(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119451983 A
(43)申请公布日 2025.02.14

(21)申请号 202380036403.9
(22)申请日 2023.02.27
(30)优先权数据
63/314,490 2022.02.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2023/050203 2023.02.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/161943 EN 2023.08.31
(71)申请人 耐科廷疗法有限公司
地址 以色列耶路撒冷
(72)发明人 皮恩卡斯·茨克尔曼
阿纳斯·阿提耶
阿克拉姆·奥贝达特
盖伊·西纳蒙
(74)专利代理机构 北京汉智嘉成知识产权代理有限公司 11682
专利代理师 方珉 鲁山
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书26页
序列表（电子公布） 附图20页

(54)发明名称

针对连接蛋白2的人源化抗体及其药物偶联物

(57)摘要

本发明提供了人源化单克隆抗体,其以高亲和力和特异性识别人连接蛋白2并抑制它与CD112R的结合。这些抗体携带细胞毒性载荷,并且不与Fcγ受体相互作用。本发明进一步提供了包含所述抗体的药物组合物及其用于癌症免疫疗法的方法。

CN 119451983 A

1.一种特异性结合人连接蛋白2的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:

(i)一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:1-3中阐述的序列;和

(ii)一组四个重链(HC)构架(FR)序列,其中:FR-H1选自SEQ ID NO:21、25和27;FR-H2是SEQ ID NO:22;FR-H3选自SEQ ID NO:23、26、28和29;FR-H4是SEQ ID NO:24;

并且所述轻链可变区包含:

(i)一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:4-6中阐述的序列;和

(ii)一组四个轻链(LC)构架(FR)序列,其中:FR-L1选自SEQ ID NO:30、34、37和39;FR-L2选自SEQ ID NO:31和35;FR-L3选自SEQ ID NO:32、36、38和40;并且FR-L4是SEQ ID NO:33。

2.根据权利要求1所述的人源化抗体,其中所述重链包含选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的可变区序列;并且其中所述轻链包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的可变区序列。

3.根据权利要求1或2中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含选自下述的重链和轻链:

(i)重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的可变区;

(ii)重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:15的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:18的可变区;

(iii)重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:17的可变区;

(iv)重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:14的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:18的可变区;

(v)重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:15的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:19的可变区;和

(vi)重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:16的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:20的可变区。

4.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:11具有至少约95%同一性的可变区,并且轻链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:12具有至少约95%的同一性的可变区。

5.根据权利要求4所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中重链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的可变区,并且轻链包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:12的可变区。

6.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化单克隆抗体具有选自IgG1、IgG4和IgG2的重链恒定区。

7.根据前述权利要求中任一项所述的人源化抗体,其中所述人源化抗体具有阻止Fcγ R介导的内化的突变Fc结构域。

8.根据权利要求7所述的人源化抗体,其中所述Fc结构域对于与Fcγ受体的结合是无

效的。

9.一种偶联物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的抗体或其片段。

10.根据权利要求9所述的偶联物,其中所述人源化抗体或其片段被附连到细胞毒性部分、放射活性部分、亲和力部分或标记部分。

11.根据权利要求9所述的偶联物,其中所述人源化抗体或其片段被附连到毒素(载荷)。

12.根据权利要求11所述的偶联物,其中所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

13.根据权利要求12所述的偶联物,其中所述微管抑制剂是澳瑞他汀或其衍生物。

14.根据权利要求13所述的偶联物,其中所述澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

15.根据权利要求12所述的偶联物,其中所述毒素是美登素衍生物。

16.根据权利要求15所述的偶联物,其中所述美登素衍生物是DM4或DM1。

17.根据权利要求12所述的偶联物,其中所述毒素是DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂。

18.根据权利要求17所述的偶联物,其中所述DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂是DXd。

19.根据权利要求17所述的偶联物,其中所述DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂是SN-38。

20.根据权利要求11所述的偶联物,其中所述抗体和所述毒素通过接头连接。

21.根据权利要求20所述的偶联物,其中所述接头是可切割的。

22.一种多核苷酸序列,其编码根据权利要求1-8中任一项所述的人源化抗体或其片段的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

23.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-8中任一项所述的人源化抗体或抗原结合片段和/或根据权利要求9-20中任一项所述的偶联物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

24.根据权利要求23所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

25.一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药治疗有效量的至少一种根据权利要求1-8中任一项所述的人源化抗体或其片或根据权利要求9-21中任一项所述的偶联物。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述癌症是实体癌。

27.根据权利要求25所述的方法,其中所述癌症选自前列腺癌、结肠直肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌、甲状腺癌、类癌瘤、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、睾丸癌、尿路上皮癌、宫颈癌、黑色素瘤、淋巴瘤和肺癌。

28.根据权利要求25所述的方法,其中所述癌症是结肠直肠腺癌或肺腺癌。

29.根据权利要求25所述的方法,其中所述癌症是血液学癌症。

30.根据权利要求25-29中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用或进行至少一种额外的抗癌疗法。

31.一种在受试者中进行癌症诊断或预后的方法,所述方法包括使用至少一种根据权利要求1-8中任一项所述的人源化抗体或片段确定所述受试者的生物样品中连接蛋白2的表达水平。

针对连接蛋白2的人源化抗体及其药物偶联物

技术领域

[0001] 本发明属于免疫疗法领域,并涉及抗连接蛋白2抗体和抗体偶联物以及包含它们的治疗和诊断组合物,用于治疗疾病,特别是癌症。

背景技术

[0002] 癌症免疫疗法用于产生和增强抗肿瘤免疫应答,例如通过用特异性针对肿瘤细胞上的抗原的抗体治疗,或通过特异性激活抗肿瘤T细胞。在患者中召集针对肿瘤细胞的免疫细胞(例如T细胞)的能力提供了对抗原本被认为是不可治愈的癌症类型和转移的治疗模式。

[0003] T细胞介导的免疫应答包括由控制免疫应答幅度的共刺激和共抑制信号之间的平衡所调节的多个连续步骤。被称为免疫检查点的抑制信号对于维持自身耐受和限制免疫介导的附带组织损伤至关重要。这些抑制信号影响T细胞的应答并重塑免疫应答。

[0004] 连接蛋白2,也被称为脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白2、脊髓灰质炎病毒受体样2、CD112或PRR-2,是一种单程跨膜糖蛋白,具有两个Ig样C2型结构域和一个Ig样V型结构域。连接蛋白参与介导细胞与细胞外基质分子的黏附,充当黏附连接的质膜组分之一。它也充当单纯性疱疹病毒和伪狂犬病病毒的某些突变株的进入受体,并参与这些病毒的细胞间传播。已将该基因的变异与多发性硬化症严重程度的差异相关联。重要的是,连接蛋白2也可以充当T细胞信号传导的调节剂。它可以是T细胞功能的共刺激物或共抑制剂,具体取决于这些靶细胞上与它结合的受体:在与CD226(DNAM-1)结合后,它刺激T细胞增殖和细胞因子产生,包括IL-2和IFNγ的产生,而在与PVRIG(CD112R)和/或TIGIT(具有免疫球蛋白和ITIM结构域的T细胞免疫受体)相互作用时,它抑制T细胞的增殖和激活。这些矛盾的相互作用是竞争性的。

[0005] 连接蛋白2在包括乳腺癌和卵巢癌在内的各种肿瘤中被显示为过表达(Oshima等,Molecular Cancer,2013,12:60)。连接蛋白2在肿瘤细胞上的存在导致预后不良和T细胞活性降低(Stamm等,Oncogene(2018)37:5269-5280)。

[0006] 美国专利申请第2017/0037133号公开了针对CD112(连接蛋白2、PVRL2)、CD155(PVR)、半乳糖凝集素9、TIM-3和/或TIGIT的抑制剂(例如抗体),其用于治疗血源性癌症,特别是急性髓系白血病(AML)。

[0007] WO 2020/144697公开了识别人连接蛋白2并阻断与TIGIT和CD112R的相互作用的单克隆抗体(mAb),其用于治疗癌症。

[0008] 抗体-药物偶联物(ADC)是用于直接杀死肿瘤细胞和随后激活旁观免疫细胞的有前景的工具。这些治疗性实体由与细胞毒性药物(载荷(payload))相连的mAb组成,并在原理上被设计成通过限制这些药物向表达靶抗原的细胞的特异性递送来拓宽它们的治疗窗口,从而减少其全身暴露和毒性。

[0009] 可能的载荷的实例是澳瑞他汀(Auristatin),一种破坏微管的药物。它衍生自海洋无壳软体动物龙骨海鹿(Dolabella auricularia),被称为尾海兔素(dolastatins)。已

经合成了澳瑞他汀的各种衍生物,例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)和单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。MMAE和MMAF由Seattle Genetics开发并用作ADC的载荷。MMAF和MMAE各有优缺点。MMAE的膜渗透性更强,IC50低于MMAF。然而,与MMAE相比,MMAF更加亲水,聚集倾向更低,显示出更低的全身毒性(park等,Molecules 2019,24,2754)。

[0010] 对于提供安全有效并且可以单独地或作为靶向工具用于涉及连接蛋白2表达的疾病中的诊断和治疗用途,例如作为癌症中的ADC的识别人连接蛋白2的人源化抗体,存在着尚未满足的需求。

发明内容

[0011] 本发明提供了特异性结合连接蛋白2的人源化抗体。从较大量抗体克隆中选择的本发明的人源化抗体与其他抗连接蛋白2抗体相比具有改进特性。根据一些实施方案,本发明进一步提供了包含所述抗体和诊断或治疗剂的偶联物。在一些实施方案中,所述偶联物包含细胞毒性部分,其被所述人源化抗体靶向在表面上呈递连接蛋白2受体的肿瘤细胞。

[0012] 通过将特定的成组互补决定区(CDR)序列和人构架(FW)序列组合,并在这些序列中引入特定突变以产生具有修饰的可变区和改进的特性的抗体,产生了大量的人源化抗体。有利的是,本文描述的新设计的人源化可变区保留了对维持抗体构象和结合亲和力至关重要的残基,同时具有较低的潜在T细胞表位发生率,从而将对抗体产生不良免疫应答的风险降至最低。本文公开的抗体基于包括同源性、T细胞表位、关键残基和预测结构在内的因素设计。出乎意料的是,与亲本嵌合抗体相比,本文公开的人源化抗体显示出改进的生物稳定性。

[0013] 已发现本文公开的人源化抗体非常适合用作使用治疗性毒素的靶向抗癌疗法。现在公开的是,与细胞毒性部分偶联的本文描述的抗连接蛋白2单克隆人源化抗体对各种肿瘤细胞系表现出强大的致死。将毒素使用本文描述的抗体直接靶向具有提高这些毒素的抗肿瘤功效、降低其全身毒性并因此提高癌症患者生存率的潜力。

[0014] 人Fc受体(Fcγ R)激活Fc效应功能例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。本发明的一些ADC包含一个或多个Fc突变,所述突变显著降低了它们被免疫细胞上表达的Fcγ R的结合,从而提高了它们的安全性和特异性。现在公开的是,包含具有特定Fc突变并与毒素连接的抗连接蛋白2单克隆人源化抗体的ADC是高效和安全的,适合于抗癌疗法。

[0015] 本发明的发明人首次表明,靶向连接蛋白2的ADC对于治疗癌症,特别是实体瘤是非常有用的。

[0016] 根据第一方面,本发明提供了一种特异性结合人连接蛋白2的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链(HC)和轻链(LC),其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的序列具有至少约90%同一性的可变区;并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0017] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与SEQ ID NO:11具有至少约90%同一性的可变区,并且所述轻链包含氨基酸

序列与SEQ ID NO:12具有至少约90％同一性的可变区。

[0018] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:11中阐述的序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:12中阐述的序列。

[0019] 本领域中已知有几种方法用于确定给定抗体分子的CDR序列,但不存在标准的明确方法。从抗体重链和轻链可变区确定CDR序列可以根据本领域中已知的任何方法来进行,包括但不限于被称为KABAT、Chothia和IMGT的方法。一组选定的CDR可能包括通过一种以上的方法鉴定的序列,即例如一些CDR序列可以使用KABAT确定,另一些可以使用IMGT确定。根据一些实施方案,所述mAb可变区的CDR序列使用IMGT方法确定。

[0020] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含一组6个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYW,重链CDR2包含序列VYPGNSDS(SEQ ID NO:8),重链CDR3包含序列LVGTFDY(SEQ ID NO:3),轻链CDR1包含序列QNVGIN(SEQ ID NO:10),轻链CDR2包含序列SAS,并且轻链CDR3包含序列QQYNTNPFT(SEQ ID NO:6)。

[0021] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含一组6个CDR序列,其中重链CDR1包含序列SYWIH(SEQ ID NO:1),重链CDR2包含序列AVYPGNSDSNYNQKF(KA/QG)(SEQ ID NO:2),重链CDR3包含序列LVGTFDY(SEQ ID NO:3),轻链CDR1包含序列(K/R)ASQNVGINV(V/A)(SEQ ID NO:4),轻链CDR2包含序列SASYRYS(SEQ ID NO:5),并且轻链CDR3包含序列QQYNTNPFT(SEQ ID NO:6)。

[0022] 根据一些实施方案,所述重链CDR2包含序列AVYPGNSDSNYNQKFKA(SEQ ID NO:41)或AVYPGNSDSNYNQKFQG(SEQ ID NO:42)。根据某些实施方案,所述轻链CDR1包含选自KASQNVGINVV(SEQ ID NO:43),KASQNVGINVA(SEQ ID NO:44)、RASQNVGINVV(SEQ ID NO:45)和RASQNVGINVA(SEQ ID NO:46)的序列。

[0023] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含在SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中阐述的一组6个CDR序列。根据其他示例性实施方案,所述人源化抗体或其片段包含在SEQ ID NO:7、8、9、10、(SAS)和6中阐述的一组6个CDR序列。根据其他实施方案,所述人源化抗体或其片段包含在SEQ ID NO:1、41、3、43、5和6中阐述的一组6个CDR序列。

[0024] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其包含:

[0025] i.一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:1-3中阐述的序列;和

[0026] ii.一组四个重链构架(FR)序列,其中FR-H1选自SEQ ID NO:21、25和27;FR-H2是SEQ ID NO:22;FR-H3选自SEQ ID NO:23、26、28和29;并且FR-H4是SEQ ID NO:24。

[0027] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,其包含:

[0028] i.一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:4-6中阐述的序列;和

[0029] ii.一组四个轻链构架(FR)序列,其中FR-L1选自SEQ ID NO:30、34、37和39;FR-L2选自SEQ ID NO:31和35;FR-L3选自SEQ ID NO:32、36、38和40;并且FR-L4是SEQ ID NO:33。

[0030] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:

[0031] i.一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:1-3中阐述的序列;和

[0032] ii.一组四个重链构架序列,其中FR-H1选自SEQ ID NO:21、25和27;FR-H2是SEQ ID NO:22;FR-H3选自SEQ ID NO:23、26、28和29;FR-H4是SEQ ID NO:24;

[0033] 并且所述轻链可变区包含:

[0034] i.一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:4-6中阐述的序列;和

[0035] ii.一组四个轻链构架序列,其中FR-L1选自SEQ ID NO:30、34、37和39;FR-L2选自SEQ ID NO:31和35;FR-L3选自SEQ ID NO:32、36、38和40;并且FR-L4是SEQ ID NO:33。

[0036] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:

[0037] i.一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:7-9中阐述的序列;和

[0038] ii.一组四个重链构架序列,其中:FR-H1选自SEQ ID NO:21、25和27;FR-H2是SEQ ID NO:22;FR-H3选自SEQ ID NO:23、26、28和29;FR-H4是SEQ ID NO:24;

[0039] 并且所述轻链可变区包含:

[0040] i.一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:10、序列SAS和SEQ ID NO:6中阐述的序列;和

[0041] ii.一组四个轻链构架序列,其中:FR-L1选自SEQ ID NO:30、34、37和39;FR-L2选自SEQ ID NO:31和35;FR-L3选自SEQ ID NO:32、36、38和40;并且FR-L4是SEQ ID NO:33。

[0042] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的序列具有至少约95%同一性的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的序列具有至少约95%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的序列具有至少约97%同一性的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的序列具有至少约97%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述人源化单克隆抗体的重链可变区包含选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0043] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段是单克隆抗体、Fab、$F(ab)_2$、单结构域抗体或单链可变片段(scFv)。

[0044] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段是IgG单克隆抗体。根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体包含选自IgG4、IgG1和IgG2的重链恒定区。在某些实施方案中,所述人源化抗体或其片段是IgG4亚类。在某些实施方案中,所述人源化抗体或其抗原结合片段是IgG1亚类。

[0045] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体包含κ轻链恒定区。

[0046] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体是IgG1,其重链包含与SEQ ID NO:47中阐述的序列具有至少约90%、95%或98%同一性的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案,所述人源化单克隆抗体是IgG1,其重链包含SEQ ID NO:47中阐述的氨基酸序列。

