单特异性抗体的表位分区(epitope binning)。

[0019] 图9示出了测试的抗5T4嵌合mAb对CHO-K1表面上表达的人5T4的结合活性。

[0020] 图10示出了与嵌合14G12 mAb相比,大多数人源化14G12抗体对人5T4抗原具有相似的结合活性。

[0021] 图11示出了与嵌合14G12抗体相比,大多数测试的人源化14G12抗体对过表达人5T4的CHO-K1具有相似的结合活性。

[0022] 图12示出了测试的人源化393E9抗体及其嵌合mAb具有与人5T4抗原相当的结合活性。

[0023] 图13示出了一些测试的人源化393E9抗体具有与CHO-K1-hu5T4细胞上的嵌合抗体相似或甚至更强的结合活性。

[0024] 图14示出了测试的人源化159D5抗体及其嵌合mAb具有与人5T4抗原相当的结合活性。

[0025] 图15示出了测试的人源化159D5抗体和它们的嵌合抗体对过表达人5T4的CHO-K1具有相当的结合活性。

[0026] 图16示出了与嵌合抗体相比,一些测试的人源化286B4抗体对人5T4抗原具有相似的结合活性。

[0027] 图17示出了一些测试的人源化286B4抗体具有与它们在CHO-K1-hu5T4细胞或MCF-7细胞上的嵌合抗体相似或甚至更强的结合活性。

[0028] 图18示出了去除PTM的抗体比它们的嵌合抗体对表达5T4的细胞具有增强的结合能力。

[0029] 图19示出了亲和力成熟的抗体比它们的亲本Hu14G12-28抗体对人5T4抗原具有更强的结合活性。

[0030] 图20示出了亲和力成熟的抗体比它们的亲本Hu14G12-28抗体对表达5T4的细胞具有增强的结合能力。

具体实施方式

定义

[0031] 应当注意的是,术语“一”或“一个”实体是指该实体中的一个或多个实体;例如,“一个抗体”应理解为表示一个或多个抗体。因此,术语“一”(或“一个”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0032] 如本文所用,“抗体”或“抗原结合”多肽是指特异性识别并结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整抗体及其任何抗原结合片段或单链。因此,术语“抗体”包括含有分

子的任何蛋白质或肽,该分子包含具有与抗原结合的生物活性的免疫球蛋白分子的至少一部分。其示例包括但不限于重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区、或它们的任何部分、或结合蛋白的至少一部分。

[0033] 如本文所用,术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分,诸如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等。无论结构如何,抗体片段均与由完整抗体识别的同一抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、镜铁和双抗体。术语“抗体片段”还包括任何合成的或基因工程化的蛋白,该蛋白通过与特定抗原结合形成复合物而起类似抗体的作用。

[0034] 术语抗体涵盖可在生物化学上加以区分的各大类别的多肽。本领域技术人员将理解,重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 以及它们之中的一些亚类(例如, γ 1- γ 4)。正是这种链的性质决定了抗体的“类别”,分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。

[0035] 免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等,已被充分表征并且已知具有功能特化。鉴于本公开,这些类别和同种型中的每一种的修饰形式对于本领域技术人员来说都是容易辨别的,因此都在本公开的范围之内。所有免疫球蛋白类别显然都在本公开的范围之内,以下讨论通常将针对免疫球蛋白分子的IgG类别。关于IgG,标准免疫球蛋白分子包含两条相同的分子量约为23,000道尔顿的轻链多肽,和两条相同的分子量为53,000-70,000道尔顿的重链多肽。这四条链通常通过二硫键以“Y”构型连接,其中轻链包围重链,起始于“Y”的开口并继续穿过可变区。

[0036] 本公开的抗体、抗原结合多肽、其变体或衍生物包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长动物化抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段(例如,Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fvs、单链Fvs(scFv))、单链抗体、二硫键连接的Fvs(sdFv)、包含VK或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗Id)抗体(包括,例如,针对本文公开的LIGHT抗体的抗Id抗体)。本公开的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或免疫球蛋白分子的亚类。

[0037] 如本文所用,术语“嵌合抗体”将被认为是指其中免疫反应区或位点获自或来源于第一物种并且恒定区(根据本公开,其可为完整的、部分的或修饰的)获自第二物种的任何抗体。在某些实施方案中,靶结合区或位点将来自非人来源(例如,小鼠或灵长类动物),并且恒定区是人的。

[0038] 本文公开的抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡的抗体。在一些实施方案中,可变区可以是软骨鱼纲(condrichthoid)来源(例如,来自鲨鱼)。

[0039] 如本文所用,术语“重组”当涉及多肽或多核苷酸时,是指天然不存在的多肽或多核苷酸的形式,其非限制性示例可通过将通常不会一起出现的多核苷酸组合而产生。

[0040] 杂交瘤技术可在不同“严格度”的条件下进行。通常,低严格度杂交反应在约40℃下在约10×SSC或相等离子强度/温度的溶液中进行。中等严格度杂交通常在约50℃下在约6×SSC中进行,并且高严格度杂交反应通常在约60℃下在约1×SSC中进行。杂交反应也可以在本领域技术人员熟知的“生理条件”下进行。生理条件的非限制性示例为通常在细胞中存在的温度、离子强度、pH和Mg²⁺浓度。

抗5T4抗体

[0041] 如所附实验实施例所示,本发明人能够产生抗5T4抗体14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10和95F10(表1)。同样重要的是,这些抗体中的许多抗体表现出比那普妥莫单抗(NeoTX)(包含针对5T4的Fab部分的基准融合蛋白)更高的生物活性。此外,这些抗体显示出与食蟹猴5T4的交叉反应性,这使得临床前评估得以向前推进。

[0042] 竞争性结合实验显示,这些新鉴定的抗体连同那普妥莫单抗可基于它们在5T4抗原上的结合位置分类为四个不同的区段(bin)。有趣的是,仅14G12、393E9和113H5与那普妥莫单抗竞争结合5T4(称为“区段A”,表4)。区段B包括159D5、24F10和493E10,区段C包括257F1、353H11、367B8、389G2和109H7,并且区段D包括286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10和95F10。序列检查显示这些区段的每个区段中的抗体的某些CDR是高度同源的,因此被认为是可互换的。

[0043] 根据本公开的一个实施方案,提供了抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对人5T4蛋白具有结合特异性。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包括VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,该轻链可变区包括VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0044] 序列分析显示,一些CDR可能在翻译后被修饰。为了避免翻译后修饰(PTM)风险并因此简化制造,本公开设计并测试了某些去风险形式的CDR。

[0045] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体393E9的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:60-63或266-267中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:59的氨基酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:266的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:59的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:54的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:267的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:59的氨基酸序列。有趣的是,如实施例12所示,PTM去风险形式,特别是Hu393E9-45-P2和Hu393E9-62-P2(两者都含有SEQ ID NO:267作为VH CDR2)与嵌合形式相比具有增强的亲和力。

[0048] 示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:3、215-221和248-256的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:4和222-226的氨基酸序列。

[0049] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:3、215-221和248-256中任一者的氨基酸序

列,或与SEQ ID NO:3、215-221和248-256中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:4和222-226中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:4和222-226中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0050] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与393E9相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与393E9竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0051] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体286B4的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

[0052] 在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:124或SEQ ID NO:129的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:127的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:128的氨基酸序列。有趣的是,如实施例12所示,PTM去风险形式与嵌合形式相比具有增强的亲和力。

[0053] 示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:23、236-241和259-261的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:24和242-247的氨基酸序列。

[0054] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:23、236-241和259-261中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:23、236-241和259-261中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:24和242-247中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:24和242-247中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0055] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与286B4相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与286B4竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0056] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体14G12的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0057] 在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47-53中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0058] 在一些实施方案中,VL CDR3是亲和力成熟的。如实施例20所示,与亲本14G12-28抗体相比,亲和力成熟的抗体Hu14G12-28-88#和Hu14G12-28-108#对人5T4蛋白的结合亲和力分别显著增加至9.45倍和7.41倍。

[0059] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:264的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:265的氨基酸序列。

[0060] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47-53中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46、264和265的氨基酸序列。

[0061] 示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263的氨基酸序列。另一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:262的氨基酸序列。另一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:263的氨基酸序列。又一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:197的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:262的氨基酸序列。又一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:197的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:263的氨基酸序列。

[0062] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:197中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:197中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:262中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:262中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其亲和力成熟形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:263中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:263中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其亲和力成熟形式。

[0063] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与14G12相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与14G12竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0064] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体159D5的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:75的氨基酸序列。

[0065] 在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ

ID NO:70的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:71或SEQ ID NO:76的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:75的氨基酸序列。如实施例12所示,PTM去风险形式(159D50-P1)具有与嵌合抗体相似的性能。

[0066] 示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:7、227-229和257的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:8、230-235和258的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:7、227-229和257中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:7、227-229和257中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:8、230-235和258中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:8、230-235和258中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0068] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与159D5相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与159D5竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0069] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体353H11的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0070] 在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:96或SEQ ID NO:101-104中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:100的氨基酸序列。

[0071] 示例性VH序列包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列,并且示例性VL序列包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:15具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:16具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0072] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与353H11相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与353H11竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0073] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体109H7的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:122的氨基酸序列。

[0074] 示例性VH序列包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列,并且示例性VL序列包括SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:21的氨基酸序列,或与SEQ ID

N0:21具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID N0:22的氨基酸序列,或与SEQ ID N0:22具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0075] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与109H7相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与109H7竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0076] 在一些实施方案中,提供了来源于抗体49C5的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID N0:154的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID N0:155的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID N0:156的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID N0:157的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID N0:158的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID N0:159的氨基酸序列。

[0077] 示例性VH序列包括SEQ ID N0:33的氨基酸序列,并且示例性VL序列包括SEQ ID N0:34的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID N0:33的氨基酸序列,或与SEQ ID N0:33具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID N0:34的氨基酸序列,或与SEQ ID N0:34具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0078] 在一些实施方案中,还提供了结合5T4上与49C5相同的表位的抗体和抗原结合片段。在一些实施方案中,因此还提供了与49C5竞争结合5T4的抗体和抗原结合片段。

[0079] 还提供了包括本文公开的任何抗体的一组CDR (VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3)的抗体,诸如14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10和95F10 (表1)或其PTM去风险形式。CDR序列描述于表1-1至表1-41中。

[0080] 在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:41、42 (或47-53中的任一者)、43、44、45和46 (或264或265)的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:54、55 (或60-63中的任一者或266或267)、56、57、58和59的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:64-69的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:70、71或76、72、73、74或75的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:77-82的氨基酸序列。

[0081] 在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:83-88的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:89-94的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:95、96 (或101-104中的任一者)、97、98、99和100的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:105-110的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID N0:111-

116的氨基酸序列。

[0082] 在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:117-122的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:123、124或129、125、126、127和128的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:130-135的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:136-141的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:142-147的氨基酸序列。

[0083] 在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:148-153的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:154-159的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:160、161或166、162、163、164和165的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:167、168或173、169、170、171和172的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:174、175或180、176、177、178和179的氨基酸序列。

[0084] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:5具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:6具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0085] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:9具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:10具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0086] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:11具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:12具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0087] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:13具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:14具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0088] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:17的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:17具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其

PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:18的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:18具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0089] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:19的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:19具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:20的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:20具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0090] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:25具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:26的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:26具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0091] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:27的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:27具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:28的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:28具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0092] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:29的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:29具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:30具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0093] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:31具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:32的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:32具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0094] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:36具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0095] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:37具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:38的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:38具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0096] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:39的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:39具有

至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:40的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:40具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式。

[0097] 在一些实施方案中,还提供了包含来源于本公开的CDR序列的抗体和抗原结合片段,这些CDR序列具有一个、两个或三个氨基酸取代、缺失和/或添加。

抗体-药物缀合物

[0098] 在一些实施方案中,抗体或片段可与治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂或PEG缀合。

[0099] 在一个实施方案中,本公开的抗体或片段共价连接到药物部分。药物部分可以是或被修饰以包括与抗体上的偶联点反应的基团。例如,可通过烷基化(例如,在 ϵ -氨基赖氨酸或抗体的N末端)、氧化碳水化合物的还原胺化、羟基和羧基之间的酯交换、氨基或羧基的酰胺化以及与硫醇的偶联来连接药物部分。

[0100] 在一些实施方案中,每个抗体分子缀合的药物部分的数目p的范围为平均1至8;1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2。在一些实施方案中,p的范围为平均2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3。在其他实施方案中,p是1、2、3、4、5、6、7或8的平均值。在一些实施方案中,p的范围为平均约1至约20、约1至约10、约2至约10、约2至约9、约1至约8、约1至约7、约1至约6、约1至约5、约1至约4、约1至约3或约1至约2。在一些实施方案中,p的范围为约2至约8、约2至约7、约2至约6、约2至约5、约2至约4或约2至约3。

[0101] 例如,当蛋白质的化学活化导致形成游离硫醇基时,该蛋白质可与巯基反应剂缀合。在一个方面,该试剂是基本上对游离硫醇基具有特异性的试剂。此类试剂包括例如马来酰亚胺、卤代乙酰胺(例如,碘、溴或氯)、卤代酯(例如,碘、溴或氯)、卤代甲基酮(例如,碘、溴或氯)、苄基卤化物(例如,碘化物、溴化物或氯化物)、乙烯基砜和吡啶硫基。

[0102] 药物可通过接头与抗体或片段连接。合适的接头包括例如可切割的接头和不可切割的接头。可切割接头通常在胞内条件下易于切割。合适的可切割接头包括例如可被胞内蛋白酶诸如溶酶体蛋白酶或内体蛋白酶切割的肽接头。在示例性实施方案中,接头可以是二肽接头,诸如缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)接头或马来酰亚胺基己酸-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(mc-Val-Cit-PABA)接头。另一个接头是磺基琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯(smcc)。磺基-smcc偶联通过与巯基(硫醇,-SH)反应的马来酰亚胺基团发生,而其磺基-NHS酯对伯胺(如在赖氨酸和蛋白质或肽N末端中发现的)具有反应性。又一种接头是马来酰亚胺基己酰基(mc)。其他合适的接头包括在特定pH或pH范围可水解的接头,诸如脲接头。其他合适的可切割接头包括二硫化物接头。接头可共价结合到抗体,达到抗体必须在细胞内降解以便释放药物的程度,例如lmc接头等。

[0103] 接头可包括用于与抗体连接的基团。例如,接头可包括氨基、羟基、羧基或巯基反应性基团(例如,马来酰亚胺、卤代乙酰胺(例如,碘、溴或氯)、卤代酯(例如,碘、溴或氯)、卤代甲基酮(例如,碘、溴或氯)、苄基卤化物(例如,碘化物、溴化物或氯化物)、乙烯基砜和吡啶硫基。

[0104] 在一些实施方案中,药物部分是细胞毒性剂或细胞抑制剂、免疫抑制剂、放射性同位素、毒素等。缀合物可用于抑制肿瘤细胞或癌细胞的增殖,引起肿瘤或癌细胞的凋亡,或

用于治疗患者的癌症。因此,缀合物可以用于治疗动物癌症的各种环境中。缀合物可用于将药物递送至肿瘤细胞或癌细胞。不受理论的约束,在一些实施方案中,缀合物与表达CLDN6的癌细胞结合或缔合,并且缀合物和/或药物可通过受体介导的胞吞作用在肿瘤细胞或癌细胞内被摄取。

[0105] 在一些实施方案中,药物部分是美登素或澳瑞他汀。在一些实施方案中,药物部分是大环酮类似物,诸如艾日布林。在一些实施方案中,药物部分是拓扑异构酶抑制剂,诸如依喜替康和依喜替康衍生物。

[0106] 一旦进入细胞,缀合物内(例如,在接头中)的一个或多个特异性肽序列就会被一种或多种肿瘤细胞或癌细胞相关蛋白酶水解切割,导致药物的释放。然后,释放的药物在细胞内自由迁移并诱导细胞毒性或细胞抑制或其他活性。在一些实施方案中,药物从肿瘤细胞或癌细胞外的抗体上裂解,并且药物随后穿透细胞,或作用于细胞表面。

[0107] 药物部分或有效载荷的示例选自:艾日布林(2-(3-氨基-2-羟丙基)二十六氢-3-甲氧基-26-甲基-20,27-双(亚甲基)11,15-18,21-24,28-三环氧-7,9-亚乙基-12,15-亚甲基-9H,15H-呋喃并(3,2-i)呋喃并(2',3'-5,6)吡喃并(4,3-b)(1,4)二氧杂环二十五烷-5-(4H)-酮)、DM1(美登素,N2'-脱乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-或N2'-脱乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素)、mc-MMAD(6-马来酰亚胺基己酰基-单甲基澳瑞他汀-D或N-甲基-L-缬氨酰-N-[(1S,2R)-2-甲氧基-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[[[(1S)-2-苯基-1-(2-噻唑基)乙基]氨基]丙基]-1-吡咯烷基]-1-[(1S)-1-甲基丙基]-4-氧代丁基]-N-甲基-(9C1)-L-缬氨酰胺)、mc-MMAF(马来酰亚胺基己酰基-单甲基澳瑞他汀F或N-[6-(2,5-二氢-2,5-二氧化-1H-吡咯-1-基)-1-氧代己基]-N-甲基-L-缬氨酰-L-缬氨酰-(3R,4S,5S)-3-甲氧基-5-甲基-4-(甲基氨基)庚酰-(α R, β R,2S)- β -甲氧基- α -甲基-2-吡咯烷丙酰-L-苯丙氨酸)和mc-Val-Cit-PABA-MMAE(6-马来酰亚胺基己酰基-ValcCit-(对氨基苄氧羰基)-单甲基澳瑞他汀E或N-[[[4-[[N-[6-(2,5-二氢-2,5-二氧化-1H-吡咯-1-基)-1-氧代己基]-L-缬氨酰-N5-(氨基羰基)-L-鸟氨酸]氨基]苯基]甲氧基]羰基]-N-甲基-L-缬氨酰-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-羟基-1-甲基-2-苯乙基]氨基]-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]-1-吡咯烷基]-2-甲氧基-1-[(1S)-1-甲基丙基]-4-氧代丁基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)。DM1是微管蛋白抑制剂美登素的衍生物,而MMAD、MMAE和MMAF是澳瑞他汀衍生物。在一些实施方案中,药物部分选自mc-MMAF和mc-Val-Cit-PABA-MMAE。

[0108] 抗体或片段可与治疗剂缀合或融合,该治疗剂可包括可检测标记诸如放射性标记、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光敏治疗剂或诊断剂、细胞毒性剂(其可以是药物或毒素)、超声增强剂、非放射性标记、它们的组合以及本领域已知的其他此类试剂。

[0109] 抗体可通过与化学发光化合物偶联而被可检测地标记。化学发光标记的抗原结合多肽的存在随后通过检测化学反应过程中出现的发光的存在来确定。特别有用的化学发光标记化合物的示例是鲁米诺(luminol)、异鲁米诺(isoluminol)、热性吖啶鎓酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吖啶鎓盐和草酸酯。

[0110] 抗体还可使用荧光发射金属诸如 ^{152}Eu 或其他镧系元素进行可检测标记。这些金属可使用金属螯合基团诸如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)连接到抗体上。将各种部分偶联到抗体上的技术是公知的,参见例如Arnon等人,“Monoclonal

Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,载于Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编辑),第243-256页(Alan R.Liss,Inc.(1985年);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,载于Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编辑),Marcel Dekker,Inc.,第623-653页(1987年);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,载于Monoclonal Antibodies’84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编辑),第475-506页(1985年);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,载于Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编辑),Academic Press,第303-316页(1985年);以及Thorpe等人,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”,Immunol.Rev.(第52卷:第119-158页(1982年))。

[0111] 应当理解,本公开的任何抗体或抗原结合片段适于包含在目前公开的抗体-药物缀合物(ADC)中。在一个实施方案中,抗体或片段包括抗体14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10或95F10中任一者或其PTM去风险形式或亲和力成熟形式的VH CDR和VL CDR。

[0112] 在一些实施方案中,抗体或片段包括区段A(14G12、393E9和113H5)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。在一些实施方案中,抗体或片段包括区段B(159D5、24F10和493E10)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。在一些实施方案中,抗体或片段包括区段C(257F1、353H11、367B8、389G2和109H7)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。在一些实施方案中,抗体或片段包括区段D(286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10和95F10)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。

[0113] 在一些实施方案中,ADC的抗体或抗原结合片段包括VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0114] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47-53中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0115] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:264的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:265的氨基酸序列。

[0116] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ

ID NO:42或SEQ ID NO:47-53中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46、264和265的氨基酸序列。

[0117] 示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263的氨基酸序列。另一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:262的氨基酸序列。另一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:263的氨基酸序列。又一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:197的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:262的氨基酸序列。又一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:197的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:263的氨基酸序列。

[0118] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式或亲和力成熟形式。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:197中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:197中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:262中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:262中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其亲和力成熟形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:263中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:263中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其亲和力成熟形式。

多功能分子

[0119] 多功能分子包括对5T4具有特异性的抗体或抗原结合片段诸如本文公开的那些抗体或抗原结合片段,和对第二抗原具有特异性的一种或多种抗体或抗原结合片段。

[0120] 在一些实施方案中,第二抗原是在免疫细胞上表达的蛋白质,该免疫细胞诸如T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞、吞噬细胞、自然杀伤细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞。

[0121] 在一些实施方案中,第二抗原是CD3、CD47、PD1、PD-L1、LAG3、TIM3、CTLA4、VISTA、CSFR1、A2AR、CD73、CD39、CD40、CEA、HER2、CMET、4-1BB、OX40、SIRPA CD16、CD28、ICOS、CTLA4、BTLA、TIGIT、HVEM、CD27、VEGFR或VEGF。

[0122] 还提供了不同形式的双特异性抗体。在一些实施方案中,每个抗5T4片段和第二片段各自独立地选自Fab片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体还包括Fc片段。

[0123] 还提供了不仅包括抗体还包括抗原结合片段的双功能分子。作为肿瘤抗原靶向分子,对5T4具有特异性的抗体或抗原结合片段,诸如本文所述的那些抗体或抗原结合片段,

可任选地通过肽接头与免疫细胞因子或配体组合。连接的免疫细胞因子或配体包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、GM-CSF、TNF- α 、CD40L、OX40L、CD27L、CD30L、4-1BBL、LIGHT和GITRL。这种双功能分子可将免疫检查点阻断效应与肿瘤部位局部免疫调节相结合。

[0124] 在一些实施方案中,抗5T4片段包括区段A(14G12、393E9和113H5)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。在一些实施方案中,抗5T4片段包括区段B(159D5、24F10和493E10)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。在一些实施方案中,抗5T4片段包括区段C(257F1、353H11、367B8、389G2和109H7)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。在一些实施方案中,抗5T4片段包括区段D(286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10和95F10)的任何抗体的VH CDR和VL CDR。

[0125] 在一些实施方案中,抗5T4片段包括VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47-53中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:264的氨基酸序列。在一些实施方案中,VH CDR2被PTM去风险化。在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:265的氨基酸序列。

[0128] 在一些实施方案中,VH CDR1包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列;VH CDR2包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47-53中的任一者的氨基酸序列;VH CDR3包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列;VL CDR1包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列;VL CDR2包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;并且VL CDR3包含选自SEQ ID NO:46、264和265的氨基酸序列。

[0129] 示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263的氨基酸序列。另一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:262的氨基酸序列。另一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:263的氨基酸序列。又一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:197的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:262的氨基酸序列。又一个示例性VH序列包括选自SEQ ID NO:197的氨基酸序列。示例性VL序列包括选自SEQ ID NO:263的氨基酸序列。

[0130] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1、181-184、189-192和195-204中任一者具有至少75%、80%、

85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2、185-188、193-194、205-214和262-263中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其PTM去风险形式或亲和力成熟形式。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:197中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:197中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VH CDR或其PTM去风险形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:262中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:262中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其亲和力成熟形式。在一些实施方案中,VL包括SEQ ID NO:263中任一者的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:263中任一者具有至少75%、80%、85%、90%、95%或99%序列同一性的序列,同时保留对应的VL CDR或其亲和力成熟形式。

嵌合抗原受体

[0131] 在一个实施方案中,还提供了一种包含本公开的抗体或其片段作为靶向单元的嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,CAR包含本公开的抗体或其片段、跨膜结构域、共刺激结构域和CD3 ξ 胞内结构域。

[0132] 跨膜结构域可被设计成融合到包含抗体或片段的胞外结构域,任选地通过铰链结构域融合。它可类似地融合到胞内结构域,诸如共刺激结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域可包括共刺激结构域的天然跨膜区(例如,用作共刺激结构域的CD28T或4-1BB的TM区)或铰链区的天然跨膜结构域(例如,用作铰链结构域的CD8 α 或CD28T的TM区)。

