



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116782955 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 19

(21) 申请号 202180078901.0

(22) 申请日 2021.10.15

(30) 优先权数据

63/093,255 2020.10.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/055311 2021.10.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/082066 EN 2022.04.21

(71) 申请人 艾迪健公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 玛丽亚·莱娅·史密斯

梅·孔·苏瑟兰

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

权利要求书6页 说明书53页

序列表44页 附图13页

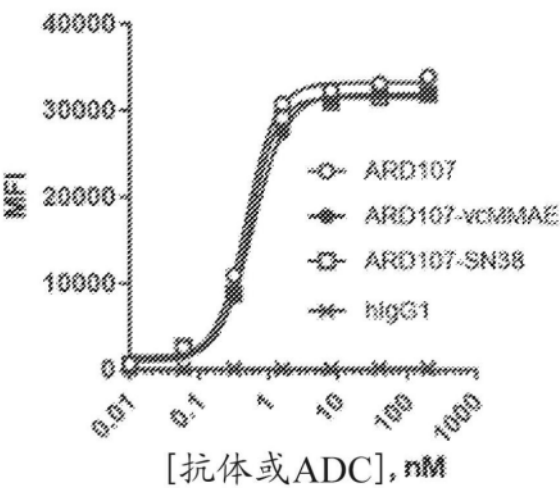
(54) 发明名称

抗CSPG4结合剂、其缀合物及其使用方法

(57) 摘要

本公开内容提供了抗CSPG4抗体、其抗原结合部分及其CSPG4缀合物,其用于癌症的治疗中。

A2058 黑色素瘤



1. 缀合物,其包含:
 - (a) 结合剂,其包含:
 - (i) 具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;
 - (ii) 具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;
 - (iii) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者
 - (iv) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区;其中所述重链和轻链框架区被任选地修饰,其中所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入,
其中所述结合剂特异性结合人CSPG4;
 - (b) 至少一种附接至所述结合剂的接头;以及
 - (c) 至少一种附接至每种接头的细胞毒性剂。
2. 如权利要求1所述的缀合物,其中所述结合剂包含:
 - (a) 具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;
 - (b) 具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;
 - (c) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者
 - (d) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区。
3. 缀合物,其包含:
 - (a) 含有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的结合剂,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的互补决定区HCDR1序列、具有SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的HCDR2,以及具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的HCDR3,它们各自设置在重链框架区内;并且其中所述VL区包含具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR1序列、具有SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR2,以及具有SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3,它们各自设置在轻链框架区内;
 - (b) 至少一种附接至所述结合剂的接头;以及
 - (c) 至少一种附接至每种接头的细胞毒性剂。
4. 如权利要求3所述的缀合物,其中所述框架区是鼠框架区。
5. 如权利要求3所述的缀合物,其中所述框架区是人框架区。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的缀合物,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合部分。
7. 如权利要求6所述的缀合物,其中所述结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。
8. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述重链可变区还包含重链恒定区。

9. 如权利要求8所述的缀合物,其中重链恒定区是人IgG同种型的。
10. 如权利要求9所述的缀合物,其中所述重链恒定区是IgG1恒定区。
11. 如权利要求10所述的缀合物,其中所述IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。
12. 如权利要求9所述的缀合物,其中所述重链恒定区是IgG4恒定区。
13. 如权利要求10或11所述的缀合物,其中所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:3、33和35中任一个所示的氨基酸序列。
14. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述轻链可变区还包含轻链恒定区。
15. 如权利要求13所述的缀合物,其中所述轻链恒定区是κ同种型的。
16. 如权利要求15所述的缀合物,其中所述κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。
17. 如权利要求15或16所述的缀合物,其中所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:4、38和39中任一个所示的氨基酸序列。
18. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中:
 - (a) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;
 - (b) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;
 - (c) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列;或者
 - (d) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。
19. 如权利要求1-18中任一项所述的缀合物,其中所述接头经由链间二硫化物残基、工程化的半胱氨酸、聚糖或修饰的聚糖、所述结合剂的N端残基或附接至所述结合剂的聚组氨酸残基附接至所述结合剂。
20. 如权利要求1-19中任一项所述的缀合物,其中所述缀合物的平均载药量是约1至约8、约2、约4、约6、约8、约10、约12、约14、约16、约3至约5、约6至约8、或约8至约16。
21. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述结合剂是单特异性的。
22. 如权利要求1-21中任一项所述的缀合物,其中所述结合剂是二价的。
23. 如权利要求1-20中任一项所述的缀合物,其中所述结合剂包含第二结合结构域,并且所述结合剂是双特异性的。
24. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂选自澳瑞他汀、喜树碱和卡利奇霉素。
25. 如权利要求24所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂是澳瑞他汀。
26. 如权利要求25所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。
27. 如权利要求24所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂是喜树碱。
28. 如权利要求27所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂是依喜替康。
29. 如权利要求24所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂是卡利奇霉素。
30. 如权利要求29所述的缀合物,其中所述细胞毒性剂是SN-38。

31. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物, 其中所述接头选自mc-VC-PAB、CL2、CL2A、马来酰亚胺乙酰基-Gly-Val-Cit-PAB和(琥珀酰亚胺-3-基-N) - $(\text{CH}_2)_n^2$ -C(=O)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-CH₂=OCH₂- (C=O) -。

32. 如权利要求31所述的缀合物, 其中所述接头是mc-VC-PAB。

33. 如权利要求32所述的缀合物, 其中所述接头附接至MMAE的至少一个分子。

34. 如权利要求31所述的缀合物, 其中所述接头是CL2A。

35. 如权利要求34所述的缀合物, 其附接至SN-38的至少一个分子。

36. 如权利要求31所述的缀合物, 其中所述接头是CL2。

37. 如权利要求36所述的缀合物, 其附接至SN-38的至少一个分子。

38. 如权利要求31所述的缀合物, 其中所述接头是(琥珀酰亚胺-3-基-N) - $(\text{CH}_2)_n^2$ -C(=O)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-CH₂=OCH₂- (C=O) -。

39. 如权利要求38所述的缀合物, 其中所述接头附接至依喜替康的至少一个分子。

40. 药物组合物, 其包含前述权利要求中任一项所述的缀合物和药学上可接受的载体。

41. 治疗CSPG4+癌症的方法, 其包括向有需要的对象施用治疗有效量的权利要求1-39中任一项所述的缀合物或权利要求40所述的药物组合物。

42. 如权利要求41所述的方法, 其中所述CSPG4+癌症是癌或恶性肿瘤。

43. 如权利要求42所述的方法, 其中所述CSPG4+癌症选自黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌、软骨肉瘤、尿路上皮(膀胱)癌、骨肉瘤、胰腺癌和白血病(B-ALL)。

44. 如权利要求41-43中任一项所述的方法, 其还包括向所述对象施用免疫疗法。

45. 如权利要求44所述的方法, 其中所述免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。

46. 如权利要求45所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。

47. 如权利要求46所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

48. 如权利要求41-47中任一项所述的方法, 其还包括向所述对象施用化疗。

49. 如权利要求41-48中任一项所述的方法, 其中所述缀合物经静脉内施用。

50. 如权利要求41-49中任一项所述的方法, 其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg或约0.1mg/kg至约12mg/kg的剂量施用所述缀合物。

51. 改善接受针对CSPG4+癌症的免疫疗法和/或化疗的对象中的治疗结果的方法, 其包括:

向所述患有癌症的对象施用有效量的免疫疗法或化疗; 以及

向所述对象施用治疗有效量的权利要求1-39中任一项所述的缀合物或权利要求40所述的药物组合物;

其中与单独施用所述免疫疗法或化疗相比, 所述对象的治疗结果得到改善。

52. 如权利要求51所述的方法, 其中所述改善的治疗结果是选自稳定疾病、部分反应或完全反应的客观反应。

53. 如权利要求51所述的方法, 其中所述改善的治疗结果是降低的肿瘤负荷。

54. 如权利要求51所述的方法, 其中所述改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

55. 如权利要求51所述的方法,其中所述免疫疗法是免疫检查点抑制剂。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。

57. 如权利要求56所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

58. 如权利要求51-57中任一项所述的方法,其中所述缀合物经静脉内施用。

59. 如权利要求51-58中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用所述缀合物。

60. 权利要求1-39中任一项所述的缀合物或权利要求40所述的药物组合物用于治疗对象中的CSPG4+癌症的用途。

61. 权利要求1-39中任一项所述的缀合物或权利要求40所述的药物组合物用于治疗接受免疫疗法或化疗的对象中的CSPG4+癌症的用途。

62. 结合剂,其包含:

(a) 具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;

(b) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区(VL);或者

(c) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区(VH)区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)区;

其中所述重链和轻链框架区被任选地修饰,其中所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入,以及

其中所述结合剂特异性结合人CSPG4。

63. 如权利要求62所述的结合剂,其中:

(a) 重链可变区具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,以及轻链可变区具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;

(b) 重链可变区具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,以及轻链可变区具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;或者

(c) 重链可变区具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,以及轻链可变区具有SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列。

64. 如权利要求63所述的结合剂,其中所述框架区是鼠框架区。

65. 如权利要求63所述的结合剂,其中所述框架区是人框架区。

66. 如权利要求62-65中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合部分。

67. 如权利要求66所述的结合剂,其中所述结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

68. 如权利要求62-67中任一项所述的结合剂,其中所述重链可变区还包含重链恒定区。

69. 如权利要求68所述的结合剂,其中所述重链恒定区是人IgG同种型的。

70. 如权利要求69所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG1恒定区。

71. 如权利要求70所述的结合剂,其中所述IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。

72. 如权利要求69所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG4恒定区。

73. 如权利要求70或71所述的结合剂,其中所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33或35所示的氨基酸序列。

74. 如权利要求62-73中任一项所述的结合剂,其中所述轻链可变区还包含轻链恒定区。

75. 如权利要求74所述的结合剂,其中所述轻链恒定区是κ同种型的。

76. 如权利要求75所述的结合剂,其中所述κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。

77. 如权利要求75或76所述的结合剂,其中所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38或39所示的氨基酸序列。

78. 如权利要求62-77中任一项所述的结合剂,其中:

(a) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;

(b) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;或者

(c) 所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

79. 药物组合物,其包含权利要求62-78中任一项所述的结合剂和药学上可接受的载体。

80. 编码权利要求62-78中任一项所述的结合剂的核酸。

81. 包含权利要求80所述的核酸的载体。

82. 包含权利要求80所述的核酸或权利要求81所述的载体的细胞系。

83. 治疗CSPG4+癌症的方法,其包括向有需要的对象施用治疗有效量的权利要求62-78中任一项所述的结合剂或权利要求79所述的药物组合物。

84. 如权利要求83所述的方法,其中所述CSPG4+癌症是癌或恶性肿瘤。

85. 如权利要求84所述的方法,其中所述CSPG4+癌症选自黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌、软骨肉瘤、尿路上皮(膀胱)癌、骨肉瘤、胰腺癌和白血病(B-ALL)。

86. 如权利要求83-85中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用免疫疗法。

87. 如权利要求86所述的方法,其中所述免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。

89. 如权利要求88所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

90. 如权利要求83-89中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用化疗。

91. 如权利要求83-90中任一项所述的方法,其中所述结合剂经静脉内施用。

92. 如权利要求83-91中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg或约0.1mg/kg至约12mg/kg的剂量施用所述结合剂。

93.改善接受针对CSPG4+癌症的免疫疗法和/或化疗的对象中的治疗结果的方法,其包括:

(a)向所述患有癌症的对象施用有效量的免疫疗法或化疗;以及

(b)向所述对象施用治疗有效量的权利要求62-78中任一项所述的结合剂或权利要求79所述的药物组合物;

其中与单独施用所述免疫疗法或化疗相比,所述对象的治疗结果得到改善。

94.如权利要求93所述的方法,其中所述改善的治疗结果是选自稳定疾病、部分反应或完全反应的客观反应。

95.如权利要求93所述的方法,其中所述改善的治疗结果是降低的肿瘤负荷。

96.如权利要求93所述的方法,其中所述改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

97.如权利要求93所述的方法,其中所述免疫疗法是免疫检查点抑制剂。

98.如权利要求97所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。

99.如权利要求98所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

100.如权利要求93-99中任一项所述的方法,其中所述结合剂经静脉内施用。

101.如权利要求93-100中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用所述结合剂。

抗CSPG4结合剂、其缀合物及其使用方法

关于序列表的声明

[0001] 与本申请相关的序列表是以文本格式代替纸质副本提供的,并在此通过引用并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是120301_401W0_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件为96.1KB,于2021年10月14日创建,并经由EFS-Web以电子方式提交。

背景

[0002] 对于各种类型的癌症的有效和肿瘤靶向治疗仍然是改善患者存活的重要需求。2018年,全世界有210万例浸润性乳腺癌,死亡620,000例。在同一年中,头颈癌和恶性黑色素瘤相应地占286,000例死亡和61,000例死亡。目前,对于胶质母细胞瘤和胰腺癌的治疗选择很少。已知硫酸软骨素蛋白聚糖4或CSPG4——一种也在人恶性细胞上表达的癌胚抗原,在这些肿瘤以及肾细胞癌、间皮瘤、膀胱癌、软骨肉瘤、骨肉瘤和一些形式的白血病中高度表达。利用正常成体组织中CSPG4的有限表达,使用拥有细胞毒性剂的抗体(抗体-药物缀合物)靶向CSPG4提供了一种选择性地攻击癌细胞并保留正常组织的方法。

简要概述

[0003] 本公开内容部分地提供了ARD107抗CSPG4结合抗体、其人源化变体、其抗原结合部分和特异性结合CSPG4的相关结合剂,以及其缀合物,它们表现出改善的治疗特性。CSPG4是一种用于治疗某些癌症的重要和有利的治疗靶标。CSPG4结合抗体、其抗原结合部分及其结合剂和缀合物提供了基于在CSPG4+癌症的治疗中使用此类抗体、其抗原结合部分和相关结合剂及缀合物的组合物和方法。因此,本公开内容提供了与ARD107抗CSPG4抗体、其人源化变体、抗原结合部分、结合剂和缀合物相关的方法、组合物、试剂盒和制品。

[0004] 在一些实施方案中,提供了缀合物,其包含:结合剂,其包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区,其中所述重链和轻链框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入,其中所述结合剂特异性结合人CSPG4;至少一种附接至所述结合剂的接头;以及至少一种附接至每种接头的细胞毒性剂。

[0005] 在一些实施方案中,结合剂包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区。

[0006] 在一些实施方案中,结合剂包含:(i)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(ii)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区。

[0007] 在一些实施方案中,结合剂包含:(i)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(ii)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区。

[0008] 在一些实施方案中,结合剂包含:(i)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及(ii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区。

[0009] 在一些实施方案中,提供了缀合物,其包含:含有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的结合剂,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的互补决定区HCDR1序列、具有SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的HCDR2和具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的HCDR3,它们各自设置在重链框架区内;并且其中所述VL区包含具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR1序列、具有SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3,它们各自设置在轻链框架区内;至少一种附接至所述结合剂的接头;以及至少一种附接至每种接头的细胞毒性剂。

[0010] 在一些实施方案中,框架区是鼠框架区。

[0011] 在一些实施方案中,框架区是人框架区。

[0012] 在一些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合部分。

[0013] 在一些实施方案中,结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0014] 在一些实施方案中,重链可变区还包含重链恒定区。

[0015] 在一些实施方案中,重链恒定区是人IgG同种型的。

[0016] 在一些实施方案中,重链恒定区是IgG1恒定区。

[0017] 在一些实施方案中,IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,重链恒定区是IgG4恒定区。

[0019] 在一些实施方案中,重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。

[0020] 在一些实施方案中,重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方案中,重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,轻链可变区还包含轻链恒定区。

[0023] 在一些实施方案中,轻链恒定区是κ同种型的。

[0024] 在一些实施方案中,κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方案中,轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方案中,轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0027] 在一些实施方案中,轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,结合剂包含:(a)具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链可变区和恒定区,以及具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的轻链可变区和恒定区;(b)具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的重链可变区和恒定区,以及具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链可变区和恒定区;(c)具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的重链可变区和恒定区,以及具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链可变区和恒定区;或(d)具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的重链可变区和恒定区,以及具有SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链可变区和恒定区。

[0029] 在一些实施方案中,接头经由链间二硫化物残基、工程化的半胱氨酸、聚糖或修饰的聚糖、结合剂的N端残基或附接至结合剂的聚组氨酸残基附接至结合剂。

[0030] 在一些实施方案中,缀合物的平均载药量是约1至约8、约2、约4、约6、约8、约10、约12、约14、约16、约3至约5、约6至约8或约8至约16。

- [0031] 在一些实施方案中,结合剂是单特异性的。
- [0032] 在一些实施方案中,结合剂是二价的。
- [0033] 在一些实施方案中,结合剂包含第二结合结构域,并且结合剂是双特异性的。
- [0034] 在一些实施方案中,细胞毒性剂选自澳瑞他汀(auristatin)、喜树碱和卡利奇霉素(calicheamicin)。
- [0035] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是澳瑞他汀。
- [0036] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。
- [0037] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是喜树碱。
- [0038] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是依喜替康。
- [0039] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是卡利奇霉素。
- [0040] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是SN-38。
- [0041] 在一些实施方案中,接头选自mc-VC-PAB、CL2、CL2A、马来酰亚胺-乙酰基-Gly-Val-Cit-PAB和(琥珀酰亚胺-3-基-N)-(CH₂)_n²-C(=O)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-CH₂=OCH₂-(C=O)-。
- [0042] 在一些实施方案中,接头是mc-VC-PAB。
- [0043] 在一些实施方案中,接头附接至MMAE的至少一个分子。
- [0044] 在一些实施方案中,接头是CL2A。
- [0045] 在一些实施方案中,接头附接至SN-38(也称为7-乙基-10-羟基喜树碱)的至少一个分子。
- [0046] 在一些实施方案中,接头是CL2。
- [0047] 在一些实施方案中,接头附接至SN-38的至少一个分子。
- [0048] 在一些实施方案中,接头是(琥珀酰亚胺-3-基-N)-(CH₂)_n²-C(=O)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-CH₂=OCH₂-(C=O)-。
- [0049] 在一些实施方案中,接头附接至依喜替康的至少一个分子。
- [0050] 在一些实施方案中,提供了结合剂,其包含:(a)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;(b)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;或者(c)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;其中所述重链和轻链框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入,并且其中所述结合剂特异性结合人CSPG4。
- [0051] 在一些实施方案中,结合剂包含(a)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(b)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(c)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区。
- [0052] 在一些实施方案中,框架区是鼠框架区。
- [0053] 在一些实施方案中,框架区是人框架区。
- [0054] 在一些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合部分。

- [0055] 在一些实施方案中,结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。
- [0056] 在一些实施方案中,重链可变区还包含重链恒定区。
- [0057] 在一些实施方案中,重链恒定区是人IgG同种型。
- [0058] 在一些实施方案中,重链恒定区是IgG1恒定区。
- [0059] 在一些实施方案中,IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。
- [0060] 在一些实施方案中,重链恒定区是IgG4恒定区。
- [0061] 在一些实施方案中,重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33或35所示的氨基酸序列。
- [0062] 在一些实施方案中,轻链可变区还包含轻链恒定区。
- [0063] 在一些实施方案中,轻链恒定区是κ同种型的。
- [0064] 在一些实施方案中,κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。
- [0065] 在一些实施方案中,轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38或39所示的氨基酸序列。
- [0066] 在一些实施方案中,(a)重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,并且轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;(b)重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,并且轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;或者(c)重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,并且轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。
- [0067] 在一些实施方案中,提供了包含本文所述的任何实施方案的缀合物或结合剂和药学上可接受的载体的药物组合物。
- [0068] 在一些实施方案中,提供了编码本文所述的任何实施方案的结合剂的核酸。
- [0069] 在一些实施方案中,提供了包含前述实施方案的核酸的载体。
- [0070] 在一些实施方案中,提供了包含本文所述的任何实施方案的核酸的细胞系。
- [0071] 在一些实施方案中,提供了治疗CSPG4+癌症的方法,其包括向有需要的对象施用治疗有效量的本文所述的缀合物的任何实施方案的缀合物或本文所述的结合剂的任何实施方案的结合剂或者任何这些缀合物或结合剂的药物组合物。
- [0072] 在所述方法的一些实施方案中,CSPG4+癌症是癌或恶性肿瘤。
- [0073] 在所述方法的一些实施方案中,CSPG4+癌症选自黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌、软骨肉瘤、尿路上皮(膀胱)癌、骨肉瘤、胰腺癌和白血病(B-ALL)。
- [0074] 在所述方法的一些实施方案中,其还包括向对象施用免疫疗法。
- [0075] 在所述方法的一些实施方案中,免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。
- [0076] 在所述方法的一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。
- [0077] 在所述方法的一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。
- [0078] 在一些实施方案中,所述方法还包括向对象施用化疗。

- [0079] 在所述方法的一些实施方案中,缀合物或结合剂经静脉内施用。
- [0080] 在所述方法的一些实施方案中,以约0.1mg/kg至约10mg/kg或约0.1mg/kg至约12mg/kg的剂量施用缀合物或结合剂。
- [0081] 在一些实施方案中,提供了改善接受针对CSPG4+癌症的免疫疗法和/或化疗的对象中的治疗结果的方法,其包括:向患有癌症的对象施用有效量的免疫疗法或化疗;以及施用治疗有效量的本文所述的缀合物的任何实施方案的缀合物或本文所述的结合剂的任何实施方案的结合剂或者本文所述的任何缀合物或结合剂的药物组合物;其中与单独施用免疫疗法或化疗相比,对象的治疗结果得到改善。
- [0082] 在一些实施方案中,改善的治疗结果是选自稳定疾病、部分反应或完全反应的客观反应。
- [0083] 在一些实施方案中,改善的治疗结果是降低的肿瘤负荷。
- [0084] 在一些实施方案中,改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。
- [0085] 在一些实施方案中,免疫疗法是免疫检查点抑制剂。
- [0086] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。
- [0087] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。
- [0088] 在一些实施方案中,缀合物或结合剂经静脉内施用。
- [0089] 在一些实施方案中,以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用缀合物或结合剂。
- [0090] 在一些实施方案中,提供了本文所述的缀合物或结合剂或者本文所述的缀合物或结合剂的药物组合物用于治疗对象中的CSPG4+癌症的用途。
- [0091] 在一些实施方案中,提供了本文所述的缀合物或结合剂或者本文所述的任何缀合物的药物组合物用于治疗接受免疫疗法或化疗的对象中的CSPG4+癌症的用途。
- [0092] 通过参考以下详述、具体实施方案的非限制性实例和附图,可以更全面地理解本发明的这些和其他方面。

附图的简要说明

- [0093] 图1A-1D。ARD107抗体和相应的ARD107 ADCs与CSPG4阳性细胞系的FACs结合。
- [0094] 图2。ARD107抗体与人黑色素瘤和肺细胞系结合的比较。
- [0095] 图3。ARD107-vcMMAE缀合物在体外细胞毒性测定中的活性。
- [0096] 图4。ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38 ADCs在A2058黑色素瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用。
- [0097] 图5。ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38 ADCs在A375黑色素瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用。
- [0098] 图6。ARD107-vcMMAE的不同制剂与重组人CSPG4蛋白结合的比较。
- [0099] 图7。ARD107-vcMMAE的不同制剂(随机缀合、富集4-负载(4-load)、针对4-负载的HIC柱纯化和马来酰亚胺-乙酰基-Gly-vc-PAB-MMAE接头[Gly-vcMMAE])在A2058黑色素瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用。
- [0100] 图8A-8B。通过与A2058细胞结合(图8A)和在热处理后与A2058细胞结合(图8B)来表征ARD107抗体的16种人源化候选物。

[0101] 图9A-9B。与嵌合抗体相比,通过与A2058细胞结合(图9A)和在热处理后与A2058细胞结合(图9B)来表征ARD107抗体的3种人源化前导物。

[0102] 图10。与嵌合抗体相比,通过在A2058黑色素瘤细胞中内化的ARD107抗体的3种人源化前导物的表征。

详述

[0103] 本公开内容提供了抗CSPG4抗体、包含抗CSPG4抗体的细胞毒性剂缀合物,以及包含这种抗体和缀合物的药物组合物。本公开内容的抗体、缀合物和药物组合物可单独或与其他癌症治疗剂组合用于治疗CSPG4+癌症。

[0104] 为方便起见,本说明书、实施例和权利要求书中的某些术语在这里进行定义。除非另有说明,或者从上下文中暗示,以下术语和短语具有以下提供的含义。提供这些定义是为了帮助描述特定的实施方案,且并非旨在限制所要求保护的发明,因为本发明的范围仅由权利要求限定。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0105] 如本文所用,并且除非另有说明,否则术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”用于意指“一个/种”、“至少一个/种”或“一个或多个/一种或多种”。除非上下文另有要求,否则本文所用的单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0106] 替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任意组合。如在整个本公开内容中使用的,术语“包括(include)”和“包含(comprise)”被同义地使用。

[0107] “任选的”或“任选地”意指随后描述的元素、组分、事件或情况可能存在或可能不存在,并且该描述包括元素、组分、事件或情况存在的情况和它们不存在的情况。

[0108] 短语“至少一个”在后面跟随有项目或元素的列表时是指列表中的一个或多个元素的开放式集合,其可以但不一定包括多于一个元素。

[0109] 如在整个本公开中在数字的上下文中使用的术语“约(about)”是指以该数字为中心并跨越小于该数字的15%和大于该数字的15%的范围。在范围的上下文中使用的术语“约”是指跨越小于范围中列出的最小数字的15%并且大于范围中列出的最大数字的15%的扩展范围。

[0110] 在整个公开内容中,除非另有说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何值(包括整数或分数)或子范围。

[0111] 除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含(comprise)”、“包含(comprising)”等应被解释为与排他性或穷尽性含义相反的包括性含义;也就是说,以“包括但不限于”的含义。

[0112] 术语“减少(decrease)”、“降低(reduce)”、“降低的(reduced)”、“降低(reduction)”、“减少(decrease)”和“抑制(inhibit)”在本文中一般都用于意指相对于参照的统计学上显著的量的降低。

[0113] 术语“增加的(increased)”、“增加(increase)”或“增强(enhance)”或“激活(activate)”在本文中通常都用于意指相对于参照的统计学上显著的量的增加。

[0114] 本文所用的术语“分离的”或“部分纯化的”在核酸、多肽或蛋白质的情况下是指与至少一种其他组分(例如,核酸或多肽或蛋白质)分离的核酸、多肽或蛋白质,所述其他组分

与在其天然来源中发现的核酸、多肽或蛋白质一起存在和/或当由细胞表达时与核酸、多肽或蛋白质一起存在,或者在分泌的多肽和蛋白质的情况下被分泌。化学合成的核酸、多肽或蛋白质,或者使用体外转录/翻译合成的那些,被认为是“分离的”。术语“纯化的”或“基本上纯化的”是指分离的核酸、多肽或蛋白质,其按重量计至少95%是主题核酸、多肽或蛋白质,包括例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多。

[0115] 如本文所用,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用,以表示一系列氨基酸残基,每个残基通过相邻残基的 α -氨基和羧基之间的肽键彼此连接。术语“蛋白质”和“多肽”还指蛋白质氨基酸的聚合物,包括修饰的氨基酸(例如,磷酸化的、糖化的、糖基化的等)和氨基酸类似物,而不管其大小或功能。“蛋白质”和“多肽”常用于指相对大的多肽,而术语“肽”常用于指小的多肽,但这些术语在本领域中的使用重叠。当提及编码的基因产物及其片段时,术语“蛋白质”和“多肽”在本文中可互换使用。因此,示例性的多肽或蛋白质包括基因产物、天然存在的蛋白质、前述的同源物、直系同源物、旁系同源物、片段和其他等同物、变体、片段和类似物。

[0116] CSPG4或硫酸软骨素蛋白聚糖4是在人恶性细胞上表达的癌胚抗原。CSPG4也称为硫酸软骨素蛋白聚糖4(黑色素瘤相关的);HMW MAA;MCSP;MCSPG;MEL CSPG;黑色素瘤相关的硫酸软骨素蛋白聚糖;MSK16;NG2;硫酸软骨素蛋白聚糖NG2;以及黑色素瘤硫酸软骨素蛋白聚糖。CSPG4多肽包括但不限于具有NCBI Ref Seq.NP_001888.2(SEQ ID NO:9)和UniProtKB Q6UVK1(SEQ ID NO:10)所示氨基酸序列的那些;这些序列通过引用并入本文中。

[0117] 如本文所用,“表位”是指通常与免疫球蛋白VH/VL对结合的氨基酸,如本文所述的抗体和结合剂。表位可以在多肽上由连续氨基酸或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常保留,而通过三级折叠形成的表位在使用变性溶剂处理时通常丢失。表位通常包括在独特的空间构象中的至少3个,并且更通常至少5个、约9个或约8-10个氨基酸。表位限定抗体或其他结合剂的最小结合位点,因此代表抗体、其抗原结合部分或其他基于免疫球蛋白的结合剂的特异性的靶标。在单域抗体的情况下,表位代表分离的可变结构域结合的结构单元。

[0118] 如本文所用,“特异性结合”是指本文所述的结合剂(例如抗体或其抗原结合部分)以 10^{-5} M(10000nM)或更低,例如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更低的KD与靶标如CSPG4结合的能力。特异性结合可受例如抗体或其他结合剂的亲和力和亲合力以及靶标多肽浓度的影响。本领域普通技术人员可以使用任何合适的方法,如在合适的细胞结合测定中结合剂的滴定来确定本文所述的抗体和其他结合剂选择性地结合CSPG4的适当条件。特异性结合CSPG4的结合剂不被非相似的竞争剂取代。在某些实施方案中,当抗CSPG4抗体或其抗原结合部分在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其靶抗原CSPG4时,其被说成特异性结合CSPG4。

[0119] 在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以 10^{-5} M(10000nM)或更低,例如 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M或更低的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-5} M至 10^{-6} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-6} M至 10^{-7} M的

解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-7} M至 10^{-8} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-8} M至 10^{-9} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-9} M至 10^{-10} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-10} M至 10^{-11} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以约 10^{-11} M至 10^{-12} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。在一些实施方案中,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂以小于 10^{-12} M的解离常数(KD)特异性结合CSPG4多肽。

[0120] 如在整个公开内容中使用的,“相同的”或“同一性”是指DNA、RNA、核苷酸、氨基酸或蛋白质序列与另一DNA、RNA、核苷酸、氨基酸或蛋白质序列之间的相似性。同一性可以根据第一序列与第二序列的序列同一性的百分比来表示。相对于参考DNA序列的序列同一性百分比(%)可以是在比对序列之后,候选序列中与参考DNA序列中的DNA核苷酸相同的DNA核苷酸的百分比。相对于参考氨基酸序列的序列同一性百分比(%)可以是在比对序列和引入缺口(如果需要)以获得最大的序列同一性百分比之后,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与参考氨基酸序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。如在整个公开内容中所用的,如由Altschul等人,“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs,”Nucleic Acids Res.2007, 25,3389-3402所定义的,使用NCBI BLAST 2.0软件,将参数设置为默认值,产生序列同一性百分比值。