[0047] 根据一些实施方案,所述人源化单克隆抗体的κ轻链包含与SEQ ID NO:49中阐述的序列具有至少约90%、95%或98%同一性的氨基酸序列。根据某些示例性实施方案,所述人源化单克隆抗体的κ轻链包含SEQ ID NO:49中阐述的氨基酸序列。

[0048] 根据一些实施方案,所述人源化抗体具有阻止Fc γR介导的内化的突变Fc结构域。

[0049] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含Fc无效结构域。根据某些实施方案,所述Fc结构域对于与在免疫细胞上发现的Fc γ受体的结合是无效的。根据某些示例性实施方案,所述Fc结构域对于与CD64、CD32a、CD32b、CD16a和/或CD16b的结合是无效的。

[0050] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含IgG1 Fc结构域。根据某些实施方案,所述IgG1 Fc结构域对于与Fc γ受体的结合是无效的。根据其他实施方案,所述IgG1 Fc结构域对于与一种或多种Fc γ受体的结合是无效的。根据某些示例性实施方案,所述IgG1 Fc结构域对于与CD64、CD32a、CD32b、CD16a和/或CD16b的结合是无效的。

[0051] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包括选自下述的人IgG:(i)具有突变L235S的人IgG1;(ii)具有突变L235S和E272K的人IgG1;(iii)具有突变G237I的人IgG1;(iv)具有突变G237I和E272I的人IgG1;(v)具有突变G237I和V264R的人IgG1;(vi)具有突变V215A、E269R和K322A的人IgG1;(vii)具有突变L234A、L235A和P329G的人IgG1;(viii)具有突变S228P、L235P和V264R的人IgG4;(ix)具有突变P238H的人IgG2;或(x)具有突变P238H和V264R的人IgG2。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0052] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含选自SEQ ID NO:61-70的重链序列。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0053] 根据一些实施方案,提供了一种包含上述人源化抗体或其片段的偶联物。

[0054] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或其片段被附连到细胞毒性部分、放射活性部分或亲和力或标志标记物。

[0055] 根据本发明的抗体-药物偶联物(ADC)包含如本文所述的人源化抗体和任选的接头,以及毒素。

[0056] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段直接地或通过接头偶联到毒素(载荷)。

[0057] 根据一些实施方案,所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。

[0058] 根据某些实施方案,所述毒素是微管破坏药物。根据某些示例性实施方案,所述毒素是澳瑞他汀或其衍生物。根据某些实施方案,所述澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

[0059] 根据一些实施方案,所述毒素是皂草素(saporin)。

[0060] 根据一些实施方案,所述毒素是美登素(maytansine)衍生物。根据某些实施方案,所述美登素衍生物是DM4或DM1。

[0061] 根据一些实施方案,所述毒素是喹啉生物碱。根据某些实施方案,所述喹啉生物碱是SN-38。

[0062] 根据一些实施方案,所述毒素是DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂。根据一些实施方案,DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂是依喜替康(Exatecan)或依喜替康衍生物。根据某些实施方案,所述DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂是DXd。

[0063] 根据一些实施方案,所述毒素被直接连接到所述抗体。根据其他实施方案,所述抗体和毒素通过接头或间隔物相连。根据一些实施方案,所述毒素被直接地或通过接头或间隔物连接到所述人源化抗体。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0064] 根据一些实施方案,所述接头是可切割的。根据其他实施方案,所述接头是不可切

割的。根据一些实施方案,所述接头是酶可切割接头。根据某些实施方案,所述接头是pH敏感性接头。根据一些实施方案,所述接头是可还原接头(sulfo-SPDB)。

[0065] 根据一些实施方案,所述接头选自马来酰亚胺基己酰基(MC)、马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)、马来酰亚胺基甲基环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)和Lys-PAB-CO(赖氨酸-对氨基苯甲基-C=O)。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0066] 根据一些实施方案,提供了编码上述重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0067] 根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码人源化抗体重链可变区,所述多核苷酸包含选自SEQ ID NO:51-55的序列或其具有至少80%序列同一性的变体。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0068] 根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码人源化抗体轻链可变区,所述多核苷酸包含选自SEQ ID NO:56-60的序列或其具有至少80%序列同一性的变体。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0069] 根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码人源化抗体重链可变区,所述多核苷酸包含选自SEQ ID NO:51-55的序列。根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码人源化抗体轻链可变区,所述多核苷酸包含选自SEQ ID NO:56-60的序列。

[0070] 根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码人源化抗体重链可变区,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:51中阐述的序列。根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码人源化抗体轻链可变区,所述多核苷酸包含SEQ ID NO:56中阐述的序列。

[0071] 根据一些实施方案,提供了编码上述人源化抗体重链和轻链的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0072] 根据一些实施方案,所述编码人源化抗体重链的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:48中阐述的序列或其具有至少80%序列同一性的变体。根据一些实施方案,所述编码人源化抗体轻链的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:50中阐述的序列或其具有至少80%序列同一性的变体。

[0073] 根据一些实施方案,编码本文所述的人源化抗体的氨基酸链的DNA序列包含前导序列。根据某些示例性实施方案,所述DNA序列编码SEQ ID NO:71中阐述的前导肽序列。

[0074] 另一方面,本发明提供了一种核酸构建体,其包含编码至少一个本文所述的人源化抗体链或其片段的核酸分子。根据一些实施方案,所述核酸构建体是质粒。

[0075] 还描述了一种细胞系,其包含编码本发明的抗体的核酸。所述细胞系用于表达本文所述的人源化抗体或其片段。在某些实施方案中,所述细胞系是哺乳动物细胞系例如中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

[0076] 根据另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文描述的人源化抗体或抗原结合片段或包含所述抗体的偶联物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0077] 根据一些实施方案,所述药物组合物用于治疗癌症。

[0078] 任何给药方式均可用于将本发明的组合物递送到有需要的受试者,包括肠胃外和肠内给药方式。

[0079] 根据一些实施方案,所述药物组合物被配制成用于注射或输注。根据一些实施方

案,所述药物组合物被配制成用于静脉内给药。在某些实施方案中,所述药物组合物被配制成用于肿瘤内给药。

[0080] 根据另一个方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者给药治疗有效量的至少一种本文所述的人源化抗体或其偶联物。

[0081] 根据一些实施方案,所述癌症的特征在于连接蛋白2的过表达。

[0082] 在某些实施方案中,所述癌症包括实体瘤。

[0083] 在某些实施方案中,所述癌症选自前列腺癌、结肠直肠癌、肝癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌、甲状腺癌、类癌瘤、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌、睾丸癌、尿路上皮癌、宫颈癌、黑色素瘤、淋巴瘤和肺癌。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0084] 根据一些实施方案,所述癌症是乳腺癌。根据一些实施方案,所述癌症是结肠直肠腺癌或肺腺癌。

[0085] 根据其他实施方案,所述癌症是血液学癌症。根据一些实施方案,所述血液学癌症选自:白血病,包括急性髓系白血病(AML)、慢性髓系白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL);淋巴瘤,包括霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤;和多发性骨髓瘤。

[0086] 根据一些实施方案,所述受试者是人。

[0087] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用或进行至少一种额外的抗癌疗法。根据某些实施方案,所述额外的抗癌疗法是手术、化疗、放疗或免疫疗法。

[0088] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括给药本文描述的人源化抗体和额外的抗癌药剂。根据一些实施方案,所述额外的抗癌药剂选自免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂和化学治疗剂。

[0089] 根据其他实施方案,所述额外的免疫调节剂是与人连接蛋白2之外的抗原结合的抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0090] 根据一些实施方案,所述额外的免疫调节剂是针对免疫检查点分子的抗体。根据一些实施方案,所述额外的免疫调节剂是针对免疫检查点分子的抗体,所述免疫检查点分子选自人程序化细胞死亡蛋白1(PD-1)、PD-L1和PD-L2、癌胚抗原相关细胞黏附分子1(CEACAM1)、淋巴细胞活化基因3(LAG3)、CD137、OX40(也被称为CD134)、致死细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、TIGIT、PVR、CTLA-4、NKG2A、GITR和任何其他检查点分子或其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方案。根据某些实施方案,所述额外的免疫调节剂是针对PD-1的抗体。根据一些实施方案,所述额外的免疫调节剂是针对CTLA-4的抗体。

[0091] 根据一些实施方案,所述抗癌药剂选自爱必妥(erbitux)、阿糖胞苷(cytarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨(gemcitabine)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春瑞滨、卡莫司汀、洛莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺铂、卡铂、异环磷酰胺、氮芥、美法仑、噻替派、达卡巴嗪、博来霉素(bleomycin)、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)及其任何组合。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0092] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法涉及在受试者中阻止或减少转移的形成、生长或扩散。

[0093] 根据另一个方面,本发明提供了一种抗体-药物偶联物,其包含特异性结合人连接蛋白2的人源化抗体和毒素,用于治疗癌症。

[0094] 所述癌症和毒素如上所述。

[0095] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含突变Fc结构域。

[0096] 根据一个方面,本发明还提供了一种在受试者中对癌症进行诊断或预后的方法,所述方法包括使用至少一种本文所述的人源化抗体、片段或偶联物确定所述受试者的生物样品中连接蛋白2的表达水平。

[0097] 根据另一个方面,本发明还提供了一种确定或量化连接蛋白2的表达的方法,所述方法包括将生物样品与本文所述的抗体或抗体片段接触,并测量复合物形成的水平。

[0098] 根据一些实施方案,所述检测或量化连接蛋白2的表达的方法包括下述步骤:

[0099] i.将样品与特异性针对连接蛋白2的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段温育;

[0100] ii.使用可检测探针检测结合的连接蛋白2。

[0101] 根据一些实施方案,所述方法进一步包括下述步骤:

[0102] iii.将(ii)的量与从含有已知量的连接蛋白2的参比样品获得的标准曲线进行比较;和

[0103] iv.从所述标准曲线计算所述样品中连接蛋白2的量。

[0104] 根据一些特定实施方案,所述样品是体液或固体组织。在一些实施方案中,所述方法在体外或离体进行。

[0105] 还提供了一种用于测量生物样品中连接蛋白2的表达的试剂盒,其包含至少一种本文所述的抗体或抗体片段和测量连接蛋白2表达的设备。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含指导所述试剂盒的使用的说明材料。

[0106] 从下文给出的详细描述,本发明的进一步实施方案和全部适用范围将变得显而易见。然而应当理解,所述详细描述和具体实施例尽管指示了本发明的优选实施方案,但仅通过说明的方式给出,因为对于本领域技术人员而言,从该详细描述,本发明的精神和范围内的各种变化和修改将变得显而易见。

附图说明

[0107] 图1A-1C描绘了连接蛋白2mRNA水平(如所示的高或低)与低级别胶质瘤(图1A)、肾透明细胞癌(图1B)和肺腺癌(图1C)患者的存活率的相关性。数据集从TCGA网站获得,并使用oncolnc.org网站(https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67)分析。N表示分析时包含的患者的数量。

[0108] 图2是在免疫细胞上表达的受体及其对肿瘤表达的或抗原呈递细胞(APC)上的连接蛋白2(CD112)的相应亲和力的示意图。TIGIT是许多免疫细胞(例如T细胞和NK细胞)上的共抑制受体;DNAM-1(也被称为CD226)是许多免疫细胞(例如T细胞)上的激活受体,并且CD112R(也被称为PVRIG)和TIGIT是淋巴系免疫细胞(例如T细胞和NK细胞)上的共抑制受体;连接蛋白2主要通过其与CD112R的高亲和力结合而作为免疫细胞的抑制配体(矩形)。

[0109] 图3是示出了连接蛋白2表达阳性的肿瘤的百分比的图。从proteatlas.com获得的数据使用HPA012759mAb(抗连接蛋白2抗体;Sigma-Aldrich®)。在17/20的适应症中,观

察到连接蛋白2的膜表达呈中高水平。

[0110] 图4A-4C描绘了亲本(嵌合)抗连接蛋白2mAb的人源化变体的细胞上结合得以改进。通过FACS分析表达连接蛋白2的细胞与连续稀释的mAb人源化变体的结合。相对于嵌合Ab(HOKO)的EC50值(其被设置为1),计算每种变体的EC50值,并进行记录。图4A-与表达人连接蛋白2的293T细胞结合的EC50的倍数变化。图4B-与源自非洲绿猴(AFG,Chlorocebus)并天然表达连接蛋白2(XP_007995342.1)的Vero细胞结合的EC50的倍数变化。图4C-通过不同人源化mAb变体阻断CD112R的结果,其在浓度为66-0.81nM的抗连接蛋白2人源化克隆存在下,通过FACS分析CD112R-Fc与过表达人连接蛋白2的CHO(K)1细胞的结合来评估。在最低剂量下保持>70%阻断能力的变体被认为是优越的。

[0111] 图5A-5C描绘了人源化抗连接蛋白2ADC变体的致死效果。ADC基于皂草素(ZAP),并且A549靶细胞(肺腺癌)被证实表达连接蛋白2。图5A显示了与在两种浓度下测试的其他人源化变体相比,先导克隆H3K3的致死效果更优。图5B描绘了人源化H3K3和H4K2变体之间的ADC活性水平可比。图5C-在三种浓度下嵌合mAb(HOKO)和人源化H3K3变体之间的ADC活性水平可比。H3K3在移植到IgG2-P238H上时也进行了测试,IgG2-P238H具有FcgR无效Fc,并且对该变体的效力没有影响。除非用NS(不显著)指示,否则所有致死结果均为显著的($p<0.001$,双向t检验)。

[0112] 图6A-6C证实,与各种毒素偶联的人源化H3K3-$FcgR^{null}$抗连接蛋白2ADC导致各种实体瘤细胞系的有效致死。所述图显示了H3K3-$FcgR^{null}$ ADC在不同ADC浓度下以及在不同癌症靶之间在温育72小时后的显著致死活性。图6A描绘了RKO细胞(结肠直肠腺癌)的致死。图6B描绘了MDA-MB-231细胞(三阴性乳腺癌)的致死。图6C描绘了A549细胞(肺腺癌)的致死。除非用NS(不显著)指示,否则靶细胞的致死均为显著的($p<0.001$)。尽管所有ADC均都有毒性作用,但其程度因偶联的毒素和靶细胞的本质而异。尽管如此,在所有靶细胞中,含有MMAE或MMAF的ADC仍优于所有其他ADC。

[0113] 图7证实,人源化H3K3-$FcgR^{null}$抗连接蛋白2ADC不通过与高亲和力FcgR-CD64的相互作用而内化。将CHO-K1细胞或过表达人CD64(hCD64)但不表达连接蛋白2的CHO-K1细胞与两种版本的H3K3-$FcgR^{null}$ ADC(与MMAE或DM4偶联)或与具有hIgG4(S228P)或hIgG1Fc(两者均与DM4偶联)的对照无关ADC以12ug/ml温育72小时。当使用hIgG4或hIgG1时,观察到CD64阳性细胞的特异性致死增加,但当使用$FcgR^{null}$ Fc H3K3 ADC变体时则没有。注意,无论靶细胞表达连接蛋白2还是CD64,DM4均诱导背景非特异性致死。

[0114] 图8证实,人源化H3K3-$FcgR^{null}$抗连接蛋白2ADC导致血液细胞系的有效致死。将具有所指示的接头-载荷组合的H3K3-$FcgR^{null}$ Ab以9-1μg/ml的浓度与HL-60细胞(AML模型)温育72小时。除了DM1之外,所有接头-载荷组合在高剂量下均导致>90%的致死,并且在所有测试的剂量下均显著致死($p<0.001$)。

[0115] 图9A-9B描绘了人源化H3K3-$FcgR^{null}$抗连接蛋白2ADC对皮下移植到雌性裸小鼠的血液肿瘤细胞系HL-60的体内疗效。图9A比较了使用不同接头-载荷(LP)组合的治疗效果。其中两种LP组合具有显著效果:DM4导致显著的肿瘤生长抑制(TGI,$p<0.05$),而对MMAE观察到肿瘤完全消退。基于MMAE的ADC的效果在图9B中示出,不包括其他治疗。

[0116] 图10描绘了人源化H3K3-$FcgR^{null}$抗连接蛋白2ADC(1107-MC-VC-MMAE)对实体(结肠直肠腺癌)肿瘤细胞系RKO的体内疗效。空白的媒介物被用作对照。

[0117] 图11描绘了与批准用于TNBC的ADC药物Trodelvy(Sacituzumab-govitecan)相比,与Dxd连接的人源化H3K3-FcgR^{null}抗连接蛋白2mAb(NTX1107)对MDA-MB-231(三阴性乳腺癌或TNBC)细胞的体外致死。两种ADC均使用相同类别的细胞毒性载荷(即拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂)。将MDA-MB-231细胞在指定浓度的这些ADC存在下温育。120小时后评估致死。两种ADC均诱导靶细胞的强烈致死,Trodelvy在两种浓度下都具有显著优势(***p<0.0005)。

[0118] 图12描绘了与Trodelvy相比,人源化H3K3-FcgR^{null}抗连接蛋白2ADC(NTX1107)针对雌性裸小鼠中MDA-MB-231皮下肿瘤模型的体内疗效。NTX1107-Dxd能够显著抑制肿瘤生长,导致肿瘤停滞,而Trodelvy在相同治疗方案下对肿瘤生长没有影响。