[0133] 在一些实施方案中,跨膜结构域可包括跨越细胞膜但延伸到细胞的细胞质中和/或延伸到细胞外空间中的序列。例如,跨膜可包括跨膜序列,该序列本身可进一步包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个延伸到细胞的细胞质和/或细胞外空间中的氨基酸。因此,跨膜结构域包括跨膜区,还可进一步包含延伸超过膜本身的内表面或外表面的氨基酸;此类序列仍可被认为是“跨膜结构域”。

[0134] 在一些实施方案中,跨膜结构域通过短接头融合到胞质结构域。任选地,长度优选为2至10个氨基酸的短肽或多肽接头可形成嵌合受体的跨膜结构域和近端胞质信号传导结构域之间的连接。甘氨酸-丝氨酸双联体(GS)、甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸三联体(GSG)或丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸三联体(AAA)提供了合适的接头。

[0135] 在一些实施方案中,CAR还包括共刺激结构域。在一些实施方案中,共刺激结构域位于跨膜结构域和活化结构域之间。示例性共刺激结构域包括但不限于CD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD4、CD7、CD8a、CD8、CD11a(ITGAL)、CD11b(ITGAM)、CD11c(ITGAX)、CD11d(ITGAD)、CD18(ITGB2)、CD19(B4)、CD27(TFRSF7)、CD28、CD28T、CD29(ITGB1)、CD30(TNFRSF8)、CD40(TNFRSF5)、CD48(SLAMF2)、CD49a(ITGA1)、CD49d(ITGA4)、CD49f(ITGA6)、CD66a(CEACAM1)、CD66b(CEACAM8)、CD66c(CEACAM6)、CD66d(CEACAM3)、CD66e(CEACAM5)、CD69(CLEC2)、CD79A(B-细胞抗原受体复合物相关的 α 链)、CD79B(B-细胞抗原受体复合物相关的 β 链)、CD84(SLAMF5)、CD96(Tactile)、CD100(SEMA4D)、CD103(ITGAE)、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD150(SLAMF1)、CD158A(KIR2DL1)、CD158B1(KIR2DL2)、CD158B2(KIR2DL3)、CD158C(KIR3DP1)、CD158D(KIRDL4)、CD158F1(KIR2DL5A)、CD158F2(KIR2DL5B)、CD158K(KTR3DL2)、

CD160 (BY55)、CD162 (SELPLG)、CD226 (DNAM1)、CD229 (SLAMF3)、CD244 (SLAMF4)、CD247 (CD3-zeta)、CD258 (LIGHT)、CD268 (BAFFR)、CD270 (TFSF14)、CD272 (BTLA)、CD276 (B7-H3)、CD279 (PD-1)、CD314 (KG2D)、CD319 (SLAMF7)、CD335 (K-p46)、CD336 (K-p44)、CD337 (K-p30)、CD352 (SLAMF6)、CD353 (SLAMF8)、CD355 (CRTAM)、CD357 (TNFRSF 18)、可诱导的T细胞共刺激剂 (ICOS)、LFA-1 (CD 11a/CD 18)、KG2C、DAP-10、ICAM-1、Kp80 (KLRF1)、IL-2R β 、IL-2R γ 、IL-7R α 、LFA-1、SLAMF9、LAT、GADS (GrpL)、SLP-76 (LCP2)、PAG1/CBP、CD83配体、Fc γ 受体、MHC 1类分子、MHC 2类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白细胞因子受体、整合素、激活NK细胞受体、Toll配体受体及其片段或它们的组合。

[0136] 在一些实施方案中,CAR的胞质部分还包括信号传导/激活结构域。在一个实施方案中,信号传导/激活结构域是CD3 ξ 结构域,或者是与CD3 ξ 结构域具有至少约80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

多核苷酸、mRNA以及表达或制备抗体的方法

[0137] 本公开还提供了编码本公开的抗体、其变体或衍生物或CAR的多核苷酸或核酸分子。本公开的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或在分开的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、其变体或衍生物整个重链和轻链可变区。另外,本公开的多核苷酸可以在相同的多核苷酸分子上或在分开的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、其变体或衍生物的重链和轻链可变区的部分。

[0138] 在一些实施方案中,多核苷酸是mRNA分子。在一些实施方案中,可将mRNA引入靶细胞中以表达抗体或其片段。

[0139] mRNA可根据各种已知方法中的任一种来合成。例如,mRNA可通过体外转录 (IVT) 来合成。简言之,IVT通常用含有启动子的线性或环状DNA模板、核糖核苷三磷酸库、可包含DTT和镁离子的缓冲体系以及适当的RNA聚合酶 (例如,T3、T7或SP6 RNA聚合酶)、DNA酶I、焦磷酸酶和/或RNA酶抑制剂进行。确切的条件将根据具体应用而变化。

[0140] 在一些实施方案中,为了制备编码抗体的mRNA,DNA模板在体外转录。合适的DNA模板通常具有用于体外转录的启动子,例如T3、T7或SP6启动子,其后是用于编码期望抗体 (例如,编码重链或轻链)的mRNA的期望核苷酸序列以及终止信号。

[0141] 可测定编码期望抗体 (例如,编码重链或轻链)的mRNA序列,并使用标准方法将其掺入DNA模板中。例如,从期望的氨基酸序列 (例如,期望的重链或轻链序列)开始,基于简并的遗传密码进行虚拟反向翻译。然后可使用优化算法来选择合适的密码子。通常,一方面可优化G/C含量以实现最高可能的G/C含量,另一方面根据密码子使用尽可能考虑tRNA的频率。优化的RNA序列例如可借助适当的展示设备来建立和展示,并与原始 (野生型) 序列进行比较。还可分析二级结构以分别计算RNA的稳定和去稳定特性或区域。

[0142] mRNA可作为未修饰的或修饰的mRNA合成。通常,修饰mRNA以增强稳定性。mRNA的修饰可包括例如RNA核苷酸的修饰。经修饰的mRNA可因此包括例如骨架修饰、糖修饰或碱基修饰。在一些实施方案中,编码抗体的mRNA (例如,编码重链和轻链的mRNA)可由天然存在的核苷酸和/或核苷酸类似物 (经修饰的核苷酸)合成,包括但不限于嘌呤 (腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G))或嘧啶 (胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C)、尿嘧啶 (U)),以及作为嘌呤和嘧啶的经修饰的核苷酸类似物或衍生物,诸如例如1-甲基-腺嘌呤、2-甲基-腺嘌呤、2-甲硫基-N-6-异戊烯基-腺嘌呤、N6-甲基-腺嘌呤、N6-异戊烯基-腺嘌呤、2-硫代-胞嘧啶、3-甲基-胞嘧啶、4-乙酰基-

胞嘧啶、5-甲基-胞嘧啶、2,6-二氨基嘌呤、1-甲基-鸟嘌呤、2-甲基-鸟嘌呤、2,2-二甲基-鸟嘌呤、7-甲基-鸟嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、假尿嘧啶(5-尿嘧啶)、二氢-尿嘧啶、2-硫代-尿嘧啶、4-硫代-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-(羧基羟甲基)-尿嘧啶、5-氟-尿嘧啶、5-溴-尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲基-2-硫代-尿嘧啶、5-甲基-尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、5-甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代-尿嘧啶、5'-甲氧基羰基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基-尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸(v)、1-甲基-假尿嘧啶、奎辛(queosine)、13-D-甘露糖基-奎辛、威布托辛(wybutoxosine)和氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、肽核苷酸、甲基磷酸酯、7-脱氮鸟苷、5-甲基胞嘧啶和肌苷。此类类似物的制备是本领域技术人员已知的,例如来自美国专利号4,373,071、4,401,796、4,415,732、4,458,066、4,500,707、4,668,777、4,973,679、5,047,524、5,132,418、5,153,319、5,262,530和5,700,642,这些专利的公开内容以引用方式包括在其全部范围内。

[0143] 在一些实施方案中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可含有RNA骨架修饰。通常,骨架修饰是其中RNA中所含的核苷酸骨架的磷酸经化学修饰的修饰。示例性骨架修饰通常包括但不限于来自甲基磷酸酯、甲基氨基磷酸酯、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯(例如胞苷5'-O-(1-硫代磷酸酯))、硼磷酸酯、带正电荷的胍基等的修饰,这意味着用其他阴离子、阳离子或中性基团代替磷酸二酯键。

[0144] 在一些实施方案中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可含有糖修饰。典型的糖修饰是核苷酸的糖的化学修饰,该化学修饰包括但不限于选自2'-脱氧-2'-氟-寡核糖核苷酸(2'-氟-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-氟-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)、2'-脱氧-2'-脱胺-寡核糖核苷酸(2'-氨基-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)、2'-O-烷基寡核糖核苷酸、2'-脱氧-2'-C-烷基寡核糖核苷酸(2'-O-甲基胞苷5'-三磷酸、2'-甲基尿苷5'-三磷酸)、2'-C-烷基寡核糖核苷酸及其异构体(2'-芳胞苷5'-三磷酸、2'-芳尿苷5'-三磷酸)或叠氮基三磷酸(2'-叠氮基-2'-脱氧胞苷5'-三磷酸、2'-叠氮基-2'-脱氧尿苷5'-三磷酸)的糖修饰。

[0145] 在一些实施方案中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)可含有核苷酸的碱基的修饰(碱基修饰)。含有碱基修饰的经修饰的核苷酸也称为经碱基修饰的核苷酸。此类经碱基修饰的核苷酸包括但不限于2-氨基-6-氯嘌呤核苷5'-三磷酸、2-氨基腺苷5'-三磷酸、2-硫代胞苷5'-三磷酸、2-硫代尿苷5'-三磷酸、4-硫代尿苷5'-三磷酸、5-氨基烯丙基胞苷5'-三磷酸、5-氨基烯丙基尿苷5'-三磷酸、5-溴胞苷5'-三磷酸、5-溴尿苷5'-三磷酸、5-碘胞苷5'-三磷酸、5-碘尿苷5'-三磷酸、5-甲基胞苷5'-三磷酸、5-甲基尿苷5'-三磷酸、6-氮杂胞苷5'-三磷酸、6-氮杂尿苷5'-三磷酸、6-氯嘌呤核苷5'-三磷酸、7-脱氮腺苷5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷5'-三磷酸、8-氮杂腺苷5'-三磷酸、8-叠氮基腺苷5'-三磷酸、苯并咪唑核苷5'-三磷酸、N1-甲基腺苷5'-三磷酸、N1-甲基鸟苷5'-三磷酸、N6-甲基腺苷5'-三磷酸、O6-甲基鸟苷5'-三磷酸、假尿苷5'-三磷酸、嘌呤霉素5'-三磷酸或黄苷5'-三磷酸。

[0146] 通常,mRNA合成包括在N末端(5')添加“帽”,和在C末端(3')添加“尾”。帽的存在对于提供对大多数真核细胞中发现的核酸酶的抵抗力至关重要。“尾”的存在用于保护mRNA免受核酸外切酶降解。

[0147] 因此,在一些实施方案中,mRNA(例如,编码重链和轻链的mRNA)包含5'帽结构。5'

帽通常如下添加:首先, RNA末端磷酸酶从5'核苷酸除去一个末端磷酸基团,留下两个末端磷酸;然后经由鸟苷酰转移酶将三磷酸鸟苷(GTP)添加到末端磷酸酯,产生5'5'5'三磷酸酯键;然后用甲基转移酶将鸟嘌呤的7-氮甲基化。帽结构的示例包括但不限于m7G(5')ppp(5'(A, G(5')ppp(5)A和G(5)ppp(5')G。

[0148] 在一些实施方案中, mRNA(例如, 编码重链和轻链的mRNA)包含3'聚(A)尾结构。mRNA的3'末端上的聚A尾通常包含约10至300个腺苷核苷酸(例如, 约10至200个腺苷核苷酸、约10至175个腺苷核苷酸、约10至150个腺苷核苷酸、约10至125个腺苷核苷酸、10至100个腺苷核苷酸、约10至75个腺苷核苷酸、约20至70个腺苷核苷酸、或约20至60个腺苷核苷酸)。在一些实施方案中, 编码抗体的mRNA(例如, 编码重链和轻链的mRNA)包含3'聚(C)尾结构。mRNA的3'末端上的合适聚C尾通常包含约10至200个胞嘧啶核苷酸(例如, 约10至150个胞嘧啶核苷酸、约10至100个胞嘧啶核苷酸、约20至70个胞嘧啶核苷酸、约20至60个胞嘧啶核苷酸、或约10至40个胞嘧啶核苷酸)。聚C尾可加入到聚A尾, 或者可取代聚A尾。

[0149] 在一些实施方案中, mRNA(例如, 编码重链和轻链的mRNA)包含5'和/或3'非翻译区。在一些实施方案中, 5'非翻译区包含影响mRNA稳定性或翻译的一个或多个元件, 例如铁响应元件。在一些实施方案中, 5'非翻译区可以是约50至500个核苷酸的长度(例如, 约50至400个核苷酸的长度、约50至300个核苷酸的长度、约50至200个核苷酸的长度、或约50至100个核苷酸的长度)。

[0150] 在一些实施方案中, mRNA的5'区(例如, 编码重链和轻链的mRNA)包含编码信号肽的序列, 诸如本文所述的那些。在特定实施方案中, 将来源于人生长激素(hGH)的信号肽掺入5'区中。通常, 信号肽编码序列在N末端处直接或间接地与重链或轻链编码序列连接。

[0151] 本技术可用于递送本领域已知的任何抗体和可使用标准方法产生的针对期望抗原的抗体。本发明可用于递送单克隆抗体、多克隆抗体、抗体混合物或混合品(cocktail)、人抗体或人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

[0152] 制备抗体的方法是本领域众所周知的, 并且在本文中有描述。在某些实施方案中, 本公开的抗原结合多肽的可变区和恒定区均是全人的。全人抗体可以使用本领域所述的以及如本文所述的技术来制备。例如, 通过将抗原施用于转基因动物, 可以制备针对特定抗原的全人抗体, 该转基因动物已被修饰以响应于抗原攻击产生此类抗体, 但是其内源性基因座已被禁用。可用于制备此类抗体的示例性技术描述于美国专利6,150,584、6,458,592、6,420,140中, 其全文以引用方式并入。

治疗和用途

[0153] 如本文所述, 本公开的抗体、变体或衍生物可用于某些治疗和诊断方法。

[0154] 本公开还涉及基于抗体的疗法, 其涉及将本公开的抗体或片段施用于患者, 诸如动物、哺乳动物和人, 以用于治疗本文所述的一种或多种病症或病况。本公开的治疗性化合物包括但不限于本公开的抗体(包括如本文所述的其变体和衍生物)和编码本公开的抗体(包括如本文所述的其变体和衍生物)的核酸或多核苷酸。

[0155] 本公开的抗体还可用于治疗或抑制癌症。如上所述, 5T4在正常成人组织中很少表达, 但在胎盘和大多数常见肿瘤中以高水平存在, 通常在肾癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和卵巢癌中占超过80%。

[0156] 因此, 在一些实施方案中, 提供了用于治疗有需要的患者中的癌症的方法。该方法

在一个实施方案中需要向患者施用有效量的本公开的抗体或片段或抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,患者中的至少一种癌细胞(例如,基质细胞)过表达5T4。

[0157] 本公开还提供了细胞疗法,诸如嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法。可使用用编码CAR或与CAR接触的载体转导的合适细胞,该CAR包括本公开的抗5T4抗体(或另选地,工程化以表达本公开的抗5T4抗体)。在这种接触或工程化后,然后将细胞引入需要治疗的癌症患者。癌症患者可患有本文公开的任何类型的癌症。细胞(例如,T细胞)可以是例如肿瘤浸润性T淋巴细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或它们的组合,但不限于此。

[0158] 在一些实施方案中,该细胞分离自癌症患者自身。在一些实施方案中,该细胞由供体或细胞库提供。当从癌症患者中分离出细胞时,可最大限度地减少不期望的免疫反应。

[0159] 癌症的非限制性示例包括膀胱癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、头颈癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、胰腺癌、前列腺癌和甲状腺癌。在一些实施方案中,癌症是胃癌、胰腺癌、食管癌、卵巢癌和肺癌中的一种或多种。

[0160] 可用本公开的抗体或其变体或衍生物治疗、预防、诊断和/或预后的与增加的细胞存活相关的其他疾病或状况包括但不限于恶性肿瘤和相关病症的进展和/或转移,恶性肿瘤和相关病症诸如白血病(包括急性白血病(例如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病(包括成髓细胞性、早幼粒细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病)) and 慢性白血病(例如慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,实体瘤包括但不限于肉瘤和癌,诸如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0161] 用于任何特定患者的具体剂量和治疗方案将取决于多种因素,包括所用的特定抗体、其变体或衍生物、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食、给药时间、排泄速率、药物组合和所治疗的特定疾病的严重程度。医疗护理人员对这些因素的判断在本领域的普通技术范围内。该量还将取决于待治疗的个体患者、施用途径、制剂类型、所用化合物的特征、疾病的严重程度和期望效果。所用的量可通过本领域众所周知的药理学和药代动力学原理来确定。

[0162] 抗体或片段的施用方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。抗原结合多肽或组合物可通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可与其他生物活性剂一起施用。因此,含有本公开的抗原结合多肽的药物组合物可口服、直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉末、软膏、滴剂或透皮贴剂)、含服或作为口腔或鼻腔喷雾剂施用。

[0163] 如本文所用的术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节

内注射和输注的施用模式。

[0164] 施用可以是全身性的或局部的。此外,可能期望通过任何合适的途径将本公开的抗体引入中枢神经系统,包括脑室内和鞘内注射;脑室内注射可通过例如连接到储液器诸如Ommaya储液器的脑室内导管来促进。也可采用肺部施用,例如,通过使用吸入器或雾化器,以及与雾化剂一起配制。

[0165] 可能需要将本公开的抗原结合多肽或组合物局部施用至需要治疗的区域;这可通过例如但不限于手术期间的局部输注、局部施用(例如,与手术后的伤口敷料结合)、通过注射、通过导管、通过栓剂或通过植入物来实现,所述植入物是多孔、无孔或凝胶状材料,包括膜诸如唾液酸膜或纤维。优选地,当施用本公开的蛋白质(包括抗体)时,必须注意使用蛋白质不吸收的材料。

[0166] 可通过标准临床技术来确定本公开的抗体或片段或抗体-药物缀合物将有效治疗、抑制和预防炎性、免疫或恶性疾病、病症或病况的量。此外,可任选地采用体外测定以帮助鉴定最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量还将取决于施用途径以及疾病、病症或病况的严重程度,并且应当根据医师的判断和每个患者的情况来决定。有效剂量可从由体外或动物模型测试系统导出的剂量-反应曲线外推得到。

[0167] 作为一般建议,向患者施用本公开的抗体或片段的剂量通常为0.001mg/kg至100mg/kg患者体重、0.01mg/kg至20mg/kg患者体重或0.5mg/kg至10mg/kg患者体重。通常,由于对外来多肽的免疫应答,人抗体在人体内的半衰期比来自其他物种的抗体长。因此,较低剂量的人抗体和较少频率的施用通常是可能的。此外,可通过修饰(例如,脂化)增强抗体的摄取和组织渗透(例如,进入脑中)来降低本公开的抗体的施用剂量和频率。

[0168] 在另外的实施方案中,本公开的组合物与细胞因子组合施用。可与本公开的组合物一起施用的细胞因子包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、抗CD40、CD40L和TNF- α 。

[0169] 在另外的实施方案中,本公开的组合物与其他治疗或预防方案(例如,放射疗法)组合施用。

组合物

[0170] 本公开还提供药物组合物。此类组合物包含有效量的抗体或片段或抗体-药物缀合物和可接受的载体。在一些实施方案中,组合物还包含第二抗癌剂(例如,免疫检查点抑制剂)。

[0171] 在一个具体的实施方案中,术语“药学上可接受的”意指由联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于动物,更具体地用于人的。此外,“药学上可接受的载体”通常是任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。

[0172] 术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒。此类药物载体可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,水是优选的载体。盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可用作液体载体,特别是用于注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂

或乳化剂,或pH缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。还可以考虑抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;和张力调节剂,诸如氯化钠或葡萄糖。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等形式。组合物可用传统的粘合剂和载体(诸如甘油三酯)制成栓剂。口服制剂可以包含标准载体,诸如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的示例描述于E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中,其以引用方式并入本文。此类组合物将含有治疗有效量的抗原结合多肽,优选纯化形式的抗原结合多肽,以及合适量的载体,以便提供用于适当施用于患者的形式。制剂应适合施用模式。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0173] 在一个实施方案中,根据常规方法将组合物配制成适于静脉内施用于人的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可以包含增溶剂和局部麻醉剂(诸如利多卡因)以减轻注射部位的疼痛。通常,这些成分以单位剂型单独提供或混合在一起提供,例如,以在指示活性剂的量的密封容器(诸如安瓿或小袋)中的冻干粉末或无水浓缩物的形式提供。在组合物通过输注施用的情况下,其可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。在组合物通过注射施用的情况下,可以提供一安瓿瓶的无菌注射用水或盐水,以便在给药前将各成分混合。

[0174] 本公开的化合物可被配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的盐,诸如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐,以及与阳离子形成的盐,诸如衍生自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

实施例

实施例1:针对人5T4的小鼠单克隆抗体的产生

[0175] 本实施例描述了使用杂交瘤技术产生抗人5T4小鼠单克隆抗体。

[0176] 抗原:人5T4-His蛋白和表达人5T4的CHO-K1。

[0177] 免疫:为了产生靶向人5T4的小鼠单克隆抗体,首先用5T4-His蛋白免疫SJL小鼠、Balb/C小鼠和C57BL/6小鼠。随后用5T4-His蛋白或表达人5T4的CHO-K1加强所免疫的小鼠。为了选择产生结合5T4蛋白的抗体的小鼠,通过ELISA和FACS对免疫小鼠的血清进行抗体滴度评估。简言之,将微量滴定板用ELISA包被缓冲液中的0.5 μ g/mL或1 μ g/mL的人5T4或食蟹猴5T4蛋白以100 μ L/孔在4 $^{\circ}$ C包被过夜,然后用150 μ L/孔的1% BSA封闭。将来自免疫小鼠的血清稀释液加入到每个孔中并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。将板用PBS/Tween洗涤,然后与缀合辣根过氧化物酶(HRP)的抗小鼠IgG抗体在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。还通过血清FACS测试了针对CHOK1-hu5T4细胞系的免疫应答,其中CHOK1亲代细胞系用作阴性对照。将所得小鼠用于融合。通过ELISA筛选杂交瘤上清液。

[0178] 细胞融合:融合通过电融合进行。将融合的细胞接种到50个96孔板中以用于每次融合。

[0179] 筛选:通过ELISA筛选针对重组人(rh) 5T4-His蛋白和重组食蟹猴5T4-His蛋白的上清液。然后,用FACS结合针对CHOK1-hu5T4的细胞系以及用ELISA结合蛋白对初筛的阳性上清液进行证实筛选。

[0180] 亚克隆和筛选:通过有限稀释法对来自每个融合体的阳性原代克隆进行亚克隆,以确保亚克隆来源于单个亲本细胞。亚克隆以与原代克隆相同的方法进行筛选,并且阳性克隆的培养上清液通过亲和力排序进行额外的证实筛选。

[0181] 选择杂交瘤克隆14G12、393E9、113H5、159D5、24F10、493E10、257F1、353H11、367B8、389G2、109H7、286B4、37G6、267B5、425G1、449H9、49C5、119G5、85B10和95F10进行进一步分析。这些克隆的可变区的氨基酸序列列于下表1中。在表1-1至表1-20中,除了来自这种鼠抗体的原始CDR序列之外,还包括其中潜在翻译后修饰 (PTM) 被去除的形式或亲和力成熟的形式。

表1.所选克隆的可变区的序列

名称	序列	SEQ ID NO:
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAV YFCANGGAMDYWGQGTSTVTVSS	1
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTLPWTF GGGKLEIK	2
393E9 VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEW LGFIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSAT YYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	3
393E9 VL	DIVLTQFPASLAVSLGQRATISCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQPP KLLIYGASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLSIHPVEEDDIAMYFCQOSRK VPSTFGGGTKLEIK	4
113H5 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEW MGYINSDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTEDTATYYC AREEYDYWFAYWGQGTSLTVSA	5
113H5 VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASONVGTNVAWYQQKPGQSPKA LIYSASNRYSGVPDRFTGSGFGTDFLTISNVQSEDLTEYFCQQYNSYP YTFGGGTNLEIK	6
159D5 VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCTASGFTFSNFGMHWVRQAPETGLE WVAYISSGSSTFYADSVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDATMY FCARSPAYYRYGLDYWGQGTTLTVSS	7
159D5 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQPP KLLIKSSSNLESVGPARGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWE IPYTFGGGTLEIK	8
24F10 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYGMHWVRQAPEKGLE WVAYISSGSTIYYTDTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDATMY YCARGGDGYRSTMDYWGQGISVTVSS	9
24F10 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSSSYSYMHWYQQKPGQPP KLLIKSASNLAGVGPARGSGSGTDFTLNIHPVEEEDSATYYCQHSWE VPRTFGGGTKLEIK	10
493E10 VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSFSGMHWVRQAPEKGLE WVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDATMY YCARNRAYHREAMDYWGQGTSTVTVSS	11
493E10 VL	DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASQSVSSSSYNMHWYQQKPGQPP KLLIKSASNLESVGPARGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWE IPYTFGGGTLEIK	12
257F1 VH	QVLLQQSGAEVARPGASVKLSCKASGYTFTSYGLNWLRQRTGQGLE WIGEIYPRSENTHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YFCARGDWDFDHWGQGTTLTVSS	13
257F1 VL	EILLTQSPAIPASPGKVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGSSPKIWIYGIS NLASGVGPARGSGSGTFFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPRTFGG GTKLEIK	14
353H11 VH	QVQLQQPGTELKPGASVKLSCKASDYTFTSYWMHWVKQRPEQGLE WIGNINPSNGNTNYNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTFEDSAV YYCARGGWDFDYWGQGTTLTVSS	15

