(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108883198 B
(45)授权公告日 2022.08.09

(21)申请号 201780022381.5
(22)申请日 2017.03.02
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108883198 A
(43)申请公布日 2018.11.23
(30)优先权数据
62/302,562 2016.03.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.10.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/020529 2017.03.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/151979 EN 2017.09.08
(83)生物保藏信息
PTA-7552 2006.04.24
(73)专利权人 卫材研究发展管理有限公司
地址 日本东京都
(72)发明人 E.F.艾尔博恩 X.程 D.W.卡斯塔
K.古内 J.李 U.马祖达尔
T.尤纳卡
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
(56)对比文件
WO 2013130093 A1,2013.09.06
CN 105143263 A,2015.12.09
WO 2015154029 A1,2015.10.08
WO 2014202775 A1,2014.12.24
WO 2015115656 A1,2015.08.06
WO 2004010957 A2,2004.02.05
Wanjun Zheng等.Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2004,第14卷示意图4,第5553页正文左栏第2段至第5554页左栏第2段.
Sridhar Narayan等.Novel second generation analogs of eribulin. Part II: Orally available and active against resistant tumors in vivo.《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》.2011,第21卷第1634-1638页.
Nikolaos Diamantis等.Antibody-drug conjugates-an emerging class of cancer treatment.《British Journal of Cancer》.2016,第114卷第362-367页.
Antonio Jimeno.Eribulin: Rediscovering Tubulin as an Anticancer Target.《CLINICAL CANCER RESEARCH》.2009,第3903-3905页.
Myra F Barginear等.Trastuzumab-DM1: A Clinical Update of the Novel Antibody-Drug Conjugate for HER2-Overexpressing Breast Cancer.《Molecular Medicine》.2013,第18卷第1473-1479页.
(续)
审查员 刘应梅

权利要求书2页 说明书183页
序列表116页 附图32页

(54)发明名称

基于艾日布林的抗体-药物偶联物和使用方法

(57)摘要

公开了结合于例如叶酸受体α的人类肿瘤学抗原标靶和/或提供抗微管蛋白药物活性的连接子毒素和抗体-药物偶联物。所述连接子毒素和抗体-药物偶联物包含艾日布林药物部分且可以内化至表达标靶抗原的细胞。本公开进一步涉及通过施用本文提供的抗体-药物偶联物,用于治疗癌症的方法和组合物。

CN 108883198 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Wolfgang Ebel等.Preclinical evaluation of MORAb-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha.《Cancer Immunity》.2007,第7卷第6(1-8)页.

Peter M. Smith-Jones等.Preclinical radioimmunotargeting of folate receptor alpha using the monoclonal antibody conjugate DOTA-MORAb-003.《Nuclear Medicine and Biology》.2008,第35卷第343-351页.

Xin Cheng等.MORAb-202, an Antibody-Drug Conjugate Utilizing Humanized Anti-human FRa Farletuzumab and the Microtubule-targeting Agent Eribulin, has Potent Antitumor Activity.《Molecular Cancer Therapeutics》.2018,第17卷(第12期),第2665-2675页.

Toshio Shimizu等.First-in-human Phase 1 Study of MORAb-202, An Antibody-drug Conjugate Comprising Farletuzumab Linked to Eribulin Mesylate, in Patients with Folate Receptor-α-positive Advanced Solid Tumors.《CLINICAL CANCER RESEARCH》.2021,

Yuki Matsunaga等.Novel Anti-FOLR1 Antibody-Drug Conjugate MORAb-202 in Breast Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer Cells.《Antibodies》.2021,第10卷(第1期),第6页.

1.一种抗体-药物偶联物,其具有式(I):

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中Ab为内化抗叶酸受体α抗体或其内化抗原结合片段,其包含:如Kabat编号系统所定义,三个重链互补决定区(HCDR)和三个轻链互补决定区(LCDR),所述三个重链互补决定区分别由SEQ ID NO:2(HCDR1)、SEQ ID NO:3(HCDR2)和SEQ ID NO:4(HCDR3)的氨基酸序列组成;所述三个轻链互补决定区分别由SEQ ID NO:7(LCDR1)、SEQ ID NO:8(LCDR2)和SEQ ID NO:9(LCDR3)的氨基酸序列组成;或如IMGT编号系统所定义,三个重链互补决定区(HCDR)和三个轻链互补决定区(LCDR),所述三个重链互补决定区(HCDR)分别由SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列组成;所述三个轻链互补决定区分别由SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列组成;

D为艾日布林;

L为包含$Mal-(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子;且

p为整数1至8。

2.如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其中p为3或4。

3.如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其中所述$Mal-(PEG)_2$-Val-Cit-pAB经由所述抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合于所述抗体或抗原结合片段。

4.如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其中所述可裂解连接子经由C-35胺共价附接于艾日布林。

5.如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其中所述抗体或抗原结合片段包含由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的轻链可变区。