[0119] 图13比较了使用H3K3-FcgR^{null}-Dxd(NTX1107-Dxd)和H3K3-FcgR^{null} MMAE(NTX1107-MMAE)的体内治疗针对雌性裸小鼠中MDA-MB-231皮下肿瘤模型的效果。对HNTX1107-MMAE观察到肿瘤完全消退,在研究结束时7/7只小鼠没有可测量的肿瘤。对NTX1107-Dxd观察到肿瘤消退,在研究结束时4/7只小鼠没有可测量的肿瘤。

具体实施方式

[0120] 本发明提供了识别连接蛋白2的人源化单克隆抗体。有利地,本发明的抗体被几乎完全人源化,从而避免了对所述抗体产生不良免疫应答的风险,因此可能在人体中使用是安全的。本发明的抗体的特征在于具有独特的CDR序列和新的人源化构架序列和设计。

[0121] 在一些实施方案中,本发明进一步提供了包含本文描述的人源化抗体的抗体-药物偶联物或ADC,其可用于治疗癌症。

[0122] 在下面的描述中阐述了某些具体细节,以便提供对各种实施方案的全面理解。然而,本领域技术人员将理解,所提供的实施方案可以在没有这些细节的情况下实践。除非上下文另有要求,否则在整个本说明书和随后的权利要求书中,词语“包含”及其变化形式应当以开放、包容的意义解释,即解释为“包括但不限于”。在本说明书和随附的权利要求书中使用的没有具体数目的指称包括多个指称物,除非内容另有明确规定。还应注意的是,除非内容另有明确规定,否则术语“或”通常以其包括“和/或”的含义使用。此外,本文提供的标题仅为方便起见,并不解释所要求保护的实施方案的范围或含义。

[0123] 本文所使用的术语“约”是指与所陈述的量相差10%或更少的量。

[0124] 本文所使用的术语“连接蛋白2”或“连接蛋白细胞黏附分子2”是指人类质膜糖蛋白,也被称为CD112和PVRL2。连接蛋白2蛋白是I型单程跨膜糖蛋白,具有两个Ig样C2型结构域和一个Ig样V型结构域。这种蛋白质是黏附连接的质膜组分之一。它也充当单纯性疱疹病毒和伪狂犬病病毒的某些突变株的入口,并参与这些病毒的细胞间传播。根据本发明的示例性连接蛋白2被阐述在下述SwissPort、UniPort和GenBank符号或登录号中:基因ID:5819、Q92692、I68093、NP_001036189.1、NP_002847.1和#Q92692。

[0125] 根据一个方面,本发明提供了一种特异性结合连接蛋白2的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链和轻链,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的序列具有至少约90%同一性的可变区;并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0126] 根据另一个方面,本发明提供了一种特异性结合连接蛋白2的人源化抗体或其至少包含抗原结合位点的片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:

[0127] (i)一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:1-3中阐述的序列;和

[0128] (ii)一组四个重链构架序列,其中:FR-H1(构架重链No.1)选自SEQ ID NO:21、25和27;FR-H2是SEQ ID NO:22;FR-H3选自SEQ ID NO:23、26、28和29;FR-H4是SEQ ID NO:24;

[0129] 并且所述轻链可变区包含:

[0130] (i)一组三个CDR序列,其包含SEQ ID NO:4-6中阐述的序列;和

[0131] (ii)一组四个轻链构架序列,其中FR-L1(构架轻链No.1)选自SEQ ID NO:30、34、37和39;FR-L2选自SEQ ID NO:31和35;FR-L3选自SEQ ID NO:32、36、38和40;并且FR-L4是SEQ ID NO:33。

[0132] 所述构架是链可变区的非CDR序列。FR-H1是可变重链中CDR1之前的序列,FR-H2是CDR1和CDR2之间的序列,FR-H3是CDR2和CDR3之间的序列,并且FR-H4是CDR3之后的序列。FR-L1是可变轻链中CDR1之前的序列,FR-L2是CDR1和CDR2之间的序列,FR-L3是CDR2和CDR3之间的序列,并且FR-L4是CDR3之后的序列。

[0133] 根据另一个方面,本发明提供了一种人源化抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含:

[0134] i.一组三个CDR序列,所述CDR包含序列SYW、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:3;和

[0135] ii.一组四个重链构架序列,其中:FR-H1选自SEQ ID NO:21、25和27;FR-H2是SEQ ID NO:22;FR-H3选自SEQ ID NO:23、26、28和29;FR-H4是SEQ ID NO:24;

[0136] 并且所述轻链可变区包含:

[0137] i.一组三个CDR序列,所述CDR包含SEQ ID NO:10、SAS和SEQ ID NO:6中阐述的序列;和

[0138] ii.一组四个轻链构架序列,其中:FR-L1选自SEQ ID NO:30、34、37和39;FR-L2选自SEQ ID NO:31和35;FR-L3选自SEQ ID NO:32、36、38和40;并且FR-L4是SEQ ID NO:33。

[0139] 根据一些实施方案,所述人源化抗体或其片段包含:重链可变区,其包含一组三个CDR序列,所述CDR包含序列SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9;和轻链可变区,其包含一组三个CDR序列,所述CDR包含序列SEQ ID NO:10、SAS和SEQ ID NO:6。

[0140] 所提供的抗体中包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体和多反应性抗体)和抗体片段。所述抗体包括抗体偶联物和包含所述抗体的分子例如嵌合分子。因此,所述抗体包括但不限于全长及其保留结合特异性的片段和部分,例如其任何特异性结合部分,包括具有任何免疫球蛋白类别和/或同种型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、IgD、IgE和IgM)的那些特异性结合部分;以及生物学相关(抗原结合)片段或其特异性结合部分,包括但不限于Fab、F(ab')2、Fv和scFv(单链或相关实体)。单克隆抗体通常是基本上均质的抗体组合物中的一种;因此,除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变之外,单克隆抗体组合物中包含的任何单个抗体都是相同的。多克隆抗体是制剂,其包括不同序列的不同抗体,它们通常针对两个或更多个不同的决定簇(表位)。单克隆抗体可以包含人IgG1恒定区。单克隆抗体可以包含人IgG4恒定区。

[0141] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并包括多克隆和单克隆抗体,包括

完整抗体及其功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')2片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链抗体片段(包括单链可变片段(sFv或scFv))和单结构域抗体(例如sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖遗传工程改造和/或以其他方式修饰的免疫球蛋白形式,例如胞内抗体、肽体、全人抗体、人源化抗体和异源偶联抗体、多特异性(例如双特异性)抗体、双体抗体、三体抗体和四体抗体、串联双-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语"抗体"应当被理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。抗体可以包含人IgG1恒定区。抗体可以包含人IgG4恒定区。

[0142] 从给定的重链或轻链可变序列进行CDR鉴定或测定,通常使用本领域中已知的几种方法之一。例如,此类测定根据Kabat(Wu T.T和Kabat E.A.,J Exp Med,1970;132:211-50)和IMGT(Lefranc M-P等,Dev Comp Immunol,2003,27:55-77)来进行。

[0143] 当使用术语"具有序列的CDR"或类似术语时,它包括其中所述CDR包含指定序列的选项,以及其中所述CDR由所述指定序列组成的选项。

[0144] 抗体的抗原特异性是基于高变区(HVR),即轻链和重链两者的共同形成抗原结合位点的独特CDR序列。

[0145] 所提供的抗体中包括抗体片段。"抗体片段"是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,所述部分与完整抗体结合的抗原结合。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv或sFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在特定实施方案中,所述抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,例如scFv。

[0146] "人源化"抗体是其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基均源自非人CDR,并且所有或基本上所有构架区(FR)氨基酸残基均源自人FR的抗体。人源化抗体任选地可以包括至少一部分源自人抗体的抗体恒定区。非人抗体的"人源化形式"是指非人抗体的经历人源化的变体,通常是为了降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。根据一些实施方案,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如CDR残基所源自的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或提高抗体的特异性或亲和力。

[0147] 所述Fc结构域中的氨基酸残基可以被替换为无效,这意味着所述Fc结构域不结合Fc受体,或者可以以如此低的亲和力和/或亲合力结合,从而不会因结合而引起任何Fc受体信号传导。所述Fc结构域可以对与Fcγ受体的结合无效。Fc结构域可以对其结合无效的一些示例Fcγ受体可以是但不限于FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32a)、FcγRIIB(CD32b)、FcγRIIIA(CD16a)、FcγRIIIA(CD16a)F158变体、FcγRIIIA(CD16a)V158变体或FcγRIIIB(CD16b)。Fc结构域可以具有一个或多个、两个或更多个、三个或更多个或四个或更多个降低所述Fc结构域与Fc受体的结合的氨基酸替换。

[0148] 根据一些实施方案,所述人源化抗体具有阻止FcγR介导的内化的突变Fc结构域。

[0149] 根据一些实施方案,所述人源化抗体包含Fc无效结构域。根据某些实施方案,所述Fc结构域对与Fcγ受体的结合是无效的。

[0150] 本文所使用的"Fc无效"是指与一种或多种Fcγ受体结合弱或没有结合的结构域。

[0151] 抗体-药物偶联物

[0152] 根据一个方面,本发明提供了一种偶联物,其包含与毒素融合的本文所描述的人

源化抗体。

[0153] 根据一些实施方案,所述偶联物包含含有重链和轻链的抗体或其片段,其中所述重链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的序列具有至少约90%同一性的可变区;并且其中所述轻链包含氨基酸序列与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的序列具有至少约90%同一性的可变区。

[0154] 根据一些实施方案,所述毒素选自微管抑制剂、DNA合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和RNA聚合酶抑制剂。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0155] 根据某些实施方案,所述毒素是微管破坏药物。根据某些示例性实施方案,所述毒素是澳瑞他汀或其衍生物。根据某些实施方案,所述澳瑞他汀衍生物是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)或单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。

[0156] 根据一些实施方案,所述毒素是皂苷。

[0157] 根据一些实施方案,所述毒素是美登素衍生物。根据某些实施方案,所述美登素衍生物是DM4或DM1。

[0158] 根据一些实施方案,所述毒素是喹啉生物碱。根据某些实施方案,所述喹啉生物碱是SN-38。

[0159] 根据其他实施方案,所述毒素选自MMAE、MMAF、皂草素、DM4、DM1、SN-38、卡利奇霉素、DXd、PBD、倍癌霉素、山卓霉素、α-鹅膏蕈碱、毛壳素、柔红霉素、17-AAG、Agrochelin A、多柔比星、甲氨蝶呤、秋水仙素、虫草素、Hygrolidin、Herboxidiene、阿魏醇、Curvulin、Englerin A、Taltobulin、雷公藤内酯、念珠藻素和奈莫柔比星。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0160] 根据一些实施方案,所述毒素是DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂。根据某些实施方案,所述DNA拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂是DXd。

[0161] 本文中使用本领域中已知的毒素名称。适合的载荷的非限制性示例包括:

[0162] -DM1——$N^{2'}$-脱乙酰基-$N^{2'}$-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素———一种微管蛋白抑制剂。

[0163] -DM4——$N^{2'}$-脱乙酰基-$N^{2'}$-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-Ravtansine———一种微管蛋白抑制剂。

[0164] -SN-38———一种强效DNA拓扑异构酶I抑制剂,吡喃并中氮茚并喹啉类别的成员,即(4S)-吡喃并[3',4':6,7]中氮茚并[1,2-b]喹啉-3,14-二酮,在第4和11位处带有两个额外的乙基取代基,并在第4和9位处带有两个额外的羟基取代基。

[0165] -DXd———一种依喜替康衍生物,强效DNA拓扑异构酶I抑制剂(例如目录号:MCE®的HY-13631D)。

[0166] -MMAF——单甲基澳瑞他汀F———一种微管蛋白抑制剂,分子式为C39H65N5O8。

[0167] -MMEA——单甲基澳瑞他汀E———一种微管蛋白抑制剂,分子式为C39H67N5O7。

[0168] 根据一些实施方案,所述抗体被直接连接到所述毒素。根据其他实施方案,所述抗体和毒素通过接头连接。根据一些实施方案,本文描述的人源化抗体被共价连接到所述毒素。

[0169] 根据一些实施方案,所述接头是可切割的。根据其他实施方案,所述接头是不可切

割的。

[0170] 根据一些实施方案,所述接头对pH或氧化还原电位的变化做出响应而被切割。根据一些实施方案,所述接头在与溶酶体酶接触时被切割。

[0171] 根据另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文描述的人源化抗体或抗原结合片段或包含所述抗体的偶联物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0172] 根据其他实施方案,根据本发明的药物组合物用于治疗以连接蛋白2的过表达为特征的癌症。可以使用已知数据库例如癌症基因组图谱(TCGA)来鉴定与连接蛋白2过表达相关的癌症类型。根据某些实施方案,可以使用根据本发明的组合物治疗的癌症选自肾上腺皮质癌(ACC)、嫌色性肾细胞癌(KICH)、肝细胞癌(LIHC)、结肠和直肠腺癌(COAD、READ)、胰腺导管腺癌(PAAD)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PCPG)、乳头状肾癌(KIRP)、肺腺癌(LUAD)、头颈部鳞状细胞癌(HNSC)、前列腺腺癌(PRAD)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、宫颈癌(CESC)、皮肤黑色素瘤(SKCM)、间皮瘤(MESO)、尿路上皮膀胱癌(BLCA)、透明细胞肾癌(KIRC)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、子宫癌肉瘤(UCS)、肉瘤(SARC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)、乳头状甲状腺癌(THCA)、多形性成胶质细胞瘤(GBM)、乳腺癌(BRCA)、低级别神经胶质瘤(LGG)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBC)。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0173] 本文所使用的术语“个体”、“患者”或“受试者”是指被诊断患有、疑似患有或有风险发生所述组合物和方法可用于治疗的至少一种疾病的个体。根据一些实施方案,所述个体是哺乳动物。根据一些实施方案,所述哺乳动物是小鼠、大鼠、兔、狗、猫、马、奶牛、绵羊、猪、山羊、美洲驼、羊驼或牦牛。根据一些实施方案,所述个体是人。

[0174] 本文所使用的术语“有效量”是指当施用到哺乳动物时引起生物效应的治疗剂的量。生物效应包括但不限于抑制或阻断受体-配体相互作用(例如PVR-TIGIT、PD-1-PD-L1/PD-L-2)、抑制信号传导通路、减少肿瘤生长、减少肿瘤转移或延长携带肿瘤的动物的存活期。“治疗量”是为发挥治疗效果而计算的药物浓度。治疗量涵盖能够在个体群体中诱导治疗反应的剂量范围。所述哺乳动物可以是人类个体。所述人类个体可能患有或疑似患有肿瘤。

[0175] 本文所使用的术语“组合”或“组合治疗”可以指同时给药待组合的制品或顺序给药待组合的制品。如本文中所述,当所述组合涉及制品的顺序给药时,所述制品可以按任何时间顺序给药。

[0176] 本文所使用的“检查点抑制剂”是指抑制生物体产生的生物分子(“检查点分子”)的药物,所述生物分子对生物体内T细胞的抗肿瘤/癌症活性进行负调控。检查点分子包括但不限于PD-1、PD-L-1、PD-L-2、CTLA4、TIM-3、LAG-3、VISTA、SIGLEC7、PVR、TIGIT、IDO、KIR、A2AR、B7-H3、B7H4、CEACAM1和CD112R。

[0177] 作为活性成分的本发明的分子被溶解、分散或混合在赋形剂中,众所周知,所述赋形剂是药学上可接受的并且与所述活性成分相容。适合的赋形剂是例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。本领域技术人员熟知其他适合的载体。此外,如果需要,所述组合物可以含有少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂。

[0178] 本文使用的术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性或预防性措施两者。需要治疗的人包括已经患有所述障碍的人以及将要预防所述障碍的人。

[0179] 术语“癌症”和“肿瘤”与哺乳动物中以细胞生长失调为特征的生理状况有关。癌症

是其中一组细胞表现出不受控制的生长或不想要的生长的一类疾病。癌细胞也可以扩散到其他地方,这可能导致转移的形成。例如,癌细胞在体内的扩散可以通过淋巴或血液发生。不受控制的生长、侵入和转移形成也被称为癌症的恶性特性。这些恶性特性将癌症与通常不侵袭或转移的良性肿瘤区分开来。

[0180] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括作为包含至少一种额外抗癌药剂的给药的治疗方案的一部分给药所述药物组合物。

