



(10) 授权公告号 CN 116178553 B

(45) 授权公告日 2023.11.17

(21) 申请号 202310076398.6

(22) 申请日 2023.02.07

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 116178553 A

(43) 申请公布日 2023.05.30

(66) 本国优先权数据
PCT/CN2022/078008 2022.02.25 CN

(73) 专利权人 南京蓬勃生物科技有限公司
地址 211100 江苏省南京市江宁区雍熙路
28号4010室(江宁高新园)

(72) 发明人 周艺 李中道 方卓 贾文双
邵翠英

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 唐莉

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109843927 A, 2019.06.04

CN 109563167 A, 2019.04.02

CN 112500485 A, 2021.03.16

US 2016096891 A1, 2016.04.07

US 2013149236 A1, 2013.06.13

WO 2017180813 A1, 2017.10.19

王茗典;张大昕.B7-H3在恶性肿瘤中的研究
进展.现代肿瘤医学.2018,(14),171-174.

审查员 王静

权利要求书2页 说明书53页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

针对人B7-H3的抗体及其变体

(57) 摘要

本申请提供了特异性识别B7-H3的抗体诸如单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段。本申请还提供了药物组合物,或制备和使用该抗体或其抗原结合片段的方法。

1. 一种分离的抗体或其抗原结合片段, 包含:
 - I) 重链可变结构域 (VH), 所述重链可变结构域 (VH) 分别包含:
 - 1) 重链互补决定区1 (CDR1), 所述重链互补决定区1 (CDR1) 的氨基酸序列为SEQ ID NO: 2所示;
 - 2) 重链CDR2, 所述重链CDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO: 3所示; 以及
 - 3) 重链CDR3, 所述重链CDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO: 4所示; 以及
 - II) 轻链可变结构域 (VL), 所述轻链可变结构域 (VL) 分别包含:
 - 1) 轻链CDR1, 所述轻链CDR1的氨基酸序列为SEQ ID NO: 6所示;
 - 2) 轻链CDR2, 所述轻链CDR2的氨基酸序列为SEQ ID NO: 7所示; 以及
 - 3) 轻链CDR3, 所述轻链CDR3的氨基酸序列为SEQ ID NO: 8所示,其中所述抗体或其抗原结合片段能够与人B7-H3特异性结合。
2. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中: 所述VH包含SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列, 并且所述VL包含SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。
3. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体是小鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。
4. 如权利要求3所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述人源化抗体包含包含SEQ ID NO: 81所示的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO: 88所示的氨基酸序列的VL。
5. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VH与免疫球蛋白的重链恒定区融合。
6. 如权利要求5所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定区来自人IgG1。
7. 如权利要求5所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定区包含增强所述抗体的ADCC效应的修饰。
8. 如权利要求5所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定区包含突变K214R、L235V、F243L、R292P、Y300L、D356E、L358M和P396L。
9. 如权利要求5所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述重链恒定区包含SEQ ID NO: 93或94的氨基酸序列。
10. 如权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述VL与免疫球蛋白的轻链恒定区 (CL) 融合。
11. 如权利要求10所述的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述轻链恒定区包含SEQ ID NO: 92所示的氨基酸序列。
12. 缀合物, 其由如权利要求1-11中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段与毒素或化学治疗剂缀合。
13. 如权利要求12所述的缀合物, 其中所述毒素是假单胞菌外毒素 (PE)、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素、核糖体毒素、皂草素、卡奇霉素或肉毒杆菌毒素。
14. 如权利要求12所述的缀合物, 其中所述化学治疗剂是单甲基澳瑞他汀E或美登木素生物碱。
15. 一种双特异性抗体, 包含如权利要求1-11中任一项所述的分离的抗体或抗原结合片段和第二抗体部分, 其中所述第二抗体部分能够与除B7-H3以外的抗原特异性结合。

16. 如权利要求15所述的双特异性抗体,其中所述除B7-H3以外的抗原是CTLA-4、PD-L1、TIM-3或LAG-3。

17. 如权利要求15或16所述的双特异性抗体,其中所述第二抗体部分是Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、scFv-scFv、微型抗体、双链抗体或sdAb。

18. 一种用于治疗癌症的药物组合物,包含:

如权利要求1-11中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,如权利要求12-14中任一项所述的缀合物,或如权利要求15-17中任一项所述的双特异性抗体;以及药学上可接受的载剂。

19. 如权利要求18所述的药物组合物,进一步包含一种或多种其他抗癌剂。

20. 如权利要求1-11中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段、如权利要求12-14中任一项所述的缀合物、权利要求15-17中任一项所述的双特异性抗体或如权利要求18或19中所述的药物组合物在治疗表达B7-H3的癌症中的用途。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述癌症是NSCLC、HNSCC或乳腺癌。

针对人B7-H3的抗体及其变体

[0001] 交叉引用:

[0002] 本申请要求2022年2月25日提交的PCT申请PCT/CN2022/078008的优先权,全部内容通过引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及能够与B7-H3蛋白特异性结合的抗体或其抗原结合片段以及此类药剂的用途。这些抗体或其抗原结合片段可用于治疗与B7-H3的活性和/或表达相关的疾病。

背景技术

[0004] B7-H3是2001年发现的单程I型跨膜蛋白,它属于B7家族[Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3,a member of the B7 family with four Ig-like domains.J Immunol 172(4):2352-2359]。它在多种癌症中广泛表达,这些癌症包括非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、乳腺癌和其他癌症,但它在正常组织中较低或不可检测[B7-H3:an attractive target for antibody-based immunotherapy.Clin Cancer Res]。同时,已经在低或阴性PD-L1表达实体瘤中发现B7-H3。已经对B7-H3进行了20多项临床试验,包括单克隆抗体(Mab)、双特异性抗体(BsAb)、抗体-药物缀合物(ADC)、嵌合抗原受体(CAR)-T和放射免疫疗法(RIT)。

[0005] 在I/II期临床研究中测试了MGC018(NCT03729596)和DS-7300a(NCT04145622),即针对B7-H3的两种ADC。虽然有ADC靶向B7-H3,但是由于B7-H3在正常细胞中低表达,尚不清楚是否会引起威胁生命的脱肿瘤中靶毒性[New B7 family checkpoints in human cancers.Mol Cancer Ther 16(7):1203-1211]。靶向B7-H3的RIT(带有碘-131标签的奥布他单抗(omburtamab))已被授予突破性疗法,但迄今为止,其适应症几乎限于脑肿瘤。

[0006] MGA271(依诺妥珠单抗(Enoblituzumab))和DS-5573a是靶向B7-H3的两种抗体。MGA271(依诺妥珠单抗,Macrogenics)是Fc优化的人源化IgG1抗体,并且其安全性特征和功效已经在三项临床研究(NCT01391143、NCT02923180、NCT02982941)中进行了测试,具有B7-H3依赖性抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性的效力。DS-5573a(Daiichi Sankyo Inc)是人源化抗B7-H3 IgG1[Development of DS-5573a:a novel afucosylated mAb directed at B7-H3 with potent antitumor activity.Cancer Sci 107(5):674-681]。DS-5573a的临床试验是一项开放标签I期研究(NCT021925679),该研究于2014年在晚期实体瘤患者中启动并于2017年出于商业决策而终止。DS-5573a依赖于ADCC和补体依赖性细胞毒性(CDC)活性杀伤肿瘤细胞。

[0007] 阿维鲁单抗(Avelumab)(抗PD-L1)、曲妥珠单抗(trastuzumab)(抗HER2)和西妥昔单抗(cetuximab)(抗EGFR)是单克隆抗体,这些抗体很大程度上依赖于ADCC杀伤肿瘤细胞。这些经过批准的药物支持ADCC相关药物在实体瘤治疗中的治疗潜力。另外,根据NCT02923180和NCT02982941的临床结果,MGA271(依诺妥珠单抗)显示了患有表达B7-H3的复发性或难治性实体瘤的患者的缓解。

[0008] 需要开发靶向B7-H3的抗体,这些抗体可依赖于ADCC和CDC杀伤肿瘤诸如NSCLC和HNSCC,并且具有比阳性对照MGA271(依诺妥珠单抗)和DS-5573a更好的功效。

发明内容

[0009] 在一方面,本披露提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,包含:

[0010] I) 重链可变结构域(VH),所述重链可变结构域(VH)分别包含:

[0011] 1) 重链决定区1(CDR1),所述重链决定区1(CDR1)包含选自由SEQ ID NO:2、10、18、26、34、42、50、58、66和74组成的组的氨基酸序列;

[0012] 2) 重链CDR2,所述重链CDR2包含选自由SEQ ID NO:3、11、19、27、35、43、51、59、67和75组成的组的氨基酸序列;以及

[0013] 3) 重链CDR3,所述重链CDR3包含选自由SEQ ID NO:4、12、20、28、36、44、52、60、68和76组成的组的氨基酸序列;以及

[0014] II) 轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域(VL)分别包含:

[0015] 1) 轻链CDR1,所述轻链CDR1包含选自由SEQ ID NO:6、14、22、30、38、46、54、62、70和78组成的组的氨基酸序列;

[0016] 2) 轻链CDR2,所述轻链CDR2包含选自由SEQ ID NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71和79组成的组的氨基酸序列;以及

[0017] 3) 轻链CDR3,所述轻链CDR3包含选自由SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72和80组成的组的氨基酸序列,

[0018] 其中所述抗体或其抗原结合片段能够与B7-H3,优选人B7-H3特异性结合。

[0019] 在一些实施例中,在所述分离的抗体或其抗原结合片段中,1) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:2、3和4的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:6、7和8的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;2) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:10、11和12的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:14、15和16的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;3) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:18、19和20的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:22、23和24的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;4) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:26、27和28的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:30、31和32的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;5) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:34、35和36的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:38、39和40的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;6) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:42、43和44的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:46、47和48的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;7) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:50、51和52的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:54、55和56的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;8) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:58、59和60的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:62、63和64的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;9) 所述VH包含分别具有SEQ ID NO:66、67和68的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:70、71和72的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;或10) 所述VH包含分别具有

SEQ ID NO:74、75和76的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列,并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:78、79和80的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0020] 在一些实施例中,分别地,所述VH包含与选自由SEQ ID NO:1、9、17、25、33、41、49、57、65和73组成的组的序列至少90%相同的氨基酸序列,并且所述VL包含与选自由SEQ ID NO:5、13、21、29、37、45、53、61、69和77组成的组的序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施例中,所述VH包含选自由SEQ ID NO:1、9、17、25、33、41、49、57、65和73组成的组的氨基酸序列或在所述VH中包含至多约3个氨基酸取代的其变体;并且所述VL包含选自由SEQ ID NO:5、13、21、29、37、45、53、61、69和77组成的组的氨基酸序列或在所述VL中包含至多约3个氨基酸取代的其变体。

[0022] 在一些实施例中,在所述分离的抗体或其抗原结合片段中,1)所述VH包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;2)所述VH包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;3)所述VH包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列;4)所述VH包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列;5)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:37的氨基酸序列;6)所述VH包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列;7)所述VH包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列;8)所述VH包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列;9)所述VH包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列;或10)所述VH包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段与表达所述B7-H3的细胞之间的所述结合的 EC_{50} 为 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$,优选约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$,更优选约 $10^{-9}M$ 至约 $10^{-12}M$ 。

[0024] 在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段与表达所述B7-H3的细胞之间的所述结合具有低于参考抗体MGA271的 EC_{50} 。

[0025] 在一些实施例中,所述抗体是小鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0026] 在一些实施例中,所述人源化抗体包含VH和VL,所述VH包含选自由SEQ ID NO:81-87组成的组的氨基酸序列,所述VL包含选自由SEQ ID NO:88-91组成的组的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施例中,所述人源化抗体包含:1)包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的VL;2)包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的VL;3)包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的VL;4)包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的VL;5)包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的VL;6)包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的VL;或7)包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的VL。

[0028] 在一些实施例中,所述VH与免疫球蛋白的重链恒定区融合。

[0029] 在一些实施例中,所述重链恒定区来自人IgG1。

[0030] 在一些实施例中,所述重链恒定区包含增强所述抗体的ADCC效应的修饰。

[0031] 在一些实施例中,所述重链恒定区包含突变K214R、L235V、F243L、R292P、Y300L、D356E、L358M和P396L。

- [0032] 在一些实施例中,所述重链恒定区包含SEQ ID NO:93或94的氨基酸序列。
- [0033] 在一些实施例中,所述VL与免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)融合。
- [0034] 在一些实施例中,所述轻链恒定区包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列。
- [0035] 在一些实施例中,所述分离的抗体或其抗原结合片段与毒素或化学治疗剂缀合。
- [0036] 在一些实施例中,所述毒素是假单胞菌外毒素(PE)、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素、核糖体毒素(ribotoxin)、皂草素、卡奇霉素(calicheamicin)或肉毒杆菌毒素。
- [0037] 在一些实施例中,所述化学治疗剂是单甲基澳瑞他汀(Auristatin)E或美登木素生物碱(maytansinoid)。
- [0038] 在另一方面,本披露提供了一种双特异性抗体,包含分离的抗体或抗原结合片段和第二抗体部分。
- [0039] 在一些实施例中,所述第二抗体部分能够与除B7-H3以外的抗原特异性结合。
- [0040] 在一些实施例中,除B7-H3以外的所述抗原是CTLA-4、PD-L1、TIM-3或LAG-3。
- [0041] 在一些实施例中,所述第二抗体部分是Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、scFv-scFv、微型抗体、双链抗体、sdAb或抗体模拟物。
- [0042] 在另一方面,本披露提供了一种用于治疗癌症的药物组合物,包含:所述分离的抗体或抗原结合片段或所述双特异性抗体;和药学上可接受的载剂。
- [0043] 在一些实施例中,所述药物组合物进一步包含一种或多种其他抗癌剂。
- [0044] 在一些实施例中,所述癌症是表达B7-H3的癌症;优选NSCLC、HNSCC或乳腺癌。
- [0045] 在另一方面,本披露提供了一种治疗癌症的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的所述分离的抗体或其抗原结合片段、所述双特异性抗体或所述药物组合物。
- [0046] 在一些实施例中,所述癌症是表达B7-H3的癌症;优选NSCLC、HNSCC或乳腺癌。
- [0047] 在另一方面,本披露提供了所述分离的抗体或其抗原结合片段或所述双特异性抗体在制造用于癌症治疗的药物中的用途。
- [0048] 在一些实施例中,所述癌症是表达B7-H3的癌症;优选NSCLC、HNSCC或乳腺癌。
- [0049] 在另一方面,本披露提供了在治疗有需要的受试者的癌症中使用的分离的抗体或其抗原结合片段、双特异性抗体或药物组合物。
- [0050] 在一些实施例中,所述癌症是表达B7-H3的癌症;优选NSCLC、HNSCC或乳腺癌。
- [0051] 在一些实施例中,所述分离的抗体或抗原结合片段、所述双特异性抗体或所述药物组合物用于全身性施用或局部施用。
- [0052] 在一些实施例中,所述分离的抗体或抗原结合片段、所述双特异性抗体或药物组合物用于静脉内施用或瘤内施用。
- [0053] 本文提供的抗体能够依赖于ADCC和CDC杀伤肿瘤诸如NSCLC和HNSCC,并且具有比阳性对照MGA271(依诺妥珠单抗)和DS-5573a更好的功效。

附图说明

- [0054] 图1.显示了一些实施例中小鼠mAb FACS结合分析的结果。
- [0055] 图2.显示了一些实施例中嵌合抗体CDC诱导分析的结果。
- [0056] 图3.显示了一些实施例中嵌合抗体ADCC诱导分析的结果。
- [0057] 图4.显示了一些实施例中人源化抗体FACS结合分析的结果。

[0058] 图5.显示了一些实施例中人源化抗体CDC诱导分析的结果。

[0059] 图6.图A-D显示了一些实施例中人源化抗体ADCC诱导分析的结果。

具体实施方式

[0060] 本披露提供了抗B7-H3单克隆抗体以及它们的应用。本披露涉及小鼠抗B7-H3单克隆抗体克隆12C9F1B5、38F11B2、34A9C12、37D11F5B8、37F11A10、43H11G12、47F3F10B4、47C7E3、31H11B1和38D6A4的重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的氨基酸序列。本披露还涉及对这些小鼠抗B7-H3单克隆抗体克隆中的一些单克隆抗体的人源化或翻译后修饰后的重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的氨基酸序列。本披露涉及这些抗B7-H3单克隆抗体的生成方法。

[0061] 本披露通过将所披露的克隆的重链和轻链的可变结构域与人IgG1的恒定区融合来提供嵌合抗B7-H3单克隆抗体。本披露提供了小鼠抗B7-H3单克隆抗体克隆的重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的人源化形式。人源化抗B7-H3单克隆抗体通过将所披露的克隆的重链和轻链的人源化可变结构域与人IgG1的恒定区融合而生成。

[0062] I. 定义

[0063] 除非明确指示相反,否则本发明的实践将采用本领域技术范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,出于说明的目的下面描述了其中许多方法。此类技术在文献中有充分解释。参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel等人, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley&Sons, 1995; Sambrook和Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第3版, 2001); Maniatis等人Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, 第I和II卷(D.Glover编); Oligonucleotide Synthesis (N.Gait编, 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.Hames&S.Higgins编, 1985); Transcription and Translation (B.Hames&S.Higgins编, 1984); Animal Cell Culture (R.Freshney编, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) 和其他类似参考文献。

[0064] 必须注意,除非上下文另外明确规定,否则如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”包括复数指示物。

[0065] 除非另外指示,否则在一系列要素前面的术语“至少”应被理解为指该系列中的每一个要素。本领域技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述的本发明的具体实施例的许多等效物。此类等效物旨在涵盖在本发明中。

[0066] 在整个说明书和随后的权利要求书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”和诸如“包含(comprises)”和“包含(comprising)”的变型将被理解为暗示包括所陈述的整数或步骤或整数或步骤的组,但不排除任何其他整数或步骤或整数或步骤的组。当在本文中使用时,术语“包含”可以用术语“含有”或“包括”代替,或者有时在本文中使用时,可以用术语“具有”代替。

[0067] 当在本文中使用时,“由.....组成”不包括权利要求要素中未指定的任何要素、步骤或成分。当在本文中使用时,“基本上由.....组成”不排除不会实质上影响权利要求的基本特征和新颖特征的材料或步骤。“包含”、“含有”、“包括”和“具有”的任何前述术语,

无论何时在本文中在本申请的方面或实施例的上下文中使用时,都可以用术语“由……组成”或“基本上由……组成”替换以改变本披露的范围。

[0068] 如本文所用,多个列举的要素之间的连接术语“和/或”应被理解为同时涵盖单独的和组合的选项。例如,当两种要素由“和/或”连接时,第一选项是指在不具有第二要素的情况下第一要素的适用性。第二选项是指在没有第一要素的情况下第二要素的适用性。第三选项是指第一要素和第二要素一起的适用性。这些选项中的任一种应被理解为落入该含义内,因此满足如本文所用的术语“和/或”的要求。这些选项中的多于一种的同时适用性也应被理解为落入该含义内,因此满足术语“和/或”的要求。

[0069] 除非另外陈述,否则任何数值(如本文所述的浓度或浓度范围)应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,数值通常包括所列举值的 $\pm 10\%$ 。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1mg/mL至10mg/mL的浓度范围包括0.9mg/mL至11mg/mL。如本文所用,数值范围的使用明确包括所有可能的子范围、该范围内的所有单独数值,包括此类范围内的整数和值的分数,除非上下文另外明确指示。

[0070] 术语“表位”意指能够与抗体特异性结合的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团诸如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于在变性溶剂的存在下丧失与前者而不是后者的结合。

[0071] 如本文所用,“治疗(treatment或treating)”是用于获得有益的或所希望的结果(包括临床结果)的方法。出于本发明的目的,有益的或所希望的临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:缓解由疾病引起的一种或多种症状、减少疾病的程度、稳定疾病(例如,预防或延迟疾病的恶化)、预防或延迟疾病的传播(例如,转移)、预防或延迟疾病的复发、延迟或减缓疾病的进展、改善疾病状态、提供疾病的缓解(部分或全部)、减少治疗疾病所需的一种或多种其他药物的剂量、延迟疾病的进展、增加生活质量和/或延长存活。“治疗”还涵盖减少疾病的病理结果。本发明的方法考虑了这些治疗方面中的任何一个或多个。

[0072] 本文所用的术语“有效量”是指足以治疗指定的病症、病状或疾病,诸如改善、缓和、减轻和/或延迟其一种或多种症状的药剂或药剂组合的量。关于癌症,有效量包括足以使肿瘤缩小和/或降低肿瘤生长速率(诸如阻抑肿瘤生长)或预防或延迟其他不必要的细胞增殖的量。在一些实施例中,有效量是足以延迟发展的量。在一些实施例中,有效量是足以预防或延迟复发的量。有效量可以分一次或多次施用来施用。药物或组合物的有效量可以:(i)减少癌细胞的数目;(ii)减小肿瘤大小;(iii)在一定程度上抑制、延迟、减缓并且优选地终止癌细胞浸润到周围器官中;(iv)抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地终止)肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。