353H11 VL	QVVLTSQSPAIMSASPGEKVTMTCS <u>SASSSVRYMH</u> WYQQRSGTSPKRWI <u>YDTSKLTSGV</u> PARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QLWTSKPP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIR	16
367B8 VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVKQRPEQGLE WIG <u>NINPSNGNTNYNENFKS</u> QATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY YCAR <u>GGWDFDY</u> WGQGTTLTVSS	17
367B8 VL	QVVLTSQSPAIMSASPGEKVTMTCS <u>SASSSVRYIH</u> WYQQRSGTSPKRWIY <u>DTSKLTSGV</u> PVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QQWTSKPP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIR	18
389G2 VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT <u>SYWMH</u> WVKQRPEQGLE WIG <u>NINPSNGNTNYNERFKS</u> KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSSTVY YCAR <u>GGWDFDY</u> WGQGTTLTVSS	19
389G2 VL	QVVLTSQSPAIMSASPGEKVTMTCS <u>SASSSVRYIH</u> WYQQRSGTSPKRWIY <u>DTSKLTSGV</u> PVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC <u>QQWTSKPP</u> <u>WTFGGG</u> TKLEIK	20
109H7 VH	QVQLQQSGAELMKPGASVKLSCKATGYTFT <u>GYWIE</u> WVKQRPGQGLE WIG <u>ETLPGRGSTNYNEKFKG</u> KATFTADTSSNIVYMQLSSLTIEDSAIY YCAR <u>GRRDFDY</u> WGQGTTLTVSS	21
109H7 VL	DIQMTQTSSLSASLGDEVTISCS <u>SASQGINNYLN</u> WYQQKPDGTVKLLI <u>YYTSSLHSGV</u> PSRFSGSGSGTDYSLTIINLEPEDIATYYC <u>QQFSKLPFTF</u> GSGTKLEIR	22
286B4 VH	DVQLHESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYST <u>NYYWN</u> WIRQFPGNNLEW MGY <u>ITYDGSNNYNPSLKN</u> RISVTRDTSKNQFFLKLSSVTTEDATYYC TR <u>GGGQLRFDY</u> WGQGTTLTVSS	23
286B4 VL	SIVMTQTPKFLIVSAGDRVITITC <u>KASQSVSNEVT</u> WYQQKPGQSPKMLI <u>YYASNRYT</u> GVPDRFTGSGYGTDFTFINTVQAEDLAIYFC <u>QQDYSSPW</u> <u>TFGGG</u> TKLEIK	24
37G6 VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>SYWIT</u> WVKQRPGQGLE RIG <u>DIYPGSGTINYNEKFKS</u> KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYC CAR <u>SDGNYYFDY</u> WGQGTTLKVSS	25
37G6 VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCS <u>RASSSVNYMH</u> WYQQKPGSSPKPWIY <u>ATSNLASGV</u> PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC <u>QQWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK	26
267B5 VH	DVQFQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYST <u>SSYYWN</u> WIRQFPGDKLEW MGY <u>ISYDGSNNYNPSLKN</u> RISITRDTSKKQFFLKLNSVTTEDATYYC ARS <u>WDGGYAMD</u> NWGQGTSTVTVSS	27
267B5 VL	SIVMTQTPKFLIVSAGDRVITITC <u>KASQSVSNDVA</u> WYQQKPGQSPKLLI <u>YFASNRYT</u> GVPDRFTGSGYGTFTFTISTVQADDLAVYFC <u>QQDYTSP</u> <u>WTFGGG</u> TRLEIK	28
425G1 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIK <u>DTYMH</u> WVKQRPEQGLE WIG <u>RIDPANGHTIFASKFOG</u> KATITADTSSNTAYMQLSSLTSGDTAVY YCG <u>LFTMVVVPWYFDV</u> WGTGTTTVTVSS	29
425G1 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC <u>KASQDVSTAVA</u> WYQQKPGQSPKLLI <u>YWASTRHT</u> GVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYC <u>QQHYSSP</u> <u>LTFGAG</u> TKLEIK	30
449H9 VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVRISCKASGYAFS <u>NYWMN</u> WVKQRPGQGLE WIG <u>QIYPGDGDTNYNGKFKN</u> KATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YFCAR <u>HYDYPYYYAMDY</u> WGQGTSTVTVSS	31
449H9 VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC <u>RASQDIGIAL</u> TWLQQEPDGTIKRLIY <u>ATSSLDSGV</u> PKRFSRSGSDYTLTISSLESEDFVDYYC <u>LOYIISPYT</u> FG GGTKLEIK	32
49C5 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT <u>DYYMN</u> WVKQSHGKSLEW IG <u>DINPYSGGATNNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYIELRSLTSEDSAVYF	33

	CARGSIYYDSTANYFDYWGQGTTTLTVSS	
49C5 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RASENIYSYLA WYQQKQKSPQLLV Y NAKSLTE GVPSRFSGRSGTQFSLKINSLQPEDFGSY YCQH HYVTPW TFGGGTKLEIK	34
119G5 VH	QVQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFT DYYMN WVKQSRGKSLE WIG DINPNNGGTNYNQKFKG KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAV YYCA KEGPPGAMDY WGQGTSTVTVSS	35
119G5 VL	NIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITC KASQSVSNHVA WYQQKPGQSPKLLI Y YVSNRSI GVDPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC QQVYSSPFT FGGGTRLEMK	36
85B10 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT AYYVN WVKQSHGKSLEW IG DINPNNGGTNYNQKFKG KATLTVDMSSTAYMELRSLTSEDSAVY YCA KEGPPGAMDY WGQGTSTVTVSS	37
85B10 VL	SIVLTQTPKFLLVSAGDRVITITC KASQSVSNNA WYQQKPGQSPKLLIY Y ASN PYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITITTVQAEDLAVYFC QQVYSSPFT FGGGTKLEMK	38
95F10 VH	QVQLQQSGPEVVNPGASVKISCKASGYTFT DYYMN WVKQSRGKSLE WIG DINPNNGGTNYNQKFKD KATLTVDKSSNTAYMELRSLTSENSAV YYCA KEGPPGAMDY WGQGTSTVTVSS	39
95F10 VL	NIVMTQTPKFLLVSAGDRVITITC KASQSVSNHVA WYQQKPGQSPKLLI Y YVSNRYI GVDPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFC QQVYSSPF TFGGGTRLEMK	40

表1-1.14G12的CDR序列

14G12	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	H	41
CDRH2	RIYREDGHTNYNGKFKG RIYRED A HTNYNGKFKG RIYREDGHTNYN A KFKG RIYREDGHTNYN Q KFKG RIYRE E GHTNYN Q KFKG RIYRE E GHTNYN E KFKG RIYRE S GHTNYN Q KFKG RIYRE S GHTNYN E KFKG	42 47 48 49 50 51 52 53
CDRH3	GGAMDY	43
CDRL1	RASQDISNYLN	44
CDRL2	YTSRLHS	45
CDRL3	QQDNTLPWT G N D N T L P W T A N D N T L P W T	46 264 265

表1-2.393E9的CDR序列

393E9	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	DYYMS	54
CDRH2	FIRNKGNGYTTENSASVKG FIRNKG N A Y T T E Y SASVKG FIRNKG N T Y T T E Y SASVKG FIRNKG N A Y T T E N A SVK G	55 60 61 62 63 266

	FIRNKGN[T]YTTEN[A]ASVKG FIRNKGN[A]YTTENSASVKG FIRNKGNGYTTE[Y]SASVKG	267
CDRH3	YRGNPYAMDY	56
CDRL1	RASESVEFYGTSFLQ	57
CDRL2	GASNVES	58
CDRL3	QQSRKVPST	59

表1-3.113H5的CDR序列

113H5	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SGYYWN	64
CDRH2	YINSDGSNNYNPSLKN	65
CDRH3	EEYDYWFAY	66
CDRL1	KASQNVGTNVA	67
CDRL2	SASNRYS	68
CDRL3	QQYNSYPYT	69

表1-4.159D5的CDR序列

159D5	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	NFGMH	70
CDRH2	YISSGSSTFYADSVKG YISSGSSTFYAD[A]VKG	71 76
CDRH3	SPAYRYGLDY	72
CDRL1	RASQSVSSSTFSYMH	73
CDRL2	SSSNLES	74
CDRL3	QHSWEIPYT	75

表1-5.24F10的CDR序列

24F10	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	DYGMH	77
CDRH2	YISSGTSTIYYTDTVKG	78
CDRH3	GGDGYRSTMDY	79
CDRL1	RASQSVSSSSYSYMH	80
CDRL2	SASNLAS	81
CDRL3	QHSWEVPRT	82

表1-6.493E10的CDR序列

493E10	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SFGMH	83
CDRH2	YISSGSSTIYYADTVKG	84
CDRH3	NRAYHREAMDY	85
CDRL1	RASQSVSSSSYNMH	86
CDRL2	SASNLES	87

CDRL3	QHSWEIPYT	88
-------	-----------	----

表1-7.257F1的CDR序列

257F1	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SYGLN	89
CDRH2	EIYPRSENTHYNEKFKG	90
CDRH3	GDWDFDH	91
CDRL1	SASSSVSYMN	92
CDRL2	GISNLAS	93
CDRL3	QQRSSYPRT	94

表1-8.353H11的CDR序列

353H11	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SYWMH	95
CDRH2	NINPSNGNTNYNEKFKN	96
	NINPSNANTNYNEKFKN	101
	NINPSNQNTNYNEKFKN	102
	NINPSNENTNYNEKFKN	103
	NINPSQNGNTNYNEKFKN	104
CDRH3	GGWDFDY	97
CDRL1	SASSSVRYMH	98
CDRL2	DTSKLTS	99
CDRL3	QLWTSKPPWT	100

表1-9.367B8的CDR序列

367B8	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SYWMH	105
CDRH2	NINPSNGNTNYNERFKS	106
CDRH3	GGWDFDY	107
CDRL1	SASSSVRYIH	108
CDRL2	DTSKLTS	109
CDRL3	QQWTSKPPWT	110

表1-10.389G2的CDR序列

389G2	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SYWMH	111
CDRH2	NINPSNGNTNYNERFKS	112
CDRH3	GGWDFDY	113
CDRL1	SASSSVRYIH	114
CDRL2	DTSKLTS	115
CDRL3	QQWTSKPPWT	116

表1-11.109H7的CDR序列

109H7	序列	SEQ ID NO:
--------------	-----------	-------------------

CDRH1	GYWIE	117
CDRH2	ETLPGRGSTNYNEKFKG	118
CDRH3	GRRDFDY	119
CDRL1	SASQGINNYLN	120
CDRL2	YTSSLHS	121
CDRL3	QQFSKLPFT	122

表1-12.286B4的CDR序列

286B4	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	NNYYWN	123
CDRH2	YITYDGSNNYNPSLKN YITYDASNNYNPSLKN	124 129
CDRH3	GGGQLRFDY	125
CDRL1	KASQSVSNEVT	126
CDRL2	YASNRYT	127
CDRL3	QQDYSSPWT	128

表1-13.37G6的CDR序列

37G6	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SYWIT	130
CDRH2	DIYPGSGTINYNEKFKS	131
CDRH3	SDGNYYFDY	132
CDRL1	RASSSVNYMH	133
CDRL2	ATSNLAS	134
CDRL3	QQWSSNPPT	135

表1-14.267B5的CDR序列

267B5	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SSYYWN	136
CDRH2	YISYDGSNNYNPSLKN	137
CDRH3	SWDGGYAMDN	138
CDRL1	KASQSVSNDVA	139
CDRL2	FASNRYT	140
CDRL3	QQDYTSPWT	141

表1-15.425G1的CDR序列

425G1	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	DTYMH	142
CDRH2	RIDPANGHTIFASKFQG	143
CDRH3	FTMVVVPWYFDV	144
CDRL1	KASQDVSTAVA	145
CDRL2	WASTRHT	146
CDRL3	QQHYSSPLT	147

表1-16.449H9的CDR序列

449H9	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	NYWMN	148
CDRH2	QIYPGDGDTNYNGKFKN	149
CDRH3	HYDYPYYYAMDY	150
CDRL1	RASQDIGIALT	151
CDRL2	ATSSLDS	152
CDRL3	LQYIISPYT	153

表1-17.49C5的CDR序列

49C5	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	DYYMN	154
CDRH2	DINPYSGGATNNQKFKG	155
CDRH3	GSIIYDSTANYFD Y	156
CDRL1	RASENIYSYLA	157
CDRL2	NAKSLTE	158
CDRL3	QHHYVTPWT	159

表1-18.119G5的CDR序列

119G5	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	DYYMN	160
CDRH2	DINPNNGGTNYNQKFKG DINPNQGGTNYNQKFKG	161 166
CDRH3	EGPPGAMDY	162
CDRL1	KASQSVSNHVA	163
CDRL2	YVSNRSI	164
CDRL3	QQVYSSPFT	165

表1-19.85B10的CDR序列

85B10	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	AYYVN	167
CDRH2	DINPNNGGTNYNQKFKG DINPNQGGTNYNQKFKG	168 173
CDRH3	EGPPGAMDY	169
CDRL1	KASQSVSNNVA	170
CDRL2	YASNPYT	171
CDRL3	QQVYSSPFT	172

表1-20.95F10的CDR序列

95F10	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	DYYMN	174
CDRH2	DINPNNGGTNYNQKFKD	175

	DINPNQGGTNYNQKFKD	180
CDRH3	EGPPGAMDY	176
CDRL1	KASQSVSNHVA	177
CDRL2	YVSNRYI	178
CDRL3	QQVYSSPFT	179

实施例2:mAb的结合亲和力

[0182] 使用捕获方法通过Biacore测试来自这些克隆的嵌合mAb对重组5T4蛋白(人5T4-his标签)的结合。用蛋白A芯片捕获mAb。以30 μ l/min的流速将人5T4-his标签蛋白的系列稀释液注射到捕获的抗体上2分钟-3分钟。允许抗原解离360秒-1000秒。所有实验均在Biacore T200上进行。使用Biacore T200评价软件进行数据分析。

[0183] 如下表2的结果所示,大多数所测试抗体对重组人5T4蛋白表现出纳摩尔或亚纳摩尔的结合亲和力。

表2.通过Biacore测量的亲和力

Abs	5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
14G12	5.38 x 10 ⁵	2.22 x 10 ⁻⁴	4.13 x 10 ⁻¹⁰
393E9	3.24 x 10 ⁶	1.83 x 10 ⁻⁴	5.65 x 10 ⁻¹¹
113H5	3.48 x 10 ⁵	1.92 x 10 ⁻⁴	5.52 x 10 ⁻¹⁰
159D5	1.16 x 10 ⁶	2.40 x 10 ⁻⁴	2.06 x 10 ⁻¹⁰
24F10	4.18 x 10 ⁵	1.26 x 10 ⁻⁴	3.02 x 10 ⁻¹⁰
493E10	6.42 x 10 ⁵	4.02 x 10 ⁻⁴	6.26 x 10 ⁻¹⁰
257F1	1.86 x 10 ⁵	2.75 x 10 ⁻⁴	1.48 x 10 ⁻⁹
353H11	4.01 x 10 ⁵	9.63 x 10 ⁻⁵	2.40 x 10 ⁻¹⁰
367B8	5.88 x 10 ⁵	1.67 x 10 ⁻⁴	2.85 x 10 ⁻¹⁰
389G2	2.82 x 10 ⁵	1.38 x 10 ⁻⁴	4.90 x 10 ⁻¹⁰
109H7	6.45 x 10 ⁵	3.91 x 10 ⁻⁴	6.06 x 10 ⁻¹⁰
286B4	7.28 x 10 ⁴	6.99 x 10 ⁻⁵	9.60 x 10 ⁻¹⁰
37G6	8.23 x 10 ⁵	4.86 x 10 ⁻⁴	5.90 x 10 ⁻¹⁰
267B5	1.58 x 10 ⁵	2.55 x 10 ⁻⁴	1.62 x 10 ⁻⁹
425G1	1.31 x 10 ⁵	2.15 x 10 ⁻⁴	1.64 x 10 ⁻⁹
449H9	3.01 x 10 ⁵	1.15 x 10 ⁻⁴	3.81 x 10 ⁻¹⁰
49C5	5.44 x 10 ⁵	3.37 x 10 ⁻⁴	6.20 x 10 ⁻¹⁰
119G5	1.30 x 10 ⁵	1.59 x 10 ⁻⁴	1.22 x 10 ⁻⁹
85B10	1.58 x 10 ⁵	1.25 x 10 ⁻⁴	7.92 x 10 ⁻¹⁰
95F10	3.55 x 10 ⁵	1.20 x 10 ⁻⁴	3.37 x 10 ⁻¹⁰

[0184] 进行ELISA测试以评估嵌合抗体分别与人和食蟹猴的结合。产生靶向5T4的那普妥莫单抗(NeoTX)的抗体部分(在本公开中缩写为那普妥莫单抗)并用作基准。

[0185] 简言之,用1 μ g/ml的人和食蟹猴5T4蛋白的PBS溶液,以100 μ l/孔包被微量滴定板,4 $^{\circ}$ C过夜,然后用150 μ l/孔的1% BSA封闭。将嵌合抗体的系列稀释液加入到每个孔中,并在RT下孵育1小时。用PBS/Tween洗涤板,然后与缀合有辣根过氧化物酶(HRP)的小鼠抗人IgG Fc抗体一起在RT下孵育30分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。所有5T4嵌合mAb结合人和食蟹猴5T4(图1至图2和表3)。那普妥莫单抗对食蟹猴5T4表现出非常弱的交叉活性。

实施例3:对5T4抗原的结合活性

3.1物种间活性

表3.通过ELISA评估的克隆的物种间活性

克隆/EC ₅₀ (nM)	人5T4	食蟹猴5T4
那普妥莫单抗	0.15	2.02
159D5	0.20	0.19
14G12	0.19	0.17
24F10	0.18	0.21
37G6	0.13	0.28

克隆/EC ₅₀ (nM)	人5T4	食蟹猴5T4
159D5	0.39	0.20
109H7	0.31	0.19
113H5	0.52	0.82
119G5	0.32	0.20
85B10	0.34	0.17
95F10	0.24	0.17
49C5	0.60	0.18

克隆/EC ₅₀ (nM)	人5T4	食蟹猴5T4
那普妥莫单抗	0.48	0.16
286B4	0.35	0.22
257F1	0.56	-
267B5	0.31	0.17

克隆/EC ₅₀ (nM)	人5T4	食蟹猴5T4
那普妥莫单抗	0.52	-
159D5	-	0.11
257F1	-	0.11
353H11	0.73	0.13
367B8	0.86	0.13
393E9	0.37	0.14
425G1	0.29	0.23
449H9	0.37	0.10

克隆/EC ₅₀ (nM)	人5T4	食蟹猴5T4
那普妥莫单抗	0.11	0.17
389G2	0.23	0.19

克隆/EC ₅₀ (nM)	人5T4	食蟹猴5T4
159D5	0.24	0.18
493E10	0.28	0.25

3.2通过竞争性ELSA进行的表位分区

[0186] 进行竞争性ELISA,以基于与人5T4的结合表位对测试的5T4 mAb进行分类。

[0187] 简言之,用0.5μg/ml的人5T4蛋白的PBS溶液,以100μl/孔包被微量滴定板,4℃过夜,然后用150μl/孔的1% BSA封闭。将嵌合抗体的系列稀释液以及0.2μg/ml生物素缀合的参比mAb加入到每个孔中,并在RT下孵育1小时。用PBS/Tween洗涤平板,然后用链霉亲和素-HRP在RT下孵育15分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。根据与参比mAb的竞争表现,将5T4 mAb分为四个区段(区段A-D),如图3至图8和表4所示。

表4.表位类别

类别	示例性克隆
----	-------

区段A	那普妥莫单抗、14G12、393E9、113H5
区段B	159D5, 24F10, 493E10
区段C	257F1, 353H11, 367B8, 389G2, 109H7
区段D	286B4, 37G6, 267B5, 425G1, 449H9, 49C5, 119G5, 85B10, 95F10

3.3 FACS测试

[0188] 基于细胞的结合：FACS用于评估所有测试的嵌合mAb对表达人5T4的CHO-K1 (CHO-K1-hu5T4)的结合活性。

[0189] 简言之，CHO-K1-hu5T4细胞用FACS缓冲液洗涤，并在4℃下用系列稀释的5T4嵌合mAb分入每个孔中30分钟。用FACS缓冲液洗涤后，将PE山羊抗人IgG Fc二抗 (eBioscience™, Invitrogen) 加入到每个孔中，并且在4℃孵育30分钟。用FACS缓冲液将样品洗涤两次。用MACSQuant分析仪16评估PE的平均荧光强度 (MFI)。如图9所示，所有测试的5T4嵌合mAb与CHO-K1-hu5T4细胞结合，并且不同区段中的抗体显示不同的结合活性。

实施例4. 14G12的人源化

[0190] 采用14G12可变区基因来产生人源化mAb。在该过程的第一步中，将14G12的VH和VK的氨基酸序列与可用的人Ig基因序列数据库进行比较，以找到总体上最匹配的人种系Ig基因序列。

[0191] 用于CDR移植的人种系的序列以及所得的人源化序列列于表5中。

表5-1. 14G12的人源化—第1轮

名称	序列	SEQ ID NO:
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPKGKLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSSTTAYMQLTSLTSEDSAVY FCANGGAMDYWGQGTSVTVSS	1

14G12 VH.V1 (移植)	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYAFSSSWMNWVQAPGKGLE WMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADTSTD ~~TAY~~ MELSSLRSED ~~TAV~~ YYCATGGAMDYWGQGT ~~LT~~ VTVSS	181
14G12 VH.V2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYAFSSSWMNWVQAPGKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADTSTD ~~TAY~~ MELSSLRSED ~~TAVY~~ FCANGGAMDYWGQGT ~~LT~~ VTVSS	182
14G12 VH.V3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYAFSSSWMNWVQAPGKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRATITADTST ~~TAY~~ MELSSLRSED ~~TAVY~~ FCANGGAMDYWGQGT ~~LT~~ VTVSS	183
14G12 VH.V4	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYAFSSSWMNWVQAPGKGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFKGRATITADTST ~~TAY~~ MELSSLRSED ~~SAVY~~ FCANGGAMDYWGQGT ~~LT~~ VTVSS	184
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTLPWT FGGGTKLEIK	2
14G12 VL.V1 (移植)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPED ~~IATYYC~~ QQDNTLPWT FGGGTKLEIK	185
14G12 VL.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDY ~~TFT~~ ISLQPED ~~IATYFC~~ QQDNTLPWT FGGGTKLEIK	186
14G12 VL.V3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPED ~~IATYFC~~ QQDNTLPWT FGGGTKLEIK	187
14G12 VL.V4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDY ~~TFT~~ ISLQPED ~~IATYFC~~ QQDNTLPWT FGGGTKLEIK	188

表5-2. 来自14G12的人源化抗体—第1轮

VL VH	14G12-VL.V1	14G12-VL.V2	14G12-VL.V3	14G12-VL.V4	14G12-VL
14G12-VH.V1	Hu14G12-1	Hu14G12-2	Hu14G12-3	Hu14G12-4	
14G12-VH.V2	Hu14G12-5	Hu14G12-6	Hu14G12-7	Hu14G12-8	
14G12-VH.V3	Hu14G12-9	Hu14G12-10	Hu14G12-11	Hu14G12-12	
14G12-VH.V4	Hu14G12-13	Hu14G12-14	Hu14G12-15	Hu14G12-16	
14G12-VH					14G12-C

表5-3. 14G12的人源化—第2轮

名称	序列	SEQ ID NO:
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRP ~~GK~~ GLEW IGRIYREDGHTNYNGKFKGKATLTADKSS ~~TAY~~ MQLTSLTSEDS ~~AVYFC~~ ANGGAMDYWGQGT ~~SV~~ TVTVSS	1
14G12 VH0 (移植)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSSWMNWVRQAPGQGLE WMGRIYREDGHTNYNGKFKGRATITADKST ~~STAY~~ MELSSLRSED ~~TAVY~~ YCARGGAMDYWGQGT ~~TV~~ TVTVSS	189