[0181] 根据一些实施方案,所述抗癌药剂选自抗代谢剂、有丝分裂抑制剂、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、天冬酰胺酶、烷基化剂、抗肿瘤抗生素及其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0182] 根据一些实施方案,所述抗代谢剂选自阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨和羟基脲。根据一些实施方案,所述有丝分裂抑制剂选自长春新碱、长春花碱和长春瑞滨。根据一些实施方案,所述拓扑异构酶抑制剂选自拓扑替康和伊立替康。根据一些实施方案,所述烷基化剂选自白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺铂、卡铂、异环磷酰胺、氮芥、美法仑、噻替哌、达卡巴嗪和丙卡巴肼。根据一些实施方案,所述抗肿瘤抗生素选自博莱霉素、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、丝裂霉素、米托蒽醌和普卡霉素。根据一些实施方案,所述拓扑异构酶II抑制剂选自依托泊苷和替尼泊苷。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0183] 根据另一个方面,本发明提供了一种在患有癌症的个体中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述个体给药治疗有效量的所述人源化抗体或其抗原结合片段或所述药物组合物,以及PD-1、PD-L1、CTLA-4或CD112R信号传导的抑制剂。在某些实施方案中,所述癌症包括实体瘤。在某些实施方案中,所述癌症选自癌症、结肠癌、成胶质细胞瘤、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌或前列腺癌。在某些实施方案中,所述PD-1信号传导的抑制剂是与PD-1结合的抗体或其片段。在某些实施方案中,所述与PD-1结合的抗体或其片段是派姆单抗、纳武单抗、AMP-514、替雷利珠单抗、Spartalizumab,或其PD-1结合片段。在某些实施方案中,所述PD-1信号传导的抑制剂是特异性结合PD-L-1或PD-L-2的抗体。在某些实施方案中,所述特异性结合PD-L1或PD-L2的抗体包括德瓦鲁单抗、阿特珠单抗、阿维单抗、BMS-936559或FAZ053,或其PD-L1或PD-L2结合片段。在某些实施方案中,所述PD-1信号传导的抑制剂包括结合PD-1、PD-L1或PD-L2的Fc融合蛋白。在某些实施方案中,所述Fc融合蛋白包括AMP-224或其PD-1结合片段。在某些实施方案中,所述PD-1信号传导的抑制剂包括PD-1、PD-L1或PD-L2的小分子抑制剂。在某些实施方案中,所述PD-1、PD-L1或PD-L2信号传导的小分子抑制剂包括下述一者或多者:N-{2-[({2-甲氧基-6-[(2-甲基[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基]吡啶-3-基}甲基)氨基]乙基}乙酰胺(BMS202);(2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)-5-甲基苯甲基)-D-丝氨酸盐酸盐;(2R,4R)-1-(5-氯-2-((3-氰基苯甲基)氧基)-4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苯甲基)氧基)苯甲基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基吲哚;3-(4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基)-1-苯基-1h-吲哚;L-α-谷氨酰胺,N2,N6-双(L-丝氨酰基-L-天冬酰基胺酰基-L-苏氨酰基-L-丝氨酰基-L-α-谷氨酰基-L-丝氨酰基-L-苯丙氨酰基)-L-赖氨酰基-L-苯丙氨酰基-L-精氨酰基-L-缬氨酰基-L-苏氨酰基-L-谷氨酰胺酰基-L-亮氨酰基-L-丙氨酰基-L-脯氨酰基-L-赖氨酰基-L-丙氨

酰基-L-谷氨酰胺酰基-L-异亮氨酰基-L-赖氨酰基;(2S)-1-[[2,6-二甲氧基-4-[(2-甲基[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基]苯基]甲基]-2-哌啶甲酸;甘氨酰胺,N-(2-巯基乙酰基)-L-苯丙氨酰基-N-甲基-L-丙氨酰基-L-天冬酰胺酰基-L-脯氨酰基-L-组氨酰基-L-亮氨酰基-N-甲基甘氨酰基-L-色氨酰基-L-丝氨酰基-L-色氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-N-甲基-L-正亮氨酰基-L-精氨酰基-L-半胱氨酰基-,环状(1→14)-硫醚;或其衍生物或类似物。

[0184] 本文还描述了制备用于在患有癌症的个体中治疗癌症的组合物的方法,所述方法包括将所述人源化抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。在某些实施方案中,所述癌症包括实体瘤。在某些实施方案中,所述癌症选自结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾癌、头颈癌、卵巢癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、前列腺癌和肺癌。

[0185] 本文还描述了一种生产所述人源化抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在足以允许所述人源化抗体或其抗原结合片段表达和分泌的条件下,在细胞培养基中温育本文中描述的细胞系。

[0186] 根据一些特定实施方案,所述额外的抗癌药剂选自贝伐单抗、卡铂、环磷酰胺、盐酸多柔比星、盐酸吉西他滨、盐酸拓扑替康、噻替哌及其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方案。

[0187] 实施例

[0188] 现在参考下述实施例,所述实施例与上述描述一起以非限制性方式说明本发明。

[0189] 通常,本文使用的命名法和本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学、免疫学和重组DNA技术。此类技术在本领域中是众所周知的。为了方便读者,在整个本文件中提供了引用公知程序的其他通用参考文献。

[0190] 实施例1.连接蛋白2mRNA的高表达与各种癌症患者的低存活率相关

[0191] 在来自TCGA网站的数据上检查连接蛋白2mRNA表达水平与存活率之间的相关性,并使用oncolnc.org网站(https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67)进行分析。连接蛋白2mRNA表达水平是将患者分为低表达者和高表达者两个亚组的基础,如图1中用箭头为低级别胶质瘤(图1A;p=5.22E-5)、肾透明细胞癌(图1B;p=0.00037)和肺腺癌(图1C;p=0.0319)患者所指示的。

[0192] 实施例2.连接蛋白2通过特定受体结合并影响免疫细胞

[0193] 图2的示意图演示了在免疫细胞上表达的受体及其与通过肿瘤或抗原呈递细胞(APC)表达的连接蛋白2的相应亲和力。TIGIT与免疫细胞例如T细胞和NK细胞上的共抑制受体相关;DNAM-1(也被称为CD226)与免疫细胞(例如T细胞)上的激活受体相关,CD112R(也被称为PVRIG)与淋巴系免疫细胞(例如T细胞和NK细胞)上的共抑制受体相关;连接蛋白2(CD112)主要通过其与CD112R的结合而充当免疫细胞的抑制性配体。根据本发明,人源化抗连接蛋白2mAb阻断连接蛋白2与其高亲和力受体CD112R的相互作用,并且可以靶向癌细胞进行特异性毒素递送和致死。

[0194] 实施例3.连接蛋白2在大多数实体瘤上表达

[0195] 在Proteinatlas.com数据库中搜索连接蛋白2的所有别名(连接蛋白2、CD112、HVEB、PRR2、PVRL2、PVRR2)。在病理学标题下,发现了使用三种不同mAb的数据。HPA0127569mAb具有最高的验证评分(增强),因为它是通过正交方法验证的。因此,仅选择了该克隆在不同肿瘤之间的表达数据,如图3中所示。所述图显示了连接蛋白2表达阳性的

肿瘤的百分比。在17/20的适应症中,观察到连接蛋白2的膜表达处于中高水平。

[0196] 实施例4.人源化抗连接蛋白2mAb的改进的性能

[0197] 选择在专利申请公开号WO2020144697中公开的鼠类抗人连接蛋白2克隆2.11作为用于人源化的先导mAb。基于结构分析,鉴定了初步的一大组序列区段用于创建人源化变体。使用iTope™技术对这些区段进行选择和分析,以对肽与人II类MHC等位基因的结合进行计算机分析(Perry等,2008),并使用已知抗体序列相关T细胞表位的TCED™(Bryson等,2010)。被鉴定为人II类MHC的显著非人种系结合物或对TCED™的评分显著命中物的序列区段被丢弃。这产生了缩减的一组区段,将这些区段的组合如上所述进一步分析,以确保区段之间的结合部不含潜在的T细胞表位。将所选的序列区段组装成没有显著T细胞表位的完整V区序列。然后选择5个重链(VH1至VH5)和5个轻链(VK1至VK5)序列。表1中的数据显示了iTope™算法的读数。为了降低产生抗药物抗体(ADA)的可能性,分析了所述mAb的序列与MHCII的潜在结合。主要风险与高亲和力结合肽有关,这些肽与中度亲和力结合肽分开。

[0198] 表1.人源化抗连接蛋白2mAb的改进的特性。用于产生用于先导药物选择的人源化变体的亲本(V0)和人源化重链(VH1-5)和轻链(Vk1-5)可变链的预测MHCII表位(iTope评分)的说明。

[0199] 重链

[0200]

预测亲和力 MHCII	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
中	5	6	4	4	4	3
高	8	4	3	3	1	1

[0201] 轻链

[0202]

预测亲和力 MHCII	Vk0	Vk1	Vk2	Vk3	Vk4	Vk5
中	8	4	3	3	3	1
高	4	3	3	2	2	2

[0203] 亲本重链(VH0)有8个预测的高亲和力基序,亲本轻链(Vk0)具有4个此类基序。在人源化过程后,重链的预测高亲和力MHCII表位数量减少到3个(VH2、VH3)或甚至1个(VH4、VH5),轻链的预测高亲和力MHCII基序减少到2个(VK3-5)。

[0204] 因此,所述人源化过程消除了大多数预测的高亲和力MHCII基序,这些基序可能引发针对mAb的免疫原性。

[0205] 人源化变体的稳定性通过热斜坡稳定性实验进行评估,所述实验是对蛋白质和制剂的稳定性进行排序的确立方法。蛋白质的变性曲线提供了关于其热稳定性的信息,并代表了评估结构和制剂缓冲液修饰的结构“指纹”。蛋白质热结构稳定性的一个广泛使用的衡量标准是它从天然状态解折叠到变性状态的温度。

[0206] 对于许多蛋白质而言,这种解折叠过程发生在狭窄的温度范围内,并且该转变的中点被称为“解链温度”或“Tm”。为了确定蛋白质的解链温度,UNcle测量了在蛋白质经历构象变化时Sypro橙(其与蛋白质暴露的疏水性区域结合)的荧光。Tm提高是Ab先导物选择中

的一个理想特征,因为它预测了更稳定的Ab。

[0207] 将纯化的先导人源化抗体变体(一式两份)在PBS中稀释至0.5mg/ml的最终测试浓度,向其中加入Sypro橙(160x储用溶液)至20x溶液的终浓度。将9μL的每种样品混合物一式两份装入Uni微量比色池中。使样品经受15-95℃的热斜坡,斜坡速率为0.3℃/分钟,激发波长为473nm。从250-720nm收集全发射光谱,并使用510-680nm之间的曲线下面积来计算转变曲线的拐点(Tonset和Tm)。正如在表2中看到的,对于所有测试的抗体而言,与嵌合抗体(VH0/Vκ0)相比人源化变体的Tm1和Tonset更高。

[0208] 表2.使用UNcle生物稳定性平台测定的亲本/嵌合(VH0/Vk0)抗体和六种纯化的先导人源化变体的热稳定性值的总结。Tonset和TM1(解折叠的度量)两者高于5摄氏度的稳定性改善被认为是显著的,并以粗体标记。

[0209]

变体	平均 Tonset (℃)	平均 Tm1 (℃)
VH0/Vκ0	58.1	67.3
VH3/Vκ3	**65.6**	**74.3**
VH4/Vκ2	60.7	71.9
VH4/Vκ3	60.6	70.8
VH5/Vκ3	58.8	72.7

[0210]

VH5/Vκ4	59.9	68.3
VH5/Vκ5	61.3	69.4

[0211] 实施例5.人源化抗连接蛋白2mAb与连接蛋白2的改进的结合和对CD112R结合的阻断

[0212] 评估了人源化抗连接蛋白2mAb与由293T细胞(蛋白质id:Q92692)和Chlorocebus(非洲绿猴,AFG)Vero细胞表达的人连接蛋白2的结合,并确立了EC50值。AFG表达与人连接蛋白2具有97%相似性的连接蛋白2蛋白(XP_007995342.1)。图4A和4B分别描绘了人和AFG细胞表达的连接蛋白2的EC50值的倍数变化。两种细胞系均以每孔0.5x10^5个细胞进行铺板。以20-0.001nM的浓度范围添加嵌合(HOKO)和人源化mAb。为了检测,使用1:200稀释的抗人APC抗体(Jackson Immunoresearch AB_2340526)。通过FACS分析细胞,计算EC50,并将其与嵌合Ab的EC50进行比较(倍数提高)。该分析显示与嵌合mAb相比,人源化变体的结合得到改善,并且与猴连接蛋白2的交叉反应性程度相似(图4A相比于4B)。为了评估人源化Ab的阻断能力,在中华仓鼠卵巢(CHO)细胞中过表达了人连接蛋白2。图4C显示了当将10^5个CHO-h连接蛋白2/孔与30nM的人CD112R-mIgG2a在浓度范围为66-0.81nM的指定人源化Ab存在下温育时产生的数据。使用1:200稀释的抗mIgG2a-647(Jackson Immunoresearch Cat 115-607-186)检测结合的CD112R,然后进行FACS分析。可以看出,所有人源化变体都保持了完全阻断能力。

[0213] 实施例6.抗人连接蛋白2人源化变体H3K3可以以Fc不依赖性方式充当ADC驱动物

[0214] 为了评估mAb充当ADC的能力,使用了链霉亲和素-皂草素(ZAP)IT-27-250(ATS)。

将图5中指示的mAb使用生物素化试剂盒Ab207195(Abcam)以1:1的比例进行生物素化。图5A描绘了初始筛选的结果,其包括排名靠前的人源化克隆和作为靶的A549(肺腺癌)细胞。以每孔2x10^{3}个细胞铺板,并允许其黏附4-6小时的时间段。加入ADC,并将细胞与ADC温育。72小时后,收集测定体系,并使用CellTiter-Glo®2.0细胞存活率测定法(Promega G9242)按照标准方案评估肿瘤细胞的致死。只有克隆H3K3显示出强烈的致死。接下来,将克隆H3K3与克隆H4K2直接进行比较(图5B)。两个克隆都表现出强大的致死,并且由于H3K3具有优异的可开发特性,因此选择H3K3用于未来的分析。在上述条件下测试了嵌合亲本克隆和克隆H3K3(IgG1)的FcgR^{null}变体(IgG2-P238H)(在FcgR^{null}中,g代表γ),结果如图5C中所示。在这些ADC的所有浓度下,嵌合和人源化H3K3变体两者都显示出显著的致死($p<0.001$),并且与hIgG1克隆相比,FcgR^{null}变体导致相同水平的靶细胞致死。

[0215] 实施例7.抗人连接蛋白2H3K3-FcgR^{null} ADC在体外导致实体瘤细胞系的强大致死

[0216] 如表3中所示,通过突变人IgG1铰链区中的关键残基,产生了额外的H3K3-FcgR^{null} mAb。

[0217] 表3.基于H3K3的ADC的人源化IgG1 FcgR^{null}接头-载荷组合的Fc替代、释放机制和相关药物抗体比率(DAR)的总结

[0218]

Fc 突变 (FcgR^{null})	接头	载荷	释放机制	平均 DAR (LC-MS)
hIgG1 G237I	MC-VC-PAB	MMAE	蛋白水解切割	4.3
hIgG1 G237I	MC	MMAF	降解	4.2
hIgG1 L235S	SMCC	DM1	降解	4.0
hIgG1 L235S	SPDB	DM4	氧化还原	4.2
hIgG1 L235S/G237I	Lys-PAB-CO	SN38	pH	8

[0219] 所呈现的接头-载荷组合根据所需的释放机制选择,并由Abzena LTD根据标准方案产生。简而言之,将mAb还原并与过量的接头-载荷温育,以便为除SN-38之外的所有接头-载荷获得4的所需药物抗体比率(DAR),而SN-38的靶DAR为8。然后纯化最终产物,通过LC/MS方法确立DAR。施用代表各种实体瘤的选定肿瘤细胞系来评估各种接头-载荷组合的体外效力。将所指示的靶细胞以每孔2x10^{3}个细胞铺板,并允许其黏附4-6小时的时间段。使用5倍稀释液以4-0.16μg/ml的浓度添加ADC,并将细胞与ADC温育。72小时后,收获测定体系,并使用CellTiter-Glo®2.0细胞存活率测定法(Promega G9242)按照标准方案评估肿瘤细胞的致死。在图6A-6C中分别描绘了RKO细胞(结肠直肠腺癌)、MDA-MB-231细胞(三阴性乳腺癌)和A549细胞(肺腺癌)的强力致死。通过双尾student t检验,靶细胞的致死是显著的($p<0.001$),除非用NS注明(不显著,$p>0.05$)。

[0220] 实施例8.选定的FcgR^{null}突变通过FcgR阻止ADC致死

[0221] 为了评估人源化抗连接蛋白2ADC的非靶向特异性致死程度(这是由于Ab Fc与其FcγR的结合,并可能造成ADC的非特异性作用),产生了过表达高亲和力Fc受体hCD64的CHO细胞(CHO-hCD64)。这些细胞不表达人连接蛋白2,因此预计没有靶向特异性致死。将亲本

CHO细胞和CHO-hCD64以每孔2x10^{3}个细胞铺板,并允许其黏附4-6小时。以12μg/ml的浓度加入不同的Fc变体ADC。温育72小时后,收获测定体系,并使用CellTiter-Glo®2.0细胞存活率测定法(Promega G9242)评估肿瘤细胞的致死率。

