



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I374032B1

(45)公告日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 11 日

(21)申請案號：098118092

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**A61P35/02 (2006.01)*

(30)優先權：2008/05/30 美國

61/130,394

2008/05/30 美國

61/130,395

2008/05/30 美國

61/130,539

(71)申請人：應克隆公司(美國) IMCLONE LLC (US)

美國

(72)發明人：李意文 LI, YIWEN (US)；盧丹 LU, DAN (US)；沙格拉茲 大衛 SURGULADZE,

DAVID (GE)；湯拉 詹母士 R TONRA, JAMES R. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Williams B et al., "Cell-based selection of internalizing fully human antagonistic antibodies directed against FLT3 for suppression of leukemia cell growth", *Leukemia*, Vol.19, P.1432-1438, 2005/06/02

Li Y et al., "Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody", *BLOOD*, Vol.104, No.4, P.1137-1144, 2004/08/15

Piloto O et al., "Inhibitory Anti-FLT3 Antibodies Are Capable of Mediating Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Reducing Engraftment of Acute Myelogenous Leukemia Blasts in Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice", *Cancer Research*, Vol.65, No.4, P.1514-1522, 2005/02/15

Piloto1 O et al., "IMC-EB10, an Anti-FLT3 Monoclonal Antibody, Prolongs Survival and Reduces Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Engraftment of Some Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines and Primary Leukemic Samples", *Cancer Research*, Vol.66, No.9, P.4843-4851, 2006/05/01

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：16 項 圖式數：0 共 0 頁

(54)名稱

抗 F L T 3 抗體

ANTI-FLT3 ANTIBODIES

(57)摘要

本發明提供以高親和力在細胞外結構域 4 或 5 內與人類 FLT3 特異性結合之完全人類抗體。本發明進一步提供治療白血病之方法，藉由投與有效量之抗體，單獨或與包括甲胺蝶呤之抗癌劑或治療組合。

The present invention provides fully human antibodies that specifically bind to human FLT3 within extracellular domains 4 or 5 with high affinity. The invention further provides methods of treating leukemia by administering an effective amount of an antibody either alone or in combination with an anti-cancer agent or treatment including methotrexate.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於對人類Fms樣酪胺酸激酶3受體(FLT3)具有特異性之人類抗體，包括其片段或部分。該等抗體可用於治療癌細胞生長，且可單獨或與包括但不限於甲胺蝶呤(MXT)之抗腫瘤劑組合使用來治療白血病。

【先前技術】

人類Fms樣酪胺酸激酶3受體(FLT3)亦稱為胎肝激酶2(FLK-2)、幹細胞酪胺酸激酶1(STK-1)及CD135 (SEQ ID NO:43)，其為III類受體酪胺酸激酶之成員。通常，FLT3在未成熟骨髓-淋巴細胞前體細胞及樹突細胞前體上表現，但很少在成熟成人細胞上表現。FLT3在約90%的急性骨髓性白血病(AML)、大部分急性淋巴細胞白血病(ALL)及慢性骨髓性白血病之急性轉化期(blast-crisis phase)(BC-CML)中過表現。FLT3配體(FL)刺激可增強白血病細胞增殖及存活。抑制FLT3信號轉導會導致成熟樹突細胞死亡並抑制免疫應答。

小分子抑制劑並非完全FLT3特異性的且可能發生抗藥性。因此，小分子FLT3抑制劑仍未提供用於白血病之有效靶向療法。吾人高度期望可滿足該未滿足之醫學需要的新穎治療方法。抗體方法可克服與小分子FLT3抑制劑有關之一些缺點。第一，抗體對界定之抗原具有特異性，因此避免了由抑制多種激酶而造成之潛在副作用。第二，FLT3中和抗體靶向細胞外結構域，其較激酶結構域不易突變，降

低了發生抗藥性之可能性。第三，抗體可募集免疫效應子機制(例如抗體依賴性細胞毒性(ADCC)及/或補體調介之細胞毒性(CMC))來殺死目標腫瘤細胞，使得治療功效提高。最後，FLT3特異性抗體對野生型(尤其在中和抗體情形下)及突變體FLT3(由於免疫效應子機制)均具有活性，擴大了目標患者群體。

研發白血病治療劑之過去成就包括FLT3抑制劑(Li Y.等人，Int. J. Hematol. 82(2):108-14 (2005). Li Y., Drug Development Research 67(6):495-500 (2006). Li Y.等人，Expert Opinion in Biological Therapy 7(3):319-330 (2007))，其在很大程度上未成功。其他研發策略包括：US 5,777,084 雜交瘤抗體；WO 95/27062激動型抗體；WO 94/28391配體抗體；WO 2005/094823小分子。

Zheng R.等人，Blood 103(1):267-274 (2004). Li Y.等人，Blood 104(4):1137-44 (2004). Piloto, O.等人，Cancer Res. 65(4):1514-22 (2005). Williams B.等人，Leukemia 19(8):1432-8 (2005). Piloto O.等人，Cancer Res. 66(9):4843-51 (2006). Piloto O.等人，Blood 109(4):1643-1652 (2007) 及Brent R.等人，AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles (2007)，揭示對FLT3受體具有高結合親和力之人類拮抗型抗體。

包括EB10、NC7及D4-3在內之數種抗FLT3抗體可抑制FLT3之配體依賴型(野生型受體)以及非配體依賴型(突變受體)激活(參見Piloto, Cancer Res.，見上文)。通常，配體在

結構域1-3處結合酪胺酸激酶受體。在本發明之前，本發明抗FLT3抗體之準確CDR序列及抗原決定部位結合結構域仍未知。

另外，需要提供與彼等熟習此項技術者所習知之抑制劑相比對FLT3具有高結合親和力並阻斷配體與FLT3受體之結合且因此抑制FLT3及其信號轉導路徑激活之替代抗FLT3抑制劑。本發明力圖提供與彼等熟習此項技術者所習知之抑制劑相比對FLT3具有改良之配體阻斷及結合親和力的替代抗FLT3抗體。

亦需要提供可誘導細胞表面FLT3之快速且有效內在化及下行調節的替代抗FLT3抑制劑。本發明力圖提供與彼等熟習此項技術者所習知之抑制劑相比可誘導細胞表面FLT3之快速且有效內在化及下行調節的人類抗FLT3抗體。

亦需要提供可在白血病中抑制FL誘導之野生型FLT3及MPK、PI3K、及STAT5路徑之下游激酶磷酸化的替代抗FLT3抑制劑。本發明力圖提供與彼等熟習此項技術者所習知之抑制劑相比可在白血病中抑制FL誘導之野生型FLT3及MPK、PI3K、及STAT5路徑之下游激酶磷酸化的人類抗FLT3抗體。

此外，亦需要提供具有提高之激活下游免疫效應子功能(例如抗體依賴性細胞毒性(ADCC))之能力的替代抗FLT3抑制劑。本發明力圖提供與彼等熟習此項技術者所習知之抑制劑相比具有提高之激活下游免疫效應子功能(包括抗體依賴性細胞毒性(ADCC))之能力的人類抗FLT3抗體。

完全人類或人類化抗體具有成功用作人類治療劑之最大潛力，此乃因其與諸如 WO 95/07348及 WO 98/25457中之鼠科動物或嵌合抗體相比在人類中具有較低免疫原性。本發明抗體具有該等上述特徵，因此可提供顯著優點。

在本發明之前，人們一直認為FLT3抑制劑與甲胺蝶呤(MTX)之組合對於治療白血病沒有益處。此見解源於所報導之下述發現：在使用小分子FLT3抑制劑與甲胺蝶呤之組合和白血病細胞系一起培養時對於治療白血病無效，而與其他化學療法之組合則有效(Furukawa, Y.等人，Leukemia (2007) 21:1005-1014)。與本發明有關之實驗結果表明，實際上將靶向FLT3之抗體(稱為EB10)與MTX組合可在白血病動物模型中顯著提高存活率。

【發明內容】

本發明提供與人類FLT3之結構域D4或D5內之抗原決定部位結合的抗體或其片段。

本發明提供在哺乳動物中治療癌前病狀或癌症之方法，其包含以有效治療癌前病狀或癌症的量向哺乳動物投與MTX與FLT3抑制劑之組合。本發明亦提供包含相連接之FLT3抑制劑與MTX之偶聯物。

本發明係關於以不大於 4.5×10^{-10} M之親和力結合人類抗原FLT3 (SEQ ID NO:43)之人類抗體及其片段，此係對於可溶性FLT3-Fc融合蛋白在25°C下藉由表面電漿共振而測定。本發明亦係關於與人類抗原FLT3結合之人類單株拮抗型抗體及其片段。

本發明之一個態樣係結合FLT3之抗體或其片段，其包含CDRH1，具有序列GYTFTSYMH (SEQ ID NO:1)或SYMH (SEQ ID NO:2)；CDRH2，具有序列IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:3)；CDRH3，具有序列GVGAHDADFID (SEQ ID NO:4)或VVAAAVADY (SEQ ID NO:5)；CDRL1，具有序列RSSQSLLHSNGNNYLD (SEQ ID NO:6)或RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO:7)；CDRL2，具有序列LGSNRAS (SEQ ID NO:8)；及CDRL3，具有序列MQGTHPAIS (SEQ ID NO:9)或MQSLQTPFT (SEQ ID NO:11)。

本發明之一個態樣係結合FLT3之抗體或其片段，其包含CDRH1，具有序列GYTFTSYMH (SEQ ID NO:1)或SYMH (SEQ ID NO:2)；CDRH2，具有序列IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:3)；CDRH3，具有序列GVGAHDADFID (SEQ ID NO:4)；CDRL1，具有序列RSSQSLLHSNGNNYLD (SEQ ID NO:6)；CDRL2，具有序列LGSNRAS (SEQ ID NO:8)；及CDRL3，具有序列MQGTHPAIS (SEQ ID NO:9)。在再一態樣中，具有上述CDR之抗體以不大於 4.5×10^{-10} M之親和力與人類FLT3特異性結合，此係在25°C下藉由表面電漿共振而測定。

在本發明之另一態樣中，特異性結合FLT3之抗體或其片段包含CDRH1，具有序列GYTFTSYMH (SEQ ID NO:1)或SYMH (SEQ ID NO:2)；CDRH2，具有序列IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:3)；CDRH3，具有序列VVAAAVADY (SEQ ID NO:5)；CDRL1，具有序列RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ

ID NO:7); CDRL2, 具有序列LGSNRAS (SEQ ID NO:8); 及CDRL3, 具有序列MQSLQTPFT (SEQ ID NO:11)。

在本發明之另一態樣中, 特異性結合FLT3之抗體或其片段包含CDRH1, 具有序列GGTFSSYAIS (SEQ ID NO:12) 或 SYAIS (SEQ ID NO:13); CDRH2, 具有序列GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:14); CDRH3, 具有序列FALFGFREQAFDI (SEQ ID NO:15); CDRL1, 具有序列RASQSISSYLN (SEQ ID NO:16); CDRL2, 具有序列AASSLQS (SEQ ID NO:17); 及CDRL3, 具有序列QQSYSTPFT (SEQ ID NO:18)。

本發明之另一態樣係結合FLT3且包含VL及VH之抗體或其片段, 該VL具有序列:

DVVM TQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQSLLHSNGNNYLD
WYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGV PDRFSGSGSDTDFTL
QISRVEAEDVGVYYCMQGTHPAISFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:22),

且該VH具有序列:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVW
RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRTMTRDTS
TSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO:19)。

本發明之另一態樣係結合FLT3且包含VL及VH之抗體或其片段, 該VL具有序列:

DVVM TQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLD

WYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIK (SEQ
ID NO:24),

且該 VH 具有序列：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWA
RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARVVAAGVADYWGQGT
LVTVSS (SEQ ID NO:21)。

本發明之另一態樣係結合 FLT3 且包含 VL 及 VH 之抗體或
其片段，該 VL 具有序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK
PKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPELATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK (SEQ ID NO:23),

且該 VH 具有序列：

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR
QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKST
STAYMELSSLRSEDVAVYYCATFALFGFREQA
FDIWGQGT VTVSS (SEQ ID NO:20)。

本發明之另一態樣係包含以下之單株抗體：SEQ ID
NO:28 輕鏈及 SEQ ID NO:25 重鏈；或 SEQ ID NO:29 輕鏈及
SEQ ID NO:26 重鏈；或 SEQ ID NO:30 輕鏈及 SEQ ID
NO:27 重鏈。在本發明之另一態樣中，抗體包含兩條 SEQ
ID NO:28 輕鏈及兩條 SEQ ID NO:25 重鏈；或包含兩條 SEQ
ID NO:29 輕鏈及兩條 SEQ ID NO:26 重鏈；或包含兩條 SEQ

ID NO:30輕鏈及兩條SEQ ID NO:27重鏈。該等抗體之FLT3結合片段係本發明之一部分。

本發明亦係關於編碼該等抗體及其部分之經分離DNA。本發明之其他態樣包括：包含編碼該抗體或其片段之核苷酸序列的經分離聚核酸；包含與表現序列連接之該核苷酸序列的表現載體；或包含該表現載體之重組宿主細胞；或表現該抗體或其片段之重組宿主細胞或其子代。本發明之再一態樣係產生或純化抗體或其片段之方法，其包含在容許表現該抗體或其片段之條件下培養細胞。

另外，本發明係關於抑制癌細胞生長之方法、及治療白血病之方法，所有該等方法皆在哺乳動物中藉由投與有效量之抗體來實施。本發明抗體可用於治療腫瘤性疾病(包括實體及非實體腫瘤)、及用於治療白血病。本發明之一個態樣係使用先前所述抗體或其片段作為藥劑。在再一態樣中，先前所述抗體或其片段擬用於治療癌症，包括但不限於白血病。本發明亦提供本發明抗體用以製造用於治療癌症之藥劑的用途。在一較佳實施例中，癌症係白血病。

本發明抗體可單獨或與抗腫瘤劑或治療組合使用。本發明之一個態樣係與額外抗癌劑或治療組合來使用先前所述抗體。在再一態樣中，抗癌劑係甲胺蝶呤。

【實施方式】

天然存在之抗體通常具有兩條相同重鏈及兩條相同輕鏈，每條輕鏈藉由鏈間二硫鍵與重鏈共價連接。多個二硫鍵進一步將該兩條重鏈相互連接。基因工程抗體可涵蓋對

天然存在抗體之結構及/或形式作出的多種改變。本文所用之術語「抗體」包括包含藉由二硫鍵相互連接之4條多肽鏈兩條重鏈(H)及兩條輕鏈(L)之免疫球蛋白分子。各鏈可摺疊成具有類似大小(110-125個胺基酸)及結構但不同功能之結構域。

輕鏈可包含一個可變結構域(在本文中縮寫為VL)及/或一個恆定結構域(在本文中縮寫為CL)。抗體(免疫球蛋白)之輕鏈為卡帕(K)輕鏈或蘭姆達(λ)輕鏈。本文所用之措詞VL意欲包括來自K型輕鏈之可變區(VK)及來自 λ 型輕鏈之可變區(V λ)二者。輕鏈恆定區包含一個結構域CL。