[0121] 如本文所用,术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需的那些元素。该术语允许存在不会实质上影响该实施方案的基本和新颖或功能特性的元素。

[0122] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其相应的组分,这排除了在实施方案的该描述中未陈述的任何元素。

[0123] 除了在实例中,或者在另外指出的情况下,本文使用的表示成分的量或反应条件的所有数字应被理解为在所有情况下由术语“约”进行修饰。当与百分比一起使用时,术语“约”可以意指 $\pm 1\%$ 。

[0124] 术语“统计学上显著的”或“显著地”是指统计学显著性,并且通常意指高于或低于参考值的两个标准偏差(2SD)差异。

[0125] 在本公开内容的各个方面的描述中,本文定义了其他的术语。

I. 抗体

[0126] 本文提供了ARD107抗体及其人源化变体(本文也统称为抗CSPG4抗体或CSPG4结合抗体)及其抗原结合部分,其特异性结合CSPG4。本文还提供了ARD107抗体的缀合物、其人源化变体以及抗原结合部分和细胞毒性剂(也称为CSPG4缀合物)。在一些实施方案中,CSPG4缀合物减少对象中的CSPG4+癌细胞的数目。

[0127] 在一些实施方案中,CSPG4抗体或其抗原结合部分包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示

氨基酸序列的轻链可变区；(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区。

[0128] 在一些实施方案中,CSPG4结合抗体或其抗原结合部分包含(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个保守氨基酸取代,并且其中所述重链或轻链可变区的CDR未被修饰。

[0129] 在一些实施方案中,CSPG4抗体或其抗原结合部分包含(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区和(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个氨基酸取代、缺失或插入,并且其中所述重链或轻链可变区的CDR未被修饰。

[0130] 在一些实施方案中,本文提供了结合剂,其包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述结合剂特异性结合CSPG4。在一些实施方案中,本文提供了结合剂,其包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区和(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个保守氨基酸取代,并且其中所述重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,本文提供了结合剂,其包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架

区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个氨基酸取代、缺失或插入,并且其中所述重链或轻链可变区的CDR未被修饰。如本文所述,结合剂包含抗CSPG4抗体或其抗原结合部分,并且可以包含共价附接至CSPG4抗体或其抗原结合部分的其他肽或多肽。在任何这些实施方案中,结合剂特异性结合CSPG4。

[0131] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链CDR可通过使用以下方法中的任一种来鉴定:Kabat、Chothia、AbM、Contact、IMGT和/或Aho。

[0132] 在一些实施方案中,提供了包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的结合剂,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的互补决定区重链互补决定区1(HCDR1)、具有SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的重链互补决定区2(HCDR2)和具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的重链互补决定区3(HCDR3),并且所述VL区包含具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(LCDR1)、具有SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(LCDR2)和具有SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(LCDR3),如通过IMGT测定的,并且其中每个VH和VL包含人源化框架区,并且所述结合剂特异性结合CSPG4。

[0133] 在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法涉及通过抗CSPG4抗体、其抗原结合部分、其他结合剂或其缀合物在体内减少对象中的CSPG4+细胞(例如,减少癌症或肿瘤中的CSPG4+细胞的数目)。在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法涉及通过施用抗CSPG4抗体、其抗原结合部分、其他结合剂或其缀合物来治疗对象中的CSPG4+癌症。

[0134] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。该术语通常是指由两个免疫球蛋白重链可变区和两个免疫球蛋白轻链可变区组成的抗体,包括全长抗体(具有重链和轻链恒定区)及其抗原结合部分;包括例如,完整的单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')²、Fv、二硫化物连接的Fv、scFv、单域抗体(dAb)、双链抗体、多特异性抗体、双重特异性抗体、双特异性抗体和单链抗体(参见例如,Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,85,5879-5883(1988)和Bird等人,Science 242,423-426(1988),将其通过引用并入本文中)。抗体可以包括例如,多克隆、单克隆和遗传工程化的抗体及其抗原结合片段。抗体可以是例如,鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体、异源缀合物(heteroconjugate)、双特异性抗体、双链抗体、三链抗体或四链抗体。

[0135] 每个重链通常由可变区(缩写为VH)和恒定区组成。重链恒定区可包括三个结构域CH1、CH2和CH3以及任选的第四结构域CH4。每个轻链通常由可变区(缩写为VL)和恒定区组成。轻链恒定区是CL结构域。VH和VL区可进一步分成称为互补决定区(CDR)的高变区,并散布有称为框架区(FR)的保守区。因此,每个VH和VL区由三个CDR和四个FR组成,它们从N端到C端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。这种结构是本领域技术人员众所周知的。CDR和FR序列可以通过几种不同的编号方案确定,包括Kabat、Chothia、AbM、Contact、IMGT和/或Aho。

[0136] 在一些实施方案中,抗原结合部分包含轻链互补决定区1(LCDR1)、轻链互补决定区2(LCDR2)、轻链互补决定区3(LCDR3)、重链互补决定区1(HCDR1)、重链互补决定区2(HCDR2)和重链互补决定区3(HCDR3)。

[0137] CSPG4抗体的VH CDR的氨基酸序列在SEQ ID NO:1的氨基酸26-36(GYSITSGYYWN,

HCDR1, SEQ ID NO:11)、51-65(YITYDGSNNY, HCDR2, SEQ ID NO:12)和109-111(FDY、HCDR3、SEQ ID NO:13)处示出。CSPG4抗体的VL CDR的氨基酸序列在SEQ ID NO:2的氨基酸24-34(SASQGIRNYLN, LCDR1, SEQ ID NO:14)、50-56(YTSSLHS, LCDR2, SEQ ID NO:15)和99-107(QQYSKLPWT, LCDR3, SEQ ID NO:16)处示出。短语“其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰”是指如通过IMGT测定的,不具有氨基酸取代、缺失或插入的这些VH和VL CDR(SEQ ID NO:11-16)。

[0138] 如本文所用,抗CSPG4抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指特异性结合抗原的抗体分子的区域。在一些实施方案中,抗原结合部分是指如本文所述的具有CSPG4抗体的VH和VL序列(如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:31所示,任选地如本文所述进行修饰)的抗CSPG4抗体的部分。根据术语抗体的“抗原结合部分”,抗原结合部分的实例包括Fab、Fab'、F(ab')²、Fv、二硫化物连接的Fv、scFv、单域抗体(dAb)、双链抗体、重链抗体(hcAb)、VHH、VNAR、纳米抗体和单链抗体。如本文所用,术语Fab、F(ab')²和Fv是指以下:(i) Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')²片段,即包含在铰链区中经由二硫化物桥彼此连接的两个Fab片段的二价片段;以及(iii)由抗CSPG4抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段。尽管Fv片段的两个结构域,即VL和VH,由单独的编码区编码,但是它们还可以使用合成接头彼此连接,例如聚G4S氨基酸序列(如SEQ ID NO:17公开的“(G4S)ⁿ”,其中n=1-5),使得可以将它们制备为其中VL和VH区结合以形成单价分子(称为单链Fv(ScFv))的单一蛋白链。术语抗体的“抗原结合部分”也旨在包括这种单链抗体。其他形式的单链抗体如“双链抗体”同样包括在本文中。双链抗体是二价的双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单一多肽链上表达,但使用连接VH和VL结构域的接头,该接头对于两个结构域而言太短以致不能在同一链上结合,从而迫使VH和VL结构域与不同链的互补结构域配对(分别为VL和VH),并形成两个抗原结合位点(参见例如,Holliger, R, 等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J, 等人(1994) Structure 2:1121-1123)。

[0139] 免疫球蛋白恒定区是指重链或轻链恒定区。恒定区提供抗体的一般框架,并且可以不直接参与抗体与抗原的结合,但是可以参与各种效应子功能,如抗体参与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、ADCP(抗体依赖性细胞吞噬)、CDC(补体依赖性细胞毒性)和补体固定、与Fc受体(例如,CD16、CD32、FcRn)结合、相对于缺乏Fc区的多肽的体内半衰期更长、蛋白A结合,以及可能甚至胎盘转移(参见Capon等人, Nature 337:525, 1989)。如在整个公开内容中所用的,“Fc区”是指来自抗体的Fc片段的重链恒定区区段(“片段可结晶”区或Fc区),其可包括一个或多个恒定结构域,如CH2、CH3、CH4或以上的任意组合。在一些实施方案中, Fc区包括IgG、IgA或IgD抗体的CH2和CH3结构域,或者IgM或IgE抗体的CH3和CH4结构域。

[0140] 人重链和轻链恒定区氨基酸序列是本领域已知的。恒定区可以是任何合适的类型,其可以选自免疫球蛋白类别IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。几种免疫球蛋白类别可进一步分成同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区(Fc)可以分别是 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。轻链可以是kappa(或 κ)和lambda(或 λ)中的一种。

[0141] 在一些实施方案中,恒定区可以具有IgG1同种型。在一些实施方案中,恒定区可以具有IgG2同种型。在一些实施方案中,恒定区可以具有IgG3同种型。在一些实施方案中,恒

定区可以具有IgG4同种型。在一些实施方案中,Fc区可以具有包含来自两种或更多种同种型的恒定结构域的杂合同种型。在一些实施方案中,免疫球蛋白恒定区可以是IgG1或IgG4恒定区。

[0142] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体具有IgG1重链恒定区。在一些实施方案中,IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体具有κ轻链恒定区。在一些实施方案中,κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。

[0143] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体重链是IgG1同种型的,并且具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体轻链是κ同种型的,并且具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

[0144] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体重链是IgG1同种型的,并且具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列;和/或抗CSPG4抗体轻链是κ同种型的,并且具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0145] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体重链是IgG1同种型的,并且具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;和/或抗CSPG4抗体轻链是κ同种型的,并且具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体重链是IgG1同种型的,并且具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列;和/或抗CSPG4抗体轻链是κ同种型的,并且具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

[0147] 此外,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分可以通过抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白或肽共价或非共价结合形成的较大结合剂的一部分。与这种结合剂相关的是使用链霉亲和素核心区域以便制备四聚体的scFv分子(Kipriyanov,S.M.,等人(1995),*Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101),以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C端聚组氨酸基肽,例如六组氨酸基标签(如SEQ ID NO:18公开的“六组氨酸基标签”)以便产生二价和生物素化的scFv分子(Kipriyanov,S.M.,等人(1994)*Mol.Immunol.*31:10471058)。

[0148] 至于VH和VL氨基酸序列,本领域技术人员将认识到,对编码VH或VL的核酸或多肽中的氨基酸进行改变编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸的个别取代、缺失或添加(插入)是“保守修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代(保守氨基酸取代),并且改变的多肽保留特异性结合CSPG4的能力。

[0149] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分的保守修饰变体可在框架区(FR)中具有改变;即不同于在CDR中,例如抗CSPG4抗体的保守修饰变体具有VH和VL CDR的氨基酸序列(SEQ ID NO:11-16所示),并且在FR中具有至少一个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)在FR中总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)在FR中具有8-1个、6-1个、4-1个或2-1个保守氨基酸取代。在任何这些实施

方案的其他方面,抗CSPG4抗体、其抗原结合部分或其他结合剂的保守修饰变体表现出特异性结合CSPG4。

[0150] 对于保守氨基酸取代,给定的氨基酸可以被具有类似理化特性的残基取代,例如,用一个脂族残基取代另一个脂族残基(如用Ile、Val、Leu或Ala取代另一个脂族残基),或者用一个极性残基取代另一个极性残基(如在Lys和Arg;Glu和Asp;或者Gln和Asn之间)。其他这样的保守氨基酸取代,例如具有相似疏水性特性的整个区域的取代是众所周知的。可以在本文所述的任何一种测定中测试包含保守氨基酸取代的多肽,以证实保留了所需活性,例如即针对CSPG4的天然或参考多肽的抗原结合活性和特异性。

[0151] 对于保守取代,氨基酸可根据其侧链性质的相似性进行分组(在A.L.Lehninger, in Biochemistry,第2版,pp.73-75,Worth Publishers,New York(1975)中):(1)非极性:Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M);(2)不带电荷的极性:Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、ASN(N)、Gln(Q);(3)酸性:Asp(D)、Glu(E);以及(4)碱性:Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

[0152] 可选地,对于保守取代,可基于共同的侧链性质将天然存在的残基进行分组:(1)疏水性:正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;(2)中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;(3)酸性:Asp、Glu;(4)碱性:His、Lys、Arg;(5)影响链取向的残基:Gly、Pro;以及(6)芳族:Trp、Tyr、Phe。非保守取代将需要交换这些类别中的一个或另一类别的成员。

[0153] 特别的保守取代包括例如Ala至Gly或至Ser;Arg至Lys;Asn至Gln或至His;Asp至Glu;Cys至Ser;Gln至Asn;Glu至Asp;Gly至Ala或至Pro;His至Asn或至Gln;Ile至Leu或至Val;Leu至Ile或至Val;Lys至Arg、至Gln或至Glu;Met至Leu、至Tyr或至Ile;Phe至Met、至Leu或至Tyr;Ser至Thr;Thr至Ser;Trp至Tyr;Tyr至Trp;和/或Phe至Val、至Ile或至Leu。

[0154] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分的保守修饰变体优选与参考VH或VL序列至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多相同,其中VH和VL CDR(SEQ ID NO:11-16)未被修饰。如在整个公开内容中使用的,“相同的”或“同一性”是指DNA、RNA、核苷酸、氨基酸或蛋白质序列与另一DNA、RNA、核苷酸、氨基酸或蛋白质序列之间的相似性。同一性可以根据第一序列与第二序列的序列同一性百分比来表示。相对于参考DNA序列的序列同一性百分比(%)可以是在比对序列后,候选序列中与参考DNA序列中的DNA核苷酸相同的DNA核苷酸的百分比。相对于参考氨基酸序列的序列同一性百分比(%)可以是在比对序列和引入缺口(如果需要)以获得最大的序列同一性百分比后,并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与参考氨基酸序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。如在整个本公开内容中所用的,如由Altschul等人,“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs,”Nucleic Acids Res.2007,25,3389-3402所定义的,使用NCBI BLAST 2.0软件,将参数设置为默认值,产生序列同一性百分比值。

[0155] 在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)在框架区中总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID

N0:27和31所示)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2所示)在框架区中总共具有8-1个或6-1个或4-1个或2-1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2所示)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)在框架区中总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个氨基酸取代、缺失或插入。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2所示)在框架区中具有8-1个、6-1个、4-1个或2-1个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,与VH和VL的氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)相比,VH和VL氨基酸序列(分别如SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示)总共具有不超过8个或6个或4个或2个或1个氨基酸取代、缺失或插入。

[0156] 天然(或参考)氨基酸序列的修饰可以通过本领域技术人员已知的多种技术中的任一种来完成。例如,通过合成含有侧翼是能够与天然序列的片段连接的限制性位点的所需突变序列的寡核苷酸,可以在特定基因座处引入突变。连接后,得到的重建序列编码具有所需氨基酸插入、取代或缺失的变体。可选地,可采用寡核苷酸指导的位点特异性诱变程序来提供改变的核苷酸序列,其具有根据所需的取代、缺失或插入而改变的特定密码子。用于进行这种改变的技术是非常成熟的,并且包括例如由Walder等人(Gene 42:133,1986);Bauer等人(Gene 37:73,1985);Craik(BioTechniques,January 1985,12-19);Smith等人(Genetic Engineering:Principles and Methods,Plenum Press,1981);以及第4,518,584号和第4,737,462号美国专利所公开的那些,将其通过引用以其整体并入本文中。

[0157] 在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分具有完全的人恒定区。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分具有非人恒定区。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分具有嵌合(部分人的、部分非人的)恒定区。

[0158] 在各种实施方案中,抗CSPG4抗体、其抗原结合部分和其他结合剂可在人、鼠或其他动物来源的细胞系中产生。重组DNA表达可用于产生抗CSPG4抗体、其抗原结合部分和其他结合剂。这允许在选择的主物种中产生抗CSPG4抗体以及一连串抗CSPG4抗原结合部分和其他结合剂(包括融合蛋白)。在细菌、酵母、转基因动物和鸡蛋中产生抗CSPG4抗体、其抗原结合部分和其他结合剂也是基于细胞的生产系统的替代选择。转基因动物的主要优点是来自可再生资源的潜在高产率。

[0159] 在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的CSPG4 VL多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由具有SEQ ID NO:21所示序列的核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的抗CSPG4 VL多肽由具有SEQ ID NO:22所示序列的核酸编码。

[0160] 在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的CSPG4 VL多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由具有SEQ ID NO:41所示序列的核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的抗CSPG4 VL多肽由具有SEQ ID NO:46所示序列的核酸编码。

[0161] 在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的CSPG4 VL多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由具有SEQ ID NO:43所示序列的核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的抗CSPG4 VL多肽由具有SEQ ID NO:46所示序列的核酸编码。

[0162] 在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的CSPG4 VL多肽由核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的抗CSPG4 VH多肽由具有SEQ ID NO:43所示序列的核酸编码。在一些实施方案中,具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的抗CSPG4 VL多肽由具有SEQ ID NO:47所示序列的核酸编码。

[0163] 如本文所用,术语“核酸”或“核酸序列”或“多核苷酸序列”或“核苷酸”是指掺入核糖核酸、脱氧核糖核酸或其类似物的单元的聚合分子。核酸可以是单链或双链的。单链核酸可以是变性双链DNA的一条链核酸。如果是单链的,则核酸可以是编码链或非编码的(反义链)。核酸分子可以含有天然亚单位或非天然亚单位。编码氨基酸序列的核酸分子包括编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。核苷酸序列的一些形式也可以包括内含子,其程度至可以通过共转录或转录后机制除去内含子。换句话说,由于遗传密码的冗余或简并性,或通过剪接,不同的核苷酸序列可以编码相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸可以是cDNA,例如缺乏内含子的核酸。

[0164] 编码抗CSPG4抗体、其抗原结合部分以及其他结合剂的氨基酸序列的核酸分子可以通过本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于制备编码抗CSPG4抗体、抗原结合部分或其他结合剂的合成核苷酸序列。另外,寡核苷酸介导的(或定点的)诱变、PCR介导的诱变和盒式诱变可用于制备编码抗CSPG4抗体或抗原结合部分以及其他结合剂的核苷酸序列。如本文所述,编码至少抗CSPG4抗体、其抗原结合部分、结合剂或其多肽的核酸序列可根据常规技术与载体DNA重组,所述常规技术诸如例如平端或交错末端以用于连接、限制酶消化以提供适当的末端、根据需要填充粘性端、碱性磷酸酶处理以避免不希望的连接以及用适当的连接酶连接。用于这种操作的技术例如由Maniatis等人,Molecular Cloning, Lab.Manual (Cold Spring Harbor Lab.Press,NY,1982和1989)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley&Sons),1987-1993公开,并且可以用于构建编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其VH或VL多肽的核酸序列和载体。

[0165] 如果核酸分子如DNA包含含有转录和翻译调节信息的核苷酸序列,并且这种序列与编码多肽的核苷酸序列“可操作地连接”,则它被称为是“能够表达”多肽。可操作的连接是这样的连接,其中调节DNA序列和寻求表达的DNA序列(例如,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分)以允许以可回收量进行多肽或抗原结合部分的基因表达的方式连接。基因表达所需的调节区的精确性质可因有机体而异,这在类似领域中是众所周知的。参见例如,Sambrook等人,1989;Ausubel等人,1987-1993。

[0166] 因此,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分的表达可以在原核或真核细胞中发生。合适的宿主包括细菌或真核宿主,包括体内或原位的酵母、昆虫、真菌、鸟和哺乳动物细胞,或者哺乳动物、昆虫、鸟或酵母来源的宿主细胞。哺乳动物细胞或组织可以是人、灵长类动物、仓鼠、兔、啮齿类动物、牛、猪、绵羊、马、山羊、狗或猫来源的,但可以使用任何

其他哺乳动物细胞。此外,通过使用例如酵母泛素水解酶系统,可以实现泛素-跨膜多肽融合蛋白的体内合成。如此产生的融合蛋白可在体内加工或在体外纯化和加工,允许合成具有特定氨基末端序列的如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分。此外,可以避免与在直接酵母(或细菌)表达中保留起始密码子来源的甲硫氨酸残基有关的问题。(参见例如, Sabin等人, 7Bio/Technol. 705(1989); Miller等人, 7Bio/Technol. 698(1989)。)当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时,可以利用掺入来自编码大量产生的糖酵解酶的活性表达基因的启动子和终止元件的一系列酵母基因表达系统中的任何一种来获得重组抗CSPG4抗体或其抗原结合部分。已知的糖酵解基因也可以提供非常有效的转录控制信号。例如,可以利用磷酸甘油酸激酶基因的启动子和终止子信号。

[0167] 可以例如通过本领域普通技术人员已知的方法,通过用经工程化以表达多肽的杆状病毒感染昆虫宿主,来实现在昆虫中产生抗CSPG4抗体或其抗原结合部分。参见Ausubel等人, 1987-1993。

[0168] 在一些实施方案中,将引入的核酸序列(编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其多肽)掺入能够在受体宿主细胞中自主复制的质粒或病毒载体中。为此目的可以采用多种载体中的任一种,并且其是本领域普通技术人员已知的和可获得的。参见例如, Ausubel等人, 1987-1993。在选择特定质粒或病毒载体中重要的因素包括:含有载体的受体细胞可以被识别和从不含有载体的那些受体细胞中选出的容易程度;特定宿主中所需的载体拷贝数;以及是否希望能够在不同物种的宿主细胞之间“穿梭”载体。

[0169] 示例性的病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如,腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒如正粘病毒(例如,流感病毒)、弹状病毒(例如,狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如,麻疹和仙台病毒)、正链RNA病毒如小RNA病毒和 α 病毒,以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如,1型和2型单纯疱疹病毒、Epstein-Barr病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘、禽痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺瓦克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽类白血病-肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒、泡沫病毒(Coffin, J.M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, 第3版, B.N.Fields等人编辑, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。在一些这样的实施方案中,病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0170] 本领域已知的示例性原核载体包括质粒,如能够在大肠杆菌中复制的那些质粒。用于表达编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分的DNA的其他基因表达元件包括但不限于(a)病毒转录启动子及其增强子元件,如SV40早期启动子。(Okayama等人, 3Mol. Cell. Biol. 280(1983)), 劳氏肉瘤病毒LTR(Gorman等人, 79PNAS 6777(1982)), 以及莫洛尼鼠白血病病毒LTR(Grosschedl等人, 41Cell 885(1985)); (b)剪接区和聚腺苷酸化位点,如来源于SV40晚期区的那些(Okayama等人, 1983), 以及(c)聚腺苷酸化位点,如在SV40中(Okayama等人, 1983)。如由Liu等人, 同下和Weidle等人, 51Gene 21(1987)所述,使用SV40早期启动子及其增强子、小鼠免疫球蛋白H链启动子增强子、SV40晚期区mRNA剪接、兔S-珠蛋白插入序列、免疫球蛋白和兔S-珠蛋白聚腺苷酸化位点和SV40聚腺苷酸化元件作为表达元件,可以表达编码免疫球蛋白的DNA基因。

[0171] 对于编码免疫球蛋白的核苷酸序列,转录启动子可以是例如人巨细胞病毒,启动

子增强子可以是巨细胞病毒和小鼠/人免疫球蛋白。

[0172] 在一些实施方案中,为了在啮齿动物细胞中表达DNA编码区,转录启动子可以是病毒LTR序列,转录启动子增强子可以是小鼠免疫球蛋白重链增强子和病毒LTR增强子,以及聚腺苷酸化和转录终止区之一或两者。在其他实施方案中,编码其他蛋白质的DNA序列与上述表达元件组合,以在哺乳动物细胞中实现蛋白质的表达。

[0173] 每个编码区或基因融合物组装在表达载体中或插入表达载体中。然后用编码抗CSPG4抗体或抗体多肽或其抗原结合部分的核苷酸单独转染,或与编码VH和VL链编码区的多核苷酸共转染能够表达抗CSPG4可变区或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)的受体细胞。在允许表达掺入的编码区的条件下培养转染的受体细胞,并从培养物中回收表达的抗体链或完整的抗体或抗原结合部分。

[0174] 在一些实施方案中,将含有编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)的编码区的核酸组装在单独的表达载体中,然后将其用于共转染受体宿主细胞。每种载体可以含有一个或多个可选择的基因。例如,在一些实施方案中,使用两个可选择的基因,第一可选择基因设计用于在细菌系统中进行选择,并且第二可选择基因设计用于在真核系统中进行选择,其中每种载体具有一组编码区。该策略产生首先指导细菌系统中核苷酸序列的产生和允许扩增的载体。随后将在细菌宿主中如此产生和扩增的DNA载体用于共转染真核细胞,并允许选择携带所需转染核酸(例如,含有抗CSPG4抗体重链和轻链)的共转染细胞。用于细菌系统的可选择基因的非限制性实例是赋予氨苄青霉素抗性的基因和赋予氯霉素抗性的基因。用于真核转染子的可选择基因包括黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶基因(命名为gpt)和来自Tn5的磷酸转移酶基因(命名为neo)。可选地,编码VH和VL链的融合核苷酸序列可以组装在同一表达载体上。

[0175] 为了转染表达载体和产生抗CSPG4抗体或其抗原结合部分,受体细胞系可以是中國仓鼠卵巢细胞系(例如DG44)或骨髓瘤细胞。骨髓瘤细胞可以合成、组装和分泌由转染的免疫球蛋白基因编码的免疫球蛋白,并具有免疫球蛋白糖基化的机制。例如,在一些实施方案中,受体细胞是产生重组Ig的骨髓瘤细胞SP2/0。SP2/0细胞仅产生由转染基因编码的免疫球蛋白。骨髓瘤细胞可以在培养物中或在小鼠的腹腔中生长,其中分泌的免疫球蛋白可以从腹水中获得。

[0176] 编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序

列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)的表达载体可以通过多种合适手段中的任一种引入适当的宿主细胞中,所述合适的手段包括生物化学手段,如转化、转染、原生质体融合、磷酸钙沉淀,以及利用聚阳离子如二乙基氨基乙基(DEAE)葡聚糖的应用,以及机械方法,如电穿孔、直接显微注射和微粒轰击。Johnston等人,240Science 1538(1988),如本领域普通技术人员已知的。

[0177] 酵母为免疫球蛋白重链和轻链的产生提供了优于细菌的某些优点。酵母进行翻译后肽修饰,包括糖基化。存在许多重组DNA策略,其利用可用于在酵母中产生所需蛋白质的强启动子序列和高拷贝数质粒。酵母识别克隆的哺乳动物基因产物的前导序列并分泌带有前导序列的多肽(即,前多肽)。参见例如,Hitzman等人,11th Intl.Conf.Yeast,Genetics&Molec.Biol.(Montpellier,France,1982)。

[0178] 可以常规地评价酵母基因表达系统的抗体以及组装的抗CSPG4抗体及其抗原结合部分的产生、分泌和稳定性水平。可以利用掺入来自编码当酵母在富含葡萄糖的培养基中生长时大量产生的糖酵解酶的活性表达基因的启动子和终止元件的各种酵母基因表达系统。已知的糖酵解基因也可以提供非常有效的转录控制信号。例如,可以利用磷酸甘油酸激酶(PGK)基因的启动子和终止子信号。另一实例是翻译延伸因子1 α 启动子。可以采用多种方法以用于评价用于在酵母中表达免疫球蛋白的最佳表达质粒。参见II DNACloning 45,(Glover编辑,IRL Press,1985)和例如美国公开号US 2006/0270045 A1。

[0179] 细菌菌株也可用于产生本文所述的抗体分子或其抗原结合部分的宿主,可以使用大肠杆菌K12菌株如大肠杆菌W3110、芽孢杆菌属物种、肠细菌如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)或粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),以及各种假单胞菌属物种。含有复制子和来源于与宿主细胞相容的物种的控制序列的质粒载体与这些细菌宿主结合使用。载体携带复制位点,以及能够在转化细胞中提供表型选择的特定基因。可以采用多种方法以用于评价用于在细菌中产生抗CSPG4抗体及其抗原结合部分的表达质粒(参见Glover,1985;Ausubel,1987,1993;Sambrook,1989;Colligan,1992-1996)。

[0180] 宿主哺乳动物细胞可以在体外或体内生长。哺乳动物细胞提供对免疫球蛋白分子的翻译后修饰,包括前导肽去除、VH和VL链的折叠和组装、抗体分子的糖基化,以及功能性抗体和/或其抗原结合部分的分泌。

[0181] 除了上述淋巴样来源的细胞外,可用于产生抗体蛋白的宿主的哺乳动物细胞还包括成纤维细胞来源的细胞,如Vero或CHO-K1细胞。可用于表达免疫球蛋白多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S和DG44细胞;PERC6TM细胞(Crucell);以及NS0细胞。在一些实施方案中,基于特定真核宿主细胞对重链和/或轻链进行所需的翻译后修饰的能力来选择所述特定的真核宿主细胞。例如,在一些实施方案中,CHO细胞产生具有比293细胞中产生的相同多肽更高水平的唾液酸化的多肽。

[0182] 在一些实施方案中,可以根据任何合适的方法,在已经用一种或多种编码多肽的核酸分子工程化或转染的动物中体内产生一种或多种抗CSPG4抗体或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序

列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)。

[0183] 在一些实施方案中,在无细胞系统中产生抗体或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)。例如,在Sitaraman等人,Methods Mol.Biol.498:229-44(2009);Spirin,Trends Biotechnol.22:538-45(2004);Endo等人,Biotechnol.Adv.21:695-713(2003)中描述了非限制性的示例性无细胞系统。

[0184] 许多载体系统可用于在哺乳动物细胞中表达VH和VL链(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)(参见Glover,1985)。可以采用各种方法获得完整的抗体。如上文讨论的,可以在相同细胞中共表达VH和VL链以及任选的相关恒定区,以实现VH和VL链的细胞内结合和连接成完整的四聚体 H_2L_2 抗体或其抗原结合部分。共表达可以通过在相同的宿主中使用相同或不同的质粒来进行。可将编码VH和VL链或其抗原结合部分(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)的核酸置于同一质粒中,然后将其转染到细胞中,从而直接选择表达两种链的细胞。可选地,可以首先用编码一条链,例如VL链的质粒转染细胞,然后用含有第二可选择标志物的VH链质粒转染所得细胞系。可以与另外的选择性标志物结合,用编码肽、VH、VL或VH加VL链(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)的另外拷贝的质粒转染经由任一途径产生抗体、其抗原结合部分的细胞系,以产生具有增强特性的细胞系,如组装的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分的较高产生或者转染的细胞系的增强的稳定性。