6.如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其中所述抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定域和人Igκ轻链恒定域。

7.一种组合物,其包含多个拷贝的如权利要求1至6中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中所述组合物中所述抗体-药物偶联物的平均p为约3.2至约4.4。

8.如权利要求1-6中任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求7所述的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述癌症表达叶酸受体α。

9.如权利要求8所述的用途,其中所述癌症为胃癌、浆液性卵巢癌、透明细胞卵巢癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、三阴性乳腺癌、子宫内膜癌、肺类癌、骨肉瘤、膀胱癌或尿路上皮细胞癌。

10.如权利要求8所述的用途,其中所述癌症为浆液性子宫内膜癌。

11.一种药物组合物,其包含如权利要求1至6中任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求7所述的组合物和药学上可接受的载体。

12.一种产生如权利要求1至6中任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求7或11所述的组合物的方法,其包括使抗体或抗原结合片段与接合于艾日布林的可裂解连接子在允许偶联的条件下反应。

13.一种组合物,其包含多个拷贝的具有式(I)的抗体-药物偶联物:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中

Ab为内化抗叶酸受体α抗体或其内化抗原结合片段，其包含：如Kabat编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其由SEQ ID NO:2(HCDR1)、SEQ ID NO:3(HCDR2)和SEQ ID NO:4(HCDR3)的氨基酸序列组成；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其由SEQ ID NO:7(LCDR1)、SEQ ID NO:8(LCDR2)和SEQ ID NO:9(LCDR3)的氨基酸序列组成；或如IMGT编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其由SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列组成；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其由SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列组成；

D为艾日布林；

L为包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子；且

p为每一Ab的-L-D部分的平均数目，其中所述组合物中所述抗体-药物偶联物的平均p为约3.6至约4.4；且所述平均p由疏水作用色谱-高效液相色谱(HIC-HPLC)确定。

14.如权利要求13所述的组合物，其中所述抗体或抗原结合片段包含有由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的重链可变区和由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成的轻链可变区。

基于艾日布林的抗体-药物偶联物和使用方法

[0001] 本申请主张2016年3月2日提交的美国临时专利申请No.62/302,562的优先权益，所述临时专利申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0002] 本公开涉及结合例如叶酸受体α的人类肿瘤学抗原标靶和/或提供抗微管蛋白药物活性的抗体药物偶联物(ADC)。本公开进一步涉及可用于治疗和诊断表达叶酸受体α和/或通过破坏微管蛋白可治疗的癌症的方法和组合物。

[0003] 癌症为全世界致病率和死亡率的主要原因之一，其中2012年大约有1400万例新病例和820万例癌症相关的死亡。癌症死亡的最常见原因为以下癌症：肺癌(159万例死亡)；肝癌(745,000例死亡)；胃癌(723,000例死亡)；结肠直肠癌(694,000例死亡)；乳腺癌(521,000例死亡)；和食道癌(400,000例死亡)。预计新癌症病例的数目在未来二十年间上升约70％，每年达大约2200万例新癌症病例(World Cancer Report 2014)。

[0004] 微管为与包括细胞内迁移和转运、细胞信号传导和维持细胞形状的多种细胞功能相关的有力的细丝状细胞骨架蛋白。微管也在有丝分裂细胞分裂中通过形成染色体分成两个子细胞所需的有丝分裂纺锤体而起到关键作用。所有细胞中微管的生物功能大部分由其聚合动力学调节，这通过α和β微管蛋白二聚物可逆、非共价地加在微管两端进行。这种动力学行为和所产生的对微管长度的控制为有丝分裂纺锤体的适当功能所不可缺少的。甚至微管动力学的微小改变也会牵涉轴检查点，抑制有丝分裂时细胞周期进展，且随后引起细胞死亡(Mukhtar等人(2014)Mol.Cancer Ther.13:275-84)。由于癌细胞的细胞分裂快速，所以与正常细胞相比，其一般对结合于微管蛋白且破坏其正常功能的化合物更加敏感。因此，微管蛋白抑制剂和其它靶向微管剂有望成为一类治疗癌症的药物(Dumontet和Jordan(2010)Nat.Rev.Drug Discov.9:790-803)。

[0005] 叶酸受体α(FRA)为一种结合叶酸盐的经甘油磷脂酰肌醇(GPI)连接的膜蛋白。虽然未充分了解FRA在正常和癌组织的生物学中的作用，但其在高百分比的上皮细胞来源的卵巢癌上(O′Shannessy等人(2013)Int.J.Gynecol.Pathol.32(3):258-68)，以及在一定百分比的非小细胞肺癌中(Christoph等人(2014)Clin.Lung Cancer 15(5):320-30)过度表达。FRA在正常组织中也具有有限表达。这些特性使得FRA成为癌症免疫疗法的吸引人的标靶。