[0073] 术语“抗体”、“抗体部分”或“抗体构建体”以其最广泛的含义使用,并且涵盖多种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、全长抗体和其抗原结合片段,只要它们表现出所希望的抗原结合活性即可。

[0074] 基本的4链抗体单元是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。IgM抗体由5个基本的异四聚体单元连同称为J链的附加多肽组成,并且含有10个抗原结合位点,而IgA抗体包含2-5个基本的4链单元,这些单元可以聚合形成与J链组合的

多价装配体。在IgG的情况下,4-链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两条H链根据H链同种型通过一个或多个二硫键彼此连接。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N端具有可变结构域(V_H),后面是三个恒定结构域 C_H (对于 α 链和 γ 链中的每条链而言)和四个 C_H 结构域(对于 μ 同种型和 ϵ 同种型)。每条L链在N端具有可变结构域(V_L),后面是在其另一末端的恒定结构域。 V_L 与 V_H 对齐并且 C_L 与重链第一恒定区(C_H1)对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。 V_H 和 V_L 配对在一起形成单个抗原结合位点。关于不同类别的抗体的结构和特性,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Sties,Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编),Appleton&Lange,Norwalk,Conn.,1994,第71页和第6章。来自任何脊椎动物物种的L链基于其恒定结构域的氨基酸序列可以指定为两种明显不同的类型之一,称为 κ 和 λ 。根据重链恒定区(C_H)的氨基酸序列,免疫球蛋白可指定为不同的类别或同种型。存在五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,它们分别具有指定为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于 C_H 序列和功能中相对较小的差异将 γ 和 α 类进一步分成亚类,例如人表达以下亚类:IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0075] 术语“仅有重链的抗体”或“HCAb”是指包含重链,但缺少通常在4-链抗体中发现的轻链的功能性抗体。已知骆驼科动物(诸如骆驼、美洲驼或羊驼)会产生HCAb。

[0076] 术语“单域抗体”或“sdAb”是指具有三个互补决定区(CDR)的单一抗原结合多肽。单独的sdAb能够与抗原结合而不与相应的含CDR的多肽配对。在一些情况下,单域抗体从骆驼科HCAb工程改造,并且它们的重链可变结构域在本文中称为“ V_HH ”(重链抗体的重链可变结构域)。一些 V_HH 也可以称为纳米抗体。骆驼科sdAb是最小的已知抗原结合抗体片段之一(参见,例如,Hamers-Casterman等人,Nature363:446-8(1993);Greenberg等人,Nature 374:168-73(1995);Hassanzadeh-Ghassabeh等人,Nanomedicine(Lond),8:1013-26(2013))。基本 V_HH 从N端到C端具有以下结构:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR1至FR4分别指框架区1至4,并且其中CDR1至CDR3是指互补决定区1至3。

[0077] “分离的”抗体是已经从其产生环境的组分(例如天然或重组)中鉴定、分离和/或回收的抗体。优选地,分离的多肽不与其产生环境中的所有其他组分缔合。其产生环境的污染组分,例如由重组转染细胞产生的污染组分,是典型地会干扰抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白质溶质或非蛋白质溶质。在优选的实施例中,多肽将被纯化:(1)至大于95重量%的抗体,如通过例如Lowry方法所确定的,并且在一些实施例中,至大于99重量%;(2)达到足以通过使用旋杯测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)在非还原条件或还原条件下使用考马斯蓝或优选银染剂通过SDS-PAGE达到均一性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常将通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽、抗体或构建体。

[0078] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基端结构域。可以分别将重链和轻链的可变结构域称为“ V_H ”和“ V_L ”。这些结构域通常是抗体最易变的部分(相对于相同类别的其他抗体)并且含有抗原结合位点。骆驼科物种的仅有重链的抗体具有单个重链可变区,称为“ V_HH ”。因此 V_HH 是一种特殊类型的 V_H 。

[0079] 术语“可变”是指抗体中可变结构域的某些区段在序列上广泛不同的事实。V结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性不是均匀地分布在

可变结构域的整体跨度上。相反,它集中在轻链和重链可变结构域中称为互补决定区(CDR)或高变区(HVR)的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,主要采取 β -折叠构型,由三个CDR连接,形成连接 β -折叠结构,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分的环。每条链中的CDR通过FR区紧密靠近地结合在一起,并且与来自另一条链的CDR一起有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第五版,National Institute of Health,Bethesda,Md.(1991))。恒定结构域不直接牵涉于抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0080] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即组成该群体的各个抗体是相同的,除了可能少量存在的可能自然发生的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化)。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂大不相同,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性,单克隆抗体的优点在于它们由杂交瘤培养物合成,不受其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本申请使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,这些技术包括例如杂交瘤方法(例如,Kohler和Milstein., Nature, 256:495-97 (1975); Hongo等人, Hybridoma, 14 (3):253-260 (1995); Harlow等人, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988年第2版); Hammerling等人, 在: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)中)、重组DNA方法(参见,例如,美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见,例如, Clackson等人, Nature, 352:624-628 (1991); Marks等人, J.Mol.Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu等人, J.Mol.Biol. 338 (2):299-310 (2004); Lee等人, J.Mol.Biol. 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 101 (34):12467-12472 (2004); 和Lee等人, J. Immunol. Methods 284 (1-2):119-132 (2004)),以及在具有部分或全部编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的动物中产生人抗体或人样抗体的技术(参见,例如WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits等人, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann等人, Year in Immunol. 7:33 (1993); 美国专利号5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和5,661,016; Marks等人, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg等人, Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-813 (1994); Fishwild等人, Nature Biotechnol. 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); 以及Lonberg和Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。

[0081] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换用于指基本上完整形式的抗体,与抗体片段相反。具体地,全长4-链抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的那些抗体。仅有全长重链的抗体包括重链(诸如 V_H H)和Fc区。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可具有一种或多种效应子功能。

[0082] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗

体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段；双链抗体；线性抗体（参见，美国专利号5,641,870实施例2；Zapata等人，Protein Eng.8(10):1057-1062[1995]）；单链抗体分子；单域抗体（诸如V_HH）和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段（称为“Fab”片段）和残留“Fc”片段，该名称反映了容易结晶的能力。Fab片段由整条L链连同H链的可变区结构域（V_H）和一条重链的第一恒定结构域（C_H1）组成。每个Fab片段就抗原结合而言是单价的，即它具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体得到单个大的F(ab')₂片段，该片段大致对应于具有不同抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段并且仍能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在C_H1结构域的羧基端具有几个附加残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对于Fab'的名称，其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基团。F(ab')₂抗体片段最初作为在它们之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0083] Fc片段包含通过二硫化物结合在一起的两条H链的羧基端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定，Fc区是也被某些类型的细胞上发现的Fc受体（FcR）识别的区域。

[0084] 术语“恒定结构域区”或“恒定区”是指免疫球蛋白分子的一部分，该免疫球蛋白分子的一部分相对于免疫球蛋白的另一部分，即可变结构域，具有更保守的氨基酸序列，该氨基酸序列含有抗原结合位点。恒定结构域含有重链的C_H1、C_H2和C_H3结构域（统称为CH）和轻链的CHL（或CL）结构域。

[0085] 任何哺乳动物物种的抗体（免疫球蛋白）的“轻链”都可以根据其恒定结构域的氨基酸序列指定为两种明显不同的类型之一，分别称为kappa（“κ”）和lambda（“λ”）。

[0086] “Fv”是含有完全的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。这两个结构域的折叠产生六个高变环（H链和L链中各3个环），高变环为抗原结合提供氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而，甚至单个可变结构域（或仅包含对抗原具有特异性的三个CDR的Fv的一半）也具有识别和结合抗原的能力，但是比整个结合位点的亲和力更低。

[0087] “单链Fv”（也缩写为“sFv”或“scFv”）是包含连接到单个多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地，sFv多肽进一步包含在V_H和V_L结构域之间的多肽接头，该多肽接头使得sFv形成所希望的用于抗原结合的结构。关于sFv的综述，参见Pluckthun于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Rosenburg和Moore编，Springer-Verlag，New York，第269-315页（1994）。

[0088] 本文所述的抗体的“功能片段”包含完整抗体的一部分，通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区或保留或具有改变的FcR结合能力的抗体的Fc区。抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0089] 术语“双链抗体”是指通过以下方式制备的小抗体片段：构建在V_H结构域和V_L结构域之间具有短接头（约5-10个残基）的sFv片段（见前一段落），以便实现V结构域的链间配对而非链内配对，由此产生二价片段，即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双链抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体，其中两个抗体的V_H结构域和V_L结构域存在于不同的多肽链上。双链抗体更详细地描述于例如EP 404,097；WO 93/11161；Hollinger等人，Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 90:6444-6448（1993）中。

[0090] 本文的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而该链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们表现出所希望的生物活性(美国专利号4,816,567; Morrison等人, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。“人源化抗体”用作“嵌合抗体”的子集。

[0091] 非人(例如,美洲驼或骆驼)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的抗体。在一些实施例中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体),其中来自受者 CDR(下文定义)的残基被来自非人物种(诸如小鼠、大鼠、兔、骆驼、美洲驼、羊驼或非人灵长类)的具有所希望的特异性、亲和力和容量的CDR(供体抗体)的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架(“FR”)残基被相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含未在受者抗体中或供体抗体中发现的残基。可以进行这些修饰以进一步改进抗体性能,诸如结合亲和力。一般来说,人源化抗体将包含至少一个且典型地两个可变结构域的基本上全部,其中高变环全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白序列的那些,并且FR区全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些,但是FR区可以包括一个或多个单独的FR残基取代,这些取代改善抗体性能,诸如结合亲和力、异构化、免疫原性等。FR中这些氨基酸取代的数目典型地在H链中不超过6个,并且在L链中不超过3个。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。关于进一步细节,参见例如 Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988) 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。另请参见例如 Vaswani 和 Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler 和 Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); 以及美国专利号 6,982,321 和 7,087,409。

[0092] “人抗体”是这样一种抗体,其具有对应于由人类产生的抗体的氨基酸序列和/或已经使用如本文披露的任何用于制造人抗体的技术来产生。人抗体的此定义特别排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术(包括噬菌体展示文库)产生人抗体。Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。也可用于制备人单克隆抗体的是在 Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985); Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)。另请参见 van Dijk 和 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5:368-74 (2001)。人抗体可以通过将抗原施用至已被修饰以响应抗原攻击而产生此类抗体但其内源基因座已失效的转基因动物(例如,已免疫的异种小鼠(xenomice))来制备(参见,例如,有关 XENOMOUSE™ 技术的美国专利号 6,075,181 和 6,150,584)。另请参见例如 Li 等人, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 关于经由人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体。

[0093] 当在本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指在序列上高变和/或形成结构上限定的环的抗体可变结构域的区域。通常,单域抗体包含三个 HVR(或 CDR):HVR1(或 CDR1)、HVR2(或 CDR2) 和 HVR3(或 CDR3)。HVR3(或 CDR3)展示了三个 HVR 的最大多样性,并且据信在赋予抗体精细特异性中起到独特作用。参见,例如,Hamers-Casterman 等人, *Nature*

363:446-448(1993);Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0094] 术语“互补决定区”或“CDR”用于指如按照Kabat系统定义的高变区。参见Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)。

[0095] 许多HVR描绘在使用并且涵盖在本文中。Kabat互补决定区(CDR)基于序列可变性并且是最常用的(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR表示Kabat HVR和Chothia结构环之间的折中,并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触”HVR基于对可用的复杂晶体结构的分析。这些HVR中的每一个的残基在下表1中指出。

[0096] 表1.HVR描绘。

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B

[0097] (Kabat 编号)

H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
----	---------	---------	---------	---------

(Chothia 编号)

H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0098] HVR可以包含如下“扩展HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)以及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些定义中的每一种定义,可变区残基根据上文Kabat等人进行编号。

[0099] 单域抗体(诸如 V_H)的氨基酸残基根据Kabat等人给出的VH结构域的通用编号进行编号(“Sequence of proteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIH Bethesda,Md.,公开号91),如Riechmann和Muyldermans,J.Immunol.Methods2000年6月23日;240(1-2):185-195的论文中适用于来自骆驼科的 V_H 结构域。根据该编号, V_H 的FR1包含在位置1-30的氨基酸残基, V_H 的CDR1包含在位置31-35的氨基酸残基, V_H 的FR2包含在位置36-49的氨基酸残基, V_H 的CDR2包含在位置50-65的氨基酸残基, V_H 的FR3包含在位置66-94的氨基酸残基, V_H 的CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,并且 V_H 的FR4包含在位置103-113的氨基酸残基。在这方面,应当注意一如本领域中对于 V_H 结构域和对于 V_H 结构域众所周知的一每个CDR中的氨基酸残基的总数可以变化并且

不能对应于按照Kabat编号指示的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置在实际序列中不能被占用,或者实际序列可以含有比Kabat编号所允许的数目更多的氨基酸残基)。

[0100] 表述“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变型是指用于上文Kabat等人的抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统,实际直链氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入的更少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包含在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)以及在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可以通过在抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0101] 在某些实施例中,还可以使用IMGT信息系统来分析抗体。IMGT信息系统是由Marie-Paule Lefranc在1989年创建的,现在用作免疫遗传学和免疫信息学的全局参考(参见,例如,Lefranc M-P, The Immunologist 7:132-136(1999)以及Lefranc M-P等人, Nucleic Acids Res 27:209-212(1999))。IMGT编号方案总结于表2中(参见<https://www.imgt.org/IMGTinformation/>)。

[0102] 表2. IMGT编号方案

	FR1-IM GT	CDR1-I MGT	FR2-IM GT	CDR2-I MGT	FR3-IM GT	对于种系 V-基因(*) CDR3-IM GT	对于重排的 V-J-基因和 V-D-J-基因	
						种系 CDR3-IM GT	重排的 CDR3-IMGT	FR4-I MGT
[0103]	氨基酸 编号 1 --> 26 (C 23)	27 --> 38	39 --> 55 (W 41)	56 --> 65	66 --> 104 (C 104)	105 --> 116	105 --> 117 (112.1、 111.1、 112.2、111.2 等)	118 --> 129
	氨基酸 数目 25-26 个 氨基酸	5-12 个 氨基酸	16-17 个 氨基酸	0-10 个 氨基酸	36-39 个 氨基酸	2-12 个氨 基酸	2-13 个氨基 酸	10-12 个氨 基酸
[0104]							(超过 13 个 氨基酸)	基 酸

[0105] (*) 在七聚体之前+0、1或2个核苷酸。

[0106] 除非本文另外指示,否则免疫球蛋白重链中的残基编号是如上文Kabat等人所述的EU索引的编号。“如Kabat所述的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0107] “框架”或“FR”残基是除如本文定义的HVR残基之外的那些可变结构域残基。

[0108] “人共有框架”或“受体人框架”是表示在人免疫球蛋白V_L或V_H框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白V_L或V_H序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列亚组是如同Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md. (1991)中的亚组。对于V_L的实例包括,亚组可以是如上文Kabat等人所述的亚组κI、κII、κIII或κIV。另外,对于V_H,亚组可以是如Kabat等人所述的亚组I、亚组II或亚组III。可替代地,人共有框架可源自上述特定残基,诸如当通过将供体框架序列与各种人框架序列的集合进行比对,基于其与供体框架的同源性来选择人框架残基时。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施例中,预先存在的氨基酸变化的数目为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少或2个或更少。

[0109] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个CDR中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,那些改变引起抗体对抗原的亲和力改善。在一些实施例中,亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体的通过本领域已知的方法制备的。例如,Marks等人,Bio/Technology10:779-783(1992)描述了通过V_H-结构域和V_L-结构域改组进行的亲和力成熟。CDR和/或框架残基的随机诱变由例如以下文献描述:Barbas等人Proc Nat'l Acad.Sci.USA 91:3809-3813(1994);Schier等人Gene 169:147-155(1995);Yelton等人J.Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.154(7):3310-9(1995);以及Hawkins等人,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)。

[0110] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”或“对……有特异性”是指靶点与抗原结合蛋白(诸如mAb)之间的可测量和可再现的相互作用诸如结合,其决定了在异质分子(包括生物分子)群体存在时靶点的存在。例如,特异性结合靶点(可以是表位)的抗原结合蛋白(诸如mAb)是以比它结合其他靶点更大的亲和力、亲合力、更容易和/或以更长持续时间结合该靶点的抗原结合蛋白(诸如mAb)。在一些实施例中,抗原结合蛋白(诸如mAb)与不相关靶点的结合程度小于例如通过放射免疫测定法(RIA)测量的抗原结合蛋白(诸如mAb)与靶点的结合的约10%。在一些实施例中,特异性结合靶点的抗原结合蛋白(诸如mAb)的解离常数(K_D) ≤ 10⁻⁵M、≤ 10⁻⁶M、≤ 10⁻⁷M、≤ 10⁻⁸M、≤ 10⁻⁹M、≤ 10⁻¹⁰M、≤ 10⁻¹¹M、或 ≤ 10⁻¹²M。在一些实施例中,抗原结合蛋白特异性结合对来自不同物种的蛋白来说是保守的蛋白上的表位。在一些实施例中,特异性结合可以包括但不要求排他结合。

[0111] 术语“特异性”是指抗原结合蛋白(诸如mAb)对抗原的特定表位的选择性识别。例如,天然抗体是单特异性的。如本文所用的术语“多特异性”指代抗原结合蛋白具有多表位特异性(即,能够与一个生物分子上的两个、三个或更多个不同表位特异性结合或能够与两个、三个或更多个不同生物分子上的表位特异性结合)。如本文所用的“双特异性”指代抗原结合蛋白具有两种不同的抗原结合特异性。除非另外指示,否则列出的双特异性抗体所结合的抗原的顺序是任意的。即,例如,术语“抗B7-H3/PD-L1”、“抗PD-L1/B7-H3”、“B7-H3 × PD-L1”、“PD-L1 × B7-H3”、“PD-L1-B7-H3”和“B7-H3-PD-L1”可互换用于指同时与B7-H3和PD-L1特异性结合的双特异性抗体。如本文所用的术语“单特异性”指代具有一个或多个结合位点的抗原结合蛋白(诸如mAb),每个结合位点结合相同抗原的相同表位。

[0112] 入本文所用的术语“价”指代抗原结合蛋白中存在指定数目的结合位点。例如天然抗体或全长抗体具有两个结合位点,是二价的。因此,术语“三价”、“四价”、“五价”和“六价”分别指代在抗原结合蛋白中存在两个结合位点、三个结合位点、四个结合位点、五个结合位点和六个结合位点。

[0113] “抗体效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性并且随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;和B细胞活化。“降低或最小化的”抗体效应子功能意指与野生型或未修饰的抗体相比降低至少50%(或者60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)的抗体效应子功能。抗体效应子功能的确定可由本领域普通技术人员容易地确定和测量。在一个优选的实施例中,补体结合、补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞毒性的抗体效应子功能受到影响。在一些实施例中,通过恒定区中消除糖基化的突变(例如“无效效应子突变”)消除效应子功能。在一方面,无效效应子突变在C_H2区中包含N297A或DANA突变(D265A和/或N297A)。Shields等人,J.Biol.Chem.276(9):6591-6604(2001)。可替代地,导致效应子功能降低或消除的另外的突变包括:K322A和L234A/L235A(LALA)。可替代地,效应子功能可以通过生产技术降低或消除,这些生产技术诸如在不会糖基化或导致在促进效应子功能方面无效或低效的改变的糖基化模式的宿主细胞(例如,大肠杆菌(E.coli.))中表达(例如,Shinkawa等人,J.Biol.Chem.278(5):3466-3473(2003))。

[0114] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或ADCC是指一种细胞毒性形式,其中结合到某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)上的分泌Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够与带有抗原的靶细胞特异性结合并随后用细胞毒素杀伤靶细胞。抗体“武装(arm)”细胞毒性细胞并且是通过这种机制杀伤靶细胞所需的。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的Fc表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991)第464页的表3中。为了评估目标分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的测定。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可以在体内评估目标分子的ADCC活性,例如在动物模型,诸如Clynes等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中披露的动物模型中。

[0115] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区域,包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化,但是通常将人IgG重链的Fc区定义为从Cys226位置处的氨基酸残基或从Pro230至其羧基端的链段。可以例如在抗体的产生或纯化期间或通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程化来去除Fc区的C端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)。因此,完整抗体的组合物可以包含去除了所有K447残基的抗体群体,没有去除K447残基的抗体群体以及具有带有和不带有K447残基的抗体混合物的抗体群体。用于本文所述抗体的合适天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0116] “Fc受体”或“FcR”描述结合抗体的Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体(γ 受体)并包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体的FcR,包括等位基因变体和可替代地这些受体的剪接形式,Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活

化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其胞内结构域。活化受体Fc γ RIIA在其胞内结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞内结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994)以及de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)。本文的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括将来鉴定的FcR。