[0185] 另外,植物已经作为用于重组抗体生产的方便、安全和经济的替代表达系统出现,其基于微生物或动物细胞的大规模培养。抗CSPG4抗体或抗原结合部分可以在植物细胞培养物或常规生长的植物中表达。植物中的表达可以是系统性的,限于亚细胞质体或限于种子(胚乳)。参见例如,美国专利公开号2003/0167531;第6,080,560号美国专利;第6,512,162号美国专利;WO 0129242。几种植物来源的抗体已经达到了开发的后期阶段,包括临床试验(参见例如,Biolex,N.C.)。

[0186] 对于完整抗体,抗CSPG4抗体的可变区(VH和VL)(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的VL;具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的VH和/或具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的VL,或者以上的变体)通常与(通常是人免疫球蛋白的)免疫球蛋白恒定区(例如,Fc)的至少一部分连接。可以根据众所周知的程序从多种人细胞,如永生化的B细胞中分离人恒定区DNA序列(WO 87/02671;将其通过引用以其整体并入本文中)。抗CSPG4结合抗体可以含有轻链和重链恒定区。重链恒定区可包括CH1、铰链区、CH2、CH3,以及有时还包括CH4区。在一些实施方案中,可以缺失或省略CH2结构域。

[0187] 可选地,描述的用于生产单链抗体的技术(参见例如,第4,946,778号美国专利;Bird,Science 242:423-42(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988);以及Ward等人,Nature 334:544-54(1989);将其通过引用以其整体并入本文中)可经调整以产生特异性结合CSPG4的单链抗体。通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链可变区(例如,如本文所述的具有SEQ ID NO:1和2、SEQ ID NO:25和30、SEQ ID NO:27和30或SEQ ID NO:27和31所示氨基酸序列,或者以上的变体(例如,任选地用1-8个氨基酸取代、缺失和/或插入修饰)),产生单链多肽,来形成单链抗体。也可以使用用于在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(参见例如,Skerra等人,Science 242:1038-1041(1988);将其通过引用以其整体并入本文中)。

[0188] 完整的(例如,整个的)抗体、它们的二聚体、单独的轻链和重链或其抗原结合部分可以通过已知技术回收和纯化,例如免疫吸附或免疫亲和色谱、色谱方法如HPLC(高效液相色谱)、硫酸铵沉淀、凝胶电泳或者这些的任意组合。一般参见Scopes,Protein Purification(Springer-Verlag,N.Y.,1982)。至少约90%至95%均质性的基本上纯的CSPG4结合抗体或其抗原结合部分是有利的,与具有98%-99%或更高均质性的那些一样,特别是对于药物用途。一旦纯化、部分纯化或纯化至所需的均质性,完整的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分就可以用于治疗或开发和进行测定程序、免疫荧光染色等。一般参见卷I&II Immunol.Meth.(Lefkovits&Pernis编辑,Acad.Press,NY,1979和1981)。

[0189] 另外,并且如本文所述,可以进一步优化抗CSPG4抗体或其抗原结合部分,以降低潜在的免疫原性,同时保持功能活性,以用于人的治疗。在一些实施方案中,优化的CSPG4结合抗体或其抗原结合部分来源于抗CSPG4抗体,其包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个保守氨基酸取代,其中所述重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,优化的CSPG4结合抗体或其抗原结合部分来源于CSPG4结合抗体,其包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链

可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个氨基酸取代、缺失或插入,其中所述重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在这方面,功能活性意指能够显示与CSPG4结合抗体或其抗原结合部分相关的一种或多种已知功能活性的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分,所述CSPG4结合抗体或其抗原结合部分包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区。在这些实施方案的任一个中,CSPG4结合抗体或其抗原结合部分的功能活性包括特异性结合CSPG4。另外的功能活性包括抗癌活性。另外,具有功能活性的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分意指在具有或没有剂量依赖性的情况下,多肽表现出类似于或优于本文所述的参考抗体或其抗原结合部分(例如,CSPG4结合抗体或其抗原结合部分,其包含如本文所述的(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,或者以上的变体)的活性,如在特定测定,诸如例如生物测定中所测量的。在存在剂量依赖性的情况下,其不必与参考抗体或其抗原结合部分的剂量依赖性相同,而是与本文所述的参考抗体或其抗原结合部分相比,基本上类似于或优于给定活性中的剂量依赖性(即相对于参考抗体,候选多肽将表现出更大的活性)。

II. 抗体药物缀合物

[0190] 在一些实施方案中,抗CSPG4(ARD107或其人源化变体)抗体是抗CSPG4抗体药物缀合物(或CSPG4缀合物)的一部分。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体衔接至至少一种接头,并且至少一种细胞毒性剂衔接至每种接头。

[0191] 如本文所用,“细胞毒性剂是指例如通过防止细胞生长或复制对细胞发挥细胞毒性或细胞抑制作用的化合物。“小分子”或“化合物”是分子量小于1500或100或900或750或600或500道尔顿的有机化合物。“小分子药物”是具有治疗效果如治疗疾病或病症的小分子。在一些实施方案中,小分子不是蛋白质、多糖或核酸。

[0192] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是微管破坏剂(例如,微管蛋白破坏剂)或DNA修饰剂。

[0193] 在一些实施方案中,CSPG4缀合物包括作为微管蛋白破坏剂的细胞毒性剂。已知几种不同种类的微管蛋白破坏剂,包括澳瑞他汀、tubulysins、秋水仙碱、长春花生物碱、紫杉烷类、隐藻素类(cryptophycins)、美登素类化合物(maytansinoids)、哈密特林(hemisterlins)以及其他微管蛋白破坏剂。澳瑞他汀是天然产物尾海兔素10(dolastatin 10)的衍生物。示例性的澳瑞他汀包括MMAE(N-甲基缬氨酸-缬氨酸-海兔异亮氨酸(dolaisoleuine)-海兔脯氨酸(dolaproine)-去甲麻黄碱或单甲基澳瑞他汀E)和MMAF(N-甲基缬氨酸-缬氨酸-海兔异亮氨酸-海兔脯氨酸-苯丙氨酸或单甲基澳瑞他汀F)和AFP(参

见W02004/010957和W02007/008603)。W0 2015/057699描述了包括MMAE在内的聚乙二醇化澳瑞他汀。在第9,345,785号美国专利中公开了预期使用的另外的尾海兔素衍生物,将该专利通过引用并入本文中。

[0194] Tubulysins包括但不限于tubulysin D、tubulysin M、微管苯丙氨酸(tubuphenylalanine)和微管酪氨酸(tubutyrosine)。W0 2017-096311和W0 2016-040684描述了微管溶素(tubulysin)类似物,包括微管溶素M。

[0195] 秋水仙碱包括但不限于秋水仙碱和CA-4。

[0196] 长春花生物碱包括但不限于长春碱(VBL)、长春瑞滨(VRL)、长春新碱(VCR)和长春地辛(VOS)。

[0197] 紫杉烷类包括但不限于紫杉醇和多西他赛。

[0198] 隐藻素类包括但不限于隐藻素类-1和隐藻素类-2。美登素类化合物包括但不限于美登素,美登醇,DM1、DM3和DM4中的美登素类似物和ansamitocin-2。示例性的美登素类化合物药物部分包括具有修饰的芳环的那些,如:C-19-脱氯(第4,256,746号美国专利)(通过安丝菌素(ansamitocin)P2的氢化铝锂还原制备);C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(第4,361,650号和第4,307,016号美国专利)(通过使用链霉菌或放线菌的脱甲基化或使用LAH的脱氯制备);以及C-20-脱甲氧基、C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-脱氯(第4,294,757号美国专利)(通过使用酰氯的酰化制备)以及其他位置具有修饰的那些。

[0199] 美登素类化合物药物部分还包括具有修饰的那些,如:C-9-SH(第4,424,219号美国专利)(通过美登醇与H₂S或P₂S₅的反应制备);C-14-烷氧基甲基(脱甲氧基/CH₂OR)(第4,331,598号美国专利);C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(第4,450,254号美国专利)(由诺卡氏菌制备);C-15-羟基/酰氧基(第4,364,866号美国专利)(通过链霉菌转化美登醇制备);C-15-甲氧基(第4,313,946号和第4,315,929号美国专利)(分离自滑桃树(*Trewia nudiflora*));C-18-N-去甲基(第4,362,663号和第4,322,348号美国专利)(通过链霉菌使美登醇脱甲基化制备);以及4,5-脱氧(第4,371,533号美国专利)(通过美登醇的三氯化钛/LAH还原制备)。在体外对人乳腺癌细胞系SK-BR-3测试结合HER-2的TA.1-美登素类化合物缀合物(Chari等人,Cancer Research 52:127-131(1992)的细胞毒性。药物缀合物达到了与游离美登素类化合物药物相似的细胞毒性程度,其可以通过增加每抗体分子的美登素类化合物分子的数目来增加。

[0200] 哈密特林包括但不限于hemiasterlin和HT1-286。

[0201] 其他的微管蛋白破坏剂包括根薯酮内酯(taccalonolide)A、根薯酮内酯B、根薯酮内酯AF、根薯酮内酯AJ、根薯酮内酯A1-环氧化物、圆皮海绵内酯(discodermolide)、埃博霉素(epothilone)A、埃博霉素B和莱利霉素(laulimalide)。

[0202] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是DNA修饰剂。在一些实施方案中,DNA修饰剂是烷化剂或拓扑异构酶抑制剂。在一些实施方案中,DNA修饰剂是倍癌霉素(duocarmycin)类似物、卡利奇霉素或吡咯并苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepine)。

[0203] 在一些实施方案中,细胞毒性剂可以是拓扑异构酶抑制剂,如喜树碱,如喜树碱、伊立替康(也称为CPT-11)、拓扑替康、10-羟基-CPT、SN-38、依喜替康和依喜替康类似物DXd(参见US20150297748)。

[0204] 预期用于本文方法的CSPG4缀合物包含至少一种接头,每种接头具有至少一种与

其附接的细胞毒性剂。通常,缀合物包括抗CSPG4抗体或其抗原结合片段与细胞毒性剂之间的接头。接头可以是蛋白酶可切割接头(参见例如,W02004/010957)、酸可切割接头、二硫化物接头、自稳定接头(参见例如,W02018/031690和W02015/095755)、不可切割接头(参见例如,W02007/008603)和/或亲水性接头(参见例如,W02015/123679)。在各种实施方案中,接头在细胞内条件下是可切割的,使得接头的切割在细胞内环境中从抗体释放细胞毒性剂。

[0205] 例如,在一些实施方案中,接头可被存在于细胞内环境(例如,在溶酶体或内体或质膜微囊(caveolea)内)中的切割剂切割。接头可以是例如被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽基接头。通常,肽基接头长度为至少一个氨基酸或至少两个氨基酸。切割剂可以包括组织蛋白酶B和D以及纤溶酶,已知所有这些都水解二肽药物衍生物,导致活性药物在靶细胞内释放(参见例如,Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123)。最典型的是可被存在于表达靶抗原的细胞中的酶切割的肽基接头。例如,可以使用可被在癌组织中高度表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽基接头(例如,Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly接头)。其他此类接头描述于例如第6,214,345号美国专利中。在具体的实施方案中,可被细胞内蛋白酶切割的肽基接头是Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见例如,第6,214,345号美国专利,其描述了具有val-cit接头的多柔比星的合成)或Gly-Gly-Phe-Gly接头(参见例如,美国专利公开2015/0297748)。使用细胞毒性剂的细胞内蛋白水解释放的一个优点是,当缀合时,该试剂通常是减毒的,并且缀合物的血清稳定性通常较高。也参见,第9,345,785号美国专利。

[0206] 如本文所用,术语“细胞内切割的”和“细胞内切割”是指细胞内抗体药物缀合物上的代谢过程或反应,由此细胞毒性剂和抗体之间的共价附接,例如接头被破坏,导致游离的细胞毒性剂或缀合物的其他代谢物从细胞内的抗体解离。因此,缀合物的切割部分是细胞内代谢物。

[0207] 在一些实施方案中,可切割的接头是pH敏感的,即在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感接头在酸性条件下是可水解的。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定接头(例如,脞、缩氨基脞、缩氨基硫脞、顺式-乌头酰胺(cis-aconitic amide)、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如,第5,122,368号;第5,824,805号;以及第5,622,929号美国专利;Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics 83:67-123;Neville等人,1989,Biol.Chem.264:14653-14661。)这种接头在中性pH条件下相对稳定,如血液中的那些,但在低于pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH)下是不稳定的。在某些实施方案中,可水解的接头是硫醚接头(诸如例如,经由酰脞键附接至治疗剂的硫醚(参见例如,第5,622,929号美国专利))。

[0208] 在各种实施方案中,接头在还原条件下是可切割的(例如,二硫化物接头)。已知多种二硫化物接头,包括例如可以使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)-、SPDB和SMPT形成的那些(参见例如,Thorpe等人,1987,Cancer Res.47:5924-5931;Wawrzynczak等人,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编辑,Oxford U.Press,1987。也参见第4,880,935号美国专利)。

[0209] 在各种实施方案中,接头是丙二酸酯接头(Johnson等人,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):

1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。在一些实施方案中,接头单元是不可切割的,并且药物通过抗体降解而释放。(参见美国公开号2005/0238649)。

[0210] 在各种实施方案中,接头对细胞外环境基本上不敏感。如本文所用,“对细胞外环境基本上不敏感”在接头的上下文中意指当ADC或ADC衍生物存在于细胞外环境中(例如,在血浆中)时,在抗体药物缀合物(ADC)或ADC衍生物的样品中,不超过约20%,通常不超过约15%,更通常不超过约10%,并且甚至更通常不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%的接头被切割。可例如通过以下方式来确定接头对细胞外环境是否基本上不敏感:将(a)ADC或ADC衍生物(“ADC样品”)和(b)等摩尔量的未缀合抗体或治疗剂(“对照样品”)独立地与血浆一起孵育预定的时间段(例如2、4、8、16或24小时),然后将ADC样品中存在的未缀合抗体或治疗剂的量与对照样品中存在的那些进行比较,如例如通过高效液相色谱所测量的。

[0211] 在各种实施方案中,接头促进细胞内化。在某些实施方案中,当与细胞毒性剂缀合时(即在本文所述的ADC或ADC衍生物的接头-治疗剂部分的环境中),接头促进细胞内化。在其他实施方案中,当与细胞毒性剂和抗CSPG4抗体或其衍生物缀合时(即,在本文所述的ADC或ADC衍生物的环境中),接头促进细胞内化。

[0212] 可用于本发明组合物和方法的各种接头描述于PCT公开W0 2004/010957中。在各种实施方案中,蛋白酶可切割接头包含硫醇反应性间隔基和二肽。在一些实施方案中,蛋白酶可切割接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔基、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧基羰基间隔基组成。

[0213] 在各种实施方案中,酸可切割接头是胍接头或季铵接头(参见PCT公开W02017/096311和W02016/040684)。

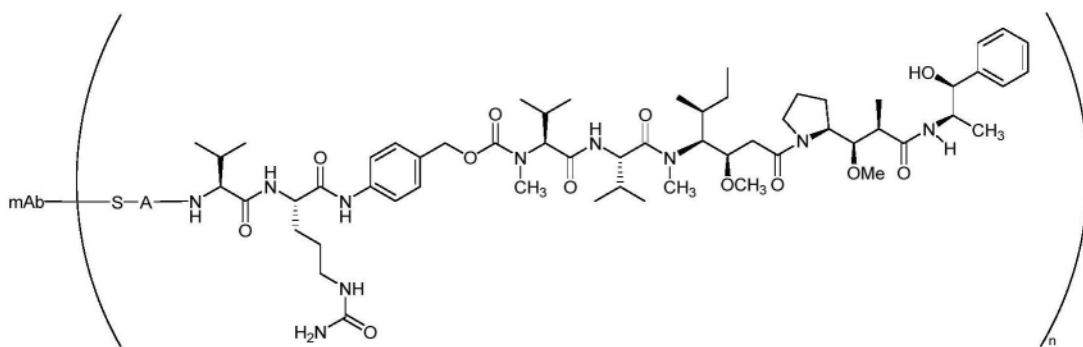
[0214] 包含马来酰亚胺基团的自稳定接头描述于第9,504,756号美国专利中。

[0215] 在各种实施方案中,微管蛋白破坏剂如澳瑞他汀,通过与如第9,463,252号美国专利中所述的接头单元(LU)形成酰胺键的C端羧基与接头缀合,该专利通过引用并入本文中。在各种实施方案中,接头单元包含至少一个氨基酸。N,N-二烷基澳瑞他汀的结合剂-药物缀合物(ADC)公开于第8,992,932号美国专利中。

[0216] 在各种实施方案中,接头还包含延伸单元和/或氨基酸单元。示例性的延伸单元和氨基酸单元描述于第9,345,785号美国专利和第9,078,931号美国专利中,将其各自通过引用并入本文中。

[0217] 在各种实施方案中,本文提供了包含通过mc-val-cit-PAB接头共价连接至MMAE的抗CSPG4抗体的抗体药物缀合物的用途。CSPG4缀合物作为药物组合物递送至对象。

[0218] 在一些实施方案中,CSPG4缀合物具有下式:



或其药学上可接受的盐；其中：mAb是抗CSPG4抗体，S是抗体的硫原子，A-是延伸单位，并且n是约3至约5或约3至约8。

[0219] 在各种实施方案中，本文提供了包含通过马来酰亚胺乙酰基-Gly-Val-Cit-PAB接头共价连接至MMAE的抗CSPG4抗体的抗体药物缀合物的用途。

[0220] 载药量由p表示，即药物组合物中每个抗体的药物分子(细胞毒性剂)的平均数目。例如，如果p为约4，则考虑到药物组合物中存在的所有抗体的平均载药量为约4。在一些实施方案中，P的范围为约3至约5，更优选约3.6至约4.4，甚至更优选约3.8至约4.2。P可为约3、约4或约5。在一些实施方案中，P的范围为约6至约8，更优选约7.5至约8.4。P可为约6、约7或约8。在缀合反应的制备中，每个抗体的药物的平均数目可以通过常规手段如质谱法、ELISA测定和HPLC来表征。抗体-药物缀合物的定量分布也可以根据p来确定。在一些情况下，均质抗体-药物缀合物的分离、纯化和表征可以通过诸如反相HPLC或电泳的手段来实现，其中p是来自具有其他载药量的抗体-药物缀合物的某个值。

[0221] 延伸单元(A)能够经由抗体的巯基将抗体单元与氨基酸单元(例如缬氨酸-瓜氨酸肽)连接。巯基可以例如通过还原抗CSPG4抗体的链间二硫键来产生。例如，可以经由从抗体的链间二硫键的还原产生的硫原子将延伸单元连接到抗体上。在一些实施方案中，延伸单元仅经由从抗体的链间二硫键的还原产生的硫原子与抗体连接。在一些实施方案中，巯基可通过抗CSPG4抗体的赖氨酸部分的氨基与2-亚氨基硫杂环戊烷(2-iminothiolane)(Traut试剂)或其他巯基产生试剂反应而产生。在某些实施方案中，抗CSPG4抗体是重组抗体，并且被工程化以携带一个或多个赖氨酸。在某些其他实施方案中，重组抗CSPG4抗体被工程化以携带另外的巯基，例如另外的半胱氨酸。

[0222] MMAE的合成和结构描述于第6,884,869号美国专利中，将其通过引用以其整体且出于所有目的并入本文中。在例如美国公开号2006/0074008和2009/0010945中描述了示例性延伸单元的合成和结构以及用于制备抗体药物缀合物的方法，将其各自通过引用以其整体并入本文中。

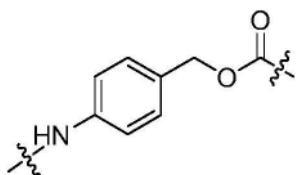
[0223] 代表性的延伸单元描述于第9,211,319号美国专利的式IIIa和IIIb的方括号内，并通过引用并入本文中。

[0224] 在各种实施方案中，抗体药物缀合物包含单甲基澳瑞他汀E和蛋白酶可切割的接头。预期蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔基和二肽。在各种实施方案中，蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔基、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧基羰基或PAB间隔基组成。

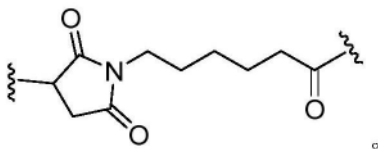
[0225] 缩写“MMAE”是指单甲基澳瑞他汀E。

[0226] 缩写“vc”和“val-cit”是指二肽缬氨酸-瓜氨酸。

[0227] 缩写“PAB”是指自裂解的(self-immolative)间隔基:



[0228] 缩写“MC”是指延伸剂马来酰亚胺基己酰基:

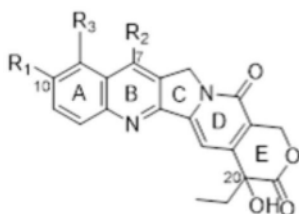


[0229] 在其他示例性实施方案中,所述缀合物具有以下通式:

Ab-[L3]-[L2]-[L1]_m-AA_n-细胞毒性剂。

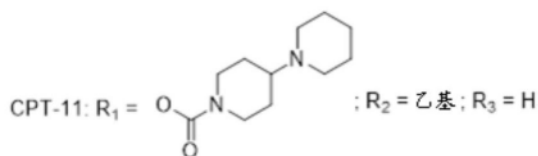
其中Ab是抗CSPG4抗体;细胞毒性剂可以是微管蛋白破坏剂或拓扑异构酶抑制剂;L3是包含抗体偶联部分和一个或多个乙炔(或叠氮化物)基团的接头的组分;L2在一端包含与L3中的乙炔(或叠氮化物)部分互补的限定的PEG(聚乙二醇)叠氮化物(或乙炔),并且在另一端包含反应性基团如羧酸或羟基;L1包含可分解单元(例如,自裂解基团)或任选地附接至可分解单元的肽酶可切割部分或酸可切割部分;AA是氨基酸;m是值为0或1的整数,并且n是值为0、1、2、3或4的整数。这种接头可以经由点击化学来组装。(参见例如,第7,591,944号和第7,999,083号美国专利。)

[0230] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是喜树碱或喜树碱(CPT)类似物,如伊立替康(也称为CPT-11)、拓扑替康、10-羟基-CPT、依喜替康、DXd和SN-38。代表性结构如下所示。



CPT: R₁ = R₂ = R₃ = H

10-羟基-CPT: R₁ = OH; R₂ = R₃ = H



SN-38: R₁ = OH; R₂ = 乙基; R₃ = H

拓扑替康: R₁ = OH; R₂ = H; R₃ = CH₂-N(CH₃)₂

[0231] 提及缀合物式Ab-[L3]-[L2]-[L1]_m-AA_n-细胞毒性剂,在一些实施方案中,m是0。在这样的实施方案中,首先在氨基酸(AA)如甘氨酸、丙氨酸或肌氨酸的羧酸或者肽如甘氨酸甘氨酸的羧酸与细胞毒性剂的羟基之间形成酯部分。在该实施方案中,氨基酸或多肽的N端可以被保护为Boc或Fmoc或单甲氧基三苯甲基(MMT)衍生物,其在与细胞毒性剂的羟基形成酯键之后被去保护。在含有另外的羟基的细胞毒性剂的羟基位置处的BOC保护基团的存在

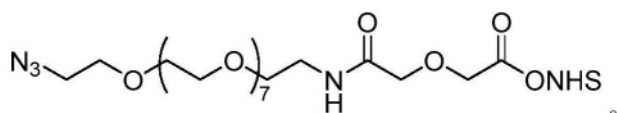
下,使用单甲氧基三苯甲基(MMT)作为参与酯形成的氨基酸或多肽的氨基的保护基团,可以实现胺保护基团的选择性去除,因为通过弱酸处理,如不裂解BOC基团的二氯乙酸,可去除“MMT”。在与细胞毒性剂的羟基形成酯键的氨基酸或多肽的氨基被去掩蔽后,在标准酰胺形成条件下,氨基与L2的PEG部分上的COOH基团的活化形式反应。在优选的实施方案中,L3包含与抗体的硫醇基团连接的硫醇反应性基团。硫醇反应性基团任选地是马来酰亚胺或乙烯砒或溴乙酰胺或碘乙酰胺,其与抗体的硫醇基团连接。在一些实施方案中,带有硫醇反应性基团的试剂从琥珀酰亚胺基-4-(N马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)或从琥珀酰亚胺基-(ϵ -马来酰亚胺基)己酸酯产生,例如,其中硫醇反应性基团是马来酰亚胺基团。

[0232] 在另一实施方案中,m是0,并且AA包含可被细胞内肽酶如组织蛋白酶-B切割的肽部分,优选二肽、三肽或四肽。组织蛋白酶-B可切割的肽的实例是:Phe-Lys、Val-Cit (Dubowchick,2002)、Ala-Leu、Leu-Ala-Leu和Ala-Leu-Ala-Leu(Trouet等人,1982)。

[0233] 在优选的实施方案中,L1由细胞内可切割的肽,如组织蛋白酶-B可切割的肽组成,其在肽的C端处与可分解单元对氨基苄醇(或对氨基-苄氧基羰基)连接,其苄醇部分又直接与氯甲酸酯形式的细胞毒性剂的羟基附接。在该实施方案中,n是0。可选地,当“n”不为0时,对酰胺基苄醇(或对氨基-苄氧基羰基)部分的苄醇部分通过活化形式的对酰胺基苄醇,即其中PNP是对硝基苯基的PABOCOPNP,附接至在细胞毒性剂的羟基处连接的氨基酸或肽的N端。在优选的实施方案中,接头包含与抗体的硫醇基团连接的硫醇反应性基团。硫醇反应性基团任选地是马来酰亚胺或乙烯砒或溴乙酰胺或碘乙酰胺,其与抗体的硫醇基团连接。在优选的实施方案中,带有硫醇反应性基团的组分从琥珀酰亚胺基-4-(N马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)或从琥珀酰亚胺基-(ϵ -马来酰亚胺基)己酸酯产生,例如,其中硫醇反应性基团是马来酰亚胺基团。

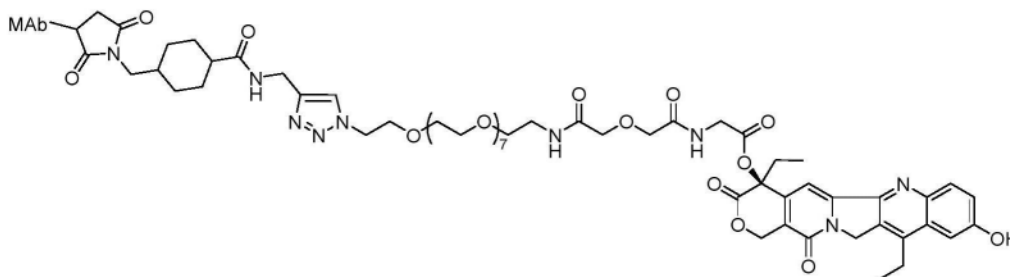
[0234] 在优选的实施方案中,当细胞毒性剂是具有20-羟基的喜树碱或其类似物或衍生物时,L1由细胞内可切割的肽,如组织蛋白酶-B可切割的肽组成,其在肽的C端处与可分解的接头对氨基苄醇(或对氨基-苄氧基羰基)连接,其苄醇部分又直接与CPT-20-O-氯甲酸酯附接。在该实施方案中,n是0。可选地,当“n”不为0时,对酰氨基苄醇部分的苄醇部分通过活化形式的对酰氨基苄醇,即其中PNP为对硝基苯基的PABOCOPNP,附接至在CPT的20位置处连接的氨基酸或多肽的N端。在优选的实施方案中,接头包含与抗体的硫醇基团连接的硫醇反应性基团。硫醇反应性基团任选地是马来酰亚胺或乙烯砒或溴乙酰胺或碘乙酰胺,其与抗体的硫醇基团连接。在优选的实施方案中,带有硫醇反应性基团的组分从琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)或从琥珀酰亚胺基-(ϵ -马来酰亚胺基)己酸酯产生,例如,其中硫醇反应性基团是马来酰亚胺基团。

[0235] 在另一实施方案中,缀合物的L2组分含有聚乙二醇(PEG)间隔基,其大小可以高达MW 5000,并且在优选的实施方案中,PEG是具有(1-12个或1-30个)重复单体单元的限定的PEG。在进一步优选的实施方案中,PEG是具有1-12个重复单体单元的限定的PEG。PEG的引入可涉及使用可商购获得的异双官能化的PEG衍生物。在本公开内容的上下文中,异双官能化的PEG含有叠氮化物或乙炔基。含有8个重复单体单元的异双官能化的限定的PEG的实例在以下下式中给出,其中“NHS”是琥珀酰亚胺基:

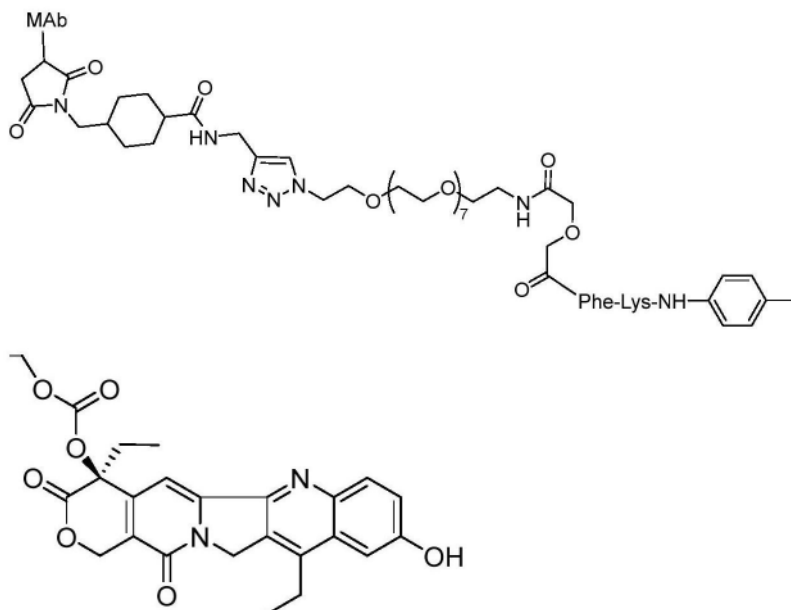


[0236] 在优选的实施方案中,L3具有多个乙炔(或叠氮化物)基团,范围为2-40个,但优选2-20个,并且更优选2-5个;以及单个抗体结合部分。

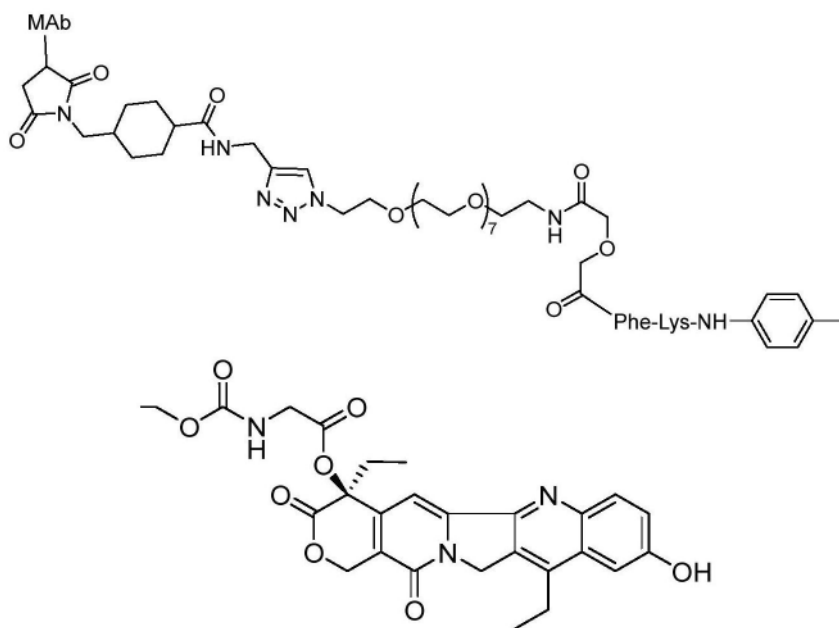
[0237] 下面给出了代表性缀合物,其中细胞毒性剂是SN-38(CPT类似物),所述缀合物利用与表示为琥珀酰亚胺的抗体(命名为MAb)键合的含有马来酰亚胺的SN-38接头衍生物制备。这里,m=0,并且与SN-38结合的20-O-AA酯是甘氨酸酯;L2和L3的叠氮化物-乙炔偶联连接产生如下所示的三唑部分。