[0222] 如图7中所示,与亲本CHO细胞相比,IgG4-S228P和hIgG1阳性对照两者均如预期那样导致CHO-hCD64细胞显著更高的致死程度。另一方面,IgG1 G237I替换导致对亲本和hCD64过表达细胞两者的类似的低水平致死(非特异性致死)。这些结果证实,FcgR^{null}变体不被高亲和力FcgR CD64结合和内化。

[0223] 实施例9.抗人连接蛋白2人源化H3K3-FcgR^{null} ADC在体外导致血液肿瘤细胞系HL-60的强大致死

[0224] 将HL-60细胞(AML模型)以每孔2x10^{3}个细胞铺板,并使用3倍稀释液以9-1μg/ml的浓度加入ADC。将细胞与ADC温育72小时。然后收获测定体系,并如上所述使用CellTiter-Glo®2.0细胞存活率测定法(Promega G9242)评估肿瘤细胞的致死率。正如在图8中看到的,除了DM1载荷(在图中指明)之外,所有其他化合物在所有测试浓度下均导致靶的显著致死,并且在最高浓度(>60nM)下均导致超过90%的致死率。基于这些结果,SMCC-DM1接头-载荷被排除在将来的实验之外。

[0225] 实施例10.抗人连接蛋白2H3K3-FcgR^{null}-MC-VC-PAB-MMAE ADC在侵袭性AML模型中导致肿瘤消退

[0226] 将雌性裸小鼠(n=25)用1:1基质胶中的10x10^{6}个HL-60细胞皮下注射。一旦肿瘤达到205mm^{3}的平均体积,将小鼠随机分为五组(每组n=5),并以盲法方式通过静脉内注射PBS(媒介物)、H3K3-FcgR^{null}-MMAE、H3K3-FcgR^{null}-MMAF、H3K3-FcgR^{null}-DM4或H3K3-FcgR^{null}-SN-38进行治疗。所有治疗均以5mg/kg进行,每4天给药一次,连续4剂。正如可以在图9A中看到的,在随机化后第23天,H3K3-FcgR^{null}-MMAF和SN-38变体不减弱肿瘤生长。H3K3-FcgR^{null}-DM4导致49%的显著肿瘤生长抑制(TGI),而H3K3-FcgR^{null}-MMAE导致显著的肿瘤消退。图9B示出了H3K3-FcgR^{null}-MMAE的平均效果。

[0227] 实施例11.抗人连接蛋白2H3K3-FcgR^{null}-MC-VC-PAB-MMAE ADC在侵袭性结肠腺癌模型中导致肿瘤消退

[0228] 将雌性裸小鼠(每组n=5)用1:1基质胶中的5x10^{6}个RKO细胞皮下注射。一旦肿瘤达到160mm^{3}的平均体积,将小鼠随机分为两组,并以盲法方式通过静脉内注射PBS(媒介物)或H3K3-FcgR^{null}-MMAE(1107-MC-VC-MMAE)进行治疗,每4天一次,剂量为5mg/kg,连续4剂。正如可以在图10中看到的,在随机化后第13天,H3K3-FcgR^{null}-MMAE与媒介物治疗组相比导致显著的肿瘤消退,代表>80%的TGI。

[0229] 实施例12.抗人连接蛋白2H3K3-FcgR^{null} mAb与Trodelvy相比具有相似的体外致死活性

[0230] 对于体外致死测定(图11)而言,将MDA-MB-231靶细胞以每孔2x10^{3}个细胞铺板,并允许其黏附4-6小时。接下来,以12μg/ml(深灰色条)和3μg/ml(浅灰色条)的浓度添加与Dxd连接的H3K3-FcgR^{null}抗连接蛋白2mAb(NTX1107)和Trodelvy(Sacituzumab govitecan)这种获批的用于TNBC的ADC药物。值得注意的是,两种ADC均使用相同类别的细胞毒性载荷(即拓扑异构酶I(TOP1)抑制剂)。将细胞与ADC温育120小时,然后使用CellTiter Glo®2.0细

胞存活率测定法(Promega G9242)按照标准方案评估肿瘤细胞的致死。两种ADC均诱导MDA-MB-231细胞的强烈致死,Trodelvy在两种浓度下都具有显著优势(***p<0.0005)。

[0231] 实施例13.与拓扑异构酶1抑制剂偶联的抗人连接蛋白2H3K3-FcgR^{null}但不是Trodelvy抑制侵袭性MDA-MB-231肿瘤的体内生长

[0232] 将雌性裸小鼠(每组n=7)用1:1基质胶中的5x10^{6}个MDA-MB-231细胞皮下注射。一旦肿瘤达到230mm^{3}的平均体积,将小鼠随机分成治疗组,并以盲法方式通过静脉内注射PBS(媒介物)、NTX1107-Dxd或Trodelvy进行治疗,每4天一次,剂量为5mg/kg,连续3剂。Trodelvy治疗对肿瘤生长没有影响。

[0233] 正如在图12中看到的,NTX1107-Dxd能够显著抑制肿瘤生长(*p<0.02,**<0.005,***p<0.0005)。这些发现是出乎意料的,因为Trodelvy的体外致死效力高于NTX1107-Dxd(图11),并且Trodelvy是用于TNBC的批准ADC。这些观察结果表明,抗连接蛋白2抗体(NTX1107)是治疗实体瘤的独特有效的ADC。

[0234] 实施例14.抗人连接蛋白2H3K3-FcgR^{null}在与微管蛋白或TOP1靶向剂偶联时可以在体内减退侵袭性MDA-MB-231肿瘤

[0235] 将雌性裸小鼠(每组n=7)用1:1基质胶中的5x10^{6}个MDA-MB-231细胞皮下注射。一旦肿瘤达到210mm^{3}的平均体积,将小鼠随机分成治疗组,并以盲法方式通过静脉内注射PBS(媒介物)、H3K3-FcgR^{null}(NTX1107)-MMAE或NTX1107-Dxd进行治疗,每4天一次,连续5剂。正如可以在图13中看到的,所有用NTX1107-MMAE治疗的动物在研究结束时均没有可检测的肿瘤。对于用NTX1107 Dxd治疗的动物而言,四只没有肿瘤,而其余三只的平均肿瘤体积为210mm^3,表明肿瘤停滞。这些发现表明,当使用各种类别的载荷时,本文描述的靶向连接蛋白2的人源化抗体(NTX1107)可以形成用于治疗实体瘤的独特有效的ADC。

[0236] 序列

[0237] 表4:CDR序列:

[0238]

说明	KABAT	IMGT	重叠序列
重链 CDR1	SYWIH (SEQ ID NO: 1)	GYIFTSYW (SEQ ID NO: 7)	SYW
重链 CDR2	AVYPGNSDSNYNQKF(KA/QG) (SEQ ID NO: 2)	VYPGNSDS (SEQ ID NO: 8)	SEQ ID NO: 8
重链 CDR3	LVGTFDY (SEQ ID NO: 3)	TKLVGTFDY (SEQ ID NO: 9)	SEQ ID NO: 3
轻链 CDR1	(K/R) ASQNVGINV (V/A) (SEQ ID NO: 4)	QNVGIN (SEQ ID NO: 10)	SEQ ID NO: 10
轻链 CDR2	SASYRYS (SEQ ID NO: 5)	SAS	SAS

[0239]

轻链 CDR3	QQYNTNPFT (SEQ ID NO: 6)	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 6

[0240] SEQ ID NO:11-重链可变区NT20-11_VH3

[0241] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNSDSNYNQKFKARVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTVTVSS

[0242] SEQ ID NO:12-轻链可变区NT20-11_Vk3

[0243] DIQMTQSPSTLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

[0244] SEQ ID NO:13-重链可变区NT20-11_VH1

[0245] EVQLVQSGTELKKPGSSVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNSDSNYNQKFKARATITAVTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTVTVSS

[0246] SEQ ID NO:14-重链可变区NT20-11_VH2

[0247] EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNSDSNYNQKFKARATITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTVTVSS

[0248] SEQ ID NO:15-重链可变区NT20-11_VH4

[0249] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNSDSNYNQKFQGRVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTVTVSS

[0250] SEQ ID NO:16-重链可变区NT20-11_VH5

[0251] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNSDSNYNQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTVTVSS

[0252] SEQ ID NO:17-轻链可变区NT20-11_Vk1

[0253] DIVMTQSPSFLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQRAGQPPKTLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQSEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

[0254] SEQ ID NO:18-轻链可变区NT20-11_Vk2

[0255] DIVMTQSPSTLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

[0256] SEQ ID NO:19-轻链可变区NT20-11_Vk4

[0257] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

[0258] SEQ ID NO:20-轻链可变区NT20-11_Vk5

[0259] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVGINVAWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

[0260] 表5:人源化重链可变区的构架(非CDR)序列

[0261]

链	FR-H1	FR-H2	FR-H3	FR-H4
VH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFT（SEQ ID NO：21）	WVRQPPGKGLEWIG（SEQ ID NO：22）	RVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTK（SEQ ID NO：23）	WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：24）
VH1	EVQLVQSGTELKKPGSSVKVSCKASGYIFT（SEQ ID NO：25）	WVRQPPGKGLEWIG（SEQ ID NO：22）	RATITAVTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTK（SEQ ID NO：26）	WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：24）
VH2	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFT（SEQ ID NO：27）	WVRQPPGKGLEWIG（SEQ ID NO：22）	RATITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTK（SEQ ID NO：28）	WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：24）
VH4	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFT（SEQ ID NO：21）	WVRQPPGKGLEWIG（SEQ ID NO：22）	RVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTK（SEQ ID NO：23）	WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：24）

[0262]

VH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFT（SEQ ID NO：21）	WVRQPPGKGLEWIG（SEQ ID NO：22）	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTK（SEQ ID NO：29）	WGQGTTVTVSS（SEQ ID NO：24）

[0263] 表6:人源化轻链可变区的构架(非CDR)序列

[0264]

链	FR-L1	FR-L2	FR-L3	FR-L4
LK3	DIQMTQSPSTLSASVGDRVSVTC（SEQ ID NO：30）	WYQQKPGQPPKTLIY（SEQ ID NO：31）	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAEYFC（SEQ ID NO：32）	FGQGTKLEIK（SEQ ID NO：33）
LK1	DIVMTQSPSFLSASVGDRVSVTC（SEQ ID NO：34）	WYQQRAGQPPKTLIY（SEQ ID NO：35）	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQSEDLAEYFC（SEQ ID NO：36）	FGQGTKLEIK（SEQ ID NO：33）
LK2	DIVMTQSPSTLSASVGDRVSVTC（SEQ ID NO：37）	WYQQKPGQPPKTLIY（SEQ ID NO：31）	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDLAEYFC（SEQ ID NO：38）	FGQGTKLEIK（SEQ ID NO：33）
LK4	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC（SEQ ID NO：39）	WYQQKPGQPPKTLIY（SEQ ID NO：31）	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC（SEQ ID NO：40）	FGQGTKLEIK（SEQ ID NO：33）

[0265]

LK5	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC（SEQ ID NO：39）	WYQQKPGQPPKTLIY（SEQ ID NO：31）	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC（SEQ ID NO：40）	FGQGTKLEIK（SEQ ID NO：33）

[0266] SEQ ID NO:41-HC CDR2 AVYPGNSDSNYNQKFKA

[0267] SEQ ID NO:42-HC CDR2 AVYPGNSDSNYNQKFQG

[0268] SEQ ID NO:43-LC CDR1 KASQNVGINVV

[0269] SEQ ID NO:44-LC CDR1 KASQNVGINVA

[0270] SEQ ID NO:45-LC CDR1 RASQNVGINVV

[0271] SEQ ID NO:46-LC CDR1 RASQNVGINVA

[0272] SEQ ID NO:47-全长hIgG1重链VH3的氨基酸序列

[0273] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNSDSNYNQKFKARVT

ITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0274] SEQ ID NO:48-全长hIgG1 VH3的DNA序列

[0275] caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtg

[0276] agctgcaaagcgagcggctatattttaccagctattggattcattgggtgcgccagccg

[0277] ccgggcaaaggcctggaatggattggcgcggtgtatccgggcaacagcgatagcaactat

[0278] aaccagaaatttaaagcgcgcgtgaccattaccgcggtgaccagcaccagcaccgcgtat

[0279] atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattattgcaccaaactggtg

[0280] ggcacctttgattattggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagcgcgagcaccaaa

[0281] ggcccgagcgtgtttccgctggcgccgagcagcaaaagcaccagcggcggcaccgcggcg

[0282] ctgggctgcctggtgaaagattattttccggaaccggtgaccgtgagctggaacagcggc

[0283] gcgctgaccagcggcgtgcataccttccggcggtgctgcagagcagcggcctgtatagc

[0284] ctgagcagcgtggtgaccgtgccgagcagcagcctgggcacccagacctatatttgcaac

[0285] gtgaaccataaaccgagcaacaccaaagtggataaacgcgtggaaccgaaaagctgcgat

[0286] aaaacccatacctgcccgccgtgcccggcgccggaactgctgggcggcccgagcgtgttt

[0287] ctgtttccgccgaaaccgaaagataccctgatgattagccgcaccccggaagtgacctgc

[0288] gtggtggtggatgtgagccatgaagatccggaagtgaaatttaactggtatgtggatggc

[0289] gtggaagtgcataacgcgaaaaccaaaccgcgcgaagaacagtataacagcacctatcgc

[0290] gtggtgagcgtgctgaccgtgctgcatcaggattggctgaacggcaaagaatataaatgc

[0291] aaagtgagcaacaaagcgctgccggcgccgattgaaaaaaccattagcaaagcgaaaggc

[0292] cagccgcgcgaaccgcaggtgtataccctgccgccgagccgcgaagaaatgaccaaaaac

[0293] caggtgagcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtggaatgg

[0294] gaaagcaacggccagccggaaaacaactataaaaccaccccgccggtgctggatagcgat

[0295] ggcagctttttctgtatagcaaactgaccgtggataaaagccgctggcagcagggcaac

[0296] gtgtttagctgcagcgtgatgcatgaagcgctgcataaccattatacccagaaaagcctg

[0297] agcctgagcccgggcaaa

[0298] SEQ ID NO:49-全长κ轻链Vk3的氨基酸序列

[0299] DIQMTQSPSTLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYSGVPDRFSGSGSGT
DFTLTISSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0300] SEQ ID NO:50-全长κVk3的DNA序列

[0301] gatattcagatgacccagagcccgagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgagc

[0302] gtgacctgcaaagcgagccagaacgtgggcattaacgtggtgtggtatcagcagaaaccg

[0303] ggccagccgccgaaaaccctgatttatagcgcgagctatcgctatagcggcgtgccggat

[0304] cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcaggcg

[0305] gaagatctggcggaatattttgccagcagtataacaccaacccgtttacctttggccag

[0306] ggcaccaaactggaaattaaacgcaccgtggcggcgccgagcgtgtttatttttccgccg

[0307] agcgatgaacagctgaaaagcggcaccgcgagcgtggtgtgcctgctgaacaacttttat

[0308] ccgcgcgaagcgaaagtgcagtggaaagtggataacgcgctgcagagcggcaacagccag

[0309] gaaagcgtgaccgaacaggatagcaaagatagcacctatagcctgagcagcaccctgacc

[0310] ctgagcaaagcggattatgaaaaacataaagtgtatgcgtgcgaagtgacccatcagggc

[0311] ctgagcagcccggtgaccaaaagctttaaccgcggcgaatgc

[0312] SEQ ID NO:51-VH3核酸

[0313] SEQ ID NO:52-VH1核酸

[0314] SEQ ID NO:53-VH2核酸

[0315] SEQ ID NO:54-VH4核酸

[0316] SEQ ID NO:55-VH5核酸

[0317] SEQ ID NO:56-Vk3核酸

[0318] SEQ ID NO:57-Vk1核酸

[0319] SEQ ID NO:58-Vk2核酸

[0320] SEQ ID NO:59-Vk4核酸

[0321] SEQ ID NO:60-Vk5核酸

[0322] SEQ ID NO:61-人IgG1(L235S)(包括VH3)

[0323] SEQ ID NO:62-人IgG1(L235S/E272K)(包括VH3)

[0324] SEQ ID NO:63-人IgG1(G237I)(包括VH3)

[0325] SEQ ID NO:64-人IgG1(G237I/E272I)(包括VH3)

[0326] SEQ ID NO:65-人IgG1(G237I/V264R)(包括VH3)

[0327] SEQ ID NO:66-人IgG1(V215A/E269R/K322A)(包括VH3)

[0328] SEQ ID NO:67-人IgG1(L234A/L235A/P329G)(包括VH3)

[0329] SEQ ID NO:68-人IgG4(S228P/L235P/V264R)(包括VH3)

[0330] SEQ ID NO:69-人IgG2(P238H)(包括VH3)

[0331] SEQ ID NO:70-人IgG2(P238H/V264R)(包括VH3)