[0117] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括负责将母体IgG转运至胎儿的新生儿受体FcRn。Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976)和Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994)。测量与FcRn的结合的方法是已知的(参见,例如Ghetie和Ward, *Immunol. Today* 18: (12):592-8 (1997); Ghetie等人, *Nature Biotechnology* 15(7):637-40 (1997); Hinton等人, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton等人))。可以测定人FcRn高亲和力结合多肽在体内与FcRn的结合和血清半衰期,例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中,或在施用具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中。WO 2004/42072 (Presta)描述了改善或减弱与FcR结合的抗体变体。另请参见例如Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。

[0118] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指靶细胞在补体存在下的裂解。经典补体途径的活化是由补体系统的第一组分(C1q)与结合至其同源抗原的抗体(适当亚类)的结合启动的。为了评估补体活化,可以进行CDC测定,例如,如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述。具有改变的Fc区氨基酸序列和增加或降低的C1q结合能力的抗体变体描述于美国专利号6,194,551B1和WO 99/51642中。那些专利出版物的内容明确地通过援引并入本文。还参见,Idusogie等人, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000)。

[0119] “结合亲和力”总体上是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(partner)(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。结合亲和力可用 K_D 、 K_{off} 、 K_{on} 或 K_a 指示。如本文所用的术语“ K_{off} ”意在指抗体(或抗原结合结构域)从抗体/抗原复合物解离的解离速率常数,如由动力学选择设置确定的,以单位 s^{-1} 表示。如本文所用的术语“ K_{on} ”意在指抗体(或抗原结合结构域)与抗原缔合形成抗体/抗原复合物的缔合速率常数,以单位 $M^{-1}s^{-1}$ 表示。如本文所用,术语平衡解离常数“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离常数,并且描述了在平衡状态下占据抗体分子溶液中存在的所有抗体结合结构域的一半所需的抗原浓度,并且等于 K_{off}/K_{on} ,以单位M表示。 K_D 的测量预先假定所有结合剂都处于溶液中。在抗体被拴系至细胞壁的情况下,例如在酵母表达系统中,相应的平衡速率常数表示为 EC_{50} ,给出了 K_D 的良好近似值。亲和常数 K_a 是解离常数 K_D 的倒数,以单位 M^{-1} 表示。

[0120] 解离常数(K_D)用作显示抗体对抗原的亲合力的指标。例如,通过Scatchard方法,使用以各种标记剂标记的抗体,以及通过使用作为非处方测量套件(试剂盒)的BiacoreX(由Amersham Biosciences制造)或类似套件,根据附于套件的用户手册和实验操作方法,可以容易地进行分析。使用这些方法可以得到的 K_D 值以单位M(摩尔/升)表示。与靶点特异

性结合的抗体或其抗原结合片段可以具有例如 $\leq 10^{-5}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-6}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-7}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-8}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-9}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-10}\text{M}$ 、 $\leq 10^{-11}\text{M}$ 或 $\leq 10^{-12}\text{M}$ 的解离常数(K_D)。

[0121] 抗体或抗原结合结构域的结合特异性可以通过本领域已知的方法通过实验确定。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、BIAcore检验和肽扫描。

[0122] 半数最大抑制浓度(IC_{50})是物质(诸如抗体)抑制特定生物功能或生物化学功能的有效性的量度。其指示需要多少特定药物或其他物质(抑制剂,诸如抗体)来将给定生物过程(例如,PD-L1与B7-1之间的结合,或过程的组分,即酶、细胞、细胞受体或微生物)抑制一半。该值典型地表示为摩尔浓度。 IC_{50} 与激动剂药物或其他物质(诸如抗体)的 EC_{50} 相当。 EC_{50} 也表示在体内获得50%最大效应所需的血浆浓度。如本文所用,“ IC_{50} ”用于指示在体外中和50%抗原生物活性(诸如PD-L1生物活性)所需的抗体(诸如抗PD-L1 mAb)的有效浓度。 IC_{50} 或 EC_{50} 可以通过生物测定来测量,诸如通过FACS分析(竞争结合分析)、基于细胞的细胞因子释放测定或放大发光邻近均相测定(AlphaLISA)来测量对配体结合的抑制。

[0123] 将关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为在比对序列并且在必要时引入空位以达到最大序列同一性百分比后,不考虑任何保守性取代作为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的,可以用本领域技术中的多种方式来实现比对,例如使用公众可得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括需要在被比较序列的全长范围实现最大比对的任何算法。

[0124] 编码本文所述的构建体、抗体或其抗原结合片段的“分离的”核酸分子是与在其生产环境中从通常与其相关联的至少一种污染物核酸分子中鉴定并分离的核酸分子。优选地,分离的核酸不与产生环境有关的所有组分缔合。编码本文所述的多肽和抗体的分离的核酸分子的形式不同于天然存在的形式或背景。因此,分离的核酸分子不同于编码天然存在于细胞中的本文所述的多肽和抗体的核酸。分离的核酸包括通常包含核酸分子的细胞中所含的该核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0125] 如本文所用,术语“载体”是指能够繁殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体,以及掺入宿主细胞(载体已引入其中)基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0126] 如本文所用的术语“转染”或“转化”或“转导”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代目标细胞及其子代。

[0127] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,包括原代转化细胞和由其衍生的子代,不考虑传代次数。子代的核酸含量可能与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。具有与在原始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体子代包括在本文中。

[0128] 术语“药物组合物”的“药物配制品”是指制剂,该制剂的形式允许活性成分的生物活性有效,并且该制剂不含对将被施用该配制品的受试者具有不可接受的毒性的其他组分。此类配制品是无菌的。“无菌”配制品是经消毒的或无活的微生物及其孢子。

[0129] 应当理解,本文所述的发明的实施例包括“由实施例组成”和/或“基本上由实施例组成”。

[0130] 本文对“约”值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的变化。例如,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0131] 本文使用的术语“约X-Y”具有与“约X至约Y”相同的含义。

[0132] II. 抗B7-H3构建体

[0133] 抗B7-H3单克隆抗体

[0134] 本文所述的分离的抗B7-H3构建体包含特异性识别或结合B7-H3的单克隆抗体(mAb)部分(或“抗B7-H3 mAb”)。在本发明的一些实施例中,分离的抗B7-H3构建体是全长IgG。

[0135] B7超家族和B7-H3

[0136] 如本文所用,术语“B7-H3”是指人B7蛋白家族的成员,一种具有Ig样结构域的I型膜蛋白,也称为CD276。

[0137] 对CD28受体的配体的研究已产生了对称为B7超家族的一组相关分子的表征。B7家族成员是具有免疫球蛋白-V样结构域和免疫球蛋白-C样结构域的免疫球蛋白超家族成员。B7家族成员的IgV和IgC结构域各自由单个外显子编码,有另外的外显子编码前导序列、跨膜结构域和胞内结构域。胞内结构域较短,长度范围从19个到62个氨基酸残基,并且可以由多个外显子编码。B7-H3的独特之处在于主要的人类形式含有两个胞外串联IgV-IgC结构域(即,IgV-IgC-IgV-IgC)(Collins,M.等人(2005),Genome Biol.6:223.1-223.7)。预测B7家族的成员在细胞表面形成背靠背的非共价同型二聚体,并且已经就B7-1(CD80)和B7-2(CD86)来说发现了此类二聚体。

[0138] 尽管最初认为仅包含2个Ig结构域(IgV-IgC)(Chapoval,A.等人(2001),Nature Immunol.2:269-274;Sun,M.等人(2002),J.Immunol.168:6294-6297),但是已经鉴定了四个免疫球蛋白胞外结构域的变体(“4Ig-B7-H3”)并且发现是该蛋白更常见的人类形式(Sharpe,A.H.等人(2002),Nature Rev.Immunol.2:116-126)。在这两种形式间尚未观察到功能差异,这是由于天然鼠类形式(2Ig)和人4Ig形式表现出相似的功能(Hofmeyer,K.等人(2008),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,105(30):10277-10278)。4Ig-B7-H3分子抑制自然杀伤细胞介导的癌细胞裂解(Castriconi,R.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,101(34):12640-12645)。已发现人B7-H3(2Ig形式)通过与活化T细胞上的推定受体结合而促进T细胞活化和IFN- γ 产生(Chapoval,A.等人(2001),Nature Immunol.2:269-274;Xu,H.等人(2009),Cancer Res.69(15):5275-6281)。当在肿瘤细胞上表达时,B7-H4和B7-H1都是有效的免疫功能抑制剂(Flies,D.B.等人(2007),J.Immunother.30(3):251-260)。

[0139] B7-H3的作用模式复杂,因为蛋白质同时介导T细胞共刺激和共抑制(Hofmeyer,K.等人(2008),Proc.Natl.Acad.Sci.USA,105(30):10277-10278;Martin-Orozco,N.等人(2007),Semin.Cancer Biol.17(4):288-298;Subudhi,S.K.等人(2005),J.Mol.Med.83:193-202)。B7-H3与(TREM)样转录物2(TLT-2)结合并共刺激T细胞活化,但也与一种或多种

尚未鉴定的受体结合以介导对T细胞的共抑制。另外,B7-H3通过与未知受体的相互作用是自然杀伤细胞和成骨细胞的抑制剂(Hofmeyer,K.等人(2008),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,105(30):10277-10278)。该抑制可通过与主要信号传导途径的成员(例如,NFTA、NF- κ B或AP-1因子)的相互作用而起作用,T细胞受体(TCR)通过这些主要信号传导途径调控基因转录。

[0140] B7-H3共刺激CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖。B7-H3也刺激IFN- γ 产生和CD8⁺裂解活性(Chapoval,A.等人(2001),*Nature Immunol.*2:269-274;Sharpe,A.H.等人(2002),*Nature Rev.Immunol.*2:116-126)。然而,该蛋白还可能通过NFAT(活化T细胞的核因子)、NF- κ B(核因子 κ B)和AP-1(活化蛋白-1)因子起作用,以抑制T细胞活化(Yi.K.H.等人(2009),*Immunol.Rev.*229:145-151)。还认为B7-H3会在体内抑制Th1、Th2或Th17(Prasad,D.V.等人(2004),*J.Immunol.*173:2500-2506;Fukushima,A.等人(2007),*Immunol.Lett.*113:52-57;Yi.K.H.等人(2009),*Immunol.Rev.*229:145-151)。几项独立的研究已经显示,人恶性肿瘤细胞表现出B7-H3蛋白表达的显著增加,并且这种增加的表达与增加的疾病严重程度相关(Zang,X.等人(2007),*Clin.Cancer Res.*13:5271-5279),表明肿瘤利用B7-H3作为免疫逃逸途径(Hofmeyer,K.等人(2008),*Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)*105(30):10277-10278)。

[0141] 阻断B7分子与T细胞受体(例如,CD28)结合的能力的分子抑制免疫系统,并且已被提议作为自身免疫疾病的治疗(Linsley,P.S.等人(2009),*Immunolog.Rev.*229:307-321)。用抗4Ig-B7-H3抗体处理过的表达4Ig-B7-H3的成神经细胞瘤细胞对NK细胞更敏感。然而,不清楚这种活性是否仅可归因于针对4Ig-B7-H3形式的抗体,因为所有报道的针对4Ig-B7-H3产生的抗体也结合B7-H3的两种IgG样形式(Steinberger,P.等人(2004),*J.Immunol.*172(4):2352-2359和Castriconi等人(2004),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,101(34):12640-12645)。

[0142] B7-H3不在静息B细胞或T细胞、单核细胞或树突细胞上表达,但在树突细胞上受IFN- γ 诱导并且在单核细胞上受GM-CSF诱导(Sharpe,A.H.等人(2002),*Nature Rev.Immunol.*2:116-126)。结合B7-H3的受体尚未完全表征。早期的工作表明一种此类受体在活化后需要在T细胞上快速瞬时上调(Loke,P.等人(2004),*Arthritis Res.Ther.*6:208-214)。

[0143] 除了在成神经细胞瘤细胞上表达外,还已知人B7-H3会在多种其他癌细胞(例如胃癌、卵巢癌和非小细胞肺癌)上表达。已经在肿瘤细胞系中通过免疫组织学检测到B7-H3蛋白表达(Chapoval,A.等人(2001),*Nature Immunol.*2:269-274;Saatian,B.等人(2004),*Amer.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.*287:L217-L225;Castriconi等人(2004),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,101(34):12640-12645);Sun,M.等人(2002),*J.Immunol.*168:6294-6297)。已在心脏、肾脏、睾丸、肺、肝脏、胰腺、前列腺、结肠和成骨细胞中发现mRNA表达(Collins,M.等人(2005),*Genome Biol.*6:223.1-223.7)。在蛋白水平上,在人肝脏、肺、膀胱、睾丸、前列腺、乳腺、胎盘和淋巴器官中发现B7-H3(Hofmeyer,K.等人(2008),*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,105(30):10277-10278)。

[0144] 在一些实施例中,本披露的抗B7-H3 mAb可与来自除人以外的物种的B7-H3或在结构上与人B7-H3有关的其他蛋白交叉反应。在一些实施例中,本申请的抗B7-H3mAb完全对人B7-H3有特异性并且不表现出物种或其他类型的交叉反应性。

[0145] 抗体亲和力

[0146] 抗体或抗原结合结构域的结合特异性可以通过本领域已知的方法通过实验确定。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA-、RIA-、ECL-、IRMA-、EIA-、BIAcore检验和肽扫描。

[0147] 在一些实施例中,抗B7-H3 mAb与B7-H3之间的结合的 K_D 为约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-6}M$ 、约 $10^{-6}M$ 至约 $10^{-7}M$ 、约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-8}M$ 、约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-9}M$ 、约 $10^{-9}M$ 至约 $10^{-10}M$ 、约 $10^{-10}M$ 至约 $10^{-11}M$ 、约 $10^{-11}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-6}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-9}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-10}M$ 至约 $10^{-12}M$ 、约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-11}M$ 、约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-11}M$ 、约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-11}M$ 、约 $10^{-9}M$ 至约 $10^{-11}M$ 、约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-10}M$ 、约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-10}M$ 、约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-10}M$ 、约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-9}M$ 、约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-9}M$ 、约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-8}M$ 或约 $10^{-6}M$ 至约 $10^{-8}M$ 。

[0148] 在一些实施例中,抗B7-H3 mAb与B7-H3之间的结合的 K_{on} 为约 $10^2M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^2M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^3M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^5M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、约 $10^3M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 或约 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 至约 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 。

[0149] 在一些实施例中,抗B7-H3 mAb与B7-H3之间的结合的 K_{off} 为约 $1s^{-1}$ 至约 $10^{-2}s^{-1}$ 、约 $10^{-2}s^{-1}$ 至约 $10^{-4}s^{-1}$ 、约 $10^{-4}s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$ 、约 $10^{-5}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$ 、约 $1s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$ 、约 $10^{-2}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$ 、约 $10^{-3}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$ 、约 $10^{-4}s^{-1}$ 至约 $10^{-6}s^{-1}$ 、约 $10^{-2}s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$ 或约 $10^{-3}s^{-1}$ 至约 $10^{-5}s^{-1}$ 。

[0150] 在一些实施例中,在抗B7-H3 mAb与表达B7-H3的CHO-K1细胞结合的FACS研究中,抗B7-H3 mAb的 E_{50} 小于10nM。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb的 EC_{50} 小于1nM。

[0151] 嵌合或人源化抗体

[0152] 在一些实施例中,本文提供的抗B7-H3抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4,816,567和Morrison等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自骆驼科物种诸如美洲驼的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或子类已相对于亲本抗体的类别或子类发生改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0153] 在一些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体进行人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR,(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体还将可以任选地包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,源自HVR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0154] 人源化抗体及其制造方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并在例如以下文献中进一步描述:Riechmann等人,Nature332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述了SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“重修表面”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”);以及Osborn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的“导向选

择”方法)。

[0155] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如,Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));源自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter等人Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,89:4285(1992)和Presta等人J.Immunol.,151:2623(1993));人类成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及源自筛选FR文库的框架区(参见例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0156] 在一些实施例中,对mAb进行修饰,诸如人源化,而不减弱结构域对抗原的天然亲和力并且同时降低其相对于异源物种的免疫原性。例如,可以确定抗体重链和轻链可变结构域(VH和VL)的氨基酸残基,并且例如在框架区中的一个或多个小鼠氨基酸被如在人共有序列中发现的它们的人对应物替换,而该多肽不会丧失其典型特征,即人源化不会显著影响所得多肽的抗原结合能力。小鼠单克隆抗体的人源化需要两条链(轻链和重链)中有限量的氨基酸的引入和诱变以及两条链装配的保持。

[0157] 人抗体

[0158] 在一些实施例中,本文提供的抗B7-H3抗体,特别是mAb是人抗体。人抗体可以使用本领域已知的不同技术产生。人抗体一般在以下文献中描述:van Dijk和van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg, Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。能够产生全人单域抗体的转基因小鼠或大鼠是本领域已知的。参见例如,US 20090307787 A1、美国专利号8,754,287、US 20150289489 A1、US 20100122358A1和WO 2004049794。

[0159] 可以通过向转基因动物施用免疫原来制备人抗体,该转基因动物已被修饰以响应抗原攻击而产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分的人免疫球蛋白基因座,它们取代了内源性免疫球蛋白基因座,或者存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。对于从转基因动物中获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。另请参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HuMab®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870,以及描述VelociMouse®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900。来自此类动物产生的完整抗体的人可变区可以(例如通过与不同的人恒定区结合)被进一步修饰。

[0160] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法来制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见,例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人,J.Immunol.,147:86(1991))。经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体在Li等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中也有描述。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系生产单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)中描述的那些方法。人杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)和

Vollmers和Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91(2005)中。

[0161] 人抗体也可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生。然后可以将此类可变结构域序列与所希望的人恒定结构域组合。从抗体库中选择人抗体的技术描述如下。

[0162] 文库来源的抗体

[0163] 本申请的抗体可通过筛选组合文库中具有所希望的活性的抗体来分离。例如,本领域已知用于产生噬菌体展示文库和筛选具有所希望的结合特征的抗体的此类文库的多种方法。此类方法综述于例如Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, 2001)中,并进一步描述于例如以下文献中: McCafferty等人, *Nature* 348:552-554; Clackson等人, *Nature* 352:624-628(1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1992); Marks和Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310(2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472(2004); 以及Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004)。已经描述了用于构建单域抗体文库的方法,例如,参见美国专利号7371849。

[0164] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因库通过聚合酶链反应(PCR)来分别克隆并在噬菌体文库中随机重组,然后可以将其针对抗原结合噬菌体筛选,如以下文献中所述的:Winter等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455(1994)。噬菌体典型地以单链Fv(scFv)片段或Fab片段的形式展示抗体片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。可替代地,可以(例如,从人)克隆原始库,以提供针对多种非自身抗原以及自身抗原的单一抗体来源,而无需任何免疫,如由以下文献所述的:Griffiths等人, *EMBO J*, 12:725-734(1993)。最后,还可以通过从干细胞中克隆未重排的V基因片段,并使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区域并完成体外重排来合成原始文库,如由以下文献所述的:Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388(1992)。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如美国专利号5,750,373以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0165] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中被认为是人抗体或人抗体片段。

[0166] 抗B7-H3抗体

[0167] 在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3 mAb,该抗B7-H3 mAb包含:重链可变结构域(VH),该重链可变结构域具有:重链CDR1,该重链CDR1包含SEQ ID NO:2(DHYMH)、SEQ ID NO:10(GMN)、SEQ ID NO:18(GIN)、SEQ ID NO:26(DFGMN)、SEQ ID NO:34(NNGMN)、SEQ ID NO:42(NYGMN)、SEQ ID NO:50(DFGMN)、SEQ ID NO:58(DYGMN)、SEQ ID NO:66(NFGMN)和SEQ ID NO:74(SYWMH)中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况)(对于具有3个氨基酸残基的CDR,其变体可包含至多约2个(诸如1或2个)氨基酸取代);重链CDR2,该重链CDR2包含SEQ ID NO:3(YIFPNNGVSGYNQNFKD)、SEQ ID NO:11(WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO:19

(WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO:27 (WINPYSGVPTYADEFKG)、SEQ ID NO:35 (WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO:43 (WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO:51 (WLNSYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO:59 (WINIYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO:67 (WIYTPSGVPIYADDFKG)和SEQ ID NO:75 (HINPNSGSTNQNAKFKN)中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);以及重链CDR3,该重链CDR3包含SEQ ID NO:4 (RQLGLGTMDY)、SEQ ID NO:12 (DDGFHYTMDY)、SEQ ID NO:20 (DDGFHYTMDY)、SEQ ID NO:28 (DDGYHYTMDY)、SEQ ID NO:36 (DDGYHYTMDF)、SEQ ID NO:44 (DDGFHYTMDY)、SEQ ID NO:52 (DDGYNYTMNY)、SEQ ID NO:60 (DDGYHYTMNY)、SEQ ID NO:68 (DDGYHYTMDY)和SEQ ID NO:76 (SGSNYRRNYFDY)中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);和轻链可变结构域(VL),该轻链可变结构域具有:轻链CDR1,该轻链CDR1包含SEQ ID NO:6 (RASKSVSTSGYNYMH)、SEQ ID NO:14 (RSSQNLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO:22 (RSSQNLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO:30 (RSSQSLIHSNGITYLH)、SEQ ID NO:38 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO:46 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO:54 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO:62 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO:70 (RSSQSLVHSNGITYLH)和SEQ ID NO:78 (KASDHINWLA)中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);轻链CDR2,该轻链CDR2包含SEQ ID NO:7 (LASNLES)、SEQ ID NO:15 (KVSNRFS)、SEQ ID NO:23 (KVSNRFS)、SEQ ID NO:31 (KVSNRFS)、SEQ ID NO:39 (KVSHRFS)、SEQ ID NO:47 (KVSHRFS)、SEQ ID NO:55 (KVSNRFS)、SEQ ID NO:63 (KVSNRFS)、SEQ ID NO:71 (KVSNRFS)和SEQ ID NO:79 (GATSLET)中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);以及轻链CDR3,该轻链CDR3包含SEQ ID NO:8 (QHSKELPWT)、SEQ ID NO:16 (SQSTLVPWT)、SEQ ID NO:24 (SQSTLVPWT)、SEQ ID NO:32 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO:40 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO:48 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO:56 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO:64 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO:72 (SQSTHVPWT)和SEQ ID NO:80 (QQYWSTPLT)中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况)。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb与B7-H3之间的结合的 K_D 为约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-12}M$ (诸如约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$ 或约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$)。在一些实施例中,抗B7-H3抗体是啮齿动物的、嵌合的、人的、部分人源化的或完全人源化的。

[0168] 在一些实施例中,抗B7-H3 mAb包含VH CDR3和VL CDR3,该VH CDR3包含SEQ ID NO:4、12、20、28、36、44、52、60、68和76中任一个的氨基酸序列,该VL CDR3包含SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72和80中任一个的氨基酸序列,并且氨基酸取代在VH结构域和VL结构域的CDR1和/或CDR2中。

[0169] 因此,在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3 mAb,该抗B7-H3 mAb包含:重链可变结构域(VH),该重链可变结构域具有:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:2、10、18、26、34、42、50、58、66和74中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:3、11、19、27、35、43、51、59、67和75中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:4、12、20、28、36、

44、52、60、68和76中的任一个的氨基酸序列;和轻链可变结构域(VL),该轻链可变结构域具有:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:6、14、22、30、38、46、54、62、70和78中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71和79中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72和80中的任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb与B7-H3之间的结合的 K_D 为约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-12}M$ (诸如约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$ 或约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$)或更低。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb是啮齿动物的、嵌合的、人的、部分人源化的或完全人源化的。

[0170] 在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3 mAb,该抗B7-H3 mAb包含:重链可变结构域(VH),该重链可变结构域具有:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:2、10、18、26、34、42、50、58、66和74中的任一个的氨基酸序列;CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:3、11、19、27、35、43、51、59、67和75中的任一个的氨基酸;和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:4、12、20、28、36、44、52、60、68和76中的任一个的氨基酸序列;和轻链可变结构域(VL),该轻链可变结构域具有:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:6、14、22、30、38、46、54、62、70和78中的任一个的氨基酸序列;CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71和79中的任一个的氨基酸;和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72和80中的任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb与B7-H3之间的结合的 K_D 为约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-12}M$ (诸如约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$ 或约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$)。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb是啮齿动物的、嵌合的、人的、部分人源化的或完全人源化的。

[0171] 在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3 mAb,该抗B7-H3 mAb包含:1) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:2、3和4的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:6、7和8的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;2) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:10、11和12的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:14、15和16的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;3) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:18、19和20的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:22、23和24的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;4) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:26、27和28的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:30、31和32的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;5) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:34、35和36的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:38、39和40的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;6) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:42、43和44的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:46、47和48的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;7) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:50、51和52的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:54、55和56的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;8) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:58、59和60的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:62、63和64的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;9) VH,该VH包含分别具有SEQ ID NO:66、67和68的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:70、71和72的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3;或10) VH,该VH包含分别具

有SEQ ID NO:74、75和76的氨基酸序列的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;和VL,该VL包含分别具有SEQ ID NO:78、79和80的氨基酸序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0172] 在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3 mAb,该抗B7-H3 mAb包含:1)包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VL(47F3F10B4);2)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VL(12C9F1B5);3)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的VL(34A9C12);4)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的VL(38D6A4);5)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VL(37D11F5B8);6)包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的VL(37F11A10);7)包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的VL(43H11G12);8)包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的VL(38F11B2);9)包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的VL(47C7E3);或10)包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的VL(31H11B1)。

[0173] CDR可以以各种成对组合方式组合以生成许多人源化抗B7-H3抗体。人源化取代对本领域技术人员来说将是清楚的。例如,通过将天然存在的VH或VL的FR序列与一个或多个密切相关的人VH或VL的相应FR序列进行比较,然后使用本领域已知的方法(也如本文所述)将一个或多个此类潜在有用的人源化取代引入所述VH或VL中,可以确定潜在有用的人源化取代。人源化重链和轻链是配对的。可以测试所得人源化抗体的B7-H3结合亲和力、稳定性、表达的容易程度和水平和/或其他所希望的特性。本文所述的抗B7-H3 mAb可以是部分或完全人源化的。优选地,所得人源化抗体,诸如人源化mAb或其抗原结合片段,以本文所述的 K_D 、 K_{on} 、 K_{off} 与B7-H3结合。

[0174] 在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3人源化mAb或其抗原结合片段,该抗B7-H3人源化mAb或其抗原结合片段包含:VH结构域,该VH结构域包含SEQ ID NO:81-87中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:81-87中的任一个具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)的序列同一性的其变体;和VL结构域,该VL结构域包含SEQ ID NO:88-91中的任一个的氨基酸序列或与SEQ ID NO:88-91中的任一个具有至少约80%(诸如至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%中的任一个)的序列同一性的其变体。在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3 mAb,该抗B7-H3 mAb包含:VH结构域,该VH结构域包含SEQ ID NO:81-87中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体在该VH结构域中包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);和VL结构域,该VL结构域包含SEQ ID NO:88-91中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体在该VL结构域中包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况)。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:81-87中任一个的氨基酸序列的VH结构域的变体,其中该变体在VH的CDR,诸如CDR1和/或CDR2和/或CDR3中包含氨基酸取代;和具有SEQ ID NO:88-91中任一个的氨基酸序列的VL结构域的变体,其中该变体在VL任一个的CDR,诸如CDR1和/或CDR2和/或CDR3中包含氨基酸取代。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:81-87中任一个的氨基酸序列的VH结构域的变体,其中该变体在VH任一个

的FR,诸如FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4中包含氨基酸取代;和具有SEQ ID NO:88-91中任一个的氨基酸序列的VL结构域的变体,其中该变体在FR,诸如FR1和/或FR2和/或FR3和/或FR4中包含氨基酸取代。

[0175] 在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3人源化mAb或其抗原结合片段,该抗B7-H3人源化mAb或其抗原结合片段包含:1)包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的VL(47F3F10B4-VH1-VL4);2)包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的VL(47F3F10B4-VH2-VL4);3)包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的VL(12C9F1B5-VH2.1-VL2);4)包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的VL(12C9F1B5-VH4-VL2);5)包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的VL(43H11G12-VH4-VL2);6)包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的VL(31H11B1-VH1-VL3);或7)包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的VH和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的VL(31H11B1-VH1.1-VL3)。

[0176] 在一些实施例中,提供了一种与本文所述的任一种抗B7-H3 mAb竞争性地与B7-H3特异性结合的抗B7-H3抗体,诸如mAb(下文称为“竞争性抗B7-H3抗体或竞争性抗B7-H3 mAb”)或其抗原结合片段。在一些实施例中,可以使用ELISA测定来确定竞争性结合。在一些实施例中,竞争性抗B7-H3抗体和上述抗B7-H3抗体结合B7-H3上的相同表位。

[0177] 包含抗B7-H3 mAb的构建体

[0178] 包含抗B7-H3 mAb的抗B7-H3构建体可以是任何可能的形式。

[0179] 在一些实施例中,包含抗B7-H3 mAb的抗B7-H3构建体可进一步包含附加多肽序列,诸如一个或多个抗体部分。此类附加多肽序列可以或不可以改变或以其他方式影响抗B7-H3 mAb的(生物)特性,并且可以或不可以为本文所述的抗B7-H3 mAb增加其他功能。在一些实施例中,附加多肽序列赋予本申请的抗B7-H3 mAb一种或多种所希望的特性或功能。在一些实施例中,抗B7-H3构建体是包含胞外抗原结合结构域的嵌合抗原受体(CAR),该胞外抗原结合结构域包含一个或多个本文所述的抗B7-H3结合部分。

[0180] 在一些实施例中,附加多肽序列可以是特异性识别第二抗原的第二抗体部分(诸如sdAb、scFv)。在一些实施例中,第二抗原不是B7-H3。在一些实施例中,第二抗体部分与本文所述的抗B7-H3 mAb特异性识别B7-H3上的相同表位。在一些实施例中,第二抗体部分与本文所述的抗B7-H3 mAb特异性识别B7-H3上的不同表位。

[0181] 在一些实施例中,与本文所述的抗B7-H3 mAb本身相比,附加多肽序列可以增加本发明的抗B7-H3构建体的分子稳定性、溶解性或吸收,降低免疫原性或毒性,消除或减弱不期望的副作用,和/或赋予本发明的抗B7-H3构建体其他有利的特性和/或减少不期望的特性。

[0182] 全长IgG

[0183] 在一些实施例中,抗B7-H3 mAb是全长IgG。在一些实施例中,抗B7-H3 mAb包含IgG(诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的任一种)的恒定区。在一些实施例中,该恒定区是人恒定区。在一些实施例中,该恒定区是人IgG1恒定区。

[0184] 因此,在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3全长IgG,该抗B7-H3全长IgG包含:重链,其中可变区(VH)包含:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:2、10、18、26、34、42、50、58、66和74

中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:3、11、19、27、35、43、51、59、67和75中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:4、12、20、28、36、44、52、60、68和76中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况),并且其中该VH与免疫球蛋白的重链恒定区(铰链区、 C_H1 、 C_H2 和 C_H3)融合;和轻链,其中可变区(VL)包含:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:6、14、22、30、38、46、54、62、70和78中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71和79中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况);和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72和80中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况),并且其中该VL与免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)融合。在一些实施例中,提供了一种抗B7-H3全长IgG,该抗B7-H3全长IgG包含:重链,其中可变区(VH)包含:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:2、10、18、26、34、42、50、58、66和74中的任一个的氨基酸序列;CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:3、11、19、27、35、43、51、59、67和75中的任一个的氨基酸;和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:4、12、20、28、36、44、52、60、68和76中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况),并且其中该VH与免疫球蛋白的重链恒定区(铰链区、 C_H1 、 C_H2 和 C_H3)融合;和轻链,其中可变区(VL)包含:CDR1,该CDR1包含SEQ ID NO:6、14、22、30、38、46、54、62、70和78中的任一个的氨基酸序列;CDR2,该CDR2包含SEQ ID NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71和79中的任一个的氨基酸;和CDR3,该CDR3包含SEQ ID NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72和80中的任一个的氨基酸序列或其变体,该变体包含至多约3个氨基酸取代(诸如约1、2或3个氨基酸取代中的任一种情况),并且其中该VL与免疫球蛋白的轻链恒定区(CL)融合。在一些实施例中,全长抗B7-H3 mAb包含VH和VL,该VH包含SEQ ID NO:1、9、17、25、33、41、49、57、65和73中任一个的氨基酸序列,该VL包含SEQ ID NO:5、13、21、29、37、45、53、61、69和77中任一个的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施例中,全长抗B7-H3 IgG与B7-H3之间的结合的 K_D 为约 $10^{-5}M$ 至约 $10^{-12}M$ (诸如约 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-12}M$ 或约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-12}M$)或更低。在一些实施例中,全长抗B7-H3 IgG是啮齿动物的、嵌合的、人的、部分人源化的或完全人源化的。

[0186] 多价抗体和/或多特异性抗体

[0187] 在一些实施例中,抗B7-H3构建体包含与一个或多个其他抗体部分(诸如特异性识别另一抗原的抗体部分)融合的本文所述的抗B7-H3 mAb。该一个或多个其他抗体部分可以是任何抗体或抗体片段形式,诸如sdAb、全长抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、单链Fv(scFv)、scFv-scFv、微型抗体或双链抗体。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人Nat. Med. 9: 129-134 (2003)。关于scFv片段的综述,参见例如,Pluckthün于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,(Springer-Verlag, New York),第269-315页(1994);另请参见WO 93/16185以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基并具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美

国专利号5,869,046。关于多特异性抗体的综述,参见Weidle等人,Cancer Genomics Proteomics,10(1):1-18,2013;Geering和Fussenegger,Trends Biotechnol.,33(2):65-79,2015;Stamova等人,Antibodies,1(2):172-198,2012。双链抗体是具有两个抗原结合位点的,可以是二价的或双特异性的抗体片段。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)和Hollinger等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三链抗体和四链抗体也在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中有描述。抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。在一些实施例中,该一个或多个其他抗体部分是抗体模拟物,是包含使人联想到抗体的抗原结合结构域的小工程化蛋白(Geering和Fussenegger,Trends Biotechnol.,33(2):65-79,2015)。这些分子源自现有的人支架蛋白并且包含单个多肽。可以包含在本文所述的抗B7-H3构建体中的示例性抗体模拟物可以是但不限于设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin;包含3-5个侧翼为N端和C端Cap结构域的全合成锚蛋白重复序列)、亲合多聚体(avimer;包含多个A结构域的高亲和力蛋白,每个结构域对靶点具有低亲和力)或Anticalin(基于脂质运载蛋白的支架,具有四个可接近的环,每个环的序列可以随机化)。

[0188] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuellar,Nature 305:537(1983)、WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991))和“杵臼结构(knob-in-hole)”工程化(参见,例如,美国专利号5,731,168)。多特异性抗体也可以通过以下方式制备:用于制备抗体Fc-异二聚体分子的工程化静电转向效应(WO 2009/089004 A1);交联两种或更多种抗体或片段(参见,例如美国专利号4,676,980和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用用于制备双特异性抗体片段的“双链抗体”技术(参见,例如Hollinger等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(scFv)二聚体(参见,例如Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及如例如在Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)中所述,制备三特异性抗体;以及产生包含串联单域抗体的多肽(参见,例如,美国专利申请号20110028695;和Conrath等人J.Biol.Chem.,2001;276(10):7346-50)。本文还包括具有三个或更多个功能抗原结合位点的工程化抗体,包括“章鱼抗体”(参见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0189] 肽接头

[0190] 在一些实施例中,抗B7-H3构建体内的两个或更多个抗体部分可以任选地通过肽接头连接。抗B7-H3构建体中使用的肽接头的长度、灵活度和/或其他特性可能对特性有一些影响,这些特性包括但不限于对一种或多种特定抗原或表位的亲和力、特异性或亲合力。例如,可以选择更长的肽接头以确保两个相邻的结构域在空间上不会彼此干扰。在一些实施例中,肽接头包含柔性残基(诸如甘氨酸和丝氨酸),使得相邻的结构域相对于彼此自由移动。例如,甘氨酸-丝氨酸双联体可以是合适的肽接头。

[0191] 肽接头可以具有任何合适的长度。在一些实施例中,肽接头的长度为至少约以下中的任何一者:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100个或更多个氨基酸。在一些实施例中,肽接头的长度为不超过约以下中的任何一

者:100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5个或更少个氨基酸。在一些实施例中,肽接头的长度为以下中的任何一者:约1个氨基酸至约10个氨基酸、约1个氨基酸至约20个氨基酸、约1个氨基酸至约30个氨基酸、约5个氨基酸至约15个氨基酸、约10个氨基酸至约25个氨基酸、约5个氨基酸至约30个氨基酸、约10个氨基酸至约30个氨基酸长、约30个氨基酸至约50个氨基酸、约50个氨基酸至约100个氨基酸、或约1个氨基酸至约100个氨基酸。

[0192] 肽接头可具有天然存在的序列或非天然存在的序列。例如,源自仅有重链的抗体的铰链区的序列可以用作接头。参见,例如,WO 1996/34103。在一些实施例中,肽接头是突变的人IgG1铰链(EPKSSDKTHTSPSP,SEQ ID NO:95)。在一些实施例中,肽接头是柔性接头。示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括,例如,(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n和(GGGGS)_n,其中n是至少是一的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域已知的其他柔性接头。在一些实施例中,肽接头包含GGGGSGGG(SAQ ID NO:96)的氨基酸序列。在一些实施例中,肽接头包含SEQ ID NO:97(GGGGSGGGGSGGGGS)的氨基酸序列。

[0193] 双特异性抗体

[0194] 在一些实施例中,本申请的分离的抗体或抗原结合片段是包含与第二抗体部分融合的本文所述的抗B7-H3 IgG的双特异性抗体或多特异性抗体,其中第二抗体部分与另一抗原,优选另外的抑制性免疫检查点分子特异性结合。

[0195] 在一个实施例中,另一抗原是CTLA-4并且第二抗体部分包含与CTLA-4特异性结合的抗体或抗原结合片段,诸如抗CTLA-4mAb,优选抗CTLA-4sdAb。具有针对B7-H3和CTLA-4的双特异性的分离的抗体或抗原结合片段在下文中可以称为“抗B7-H3/CTLA-4抗体”、“抗B7-H3/CTLA-4构建体”或“B7-H3×CTLA-4抗体”。

[0196] 在一个实施例中,另一抗原是PD-L1并且第二抗体部分包含与PD-L1特异性结合的抗体或抗原结合片段,诸如抗PD-L1 mAb,优选抗PD-L1 sdAb。具有针对B7-H3和PD-L1的双特异性的分离的抗体或抗原结合片段在下文中可以称为“抗B7-H3/PD-L1抗体”、“抗B7-H3/PD-L1构建体”或“B7-H3×PD-L1抗体”。

[0197] 在一个实施例中,另一抗原是TIM-3并且第二抗体部分包含与TIM-3特异性结合的抗体或抗原结合片段,诸如抗TIM-3mAb,优选抗TIM-3sdAb。具有针对B7-H3和TIM-3的双特异性的分离的抗体或抗原结合片段在下文中可以称为“抗B7-H3/TIM-3抗体”、“抗B7-H3/TIM-3构建体”或“B7-H3×TIM-3抗体”。

[0198] 在一个实施例中,另一抗原是LAG-3并且第二抗体部分包含与LAG-3特异性结合的抗体或抗原结合片段,诸如抗LAG-3mAb,优选抗LAG-3sdAb。具有针对B7-H3和LAG-3的双特异性的分离的抗体或抗原结合片段在下文中可以称为“抗B7-H3/LAG-3抗体”、“抗B7-H3/LAG-3构建体”或“B7-H3×LAG-3抗体”。

[0199] CTLA-4、PD-L1、TIM-3和LAG-3是抑制性免疫检查点分子。

[0200] 缀合物

[0201] 对B7-H3具有特异性的人单克隆抗体或其抗原结合片段可以使用本领域技术人员已知的多种方式缀合至药剂,诸如效应分子或可检测标记物。可以使用共价和非共价连接方式。缀合物包括但不限于其中效应分子或可检测标记物与特异性结合B7-H3的抗体或抗

原结合片段共价连接的分子。本领域技术人员将理解可以使用多种效应分子和可检测标记物,包括(但不限于)化学治疗剂、抗血管生成剂、毒素、放射剂(诸如 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^3H 和 ^{35}S)和其他标签、靶部分和配体等。

[0202] 特定效应分子或可检测标记物的选择取决于特定靶分子或靶细胞,以及所希望的生物效应。因此,例如,效应分子可以是用于引起特定靶细胞(诸如肿瘤细胞)死亡的细胞毒素。

[0203] 效应分子和可检测标记物可以使用本领域技术人员已知的任何方式与目标抗体或抗原结合片段连接。可以使用共价和非共价连接方式。将效应分子或可检测标记物附接到抗体或抗原结合片段的程序根据效应子的化学结构而变化。多肽通常含有多种官能团;例如羧酸(COOH)、游离胺($-\text{NH}_2$)或巯基($-\text{SH}$)基团,这些基团可用于与抗体上的合适官能团反应以引起效应分子或可检测标记物的结合。可替代地,将抗体或抗原结合片段衍生化以暴露或附接另外的反应性官能团。衍生化可牵涉附接多种已知接头分子中的任何一种,诸如可从Pierce Chemical Company, Rockford, IL. 获得的那些。接头可以是用于将抗体或抗原结合片段连接到效应分子或可检测标记物上的任何分子。接头能够与抗体或抗原结合片段和效应分子或可检测标记物同时形成共价键。合适的接头是本领域技术人员众所周知的,包括但不限于直链或支链碳接头、杂环碳接头或肽接头。在抗体或抗原结合片段和效应分子或可检测标记物是多肽的情况下,接头可以通过其侧基(诸如通过与半胱氨酸的二硫键)连接至组成氨基酸,或者连接至末端氨基酸的 α 碳氨基和羧基基团。

