



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112543770 A

(43) 申请公布日 2021.03.23

(21) 申请号 201980049672.2

(22) 申请日 2019.06.25

(30) 优先权数据

62/690,052 2018.06.26 US

62/691,342 2018.06.28 US

62/810,703 2019.02.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/038992 2019.06.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/005945 EN 2020.01.02

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 宏基因公司

(72) 发明人 S·W·希克斯 N·C·尤德

B·巴拉特 E·邦维尼

G·迪德里克 L·S·约翰逊

D·卢 J·A·斯克里布纳

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 吴斌

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书17页 说明书129页

序列表138页 附图25页

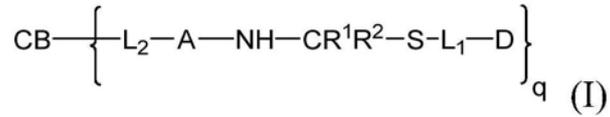
(54) 发明名称

靶向ADAM9的免疫缀合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及包含能够特异性结合至“含解联蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白9” (“ADAM9”) 的抗体或其片段的免疫缀合物,所述抗体或其片段缀合至至少一种美登木素生物碱化合物。本发明具体地涉及与人ADAM9和非人灵长类(例如,食蟹猴)的ADAM9具有交叉反应性的此类免疫缀合物。本发明另外涉及包含轻链可变(VL)结构域和/或重链可变(VH)结构域的所有此类免疫缀合物,所述轻链可变(VL)结构域和/或重链可变(VH)结构域已被人源化和/或去免疫化以便在向接受受试者施用此类免疫缀合物后表现出降低的免疫原性。本发明还涉及含有此类免疫缀合物中的任一种的药物组合物,以及涉及使用此类免疫缀合物中的任一种治疗癌症及其他疾病和病状的方法。

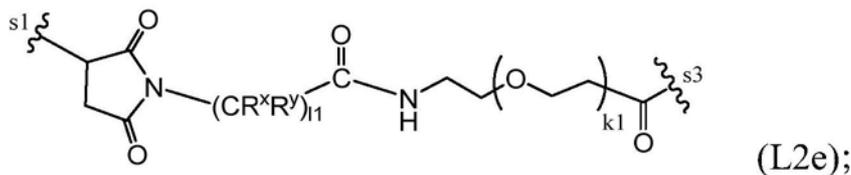
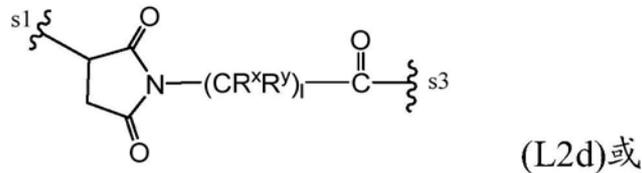
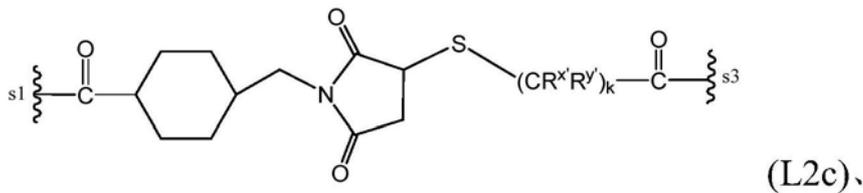
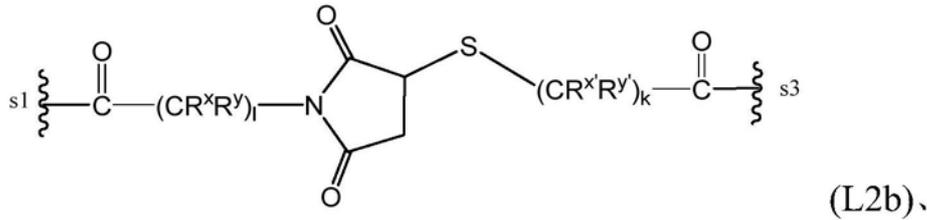
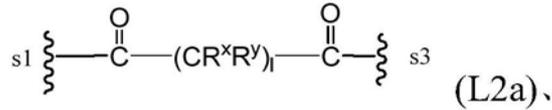
1. 一种免疫缀合物,其由下式:



或其药学上可接受的盐表示,其中:

CB为抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段;

L₂由下式之一表示:



其中:

R^x、R^y、R^{x'}和R^{y'}在每次出现时独立地为H、-OH、卤素、-O-(C₁₋₄烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺或被-OH、卤素、SO₃H或NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代的C₁₋₄烷基,其中R₄₀、R₄₁和R₄₂各自独立地为H或C₁₋₄烷基;

l和k各自独立地为1至10的整数;

l1为2至5的整数;

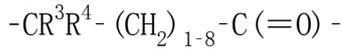
k1为1至5的整数;并且

s1表示连接至细胞结合剂CB的位点且s3表示连接至A基团的位点;

A为氨基酸残基或包含2至20个氨基酸残基的肽;

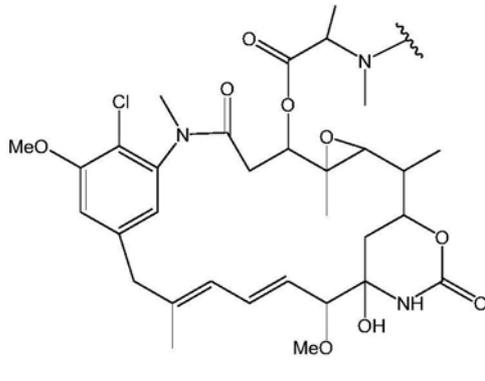
R¹和R²各自独立地为H或C₁₋₃烷基;

L_1 由下式表示:



其中 R^3 和 R^4 各自独立地为H或Me,且 L_1 中的 $-C(=O)-$ 部分连接至D;

D由下式表示:



q 为1至20的整数。

2. 如权利要求1所述的免疫缀合物,其中 R^x 、 R^y 、 R^x 及 R^y 都为H;并且1和k各自独立地为2至6的整数。

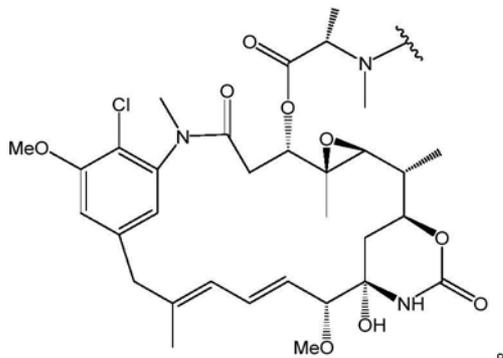
3. 如权利要求1或2所述的免疫缀合物,其中A为含有2至5个氨基酸残基的肽。

4. 如权利要求3所述的免疫缀合物,其中A选自由以下组成的组:Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:144)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:145)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:146)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro及D-Ala-tBu-Gly,其中各肽中的第一个氨基酸连接至 L_2 基团,而各肽中的最后一个氨基酸连接至 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 。

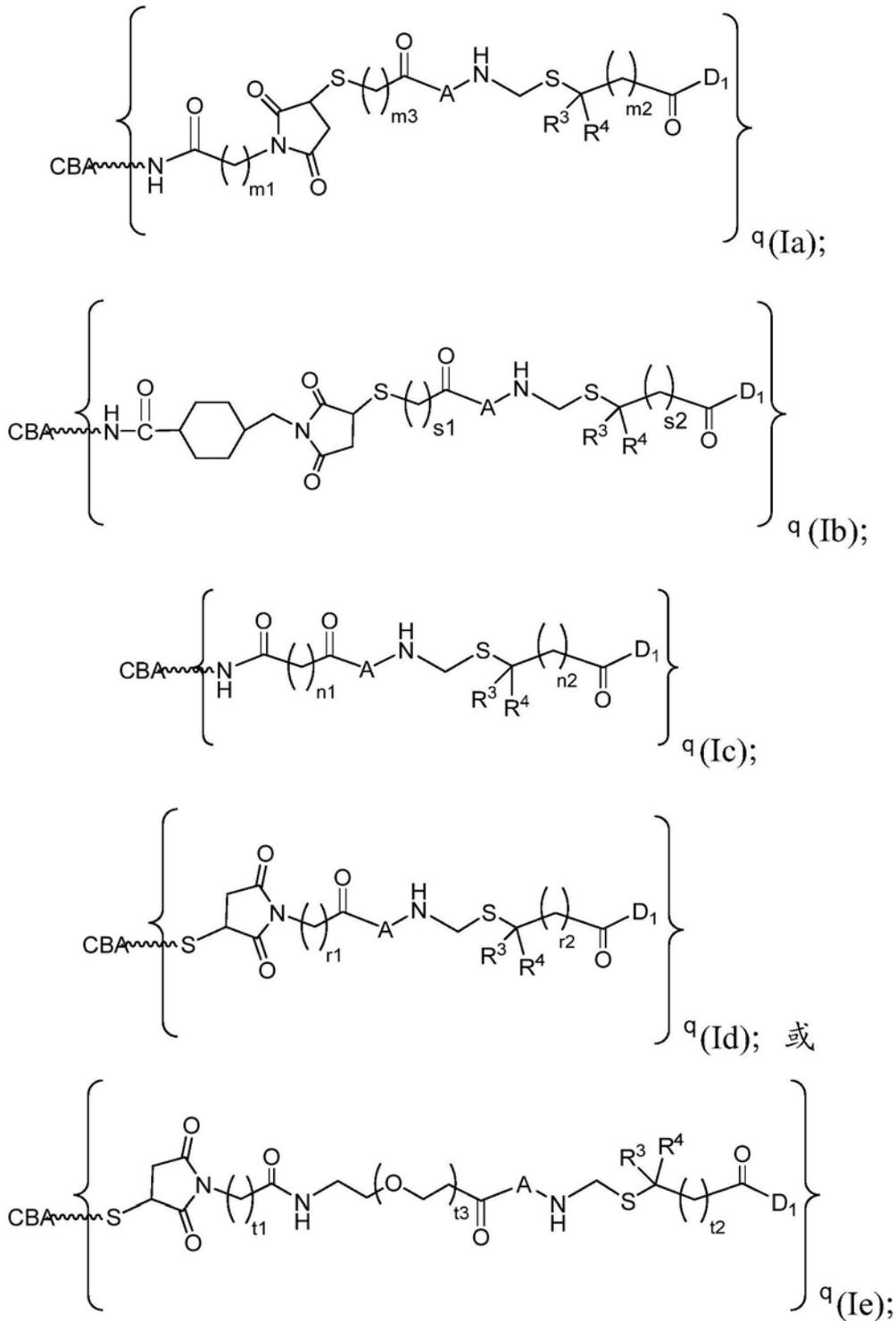
5. 如权利要求1-4中任一项所述的免疫缀合物,其中 R^1 和 R^2 皆为H。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的免疫缀合物,其中 L_1 为 $-(CH_2)_{4-6}-C(=O)-$ 。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的免疫缀合物,其中D由下式表示:



8. 如权利要求1-7中任一项所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式:



或其药学上可接受的盐表示,其中:

$\text{CBA}\sim\text{NH}$ 为通过Lys胺基团连接至 L_2 基团的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段;

$\text{CBA}\sim\text{S}$ 为通过Cys硫醇基团连接至 L_2 基团的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段;

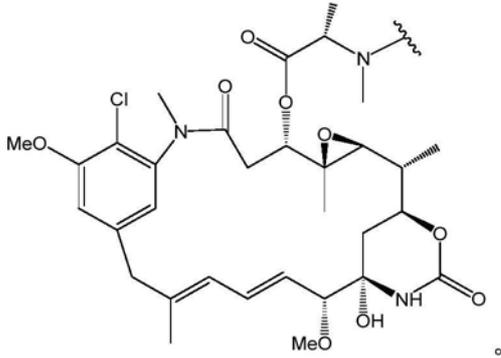
R^3 和 R^4 各自独立地为H或Me;

m_1 、 m_3 、 n_1 、 r_1 、 s_1 及 t_1 各自独立地为1至6的整数;

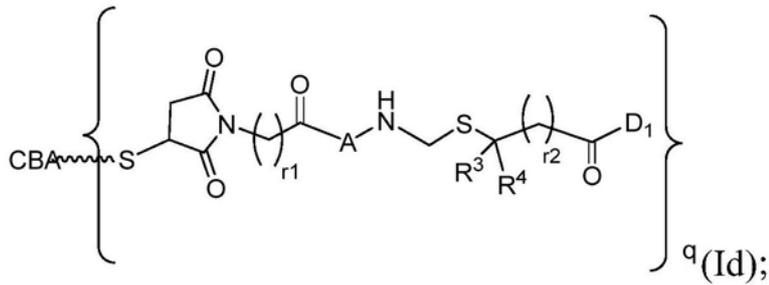
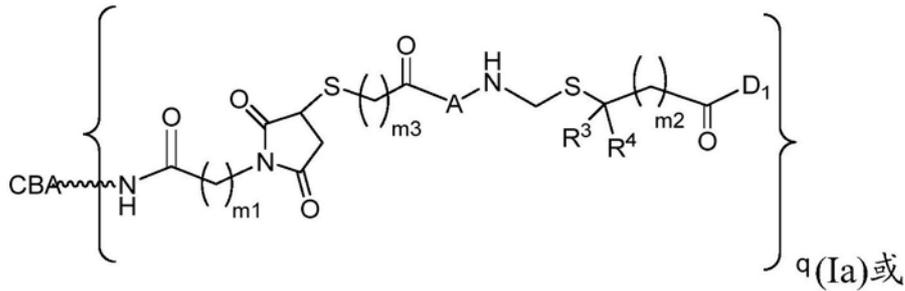
m_2 、 n_2 、 r_2 、 s_2 及 t_2 各自独立地为1至7的整数;

t_3 为1至12的整数;

D₁由下式表示:



9. 如权利要求8所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式表示:



其中:

m₁和m₃各自独立地为2至4的整数;

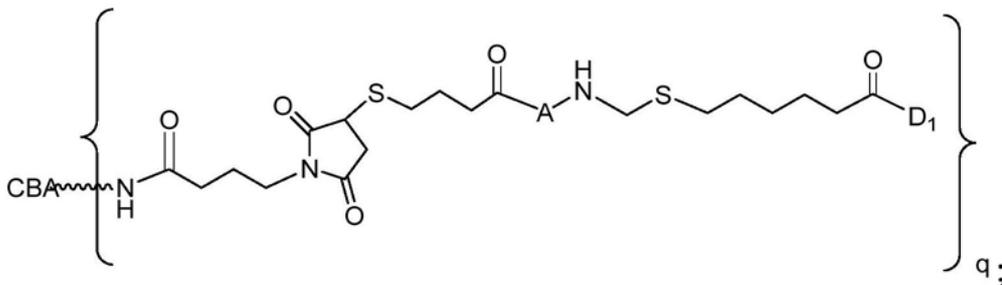
m₂为2至5的整数;

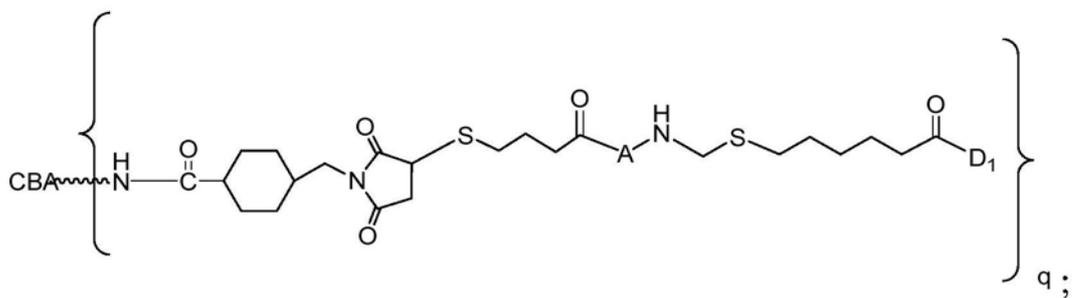
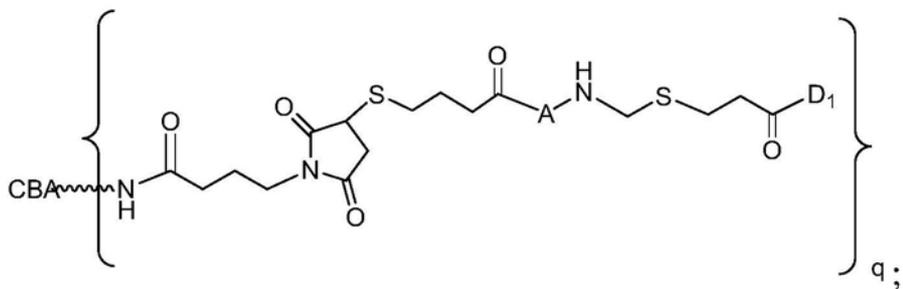
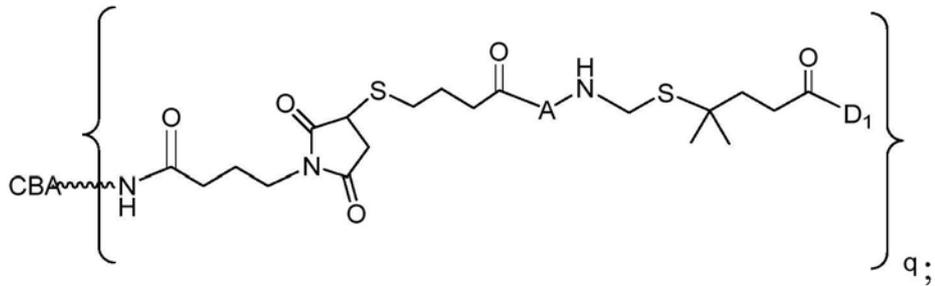
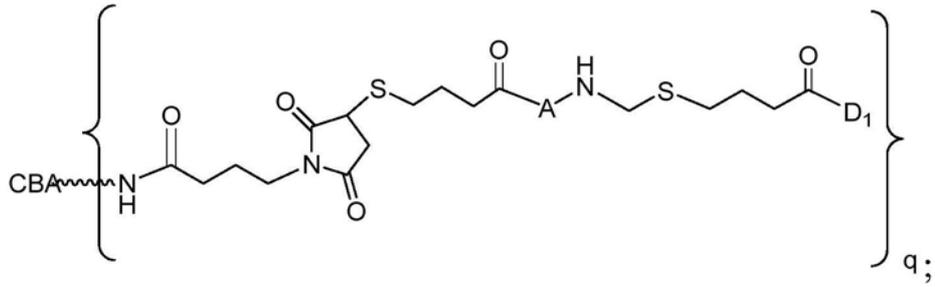
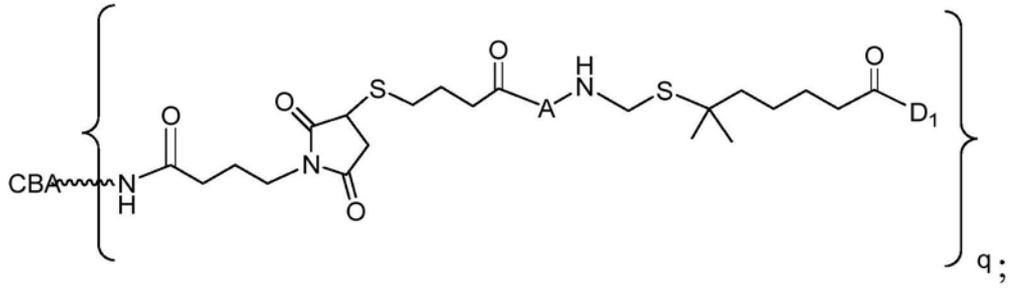
r₁为2至6的整数;并且

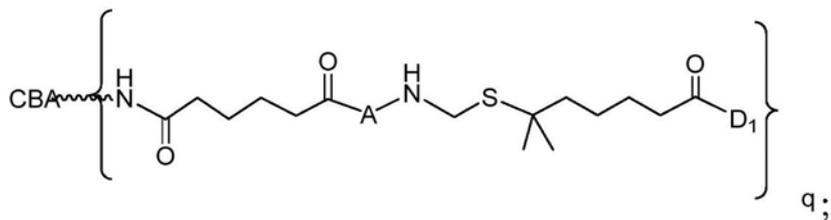
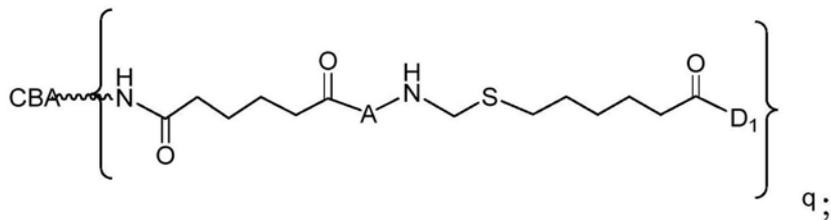
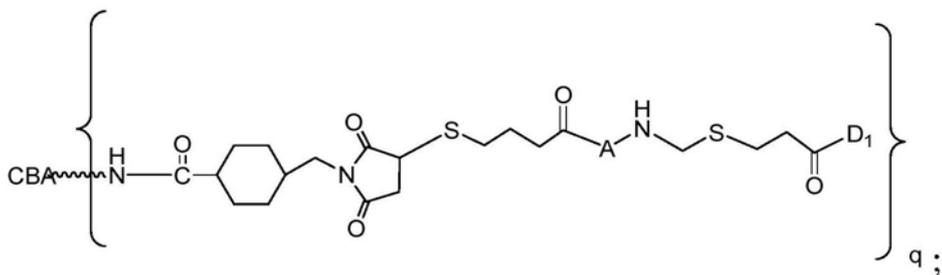
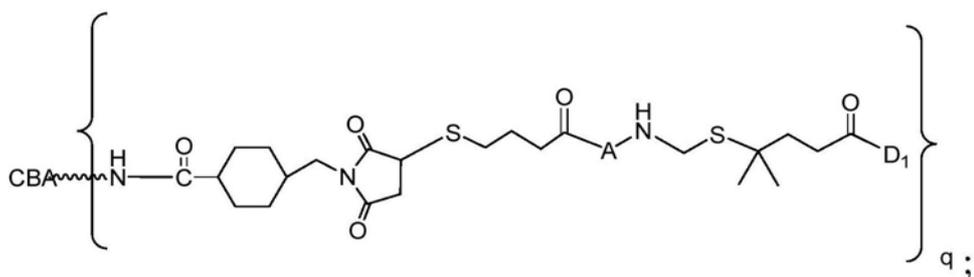
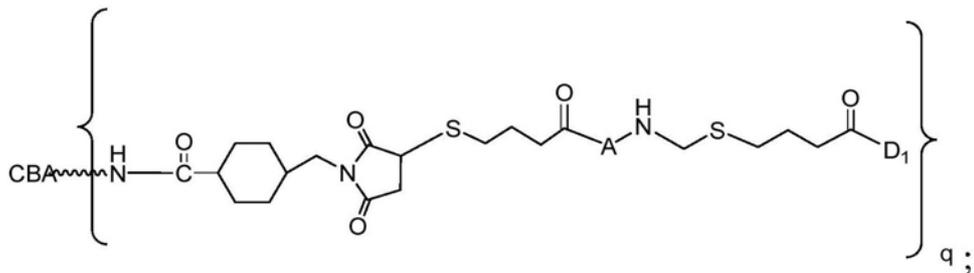
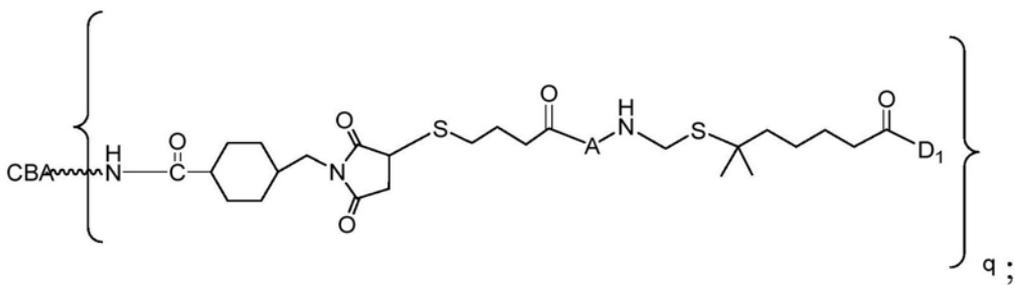
r₂为2至5的整数。

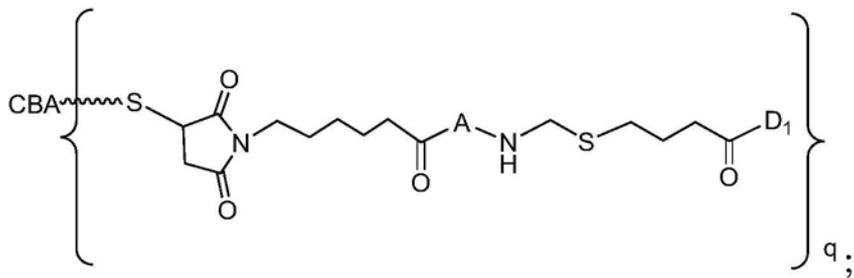
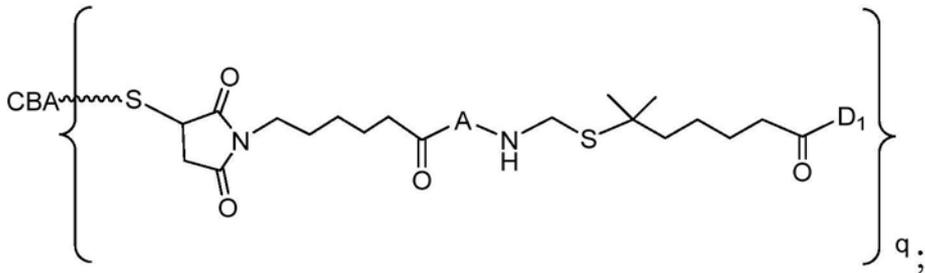
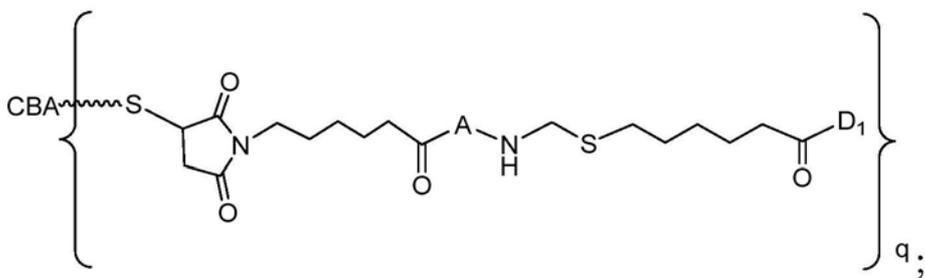
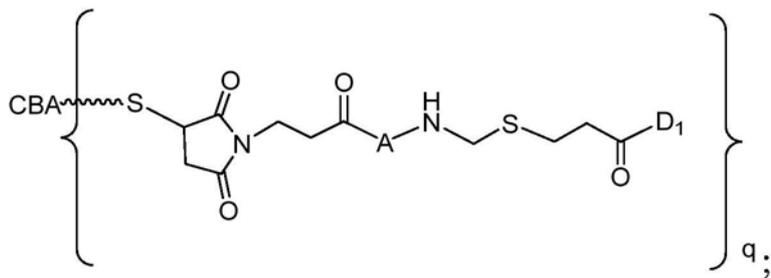
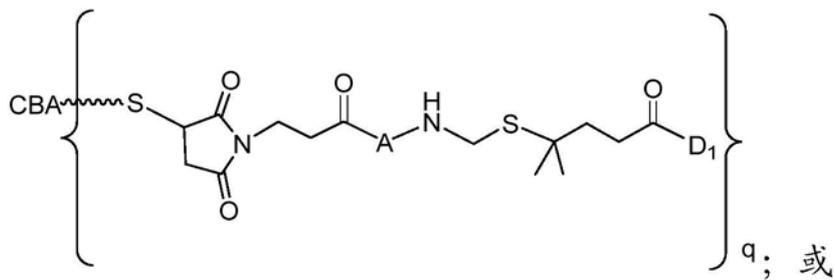
10. 如权利要求8或9所述的免疫缀合物,其中A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。

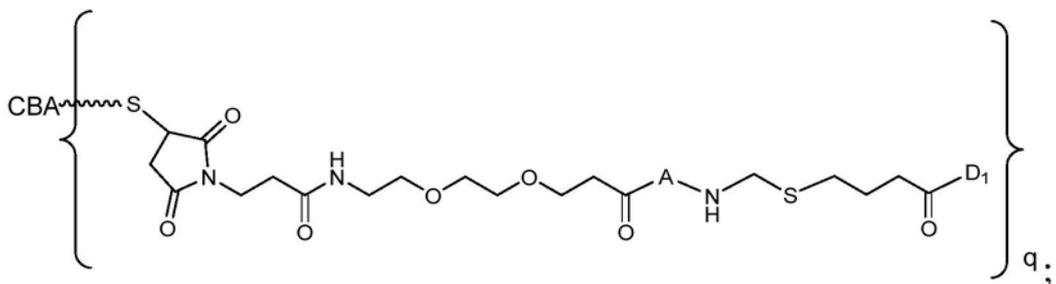
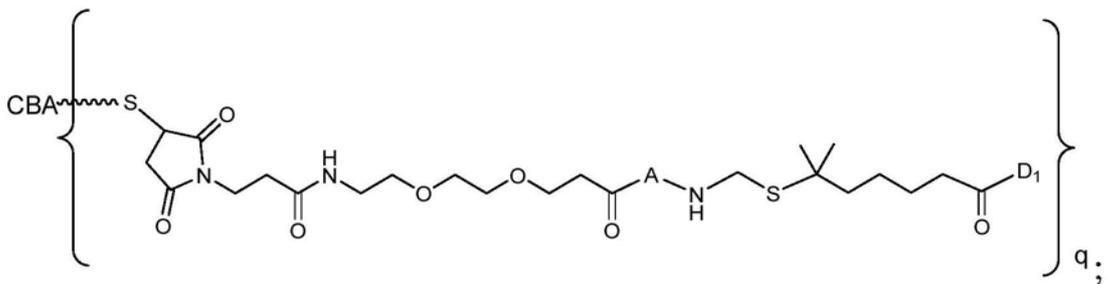
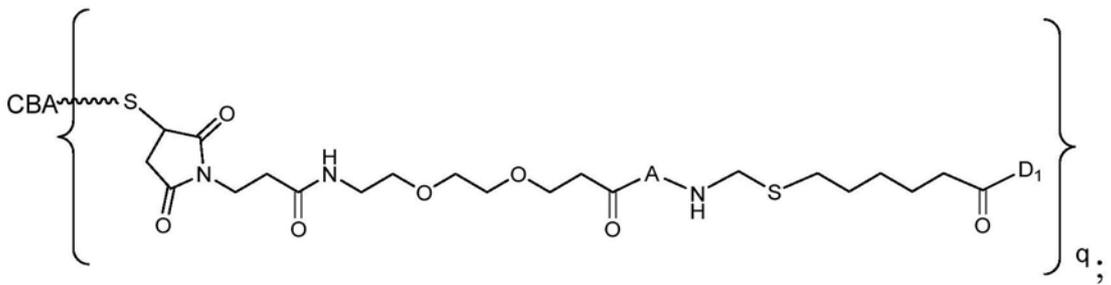
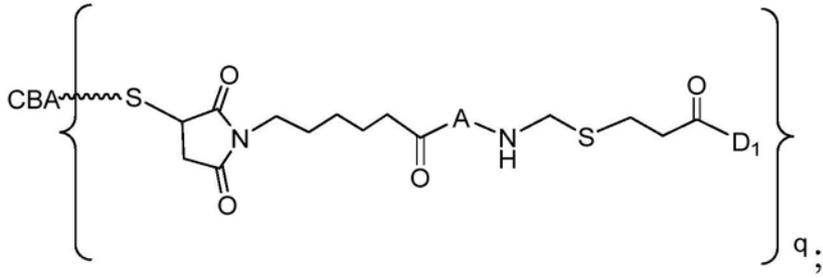
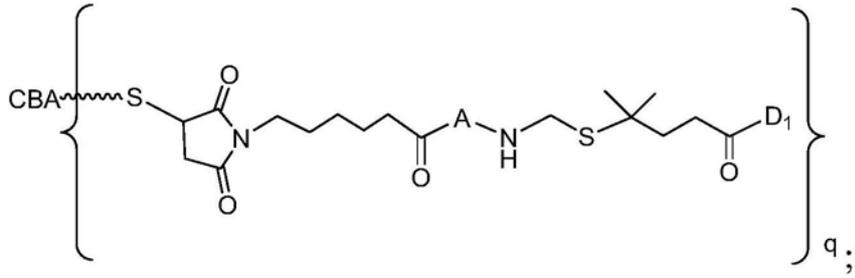
11. 如权利要求8所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式:

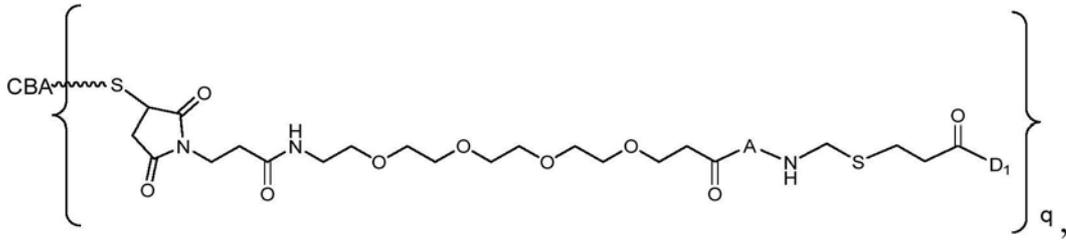








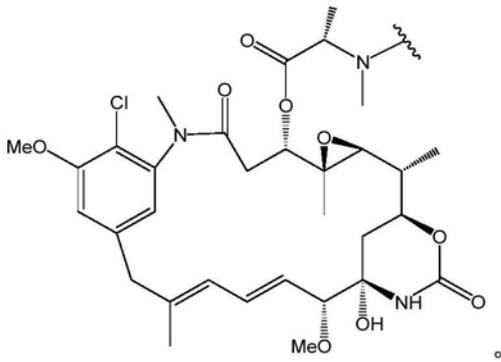




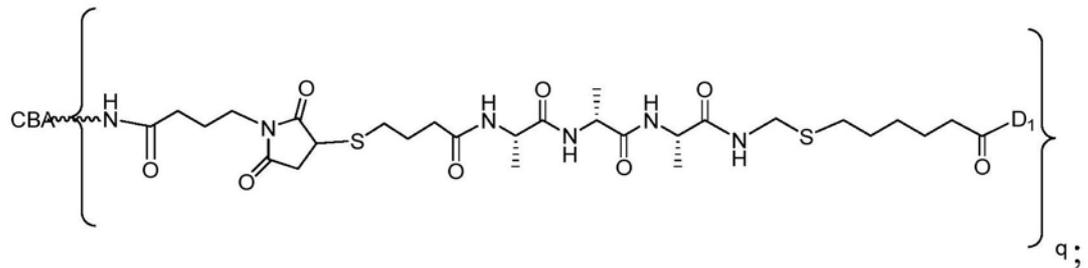
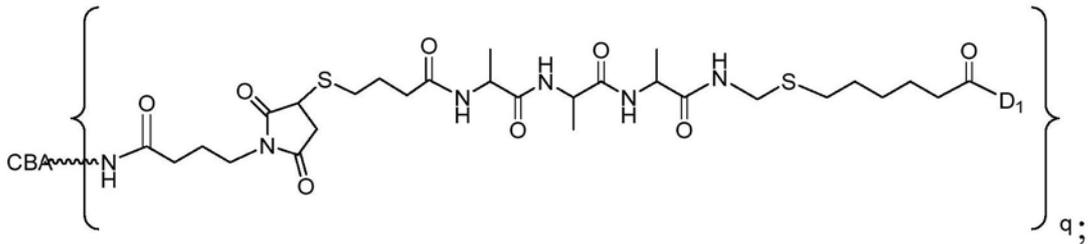
或其药学上可接受的盐表示,其中:

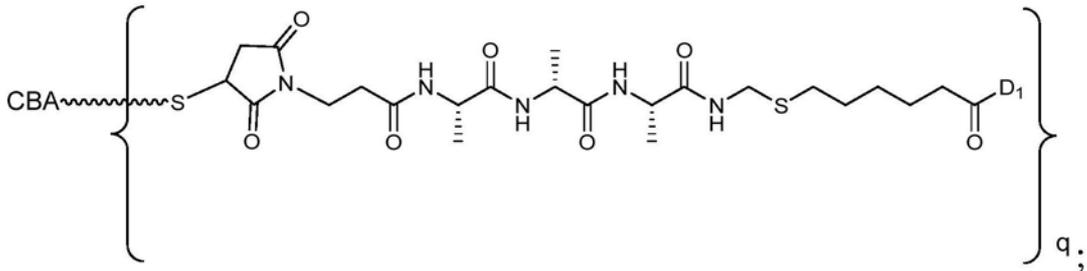
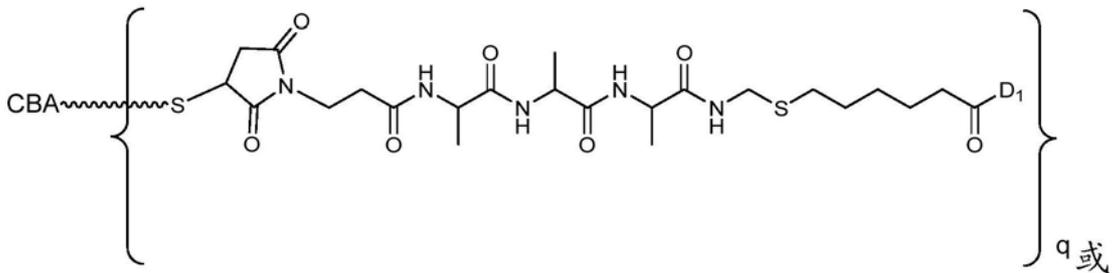
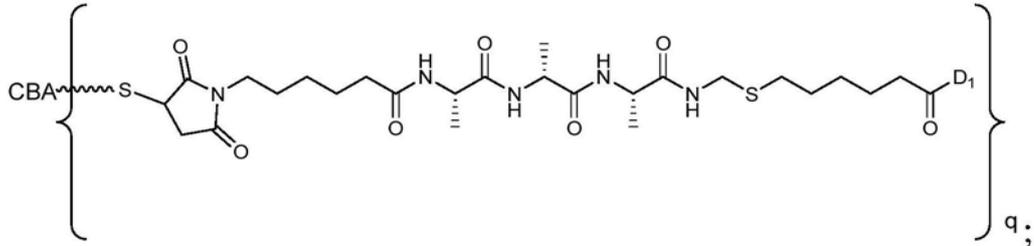
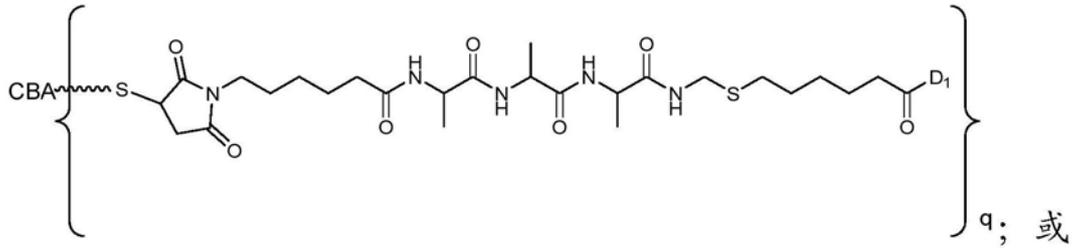
A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly,并且

D₁由下式表示:

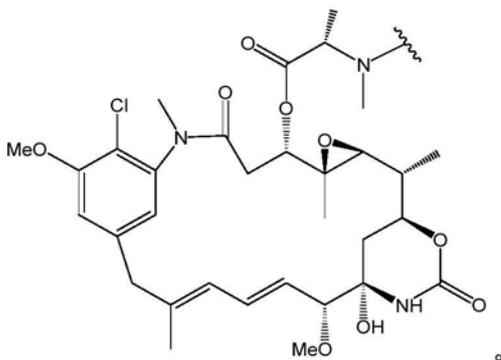


12. 如权利要求11所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式表示:





其中D₁由下式表示:



13. 如权利要求1-12中任一项所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物包含特异性结合至人ADAM9和cyno ADAM9的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段缀合至所述药理剂。

14. 如权利要求13所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含具有选自由以下组成的组的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和

CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域：

- (a) 分别为SEQ ID NO:8、35及10和SEQ ID NO:62、13、14；
- (b) 分别为SEQ ID NO:8、35及10和SEQ ID NO:63、13、14；
- (c) 分别为SEQ ID NO:8、36及10和SEQ ID NO:63、13、14；及
- (d) 分别为SEQ ID NO:34、36及10和SEQ ID NO:64、13、65。

15. 如权利要求13或14所述的免疫缀合物，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)，所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有与选自由以下组成的组的序列有至少90%、至少95%或至少99%同一性的序列：

- (a) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:55；
- (b) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:56；
- (c) 分别为SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:56；及
- (d) 分别为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:57。

16. 如权利要求15所述的免疫缀合物，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)，所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有选自由以下组成的组的序列：

- (a) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:55；
- (b) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:56；
- (c) 分别为SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:56；及
- (d) 分别为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:57。

17. 如权利要求13所述的免疫缀合物，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段被优化成与嵌合或鼠亲代抗体相比具有至少增强100倍的cyno ADAM9结合亲和力并保留与人ADAM9的高亲和力结合。

18. 如权利要求17所述的免疫缀合物，其中所述抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含具有选自由以下组成的组的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域：

- (a) 分别为SEQ ID NO:8、35及37和SEQ ID NO:62、13、14；
- (b) 分别为SEQ ID NO:8、35及38和SEQ ID NO:62、13、14；
- (c) 分别为SEQ ID NO:8、35及39和SEQ ID NO:62、13、14；
- (d) 分别为SEQ ID NO:8、35及40和SEQ ID NO:62、13、14；
- (e) 分别为SEQ ID NO:8、35及41和SEQ ID NO:62、13、14；
- (f) 分别为SEQ ID NO:8、35及42和SEQ ID NO:62、13、14；
- (g) 分别为SEQ ID NO:8、35及43和SEQ ID NO:62、13、14；
- (h) 分别为SEQ ID NO:8、35及44和SEQ ID NO:62、13、14；
- (i) 分别为SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14；及
- (j) 分别为SEQ ID NO:8、35及46和SEQ ID NO:62、13、14。

19. 如权利要求18所述的免疫缀合物，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)，所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有与选自由以下组成的组的序列有至少90%、至少95%或至少99%同一性的

序列:

- (a) 分别为SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:55;
- (b) 分别为SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:55;
- (c) 分别为SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:55;
- (d) 分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:55;
- (e) 分别为SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:55;
- (f) 分别为SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:55;
- (g) 分别为SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:55;
- (h) 分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:55;
- (i) 分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55;及
- (j) 分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:55。

20. 如权利要求19所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有选自由以下组成的组的序列:

- (a) 分别为SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:55;
- (b) 分别为SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:55;
- (c) 分别为SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:55;
- (d) 分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:55;
- (e) 分别为SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:55;
- (f) 分别为SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:55;
- (g) 分别为SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:55;
- (h) 分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:55;
- (i) 分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55;及
- (j) 分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:55。

21. 如权利要求13-20中任一项所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体为包含Fc区的全长抗体。

22. 如权利要求21所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含具有选自由以下组成的组的序列的重链和轻链:

- (a) 分别为SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:68;
- (b) 分别为SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:68;及
- (c) 分别为SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68。

23. 如权利要求13-22中任一项所述的免疫缀合物,其中所述Fc区为包含以下的变体Fc区:

(a) 降低所述变体Fc区对Fc γ R的亲力的一个或多个氨基酸修饰,其选自由以下组成的组:L234A、L235A、及L234A和L235A;和/或

(b) 在S442处引入半胱氨酸残基的氨基酸修饰,其中所述编号为如Kabat中的EU索引的编号;和/或

(c) 延长针对FcRn的变体Fc区的半衰期的一个或多个氨基酸取代,其选自由以下组成的组:M252Y、S254T、及T256E。

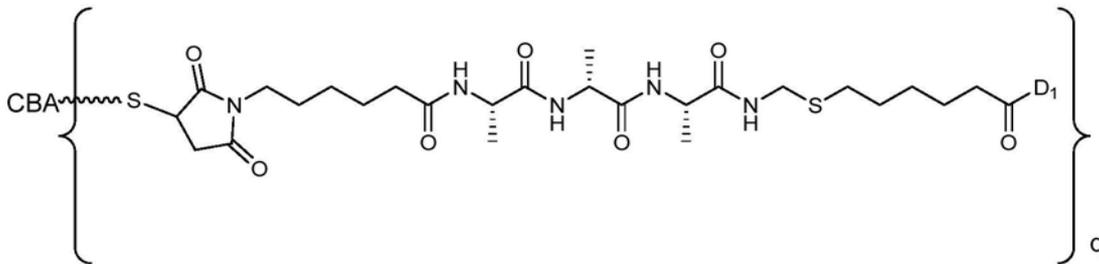
24. 如权利要求18所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含具有选自以下组成的组的序列的重链和轻链:

- (a) 分别为SEQ ID NO:141和SEQ ID NO:68;
- (b) 分别为SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:68;
- (c) 分别为SEQ ID NO:143和SEQ ID NO:68;
- (d) 分别为SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:68;
- (e) 分别为SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:68;
- (f) 分别为SEQ ID NO:153和SEQ ID NO:68;及
- (g) 分别为SEQ ID NO:154和SEQ ID NO:68。

25. 如权利要求24所述的免疫缀合物,其中SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:154中的X为赖氨酸。

26. 如权利要求24所述的免疫缀合物,其中SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:154中的X不存在。

27. 如权利要求1所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式表示:

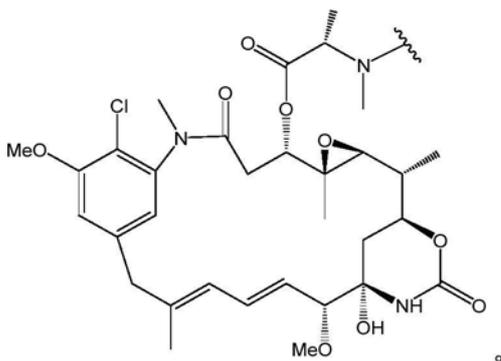


其中:

CBA为人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其包含分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_{H1}结构域、CDR_{H2}结构域及CDR_{H3}结构域和CDR_{L1}结构域、CDR_{L2}结构域及CDR_{L3}结构域;

q为1或2;

D₁由下式表示:



28. 如权利要求27所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。

29. 如权利要求27所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

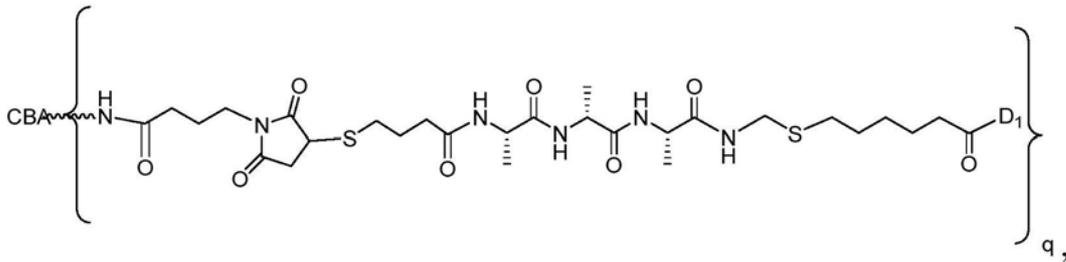
30. 如权利要求27所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

31. 如权利要求29或30所述的免疫缀合物,其中SEQ ID NO:142或SEQ ID NO:152中的X为赖氨酸。

32. 如权利要求29所述的免疫缀合物,其中SEQ ID NO:142中的X不存在。

33. 如权利要求27所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:156和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

34. 如权利要求1所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物由下式表示:

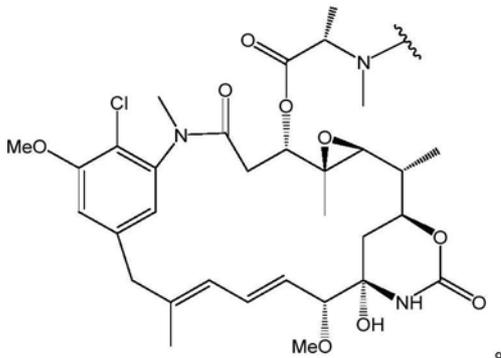


其中:

CBA为人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其包含分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;

q为1或10的整数;

D₁由下式表示:



35. 如权利要求33所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。

36. 如权利要求35所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

37. 如权利要求34所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

38. 如权利要求36或37所述的免疫缀合物,其中SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:151中的X为赖氨酸。

39. 如权利要求36所述的免疫缀合物,其中SEQ ID NO:52中的X不存在。

40. 如权利要求34所述的免疫缀合物,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ

ID NO:155和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

41. 一种药物组合物,其包含有效量的如权利要求1-40中任一项所述的免疫缀合物及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

42. 一种用于治疗受试者的与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的疾病或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求1-40中任一项所述的免疫缀合物或如权利要求41所述的药物组合物。

43. 如权利要求42所述的方法,其中与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的所述疾病或病状为癌症。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述癌症选自由以下组成的组:非小细胞肺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食道癌、乳腺癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、骨髓癌、黑色素瘤和淋巴瘤。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述非小细胞肺癌为鳞状细胞癌、非鳞状细胞癌、腺癌或大细胞未分化癌。

46. 如权利要求44所述的方法,其中所述结肠直肠癌为腺癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌。

47. 如权利要求42所述的方法,其中所述方法是用于治疗非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或结肠直肠癌。

靶向ADAM9的免疫缀合物及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2018年6月26日提交的美国临时申请号:62/690,052、和2018年6月28日提交的美国临时申请号:62/691,342、和2019年2月26日提交的美国临时申请号:62/810,703的优先权。这些申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0003] 序列列表

[0004] 本申请包含序列列表,该序列列表已经以ASCII格式以电子方式提交,并且通过引用整体并入本文。所述ASCII副本于2019年5月16日创建,名为121162-04820_SL.txt,大小为163,070字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及包含能够特异性结合至“含解联蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白9”(“ADAM9”)的抗体或其片段的免疫缀合物,所述抗体或其片段结合至至少一种药理剂。本发明具体地涉及与人ADAM9和非人灵长类(例如,食蟹猴)的ADAM9具有交叉反应性的此类免疫缀合物。本发明另外涉及包含轻链可变(VL)结构域和/或重链可变(VH)结构域的所有此类免疫缀合物,所述轻链可变(VL)结构域和/或重链可变(VH)结构域已被人源化和/或去免疫化以便在向接受受试者施用此类免疫缀合物时展现降低的免疫原性。本发明还涉及含有此类免疫缀合物中任一种的药物组合物,并且涉及此类免疫缀合物中的任一种用于治疗癌症及其他疾病和病状的方法。

背景技术

[0006] ADAM为涉及各种生理和病理过程的蛋白质家族(Amendola,R.S.等人(2015)“ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2,”*J.Leukocyte Biol.*97(5):951-962;Edwards,D.R.等人(2008)“The ADAM Metalloproteases,”*Molec.Aspects Med.*29:258-289)。已鉴别出该家族的至少40个基因成员,并且认为此类成员中的至少21个在人类中具有功能性(Li,J.等人(2016)“Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion,”*J.Invest.Surg.*26(3):127-133;Duffy,M.J.等人(2011)“The ADAMs Family Of Proteases:New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?,”*Clin.Proteomics* 8:9:1-13;还参见美国专利公布号2013/0045244)。

[0007] ADAM家族成员有具有8个结构域的相当保守的结构,在所述8个结构域中有金属蛋白酶结构域和整联蛋白结合(解联蛋白)结构域(Duffy,M.J.等人(2009)“The Role Of ADAMs In Disease Pathophysiology,”*Clin.Chim.Acta* 403:31-36)。ADAM金属蛋白酶结构域充当脱落酶(sheddase)且已报道通过裂解跨膜蛋白来调节一系列生物学过程,所述跨膜蛋白则可充当可溶性配体并调控细胞传讯(Amendola,R.S.等人(2015)“ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2,”*J.Leukocyte Biol.*97(5):951-962;Ito,N.等人

(2004) "ADAMs, A Disintegrin And Metalloproteinases, Mediate Shedding Of Oxytocinase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 1008-1013)。

[0008] ADAM9为ADAM分子家族的成员。其被合成为非活性形式,所述非活性形式被蛋白水解裂解,产生活性酶。在上游位点处的加工对酶原的活化特别重要。ADAM9在以下细胞中表达:成纤维细胞(Zigrino, P.等人(2011) "The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts," *J. Biol. Chem.* 286:6801-6807)、活化的血管平滑肌细胞(Sun, C.等人(2010) "ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2 Signalling," *Cardiovasc. Res.* 87:348-355)、单核细胞(Namba, K.等人(2001) "Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes," *Cell. Immunol.* 213:104-113)、活化的巨噬细胞(Oksala, N.等人(2009) "ADAM-9, ADAM-15, And ADAM-17 Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries-Tampere Vascular Study," *Ann. Med.* 41:279-290)。

[0009] ADAM9的金属蛋白酶活性参与基质组分的降解,从而使肿瘤细胞迁移(Amendola, R.S.等人(2015) "ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2," *J. Leukocyte Biol.* 97(5):951-962)。ADAM9的与许多蛇毒解联蛋白高度同源的解联蛋白结构域允许ADAM9与整联蛋白之间的相互作用,且使ADAM9能够正向或负向地调节细胞粘附事件(Zigrino, P.等人(2011) "The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9 Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts," *J. Biol. Chem.* 286:6801-6807; Karadag, A.等人(2006) "ADAM-9 (MDC-9/Meltringamma), A Member Of The A Disintegrin And Metalloproteinase Family, Regulates Myeloma-Cell-Induced Interleukin-6 Production In Osteoblasts By Direct Interaction With The Alpha(v) Beta5 Integrin," *Blood* 107:3271-3278; Cominetti, M.R.等人(2009) "Inhibition Of Platelets And Tumor Cell Adhesion By The Disintegrin Domain Of Human ADAM9 To Collagen I Under Dynamic Flow Conditions," *Biochimie*, 91:1045-1052)。已显示ADAM9解联蛋白结构域与 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha v\beta 5$ 及 $\alpha 9\beta 1$ 整联蛋白相互作用。

[0010] 已发现ADAM9的表达与疾病(尤其是癌症)相关。已发现ADAM9裂解并释放众多在肿瘤形成和血管生成方面起重要作用的分子,如TEK、KDR、EPHB4、CD40、VCAM1及CDH5。ADAM9是由许多类型的肿瘤细胞表达,所述肿瘤细胞包括乳腺癌、结肠癌、胃癌、神经胶质瘤、肝癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、胰腺癌及前列腺癌的肿瘤细胞(Yoshimasu, T.等人(2004) "Overexpression Of ADAM9 In Non-Small Cell Lung Cancer Correlates With Brain Metastasis," *Cancer Res.* 64:4190-4196; Peduto, L.等人(2005) "Critical Function For ADAM9 In Mouse Prostate Cancer," *Cancer Res.* 65:9312-9319; Zigrino, P.等人(2005) "ADAM-9 Expression And Regulation In Human Skin Melanoma And Melanoma Cell Lines," *Int. J. Cancer* 116:853-859; Fritzsche, F.R.等人(2008) "ADAM9 Is Highly Expressed In Renal Cell Cancer And Is Associated With Tumour Progression," *BMC Cancer* 8:179:1-9; Fry, J.L.等人(2010) "Secreted And Membrane-

Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration,”*Cancer Res.*70,8187-8198;Chang,L.等人(2016)“Combined Rnai Targeting Human Stat3 And ADAM9 As Gene Therapy For Non-Small Cell Lung Cancer,”*Oncology Letters* 11:1242-1250;Fan,X.等人(2016)“ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type,and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas,”*Int.J.Mol.Sci.*17:1276:1-11)。

[0011] 显著地,已发现ADAM9表达增加与肿瘤恶性及转移可能性正相关(Amendola,R.S.等人(2015)“ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2,”*J.Leukocyte Biol.*97(5):951-962;Fan,X.等人(2016)“ADAM9 Expression Is Associate with Glioma Tumor Grade and Histological Type,and Acts as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas,”*Int.J.Mol.Sci.*17:1276:1-11;Li,J.等人(2016)“Overexpression of ADAM9 Promotes Colon Cancer Cells Invasion,”*J.Invest.Surg.*26(3):127-133)。另外,ADAM9及其分泌的可溶性同种型似乎对癌细胞的散布至关重要(Amendola,R.S.等人(2015)“ADAM9 Disintegrin Domain Activates Human Neutrophils Through An Autocrine Circuit Involving Integrins And CXCR2,”*J.Leukocyte Biol.*97(5):951-962;Fry,J.L.等人(2010)“Secreted And Membrane-Bound Isoforms Of Protease ADAM9 Have Opposing Effects On Breast Cancer Cell Migration,”*Cancer Res.*70,8187-8198;Mazzocca,A.(2005)“A Secreted Form Of ADAM9 Promotes Carcinoma Invasion Through Tumor-Stromal Interactions,”*Cancer Res.*65:4728-4738;还参见美国专利号9,150,656;7,585,634;7,829,277;8,101,361;和8,445,198以及美国专利公布号2009/0023149)。

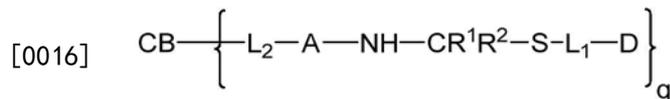
[0012] 因此,众多研究已将ADAM9鉴别为抗癌疗法的潜在标靶(Peduto,L.(2009)“ADAM9 As A Potential Target Molecule In Cancer,”*Curr.Pharm.Des.*15:2282-2287;Duffy,M.J.等人(2009)“Role Of ADAMs In Cancer Formation And Progression,”*Clin.Cancer Res.*15:1140-1144;Duffy,M.J.等人(2011)“The ADAMs Family Of Proteases:New Biomarkers And Therapeutic Targets For Cancer?,”*Clin.Proteomics*8:9:1-13;Josson,S.等人(2011)“Inhibition of ADAM9 Expression Induces Epithelial Phenotypic Alterations and Sensitizes Human Prostate Cancer Cells to Radiation and Chemotherapy,”*Prostate* 71(3):232-240;还参见美国专利公布号2016/0138113、2016/0068909、2016/0024582、2015/0368352、2015/0337356、2015/0337048、2015/0010575、2014/0342946、2012/0077694、2011/0151536、2011/0129450、2010/0291063、2010/0233079、2010/0112713、2009/0285840、2009/0203051、2004/0092466、2003/0091568和2002/0068062以及PCT公布号WO 2016/077505、WO 2014/205293、WO 2014/186364、WO 2014/124326、WO 2014/108480、WO 2013/119960、WO 2013/098797、WO 2013/049704和WO 2011/100362)。另外,还发现了ADAM9的表达与肺部疾病和炎症相关(参见,例如,美国专利公布号2016/0068909;2012/0149595;2009/0233300;2006/0270618;及2009/0142301)。结合至ADAM9的抗体可自Abcam、Thermofisher、Sigma-Aldrich及其他公司商购获得。

[0013] 然而,尽管存在所有先前进展,仍需要高亲和力的靶向ADAM9的免疫缀合物,所述免疫缀合物展现与正常组织的最小结合且能够以类似的高亲和力结合至人和非人ADAM9。本发明解决了此需要及对改善的癌症治疗的需要。

发明内容

[0014] 本发明涉及包含能够特异性结合至“含解联蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白9”(“ADAM9”)的抗体或其片段的免疫缀合物,所述抗体或其片段缀合至至少一种本文所述的美登木素生物碱(美登木素生物碱)。本发明具体地涉及与人ADAM9和非人灵长类(例如,食蟹猴)的ADAM9具有交叉反应性的此类免疫缀合物。本发明另外涉及包含轻链可变(VL)结构域和/或重链可变(VH)结构域的所有此类免疫缀合物,所述轻链可变(VL)结构域和/或重链可变(VH)结构域已被人源化和/或去免疫化以便在向接受受试者施用此类免疫缀合物时展现降低的免疫原性。本发明还涉及含有此类免疫缀合物中的任一种的药物组合物,并且涉及此类免疫缀合物中的任一种用于治疗癌症及其他疾病和病状的方法。

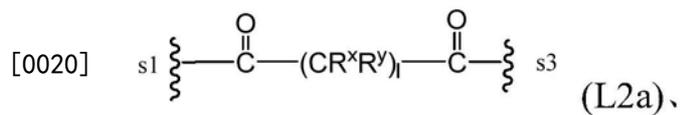
[0015] 详细地说,本发明提供一种免疫缀合物,其由下式:

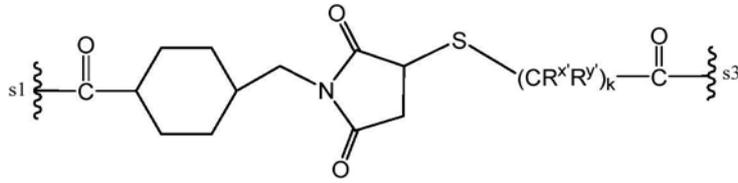
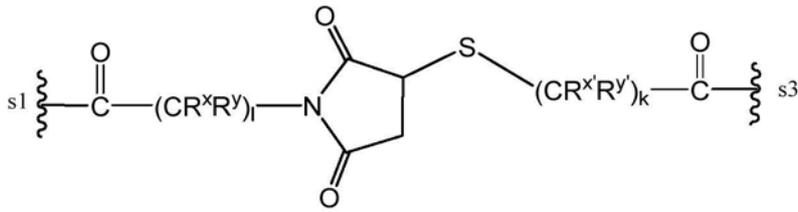


[0017] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

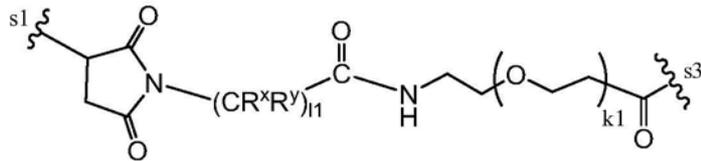
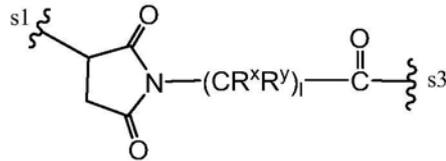
[0018] CB为抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段;

[0019] L₂由下式之一表示:





[0021]



[0022] 其中:

[0023] R^x 、 R^y 、 R^x 和 R^y 在每次出现时独立地为 H、-OH、卤素、-O-(C_{1-4} 烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺ 或被 -OH、卤素、SO₃H 或 NR₄₀R₄₁R₄₂⁺ 取代的 C_{1-4} 烷基, 其中 R₄₀、R₄₁ 和 R₄₂ 各自独立地为 H 或 C_{1-4} 烷基;

[0024] 1 和 k 各自独立地为 1 至 10 的整数;

[0025] 11 为 2 至 5 的整数;

[0026] k1 为 1 至 5 的整数; 并且

[0027] s1 表示连接至细胞结合剂 CB 的位点且 s3 表示连接至 A 基团的位点;

[0028] A 为氨基酸残基或包含 2 至 20 个氨基酸残基的肽;

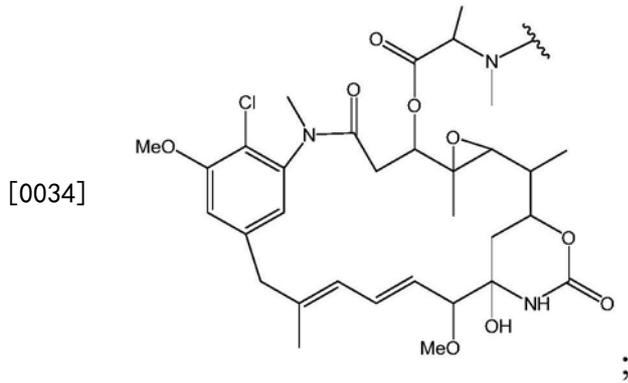
[0029] R¹ 和 R² 各自独立地为 H 或 C_{1-3} 烷基;

[0030] L₁ 由下式表示:

[0031] $-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$

[0032] 其中 R³ 和 R⁴ 各自独立地为 H 或 Me, 且 L₁ 中的 -C(=O)- 部分连接至 D;

[0033] D 由下式表示:



[0035] q为1至20的整数。

[0036] 在某些实施方案中,所述抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含轻链可变(VL)结构域和重链可变(VH)结构域,其中所述重链可变结构域包含CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域,且所述轻链可变结构域包含CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域,其中:

[0037] (A) 所述CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域具有MAB-A的优化变体的重链可变(VH)结构域的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域的氨基酸序列;且所述CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域具有MAB-A的轻链可变(VL)结构域的CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域的氨基酸序列;或

[0038] (B) 所述CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域具有MAB-A的重链可变(VH)结构域的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域的氨基酸序列;且所述CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域具有MAB-A的优化变体的轻链可变(VL)结构域的CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域的氨基酸序列;或

[0039] (C) 所述CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域具有MAB-A的优化变体的重链可变(VH)结构域的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域的氨基酸序列;且所述CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域具有MAB-A的优化变体的轻链可变(VL)结构域的CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域的氨基酸序列。

[0040] 在某些实施方案中,所述抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含:

[0041] (A) (1) MAB-A的所述重链可变(VH)结构域的所述CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域;和

[0042] (2) MAB-A的人源化变体的VH结构域的FR1、FR2、FR3及FR4;或

[0043] (B) (1) MAB-A的所述轻链可变(VL)结构域的所述CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;和

[0044] (2) MAB-A的人源化变体的VL结构域的FR1、FR2、FR3及FR4;或

[0045] (C) (1) MAB-A的优化变体的重链可变(VH)结构域的所述CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域;和

[0046] (2) MAB-A的人源化变体的所述VH结构域的所述FR1、FR2、FR3及FR4;或

[0047] (D) (1) MAB-A的优化变体的轻链可变(VL)结构域的所述CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;和

[0048] (2) MAB-A的人源化变体的所述VL结构域的所述FR1、FR2、FR3及FR4;或

[0049] (E) (1) MAB-A的人源化/优化变体的所述重链可变(VH)结构域;和

[0050] (2) MAB-A的人源化/优化变体的所述VL轻链可变(VL)结构域。

[0051] 在某些实施方案中, MAB-A的优化变体的重链可变(VH)结构域的所述CDR_{H1}结构域、CDR_{H2}结构域及CDR_{H3}结构域分别具有以下氨基酸序列:

[0052] (1) SEQ ID NO:47 (SYWX₁H)

[0053] 其中:X₁为M或I;

[0054] (2) SEQ ID NO:48 (EIIPIX₂GHTNYNEX₃FX₄X₅)

[0055] 其中:X₂、X₃、X₄及X₅被独立地选择, 并且

[0056] 其中:X₂为N或F; X₃为K或R;

[0057] X₄为K或Q; 并且

[0058] X₅为S或G; 以及

[0059] (3) SEQ ID NO:49 (GGYYYYX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁DY)

[0060] 其中:X₆为P、F、Y、W、I、L、V、T、G或D, 且X₇、X₈、X₉、X₁₀及X₁₁被选择以使得:

[0061] (A) 当X₆为P时:

[0062] X₇为K或R; X₈为F或M; X₉为G;

[0063] X₁₀为W或F; 且X₁₁为M、L或K;

[0064] (B) 当X₆为F、Y或W时:

[0065] X₇为N或H; X₈为S或K; X₉为G或A;

[0066] X₁₀为T或V; 且X₁₁为M、L或K;

[0067] (C) 当X₆为I、L或V时:

[0068] X₇为G; X₈为K; X₉为G或A;

[0069] X₁₀为V; 且X₁₁为M、L或K;

[0070] (D) 当X₆为T时:

[0071] X₇为G; X₈为K、M或N; X₉为G;

[0072] X₁₀为V或T; 且X₁₁为L或M;

[0073] (E) 当X₆为G时:

[0074] X₇为G; X₈为S; X₉为G;

[0075] X₁₀为V; 且X₁₁为L; 并且

[0076] (F) 当X₆为D时:

[0077] X₇为S; X₈为N; X₉为A;

[0078] X₁₀为V; 且X₁₁为L。

[0079] 在某些实施方案中, MAB-A的优化变体的重链可变(VH)结构域包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列:

	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYWX₁HWVRQA
	PGKGLEWVGE	IIPIX₂GHTNY	NEX₃FX₄X₅RFTI	SLDNSKNTLY
[0080]	LQMGSLRAED	TAVYYCARGG	YYYYX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁	
	DYWGQGTIVT	VSS		

[0081] 其中:X₁、X₂、X₃、X₄、X₅及X₆被独立地选择,

[0082] 其中:X₁为M或I; X₂为N或F;

[0083] X₃为K或R; X₄为K或Q;

[0084] X₅为S或G, 且X₆为P、F、Y、W、I、L、V、T、G或D;

- [0085] 其中： X_7 、 X_8 、 X_9 、 X_{10} 及 X_{11} 被选择以使得：
- [0086] 当 X_6 为P时； X_7 为K或R； X_8 为F或M； X_9 为G； X_{10} 为W或F；且 X_{11} 为M、L或K；
- [0087] 当 X_6 为F、Y或W时； X_7 为N或H； X_8 为S或K； X_9 为G或A； X_{10} 为T或V；且 X_{11} 为M、L或K；
- [0088] 当 X_6 为I、L或V时； X_7 为G； X_8 为K； X_9 为G或A； X_{10} 为V；且 X_{11} 为M、L或K；
- [0089] 当 X_6 为T时； X_7 为G； X_8 为K、M或N； X_9 为G； X_{10} 为V或T；且 X_{11} 为L或M；
- [0090] 当 X_6 为G时； X_7 为G； X_8 为S； X_9 为G； X_{10} 为V；且 X_{11} 为L；
- [0091] 当 X_6 为D时； X_7 为S； X_8 为N； X_9 为A； X_{10} 为V；且 X_{11} 为L。
- [0092] 在某些实施方案中，MAB-A的优化变体的重链可变 (VH) 结构域选自自由以下组成的组：