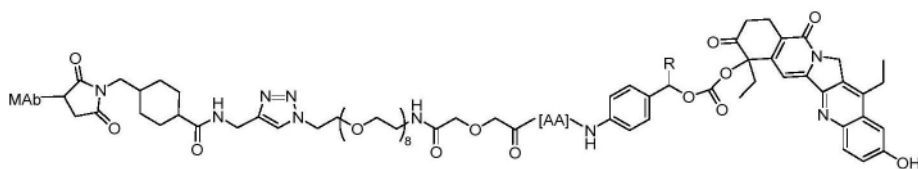
[0238] 在另一代表性缀合物中,所述缀合物用与表示为琥珀酰亚胺的抗体(MAb)键合的含有马来酰亚胺的SN-38接头衍生物制备,如下所示。这里,通式2中的n=0;“L1”含有附接至可分解的对氨基苄醇部分的组织蛋白酶-B可切割的二肽,并且后者在20位置处以碳酸酯键附接至SN-38;连接“L2”和“L3”的叠氮化物-乙炔偶联产生如下所示的三唑部分。



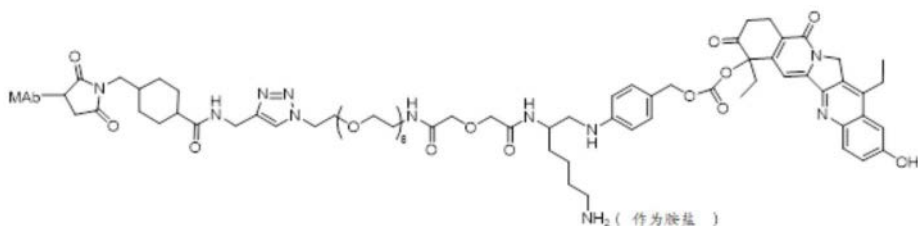
[0239] 下面给出了另一代表性SN-38缀合物Mab-CL2-SN-38,其用与表示为琥珀酰亚胺的抗体键合的含有马来酰亚胺的SN-38接头衍生物制备。这里,与SN-38键合的20-O-AA酯是经由对氨基苄醇部分和组织蛋白酶-B可切割的二肽附接至L1部分的甘氨酸酯;后者又经由酰胺键附接至“L2”,而“L2”和“L3”经由叠氮化物-乙炔“点击化学”偶联。



[0240] 在下面给出的优选实施方案的另一实例中，“L1”含有附接至可分解的对氨基苄醇部分的单个氨基酸，其中对氨基苄醇是取代或未取代的(R)，其中在缀合物通式中， $m=1$ 和 $n=0$ ，并且细胞毒性剂用SN-38举例说明。该结构如下表示(称为MAb-CLX-SN-38)。AA的单个氨基酸可选自以下L-氨基酸中的任一种：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。4-氨基苄醇部分上的取代基R是氢或选自C1-C10烷基的烷基。



[0241] 下面显示了MAb-CLX-SN-38(上文)的一个实施方案，其中单个氨基酸AA是L-赖氨酸并且R=H，并且细胞毒性剂用SN-38举例说明(称为MAb-CL2A-SN-38)：

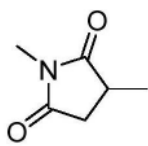


[0242] 在其他实施方案中，细胞毒性剂附接至包含延伸单元(Z)的接头，所述延伸单元(Z)附接至氨基酸单元(AA)，所述氨基酸单元(AA)附接至间隔基单元(Y)，其中所述延伸单元附接至抗体(Ab或MAb)，并且所述间隔基单元附接至细胞毒性剂的氨基。这样的接头具有下式：

Ab-Z-AA-Y-细胞毒性剂，

其中Z选自-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-(CH₂)_n-C(=O)-、-CH₂-C(=O)-NH-(CH₂)_n-C(=O)-、-C(=O)-cyc.Hex(1,4)-CH₂-(N-ly-3-dimincuccuS)-或者-C(=O)-

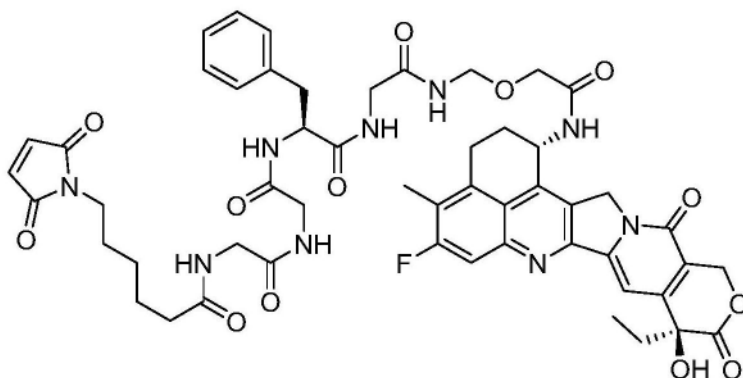
$(\text{CH}_2)_{n^4}-\text{C}(=\text{O})-$ ，其中 n^2 表示2-8的整数， n^3 表示1-8的整数，并且 n^4 表示1-8的整数；
cyc.Hex(1,4)表示1,4-亚环己基；并且(N-ly-3-dimanicuS)-具有由下式表示的结构：



[0243] AA是2-7个氨基酸的肽。间隔基单元Y是 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_b-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ ，其中b是1-5的整数。

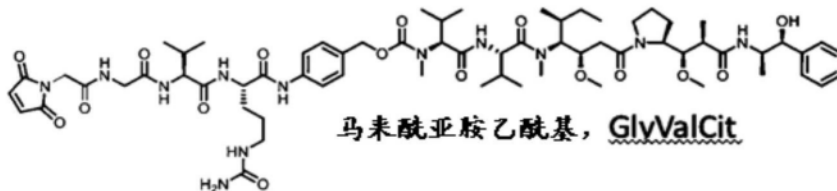
[0244] 在一些实施方案中，细胞毒性剂是依喜替康。在一些实施方案中，氨基酸单元(AA)是-Gly-Gly-Phe-Gly-。在一些实施方案中，间隔基单元Y是 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。

[0245] 在一些实施方案中，接头-细胞毒性剂具有以下结构：



其中所释放的细胞毒性剂是DXd(参见第9,808,537号美国专利)。

[0246] 在一些实施方案中，接头-细胞毒性剂具有以下结构：



III. 细胞毒性剂-接头与抗体或抗体结合部分的衔接

[0247] 用于经由接头将细胞毒性剂与抗体或其抗原结合部分衔接的技术是本领域众所周知的。参见例如,Alley等人,Current Opinion in Chemical Biology 2010 14:1-9; Senter, Cancer J., 2008, 14(3):154-169。在一些实施方案中,首先将接头衔接至细胞毒性剂,然后将接头-细胞毒性剂衔接至抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,首先将接头衔接至抗体或其抗原结合部分,然后将细胞毒性剂衔接至接头。在以下讨论中,术语“接头-细胞毒性剂”用于举例说明接头或接头-细胞毒性剂与抗体或其抗原结合部分的衔接；技术人员将理解,可以根据接头和细胞毒性剂来选择所选择的衔接方法。在一些实施方案中,细胞毒性剂经由接头以降低其活性直至其从缀合物中释放的方式(例如通过水解、通过蛋白水解降解或通过切割剂)衔接至抗体或其抗原结合部分上。

[0248] 通常,缀合物可以通过采用本领域技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂的几种途径制备,包括:(1)抗体或其抗原结合部分的亲核基团与二价接头试剂的反应,以经由共价键形成抗体-接头中间体,随后与细胞毒性剂反应；以及(2)细胞毒性剂的亲核基团与二价接头试剂的反应,以经由共价键形成接头-细胞毒性剂,随后与抗体或其抗原结合部

分的亲核基团反应。用于经由后一途径制备缀合物的示例性方法描述于第7,498,298号美国专利中,将所述专利明确地通过引用并入本文中。

[0249] 抗体上的亲核基团包括但不限于:(i)N端氨基,(ii)侧链氨基,例如赖氨酸,(iii)侧链硫醇基,例如半胱氨酸,以及(iv)糖羟基或氨基,其中抗体被糖基化。氨基、硫醇基和羟基是亲核的,并且能够与接头部分和接头试剂上的亲电基团反应以形成共价键,所述接头部分和接头试剂包括:(i)活性酯,如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯和酰基卤;(ii)烷基和苄基卤化物,如卤代乙酰胺;以及(iii)醛、酮、羧基和马来酰亚胺基。某些抗体具有可还原的链间二硫化物,即半胱氨酸桥。可通过用还原剂如DTT(二硫苏糖醇)或三羰基乙基膦(TCEP)处理使抗体反应以用于与接头试剂缀合,从而使抗体完全或部分还原。因此,理论上,每个半胱氨酸桥将形成两个反应性硫醇亲核体。可以通过赖氨酸残基的修饰,例如通过使赖氨酸残基与2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut试剂)反应,导致胺转化为硫醇,来将另外的亲核基团引入抗体中。也可以通过引入一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基(例如,通过制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的变体抗体),来将反应性硫醇基引入抗体中。

[0250] 还可以通过抗体上的亲电基团如醛或酮羰基与接头试剂或药物上的亲核基团之间的反应来产生本公开内容的缀合物。接头试剂上有用的亲核基团包括但不限于酰肼、肼、氨基、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳酰肼。在一个实施方案中,修饰抗体以引入能够与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电部分。在另一个实施方案中,糖基化抗体的糖可以例如用高碘酸盐氧化试剂氧化以形成醛基或酮基,其可以与接头试剂或药物部分的氨基反应。所得亚胺席夫碱基团可以形成稳定的键,或者可以被还原,例如通过硼氢化物试剂以形成稳定的胺键。在一个实施方案中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可以在抗体或其抗原结合部分中产生羰基(醛和酮)基团,其可以与药物上的适当基团反应(参见例如,Hermanson,Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中,含有N端丝氨酸或苏氨酸残基的抗体可以与偏高碘酸钠反应,导致产生醛而不是第一个氨基酸(Geoghegan&Stroh,(1992)Bioconjugate Chem.3:138-146;US 5362852)。这种醛可以与细胞毒性剂或接头反应。

[0251] 细胞毒性剂上的示例性亲核基团包括但不限于:胺、硫醇、羟基、酰肼、肼、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼基团,其能够与接头部分和接头试剂上的亲电基团反应以形成共价键,所述接头部分和接头试剂包括:(i)活性酯,如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯和酰基卤;(ii)烷基和苄基卤化物,如卤代乙酰胺;(iii)醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团。

[0252] 可用于制备缀合物的非限制性示例性交联剂试剂在本文中有描述或是本领域普通技术人员已知的。使用这种交联剂试剂连接两个部分,包括蛋白质部分和化学部分的方法是本领域已知的。在一些实施方案中,可例如通过重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒性剂的融合蛋白。重组DNA分子可以包含编码缀合物中的抗体和细胞毒性部分的区域,所述抗体和细胞毒性部分彼此相邻或被编码接头肽的区域隔开,所述接头肽不破坏缀合物的所需特性。

[0253] 在另一个实施方案中,抗体可以缀合到“受体”(如链霉亲和素)以用于肿瘤预靶向,其中将抗体-受体缀合物施用至患者,随后使用清除剂从循环中除去未结合的缀合物,然后施用缀合到细胞毒性剂(例如,药物或放射性核苷酸)的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0254] 在一些实施方案中,接头-细胞毒性剂附接至抗体或其抗原结合片段的链间半胱

氨酸残基。参见例如, W02004/010957和W02005/081711。在这样的实施方案中, 接头通常包含马来酰亚胺基团, 以用于附接至链间二硫化物的半胱氨酸残基。在一些实施方案中, 如第7,585,491号或第8,080250号美国专利中所述, 接头或接头-细胞毒性剂附接至抗体或其抗原结合部分的半胱氨酸残基。所得缀合物的载药量范围通常为1-8。

[0255] 在一些实施方案中, 如W02005/037992或W02010/141566中所述, 接头或接头-细胞毒性剂附接至抗体或其抗原结合部分的赖氨酸或半胱氨酸残基。所得缀合物的载药量范围通常为1-8。

[0256] 在一些实施方案中, 工程化的半胱氨酸残基、聚组氨酸序列、糖基工程化(glycoengineering)标签或转谷氨酰胺酶识别序列可用于接头或接头-细胞毒性剂至抗体或其抗原结合部分的位点特异性附接。

[0257] 在一些实施方案中, 接头-细胞毒性剂在除链间二硫化物以外的Fc区残基处附接至工程化的半胱氨酸残基。在一些实施方案中, 接头-细胞毒性剂附接至工程化的半胱氨酸, 所述工程化的半胱氨酸根据Kabat的EU编号, 在重链的位置118、221、224、227、228、230、231、223、233、234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、249、250、258、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、275、276、278、280、281、283、285、286、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、302、305、313、318、323、324、325、327、328、329、330、331、332、333、335、336、396和/或428处, 和/或在轻链的位置106、108、142(轻链)、149(轻链)和/或位置V205处, 被引入IgG(通常为IgG1)中。使用工程化的半胱氨酸的位点特异性缀合的示例性取代是S239C(参见例如, US 2010/0158909; Fc区的编号根据EU索引)。

[0258] 在一些实施方案中, 接头或接头-细胞毒性剂附接至抗体或其抗原结合部分的一个或多个引入的半胱氨酸残基, 如W02006/034488、W02011/156328和/或W02016040856中所述。在一些实施方案中, 使用细菌转谷氨酰胺酶的位点特异性缀合的示例性取代是Fc区的N297S或N297Q。在一些实施方案中, 接头或接头-细胞毒性剂附接至抗体或抗原结合部分或糖基工程化的抗体或其抗原结合部分的聚糖或修饰的聚糖。参见例如, W02017/147542、W02020123425、W02014/072482; W02014//065661、W02015/057066和W02016/022027。

IV. 药物制剂

[0259] 抗CSPG4抗体及其抗原结合部分或其他结合剂的其他方面涉及包含活性成分(即包括本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或其缀合物, 或者如本文所述的编码抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的核酸)的组合物。在一些实施方案中, 所述组合物是药物组合物。如本文所用, 术语“药物组合物”是指活性剂与被接受用于制药工业的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合。短语“药学上可接受的”在本文用于指在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症, 与合理的益处/风险比相称的那些化合物、物质、组合物和/或剂型。

[0260] 含有溶解或分散于其中的活性成分的药物组合物的制备在本领域中是充分理解的, 并且不需要基于任何特定的制剂来限制。典型地, 这种组合物被制备为可注射的液体溶液或悬浮液; 然而, 也可以制备适于在使用前在液体中再水合的固体形式或悬浮液。制剂也可以被乳化或作为脂质体组合物呈现。抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或其缀合物可以与药学上可接受的并且与活性成分相容的赋形剂混合, 并且其量适合用于本文

所述的治疗方法。合适的赋形剂是例如,水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及以上的组合。另外,如果需要,药物组合物可以含有少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂等,其增强或维持活性成分(例如,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分)的有效性。如本文所述的药物组合物可以包括其中的组分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括与诸如例如盐酸或磷酸的无机酸或诸如乙酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成的酸加成盐(与多肽的游离氨基形成)。与游离羧基形成的盐也可以来源于无机碱,诸如例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等。生理学上可耐受的载体是本领域众所周知的。示例性的液体载体是无菌水溶液,其含有活性成分(例如,抗CSPG4抗体和/或其抗原结合部分或其缀合物)和水,并且可以含有缓冲液,如生理pH值的磷酸钠、生理盐水或两者,如磷酸盐缓冲盐水。此外,水性载体可以含有一种以上的缓冲盐,以及盐,如氯化钠和氯化钾、右旋糖、聚乙二醇和其他溶质。除了水之外以及排除水之外,液体组合物还可以包含液相。这种另外的液相的示例是甘油、植物油如棉籽油和水-油乳液。有效治疗特定病症或病况的活性剂的量将取决于病症或病况的性质,并且可以通过标准临床技术来确定。

[0261] 本文所述的药物组合物可配制用于口服、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、口腔、直肠、阴道和鼻内施用。如本文所用的术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌内、胸骨内和肿瘤内注射或输注技术。

[0262] 在一些实施方案中,本公开内容的药物组合物被配制成单剂量单位或包含多个剂量单位的形式。制备此类剂型的方法是本领域技术人员已知的或对于本领域技术人员而言将是显而易见的;例如参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。

[0263] 在一些实施方案中,包含如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其缀合物或者如本文所述的编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分的核酸的药物组合物可以是冻干物。

[0264] 在一些实施方案中,提供了包含治疗有效量的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其缀合物或者本文所述的药物组合物的注射器。IV.抗CSPG4抗体、其抗原结合部分、结合剂和缀合物的治疗用途

[0265] 在一些方面,如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分、结合剂和缀合物可用于以下方法中,所述方法包括向有需要的对象施用如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或缀合物。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分包含(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及

(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个保守氨基酸取代,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体或其抗原结合部分包含:(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述重链和轻链可变框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个、1-6个、1-4个或1-2个氨基酸取代、缺失或插入,其中重链或轻链可变区的CDR未被修饰。在一些实施方案中,抗CSPG4抗体包含:(i)具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链,以及(ii)具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的轻链;(iii)具有SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的重链,以及(iv)具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链;(v)具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的重链,以及(vi)具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链;或者(vii)具有SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的重链,以及(viii)具有SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链。CSPG4缀合物包含任何这些实施方案的抗体或抗原结合部分。

[0266] 在一些实施方案中,对象需要治疗癌症和/或恶性肿瘤。在一些实施方案中,对象需要治疗CSPG4+癌症或CSPG4+恶性肿瘤,诸如例如黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、间皮瘤、肾癌、肾透明细胞癌、软骨肉瘤、尿路上皮(膀胱)癌、骨肉瘤、胰腺癌和白血病(B-ALL)。在一些实施方案中,所述方法用于治疗患有CSPG4+癌症或恶性肿瘤的对象。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的黑色素瘤。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的头颈癌。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的乳腺癌。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的间皮瘤。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的肾细胞癌。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的肾透明细胞癌。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的软骨肉瘤。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的尿路上皮(膀胱)癌。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的骨肉瘤。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的胰腺癌。在一些实施方案中,所述方法用于治疗对象中的白血病,如B-ALL。

[0267] 本文所述的方法包括向患有CSPG4+癌症或恶性肿瘤的对象施用治疗有效量的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或缀合物。如本文所用,短语“治疗有效量”、“有效量”或“有效剂量”是指如本文所述的抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或缀合物在治疗、管理或预防癌症或恶性肿瘤的复发方面提供治疗益处的量,例如在肿瘤或恶性肿瘤的至少一种症状、体征或标记物中提供统计学上显著降低的量。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。通常,治疗有效量可随对象的病史、年龄、状况、性别以及对象中的医学状况的严重程度和类型以及其他药物活性剂的施用而变化。

[0268] 术语“癌症”和“恶性肿瘤”是指干扰身体器官和系统的正常功能的不受控制的细胞生长。癌症或恶性肿瘤可以是原发的或转移的,即它已经变成侵入性的,在远离原始肿瘤部位的组织中接种肿瘤生长。“肿瘤”是指干扰身体器官和系统的正常功能的不受控制的细

胞生长。患有癌症的对象是具有存在于对象体内的客观可测量的癌细胞的对象。在该定义中包括良性肿瘤和恶性癌症,以及潜在的休眠肿瘤和微转移。从它们的原始位置迁移并接种其他重要器官的癌症最终可以通过受影响器官的功能退化而导致对象死亡。血液恶性肿瘤(造血癌症),如白血病和淋巴瘤,能够例如使对象中的正常造血区室失去竞争力,从而导致造血衰竭(以贫血、血小板减少症和中性粒细胞减少症的形式),最终导致死亡。

[0269] 癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这样的癌症的更特定的实例包括但不限于基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脑癌和CNS癌、乳腺癌、腹膜癌、宫颈癌;绒毛膜癌、软骨肉瘤、结肠癌和直肠癌(结肠直肠癌)、结缔组织癌、消化系统癌、子宫内膜癌、食道癌、眼癌、头颈癌、胃癌(包括胃肠癌和胃癌)、胶质母细胞瘤(GBM)、肝癌、肝细胞瘤、上皮内赘生物、肾脏癌或肾癌(例如,透明细胞癌)、喉癌、白血病、肝癌、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、成神经细胞瘤、口腔癌(例如,唇、舌、口和咽)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、呼吸系统癌症、唾液腺癌、肉瘤、皮肤癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫或子宫内膜癌、泌尿系统癌症、外阴癌;以及其他癌和肉瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL) NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级免疫母细胞NHL、高级淋巴母细胞NHL、高级小无裂细胞NHL、巨块疾病NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性骨髓细胞白血病和移植后淋巴增殖性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病(phakomatoses)相关的异常血管增殖、水肿(如与脑肿瘤相关的水肿)和Meigs综合征。

[0270] 在一些实施方案中,所述癌选自实体瘤,包括但不限于黑色素瘤、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌和头颈癌。

[0271] 在一些实施方案中,癌症或恶性肿瘤是CSPG4阳性的(CSPG4+)。如本文所用,术语“CSPG4阳性的”或“CSPG4+”用于描述癌细胞、癌细胞簇、肿瘤块或在细胞表面上表达CSPG4的转移细胞(膜结合的CSPG4)。CSPG4阳性癌症的一些非限制性实例包括黑色素瘤、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌和头颈癌。

[0272] 预期本文的方法减小对象中的肿瘤大小或肿瘤负荷,和/或减少对象中的转移。在各种实施方案中,对象中的肿瘤大小降低约25%-50%、约40%-70%或约50%-90%或更多。在各种实施方案中,所述方法将肿瘤大小减小10%、20%、30%或更多。在各种实施方案中,所述方法将肿瘤大小减小10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0273] 如本文所用,“对象”是指人或动物。通常,所述动物是脊椎动物,如灵长类动物、啮齿类动物、家畜或狩猎动物(game animal)。灵长类动物包括黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿类动物包括小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、兔和仓鼠。家畜和狩猎动物包括牛;马;猪;鹿;野牛;水牛;猫科动物物种,例如家猫;犬科动物物种,例如狗、狐、狼;禽类物种,例如鸡、鹌鹑、鸵鸟;以及鱼,例如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼。在某些实施方案中,对象是哺乳动物,例如灵长类动物,例如人。术语“患者”、“个体”和“对象”在本文中可互换使用。

[0274] 优选地,对象是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。除人以外的哺乳动物可有利地用作例如代表例如各种癌症

的动物模型的对象。另外,本文所述的方法可用于治疗家畜和/或宠物。对象可以是雄性或雌性。在某些实施方案中,对象是人。

[0275] 对象可以是这样的对象,其先前已经被诊断患有或被鉴定为患有CSPG4+癌症并且需要治疗,但不需要已经经历CSPG4+癌症治疗。可选地,对象也可以是先前未被诊断为患有需要治疗的CSPG4+癌症的对象。对象可以是表现出与CSPG4+癌症有关的病况或一种或多种并发症的一种或多种风险因素的对象或未表现出风险因素的对象。特别需要治疗CSPG4+癌症的“对象”可以是患有该病况或被诊断为患有该病况的对象。在其他实施方案中,“处于发展病况的风险中”的对象是指被诊断为处于发展病况(例如,CSPG4+癌症)的风险中的对象。

[0276] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“改善”当在提及疾病、病症或医学病况使用时,是指对病况的治疗性治疗,其中目的是逆转、减轻、改善、抑制、减缓或停止症状或病况的进展或严重程度。术语“治疗”包括减少或减轻病况的至少一种副作用或症状。如果一种或多种症状或临床标志物减少,则治疗通常是“有效的”。可选地,如果病况的进展减少或停止,则治疗是“有效的”。也就是说,“治疗”不仅包括症状或标志物的改善,而且包括停止或至少减缓在没有治疗的情况下预期的症状的进展或恶化。有益的或期望的临床结果包括但不限于对象中CSPG4+癌细胞的减少、一种或多种症状的减轻、缺陷程度的减少、癌症或恶性肿瘤的稳定(即不恶化)状态、肿瘤生长和/或转移的延迟或减缓,以及与没有治疗的情况下所预期的相比增加的寿命。如本文所用,术语“施用”是指通过导致CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或缀合物与CSPG4+癌细胞或恶性细胞结合的方法或途径,将本文所述的CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或缀合物或者如本文所述的编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的核酸提供到对象中。类似地,本文公开的包含本文所述的CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或其他结合剂或缀合物或者如本文所述的编码抗CSPG4抗体或其抗原结合部分或其他结合剂的核酸的药物组合物可以通过任何适当的途径施用,其导致对象中的有效治疗。

[0277] CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或结合剂或缀合物的剂量范围取决于效力,并且涵盖足够大以产生所需效果,例如减缓肿瘤生长或减小肿瘤大小的量。剂量不应大到引起不可接受的不良副作用。通常,剂量将随对象的年龄、状况和性别而变化,并且可以由本领域技术人员确定。在任何并发症的情况下,剂量也可以由个体医生调节。在一些实施方案中,剂量范围为0.1mg/kg体重至10mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为0.5mg/kg体重至15mg/kg体重。在一些实施方案中,剂量范围为0.5mg/kg体重至5mg/kg体重。可选地,可滴定剂量范围以将血清水平维持在1 μ g/mL至1000 μ g/mL。对于全身性施用,可向对象施用治疗量,诸如例如0.1mg/kg、0.5mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、12mg/kg或更多。

[0278] 可以重复上述剂量的施用。在优选的实施方案中,每周、每两周、每三周或每月施用上述剂量,持续几周或几个月。治疗的持续时间取决于对象的临床进展和对治疗的响应。

[0279] 在一些实施方案中,剂量可以为约0.1mg/kg至约100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约0.1mg/kg至约25mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约0.1mg/kg至约20mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约0.1mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约0.1mg/kg至约12mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约1mg/kg至约100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约1mg/kg至约25mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约1mg/

kg至约20mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约1mg/kg至约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约1mg/kg至约12mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约2mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约4mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约5mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约6mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约8mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约10mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约12mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约15mg/kg。在一些实施方案中,剂量可以为约100mg/m²至约700mg/m²。在一些实施方案中,剂量可以为约250mg/m²。在一些实施方案中,剂量可以为约375mg/m²。在一些实施方案中,剂量可以为约400mg/m²。在一些实施方案中,剂量可以为约500mg/m²。

[0280] 在一些实施方案中,可以经静脉内施用剂量。在一些实施方案中,静脉内施用可以是在约10分钟至约4小时的时间段内发生的输注。在一些实施方案中,静脉内施用可以是在约30分钟至约90分钟的时间段内发生的输注。

[0281] 在一些实施方案中,可以每周施用剂量。在一些实施方案中,可以每两周施用剂量。在一些实施方案中,可以约每2周施用剂量。在一些实施方案中,可以约每3周施用剂量。在一些实施方案中,可以每三周施用剂量。在一些实施方案中,可以每四周施用剂量。

[0282] 在一些实施方案中,将总共约2至约10个剂量施用至对象。在一些实施方案中,施用总共4个剂量。在一些实施方案中,施用总共5个剂量。在一些实施方案中,施用总共6个剂量。在一些实施方案中,施用总共7个剂量。在一些实施方案中,施用总共8个剂量。在一些实施方案中,施用总共9个剂量。在一些实施方案中,施用总共10个剂量。在一些实施方案中,施用总共10个剂量以上。

[0283] 含有CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或其他CSPG4结合剂或CSPG4缀合物的药物组合物可以以单位剂量施用。当在提及药物组合物中使用术语“单位剂量”是指适合作为对象的单位剂量的物理上离散的单元,每个单元含有与所需生理学上可接受的稀释剂,即载体或媒介物结合的经计算产生所需治疗效果的预定量的活性物质(例如,CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或缀合物)。

[0284] 在一些实施方案中,CSPG4结合抗体或其抗原结合部分或缀合物,或者任何这些的药物组合物与免疫疗法一起施用。如本文所用,“免疫疗法”是指设计用于诱导或增强对象自身免疫系统以对抗癌症或恶性肿瘤的治疗策略。免疫疗法的实例包括但不限于抗体如免疫检查点抑制剂。

[0285] 在一些实施方案中,免疫疗法涉及施用免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PL-L2、B7-H3、B7-H4、BMA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK1、CHK2和A2aR的抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂包括抑制CTLA-4、PD-1、PD-L1等的试剂。合适的抗CTLA-4治疗剂包括例如抗CTLA-4抗体、人抗CTLA-4抗体、小鼠抗CTLA-4抗体、哺乳动物抗CTLA-4抗体、人源化抗CTLA-4抗体、单克隆抗CTLA-4抗体、多克隆抗CTLA-4抗体、嵌合抗CTLA-4抗体、伊匹单抗、替西木单抗(tremelimumab)、抗CTLA-4adnectins、抗CTLA-4结构域抗体、单链抗CTLA-4mAbs、重链抗CTLA-4mAb、轻链抗CTLA-4mAb、激动共刺激途径的CTLA-4的抑制剂、PCT公开号W0 2001/014424中公开的抗体、PCT公开号W0 2004/035607中公开的抗体、美国公开号2005/0201994中公开的抗体,以及授权的欧洲专利号EP1212422B 1中公开的抗体。另外的抗CTLA-4抗体描述于第5,811,097号、第5,855,887号、第6,051,227号和第6,984,720号美国