[0332] SEQ ID NO:71-前导肽序列

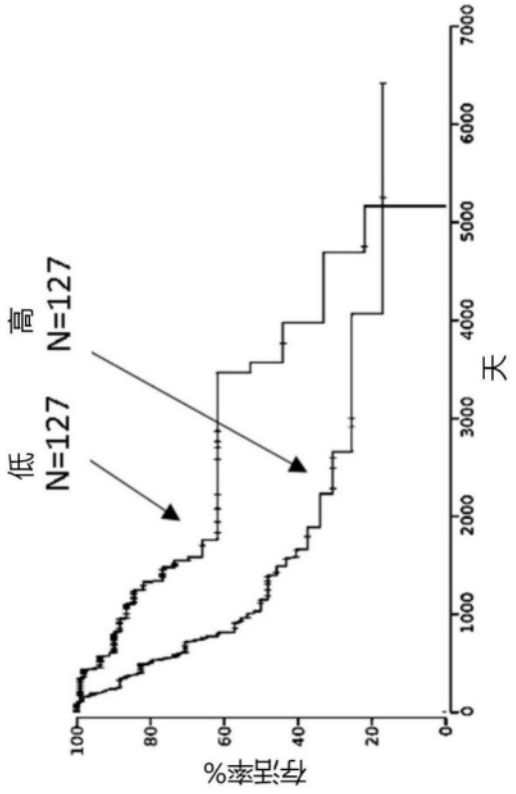

高
N=127
低
N=127
存活率%
天
100
80
60
40
20
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

图1A

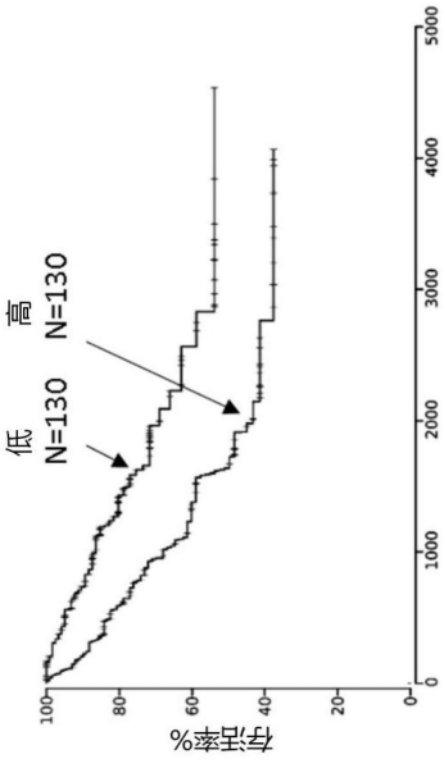

高
N=130
低
N=130
存活率%
100
80
60
40
20
0
0
1000
2000
3000
4000
5000

图1B

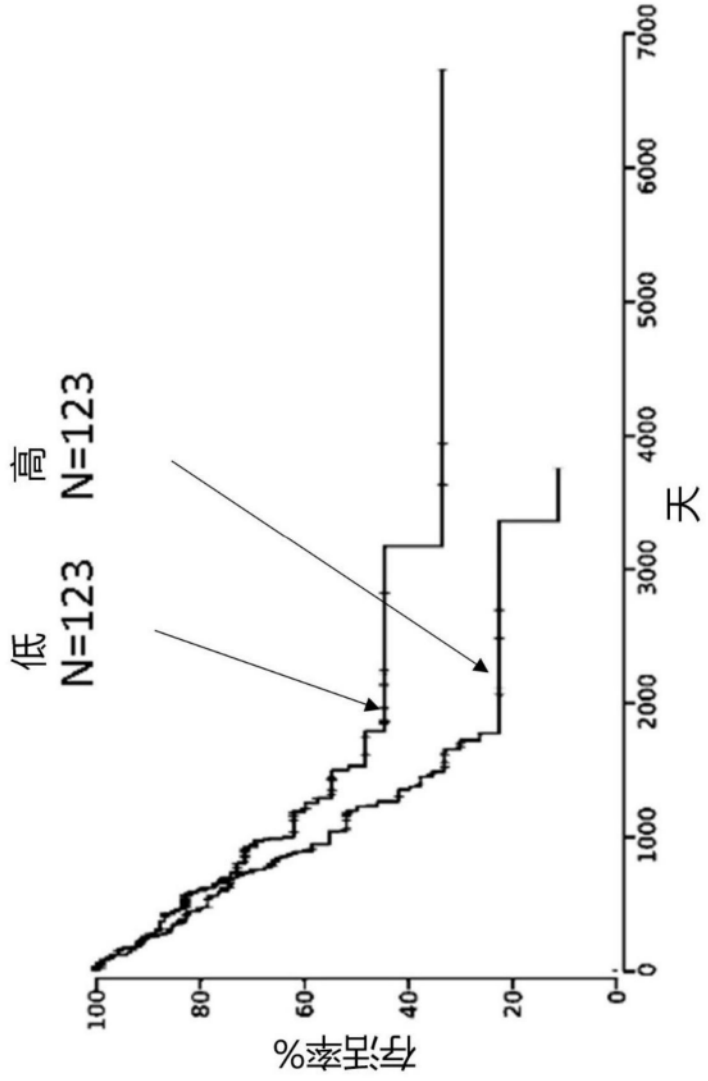

低
N=123
高
N=123
存活率%
100
80
60
40
20
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
天

图1C

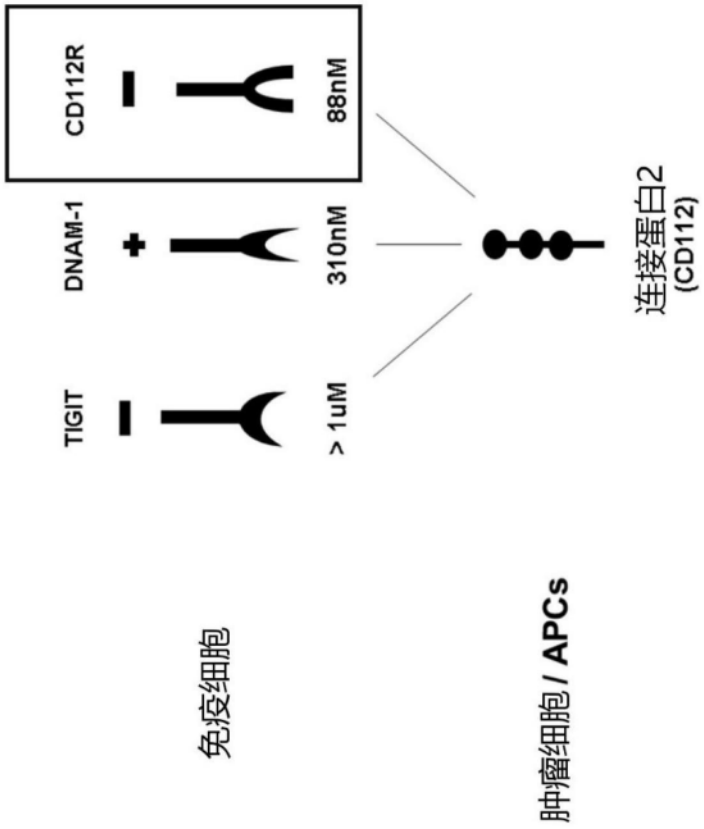

CD112R
88nM
DNAM-1
310nM
TIGIT
> 1uM
连接蛋白2
(CD112)
免疫细胞
肿瘤细胞 / APCs

图2

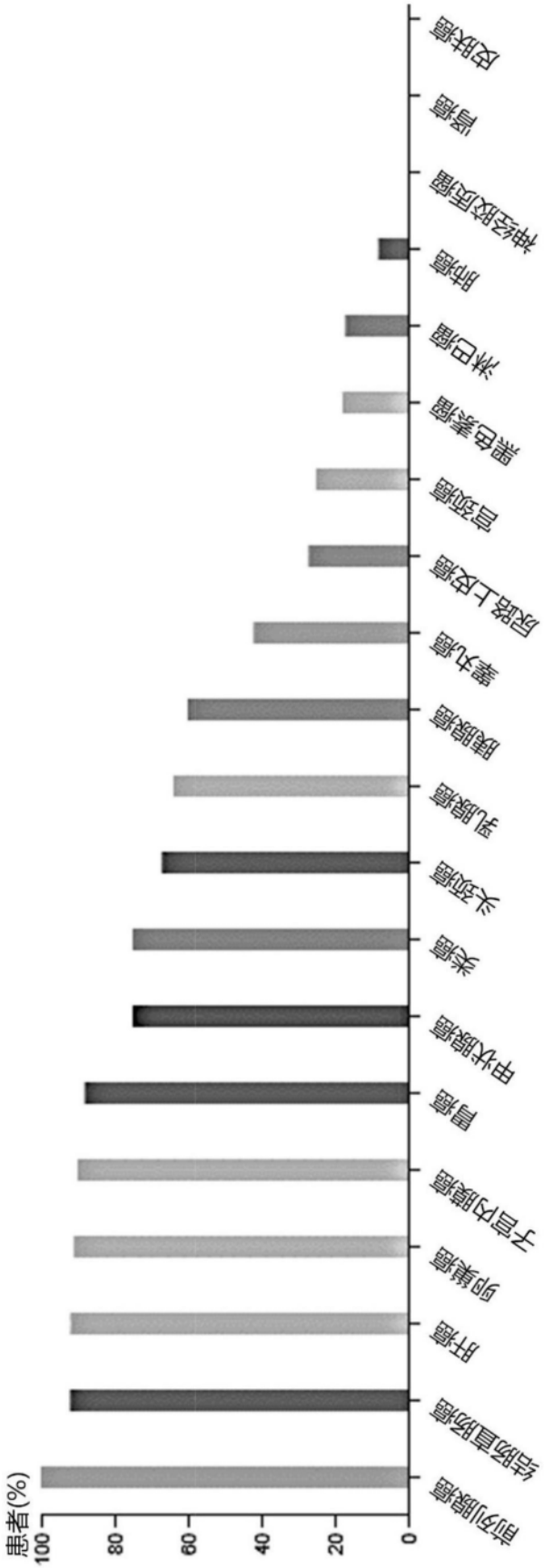

前列腺癌
结肠直肠癌
肝癌
卵巢癌
子宫内膜癌
胃癌
甲状腺癌
类癌
头颈癌
乳腺癌
胰腺癌
睾丸癌
尿路上皮癌
宫颈癌
黑色素瘤
淋巴瘤
肺癌
神经胶质瘤
肾癌
皮肤癌
患者(%)
100
80
60
40
20
0

图3

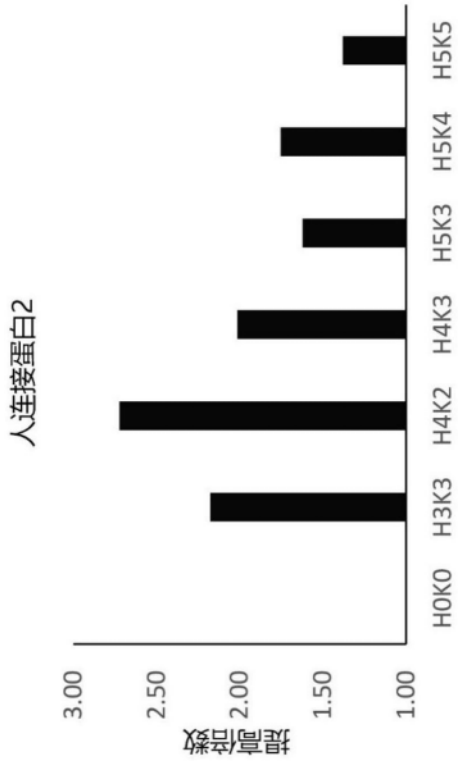

人连接蛋白2
提高倍数
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
H0K0
H3K3
H4K2
H4K3
H5K3
H5K4
H5K5

图4A

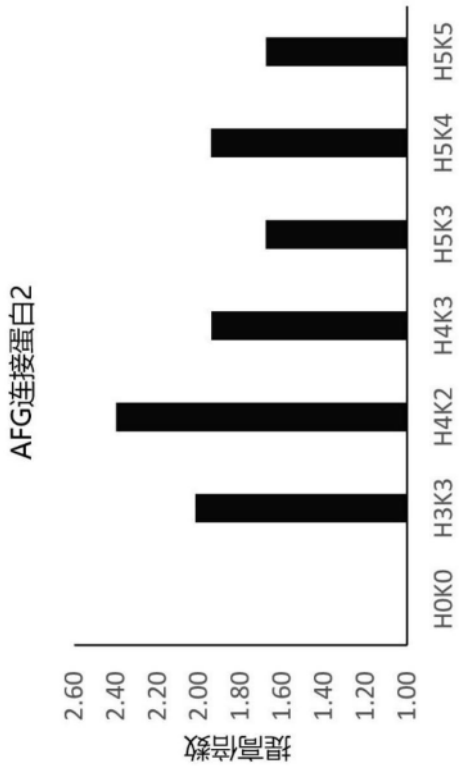

AFG连接蛋白2
提高倍数
2.60
2.40
2.20
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
H0K0
H3K3
H4K2
H4K3
H5K3
H5K4
H5K5

图4B

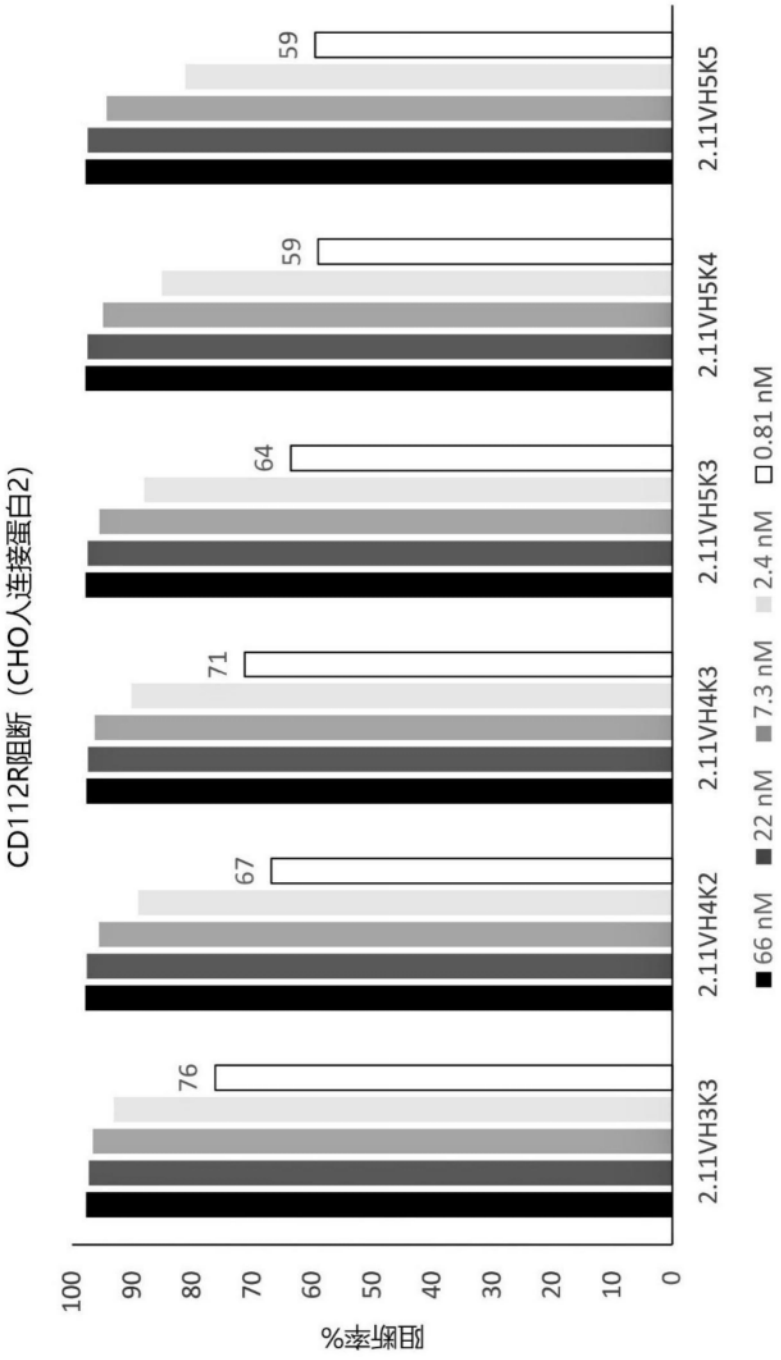

CD112R阻断（CHO人连接蛋白2）
阻断率%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
76
67
71
64
59
59
2.11VH3K3
2.11VH4K2
2.11VH4K3
2.11VH5K3
2.11VH5K4
2.11VH5K5
66 nM
22 nM
7.3 nM
2.4 nM
0.81 nM