[0204] 另外,在几个实施例中,接头可包括间隔区元件,当存在时,间隔区元件增加接头的大小,使得效应分子或可检测标记物与抗体或抗原结合片段之间的距离增加。示例性的间隔区是普通技术人员已知的,并且包括在以下列出的那些:美国专利号7,964,5667、498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444和4,486,414以及美国专利公开号20110212088和20110070248,这些专利中的每一者通过援引以其全文并入。

[0205] 因此,在几个实施例中,缀合物包括将效应分子或可检测标记物连接至B7-H3特异性抗体或其抗原结合片段的接头。在一些实施例中,接头在胞内条件下是可切割的,使得接头的切割在胞内环境中使效应分子或可检测标记物从抗体或抗原结合片段释放。在其他实施例中,接头是不可切割的并且效应分子或可检测标记物例如通过抗体降解释放。在一些实施例中,接头可被胞内环境中(例如,在溶酶体或核内体或小窝内)存在的切割剂切割。接头可以是例如被胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体蛋白酶或核内体蛋白酶)切割的肽接头。在一些实施例中,肽接头为至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。然而,接头可以是4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸长,诸如1-2、1-3、2-5、3-10、3-15、1-5、1-10、1-15个氨基酸长。蛋白酶可以包括组织蛋白酶B和D以及纤溶酶,已知所有这些蛋白酶都会水解二肽药物衍生物,引起活性药物在靶细胞内部释放(参见,例如,Dubowchik和Walker,1999,Pharm. Therapeutics 83:67-123)。例如,可以使用可被硫醇依赖性蛋白酶即组织蛋白酶-B切割的肽接头(例如,苯丙氨酸-亮氨酸或甘氨酸-苯丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸接头)。此类接头的其他实例描述于例如美国专利号6,214,345中,该专利通过援引并入本文。在一个具体的实施例中,可被胞内蛋白酶切割的肽接头是缬氨酸-瓜氨酸接头或苯丙氨

酸-赖氨酸接头(参见,例如,美国专利号6,214,345,该专利描述了具有缬氨酸-瓜氨酸接头的阿霉素的合成)。

[0206] 在其他实施例中,可切割接头是pH敏感的,即在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感型接头在酸性条件下是可水解的。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定接头(例如,脞、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺式乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见,例如,美国专利号5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm. Therapeutics 83:67-123;Neville等人,1989,Biol. Chem. 264:14653-14661)。此类接头在中性pH条件下,诸如在血液中的那些条件下相对稳定,但在低于pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH)下不稳定。在某些实施例中,可水解接头是硫醚接头(诸如,例如,经由酰脞键附接至治疗剂的硫醚)(参见,例如,美国专利号5,622,929)。

[0207] 在其他实施例中,接头在还原条件下是可切割的(例如,二硫化物接头)。本领域已知多种二硫化物接头,包括例如可使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB和SMPT形成的那些。(参见,例如,Thorpe等人,1987,Cancer Res. 47:5924-5931;Wawrzynczak等人,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编,Oxford U.Press,1987);Phillips等人,Cancer Res. 68:92809290,2008。另请参见美国专利号4,880,935)。

[0208] 在其他具体实施例中,接头是丙二酸酯接头(Johnson等人,1995,Anticancer Res. 15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰接头(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)。

[0209] 在其他实施例中,接头是不可切割的并且效应分子或可检测标记物通过抗体降解释放。(参见通过援引以其全文并入本文的美国公开号2005/0238649)。

[0210] 在几个实施例中,接头在胞外环境中耐切割。例如,当缀合物存在于胞外环境中(例如,存在于血浆中)时,缀合物样品中不超过约20%、不超过约15%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%的接头被切割。接头在胞外环境中是否耐切割可以例如通过将含有目标接头的缀合物与血浆一起孵育预定的时间段(例如,2、4、8、16或24小时),然后对血浆中存在的游离效应分子或可检测标记物的量进行定量来确定。可用于缀合物中的多种示例性接头描述于WO 2004-010957、美国公开号2006/0074008、美国公开号2005/0238649和美国公开号2006/0024317中,这些中的每一个通过援引以其全文并入本文。

[0211] 本文披露的抗体或抗原结合片段可以例如通过交联两个或更多个抗体(相同类型或不同类型的抗体,诸如以产生双特异性抗体)而衍生化。合适的交联剂包括异双官能的,具有被适当的间隔区隔开的两个明显反应性基团的交联剂(诸如间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)或是同双官能的交联剂(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)。此类接头是可商购的。

[0212] 考虑到已经报道的用于将多种放射性诊断化合物、放射性治疗化合物、标签(诸如酶或荧光分子)、毒素和其他药剂附接到抗体的大量方法,本领域技术人员将能够确定用于将给定药剂附接到抗体或抗原结合片段或其他多肽的合适方法。例如,抗体或抗原结合片

段可与小分子量药物诸如单甲基澳瑞他汀E (MMAE)、单甲基澳瑞他汀F (MMAF)、美登素 (maytansine)、美登素衍生物(包括称为DM1的美登素衍生物(也称为美登木素(mertansine)))或其他化学治疗剂缀合以制备抗体药物缀合物(ADC)。在几个实施例中,本文所述的各种化学治疗剂可以与提供的抗体缀合以生成缀合物。

[0213] 在几个实施例中,提供了抗体或抗原结合片段和一种或多种小分子毒素的缀合物,这些小分子毒素诸如卡奇霉素、美登木素生物碱、尾海兔素(dolastatin)、澳瑞他汀、单端孢霉烯(trichothecene)和CC1065,以及这些毒素的具有毒素活性的衍生物。

[0214] 适合用作美登木素生物碱毒素部分的美登素化合物是可获得的,并且可以根据已知方法从天然来源分离,使用基因工程技术产生(参见Yu等人(2002)PNAS 99:7968-7973),或根据已知方法合成制备美登醇(maytansinol)和美登醇类似物。美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白聚合起作用的有丝分裂抑制剂。美登素首先分离自东非灌木即齿叶美登木(Maytenus serrata)(美国专利号3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登木素生物碱,诸如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利号4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物披露于例如美国专利号4,137,230、4,248,870、4,256,746、4,260,608、4,265,814、4,294,757、4,307,016、4,308,268、4,308,269、4,309,428、4,313,946、4,315,929、4,317,821、4,322,348、4,331,598、4,361,650、4,364,866、4,424,219、4,450,254、4,362,663和4,371,533中,这些专利中的每一者通过援引并入本文。含有美登木素生物碱的缀合物、这些缀合物的制备方法以及它们的治疗用途披露于例如美国专利号5,208,020;5,416,064;6,441,163和欧洲专利EP 0 425 235 B1中,这些专利的披露内容特此明确地通过援引并入。

[0215] 抗B7-H3抗体变体

[0216] 在一些实施例中,考虑了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括,例如,抗体的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以得到最终的构建体,条件是最终的构建体具有所希望的特征,例如抗原结合性。

[0217] a) 取代、插入、缺失和变体

[0218] 在一些实施例中,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。取代诱变的目标位点包括HVR和FR。保守取代示于标题为“优选的取代”的表3中。标题为“示例性取代”的表3中提供了更实质的变化,并且如下文参考氨基酸侧链类别进一步描述的。氨基酸取代可以引入目标抗体中,并针对所希望的活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC)筛选产物。

[0219] 表3. 氨基酸取代

	原始残基	示例性取代	优选的取代
[0220]	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
[0221]	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0222] 氨基酸可以根据共同的侧链特性分组:

[0223] (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0224] (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0225] (3) 酸性: Asp、Glu;

[0226] (4) 碱性: His、Lys、Arg;

[0227] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0228] (6) 芳香族的: Trp、Tyr、Phe。

[0229] 非保守取代将需要将这类别中的一个的成员交换为另一个类别。

[0230] 取代变体的一种类型涉及取代亲本抗体(例如, 人源化或人抗体)的一个或多个高

变区残基。通常,选择用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性(例如,增加的亲和力、降低的免疫原性)上具有修饰(例如,改善)和/或将基本上保留了亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体,该抗体可以方便地生成,例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文所述的那些)。简而言之,一个或多个HVR残基突变并且变体抗体在噬菌体上展示并针对特定的生物活性(例如,结合亲和力)来筛选。

[0231] 可以在HVR中进行改变(例如,取代),例如以提高抗体的亲和力。可在HVR“热点”,即由在体细胞成熟过程中经历高频突变的密码子编码的残基(参见,例如,Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))和/或SDR(a-CDR)中进行此类改变,其中测试所得变体VH或VL的结合亲和力。例如,Hoogenboom等人已经在*Methods in Molecular Biology* 178:1-37中描述了通过从二级文库构建和重新选择的亲和力成熟(O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施例中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种将多样性引入被选择用于成熟的可变基因中。然后创建二级文库。然后筛选文库以鉴定具有所希望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR导向的方法,其中将几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机化。可以特异性鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地,CDR-H3和CDR-L3经常被靶向。

[0232] 在一些实施例中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行不显著降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文提供的保守取代)。此类改变可以在HVR“热点”或CDR之外。在上述提供的变体V_HH序列的一些实施例中,每个HVR是未改变的或者含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0233] 如Cunningham和Wells(1989) *Science*, 244:1081-1085所述,用于鉴定可以靶向诱变的抗体的残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴定靶残基的残基或残基组(例如,带电荷的残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置引入另外的取代,证明对初始取代的功能敏感性。可替代地或另外地,抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴定抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可以被靶向或消除作为取代候选。可以筛选变体以确定它们是否含有所希望的特性。

[0234] 氨基酸序列插入包括氨基末端和/或羧基末端融合,长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括将抗体的N末端或C末端与延长该抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽融合。

[0235] b) 糖基化变体

[0236] 在一些实施例中,改变本文提供的抗B7-H3构建体以增加或减少构建体糖基化的程度。向抗体中添加或缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0237] 当抗B7-H3构建体包含Fc区时,可以改变与其附接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的双触角寡糖,其通常通过N-键附接至Fc区CH2结构域的

Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括多种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角寡糖结构的“茎”中附接至GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可对本申请的抗B7-H3构建体中的寡糖进行修饰以便产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0238] 在一些实施例中,提供了具有碳水化合物结构的抗体变体,该碳水化合物结构缺少(直接或间接)附接至Fc区的岩藻糖。例如,此类抗体中的岩藻糖含量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量是通过计算Asn297糖链中岩藻糖的平均量来确定的,相对于通过MALDI-TOF质谱测量的与Asn 297附接的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸,即在位置294和300之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体有关的出版物实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化作用缺陷型的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,尤其是实例11),以及敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8,敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO 2003/085107)。

[0239] 抗B7-H3构建体变体还具有等分寡糖,例如其中通过GlcNAc等分附接至抗体Fc区的双触角寡糖。此类抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)。还提供了在寡糖上具有至少一个附接至Fc区的半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)。

[0240] c)Fc区变体

[0241] 在一些实施例中,可将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗B7-H3构建体的Fc区内,从而生成Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),该序列包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如,取代)。

[0242] 在一些实施例中,本申请考虑了一种抗B7-H3构建体变体,该变体具有一些但非全部的效应子功能,这类功能使该变体成为适合应用的理想候选物,在这些应用中,抗B7-H3构建体的体内半衰期很重要,但某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是非必要或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定确保抗体没有Fc γ R结合能力(因此可能缺乏ADCC活性),但可以保留

FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991) 的第464页的表3中。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362 (参见,例如Hellstrom, I.等人 *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) 和Hellstrom, I等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (参见Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))。可替代地,可以采用非放射性测定方法 (参见,例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI))。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。可替代地或另外地,可以在体内评估目标分子的ADCC活性,例如在动物模型,诸如Clynes等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998) 中披露的动物模型中。还可以进行C1q结合测定确认抗体不能结合C1q,并且因此缺乏CDC活性。参见,例如,在WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以进行CDC测定 (参见,例如, Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 以及Cragg, M. S. 和M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定 (参见,例如, Petkova, S. B. 等人, *Int' l. Immunol.* 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0243] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有对Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的抗体 (美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括取代氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个的Fc突变体,包括残基265和297被丙氨酸取代的称为“DANA”的Fc突变体 (美国专利号7,332,581)。

[0244] 描述了与FcR结合提高或降低的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056; WO 2004/056312, 以及Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001))。

[0245] 在一些实施例中,抗B7-H3构建体变体包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区,这些取代 (例如,Fc区内的位置298、333和/或334处的取代 (残基的EU编号)) 改善ADCC。

[0246] 在一些实施例中,Fc区内发生改变,导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 发生改变 (即,提高或降低),例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) 中所描述。

[0247] 在一些实施例中,提供了包含变体Fc区的抗B7-H3构建体 (例如, HCAb) 变体,该变体Fc区包含延长半衰期和/或改善与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合的一个或多个氨基酸取代。具有延长的半衰期和与新生儿Fc受体 (FcRn) 的结合改善的抗体,其负责将母体IgG转移至胎儿 (Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 和Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994)), 描述于US 2005/0014934 A1 (Hinton等人) 中。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,这些取代改善了Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一个或多个残基处具有取代的那些:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如Fc区残基434的取代 (美国专利号7,371,826)。

[0248] 另请参见Duncan&Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260; 美国专利号5,624,821; 以及关于Fc区变体的其他实例的WO 94/29351。

[0249] 考虑了包含本文所述的任何Fc变体或其组合的抗B7-H3构建体 (诸如全长IgG或融

合至sdAb的抗B7-H3 IgG)。

[0250] 在一些实施例中,恒定区是人IgG1恒定区。在一些实施例中,重链恒定区包含增强ADCC效应的修饰。在一些实施例中,重链恒定区包含突变K214R、L235V、F243L、R292P、Y300L、D356E、L358M和P396L。在一些实施例中,重链恒定区包含SEQ ID NO:93或94的氨基酸序列。在一些实施例中,轻链恒定区包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列。

[0251] d) 半胱氨酸工程化的抗体变体

[0252] 在一些实施例中,可能期望产生半胱氨酸工程化的抗B7-H3构建体,例如“硫代MAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施例中,取代的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此位于抗体的可及位点,并可用于将抗体与其他部分,诸如药物部分或接头-药物部分缀合,以产生免疫缀合物,如本文进一步所述。在一些实施例中,以下残基中的任何一个或多个残基可以被半胱氨酸取代:重链的A118(EU编号);以及重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程化的抗B7-H3构建体可以如例如美国专利号7,521,541中所述那样生成。

[0253] e) 抗体衍生物

[0254] 在一些实施例中,本文提供的抗B7-H3构建体可以被进一步修饰以含有本领域已知的和容易获得的另外的非蛋白质部分。适用于抗体衍生的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和右旋糖酐或聚(正乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇以及它们的混合物。聚乙二醇丙醛由于在水中的稳定性而在制造中可具有优势。聚合物可以具有任何分子量,并且可以是支链或非支链的。附接至抗体的聚合物的数目可以变化,并且如果附接的聚合物多于一种,则它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑因素来确定,这些因素包括但不限于待改善抗体的特定特性或功能,是否将抗体衍生物用于确定条件的疗法等。

[0255] 在一些实施例中,提供了抗B7-H3构建体与非蛋白质部分的缀合物,该非蛋白质部分可通过暴露于辐射而选择性加热。在一些实施例中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以具有任何波长,包括但不限于不伤害普通细胞,但将非蛋白质部分加热到邻近抗体-非蛋白质部分的细胞被杀伤的温度的波长。

[0256] 在一些实施例中,本文提供的抗B7-H3构建体(诸如抗B7-H3 IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体)可被进一步修饰以含有一种或多种生物活性蛋白、多肽或其片段。如本文所用的“生物活性的”或“具有生物学活性的”意指在体内显示执行特定功能的生物学活性。例如,它可意指与特定生物分子(诸如蛋白质、DNA等)结合,然后促进或抑制此类生物分子的活性。在一些实施例中,生物活性蛋白或其片段具有免疫刺激活性/免疫调节活性、膜转运活性或酶活性。

[0257] 在一些实施例中,可与本文所述的抗B7-H3构建体融合的生物活性蛋白质或其片段是配体,诸如与特异性细胞受体相互作用的淋巴因子和细胞因子。淋巴因子是当抗原或

凝集素刺激T细胞生长时由T细胞分泌的低分子量蛋白。淋巴因子的实例包括但不限于干扰素- α 、干扰素- γ 、白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、白介素-3 (IL-3)、肿瘤坏死因子 (TNF)、集落刺激因子 (例如CSF-1、G-CSF或GM-CSF)、趋化因子、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、巨噬细胞活化因子 (MAF)、NK细胞活化因子、T细胞替代因子、白细胞抑制因子 (LIF)、淋巴毒素、破骨细胞活化因子 (OAF)、可溶性免疫应答抑制剂 (SIRS)、生长刺激因子、靶点生长因子等。可掺入本发明的抗B7-H3融合蛋白中的细胞因子包括但不限于肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素 (IFN) 和神经生长因子 (NGF) 等。

[0258] III. 药物组合物

[0259] 本申请进一步提供了药物组合物,这些药物组合物包含抗B7-H3构建体 (诸如抗B7-H3 IgG、全长抗B7-H3 IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体) 中的任一种和任选药学上可接受的载剂。药物组合物可通过将本文所述的具有所希望的纯度的抗B7-H3构建体与任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合来制备 (Remington's Pharmaceutical Sciences第16th版, Osol, A. Ed. (1980)), 呈冻干配制品或水溶液的形式。

[0260] 药物组合物优选是稳定的,其中包含本文所述抗B7-H3mAb的抗B7-H3构建体在储存时基本上保持其物理和化学稳定性和完整性。用于测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域中是可获得的,并且在Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee编, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) 和 Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993) 中有综述。稳定性可以在选定的温度下测量选定的时间段。对于快速筛选,可将配制品在40°C下保持2周至1个月,此时测量稳定性。在配制品要在2-8°C下储存的情况下,通常配制品应在30°C或40°C下稳定至少1个月,和/或在2-8°C下稳定至少2年。在配制品要在30°C下储存的情况下,通常配制品应在30°C下稳定至少2年,和/或在40°C下稳定至少6个月。例如,储存期间的聚集程度可用作蛋白质稳定性的指标。在一些实施例中,本文所述的抗B7-H3构建体的稳定配制品可包含少于约10% (优选少于约5%) 的在配制品中作为聚集体存在的抗B7-H3构建体。

[0261] 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对受者无毒,并且包括缓冲剂、抗氧化剂,包括抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素E、焦亚硫酸钠;防腐剂、等渗剂 (例如,氯化钠)、稳定剂、金属络合物 (例如,Zn-蛋白络合物);螯合剂诸如EDTA和/或非离子表面活性剂。

[0262] 生理上可接受的载剂的实例包括缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂 (诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量 (小于约10个残基) 多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子诸如钠离子;金属络合物 (例如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂诸如TWEENTM、聚乙二醇 (PEG) 和 PLURONICSTM 或聚乙二醇 (PEG)。

[0263] 缓冲剂用于将pH控制在优化治疗有效性的范围内,特别是如果稳定性是pH依赖性

的。缓冲剂优选以约50mM至约250mM的浓度存在。适合用于本申请的缓冲剂包括有机酸和无机酸以及它们的盐。例如,柠檬酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、草酸盐、乳酸盐、乙酸盐。另外,缓冲剂可包含组氨酸盐和三甲胺盐,诸如Tris。

[0264] 添加防腐剂以延缓微生物生长,并且防腐剂通常以0.2% -1.0% (w/v) 的范围存在。防腐剂的添加可以例如促进多次用(多剂量)配制品的生产。适合用于本申请的防腐剂包括十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎卤化铵(例如,苯扎氯铵、苯扎溴铵、苯扎碘铵)、苄索氯铵;硫柳汞、苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0265] 存在张度剂(有时称为“稳定剂”)以调节或维持组合物中液体的张力。当与大的带电荷的生物分子诸如蛋白质和抗体一起使用时,它们常常称为“稳定剂”,因为它们可以与氨基酸侧链的带电荷的基团相互作用,从而降低分子间和分子内相互作用的潜力。考虑到其他成分的相对量,张度剂可以以0.1重量%至25重量%,优选1重量%至5重量%的任何量存在。优选的张度剂包括多羟基糖醇,优选三羟基或更高级的糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。

[0266] 另外的赋形剂包括可用作以下的一种或多种的药剂:(1)填充剂,(2)增溶剂,(3)稳定剂和(4)防止变性或粘附至容器壁的药剂。此类赋形剂包括:多羟基糖醇(上述列举的);氨基酸,诸如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等;有机糖或糖醇,诸如蔗糖、乳糖、乳糖醇、海藻糖、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌糖(myoinisitose)、肌醇(myoinisitol)、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环多醇(例如,肌醇(inositol))、聚乙二醇;含硫还原剂,诸如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、短舌、硫代甘油、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量蛋白质,诸如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其他免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;单糖(例如,木糖、甘露糖、果糖、葡萄糖);二糖(例如,乳糖、麦芽糖、蔗糖);三糖诸如棉子糖;和多糖诸如糊精或葡聚糖。