专利;PCT公开号WO 01/14424和WO 00/37504;以及美国公开号2002/0039581和2002/086014中。可用于本公开内容的方法中的其他抗CTLA-4抗体包括例如,WO 98/42752;第6,682,736号和第6,207,156号美国专利;Hurwitz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95(17):10067-10071(1998);Camacho等人,J.Clin.Oncology,22(145):摘要号2505(2004)(抗体CP-675206);Mokyr等人,Cancer Res,58:5301-5304(1998)、第5,977,318号、第6,682,736号、第7,109,003号和第7,132,281号美国专利中公开的那些。

[0286] 合适的抗PD-1和抗PD-L1治疗剂包括例如,抗PD-1和抗PD-L1抗体、人抗PD-1和抗PD-L1抗体、小鼠抗PD-1和抗PD-L1抗体、哺乳动物抗PD-1和抗PD-L1抗体、人源化抗PD-1和抗PD-L1抗体、单克隆抗PD-1和抗PD-L1抗体、多克隆抗PD-1和抗PD-L1抗体、嵌合抗PD-1和抗PD-L1抗体、抗PD-1adnectins和抗PD-L1 adnectins、抗PD-1结构域抗体和抗PD-L1结构域抗体、单链抗PD-1mAb和单链抗PD-L1 mAb、重链抗PD-1mAb和重链抗PD-L1 mAb,以及轻链抗PD-1mAb和轻链抗PD-L1 mAb。在具体的实施方案中,抗PD-1治疗剂包括纳武单抗、派姆单抗、匹地利珠单抗(pidilizumab)、MEDI0680和以上的组合。在其他具体的实施方案中,抗PD-L1治疗剂包括阿替利珠单抗(atenzolizumab)、阿维单抗(avelumab)、BMS-936559、德瓦鲁单抗(MEDI4736)、MSB0010718C和以上的组合。

[0287] 合适的抗PD-1和抗PD-L1抗体也描述于Topalian,等人,Immune Checkpoint Blockade:A Common Denominator Approach to Cancer Therapy,Cancer Cell 27:450-61(2015年4月13日)中,将其通过引用以其整体并入本文中。

[0288] 在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是伊匹单抗(Yervoy)、纳武单抗(欧狄沃(Opdivo))、派姆单抗(可瑞达(Keytruda))、阿替利珠单抗(Tecentriq)、阿维单抗(Bavencio)或德瓦鲁单抗(Imfinzi)。

[0289] 在一些实施方案中,提供了改善接受免疫疗法的对象中的治疗结果的方法。所述方法通常包括向患有癌症的对象施用有效量的免疫疗法;以及向所述对象施用治疗有效量的CSPG4结合剂或其缀合物或药物组合物,其中所述结合剂或缀合物特异性结合CSPG4+癌细胞;其中与单独施用免疫疗法相比,对象的治疗结果得到改善。在一些实施方案中,结合剂或其缀合物包含(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中重链和轻链框架区被任选地修饰,所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入。在一些实施方案中,结合剂或其缀合物包含(i)具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及(ii)具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及(iv)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(v)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(vi)具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(vii)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及(viii)具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区,其中所述结合剂特异性结合CSPG4+癌细胞。在一些实施方案中,结合剂是抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接

的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。在一些实施方案中,结合剂是抗CSPG4单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体的缀合物。

[0290] 在一些实施方案中,改善的治疗结果是选自如通过所治疗的癌症的标准医学标准所确定的稳定疾病、部分反应或完全反应的客观反应。在一些实施方案中,改善的治疗结果是降低的肿瘤负荷。在一些实施方案中,改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

[0291] 本公开内容的实施方案的描述并非旨在穷举或将本公开内容限制于所公开的精确形式。虽然本文出于说明目的描述了本公开内容的具体实施方案和实例,但是如相关领域的技术人员将会认识到的,在本公开内容的范围内,各种等同的修改是可能的。视情况而定,本文提供的本公开内容的教导可适用于其他程序或方法。本文所描述的各种实施方案可以组合以提供其他实施方案。如果需要,可以修改本公开内容的方面,以采用上述参考文献和申请的组成、功能和概念来提供本公开内容的其他实施方案。根据详述,可以对本公开内容进行这些和其他改变。

[0292] 任何前述实施方案的特定元素可组合或替代其他实施方案中的元素。此外,虽然已经在这些实施方案的上下文中描述了与本公开内容的某些实施方案相关的优点,但是其他实施方案也可以表现出这些优点,并且不是所有实施方案都必须表现出这些优点,以落入本公开内容的范围内。

[0293] 将标识的所有专利和其他出版物通过引用明确地并入本文中,目的是描述和公开例如在这类出版物中描述的可能结合本公开内容使用的方法。提供这些出版物仅是因为其在在本申请的申请日之前公开。在这一点上,不应将任何东西解释为承认本申请的发明人无权因为是在先发明或任何其它原因而先于此类公开内容。关于这些文件的内容的日期或表示的所有声明都是基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何认可。

[0294] 通过以下不应被解释为限制的实施方案来进一步说明本公开内容。

[0295] 1. 缀合物,其包含:结合剂,其包含:(i) 具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;(ii) 具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(iv) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区;其中所述重链和轻链框架区被任选地修饰,其中所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入,其中所述结合剂特异性结合人CSPG4;至少一种附接至所述结合剂的接头;以及至少一种附接至每种接头的细胞毒性剂。

[0296] 2. 如实施方案1所述的缀合物,其中所述结合剂包含:

(i) 具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区;(ii) 具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;(iii) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区;或者(iv) 具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区。

[0297] 3. 缀合物,其包含:含有重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的结合剂,其中所述VH区包含具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的互补决定区HCDR1序列、具有SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的HCDR2,以及具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的HCDR3,它们各自设置在重链框架区内;并且其中所述VL区包含具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR1序列、具有SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR2,以及具有SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3,它们各自设置在轻链框架区内;至少一种附接至所述结合剂的接头;以及至少一种附接至每种接头的细胞毒性剂。

[0298] 4. 如实施方案3所述的缀合物,其中所述框架区是鼠框架区。

[0299] 5. 如实施方案3所述的缀合物,其中所述框架区是人框架区。

[0300] 6. 如实施方案1-5中任一项所述的缀合物,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合部分。

[0301] 7. 如实施方案6所述的缀合物,其中所述结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0302] 8. 如前述实施方案中任一项所述的缀合物,其中所述重链可变区还包含重链恒定区。

[0303] 9. 如实施方案8所述的缀合物,其中所述重链恒定区是人IgG同种型的。

[0304] 10. 如实施方案9所述的缀合物,其中所述重链恒定区是IgG1恒定区。

[0305] 11. 如实施方案10所述的缀合物,其中所述IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。

[0306] 12. 如实施方案9所述的缀合物,其中所述重链恒定区是IgG4恒定区。

[0307] 13. 如实施方案10所述的缀合物,其中所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:3、33和35中任一个所示的氨基酸序列。

[0308] 14. 如前述实施方案中任一项所述的缀合物,其中所述轻链可变区还包含轻链恒定区。

[0309] 15. 如实施方案14所述的缀合物,其中所述轻链恒定区是κ同种型的。

[0310] 16. 如实施方案15所述的缀合物,其中所述κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。

[0311] 17. 如实施方案15或16所述的缀合物,其中所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:4、38和39中任一个所示的氨基酸序列。

[0312] 18. 如实施方案1-17中任一项所述的缀合物,其中:(a)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列;(b)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;(c)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示氨基酸序列;或者(d)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

[0313] 19. 如实施方案1-18中任一项所述的缀合物,其中所述接头经由链间二硫化物残基、工程化的半胱氨酸、聚糖或修饰的聚糖、所述结合剂的N端残基或附接至所述结合剂的聚组氨酸残基附接至所述结合剂。

- [0314] 20. 如实施方案1-19中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物的平均载药量是约1至约8、约2、约4、约6、约8、约10、约12、约14、约16、约3至约5、约6至约8、或约8至约16。
- [0315] 21. 如前述实施方案中任一项所述的缀合物, 其中所述结合剂是单特异性的。
- [0316] 22. 如实施方案1-21中任一项所述的缀合物, 其中所述结合剂是二价的。
- [0317] 23. 如实施方案1-20中任一项所述的缀合物, 其中所述结合剂包含第二结合结构域, 并且所述结合剂是双特异性的。
- [0318] 24. 如前述实施方案中任一项所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂选自澳瑞他汀、喜树碱和卡利奇霉素。
- [0319] 25. 如实施方案24所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂是澳瑞他汀。
- [0320] 26. 如实施方案25所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂是单甲基澳瑞他汀E (MMAE)。
- [0321] 27. 如实施方案24所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂是喜树碱。
- [0322] 28. 如实施方案27所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂是依喜替康。
- [0323] 29. 如实施方案24所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂是卡利奇霉素。
- [0324] 30. 如实施方案29所述的缀合物, 其中所述细胞毒性剂是SN-38。
- [0325] 31. 如前述实施方案中任一项所述的缀合物, 其中所述接头选自mc-VC-PAB、CL2、CL2A、马来酰亚胺乙酰基-Gly-Val-Cit-PAB和(琥珀酰亚胺-3-基-N) - $(\text{CH}_2)_n^2$ -C(=O)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-CH₂=OCH₂- (C=O) -。
- [0326] 32. 如实施方案31所述的缀合物, 其中所述接头是mc-VC-PAB。
- [0327] 33. 如实施方案32所述的缀合物, 其中所述接头附接至MMAE的至少一个分子。
- [0328] 34. 如实施方案31所述的缀合物, 其中所述接头是CL2A。
- [0329] 35. 如实施方案34所述的缀合物, 其附接至SN-38的至少一个分子。
- [0330] 36. 如实施方案31所述的缀合物, 其中所述接头是CL2。
- [0331] 37. 如实施方案36所述的缀合物, 其附接至SN-38的至少一个分子。
- [0332] 38. 如实施方案31所述的缀合物, 其中所述接头是(琥珀酰亚胺-3-基-N) - $(\text{CH}_2)_n^2$ -C(=O)-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-CH₂=OCH₂- (C=O) -。
- [0333] 39. 如实施例38所述的缀合物, 其中所述接头附接至依喜替康的至少一个分子。
- [0334] 40. 药物组合物, 其包含前述实施方案中任一项所述的缀合物和药学上可接受的载体。
- [0335] 41. 治疗CSPG4+癌症的方法, 其包括向有需要的对象施用治疗有效量的实施方案1-39中任一项所述的缀合物或实施方案40所述的药物组合物。
- [0336] 42. 如实施方案41所述的方法, 其中所述CSPG4+癌症是癌或恶性肿瘤。
- [0337] 43. 如实施方案42所述的方法, 其中所述CSPG4+癌症选自黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌、软骨肉瘤、尿路上皮(膀胱)癌、骨肉瘤、胰腺癌和白血病(B-ALL)。
- [0338] 44. 如实施方案41-43中任一项所述的方法, 其还包括向所述对象施用免疫疗法。
- [0339] 45. 如实施方案44所述的方法, 其中所述免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。
- [0340] 46. 如实施方案45所述的方法, 其中所述免疫检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。

[0341] 47.如实施方案46所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

[0342] 48.如实施方案41-47中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用化疗。

[0343] 49.如实施方案41-48中任一项所述的方法,其中所述缀合物经静脉内施用。

[0344] 50.如实施方案41-49中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg或约0.1mg/kg至约12mg/kg的剂量施用所述缀合物。

[0345] 51.改善接受针对CSPG4+癌症的免疫疗法和/或化疗的对象中的治疗结果的方法,其包括:

向所述患有癌症的对象施用有效量的免疫疗法或化疗;以及

向所述对象施用治疗有效量的实施方案1-39中任一项所述的缀合物或实施方案40所述的药物组合物;

其中与单独施用所述免疫疗法或化疗相比,所述对象的治疗结果得到改善。

[0346] 52.如实施方案51所述的方法,其中所述改善的治疗结果是选自稳定疾病、部分反应或完全反应的客观反应。

[0347] 53.如实施方案51所述的方法,其中所述改善的治疗结果是降低的肿瘤负荷。

[0348] 54.如实施方案51所述的方法,其中所述改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

[0349] 55.如实施方案51所述的方法,其中所述免疫疗法是免疫检查点抑制剂。

[0350] 56.如实施方案55所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。

[0351] 57.如实施方案56所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

[0352] 58.如实施方案51-57中任一项所述的方法,其中所述缀合物经静脉内施用。

[0353] 59.如实施方案51-58中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用所述缀合物。

[0354] 60.实施方案1-36中任一项所述的缀合物或实施方案37所述的药物组合物用于治疗对象中的CSPG4+癌症的用途。

[0355] 61.实施方案1-36中任一项所述的缀合物或实施方案37所述的药物组合物用于治疗接受免疫疗法或化疗的对象中的CSPG4+癌症的用途。

[0356] 62.结合剂,其包含:(a)具有SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变(VL)区;(b)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变(VH)区,以及具有SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的轻链可变区(VL);或者(c)具有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链可变区(VH)区,以及具有SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的轻链可变区(VL)区;其中所述重链和轻链框架区被任选地修饰,其中所述框架区中具有1-8个氨基酸取代、缺失或插入,以及其中所述结合剂特异性结合人CSPG4。

[0357] 63.如实施方案62所述的结合剂,其中:(a)重链可变区具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列,以及轻链可变区具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;(b)重链可变区具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,以及轻链可变区具有SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列;或者(c)重链可变区具有SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列,以及轻链可变区具有SEQ ID

N0:31所示的氨基酸序列。

[0358] 64.如实施方案63所述的结合剂,其中所述框架区是鼠框架区。

[0359] 65.如实施方案63所述的结合剂,其中所述框架区是人框架区。

[0360] 66.如实施方案62-65中任一项所述的结合剂,其中所述结合剂是抗体或其抗原结合部分。

[0361] 67.如实施方案66所述的结合剂,其中所述结合剂是单克隆抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、二硫化物连接的Fc、scFv、单域抗体、双链抗体、双特异性抗体或多特异性抗体。

[0362] 68.如实施方案62-67中任一项所述的结合剂,其中所述重链可变区还包含重链恒定区。

[0363] 69.如实施方案68所述的结合剂,其中重链恒定区是人IgG同种型的。

[0364] 70.如实施方案69所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG1恒定区。

[0365] 71.如实施方案70所述的结合剂,其中所述IgG1重链恒定区具有SEQ ID NO:3的位置113-442所示的氨基酸序列。

[0366] 72.如实施方案69所述的结合剂,其中所述重链恒定区是IgG4恒定区。

[0367] 73.如实施方案70或71所述的结合剂,其中所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33或35所示的氨基酸序列。

[0368] 74.如实施方案62-73中任一项所述的结合剂,其中所述轻链可变区还包含轻链恒定区。

[0369] 75.如实施方案74所述的结合剂,其中所述轻链恒定区是κ同种型的。

[0370] 76.如实施方案75所述的结合剂,其中所述κ轻链恒定区具有SEQ ID NO:4的位置108-214所示的氨基酸序列。

[0371] 77.如实施方案75或76所述的结合剂,其中所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38或39所示的氨基酸序列。

[0372] 78.如实施方案62-77中任一项所述的结合剂,其中:(a)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;(b)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列;或者(c)所述重链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列,以及所述轻链可变区和恒定区具有SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

[0373] 79.药物组合物,其包含实施方案62-78中任一项所述的结合剂和药学上可接受的载体。

[0374] 80.编码实施方案62-78中任一项所述的结合剂的核酸。

[0375] 81.包含实施方案80所述的核酸的载体。

[0376] 82.包含实施方案80所述的核酸或实施方案81所述的载体的细胞系。

[0377] 83.治疗CSPG4+癌症的方法,其包括向有需要的对象施用治疗有效量的实施方案62-78中任一项所述的结合剂或实施方案79所述的药物组合物。

[0378] 84.如实施方案83所述的方法,其中所述CSPG4+癌症是癌或恶性肿瘤。

[0379] 85.如实施方案84所述的方法,其中所述CSPG4+癌症选自黑色素瘤、头颈癌、乳腺癌、间皮瘤、肾透明细胞癌、软骨肉瘤、尿路上皮(膀胱)癌、骨肉瘤、胰腺癌和白血病(B-

ALL)。

[0380] 86.如实施方案83-85中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用免疫疗法。

[0381] 87.如实施方案86所述的方法,其中所述免疫疗法包括免疫检查点抑制剂。

[0382] 88.如实施方案87所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂选自特异性结合人PD-1、人PD-L1或人CTLA4的抗体。

[0383] 89.如权利要求88所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

[0384] 90.如实施方案83-89中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用化疗。

[0385] 91.如实施方案83-90中任一项所述的方法,其中所述结合剂经静脉内施用。

[0386] 92.如实施方案83-91中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg或约0.1mg/kg至约12mg/kg的剂量施用所述结合剂。

[0387] 93.改善接受针对CSPG4+癌症的免疫疗法和/或化疗的对象中的治疗结果的方法,其包括:(a)向所述患有癌症的对象施用有效量的免疫疗法或化疗;以及(b)向所述对象施用治疗有效量的权利要求62-78中任一项所述的结合剂或权利要求79所述的药物组合物;其中与单独施用所述免疫疗法或化疗相比,所述对象的治疗结果得到改善。

[0388] 94.如实施方案93所述的方法,其中所述改善的治疗结果是选自稳定疾病、部分反应或完全反应的客观反应。

[0389] 95.如实施方案93所述的方法,其中所述改善的治疗结果是降低的肿瘤负荷。

[0390] 96.如实施方案93所述的方法,其中所述改善的治疗结果是无进展生存期或无病生存期。

[0391] 97.如实施方案93所述的方法,其中所述免疫疗法是免疫检查点抑制剂。

[0392] 98.如实施方案97所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包含特异性结合人PD-1、人PD-L1或CTLA4的抗体。

[0393] 99.如实施方案98所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂是派姆单抗、纳武单抗、西米普利单抗或伊匹单抗。

[0394] 100.如实施方案93-99中任一项所述的方法,其中所述结合剂经静脉内给药。

[0395] 101.如实施方案93-100中任一项所述的方法,其中以约0.1mg/kg至约10mg/kg的剂量施用所述结合剂。

实施例

方法和材料

[0396] 在以下实施例中使用以下方法和材料。

[0397] 细胞培养-黑色素瘤细胞系(A375、A2058、SkMel31、Malme-3M)、肺癌细胞系(NCI-H1975、NCI-H2052)和软骨肉瘤细胞系(SW1353)获自ATCC(Manassas, VA),并根据供应商的说明维持培养。

[0398] 流式细胞术-用PBS(磷酸盐缓冲盐水,pH7.4)冲洗细胞,并用Versene(Thermo Fisher)进行收获,然后用含有测试抗体或ADC的FACs缓冲液(PBS+1%胎牛血清(FBS;来源BioSun)在4℃下孵育1小时。冲洗细胞,用FACs缓冲液(PBS+1% FBS)洗涤,并用抗hIgG-AF488进行检测。在FACs Canto II(BD Biosciences)上分析细胞。根据制造商的说明,用

DAKO QifiKit (DAKO, Carpinteria, CA) 进行定量FACs (qFACs) 以测量抗原结合位点的数目。

[0399] 缀合物的制备-通过在室温下于pH 7.4的硼酸钠缓冲液中的随机缀合来制备ARD107-vcMMAE (ARD107-mc-vc-PAB-MMAE)。简言之,在与药物接头mc-vc-pab-MMAE以10:1的有效载荷:抗体比一起孵育之前,用TCEP (tris, 2-羧乙基磷) 还原ARD107抗体 (重链=SEQ ID NO:3;轻链=SEQ ID NO:4)。通过透析除去过量的药物接头。尺寸排阻HPLC证实了缀合物纯度 (99%单体, <1%聚集体)。通过LC-MS评估的载药量平均为4。

[0400] 通过控制天然二硫键还原的程度和随后将接头-有效载荷缀合至还原的二硫化物上,产生富含4-负载物质的抗体药物缀合物。在精确控制还原反应温度、pH、还原时间和还原剂与抗体的摩尔比的情况下,通过与还原剂如TCEP一起孵育使抗体部分还原。还原后,在精确控制的反应温度、pH、缀合时间和接头-有效载荷与抗体的摩尔比的情况下,将抗体然后与接头有效载荷缀合。然后通过添加摩尔过量的半胱氨酸或半胱氨酸的类似氨基酸类似物淬灭缀合反应以终止缀合反应。设计还原和缀合反应条件以提高DAR4物质的产率,并使较高负载形式如DAR6和DAR8的产率最小化。

[0401] 通过进行随机缀合,然后通过使用疏水相互作用色谱 (HIC) 柱将4-负载物质与较低和较高负载物质分离来选择性富集4-负载物质,也可以富集抗体药物缀合物的4-负载物质。

[0402] 在室温下于pH 7.4的PBS缓冲液中制备ARD107-CL2A-SN38 (ARD107-SN-38)。简言之,在与药物接头CL2A-SN38以10:1的比例孵育之前,用TCEP还原ARD107抗体。用N-乙基马来酰亚胺终止反应。通过透析除去过量的药物接头。尺寸排阻HPLC证实了缀合物纯度 (99%单体, 1%聚集体)。通过LC-MS评估的载药量平均为8。

[0403] 体外细胞毒性测定-用胰蛋白酶收获细胞,并以1000个细胞/孔接种于96孔平底透明黑壁组织培养板中的组织培养基中。第二天,添加测试化合物 (通过连续稀释以产生10点剂量曲线而制备的ADC) 或媒介物。将细胞孵育144h。按照制造商的说明用CelltiterGlo (Promega, Madison, WI) 测定细胞活力。用Prism (GraphPad, La Jolla, CA) 对数据进行作图。

[0404] 小鼠异种移植研究-根据IACUC (机构动物护理和使用 (Institutional Animal Care and Use)) 批准的方案,按照AAALAC (实验室动物护理的评估和认可协会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)) 指南,进行所有动物实验。将两百万个A2058或A375黑色素瘤细胞植入Balb/c小鼠的右侧。用卡尺测量每周两次监测肿瘤生长,并用公式 ($V = 0.5a \times b^2$, 其中a=最长直径,且b=最短直径) 计算肿瘤体积。当肿瘤达到~150mm³时,用测试化合物经静脉内处理小鼠。在最后一剂的测试试剂后,连续监测小鼠的肿瘤生长、体重和一般健康状况1周。用Prism (GraphPad, La Jolla, CA) 对数据进行作图。

实施例1:ARD107抗体和ADC的FACS结合

[0405] 进行ARD107抗体和相应缀合物与CSPG4阳性细胞系的FACs结合。将黑色素瘤A2058和Malme-3M、SW1353软骨肉瘤和NCI-H1975肺细胞系与递增浓度 (8点剂量曲线) 的抗体、缀合物 (ARD107-vcMMAE或ARD107-SN38 (ARD107-CL2A-SN-38)) 或同种型对照 (hIgG1) 在4℃下孵育1小时。利用抗hIgG-AF488二抗进行检测。

[0406] 黑色素瘤A2058和Malme-3M、SW1353软骨肉瘤和NCI-H1975肺细胞系上ARD107抗体、相应的ADC (缀合物) 和同种型对照的结合曲线显示在图1A-1D中。利用Prism (GraphPad

Software, San Diego, CA) 对数据作图, 并测定估计的结合常数(下表中的EC50)。如图1A-1D和附表中可见的, 每种细胞系的抗体和相应缀合物的结合是类似的, 使得曲线几乎重叠。在NCI-H1975肺细胞系中几乎没有抗体或ADC的结合。

EC50 (nM)	A2058	Malme-3M	SW1353	NCI-H1975
ARD107	0.48	0.59	0.21	-
ARD107-vcMMAE	0.59	0.93	0.27	-
ARD107-SN38	0.53	N/A	N/A	-

实施例2: ARD107抗体与人黑色素瘤和肺细胞系结合的比较。

[0407] 将CSPG4+A2058和A375黑色素瘤以及肺NCI-H2052和NCI-H1975细胞系与递增浓度的抗体(6点剂量曲线)在4℃下孵育1小时。利用抗hIgG-AF488二抗进行检测。

[0408] ARD107抗体与黑色素瘤A2058和Malme-3M以及肺NCI-H2052和NCI-H1975肺细胞系的结合曲线显示在图2中。利用Prism(GraphPad Software, San Diego, CA)对数据作图, 并测定估计的结合常数(表中的EC50)。如图2和附表中可见的, 抗体与2种黑色素瘤细胞系和NCI-H2052肺细胞系结合良好, 但与NCI-H1975细胞系的结合少得多。

EC50 (nM)	A2058	A375	NCI-H2052	NCI-H1975
ARD107	0.24	0.19	0.30	-

实施例3: 体外细胞毒性测定中ARD107-vcMMAE的活性

[0409] 在7种人癌症细胞系(黑色素瘤SkMel-31、Malme-3M、A2058和A375)、SW1353软骨肉瘤和肺NCI-H2052和NCI-H1975细胞系上, 测定与vcMMAE缀合的ARD107抗体(ARD107-mc-vc-PAB-MMAE)的活性。将每种细胞系与递增浓度的ADC(10点剂量曲线)一起孵育144小时。利用CelltiterGlo测定细胞活力。

[0410] 细胞毒性测定中ARD107-vcMMAE的体外测试结果显示在图3中。ARD107-vcMMAE在抑制A2058黑色素瘤细胞(IC₅₀=105ng/ml)和NCI-H2052肺癌细胞(IC₅₀=53ng/ml)的细胞生长中是有活性的。在较高浓度下, ARD107-vcMMAE抑制A375黑色素瘤细胞的生长(IC₅₀=575ng/ml)。该缀合物似乎对SkMel-31和Malme-3M细胞的亚群有效, 但45%的细胞的生长不受影响(在较高的ADC剂量下稳定(plateaus))。对SW1353软骨肉瘤或NCI-H1975肺细胞系没有活性(IC₅₀>10,000)。IC₅₀显示在下表中:

细胞系	A2058	A375	NCI-H2052	SkMel-31	Malme-3M	SW1353	NCI-H1975
指示	黑色素瘤	黑色素瘤	肺	黑色素瘤	黑色素瘤	软骨肉瘤	肺
IC ₅₀ (ng/ml)	105	575	53	稳定 (Plateau)	稳定	>10000	>10000

实施例4: ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38 ADC在A2058黑色素瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用

[0411] 向小鼠植入A2058黑色素瘤细胞, 并且当肿瘤达到150mm³时, 用ADC处理。每4天经静脉内给予ADC一次, 持续4个剂量(箭头)或如图例中所示。

[0412] ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38 ADC在A2058黑色素瘤异种移植模型中的体内测试结果显示在图4中。荷瘤小鼠每4天经静脉内给予ADC一次(箭头)或如图例中所示。ARD107-

vcMMAE在减轻肿瘤负荷方面是高度有效的。当以5mg/kg给予时,用该ADC处理小鼠在100%的小鼠(8只/8只小鼠)中产生完全消退,或者当以3mg/kg给予时,在8只小鼠中的6只中产生完全消退。

实施例5:ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38 ADC在A375黑色素瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用。

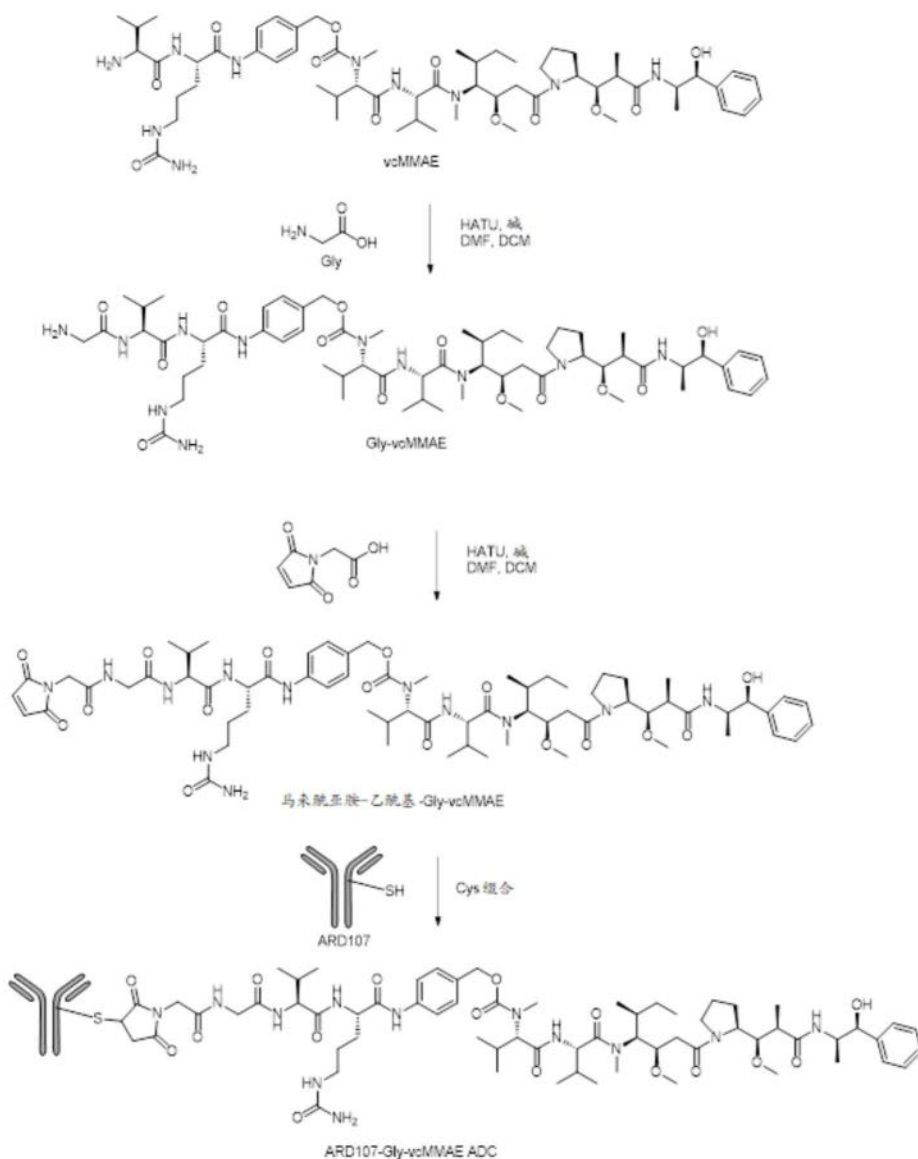
[0413] 向小鼠植入A2058黑色素瘤细胞,并且当肿瘤达到150mm³时,用ADC处理。每4天经静脉内给予ARD107-SN38一次,持续6个剂量(箭头)。ARD107-vcMMAE每4天经静脉内给予一次,持续4个剂量。

