



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108064244 B

(45) 授权公告日 2021. 09. 17

(21) 申请号 201580071419.9
(22) 申请日 2015.11.13
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108064244 A

(43) 申请公布日 2018.05.22

(30) 优先权数据
62/079,942 2014.11.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.06.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2015/058801 2015.11.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/075670 EN 2016.05.19

(73) 专利权人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 T·阿布拉姆斯 S·科恩
J·达米亚诺 C·杜尔
T·胡贝尔 D·曼内斯 K·米勒
K·伦达尔 J-M·R·隆多

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 柴云峰 黄革生

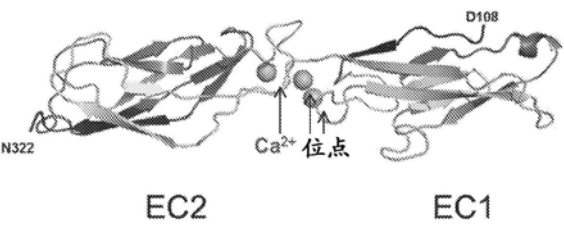
(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 31/5365 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

审查员 李阳

权利要求书3页 说明书119页
序列表71页 附图12页

(54) 发明名称
抗体药物缀合物

(57) 摘要
本申请公开了抗P-钙黏着蛋白抗体、其抗原结合片段和所述抗体或抗原结合片段的抗体药物缀合物。本发明还涉及使用抗体、抗原结合片段和抗体药物缀合物治疗癌症的方法。本文还公开了产生抗体、抗原结合片段和抗体药物缀合物的方法和将抗体和抗原结合片段作为诊断试剂使用的方法。



1. 结合P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区中VH CDR1如SEQ ID NO:1所示,VH CDR2如SEQ ID NO:2所示,VH CDR3如SEQ ID NO:3所示,其中CDR根据Kabat定义限定;所述轻链可变区中VL CDR1如SEQ ID NO:11所示,VL CDR2如SEQ ID NO:12所示,VL CDR3如SEQ ID NO:13所示,其中CDR根据Kabat定义限定;

所述抗原结合片段是单链Fv、二硫键连接的Fv、Fab片段、F(ab')₂片段,一种由VL结构域、VH结构域、CL结构域和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,一种包含由二硫键在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段;由抗体单臂的VL结构域和VH结构域组成的Fv片段。

2. 结合P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区(VH)和SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

3. 结合P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是人抗体或人源化抗体。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是单链抗体。

7. 式Ab—(L—(D)_m)_n所示的抗体药物缀合物或其可药用盐;其中

Ab是根据权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段;

L是接头;

D是药物部分;

m是从1至8的整数;并且

n是从1至10的整数。

8. 权利要求7所述的抗体药物缀合物,其中所述m是1。

9. 权利要求7所述的抗体药物缀合物,其中所述n是3或4。

10. 根据权利要求7所述的抗体药物缀合物,其中所述抗体是单克隆抗体。

11. 根据权利要求7所述的抗体药物缀合物,其中所述接头选自可切割接头、不可切割接头、亲水接头、预先带电荷的接头和基于二羧酸的接头。

12. 根据权利要求11所述的抗体药物缀合物,其中所述接头衍生自选自以下的交联试剂:N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、马来酰亚胺PEG NHS、N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(SMCC)、N-磺基琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(磺基-SMCC)和2,5-二氧杂吡咯烷-1-基17-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧代-4,7,10,13-四氮杂十七碳-1-酸酯(CX1-1)。

13. 根据权利要求12所述的抗体药物缀合物,其中所述接头衍生自选自以下的交联试剂:N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶

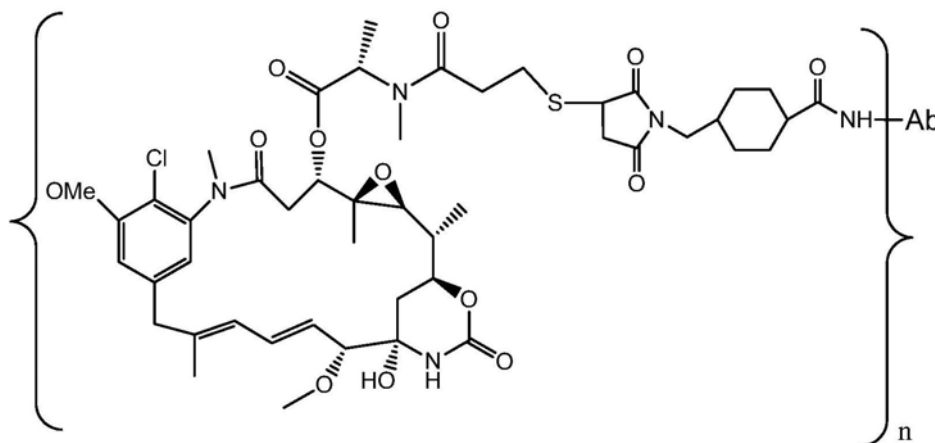
基二硫代)丁酸酯(SPDB)和2,5-二氧杂吡咯烷-1-基17-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧代-4,7,10,13-四氮杂十七碳-1-酸酯(CX1-1)。

14. 根据权利要求7-13中任一项所述的抗体药物缀合物,其中所述药物部分选自V-ATP酶抑制剂、促凋亡剂、Bcl2抑制剂、MCL1抑制剂、HSP90抑制剂、IAP抑制剂、mTor抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定化剂、澳瑞司他汀、多拉司他汀(dolastatin)、类美登素、MetAP(甲硫氨酸氨基肽酶)、蛋白质CRM1核输出的抑制剂、DPPIV抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中磷酸基转移反应抑制剂、蛋白质合成抑制剂、激酶抑制剂、CDK2抑制剂、CDK9抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC抑制剂、DNA损伤剂、DNA烷基化剂、DNA嵌入剂、DNA小沟结合剂和DHFR抑制剂。

15. 根据权利要求14所述的抗体药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是类美登素。

16. 根据权利要求15所述的抗体药物缀合物,其中所述类美登素是N(2')-去乙酰基-N(2')-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)或N(2')-去乙酰基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

17. 根据权利要求7所述的抗体药物缀合物,其具有以下式:



其中Ab是权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段;并且n是1至10;或其可药用盐。

18. 药物组合物,其包含根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和可药用载体。

19. 药物组合物,其包含根据权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物和可药用载体。

20. 根据权利要求18或19所述的药物组合物,其中所述组合物作为冻干物制备。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述冻干物包含根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或根据权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物、组氨酸、蔗糖和聚山梨酯20。

22. 根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述组合物包含约10mg/mL权利要求17所述的抗体药物缀合物、20mM组氨酸、240mM蔗糖和0.02%聚山梨酯20。

23. 根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段、根据权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物或根据权利要求18-22中任一项所述的药物组合物的用途,用于制备治疗有需要的患者中表达P-钙黏着蛋白的癌症的药物,其中所述癌症选自乳腺癌、下咽鳞状细胞癌、膀胱癌、食管癌。

24. 核酸,其编码根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

25. 根据权利要求24所述的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:8、18、10或20的核苷酸序列。

26. 载体,其包含根据权利要求24或25所述的核酸。

27. 宿主细胞,其包含根据权利要求26所述的载体或根据权利要求24或25所述的核酸。

28. 用于产生抗体或抗原结合片段的方法,包括培养权利要求27所述的宿主细胞并从培养物回收所述抗体。

29. 用于产生抗P-钙黏着蛋白抗体药物缀合物的方法,包括:

(a) 将SMCC与药物部分DM-1化学连接;

(b) 将所述接头-药物缀合到如根据权利要求1-6中任一项所述的抗体;并且

(c) 纯化抗体药物缀合物。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中抗体药物缀合物具有用UV分光光度计测量的约3.8的平均DAR。

31. 诊断试剂,包含根据权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

32. 根据权利要求31所述的诊断试剂,其中所述抗体或其抗原结合片段用放射标记物、荧光团、发色团、成像剂或金属离子标记。

抗体药物缀合物

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已经通过电子方式以ASCII格式提交并因而通过引用的方式完整并入的序列表。在2015年11月12日创建的所述ASCII副本命名为PAT056506-WO-PCT_SL.txt并且大小是146,966比特。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及抗P-钙黏着蛋白抗体、抗体片段、抗体药物缀合物和它们治疗癌症的用途。

背景技术

[0004] P-钙黏着蛋白

[0005] 经典的钙黏着蛋白代表一个在介导钙依赖性细胞-细胞接触的黏着型连接中表达的细胞黏附分子家族。胎盘钙黏着蛋白(P-钙黏着蛋白;也称作1型钙黏着蛋白3或“CDH3”)在正常组织中具有受限制的表达,但是已知在几种组织的未分化或低分化细胞类型(包括皮肤、食道、肺和口腔的基底上皮细胞)中表达(参见,例如,Albergaria等人,Int.J.Dev.Biol.55:811-822(2011))。

[0006] P-钙黏着蛋白的结构由3个不同结构域组成:一个含有五个串联的钙黏着蛋白重复序列的胞外结构域(ECD)、一个跨膜结构域;和一个含有连环蛋白结合结构域的胞内尾。ECD介导多个P-钙黏着蛋白分子之间的顺式和反式相互作用,而连环蛋白结合结构域将P-钙黏着蛋白连接至蛋白质如p120连环蛋白并因此连接至细胞细胞骨架元件(参见,例如,Wu等人,PNAS 107:17592-7(2010))。

[0007] P-钙黏着蛋白和癌症

[0008] 还已知P-钙黏着蛋白(也称作“Pcad”、“PCad”、“P-Cad”或CDH3)在众多恶性肿瘤(包括乳腺癌、胃癌、子宫内膜癌、头颈部癌和结直肠癌等)中过量表达。与其中P-钙黏着蛋白表达水平低或不存在的病例相比,P-钙黏着蛋白在某些乳腺肿瘤、子宫内膜肿瘤、卵巢肿瘤、结直肠肿瘤和膀胱肿瘤中的过量表达还已经与预后更差相关。在乳腺癌中,P-钙黏着蛋白在高等级侵袭性癌中频繁过量表达并且是基底样肿瘤的可靠标志物(参见,例如,Paredes等人,Br.Can.Res.9:214-226(2007);Sanders等人,Int.J.Can.79:573-579(1998);Albergaria等人,Int.J.Dev.Biol.55:811-822(2011);Sousa等人,Histol.Histopathol.25:963-975(2010))。

[0009] 在某些癌类型如乳腺癌和卵巢癌中,已知P-钙黏着蛋白促进肿瘤细胞运动性、侵袭性和转移(参见,例如,Cheung等人,Oncogene 30:2964-74(2011);Ribeiro等人,Oncogene 29:392-402(2010))。

[0010] 已知多种癌相关过程促进P-钙黏着蛋白mRNA和蛋白质的表达。肿瘤抑制基因BRCA1因突变或表达丢失而失活已经与乳腺癌细胞系样本和患者样本中增加的P-钙黏着蛋白表达相关。还已知转录因子C-EBP β 和抗雌激素ICI182780(氟维司群)失调P-钙黏着蛋白

表达并在肿瘤细胞中诱导其上调,CDH3启动子借助其他过程的低甲基化也是如此。在肺泡横纹肌肉瘤中,嵌合致癌性转录因子PAX3-FOXO1和PAX7-FOXO1(因易位产生)直接诱导P-钙黏着蛋白表达,导致肿瘤侵入性增加(参见,例如,Albergaria等人,Int.J.Dev.Biol.55:811-822(2011);Thuault等人,Oncogene 15:1474-86(2012);Ames等人,Clin.Can.Res.11:4003-11(2005);Gorski等人,Br.Can.Res.Treat.122:721-31(2010);Paredes等人,Clin.Can.Res.11:5869-5877(2005);Albergaria等人,Human Mol.Gen.19:2554-2566(2010)。

[0011] 抗体药物缀合物

[0012] 抗体药物缀合物(“ADC”)已经用于治疗癌症中细胞毒性剂的局部递送(参见例如,Lambert,Curr.Opinion In Pharmacology 5:543-549,2005)。ADC允许定向递送药物部分,其中可以实现最大效力,同时毒性最小。由于更多的ADC显示有前景的临床结果,因此开发新治疗药用于癌疗法的需求增加。另外,并非产生治疗有效的针对已知癌症靶的ADC的全部尝试已经取得成功。可能影响ADC的治疗有效性的因素的例子包括亲和力、抗体缀合能力、接头的可切割性或稳定性;抗体-药物缀合物的稳定性、抗体药物缀合物聚集的倾向性和缀合至每种抗体的药物/负载分子的比率(“DAR”或“药物抗体比”)。

[0013] 聚集和稳定性缺乏可增加临床环境下抗体药物缀合物的不良反应的可能性、降低效力以及增加产生ADC的成本。

[0014] 因此需要治疗有效的ADC分子。

[0015] 发明简述

[0016] 本申请公开了与人P-钙黏着蛋白结合的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段与P-钙黏着蛋白在选自SEQ ID NO:126的位置124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171和172处的氨基酸中的一个或多个残基结合。在另一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段与人P-钙黏着蛋白在SEQ ID NO:126的位置124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171和172处的氨基酸结合。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与人P-钙黏着蛋白在选自SEQ ID NO:126的位置124、151、153-156和172中的一个或多个氨基酸残基处结合的重链可变区。在又一个实施方案中,重链可变区包含人P-钙黏着蛋白的重链结合互补位,所述重链结合互补位包含选自SEQ ID NO:128的位置52、54、56、60、65、105或107中的一个或多个氨基酸残基。在又一个实施方案中,抗体包含抗体包含与人P-钙黏着蛋白在选自SEQ ID NO:126的位置124、125、155、156、159-163、168、170和171中的一个或多个氨基酸残基处结合的轻链可变区。在又一个实施方案中,人P-钙黏着蛋白的轻链可变区结合互补位包含选自SEQ ID NO:129的位置1、2、27、28、30、68、92、93或94中的一个或多个氨基酸残基。在一个具体实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含如上文讨论的重链可变区和轻链可变区。

[0017] 在其他实施方案中,本申请公开了结合人P-钙黏着蛋白结合的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0018] a) 包含SEQ ID NO:1的VH CDR1、SEQ ID NO:2的VH CDR2和SEQ ID NO:3的VH CDR3的重链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;包含SEQ ID NO:11的VL CDR1、SEQ ID NO:12的VL CDR2和SEQ ID NO:13的VL CDR3的轻链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;

[0019] b) 包含SEQ ID NO:21的VH CDR1、SEQ ID NO:22的VH CDR2和SEQ ID NO:23的VH

CDR3的重链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;包含SEQ ID NO:31的VL CDR1、SEQ ID NO:32的VL CDR2和SEQ ID NO:33的VL CDR3的轻链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;

[0020] c) 包含SEQ ID NO:41的VH CDR1、SEQ ID NO:42的VH CDR2和SEQ ID NO:43的VH CDR3的重链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;包含SEQ ID NO:51的VL CDR1、SEQ ID NO:52的VL CDR2和SEQ ID NO:53的VL CDR3的轻链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;

[0021] d) 包含SEQ ID NO:61的VH CDR1、SEQ ID NO:62的VH CDR2和SEQ ID NO:63的VH CDR3的重链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;包含SEQ ID NO:71的VL CDR1、SEQ ID NO:72的VL CDR2和SEQ ID NO:73的VL CDR3的轻链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;

[0022] e) 包含SEQ ID NO:81的VH CDR1、SEQ ID NO:82的VH CDR2和SEQ ID NO:83的VH CDR3的重链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;包含SEQ ID NO:91的VL CDR1、SEQ ID NO:92的VL CDR2和SEQ ID NO:93的VL CDR3的轻链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;或

[0023] f) 包含SEQ ID NO:101的VH CDR1、SEQ ID NO:102的VH CDR2和SEQ ID NO:103的VH CDR3的重链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定;包含SEQ ID NO:111的VL CDR1、SEQ ID NO:112的VL CDR2和SEQ ID NO:113的VL CDR3的轻链可变区,其中CDR根据Kabat定义限定。

[0024] 本申请还公开了结合P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0025] a) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0026] b) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0027] c) 包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0028] d) 包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0029] e) 包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列的轻链可变区(VL);或

[0030] f) 包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的重链可变区(VH),和包含SEQ ID NO:117的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0031] 在其他实施方案中,本申请公开了结合P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0032] a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链可变区;

[0033] b) 包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的轻链可变区;

[0034] c) 包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的轻链可变区;

[0035] d) 包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的轻链可变区;

[0036] e) 包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区;

[0037] f) 包含SEQ ID NO:109的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列的轻链可变区。

[0038] 本申请进一步公开了抗体或其抗原结合片段,所述与本文所公开的抗体结合人P-钙黏着蛋白相同的表位,或与本文所公开的抗体竞争结合人P-钙黏着蛋白。

[0039] 在一些实施方案中,P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合片段是人抗体或人源化抗体。在其他实施方案中,抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体。在其他实施方案中,抗体或其抗原结合片段是单链抗体(scFv)。

[0040] 本申请还公开抗体药物缀合物(ADC),其包含式:

[0041] $Ab-(L-(D)_m)_n$

[0042] 或其可药用盐;其中:

[0043] Ab是如本文中公开的P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合片段;L是接头;D是药物部分;m是从1至8的整数;并且n是从1至10的整数。在一些实施方案中,m是1。在其他实施方案中,n是3或4。

[0044] 在一些实施方案中,ADC的抗体或其抗原结合片段包含:

[0045] a) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH区和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL区;

[0046] b) 包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的VH区和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的VL区。

[0047] 在又一个实施方案中,抗体药物缀合物的抗体或其抗原结合片段包含VH区和VL区,所述VH区包含:

[0048] (a) SEQ ID NO:1的VH CDR1、(b) SEQ ID NO:2的VH CDR2、(c) SEQ ID NO:3的VH CDR3,所述VL区包含(d) SEQ ID NO:11的VL CDR1、(e) SEQ ID NO:12的VL CDR2和(f) SEQ ID NO:13的VL CDR3,其中CDR根据Kabat定义限定;或

[0049] 所述VH区包含(a) SEQ ID NO:21的VH CDR1、(b) SEQ ID NO:22的VH CDR2、(c) SEQ ID NO:23的VH CDR3,所述VH区包含(d) SEQ ID NO:31的VL CDR1、(e) SEQ ID NO:32的VL CDR2和(f) SEQ ID NO:33的VL CDR3,其中CDR根据Kabat定义限定。

[0050] 在其他实施方案中,抗体药物缀合物的抗体或其抗原结合片段包含:

[0051] a) SEQ ID NO:9的重链和SEQ ID NO:19的轻链;或

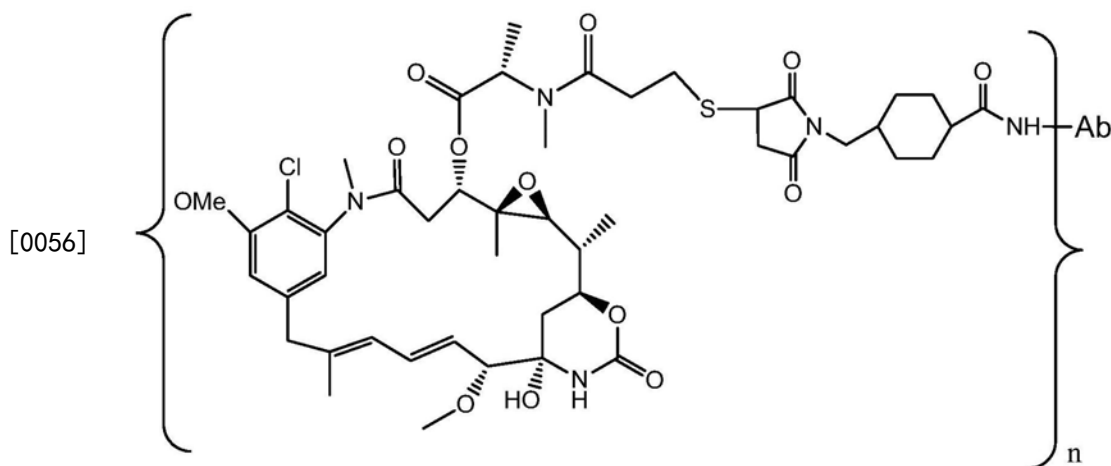
[0052] b) SEQ ID NO:29的重链和SEQ ID NO:39的轻链。

[0053] 在其他实施方案中,抗体药物缀合物的接头选自可切割接头、不可切割接头、亲水接头、预先带电荷的接头和基于二羧酸的接头。在一些实施方案中,接头衍生自选自以下的交联试剂:N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、马来酰亚胺PEG NHS、N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(SMCC)、N-磺基琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(磺基-SMCC)和2,5-二氧杂吡咯烷-1-基17-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-

吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十七碳-1-酸酯(CX1-1)。

[0054] 在一些实施方案中,抗体药物缀合物的药物部分选自V-ATP酶抑制剂、促凋亡剂、Bcl2抑制剂、MCL1抑制剂、HSP90抑制剂、IAP抑制剂、mTor抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、澳瑞司他汀、多拉司他汀(dolastatin)、类美登素、MetAP(甲硫氨酸氨基肽酶)、蛋白质CRM1核输出的抑制剂、DPPIV抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中磷酸基转移反应抑制剂、蛋白质合成抑制剂、激酶抑制剂、CDK2抑制剂、CDK9抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC抑制剂、DNA损伤剂、DNA烷基化剂、DNA嵌入剂、DNA小沟结合剂和DHFR抑制剂。在其他实施方案中,细胞毒性剂是类美登素(maytansinoid)。在具体实施方案中,类美登素是N(2')-去乙酰基-N(2')-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)或N(2')-去乙酰-N2-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

[0055] 在一个具体实施方案中,抗体药物缀合物具有以下式:



[0057] 其中Ab是抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:1的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR3以及SEQ ID NO:11的轻链CDR1、SEQ ID NO:12的轻链CDR2、SEQ ID NO:13的轻链CDR3,其中CDR根据Kabat定义限定;并且n是1至10;或其可药用盐。

[0058] 本申请还公开了药物组合物,所述药物组合物包含如本文中公开的人P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合片段或包含这些抗体的抗体药物缀合物,和可药用载体。在一些实施方案中,药物组合物作为冻干物制备。在其他实施方案中,冻干物包含抗体、其抗原结合片段、或这些抗体的抗体药物缀合物、组氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯20。在一个具体实施方案中,药物组合物包含约10mg/mL本文公开的抗体药物缀合物、20mM组氨酸、240mM蔗糖和0.02%聚山梨醇酯20。

[0059] 本申请还公开了治疗有需要的患者中癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用本文公开的抗体药物缀合物或药物组合物。在一些实施方案中,所述方法包括将抗体药物缀合物或药物组合物与一种或多种额外的治疗性化合物组合施用至患者。

[0060] 在其他实施方案中,本申请公开了如本文中公开的用作药物的P-钙黏着蛋白抗体药物缀合物或药物组合物。在具体实施方案中,抗体药物缀合物或药物组合物用于治疗有需要的患者中的癌症。

[0061] 本文还公开了如本文中讨论的P-钙黏着蛋白抗体或其抗原结合片段或者抗体药物缀合物治疗有需要的患者中癌症的用途或在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0062] 在一些实施方案中,癌表达P-钙黏着蛋白。在其他实施方案中,癌选自肾上腺皮质癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、中枢神经系统非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、结肠癌、结直肠癌、胚胎瘤、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、肝细胞癌、卡波西肉瘤、肝癌、肺癌,包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌、卵巢癌、直肠癌、横纹肌肉瘤、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌、胃癌、子宫癌、阴道癌和外阴癌、肾上腺皮质癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、中枢神经系统非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、结肠癌、结直肠癌、胚胎瘤、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、肝细胞癌、卡波西肉瘤、肝癌、肺癌,包含小细胞肺癌和非小细胞肺癌、卵巢癌、直肠癌、横纹肌肉瘤、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌、胃癌、子宫癌、阴道癌和外阴癌。在具体实施方案中,癌选自膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、肺癌和卵巢癌。

[0063] 本申请还公开了编码如本文中公开的P-钙黏着蛋白抗体或抗原结合片段的核酸。在具体实施方案中,核酸包含SEQ ID NO:8、28、48、68、88、108、18、38、58、78、98、118、10、30、50、70、90、110、20、40、60、80、100和120的核苷酸序列。在又一个实施方案中,本申请构思了包含本文公开的核酸的载体,以及包含本文公开的载体或核酸的宿主细胞。另外公开了用于产生P-钙黏着蛋白抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括培育该宿主细胞并从培养物回收抗体。

[0064] 在其他实施方案中,本申请公开用于产生抗P-钙黏着蛋白抗体药物缀合物的方法,所述方法包括:

[0065] (a) 将SMCC与药物部分DM-1化学连接;

[0066] (b) 将所述接头-药物与从根据权利要求47所述的细胞培养物中回收的抗体缀合;并且

[0067] (c) 纯化抗体药物缀合物。

[0068] 在另一个实施方案中,用于产生抗P-钙黏着蛋白抗体药物缀合物的方法包括:

[0069] (a) 将SMCC与药物部分DM-1化学连接;

[0070] (b) 使所述接头-药物与如本文中公开的抗体缀合;和

[0071] (c) 纯化抗体药物缀合物。

[0072] 在一些实施方案中,根据这些方法产生的抗体药物缀合物具有用UV分光光度计测量的约3.8的平均DAR。

[0073] 在其他实施方案中,使用本文公开的抗体或其抗原结合片段作为诊断试剂。在诊断试剂的一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段用放射标记物、荧光团、发色团、成像剂或金属离子标记。

[0074] 附图简述

[0075] 图1描述人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的晶体结构的总体视图,其显示人P-钙黏着蛋白的胞外结构域的前两个钙黏着蛋白重复序列结构域,三个钙结合位点位于结构域-结构域交界处。

[0076] 图2描述形成非对称晶体单元的与两个人P-钙黏着蛋白复合的两个P-钙黏着蛋白抗体Fab的晶体结构的总体视图。插图是涉及两个P-钙黏着蛋白分子的EC1结构域的接触区的特写镜头。在两个复合体之间仅存在一些晶体接触。

[0077] 图3是描述接触P-钙黏着蛋白抗体NOV169N31Q的Fab残基的人P-钙黏着蛋白表位

残基 (SEQ ID NO:133) 的图。人P-钙黏着蛋白EC1结构域的氨基酸序列在水平轴上列出。图的上半部分显示蛋白质抗原和抗体之间直接分子间接触的数目,如使用非氢原子之间的临界距离**4.0Å**,通过程序NCONT所鉴定。图的下半部分显示如通过程序AREAIMOL计算,抗体结合时因P-钙黏着蛋白残基所致的溶剂可及表面(以Å²计)减少。EC1结构域的β-桶结构示意图显示为一连串箭头,标记物对应于β-链的编号。

[0078] 图4描述人P-钙黏着蛋白的N末端钙黏着蛋白重复序列 (EC1) 结构域的晶体结构特写镜头(灰色草图),与抗体相互作用的全部氨基酸残基 (**4.0Å** 临界距离) 以黑色棒显示(抗体视图)。

[0079] 图5描述人P-钙黏着蛋白EC1结构域 (SEQ ID NO:133) 和食蟹猴P-钙黏着蛋白EC1结构域(“食蟹猴”;食蟹猴 (*Macaca fascicularis*)) (SEQ ID NO:134) 的序列比对。黑粗字体的氨基酸残基涉及与NOV169N31Q抗体的直接分子间接触(**<4.0 Å**)。灰粗字体和以箭头指示的氨基酸残基进一步远离,但是抗体结合时经历其溶剂可及表面减少。注意,两个类别的表位残基在食蟹猴P-钙黏着蛋白中充分保守。

[0080] 图6描述了人钙黏着蛋白EC1结构域 (SEQ ID NO:135-143,分别按出现顺序) 的多重序列比对。注意P-钙黏着蛋白也称作“钙黏着蛋白-3”。加框的残基位于抗原-抗体界面处,如通过其溶剂可及表面减少所确定。人钙黏着蛋白1至4中存在的插入以粗线加框表示。注意关键表位残基Glu155在其他钙黏着蛋白中不保守。

[0081] 图7描述显示P-钙黏着蛋白抗体NOV169N31Q影响P-钙黏着蛋白介导的细胞黏附的显微照片。在诱导球体形成之前,用NOV169N31Q或一种非特异性人IgG1抗体预处理细胞。在132小时温育时间后,通过显微术评估球体形状和密度。

[0082] 图8描述了说明NOV169N31Q-MCC-DM1在P-钙黏着蛋白阳性细胞系 (HCC70和HCC1954) 和阴性细胞系 (HT29) 中的体外细胞毒效力的图。NOV169N31Q-MCC-DM1在 (A) HCC1954细胞 (P-钙黏着蛋白⁺), (B) HCC70细胞 (P-钙黏着蛋白⁺) 和 (C) HT29细胞 (P-钙黏着蛋白⁻) 中的体外剂量-反应。在用游离美登素 (L-DM1-Me; 实心圆圈)、同种型对照ADC (IgG1-MCC-DM1; 空心正方形), 抗体组分NOV169N31Q-MCC-DM1 (NOV169N31Q; 空心三角形) 和 NOV169N31Q-MCC-DM1 (实心三角形) 处理5天后,测量活力。

[0083] 图9描述了说明NOV169N31Q和NOV169N31Q-MCC-DM1的ADCC活性的图。将靶细胞与固定数目的新鲜人NK效应细胞 (5:1效应细胞对靶细胞比率) 和渐增量的NOV169N31Q (闭合圆圈)、IgG1对照抗体 (空心圆圈)、NOV169N31Q-MCC-DM1 (封闭正方形) 或IgG1-SMCC-DM1 (空心正方形) 温育。全部样品一式三份测试;24小时后评估细胞活力。

[0084] 图10描述一系列显示NOV169N31Q-MCC-DM1ADC在HCC70三阴性乳腺癌皮下肿瘤异种移植模型中活性的IHC图像。图像显示在单剂NOV169N31Q-MC-DM1后有丝分裂停滞 (p-组蛋白H3)

[0085] 图11A描述了HCC70肿瘤组织上P-钙黏着蛋白的代表性IHC图像以显示P-钙黏着蛋白表达。

[0086] 图11B描述了说明多种P-钙黏着蛋白ADC在HCC70乳腺癌异种移植模型中效力的图。

[0087] 图12描述了说明NOV169N31Q-MCC-DM1针对HCC70乳腺癌异种移植模型的剂量反应效力的图。

[0088] 图13A描述了HCC1954肿瘤组织上P-钙黏着蛋白的代表性IHC图像以显示P-钙黏着蛋白表达。

[0089] 图13B是说明NOV169N31Q-MCC-DM1在HCC1954乳腺癌异种移植模型中效力的图。

[0090] 图13C是说明NOV169N31Q-MCC-DM1在HCC1954乳腺癌异种移植模型中效力的图。

[0091] 图13D是描述使用NOV169N31Q-MCC-DM1, HCC1954乳腺癌异种移植小鼠响应于处理的体重变化的图。

[0092] 图14A描述了BICR6肿瘤组织上P-钙黏着蛋白的代表性IHC图像以显示P-钙黏着蛋白表达。

[0093] 图14B描述了说明NOV169N31Q-MCC-DM1在BICR6头颈癌异种移植模型中效力的图。

[0094] 图15A描述了scaBER肿瘤组织上P-钙黏着蛋白的代表性IHC图像以显示P-钙黏着蛋白表达。

[0095] 图15B描述了说明NOV169N31Q-MCC-DM1在scaBER膀胱癌异种移植模型中效力的图。

[0096] 图16描述了说明NOV169N31Q-MCC-DM1在HuPrime ED2267食管癌异种移植模型中效力的图。

[0097] 图17描述这样的图,所述图比较了使用两种不同接头(MCC与CX1-1),与DM1缀合的抗P-钙黏着蛋白NEG0067抗体在HCC70乳腺癌异种移植模型中的效力。

[0098] 图18描述这样的图,所述图比较了使用SPDB-DM4接头-负载缀合的3种鼠杂交瘤衍生的抗P-钙黏着蛋白ADC在HCC70乳腺癌异种移植模型中的效力。

[0099] 发明详述

[0100] 定义

[0101] 除非另外声明,否则如本文所用以下术语和短语意在具有以下意思:

[0102] 术语“烷基”指具有指定碳原子数目的单价饱和烃链。例如, C_{1-6} 烷基指具有1个至6个碳原子的烷基。烷基可以是直链或支链的。代表性支链烷基具有一个、两个或三个分支。烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、丙基(正丙基和异丙基)、丁基(正丁基、异丁基、仲丁基和叔-丁基)、戊基(正戊基、戊基和新戊基)和己基。

[0103] 如本文所用的术语“抗体”指免疫球蛋白家族的多肽,所述多肽能够非共价、可逆并以特异性方式结合相应的抗原。例如,天然存在的IgG抗体是包含由二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的四聚体。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定结域由一个结构域CL组成。VH区和VL区可以进一步再划分为超变区,名为互补性决定区(CDR),其间插有更保守的区域,名为构架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基端到羧基端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))结合。

[0104] 术语“抗体”包括,但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和抗独特

型(抗Id)抗体(包括,例如,针对本发明抗体的抗Id抗体)。抗体可以属于任何同种型/类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0105] “互补性决定结构域”或“互补决定区(“CDR”)可互换地指VL和VH的高变区。CDR是抗体链的靶蛋白结合位点,其携带针对这种靶蛋白的特异性。每种人VL或VH中存在三个CDR(CDR1-3,从N末端依次编号),构成约15-20%的可变结构域。CDR在结构上与靶蛋白的表位互补并因此直接负责结合特异性。VL或VH的剩余片段(所谓的构架区)显示出较小的氨基酸序列变异性(Kuby, Immunology, 第4版, 第4章, W.H. Freeman & Co., New York, 2000)。

[0106] CDR和构架区的位置可以使用本领域熟知的多种定义确定,例如,Kabat、Chothia, 国际ImMunoGeneTics数据库(IMGt)(在互联网以下网址:www.imgt.org/)和AbM(参见,例如,Johnson等人, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia等人, Nature, 342:877-883 (1989); Chothia等人, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani等人, J. Mol. Biol., 273:927-748 (1997))。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述:Ruiz等人, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); 和Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum等人, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); 和Martin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin等人, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); 和Rees等人, 引自Sternberg M.J.E. (编著), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

[0107] 轻链和重链均分成具有结构同源性和功能同源性的区域。术语“恒定”和“可变”以功能方式使用。在这个方面,将可以理解轻链(VL)和重链(VH)部分的可变结构域决定抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要的生物学特性如分泌、跨胎盘移动、Fc受体结合、补体结合作用等。按常规,恒定区结构域的编号随着它们变得距抗体的抗原结合位点或氨基端更远而增加。N端是可变区并且在C端是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端。

[0108] 如本文所用,术语“抗原结合片段”,指抗体的一个或多个部分,所述部分保留与抗原的表位特异性相互作用的能力(例如,通过结合、空间位阻、稳定化/去稳定化、空间分布)。结合片段的例子包括但不限于、单链Fvs(scFv)、骆驼抗体、二硫键连接的Fvs(sdFv)、Fab片段、F(ab')片段,一种由VL结构域、VH结构域、CL结构域和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,一种包含由二硫键在铰链区连接的两个Fab片段的二价片段;由VH结构域和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL结构域和VH结构域组成的Fv片段;由VH域组成的dAb片段(Ward等人, Nature 341:544-546, 1989);和分离的互补性决定区(CDR)、或抗体的其他表位结合片段。

[0109] 另外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由独立基因编码,但是使用重组方法,可以将它们通过合成接头连接,所述合成接头能够使这两个结构域作为单个蛋白链产生,在所述单个蛋白链中VL区和VH区配对以形成单价分子(称作单链Fv(“scFv”);参见例如Bird等人, Science 242:423-426, 1988;和Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988。这类单链抗体也意在涵盖在术语“抗原结合片段”内。使用本领域技术人员已知的常规技术,获得这些抗原结合片段,并且按照与完整抗体相同的方式筛选所述片段的用途。

[0110] 也可以将抗原结合片段掺入单结构域抗体、大抗体(maxibody)、微型抗体、单结构

域抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双-scFv(参见,例如,Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology,23:1126-1136,2005)。可以将抗原结合片段移植至基于多肽的支架如纤连蛋白III型(Fn3)中(参见美国专利号6,703,199,其描述纤连蛋白多肽单体抗体)。

[0111] 可以将抗原结合片段掺入单链分子中,其中所述单链分子包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),它们与互补性轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,Protein Eng.8:1057-1062,1995;和美国专利号5,641,870)。

[0112] 如本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指具有基本上相同的氨基酸序列或从相同遗传源衍生的多肽,包括抗体和抗原结合片段等。这个术语还包括具有单一分子组成的抗体分子的制备物。一种单克隆抗体组合物对特定表位显示单一结合特异性和亲和力。

[0113] 如本文所用,术语“人抗体”包括具有可变区的抗体,其中构架和CDR区均从人源序列衍生。另外,如果该抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自这类人序列,例如,人种系序列、或者突变形式的人种系序列或含有从人构架序列分析导出的共有构架序列的抗体,例如,如Knappik等人,J.Mol.Biol.296:57-86,2000)中所述。还包括衍生自人序列的抗体,其中已经为了亲和力成熟或出于制造/负载缀合目的突变一个或多个CDR。参见Hybridoma.1997 Aug;16(4):381-9.Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS.Kilpatrick KE,Wring SA,Walker DH,Macklin MD,Payne JA,Su JL,Champion BR,Caterson B,McIntyre GD.Department of Molecular Sciences,Glaxo Wellcome,Research Triangle Park,NC 27709,USA

[0114] 本发明的人抗体可包括不由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外的随机或位点特异性诱变或通过体内的体细胞突变而引入的突变或保守性置换,以促进稳定性或生产)。

[0115] 如本文所用的术语“识别”指发现其表位并与之相互作用(例如,结合)的抗体或其抗原结合片段,无论该表位是否为线性或构象的。术语“表位”指抗原上与本发明的抗体或抗原结合片段特异性结合的位点。表位可以从连续氨基酸或通过蛋白质的立体折叠而并置的非连续氨基酸形成。从连续氨基酸形成的表位一般在暴露于变性溶剂时保留,而通过立体折叠形成的表位通一般用变性溶剂处理时丧失。表位一般包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个处于独特空间构象的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术,例如,X射线晶体学和二维核磁共振(参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编著(1996))。

[0116] 本文所用的术语“亲和力”(affinity)指抗体与抗原在单个抗原部位上相互作用的强度。在每个抗原位点内部、抗体“臂”的可变区通过弱非共价力在许多位点处与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。

[0117] 因此,术语“分离的抗体”指一种抗体,其基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体。然而,与一种抗原特异性结合的分离的抗体可以对其他抗原具有交叉反应性。另外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学品。

[0118] 术语“相应的人种系序列”指编码人可变区氨基酸序列或子序列的核酸序列,其中与人种系免疫球蛋白可变区序列编码的其他全部其他已知可变区氨基酸序列相比,所述人

可变区氨基酸序列或子序列与参比可变区氨基酸序列或子序列共有最高确定的氨基酸序列同一性。相应的人种系序列还可以指与全部其他评价的可变区氨基酸序列相比,与参比可变区氨基酸序列或子序列具有最高氨基酸序列同一性的人可变区氨基酸序列或子序列。相应的人种系序列可以仅是构架区、仅是互补决定区、是构架区和互补决定区、可变区段(如上文定义),或包含可变区的序列或子序列的其他组合。可以使用本文所述的方法,例如,使用BLAST、ALIGN或本领域已知的另一种比对算法比对两个序列,确定序列同一性。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参比可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。可以例如通过可公开获得的国际免疫ImMunoGeneTics数据库(IMGt)(互联网上以下网址:www.imgt.org/)和V-碱基(互联网上以下网址:vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk),确定相应的人种系序列。

[0119] 在描述抗原(例如,蛋白质)和抗体、抗体片段或抗体衍生的结合剂之间相互作用的语境中使用时,短语“特异性结合”或“选择性结合”指确定抗原在蛋白质异质群体和其他生物制品中例如在生物样品(例如,血清、血浆或组织样品)中存在的结合反应。因此,在某些指明的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合剂与特定抗原的结合至少两倍于背景并且所述抗体或结合剂基本上不以显著的量与样品中存在的其他抗原结合。在一个实施方案中,在某些指明的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合剂与特定抗原的结合至少10倍于背景并且所述抗体或结合剂基本上不以显著的量与样品中存在的其他抗原结合。在这类条件下与抗体或结合剂特异性结合可能需要已经就其针对特定蛋白质的特异性选择的抗体或结合剂。根据需要或适宜的,可以通过扣除与来自其他物种(例如,小鼠或大鼠)或其他亚型的分子交叉反应的抗体,实现这种选择。备选地,在一些实施方案,选择与某些所需分子交叉反应的抗体或抗体片段。

[0120] 多种免疫测定法可以用来选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定法常规地用来选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(关于可以用来确定特异免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述,参见例如Harlow和Lane,Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998))。一般,特异性或选择性结合反应将产生高于背景信号至少2倍和更一般高于背景至少10至100倍的信号。

[0121] 术语“平衡解离常数(KD(M))”指解离速率常数(kd,时间⁻¹)除以结合速率常数(ka,时间⁻¹,M⁻¹)。可以使用本领域的任何已知方法,测量平衡解离常数。本发明的抗体通常将具有小于约10⁻⁷或10⁻⁸M,例如,小于约10⁻⁹M或10⁻¹⁰M,在一些实施方案,小于约10⁻¹¹M、10⁻¹²M或10⁻¹³M的平衡解离常数。

[0122] 术语“生物利用率”指施用至患者的药物的给定量的全身性利用率(即,血液/血浆水平)。生物利用率是一个绝对术语,其表示从所施用剂型到达总循环的药物时间(速率)和总量(程度)的度量。

[0123] 如本文所用,短语“基本上由……组成”指方法或组合物中所包含的活性药用物质以及对该方法或组合物的预期目的而言无活性任何赋形剂的类属或种类。在一些实施方案中,短语“基本上由……组成”明确地排除了包含除本发明的抗体药物缀合物之外的一种或多种额外活性物质。在一些实施方案中,短语“基本上由……组成”明确地排除了包含除本发明抗体药物缀合物和共施用的第二药物之外的一种或多种额外活性物质。

[0124] 术语“氨基酸”指天然存在的、合成的和非天然的氨基酸,以及以类似于天然存在

氨基酸的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及后来经修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸、 γ -羧谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在氨基酸相同的基本化学结构(即,与氢、羧基、氨基和R基结合的 α -碳)的化合物,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这些类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽主链,但是保留与天然存在氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但是以类似于天然存在氨基酸的方式发挥作用的化学化合物。

[0125] 术语“保守性修饰的变体”适用于氨基酸序列和核酸序列。就特定的核酸序列,保守性修饰的变体指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或在核酸不编码氨基酸序列的情况下,指基本上相同的序列。因为遗传密码的简并性,许多功能上相同的核酸编码任何给出的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU均编码氨基酸丙氨酸。因而,在其中丙氨酸由某个密码子指定的每个位置,可以将该密码子变成任一个所述的相应密码子,而不改变编码的多肽。这类核酸变异是“沉默性变异”,它们是一个种类的保守性修饰的变异。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述了该核酸的每种可能的沉默变异。技术人员会认识到,可以修饰核酸中的每个密码子(例外是AUG,它通常是甲硫氨酸的唯一密码子,和TGG,它通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每种沉默性变异隐含于每个描述的序列中。

[0126] 对于多肽序列,“保守性修饰的变体”包括对多肽序列的各个置换、缺失或添加,它们导致某个氨基酸取代为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性取代表是本领域熟知的。这类保守性修饰的变体相对于本发明的多态性变体、物种间同源物和等位基因而言是附加的并且不排斥它们。以下八组含有互为保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参阅例如,Creighton,Proteins(1984))。在一些实施方案中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0127] 如本文所用的术语“优化的”指已经改变的核苷酸序列,其使用在生产性细胞或生物(通常是真核细胞,例如酵母细胞、毕赤酵母属(*Pichia*)细胞、真菌细胞、木霉属(*Trichoderma*)细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞)中为优选的密码子编码氨基酸序列。优化的核苷酸序列经工程化以完全或尽可能多地保留由起始核苷酸序列最初编码的氨基酸序列,也称作“亲本”序列。

[0128] 在两个或更多个核酸序列或多肽序列的情境下,术语“相同百分数”或“同一性百分数”指两个或更多个序列或子序列相同的程度。如果两个序列在正在比较的区域范围内具有相同的氨基酸序列或核苷酸序列,则它们是“相同的”。如果在比较窗口或指定区域范围内为最大对应性而进行比较和比对时,如使用以下序列比较算法之一或通过手工比对和目视检查所测量,两个序列具有指定百分数的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域范围内或当未指定时在整个序列范围内60%同一性,任选地65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),则这两个序列是“基本上相同的”。任选地,同一性存在于具有至少约30个核苷酸(或10个氨基酸)长度的区域内,或更优选地存在于具有100个至500个或

1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)长度的区域内。

[0129] 对于序列比较,一般地一个序列充当参考序列,测试序列与之比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,如果需要,指定子序列坐标,并指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数或可以指定备选参数。基于程序参数,序列比较算法随后相对于参考序列计算测试序列的序列同一性百分数。

[0130] 如本文所用,“比较窗口”包括针对具有任一连续位置数的区段的参考,所述的连续位置数选自20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150,其中一个序列可以与具有相同连续位置数的参考序列在最佳比对这两个序列后进行比较。用于比对序列以比较的方法是本领域熟知的。用于比较的最佳序列比对可以按如下方式进行,例如通过Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c (1970) 的局部同源性算法、通过Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) 的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988) 的相似性检索方法、通过这些算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics软件包, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA) 或通过手工比对和目视检查(参见,例如, Brent等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003)。

[0131] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分数的两个算法的例子是BLAST算法和BLAST 2.0算法,它们分别在Altschul等人, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; 和Altschul等人, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990中描述。用于进行BLAST分析的软件是通过国家生物技术信息中心可公开获得的。这种算法涉及首先通过确定查询序列中长度为W的短字,鉴定高评分序列对(HSP),其中与数据库序列中具有相同长度的字比对时,所述短字匹配或满足某个正值阈评分T。将T称作相邻字评分阈值(Altschul等人, 上文)。这些初始相邻字命中充当种子用于启动检索以找到含有这些种子的更长HSP。所述字命中在两个方向沿每个序列尽可能远地延伸,只要可以提高累积比对评分。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励评分;总是>0)和N(错配残基的惩罚评分;总是<0)计算累积评分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵计算累积评分。字命中在每个方向上的延伸在以下情况时停止:累积比对评分从其最大实现值跌落达量X;累积评分因积累一个或更多负评分残基比对而达到或低于零;或抵达两个序列中任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长度(W) 11、期望(E) 10、M=5、N=-4和两条链比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长度3和期望(E) 10,以及BLOSUM62评分基质(参见Henikoff和Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915)、比对结果(B) 50、期望(E) 10、M=5、N=-4和两条链的比较作为默认值。

[0132] BLAST算法也进行两个序列之间相似性的统计分析(参见,例如, Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993)。由BLAST算法提供的相似性的一种度量是最小总和概率(P(N)),其提供两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的匹配会因偶然发生的概率指示。例如,如果最小总和概率在测试核酸与参考核酸的比较中小于约0.2、更优选小于约0.01并且最优选小于约0.001,则将认为测试核酸相似于参考核酸。

[0133] 还可以使用PAM120加权余数表、空位长度罚分12,空位罚分4,利用已经并入ALIGN程序(2.0版)的E. Meyers和W. Miller算法, *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17, 1988) 确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。此外,可以使用已经并入GCG软件包的GAP程序中的

Needlema和Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) 算法(在www.gcgc.com可获得), 使用 Blossom 62矩阵或PAM250矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6, 确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。

[0134] 除上文所示的序列同一性的百分数之外, 两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指标是由第一核酸编码的多肽与针对第二核酸编码的多肽所产生的抗体发生免疫杂交反应, 如下文描述。因此, 在两种肽仅因保守性取代而不同的情况下, 一个多肽一般与第二多肽基本上相同。两个核酸序列基本上相同的另一个指标是这两个分子或它们的互补物在严格条件下彼此杂交, 如下文描述。两个核酸序列基本上相同的又一个指标是相同的引物可以用来扩增该序列。