- [0093] (1) hMAB-A VH (1) (SEQ ID NO:16)；
- [0094] (2) hMAB-A VH (2) (SEQ ID NO:17)；
- [0095] (3) hMAB-A VH (3) (SEQ ID NO:18)；
- [0096] (4) hMAB-A VH (4) (SEQ ID NO:19)；
- [0097] (5) hMAB-A VH (2A) (SEQ ID NO:20)；
- [0098] (6) hMAB-A VH (2B) (SEQ ID NO:21)；
- [0099] (7) hMAB-A VH (2C) (SEQ ID NO:22)；
- [0100] (8) hMAB-A VH (2D) (SEQ ID NO:23)；
- [0101] (9) hMAB-A VH (2E) (SEQ ID NO:24)；
- [0102] (10) hMAB-A VH (2F) (SEQ ID NO:25)；
- [0103] (11) hMAB-A VH (2G) (SEQ ID NO:26)；
- [0104] (12) hMAB-A VH (2H) (SEQ ID NO:27)；
- [0105] (13) hMAB-A VH (2I) (SEQ ID NO:28)；及
- [0106] (14) hMAB-A VH (2J) (SEQ ID NO:29)。

[0107] 在某些实施方案中，MAB-A的优化变体的轻链可变 (VL) 结构域的CDR_{L1}结构域、CDR_{L2}结构域及CDR_{L3}结构域分别具有以下氨基酸序列：

[0108] (1) SEQ ID NO:66 (X_{12} ASQSVDYX₁₃GDSYX₁₄N)

[0109] 其中： X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 被独立地选择，并且

[0110] 其中： X_{12} 为K或R； X_{13} 为D或S；且 X_{14} 为M或L；

[0111] (2) SEQ ID NO:13 (AASDLES)；及

[0112] (3) SEQ ID NO:67 (QQSX₁₅X₁₆X₁₇PFT)

[0113] 其中： X_{15} 、 X_{16} 及 X_{17} 被独立地选择，并且

[0114] 其中： X_{15} 为H或Y； X_{16} 为E或S；且 X_{17} 为D或T。

[0115] 在某些实施方案中，轻链可变 (VL) 结构域包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列：

[0116]

DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISCS X₁₂ASQSVD
<u>YX₁₃GDSYX₁₄NWY</u>	QQKPGQPPKL	<u>LIYAASDLES</u>
GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFATY
YC <u>QOSX₁₅X₁₆X₁₇PF</u>	<u>TFGQGTKLEI</u>	K

[0117] 其中： X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{15} 、 X_{16} 及 X_{17} 被独立地选择，并且

[0118] 其中： X_{12} 为K或R； X_{13} 为D或S；

[0119] X_{14} 为M或L; X_{15} 为H或Y;

[0120] X_{16} 为E或S;且 X_{17} 为D或T。

[0121] 在某些实施方案中,MAB-A的优化变体的轻链可变(VL)结构域选自自由以下组成的组:

[0122] (1) hMAB-A VL (1) (SEQ ID NO:54);

[0123] (2) hMAB-A VL (2) (SEQ ID NO:55);

[0124] (3) hMAB-A VL (3) (SEQ ID NO:56);

[0125] (4) hMAB-A VL (4) (SEQ ID NO:57);

[0126] (5) hMAB-A VL (2A) (SEQ ID NO:20)。

[0127] 在某些实施方案中,所述CDR_H1结构域包含氨基酸序列SYWMH(SEQ ID NO:8),所述CDR_H2结构域包含氨基酸序列EIIPIFGHTNYNEKFKS(SEQ ID NO:35),且所述CDR_H3结构域包含氨基酸序列GGYYYYPRQGFLDY(SEQ ID NO:45)。

[0128] 在某些实施方案中,所述CDR_L1结构域包含氨基酸序列KASQSVDYSGDSYMN(SEQ ID NO:62),所述CDR_L2结构域包含氨基酸序列AASDLES(SEQ ID NO:13),且所述CDR_L3结构域包含氨基酸序列QQSHEDPFT(SEQ ID NO:14)。

[0129] 在某些实施方案中,免疫缀合物包含:

[0130] (A) hMAB-A (2I.2) 的重链可变(VH)结构域(SEQ ID NO:28);或

[0131] (B) hMAB-A (2I.2) 的轻链可变(VL)结构域(SEQ ID NO:55);或

[0132] (C) hMAB-A (2I.2) 的重链可变(VH)结构域(SEQ ID NO:28)和hMAB-A (2I.2) 的轻链可变(VL)结构域(SEQ ID NO:55)。

[0133] 在某些实施方案中,免疫缀合物包含Fc区。在一些实施方案中,Fc区为包含以下的变体Fc区:(a)降低所述变体Fc区对Fc γ R的亲力的一个或多个氨基酸修饰;和/或(b)引入半胱氨酸残基的一个或多个氨基酸修饰。在某些实施方案中,降低变体Fc区对Fc γ R的亲力的一个或多个氨基酸修饰包含:(A) L234A;(B) L235A;或(C) L234A和L235A;其中所述编号为如Kabat中的EU索引的编号。在一些实施方案中,引入半胱氨酸残基的所述一个或多个氨基酸修饰包含S442C,其中所述编号为如Kabat中的EU索引的编号。

[0134] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含特异性结合至人ADAM9和cyno ADAM9的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段缀合至所述药剂。

[0135] 在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含具有选自自由以下组成的组的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域:

[0136] (a) 分别为SEQ ID NO:8、35及10和SEQ ID NO:62、13、14;

[0137] (b) 分别为SEQ ID NO:8、35及10和SEQ ID NO:63、13、14;

[0138] (c) 分别为SEQ ID NO:8、36及10和SEQ ID NO:63、13、14;及

[0139] (d) 分别为SEQ ID NO:34、36及10和SEQ ID NO:64、13、65。

[0140] 在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有与选自自由以下组成的组的序列有至少90%、至少95%或至少99%同一性的序列:

[0141] (a) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:55;

[0142] (b) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:56;

[0143] (c) 分别为SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:56;及(d) 分别为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:57。

[0144] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有选自以下组成的组的序列:

[0145] (a) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:55;

[0146] (b) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:56;

[0147] (c) 分别为SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:56;及

[0148] (d) 分别为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:57。

[0149] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段优化以相较于嵌合或鼠亲代抗体与cyno ADAM9的结合亲和力有至少100倍增强并保留与人ADAM9的高亲和力结合。

[0150] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含具有选自以下组成的组的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域:

[0151] (a) 分别为SEQ ID NO:8、35及37和SEQ ID NO:62、13、14;

[0152] (b) 分别为SEQ ID NO:8、35及38和SEQ ID NO:62、13、14;

[0153] (c) 分别为SEQ ID NO:8、35及39和SEQ ID NO:62、13、14;

[0154] (d) 分别为SEQ ID NO:8、35及40和SEQ ID NO:62、13、14;

[0155] (e) 分别为SEQ ID NO:8、35及41和SEQ ID NO:62、13、14;

[0156] (f) 分别为SEQ ID NO:8、35及42和SEQ ID NO:62、13、14;

[0157] (g) 分别为SEQ ID NO:8、35及43和SEQ ID NO:62、13、14;

[0158] (h) 分别为SEQ ID NO:8、35及44和SEQ ID NO:62、13、14;

[0159] (i) 分别为SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14;及

[0160] (j) 分别为SEQ ID NO:8、35及46和SEQ ID NO:62、13、14。

[0161] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有与选自以下组成的组的序列有至少90%、至少95%或至少99%同一性的序列:

[0162] (a) 分别为SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:55;

[0163] (b) 分别为SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:55;

[0164] (c) 分别为SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:55;

[0165] (d) 分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:55;

[0166] (e) 分别为SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:55;

[0167] (f) 分别为SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:55;

[0168] (g) 分别为SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:55;

[0169] (h) 分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:55;

[0170] (i) 分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55;及

[0171] (j) 分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:55。

[0172] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL),所述重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)具有选自自由以下组成的组和序列:

[0173] (a) 分别为SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:55;

[0174] (b) 分别为SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:55;

[0175] (c) 分别为SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:55;

[0176] (d) 分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:55;

[0177] (e) 分别为SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:55;

[0178] (f) 分别为SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:55;

[0179] (g) 分别为SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:55;

[0180] (h) 分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:55;

[0181] (i) 分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55;及

[0182] (j) 分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:55。

[0183] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体为包含Fc区的全长抗体。在一些实施方案中,Fc区为包含以下的变体Fc区:

[0184] (a) 降低所述变体Fc区对Fc γ R的亲力的一个或多个氨基酸修饰,其选自自由以下组成的组:L234A、L235A、及L234A和L235A;和/或

[0185] (b) 在S442处引入半胱氨酸残基的氨基酸修饰,其中所述编号为如Kabat中的EU索引的编号;和/或

[0186] (c) 延长针对FcRn的变体Fc区的半衰期的一个或多个氨基酸取代,其选自自由以下组成的组:M252Y、S254T、及T256E。

[0187] 在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含具有选自自由以下组成的组的序列的重链和轻链:

[0188] (a) 分别为SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:68;

[0189] (b) 分别为SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:68;及

[0190] (c) 分别为SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68。

[0191] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含具有选自自由以下组成的组的序列的重链和轻链:

[0192] (a) 分别为SEQ ID NO:141和SEQ ID NO:68;

[0193] (b) 分别为SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:68;

[0194] (c) 分别为SEQ ID NO:143和SEQ ID NO:68;

[0195] (d) 分别为SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:68;

[0196] (e) 分别为SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:68;

[0197] (f) 分别为SEQ ID NO:153和SEQ ID NO:68;及

[0198] (g) 分别为SEQ ID NO:154和SEQ ID NO:68。

[0199] 在某些实施方案中,SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:154中的X为赖氨酸。

[0200] 在某些实施方案中,SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142、SEQ ID NO:143、SEQ ID NO:

151、SEQ ID NO:152、SEQ ID NO:153或SEQ ID NO:154中的X不存在。

[0201] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:156和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

[0202] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含由SEQ ID NO:157编码的轻链和由(i) SEQ ID NO:159、(ii) SEQ ID NO:160、(iii) SEQ ID NO:161或(iv) SEQ ID NO:162编码的重链。

[0203] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含由SEQ ID NO:158编码的轻链和由(i) SEQ ID NO:159、(ii) SEQ ID NO:160、(iii) SEQ ID NO:161或(iv) SEQ ID NO:162编码的重链。

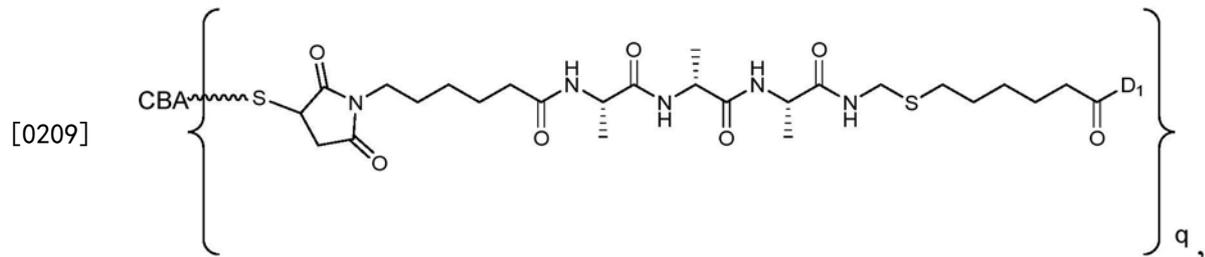
[0204] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含由SEQ ID NO:157编码的轻链和由SEQ ID NO:161编码的重链。

[0205] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含由SEQ ID NO:157编码的轻链和由SEQ ID NO:162编码的重链。

[0206] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含由SEQ ID NO:158编码的轻链和由SEQ ID NO:161编码的重链。

[0207] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含由SEQ ID NO:158编码的轻链和由SEQ ID NO:162编码的重链。

[0208] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:

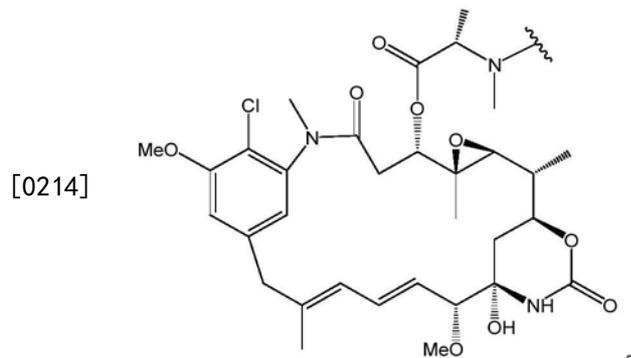


[0210] 其中:

[0211] CBA为人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其包含分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;

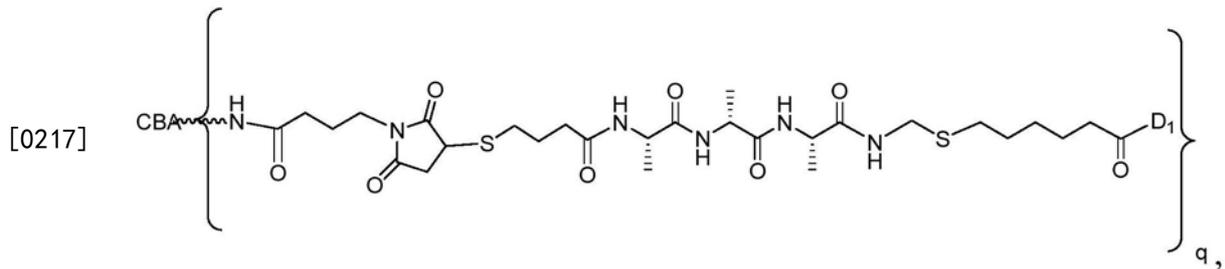
[0212] q为1或2;

[0213] D₁由下式表示:



[0215] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:142或SEQ ID NO:152中的X为赖氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:142或SEQ ID NO:152中的X不存在。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:156和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,包含免疫缀合物的组合物(例如,药物组合物)的DAR值处于以下范围内:1.0至2.5、1.5至2.5、1.8至2.2或1.9至2.1。在一些实施方案中,DAR为1.8、1.9、2.0或2.1。

[0216] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:

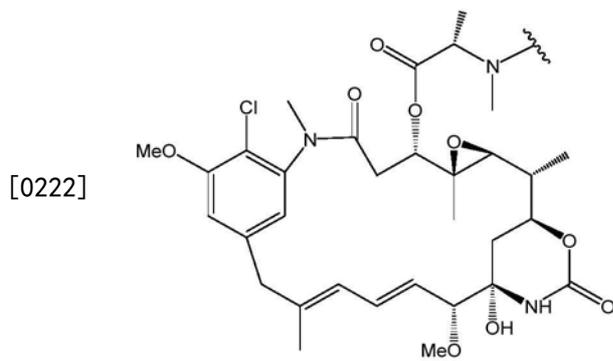


[0218] 其中:

[0219] CBA为人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其包含分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;

[0220] q为1或10的整数;

[0221] D₁由下式表示:



[0223] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:151中的X为赖氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:151中的X不存在。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,包含免疫缀合物的组合物(例如,药物组合物)的DAR值处于以下范围内:

1.0至5.0、1.0至4.0、1.5至4.0、2.0至4.0、2.5至4.0、2.9至3.3、3.3至3.8、1.5至2.5或1.8至2.2。在一些实施方案中,DAR小于4.0、小于3.8、小于3.6、小于3.5、小于3.0或小于2.5。在一些实施方案中,DAR在3.0至3.2的范围内。在一些实施方案中,DAR在3.5至3.7的范围内。在一些实施方案中,DAR为3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6或3.7。在一些实施方案中,DAR在1.9至2.1的范围内。在一些实施方案中,DAR为1.9、2.0或2.1。

[0224] 本发明的另一方面提供一种药物组合物,其包含有效量的本文所述的本发明的免疫缀合物及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

[0225] 另一方面,本发明提供一种用于治疗受试者的与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的疾病或病状的方法,其包括向所述受试者施用有效量的本文所述的本发明的免疫缀合物或药物组合物。在本发明中还提供本文所述的本发明的免疫缀合物或药物组合物在治疗受试者的与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的疾病或病状中的用途。本发明还提供本文所述的本发明的免疫缀合物或药物组合物用于制造供治疗受试者的与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的疾病或病状用的药剂的用途。

[0226] 在某些实施方案中,与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的疾病或病状为癌症。在一些实施方案中,癌症选自自由以下组成的组:非小细胞肺癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食道癌、乳腺癌、头颈癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、骨髓癌、黑色素瘤及淋巴瘤。在某些实施方案中,癌症为非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌或结肠直肠癌。在某些实施方案中,非小细胞肺癌为鳞状细胞癌、腺癌或大细胞未分化癌。在某些实施方案中,结肠直肠癌为腺癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌。

附图说明

[0227] 图1A至图1C呈现免疫组织化学(IHC)研究的结果,并且示出了MAB-A特异性标记多种非小细胞肺癌类型(图1A)、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、胃癌细胞(图1B)及结肠癌细胞(图1C)的能力,而同种型对照未能特异性标记任何这些癌细胞类型(图1A-1C)。

[0228] 图2呈现细胞染色研究的结果,并且示出了MAB-A结合至在293-FT和CHO-K细胞(分别为上图和下图)的表面上瞬时表达的人ADAM9且以较小程度结合至食蟹猴ADAM9。

[0229] 图3A至3B描绘了与MAB-A的若干人源化/优化变体(图3A,SEQ ID NO:7、16、17、18、19、21、22、23及28)比对的鼠抗ADAM9-VH结构域和与MAB-A的若干人源化/优化变体(图3B,SEQ ID NO:11、54、55、56及57)比对的鼠抗ADAM9-VL结构域的氨基酸序列。初始优化期间CDR内被取代的位置如下加下划线:潜在的脱酰胺和异构化(isomeration)位点用单下划线指示,赖氨酸残基用双下划线指示,另外的不稳定残基用下划虚线指示。

[0230] 图4A至4B呈现包含CDR_H3变体的十个所选优化hMAB-A克隆、亲代hMAB-A(2.2)及同种型对照抗体的ELISA结合曲线。图4A呈现cynoADAM9的结合曲线,且图4B呈现huADAM9的结合曲线。

[0231] 图5A至5B呈现Fc变体的ELISA结合曲线。图5A呈现huADAM9的结合曲线,且图5B呈现cynoADAM9的结合曲线。

[0232] 图6A至6B分别示出了20个癌组织微阵列中的ADAM9 IHC膜染色以及八个所选适应症中的ADAM IHC膜和细胞质染色。

- [0233] 图7A至7B示出了各种抗ADAM9抗体缀合物的脉冲内化和连续内化。
- [0234] 图8A示出了在pH 6.0下250nM和1000nM huFcRn与捕获的有和没有YTE突变的抗ADAM9抗体的结合。
- [0235] 图8B示出了在pH 6.0下25nM和100nM有和没有YTE突变的抗-ADAM9抗体与固定的FcRn的结合。
- [0236] 图9A、9B及9C示出了用于制备本发明的示例性美登木素生物碱化合物和免疫缀合物的合成方案。
- [0237] 图10示出了hMAB-A (2I.2)、hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4、hMAB-A (2I.2) (YTE/-K) -LDL-DM及hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -LDL-DM的FACS结合曲线。
- [0238] 图11A和11B示出了各种抗ADAM9免疫缀合物对各种非小细胞肺癌细胞系的体外细胞毒性。非靶向IgG1基缀合物作为阴性对照包括在内。
- [0239] 图12示出了hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR)、hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR)、hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 在Calu-3人非小细胞肺腺癌异种移植物模型中的抗肿瘤活性。
- [0240] 图13示出了hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR)、hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR)、hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 在H1703人非小细胞肺鳞状细胞癌异种移植物中的抗肿瘤活性。
- [0241] 图14示出了hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR)、hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR)、hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 在SNU-5人胃癌异种移植物中的抗肿瘤活性。
- [0242] 图15示出了25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR) 和hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (2.1DAR) 缀合物在携带EBC-1人非小细胞肺鳞状细胞癌异种移植物的SCID小鼠中的抗肿瘤活性。
- [0243] 图16示出了25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM缀合物和100 μ g/kg的DM有效负载的非结合对照huKTI-Ma1-LDL-DM (2.0DAR) 缀合物在携带SW48人结肠直肠癌异种移植物的CD1裸小鼠中的抗肿瘤活性。
- [0244] 图17示出了25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM缀合物和100 μ g/kg of DM有效负载的非结合对照huKTI-Ma1-LDL-DM (2.0DAR) 缀合物在携带HPAF-II人胰腺腺癌异种移植物的CD1裸小鼠中的抗肿瘤活性。
- [0245] 图18示出了25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR) 缀合物和25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (2.1DAR) 缀合物在携带H1975人非小细胞肺腺癌异种移植物的CD1裸小鼠中的抗肿瘤活性。
- [0246] 图19示出了25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR) 缀合物和25、50及100 μ g/kg的DM有效负载的hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (2.1DAR) 缀合物在携带Hs 746T人胃癌异种移植物的CD1裸小鼠中的抗肿瘤活性。

具体实施方式

[0247] 本发明涉及包含能够特异性结合至“含解联蛋白和金属蛋白酶结构域的蛋白9” (“ADAM9”) 的抗体或其片段的免疫缀合物, 所述抗体或其片段缀合至至少一种本文所述的美登木素生物碱化合物。本发明具体地涉及与人ADAM9和非人灵长类(例如, 食蟹猴)的ADAM9具有交叉反应性的此类免疫缀合物。本发明另外涉及包含轻链可变(VL) 结构域和/或重链可变(VH) 结构域的所有此类免疫缀合物, 所述轻链可变(VL) 结构域和/或重链可变(VH) 结构域已被人源化和/或去免疫化以便在向接受受试者施用此类免疫缀合物时展现降低的免疫原性。本发明还涉及含有此类免疫缀合物中的任一种的药物组合物, 并且涉及此类免疫缀合物中的任一种用于治疗癌症及其他疾病和病状的方法。

[0248] I. 抗体及其结合结构域

[0249] 本发明的免疫缀合物包含结合至ADAM9或其ADAM9结合片段的抗体。“抗体”为能够通过位于免疫球蛋白分子的可变结构域中的至少一个抗原识别位点来特异性结合至标靶(如, 碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文所使用, 术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”是指单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、合成抗体、嵌合抗体、多克隆抗体、骆驼源化抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、胞内抗体、及以上任一种的表位结合片段。具体来说, 术语“抗体”包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段, 即含有表位结合位点的分子。免疫球蛋白分子可具有任何类型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、类别(例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂)或子类。近几十年来已看到对抗体的治疗潜能的关注的复兴, 且抗体已成为生物技术衍生药物的主要类别之一(Chan, C.E. 等人(2009) “The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,” Singapore Med. J. 50(7):663-666)。除了在诊断中的用途以外, 显示抗体还可用作治疗剂。200多种基于抗体的药物已被批准使用或处于开发中。

[0250] 抗体能够“免疫特异性结合”至多肽或蛋白质或非蛋白质分子, 这归因于在此类分子上存在特定的结构域或部分或构象(“表位”)。含表位的分子可具有免疫原性活性, 使得其引发动物中的抗体产生应答; 此类分子被称为“抗原”。如本文所用, 如果抗体相对于替代性表位更频繁、更迅速、以更长的持续时间和/或以更大的亲和力与表位反应或缔合, 那么便称抗体“免疫特异性”结合另一分子的区(即, 所述表位)。例如, 免疫特异性结合至病毒表位的抗体为与所述抗体免疫特异性结合至其他病毒表位或非病毒表位相比, 以更大亲和力、亲合力、更容易和/或以更长的持续时间结合所述病毒表位的抗体。通过阅读此定义还应理解, 例如, 免疫特异性结合至第一标靶的抗体(或部分或表位)可以或不能特异性或优先地结合至第二标靶。因而, 与特定表位的“免疫特异性结合”未必需要(尽管其可包括)与所述表位的唯一结合。通常并非必要地, 对结合的提及意指“免疫特异性”结合。如果结合展现受体结合至其各别配体的特异性, 那么便称两个分子能够以“生理特异性”方式彼此结合。

[0251] 术语“单克隆抗体”是指同源抗体群, 其中单克隆抗体包含涉及抗原的选择性结合的氨基酸(天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸)。单克隆抗体针对单一表位(或抗原位点)具有高特异性。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整单克隆抗体和全长单克隆抗体, 而且涵盖其片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂Fv)、单链(scFv)、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白、

人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、及免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型,所述免疫球蛋白分子包含具有所需特异性和结合至抗原的能力的抗原识别位点。该术语并非意图就抗体的来源或制造(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)所述抗体的方式进行限制。该术语包括完整免疫球蛋白以及以上在“抗体”的定义下所述的片段等。制造单克隆抗体的方法为本领域中已知的。一种可采用的方法为Kohler,G.等人(1975)“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,”*Nature* 256:495-497的方法或其修改版。通常,在小鼠、大鼠或兔中开发单克隆抗体。抗体通过用免疫原性量的细胞、细胞提取物、或含有所要表位的蛋白质制剂使动物免疫来产生。免疫原可为但不限于初代细胞、培养的细胞系、癌性细胞、蛋白质、肽、核酸或组织。用于免疫的细胞可在将其用作免疫原之前培养一段时间(例如,至少24小时)。细胞可自身或与非变性佐剂(如Ribi)组合用作免疫原(参见,例如,Jennings,V.M.(1995)“Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production,”*ILAR J.*37(3):119-125)。一般来说,细胞在用作免疫原时应保持完整且优选保持活力。完整细胞与破裂细胞相比可使抗原更好地被免疫的动物检测到。使用变性或苛刻的佐剂(例如,弗氏佐剂)可使细胞破裂,且因此不受提倡。免疫原可以周期性间隔(如每两周或每周)施用多次,或可以维持在动物(例如,组织重组体)中的活力的方式施用。或者,现有单克隆抗体及对所要病原性表位具有免疫特异性的任何其他等效抗体可通过本领域中已知的任何手段对来测序并重组产生。在一个实施方案中,对这类抗体进行测序,且接着将多核苷酸序列克隆到载体中以供表达或繁殖。编码目标抗体的序列可维持在宿主细胞中的载体中,且接着可将所述宿主细胞扩增并冷冻以供未来使用。此类抗体的多核苷酸序列可用于遗传操作以产生亲和力优化的嵌合抗体、人源化抗体和/或犬源化抗体,以改善抗体的亲和力或其他特征,以及产生本发明的免疫缀合物。将抗体人源化的一般原则涉及保留所述抗体的抗原结合部分的基本序列,同时用人抗体序列交换抗体的非人其余部分。

[0252] 天然抗体(如天然IgG抗体)是由两条与“重链”复合的“轻链”构成。各轻链含有可变结构域(“VL”)和恒定结构域(“CL”)。各重链含有可变结构域(“VH”)、三个恒定结构域(“CH1”、“CH2”及“CH3”)、及位于CH1与CH2结构域之间的“铰链”区(“H”)。相比之下,scFv是通过经由短连接肽将轻链可变结构域和重链可变结构域连接在一起所形成的单链分子。

[0253] 天然存在的免疫球蛋白(例如IgG)的基本结构单元因此为具有两条轻链和两条重链的四聚体,其通常表示为约150,000Da的糖蛋白。各链的氨基端(“N端”)部分包括具有约100至110或更多个氨基酸的主要负责抗原识别的可变结构域。各链的羧基端(“C端”)部分界定恒定区,其中轻链具有单个恒定结构域,且重链通常具有三个恒定结构域和铰链区。因此,IgG分子轻链的结构为n-VL-CL-c,且IgG重链的结构为n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c(其中n和c分别表示多肽的N端和C端)。

[0254] A. 抗体可变结构域的特征

[0255] IgG分子的可变结构域是由1、2及最常见3个互补决定区(“CDR”,即分别为CDR1、CDR2及CDR3)和非CDR区段(称为构架区(“FR”)组成,所述互补决定区含有与表位接触的残基,所述构架区一般维持结构并决定CDR区的位置以容许此类接触(尽管某些构架残基也可与表位接触)。因此,VL和VH结构域通常具有以下结构:n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c(其中“n”表示N端,且“c”表示C端)。作为(或可用作)抗体轻链的第一、第二、第三及第

四FR的多肽在本文中分别命名为:FR_L1结构域、FR_L2结构域、FR_L3结构域及FR_L4结构域。类似地,作为(或可用作)抗体重链的第一、第二、第三及第四FR的多肽在本文中分别命名为:FR_H1结构域、FR_H2结构域、FR_H3结构域及FR_H4结构域。作为(或可用作)抗体轻链之第一、第二及第三CDR的多肽在本文中分别命名为:CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域。类似地,作为(或可用作)抗体重链的第一、第二及第三CDR的多肽在本文中分别命名为:CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域。因此,术语CDR_L1结构域、CDR_L2结构域、CDR_L3结构域、CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域涉及在并入抗体中时使抗体能够结合至特异性表位的多肽。

[0256] 在本说明书通篇,免疫球蛋白的成熟重链和轻链的可变结构域中残基的编号是由链中氨基酸的位置来指定。Kabat描述了抗体的众多氨基酸序列,鉴别各亚组的氨基酸共有序列,且将残基编号分配给各氨基酸,并且CDR是如由Kabat所定义来鉴别(应当理解,如由Chothia,C.和Lesk,A.M.((1987)“Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins,”J.Mol.Biol.196:901-917)所定义的CDR_H1较早开始为五个残基)。可通过参考保守氨基酸将所论述的抗体与Kabat中的共有序列之一进行比对来将Kabat的编号方案扩展至未包括在其概要中的抗体。此用于分配残基编号的方法已成为本领域中的标准,且容易鉴别不同抗体(包括嵌合或人源化变体)中等效位置处的氨基酸。例如,人抗体轻链的位置50处的氨基酸占据与小鼠抗体轻链的位置50处的氨基酸等效的位置。

[0257] 抗体结合抗原的表位的能力取决于抗体的VL和VH结构域的存在及氨基酸序列。抗体的轻链与重链的相互作用且特别是抗体的VL结构域与VH结构域的相互作用形成天然抗体(如IgG)的两个表位结合位点之一。天然抗体能够结合至仅一种表位种类(即,所述天然抗体为单特异性的),但是所述天然抗体可结合所述表位种类的多个拷贝(即,展现二价或多价)。

[0258] 因此,如本文所使用,术语“表位结合片段”意指能够免疫特异性结合至表位的抗体片段,且术语“表位结合位点”是指分子的包含表位结合片段的部分。表位结合片段可含有抗体的CDR结构域中的任何1、2、3、4或5个,或可含有抗体的CDR结构域中的全部6个,且虽然能够免疫特异性结合至此类表位,但是可对此类表位展现与此类抗体的免疫特异性、亲和性或选择性不同的免疫特异性、亲和性或选择性。然而,优选的是,表位结合片段将含有此类抗体的CDR结构域中的全部6个。抗体的表位结合片段可为单条多肽链(例如,scFv),或可包含两条或更多条多肽链,所述多肽链各自具有氨基端和羧基端(例如,Fab片段、Fab₂片段等)。除非具体指出,本文所述的蛋白质分子的结构域的顺序是以“N端至C端”方向。

[0259] 本发明还涵盖包含单链可变结构域片段(“scFv”)的免疫缀合物,所述单链可变结构域片段包含本发明的抗ADAM9-VL和/或VH结构域。单链可变结构域片段包含使用短“接头”肽连接在一起的VL和VH结构域。此类接头可被修饰的以提供额外的功能,如容许药物连接或容许至固体支持物的连接。单链变体可重组或合成产生。对于scFv的合成产生,可使用自动化合成仪。对于scFv的重组产生,可将含有编码scFv的多核苷酸的合适质粒引入合适的宿主细胞(真核细胞(如酵母、植物、昆虫或哺乳动物细胞)或原核细胞(如大肠杆菌))中。编码目标scFv的多核苷酸可通过常规操作(如,多核苷酸的连接)制成。所得scFv可使用本领域中已知的标准蛋白质纯化技术来分离。

[0260] 本发明还特别涵盖：包含本发明的抗ADAM9抗体的人源化/优化变体的CDR_H1、CDR_H2、CDR_H3、CDR_L1、CDR_L2及CDR_L3结构域以及含有此类CDR_L中的任何1、2或3个的VL结构域和含有此类CDR_H中的任何1、2或3个的VH结构域的免疫缀合物；以及包含上述各物的多特异性结合分子。术语“人源化”抗体是指具有来自非人物种的免疫球蛋白的表位结合位点及基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的其余免疫球蛋白结构的嵌合分子。一般使用重组技术制备人源化抗体。本发明的免疫缀合物可包含在本文中命名为“MAB-A”的抗体的人源化、嵌合或犬源化变体。编码MAB-A的可变结构域的多核苷酸序列可用于遗传操作，以产生具有改善或改变的特征（例如，亲和力、交叉反应性、特异性等）的MAB-A衍生物。将抗体人源化的一般原则涉及保留所述抗体的表位结合部分的基本序列，同时用人抗体序列交换抗体的非人其余部分。使单克隆抗体人源化有四个一般步骤。这些步骤为：(1) 确定起始抗体轻链可变结构域和重链可变结构域的核苷酸及预测的氨基酸序列；(2) 设计人源化抗体或犬源化抗体，即在人源化或犬源化过程期间决定使用哪个抗体构架区；(3) 采用现行的人源化或犬源化方法/技术；及(4) 转染并表达人源化抗体。参见，例如美国专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;及6,331,415。术语“优化”抗体是指在轻链可变区或重链可变区中的至少一个互补决定区(CDR)中具有至少一个与亲代抗体不同的氨基酸的抗体，此举赋予比亲代抗体更高的与人ADAM9和/或食蟹猴ADAM9的结合亲和力，例如，高2倍或更多倍的结合亲和力。从本文所提供的教导应理解，本发明的抗体可为人源化的、优化的、或既人源化也优化的。

[0261] 表位结合位点可包含融合至一个或多个恒定结构域的完整可变结构域，或仅包含接枝至适当构架区的此类可变结构域的CDR。表位结合位点可为野生型或可通过一个或多个氨基酸取代、插入或缺失来修饰。此类作用部分或完全消除恒定区充当接受者（例如，人类个体）中的免疫原的能力，然而，对外来可变结构域的免疫应答的可能性保留(LoBuglio, A.F.等人(1989)“Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man:Kinetics And Immune Response,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224)。另一种方法不仅关注提供来源于人的恒定区，而且还关注修饰可变结构域以便将所述可变结构域尽可能紧密地改造成见于人免疫球蛋白中的形式。已知抗体的重链和轻链两者的可变结构域含有三个CDR，其响应于所论述的抗原而变化并且决定结合能力，其侧接有四个构架区，所述构架区在给定物种中相对保守且推定地提供用于CDR的骨架。当相对于特定抗原来制备非人抗体时，可变结构域可通过将来源于非人抗体的CDR接枝于待修饰的人抗体中存在的FR上来“改造”或“人源化”。此方法对各种抗体的应用已由以下文献报道：Sato,K.等人(1993)*Cancer Res*53:851-856;Riechmann,L.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies for Therapy,”*Nature* 332:323-327;Verhoeyen,M.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies:Grafting An Antilysozyme Activity,”*Science* 239:1534-1536;Kettleborough,C.A.等人(1991)“Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting:The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,”*Protein Engineering* 4:773-3783;Maeda,H.等人(1991)“Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,”*Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134;Gorman,S.D.等人(1991)“Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185;Tempest,P.R.等人(1991)“Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,”*Bio/Technology*

9:266-271;Co,M.S.等人(1991)“Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873;Carter,P.等人(1992)“Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289;及Co,M.S.等人(1992)“Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,”*J.Immunol.*148:1149-1154。在一些实施方案中,人源化抗体保留所有CDR序列(例如,人源化鼠抗体,其含有鼠抗体中存在的所有六个CDR)。在其他实施方案中,人源化抗体具有相对于原始抗体的CDR在序列上不同的一个或多个CDR(一、二、三、四、五或六个)。

[0262] 已描述了众多包含来源于非人免疫球蛋白的表位结合位点的人源化抗体分子,包括具有啮齿动物或修饰的啮齿动物可变结构域及其融合至人恒定结构域的相关互补决定区(CDR)的嵌合抗体(参见,例如Winter等人(1991)“Man-made Antibodies,”*Nature* 349:293-299;Lobuglio等人(1989)“Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224;Shaw等人(1987)“Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen,”*J.Immunol.*138:4534-4538;及Brown等人(1987)“Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody,”*Cancer Res.*47:3577-3583)。其他参考文献描述了在与适当的人抗体恒定结构域融合之前接枝到人支持构架区(FR)中的啮齿动物CDR(参见,例如Riechmann,L.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies for Therapy,”*Nature* 332:323-327;Verhoeyen,M.等人(1988)“Reshaping Human Antibodies:Grafting An Antilysozyme Activity,”*Science* 239:1534-1536;及Jones等人(1986)“Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse,”*Nature* 321:522-525)。另一参考文献描述了由重组镶饰(veneered)的啮齿动物构架区支持的啮齿动物CDR(参见,例如欧洲专利公布号519,596)。这些“人源化”分子被设计成使对啮齿动物抗人抗体分子的非所要免疫应答最小,这限制了那些部分在人接受者中的治疗应用的持续时间和有效性。还可利用的使抗体人源化的其他方法由Daugherty等人(1991)“Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning,CDR-Grafting,And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins,”*Nucl.Acids Res.*19:2471-2476公开,且在美国专利号6,180,377;6,054,297;5,997,867;及5,866,692中公开。

[0263] B. 抗体恒定结构域的特征

[0264] 在本说明书通篇,IgG重链的恒定区中残基的编号为如Kabat等人,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版Public Health Service,NH1,MD(1991) (“Kabat”)中的EU索引的编号,所述文献明确以引用方式并入本文中。术语“如Kabat中所阐明的EU索引”是指Kabat中提供的人IgG1 EU抗体的恒定结构域的编号。用于分配残基编号的这种方法已成为本领域中的标准,并且容易鉴别不同抗体同种型的恒定区中的等效位置处的氨基酸。

[0265] 1. 轻链的恒定区

[0266] 如上文所示,抗体的各轻链含有可变结构域(“VL”)和恒定结构域(“CL”)。

[0267] 优选CL结构域为人IgG CL κ 结构域。示例性人CL κ 结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:69) :

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG

[0268] NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

[0269] 或者,示例性CL结构域为人IgG CL λ 结构域。示例性人CL λ 结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:70) :

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA

[0270] GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS

[0271] 2.重链的恒定区

[0272] a.天然存在的Fc区

[0273] 如本文所提供,本发明的免疫缀合物可包含Fc区。本发明的此类免疫缀合物的Fc区可为任何同种型(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。本发明的免疫缀合物还可包含CH1结构域和/或铰链区。当存在时,CH1结构域和/或铰链区可为任何同种型(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4),且优选为与所要Fc区相同的同种型。

[0274] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的Fc区可为完整的Fc区(例如,完整的IgG Fc区)或仅为Fc区的片段。任选地,本发明的含Fc区的免疫缀合物的Fc区缺乏C端赖氨酸氨基酸残基。

[0275] 抗体的两条重链的CH1结构域与抗体轻链的“CL”恒定区复合,且经由介入铰链结构域连接至重链CH2结构域。

[0276] 示例性CH1结构域为人IgG1 CH1结构域。示例性人IgG1 CH1结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:71) :

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

[0277] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

[0278] 示例性CH1结构域为人IgG2 CH1结构域。示例性人IgG2 CH1结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:72) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

[0279] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

[0280] 示例性CH1结构域为人IgG4 CH1结构域。示例性人IgG4 CH1结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:73) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

[0281] HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

[0282] 一个示例性铰链区为人IgG1铰链区。示例性人IgG1铰链区的氨基酸序列为(SEQ ID NO:74) :EPKSCDKTHTCPPCP。

[0283] 另一示例性铰链区为人IgG2铰链区。示例性人IgG2铰链区的氨基酸序列为(SEQ ID NO:75) :ERKCCVECPPCP。

[0284] 另一示例性铰链区为人IgG4铰链区。示例性人IgG4铰链区的氨基酸序列为(SEQ ID NO:76) :ESKYGPPCPSCP。如上文所述,IgG4铰链区可包含稳定化突变,如S228P取代。示例性稳定化IgG4铰链区的氨基酸序列为(SEQ ID NO:77) :ESKYGPPCPPCP。

[0285] 抗体的两条重链的CH2与CH3结构域相互作用以形成“Fc区”，其为由细胞“Fc受体”（包括但不限于Fc γ 受体（“Fc γ R”））识别的结构域。如本文所使用，术语“Fc区”用于定义IgG重链的包含所述链的CH2和CH3结构域的C端区。如果Fc区的氨基酸序列相对于其他IgG同种型与一IgG同种型的同源性最高，那么称所述Fc区为特定IgG同种型、类别或子类。

[0286] 示例性人IgG1的CH2-CH3结构域的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:1)：

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340      350      360      370      380
[0287] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

          440      447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

[0288] 如通过Kabat中所阐明的EU索引来编号，其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0289] 示例性人IgG2的CH2-CH3结构域的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:2)：

```

231      240      250      260      270      280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

          340      350      360      370      380
[0290] PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

          390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE

          440      447
[0291] ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

[0292] 如通过Kabat中所阐明的EU索引来编号，其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0293] 示例性人IgG3的CH2-CH3结构域的氨基酸序列为 (SEQ ID NO:3)：

```

231      240      250      260      270      280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

          340      350      360      370      380
[0294] PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390      400      410      420      430
WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE

          440      447
ALHNRFTQKS LSLSPGX

```

[0295] 如通过Kabat中所阐明的EU索引来编号,其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0296] 示例性人IgG4的CH2-CH3结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:4):

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

          290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

          340      350      360      370      380
[0297] SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

          390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

          440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

[0298] 如通过Kabat中所阐明的EU索引来编号,其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0299] 已在抗体恒定区(例如,Fc位置,包括但不限于如通过Kabat中所阐明的EU索引所编号的位置270、272、312、315、356及358)内的众多不同位置处观察到多态性,且因此所呈现的序列与现有技术的序列之间可存在轻微差异。人免疫球蛋白的多态形式已被充分表征。目前,已知18个Gm同种异型:G1m(1、2、3、17)或G1m(a、x、f、z)、G2m(23)或G2m(n)、G3m(5、6、10、11、13、14、15、16、21、24、26、27、28)或G3m(b1、c3、b3、b0、b3、b4、s、t、g1、c5、u、v、g5)(Lefranc等人,“The Human IgG Subclasses:Molecular Analysis of Structure, Function And Regulation.”Pergamon,Oxford,第43-78页(1990);Lefranc,G.等人,1979, Hum.Genet.:50,199-211)。特别考虑到,本发明的抗体可并入任何免疫球蛋白基因的任何同种异型、同族同种异型(isoallotype)或单倍型,且不限于本文所提供的序列的同种异型、同族同种异型或单倍型。此外,在一些表达系统中,CH3结构域的C端氨基酸残基(上文加粗)可被转译后除去。因此,CH3结构域的C端残基为本发明的免疫缀合物中的任选氨基酸残基。本发明特别涵盖缺乏CH3结构域的C端残基的免疫缀合物。本发明还特别涵盖包含CH3结

构域的C端赖氨酸残基的此类构建体。

[0300] b. Fc γ 受体 (Fc γ R)

[0301] 在传统免疫功能中,抗体-抗原复合物与免疫系统细胞的相互作用导致一系列广泛的反应,其范围为从效应功能(如抗体依赖性细胞毒性、肥大细胞脱颗粒及吞噬作用)至免疫调节信号如调控淋巴细胞增殖和抗体分泌。所有这些相互作用皆通过抗体或免疫复合物的Fc区与造血细胞上的特化细胞表面受体且特别是与见于多种类型的免疫系统细胞(例如,B淋巴细胞、滤泡树状细胞、自然杀手细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞及肥大细胞)表面上的受体(单一地称为“Fc γ 受体”“Fc γ R”,且共同称为“Fc γ R”)的结合来起始。

[0302] 由抗体和免疫复合物触发的细胞应答的多样性是由以下三种Fc受体的结构异质性引起:Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)及Fc γ RIII (CD16)。Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)及Fc γ RIII (CD16)为活化的(即,免疫系统增强的)受体;Fc γ RIIB (CD32B)为抑制性(即,免疫系统阻抑的)受体。另外,与新生儿Fc受体 (FcRn)的相互作用介导IgG分子自胞内体再循环至细胞表面并释放到血液中。上文呈现了示例性野生型IgG1 (SEQ ID NO:1)、IgG2 (SEQ ID NO:2)、IgG3 (SEQ ID NO:3)及IgG4 (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列。

[0303] 不同Fc γ R介导完全相反功能的能力反映了不同Fc γ R之间的结构差异,且特别反映了结合的Fc γ R是具有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(“ITAM”)还是具有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(“ITIM”)。不同的细胞质酶向这些结构的募集决定Fc γ R介导的细胞应答的结果。含ITAM的Fc γ R包括Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA,且当结合至Fc区(例如,存在于免疫复合物中的聚集的Fc区)时激活免疫系统。Fc γ RIIB为当前已知的唯一天然的含ITIM的Fc γ R;其在结合至聚集的Fc区时发挥作用以阻抑或抑制免疫系统。人中性粒细胞表达Fc γ RIIA基因。经由免疫复合物或特异性抗体交联进行的Fc γ RIIA聚集用于使ITAM与促进ITAM磷酸化的受体相关激酶聚集。ITAM磷酸化用作Syk激酶的停泊位点(docking site),所述Syk激酶的活化导致下游底物(例如,PI₃K)的活化。细胞活化导致促炎介质的释放。Fc γ RIIB基因在B淋巴细胞上表达;其细胞外结构域与Fc γ RIIA 96%相同,且以不可区分的方式结合IgG复合物。ITIM在Fc γ RIIB的细胞质结构域中的存在限定了Fc γ R的此抑制性子类。最近确立了此抑制的分子基础。当连同活化Fc γ R一起共连接时,Fc γ RIIB中的ITIM变为磷酸化的,且吸引肌醇多磷酸5'-磷酸酶(SHIP)的SH2结构域,所述肌醇多磷酸5'-磷酸酶水解由于含ITAM的Fc γ R介导的酪氨酸激酶活化而释放的磷酸肌醇信使,由此防止细胞内Ca⁺⁺流入。因此,Fc γ RIIB的交联阻抑对Fc γ R连接的活化反应并且抑制细胞反应性。B细胞活化、B细胞增殖和抗体分泌因此被中止。

[0304] c. 变体Fc区

[0305] Fc区的修饰可导致表型改变,例如,血清半衰期改变、稳定性改变、对细胞酶的易感性改变或效应功能改变。因此,可能需要关于效应功能修饰本发明的含Fc区的分子,例如以增强此类分子在治疗癌症方面的有效性。在某些情况下,例如在作用机制涉及阻断或拮抗作用但不杀伤带有靶抗原的细胞的抗体的情况下,需要降低或消除效应功能。当针对以低水平表达Fc γ R的非所要细胞(如肿瘤和外来细胞,例如具有低水平Fc γ RIIB的肿瘤特异性B细胞(例如,非何杰金氏淋巴瘤、CLL及柏基特氏淋巴瘤))时,效应功能提高一般为所要的。具有此类经赋予或改变的效应功能活性的本发明的免疫缀合物可用于治疗和/或预防

需要增强的效应功能活性的功效的疾病、病症或感染。

[0306] 因此,在某些实施方案中,本发明的含Fc区的免疫缀合物的Fc区可为工程改造的变体Fc区。尽管本发明的免疫缀合物的Fc区可具有结合至一种或多种Fc受体(例如,Fc γ R)的能力,但更优选的是,此类变体Fc区与Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIIB (CD16b)的结合(相对于由野生型Fc区展现的结合)改变,例如,与活化受体的结合将增强和/或结合至抑制性受体的能力大体上降低或无能力。因此,本发明的免疫缀合物的Fc区可包括完整Fc区的一些或全部CH2结构域和/或一些或全部CH3结构域,或可包含变体CH2和/或变体CH3序列(其可相对于完整Fc区的CH2或CH3结构域包括例如一个或多个插入和/或一个或多个缺失)。此类Fc区可包含非Fc多肽部分,或可包含非天然完整Fc区的部分,或可包含CH2和/或CH3结构域的非天然存在的取向(如,例如两个CH2结构域或两个CH3结构域,或在N端至C端方向上,CH3结构域连接至CH2结构域等)。

[0307] 鉴别为改变效应功能的Fc区修饰为本领域中已知的,包括增加与活化受体(例如,Fc γ RIIA (CD16A)的结合并降低与抑制性受体(例如,Fc γ RIIB (CD32B)的结合的修饰(参见,例如,Stavenghagen,J.B.等人(2007)“Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc γ Receptors,”Cancer Res.57 (18):8882-8890)。表1列出增加与活化受体的结合和/或降低与抑制性受体的结合的示例性修饰的示例性单一、双重、三重、四重及五重取代(编号为如Kabat中的EU索引的编号,且取代是相对于SEQ ID NO:1的氨基酸序列)。

[0308]

表 1			
优选活化 Fc 区的变化			
单一位点变化			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
双重位点变化			
F243L 和 R292P	F243L 和 Y300L	F243L 和 P396L	R292P 和 Y300L
D270E 和 P396L	R292P 和 V305I	P396L 和 Q419H	P247L 和 N421K
R292P 和 P396L	Y300L 和 P396L	R255L 和 P396L	R292P 和 P305I
K392T 和 P396L			
三重位点变化			
F243L、P247L 及 N421K		P247L、D270E 及 N421K	
F243L、R292P 及 Y300L		R255L、D270E 及 P396L	
F243L、R292P 及 V305I		D270E、G316D 及 R416G	

表 1
优选活化 Fc 区的变化

F243L、R292P 及 P396L	D270E、K392T 及 P396L
F243L、Y300L 及 P396L	D270E、P396L 及 Q419H
V284M、R292L 及 K370N	R292P、Y300L 及 P396L
四重位点变化	
L234F、F243L、R292P 及 Y300L	F243L、P247L、D270E 及 N421K
L234F、F243L、R292P 及 Y300L	F243L、R255L、D270E 及 P396L
L235I、F243L、R292P 及 Y300L	F243L、D270E、G316D 及 R416G
L235Q、F243L、R292P 及 Y300L	F243L、D270E、K392T 及 P396L
P247L、D270E、Y300L 及 N421K	F243L、R292P、Y300L 及 P396L
R255L、D270E、R292G 及 P396L	F243L、R292P、V305I 及 P396L
R255L、D270E、Y300L 及 P396L	F243L、D270E、P396L 及 Q419H
D270E、G316D、P396L 及 R416G	
五重位点变化	
L235V、F243L、R292P、Y300L 及 P396L	F243L、R292P、V305I、Y300L 及 P396L
L235P、F243L、R292P、Y300L 及 P396L	

[0309] 与 CD32B 的结合减少和/或与 CD16A 的结合增加的人 IgG1 Fc 区的示例性变体含有 F243L、R292P、Y300L、V305I 或 P396L 取代，其中编号为如 Kabat 中的 EU 索引的编号。这些氨基酸取代可以任何组合存在于人 IgG1 Fc 区中。在一个实施方案中，变体人 IgG1 Fc 区含有 F243L、R292P 及 Y300L 取代。在另一实施方案中，变体人 IgG1Fc 区含有 F243L、R292P、Y300L、V305I 及 P396L 取代。

[0310] 在某些实施方案中，本发明的免疫缀合物的 Fc 区优选展现与 Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) 或 Fc γ RIIB (CD16b) 的结合减少 (或大体上无结合) (相对由野生型 IgG1 Fc 区 (SEQ ID NO:1) 所展现的结合)。在一个具体实施方案中，本发明的免疫缀合物包含展现 ADCC 效应功能降低的 IgG Fc 区。在一个优选实施方案中，免疫缀合物的 CH2-CH3 结构域包括以下取代中的任何 1、2、3 或 4 个：L234A、L235A、D265A、N297Q 及 N297G，其中编号为如 Kabat 中的 EU 索引的编号。在另一实施方案中，CH2-CH3 结构域含有 N297Q 取代、N297G 取代、L234A 及 L235A 取代或 D265A 取代，因为这些突变消除 FcR 结合。或者，利用固有地展现与 Fc γ RIIIA (CD16a) 的结合减少 (或大体上无结合) 和/或效应功能降低 (相对于野生型 IgG1 Fc 区 (SEQ ID NO:1) 所展现的结合及效应功能) 的天然存在的 Fc 区的 CH2-CH3 结构域。在一个具体实施方案中，本发明的免疫缀合物包含 IgG2 Fc 区 (SEQ ID NO:2) 或 IgG4 Fc 区 (SEQ ID: NO:4)。当利用 IgG4 Fc 区时，本发明还涵盖引入稳定化突变，如上文所述的铰链区 S228P 取代 (参见，例如，SEQ ID NO:77)。由于 N297G、N297Q、L234A、L235A 及 D265A 取代消除效应功能，所以在需要效应功能的情况下，优选不采用这些取代。

[0311] 效应功能降低或消除的本发明的含 Fc 区的免疫缀合物的 CH2 和 CH3 结构域的优选 IgG1 序列将包含取代 L234A/L235A (加下划线示出) (SEQ ID NO:78)：

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0313] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

[0314] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0315] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的CH2和CH3结构域的第二优选IgG1序列包含S442C取代(加下划线示出),S442C取代容许两个CH3结构域经由二硫键彼此共价键结或药剂的缀合。此类分子的氨基酸序列为(SEQ ID NO:79):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0316] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

[0317] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0318] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的CH2和CH3结构域的第三优选IgG1序列包含L234A/L235A取代(加下划线示出)和S442C取代(加下划线示出),L234A/L235A取代降低或消除效应功能,S442C取代容许两个CH3结构域经由二硫键彼此共价键结或药剂的缀合。此类分子的氨基酸序列为(SEQ ID NO:80):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0319] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

[0320] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0321] 包含Fc区的蛋白质的血清半衰期可通过提高Fc区对FcRn的结合亲和力来增加。如本文所使用的术语“半衰期”意指分子的药动力学性质,其为分子在其施用之后的平均存活时间的量度。半衰期可表示为自受试者(例如,人患者或其他哺乳动物)体内或其具体区室中消除百分之五十(50%)已知量的分子所需的时间,例如,如在血清中(即循环半衰期)或在其他组织中所测量。一般来说,半衰期的增加导致施用分子在循环中的平均停留时间(MRT)的增加。

[0322] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含变体Fc区,所述变体Fc区相对于野生型Fc区包含至少一个氨基酸修饰,使得所述分子的半衰期增加(相对于包含野生型Fc区的分子)。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含变体IgG Fc区,其中所述变体Fc区包含在选自由以下组成的组的一个或多个位置处的延长半衰期的氨基酸取代:238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435及436,其中编号为如Kabat中的EU索引的编号。能够增加含Fc区的分子的半衰期的众多突变为本领域中已知的,且包括例如M252Y、S254T、T256E及其组合。例如,参见以下文献中所述的突变:美国专利号6,277,375、7,083,784;7,217,797、8,088,376;美国公布号2002/0147311;2007/0148164;以及PCT公布

号WO 98/23289;WO 2009/058492;及WO 2010/033279,所述文献以引用的方式整体并入本文中。半衰期增加的免疫缀合物还包括具有包含在Fc区残基250、252、254、256、257、288、307、308、309、311、378、428、433、434、435及436的两个或更多个处的取代的变体Fc区的免疫缀合物,其中编号为如Kabat中的EU索引的编号。具体来说,两个或更多个取代选自:T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、H435K及Y436I,其中编号为如Kabat中的EU索引的编号。

[0323] 在一个具体实施方案中,本发明的免疫缀合物具有包含以下取代的变体IgG Fc区:

[0324] (A) M252Y、S254T及T256E;

[0325] (B) M252Y和S254T;

[0326] (C) M252Y和T256E;

[0327] (D) T250Q和M428L;

[0328] (E) T307Q和N434A;

[0329] (F) A378V和N434A;

[0330] (G) N434A和Y436I;

[0331] (H) V308P和N434A;或

[0332] (I) K288D和H435K。

[0333] 在一个优选实施方案中,本发明的免疫缀合物具有包含以下取代中的任何1、2或3个的变体IgG Fc区:M252Y、S254T及T256E。本发明进一步涵盖具有包含以下的变体Fc区的免疫缀合物:

[0334] (A) 改变效应功能和/或Fc γ R的一个或多个突变;以及

[0335] (B) 延长血清半衰期的一个或多个突变。

[0336] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的CH2和CH3结构域的第四优选IgG1序列包含M252Y、S254T及T256E取代(加下划线示出),以便延长血清半衰期。此类分子的氨基酸序列为(SEQ ID NO:147):

```

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
[0337] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

[0338] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0339] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的CH2和CH3结构域的第五优选IgG1序列包含M252Y、S254T及T256E取代(加下划线示出)以便延长血清半衰期,且包含S442C取代(加下划线示出),以便容许两个CH3结构域经由二硫键彼此共价键结或容许药物部分的缀合。此类分子的氨基酸序列为(SEQ ID NO:148):

```

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
[0340] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LCLSPGX

```

[0341] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0342] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的CH2和CH3结构域的第六优选IgG1序列包含降低或消除效应功能的L234A/L235A取代(加下划线示出),以及M252Y、S254T及T256E取代(加下划线示出),以便延长血清半衰期。此类分子的氨基酸序列为(SEQ ID NO:149):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0343] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

[0344] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0345] 本发明的含Fc区的免疫缀合物的CH2和CH3结构域的第七优选IgG1序列包含降低或消除效应功能的L234A/L235A取代(加下划线示出),以及M252Y、S254T及T256E取代(加下划线示出)以便延长血清半衰期,以及S442C取代(加下划线示出),以便容许两个CH3结构域经由二硫键彼此共价键结或容许药物部分的缀合。此类分子的氨基酸序列为(SEQ ID NO:150):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 [0346] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LCLSPGX

[0347] 其中,X为赖氨酸(K)或不存在。

[0348] II. 示例性抗ADAM9抗体

[0349] 本发明提供能够特异性结合至ADAM9、可用于产生本发明的免疫缀合物的特定抗体及其抗原结合片段。

[0350] 代表性人ADAM9多肽(NCBI序列NP_003807,包括28个氨基酸残基信号序列,加下划线示出)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:5):

MSGARFPSG TLRVRWLLLL GLVGPVLGAA RPGFQQTSHL SSYEIITPWR
 LTRERREAPR PYSKQVSYVI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
 GTLITDHPNI QNHCHYRGYV EGVHNSSIAL SDCFGLRGLL HLENASYGIE
 [0351] PLQNSSHFEH IYRMDDVYK EPLKCGVSNK DIEKETAKDE EEEPPSMTQL
 LRRRRAVLPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
 IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIVGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
 AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGQITVET FASIVAHELG

[0352] HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTNLKGGN
 CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDG GTPKECELDP CCEGSTCKLK
 SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNQSS QFCQPDVFIQ
 NGYPCQNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRE
 GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTKC
 WGVDLQLGSD VPDPMVMNEG TKCGAGKICR NFQCVDAVSL NYDCDVQKKC
 HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
 VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRSYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
 GSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFAVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ
 GNLIPARPAP APPLYSSLT

[0353] 在ADAM9 (SEQ ID NO:5) 的819个氨基酸残基中,残基1-28为信号序列,残基29-697为细胞外结构域,残基698-718为跨膜结构域,且残基719-819为细胞内结构域。三个结构域位于以下细胞外结构域内:Reprolysin (M12B) 家族锌金属蛋白酶结构域(在约残基212-406处);解联蛋白结构域(在约残基423-497处);及EGF样结构域(在约残基644-697处)。已鉴别出众多转译后修饰和同种型,且蛋白质在其到达质膜之前在高尔基体外侧网络(trans-Golgi network)中被蛋白水解裂解以产生成熟蛋白质。前结构域(pro-domain)的移除经由在两个不同位点处的裂解发生。最可能由前蛋白转化酶(如弗林蛋白酶)在前结构域与催化结构域之间的边界(Arg-205/Ala-206)处进行加工。另外的上游裂解前蛋白转化酶位点(Arg-56/Glu-57)在ADAM9的活化中具有重要作用。

[0354] 代表性食蟹猴ADAM9多肽(NCBI序列XM_005563126.2,包括可能的28个氨基酸残基信号序列,加下划线示出)具有氨基酸序列(SEQ ID NO:6):

[0355] MGSGVGSPPG TLRVRWLLLL CLVGPVLGAA RPFQQTSHL SSYEIITPWR
 LTRERREAPR PYSKQVSYLI QAEGKEHIIH LERNKDLLPE DFVVYTYNKE
 GTVITDHPNI QNHCHFRGYV EGVYNSSVAL SNCFGLRGLL HLENASYGIE
 PLQNSSHFEH IYRMDDVHK EPLKCGVSNK DIEKETTDE EEEPPSMTQL
 LRRRRAVLPQ TRYVELFIVV DKERYDMMGR NQTAVREEMI LLANYLDSMY
 IMLNIRIVLV GLEIWTNGNL INIAGGAGDV LGNFVQWREK FLITRRRHDS
 AQLVLKKGFG GTAGMAFVGT VCSRSHAGGI NVFGHITVET FASIVAHELG
 HNLGMNHDDG RDCSCGAKSC IMNSGASGSR NFSSCSAEDF EKLTNLKGGN
 CLLNIPKPDE AYSAPSCGNK LVDAGEECDG GTPKECELDP CCEGSTCKLK
 SFAECAYGDC CKDCRFLPGG TLCRGKTSEC DVPEYCNQSS QFCQPDVFIQ
 NGYPCQNKA YCYNGMCQYY DAQCQVIFGS KAKAAPKDCF IEVNSKGDRE
 GNCGFSGNEY KKCATGNALC GKLQCENVQE IPVFGIVPAI IQTPSRGTKC
 WGVDLQLGSD VPDPMVMNEG TKCGADKICR NFQCVDAVSL NYDCDIQKKC
 HGHGVCNSNK NCHCENGWAP PNCETKGYGG SVDSGPTYNE MNTALRDGLL
 VFFFLIVPLI VCAIFIFIKR DQLWRRYFRK KRSQTYESDG KNQANPSRQP
 VSVPRHVSPV TPPREVPIYA NRFPVPTYAA KQPQQFPSRP PPPQPKVSSQ
 GNLIPARPAP APPLYSSLT

[0356] 蛋白质的Reprolysin (M12B) 家族锌金属蛋白酶结构域在约残基212-406处;蛋白质的解联蛋白结构域在约残基423-497处。

[0357] 在某些实施方案中,本发明的抗ADAM9抗体及其ADAM9结合片段的特征为以下准则

中的任何一、二、三、四、五、六、七、八或九个：

- [0358] (1) 免疫特异性结合如癌细胞表面上内源性表达的人ADAM9的能力；
- [0359] (2) 以类似结合亲和力特异性结合人和非人灵长类ADAM9 (例如, 食蟹猴的ADAM9) ；
- [0360] (3) 以4nM或更小的平衡结合常数 (K_D) 特异性结合人ADAM9；
- [0361] (4) 以4nM或更小的平衡结合常数 (K_D) 特异性结合非人灵长类ADAM9；
- [0362] (5) 以 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ 或更大的缔合速率 (k_a) 特异性结合人ADAM9；
- [0363] (6) 以 $1 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ 或更大的缔合速率 (k_a) 特异性结合非人灵长类ADAM9；
- [0364] (7) 以 $1 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ 或更小的解离速率 (k_d) 特异性结合人ADAM9；
- [0365] (8) 以 $9 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$ 或更小的解离速率 (k_d) 特异性结合非人灵长类ADAM9。
- [0366] (9) 被优化以相较于嵌合或鼠亲代抗体与cyno ADAM9的结合亲和力 (例如, 如通过 **BIACORE®** 分析所测量) 有至少100倍增强 (例如, 至少100倍、至少150倍、至少200倍、至少250倍、至少300倍、至少350倍、至少400倍、至少450倍、至少500倍、至少550倍或至少600倍增强), 并保留与人ADAM9的高亲和力结合 (例如, **BIACORE®** 分析)。

[0367] 如本文所述, 抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段的结合常数可使用表面等离子体共振例如经由 **BIACORE®** 分析来确定。可将表面等离子体共振数据拟合至1:1朗缪耳 (Langmuir) 结合模型 (同时 k_a k_d), 且自速率常数的比 k_d/k_a 计算平衡结合常数 K_D 。可确定单价抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段 (即, 包含单个ADAM9表位结合位点的分子)、二价抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段 (即, 包含两个ADAM9表位结合位点的分子) 或具有更高价的抗ADAM9抗体及其ADAM9结合片段 (例如, 包含三、四或更多个ADAM9表位结合位点的分子) 的此类结合常数。

[0368] 本发明特别涵盖具有抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段的免疫缀合物, 所述抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含免疫特异性结合至人ADAM9多肽的表位的抗ADAM9轻链可变 (VL) 结构域和抗ADAM9重链可变 (VH) 结构域。除非另外说明, 所有此类抗ADAM9抗体及其ADAM9结合片段皆能够免疫特异性结合至人ADAM9。如本文所使用, 此类ADAM9可变结构域分别被称为“抗ADAM9-VL”和“抗ADAM9-VH”。

[0369] A. 鼠抗人ADAM9抗体

[0370] 已鉴别出阻断ADAM9的靶蛋白加工活性、被内化且具有抗肿瘤活性的鼠抗ADAM9抗体 (参见, 例如, 美国专利号8,361,475)。此抗体在美国专利号7,674,619和8,361,475中命名为由杂交瘤克隆ATCC PTA-5174产生的“抗KID24”抗体, 在本文中命名为“MAB-A”。MAB-A展现出优于正常组织的与肿瘤的强优先结合 (参见图7A-7C)。MAB-A在一大组正常细胞类型中展现极少或无染色 (表2)。

[0371]

表 2	
组织	MAB-A (1.25 µg/mL)
肾上腺	阴性
膀胱	阴性
骨髓	阴性
乳房	阴性
小脑	阴性
大脑	ND
子宫颈	阴性
结肠	阴性
食道	平滑肌+/-至 1+ (gr c) <5%
输卵管 (Ovaduct)	阴性
心脏	阴性
肾	阴性
肝	阴性
肺	阴性
淋巴结	阴性

表 2	
组织	MAB-A (1.25 µg/mL)
卵巢	阴性
胰腺	非常罕见(可能为腺泡性) 1+ (c)
副甲状腺	上皮实质细胞 1+ (gr c), 1% 细胞(偏主细胞) 2+ (m,c)5% 1+ (m,c) 10%主要为顶端
垂体	后叶细胞(可能为神经细胞和/或垂体细胞 1+ (c>m) <5%
胎盘	绒毛膜板内的血管衬里细胞(Vascular lining cell) 1+ (gr c>m) 绒毛膜板的间叶细胞 1-2+ (gr c),5%
前列腺	腺上皮 2+ (gr c)5%和 1+ (gr c) 5%
视网膜+睫状体	偏阴性(色素上皮层 3-4+ (gr c), 由于色素未染色)
颌下腺	导管上皮+/- (c) 10%
骨骼肌	阴性
皮肤	阴性
小肠	阴性
脊髓	神经纤维网 1+ (gr c) <1%
脾	阴性
胃	阴性
睾丸	细精管 1+ (gr c) <5% 间质细胞(可能为莱氏细胞)2-3+ (gr c) <5%和 1+ (gr c) 10%
甲状腺	阴性
扁桃腺	内皮细胞 2-3+ (c,m) <5%和 1+ (m,c) 15%
输尿管	移行上皮 1+ (m,c) <5%和 1+ (m,c) 5%; 内皮细胞 1+ (c) <5%
子宫	阴性
A498 细胞团块	2-3+ (m,c), 50%, 1+ (m,c) 45%

[0372]

[0373] 如图2中所示, MAB-A以高亲和力结合人ADAM9, 但以较低程度结合非人灵长类(例如, 食蟹猴) ADAM9。

[0374] 下文提供MAB-A的VL和VH结构域的氨基酸序列。将MAB-A的VH和VL结构域人源化,

并将CDR优化以改善亲和力和/或去除潜在的氨基酸不利条件。将CDR_H3进一步优化以增强与非人灵长类ADAM9的结合,同时维持其对ADAM9的高亲和力。

[0375] 本发明的优选免疫缀合物包含MAB-A的优化变体的VH结构域的1、2或全部3个CDR_H和/或VL结构域的1、2或全部3个CDR_L,且优选进一步具有人源化MAB-A的VH和/或VL结构域的人源化构架区(“FR”)。本发明的其他优选免疫缀合物具有MAB-A的人源化/优化变体的整个VH和/或VL结构域。

[0376] 本发明特别涉及包含以下的免疫缀合物:

[0377] (A) (1) MAB-A的VH结构域的三个CDR_H;和

[0378] (2) MAB-A的人源化变体的VH结构域四个FR;或

[0379] (B) (1) MAB-A的VL结构域的三个CDR_L;和

[0380] (2) MAB-A的人源化变体的VL结构域四个FR;或

[0381] (C) MAB-A的优化变体的VH结构域的三个CDR_H;和MAB-A的VL结构域的三个CDR_L;或

[0382] (D) MAB-A的VH结构域的三个CDR_H;和优化变体MAB-A的VL结构域的三个CDR_L;或

[0383] (E) MAB-A的优化变体的VH结构域的三个CDR_H;和优化MAB-A的VL结构域的三个CDR_L;或

[0384] (F) (1) MAB-A的优化变体的VH结构域的三个CDR_H;和

[0385] (2) MAB-A的人源化变体的VH结构域四个FR;或

[0386] (G) (1) MAB-A的优化变体的VL结构域的三个CDR_L;和

[0387] (2) MAB-A的人源化变体的VL结构域四个FR;或

[0388] (H) (1) MAB-A的人源化/优化变体的VH结构域;和

[0389] (2) MAB-A的人源化/优化变体的VL结构域。鼠抗体“MAB-A”

[0390] 鼠抗ADAM9抗体MAB-A的VH结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:7 (CDR_H残基以下划线示出):

QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMHWVKQR PGQGLEWIGE

[0391] IIPINGHTNY NEKFKSKATL TLDKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTTLT VSS

[0392] MAB-A的CDR_H1结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:8):SYWMH。

[0393] MAB-A的CDR_H2结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:9):EIIPINGHTNYNEKFKS。

[0394] MAB-A的CDR_H3结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:10):GGYYYYGSRDYFDY。

[0395] 鼠抗ADAM9抗体MAB-A的VL结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:11 (CDR_L残基以下划线示出):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QQIPGQPPKL

[0396] LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSHEDPF
TFGGGTKLEI K

[0397] MAB-A的CDR_L1结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:12):KASQSVDYDGDSYMN。

[0398] MAB-A的CDR_L2结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:13):AASDLES。

[0399] MAB-A的CDR_L3结构域的氨基酸序列为(SEQ ID NO:14):QQSHEDPFT。

[0400] B. 示例性人源化/优化抗ADAM9-VH和VL结构域

[0401] 1. MAB-A的变体VH结构域

[0402] MAB-A的某些优选人源化/优化抗ADAM9-VH结构域的氨基酸序列为MAB-A的ADAM9-VH结构域(SEQ ID NO:7)的变体,且由SEQ ID NO:15表示(CDR_H残基以下划线示出):

	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYWX₁</u> HWVRQA
[0403]	PGKGLEWVGE	<u>IIPIX₂</u> GHTNY	<u>NEX₃</u> <u>FX₄</u> <u>X₅</u> RFTI	SLDNSKNTLY
	LQMGSRAED	TAVYYCARGG	<u>YYYYX₆</u> <u>X₇</u> <u>X₈</u> <u>X₉</u> <u>X₁₀</u> <u>X₁₁</u>	<u>DY</u> WGQGTIVT
	VSS			

[0404] 其中:X₁、X₂、X₃、X₄、X₅及X₆被独立地选择,

[0405] 其中:X₁为M或I; X₂为N或F;

[0406] X₃为K或R; X₄为K或Q;

[0407] X₅为S或G,且 X₆为P、F、Y、W、I、L、V、T、G或D;

[0408] 其中:X₇、X₈、X₉、X₁₀及X₁₁被选择以使得:

[0409] (A) 当X₆为P时: (B) 当X₆为F、Y或W时:

[0410] X₇为K或R; X₇为N或H;

[0411] X₈为F或M; X₈为S或K;

[0412] X₉为G; X₉为G或A;

[0413] X₁₀为W或F;且 X₁₀为T或V;且

[0414] X₁₁为M、L或K; X₁₁为M、L或K;

[0415] (C) 当X₆为I、L或V时: (D) 当X₆为T时:

[0416] X₇为G; X₇为G;

[0417] X₈为K; X₈为K、M或N;

[0418] X₉为G或A; X₉为G;

[0419] X₁₀为V;且 X₁₀为V或T;且

[0420] X₁₁为M、L或K; X₁₁为L或M;

[0421] (E) 当X₆为G时:并且 (F) 当X₆为D时:

[0422] X₇为G; X₇为S;

[0423] X₈为S; X₈为N;

[0424] X₉为G; X₉为A;

[0425] X₁₀为V;且 X₁₀为V;且

[0426] X₁₁为L; X₁₁为L。

[0427] MAB-A的优选人源化抗ADAM9 VH结构域的氨基酸序列:hMAB-A VH(1)(SEQ ID NO:16)和MAB-A的某些优选人源化/优化抗ADAM9-VH结构域的氨基酸序列:

	hMAB-A VH(2)	(SEQ ID NO:17)	hMAB-A VH(2D)	(SEQ ID NO:23)
	hMAB-A VH(3)	(SEQ ID NO:18)	hMAB-A VH(2E)	(SEQ ID NO:24)
	hMAB-A VH(4)	(SEQ ID NO:19)	hMAB-A VH(2F)	(SEQ ID NO:25)
[0428]	hMAB-A VH(2A)	(SEQ ID NO:20)	hMAB-A VH(2G)	(SEQ ID NO:26)
	hMAB-A VH(2B)	(SEQ ID NO:21)	hMAB-A VH(2H)	(SEQ ID NO:27)
	hMAB-A VH(2C)	(SEQ ID NO:22)	hMAB-A VH(2I)	(SEQ ID NO:28)
	和 hMAB-A VH(2J)	(SEQ ID NO:29)		

[0429] 呈现于下文中(CDR_H残基以单下划线示出;相对于hMAB-A VH(1)(SEQ ID NO:7)的

差异以双下划线示出)。

[0430] hMAB-A VH(1) (SEQ ID NO:16) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0431] IIPINGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[0432] hMAB-A VH(2) (SEQ ID NO:17) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0433] IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[0434] hMAB-A VH(3) (SEQ ID NO:18) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0435] IPIFGHTNY NERFOGRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[0436] hMAB-A VH(4) (SEQ ID NO:19) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWIHWVRQA PGKGLEWVGE

[0437] IPIFGHTNY NERFOGRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYGSRDYF DYWGQGTTVT VSS

[0438] hMAB-A VH(2A) (SEQ ID NO:20) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0439] IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYFNSGTL DYWGQGTTVT VSS

[0440] hMAB-A VH(2B) (SEQ ID NO:21) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0441] IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYIGKGVL DYWGQGTTVT VSS

[0442] hMAB-A VH(2C) (SEQ ID NO:22) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0443] IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRFGWL DYWGQGTTVT VSS

[0444] hMAB-A VH(2D) (SEQ ID NO:23) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0445] IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYTGKGVL DYWGQGTTVT VSS

[0446] hMAB-A VH(2E) (SEQ ID NO:24) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE

[0447] IPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYDSNAVL DYWGQGTTVT VSS

[0448] hMAB-A VH(2F) (SEQ ID NO:25) :

[0449] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYFHSCTL DYWGQGT TTVT VSS

[0450] hMAB-A VH(2G) (SEQ ID NO:26) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
[0451] IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYFNKAVL DYWGQGT TTVT VSS

[0452] hMAB-A VH(2H) (SEQ ID NO:27) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
[0453] IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYGGSGVL DYWGQGT TTVT VSS

[0454] hMAB-A VH(2I) (SEQ ID NO:28) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
[0455] IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGF DYWGQGT TTVT VSS

[0456] hMAB-A VH(2J) (SEQ ID NO:29) :

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
[0457] IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCARGG
YYYYNSGTL DYWGQGT TTVT VSS

[0458] MAB-A的人源化和/或优化抗ADAM9-VH结构域的FR的合适氨基酸序列为:

[0459] FR_H1结构域 (SEQ ID NO:30) :EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFS

[0460] FR_H2结构域 (SEQ ID NO:31) :WVRQAPGKGLEWVG

[0461] FR_H3结构域 (SEQ ID NO:32) :RFTISLDNSKNTLYLQMGSLR AEDTAVYYCAR

[0462] FR_H4结构域 (SEQ ID NO:33) :WGQGT TTVTVSS

[0463] 抗ADAM9-VH结构域的CDR_H1结构域的合适替代性氨基酸序列包括:

[0464] SEQ ID NO:8:SYWMH

[0465] SEQ ID NO:34:SYWIH

[0466] 抗ADAM9-VH结构域的CDR_H2结构域的合适替代性氨基酸序列包括:

[0467] SEQ ID NO:9:EIIPINGHTNYNEKFKS

[0468] SEQ ID NO:35:EIIPIFGHTNYNEKFKS

[0469] SEQ ID NO:36:EIIPIFGHTNYNERFQG

[0470] 抗ADAM9-VH结构域的CDR_H3结构域的合适替代性氨基酸序列包括:

[0471] SEQ ID NO:10:GGYYYYGSRDYFDY

[0472] SEQ ID NO:37:GGYYYYFNSGTLDY

[0473] SEQ ID NO:38:GGYYYYIGKGVLDY

[0474] SEQ ID NO:39:GGYYYYPRFGWLDY

[0475] SEQ ID NO:40:GGYYYYTGKGVLDY

[0476] SEQ ID NO:41:GGYYYYDSNAVL DY

[0477] SEQ ID NO:42:GGYYYYFHSCTL DY

[0478] SEQ ID NO:43:GGYYYYFNKAVLDY

[0479] SEQ ID NO:44:GGYYYYGGSGVLDY

[0480] SEQ ID NO:45:GGYYYYPRQGFLDY

[0481] SEQ ID NO:46:GGYYYYYNSGTLDY

[0482] 因此,本发明涵盖具有包含以下的VH结构域的ADAM9结合分子:

[0483] (1) CDR_H1结构域,其具有以下氨基酸序列:

[0484] SEQ ID NO:47:SYWX₁H

[0485] 其中:X₁为M或I;

[0486] (2) CDR_H2结构域,其具有以下氨基酸序列:

[0487] SEQ ID NO:48:EIIPIX₂GHTNYNEX₃FX₄X₅

[0488] 其中:X₂、X₃、X₄及X₅被独立地选择,并且

[0489] 其中:X₂为N或F;X₃为K或R;

[0490] X₄为K或Q;且X₅为S或G。

[0491] 及

[0492] (3) CDR_H3结构域,其具有以下氨基酸序列:

[0493] SEQ ID NO:49:GGYYYYX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁DY

[0494] 其中:X₆为P、F、Y、W、I、L、V、T、G或D,且X₇、X₈、X₉、X₁₀及X₁₁被选择以使得:

[0495] (A) 当X₆为P时: (B) 当X₆为F、Y或W时:

[0496] X₇为K或R; X₇为N或H;

[0497] X₈为F或M; X₈为S或K;

[0498] X₉为G; X₉为G或A;

[0499] X₁₀为W或F;且 X₁₀为T或V;且

[0500] X₁₁为M、L或K; X₁₁为M、L或K;

[0501] (C) 当X₆为I、L或V时: (D) 当X₆为T时:

[0502] X₇为G; X₇为G;

[0503] X₈为K; X₈为K、M或N;

[0504] X₉为G或A; X₉为G;

[0505] X₁₀为V;且 X₁₀为V或T;且

[0506] X₁₁为M、L或K; X₁₁为L或M;

[0507] (E) 当X₆为G时:并且 (F) 当X₆为D时:

[0508] X₇为G; X₇为S;

[0509] X₈为S; X₈为N;

[0510] X₉为G; X₉为A;

[0511] X₁₀为V;且 X₁₀为V;且

[0512] X₁₁为L; X₁₁为L。

[0513] MAB-A的衍生物/变体的第一示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2)结构域(SEQ ID NO:17),且具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:50):

[0514] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
 YYYYSRDFY DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLS
 PGX

[0515] 其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0516] MAB-A的衍生物/变体的第二示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2C)结构域(SEQ ID NO:22),且具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:51):

[0517] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
 YYYYPFRGWL DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLS
 PGX

[0518] 其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0519] MAB-A的衍生物/变体的第三示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2I)结构域(SEQ ID NO:28),且具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:52):

[0520] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQGFY DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLS
 PGX

[0521] 其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0522] 如上文所提供,Fc区的CH2-CH3结构域可被工程改造例如以降低效应功能和/或引入缀合位点和/或延长血清半衰期。在某些实施方案中,本发明的示例性人源化/优化IgG1重链的CH2-CH3结构域包含选自以下的一个或多个取代:L234A、L235A、M252Y、S254T、T256E及S442C。

[0523] 因此,MAB-A的衍生物/变体的第四示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH

(2I) 结构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:78) 中的取代L234A和L235A, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:141)

[0524] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQGF L DYWGQGT T VVSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA **A** **A**GGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
 PGX

[0525] 其中X为赖氨酸(K) 或不存在。

[0526] MAB-A的衍生物/变体的第五示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2I) 结构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:79) 中的S442C取代, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:142):

[0527] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQGF L DYWGQGT T VVSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
 PGX

[0528] 其中X为赖氨酸(K) 或不存在。

[0529] MAB-A的衍生物/变体的第六示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2I) 结构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:80) 中的取代L234A、L235A及S442C, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:143):

[0530] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQGF L DYWGQGT T VVSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA **A** **A**GGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
 PGX

[0531] 其中X为赖氨酸(K) 或不存在。

[0532] MAB-A的衍生物/变体的第七示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2I) 结

构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:147) 中的取代M252Y、S254T及T256E, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:151):

```

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
[0533] PKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG
PGX

```

[0534] 其中X为赖氨酸(K) 或不存在。

[0535] 在一个实施方案中, MAB-A的衍生物/变体的人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH (2I) 结构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:147) 中的取代M252Y、S254T及T256E, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:155):

```

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
[0536] PKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG
PG

```

[0537] MAB-A的衍生物/变体的第八示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH (2I) 结构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:148) 中的取代M252Y、S254T、T256E及S442C, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:152):

```

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGSRAED TAVYYCARGG
YYYYPRQGFL DYWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
[0538] PKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
PGX

```

[0539] 其中X为赖氨酸(K) 或不存在。

[0540] 在一个实施方案中, MAB-A的衍生物/变体的人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH (2I) 结构域 (SEQ ID NO:28), 且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域 (SEQ ID NO:148) 中的取代M252Y、S254T、T256E及S442C, 且具有以下氨基酸序列 (SEQ ID NO:156):

[0541] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGLSLRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQQGFL DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
 PG

[0542] MAB-A的衍生物/变体的第九示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2I)结构域(SEQ ID NO:28),且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:149)中的取代L234A、L235A、M252Y、S254T及T256E,且具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:153):

[0543] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGLSLRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQQGFL DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
 PGX

[0544] 其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0545] MAB-A的衍生物/变体的第十示例性人源化/优化IgG1重链含有hMAB-A VH(2I)结构域(SEQ ID NO:28),且进一步包含Fc区的CH2-CH3结构域(SEQ ID NO:150)中的取代L234A、L235A、M252Y、S254T、T256E及S442C,且具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:154):

[0546] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYWMHWVRQA PGKGLEWVGE
 IIPIFGHTNY NEKFKSRFTI SLDNSKNTLY LQMGLSLRAED TAVYYCARGG
 YYYYPQQGFL DYWGQGTIVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG
 TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLYIT REPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLCLS
 PGX

[0547] 其中X为赖氨酸(K)或不存在。

[0548] 2.MAB-A的变体VL结构域

[0549] MAB-A的优选人源化/优化抗ADAM9-VL结构域的氨基酸序列为MAB-A的ADAM9-VL结构域(SEQ ID NO:11)的变体,且由SEQ ID NO:53表示(CDR_L残基以下划线示出):

[0550] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCX₁₂ASQSVD YX₁₃GDSYX₁₄NWY
 QOKPGQPPKL LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS
 SLEPEDFATY YCQOSX₁₅X₁₆X₁₇PF TFGQGTKLEI K

[0551] 其中: X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₁₆及X₁₇被独立地选择,并且

[0552] 其中: X₁₂为K或R; X₁₃为D或S;

[0553] X₁₄为M或L; X₁₅为H或Y;

[0554] X₁₆为E或S;且X₁₇为D或T。

[0555] MAB-A的优选人源化抗ADAM9-VL结构域的氨基酸序列(hMAB-A VL(1)(SEQ ID NO:54))和MAB-A的某些优选人源化/优化抗ADAM9-VL结构域的氨基酸序列(hMAB-A VL(2)(SEQ ID NO:55)、hMAB-A VL(3)(SEQ ID NO:56)及hMAB-A VL(4)(SEQ ID NO:57))呈现于下文中(CDR_L残基以单下划线示出;相对于hMAB-A VL(1)(SEQ ID NO:54)的差异以双下划线示出)。

[0556] hMAB-A VL(1)(SEQ ID NO:54):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YDGDSYMNWY QOKPGQPPKL
 [0557] LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSHEDPF
TFGQGTKLEI K

[0558] hMAB-A VL(2)(SEQ ID NO:55):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSVD YSGDSYMNWY QOKPGQPPKL
 [0559] LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSHEDPF
TFGQGTKLEI K

[0560] hMAB-A VL(3)(SEQ ID NO:56):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSVD YSGDSYMNWY QOKPGQPPKL
 [0561] LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSHEDPF
TFGQGTKLEI K

[0562] hMAB-A VL(4)(SEQ ID NO:57):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCRASQSVD YSGDSYLNWY QOKPGQPPKL
 [0563] LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQOSYSTPF
TFGQGTKLEI K

[0564] 因此,MAB-A的人源化和/或优化抗ADAM9-VL结构域的FR的合适氨基酸序列为:

[0565] FR_L1结构域(SEQ ID NO:58):DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC

[0566] FR_L2结构域(SEQ ID NO:59):WYQQKPGQPPKLLIY

[0567] FR_L3结构域(SEQ ID NO:60):GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFATYYC

[0568] FR_L4结构域(SEQ ID NO:61):FGQGTKLEIK

[0569] 抗ADAM9-VL结构域的CDR_L1结构域的合适的替代性氨基酸序列包括:

[0570] SEQ ID NO:12:KASQSVDYDGDSYMN

[0571] SEQ ID NO:62:KASQSVDYSGDSYMN

[0572] SEQ ID NO:63:RASQSVDYSGDSYMN

[0573] SEQ ID NO:64:RASQSVDYSGDSYLN

[0574] 抗ADAM9-VL结构域的CDR_L3结构域的合适的替代性氨基酸序列包括:

[0575] SEQ ID NO:14:QQSHEDPFT

[0576] SEQ ID NO:65:QQSYSTPFT

[0577] 因此,本发明涵盖包含以下的抗ADAM9抗体VL结构域:

[0578] (1) CDR_L1结构域,其具有以下氨基酸序列:

[0579] SEQ ID NO:66:X₁₂ASQSVDYX₁₃GDSYX₁₄N

[0580] 其中:X₁₂、X₁₃、X₁₄被独立地选择,并且

[0581] 其中:X₁₂为K或R;X₁₃为D或S;且X₁₄为M或L;

[0582] (2) CDR_L2结构域,其具有以下氨基酸序列:

[0583] SEQ ID NO:13:AASDLES

[0584] 及

[0585] (3) CDR_L3结构域,其具有以下氨基酸序列:

[0586] SEQ ID NO:67:QQSX₁₅X₁₆X₁₇PFT

[0587] 其中:X₁₅、X₁₆及X₁₇被独立地选择,并且

[0588] 其中:X₁₅为H或Y;X₁₆为E或S;且X₁₇为D或T。

[0589] MAB-A的衍生物/变体的示例性人源化/优化IgG1轻链含有hMAB-A VL(2)结构域(SEQ ID NO:55),且具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:68):

[0590] DIVMTQSPDS LAVSLGERAT ISCKASQSV D YSGDSYMNWY QQKPGQPPKL
LIYAASDLES GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATY YCQQSHEDPF
TFGQGKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

[0591] 本发明另外明确地考虑免疫特异性结合至人ADAM9多肽的表位且包含上文提供的MAB-A CDR_H1、CDR_H2、CDR_H3、CDR_L1、CDR_L2或CDR_L3中的任一个的免疫缀合物,且特别考虑包含以下的此类免疫缀合物:上文提供的MAB-A CDR_H1之一、上文提供的MAB-A CDR_H2之一、上文提供的MAB-A CDR_H3之一、上文提供的MAB-A CDR_L1之一、上文提供的MAB-A CDR_L2之一及上文提供的MAB-A CDR_L3之一。本发明进一步考虑还包含上文提供的人源化MAB-A FR_H1、FR_H2、FR_H3、或FR_H4、FR_L1、FR_L2、FR_L3或FR_L4中的任一个的此类免疫缀合物,且特别考虑包含FR_H1、FR_H2、FR_H3及FR_H4和/或包含FR_L1、FR_L2、FR_L3、FR_L4及FR_H1的此类免疫缀合物。

[0592] 在一些实施方案中,人源化/优化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含具有选自自由以下组成的组的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域:

[0593] (a) 分别为SEQ ID NO:8、35及10和SEQ ID NO:62、13、14;

[0594] (b) 分别为SEQ ID NO:8、35及10和SEQ ID NO:63、13、14;

[0595] (c) 分别为SEQ ID NO:8、36及10和SEQ ID NO:63、13、14;

[0596] (d) 分别为SEQ ID NO:34、36及10和SEQ ID NO:64、13、65

[0597] (e) 分别为SEQ ID NO:8、35及37和SEQ ID NO:62、13、14;

[0598] (f) 分别为SEQ ID NO:8、35及38和SEQ ID NO:62、13、14;

[0599] (g) 分别为SEQ ID NO:8、35及39和SEQ ID NO:62、13、14;

[0600] (h) 分别为SEQ ID NO:8、35及40和SEQ ID NO:62、13、14;

[0601] (i) 分别为SEQ ID NO:8、35及41和SEQ ID NO:62、13、14;

[0602] (j) 分别为SEQ ID NO:8、35及42和SEQ ID NO:62、13、14;

[0603] (k) 分别为SEQ ID NO:8、35及43和SEQ ID NO:62、13、14;

[0604] (l) 分别为SEQ ID NO:8、35及44和SEQ ID NO:62、13、14;

[0605] (m) 分别为SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14; 及

[0606] (n) 分别为SEQ ID NO:8、35及46和SEQ ID NO:62、13、14。

[0607] 在特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包括分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域。

[0608] 在一些实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包括重链可变结构域(VH) 和轻链可变结构域(VL), 所述重链可变结构域(VH) 和轻链可变结构域(VL) 具有与如下序列有至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列:

[0609] (a) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:55;

[0610] (b) 分别为SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:56;

[0611] (c) 分别为SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:56;

[0612] (d) 分别为SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:57;

[0613] (e) 分别为SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:55;

[0614] (f) 分别为SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:55;

[0615] (g) 分别为SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:55;

[0616] (h) 分别为SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:55;

[0617] (i) 分别为SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:55;

[0618] (j) 分别为SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:55;

[0619] (k) 分别为SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:55;

[0620] (l) 分别为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:55;

[0621] (m) 分别为SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55; 及

[0622] (n) 分别为SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:55

[0623] “大体上同一的”或“同一的”意指展现与参考氨基酸序列(例如, 本文所述的任何一种氨基酸序列) 至少50%同一性的多肽。优选地, 这种序列在氨基酸水平或核酸上与用于比较的序列至少60%、更优选至少80%或至少85%、且更优选至少90%、至少95%至少99%或甚至100%同一。

[0624] 通常使用序列分析软件(例如, 序列分析软件包, Genetics Computer Group (University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序) 测量序列同一性。此类软件通过为各种取代、缺失和/或其他修饰分配同源性程度来对同一或类似的序列进行匹配。保守取代通常包括以下组内的取代: 甘氨酸、丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸; 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺; 丝氨酸、苏氨酸; 赖氨酸、精氨酸; 及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中, 可使用BLAST程序, e^{-3} 与 e^{-100} 之间的机率记分指示紧密相关的序列。

[0625] 在特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包括重链可变

结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL), 所述重链可变结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL) 具有分别与SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列有至少90%、至少95%、至少99%或100%同一性的序列。

[0626] 在某些实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体包含如下重链和轻链序列:

[0627] (a) 分别为SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:68;

[0628] (b) 分别为SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:68;

[0629] (c) 分别为SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68;

[0630] (d) 分别为SEQ ID NO:141和SEQ ID NO:68;

[0631] (e) 分别为SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:68;

[0632] (f) 分别为SEQ ID NO:143和SEQ ID NO:68;

[0633] (g) 分别为SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:68;

[0634] (h) 分别为SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:68;

[0635] (i) 分别为SEQ ID NO:153和SEQ ID NO:68; 及

[0636] (j) 分别为SEQ ID NO:154和SEQ ID NO:68。

[0637] 在特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体包含具有SEQ ID NO:52的序列的重链和具有SEQ ID NO:68的序列的轻链。在其他特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体包含具有SEQ ID NO:142的序列的重链和具有SEQ ID NO:68的序列的轻链。在其他实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体被工程改造以实现血清半衰期延长, 且包含具有SEQ ID NO:151的序列的重链和具有SEQ ID NO:68的序列的轻链。在其他特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体被工程改造以实现血清半衰期延长, 且包含具有SEQ ID NO:155的序列的重链和具有SEQ ID NO:68的序列的轻链。在其他特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体被工程改造以实现血清半衰期延长和位点特异性缀合, 且包含具有SEQ ID NO:152的序列的重链和具有SEQ ID NO:68的序列的轻链。在其他特定实施方案中, 人源化/优化抗ADAM9抗体被工程改造以实现血清半衰期延长和位点特异性缀合, 且包含具有SEQ ID NO:156的序列的重链和具有SEQ ID NO:68的序列的轻链。

[0638] 本发明还明确考虑免疫特异性结合至人ADAM9多肽的表位且包含上文提供的人源化/优化抗ADAM9 MAB-A VL或VH结构域中的任一个的免疫缀合物。本发明特别考虑包含人源化/优化抗ADAM9VL或VH结构域的以下组合中的任一个的此类抗ADAM9抗体及其ADAM9结合片段:

hMAB-A VH / hMAB-A VL 组合	
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(1) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2D) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2E) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(3) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2F) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(4) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2G) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2A) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2H) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH / hMAB-A VL 组合	
hMAB-A VH(2B) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2I) / hMAB-A VL(4)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(1)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(1)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(2)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(2)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(3)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(3)
hMAB-A VH(2C) / hMAB-A VL(4)	hMAB-A VH(2J) / hMAB-A VL(4)

[0641] 本发明具体涵盖包含如上文所提供的人源化/优化抗ADAM9-VL和/或VH结构域的免疫缀合物。在特定实施方案中,本发明的免疫缀合物包含(i)如上文所提供的人源化/优化抗ADAM9-VL和/或VH结构域,及(ii)Fc区。

[0642] 尽管抗ADAM9 VH和VL结构域的特定修饰在上文中概述且在图3A-3B中进行比较,但在工程改造本发明的人源化和/或优化抗ADAM9-VH或VL结构域时,不必对这些残基中的全部或大部分进行修饰。本发明还涵盖这些VH和VL序列的较小变化,包括例如可引入以促进亚克隆的C端和/或N端氨基酸残基的氨基酸取代。

[0643] III. 抗体药物缀合物

[0644] 定义

[0645] 如本文所使用的术语“免疫缀合物”、“缀合物”或“ADC”是指连接至或缀合至细胞结合剂(例如,本文所述的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段)的本文所述的美登木素生物碱化合物。

[0646] “接头”为能够以稳定、共价方式将本文所述的美登木素生物碱化合物连接至细胞结合剂(如抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段)的任何化学部分。在化合物或抗体保持活性的

条件下,接头易受或大体上抵抗酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解及二硫键裂解。合适的接头为本领域中公知的,且包括例如二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团及酯酶不稳定基团。接头还包括如本文所述且本领域中已知的带电接头及其亲水性形式。

[0647] 如本文所使用的“烷基”是指具有一至二十个碳原子的饱和直链或支链单价烃基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等。优选地,烷基具有一至十个碳原子。更优选地,烷基具有一至四个碳原子。

[0648] 基团中的碳原子数可在本文中通过字首“ C_{x-xx} ”指定,其中x和xx为整数。例如,“ C_{1-4} 烷基”为具有1至4个碳原子的烷基。

[0649] 术语“化合物”或“细胞毒性化合物”或“细胞毒性剂”可互换使用。其意在包括结构或结构式或其任何衍生物已公开于本发明或者结构或结构式或其任何衍生物以引用方式并入的化合物。该术语还包括本发明中公开的所有式的化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢物及盐(例如药学上可接受的盐)。所述术语还包括前述任一种的任何溶剂合物、水合物及多晶型物。在本申请中描述的本发明某些方面中有关“立体异构体”、“几何异构体”、“互变异构体”、“溶剂合物”、“代谢物”、“盐”、“缀合物”、“缀合物盐”、“溶剂合物”、“水合物”或“多晶型物”的具体陈述不应解释为意在未陈述这些其他形式的情况下使用术语“化合物”的本发明其他方面中省略这些形式。

[0650] 术语“手性”是指分子具有与镜像搭配物不可重叠的性质,而术语“非手性”是指分子可重叠于其镜像搭配物上。

[0651] 术语“立体异构体”是指具有相同化学构成和连接性但原子的空间定向不同,无法通过围绕单键的旋转而相互转化的化合物。

[0652] “非对映异构体”是指具有两个或更多个手性中心且分子不互为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同物理性质,例如熔点、沸点、光谱性质及反应性。非对映异构体的混合物可在如结晶、电泳及色谱的高分辨率分析程序下分离。

[0653] “对映异构体”是指化合物的两个互为不可重叠镜像的立体异构体。

[0654] 本文中使用的立体化学定义和规则一般遵循S.P.Parker编,McGraw-Hill, Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;及ElieI, E.和Wilens,S.,Stereochemistry of Organic Compounds,John Wiley&Sons,Inc.,New York,1994。本发明化合物可含有不对称或手性中心,且因此以不同立体异构形式存在。预期本发明化合物的所有立体异构形式,包括但不限于非对映异构体、对映异构体及阻转异构体,以及其混合物(如外消旋混合物),皆形成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在,即其具有使平面偏振光的平面旋转的能力。在描述光学活性化合物时,字首D和L或R和S用于表示分子围绕其手性中心的绝对构型。字首d和l或(+)及(-)用于表示化合物旋转平面偏振光的符号,其中(-)或l意指所述化合物为左旋的。字首为(+)或d的化合物为右旋的。对于给定化学结构,这些立体异构体为相同的,例外之处为其互为镜像。特定的

立体异构体也可称为对映异构体,且此类异构体的混合物常被称为对映异构混合物。对映异构体的50:50混合物被称为外消旋混合物或外消旋体,其可在化学反应或制程中不存在立体选择或立体特异性时存在。术语“外消旋混合物”和“外消旋体”是指两种对映异构体物质的缺乏光学活性的等摩尔混合物。

[0655] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指具有不同能量的结构异构体,其可经由低能障壁相互转化。举例来说,质子互变异构体(也称为质子转移互变异构体)包括经由质子迁移发生的相互转化,如酮基-烯醇及亚胺-烯胺异构化。价态互变异构体包括通过一些键结电子的重排发生的相互转化。

[0656] 术语“阳离子”是指带正电的离子。阳离子可为一价(例如, Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 等)、二价(例如, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)或多价(例如, Al^{3+} 等)。优选地,阳离子为一价。

[0657] 如本文所使用的短语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机盐或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐“甲磺酸盐”、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘酸盐))、碱金属(例如钠和钾)盐、碱土金属(例如镁)盐、及铵盐。药学上可接受的盐可涉及包括另一分子,如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。所述抗衡离子可为使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐的结构中可具有一个以上带电原子。多个带电原子为药学上可接受的盐的一部分的情形可具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0658] 如果本发明化合物为碱,那么所要药学上可接受的盐可通过本领域中可用的任何适合方法制备,例如用如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸等无机酸或用如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖苷酸(如葡糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α 羟基酸(如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(如天冬氨酸或谷氨酸)、芳香酸(如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(如对甲苯磺酸或乙烷磺酸)等有机酸处理游离碱。

[0659] 如果本发明的化合物为酸,那么所需药学上可接受的盐可通过任何合适的方法制备,例如用如胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等无机或有机碱处理游离酸。合适的盐的说明性实例包括但不限于衍生自氨基酸(如甘氨酸和精氨酸)、氨、伯胺、仲胺和叔胺、及环状胺(如哌啶、吗啉及哌嗪)的有机盐,以及衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝及锂的无机盐。

[0660] 如本文所使用,术语“溶剂合物”意谓进一步包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量之量的溶剂(如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇等溶剂)的化合物。化合物的溶剂合物或水合物易于通过将至少1摩尔当量的羟基溶剂(如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)添加到化合物中以引起亚胺部分的溶剂化或水合作用来制备。

[0661] “代谢物”或“分解代谢物”为通过指定化合物、其衍生物、或其缀合物或其盐在体内代谢或分解代谢产生的产物。化合物、其衍生物或其缀合物的代谢物可使用本领域中已

知的常规技术鉴别,且其活性可使用如本文所述者的测试来测定。此类产物可例如由施用的化合物的氧化、羟基化、还原、水解、胺化、脱酰胺、酯化、脱酯、酶促裂解等反应产生。因此,本发明包括通过包含使本发明化合物、其衍生物或其缀合物与哺乳动物接触一段足以产生其代谢产物的时间的方法而制备的本发明化合物、其衍生物或其缀合物的代谢物(包括化合物、其衍生物或其缀合物)。

[0662] 短语“药学上可接受的”表示物质或组合物必须与构成制剂的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物在化学上和/或毒理学上相容。

[0663] 术语“保护基”或“保护部分”是指常用于在化合物、其衍生物或其缀合物上的其他官能团反应时阻断或保护特定官能团的取代基。举例来说,“胺保护基”或“氨基保护部分”为连接至氨基以阻断或保护化合物中的氨基官能团的取代基。此类基团为本领域中公知的(参见,例如P.Wuts和T.Greene,2007,Protective Groups in Organic Synthesis,第7章,J.Wiley&Sons,NJ)且例证为胺基甲酸酯,如胺基甲酸甲酯和胺基甲酸乙酯、Fmoc、被取代的胺基甲酸乙基酯、通过1,6-β-消除反应(也称为“自消耗(self immolative)”)裂解的胺基甲酸酯;脲;酰胺;肽;烷基及芳基衍生物。合适的氨基保护基包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧羰基(BOC)、苯甲氧基羰基(CBZ)及9-苄基亚甲基氧基羰基(Fmoc)。对于保护基及其用途的一般描述,参见P.G.M.Wuts和T.W.Greene,Protective Groups in Organic Synthesis,John Wiley&Sons,New York,2007。

[0664] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中,氨基酸是由 $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}})\text{-C}(=\text{O})\text{OH}$ 表示,其中 R^{aa} 和 R^{aa} 各自独立地为H、具有1至10个碳原子的任选被取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;芳基、杂芳基或杂环基,或 R^{aa} 与N端氮原子可一起形成杂环(例如,如脯氨酸中)。术语“氨基酸残基”是指当一个氢原子从氨基酸的胺端移除和/或羟基从氨基酸的羧基端移除时得到的相应残基,如 $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa}})\text{-C}(=\text{O})\text{-}$ 。当氨基酸或氨基酸残基在不指示α碳的特定立体化学的情况下提及时,其意在包括L-异构体和R-异构体。举例来说,“Ala”既包括L-丙氨酸也包括R-丙氨酸。

[0665] 术语“肽”是指通过肽(酰胺)键连接的氨基酸单体的短链。在一些实施方案中,肽含有2至20个氨基酸残基。在其他实施方案中,肽含有2至10个氨基酸残基。在又一些实施方案中,肽含有2至5个氨基酸残基。如本文所使用,当肽为本文所述的由具体氨基酸序列表示的细胞毒性剂或接头的一部分时,肽可在两个方向上连接至细胞毒性剂或接头的其余部分。例如,二肽X1-X2包括X1-X2和X2-X1。类似地,三肽X1-X2-X3包括X1-X2-X3和X3-X2-X1,且四肽X1-X2-X3-X4包括X1-X2-X3-X4和X4-X2-X3-X1。X1、X2、X3及X4表示氨基酸残基。当肽或肽残基在不指示每个氨基酸或氨基酸残基的立体化学的情况下提及时,其意在包括L-异构体和R-异构体。然而,当将肽或肽残基中一个或多个氨基酸或氨基酸残基的立体化学指定为D-异构体时,没有指定立体化学的肽或肽残基中的另一个氨基酸或氨基酸残基意在仅包括天然的L-异构体。举例来说,“Ala-Ala-Ala”意在包括肽或肽残基,其中每个Ala可以是L-异构体或R-异构体;而“Ala-D-Ala-Ala”意在包括L-Ala-D-Ala-L-Ala。

[0666] 术语“反应性酯基”是指可易于与胺基反应以形成酰胺键的基团(酯基)。示例性反应性酯基包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯及其衍生物,其中所述衍生物促进酰胺键形成。在某些实施方案中,反应性酯基为N-羟基琥珀酰亚胺酯或N-羟基磺基琥珀酰亚

胺酯。

[0667] 术语“胺反应性基团”是指可与胺基反应以形成共价键的基团。示例性胺反应性基团包括但不限于反应性酯基、酰基卤化物、磺酰基卤化物、亚胺酯或反应性硫酯基。在某些实施方案中，胺反应性基团为反应性酯基。在一个实施方案中，胺反应性基团为N-羟基琥珀酰亚胺酯或N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯。

[0668] 术语“硫醇反应性基团”是指可与硫醇(-SH)基团反应以形成共价键的基团。示例性硫醇反应性基团包括但不限于马来酰亚胺、卤乙酰基、卤乙酰胺(aloacetamide)、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺或乙烯基吡啶(vinyal pyridine)。在一个实施方案中，硫醇反应性基团为马来酰亚胺。

[0669] 如本公开和权利要求书中所使用，除非上下文另有明确说明，单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数形式。

[0670] 应理解，当在本文中用词语“包含”描述实施方案时，同样提供根据“由…组成”和/或“基本上由…组成”描述的其他类似实施方案。

[0671] A. 示例性免疫缀合物

[0672] 本发明的美登木素生物碱化合物可使用本领域中已知的技术直接或通过接头间接偶合或缀合至抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，以产生“免疫缀合物”、“缀合物”或“ADC”。

[0673] 在第一实施方案中，本发明的免疫缀合物包含本文所述的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，其通过位于抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段上的一个或多个赖氨酸残基的 ϵ -氨基或通过位于抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段上的一个或多个半胱氨酸残基的硫醇基共价键联至本文所述的美登木素生物碱化合物。

[0674] 在第一实施方案的第1具体实施方案中，本发明的免疫缀合物由上述式(I)表示，其中 R^x 、 R^y 、 R^x 及 R^y 都为H；并且1和k各自独立地为2至6的整数；并且其余变量如上针对式(I)所述。

[0675] 在第一实施方案的第2具体实施方案中，本发明的免疫缀合物由上述式(I)表示，其中A为含有2至5个氨基酸残基的肽；且其余变量如上针对式(I)或在第1具体实施方案中所述。在一些实施方案中，A为可由蛋白酶裂解的肽。在一些实施方案中，可由蛋白酶裂解的肽在肿瘤组织中表达。在一些实施方案中，A为具有与 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 共价键联的氨基酸的肽，所述氨基酸选自由以下组成的组：Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、selino-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及Val，其各自独立地作为L异构体或D异构体。在一些实施方案中，连接至 $-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ 的氨基酸为L氨基酸。

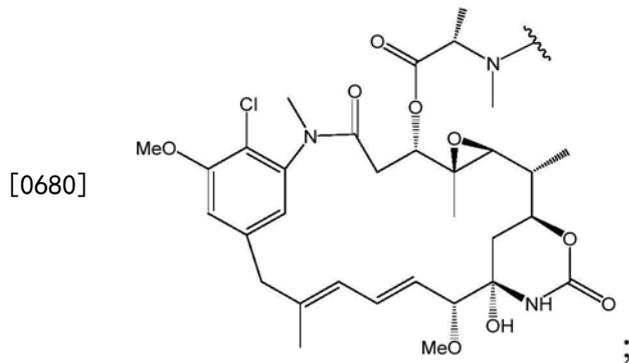
[0676] 在第一实施方案的第3具体实施方案中，本发明的免疫缀合物由上述式(I)表示，其中A选自由以下组成的组：Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe-N9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:144)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:145)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:146)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、

Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro及D-Ala-tBu-Gly,其中各肽中的第一个氨基酸连接至L2基团,而各肽中的最后一个氨基酸连接至-NH-CR¹R²-S-L1-D;且其余变量如针对式(I)或在第1具体实施方案中所述。

[0677] 在第一实施方案的第4具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由上述式(I)表示,其中R¹和R²皆为H;且其余变量如针对式(I)或在第1、第2或第3具体实施方案中所述。

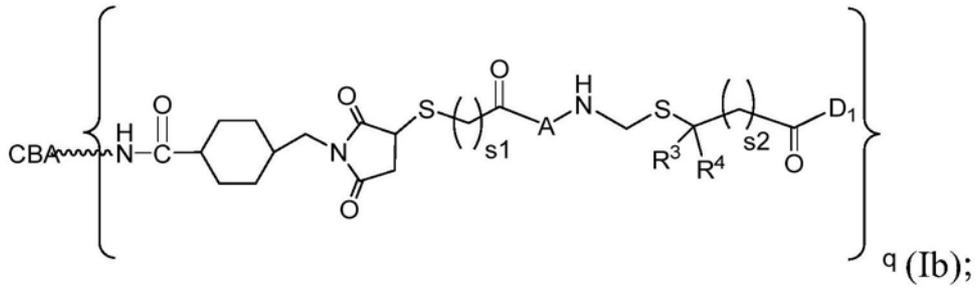
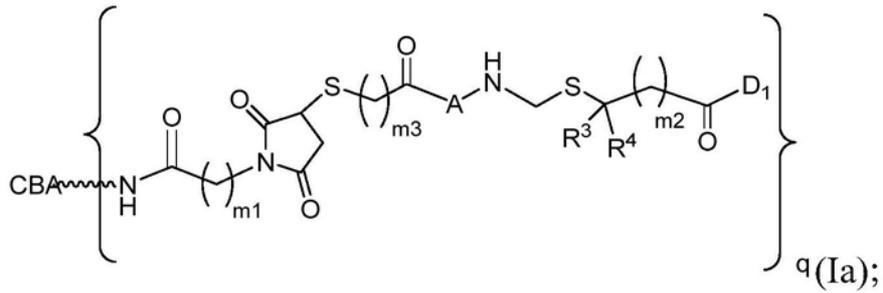
[0678] 在第一实施方案的第5具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由上述式(I)表示,其中L₁为-(CH₂)₄₋₆-C(=O)-;且其余变量如针对式(I)或在第1、第2、第3或第4具体实施方案中所述。

[0679] 在第一实施方案的第6具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由上述式(I)表示,其中D由下式表示:

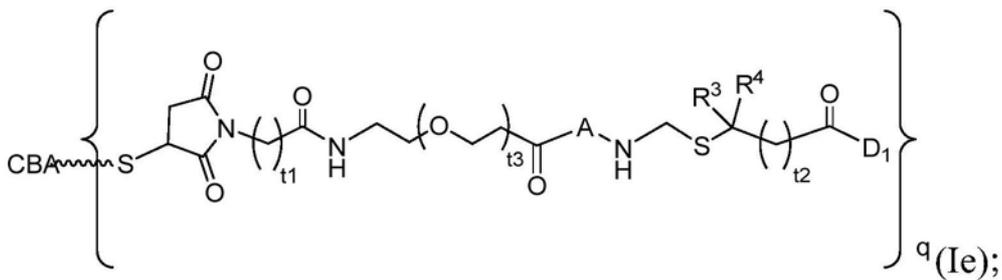
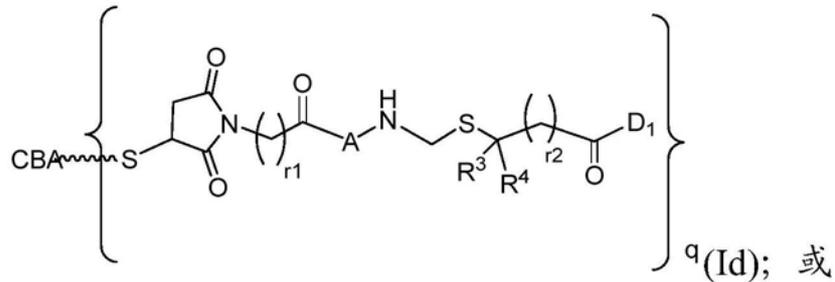
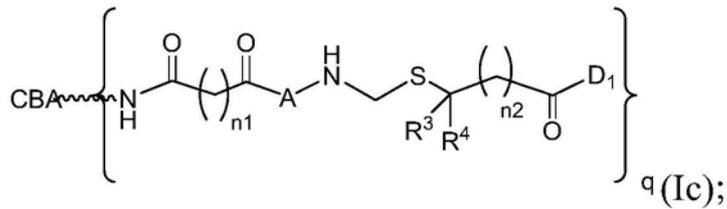


[0681] 且其余变量如针对式(I)或在第1、第2、第3、第4或第5具体实施方案中所述。

[0682] 在第7具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式:



[0683]

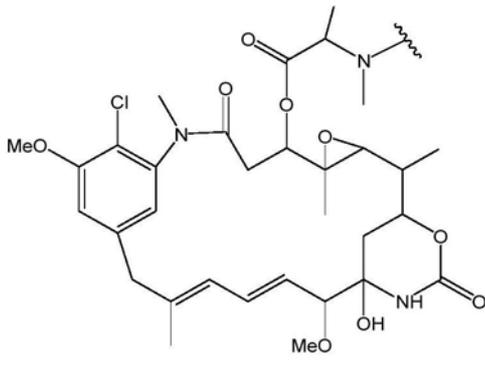


[0684] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0685] $\text{CBA} \sim \text{NH}$ 为通过Lys胺基团连接至 L_2 基团的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段;[0686] $\text{CBA} \sim \text{S}$ 为通过Cys硫醇基团连接至 L_2 基团的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段;[0687] R^3 和 R^4 各自独立地为H或Me;[0688] m_1 、 m_3 、 n_1 、 r_1 、 s_1 及 t_1 各自独立地为1至6的整数;[0689] m_2 、 n_2 、 r_2 、 s_2 及 t_2 各自独立地为1至7的整数;

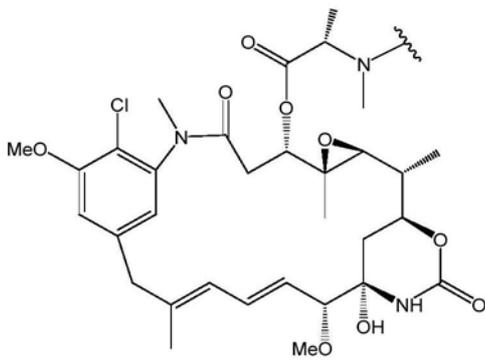
[0690] t₃为1至12的整数；

[0691] D₁由下式表示：



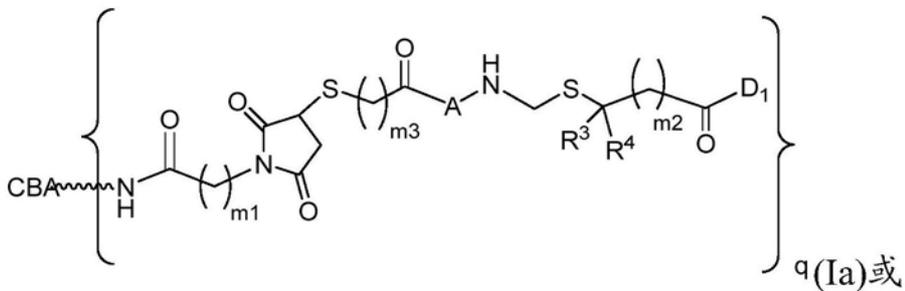
[0692] 并且

[0693] q为1至20的整数。在更具体的实施方案中，D₁由下式表示：

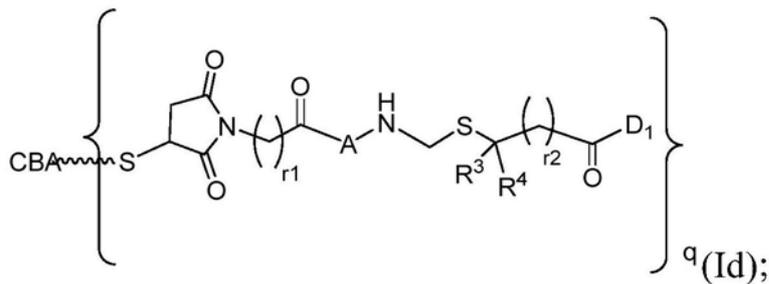


[0694]

[0695] 在第8具体实施方案中，本发明的免疫缀合物由下式表示：



[0696]



[0697] 其中：

[0698] m₁和m₃各自独立地为2至4的整数；

[0699] m₂为2至5的整数；

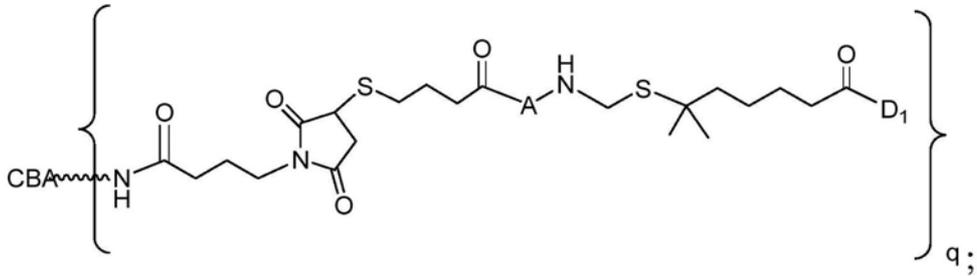
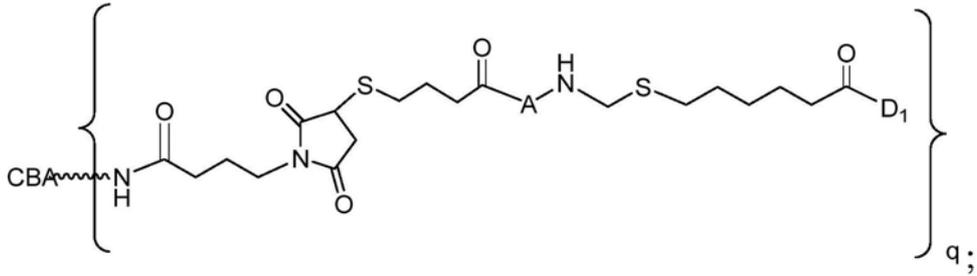
[0700] r₁为2至6的整数；

[0701] r₂为2至5的整数；并且

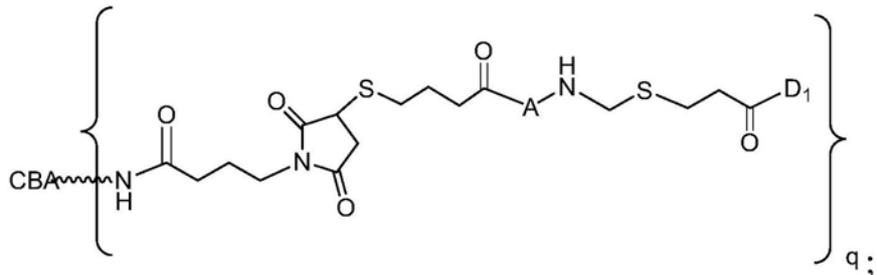
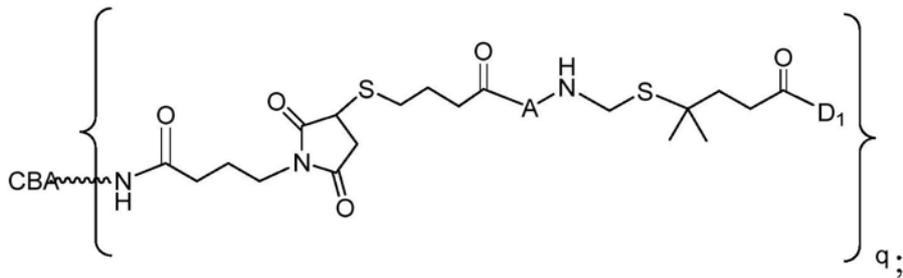
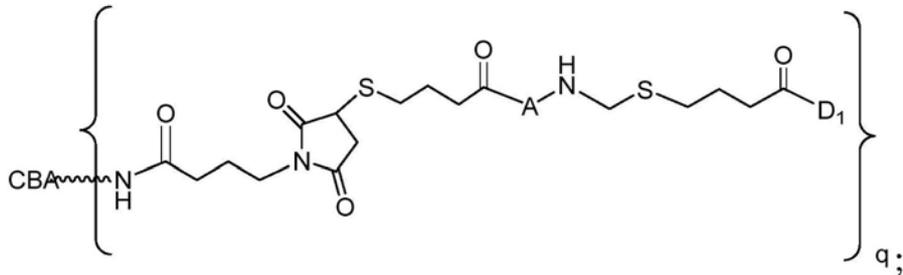
[0702] 其余变量如在第7具体实施方案中所述。

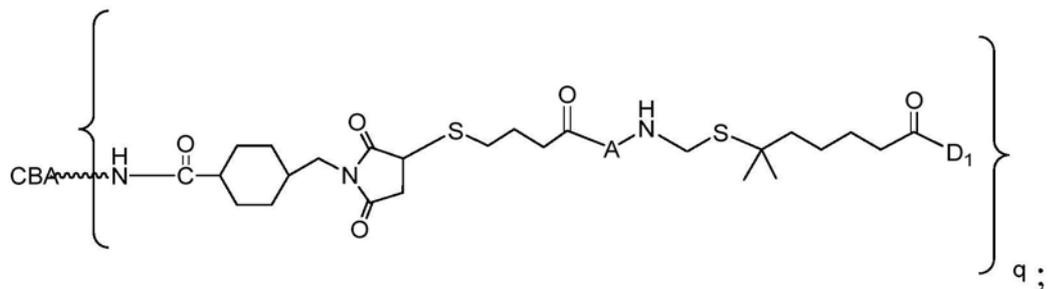
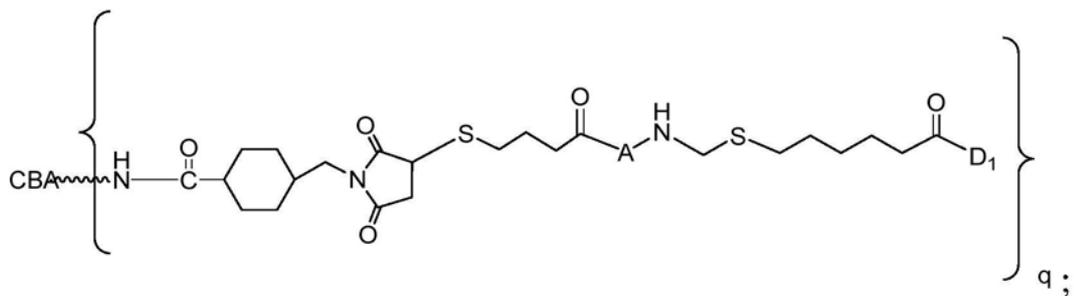
[0703] 在第9具体实施方案中,对于在第7或第8具体实施方案中所述的免疫缀合物,A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。在更具体的实施方案中,对于在第7或第8具体实施方案中所述的免疫缀合物,A为L-Ala-D-Ala-L-Ala。

[0704] 在第10具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式:

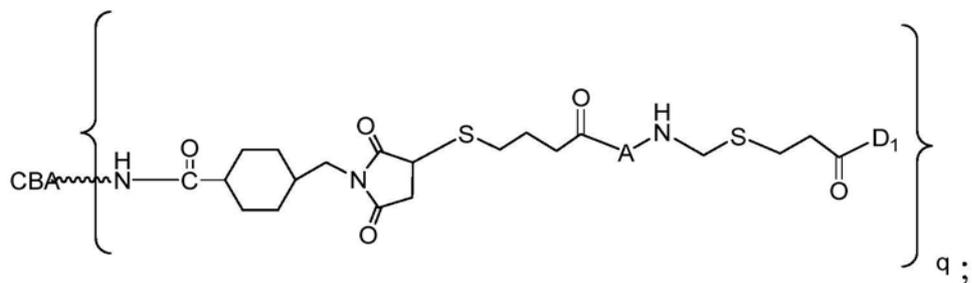
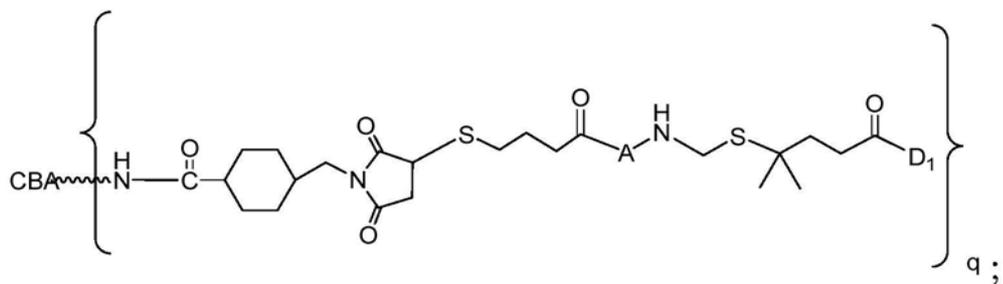
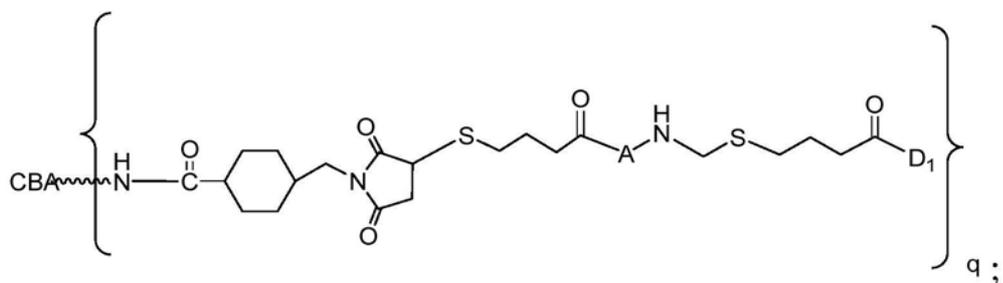


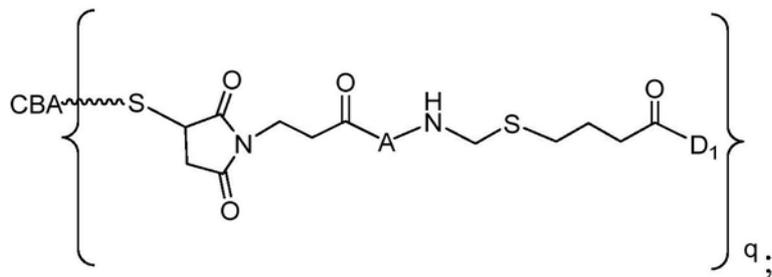
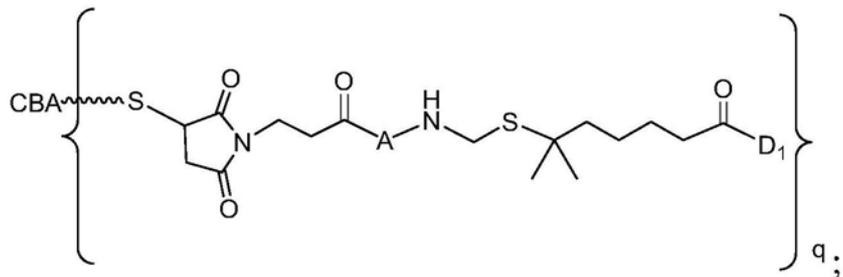
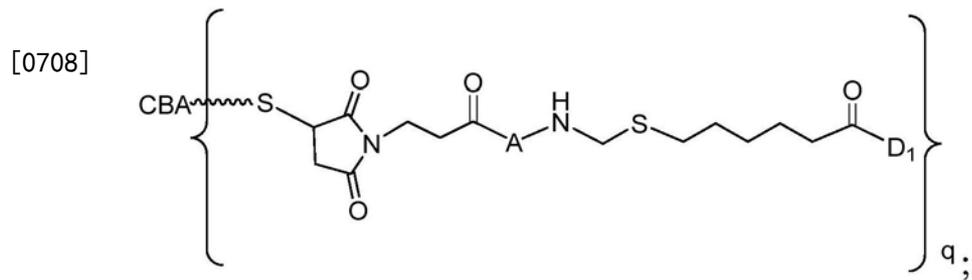
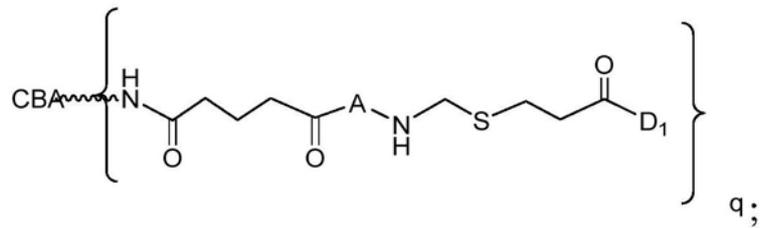
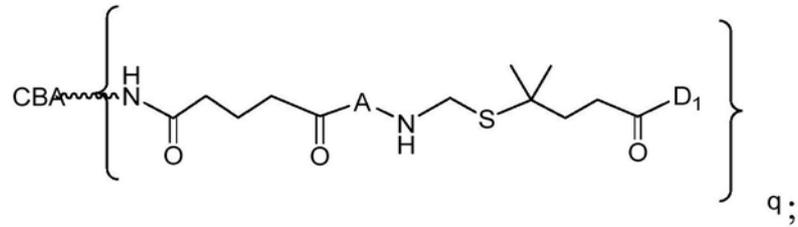
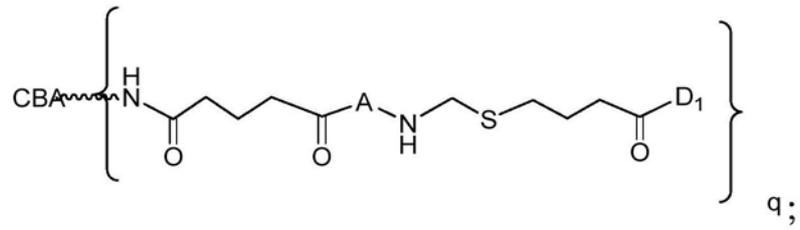
[0705]

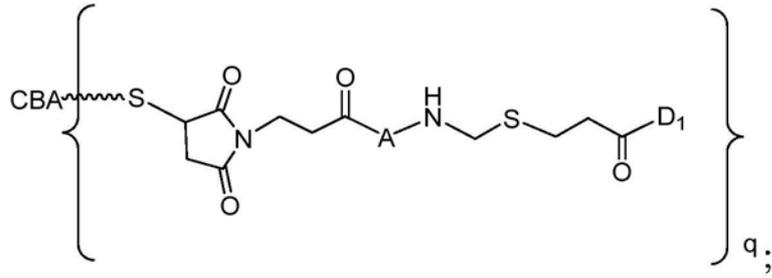
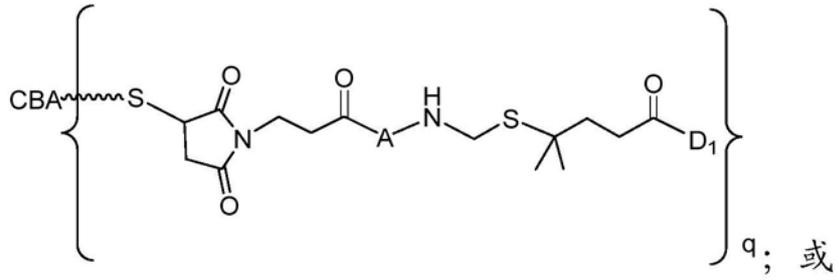




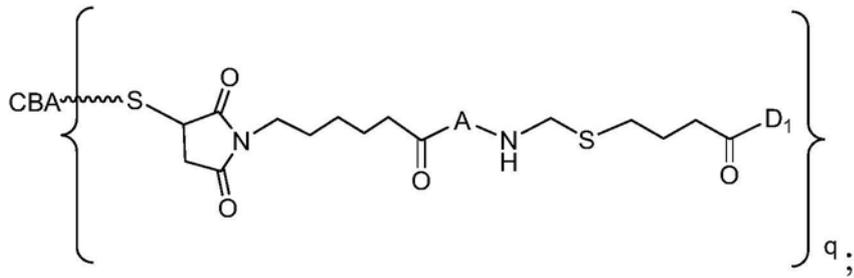
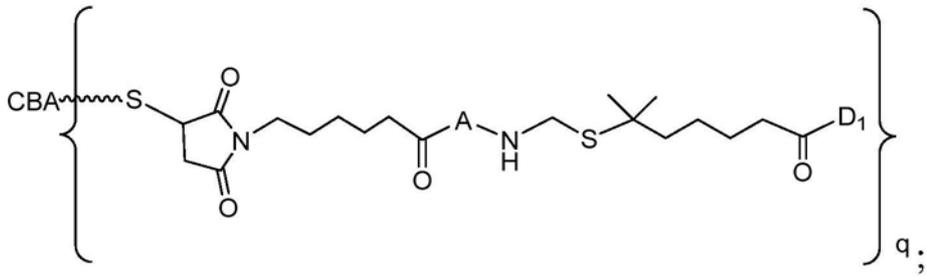
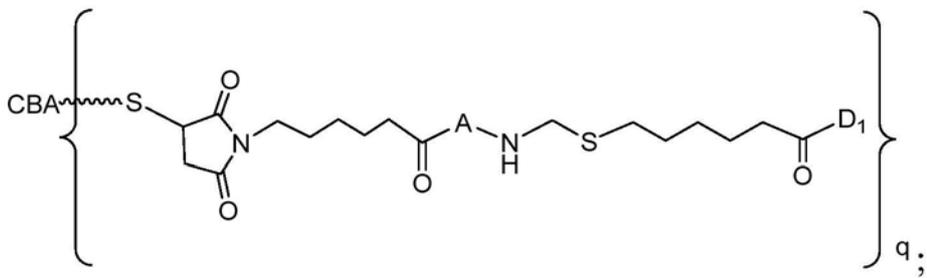
[0706]

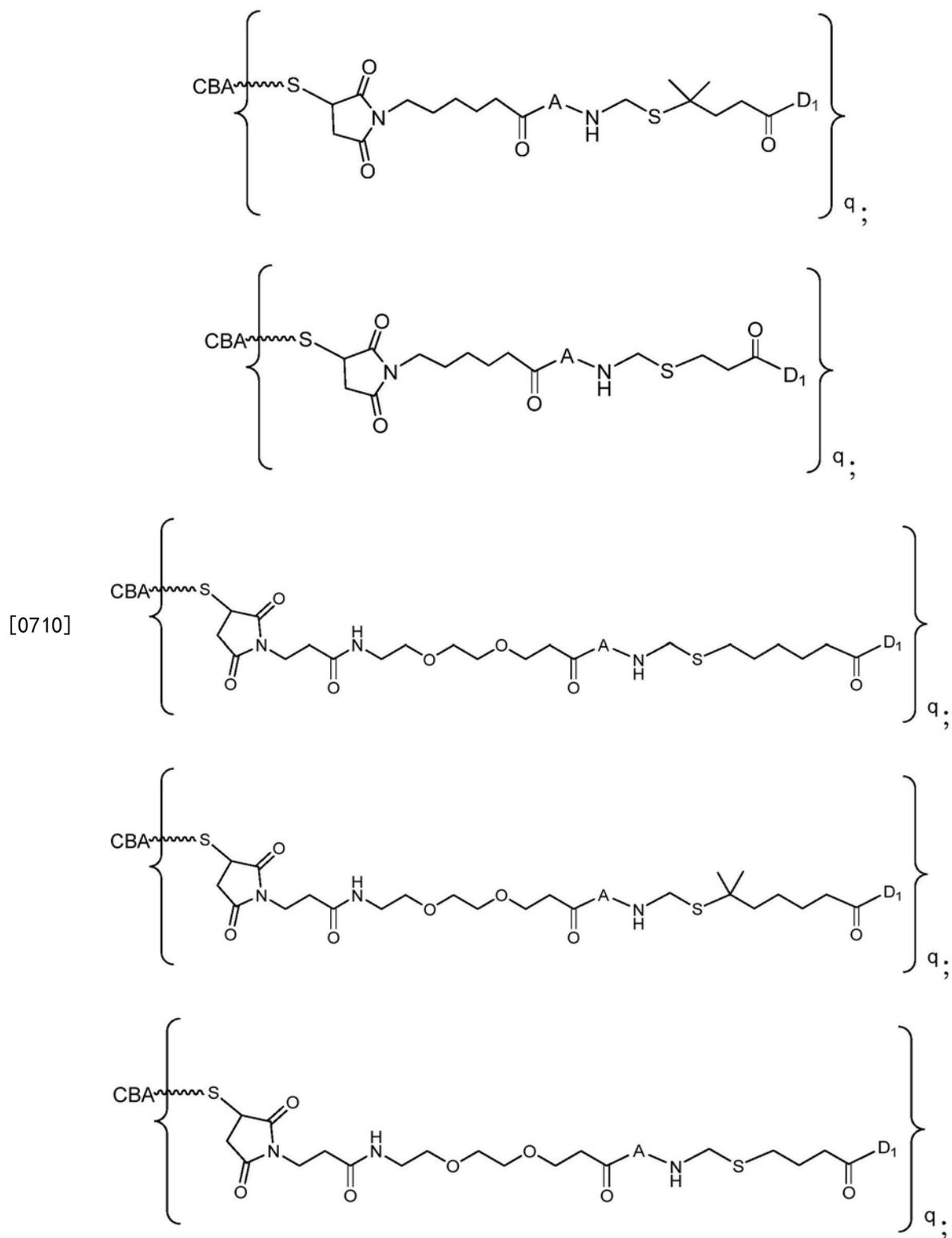




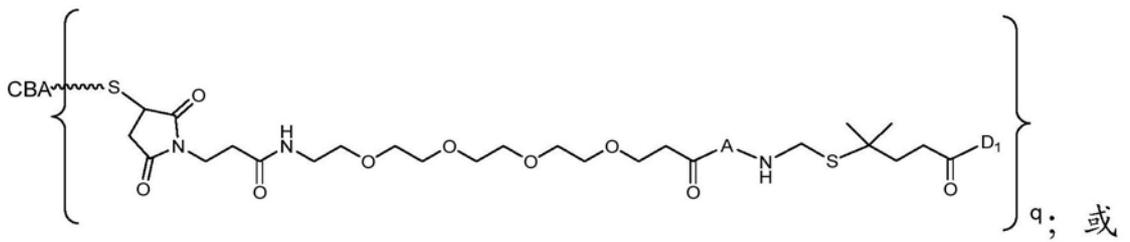
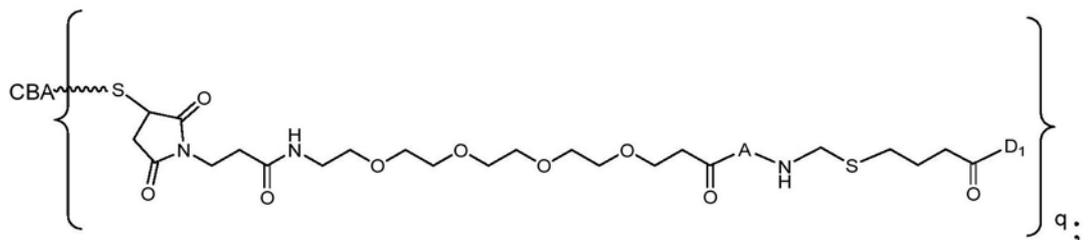
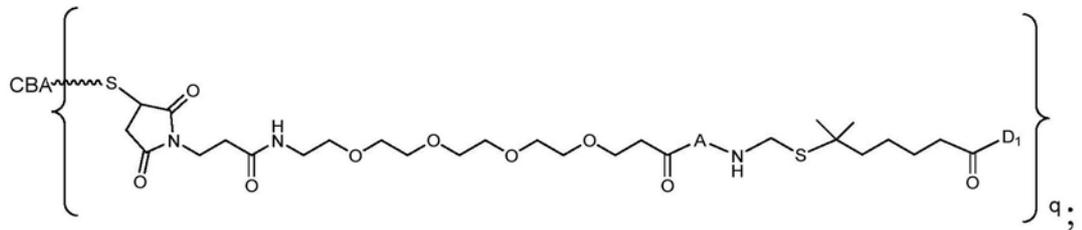
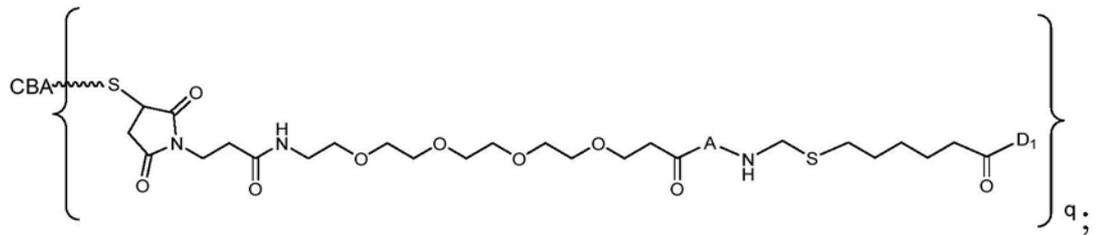
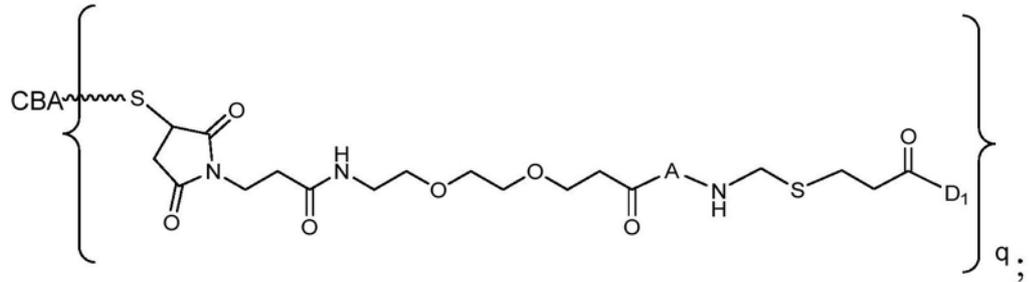
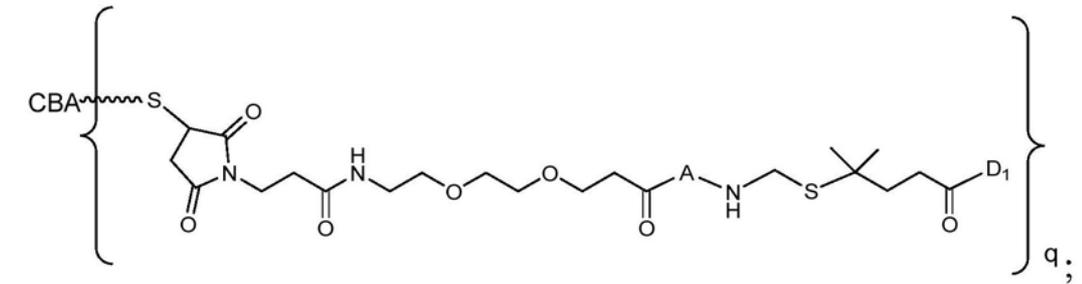