[0267] 存在非离子表面活性剂或洗涤剂(也称为“润湿剂”)以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白质免于搅动引起的聚集,从而允许配制品暴露于剪切表面应力而不会引起活性治疗性蛋白质或抗体的变性。非离子表面活性剂以约0.05mg/ml至约1.0mg/ml,优选约0.07mg/ml至约0.2mg/ml的范围存在。

[0268] 合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、40、60、65、80等)、泊洛沙姆(184、188等)、PLURONIC®多元醇、TRITON®、聚氧乙烯脱水山梨醇单醚(TWEEN®-20、TWEEN®-80等)、聚桂醇400、硬脂酸聚羟氧40酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油10、50和60、单硬脂酸甘油酯、蔗糖脂肪酸酯、甲基纤维素和羧甲基纤维素。可以使用的阴离子洗涤剂包括月桂基硫酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠和二辛基磺酸钠。阳离子洗涤剂包括苯扎氯铵或苄索氯铵。

[0269] 为了使药物组合物用于体内施用,它们必须是无菌的。可通过无菌滤膜过滤而使药物组合物无菌。本文的药物组合物通常置于具有无菌入口的容器中,例如具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶。

[0270] 施用途径根据已知的和接受的方法,诸如通过单次或多次推注或以合适的方式在长时间内输注,例如通过皮下、静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、病灶内或关节内途径注射

或输注,局部施用,吸入或通过持续释放或延长释放方式。在一些实施例中,药物组合物局部施用,诸如肿瘤内施用。

[0271] 可以制备缓释配制品。缓释配制品的合适实例包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,这些基质为成形制品的形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0272] 本文的药物组合物还可以含有一种以上的所治疗的特定适应症所必需的活性化合物,优选具有彼此没有不利影响的互补活性的那些活性化合物。可替代地或另外地,该组合物可包含细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞因子、免疫抑制剂或生长抑制剂。此类分子适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0273] 也可以将活性成分包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊,分别例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中,包埋在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或包埋在粗乳液中。此类技术披露于Remington's Pharmaceutical Sciences第18版中。

[0274] 在一些实施例中,药物组合物容纳在一次性小瓶,诸如一次性密封小瓶中。在一些实施例中,药物组合物容纳在多次用小瓶中。在一些实施例中,药物组合物散装容纳在容器中。在一些实施例中,药物组合物是冷冻保存的。

[0275] IV. 使用或应用方法

[0276] 如本文所述的包含特异性识别B7-H3的mAb的抗B7-H3构建体(诸如抗B7-H3全长IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体)以及它们的组合物(诸如药物组合物)可用于多种应用,诸如用于诊断、分子测定和治疗。

[0277] 本发明的一方面提供了一种在有需要的个体中治疗B7-H3相关疾病或病状的方法,该方法包括向个体施用有效量的包含本文所述的抗B7-H3构建体的药物组合物。在一些实施例中,B7-H3相关疾病是癌症。在一些实施例中,该癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)或乳腺癌。

[0278] 本申请部分地考虑了蛋白质构建体(诸如抗B7-H3全长IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体),编码蛋白质构建体的核酸分子和/或载体,包含编码蛋白质构建体的核酸分子和/或载体的宿主细胞,这些可以单独施用或与另一种疗法组合施用,并且在至少一些方面,连同药学上可接受的载剂或赋形剂一起施用。在一些实施例中,在施用抗B7-H3构建体之前,它们可以与本领域众所周知的合适的药物载剂和赋形剂组合。根据本披露制备的组合物可用于癌症的治疗或恶化的延迟。

[0279] 在一些实施例中,提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括向个体施用有效量的药物组合物,该药物组合物包含含有特异性识别B7-H3的mAb的分离的抗B7-H3构建体(诸如抗B7-H3全长IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体)。在一些实施例中,癌症是实体瘤(诸

如肺癌)。在一些实施例中,该药物组合物全身(诸如静脉内)施用。在一些实施例中,该药物组合物局部(诸如肿瘤内)施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用附加癌症疗法(诸如手术、辐射、化学疗法、免疫疗法、激素疗法或它们的组合)。在一些实施例中,个体是人。在一些实施例中,治疗癌症的方法具有以下的一种或多种生物学活性:(1)杀伤癌细胞(包括旁观者杀伤);(2)抑制癌细胞增殖;(3)在肿瘤中诱导免疫应答;(4)减小肿瘤大小;(5)缓解患有癌症的个体的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移;(7)延长存活期;(8)延长癌症进展的时间;和(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导杀伤癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一种的肿瘤细胞死亡率。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导杀伤癌细胞的方法可实现至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一种的旁观者肿瘤细胞(未受溶瘤细胞VV感染的)死亡率。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导减小肿瘤大小的方法可减小肿瘤大小的至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一种)。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导抑制肿瘤转移的方法可抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一种)的转移。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导延长个体(诸如人)的存活的方法可将个体的存活延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月中的至少任一种。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导延长癌症进展的时间的方法可将癌症进展的时间延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周中的至少任一种。

[0280] 本文所述的方法适合治疗多种癌症,包括实体癌和液体癌两种。这些方法适用于所有分期的癌症,包括早期癌症、非转移性癌症、原发性癌症、晚期癌症、局部晚期癌症、转移性癌症或缓解期癌症。本文所述的方法可在辅助设置或新辅助设置中用作第一疗法、第二疗法、第三疗法或与本领域已知的其他类型的癌症疗法的组合疗法,其他类型的癌症疗法诸如化学疗法、手术、激素疗法、辐射、基因疗法、免疫疗法(诸如T细胞疗法)、骨髓移植、干细胞移植、靶向疗法、冷冻疗法、超声疗法、光动力疗法、射频消融等(即,该方法可在主要/确定性疗法之前进行)。在一些实施例中,该方法用于治疗先前已经治疗的个体。在一些实施例中,癌症对先前的疗法已经是难治性的。在一些实施例中,该方法用于治疗先前尚未治疗的个体。

[0281] 在一些实施例中,该方法适合治疗具有异常的B7-H3表达、活性和/或信号传导的癌症,以非限制性实例的方式包括膀胱癌、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、头颈癌、皮肤癌、肉瘤、脑肿瘤、脑和脊髓癌、肾上腺癌、子宫癌、成神经细胞瘤、小圆细胞肿瘤、外周神经鞘瘤、骨癌、横纹肌样瘤、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、神经内分泌肿瘤和黑色素瘤。

[0282] 因此在一些实施例中,提供了一种治疗免疫疗法应答性实体瘤(诸如癌或腺癌,诸如具有异常的B7-H3表达、活性和/或信号传导的癌症)的方法,该方法包括向个体施用有效量的药物组合物,该药物组合物包含含有特异性识别B7-H3的单克隆抗体的分离的抗B7-H3构建体(诸如抗B7-H3全长IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体)。在一些实施例中,癌症是实体瘤(诸如肺癌)。在一些实施例中,该药物组合物全身(诸如静脉内)施用。在一些实施

例中,该药物组合物局部(诸如肿瘤内)施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用附加癌症疗法(诸如手术、辐射、化学疗法、免疫疗法、激素疗法或它们的组合)。在一些实施例中,个体是人。在一些实施例中,治疗癌症的方法具有以下的一种或多种生物学活性:(1)杀伤癌细胞(包括旁观者杀伤);(2)抑制癌细胞增殖;(3)在肿瘤中诱导免疫应答;(4)减小肿瘤大小;(5)缓解患有癌症的个体的一种或多种症状;(6)抑制肿瘤转移;(7)延长存活期;(8)延长癌症进展的时间;和(9)预防、抑制或降低癌症复发的可能性。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导杀伤癌细胞的方法可实现至少约40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一种的肿瘤细胞死亡率。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导杀伤癌细胞的方法可实现至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高百分比中的任一种的旁观者肿瘤细胞(未受溶瘤细胞VV感染的)死亡率。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导减小肿瘤大小的方法可减小肿瘤大小的至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一种)。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导抑制肿瘤转移的方法可抑制至少约10%(包括例如至少约20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%或100%中的任一种)的转移。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导延长个体(诸如人)的存活的方法可将个体的存活延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18或24个月中的至少任一种。在一些实施例中,由本文所述的药物组合物介导延长癌症进展的时间的方法可将癌症进展的时间延长1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12周中的至少任一种。

[0283] 本申请的药物组合物的剂量和所希望的药物浓度可以根据预期的具体用途而变化。适当剂量或施用途径的确定完全在普通技术人员的技术范围内。动物实验为确定用于人类治疗的有效剂量提供了可靠的指导。可以按照Mordenti, J.和Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi等人编, Pergamon Press, New York 1989, 第42-46页制定的原理来进行有效剂量的种间类推。

[0284] 当使用本文所述的包含抗B7-H3 mAb的抗B7-H3构建体的体内施用时,正常剂量可以从每天约10ng/kg至约100mg/kg哺乳动物体重或更多变化,优选约1mg/kg/天至10mg/kg/天,诸如约1-3mg/kg/天、约2-4mg/kg/天、约3-5mg/kg/天、约4-6mg/kg/天、约5-7mg/kg/天、约6-8mg/kg/天、约6-6.5mg/kg/天,约6.5-7mg/kg/天、约7-9mg/kg/天或约8-10mg/kg/天,这取决于施用途径。在本申请的范围内,不同的配制品将对不同的治疗和不同的病症有效,并且旨在治疗特定器官或组织的施用可能需要以不同于递送至另一器官或组织的方式递送。而且,剂量可通过一次或多次分开施用或通过连续输注施用。对于几天或更长时间的重复施用,根据病状,持续治疗直到出现对疾病症状所希望的阻抑。然而,其他剂量方案也可以是有用的。这种疗法的进展容易通过常规技术和测定来监测。

[0285] 在一些实施例中,药物组合物施用一次(例如推注)。在一些实施例中,药物组合物施用多次(诸如2、3、4、5、6次或更多次中的任一种)。如果多次给药,它们可以通过相同或不同的途径进行,并且可以在相同部位或在替代部位进行。药物组合物可以每周施用两次、每周3次、每周4次、每周5次、每天一次、每天一次不中断、每周一次、每周一次不中断、每2周一次、每3周一次、每月一次、每2个月一次、每3个月一次、每4个月一次、每5个月一次、每6个月一次、每7个月一次、每8个月一次、每9个月一次、每10个月一次、每11个月一次或每年一次。

施用之间的间隔可以是约24h至48h、2天至3天、3天至5天、5天至1周、1周至2周、2周至1个月、1个月至2个月、2个月至3个月、3个月至6个月或6个月至一年中的任一种。间隔也可以是不规则的(例如,在肿瘤进展之后)。在一些实施例中,给药计划没有中断。在一些实施例中,药物组合物每4天施用,持续4次。对于特定患者的最佳剂量和治疗方案可以由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病体征并相应地调整治疗而容易地确定。

[0286] 本申请的药物组合物(包括但不限于重构配制品和液体配制品)根据已知方法施用于需要用本文所述的抗B7-H3构建体治疗的个体,优选人,这些已知方法诸如作为大丸剂静脉内施用或通过一段时间内连续输注,通过肌内、腹膜内、脑脊液内、皮下、静脉内(i.v.)、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。重构配制品可通过将本文所述的冻干抗B7-H3构建体溶解在稀释剂中使得蛋白质分散于其中来制备。适合用于本申请的示例性的药学上可接受的(对于向人施用是安全且无毒的)稀释剂包括但不限于无菌水、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液,或盐和/或缓冲剂的水溶液。

[0287] 在一些实施例中,药物组合物通过皮下(即,在皮肤下)施用而施用于个体。出于此类目的,可以使用注射器注射药物组合物。然而,用于施用药物组合物的其他装置是可用的,诸如注射装置;注射笔;自动注射器装置、无针装置;以及皮下贴剂递送系统。

[0288] 在一些实施例中,药物组合物静脉内施用于个体。在一些实施例中,药物组合物通过输注(诸如静脉内输注)施用于个体。用于免疫疗法的输注技术是本领域已知的(参见,例如,Rosenberg等人,New Eng. J. of Med. 319:1676(1988))。

[0289] 如本文所述的包含特异性识别B7-H3的mAb的抗B7-H3构建体(诸如抗B7-H3全长IgG、抗B7-H3/CTLA-4双特异性抗体、抗B7-H3/PD-L1双特异性抗体、抗B7-H3/TIM-3双特异性抗体或抗B7-H3/LAG-3双特异性抗体)以及它们的组合物(诸如药物组合物)也可用于诊断或分子测定。例如,抗体或抗原结合片段可用于检测或定量生物样品中的B7-H3,从而检测或监测与B7-H3有关的疾病(诸如上述疾病)的进展或治疗。

[0290] 抗体、抗原结合片段、缀合物、双特异性抗体或组合物的施用可伴随其他抗癌或抗血管生成剂或治疗性治疗(诸如肿瘤的手术切除或放射疗法)的施用。例如,在施用治疗量的抗体或缀合物之前、期间或之后,受试者可以接受一种或多种附加疗法。在一个实例中,在施用治疗量的一种或多种用于肿瘤治疗的药剂之前,受试者接受一种或多种治疗以去除或减小肿瘤。例如,附加药剂可包括但不限于化学治疗剂、抗血管生成剂或它们的组合。在另一个实例中,在施用治疗有效量的抗体或抗原结合片段或缀合物之前,肿瘤的至少一部分被手术切除或以其他方式切除或减小大小或体积。

[0291] 可以使用的附加治疗剂的特定实例包括微管结合剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂、DNA和RNA转录抑制剂、抗体、酶、酶抑制剂、基因调节剂和血管生成抑制剂。这些药剂(以治疗有效量施用)和治疗可单独使用或组合使用。例如,任何合适的抗癌剂或抗血管生成剂都可以与本文披露的抗体、缀合物组合施用。此类药剂的方法和治疗剂量是本领域技术人员已知的,并且可以由熟练的临床医师确定。在一个实例中,化学治疗剂包括5-FU或IRT或同时包括5-FU和IRT。

[0292] V. 制备方法

[0293] 本文所述的抗B7-H3构建体(诸如抗B7-H3单克隆抗体)可以使用本领域已知的或

如本文所述的任何方法制备。

[0294] 啮齿动物单克隆抗体可以使用本领域已知的方法获得,诸如通过使啮齿动物物种(诸如小鼠或大鼠)免疫并从其获得杂交瘤,或通过使用本领域已知的分子生物学技术克隆Fab片段或单链Fc(scFv)文库并随后通过ELISA用未选择文库的单个克隆或通过使用噬菌体展示进行选择。

[0295] 为了重组产生单克隆抗体,分离或合成编码单克隆抗体的核酸,并将其插入可复制载体中,用于进一步克隆(DNA扩增)或用于表达。使用常规的程序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),容易地对编码单克隆抗体的DNA进行分离和测序。许多载体是可用的。载体的选择部分取决于要使用的宿主细胞。通常,优选的宿主细胞是原核或真核(通常是哺乳动物)来源的。

[0296] 实例

[0297] 以下实例旨在纯粹作为本发明的示例,因此不应认为以任何方式限制本发明。以下实例和详细描述是作为说明而并不是作为限制而提供的。

[0298] 实例1:抗B7-H3单克隆抗体(mAb)的产生

[0299] 免疫

[0300] A/J小鼠在腹部皮肤下用25 μ g的人B7-H3蛋白免疫(AcroBiosystems,目录号B7B-H52E7)皮下免疫,该蛋白与佐剂(CFA,完全弗氏佐剂,用于初次免疫;IFA,不完全弗氏佐剂,用于加强免疫)一起配制为乳液,体积为200 μ l。每只小鼠接受3剂-5剂。在免疫的每个时间点(除了最后一次免疫)之后七天,从动物收集20 μ l血液样品以在用固定化B7-H3-His蛋白的ELISA测定中监测抗血清滴度,直到满足融合标准。

[0301] 分泌抗人B7-H3抗体的杂交瘤的选择

[0302] 在最后一次免疫后三天,在无菌环境中按照标准杂交瘤生成方案提取来自所选小鼠的脾细胞并与SP2/0细胞融合。将融合细胞在含有1x HAT(次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷)的DMEM培养基(补充有10% FBS)中培养七天。分别通过ELISA分析杂交瘤上清液与人B7-H3、食蟹猴B7-H3或小鼠B7-H3的结合能力。通过有限稀释对阳性杂交瘤克隆进行亚克隆,并在含有1x HT(次黄嘌呤-胸苷)的DMEM培养基(补充有10% FBS)中培养。将细胞培养一周,然后进行新一轮筛选,直到获得阳性单克隆。使用每个克隆产生0.5mg抗体,使用蛋白A色谱法纯化抗体用于进一步表征。使用克隆分型系统-HRP,Southern Biotech.测试抗体同种型。

[0303] 实例2:体外B7-H3小鼠抗体的表征

[0304] 通过FACS测定的CHO-K1/B7-H3细胞结合

[0305] 来自阳性克隆的纯化抗体用于针对CHO-K1/B7-H3细胞系(Probio Biotech)的FACS结合测定,其中生成结合EC₅₀值(图1)。阳性克隆包括12C9F1B5、38F11B2、34A9C12、37D11F5B8、37F11A10、43H11G12、47F3F10B4、47C7E3、31H11B1、38D6A4、MGA271。小鼠IgG用作同种型对照。

[0306] FACS结合测定的EC₅₀值在表4中给出。所有阳性克隆都具有比MGA271的参照抗体(依诺妥珠单抗)更高的结合亲和力。

[0307] 表4.小鼠mAb FACS结合分析

克隆编号	FACS 结合 EC ₅₀ 值 (nM)
12C9F1B5	4.759
38F11B2	0.6511
34A9C12	0.8217
37D11F5B8	0.9091
37F11A10	1.377
[0308] 43H11G12	6.375
47F3F10B4	0.7509
47C7E3	0.8696
31H11B1	0.9766
38D6A4	1.777
MGA271	20.82
小鼠 IgG	不适用

[0309] 实例3:嵌合抗体的产生和分析

[0310] 用于表征的嵌合抗体的构建

[0311] 将这10种mAb的可变区编码序列使用GenScript在线工具针对人密码子偏倚表达进行了优化。合成可变DNA片段并与人IgG1重链结构域(CH1-铰链-CH2-CH3)和轻链κ恒定区(CL)融合,用于以嵌合形式瞬时表达。将重链和轻链表达构建体克隆到单个基于pTT5的质粒中在合成信号肽之后,用于分泌表达。

[0312] 在使用PEI_{max} 40,000(polysciences)用抗体重链/轻链对质粒转染的HEK293-6E细胞中表达嵌合抗体。24小时后,用胰蛋白胍N-1补充剂(Kirgen Bioscience)加强表达/分泌。在37°C、5% CO₂下振荡培养5天后,收集上清液,并用蛋白-A珠粒(Genscript)纯化抗体内容物。将嵌合抗体产物保存在PBS中用于分析。

[0313] 抗B7-H3抗体诱导的CDC分析

[0314] 对嵌合抗体进行CDC测定。培养并收获靶细胞系(CHO-K1过表达人B7-H3),并将该靶细胞系以特定细胞密度接种在384孔板中(5E3个细胞/孔)。将抗体样品相应地添加到板中并将板在37°C/5% CO₂下孵育30分钟。然后向板中添加纯化的正常人血清补体(NHSC, SIGMA-ALDRICH),并将板再孵育4小时。将板从培养箱中取出并用Cell Titer-Glo[®]测定套件(Promega)分析细胞活力。通过PheraStar (BMG) 捕获发光数据用于细胞活力分析。以靶细胞裂解%对比候选抗体浓度表示的CDC测定结果显示在图2中。

[0315] 来自CDC测定的所有候选嵌合抗体的EC₅₀值总结于表5中。克隆43H11G12-hIgG1显示了最低的EC₅₀值,为0.1217μg/ml。使用具有与DS-5573a(专利号:US 2013/0078234 A1)相同氨基酸序列的内部合成阳性对照的EC₅₀值计算每种候选抗体的相对活性(%相对活性=(阳性对照的EC₅₀/样品的EC₅₀)*100%)。所有嵌合mAb样品均显示超过100%的相对活性。

[0316] 表5. 嵌合抗体CDC诱导分析

	样品 ID	EC ₅₀ (µg/ml)	%相对活性
[0317]	12C9F1B5-hIgG1	0.2995	230.32
	38F11B2-hIgG1	0.3187	216.44
	34A9C12-hIgG1	0.2686	256.81
	37D11F5B8-hIgG1	0.2673	258.06
	37F11A10-hIgG1	0.3574	193.01
	43H11G12-hIgG1	0.1217	566.80
	47F3F10B4-hIgG1	0.4178	165.10
	47C7E3-hIgG1	0.251	274.82
[0318]	31H11B1-hIgG1	0.3925	175.75
	38D6A4-hIgG1	0.5034	137.03
	DS-5573a	0.6898	100.00