[0135] 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用并且指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其单链形式或双链形式的聚合物。本术语涵盖含有已知的核苷酸类似物或已修饰的主链残基或键的核酸, 所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的, 具有与参考核酸相似的结合特性, 并且以类似参考核苷酸的方式代谢。这类类似物的例子包括而限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。

[0136] 除非另外说明, 特定核酸序列也内在包括其保守方式修饰的变体(例如简并密码子取代)和互补序列, 以及明确指出的序列。具体而言, 如下文详述, 可以通过产生其中一个或多个选择的(或全部)密码子的第三位置用混合型碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列, 实现简并密码子取代(Batzer等人, (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka等人, (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; 和Rossolini等人, (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

[0137] 术语“有效连接”在核酸的语境下指两个或更多个多核苷酸(例如, DNA)区段之间的功能性关系。一般, 它指转录调节序列与已转录序列的功能性关系。例如, 如果启动子或增强子序列在适宜的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录, 则该启动子或增强子序列与编码序列有效连接。通常, 与已转录的序列有效连接的启动子转录调节序列与已转录的序列物理地连续, 即, 它们是顺式作用的。然而, 一些转录调节序列(如增强子)不需要物理上与它们增强其转录的编码序列连续或紧邻。

[0138] 术语“多肽”和“蛋白质”在此互换地使用来指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在氨基酸的人造化学模拟物的氨基酸聚合物, 以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有指出, 特定的多肽序列也隐含地涵盖其保守修饰的变体。

[0139] 如本文所用的术语“抗体药物缀合物”或“免疫缀合物”指抗体或其抗原结合片段与另一种药物如化疗药、毒素、免疫治疗剂、成像探针等连接。该连接可以是共价键或非共价相互作用, 如借助静电力。可以使用本领域已知的多种接头以形成抗体药物缀合物。另外, 可以将抗体药物缀合物以融合蛋白的形式提供, 所述融合蛋白可以从编码免疫缀合物的多核苷酸表达。如本文所用, “融合蛋白”指通过连接最初编码分离的蛋白质(包括肽和多肽)的两个或更多个基因或基因片段产生的蛋白质。融合基因的翻译产生具有从每种原始蛋白质衍生的功能特性的单一蛋白。

[0140] 术语“受试者”包括人类和非人动物。非人动物包括全部脊椎动物, 例如, 哺乳动物

和非哺乳动物,如非人的灵长类、绵羊、犬、牛、鸡、两栖类和爬行类。除了被指出,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[0141] 如本文所用,术语“细胞毒素”或“细胞毒性剂”指对细胞的生长和增殖有害并可以发挥作用以减少、抑制或摧毁细胞或恶性肿瘤的任何物质。

[0142] 如本文所用,术语“抗癌剂”指可以用来治疗细胞增殖性疾病如癌症的任何药剂,包括但不限于细胞毒性剂、化疗药、放疗法和放疗药、靶向抗癌剂和免疫治疗剂。

[0143] 如本文所用,术语“药物部分”或“负载”指与本发明抗体或抗原结合片段缀合的化学部分,并且可以包括任何治疗剂或诊断剂,例如,抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂(例如,抗真菌药、抗细菌药、抗寄生虫药、抗病毒药)或麻醉剂。例如,药物部分可以是抗癌剂,如细胞毒素。在某些实施方案中,药物部分选自V-ATP酶抑制剂、HSP90抑制剂、IAP抑制剂、mTor抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、澳瑞司他汀、多拉司他汀(dolastatin)、类美登素、MetAP(甲硫氨酸氨基肽酶)、蛋白质CRM1核输出的抑制剂、DPPIV抑制剂、线粒体中磷酸基转移反应抑制剂、蛋白质合成抑制剂、激酶抑制剂、CDK2抑制剂、CDK9抑制剂、蛋白酶体抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC抑制剂、DNA损伤剂、DNA烷基化剂、DNA嵌入剂、DNA小沟结合剂和DHFR抑制剂。用于将这些药物中每种药物连接至与本发明抗体和方法相容的接头的方法是本领域已知的。参见,例如,Singh等人,(2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*,第525卷,445-457。此外,负载可以是生物物理探针、荧光团、自旋标记物、红外探针、亲和力探针、螯合剂、光谱探针、放射性探针、脂质分子、聚乙二醇、聚合物、自旋标记物、DNA、RNA、蛋白质、肽、表面、抗体、抗体片段、纳米粒子、量子点、脂质体、PLGA粒子、糖或多糖。

[0144] 术语“类美登素药物部分”意指具有类美登素化合物结构的抗体-药物缀合物的亚结构。美登素首次分离自非洲灌木齿叶美登木(*Maytenus serrata*) (美国专利号3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生类美登素,如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利号4,151,042)。已经报道合成性美登醇和美登醇类似物。参见美国专利号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,和Kawai等人(1984) *Chem. Pharm. Bull.* 3441-3451),所述文献各自明确地通过引用的方式并入。可用于缀合的具体类美登素的例子包括DM1、DM3和DM4。

[0145] “肿瘤”指无论是恶性还是良性的赘生性细胞生长和增殖,及所有癌变前和癌变的细胞和组织。

[0146] 术语“抗肿瘤活性”意指肿瘤细胞的增殖速率、存活力或转移活性的降低。例如,抗肿瘤活性可以由治疗期间出现的异常细胞的生长速率减少或肿瘤尺寸稳定或缩减或与在无治疗情况下对照相比因治疗所致的存活期更长显示。这种活性可使用公认的体外或体内肿瘤模型评估,包括但不限于异种移植模型、同种异体移植模型、MMTV模型和本领域公知的用于研究抗肿瘤活性的其他已知模型。

[0147] 术语“恶性肿瘤”指非良性肿瘤或癌症。如本文所用,术语“癌症”包括以失调节或失控的细胞生长为特征的恶性肿瘤。示例性癌症包括癌、肉瘤、白血病和淋巴瘤。

[0148] 术语“癌症”包括原发性恶性肿瘤(例如,其细胞已经不移行至受试者身体中除原

始肿瘤部位之外部位的那些)和继发性恶性肿瘤(例如,因转移、肿瘤细胞移行至与原始肿瘤部位不同的继发部位而产生的那些)。

[0149] 术语“P-钙黏着蛋白”(也称作Pcad、PCad或CDH3)指P-钙黏着蛋白的核酸序列和氨基酸序列,所述序列已经在GenBank登录号NP_001784、NP_001784.2(氨基酸序列)和NM_001793.4、GenBank登录号AA14462、NG_009096和NG_009096.1(核苷酸序列)中公开。人P-钙黏着蛋白结构域1-5的序列信息是胞外信息并且是在GenBank登录号NM_001793.4和NP_001784中公开。

[0150] “P-钙黏着蛋白”还指在其全长范围内与上述GenBank登录号NP_001784、NP_001784.2的氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%序列同一性的蛋白质和氨基酸序列。

[0151] 结构上,P-钙黏着蛋白核酸序列在其胞外结构域范围内与GenBank登录号NM_001793.4、GenBank登录号AA14462、NG_009096和NG_009096.1的核酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0152] 如本文所用,术语对任何疾病或病症的“治疗”、“治疗着”或“治疗”在一个实施方案中指改善该疾病或病症(即,延缓或停滞或减少疾病或其至少一个临床症状的形成)。在另一个实施方案中,“治疗”、“治疗着”或“治疗”指缓和或缓解至少一个身体参数,包括患者可能不可察觉的那些身体参数。在又一个实施方案中,“治疗”、“治疗着”或“治疗”指在身体上(例如,稳定可察觉症状)、生理上(例如,稳定身体参数)或这两方面调节疾病或病症。在又一个实施方案中,“治疗”、“治疗着”或“治疗”指防止或延迟疾病或病症的发作或形成或进展。

[0153] 术语“治疗可接受量”或“治疗有效剂量”可互换地指足以实现所需结果(即,肿瘤尺寸减小、抑制肿瘤生长、防止转移、抑制或防止病毒、细菌、真菌或寄生虫感染)的量。在一些实施方案中,治疗可接受的量不引起或不造成不利副作用。在一些实施方案中,治疗可接受的量诱导或造成副作用,但仅是由医疗服务提供者就患者的状况而言可接受的那些。可以通过首先施用低剂量并且随后递增地增加该剂量直至实现所需效果,确定治疗可接受量。本发明分子的“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”可以分别防止疾病症状发作或导致疾病症状的严重程度下降,所述疾病症状包括与癌症相关的症状。

[0154] 术语“共施用”指个体的血液中存在两种活性剂。共施用的活性剂可以同时或依次递送。

[0155] 本发明提供与P-钙黏着蛋白结合的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)及其药物缀合物,即抗体药物缀合物或ADC。特别地,本发明提供与P-钙黏着蛋白结合并一旦结合则内化的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)。本发明的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)可以用于产生抗体药物缀合物。另外,本发明提供具有合乎需要的药代动力学特征和其他所需属性并且因此可以用于治疗表达P-钙黏着蛋白的癌的抗体药物缀合物。本发明还提供包含本发明抗体药物缀合物的药物组合物,以及制造这类药物组合物及使用它们治疗癌症的方法。

[0156] 抗体药物缀合物

[0157] 本发明提供抗体药物缀合物,也称作免疫缀合物,其中与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体、抗原结合片段或其功能性等同物与药物部分连接。在一个方面,通过接头借助共

价连接,本发明的抗体、抗原结合片段或其功能等同物连接至作为抗癌剂的药物部分。本发明的抗体药物缀合物可以选择性地递送有效剂量的抗癌剂(例如,细胞毒性剂)至表达P-钙黏着蛋白的肿瘤组织,因而可以实现更大的选择性(和较低的有效剂量)。

[0158] 在一个方面,本发明提供式(I)的免疫缀合物:

[0159] $Ab-(L-(D))_m)_n$

[0160] 其中Ab表示本文所述的P-钙黏着蛋白结合抗体;

[0161] L是接头;

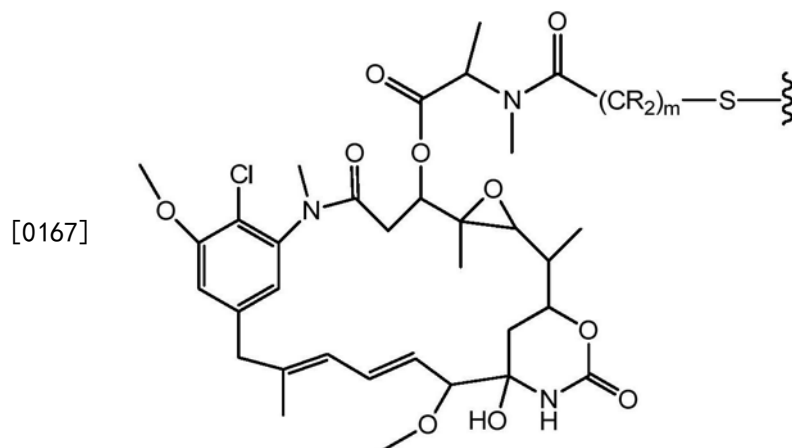
[0162] D是药物部分;

[0163] m是一个从1至8的整数;并且

[0164] n是从1-20的整数。在一个实施方案中,n是从1至10、2至8或2至5的整数。在一个具体实施方案中,n是2、3或4。在一些实施方案中,m是1;在其他实施方案中,m是2、3或4。

[0165] 尽管对于特定缀合物分子而言,药物对抗体比率特定具有确切的值(例如,在式(I)中n乘以m),但是可以理解当用来描述含有许多分子的样品时,该值将经常是平均值,原因在于一般与缀合步骤相关的某种程度的非均匀性。免疫缀合物样品的平均载量在本文中称作药物对抗体比率或“DAR”。在一些实施方案中,当药物是类美登素时,将它称作“MAR”。在一些实施方案中,DAR在约2和约6之间,并且一般是约3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7.0、7.5、8.0。在一些实施方案中,以重量计至少50%的样品是具有加或减2的平均DAR的化合物,并且优选地至少50%的样品是含有平均DAR加或减1的缀合物。实施方案包括其中DAR是约3.5、3.6、3.7、3.8或3.9的免疫缀合物。在一些实施方案中,’约n’的DAR意指DAR的测量值在n的20%内部。

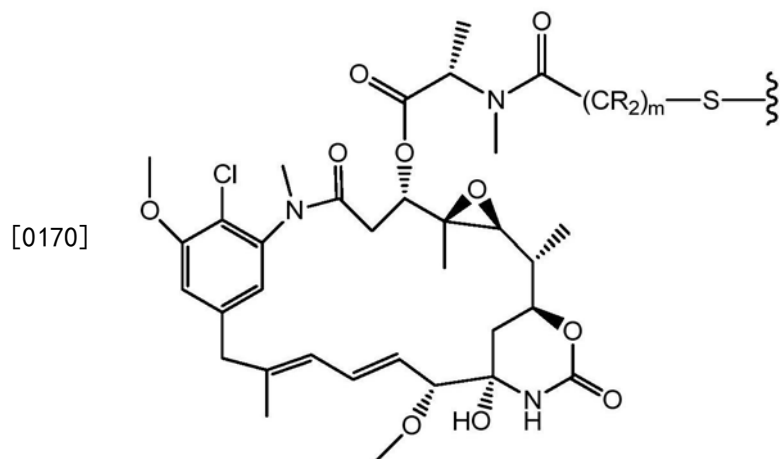
[0166] 本发明还涉及包含与药物部分连接或缀合的如本文中公开的抗体,抗体片段(例如,抗原结合片段)及其功能等同物的免疫缀合物。在一个实施方案中,药物部分D是类美登素药物部分,所述类美登素药物部分包括具有以下结构的那些:



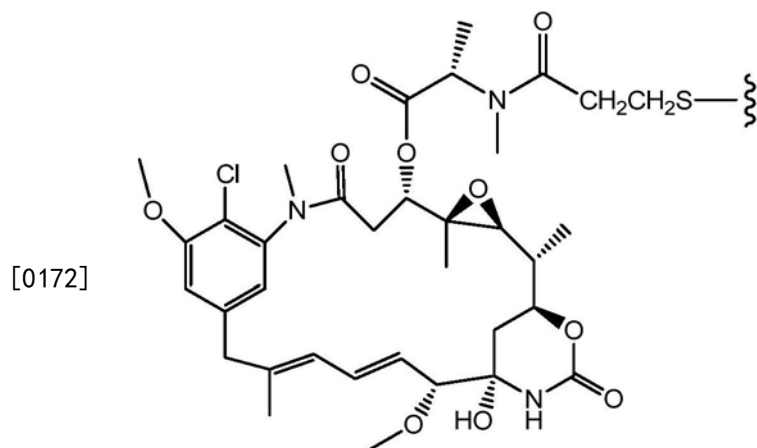
[0168] 其中波浪线表示类美登素的硫原子与抗体药物缀合物的接头共价连接。R在每次出现时独立地是H或C₁-C₆烷基。使酰胺基团与硫原子连接的亚烷基链可以是甲基、乙基或丙基,即,m是1、2或3。(美国专利号633,410、美国专利号5,208,020,Chari等人,(1992) Cancer Res.52:127-131,Lui等人,(1996) Proc.Natl.Acad.Sci.93:8618-8623)。

[0169] 对于本发明的免疫缀合物,构思类美登素药物部分的全部立体异构体,即在类美登素的手性碳处R构型和S构型的任何组合。在一个实施方案中,类美登素药物部分具有以

下立体化学。

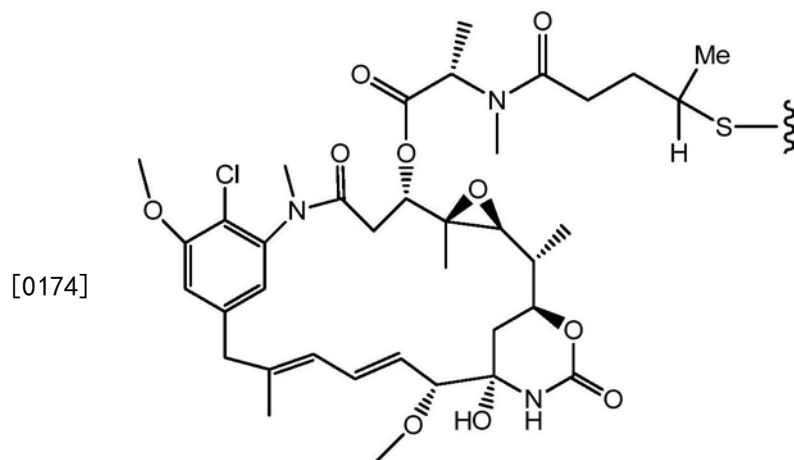


[0171] 在一个实施方案中,类美登素药物部分是 $N^{2'}$ -去乙酰基- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(也称作DM1)。DM1由以下结构式代表。



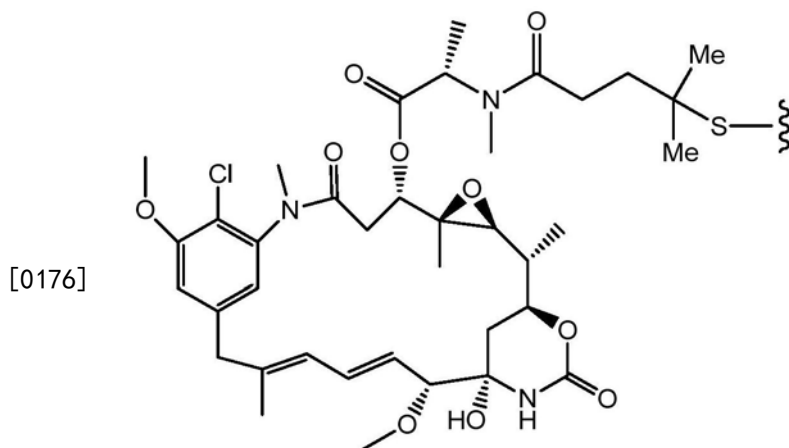
DM1

[0173] 在另一个实施方案中,类美登素药物部分是 $N^{2'}$ -去乙酰基- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(也称作DM3)。DM3由以下结构式代表。



DM3

[0175] 在另一个实施方案中,类美登素药物部分是 $N^{2'}$ -去乙酰基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(也称作DM4)。DM4由以下结构式代表。



DM4

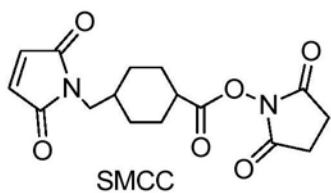
[0177] 药物部分D可以通过接头L与抗体Ab连接。L是能够通过共价键使药物部分与抗体连接的任何化学部分。交联试剂是可以用来连接药物部分和抗体以形成抗体药物缀合物的双官能或多官能试剂。可以使用具有能够与药物部分和抗体结合的反应性官能团的交联试剂,制备抗体药物缀合物。例如,半胱氨酸、巯基或胺,例如抗体的N末端或氨基酸侧链如赖氨酸,可以与交联试剂的官能基团形成键。

[0178] 在一个实施方案中,L是可切割接头。在另一个实施方案中,L是不可切割接头。在一些实施方案中,L是酸不稳定接头、光不稳定接头、肽酶可切割接头、酯酶可切割接头、二硫键可切割接头、亲水接头、预先带电荷的接头或基于二羧酸的接头。

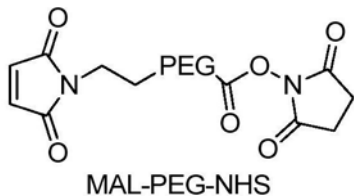
[0179] 在药物部分(例如类美登素)和抗体之间形成不可切割接头的合适的交联试剂是本领域熟知的并且可以形成包含硫原子(如SMCC)的不可切割接头或无硫原子的那些不可切割接头。在药物部分(例如类美登素)和抗体之间形成不可切割接头的优选交联试剂包含基于马来酰亚胺或基于卤代乙酰基的部分。根据本发明,将这类不可切割接头描述为衍生自基于马来酰亚胺或基于卤代乙酰基的部分。

[0180] 包含基于马来酰亚胺的部分的交联试剂包括但不限于N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(SMCC)、磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-(6-氨基己酸酯)(其是SMCC(LC-SMCC)的“长链”类似物)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(马来酰亚胺乙酰)-琥珀酰亚胺酯(AMSA)、琥珀酰亚胺基-6-(马来酰亚胺丙酰氨基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基-4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMIP)和含有聚乙二醇间隔团的基于马来酰亚胺的交联试剂,如MAL-PEG-NHS。这些交联试剂形成从基于马来酰亚胺的部分衍生的不可切割接头。下文显示基于马来酰亚胺的交联试剂的代表性结构。

[0181]



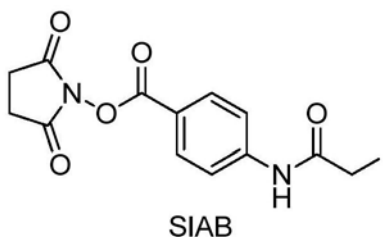
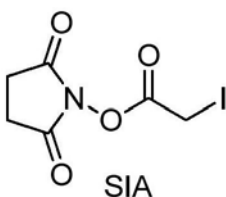
[0182]



[0183] 在另一个实施方案中,接头L衍生自N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(SMCC),磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)或MAL-PEG-NHS。

[0184] 包含基于卤代乙酰基的部分的交联试剂包括N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。这些交联试剂形成从基于卤代乙酰基的部分衍生的不可切割接头。下文显示基于卤代乙酰基的交联试剂的代表性结构。

[0185]

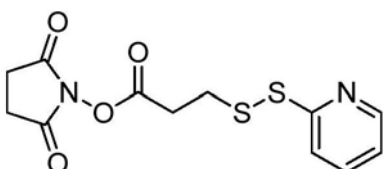


或

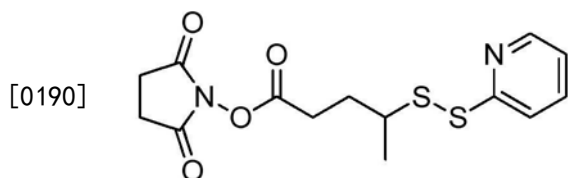
[0186] 在一个实施方案中,接头L衍生自N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)或N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

[0187] 在药物部分(例如类美登素)和抗体之间形成可切割接头的合适交联试剂是本领域熟知的。含有二硫键的接头是通过可以在生理条件下发生的二硫键交换可切割的接头。根据本发明,将这类可切割接头描述为衍生自基于二硫键的部分。合适的二硫键交联试剂包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB),下文显示其结构。这些二硫键交联试剂形成从基于二硫键的部分衍生的可切割接头。

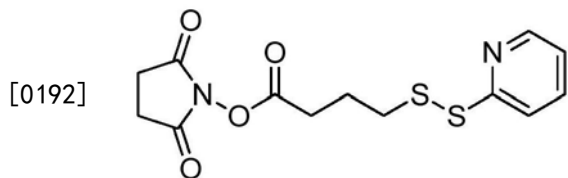
[0188]



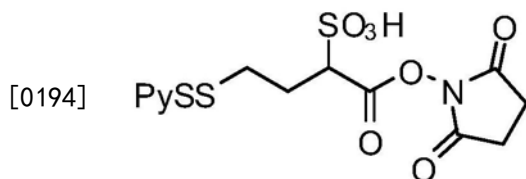
[0189] N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、



[0191] N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯 (SPP)、



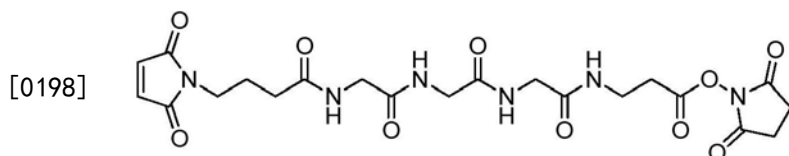
[0193] N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB) 和



[0195] N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基-丁酸酯 (磺基-SPDB)。

[0196] 在一个实施方案中,接头L衍生自N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)。

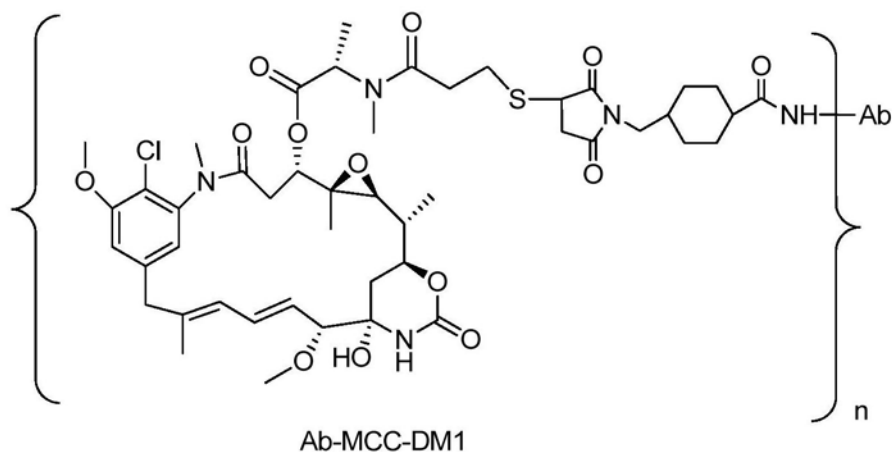
[0197] 在药物部分 (例如类美登素) 和抗体之间形成带电荷接头的合适交联试剂称作预先带电荷的交联试剂。在一个实施方案中,从预先带电荷的交联试剂CX1-1衍生接头L。CX1-1的结构如下。



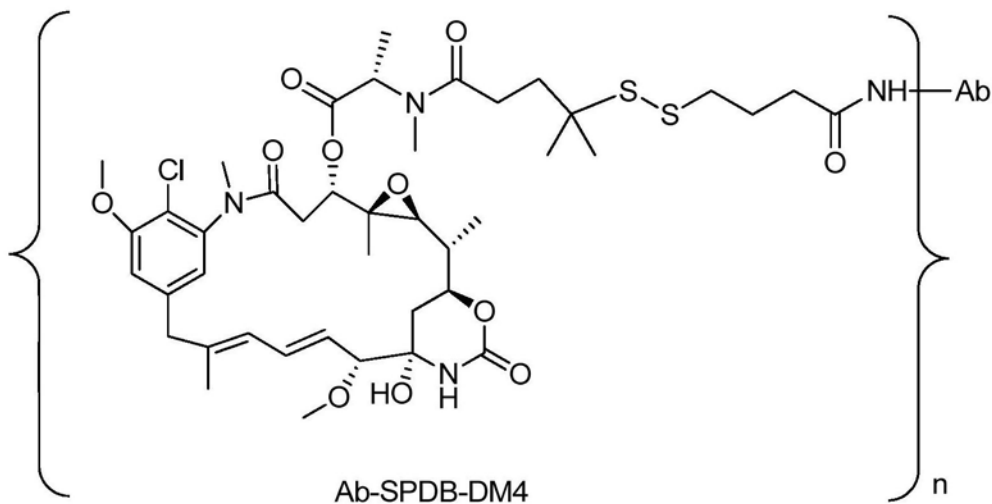
[0199] 2,5-二氧代吡咯烷-1-基17-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧代-4,7,10,13-四氮杂十七碳-1-酸酯 (CX1-1)

[0200] 上述的每种交联试剂在交联试剂的一个末端处含有与抗体的伯胺反应以形成酰胺键的NHS-酯并且在另一端处含有与类美登素药物部分的硫氢基反应以形成硫醚或二硫键的马来酰亚胺基或吡啶基二硫化物基团。

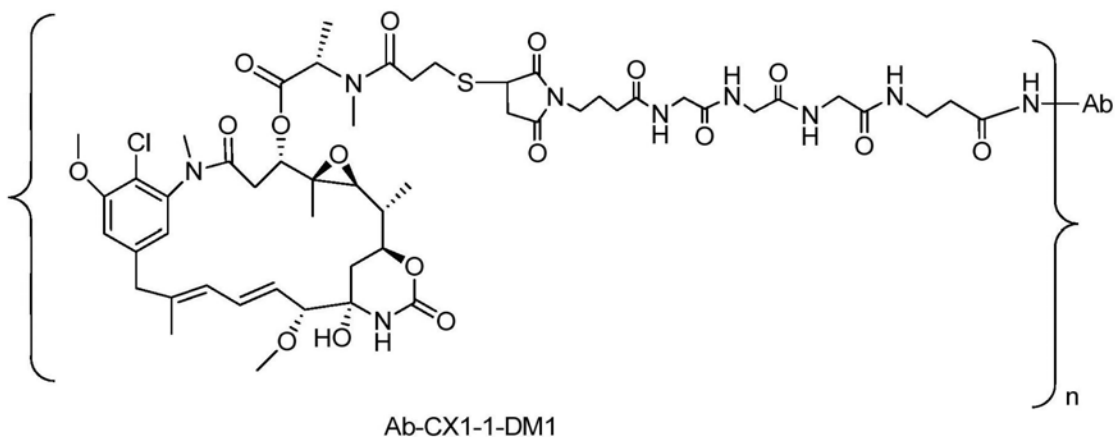
[0201] 在一个实施方案中,本发明的缀合物由以下任一个结构式代表。



[0202]



[0203]



[0204] 其中：

[0205] Ab是特异性结合P-钙黏着蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0206] n,表示通过与Ab的伯胺形成酰胺键与Ab连接的D-L基团的数目,是从1至20的整数。在一个实施方案中,n是从1至10,2至8或2至5的整数。在一个具体实施方案,n是3或4。

[0207] 在一个实施方案中,缀合物中药物(例如,DM1或DM4)对抗体的平均摩尔比(即,平

均n值,也称作类美登素对抗体比率(MAR))是约1至约10、约2至约8(例如,1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0或8.1)、约2.5至约7、约3至约5、约2.5至约4.5(例如,约2.5、约2.6、约2.7、约2.8、约2.9、约3.0、约3.1、约3.3、约3.4、约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4.0、约4.1、约4.2、约4.3、约4.4、约4.5)、约3.0至约4.0、约3.2至约4.2,或约4.5至5.5(例如,约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4或约5.5)。

[0208] 在本发明的一个方面,本发明缀合物具有实质高的纯度并具有以下一种或多种特征:(a)大于约90%(例如,大于或等于约91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%),优选地大于约95%的缀合物种类是单体的,(b)缀合物制品中的未缀合接头水平小于约10%(例如,小于或等于约9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)(相对于总接头),(c)小于10%的缀合物种类是交联的(例如,小于或等于约9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%),(d)缀合物制品中的游离药物(例如,DM1或DM4)水平小于约2%(例如,小于或等于约1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%)(mol/mol相对总细胞毒性剂)和/或(e)储存时(例如,在约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约3年、约4年或约5年后),游离药物(例如,DM1或DM4)水平未出现实质性增加。游离药物(例如,DM1或DM4)的水平“实质性增加”意指在某段储存时间(例如,约1周、约2周、约3周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约1年、约2年、约3年、约4年或约5年)后,游离药物(例如,DM1或DM4)水平增加小于约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1.0%、约1.1%、约1.2%、约1.3%、约1.4%、约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2.0%、约2.2%、约2.5%、约2.7%、约3.0%、约3.2%、约3.5%、约3.7%或约4.0%。

[0209] 如本文所用,术语“未缀合的接头”指与从交联试剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)衍生的接头共价连接的抗体,其中抗体不通过接头共价偶联于药物(例如,DM1或DM4)(即,“未缀合的接头”可以由Ab-MCC、Ab-SPDB或Ab-CX1-1代表)。

[0210] 1. 药物部分

[0211] 本发明提供与P-钙黏着蛋白特异性结合的免疫缀合物。本发明的抗体药物缀合物包含与药物部分,例如抗癌剂、自身免疫治疗剂、抗炎剂、抗真菌剂、抗细菌剂、抗寄生虫剂药、抗病毒剂或麻醉剂缀合的抗P-钙黏着蛋白抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物。可以使用本领域已知的任何方法,将本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物与几个相同或不同的药物部分缀合。

[0212] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物的药物部分选自V-ATP酶抑制剂、促凋亡剂、Bcl2抑制剂、MCL1抑制剂、HSP90抑制剂、IAP抑制剂、mTor抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、澳瑞司他汀、多拉司他汀(dolastatin)、类美登素(maytansinoid)、MetAP(甲硫氨酸氨基肽酶)、蛋白质CRM1核输出的抑制剂、DPPIV抑制剂、Eg5抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中磷酸基转移反应的抑制剂、蛋白质合成抑制剂、激酶抑制剂、CDK2抑制剂、CDK9抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC抑制剂、DNA损伤剂、DNA烷基化剂、DNA嵌入剂、DNA小沟结合剂和DHFR

抑制剂。

[0213] 在一个实施方案,本发明的免疫缀合物的药物部分是类美登素药物部分,如但不限于DM1、DM3或DM4。

[0214] 进一步,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物可以与调节给定生物学反应的药物部分缀合。药物部分不得解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是拥有所需生物学活性的蛋白质、肽或多肽。这类蛋白质可以例如包括毒素如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素、或白喉毒素、蛋白质如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤维蛋白溶酶原激活物、细胞因子、凋亡物质、抗血管生成物质、或生物学反应调节物,例如淋巴因子。

[0215] 在一个实施方案中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物与药物部分如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性毒素缀合。细胞毒素的例子包括但不限于紫杉烷(参见例如,国际(PCT专利号申请号W0 01/38318和PCT/US03/02675)、DNA-烷基化剂(例如,CC-1065类似物)、蒽环类、微管溶素(tubulysin)类似物、多卡米星类似物、澳瑞司他汀E、澳瑞司他汀F、类美登素和细胞毒性剂,包括反应性聚乙二醇部分(参见例如, Sasse等人, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000)、Suzawa等人, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000)、Ichimura等人, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)、Francisco等人, (2003) (电子出版先于印刷出版))、美国专利号5,475,092、6,340,701、6,372,738和6,436,931、美国专利申请公开号2001/0036923A1、待决美国专利申请系列号10/024,290和10/116,053和国际(PCT专利号申请号W0 01/49698)、紫杉酚、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗剂还包括,例如抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、消融剂(例如,氮芥、噻替哌、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和罗莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)、顺铂、蒽环类(例如,柔红霉素(以前称作道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,更生霉素(以前称作放线菌素)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。(参见例如, Seattle Genetics US 20090304721)。

[0216] 可以与本发明的抗体、抗体片段(抗原结合片段)或功能等同物缀合的细胞毒素的其他例子包括多卡米星、加利车霉素、美登素和澳瑞司他汀及其衍生物。

[0217] 多种类型的细胞毒素、接头和用于使治疗剂与抗体缀合的方法是本领域已知的,参见,例如, Saito等人, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail等人, (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan和Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter和Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0218] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物也可以与放射性同位素缀合以产生细胞毒性放射药物,称作放射免疫缀合物。可以与抗体缀合的用于诊断或治疗性用途的放射性同位素的例子包括,但不限于碘¹³¹、钆¹¹¹、钇⁹⁰和镥¹⁷⁷。本领域中建立了

用于制备放射免疫缀合物的方法。放射免疫缀合物的例子是可商业获得的,包括ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals)和BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals),并且利用本发明的抗体,相似的方法可以用来制备放射免疫缀合物。在某些实施方案中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可通过接头分子附着到抗体上。这类接头分子是本领域公知的并且在Denardo等人(1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90;Peterson等人,(1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7;和Zimmerman等人,(1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50中描述,所述文献每篇通过引用的方式完整并入。

[0219] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物还可以与异源蛋白或多肽(或其片段、优选地与至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的多肽)缀合以产生融合蛋白。特别地,本发明提供融合蛋白,所述融合蛋白包含本文所述的抗体片段(例如,抗原结合片段)(例如,Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)₂片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)和异源蛋白、多肽或肽。

[0220] 可通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)技术,产生其他融合蛋白。可利用DNA改组来改变本发明抗体或其片段的活性(例如,具有更高亲和力和更低解离速率的抗体或其片段)。通常参见,美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252和5,837,458;Patten等人,(1997), Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33;Harayama,(1998), Trends Biotechnol. 16(2):76-82;Hansson等人,(1999), J. Mol. Biol. 287:265-76;和Lorenzo和Blasco,(1998), Biotechniques 24(2):308-313(这些专利和出版物的每篇每因而通过引用方式完整地并入)。可以通过在重组之前借助易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法经历随机诱变,改变抗体或其片段或编码的抗体或其片段。编码与抗原特异性结合的抗体或其片段的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0221] 另外,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物可以与标记序列如肽缀合以促进纯化。在优选的实施方案中,标志物氨基酸序列是六组氨酸肽(SEQ ID NO:130),如pQE载体(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)等中提供的标签等,所述载体中许多是市售的。如Gentz等人,(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824中所述,例如,六组氨酸(SEQ ID NO:130)为纯化融合蛋白提供便利。用于纯化的其他肽标签包括但不限于血凝素(“HA”)标签,其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,(1984) Cell 37:767),和“FLAG”标签(A. Einhauser等人, J. Biochem. Biophys. Methods 49:455-465, 2001)。根据本发明,抗体或抗原结合片段也可以与渗透肿瘤的肽缀合以提高它们的效力。

[0222] 在其他实施方案中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物与诊断物质或可检测物质缀合。这类免疫缀合物可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力),用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测物质偶联实现这类诊断和检测,所述可检测物质包括但不限于多种酶,如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,如但不限于链霉素亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,如但不限于Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、

Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质，如但不限于鲁米诺；生物发光物质，如但不限于、萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白；放射性物质，如但不限于碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 和 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 和 ^{111}In)、锝(^{99}Tc)、钛(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{64}Cu 、 ^{113}Sn 和 ^{117}Sn ；和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

[0223] 本发明的抗体、抗体片段(例如，抗原结合片段)或功能等同物也可以与特别可用于靶抗原的免疫测定法或纯化的固相支持物连接。此类固相支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0224] 2. 接头

[0225] 如本文所用，“接头”是能够使抗体、抗体片段(例如，抗原结合片段)或功能等同物与另一个部分如药物部分连接的任何化学部分。接头可以在化合物或抗体仍保持活性的条件下易于切割(可切割接头)，如，酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键切割。备选地，接头可以基本上抵抗切割(例如，稳定接头或不可切割接头)。在一些方面，接头是预先带电荷的接头、亲水接头或基于二羧酸的接头。

[0226] 在一个方面，本发明中使用的接头衍生自交联试剂如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)-2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、马来酰亚胺PEG NHS、N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(SMCC)、N-磺基琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷甲酸酯(磺基-SMCC)或2,5-二氧代吡咯烷-1-基17-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十七碳-1-酸酯(CX1-1)。

[0227] 不可切割接头是能够使药物如类美登素与抗体以稳定、共价方式连接并且不脱离上文对可切割接头所列分类的任何化学部分。因此，不可切割接头基本上抵抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键裂解。另外，不可切割指接头中或毗邻接头的化学键在药物如类美登素或抗体不丧失其活性的条件经受住酸、光不稳定性切割剂、肽酶、酯酶或切割二硫键的化学或生理学化合物诱导的切割作用的能力。

[0228] 酸不稳定接头是在酸性pH可切割的接头。例如，某些胞内区室如内体和溶酶体具有酸性pH(pH 4-5)，并且提供合适切割酸不稳定接头的条件。

[0229] 光不稳定接头是在体表在光可抵达的许多体腔中可用的接头。另外，红外光可以穿透组织。

[0230] 一些接头可以被肽酶切割，即肽酶可切割接头。仅某些肽轻易地在细胞内部或外部被切割，参见例如Trout等人，79Proc.Natl.Acad.Sci.USA,626-629(1982)和Umemoto等人，43Int.J.Cancer,677-684(1989)。另外，肽由 α -氨基酸和肽键组成，所述肽键在化学上

是一个氨基酸的羧酸根和第二个氨基酸的氨基之间的酰胺键。将其他酰胺键,如赖氨酸的羧酸根和 α -氨基之间的键理解为不是肽键并且视为不可切割的。

[0231] 一些接头可以由酯酶切割,即酯酶可切割接头。再次,仅某些酯可以被细胞内部或外部存在的酯酶切割。酯由羧酸和醇的缩合形成。简单酯是以简单醇如脂族醇和小环状醇和小芳族醇产生的酯。

[0232] 预先带电荷的接头衍生自带电荷交联试剂,其掺入抗体药物缀合物后保持其电荷。预先带电荷的接头的例子可以在US 2009/0274713中找到。

[0233] 3.ADC的缀合和制备

[0234] 本发明的缀合物可以通过本领域已知的任何方法(如在美国专利号7,811,572、6,411,163、7,368,565和8,163,888,以及美国申请公开2011/0003969、2011/0166319、2012/0253021和2012/0259100中描述的那些方法)制备。这些专利和专利申请公开的完整教导通过引用方式并入本文。

[0235] 单步骤法

[0236] 在一个实施方案中,本发明的缀合物可以通过单步骤法制备。该方法包括在合适的pH将抗体、药物和交联剂在基本上水性的介质中组合,所述介质任选地含有一种或多种共溶剂。在一个实施方案中,该方法包括步骤:在具有pH约4至约9的溶液中使本发明的抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触以形成包含抗体和药物的第一混合物,并且随后使包含抗体和药物的第一混合物与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触以提供包含(i)缀合物(例如,Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游离药物(例如,DM1或DM4)和(iii)反应副产物的混合物。

[0237] 在一个实施方案中,单步骤法包括在具有约6或更大(例如,约6至约9、约6至约7、约7至约9、约7至约8.5、约7.5至约8.5、约7.5至约8.0、约8.0至约9.0,或约8.5至约9.0)pH的溶液中使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。例如,本发明的方法包括使细胞结合剂在具有pH约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、约8.0、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4、约8.5、约8.6、约8.7、约8.8、约8.9或约9.0的溶液中与药物(例如,DM1或DM4)接触并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。在一个具体实施方案中,本发明的方法包括在具有pH约7.8(例如,pH 7.6至8.0或pH 7.7至7.9)的溶液中使细胞结合剂与药物(例如,DM1或DM4)接触并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。

[0238] 单步骤法(即,使抗体与药物(例如,DM1或DM4)并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1接触)可以在本领域已知的任何合适温度实施。例如,单步骤法可以在约20°C或更低温度(例如,约-10°C(前提是防止溶液冻结,例如,因存在用来溶解细胞毒性剂的有机溶剂和双官能交联试剂)至约20°C、约0°C至约18°C、约4°C至约16°C)、在室温(例如,约20°C至约30°C或约20°C至约25°C),或在升高的温度(例如,约30°C至约37°C)进行。在一个实施方案中,单步骤法在约16°C至约24°C(例如,约16°C、约17°C、约18°C、约19°C、约20°C、约21°C、约22°C、约23°C、约24°C或约25°C)的温度进行。在另一个实施方案中,单步骤法在约15°C或更低(例如,约-10°C至约15°C或约0°C至约15°C)的温度实施。

例如,该方法包括在约15℃、约14℃、约13℃、约12℃、约11℃、约10℃、约9℃、约8℃、约7℃、约6℃、约5℃、约4℃、约3℃、约2℃、约1℃、约0℃、约-1℃、约-2℃、约-3℃、约-4℃、约-5℃、约-6℃、约-7℃、约-8℃、约-9℃或约-10℃的温度使抗体与药物(例如,DM1或DM4)并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触,前提是防止溶液冻结,例如,因存在用来溶解交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、磺基-SPDB、SPDB或CX1-1)的有机溶剂。在一个实施方案中,该方法包括在约-10℃至约15℃、约0℃至约15℃、约0℃至约10℃、约0℃至约5℃、约5℃至约15℃、约10℃至约15℃或约5℃至约10℃的温度使抗体与药物(例如,DM1或DM4)并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。在另一个实施方案中,该方法包括在约10℃的温度(例如,8℃至12℃的温度或9℃至11℃的温度)使抗体与药物(例如,DM1或DM4)并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。

[0239] 在一个实施方案中,通过以下方式实现上述的接触:提供抗体,随后使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触以形成包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的第一混合物,并且随后使包含抗体和药物的第一混合物(例如,DM1或DM4)与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。例如,在一个实施方案中,在反应容器中提供抗体,添加药物(例如,DM1或DM4)至反应容器(因而与抗体接触),并且随后将交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)添加至包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物(因而与包含抗体和药物的混合物接触)。在一个实施方案中,在反应容器中提供抗体,并且向容器提供抗体后立即添加药物(例如,DM1或DM4)至反应容器。在另一个实施方案中,在反应容器中提供抗体,并且向容器提供抗体后某个时间区间(例如,在向该空间提供细胞结合剂后约5分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约40分钟、约50分钟,约1小时、约1天或更长时间)之后添加药物(例如,DM1或DM4)至反应容器。药物(例如,DM1或DM4)可以迅速(即,在短时间区间,如约5分钟、约10分钟内)或缓慢(如通过使用泵)添加。

[0240] 包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物随后可以与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触后立即接触或在使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触后的某个更晚时间点(例如,约5分钟至约8小时或更长时间)接触。例如,在一个实施方案中,在添加药物(例如,DM1或DM4)至包含抗体的反应容器后立即添加交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)至包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物。备选地,包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物可以在使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触后约5分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时或更长时间与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触。

[0241] 在包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触后,使反应推进约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时或更长时间(例如,约30小时、约35小时、约40小时、约45小时或约48小时)。

[0242] 在一个实施方案中,单步骤法还包括使任何未反应的药物(例如,DM1或DM4)和/或

未反应的交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)猝灭的猝灭步骤。猝灭步骤一般在纯化缀合物之前进行。在一个实施方案中,通过使混合物与猝灭试剂接触,使混合物猝灭。如本文所用,“猝灭试剂”指与游离药物(例如,DM1或DM4)和/或游离交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)反应的试剂。在一个实施方案中,马来酰亚胺或卤乙酰胺猝灭试剂,如4-马来酰亚胺丁酸、3-马来酰亚胺丙酸、N-乙基马来酰亚胺、碘乙酰胺或碘乙酰氨基丙酸,可以用来确保药物(例如,DM1或DM4)中的任何未反应基团(如巯基)猝灭。猝灭步骤可以帮助防止药物(例如,DM1)二聚化。二聚化的DM1可能难以移除。一旦用极性、带电荷的巯基猝灭试剂(如4-马来酰亚胺丁酸或3-马来酰亚胺丙酸)猝灭,多余的未反应DM1转化成极性、带电荷的水溶性加合物,其中所述加合物可以在纯化步骤期间容易地与共价连接的缀合物分离。也可以使用非极性和中性巯基猝灭试剂猝灭。在一个实施方案中,使混合物与猝灭试剂接触,使混合物猝灭,其中所述猝灭试剂与未反应的交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)反应。例如,可以添加亲核试剂至混合物以猝灭任何未反应的SMCC。亲核试剂优选地是含有氨基的亲核试剂,如赖氨酸、牛磺酸和羟胺。

[0243] 在一个优选实施方案中,在使混合物与猝灭试剂接触之前,允许反应(即,使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触并且随后与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触)推进至完成。在这个方面,在包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触后约1小时至约48小时(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时或约25小时至约48小时)将猝灭试剂添加至混合物。

[0244] 备选地,通过降低混合物pH至约5.0(例如,4.8、4.9、5.0、5.1或5.2),使混合物猝灭。在另一个实施方案中,通过降低混合物pH至小于6.0、小于5.5、小于5.0、小于4.8、小于4.6、小于4.4、小于4.2、小于4.0,使混合物猝灭。备选地,将pH降低至约4.0(例如,3.8、3.9、4.0、4.1或4.2)至约6.0(例如,5.8、5.9、6.0、6.1或6.2)、约4.0至约5.0、约4.5(例如,4.3、4.4、4.5、4.6或4.7)至约5.0。在一个实施方案中,通过降低混合物pH至4.8,使混合物猝灭。在另一个实施方案中,通过降低混合物pH至5.5,使混合物猝灭。