[0414] ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38 ADC在A375黑色素瘤异种移植模型中的体内测试结果显示在图5中。荷瘤小鼠每4天经静脉内给予ARD107-SN38一次,持续6个剂量(箭头),或者每4天给予ARD107-vcMMAE一次,持续4个剂量。一组小鼠每4天给予8mg/kg ARD107-SN38一次,持续4个剂量。ARD107-vcMMAE和ARD107-SN38ADC在减轻肿瘤负荷方面是有效的。当以12mg/kg给予时,用ARD107-SN38处理小鼠产生1次完全消退。

实施例6:ARD107-Gly-vcMMAE和ARD107-vcMMAE的制备

[0415] 以下提供了可用于制备ARD107-Gly-vcMMAE和ARD107-vcMMAE ADC的方法的实例。除非另有说明,否则所有反应均在氮气气氛下,在烘箱干燥的玻璃器皿中进行。可商购获得的vcMMAE购自MedChem Express。二氯甲烷(DCM)、二异丙基乙胺、二甲基甲酰胺(DMF)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)、四氢呋喃(THF)、乙二胺四乙酸(EDTA)、三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、N-乙酰基半胱氨酸(NAC)和二甲基亚砜(DMSO)分别购自Sigma-Aldrich、TCI、Fisher Scientific和Sigma-Aldrich,并且不经另外的纯化原样使用。

经由半胱氨酸残基的ARD107-Gly-vcMMAE ADC的反应方案



[0416] Gly-vcMMAE的合成

[0417] 向圆底烧瓶中加入vcMMAE (1.0当量)、DMF和磁力搅拌棒。加入HATU偶联剂(1.2当量),并将混合物搅拌5min,然后加入甘氨酸(1.0当量)和二异丙基乙胺(3.0当量)。搅拌过夜后,TLC指示反应完成。将反应混合物在旋转蒸发器上浓缩,然后在二氯甲烷和水之间分配。用萃取漏斗分离溶剂层,并将水层用二氯甲烷再萃取三次。合并有机层,经硫酸钠干燥并在减压下浓缩。通过柱色谱法纯化产物,以得到纯的乙酰基-Gly-vcMMAE。

[0418] 马来酰亚胺乙酰基-Gly-vcMMAE的合成

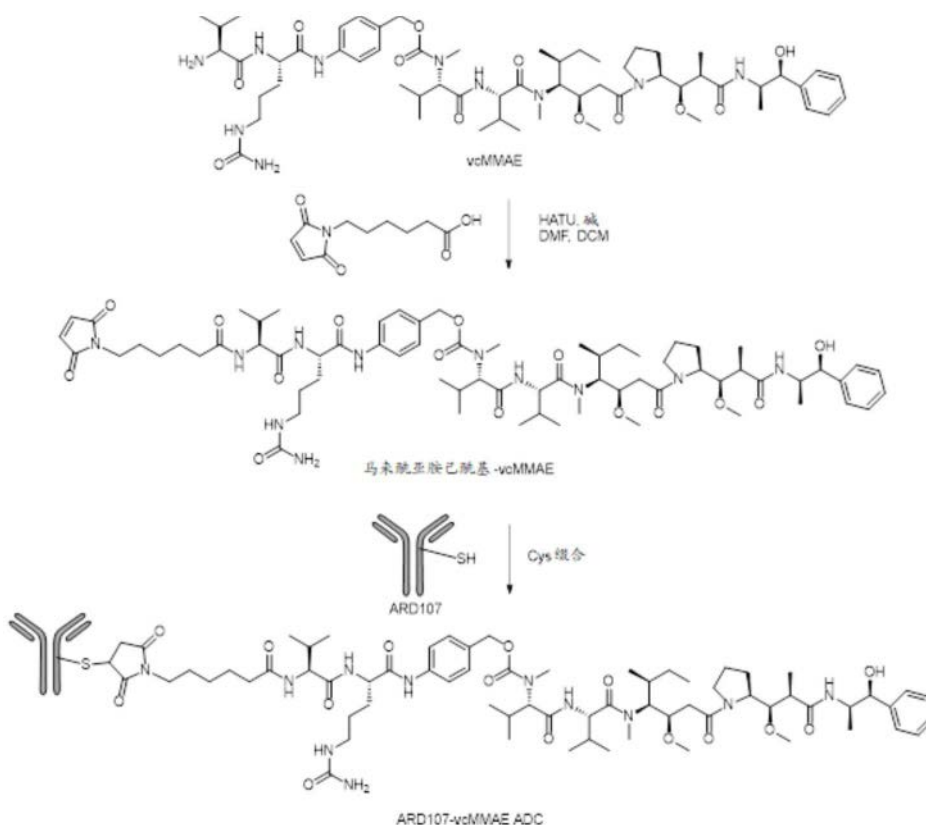
[0419] 向2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸(1.0当量)在DCM和DMF中的搅拌溶液中加入HATU(1.0当量),然后加入二异丙基乙胺(3.0当量)。允许反应搅拌5分钟,然后加入Gly-vcMMAE作为于DCM和DMF中的溶液。允许反应在室温下搅拌6小时,然后通过添加水进行淬灭。将反应混合物在旋转蒸发器上浓缩并通过柱色谱法纯化,以得到纯的马来酰亚胺乙酰基-Gly-vcMMAE。

[0420] 经由半胱氨酸残基合成ARD107-Gly-vcMMAE ADC

[0421] 通过控制天然二硫键还原的程度和随后将接头-有效载荷缀合至还原的二硫化物

上,产生富含4-负载物质的抗体药物缀合物(ADC)。半胱氨酸缀合依赖于抗体的半胱氨酸硫醇基和连接子中马来酰亚胺-乙酰基-Gly-vcMMAE的马来酰亚胺基团之间的化学反应。马来酰亚胺-乙酰基-Gly-vcMMAE通过迈克尔(Michael)加成与抗体ARD107缀合,以形成ARD107-Gly-vcMMAE(ARD107-马来酰亚胺乙酰基-Gly-Val-Cit-PAB-MMAE)ADC。制备含有磷酸钠、氯化钠和乙二胺四乙酸(EDTA)的缀合缓冲溶液。用缀合缓冲液稀释ARD107储备溶液。然后在精确控制还原反应温度、pH、还原时间和TCEP与ARD107的摩尔比的情况下,用三(2-羧乙基)膦(TCEP)还原二硫化物桥,以在ARD107分子上提供可用的巯基。然后将还原的ARD107与溶解在DMSO中的马来酰亚胺-乙酰基-Gly-vcMMAE在精确控制反应温度、pH、缀合时间和马来酰亚胺-乙酰基-Gly-vcMMAE与ARD107的摩尔比的情况下缀合以提供DAR4。将反应物搅拌过夜。反应完成后,采用N-乙酰基半胱氨酸(NAC)或半胱氨酸淬灭反应,并通过超滤除去未反应的马来酰亚胺-乙酰基-Gly-vcMMAE和副产物,以提供纯的ARD107-Gly-vcMMAE(ARD107-马来酰亚胺乙酰基-Gly-Val-Cit-PAB-MMAE)ADC。设计还原和缀合反应条件以提高DAR4物质的产率,并使较高负载形式如DAR6和DAR8的产率最小化。

经由半胱氨酸残基的ARD107-vcMMAE ADC的反应方案



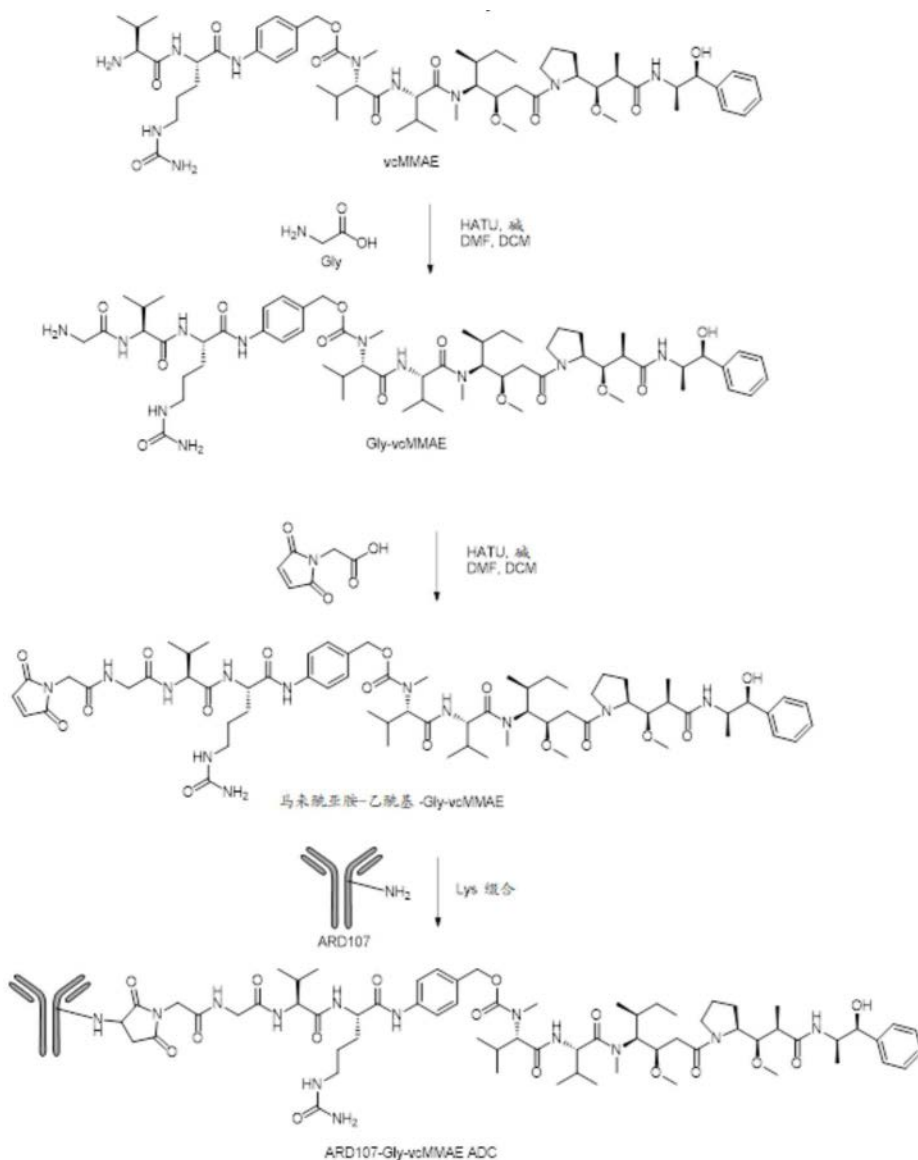
[0422] 马来酰亚胺基己酰基-vcMMAE的合成

[0423] 向2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸(1.0当量)在DCM和DMF中的搅拌溶液中加入HATU(1.0当量),然后加入二异丙基乙胺(3.0当量)。允许反应搅拌5分钟,然后加入vcMMAE作为于DCM和DMF中的溶液。允许反应在室温下搅拌6小时,然后通过添加水进行淬灭。将反应混合物在旋转蒸发器上浓缩并通过柱色谱法纯化,以提供纯的马来酰亚胺基己酰基-vcMMAE(mc-vcMMAE)。

[0424] 经由半胱氨酸残基合成ARD107-vcMMAE ADC

[0425] ARD107-vcMMAE ADC由ARD107与mc-vcMMAE的缀合制备。制备含有磷酸钠、氯化钠和乙二胺四乙酸(EDTA)的缀合缓冲溶液。用缀合缓冲液稀释ARD107储备溶液。然后在精确控制还原反应温度、pH、还原时间和TCEP与ARD107的摩尔比的情况下,用三(2-羧乙基)膦(TCEP)还原二硫化物桥以在ARD107分子上提供可用的巯基。然后在精确控制反应温度、pH、缀合时间和mc-vcMMAE与ARD107的摩尔比的情况下,将还原的ARD107与溶解在DMSO中的mc-vcMMAE缀合以提供DAR4。将反应物搅拌过夜。反应完成后,采用N-乙酰基半胱氨酸(NAC)或半胱氨酸淬灭反应,并通过超滤除去未反应的mc-vcMMAE和副产物,以提供纯的ARD107-vcMMAE(ARD107-mc-vc-PAB-MMAE)ADC。设计还原和缀合反应条件,以提高DAR4物质的产率,并使较高负载形式如DAR6和DAR8的产率最小化。根据上述程序制备ARD107-vcMMAE[DAR4]。

经由赖氨酸残基的ARD107-Gly-vcMMAE ADC的反应方案

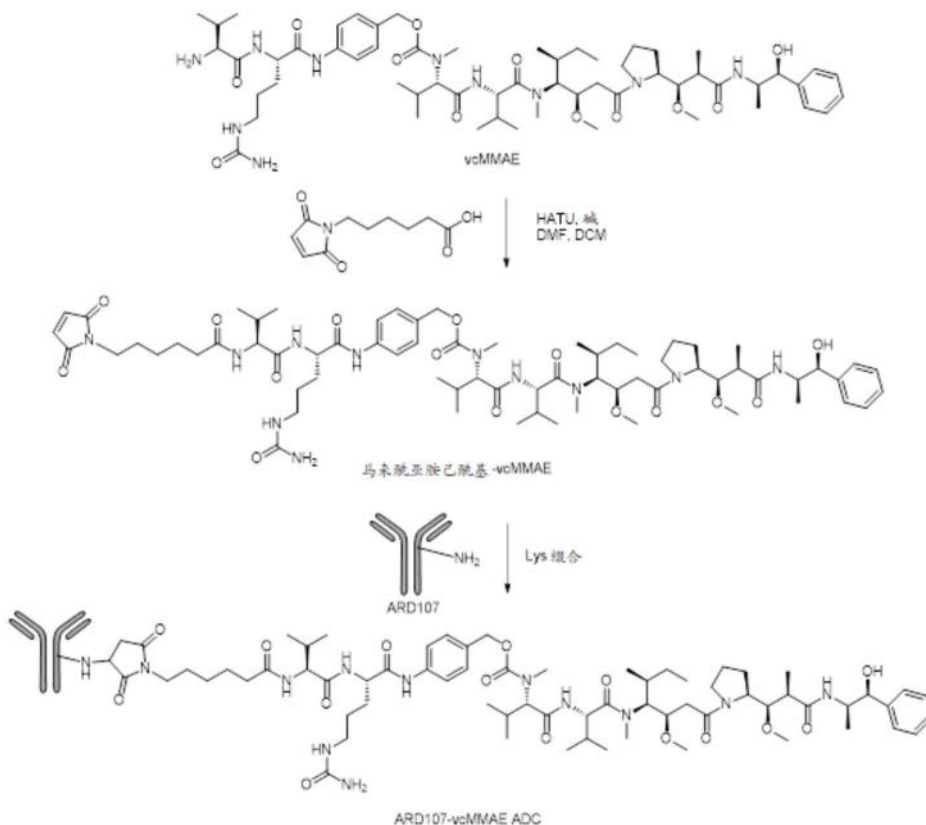


[0426] 经由赖氨酸残基合成ARD107-Gly-vcMMAE ADC

[0427] 在一些实施方案中,还可以通过进行上述反应方案中所示的随机缀合(基于赖氨酸的缀合),随后通过使用疏水相互作用色谱柱(HIC)将4-负载物质与较低和较高负载物质分离来选择性富集4-负载物质,从而富集ADC的4-负载物质。通过HIC树脂预填充的HIC柱

(0.8/10cm, 5mL) 来纯化未纯化的ARD107-Gly-vcMMAE ADC, 以提供富含4-负载的物质。所有过程都在室温下进行。在上样之前, 用3个柱体积的缓冲液A (50mM磷酸钠, pH7.0和2M氯化钠 (NaCl)) 平衡柱子。为了装载到柱上, 将2.5mL未纯化的ARD107-Gly-vcMMAE ADC与2.5mL缓冲液A混合。将该所得混合物 (共5mL) 注入柱中, 并使用从100%缓冲液到100%缓冲液B (50mM磷酸钠, pH7.0, 20%异丙醇 (IPA) v/v) 的线性梯度进行洗脱。

经由赖氨酸残基的ARD107-vcMMAE ADC的反应方案



[0428] 经由赖氨酸残基合成ARD107-vcMMAE ADC

[0429] 在一些实施方案中, 还可以通过进行上述反应方案中所示的随机缀合 (基于赖氨酸的缀合), 随后通过使用疏水相互作用色谱柱 (HIC) 将4-负载物质与较低和较高负载物质分离来选择性富集4-负载物质, 从而富集ADC的4-负载物质。通过HIC树脂预填充的HIC柱 (0.8×10cm, 5mL) 来纯化未纯化的ARD107-vcMMAE ADC, 以提供富含4-负载的物质。所有过程都在室温下进行。在上样之前, 用3个柱体积的缓冲液A (50mM磷酸钠, pH7.0和2M氯化钠 (NaCl)) 平衡柱子。为了装载到柱上, 将2.5mL未纯化的ARD107-vcMMAE ADC与2.5mL缓冲液A混合。将该所得混合物 (共5mL) 注入柱中, 并使用从100%缓冲液到100%缓冲液B (50mM磷酸钠, pH 7.0, 20%异丙醇 (IPA) v/v) 的线性梯度进行洗脱。根据上述程序制备ARD107-vcMMAE和ARD107-vcMMAE [HIC]。

[0430] 实施例7: ARD107-MMAE的不同制剂与CSPG4蛋白的结合

[0431] 通过ELISA测试通过随机缀合、富集4-负载, 以及通过柱纯化4-负载物质和缀合至Gly-vcMMAE接头的ARD107抗体制备的ARD107-vcMMAE ADC与重组人CSPG4蛋白的结合。如图6所示, 所有测试的ADC制剂都表现出与靶标CSPG4的结合, 类似于未缀合的ARD107单克隆抗体。

实施例8:ARD107-vcMMAE和ARD107-Gly-vcMMAE ADC的不同制剂在A2058黑色素瘤异种移植模型中的抗肿瘤作用

[0432] 向小鼠植入A2058黑色素瘤细胞,并且当肿瘤达到200mm³时,用ADC进行处理。每4天经静脉内给予实施例6中描述的ADC一次,持续4个剂量(图7中的箭头)。每4天经静脉内给予ARD107-vcMMAE一次,持续4个剂量。通过标准随机缀合方法(ARD107-vcMMAE)、富集4-负载(ARD107-vcMMAE(DAR4))或4-负载物质(ARD107-vcMMAE(HIC))和ARD107-Gly-vcMMAE ADC的柱纯化制备的ARD107-vcMMAE在AA2058黑色素瘤异种移植模型中的体内测试的结果显示在图7中。通过标准随机缀合方法(ARD107-vcMMAE)、富集4-负载(ARD107-vcMMAE(DAR4))或4-负载物质(ARD107-vcMMAE(HIC))的柱纯化制备的ADC都显著降低了肿瘤负荷(p<0.025,相比媒介物)。与媒介物相比,ARD107-Gly-vcMMAE处理还降低了肿瘤负荷(p<0.05),但是与其他ADC制剂相比效果较差。用3mg/kg ADC处理小鼠在一些小鼠中产生完全消退(ARD107-vcMMAE(HIC)中为2只/8只小鼠,且在随机组中为1只/8只小鼠)。

实施例9:ARD107的人源化变体和表征

[0433] 将计算建模用于人源化设计。通过使用蛋白质数据库(pdb) 3CFD作为模型结构来建立ARD107 Fv同源性模型,并用建立在其他结构1FNS和1NDM上的另一模型双重检查设计。对人VH和VL框架受体(对于VH为IGHV4-31*02,且对于VL为IGKV1-39*01)进行与来自IMGT V结构域目录(智人(Homo sapien))的最近基因和等位基因的比对。在人源化过程中,将小鼠CDR移植到人框架受体中,评价人框架中与鼠框架中的那些残基不同的残基。在VHv1中有6个回复突变,在VHv2中有7个回复突变,在VHv3中有8个回复突变,且在VHv4中有9个回复突变。在VLv1中有6个回复突变,在VLv2中有7个回复突变,在VLv3中有7个回复突变,且在VLv4中有9个回复突变。

[0434] 将重链可变区序列克隆到含有信号肽序列和人IgG1恒定区的载体中,而将轻链可变区克隆到含有信号肽序列和人κ轻链区的载体中。将重链和轻链配对以产生表1中提供的单克隆抗体,以用于进一步表征。

[0435] 进行初级筛选以评价VH和VL的十六种组合(参见表1)与CSPG4+A2058黑色素瘤细胞系的结合(图8A)。将该结合亲和力与在5分钟热处理(热稳定性)后测量的结合进行比较(图8B)。基于这些结果和蛋白质生产的评估,选择前导候选物用于包括结合和内化研究(H1L2、H3L2和H3L3)在内的其它轮的测试。

[0436] 表1:ARD107人源化抗体

抗体描述	重链多肽	轻链多肽
H0L0 (ARD107嵌合抗体)	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8
H1L1	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:37
H1L2	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:38
H1L3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:39
H1L4	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:40
H2L1	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:37
H2L2	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:38
H2L3	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:39
H2L4	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:40

H3L1	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:37
H3L2	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:38
H3L3	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:39
H3L4	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:40
H4L1	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37
H4L2	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:38
H4L3	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:39
H4L4	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:40

[0437] 分析ARD107抗体的前导人源化变体 (H1L2、H3L2和H3L3) 与CSPG4+A2058黑色素瘤细胞的结合 (图9A) 和被A2058黑色素瘤细胞的内化 (图9B)。为了通过ELISA评估抗体结合, 将Nunc Immuno Maxisorp96孔板 (ThermoFisher) 用重组人CSPG4蛋白 (R&D Systems) 包被过夜。然后将板洗涤、封闭并与测试试剂 (mAb或ADC) 一起孵育2小时。在随后与山羊抗人Fc特异性二抗 (Sigma) 和TMB底物孵育后, 测定结合的测试试剂的检测。与嵌合抗体类似, 所有3种人源化变体均与靶细胞结合, 其中H3L3变体显示出稍微更好的结合。

[0438] 使用Zenon pHrodo试剂, 按照制造商的说明 (ThermoFisher) 进行人源化ARD107抗体 (H1L2、H3L2和H3L3) 的内化。简言之, 将A2058黑色素瘤细胞以100,000个细胞/孔接种在96孔组织培养板中的组织培养基中。在与pHrodo标记的二抗一起孵育过夜之前, 将细胞与抗体一起预孵育。第二天, 收获细胞并通过流式细胞术进行分析。内化被确定为对pHrodo-RED染色呈阳性的活细胞的分数的分数。用Prism (GraphPad, La Jolla, CA) 对数据进行作图。所有人源化抗体均被靶细胞内化 (图10)。当与嵌合抗体或其他2种变体相比时, H1L2变体显示出更好的内化。

[0439] 本发明不限于本文描述的特定实施方案的范围。实际上, 除了本文描述的那些之外, 对于本领域技术人员来说, 本发明的各种修改从前面的描述和附图也将变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0440] 可以组合上述各种实施方案以提供其他实施方案。在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物, 包括2020年10月18日提交的第63/093,255号美国专利申请, 均通过引用以其整体并入本文中。如果需要, 可以修改实施方案的方面, 以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其他实施方案。

[0441] 根据以上详述, 可以对实施方案进行这些和其他改变。通常, 在所附权利要求中, 所使用的术语不应被解释为将权利要求限制于说明书和权利要求书中公开的具体实施方案, 而应被解释为包括所有可能的实施方案以及这些权利要求所赋予的等同物的全部范围。因此, 权利要求书不受本公开内容的限制。

序列表

- <110> 艾迪健公司 (Ardeagen Corporation)
 <120> 抗CSPG4结合剂、其缀合物及其使用方法
 <130> 120301.401W0
 <140> PCT
 <141> 2021-10-15
 <150> US 63/093,255
 <151> 2020-10-18
 <160> 48
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列ARD107 VH
 <400> 1

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

- <210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列ARD107 VL
 <400> 2

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

<210> 3

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列ARD107 VH-IgG1

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

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

<210> 4

<211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列ARD107 VL-Igκ
 <400> 4
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 5
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>

<223> VH信号序列

<400> 5

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VL信号序列

<400> 6

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys

20

<210> 7

<211> 461

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 具有信号序列的ARD107 VH-IgG1

<400> 7

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile

35 40 45

Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys

50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn

65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn

85 90 95

Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

115 120 125

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
130	135	140
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
145	150	155
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
	165	170
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
	180	185
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
	195	200
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
	210	215
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
225	230	235
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
	245	250
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
	260	265
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
	275	280
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	290	295
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
305	310	315
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
	325	330
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
	340	345
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
	355	360
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
385	390	395
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
	405	410
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
	420	425
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		

435	440	445
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
450	455	460
<210> 8		
<211> 236		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 具有信号序列的合成序列ARD107 VL-Igκ		
<400> 8		
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp		
1	5	10
Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser		
	20	25
Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser		
	35	40
Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly		
	50	55
Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val		
65	70	75
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr		
	85	90
Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln		
	100	105
Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
	115	120
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
	130	135
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
145	150	155
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
	165	170
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
	180	185
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
	195	200
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
	210	215
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		

225 230 235
 <210> 9
 <211> 2322
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> CSPG4 [NP_001888.2]
 <400> 9
 Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
 20 25 30
 Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
 50 55 60
 Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
 85 90 95
 Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
 100 105 110
 Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
 115 120 125
 Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
 130 135 140
 Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn
 165 170 175
 Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys
 180 185 190
 Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly
 195 200 205
 Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly
 210 215 220
 Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala
 225 230 235 240
 Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe

	245		250		255
Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val	Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu				
260	265	270			
Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser					
275	280	285			
Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro					
290	295	300			
Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly					
305	310	315	320		
Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln					
325	330	335			
Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu					
340	345	350			
Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg					
355	360	365			
Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu					
370	375	380			
Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr					
385	390	395	400		
Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val					
405	410	415			
Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu					
420	425	430			
Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu					
435	440	445			
Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg					
450	455	460			
Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu					
465	470	475	480		
Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu					
485	490	495			
Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu					
500	505	510			
Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val					
515	520	525			
Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile					
530	535	540			
Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly					
545	550	555	560		

Ser	Leu	Met	Val	Ile	Leu	Glu	His	Thr	Gln	Lys	Pro	Leu	Gly	Pro	Glu			
																565	570	575
Val	Phe	Gln	Ala	Tyr	Asp	Pro	Asp	Ser	Ala	Cys	Glu	Gly	Leu	Thr	Phe			
																580	585	590
Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Glu	Arg	Arg	Asp	Gln			
																595	600	605
Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Thr	Glu	Phe	Ser	Cys	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Gly			
																610	615	620
Ser	Leu	Val	Tyr	Val	His	Arg	Gly	Gly	Pro	Ala	Gln	Asp	Leu	Thr	Phe			
																625	630	635
Arg	Val	Ser	Asp	Gly	Leu	Gln	Ala	Ser	Pro	Pro	Ala	Thr	Leu	Lys	Val			
																645	650	655
Val	Ala	Ile	Arg	Pro	Ala	Ile	Gln	Ile	His	Arg	Ser	Thr	Gly	Leu	Arg			
																660	665	670
Leu	Ala	Gln	Gly	Ser	Ala	Met	Pro	Ile	Leu	Pro	Ala	Asn	Leu	Ser	Val			
																675	680	685
Glu	Thr	Asn	Ala	Val	Gly	Gln	Asp	Val	Ser	Val	Leu	Phe	Arg	Val	Thr			
																690	695	700
Gly	Ala	Leu	Gln	Phe	Gly	Glu	Leu	Gln	Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Gly	Val			
																705	710	715
Glu	Gly	Ala	Glu	Trp	Trp	Ala	Thr	Gln	Ala	Phe	His	Gln	Arg	Asp	Val			
																725	730	735
Glu	Gln	Gly	Arg	Val	Arg	Tyr	Leu	Ser	Thr	Asp	Pro	Gln	His	His	Ala			
																740	745	750
Tyr	Asp	Thr	Val	Glu	Asn	Leu	Ala	Leu	Glu	Val	Gln	Val	Gly	Gln	Glu			
																755	760	765
Ile	Leu	Ser	Asn	Leu	Ser	Phe	Pro	Val	Thr	Ile	Gln	Arg	Ala	Thr	Val			
																770	775	780
Trp	Met	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Leu	His	Thr	Gln	Asn	Thr	Gln	Gln	Glu			
																785	790	795
Thr	Leu	Thr	Thr	Ala	His	Leu	Glu	Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Pro			
																805	810	815
Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	His	Tyr	Glu	Val	Val	Gln	Ala	Pro	Arg	Lys	Gly			
																820	825	830
Asn	Leu	Gln	Leu	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Ser	Asp	Gly	Gln	Gly	Phe	Thr			
																835	840	845
Gln	Asp	Asp	Ile	Gln	Ala	Gly	Arg	Val	Thr	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ala	Arg			
																850	855	860
Ala	Ser	Glu	Ala	Val	Glu	Asp	Thr	Phe	Arg	Phe	Arg	Val	Thr	Ala	Pro			

865	870	875	880
Pro Tyr Phe Ser	Pro Leu Tyr Thr Phe	Pro Ile His Ile Gly Gly Asp	
	885	890	895
Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly			
900	905	910	
Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn			
915	920	925	
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg			
930	935	940	
Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe			
945	950	955	960
Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp			
965	970	975	
Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly			
980	985	990	
Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg			
995	1000	1005	
Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile			
1010	1015	1020	
Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr			
1025	1030	1035	
Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp			
1040	1045	1050	
Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile			
1055	1060	1065	
Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln			
1070	1075	1080	
Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala			
1085	1090	1095	
Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln			
1100	1105	1110	
Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg			
1115	1120	1125	
Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly			
1130	1135	1140	
Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile			
1145	1150	1155	
Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg			
1160	1165	1170	