14G12 VH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWV K QAPGQGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFK K AT L TADKSTSTAYMELSSLRSED T AVY F CANGGAMDYWGQGT T TVSS	190
14G12 VH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWV K QAPGQGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFK R AT L TADKSTSTAYMELSSLRSED T AVY F CANGGAMDYWGQGT T TVSS	191
14G12 VH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWV K QAPGQGLE WIGRIYREDGHTNYNGKFK R ATITADKSTSTAYMELSSLRSED T AVY F CANGGAMDYWGQGT T TVSS	192
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTLPWTFG GGTKLEIK	2
14G12 VL1 (移植)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKVPKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQQDNTLPWTF GGG T KLEIK	193
14G12 VL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKVPKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDVATY F CQQDNTLPWTF GGG T KLEIK	194

表5-4. 来自14G12的人源化抗体—第2轮

VL VH	14G12-VL1	14G12-VL2	14G12-VL
14G12-VH1	Hu14G12-17	Hu14G12-18	
14G12-VH2	Hu14G12-19	Hu14G12-20	
14G12-VH3	Hu14G12-21	Hu14G12-22	
14G12-VH			14G12-C

表5-5. 14G12的人源化—第3轮

名称	序列	SEQ ID NO:
14G12 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWV K QRP G KGL EWIGRIYREDGHTNYNGKFK K ATLTADKSSTTAYMQ L TS L TSEDS AVYFCANGGAMDYWGQGT S TVSS	1
14G12 hVH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY A FSSSWMNWVRQAPGQ G LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKST T TAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGT L TVSS	195
hVH1移植	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSSWMNWVRQAPGQ G LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGT L TVSS	196
14G12 hVH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY A FSSSWMNWVRQAPGQ G LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSIT T AYMELSRLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGT L TVSS	197
hVH2移植	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY T FSSSWMNWVRQAPGQ G LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSIT T AYMELSRLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGT L TVSS	198
14G12 hVH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY A FSSSWMNWVRQAPGQ G LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKST T TAYMELSSLRSE	199

	DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	
hVH3移植	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTTTGYMELSSLRSE DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	200
14G12 hVH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQR LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSATTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	201
hVH4移植	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMNWVRQAPGQR LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTITADKSATTAYMELSSLRSED TAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	202
14G12 hVH5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTTTAYMELRSLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	203
hVH5移植	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGLTVTVSS	204
14G12 VL	DIQMTQSTSSLSASLGDRVITISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGKLEIK	2
14G12 hVL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLPEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	205
hVL1移植	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLPEDIATYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	206
14G12 hVL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDVATYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	207
hVL2移植	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	208
14G12 hVL3	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRL IYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDVAVYFCQQDNTLP WTFGGGKVEIK	209
hVL3移植	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPRL IYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYFCQQDNTLP WTFGGGKVEIK	210
14G12 hVL4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQDISNYLNWYQQKPGQPPKL LIYYTSRLHSGVPDRFSGSGSGTDYTLTISSLQAEDIAVYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	211
hVL4移植	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQDISNYLNWYQQKPGQPPKL LIYYTSRLHSGVPDRFSGSGSGTDYTLTISSLQAEDIAVYFCQQDNT LPWTFGGGKVEIK	212
14G12 hVL5	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLPDDVATYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	213
hVL5移植	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLPDDFATYFCQQDNTL PWTFGGGKVEIK	214

表5-6. 来自14G12的人源化抗体—第3轮

VL VH	14G12-hVL1	14G12-hVL2	14G12-hVL3	14G12-hVL4	14G12-hVL5	14G12-VL
14G12-hVH1	Hu14G12-23	Hu14G12-24	Hu14G12-25	Hu14G12-26	Hu14G12-27	
14G12-hVH2	Hu14G12-28	Hu14G12-29	Hu14G12-30	Hu14G12-31	Hu14G12-32	
14G12-hVH3	Hu14G12-33	Hu14G12-34	Hu14G12-35	Hu14G12-36	Hu14G12-37	
14G12-hVH4	Hu14G12-38	Hu14G12-39	Hu14G12-40	Hu14G12-41	Hu14G12-42	
14G12-hVH5	Hu14G12-43	Hu14G12-44	Hu14G12-45	Hu14G12-46	Hu14G12-47	
14G12-VH						14G12-C

实施例5:14G12人源化抗体对人5T4抗原的结合活性

[0192] 本实施例测试了14G12人源化抗体对人5T4蛋白的结合活性。

5.1 14G12人源化抗体对5T4的ELISA结合

[0193] 为了评估14G12人源化抗体对人5T4的结合活性,对14G12嵌合抗体连同14G12人源化mAb一起进行ELISA测试。

[0194] 简言之,将微量滴定板用1 μ g/ml人5T4-His蛋白的PBS溶液以100 μ l/孔在4 $^{\circ}$ C包被过夜,然后用150 μ l/孔的1% BSA封闭。将抗体的系列稀释液加入到每个孔中,并在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBS/Tween洗涤平板,然后与山羊抗人IgG-HRP在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如图10和表6所示,大多数人源化抗体以高活性结合人5T4。

表6. 人源化14G12抗体对人5T4的结合活性

Abs	EC50 (μ g/ml)
14G12-C	0.0084
Hu14G12-1	0.021
Hu14G12-2	0.021
Hu14G12-3	0.026
Hu14G12-4	0.019
Hu14G12-5	0.014

Abs	EC50 (μ g/ml)
Hu14G12-6	0.010
Hu14G12-7	0.015
Hu14G12-8	0.015
Hu14G12-9	0.012
Hu14G12-10	0.015
Hu14G12-11	0.015

Abs	EC50 (μg/ml)
Hu14G12-12	0.019
Hu14G12-13	0.018
Hu14G12-14	0.014
Hu14G12-15	0.014
Hu14G12-16	0.017

Abs	EC50 (nM)
14G12-C	0.40
Hu14G12-17	0.52
Hu14G12-18	0.31
Hu14G12-19	0.40
Hu14G12-20	0.32
Hu14G12-21	0.40
Hu14G12-22	0.45

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0076
Hu14G12-33	0.011
Hu14G12-35	0.013
Hu14G12-36	0.0068
Hu14G12-37	0.011
Hu14G12-38	0.0064
Hu14G12-39	0.0069
Hu14G12-40	0.028
Hu14G12-41	0.0047
Hu14G12-42	0.0078
Hu14G12-43	0.0064

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0082
Hu14G12-44	0.0075
Hu14G12-45	0.0082
Hu14G12-46	0.023
Hu14G12-47	0.014

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.0057
Hu14G12-23	0.0071
Hu14G12-24	0.0049
Hu14G12-25	0.0060
Hu14G12-26	0.0069
Hu14G12-27	0.0078
Hu14G12-28	0.010

Abs	EC50 (μg/ml)
14G12-C	0.010
Hu14G12-29	0.0067
Hu14G12-30	0.010

Hu14G12-31	0.0084
Hu14G12-32	0.0093
Hu14G12-34	0.0087

5.2 14G12人源化抗体对5T4的基于细胞的结合

[0195] 为了评估14G12人源化抗体对人5T4的基于细胞的结合特性,在CHOK1-hu5T4细胞中通过FACS分析所测试抗体。在FACS缓冲液中,将每孔中总数为 1×10^5 个的CHOK1-hu5T4细胞与系列稀释的抗体在4℃孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在4℃孵育30分钟。洗涤后,通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图11所示,一些列出的14G12人源化抗体显示出与14G12嵌合抗体相当的结合能力。

5.3 14G12人源化抗体对5T4的蛋白质亲和力排序

[0196] 使用捕获方法通过Biacore测试14G12人源化抗体与重组5T4蛋白(人5T4-his标签)的结合。用蛋白A芯片捕获mAb。以 $30 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速将人5T4-his标签蛋白的系列稀释液注射到捕获的抗体上120秒-180秒。允许抗原解离360秒-1000秒。所有实验均在Biacore T200上进行。使用Biacore T200评价软件进行数据分析。结果示于下表7中。

表7.通过Biacore测量的亲和力排序

Abs	人5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
14G12-C	4.01×10^5	3.36×10^{-4}	8.39×10^{-10}
Hu14G12-1	2.83×10^5	1.21×10^{-2}	4.27×10^{-8}
Hu14G12-2	2.03×10^5	4.36×10^{-3}	2.15×10^{-8}
Hu14G12-3	2.00×10^5	5.50×10^{-3}	2.75×10^{-8}
Hu14G12-4	2.14×10^5	2.67×10^{-3}	1.25×10^{-8}
Hu14G12-5	2.48×10^5	1.46×10^{-3}	5.88×10^{-9}
Hu14G12-6	2.88×10^5	7.70×10^{-4}	2.68×10^{-9}
Hu14G12-7	3.36×10^5	8.46×10^{-4}	2.52×10^{-9}
Hu14G12-8	3.40×10^5	4.64×10^{-4}	1.36×10^{-9}
Hu14G12-9	2.02×10^5	1.07×10^{-3}	5.31×10^{-9}
Hu14G12-10	2.12×10^5	5.12×10^{-4}	2.42×10^{-9}
Hu14G12-11	2.41×10^5	5.23×10^{-4}	2.17×10^{-9}
Hu14G12-12	2.74×10^5	6.55×10^{-4}	2.39×10^{-9}
Hu14G12-13	1.98×10^5	1.21×10^{-3}	6.12×10^{-9}
Hu14G12-14	2.07×10^5	7.01×10^{-4}	3.39×10^{-9}
Hu14G12-15	2.62×10^5	8.37×10^{-4}	3.19×10^{-9}
Hu14G12-16	2.69×10^5	4.99×10^{-4}	1.85×10^{-9}

Abs	人5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)

14G12-C	6.15×10^5	3.30×10^{-4}	5.37×10^{-10}
Hu14G12-18	3.92×10^5	1.78×10^{-3}	4.55×10^{-9}
Hu14G12-23	3.52×10^5	9.08×10^{-4}	2.58×10^{-9}
Hu14G12-28	2.95×10^5	7.14×10^{-4}	2.42×10^{-9}
Hu14G12-29	5.14×10^5	1.10×10^{-3}	2.14×10^{-9}
Hu14G12-32	3.55×10^5	9.79×10^{-4}	2.76×10^{-9}
Hu14G12-37	1.34×10^6	1.42×10^{-3}	1.05×10^{-9}
Hu14G12-43	1.89×10^6	1.60×10^{-3}	8.44×10^{-10}
Hu14G12-44	1.40×10^6	1.97×10^{-3}	1.41×10^{-9}
Hu14G12-47	4.38×10^5	9.21×10^{-4}	2.10×10^{-9}

实施例6.393E9抗体的人源化

[0197] 采用393E9可变区基因来产生人源化mAb。在该过程的第一步中,将393E9的VH和VK的氨基酸序列与可用的人Ig基因序列数据库进行比较,以找到总体上最匹配的人种系Ig基因序列。

[0198] 用于CDR移植的人种系的序列以及所得的人源化序列列于表8中。

表8.393E9的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
393E9_VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKAL EWLGFIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRAE DSATYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	3
393E9 VH-G57A (CDR2 突变)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKAL EWLGFIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRAE DSATYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSTVTVSS	215
393E9 VH.V1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSLTVTVSS	216
393E9 VH.V2	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKGL EWVGFIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR EDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSLTVTVSS	217
393E9 VH.V3	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSLTVTVSS	218
393E9 VH.V4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR TEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSLTVTVSS	219
393E9 VH.V5	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL EWVGFIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR DTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSLTVTVSS	220
393E9 VH.V6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGL LEWVGFIIRNKGNGYTTENSASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGTSLTVTVSS	221
393E9 VL	DIVLTQFPASLAVSLGQRATISCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQP PKLLIYGASNVESGVPARFSGSGSGTDFSLSIHPVEEDDIAMYFCQ	4

	<u>QSRKVPSTFGGGTKLEIK</u>	
393E9 VL.V1	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQ PPKLLIYGASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDIAVYFCQ <u>QSRKVPSTFGGGTKVEIK</u>	222
393E9 VL.V2	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQ APRLLIYGASNVESGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYFCQ <u>SRKVPSTFGGGTKVEIK</u>	223
393E9 VL.V3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGK APKLLIYGASNVESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDIAVYFCQ <u>QSRKVPSTFGGGTKVEIK</u>	224
393E9 VL.V4	DIVLTQSPSLPVTTPGEPASISCRASESVEFYGTSFLQWYLQKPGQS PQLLIYGASNVESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDIGVYFCQ <u>QSRKVPSTFGGGTKVEIK</u>	225
393E9 VL.V5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASESVEFYGTSFLQWYQQKPGQ APRLLIYGASNVESGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDIAVYFCQ <u>SRKVPSTFGGGTKVEIK</u>	226

表8-2. 来自393E9的人源化抗体

	393E9 VH.V1	393E9 VH.V2	393E9 VH.V3	393E9 VH.V4	393E9 VH.V5	393E9 VH.V6
393E9 VL.V1	393E9_hVH1 _hVL1	393E9_hVH 2_hVL1	393E9_hVH3 _hVL1	393E9_hVH 4_hVL1	393E9_hVH 5_hVL1	393E9_hVH6 _hVL1
393E9 VL.V2	393E9_hVH1 _hVL2	393E9_hVH 2_hVL2	393E9_hVH3 _hVL2	393E9_hVH 4_hVL2	393E9_hVH 5_hVL2	393E9_hVH6 _hVL2
393E9 VL.V3	393E9_hVH1 _hVL3	393E9_hVH 2_hVL3	393E9_hVH3 _hVL3	393E9_hVH 4_hVL3	393E9_hVH 5_hVL3	393E9_hVH6 _hVL3
393E9 VL.V4	393E9_hVH1 _hVL4	393E9_hVH 2_hVL4	393E9_hVH3 _hVL4	393E9_hVH 4_hVL4	393E9_hVH 5_hVL4	393E9_hVH6 _hVL4
393E9 VL.V5	393E9_hVH1 _hVL5	393E9_hVH 2_hVL5	393E9_hVH3 _hVL5	393E9_hVH 4_hVL5	393E9_hVH 5_hVL5	393E9_hVH6 _hVL5

实施例7: 393E9人源化抗体对人5T4抗原的结合活性

[0199] 本实施例测试了393E9人源化抗体对人5T4蛋白的结合活性。

7.1 393E9人源化抗体对5T4的ELISA结合

[0200] 为了评估393E9人源化抗体对人5T4的结合活性,对393E9嵌合抗体(393E9-C)连同393E9人源化mAb一起进行ELISA测试。

[0201] 简言之,将微量滴定板用1 μ g/ml人5T4-His蛋白的PBS溶液以100 μ l/孔在4 $^{\circ}$ C包被过夜,然后用150 μ l/孔的1% BSA封闭。将从20nM开始的抗体的4倍稀释液加入到每个孔中,并且在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBS/Tween洗涤平板,然后与山羊抗人IgG-HRP在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如图12和表9所示,大多数人源化抗体以高活性结合人5T4。

表9. 人源化393E9抗体对人5T4的结合活性

Abs	EC50 (nM)
393E9-C	0.27
393E9_hVH1_hVL1	0.18
393E9_hVH1_hVL2	0.16
393E9_hVH1_hVL3	0.085
393E9_hVH1_hVL4	0.13
393E9_hVH1_hVL5	0.13
393E9_hVH2_hVL1	0.17
393E9_hVH2_hVL2	0.12
393E9_hVH2_hVL3	0.11
393E9_hVH2_hVL4	0.12
393E9_hVH2_hVL5	0.11
393E9_hVH3_hVL1	0.16

Abs	EC50 (nM)
393E9-C	0.13
393E9_hVH3_hVL2	0.20
393E9_hVH3_hVL3	0.14
393E9_hVH3_hVL4	0.095
393E9_hVH3_hVL5	0.12
393E9_hVH4_hVL1	0.13
393E9_hVH4_hVL2	0.12
393E9_hVH4_hVL3	0.13
393E9_hVH4_hVL4	0.16
393E9_hVH4_hVL5	0.22
393E9_hVH5_hVL1	0.16
393E9_hVH5_hVL2	0.27

Abs	EC50 (nM)
393E9-C	0.23
393E9_hVH5_hVL3	0.12
393E9_hVH5_hVL4	0.17
393E9_hVH5_hVL5	0.11
393E9_hVH6_hVL1	0.11
393E9_hVH6_hVL2	0.11
393E9_hVH6_hVL3	0.052
393E9_hVH6_hVL4	0.14
393E9_hVH6_hVL5	0.19

7.2 393E9人源化抗体对5T4的基于细胞的结合

[0202] 为了评估393E9人源化抗体对人5T4的基于细胞的结合特性,在CHOK1-hu5T4细胞中通过FACS分析所测试抗体。在FACS缓冲液中,将每孔中总数为 1×10^5 个的CHOK1-hu5T4细胞与从50nM开始的3倍系列稀释的抗体在4℃孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在4℃孵育30分钟。洗涤后,通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图13所示,一些列出的393E9人源化抗体显示出与393E9嵌合抗体相当的结合能力。

7.3 393E9人源化抗体对5T4的蛋白质亲和力排序

[0203] 使用捕获方法通过Biacore测试393E9人源化抗体与重组5T4蛋白(人5T4-his标签)的结合。用蛋白A芯片捕获mAb。以30 μ l/min的流速将人5T4-his标签蛋白的系列稀释液注射到捕获的抗体上3分钟。允许抗原解离280秒-800秒。所有实验均在Biacore T200上进行。使用Biacore T200评价软件进行数据分析。结果示于下表10中。

表10.通过Biacore测量的亲和力排序

Abs	人5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
393E9-C	2.31 x 10 ⁵	1.07 x 10 ⁻⁴	4.63 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH1_hVL4	1.99 x 10 ⁵	1.19 x 10 ⁻⁴	5.99 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH1_hVL5	2.17 x 10 ⁵	1.12 x 10 ⁻⁴	5.15 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH2_hVL1	1.90 x 10 ⁵	1.04 x 10 ⁻⁴	5.47 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH2_hVL2	2.01 x 10 ⁵	1.20 x 10 ⁻⁴	5.94 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH2_hVL3	1.74 x 10 ⁵	1.20 x 10 ⁻⁴	6.84 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH2_hVL4	1.95 x 10 ⁵	1.27 x 10 ⁻⁴	6.50 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH2_hVL5	2.17 x 10 ⁵	1.22 x 10 ⁻⁴	5.60 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH3_hVL1	2.13 x 10 ⁵	1.08 x 10 ⁻⁴	5.06 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH3_hVL3	1.93 x 10 ⁵	1.11 x 10 ⁻⁴	5.74 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH3_hVL4	2.15 x 10 ⁵	1.23 x 10 ⁻⁴	5.73 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH3_hVL5	2.38 x 10 ⁵	1.20 x 10 ⁻⁴	5.02 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH4_hVL2	2.04 x 10 ⁵	1.23 x 10 ⁻⁴	6.03 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH4_hVL3	1.81 x 10 ⁵	1.28 x 10 ⁻⁴	7.06 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH4_hVL5	2.17 x 10 ⁵	1.29 x 10 ⁻⁴	5.95 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH5_hVL3	1.70 x 10 ⁵	1.19 x 10 ⁻⁴	7.00 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH5_hVL4	1.84 x 10 ⁵	1.25 x 10 ⁻⁴	6.79 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH5_hVL5	2.02 x 10 ⁵	1.21 x 10 ⁻⁴	5.98 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH6_hVL2	1.99 x 10 ⁵	1.37 x 10 ⁻⁴	6.87 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH6_hVL3	1.79 x 10 ⁵	1.24 x 10 ⁻⁴	6.91 x 10 ⁻¹⁰
393E9_hVH6_hVL5	2.12 x 10 ⁵	1.22 x 10 ⁻⁴	5.74 x 10 ⁻¹⁰

实施例8.159D5抗体的人源化

[0204] 采用159D5可变区基因来产生人源化mAb。在该过程的第一步中,将159D5的VH和VK的氨基酸序列与可用的人Ig基因序列数据库进行比较,以找到总体上最匹配的人种系Ig基因序列。

[0205] 用于CDR移植的人种系的序列以及所得的人源化序列列于表11中。

表11-1.159D5的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
159D5 VH	DVQLVESGGGLVQP ~~GGSR~~ KL ~~SCTASGFTFSNFGM~~ HVVRQAPETGL EWVAYISSGSSTFY ~~YADSVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLR~~ SEDTA MYFCARSPAYYRYGLDYWGQGTTTLTVSS	7
159D5 mVH-S62A (CDR2 突变)	DVQLVESGGGLVQP ~~GGSR~~ KL ~~SCTASGFTFSNFGM~~ HVVRQAPETGL EWVAYISSGSSTFY ~~YADSVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLR~~ SEDTA MYFCARSPAYYRYGLDYWGQGTTTLTVSS	227
159D5 VH.V0 (移植)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS ~~CAASGFTFSNFGM~~ HVVRQAPGKGL EWVAYISSGSSTFY ~~YADSVKGRFTISRDN~~ SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARSPAYYRYGLDYWGQGTTTVTVSS	228
159D5 VH.V1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS ~~CAASGFTFSNFGM~~ HVVRQAPGKGL EWVAYISSGSSTFY ~~YADSVKGRFTISRDN~~ SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARSPAYYRYGLDYWGQGTTTVTVSS	229
159D5 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQP~~ PKLLIKSSSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQH SWEIPYTFGGGTKLEIK	8
159D5 VL.V0 (移植)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQP~~ PQLLIYSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	230
159D5 VL.V1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQP~~ PQLLIKSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	231
159D5 VL.V2	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQP~~ PQLLIKSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	232
159D5 VL.V3 (移植)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQ~~ PPKLLIYSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	233
159D5 VL.V4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQ~~ PPKLLIKSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	234
159D5 VL.V5	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSSSTFSYMH ~~WYQQKPGQP~~ PKLLIKSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQH SWEIPYTFGGGTKVEIK	235

表11-2. 来自159D5的人源化抗体

VL VH	159D5V L.V0	159D5V L.V1	159D5V L.V2	159D5V L.V3	159D5V L.V4	159D5V L.V5	159D5 VL
159D5-VH.V0	Hu159D 5-1	Hu159D 5-2	Hu159D 5-3	Hu159D 5-4	Hu159D 5-5	Hu159D 5-6	
159D5-VH.V1	Hu159D 5-7	Hu159D 5-8	Hu159D 5-9	Hu159D 5-10	Hu159D 5-11	Hu159D 5-12	
159D5-VH.S62A							159D5-P1
159D5-VH							159D5-C

实施例9: 159D5人源化抗体对人5T4抗原的结合活性

[0206] 本实施例测试了159D5人源化抗体对人5T4蛋白的结合活性。

9.1 159D5人源化抗体对5T4的ELISA结合

[0207] 为了评估159D5人源化抗体对人5T4的结合活性,对159D5嵌合抗体连同159D5人源化mAb一起进行ELISA测试。

[0208] 简言之,将微量滴定板用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 人5T4-His蛋白的PBS溶液以 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 在 4°C 包被过夜,然后用 $150\mu\text{l}/\text{孔}$ 的1% BSA封闭。将抗体的系列稀释液加入到每个孔中,并在 37°C 孵育1小时。用PBS/Tween洗涤平板,然后与山羊抗人IgG-HRP在 37°C 孵育30分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如图14和表12所示,大多数人源化抗体以高活性结合人5T4。

表12. 人源化159D5抗体对人5T4的结合活性

Abs	EC50 (nM)
Hu159D5-1	0.088
Hu159D5-2	0.12
Hu159D5-3	0.12
Hu159D5-4	0.094
Hu159D5-5	0.099
Hu159D5-6	0.10

Abs	EC50 (nM)
Hu159D5-7	0.097
Hu159D5-8	0.15
Hu159D5-9	0.14
Hu159D5-10	0.094
Hu159D5-11	0.12
Hu159D5-12	0.12
159D5-P1	0.13
159D5-C	0.13

9.2 159D5人源化抗体对5T4的基于细胞的结合

[0209] 为了评估159D5人源化抗体对人5T4的基于细胞的结合特性,在CHOK1-hu5T4细胞中通过FACS分析所测试抗体。在FACS缓冲液中,将每孔中总数为 1×10^5 个的CHOK1-hu5T4细胞与系列稀释的抗体在 4°C 孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在 4°C 孵育30分钟。洗涤后,通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图15所示,大多数列出的159D5人源化抗体显示出与159D5嵌合抗体相当的结合能力。

9.3 159D5人源化抗体对5T4的蛋白质亲和力排序

[0210] 使用捕获方法通过Biacore测试159D5人源化抗体与重组5T4蛋白(人5T4-his标签)的结合。用蛋白A芯片捕获mAb。以 $30\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速将50nM人5T4-his标签蛋白注射到捕获的抗体上3分钟。允许抗原解离600秒。所有实验均在Biacore T200上进行。使用Biacore T200评价软件进行数据分析。结果示于下表13中。