[0245] 在一个实施方案中,单步骤法还包括从抗体释放不稳定结合的接头的维持步骤。维持步骤包括在纯化缀合物之前(例如,在反应步骤后,在反应步骤和猝灭步骤之间,或在猝灭步骤后)维持混合物。例如,该方法包括(a)在具有pH约4至约9的溶液中使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触以形成包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物;并且随后使包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触,以提供包含(i)缀合物(例如,Ab-MCC-DM1,Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1), (ii)游离药物(例如,DM1或DM4),和(iii)反应副产物的混合物,(b)维持在步骤(a)中制备的混合物以从细胞结合剂释放不稳定结合的接头,和(c)纯化混合物以提供纯化的缀合物。

[0246] 在另一个实施方案中,该方法包括(a)在具有pH约4至约9的溶液中使抗体与药物(例如,DM1或DM4)接触以形成包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物;并且随后使包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB

或CX1-1)接触,以提供包含(i)缀合物、(ii)游离药物(例如,DM1或DM4)和(iii)反应副产物的混合物,(b)淬灭在步骤(a)中制备的混合物以淬灭任何未反应的药物(例如,DM1或DM4)和/或未反应的交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1), (c)维持在步骤(b)中制备的混合物以从细胞结合剂释放不稳定结合的接头,和(d)纯化混合物以提供纯化的缀合物(例如,Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)。

[0247] 备选地,维持步骤可以在纯化缀合物后进行,随后进行额外的纯化步骤。

[0248] 在一个优选实施方案中,在维持步骤之前允许反应推进至完成。在这个方面,维持步骤可以在包含抗体和药物(例如,DM1或DM4)的混合物与交联剂(例如,SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接触后约1小时至约48小时(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、或约24小时至约48小时)后进行。

[0249] 维持步骤包括将溶液维持在合适的温度(例如,约0℃至约37℃)持续合适的时间段(例如,约1小时至约1周、约1小时至约24小时、约1小时至约8小时或约1小时至约4小时)以从抗体释放不稳定结合的接头,同时基本上不从抗体释放稳定结合的接头。在一个实施方案中,维持步骤包括将溶液维持在约20℃或更低温度(例如,约0℃至约18℃、约4℃至约16℃)、在室温(例如,约20℃至约30℃或约20℃至约25℃),或在升高的温度(例如,约30℃至约37℃)。在一个实施方案中,维持步骤包括将溶液维持在约16℃至约24℃(例如,约15℃、约16℃、约17℃、约18℃、约19℃、约20℃、约21℃、约22℃、约23℃、约24℃或约25℃)的温度。在另一个实施方案中,维持步骤包括将溶液维持在约2℃至约8℃(例如,约0℃、约1℃、约2℃、约3℃、约4℃、约5℃、约6℃、约7℃、约8℃、约9℃或约10℃)的温度。在另一个实施方案中,维持步骤包括将溶液维持在约37℃(例如,约34℃、约35℃、约36℃、约37℃、约38℃、约39℃或约40℃)的温度。

[0250] 维持步骤的持续时间取决于实施维持步骤的温度和pH。例如,可以通过在升高的温度实施维持步骤大幅度减少维持步骤的持续时间,最高温度受细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的稳定性限制。维持步骤可以包括将溶液维持约1小时至约1天(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约12小时、约14小时、约16小时、约18小时、约20小时、约22小时、或约24小时)、约10小时至约24小时、约12小时至约24小时、约14小时至约24小时、约16小时至约24小时、约18小时至约24小时、约20小时至约24小时、约5小时至约1周、约20小时至约1周、约12小时至约1周(例如,约12小时、约16小时、约20小时、约24小时、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天)或约1天至约1周。

[0251] 在一个实施方案中,维持步骤包括将溶液维持在约2℃至约8℃的温度持续至少约12小时、至多一周的时间。在另一个实施方案中,维持步骤包括将溶液维持在约2℃至约8℃的温度过夜(例如,约12至约24小时,优选地约20小时)。

[0252] 用于维持步骤的pH值优选地是约4至约10。在一个实施方案中,用于维持步骤的pH值是约4或更大,但是小于约6(例如,4至5.9)或约5或更大,但是小于约6(例如,5至5.9)。在另一个实施方案中,用于维持步骤的pH值范围从约6至约10(例如,约6.5至约9、约6至约8)。例如,用于维持步骤的pH值可以是约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5或约10。

[0253] 在具体实施方案中,维持步骤可以包含将混合物在25℃在pH约6-7.5温育约12小时至约1周,将混合物在4℃在pH约4.5-5.9温育约5小时至约5天,或将混合物在25℃在pH约4.5-5.9温育约5小时至约1天。

[0254] 单步骤法可以任选地包括向反应步骤添加蔗糖以增加溶解度和回收缀合物。合乎需要地,蔗糖以约0.1% (w/v) 至约20% (w/v) (例如,约0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v) 或20% (w/v)) 的浓度添加。优选地,蔗糖以约1% (w/v) 至约10% (w/v) (例如,约0.5% (w/v)、约1% (w/v)、约1.5% (w/v)、约2% (w/v)、约3% (w/v)、约4% (w/v)、约5% (w/v)、约6% (w/v)、约7% (w/v)、约8% (w/v)、约9% (w/v)、约10% (w/v) 或约11% (w/v)) 的浓度添加。此外,反应步骤还可以包括添加缓冲剂。可以使用本领域已知的任何合适缓冲剂。合适的缓冲剂例如包括柠檬酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和磷酸盐缓冲剂。在一个实施方案中,缓冲剂选自HEPPSO (N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-羟基丙磺酸))、POPSO (哌嗪-1,4-双-(2-羟-丙烷-磺酸)脱水物)、HEPES (4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸)、HEPPS (EPPS) (4-(2-羟乙基)哌嗪-1-丙磺酸)、TES (N-[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸) 及其组合。

[0255] 在一个实施方案中,单步骤法还可以包括纯化混合物以提供纯化的缀合物(例如,Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)的步骤。本领域已知的任何纯化方法可以用来纯化本发明的缀合物。在一个实施方案中,使用切线流过滤(TFF)、非吸附性层析、吸附性层析、吸收性过滤、选择性沉淀或任何其他合适的纯化过程以及其组合纯化本发明的缀合物。在另一个实施方案中,在使缀合物经历上文描述的纯化过程之前,首先通过一个或多个PVDF膜过滤缀合物。备选地,在使缀合物经历上文描述的纯化过程之后,通过一个或多个PVDF膜过滤缀合物。例如,在一个实施方案中,将缀合物通过一个或多个PVDF膜过滤并且随后使用切线流过滤法纯化。备选地,将缀合物使用切线流过滤法纯化并且随后通过一个或多个PVDF膜过滤。

[0256] 任何合适的TFF系统可以用于纯化,包括Pellicon型系统(Millipore,Billerica,MA)、Sartocon Cassette系统(Sartorius AG,Edgewood,NY),和Centrasette型系统(Pall Corp.,East Hills,NY)。

[0257] 任何合适的吸附性层析树脂可以用于纯化。优选的吸附性层析树脂包括羟基磷灰石层析、疏水性电荷诱导层析(HCIC)、疏水相互作用层析(HIC)、离子交换层析、混合模式离子交换层析、固定化金属亲和层析(IMAC)、染料配体层析、亲和层析、反相层析及其组合。合适的羟基磷灰石树脂的例子包括陶瓷羟基磷灰石(CTH I型和II型,Biorad Laboratories,Hercules,CA)、HA Ultrogel羟基磷灰石(Pall Corp.,East Hills,NY)和陶瓷氟磷灰石(CFT I型和II型,Biorad Laboratories,Hercules,CA)。合适的HCIC树脂的例子是MEP Hypercel树脂(Pall Corp.,East Hills,NY)。合适的HIC树脂的例子包括丁基-琼脂糖凝胶、己基-琼脂糖凝胶、苯基-琼脂糖凝胶和辛基琼脂糖凝胶树脂(全部来自GE Healthcare,Piscataway,NJ)以及Macro-prep甲基树脂和Macro-Prep叔丁基树脂(Biorad Laboratories,Hercules,CA)。合适的离子交换树脂的例子包括SP-琼脂糖凝胶、CM-琼脂糖凝胶和Q-琼脂糖凝胶树脂(全部来自GE Healthcare,Piscataway,NJ)和Unosphere S树脂(Biorad Laboratories,Hercules,CA)。合适的混合模式离子交换剂的例子包括Bakerbond ABx树脂(JT Baker,Phillipsburg NJ)。合适的IMAC树脂的例子包含螯合琼脂

糖凝胶树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Profinity IMAC 树脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。合适的染料配体树脂的例子包括蓝色琼脂糖凝胶树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和 Affi-凝胶蓝色树脂 (Biorad Laboratories, Hercules, CA)。合适的亲和树脂的例子包括蛋白 A 琼脂糖凝胶树脂 (例如, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) 和凝集素亲和树脂, 例如兵豆凝集素琼脂糖凝胶树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), 其中抗体携带适宜的凝集素结合位点。合适的反相树脂的例子包括 C4、C8 和 C18 树脂 (Grace Vydac, Hesperia, CA)。

[0258] 任何合适的非吸附性层析树脂可以用于纯化。合适的非吸附性层析树脂的例子包括但不限于 SEPHADEXTMG-25、G-50、G-100、SEPHACRYLTM 树脂 (例如, S-200 和 S-300)、SUPERDEXTM 树脂 (例如, SUPERDEXTM75 和 SUPERDEXTM200)、**BIO-GEL®** 树脂 (例如, P-6、P-10、P-30、P-60 和 P-100) 和本领域普通技术人员已知的其他树脂。

[0259] 两步骤法和单罐法

[0260] 在一个实施方案中, 本发明的缀合物可以如美国专利 7,811,572 和美国专利申请公开号 2006/0182750 中所述制备。这种方法包括步骤: (a) 使本发明的抗体与交联剂 (例如, SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB 或 CX1-1) 接触, 以将接头 (即, Ab-SMCC、Ab-SPDB 或 Ab-CX1-1) 共价连接至抗体并因而制备包含具有与之结合的接头的抗体的第一混合物; (b) 任选地使第一混合物经历纯化过程以制备具有与之结合的接头的抗体的纯化的第一混合物; (c) 通过在具有 pH 约 4 至约 9 的溶液中使具有与之结合的接头的抗体与药物 (例如, DM1 或 DM4) 反应, 使药物 (例如, DM1 或 DM4) 与第一混合物中具有与之结合的接头的抗体缀合以制备包含 (i) 缀合物 (例如, Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4 或 Ab-CX1-1-DM1)、(ii) 游离药物 (例如, DM1 或 DM4); 和 (iii) 反应副产物的第二混合物; 和 (d) 使第二混合物经历纯化过程以将缀合物从第二混合物的其他组分纯化。备选地, 可以省略纯化步骤 (b)。本文所述的任何纯化方法可以用于步骤 (b) 和 (d)。在一个实施方案中, TFF 用于步骤 (b) 和步骤 (d)。在另一个实施方案中, TFF 是用于步骤 (b) 并且吸附性层析 (例如, CHT) 用于步骤 (d)。

[0261] 单步骤试剂和原位法

[0262] 在一个实施方案中, 可以通过如下方式制备本发明的缀合物: 使预先形成的药物-接头化合物 (例如, SMCC-DM1、磺基-SMCC-DM1、SPDB-DM4 或 CX1-1-DM1) 与本发明的抗体缀合, 如美国专利 6,441,163 和美国专利申请公开号 2011/0003969 和 2008/0145374 中所述, 随后实施纯化步骤。可以使用本文所述的任何纯化方法。通过使药物 (例如, DM1 或 DM4) 与交联剂 (例如, SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB 或 CX1-1) 反应制备药物-接头化合物。药物-接头化合物 (例如, SMCC-DM1、磺基-SMCC-DM1、SPDB-DM4 或 CX1-1-DM1) 任选地与抗体缀合之前经历纯化。

[0263] 抗 P-钙黏着蛋白抗体

[0264] 本发明提供与人 P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段 (例如, 抗原结合片段)。本发明的抗体或抗体片段 (例如, 抗原结合片段) 包括但不限于如以下实施例中所述那样分离的人单克隆抗体或其片段。

[0265] 在某些实施方案中, 本发明提供特异性结合 P-钙黏着蛋白的抗体或抗体片段 (例如, 抗原结合片段), 所述抗体或抗体片段 (例如, 抗原结合片段) 包含具有 SEQ ID NO: 7、27、47、67、87 或 107 的氨基酸序列的 VH 结构域。在某些实施方案中, 本发明还提供与 P-钙黏着蛋

白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)尤其包含具有表1中所列任一个VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。在具体的实施方案中,本发明提供与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述抗体尤其包含(或备选地,由其组成)一个、两个、三个、四个、五个或更多个具有下表1中所列任一个VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。

[0266] 本发明提供特异性结合于P-钙黏着蛋白的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含具有SEQ ID NO:17、37、57、77、97或117的氨基酸序列的VL结构域。本发明还提供与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)尤其包含具有下表1中所列任一个VL CDR的氨基酸序列的VL CDR。特别地,本发明提供与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)尤其包含(或备选地,由其组成)一个、两个、三个或更多具有表1中所列任一个VL CDR的氨基酸序列的VL CDR。

[0267] 本发明的其他抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含已经被突变的氨基酸,然而在CDR区内与表1中所述的序列描述的CDR区具有至少60%、70%、80%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,所述抗体包含突变氨基酸序列,其中与表1所述序列中描述的CDR相比时,已经突变CDR区内不多于1、2、3、4或5个氨基酸。

[0268] 本发明还提供了编码与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。这些核酸序列可以为哺乳动物细胞中的表达而优化。

[0269] 表1. 本发明的抗P-钙黏着蛋白抗体的例子

[0270]

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	描述	序列
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	SQSAAWN
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	RIYYRSKWYNDYALSVKS
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	GEGYGREGFAI
SEQ ID NO: 4	HCDR1	GDSVSSQSA

[0271]

	(Chothia)	
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	YYRSKWY
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (Chothia)	GEGYGREGFAI
SEQ ID NO: 7	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISG DSVSSQSAAWN WIRQSPSRGLEWLG RIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEG YGREGFAIWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 8	DNA VH	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGC CCTGGCCTGGTCAAGCCTAGTCAGA CCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAG CGGCGATAGTGTGTCTAGTCAGTCA GCCGCCTGGAAGTGGATTAGACAG TCACCCTCTAGGGGGCCTGGAGTGG CTGGGTAGAATCTACTATAGGTCTA AGTGGTATAACGACTACGCCCTGAG CGTGAAGTCTAGGATCACTATTAAC CCCGACACCTCTAAGAATCAGTTTA GCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCC CCGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGCTAGAGGCGAGGGCTACGGTAG AGAGGGCTTCGCTATCTGGGGTCA GGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAG C
SEQ ID NO: 9	重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISG DSVSSQSAAWN WIRQSPSRGLEWLG RIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEG YGREGFAIWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF

[0272]

		PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 10	DNA 重链	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGC CCTGGCCTGGTCAAGCCTAGTCAGA CCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAG CGGCGATAGTGTGTCTAGTCAGTCA GCCGCCTGGAAGTGGATTAGACAG TCACCCTCTAGGGGCCTGGAGTGG CTGGGTAGAATCTACTATAGGTCTA AGTGGTATAACGACTACGCCCTGAG CGTGAAGTCTAGGATCACTATTAAC CCCGACACCTCTAAGAATCAGTTTA GCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCC CCGAGGACACCGCCGTCTACTACTG CGCTAGAGGCGAGGGCTACGGTAG AGAGGGCTTCGCTATCTGGGGTCA GGGCACCCTGGTCACCGTGTCTAG CGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGT GTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG TCTACTTCCGGCGGAAGTGTGCCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTT CCCCGAGCCCGTGACAGTGTCCTG

[0273]

GA ACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC
GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGC
AGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGA
GCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCA
GCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT
CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT
GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC
CCACACCTGCCCCCCCCTGCCCAGCT
CCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC
GTGTTCTGTTCccccccaAGCCCA
AGGACACCCTGATGATCAGCAGGA
CCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG
TGGACGTGTCCCACGAGGACCCAG
AGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA
AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT
ACAACAGCACCTACAGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG
ACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA
AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCT
GCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATC
AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGG
GAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCC
CCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGG
TGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATAT
CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG
CCAGCCCCGAGAACA ACTACAAGAC
CACCCCCCAGTGCTGGACAGCGA
CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG
CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGG

[0274]

		CAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	RASQTISNTLA
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	AASNLQS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QQYLSWFT
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	SQTISNT
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	YLSWF
SEQ ID NO: 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ TISNTLAWYQQKPGKAPKLLIYAASN LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYLSWFTFGQGGTKVEI K
SEQ ID NO: 18	DNA VL	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTA GTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCG ATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGC CTCTCAGACTATCTCTAACACCCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGT AAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACG CCGCCTCTAACCTGCAGTCAGGCGT GCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCTGACTA TTAGTAGCCTGCAGCCCGAGGACTT CGCTACCTACTACTGTCAGCAGTAC

[0275]

		CTGAGCTGGTTCACCTTCGGTCAGG GCACTAAGGTCGAGATTAAG
SEQ ID NO: 19	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ TISNTLAWYQQKPKGAPKLLIYAASN LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQYLSWFTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
SEQ ID NO 20:	DNA 轻链	GATATTCAGATGACTCAGTCACCTA GTAGCCTGAGCGCTAGTGTGGGCG ATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGC CTCTCAGACTATCTCTAACACCCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGT AAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTACG CCGCCTCTAACCTGCAGTCAGGCGT GCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCTGACTA TTAGTAGCCTGCAGCCCGAGGACTT CGCTACCTACTACTGTTCAGCAGTAC CTGAGCTGGTTCACCTTCGGTCAGG GCACTAAGGTCGAGATTAAGCGTAC GGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATC TTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTG AAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCC GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGC AGGACAGCAAGGACTCCACCTACA

[0276]

		GCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCATA AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
--	--	---

[0277]

NEG0012		
SEQ ID NO: 21	HCDR1 (Kabat)	DHTIH
SEQ ID NO: 22	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSINYNEKFKG
SEQ ID NO: 23	HCDR3 (Kabat)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 24	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 25	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 26	HCDR3 (Chothia)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 27	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSG YTFTDHTIHWMRQMPGKGLEWMG YIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSS STAYLQWSSLKASDTAMYYCARRNL FLPMEYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 28	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCGAG TCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCT CAGGCTACACCTTCACCGATCACAC TATTCAGTGGATGAGACAGATGCC CGGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGG

[0278]

		CTATATCTACCCTAGATCAGGCTCT ATTA ACTATAACGAGAAGTTTAAGG GTCAGGTCACAATTAGCGCCGATA AGTCTAGCTCTACCGCCTACCTGCA GTGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGA CACCGCTATGTACTACTGCGCTAGA CGTAACCTGTTCTGCCTATGGAAT ACTGGGGTCAGGGCACCTGGTCA CCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 29	重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSG YTFTDHTIHWMRQMPGKGLEWMG YIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSS STAYLQWSSLKASDTAMYYCARRNL FLPMEYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 30	DNA 重链	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCGAG TCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCT CAGGCTACACCTTCACCGATCACAC TATCACTGGATGAGACAGATGCC

[0279]

CGGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGG
CTATATCTACCCTAGATCAGGCTCT
ATTA ACTATAACGAGAAGTTTAAGG
GTCAGGTCACAATTAGCGCCGATA
AGTCTAGCTCTACCGCCTACCTGCA
GTGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGA
CACCGCTATGTACTACTGCGCTAGA
CGTAACCTGTTCTCCTGCCTATGGAAT
ACTGGGGTTCAGGGCACCCTGGTCA
CCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGG
GCCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCC
CCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCG
GAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGG
TGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCG
TGACAGTGTCTCTGGA ACTCTGGGG
CTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTT
CCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG
CCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT
GACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG
AACC CAGACCTATATCTGCAACGTG
AACCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAG
AGCTGCGACAAGACCCACACCTGC
CCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTG
CTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTG
TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACC
CTGATGATCAGCAGGACCCCCGAG
GTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG
TCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAG
CCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC

[0280]

		ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAA GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCC CCAATCGAAAAGACAATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCC CAGGTGTACACCCTGCCCCCAGC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAG CCCGAGAACAACACTACAAGACCACC CCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA CCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCAGAAAGTCCCTGAGCCT GAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 31	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGDQKNYLT
SEQ ID NO: 32	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 33	LCDR3 (Kabat)	QNDYRYPLT
SEQ ID NO: 34	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGDQKNY
SEQ ID NO: 35	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 36	LCDR3 (Chothia)	DYRYPL
SEQ ID NO: 37	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQ

[0281]

		SLLSSGDQKNYLTWYLQKPGQSPQL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYRYPLTF GQGTKLEIK
SEQ ID NO: 38	DNA VL	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCC TGAGCCTGCCCCGTGACCCCTGGCG AGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATC TAGTCAGTCACTGCTGTCTAGCGG CGATCAGAAGAACTACCTGACCTG GTATCTGCAGAAGCCCGGTCAGTC ACCTCAGCTGCTGATCTACTGGGC CTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCC CGATAGGTTTAGCGGTAGCGGTAG TGGCACCGACTTCACCCTGAAGATC TCTAGGGTGGAAGCCGAGGACGTG GGCGTCTACTACTGTCAGAACGAC TATAGATACCCCCTGACCTTCGGTC AGGGCACTAAGCTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 39	轻链	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLSSGDQKNYLTWYLQKPGQSPQL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYRYPLTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 40:	DNA 轻链	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCC TGAGCCTGCCCCGTGACCCCTGGCG AGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATC TAGTCAGTCACTGCTGTCTAGCGG CGATCAGAAGAACTACCTGACCTG

[0282]

		GTATCTGCAGAAGCCCGGTCAGTC ACCTCAGCTGCTGATCTACTGGGC CTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCC CGATAGGTTTAGCGGTAGCGGTAG TGGCACCGACTTCACCCTGAAGATC TCTAGGGTGGAAGCCGAGGACGTG GGCGTCTACTACTGTCAGAACGAC TATAGATACCCCCTGACCTTCGGTC AGGGCACTAAGCTGGAGATTAAGC GTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGT TCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCA GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTAC CCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTG ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCC GTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGC GAGTGC
--	--	---

[0283]

NEG0013		
SEQ ID NO: 41	HCDR1 (Kabat)	DHTIH
SEQ ID NO: 42	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSINYNEKFKG
SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Kabat)	RNLFLPMEY

[0284]

SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Chothia)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 47	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVS GYTFTDHTIHWMRQMPGKGLEWM GYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADK SSSTAYLQWSSLKASDTAMYVCARR NLFLPMEYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 48	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCCGA GTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGT CTCAGGCTACACCTTCACCGATCA CACTATTCAGTGGATGAGACAGAT GCCCCGGTAAAGGCCTGGAGTGGAT GGGCTATATCTACCCTAGATCAGG CTCTATTAACATAACGAGAAGTTT AAGGGTCAGGTCACAATTAGCGCC GATAAGTCTAGCTCTACCGCCTAC CTGCAGTGGTCTAGCCTGAAGGCT AGTGACACCGCTATGTACTACTGC GCTAGACGTAACCTGTTCTGCCT ATGGAATACTGGGGTCAGGGCACC CTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 49	重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVS GYTFTDHTIHWMRQMPGKGLEWM GYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADK SSSTAYLQWSSLKASDTAMYVCARR NLFLPMEYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY

[0285]

		FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 50	DNA 重链	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCCGA GTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGT CTCAGGCTACACCTTCACCGATCA CACTATTCAGTGGATGAGACAGAT GCCCGGTAAAGGCCTGGAGTGGAT GGGCTATATCTACCCTAGATCAGG CTCTATTAACATAACGAGAAGTTT AAGGGTCAGGTCACAATTAGCGCC GATAAGTCTAGCTCTACCGCCTAC CTGCAGTGGTCTAGCCTGAAGGCT AGTGACACCGCTATGTACTACTGC GCTAGACGTAACCTGTTCTGCCT ATGGAATACTGGGGTCAGGGCACC CTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGC ACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCC CTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACT TCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGT TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACAGTGTCTGGAAC

[0286]

TCTGGGGCTCTGACTTCCGGGCGTG
CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG
AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC
AGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGC
TCTCTGGGAACCCAGACCTATATC
TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG
GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC
CACACCTGCCCCCCCCTGCCCAGCT
CCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC
GTGTTCCCTGTTCCCCCCCCAAGCCC
AAGGACACCCTGATGATCAGCAGG
ACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG
GTGGACGTGTCCACGAGGACCCA
GAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC
AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAG
TACAACAGCACCTACAGGGTGGTG
TCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GACTGGCTGAACGGCAAAGAATAC
AAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCC
CTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACA
ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCA
CGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTG
CCCCCAGCCGGGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT
CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC
GATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AACGGCCAGCCCGAGAACAACACTAC
AAGACCACCCCCCAGTGCTGGAC
AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC
AGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC

[0287]

		AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 51	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLSSGNQKNYLT
SEQ ID NO: 52	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 53	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPLT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Chothia)	SQSLLSSGNQKNY
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Chothia)	DYSYPL
SEQ ID NO: 57	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQ SLLSSGNQKNYLTWYLQKPGQSPQL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYSYPLTF GQGTELEIK
SEQ ID NO: 58	DNA VL	GATATCGTGATGACTCAGACCCCC CTGAGCCTGCCCCGTGACCCCTGGC GAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGA TCTAGTCAGTCACTGCTGTCTAGC GGTAATCAGAAGAACTACCTGACC TGGTATCTGCAGAAGCCCGGTCAG TCACCTCAGCTGCTGATCTACTGG GCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTG CCCGATAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCTGAAG ATCTCTAGGGTGGAAGCCGAGGAC

[0288]

		GTGGGCGTCTACTACTGTCAGAAC GACTATAGCTACCCCCTGACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATT AAG
SEQ ID NO: 59	轻链	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQ SLLSSGNQKNYLTWYLQKPGQSPQL LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYSYPLTF GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 60:	DNA 轻链	GATATCGTGATGACTCAGACCCCC CTGAGCCTGCCCGTGACCCCTGGC GAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGA TCTAGTCAGTCACTGCTGTCTAGC GGTAATCAGAAGAACTACCTGACC TGGTATCTGCAGAAGCCCGGTCAG TCACCTCAGCTGCTGATCTACTGG GCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTG CCCGATAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCTGAAG ATCTCTAGGGTGGAAGCCGAGGAC GTGGGCGTCTACTACTGTCAGAAC GACTATAGCTACCCCCTGACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATT AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGC GTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC AGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG

[0289]

		CAGTGGGAAGGTGGACAACGCCCTG CAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG CGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAC CCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTG CGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAA CAGGGGCGAGTGC
--	--	--

[0290]

NEG0016		
SEQ ID NO: 61	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
SEQ ID NO: 62	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNENFRG
SEQ ID NO: 63	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 64	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 65	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 66	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 67	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVS GYTFTDHTLHWMRQAPGQGLEWM GYIYPRSGSTKYNENFRGRVTITADT SSSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRL LFLPLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 68	DNA VH	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCT AGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTC

[0291]

		TCAGGCTACACCTTCACCGATCAC ACCCTGCACTGGATGAGACAGGCC CCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATG GGCTATATCTACCCTAGATCAGGC TCTACTAAGTATAACGAGAACTTTA GGGGTAGAGTGACTATCACCGCCG AACTAGCTCTAGCACCGCCTATA TGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAG AGGACACCGCCGTCTACTACTGCG CTAGACGGCTGCTGTTCTGCCCC TGGACTACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 69	重链	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKVS GYFTDHTLHWMRQAPGQGLEWM GYIYPRSGSTKYNENFRGRVTITADT SSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRL LFLPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 70	DNA 重链	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCT

[0292]

AGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTC
TCAGGCTACACCTTCACCGATCAC
ACCCTGCACTGGATGAGACAGGCC
CCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATG
GGCTATATCTACCCTAGATCAGGC
TCTACTAAGTATAACGAGAACTTTA
GGGGTAGAGTGACTATCACCGCCG
ACACTAGCTCTAGCACCGCCTATA
TGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAG
AGGACACCGCCGTCTACTACTGCG
CTAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCCC
TGGACTACTGGGGTCAGGGCACCC
TGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCA
CTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCC
TGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTT
CCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCG
AGCCCGTGACAGTGTCCCTGGAAGT
CTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGC
ACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA
GCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCA
GCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCT
CTCTGGGAACCCAGACCTATATCT
GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG
AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC
ACACCTGCCCCCCCCTGCCCAGCTC
CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCG
TGTTCCCTGTTCCCCCCCCAAGCCCA
AGGACACCCTGATGATCAGCAGGA
CCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG
TGGACGTGTCCCACGAGGACCCAG

[0293]

		AGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGTGGTGT CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCC TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAC GGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC CCCCAGCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACA AGACCACCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCA GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC TGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 71	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT
SEQ ID NO: 72	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 73	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT
SEQ ID NO: 74	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY
SEQ ID NO: 75	LCDR2 (Chothia)	WAS

[0294]

SEQ ID NO: 76	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF
SEQ ID NO: 77	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSS QSLSSGNQKSYLTWYQQKPGQAPR LLIWASTRESGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFT FGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 78	DNA VL	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCC GCTACCCTGAGCCTGAGCCCTGGC GAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGA TCTAGTCAGTCACTGCTGTCTAGC GGTAATCAGAAGTCCTACCTGACC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAG GCCCCTAGACTGCTGATCTACTGG GCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATC CCCGCTAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCTGACT ATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCCGTCTACTACTGTCAGAAC GACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATT AAG
SEQ ID NO: 79	轻链	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSS QSLSSGNQKSYLTWYQQKPGQAPR LLIWASTRESGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 80:	DNA 轻链	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCC

[0295]

		GCTACCCTGAGCCTGAGCCCTGGC GAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGA TCTAGTCAGTCACTGCTGTCTAGC GGTAATCAGAAGTCCTACCTGACC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAG GCCCCTAGACTGCTGATCTACTGG GCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATC CCCGCTAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCTGACT ATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCCGTCTACTACTGTCAGAAC GACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATT AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGC GTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC AGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTG CAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG CGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAC CCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTG CGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAA CAGGGGCGAGTGC
--	--	---

[0296]

NEG0064		
SEQ ID NO: 81	HCDR1 (Kabat)	DHTLH

[0297]

SEQ ID NO: 82	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNNENFRG
SEQ ID NO: 83	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 84	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 85	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 86	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 87	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVS GYTFTDHTLHWMRQAPGQGLEWM GYIYPRSGSTKYNNENFRGRVTITADT SSSTAYMELSSLRSED TAVYYCVRRL LFLPLDYWGQGT LVT VSS
SEQ ID NO: 88	DNA VH	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCT AGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTC TCAGGCTACACCTTCACCGATCAC ACCCTGCACTGGATGAGACAGGCC CCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATG GGCTATATCTACCCTAGATCAGGC TCTACTAAGTATAACGAGAACTTTA GGGGTAGAGTGACTATCACCGCCG ACACTAGCTCTAGCACCGCCTATA TGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAG AGGACACCGCCGTCTACTACTGCG TCAGACGGCTGCTGTTCTGCCCC TGGACTACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 89	重链	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVS GYTFTDHTLHWMRQAPGQGLEWM

[0298]

		GYIYPRSGSTKYNNFRGRVTITADT SSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCVRRL LFLPLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 90	DNA 重链	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCT AGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTC TCAGGCTACACCTTCACCGATCAC ACCCTGCACTGGATGAGACAGGCC CCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATG GGCTATATCTACCCTAGATCAGGC TCTACTAAGTATAACGAGAACTTTA GGGGTAGAGTGACTATCACCGCCG ACACTAGCTCTAGCACCGCCTATA TGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAG AGGACACCGCCGTCTACTACTGCG TCAGACGGCTGCTGTTCTGCCCC TGGACTACTGGGGTCAGGGCACCC TGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCA CTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCC

[0299]

TGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTT
CCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTT
GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCG
AGCCCGTGACAGTGTCTGGAAGT
CTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGC
ACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGA
GCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCA
GCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCT
CTCTGGGAACCCAGACCTATATCT
GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG
AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC
ACACCTGCCCCCCCCTGCCCAGCTC
CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCG
TGTTCTGTTCccccccaAGCCCA
AGGACACCCTGATGATCAGCAGGA
CCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG
TGGACGTGTCCACGAGGACCCAG
AGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCA
AGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT
ACAACAGCACCTACAGGGTGGTGT
CCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG
ACTGGCTGAACGGCAAAGAATACA
AGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCC
TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAA
TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAC
GGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCA
AGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC
TGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG
ATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA

[0300]

		ACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACA AGACCACCCCCCCCAGTGCTGGACA GCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCA GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCC TGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 91	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT
SEQ ID NO: 92	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 93	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT
SEQ ID NO: 94	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY
SEQ ID NO: 95	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 96	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF
SEQ ID NO: 97	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSS QSLSSGNQKSYLTWYQQKPGQAPR LLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFT FGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 98	DNA VL	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCC GCTACCCTGAGCCTGAGCCCTGGC GAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGA TCTAGTCAGTCACTGCTGTCTAGC GGTAATCAGAAGTCCTACCTGACC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAG GCCCCTAGACTGCTGATCTACTGG

[0301]

		GCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATC CCCGCTAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCCTGACT ATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCCGTCTACTACTGTCAGAAC GACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATT AAG
SEQ ID NO: 99	轻链	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSS QSLSSGNQKSYLTWYQQKPGQAPR LLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDF TLTISLQPEDFAVYYCQNDYSYPFT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 100	DNA 轻链	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCC GCTACCCTGAGCCTGAGCCCTGGC GAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGA TCTAGTCAGTCACTGCTGTCTAGC GGTAATCAGAAGTCCTACCTGACC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAG GCCCCTAGACTGCTGATCTACTGG GCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATC CCCGCTAGGTTTAGCGGTAGCGGT AGTGGCACCGACTTCACCCCTGACT ATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGAC TTCGCCGTCTACTACTGTCAGAAC GACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATT AAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGC

[0302]

		GTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC AGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTG CAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAG CGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAC CCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTG CGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTC CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAA CAGGGGCGAGTGC
--	--	--

[0303]

NEG0067		
SEQ ID NO: 101	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
SEQ ID NO: 102	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNENFKG
SEQ ID NO: 103	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 104	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 105	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 106	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 107	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSG YTFTDHTLHWMRQAPGQGLEWMGY IYPRSGSTKYNENFKGRVTITADTSSS TAYMELSSLRSEDNAVYYCVRRLFL

[0304]

		PLDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 108	DNA VH	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCT AGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCT CAGGCTACACCTTCACCGATCACAC CCTGCACTGGATGAGACAGGCCCC AGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGG CTATATCTACCCTAGATCAGGCTCT ACTAAGTATAACGAGAACTTTAAGG GTAGAGTGACTATCACCGCCGACAC TAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGTCAGACG GCTGCTGTTCTGCCCCCTGGACTAC TGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACC GTGTCTAGC
SEQ ID NO: 109	重链	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSG YTFTDHTLHWMRQAPGQGLEWMGY IYPRSGSTKYNENFKGRVTITADTSSS TAYMELSSLRSEDNAVYYCVRRLLFL PLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD

[0305]

		KSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 110	DNA 重 链	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGC GCCGAAGTGAAGAAACCCGGCTCT AGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCT CAGGCTACACCTTCACCGATCACAC CCTGCACTGGATGAGACAGGCCCC AGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGG CTATATCTACCCTAGATCAGGCTCT ACTAAGTATAACGAGAACTTTAAGG GTAGAGTGACTATCACCGCCGACAC TAGCTCTAGCACCGCCTATATGGAA CTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGTCAGACG GCTGCTGTTCCCTGCCCCCTGGACTAC TGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACC GTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGC CCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAA CTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACA GTGTCCTGGAACCTCTGGGGCTCTGA CTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTA CAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGT GCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAG ACCTATATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAGACCCACACCTGCCCCCCCCTG CCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCCC

[0306]

		AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCG TGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGA GCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGA ATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAG ACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAG CGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAACGGCCAGCCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 111	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLSSGNQKSYLT
SEQ ID NO: 112	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 113	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT
SEQ ID NO: 114	LCDR1	SQSLLSSGNQKSY

[0307]

	(Chothia)	
SEQ ID NO: 115	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 116	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF
SEQ ID NO: 117	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQ SLLSSGNQKSYLTWYQQKPGQAPRL LIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQ GTKLEIK
SEQ ID NO: 118	DNA VL	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCG CTACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCG AGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATC TAGTCAGTCACTGCTGTCTAGCGGT AATCAGAAGTCCTACCTGACCTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCC CTAGACTGCTGATCTACTGGGCCTC TACTAGAGAGTCAGGGATCCCCGCT AGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGC ACCGACTTCACCCTGACTATCTCTA GCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCG TCTACTACTGTCAGAACGACTATAG CTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGC ACTAAGCTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 119	轻链	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQ SLLSSGNQKSYLTWYQQKPGQAPRL LIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP

[0308]

		VTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 120	DNA 轻链	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCG CTACCCTGAGCCTGAGCCCTGGCG AGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATC TAGTCAGTCACTGCTGTCTAGCGGT AATCAGAAGTCCTACCTGACCTGGT ATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCC CTAGACTGCTGATCTACTGGGCCTC TACTAGAGAGTCAGGGATCCCCGCT AGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGC ACCGACTTCACCCTGACTATCTCTA GCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCG TCTACTACTGTCAGAACGACTATAG CTACCCCTTCACCTTCGGTCAGGGC ACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACG GTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCT TCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCG GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCA GGACAGCAAGGACTCCACCTACAG CCTGAGCAGCACCTTGACCCTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGAC CAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG C

[0309] 本发明的其他抗体包括这些抗体,其中所述氨基酸或编码所述氨基酸的核酸已经被突变,仍与表1中描述的序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%同一性。在一些实施方案中,与表1所述序列中所示的可变区相比时,可变区中已经突变1、2、3、4或5个氨基酸,但基本保留与表1中所列抗体相同的治疗活性。

[0310] 由于这些抗体的每一种可以与P-钙黏着蛋白结合,可以“混合并匹配”VH、VL、全长轻链和全长重链序列(氨基酸序列和编码所述氨基酸序列的核苷酸序列)以产生本发明的其他P-钙黏着蛋白抗体。可以使用本领域已知的结合测定法(例如,ELISA,和实施例部分中

描述的其他测定法)测试这类“混合和匹配的”结合P-钙黏着蛋白的抗体。在混合和匹配这些链时,应当将来自具体VH/VL配对的VH序列替换为结构相似的VH序列。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列应当替换为结构上相似的全长重链序列。同样,从特定VH/VL配对的VL序列应当替换为结构上相似的VL序列。同样地,应当将来自具体全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列替换为结构相似的全长轻链序列。因此,在一个方面,本发明提供具有重链可变区和轻链可变区的分离的单克隆抗体或其抗原结合区,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:7、27、47、67、87和107的氨基酸序列;所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:17、37、57、77、97和117的氨基酸序列;其中抗体与P-钙黏着蛋白特异性结合。

[0311] 在另一个方面,本发明提供(i)具有全长重链和全长轻链的分离的单克隆抗体,所述全长重链包含选自SEQ ID NO:9、29、49、69、89和109的已经优化用于哺乳动物表达系统的细胞中表达的氨基酸序列;所述全长轻链包含选自SEQ ID NO:19、39、59、79、99和119的已经优化用于哺乳动物细胞中表达的氨基酸序列;或(ii)包含其抗原结合部分的有功能的蛋白质。

[0312] 在另一方面,本发明提供结合P-钙黏着蛋白的抗体,所述抗体包含表1中所述的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3或其组合。所述抗体的VH CDR1的氨基酸序列在SEQ ID NO:1、21、41、61、81和101中显示。所述抗体的VH CDR2的氨基酸序列在SEQ ID NO:2、22、42、62、82和102中显示。所述抗体的VH CDR3的氨基酸序列在SEQ ID NO:3、23、43、63、83和103中显示。所述抗体的VL CDR1的氨基酸序列在SEQ ID NO:11、31、51、71、91和111中显示。所述抗体的VL CDR2的氨基酸序列在SEQ ID NO:12、32、52、72、92和112中显示。所述抗体的VL CDR3的氨基酸序列在SEQ ID NO:13、33、53、73、93和113中显示。

[0313] 鉴于这些抗体的每一者均可以与P-钙黏着蛋白结合以及抗原结合特异性主要由CDR1区、CDR2区和CDR3区提供,可以将VH CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列和VL CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列“混合并匹配”(即,可以混合并匹配来自不同抗体的CDR)。可以使用本领域已知的结合测定法和实施例中描述的那些测定法(例如,ELISA)测试这类“混合和匹配的”结合P-钙黏着蛋白的抗体。当混合并匹配VH CDR序列时,来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应当替换为结构上相似的CDR序列。同样,当混合并匹配VL CDR序列时,来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应当替换为结构上相似的CDR序列。普通技术人员将轻易地明白,可以通过将一个或多个VH和/或VL CDR区序列取代为结构上相似的来自本文中对本发明单克隆抗所显示的CDR序列中的序列。

[0314] 因此,本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合区,所述分离的单克隆抗体或其抗原结合区包含了包含选自SEQ ID NO:1、21、41、61、81和101的氨基酸序列的重链CDR1;包含选自SEQ ID NO:2、22、42、62、82和102的氨基酸序列的重链CDR2;包含选自SEQ ID NO:3、23、43、63、83和103的氨基酸序列的重链CDR3;包含选自SEQ ID NO:11、31、51、71、91和111的氨基酸序列的轻链CDR1;包含选自SEQ ID NO:12、32、52、72、92和112的氨基酸序列的轻链CDR2;和包含选自SEQ ID NO:13、33、53、73、93和113的氨基酸序列的轻链CDR3;其中抗体特异性结合P-钙黏着蛋白。

[0315] 在一个具体实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含SEQ ID NO:1的重链CDR1;SEQ ID NO:2的重链CDR2;SEQ ID NO:3的重链CDR3;SEQ ID NO:11的轻链CDR1;SEQ ID NO:12的轻链CDR2;和SEQ ID NO:13的轻链CDR3。

[0316] 在另一个具体实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含SEQ ID NO:21的重链CDR1;SEQ ID NO:22的重链CDR2;SEQ ID NO:23的重链CDR3;SEQ ID NO:31的轻链CDR1;SEQ ID NO:32的轻链CDR2;和SEQ ID NO:33的轻链CDR3。

[0317] 在又一个实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含SEQ ID NO:41的重链CDR1;SEQ ID NO:42的重链CDR2;SEQ ID NO:43的重链CDR3;SEQ ID NO:51的轻链CDR1;SEQ ID NO:52的轻链CDR2;和SEQ ID NO:53的轻链CDR3。

[0318] 在又一个实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含SEQ ID NO:61的重链CDR1;SEQ ID NO:62的重链CDR2;SEQ ID NO:63的重链CDR3;SEQ ID NO:71的轻链CDR1;SEQ ID NO:72的轻链CDR2;和SEQ ID NO:73的轻链CDR3。

[0319] 在另一个具体实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含SEQ ID NO:81的重链CDR1;SEQ ID NO:82的重链CDR2;SEQ ID NO:83的重链CDR3;SEQ ID NO:91的轻链CDR1;SEQ ID NO:92的轻链CDR2;和SEQ ID NO:93的轻链CDR3。

[0320] 在又一个具体实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含SEQ ID NO:101的重链CDR1;SEQ ID NO:102的重链CDR2;SEQ ID NO:103的重链CDR3;SEQ ID NO:111的轻链CDR1;SEQ ID NO:112的轻链CDR2;和SEQ ID NO:113的轻链CDR3。

[0321] 在某些实施方案中,与P-钙黏着蛋白特异性结合的抗体是在表1中描述的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)。

[0322] 1. 鉴定表位和与相同表位结合的抗体

[0323] 在一个实施方案中,本发明提供与人P-钙黏着蛋白上的表位特异性结合的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述表位包含选自SEQ ID NO:126的位置124、125、151、153、154、155、156、159、160、161、162、163、168、170、171和172处的氨基酸中的一个或多个残基。在一些实施方案中,本发明提供包含重链的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述重链与人P-钙黏着蛋白在选自SEQ ID NO:126的位置124、151、153-156和172中的一个或多个氨基酸残基处结合。在其他实施方案中,本发明提供包含轻链的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段),所述轻链与人P-钙黏着蛋白在选自SEQ ID NO:126的位置124、125、155、156、159-163、168、170和171中的一个或多个氨基酸残基处结合。在一些实施方案中,抗体或抗体片段包含人P-钙黏着蛋白的重链结合互补位,所述重链结合互补位包含选自SEQ ID NO:128的位置52、54、56、60、65、105或107中的一个或多个氨基酸残基。在其他实施方案中,抗体或抗体片段包含人P-钙黏着蛋白的轻链结合互补位,所述轻链结合互补位包含选自SEQ ID NO:129的位置1、2、27、28、30、68、92、93或94中的一个或多个氨基酸残基。

[0324] 本发明还提供抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段),其特异性结合与表1中描述的抗P-钙黏着蛋白抗体相同的表位或与表1中描述的抗体交叉竞争。可以因此基于其在P-钙黏着蛋白结合测定法(例如,借助BIACORE或本领域技术人员已知用于测量结合作用的测定法)中与本发明的其他抗体交叉竞争(例如,以统计显著方式竞争性抑制结合作用)的能力,鉴定额外的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)。测试抗体抑制本发明的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)与P-钙黏着蛋白(例如,人P-钙黏着蛋白)结合的能力表明,测试

抗体可以同这种抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)竞争与P-钙黏着蛋白结合;根据非限制的理论,这种抗体可以与P-钙黏着蛋白上同该抗体竞争的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)相同或相关(例如,结构上相似或空间接近或重叠的)的表位结合。在某些实施方案中,与P-钙黏着蛋白上与表1中所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)相同的表位结合的抗体是人单克隆抗体或人源化单克隆抗体。可以如本文所述制备并分离这类人单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

[0325] 2.Fc区构架的进一步改变

[0326] 本发明的免疫缀合物可以包含修饰的抗体或其抗原结合片段,所述修饰的抗体或其抗原结合片段还在VH和/或VL内部包含对构架残基的修饰,例如以改善抗体的特性。在一些实施方案中,进行这种构架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方案是将一个或多个构架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地,已经历过体细胞突变的抗体可以含有与衍生该抗体的种系序列不同的构架残基。可以通过将抗体构架序列与衍生该抗体的种系序列比较而确定这类残基。为了使构架区序列恢复其种系构型,可以例如通过位点定向诱变,将体细胞突变“回复突变”成种系序列。此类“回复突变的”抗体也意在由本发明涵盖。

[0327] 另一个类型的构架修饰涉及使构架区内部、或甚至一个或多个CDR区内部的一个或多个残基突变,以移除T细胞表位,从而减少抗体的潜在免疫原性。该方法也称为“去免疫化”,并由Carr等人在美国专利公开号20030153043中更详细地描述。

[0328] 除构架区或CDR区内进行的修饰外或作为其备选,本发明的抗体可以经工程化以在Fc区内包含修饰,一般旨在改变抗体的一种或多种功能性质,如血清半寿期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,可化学修饰(例如,一个或多个化学部分可附着到抗体上)或修饰本发明的抗体以改变其糖基化,进而改变抗体的一种或多种功能性质。下文中进一步详细描述了这些实施方案中的每一个。

[0329] 在一个实施方案中,修饰CH1的铰链区,从而改变(例如增加或减少)铰链区中半胱氨酸残基的数目。这种方案由Bodmer等人在美国专利号5,677,425中进一步描述。改变CH1的铰链区中半胱氨酸残基的数目,例如旨在促进轻链和重链的装配或增加或减少抗体的稳定性。

[0330] 在另一实施方案中,突变抗体的Fc铰链区,以降低抗体的生物半寿期。更特别地,可以向Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区引入一个或多个氨基酸突变,使得抗体相对于天然的Fc铰链结构域SpA结合作用具有受损的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合作用。这种方案由Ward等人在美国专利号6,165,745中更详细地描述。

[0331] 还在其他实施方案中,通过将至少一个氨基酸残基替换为不同氨基酸残基改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可用不同氨基酸残基替换一个或多个氨基酸,使得抗体对效应子配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变了亲和力的效应子配体可以是例如,Fc受体或补体的C1组分。这种方案由Winter等人在例如美国专利号5,624,821和5,648,260中描述。