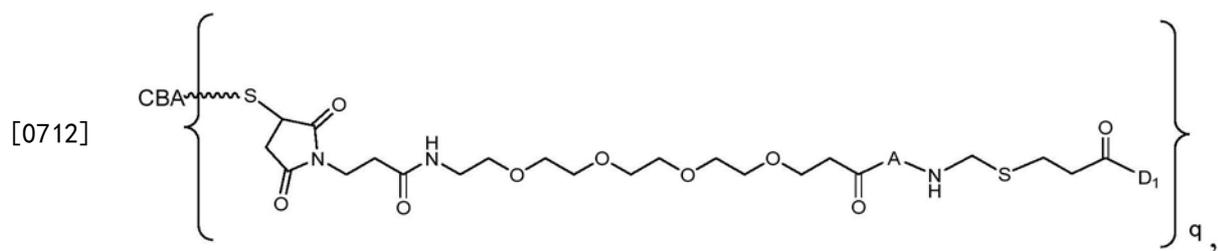
[0709]





[0711]

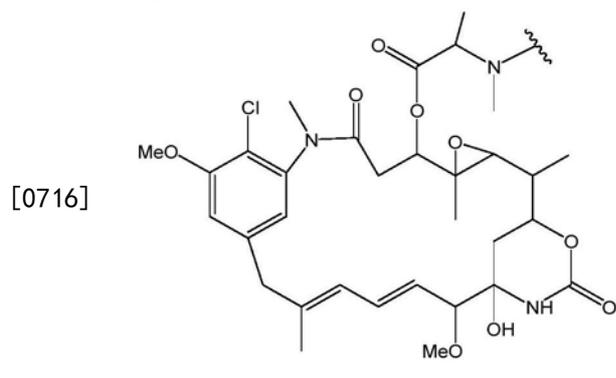




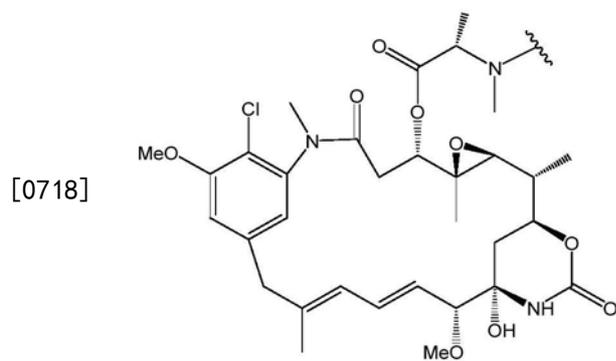
[0713] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0714] A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly,并且

[0715] D_1 由下式表示:

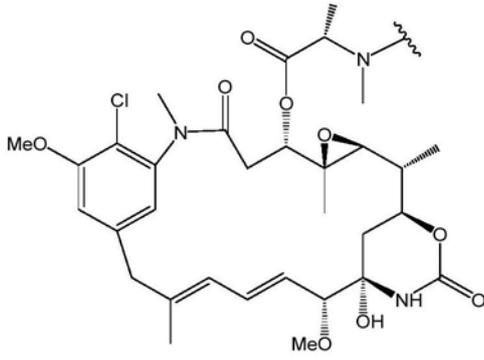


[0717] 且其余变量如在第7、第8或第9具体实施方案中所述。在更具体的实施方案中,A为L-Ala-D-Ala-L-Ala。在更具体的实施方案中, D_1 由下式表示:

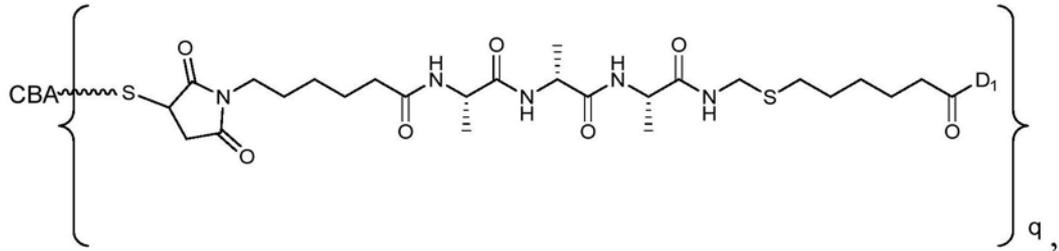


[0719] 在第11具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:

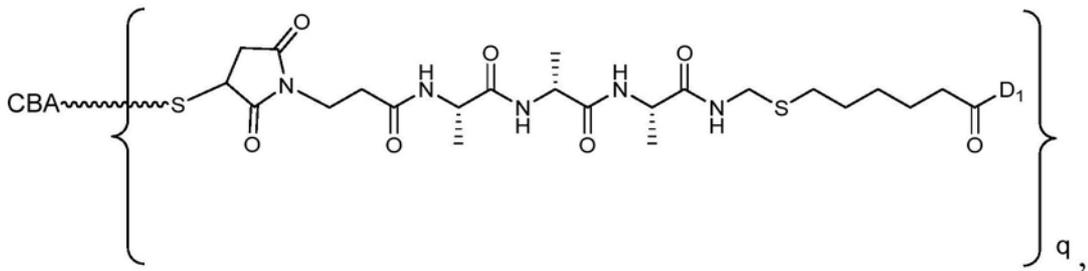
[0722]



[0723] 在第12具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:



[0724]



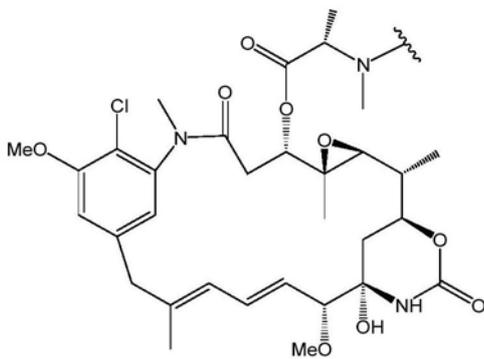
[0725] 其中:

[0726] CBA为人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其包含分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;

[0727] q为1或2;

[0728] D₁由下式表示:

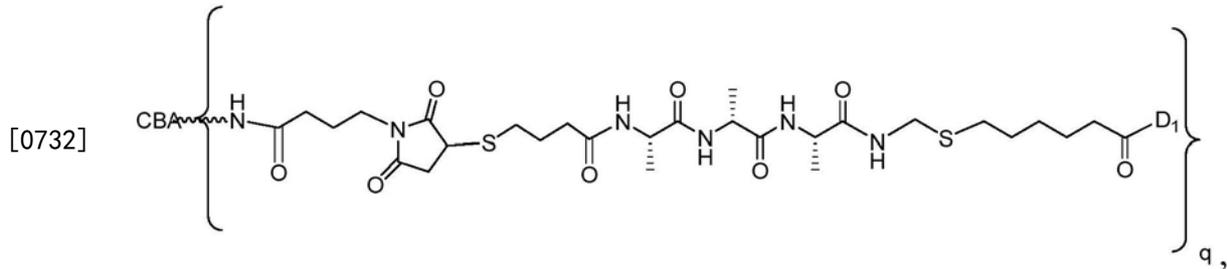
[0729]



[0730] 在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:142和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:152和SEQ ID NO:

68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:142或SEQ ID NO:152中的X为赖氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:142或SEQ ID NO:152中的X不存在。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:156和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

[0731] 在第13具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:

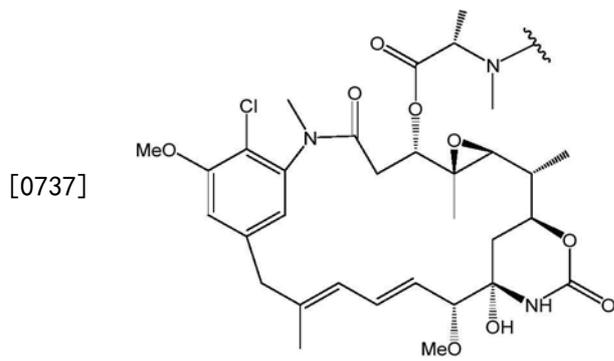


[0733] 其中:

[0734] CBA为人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其包含分别具有SEQ ID NO:8、35及45和SEQ ID NO:62、13、14的序列的CDR_H1结构域、CDR_H2结构域及CDR_H3结构域和CDR_L1结构域、CDR_L2结构域及CDR_L3结构域;

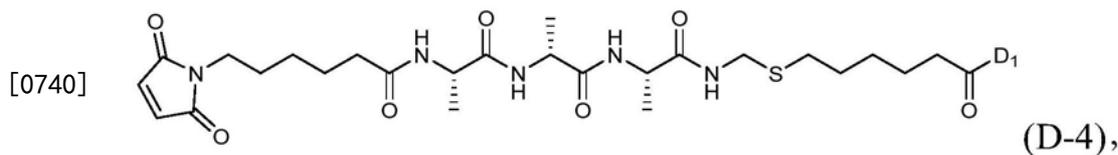
[0735] q为1或10的整数;

[0736] D₁由下式表示:

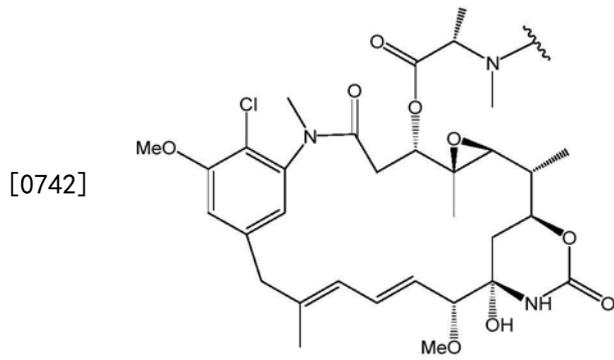


[0738] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:55的序列的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:52和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:151中的X为赖氨酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:151中的X不存在。在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体包含分别具有SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。

[0739] 在第14实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗ADAM9抗体,即hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K),其偶联至美登木素生物碱化合物DM21C(也称为Ma1-LDL-DM或Ma1C5-LDL-DM或化合物17a),该化合物由以下结构式表示:

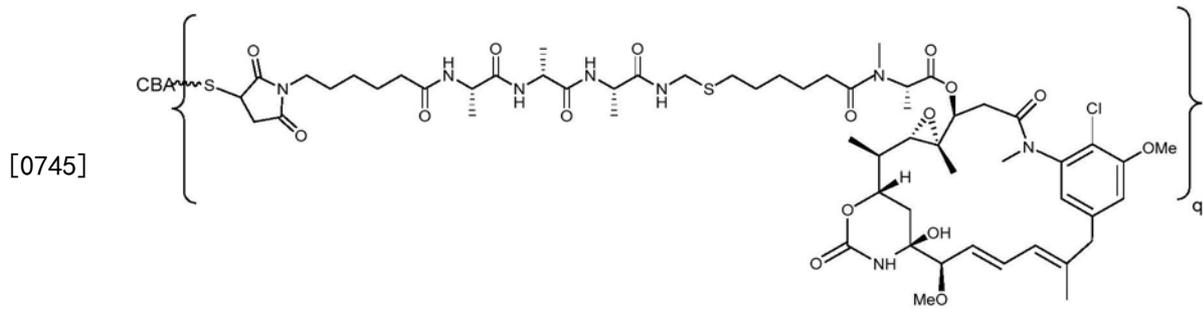


[0741] 其中D₁由下式表示:



[0743] 抗ADAM9抗体hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)具有分别具有SEQ ID NO:156和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,免疫缀合物在本文中称为hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Ma1-LDL-DM。

[0744] 在一个实施方案中,免疫缀合物hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Ma1-LDL-DM由以下结构式表示:



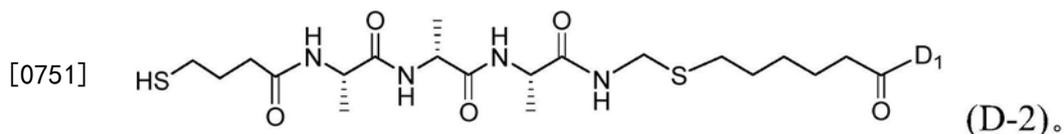
[0746] 其中:

[0747] CBA为通过Cys硫醇基连接至美登木素生物碱化合物的抗ADAM9抗体hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K);并且

[0748] q为1或2。

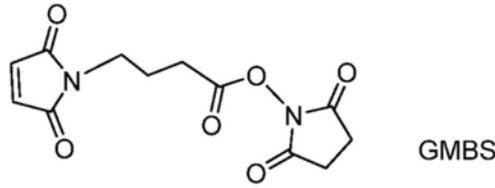
[0749] 在某些实施方案中,对于包含第14具体实施方案的免疫缀合物的组合物(例如,药物组合物),DAR在以下范围内:1.5至2.2、1.7至2.2或1.9至2.1。在一些实施方案中,DAR为1.7、1.8、1.9、2.0或2.1。

[0750] 在第15实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗ADAM9抗体hMAB-A(2I.2)(YTE/-K),该抗体经由 γ -马来酰亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)或N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)接头偶联至美登木素生物碱化合物DM21L(也称为LDL-DM或化合物14c),该化合物由以下结构式表示:

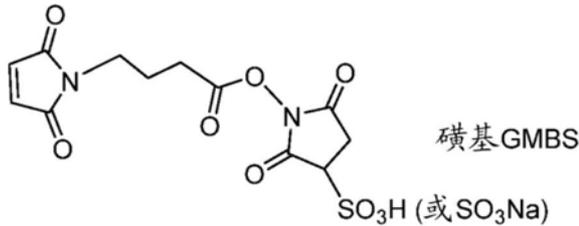


[0752] 抗ADAM9抗体hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)具有分别具有SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:68的序列的重链和轻链。在一些实施方案中,缀合物在本文中称为hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM。缀合物也可称为hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-GMBS-LDL-DM,其可与hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM互换使用。

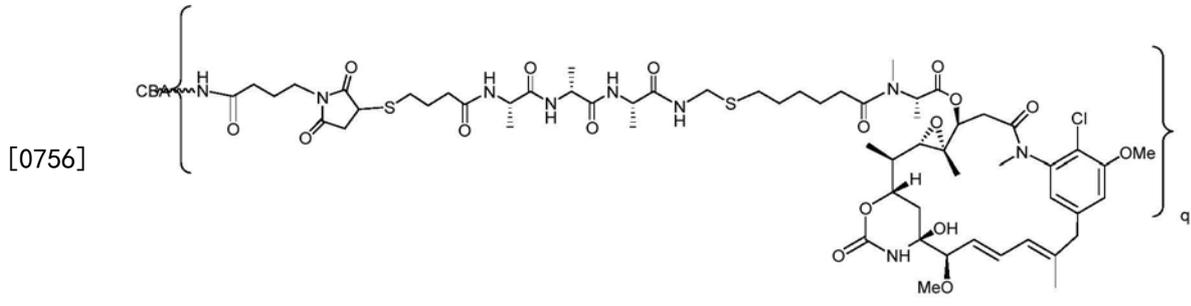
[0753] GMBS和磺基-GMBS (或sGMBS) 接头是本领域中已知的并且可由以下结构式表示:



[0754]



[0755] 在一个实施方案中,免疫缀合物由以下结构式表示:



[0757] 其中:

[0758] CBA为通过Lys胺基团连接至美登木素生物碱化合物的抗ADAM9抗体hMAB-A (2I.2) (YTE/-K); 并且

[0759] q为1或10的整数。

[0760] 在某些实施方案中,对于包含第15具体实施方案的免疫缀合物的组合物(例如,药物组合物), DAR在以下范围内: 3.0至4.0、3.2至3.8或3.4至3.7。在一些实施方案中, DAR为3.2、3.3、3.4、3.5、3.5、3.7或3.8。

[0761] 在某些实施方案中,对于包含第一实施方案或第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14或第15具体实施方案的免疫缀合物的组合物(例如,药物组合物),组合物中每个抗体分子的细胞毒性剂的平均数量(即,平均值q)(也称为药物-抗体比(DAR))在1.0至8.0的范围内。在一些实施方案中, DAR在以下范围内: 1.0至5.0、1.0至4.0、1.5至4.0、2.0至4.0、2.5至4.0、1.0至3.4、1.0至3.0、2.9至3.3、3.3至3.8、1.5至2.5、2.0至2.5、1.7至2.3或1.8至2.2。在一些实施方案中, DAR小于4.0、小于3.8、小于3.6、小于3.5、小于3.0或小于2.5。在一些实施方案中, DAR在3.2至3.4的范围内。在一些实施方案中, DAR在3.0至3.2的范围内。在一些实施方案中, DAR在3.5至3.7的范围内。在一些实施方案中, DAR为3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6或3.7。在一些实施方案中, DAR在1.8至2.0的范围内。在一些实施方案中, DAR在1.7至1.9的范围内。在一些实施方案中, DAR在1.9至2.1的范围内。在一些实施方案中, DAR为1.9、2.0或2.1。在一些实施方案中,对于包含通过一个或多个半胱氨酸硫醇基连结至美登木素生物碱化合物的抗ADAM9抗体或其抗ADAM9结合片段的

本发明的免疫缀合物来说,DAR在以下范围内:1.5至2.5、1.8至2.2、1.1至1.9或1.9至2.1。在一些实施方案中,DAR为1.8、1.9、2.0或2.1。

[0762] C. 示例性接头分子

[0763] 本领域中已知的任何合适接头可用于制备本发明的免疫缀合物。在某些实施方案中,接头为双官能接头。如本文所使用,术语“双官能接头”是指具有两个反应性基团的改质剂,所述两个反应性基团之一者能够与细胞结合剂反应,而另一者与美登木素生物碱化合物反应,以便将两个部分连接在一起。此类双官能交联剂为本领域中公知的(参见,例如 Isalm和Dent于Bioconjugation第5章,第218-363页,Groves Dictionaries Inc.New York,1999中)。举例来说,经由硫醚键实现键联的双官能交联剂包括用以引入马来酰亚胺基的N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(SMCC)或用以引入碘代乙酰基的N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)。将马来酰亚胺基或卤代乙酰基引入细胞结合剂上的其他双官能交联剂为本领域中公知的(参见,美国专利公布号2008/0050310、20050169933,可从Pierce Biotechnology Inc.P.O.Box 117,Rockland,IL 61105,USA获得)且包括但不限于双-马来酰亚胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、N-(β-马来酰亚胺基丙氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、γ-马来酰亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、5-马来酰亚胺基戊酸NHS、HBVS、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯)(其为SMCC(LC-SMCC)的“长链”类似物)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酞肼或盐酸盐(MPBH)、N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰胺基)丙酸酯(SBAP)、N-琥珀酰亚胺基碘代乙酸酯(SIA)、κ-马来酰亚胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、N-琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺)己酸酯(SMPH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺基乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺基丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺基己烷(BMH)、双-马来酰亚胺基乙烷(BMOE)、磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)胺基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)、N-(ε-马来酰亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-马来酰亚胺基十一烷酰基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)及磺基琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB)。

[0764] 异双官能交联剂为具有两个不同反应性基团的双官能交联剂。还可使用含有胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS基团)和羰基反应性肼基的异双官能交联剂将本文所述的细胞毒性化合物与细胞结合剂(例如抗体)连接。此类商购获得的异双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基6-肼基烟酰胺丙酮脞(SANH)、琥珀酰亚胺基4-肼基对苯二甲酸酯盐酸盐(SHTH)及琥珀酰亚胺基肼烟酸酯盐酸盐(SHNH)。带有酸不稳定键联的缀合物还可使用带有肼的本发明苯并二氮杂卓衍生物制备。可用的双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯甲酸酯(SFB)和琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯氧基乙酸酯(SFPA)。

[0765] 经由二硫键实现细胞结合剂与细胞毒性化合物的键联的双官能交联剂为本领域中已知的,且包括用以引入二硫吡啶基的N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯

(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB或sSPDB)。可用以引入二硫基团的其他双官能交联剂为本领域中已知的,且公开于美国专利6,913,748、6,716,821及美国专利公布20090274713和20100129314中,所有这些专利皆以引用方式并入本文中。或者,也可使用交联剂,如2-亚胺基硫杂环戊烷、同型半胱氨酸硫酸内酯或S-乙酰基琥珀酸酐来引入硫醇基。

[0766] D. 示例性美登木素生物碱

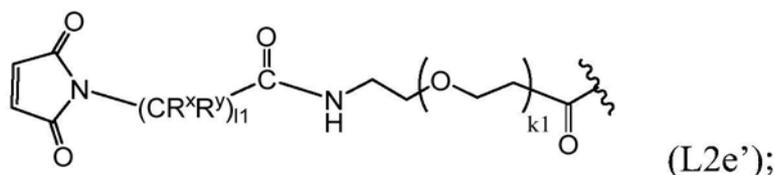
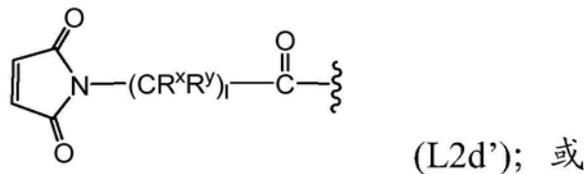
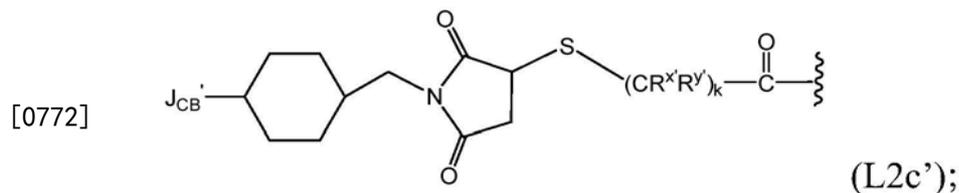
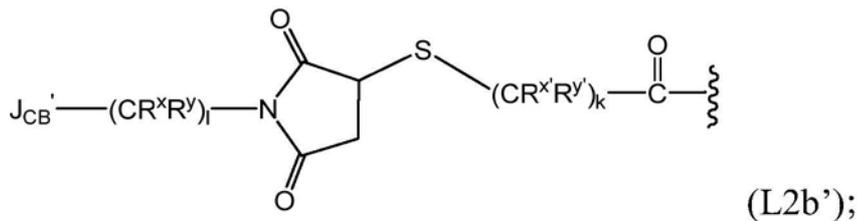
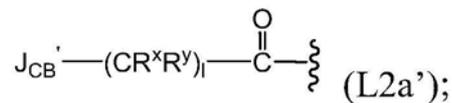
[0767] 在第二实施方案中,本发明提供美登木素生物碱化合物,其可用于制备本发明的免疫缀合物。

[0768] 在一些实施方案中,美登木素生物碱化合物由下式:

[0769] $L_2' - A - NH - CR^1R^2 - S - L_1 - D$ (II)

[0770] 或其药学上可接受的盐表示,其中:

[0771] L_2' 由以下结构式表示:



[0773] 其中:

[0774] R^x 、 R^y 、 R^x' 及 R^y' 在每次出现时独立地为H、-OH、卤素、-O-(C_{1-4} 烷基)、- SO_3H 、- $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$ 或任选地被-OH、卤素、- SO_3H 或 $NR_{40}R_{41}R_{42}^+$ 取代的 C_{1-4} 烷基,其中 R_{40} 、 R_{41} 和 R_{42} 各自独立地为H或 C_{1-4} 烷基;

[0775] 1和k各自独立地为1至10的整数；

[0776] J_{CB}' 为 $-C(=O)OH$ 或 $-COE$ ，其中 $-COE$ 为反应性酯；

[0777] A 为氨基酸或包含2至20个氨基酸的肽；

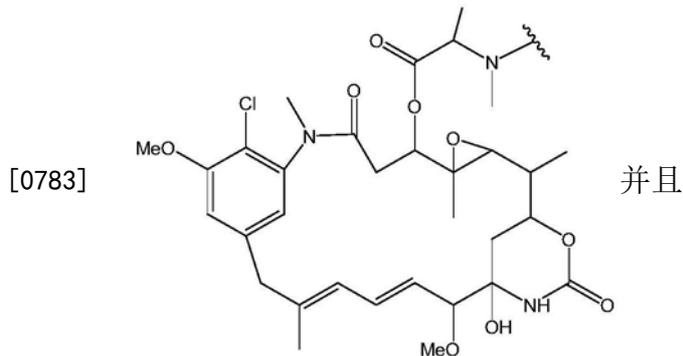
[0778] R^1 和 R^2 各自独立地为H或 C_{1-3} 烷基；

[0779] L_1 由下式表示：

[0780] $-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$ ；

[0781] 其中 R^3 和 R^4 各自独立地为H或Me，且 L_1 中的 $-C(=O)-$ 部分连接至D；

[0782] D 由下式表示：



[0784] q 为1至20的整数。

[0785] 在一些实施方案中，本发明的美登木素生物碱由下式：

[0786] $A'-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ (III)

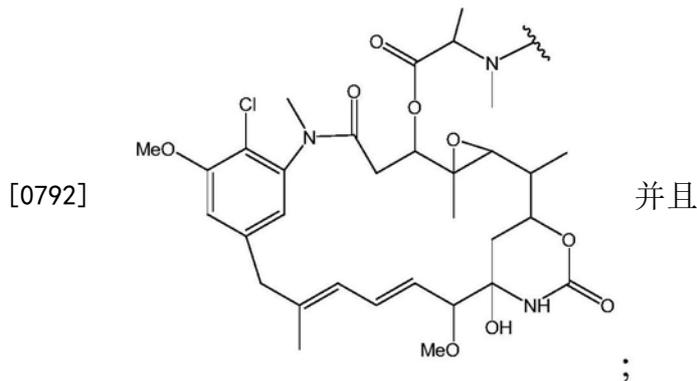
[0787] 或其药学上可接受的盐表示，其中：

[0788] A' 为氨基酸或包含2至20个氨基酸的肽（即 $A-NH_2$ ）；

[0789] R^1 和 R^2 各自独立地为H或 C_{1-3} 烷基；

[0790] L_1 为 $-CR^3R^4-(CH_2)_{1-8}-C(=O)-$ ； R^3 和 R^4 各自独立地为H或Me；

[0791] D 由下式表示：



[0793] q 为1至20的整数。

[0794] 在一些实施方案中，本发明的美登木素生物碱由下式：

[0795] $HS-(CR^xR^y)_k-C(=O)-A-NH-CR^1R^2-S-L_1-D$ (IV)，

[0796] 或其药学上可接受的盐表示，其中：

[0797] R^x 和 R^y 在每次出现时独立地为H、 $-OH$ 、卤素、 $-O-(C_{1-4}$ 烷基)、 $-SO_3H$ 、 $-NR_{40}R_{41}R_{42}^+$ 或

被-OH、卤素、SO₃H或NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代的C₁₋₄烷基,其中R₄₀、R₄₁和R₄₂各自独立地为H或C₁₋₄烷基;

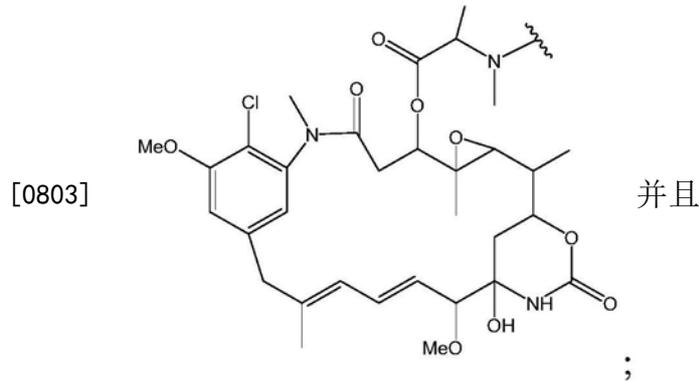
[0798] k为1至10的整数

[0799] A为氨基酸残基或包含2至20个氨基酸残基的肽;

[0800] R¹和R²各自独立地为H或C₁₋₃烷基;

[0801] L₁ is-CR³R⁴-(CH₂)₁₋₈-C(=O)-;R³和R⁴各自独立地为H或Me;

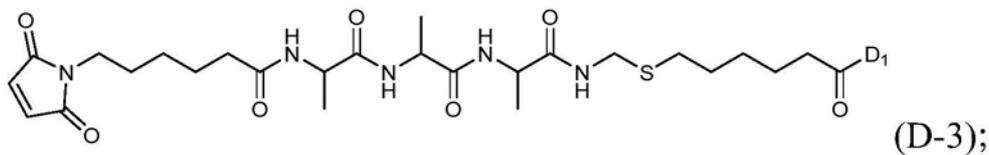
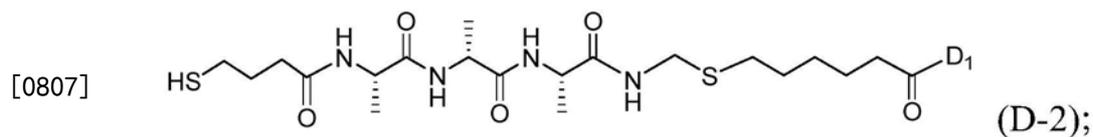
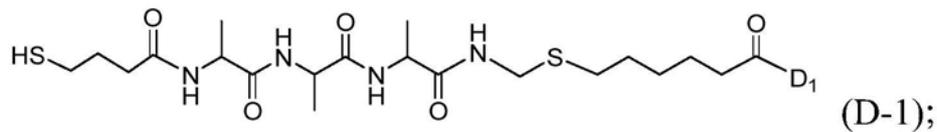
[0802] D由下式表示:

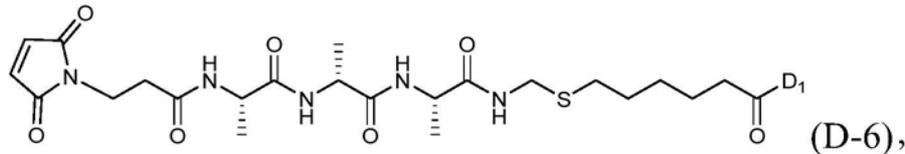
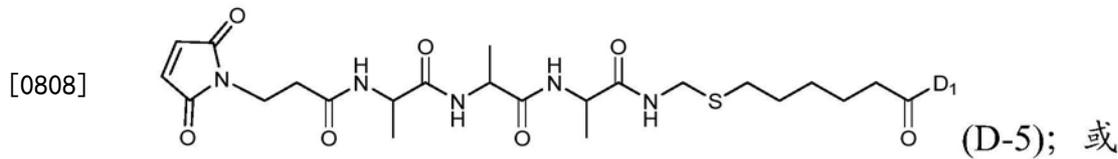
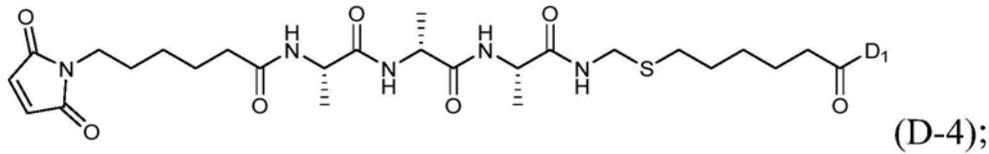


[0804] q为1至20的整数。

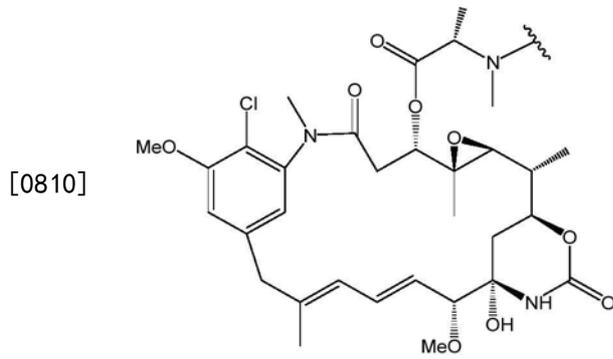
[0805] 在一些实施方案中,对于式(II)、式(III)或式(IV)的美登木素生物碱化合物,变量如在第一实施方案或第一实施方案的第1、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10或第11具体实施方案中所述。

[0806] 在一个具体实施方案中,美登木素生物碱化合物由下式表示:





[0809] 其中D₁由下式表示:



[0811] IV. 产生方法

[0812] 如本领域中公知的,本发明的抗ADAM9抗体及其ADAM9结合片段最优选通过编码此类多肽的核酸分子的重组表达而产生。

[0813] 本发明的多肽可使用固相肽合成来方便地制备 (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," *Science* 232 (4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82 (15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," *Mini Rev. Med. Chem.* 6 (1):3-10)。

[0814] 在替代方案中,抗体可使用本领域中已知的任何方法来重组制备并表达。抗体可通过首先分离由宿主动物制造的抗体、获得基因序列并使用所述基因序列在宿主细胞(例如,CHO细胞)中重组表达抗体来重组地制成。可采用的另一方法为在植物(例如,烟草)或转基因奶中表达抗体序列。已公开了用于在植物或奶中重组表达抗体的合适方法(参见,例如 Peeters等人(2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N.等人(1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Int. Rev. Immunol* 13:65-93; 及 Pollock等人(1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," *J. Immunol Methods* 231:147-157)。用于制造抗体衍生物(例如,人源化、单链等)的合适方法为本领域中已知的,且已在上文中描

述。在另一替代方案中,抗体可通过噬菌体展示技术来重组地制成(参见,例如美国专利号5,565,332;5,580,717;5,733,743;6,265,150;及Winter,G.等人(1994)“Making Antibodies By Phage Display Technology,”*Annu.Rev.Immunol.*12.433-455)。

[0815] 含有目标多核苷酸(例如,编码本发明的抗ADAM9抗体及其ADAM9结合片段的多肽链的多核苷酸)的载体可通过众多适当手段中的任一个来引入宿主细胞中,所述手段包括电穿孔,采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质的转染;微粒子炸射法(microprojectile bombardment);脂转染;及感染(例如,在载体为感染剂(如牛痘病毒)的情况下)。引入载体或多核苷酸的选择将常常取决于宿主细胞的特征。

[0816] 能够过度表达异源DNA的任何宿主细胞可出于表达目标多肽或蛋白质的目的来使用。合适的哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括但不限于COS、HeLa及CHO细胞。

[0817] 本发明包括包含本发明的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段的氨基酸序列的免疫缀合物。本发明的多肽可通过本领域中已知的工序来制造。多肽可通过抗体的蛋白水解或其他降解,通过如上文所述的重组方法(即,单一或融合多肽)或通过化学合成而产生。抗体的多肽,尤其是至多约50个氨基酸的较短多肽通过化学合成来方便地制造。化学合成方法为本领域中已知的,且可商购获得。

[0818] 本发明包括包含抗ADAM9抗体及其片段的变体的免疫缀合物,包括不显著影响此类分子的性质的功能上等效的多肽以及具有提高或降低的活性的变体。多肽的修饰为本领域中的常规实践,且不需要在本文中详细描述。修饰的多肽的实例包括具有氨基酸残基的保守取代、不显著有害地改变功能活性的氨基酸的一个或多个缺失或添加或使用化学类似物的多肽。可彼此保守地取代的氨基酸残基包括但不限于:甘氨酸/丙氨酸;丝氨酸/苏氨酸;缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸;天冬酰胺/谷氨酰胺;天冬氨酸/谷氨酸;赖氨酸/精氨酸;及苯丙氨酸/酪氨酸。这些多肽还包括糖基化和非糖基化多肽,以及具有其他转译后修饰的多肽,例如像用不同糖的糖基化、乙酰化及磷酸化。优选地,氨基酸取代将为保守的,即被取代的氨基酸将具有与原始氨基酸的化学性质类似的化学性质。此类保守取代为本领域中已知的,且实例已在上文中提供。氨基酸修饰的范围可为从改变或修饰一个或多个氨基酸至区(如可变结构域)的完全重新设计。可变结构域的变化可改变结合亲和力和/或特异性。其他修饰方法包括使用本领域中已知的偶合技术,包括但不限于酶促手段、氧化取代及螯合。修饰可用于例如用于免疫测定的标记的连接,如用于放射免疫测定的放射性部分的连接。修饰的多肽是使用本领域中确立的工序来制造,且可使用本领域中已知的标准测定来筛选。

[0819] 本发明涵盖包含具有本发明的一种或多种抗ADAM9-VL和/或VH的融合蛋白的免疫缀合物。在一个实施方案中,提供融合多肽,其包含轻链、重链、或轻链和重链两者。在另一实施方案中,融合多肽含有异源免疫球蛋白恒定区。在另一实施方案中,融合多肽含有由公开保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变结构域和重链可变结构域。出于本发明的目的,抗体融合蛋白含有一个或多个特异性结合至ADAM9的多肽结构域、及天然分子中不与之连接的另一氨基酸序列,例如来自另一区的异源序列或同源序列。

[0820] 本发明还提供包含核苷酸序列的多核苷酸,所述核苷酸序列编码本发明的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段。

[0821] 在某些实施方案中,本发明提供一种多核苷酸,其编码具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的hMAB-A VL(2)轻链,其中所述多核苷酸具有SEQ ID NO:157的核苷酸序列:

[0822] gacattgtgatgaccaatctccagattctttggctgtgtctctaggggagagggccaccatctcctg
caaggccagccaaagtgttgattactctggtgatagttatatgaactgggtaccaacagaaaccaggacagccacc
aaactcctcatctatgctgcatccgacctagaatctggaatcccagccaggttagtggcagtgsgtctgggacag
acttcaccctcactatctctagcctggagcctgaggatttcgcaacctattactgtcagcaaagtcataagaccc
gttcacgttcggacaagggaccaagctcgaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca
tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacag
cacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtc
accatcagggcctgagctcgccctcacaagagcttcaacaggggagagtg

[0823] 在某些实施方案中,本发明提供一种多核苷酸,其编码具有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的hMAB-A VL (2) 轻链,其中所述多核苷酸为密码子优化的且具有SEQ ID NO:158的核苷酸序列:

[0824] gacattgtgatgacgcagtcceccgactccctggcctgtccttgggcgaaaggccacaatcagctg
caaggcatcacagagcgtggactactctggggacagctacatgaattgggtaccagcagaagcccgggcagcctcca
aagctgctgatctacgcccatccgacctggagtcggcctcccggcggttctcgggttcgggatccggcactg
acttcaccctgaccatctcaagcctggagcccaggactttgcgacctactactgccaacagtcccacgaagatcc
gtttacccttcggacaaggcaccgaagctcgagatcaagagaactgtggccgccccgagcgtgttcatcttcccgcca
tcggatgagcaactgaagtccggaactgcgagcgtggtctgcctcctcaacaacttctatcctcgggaagccaaag
tgcagtggaaggtcgacaacgctctgcagtcggaaactcccagagagcgtgaccgaacaggattccaaggactc
gacctactcgtgtcatccactctgacctgagcaaggccgattacgaaaagcacaagtgtagccttgcaagtg
accaccagggactgtcatcccctgtgaccaagtcgttcaaccgcggcgaatgc

[0825] 在某些实施方案中,本发明提供一种多核苷酸,其编码具有SEQ ID NO:151的氨基酸序列的hMAB-A VH (2I) 重链,其中所述多核苷酸具有SEQ ID NO:159的核苷酸序列:

[0826] gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagactgtcttgcgc
tgcttctggttttaccttcttagctactggatgcactgggtgagacagggcaccctggaaaggccttgagtgggt
ggagagattattcctatcttggtcataactacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttctttagaca
actccaagaatacactgtacctccaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggcttattactgtgcaagagg
gggttattattattacccccggcagggttctctggactactggggccaaggcaccactgtgacagtctcctcagcc
tccaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcacagcggcctgggct
gcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacac
cttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatctt
gtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagttctcttcccccc
aaaaccaaggacaccctctatacaccgggagcctgaggtcactatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt
acaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctcaccaggactggctgaaatggcaaggagtacaagtg
caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggcagccccgagaacca
caggtgtacacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggt
tctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgt

gctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtc
ttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtxxx

[0827] 其中xxx为aaa或不存在。

[0828] 在某些实施方案中,本发明提供一种多核苷酸,其编码具有SEQ ID NO:155的氨基酸序列的hMAB-A VH(2I)重链,其中所述多核苷酸具有SEQ ID NO:160的核苷酸序列:

[0829] gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagactgtcttgcgc
tgcttctggttttaccttcttagctactggatgcactgggtgagacaggcaccctggaaaggccttgagtgggtt
ggagagattattcctatctttggtcataactacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttcttttagaca
actccaagaatacactgtacctccaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggcttattactgtgcaagagg
gggttattattattacccccggcagggttctctggactactggggccaaggcaccactgtgacagtctcctcagcc
tccaccaagggccatcggttctccccctggcaccctctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggct
gcttgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacac
cttccccggtgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctt
gtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagttctctcttcccccc
aaaaccaaggacaccctctatacaccgggagcctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt
acaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg
caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaacca
caggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgcctgggtcaaaggct
tctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtc
ttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggt

[0830] 在某些实施方案中,本发明提供一种多核苷酸,其编码具有SEQ ID NO:156的氨基酸序列的hMAB-A VH(2I)重链,其中所述多核苷酸具有SEQ ID NO:161的核苷酸序列:

[0831] gaggtccaactggtggaatctgggggaggcctggtgaagcctgggggctcactgagactgtcttgcgc
tgcttctggttttaccttcttagctactggatgcactgggtgagacaggcaccctggaaaggccttgagtgggtt
ggagagattattcctatctttggtcataactacaatgagaagttcaagagcaggttcacaatttcttttagaca
actccaagaatacactgtacctccaatgggaagcctgagggcagaggacacagcggcttattactgtgcaagagg
gggttattattattacccccggcagggttctctggactactggggccaaggcaccactgtgacagtctcctcagcc
tccaccaagggccatcggttctccccctggcaccctctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggct
gcttgggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacac
cttccccggtgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggc
accagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaattctt
gtgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcaccctgaactcctggggggaccgtcagttctctcttcccccc
aaaaccaaggacaccctctatacaccgggagcctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagt
acaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg
caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaacca

caggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtaaaggct
tctatcccagcgcacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtc
ttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctgcctgtctccgggt

[0832] 在某些实施方案中,本发明提供一种多核苷酸,其编码具有SEQ ID NO:156的氨基酸序列的hMAB-A VH(2I)重链,其中所述多核苷酸为密码子优化的且具有SEQ ID NO:162的核苷酸序列:

[0833] gaagtccaactggtggaatcggggggcgccctcgtgaagcccggaggatccctgaggctctcctgcgc
cgctccgggttcaacttttctgcatactggatgcattgggtccgccaggccccggggaaggactggaatgggtc
ggagagatcatccccattttcggccacacaaactacaacgaaaagttcaagagccgctttactatttcttggaca
attcaagaacaccctgtatctgcaaatgggaagcctgcggggccaggacaccgctgtgtactactgcgccccggg
tggtactattactaccgagacagggtttctctgattactggggccagggaaccaccgtgaccgtgtcctctgcc
tcgaccaaaggccccctcggtgttcccgttgcgccatcctccaaatccacctccggcgccaccgctctgggat
gcctgggtcaaagattacttcccggagcctgtgacggtgtcgtggaactctggagccctcacgagcggagtgcatac
cttccctgcggtgctccaatcgtccggactgtacagcctgagcagcgtcgtcactgtgcctagctcgtccctgggc
accagacctacatttgcaacgtgaaccataagccttcaaactaaggtcgacaaacgggtggaaccaagtctgt
gcgataagactcatacttgcccgccttgcggcgcctgaacttttgggagggccgtccgtgttctctgttcccgcc
aaagccaaaggacactctgtacatcactcgcgaaccggaagtgcacctgtgtggtcgtggacgtgtcccacgaggat
ccggaagtcaagttcaattggtacgtggacggtgtcaggtgcacaacgcaaagaccaagccgcgcgaggaacagt
acaactccacataccgggtggtgtcagtgtgaccgtgttgcaccaggactggctcaacggaaaggagtacaagtg
caaagtgtccaacaaggccctgcctgcaccaatcgaaaagaccattagcaaggccaaggggcagccccgggagccc
caagtgtacactctgccccgtcacgggaagaaatgaccaagaaccaagtgtcactgacctgtcttgtgaagggtt
tctaccctccgacatcgccgtggagtgggagtccaacggacagccggagaacaattacaagactaccccgccgtg
gctggatagcagcggctccttcttctgtactccaagctgaccgtggacaagtcgagatggcagcaggggaacgtg
ttctcgtgctccgtgatgcacgaagcgtgcacaaccactatacccagaagtcctgtgcctgtcccctgga

[0834] V. 药物缀合

[0835] 包含共价键联至本文所述的美登木素生物碱化合物的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段的免疫偶联物可根据本领域中已知的任何合适的方法制备。

[0836] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过第一方法来制备,所述方法包括以下步骤:使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与第二实施方案中所述的式(II)的美登木素生物碱化合物反应。

[0837] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过包括以下步骤的第二方法来制备:

[0838] (a) 使式(III)或(IV)的美登木素生物碱化合物与本文所述的接头化合物反应以形成细胞毒性剂-美登木素生物碱化合物,其上结合有胺反应性基团或硫醇反应性基团,这些基团可共价键联至抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段(或CBA);以及

[0839] (b) 使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与美登木素生物碱-接头化合物反应以形成免疫缀合物。

[0840] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过包括以下步骤的第三方法

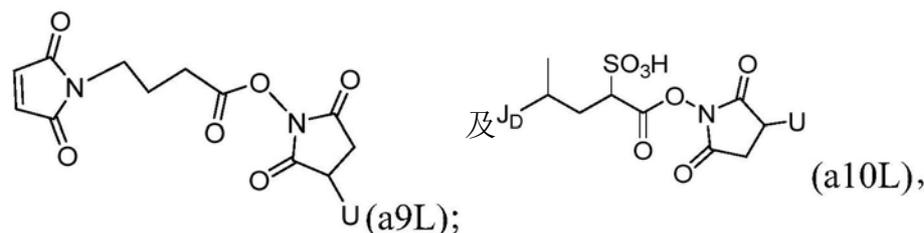
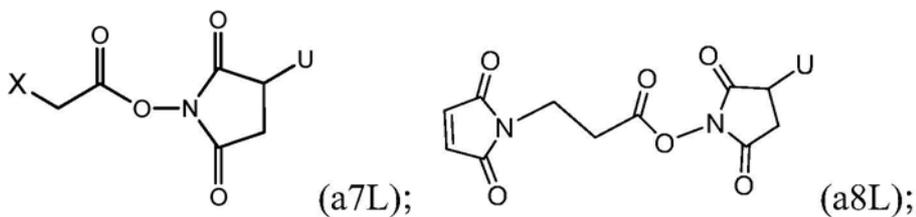
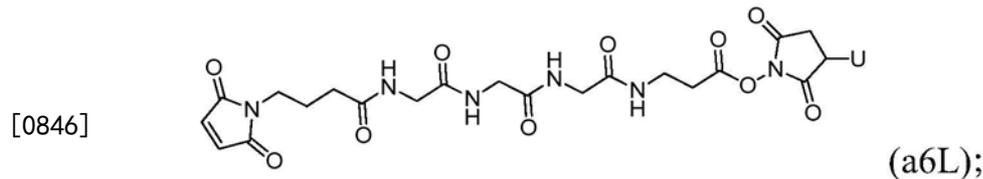
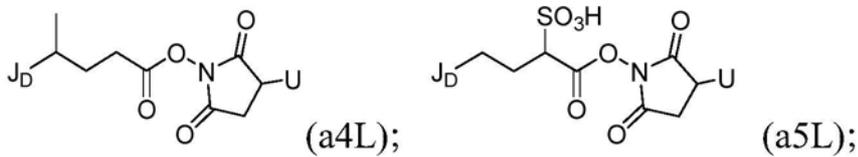
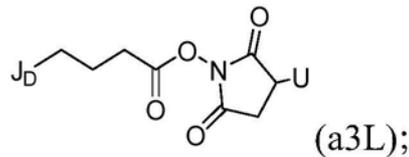
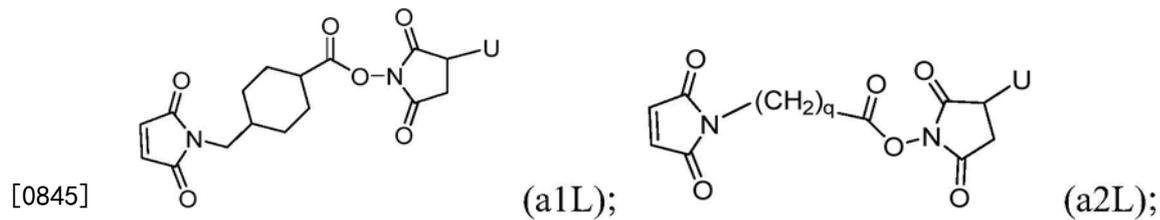
来制备:

[0841] (a) 使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与本文所述的接头化合物反应以形成修饰的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,其上结合有胺反应性基团或硫醇反应性基团(例如,式(II)的化合物),这些基团可共价键联至式(III)或(IV)的美登木素生物碱化合物;以及

[0842] (b) 使修饰的抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与式(III)或(IV)的美登木素生物碱化合物反应以形成免疫缀合物。

[0843] 在某些实施方案中,第一实施方案的免疫缀合物可通过第三方法来制备,所述第三方法包括使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段、接头化合物及式(III)或(IV)的美登木素生物碱化合物反应以形成免疫缀合物。在一个实施方案中,首先将抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与式(III)或(IV)的美登木素生物碱化合物反应,然后添加接头化合物。

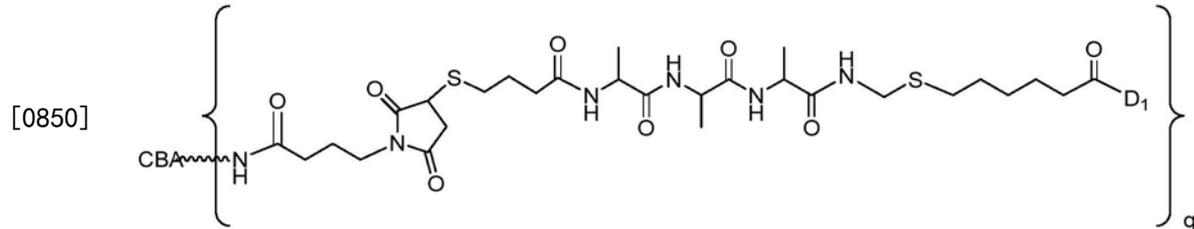
[0844] 在某些实施方案中,对于上述第二、第三或第四方法,接头化合物由式(a1L) - (a10L)中的任一个或其药学上可接受的盐表示:



[0847] 其中X为卤素、 J_D -SH或-SSR^d;R^d为苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基;R^e为烷基;并且U为-H或SO₃H。

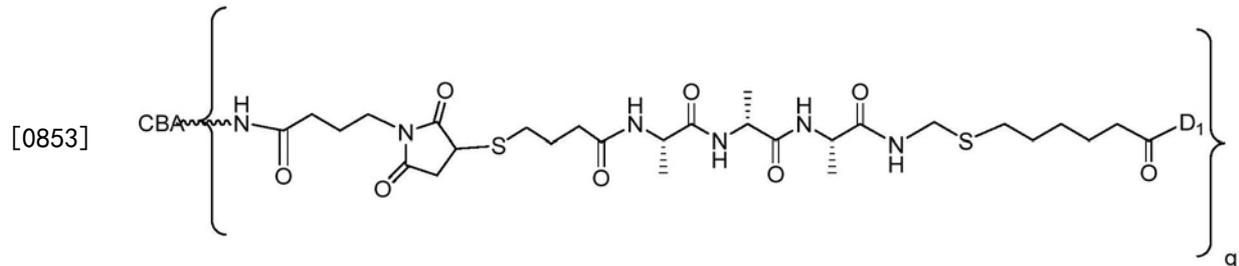
[0848] 在一个实施方案中,接头化合物为由式(a9L)或其药学上可接受的盐表示的GMBS或磺基-GMBS,其中U为-H或SO₃H。

[0849] 在一个具体实施方案中,本发明的免疫缀合物由下式表示:



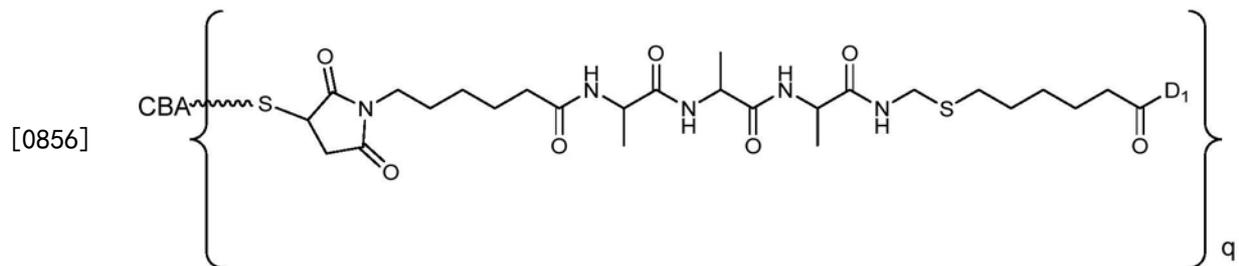
[0851] (I-1);并且免疫缀合物可通过上述第二、第三或第四方法来制备,其中接头化合物为由式(a9L)或其药学上可接受的盐表示的GMBS或磺基-GMBS,其中U为-H或SO₃H;且美登木素生物碱化合物由上述式(D-1)表示。在更具体的实施方案中,式(I-1)的免疫缀合物通过以下步骤来制备:使式(D-1)的美登木素生物碱化合物与接头化合物GMBS或磺基-GMBS反应以形成美登木素生物碱-接头化合物,然后使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与美登木素生物碱-接头化合物反应。在一个甚至更具体的实施方案中,美登木素生物碱接头化合物在与抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段反应之前没有经过纯化。

[0852] 在另一具体实施方案中,免疫缀合物由下式表示:



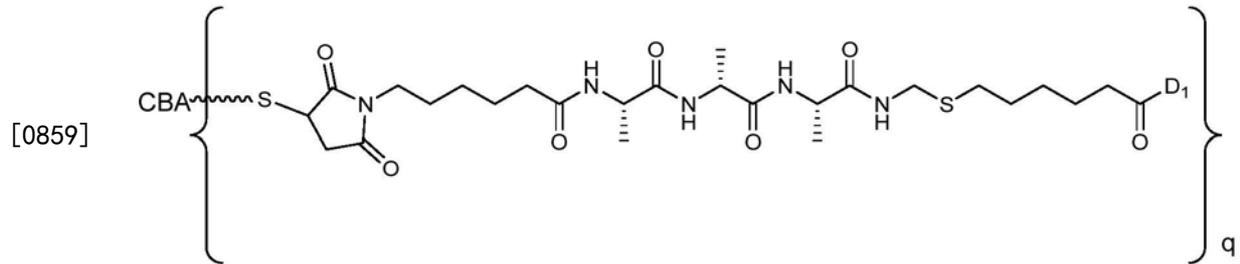
[0854] (I-2);并且免疫缀合物可通过上述第二、第三或第四方法来制备,其中接头化合物为由式(a9L)或其药学上可接受的盐表示的GMBS或磺基-GMBS,其中U为-H或SO₃H;且美登木素生物碱化合物由上述式(D-2)表示。在更具体的实施方案中,式(I-2)的免疫缀合物通过以下步骤来制备:使式(D-2)的美登木素生物碱化合物与接头化合物GMBS或磺基-GMBS反应以形成美登木素生物碱-接头化合物,然后使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与美登木素生物碱-接头化合物反应。在一个甚至更具体的实施方案中,美登木素生物碱接头化合物在与抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段反应之前没有经过纯化。

[0855] 在另一具体实施方案中,免疫缀合物由下式表示:



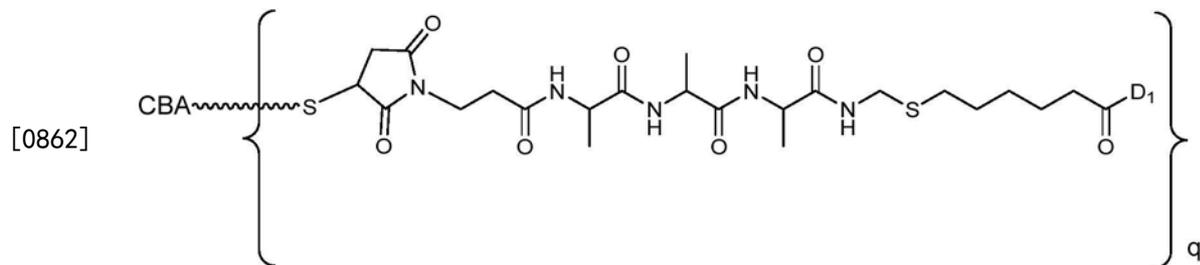
[0857] (I-3); 并且免疫缀合物根据上述第一方法通过使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与上述式(D-3)的美登木素生物碱化合物反应来制备。

[0858] 在另一具体实施方案中, 免疫缀合物由下式表示:



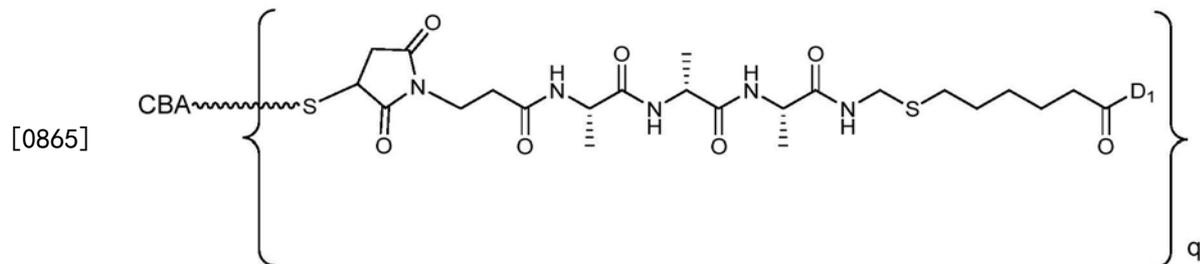
[0860] (I-4); 并且免疫缀合物根据上述第一方法通过使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与上述式(D-4)的美登木素生物碱化合物反应来制备。

[0861] 在另一具体实施方案中, 免疫缀合物由下式表示:



[0863] (I-5); 并且免疫缀合物根据上述第一方法通过使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与上述式(D-5)的美登木素生物碱化合物反应来制备。

[0864] 在另一具体实施方案中, 免疫缀合物由下式表示:



[0866] (I-6); 并且免疫缀合物根据上述第一方法通过使抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段与上述式(D-6)的美登木素生物碱化合物反应来制备。

[0867] 在一些实施方案中, 使通过上文所述的任何方法制备的免疫缀合物经历纯化步骤。就此而言, 可使用切向流过滤(TFF)、非吸附色谱、吸附色谱、吸附过滤、选择性沉淀或任何其他合适的纯化方法及其组合来从混合物的其他组分中纯化免疫缀合物。

[0868] 在一些实施方案中, 使用单一纯化步骤(例如, TFF)来纯化免疫缀合物。优选地, 使用单一纯化步骤(例如, TFF)将缀合物纯化并交换到适当制剂中。在本发明的其他实施方案中, 使用两个连续的纯化步骤纯化免疫缀合物。例如, 免疫缀合物可首先通过选择性沉淀、吸附过滤、吸附色谱或非吸附色谱来纯化, 随后用TFF进行纯化。一般本领域技术人员将理解, 免疫缀合物的纯化实现包含化学偶合至细胞毒性剂的细胞结合剂的稳定缀合物的分离。

[0869] 任何合适的TFF系统都可用于纯化, 所述系统包括Pellicon型系统(Millipore,

Billerica, Mass.)、Sartocon盒式系统(Sartorius AG, Edgewood, N.Y.)及Centrasette型系统(Pall Corp., East Hills, N.Y.)