表13. 通过Biacore测量的亲和力排序

Abs	人5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
159D5-C	3.30×10^5	2.04×10^{-4}	6.18×10^{-10}
Hu159D5-1	7.37×10^4	2.94×10^{-4}	3.99×10^{-9}
Hu159D5-2	2.87×10^5	2.27×10^{-4}	7.89×10^{-10}
Hu159D5-3	2.35×10^5	2.40×10^{-4}	1.02×10^{-9}
Hu159D5-4	6.02×10^4	4.26×10^{-4}	7.07×10^{-9}
Hu159D5-5	5.56×10^4	5.61×10^{-4}	1.01×10^{-8}
Hu159D5-6	2.52×10^5	1.79×10^{-4}	7.10×10^{-10}
Hu159D5-7	2.21×10^5	2.53×10^{-4}	1.14×10^{-9}
Hu159D5-8	8.40×10^4	3.52×10^{-4}	4.19×10^{-9}
Hu159D5-9	2.95×10^5	2.21×10^{-4}	7.47×10^{-10}
Hu159D5-10	5.24×10^4	4.88×10^{-4}	9.31×10^{-9}
Hu159D5-11	2.57×10^5	2.73×10^{-4}	1.06×10^{-9}
Hu159D5-12	2.22×10^5	2.67×10^{-4}	1.21×10^{-9}
159D5-P1	3.34×10^5	1.63×10^{-4}	4.89×10^{-10}

实施例10.286B4抗体的人源化

[0211] 采用286B4可变区基因来产生人源化mAb。在该过程的第一步中,将286B4的VH和VK的氨基酸序列与可用的人Ig基因序列数据库进行比较,以找到总体上最匹配的人种系Ig基因序列。

[0212] 对于286B4的重链,选择VH4-28/JH6作为人源化骨架,而对于286B4的轻链,VL-018/JK4是最适合的种系。然后设计人源化286B4 CDR移植抗体,其中将CDRL1、L2和L3移植到VL-018-JK4的框架序列上,并且将CDRH1、H2和H3移植到VH4-28-JH6的框架序列上。然后生成3D模型以确定原始小鼠FR区序列中对抗体结合和构象至关重要的氨基酸。基于286B4 CDR移植抗体序列,创建了4条另外的人源化重链和5条另外的轻链。

[0213] 用于CDR移植的人种系的序列以及所得的人源化序列列于表14中。

表14-1.286B4的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
286B4 VH	DVQLHESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITNNYYWNWIRQFPGNNLEW	23

	MGYITYDGSNNYNPSLKNRISVTRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTATYYCT RGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	
286B4 VH- G55A (CDR2 突变)	DVQLHESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITNNYYWNWIRQPPGNNLEW MGYITYD <u>A</u> SNNNYNPSLKNRISVTRDTSKNQFFLKLSSVTTEDTATYYCT RGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	236
286B4 VH.V0 (移 植)	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEWI GYITYDGSNNYNPSLKNRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCA RGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	237
286B4 VH.V1	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEWI GYITYDGSNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCA RGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	238
286B4 VH.V2	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEWI GYITYDGSNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCA RGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	239
286B4 VH.V3	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEW MGYITYDGSNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYC ARGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	240
286B4 VH.V4	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEW MGYITYDGSNNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCT RGGGQLRFDYWGQGTTLTVSS	241
286B4 VL	SIVMTQTPKFLIVSAGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGQSPKMLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITINTVQAEDLAIYFCQQDYSSPWT GGGTKLEIK	24
286B4 VL.V0 (移 植)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKLLI YYASNRYTGVPDRFSGSGGTDFTFITISLQPEDATYYCQQDYSSPWT GGGTKVEIK	242
286B4 VL.V1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKLLI YYASNRYTGVPDRFSGSGGTDFTFITISLQPEDATYYCQQDYSSPWT FGGGTKVEIK	243
286B4 VL.V2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKMLI YYASNRYTGVPDRFSGSGGTDFTFITISLQPEDATYYCQQDYSSPWT FGGGTKVEIK	244
286B4 VL.V3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKAPKMLI YYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYYCQQDYSSPWT FGGGTKVEIK	245
286B4 VL.V4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKSPKMLI YYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYFCQQDYSSPWT FGGGTKVEIK	246
286B4 VL.V5	SIVMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNEVTWYQQKPGKSPKMLIY YASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYFCQQDYSSPWT GGGTKVEIK	247

表14-2. 来自286B4的人源化抗体

VL VH	286B4VL.V1	286B4VL.V2	286B4VL.V3	286B4VL.V4	286B4VL.V5	286B4 VL
286B4-VH.V1	Hu286B4-1	Hu286B4-2	Hu286B4-3	Hu286B4-4	Hu286B4-5	
286B4-VH.V2	Hu286B4-6	Hu286B4-7	Hu286B4-8	Hu286B4-9	Hu286B4-10	
286B4-VH.V3	Hu286B4-11	Hu286B4-12	Hu286B4-13	Hu286B4-14	Hu286B4-15	

286B4-VH.V4	Hu286B4-16	Hu286B4-17	Hu286B4-18	Hu286B4-19	Hu286B4-20	
286B4-VH.G55A						286B4-P1
286B4-VH						286B4-C

实施例11:286B4人源化抗体对人5T4抗原的结合活性

[0214] 本实施例测试了286B4人源化抗体对人5T4蛋白的结合活性。

11.1对5T4的ELISA结合

[0215] 为了评估克隆的结合活性,对286B4嵌合抗体连同286B4人源化mAb一起进行ELISA测试。

[0216] 简言之,微量滴定板用1 μ g/ml人5T4-His蛋白的PBS溶液以100 μ l/孔在4 $^{\circ}$ C包被过夜,然后用150 μ l/孔的1% BSA封闭。将从20nM开始的所测试抗体的4倍稀释液加入到每个孔中,并且在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PBS/Tween洗涤平板,然后与山羊抗人IgG-HRP在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如图16和表15所示,大多数人源化克隆以高效力结合人5T4。

表15. 人源化286B4人源化抗体对人5T4的结合活性

Abs	EC50 (nM)
284B4-C	0.32
Hu286B4-1	3.81
Hu286B4-2	1.35
Hu286B4-3	0.51
Hu286B4-4	0.46
Hu286B4-5	0.28
Hu286B4-6	2.64
Hu286B4-7	1.76
Hu286B4-8	0.68
Hu286B4-9	0.33
Hu286B4-10	2.61

Abs	EC50 (nM)
284B4-C	0.32
Hu286B4-11	1.42
Hu286B4-12	0.89
Hu286B4-13	0.57
Hu286B4-14	0.30
Hu286B4-15	0.25
Hu286B4-16	4.03
Hu286B4-17	0.71
Hu286B4-18	0.42
Hu286B4-19	0.27
Hu286B4-20	0.42

11.2对5T4的基于细胞的结合

[0217] 为了评估286B4人源化抗体对人5T4的基于细胞的结合特性,通过FACS分析所测试抗体与CHOK1-hu5T4(人5T4高表达细胞系)或MCF-7细胞(人5T4低表达细胞系)的结合。在FACS缓冲液中,将每孔中总数为 1×10^5 个的CHOK1-hu5T4或MCF7细胞与从50nM开始的4倍或3倍系列稀释的抗体在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤后,通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图17A

(CHO-hu5T4细胞)和图17B(MCF-7细胞)所示,286B4-3/8/13/18/5/10/15人源化抗体显示出与286B4嵌合抗体相当的结合能力。

11.3对人5T4的蛋白质亲和力排序

[0218] 使用捕获方法通过Biacore测试286B4人源化抗体与重组5T4蛋白(人5T4-his标签)的结合。用蛋白A芯片捕获mAb。以30μl/min的流速将人5T4-his标签蛋白的系列稀释液注射到捕获的抗体上3分钟。允许抗原解离280秒-800秒。所有实验均在Biacore T200上进行。使用Biacore T200评价软件进行数据分析。结果示于下表16中。

表16.通过Biacore测量的亲和力排序

Abs	人5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
286-C	9.09 x 10 ⁴	1.13 x 10 ⁻⁴	1.25 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-3	9.34 x 10 ⁴	1.07 x 10 ⁻⁴	1.14 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-5	1.06 x 10 ⁵	1.28 x 10 ⁻⁴	1.20 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-8	9.46 x 10 ⁴	1.03 x 10 ⁻⁴	1.08 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-10	1.06 x 10 ⁵	2.04 x 10 ⁻⁴	1.93 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-13	9.55 x 10 ⁴	1.07 x 10 ⁻⁴	1.12 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-15	1.10 x 10 ⁵	1.14 x 10 ⁻⁴	1.04 x 10 ⁻⁹
Hu286B4-18	1.13 x 10 ⁵	1.33 x 10 ⁻⁴	1.18 x 10 ⁻⁹

实施例12. 393E9、159D5和286B4的PTM去除确认

12.1 393E9的PTM去除确认

[0219] 393E9 VH CDR2包括NG和NS残基(Kabat编号),这些残基处于翻译后修饰(PTM)的风险中,并且对未来制造构成挑战。因此,本实施例将VH上的NG突变为NA,NS突变为YS,以防止PTM。潜在的PTM去除位点的序列列于表17中。

表17-1:去除了潜在PTM位点的393E9的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
393E9 VH.V4 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DY ~~Y~~ MSWVRQAPGKGLE WVGFI ~~R~~ NKG ~~N~~ AYTTENSASVKGRFTISRDN ~~S~~ KSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGT ~~L~~ TVSS	248
393E9 VH.V4 NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DY ~~Y~~ MSWVRQAPGKGLE WVGFI ~~R~~ NKGNGYTTE ~~Y~~ SASVKGRFTISRDN ~~S~~ KSSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGT ~~L~~ TVSS	249
393E9 VH.V4 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF7DY ~~Y~~ MSWVRQAPGKGLE WVGFI ~~R~~ NKG ~~N~~ AYTTE ~~Y~~ SASVKGRFTISRDN ~~S~~ KSSLYLQMNSLKTEDT	250

NS-YS	AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	
393E9 VH.V5 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTF7DYYSMSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTENSASVKGRFTISRDNKSKSLYLQMNSLKTEDTA VYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	251
393E9 VH.V5 NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTF7DYYSMSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNGYTTEYSASVKGRFTISRDNKSKSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	252
393E9 VH.V5 NG-NA NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTF7DYYSMSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTEYSASVKGRFTISRDNKSKSLYLQMNSLKTEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	253
393E9 VH.V6 NG-NA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTF7DYYSMSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTENSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	254
393E9 VH.V6 NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTF7DYYSMSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNGYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	255
393E9 VH.V6 NG-NA NS-YS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTF7DYYSMSWVRQAPGKGLE WVGFIRNKGNAYTTEYSASVKGRFTISRDNKSSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARYRGNPHYAMDYWGQGLTVTVSS	256

表17-2. 去除了潜在PTM位点的393E9人源化抗体

VL VH	393E9 hVL2	393E9 hVL3	393E9 hVL5
393E9 VH.V4			Hu393E9-45
393E9 VH.V4 (NG-NA)			Hu393E9-45-P1
393E9 VH.V4 (NS-YS)			Hu393E9-45-P2
393E9 VH.V4(NG-NA/ NS-YS)			Hu393E9-45-P3
393E9 VH.V5		Hu393E9-53	
393E9 VH.V5(NG-NA)		Hu393E9-53-P1	
393E9 VH.V5(NS-YS)		Hu393E9-53-P2	
393E9 VH.V5(NG-NA/ NS-YS)		Hu393E9-53-P3	
393E9 VH.V6	Hu393E9-62		
393E9 VH.V6(NG-NA)	Hu393E9-62-P1		
393E9 VH.V6(NS-YS)	Hu393E9-62-P2		
393E9 VH.V6(NG-NA/ NS-YS)	Hu393E9-62-P3		

[0220] 为了评估PTM去除抗体对表面5T4的结合特性,通过FACS分析了具有Hu393E9-45-P2、Hu393E9-53-P2、Hu393E9-62-P2或嵌合393E9的抗5T4部分的三特异性抗体与CHOK1-hu5T4细胞的结合。将每孔中总数为 1×10^5 的细胞与从100nM开始的4倍系列稀释的抗体在4℃孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在4℃孵育30分钟。通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图18A所示,具有Hu393E9-45-P2或Hu393E9-62-P2的抗5T4部分的三特异性抗体显示出比具有嵌合393E9的三特异性抗体对表达5T4的细胞的结合能力增强。所测试的三特异性抗体之间唯一的区别是抗5T4部分。

12.2 159D5的PTM去除确认

[0221] 159D5 VH CDR2包括DS残基(Kabat编号),这些残基处于翻译后修饰(PTM)的风险中,并且对未来制造构成挑战。因此,本实施例将VH上的DS突变为DA,以防止PTM。潜在的PTM去除位点的序列列于表18中。如图14B、图15和表13所示,159D5-P1的PTM去除抗体显示出与159D5-C的159D5嵌合抗体相当的结合能力。

表18-1.159D5 CDRH2的PTM去除

VL	VH	159D5-VH DS-DA	159D5-VH
159D5-VL		159D5-P1	159D5-C

表18-2.去除了潜在PTM位点的159D5的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
159D5 VH.V0 (移植) DS-DA	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEW VAYISSGSSTFYADAVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARSPAYRYGLDYWGQGTITVTVSS	257
159D5 VL.V1	DIVMTQTPLSLSVTPGPASISCRASQSVSSSTFSYMHWYQQKPGQPPQ LLIKSSSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQHSWEIP YTFGGGTKVEIK	258

表18-3.去除了潜在PTM位点的159D5人源化抗体

VH VL	159D5 VH.V0 DS-DA
159D5 VL.V1	Hu159D5-2-P1

12.3 286B4的PTM去除确认

[0222] 286B4 VH CDR2包括DG残基(Kabat编号),这些残基处于翻译后修饰(PTM)的风险中,并且对未来制造构成挑战。因此,本实施例将VH上的DG突变为DA,以防止PTM。潜在的PTM去除位点的序列列于表19中。

表19-1.去除了潜在PTM位点的286B4的人源化

名称	序列	SEQ ID NO:
286B4 VH.V1 DG-DA	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEWIG YITYDA ~~S~~ NNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARG	259
	GGQLRFDYWGQGTITVTVSS	
286B4 VH.V2 DG-DA	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEWIG YITYDA ~~S~~ NNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARG GGQLRFDYWGQGTITVTVSS	260
286B4 VH.V3 DG-DA	EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISNNYYWNWIRQPPGKGLEWM GYITYDA ~~S~~ NNYNPSLKNRVTMSRDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCARG GGQLRFDYWGQGTITVTVSS	261

表19-2:去除了潜在PTM位点的286B4人源化抗体

VH	VL	286B4 hVL3	286B4 hVL5
286B4 VH.V1		Hu286B4-3	Hu286B4-5
286B4 VH.V1 DG-DA		Hu286B4-3-P1	Hu286B4-5-P1
286B4 VH.V2		Hu286B4-8	
286B4 VH.V2 DG-DA		Hu286B4-8-P1	
286B4 VH.V3			Hu286B4-15
286B4 VH.V3 DG-DA			Hu286B4-15-P1

[0223] 为了评估PTM去除抗体对表面5T4的结合特性,通过FACS分析了具有Hu286B4-3-P1、Hu286B4-5-P1、Hu286B4-8-P1、Hu286B4-15-P1或嵌合286B4的抗5T4部分的三特异性抗体与CHO-K1-hu5T4细胞的结合。将每孔中总数为 1×10^5 的细胞与从100nM开始的4倍系列稀释的抗体在4℃孵育30分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在4℃孵育30分钟。通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图18B所示,具有PTM去除286B4片段的三特异性抗体显示出比具有嵌合286B4片段的三特异性抗体对表达5T4的细胞的结合能力增强。所测试的三特异性抗体之间唯一的区别是抗5T4部分。

实施例13.人源化抗体Hu14G12-28的亲合力成熟

[0224] 为了增强Hu14G12-28人源化抗体的亲合力,进行亲合力成熟。简言之,构建了在Hu14G12-28的CDR区含有单点或两点饱和突变的4个噬菌体文库。通过1轮固体或液体淘选筛选,获得了两个在CDR中具有独特突变的候选物。将这些候选物的CDR移植入Hu14G12-28框架中以产生用于进一步结合和亲合力验证的抗体。

[0225] 移植入亲合力成熟候选物的框架的可变区的氨基酸序列列于下表20中。

表20-1.亲合力成熟的抗体的可变区的序列

名称	序列	SEQ ID NO:
14G12 hVH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSITTAYMELSRLRSD	197
	DTAVYYCANGGAMDYWGQGTLVTVSS	
14G12 hVL1-88#	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYFCGNDNTL PWTFGGGTKVEIK	262
14G12 hVH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWMNWVRQAPGQG LEWMGRIYREDGHTNYNGKFKGRVTMTADKSITTAYMELSRLRSD DTAVYYCANGGAMDYWGQGTLVTVSS	197
14G12 hVL1-108#	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYFCANDNTL PWTFGGGTKVEIK	263

表20-2.来自Hu14G12-28的亲合力成熟的抗体

VH	VL	14G12-hVL1-88#	14G12-hVL1-108#
14G12-hVH2		Hu14G12-28-88#	Hu14G12-28-108#

表20-3.Hu14G12-28-88#的CDR序列

Hu14G12-28-88#	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SSWMN	41
CDRH2	RIYREDGHTNYNGKFK G	42
CDRH3	GGAMDY	43
CDRL1	RASQDISNYLN	44
CDRL2	YTSRLHS	45
CDRL3	<u>GN</u> DNTLPWT	264

表20-4. Hu14G12-28-108#的CDR序列

Hu14G12-28-108#	序列	SEQ ID NO:
CDRH1	SSWMN	41
CDRH2	RIYREDGHTNYNGKFK G	42
CDRH3	GGAMDY	43
CDRL1	RASQDISNYLN	44
CDRL2	YTSRLHS	45
CDRL3	<u>AN</u> DNTLPWT	265

13.1对5T4的ELISA结合

[0226] 为了评估亲和力成熟的抗体对人5T4的结合活性,对Hu14G12-28连同Hu14G12-28-88#和Hu14G12-28-108#一起进行ELISA测试。

[0227] 简言之,将微量滴定板用2 μ g/ml人5T4-His蛋白的PBS溶液以30 μ l/孔在4℃包被过夜,然后用5% PBS/乳封闭。将抗体的系列稀释液加入到每个孔中,并在室温下孵育1小时。用PBS/Tween洗涤平板,然后与山羊抗人IgG-HRP在室温下孵育50分钟。洗涤后,板用TMB底物显色,并通过分光光度计在OD 450nm下分析。如图19所示,亲和力成熟的抗体与人5T4结合,其效力比亲本Hu14G12-28抗体更高。

13.2对5T4的基于细胞的结合

[0001] 为了评估亲和力成熟的抗体与表面5T4的结合特性,通过FACS分析所测试抗体与CHOK1-hu5T4、HEK293-hu5T4或MCF-7细胞的结合。将每孔中总数为 1×10^5 的细胞与从133nM或100nM开始的4倍或5倍系列稀释的抗体在4℃孵育60分钟。用FACS缓冲液洗涤后,将缀合PE的抗人IgG抗体加入到每个孔中,并在4℃孵育30分钟。通过MACSQuant分析仪16评估PE的MFI。如图20A至图20B (CHOK1-hu5T4细胞)、图20C至图20D (HEK293-hu5T4细胞) 和图20E (MCF-7细胞) 所示,亲和力成熟的抗体显示出与亲本Hu14G12-28抗体相比对表达5T4的细胞的结合能力增强。

13.3对5T4的结合亲和力

[0228] 使用捕获方法通过Biacore测试所测试抗体对重组5T4蛋白(人5T4-his标签)的结合亲和力。用蛋白A芯片捕获抗体。以30 μ l/min的流速将人5T4-his标签蛋白的系列稀释液注射到捕获的抗体上3分钟。允许抗原解离300秒。所有实验均在Biacore T200上进行。使用Biacore T200评价软件进行数据分析。

[0229] 如下表21的结果所示,与亲本Hu14G12-28抗体相比,亲和力成熟的抗体Hu14G12-28-88#和Hu14G12-28-108#分别显著增加至9.45倍和7.41倍的对人5T4蛋白的结合亲和力,这使它们成为用于抗体-药物缀合物(ADC)和双特异性抗体的理想抗5T4抗体。

表21.通过Biacore测量的亲和力

Abs	人5T4-His		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Hu14G12-28	1.80×10^5	7.38×10^{-4}	4.09×10^{-9}
Hu14G12-28-88#	1.91×10^5	8.28×10^{-5}	4.33×10^{-10}
Hu14G12-28-108#	1.83×10^5	1.01×10^{-4}	5.52×10^{-10}

[0230] 本公开范围不受所述具体实施方案的限制,这些具体实施方案旨在作为本公开的各个方面的单一说明,并且功能上等效的任何组合物或方法都在本公开的范围内。对于本领域技术人员显而易见的是,在不背离本公开实质或范围的情况下,可对本公开的方法和组合物进行各种修改和变型。因此,本公开旨在涵盖本公开的各种修改和变型,前提条件是它们落入所附权利要求或其等效内容的范围内。

[0231] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请以引用方式并入本文,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体地且单独地指示以引用方式并入。