[0006] 原致癌基因人类表皮生长因子受体2(HER2)编码属于人类表皮生长因子受体(EGFR)家族的跨膜酪氨酸激酶受体(King等人(1985)Science 229:974-6)。HER2的过度表达能够组成性活化生长因子信号传导路径，例如PI3K-AKT-mTOR路径，因此用作若干类癌症，包括接近20％侵袭性乳腺癌的致瘤驱动因子(Slamon等人(1989)Science 244:707-12；Gajria和Chandarlapaty(2011)Expert Rev.Anticancer Ther.11:263-75)。鉴于HER2扩增介导转化的表型，HER2为癌症治疗的另一有希望的标靶。

发明概要

[0007] 本公开部分提供具有针对肿瘤细胞的生物活性的新颖化合物。所述化合物可以抑制哺乳动物中的肿瘤生长，且可用于治疗人类癌症患者。

[0008] 更特定地说，本公开涉及能够结合、内化和杀死肿瘤细胞(例如表达FRA的肿瘤细胞)的抗体-药物偶联物化合物。公开了包含将药物部分附接于抗体部分的连接子的抗体-药物偶联物化合物。抗体-药物偶联物(ADC)化合物可以由式I表示：

[0009] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0010] 其中Ab为靶向肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段；

[0011] D为艾日布林；

[0012] L为将Ab共价附接于D的可裂解连接子；且

[0013] p为整数1至20。

[0014] 在一些实施方案中，连接子在细胞外是稳定的，使得ADC在存在于细胞外环境中时保持完整，但在例如癌细胞的细胞中内化时能够裂解。在一些实施方案中，当ADC进入表达对ADC的抗体部分具有特异性的抗原的细胞时，艾日布林药物部分从抗体部分裂解，且裂解释放艾日布林的未修饰形式。在一些实施方案中，连接子包含被定位成使得所述连接子或所述抗体部分中没有部分在裂解后保持结合于艾日布林的可裂解部分。

[0015] 在一些实施方案中，连接子中的可裂解部分为可裂解肽部分。在一些实施方案中，相对于包含替代可裂解部分的ADC，包含可裂解肽部分的ADC显示较低的聚集水平，改善的抗体:药物比率，增加的癌细胞的靶向杀死，减少的非癌细胞的脱靶杀死，和/或较高的药物负载(p)。在一些实施方案中，相对于不可裂解的连接子，添加可裂解部分增加细胞毒性和/或效力。在一些实施方案中，增加的效力和/或细胞毒性是在表达中等水平的由ADC的抗体部分所靶向的抗原(例如中等FRA表达)的癌症中。在一些实施方案中，可裂解肽部分能够由酶裂解，且连接子为酶能够裂解的连接子。在一些实施方案中，酶为组织蛋白酶，且连接子为组织蛋白酶能够裂解的连接子。在某些实施方案中，与替代分裂机制相比，酶能够裂解的连接子(例如组织蛋白酶能够裂解的连接子)显示上述改善特性中的一种或多种。

[0016] 在一些实施方案中，连接子中的可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施方案中，氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)。在一些实施方案中，相对于包含替代氨基酸单元或替代可裂解部分的ADC，包含Val-Cit的ADC显示增加的稳定性，减少的脱靶细胞杀死，增加的靶向细胞杀死，较低的聚集水平，和/或较高的药物负载。

[0017] 在一些实施方案中，连接子包含至少一种将抗体部分接合于可裂解部分的间隔子单元。在一些实施方案中，连接子中的间隔子单元可以包含至少一种聚乙二醇(PEG)部分。PEG部分可以例如包含$-(PEG)_m-$，其中m为整数1至10。在一些实施方案中，连接子中的间隔子单元包含$(PEG)_2$。在一些实施方案中，尽管连接子长度较短，但相对于包含较长间隔子单元(例如$(PEG)_8$)的ADC，包含较短间隔子单元(例如$(PEG)_2$)的ADC显示较低的聚集水平和/或较高的药物负载。

[0018] 在一些实施方案中，连接子中的间隔子单元经由顺丁烯二酰亚胺部分(Mal)附接于ADC的抗体部分。在一些实施方案中，相对于包含经由替代部分附接于抗体部分的连接子的ADC，包含经由Mal附接于抗体部分的连接子的ADC显示较高的药物负载。在一些实施方案中，连接子中的Mal与抗体部分上的半胱氨酸残基反应。在一些实施方案中，连接子中的Mal经由半胱氨酸残基接合于抗体部分。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，连接子包含$Mal-(PEG)_m$，例如$Mal-(PEG)_2$。在一些实施方案中，连接子包含$Mal-(PEG)_2$。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元将抗体部分附接于连接子中的可裂解部