[0870] 任何合适的吸附色谱树脂都可用于纯化。优选吸附色谱树脂包括羟基磷灰石色谱、疏水性电荷诱导色谱(HCIC)、疏水性相互作用色谱(HIC)、离子交换色谱、混合模式离子交换色谱、固定化金属亲和色谱(IMAC)、染料配体色谱、亲和色谱、逆相色谱及其组合。合适的羟基磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟基磷灰石(I型和II型CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)、HA Ultrogel羟基磷灰石(Pall Corp., East Hills, N.Y.)及陶瓷氟磷灰石(I型和II型CFT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的HCIC树脂的实例为MEP Hypercel树脂(Pall Corp., East Hills, N.Y.)。合适的HIC树脂的实例包括丁基-琼脂糖、己基-琼脂糖、苯基-琼脂糖及辛基琼脂糖树脂(全部来自GE Healthcare, Piscataway, N.J.)以及Macro-prep甲基树脂和Macro-Prep叔丁基树脂(Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的离子交换树脂的实例包括SP-琼脂糖、CM-琼脂糖及Q-琼脂糖树脂(全部来自GE Healthcare, Piscataway, N.J.)、以及Unosphere S树脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的混合模式离子交换剂的实例包括Bakerbond ABx树脂(JT Baker, Phillipsburg N.J.)。合适的IMAC树脂的实例包括螯合琼脂糖树脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)和Profinity IMAC树脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的染料配体树脂的实例包括蓝色琼脂糖树脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)和Affi-gel蓝色树脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合适的亲和树脂的实例包括:蛋白A琼脂糖树脂(例如MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.),其中细胞结合剂为抗体;和凝集素亲和树脂,例如扁豆凝集素琼脂糖树脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.),其中细胞结合剂载有适当的凝集素结合位点。或者,可使用对细胞结合剂有特异性的抗体。这种抗体可被固定在例如Sepharose 4Fast Flow树脂(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)上。合适的逆相树脂的实例包括C4、C8及C18树脂(Grace Vydac, Hesperia, Calif.)。

[0871] 任何合适的非吸附色谱树脂都可用于纯化。合适的非吸附色谱树脂的实例包括但不限于SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™树脂(例如,S-200和S-300)、SUPERDEX™树脂(例如,SUPERDEX™ 75和SUPERDEX™ 200)、**BIO-GEL®**树脂(例如,P-6、P-10、P-30、P-60及P-100)以及本领域普通技术人员已知的其他树脂。

[0872] VI. 本发明的免疫缀合物的用途

[0873] 本发明涵盖包含本发明的免疫缀合物的组合物,包括药物组合物。

[0874] 如本文所提供,包含本文提供的人源化/优化抗ADAM9-VL和/或VH结构域的本发明的免疫缀合物具有结合细胞表面上存在的ADAM9并介导细胞杀伤的能力。特别地,包含药理剂的本发明免疫缀合物被内化,并经由药理剂的活性介导细胞杀伤。此类细胞杀伤活性可通过免疫缀合物诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)来增强。

[0875] 因此,包含本文提供的人源化/优化抗ADAM9-VL和/或VH结构域的本发明的免疫缀合物具有治疗与ADAM9表达相关或特征在于ADAM9表达的任何疾病或病状的能力。如上文所讨论,ADAM9为在众多血液和实体恶性肿瘤中表达的肿瘤-胚胎抗原,其与展现低分化形态的高级肿瘤相关,且与不良临床结果相关联。因此,且无限制,本发明的免疫缀合物可用于

治疗癌症,特别是特征在于ADAM9表达的癌症。

[0876] 在其他特定实施方案中,本发明的免疫缀合物可适用于治疗肺癌(例如,非小细胞肺癌)、结肠直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食道癌、乳腺癌、头颈癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、骨髓癌、黑色素瘤及淋巴瘤。在其他特定实施方案中,本发明的免疫缀合物可适用于治疗非小细胞肺癌、结肠直肠癌、胃癌、乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌(TNBC))或胰腺癌。

[0877] 在进一步的实施方案中,本发明的免疫缀合物可适用于治疗非小细胞肺癌(鳞状细胞、非鳞状细胞、腺癌或大细胞未分化癌)、结肠直肠癌(腺癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌)或乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌(TNBC))。

[0878] 除了其在治疗中的效用以外,本发明的免疫缀合物还可被可检测地标记,并用于癌症的诊断或肿瘤和肿瘤细胞的成像中。

[0879] VII. 药物组合物

[0880] 本发明的组合物包括适用于制造药物组合物(例如,不纯或非无菌组合物)的散装药物(bulk drug)组合物及可用于制备单位剂型的药物组合物(即适于向受试者或患者施用的组合物)。此类组合物包含预防或治疗有效量的本发明的免疫缀合物、或此类剂与药学上可接受的载体的组合。优选地,本发明的组合物包含预防或治疗有效量的本发明的免疫缀合物及药学上可接受的载体。本发明还涵盖此类药物组合物,其另外包含对特定癌症抗原具有特异性的第二治疗性抗体(例如,肿瘤特异性单克隆抗体)及药学上可接受的载体。

[0881] 在一个具体实施方案中,术语“药学上可接受的”意谓由联邦政府或州政府的管理机构批准或列于美国药典或其他通常认可的药典中且在动物中,且更具体来说在人类中使用。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全))、赋形剂或媒介物。一般来说,本发明组合物的成分单独或以混合在一起的单位剂型(例如以干燥冻干粉末或无水浓缩物形式)在指示活性剂的量的密封容器(如安瓿或药囊)中供应。在有待通过输注施用组合物的情况下,其可用含有无菌药用级水或盐水的输注瓶分配。在通过注射施用组合物的情况下,可提供无菌注射用水或盐水的安瓿以使得可于施用之前混合所述成分。

[0882] 本发明还提供一种药物包装或药盒,其包含一个或多个填充有本发明的免疫缀合物(单独或与此类药学上可接受的载体一起)的容器。另外,适用于治疗疾病的一种或多种其他预防剂或治疗剂也可容纳于药物包装或药盒中。本发明还提供一种药物包装或药盒,其包含一个或多个填充有本发明的药物组合物的一种或多种成分的容器。任选地,此类容器可附有管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构所规定形式的须知,所述须知反映了所述机构对制造、使用或销售以供人类施用的批准。

[0883] 本发明提供可用于上文方法中的药盒。药盒可包含本发明的任何免疫缀合物。药盒可在一个或多个容器中进一步包含一种或多种适用于治疗癌症的其他预防剂和/或治疗剂。

[0884] VIII. 施用方法

[0885] 可提供本发明的组合物以便通过向受试者施用有效量的本发明的免疫缀合物来治疗、预防及改善与疾病、病症相关的一种或多种症状。在一个优选方面中,此类组合物为

大体上纯的(即,大体上不含限制其作用或产生非所要副作用的物质)。在一个具体实施方案中,受试者为动物,优选为哺乳动物,如非灵长类(例如,牛、马、猫、犬、啮齿动物等)或灵长类(例如,猴如食蟹猴、人等)。在一个优选实施方案中,受试者为人。

[0886] 各种递送系统为已知的,且可用于施用本发明的组合物,例如,囊封于脂质体中、微粒、微胶囊、能够表达抗体或融合蛋白的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见,例如Wu等人(1987)“Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,”*J.Biol.Chem.*262:4429-4432)、核酸构建成逆转录病毒或其他载体的一部分等。

[0887] 施用本发明的免疫缀合物的方法包括但不限于肠胃外施用(例如,皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内及皮下)、硬膜外及黏膜(例如,鼻内和经口途径)。在一个具体实施方案中,本发明的免疫缀合物是以肌肉内、静脉内或皮下方式施用。组合物可通过任何方便途径例如通过输注或推注注射来施用,且可与其他生物活性剂一起施用。施用可为全身的或局部的。

[0888] 本发明还提供,将本发明的免疫缀合物制剂包装在指示分子之量的密封容器(如安瓿或药囊)中。在一个实施方案中,此类分子以干燥灭菌的冻干粉末或无水浓缩物形式在密封容器中供应,并且可例如用水或盐水复原至适当浓度以向受试者施用。优选地,本发明的免疫缀合物以干燥无菌冻干粉末形式在密封容器中供应。

[0889] 本发明的免疫缀合物的冻干制剂应在2°C与8°C之间在其原始容器中储存,且分子应在复原后12小时内、优选6小时内、5小时内、3小时内或1小时内施用。在一个替代实施方案中,此类分子以液体形式在指示分子、融合蛋白或缀合分子之量和浓度的密封容器中供应。优选地,此类免疫缀合物当以液体形式提供时在密封容器中供应。

[0890] 如本文所使用,药物组合物的“有效量”为足以产生有益或所要结果的量,所述包括但不限于临床结果,如减少由疾病引起的症状、减轻感染的症状(例如,病毒负荷、发热、疼痛、败血症等)或癌症的症状(例如,癌细胞增殖、肿瘤存在、肿瘤转移等),从而提高罹患所述疾病的患者的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量、如经由靶向和/或内化来增强另一药物的作用、延缓疾病的进展和/或延长个体的存活。有效量可以一次或多次用来施用。出于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量为足以杀死癌细胞和/或减少癌细胞增殖、和/或消除、减少和/或延缓癌症原发部位的转移发展的量。

[0891] 本发明的药物组合物可以局部方式向需要治疗的区域施用;这可通过例如但不限于局部输注、通过注射或借助于植入物来实现,所述植入物为多孔、非多孔或凝胶状材料,包括膜(如硅化橡胶膜)或纤维。优选地,当施用本发明的免疫缀合物时,必须注意使用所述分子不吸收的材料。

[0892] 本发明的组合物可在囊泡,特别是在脂质体中递送(参见,Langer(1990)“New Methods Of Drug Delivery,”*Science* 249:1527-1533);Treat等人,于LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER,Lopez-Berestein和Fidler(编),Liss,New York,第353-365页(1989)中;Lopez-Berestein,ibid.,第317-327页)。

[0893] 实施例

[0894] 现已大体上描述了本发明,通过参考以下实施例将更容易理解本发明。以下实施例说明了组合物在本发明的诊断或治疗方法中的各种方法。所述实施例旨在说明,但绝不

限制本发明的范围。

[0895] 实施例1

[0896] 抗ADAM9抗体MAB-A的肿瘤细胞特异性

[0897] 已鉴别出鼠ADAM9抗体(在本文中命名为MAB-A),其:(1)阻断ADAM9的靶蛋白加工活性;(2)被内化;及(3)具有抗肿瘤活性(参见,例如美国专利号8361475)。通过IHC研究MAB-A的肿瘤细胞特异性。使肿瘤组织与MAB-A(0.4 μ g/mL)或同种型对照(0.4 μ g/mL)接触,且目视检查染色程度。发现MAB-A强标记多种大细胞癌、鳞状细胞癌及腺癌非小细胞肺癌细胞类型(图1A)、乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、胃癌细胞(图1B)以及结肠癌样品(图1C)。使正常组织与MAB-A(1.25 μ g/mL)接触,且目视检查染色程度。如上表2中所概述,MAB-A展现广泛多种正常组织的极少或无染色。应指出,这些研究中使用的MAB-A的浓度为用于染色肿瘤细胞的浓度的几乎3倍。这些IHC研究结果指示,MAB-A展现出优于正常细胞的与肿瘤细胞的强优先结合。

[0898] 实施例2

[0899] 物种交叉反应性

[0900] 检查MAB-A与人ADAM9(huADAM9)和食蟹猴ADAM9(cynoADAM9)的结合。简单说来,将瞬时表达huADAM9、cynoADAM9、无关抗原的293-FT和CHO-K细胞或未被转染的亲代细胞与MAB-A一起培育,随后与山羊抗鼠-PE第二抗体一起培育,且通过FACS来分析。如图2中所示,MAB-A展现出与两种细胞类型上瞬时表达的huADAM9的强结合。MAB-A展现出与cynoADAM9的不良结合。MAB-A不结合至亲代细胞或表达无关抗原的细胞。在ELISA测定中见到与cynoADAM9的类似的低水平结合。

[0901] 实施例3

[0902] 人源化和初始优化

[0903] MAB-A的人源化作用产生人源化VH结构域(本文中命名为“hMAB-A VH(1)”)和人源化VL结构域(本文中命名为“hMAB-A VL(1)”)。接着对人源化可变结构域进行优化以增强结合活性和/或去除潜在的不稳定氨基酸残基,如下文更详细地描述。此第一轮优化产生三个另外的人源化VH结构域(本文中命名为“hMAB-A VH(2)”、“hMAB-A VH(3)”及“hMAB-A VH(4)”)和三个另外的人源化VL结构域(本文中命名为“hMAB-A VL(2)”、“hMAB-A VL(3)”及“hMAB-A VL(4)”)。另外,产生具有鼠VH和VL结构域以及人恒定区的MAB-A的嵌合形式(“chMAB-A”)。上文提供鼠和人源化/优化VH和VL结构域的氨基酸序列,在图3A和图3B中提供比对。上文提供这些人源化/优化VH和VL结构域的共同序列。在产生多个人源化可变结构域的情况下,可以任何组合使用特定抗ADAM9抗体(例如,MAB-A)的人源化重链可变结构域和轻链可变结构域,且通过引用具体VH/VL结构域的方式来提及人源化链的特定组合,例如,将包含hMAB-A VH(1)和hMAB-A VL(2)的抗体具体称为“hMAB-A(1.2)”。

[0904] 产生具有来源于人种系VH3-21和VH3-64的构架区的hMAB-A VH(1),且产生具有来源于人种系B3和L6的构架区的hMAB-A VL(1)。在这些人源化可变结构域中保留鼠CDR。

[0905] 在CDR_H2中鉴别出潜在的脱酰胺位点(在图3A中以单下划线示出),且在CDR_L1中鉴别出潜在的天冬氨酸异构化位点(在图3B中以单下划线示出)。检查这些位置处的氨基酸取代以鉴别去除这些位点同时维持结合亲和力的取代。选择CDR_H2(存在于hMAB-A VH(2)中)的位置54处的苯丙氨酸取代(N54F)和CDR_L1(存在于hMAB-A VL(2)中)的位置28处的丝氨酸

取代 (D28S), 其中编号是根据Kabat。可单独或组合使用所鉴别的取代。惊人地发现, 包含 N54F取代的抗体展现出对人ADAM9的亲力的2倍增加 (参见, 例如下文表3) 及与食蟹猴 ADAM9的轻微改善的结合。

[0906] 另外, 产生优化变体以使CDR中存在的赖氨酸残基的数目最小化。两个赖氨酸残基存在于CDR_H2中 (在图3A中用双下划线指示), 且一个赖氨酸存在于CDR_L1中 (在图3B中用双下划线指示)。检查这些位置处的氨基酸取代以鉴别维持结合亲和力的取代。选择CDR_H2 (存在于hMAB-A VH (3) 中) 的位置62处的精氨酸取代 (K62R)、位置64处的谷酰胺取代 (K64Q) 及位置65处的丝氨酸取代 (S65G), 其中编号是根据Kabat。选择CDR_L1 (存在于hMAB-A VL (3) 中) 的位置24处的精氨酸取代 (K24R)。可单独或组合使用所鉴别的取代。

[0907] 鉴别CDR中存在的其他潜在不稳定残基 (在图3A-3B中用下划虚线指示), CDR_H1内位置34处的一个甲硫氨酸残基 (M34)、CDR_L1内位置33处的一个甲硫氨酸残基 (M33) 以及 CDR_L3内位置92处的组氨酸残基 (H93)、位置93处的谷氨酸残基 (E93) 及位置94处的天冬氨酸残基 (D94), 其中编号是根据Kabat。检查这些位置处的氨基酸取代以鉴别维持结合亲和力的取代。选择CDR_H1的位置34处的异亮氨酸取代 (M34I), 且选择CDR_L3的位置33处的亮氨酸取代 (M33L)、位置92处的酪氨酸取代 (H93Y)、位置93处的丝氨酸取代 (E93S) 及位置94处的苏氨酸取代 (D94T), 其中编号是根据Kabat。这些位置各自可容易与上文详述的所有取代组合被取代, 以产生hMAB-A VH (4) 和hMAB-A VL (4), 其在配对在一起时产生相较于亲代鼠抗体保留小的亲和力改善的抗体, 且所述抗体的脱酰胺或氧化的可能性大大减小且CDR中无赖氨酸残基。

[0908] 使用 **BIACORE®** 分析研究人源化/优化抗体hMAB-A (1.1)、hMAB-A (2.2)、hMAB-A (2.3)、hMAB-A (3.3)、hMAB-A (4.4) 及嵌合chMAB-A (具有鼠VH/VL结构域) 与huADAM9的相对结合亲和力, 其中使His标记的可溶性人ADAM9 (“shADAM9-His”, 含有融合至含组氨酸的蛋白的人ADAM9的细胞外部分) 在包被有固定化抗体的表面上通过。简单说来, 将各抗体捕获在Fab2山羊抗人Fc表面上, 且接着在不同浓度 (6.25-100nM) 的shADAM9-His蛋白存在下培育。经由 **BIACORE®** 分析结合 (归一化的1:1朗格缪尔结合模型) 测定结合的动力学。这些研究的计算的 k_a 、 k_d 及 K_D 呈现于表3中。通过如上文所述的FACS且通过ELISA来检查与cynoADAM9的结合。

[0909] 表3.

抗体	pI	huADAM9		
		k_a ($\times 10^6$)	k_d ($\times 10^{-3}$)	KD (nM)
chMAB-A	6.61	1.3	4.7	3.6
[0910] hMAB-A (1.1)	6.44	1.5	5.2	3.5
hMAB-A (2.2)	6.58	1.1	1.5	1.4
hMAB-A (2.3)	6.58	1.3	1.7	1.3
hMAB-A (3.3)	6.44	1.1	1.5	1.4
hMAB-A (4.4)	6.73	1.0	2.0	2.0

[0911] 这些研究结果说明, 人源化/优化抗体具有与亲代鼠抗体相比相同或更高的与人ADAM9的结合亲和力。具体说来, 观察到在人源化抗体中引入N54F突变得得到与huADAM9 (即, hMAB-A (2.2)、hMAB-A (2.3) 及hMAB-A (3.3)) 的结合改善。如通过FACS和ELISA所确定, 此突变还提供与cynoADAM9的结合的轻微改善, 然而, 这些抗体继续展现与cynoADAM9的不良结

合。这些研究还鉴别可被引入以从CDR中去除赖氨酸残基而不减少亲和力的另外取代。鉴别另外的取代以去除对亲和力具有最小影响的其他潜在不稳定残基。

[0912] 实施例4

[0913] 与非人灵长类ADAM9的结合的优化

[0914] 使用随机诱变在hMAB-A (2.2) 的重链CDR_H2 (Kabat位置53-58) 和CDR_H3 (Kabat位置95-100和100a-100f) 结构域内引入取代。对突变体进行筛选以鉴别具有与非人灵长类ADAM9 (例如, cynoADAM9) 的增强结合且保留与huADAM9的高亲和力结合的克隆。从CDR_H3 (Kabat位置100a-100f) 内的突变的两次独立筛选中选择48种克隆。表4提供从两次独立筛选中针对与cynoADAM9的增强结合所选择的hMAB-A (2.2) 克隆的CDR_H3 Kabat残基100a-f的氨基酸序列的比对。另外的克隆比对提供于表5中。如这种表中所示, 各实验中出现类似的克隆, 所述克隆处于离散的取代模式中。

表 4
MAB-A 的重链 CDRH3 的子结构域内的取代
(Kabat 位置 100a-100f)

筛选 1			筛选 2		
克隆 ID	SEQ ID NO	CDR _H 3 子结构域序列	克隆 ID	SEQ ID NO	CDR _H 3 子结构域序列
MAB-A	81	GSRDYF	MAB-A	81	GSRDYF
1	82	DGEGVM	1	112	DGKAVL
2	82	DGEGVM	2	113	FNKAVL
3	83	FHSGLL	3	84	FNSATL
4	84	FNSATL	4	114	FNSGTW
5	85	FNSGTL	5	115	FNTGVF
6	86	FNSSTL	6	116	GKSRFH
7	87	GKSKWL	7	91	IGKGVF
8	88	GMGGTL	8	92	IGKGVL
9	89	HAKGGM	9	117	IGKNVY
10	90	IGEAVL	10	118	MGKGVM
11	91	IGKGVF	11	119	NGESVF
12	91	IGKGVF	12	120	PDFGWM
13	92	IGKGVL	13	121	PGSGVM
14	93	KHDSVL	14	122	PKDAWL
15	94	LNTAVM	15	99	PKFGWK
16	95	NGEGTL	16	99	PKFGWK
17	96	NGKNTL	17	123	PKFGWL
18	97	NSAGIL	18	124	PKIGWH
19	98	PKEGWM	19	124	PKIGWH
20	99	PKFGWK	20	124	PKIGWH
21	100	PKMGWV	21	125	PKMGWA
22	101	PRLGHL	22	126	PKMGWM
23	102	PSFGWA	23	126	PKMGWM
24	103	QAKGTM	24	126	PKMGWM
25	104	RGMGVM	25	126	PKMGWM

[0915]

[0916]	26	105	RKEGWM	26	127	PQMGWL
	27	106	TGKGV L	27	128	PRFGWL
	28	107	TGMGTL	28	128	PRFGWL
	29	108	TGNGVM	29	128	PRFGWL
	30	108	TGNGVM	30	129	PRMGFL
	31	109	WNAGTF	31	130	PRMGFM
	32	110	YHHTPL	32	131	PSFGWM
	33	110	YHHTPL	33	132	RREGWM
	34	111	YQSATL	34	133	SGEGVL
				35	134	SGNGVM
				36	135	VGKAVL

表 5
MAB-A 的重链 CDR_{H3} 的子结构域内的取代
(Kabat 位置 100a-100f)

克隆 ID	SEQ ID NO	CDR _{H3} 子结构域序列
MAB-A VH (2A)	85	FNSGTL
MAB-A VH (2B)	92	IGKGV L
MAB-A VH (2C)	128	PRFGWL
MAB-A VH (2D)	106	TGKGV L
MAB-A VH (2E)	136	DSNAVL
MAB-A VH (2F)	137	FHSGTL
MAB-A VH (2G)	113	FNKAVL
MAB-A VH (2H)	138	GGSGVL
MAB-A VH (2I)	139	PRQGFL
MAB-A VH (2J)	140	YNSGTL

[0918] 对于所有检查的克隆,Gly和Ala为位置4 (P4) 处的优选氨基酸残基,且Leu、Met及Phe为位置6 (P6) 处的优选氨基酸残基。其他位置(例如,位置2 (P2)、位置3 (P3) 及位置5 (P5)) 处的优选氨基酸残基取决于P1处发现的氨基酸残基。对于在位置1 (P1) 处具有Pro残基的克隆,P2处Lys和Arg为优选的,P3处Phe和Met为优选的,P4处Gly为优选的,且P5处Trp或Phe为优选的。对于在P1处具有Phe、Tyr或Trp的克隆,P2处Asn和His为优选的,P3处Ser和His为优选的,且P6处Leu为优选的。对于在P1处具有Ile、Leu或Val的克隆,P2处Gly为优选的,P3处Lys为优选的,P5处Val为优选的,且P6处疏水性为优选的。另外,如可在表4中看到,对于在P1处具有Thr残基的克隆,P2处Gly为优选的,P3处Lys、Met及Asn为优选的,P4处Gly为优选的,P5处Val或Thr为优选的,且P6处Leu和Met为优选的。还鉴别出以较低频率在P1处具有Asp、Gly、Arg、His或Ser残基的另外克隆(参见表4和表5)。

[0919] 使用表5中所示的十个克隆的VH结构域产生hMAB-A (2.2) 的进一步优化的变体,命名为hMAB-A (2A.2) - (2J.2)。通过ELISA测定检查所选克隆的结合。简单说来,使用结合至含组氨酸的肽且已包被于微量滴定板上的抗体捕获His肽标记的可溶性cynoADAM9 (“cynoADAM9-His”) (1 μ g/mL) 或His肽标记的可溶性huADAM9 (1 μ g/mL), 并且检查亲代hMAB-A (2.2) 和十个CDR_{H3} hMAB-A (2A.2) 变体的连续稀释液的结合。结合曲线cynoADAM9和

huADAM9分别呈现于图4A和图4B中。在MAB-A VH(2B)、MAB-A VH(2C)、MAB-A VH(2D)及MAB-A VH(2I)的情况下,包含每个所选VH结构域的hMAB-A(2A.2)变体展现与cynoADAM9的改善结合,显示cynoADAM9结合的最大增强,同时维持与亲代hMAB-A(2.2)抗体类似的与huADAM9的结合。

[0920] 基本上如上文所述使用BIACORE®分析研究人源化/进一步优化的抗体MAB-A VH(2B.2)、MAB-A VH(2C.2)、MAB-A VH(2D.2)及MAB-A VH(2I.2)以及亲代hMAB-A(2.2)与huADAM9-His和cynoADAM9-His的相对结合亲和力。这些研究的计算的 k_a 、 k_d 及 K_D 呈现于表6中。

抗体	huADAM9			cynoADAM9		
	k_a ($\times 10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-4}$) (s^{-1})	KD (nM)	k_a ($\times 10^5$) ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d ($\times 10^{-4}$) (s^{-1})	KD (nM)
hMAB-A (2.2)	9.0	5.5	0.6	2.0	220	110
hMAB-A (2B.2)	6.1	3.9	0.6	3.4	0.66	0.2
hMAB-A (2C.2)	5.9	8.1	1.4	3.5	<0.1	<0.3
hMAB-A (2D.2)	6.9	5.8	0.8	4.2	3.0	0.7
hMAB-A (2I.2)	6.6	2.3	0.4	4.0	0.85	0.2

[0922] 结合研究说明,四个最高克隆展现与cynoADAM9的结合亲和力的150-550倍之间的增强,同时维持与亲代抗体一样高的与huADAM9的亲和力结合。选择hMAB-A(2C.2)及hMAB-A(2I.2)以进行进一步研究。

[0923] 实施例5

[0924] 抗体hMAB-A(2I.2)的免疫组织化学研究

[0925] 通过IHC研究hMAB-A(2I.2)的细胞特异性。使阳性和阴性对照细胞以及正常人和食蟹猴组织与hMAB-A(2I.2)(2.5 μ g/mL)或同种型对照(2.5 μ g/mL)接触,且目视检查染色程度。研究结果概述于表7中。

[0926]

表 7		
细胞/组织	hMAB-A(2I.2) (2.5 µg/ml)	IgG1 阴性对照(2.5 µg/ml)
Cho-K 亲代细胞	-	-
Cho-K/huADAM9 中等表达 P:1	2-4+ (gr c > m) 罕见至偶尔, 且 1+ (gr c > m) 偶尔	-
Cho-K/huADAM9 高表达	2-4+ (gr c > m) 频繁	-
Cho-K/ cynoADAM9 克隆 2	2-4+ (gr c > m) 频繁	-
Cho-K/cynoADAM9 克隆#16	2-4+ (gr c > m) 频繁	-
A498 细胞	2-4+ (gr c > m) 罕见至偶尔, 且 1+ (gr c > m) 偶尔至频繁	-
克隆 MG06-CHTN-96 B	-	众多 2-4+ (gr c) 细胞, 与巨噬细胞一致
肺 MG06-CHtN-162B1 A	-	偶尔 2-4+ (gr c) 细胞, 与巨噬细胞一致
肝 ILS11103 B	-	肝细胞 1+ (gr c) 罕见至偶尔
胰腺 ILS10266	-	-
心脏 Life Legacy 0910035D	-	具有众多 1-3+ (gr c) 的小病灶的心肌细胞, 与脂褐质色素一致
肾 ILS10241 B	-	小管上皮 1+ (gr c) 罕见
膀胱 ILSD8011 J	-	偶尔 2-4+ (gr c) 细胞, 与巨噬细胞一致

细胞/组织	hMAB-A(2I.2) (2.5 µg/ml)	IgG1 阴性对照(2.5 µg/ml)
食蟹猴克隆#1	-	黏膜上皮(鲁米那 m) 2-4+罕见至偶尔, 且 1+罕见至偶尔; 众多 2-3+ (gr c)细胞, 与主要在 LP 内的巨噬细胞一致
食蟹猴肺#1	-	非常罕见 2-4+ (gr c)细胞, 与巨噬细胞一致
食蟹猴肝#1	-	-
[0927] 食蟹猴胰腺#1	-	-
食蟹猴心脏#1	-	-
食蟹猴肾#070368M	-	小管上皮 2+ (gr c)罕见, 且 1+ (gr c)罕见至偶尔
食蟹猴膀胱#1	移行细胞上皮± (gr c)罕见	罕见 1-4+ (gr c)细胞, 与巨噬细胞一致
肺 CA ILS10108	H 记分 150	tu -
肺 CA ILS7223	H 记分 180	tu -
肺 CA ILS2156 A	H 记分 80	tu -
肺 CA ILS7295 A	H 记分 60	tu -

[0928] 还进行IHC研究以评定在12.5µg/mL的浓度(5x最佳染色浓度)下人源化/优化hMAB-A(2I.2)的结合。此研究中采用阳性和阴性对照细胞以及正常人和食蟹猴组织。研究结果概述于表8中。

细胞/组织	hMAB-A(2I.2) (12.5 µg/ml)	IgG1 阴性对照(12.5 µg/ml)
Cho-K 亲代细胞	-	-
Cho-K/huADAM9 中等表达 P:1	2-4+ (gr c > m)偶尔至频繁	-
Cho-K/huADAM9 高表达	3-4+ (gr c > m)偶尔至频繁	-
[0929] Cho-K/cynoADAM9 克隆 2	3-4+ (gr c > m)频繁	-
Cho-K/cynoADAM9 克隆#16	3-4+ (gr c > m)频繁	-
A498 细胞	2-4+ (gr c > m)偶尔至频繁	-
克隆 MG06-CHTN-96 B	上皮± - 1+罕见至偶尔	众多 2-4+ (gr c)细胞, 与测试物品中主要在 LP 内的巨噬细胞和阴性对照一致
肺 MG06-CHtN-162B1 A	肺泡细胞(偏肺细胞) 2-3+ (gr c > m)罕见, 1+ (gr c > m)罕	偶尔散布的 2-4+ (gr c)细胞, 与测试物品中的巨噬细胞和

表 8

细胞/组织	hMAB-A(2I.2) (12.5 µg/ml)	IgG1 阴性对照(12.5 µg/ml)
	见至偶尔; EC 2-4+ (c,m)罕见, 1+ (c,m)罕见	阴性对照一致
肝 ILS11103 B	-	偶尔散布的 2-4+ (gr c)细胞, 与测试物品中的巨噬细胞和阴性对照一致
胰腺 ILS10266	导管上皮 1+ (gr c > m)非常罕见	细胞(偏腺泡细胞) 1+ (gr c)非常罕见; 偶尔散布的 2-4+ (gr c)细胞, 与测试物品中的巨噬细胞和阴性对照一致
心脏 Life Legacy 0910035D	-	在心肌细胞情况下众多小病灶 1-3+颗粒状染色, 与脂褐质色素一致, 与测试物品中的假影和阴性对照一致
肾 ILS10241 B	小管上皮 1+ (gr c)罕见至偶尔	小管上皮± (gr c)罕见
膀胱 ILS8011 J	移行细胞上皮 1+ (gr c)罕见	罕见 2-4+ (gr c)细胞, 与测试物品中的巨噬细胞和阴性对照一致
食蟹猴克隆#1	-	黏膜上皮(鲁米那 m) 2-4+偶尔, 且 1+罕见至偶尔
食蟹猴肺#1	支气管上皮 1+ (gr c > m)罕见至偶尔, 且± (gr c > m)偶尔至频繁	-
食蟹猴肝#1	-	-
食蟹猴胰腺#1	-	-
食蟹猴心脏#1	-	-
食蟹猴肾#070368M	-	小管上皮 1+ (gr c)罕见, 且± (gr c)罕见
食蟹猴膀胱#1	移行细胞上皮 2+ (gr c > m)罕见, 且 1+ (gr c > m)罕见至偶尔	-
肺 CA ILS10108	H 记分 180	tu -
肺 CA ILS7223	H 记分 180	tu -
肺 CA ILS2156 A	H 记分 115	tu -
肺 CA ILS7295 A	H 记分 115	tu -

[0930]

[0931] 进行比较性IHC研究以评定在2.5µg/mL或5µg/mL下hMAB-A (2.2)、hMAB-A (2.3)、hMAB-A (2C.2)及hMAB-A (2I.2)的结合差异。此研究中采用阳性和阴性对照细胞以及正常人和食蟹猴组织。研究结果概述于表9中。

表 9

组织	hMAB-A(2.3) 5 ug/mL	hMAB-A(2.2) 2.5 µg/mL	hMAB-A(2C.2) 2.5 µg/mL	hMAB-A(2I.2) 2.5 µg/mL	同种型对照 5 µg/mL
Cho-K 亲代 P:3	-	-	-	-	-
Cho-K/hu ADAM9.2 中等表达 P:1	1+(c)偶尔	2-4+(gr c > m)罕见, 且 1+(gr c > m) 罕见至偶尔	2-4+(gr c > m) 罕见至偶尔, 且 1+(gr c > m) 罕见至偶尔	2-4+(gr c > m) 罕见至偶 尔, 且 1+(gr c > m)偶尔	-
Cho-K/hu ADAM9.18 高表达 P:1	3+(m,c)频 繁	2-4+(gr c > m)偶尔至频 繁, 且 1+(gr c > m)偶尔	2-4+(gr c > m) 偶尔至频繁, 且 1+(gr c > m)偶尔	2-4+(gr c > m)频繁	-
Cho-K 食蟹 猴#2	1+(c)偶尔	-	3-4+(gr c > m) 频繁	2-4+(gr c > m)频繁	-
Cho-K 食蟹 猴#16	2+(c,m)偶 尔至频繁	2-4+(gr c > m)罕见, 且 1+(gr c > m) 罕见至偶尔	3-4+(gr c > m) 频繁	2-4+(gr c > m)频繁	-
A498 072210	3-4+(c,m) 频繁	2-4+(gr c > m)罕见, 且 1+(gr c > m) 偶尔至频繁	2-4+(gr c > m) 罕见, 且 1+(gr c > m)偶尔	2-4+(gr c > m) 罕见至偶 尔, 且 1+(gr c > m)偶尔至 频繁	-
肺 CA ILS10108	IHC 记分 3	H 记分 55	H 记分 17	H 记分 150	-
肺 CA ILS7223	IHC 记分 3	H 记分 205	H 记分 160	H 记分 180	-
肺 CA ILS2156 A	IHC 记分 1	H 记分 5	H 记分 0	H 记分 80	-
肺 CA ILS7295 A	IHC 记分 1	H 记分 1	H 记分 0	H 记分 60	-

[0932]

[0933] 进行进一步比较性IHC研究以评定在2.5µg/mL、5µg/mL或12.5µg/mL下hMAB-A(2.2)、hMAB-A(2.3)、hMAB-A(2C.2)及hMAB-A(2I.2)以及鼠MAB-A的结合差异。此研究中采用阳性和阴性对照细胞以及正常人和食蟹猴组织。研究结果概述于表10中。

[0934]

表 10

[0935]

组织	hMAB-A(2.3) 5 ug/mL	hMAB-A(2.2) 2.5 ug/mL	hMAB-A(2C. 2) 2.5 ug/mL	hMAB-A(2I. 2) 12.5 ug/ml	MAB-A 5 ug/mL
结肠 MG06-CH TN-96 B	上皮 1+ (c,m)罕见; sm 阴性	-	-	上皮± - 1+罕 见至偶尔	上皮 1-3+ [m, c] (偶尔 至频繁); 其 他(阴性)
肺 MG06-CH tN-162B1 A	肺细胞/巨噬 细胞 2+ (c,m)偶尔	-	-	肺泡细胞(偏 肺细胞) 2-3+ (gr c > m)罕 见, 1+ (gr c > m)罕见至偶 尔; EC 2-4+ (c,m)罕见, 1+ (c,m)罕见	单核细胞 (Monoctye)1 +[c] (罕见至 偶尔); 其他 (阴性)
肝 ILS11103 B	肝细胞 1+ (c)罕见至偶 尔	肝细胞 1+ (gr c)频繁	肝细胞 2+ (gr c)罕见, 且 1+ (gr c)频繁	-	库弗细胞 3+ [c] (偶尔); 其他(阴性)
胰腺 ILS10266	上皮 1+ (c) 罕见; 胰岛细 胞 1+ (c)非常罕见	-	-	导管上皮 1+ (gr c > m)非 常罕见	导管上皮 1-2+ [c, m] (罕见至偶 尔); 原纤维 2+ (罕见); 其 他(阴性)
心脏人生 遗赠 0910035D	±	-	-	-	阴性
肾 ILS10241 B	上皮 2-3+ (c,m)频繁	小管上皮 2+ (gr c)罕见至 偶尔, 且 1+ (gr c)偶尔至 频繁	小管上皮 2+ (gr c)罕见至 偶尔, 且 1+ (gr c)偶尔至 频繁	小管上皮 1+ (gr c)罕见至 偶尔	上皮 1+ [c] (罕见); 其他 (阴性)
膀胱 ILSD8011 J	移行上皮 1+ (c)罕见至偶 尔	-	-	移行细胞上 皮 1+ (gr c)罕 见	移行上皮 2+ [c, m] (偶尔 至频繁); 基 质细胞 3+ [c] (罕见); 其他(阴性)
食蟹猴克 隆#1	上皮 1+ (c,m)罕见	-	-	-	
食蟹猴肺 #1	巨噬细胞及 肺细胞 1+ (c)非常罕见	-	支气管上皮 3-4+ (gr c)罕 见, 2+ (gr c)偶尔, 且	支气管上皮 1+ (gr c > m) 罕见至偶尔, 且± (gr c >	

组织	hMAB-A(2.3) 5 ug/mL	hMAB-A(2.2) 2.5 µg/mL	hMAB-A(2C. 2) 2.5 µg/mL	hMAB-A(2I. 2) 12.5 µg/ml	MAB-A 5 µg/mL
			1+ (gr c)偶尔	m)偶尔至频繁	
食蟹猴肝 #1	肝细胞 1+ (c)频繁	肝细胞 2+ (gr c)罕见至偶 尔, 且 1+ (gr c)罕见至偶尔	肝细胞 2+ (gr c)罕见至偶 尔, 且 1+ (gr c)偶尔; 导管 上皮 1+ (gr c)偶尔	-	
[0936] 食蟹猴胰 腺#1	上皮及胰岛 细胞 1+ (c) 非常罕见	-	胰岛细胞± (gr c)频繁; 导 管上皮 1+ (gr c)罕见至偶尔	-	阳性
食蟹猴心 脏#1	心肌 1+ (c)频繁	-	-	-	
食蟹猴肾 #070368M	上皮 2+ (c) 频繁	小管上皮 2+ (gr c)罕见至 偶尔, 且 1+ (gr c)罕见至 偶尔	小管上皮 2+ (gr c)罕见至 偶尔, 且 1+ (gr c)偶尔至 频繁	-	阳性
食蟹猴膀 胱#1	移行上皮± (c); 巨噬细 胞非常罕见	-	移行细胞上 皮 2-3+ (gr c > m)罕见, 且 1+ (gr c > m)偶 尔	移行细胞上 皮 2+ (gr c > m)罕见, 且 1+ (gr c > m)罕 见至偶尔	

[0937] 因此,结果说明,hMAB-A(2.2)展现出在最佳浓度下人肝细胞和肾小管的总体低水平染色,在阴性对照中观察到肝细胞和肾小管中较低染色强度/反应性频率。hMAB-A(2.2)展现出在最佳浓度下类似的食蟹猴肝细胞和肾小管的低水平染色,在阴性对照中观察到肾小管中较低染色强度/反应性频率。

[0938] 结果还说明,hMAB-A(2C.2)展现出在最佳浓度下人肝细胞和肾小管的总体低水平染色,在阴性对照中观察到肝细胞和肾小管中较低染色强度/反应性频率。hMAB-A(2C.2)展现出在最佳浓度下类似的在食蟹猴肝细胞和肾小管中的低水平染色。相应人组织中未观察到hMAB-A(2C.2)在食蟹猴肺上皮、胰岛/上皮及膀胱上皮中的另外最小实验值;阴性对照中在肺上皮、肾小管、膀胱上皮中观察到较低染色强度/反应性频率。结果还说明,hMAB-A(2I.2)展现在最佳浓度下无人或食蟹猴组织的染色,+/-膀胱移行细胞上皮染色罕见。hMAB-A(2I.2)还展现出在5x最佳浓度下人肺泡细胞、胰腺导管上皮、肾小管、膀胱移行细胞上皮的总体低水平和频率染色,以及在5x最佳浓度下食蟹猴支气管上皮及膀胱移行细胞上皮的总体低水平染色。hMAB-A(2I.2)展现出所测试的人正常组织的总体有利的IHC概况及

相应食蟹猴组织的类似概况。

[0939] 实施例6

[0940] 包含变体Fc区的hMAB-A (2I.2)

[0941] hMAB-A (2I.2) 包含具有 κ 轻链恒定区的轻链 (SEQ ID NO:68) 和具有野生型IgG重链恒定区的重链 (SEQ ID NO:52)。通过将以下取代引入Fc区中来产生Fc变体:L234A/L235A (参见,例如SEQ ID NO:78),其命名为hMAB-A (2I.2) (AA);S442C (参见,例如SEQ ID NO:79),其命名为hMAB-A (2I.2) (C);及L234A/L235A/S442C (参见,例如SEQ ID NO:80),其命名为hMAB-A (2I.2) (AA/C)。通过ELISA测定检查各Fc变体与huADAM9-His和cynoADAM9-His的结合。简单说来,使用结合至含组氨酸的肽且已包被于微量滴定板上的抗体捕获His肽标记的可溶性cynoADAM9或His肽标记的可溶性huADAM9 (0.5 μ g/mL),且检查亲代hMAB-A (2.2) 和Fc变体的连续稀释液的结合。结合曲线huADAM9和cynoADAM9分别呈现于图5A和图5B中,且显示各Fc变体保留具有野生型Fc区的hMAB-A (2I.2) 的结合亲和力。

[0942] 实施例7

[0943] 靶表达分析

[0944] 为了评估在不同适应症中的ADAM9表达,首先使用ImmunoGen开发的ADAM9 IHC测定评估具有20种不同肿瘤类型之组织微阵列 (TMA) 以用于初步研究用途。

[0945] 所有分析样品都为FFPE (福尔马林固定及石蜡包埋) 样品。500个核心20种癌TMA是购自Folio Biosciences (目录号ARY-HH0212)。具有80个腺癌核心及80个鳞状细胞癌核心的NSCLC TMA是购自US Biomax (目录号LC1921A)。具有80个腺癌核心的结肠直肠癌TMA是购自Pantomics Inc. (目录号COC1261)。胃癌样品是购自Avaden Biosciences。

[0946] 使用Ventana Discovery Ultra自动染色仪进行ADAM9的免疫组织化学染色。ADAM9的第一抗体为可商购获得的兔单克隆抗体。由受过记分算法训练的委员会认证的病理学家对所有样品进行评估并记分。记分需要存在至少100个有活力的肿瘤细胞。以0至3的半定量整数标度对染色强度进行记分,0表示无染色,1表示弱染色,2表示中等,且3表示强染色。记录在各强度水平下阳性染色的细胞的百分比。记分是基于Adam9仅在细胞膜上的定位,且评估是基于在细胞质和膜上的定位。通过H记分对染色结果进行分析,H记分将染色强度的分量与阳性细胞的百分比组合。其具有介于0与300之间的值,且定义为:

[0947] 1*(以1+强度染色的细胞的百分比)

[0948] +2*(以2+强度染色的细胞的百分比)

[0949] +3*(以3+强度染色的细胞的百分比)

[0950] =H记分。

[0951] 对于各肿瘤类型,将具有5个正常组织对照的500个核心20种癌TMA染色且以两种不同的方式记分:(1) 单独基于膜染色或(2) 基于膜和细胞质染色。下表11和图6A概述了针对所有二十种适应症的基于膜染色的ADAM9的盛行率,且表12和图6B概述了针对八种所选适应症的膜和细胞质染色的结果。

[0952] 基于多发性癌TMA的结果,选择三种适应症以用于扩大的盛行率分析:非小细胞肺癌 (NSCLC)、结肠直肠癌 (CRC) 及胃癌。对于NSCLC,对一种具有80个腺癌核心和80个鳞状细胞癌核心的TMA进行染色并评估。对于CRC,分析一种具有80个腺癌核心的TMA,所述80个腺癌核心中有78个腺癌核心为可评估的。对于胃癌,分析腺癌的15个全组织切片。对所有这些

样品的膜和细胞质染色进行记分,且结果概述于表13中。这些初步研究的结果显示,ADAM9在多种多样的实体瘤中表达,并且支持抗ADAM9药物缀合物在许多不同的表达ADAM9的实体瘤中的使用。

[0953] 表11:基于膜染色的20种不同适应症中ADAM9的盛行率

肿瘤类型	阳性% (H 记分 \geq 1)	H 记分: 1-100	H 记分: 101-200
胰腺(n=17)	95%	24%	71%
子宫(n=18)	89%	67%	22%
甲状腺(n=17)	88%	88%	0%
肾(n=17)	88%	59%	29%
睾丸(n=17)	83%	65%	18%
前列腺(n=20)	80%	45%	35%
结肠(n=16)	76%	38%	38%
膀胱(n=16)	76%	63%	13%
乳房(n=20)	75%	65%	10%
脑(n=19)	68%	63%	5%
胃(n=17)	59%	24%	35%
肺(n=19)	58%	58%	0%
食道(n=19)	43%	32%	11%
子宫颈(n=20)	40%	40%	0%
卵巢(n=18)	39%	33%	6%
头颈(n=20)	35%	30%	2%
肝(n=19)	32%	32%	0%
皮肤(n=20)	10%	10%	0%
软组织(n=20)	0%	0%	0%
淋巴瘤(n=20)	0%	0%	0%

[0955] 表12:基于膜和细胞质染色的8种所选适应症中ADAM9的盛行率

肿瘤类型	阳性% (H 记分 \geq 1)	H 记分: 1-100	H 记分: 101-200	H 记分: 201-300
结肠	100%	31%	63%	6%
肺	100%	58%	42%	0%
胰腺	100%	18%	76%	6%
前列腺	95%	25%	55%	15%
食道	95%	58%	37%	0%
胃	94%	18%	71%	6%
乳房	70%	50%	20%	0%
卵巢	61%	44%	17%	0%

[0957] 表13:基于膜和细胞质染色的另外的NSCLC、CRC及胃癌样品中ADAM9的盛行率

	肿瘤类型	样品数目	阳性% (H 记 分 ≥ 1)	H-记分分布		
				1-100	101-200	201-300
[0958]	NSCLC 腺癌	80	90%	46%	39%	5%
	NSCLC 鳞状	80	81%	65%	13%	3%
	CRC 腺癌	78	91%	51%	41%	0%
	胃腺癌	15	100%	27%	53%	20%

[0959] 实施例8

[0960] 抗ADAM9抗体内化研究

[0961] 为了评定本发明的抗ADAM9抗体的内化,对缀合至Alexa Fluor488的hMAB-A (2.2)、hMAB-A (2I.2) 及hMAB-A (2I.2) -S442C抗体进行基于流式细胞术的内化实验。

[0962] 根据制造商说明书(Thermofisher),使用Alexa Fluor 488四氟苯基酯产生hMAB-A (2.2)、hMAB-A (2I.2)、hMAB-A (2I.2) -S442C的抗ADAM9 Alexa488抗体缀合物。在不含叠氮化钠的PBS (pH7.2) 中洗脱缀合物以实现内化测定。由280nm和494nm处的吸收测量值计算标记的浓度和程度。进行FACS结合测定以确保Alexa488-标记不会不利地影响靶结合。

[0963] 在连续和脉冲暴露于荧光缀合物之后测定抗ADAM9-Alexa488缀合物的内化。对于连续实验,在冰上或在37°C下用饱和浓度的指示的Alexa488标记的抗体处理NCI-H1703细胞达整个指示的时间。而对于脉冲实验,使抗ADAM9-Alexa488缀合物预先结合至冰上的细胞,且将过量缀合物洗去,之后转移至37°C并监测内化。在连续或脉冲暴露后指示的时间点,用维耳新(Thermofisher)使细胞提升,并用冰冷的PBS洗涤两次,且将重复孔重悬浮于不具有(未淬灭样品)或具有300nM抗A488抗体(淬灭样品)的冰冷PBS中。将所有样品在冰上培育30m。接着使细胞成团,在1%多聚甲醛中固定且通过流式细胞术分析。在冰上培育30分钟且接着与抗Alexa488抗体一起培育的细胞的荧光表示不可淬灭的荧光级分,且从所有其他样品中减去,之后计算内化。将内化百分比计算为针对不完全表面淬灭进行校正的淬灭样品的荧光(细胞内荧光)除以未淬灭细胞的荧光(总荧光)。对抗ADAM9抗体缀合物的内化进行作图,且使用单相指数衰变方程(GraphPad Prism,5.01版)对数据进行拟合。

[0964] 在NCI-H1703细胞中进行脉冲和连续处理之后,评估表面结合的Alexa488标记的抗ADAM9抗体的内化。所测试的所有三种抗ADAM9-Alexa488缀合物显示快速内化,约39%缀合物在第一个15分钟内内化,且总计约77%缀合物在6小时后内化(图7A)。有趣的是,在连续暴露24小时之后,内化的荧光信号为30分钟后结合至细胞表面的总初始荧光信号的约7倍大(图7B)。因此,ADAM9很可能在37°C下的培育期间自细胞内池补充在细胞表面,允许多轮的抗ADAM9抗体缀合物内化。抗ADAM9免疫缀合物的功效依赖于免疫缀合物的内化、细胞内运输(intracellular trafficking)及降解。抗ADAM9免疫缀合物的效力可部分通过抗ADAM9免疫缀合物的高度内化来解释,高度内化可能引起产生大量的细胞毒性分解代谢物。

[0965] 实施例9

[0966] 抗ADAM9抗体细胞加工研究

[0967] 为了评定chMAB-A的细胞上结合、摄取及溶酶体降解,使用先前描述的³H-丙酰胺标记的抗体加工方法(Lai等人,Pharm Res.2015年11月;32(11):3593-603)。使用此方法,用氘化丙酸盐经由赖氨酸残基对靶向ADAM9的chMAB-A抗体进行示踪标记。先前已显示,在

细胞结合、摄取及向溶酶体运输时, [³H] 丙酸盐标记的Ab (³H-Ab) 降解, 且赖氨酸- [³H] 丙酰胺释放到细胞生长培养基中。添加有机溶剂使完整的标记的抗体沉淀, 且在溶液中留下赖氨酸- [³H] 丙酰胺, 允许方便且精确地测量抗体加工的程度。

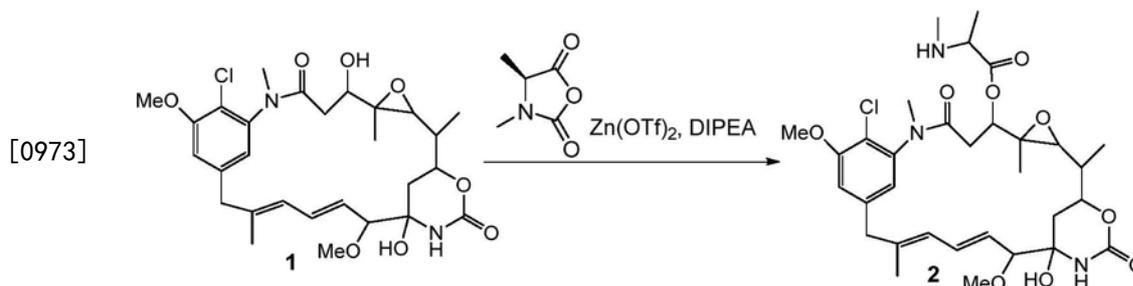
[0968] 如先前所述, 用 [³H] - 丙酸盐标记chMAB-A。在经由结合曲线判定抗原饱和后, 用10nM ³H-chMAB-A抗体处理NSCLC株NCI-H1703和CRC株DLD-1。将一些细胞样品用非靶向的氟化同种型对照抗体³H-chKTI处理, 而其他细胞样品未经处理。将细胞铺板于6孔板中并生长过夜, 且接着如先前所述用一(或多)种试剂进行脉冲处理。简单说来, 将细胞与³H-chMAB-A抗体或³H-chKTI一起培育20分钟, 之后在新鲜培养基中洗涤3次。在37°C下, 在5% CO₂下培育细胞过夜。培育20-24小时之后, 收获细胞且用体积4:3的丙酮: 培养基/细胞混合物使蛋白质沉淀。在-80°C下将样品冷冻最少1小时, 之后解冻且通过离心来分离。处理沉淀以使蛋白质溶解, 之后在Tri-Carb液体闪烁计数器(LSC)中计数5分钟。按照制造商方案, 将1mL的SOLVABLE(Perkin Elmer)添加到各沉淀样品中, 且在50°C水浴中培育过夜。将样品从水浴中移除, 转移至20mL玻璃闪烁小瓶中, 且将EDTA和H₂O₂添加到样品中, 随后再进行1小时的50°C培育。用HCl使样品淬灭, 添加15mL的Optima Gold液体闪烁液(Perkin Elmer), 且将样品充分地涡旋。将样品在黑暗中保持最少4小时, 之后通过LSC进行计数。将不含蛋白质的丙酮提取物样品在真空下干燥至<1mL体积, 且如上文所述使用Solvable加工, 之后进行LSC。由所得样品CPM值计算结合的、降解的及完整的标记抗体之量。

[0969] 在脉冲处理且在37°C下培育过夜之后测定³H-chMAB-A抗体的加工水平。NCI-H1703细胞显示出在24小时内93%的³H-chMAB-A被加工, 且DLD-1细胞显示出在同一时间周期内92%的³H-chMAB-A被加工。³H-chKTI的结合和加工可忽略(总CPM低于靶向抗体的CPM>100倍)。这些细胞系的加工值较高, 尤其是相较于先前针对支持本发明抗ADAM9抗体作为作为有效药物缀合物的其他ADC标靶/抗体报道的24小时脉冲加工值亦然。

[0970] 实施例10.

[0971] 本发明的美登木素生物碱衍生物的合成

[0972] 实施例10a. 制备DM-H(7) 储备溶液



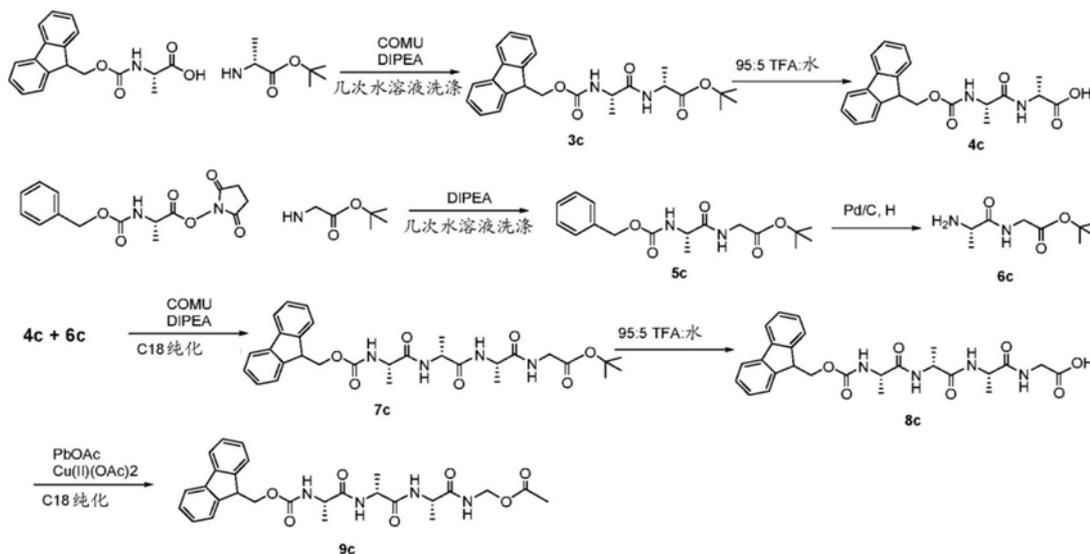
[0974] 将美登木醇(5.0g, 8.85mmol)溶于无水DMF(125mL)中, 然后在冰浴中冷却。然后在氩气气氛下, 在磁力搅拌下添加N-甲基丙氨酸的N-羧酸酐(5.7g, 44.25mmol)、无水DIPEA(7.70mL, 44.25mmol)及三氟甲烷磺酸锌(22.5g, 62mmol)。移除冰浴并且允许在搅拌下对反应加温。16h之后, 添加去离子水(10mL)。30min之后, 在强烈搅拌下添加1:1饱和碳酸氢钠水溶液: 饱和氯化钠水溶液(190mL)和乙酸乙酯(250mL)。将混合物转移到分液漏斗中, 并保留有机层。用乙酸乙酯(100mL)萃取水层, 然后合并有机层, 并用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤。通过在不加热蒸发器浴的情况下在真空下通过旋转蒸发将有机层浓缩至其体积的约1/4, 不进行纯化。通过将反应中使用的美登木醇的毫摩尔数(1.77mmol)除以体积(150mL), 得

到DM-H储备溶液(0.06mmol/mL),来估计溶液的浓度。立即分配等量的储备溶液,随后用于反应中或储存在-80C冰箱中,然后在需要时解冻。

[0975] 实施例10b. 硫肽-美登木素生物碱的合成

[0976] 1. FMoc-肽-NH-CH₂-OAc化合物(化合物9a-j)

[0977] FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-OAc (9c) 的合成:



[0978]

[0979] 步骤1: FMoc-L-Ala-D-Ala-OtBu (3c):

[0980] 将FMoc-L-丙氨酸(10g, 32.1mmol)和D-Ala-OtBu, HCl (7.00g, 38.5mmol)溶于CH₂Cl₂(100ml)中,用COMU(20.63g, 48.2mmol)和DIPEA(11.22ml, 64.2mmol)处理。允许反应在室温下在氩气下继续进行。2小时之后,反应通过UPLC显示已完成,用2-MeTHF(50ml)稀释,用10%柠檬酸水溶液(2x 100mL)、水(100mL)、接着盐水(100mL)洗涤。将有机层经硫酸镁干燥,过滤并浓缩以产生粗制的FMoc-L-Ala-D-Ala-OtBu,假设100%产率。

[0981] 步骤2: FMoc-L-Ala-D-Ala (4c)

[0982] 将FMoc-L-Ala-D-Ala-OtBu (11.25g, 25.7mmol)用TFA:水(95:5)(50ml)处理。允许反应在室温下在氩气气氛下继续进行。4小时之后,反应通过UPLC显示已完成,用甲苯(25mL)稀释并共蒸发3次以产生FMoc-L-Ala-D-Ala,假设100%产率。

[0983] 步骤3: FMoc-L-Ala-Gly-OtBu (5c)

[0984] 将Z-L-Ala-ONHS(10g, 31.2mmol)和甘氨酸叔丁酯(6.28g, 37.5mmol)溶于CH₂Cl₂(100ml)中,用DIPEA(10.91ml, 62.4mmol)处理。允许反应在室温下在氩气下继续进行。2小时之后,UPLC显示已完成,将反应用2-MeTHF(50mL)稀释,用10%柠檬酸水溶液(100mL)、饱和碳酸氢钠(2x100 mL)、水(100mL)、盐水(100mL)洗涤。将有机层经硫酸镁干燥,过滤并浓缩以产生Z-L-Ala-Gly-OtBu,假设100%产率。

[0985] 步骤4: L-Ala-Gly-OtBu (6c)

[0986] 将Z-Ala-Gly-OtBu(10.05g, 29.9mmol)溶于95:5MeOH:水(50ml)中,转移至加氢反应器烧瓶中,用Pd/C(1.272g, 11.95mmol)处理。将加氢反应器烧瓶置于振荡器上,利用真空移除空气,同时振荡烧瓶。用氢气填充烧瓶至30psi,振荡烧瓶2分钟并利用真空移除氢气。再重复此操作2次。允许用氢气填充烧瓶至30psi并允许振荡。4小时之后,UPLC显示已完成,将反应经由硅藻土塞过滤,真空处理,再溶解于2-MeTHF中,浓缩以产生L-Ala-Gly-OtBu,假

设100%产率。

[0987] 步骤5:FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OtBu (7c)

[0988] 将FMoc-LAla-D-ALa-OH (0.959g, 2.508mmol) 和L-Ala-Gly-OtBu (0.718g, 3.01mmol) 溶于CH₂Cl₂ (10ml) 中,用COMU (1.181g, 2.76mmol) 和DIPEA (0.876ml, 5.02mmol) 处理。允许反应在室温下在氩气下继续进行。2小时之后,反应显示完成。将反应浓缩以除去CH₂Cl₂,再溶解于2mL DMF中并通过C18 combiflash,使用线性梯度进行纯化,将产物合并以产生FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OtBu (660mg, 46%产率)。

[0989] 步骤6.FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OH (8c)

[0990] 将FMoc-LAla-DAla-LAla-GlyOtBu (200mg, 0.353mmol) 用TFA:水 (95:5) (2ml) 处理。允许反应在室温下在氩气下继续进行。1小时之后,通过UPLC显示反应已完成。将粗产物用甲苯 (1mL) 稀释,与甲苯共蒸发2次以产生FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OH,假设100%产率。

[0991] 步骤7.FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH₂-OAc (9c)

[0992] 将FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Gly-OH (2.65g, 5.19mmol) 溶于DMF (20mL) 中,用乙酸铜(II) (0.094g, 0.519mmol) 和乙酸 (0.446ml, 7.79mmol) 处理,一旦所有试剂均溶解,则用四乙酸铅 (3.45g, 7.785mmol) 处理反应。允许反应在60°C下在氩气下继续进行30分钟。将粗反应物经由Combiflash Rf 200i,使用C18 450g柱,用含有0.1%甲酸和乙腈作为溶剂的去离子水,以125mL/min的流率,使用如下梯度(时间以分钟计,乙腈百分比) (0,5) (8,50) (26,55) 进行纯化。所需产物具有11分钟的滞留时间,将产物级分立即冷冻并冻干以产生FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH₂-OAc (843mg, 1.607mmol, 31.0%产率)。HRMS (M+Na)⁺计算值:547.2163,实测值:547.2167。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ1.23 (dd, J=12.5, 7.4Hz, 9H), 1.95 (s, 2H), 4.00-4.13 (m, 1H), 4.17-4.38 (m, 6H), 5.06 (q, J=8.8Hz, 2H), 7.33 (t, J=7.3Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.62 (d, J=6.8Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.6Hz, 2H), 7.85-8.01 (m, 3H), 8.21 (d, J=7.0Hz, 1H), 8.69 (d, J=6.9Hz, 1H)。

[0993] 如图9A所示且如上针对FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-OAc (9c) 所例示来制备FMoc-肽-NH-CH₂-OAc型的下列化合物。

[0994] FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-OAc (9a):将FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-Gly-OH (SEQ ID NO:163) (500mg, 0.979mmol) 溶于DMF (2mL) 中,在氩气下,在磁力搅拌下向其中添加乙酸铜(II) (17.8mg, 0.098mmol) 和乙酸 (84μL, 1.47mmol)。一旦固体溶解,便添加四乙酸铅 (434mg, 0.979mmol)。允许反应在60°C下继续进行20min,然后在C18, 30微米450g柱筒上纯化,用含有0.1%甲酸和5%至55%线性乙腈梯度的去离子水经26min以125mL/min的流率洗脱。将含有纯的所需产物的级分冷冻并冻干以得到178mg (34%产率) 白色固体。HRMS (M+Na)⁺计算值:547.2163;实测值:547.2160。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ1.20 (qd, J=7.5, 6.9, 4.2Hz, 9H), 1.91-2.05 (m, 3H), 3.26-3.38 (m, 1H), 4.05 (q, J=7.3Hz, 1H), 4.23 (td, J=11.9, 10.7, 6.4Hz, 5H), 5.07 (ddd, J=11.2, 6.9, 4.3Hz, 2H), 7.32 (q, J=7.5Hz, 2H), 7.41 (q, J=7.4Hz, 2H), 7.52 (t, J=6.8Hz, 1H), 7.71 (q, J=7.5, 7.0Hz, 2H), 7.82-8.08 (m, 4H), 8.84 (q, J=7.1Hz, 1H)。

[0995] FMoc-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-OAc (9b):HRMS (M+Na)⁺计算值:547.2163,实测值:547.2167。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ1.23 (dd, J=12.5, 7.4Hz, 9H), 1.95 (s, 2H), 4.00-

4.13 (m, 1H), 4.17-4.38 (m, 6H), 5.06 (q, J=8.8Hz, 2H), 7.33 (t, J=7.3Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.62 (d, J=6.8Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.6Hz, 2H), 7.85-8.01 (m, 3H), 8.21 (d, J=7.0Hz, 1H), 8.69 (d, J=6.9Hz, 1H)。

[0996] FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-OAc (9d): HRMS (M+Na)⁺ 计算值: 547.2163, 实测值: 547.2167。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.18-1.25 (m, 9H), 1.97 (s, 3H), 3.96-4.15 (m, 1H), 4.17-4.36 (m, 5H), 5.09 (d, J=6.9Hz, 2H), 7.34 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.57 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.71 (d, J=7.3Hz, 2H), 7.90 (d, J=7.5Hz, 2H), 8.07 (s, 2H), 8.86 (s, 1H)。

[0997] FMoc-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-OAc (9f): HRMS (M+Na)⁺ 计算值: 476.1792, 实测值: 476.1786。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.13 (dd, J=7.1, 1.4Hz, 6H), 1.89 (s, 3H), 3.99 (q, J=7.1Hz, 1H), 4.10-4.29 (m, 4H), 4.95-5.08 (m, 2H), 7.26 (t, J=7.4, 1.3Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.49 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.66 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.82 (d, J=7.5Hz, 2H), 8.11 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.76 (t, J=7.0Hz, 1H)。

[0998] FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-OAc (9g): HRMS (M+Na)⁺ 计算值: 476.1792, 实测值: 476.1788。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.21 (dd, J=7.1, 1.4Hz, 6H), 1.96 (s, 3H), 4.08 (t, J=7.1Hz, 1H), 4.17-4.36 (m, 4H), 5.05-5.14 (m, 2H), 7.26-7.38 (m, 2H), 7.42 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.56 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.73 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.90 (d, J=7.6Hz, 2H), 8.18 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.83 (t, J=6.9Hz, 1H)。

[0999] FMoc-D-Ala-D-Ala-NH-CH₂-OAc (9h): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 455.4877, 实测值: 455.2051。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.14 (dd, J=7.1, 3.3Hz, 6H), 1.21 (d, J=7.2Hz, 1H), 1.81 (s, 1H), 1.91 (s, 2H), 4.01 (q, J=7.7Hz, 1H), 4.09-4.27 (m, 5H), 4.95-5.10 (m, 1H), 7.26 (td, J=7.4, 1.2Hz, 3H), 7.35 (t, J=7.4Hz, 3H), 7.45 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.65 (t, J=7.1Hz, 3H), 7.82 (d, J=6.4Hz, 2H), 7.96 (d, J=7.4Hz, 1H), 8.78 (t, J=7.0Hz, 1H)。

[1000] 2.FMoc-肽-COOH化合物(化合物10a-10j)

[1001] 如图9A所示且如由FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H所例示制备FMoc-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂H型的化合物。

[1002] FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H (10a): 将6-巯基己酸(287μL, 2.07mmol)溶于1:4TFA:二氯甲烷的溶液(5mL)中,然后添加至含有FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-OAc(178mg, 0.339mmol)的小瓶中。允许反应在室温下在氩气气氛下在磁力搅拌下继续进行20min。将粗物质在真空下浓缩,再溶解于最小体积的DMF中并在C18, 30微米, 30g筒上纯化,用含有0.1%甲酸和5%至95%乙腈线性梯度的去离子水经13min以35mL/min洗脱。将含有纯的所需产物的级分冷冻并冻干以得到200mg(96%产率)白色固体。HRMS (M+H)⁺ 计算值: 613.2690; 实测值: 613.2686。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.20 (dt, J=7.1, 4.9Hz, 10H), 1.31 (tt, J=10.1, 6.0Hz, 2H), 1.49 (dq, J=12.5, 7.4Hz, 4H), 2.18 (t, J=7.3Hz, 2H), 4.05 (t, J=7.3Hz, 1H), 4.16-4.30 (m, 7H), 7.33 (td, J=7.4, 1.2Hz, 2H), 7.42 (td, J=7.3, 1.1Hz, 2H), 7.54 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.72 (t, J=7.0Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.94-8.07 (m, 2H), 8.44 (t, J=6.1Hz, 1H)。

[1003] FMoc-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H (10b): HRMS (M+Na)⁺ 计算值: 635.2510, 实测值: 635.2515。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.15 (d, J=6.8Hz, 3H), 1.18-1.25

(m, 10H), 2.18 (q, J=7.5Hz, 4H), 2.40-2.48 (m, 1H), 2.70 (t, J=7.2Hz, 1H), 4.15-4.30 (m, 6H), 6.29 (s, 2H), 7.34 (q, J=7.3Hz, 3H), 7.42 (t, J=7.4Hz, 3H), 7.63-7.78 (m, 1H), 7.85 (d, J=7.3Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 3H), 8.37-8.46 (m, 1H)。

[1004] FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H(10c): HRMS (M+Na)⁺计算值: 635.2510, 实测值: 635.2514。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.18-1.23 (m, 10H), 1.34 (q, J=3.4Hz, 5H), 2.24 (s, 2H), 2.44 (s, 2H), 4.05 (t, J=7.1Hz, 1H), 4.16-4.35 (m, 8H), 7.33 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.58 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.4Hz, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.98 (d, J=7.5Hz, 1H), 8.15 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.39 (t, J=6.2Hz, 1H), 11.98 (s, 1H)。

[1005] FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H(10d): HRMS (M+Na)⁺计算值: 635.2510, 实测值: 635.2510。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.15 (d, J=6.9Hz, 3H), 1.21 (d, J=7.1Hz, 9H), 1.28-1.38 (m, 3H), 1.44-1.60 (m, 5H), 2.13-2.22 (m, 3H), 3.33 (q, J=6.9Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 6.29 (s, 2H), 7.29-7.40 (m, 3H), 7.38-7.47 (m, 3H), 7.85 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 8.26 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.48 (d, J=6.2Hz, 1H)。

[1006] FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H(10g): HRMS (M+H)⁺计算值: 542.2319, 实测值: 542.2316。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.13 (dd, J=7.1, 1.7Hz, 6H), 1.16-1.25 (m, 2H), 1.32-1.47 (m, 4H), 2.08 (t, J=7.3Hz, 2H), 3.25 (s, 2H), 3.99 (p, J=7.0Hz, 1H), 4.07-4.27 (m, 6H), 7.26 (t, J=7.4, 1.2Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.52 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.65 (t, J=7.3Hz, 2H), 7.82 (d, J=7.5Hz, 2H), 8.08 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.27 (t, J=6.2Hz, 1H), 11.82 (s, 1H)。

[1007] FMoc-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H(10f): HRMS (M+H)⁺计算值: 542.2319, 实测值: 542.2321。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.13 (dd, J=7.1, 1.8Hz, 7H), 1.17-1.26 (m, 2H), 1.32-1.48 (m, 5H), 2.08 (t, J=7.3Hz, 2H), 3.99 (p, J=7.1Hz, 1H), 4.07-4.26 (m, 7H), 7.26 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.53 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.65 (t, J=7.3Hz, 2H), 7.82 (d, J=7.4Hz, 2H), 8.10 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.28 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1008] FMoc-D-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO₂H(10h): (16.7mg, 0.031mmol, 70%产率)。HRMS (M+H)⁺计算值: 542.2319, 实测值: 542.2318。

[1009] FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₃-CO₂H(10j): HRMS (M+H)⁺计算值: 585.2377, 实测值: 585.2367。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.14-1.26 (m, 9H), 1.75 (p, J=7.3Hz, 2H), 2.27 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.54 (d, J=7.7Hz, 2H), 3.97-4.10 (m, 1H), 4.13-4.34 (m, 7H), 7.33 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.42 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.57 (d, J=6.9Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.4Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.97 (d, J=7.5Hz, 1H), 8.14 (d, J=7.0Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 12.06 (s, 1H)。

[1010] FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₂-CO₂H(10i): HRMS (M+H)⁺计算值: 500.1850, 实测值: 500.1843。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.20 (dd, J=7.2, 1.9Hz, 6H), 2.53 (d, J=7.1Hz, 2H), 2.70 (t, J=7.1Hz, 2H), 4.07 (q, J=7.0Hz, 1H), 4.17-4.26 (m, 4H), 4.29 (d, J=6.8Hz, 2H), 7.33 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.41 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.56 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.72 (t, J=7.7Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 8.14 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.42 (t, J=6.3Hz, 1H), 12.22 (s, 1H)。

[1011] 3.FMoc-肽-May-NMA化合物(化合物11a-11j)

[1012] 如图9A所示且如由FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM所例示制备FMoc-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM型的化合物。

[1013] FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(11a):向DM-H储备溶液(8.2mL,0.49mmol)中添加FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-COOH(300mg,0.49mmol)、EDC(94mg,0.490mmol)和DIPEA(90μL,0.49mmol)。允许反应在室温下在氩气气氛下在磁力搅拌下继续进行2h。将粗物质在真空下通过旋转蒸发来浓缩并且将残余物溶解于最小体积的DMF中,然后在C18,30微米,30g筒上纯化,用含有0.1%甲酸和5%至50%乙腈线性梯度的去离子水经25min洗脱。将含有纯的所需产物的级分冷冻并冻干以得到151mg(37.2%产率)白色固体。HRMS(M+Na)⁺计算值:1266.5170;实测值:1266.5141。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.77(s,3H),1.12(d,J=6.4Hz,3H),1.14-1.22(m,12H),1.22-1.30(m,3H),1.35-1.49(m,4H),1.50-1.55(m,1H),1.59(s,3H),2.00-2.07(m,1H),2.14(ddd,J=15.6,8.7,5.9Hz,1H),2.40(dtd,J=17.0,7.9,7.0,4.9Hz,3H),2.69(s,3H),2.79(d,J=9.6Hz,1H),3.08(s,3H),3.20(d,J=12.6Hz,1H),3.24(s,3H),3.43(d,J=12.4Hz,2H),3.48(d,J=8.9Hz,1H),3.92(s,3H),4.08(ddd,J=20.8,10.8,5.0Hz,3H),4.14-4.24(m,4H),4.26(d,J=6.0Hz,3H),4.52(dd,J=12.0,2.8Hz,1H),5.34(q,J=6.7Hz,1H),5.56(dd,J=14.7,9.0Hz,1H),5.91(s,1H),6.50-6.66(m,3H),6.88(s,1H),7.17(d,J=1.8Hz,1H),7.33(td,J=7.5,1.2Hz,2H),7.41(t,J=7.4Hz,2H),7.53(d,J=7.4Hz,1H),7.72(t,J=7.0Hz,2H),7.89(d,J=7.5Hz,3H),7.99(d,J=7.3Hz,1H),8.36(t,J=6.3Hz,1H)。

[1014] FMoc-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(11b):HRMS(M+Na)⁺计算值:1266.5170,实测值:1266.5164。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.78(s,3H),1.14(dd,J=14.6,6.5Hz,6H),1.22(t,J=6.8Hz,10H),1.33-1.57(m,4H),1.59(s,3H),2.04(d,J=13.5Hz,1H),2.27-2.44(m,1H),2.69(s,3H),2.80(d,J=9.7Hz,1H),3.08(s,3H),3.14-3.28(m,5H),3.37-3.55(m,3H),3.92(s,3H),3.98-4.16(m,3H),4.20(dd,J=15.6,7.6Hz,7H),4.52(d,J=12.7Hz,1H),5.34(d,J=6.9Hz,1H),5.57(dd,J=14.7,9.0Hz,1H),5.92(s,1H),6.46-6.72(m,4H),6.88(s,1H),7.17(s,1H),7.33(t,J=7.5Hz,3H),7.41(t,J=7.4Hz,3H),7.60-7.75(m,4H),7.80-7.93(m,4H),8.12(t,1H),8.29(d,J=6.9Hz,1H)。