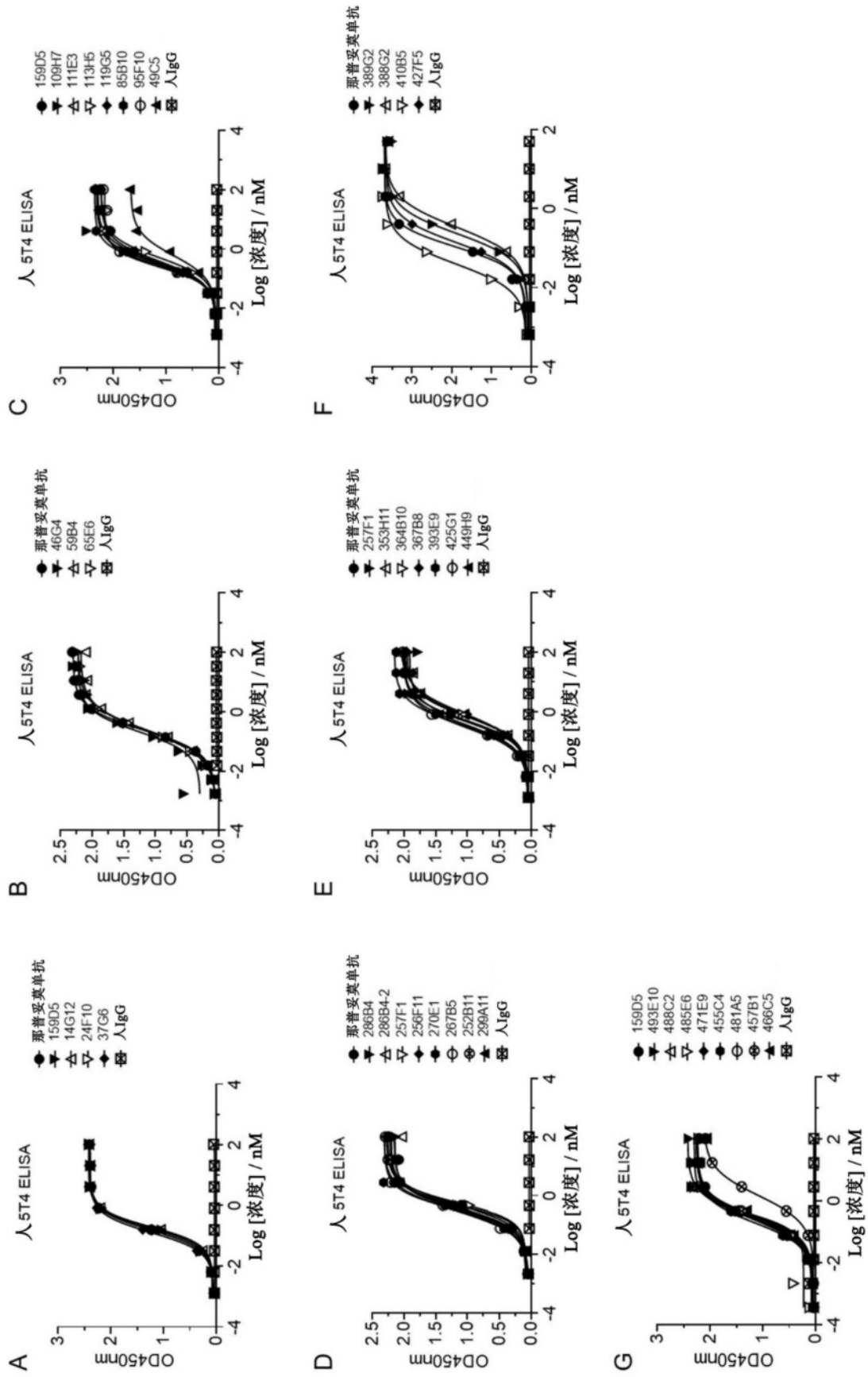


图1

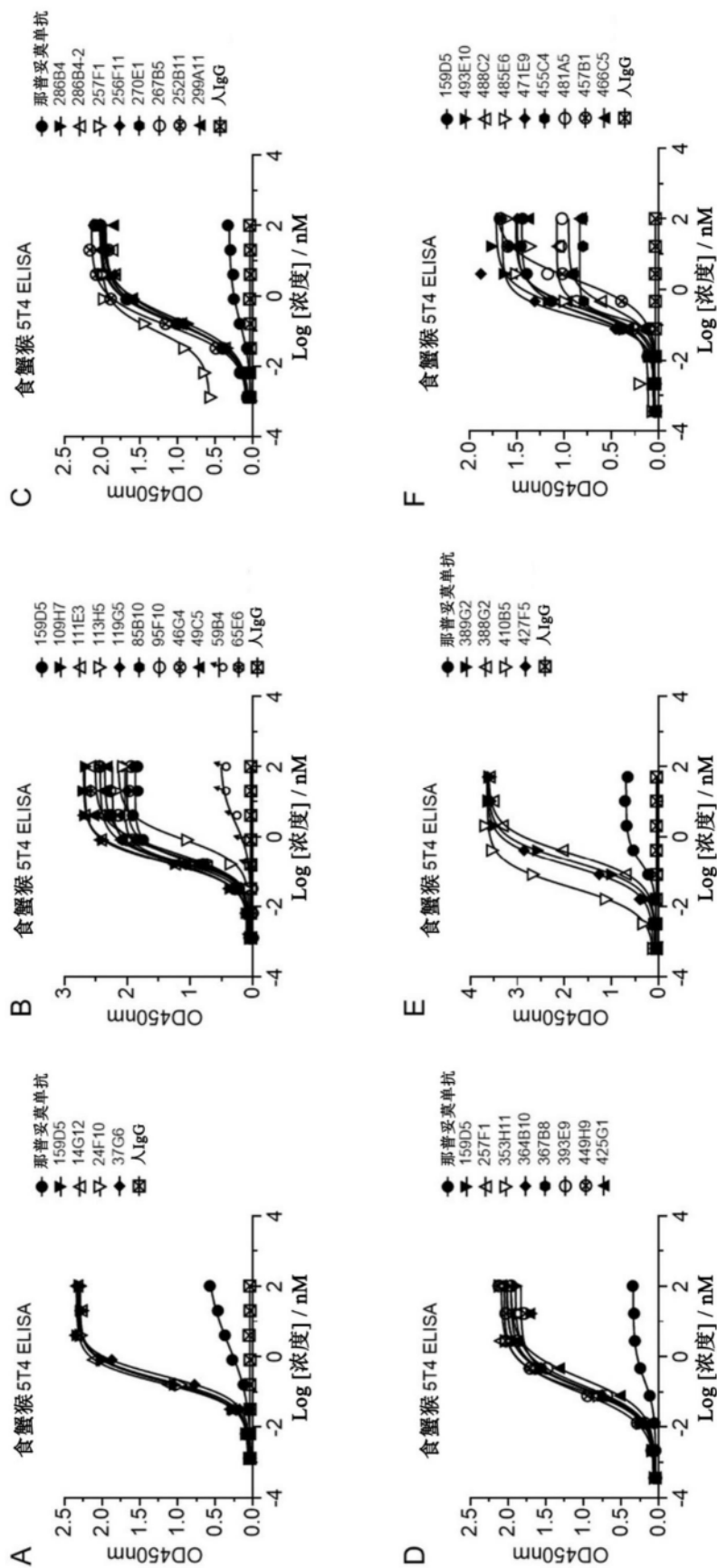


图2

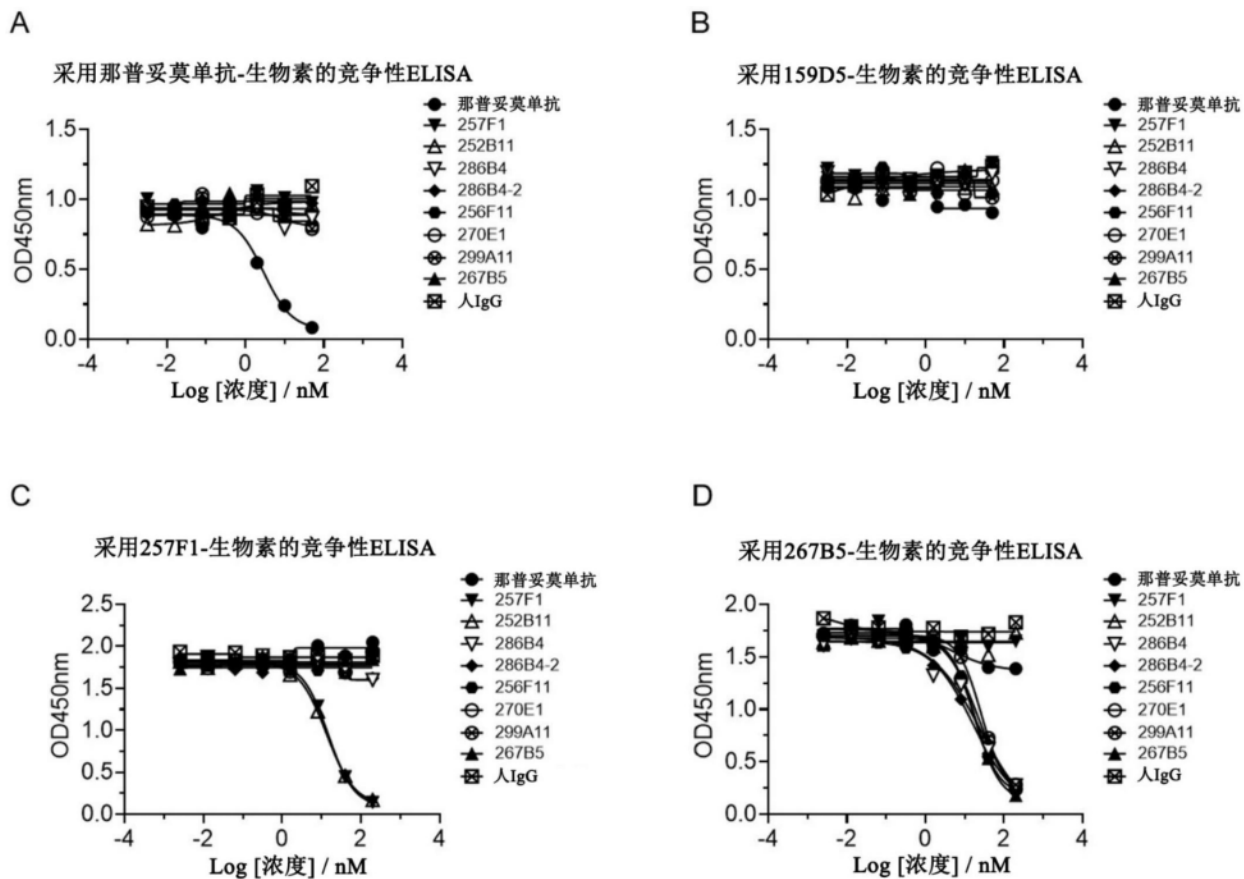


图3

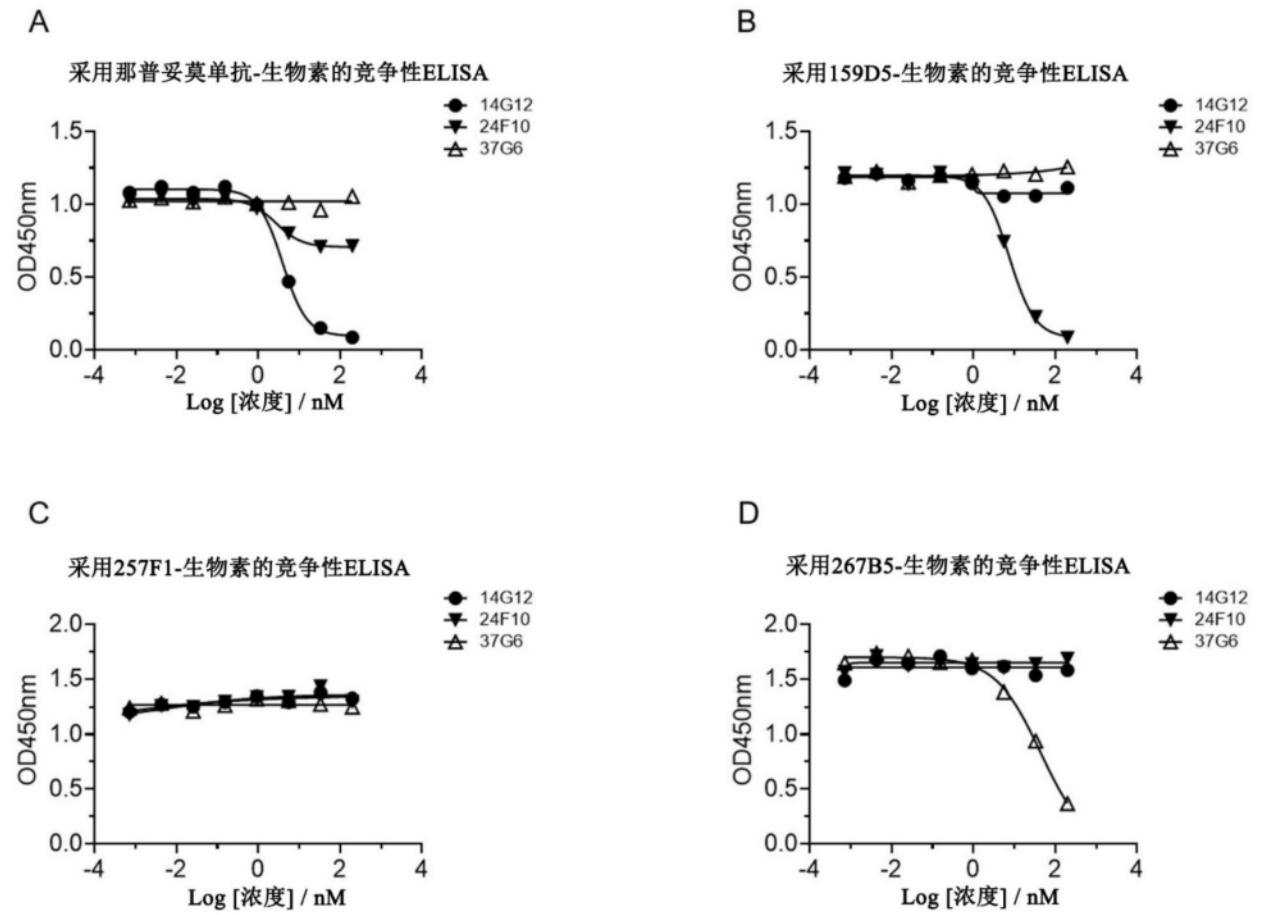


图4

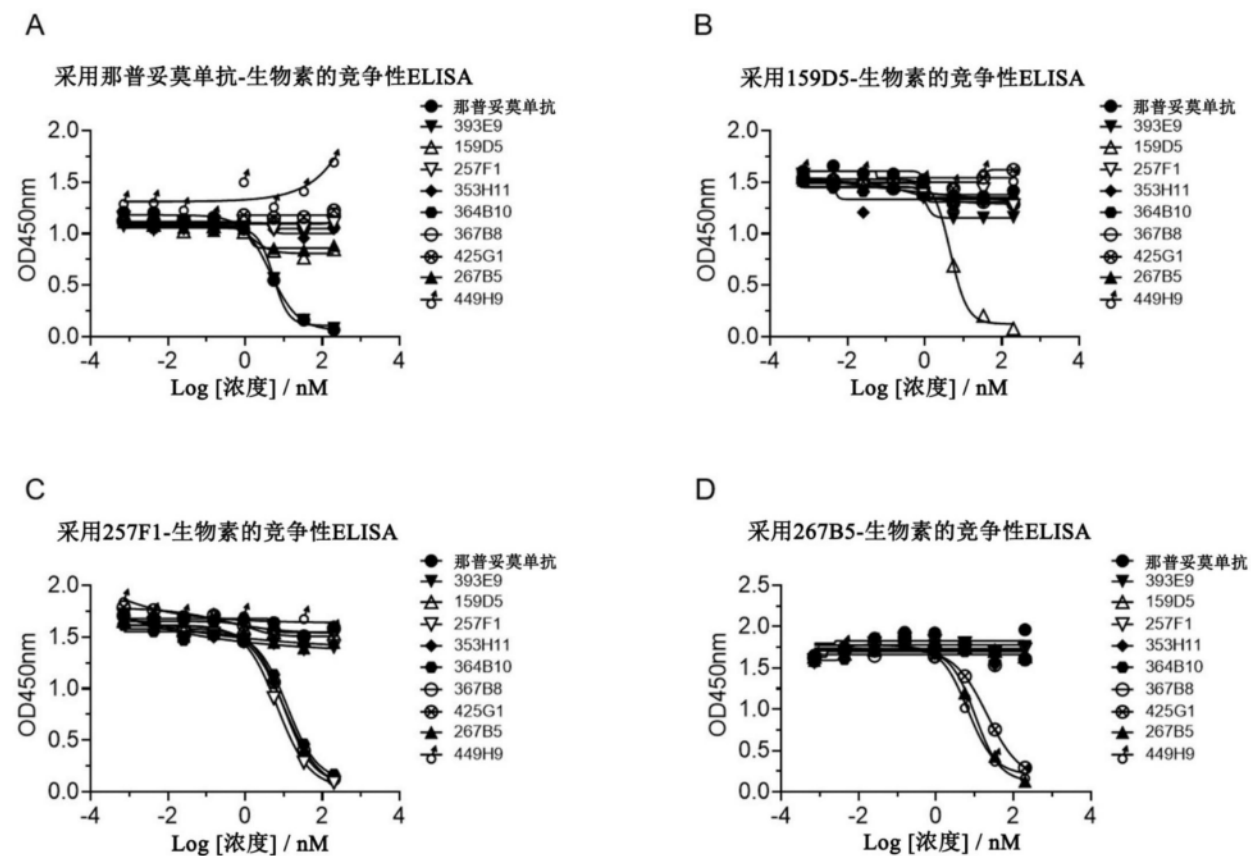


图5

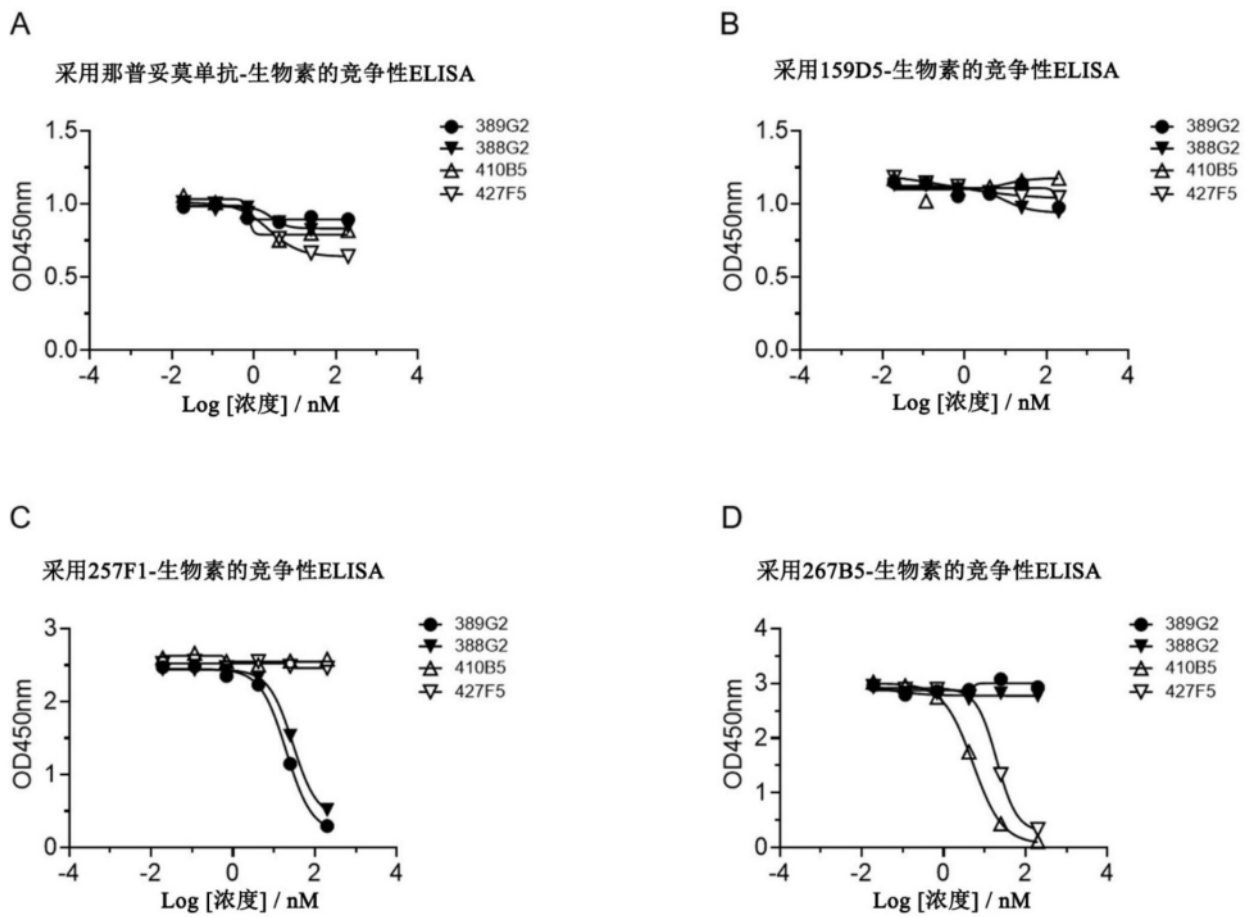


图6

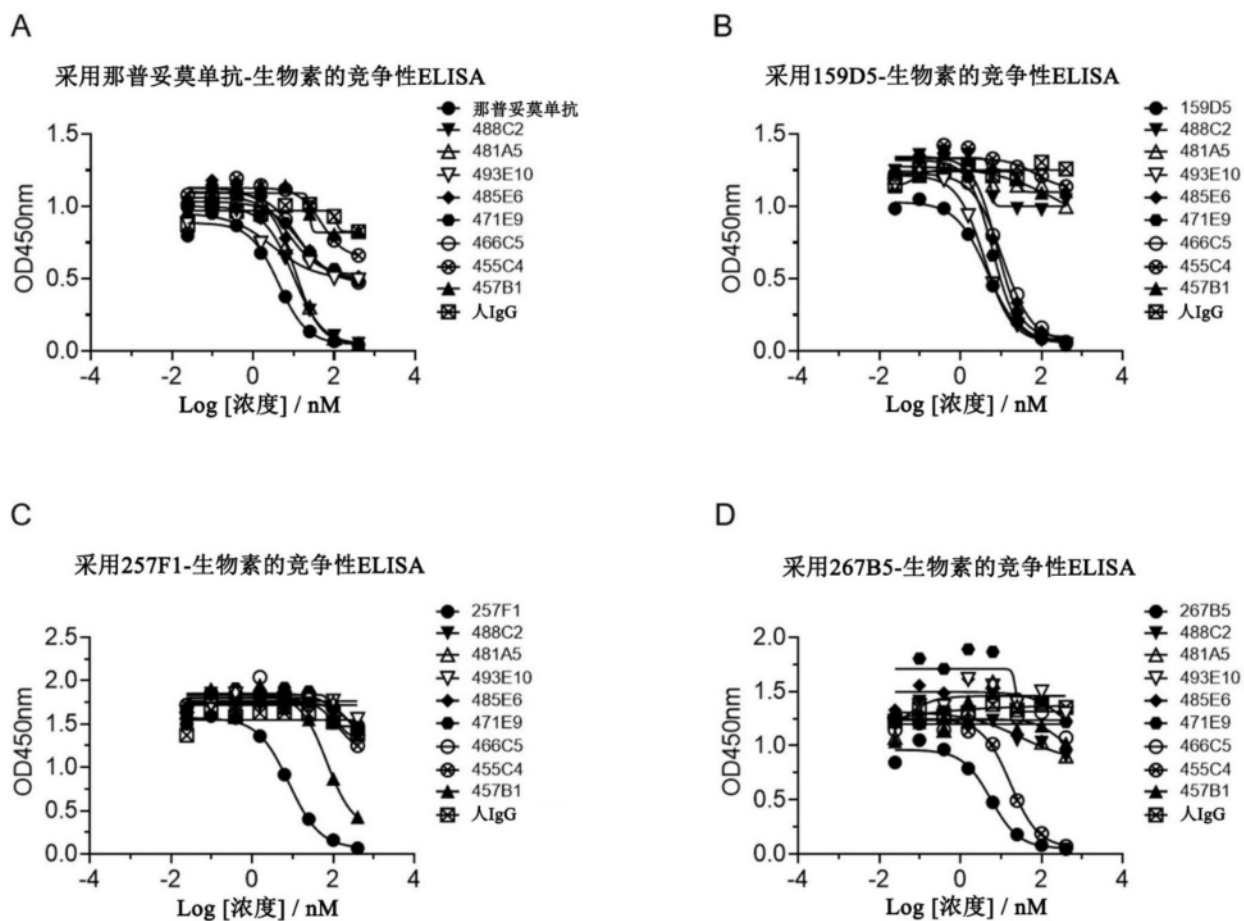


图7

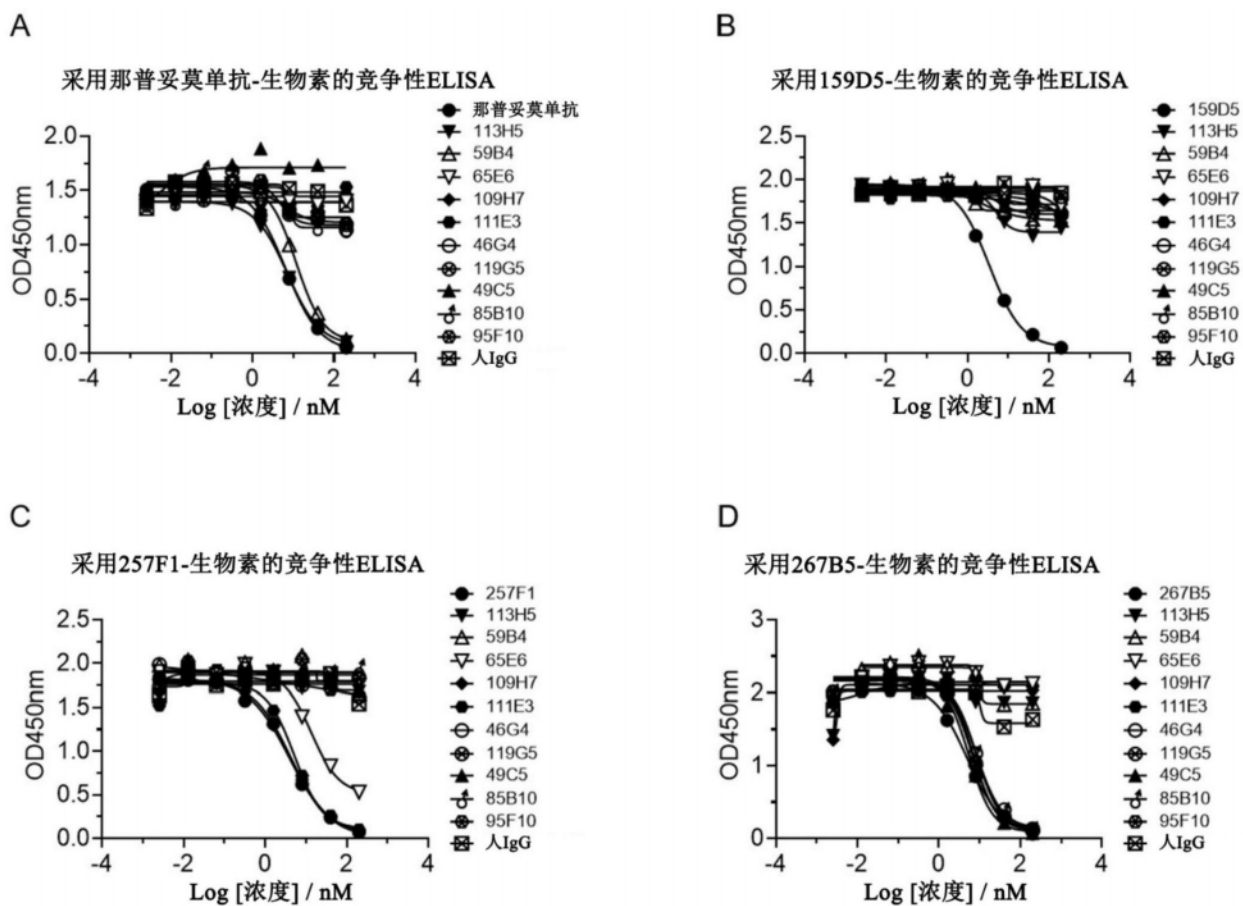


图8

CHOK1-hu5T4 细胞结合

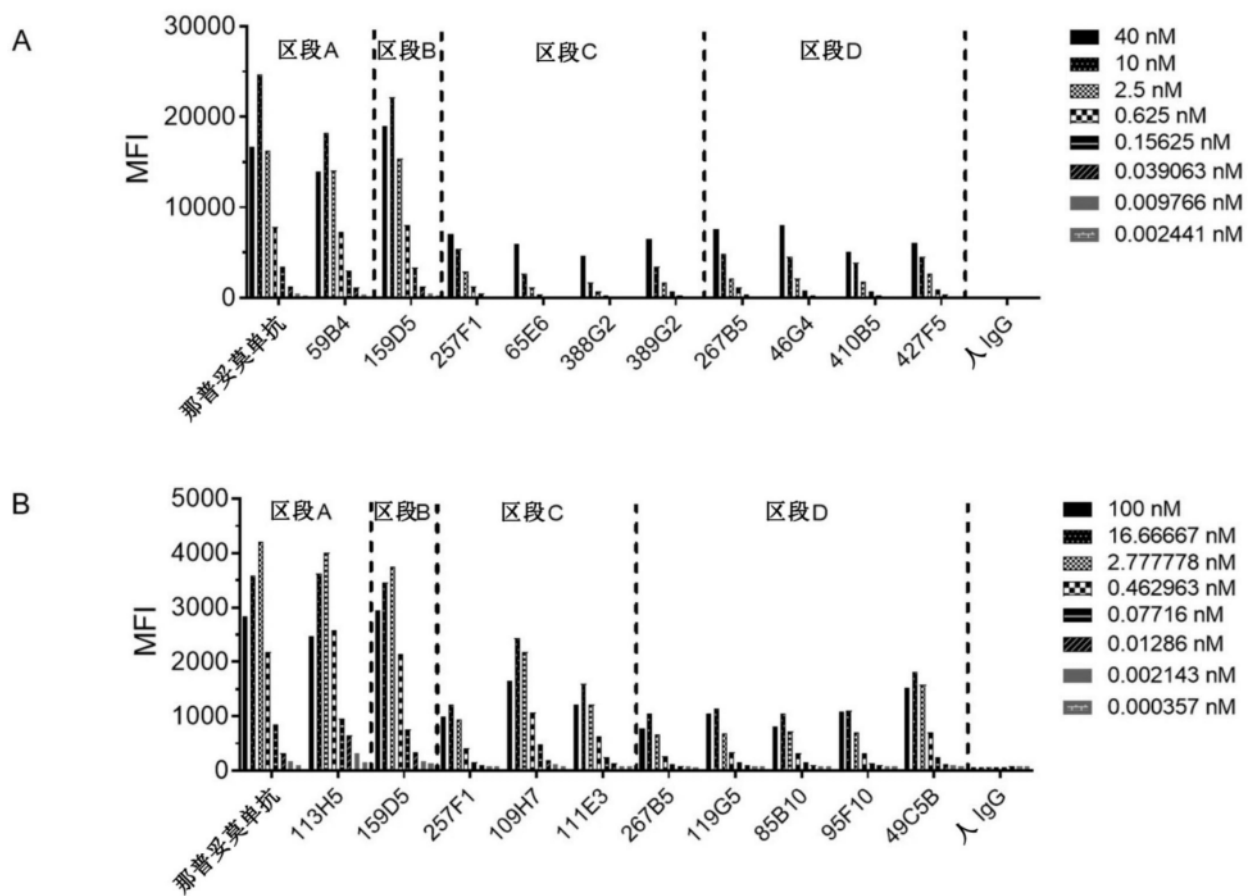