重鏈亦可包含一個可變結構域(在本文中縮寫為VH)及/或端視抗體類型或同種型而包含三個或四個恆定結構域(CH1、CH2、CH3及CH4)(在本文中共同縮寫為CH)。在人類中，同種型為IgA、IgD、IgE、IgG、及IgM，其中IgA及IgG進一步再分成數個亞類或亞型(IgA₁₋₂及IgG₁₋₄)。本發明包括任何上述抗體類型或亞類。人類IgG₁係本發明抗體之較佳同種型。

通常而言，可變結構域顯示各抗體間具有相當大之胺基酸序列可變性，尤其在抗原結合位點位置處。在每一VL及VH中可以看到三個稱為超變區或互補決定區(在本文中縮寫為CDR)之區域，其由稱為框架區(在本文中縮寫為FR)之較不變化區域所支撐。根據Kabat條約(Kabat等人，Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971)；Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，美國健康及

人類服務部 (U.S. Department of Health and Human Services)，NIH 公開案第 91-3242 號 (1991)) 或 Chothia 條約 (C. Chothia 及 A.M. Lesk, J. Mol. Biol. 196 (4):901-917 (1987).)(A. Martin, <http://www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html>) 將胺基酸分配至特定 CDR 區或結構域。每一 VH 及 VL 由 3 個 CDR 及 4 個 FR 構成，其自胺基末端至羧基末端之排列順序如下：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

由 VL 及 VH 結構域組成之抗體部分稱為 Fv (可變片段) 且構成抗原結合位點。單鏈 Fv (scFv) 係在一條多肽鏈上含有 VL 結構域及 VH 結構域之抗體片段，其中一個結構域之 N 末端與另一結構域之 C 末端藉由撓性連接體連接 (參見，例如，美國專利第 4,946,778 號 (Ladner 等人)；WO 88/09344 (Huston 等人)；WO 92/01047 (McCafferty 等人) 闡述了在可溶重組基因呈現封包 (例如噬菌體) 表面上呈現 scFv 片段)。

用於產生單鏈抗體之肽連接體可為撓性肽，其經選擇以確保 VL 及 VH 結構域發生適當三維摺疊及連接。連接體通常為 10 至 50 個胺基酸殘基。較佳地，連接體為 10 至 30 個胺基酸殘基。更佳地，連接體為 12 至 30 個胺基酸殘基。最佳之連接體為 15 至 25 個胺基酸殘基。該等連接體肽之非限制性實例為 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃。

「經分離抗體」係具有如下性質之抗體：(1) 已自組份混合物部分、基本上、或完全純化；(2) 已得到鑒定並自其天然環境組份分離及/或回收；(3) 單株；(4) 不含來自相同物種之其他蛋白質；(5) 由來自不同物種之細胞表現；或

(6)非天然存在。其天然環境之污染組份係會干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素、及其他蛋白質或非蛋白質溶質。經分離抗體之實例包括經親和純化之抗體、藉由雜交瘤或其他活體外細胞系製得之抗體、及衍生自轉基因小鼠之人類抗體。

本文所用之術語「單株抗體」係指自一群實質上同源之抗體獲得的抗體，例如，構成該抗體群的單個抗體除了可存在可能天然存在之突變或較少轉譯後變異外實質上相同。單株抗體具有高度特異性，其針對單個抗原位點(亦稱為決定簇或抗原決定部位)。此外，與通常包括針對不同決定簇之不同抗體之習用(多株)抗體製品相反，每一單株抗體僅針對抗原上之單個決定簇。修飾詞「單株」表明該抗體係自實質上同源之抗體群獲得之特徵，且不能理解為需要藉助任一特定方法來產生該抗體。

本文所用之術語「人類抗體」包括具有對應於人類種系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區的抗體(如Kabat等人，見上文及Chothia等人，見上文中所述)。本發明之人類抗體在(例如)CDR內可包括非由人類種系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(舉例而言，藉由活體外隨機誘變或定點誘變或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。該人類抗體之至少一個位置由胺基酸殘基、例如非由人類種系免疫球蛋白序列編碼之活性增強胺基酸殘基所置換。然而，本文所用之術語「人類抗體」不欲包括其中衍生自另一哺乳動物物種(例如小鼠)種系之CDR序列接枝到人類框架序列上

之抗體。

片語「重組人類抗體」包括藉由重組手段製備、表現、產生或分離之人類抗體，例如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體、分離自重組、組合人類抗體文庫之抗體、分離自人類免疫球蛋白基因轉基因動物之抗體、或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列拼接至其他DNA序列之任何其他手段而製備、表現、產生或分離之抗體。此等重組人類抗體具有衍生自人類種系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區(參見，Kabat等人，見上文及Chothia等人，見上文)。

Fc(片段，可結晶區域)係指由成對重鏈恆定結構域組成之抗體部分或片段。例如，在IgG抗體中，Fc包含CH₂及CH₃結構域。IgA或IgM抗體之Fc進一步包含CH₄結構域。Fc與Fc受體結合、補體調介之細胞毒性(CMC)及ADCC之激活有關。對於諸如IgA及IgM等抗體(其為多種IgG樣蛋白質之複合物)而言，複合物形成需要Fc恆定結構域。

因此，本發明抗體包括(但不限於)天然存在之抗體、抗體、人類抗體、人類化抗體、重組人類抗體、單株抗體、消化片段、其指定部分及變體，包括抗體模擬物或包含模擬抗體或其指定片段或部分之結構及/或功能的抗體部分；每一含有至少一個CDR。功能片段包括結合FLT3抗原之抗原結合片段。例如，能夠結合FLT3或其一部分且為本發明所涵蓋之抗體片段包括二價片段，例如具有完整鏈間二硫鍵之(Fab')₂；單價片段，例如Fab(抗原結合片段)，其

係指由 VL-CL VL-CH1 結構域組成且不保留重鏈鉸鏈區之抗體片段(例如，藉由木瓜蛋白酶消化)；保留重鏈鉸鏈區之 fab、facb(例如，藉由纖維溶酶消化)、 $F(ab')_2$ 、缺少二硫鍵之 Fab'、pFc'(例如，藉由胃蛋白酶或纖維溶酶消化)、Fd(例如，藉由胃蛋白酶消化、部分還原及重聚合)及 Fv 或 scFv(例如，藉由分子生物學技術)。抗體片段亦意欲包括(例如)結構域缺失型抗體、線性抗體、單鏈抗體、scFv、單結構域抗體、多價單鏈抗體、自抗體片段形成之多特異性抗體，包括雙特異性抗體、三特異性抗體、及與抗原特異性結合之諸如此類抗體。

鉸鏈區使抗體之 Fab 與 Fc 部分分開，使 Fab 相對於彼此及相對於 Fc 具有活動性，以及包括用於使兩條重鏈共價連接之多個二硫鍵。

已研發出保留結合特異性但具有其他期望特徵之抗體形式，該等其他期望特徵包括例如雙特異性、多價(多於兩個結合位點)、及緊湊大小(例如，單獨結合結構域)。

本發明抗體對 FLT3 具有特異性。抗體特異性係指抗體選擇性識別抗原之特定抗原決定部位。本發明抗體可為例如單特異性或雙特異性的。雙特異性抗體(BsAb)係具有兩種不同抗原結合特異性或位點的抗體。在抗體具有一種以上特異性之情形下，所識別之抗原決定部位可能與單一抗原或與一種以上抗原有關。因此，本發明提供結合兩種不同抗原且至少一種特異性針對 FLT3 之雙特異性抗體。如上所述，該等抗體包括其任何片段。

本發明抗體或其片段對FLT3之特異性可基於親和力及/或親合力來測定。藉由抗原與抗體之離解平衡常數(K_D)表示之親和力量測抗原決定簇與抗體結合位點間之結合強度。

本發明抗體或其片段與FLT3之抗原決定部位結合，FLT3之抗原決定部位可包含FLT3之5個細胞外結構域區段之任一者(下文中簡稱為「結構域」或「ECD」)，即，D1、D2、D3、D4及D5。本發明抗體或片段結合之抗原決定部位在結構域D4或D5內。抗體EB10及D4-3與FLT3之結構域4內之抗原決定部位結合，而NC7與FLT3之結構域5內之抗原決定部位結合。本文所用之術語「抗原決定部位」係指由本發明抗體識別之抗原上的不連續三維位點。抗原決定部位係複合抗原上之免疫學活性區域，該等區域實際上與B細胞受體結合，且實際上與該B細胞所產生之所得抗體分子結合。抗原通常含有至少一個抗原決定部位且通常含有一個以上抗原決定部位。蛋白質抗原上之抗原決定部位可為線性或非線性的。線性抗原決定部位係彼等蛋白質之胺基酸序列由鄰接胺基酸殘基組成者。線性抗原決定部位可能需要或不需要構象摺疊來形成天然三維結構及引發產生對抗原具有結合特異性之抗體之免疫應答。非線性抗原決定部位由非鄰接胺基酸殘基組成。因此，非線性抗原決定部位需要一定程度之蛋白質摺疊來使需要的胺基酸殘基彼此接近來形成天然三維結構及引發產生對抗原具有結合特異性之抗體之免疫應答。

本發明抗體或其片段與野生型或突變體FLT3結合。例如，突變體或野生型FLT3通常在AML及ALL、以及其他白血病中表現。在約三分之一的急性AML患者中其藉由近膜結構域內部串聯重複(ITD)或藉由通常涉及激酶結構域(KD)之點突變發生突變。兩種突變類型均組成型激活FLT3。除干擾FLT3信號轉導外，抗FLT3抗體亦可誘導ADCC，此可作為誘導細胞毒性之額外機制。

本發明抗體或其片段亦包括彼等結合特徵已藉由定向突變、親和力成熟、噬菌體呈現、或鏈改組方法改變或改良者。親和力及特異性可藉由使CDR及/或FW殘基突變並篩選具有期望特徵之抗原結合位點來改變或改良(參見，例如，Yang等人，J. Mol. Biol. 254:392-403 (1995))。可以多種方式使CDR突變。一種方式係使各殘基或殘基組合隨機化以使在其他方面相同之抗原結合位點群體中兩種至二十種胺基酸之子集可見於特定位置。或者，可藉由易錯PCR方法在多個殘基內引入突變(參見，例如，Hawkins等人，J. Mol. Biol. 226:889-96 (1992))。在另一實例中，含有重鏈及輕鏈可變區基因之噬菌體呈現載體可在大腸桿菌(E. coli)增變菌株中實施繁殖(參見，例如，Low等人，J. Mol. Biol. 250:359-68 (1996))。例如，含有重鏈及輕鏈可變區基因之噬菌體呈現載體可在大腸桿菌增變菌株中實施繁殖(參見，例如，Low等人，J. Mol. Biol. 250:359-368 (1996))。該等誘變方法作為熟習此項技術者所習知之許多方法的例子。

一種產生取代變體之方便方式係使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使數個CDR區之位點突變以在各位點產生所有可能之胺基酸取代。由此產生之抗體變體，當融合至各絲狀噬菌體顆粒中所包裹之M13基因III產物時，以單價形式自絲狀噬菌體顆粒呈現。隨後就本文所揭示變體之生物活性(例如結合親和力、特異性、IC₅₀、EC₅₀、K_D)對噬菌體呈現之變體加以篩選。為鑒定用於修飾之候選CDR區位點，可實施丙胺酸掃描誘變以鑒定明顯促進抗原結合之CDR區殘基。或者(或另外)，可對一或多種CDR序列在一或多個殘基位置上實施隨機誘變，同時使CDR與可變區可操作連接或同時CDR獨立於其他可變區序列，且隨後使用重組DNA技術使經改變之CDR返回到可變區。產生並表現此等變體抗體後，即可使該組變體經受本文所述之篩選且可對在一或多種相關分析中具有優良特性之抗體加以選擇以用於進一步研發。

除本文特別闡述之抗體外，其他經「實質上同源」修飾之抗體可容易地利用彼等熟習此項技術者所熟知之多種重組DNA技術來設計及製造。例如，可藉由數種胺基酸取代、末端及中間添加及缺失、及諸如此類使框架區在主結構層面上不同於原始序列。而且，可單獨或組合使用多種不同人類框架區作為本發明人類化免疫球蛋白之基礎。通常而言，基因修飾可藉由諸如定點誘變等多種熟知技術容易地達成。

本發明包括胺基酸序列與所述全長抗FLT3抗體之可變區

或超變區胺基酸序列實質上相同之FLT3結合多肽。實質上相同之胺基酸序列在本文中定義為與另一胺基酸序列具有至少70%、較佳至少80%、且更佳至少約90%同源性之序列，如根據Pearson及Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8 (1988))藉由FASTA搜索方法所測定。另外，本發明包括保持本發明所揭示抗體之功能特徵的保守胺基酸取代。

本發明包括編碼抗FLT3抗體重鏈之核酸序列，其包含任一VH區或其一部分、或任一VH CDR，包括本文所揭示之其任何變體。本發明亦包括編碼抗FLT3抗體輕鏈之核酸分子，其包含任一VL區或其一部分或任一VL CDR，包括本文所揭示之其任何變體。

本發明抗體之每一結構域可為具有重鏈或輕鏈可變結構域之完全抗體，或其可為天然存在結構域之功能等效物或突變體或衍生物、或(例如)在活體外使用例如闡述於WO 93/11236(Griffiths等人)中之一種技術所構建之合成結構域。例如，可將失去至少一種胺基酸之對應於抗體可變結構域之結構域連接在一起。亦包括在一種CDR序列內具有一或多種胺基酸取代、突變或缺失之抗體。重要特徵係每一結構域能夠與互補結構域結合形成抗原結合位點。因此，術語可變重鏈及輕鏈片段不應理解為排除對特異性無實質效應之變體，包括CDR變體。

本發明抗體可藉由熟習此項技術者所習知之方法來產生。該等方法包括Kohler及Milstein，Nature 256:495-497

(1975)及Campbell, Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas, Burdon等人編輯, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 第13卷, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985)所述之免疫學方法; 以及Huse等人, Science 246:1275-1281 (1989)所述之重組DNA方法。抗體亦可自具有呈scFv或Fab形式之VH及VL結構域組合之噬菌體呈現文庫獲得。VH及VL結構域可藉由合成、部分合成、或天然衍生之核苷酸編碼。在某些實施例中, 具有人類抗體片段之噬菌體呈現文庫可能較佳。人類抗體之其他來源係經基因工程改造而表現人類免疫球蛋白基因之轉基因小鼠。

抗體片段可藉由裂解全抗體或藉由表現編碼該片段之DNA來產生。抗體片段可藉由Lamoyi等人, J. Immunol. Methods 56:235-243 (1983)及Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983)所述之方法來製備。該等片段可含有Fab片段或F(ab')₂片段中的一種或兩種。該等片段亦可含有單鏈片段可變區抗體, 即scFv、雙特異性抗體、或其他抗體片段。產生該等功能等效物之方法揭示於PCT申請案WO 93/21319、歐洲專利申請案第239,400號; PCT申請案WO 89/09622; 歐洲專利申請案338,745; 及歐洲專利申請案EP 332,424中。在整篇本說明書中, 本發明之術語「抗體」包括其任何片段, 不管是否特別說明。