分。在一些实施方案中,连接子中的可裂解部分为可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit。

[0019] 在一些实施方案中,连接子中的可裂解部分直接接合于ADC的艾日布林药物部分,且可裂解部分直接连接于抗体部分或经由间隔子单元连接。在一些实施方案中,间隔子单元还将连接子中的可裂解部分附接于艾日布林药物部分。在一些实施方案中,将连接子中的可裂解部分附接于艾日布林药物部分的间隔子单元为自消耗的。在一些实施方案中,自消耗间隔子能够释放标靶细胞中的未改性的艾日布林。在一些实施方案中,自消耗间隔子单元包含对氨基苯甲醇。在一些实施方案中,自消耗间隔子单元包含对氨基苯甲氧基羰基(pAB)。在一些实施方案中,连接子中的pAB将可裂解部分附接于艾日布林药物部分。在一些实施方案中,可裂解部分为可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施方案中,连接子包含Val-Cit-pAB。在一些实施方案中,连接子包含Val-Cit-pAB和经由Mal将连接子接合于抗体部分的PEG间隔子单元。

[0020] 在一些实施方案中,p为整数1至6、2至5或优选3至4。在一些实施方案中,p为4。在一些实施方案中,提供一组ADC,且所述组中的平均p为约4(例如3.5-4.5,例如约3.8)。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB且p为4。在一些实施方案中,提供一组ADC,其中各ADC包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子,且所述组中平均p为约4(例如3.5-4.5,例如约3.8)。

[0021] 在一些实施方案中,ADC的内化抗体或内化抗原结合片段(Ab或Ab部分)为抗叶酸受体α(FRA)抗体或内化抗体片段,且可以结合表达FRA的肿瘤细胞(即ADC靶向表达FRA的细胞)。在一些实施方案中,相对于不可裂解连接子或替代裂解机制,包含抗FRAAb部分和可裂解肽部分的ADC显示较低的聚集水平,改善的抗体:药物比率,增加的癌细胞的靶向杀死,减少的非癌细胞的脱靶杀死,较高的药物负载(p),增加的细胞毒性和/或效力。在一些实施方案中,增加的效力和/或细胞毒性是在表达中等水平的由ADC的抗体部分靶向的抗原(例如中等FRA表达)的癌症中。在一些实施方案中,可裂解的肽部分能够由酶裂解,且连接子为酶能够裂解的连接子。在一些实施方案中,酶为组织蛋白酶,且连接子为组织蛋白酶能够裂解的连接子。在某些实施方案中,与替代分裂机制相比,酶能够裂解的连接子(例如组织蛋白酶能够裂解的连接子)显示上述改善特性中的一种或多种。在一些实施方案中,连接子为Mal-$(PEG)_m$-Val-Cit-pAB。

[0022] 在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段结合于叶酸受体α(FRA)且靶向表达FRA的肿瘤细胞。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含三个重链互补决定区(CDR)和三个轻链CDR,其中重链CDR包含由SEQ ID NO:2组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:3组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:4组成的重链CDR3;且三个轻链CDR包含由SEQ ID NO:7组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:8组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:9组成的轻链CDR3(如Kabat编号系统所定义);或其中重链CDR包含由SEQ ID NO:13组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:14组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:15组成的重链CDR3;且轻链CDR包含由SEQ ID NO:16组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:17组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:18组成的轻链CDR3(如IMGT编号系统所定义)。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含人类构架序列。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含SEQ ID NO:23的重链可变域和SEQ ID NO:24的轻链可变域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含人类

IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段与包含SEQ ID NO:23的重链可变域和SEQ ID NO:24的轻链可变域的抗体竞争结合表位和/或结合相同的表位。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段结合于包含丙氨酸-组氨酸-赖氨酸-天冬氨酸(AHKD)的表位(SEQ ID NO:365)(O'Shannessy等人，(2011) Oncotarget 2:1227-43)。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段结合于包含NTSQEAHKDVSYL(SEQ ID NO:366)的表位。

[0023] 在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段为内化抗FRA抗体或内化抗原结合片段。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含三个重链CDR和三个轻链CDR，其中重链CDR包含由SEQ ID NO:2组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:3组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:4组成的重链CDR3；且三个轻链CDR包含由SEQ ID NO:7组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:8组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:9组成的轻链CDR3(如Kabat编号系统所定义)；或其中重链CDR包含由SEQ ID NO:13组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:14组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:15组成的重链CDR3；且轻链CDR包含由SEQ ID NO:16组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:17组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:18组成的轻链CDR3(如IMGT编号系统所定义)；连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB；且p为4。在一些实施方案中，提供一组这类ADC，且p为约4(例如约3.8)。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含SEQ ID NO:23的重链可变域和SEQ ID NO:24的轻链可变域。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段与包含SEQ ID NO:23的重链可变域和SEQ ID NO:24的轻链可变域的抗体竞争结合表位和/或结合相同的表位。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段结合于包含SEQ ID NO:365的表位。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段结合于包含SEQ ID NO:366的表位。