[0332] 在另一实施方案中,可用不同氨基酸残基替换选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸,使得抗体具有改变的C1q结合/或降低的或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这种方案由Idusogie等人在例如美国专利号6,194,551中描述。

[0333] 在另一实施方案中,改变一个或多个氨基酸残基,由此改变抗体固定补体的能力。

这种方案由Bodmer在例如PCT公开W0 94/29351中描述。在一个具体实施方案中,将本发明的抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸替换为一个或多个异型氨基酸残基,如图4中对于IgG1亚类和 κ 同种型所显示的那些。异型氨基酸残基还包括但不限于IgG1、IgG2和IgG3亚类的重链的恒定区以及 κ 同种型的轻链的恒定区,如Jefferis等人,MAbs.1:332-338 (2009)所描述。

[0334] 还在另一实施方案中,修饰Fc区以提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力,和/或通过修饰一个或多个氨基酸来增加抗体对Fc γ 受体的亲和力。这种方案由Presta在PCT公开W0 00/42072中描述。另外,已经定位人IgG1上Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改进的结合作用的变体(参见Shields等人, J.Biol.Chem.276:6591-6604,2001)。

[0335] 还在另一实施方案中,修饰抗体的糖基化。例如,可以产生无糖基化的抗体(即,缺少糖基化的抗体)。可以改变糖基化以便例如增加抗体对“抗原”的亲和力。这类糖修饰也可以通过例如改变抗体序列内部的一个或多个糖基化位点来完成。例如,可以产生一个或多个氨基酸取代,所述氨基酸取代导致消除一个或多个可变区构架糖基化位点,从而消除在这个位点处的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。在例如Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中描述这种方法。

[0336] 额外或备选地,可以产生一种抗体,所述抗体具有改变的糖基化类型,如岩藻糖残基数量减少的低岩藻糖化的抗体或具有增加的二分GlcNac结构的抗体。这类改变的糖基化模式已经展示增加抗体的ADCC能力。这类糖修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机器的宿主细胞中表达这种抗体而完成。已经在本领域中描述了具有改变的糖基化机器的细胞,并且该细胞可用作表达本发明重组抗体的宿主细胞,由此产生具有改变的糖基化的抗体。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述了编码岩藻糖基转移酶的FUT8基因在功能上遭破坏的细胞系,从而在这种细胞系中表达的抗体显示低岩藻糖化。Presta的PCT公开W0 03/035835描述了一种变异CHO细胞系(Lec13细胞),所述细胞系具有降低的将岩藻糖连接至Asn(297)连接的糖类的能力,这也导致在这种宿主细胞中表达的抗体低岩藻糖化(还见Shields等人,(2002) J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开W0 99/54342描述了经工程化以表达修饰糖蛋白的糖基转移酶(例如 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTIII))的细胞系,从而在这种工程化的细胞系中表达的抗体显示出增加的二分GlcNac结构,这导致抗体的增加的ADCC活性(还参见Umana等人,Nat.Biotech.17:176-180,1999)。

[0337] 在另一实施方案中,修饰抗体以增加其生物半寿期。多种方法是可能的。例如,可以引入以下一个或多个突变:T252L、T254S、T256F,如Ward的美国专利号6,277,375中所述。备选地,为了增加生物半寿期,可以在CH1或CL区内改变抗体以含有救援受体(salvage receptor)结合表位,所述救援受体结合表位取自IgG的Fc区的C_H2结构域的两个环,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。

[0338] 3.P-钙黏着蛋白抗体的产生

[0339] 可以通过本领域已知的任何手段产生抗P-钙黏着蛋白抗体及其抗体片段(例如,抗原结合片段),所述手段包括但不限于重组表达、化学合成和酶消化抗体四聚体,而可以通过例如杂交瘤或重组产生获得全长单克隆抗体。重组表达可以来自本领域已知的任何适宜宿主细胞,例如,哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。

[0340] 本发明进一步提供编码本文所述抗体的多核苷酸,例如,编码包含如本文所述的互补决定区的重链或轻链可变区或区段的多核苷酸。在一些实施方案中,编码重链可变区的多核苷酸与选自SEQ ID NO:8、28、48、68、88和108的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些实施方案中,编码轻链可变区的多核苷酸与选自SEQ ID NO:18、38、58、78、98和118的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[0341] 在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸与SEQ ID NO:10、30、50、70、90或110的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸与SEQ ID NO:20、40、60、80、100或120的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[0342] 本发明的多核苷酸可以仅编码抗P-钙黏着蛋白抗体的可变区序列。它们还可以编码抗体的可变区和恒定区。一些多核苷酸序列编码这样的多肽,所述多肽包含一种所列举的小鼠抗P-钙黏着蛋白抗体的重链和轻链的可变区。一些其他多核苷酸编码分别与一种小鼠抗体的重链可变区和轻链可变区基本上相同的两个多肽区段。

[0343] 可以通过从头固相DNA合成或通过PCR诱变编码抗P-钙黏着蛋白抗体或其结合片段的现有序列(例如,如下文实施例中所述的序列)产生这些多核苷酸序列。核酸的直接化学合成可以借助本领域已知的方法完成,如Narang等人,Meth.Enzymol.68:90,1979的磷酸三酯法;Brown等人,Meth.Enzymol.68:109,1979的磷酸二酯法;Beaucage等人,Tetra.Lett.,22:1859,1981的二乙基亚磷酰胺法;和美国专利号4,458,066的固相支持法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification,H.A.Erlich(编著),Freeman Press,NY,NY,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Innis等人(编著),Academic Press,San Diego,CA,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.19:967,1991;和Eckert等人,PCR Methods and Applications 1:17,1991中所述那样进行。

[0344] 本发明中还提供用于产生上文描述的P-钙黏着蛋白抗体的表达载体和宿主细胞。多种表达载体可以用来表达编码抗P-钙黏着蛋白抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的表达载体和非病毒表达载体都可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包含质粒、游离型载体,一般含有用于表达蛋白质或RNA的表达盒,和人类人工染色体(参见,例如,Harrington等人,Nat Genet 15:345,1997)。例如,可用于哺乳动物(例如人)细胞中表达抗P-钙黏着蛋白多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B和C、pcDNATM3.1/His、pEBVHis A、B和C(Invitrogen,圣迭戈,CA)、MPSV载体和本领域已知用于表达其他蛋白质的许多其他载体。可用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒的载体、基于SV40、乳头瘤病毒、HBP Epstein Barr病毒的载体、痘苗病毒载体和Semliki森林病毒(SFV)载体。参见,Brent等人,上文;Smith,Annu.Rev.Microbiol.49:807,1995;和Rosenfeld等人,Cell 68:143,1992。

[0345] 表达载体的选择依赖于待在其中表达该载体的预期宿主细胞。一般,表达载体含有与编码抗P-钙黏着蛋白抗体链或片段的多核苷酸有效连接的启动子和其他调节序列(例

如,增强子)。在一些实施方案中,用诱导型启动子来防止插入序列的表达,在诱导条件下除外。诱导型启动子包括,例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可在非诱导条件下扩大转化的生物培养物,而不偏向表达产物能更好地被宿主细胞耐受的编码序列群体。除启动子之外,也可能要求或需要其他调节元件用于高效表达抗P-钙黏着蛋白抗体链或片段。这些元件通常包括ATG起始密码子和邻近核糖体结合位点或其他序列。此外,可以通过纳入适用于所用细胞系统的增强子增强表达的效率(参见,例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.,153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可用于提高哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0346] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置以形成与多肽的融合蛋白,其中所述多肽由插入的抗P-钙黏着蛋白抗体序列编码。更经常地,插入的抗P-钙黏着蛋白抗体序列在纳入载体之前与信号序列连接。待用来接受编码抗P-钙黏着蛋白抗体轻链可变结构域和重链可变结构域的序列的载体有时还编码恒定区或其部分。此类载体允许可变区表达为与恒定区的融合蛋白,由此导致完整抗体或其片段的产生。通常,此类恒定区是人的恒定区。

[0347] 用于携带并表达抗P-钙黏着蛋白抗体链的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。大肠杆菌是可以用于克隆和表达本发明的多核苷酸的一种原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其他肠杆菌科(*Enterobacter*)如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷菌属(*Serratia*)和多种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。在这些原核宿主中,还可以产生一般含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)的表达载体。此外,将存在任何数目的多种熟知启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(*trp*)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常任选地与操纵基因序列一起控制表达,并具有核糖体结合位点序列等,用于起始并完成转录和翻译。其他微生物,如酵母,也可以用来表达本发明的抗P-钙黏着蛋白多肽。也可组合使用昆虫细胞与杆状病毒载体。

[0348] 在一些优选的实施方案中,哺乳动物宿主细胞用来表达并产生本发明的抗P-钙黏着蛋白多肽。例如,它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,如实施例所述的骨髓瘤杂交瘤克隆)或携带外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如,下文例举的SP2/0骨髓瘤细胞)。这包括任何正常的非永生的或正常或非正常的永生的动物细胞或人细胞。例如,已经开发出能够分泌完整免疫球蛋白的众多合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。哺乳动物组织细胞培养物表达多肽的用途通常例如在Winnacker,From Genes to Clones,VCH Publishers,N.Y.,N.Y.,1987中讨论。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列,如复制起点、启动子和增强子(参见,例如,Queen等人,Immunol.Rev.89:49-68,1986),和必需的加工信息位点如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多聚腺苷化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或来自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异的、阶段特异的和/或可调节或可控制的。可用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人CMV立即早期启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[0349] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型变动。例

如,氯化钙转染常用于原核细胞,而磷酸钙处理法或电穿孔法可以用于其他细胞宿主。(总体上参见Sambrook等人,上文)。其他方法包括例如电穿孔法、磷酸钙处理法、脂质体介导的转化法、注射法和微量注射法、生物射弹法、病毒体法、免疫脂质体法、聚阳离子:核酸缀合物法、裸DNA法、人工病毒粒法、与疱疹病毒结构蛋白VP22融合法(Elliot和O'Hare,Cell 88:223,1997)、试剂增强的DNA摄取法和离体转导法。对于重组蛋白质的长期高产率产生,通常期望稳定表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源表达元件和选择标记基因的本发明表达载体,制备稳定表达抗P-钙黏着蛋白抗体链或结合片段的细胞系。在引入该载体之后,可以允许细胞在富集培养基中生长1-2日,之后将它们转换至选择性培养基。选择标记目的是赋予选择抗性,并且它的存在允许成功表达所引入序列的细胞在选择性培养基中生长。抗性、稳定转染的细胞可以使用适于该细胞类型的组织培养技术增殖。

[0350] 治疗性和诊断性用途

[0351] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物可用于多种应用,包括但不限于治疗癌症,如实体癌。在某些实施方案中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物可用于抑制肿瘤生长、诱导分化、缩减肿瘤体积和/或减少肿瘤的致瘤性。使用方法可以是体外、离体或体内方法。

[0352] 在一个方面,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物可用于检测P-钙黏着蛋白在生物样品中的存在。如本文所用,术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,生物样品包括细胞或组织。在某些实施方案中,这类组织包含相对于其他组织以较高水平表达P-钙黏着蛋白的正常组织和/或癌组织。

[0353] 在一个方面,本发明提供一种检测P-钙黏着蛋白在生物样品中存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括使生物样品与抗P-钙黏着蛋白抗体在允许抗体与抗原结合的条件下接触,并且检测是否在抗体和抗原之间形成复合物。

[0354] 在一个方面,本发明提供一种诊断P-钙黏着蛋白表达增加相关的病症的方法。在某些实施方案中,该方法包括使测试细胞与抗P-钙黏着蛋白抗体接触;通过检测抗P-钙黏着蛋白抗体与P-钙黏着蛋白抗原的结合,(定量或定性)确定测试细胞上的P-钙黏着蛋白表达水平;并且比较测试细胞中的P-钙黏着蛋白表达水平与对照细胞(例如,与测试细胞相同的组织来源的正常细胞或按照与这种正常细胞可比较的水平表达P-钙黏着蛋白的细胞)上的P-钙黏着蛋白表达水平,其中与对照细胞相比,测试细胞上P-钙黏着蛋白的更高表达水平表示存在与P-钙黏着蛋白表达增加相关的病症。在某些实施方案中,测试细胞从疑似患有与P-钙黏着蛋白表达增加相关的病症的个体获得。在某些实施方案中,病症是细胞增殖性疾病,如癌症或肿瘤。在某些实施方案中,该方法包括测量P-钙黏着蛋白基因在测试细胞中的拷贝数。在某些实施方案中,该方法包括检测PAX-FOXO易位突变。可以使用本领域已知的标准方法,例如,PCR、RT-PCR等,检测基因的拷贝数和/或易位突变。

[0355] 在某些实施方案中,诊断或检测方法,如上文描述的那些,包括检测抗P-钙黏着蛋白抗体与细胞表面上或膜制备物中表达的P-钙黏着蛋白的结合,所述膜制备物从在其表面上表达P-钙黏着蛋白的细胞获得。用于检测抗P-钙黏着蛋白抗体与细胞表面上表达的P-钙黏着蛋白结合的示例性测定法是“FACS”测定法。

[0356] 某些其他方法可以用来检测抗P-钙黏着蛋白抗体与P-钙黏着蛋白的结合。这类方法包括但不限于本领域熟知的抗原结合测定法,如蛋白质印迹法、放射免疫测定、ELISA(酶

联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法、蛋白A免疫测定法和免疫组织化学(IHC)。

[0357] 在某些实施方案中,抗P-钙黏着蛋白抗体是标记的。标记物包括但不限于直接检测到的标记物或部分(如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记),以及间接检测到(例如借助酶促反应或分子相互作用)的部分,如酶或配体。

[0358] 在某些实施方案中,抗P-钙黏着蛋白抗体固定在不溶性基质上。固定能够将抗P-钙黏着蛋白抗体与在溶液中保持游离的任何P-钙黏着蛋白分离。通过使抗P-钙黏着蛋白抗体在分析流程之前不溶,如通过吸附至水不溶性基质或表面(Bennich等人,美国专利号3,720,760),或通过共价偶联(例如,使用戊二醛交联),或通过在抗P-钙黏着蛋白抗体和P-钙黏着蛋白之间形成复合物之后使抗P-钙黏着蛋白抗体不溶(例如,通过免疫沉淀法),常规地完成这一点。

[0359] 可以使用本发明的免疫缀合物替代抗P-钙黏着蛋白抗体或除抗P-钙黏着蛋白抗体外还使用本公开的免疫缀合物,实施诊断或检测的任一个以上实施方案。

[0360] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗或预防疾病的方法,所述方法包括施用本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物至患者。本发明也提供本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物治疗或预防患者中疾病的用途。在一些实施方案中,本发明提供本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物用于治疗或预防患者中的疾病。在其他实施方案中,本发明提供本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物在制造药物中的用途,所述药物用于治疗或预防患者中的疾病。

[0361] 在某些实施方案中,用本发明抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物治疗的疾病是癌症。在某些实施方案中,癌症以表达P-钙黏着蛋白的细胞为特征,本发明抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物结合所述细胞。在某些实施方案中,癌症以相对于健康患者而言P-钙黏着蛋白表达增加为特征。在一些实施方案中,可以通过P-钙黏着蛋白RNA的增加测量P-钙黏着蛋白的表达。在其他实施方案中,癌症以P-钙黏着蛋白的DNA拷贝数增加为特征。测量或确定p-钙黏着蛋白表达水平的其他方法是本领域技术人员已知的。可以治疗和/或防止的疾病的例子包括但不限于肾上腺皮质癌、膀胱癌、骨癌、乳腺癌、中枢神经系统非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤、结肠癌、结直肠癌、胚胎瘤、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、肝细胞癌、卡波西肉瘤、肝癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、卵巢癌、直肠癌、横纹肌肉瘤、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌、胃癌、子宫癌、阴道癌和外阴癌。

[0362] 本发明提供治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本发明抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物。在某些实施方案中,癌是实体癌。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,癌症是抗性癌和/或复发癌。在某些方面,例如,抗性癌抵抗酪氨酸激酶抑制剂,所述酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于EGFR抑制剂、Her2抑制剂、Her3抑制剂、IGFR抑制剂和Met抑制剂。在某些实施方案中,癌是Her2抗性癌。

[0363] 在某些实施方案中,本发明提供抑制肿瘤生长的方法,所述方法包含向受试者施用治疗有效量的本发明抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,受试者具有肿瘤或已经去除肿瘤。在某些实施

方案中,肿瘤抵抗其他酪氨酸激酶抑制剂,包括但不限于EGFR抑制剂、Her2抑制剂、Her3抑制剂、IGFR抑制剂和Met抑制剂。

[0364] 在某些实施方案中,肿瘤表达与抗P-钙黏着蛋白抗体结合的P-钙黏着蛋白。在某些实施方案中,肿瘤过量表达人P-钙黏着蛋白。在某些实施方案中,肿瘤具有增加的P-钙黏着蛋白基因拷贝数。

[0365] 本发明还提供选择患者以使用本发明抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物治疗的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物。在某些方面,该方法包括选择具有抗酪氨酸激酶抑制剂的癌的患者。在某些方面构思了抗酪氨酸激酶抑制剂的癌抵抗EGFR抑制剂、Her2抑制剂、Her3抑制剂、IGFR抑制剂和/或Met抑制剂。在某些方面构思了,抗性癌是Her2抗性癌。更具体地构思了Her2抗性癌不应答于曲妥珠单抗或曲妥珠单抗emtansine。在某些方面构思了癌症是从头抗性癌,并且在仍然其他方面,构思了癌是复发癌,例如Her2复发癌。在本发明的某些方面,方法包括选择患有从头抗性癌或复发癌的患者并测量P-钙黏着蛋白的表达。构思了在某些方面,复发癌或肿瘤起初不是表达P-钙黏着蛋白的癌或肿瘤,但是用酪氨酸激酶抑制剂(例如,曲妥珠单抗或曲妥珠单抗emtansine)治疗后,变成P-钙黏着蛋白阳性癌,所述阳性癌是抵抗酪氨酸激酶抑制剂的癌或肿瘤或复发癌或肿瘤。

[0366] 为了治疗疾病,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物的适宜剂量取决于多种因素,如待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和过程、疾病的反应性、既往疗法、患者临床史等。抗体或药物可以一次性或经一系列治疗施用,持续几日至几个月或直至实现治愈或实现疾病状态的减轻(例如,肿瘤尺寸减少)。最佳给药方案可以从测量患者身体内的药物蓄积量计算出来并且将根据各自抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物的相对效力变动。治疗医师可以基于药物在体液或组织中的实测停留时间和浓度,估计重复给药率。

[0367] 联合疗法

[0368] 在某些情况下,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物与其他治疗剂如其他抗癌剂、抗过敏剂、抗恶心剂(或镇吐剂)、镇痛剂、细胞保护剂及其组合组合。

[0369] 在一个实施方案中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物在作为联合疗法的药物联合制剂或给药方案中与具有抗癌特性的第二化合物组合。药物联合制剂或给药方案的第二化合物可以对该联合的抗体或免疫缀合物具有互补活性,从而它们没有彼此不利地影响彼此。例如,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物可以与但不限于化疗剂、酪氨酸激酶抑制剂、P-钙黏着蛋白下游信号传导途径抑制剂、IAP抑制剂、Bcl2抑制剂、Mcl1抑制剂和其他P-钙黏着蛋白抑制剂联合。

[0370] 如本文所用,术语“药物联合”指在一个剂量单位形式中的固定组合或用于联合施用的非固定组合或套药包,其中两种或更多种治疗剂可以在相同时间独立地施用或在各时间区间内分别施用,特别地其中这些时间区间允许联合配偶体显示合作性例如协同效应。

[0371] 术语“联合疗法”指施用两种或更多治疗剂以治疗本公开中描述的治疗性病状或病症。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,如以具有固定比率活性成分的单个胶囊施用。备选地,这种施用涵盖在多个容器中或在每种活性成分的独立容器(例

如,胶囊、粉末和液体)中共同施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所需的剂量。此外,这类施用也包括在大致相同的时间或在不同的时间顺序使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下,治疗方案将在治疗本文所述的病状或病症方面提供药物联合的有益作用。

[0372] 联合疗法可以提供“协同”并且证明是“协同的”,即,当所述活性成分一起使用时所实现的作用大于因分别使用这些化合物所产生的作用的总和。当活性成分如下处置时,可以实现协同效应:(1)共配制并且以组合的单位剂量剂型同时施用或递送;(2)作为分开的制剂交替或平行递送;或(3)通过一些其他方案。以交替疗法递送时,可以在依次(例如通过在独立注射器中不同的注射)施用或递送化合物时获得协同效应。通常,在交替疗法期间,将有效剂量的每种活性成分依次地即顺次地施用,而在联合疗法中,将有效剂量的两种或更多种活性成分一起施用。

[0373] 考虑用于联合疗法的一般化疗剂包括阿那曲唑(**Arimidex®**)、比卡鲁胺(**Casodex®**)、硫酸博来霉素(**Blenoxane®**)、白消安(**Myleran®**)、白消安注射液(**Busulfex®**)、卡培他滨(希罗达)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(**Paraplatin®**)、卡莫司汀(**BiCNU®**)、苯丁酸氮芥(**Leukeran®**)、顺铂(**Platinol®**)、克拉屈滨(**Leustatin®**)、环磷酰胺(**Cytoxan®**或**Neosar®**)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿糖核苷(**Cytosar-U®**)、阿糖胞苷脂质体注射液(**DepoCyt®**)、达卡巴嗪(**DTIC-Dome®**)、更生霉素(dactinomycin D)(放线菌素D,Cosmegen)、盐酸柔红霉素(**Cerubidine®**)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射剂(**DaunoXome®**)、地塞米松、多西紫杉醇(**Taxotere®**)、盐酸多柔比星(阿霉素®,**Rubex®**)、依托泊苷(**Vepesid®**)、磷酸氟达拉滨(**Fludara®**)、5-氟尿嘧啶(**Adrucil®**,**Efudex®**)、氟他胺(**Eulexin®**)、替扎他滨(tezacitibine)、吉西他滨(difluorodeoxycitidine)、羟基脲(**Hydrea®**)、伊达比星(**Idamycin®**)、异环磷酰胺(**IFEX®**)、伊立替康(**Camptosar®**)、L-天冬酰胺酶(**ELSPAR®**)、甲酰四氢叶酸钙、美法仑(**Alkeran®**)、6-巯基嘌呤(嘌呤)、甲氨蝶呤(**Folex®**)、米托蒽醌(**Novantrone®**)、麦罗塔(mylotarg)、紫杉醇(**Taxol®**)、phoenix(钇90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生20连同卡莫司汀植入物(**Gliadel®**)、柠檬酸他莫昔芬(**Nolvadex®**)、替尼泊苷(**Vumon®**)、6-巯鸟嘌呤、噻替哌、替拉扎明(**Tirazone®**)、注射用盐酸拓扑替康(**Hycamptin®**)、长春碱(**Velban®**)、长春新碱(**Oncovin®**)和长春瑞滨(**Navelbine®**)。

[0374] 在一个方面,本发明提供一种通过向有需求的受试者施用与一种或多种酪氨酸激酶抑制剂组合的本发明抗体药物缀合物而治疗癌症的方法,所述酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于EGFR抑制剂、Her2抑制剂、Her3抑制剂、IGFR抑制剂和Met抑制剂。

[0375] 例如,酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于盐酸厄洛替尼(**Tarceva®**);利尼伐尼(Linifanib) (N-[4-(3-氨基-1H-吡唑-4-基)苯基]-N'-(2-氟-5-甲基苯基)脲,也称作ABT869,从Genentech可获得);苹果酸舒尼替尼(索坦(**Sutent®**));博舒替尼(4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基)氨基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基]喹啉-3-甲腈,也称作SKI-606,并且在美国专利号6,780,996中描述);达沙替尼(**Sprycel®**);帕唑帕尼(**Votrient®**);索拉替尼(**Nexavar®**);Zactima (ZD6474);和伊马替尼或甲磺酸伊马替尼(**Gilvec®**和**Gleevec®**)。

[0376] 表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂包括但不限于盐酸厄洛替尼(**Tarceva®**)、吉非替尼(Gefitinib) (**Iressa®**);N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[(3''S'') -四氢-3-咪唑基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺, **Tovok®**;凡德他尼(**Caprelsa®**);拉帕替尼(**Tykerb®**); (3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5基)甲基)哌啶-3-醇 (BMS690514);二盐酸卡纳替尼(CI-1033);6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788,CAS 497839-62-0);木利替尼(mubritinib) (TAK165);培利替尼(Pelitinib) (EKB569);阿法替尼(BIBW2992);来那替尼(Neratinib) (HKI-272);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸,(3S)-3-吗啉基甲基酯(BMS599626);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3a α ,5 β ,6a α)-八氢-2-甲基环戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8);和4-[4-[(1R)-1-苯乙基]氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166,CAS 187724-61-4)。

[0377] EGFR抗体包括但不限于西妥昔单抗(**Erbitux®**);帕尼单抗(**Vectibix®**);马妥珠单抗(EMD-72000);曲妥珠单抗(**Herceptin®**);尼妥珠单抗(hR3);扎鲁木单抗;TheraCIM h-R3;MDX0447 (CAS 339151-96-1);和ch806 (mAb-806,CAS 946414-09-1)。

[0378] 人表皮生长因子受体2(Her2受体)(也称作Neu,ErbB-2,CD340或p185)抑制剂包括但不限于曲妥珠单抗(**Herceptin®**);培妥珠单抗(**Omnitarg®**);曲妥珠单抗emtansine(**Kadcyla®**);来那替尼(HKI-272,(2E)-N-[4-[[3-氯-4-[(吡啶-2基)甲氧基]苯基]氨基]-3-氰基-7-乙氧喹啉-6-基]-4-(二甲基氨基)丁-2-烯酰胺,并在PCT公开号WO 05/028443中描述);拉帕替尼或二甲苯磺酸拉帕替尼(**Tykerb®**); (3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5基)甲基)哌啶-3-醇 (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[(3S)-四氢-3-咪唑基]氧基]-6-喹唑啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺(BIBW-2992,CAS 850140-72-6);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸,(3S)-3-吗啉基甲基酯(BMS599626,CAS 714971-09-2);卡纽替尼二盐酸盐(PD183805或CI-1033);和N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3a α ,5 β ,6a α)-八氢-2-甲基环戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS 781613-23-8)。

[0379] Her3抑制剂包括但不限于LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111和MEHD-7945A。

[0380] MET抑制剂包括但不限于卡博替尼(cabozantinib) (XL184, CAS 849217-68-1); Foretinib (GSK1363089, 以前的XL880, CAS 849217-64-7); Tivantinib (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-羟基-2-甲基丙基)-N-(5-(7-甲氧基喹啉-4-基氧基)吡啶-2-基)-5-甲基-3-氧代-2-苯基-2,3-二氢-1H-吡唑-4-甲酰胺 (AMG458); 克里唑替尼 (Cryzotinib) (**Xalkori®**, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-二氢-1H-吡啶-1-基磺酰)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-1,3-二氢-2H-吡啶-2-酮 (SU11271); (3Z)-N-(3-氯苯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-N-甲基-2-氧代二氢吡啶-5-磺酰胺 (SU11274); (3Z)-N-(3-氯苯基)-3-{{[3,5-二甲基-4-(3-吗啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基]亚甲基}-N-甲基-2-氧代二氢吡啶-5-磺酰胺 (SU11606); 6-[二氟[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-]三唑并[4,3-b]哒嗪-3-基]甲基-喹啉 (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(喹啉-6-基甲基)-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-6-基]-1H-吡唑-1-基]乙醇 (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-二噁烷-2-基甲基)-N-甲基-N'-[3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-氧代-5H-苯并[4,5]环庚[1,2-b]吡啶-7-基]磺酰胺 (MK2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-]三唑并[4,3-b]哒嗪-3-基]硫代]-喹啉 (SGX523, CAS 1022150-57-7); 和 (3Z)-5-[[2,6-二氯苯基]甲基]磺酰基]-3-[[3,5-二甲基-4-[(2R)-2-(1-吡咯烷基甲基)-1-吡咯烷基]羰基]-1H-吡咯-2-基]亚甲基)-1,3-二氢-2H-吡啶-2-酮 (PHA665752, CAS 477575-56-7)。

[0381] IGF1R抑制剂包括但不限于BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MEDI-573和BI836845。综述参见例如, Yee, JNCI, 104;975 (2012)。

[0382] 在另一个方面, 本发明提供一种通过向有需求的受试者施用与一种或多种P-钙黏着蛋白下游信号传导途径抑制剂组合的本发明抗体药物缀合物而治疗癌症的方法, 所述P-钙黏着蛋白下游信号传导途径抑制剂包括但不限于MEK抑制剂、Braf抑制剂、PI3K/Akt抑制剂、SHP2抑制剂并且还包括mTor。

[0383] 例如, 促分裂原活化蛋白激酶 (MEK) 抑制剂包括但不限于XL-518 (也称作GDC-0973, Cas编号1029872-29-4, 从ACC Corp. 可获得); 2-[(2-氯-4-碘苯基)氨基]-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲酰胺 (也称作CI-1040或PD184352并且在PCT公开号WO 2000035436中描述); N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺 (也称作PD0325901并且在PCT公开号WO 2002006213中描述); 2,3-双[氨基[(2-氨基苯基)硫代]亚甲基]-丁二腈 (也称作U0126并且在美国专利号2,779,780中描述); N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-环丙磺酰胺 (也称作RDEA119或BAY869766并且在PCT公开号WO 2007014011中描述); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙基氨基)-8,9,16-三羟基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氢-1H-2-苯氧杂环十四烷-1,7(8H)-二酮] (也称作E6201并且在PCT公开号WO 2003076424中描述); 2'-氨基-3'-甲氧基黄酮 (也称作PD98059, 从德国Biaffin GmbH&Co., KG可获得); 威罗菲尼 (PLX-4032, CAS

918504-65-1); (R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮(TAK-733,CAS1035555-63-5);Pimasertib(AS-703026,CAS 1204531-26-9);和曲美替尼二甲基亚砷(GSK-1120212,CAS 1204531-25-80)。

[0384] 磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂包括但不限于4-[2-(1H-吡唑-4-基)-6-[[4-(甲磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也称作GDC0941并且在PCT公开号W0 09/036082和W0 09/055730中描述);2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(也称作BEZ235或NVP-BEZ235,并且在PCT公开号W0 06/122806中描述);4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4基)吡啶-2-胺(也称作BKM120或NVP-BKM120,并且在PCT公开号W0 2007/084786中描述);陶扎色替(Tozasertib)(VX680或MK-0457,CAS 639089-54-6);(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615,CAS 958852-01-2);(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基)亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-环戊[5,6]萘并[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866,CAS 502632-66-8);和8-苯基-2-(吗啉-4基)-色烯-4-酮(LY294002,CAS 154447-36-6)。

[0385] mTor包括但不限于坦罗莫司(**Torisel®**);地磷莫司(正式地称作deferolimus,(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-二羟基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五氧-11,36-二氧杂-4-氮杂三环并[30.3.1.0^{4,9}]三十六碳-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧环己基二甲基次膦酸酯,也称作AP23573和MK8669,并且在PCT公开号W0 03/064383中描述);依维莫司(**Afinitor®**或RAD001);雷帕霉素(AY22989, **Sirolimus®**);Simapimod(CAS 164301-51-3);(5-{2,4-双[(3S)-3-甲基吗啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055);2-氨基-8-[反-4-(2-羟基乙氧基)环己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-7(8H)-酮(PF04691502,CAS 1013101-36-4);和N²-[1,4-二氧代-[[4-(4-氧代-8-苯基-4H-1-苯并吡喃-2基)吗啉-4-基]甲氧基]丁基]-L-精氨酸甘氨酸-L-α-天冬氨酸L-丝氨酸-(SEQ ID NO:131)内盐(SF1126,CAS 936487-67-1)。

[0386] 在又一个方面,本发明提供一种通过向有需求的受试者施用与一种或多种促凋亡剂组合的本发明抗体药物缀合物而治疗癌症的方法,所述促凋亡剂包括但不限于IAP抑制剂、Bcl2抑制剂、Mcl1抑制剂、Trail剂、Chk抑制剂。

[0387] 例如,IAP抑制剂包括但不限于LCL161、GDC-0917、AEG-35156、AT406和TL32711。IAP抑制剂的其他例子包括但不限于W0 04/005284、W0 04/007529、W0 05/097791、W0 05/069894、W0 05/069888、W0 05/094818、US 2006/0014700、US 2006/0025347、W0 06/069063、W0 06/010118、W0 06/017295和W0 08/134679中公开的那些,全部文献均通过引用方式并入本文。

[0388] BCL-2抑制剂包括但不限于4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5.5-二甲基-1-环己烯-1-基]甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[[(1R)-3-(4-吗啉基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]氨基]-3-[(三氟甲基)磺酰]苯基]磺酰]苯甲酰胺(也称作ABT-263并且在PCT公开号W0 09/155386中描述);替曲卡星(Tetrocarcin A);抗霉素;棉酚((-)BL-193);Obatoclax;乙基-2-氨基-6-环戊

基-4-(1-氰基-2-乙氧基-2-氧乙基)-4H色酮-3-甲酸酯(HA14-1); 奥利默森(Oblimersen)(G3139, **Genasense®**); Bak BH3肽; (-)-棉酚乙酸(AT-101); 4-[4-[(4'-氯[1,1'-联苯基]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[(1R)-3-(二甲基氨基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基氨基]-3-硝基苯基]磺酰]-苯甲酰胺(ABT-737, CAS 852808-04-9); 和Navitoclax(ABT-263, CAS 923564-51-6)。

[0389] 促凋亡受体激动剂(PARA)包括DR4(TRAILR1)和DR5(TRAILR2),包括但不限于度拉纳明(Dulanermin)(AMG-951, RhApo2L/TRAIL); 马帕木单抗(mapatumumab)(HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); 来沙木单抗(HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); Apomab (**Apomab®**); 可那木单抗(conatumumab)(AMG655, CAS 896731-82-1); 和替加珠单抗(tigatuzumab)(CS1008, CAS 946415-34-5, 从Daiichi Sankyo可获得)。

[0390] 检查点激酶(CHK)抑制剂包括但不限于7-羟星形孢菌素(UCN-01); 6-溴-3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-(3R)-3-哌啶基-吡唑并[1,5-a]嘧啶-7-胺(SCH900776, CAS 891494-63-6); 5-(3-氟苯基)-3-脲基噻吩-2-羧酸N-[(S)-哌啶-3-基]酰胺(AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[(3S)-1-氮杂双环并[2.2.2]辛-3基)氨基]-3-(1H-苯并咪唑-2-基)-6-氯喹啉-2(1H)-酮(CHIR124, CAS 405168-58-3); 7-氨基更生霉素(7-AAD)、Isogranulatimide、debromohymenialdisine; N-[5-溴-4-甲基-2-[(2S)-2-吗啉基甲氧基]-苯基]-N'-(5-甲基-2-吡嗪基)脲(LY2603618, CAS 911222-45-2); 莱菔子素(Sulforaphane)(CAS 4478-93-7、4-甲基亚磺酰基丁基异硫氰酸酯); 9,10,11,12-四氢-9,12-环氧-1H-二吡啶并[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]吡咯并[3.4-i][1,6]苯并二吡辛因-1,3(2H)-二酮(SB-218078, CAS 135897-06-2); 和TAT-S216A(YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL(SEQ ID NO:132)), 和CBP501((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqrr)。

[0391] 在又一个实施方案中,本发明提供一种通过向有需求的受试者施用与一种或多种免疫调节剂(例如共刺激分子的激活剂或免疫检查点分子的抑制剂中一者或多者)组合的本发明抗体药物缀合物而治疗癌症的方法。

[0392] 在某些实施方案中,免疫调节剂是共刺激分子的激活剂。在一个实施方案中,共刺激分子的激动剂选自以下的激动剂(例如,激动性抗体或其抗原结合片段、或可溶性融合物): OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3或CD83配体。

[0393] 在某些实施方案中,免疫调节剂是免疫检查点分子的抑制剂。在一个实施方案中,免疫调节剂是PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFRβ的抑制剂。在一个实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂抑制PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或CTLA4或其任意组合。术语“抑制作用”或“抑制剂”包括给定的分子(例如,免疫检查点抑制蛋白)的某个参数(例如,活性)降低。例如,这个术语包括抑制至少5%、10%、20%、30%、40%、50%或更多的活性(例如,PD-1活性或PD-L1活性)。因此,抑制作用不必是100%。

[0394] 对抑制性分子的抑制可以在DNA、RNA或蛋白质水平进行。在一些实施方案中,抑制性核酸(例如,dsRNA、siRNA或shRNA)可以用来抑制抑制性分子的表达。在其他实施方案中,抑制性信号的抑制剂是与抑制性分子结合的多肽,例如,可溶性配体(例如,PD-1-Ig或

CTLA-4Ig),或抗体或其抗原结合片段;例如,与PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFRB或其组合结合的抗体或其片段(本文也称作“抗体分子”)。

[0395] 在一个实施方案中,抗体分子是完整抗体或其片段(例如,Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在另外的其他实施方案中,抗体分子具有重链恒定区(Fc),其选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区;具体地,选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的重链恒定区,更具体地IgG1或IgG4(例如,人IgG1或IgG4)的重链恒定区。在一个实施方案中,重链恒定区是人IgG1或人IgG4。在一个实施方案中,将恒定区改变,例如,突变,以修饰抗体分子的特性(例如,以增加或减少以下一种或多种特性:Fc受体结合作用,抗体糖基化、半胱氨酸残基数目、效应细胞功能或补体功能)。

[0396] 在某些实施方案中,抗体分子处于双特异性或多特异性抗体分子形式。在一个实施方案中,双特异性抗体分子具有针对PD-1或PD-L1的第一结合特异性和第二结合特异性(例如,针对TIM-3、LAG-3或PD-L2的第二结合特异性)。在一个实施方案中,双特异性抗体分子与PD-1或PD-L1和TIM-3结合。在另一个实施方案中,双特异性抗体分子与PD-1或PD-L1和LAG-3结合。在另一个实施方案中,双特异性抗体分子与PD-1和PD-L1结合。在又一个实施方案中,双特异性抗体分子与PD-1和PD-L2结合。在另一个实施方案中,双特异性抗体分子与TIM-3和LAG-3结合。可以在多特异性抗体分子(例如,三特异性抗体)中产生前述分子的任何组合,所述三特异性抗体包含针对PD-1或PD-L1的第一结合特异性和针对以下两者或更多者的第二和第三结合特异性:TIM-3、LAG-3或PD-L2。

[0397] 在某些实施方案中,免疫调节剂是PD-1(例如,人PD-1)的抑制剂。在另一个实施方案中,免疫调节剂是PD-L1(例如,人PD-L1)的抑制剂。在一个实施方案中,PD-1或PD-L1的抑制剂是针对PD-1或PD-L1的抗体分子。PD-1或PD-L1抑制剂可以单独施用,或与其他免疫调节剂组合(例如,与LAG-3、TIM-3或CTLA4的抑制剂组合)施用。在一个示例性实施方案中,PD-1或PD-L1的抑制剂(例如,抗PD-1或PD-L1抗体分子)与LAG-3抑制剂(例如,抗LAG-3抗体分子)组合施用。在另一个实施方案,PD-1或PD-L1的抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子或抗PD-L1抗体分子)与TIM-3抑制剂(例如,抗TIM-3抗体分子)组合施用。在另外的其他实施方案中,PD-1或PD-L1的抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子)与LAG-3抑制剂(例如,抗LAG-3抗体分子)和TIM-3抑制剂(例如,抗TIM-3抗体分子)组合施用。免疫调节剂与PD-1抑制剂(例如,PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFR中一者或多者)的其他组合还处于本发明范围内。本领域已知的或本文公开的任何抗体分子可以用于检查点分子的抑制剂的上述组合中。

[0398] 在一个实施方案中,PD-1抑制剂是选自纳武单抗、派姆单抗或Pidilizumab的抗PD-1抗体。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是纳武单抗。纳武单抗的备选名称包括MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是纳武单抗(CAS登录号:946414-94-4)。纳武单抗是特异性阻断PD1的全人IgG4单克隆抗体。与PD1特异性结合的纳武单抗(克隆5C4)和其他人单克隆抗体在美国专利号8,008,449和PCT公开号W02006/121168中公开。

[0399] 在其他实施方案中,抗PD-1抗体是派姆单抗(Pembrolizumab)。派姆单抗(商品名KEYTRUDA,之前的Lambrolizumab,也称作Merck 3745、MK-3475或SCH-900475)是与PD1结合

的人源化IgG4单克隆抗体。派姆单抗例如在Hamid, O.等人, (2013) New England Journal of Medicine 369 (2):134-44、PCT公开号W02009/114335和美国专利号8,354,509中公开。

[0400] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体是Pidilizumab。Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) 是与PD1结合的人源化IgG1k单克隆抗体。Pidilizumab和其他人源化抗PD-1单克隆抗体在PCT公开号W02009/101611中公开。其他抗PD1抗体在美国专利号8,609,089、美国公开号2010028330和/或美国公开号20120114649中公开。其他抗PD1抗体包括AMP 514 (Amplimmune)。

[0401] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂是免疫黏附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PD-L1或PD-L2的胞外部分或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是AMP-224。

[0402] 在一些实施方案中,PD-L1抑制剂是抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,抗PD-L1抑制剂选自例如W0 2013/0179174中公开的并且具有本文公开的序列(或基本上相同或与之相似的序列,例如,与指定的序列至少85%、90%、95%或更多同一性的序列)的YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736或MDX-1105MSB-0010718C(也称作A09-246-2)。

[0403] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是MDX-1105。MDX-1105,也称作BMS-936559,是PCT公开号W02007/005874中描述的抗PD-L1抗体。

[0404] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是YW243.55.S70。YW243.55.S70抗体是在PCT公开号W0 2010/077634中描述的抗PD-L1(重链可变区序列和轻链可变区序列分别在SEQ ID NO:20和21中显示)。

[0405] 在一个实施方案中,PD-L1抑制剂是MDPL3280A (Genentech/Roche)。MDPL3280A是与PD-L1结合的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。针对PD-L1的MDPL3280A和其他人单克隆抗体在美国专利号7,943,743和美国公开号20120039906中公开。

[0406] 在其他实施方案中,PD-L2抑制剂是AMP-224。AMP-224是阻断PD1和B7-H1之间相互作用的PD-L2Fc融合可溶性受体(B7-DCIg; Amplimmune; 例如,在PCT公开号W02010/027827和W02011/066342中公开)。

[0407] 在一个实施方案中,LAG-3抑制剂是抗LAG-3抗体分子。在一个实施方案中,LAG-3抑制剂是BMS-986016。

[0408] 药物组合物

[0409] 为了制备包含免疫缀合物的药物组合物或无菌组合物,将本发明的免疫缀合物与可药用载体或赋形剂混合。组合物可以额外地含有一种或多种适于治疗或预防癌症(包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、Barrett食管癌、胃癌、头颈癌、肺癌、多发性骨髓瘤、卵巢癌、肝癌、胰腺癌、急性髓样白血病、慢性髓样白血病、骨肉瘤、鳞状细胞癌、外周神经鞘肿瘤神经鞘瘤、胶质母细胞瘤、软组织的透明细胞肉瘤、恶性间皮瘤、神经纤维瘤病、肾癌、黑素瘤、前列腺癌、良性前列腺增生(BPH)、男性乳房增大症和横纹肌肉瘤)的其他治疗剂。

[0410] 可以通过与生理可接受载体、赋形剂或稳定剂混合以例如冻干散剂、膏剂、水溶液剂、洗剂或混悬剂的形式制备治疗剂和诊断剂的制剂(参见,例如,Hardman等人, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott,

Williams和Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis等人, (编著), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman等人, (编著), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman等人, (编著) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner和Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000)。

[0411] 在一个实施方案中, 本发明的抗体药物缀合物的临床使用形式(CSF)是小瓶中含有ADC、组氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯20的冻干物。冻干物可以用注射用水复溶, 溶液包含ADC、组氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯20, pH约5.0。在一个具体的实施方案中, 冻干物包含10mg/ml ADC、20mM组氨酸、240mM蔗糖和0.02%聚山梨醇酯20, pH为5.3。

[0412] 治疗剂施用方案的选择取决于若干因素, 包括该实体的血清或组织周转率、症状水平、该实体的免疫原性、及靶细胞在生物基质中的可达性。在某些实施方案中, 符合可接受的副作用水平, 施用方案使递送给患者的治疗剂的量最大化。因此, 递送的生物剂的量部分取决于具体实体和所治疗病症的严重性。选择适宜剂量抗体、细胞因子和小分子的指南是可获得的(参见, 例如, Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (编著), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (编著), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert等人, New Engl.J.Med.348:601-608, 2003; Milgrom等人, New Engl.J.Med.341:1966-1973, 1999; Slamon等人, New Engl.J.Med.344:783-792, 2001; Beniaminovitz等人, New Engl.J.Med.342:613-619, 2000; Ghosh等人, New Engl.J.Med.348:24-32, 2003; Lipsky等人, New Engl.J.Med.343:1594-1602, 2000)。

[0413] 由临床医生, 例如, 使用本领域已知或疑似影响治疗或预计影响治疗的参数或因素确定适宜的剂量。通常, 剂量始于或多或少小于最佳剂量的量并此后将它以小增量增加, 直至相对于任何不利副作用, 实现所需的或最佳的效果。重要的诊断量值包括症状(例如炎症)的那些量值或产生的炎性细胞因子的水平。

[0414] 可改变本发明的药物组合中活性成分的实际剂量水平, 以获得活性成份的下述量, 所述量就具体患者、组合物和施用方式而言可以达到所希望的治疗反应, 并同时对患者无毒性。所选剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素, 包括所用的本发明具体组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、所用的具体化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所用的具体组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、待治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康和过往病史, 以及医学领域已知的类似因素。

[0415] 包含本发明抗体或其片段的组合物可以通过连续输注或通过按某时间间隔例如一天、一周或每周1-7次, 每隔一周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次或每八周一次给药来提供。可通过静脉内、皮下、局部、口服、鼻、直肠、肌肉内、脑内或通过吸入来提供剂量。具体剂量方案可以涉及避免显著不良副作用的最大剂量或剂量频率。

[0416] 对于本发明的免疫缀合物, 向患者施用的剂量可以是0.0001mg/kg至100mg/kg患者体重。剂量可以在0.0001mg/kg和30mg/kg、0.0001mg/kg至20mg/kg、0.0001mg/kg至10mg/

kg、0.0001mg/kg至5mg/kg、0.0001至2mg/kg、0.0001至1mg/kg、0.0001mg/kg至0.75mg/kg、0.0001mg/kg至0.5mg/kg、0.0001mg/kg至0.25mg/kg、0.0001至0.15mg/kg、0.0001至0.10mg/kg、0.001至0.5mg/kg、0.01至0.25mg/kg、或0.01至0.10mg/kg患者体重之间。可以用以千克(kg)计的患者体重乘以以mg/kg计的待施用剂量来计算本发明的抗体或其片段的剂量。

[0417] 可以重复本发明免疫缀合物的剂量并且各次施用可以相隔不足1天、至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2月、75天、3个月、4个月、5个月或至少6个月。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物可以每周二次、每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次或更低频率地给予。在一个具体实施方案中,每2周重复本发明免疫缀合物的剂量。

[0418] 特定患者的有效量可以根据多种因素变动,如正在治疗的病状、患者的总体健康、施用方法、途径和剂量和副作用的严重程度(参见,例如,Maynard等人,A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice,Interpharm Press,Boca Raton,Fla.,1996;Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice,Urch Publ.,London,UK,2001)。

[0419] 施用途径可以是通过皮下、静脉内、腹膜内、脑内、肌内、眼内、动脉内、脑室椎管内、病灶内施用法或通过缓释系统或植入物借助例如局部或皮肤应用、注射或输注(参见例如,Sidman等人,Biopolymers 22:547-556,1983;Langer等人,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277,1981;Langer,Chem.Tech.12:98-105,1982;Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688-3692,1985;Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030-4034,1980;美国专利号6,350,466和6,316,024)。必要时,组合物也可以包含增溶剂或局部麻醉药如利多卡因或两者以缓解注射部位的疼痛。此外,也可以利用肺部施用法,例如,通过使用吸入器或雾化器和含有雾化剂的制剂。参见,例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;和PCT公开号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903,每份专利通过引用方式完整并入本文。