[1015] FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(11c):HRMS(M+Na)⁺计算值:1266.5170,实测值:1266.5170。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.71(s,3H),0.96-1.16(m,10H),1.16-1.51(m,10H),1.52(s,4H),1.82-2.16(m,1H),2.17-2.56(m,11H),2.62(d,J=5.8Hz,4H),2.68-2.87(m,3H),2.92-3.04(m,4H),3.09-3.22(m,7H),3.24(d,J=7.4Hz,1H),3.33-3.50(m,2H),3.73-3.89(m,4H),3.92-4.07(m,2H),4.07-4.25(m,2H),4.45(dd,J=12.0,2.8Hz,1H),5.27(q,J=6.7Hz,1H),5.40-5.55(m,1H),5.85(s,1H),6.33-6.66(m,4H),6.81(s,2H),7.03-7.19(m,1H),7.19-7.43(m,2H),7.62(d,J=11.6Hz,1H),7.73-7.85(m,1H)。

[1016] FMoc-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(11d):HRMS(M+Na)⁺计算值:1266.5170,实测值:1266.5158。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.78(s,3H),1.06-1.33(m,16H),1.44(d,J=10.3Hz,11H),1.59(s,3H),1.99-2.22(m,3H),2.35-2.45(m,2H),2.55(d,J=1.8Hz,1H),2.69(s,3H),2.80(d,J=9.6Hz,1H),3.08(s,2H),3.25(s,3H),3.39-3.52

(m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.99-4.40 (m, 4H), 4.52 (d, J=11.1Hz, 1H), 5.34 (d, J=6.8Hz, 1H), 5.57 (dd, J=14.5, 9.2Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 6.53-6.64 (m, 2H), 6.88 (s, 2H), 7.17 (d, J=1.9Hz, 1H), 7.33 (t, J=7.3Hz, 3H), 7.42 (t, J=7.4Hz, 3H), 7.57 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.72 (s, 3H), 7.89 (d, J=7.6Hz, 3H), 7.99 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.35 (s, 1H)。

[1017] FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (11g): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1173.4980, 实测值: 1173.4964。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.79 (s, 3H), 1.06-1.34 (m, 13H), 1.36-1.54 (m, 4H), 1.60 (s, 2H), 1.88-2.10 (m, 1H), 2.10-2.23 (m, 1H), 2.31-2.51 (m, 13H), 2.71 (s, 3H), 2.80 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.26 (s, 4H), 3.33-3.66 (m, 3H), 3.98-4.32 (m, 4H), 4.53 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.35 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.49-5.65 (m, 1H), 6.51-6.67 (m, 3H), 6.89 (s, 1H), 7.19 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.25 (s, 2H), 8.34 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.58 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1018] FMoc-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (11f): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1173.4980, 实测值: 1173.4969。

[1019] FMoc-D-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (11h): HRMS (M+Na)⁺ 计算值: 1195.4907, 实测值: 1195.4799。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.00-1.22 (m, 13H), 1.28-1.45 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.91-2.14 (m, 1H), 2.26 (t, J=1.9Hz, 5H), 2.48 (t, J=1.8Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.66-2.77 (m, 2H), 3.01 (s, 2H), 3.10-3.21 (m, 5H), 3.28-3.47 (m, 2H), 3.86 (d, J=6.7Hz, 4H), 3.93-4.25 (m, 10H), 4.37-4.54 (m, 1H), 5.27 (d, J=6.7Hz, 1H), 5.40-5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.31-6.66 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.26 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.45 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.65 (t, J=7.1Hz, 2H), 7.82 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.3Hz, 1H)。

[1020] FMoc-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₃-CO-DM (11j): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1216.5038, 实测值: 1216.4999。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.78 (s, 3H), 0.95-1.29 (m, 16H), 1.37 (d, J=3.4Hz, 1H), 1.46 (t, J=12.5Hz, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.62-1.90 (m, 1H), 1.99-2.07 (m, 1H), 2.08 (s, 2H), 2.18-2.43 (m, 1H), 2.50-2.59 (m, 1H), 2.69 (s, 3H), 2.73-2.83 (m, 1H), 3.10 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.38-3.55 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.99-4.13 (m, 4H), 4.12-4.35 (m, 7H), 4.52 (dd, J=12.0, 2.9Hz, 1H), 5.34 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.48-5.65 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 6.48-6.70 (m, 3H), 6.88 (s, 1H), 7.17 (d, J=1.7Hz, 1H), 7.33 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.41 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.58 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.71 (t, J=8.3Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 3H), 7.95 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.15 (d, J=7.2Hz, 1H), 8.29-8.38 (m, 1H), 8.41 (s, 1H)。

[1021] FMoc-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₂-CO-DM (11i): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1131.4510, 实测值: 1131.4507。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.76 (s, 3H), 1.08-1.21 (m, 12H), 1.24 (d, J=13.9Hz, 1H), 1.38-1.52 (m, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.99-2.09 (m, 1H), 2.33-2.44 (m, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.80 (dd, J=14.4, 8.6Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 3.17 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.46 (t, J=10.3Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.00-4.13 (m, 3H), 4.13-4.34 (m, 5H), 4.52 (dd, J=12.0, 2.9Hz, 1H), 5.30 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.55 (dd, J=13.4, 9.1Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 6.55 (dd, J=7.4, 5.7Hz, 3H), 6.87 (s, 1H), 7.16 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.32 (tt, J=7.4, 1.5Hz, 2H), 7.41 (tt, J=7.5, 1.5Hz, 2H), 7.57 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.71 (dd, J=10.5,

7.5Hz, 2H), 7.88 (d, J=7.5Hz, 2H), 8.14 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.37 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1022] 4. 氨基-肽-美登木素生物碱(化合物12a-12j)

[1023] 如图9A所示且如由 $H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)_5-CO-DM$ 所例示制备 $H_2N-肽-NH-CH_2-S-(CH_2)_n-CO_2-DM$ 型的化合物。

[1024] $H_2N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)_5-CO-DM$ (12a): 将FMoc-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH- $CH_2-S-(CH_2)_5-CO-DM$ (151mg, 0.121mmol) 用DMF (2mL) 中的20%吗啉处理。允许反应在室温下在氩气下在磁力搅拌下继续进行1h。将粗物质在C18, 30微米, 150g柱筒上纯化, 用含有0.1%甲酸和5%至50%乙腈线性梯度的去离子水经26min洗脱。将含有所需产物的级分立即冷冻并冻干以得到46mg (37.1%产率) 无色油状物。HRMS (M+H)⁺计算值: 1022.4670; 实测值: 1022.4669。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.78 (s, 3H), 1.12 (d, J=6.3Hz, 3H), 1.13-1.21 (m, 10H), 1.21-1.31 (m, 3H), 1.37-1.50 (m, 4H), 1.51-1.57 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 2.04 (dd, J=14.4, 2.8Hz, 1H), 2.15 (ddd, J=15.9, 8.7, 6.0Hz, 1H), 2.38 (td, J=7.0, 3.6Hz, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.79 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.21 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.33-3.55 (m, 8H), 3.93 (s, 3H), 4.01-4.33 (m, 5H), 4.52 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.34 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.57 (dd, J=14.6, 9.0Hz, 1H), 5.95 (s, 1H), 6.48-6.65 (m, 3H), 6.89 (s, 1H), 7.18 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.07 (d, J=7.5Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.40 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1025] $H_2N-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)_5-CO-DM$ (12b): HRMS (M+H)⁺计算值: 1022.4670, 实测值: 1022.4675。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.05 (dd, J=6.7, 3.1Hz, 7H), 1.08-1.16 (m, 10H), 1.19 (t, J=8.1Hz, 3H), 1.30-1.50 (m, 6H), 1.52 (s, 3H), 1.97 (d, J=13.3Hz, 1H), 2.01-2.21 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.8Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.33-3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95-4.23 (m, 7H), 4.45 (dd, J=13.1Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.41-5.58 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.39-6.63 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.13 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.36 (t, J=6.2Hz, 1H)。

[1026] $H_2N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)_5-CO-DM$ (12c): HRMS (M+H)⁺计算值: 1022.4670, 实测值: 1022.4680。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.01-1.26 (m, 19H), 1.25-1.50 (m, 6H), 1.52 (s, 3H), 1.97 (d, J=13.7Hz, 1H), 2.02-2.22 (m, 1H), 2.35 (dd, J=17.2, 9.5Hz, 2H), 2.47 (d, J=11.5Hz, 1H), 2.63 (s, 4H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.10-3.24 (m, 6H), 3.32-3.50 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95-4.18 (m, 4H), 4.45 (dd, J=12.1, 2.6Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.9Hz, 1H), 5.44-5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42-6.59 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.7Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.13 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.36 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1027] $H_2N-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH_2-S-(CH_2)_5-CO-DM$ (12d): HRMS (M+H)⁺计算值: 1022.4670, 实测值: 1022.4675。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 0.98-1.14 (m, 13H), 1.14-1.26 (m, 2H), 1.30-1.49 (m, 4H), 1.52 (s, 3H), 2.24-2.41 (m, 2H), 2.44 (d, J=1.8Hz, 16H), 2.63 (s, 2H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 2H), 3.08-3.21 (m, 4H), 3.32-3.49 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.92-4.23 (m, 3H), 4.45 (d, J=11.8Hz, 1H), 5.26 (t, J=6.7Hz, 1H), 5.40-5.57 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.41-6.66 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.7Hz,

1H), 8.02 (s, 1H), 8.10 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.35 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1028] $\text{H}_2\text{N-D-Ala-L-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-DM}$ (12g): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 951.4299, 实测值: 951.4289。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.79 (s, 3H), 1.06-1.34 (m, 13H), 1.36-1.54 (m, 4H), 1.60 (s, 2H), 1.88-2.10 (m, 1H), 2.10-2.23 (m, 1H), 2.31-2.51 (m, 13H), 2.71 (s, 3H), 2.80 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.10 (s, 3H), 3.26 (s, 4H), 3.33-3.66 (m, 3H), 3.98-4.32 (m, 4H), 4.53 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.35 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.49-5.65 (m, 1H), 6.51-6.67 (m, 3H), 6.89 (s, 1H), 7.19 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.25 (s, 2H), 8.34 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.58 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1029] $\text{H}_2\text{N-L-Ala-D-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-DM}$ (12f): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 951.4226, 实测值: 951.1299。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.00-1.13 (m, 11H), 1.19 (t, J=8.9Hz, 3H), 1.29-1.45 (m, 4H), 1.52 (s, 3H), 1.92-2.03 (m, 1H), 2.07 (dd, J=15.7, 8.7Hz, 1H), 2.23-2.39 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.7Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.07-3.32 (m, 14H), 3.34-3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95-4.21 (m, 4H), 4.45 (dd, J=11.9, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.50 (dd, J=14.7, 9.0Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40-6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.41 (t, J=6.1Hz, 1H)。

[1030] $\text{H}_2\text{N-D-Ala-D-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-DM}$ (12h): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 950.4226, 实测值: 951.4299。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 0.96-1.14 (m, 14H), 1.19 (t, J=8.9Hz, 3H), 1.38 (q, J=10.5, 7.0Hz, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.88-2.02 (m, 1H), 2.02-2.18 (m, 1H), 2.22-2.41 (m, 2H), 2.48 (s, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.08-3.22 (m, 4H), 3.34-3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 4H), 3.95-4.23 (m, 5H), 4.45 (dd, J=11.9, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.41-5.60 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40-6.65 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.44 (t, J=6.1Hz, 1H)。

[1031] $\text{H}_2\text{N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2\text{)}_3\text{-CO-DM}$ (12j): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 994.4357, 实测值: 994.4330。

[1032] $\text{H}_2\text{N-D-Ala-L-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2\text{)}_2\text{-CO-DM}$ (12i): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 909.3830, 实测值: 909.3826。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.77 (s, 3H), 1.12 (d, J=6.7Hz, 6H), 1.17 (dd, J=7.0, 5.2Hz, 6H), 1.25 (d, J=13.3Hz, 1H), 1.40-1.51 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 2.04 (dd, J=14.4, 2.9Hz, 1H), 2.41 (ddt, J=18.6, 10.1, 5.4Hz, 1H), 2.61-2.70 (m, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.76-2.90 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.20 (d, J=12.4Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.33 (q, J=6.9Hz, 1H), 3.39-3.64 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.03-4.16 (m, 2H), 4.24 (dt, J=15.1, 7.6Hz, 2H), 4.53 (dd, J=12.0, 2.9Hz, 1H), 5.32 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.51-5.64 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 6.49-6.62 (m, 2H), 6.88 (s, 1H), 7.19 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.55 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1033] 5.SPDB-肽-美登木素生物碱(化合物13a-13j)

[1034] 如图9A所示且如由SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM所例示制备SPDB-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM型的化合物。

[1035] SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13a): 将H₂N-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (46mg, 0.045mmol) 溶于DMF (2mL) 中, 向其中添加SPDB (14.7mg, 0.045mmol), 并且在氩气气氛下在室温下在磁力搅拌下反应1h。将粗物质在C18, 430微米, 30g筒上纯化, 用含有0.1%甲酸和5%至95%乙腈线性梯度的去离子水经35min洗脱。将含

有纯的所需产物的级分冷冻并冻干以得到38mg (68.5%产率) 白色固体。HRMS (M+H)⁺计算值:1233.4796;实测值:1233.4783。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ0.78 (s, 3H), 1.12 (d, J=6.4Hz, 3H), 1.14-1.21 (m, 10H), 1.22-1.30 (m, 3H), 1.44 (qd, J=10.2, 4.5Hz, 5H), 1.50-1.56 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.84 (p, J=7.3Hz, 2H), 2.04 (dd, J=14.4, 2.7Hz, 1H), 2.15 (ddd, J=15.8, 8.6, 5.9Hz, 2H), 2.24 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.39 (dtdd, J=18.1, 13.2, 8.1, 4.7Hz, 3H), 2.70 (s, 3H), 2.76-2.86 (m, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.21 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.43 (d, J=12.4Hz, 1H), 3.48 (d, J=9.0Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.13 (s, 2H), 4.19 (h, J=6.6Hz, 4H), 4.52 (dd, J=12.1, 2.8Hz, 1H), 5.34 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.56 (dd, J=14.7, 9.0Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 6.49-6.66 (m, 3H), 6.85-6.97 (m, 2H), 7.18 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.23 (ddd, J=7.3, 4.8, 1.2Hz, 1H), 7.76 (dt, J=8.1, 1.2Hz, 1H), 7.78-7.91 (m, 2H), 8.00 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.09 (d, J=7.0Hz, 1H), 8.33 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.44 (dt, J=4.7, 1.3Hz, 1H), 8.50 (s, 1H)。

[1036] SPDB-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13b):HRMS (M+H)⁺计算值:1233.4796,实测值:1233.4799。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ0.71 (s, 3H), 1.01-1.22 (m, 13H), 1.27-1.45 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 1.91-2.16 (m, 1H), 2.26 (d, J=7.4Hz, 7H), 2.26 (t, J=1.9Hz, 4H), 2.48 (t, J=1.8Hz, 2H), 2.57-2.65 (m, 3H), 2.65-2.77 (m, 2H), 3.01 (s, 2H), 3.13 (d, J=12.2Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.32-3.47 (m, 2H), 3.86 (d, J=6.7Hz, 4H), 3.93-4.11 (m, 3H), 4.18 (t, J=11.2Hz, 7H), 4.39-4.50 (m, 1H), 5.27 (d, J=6.7Hz, 1H), 5.50 (dd, J=14.7, 8.8Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.37-6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.26 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.35 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.45 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.65 (t, J=7.1Hz, 2H), 7.82 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.3Hz, 1H)。

[1037] SPDB-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13c):HRMS (M+H)⁺计算值:1233.4796,实测值:1233.4795。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ0.71 (s, 3H), 1.02-1.25 (m, 18H), 1.29-1.50 (m, 6H), 1.52 (s, 3H), 1.70-1.87 (m, 2H), 1.87-2.14 (m, 2H), 2.13-2.22 (m, 2H), 2.27-2.40 (m, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.69-2.84 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J=12.3Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.32-3.45 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.95-4.07 (m, 2H), 4.07-4.19 (m, 4H), 4.45 (dd, J=11.9, 2.7Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42-6.59 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.13-7.19 (m, 1H), 7.68 (d, J=8.2, 2.7Hz, 1H), 7.72-7.80 (m, 1H), 7.88 (t, J=6.6Hz, 1H), 8.04 (d, J=6.4Hz, 1H), 8.09 (d, J=7.4Hz, 1H), 8.25 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.37 (dd, J=5.0, 1.9Hz, 1H)。

[1038] SPDB-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13d):HRMS (M+H)⁺计算值:1233.4796,实测值:1233.4797。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ0.72 (d, J=3.3Hz, 3H), 0.98-1.28 (m, 22H), 1.30-1.46 (m, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.78 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.86-2.16 (m, 2H), 2.19 (q, J=7.4, 5.6Hz, 2H), 2.26-2.41 (m, 2H), 2.41-2.55 (m, 4H), 2.64 (d, J=3.2Hz, 2H), 2.81-2.92 (m, 1H), 3.02 (s, 2H), 3.14 (d, J=12.0Hz, 1H), 3.26 (s, 1H), 3.31-3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.97-4.30 (m, 7H), 4.46 (dd, J=11.8, 3.2Hz, 1H), 5.24-5.36 (m, 1H), 5.45-5.62 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.40-6.65 (m, 3H), 6.82 (d, J=3.4Hz, 1H), 7.11 (d, J=3.2Hz, 1H), 7.18 (d, J=12.1, 6.1, 4.9Hz, 2H), 7.69 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.75 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.89 (d, J=7.8, 3.2Hz, 1H), 7.95-8.04 (m, 2H), 8.26 (d, J=6.1Hz, 1H), 8.33-8.47 (m, 1H)。

[1039] SPDB-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13g) :HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1162.4425, 实测值: 1162.4405。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.08 (dt, J=13.9, 6.9Hz, 15H), 1.15-1.25 (m, 3H), 1.28-1.44 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.77 (p, J=7.2Hz, 2H), 1.91-2.02 (m, 1H), 2.02-2.13 (m, 1H), 2.17 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.22-2.40 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.68-2.80 (m, 3H), 3.02 (s, 3H), 3.13 (d, J=12.3Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.33-3.45 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.95-4.16 (m, 5H), 4.45 (dd, J=12.1, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.43-6.60 (m, 3H), 6.82 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.12-7.18 (m, 1H), 7.65-7.79 (m, 2H), 8.06-8.16 (m, 2H), 8.30 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.35-8.40 (m, 1H)。

[1040] SPDB-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13f) :HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1162.4399, 实测值: 1162.455。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.02-1.13 (m, 12H), 1.14-1.25 (m, 3H), 1.31-1.44 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.77 (p, J=7.3Hz, 2H), 1.97 (d, J=14.3, 2.7Hz, 1H), 2.02-2.13 (m, 1H), 2.17 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.28-2.40 (m, 3H), 2.43 (m, J=3.2Hz, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.69-2.80 (m, 3H), 3.02 (s, 3H), 3.13 (d, J=12.4Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.39 (dd, J=21.0, 10.7Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.96-4.18 (m, 5H), 4.45 (dd, J=12.1, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.45-5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.43-6.60 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.10 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.16 (t, J=7.2, 4.9Hz, 1H), 7.68 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.71-7.79 (m, 1H), 8.02-8.15 (m, 2H), 8.28 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.37 (d, J=4.8, 1.7Hz, 1H)。

[1041] SPDB-D-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (13h) :HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1162.4399, 实测值: 1162.455。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.02-1.16 (m, 13H), 1.14-1.25 (m, 3H), 1.28-1.49 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.77 (p, J=7.2Hz, 2H), 1.92-2.14 (m, 2H), 2.17 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.23-2.40 (m, 2H), 2.46-2.54 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.65-2.85 (m, 4H), 3.02 (s, 3H), 3.03-3.16 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.28-3.45 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.95-4.20 (m, 5H), 4.45 (dd, J=12.1, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.55 (m, 1H), 5.82-5.88 (m, 1H), 6.42-6.59 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.9Hz, 1H), 7.14-7.20 (m, 1H), 7.67-7.72 (m, 1H), 7.72-7.80 (m, 1H), 7.88 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.99 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.28 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.35-8.40 (m, 1H)。

[1042] SPDB-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₃-CO-DM (13j) :HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1203.4337, 实测值: 1203.4315。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 0.94-1.24 (m, 20H), 1.38 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.57-1.87 (m, 1H), 1.89-2.08 (m, 1H), 2.26 (t, J=15.1Hz, 1H), 2.50 (d, J=5.2Hz, 2H), 2.54-2.79 (m, 7H), 3.05 (d, J=3.8Hz, 3H), 3.18 (s, 5H), 3.29-3.46 (m, 3H), 3.86 (d, J=6.1Hz, 4H), 4.00 (s, 3H), 4.05-4.24 (m, 4H), 4.33-4.54 (m, 1H), 5.17-5.38 (m, 1H), 5.39-5.58 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.29-6.58 (m, 4H), 6.63 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 7.04-7.19 (m, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.14-8.39 (m, 1H), 8.45 (s, 1H)。

[1043] SPDB-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₂-CO-DM (13i) :HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1120.3955, 实测值: 1120.3951。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.74-0.82 (m, 3H), 1.10-1.22 (m, 13H), 1.25 (d, J=14.1Hz, 1H), 1.46 (t, J=10.9Hz, 2H), 1.56-1.63 (m, 3H), 1.85 (ddd, J=14.4, 9.0, 5.1Hz, 2H), 2.00 (ddd, J=14.7, 9.3, 5.4Hz, 9H), 2.24 (dt, J=10.8, 5.0Hz, 2H), 2.72 (d, J=3.6Hz, 2H), 2.94 (dq, J=10.7, 7.2, 5.7Hz, 9H), 3.10 (d, J=3.7Hz, 3H),

3.20 (d, J=3.4Hz, 1H), 3.25 (d, J=3.6Hz, 3H), 3.32 (d, J=3.7Hz, 1H), 3.47 (td, J=10.7, 10.0, 3.8Hz, 2H), 3.93 (t, J=4.6Hz, 3H), 4.02-4.25 (m, 6H), 4.49-4.57 (m, 1H), 5.28-5.37 (m, 1H), 5.53-5.62 (m, 1H), 5.92 (d, J=3.6Hz, 1H), 6.57 (q, J=5.4, 4.5Hz, 3H), 6.85-6.93 (m, 1H), 7.17 (d, J=3.3Hz, 1H), 7.25 (dq, J=8.0, 4.9Hz, 6H), 7.72-7.87 (m, 11H), 8.16 (dt, J=15.4, 4.9Hz, 2H), 8.45 (tt, J=9.9, 5.9Hz, 6H)。

[1044] 6. 硫肽-美登木素生物碱(化合物14a-14j)

[1045] 如图9A所示且如由HS-(CH₂)₃CO-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM所例示制备HS-(CH₂)₃CO-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM型的化合物。

[1046] HS-(CH₂)₃CO-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(14a):将SPDB-L-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(38mg, 0.031mmol)溶于DMSO(1mL)中,向其中添加DTT(19mg, 0.12mmol)于100mM磷酸钾中的溶液、2mM EDTA pH 7.5缓冲液(1mL)。允许反应在室温下在氩气下在磁力搅拌下继续进行1h。将粗反应物在C18, 30微米, 30g筒上纯化,用含有0.1%甲酸和5%至95%乙腈线性梯度的去离子水经35min洗脱。将含有所需产物的级分立即冷冻并冻干以得到18.2mg(52.5%产率)白色固体。HRMS(M+H)⁺计算值:1124.4809;实测值:1124.4798。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ0.78 (s, 3H), 1.12 (d, J=6.4Hz, 3H), 1.14-1.21 (m, 10H), 1.22-1.30 (m, 3H), 1.37-1.50 (m, 5H), 1.51-1.57 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.74 (p, J=7.2Hz, 2H), 2.04 (dd, J=14.4, 2.8Hz, 1H), 2.09-2.18 (m, 1H), 2.18-2.24 (m, 2H), 2.27 (t, J=7.6Hz, 1H), 2.38 (td, J=7.1, 4.7Hz, 2H), 2.44 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.79 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.09 (s, 3H), 3.21 (d, J=12.6Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.43 (d, J=12.4Hz, 1H), 3.49 (d, J=9.0Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 4.08 (ddd, J=21.6, 11.4, 4.1Hz, 2H), 4.13-4.28 (m, 4H), 4.52 (dd, J=12.1, 2.8Hz, 1H), 5.34 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.56 (dd, J=14.7, 9.0Hz, 1H), 5.91 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.48-6.66 (m, 3H), 6.88 (s, 1H), 7.18 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.86 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.96 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.05 (d, J=7.1Hz, 1H), 8.33 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1047] HS-(CH₂)₃CO-D-Ala-L-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(14b):HRMS(M+Na)⁺计算值:1146.4629,实测值:1146.4591。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ0.71 (s, 3H), 1.03-1.25 (m, 19H), 1.30-1.45 (m, 6H), 1.52 (s, 4H), 1.65 (p, J=7.3Hz, 2H), 1.91-2.02 (m, 1H), 2.02-2.13 (m, 1H), 2.12-2.19 (m, 4H), 2.29-2.39 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.33-3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 4.01 (td, J=10.4, 9.7, 4.3Hz, 2H), 4.04-4.16 (m, 5H), 4.45 (dd, J=12.0, 2.9Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.43-5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.38-6.61 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.82 (d, J=7.7Hz, 1H), 7.97 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.10 (d, J=6.0Hz, 1H), 8.25 (d, J=6.9Hz, 1H)。

[1048] HS-(CH₂)₃CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(14c):HRMS(M+Na)⁺计算值:1146.4629,实测值:1146.4553。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ0.71 (s, 3H), 0.99-1.26 (m, 21H), 1.31-1.45 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.67 (p, J=7.2Hz, 2H), 1.89-2.02 (m, 1H), 2.02-2.24 (m, 4H), 2.25-2.46 (m, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.7Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 3.32-3.51 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.96-4.18 (m, 7H), 4.45 (dd, J=12.0, 2.9Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.44-5.63 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.37-6.59 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.03 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.08 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.27

(t, J=6.3Hz, 1H)。

[1049] HS-(CH₂)₃CO-L-Ala-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (14d): HRMS (M+Na)⁺ 计算值: 1146.4629, 实测值: 1146.4519。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 0.95-1.24 (m, 20H), 1.27-1.45 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.67 (p, J=7.3Hz, 2H), 1.93-2.01 (m, 1H), 2.02-2.22 (m, 4H), 2.22-2.41 (m, 5H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 4H), 3.39 (dd, J=21.4, 10.7Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.94-4.24 (m, 6H), 4.45 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.57 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.37-6.65 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.93-8.05 (m, 2H), 8.26 (t, J=6.4Hz, 1H)。

[1050] HS-(CH₂)₃CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (14g): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1053.4438, 实测值: 1053.4426。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.01-1.15 (m, 13H), 1.15-1.27 (m, 3H), 1.31-1.44 (m, 5H), 1.53 (s, 3H), 1.67 (p, J=7.1Hz, 2H), 1.93-2.03 (m, 1H), 2.03-2.23 (m, 4H), 2.22-2.41 (m, 5H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.7Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.32-3.46 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.92-4.20 (m, 6H), 4.45 (dd, J=11.9, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.42-5.58 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42-6.60 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.05 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.10 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.30 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1051] HS-(CH₂)₃CO-L-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (14f): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1053.4366, 实测值: 1053.4438。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.02-1.14 (m, 13H), 1.19 (t, J=9.7Hz, 3H), 1.31-1.43 (m, 6H), 1.53 (s, 3H), 1.67 (p, J=7.3Hz, 2H), 1.91-2.02 (m, 1H), 2.02-2.22 (m, 4H), 2.34-2.39 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.5Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.19 (d, J=4.2Hz, 4H), 3.30-3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.94-4.20 (m, 6H), 4.45 (d, J=11.8, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40-6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 8.03 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.08 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.29 (t, J=6.2Hz, 1H)。

[1052] HS-(CH₂)₃CO-D-Ala-D-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM (14h): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1053.4366, 实测值: 1053.4438。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.02-1.15 (m, 13H), 1.14-1.24 (m, 3H), 1.30-1.45 (m, 5H), 1.53 (s, 3H), 1.67 (p, J=7.1Hz, 2H), 1.90-2.01 (m, 1H), 2.01-2.24 (m, 4H), 2.27-2.33 (m, 1H), 2.33-2.42 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.7Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.10-3.21 (m, 4H), 3.33-3.46 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95-4.18 (m, 6H), 4.45 (dd, J=11.9, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.55 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.42-6.59 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.05 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.10 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.30 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1053] HS-(CH₂)₃CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₃-CO-DM (14j): HRMS (M+H)⁺ 计算值: 1096.4496, 实测值: 1096.4464。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.78 (s, 3H), 1.02-1.31 (m, 19H), 1.35-1.55 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.74 (p, J=7.4Hz, 3H), 1.78-1.93 (m, 1H), 2.14-2.33 (m, 4H), 2.41-2.49 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.80 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.12 (s, 3H), 3.22 (d, J=12.7Hz, 1H), 3.26 (s, 3H), 3.47 (dd, J=21.3, 10.6Hz, 2H), 3.93 (s, 4H), 4.03-4.13 (m, 3H), 4.13-4.25 (m, 3H), 4.52 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.35 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.50-5.64 (m,

1H), 5.92 (s, 1H), 6.47-6.69 (m, 4H), 6.88 (s, 1H), 7.18 (d, J=1.7Hz, 1H), 7.94 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.09 (d, J=6.4Hz, 1H), 8.15 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.32 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1054] HS-(CH₂)₃-CO-(CH₂)₃-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₂-CO-DM(14i):HRMS (M+H)⁺ 计算值:1011.3969, 实测值:1011.3961。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.77 (s, 3H), 1.12 (d, J=6.4Hz, 3H), 1.17 (dd, J=7.0, 5.1Hz, 9H), 1.25 (d, J=13.0Hz, 1H), 1.40-1.51 (m, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.74 (q, J=7.2Hz, 2H), 2.00-2.08 (m, 1H), 2.23 (dt, J=16.8, 7.6Hz, 3H), 2.43 (q, J=7.4Hz, 2H), 2.62-2.69 (m, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.76-2.88 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 3.20 (d, J=12.6Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.39-3.54 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 4.01-4.26 (m, 5H), 4.53 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.32 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.49-5.63 (m, 1H), 5.92 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.48-6.62 (m, 3H), 6.88 (s, 1H), 7.18 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.10 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.16 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.41 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[1055] 7.HOOC-(CH₂)₃-CO-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM(化合物19a-19j)

[1056] 如图9B所示且如由HOOC-(CH₂)₃-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM所例示制备HOOC-(CH₂)₃-CO-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM型的化合物。

[1057] HOOC-(CH₂)₃-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(19a):将L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(17.25mg, 0.017mmol)用戊二酸酐(38.5mg, 0.337mmol)处理并在室温下在氩气下在磁力搅拌下反应过夜。将粗反应物通过XDB-C18, 21.2x 5mm, 5微米柱纯化,用含有0.1%甲酸和5%至95%乙腈线性梯度的去离子水经30min以20ml/min洗脱。将含有纯的所需产物的级分立即合并,冷冻并冻干以得到3mg(15%产率)白色固体。HRMS (M+H)⁺计算值:1136.4987, 实测值:1136.4954。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 0.92-1.27 (m, 20H), 1.26-1.48 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.63 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.83-2.20 (m, 7H), 2.23-2.41 (m, 5H), 2.63 (s, 4H), 2.73 (d, J=9.5Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.36-3.50 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.91-4.24 (m, 7H), 4.45 (d, J=11.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.41-5.57 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.32-6.66 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 8.06 (t, J=9.1Hz, 2H), 8.35 (d, J=11.6Hz, 1H), 8.62 (s, 1H)。

[1058] HOOC-(CH₂)₃-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(19g):HRMS (M+H)⁺计算值:1136.4987, 实测值:1136.4962。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 0.97-1.14 (m, 13H), 1.14-1.26 (m, 3H), 1.28-1.45 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.62 (p, J=7.5Hz, 2H), 1.93-2.00 (m, 1H), 2.08 (dt, J=13.1, 7.4Hz, 6H), 2.25-2.41 (m, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.5Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 3.31-3.48 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.93-4.19 (m, 6H), 4.45 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.43-5.58 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.40-6.61 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.03 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.13 (d, J=7.8Hz, 1H), 8.34 (t, J=6.3Hz, 1H), 11.94 (s, 1H)。

[1059] HOOC-(CH₂)₃-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₃-CO-DM(19i):HRMS (M+H)⁺ 计算值:1108.4674, 实测值:1108.4634。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.78 (s, 3H), 1.04-1.32 (m, 16H), 1.45 (d, J=12.6Hz, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.69 (p, J=7.2Hz, 3H), 1.77-1.95 (m, 1H), 1.99-2.07 (m, 1H), 2.11-2.20 (m, 4H), 2.20-2.39 (m, 1H), 2.55 (s, 1H), 2.71 (s, 3H), 2.80 (d, J=9.5Hz, 1H), 3.12 (s, 3H), 3.40 (d, J=21.0Hz, 8H), 3.49 (d, J=9.1Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 4.02-4.27 (m, 6H), 4.48-4.61 (m, 1H), 5.34 (q, J=6.6Hz, 1H), 5.48-5.65 (m, 1H), 5.92 (s,

1H), 6.50-6.71 (m, 3H), 6.88 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.99 (d, J=7.6Hz, 1H), 8.08 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.22 (d, J=7.4Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.42 (s, 1H)。

[10660] 8.NHS-OOC-(CH₂)₃-CO-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM(化合物20a-20j)

[10661] 如图9B所示且如由NHS-OOC-(CH₂)₃-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM所例示制备NHS-OOC-(CH₂)₃-CO-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO₂-DM型的化合物。

[10662] NHS-OOC-(CH₂)₃-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(20g):将H₂N-(CH₂)₃-CO-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(8mg, 7.5μmol)溶于DMSO(1mL)中,用NHS(0.9mg, 7.51μmol)和EDC(1.4mg, 7.51μmol)处理。允许反应在室温下在氩气气氛下在磁力搅拌下继续进行2小时。将粗物质经由HPLC使用XDB-C18, 21.2x5mm, 5μm柱纯化,用含有0.1%甲酸和5%至95%乙腈线性梯度的去离子水经30min以20ml/min洗脱。将含有所需产物的级分合并,立即冷冻,然后冻干以得到6.5mg(74%产率)白色固体。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ0.71 (s, 3H), 1.00-1.14 (m, 13H), 1.14-1.25 (m, 3H), 1.29-1.46 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.75 (p, J=7.5Hz, 2H), 1.92-2.12 (m, 2H), 2.16 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.22-2.39 (m, 3H), 2.62 (d, J=10.8Hz, 5H), 2.73 (d, J=10.5Hz, 5H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 3H), 3.32-3.47 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95-4.19 (m, 6H), 4.45 (dd, J=12.0, 2.8Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.8Hz, 1H), 5.42-5.57 (m, 1H), 5.82-5.87 (m, 1H), 6.41-6.60 (m, 4H), 6.81 (s, 1H), 7.11 (d, J=1.7Hz, 1H), 8.05 (d, J=6.5Hz, 1H), 8.10 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.20 (d, J=4.8Hz, 1H), 8.29 (t, J=6.3Hz, 1H)。

[10663] NHS-OOC-(CH₂)₃-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(20g):HRMS(M+H)⁺计算值:1233.5151,实测值:1233.5135。

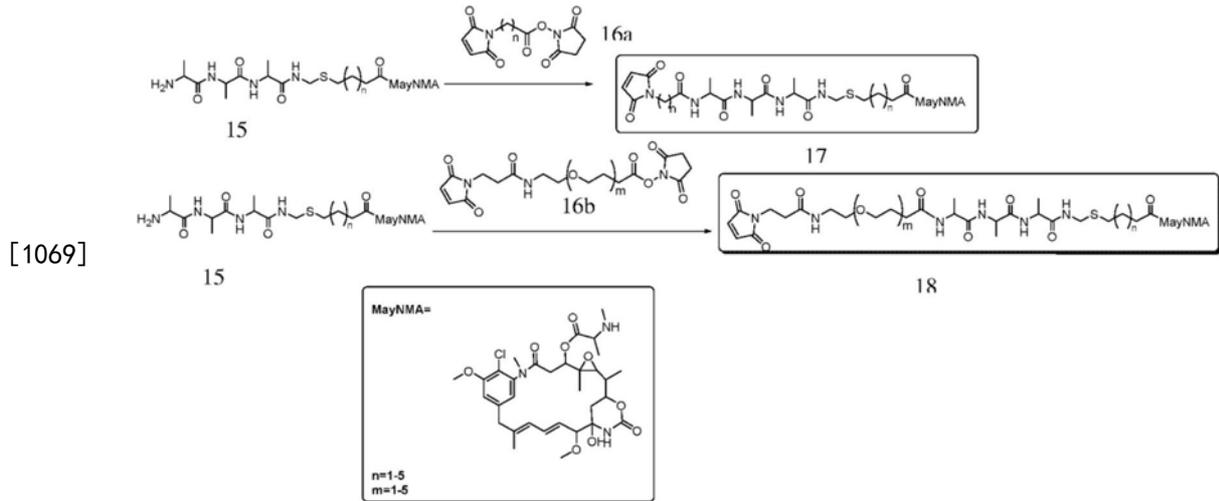
[10664] NHS-OOC-(CH₂)₃-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₃-CO-DM(20i):HRMS(M+H)⁺计算值:1205.4838,实测值:1205.4808。

[10665] 9.Ma1-(CH₂)₃-CO-肽-NH-CH₂-S-(CH₂)_n-CO-DM(化合物23a-23j)

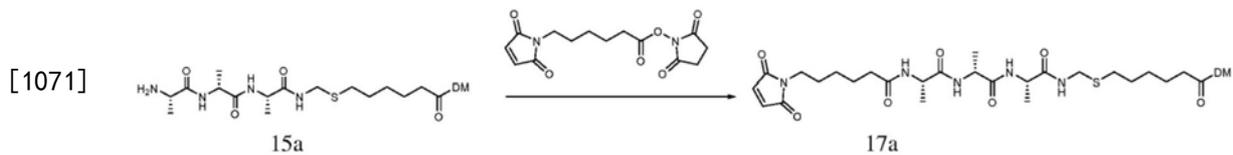
[10666] 可如图9B所示且如针对化合物23c所例示制备化合物23a-23j。

[10667] Ma1-(CH₂)₃-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM或Ma1-LDL-DM(23c):将H₂N-L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-DM(8mg, 7.82μmol)溶于DMF(2mL)中,用3-马来酰亚胺基丙酸(1.32mg, 7.82μmol)、EDC(2.25mg, 0.012mmol)及HOBT(1.198mg, 7.82μmol)处理。允许反应在室温下在氩气气氛下在磁力搅拌下继续进行2h。将粗物质经由半制备型HPLC使用XDB-C18, 21.2x5mm, 5μm纯化,用含有0.1%甲酸和5%至95%乙腈线性梯度的去离子水经30min以20ml/min洗脱。将含有所需产物的级分立即合并,并且冷冻,然后冻干以得到1.8mg(19.60%产率)白色固体。HRMS(M+H)⁺计算值:1173.4940,实测值:1173.4931。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ0.71 (s, 3H), 1.02-1.14 (m, 15H), 1.16-1.25 (m, 3H), 1.30-1.44 (m, 5H), 1.52 (s, 3H), 1.92-2.03 (m, 1H), 2.03-2.17 (m, 1H), 2.23-2.39 (m, 4H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.18 (s, 4H), 3.33-3.46 (m, 2H), 3.52 (t, J=7.3Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.95-4.17 (m, 7H), 4.45 (dd, J=12.0, 2.9Hz, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.44-5.56 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.39-6.64 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.92 (s, 2H), 7.11 (d, J=1.7Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.4Hz, 1H), 8.10 (d, J=7.3Hz, 1H), 8.17 (d, J=6.7Hz, 1H), 8.28 (t, J=6.3Hz, 1H), 8.43 (s, 1H)。

[10668] 10.其他化合物

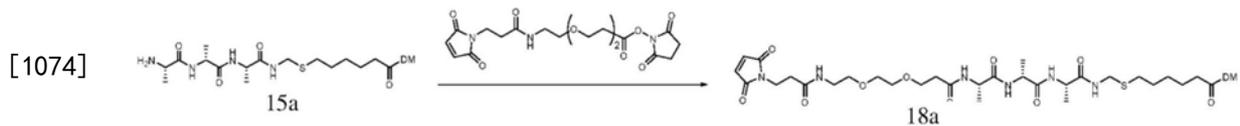


[1070] Mal₂-LAla-D-Ala-L-Ala-Imm-C6-May



[1072] Mal-C5-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Imm-C6-May:L-Ala-D-Ala-L-Ala-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA (化合物I-1a) (25mg, 0.024mmol) 与 2,5-二氧化吡咯烷-1-基-6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯 (7.54mg, 0.024mmol) 之间的反应产生 Mal-C5-L-Ala-D-Ala-L-Ala-Imm-C6-May (化合物I-2a) (20.8mg, 0.017mmol, 70.0% 产率)。LRMS (M+H)⁺ 计算值: 1215.52, 实测值: 1216.4。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 3H), 1.05 (d, J=6.4Hz, 3H), 1.07-1.14 (m, 14H), 1.15-1.25 (m, 3H), 1.39 (t, J=9.2Hz, 10H), 1.52 (s, 3H), 2.01 (t, J=7.6Hz, 3H), 2.26 (t, J=1.9Hz, 1H), 2.28-2.38 (m, 2H), 2.57-2.62 (m, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.14 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.29 (t, J=7.1Hz, 2H), 3.36 (d, J=12.5Hz, 1H), 3.42 (d, J=9.0Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.96-4.05 (m, 1H), 4.04-4.15 (m, 4H), 4.41-4.48 (m, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.46-5.54 (m, 1H), 5.82-5.88 (m, 1H), 6.47-6.50 (m, 2H), 6.54 (t, J=11.4Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.92 (s, 2H), 7.11 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.86-7.93 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 8.05 (d, J=7.4Hz, 1H), 8.24 (t, J=6.2Hz, 1H)。

[1073] Mal-(CH₂)₂-PEG₂-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA

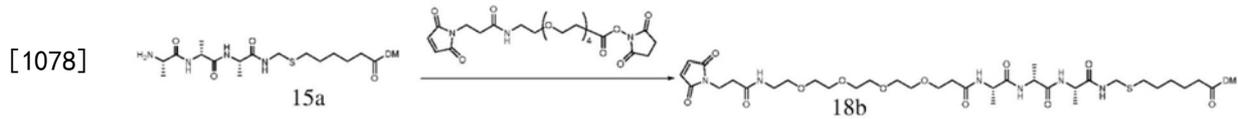


[1075] Mal-(CH₂)₂-PEG₂-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA:

[1076] L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA (化合物I-1a) (25mg, 0.024mmol) 与 Mal-酰胺基-PEG₂-NHS (10.40mg, 0.024mmol) 之间的反应产生 Mal-(CH₂)₂-PEG₂-CO₂-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA (化合物I-3a) (14.1mg, 10.58μmol, 43.3% 产率)。LRMS (M+H)⁺ 计算值: 1332.58, 实测值: 1332.95。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 4H), 1.05 (d, J=6.3Hz, 4H), 1.07-1.14 (m, 15H), 1.18 (d, J=9.0Hz, 2H), 1.37 (d, J=11.8Hz, 6H), 1.52 (s, 3H), 2.23-2.38 (m, 5H), 2.63 (s, 4H), 2.72 (d, J=9.7Hz, 1H), 3.02

(s, 3H), 3.07 (q, J=5.7Hz, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.39 (s, 4H), 3.41 (d, J=9.9Hz, 2H), 3.47-3.56 (m, 4H), 3.86 (s, 4H), 3.95-4.08 (m, 2H), 4.08-4.19 (m, 3H), 4.41-4.51 (m, 1H), 5.23-5.31 (m, 1H), 5.44-5.54 (m, 1H), 5.85 (s, 1H), 6.46-6.50 (m, 2H), 6.54 (t, J=11.3Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.93 (s, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.88-8.00 (m, 2H), 8.01-8.08 (m, 2H), 8.27 (t, J=6.2Hz, 1H)。

[1077] $\text{Mal}-(\text{CH}_2)_2\text{-PEG}_4\text{-CO-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2)_5\text{-CO-MayNMA}$



[1079] $\text{Mal}-(\text{CH}_2)_2\text{-PEG}_4\text{-CO}_2\text{-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH}_2\text{-S-(CH}_2)_5\text{-CO-MayNMA}$:

[1080] L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA (化合物 I-1a) (25mg, 0.024mmol) 与 Mal-酰胺基-PEG4-NHS (12.55mg, 0.024mmol) 之间的反应产生 Mal-(CH₂)₂-PEG₄-CO₂-L-Ala-D-Ala-L-Ala-NH-CH₂-S-(CH₂)₅-CO-MayNMA Mal-PEG4-CO₂-C6-LDL-DM (化合物 I-3b) (22.3mg, 0.016mmol, 64.2% 产率)。

[1081] LRMS (M+H)⁺ 计算值: 1420.63, 实测值: 1420.06

[1082] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.71 (s, 4H), 1.05 (d, J=6.4Hz, 3H), 1.07-1.16 (m, 14H), 1.19 (t, J=8.1Hz, 2H), 1.31-1.50 (m, 2H), 1.52 (s, 4H), 1.98 (s, 1H), 2.02-2.17 (m, 2H), 2.20-2.40 (m, 7H), 2.63 (s, 4H), 2.73 (d, J=9.6Hz, 1H), 3.02 (s, 3H), 3.05-3.12 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 3.28-3.36 (m, 1H), 3.37-3.45 (m, 15H), 3.47-3.57 (m, 4H), 3.86 (s, 4H), 3.94-4.08 (m, 2H), 4.12 (ddt, J=14.5, 7.3, 3.6Hz, 4H), 4.41-4.49 (m, 1H), 5.27 (q, J=6.7Hz, 1H), 5.45-5.55 (m, 1H), 5.86 (s, 1H), 6.42-6.60 (m, 4H), 6.83 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.12 (d, J=1.8Hz, 1H), 7.89-8.00 (m, 2H), 8.00-8.09 (m, 2H), 8.26 (t, J=6.2Hz, 1H)。

[1083] 实施例 11

[1084] 制备抗 ADAM9 抗体的赖氨酸键联的 DM 缀合物

[1085] a. 制备 hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4

[1086] hMAB-A (2I.2) 为具有轻链序列 SEQ ID NO:68 和重链序列 SEQ ID NO:52 (SEQ ID NO:52 中的 X 为 K) 的人源化/优化抗体。

[1087] 为了制备 hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 缀合物, 以逐步方式执行磺基-SPDB (sSPDB) 和 DM4 添加。首先, 将含有 hMAB-A (2I.2) 抗体的用 50mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸 (EPPS)、50mM 氯化钠在 pH 8.1 下缓冲的溶液与 DMA 及来自 DMA 储备溶液的 11.5 当量 sSPDB 混合, 使得最终溶剂组成为 10% (v/v) DMA 和 90% (v/v) 水性缓冲液。在使第一反应步骤在 25℃ 下进行 4 小时之后, 将来自 DMA 储备溶液的 17.3 当量 DM4、DMA 及 500mM EPPS/500mM 氯化钠 pH 8.1 缓冲液添加到反应混合物中, 使得维持最终溶剂组成为来自第一反应步骤的 10% (v/v) DMA 和 90% (v/v) 水性缓冲液。使第二反应步骤在 25℃ 下进行过夜。

[1088] 经由 Sephadex G-25 脱盐柱将缀合物纯化到 10mM 琥珀酸盐、250mM 甘氨酸、0.5% 蔗糖、0.01% Tween-20 (pH 5.5) 中, 使用分子量截断为 10kDa 的膜针对此缓冲液加以透析, 且通过 0.22μm 针筒式过滤器过滤。

[1089] 缀合物具有以下平均值: 3.5mol DM4/mol 抗体, 通过 UV-vis; 99.2% 单体, 通过 SEC; 及 ≤1.7% 未缀合的 DM4, 通过混合模式 HPLC。未示出去糖基化的缀合物的 LC-MS。

[1090] b. 制备hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM

[1091] hMAB-A (2I.2) -S442C为具有轻链序列SEQ ID NO:68和重链序列SEQ ID NO:142 (其中X为K)的人源化/优化抗体。

[1092] 使用标准方法制备呈还原态的带有两个未配对的半胱氨酸残基(在重链CH3区的C442位置处)的hMAB-A (2I.2) -S442C抗体,并纯化至磷酸盐缓冲盐水(PBS) 7.4、2mM EDTA中。还原和再氧化的抗体溶液立即用于与Ma1-LDL-DM(化合物17a)缀合。

[1093] 向再氧化的hMAB-A (2I.2) -S442C抗体中掺入PBS pH 6.0、2mM EDTA,并在90%水溶液中与10%N-N-二甲基乙酰胺(DMA,SAFC)和5当量的Ma1-LDL-DM(化合物17a)进行缀合。将反应物在25°C下培育过夜。

[1094] 反应后,将缀合物使用NAP脱盐柱(GE Healthcare)纯化至10mM乙酸盐、9%蔗糖、0.01%Tween-20pH 5.0调配物缓冲液中并经由注射器式过滤器用0.22 μ m PVDF膜过滤。

[1095] 通过UV-Vis发现纯化的缀合物具有2.1mol LDL-DM/mol抗体,通过SEC发现具有95%单体,且通过SEC/反相HPLC双柱分析发现具有低于1%游离药物。

[1096] c. 制备hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM,3.1DAR

[1097] 缀合之前,通过将sGMBS(图9C)于N-N-二甲基乙酰胺(DMA,SAFC)中的储备溶液与LDL-DM(图9A中的化合物14c)于DMA中的储备溶液在琥珀酸盐缓冲液pH 5.0存在下混合以获得60:40有机溶液:水溶液及3mM磺基-GMBS和3.9mM LDL-DM的最终浓度来制备sGMBS-LDL-DM。将反应物在25°C下培育2h。将粗制的sGMBS-LDL-DM混合物添加至于掺有300mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸(EPPS) pH 8.5和10%DMA(v/v)的5x溶液的磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4中的含有hMAB-A (2I.2) 抗体的溶液中至7.8mol磺基-LDL-DM与1mol hMAB-A (2I.2) 抗体的最终比率。将反应物在25°C下培育过夜。

[1098] 将反应物使用NAP脱盐柱(GE Healthcare)纯化至10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1%蔗糖、0.01%Tween20 pH 5.5调配物缓冲液中并经由注射器式过滤器用0.22 μ m PVDF膜过滤。

[1099] 通过UV-Vis发现纯化的缀合物具有3.1mol LDL-DM/mol抗体,通过SEC发现具有97%单体,且通过SEC/反相HPLC双柱分析发现具有低于4%游离药物。

[1100] d. 制备hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM,2.0DAR

[1101] 缀合之前,通过将sGMBS于N-N-二甲基乙酰胺(DMA,SAFC)中的储备溶液与LDL-DM(图9A中的化合物14c)于DMA中的储备溶液在琥珀酸盐缓冲液pH 5.0存在下混合以获得60/40有机溶液/水溶液及3mM磺基-GMBS和3.9mM LDL-DM的最终浓度来制备sGMBS-LDL-DM。将反应物在25°C下培育2h。将粗制的sGMBS-LDL-DM混合物添加至于掺有300mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸(EPPS) pH 8.5和10%DMA(v/v)的5x溶液的磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4中的含有hMAB-A (2I.2) 抗体的溶液中至3mol sGMBS-LDL-DM与1mol hMAB-A (2I.2) 抗体的最终比率。将反应物在25°C下培育过夜。

[1102] 将反应使用NAP脱盐柱(GE Healthcare)纯化至10mM乙酸盐、9%蔗糖、0.01% Tween20 pH 5.0调配物缓冲液中并经由注射器式过滤器用0.22 μ m PVDF膜过滤。

[1103] 通过UV-Vis发现纯化的缀合物具有2.0mol LDL-DM/mol抗体,通过SEC发现具有99%单体,且通过SEC/反相HPLC双柱分析发现具有低于1%游离药物。

[1104] e. 制备hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM

[1105] hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) 为具有SEQ ID NO:68的轻链序列和SEQ ID NO:156的重链序列的人源化抗体。

[1106] 使用标准方法制备呈还原态的带有两个未配对的半胱氨酸残基(在重链CH3区的C442位置处)的hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) 抗体,并纯化至磷酸盐缓冲盐水(PBS) 7.4、2mM EDTA中。还原和再氧化的抗体溶液立即用于与Ma1-LDL-DM缀合。

[1107] 向再氧化的hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) 抗体中掺入PBS pH 6.0、2mM EDTA,并在90%水溶液中与10%N-N-二甲基乙酰胺(DMA,SAFC)和5当量的Ma1-LDL-DM(化合物17a)进行缀合。将反应物在25°C下培育过夜。

[1108] 反应后,将缀合物使用NAP脱盐柱(GE Healthcare)纯化至10mM乙酸盐、9%蔗糖、0.01%Tween-20pH 5.0调配物缓冲液中并经由注射器式过滤器用0.22 μ m PVDF膜过滤。

[1109] 通过UV-Vis发现纯化的缀合物具有2.0mol LDL-DM/mol抗体,通过SEC发现具有99%单体,且通过SEC/反相HPLC双柱分析发现具有低于5%游离药物。

[1110] f. 制备hMAB-A (2I.2) (YTE/-K) -sGMBS-LDL-DM

[1111] hMAB-A (2I.2) (YTE/-K) 抗体为具有SEQ ID NO:68的轻链序列和SEQ ID NO:155的重链序列的人源化抗体。

[1112] 缀合之前,通过将磺基-GMBS于N-N-二甲基乙酰胺(DMA,SAFC)中的储备溶液与LDL-DM于DMA中的储备溶液在琥珀酸盐缓冲液pH 5.0存在下混合以获得60/40有机溶液/水溶液及3mM磺基-GMBS和3.9mM LDL-DM(化合物14c)的最终浓度来制备sGMBS-LDL-DM。将反应物在25°C下培育2h。将粗制的sGMBS-LDL-DM混合物添加至于掺有300mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸(EPPS) pH 8.5和10%DMA(v/v)的5x溶液的磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4中的含有hMAB-A (2I.2) (YTE/-K) 抗体的溶液中至5mol sGMBS-LDL-DM与1mol hMAB-A (2I.2) (YTE/-K) 抗体的最终比率。将反应物在25°C下培育过夜。

[1113] 将反应使用NAP脱盐柱(GE Healthcare)纯化至10mM乙酸盐、9%蔗糖、0.01% Tween20 pH 5.0调配物缓冲液中并经由注射器式过滤器用0.22 μ m PVDF膜过滤。

[1114] 通过UV-Vis发现纯化的缀合物具有3.6mol LDL-DM/mol抗体,通过SEC发现具有99%单体,且通过SEC/反相HPLC双柱分析发现具有低于4%游离药物。

[1115] 实施例12

[1116] 抗ADAM9抗体药物缀合物的结合亲和力

[1117] 为了评估缀合对抗原结合的重要性,通过在内源性表达人ADAM9的NCI-H1703细胞上进行FACS分析,确定了每种抗ADAM9ADC及其各自非缀合抗体对ADAM9的相对结合亲和力。简而言之,将表达ADAM9的NCI-H1703细胞与稀释系列的抗ADAM9抗体或ADC在FACS缓冲液(PBS、0.1%BSA、0.01%NaN₃)中在4°C下培育30分钟。然后洗涤样品,并与荧光标记的二抗在4°C下培育30分钟。绘制各浓度下荧光强度的归一化平均值,并使用非线性回归分析(GraphPad Prism 7.0)计算结合的EC₅₀。这些研究的结果总结于表14中。

[1118] 所有抗ADAM9抗体和ADC以与人ADAM9相似的亲和力以通过流式细胞术测得的约0.3nM的EC₅₀结合,表明缀合并未明显改变抗体结合亲和力图10。

[1119] 表14.

[1120]	抗体/ADC	EC ₅₀ (nM)
		NCI-H1703
	hMAB-A(2I.2)	0.37
	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	0.33
	hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM	0.31
	hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM	0.33

[1121] 实施例13

[1122] 抗ADAM9抗体药物缀合物的体外细胞毒性

[1123] 将使用LDL-DM接头/有效负载的抗ADAM9 ADC对三种表达ADAM9的肺癌细胞系的体外细胞毒性与非靶向IgG1 ADC或首先被非缀合的抗体阻断的细胞进行比较。使用DM4有效负载的抗ADAM9ADC包括在内以用于比较。具体而言,在处理之前24小时,将500至2000个细胞/孔铺板在96孔板中。使用3倍稀释系列将缀合物稀释到培养基中,且每孔添加100 μ L。各测定板中包括含有细胞但缺乏缀合物的对照孔以及仅含有培养基的孔。一式三份进行各数据点的分析。将板在37 $^{\circ}$ C下在潮湿的5%CO₂培育箱中培育5天。接着使用基于WST-8的细胞计数药盒-8测定各孔中有活力的细胞的相对数目。通过以下计算各孔中细胞的存活分数:首先校正培养基背景吸光度,且接着将各值除以对照孔(未被处理的细胞)的值的平均值。针对缀合物浓度对存活细胞的百分比进行绘图,且使用非线性回归分析(GraphPad Prims 7.0)计算活性的EC₅₀。这些结果示于表15及图11A和图11B中。LDL-DM缀合物是有效的并且与DM4缀合物相比显示出更大的特异性窗口。

[1124] 表15

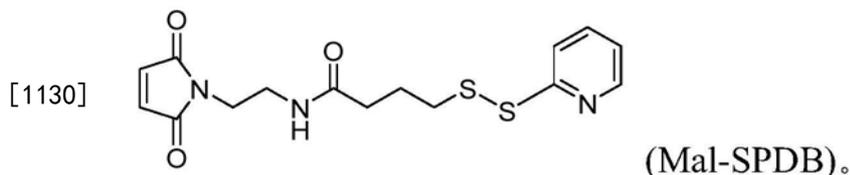
[1125]	细胞系	疾病类型	抗 ADAM9 ADC	药物造成的体外细胞毒性 (IC ₅₀ M)	特异性倍数 (IC ₅₀ 对照 ADC/ IC ₅₀ 抗 ADAM9 ADC) 或 (IC ₅₀ 阻断的抗 ADAM9 ADC/ IC ₅₀ 抗 ADAM9 ADC)
	NCI-H 1703	NSCLC -鳞状	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	7.13E-11	134

	细胞癌	hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	2.56E-10	>1000	
		hMAB-A(2I.2)(YTE/-K)-sGMBS-LDL-DM	3.73E-10	>1000	
		hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Mal-LDL-DM	3.10E-10	>1000	
[1126]	NCI-H 2110	NSCLC -腺癌	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	1.65E-09	4.4
			hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	1.20E-08	>1000
	Calu-3	NSCLC -腺癌	hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4	3.07E-09	13
			hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM	1.42E-09	>1000

[1127] 实施例14

[1128] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带Calu-3人非小细胞肺腺癌异种移植物的SCID小鼠中的抗肿瘤活性

[1129] 在携带Calu-3细胞(即人肺腺癌异种移植物)的雌性SCID小鼠模型中评价50 μ g/kg hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(3.6DAR)、hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(3.3DAR)、hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)、hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(1.9DAR)、hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-SPBD-DM4(1.8DAR)及hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(1.8DAR)缀合物的DM(美登木素生物碱)有效负载的抗肿瘤活性。包含hMAB-A(2I.2)-S442C抗体的免疫缀合物hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-SPBD-DM4经由Ma1-SPBD接头偶联到DM4:



[1131] 收获Calu-3细胞用于接种,通过台盼蓝排除法测定活力为99%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在0.2ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的5x 10⁶个Calu-3细胞对小鼠进行接种。获得八十八只雌性CB.17SCID小鼠(6周龄)。在收到后,先观察动物7天,之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛迹象。

[1132] 将八十六只小鼠按肿瘤体积随机分成7个组(每组8只小鼠)。肿瘤体积的范围为78.92至123.62(98.60 \pm 12.90,平均值 \pm SD)mm³。在植入后第7天,基于肿瘤体积对小鼠进行测量并随机分组。在植入后第7天对小鼠进行给药(12/19/17)。小鼠体重的范围为16.99至21.57(18.89 \pm 0.93,平均值 \pm SD)克。通过打孔法对各组中的小鼠进行鉴别。通过使用配备有27号1/2英寸针的1.0ml针筒以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以50 μ g/kg DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂,对于DAR \sim 3.5缀合物,其为 \sim 2.5mg/kg抗体,而对于DAR \sim 2.0缀合物,其为 \sim 4.3mg/kg抗体。所述组包括:对照组,用媒介物(PBS,150 μ L)进行给药;hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(3.6DAR),2.6mg/kg抗体;hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(3.3DAR),2.9mg/kg抗体;hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR),4.3mg/kg抗体;hMAB-A

(2I.2) - sGMBS-LDL-DM (1.9DAR), 5.1mg/kg抗体; hMAB-A (2I.2) - S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR), 5.3mg/kg抗体; 及hMAB-A (2I.2) - S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR), 5.3mg/kg抗体。

[1133] 使用卡尺在三个维度上每周测量肿瘤大小两次。使用公式体积=长度x宽度x高度x1/2以 mm^3 表述肿瘤体积。认为小鼠在肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR); 在未检测到可触知的肿瘤时具有完全肿瘤消退(CR); 且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤, 则为无肿瘤存活者(TFS)。通过StudyLog软件确定肿瘤体积。

[1134] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如, 当对照肿瘤的中值TV达到~1000 mm^3 的最大肿瘤体积的时间, 也是对小鼠施以安乐死之时)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第58天, 当对照组的中值TV达到953 mm^3 时, 计算%T/C。根据NCI标准, T/C \leq 42%是抗肿瘤活性的最低水平, 而T/C<10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。肿瘤生长延缓(T-C)是治疗组(T)与对照组肿瘤(C)达到预定大小1000 mm^3 (排除无肿瘤存活者)的中值时间(以天计)之间的差异。肿瘤倍增时间(Td)由对照肿瘤生长的每日中值的非线性指数曲线拟合估算, 并由StudyLog软件确定。Td为16.9天, R²=0.998。用公式LCK=(T-C)/Td x3.32计算Log10细胞杀伤(LCK), 其中3.32为每对数细胞生长的细胞倍增数量。LCK的南方研究院(The Southern Research Institute)(SRI)活性标准为<0.7:- (无活性); 0.7-1.2:+; 1.3-1.9:++; 2.0-2.8:+++; >2.8:++++ (高度活性)。

[1135] 所有小鼠的体重(BW)每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并通过StudyLog软件来确定。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比: BW变化%=[(后BW/前BW)-1]x100, 其中后BW为处理后的体重, 且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比(BWL)表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于1000 mm^3 , 肿瘤变得坏死, 小鼠丧失>20%其初始体重或小鼠变得垂死, 则对动物施以安乐死。

[1136] 研究结果示于图12中。LDL-DM ADC比其SPDB-DM4对应物都更具活性。hMAB-A (2I.2) - sSPDB-DM4 (3.6DAR) 缀合物具有30% (活性) 的肿瘤生长抑制(T/C)值、34天的肿瘤生长延缓(T-C)值和6.7(++++的log10细胞杀伤(LCK)值, 其中8只小鼠中有1只具有部分肿瘤消退且没有完全消退。hMAB-A (2I.2) - sGMBS-LDL-DM (3.3DAR) 缀合物具有7% (高度活性) 的T/C值、>66天的T-C值和>13.0(++++的LCK值, 其中8只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退且没有完全消退。这表明hMAB-A (2I.2) - sGMBS-LDL-DM比~3.5DAR的hMAB-A (2I.2) - sSPDB-DM4更具活性。hMAB-A (2I.2) - sSPDB-DM4 (2.1DAR) 具有58% (无活性) 的T/C值、20天的T-C值和4.0(++++的LCK值, 其中8只小鼠中有0只具有部分肿瘤消退且没有完全消退。hMAB-A (2I.2) - sGMBS-LDL-DM (1.9DAR) 具有15% (活性) 的T/C值、47天的T-C值和9.2(++++的LCK值, 其中8只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退且有1只完全消退。这表明hMAB-A (2I.2) - sGMBS-LDL-DM比~2.0DAR的hMAB-A (2I.2) - sSPDB-DM4更具活性。hMAB-A (2I.2) - S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 具有97% (无活性) 的T/C值、3天的T-C值和0.6(-)的LCK值, 其中8只小鼠中有0只具有部分肿瘤消退且没有完全消退。hMAB-A (2I.2) - S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 具有15% (活性) 的T/C值、39天的T-C值和7.7(++++的LCK值, 其中8只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退且有2只完全消退。这表明hMAB-A (2I.2) - S442C-Ma1-LDL-DM比DAR~2.0的具有位点特异性缀合的hMAB-A (2I.2) - S442C-Ma1-SPBD-DM4更具活性。在指定剂量下, 任何ADC均未观察到明显的体重减轻, 且因此, 在本研究中, 所有六种缀合物在小鼠中均

具有良好的耐受性。

[1137] 另外, DAR~2.0ADC与其DAR~3.5对应物的活性相当。具体来说, hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR) 与hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR) 和hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 的活性差不多。由于耐受性和毒性是由有效负载浓度决定的, 因此与具有DAR 3.5的ADC相比, 具有DAR 2.0的ADC可以更高的抗体浓度给予。DAR 2.0ADC暴露的增加可通过使靶标介导的药物处置 (TMDD) 饱和和/或增加肿瘤渗透来提高疗效。这项研究的结果表明, hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 缀合物在Calu-3非小细胞肺腺癌肿瘤异种移植模型中表现出很强的抗肿瘤活性并且非常有效。

[1138] 实施例15

[1139] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带H1703人非小细胞肺鳞状细胞癌异种移植物的裸小鼠中的抗肿瘤活性

[1140] 在携带H1703细胞 (即人非小细胞肺鳞状细胞癌异种移植物) 的雌性裸小鼠模型中评价50 μ g/kg hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR)、hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR)、hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1141] 收获H1703细胞以进行接种, 通过台盼蓝排除法测定活力为100%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在0.2ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的5x 10⁶个H1703细胞对小鼠进行接种。获得六十六只雌性无胸腺Nude-Foxn1nu小鼠 (6周龄)。在收到后, 先观察动物3天, 之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛的症状。

[1142] 将四十二只小鼠按肿瘤体积随机分成7个组 (每组6只小鼠)。肿瘤体积的范围为61.84至310.17 (128.05 \pm 46.61, 平均值 \pm SD) mm³。在植入后第26天, 基于肿瘤体积对小鼠进行测量并随机分组。在植入后第27天对小鼠进行给药 (12/28/17)。小鼠体重的范围为19.69至26.59 (23.54 \pm 1.61, 平均值 \pm SD) 克。通过打孔法对各组中的小鼠进行鉴别。通过使用配备有27号1/2英寸针的1.0ml针筒以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以50 μ g/kg DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂, 对于DAR~3.5缀合物, 其为~2.5mg/kg抗体, 而对于DAR~2.0缀合物, 其为~4.3mg/kg抗体。所述组包括: 对照组, 用媒介物 (PBS, 150 μ L) 进行给药; hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR), 2.6mg/kg抗体; hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR), 2.9mg/kg抗体; hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR), 4.3mg/kg抗体; hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR), 5.1mg/kg抗体; hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR), 5.3mg/kg抗体; 及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR), 5.3mg/kg抗体。

[1143] 使用卡尺在三个维度上每周测量肿瘤大小两次。使用公式体积=长度x宽度x高度x1/2以mm³表述肿瘤体积。认为小鼠在肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退 (PR); 在未检测到可触知的肿瘤时具有完全肿瘤消退 (CR); 且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤, 则为无肿瘤存活者 (TFS)。通过StudyLog软件确定肿瘤体积。

[1144] 肿瘤生长抑制率 (%T/C) 是在预定时间 (例如, 当对照肿瘤的中值TV达到~1000mm³的最大肿瘤体积的时间, 也是对小鼠施以安乐死之时) 下治疗组 (T) 的中值肿瘤体积 (TV) 与对照组 (C) 的中值TV的比率。接种后第44天, 当对照组的中值TV达到1206mm³时, 计

算%T/C。根据NCI标准，T/C \leq 42%是抗肿瘤活性的最低水平，而T/C $<$ 10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。肿瘤生长延缓(T-C)是治疗组(T)与对照组肿瘤(C)达到预定大小1000mm³(排除无肿瘤存活者)的中值时间(以天计)之间的差异。肿瘤倍增时间(Td)由对照肿瘤生长的每日中值的非线性指数曲线拟合估算，并由StudyLog软件确定。Td为7.60天，R²=0.994。用公式LCK=(T-C)/Td x 3.32计算Log₁₀细胞杀伤(LCK)，其中3.32为每对数细胞生长的细胞倍增数量。LCK的南方研究院(SRI)活性标准为 <0.7 :- (无活性); $0.7-1.2$:+; $1.3-1.9$:++; $2.0-2.8$:+++; >2.8 :++++ (高度活性)。

[1145] 所有小鼠的体重(BW)每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并通过StudyLog软件来确定。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比:BW变化%=[(后BW/前BW)-1]x 100,其中后BW为处理后的体重,且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比(BWL)表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于1000mm³,肿瘤变得坏死,小鼠丧失 $>20\%$ 其初始体重或小鼠变得垂死,则对动物施以安乐死。

[1146] 研究结果示于图13中。LDL-DM ADC比其SPDB-DM4对应物都更具活性。hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(3.6DAR)缀合物具有5%(高度活性)的肿瘤生长抑制(T/C)值、32天的肿瘤生长延缓(T-C)值和1.3(++)的log₁₀细胞杀伤(LCK)值,其中6只小鼠中有3只具有部分肿瘤消退,1只完全消退且1只是无肿瘤存活者。hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(3.3DAR)缀合物具有0%(高度活性)的T/C值、 >85 天的T-C值和 >3.4 (++++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,6只完全消退且5只是无肿瘤存活者。这表明hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM比 ~ 3.5 DAR的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4更具活性。hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有1%(高度活性)的T/C值、 >66 天的T-C值和 >2.6 (+++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,5只完全消退且2只是无肿瘤存活者。hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(1.9DAR)具有1%(高度活性)的T/C值、64天的T-C值和2.5(+++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,5只完全消退且1只是无肿瘤存活者。这表明hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM比 ~ 2.0 DAR的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4更具活性。hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-SPBD-DM4(1.8DAR)具有36%(活性)的T/C值、13天的T-C值和0.5(-)的LCK值,其中6只小鼠中有1只具有部分肿瘤消退且没有完全消退。hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(1.8DAR)具有1%(高度活性)的T/C值、38天的T-C值和1.5(++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,5只完全消退且4只是无肿瘤存活者。这表明hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM比DAR ~ 2.0 的具有位点特异性缀合的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-SPBD-DM4更具活性。在指定剂量下,任何ADC均未观察到明显的体重减轻,且因此,在本研究中,所有六种缀合物在小鼠中均具有良好的耐受性。