[0024] 在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段结合于人类表皮生长因子受体2(her2)且靶向表达her2的肿瘤细胞。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含三个重链互补决定区(CDR)和三个轻链CDR，其中重链CDR包含由SEQ ID NO:71组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:72组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:73组成的重链CDR3；且三个轻链CDR包含由SEQ ID NO:74组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:75组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:76组成的轻链CDR3(如Kabat编号系统所定义)；或其中重链CDR包含由SEQ ID NO:191组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:192组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:193组成的重链CDR3；且轻链CDR包含由SEQ ID NO:194组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:195组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:196组成的轻链CDR3(如IMGT编号系统所定义)。在一些实施方案中，抗体或内化抗原结合片段包含人类构架序列。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含SEQ ID NO:27的重链可变域和SEQ ID NO:28的轻链可变域。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段与包含SEQ ID NO:27的重链可变域和SEQ ID NO:28的轻链可变域的抗体竞争结合表位和/或结合相同的表位。

[0025] 在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段为内化抗her 2抗体或内化抗原结合片段。在一些实施方案中，内化抗体或内化抗原结合片段包含三个重链CDR和三个轻链CDR，其中重链CDR包含由SEQ ID NO:71组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:72组成的重链

CDR2和由SEQ ID NO:73组成的重链CDR3;且三个轻链CDR包含由SEQ ID NO:74组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:75组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:76组成的轻链CDR3(如Kabat编号系统所定义);或其中重链CDR包含由SEQ ID NO:191组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:192组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:193组成的重链CDR3;且轻链CDR包含由SEQ ID NO:194组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:195组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:196组成的轻链CDR3(如IMGT编号系统所定义);连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB;且p为4。在一些实施方案中,提供一组这类ADC,且p为约4(例如约3.8)。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含SEQ ID NO:27的重链可变域和SEQ ID NO:28的轻链可变域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段与包含SEQ ID NO:27的重链可变域和SEQ ID NO:28的轻链可变域的抗体竞争结合表位和/或结合相同的表位。

[0026] 在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段结合于间皮素(MSLN)且靶向表达MSLN的肿瘤细胞。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含三个重链互补决定区(CDR)和三个轻链CDR,其中重链CDR包含由SEQ ID NO:65组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:66组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:67组成的重链CDR3;且三个轻链CDR包含由SEQ ID NO:68组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:69组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:70组成的轻链CDR3(如Kabat编号系统所定义);或其中重链CDR包含由SEQ ID NO:185组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:186组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:187组成的重链CDR3;且轻链CDR包含由SEQ ID NO:188组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:189组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:190组成的轻链CDR3(如IMGT编号系统所定义)。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含SEQ ID NO:25的重链可变域和SEQ ID NO:26的轻链可变域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段与包含SEQ ID NO:25的重链可变域和SEQ ID NO:26的轻链可变域的抗体竞争结合表位和/或结合相同的表位。

[0027] 在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段为内化抗MSLN抗体或内化抗原结合片段。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含三个重链CDR和三个轻链CDR,其中重链CDR包含由SEQ ID NO:65组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:66组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:67组成的重链CDR3;且三个轻链CDR包含由SEQ ID NO:68组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:69组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:70组成的轻链CDR3(如Kabat编号系统所定义);或其中重链CDR包含由SEQ ID NO:185组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:186组成的重链CDR2和由SEQ ID NO:187组成的重链CDR3;且轻链CDR包含由SEQ ID NO:188组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:189组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:190组成的轻链CDR3(如IMGT编号系统所定义);连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB;且p为4。在一些实施方案中,提供一组这类ADC,且p为约4(例如约3.8)。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含SEQ ID NO:25的重链可变域和SEQ ID NO:26的轻链可变域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。在一些实施方案中,内化抗体或内化抗原结合片段与包含SEQ ID NO:25的重链可变域和SEQ ID NO:26的轻链可变域的抗体竞争结合表位和/或结合相同的表位。

[0028] 本文中还提供包含多个拷贝的任何所述ADC的组合物,其中组合物中ADC的平均药

物负载(平均p)在约3与4之间,或约3.5至约4.5,或约4。在一些实施方案中,平均p在约3.2与3.8之间。在一些实施方案中,平均p在约3.6与4.4之间。

[0029] 本文还提供包含-L-D的组合物,其中D为艾日布林;且L为共价附接于D的可裂解连接子。在一些实施方案中,可裂解连接子共价附接于艾日布林上的C-35胺。在一些实施方案中,可裂解连接子包含Val-Cit。在一些实施方案中,可裂解连接子包含PEG间隔子单元。在一些实施方案中,可裂解连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB。

[0030] 本文进一步提供包含ADC和药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂的药物组合物。