用於轉化載體及表現本發明抗體之較佳宿主細胞係哺乳

動物細胞，例如，NSO細胞(非分泌型(0)小鼠骨髓瘤細胞)、293及CHO細胞及其他淋巴樣來源細胞系，例如淋巴瘤、骨髓瘤、或雜交瘤細胞。或者，可使用諸如酵母等其他真核宿主。

本發明提供對FLT3具有特異性之經分離抗體或其片段。本發明抗體具有一或多種以下活性：1)對FLT3呈現高親和力結合；2)阻斷配體與FLT3受體之結合且因此抑制FLT3及其信號轉導路徑之激活；3)誘導細胞表面FLT3快速且有效內在化及下行調節；4)在白血病中抑制FL誘導之野生型FLT3及MPK、PI3K、及STAT5路徑之下游激酶磷酸化；5)在人類中呈現降低之免疫原性；6)呈現提高之激活下游免疫效應子功能(例如抗體依賴性細胞毒性(ADCC))的能力；7)誘導FLT3受體內在化；及8)在活體外及活體內抑制腫瘤生長。在本發明之一個態樣中，本發明抗FLT3抗體係展示一或多種以下特性之人類抗體，該等特性在整篇說明書中進一步闡明，包括以下實例：

- (i) 抑制FLT3配體(FL)與野生型FLT3之結合；
- (ii) 抑制FL與內部串聯重複突變體FLT3 (FLT3-ITD)之結合；
- (iii) 與FLT3之結構域4及/或結構域5內的抗原決定部位結合；
- (iv) 中和FLT3之FL激活；
- (v) 中和與FL無關之FLT3激活；
- (vi) 調介ADCC；

(vii) 使FLT3內在化；

(viii) 減少表面FLT3；或

(ix) 以不大於約 4.5×10^{-10} M之 K_D 與FLT3結合。

本發明抗體結合至FLT3之外部結構域並抑制FL與FLT3之結合。抑制可藉由例如使用純化或膜結合受體實施直接結合分析來測定。在一個實施例中，本發明抗體或其片段與FLT3之結合強度較佳至少與FLT3天然配體與FLT3之結合強度相同。

本發明抗體可中和FLT3。中和經由多種機制發生。一種機制係FL與FLT3細胞外結構域之結合刺激 β 亞單元自磷酸化及FLT3受質(包括下游路徑之STAT5、Akt、PI3K及MAPK)磷酸化。FLT3之中和亦包括抑制、降低、不活化及/或破壞一或多種通常伴隨信號轉導之該等活性。此外，中和包括抑制FLT3異二聚體以及FLT3同二聚體。因此，中和FLT3具有多種效應，包括抑制、降低、不活化及/或破壞生長(增殖及分化)、血管發生(血管新增、侵入、及轉移)、及細胞運動性及轉移(細胞黏附及侵襲力)。藉由中和FLT3，經由(但不限於)本文揭示之各種機制，本發明抗體可降低FLT3激酶活性，由此抑制疾病進行。

FLT3中和之一個測量係受體之酪胺酸激酶活性之抑制。酪胺酸激酶抑制可利用熟知方法測定；例如，藉由測量重組激酶受體之自磷酸化程度、及/或天然或合成受質之磷酸化。因此，在本發明中磷酸化分析可用以測定中和抗體。可以例如在ELISA分析或西方墨點法中使用對磷酸酪

胺酸具有特異性之抗體來檢測磷酸化。一些酪胺酸激酶活性分析法述於Panek等人，*J. Pharmacol. Exp. Thera.* 283:1433-44 (1997)及Batley等人，*Life Sci.* 62:143-50 (1998)中。本發明抗體使得對於配體反應之細胞中之FLT3的酪胺酸磷酸化顯著降低至少約60%、較佳至少約75%、更佳至少約85-90%。

FLT3中和之另一測量係FLT3之下游受質磷酸化之抑制。因此，可測量STAT5、PI3K、Akt或MAPK之磷酸化程度。

另外，可利用檢測蛋白質表現之方法來測定FLT3中和，其中所測量之蛋白質係由FLT3酪胺酸激酶活性調節。該等方法包括用於檢測蛋白質表現之免疫組織化學(IHC)、用於檢測基因擴增之螢光原位雜交(FISH)、競爭性放射性配體結合分析、固體基質墨點技術(例如北方及南方墨點法)、逆轉錄酶聚合酶鏈反應(RT-PCR)及ELISA。參見例如Grandis等人，*Cancer* 78:1284-92 (1996)；Shimizu等人，*Japan J. Cancer Res.* 85:567-71 (1994)；Sauter等人，*Am. J. Path.* 148:1047-53 (1996)；Collins，*Glia* 15:289-96 (1995)；Radinsky等人，*Clin. Cancer Res.* 1:19-31 (1995)；Petrides等人，*Cancer Res.* 50:3934-39 (1990)；Hoffmann等人，*Anticancer Res.* 17: 4419-26 (1997)；Wikstrand等人，*Cancer Res.* 55:3140-48 (1995)。

亦可利用活體內分析來測定FLT3中和。例如，受體酪胺酸激酶抑制可藉由使用經受體配體刺激之細胞系於存在及

不存在抑制劑下實施促有絲分裂分析來觀測。一種方法涉及測試對表現FLT3之腫瘤細胞或經轉染以表現FLT3之細胞的生長抑制。抑制亦可使用腫瘤模型來觀測，例如將人類腫瘤細胞注射至小鼠中。

本發明並不限於任一特定FLT3中和機制。本發明之抗FLT3抗體能夠(1)自外部結合至FLT3細胞表面受體；(2)阻斷與FL之結合及隨後阻斷經由受體相關之酪胺酸激酶調介之信號轉導；及(3)阻止FLT3及信號轉導級聯中之其他下游蛋白質磷酸化。

在另一實施例中，本發明抗體下行調節FLT3。細胞表面上存在之FLT3的量取決於受體蛋白質之產生、內在化、及降解。細胞表面上存在之FLT3的量可藉由檢測受體或與受體結合之分子的內在化間接量測。例如，受體內在化可藉由使表現FLT3之細胞與標記抗體接觸或用標記抗體包覆表現FLT3之細胞來量測。隨後刮除、收集及計數膜結合抗體。抗體之內在化係藉由裂解細胞並檢測經標記組份來測定。

細胞表面上存在之FLT3的量可藉由在用抗FLT3抗體或其他物質處理後量測細胞上存在之受體的量直接量測，例如，藉由經染色以表面表現FLT3之細胞的螢光激活之細胞分選分析。培育經染色細胞並量測隨時間變化之螢光強度。作為對照，在停止受體內在化之條件下培育一部分經染色群體。

如下文實例中所述，可使用對FLT3具有特異性且不阻斷

所測試抗體之結合或不與所測試抗體競爭結合之不同抗體來檢測及量測細胞表面FLT3。(Burtrum等人, Cancer Res. 63:8912-21 (2003))。在一個實施例中, 用本發明抗體處理表現FLT3之細胞使得細胞表面FLT3減少。

下行調節之另一量度係細胞中存在之總受體蛋白質之減少, 且此量度反映內部受體之降解。因此, 用本發明抗體處理細胞(尤其為癌細胞)可顯著減少總細胞FLT3。

本發明抗體可抑制腫瘤生長。例如, 皮下異種移植物腫瘤可藉由將癌細胞系之細胞注射至免疫缺陷小鼠中來建立。隨後藉由腹膜內注射抗體對小鼠實施治療並每隔一定時間量測腫瘤大小。與對照注射相比, 本發明抗體可抑制腫瘤生長。在一個實施例中, 當將本發明抗體與抗腫瘤劑組合時其可促進腫瘤消退。在又一實施例中, 以單一療法使用之本發明抗體可促進腫瘤消退。促進腫瘤消退意指投與有效量之抗體、或有效量之抗體與抗腫瘤劑之組合可使腫瘤大小減小或腫瘤壞死。腫瘤消退可作為經歷特定治療方案之個體組之平均值來量測, 或可藉由腫瘤消退治療組中之個體數量來量測。

本發明抗體可藉由熟習此項技術者所習知之任何方法來分離或純化, 包括藉由硫酸銨或硫酸鈉沉澱繼之對鹽水透析、離子交換層析、親和層析或免疫親和層析以及凝膠過濾或區帶電泳。純化本發明抗體之較佳方法係蛋白質-A親和層析。

編碼人類抗體之DNA可藉由重組編碼實質上或專一地衍

生自對應人類抗體區之人類恆定區及可變區(除CDR外)的DNA與編碼衍生自人類之CDR的DNA來製備。

編碼抗體片段之DNA的適宜來源包括表現全長抗體之任何細胞，例如雜交瘤及脾細胞。該等片段本身可作為抗體等效物使用，或可如上所述重組成等效物。該部分中所述之DNA缺失、重組及其他技術可藉由熟知方法來實施。如熟習此項技術者所習知，DNA之另一來源係抗體之噬菌體呈現文庫。本發明之例示性抗體係經由噬菌體呈現技術來製得。

另外，本發明提供含有先前所述與表現序列、啟動子及增強子序列可操作連接之聚核苷酸序列的表現載體。已研發出多種用於在諸如細菌等原核系統及包括但不限於酵母及哺乳動物細胞培養系統在內之真核系統中有效合成抗體多肽的表現載體。本發明載體可包含染色體、非染色體及合成DNA序列的區段。

可使用任何適宜表現載體。例如，原核選殖載體包括來自大腸桿菌之質粒，例如colE1、pCR1、pBR322、pMB9、pUC、pKSM、及RP4。原核載體亦包括噬菌體DNA之衍生物(例如M13)及其他絲狀單鏈DNA噬菌體。可在酵母中使用之載體的一個實例係2 μ 質粒。適於在哺乳動物細胞中表現之載體包括SV-40之熟知衍生物、腺病毒、逆轉錄病毒衍生DNA序列及衍生自功能哺乳動物載體組合之穿梭載體(例如彼等上文所述者)、及功能質粒及噬菌體DNA。

額外真核表現載體已為熟習此項技術者所習知(例如，P.J. Southern及P. Berg，J. Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982)；Subramani等人，Mol. Cell. Biol. 1:854-64 (1981)；Kaufmann及Sharp，J. Mol. Biol. 159:601-21 (1982)；Kaufmann及Sharp，Mol. Cell. Biol. 159:601-64 (1982)；Scahill等人，Proc. Nat'l Acad. Sci. 80:4654-59 (1983)；Urlaub及Chasin，Proc. Nat'l Acad. Sci. 77:4216-20 (1980))。

可用於本發明之表現載體含有與擬表現DNA序列或片段可操作連接之至少一種表現控制序列。將控制序列插入載體中以控制及調節選殖DNA序列之表現。可用表現控制序列之實例係lac系統、trp系統、tac系統、trc系統、噬菌體 λ 之主要操縱基因及啟動子區域、fd外殼蛋白之控制區域、酵母之糖酵解啟動子，例如，3-磷酸甘油酸酯激酶之啟動子、酵母酸性磷酸酶之啟動子(例如，Pho5)、酵母 α -交配因子之啟動子、及衍生自多瘤病毒、腺病毒、逆轉錄病毒、及猿猴病毒之啟動子，例如，早期及晚期啟動子或SV40、及已知可控制原核或真核細胞及其病毒或其組合之基因表現的其他序列。

在期望於酵母中表現基因構建體之情形下，適宜用於酵母中之選擇基因係存在於酵母質粒YRp7中之trp1基因。Stinchcomb等人，Nature，282:39 (1979)；Kingsman等人，Gene，7:141 (1979)。trp1基因可為缺乏在色胺酸中生長之能力之酵母突變體菌株(例如，ATCC第44076號或

PEP4-1)提供選擇標記。Jones, Genetics 85:12 (1977)。隨後酵母宿主細胞基因組中

本發明亦提供含有先前所述表現載體之重組宿主細胞。本發明抗體可在非雜交瘤細胞系中表現。可使用包含編碼本發明多肽之序列的核酸來轉化適宜哺乳動物宿主細胞。

基於高表現程度、所關注蛋白質之組成型表現及受宿主蛋白質最少污染來選擇尤佳之細胞系。可用作用於表現之宿主的哺乳動物細胞系已為熟習此項技術者所熟知，且包括許多永生化細胞系，例如但不限於COS-7細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、幼倉鼠腎(BHK)細胞及許多其他細胞，包括淋巴來源之細胞系，例如淋巴瘤、骨髓瘤、或雜交瘤細胞。適宜額外真核細胞包括酵母及其他真菌。可用原核宿主包括例如大腸桿菌，例如大腸桿菌SG-936、大腸桿菌HB 101、大腸桿菌W3110、大腸桿菌X1776、大腸桿菌X2282、大腸桿菌DHI、及大腸桿菌MRC1、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)、芽孢桿菌屬(*Bacillus*)(例如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*))、及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。

可使用該等重組宿主細胞來產生抗體或其片段，此係藉由在容許抗體或其片段表現之條件下培養細胞並自宿主細胞或包圍宿主細胞之培養基純化抗體或其片段來實施。可藉由在所關注抗體編碼基因之5'端插入信號或分泌型前導

肽編碼序列(參見, Shokri 等人, Appl Microbiol Biotechnol. 60:654-64 (2003); Nielsen 等人, Prot. Eng. 10:1-6 (1997); 及 von Heinje 等人, Nucl. Acids Res. 14:4683-90 (1986))來靶向擬在重組宿主細胞中分泌的所表現抗體或片段。該等分泌型前導肽元件可衍生自原核或真核序列。因此, 可使用適宜分泌型前導肽, 其為結合至多肽之N末端的胺基酸, 用以引導多肽移動出宿主細胞胞質溶膠並分泌至培養基中。

可藉由熟習此項技術者所習知之方法在含有可同化碳(碳水化合物, 例如葡萄糖或乳糖)、氮(胺基酸、肽、蛋白質或其降解產物, 例如蛋白腴、銨鹽或諸如此類)、及無機鹽(鈉、鉀、鎂及鈣之硫酸鹽、磷酸鹽及/或碳酸鹽)來源之液體培養基中培養經轉化宿主細胞。該培養基進一步含有(例如)生長促進物質, 例如微量元素, 例如鐵、鋅、錳及諸如此類。

可使本發明抗體與額外胺基酸殘基融合。該等胺基酸殘基可為肽標籤, 其或許能促進分離。本發明亦涵蓋使抗體尋靶特定器官或組織之其他胺基酸殘基。

用於製備抗體之本發明之另一實施例係在已插入人類抗體產生基因組之實質部分且在產生內源性抗體方面具有缺陷之轉基因動物中表現編碼本發明抗體之核酸。轉基因動物包括但不限於小鼠、山羊、及兔。本發明之又一實施例包括在例如分泌多肽之動物乳腺中於泌乳期間表現抗體編碼基因。

如下文實例中所述，本發明之高親和力抗FLT3抗體可自由人類重鏈及輕鏈可變區基因構建之噬菌體呈現文庫分離得到。例如，本發明之可變結構域可自含有重排可變區基因之外周血淋巴細胞獲得。或者，可變結構域部分(例如CDR及FW區)可衍生自不同人類序列。在三輪選擇後超過90%的所回收純系對FLT3具有特異性。所篩選Fab對FLT3之結合親和力在nM範圍內，此與利用雜交瘤技術產生之許多二價抗FLT3單株抗體一樣高。