Trp Gly	Gln Leu Val Arg Ala	Gly Gln Pro Ala Thr	Ala Phe Ser
1175	1180	1185	
Gln Gln	Asp Leu Leu Asp Gly	Ala Val Leu Tyr Ser	His Asn Gly
1190	1195	1200	
Ser Leu	Ser Pro Arg Asp Thr	Met Ala Phe Ser Val	Glu Ala Gly
1205	1210	1215	
Pro Val	His Thr Asp Ala Thr	Leu Gln Val Thr Ile	Ala Leu Glu
1220	1225	1230	
Gly Pro	Leu Ala Pro Leu Lys	Leu Val Arg His Lys	Lys Ile Tyr
1235	1240	1245	
Val Phe	Gln Gly Glu Ala Ala	Glu Ile Arg Arg Asp	Gln Leu Glu
1250	1255	1260	
Ala Ala	Gln Glu Ala Val Pro	Pro Ala Asp Ile Val	Phe Ser Val
1265	1270	1275	
Lys Ser	Pro Pro Ser Ala Gly	Tyr Leu Val Met Val	Ser Arg Gly
1280	1285	1290	
Ala Leu	Ala Asp Glu Pro Pro	Ser Leu Asp Pro Val	Gln Ser Phe
1295	1300	1305	
Ser Gln	Glu Ala Val Asp Thr	Gly Arg Val Leu Tyr	Leu His Ser
1310	1315	1320	
Arg Pro	Glu Ala Trp Ser Asp	Ala Phe Ser Leu Asp	Val Ala Ser
1325	1330	1335	
Gly Leu	Gly Ala Pro Leu Glu	Gly Val Leu Val Glu	Leu Glu Val
1340	1345	1350	
Leu Pro	Ala Ala Ile Pro Leu	Glu Ala Gln Asn Phe	Ser Val Pro
1355	1360	1365	
Glu Gly	Gly Ser Leu Thr Leu	Ala Pro Pro Leu Leu	Arg Val Ser
1370	1375	1380	
Gly Pro	Tyr Phe Pro Thr Leu	Leu Gly Leu Ser Leu	Gln Val Leu
1385	1390	1395	
Glu Pro	Pro Gln His Gly Ala	Leu Gln Lys Glu Asp	Gly Pro Gln
1400	1405	1410	
Ala Arg	Thr Leu Ser Ala Phe	Ser Trp Arg Met Val	Glu Glu Gln
1415	1420	1425	
Leu Ile	Arg Tyr Val His Asp	Gly Ser Glu Thr Leu	Thr Asp Ser
1430	1435	1440	
Phe Val	Leu Met Ala Asn Ala	Ser Glu Met Asp Arg	Gln Ser His
1445	1450	1455	
Pro Val	Ala Phe Thr Val Thr	Val Leu Pro Val Asn	Asp Gln Pro

1460	1465	1470
Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala		
1475	1480	1485
Thr Ala Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp		
1490	1495	1500
Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn		
1505	1510	1515
Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser		
1520	1525	1530
Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His		
1535	1540	1545
Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly		
1550	1555	1560
Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys		
1565	1570	1575
Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys		
1580	1585	1590
Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser		
1595	1600	1605
Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val		
1610	1615	1620
Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser		
1625	1630	1635
Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala		
1640	1645	1650
Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp		
1655	1660	1665
Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala		
1670	1675	1680
Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala		
1685	1690	1695
Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu		
1700	1705	1710
Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu		
1715	1720	1725
Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser		
1730	1735	1740
Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly		
1745	1750	1755

Gln Leu	Leu Val	Ser Glu	Glu Pro	Leu His	Ala Gly	Gln Pro	His	
1760			1765		1770			
Phe Leu	Gln Ser	Gln Leu	Ala Ala	Gly Gln	Leu Val	Tyr Ala	His	
1775			1780		1785			
Gly Gly	Gly Gly	Thr Gln	Gln Asp	Gly Phe	His Phe	Arg Ala	His	
1790			1795		1800			
Leu Gln	Gly Pro	Ala Gly	Ala Ser	Val Ala	Gly Pro	Gln Thr	Ser	
1805			1810		1815			
Glu Ala	Phe Ala	Ile Thr	Val Arg	Asp Val	Asn Glu	Arg Pro	Pro	
1820			1825		1830			
Gln Pro	Gln Ala	Ser Val	Pro Leu	Arg Leu	Thr Arg	Gly Ser	Arg	
1835			1840		1845			
Ala Pro	Ile Ser	Arg Ala	Gln Leu	Ser Val	Val Asp	Pro Asp	Ser	
1850			1855		1860			
Ala Pro	Gly Glu	Ile Glu	Tyr Glu	Val Gln	Arg Ala	Pro His	Asn	
1865			1870		1875			
Gly Phe	Leu Ser	Leu Val	Gly Gly	Gly Leu	Gly Pro	Val Thr	Arg	
1880			1885		1890			
Phe Thr	Gln Ala	Asp Val	Asp Ser	Gly Arg	Leu Ala	Phe Val	Ala	
1895			1900		1905			
Asn Gly	Ser Ser	Val Ala	Gly Ile	Phe Gln	Leu Ser	Met Ser	Asp	
1910			1915		1920			
Gly Ala	Ser Pro	Pro Leu	Pro Met	Ser Leu	Ala Val	Asp Ile	Leu	
1925			1930		1935			
Pro Ser	Ala Ile	Glu Val	Gln Leu	Arg Ala	Pro Leu	Glu Val	Pro	
1940			1945		1950			
Gln Ala	Leu Gly	Arg Ser	Ser Leu	Ser Gln	Gln Gln	Leu Arg	Val	
1955			1960		1965			
Val Ser	Asp Arg	Glu Glu	Pro Glu	Ala Ala	Tyr Arg	Leu Ile	Gln	
1970			1975		1980			
Gly Pro	Gln Tyr	Gly His	Leu Leu	Val Gly	Gly Arg	Pro Thr	Ser	
1985			1990		1995			
Ala Phe	Ser Gln	Phe Gln	Ile Asp	Gln Gly	Glu Val	Val Phe	Ala	
2000			2005		2010			
Phe Thr	Asn Phe	Ser Ser	Ser His	Asp His	Phe Arg	Val Leu	Ala	
2015			2020		2025			
Leu Ala	Arg Gly	Val Asn	Ala Ser	Ala Val	Val Asn	Val Thr	Val	
2030			2035		2040			
Arg Ala	Leu Leu	His Val	Trp Ala	Gly Gly	Pro Trp	Pro Gln	Gly	

2045	2050	2055
Ala Thr Leu Arg Leu Asp	Pro Thr Val Leu Asp	Ala Gly Glu Leu
2060	2065	2070
Ala Asn Arg Thr Gly Ser	Val Pro Arg Phe Arg	Leu Leu Glu Gly
2075	2080	2085
Pro Arg His Gly Arg Val	Val Arg Val Pro Arg	Ala Arg Thr Glu
2090	2095	2100
Pro Gly Gly Ser Gln Leu	Val Glu Gln Phe Thr	Gln Gln Asp Leu
2105	2110	2115
Glu Asp Gly Arg Leu Gly	Leu Glu Val Gly Arg	Pro Glu Gly Arg
2120	2125	2130
Ala Pro Gly Pro Ala Gly	Asp Ser Leu Thr Leu	Glu Leu Trp Ala
2135	2140	2145
Gln Gly Val Pro Pro Ala	Val Ala Ser Leu Asp	Phe Ala Thr Glu
2150	2155	2160
Pro Tyr Asn Ala Ala Arg	Pro Tyr Ser Val Ala	Leu Leu Ser Val
2165	2170	2175
Pro Glu Ala Ala Arg Thr	Glu Ala Gly Lys Pro	Glu Ser Ser Thr
2180	2185	2190
Pro Thr Gly Glu Pro Gly	Pro Met Ala Ser Ser	Pro Glu Pro Ala
2195	2200	2205
Val Ala Lys Gly Gly Phe	Leu Ser Phe Leu Glu	Ala Asn Met Phe
2210	2215	2220
Ser Val Ile Ile Pro Met	Cys Leu Val Leu Leu	Leu Leu Ala Leu
2225	2230	2235
Ile Leu Pro Leu Leu Phe	Tyr Leu Arg Lys Arg	Asn Lys Thr Gly
2240	2245	2250
Lys His Asp Val Gln Val	Leu Thr Ala Lys Pro	Arg Asn Gly Leu
2255	2260	2265
Ala Gly Asp Thr Glu Thr	Phe Arg Lys Val Glu	Pro Gly Gln Ala
2270	2275	2280
Ile Pro Leu Thr Ala Val	Pro Gly Gln Gly Pro	Pro Pro Gly Gly
2285	2290	2295
Gln Pro Asp Pro Glu Leu	Leu Gln Phe Cys Arg	Thr Pro Asn Pro
2300	2305	2310
Ala Leu Lys Asn Gly Gln	Tyr Trp Val	
2315	2320	
<210> 10		
<211> 2222		

<212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> CSPG4 [UniProtKB Q6UVK1]
 <400> 10
 Met Gln Ser Gly Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
 20 25 30
 Phe Gly Glu Asn His Leu Glu Val Pro Val Ala Thr Ala Leu Thr Asp
 35 40 45
 Ile Asp Leu Gln Leu Gln Phe Ser Thr Ser Gln Pro Glu Ala Leu Leu
 50 55 60
 Leu Leu Ala Ala Gly Pro Ala Asp His Leu Leu Leu Gln Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Gln Val Arg Leu Val Leu Gly Gln Glu Glu Leu Arg Leu
 85 90 95
 Gln Thr Pro Ala Glu Thr Leu Leu Ser Asp Ser Ile Pro His Thr Val
 100 105 110
 Val Leu Thr Val Val Glu Gly Trp Ala Thr Leu Ser Val Asp Gly Phe
 115 120 125
 Leu Asn Ala Ser Ser Ala Val Pro Gly Ala Pro Leu Glu Val Pro Tyr
 130 135 140
 Gly Leu Phe Val Gly Gly Thr Gly Thr Leu Gly Leu Pro Tyr Leu Arg
 145 150 155 160
 Gly Thr Ser Arg Pro Leu Arg Gly Cys Leu His Ala Ala Thr Leu Asn
 165 170 175
 Gly Arg Ser Leu Leu Arg Pro Leu Thr Pro Asp Val His Glu Gly Cys
 180 185 190
 Ala Glu Glu Phe Ser Ala Ser Asp Asp Val Ala Leu Gly Phe Ser Gly
 195 200 205
 Pro His Ser Leu Ala Ala Phe Pro Ala Trp Gly Thr Gln Asp Glu Gly
 210 215 220
 Thr Leu Glu Phe Thr Leu Thr Thr Gln Ser Arg Gln Ala Pro Leu Ala
 225 230 235 240
 Phe Gln Ala Gly Gly Arg Arg Gly Asp Phe Ile Tyr Val Asp Ile Phe
 245 250 255
 Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu
 260 265 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser		
275	280	285
Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro		
290	295	300
Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly		
305	310	315
Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln		
	325	330
Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu		
	340	345
Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg		
	355	360
Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu		
	370	375
Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr		
385	390	395
Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val		
	405	410
Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu		
	420	425
Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu		
	435	440
Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg		
450	455	460
Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu		
465	470	475
Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu		
	485	490
Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu		
	500	505
Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val		
	515	520
Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile		
	530	535
Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly		
545	550	555
Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu		
	565	570
Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe		

	580		585		590
Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln					
595			600		605
Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly					
610			615		620
Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe					
625			630		635
Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val					
	645		650		655
Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg					
	660		665		670
Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val					
	675		680		685
Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr					
	690		695		700
Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val					
705			710		715
Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val					
	725		730		735
Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala					
	740		745		750
Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu					
	755		760		765
Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val					
	770		775		780
Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu					
785			790		795
Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro					
	805		810		815
Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly					
	820		825		830
Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr					
	835		840		845
Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg					
	850		855		860
Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro					
865			870		875
Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp					
	885		890		895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly		
900	905	910
Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn		
915	920	925
Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg		
930	935	940
Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe		
945	950	955
Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp		
965	970	975
Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly		
980	985	990
Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg		
995	1000	1005
Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile		
1010	1015	1020
Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr		
1025	1030	1035
Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp		
1040	1045	1050
Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile		
1055	1060	1065
Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln		
1070	1075	1080
Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala		
1085	1090	1095
Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln		
1100	1105	1110
Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg		
1115	1120	1125
Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly		
1130	1135	1140
Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile		
1145	1150	1155
Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg		
1160	1165	1170
Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser		
1175	1180	1185
Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly		

1190	1195	1200
Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr	Met Ala Phe Ser Val	Glu Ala Gly
1205	1210	1215
Pro Val His Thr Asp Ala Thr	Leu Gln Val Thr Ile	Ala Leu Glu
1220	1225	1230
Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys	Leu Val Arg His Lys	Lys Ile Tyr
1235	1240	1245
Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala	Glu Ile Arg Arg Asp	Gln Leu Glu
1250	1255	1260
Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro	Pro Ala Asp Ile Val	Phe Ser Val
1265	1270	1275
Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly	Tyr Leu Val Met Val	Ser Arg Gly
1280	1285	1290
Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro	Ser Leu Asp Pro Val	Gln Ser Phe
1295	1300	1305
Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr	Gly Arg Val Leu Tyr	Leu His Ser
1310	1315	1320
Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp	Ala Phe Ser Leu Asp	Val Ala Ser
1325	1330	1335
Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu	Gly Val Leu Val Glu	Leu Glu Val
1340	1345	1350
Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu	Glu Ala Gln Asn Phe	Ser Val Pro
1355	1360	1365
Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu	Ala Pro Pro Leu Leu	Arg Val Ser
1370	1375	1380
Gly Pro Tyr Phe Pro Thr Leu	Leu Gly Leu Ser Leu	Gln Val Leu
1385	1390	1395
Glu Pro Pro Gln His Gly Ala	Leu Gln Lys Glu Asp	Gly Pro Gln
1400	1405	1410
Ala Arg Thr Leu Ser Ala Phe	Ser Trp Arg Met Val	Glu Glu Gln
1415	1420	1425
Leu Ile Arg Tyr Val His Asp	Gly Ser Glu Thr Leu	Thr Asp Ser
1430	1435	1440
Phe Val Leu Met Ala Asn Ala	Ser Glu Met Asp Arg	Gln Ser His
1445	1450	1455
Pro Val Ala Phe Thr Val Thr	Val Leu Pro Val Asn	Asp Gln Pro
1460	1465	1470
Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr	Gly Leu Gln Met Trp	Glu Gly Ala
1475	1480	1485

Thr Ala	Pro Ile	Pro Ala	Glu Ala	Leu Arg	Ser Thr	Asp Gly	Asp
1490			1495			1500	
Ser Gly	Ser Glu	Asp Leu	Val Tyr	Thr Ile	Glu Gln	Pro Ser	Asn
1505			1510			1515	
Gly Arg	Val Val	Leu Arg	Gly Ala	Pro Gly	Thr Glu	Val Arg	Ser
1520			1525			1530	
Phe Thr	Gln Ala	Gln Leu	Asp Gly	Gly Gly	Leu Val	Leu Phe	Ser His
1535			1540			1545	
Arg Gly	Thr Leu	Asp Gly	Gly Gly	Phe Arg	Phe Arg	Leu Ser	Asp Gly
1550			1555			1560	
Glu His	Thr Ser	Pro Gly	His Phe	Phe Arg	Val Thr	Ala Gln	Lys
1565			1570			1575	
Gln Val	Leu Leu	Ser Leu	Lys Gly	Ser Gln	Thr Leu	Thr Val	Cys
1580			1585			1590	
Pro Gly	Ser Val	Gln Pro	Leu Ser	Ser Gln	Thr Leu	Arg Ala	Ser
1595			1600			1605	
Ser Ser	Ala Gly	Thr Asp	Pro Gln	Leu Leu	Leu Tyr	Arg Val	Val
1610			1615			1620	
Arg Gly	Pro Gln	Leu Gly	Arg Leu	Phe His	Ala Gln	Gln Asp	Ser
1625			1630			1635	
Thr Gly	Glu Ala	Leu Val	Asn Phe	Thr Gln	Ala Glu	Val Tyr	Ala
1640			1645			1650	
Gly Asn	Ile Leu	Tyr Glu	His Glu	Met Pro	Pro Glu	Pro Phe	Trp
1655			1660			1665	
Glu Ala	His Asp	Thr Leu	Glu Leu	Gln Leu	Ser Ser	Pro Pro	Ala
1670			1675			1680	
Arg Asp	Val Ala	Ala Thr	Leu Ala	Val Ala	Val Ser	Phe Glu	Ala
1685			1690			1695	
Ala Cys	Pro Gln	Arg Pro	Ser His	Leu Trp	Lys Asn	Lys Gly	Leu
1700			1705			1710	
Trp Val	Pro Glu	Gly Gln	Arg Ala	Arg Ile	Thr Val	Ala Ala	Leu
1715			1720			1725	
Asp Ala	Ser Asn	Leu Leu	Ala Ser	Val Pro	Ser Pro	Gln Arg	Ser
1730			1735			1740	
Glu His	Asp Val	Leu Phe	Gln Val	Thr Gln	Phe Pro	Ser Arg	Gly
1745			1750			1755	
Gln Leu	Leu Val	Ser Glu	Glu Pro	Leu His	Ala Gly	Gln Pro	His
1760			1765			1770	
Phe Leu	Gln Ser	Gln Leu	Ala Ala	Gly Gln	Leu Val	Tyr Ala	His

1775	1780	1785
Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His		
1790	1795	1800
Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser		
1805	1810	1815
Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro		
1820	1825	1830
Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg		
1835	1840	1845
Ala Pro Glu Val Pro Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln		
1850	1855	1860
Gln Gln Leu Arg Val Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala		
1865	1870	1875
Tyr Arg Leu Ile Gln Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly		
1880	1885	1890
Gly Arg Pro Thr Ser Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly		
1895	1900	1905
Glu Val Val Phe Ala Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His		
1910	1915	1920
Phe Arg Val Leu Ala Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val		
1925	1930	1935
Val Asn Val Thr Val Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly		
1940	1945	1950
Pro Trp Pro Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu		
1955	1960	1965
Asp Ala Gly Glu Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe		
1970	1975	1980
Arg Leu Leu Glu Gly Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro		
1985	1990	1995
Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe		
2000	2005	2010
Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly		
2015	2020	2025
Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr		
2030	2035	2040
Leu Glu Leu Trp Ala Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu		
2045	2050	2055
Asp Phe Ala Thr Glu Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val		
2060	2065	2070

Ala Leu	Leu Ser Val Pro Glu	Ala Ala Arg Thr Glu	Ala Gly Lys
2075	2080	2085	
Pro Glu	Ser Ser Thr Pro Thr	Gly Glu Pro Gly Pro	Met Ala Ser
2090	2095	2100	
Ser Pro	Glu Pro Ala Val Ala	Lys Gly Gly Phe Leu	Ser Phe Leu
2105	2110	2115	
Glu Ala	Asn Met Phe Ser Val	Ile Ile Pro Met Cys	Leu Val Leu
2120	2125	2130	
Leu Leu	Leu Ala Leu Ile Leu	Pro Leu Leu Phe Tyr	Leu Arg Lys
2135	2140	2145	
Arg Asn	Lys Thr Gly Lys His	Asp Val Gln Val Leu	Thr Ala Lys
2150	2155	2160	
Pro Arg	Asn Gly Leu Ala Gly	Asp Thr Glu Thr Phe	Arg Lys Val
2165	2170	2175	
Glu Pro	Gly Gln Ala Ile Pro	Leu Thr Ala Val Pro	Gly Gln Gly
2180	2185	2190	
Pro Pro	Pro Gly Gly Gln Pro	Asp Pro Glu Leu Leu	Gln Phe Cys
2195	2200	2205	
Arg Thr	Pro Asn Pro Ala Leu	Lys Asn Gly Gln Tyr	Trp Val
2210	2215	2220	

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列ARD107 VH CDR1

<400> 11

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn

1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列ARD107 VH CDR2

<400> 12

Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 13

<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列ARD107 VH CDR3
<400> 13
Phe Asp Tyr
1
<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列ARD107 VL CDR1
<400> 14
Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列ARD107 VL CDR2
<400> 15
Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5
<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列ARD107 VL CDR3
<400> 16
Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列接头

<220>

<221> VARIANT

<222> (6) ... (25)

<223>氨基酸6-25、11-25、16-25或21-25可以存在或不存在

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列六组氨酰基标签

<400> 18

His His His His His His

1 5

<210> 19

<211> 1329

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 针对VH和IgG1的合成序列ARD107编码序列

<400> 19

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc	60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag	120
tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac	180
aacccatctc tcaaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc	240
ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac	300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc	360
ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcgccctt gggctgcctg	420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc	480
ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag tctcaggac tctactcctt cagcagcgtg	540
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag	600
cccagcaaca ccaagtgga caagaaagt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca	660
tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca	720

aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac	780
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	840
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	960
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa	1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg	1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc	1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1320
ggtaaata	1329
<210> 20	
<211> 645	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 针对ARD107 VL和Igκ的合成序列编码序列	
<400> 20	
gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagagacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct	240
gaagatatgt ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttegggtga	300
ggcaccaagc tggaatatca acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	645
<210> 21	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列ARD107 VH编码区	
<400> 21	
gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctctgaaac cttctcagtc tctgtctctc	60
acctgctctg tcaactggcta ctccatcacc agtggttatt actggaactg gatccggcag	120
tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac	180

aacccatctc tcaaaaatcg aatctccatc actcgtgaca catctaagaa ccagtttttc	240
ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc ggactttgac	300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca	336
<210> 22	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列ARD107 VL编码区	
<400> 22	
gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagagacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct	240
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttcgggtga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321
<210> 23	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列VH信号序列	
<400> 23	
atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtcgcgattc ttaagggtgt ccaatgc	57
<210> 24	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列VL信号序列	
<400> 24	
atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggctgctgc tgctgtggtt ccccggatcc	60
cgatgc	66
<210> 25	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列人源化ARD107 VH1	

<400> 25

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

<210> 26

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH2

<400> 26

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

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH3

<400> 27

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

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH4

<400> 28

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

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VL1

<400> 29

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Lys Leu Pro Trp
           85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105

```

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VL2

<400> 30

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp

```

	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210>	31		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	合成序列人源化ARD107 VL3		
<400>	31		
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210>	32		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	合成序列人源化ARD107 VL4		
<400>	32		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 33
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列人源化ARD107 H1重链
 <400> 33
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly
20				25				30							
Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp
35				40				45							
Met	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
50				55				60							
Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65				70				75				80			
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85				90				95							
Ala	Asp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
100				105				110							
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
115				120				125							
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
130				135				140							
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
145				150				155				160			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
165				170				175							
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
180				185				190							
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
195				200				205							
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
210				215				220							
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
225				230				235				240			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
245				250				255							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
260				265				270							
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
275				280				285							
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
290				295				300							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
305				310				315				320			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly

	325		330		335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu					
	340		345		350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr					
	355		360		365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn					
	370		375		380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe					
385		390		395	400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn					
	405		410		415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr					
	420		425		430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		
<210>	35				
<211>	442				
<212>	PRT				
<213>	人工序列(Artificial Sequence)				
<220>					
<223>	合成序列人源化ARD107 H3重链				
<400>	35				
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln					
1	5		10		15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly					
	20		25		30
Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp					
	35		40		45
Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu					
	50		55		60
Lys Asn Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe					
65		70		75	80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	100		105		110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys					
	115		120		125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr					

130	135	140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
145	150	155
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
180	185	190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
195	200	205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
225	230	235
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
245	250	255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
275	280	285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
340	345	350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	

<210> 36
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列人源化ARD107 H4重链
 <400> 36
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 210 215 220
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 225 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
275	280	285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
325	330	335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
340	345	350
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
355	360	365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
370	375	380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
405	410	415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
420	425	430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 L1轻链

<400> 37

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 38

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 L2轻链

<400> 38

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala															
100								105						110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly															
115								120						125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala															
130								135						140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln															
145								150						155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser															
165								170						175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr															
180								185						190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser															
195								200						205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys															
210															
<210>	39														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	合成序列人源化ARD107 L3轻链														
<400>	39														
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly															
1				5					10					15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr															
20								25						30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile															
35								40						45	
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His 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 Glu Pro															
65								70						75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp															
85									90					95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala															
100									105					110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly															
115									120					125	

Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
130						135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
	195						200					205			
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
210															
<210>	40														
<211>	214														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	合成序列人源化ARD107 L4轻链														
<400>	40														
Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Arg	Asn	Tyr
		20					25						30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
	35					40						45			
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65				70					75					80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Lys	Leu	Pro	Trp
			85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
		100					105						110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
	115					120						125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135					140				
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145					150					155					160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 41

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH1

<400> 41

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagac cctgtctctc	60
acctgcaccg tctctggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag	120
tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac	180
aacccatctc tcaaaaatcg agtgaccatc agccgtgaca catctaagaa ccagtttagc	240
ctgaagttga gctctgtgac tgcggcggac acagctgtgt attactgtgc ggactttgac	300
tactggggcc aaggcaccac tgtgacagtc tcctca	336

<210> 42

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH2

<400> 42

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctcgtgaaac cttctcagac cctgtctctc	60
acctgcaccg tctctggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag	120
tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac	180
aacccatctc tcaaaaatcg agtgaccatc agccgtgaca catctaagaa ccagtttagc	240
ctgaagttga gctctgtgac tgcggaggac acagctgtgt attactgtgc ggactttgac	300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca	336

<210> 43

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH3

<400> 43

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctctgtgaaac cttctcagac cctgtctctc	60
acctgcaccg tctctggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag	120
tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac	180
aacccatctc tcaaaaatcg aatcaccatc agccgtgaca catctaagaa ccagtttttc	240
ctgaagtga gctctgtgac tgcggcggac acagctgtgt attactgtgc ggactttgac	300
tactggggcc aaggcaccac tgtgacagtc tcctca	336

<210> 44

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VH4

<400> 44

gaggtccagc tgcaggagtc aggacctggc ctctgtgaaac cttctcagac cctgtctctc	60
acctgcaccg tctctggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag	120
tttccaggaa acaagctgga atggatgggc tacataacct acgacggtag caataactac	180
aacccatctc tcaaaaatcg aatcaccatc agccgtgaca catctaagaa ccagtttttc	240
ctgaagtga gctctgtgac tgcggaggac acagctgtgt attactgtgc ggactttgac	300
tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca	336

<210> 45

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VL1

<400> 45

gatattcagc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggaga cagagtcacc	60
atcacctgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat ttaccctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaage ttccttgac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

<210> 46

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VL2

<400> 46

gatattcagc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggaga cagagtcacc	60
atcacctgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tataccctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

<210> 47

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VL3

<400> 47

gatattcagc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggaga cagagtcacc	60
atcacctgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat ttaccctca ccatcagcag cctggaacct	240
gaagattttg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

<210> 48

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人源化ARD107 VL4

<400> 48

gatattgtgc tcacacagtc tccatcctcc ctgtctgcct ctgtgggaga cagagtcacc	60
atcacctgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagtt tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tataccctca ccatcagcag cctggaacct	240
gaagatattg ccacttacta ttgtcagcag tatagtaagc ttccttggac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