[0031] 本公开的另一方面包括所述ADC化合物和组合物例如在治疗癌症中的治疗和诊断用途。另一方面包括治疗表达由ADC的抗体部分靶向的抗原(例如FRA)的癌症的方法。在各种实施方案中,提供杀死肿瘤细胞或癌细胞或抑制其增殖的方法,其是通过施用治疗有效量和/或方案的任一所述ADC。另一方面包括使用所公开的ADC检测表达FRA的肿瘤细胞或癌细胞的方法,和筛选对用所述ADC治疗起反应的癌症患者的方法。在一些实施方案中,癌症为胃癌、浆液性卵巢癌、透明细胞卵巢癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、三阴性乳腺癌、子宫内膜癌、浆液性子宫内膜癌、肺类癌或骨肉瘤。还公开了产生所述ADC的方法。

[0032] 图示简单说明

[0033] 图1展示如某些实施方案中所公开,用于制备MORAb-003 ADC的一种方法。在此方法中,通过用有限摩尔当量的非硫醇还原剂TCEP部分还原,产生未配对的半胱氨酸。此方法优先还原连接轻链与重链(每一H-L配对的一对)和铰链区中的两个重链(在人类IgG1情况下每一H-H配对的两对)的链间二硫键,而使链内二硫键完整。

[0034] 图2展示如某些实施方案中所公开,合成顺丁烯二酰亚胺-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林(mal-$(PEG)_2$-VCP-艾日布林)的方法。

[0035] 图3展示MORAb-003的还原条件的SDS-PAGE分析。泳道指示在图右侧。泳道M对应于标准蛋白质;泳道1对应于未经处理的MORAb-003;泳道2对应于5.3mg/mL,70.6μM TCEP中还原;泳道3对应于MORAb-003 5.3mg/mL,141.2μM TCEP中还原;泳道4对应于MORAb-003 1.5mg/mL,20μM TCEP中还原;且泳道5对应于MORAb-003 1.5mg/mL,40μM TCEP中还原。各亮带的身分指示在右下凝胶上。“H”指示重链。“L”指示轻链。

[0036] 图4展示MORAb-003的还原条件的SDS-PAGE分析。泳道1对应于蛋白质标准;泳道2对应于未经处理的MORAb-003;泳道3对应于以1∶1的MORAb-003∶TCEP比率处理的MORAb-003;泳道4对应于以1∶2的MORAb-003∶TCEP比率处理的MORAb-003;泳道5对应于以1∶3的MORAb-003∶TCEP比率处理的MORAb-003;且泳道6对应于以1∶4的MORAb-003∶TCEP比率处理的MORAb-003。

[0037] 图5展示所选MORAb-003 ADC的非还原SDS-PAGE分析,包括M-MMAE(泳道2)、M-DM1(泳道3)、M-0026(泳道4)、M-0260(泳道5)、M-0267(泳道6)、M-0272(泳道7)、M-0285(泳道8)、M-0292(泳道9)、M-027-0381(泳道10)和M-0284(泳道11)。

[0038] 图6A展示MORAb-003-顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-Val-Cit-pAB-艾日布林(M3-VCP-艾日布林或“MORAb-202”)的旁观细胞毒性测定的结果。图6B展示MORAb-003-顺丁烯二酰亚胺基-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB-ER-001150828(M3-ER-61318)的旁观细胞毒性测定的结果。图6C展示MORAb-003-PEG-pAB-多司他汀3(M3-027-0285)的旁观细胞毒性分析的结果。各别图例

中所示的信息提供细胞系:所测试的剂(培养细胞系,第一/第二细胞系的接种密度)。

[0039] 图7A和7B展示如某些实施方案中公开,ADCMORAb-003-VCP-艾日布林(图7A)和MORAb-003-0285(图7B)相对于未偶联的MORAb-003的药物抗体比率(DAR)分配。各峰上的编号指示个别物种的DAR。

[0040] 图8展示IGROV1或SJSA-1细胞中细胞毒性分析的结果-MORAb-003-VCP-艾日布林与未偶联的MORAb-003(2μM)的竞争。

[0041] 图9展示用单静脉内剂量的媒介物(PBS)或MORAb-202以10、20、40或80mg/kg处理每组CD-1小鼠(组平均数和SEM)的体重动力学。

[0042] 图10展示根据q4d×3给药方案(剂量每四日施用一次,共3剂),用PBS或艾日布林以0.4、0.8、1.6或3.2mg/kg静脉内处理的每组CD-1小鼠(组平均数和SEM)的体重动力学。

[0043] 图11展示植入hNSCLC NCI-H2110细胞(组平均数和SEM)且用单静脉内剂量PBS、1、2.5或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)或5mg/kg MORAb-003-0285处理的每组CB17-SCID小鼠的肿瘤生长动力学。

[0044] 图12展示第17天植入hNSCLC NCI-H2110细胞的个别CB17-SCID小鼠的肿瘤体积,以及组平均数和SEM。各组用单静脉内剂量PBS、1、2.5或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)或5mg/kg MORAb-003-0285处理。