图9

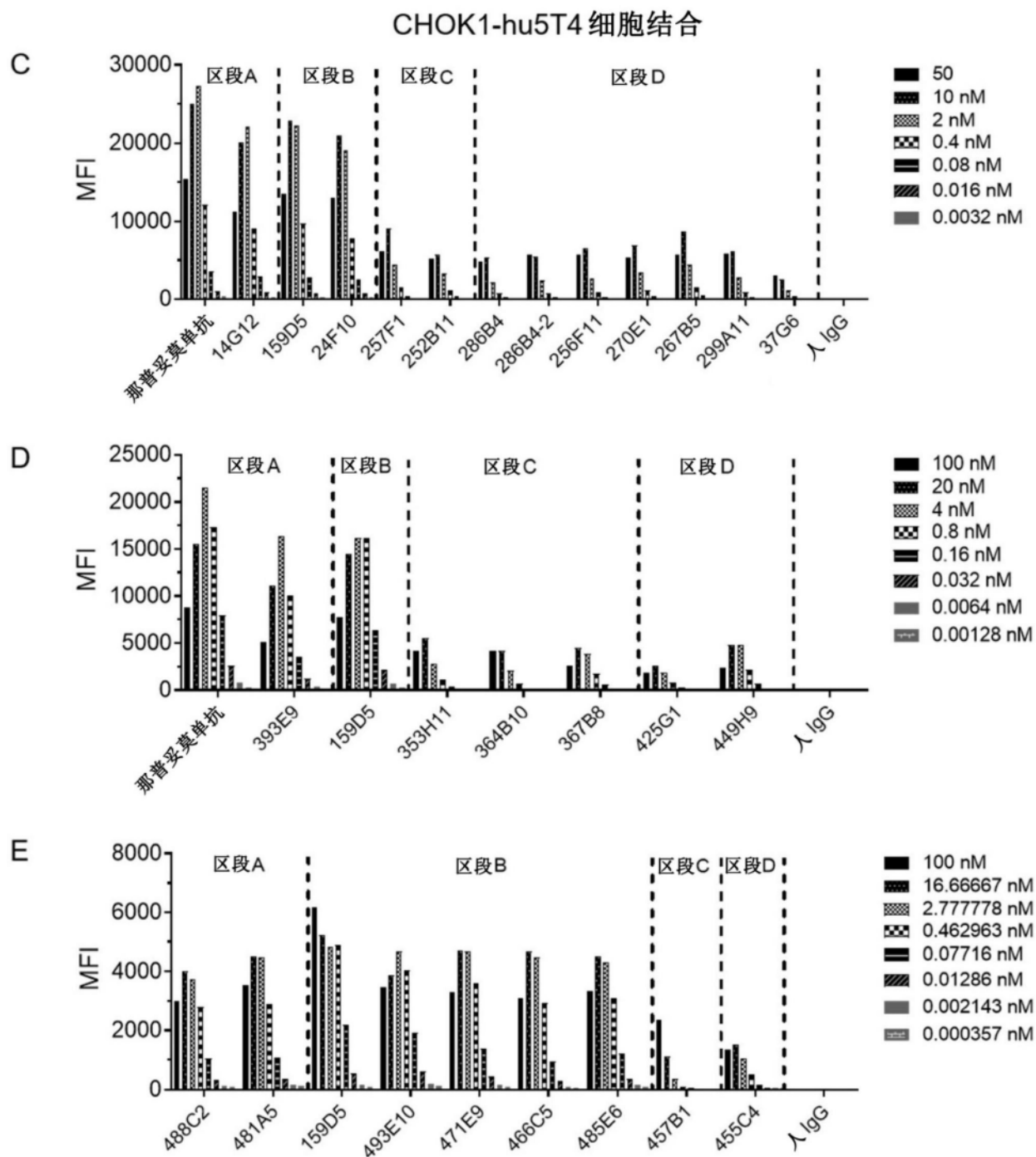


图9(续)

14G12人源化ELISA

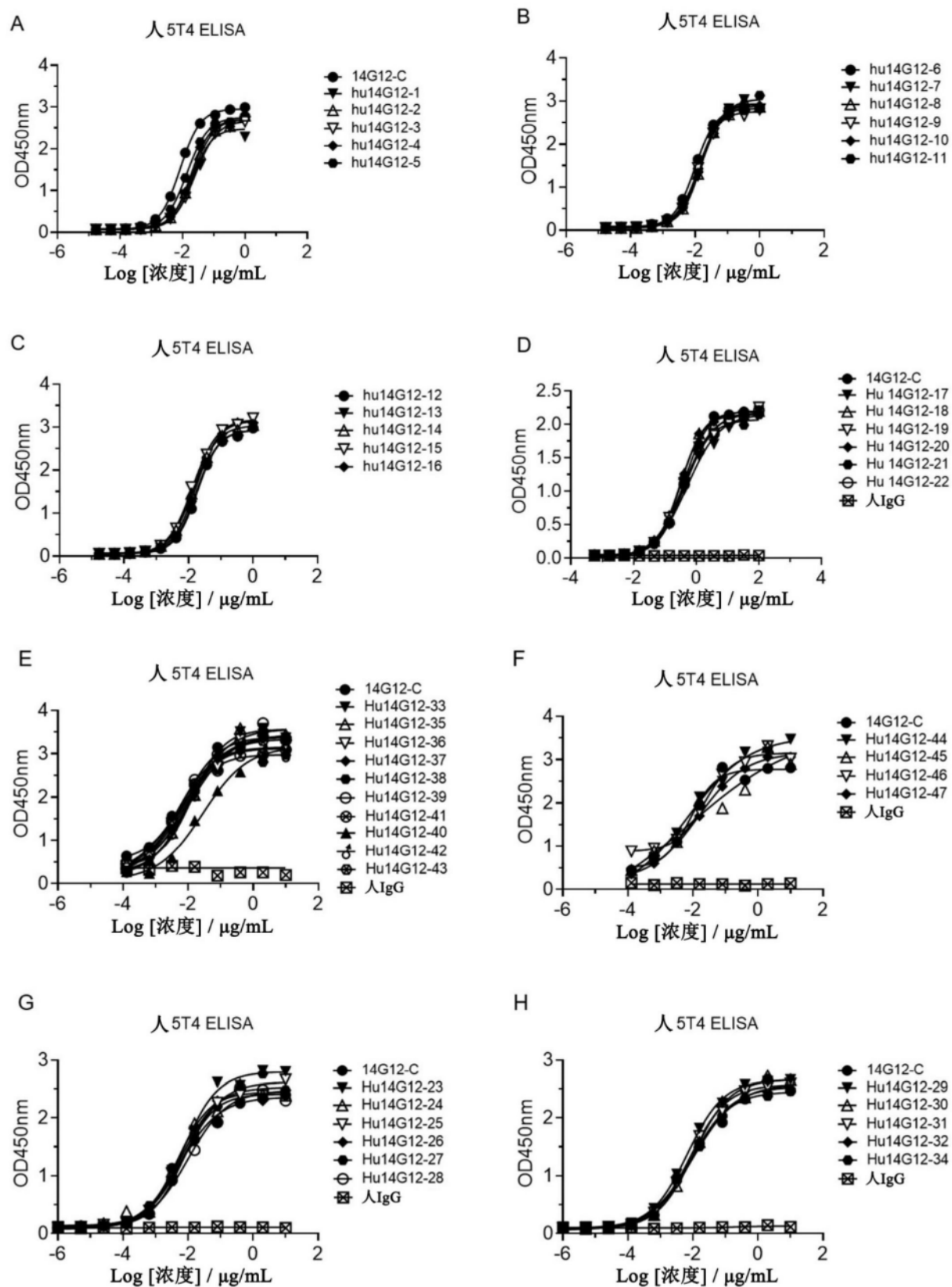
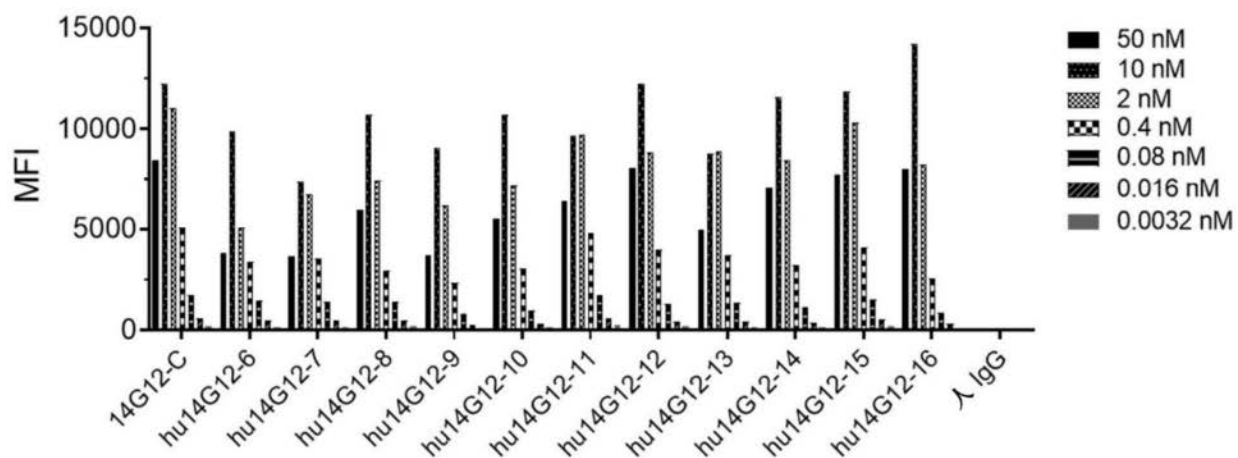


图10

14G12人源化抗体的基于细胞的结合

CHOK1-hu5T4 细胞结合

A



B

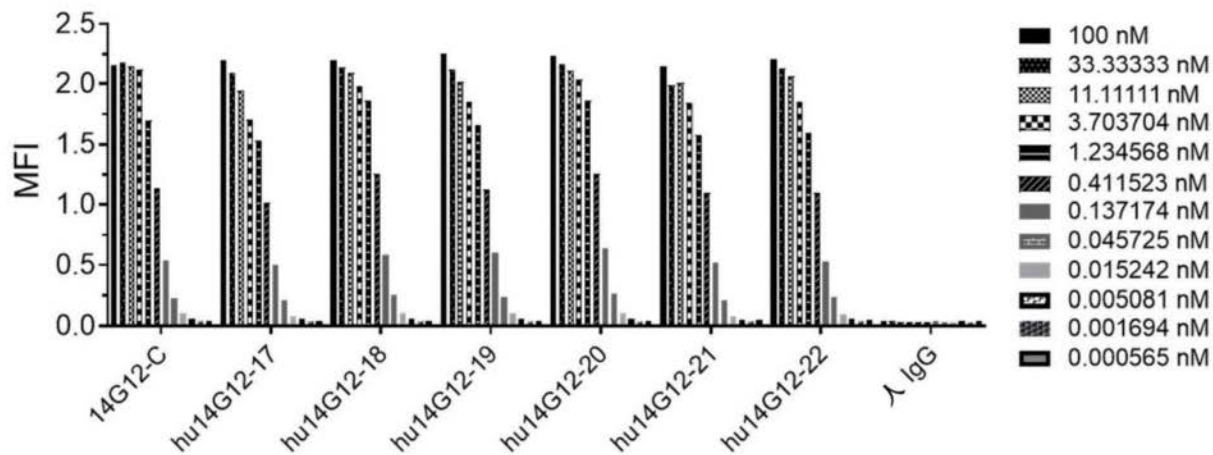
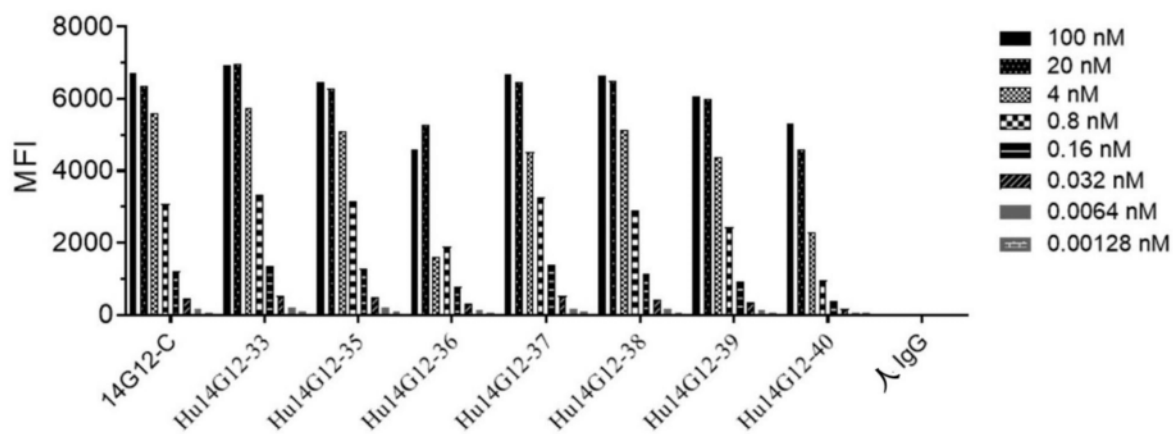


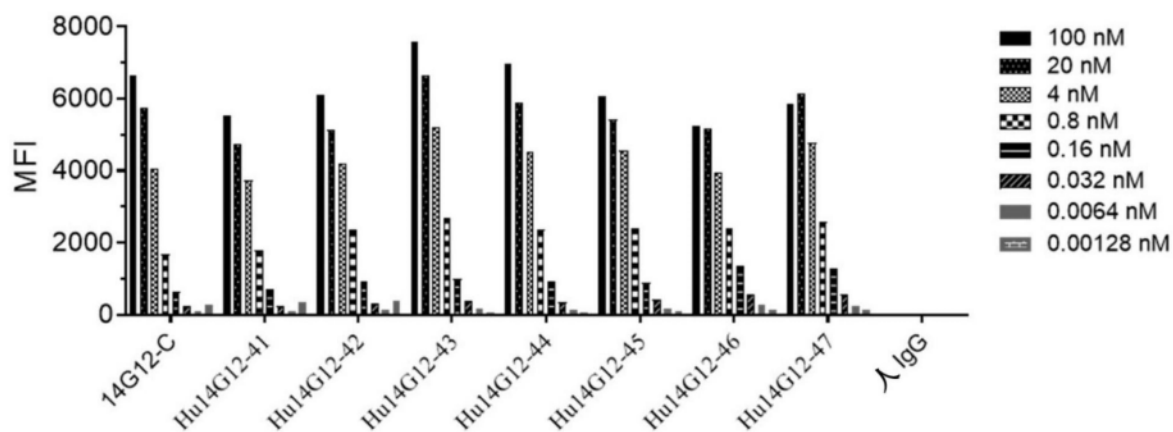
图11

CHOK1-hu5T4 细胞结合

C



D



E

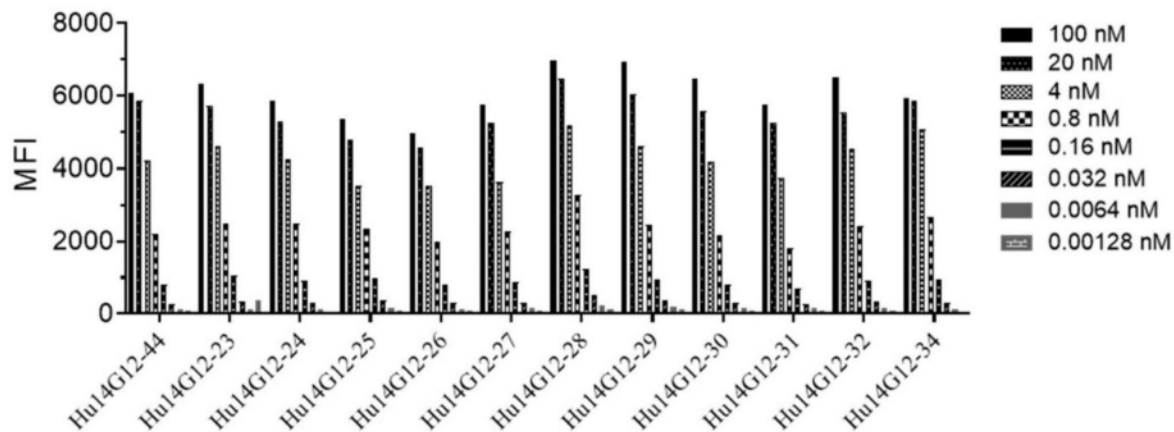


图11 (续)