图4C

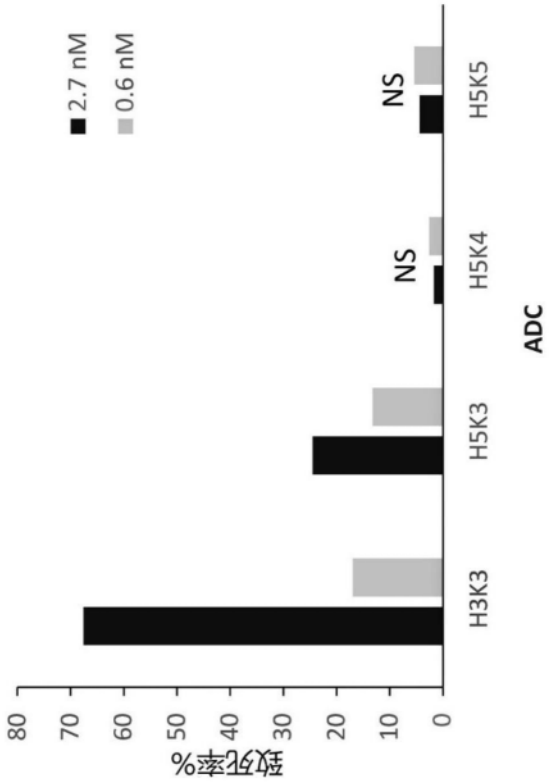

2.7 nM
0.6 nM
NS
NS
H5K5
H5K4
H5K3
H3K3
ADC
致死率%
80
70
60
50
40
30
20
10
0

图5A

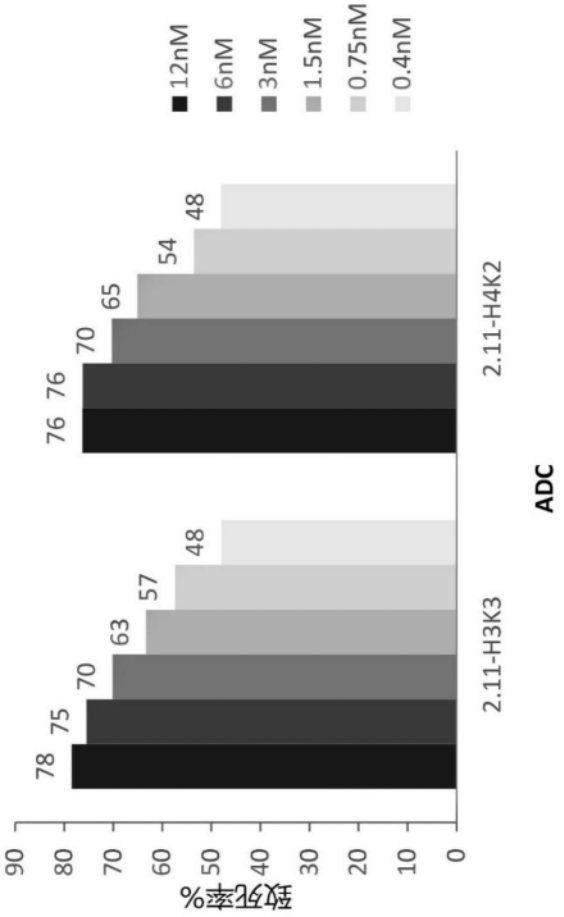

12nM
6nM
3nM
1.5nM
0.75nM
0.4nM
致死率%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
78
75
70
63
57
48
2.11-H3K3
76
76
70
65
54
48
2.11-H4K2
ADC

图5B

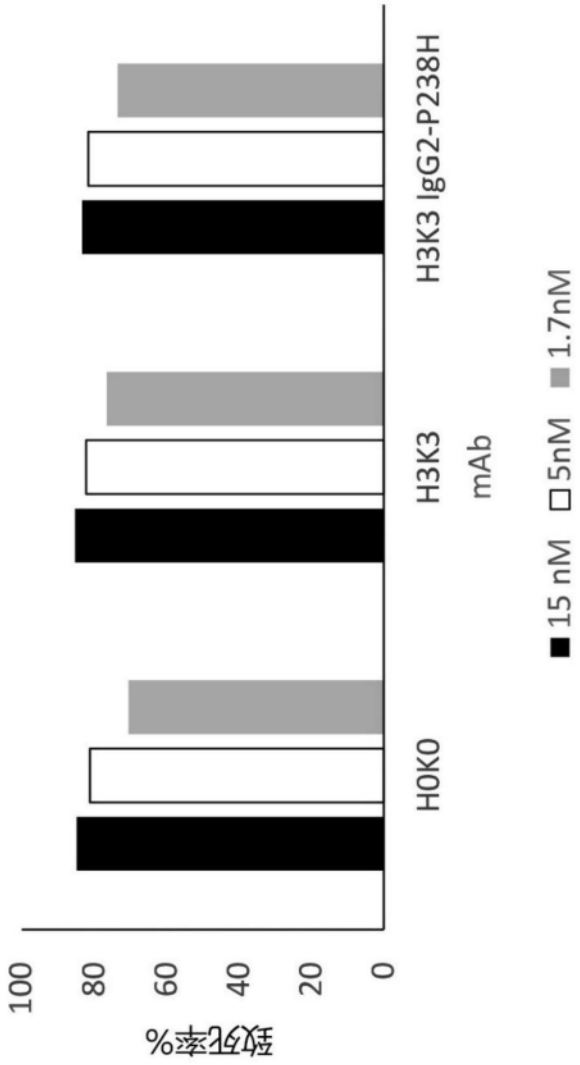

致死率%
100
80
60
40
20
0
H0K0
H3K3
mAb
H3K3 IgG2-P238H
15 nM
5nM
1.7nM

图5C

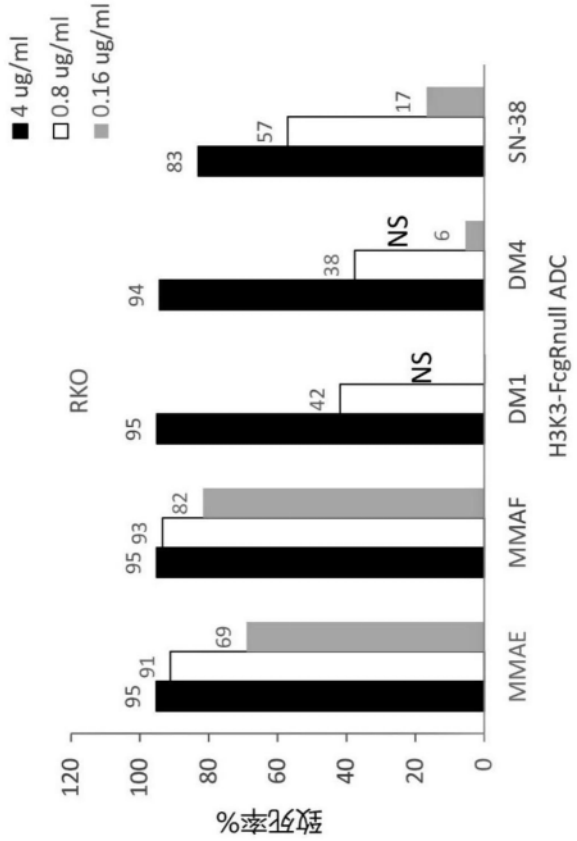

4 ug/ml
0.8 ug/ml
0.16 ug/ml
RKO
H3K3-FcgRnull ADC
致死率%
120
100
80
60
40
20
0
MMAE
MMAF
DM1
DM4
SN-38
95
91
69
95
93
82
95
42
NS
94
38
NS
6
83
57
17

图6A

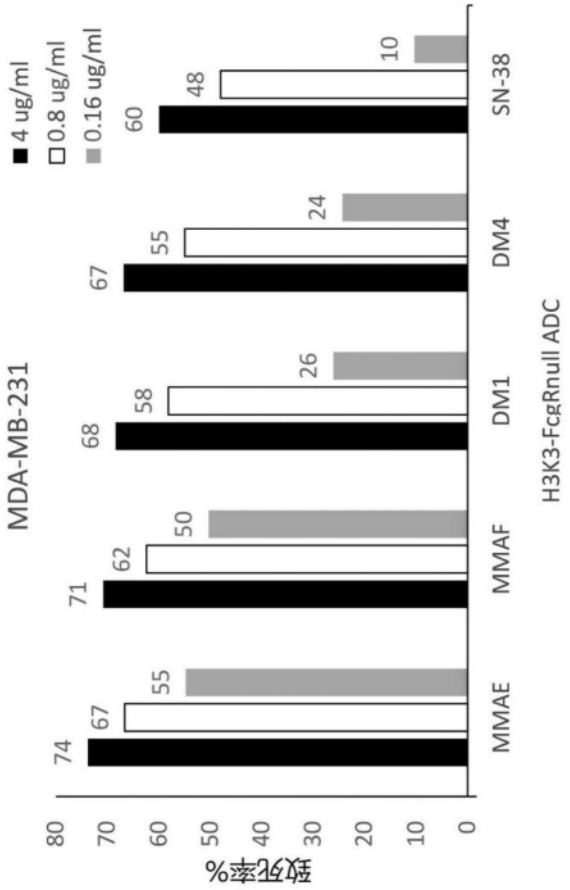

4 ug/ml
0.8 ug/ml
0.16 ug/ml
MDA-MB-231
H3K3-FcgRnull ADC
致死率%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
74
67
55
71
62
50
68
58
26
67
55
24
60
48
10
MMAE
MMAF
DM1
DM4
SN-38

图6B

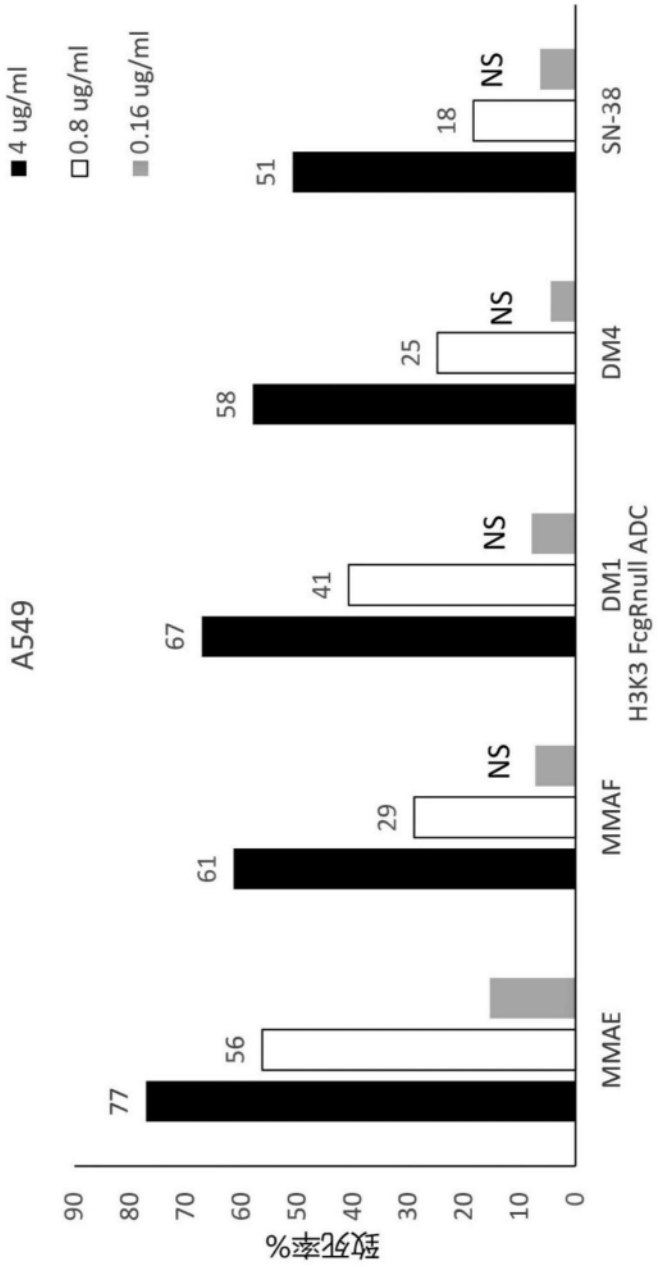

4 ug/ml
0.8 ug/ml
0.16 ug/ml
A549
H3K3 FcgRnull ADC
致死率%
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
MMAE
MMAF
DM1
DM4
SN-38
77
56
61
29
67
41
58
25
51
18
NS
NS
NS
NS

图6C

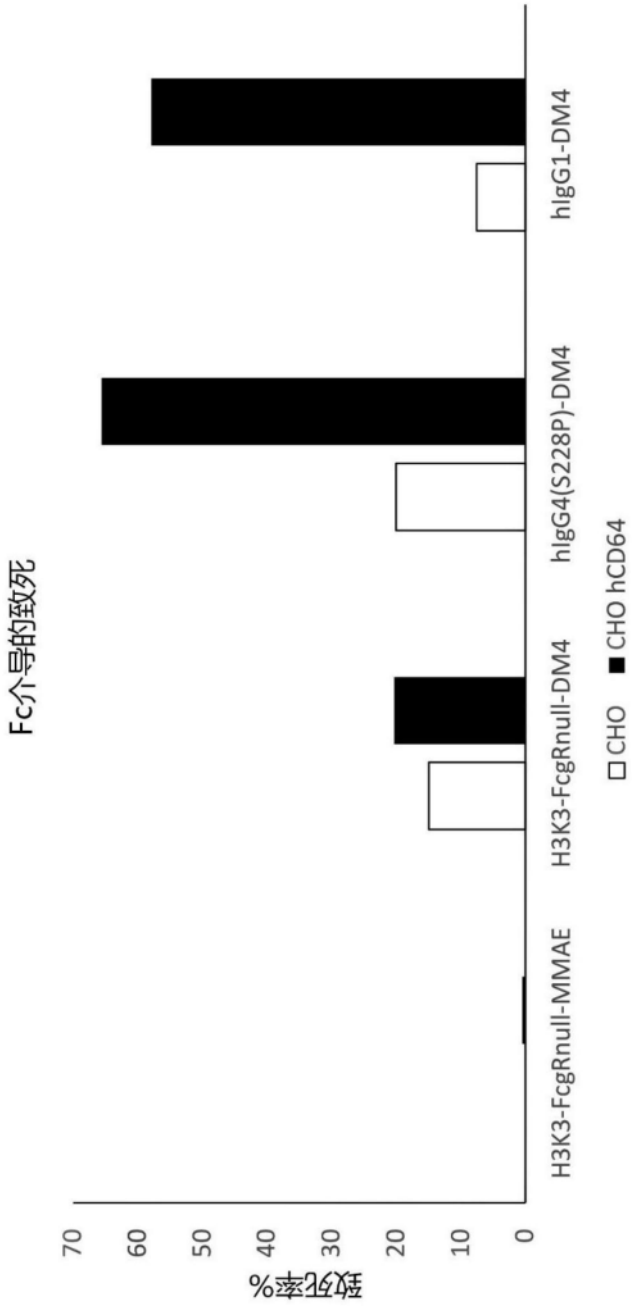

Fc介导的致死
致死率%
70
60
50
40
30
20
10
0
H3K3-FcgRnull-MMAE
H3K3-FcgRnull-DM4
hIgG4(S228P)-DM4
hIgG1-DM4
CHO
CHO hCD64