本發明抗體可例如自天然存在抗體、或Fab或scFv噬菌體呈現文庫獲得。單結構域抗體可藉由自天然存在抗體或雜交瘤選擇VH或VL結構域來獲得，或可選自VH結構域文庫或VL結構域文庫。應瞭解，作為單結構域抗體結合之主要決定簇之胺基酸殘基可在Kabat或Chothia定義之CDR內，但亦可包括其他殘基，例如，以其他方式隱藏於VH-VL異二聚體之VH-VL介面中的殘基。

本發明抗體亦包括彼等結合特徵已藉由定向突變、親和力成熟、噬菌體呈現、或鏈改組方法改良者。親和力及特異性可藉由使CDR突變並篩選具有期望特徵之抗原結合位點來改變或改良(參見，例如，Yang等人，J. Mol. Biol., 254:392-403 (1995))。可以多種方式使CDR突變。一種方式係使各殘基或殘基組合隨機化以使在其他方面相同之抗原結合位點群體中所有二十種胺基酸皆可見於特定位置。或者，藉由易錯PCR方法在多個CDR殘基內引入突變(參見，例如，Hawkins等人，J. Mol. Biol., 226:889-896

(1992))。例如，含有重鏈及輕鏈可變區基因之噬菌體呈現載體可在大腸桿菌增變菌株中實施繁殖(參見，例如，Low等人，J. Mol. Biol., 250: 359-368 (1996))。該等誘變方法作為熟習此項技術者所習知之許多方法的例子。

用於識別本發明之FLT3結合抗體的蛋白質較佳為FLT3，且更佳為FLT3之細胞外結構域。FLT3細胞外結構域可游離或與另一分子偶聯。

可使本發明抗體與額外胺基酸殘基融合。該等胺基酸殘基可為肽標籤，其或許能促進分離。本發明亦涵蓋使抗體尋靶特定器官或組織之其他胺基酸殘基。

在本發明之另一態樣中，包括但不限於本發明抗體之抗FLT3抑制劑可與抗腫瘤或抗血管發生劑或可檢測信號產生劑結合投與，或將包括但不限於本發明抗體之抗FLT3抑制劑以化學或生物合成方式連接至抗腫瘤或抗血管發生劑或可檢測信號產生劑上。如下文所例示，本發明抗體在與具有FLT3之細胞結合後有效內在化。與抗體結合投與、偶聯或連接之抗腫瘤劑包括破壞或損害抗體已結合或在細胞環境中抗體已結合之腫瘤的任何藥劑。在一個態樣中，包括本發明抗體在內之抗FLT3抑制劑可以偶聯物形式投與，該偶聯物與受體特異性結合並在配體-毒素內在化後遞送毒素。在另一態樣中，FLT3抑制劑-藥劑偶聯物可直接彼此連接或經由連接體、肽或非肽接合在一起。例如，抗腫瘤劑係諸如化學治療劑或放射性同位素等毒劑。適宜抗腫瘤劑已為彼等熟習此項技術者所習知，且包括蒽環抗生素

(例如道諾黴素(daunomycin)及多柔比星(doxorubicin))、奧雷司他汀(auristatin)、甲胺蝶呤(MTX)、長春地辛(vindesine)、新製癌菌素(neocarzinostatin)、順鉑、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、阿糖胞苷、5-氟脲嘧啶(5-fluorouridine)、美法倫(melphalan)、蓖麻毒素(ricin)及卡奇黴素(calicheamicin)。可利用習用方法使該等化學治療劑與抑制劑、抗體或小分子偶聯(參見，例如，Hermentin及Seiler, Behring Inst. Mitt. 82:197-215 (1988))。在一個態樣中，本發明之較佳抗腫瘤劑係MTX。

本發明進一步涵蓋在可檢測信號產生劑與抗體偶聯之診斷系統中連接至靶或報告分子部分之抗FLT3抗體，靶或報告分子部分包括例如僅抗腫瘤劑、其他抗體或報告分子，例如經放射標記之同位素。

可檢測信號產生劑可在活體內及活體外用於診斷目的。信號產生劑產生可藉由外部手段檢測之可量測信號，通常量測電磁放射。大多數情形下，信號產生劑係酶或發色團，或藉由螢光、磷光或化學發光而發射光。發色團包括吸收紫外或可見區域中之光的染料，且可為酶催化反應之受質或降解產物。

本發明進一步涵蓋連接靶或報告分子部分之抗FLT3抗體。靶部分係結合對之第一成員。例如，使抗腫瘤劑偶聯至該等對之第二成員，且由此靶向抗FLT3抗體結合之位點。該結合對之常見實例係抗生物素蛋白及生物素。在一較佳實施例中，使生物素與抗FLT3抗體偶聯，且由此提供

抗腫瘤劑或其他部分之靶標，抗腫瘤劑或其他部分與抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素偶聯。或者，使生物素或另一該部分與本發明之抗FLT3抗體連接，且在例如可檢測信號產生劑與抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素偶聯之診斷系統中用作報告分子。

適宜用作抗腫瘤劑之放射性同位素亦已為彼等熟習此項技術者所習知。例如，使用 ^{131}I 或 ^{211}At 。利用習用技術將該等同位素附接至抗體上(參見，例如，Pedley等人，Br. J. Cancer 68:69-73 (1993))。或者，附接至抗體上之抗腫瘤劑係激活前藥之酶。如此，所投與之前藥在達到腫瘤位點之前一直保持其無活性形式，在投與抗體複合物後其在腫瘤位點轉化成其細胞毒素形式。在實踐中，將抗體-酶偶聯物投與至患者並使其侷限於擬治療之組織區域。隨後將前藥投與至患者，由此在擬治療之組織區域中轉化至細胞毒性藥物。或者，與抗體偶聯之抗腫瘤劑係細胞因子，例如介白素-2 (IL-2)、介白素-4 (IL-4)或腫瘤壞死因子 α (TNF- α)。抗體使細胞因子靶向腫瘤，由此細胞因子調介對腫瘤之損害或破壞而不影響其他組織。利用習用重組DNA技術使細胞因子與抗體在DNA層面上融合。

本發明亦提供藉由向哺乳動物投與有效量之先前所述抗體來治療哺乳動物腫瘤生長的方法。擬根據本發明治療之適宜病狀涉及較佳表現FLT3之細胞。儘管不欲受限於任一特定機制，但本發明方法提供治療癌細胞生長之方法，包括例如由FLT3刺激引起之腫瘤生長、器官移植排斥或免疫

病症(例如自體免疫疾病)。

在本發明上下文中，「治療(treatment或treat)」係指治療性治療，包括抑制、減緩、減輕潛在病狀或與疾病或病症有關之不期望生理變化或逆轉其進行、改善病狀之臨床症狀或預防出現病狀之臨床症狀。有益或期望臨床結果包括(但不限於)緩和症狀、降低疾病或病症之程度、穩定疾病或病症(即，疾病或病症不惡化)、延遲或減緩疾病或病症之進行、改善或減輕疾病或病症、及使疾病或病症好轉(部分或完全)，此等可檢測或不可檢測。「治療(treatment)」亦可意指與未接受治療者之預期存活期相比存活期延長。彼等需要治療者包括彼等已患有疾病者。在一個實施例中，本發明可用作藥劑。

擬治療之一種癌前病狀係骨髓增生異常綜合徵。擬治療之其他癌症包括但不限於血液惡性腫瘤，例如白血病，尤其為AML、ALL及急性轉化期的CML。其他白血病包括表9中者，表9列示自所選白血病細胞系之EB10染色而獲得之所選人類白血病細胞系中的FLT3表現。癌症亦可為實體腫瘤，例如甲狀腺或腦瘤。

在本發明方法中，將治療有效量之本發明抗體投與至有需要之哺乳動物中。用於治療本文所述病症之本發明組合物之有效劑量端視許多不同因素而有所變化，包括投與手段、目標位點、患者之生理學狀態、患者是人類還是動物、投與之其他藥物、及治療是預防性的還是治療性的。本文所用之術語投與意指藉由可達成所尋求結果之任一方

法將本發明抗體遞送至哺乳動物中。其可經例如靜脈內或肌內投與。儘管本發明之人類抗體尤其可用於投與給人類，但亦可將其投與給其他哺乳動物。本文所用之術語哺乳動物意欲包括(但不限於)人類、實驗室動物、馴養寵物及農場動物。治療有效量意指當將本發明抗體投與給哺乳動物時可有效產生期望治療效應(例如，抑制腫瘤生長)的量。治療劑量可使用彼等熟習此項技術者所習知之常規方法來滴定量測以使安全性及功效最優化。

本發明之醫藥組合物可包括「治療有效量」之本發明抗FLT3抗體。「治療有效量」係指在所需時間段內以所需劑量有效達成期望治療效果的量。抗體之治療有效量可根據下述因素而有所變化：例如疾病狀態、年齡、性別、及個體體重、以及抗體或抗體部分於該個體內引發期望應答之能力。治療有效量亦為其中抗體或抗體部分之治療有益效應勝過其任何毒性或有害效應的量。可對劑量方案加以調節以提供最佳期望應答(例如，治療性或預防性應答)。

將本發明抗FLT3抗體以足以抑制或減少腫瘤或病理學病狀進行的量投與給有需要之患者來實施治療性治療。進行包括(例如)腫瘤或病理學病狀之生長、侵襲力、轉移及/或復發。足以達成此目的之量定義為治療有效劑量。對此用途有效之量將端視疾病之嚴重程度及患者自身免疫系統之總體狀態而定。投藥方案亦隨疾病狀態及患者狀況而有所變化，且通常自單次濃注劑量或連續輸注至每天多次投與(例如，每4-6小時一次)變化，或如治療醫師及患者病狀所

指示。本發明抗體之治療有效量之例示性非限制性範圍係 0.1-50 mg/kg，更佳為 3-35 mg/kg，且更佳為 5-20 mg/kg。投藥量及頻率將由患者之治療醫師來確定，且可包括每天一次、每週三次、每週一次、每兩週一次、或更為不經常地給與自小於 1 mg/kg 至大於 100 mg/kg 之劑量。每次投與之劑量可介於 1-100、2-75、或 5-60 mg/kg 範圍內。然而，應注意，本發明並不限於任一特定劑量。

在替代實施例中，本發明亦包括抑制樹突細胞激活或成熟之方法，其包含使樹突細胞與單獨本發明抗體或本發明抗體與其他藥劑之組合接觸。本發明之另一方法包括預防器官移植排斥或治療諸如多發性硬化或腦炎等自體免疫疾病，其包含投與單獨本發明抗體或本發明抗體與其他藥劑之組合。

在本發明之一實施例中，可將抗 FLT3 抗體與一或多種其他抗腫瘤劑組合投與。組合療法之實例可參見例如美國專利第 6,217,866 號 (Schlessinger 等人，Anti-EGFR antibodies in combination with anti-neoplastic agents)；WO 99/60023 (Waksal 等人，Anti-EGFR antibodies in combination with radiation)。可使用任何適宜抗腫瘤劑，例如化學治療劑、放射或其組合。

可將當前業內已知或經評價之抗腫瘤劑分成多個種類，包括例如有絲分裂抑制劑、烷基化劑、抗代謝物、嵌入性抗生素、生長因子抑制劑、細胞週期抑制劑、酶、拓撲異構酶抑制劑、抗存活劑、生物應答調節劑、抗激素劑、及

抗血管發生劑。烷基化劑之實例包括(但不限於)順鉑、環磷醯胺、美法倫、及達卡巴嗪。抗代謝物之實例包括(但不限於)多柔比星、柔紅黴素(daunorubicin)、紫杉醇(paclitaxel)、吉西他濱(gemcitabine)、力比泰(ALIMTA)®及拓撲異構酶抑制劑伊立替康(irinotecan)(CPT-11)、胺基喜樹鹼(aminocamptothecin)、喜樹鹼(camptothecin)、DX-8951f、托泊替康(topotecan)(拓撲異構酶I)、依託泊苷(etoposide)(VP-16)、及替尼泊苷(teniposide)(VM-26)(拓撲異構酶II)。當抗腫瘤劑係放射時，放射來源相對於所治療之患者可為外部的(外部射線束放射療法-EBRT)或內部的(近距離放射療法-BT)。所投與抗腫瘤劑之劑量端視許多因素而定，包括例如藥劑類型、所治療腫瘤之類型及嚴重程度及藥劑之投與途徑。然而，應強調，本發明並不限於任一特定劑量。

在本發明之一個態樣中，與本發明抗體組合給與之較佳抗腫瘤劑係MTX。本文提供之數據顯示抗FLT3抗體EB10與MTX組合具有協同效應。該組合非常新穎且令人感到意外，因為在Furukawa等人(Leukemia 21:1005-1014 (2007))公佈之活體外研究成果中報導同時投與FLT3抑制劑PKC412與除MTX外的其他化學治療劑可在臨床上有效對抗FLT3白血病。

在本發明中，可使用任何適宜方法或途徑來投與本發明之抗FLT3抗體，且視情況共投與抗腫瘤劑及/或其他受體之拮抗劑。在本發明之組合療法中，抗FLT3抗體可在另一

藥劑(包括例如僅MTX)療法開始之前、期間或之後、以及以其任一組合形式投與，即，在開始抗腫瘤劑療法之前及期間、之前及之後、期間及之後、或之前、期間及之後投與。例如，該抗FLT3抗體可在開始放射療法之前1至30天、較佳3至20天、更佳5至12天投與。在本發明之一較佳實施例中，化學療法係與抗體療法同時投與，或更佳在抗體療法之後投與。

在本發明之另一態樣中，可使用任一FLT3抑制劑與MTX之組合來治療白血病。

本發明抗FLT3抗體可與中和與腫瘤生長或血管發生有關之其他受體的抗體一起投與。在本發明之一實施例中，抗FLT3抗體係與特異性結合EGFR之受體拮抗劑組合使用。該受體之另一實例係VEGFR。本發明之抗FLT3抗體可與VEGFR拮抗劑組合使用。在一額外替代實施例中，FLT3抗體可與一或多種適宜佐劑組合投與，例如，細胞因子(例如，IL-10及IL-13)或其他免疫刺激劑，例如但不限於趨化因子、腫瘤相關抗原、及肽。另外，該等刺激劑可與MTX一起投與。然而，應瞭解，以單一療法單獨投與抗FLT3抗體足夠以治療有效方式預防、抑制、或減少腫瘤進行。

在本發明中，可使用任何適宜方法或途徑來投與本發明之抗FLT3抗體，且視情況共投與抗腫瘤劑(例如MTX)及/或其他受體之拮抗劑。本發明使用之抗腫瘤劑方案包括咸信最佳適於治療患者之腫瘤病狀的任何方案。不同惡性腫

瘤(包括多種形式的白血病)可能需要使用特定抗腫瘤抗體及特定抗腫瘤劑，此應基於患者來確定。投與途徑包括例如經口、靜脈內、腹膜內、皮下、鞘內、或肌內投與。所投與拮抗劑之劑量端視許多因素而定，包括例如拮抗劑類型、所治療腫瘤之類型及嚴重程度及拮抗劑之投與途徑。然而，應強調，本發明並不限於任何特定投與方法或途徑。