[0045] 图13展示用单静脉内剂量的PBS、1、2.5或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)或5mg/kg MORAb-003-0285处理的植入NCI-H2110的每组CB17-SCID小鼠(组平均数和SEM)的体重动力学。

[0046] 图14展示根据q4d×3给药方案,用媒介物(PBS)或0.5、0.2、0.8或1.6mg/kg艾日布林静脉内处理的植入NCI-H2110的每组CB 17-SCID小鼠(组平均数和SEM)的肿瘤生长动力学。

[0047] 图15展示第24天植入NCI-H2110细胞的个别CB17-SCID小鼠的肿瘤体积,以及组平均数和SEM。根据q4d×3给药方案,各组用媒介物(PBS)或0.5、0.2、0.8或1.6mg/kg艾日布林静脉内处理。

[0048] 图16展示根据q4d×3给药方案,用媒介物(PBS)或0.5、0.2、0.8或1.6mg/kg艾日布林静脉内处理的植入NCI-H2110的每组CB 17-SCID小鼠(组平均数和SEM)的体重改变动力学。

[0049] 图17展示如通过结晶紫细胞毒性测定所测量,MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)对IGROV1、OVCAR3、NCI-H2110、A431-A3和SJSA-1细胞的效力。

[0050] 图18展示用单静脉内剂量的PBS、1、2.5或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的植入NCI-H2110的各组CB17-SCID小鼠(组平均数和SEM)的肿瘤生长动力学。

[0051] 图19A和19B展示用单静脉内剂量的媒介物(PBS)、5mg/kg MORAb-003或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的负载NSCLC PDx(LXFA-737)肿瘤的每组小鼠(组平均数和SEM)的肿瘤生长动力学(图19A)和体重改变动力学(图19B)。

[0052] 图20A和20B展示用单静脉内剂量的PBS、0.1或3.2mg/kg艾日布林或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的负载子宫内膜癌PDx(Endo-12961)肿瘤的每组小鼠(组平均数和SEM)的个别肿瘤体积比(图20A)和体重改变动力学(图20B)。图20C和

20D展示用单静脉内剂量的PBS、0.1或3.2mg/kg艾日布林或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的负载子宫内膜癌PDx(Endo-10590)肿瘤的每组小鼠(组平均数和SEM)的肿瘤生长动力学(图20C)和体重改变动力学(图20D)。

[0053] 图21A展示具有抗人类IgG抗体的负载TNBC PDx(OD-BRE-0631)肿瘤的小鼠中肿瘤组织的免疫组织化学(IHC)染色。收集来自用单静脉内剂量的媒介物(右)或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)(左)处理的小鼠的肿瘤组织并在处理后5天染色。图21B展示具有α-平滑肌肌动蛋白(SMA)-FITC抗体的负载TNBC PDx(OD-BRE-0631)肿瘤的小鼠中肿瘤组织的IHC染色。在处理前2天,收集来自未经处理的小鼠的肿瘤组织(左),而处理后5天,收集来自用单静脉内剂量的5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的小鼠的肿瘤组织(右)。图21C展示用单静脉内剂量的媒介物(PBS)或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的负载TNBC PDx(OD-BRE-0631)肿瘤的每组小鼠(组平均数和SEM)的肿瘤生长动力学。

[0054] 图22展示如通过流动式细胞测量分析所测量,在用媒介物(PBS或乙醇)、艾日布林、MORAb-003或MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理后,与MKN-74细胞一起培养的人类骨髓-间质干细胞(BM-MSC)的分化。Stro-1^{+}/$CD105^{+}$、$CD34^{+}$/$CD31^{-}$和$NG2^{+}$分别为MSC、脂肪细胞和周细胞的标记物。

[0055] 图23展示来自用单静脉内剂量的媒介物(PBS)或5mg/kg MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)处理的植入NCI-H2110的CB17-SCID小鼠的肿瘤组织的时程分析,用α-平滑肌肌动蛋白(SMA)-FITC抗体染色。收集肿瘤组织且在第0天和处理后第3天、第5天、第7天和第9天染色。Y轴:%=[计数的染色细胞/计数的总细胞]×100。X轴:天数(计数的总细胞)。

[0056] 发明详述

[0057] 通过参考以下详细描述,以及形成本公开的一部分的附图,可以更容易地理解所公开的组合物和方法。应了解所公开的组合物和方法不局限于本文所述和/或所示的特定组合物和方法,且本文所用的术语仅仅出于借助于实例描述特定实施方案的目的,且不意图限制所要求的组合物和方法。

[0058] 本文通篇,描述提及组合物和使用所述组合物的方法。在本公开描述或要求与组合物有关的特征或实施方案的情况下,这类特征或实施方案同等适用于使用所述组合物的方法。同样,在本公开描述或要求与使用组合物的方法有关的特征或实施方案的情况下,这类特征或实施方案同等适用于所述组合物。