图7

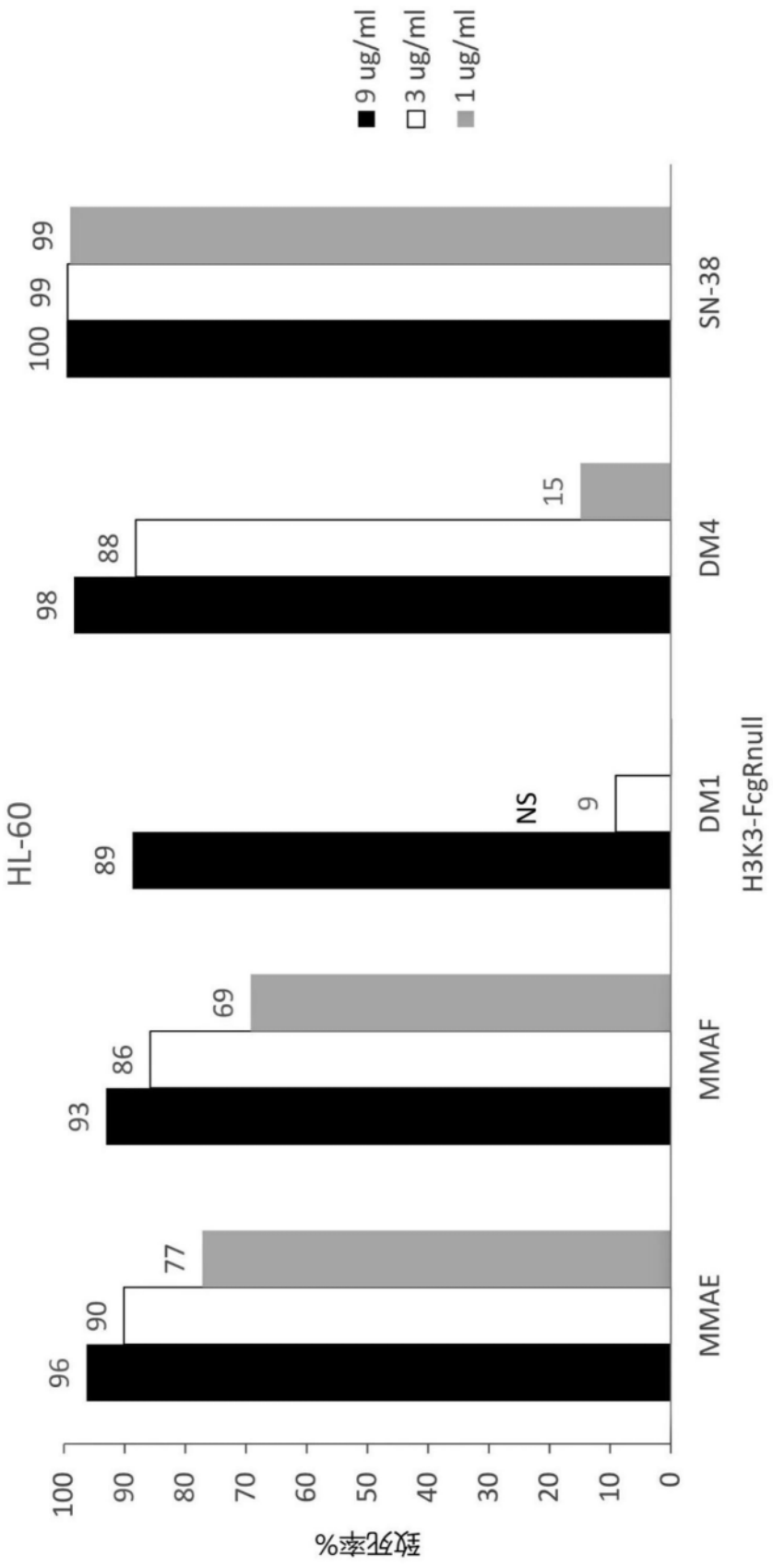

9 ug/ml
3 ug/ml
1 ug/ml
致死率%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
HL-60
H3K3-FcgRnull
MMAE
MMAF
DM1
DM4
SN-38
96
90
77
93
86
69
89
NS
9
98
88
15
100
99
99

图8

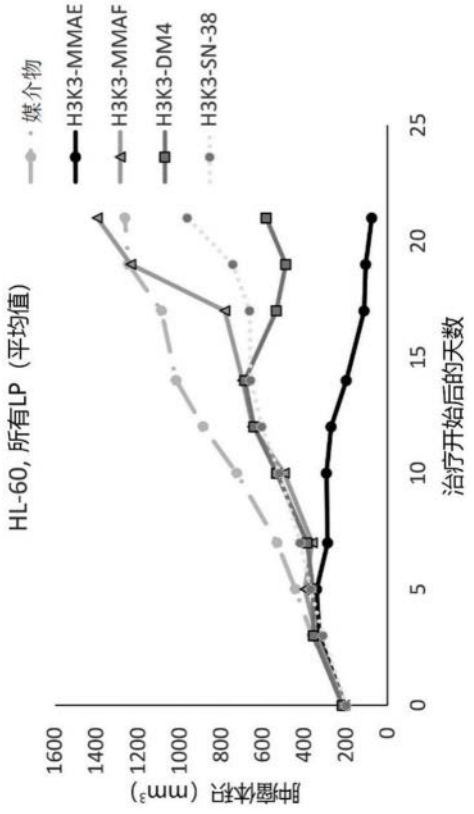

HL-60, 所有LP（平均值）
媒介物
H3K3-MMAE
H3K3-MMAF
H3K3-DM4
H3K3-SN-38
肿瘤体积（mm³）
治疗开始后的天数
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
0
5
10
15
20
25

图9A

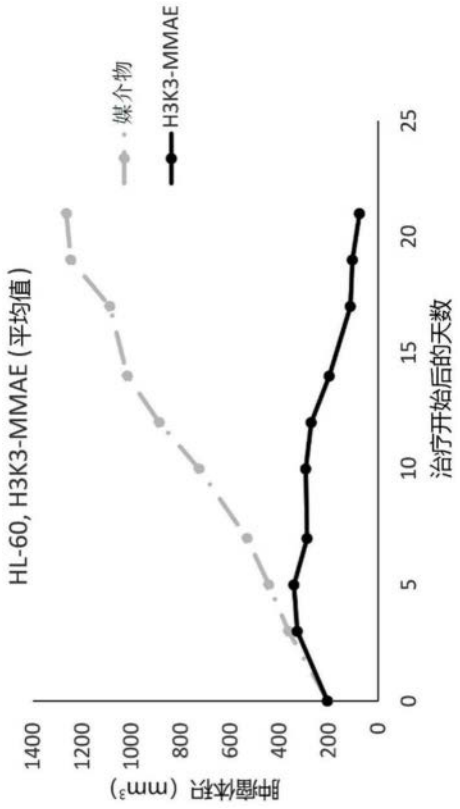

HL-60, H3K3-MMAE (平均值)
媒介物
H3K3-MMAE
肿瘤体积 (mm³)
治疗开始后的天数
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0
5
10
15
20
25

图9B

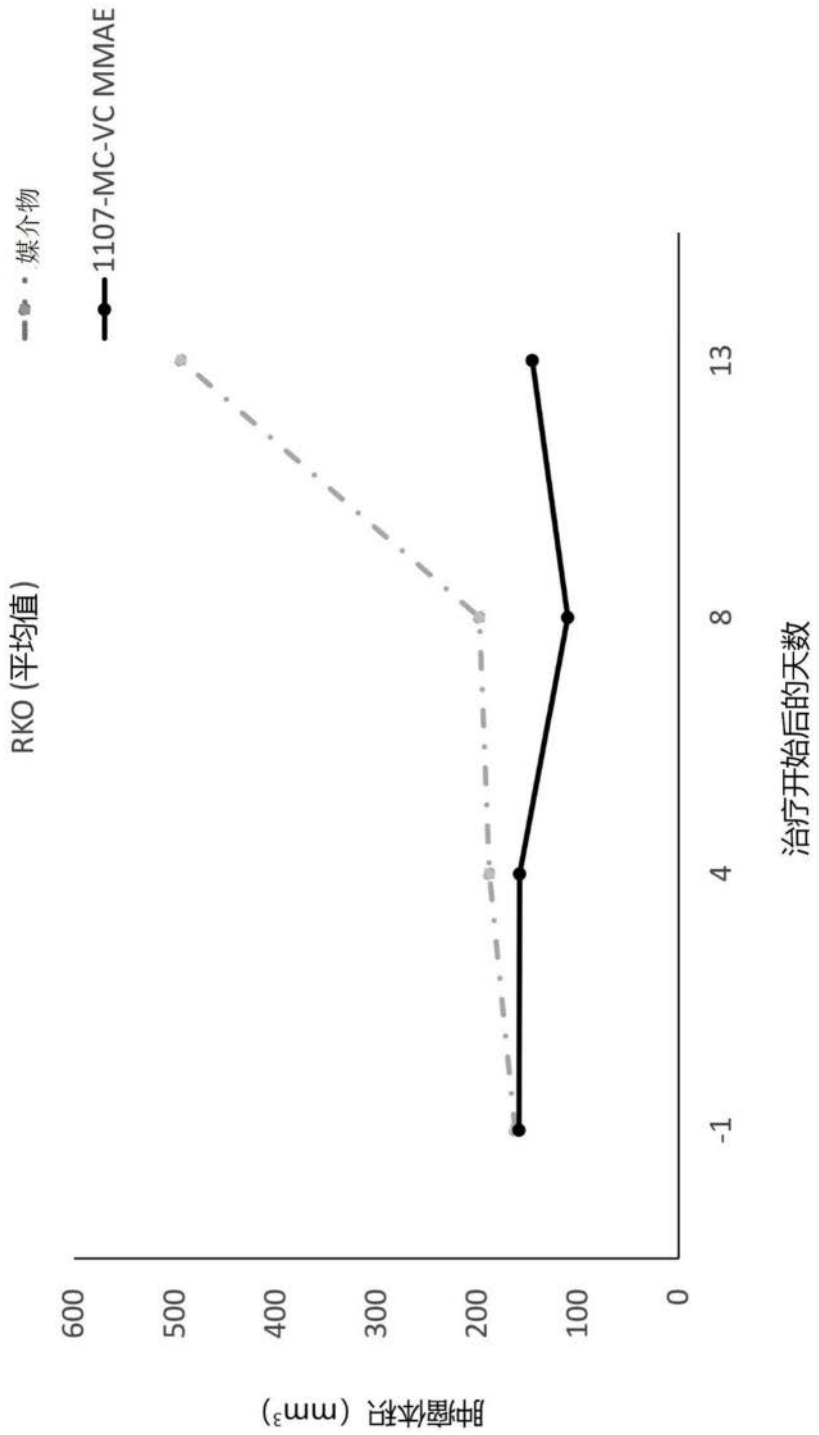

媒介物
1107-MC-VC MMAE
RKO (平均值)
肿瘤体积 (mm³)
600
500
400
300
200
100
0
-1
4
8
13
治疗开始后的天数

图10

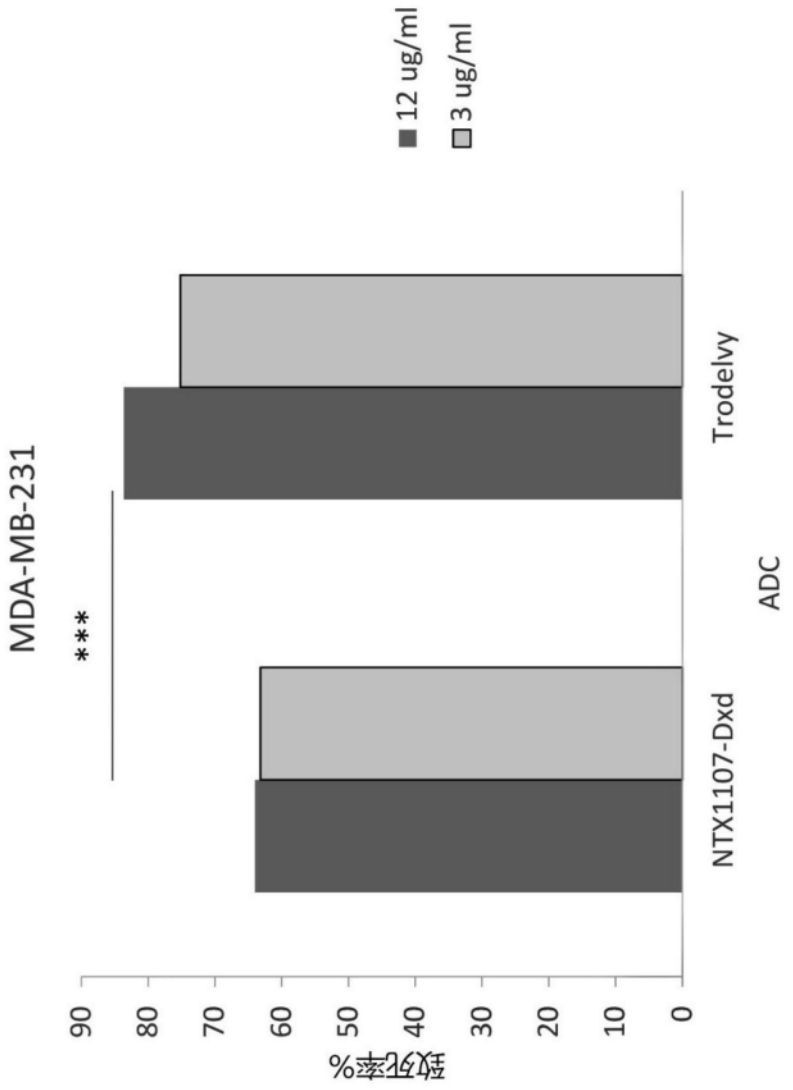

12 ug/ml
3 ug/ml
MDA-MB-231
***
Trodelvy
NTX1107-Dxd
ADC
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
致死率%

图11

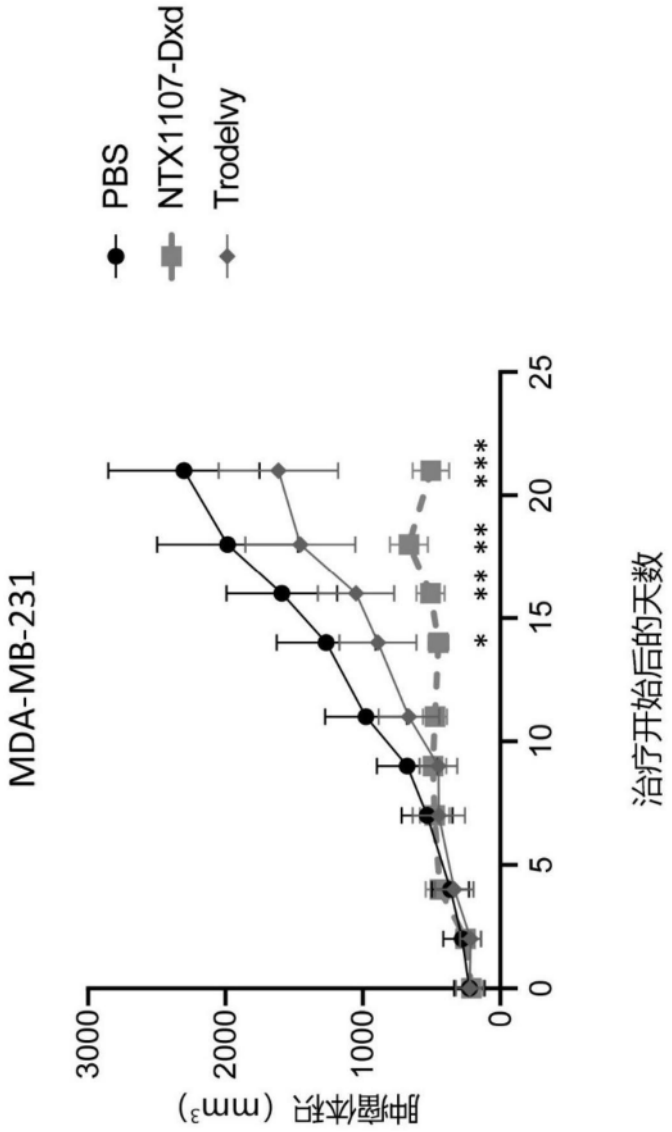

PBS
NTX1107-Dxd
Trodelvy
MDA-MB-231
肿瘤体积 (mm³)
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
治疗开始后的天数
* *** *** ***

图12

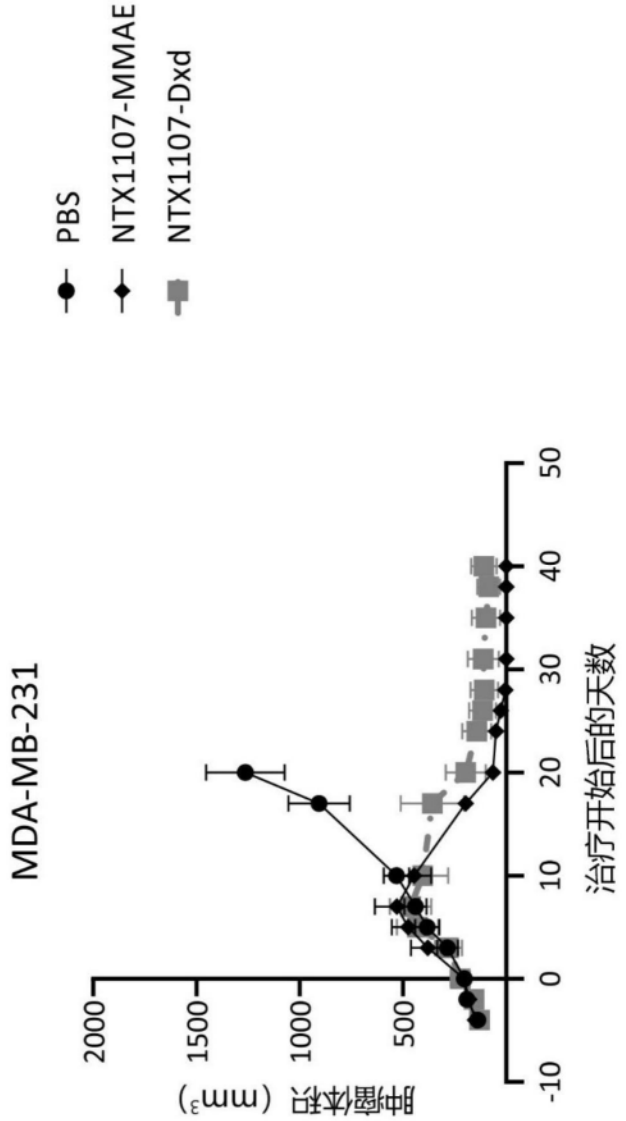

PBS
NTX1107-MMAE
NTX1107-Dxd
MDA-MB-231
肿瘤体积 (mm³)
2000
1500
1000
500
0
-10
10
20
30
40
50
治疗开始后的天数

图13