[0319] 抗B7-H3抗体诱导的ADCC测定

[0320] 对于测定程序,培养、收获靶细胞系(CHO-K1过表达人B7-H3)(Probio Biotech),并将该靶细胞系以特定细胞密度接种在96孔板中。将内部合成的,具有MGA-271(依诺妥珠单抗)(专利号:US 2012/0294796 A1)的相同氨基酸序列的嵌合抗体样品或阳性对照添加到板中并将板在37°C/5% CO₂下孵育30分钟。将NK92/CD16a-VV细胞用作效应细胞并添加到板中并在相同条件下孵育6小时。取出测定板并短暂离心。按照制造商的说明(Roche),收集上清液,并将其转移到新的板上用于LDH活性测定。通过PheraStar (BMG) 捕获吸光度数据,并通过GraphPad Prism 6.0对其进行分析。比较所有嵌合抗体的ADCC效应。以靶细胞裂解%对比候选抗体浓度表示的ADCC测定结果显示在图5中。

[0321] 在表6中总结了来自ADCC测定(一项实验中的两张板)的以下候选嵌合抗体的EC₅₀值。克隆43H11G12-hIgG1显示了最低的EC₅₀值,为0.001615µg/ml。使用具有与MGA-271(依诺妥珠单抗)(专利号:US 2012/0294796 A1)相同氨基酸序列的内部合成阳性对照的EC₅₀值计算每张测定板上每种候选抗体的相对活性(%相对活性=(阳性对照的EC₅₀/样品的EC₅₀)*100)。所有嵌合mAb样品均显示超过300%的相对活性。

[0322] 表6. 嵌合抗体ADCC诱导分析

	板编号	样品 ID	EC ₅₀ (µg/ml)	%相对活性
[0323]	板 01	12C9F1B5-hIgG1	0.002585	1524.56
		38F11B2-hIgG1	0.002656	1483.81
		34A9C12-hIgG1	0.003411	1155.38
		37D11F5B8-hIgG1	0.00368	1070.92
		37F11A10-hIgG1	0.003339	1180.29
		MGA-271	0.03941	100.00
	板 02	43H11G12-hIgG1	0.001615	2744.89
		47F3F10B4-hIgG1	0.002892	1532.85

[0324]	47C7E3-hIgG1	0.003684	1203.31
	31H11B1-hIgG1	0.003254	1362.32
	38D6A4-hIgG1	0.01132	391.61
	MGA-271	0.04433	100.00

[0325] 实例4.人源化抗体的产生和分析

[0326] 候选抗体的人源化设计

[0327] 基于抗体在功能测定中的效力及其可变结构域序列,分析CDR和FR并进行同源性建模以获得47F3F10B4、12C9F1B5、43H11G12和31H11B1的mAb的建模结构。计算框架残基的溶剂可及表面积。基于结果,鉴定出被掩埋的框架残基(即溶剂可及表面积<15%)。选择与小鼠对应物具有高序列同一性的VH和VL的人受体。将小鼠抗体的CDR直接移植到人受体框架上,以获得没有任何回复突变的移植抗体的序列。通过可发育性评估分析移植序列中的翻译后修饰和化学降解,包括脱酰胺、异构化氧化和糖基化等。鉴定了PTM热点,如N-糖基化位点、异常脯氨酸残基、脱酰胺位点、异构化位点、氧化位点和未配对的半胱氨酸残基等,它们可能会影响移植抗体的结合活性和可制造性。合成了编码人源化轻链和重链的DNA序列。比较抗体特征以选择最佳候选抗体。成功地产生了这些人源化分子。

[0328] 人源化抗体的产生

[0329] 将抗体的人源化重链和轻链组合用于抗体产生。对于每个重链和轻链组合,详细信息显示在表7中。同时,将称为IgG1m的人IgG1的重链突变体(K214R、L235V、F243L、R292P、Y300L、D356E、L358M和P396L)用于增强ADCC效应。

[0330] 表7.通过重链和轻链配对产生人源化抗体

抗体名称	重链	轻链
47F3F10B4-VH1-VL4	47F3F10B4-VH1	47F3F10B4-VL4
47F3F10B4-VH2-VL4	47F3F10B4-VH2	47F3F10B4-VL4
12C9F1B5-VH2.1-VL2	12C9F1B5-VH2.1	12C9F1B5-VL2
12C9F1B5-VH4-VL2	12C9F1B5-VH4	12C9F1B5-VL2
43H11G12-VH4-VL2	43H11G12-VH4	43H11G12-VL2
31H11B1-VH1-VL3	31H11B1-VH1	31H11B1-VL3
31H11B1-VH1.1-VL3	31H11B1-VH1.1	31H11B1-VL3

[0332] 通过FACS测定的CHO-K1/B7-H3细胞结合

[0333] 为了验证人源化抗体的细胞表面抗原结合,收获表达人B7-H3的CHO-K1细胞,并与抗B7-H3 mAb一起孵育,接着与山羊抗人IgG(H+L)二抗(Invitrogen)一起孵育。然后用流式细胞仪分析样品。典型的结合图显示在图4中。

[0334] FACS结合 EC_{50} 值总结在表8中。所有人源化抗体都显示比MGA271(专利号:US 2012/0294796A1,重链为上述IgG1m)和MGA271-hIgG1(重链为野生型人IgG1并且另一氨基酸序列与MGA271相同)的参考抗体高得多的结合亲和力。

[0335] 表8.人源化抗体FACS结合分析

克隆编号	FACS 结合 EC ₅₀ 值 (nM)
47F3F10B4-VH1-VL4	0.8884
47F3F10B4-VH2-VL4	0.7667
12C9F1B5-VH2.1-VL2	0.1528
31H11B1-VH1-VL3	0.7904
31H11B1-VH1.1-VL3	0.4053
12C9F1B5-VH4-VL2	0.3385
[0336] 43H11G12-VH4-VL2	0.1554
31H11B1-VH1-VL3 (IgG1m)	0.4209
31H11B1-VH1.1-VL3 (IgG1m)	0.3342
47F3F10B4-VH1-VL4 (IgG1m)	0.2994
MGA271	101.6
MGA271-hIgG1	81.63
人 IgG	不适用

[0337] 抗B7-H3抗体诱导的CDC测定

[0338] 对人源化抗体进行CDC测定。培养并收获靶细胞系 (CHO-K1 过表达人B7-H3), 并将该靶细胞系以特定细胞密度接种在96孔板中 (5E3个细胞/孔)。将抗体样品相应地添加到板中并将板在37°C/5% CO₂下孵育30分钟。然后向板中添加纯化的正常人血清补体 (NHSC, SIGMA-ALDRICH), 并将板再孵育4小时。将板从培养箱中取出并用Cell Titer-Glo[®]测定套件分析细胞活力。通过PheraStar (BMG) 捕获发光数据用于细胞活力分析。以靶细胞裂解%对比候选抗体浓度表示的CDC测定结果显示在图5中。

[0339] 在表9中总结了来自CDC测定 (一项实验中的两张板) 的所有候选的人源化抗体的EC₅₀值。使用具有与DS-5573a (专利号:US 2013/0078234 A1) 相同氨基酸序列的内部合成阳性对照的EC₅₀值计算每张测定板上每种候选抗体的相对活性 (%相对活性 = (阳性对照的EC₅₀/样品的EC₅₀)*100%)。克隆31H11B1-VH1-VL3 (IgG1m)、31H11B1-VH1.1-VL3 (IgG1m)、47F3F10B4-VH1-VL4 (IgG1m) 显示超过300%的相对活性。

[0340] 表9. 人源化抗体CDC诱导分析

板编号	样品 ID	EC ₅₀ (µg/ml)	%相对活性
[0341] 板 01	47F3F10B4-VH1-VL4	0.6187	96.10
	12C9F1B5-VH4-VL2	0.384	154.84
	43H11G12-VH4-VL2	0.5698	104.35
	31H11B1-VH1-VL3	0.7393	80.43
	31H11B1-VH1.1-VL3	0.874	68.03
	DS-5573a	0.5946	100.00
	MGA271	不适用	不适用
	人 IgG1	不适用	不适用
[0342] 板 02	31H11B1-VH1.1-VL3	0.6361	98.70
	31H11B1-VH1-VL3 (IgG1m)	0.1827	343.62
	31H11B1-VH1.1-VL3 (IgG1m)	0.1457	430.89
	47F3F10B4-VH1-VL4 (IgG1m)	0.1412	444.62
	31H11B1-VH1-VL3	0.7064	88.87
	47F3F10B4-VH1-VL4	0.5494	114.27
	DS-5573a	0.6278	100.00
	MGA271-hIgG1	不适用	不适用
	MGA271	不适用	不适用

[0342] 抗B7-H3抗体诱导的ADCC测定

[0343] 对于测定程序,培养靶细胞系A549(板01和板02)和Detroit 562(板03和板04),收获并以特定细胞密度(1E4个细胞/孔)接种到96孔板中。将内部合成的、具有MGA-271(依诺妥珠单抗)(专利号:US 2012/0294796 A1)的相同氨基酸序列的人源化抗体样品或阳性对照添加到板中并将板在37°C/5% CO₂下孵育30分钟。参考文献(参见Paul等人,(2002)PLOS ONE 2014;9(4):e95787)进行内部结构化的ADCC报告细胞系(GS-J2C/CD16A)用作效应细胞并添加到板中,并且在相同条件下孵育6小时。取出测定板并用Bio-Glo[®]测定套件(Promega)分析ADCC报告细胞系的活化。通过PheraStar(BMG)捕获发光数据用于细胞活力分析。通过PheraStar(BMG)捕获吸光度数据,并通过GraphPad Prism 6.0对其进行分析。比较人源化抗体的ADCC效应。ADCC测定结果显示在图6中。

[0344] 来自ADCC测定的以下人源化抗体的EC₅₀值总结于表10中。克隆47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)在A549细胞(0.00959µg/ml)和Detroit 562细胞(0.01419µg/ml)中显示最低的EC₅₀值。使用具有与MGA-271(依诺妥珠单抗)(专利号:US 2012/0294796 A1)相同氨基酸序列的内部合成阳性对照的EC₅₀值计算每张测定板上每种候选抗体的相对活性(%相对活性=(阳性对照的EC₅₀/样品的EC₅₀)*100)。31H11B1-VH1-VL3(IgG1m)、31H11B1-VH1.1-VL3(IgG1m)和47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)在ADCC测定中表现出超过1000%的靶向A549细胞的相对活性和超过600%的靶向Detroit 562细胞的相对活性。

[0345] 这些体外测定结果为实体瘤(HNSCC、NSCLC)提供了可能的治疗,并且这些抗体的安全性和功效需要在进一步的临床前研究和临床研究中进行证实。

[0346] 表10.人源化抗体ADCC诱导分析

板编号	样品 ID	EC ₅₀ (μg/ml)	%相对活性
[0347] 板 01	47F3F10B4-VH1-VL4	0.0391	365.22
	47F3F10B4-VH2-VL4	0.1719	83.07
	12C9F1B5-VH2.1-VL2	0.6254	22.83
	31H11B1-VH1-VL3	0.2567	55.63
	31H11B1-VH1.1-VL3	0.2135	66.89
板 02	MGA271	0.1428	100.00
	31H11B1-VH1.1-VL3	1.225	55.18

[0348]	31H11B1-VH1-VL3 (IgG1m)	0.06465	1045.63	
	31H11B1-VH1.1-VL3 (IgG1m)	0.04581	1475.66	
	47F3F10B4-VH1-VL4 (IgG1m)	0.00959	7049.01	
	MGA271-hIgG1	7.764	8.71	
	MGA271	0.676	100.00	
	47F3F10B4-VH1-VL4	0.09533	467.01	
	47F3F10B4-VH2-VL4	0.5767	77.20	
	12C9F1B5-VH2.1-VL2	0.6662	66.83	
	板 03	31H11B1-VH1-VL3	0.6921	64.33
	31H11B1-VH1.1-VL3	0.5065	87.90	
	MGA271	0.4452	100.00	
	31H11B1-VH1.1-VL3	1.501	193.67	
	31H11B1-VH1-VL3 (IgG1m)	0.4357	667.20	
	板 04	31H11B1-VH1.1-VL3 (IgG1m)	0.2286	1271.65
	47F3F10B4-VH1-VL4 (IgG1m)	0.01419	20486.26	
MGA271-hIgG1	7.297	39.84		
MGA271	2.907	100.00		

[0349] 下面列出了本文提及的一些氨基酸序列和核酸序列。加下划线的氨基酸序列分别是CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3。

[0350] >47F3F10B4-VH(SEQ ID NO:1)

[0351] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDHYMHVVKQSHGKSLEWIGYIFPNNG

[0352] VSGYNQNFKDKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTPEDSAVYYCTRRQLGLGTMDYWGQG TSVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:2、3和4)

[0353] >47F3F10B4-VL(SEQ ID NO:5)

[0354] DIVLTQSPASLAVSLGGQRATISCRASKSVSTSGYNYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNL ESGVPARFS GSGSGDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSKELPWTFGGGKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:6、7和8)

[0355] >12C9F1B5-VH(SEQ ID NO:9)

- [0356] QGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINPYSG
- [0357] VPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARDDGFHYTMDYWGQGT SVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:10、11和12)
- [0358] >12C9F1B5-VL (SEQ ID NO:13)
- [0359] DVVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNLVHNSGITYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISRVEAEDLGVYFCSQSTLVPWTFGGGTKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:14、15和16)
- [0360] >34A9C12-VH (SEQ ID NO:17)
- [0361] QGQIQLVQSGPELKKSGETVKISCKASGFTNYGINWVKQAPGKGLKWMGWINPYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNESATYFCARDDGFHYTMDYWGQGTSVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:18、19和20)
- [0362] >34A9C12-VL (SEQ ID NO:21)
- [0363] DVVLITQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNLVHNSGITYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTLVPWTFGGGTKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:22、23和24)
- [0364] >38D6A4-VH (SEQ ID NO:25)
- [0365] QIQLVQSGPELKKPGEAVKISCKASGSTFTDFGMNWVRQAPGKGLKWMGWINPYSG
- [0366] VPTYADEFKGRFVFSLETSARVAYMQINDLKNEDTATYFCARDDGYHYTMDYWGQGTSVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:26、27和28)
- [0367] >38D6A4-VL (SEQ ID NO:29)
- [0368] DVVMQTPLPLPVSLGDQASISCRSSQSLIHSNGITYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGSKLEIR (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:30、31和32)
- [0369] >37D11F5B8-VH (SEQ ID NO:33)
- [0370] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGDTFRNNGMNWVKQAPGKGLKWMGWINPYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCARDDGYHYTMDFWGLGTSVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:34、35和36)
- [0371] >37D11F5B8-VL (SEQ ID NO:37)
- [0372] DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNSGITYLHWYLQKPGQSPKLLTYKVSHRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:38、39和40)
- [0373] >37F11A10-VH (SEQ ID NO:41)
- [0374] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGDTFRNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINPYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLKNEDTATYFCARDDGFHYTMDYWGLGTSVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:42、43和44)
- [0375] >37F11A10-VL (SEQ ID NO:45)
- [0376] DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNSGITYLHWYLQKPGQSPKLLTYKVSHRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIR (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:46、47和48)

- [0377] >43H11G12-VH(SEQ ID NO:49)
- [0378] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYNFRDFGMNWVKQAPGKGLKWMGWLNSYSG
- [0379] VPTYADDFKGRFVLSLETSASTAYLQINNLINEDTATYFCGRDDGYNYTMNYWGQGSTVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:50、51和52)
- [0380] >43H11G12-VL(SEQ ID NO:53)
- [0381] DVVMQTAPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGITYLHWYLQRAGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:54、55和56)
- [0382] >38F11B2-VH(SEQ ID NO:57)
- [0383] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFIDYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINIYSGVPPTYADDFKGRF AFSLETSANTAYLQINNLKNEEDTATYFCARDGYYHYTMNYWGQGS TVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:58、59和60)
- [0384] >38F11B2-VL(SEQ ID NO:61)
- [0385] DIVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGITYLHWYLQKSGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTAF TLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:62、63和64)
- [0386] >47C7E3-VH(SEQ ID NO:65)
- [0387] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGKGLKWMGWIYTPSGVPIYADDFKGRF AVSLETSASTAYLQINNLKNEEDTATYFCARDGYYTMDYWGQGS TVTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:66、67和68)
- [0388] >47C7E3-VL(SEQ ID NO:69)
- [0389] DDVMTQTPLSLPVSLGDHASISCRSSQSLVHSNGDITYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:70、71和72)
- [0390] >31H11B1-VH(SEQ ID NO:73)
- [0391] QVQLQQPGAELGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRPGQGLEWIGHINPNSGSTNQNAKFNKA TLTVDSSSTAYMQLSTLTSEDSAVYYCTRS^{GS}SNYRRNYFDYWGQGTTLTVSS (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:74、75和76)
- [0392] >31H11B1-VL(SEQ ID NO:77)
- [0393] DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSG KDYTLTSLTQTEDVATYYCQY^WSTPLTFGAGTKLELK (加下划线的CDR氨基酸序列分别指定为SEQ ID NO:78、79和80)
- [0394] 以下蛋白质序列是人源化mAb序列:
- [0395] >47F3F10B4-VH1(SEQ ID NO:81)
- [0396] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYMHWRQAPGQGLEWMGYIFPNNGVSGYNQNFKDRVT MTRDTSISTAYMELSR^{SD}DTAVYYCARRQLGLGTMDYWGQGT^LTVTVSS
- [0397] >47F3F10B4-VH2(SEQ ID NO:82)
- [0398] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYMHWRQAPGQGLEWMGYIFPNNGVSGYNQNFKDRVT MTRDTSTSTVYME^{LS}SRSEDTAVYYCARRQLGLGTMDYWGQGT^LTVTVSS

- [0399] >12C9F1B5-VH2.1 (SEQ ID NO:83)
- [0400] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINPYSGVPTYADDFKGRVTMT
RDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARD^{DD}GFHYTMDYWGQGLTVTVSS
- [0401] >12C9F1B5-VH4 (SEQ ID NO:84)
- [0402] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTNYGMNWRQAPGQRLEWMGWINPYSGVPTYADDFKGRVTIT
RDTASASTAYMELSSLRSED^TAVYYCARD^{DD}GFHYTMDYWGQGLTVTVSS
- [0403] >43H11G12-VH4 (SEQ ID NO:85)
- [0404] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYNFRDFGMNWRQAPGQRLEWMGWLNSYSGVPTYADDFKGRVT
ITRDTASASTAYMELSSLRSED^TAVYYCARD^{DD}GYNYTMNYWGQGLTVTVSS
- [0405] >31H11B1-VH1 (SEQ ID NO:86)
- [0406] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGHINPNSGSTNQNAKFKNRVT
MTRDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR^{SG}SNYRRNYFDYWGQGLTVTVSS
- [0407] >31H11B1-VH1.1 (SEQ ID NO:87)
- [0408] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGHINPNSGSTNQNAKFKNRVT
MTRDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTR^{SG}SNYRRNYFDYWGQGLTVTVSS
- [0409] >47F3F10B4-VL4 (SEQ ID NO:88)
- [0410] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSVSTSGYNMHWYQQKPKGKAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFLT^{IS}SLQPEDFATYYCQHSKELPWF^{FG}QGTKVEIK
- [0411] >12C9F1B5-VL2 (SEQ ID NO:89)
- [0412] DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQNLVHSNGITYLHWYLQKPGQSPQLLIYK^{VS}NRFS^{GV}PDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCSQSTLVPWF^{FG}QGTKVEIK
- [0413] >43H11G12-VL2 (SEQ ID NO:90)
- [0414] DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNGITYLHWYLQKPGQSPQLLIYK^{VS}NRFS^{GV}PDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCSQSTHVPWF^{FG}QGTKVEIK
- [0415] >31H11B1-VL3 (SEQ ID NO:91)
- [0416] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASDHINNLAWYQQKPKGKAPKLLIYGATSLETGVPSRFS^{GS}SGT
DFTFT^{IS}SLQPED^{IAT}YYCQ^{QY}WSTPLTFGGG^TKLEIK
- [0417] 人κ轻链恒定区 (SEQ ID NO:92) :
- [0418] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0419] 人IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO:93) :
- [0420] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^{SV}WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{VE}PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ^{YN}STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TP}PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0421] 人IgG1m序列 (SEQ ID NO:94) :
- [0422] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT^{SV}WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^{RV}EPKSCDKTHTCPPCPAPELLVGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCV

VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FACS结合测试—人B7-H3细胞系

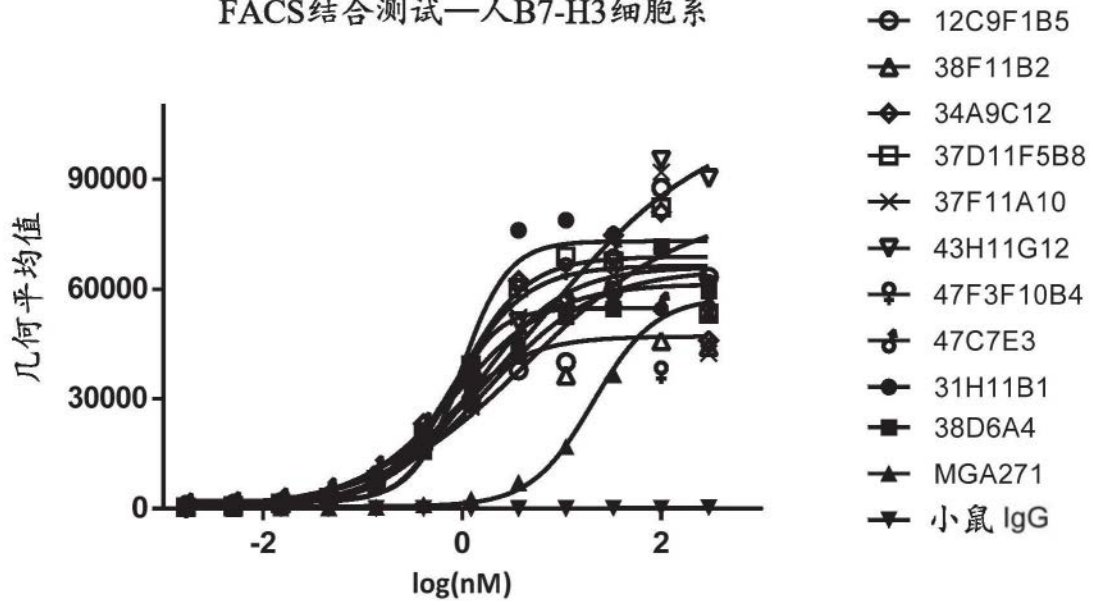


图1

含5% NHSC的CHO-K1/B7-H3细胞的CDC测定

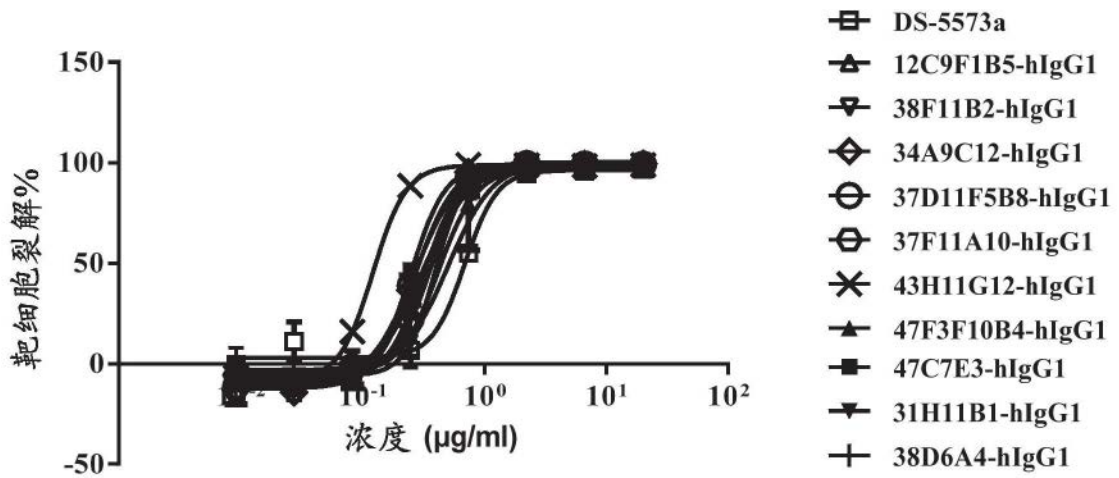
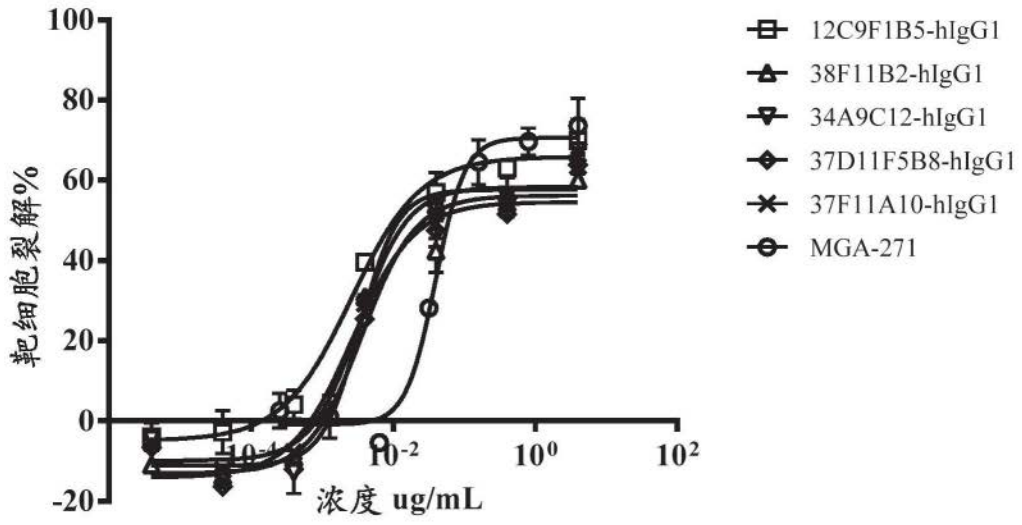


图2

对CHO-K1/B7H3&NK92的ADCC测定 (板01)



对CHO-K1/B7H3&NK92的ADCC测定 (板02)

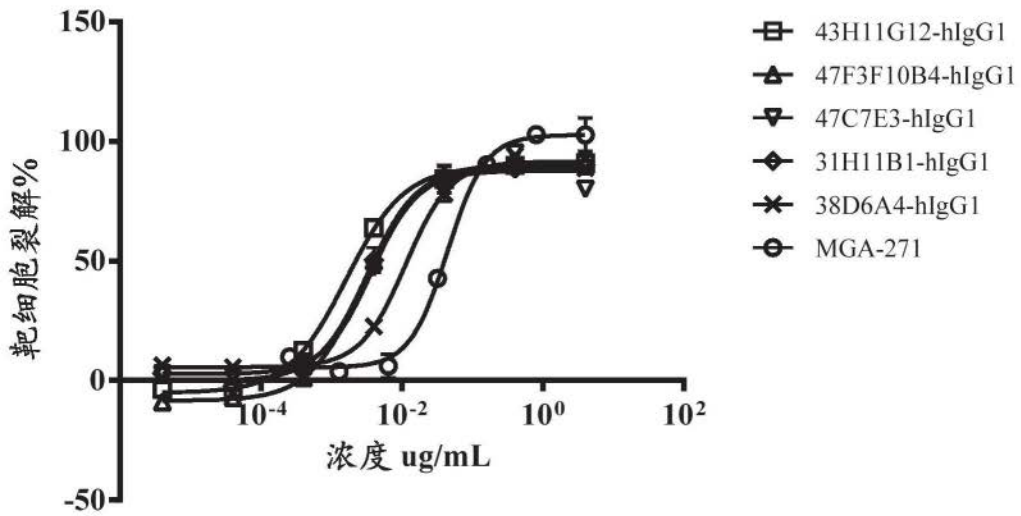


图3

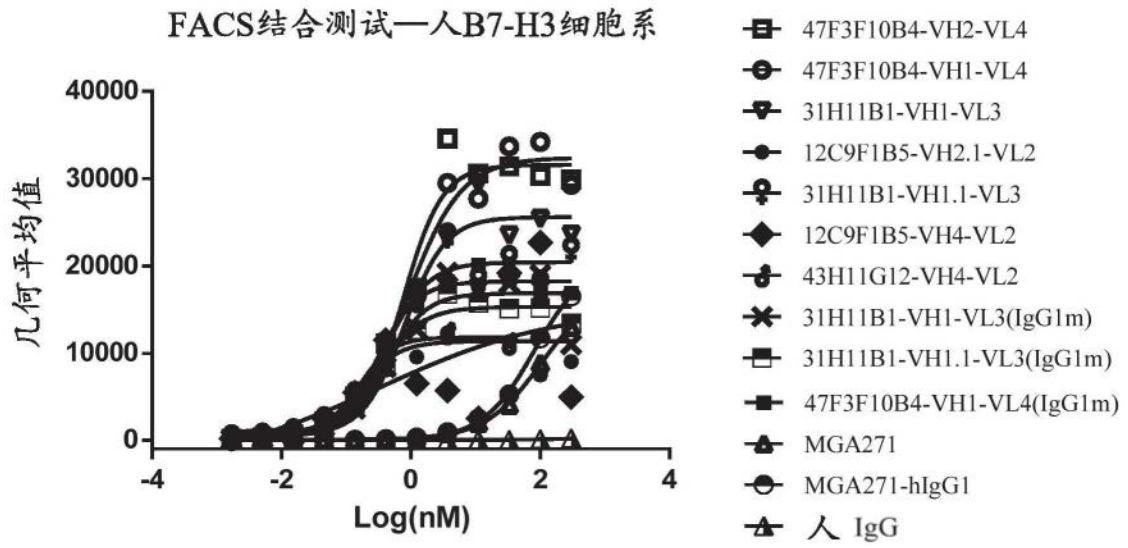
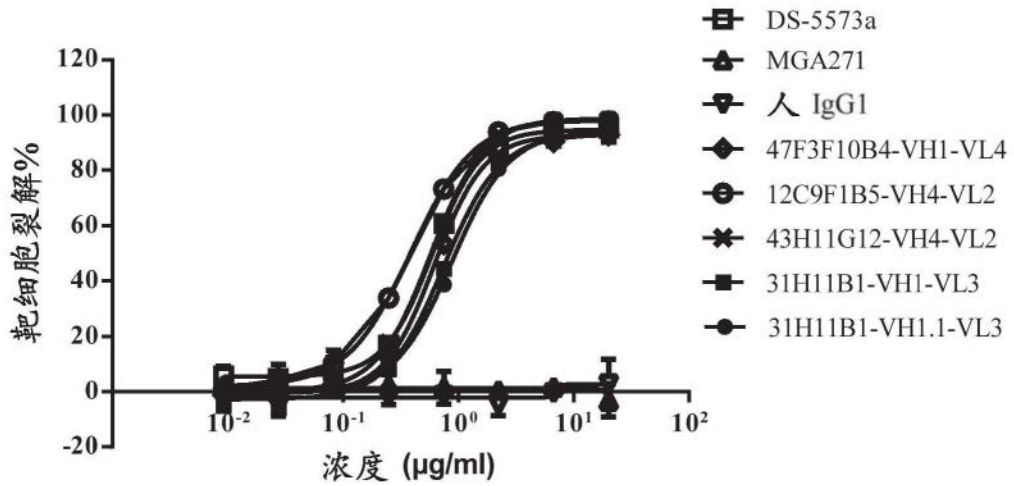


图4

含5% NHSC的CHO-K1/B7-H3细胞的CDC测定 (板01)



含5% NHSC的CHO-K1/B7-H3细胞的CDC测定 (板02)

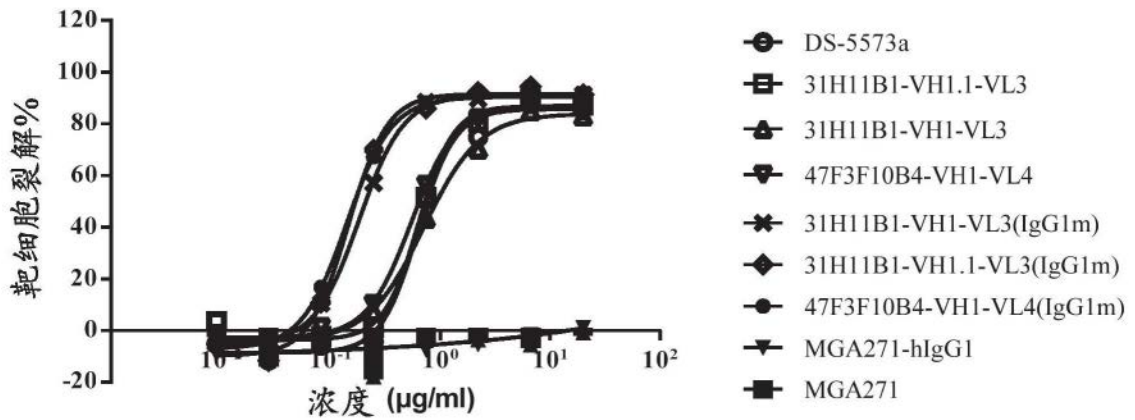
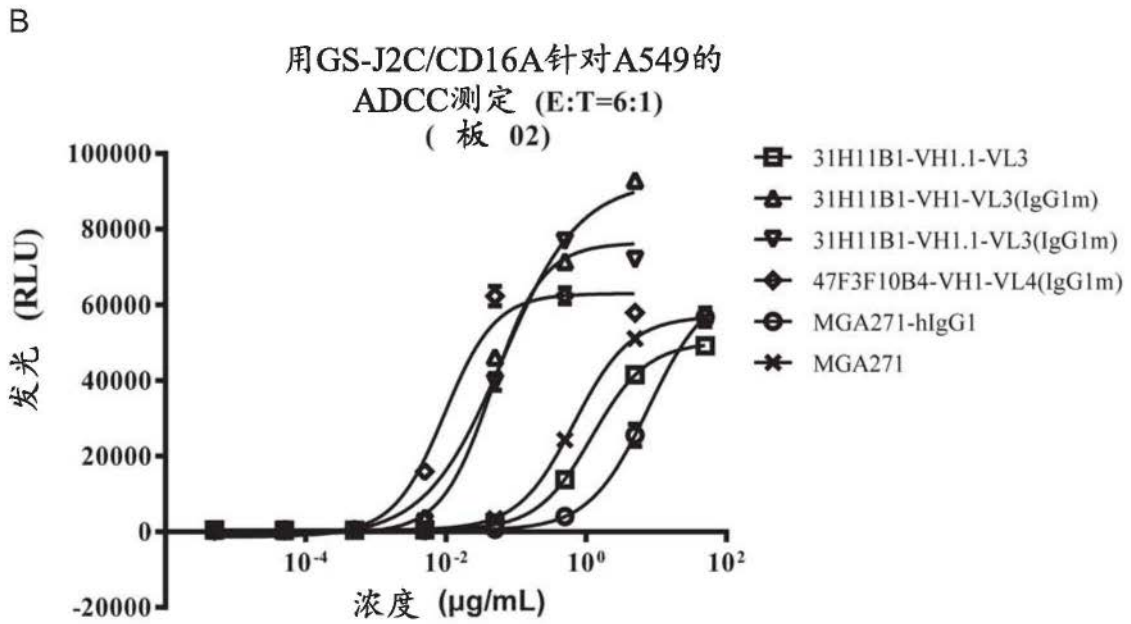
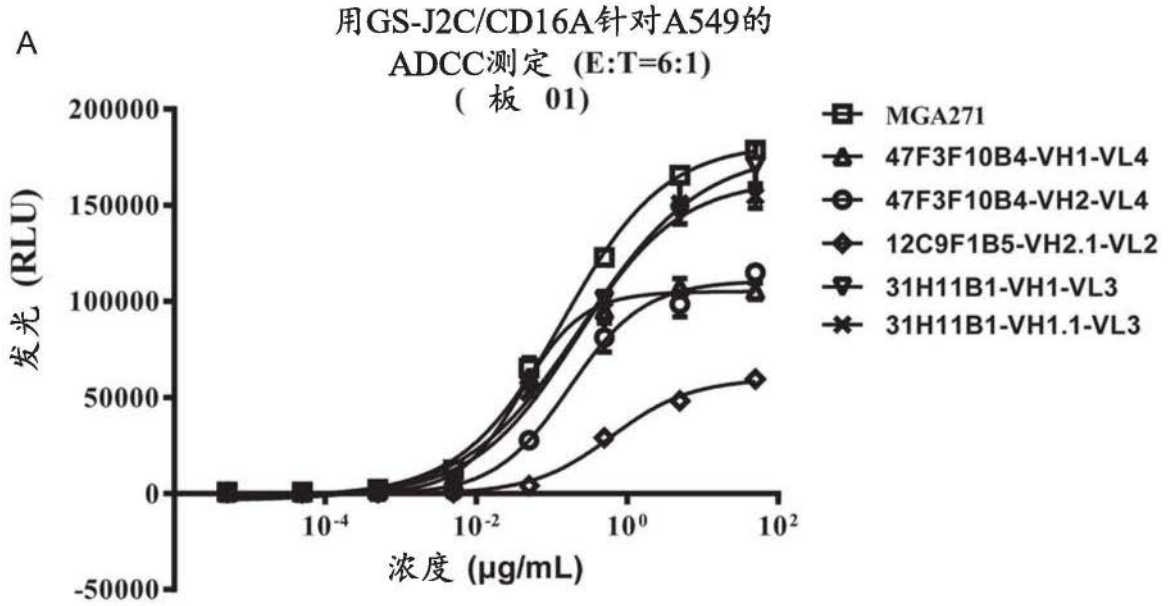
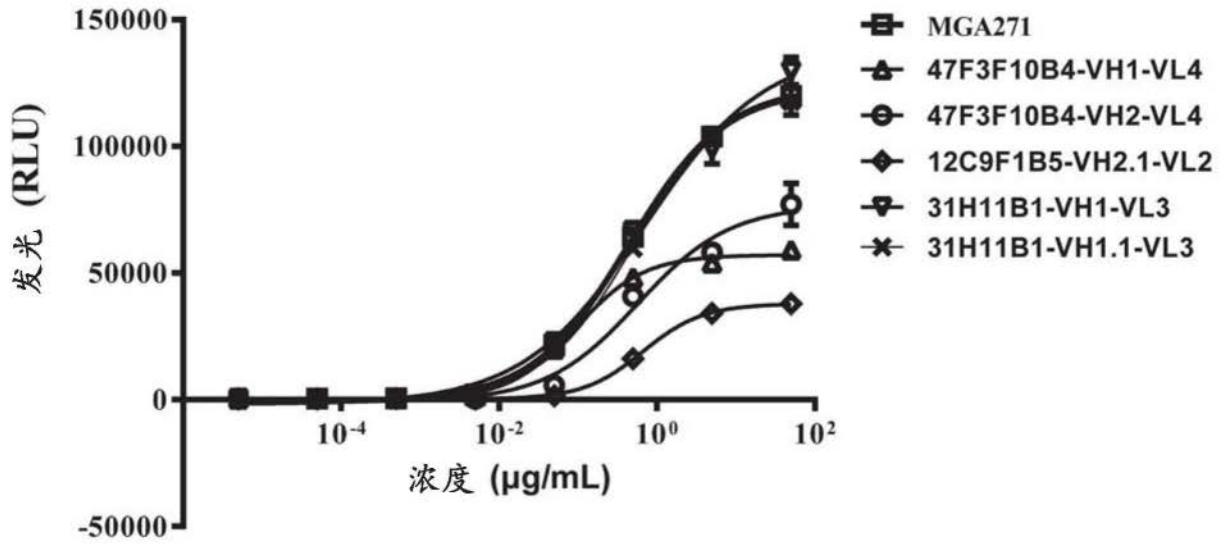


图5



C

用GS-J2C/CD16A针对Detroit 562的
ADCC测定 (E:T=6:1) (板 03)



D

用GS-J2C/CD16A针对Detroit 562的
ADCC测定 (E:T=6:1) (板 04)

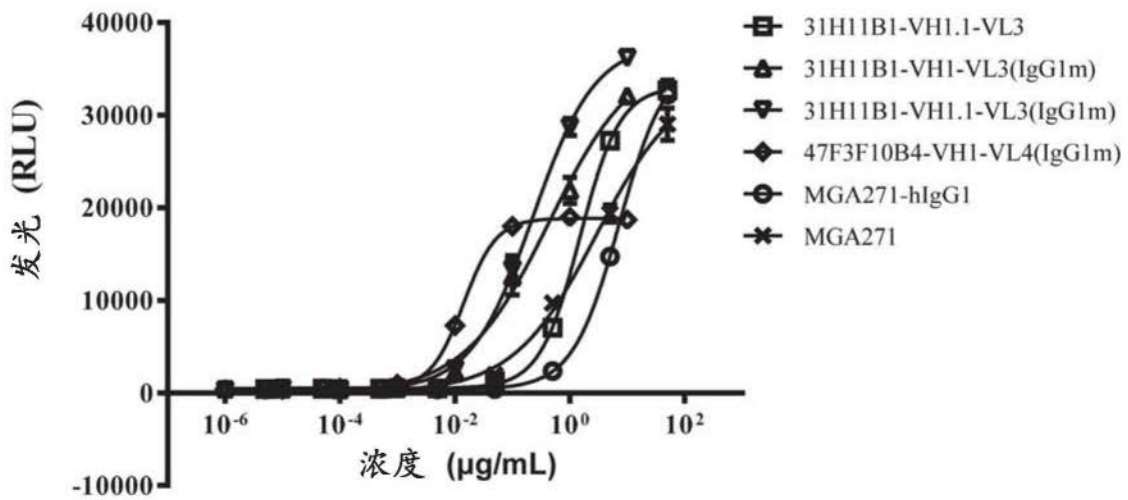


图6