應瞭解，當在哺乳動物中使用本發明之抗FLT3抗體來實施預防或治療時，其將以另外包含醫藥上可接受之載劑之組合物形式投與。適宜醫藥上可接受之載劑包括(例如)水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及諸如此類中之一或多種、以及其組合。醫藥上可接受之載劑可進一步包含少量輔助物質，例如潤濕劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，此等輔助物質可延長結合蛋白質之存架壽命或提高其效力。如熟習此項技術者所熟知，注射組合物可調配成在投與至哺乳動物後快速、持續或延遲釋放活性成份。

本發明亦包括用於抑制腫瘤生長及/或血管發生之套組，其包含治療有效量之人類抗FLT3抗體。本發明之另一實施例包括用於抑制腫瘤生長及/或血管發生之套組，其包含治療有效量之人類抗FLT3抗體與MTX。該等套組可進一步含有例如與腫瘤發生或血管發生有關之另一生長因子受體(例如，EGFR、VEGFR-1/Flt-1、VEGFR-2、PDGFR、NGFR、及FGFR)的任何適宜拮抗劑。或者(或另

外)，本發明套組可進一步包含抗腫瘤劑。本文已闡述本發明上下文中適宜抗腫瘤劑的實例。本發明套組可進一步包含佐劑，其實例在上文已闡述。

而且，本發明範圍亦包括本發明抗體在活體內及活體外用於研究或診斷方法之用途，此等方法已為熟習此項技術者所熟知。該等診斷方法包括含有本發明抗體之套組。

本發明抗體以強於FLT3配體結合活性之結合強度與FLT3結合，即， K_D 為約 200×10^{-12} M至 500×10^{-12} M。抗體與人類FLT3-Fc融合蛋白結合之 K_D 為 0.5×10^{-10} M至 5×10^{-10} M，在25°C下測定；較佳抗體與人類FLT3-Fc融合蛋白結合之 K_D 為 1.0×10^{-10} M至 4.75×10^{-10} M、 1.5×10^{-10} M至 4.5×10^{-10} M、或不大於 4.5×10^{-10} M，所有皆在25°C下測定。較佳之情形係，抗體以介於 4.5×10^{-5} 1/s (sec^{-1} ，1/秒)與 6×10^{-5} 1/s間、介於 5.0×10^{-5} 1/s與 5.7×10^{-5} 1/s間之離解速率常數(K_d 或 k_{off})結合FLT3，所有皆係在25°C下藉由本文所述之表面電漿共振來量測，且更佳地，抗體以介於 5.1×10^{-5} 1/s與 5.6×10^{-5} 1/s間、或在該等速率常數之10%內之 K_d 或 k_{off} 結合FLT3。另外較佳之情形係，抗體以介於 0.5×10^5 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ (1/Ms；1/莫耳 1/秒)與 5×10^5 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 間、或 1×10^5 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 與 4×10^5 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 間之締合速率常數(K_a 或 k_{on})結合FLT3，所有皆係在25°C下藉由本文所述之表面電漿共振來量測，且更佳地，抗體以介於 1.2×10^5 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 與 3.6×10^5 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 間、或在該等速率常數之10%內之 K_a 或 k_{on} 結合FLT3。在又一實施例中，抗體以在對於EB10、NC7、或D4-3在相同條

件下測定之離解速率常數之10%內的離解速率常數結合FLT3，此係在25℃下藉由表面電漿共振來量測。

本發明包含對FLT3具有特異性之單株抗體或其片段，其包含一或多種選自由表1及2中之CDR組成之群的CDR。在另一態樣中，本發明係對FLT3具有特異性之具有序列為MQGTHPAIS (SEQ ID NO:9)之輕鏈CDR3區的單株抗體或其片段。在另一態樣中，本發明係對FLT3具有特異性之具有序列為GVGAHDAFDI (SEQ ID NO:4)之重鏈CDR3的單株抗體或其片段。在一個不同態樣中，本發明係包含以下之單株抗體或其片段：(i)選自由EB10、NC7、及D4-3組成之群之輕鏈可變區；及(ii)選自由EB10、NC7、及D4-3組成之群之重鏈可變區。在另一態樣中，本發明係包含以下之對FLT3具有特異性之單株抗體或其片段：(i) EB10、NC7、及D4-3之輕鏈可變區；(ii) EB10、NC7、及D4-3之重鏈可變區；及(iii)人類免疫球蛋白G₁ (hIgG₁)恆定區。

本發明之一個態樣係結合FLT3之抗原決定部位之抗體或其片段，其中抗原決定部位包含至多5個細胞外結構域(D1、D2、D3、D4及D5)，且至少包含結構域D4或D5之一或二者。在又一態樣中，抗原決定部位係D4。在再一態樣中，抗原決定部位係D5。

在本發明之一個實施例中，該抗體或抗體片段可抑制包括STAT5、Akt、PI3K及MAPK在內之FLT3的下游路徑磷酸化。

在一個態樣中，當前揭示之抗體與包括奧雷司他汀或甲

胺蝶呤在內之抗腫瘤劑免疫偶聯。可將該免疫偶聯物連接至可檢測標記上。另一態樣係一種檢測方法，其使靶細胞樣品與抗體或抗體片段接觸並藉由檢測經標記抗體來測定樣品是否含有FLT3。

在一個態樣中，治療性組合物可有效抑制表現FLT3之腫瘤細胞生長或促進表現FLT3之人類腫瘤消退。在其他態樣中，該等治療性組合物包含當前揭示之抗體及醫藥上可接受之載劑。

本發明之另一態樣係在哺乳動物內中和FLT3激活之方法，其藉由向哺乳動物投與有效量之抗體或其抗體片段來實施。再一態樣係抑制樹突細胞激活或成熟之方法，其包含使樹突細胞與有效抑制樹突細胞激活或成熟的量之當前揭示之抗體或片段接觸。

本發明之另一態樣係一種治療哺乳動物癌症之方法，其包含向該哺乳動物投與有效量之先前所述任何態樣之抗體或其片段。本發明亦提供一種治療包括白血病之血液惡性腫瘤之方法。在本發明中，白血病包括，但不限於：急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病急性轉化期(急性轉化期的CML)及骨髓增生異常綜合徵。本發明提供之另一治療方法組合使用本發明之抗體或其片段與投與另一抗癌劑或治療。在一種治療方法中，抗癌劑係甲胺蝶呤(MXT)。

因此，本發明受體抗體可在活體內及活體外用於研究、診斷、預防、或治療方法中，為熟習此項技術者所熟知。

熟習此項技術者可對本文所揭示之本發明原理改變，該等修改意欲包括在本發明範圍內。

應瞭解且預期，熟習此項技術者可對本文所揭示之本發明原理改變且該等修改意欲包括在本發明範圍內。

以下實例進一步闡釋本發明，但不應理解為以任何方式限制本發明之範圍；無論如何不應將其理解為限制本發明之寬廣範圍。習用方法之詳細說明，例如用於構建載體及質粒、將編碼多肽之基因插入該等載體及質粒中、將質粒引入宿主細胞中、及表現基因及基因產物及其測定者，可獲自許多出版物，包括 Sambrook, J. 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)及 Coligan, J. 等人，Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated (1994)。

人類抗FLT3抗體之表現及純化：

對於各抗體，藉由諸如PCR選殖等適宜方法，將適宜重鏈核苷酸序列例如 SEQ ID NO 37、38或39(分別對於EB10、NC7及D4-3)工程化於適宜表現質粒(例如 pGSHC)中，及將適宜輕鏈核苷酸序列例如 SEQ ID No. 40、41或42(分別對於EB10、NC7及D4-3)工程化於適宜表現質粒(例如 pGSLC)中。為建立穩定細胞系，在諸如NSO或CHO細胞等適宜宿主細胞系中藉由電穿孔與線性化重鏈及輕鏈質粒共轉染，並在適宜培養基中進行培養，適宜培養基係例如不含麩胺醯胺之含有經透析胎牛血清及麩胺醯胺合成酶補充物之杜貝克改良鷹氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle

Medium)。藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)針對抗體表現來篩選純系並選擇出最高生產者在旋轉燒瓶中實施培養。藉由諸如蛋白質-A親和層析等適宜方法來純化抗體。

本發明包括重組人類單株抗體EB10，其為靶向人類FLT3受體之全長IgG1 κ 。其由亞型I之人類 γ -1重鏈及亞型II之人類 κ 輕鏈構成。EB10 Fab係藉由針對與人類FLT3受體以高親和力結合並能夠阻斷配體與受體之結合實施選擇自人類Fab噬菌體呈現文庫獲得。已顯示，EB10在異種移植動物模型中藉由涉及免疫效應子功能激活之機制以高親和力選擇性結合人類FLT3、阻斷FL結合並具有中等強效抗腫瘤活性。

本發明亦包括重組人類單株抗體NC7，其為靶向人類FLT3受體之全長IgG1 κ 。其由亞型I之人類 γ -1重鏈及亞型II之人類 κ 輕鏈構成。已顯示，NC7以高親和力選擇性結合人類FLT3並阻斷FL結合。

本發明亦包括重組人類單株抗體D4-3，其為靶向人類FLT3受體之全長IgG1 κ 。其由亞型I之人類 γ -1重鏈及亞型II之人類 κ 輕鏈構成。已顯示，D4-3以高親和力選擇性結合人類FLT3並阻斷FL結合。

表1及2提供本發明多種CDR之胺基酸序列及SEQ ID NO。除SEQ ID NO 1及12係使用Chothia條約測定外，所有CDR序列皆係使用Kabat條約來測定。表3提供與本發明相關之多種序列的SEQ ID NO。編碼下文所揭示胺基酸序列之聚核酸序列亦包括在本發明範圍內。

表1：EB10抗體重鏈及輕鏈可變區CDR之胺基酸序列。

	重鏈	SEQ ID NO.	輕鏈	SEQ ID NO.
CDR1	GYTFTSYMH	1	RSSQSLHLSNGNNYLD	6
	SYMH	2		
CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	3	LGSNRAS	8
CDR3	GVGAHDAFDI	4	MQGTHPAIS	9

表2：D4-3抗體重鏈及輕鏈可變區CDR之胺基酸序列。

	重鏈	SEQ ID NO.	輕鏈	SEQ ID NO.
CDR1	GYTFTSYMH	1	RSSQSLHLSNGYNYLD	7
	SYMH	2		
CDR2	IINPSGGSTSYAQKFQG	3	LGSNRAS	8
CDR3	VVAAAVADY	5	MQSLQTPFT	11

表3：NC7抗體重鏈及輕鏈可變區CDR之胺基酸序列。

	重鏈	SEQ ID NO.	輕鏈	SEQ ID NO.
CDR1	GGTFSSYAIS	12	RASQSISSYLN	16
	SYAIS	13		
CDR2	GIPIFGTANYAQKFQG	14	AASSLQS	17
CDR3	FALFGFREQAQFDI	15	QQSYSTPFT	18

表4：EB10、NC7及D4-3抗體之胺基酸序列SEQ. ID. NO

抗體	重鏈			輕鏈		
	可變區	完整無信號	完整有信號	可變區	完整無信號	完整有信號
EB10	19	25	31	22	28	34
NC7	20	26	32	23	29	35
D4-3	21	27	33	24	30	36

如表4中所給出，實驗中所用之抗體包含無信號之全長重鏈及輕鏈。

表5：EB10、NC7及D4-3抗體之活體外數據概述

抗體	FLT3結合 ELISA (EC ₅₀)	配體-受體結合競爭 ELISA (IC ₅₀)	FACS (MFI*)	親和力K _D (M)	人類ADCC (%)
EB10	0.5 - 1.0 nM	0.5 - 1.0 nM	54	1.58×10^{-10}	67%
NC7	0.3 nM	0.8 nM	63	4.5×10^{-10}	27%
D4-3	0.2 nM	7 nM	72	2.7×10^{-10}	7%

* FACS分析係使用如下所述之EOL-1白血病細胞來實施。

MFI=平均螢光強度

結合抗FLT3抗體之抗原決定部位

藉由漸進性地自C末端缺失FLT3之細胞外Ig結構域來構建一系列FLT3細胞外結構域缺失突變體-Fc融合蛋白，產生5個構建體，包括4個截短之受體蛋白質：FLT3-D1、FLT3-D1-2、FLT3-D1-3、FLT3-D1-4、及全長受體FLT3-D1-5。利用基於PCR之策略藉由連續缺失FLT3 ECD之Ig樣結構域來產生一組FLT3 ECD變體。產生4個缺失變體：Fd1(胺基酸24-183)、Fd1-2(胺基酸24-271)、Fd1-3(胺基酸24-370)、及Fd1-4(胺基酸24-451)。作為陽性對照，以類似方式產生含有胺基酸24-541之全長FLT3 (Fd1-5)。使用NheI及HindIII限制酶切位點將所有構建體選殖至表現載體pcDNA 3.1(+)(Invitrogen, Carlsbad, CA)中，其在此等位點處與融合於六聚組胺酸(His)標籤之C末端上的人類IgG1之Fc結構域達成框架內連接。藉由DNA測序來證實每一構建體之完整性。在COS細胞中短暫表現該等構建體，並藉由西方墨點分析來驗證各表現構建體之正確大小。濃縮細胞培養物上清液。藉由經由抗人類Fc ELISA及西方墨點分析估計上清液中每一變體之相對蛋白質濃度來檢測FL與突變

受體之結合，並隨後調節至與用於結合分析中之前大致相同之程度。

藉由ELISA來分析FLT3 ECD結構域缺失變體與FL及抗體之結合。簡言之，用抗His抗體(Qiagen)塗敷96孔板，隨後在輕輕振盪下與如上所述FLT3 ECD Ig結構域缺失變體一起培育1小時。用PBST(含有0.1% TWEEN®-20之磷酸鹽緩衝鹽水)將該等板洗滌3次，並隨後與100 μ l/孔抗FLT3 IgG抗體於2% M PBST中之連續稀釋液一起培育。洗滌3次後，將該等板與100 μ l/孔偶聯HRP之抗人類Fab抗體(Jackson ImmunoResearch Labs公司)一起培育。在配體結合分析中，在4°C下用FL(100 ng/孔)將該等板塗敷過夜，隨後在輕輕振盪下與FLT3 ECD Ig結構域缺失變體一起培育1小時。洗滌3次後，將該等板與100 μ l/孔偶聯HRP之抗人類Fc抗體(Jackson ImmunoResearch Labs公司)一起培育。如上所述對該等板實施培養。檢測FL與突變受體之結合。

抗原決定部位作圖研究表明，EB10及D4-3單價Fab片段二者(但非NC7 Fab)均阻斷FLT3與其配體之結合，如藉由EB10及D4-3與FLT3-D1-4(但非FLT3-D1-3)及全長受體結合之事實所顯示，由此對人類FL亦結合之Ig結構域4內的結合抗原決定部位作圖。另一方面，NC7僅與全長受體結合，但不與任何其他突變體結合，由此表明其結合位點位於Ig結構域5內。因此，本發明抗體結合結構域4或結構域5，不同於熟習此項技術者所習知的配體結合結構域1至3。