[0420] 也可用本领域已知的多种方法中的一种或多种,经由一种或多种施用途径,施用本发明的组合物。如熟练技术人员将理解,施用的途径和/或模式将取决于所想要的结果而变动。用于本发明免疫缀合物的所选择施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。胃肠外施用可以是除了肠和局部施用以外的施用模式,通常通过注射进行,并包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。备选地,本发明的组合物可经非胃肠外途径,例如局部、表皮或黏膜施用途径施用,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。在一个实施方案中,通过输注法施用本发明的免疫缀合物。在另一个实施方案中,皮下施用本发明的免疫缀合物。

[0421] 如果本发明的免疫缀合物在控释或持续释放系统中施用,则泵可以用来实现控释或持续释放(参见Langer,上文;Sefton,CRC Crit.Ref Biomed.Eng.14:20,1987;Buchwald等人,Surgery 88:507,1980;Saudek等人,N.Engl.J.Med.321:574,1989)。聚合物材料可以用来实现本发明治疗药的控释或持续释放(参见例如,Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编著),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.,1974;Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和

Ball (编著), Wiley, New York, 1984; Ranger 和 Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983; 还参见 Levy 等人, Science 228:190, 1985; During 等人, Ann. Neurol. 25:351, 1989; Howard 等人, J. Neurosurg. 71:105, 1989; 美国专利号 5,679,377; 美国专利号 5,916,597; 美国专利号 5,912,015; 美国专利号 5,989,463; 美国专利号 5,128,326; PCT 公开号 WO 99/15154; 和 PCT 公开号 WO 99/20253。在持续释放制剂中使用的聚合物的实例包括但不限于, 聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚甲基丙烯酸、聚乙交酯 (PLG)、聚酐、聚(N-乙烯吡咯烷酮)、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚乳酸 (PLA)、聚(乳酸-共-乙醇酸) (PLGA) 和聚原酸酯。在一个实施方案中, 在持续释放制剂中使用的聚合物是惰性的、不含可沥滤的杂质、储存时稳定、无菌和可生物降解。可以将控释或持续释放系统靠近预防靶或治疗靶放置, 因此仅需要全身性剂量的一部分(参见, 例如, Goodson, 引自 Medical Applications of Controlled Release, 上文, 第2卷, 第115-138页, 1984)。

[0422] 控释系统在 Langer, Science 249:1527-1533, 1990 的综述中讨论。本领域技术人员已知的任何技术可以用来产生包含本发明的一种或多种免疫缀合物的持续释放制剂。参见, 例如, 美国专利号 4,526,938, PCT 公开 WO 91/05548, PCT 公开 WO 96/20698, Ning 等人, Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996; Song 等人, PDA Journal Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995; Cleek 等人, Pro. Int'l Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997; 和 Lam 等人, Proc. Int'l Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997, 所述的每篇文献通过引用方式完整并入本文。

[0423] 如果局部施用本发明免疫缀合物, 则可以将它们按油膏剂、乳膏剂、透皮贴剂、洗剂、凝胶剂、喷雾剂、气雾剂、溶液剂、乳剂的形式或本领域技术人员熟知的其他形式配制。参见, 例如, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 第19版, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。对不可喷雾的局部剂型, 通常使用黏性至半固体或固体形式, 该形式包含与局部施用相容的载体或一种或多种赋形剂, 并在某些情况下具有大于水的动力学黏度。合适的制剂包括而限于溶液剂、混悬剂、乳剂、乳膏剂、油膏剂、散剂、搽剂、药膏剂等, 如果需要, 它们进行消毒或与影响多种特性(例如, 渗透压)的助剂(例如, 防腐剂、稳定剂、润湿剂、缓冲剂或盐)混合。其他合适的局部用剂型包括可喷雾气雾剂制品, 其中与固体或液体惰性载体组合的活性成分在一些情况下包装在含有加压的挥发性物质(例如, 气态推进剂, 如氟利昂)的混合物中或挤瓶中。如果需要, 也可以将润湿剂或湿润剂添加至药物组合物和剂型。这类额外成分的例子是本领域熟知的。

[0424] 如果鼻内施用包含免疫缀合物的组合物, 则可以将它以气雾剂、喷雾剂、雾化剂形式或以滴剂形式配制。具体而言, 根据本发明使用的预防剂或治疗剂可以在使用合适推进剂(例如, 二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适气体)的情况下, 以从加压的包装或雾化器中提供的气雾剂喷雾剂形式便利地递送。在加压气雾剂的情况下, 可通过提供阀门, 确定剂量单位, 以递送经计量的量。可以配制用于吸入器或吹入器中的胶囊剂和药筒(由例如明胶组成), 其含有所述化合物及合适散剂基料 (powder base) (如乳糖或淀粉) 的粉末混合物。

[0425] 以第二治疗剂例如细胞因子、类固醇、化疗剂、抗生素或辐射共施用或治疗的方法

是本领域已知的(参见,例如,Hardman等人,(编著)(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10增补版,McGraw-Hill,New York,N.Y.; Poole和Peterson(编著)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,Pa.;Chabner和Longo(编著)(2001)Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,Pa.)。有效量的治疗剂可使症状减轻至少10%、至少20%、至少约30%、至少40%或至少50%。

[0426] 可以与本发明的免疫缀合物组合施用的额外治疗药(例如,预防剂或治疗剂)可以按照与本发明的免疫缀合物间隔小于5分钟、间隔小于30分钟、间隔1小时,按间隔约1小时、间隔约1至约2小时、间隔约2小时至约3小时、间隔约3小时至约4小时、间隔约4小时至约5小时、间隔约5小时至约6小时、间隔约6小时至约7小时、间隔约7小时至约8小时、间隔约8小时至约9小时、间隔约9小时至约10小时、间隔约10小时至约11小时、间隔约11小时至约12小时、间隔约12小时至18小时、间隔18小时至24小时、间隔24小时至36小时、间隔36小时至48小时、间隔48小时至52小时、间隔52小时至60小时、间隔60小时至72小时、间隔72小时至84小时、间隔84小时至96小时、间隔或96小时至120小时施用。可在同一次患者就诊中施用两种或更多种疗法。

[0427] 在某些实施方案中,可以配制本发明的免疫缀合物以确保恰当的体内分布。例如,血脑屏障(BBB)排除许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗性化合物跨过BBB(如果希望),可将它们配制在例如脂质体中。对于制造脂质体的方法,参见,例如美国专利号4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可以包含一个或多个被选择性转运至特定细胞或器官中的部分,因而增强靶向的药物递送(参见,例如Ranade,(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如Low等人的美国专利号5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等人,(1988)Biochem.Biophys.Res.Comm.153:1038);抗体(Bloeman等人,(1995)FEBS Lett.357:140;Owais等人,(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性蛋白质A受体(Briscoe等人,(1995)Am.J.Physiol.1233:134;p 120(Schreier等人,(1994)J.Biol.Chem.269:9090);还参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods 4:273。

[0428] 本发明提供向有需求的受试者单独或与其他治疗药组合施用包含本发明免疫缀合物的药物组合物的方案。本发明联合疗法的治疗药(例如,预防剂或治疗剂)可以同时或依次向受试者施用。本发明联合疗法的治疗药(例如,预防剂或治疗剂)也可以循环施用。循环治疗涉及施用第一治疗药(例如,第一预防剂或治疗剂)一段时间,随后施用第二治疗药(例如,第二预防剂或治疗剂)一段时间并重复这种依次施用,即,该循环,以减少对一种治疗药(例如药物)的耐药性形成,以避免或减少一种治疗药(例如药物)的副作用和/或以改善治疗药的效力。

[0429] 本发明联合疗法的治疗药(例如,预防剂或治疗剂)可以同时施用至受试者。

[0430] 术语“同时”不限于在完全相同的时间施用治疗药(例如,预防剂或治疗剂),而是意指将包含本发明抗体或其片段的药物组合物以这样的顺序并在这样的时间间隔内部施用至受试者,使得本发明的抗体药物缀合物可以与其他治疗药一起发挥作用,以提供与如

果另外施用它们相比而增加的益处。例如,可在同一时间或在不同时点以任意顺序顺次对受试者施用各疗法;然而,如果不在同一时间施用,则应在足够接近的时间内施用,以提供希望的治疗效果或预防效果。可以以任意合适的形式和通过任意合适的途径对受试者分开施用各疗法。在多个实施方案中,将治疗药(例如,预防剂或治疗剂)相隔小于5分钟、相隔小于15分钟、相隔小于30分钟、小于1小时、相隔约1小时、相隔约1小时至约2小时、相隔约2小时至约3小时、相隔约3小时至约4小时、相隔约4小时至约5小时、相隔约5小时至约6小时、相隔约6小时至约7小时、相隔约7小时至约8小时、相隔约8小时至约9小时、相隔约9小时至约10小时、相隔约10小时至约11小时、相隔约11小时至约12小时、相隔24小时、48小时、72小时或1周施用至受试者。在其他实施方案中,将两种或更多种治疗药(例如,预防剂或治疗剂)在相同的患者就诊内施用。

[0431] 组合疗法的预防剂或治疗剂可在同一药物组合物中施用给个体。备选地,联合疗法的预防剂或治疗剂可以在分开的药物组合物中同时施用至受试者。可通过相同或不同的施用途径对受试者施用这些预防剂或治疗剂。组合疗法的预防剂或治疗剂可在同一药物组合物中施用给受试者。备选地,联合疗法的预防剂或治疗剂可以在分开的药物组合物中同时施用至受试者。可通过相同或不同的施用途径对个体施用这些预防剂或治疗剂。

实施例

[0432] 实施例1:抗体的产生

[0433] 产生人、食蟹猴、小鼠和大鼠P-钙黏着蛋白的表达构建体

[0434] 基于来自GenBank或Uniprot数据库的氨基酸序列,基因合成人、小鼠和大鼠P-钙黏着蛋白胞外结构域(ECD)(参见下表2)。基于使用从食蟹猴各种组织分离的mRNA所生成的氨基酸序列信息,基因合成食蟹猴P-钙黏着蛋白ECD cDNA模板。将全部合成的DNA片段克隆入带C末端六组氨酸标签(SEQ ID NO:130)以允许纯化的适宜表达载体。

[0435] 表2:P-钙黏着蛋白的氨基酸序列信息

[0436]

名称	描述	登录号或序列	SEQ ID NO
人 P-钙黏着蛋白 (CDH3) D1-5	人 CDH3 , 残基 108-652-TAG	NM_001793.4、NP_001784	121
大鼠 P-钙黏着蛋白 (CDH3) D1-5	大鼠 CDH3, 残基 100-647-TAG	NM_053938.1、NP_446390	122
小鼠 P-钙黏着蛋白 (CDH3) D1-5	小鼠 CDH3 同种型 a , 残基 100-647-TAG	NM_001037809.5 、 NP_001032898	123
食蟹猴 P-钙黏着蛋白变体 1 (CDH3) D1-5	食蟹猴 CDH3 变体 1 , 残基 108-654-TAG	MKFLVNVALVFMVVYI SYIYADHQTSLYKKAG FEGDRTDWVVAPISVP ENGKGPFQRLNQLKS NKDRDTKIFYSITGPGA DSPPEGVFAVEKETGW LLLNKPLDREEIAKYEL FGHAVSENGASVEDPM	124

[0437]

		NISIIVTDQNDHKPKFT QDTRGSGVLEGVLPGT SVMQVTATDEDDAIHT YNGVVAYSIIHSQEPKDP HDLMFTIHRSTGTISVIS SGLDREKVPEYTLTIQA TDMGDGSGTTTAVAVV EILDANDNAPVFDPQK YESHVPENAVGHEVQR LTVTDLDAPNSPAWRA TYLIVGGDDGDHFTIAT HPESNQGILTTRKGLDF EAKNQHTLYVEVTNEA PFVLKLPTSTATIVVHV EDVNEAPVVFVPPSKVVE VQEGIPTGEAVCVYTA KDPDKENQKISYRILRD PAGWLAMDPDSGQVT VAGTLDREDERFVRNN IYEVMLAVDNGSPPT TGTGTLLLTLIDVNDH GPVPEPREITICNQSPES QVLNITDKDLSPHTSPF QAQLTDDSDIYWMAEV NEKDDTVVLSLKKFLK QDTYDVHLSLSDHGK EQLTVIRATVCDCHGH VEKCPDPWKGGGAHH HHHHGA	
--	--	---	--

[0438]

食蟹猴 P-钙 黏着蛋白变 体 2 (CDH3) D1-5	食蟹猴 CDH3 变体 2 , 残 基 108-654-TAG	MKFLVNVALVFMVVYI SYIYADHQTSLYKKAG FEGDRTDWVAPISVP ENGKGPFQRLNQLKS NKDRDTKIFYSITGPGA DSPPEGVFAVEKETGW LLLNKPLDREEIAKYEL FGHAVSENGASVEDPM NISHVTDQNDHKPKFT QDTRGSGVLEGVLPGT SVMQVTATDEDDAIHT YNGVVAYSISHSQEPKDP HDLMFTIHRSTGTISVIS SGLDREKVPEYTLTIQA TDMGDGSTTTAVAVV EILDANDNAPVFDPQK YESHVPENAVGHEVQR LTVTDLDAPNSPAWRA TYLIVGGDDGDHFTIAT HPESNQGILTTRKGLDF EAKNQHTLYVEVTNEA PFVLKLPTSTATIVVHV EDVNEAPVFVPPSKVVE VQEGIPTGEAVCVYTA KDPDKENQKISYRILRD PAGWLAMPDPSGQVT VAGTLDREDERFVRNN IYEVMLAVDNGSPPT TGTGTLTLLTLIDVNDH GPVPEPREITICNQSPES QVLNITDKDLSPHTSPF QAQLTDDSDIYWMAEV	125
--	---------------------------------------	---	-----

[0439]			NEKDDTVVLSLKKFLK QGTVDVHLSLSDHGK EQLTVIRATVCDCHGH VEKCPDPWKGGGAHH HHHHGA
--------	--	--	---

[0440] 产生P-钙黏着蛋白杆状病毒

[0441] 遵循生产商的方案,通过共转染/蚀斑纯化法(O'Reilly等人,1992)或Bac-To-Bac表达系统法(Invitrogen)产生表达重组P-钙黏着蛋白ECD蛋白的杆状病毒。使用标准的低MOI感染方法扩增从转染的昆虫细胞产生的病毒。

[0442] 重组P-钙黏着蛋白的表达

[0443] 将无血清培养基(专有,自制配方)中生长的Tn5细胞悬浮培养物以密度 1.5×10^6 个细胞/ml接种并且用重组P-钙黏着蛋白杆状病毒按 10 pfu/ml MOI或3%体积同步感染。在2L玻璃锥形烧瓶或Wave生物反应器(GE Healthcare Life Sciences)中增殖P-钙黏着蛋白杆状病毒培养制备物。将2L烧瓶中表达的P-钙黏着蛋白制备物以120转/分钟在27°C在无血清培养基中振摇。Wave生物反应器中表达的制备物按角度 7.5° 在28°C以25转/分钟振摇。感染后2天通过将培养物在4°C按1800转/分钟离心10分钟从烧瓶或Wave生物反应器收获上清液。随后用 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤装置过滤上清液。对于大于1L的表达,使用具有KvickStart超滤平板盒的AKTAcrossflow系统(GE Healthcare Life Sciences),将细胞培养上清液浓缩至2-10倍。浓缩的材料用 $0.2 \mu\text{m}$ 过滤装置过滤。

[0444] 人、食蟹猴、小鼠和大鼠pCAD ECD蛋白的纯化

[0445] 从细胞培养上清液纯化重组六组氨酸(SEQ ID NO:130)标记的pCAD胞外结构域蛋白(例如,人pCAD-6xHis(作为SEQ ID NO:130公开的"6xHis")、食蟹猴1pCAD-6xHis(作为SEQ ID NO:130公开的"6xHis")、食蟹猴2pCAD-6xHis(作为SEQ ID NO:130公开的"6xHis")、小鼠pCAD-6xHis(作为SEQ ID NO:130公开的"6xHis")、大鼠pCAD-6xHis(作为SEQ ID NO:130公开的"6xHis"))。使澄清的上清液在已经用25mM bisTrisPropane,0.3M NaCl、1mM CaCl_2 ,pH 6.2平衡的镍琼脂糖凝胶树脂(GE Healthcare Life Sciences)柱上的固定化金属亲和层析(IMAC)上方经过。将上清液以流速5-8mL/分钟施加至IMAC柱。用25mM bisTrisPropane,0.3M NaCl,1mM CaCl_2 ,pH 6.2基线洗涤后,转换成五个柱体积的洗涤缓冲液(20mM Tris,0.3M NaCl,1mM CaCl_2 ,pH 7.5)。如果需要,使用具有10kD或30kD标称分子量截断值的Amicon Ultra 15mL离心浓缩器,浓缩汇集的蛋白质。随后利用20mM Tris,0.3M NaCl,1mM CaCl_2 ,pH 7.5中预平衡的Superdex 200 26/60柱(GE Healthcare Life Sciences),通过凝胶过滤法纯化汇集的蛋白质。汇集并通过SDS-PAGE分析相关的级分。通过Bradford蛋白质测定法(Thermal Fisher)确定蛋白质浓度。

[0446] 小鼠免疫接种和杂交瘤的生产

[0447] 在免疫接种Bcl-2转基因小鼠(C57BL/6-Tgn(bcl-2)22wehi品系)之前,将纯化的人P-钙黏着蛋白ECD用弗氏完全佐剂1:1稀释。使用要求在多个位点反复免疫(RIMMS)的程序(McIntyre GD.,Hybridoma,1997),免疫接种小鼠。简而言之,在8个临近外周淋巴结(PLN)的特定位点用1-3 μg 抗原注射小鼠。在一段为期12天的时间内重复该程序8次。在第12

日,采集检验血液并通过ELISA分析血清抗体滴度。在第15日从高滴度小鼠取出汇集的PLN。为了收获淋巴细胞,将PLN用原始DMEM洗涤两次并且随后通过穿过0.22微米筛(Falcon # 352350)而解离。在融合之前,将所产生的淋巴细胞在Cytofusion介质(BTXpress **Cytofusion®**电穿孔介质,目录号47001)中额外洗涤2次。将F0骨髓瘤细胞与淋巴细胞按4个淋巴细胞对1个F0细胞的比率混合。将细胞混合物离心,悬浮于7ml Cytofusion介质中并随后添加至9ml电融合室(Harvard Apparatus Coaxial Chamber 9 ML部件编号470020)。使用Cyto Pulse Sciences, Inc CEEF-50B Hybrimmune/杂交瘤系统,根据生产商的说明实施电融合。允许融合的细胞在融合室中恢复5分钟,在不含HAT的融合培养基(DMEM+20%FBS,青/链霉素/Glu,1 x NEAA,0.5 x HFCS)中1/10稀释并置于37℃持续1小时。添加4x HAT培养基(DMEM+20%FBS,青/链霉素/Glu,1x NEAA,4 x HAT,0.5 x HFCS)以制得1x溶液并且调节密度至 1.67×10^4 个细胞/ml。随后将细胞以60μL/孔铺种在384孔板中。

[0448] 筛选分泌针对P-钙黏着蛋白的抗体的杂交瘤

[0449] 融合后十天,对杂交瘤平板筛选P-钙黏着蛋白特异性抗体的存在。为了ELISA筛选,将Maxisorp384孔板(Nunc#464718)用50μL人P-钙黏着蛋白(在PBS中稀释至15ng/孔)包被并在4℃温育过夜。吸出剩余的蛋白质并用PBS中的1%BSA封闭孔。在室温温育30分钟后,将孔用PBS+0.05%Tween (PBST)洗涤四次。将15μL杂交瘤上清液转移至ELISA平板。将15μL在PLN取出时取得的小鼠血清1:1000在PBS中稀释并作为阳性对照添加。将50μL第二抗体(山羊抗小鼠IgG-HRP (Jackson Immuno Research#115-035-071),PBS中1:5000稀释)添加至ELISA平板上的全部孔。在室温温育1小时后,将平板用PBST洗涤八次。添加25μL TMB (KPL#50-76-05)并且在室温温育30分钟后;平板在吸光度605nm读取。来自阳性孔的细胞在HT培养基(DMEM+20%FBS,青/链霉素/Glu,1 x NEAA,1 x HT,0.5 x HFCS)中扩充至24孔板内。

[0450] 抗体纯化

[0451] 使用蛋白G (Upstate#16-266 (Billerica,MA)),纯化含有抗体的上清液。在装载上清液之前,树脂用10个柱体积的PBS平衡。在结合样品之后,将柱用10个柱体积的PBS洗涤,并随后用5个柱体积的0.1M甘氨酸,pH 2.0洗脱抗体。柱级分立即地用1/10体积的Tris HCl,pH 9.0中和。测量级分的OD₂₈₀,并汇集阳性级分并针对PBS,pH 7.2透析过夜。

[0452] 抗P-钙黏着蛋白抗体的人源化和亲和力成熟

[0453] 将杂交瘤衍生的抗P-钙黏着蛋白抗体的VH序列和VL序列如下人源化及亲和力成熟。

[0454] 人源化序列的产生

[0455] 编码人源化VL和VH结构域的DNA序列在GeneArt订购(Life Technologies Inc.雷根斯堡,德国),其包含针对智人(Homo sapiens)优化的密码子。通过切割和连接,将编码VL结构域和VH结构域的序列从GeneArt来源的载体亚克隆至适于哺乳动物细胞中分泌的表达载体中。将重链和轻链克隆至独立表达载体中以允许共转染。表达载体的元件包括启动子(巨细胞病毒(CMV)增强子-启动子)、促进分泌的信号序列、多聚腺苷酸化信号和转录终止子(牛生长激素(BGH)基因)、允许附加型复制并且在原核生物中复制的元件(例如SV40复制起点和ColE1或本领域已知的其他元件)和允许选择的元件(氨苄青霉素耐药基因和zeocin标记)。

[0456] 人源化抗体的表达和纯化

[0457] 以组成型方式表达SV40大T抗原的人胚肾细胞 (HEK293-TATCC11268) 是用于瞬时表达人源化和/或优化的IgG蛋白的优选宿主细胞系之一。使用PEI (聚乙烯亚胺, 分子量25,000线性, Polysciences, 美国, 目录号23966) 作为转染试剂, 进行转染。通过在室温 (RT) 在900ml细胞培养级水中小心溶解1g PEI, 制备PEI母液。为了促进PEI的溶解, 通过添加HCl至pH 3-5使溶液酸化, 随后用NaOH中和至最终pH 7.05。最后, 将体积调节至1L并且将溶液经0.22μm滤器过滤, 等分并冷冻在-80℃直至进一步使用。一旦解冻, 等分试样可以在-20℃再冷冻至多3次, 但是不应当在-20℃长期储存。

[0458] 使用用于细胞转染和增殖的无血清培养基, 并使用ExCell VPRO无血清培养基 (SAFC Biosciences, 美国, 目录号24561C) 作生产/进料培养基, 培养HEK 293T细胞。以悬浮培养法培育为瞬时转染所制备的细胞。对于小规模 (<5L) 转染, 在5%CO₂的增湿培养箱中有轨摇床 (100-120转/分钟) 上的Corning摇瓶 (Corning, Tewksbury, MA) 中培育细胞 (种子瓶)。应当维持种子培养物中的细胞处于指数生长相 (细胞密度在 5×10^5 /mL和 3×10^6 /mL之间) 并且对于转染, 这些细胞显示>90%的生存力。这个范围之外的细胞密度将导致稀释后延迟相或转染效率减低。对于小规模 (<5L) 转染, 将细胞等分试样从种子培养物取出并以诺华无血清培养基在36%终体积中调节至 1.4×10^6 个细胞/mL。通过以7%最终培养物体积稀释DNA至1mg/L (终体积) 随后温和混合, 制备DNA溶液 (对于1L转染, 溶液1:0.5mg重链表达质粒和0.5mg轻链表达质粒)。为了防止细菌的污染, 使用0.22μm滤器 (例如Millipore Stericup) 过滤这种溶液。随后还将3mg/L (终体积) 的PEI溶液稀释于7%的最终培养物体积中并温和地混合 (溶液2)。两种溶液均在室温 (RT) 温育5-10分钟。此后将溶液2添加至溶液1, 伴以温和混合, 并在室温温育另外5-15分钟。随后将转染混合物添加至细胞并且细胞的培育继续4至6小时。最后, 通过添加**ExCell®** VPRO无血清培养基实现剩余的50%总生产体积。转染后, 将细胞培育继续11天。通过在4℃以4500转/分钟离心20分钟 (**Heraeus®**, Multifuge 3S-R, Thermo Scientific, Rockford, IL) 收获培养物。将回收的细胞上清液经stericup滤器 (0.22μm) 无菌过滤并贮存在4℃直至进一步处理。

[0459] 使用新消毒的 (0.25M NaOH) HiTrap ProtA **MabSelect®** SuRe, 5ml柱, 在4℃在冷却柜中的“**AKTA**100 explorer Air”层析系统上进行纯化。将柱用5个CV的PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) 平衡, 并且随后将无菌过滤的上清液 (2L) 以4.0ml/分钟加载。将柱用8个CV的PBS洗涤以洗脱未结合的样品并用5个CV的PBS再次洗涤。将抗体用5个CV的50mM柠檬酸盐, 70mM NaCl pH 3.2洗脱。洗脱物按3ml级分收集; 汇集级分并用1M Tris HCl pH 10调整至pH 7。将汇集物汇集并无菌过滤 (Millipore Steriflip, 0.22μm), 在分光光度计ND-1000 (NanoDrop) 中测量OD 280nm, 并基于序列数据计算蛋白质浓度。对洗脱物检验聚集 (SEC-MALS) 和纯度 (SDS-PAGE、LAL和MS)。对于第二纯化步骤, 如果需要, 将来自第一次纯化的汇集物装入新消毒 (0.5M NaOH) 的SPX (Hi Load 16/60 Superdex 200级120mL (GE-Healthcare) 中。将柱用PBS平衡并用PBS缓冲液按1ml/分钟运行, 将洗脱物以1.2ml级分收集并如对第一纯化步骤所述那样分析。

[0460] 来自Morphosys HuCAL **PLATINUM®** 噬菌体文库淘选的抗体

[0461] 为了选择识别人P-钙黏着蛋白的抗体, 利用多种淘选策略。使用市售噬菌体展示

文库Morphosys HuCAL **PLATINUM**[®]文库作为抗体变体蛋白的来源,通过选择与P-钙黏着蛋白结合的克隆,产生了针对人P-钙黏着蛋白的治疗性抗体。该噬菌粒文库基于 **HuCAL**[®]概念 (Knappik等人,2000,J Mol Biol 296:57-86) 并利用在噬菌体表面上展示 Fab的CysDisplay[™]技术 (WO 01/05950)。

[0462] 为了分离抗P-钙黏着蛋白抗体,使用固相、液相和基于细胞的淘选策略。

[0463] 对重组P-钙黏着蛋白的固相淘选

[0464] 在抗原选择过程之前,进行包被检验ELISA是以确定抗原的最佳包被浓度。通过被动吸附包被在Maxisorp[™]平板 (Nunc) 上,在固相淘选方案中使用具有His标签的重组P-钙黏着蛋白。将96孔Maxisorp[™]平板 (Nunc) 的适宜数目 (取决于子文库汇集物的数目) 的孔在4℃用125nM抗原包被过夜。包被的孔用PBS (磷酸盐缓冲盐水) /5%乳粉/5%BSA (牛血清白蛋白) /0.1%Tween 20/1mM CaCl₂封闭。对于每次淘选,在溶液在室温 (RT) 封闭约50uL HuCAL **PLATINUM**[®]噬菌体-抗体2小时。在封闭操作后,将预封闭的噬菌体混合物添加至抗原包被和封闭的每个孔并且在室温在微量滴定板 (MTP) 摇床上温育2小时 (h)。此后,通过几个洗涤步骤用PBS洗去非特异性结合的噬菌体。为了洗脱特异性结合的噬菌体,添加25mM DTT (二硫苏糖醇) 在室温持续10分钟 (min)。DTT洗脱物用于感染大肠杆菌 (Escherichia coli) TG-F⁺细胞。感染后,将细菌铺种在LB (溶源性培养液) /Cam (氯霉素) 琼脂平板上并在30℃温育过夜。将菌落从平板刮下并用于噬菌体拯救、多克隆扩增选择的克隆和噬菌体产生。采用纯化的噬菌体,启动下一轮淘选。

[0465] 根据第一轮的方案进行第二和第三轮固相淘选,只是洗涤条件更严格。

[0466] 亚克隆和微量表达选择的Fab片段

[0467] 为了促进可溶性Fab的快速表达,将选择的HuCAL **PLATINUM**[®]噬菌体的编码 Fab的插入片段从 **pMORPH**[®]30展示载体亚克隆入 **pMORPH**[®] x11表达载体 **pMORPH**[®] x11_FH中。

[0468] 为了初始筛选和表征单个表达Fab的大肠杆菌的过夜培养物,使用0.5mg/mL溶菌酶,0.8mM EDTA和4U/μl Benzonase裂解克隆。将含有Fab的大肠杆菌裂解物用于ELISA和FACS筛选。

[0469] ELISA筛选

[0470] 使用ELISA筛选,从淘选输出结果鉴定单个Fab克隆以便与靶抗原结合。使用含有Fab的粗制大肠杆菌裂解物测试Fab。

[0471] 为了验证制备的大肠杆菌裂解物中的Fab表达,将Maxisorp[™] (Nunc) 384孔平板用PBS中1:1000稀释的Fd片段特异性绵羊抗人IgG包被。用PBS中的5%脱脂奶粉封闭平板后,添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。使用Attophos荧光底物 (Roche, 目录号11681982001), 通过与碱性磷酸酶缀合的F(ab)₂特异性山羊抗人IgG (1:5000稀释) 检测Fab的结合。在430nm激发下,记录在535nm的荧光发射。

[0472] 为了鉴定结合P-钙黏着蛋白抗原的Fab片段,在PBS中通过被动吸附用25nM人P-钙黏着蛋白抗原包被Maxisorp[™] (Nunc) 384孔平板。用PBS中的5%脱脂奶粉封闭平板后,添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。使用Attophos荧光底物 (Roche, 目录号11681982001), 通过与

碱性磷酸酶缀合的F(ab)₂特异性山羊抗人IgG(1:5000稀释)检测Fab的结合。在430nm激发下,记录在535nm的荧光发射。

[0473] FACS筛选(荧光激活细胞分选)

[0474] 在FACS筛选时,从淘选输出结果鉴定与细胞表面表达的抗原结合的单个Fab克隆。使用含有Fab的粗制大肠杆菌裂解物测试Fab的细胞结合。

[0475] 将50μl细胞悬液转移入一块新的96孔板(产生1x10⁵个细胞/孔)并与50μl含有Fab的细菌提取物混合。

[0476] 随后将细胞-抗体悬液在摇床上在冰上温育1小时。在温育后,将细胞离心并用冰冷的FACS缓冲液洗涤两次。在每个洗涤步骤后,将细胞离心并小心地重悬。

[0477] 添加第二检测抗体(PE缀合的山羊抗人IgG;Dianova)并且将样品在冰上温育并随后根据Fab温育过程洗涤。在FACSCalibur™仪中确定荧光强度。

[0478] **HuCAL**® Fab片段的表达和纯化

[0479] 在大肠杆菌TG1F⁻细胞中进行Fab片段的表达。将培养物在30℃振摇18小时。收获并破碎细胞。通过IMAC和凝胶过滤法分离His₆标记的Fab片段(作为SEQ ID NO:130公开的“His₆”)并且通过UV-分光光度测定法在280nm测定蛋白质浓度。

[0480] 通过质谱法(MS)测定天然状态的Fab制备物的身份和纯度。

[0481] 交叉反应性分析

[0482] 在ELISA中测试纯化的Fab与人、食蟹猴、大鼠和小鼠P-钙黏着蛋白ECD蛋白的结合。为此目的,将Maxisorp™(Nunc)384孔平板在4℃用PBS中浓度10ug/mL的抗原包被过夜。使用Attophos荧光底物(Roche,目录号11681982001),通过与碱性磷酸酶缀合的F(ab)₂特异性山羊抗人IgG(1:5000稀释)检测Fab的结合。在430nm激发下,记录在535nm的荧光发射。

[0483] 转换成IgG和IgG表达

[0484] 为了在HEK细胞中表达全长IgG,将重链(VH)和轻链(VL)的可变结构域片段从Fab表达载体亚克隆入用于人IgG1的适宜**pMorph**®_{-hIg}载体中。转染后10天收获细胞培养上清液。在无菌过滤后,使用液体处理站,使溶液经受蛋白A亲和层析。将缓冲液交成1 x Dulbecco PBS(pH 7.2,Invitrogen)并将样品无菌过滤(0.2μm孔径)。通过UV-分光光度法在280nm测定蛋白质浓度并且在变性、还原条件下在SDS-PAGE中分析IgG纯度。

[0485] 生物测定法

[0486] 在下文例举的测定法中评价遵循上文所述淘选方法获得的抗P-钙黏着蛋白抗体:

[0487] HCC1954细胞内化测定法

[0488] 为了确定抗P-钙黏着蛋白抗体经历靶介导的细胞内化的能力,使用表达P-钙黏着蛋白的HCC1954肿瘤细胞系,建立基于显微术的内化测定法。

[0489] 将细胞重悬于全生长培养基(RPMI-1640+10%FCS)中并以细胞密度5x10³个细胞/孔在100μl中接种至平底显微96孔分析平板(**ViewPlate**®-96F TC,Perkin Elmer,#6005225)中并且在37℃和5%CO₂温育2天。

[0490] 二天后,在PBS中稀释**HuCAL**®抗体(IgG)至所需的浓度。将100μl抗体溶液添加至接种的细胞并温育2小时。此后,将细胞用PBS洗涤两次,用1 x CellFIX试剂(CellFIX™,BD Biosciences,#340181)固定,用PBS再次洗涤两次并用0.1%Triton X-100透化。随后用

1 x Odyssey缓冲液 (Li-Cor, No. 927-40000) 封闭细胞1小时。吸出后,将细胞用Hoechst (bisBenzimide H 33342 trichloride, #B2261, Sigma) 和Alexa **Fluor**® 488山羊抗人IgG (Invitrogen, #A-11013) 染色1小时。在染色后,将细胞用PBS洗涤三次并使用Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Fischer Scientific) 分析。为了评估半数最大内化浓度 (IC_{50} 值),以4倍稀释步骤进行涵盖10nM至2.4pM范围的IgG滴定。

[0491] 移除翻译后修饰 (PTM) 位点

[0492] 发现一种抗体NOV169在HCDR1中含有单个N31S PTM位点,所述抗体在上文描述的内化测定法中鉴定并且发现其有效内化入表达P-钙黏着蛋白的肿瘤细胞HCC1954。为了防止脱酰胺化,将这个位点通过单点Kunkel诱变法转化成N31Q位点,产生抗体NOV169N31Q。与亲本NOV169相比,通过forteBIO KD测定法证实NOV169N31Q对重组人P-钙黏着蛋白的等价结合强度。

[0493] 抗体的总结

[0494] 表1阐述了从Morphosys HuCAL **PLATINUM**®噬菌体文库分离的抗P-钙黏着蛋白抗体和从鼠杂交瘤衍生的人源化抗P-钙黏着蛋白抗体的有关序列信息。

[0495] 实施例2:人P-钙黏着蛋白EC1_EC2及其与NOV169N31Q Fab的复合物的X射线晶体学结构测定

[0496] 迄今未知人P-钙黏着蛋白的三维结构。测定人P-钙黏着蛋白ECD (胞外结构域) 片段 (前两个N末端钙黏着蛋白重复序列结构域,或EC1_EC2,氨基酸108至324,SEQ ID NO:2,表1) 及其与NOV169N31Q Fab片段的复合物 (表1) 的晶体结构。如下文详述,将人P-钙黏着蛋白EC1_EC2表达、再折叠、纯化并结晶。此外,将纯化的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2与NOV169N31Q Fab混合以形成随后也纯化并结晶的复合物。随后使用蛋白质晶体学生成游离状态下和与NOV169N31Q Fab结合的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的原子解析数据,以确定表位。

[0497] 用于晶体学的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2和NOV169N31Q Fab的蛋白质产生

[0498] 表3中显示为晶体学所产生的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2和NOV169N31Q Fab的氨基酸序列。人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的构建体包含人P-钙黏着蛋白 (UniProt识别码P22223, SEQ ID NO:126) 的残基108至324 (加下划线),连同来自重组表达载体的N末端残基 (以小写字母显示,SEQ ID NO:127)。对于NOV169N31Q Fab,显示了重链和轻链连同C末端鉴定/纯化标签的氨基酸序列 (以小写字母显示,分别是SEQ ID NO:128和129)。

[0499] 表3:用于晶体结构测定的蛋白质

[0500]

构建体	单字母代码的氨基酸序列	SEQ ID NO
人 P-钙黏着蛋白(P22223)	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCR AVFREAEVTLEAGGAEQEPGQALGKVFM GCPGQEPALFSTDNDFFTNRNGETVQERR SLKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWVVAPIS VPENGKGPFPQRLNQLKSNKDRDTKIFYS ITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLLNKPL DREEIAKYELFGHAVSENGASVEDPMNISI IVTDQNDHKPKFTQDTFRGSVLEGVLPGT SVMQVTATDEDDAIYTYNGVVAYSISHSQE PKDPHDLMTIHRSTGTISVISSGLDREKV PEYTLTIQATDMDGDGSTTTAVAVVEILD ANDNAPMFDPQKYEAHVPENAVGHEVQR LTVTDLDAPNSPAWRATYLIMGGDDGDH FTITTHPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHT LYVEVTNEAPFVLKLPTSTATIVVHVEDV NEAPVFVPPSKVVEVQEGIPTGEPVCVYT AEDPDKENQKISYRILRDPAGWLAMPDS GQVTAVGTLTREDEQFVRNNIYEVMLA MDNGSPPTTGTGTLTLIDVNDHGPVPE PRQITICNQSPVRQVLNITDKDLSPTSPF QAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTVVLSLK KFLKQDQTYDVHLSLSDHGNKEQLTVIRAT VCDCHGHVETCPGPWKGGFILPVLGAVL ALLFLLLVLVVLRKKRKIKEPLLLPEDD TRDNVFYYGEEGGGEEDQDYDITQLHRG	126

[0501]

	LEARPEVVLNRNDVAPTHIPTPMYRPRPANP DEIGNFHIENLKAANTDPTAPPYDTLLVFD YEGSGSDAASLSSLTSSASDQDQDYDYLNE WGSRFKKLADMYGGGEDD	
人 P-钙黏着蛋白 EC1_EC2	gpDWVVAPISVPENGKGPFQRLNQLKSN KDRDTKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKET GWLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVSENG ASVEDPMNISHVTDQNDHKPKFTQDTRG SVLEGVLPGTSMQVTATDEDDAIYTYNG VVAYSIHSQEPKDPHDLMTIHRSTGTISV ISSGLDREKVPEYTLTIQATDMDGDGSTT TAVAVVEILDANDN	127
NOV169N31 Q Fab 重链	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVS SQSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRIFYRSK WYNDYALSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNS VTPEDTAVYYCARGEGYREGFAIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNH KPSNTKVDKKVEPKSEFdykdddkgap h h h h	128
NOV169N31 Q Fab 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISN TLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YLSWFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEA	129

[0502] 将具有N末端六组氨酸标签 (SEQ ID NO:130) 接续PreScission剪切位点的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2克隆并且在大肠杆菌BL21 (DE3) Star (Invitrogen) 中以pET28载体表达。在18℃用IPTG诱导过夜后,收获细胞 (67g) 并用弗氏压碎器在700ml的50mM TRIS pH 8.0, 500mM NaCl, 10%甘油, 2mM TCEP和14片无EDTA的完整蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 中裂解。在离心后 (在18,000转/分钟用SS34转子35分钟), 将上清液无菌过滤 (0.45μm) 并且加载于缓冲液A (50mM TRIS pH 8.0, 500mM NaCl, 10%甘油) 预平衡的Crude FF金属螯合层析柱

(5ml, GE Healthcare) 上。将柱首先用平衡缓冲液洗涤并且随后用包含25mM咪唑的缓冲液A洗涤,随后用25mM至500mM咪唑梯度洗脱。随后在针对50mM TRIS pH 8.0过夜透析期间,使用PreScission蛋白酶(10 μ g/mg)切割洗脱的蛋白质(36mg)。在过滤(0.22 μ m)后,将样品加载于50mM TRIS pH 8.0预平衡的MonoQ阴离子交换层析柱(GE Healthcare)上并用0.0M至1.0M NaCl梯度洗脱。收集含有P-钙黏着蛋白EC1_EC2(25.6mg)的主峰并通过SDS-PAGE和HPLC分析。随后将级分汇集物如前文那样再加载于用50mM TRIS pH 8.0,500mM NaCl,10%甘油预平衡的Crude FF金属螯合层析柱(5ml, GE Healthcare)上。在穿过液(flow-through)中回收并通过HPLC和LC-MS分析P-钙黏着蛋白EC1_EC2蛋白。LC-MS分析显示了预期的分子量(23,837Da)。

[0503] NOV169N31Q Fab按1升规模在大肠杆菌中表达。首先,将编码Fab片段的质粒转化入化学感受态TG1F-大肠杆菌细胞。将细菌在37 $^{\circ}$ C于LB/琼脂/1%葡萄糖/34 μ g/ml氯霉素平板上过夜生长后,将一个菌落用来接种6ml预培养物(2 x YT/1.0%葡萄糖/34 μ g/ml氯霉素)。将培养物在30 $^{\circ}$ C温育过夜,220转/分钟振摇。次日,将预培养物转移至1升表达培养物(2 x YT/0.1%葡萄糖/34 μ g/ml氯霉素)。将表达培养物在30 $^{\circ}$ C温育过夜,220转/分钟振摇,直至达到OD_{600nm} 0.6-0.8。通过添加IPTG至终浓度0.5mM诱导表达。表达在25 $^{\circ}$ C和220转/分钟过夜进行。次日,将细胞沉淀并在-80 $^{\circ}$ C冷冻。

[0504] 使用自动化方案在AEKTA表达系统上(软件:Unicorn_v5.11)以2个步骤纯化Fab片段。将细菌沉淀物首先重悬于40ml裂解缓冲液(200mM磷酸钠pH 7.4,0.5M NaCl,0.1%溶菌酶,2mM MgCl₂,10U/ml benzonase,1片/50ml完整无EDTA蛋白酶抑制剂)中并且在振摇下室温温育1小时。通过在16,000g离心30分钟移除细胞残片。将含有Fab的上清液穿过0.2 μ m注射器滤器(Pall, #PN4525)并加载于运行缓冲液(20mM磷酸钠,0.5M NaCl,10mM咪唑,pH 7.4)预平衡的系统上。第一纯化步骤在1ml HiTrap HP柱(GE Healthcare)上进行。用运行缓冲液洗涤柱并且用洗脱缓冲液(20mM磷酸钠,0.5M NaCl,250mM咪唑,pH 7.4)洗脱His₆标记的Fab片段(作为SEQ ID NO:130公开的“His₆”)。峰级分自动施加于凝胶过滤柱(HiLoad 16/60 Superdex 75;GE Healthcare)上。纯化的Fab片段用PBS洗脱。通过UV_{280nm}测量并通过使用从氨基酸序列估计的消光系数,应用Lambert-Beer等式,测定Fab片段的浓度。

[0505] 人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的结晶和结构测定

[0506] 将人P-钙黏着蛋白EC1_EC2对10mM Tris-HCl pH 7.4,25mM NaCl透析,浓缩至15mg/ml并且在20 $^{\circ}$ C筛选结晶。

[0507] 通过坐滴蒸气扩散法在96孔SD2平板中生长晶体。详细而言,将0.2 μ l蛋白质与0.2 μ l储液混合;并且将液滴在20 $^{\circ}$ C针对80 μ l相同的储液平衡。用0.085M HEPES pH 7.5,3.655M NaCl,15%甘油构成的储液获得适于X射线衍射分析的晶体。

[0508] 为了采集数据,将一枚人P-钙黏着蛋白EC1_EC2晶体安装在冷环中并且在液氮中直接快速冷却。在Swiss Light Source(Paul Scherrer Institute,瑞士)的光束线X10SA(PX-II)以Pilatus像素探测器和**0.99999 $\text{\AA}$** 波长的X射线采集衍射数据。总计,按晶体距探测器距离200mm记录各自0.25度振荡的720张图像。将数据处理并且使用如APRV-INDEX(Kroemer,Dreyer,Wendt(2004)Acta Crystallogr.Sect.D:Biological Crystallogr.60:1679-1682)中所实施的XDS(Kabsch(1993)J.Appl.Crystallogr.26:795-800),按**1.40 $\text{\AA}$** 分辨率

放大。晶体位于空间群C2, 晶胞尺度如下: **$a = 120.89 \text{ \AA}$** , **$b = 76.52 \text{ \AA}$** , **$c = 46.21 \text{ \AA}$** , $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 107.79^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ 。用程序Phaser (McCoy等人, (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674) 和PDB条目1L3W (非洲爪蟾 (*X. Laevis* C) - 钙黏着蛋白, **$3.08 \text{ \AA}$** , 55% 序列同一性), 通过分子置换, 解析人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的结构。最终模型在COOT建立 (Emsley等人, (2010) Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr. 66:486-501), 并用Buster (Global Phasing, LTD) 完善至 R_{work} 值和 R_{free} 值分别为19.8%和21.3%, 键长和键角的rmsd分别为 **$0.010 \text{ \AA}$** 和 1.13° 。

[0509] 人P-钙黏着蛋白EC1_EC2结构

[0510] 图1中显示人P-钙黏着蛋白EC1_EC2 (氨基酸残基108至322) 的晶体结构。两个钙黏着蛋白结构域均具有充分限定的电子密度并且显示出期望的总体折叠。在结构域界面观察到三个钙离子。

[0511] 已经提出钙黏着蛋白的ECD结构域在控制胞间黏附的黏着连接的胞外架构中发挥作用。连接装配物涉及钙黏着蛋白簇的胞外结构域之间的反式和顺式同型相互作用 (Boggon等人, (2002) Science 296:1308-1313; Harrison等人, (2011) Structure 19:244-256)。反式同型相互作用涉及 (由二个不同细胞呈递) 取向相反的两个钙黏着蛋白分子的EC1结构域之间的N末端Trp交换 (“链交换二聚体”)。相反, 顺式同型相互作用涉及一个分子的N末端胞外钙黏着蛋白 (EC1) 结构域和取向相同的另一个分子的第二 (EC2) 结构域。认为反式相互作用比顺式相互作用强得多。尽管反式相互作用形成胞间黏附的分子基础, 但认为顺式相互作用通过分子簇集促进细胞黏附。

[0512] 人P-钙黏着蛋白EC1_EC2片段的晶体结构显示, 借助Trp交换涉及反式同型相互作用的N末端区段不参与晶体中的这类相互作用并且与其自身结构域结合。另外, 晶体堆积的分析揭示, 对称性相关的P-钙黏着蛋白EC1_EC2分子之一正使顺式同型相互作用与已经对其他钙黏着蛋白所报告的那些顺式同型相互作用高度相似, 从而显示在这种情况下, 结晶受顺式同型相互作用驱动。

[0513] NOV169N31Q Fab复合物的结晶和结构测定

[0514] 通过以下方式制备人P-钙黏着蛋白EC1_EC2与NOV169N31Q Fab的复合物: 将纯化的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2和NOV169N31Q Fab按1.5:1.0摩尔比 (通过HPLC测量的浓度) 混合并且采用2片无EDTA完整蛋白酶抑制剂混合物 (Roche), 在10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl中平衡的Superdex 200 (GE Healthcare) 大小排阻层析柱上纯化复合物。通过SDS-PAGE和LCMS分析峰级分。浓缩含有人P-钙黏着蛋白EC1_EC2/NOV169N31Q Fab复合物的级分至约12mg/ml, 添加CaCl₂至终浓度5mM并且在20℃筛选样品的结晶情况。