[1147] 另外,DAR ~ 2.0 ADC与其DAR ~ 3.5 对应物的活性相当。具体来说,hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(3.3DAR)与hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM(1.9DAR)和hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(1.8DAR)的活性差不多。由于耐受性和毒性是由有效负载浓度决定的,因此与具有DAR 3.5的ADC相比,具有DAR 2.0的ADC可以更高的抗体浓度给予。DAR 2.0ADC暴露的增加可通过使靶标介导的药物处置(TMDD)饱和和/或增加肿瘤渗透来提高疗效。这项研究的结果表明,hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(1.8DAR)缀合物在H1703非小细胞鳞状肺癌肿瘤异种移植物模型中表现出很强的抗肿瘤活性并且非常有效。

[1148] 实施例16

[1149] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带SNU-5人胃癌异种移植物的裸小鼠中的抗肿瘤活性

[1150] 在携带SNU-5细胞(即人胃癌异种移植物)的雌性裸小鼠模型中评价50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR)、hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR)、hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR)、hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1151] 收获SNU-5细胞以进行接种,通过台盼蓝排除法测定活力为100%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在0.1ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的 5×10^6 个SNU-5细胞对小鼠进行接种。获得六十六只雌性无胸腺Nude-Foxn1nu小鼠(6周龄)。在收到后,先观察动物6天,之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛的迹象。

[1152] 将四十二只小鼠按肿瘤体积随机分成7个组(每组6只小鼠)。肿瘤体积的范围为61.84至310.17 (128.05 ± 46.61 , 平均值 \pm SD) mm^3 。在植入后第18天,基于肿瘤体积对小鼠进行测量并随机分组。在植入后第20天对小鼠进行给药(1/7/18)。小鼠体重的范围为19.69至26.59 (23.63 ± 1.57 , 平均值 \pm SD) 克。通过打孔法对各组中的小鼠进行鉴别。通过使用配备有27号1/2英寸针的1.0ml针筒以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂,对于DAR \sim 3.5缀合物,其为 \sim 2.5mg/kg抗体,而对于DAR \sim 2.0缀合物,其为 \sim 4.3mg/kg抗体。所述组包括:对照组,用媒介物(PBS, 150 μL)进行给药;hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR), 2.6mg/kg抗体;hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR), 2.9mg/kg抗体;hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR), 4.3mg/kg抗体;hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR), 5.1mg/kg抗体;hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR), 5.3mg/kg抗体;及hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR), 5.3mg/kg抗体。

[1153] 使用卡尺在三个维度上每周测量肿瘤大小两次。使用公式体积=长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2以 mm^3 表述肿瘤体积。认为小鼠在肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR);在未检测到可触知的肿瘤时具有完全肿瘤消退(CR);且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤,则为无肿瘤存活者(TFS)。通过StudyLog软件确定肿瘤体积。

[1154] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如,当对照肿瘤的中值TV达到 \sim 1000 mm^3 的最大肿瘤体积的时间,也是对小鼠施以安乐死之时)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第70天,当对照组的中值TV达到1122 mm^3 时,计算%T/C。根据NCI标准,T/C \leq 42%是抗肿瘤活性的最低水平,而T/C $<$ 10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。肿瘤生长延缓(T-C)是治疗组(T)与对照组肿瘤(C)达到预定大小1000 mm^3 (排除无肿瘤存活者)的中值时间(以天计)之间的差异。肿瘤倍增时间(Td)由对照肿瘤生长的每日中值的非线性指数曲线拟合估算,并由StudyLog软件确定。Td为19.7天,R 2 =0.986。用公式 $\text{LCK} = (\text{T}-\text{C}) / \text{Td} \times 3.32$ 计算Log $_{10}$ 细胞杀伤(LCK),其中3.32为每对数细胞生长的细胞倍增数量。LCK的南方研究院(SRI)活性标准为 <0.7 :-(无活性); $0.7-1.2$:+; $1.3-1.9$:++; $2.0-2.8$:+++; >2.8 :++++(高度活性)。

[1155] 所有小鼠的体重(BW)每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并通过StudyLog软件来确定。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比:BW变化% =

$[(\text{后BW}/\text{前BW}) - 1] \times 100$, 其中后BW为处理后的体重, 且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比 (BWL) 表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于 1000mm^3 , 肿瘤变得坏死, 小鼠丧失 $>20\%$ 其初始体重或小鼠变得垂死, 则对动物施以安乐死。

[1156] 研究结果示于图14中。LDL-DM ADC比其SPDB-DM4对应物都更具活性。hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (3.6DAR) 缀合物具有66% (无活性) 的肿瘤生长抑制 (T/C) 值、0天的肿瘤生长延缓 (T-C) 值和0.0 (-) 的 \log_{10} 细胞杀伤 (LCK) 值, 其中6只小鼠中有2只具有部分肿瘤消退且没有完全消退。hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR) 缀合物具有14% (活性) 的T/C值、45天的T-C值和0.7 (+) 的LCK值, 其中6只小鼠中有4只具有部分肿瘤消退, 1只完全消退且1只是无肿瘤存活者。这表明hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM比 ~ 3.5 DAR的hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4更具活性。hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR) 具有47% (无活性) 的T/C值、10天的T-C值和0.2 (-) 的LCK值, 其中6只小鼠中有1只具有部分肿瘤消退, 1只完全消退且1只是无肿瘤存活者。hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR) 具有41% (活性) 的T/C值、10天的T-C值和0.2 (-) 的LCK值, 其中6只小鼠中有2只具有部分肿瘤消退, 1只完全消退且1只是无肿瘤存活者。这表明hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM比 ~ 2.0 DAR的hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4更具活性。hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4 (1.8DAR) 具有107% (无活性) 的T/C值、-11天的T-C值和-0.2 (-) 的LCK值, 其中6只小鼠中有1只具有部分肿瘤消退, 1只完全消退且1只是无肿瘤存活者。hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 具有22% (活性) 的T/C值、28天的T-C值和0.4 (-) 的LCK值, 其中6只小鼠中有2只具有部分肿瘤消退, 1只完全消退且1只是无肿瘤存活者。这表明hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM比DAR ~ 2.0 的具有位点特异性缀合的hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-SPBD-DM4更具活性。在指定剂量下, 任何ADC均未观察到明显的体重减轻, 且因此, 在本研究中, 所有六种缀合物在小鼠中均具有良好的耐受性。

[1157] 另外, DAR ~ 2.0 ADC与其DAR ~ 3.5 对应物的活性相当。具体来说, hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (3.3DAR) 与hMAB-A (2I.2) -sGMBS-LDL-DM (1.9DAR) 和hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 的活性差不多。由于耐受性和毒性是由有效负载浓度决定的, 因此与具有DAR 3.5的ADC相比, 具有DAR 2.0的ADC可以更高的抗体浓度给予。DAR 2.0ADC暴露的增加可通过使靶标介导的药物处置 (TMDD) 饱和和/或增加肿瘤渗透来提高疗效。这项研究的结果表明, hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 缀合物在SNU-5胃癌肿瘤异种移植模型中表现出抗肿瘤活性并且是有效的。

[1158] 实施例17

[1159] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带EBC-1人非小细胞肺鳞状细胞癌异种移植物的SCID小鼠中的抗肿瘤活性

[1160] 在携带EBC-1细胞 (即人非小细胞肺鳞状细胞癌异种移植体) 的雌性SCID小鼠模型中评价25、50及 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR) 和hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (2.1DAR) 缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1161] 收获EBC-1细胞以进行接种, 通过台盼蓝排除法测定活力为100%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在 0.2ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的 5×10^6 个EBC-1细胞对小鼠进行接种。获得六十六只雌性CB.17SCID小鼠 (6周龄)。在收到后, 先观察动物6天, 之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛的症状。

[1162] 将四十二只小鼠按肿瘤体积随机分成7个组(每组6只小鼠)。肿瘤体积的范围为79.38至124.29 (95.81 ± 11.83 , 平均值 \pm SD) mm^3 。在植入后第7天,基于肿瘤体积对小鼠进行测量、随机分组及给药(4/16/18)。小鼠体重的范围为15.94至21.10 (18.55 ± 1.17 , 平均值 \pm SD) 克。通过打孔法对各组中的小鼠进行鉴别。通过使用配备有27号1/2英寸针的1.0ml 针筒以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以25、50或100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂,对于DAR \sim 2.0缀合物,其为 \sim 2、4及9mg/kg抗体(Ab)。所述组包括:对照组,用媒介物(PBS, 200 μL)进行给药;hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR), 2.18、4.36及8.76mg/kg Ab;以及hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR), 2.14、4.28及8.57mg/kg Ab。

[1163] 使用卡尺在三个维度上每周测量肿瘤大小两次。使用公式体积=长度 \times 宽度 \times 高度 \times 1/2以 mm^3 表述肿瘤体积。认为小鼠在肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR);在未检测到可触知的肿瘤时具有完全肿瘤消退(CR);且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤,则为无肿瘤存活者(TFS)。通过StudyLog软件确定肿瘤体积。

[1164] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如,当对照肿瘤的中值TV达到 \sim 1000 mm^3 的最大肿瘤体积的时间,也是对小鼠施以安乐死之时)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第28天,当对照组的中值TV达到1279 mm^3 时,计算%T/C。根据NCI标准,T/C \leq 42%是抗肿瘤活性的最低水平,而T/C $<$ 10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。肿瘤生长延缓(T-C)是治疗组(T)与对照组肿瘤(C)达到预定大小1000 mm^3 (排除无肿瘤存活者)的中值时间(以天计)之间的差异。肿瘤倍增时间(Td)由对照肿瘤生长的每日中值的非线性指数曲线拟合估算,并由StudyLog软件确定。Td为6.04天,R $^2=0.995$ 。用公式 $\text{LCK} = (\text{T}-\text{C}) / \text{Td} \times 3.32$ 计算Log $_{10}$ 细胞杀伤(LCK),其中3.32为每对数细胞生长的细胞倍增数量。LCK的南方研究院(SRI)活性标准为 <0.7 :-(无活性);0.7-1.2:++;1.3-1.9:++;2.0-2.8:+++;>2.8:++++(高度活性)。

[1165] 所有小鼠的体重(BW)每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并通过StudyLog软件来确定。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比:BW变化%=[(后BW/前BW)-1] \times 100,其中后BW为处理后的体重,且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比(BWL)表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于1000 mm^3 ,肿瘤变得坏死,小鼠丧失 $>20\%$ 其初始体重或小鼠变得垂死,则对动物施以安乐死。

[1166] 研究结果示于图15中。LDL-DM ADC比SPDB-DM4对应物更具活性。以25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM(2.18mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有17%(活性)的T/C值、21天的T-C值和1.06(+)的LCK值,其中没有肿瘤消退或无肿瘤存活者。以50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM(4.36mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有2%(高度活性)的T/C值、34天的T-C值和1.68(++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,1只完全消退且没有无肿瘤存活者。以100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM(8.76mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有2%(高度活性)的T/C值、 >65 天的T-C值和 >3.26 (++++的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,6只完全消退且2只是无肿瘤存活者。以25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM(2.14mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有2%(高度活性)的T/C值、56天的T-C值和2.79(+++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,3只完全消退且没有无肿瘤存活者。以

50 μ g/kg DM(4.28mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有2% (高度活性)的T/C值、>65天的T-C值和>3.26(++++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,6只完全消退且没有无肿瘤存活者。以100 μ g/kg DM(8.57mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有1% (高度活性)的T/C值、>65天的T-C值和>3.26(++++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,6只完全消退且6只是无肿瘤存活者。在指定剂量下,任何ADC均未观察到明显的体重减轻,且因此,在本研究中,所有六种缀合物在小鼠中均具有良好的耐受性。这项研究的结果表明,hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)和hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)缀合物在EBC-1非小细胞肺鳞状细胞癌肿瘤异种移植模型中都表现出剂量依赖性抗肿瘤活性并且是有效的。

[1167] 实施例18

[1168] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带SW48人结肠直肠癌异种移植物的CD1裸小鼠中的抗肿瘤活性

[1169] 在携带SW48细胞(即人结肠直肠癌异种移植体)的雌性CD1免疫缺陷裸小鼠模型中评价25、50及100 μ g/kg hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Ma1-LDL-DM(1.8DAR)的DM有效负载和100 μ g/kg非结合对照huKTI-Ma1-LDL-DM(2.0DAR)缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1170] 收获SW48(ATCC CCL-231)细胞以进行接种,通过台盼蓝排除法测定活力大于90%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在0.1ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的5x10⁶个SW48细胞对小鼠进行接种。雌性CD1裸小鼠(5-7周龄)获自Charles Rivers Laboratories。在收到后,先观察动物3-4天,之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛迹象。

[1171] 将四十只小鼠按肿瘤体积随机分成5个组(每组8只小鼠)。在植入后第19天,肿瘤体积的范围为121.33至186.59(152.49 \pm 18.50,平均值 \pm SD)mm³。在植入后第19天,基于肿瘤体积对小鼠进行测量和随机分组并且在植入后第21天给药。在第19天,小鼠体重的范围为18.80至29.90(25.75 \pm 2.50,平均值 \pm SD)克。通过耳标法对各组中的小鼠进行鉴别。使用配备有28号1/2英寸针的0.5ml注射器,通过尾静脉注射以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以25、50或100 μ g/kg DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂,对于DAR~2.0缀合物,其为~2、4及9mg/kg抗体(Ab)。所述组包括:对照组,用媒介物(1X PBS,100 μ L)进行给药;hMAB-A(2I.2)(YTE/C/-K)-Ma1-LDL-DM(1.8DAR),2.18、4.36及8.57mg/kg Ab;以及huKTI-Ma1-LDL-DM(2.0DAR),8.57mg/kg Ab。

[1172] 使用电子卡尺通过正交测量每周测量肿瘤大小一次,并在向各组给药后每周测量两次。使用公式体积=长度x宽度x高度x1/2以mm³表述肿瘤体积。认为小鼠在与给药之日相比肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR);未检测到可触知的肿瘤(\leq 14.08mm³)连续三次或四次测量时具有完全肿瘤消退(CR);且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤(\leq 14.08mm³),则为无肿瘤存活者(TFS)。在Study Director软件内记录肿瘤体积。

[1173] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如,所有媒介物对照动物仍在研究中的时间点)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第56天,当对照组的中值TV达到663.04mm³时,计算%T/C。根据NCI标准,T/C \leq 42%是抗肿瘤活性的最低水平,而T/C<10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。

[1174] 所有小鼠的体重(BW)在给药前每周测量一次并在给药后每周测量两次作为药物

毒性的粗略指标并在Study Director软件内记录。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比： $BW\text{变化}\% = [(后BW/前BW) - 1] \times 100$ ，其中后BW为处理后的体重，且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比 (BWL) 表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于 2000mm^3 ，肿瘤有明显溃疡或坏死的迹象，小鼠丧失 $>20\%$ 其初始体重或小鼠变得垂死，则对动物施以安乐死。

[1175] 研究结果示于图16中。hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 在 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($8.57\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 的剂量下具有高活性，其中8/8小鼠部分消退，7/8小鼠完全消退，7/8小鼠是无肿瘤存活者，且%T/C为1%。在 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($4.36\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 的剂量水平下，hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 是有活性的，其中5/8小鼠部分消退，2/8小鼠完全消退，2/8小鼠是无肿瘤存活者，且%T/C为15%。hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 通过NCI标准在 $25\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($2.18\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 下被认为是无活性的，其中1/8小鼠部分消退，0/8小鼠完全消退，0/8小鼠是无肿瘤存活者，且%T/C为51%。结果表明hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 与非结合对照huKTI-Ma1-LDL-DM (2.0DAR) 缀合物一样是ADAM9靶向的，在 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($8.57\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 的剂量下无活性，其中0/8部分消退，0/8完全消退，0/8是无肿瘤存活者，且%T/C为93%。在指定剂量下，任何ADC均未观察到明显的体重减轻，且因此，在本研究中，所有缀合物在小鼠中均具有良好的耐受性。这项研究的结果表明，hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 缀合物在SW48结肠直肠癌异种移植模型中表现出剂量依赖性靶向抗肿瘤活性并且是有效的。

[1176] 实施例19

[1177] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带HPAF-II人胰腺腺癌异种移植物的CD1裸小鼠中的抗肿瘤活性

[1178] 在携带HPAF-II细胞 (即人胰腺腺癌异种移植体) 的雌性CD1免疫缺陷裸小鼠模型中评价25、50及 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 的DM有效负载和 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 非结合对照huKTI-Ma1-LDL-DM (2.0DAR) 缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1179] 收获HPAF-II (ATCC CRL-1997) 细胞以进行接种，通过台盼蓝排除法测定活力大于90%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在 0.1ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的 5×10^6 个HPAF-II细胞对小鼠进行接种。雌性CD1裸小鼠 (5-7周龄) 获自Charles Rivers Laboratories。在收到后，先观察动物3-4天，之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛迹象。

[1180] 将三十五只小鼠按肿瘤体积随机分成5个组 (每组7只小鼠)。在植入后第15天，肿瘤体积的范围为81.64至136.77 (104.94 ± 13.89 ，平均值 \pm SD) mm^3 。在植入后第15天，基于肿瘤体积对小鼠进行测量和随机分组并且在植入后第16天给药。在第15天，小鼠体重的范围为21.00至28.60 (25.21 ± 1.70 ，平均值 \pm SD) 克。通过耳标法对各组中的小鼠进行鉴别。使用配备有28号1/2英寸针的 0.5ml 注射器，通过尾静脉注射以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以25、50或 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ DM有效负载 $q \times 1$ 给予抗体药物缀合物测试剂，对于DAR \sim 2.0缀合物，其为 \sim 2、4及 $9\text{mg}/\text{kg}$ 抗体 (Ab)。所述组包括：对照组，用媒介物 (1X PBS, $100\mu\text{L}$) 进行给药；hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR)，2.18、4.36及 $8.57\text{mg}/\text{kg}$ Ab；以及huKTI-Ma1-LDL-DM (2.0DAR)， $8.57\text{mg}/\text{kg}$ Ab。

[1181] 使用电子卡尺通过正交测量每周测量肿瘤大小一次，并在向各组给药后每周测量

两次。使用公式体积=长度x宽度x高度x1/2以 mm^3 表述肿瘤体积。认为小鼠在与给药之日相比肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR);未检测到可触知的肿瘤($\leq 14.08\text{mm}^3$)连续三次或四次测量时具有完全肿瘤消退(CR);且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤($\leq 14.08\text{mm}^3$),则为无肿瘤存活者(TFS)。在Study Director软件内记录肿瘤体积。

[1182] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如,所有媒介物对照动物仍在研究中的时间)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第47天,当对照组的中值TV达到 882.83mm^3 时,计算%T/C。根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平,而 $T/C < 10\%$ 被认为是高的抗肿瘤活性水平。

[1183] 所有小鼠的体重(BW)在给药前每周测量一次并在给药后每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并在Study Director软件内记录。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比: $BW\text{变化}\% = [(后BW/前BW) - 1] \times 100$,其中后BW为处理后的体重,且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比(BWL)表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于 2000mm^3 ,肿瘤有明显溃疡或坏死的迹象,小鼠丧失 $>20\%$ 其初始体重或小鼠变得垂死,则对动物施以安乐死。

[1184] 研究结果示于图17中。hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 在 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($8.57\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 的剂量下具有高活性,其中7/7小鼠部分消退,3/7小鼠完全消退,3/7小鼠是无肿瘤存活者,且%T/C为3%。在 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($4.36\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 的剂量水平下,hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 是有活性的,其中5/7小鼠部分消退,1/7小鼠完全消退,1/7小鼠是无肿瘤存活者,且%T/C为11%。hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 通过NCI标准在 $25\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($2.18\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 下被认为是无活性的,其中0/7小鼠部分消退,0/7小鼠完全消退,0/7小鼠是无肿瘤存活者,且%T/C为56%。结果表明hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 与非结合对照huKTI-Ma1-LDL-DM (2.0DAR) 缀合物一样是ADAM9靶向的,通过NCI标准在 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ DM ($8.57\text{mg}/\text{kg}$ Ab) 的剂量下被认为是无活性的,其中0/7部分消退,0/7完全消退,0/7是无肿瘤存活者,且%T/C为48%。这项研究的结果表明,hMAB-A (2I.2) (YTE/C/-K) -Ma1-LDL-DM (1.8DAR) 缀合物在HPAF-II胰腺癌异种移植模型中表现出剂量依赖性靶向抗肿瘤活性并且是有效的。

[1185] 实施例20

[1186] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带H1975人非小细胞肺腺癌异种移植物的裸小鼠中的抗肿瘤活性

[1187] 在携带H1975细胞(即人非小细胞肺腺癌异种移植物)的雌性裸小鼠模型中评价25、50及 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ hMAB-A (2I.2) -sSPDB-DM4 (2.1DAR) 和hMAB-A (2I.2) -S442C-Ma1-LDL-DM (2.1DAR) 缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1188] 收获H1975细胞以进行接种,通过台盼蓝排除法测定活力为100%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在 0.2ml 50%Matrigel/50%无血清培养基中的 3×10^6 个H1975细胞对小鼠进行接种。获得六十六只雌性Foxn1^{nu}无胸腺小鼠(6周龄)。在收到后,先观察动物7天,之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛的症状。

[1189] 将四十二只小鼠按肿瘤体积随机分成7个组(每组6只小鼠)。肿瘤体积的范围为79.43至119.61 (92.44 ± 10.36 ,平均值 \pm SD) mm^3 。在植入后第7天,基于肿瘤体积对小鼠进行测量、随机分组及给药(4/10/18)。小鼠体重的范围为18.87至26.30 (22.92 ± 1.50 ,平均

值±SD)克。通过打孔法对各组中的小鼠进行鉴别。通过使用配备有27号1/2英寸针的1.0ml 针筒以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以25、50或100µg/kg DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂,对于DAR~2.0缀合物,其为~2、4及9mg/kg抗体(Ab)。所述组包括:对照组,用媒介物(PBS,200µL)进行给药;hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR),2.18、4.36及8.76mg/kg Ab;以及hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR),2.14、4.28及8.57mg/kg Ab。

[1190] 使用卡尺在三个维度上每周测量肿瘤大小两次。使用公式体积=长度x宽度x高度x1/2以mm³表述肿瘤体积。认为小鼠在肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR);在未检测到可触知的肿瘤时具有完全肿瘤消退(CR);且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤,则为无肿瘤存活者(TFS)。通过StudyLog软件确定肿瘤体积。

[1191] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如,当对照肿瘤的中值TV达到~1000mm³的最大肿瘤体积的时间,也是对小鼠施以安乐死之时)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第20天,当对照组的中值TV达到729mm³时,计算%T/C。根据NCI标准,T/C≤42%是抗肿瘤活性的最低水平,而T/C<10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。肿瘤生长延缓(T-C)是治疗组(T)与对照组肿瘤(C)达到预定大小1000mm³(排除无肿瘤存活者)的中值时间(以天计)之间的差异。肿瘤倍增时间(Td)由对照肿瘤生长的每日中值的非线性指数曲线拟合估算,并由StudyLog软件确定。Td为3.84天,R²=0.998。用公式LCK=(T-C)/Td x3.32计算Log₁₀细胞杀伤(LCK),其中3.32为每对数细胞生长的细胞倍增数量。LCK的南方研究院(SRI)活性标准为<0.7:- (无活性);0.7-1.2:++;1.3-1.9:++;2.0-2.8:+++;>2.8:++++ (高度活性)。

[1192] 所有小鼠的体重(BW)每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并通过StudyLog软件来确定。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比:BW变化%=[(后BW/前BW)-1]x100,其中后BW为处理后的体重,且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比(BWL)表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于1000mm³,肿瘤变得坏死,小鼠丧失>20%其初始体重或小鼠变得垂死,则对动物施以安乐死。

[1193] 研究结果示于图18中。LDL-DM ADC比SPDB-DM4 ADC对应物更具活性。以25µg/kg DM(2.18mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有26%(活性)的T/C值、10天的T-C值和0.79(+)的LCK值,其中没有肿瘤消退或无肿瘤存活者。以50µg/kg DM(4.36mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有8%(高度活性)的T/C值、35天的T-C值和2.72(+++)的LCK值,其中6只小鼠中有5只具有部分肿瘤消退,1只完全消退且没有无肿瘤存活者。以100µg/kg DM(8.76mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有7%(高度活性)的T/C值、>38天的T-C值和>2.98(++++)的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,没有完全消退且没有无肿瘤存活者。以25µg/kg DM(2.14mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有6%(高度活性)的T/C值,其中6只小鼠中有4只具有部分肿瘤消退,1只完全消退且没有无肿瘤存活者。无法计算T-C和LCK值,因为这组动物由于肿瘤坏死或最低体重减轻达7%而损失(注射后10天,该组中的1只动物因体重减轻>20%而必须施以安乐死)。以50µg/kg DM(4.28mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有4%(高度活性)的T/C值,其中6只小鼠中有5只具有部分肿瘤消

退,没有完全消退且没有无肿瘤存活者。无法计算T-C和LCK值,因为这组动物由于最低体重减轻达35%而损失(注射后20天,这组中的所有动物都因水壶堵塞而造成的体重减轻>20%而必须施以安乐死)。以100 μ g/kg DM(8.57mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有6%(高度活性)的T/C值、>38天的T-C值和>2.98(++++的LCK值,其中6只小鼠中有6只具有部分肿瘤消退,2只完全消退且2只是无肿瘤存活者。在任何指示剂量的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)或100 μ g/kg最高剂量的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)下均未观察到显著体重减轻且因此两种缀合物在本研究中在小鼠中均具有良好的耐受性。这项研究的结果表明,hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)和hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)缀合物在H1975非小细胞肺腺癌肿瘤异种移植模型中都表现出剂量依赖性抗肿瘤活性并且是有效的。

[1194] 实施例21

[1195] 抗ADAM9抗体药物缀合物在携带Hs 746T人胃癌异种移植物的SCID小鼠中的抗肿瘤活性

[1196] 在携带Hs 746T细胞(即人胃癌异种移植体)的雌性SCID小鼠模型中评价25、50及100 μ g/kg hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)和hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)缀合物的DM有效负载的抗肿瘤活性。

[1197] 收获Hs 746T细胞以进行接种,通过台盼蓝排除法测定活力为100%。通过在右后肋上的区域中的皮下注射来用在0.1ml无血清培养基中的 5×10^6 个Hs 746T细胞对小鼠进行接种。获得六十只雌性CB.17SCID小鼠(6周龄)。在收到后,先观察动物7天,之后开始研究。动物在到达时或在处理之前显示无疾病或病痛的症状。

[1198] 将四十二只小鼠按肿瘤体积随机分成7个组(每组6只小鼠)。肿瘤体积的范围为69.09至136.75(101.40 ± 19.16 ,平均值 \pm SD)mm³。在植入后第13天,基于肿瘤体积对小鼠进行测量、随机分组及给药(7/11/18)。小鼠体重的范围为18.03至23.21(19.66 ± 1.21 ,平均值 \pm SD)克。通过打孔法对各组中的小鼠进行鉴别。通过使用配备有27号1/2英寸针的1.0ml针筒以静脉内方式进行测试剂和媒介物的施用。以25、50或100 μ g/kg DM有效负载qdx1给予抗体药物缀合物测试剂,对于DAR~2.0缀合物,其为~2、4及9mg/kg抗体(Ab)。所述组包括:对照组,用媒介物(PBS,200 μ L)进行给药;hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR),2.18、4.36及8.76mg/kg Ab;以及hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR),2.14、4.28及8.57mg/kg Ab。

[1199] 使用卡尺在三个维度上每周测量肿瘤大小两次。使用公式体积=长度x宽度x高度x1/2以mm³表述肿瘤体积。认为小鼠在肿瘤体积减小50%或更大时具有部分消退(PR);在未检测到可触知的肿瘤时具有完全肿瘤消退(CR);且如果在研究结束时未检测到可触知的肿瘤,则为无肿瘤存活者(TFS)。通过StudyLog软件确定肿瘤体积。

[1200] 肿瘤生长抑制率(%T/C)是在预定时间(例如,当对照肿瘤的中值TV达到~1000mm³的最大肿瘤体积的时间,也是对小鼠施以安乐死之时)下治疗组(T)的中值肿瘤体积(TV)与对照组(C)的中值TV的比率。接种后第25天,当对照组的中值TV达到1536mm³时,计算%T/C。根据NCI标准,T/C \leq 42%是抗肿瘤活性的最低水平,而T/C<10%被认为是高的抗肿瘤活性水平。肿瘤生长延缓(T-C)是治疗组(T)与对照组肿瘤(C)达到预定大小1000mm³(排除无肿瘤存活者)的中值时间(以天计)之间的差异。肿瘤倍增时间(Td)由对照肿瘤生长

的每日中值的非线性指数曲线拟合估算,并由StudyLog软件确定。Td为3.38天,R2=0.991。用公式 $LCK = (T-C) / Td \times 3.32$ 计算Log10细胞杀伤(LCK),其中3.32为每对数细胞生长的细胞倍增数量。LCK的南方研究院(SRI)活性标准为<0.7:- (无活性);0.7-1.2:+;1.3-1.9:++;2.0-2.8:+++;>2.8:++++ (高度活性)。

[1201] 所有小鼠的体重(BW)每周测量两次作为药物毒性的粗略指标并通过StudyLog软件来确定。将小鼠的体重如下表述为与处理前体重相比的体重变化百分比:BW变化%=[(后BW/前BW)-1]x 100,其中后BW为处理后的体重,且前BW为处理前的起始体重。将体重损失百分比(BWL)表述为处理后体重的平均变化。如果在研究中的任何时间下肿瘤体积变得大于1000mm³,肿瘤变得坏死,小鼠丧失>20%其初始体重或小鼠变得垂死,则对动物施以安乐死。

[1202] 研究结果示于图19中。LDL-DM ADC比SPDB-DM4 ADC对应物更具活性。以25μg/kg DM(2.18mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有77%(无活性)的T/C值、1天的T-C值和0.12(-)的LCK值,其中没有肿瘤消退或无肿瘤存活者。以50μg/kg DM(4.36mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有67%(无活性)的T/C值、3天的T-C值和0.24(-)的LCK值,其中没有肿瘤消退或无肿瘤存活者。以100μg/kg DM(8.76mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)具有12%(活性)的T/C值、15天的T-C值和1.35(++)的LCK值,其中6只小鼠中有1只具有部分肿瘤消退,没有完全消退且没有无肿瘤存活者。以25μg/kg DM(2.14mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有58%(无活性)的T/C值、4天的T-C值和0.33(-)的LCK值,其中没有肿瘤消退或无肿瘤存活者。以50μg/kg DM(4.28mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有26%(活性)的T/C值、12天的T-C值和1.09(+)的LCK值,其中没有肿瘤消退或无肿瘤存活者。以100μg/kg DM(8.57mg/kg Ab)给予的hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)具有6%(高度活性)的T/C值、29天的T-C值和2.59(+++)的LCK值,其中6只小鼠中有4只具有部分肿瘤消退,没有完全消退且没有无肿瘤存活者。在指定剂量下,任何ADC均未观察到明显的体重减轻,且因此,在本研究中,所有六种缀合物在小鼠中均具有良好的耐受性。这项研究的结果表明,hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4(2.1DAR)和hMAB-A(2I.2)-S442C-Ma1-LDL-DM(2.1DAR)缀合物在Hs 746T胃癌肿瘤异种移植物模型中都表现出剂量依赖性抗肿瘤活性并且是有效的。

[1203] 本说明书中提及的所有公布和专利皆以引用的方式并入本文,达到如同明确及个别地指示将各个个别公布或专利申请以引用的方式整体并入的相同程度。虽然本发明已结合其具体实施方案予以描述,但是应理解其能够进行进一步修改,且希望本申请涵盖本发明的通常遵循本发明原则且涉及与本申请的偏差的任何变化形式、应用或改造,所述偏差处于本发明所属领域的已知或习惯实务范围内,且可适用于上文所阐明的基本特征。

序列表

- <110> 伊缪诺金公司 (IMMUNOGEN, INC.)
宏基因公司 (MACROGENICS, INC.)
- <120> 靶向 ADAM9 的免疫缀合物及其使用方法
- <130> 121162-04820
- <140>
<141>
- <150> 62/810, 703
<151> 2019-02-26
- <150> 62/691, 342
<151> 2018-06-28
- <150> 62/690, 052
<151> 2018-06-26
- [0001] <160> 163
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)
- <220>
<221> 变体
<222> (217).. (217)
<223> /替代=" "
- <220>
<221> 位点
<222> (1).. (217)
<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"
- <400> 1
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1	5	10	15
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	20	25	30
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	35	40	45
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	50	55	60
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
65	70	75	80
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	85	90	95
[0002]			
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	100	105	110
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met			
	115	120	125
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	130	135	140
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
145	150	155	160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	165	170	175
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			

180

185

190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 变体

<222> (216)..(216)

<223> /替代=" "

[0003]

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(216)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln
	65					70					75					80
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly
				85						90						95
	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro
			100						105						110	
	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
			115						120						125	
	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
	130							135							140	
[0004]	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
	145					150						155				160
	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
					165						170					175
	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
					180					185						190
	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
					195				200						205	
	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
	210							215								
	<210>	3														
	<211>	217														
	<212>	PRT														

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> 变体

<222> (217)..(217)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(217)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

[0005]

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
195 200 205

[0006]

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 4
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<221> 变体
<222> (217).. (217)
<223> /替代=" "

<220>
<221> 位点
<222> (1).. (217)
<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 4

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

[0007] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

<210> 5

<211> 819

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 5

Met Gly Ser Gly Ala Arg Phe Pro Ser Gly Thr Leu Arg Val Arg Trp
 1 5 10 15

[0008]

Leu Leu Leu Leu Gly Leu Val Gly Pro Val Leu Gly Ala Ala Arg Pro
 20 25 30

Gly Phe Gln Gln Thr Ser His Leu Ser Ser Tyr Glu Ile Ile Thr Pro
 35 40 45

Trp Arg Leu Thr Arg Glu Arg Arg Glu Ala Pro Arg Pro Tyr Ser Lys
 50 55 60

Gln Val Ser Tyr Val Ile Gln Ala Glu Gly Lys Glu His Ile Ile His
 65 70 75 80

Leu Glu Arg Asn Lys Asp Leu Leu Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Thr
 85 90 95

Tyr Asn Lys Glu Gly Thr Leu Ile Thr Asp His Pro Asn Ile Gln Asn

	100		105		110
His Cys His Tyr Arg Gly Tyr Val Glu Gly Val His Asn Ser Ser Ile					
	115		120		125
Ala Leu Ser Asp Cys Phe Gly Leu Arg Gly Leu Leu His Leu Glu Asn					
	130		135		140
Ala Ser Tyr Gly Ile Glu Pro Leu Gln Asn Ser Ser His Phe Glu His					
	145		150		155
Ile Ile Tyr Arg Met Asp Asp Val Tyr Lys Glu Pro Leu Lys Cys Gly					
			165		170
					175
Val Ser Asn Lys Asp Ile Glu Lys Glu Thr Ala Lys Asp Glu Glu Glu					
	180		185		190
[0009]					
Glu Pro Pro Ser Met Thr Gln Leu Leu Arg Arg Arg Arg Ala Val Leu					
	195		200		205
Pro Gln Thr Arg Tyr Val Glu Leu Phe Ile Val Val Asp Lys Glu Arg					
	210		215		220
Tyr Asp Met Met Gly Arg Asn Gln Thr Ala Val Arg Glu Glu Met Ile					
	225		230		235
					240
Leu Leu Ala Asn Tyr Leu Asp Ser Met Tyr Ile Met Leu Asn Ile Arg					
			245		250
					255
Ile Val Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Thr Asn Gly Asn Leu Ile Asn					
	260		265		270
Ile Val Gly Gly Ala Gly Asp Val Leu Gly Asn Phe Val Gln Trp Arg					

275	280	285
Glu Lys Phe Leu Ile Thr Arg Arg Arg His Asp Ser Ala Gln Leu Val		
290	295	300
Leu Lys Lys Gly Phe Gly Gly Thr Ala Gly Met Ala Phe Val Gly Thr		
305	310	315
Val Cys Ser Arg Ser His Ala Gly Gly Ile Asn Val Phe Gly Gln Ile		
	325	330
		335
Thr Val Glu Thr Phe Ala Ser Ile Val Ala His Glu Leu Gly His Asn		
	340	345
		350
Leu Gly Met Asn His Asp Asp Gly Arg Asp Cys Ser Cys Gly Ala Lys		
355	360	365
[0010]		
Ser Cys Ile Met Asn Ser Gly Ala Ser Gly Ser Arg Asn Phe Ser Ser		
370	375	380
Cys Ser Ala Glu Asp Phe Glu Lys Leu Thr Leu Asn Lys Gly Gly Asn		
385	390	395
		400
Cys Leu Leu Asn Ile Pro Lys Pro Asp Glu Ala Tyr Ser Ala Pro Ser		
	405	410
		415
Cys Gly Asn Lys Leu Val Asp Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Thr		
420	425	430
Pro Lys Glu Cys Glu Leu Asp Pro Cys Cys Glu Gly Ser Thr Cys Lys		
435	440	445
Leu Lys Ser Phe Ala Glu Cys Ala Tyr Gly Asp Cys Cys Lys Asp Cys		

625	630	635	640
Asn Tyr Asp Cys Asp Val Gln Lys Lys Cys His Gly His Gly Val Cys			
	645	650	655
Asn Ser Asn Lys Asn Cys His Cys Glu Asn Gly Trp Ala Pro Pro Asn			
	660	665	670
Cys Glu Thr Lys Gly Tyr Gly Gly Ser Val Asp Ser Gly Pro Thr Tyr			
	675	680	685
Asn Glu Met Asn Thr Ala Leu Arg Asp Gly Leu Leu Val Phe Phe Phe			
	690	695	700
Leu Ile Val Pro Leu Ile Val Cys Ala Ile Phe Ile Phe Ile Lys Arg			
705	710	715	720
[0012]			
Asp Gln Leu Trp Arg Ser Tyr Phe Arg Lys Lys Arg Ser Gln Thr Tyr			
	725	730	735
Glu Ser Asp Gly Lys Asn Gln Ala Asn Pro Ser Arg Gln Pro Gly Ser			
	740	745	750
Val Pro Arg His Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Arg Glu Val Pro Ile			
	755	760	765
Tyr Ala Asn Arg Phe Ala Val Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Gln Pro Gln			
	770	775	780
Gln Phe Pro Ser Arg Pro Pro Pro Pro Gln Pro Lys Val Ser Ser Gln			
785	790	795	800
Gly Asn Leu Ile Pro Ala Arg Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Tyr Ser			

805

810

815

Ser Leu Thr

<210> 6

<211> 819

<212> PRT

<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<400> 6

Met Gly Ser Gly Val Gly Ser Pro Ser Gly Thr Leu Arg Val Arg Trp
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Cys Leu Val Gly Pro Val Leu Gly Ala Ala Arg Pro
 20 25 30

[0013] Gly Phe Gln Gln Thr Ser His Leu Ser Ser Tyr Glu Ile Ile Thr Pro
 35 40 45

Trp Arg Leu Thr Arg Glu Arg Arg Glu Ala Pro Arg Pro Tyr Ser Lys
 50 55 60

Gln Val Ser Tyr Leu Ile Gln Ala Glu Gly Lys Glu His Ile Ile His
 65 70 75 80

Leu Glu Arg Asn Lys Asp Leu Leu Pro Glu Asp Phe Val Val Tyr Thr
 85 90 95

Tyr Asn Lys Glu Gly Thr Val Ile Thr Asp His Pro Asn Ile Gln Asn
 100 105 110

His Cys His Phe Arg Gly Tyr Val Glu Gly Val Tyr Asn Ser Ser Val
 115 120 125

Ala Leu Ser Asn Cys Phe Gly Leu Arg Gly Leu Leu His Leu Glu Asn
 130 135 140

Ala Ser Tyr Gly Ile Glu Pro Leu Gln Asn Ser Ser His Phe Glu His
 145 150 155 160

Ile Ile Tyr Arg Met Asp Asp Val His Lys Glu Pro Leu Lys Cys Gly
 165 170 175

Val Ser Asn Lys Asp Ile Glu Lys Glu Thr Thr Lys Asp Glu Glu Glu
 180 185 190

Glu Pro Pro Ser Met Thr Gln Leu Leu Arg Arg Arg Arg Ala Val Leu
 195 200 205

[0014] Pro Gln Thr Arg Tyr Val Glu Leu Phe Ile Val Val Asp Lys Glu Arg
 210 215 220

Tyr Asp Met Met Gly Arg Asn Gln Thr Ala Val Arg Glu Glu Met Ile
 225 230 235 240

Leu Leu Ala Asn Tyr Leu Asp Ser Met Tyr Ile Met Leu Asn Ile Arg
 245 250 255

Ile Val Leu Val Gly Leu Glu Ile Trp Thr Asn Gly Asn Leu Ile Asn
 260 265 270

Ile Ala Gly Gly Ala Gly Asp Val Leu Gly Asn Phe Val Gln Trp Arg
 275 280 285

Glu Lys Phe Leu Ile Thr Arg Arg Arg His Asp Ser Ala Gln Leu Val
 290 295 300

	Leu	Lys	Lys	Gly	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Met	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	
	305					310					315					320	
	Val	Cys	Ser	Arg	Ser	His	Ala	Gly	Gly	Ile	Asn	Val	Phe	Gly	His	Ile	
					325					330					335		
	Thr	Val	Glu	Thr	Phe	Ala	Ser	Ile	Val	Ala	His	Glu	Leu	Gly	His	Asn	
				340					345						350		
	Leu	Gly	Met	Asn	His	Asp	Asp	Gly	Arg	Asp	Cys	Ser	Cys	Gly	Ala	Lys	
			355					360						365			
	Ser	Cys	Ile	Met	Asn	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Arg	Asn	Phe	Ser	Ser	
		370					375					380					
[0015]	Cys	Ser	Ala	Glu	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Leu	Asn	Lys	Gly	Gly	Asn	
	385					390					395					400	
	Cys	Leu	Leu	Asn	Ile	Pro	Lys	Pro	Asp	Glu	Ala	Tyr	Ser	Ala	Pro	Ser	
				405					410						415		
	Cys	Gly	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Ala	Gly	Glu	Glu	Cys	Asp	Cys	Gly	Thr	
			420						425						430		
	Pro	Lys	Glu	Cys	Glu	Leu	Asp	Pro	Cys	Cys	Glu	Gly	Ser	Thr	Cys	Lys	
			435					440						445			
	Leu	Lys	Ser	Phe	Ala	Glu	Cys	Ala	Tyr	Gly	Asp	Cys	Cys	Lys	Asp	Cys	
			450				455							460			
	Arg	Phe	Leu	Pro	Gly	Gly	Thr	Leu	Cys	Arg	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu	Cys	
	465					470					475					480	

Asp Val Pro Glu Tyr Cys Asn Gly Ser Ser Gln Phe Cys Gln Pro Asp
 485 490 495

Val Phe Ile Gln Asn Gly Tyr Pro Cys Gln Asn Asn Lys Ala Tyr Cys
 500 505 510

Tyr Asn Gly Met Cys Gln Tyr Tyr Asp Ala Gln Cys Gln Val Ile Phe
 515 520 525

Gly Ser Lys Ala Lys Ala Ala Pro Lys Asp Cys Phe Ile Glu Val Asn
 530 535 540

Ser Lys Gly Asp Arg Phe Gly Asn Cys Gly Phe Ser Gly Asn Glu Tyr
 545 550 555 560

[0016]

Lys Lys Cys Ala Thr Gly Asn Ala Leu Cys Gly Lys Leu Gln Cys Glu
 565 570 575

Asn Val Gln Glu Ile Pro Val Phe Gly Ile Val Pro Ala Ile Ile Gln
 580 585 590

Thr Pro Ser Arg Gly Thr Lys Cys Trp Gly Val Asp Phe Gln Leu Gly
 595 600 605

Ser Asp Val Pro Asp Pro Gly Met Val Asn Glu Gly Thr Lys Cys Gly
 610 615 620

Ala Asp Lys Ile Cys Arg Asn Phe Gln Cys Val Asp Ala Ser Val Leu
 625 630 635 640

Asn Tyr Asp Cys Asp Ile Gln Lys Lys Cys His Gly His Gly Val Cys
 645 650 655

Asn Ser Asn Lys Asn Cys His Cys Glu Asn Gly Trp Ala Pro Pro Asn
 660 665 670

Cys Glu Thr Lys Gly Tyr Gly Gly Ser Val Asp Ser Gly Pro Thr Tyr
 675 680 685

Asn Glu Met Asn Thr Ala Leu Arg Asp Gly Leu Leu Val Phe Phe Phe
 690 695 700

Leu Ile Val Pro Leu Ile Val Cys Ala Ile Phe Ile Phe Ile Lys Arg
 705 710 715 720

Asp Gln Leu Trp Arg Arg Tyr Phe Arg Lys Lys Arg Ser Gln Thr Tyr
 725 730 735

[0017] Glu Ser Asp Gly Lys Asn Gln Ala Asn Pro Ser Arg Gln Pro Val Ser
 740 745 750

Val Pro Arg His Val Ser Pro Val Thr Pro Pro Arg Glu Val Pro Ile
 755 760 765

Tyr Ala Asn Arg Phe Pro Val Pro Thr Tyr Ala Ala Lys Gln Pro Gln
 770 775 780

Gln Phe Pro Ser Arg Pro Pro Pro Pro Gln Pro Lys Val Ser Ser Gln
 785 790 795 800

Gly Asn Leu Ile Pro Ala Arg Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Tyr Ser
 805 810 815

Ser Leu Thr

<210> 7
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

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

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

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

 [0018]
 Gly Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 8
 Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

[0019]

<400> 9
 Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 10
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 11
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

[0020]

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

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

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 13

Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser
1 5

[0021]

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 14

Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (34)..(34)

<223> /替代="Ile"

<220>

<221> 变体

<222> (55)..(55)

<223> /替代="Phe"

<220>

<221> 变体

<222> (63)..(63)

<223> /替代="Arg"

<220>

<221> 变体

<222> (65)..(65)

[0022] <223> /替代="Gln"

<220>

<221> 变体

<222> (66)..(66)

<223> /替代="Gly"

<220>

<221> 变体

<222> (105)..(105)

<223> /替代="Phe"或"Tyr"或"Trp"或"Ile"或"Leu"
"Val"或"Thr"或"Gly"或"Asp"

<220>

<221> 变体

<222> (106)..(106)

<223> /替代="Arg"或"Asn"或"His"或"Gly"或"Ser"

<220>

<221> 变体

<222> (107)..(107)

<223> /替代="Met"或"Ser"或"Lys"或"Asn"

<220>
 <221> 变体
 <222> (108)..(108)
 <223> /替代="Ala"

<220>
 <221> 变体
 <222> (109)..(109)
 <223> /替代="Phe"或"Thr"或"Val"

<220>
 <221> 变体
 <222> (110)..(110)
 <223> /替代="Leu"或"Lys"

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(123)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

[0023]

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="关于取代和优选实施方案的详细描述参见提交的说明书"

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Lys Phe Gly Trp Met Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

[0024]

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 17

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

[0025]

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 18

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

[0026]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 19

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 19

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

[0027]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 20

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 20

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0028]

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asn Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 21

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0029]

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ile Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 22
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

[0030]

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Phe Gly Trp Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 23
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

 [0031]
 Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Thr Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 24
 <211> 123

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 25

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

[0033] Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe His Ser Gly Thr Leu Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<400> 27

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

[0035] Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Val Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 28

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

[0036]

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 29

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

[0037]

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

<210> 30

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 31
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

<210> 32
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0038]

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

<400> 32
 Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 33
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 34
 Ser Tyr Trp Ile His
 1 5

[0039]

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 35
 Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 36
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 36

Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Arg Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

[0040]

<400> 37
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asn Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 38
 Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ile Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 39

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Phe Gly Trp Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 40

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Thr Gly Lys Gly Val Leu Asp Tyr

1 5 10

[0041]

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 41

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Asn Ala Val Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 42

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe His Ser Gly Thr Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 43

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 43

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Phe Asn Lys Ala Val Leu Asp Tyr
1 5 10

[0042]

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 44

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Gly Val Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (6)..(6)
 <223> /替代="Phe"

<220>
 <221> 变体
 <222> (14)..(14)
 <223> /替代="Arg"

[0044] <220>
 <221> 变体
 <222> (16)..(16)
 <223> /替代="Gln"

<220>
 <221> 变体
 <222> (17)..(17)
 <223> /替代="Gly"

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(17)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比,
 对变体位置没有偏好"

<400> 48
 Glu Ile Ile Pro Ile Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ser

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
<221> 变体
<222> (7).. (7)
<223> /替代="Phe"或"Tyr"或"Trp"或"Ile"或"Leu"
"Val"或"Thr"或"Gly"或"Asp"

<220>
<221> 变体
<222> (8).. (8)
<223> /替代="Arg"或"Asn"或"His"或"Gly"或"Ser"

[0045]

<220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> /替代="Met"或"Ser"或"Lys"或"Asn"

<220>
<221> 变体
<222> (10).. (10)
<223> /替代="Ala"

<220>
<221> 变体
<222> (11).. (11)
<223> /替代="Phe"或"Thr"或"Val"

<220>
<221> 变体
<222> (12).. (12)
<223> /替代="Leu"或"Lys"

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

[0047]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0048] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

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

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

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

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

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	20	25	30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	50	55	60
Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
[0050]			
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Phe Gly Trp Leu Asp Tyr	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			

	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	
					165					170					175		
	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	
				180					185						190		
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
			195					200							205		
	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	
			210					215							220		
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
	225					230					235					240	
[0054]	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
					245						250					255	
	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
				260							265					270	
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
			275							280						285	
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
			290												300		
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
	305					310						315				320	
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
					325										330		335

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

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

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

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

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

[0055] Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 53

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体
 <222> (24).. (24)
 <223> /替代="Arg"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (32).. (32)
 <223> /替代="Ser"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (37).. (37)
 <223> /替代="Leu"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (96).. (96)
 <223> /替代="Tyr"

 [0056] <220>
 <221> 变体
 <222> (97).. (97)
 <223> /替代="Ser"

 <220>
 <221> 变体
 <222> (98).. (98)
 <223> /替代="Thr"

 <220>
 <221> 位点
 <222> (1).. (111)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

 <400> 53
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

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

[0057]

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 54

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 56

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

[0059]

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

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

<210> 57
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 57
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

[0060]

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

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

<210> 58
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys

20

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

[0061]

<400> 59

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 61
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0062]

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

<400> 62
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 63
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 64
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

[0063]

<400> 65
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (1).. (1)
 <223> /替代="Arg"

<220>

<221> 变体
 <222> (9)..(9)
 <223> /替代="Ser"

<220>
 <221> 变体
 <222> (14)..(14)
 <223> /替代="Leu"

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(15)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

<400> 66
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

[0064]

<210> 67
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (4)..(4)
 <223> /替代="Tyr"

<220>
 <221> 变体
 <222> (5)..(5)
 <223> /替代="Ser"

<220>
 <221> 变体
 <222> (6)..(6)
 <223> /替代="Thr"

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(9)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

<400> 67
 Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 68
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 68
 [0065] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asp Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

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

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

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

[0066]

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

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

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

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 69

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

[0067]

<210> 70

<211> 104

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 70

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 71

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 71

[0068] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 72

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 72

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

[0069]

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val

<210> 73

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 73

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0070]

Arg Val

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 74

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 75

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 76

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

[0071]

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 77

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 78

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (217)..(217)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点
 <222> (1)..(217)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

<400> 78

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

[0072]

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

[0073]

<210> 79
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (217)..(217)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(217)
 <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

<400> 79
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
									25						30		
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
			35					40					45				
	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
		50					55					60					
	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
	65					70					75					80	
	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
					85					90					95		
[0074]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
				100					105						110		
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
			115					120					125				
	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		130					135					140					
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
	145					150					155					160	
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
					165					170					175		
	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
				180					185					190			

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 80

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (217)..(217)

[0075] <223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(217)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 80

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 81
Gly Ser Arg Asp Tyr Phe
1 5

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

[0077]

<400> 82
Asp Gly Glu Gly Val Met
1 5

<210> 83
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 83
Phe His Ser Gly Leu Leu
1 5

<210> 84
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 84

Phe Asn Ser Ala Thr Leu

1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 85

[0078] Phe Asn Ser Gly Thr Leu

1 5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 86

Phe Asn Ser Ser Thr Leu

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 87
Gly Lys Ser Lys Trp Leu
1 5

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 88
Gly Met Gly Gly Thr Leu
1 5

[0079]

<210> 89
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 89
His Ala Lys Gly Gly Met
1 5

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 90

Ile Gly Glu Ala Val Leu

1 5

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 91

Ile Gly Lys Gly Val Phe

1 5

[0080] <210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 92

Ile Gly Lys Gly Val Leu

1 5

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 93
Lys His Asp Ser Val Leu
1 5

<210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 94
Leu Asn Thr Ala Val Met
1 5

[0081]

<210> 95
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 95
Asn Gly Glu Gly Thr Leu
1 5

<210> 96
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 96
Asn Gly Lys Asn Thr Leu

1 5

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 97

Asn Ser Ala Gly Ile Leu

1 5

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0082]

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 98

Pro Lys Glu Gly Trp Met

1 5

<210> 99

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 99

Pro Lys Phe Gly Trp Lys

1 5

<210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 100
Pro Lys Met Gly Trp Val
1 5

<210> 101
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
[0083] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 101
Pro Arg Leu Gly His Leu
1 5

<210> 102
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 102
Pro Ser Phe Gly Trp Ala
1 5

<210> 103

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 103
Gln Ala Lys Gly Thr Met
1 5

<210> 104
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

[0084]

<400> 104
Arg Gly Met Gly Val Met
1 5

<210> 105
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 105
Arg Lys Glu Gly Trp Met
1 5

<210> 106
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 106

Thr Gly Lys Gly Val Leu

1 5

<210> 107

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 107

[0085] Thr Gly Met Gly Thr Leu

1 5

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 108

Thr Gly Asn Gly Val Met

1 5

<210> 109

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 109
Trp Asn Ala Gly Thr Phe
1 5

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 110
Tyr His His Thr Pro Leu
1 5

[0086]

<210> 111
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 111
Tyr Gln Ser Ala Thr Leu
1 5

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 112

Asp Gly Lys Ala Val Leu

1 5

<210> 113

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 113

Phe Asn Lys Ala Val Leu

1 5

[0087] <210> 114

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 114

Phe Asn Ser Gly Thr Trp

1 5

<210> 115

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 115
Phe Asn Thr Gly Val Phe
1 5

<210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 116
Gly Lys Ser Arg Phe His
1 5

[0088]

<210> 117
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 117
Ile Gly Lys Asn Val Tyr
1 5

<210> 118
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 118
Met Gly Lys Gly Val Met

1 5

<210> 119

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 119

Asn Gly Glu Ser Val Phe

1 5

<210> 120

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0089]

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 120

Pro Asp Phe Gly Trp Met

1 5

<210> 121

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 121

Pro Gly Ser Gly Val Met

1 5

<210> 122
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 122
Pro Lys Asp Ala Trp Leu
1 5

<210> 123
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
[0090] <223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 123
Pro Lys Phe Gly Trp Leu
1 5

<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 124
Pro Lys Ile Gly Trp His
1 5

<210> 125

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 125
Pro Lys Met Gly Trp Ala
1 5

<210> 126
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

[0091]

<400> 126
Pro Lys Met Gly Trp Met
1 5

<210> 127
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 127
Pro Gln Met Gly Trp Leu
1 5

<210> 128
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 128

Pro Arg Phe Gly Trp Leu

1 5

<210> 129

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 129

[0092] Pro Arg Met Gly Phe Leu

1 5

<210> 130

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 130

Pro Arg Met Gly Phe Met

1 5

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 131
Pro Ser Phe Gly Trp Met
1 5

<210> 132
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 132
Arg Arg Glu Gly Trp Met
1 5

[0093]

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 133
Ser Gly Glu Gly Val Leu
1 5

<210> 134
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 134

Ser Gly Asn Gly Val Met

1 5

<210> 135

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 135

Val Gly Lys Ala Val Leu

1 5

[0094] <210> 136

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 136

Asp Ser Asn Ala Val Leu

1 5

<210> 137

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 137
Phe His Ser Gly Thr Leu
1 5

<210> 138
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 138
Gly Gly Ser Gly Val Leu
1 5

[0095]

<210> 139
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 139
Pro Arg Gln Gly Phe Leu
1 5

<210> 140
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 140
Tyr Asn Ser Gly Thr Leu

1 5

<210> 141
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (453)..(453)
 <223> /替代=" "

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(453)

[0096] <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

<400> 141
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

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

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

[0097] Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0098]

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 142

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (453)..(453)

[0099] <223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(453)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 142

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

225	230	235	240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
	260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
305	310	315	320
[0101]			
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
	325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			
	340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln			
	355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala			
	370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr			
385	390	395	400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			

405

410

415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 143

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

[0102] <221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (453)..(453)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(453)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 143

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

[0103]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0104] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

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

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

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

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

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> β-Ala

<400> 145
Ala Leu Ala Leu
1

<210> 146
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 146
Gly Phe Leu Gly
1

[0106]

<210> 147
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
<221> 变体
<222> (217)..(217)
<223> /替代=" "

<220>
<221> 位点
<222> (1)..(217)
<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比,"

对变体位置没有偏好”

<400> 147

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

[0107]

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165

170

175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 148

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

[0108]

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (217)..(217)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(217)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 148

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

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

[0109] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 149

<211> 217

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (217)..(217)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

[0110] <222> (1)..(217)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 149

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65	70	75	80	
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	85	90	95	
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln	100	105	110	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	115	120	125	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	130	135	140	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	145	150	155	160
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	165	170	175	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	180	185	190	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	195	200	205	
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	210	215		

[0111]

<210> 150
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

[0113]

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 151

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (453)..(453)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(453)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 151

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

[0114]

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

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

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

145	150	155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
	165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
	180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
	195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys			
	210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
225	230	235	240
[0115]			
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
	245	250	255
Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
	260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
305	310	315	320
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			

	325		330		335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro					
	340		345		350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln					
	355		360		365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala					
	370		375		380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr					
385		390		395	400
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu					
	405		410		415
[0116]					
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser					
	420		425		430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser					
	435		440		445
Leu Ser Pro Gly Lys					
	450				
<210> 152					
<211> 453					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<221> 来源					
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"					

<220>

<221> 变体

<222> (453)..(453)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(453)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 152

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0117]

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

[0118] Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

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

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

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
	305					310					315					320
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				325						330						335
	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
				340					345						350	
	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
			355					360						365		
	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
	370							375								380
[0119]	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
	385					390					395					400
	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
					405					410						415
	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
				420					425						430	
	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys
			435					440						445		
	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
	450															
	<210>	153														
	<211>	453														
	<212>	PRT														

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (453)..(453)

<223> /替代=" "

<220>

<221> 位点

<222> (1)..(453)

<223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
对变体位置没有偏好"

<400> 153

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

[0120]

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20						25					30	

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

Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
		50				55						60			

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

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

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Leu	Asp	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	100		105		110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly					
	115		120		125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly					
	130		135		140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val					
145		150		155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe					
		165		170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val					
	180		185		190
[0121]					
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val					
	195		200		205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys					
	210		215		220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala					
225		230		235	240
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr					
	245		250		255
Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val					
	260		265		270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val					

275

280

285

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

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

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

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

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

[0122]

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Xaa

450

<210> 154
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<220>
 <221> 变体
 <222> (453)..(453)
 <223> /替代="

<220>
 <221> 位点
 <222> (1)..(453)

[0123] <223> /注释="在序列中给出的变异残基与注释中的那些相比，
 对变体位置没有偏好"

<400> 154
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

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

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

[0124] Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 165 170 175

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

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

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

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

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

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

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

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

[0125]

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 155

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 155

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

[0126]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr

	100		105		110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly					
	115		120		125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly					
	130		135		140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val					
145		150		155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe					
		165		170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val					
	180		185		190
[0127]					
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val					
	195		200		205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys					
	210		215		220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu					
225		230		235	240
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr					
		245		250	255
Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val					
	260		265		270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val					

275

280

285

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

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

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

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

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

[0128]

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly

450

<210> 156

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 156

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

[0129] Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Arg Gln Gly Phe Leu Asp Tyr
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

[0130] Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 210 215 220

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

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

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

[0131] Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly
450

<210> 157

<211> 654

<212> DNA

	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"	
	<400> 157	
	gacattgtga tgaccaatc tccagattct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc	60
	atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tactctgggtg atagttatat gaactggtac	120
	caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccga cctagaatct	180
	ggaatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct cactatctct	240
	agcctggagc ctgaggattt cgcaacctat tactgtcagc aaagtcatga agaccggtc	300
	acgttcggac aagggaccaa gctcgaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc	360
	atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	420
[0132]	aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg	480
	ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	540
	agcacctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	600
	acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt	654
	<210> 158	
	<211> 654	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"	
	<400> 158	
	gacattgtga tgacgcagtc ccccgactcc ctggccgtgt ccttgggcga aaggccaca	60
	atcagetgca aggcatacaca gagcgtggac tactctgggg acagetacat gaattgtac	120

cagcagaagc cgggcagcc tccaaagctg ctgatctacg cgcgatccga cctggagtcc 180
 ggcatcccgg cgcggttctc gggttcggga tccggcactg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctggagc ccgaggactt tgcgacctac tactgccaac agtcccacga agatccgttt 300
 accttcggac aaggcaccaa gctcgagatc aagagaactg tggccgcccc gagcgtgttc 360
 attttcccgc catcggatga gcaactgaag tccggaactg cgagcgtggt ctgcctctc 420
 aacaacttct atcctcggga agccaaagtg cagtgggaagg tcgacaacgc tctgcagtcc 480
 ggaaactccc aagagagcgt gaccgaacag gattccaagg actcgaccta ctgcgtgtca 540
 tccactctga ccctgagcaa ggccgattac gaaaagcaca aagtgtacgc ttgcaagtg 600
 acccaccagg gactgtcacc cctgtgacc aagtcgttca accgcggcga atgc 654

[0133]

<210> 159
 <211> 1359
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"

<220>
 <221> 位点
 <222> (1357)..(1359)
 <223> /注释="此区域可能完整地存在，也可能不完整地存在"

<400> 159
 gaggccaac tgggtggaatc tgggggagc ctggtgaagc ctgggggctc actgagactg 60
 tcttgcgctg cttctggttt taccttctct agctactgga tgcaactggg gagacaggca 120
 cctggaaagg gccttgagtg gtttgagagc attattccta tctttggtca tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagcag gttcacaatt tcttagaca actccaagaa tacactgtac 240
 ctccaaatgg gaagcctgag ggcagaggac acagcgttct attactgtgc aagagggggt 300

tattattatt acccccggca gggcttctcg gactactggg gcccaaggcac cactgtgaca	360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc	420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg	480
acgggtgctgt ggaactcagg cgccttgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	600
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga	660
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	720
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct ctatatcacc	780
cgggagcctg aggtcacatg cgtgggtggg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag	840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcttgacca ggactggctg	960
[0134] aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccattc	1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc	1200
cctcccgtgc tggactccga eggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgetccgtga tgcattgagc tetgcacaac	1320
cactacacgc agaagacct ctcctgtct cgggtaaa	1359

<210> 160

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多核苷酸"

<400> 160

gaggtccaac tgggtggaatc tgggggaggc ctggtgaagc ctgggggctc actgagactg	60
tcttgcgctg cttctggttt taccttctct agctactgga tgcaactgggt gagacaggca	120
cctggaaagg gccttgagtg ggttggagag attattccta tcttttgtca tactaactac	180
aatgagaagt tcaagagcag gttcacaatt tctttagaca actccaagaa tacactgtac	240
ctccaaatgg gaagcctgag ggcagaggac acagcggctc attactgtgc aagagggggt	300
tattattatt acccccggca gggcttctg gactactggg gccaaaggcac cactgtgaca	360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc	420
acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg	480
acgggtgctg ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
[0135] cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	600
accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga	660
gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	720
ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc caaaaccca aggacaccct ctatatcacc	780
cgggagcctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag	840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg	960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc	1200

	cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1260
	agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac	1320
	cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggt	1356
	<210> 161	
	<211> 1356	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成多核苷酸"	
	<400> 161	
	gaggtccaac tgggtgaatc tgggggaggc ctggtgaagc ctgggggctc actgagactg	60
	tcttgcgctg cttctggttt taccttctct agctactgga tgcaactggg gagacaggca	120
[0136]	cctggaaagg gccttgagtg ggttggagag attattccta tctttgtca tactaactac	180
	aatgagaagt tcaagagcag gttcacaatt tcttagaca actccaagaa tacactgtac	240
	ctccaaatgg gaagcctgag ggcagaggac acagcggctt attactgtgc aagagggggt	300
	tattattatt acccccggca gggcttcctg gactactggg gccaaaggcac cactgtgaca	360
	gtctctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc	420
	acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg	480
	acgggtgctg ggaactcagg gcacctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta	540
	cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc	600
	accagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga	660
	gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	720
	ctggggggac cgtagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacacct ctatatcacc	780
	cgggagcctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacce tgaggtcaag	840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg	960
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa	1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc	1080
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc	1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag	1200
cctcccgtgc tggactccga cggtccttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgagge tctgcacaac	1320
cactacacgc agaagagcct ctgcctgtct cggggt	1356

[0137]

<210> 162
 <211> 1356
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

<400> 162	
gaagtccaac tggatgaatc ggggggcggc ctctgtaagc ccggaggatc cctgaggctc	60
tcttgcccg cctccgggtt cactttttcg tcatactgga tgcatgggt ccgccagcc	120
ccggggaagg gactggaatg gtcggagag atcatcccca ttttcggcca cacaaactac	180
aacgaaaagt tcaagagccg ctttactatt tccttgaca attcaaagaa caccctgtat	240
ctgcaaatgg gaagcctgcg ggccgaggac accgctgtgt actactgcg cgggggtggc	300
tactattact acccgagaca gggtttctc gattactggg gccaggaac caccgtgacc	360
gtgtctctg cctcgaccaa aggccctcg gtgttcccgc ttgcgccatc ctccaaatcc	420

	acctccggcg gcaccgccgc tctgggatgc ctggtcaaag attacttccc ggagcctgtg	480
	acgggtgctg ggaactctgg agccctcacg agcggagtgc ataccttccc tgcggtgctc	540
	caatcgtccg gactgtacag cctgagcagc gtcgtcactg tgcctagctc gtcctgggc	600
	accagacct acatttcaa cgtgaacat aagccttcaa acactaaggt cgacaaacgg	660
	gtggaacca agtcgtgca taagactcat acttgcccgc cttgcccgc gcctgaactt	720
	ttgggagggc cgtccgtgtt cctgttccc ccaaagcaa aggacactct gtacatcact	780
	cgcaaacccg aagtgacctg tgtggtcgtg gacgtgtccc acgaggatcc ggaagtcaag	840
	ttcaattggt acgtggacgg tgcgaggig cacaacgcaa agaccaagcc gcgagaggaa	900
	cagtacaact ccacataccg ggtggtgtca gtgctgaccg tgttgacca ggactggctc	960
	aacggaaagg agtacaagtg caaagtgtcc aacaaggccc tgcctgcacc aatcgaaaag	1020
	accattagca aggccaagg gcagccccgg gagccccaaag tgtacactct gccccgtca	1080
[0138]	cggaagaaa tgaccaagaa ccaagtgtca ctgacctgtc ttgtgaaggg tttctacccc	1140
	tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccgg agaacaatta caagactacc	1200
	ccgccggtgc tggatagcga cggctccttc ttctgtact ccaagctgac cgtggacaag	1260
	tcgagatggc agcaggggaa cgtgttctcg tgctccgtga tgcacgaage getgcacaac	1320
	cactataccc agaagtcctt gtgcctgtcc cctgga	1356

<210> 163

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成肽"