競爭酶聯免疫吸附分析(ELISA)及阻斷分析

對於 FLT3 結合分析，在 4°C 下用抗 His 抗體 (Qiagen, Hilden, Germany) 將 96 孔板塗敷過夜。用阻斷緩衝液 (含有 0.1% TWEEN-20® 及 5% 胎牛血清 (FCS) 之 PBS) 將孔阻斷 1 小時，並隨後在室溫下與 FLT3-Fc (1 µg/ml × 100 µl/孔) 一起培育 1 小時。用 PBST 洗滌孔 3 次並隨後添加 EB10 或對照 IgG，並在室溫下培育 1 小時。洗滌後，將板與 100 µl 抗人類 κ 鏈抗體-HRP 偶聯物在室溫下一起培育 1 小時。洗滌該等板並隨後與 100 µl 3,3',5,5'-四-甲基聯苯胺一起培育。使用微板讀數器在 450 nm 下讀取吸光度。

對於受體-配體阻斷分析，將不同量的 EB10 或對照 IgG 與固定量之生物素化 FLT3-Fc 融合蛋白 (45 ng/孔) 混合並在室溫下一起培育 1 小時。將混合物轉移至預塗敷 FL (25 ng/孔) 之 96 孔板中並隨後在室溫下再培育 1 小時。洗滌後，添加抗生蛋白鏈菌素 HRP 偶聯物，並在 450 nm 下讀取吸光度。計算 50% 抑制 FLT3 與 FL 之結合所需要之抗體濃度 (IC₅₀)。

藉由 ELISA 來檢測 EB10 與受體結合之能力。如表 6 中所示，EB10 與 FLT3 結合之 EC₅₀ 值在 0.5-1 nM 範圍內。

在 FL 結合競爭 ELISA 中檢測 EB10 阻斷受體-配體結合之能力。如表 7 中所示，EB10 阻斷 FL 與 FLT3 之結合，其 IC₅₀ 值在 0.5-1 nM 範圍內，而對於對照 IgG 未觀察到阻斷活性。

表6：藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)測定之
抗FLT3抗體之FLT3結合活性

抗體	與FLT-3結合 (EC ₅₀)
EB10	0.5 - 1.0 nM
NC7	0.3 nM
D4-3	0.2 nM

表7：藉由酶聯免疫吸附分析(ELISA)測定之
抗FLT3抗體之FLT3配體-受體阻斷活性

抗體	阻斷FL與FLT-3之結合(IC ₅₀)
EB10	0.5 - 1.0 nM
NC7	0.8 nM
D4-3	7 nM
IgG對照	未阻斷

因此，本發明抗體對於FLT3具有高配體阻斷能力及高結合親和力。

藉由表面電漿共振/Biacore™分析實施之結合動力學分析

利用表面電漿共振，例如 Biacore 2000™ 生物感測器 (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Sweden) 在 25°C 下量測抗體與 FLT3 之結合動力學。將約 1000 RU (參考單位) 抗體固定至感測器晶片上，並注射 1.5~100 nM 濃度之可溶性 FLT3-Fc 融合蛋白。獲得每一濃度下之感測圖譜並使用儀器程式 (例如 BIA Evaluation 2.0 程式) 進行評價以測定速率常數 k_{on} 及 k_{off} 。 K_d 亦稱為 k_{off} ，其為離解反應速率常數。 K_a 亦稱為 k_{on} ，其為締合反應速率常數。親和常數 (K_D) 係自以莫耳 (Molar) (M) 量測之速率常數比 $k_{off}:k_{on}$ 來計算。本文例示抗體 EB10、NC7 及 D4-3 之 K_a 、 K_d 及 K_D 概述於表 8 中。

表8：抗體與重組人類FLT3之結合動力學

抗體	K_a (1/Ms) k_{on}	K_d (1/s) k_{off}	K_D (M)
EB10	3.52×10^5	5.55×10^{-5}	1.58×10^{-10}
NC7	1.24×10^5	5.6×10^{-5}	4.5×10^{-10}
D4-3	1.9×10^5	5.1×10^{-5}	2.7×10^{-10}

因此，本發明抗體對FLT3具有高結合動力學。

流式細胞術分析

將下文列示之多種細胞(5×10^5 個，0.1 ml)在冷PBS中洗滌兩次，並隨後與存於100 μ l PBS中之10 μ g/ml抗CD16/CD32抗體(BD Pharmingen, San Diego, CA)一起培育30分鐘以阻斷多種細胞上之Fc受體(參見表9)。用冷PBS洗滌細胞並隨後與稀釋於PBS中之EB10(10 μ g/ml)或對應人類IgG同種型對照一起培育45分鐘。用冷PBS洗滌細胞並隨後在100 μ l偶聯PE之抗人類F(ab')₂二級抗體(Jackson ImmunoResearch)(1/200稀釋)中於冰上培育45分鐘。洗滌後，藉由流式細胞術(例如Coulter® Epics®流式細胞儀(Beckman Coulter, Miami, Fl))分析細胞；量測平均螢光強度(MFI)數據。

表9列示所選白血病細胞系之EB10染色結果。流式細胞術分析顯示，EB10與在EOL-1細胞上表現之野生型FLT3結合，且亦與在BaF3-ITD細胞上表現之ITD-突變體FLT3結合。在FLT3陰性JM1或BaF3對照細胞系上未觀察到EB10結合。

表9：藉由流式細胞術測定所選人類白血病細胞系中
EB10與FLT3之結合

腫瘤細胞系	白血病類型	FLT3表型	MFI
BaF3/ITD	ALL	ITD突變體	143.0
EM-3	CML	野生型	37.5
EOL-1	AML	野生型	53.5
SEMK2	ALL	野生型	526.3
MOLM-14	AML	野生型/ITD(雜合)	68.5
MV-4-11	雙表型B骨髓單核細胞性白血病	ITD	16.3
OCI-AML5	AML	野生型	24.3
Reh	ALL	野生型	19.7
RS4	ALL	野生型	91.6
JM1	B細胞淋巴瘤-白血病	FLT3陰性	0.1

磷酸化分析

將細胞在無血清RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 1640培養基中培養過夜。用存於無血清培養基中之各種濃度抗體處理細胞60分鐘。在37°C下用30 ng/ml FL刺激細胞15分鐘。在裂解緩衝液(50 mM Tris、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA、1 mM苯基甲基磺醯基氟化物、0.5 mM原鈳酸鈉、1 µg/ml留培丁(leupeptin)、1 µg/ml胃蛋白酶抑制素A、及1 µg/ml抑肽酶)中裂解細胞。在4°C下將來自每一樣品之等量細胞裂解物與抗FLT3抗體4G8 (BD Pharmingen)一起培育過夜，並隨後與蛋白質A瓊脂糖(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)一起再培育2小時。電泳後，轉移至硝化纖維膜(Invitrogen)上，用抗磷酸酪胺酸抗體4G10(Upstate Biotechnology)實施免疫印跡法以評價磷酸化之FLT3。剝離經Qentix™信號增強劑(Pierce, Rockford, IL)處理之膜並用抗FLT3抗體S-18(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)再次探測以檢測總FLT3蛋

白質。利用化學發光(Amersham, Piscataway, NJ)來顯現蛋白質帶。為檢測激活之MAPK、Stat5或AKT，藉由SDS-PAGE電泳分離50 μ g細胞蛋白質提取物，轉移至硝化纖維膜上，並用指定抗體：磷酸-p44/42 MAPK抗體、磷酸-Stat5(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、或磷酸-AKT抗體(BD Pharmingen)實施免疫印跡法。為檢測總MAPK、Stat5或AKT蛋白質，剝離膜並用指定抗體：p44/42 MAPK抗體、Stat5抗體(Cell Signaling Technology)、或AKT抗體(BD Pharmingen)再次探測。

EB10抑制野生型FLT3之FL誘導之磷酸化及ITD-突變體FLT3之非配體依賴型組成型磷酸化：在EOL-1及EM3細胞中，添加FL使FLT3受體磷酸化強烈增加。與EB10一起培育以劑量依賴性方式阻斷FL誘導之磷酸化， IC_{50} 值為0.4~4 nM。該等結果表明，EB10係配體誘導之野生型FLT3激活之強效抑制劑。

吾人已知AML中高頻率發生之ITD突變引起不依賴FL之受體磷酸化及激酶信號轉導路徑激活。使用BaF3-ITD及MV4;11細胞系EB10對突變體FLT3之組成型激活之抑制效應報告於表10中。在BaF3-ITD及MV4;11兩種細胞系中突變體FLT3均被組成型磷酸化。與對照抗體相比，EB10在BaF3-ITD細胞中抑制不依賴FL之FLT3-ITD磷酸化。EB10亦在MV4;11細胞中顯著抑制不依賴FL之FLT3-ITD磷酸化，但抑制度較低。總之，該等結果展示，EB10亦為FLT3-ITD激酶活性之強效抑制劑。

表10：EB10抑制野生型FLT3之FL誘導之磷酸化及ITD-突變體
FLT3之不依賴配體的組成型磷酸化：

細胞系	FLT3突變情況	FLT3磷酸化之抑制(IC ₅₀)
EOL-1	野生型	0.4 nM
EM3	野生型	4 nM
BaF3-ITD	ITD突變	4 nM
MV4;11	ITD突變	40 nM

本發明抗體抑制野生型FLT3之FL誘導之磷酸化。

EB10抑制FLT3調介之下游激酶激活：已認識到MAPK、PI3K及Stat5路徑與激活FLT3之下游信號轉導有關(Stirewalt DL及JP, Radich, JP. Nat Rev Cancer 3:650-665 (2003))。本發明抗體抑制白血病中MPK、PI3K、及STAT5路徑之下游激酶。

使用BaF3-ITD及MV4;11細胞來研究EB10對FLT3-ITD突變誘導之不依賴FL之MAPK磷酸化的影響。EB10在兩種細胞系中均強烈阻斷MAPK之磷酸化。該等結果表明，EB10對FLT3配體-受體相互作用的阻斷可抑制下游MAPK信號轉導路徑(表11)。與EB10一起培育可在EOL-1細胞中抑制FL誘導之AKT磷酸化及在BaF3-ITD細胞中抑制不依賴FL之AKT磷酸化(表12)。在BaF3-ITD細胞中，EB10強烈抑制不依賴FL之Stat5磷酸化，而在EOL-1中無效果(表13)。

表11：EB10抑制FLT3調介之下游激酶MAPK之激活

細胞系	FLT3突變情況	MAPK磷酸化之抑制(IC ₅₀)
EOL-1	野生型	0.1 nM
EM3	野生型	0.1 nM
BaF3-ITD	ITD突變	0.1 nM
MV4;11	ITD突變	0.4 nM

表12：EB10對AKT磷酸化之影響

細胞系	FLT3突變情況	AKT磷酸化之抑制(IC ₅₀)
EOL-1	野生型	1 nM
BaF3-ITD	ITD突變	0.1 nM

表13：EB10抑制不依賴FL之Stat5磷酸化

細胞系	FLT3突變情況	Stat5磷酸化之抑制(IC ₅₀)
EOL-1	野生型	無效果
BaF3-ITD	ITD突變	4 nM

細胞增殖分析

收穫EOL-1細胞並使用無血清RPMI 1640培養基洗滌三次。將細胞在無血清RPMI 1640培養基中培養12小時。對於BaF3-ITD細胞，在補充有10% FCS之RPMI 1640培養基中於不存在外源FL下實施增殖分析。將細胞重構於無血清AIM-V培養基中，一式三份鋪板於平底96孔板(1×10^4 個/100 μ l/孔)中並在37°C下與不同濃度的抗體(0至100 nM)及30 ng/ml FL一起培育68小時。作為背景對照，於不存在外源FL下僅用培養基培育細胞。藉助脈衝對細胞施加0.25 μ Ci/孔之 $[^3\text{H}]$ -胸苷達4小時。收穫細胞並在PerkinElmer Wallace-1205 Betaplate液體閃爍計數器(Wellesley, MA)中量測cpm。計算FL誘導之EOL-1細胞增殖之百分比抑制；自所有實驗樣品之cpm推導背景增殖之cpm(即，細胞樣品未經FL刺激)。利用以下公式來計算百分比抑制： $[(\text{未經處理樣品之cpm} - \text{經抗體處理樣品之cpm}) / \text{未經處理樣品之cpm}] \times 100\%$ 。

EB10抑制表現野生型之白血病細胞的增殖：FL在白血病細胞增殖中起重要作用。與FL一起培育使EOL-1細胞之

[3H]-胸苷攝取增加。用EB10處理以劑量依賴性方式抑制FL誘導之EOL-1細胞增殖(表14)。

表14：EB10抑制FL誘導之EOL-1白血病細胞的增殖

處理	濃度 (nM)	FL誘導之增殖之%抑制 (平均值±標準偏差)
EB10	1.5	12.4±2.1
EB10	3	19.4±1.8
EB10	6	29.3±6.5
EB10	13	32.9±1.7
EB10	25	37.2±7.2
EB10	50	40.3±11.5
EB10	100	51.8±8.2
對照IgG	100	0.4±0.1

EB10抑制表現ITD-突變體FLT3之白血病細胞的增殖：
經FLT3-ITD轉化之BaF3細胞於不存在FL刺激下增殖。FL刺激未增加BaF3-ITD細胞之增殖。EB10處理以劑量依賴性方式抑制該等細胞之不依賴FL之增殖(表15)。

表15：EB10抑制BaF3白血病細胞之FL誘導之增殖

處理	濃度(nM)	不依賴FL之增殖的%抑制 (平均值±標準偏差)
EB10	1.5	0.5±2.4
EB10	3	0.5±5.6
EB10	6	9.6±3.1
EB10	13	13.0±4.0
EB10	25	23.3±0.6
EB10	50	28.6±3.1
EB10	100	29.2±3.0
對照IgG	100	2.0±4.0

抗體內在化分析

按照製造商說明書使用 IODO 珠粒(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)用 ^{125}I 來放射碘化抗體。將EOL-1細胞以每份存於500 ml冷完全培養基中之樣品 5×10^5 個細胞等分至微量離心管中。向細胞中添加約1 mg EB10及D4-3 ^{125}I

標記之抗體並在4℃下培育1小時。將細胞在冷PBS中洗滌兩次，再懸浮於500 ml完全培養基中，隨後在4℃或37℃下培育0、30、60、120、240、或360分鐘。在每一時間點，將細胞在PBS中洗滌三次，隨後在γ計數器上計數4℃樣品以測定結合至細胞表面上之放射性物質的總量。用剝離緩衝液(100 mM甘胺酸，2 M尿素，pH 2.5)將37℃樣品剝離5分鐘。在γ計數器上計數剝離緩衝液及剝離之細胞沉澱物二者以測定內在化放射性物質之百分比。