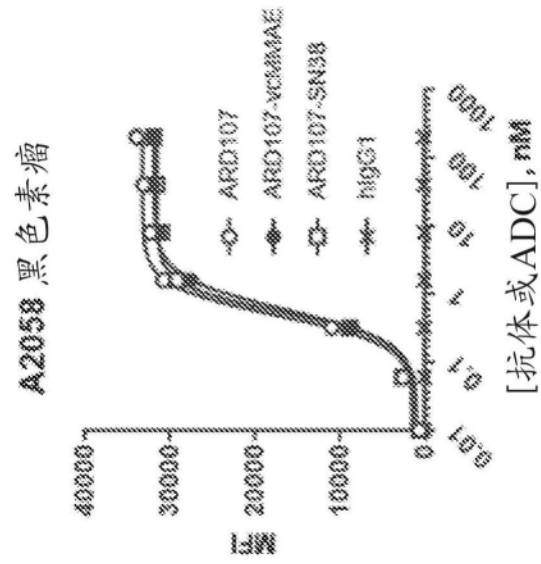


图1A

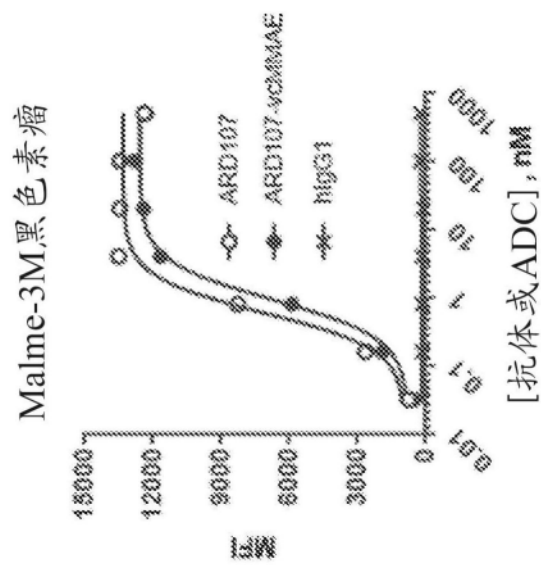


图1B

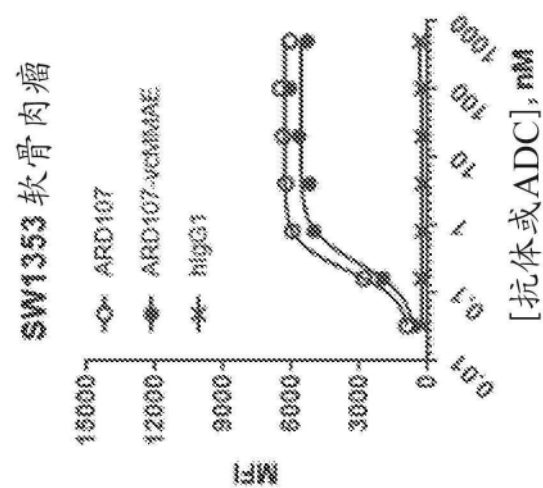


图1C

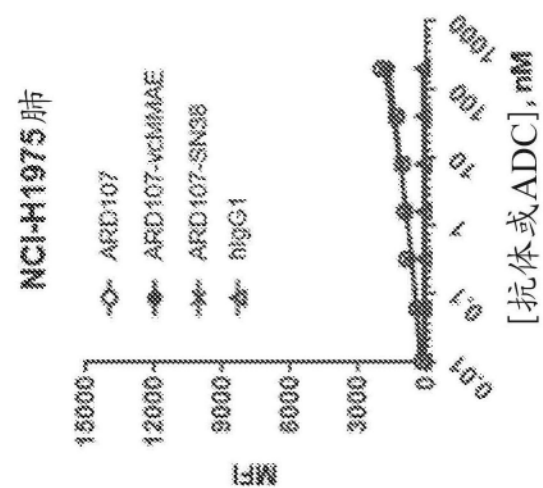


图1D

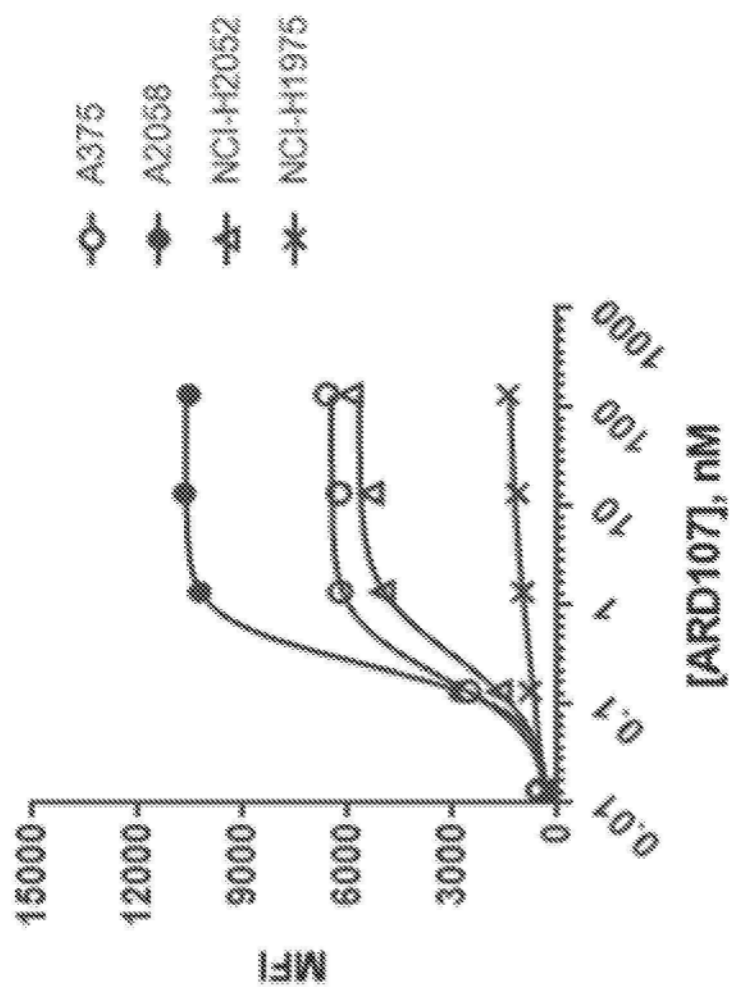


图2

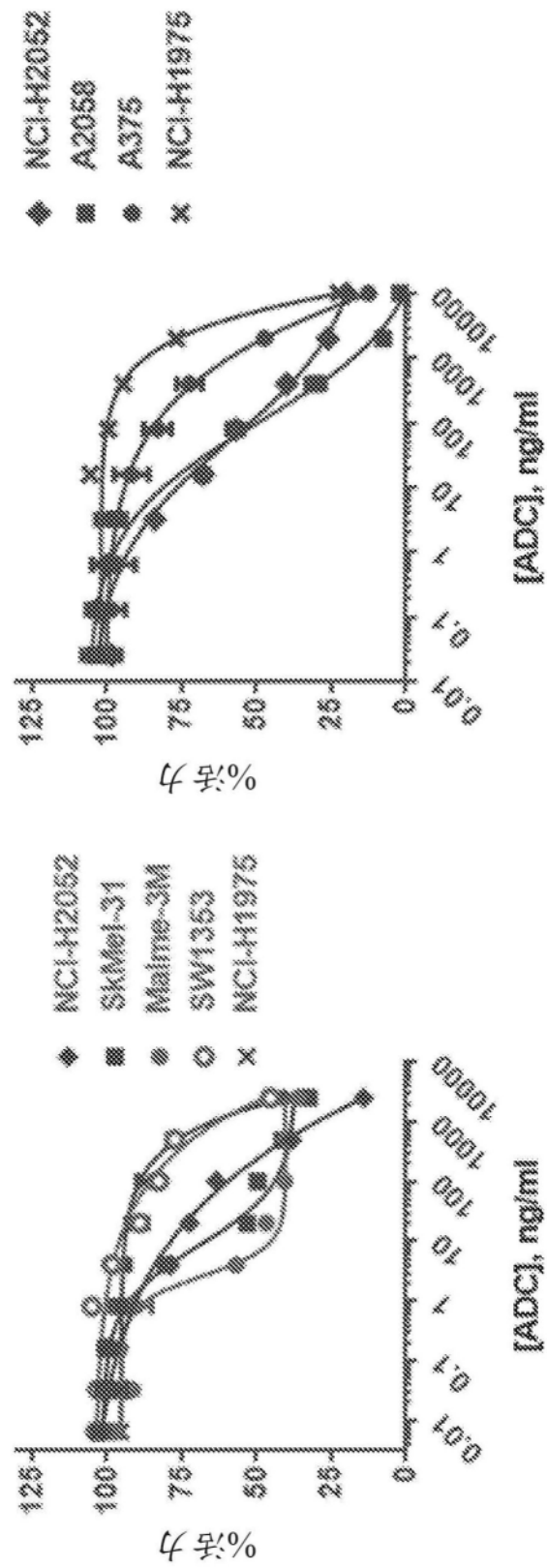


图3

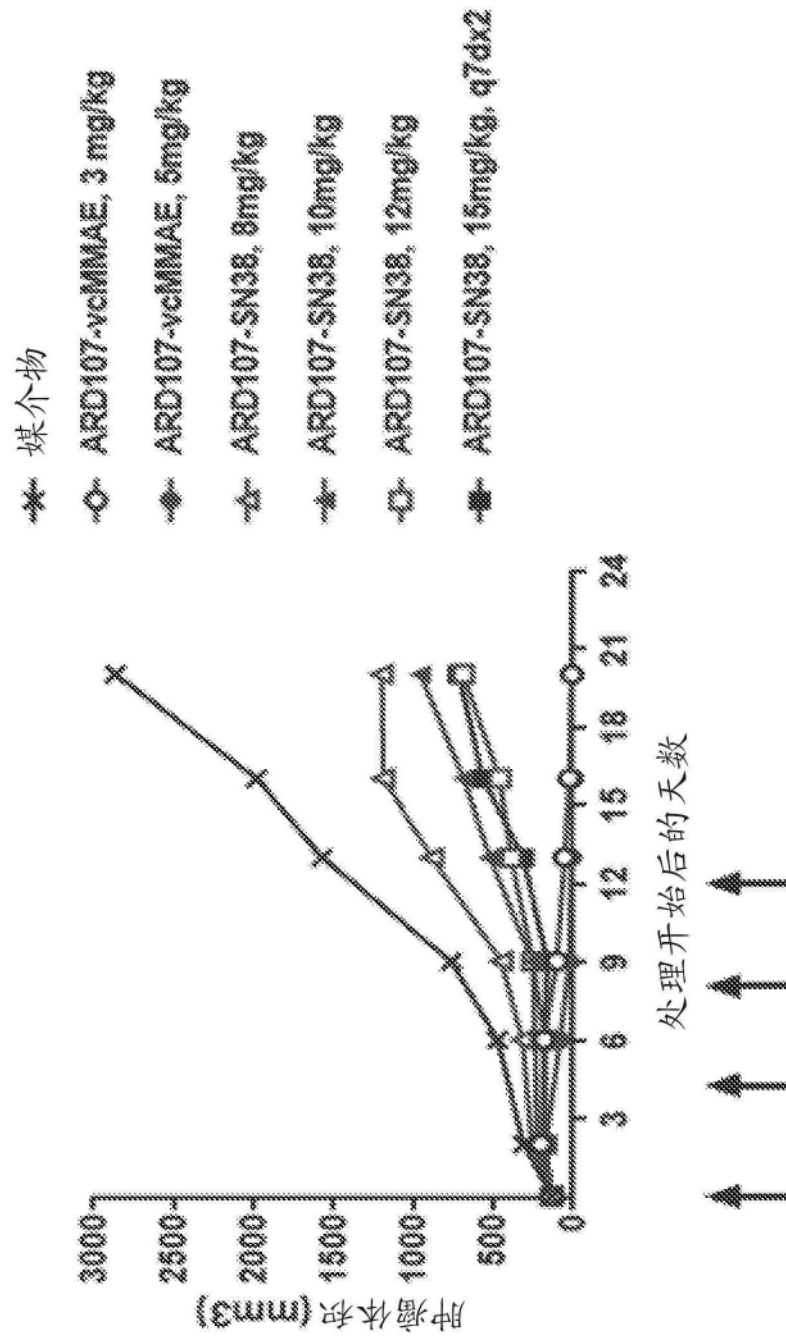


图4

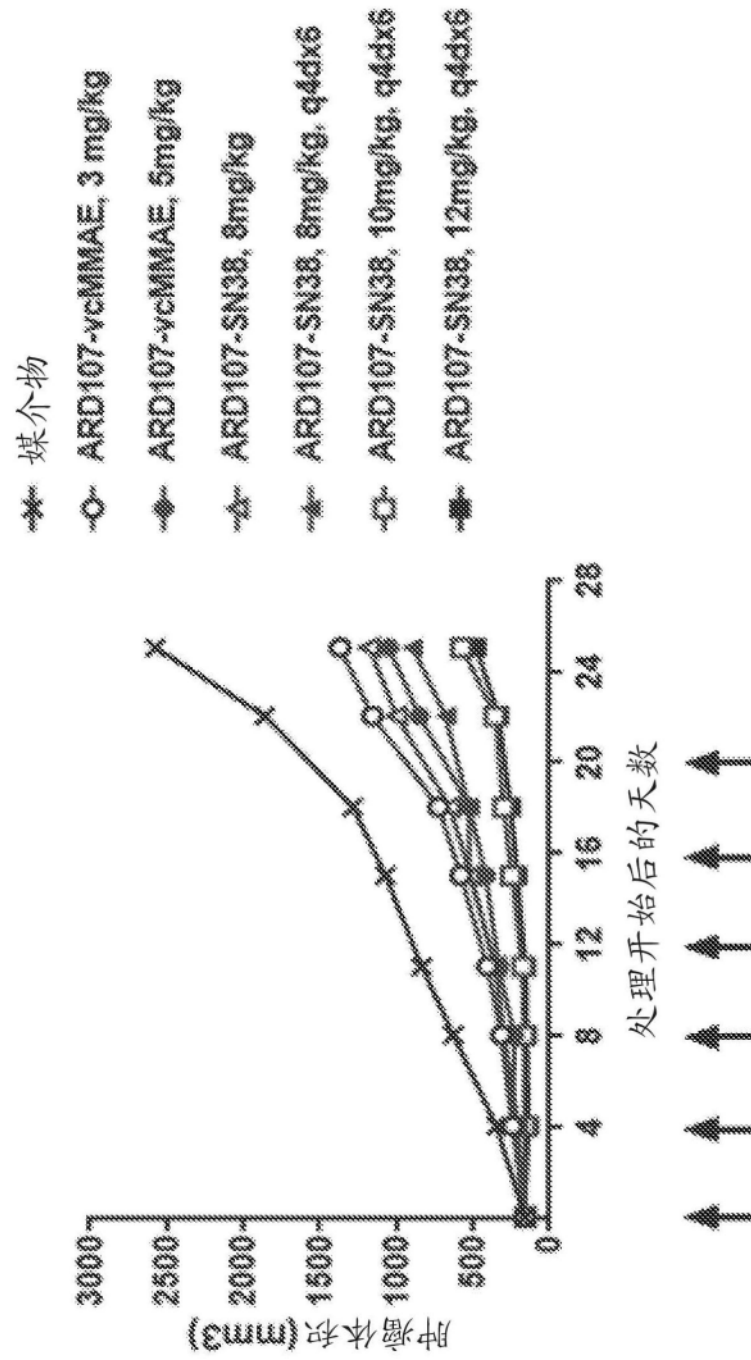


图5

测试试剂描述	缀合/富集/纯化	DAR4 (%)	载药量	结合 hCSPG4 (EC50, ng/ml)
ARD107 mAb	未缀合的	N/A	0	21
ARD107-vcMMAE	随机缀合	45	4.2	23
ARD107-vcMMAE [DAR4]	富集4-负载的缀合	71.5	4.0	20
ARD107-vcMMAE [HIC]	4-负载的随机/HIC纯化	92	4.0	17
ARD107-Gly-vcMMAE	富集4-负载的缀合	70	3.9	17

图6

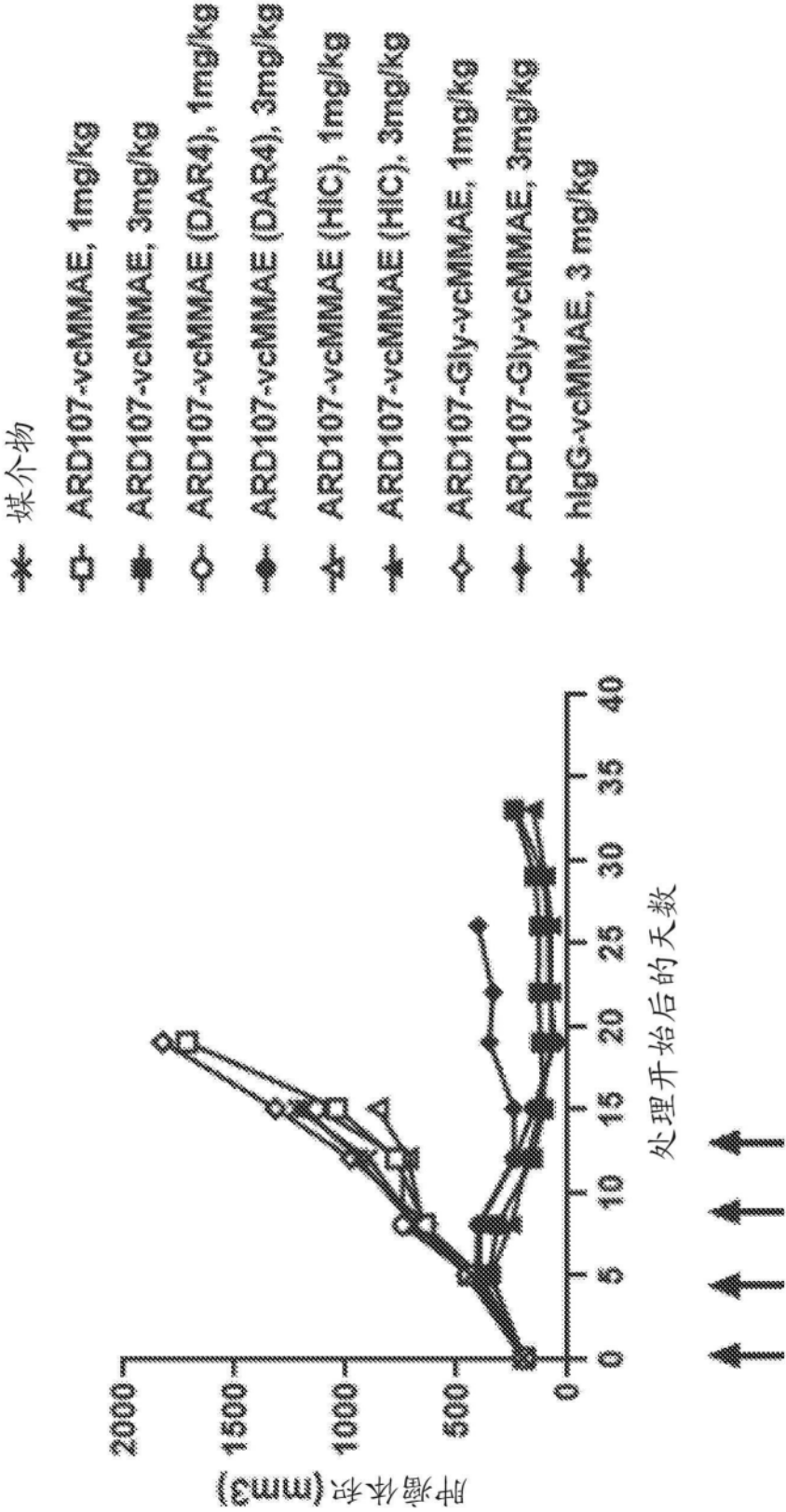


图7

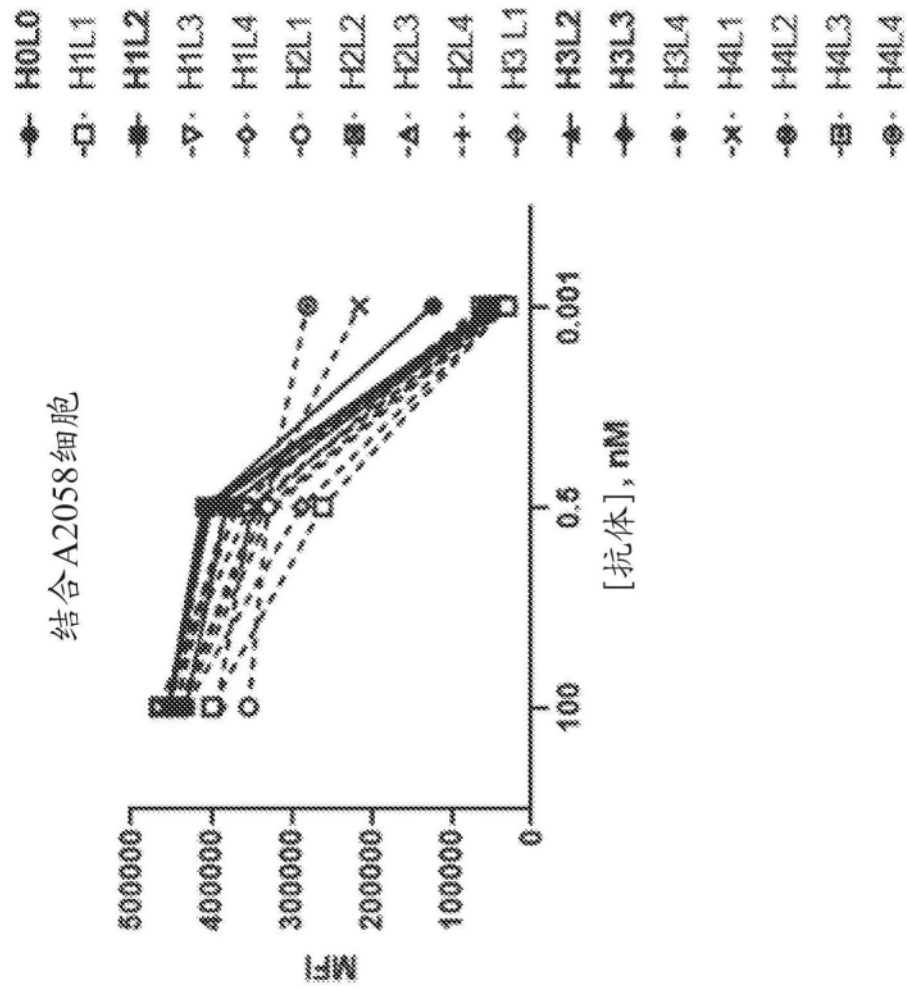


图8A

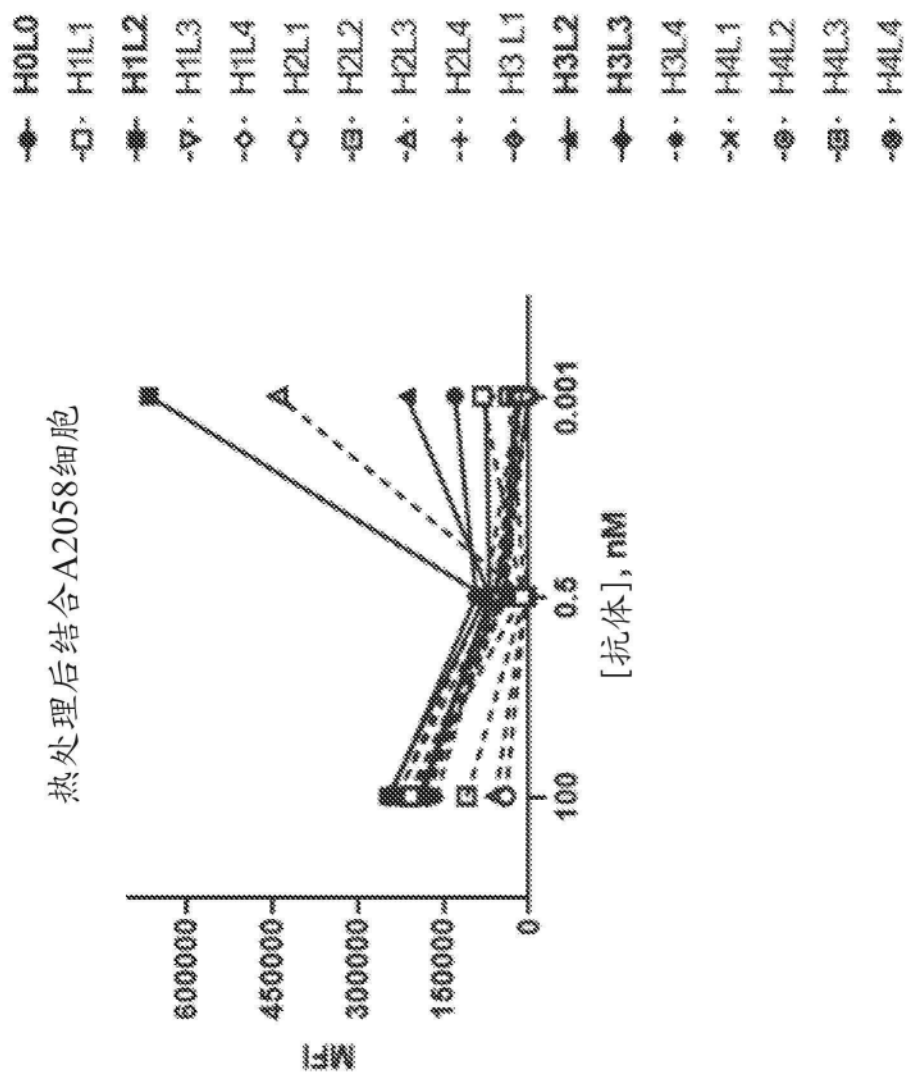


图8B

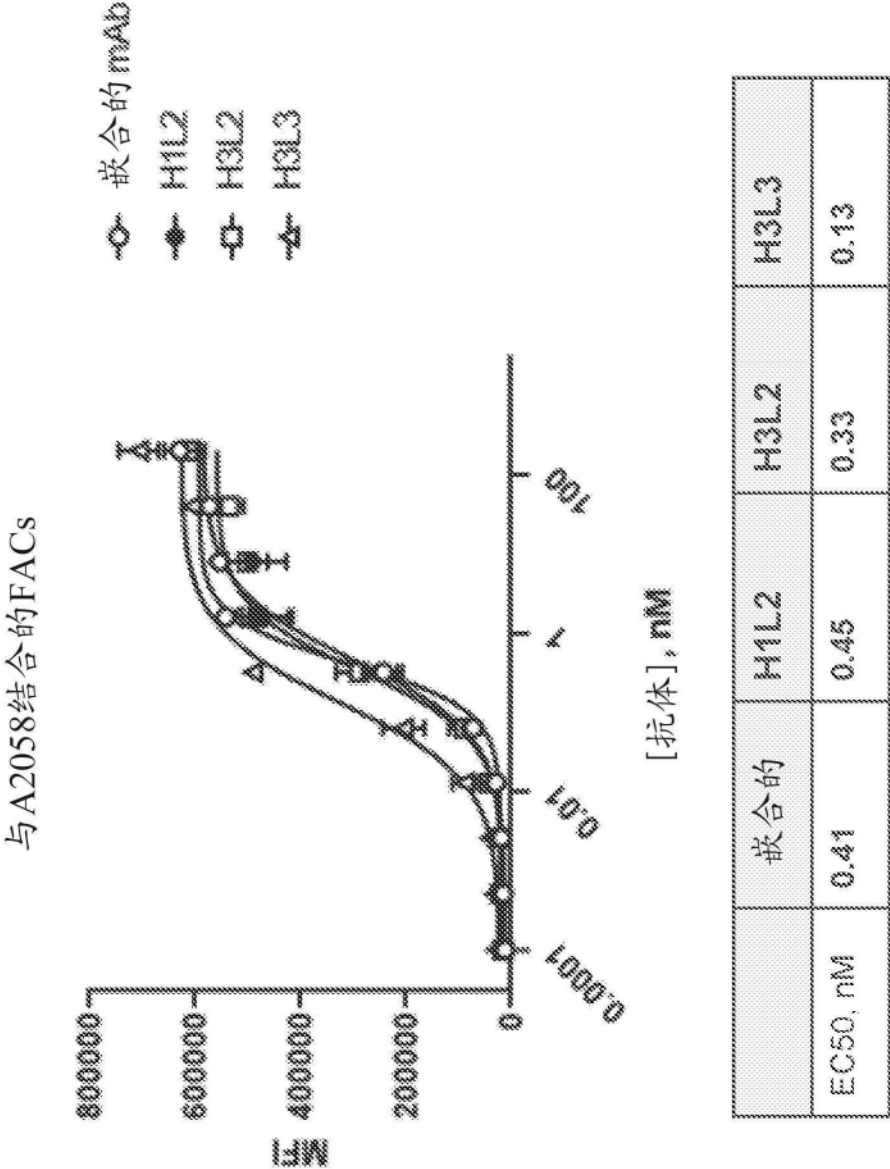


图9A

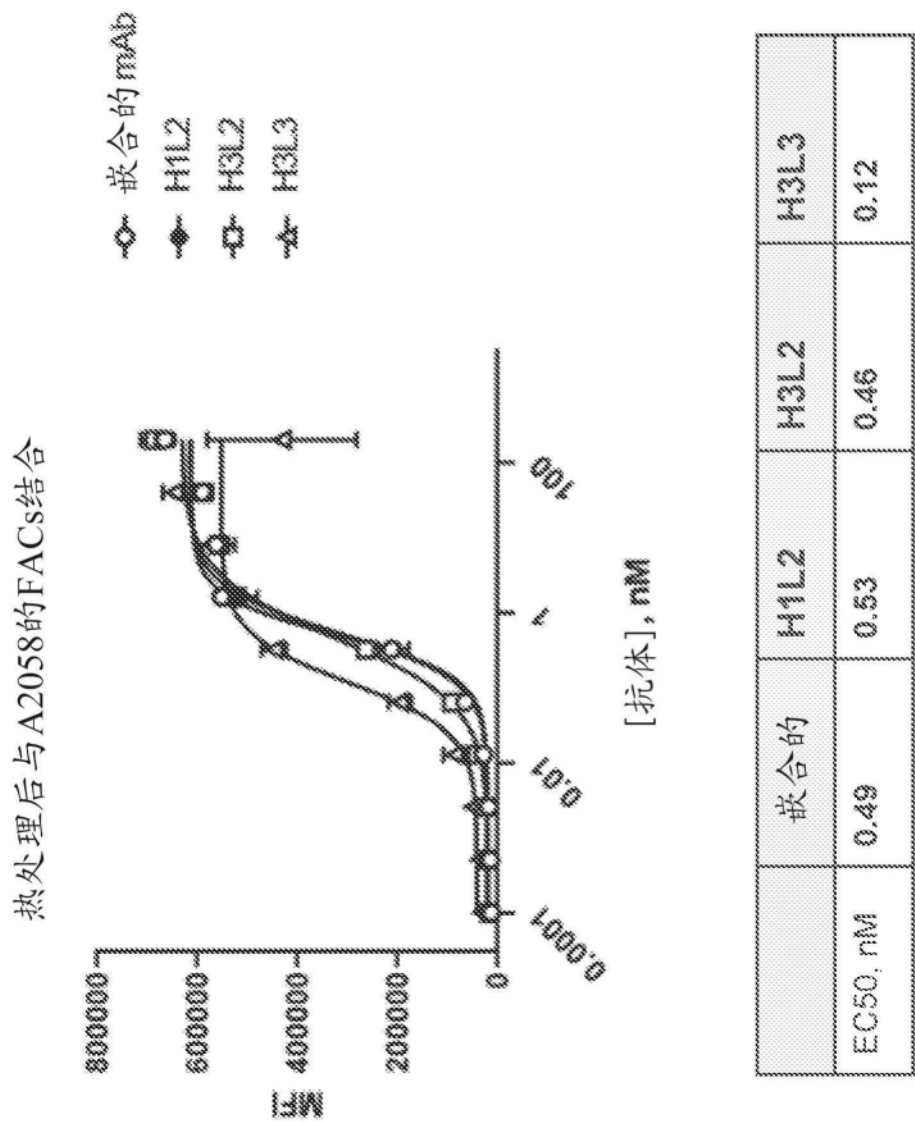


图9B

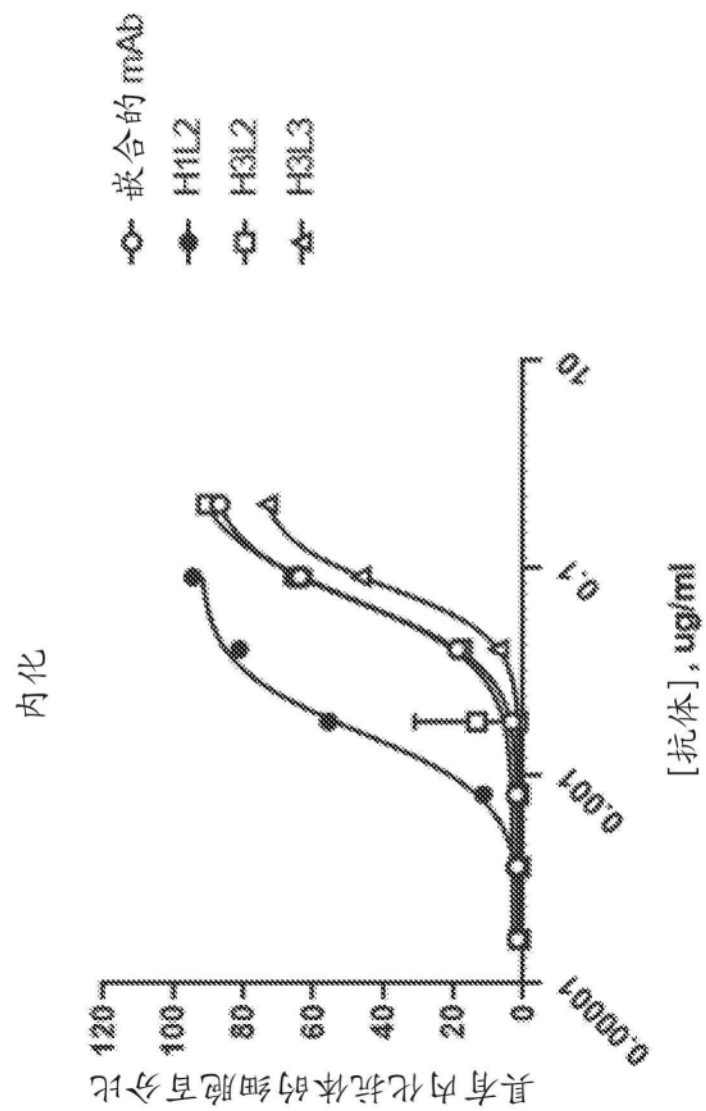


图10