<400> 163

[0139] Ala Ala Ala Gly
1

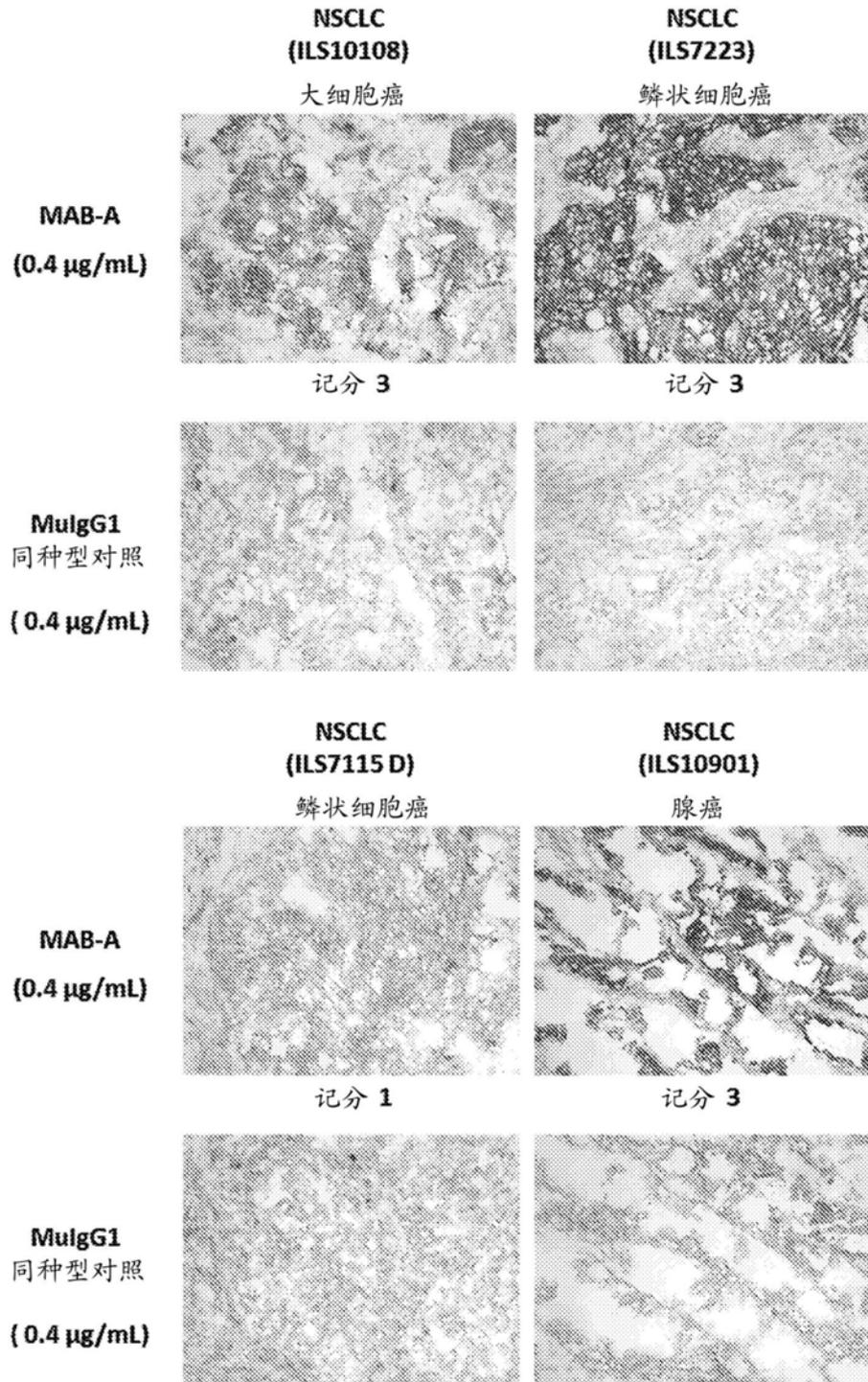


图1A

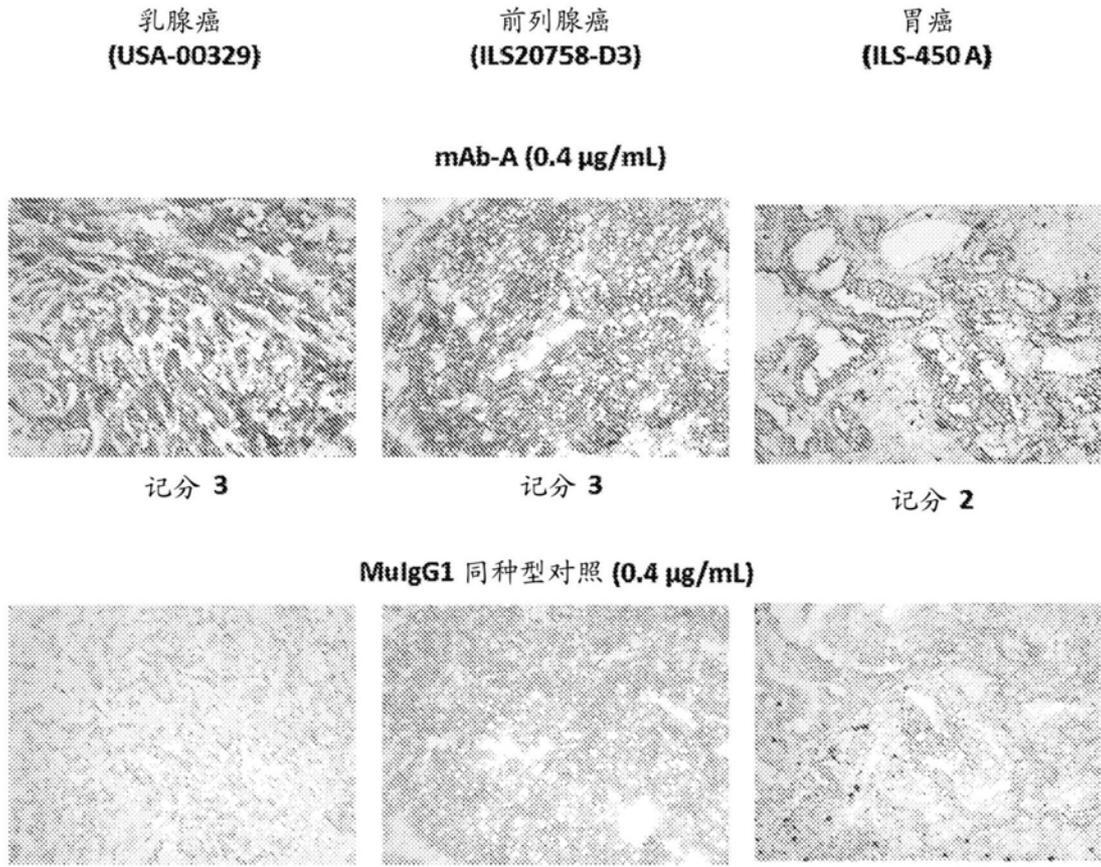


图1B

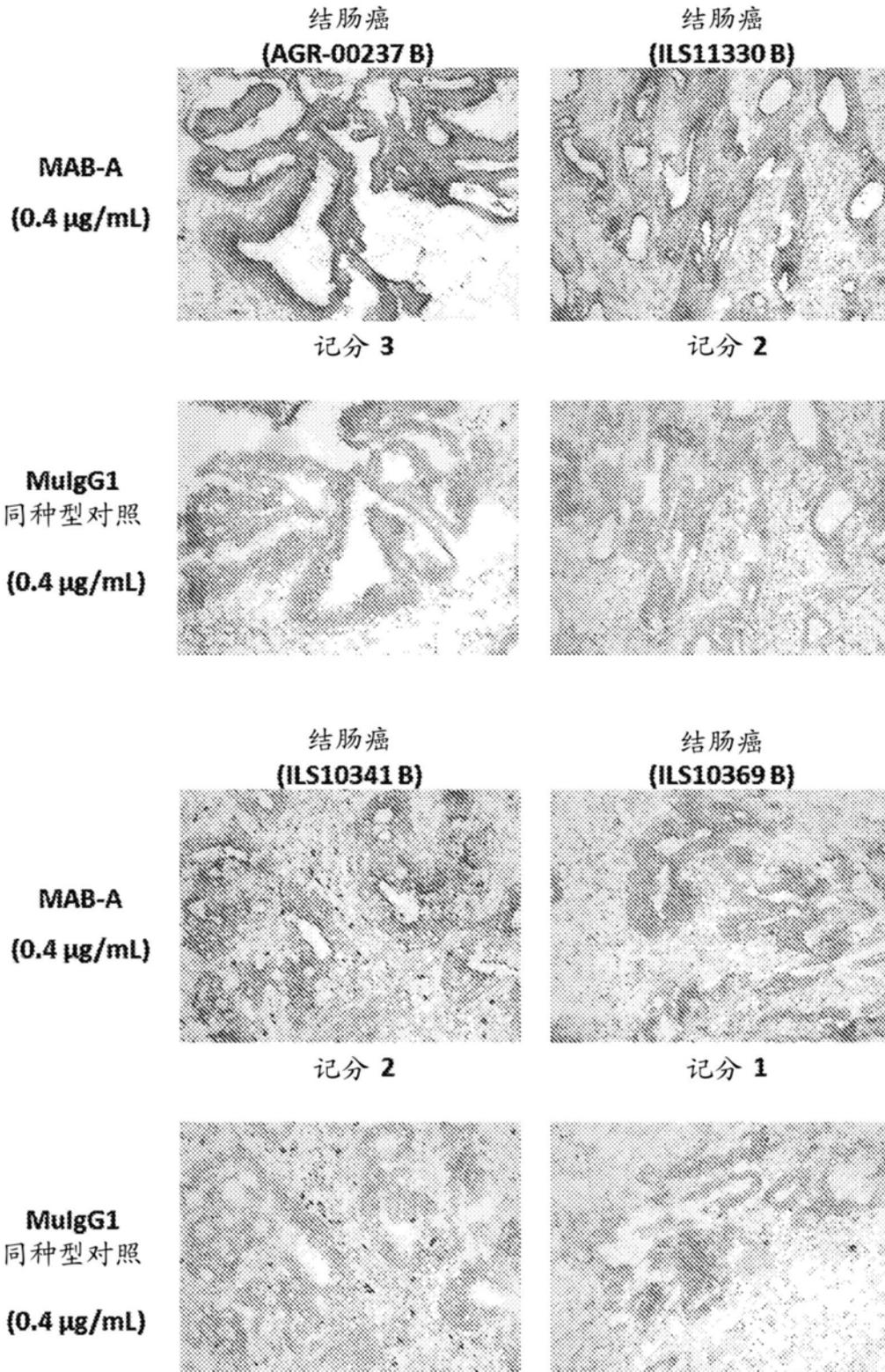


图1C

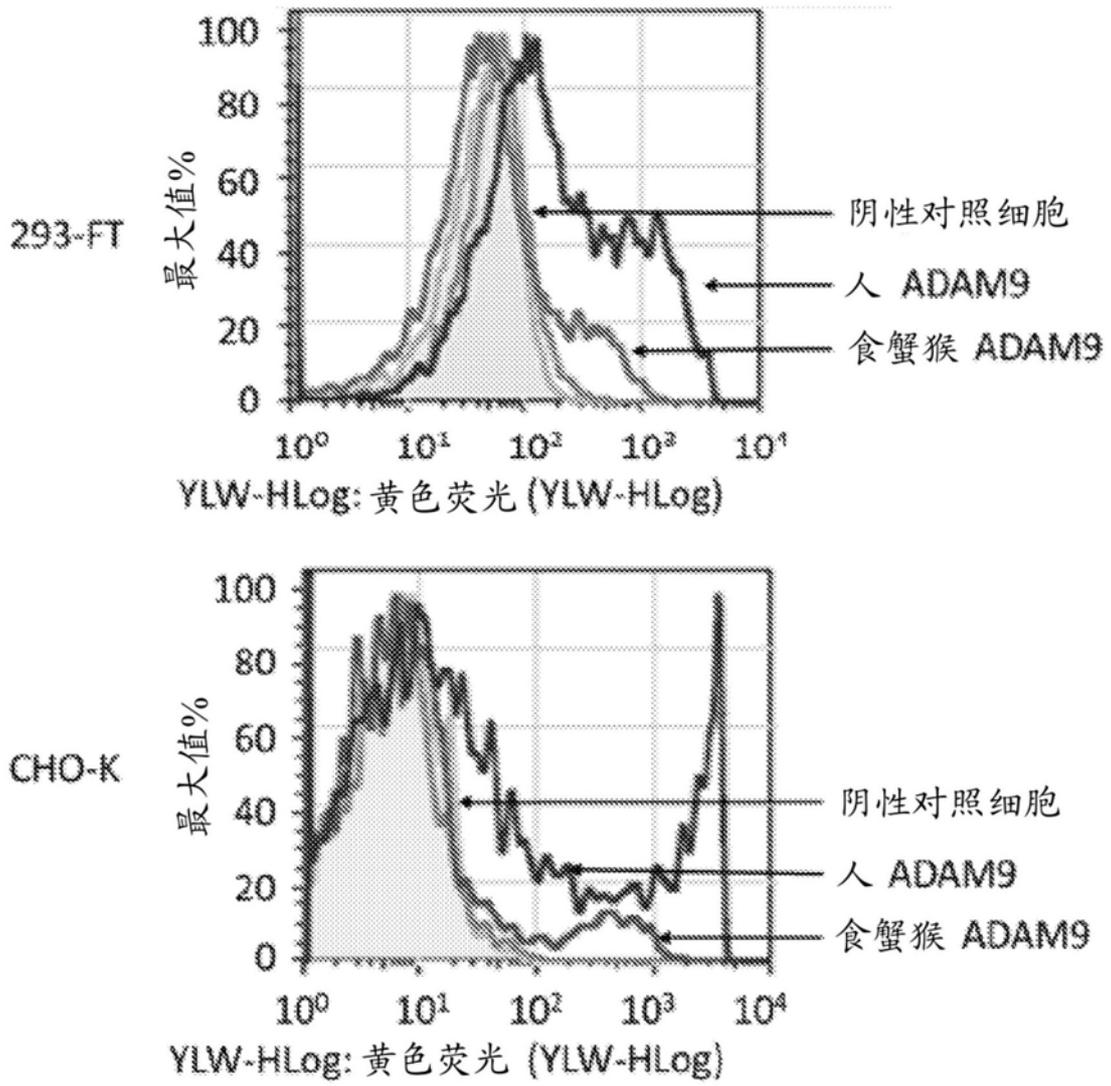


图2

			FR1	CDR1
鼠	MAB-A VH	SEQ ID NO:7	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT	SYWMH
	hMAB-A VH(1)	SEQ ID NO:16	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	hMAB-A VH(2)	SEQ ID NO:17	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	hMAB-A VH(3)	SEQ ID NO:18	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	hMAB-A VH(4)	SEQ ID NO:19	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S	...I.
	hMAB-A VH(2B)	SEQ ID NO:21	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	hMAB-A VH(2C)	SEQ ID NO:22	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	hMAB-A VH(2D)	SEQ ID NO:23	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	hMAB-A VH(2I)	SEQ ID NO:28	E...VES.GG.....G.LR...A...F..S
	FR2	CDR2	FR3	
	WVKQRPGQGLEWIG	EIIPINGHTNYNE <u>KFKS</u>	KATLTLDKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAR	
	..R.A..K...V.	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....R.QG	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	..R.A..K...V.F.....	RF.IS..N.KN.L.L.MG..RA..T.....	
	CDR3	FR4		
	GGYYYYGSRDYFDY	WGQGTTLTVSS		
V....		
IGKGVL..V....		
PRFGWL..V....		
TGKGVL..V....		
PRQGFL..V....		

图3A

			FR1	CDR1
鼠	MAB-A VL	SEQ ID NO:11	DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS	CAASQSVSDYDGD ^Y SYMN
hMAB-A	VL (1)	SEQ ID NO:54	...M...D.....E.....
hMAB-A	VL (2)	SEQ ID NO:55	...M...D.....E.....S.....
hMAB-A	VL (3)	SEQ ID NO:56	...M...D.....E.....	R.....S.....
hMAB-A	VL (4)	SEQ ID NO:57	...M...D.....E.....	R.....S.....L.

FR2	CDR2	FR3	CDR3
WYQQIPGQPPELLIY	AASDLES	GIPARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYC	QQSHEDPFT
...K.....T.SSL.P..F.....
...K.....T.SSL.P..F.....
...K.....T.SSL.P..F.....
...K.....T.SSL.P..F.....	...YST..

FR4
 FGGGTKLEIK

图3B

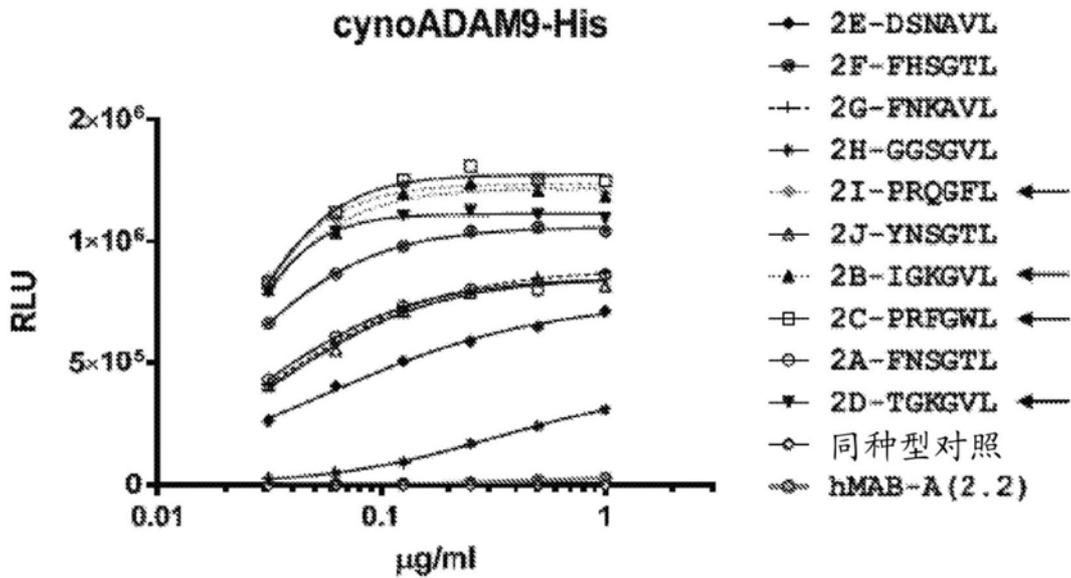


图4A

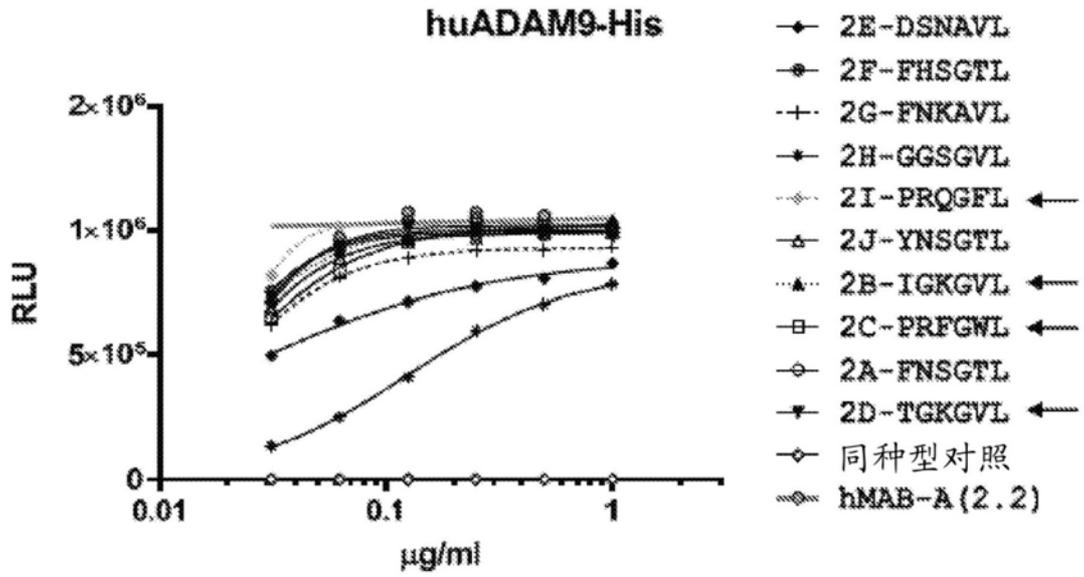


图4B

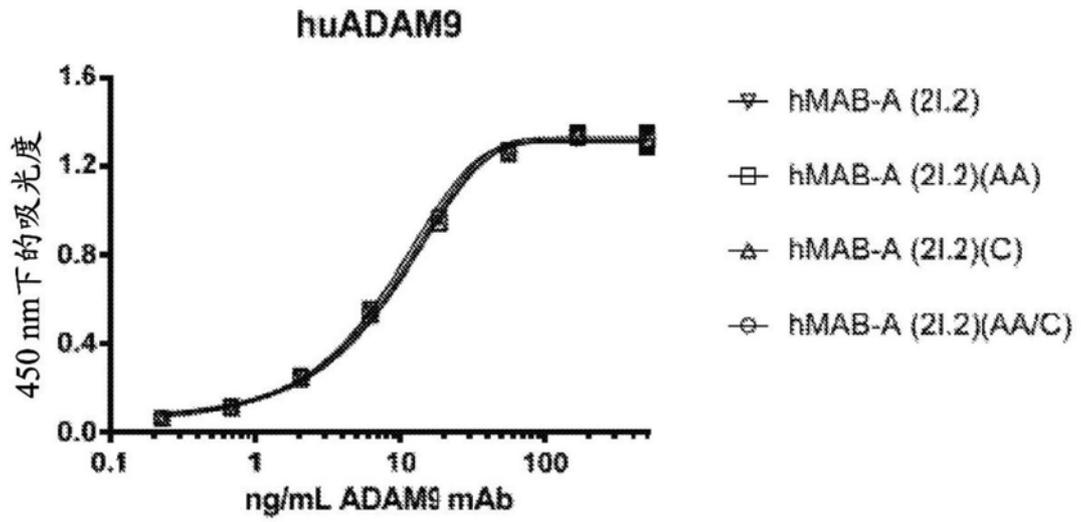


图5A

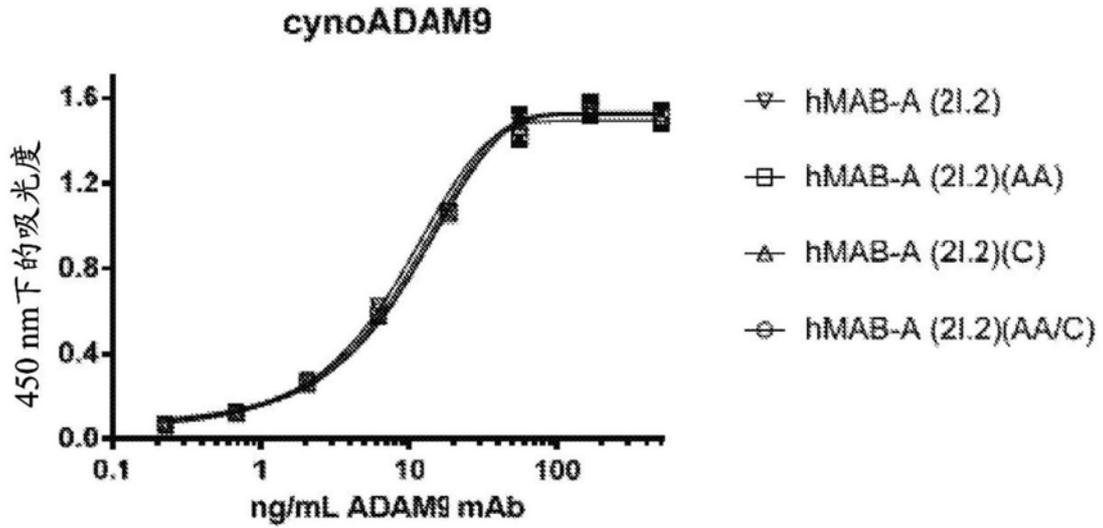


图5B

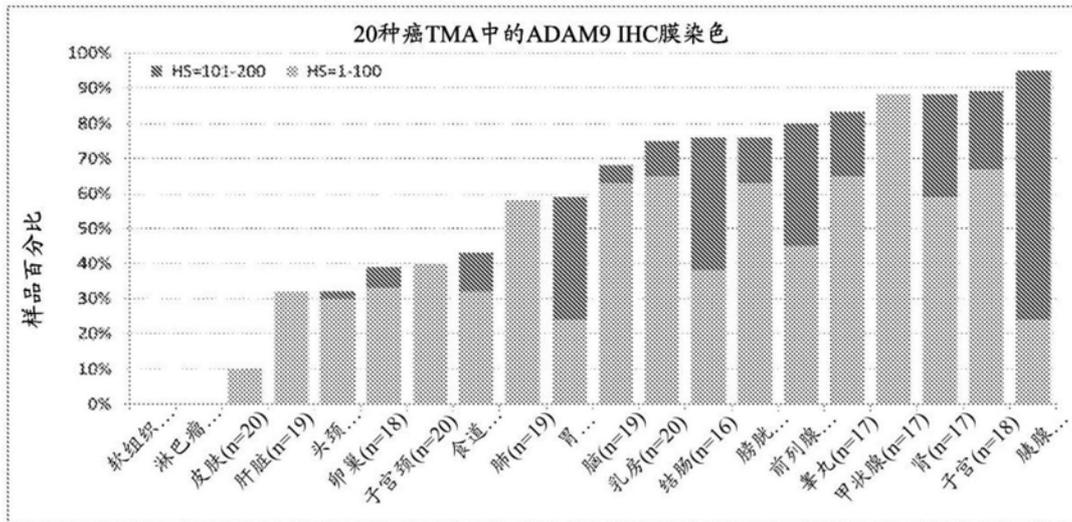


图6A

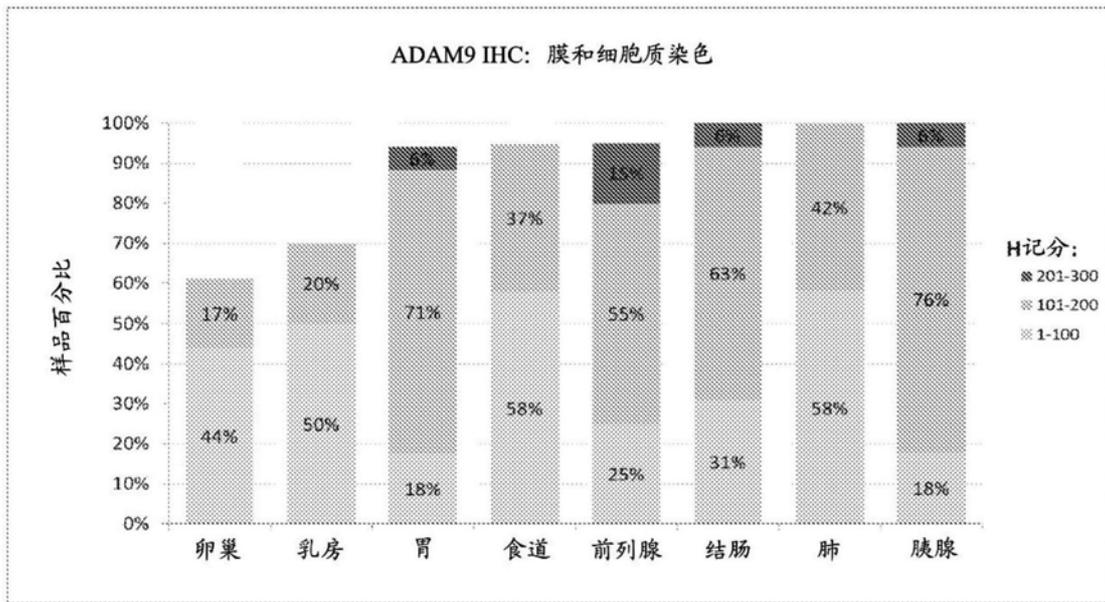


图6B

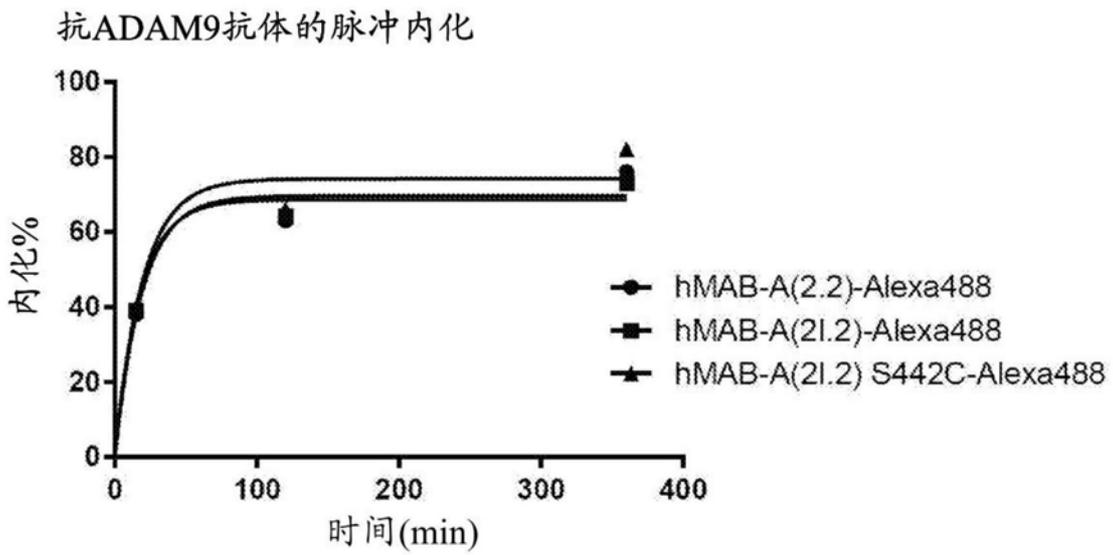


图7A

抗ADAM9抗体的连续内化

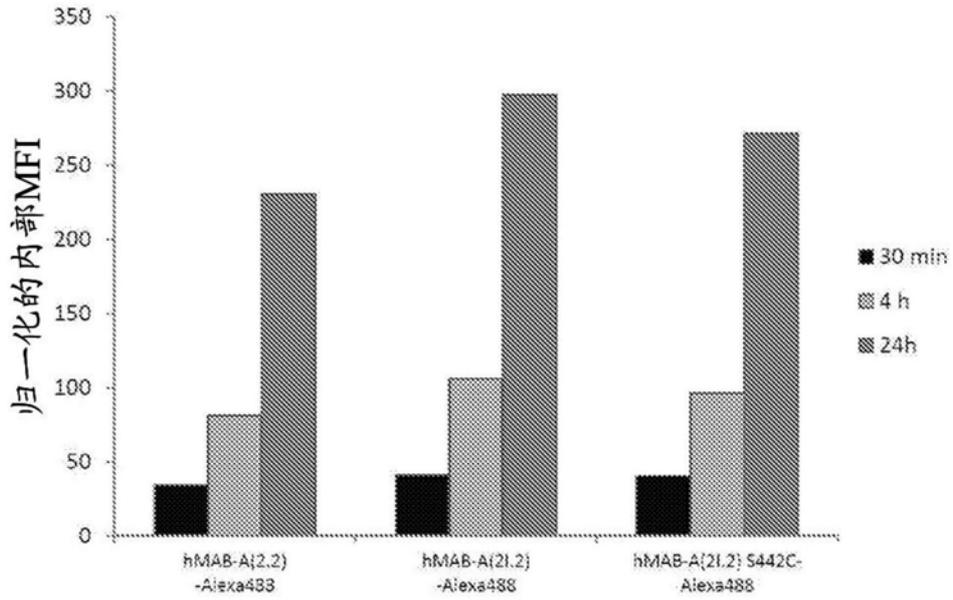


图7B

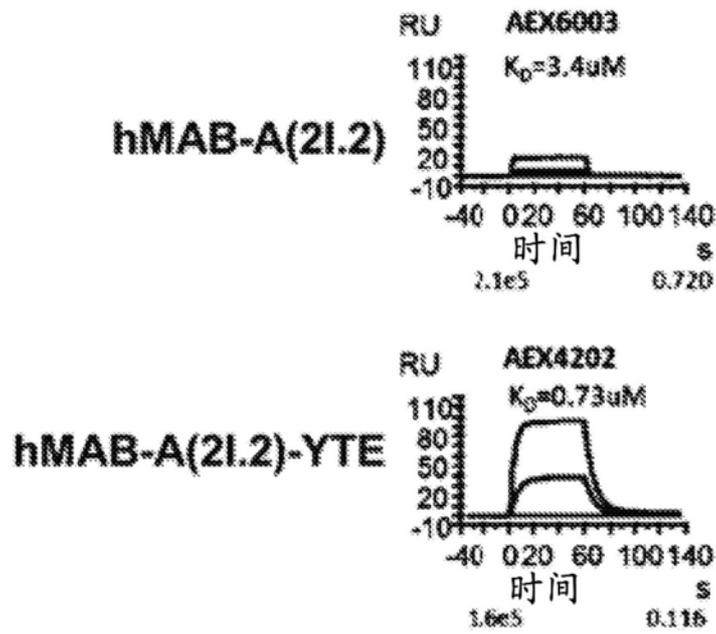


图8A

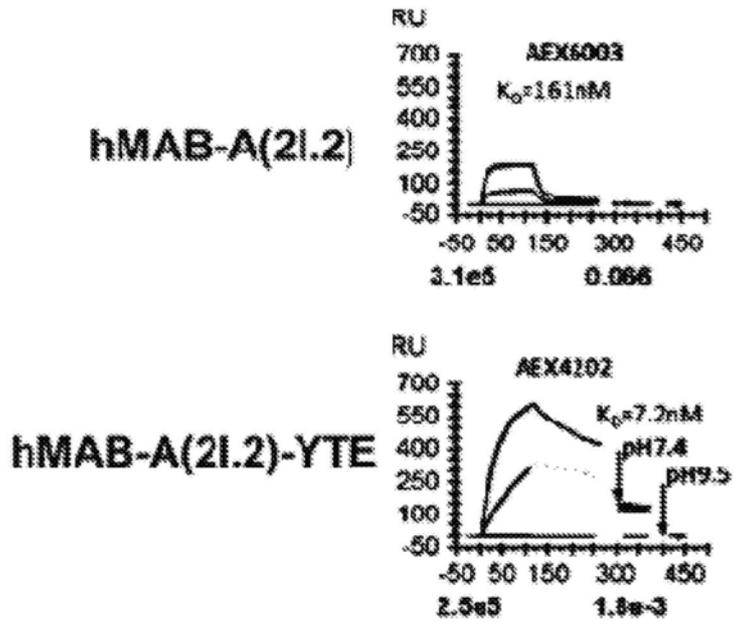


图8B

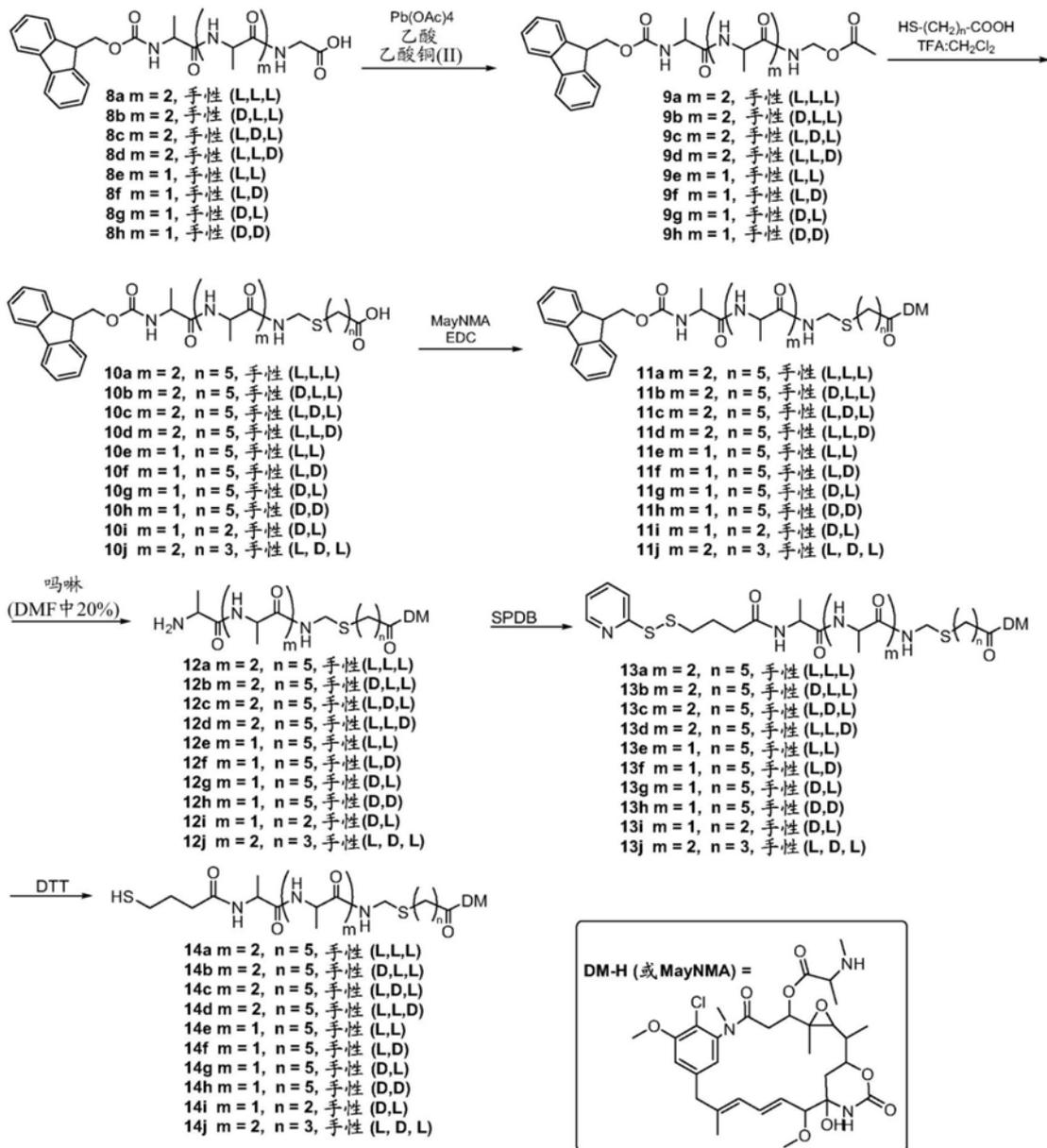


图9A

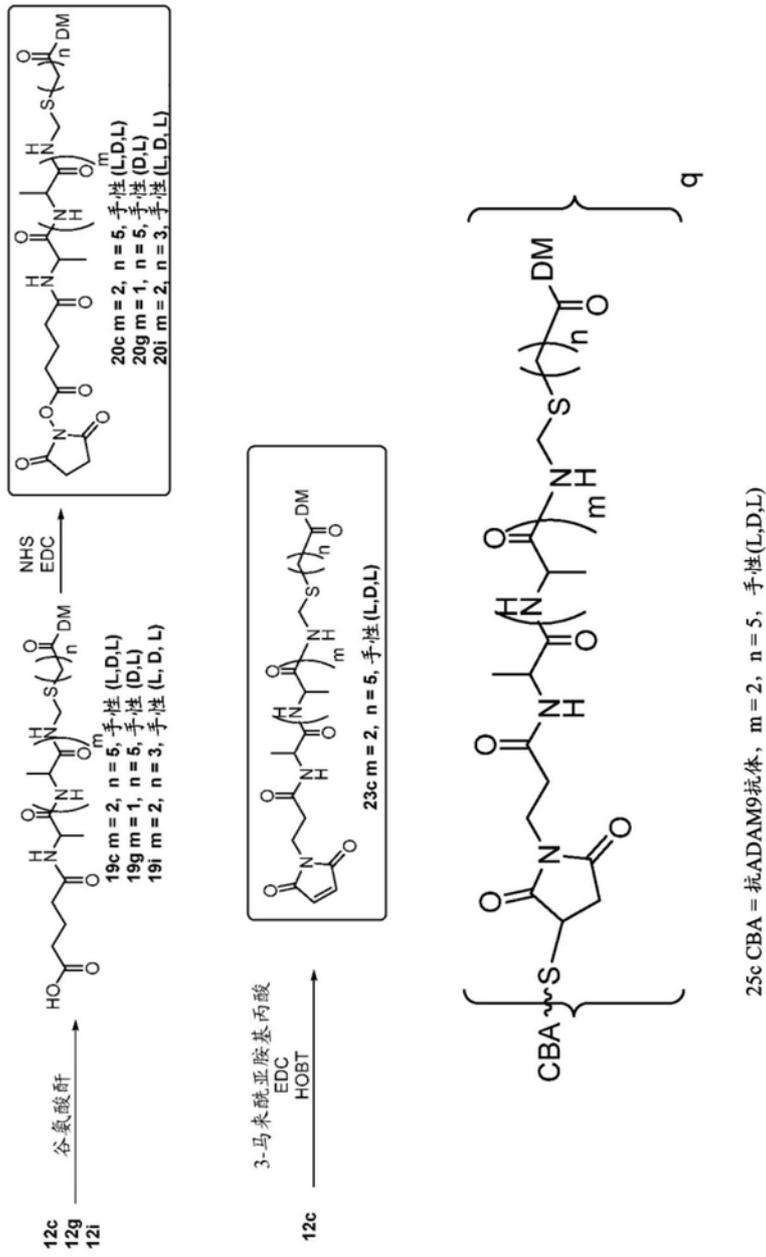


图9B

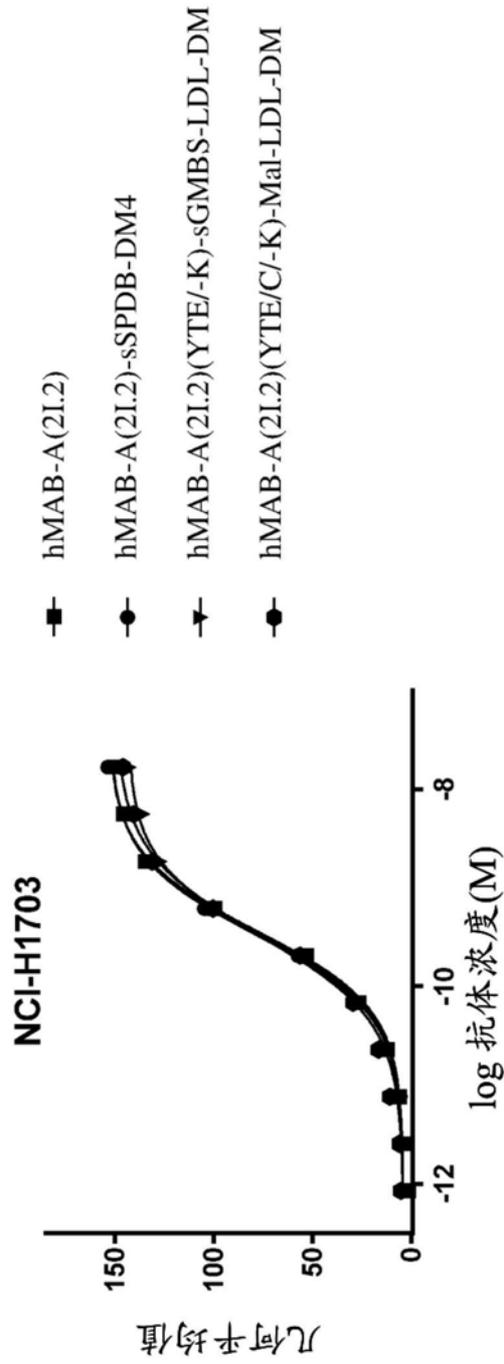


图10

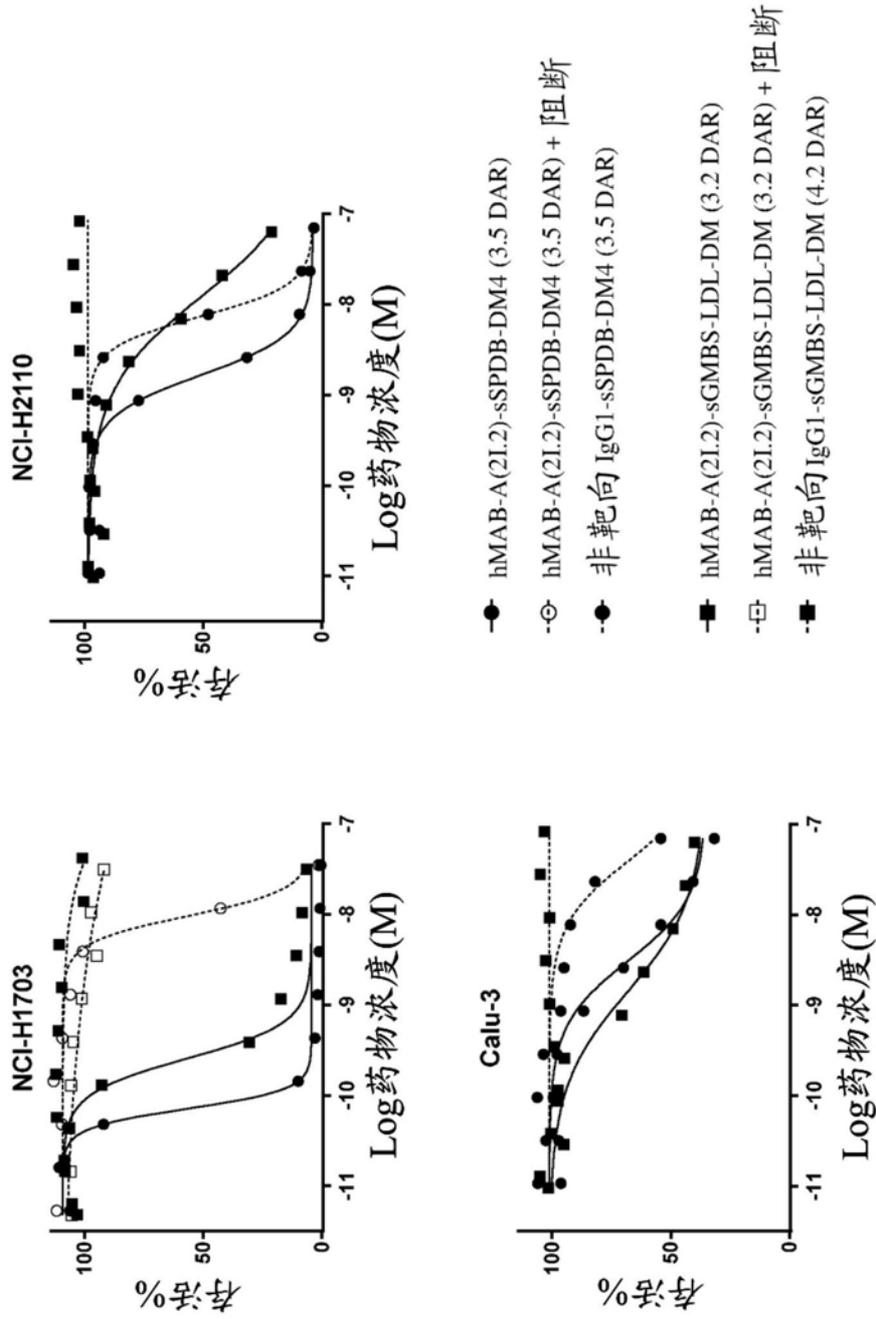


图11A

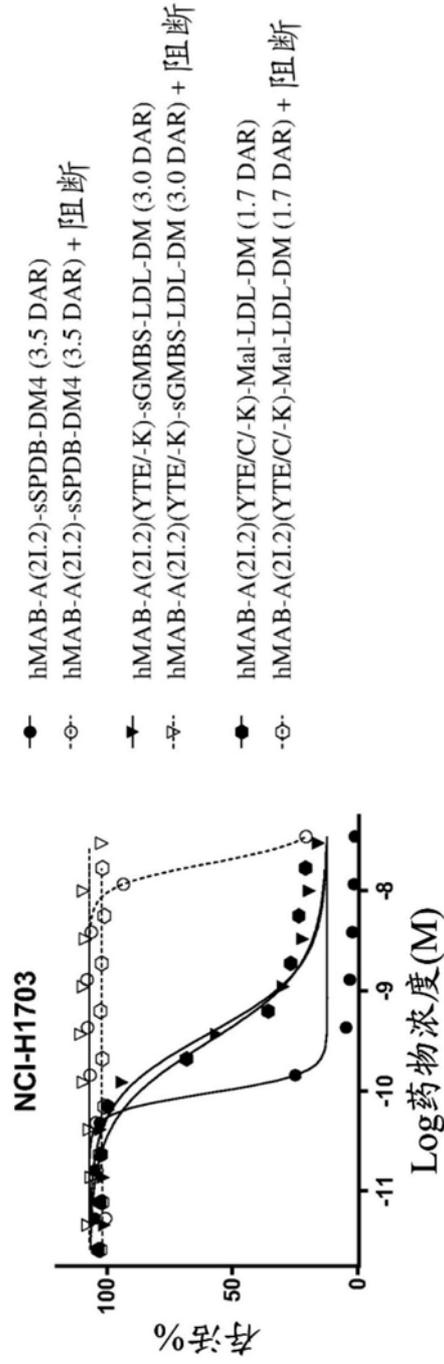
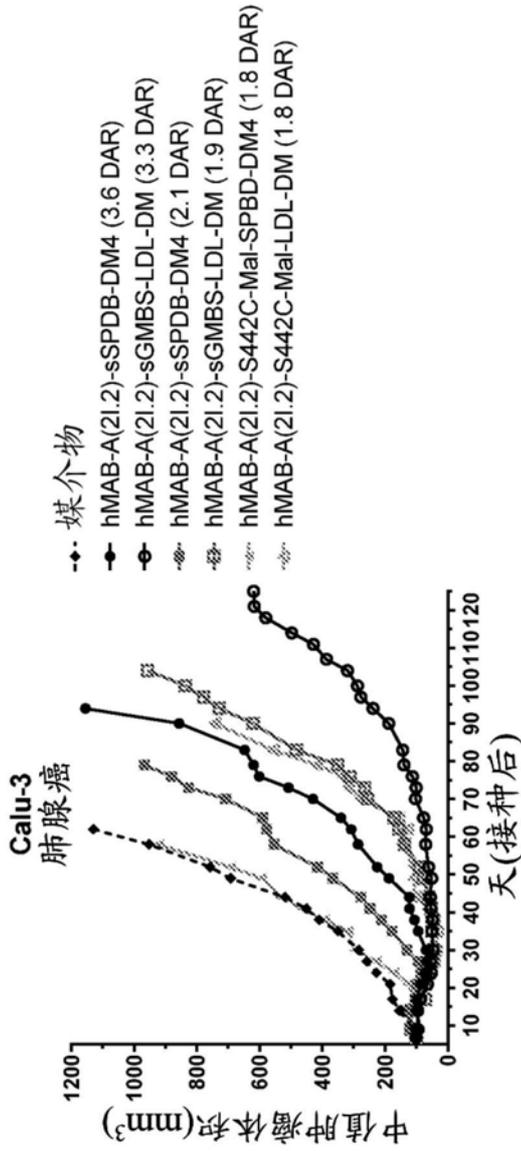
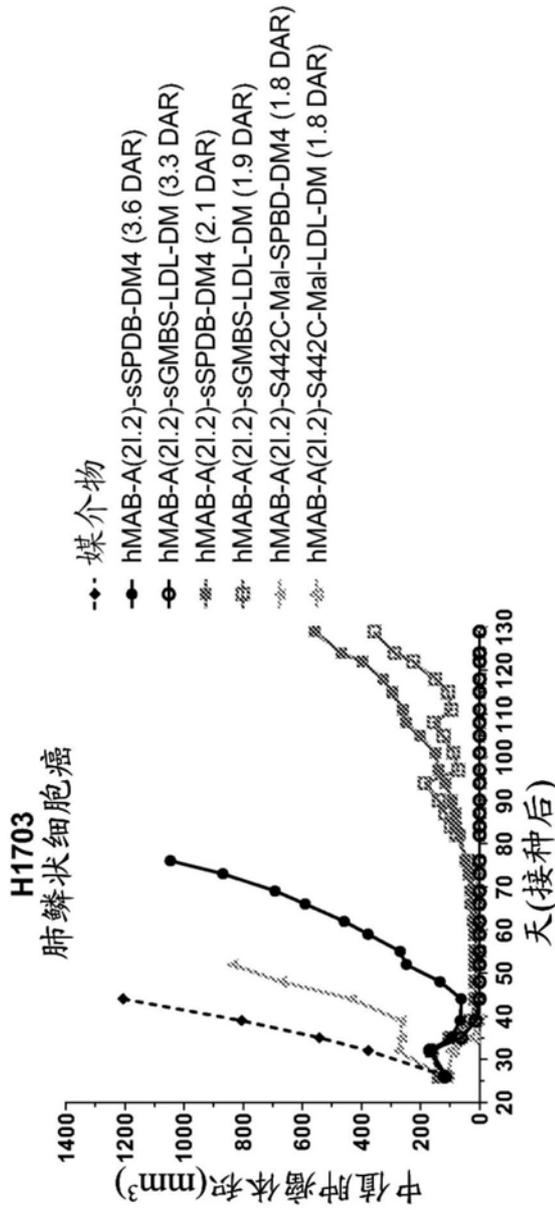


图11B



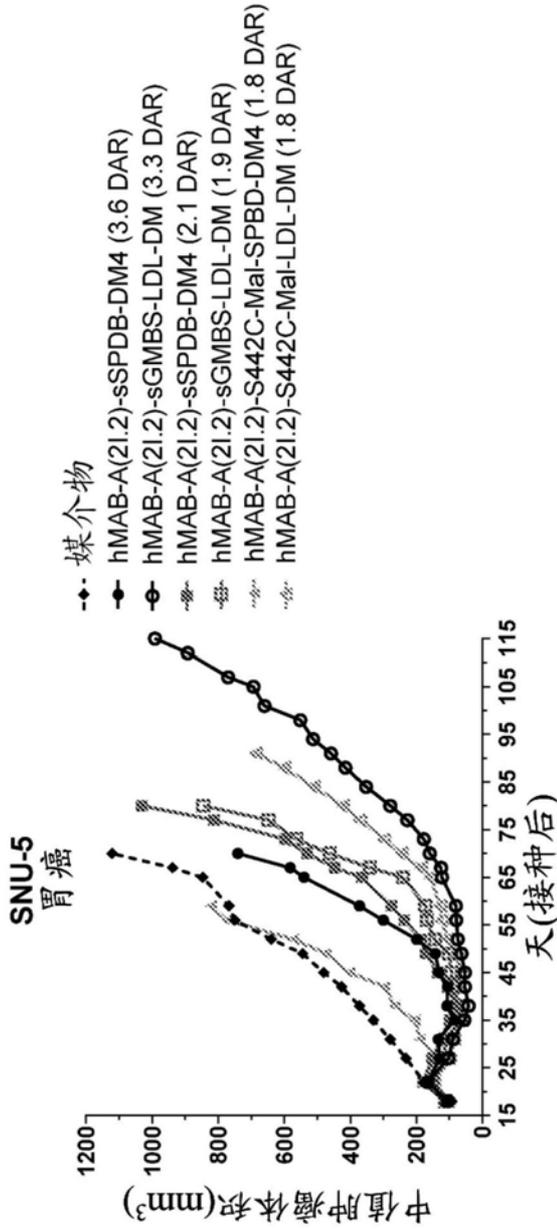
治疗(第7天, 50 μ g/kg DM)	% T/C (第58天)	% T/C结果	T-C (天)	LCK	LCK结果	消退		TFS
						PR	CR	
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	30%	活性	34	6.7	++++	1/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	7%	高度活性	>66	>13.0	++++	6/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	58%	无活性	20	4.0	++++	0/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	15%	活性	47	9.2	++++	6/8	1/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	97%	无活性	3	0.6	-	0/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	15%	活性	39	7.7	++++	6/8	2/8	0/8

图12



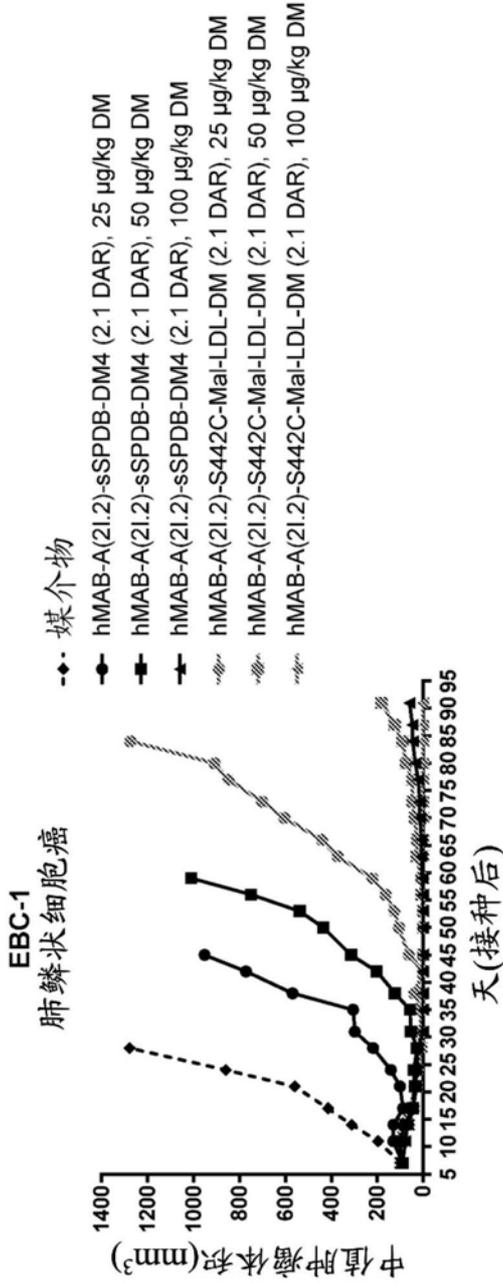
治疗(第7天, 50 μg/kg DM)	% T/C (第44天)	% T/C结果	T-C (天)	LCK	LCK 结果	消退		TFS
						PR	CR	
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	5%	高度活性	32	1.3	++	3/6	1/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	0%	高度活性	>85	>3.4	++++	6/6	6/6	5/6
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	1%	高度活性	>66	>2.6	+++	6/6	5/6	2/6
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	1%	高度活性	64	2.5	+++	6/6	5/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	36%	活性	13	0.5	-	1/6	0/6	0/6
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	1%	高度活性	38	1.5	++	6/6	5/6	4/6

图13



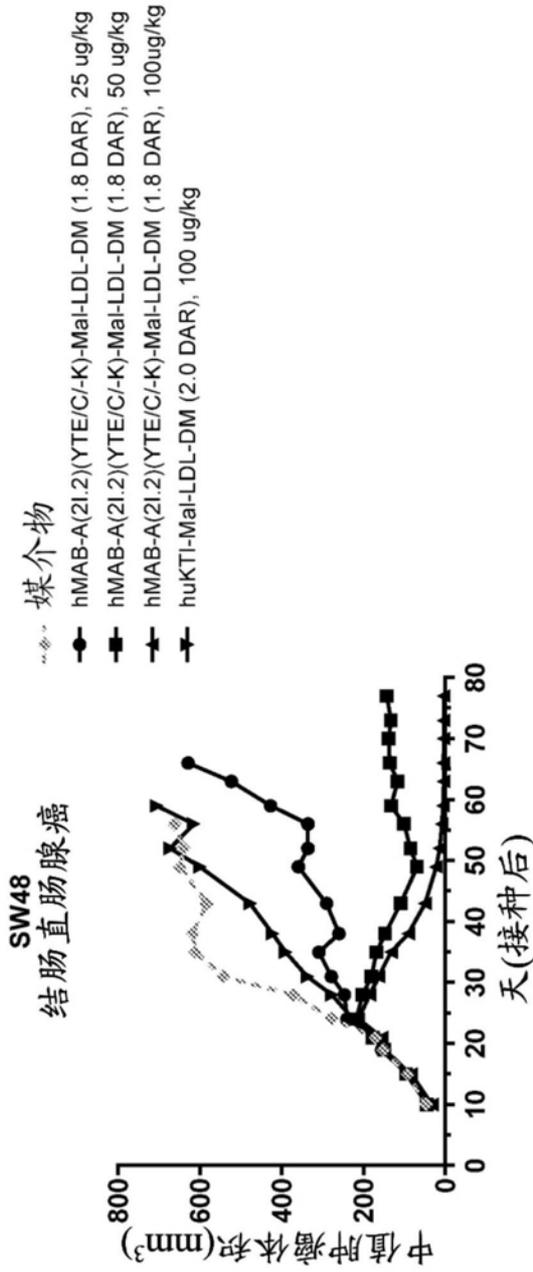
治疗(第7天, 50 μg/kg DM)	% T/C (第70天)	% T/C结果	T-C (天)	LCK	LCK 结果	消退		TFS
						PR	CR	
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (3.6 DAR)	66%	无活性	0	0.0	-	2/6	0/6	0/6
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (3.3 DAR)	14%	活性	45	0.7	+	4/6	1/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	47%	无活性	10	0.2	-	1/6	1/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-sGMBS-LDL-DM (1.9 DAR)	41%	活性	10	0.2	-	2/6	1/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-SPBD-DM4 (1.8 DAR)	107%	无活性	-11	-0.2	-	1/6	1/6	1/6
hMAB-A(2I.2)-S442C-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	22%	活性	28	0.4	-	2/6	1/6	1/6

图14



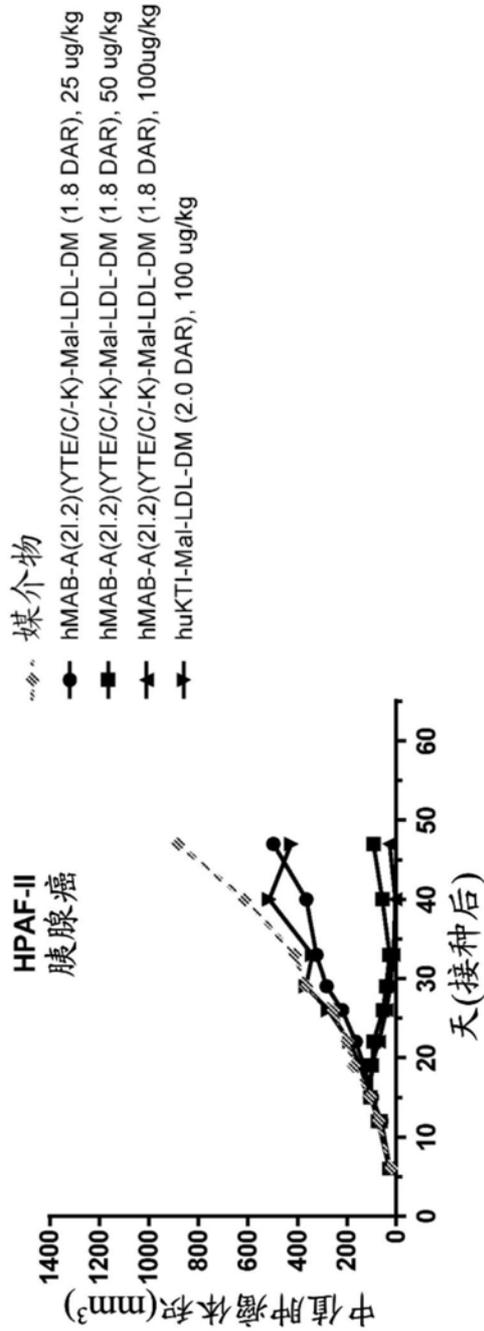
治疗	剂量 (µg/kg DM)	剂量 (mg/kg 抗体)	% T/C (第28天)	% T/C结果	T-C (天)	LCK	LCK 结果	消退		
								PR	CR	TF S
huMAB-A(2i.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2.18	17%	活性	21	1.06	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2i.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4.36	2%	高度活性	34	1.68	++	6/6	1/6	0/6
huMAB-A(2i.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8.76	2%	高度活性	>65	>3.26	++++	6/6	6/6	2/6
huMAB-A(2i.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2.14	2%	高度活性	56	2.79	+++	6/6	3/6	0/6
huMAB-A(2i.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4.28	2%	高度活性	>65	>3.26	++++	6/6	6/6	0/6
huMAB-A(2i.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8.57	1%	高度活性	>65	>3.26	++++	6/6	6/6	6/6

图15



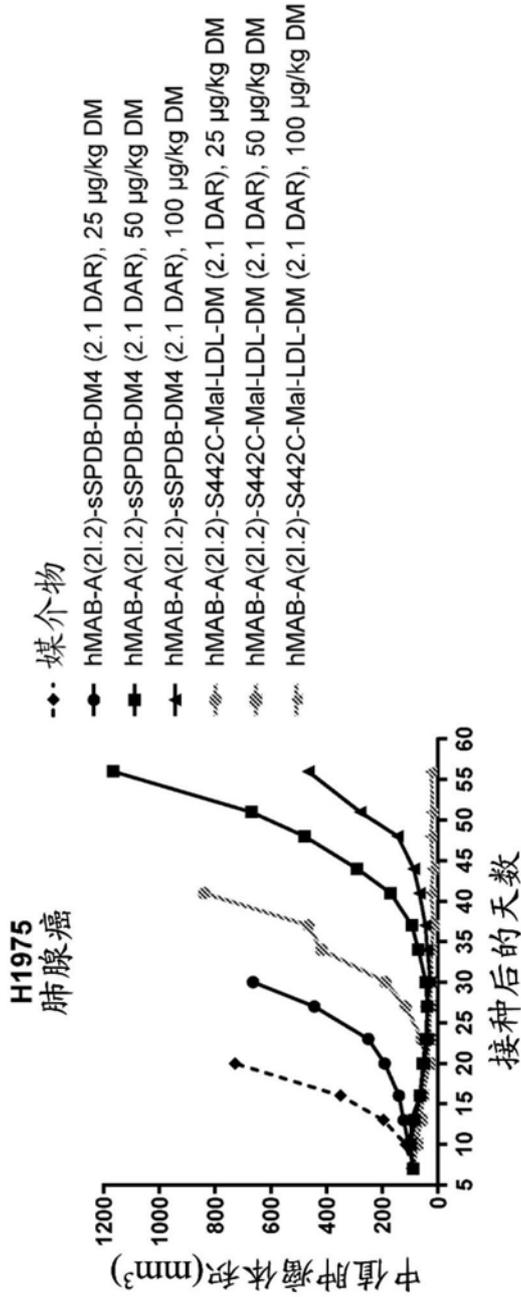
治疗	剂量 (µg/kg DM)	剂量 (mg/kg 抗体)	% T/C (第56天)	% T/C 结果	消退		TFS
					PR	CR	
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/K)-Mai-LDL-DM (1.8 DAR)	25	2.18	51	无活性	1/8	0/8	0/8
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/K)-Mai-LDL-DM (1.8 DAR)	50	4.38	15	活性	5/8	2/8	2/8
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/K)-Mai-LDL-DM (1.8 DAR)	100	8.57	1	高度活性	8/8	7/8	7/8
huKTI-Mai-LDL-DM (2.0 DAR)	100	8.57	93	无活性	0/8	0/8	0/8

图16



治疗	剂量 (µg/kg DM)	剂量 (mg/kg 抗体)	% T/C (第47天)	% T/C结果	消退		TFS
					PR	CR	
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	25	2.18	56	无活性	0/7	0/7	0/7
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	50	4.36	11	活性	5/7	1/7	1/7
hMAB-A(2I.2)(YTE/C/K)-Mal-LDL-DM (1.8 DAR)	100	8.57	3	高度活性	7/7	3/7	3/7
huKTI-Mal-LDL-DM (2.0 DAR)	100	8.57	48	无活性	0/7	0/7	0/7

图17



治疗	剂量 (µg/kg DM)	剂量 (mg/kg 抗体)	%T/C (第20天)	%T/C 结果	T-C (天)	LCK 结果	消退		TFS
							PR	CR	
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2.13	23%	活性	10	0.79	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4.38	8%	高度活性	35	2.72	5/6	1/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8.76	7%	高度活性	>38	>2.98	6/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mat-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2.14	6%	高度活性	ND	ND	4/6	1/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mat-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4.28	4%	高度活性	ND	ND	5/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mat-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8.57	6%	高度活性	>38	>2.98	6/6	2/6	2/6

图18

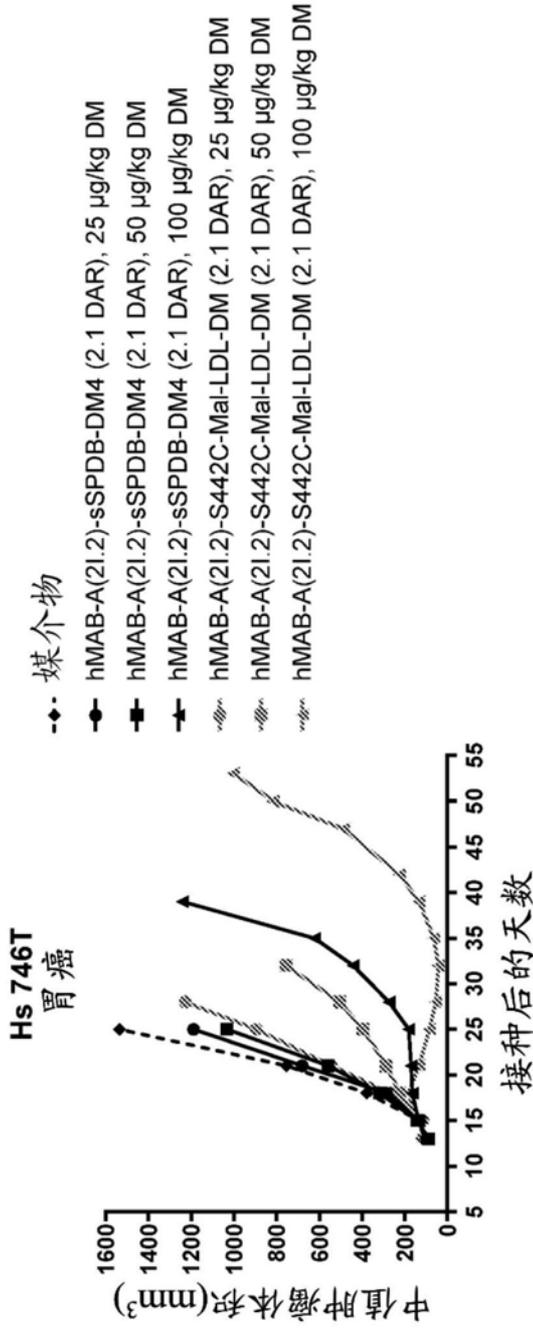


图19

治疗	剂量 (µg/kg DM)	剂量 (mg/kg 抗体)	%T/C (第25天)	%T/C 结果	T-C (天)	LCK	LCK 结果	消退		
								PR	CR	TFS
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	25	2.18	77%	无活性	1	0.12	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	50	4.36	67%	无活性	3	0.24	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-sSPDB-DM4 (2.1 DAR)	100	8.76	12%	活性	15	1.35	++	1/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	25	2.14	58%	无活性	4	0.33	-	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	50	4.28	26%	活性	12	1.09	+	0/6	0/6	0/6
huMAB-A(2I.1)-S442C-Mal-LDL-DM (2.1 DAR)	100	8.57	6%	高度活性	29	2.59	+++	4/6	0/6	0/6