393E9人源化ELISA

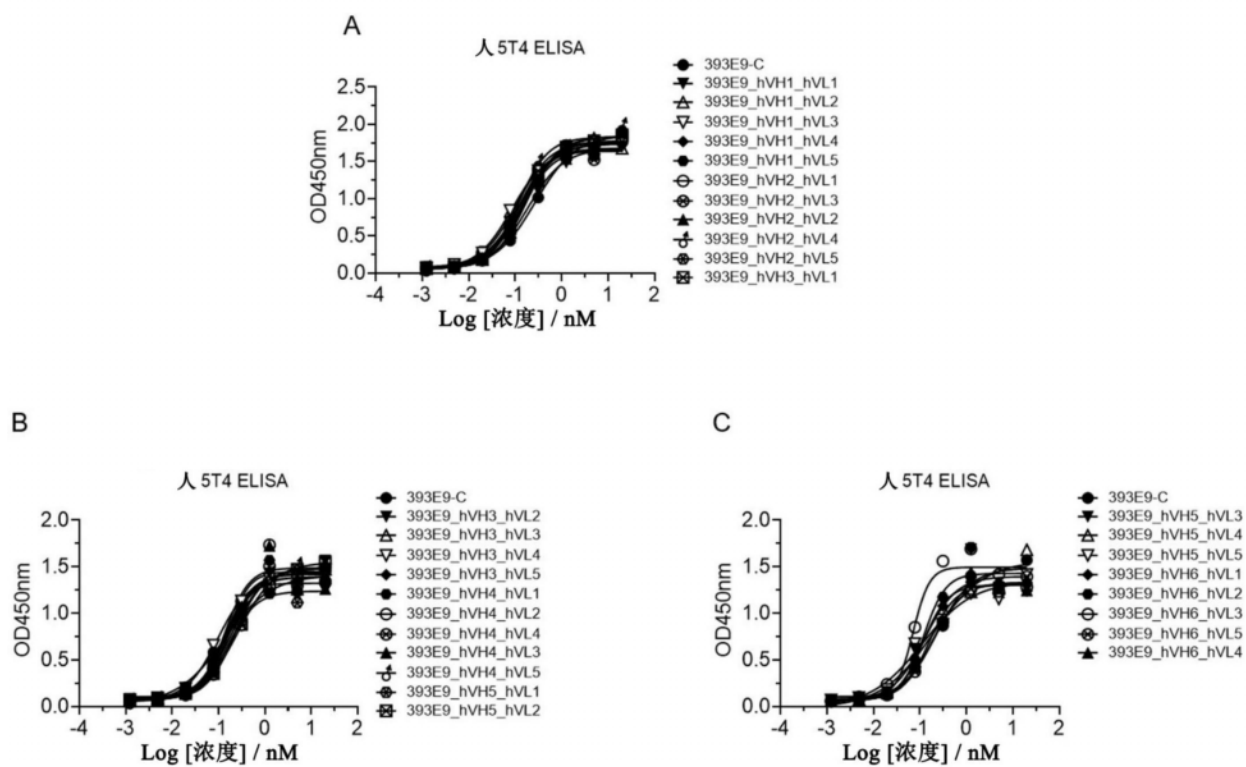


图12

393E9人源化抗体的基于细胞的结合

CHOK1-hu5T4 细胞结合

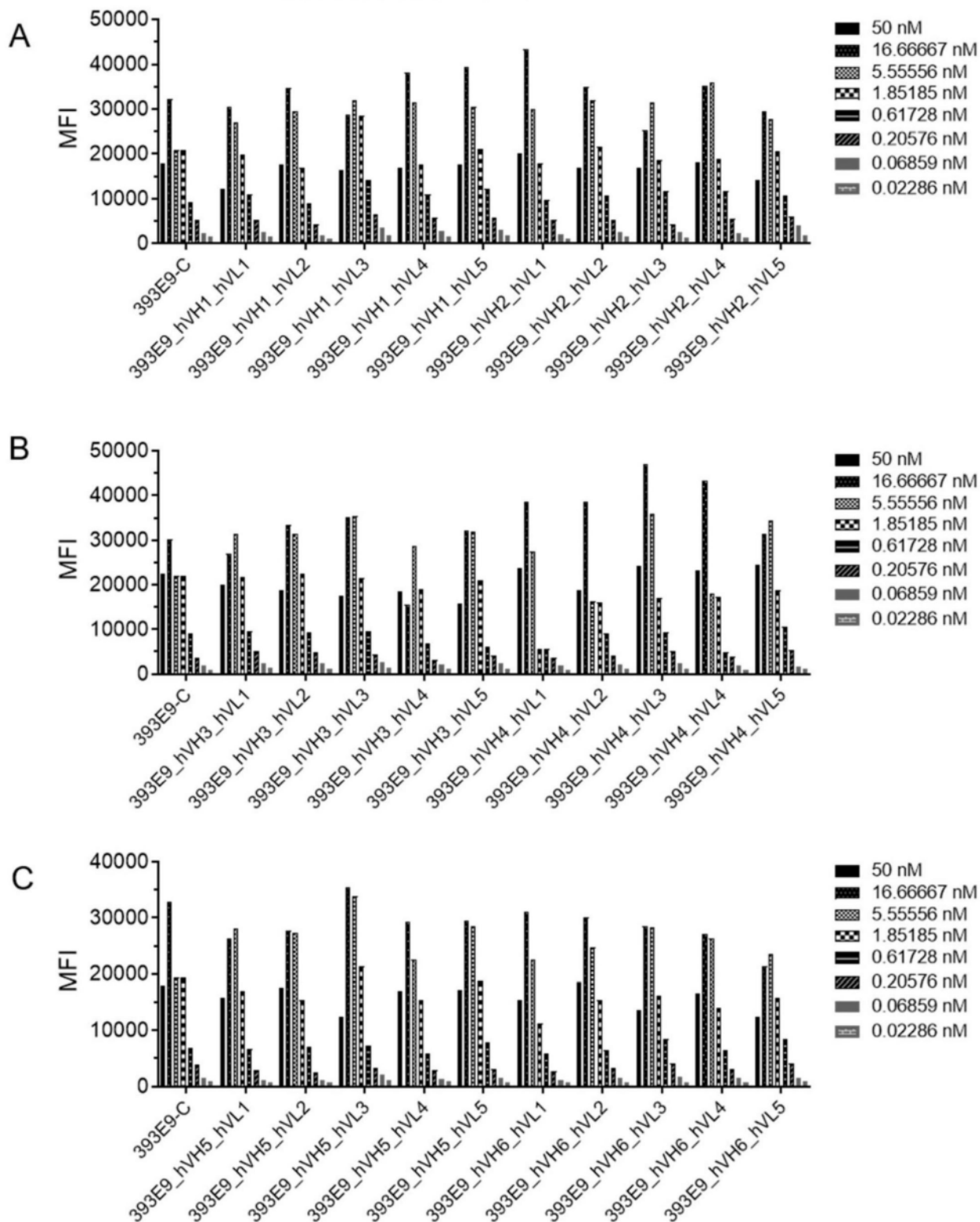


图13

159D5人源化ELISA

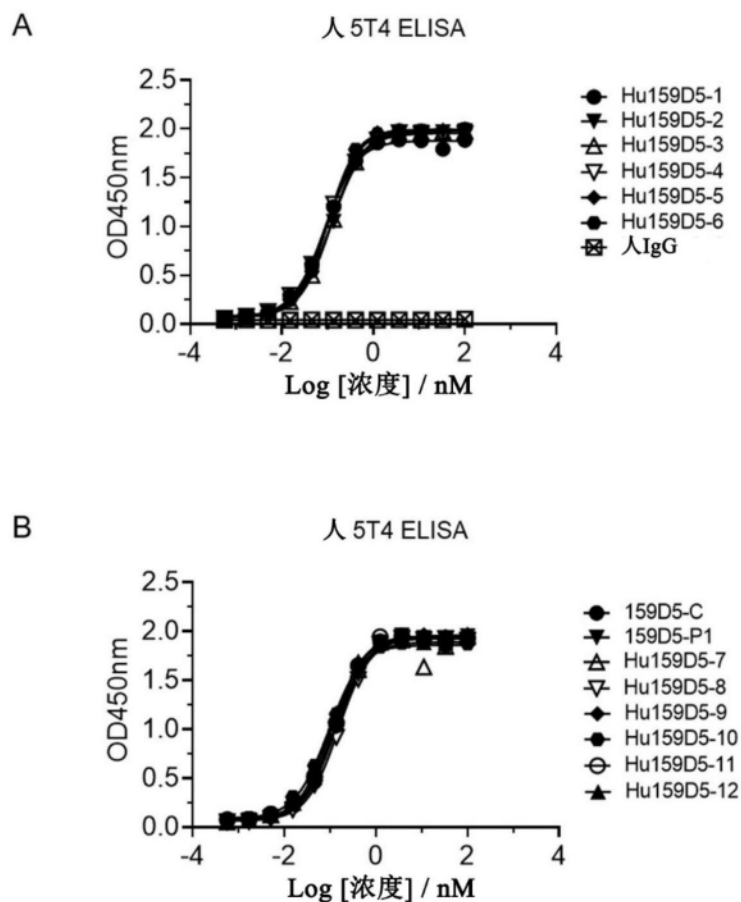


图14

159D5人源化抗体的基于细胞的结合

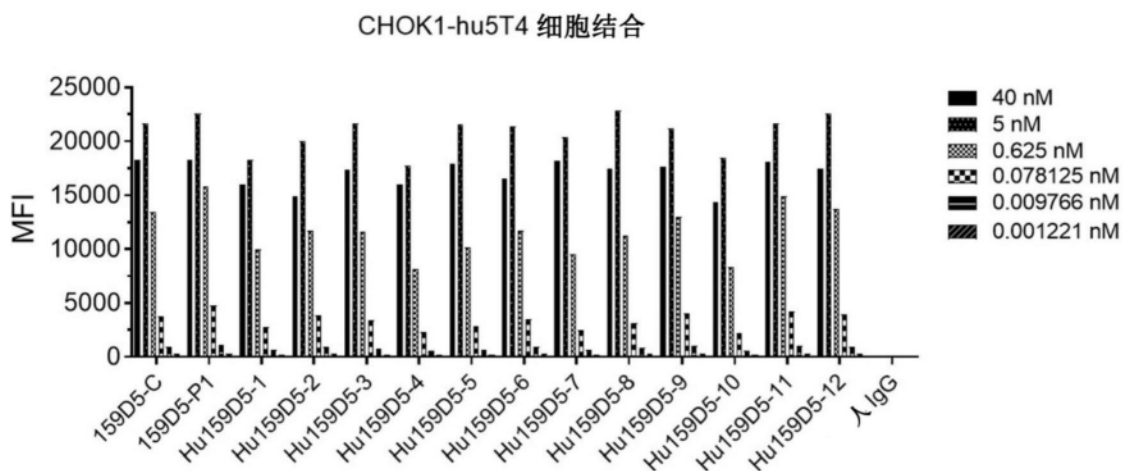


图15

286B4人源化ELISA

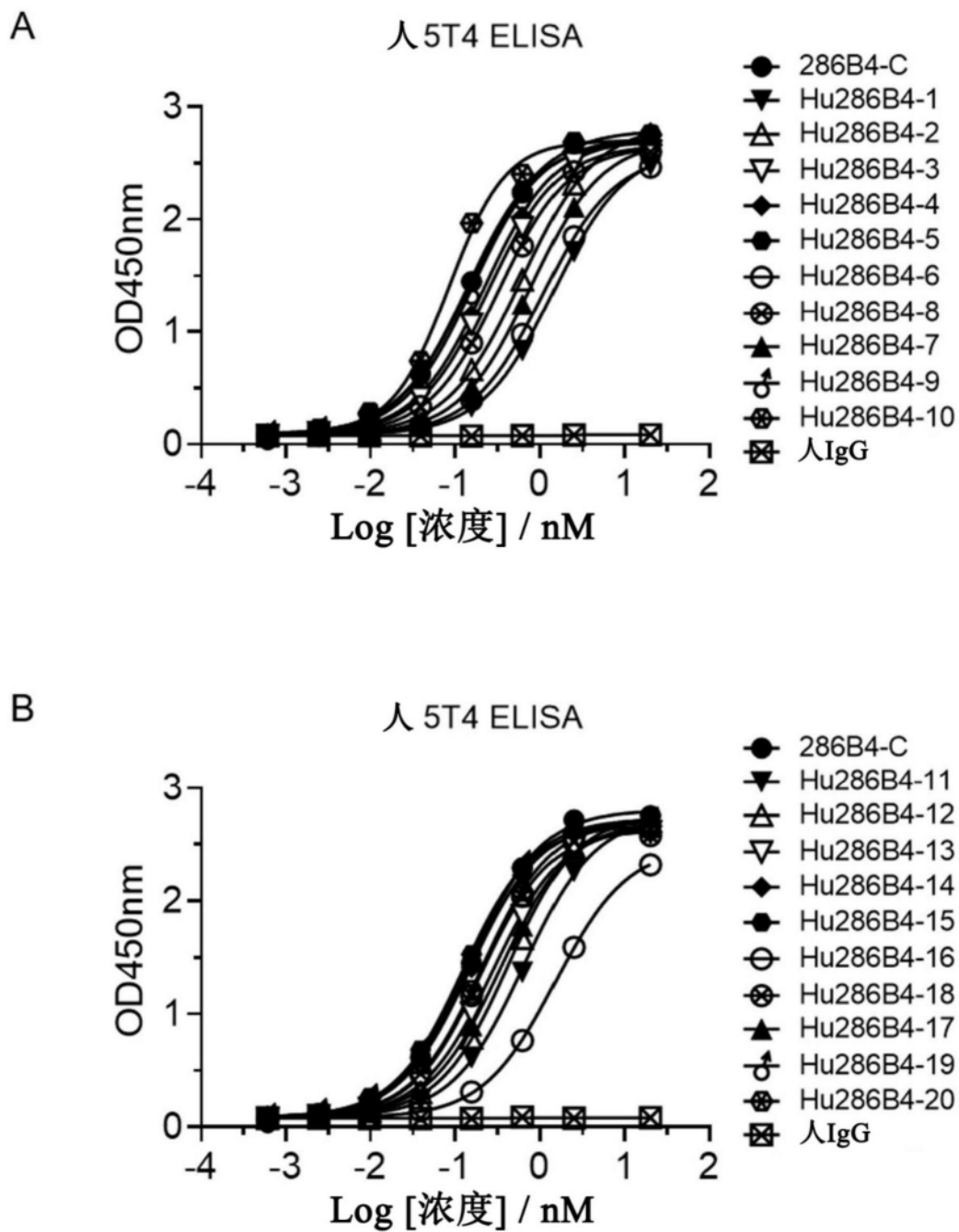


图16

286B4人源化抗体的基于细胞的结合

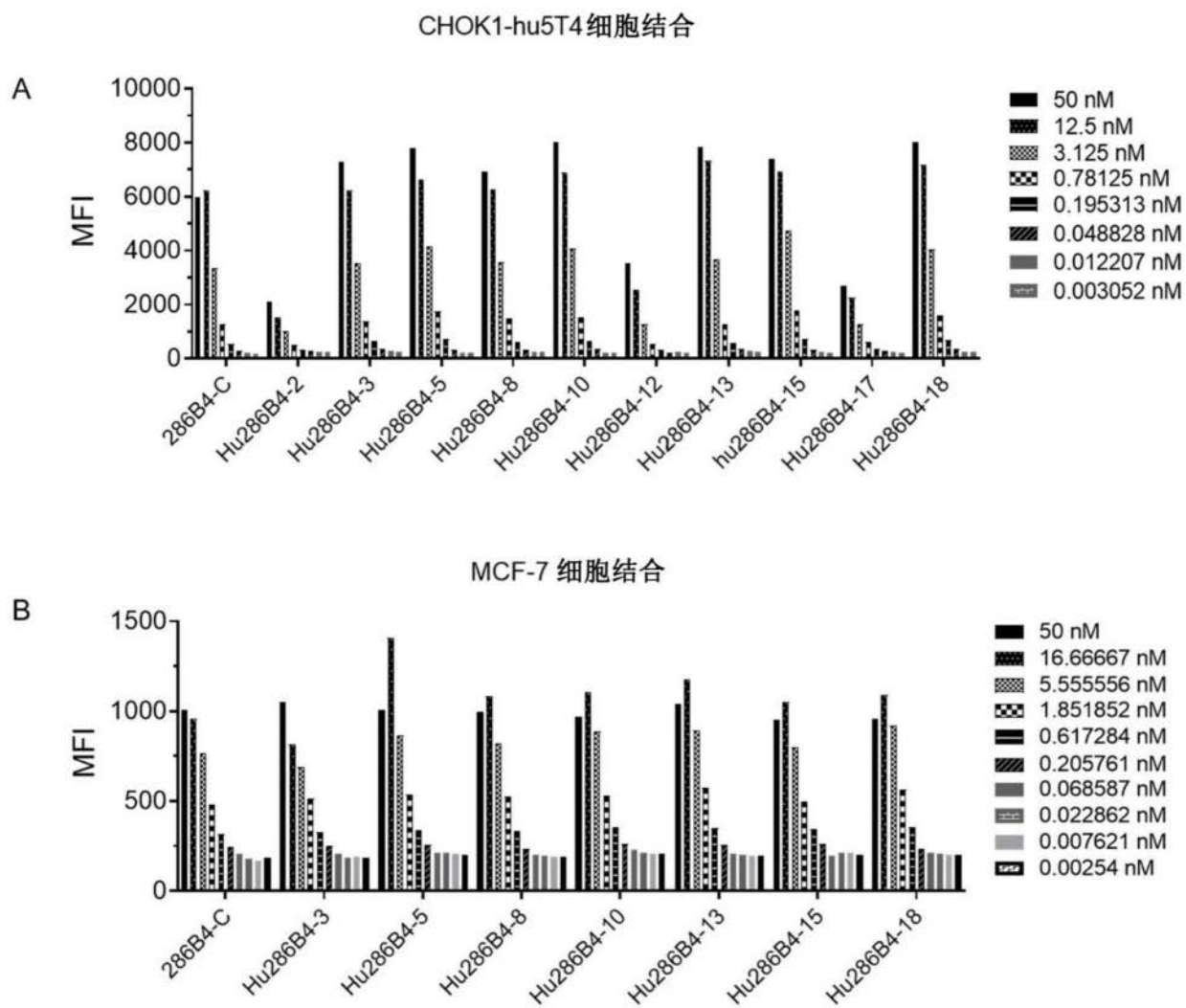


图17

PTM去除抗体的基于细胞的结合

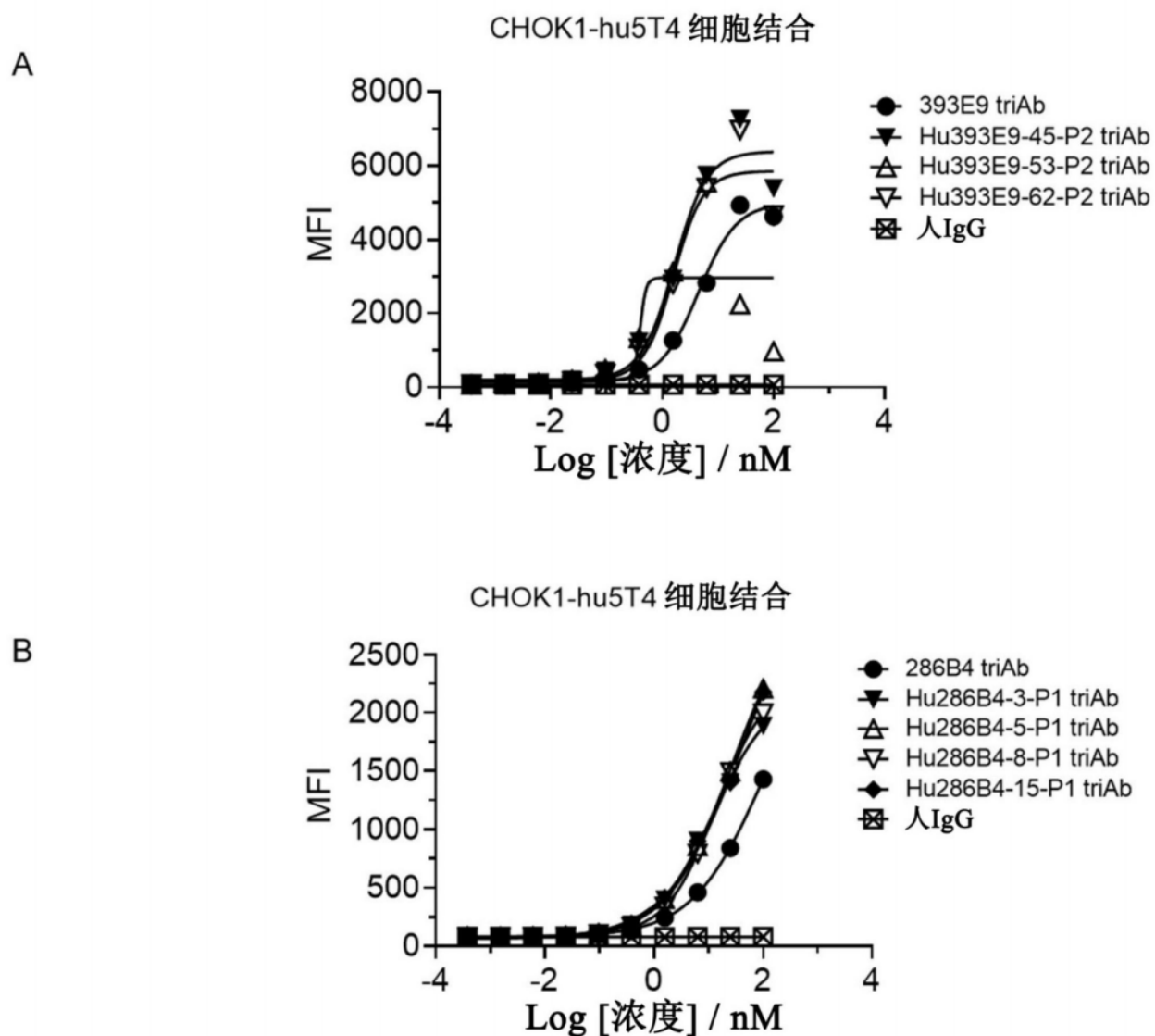


图18

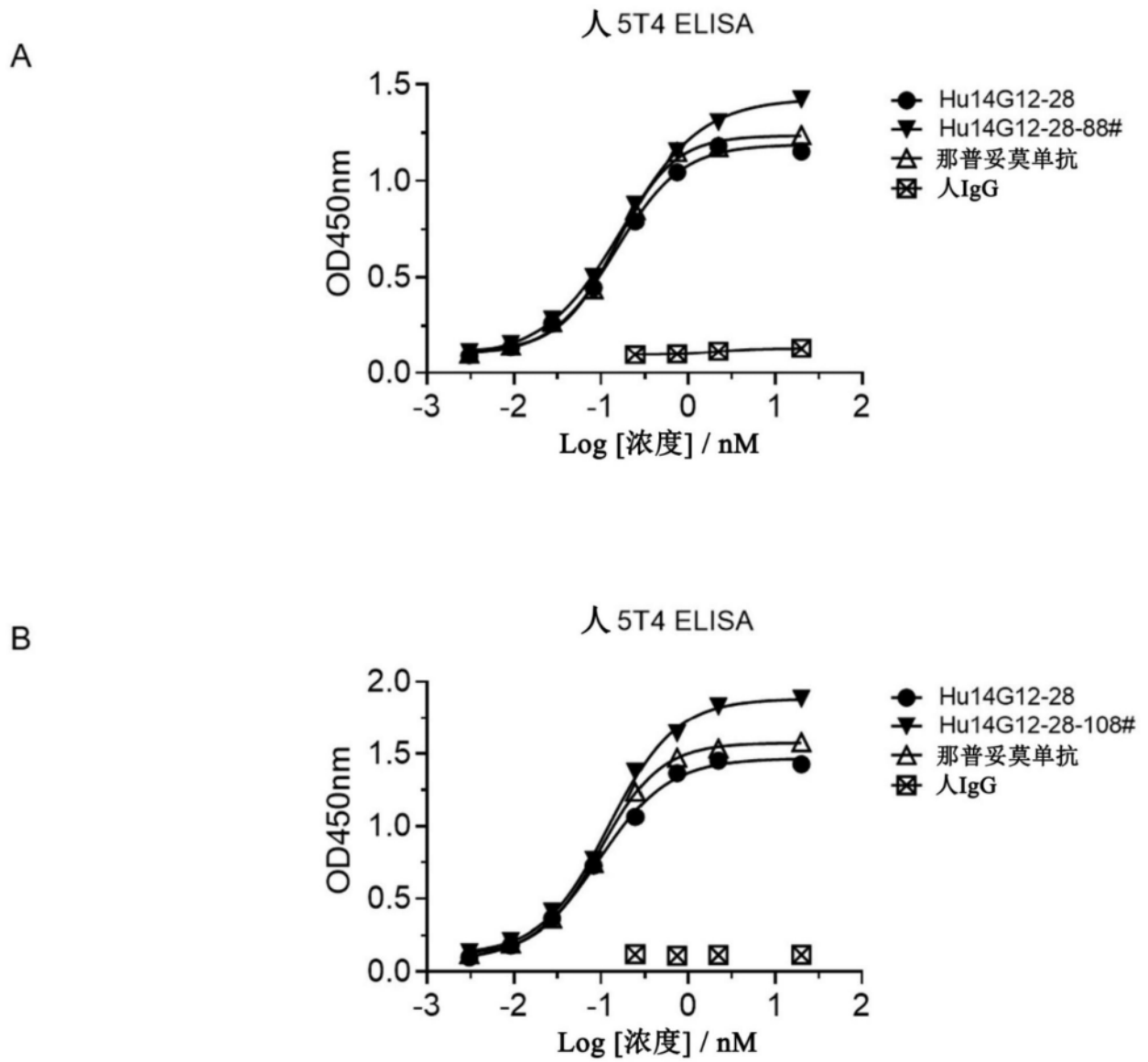


图19

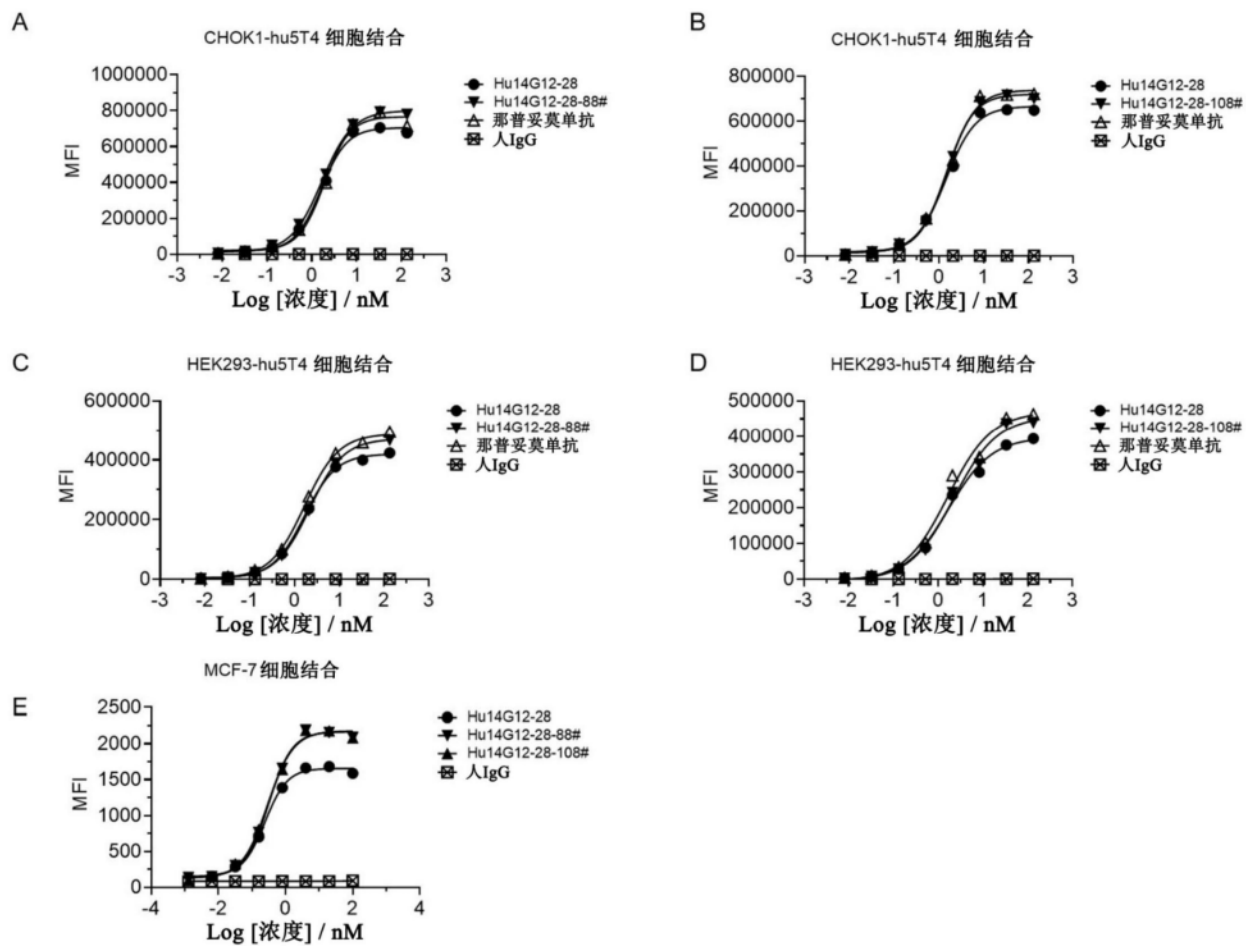


图20