表16. 結合至EOL-1細胞表面上之FLT3之抗FLT3抗體的內在化

抗體	時間(分鐘)，在37℃下	內在化抗體之百分比(%) (± SD)
EB10	0	11.1 (9.2)
	30	40.5 (13.2)
	60	55.0 (19.1)
	120	53.9 (10.3)
	240	79.9 (24.9)
	360	50.4 (8.5)
D4-3	0	6.3 (5.1)
	30	30.1 (4.9)
	60	52.2 (1.7)
	120	59.5 (7.3)
	240	60.4 (4.9)
	360	68.5 (17.1)

經EB10或D-43放射性標記之EOL-1細胞容易地結合至腫瘤細胞表面上且以時間依賴性方式內在化(表16)。

在活體外對抗人類白血病之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)

藉由標準⁵¹Cr釋放分析來實施ADCC分析。自正常供體血液獲得人類天然殺傷(NK)細胞之富集物，例如自RosettaSep NK細胞富集混合劑(Cell Enrichment Cocktail)；StemCell Technologies公司，Vancouver, British Columbia, Canada或NK細胞分離套組II，Miltenyi Biotec。

用 200 μCi ^{51}Cr 標記靶細胞(2×10^6 個)2小時，並隨後洗滌。將數量遞增之NK細胞(0至400,000個細胞)與約4,000個經 ^{51}Cr 標記之靶細胞一式三份在37°C下於V形底96孔板中一起培育6小時，或與5% SDS一起培育以量測總裂解作用，數量遞增之NK細胞先前已與10 $\mu\text{g/mL}$ (67 nmol/L)對照IgG、C225、EB10、NC7或D4-3 mAb一起培育45分鐘。為量測自發釋放，僅用100 μl 培養基培育靶細胞(4,000個細胞，100 μl /孔)。收集各孔之細胞毒性培養物的上清液並在 γ 計數器(例如1470 Wallac WIZARD, PerkinElmer Life and Analytical Sciences公司，Boston, MA)上計數 ^{51}Cr 。按照 $100 \times (\text{樣品釋放} - \text{自發釋放}) / (\text{總釋放} - \text{自發釋放})$ 計算裂解百分比或細胞毒性百分比。

與小分子FLT3抑制劑不同，FLT3抗體可引起患者針對表現FLT3之腫瘤細胞的免疫應答。具體而言，若表現FLT3之細胞塗敷有人類IgG，則抗體可誘導細胞裂解。該裂解可能是白細胞、尤其表現Fc受體之天然殺傷(NK)細胞激活之結果。本發明抗體提供具有提高之激活下游免疫效應子功能(例如ADCC)之能力的人類抗FLT3抗體。EB10誘導強ADCC應答；NC7及D4-3誘導效力較低之ADCC應答(表17)。

表17：在活體外ADCC人類白血病細胞FLT3

E:T比	%細胞毒性		
	EB10	NC7	D4-3
100:1	67	27	7
33:1	47	8	1
11:1	32	7	0
4:1	22	1	0

EB10、NC7及D4-3可有效治療白血病異種移植物

EOL-1異種移植人類AML白血病模型：經靜脈內(i.v.)注射 5×10^6 個白血病細胞至NOD-SCID小鼠(組內有10隻小鼠)中。在腫瘤注射後一天開始治療。每週經腹膜內(i.p.)注射指定量之500 μg 、250 μg 或100 μg /劑量存於200 μl 磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中的EB10對小鼠實施3次治療。用經純化的人類IgG(500 μg /劑量)治療對照組。每天監測小鼠之存活情況。藉由對數秩檢驗(Log Rank test)比較治療組之存活情況。

對照組中之所有小鼠皆在40天內死於疾病之廣泛傳播(平均存活時間為 36.0 ± 3.1 天)。相比之下，在經500 μg 、250 μg 或100 μg /劑量EB10治療之小鼠組中存活期顯著延長(平均存活時間為 62.3 ± 18.7 、 55.3 ± 18.9 、或 52.8 ± 18.6 ，P值分別 <0.001 、 <0.005 、或 <0.001)。在用10 μg EB10治療之組中未觀察到效果，表明EB10之抗白血病效果係劑量依賴性的。

人類白血病細胞之骨髓植入：在第20天自EB10治療小鼠(500 μg /劑量)及IgG對照治療組之股骨收穫骨髓。在注射白血病細胞後6及14週藉由流式細胞術分析細胞之人類CD45以測定骨髓之腫瘤細胞浸潤程度。利用免疫組織化學染色用經螢光標記之抗人類CD45抗體比較骨髓之腫瘤細胞浸潤程度。在EB10治療之小鼠中骨髓中之腫瘤細胞數量顯著降低。

BaF3-ITD白血病模型：開始給10隻無胸腺(nu/nu)小鼠

的群組i.v.注射 5×10^4 個BaF3-ITD細胞。利用非參數單尾曼-惠特尼秩和檢驗(Mann-Whitney Rank Sum test)(SigmaStat 2.03, SPSS公司, Chicago, IL)實施統計學分析。在腫瘤注射後一天開始治療。每週經i.p.注射500 μg /劑量或100 μg /劑量存於200 μl PBS中之EB10對小鼠實施三次治療。用經純化的人類IgG(500 μg /劑量)治療對照組。每天監測小鼠之存活情況。

與對照IgG治療(平均存活時間為 32.4 ± 10.6 天)相比, EB10治療顯著延長小鼠之存活期(對於500 μg 劑量, 63.4 ± 44.6 天, $P < 0.05$; 及對於100 μg 劑量, 66.5 ± 32.9 天, $P < 0.01$)。該等結果顯示, EB10在活體內在野生型FLT3及ITD-突變體FLT3兩種模型中均係治療有效的。

MOLM14異種移植AML白血病模型：用 γ 輻照器用200拉德(rad)輻照小鼠並隨後i.v.注射 10×10^6 個MOLM-14白血病細胞。在腫瘤注射後一天開始治療。每週經i.p.注射10 mg/kg及0.2 mg/kg劑量存於200 μl PBS中之EB10對小鼠實施兩次治療。用10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ USP鹽水治療對照組。每天監測小鼠之存活情況。藉由對數秩檢驗比較治療組之存活情況。

EB10顯著延長存活期。對於10 mg/kg及0.2 mg/kg劑量, 中值存活期分別為63天至38.5天, 相比之下, 鹽水對照之中值存活期為36天。該效果係劑量依賴性的, 各劑量之功效均顯著高於鄰近較低劑量。

SEM-K2異種移植人類白血病模型：開始給NOD-

SCID小鼠(組內有10隻小鼠)i.v.注射 5×10^6 個白血病細胞。在腫瘤注射後一天開始治療。每週經i.p.注射20 mg/kg存於200 μ l PBS中之EB10、NC7及D4-3對小鼠實施兩次治療。用經純化的人類IgG(500 μ g/劑量)治療對照組。每天監測小鼠之存活情況。藉由對數秩檢驗比較治療組之存活情況。

EB10、NC7及D4-3之活體內功效係在SEM-K2細胞(表現野生型FLT3之人類ALL細胞系)中測定。與人類IgG(中值存活期為30.5天)相比，EB10、NC7及D43治療皆在SEM-K2白血病模型中顯著延長存活期(中值存活期分別為108.5天， $p < 0.0001$ ；58.5天， $p < 0.0001$ 及55.5天， $p = 0.0001$)。EB10之功效顯著強於NC7($p < 0.0001$)及D43($p < 0.0001$)。NC7與D43之功效間無顯著差異($p = 0.244$)。

藉由PK研究來測定EB10之功效

在重複-劑量PK研究中，顯示EB10在非常低劑量下具有功效。吾人發現最大功效之閾值為2至10 μ g/ml。C_{avg}介於41與401 μ g/ml之間、及C_{max}介於49與475 μ g/ml之間時EB10在鼠科動物白血病模型中達成最大功效。C_{max}之第二範圍係375至475 μ g/ml。

在SEM-K2白血病模型中實施EB10與化學治療劑甲胺蝶呤(MTX)之組合療法

在開始治療前一天，給65隻7週齡雄性NOD/SCID小鼠i.v.注射 5×10^5 個懸浮於總體積為200 μ l之PBS中之SEM-K2細胞。排除經靜脈接受小於90%細胞之研究小鼠。第二

天，將具有SEM-K2白血病細胞之NOD-SCID小鼠分為4個治療組，每個組中有12隻小鼠：

- 1) USP鹽水 10 μ l/克，i.p.，2x/週；
- 2) EB10 10 mg/kg，i.p.，2x/週；
- 3) MTX 100 mg/kg，Q7D；及
- 4) MTX 100 mg/kg與EB10 10 mg/kg之組合。

將MTX(Sigma Chemical，目錄號M9929)以10 mg/ml濃度調配於USP鹽水中，並Q7D投用三個週期。將EB10調配於USP鹽水中並每週投用兩次，直至第40天，此時最後一隻鹽水對照動物死亡。以10 ml/kg i.p.給所有小鼠投藥。在組合組中，在第1天在EB10治療開始前至少1小時投用MTX。每天記錄小鼠之存活情況。跟蹤小鼠之存活情況，並宰殺呈現發病/死亡徵兆之任一小鼠；在宰殺之日標記為死亡。在第168天結束研究並宰殺在該時間點仍存活之任一小鼠。藉由治療組間之對數秩檢驗比較治療組之存活情況。

測定在SEM-K2 ALL模型中以最大耐受劑量投與之MTX與EB10組合對小鼠存活情況之影響。在對照組之所有小鼠中SEM-K2白血病急劇惡化，到第34天對照組中之所有小鼠皆死於白血病。EB10及MTX二者在該模型中均有效，但兩種藥劑之組合所產生之效果顯著高於作為單一療法之任一治療。與對照組相比，EB10療法顯著延長小鼠之存活期($p < 0.01$)。MTX療法亦延長存活期，但程度較低。

與單一療法相比，EB10與MTX二者之組合療法具有增

強之功效($P < 0.001$)。EB10與MTX之組合在該模型中達成比任一其他治療顯著較長之中值存活期。另外，在組合組中四隻小鼠在研究結束時(第168天)仍存活，而接受其他治療之小鼠均未存活到該時間點。組合治療容許一些小鼠在治療150天後仍存活、而EB10及MTX作為單一療法均不能達成此長期存活之事實表明，EB10與MTX之組合具有協同作用。該結果令人感到特別意外，因為在Furukawa等人(Leukemia 21:1005-1014 (2007))公佈之活體外研究成果中報導同時投與FLT3抑制劑PKC412與除MTX外的其他化學治療劑可在臨床上有效對抗FLT3白血病。

序列表

<110> 美商應克隆公司

<120> 抗 FLT3 抗體

<130> X18547M

<140> 098118092

<141> 2009-06-01

<150> 61/130,394; 61/130,395; 61/130,539

<151> 2008-05-30; 2008-05-30; 2008-05-30

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Gly Val Gly Ala His Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Val Val Ala Ala Ala Val Ala Asp Tyr
1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Met Gln Gly Thr His Pro Ala Ile Ser
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Met Gln Gly Thr His Pro Ala Ile Ser
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Met Gln Ser Leu Gln Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 12

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Phe Ala Leu Phe Gly Phe Arg Glu Gln Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 19
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Gly Ala His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Phe Ala Leu Phe Gly Phe Arg Glu Gln Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Val Ala Ala Ala Val Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Thr His Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 25

<211> 449

<212> PRT

<213> 智人

<400> 25

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Val Gly Ala His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 26
<211> 452
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Phe Ala Leu Phe Gly Phe Arg Glu Gln Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

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

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

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

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 27
<211> 448
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Val Ala Ala Ala Val Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

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

<210> 28
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 28

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

50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Scr Asp Thr Asp Phe Thr Leu Gln Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 29
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 29
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Scr Scr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp 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> 30
<211> 219
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 31
<211> 468
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Gly Ala His Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

195	200	205
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 210 215 220		
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser 225 230 235 240		
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 245 250 255		
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 260 265 270		
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 275 280 285		
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 290 295 300		
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 305 310 315 320		
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 325 330 335		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 340 345 350		
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 355 360 365		
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val 370 375 380		
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 385 390 395 400		
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 405 410 415		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 420 425 430		
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 435 440 445		
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 450 455 460		
Ser Pro Gly Lys 465		
<210> 32		
<211> 471		
<212> PRT		
<213> 智人		

<400> 32

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Phe Ala Leu Phe Gly Phe Arg Glu Gln Ala Phe
115 120 125

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 33
<211> 467
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Tyr Met His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Ala Ala Ala Val Ala Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465
 <210> 34
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 34
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Gln Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Met Gln Gly Thr His Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 35
<211> 233
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser
100 105 110

Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 <210> 36
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 36
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Met Gln Ser Leu Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val
 115 120 125
 Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 37
<211> 1407
<212> DNA
<213> 智人

<400> 37
atgggatggg catgtatcat cctttttctt glagcaactg caactggagt acattcagag 60
gtccagctgg tgacgtctgg ggctgaggig aagaagcctg gggcctcagt gaagggttcc 120
tgcaaggcat ctggatacac ctccaccagc tactataigc actgggtgag acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggaataatc aacctagtg gtggtagcac aagctacgca 240
cagaagttcc agggcagagt caccatgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag gggagtggga 360
gcgcaltatg ctttlatat ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagcgctagc 420
accaagggcc catcggctct cccctgggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 480
gcggccctgg gcctcctgg caaggactac tccccgaac cggtagcggg gtcgtggaac 540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgctcacacc tccccggctg tctacagtc ctccaggac 600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggca agagagttga gcccatact 720
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccttgggtc 840
acatgcgtgg tggtagcagt gagccacgaa gacctgagg tcaagttaa ctggtatgtg 900
gacggcgagg aggtgataa tgccaagaca aagccgaggg agggagcagt caacagcacg 960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaagact ggctgaatgg caaggagtac 1020
aagtgcaagg tctccaataa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140
aagaaccaag tcagcctgac ctgctgggtc aaaggctct atcccagcga catcgccgtg 1200
gagtgaggga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
tccgacggct ccttcttct ctatccaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgat gaggtctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
agcctctccc tgtctccggg caaatga 1407

<210> 38
<211> 1416
<212> DNA
<213> 智人

<400> 38
atgggatggg catgtatcat cctttttctt glagcaactg caactggagt acattcagag 60
gtccagctgg tacagctcgg ggctgaggig aagaagcctg ggtcctcggg gaagggtctc 120
tgcaaggctt ctggaggcac ctccagcagc tatgtatca gctgggtgag acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggagggaac atccctatct ttggtacagc aaactacgca 240
cagaagttcc agggcagagt caccattacc gcggacaaat ccacgagcac agcctacatg 300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaac atttgcgtt 360
ttcgggttca gggagcaggc ttltlatatc tggggccaag ggaccacggg caccgtctca 420

agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
 gggggcacag cggccclggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggig 540
 tcgiggaaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagttc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtggig accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
 acctacatct gcaacgigaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtigag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgigcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc 840
 cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtaigtgg acggcgigga ggtgcataat gccaaagcaa agccgcggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtccct accgtcctgc accaagactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaccatc 1080
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggag 1140
 gagatgacca agaaccaagt cagcctgacc tgcctggta aaggcttcta tccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagccctccc 1260
 gtgtctggact ccgacggctc ctctctctc tatccaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtct ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctga caaccactac 1380
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggc aaatga 1416