[0515] 通过坐滴蒸气扩散法在96孔SD2平板中生长晶体。详细而言, 将0.2μl蛋白质与0.2μl储液混合; 并且将液滴在20℃针对80μl相同的储液平衡。用0.2M乙酸钙, 10% (w/v) PEG 8,000, 0.1M MES pH 6.5构成的储液获得了适于X射线衍射分析的晶体。

[0516] 在数据采集之前, 将一枚人P-钙黏着蛋白EC1_EC2/NOV169N31Q Fab晶体迅速转移入含20%PEG 8,000, 30%甘油的1:1混合储液, 并在液氮中快速冷却。

[0517] 在Swiss Light Source (Paul Scherrer Institute, 瑞士) 的光束线X10SA (PX-II) 以Pilatus像素探测器和 **$0.99999 \text{ \AA}$** 波长的X射线采集衍射数据。总计, 按晶体距探测

器距离340mm记录各自0.25度振荡的720张图像。将数据处理并且使用如APRV-INDEX (Kroemer, Dreyer, Wendt (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60:1679-1682) 中所实施的XDS (Kabsch (1993) *J. Appl. Crystallogr.* 26:795-800), 按**2.10 Å**分辨率放大。晶体位于空间群 $P2_12_12_1$, 晶胞尺度如下: **a= 172.69 Å, b= 77.79 Å, c= 133.41 Å**, $\alpha=90^\circ, \beta=90.0^\circ, \gamma=90^\circ$ 。用Phaser (McCoy等人, (2007) *J. Appl. Cryst.* 40:658-674), 通过分子置换, 解析人P-钙黏着蛋白EC1_EC2/NOV169N31Q Fab复合物的结构。最终模型在COOT建立 (Emsley等人, (2010) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66:486-501), 并用Buster (Global Phasing, LTD) 完善至 R_{work} 值和 R_{free} 值分别为19.2%和22.1%, 键长和键角的rmsd分别为**0.010 Å**和 1.18° 。通过CCP4程序套装的程序Ncont (Collaborative Computing Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 50:760-763) 鉴定NOV169N31Q Fab中在任何原子的**4.0 Å**范围内含有原子的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的残基并且在表4和表5中列出。通过CCP4程序套装的程序AREAIMOL鉴定, 当结合NOV169N31Q抗体时变得溶剂更不可及的人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的残基。

[0518] NOV169N31Q的P-钙黏着蛋白EC1_EC2表位

[0519] P-钙黏着蛋白EC1_EC2/NOV169N31Q Fab复合物的晶体结构用来鉴定针对NOV169N31Q的P-钙黏着蛋白EC1_EC2表位。X射线分析显示, NOV169N31Q与人P-钙黏着蛋白的EC1结构域 (N末端钙黏着蛋白重复结构域) 结合 (图2)。在晶体的非对称单元 (一个非对称单元含有为了通过应用晶体对称性算子而再现完整晶体所需要的全部结构信息) 中, 存在两个拷贝的NOV169N31Q Fab-人P-钙黏着蛋白EC1_EC2复合物。除了由于晶体堆积造成的小的差异, 两个拷贝共有几乎相同的与NOV169N31Q Fab接触的残基。

[0520] 在人P-钙黏着蛋白EC1_EC2上与NOV169N31Q Fab的相互作用表面由两个不连续 (即, 非连续) 序列形成, 所述序列完全包含于P-钙黏着蛋白的EC1结构域内部并且涵盖残基123至残基127, 和残基151至残基177 (图3)。在那些残基当中, 残基124和残基125以及残基151至残基172直接有助于短于**4.0 Å**的分子间接触 (非氢原子之间), 如表4和表5中详述和图3中所示。这些残基形成由NOV169N31Q Fab识别的三维表面 (图4)。

[0521] 表4. 人P-钙黏着蛋白EC1_EC2和NOV169N31Q Fab重链 (H) 之间的相互作用。P-钙黏着蛋白残基根据P22223 (SEQ ID NO:126) 编号。Fab重链残基根据其线性氨基酸序列 (SEQ ID NO:128) 编号。显示的P-钙黏着蛋白残基在NOV169N31Q Fab中原子**4.0 Å**范围内具有至少一个原子。

[0522]

人 P-钙黏着蛋白残基 (SEQ ID NO: 126)		NOV169N31Q Fab 残基(SEQ ID NO: 128)		
氨基酸	编号	氨基酸	编号	链
Phe	124	Leu	65	H
Asp	151	Tyr	105	H
Pro	153	Tyr	54	H
		Arg	56	H
		Tyr	60	H
		Tyr	105	H
Pro	154	Tyr	54	H
Glu	155	Arg	52	H
		Tyr	54	H
		Tyr	105	H
		Arg	107	H
Gly	156	Arg	107	H
Pro	172	Leu	65	H

[0523] 表5. 人P-钙黏着蛋白EC1_EC2和NOV169N31Q Fab轻链(L)之间的相互作用。P-钙黏着蛋白残基根据P22223 (SEQ ID NO:126) 编号。Fab轻链残基根据其线性氨基酸序列 (SEQ ID NO:129) 编号。显示的P-钙黏着蛋白残基在NOV169N31Q Fab中原子 **4.0 Å** 范围内具有至少一个原子。

[0524]

人 P-钙黏着蛋白残基 (SEQ ID NO: 126)		NOV169N31Q Fab 残基(SEQ ID NO: 129)		
残基	编号	残基	编号	链
Phe	124	Asp	1	L
Pro	125	Ile	2	L
		Gln	27	L
		Ser	93	L

[0525]

Glu	155	Trp	94	L
Gly	156	Trp	94	L
Ala	159	Leu	92	L
Val	160	Leu	92	L
Glu	161	Gln	27	L
		Thr	28	L
Lys	162	Ser	30	L
Glu	163	Gly	68	L
Leu	168	Leu	92	L
Asn	170	Ser	93	L
		Trp	94	L
Lys	171	Trp	94	L

[0526] 与人P-钙黏着蛋白的其他胞外钙黏着蛋白-重复结构域相反,EC1结构域不携有任何已知的N联或O联糖基化位点。NOV169N31Q与P-钙黏着蛋白结合因此与糖基化无关。还值得注意的是,人P-钙黏着蛋白EC1结构域的氨基酸序列在食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) P-钙黏着蛋白中完全保守(图5)。因此在毒理学研究中所用的这个猴物种中,NOV169N31Q识别的P-钙黏着蛋白表位完全保守。

[0527] 人P-钙黏着蛋白EC1_EC2的Glu155是与NOV169N31Q Fab接触最多的表位残基(参见图3)。有趣地,Glu155位于一个仅存在于人钙黏着蛋白1至4中的非保守插入内,如全部人钙黏着蛋白的多重序列比对所示(图6)。由于Glu155本身在人钙黏着蛋白1、2和4中不保守,预期NOV169N31Q对人钙黏着蛋白-3(aka人P-钙黏着蛋白)显示高度选择性。

[0528] 如上文已经提到,钙黏着蛋白在胞间黏附的分子机制中发挥重要作用,所述分子机制涉及黏着蛋白簇的胞外结构域钙之间的强反式同型相互作用和弱顺式同型相互作用。(Boggon等人,(2002) *Science* 296:1308-1313;Harrison等人,(2011) *Structure* 19:244-256)。基于人P-钙黏着蛋白EC1_EC2/NOV169N31Q Fab复合物的晶体结构,似乎NOV169N31Q的结合表位与涉及顺式同型相互作用的EC1结构域表面区域部分重叠,但是与涉及反式(胞间)同型相互作用的N端区域不重叠。因此,NOV169N31Q不与强反式相互作用竞争钙黏着蛋白结合,并且因此更可能更容易地接近其结合表位。另外,预计这种抗体与其靶抗原的结合并不完全破坏胞间黏附,因为反式同型相互作用得到保留。

[0529] 实施例3:P-钙黏着蛋白抗体药物缀合物的生成和表征

[0530] 通过单步骤法制备DM1缀合物

[0531] 在开始缀合反应之前,将针对P-钙黏着蛋白的抗体借助切线流过滤(TFF#1)渗滤到反应缓冲液(15mM磷酸钾,2mM EDTA,pH 7.6)中。随后,将抗体(5.0mg/mL)与DM1(相对抗体的量5.6倍摩尔过量)混合并且随后与SMCC(相对抗体的量4.7倍摩尔过量)混合。反应在20℃在含有2mM EDTA和10%DMA的15mM磷酸钾缓冲液(pH 7.6)中进行大约16小时。通过添加1M乙酸以调节pH至5.50,使反应猝灭。在调节pH后,将反应混合物通过一个多层(0.45/0.22μm)PVDF滤器过滤并且使用切线流过滤(TFF#2),纯化及渗滤到含有8.22%蔗糖的20mM

组氨酸缓冲液 (pH5.6) 中。下表6中列出用于切线流过滤的仪器参数。

[0532] 表6. 用于切线流过滤的仪器参数

[0533]	TFF 参数	TFF#1 设定点	TFF#2 设定点
	本体浓度(Cb – g/L)	20	20
	TMP (psi)	12-18	12-18
	输入流速 (LMH)	324	324
	膜载量(g/m ²)	110 – 150	110 – 150
	Diavolumes	10	14
	渗滤缓冲液	15 mM 磷酸钾, 2 mM EDTA, pH 7.6	20 mM 组氨酸, 8.22% 蔗糖, pH 5.6
	温度(°C)	RT (20–25)	RT (20–25)

[0534] 通过以下方式分析从上文所述方法获得的缀合物:通过UV光谱法分析缀合物的细胞毒性剂载量(类美登素对抗体比率,MAR);通过SEC-HPLC分析所述缀合物以测定缀合物单体;并通过反相HPLC或疏水性屏蔽相(Hisep)-HPLC分析所述缀合物的游离类美登素百分数。表7中显示了数据。

[0535] 表7. 使用单步骤法制备的P-钙黏着蛋白ADC的特性

[0536]	样品	MAR	单体[%]	总游离类美登素(%)
	NOV169N31Q-MCC-DM1	3.7	99.1	0.6

[0537] 通过原位法制备DM1缀合物

[0538] 本发明的缀合物也可以根据以下程序通过原位方法制备。使用磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)接头,将P-钙黏着蛋白抗体与DM1缀合。在DMA中制备DM1和磺基-SMCC异双官能接头的母液。将磺基-SMCC和DM1硫醇混合在一起,以在25°C在含有40%v/v 50mM琥珀酸水性缓冲液、2mM EDTA, pH 5.0的DMA中按DM1对接头比率1.3:1摩尔当量和DM1终浓度1.95mM反应10分钟。随后抗体与反应物的等分试样反应,以在50mM EPPS, pH 8.0和10%DMA (v/v) 中2.5mg/mL抗体的最终缀合条件下产生SMCC对抗体摩尔当量比率约6.5:1。在25°C大约18小时后,使用SEPHADEX™G25柱纯化缀合反应混合物,其中所述柱用10mM琥珀酸,250mM甘氨酸,0.5%蔗糖,0.01%Tween 20, pH 5.5平衡。

[0539] 表8.DM1缀合的抗体的特性

[0540]	克隆名称	接头过量	MAR	单体(%)	产率(%)	游离药物(%)
	NOV169N31Q	7.0	3.15	99.0	76	<2
	NEG0012	6.8	4.07	97.8	56	<2
	NEG0013	5.5	3.29	94.6	70	<2

[0541]

NEG0016	6.8	3.44	97.3	70	<2
NEG0064	5.3	3.91	98.0	76	<2
NEG0067	5.1	3.63	97.8	79	<2

[0542] 用SPDB接头制备ADC

[0543] 在25℃在含有50mM磷酸钾、50mM NaCl、2mM EDTA和5% DMA的60mM EPPS缓冲液 (pH 8.5) 中, 将P-钙黏着蛋白抗体 (8mg/ml) 用N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代) 丁酸酯 (SPDB, 4.0-4.1倍摩尔过量) 修饰120分钟。随后在25℃在含有50mM磷酸钾、50mM NaCl、2mM EDTA和5% DMA的60mM EPPS缓冲液 (pH 8.5) 中, 将修饰的Ab在不纯化的情况下以修饰型抗体终浓度4mg/mL与DM4 (超过未结合的接头1.5倍摩尔过量) 缀合18小时。使用SEPHADEX™ G25柱纯化缀合反应混合物, 其中所述柱用10mM琥珀酸, 250mM甘氨酸, 0.5% 蔗糖, 0.01% Tween 20, pH 5.5平衡并洗脱。

[0544] 表9.DM4缀合的抗体的特性

[0545]

克隆名称	接头 过量	MAR	单体 (%)	产率 (%)	游离药物 (%)
2P10	4.0	3.18	95.6	93	<0.5%
1G12	4.1	3.60	96.8	95	<0.5%
3D21	4.0	3.42	97.0	96	<0.5%

[0546] 用CX1-1接头制备ADC将抗体NEG0067 (5.0mg/mL) 与DM1 (相对抗体数量, 7.4倍摩尔过量) 混合并且随后与CX1-1 (相对抗体数量, 5.7倍摩尔过量) 混合。反应在25℃在含有2mM EDTA和5% DMA的50mM EPPS[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸]缓冲液 (pH 8.0) 中进行大约16小时。随后使用SEPHADEX™ G25柱纯化反应混合物, 其中所述柱在10mM琥珀酸, 250mM甘氨酸, 0.5% 蔗糖, 0.01% Tween 20, pH 5.5中平衡并洗脱。

[0547] 表10.CX1-1/DM1缀合的NEG0067的特性

[0548]

克隆名称	接头 过量	MA R	单体 (%)	产率 (%)	游离药物 (%)
NEG0067	5.7	3.47	99.4	79	0.7

[0549] 实施例4:P-钙黏着蛋白抗体和ADC对P-钙黏着蛋白的亲和力

[0550] 采用CM5传感器芯片, 使用 **Biacore®** T100仪 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) 或 **Biacore®** 2000仪 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA), 利用SPR技术测定多种抗体和抗体药物缀合物 (处于Ab-MCC-DM1形式) 对P-钙黏着蛋白和其物种直向同源物的亲和力。

[0551] 简而言之, 使用补充有2% **Odyssey®** 封闭缓冲液 (Li-Cor Biosciences,

Lincoln,NE)的HBS-P⁺(0.01M HEPES,pH 7.4,0.15M NaCl,0.05%表面活性剂P20)作为 **Biacore®** T100仪上全部实验的运行缓冲液。使用补充有2% **Odyssey®** 封闭缓冲液的HBS-P(0.01M HEPES,pH 7.4,0.15M NaCl,0.005%表面活性剂P20)作为 **Biacore®** 2000 仪上全部实验的运行缓冲液。通过响应单位(RU)测量固定化水平和分析物相互作用。进行预试验以检验并确认固定蛋白A(GE Healthcare,Pittsburgh,PA)及捕获测试抗体的可行性。

[0552] 对于动力学测量,进行以下实验,其中通过固定的蛋白A,将抗体捕获到传感芯片表面,并且测定P-钙黏着蛋白在游离溶液结合的能力。简而言之,在两个流动小室上通过胺偶联法以流速10μl/分钟,将28μg/ml蛋白A在pH 4.5固定在CM5传感芯片上以实现2300-3300RU。随后将0.01-0.25μg/ml测试抗体以5μl/分钟注射3分钟。通常保持抗体的捕获水平低于400RU。随后,将6.25-100nM的P-钙黏着蛋白ECD以2倍系列稀释并且以流速40μl/分钟在参比流动小室和试验流动小室上注射2-4分钟。下文列出所测试ECD的表11。跟踪结合作用的解离5分钟。在每个注射循环后,将芯片表面用PBS/6M胍HCl,pH 7.4以100μl/分钟再生45秒。全部实验均在25℃进行,并且使用Biacore T100评价软件版本2.0.3(GE Healthcare),用简单1:1相互作用模型全局拟合响应数据,以获得 **Biacore®** T100仪上结合速率(k_a)、解离速率(k_d)和亲和力(K_D)的估计值。使用Scrubber 2®软件版本2.0b(BioLogic Software),用简单1:1相互作用模型全局拟合在 **Biacore®** 2000仪进行的实验,以获得结合速率(k_a)、解离速率(k_d)和亲和力(K_D)的估计值。

[0553] 表11:亲和力测定法中所用的P-钙黏着蛋白ECD同种型和来源

[0554]

ECD同种型	标签	来源
人	C末端6x His (SEQ ID NO:130)	NVS
Cyno_1	C末端6x His (SEQ ID NO:130)	NVS
Cyno_2	C末端6x His (SEQ ID NO:130)	NVS
小鼠	C末端6x His (SEQ ID NO:130)	NVS
大鼠	C末端6x His (SEQ ID NO:130)	NVS

[0555] 表12列出了表1中公开的各种P-钙黏着蛋白抗体的结构域结合和亲和力。如本表中所示,抗体NOV169N31Q、NEG0012、NEG0013、NEG0016、NEG0064和NEG0067均在纳摩尔水平与人P-钙黏着蛋白反应,并且与针对食蟹猴P-钙黏着蛋白ECD所测试的那些抗体具有相似的亲和力。全部抗体均与大鼠交叉反应,NOV169N31Q例外。

[0556] 表12. 针对人P-钙黏着蛋白和物种直向同源物获得的抗P-钙黏着蛋白抗体和ADC的亲和力评估

[0557]

	亲和力评估(K_D)
--	----------------

[0558]

抗体 ID		人 P-cad (nM)	食蟹猴_1 P-cad (nM)	食蟹猴_2 P-cad (nM)	大鼠 P-cad (nM)
NOV169N31Q	裸露	33.3	36.8	44.5	不结合
	ADC	27	27.5	47.1	ND
NEG0012	裸露	44.8	30.2	23	44.5
	ADC	31.3	39	37.1	ND
NEG0013	裸露	37.3	21.1	17.2	37
	ADC	36	ND	ND	ND
NEG0016	裸露	60	26.9	33.6	60.1
	ADC	54	ND	ND	ND
NEG0064	裸露	3.66	3.46	2.9	8.99
	ADC	4.4	6	6.4	13.3
NEG0067	裸露	3.21	3.27	3.53	10.3
	ADC	6	ND	ND	ND

[0559] ND=未测定

[0560] 实施例5:生物化学分析中的

[0561] NOV169N31Q-MCC-DM1/NOV169N31Q选择性

[0562] 为了研究NOV169N31Q-MCC-DM1的脱靶交叉反应性的潜力,对NOV169N31Q评价与两种密切相关的经典钙黏着蛋白家族成员:E-钙黏着蛋白(CDH1)或N-钙黏着蛋白(CDH2)的结合,所述成员在其相应ECD中氨基酸序列同一性程度最高。

[0563] 为了对比E-钙黏着蛋白和N-钙黏着蛋白评估与P-钙黏着蛋白结合的特异性,将Maxisorp 384孔板在4℃与重组人E-钙黏着蛋白或N-钙黏着蛋白ECD过夜温育,并且使用酶联免疫吸附测定(ELISA)形式测定Fab片段。在洗涤后,将平板用1 x PBST中的5%脱脂乳封闭2小时。添加含有Fab的大肠杆菌裂解物并且允许在室温(RT)结合1小时。为了检测结合的Fab片段,将平板用TBST洗涤5次并且添加稀释度1/2500的AP-抗人IgG F(ab')₂。在室温1小时后,将平板用TBST洗涤5次并且根据生产商的说明添加AttoPhos底物。添加底物后5分钟,在ELISA读出器中读取平板。

[0564] 利用ELISA方法学,对于抗P-钙黏着蛋白候选抗体NOV169N31Q,未检测到与人E-钙黏着蛋白或N-钙黏着蛋白的显著结合。

[0565] 实施例6:生物化学分析中的NOV169N31Q-MCC-DM1/NOV169N31Q选择性

[0566] 为了研究NOV169N31Q-MCC-DM1的脱靶交叉反应性的潜力,对NOV169N31Q评价与两种密切相关的经典钙黏着蛋白家族成员:E-钙黏着蛋白(CDH1)或N-钙黏着蛋白(CDH2)的结合,所述成员在其相应ECD中氨基酸序列同一性程度最高。

[0567] 为了对比E-钙黏着蛋白和N-钙黏着蛋白评估与P-钙黏着蛋白结合的特异性,将Maxisorp 384孔板在4℃与重组人E-钙黏着蛋白或N-钙黏着蛋白ECD过夜温育,并且使用酶

联免疫吸附测定 (ELISA) 形式测定 Fab 片段。在洗涤后, 将平板用 1 x PBST 中的 5% 脱脂乳封闭 2 小时。添加含有 Fab 的大肠杆菌裂解物并且允许在室温 (RT) 结合 1 小时。为了检测结合的 Fab 片段, 将平板用 TBST 洗涤 5 次并且添加稀释度 1/2500 的 AP- 抗人 IgG F(ab')₂。在室温 1 小时后, 将平板用 TBST 洗涤 5 次并且根据生产商的说明书添加 AttoPhos 底物。添加底物后 5 分钟, 在 ELISA 读出器中读取平板。

[0568] 利用 ELISA 方法, 对于抗 P- 钙黏着蛋白候选抗体 NOV169N31Q, 未检测到与人 E- 钙黏着蛋白或 N- 钙黏着蛋白的显著结合。

[0569] 实施例 7: 评估 NOV169N31Q 对 P- 钙黏着蛋白功能的影响

[0570] 进行一项研究以评估抗 P- 钙黏着蛋白抗体 NOV169N31Q (抗体药物缀合物 NOV169N31Q-MCC-DM1 的组分) 在细胞测定法中对 P- 钙黏着蛋白产生功能影响的能力。P- 钙黏着蛋白是在癌细胞的细胞表面上表达的同型细胞黏附分子, 因此使用 P- 钙黏着蛋白阳性 HCT116 细胞和 P- 钙黏着蛋白阴性 HT-29 细胞的球体完整性测定法用来评估抗体的潜在拮抗特性。这个测定法的读出是球体形状和紧实度, 如通过亮视野显微术和细胞 DNA 的 7-AAD 荧光检测法所测定。

[0571] 在具有或没有人 IgG1 同种型对照 Ab (10 μg/mL) 或 NOV169N31Q (10 μg/mL) 的情况下, 将 HCT116 细胞 (P- 钙黏着蛋白阳性) 或 HT29 细胞 (P- 钙黏着蛋白阴性) 以 6,000 个细胞/孔的密度接种在 96 孔圆底超低附着平板 (Corning 目录号 #7007) 中。细胞置于在 37°C, 5% CO₂ 的有轨摇床 (60 转/分钟) 上。在铺种细胞后 116 小时, 添加 7- 氨基放线菌素 D (7-AAD; BD Pharmingen, 目录号 #559925) 以标记细胞 DNA。在铺种细胞后 132 小时, 使用德克萨斯红滤光片在 GE IN 细胞分析仪 2000 上进行 7-AAD 成像。拍摄每个孔的 7-9 “z” 图像栈并且使用 IN Cell Developer Toolbox 1.8 程序, 使图像栈坍塌。

[0572] 在图 7 中, NOV169N31Q 对表达 P- 钙黏着蛋白的 HCT116 细胞中 P- 钙黏着蛋白介导的细胞黏附显示微小, 但是可察觉的影响, 但在 P- 钙黏着蛋白阴性 HT29 细胞中则否, 如通过亮视野显微术和借助 7-AAD (基于 DNA 的) 成像法测定的球体密度分析所证明。相反, 非特异性对照人 IgG1 抗体对多细胞球体的完整性没有影响。因此, NOV169N31Q 可能在体外和/或体内是 P- 钙黏着蛋白功能的部分拮抗剂。

[0573] 实施例 8: NOV169N31Q-MCC-DM1 抑制细胞增殖和存活

[0574] 使用 **CellTiterGlo[®]** 增殖测定法评估 NOV169N31Q-MCC-DM1 抑制细胞增殖和存活的能力。

[0575] 将细胞系在组织培养箱中在 5% CO₂, 37°C 下对其生长最佳的培养基中培养。在接种用于增殖测定法之前, 将细胞在分析之前至少 2 天分瓶以确保最佳生长密度。在接种当日, 使用 0.25% 胰蛋白酶从组织培养瓶剥离细胞。使用细胞计数器 (Vi-Cell XR Cell Viability Analyzer, Beckman Coulter) 测定细胞活力和细胞密度。在黑色壁透明底 96 孔板 (Corning 目录号 #3904) 中, 将活力高于 85% 的细胞以 2,500 个细胞/孔的密度接种在 50 μL 标准生长培养基中。位于平板边缘的孔用 PBS 填充, 以最大限度减少蒸发对孔体积的影响。将平板在组织培养箱中在 37°C 温育过夜。次日, 在标准生长培养基中按 2X 制备游离美登素 (L-DM1-Me), NOV169N31Q-MCC-DM1 和非靶向 ADC 对照 (IgG1-SMCC-DM1)。随后向细胞添加制备的药物处理, 产生范围从 0-100 nM 的终浓度和 100 μL/孔的终体积。一式三份检验每个药物浓

度。将平板在组织培养箱中在37℃温育过夜或5天,此后通过添加100μL CellTiterGlo® (Promega, 目录号G7573) (一种裂解细胞并测量总的三磷酸腺苷(ATP)含量的试剂) 评估细胞活力。将平板在有轨摇床上以这样的速度在室温于黑暗中温育,所述速度提供3分钟的充分混合作用以诱导细胞溶解。将平板在室温温育10分钟以稳定发光信号,之后使用发光计数器(Wallac 1450 MicroBeta TriLux, Perkin Elmer) 读数。在接种后当日(第0日读数)和药物暴露5天后(第5日读数)取得未处理的细胞的发光计数。作为测定法说明,未处理细胞的第5日读数与第0日读数比较。认定温育时间期间具有至少一次细胞加倍的测定法是有效的。为了评价药物处理的影响,来自含有未处理细胞的孔的发光计数(100%活力)用来归一化处理的样品。使用Graph Pad Prism 6软件计算IC₅₀值。评价每个细胞系至少3次并且显示代表性IC₅₀值。

[0576] NOV169N31Q-MCC-DM1具有3.8分子DM1与每种抗体结合的目标平均数(药物对抗体比率或DAR为3.8)。显示了3个代表性细胞系的剂量-反应曲线(图8)。计算为抑制50%细胞生长或存活所需要的处理浓度(IC₅₀),表13中总结所测试细胞系的代表性IC₅₀值。

[0577] 显示未缀合的抗体NOV169N31Q既无细胞毒性,也无增殖性,而NOV169N31Q-MCC-DM1在表达P-钙黏着蛋白的细胞系中强力抑制增殖和存活。在P-钙黏着蛋白阴性细胞系HT29中两种分子均无活性(图8)。相反,NOV169N31Q-MCC-DM1强力抑制两种乳腺癌细胞系HCC1954和HCC70的生长。表13总结了NOV169N31Q-MCC-DM1在一组细胞系中的活性。与同种型匹配的无靶向控制ADC(IgG1-MCC-DM1)相比,NOV169N31Q-MCC-DM1经常对表达多于>50,000个细胞表面拷贝的P-钙黏着蛋白拷贝/细胞的细胞系显示细胞毒活性。这些研究显示,NOV169N31Q-MCC-DM1的细胞毒效应归因于ADC的内化的美登素组分并且NOV169N31Q-MCC-DM1特异性靶向过量表达P-钙黏着蛋白的细胞。

[0578] 表13:一组人癌细胞系中的P-钙黏着蛋白表达和NOV169N31Q-MCC-DM1活性。一组细胞系中与游离美登素(L-DM1-Me)和同种型对照ADC(IgG1-MCC-DM1)相比的NOV169N31Q-MCC-DM1的IC₅₀值(nM)。报告了NOV169N31Q-MCC-DM1的最大细胞杀伤值。本文报告的值是来自代表多个重复的独立测定的值。

[0579]

			IC ₅₀ (nM)			最大细 胞杀伤 (%)
细胞系	来源	抗原密 度 (x1000)	NOV169N3 1Q-MCC- DM1	L-DM1- Me	IgG1-M CC-DM1	NOV169 N31Q-M CC-DM1
scaBER	膀胱	63	4.06	0.07	27.77	89
HCC1954	乳腺	80	2.28	0.17	26.68	88
HCC38	乳腺	95	5.29	0.09	35.10	81
HCC70	乳腺	86	3.23	0.23	92.58	69
HCC1806	乳腺	68	11.45	0.07	10.54	84
BICR6	头颈	70	9.62	0.16	25.34	71
A431	皮肤	81	21.76	0.06	27.28	83
HT29	结肠	0.2	62.94	0.06	64.32	89

[0580] 实施例9: NOV169N31Q和NOV169N31Q-MCC-DM1诱导的ADCC活性的体外评估

[0581] 除了对增殖的影响之外,还对NOV169N31Q和NOV169N31Q-MCC-DM1评价其介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。

[0582] 效应细胞是从A11Cells, LLC获得的原封未动的人天然杀伤(NK)细胞(目录号#PB012: 新鲜/原封未动的正常PB CD56+NK细胞)。通过Novartis Cell Services (NCS) 从美国典型培养物保藏中心获得靶细胞(P-钙黏着蛋白阳性HCC1954, P-钙黏着蛋白阴性HT-29)。使用无胰蛋白酶的细胞解离缓冲液(来自Gibco的“细胞解离缓冲液”, 目录号#13151-014), 将HCC1954和HT-29靶细胞从组织培养容器剥离, 用PBS洗涤2-3次, 并重悬于培养基中。手工或使用自动化细胞计数器计数细胞。将活力>90%的细胞按 1×10^5 个细胞/mL悬浮在培养基中。按照与靶细胞系相同的方式洗涤和计数人NK细胞。效应细胞随后按 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/mL悬浮在细胞培养基中。

[0583] 处理包括NOV169N31Q抗体、匹配的同种型对照抗体(IgG1对照)以及抗体药物缀合物NOV169N31Q-MCC-DM1和IgG1-SMCC-DM1。将50μL培养基中的5000个靶细胞接种在96孔平底板(Corning#3603)中。随后将测试抗体和对照抗体按4X终浓度(除无处理对照之外, 终浓度范围是50-0.0001μg/mL)在25μL培养基中在37℃添加20分钟。随后将效应细胞按效应细胞对靶细胞比率(E:T) 5:1(例如对于5:1比率, 25000个效应细胞/孔)于25μL培养基中添加。一式三份进行处理和对照(仅靶细胞、仅效应细胞、无细胞)。随后以500转/分钟(无刹车)在离心机中离心平板, 以在平板底部浓缩细胞。平板随后在正常细胞培养条件(37℃, 5%CO₂)下温育24小时。

[0584] 在温育时间后, 从平板移除培养基并且用PBS洗涤各孔2-3次以移除未贴壁的效应细胞。将100μL Cell Titer Glo (Promega目录号G7570)添加至每个孔, 将平板避光并置于有轨摇床上2分钟。随后在发光计数器(Wallac Trilux MicroBeta 1450)上读取平板。发光

计数器检出的信号与孔中留存的ATP的量或细胞数目成正比。使用对照孔作为基线,每种处理的活细胞数目可以作为未处理对照的百分数确定。

[0585] NOV169N31Q-MCC-DM1和NOV169N31Q均在体外以剂量依赖方式展示在人天然杀伤(NK)细胞存在下介导针对过量表达P-钙黏着蛋白的细胞的ADCC活性的能力(图9)。发现这种活性是P-钙黏着蛋白特异的,因为对抗体和ADC匹配的同种型对照未展示明显的细胞杀伤作用。NOV169N31Q和NOV169N31Q-MCC-DM1对P-钙黏着蛋白阴性细胞系HT-29均未显示任何ADCC诱导作用,也表明抗体和抗体药物缀合物的特异性效应。因此,除递送细胞毒性负载至肿瘤细胞之外,ADCC代表了NOV169N31Q-MCC-DM1作用对于体内肿瘤细胞杀伤的另一种潜在机制。

[0586] 实施例10:借助抗P-钙黏着蛋白调节体内中靶药效学标志物

[0587] 进行研究以评估P-钙黏着蛋白ADC NOV169N31Q-MCC-DM1在体内调节药效学标志物G2/M阻止[具有磷酸-组蛋白H3 (pHH3) 的细胞的积累]的能力。目的是评价来自小鼠的肿瘤中G2/M细胞周期阻止的程度和持续时间,所述小鼠用NOV169N31Q-MCC-DM1、同种型对照ADC或仅载体处理。

[0588] 为了测量如通过免疫组织化学评估的pHH3阳性胞核积累,自Cell Signaling Technology (Danvers, MA, 目录号9701) 获得用合成性磷酸肽免疫动物产生的兔多克隆抗体,所述的合成性磷酸肽与人组蛋白H3 (pHH3) 磷酸化Ser10周围的残基相对应。简而言之, IHC方案包括加热和标准暴露于Ventana细胞条件化#1抗原修复试剂。将第一抗体稀释至1:50并在室温温育60分钟。随后,与Jackson ImmunoResearch Laboratories山羊抗山兔生物素化第二抗体(目录号111-065-144, West Grove, PA) 温育32分钟。

[0589] 为了在皮下肿瘤异体移植模型中评估HCC70三阴性乳腺癌模型中抗P-钙黏着蛋白ADC诱导的PD标志物变化,对雌性SCID-beige小鼠皮下植入Hank平衡盐溶液中含有50%基质胶™ (BD Biosciences) 的悬液中的 10×10^6 个细胞。

[0590] 含有悬液中细胞的总注射体积是200 μ l。一旦肿瘤平均为大约130mm³ (n=3/组), 将小鼠随机分配以接受静脉内(IV) 单剂NOV169N31Q-MCC-DM1 (10mg/kg)、非特异性IgG1-MCC-DM1同种型对照 (10mg/kg) 或空的载体对照 (20mM组氨酸, 8.22%蔗糖, 0.02%PS-20, pH 5.6)。在各时间点收集肿瘤直至给药后21天。作为PD反应的测量,通过上文描述的免疫组织化学染色法实施磷酸-组蛋白H3 (pHH3) 水平的定性评估。

[0591] 在图10中,与类美登素负载的预期作用机制一致,尽管在载体处理的肿瘤中检出某种基线磷酸-组蛋白H3免疫染色染色,但是这些水平在NOV169N31Q-MCC-DM1处理后升高,尤其在给药后第2-7天之间。这些数据表明NOV169N31Q-MCC-DM1能够在肿瘤异种移植中激发稳健的细胞PD反应,与类美登素负载作用机理一致。

[0592] 实施例11:抗P-钙黏着蛋白ADC针对小鼠中HCC70三倍阴性乳腺癌 (TNBC) 模型的体内效力 (ADC效力筛选)

[0593] 在乳腺癌中,P-钙黏着蛋白经常高水平表达,这由每个细胞的表面上存在大约66,000个受体的HCC70细胞系示例。显示HCC70肿瘤上P-钙黏着蛋白免疫染色的代表性照片以显现这种异体移植模型中的染色样式(图11A)。使用Ventana Discovery XT自动染色机进行IHC。将福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤切片脱石蜡,用Ventana Cell Conditioning#1 (CCIS) 抗原修复试剂处理并且随后在浓度10 μ g/ml的第一抗体[来自BD Transduction Lab

的小鼠单克隆抗人P-cad抗体(目录号610228,批号09934)]中室温温育60分钟。接着是与按照工作浓度1:250使用的生物素化山羊抗小鼠(Jackson Laboratories,目录号115-066-072,批号63620)温育。使用DAB Map试剂盒(Ventana Medical,目录号760-124)进行检测。使用非特异性小鼠IgG抗体(载体实验室目录号I-2000,批次V0610)作为对照,以确保用P-钙黏着蛋白抗体观察到的染色是特异的。

[0594] 当肿瘤达到约215mm³时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配到治疗组(n=8/组)并用单次静脉内施用载体或7mg/kg的ADC给药。选择7mg/kg剂量水平,因为预计它提供分辨这个模型中候选ADC之间差异的窗口。针对各只小鼠体重调整剂量。IV给药体积是8ml/kg。

[0595] 在第42天,NEG0012-MCC-DM1治疗组和NOV169N31Q-MCC-DM1治疗组中的平均肿瘤体积显著不同于同种型匹配的huIgG1-MCC-DM1对照组(单因素方差分析;Dunn法,p≤0.05)。与对照相比,用ADC候选者处理的其他组未显示有统计学不同的肿瘤体积(图11B)。该选出的NEG0012-MCC-DM1和NOV169N31Q-MCC-DM1作为先导ADC候选者。在任何组中未观察到显著的体重减轻。

[0596] 实施例12:NOV169N31Q-MCC-DM1针对小鼠中HCC70三倍阴性乳腺癌(TNBC)模型的剂量依赖性体内效力

[0597] 显示每个细胞的表面上具有大约66,000个受体的HCC70细胞系在体外对NOV169N31Q-MCC-DM1敏感。为了展示NOV169N31Q-MCC-DM1在HCC70模型中的定向抗肿瘤活性,施用了2.5、5、10和15mg/kg或10mg/kg NOV169N31Q-MCC-DM1或非特异性同种型对照IgG1-MCC-DM1的单次IV处理。在雌性SCID小鼠中通过皮下注射10x10⁶个细胞至每只小鼠的右肋,建立HCC70肿瘤。当肿瘤达到约143mm³时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组(n=9)。全部测试药物均以指示的剂量水平和方案施用,并且根据各只小鼠体重调整剂量。IV给药体积是5ml/kg。

[0598] NOV169N31Q-MCC-DM1处理产生了与剂量成比例的抗肿瘤效力,%ΔT/ΔC值为48%(2.5mg/kg),1%(5mg/kg),而10mg/kg和15mg/kg剂量分别导致64%和61%的平均消退。在10mg/kg实现最大效力。5、10和15mg/kg组经检验与载体处理有统计学差异(p<0.05,ANOVA on Ranks/Dunn法,第59天)。10mg/kg和15mg/kg剂量水平在小鼠中引起持久的肿瘤消退,所述肿瘤消退持续直至处理后86天,此时研究终止。

[0599] 全部测试药物均在研究时耐受并且在任何治疗组中均未观察到毒性的明显临床症状,如在不结合小鼠P-钙黏着蛋白的ADC所预期那样。在全部组中,与随机分配时的平均体重相比,观察到体重增加,并且其类似于载体处理的小鼠的体重增加,如在不结合小鼠P-钙黏着蛋白的ADC所预期那样(图12和表14)。

[0600] 表14:在第59天HCC70乳腺癌异种移植模型中NOV169N31Q-MCC-DM1剂量反应效力。处理对肿瘤体积和体重的影响作为均值±SEM展示。在处理第59天评价实验。*p<0.001相对于载体(Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Dunn法)。 $\% \Delta T / \Delta C = 100 \Delta T / \Delta C$ 其中: ΔT =研究第21天药物治疗组的平均肿瘤体积-给药起始日药物治疗组的平均肿瘤体积; ΔC =研究第21天对照组的平均肿瘤体积-给药起始日对照组的平均肿瘤体积。 $\% \text{消退} = (1 - T_{\text{最终}} / T_{\text{起始}}) \times 100$

		肿瘤反应		宿主反应	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	消退 (%)	Δ 体重 (%)	生存率 (存活数/总数)
[0601]	化合物	剂量, 方案			
	载体	无, 单剂量	100	-	11.1 $\pm$ 1.6 9/9
	IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, 单剂量	119	-	10.9 $\pm$ 1.7 9/9
	NOV169N31Q-MCC-DM1	2.5 mg/kg, 单剂量	48	-	10.2 $\pm$ 2.5 9/9
	NOV169N31Q-MCC-DM1	5 mg/kg, 单剂量	1*	-	12.0 $\pm$ 2.4 8/9
[0602]	NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, 单剂量	-	-64*	9.9 $\pm$ 2.3 9/9
	NOV169N31Q-MCC-DM1	15 mg/kg, 单剂量	-	-61*	8.8 $\pm$ 1.9 9/9

[0603] 实施例13: NOV169N31Q-MCC-DM1针对小鼠中HCC1954乳腺癌模型的体内效力

[0604] 为了在额外的乳腺癌模型中展示效力, 在SCID-米色小鼠的HCC1954基底样 (Her2+) 乳腺癌异种移植模型中评价NOV169N31Q-MCC-DM1活性。基于P-钙黏着蛋白表达 (84,000个受体/细胞) 和对NOV169N31Q-MCC-DM1的体外灵敏度, 选择HCC1954模型。进行免疫组织化学以确认如前述的HCC70肿瘤中的肿瘤P-钙黏着蛋白水平 (图13A)。

[0605] 当肿瘤达到约150mm³时, 将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组 (n=9/组) 并用单次静脉内施用载体或10mg/kg IgG1-MCC-DM1或NOV169N31Q-MCC-DM1给药。针对各只小鼠体重调整剂量。IV给药体积是5ml/kg。

[0606] NOV169N31Q-MCC-DM1治疗导致HCC1954肿瘤56%的消退, 所述消退持续至第55天 (相对于载体或IgG1-MCC-DM1, $p < 0.05$, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Dunn法)。IgG1-MCC-DM1的效力是75%的 $\Delta T/\Delta C\%$ 并且与载体无显著差异 ($p > 0.05$)。全部测试药物均在研究时耐受并且在任何治疗组中均未观察到毒性的明显临床症状 (图13B和表15A)。

[0607] 表15A: 在第31天HCC1954乳腺癌异种移植模型中的NOV169N31Q-MCC-DM1效力。治

疗对肿瘤体积和体重的影响作为均值 $\pm$ SEM展示。在治疗第31天评价实验。 $*p<0.001$ 相对于载体 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Dunn法)。

[0608]

		肿瘤反应	宿主反应
--	--	------	------

[0609]

测试药物	剂量, 方案	$\Delta T/\Delta C$ (%)	消退 (%)	Δ 肿瘤体积 (mm^3)	Δ 体重 (%)	生存率 (存活数/总数)
载体	无, 单剂量	100	-	289 ± 49	4.1 ± 1.6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, 单剂量	75	-	218 ± 36	4.3 ± 1.5	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, 单剂量	-	-55.8*	-82 ± 10	4.8 ± 1.7	9/9

[0610] 在另一个例子中,在SCID小鼠的HCC1954基底样(Her2+)乳腺癌异种移植模型中评价NOV169N31Q-MCC-DM1活性。基于P-钙黏着蛋白表达(84,000个受体/细胞)和对NOV169N31Q-MCC-DM1的体外灵敏度,选择HCC1954模型。当肿瘤达到约 190mm^3 时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组($n=5/\text{组}$)并用两次(在第0天和第7天给予)静脉内施用载体、15mg/kg NOV169N31Q或15mg/kg NOV169N31Q-MCC-DM1给药。针对各只小鼠体重调整剂量。IV给药体积是10ml/kg。NOV169N31Q-MCC-DM1治疗导致HCC1954肿瘤100%消退,所述消退持续至第56天研究结束(相对于载体, $p<0.05$,Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Dunn法,图13C)。NOV169N31Q的效力是121.4%的 $\Delta T/\Delta C\%$ 并且与载体无显著差异($p>0.05$)。全部测试药物均在研究时耐受并且在任何治疗组中均未观察到毒性的明显临床症状(图13D和表15B)。

[0611] 表15B:在第56天HCC1954乳腺癌异种移植模型中的NOV169N31Q-MCC-DM1效力。治疗对肿瘤体积和体重的影响作为均值 $\pm$ SEM展示。在治疗第56天评价实验。 $*p<0.05$ 相对于载体 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Dunn法)。

[0612]

		肿瘤反应	宿主反应
--	--	------	------

[0613]

测试药物	剂量, 方案	$\Delta T/\Delta C$ (%)	消退 (%)	Δ 肿瘤 体积 (mm ³)	Δ 体重 (%)	生存率 (存活 数/总 数)
载体	无, 第 0 天和 第 7 天	100	-	925 $\pm$ 147	8.4 $\pm$ 1.0	5/5
NOV169N31Q	15 mg/kg, 第 0 天和 第 7 天	121.4	-	1123 $\pm$ 134	9.9 $\pm$ 1.7	5/5
NOV169N31Q- MCC-DM1	15 mg/kg, 第 0 天和 第 7 天	-20.8	-100*	-192 $\pm$ 9	9.0 $\pm$ 0.7	5/5

[0614] 实施例14: NOV169N31Q-MCC-DM1针对小鼠中BICR6头颈(下咽鳞状细胞癌)癌模型的体内效力

[0615] 在BICR6细胞系中基于其70,000个受体/细胞的P-钙黏着蛋白表达和对NOV169N31Q-MCC-DM1的体外灵敏度,实施NOV169N31Q-MCC-DM1的效力评价。进行免疫组织化学以确认如前述的BICR6肿瘤中的肿瘤P-钙黏着蛋白水平,其中82%的肿瘤细胞对P-钙黏着蛋白染色至少2+(图14A)。

[0616] 在雌性SCID-米色小鼠中通过皮下植入 5×10^6 个肿瘤细胞至每只小鼠的右肋,建立BICR6肿瘤。当肿瘤达到约130mm³时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组(n=10/组)并用静脉内施用载体或10mg/kg IgG1-MCC-DM1或NOV169N31Q-MCC-DM1(按q7d方案(q7d x 2)给予)给药。针对各只小鼠体重调整剂量。IV给药体积是5ml/kg。

[0617] NOV169N31Q-MCC-DM1治疗导致最大37%的肿瘤消退(在研究第26天)。总体上,采用NOV169N31Q-MCC-DM1时肿瘤抑制反应持久($\Delta T/\Delta C$ 1%, $p < 0.05$, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Tukey检验)直至给药后42天。全部测试药物均在研究时耐受并且在任何治疗组中均未观察到毒性的明显临床症状(图14B和表16)。

[0618] 表16: 在第42天BICR6人下咽(头颈部)鳞状细胞癌异种移植模型中的NOV169N31Q-MCC-DM1效力。治疗对肿瘤体积和体重的影响作为均值 $\pm$ SEM展示。在治疗第42天评价实验。 $*p < 0.05$ 相对于载体(Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Tukey检验)。

[0619]

测试药物	剂量, 方案	肿瘤反应			宿主反应	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	消退 (%)	Δ 肿瘤 体积 (mm ³)	Δ 体重 (%)	生存率 (存活数 /总数)
载体	无, Q2W x 2	100	-	386 ± 90	7.6 ± 1.4	10/10
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, Q2W x 2	136	-	526 ± 96	8.9 ± 1.1	10/10
NOV169N31Q- MCC-DM1	10 mg/kg, Q2W x 2	1*	-	5 ± 20	7.4 ± 2.3	10/10

[0620] 实施例15: NOV169N31Q-MCC-DM1 针对小鼠中 scaBER 膀胱癌模型的体内效力

[0621] 在 scaBER 膀胱癌异种移植模型中评价 NOV169N31Q-MCC-DM1 的抗肿瘤活性, 其中所述模型基于其 63,000 个受体/细胞的 P-钙黏着蛋白表达和对 NOV169N31Q-MCC-DM1 的体外灵敏度选择。进行免疫组织化学以确认 scaBER 肿瘤中的肿瘤 P-钙黏着蛋白水平, 显示大约 52% 的肿瘤细胞染色至少 2+。(图 15A)。

[0622] 在雌性 SCID-米色小鼠中通过皮下植入肿瘤碎片至每只小鼠的右肋, 建立 scaBER 肿瘤。当肿瘤达到约 130mm³ 时, 将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组 (n=10/组) 并用静脉内施用载体或 10mg/kg IgG1-MCC-DM1 或 NOV169N31Q-MCC-DM1 (给予两次, 间隔两周 (Q2Wx2)) 给药。针对各只小鼠体重调整剂量。IV 给药体积是 5ml/kg。

[0623] NOV169N31Q-MCC-DM1 治疗导致 18% 的 $\Delta T/\Delta C$ (相对于载体或 IgG1-MCC-DM1, $p < 0.05$, ANOVA/Tukey 检验, 第 35 天)。IgG1-MCC-DM1 的效力是 86% 的 $\Delta T/\Delta C$ 并且与载体无显著差异 ($p > 0.05$)。全部测试药物均在研究时耐受并且在任何治疗组中均未观察到毒性的明显临床症状 (图 15B 和表 17)。