<210> 39
 <211> 1404
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 39
 atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaacig caactggagt acattcagag 60
 gtccagctgg tgcagctcgg ggtgagggtg aagaagccg gggcctcagt gaaggtttcc 120
 tgcaaggcat ctggatacac ctccaccagc tactatatgc actgggcgcg acaggccccct 180
 ggacaagggc ttgagtggtt ggggaataac aaccctagt gtggttagcac aagctacgca 240
 cagaagtacc agggcagagt caccalgacc agggacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
 gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgctag agtggtagca 360
 gcagctgttg ccgactactg gggccaggga accctggta ccgtctcaag cgctagcacc 420
 aaggggccat cggctctccc cctggcaccc tcttccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gcccctgggt gccctggtaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgc gttggaactca 540
 ggcgccccga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggaactctac 600
 tccctcagca gcgtggtagc cgtgccctcc agcagctagg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttagacc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tctgggggg accgtcagtc 780
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgaici ccgggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtag tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtatgtggac 900
 ggcgtggagg tgataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgiggta gcgtccctac cgtccctgac caagactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag	1140
aaccaagica gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttclatc ccagcgacat cgccgtggag	1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc	1260
gacggctcct tcltctctta ttccaagctc accgtggaca agagcaggig gcagcagggg	1320
aacgtcttcl catgtctcgt gatgatgag gcctctgaca accactacac gcagaagagc	1380
ctctccctgt ctccgggcaa atga	1404

<210> 40
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 40	
atgggatggc catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagat	60
gttgtatga ctacagctcc actctccctg cccgtcacc ctggagagcc ggcttccatc	120
tctgcaggc ctatctagag cctcctgcat agtaattgaa acaactattt ggatlggtac	180
ctgcagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatt tgggttctaa tggggcctct	240
gggttccag acagattcag cggcagtggg tcagacactg atttcacact gcaaatcagt	300
agggaggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc aaggacacac cccgccatc	360
tcttccggcc aaggacacg actggagatt aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc	420
atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgtct	480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg	540
ggttaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaacaca aagttacgc ctgcgaagtc	660
acccatcagg gcctgagctc gccctgcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag	717

<210> 41
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 41	
atgggatggc catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagac	60
atccagatga cccagctcc atccctccctg ctgcatctg taggagacag agtcaccatc	120
acttgcggg caagtcagag cattagcagc tatitaaatt ggtatcagca gaaaccaggg	180
aaagcccta agctctctga ctatgtctga tccagtttgc caagtgggt cccatcaagg	240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc actctacca tcagcagctt gcaacctgaa	300
gatttagcaa catattactg tcaacagagt tacagtaccc caltcacitt cggccctggg	360
accaaagtgg atatcaaagc tacgggtggc gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct	420
gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct gtgtgtgcc tgcgaalaa ctctatccc	480
agagaggcca aagtcagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag	540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg	600
agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcttgcg aagtcaccca tcaggccctg	660

agctcgcccc tcacaaagag ctccaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 42
<211> 717
<212> DNA
<213> 智人

<400> 42
atgggatggg catglatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagat 60
gttgtgatga ctacagtcct acctccctg cccgtcacc cttgagagcc ggcctccatc 120
tccigcaggt ctatgcagag cctcctgcat agtaatggat acaactattt ggatttggtac 180
ctgcagaagc cagggcagtc tccacagctc ctgatctatt tgggttctaa tggggcctcc 240
ggggtcctctg acagggttcag tggcagtgga tcaggcacag attttacact gaaaatcagc 300
agagtgaggg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc aatctctaca aaccccatc 360
actttcggcc ctgggaccaa agtggatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttccgc catctgalga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
ggtaactccc aggagagigt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
agcacctga cgtgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
acccatcagg gctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag 717

<210> 43
<211> 993
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

Met Pro Ala Leu Ala Arg Asp Gly Gly Gln Leu Pro Leu Leu Val Val
1 5 10 15

Phe Ser Ala Met Ile Phe Gly Thr Ile Thr Asn Gln Asp Leu Pro Val
20 25 30

Ile Lys Cys Val Leu Ile Asn His Lys Asn Asn Asp Ser Ser Val Gly
35 40 45

Lys Ser Ser Ser Tyr Pro Met Val Ser Glu Ser Pro Glu Asp Leu Gly
50 55 60

Cys Ala Leu Arg Pro Gln Ser Ser Gly Thr Val Tyr Glu Ala Ala Ala
65 70 75 80

Val Glu Val Asp Val Ser Ala Ser Ile Thr Leu Gln Val Leu Val Asp
85 90 95

Ala Pro Gly Asn Ile Ser Cys Leu Trp Val Phe Lys His Ser Ser Leu
100 105 110

Asn Cys Gln Pro His Phe Asp Leu Gln Asn Arg Gly Val Val Ser Met
115 120 125

Val Ile Leu Lys Met Thr Glu Thr Gln Ala Gly Glu Tyr Leu Leu Phe
130 135 140

Ile Gln Ser Glu Ala Thr Asn Tyr Thr Ile Leu Phe Thr Val Ser Ile
145 150 155 160

Arg Asn Thr Leu Leu Tyr Thr Leu Arg Arg Pro Tyr Phe Arg Lys Met
165 170 175

Glu Asn Gln Asp Ala Leu Val Cys Ile Ser Glu Ser Val Pro Glu Pro
180 185 190

Ile Val Glu Trp Val Leu Cys Asp Ser Gln Gly Glu Ser Cys Lys Glu
195 200 205

Glu Ser Pro Ala Val Val Lys Lys Glu Glu Lys Val Leu His Glu Leu
210 215 220

Phe Gly Thr Asp Ile Arg Cys Cys Ala Arg Asn Glu Leu Gly Arg Glu
225 230 235 240

Cys Thr Arg Leu Phe Thr Ile Asp Leu Asn Gln Thr Pro Gln Thr Thr
245 250 255

Leu Pro Gln Leu Phe Leu Lys Val Gly Glu Pro Leu Trp Ile Arg Cys
260 265 270

Lys Ala Val His Val Asn His Gly Phe Gly Leu Thr Trp Glu Leu Glu
275 280 285

Asn Lys Ala Leu Glu Glu Gly Asn Tyr Phe Glu Met Ser Thr Tyr Ser
290 295 300

Thr Asn Arg Thr Met Ile Arg Ile Leu Phe Ala Phe Val Ser Ser Val
305 310 315 320

Ala Arg Asn Asp Thr Gly Tyr Tyr Thr Cys Ser Ser Ser Lys His Pro
325 330 335

Ser Gln Ser Ala Leu Val Thr Ile Val Glu Lys Gly Phe Ile Asn Ala
340 345 350

Thr Asn Ser Ser Glu Asp Tyr Glu Ile Asp Gln Tyr Glu Glu Phe Cys
355 360 365

Phe Ser Val Arg Phe Lys Ala Tyr Pro Gln Ile Arg Cys Thr Trp Thr
370 375 380

Phe Ser Arg Lys Ser Phe Pro Cys Glu Gln Lys Gly Leu Asp Asn Gly
385 390 395 400

Tyr Ser Ile Ser Lys Phe Cys Asn His Lys His Gln Pro Gly Glu Tyr
405 410 415

Ile Phe His Ala Glu Asn Asp Asp Ala Gln Phe Thr Lys Met Phe Thr
420 425 430

Leu Asn Ile Arg Arg Lys Pro Gln Val Leu Ala Glu Ala Ser Ala Ser

435	440	445
Gln Ala Ser Cys Phe Ser Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Ser Trp Thr Trp		
450	455	460
Lys Lys Cys Ser Asp Lys Ser Pro Asn Cys Thr Glu Glu Ile Thr Glu		
465	470	480
Gly Val Trp Asn Arg Lys Ala Asn Arg Lys Val Phe Gly Gln Trp Val		
485	490	495
Ser Ser Ser Thr Leu Asn Met Ser Glu Ala Ile Lys Gly Phe Leu Val		
500	505	510
Lys Cys Cys Ala Tyr Asn Ser Leu Gly Thr Ser Cys Glu Thr Ile Leu		
515	520	525
Leu Asn Ser Pro Gly Pro Phe Pro Phe Ile Gln Asp Asn Ile Ser Phe		
530	535	540
Tyr Ala Thr Ile Gly Val Cys Leu Leu Phe Ile Val Val Leu Thr Leu		
545	550	555
Leu Ile Cys His Lys Tyr Lys Lys Gln Phe Arg Tyr Glu Ser Gln Leu		
565	570	575
Gln Met Val Gln Val Thr Gly Ser Ser Asp Asn Glu Tyr Phe Tyr Val		
580	585	590
Asp Phe Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp Leu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Glu		
595	600	605
Asn Leu Glu Phe Gly Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Lys Val		
610	615	620
Met Asn Ala Thr Ala Tyr Gly Ile Ser Lys Thr Gly Val Ser Ile Gln		
625	630	635
Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Lys Ala Asp Ser Ser Glu Arg Glu		
645	650	655
Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Met Met Thr Gln Leu Gly Ser His Glu		
660	665	670
Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Leu Ser Gly Pro Ile Tyr		
675	680	685
Leu Ile Phe Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Tyr Leu Arg		
690	695	700
Ser Lys Arg Glu Lys Phe His Arg Thr Trp Thr Glu Ile Phe Lys Glu		
705	710	715
His Asn Phe Ser Phe Tyr Pro Thr Phe Gln Ser His Pro Asn Ser Ser		
725	730	735

Met Pro Gly Ser Arg Glu Val Gln Ile His Pro Asp Ser Asp Gln Ile
740 745 750

Ser Gly Leu His Gly Asn Ser Phe His Ser Glu Asp Glu Ile Glu Tyr
755 760 765

Glu Asn Gln Lys Arg Leu Glu Glu Glu Asp Leu Asn Val Leu Thr
770 775 780

Phe Glu Asp Leu Leu Cys Phe Ala Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Glu
785 790 795 800

Phe Leu Glu Phe Lys Ser Cys Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
805 810 815

Val Leu Val Thr His Gly Lys Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu
820 825 830

Ala Arg Asp Ile Met Ser Asp Ser Asn Tyr Val Val Arg Gly Asn Ala
835 840 845

Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Leu Phe Glu Gly Ile
850 855 860

Tyr Thr Ile Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu
865 870 875 880

Ile Phe Ser Leu Gly Val Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Asp Ala
885 890 895

Asn Phe Tyr Lys Leu Ile Gln Asn Gly Phe Lys Met Asp Gln Pro Phe
900 905 910

Tyr Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Ile Ile Met Gln Ser Cys Trp Ala Phe
915 920 925

Asp Ser Arg Lys Arg Pro Ser Phe Pro Asn Leu Thr Ser Phe Leu Gly
930 935 940

Cys Gln Leu Ala Asp Ala Glu Glu Ala Met Tyr Gln Asn Val Asp Gly
945 950 955 960

Arg Val Ser Glu Cys Pro His Thr Tyr Gln Asn Arg Arg Pro Phe Ser
965 970 975

Arg Glu Met Asp Leu Gly Leu Leu Ser Pro Gln Ala Gln Val Glu Asp
980 985 990

Ser

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：98118092

A61K39/395

※ 申請日：98.6.1

※IPC 分類：C07K16/28

一、發明名稱：(中文/英文)

抗FLT3抗體

ANTI-FLT3 ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本發明提供以高親和力在細胞外結構域4或5內與人類FLT3特異性結合之完全人類抗體。本發明進一步提供治療白血病之方法，藉由投與有效量之抗體，單獨或與包括甲胺蝶呤之抗癌劑或治療組合。

三、英文發明摘要：

The present invention provides fully human antibodies that specifically bind to human FLT3 within extracellular domains 4 or 5 with high affinity. The invention further provides methods of treating leukemia by administering an effective amount of an antibody either alone or in combination with an anti-cancer agent or treatment including methotrexate.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

七、申請專利範圍：

1. 一種特異性結合人類FLT3 (SEQ ID NO. 43)之抗體，其包含CDRH1，具有序列SYMH (SEQ ID NO:2)；CDRH2，具有序列IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:3)；CDRH3，具有序列GVGAHDADFID (SEQ ID NO:4)或VVAAAVADY (SEQ ID NO:5)；CDRL1，具有序列RSSQSLLHSNGNNYLD (SEQ ID NO:6)或RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO:7)；CDRL2，具有序列LGSNRAS (SEQ ID NO:8)；及CDRL3，具有序列MQGTHPAIS (SEQ ID NO:9)或MQSLQTPFT (SEQ ID NO:11)。
2. 如請求項1之抗體，其包含CDRH1，具有序列SYMH (SEQ ID NO:2)；CDRH2，具有序列IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:3)；CDRH3，具有序列GVGAHDADFID (SEQ ID NO:4)；CDRL1，具有序列RSSQSLLHSNGNNYLD (SEQ ID NO:6)；CDRL2，具有序列LGSNRAS (SEQ ID NO:8)；及CDRL3，具有序列MQGTHPAIS (SEQ ID NO:9)。
3. 如請求項1或2中任一項之抗體，其包含VL，該VL包含胺基酸序列：

DVVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLLHSNGNNYLD
WYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVDPDRFSGSGSDTDFTL
QISRVEAEDVGVYYCMQGTHPAISFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:22)；

及 VH，該 VH 包含胺基酸序列：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVV
RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGVGAHDAFDIWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO:19)。

4. 如請求項 1 或 2 之抗體，其包含重鏈，該重鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25；及輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列 SEQ ID NO:28。

5. 如請求項 1 或 2 之抗體，其包含兩條重鏈，各包含胺基酸序列 SEQ ID NO:25；及兩條輕鏈，各包含胺基酸序列 SEQ ID NO:28。

6. 如請求項 1 之抗體，其包含 VL，該 VL 包含胺基酸序列：
DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHLSNGYNYLD
WYLQKPGQSPQLLIYLGSRASGVPRFSGSGSGTDFTL
KISRVEAEDVGVYYCMQSLQTPFTFGPGTKVDIK (SEQ
ID NO:24)；及 VH，該 VH 包含胺基酸序列：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWA
RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTS
TSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARVVAADVWGQGT
LTVTVSS (SEQ ID NO:21)。

7. 如請求項 1 或 2 之抗體，其係用作藥劑。

8. 如請求項 1 或 2 之抗體，其係用於治療癌症。

9. 如請求項 8 之抗體，其中該癌症係白血病。

10. 一種分離之聚核酸，其包含編碼如請求項 1 至 6 中任一項

之抗體的核苷酸序列。

11. 一種表現載體，其包含如請求項10之聚核酸可操作地連接於表現控制元件，由此可表現所編碼之抗體。
12. 一種重組細胞，其包含如請求項11之表現載體，該重組細胞能夠產生如請求項1至6中任一項之抗體。
13. 一種抗體，其係藉由培養如請求項12之重組細胞以產生該抗體及自培養物回收該抗體來產生。
14. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至6或13中任一項之抗體與醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。
15. 一種產品，其含有如請求項1至6或13中任一項之抗體及另外抗癌劑或治療，同時、分別或依序組合用於療法中。
16. 如請求項15之產品，其中該抗癌劑係甲胺蝶呤(methotrexate)。