[0624] 表 17: 在第 42 天 scaBER 人膀胱鳞状癌异种移植模型中 NOV169N31Q-MCC-DM1 的效力。治疗对肿瘤体积和体重的影响作为均值 ± SEM 展示。在治疗第 42 天评价实验。* $p < 0.001$ 相对于载体 (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks/Tukey 检验)。

		肿瘤反应			宿主反应	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	消退 (%)	Δ 肿瘤 体积 (mm ³)	Δ 体重 (%)	生存率 (存活数 /总数)
[0625]	载体	100	-	279 ± 67	5.6 ± 1.9	10/10
	IgG1-MC C-DM1	86	-	239 ± 56	4.9 ± 1.8	10/10
	NOV169N 31Q-MCC -DM1	18*	-	50 ± 15	2.1 ± 1.5	10/10

[0626] 实施例16: NOV169N31Q-MCC-DM1针对小鼠中 **HuPrime**[®]ES2267食管癌模型的体内效力

[0627] 在表达P-钙黏着蛋白的ES2267食管癌异种移植模型中评价NOV169N31Q-MCC-DM1的抗肿瘤活性。在每只小鼠的右肋,对雌性BALB/c裸鼠皮下植入肿瘤碎片。当肿瘤达到约154mm³时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组(n=5)。在随机分配后第0天和第13天,静脉内施用按10mg/kg给予的NOV169N31Q-MCC-DM1或人源化非特异性同种型对照3207-MCC-DM1。针对各只小鼠体重调整剂量。静脉内给药体积是10ml/kg。

[0628] 用10mg/kg的NOV169N31Q-MCC-DM1治疗产生与载体比较时的抗肿瘤效力,在第21天平均消退58%。另外用非特异性同种型对照IgG1-MCC-DM1按照10mg/kg处理后,未观察到显著的抗肿瘤效力。在第21天和在研究最后一天(第53天),NOV169N31Q-MCC-DM1经检验与载体和同种型对照IgG1-MCC-DM1治疗组有统计差异(p<0.05,ANOVA/Holm-Sidak法,第21天)。全部测试药物均良好耐受并且在任何治疗组中均未观察到体重减轻,如在不结合小鼠P-钙黏着蛋白的ADC所预期那样(图16和表18)。

[0629] 表18: 在第21天 **HuPrime**[®]ES2267食管癌异种移植模型中的NOV169N31Q-MCC-DM1效力(给药后最大肿瘤消退)。治疗对肿瘤体积和体重的影响作为均值±SEM展示。在治疗第21天评价实验,此时NOV169N31Q-MCC-DM1治疗的肿瘤达到其治疗后最大消退。*p=0.014相对于载体(One Way ANOVA on Ranks/Holm-Sidak法)。

	化合物	剂量、途径、 方案	肿瘤反应			宿主反应
			肿瘤尺寸 (mm ³ +/- SEM)	$\Delta T/\Delta C$ (%)	消退 (%)	存活 (存活数/ 总数)
[0630]	载体	0 mg/kg, IV, 第 0 天和 第 13 天	361 ± 48	100	--	5/5
	NOV169N31Q- MCC-DM1	10 mg/kg, IV, 第 0 天和 第 13 天	66 ± 24	43	58*	5/5
[0631]	IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, IV, 第 0 天和第 13 天	267 ± 54	55	--	5/5

[0632] 实施例17:HCC70乳腺癌异种移植模型中使用两种接头(MCC和CX1-1)与DM1缀合的NEG0067的效力比较

[0633] HCC70乳腺癌异种移植模型用来比较使用MCC接头相对于CX-1-1接头与DM1缀合的抗P-钙黏着蛋白抗体NEG0067的抗肿瘤效力。当肿瘤达到约215mm³时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组(n=8/组)并用单次静脉内施用载体或7mg/kg的ADC给药。针对各只小鼠体重调整剂量。静脉内剂量体积是8ml/kg。

[0634] NEG0067-CX1-1-DM1组中的平均肿瘤体积比对照IgG1-CX1-1-DM1组有显著差异(单因素方差分析;Dunn法, $p \leq 0.05$),而NEG0067-MCC-DM1与IgG1-MCC-DM1无统计学差异。但是,与huIgG1-MCC-DM1治疗组相比,IgG1-CX1-1-DM1治疗组中存在活性增加的趋势(图17)。

[0635] 实施例18:HCC70乳腺癌异种移植模型中使用SPDB-DM4接头-负载(可切割接头)缀合的鼠杂交瘤衍生的抗P-钙黏着蛋白ADC的效力评估

[0636] HCC70乳腺癌异种移植模型用来比较使用SBDB-DM4接头-负载时3种鼠杂交瘤衍生的ADC的抗肿瘤效力。当肿瘤达到约150mm³时,将小鼠根据肿瘤体积随机分配入治疗组(n=10/组)并用单次静脉内施用载体或5mg/kg的ADC给药。针对各只小鼠体重调整剂量。

[0637] 单剂5mg/kg全部三种SPDB-DM4连接的ADC显著地引起持久的肿瘤消退($p \leq 0.05$),2P10-SPDB-DM4治疗组中存在一定的肿瘤再生长。在1G12-SPDB-DM4或3D21-SPDB-DM4治疗的组中,肿瘤保持完全消退(图18)。

[0638] 实施例19:ADC制剂

[0639] ADC NOV169N31Q-MCC-DM1的临床使用形式(CSF)是小瓶中含有50mg NOV169N31Q-MCC-DM1的冻干物。在冻干物以5mL注射用水复溶后,获得pH 5.3的溶液,其含有10mg/mL NOV169N31Q-MCC-DM1、20mM L-组氨酸/盐酸L-组氨酸一水合物、240mM蔗糖和0.02%聚山梨酯20。

[0640] 为了后续静脉内施用,将获得的溶液通常进一步稀释于载体溶液中成为用于输注的即用型ADC溶液。

[0641] 对于CSF,选择10mg/mL的ADC浓度。选择240mM的蔗糖浓度以产生等渗制剂,以维持非晶态冻干物滤饼结构并且以提供蛋白质稳定作用。

[0642] 选择最稳定制剂的重要的显示稳定性的分析方法包括确定聚集水平的大小排阻层析、亚可见颗粒物检验、游离毒素测定和效力检验,以及其它方法。筛选前研究表明浓度0.02%的聚山梨酯20提供对抗机械应力的足够稳定作用。在实时和加速稳定性条件(25℃和40℃)下的液体和冻干稳定性研究显示,在5.0和5.5之间的pH值的基于组氨酸的制剂提供总体上最好的贮存稳定性。值得注意地,在这个范围内,可以达到全部受测制剂在聚集和游离毒素释放之间的平衡。一项在25℃和40℃的二个月稳定性研究展示很低水平的聚集产物和降解产物。

[0643] 可以理解本文所述的实施例和实施方案的目的仅在于说明,并且按照其的多种修改或改变将会启发本领域技术人员并且将纳入本申请的精神与权限范围内和所附权利要求的范围内。

序列表

<110> NOVARTIS AG

<120> 抗体药物缀合物

<130> PAT056506-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/079,942

<151> 2014-11-14

<160> 143

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 1

Ser Gln Ser Ala Ala Trp Asn

1

5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 2

Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala Leu Ser Val

1

5

10

15

Lys Ser

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 3

Gly Glu Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Phe Ala Ile

1

5

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0001]

[0002]

<400> 4
Gly Asp Ser Val Ser Ser Gln Ser Ala
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 5
Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 6
Gly Glu Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Phe Ala Ile
1 5 10

<210> 7
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gln
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Phe Ala Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

	115	120
	<210> 8 <211> 369 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"	
	<400> 8 caggtgcagc tgcagcagtc aggccctggc ctggtcaagc ctagtcagac cctgagcctg acctgcgcta ttagcggcga tagtgtgtct agtcagtcag ccgcctggaa ctggattaga cagtcaccct ctaggggcct ggagtggctg ggtagaatct actataggtc taagtggat aacgactacg ccctgagcgt gaagtctagg atcactatta accccgacac ctctaagaat cagtttagcc tgcagctgaa tagcgtgacc cccgaggaca ccgccgtcta ctactgcgt agaggcgagg gctacggtag agagggttc gctatctggg gtcagggcac cctggtcacc gtgtctagc	60 120 180 240 300 360 369
	<210> 9 <211> 453 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"	
[0003]	<400> 9 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln 1 5 10 15 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gln 20 25 30 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu 35 40 45 Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala 50 55 60 Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn 65 70 75 80 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val 85 90 95 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Phe Ala Ile 100 105 110 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly 115 120 125 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 130 135 140	

	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
	145					150					155					160
	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
					165					170					175	
	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
				180					185					190		
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
			195					200					205			
	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
		210					215					220				
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
	225					230					235					240
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
					245					250					255	
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				260					265					270		
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
			275					280					285			
[0004]	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
		290					295					300				
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
	305					310					315					320
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
					325					330					335	
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
				340					345					350		
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
			355					360					365			
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
		370					375					380				
	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
	385					390					395					400
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
					405					410					415	
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
				420					425					430		
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
			435					440					445			

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 10
<211> 1359
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成
多核苷酸"

<400> 10
cagggtgcagc tgcagcagtc aggccctggc ctggtcaagc ctagtcagac cctgagcctg 60
acctgcgcta ttagcggcga tagtgtgtct agtcagtcag ccgcctggaa ctggattaga 120
cagtcacctt ctaggggcct ggagtggctg ggtagaatct actataggtc taagtggatat 180
aacgactacg cctgagcgt gaagtctagg atcactatta accccgacac ctctaagaat 240
cagtttagcc tgcagctgaa tagcgtgacc cccgaggaca ccgcctgcta ctactgcgt 300
agaggcgagg gctacggtag agagggttc gctatctggg gtcagggcac cctggtcacc 360
gtgtctagcg ctagcactaa gggcccaagt gtgtttccc tggccccag cagcaagtct 420
acttccggcg gaactgtctc cctgggttgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
acagtgtcct ggaactctgg ggctctgact tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgccctccag ctctctggga 600
accagacct atatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 660
[0005] gtggagccca agagtgcga caagaccac acctgcccc cctgcccagc tccagaactg 720
ctgggagggc cttccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct gatgatcagc 780
aggaccccc aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgtccc acgaggacc agaggtgaag 840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc cagagaggag 900
cagtacaaca gcacctacag ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaag aatacaagtg caaagtctcc aacaaggccc tgccagcccc aatcgaaaag 1020
acaatcagca aggccaagg ccagccacgg gagccccagg tgtacacct gccccccagc 1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccagggttcc ctgacctgtc tgggtgaagg cttctacccc 1140
agcgatatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagccc agaacaacta caagaccacc 1200
ccccagtg tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
tccaggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacaggc cctgcacaac 1320
cactacacc agaagtcctt gagcctgagc cccgcaag 1359

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 11
Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr Leu Ala
1 5 10

[0006]

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 12
Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 13
Gln Gln Tyr Leu Ser Trp Phe Thr
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 14
Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr
1 5

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 15
Ala Ala Ser
1

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 16
Tyr Leu Ser Trp Phe
1 5

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

 <400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr
 20 25 30

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Trp Phe Thr
 85 90 95

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

[0007]

<210> 18
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"

 <400> 18
 gatattcaga tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact 60
 atcacctgta gagcctctca gactatctct aacaccctgg cctggtatca gcagaagccc 120
 ggtaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcctctaacc tgcagtcagg cgtgcctct 180
 aggttttagcg gtagcggtag tggcaccgac ttaccctga ctattagtag cctgcagccc 240
 gaggactteg ctacctacta ctgtcagcag tacctgagct ggttcacctt cggtcagggc 300
 actaaggtcg agattaag 318

 <210> 19
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

 <400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr 20 25 30	
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45	
	Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80	
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Trp Phe Thr 85 90 95	
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro 100 105 110	
	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr 115 120 125	
	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys 130 135 140	
	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu 145 150 155 160	
[0008]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser 165 170 175	
	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala 180 185 190	
	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe 195 200 205	
	Asn Arg Gly Glu Cys 210	
	<210> 20 <211> 639 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成 多核苷酸"	
	<400> 20 gatattcaga tgactcagtc acctagtagc ctgagcgcta gtgtgggcga tagagtgact 60 atcacctgta gagcctctca gactatctct aacaccctgg cctggtatca gcagaagccc 120 ggtaaagccc ctaagctgct gatctacgcc gcctctaacc tgcagtcagg cgtgccctct 180 aggttttagcg gtagcggtag tggcaccgac ttcaccctga ctattagtag cctgcagccc 240 gaggacttcg ctacctacta ctgtcagcag tacctgagct gggttcacctt cggtcagggc 300 actaaggtcg agattaagcg tacggtggcc gctcccagcg tggtcatctt cccccccagc 360	

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccc tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtg 639

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 21
Asp His Thr Ile His
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0009] <400> 22
Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 23
Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 24
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
1 5

[0010]

<210> 25
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 25
Tyr Pro Arg Ser Gly Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 26
Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr
1 5

<210> 27
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30
Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 354
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成
多核苷酸"

<400> 28

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaagc ccggcgagtc actgaagatt      60
agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacacta ttcactggat gagacagatg      120
cccggtaaag gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tattaactat      180
aacgagaagt ttaagggta ggtcacaatt agcgccgata agtctagctc taccgcctac      240
ctgcagtggc ctagcctgaa ggctagtgac accgctatgt actactgcgc tagacgtaac      300
ctgttcctgc ctatggaata ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagc          354
```

<210> 29

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 29

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1              5              10             15
```

[0011]

```
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
                20              25              30
```

```
Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
                35              40              45
```

```
Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
                50              55              60
```

```
Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
```

```
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85              90              95
```

```
Ala Arg Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                100             105             110
```

```
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
                115             120             125
```

```
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
                130             135             140
```

```
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145             150             155             160
```

```
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165             170             175
```

[0012]

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 30

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成

多核苷酸”

[0013]	<400> 30	
	gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaagc cgggcgagtc actgaagatt	60
	agctgtaaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacacta ttcactggat gagacagatg	120
	cccggtaaaag gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tattaactat	180
	aacgagaagt ttaagggtca ggtcacaatt agcgccgata agtctagctc taccgcctac	240
	ctgcagtggt ctagectgaa ggctagtgac accgctatgt actactgcgc tagacgtaac	300
	ctgttcctgc ctatggaata ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagcgctagc	360
	actaagggcc caagtgtgtt tcccctggcc cccagcagca agtctacttc cggcggaact	420
	gtgcccctgg gttgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcctggaac	480
	tctggggctc tgacttccgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg	540
	tacagcctga gcagcgtggt gacagtgtcc tccagctctc tgggaacceca gacctatctc	600
	tgcaactga accacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agagagtga gcccaagagc	660
	tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc ccagctccag aactgctggg agggccttcc	720
	gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccagggtg	780
	acctgcgtgg tgggtggagct gtccacagag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg	840
	gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc	900
	tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagaatac	960
	aagtgcaag tctccaaca ggccctgcca gcccgaatcg aaaagacaat cagcaaggcc	1020
	aagggccagc caggggagcc ccagggtgac accctgcccc ccagccggga ggagatgacc	1080
	aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggttctt accccagcga tategccgtg	1140
	gagtgaggaga gcaacggcca gcccagaaac aactacaaga ccaccccccc agtctgtggac	1200
	agcgacggca gcttcttctt gtacagcaag ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag	1260
	ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag	1320
	tccttgagcc tgagccccgg caag	1344

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“人工序列的描述: 合成肽”

<400> 31

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asp Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Thr

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 32
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 33
Gln Asn Asp Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 34
Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asp Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

[0014]

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 35
Trp Ala Ser
1

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 36
Asp Tyr Arg Tyr Pro Leu
1 5

<210> 37
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

多肽”

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

Gly Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 38

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“人工序列的描述: 合成多核苷酸”

<400> 38

gatatcgtga tgactcagac cccctgagc ctgccgtga cccctggcga gcctgcctct 60
attagctgta gatctagtca gtcactgtg tctagcggcg atcagaagaa ctacctgacc 120
tggtatctgc agaagcccg tcagtcacct cagctgctga tctactgggc ctctactaga 180
gaatcaggcg tgcccgatag gtttagcgg agcggtagtg gcaccgactt caccctgaag 240
atctctaggg tggaagccga ggacgtgggc gtctactact gtcagaacga ctatagatac 300
cccctgacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaag 339

<210> 39

<211> 220

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=“人工序列的描述: 合成多肽”

<400> 39

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

[0015]

	Gly Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	
	35 40 45	
	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
	50 55 60	
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys	
	65 70 75 80	
	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn	
	85 90 95	
	Asp Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
	100 105 110	
	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	
	115 120 125	
	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	
	130 135 140	
	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	
	145 150 155 160	
	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	
	165 170 175	
[0016]	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	
	180 185 190	
	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	
	195 200 205	
	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
	210 215 220	
	<210> 40	
	<211> 660	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注="人工序列的描述: 合成	
	多核苷酸"	
	<400> 40	
	gatatcgtga tgactcagac cccctgagc ctgcccgta cccctggcga gcctgcctct	60
	attagctgta gatctagtca gtcactgtg tctagcggcg atcagaagaa ctacctgacc	120
	tggtatctgc agaagcccg tcagtcacct cagctgctga tctactgggc ctctactaga	180
	gaatcaggcg tgcccgatag gtttagcgg agcggtagt gcaccgactt caccctgaag	240
	atctctaggg tggaagccga ggacgtgggc gtctactact gtcagaacga ctatagatac	300
	cccctgacct tcggtcagg cactaagctg gagattaagc gtacggtggc cgctcccagc	360
	gtgttcattc tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtgggtgtgc	420
	ctgtctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg	480

cagagcggca acagccagga gagcgtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540
 ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc 600
 gaggtgaccc accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc 660

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述：合成肽"

<400> 41
 Asp His Thr Ile His
 1 5

<210> 42
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述：合成肽"

<400> 42
 Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

[0017] Gly

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述：合成肽"

<400> 43
 Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr
 1 5

<210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述：合成肽"

<400> 44
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 1 5

<210> 45
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 45
 Tyr Pro Arg Ser Gly Ser
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 46
 Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr
 1 5

<210> 47
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

[0018]

<400> 47
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源

<223> /注="人工序列的描述：合成
多核苷酸"

<400> 48
gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaagc cggcgagtc actgaagatt 60
agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacacta ttcactggat gagacagatg 120
cccggtaaag gcctggagtg gatgggctat atctacccta gacagagctc tattaactat 180
aacgagaagt ttaagggtca ggtcacaatt agcgccgata agtctagctc taccgcctac 240
ctgcagtggc ctagcctgaa ggctagtac accgctatgt actactgcgc tagacgtaac 300
ctgttcctgc ctatggaata ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagc 354

<210> 49
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述：合成
多肽"

<400> 49
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

[0019]

Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asn Leu Phe Leu Pro Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

[0020]

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 50

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成
多核苷酸"

<400> 50

gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaagc cggcgagtc actgaagatt

60

agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacacta ttacttgat gagacagatg 120
 cccggtaaag gcctggagtg gatgggtat atctacccta gatcaggctc tattaactat 180
 aacgagaagt ttaagggtca ggtcaccaatt agcgccgata agtctagctc taccgcctac 240
 ctgcagtggc ctacgctgaa ggctagtac accgctatgt actactgcgc tagacgtaac 300
 ctgttcctgc ctatggaata ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgc tagcgctagc 360
 actaagggcc caagtgtgtt tcccctggcc cccagcagca agtctacttc cggcggaact 420
 gctgccctgg gttgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcttggaac 480
 tctggggctc tgacttcgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gacagtgccc tccagctctc tgggaacca gacctatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc ccagctccag aactgctggg agggccttcc 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgagggtg 780
 acctgcgtgg tgggtggact gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagaatac 960
 aagtcaaaag tctccaacaa ggccctgcca gccccaatcg aaaagacaat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caggggagcc ccaggtgtac accctgcccc ccagccggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggttct accccagcga tatcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttcct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 tccctgagcc tgagccccgg caag 1344

[0021]

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 51
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 52

[0022]

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 53
Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 54
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 54
Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 55
Trp Ala Ser
1

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 56
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 57
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 57
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

	1	5	10	15	
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser	20	25	30	
	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	35	40	45	
	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	50	55	60	
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys	65	70	75	80
	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn	85	90	95	
	Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	100	105	110	
	Lys				
	<210> 58				
	<211> 339				
	<212> DNA				
	<213> 人工序列				
	<220>				
[0023]	<221> 来源				
	<223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"				
	<400> 58				
	gatatcgtga tgactcagac cccctgagc ctgcccgtga cccctggcga gcctgcctct			60	
	attagctgta gatctagtca gtcactgctg tctagcggta atcagaagaa ctacctgacc			120	
	tggtatctgc agaagcccgg tcagtcacct cagctgctga tctactgggc ctctactaga			180	
	gaatcaggcg tgcccgatag gtttagcggg agcggtagtg gcaccgactt caccctgaag			240	
	atctctaggg tggaagccga ggacgtgggc gtctactact gtcagaacga ctatagctac			300	
	cccctgacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaag			339	
	<210> 59				
	<211> 220				
	<212> PRT				
	<213> 人工序列				
	<220>				
	<221> 来源				
	<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"				
	<400> 59				
	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	1	5	10	15
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser	20	25	30	
	Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	35	40	45	

	Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val 50 55 60	
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys 65 70 75 80	
	Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn 85 90 95	
	Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile 100 105 110	
	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp 115 120 125	
	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn 130 135 140	
	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu 145 150 155 160	
	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp 165 170 175	
	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr 180 185 190	
[0024]	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser 195 200 205	
	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215 220	
	<210> 60 <211> 660 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成 多核苷酸"	
	<400> 60 gatatcgtga tgactcagac cccctgagc ctgcccgtaga cccctggcga gcctgcctct 60 attagctgta gatctagtca gtcactgctg tctagcggta atcagaagaa ctacctgacc 120 tggtatctgc agaagcccgg tcagtcacct cagctgctga tctactgggc ctctactaga 180 gaatcaggcg tgcccgatag gtttagcggt agcggtagtg gcaccgactt caccctgaag 240 atctctaggg tggaagccga ggacgtgggc gtctactact gtcagaacga ctatagctac 300 cccctgacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaagc gtacggtggc cgctcccagc 360 gtgttcatct tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtggtgtgc 420 ctgtcgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgcctg 480 cagagcggca acagccagga gagcgtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540 ctgagcagca ccctgacct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc 600	

gaggtgaccc accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc 660

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 61
Asp His Thr Leu His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 62
Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Arg
1 5 10 15

Gly

[0025]

<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 63
Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 64
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
1 5

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

肽”

<400> 65

Tyr Pro Arg Ser Gly Ser
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述: 合成
肽”

<400> 66

Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述: 合成
多肽”

<400> 67

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

[0026]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30Thr Leu His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60Arg Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述: 合成
多核苷酸”

<400> 68

cagattcagc tgggtcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc 60
 agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacaccc tgcactggat gagacaggcc 120
 ccaggtcagg gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tactaagtat 180
 aacgagaact ttaggggtag agtgactatc accgccgaca ctagctctag caccgcctat 240
 atggaactgt ctacgtgag atcagaggac accgccgtct actactgcgc tagacggctg 300
 ctgttctgc ccttgacta ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagc 354

<210> 69

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 69

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Thr Leu His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

[0027]

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

[0028]

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 70

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"

<400> 70

cagattcagc tgggtgcagtc aggcgcgcgaa gtgaagaaac cgggtcttag cgtgaaagtc 60

agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacacc tgcaactggat gagacaggcc 120

ccaggtcagg gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tactaagtat 180

	aacgagaact ttaggggtag agtgactatc accgccgaca ctagctctag caccgcctat	240
	atggaactgt ctagcctgag atcagaggac accgccgtct actactgcgc tagacggctg	300
	ctgttctctgc ccctggacta ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagcgctagc	360
	actaagggcc caagtgtgtt tccccctggcc cccagcagca agtctacttc cggcggaact	420
	gctgccctgg gttgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcctggaac	480
	tcctgggctc tgacttccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgcctcagag cagcggcctg	540
	tacagctga gcagcgtggg gacagtgcgc tccagctctc tgggaaccca gacctatc	600
	tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gccaagagc	660
	tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc ccagctccag aactgctggg agggccttcc	720
	gtgttctctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccagggtg	780
	acctgcgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg	840
	gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc	900
	tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagaatac	960
	aagtgcaaa tctccaacaa ggccctgcc gcccacatcg aaaagacaat cagcaaggcc	1020
	aaggccagc caggggagcc ccaggtgtac accctgcccc ccagccggga ggagatgacc	1080
	aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggtctct accccagcga tatcgcctg	1140
	gagtgaggga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctgtgac	1200
	agcgacggca gcttcttctt gtacagcaag ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag	1260
[0029]	ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggcctgc acaaccacta caccagaag	1320
	tcctgagcc tgagccccgg caag	1344

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 71

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 72

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 73
Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 74
Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr
1 5 10

<210> 75
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

[0030] <220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 75
Trp Ala Ser
1

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 76
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
1 5

<210> 77
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 77
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser

<400> 79
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile
50 55 60

Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205

[0032]

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 80

<211> 660

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"

<400> 80

gagatcgtga tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gagagctaca 60

ctgagctgta gatctagtca gtcactgctg tctagecgta atcagaagtc ctacctgacc 120

tggtatcagc agaagcccgg tcaggcccct agactgctga tctactgggc ctctactaga 180

gagtcaggga tccccgctag gtttagcggt agcggtagtg gcaccgactt caccctgact 240

atctctagcc tgcagcccga ggacttcgcc gtctactact gtcagaacga ctatagctac 300

cccttcacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaagc gtacgggtgc cgtcccagc 360

gtgttcattt tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtggtgtgc 420

ctgtgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg 480

cagagcggca acagccagga gacgctcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540

ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc 600

gaggtgaccc accagggcct gtccagcccc gtaccaaga gttcaacag gggcgagtgc 660

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 81
Asp His Thr Leu His
1 5

<210> 82
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 82
Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Arg
1 5 10 15

Gly

[0033]

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 83
Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 84
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
1 5

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 85
Tyr Pro Arg Ser Gly Ser

	1	5	
	<210> 86 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成肽" <400> 86 Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr 1 5		
	<210> 87 <211> 118 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽" <400> 87 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His 20 25 30 Thr Leu His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met 35 40 45 Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe 50 55 60 Arg Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95 Val Arg Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110 Leu Val Thr Val Ser Ser 115 <210> 88 <211> 354 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <221> 来源 <223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸" <400> 88 cagattcagc tggatgcagtc aggcgccgaa gtgaagaac ccggctctag cgtgaaagtc 60 agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacaccc tgcaactggat gagacaggcc 120		

ccaggtcagg gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tactaagtat 180
 aacgagaact ttaggggtag agtgactatc accgccgaca ctagctctag caccgcctat 240
 atggaactgt ctacgctgag atcagaggac accgccgtct actactgcgt cagacggctg 300
 ctgttcctgc ccctggacta ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagc 354

<210> 89

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 89

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Thr Leu His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

[0035]

Arg Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

[0036]

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 90

<211> 1344

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"

<400> 90

cagattcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc 60

agctgtaaag tctcaggcta caccctcacc gatcacaccc tgcaactggat gagacaggcc 120

ccaggtcagg gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tactaagtat 180

aacgagaact ttaggggtag agtgactatc accgccgaca ctagctctag caccgcctat 240

atggaactgt ctagectgag atcagaggac accgccgtct actactgcgt cagacggctg 300

```

ctgttctctgc ccttgacta ctggggctcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagcgctagc 360
actaaggggcc caagtgtgtt tcccctggcc cccagcagca agtctacttc cggcggaact 420
gtcgccctgg gtgtcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtectggaac 480
tctggggctc tgaattccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gacagtgtccc tccagctctc tgggaaccca gacctatata 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccaagagc 660
tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc ccagctccag aactgctggg agggccttcc 720
gtgttctctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgaggtg 780
acctgcgtgg tgggtggact gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagaatac 960
aagtgcagg tctccaacaa ggccctgcca gccccaatcg aaaagacaat cagcaaggcc 1020
aaggccagc caccggagcc ccaggtgtac accctgcccc ccagccggga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggttctt accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctgtgac 1200
agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
tccttgagcc tgagccccgg caag 1344

```

[0037]

```

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 91
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu
1 5 10 15

```

Thr

```

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 92
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

```

```

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

```

[0038]

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 93
Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 94
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 94
Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr
1 5 10

<210> 95
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 95
Trp Ala Ser
1

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 96
Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
1 5

<210> 97
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 97
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

	35	40	45
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile		
	50	55	60
	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65	70	75 80
	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn		
		85	90 95
	Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
		100	105 110
	Lys		
	<210> 98		
	<211> 339		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注="人工序列的描述: 合成		
	多核苷酸"		
	<400> 98		
	gagatcgtga tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gagagctaca	60	
	ctgagctgta gatctagtca gtcactgctg tctagcggta atcagaagtc ctacctgacc	120	
[0039]	tggtatcagc agaagcccgg tcaggccct agactgctga tctactgggc ctctactaga	180	
	gagtcaggga tccccgctag gtttagcggg agcggtagtg gcaccgactt caccctgact	240	
	atctctagcc tgcagcccga ggacttcgcc gtctactact gtcagaacga ctatagctac	300	
	cccttcacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaag	339	
	<210> 99		
	<211> 220		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注="人工序列的描述: 合成		
	多肽"		
	<400> 99		
	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser		
	20 25 30		
	Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35 40 45		
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile		
	50 55 60		
	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65 70 75 80		

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

[0040]

<210> 100
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成
多核苷酸"

<400> 100
gagatcgtga tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gagagctaca 60
ctgagctgta gatctagta gtcactgtg tctagcggta atcagaagtc ctacctgacc 120
tggtatcage agaagcccg tcaggccct agactgctga tctactggc ctctactaga 180
gagtcaggga tccccgctag gtttagcggt agcggtagt gcaccgactt caccctgact 240
atctctagcc tgcagccga ggacttcgcc gtctactact gtcagaacga ctatagctac 300
cccttcacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaagc gtacggtggc cgctcccagc 360
gtgttcatt tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtggtgtgc 420
ctgctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaagtgga caacgccctg 480
cagagcggca acagccagga gagcgtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540
ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc 600
gaggtgaccc accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc 660

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0041]

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 101
Asp His Thr Leu His
1 5

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 102
Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 103
Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr
1 5

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 104
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
1 5

<210> 105
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 105
Tyr Pro Arg Ser Gly Ser
1 5

<210> 106

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 106
 Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr
 1 5

<210> 107
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 107
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30

Thr Leu His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

[0042] Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成多核苷酸"

<400> 108
 cagattcagc tggatgcagtc aggcgcgcgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc 60
 agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacacc tgcactggat gagacaggcc 120
 ccaggtcagg gectggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tactaagtat 180
 aacgagaact ttaagggtag agtgactatc accgccgaca ctagctctag caccgcctat 240

atggaactgt ctacgctgag atcagaggac accgccgtct actactgcgt cagacggctg 300

ctgttctctgc ccctggacta ctggggtcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagc 354

<210> 109

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 109

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Thr Leu His Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

[0043]

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Arg Leu Leu Phe Leu Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

[0044]

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 110
<211> 1344
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成
多核苷酸"

<400> 110
cagattcagc tggatgcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc 60
agctgtaaag tctcaggcta caccttcacc gatcacaccc tgcaactggat gagacaggcc 120
ccaggtcagg gcctggagtg gatgggctat atctacccta gatcaggctc tactaagtat 180
aacgagaact ttaagggtag agtgactatc accgccgaca ctagctctag caccgcctat 240
atggaactgt ctagectgag atcagaggac accgccgtct actactgcgt cagacggctg 300
ctgttcctgc ccctggacta ctggggctcag ggcaccctgg tcaccgtgtc tagcgctagc 360
actaagggcc caagtgtgtt tcccctggcc cccagcagca agtctacttc cggcggaact 420

gctgccctgg gttgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgacagt gtcctggaac 480
tctggggctc tgactttccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gacagtcccc tccagctctc tgggaaccca gacctatac 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccaagagc 660
tgcgacaaga cccacacctg cccccctgc ccagctccag aactgctggg agggccttcc 720
gtgttctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgaggtg 780
acctgcgtgg tgggtggact gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaagaatac 960
aagtgc aaag tctccaacaa ggcctgcca gccccaatcg aaaagacaat cagcaaggcc 1020
aagggccagc caggggagcc ccaggtgtac accctgcccc ccagccggga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggttct accccagcga tatcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccc agtgctggac 1200
agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagtccag gtggcagcag 1260
ggcaacgtgt tcagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
tccctgagcc tgagccccgg caag 1344

<210> 111
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0045]

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 111
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 112
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 112
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成"

肽”

<400> 113

Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 114

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述：合成
肽”

<400> 114

Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Ser Tyr
1 5 10

<210> 115

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述：合成
肽”

<400> 115

Trp Ala Ser
1

[0046]

<210> 116

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述：合成
肽”

<400> 116

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe
1 5

<210> 117

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注=”人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 117

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile

	50	55	60
	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65	70	75 80
	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn		
		85	90 95
	Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
		100	105 110
	Lys		
	<210> 118		
	<211> 339		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注="人工序列的描述: 合成		
	多核苷酸"		
	<400> 118		
	gagatcgtga tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gagagctaca	60	
	ctgagctgta gatctagtca gtcactgctg tctagcggta atcagaagtc ctacctgacc	120	
	tggtatcagc agaagcccg tccagccct agactgctga tctactgggc ctctactaga	180	
	gagtcaggga tccccgctag gtttagcggg agcggtagtg gcaccgactt caccctgact	240	
[0047]	atctctagcc tgcagcccga ggacttcgcc gtctactact gtcagaacga ctatagctac	300	
	cccttcacct tcggtcaggg cactaagctg gagattaag	339	
	<210> 119		
	<211> 220		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注="人工序列的描述: 合成		
	多肽"		
	<400> 119		
	Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser Ser		
	20 25 30		
	Gly Asn Gln Lys Ser Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35 40 45		
	Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Ile		
	50 55 60		
	Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65 70 75 80		
	Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn		
	85 90 95		

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 115 120 125
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 120
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0048]

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 多核苷酸"

<400> 120
 gagatcgtga tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gagagctaca 60
 ctgagctgta gatctagtca gtcactgctg tctagcggta atcagaagtc ctacctgacc 120
 tggtatcagc agaagcccg gtcagccctt agactgctga tctactgggc ctctactaga 180
 gaggcaggga tccccgctag gtttagcggt agcggttagtgc gaccgactt caccctgact 240
 atctctagcc tgcagcccg ggaacttcgcc gtctactact gtcagaacga ctatagctac 300
 cccttcacct tcggtcagg gactaagctg gagattaagc gtacgggtggc cgtctccagc 360
 gtgttcattc tcccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtggtgtgc 420
 ctgctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg 480
 cagagcgcca acagccagga gagcgtcacc gaggcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540
 ctgagcagca ccctgacct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc 600
 gaggtgaccc accagggcct gtcagccccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc 660

<210> 121
 <211> 829
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 121
 Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val
 1 5 10 15

[0049]

Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg
 20 25 30
 Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly
 35 40 45
 Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala
 50 55 60
 Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr
 65 70 75 80
 Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe
 85 90 95
 Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val Val Ala
 100 105 110
 Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu
 115 120 125
 Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser
 130 135 140
 Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu
 165 170 175
 Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly
 180 185 190
 Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln
 195 200 205
 Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val
 210 215 220
 Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser
 245 250 255
 Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile
 260 265 270
 His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg
 275 280 285
 Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp
 290 295 300
 Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp
 305 310 315 320

	Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His 325 330 335
	Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr 340 345 350
	Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile 355 360 365
	Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu 370 375 380
	Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala 385 390 395 400
	Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe 405 410 415
	Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu 420 425 430
	Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu 435 440 445
	Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala 450 455 460
[0050]	Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg 465 470 475 480
	Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr 485 490 495
	Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn 500 505 510
	Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr 515 520 525
	Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His 530 535 540
	Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro 545 550 555 560
	Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr 565 570 575
	Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr 580 585 590
	Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys 595 600 605
	Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His 610 615 620

Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys
 625 630 635 640
 His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile
 645 650 655
 Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Leu Val
 660 665 670
 Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu
 675 680 685
 Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu
 690 695 700
 Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg
 705 710 715 720
 Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro
 725 730 735
 Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp
 740 745 750
 Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp
 755 760 765
 [0051] Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly
 770 775 780
 Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser
 785 790 795 800
 Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe
 805 810 815
 Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp
 820 825
 <210> 122
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠
 <400> 122
 Met Glu Leu Leu Ser Gly Pro Leu Val Phe Leu Leu Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Val Cys Trp Leu Arg Ser Val Val Ser Glu Ser Tyr Arg Glu Asp Phe
 20 25 30
 Ile Arg Glu Ala Gly Val Thr Leu Glu Val Gly Gly Thr Asp Leu Glu
 35 40 45
 Pro Ser Gln Ala Leu Glu Lys Glu Ala Leu Ala Gly His Glu Val Leu
 50 55 60

	Gly	Ala	Asp	Ser	Gly	Gly	Ile	Ile	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Thr	Val	Gln	
	65					70					75					80	
	Gly	Gly	Lys	Gly	Val	Met	Asn	Ser	Pro	Pro	Ser	Arg	Ile	Leu	Arg	Arg	
					85					90					95		
	Arg	Lys	Arg	Glu	Trp	Val	Met	Pro	Pro	Ile	Ser	Val	Pro	Glu	Asn	Gly	
				100					105					110			
	Lys	Gly	Pro	Phe	Pro	Gln	Arg	Leu	Asn	Gln	Leu	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	
			115					120					125				
	Arg	Gly	Thr	Lys	Leu	Phe	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Ser	
			130				135					140					
	Pro	Pro	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Ile	Glu	Lys	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Leu	
	145					150					155					160	
	Leu	Asn	Met	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Ile	Val	Lys	Tyr	Glu	Leu	Phe	
					165					170					175		
	Gly	His	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Glu	Pro	Met	Asn	
				180					185					190			
	Ile	Ser	Ile	Ile	Val	Thr	Asp	Gln	Asn	Asp	Asn	Lys	Pro	Lys	Phe	Thr	
			195					200					205				
[0052]	Gln	Asp	Thr	Phe	Arg	Gly	Ser	Val	Pro	Glu	Gly	Val	Met	Pro	Gly	Thr	
		210					215					220					
	Ser	Val	Met	Gln	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Glu	Asp	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	
	225					230					235					240	
	Tyr	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Tyr	Ser	Ile	His	Ser	Gln	Glu	Pro	Lys	Glu	
				245						250					255		
	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile	His	Lys	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	
				260					265					270			
	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Tyr	Thr	Leu	
			275					280					285				
	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	
			290				295					300					
	Glu	Ala	Val	Val	Gln	Ile	Leu	Asp	Thr	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Glu	Phe	
	305					310					315					320	
	Gln	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	His	
					325					330					335		
	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Leu	Asp	Ser	Pro	Asn	Ser	Pro	
				340					345					350			
	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	His	Ile	Val	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	His	
			355					360					365				

	Phe	Thr	Val	Ala	Thr	His	Pro	Glu	Thr	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	
	370						375					380					
	Lys	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	Gln	Asn	Gln	His	Thr	Leu	Tyr	Ile	
	385					390					395					400	
	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Ser	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Ala	Thr	
				405						410					415		
	Ala	Thr	Val	Val	Val	His	Val	Glu	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Val	Phe	
				420					425					430			
	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Ile	Glu	Ala	Gln	Glu	Gly	Ile	Ser	Ile	Gly	
		435						440					445				
	Glu	Leu	Val	Cys	Val	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asp	Pro	Asp	Lys	Glu	Glu	Gln	
	450						455					460					
	Lys	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ile	Leu	Arg	Asp	Pro	Ala	Ser	Trp	Leu	Ala	Val	
	465					470					475					480	
	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Leu	Asp	Arg	Glu	
					485					490					495		
	Asp	Glu	Gln	Phe	Val	Lys	Asn	Asp	Ile	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Leu	Ala	
				500					505					510			
[0053]	Thr	Asp	Asn	Gly	Asn	Pro	Pro	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	
			515					520					525				
	Thr	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Asp	His	Gly	Pro	Ile	Pro	Glu	Pro	Arg	Gln	
	530					535						540					
	Ile	Ile	Ile	Cys	Asn	Gln	Ser	Pro	Val	Pro	Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Thr	
	545					550					555					560	
	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser	Pro	Phe	Gln	Ala	Gln	Leu	Thr	
					565					570					575		
	His	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Trp	Met	Ala	Glu	Val	Ser	Glu	Lys	Gly	Asp	
				580					585					590			
	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	Phe	Leu	Lys	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asp	
		595						600					605				
	Leu	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	His	Gly	Asn	Arg	Glu	Gln	Leu	Thr	Met	
	610						615					620					
	Ile	Arg	Ala	Thr	Val	Cys	Asp	Cys	His	Gly	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Cys	
	625					630					635					640	
	Pro	Arg	Pro	Trp	Lys	Gly	Gly	Phe	Ile	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Val	
					645					650					655		
	Leu	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Arg	Lys	
				660					665					670			

Lys Arg Lys Val Lys Glu Pro Leu Leu Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg
 675 680 685
 Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln
 690 695 700
 Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu
 705 710 715 720
 Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro Thr Phe Ile Pro Thr Pro Met
 725 730 735
 Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile
 740 745 750
 Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp
 755 760 765
 Ser Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser
 770 775 780
 Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Thr Ser Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asn
 785 790 795 800
 Tyr Leu Thr Glu Trp Gly Ser Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr
 805 810 815
 Gly Gly Gly Glu Asp Asp
 820

[0054]

<210> 123
 <211> 822
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 123
 Met Glu Leu Leu Ser Gly Pro His Ala Phe Leu Leu Leu Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Val Cys Trp Leu Arg Ser Val Val Ser Glu Pro Tyr Arg Ala Gly Phe
 20 25 30
 Ile Gly Glu Ala Gly Val Thr Leu Glu Val Glu Gly Thr Asp Leu Glu
 35 40 45
 Pro Ser Gln Val Leu Gly Lys Val Ala Leu Ala Gly Gln Gly Met His
 50 55 60
 His Ala Asp Asn Gly Asp Ile Ile Met Leu Thr Arg Gly Thr Val Gln
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Asp Ala Met His Ser Pro Pro Thr Arg Ile Leu Arg Arg
 85 90 95
 Arg Lys Arg Glu Trp Val Met Pro Pro Ile Phe Val Pro Glu Asn Gly
 100 105 110
 Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp
 115 120 125

Arg Gly Thr Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser
 130 135 140
 Pro Pro Glu Gly Val Phe Thr Ile Glu Lys Glu Ser Gly Trp Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu His Met Pro Leu Asp Arg Glu Lys Ile Val Lys Tyr Glu Leu Tyr
 165 170 175
 Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Glu Pro Met Asn
 180 185 190
 Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp Asn Lys Pro Lys Phe Thr
 195 200 205
 Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Met Pro Gly Thr
 210 215 220
 Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr Asp Glu Asp Asp Ala Val Asn Thr
 225 230 235 240
 Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Glu
 245 250 255
 Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile His Lys Ser Thr Gly Thr Ile Ser
 260 265 270
 [0055] Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg Glu Lys Val Pro Glu Tyr Arg Leu
 275 280 285
 Thr Val Gln Ala Thr Asp Met Asp Gly Glu Gly Ser Thr Thr Thr Ala
 290 295 300
 Glu Ala Val Val Gln Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn Ala Pro Glu Phe
 305 310 315 320
 Glu Pro Gln Lys Tyr Glu Ala Trp Val Pro Glu Asn Glu Val Gly His
 325 330 335
 Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Val Pro Asn Ser Pro
 340 345 350
 Ala Trp Arg Ala Thr Tyr His Ile Val Gly Gly Asp Asp Gly Asp His
 355 360 365
 Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu Thr Asn Gln Gly Val Leu Thr Thr
 370 375 380
 Lys Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala Gln Asp Gln His Thr Leu Tyr Val
 385 390 395 400
 Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe Ala Val Lys Leu Pro Thr Ala Thr
 405 410 415
 Ala Thr Val Val Val His Val Lys Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe
 420 425 430

Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Ile	Glu	Ala	Gln	Glu	Gly	Ile	Ser	Ile	Gly
435															
Glu	Leu	Val	Cys	Ile	Tyr	Thr	Ala	Gln	Asp	Pro	Asp	Lys	Glu	Asp	Gln
450															
Lys	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Pro	Ala	Asn	Trp	Leu	Ala	Val
465															
Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Ile	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Leu	Asp	Arg	Gln
485															
Asp	Glu	Gln	Phe	Val	Lys	Asn	Asn	Val	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Leu	Ala
500															
Thr	Asp	Ser	Gly	Asn	Pro	Pro	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu
515															
Thr	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Asp	His	Gly	Pro	Ile	Pro	Glu	Pro	Arg	Gln
530															
Ile	Ile	Ile	Cys	Asn	Gln	Ser	Pro	Val	Pro	Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Thr
545															
Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser	Pro	Phe	Gln	Ala	Gln	Leu	Thr
565															
His	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Trp	Met	Ala	Glu	Val	Ser	Glu	Lys	Gly	Asp
580															
Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	Phe	Leu	Lys	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asp
595															
Leu	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	His	Gly	Asn	Arg	Glu	Gln	Leu	Thr	Met
610															
Ile	Arg	Ala	Thr	Val	Cys	Asp	Cys	His	Gly	Gln	Val	Phe	Asn	Asp	Cys
625															
Pro	Arg	Pro	Trp	Lys	Gly	Gly	Phe	Ile	Leu	Pro	Ile	Leu	Gly	Ala	Val
645															
Leu	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Arg	Lys
660															
Lys	Arg	Lys	Val	Lys	Glu	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Glu	Asp	Asp	Thr	Arg
675															
Asp	Asn	Val	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gln
690															
Asp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Gln	Leu	His	Arg	Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Pro	Glu
705															
Val	Val	Leu	Arg	Asn	Asp	Val	Val	Pro	Thr	Phe	Ile	Pro	Thr	Pro	Met
725															
730															
735															

Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile
 740 745 750
 Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp
 755 760 765
 Ser Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser
 770 775 780
 Leu Ser Ser Leu Thr Thr Ser Ala Ser Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asn
 785 790 795 800
 Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr
 805 810 815
 Gly Gly Gly Glu Asp Asp
 820
 <210> 124
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 多肽"
 <400> 124
 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ile Tyr Ala Asp His Gln Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly
 20 25 30
 Phe Glu Gly Asp Arg Thr Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro
 35 40 45
 Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser
 50 55 60
 Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly
 85 90 95
 Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr
 100 105 110
 Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp
 115 120 125
 Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp His Lys Pro
 130 135 140
 Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Leu
 145 150 155 160

[0057]

	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Gln	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Glu	Asp	Asp	Ala	
					165					170						175	
	Ile	His	Thr	Tyr	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Tyr	Ser	Ile	His	Ser	Gln	Glu	
				180					185						190		
	Pro	Lys	Asp	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile	His	Arg	Ser	Thr	Gly	
			195					200					205				
	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Pro	Glu	
		210					215					220					
	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	
	225					230					235					240	
	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Asn	Asp	Asn	Ala	
				245						250					255		
	Pro	Val	Phe	Asp	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ser	His	Val	Pro	Glu	Asn	Ala	
				260					265					270			
	Val	Gly	His	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Leu	Asp	Ala	Pro	
			275					280					285				
	Asn	Ser	Pro	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Asp	Asp	
		290					295						300				
[0058]	Gly	Asp	His	Phe	Thr	Ile	Ala	Thr	His	Pro	Glu	Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	
	305					310					315					320	
	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	Lys	Asn	Gln	His	Thr	
				325						330					335		
	Leu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Pro	Phe	Val	Leu	Lys	Leu	Pro	
			340						345					350			
	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Val	His	Val	Glu	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	
			355				360						365				
	Pro	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Val	Glu	Val	Gln	Glu	Gly	Ile	
		370					375					380					
	Pro	Thr	Gly	Glu	Ala	Val	Cys	Val	Tyr	Thr	Ala	Lys	Asp	Pro	Asp	Lys	
	385					390					395					400	
	Glu	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	Asp	Pro	Ala	Gly	Trp	
				405						410					415		
	Leu	Ala	Met	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Thr	Leu	
				420					425					430			
	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Arg	Phe	Val	Arg	Asn	Asn	Ile	Tyr	Glu	Val	Met	
		435					440						445				
	Val	Leu	Ala	Val	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	
		450					455						460				

Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His Gly Pro Val Pro Glu
 465 470 475 480
 Pro Arg Glu Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro Glu Ser Gln Val Leu
 485 490 495
 Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr Ser Pro Phe Gln Ala
 500 505 510
 Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Met Ala Glu Val Asn Glu
 515 520 525
 Lys Asp Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu Lys Gln Asp
 530 535 540
 Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His Gly Asn Lys Glu Gln
 545 550 555 560
 Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys His Gly His Val Glu
 565 570 575
 Lys Cys Pro Asp Pro Trp Lys Gly Gly Gly Ala His His His His His
 580 585 590
 His Gly Ala
 595

[0059]

<210> 125
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 多肽"
 <400> 125
 Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ile Tyr Ala Asp His Gln Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly
 20 25 30
 Phe Glu Gly Asp Arg Thr Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro
 35 40 45
 Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser
 50 55 60
 Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly
 85 90 95
 Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr
 100 105 110

[0060]

Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp
 115 120 125

Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp His Lys Pro
 130 135 140

Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Leu
 145 150 155 160

Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr Asp Glu Asp Asp Ala
 165 170 175

Ile His Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser Ile His Ser Gln Glu
 180 185 190

Pro Lys Asp Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile His Arg Ser Thr Gly
 195 200 205

Thr Ile Ser Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg Glu Lys Val Pro Glu
 210 215 220

Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp Gly Asp Gly Ser Thr
 225 230 235 240

Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn Ala
 245 250 255

Pro Val Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ser His Val Pro Glu Asn Ala
 260 265 270

Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr Asp Leu Asp Ala Pro
 275 280 285

Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile Val Gly Gly Asp Asp
 290 295 300

Gly Asp His Phe Thr Ile Ala Thr His Pro Glu Ser Asn Gln Gly Ile
 305 310 315 320

Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala Lys Asn Gln His Thr
 325 330 335

Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe Val Leu Lys Leu Pro
 340 345 350

Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu Asp Val Asn Glu Ala
 355 360 365

Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu Val Gln Glu Gly Ile
 370 375 380

Pro Thr Gly Glu Ala Val Cys Val Tyr Thr Ala Lys Asp Pro Asp Lys
 385 390 395 400

Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg Asp Pro Ala Gly Trp
 405 410 415

[0061]

Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr Val Ala Gly Thr Leu
 420 425 430

Asp Arg Glu Asp Glu Arg Phe Val Arg Asn Asn Ile Tyr Glu Val Met
 435 440 445

Val Leu Ala Val Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr Thr Gly Thr Gly Thr
 450 455 460

Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His Gly Pro Val Pro Glu
 465 470 475 480

Pro Arg Glu Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro Glu Ser Gln Val Leu
 485 490 495

Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr Ser Pro Phe Gln Ala
 500 505 510

Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Met Ala Glu Val Asn Glu
 515 520 525

Lys Asp Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys Phe Leu Lys Gln Gly
 530 535 540

Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His Gly Asn Lys Glu Gln
 545 550 555 560

Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys His Gly His Val Glu
 565 570 575

Lys Cys Pro Asp Pro Trp Lys Gly Gly Gly Ala His His His His His
 580 585 590

His Gly Ala
 595

<210> 126
 <211> 829
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 多肽"

<400> 126
 Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val
 1 5 10 15

Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg
 20 25 30

Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly
 35 40 45

Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala
 50 55 60

Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr

[0062]

65	70	75	80
Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe	85	90	95
Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val Val Ala	100	105	110
Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu	115	120	125
Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser	130	135	140
Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val	145	150	155
Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu	165	170	175
Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly	180	185	190
Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln	195	200	205
Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val	210	215	220
Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr	225	230	235
Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser	245	250	255
Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro His Asp Leu Met Phe Thr Ile	260	265	270
His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg	275	280	285
Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp	290	295	300
Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val Ala Val Val Glu Ile Leu Asp	305	310	315
Ala Asn Asp Asn Ala Pro Met Phe Asp Pro Gln Lys Tyr Glu Ala His	325	330	335
Val Pro Glu Asn Ala Val Gly His Glu Val Gln Arg Leu Thr Val Thr	340	345	350
Asp Leu Asp Ala Pro Asn Ser Pro Ala Trp Arg Ala Thr Tyr Leu Ile	355	360	365
Met Gly Gly Asp Asp Gly Asp His Phe Thr Ile Thr Thr His Pro Glu			

370	375	380
Ser Asn Gln Gly Ile Leu Thr Thr Arg Lys Gly Leu Asp Phe Glu Ala 385 390 395 400		
Lys Asn Gln His Thr Leu Tyr Val Glu Val Thr Asn Glu Ala Pro Phe 405 410 415		
Val Leu Lys Leu Pro Thr Ser Thr Ala Thr Ile Val Val His Val Glu 420 425 430		
Asp Val Asn Glu Ala Pro Val Phe Val Pro Pro Ser Lys Val Val Glu 435 440 445		
Val Gln Glu Gly Ile Pro Thr Gly Glu Pro Val Cys Val Tyr Thr Ala 450 455 460		
Glu Asp Pro Asp Lys Glu Asn Gln Lys Ile Ser Tyr Arg Ile Leu Arg 465 470 475 480		
Asp Pro Ala Gly Trp Leu Ala Met Asp Pro Asp Ser Gly Gln Val Thr 485 490 495		
Ala Val Gly Thr Leu Asp Arg Glu Asp Glu Gln Phe Val Arg Asn Asn 500 505 510		
Ile Tyr Glu Val Met Val Leu Ala Met Asp Asn Gly Ser Pro Pro Thr 515 520 525		
Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Thr Leu Ile Asp Val Asn Asp His 530 535 540		
Gly Pro Val Pro Glu Pro Arg Gln Ile Thr Ile Cys Asn Gln Ser Pro 545 550 555 560		
Val Arg Gln Val Leu Asn Ile Thr Asp Lys Asp Leu Ser Pro His Thr 565 570 575		
Ser Pro Phe Gln Ala Gln Leu Thr Asp Asp Ser Asp Ile Tyr Trp Thr 580 585 590		
Ala Glu Val Asn Glu Glu Gly Asp Thr Val Val Leu Ser Leu Lys Lys 595 600 605		
Phe Leu Lys Gln Asp Thr Tyr Asp Val His Leu Ser Leu Ser Asp His 610 615 620		
Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys 625 630 635 640		
His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile 645 650 655		
Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Leu Val 660 665 670		
Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu		

[0063]

675 680 685

Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu
690 695 700

Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg
705 710 715 720

Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro
725 730 735

Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp
740 745 750

Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp
755 760 765

Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly
770 775 780

Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser
785 790 795 800

Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe
805 810 815

Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp
820 825

[0064]

<210> 127
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 127
Gly Pro Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys
1 5 10 15

Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg
20 25 30

Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro
35 40 45

Pro Glu Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly
65 70 75 80

His Ala Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile
85 90 95

Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln
100 105 110

[0065]

Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser
 115 120 125
 Val Met Gln Val Thr Ala Thr Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr
 130 135 140
 Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser Ile His Ser Gln Glu Pro Lys Asp Pro
 145 150 155 160
 His Asp Leu Met Phe Thr Ile His Arg Ser Thr Gly Thr Ile Ser Val
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gly Leu Asp Arg Glu Lys Val Pro Glu Tyr Thr Leu Thr
 180 185 190
 Ile Gln Ala Thr Asp Met Asp Gly Asp Gly Ser Thr Thr Thr Ala Val
 195 200 205
 Ala Val Val Glu Ile Leu Asp Ala Asn Asp Asn
 210 215
 <210> 128
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 多肽"
 <400> 128
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gln
 20 25 30
 Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Arg Glu Gly Phe Ala Ile
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Glu Phe Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ala Pro His His
225 230 235 240

His His His His

<210> 129

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注="人工序列的描述: 合成
多肽"

[0066]

<400> 129

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Thr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Ser Trp Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Ala
 210

<210> 130
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 6xHis tag"

<400> 130
 His His His His His His
 1 5

[0067]

<210> 131
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注="人工序列的描述: 合成
 肽"

<400> 131
 Arg Gly Asp Ser
 1

<210> 132
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒

<400> 132
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro
 1 5 10 15

Ala Met Pro Glu Asn Leu
 20

<210> 133
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 133
 Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro
 1 5 10 15

Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr
 20 25 30

Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu
 35 40 45

Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys
 50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala
 65 70 75 80

Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile
 85 90 95

Ile Val Thr Asp Gln
 100

<210> 134
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 食蟹猴

<400> 134
 Asp Trp Val Val Ala Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro
 1 5 10 15

Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr
 20 25 30

Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu
 35 40 45

[0068]

Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys
 50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala
 65 70 75 80

Val Ser Glu Asn Gly Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile
 85 90 95

Ile Val Thr Asp Gln
 100

<210> 135
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 135
 Cys Pro Glu Asn Glu Lys Gly Pro Phe Pro Lys Asn Leu Val Gln Ile
 1 5 10 15

Lys Ser Asn Lys Asp Lys Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly
 20 25 30

Gln Gly Ala Asp Thr Pro Pro Val Gly Val Phe Ile Ile Glu Arg Glu
 35 40 45

Thr Gly Trp Leu Lys Val Thr Glu Pro Leu Asp
 50 55

<210> 136
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 136
 Leu Pro Glu Asn Ser Arg Gly Pro Phe Pro Gln Glu Leu Val Arg Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Asp Arg Asp Lys Asn Leu Ser Leu Arg Tyr Ser Val Thr Gly
 20 25 30

Pro Gly Ala Asp Gln Pro Pro Thr Gly Ile Phe Ile Ile Asn Pro Ile
 35 40 45

Ser Gly Gln Leu Ser Val Thr Lys Pro Leu Asp
 50 55

<210> 137
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 137
 Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu Asn Gln Leu
 1 5 10 15

Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser Ile Thr Gly
 20 25 30

[0069]

Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val Glu Lys Glu
 35 40 45

Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp
 50 55

<210> 138
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 138
 Val Pro Glu Asn Ser Arg Gly Pro Phe Pro Gln Gln Leu Val Arg Ile
 1 5 10 15

Arg Ser Asp Lys Asp Asn Asp Ile Pro Ile Arg Tyr Ser Ile Thr Gly
 20 25 30

Val Gly Ala Asp Gln Pro Pro Met Glu Val Phe Ser Ile Asp Ser Met
 35 40 45

Ser Gly Arg Met Tyr Val Thr Arg Pro Met Asp
 50 55

<210> 139
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 139
 Ile Asp Glu Glu Lys Asn Thr Ser Leu Pro His His Val Gly Lys Ile
 1 5 10 15

Lys Ser Ser Val Ser Arg Lys Asn Ala Lys Tyr Leu Leu Lys Gly Glu
20 25 30

Tyr Val Gly Lys Val Phe Arg Val Asp Ala Glu Thr Gly Asp Val Phe
35 40 45

Ala Ile Glu Arg Leu Asp
50

<210> 140

<211> 56

<212> PRT

<213> 智人

<400> 140

Leu Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Ser Asp Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu
1 5 10 15

His Ser Asp Gln Asp Arg Gly Asp Gly Ser Leu Lys Tyr Ile Leu Ser
20 25 30

Gly Asp Gly Ala Gly Asp Leu Phe Ile Ile Asn Glu Asn Thr Gly Asp
35 40 45

Ile Gln Ala Thr Lys Arg Leu Asp
50 55

[0070]

<210> 141

<211> 56

<212> PRT

<213> 智人

<400> 141

Val Leu Glu Glu Tyr Met Gly Ser Asp Pro Leu Tyr Val Gly Lys Leu
1 5 10 15

His Ser Asp Val Asp Lys Gly Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Ile Leu Ser
20 25 30

Gly Glu Gly Ala Ser Ser Ile Phe Ile Ile Asp Glu Asn Thr Gly Asp
35 40 45

Ile His Ala Thr Lys Arg Leu Asp
50 55

<210> 142

<211> 56

<212> PRT

<213> 智人

<400> 142

Val Leu Glu Glu Phe Ser Gly Pro Glu Pro Ile Leu Val Gly Arg Leu
1 5 10 15

His Thr Asp Leu Asp Pro Gly Ser Lys Lys Ile Lys Tyr Ile Leu Ser
20 25 30

Gly Asp Gly Ala Gly Thr Ile Phe Gln Ile Asn Asp Val Thr Gly Asp
35 40 45

Ile His Ala Ile Lys Arg Leu Asp
50 55

<210> 143
<211> 56
<212> PRT
<213> 智人

<400> 143
Leu Leu Glu Glu Tyr Thr Gly Thr Asp Thr Gln Tyr Val Gly Lys Leu
1 5 10 15

[0071]

His Thr Asp Gln Asp Lys Gly Asp Gly Asn Leu Lys Tyr Ile Leu Thr
20 25 30

Gly Asp Gly Ala Gly Ser Leu Phe Val Ile Asp Glu Asn Thr Gly Asp
35 40 45

Ile His Ala Ala Lys Lys Leu Asp
50 55

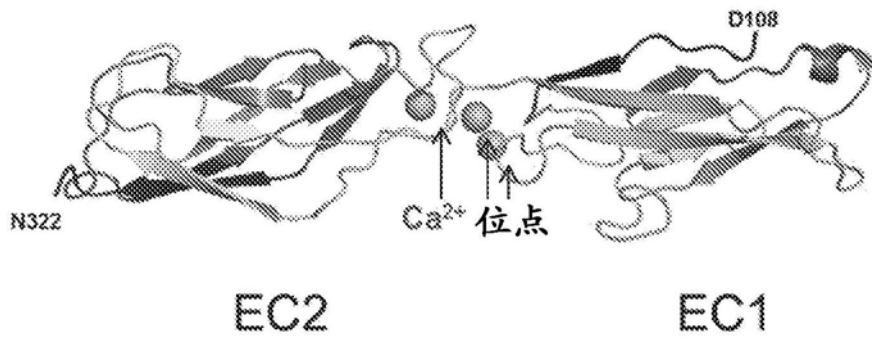


图1

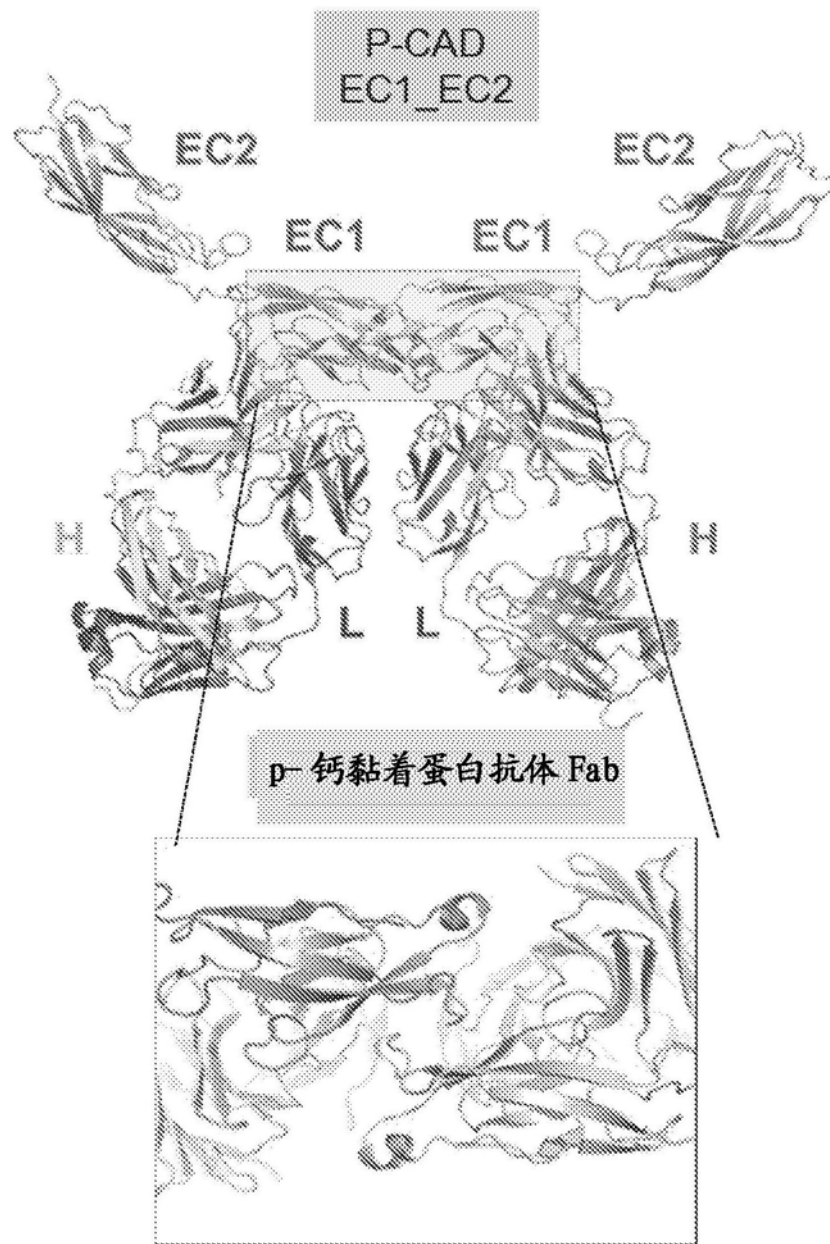


图2

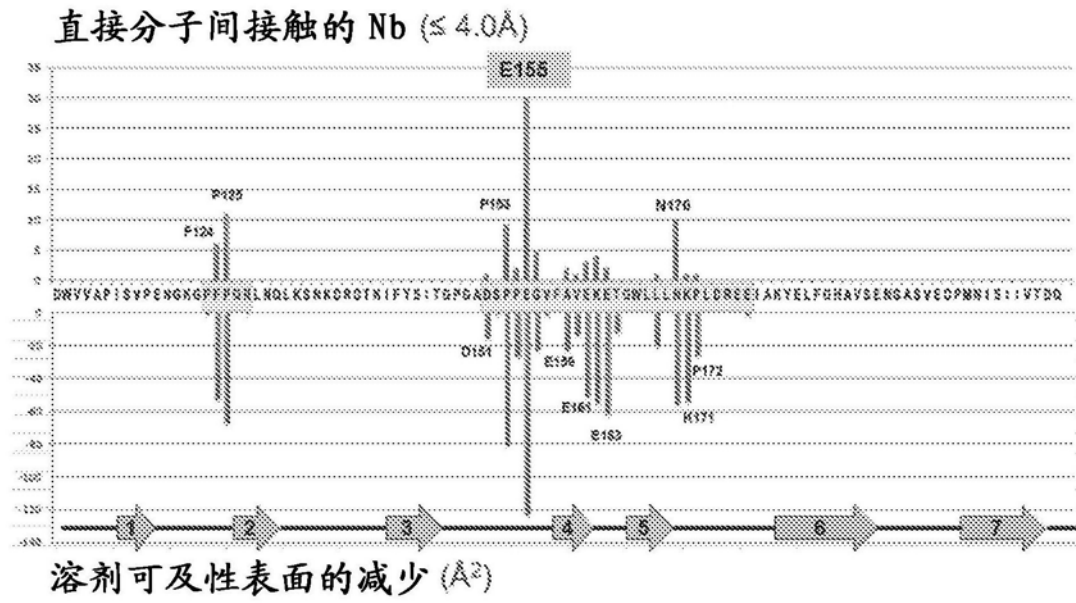


图3

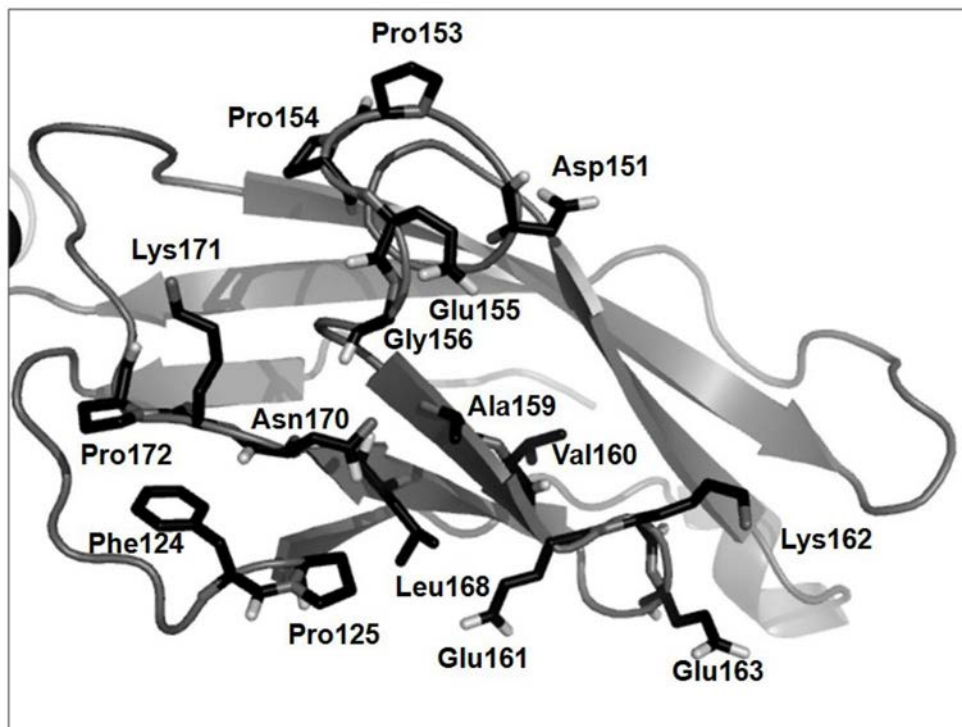


图4

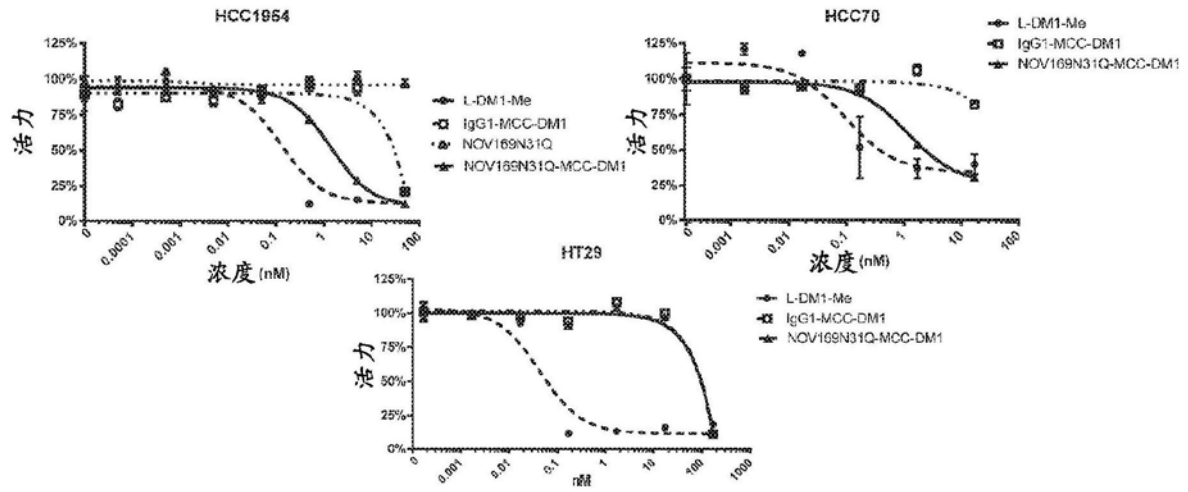


图8

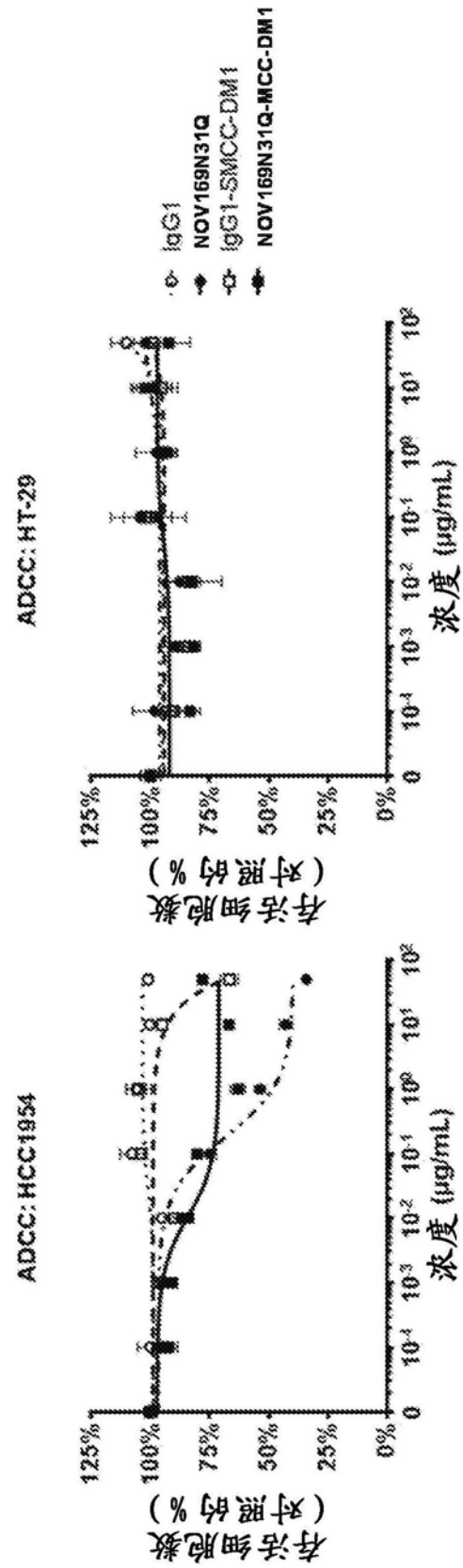


图9

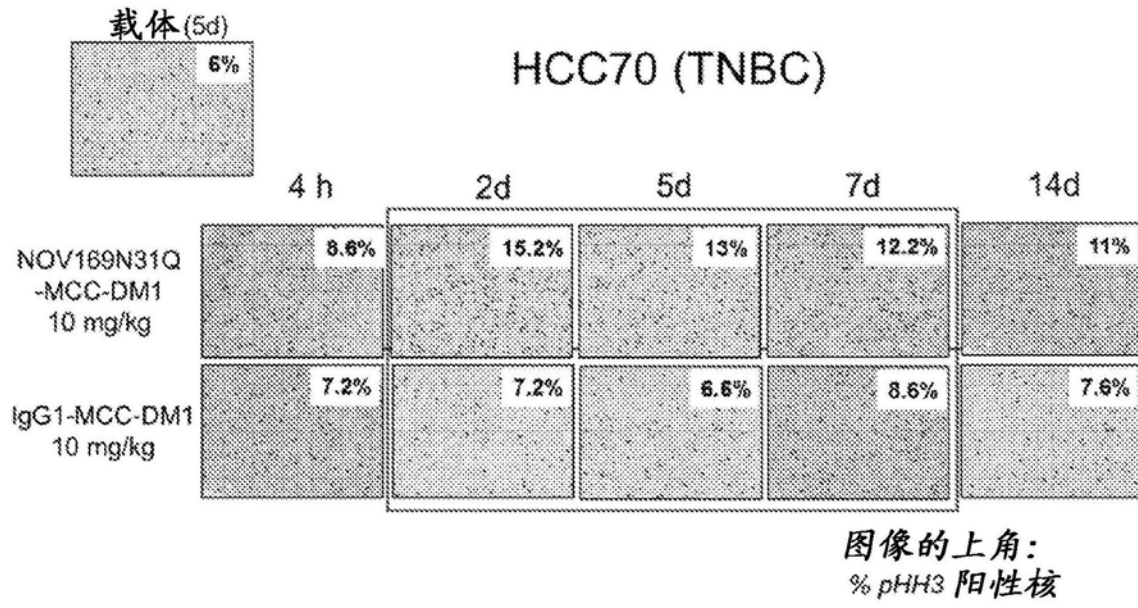


图10



图11A

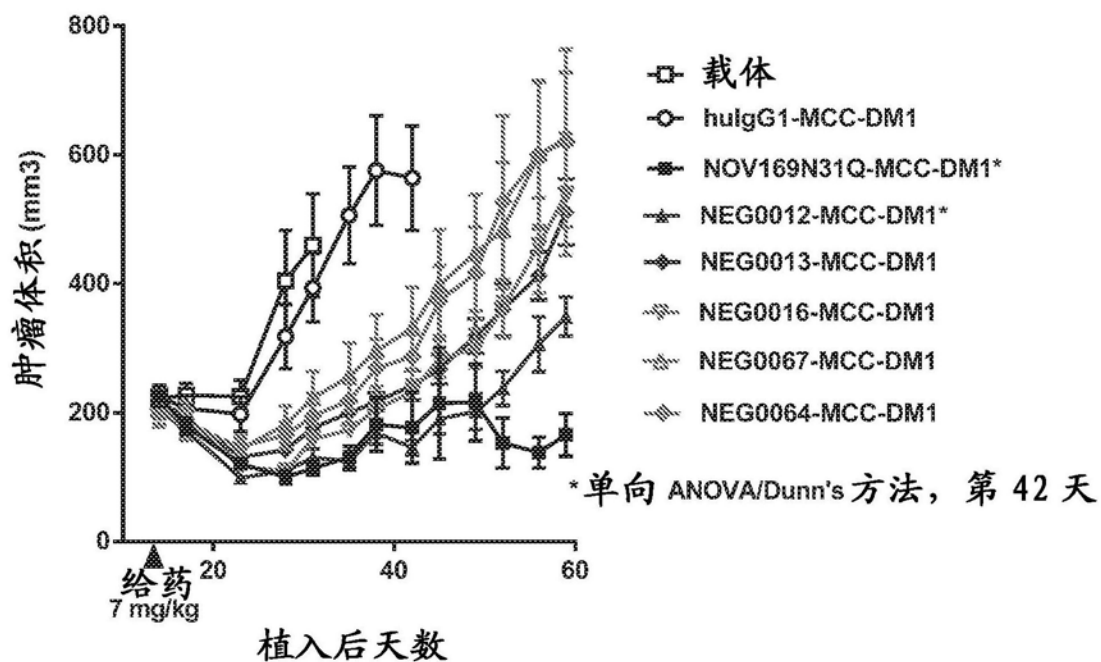


图11B

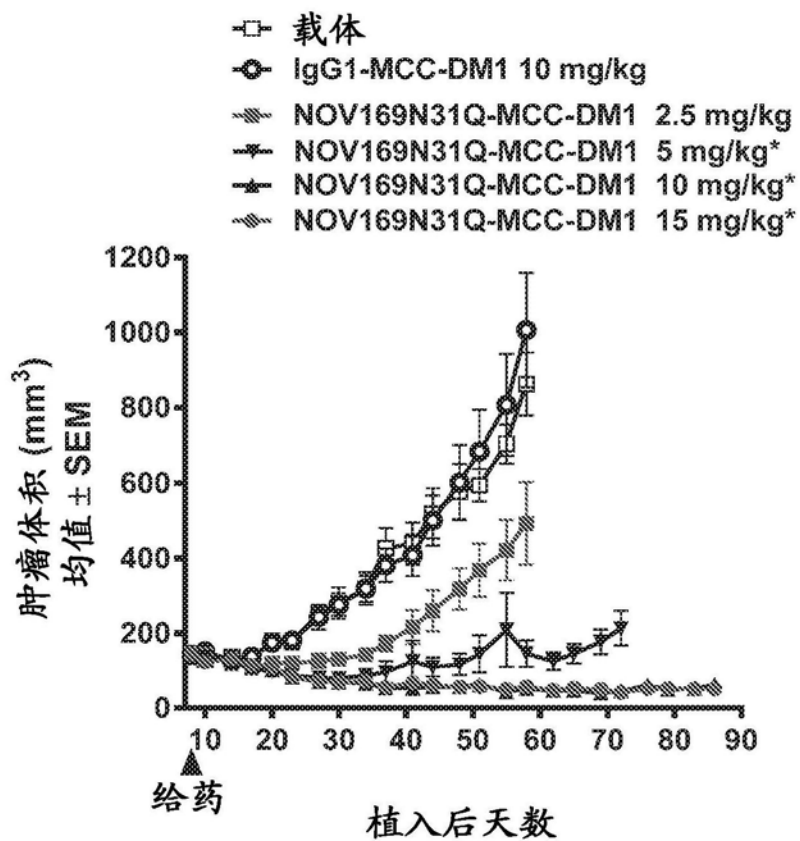


图12

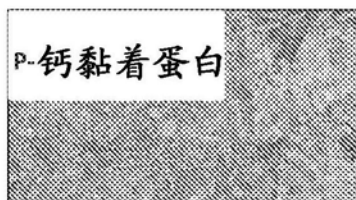


图13A

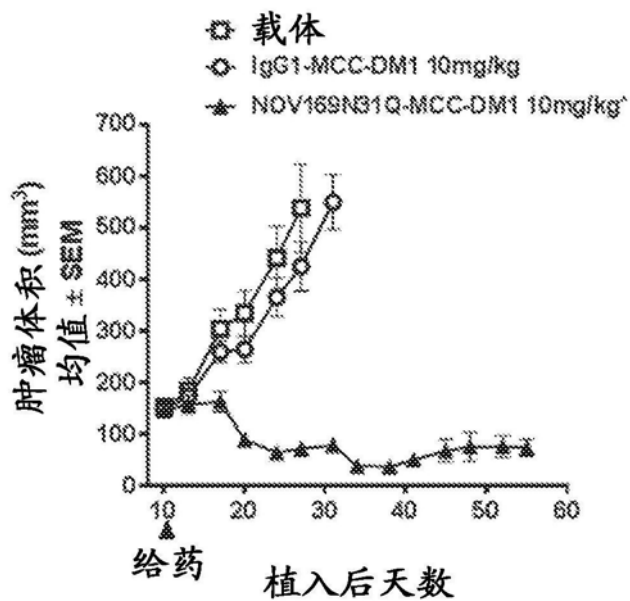


图13B

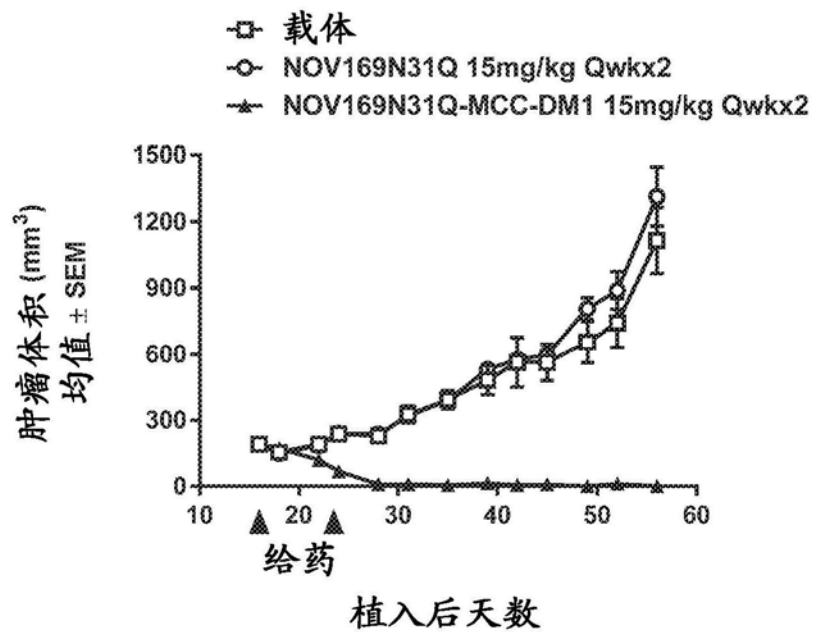


图13C

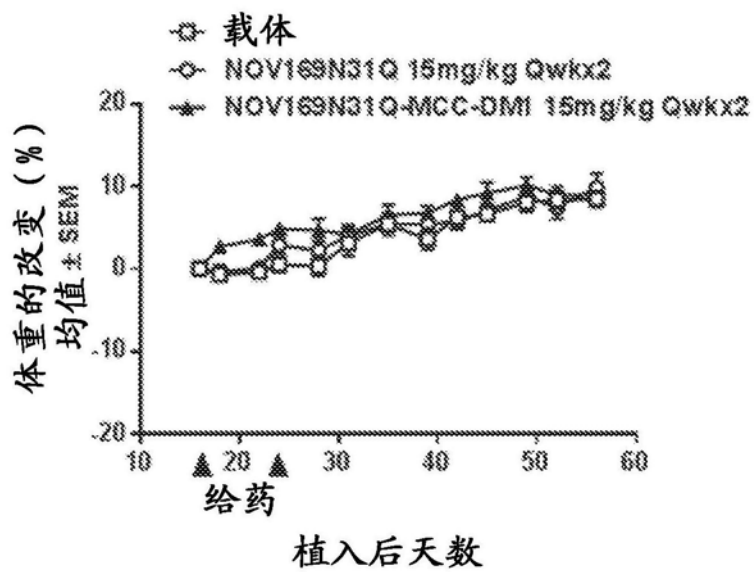


图13D

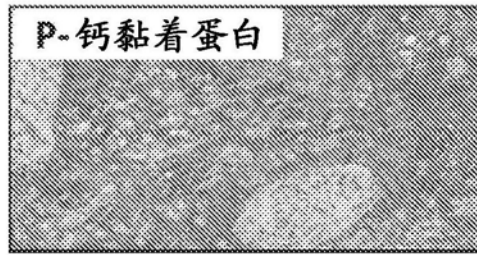


图14A

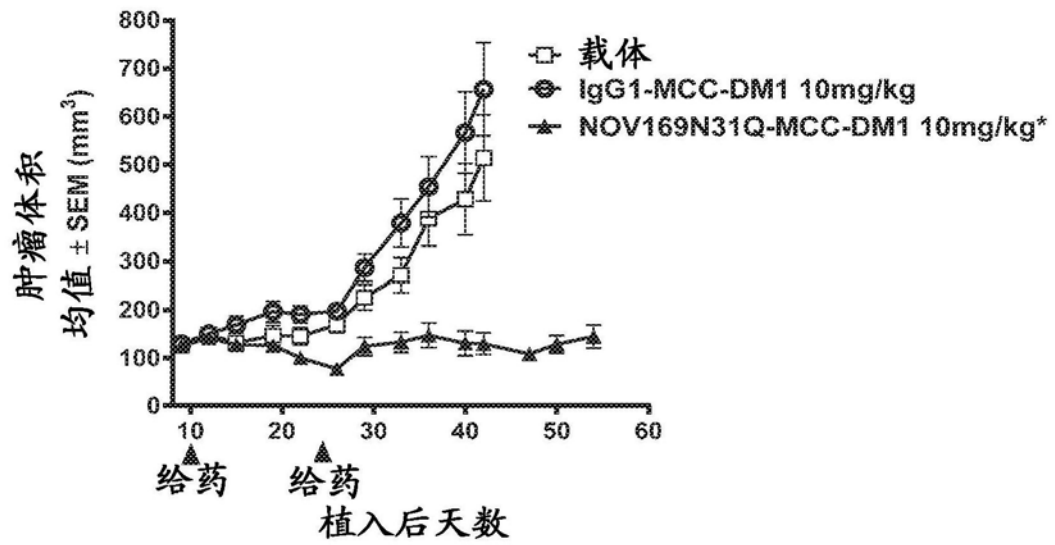


图14B



图15A

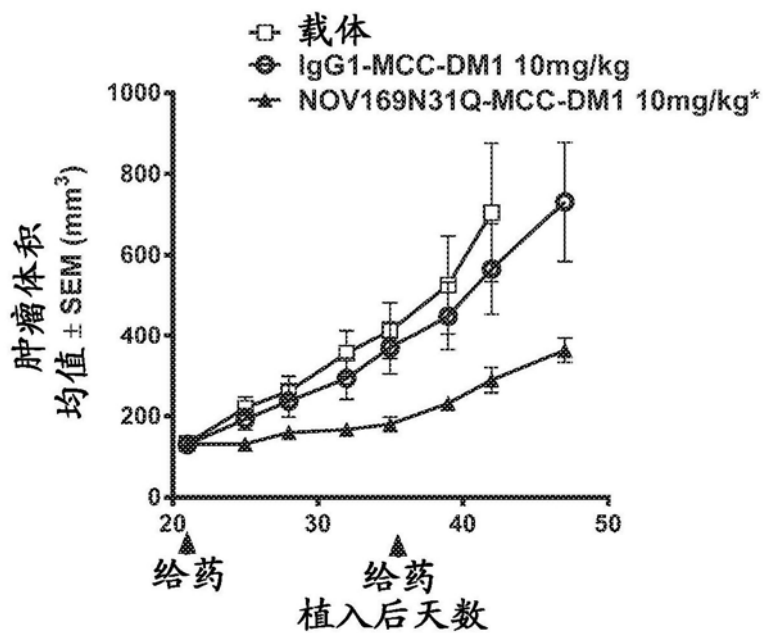


图15B

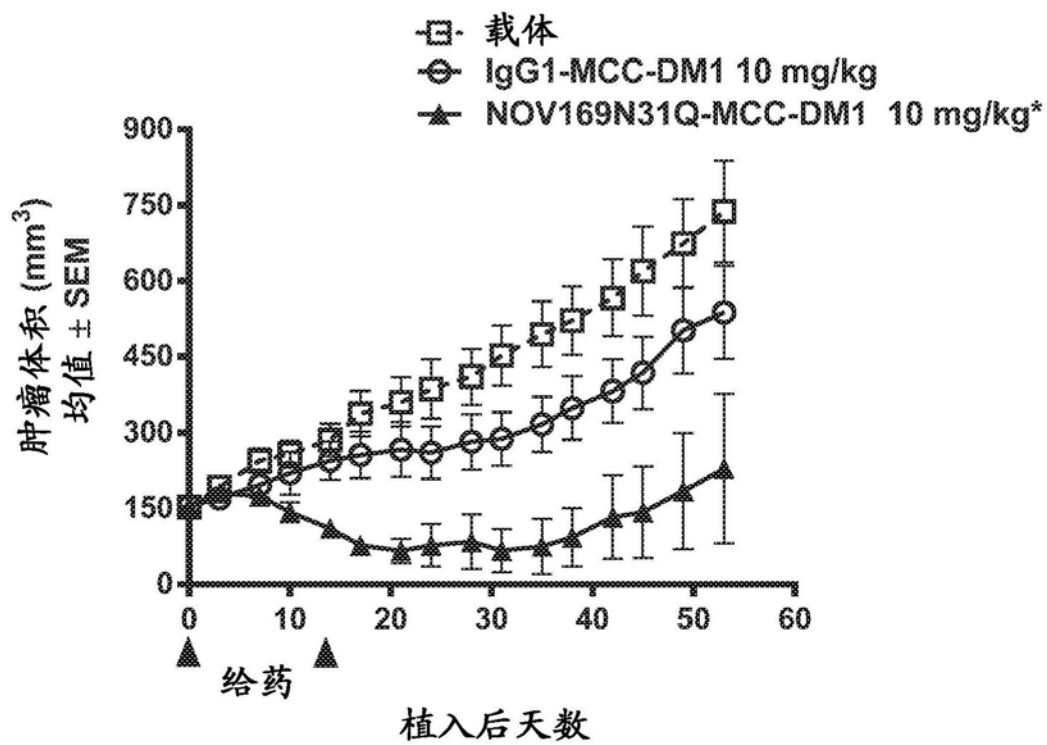


图16

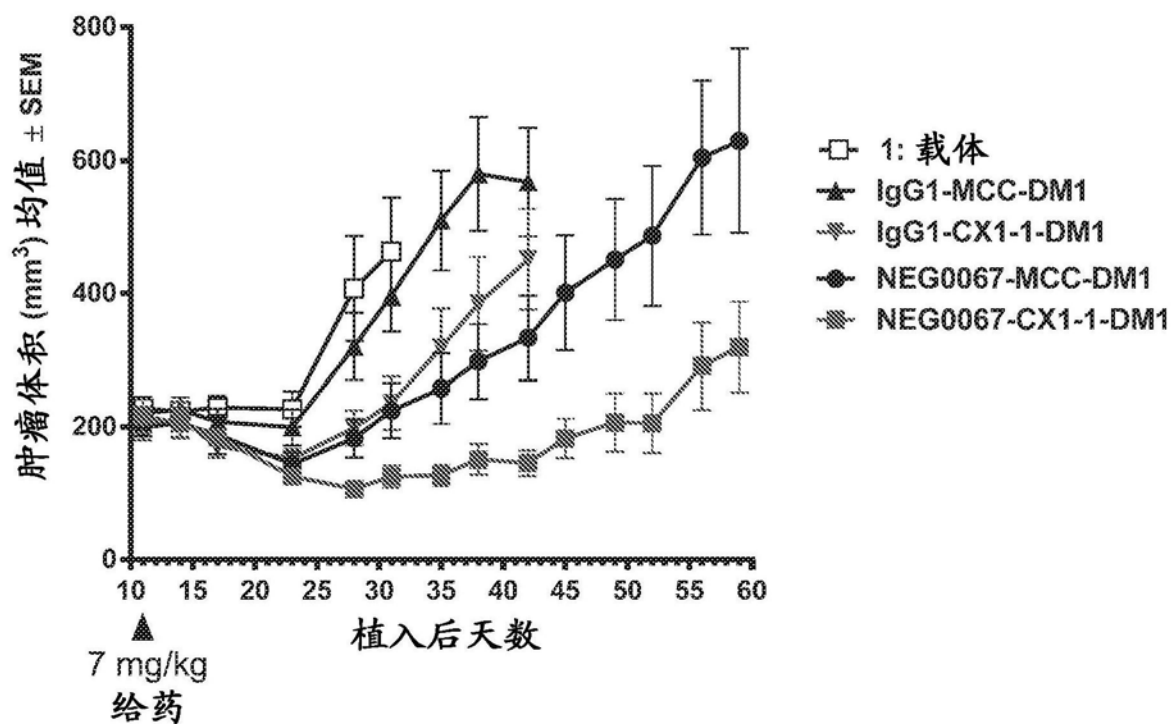


图17

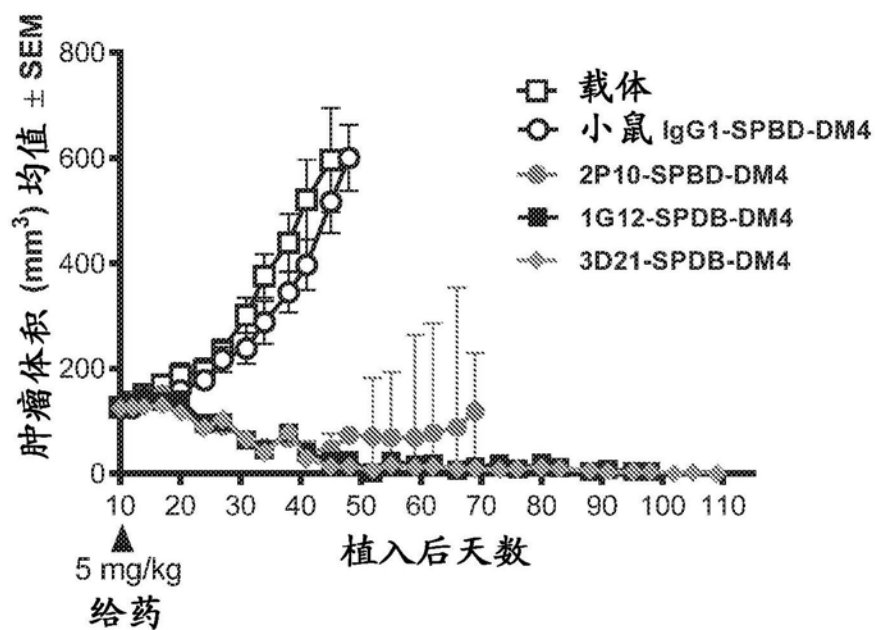


图18