[0059] 当表述值的范围时,其包括使用所述范围内的任何特定值的实施方案。此外,提及范围内所述的值包括所述范围内的每个值。所有范围都包括其终点且可以组合。当通过利用前面的“约”,将值表述为近似值时,应了解特定值形成另一实施方案。除非上下文另外清楚规定,否则提及特定数值至少包括所述特定值。除非所使用的特定上下文另外规定,否则使用“或”将意指“和/或”。本文中引用的所有参考文献都以引用的方式并入以达成任何目的。在参考文献与本说明书冲突的情况下,将以本说明书为主。

[0060] 应了解,为清楚起见,在本文中单独实施方案的上下文中描述的所公开组合物和方法的某些特征也可以组合提供于单个实施方案。相反,为简便起见,在单个实施方案的上下文中描述的所公开的组合物和方法的各种特征也可以分开或呈任何子组合提供。

[0061] 定义

[0062] 本说明书和权利要求书通篇使用与本描述的方面有关的各种术语。除非另有指示，否则这类术语将给出其通常含义。其它特别定义的术语将以符合本文中提供的定义的方式解释。

[0063] 如本文所用，除非上下文另外清楚规定，单数形式“一种(a/an)”和“所述”包括复数形式。

[0064] 在数值和范围的上下文中术语“约”或“大约”是指约等于或接近所述值或范围，使得实施方案可以如所欲执行，例如反应混合物中具有所需量的核酸或多肽的值或范围，如技术人员从本文中所含的教示内容显而易见。这至少部分归因于核酸组合物的改变特性、年龄、种族、性别、解剖和生理变异和生物系统的不精密。因此，这些术语涵盖除由系统误差产生的值以外的值。

[0065] 术语“抗体-药物偶联物”、“抗体偶联物”、“偶联物”、“免疫偶联物”和“ADC”可以互换使用，且是指连接于抗体(例如抗FRA抗体)的化合物或其衍生物，且定义为以下通式：Ab-(L-D)$_p$(式I)，其中Ab＝抗体部分(即抗体或抗原结合片段)，L＝连接子部分，D＝药物部分，且p＝每一抗体部分的药物部分数目。

[0066] 术语“抗体”以最广泛的意义使用，是指一种免疫球蛋白分子，其通过免疫球蛋白分子的可变区内的抗原识别位点，识别和特异性结合于标靶，例如蛋白质、多肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或上述组合。抗体重链由重链可变域(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。轻链由轻链可变域(V_L)和轻链恒定域(C_L)组成。出于本应用的目的，成熟重链和轻链可变域各包含在N端至C端排列的四个构架区(FR1、FR2、FR3和FR4)内的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。“抗体”可以天然存在或是人造的，例如通过常规杂交瘤技术产生的单克隆抗体。术语“抗体”包括全长单克隆抗体和全长多克隆抗体，以及抗体片段，例如Fab、Fab′、F(ab′)2、Fv和单链抗体。抗体可以为免疫球蛋白五种主要类别中的任一者：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM或其子类(例如同型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。所述术语进一步涵盖人类抗体、嵌合抗体、人源化抗体和含有抗原识别位点的任何经修饰的免疫球蛋白分子，只要其显示所需生物活性即可。

[0067] 如本文所用，术语“单克隆抗体”是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体，即除了可能少量存在的可能天然存在的突变外，构成所述群体的个别抗体都一致。单克隆抗体为高度特异性的，针对单个表位。相反，常规(多克隆)抗体制剂通常包括针对不同表位(或对其具有特异性)的众多抗体。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为从基本上均质的抗体群体获得，且不应解释为需要通过任何特定的方法产生所述抗体。举例来说，根据本公开使用的单克隆抗体可以通过Kohler等人(1975)Nature 256:495最先描述的杂交瘤方法制备，或可以通过重组DNA方法制备(参见例如美国专利No.4,816,567)。单克隆抗体也可以从噬菌体抗体库使用例如Clackson等人(1991)Nature 352:624-8和Marks等人(1991)J.Mol.Biol.222:581-97中描述的技术分离。

[0068] 本文中描述的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或子类的抗体中的对应序列同一或同源，而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或子类的抗体中的对应序列同一或同源；以及这类抗体的片段，只要所述片段特异性结合标靶抗原和/或展现所需生物活性即可。

[0069] 如本文所用，术语“人类抗体”是指由人类产生的抗体或具有由人类产生的抗体的

氨基酸序列的抗体。

[0070] 如本文所用，术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两种或更多种物种的抗体。在有些情况下，重链与轻链的可变区都对应于来源于一种物种的具有所需特异性、亲和力和活性的抗体的可变区，而恒定区与来源于另一物种(例如人类)的抗体同源以使在后一物种中的免疫反应降至最低。

[0071] 如本文所用，术语“人源化抗体”是指含有来自非人类(例如鼠类)抗体以及人类抗体的序列的抗体形式。这类抗体为含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。一般来说，人源化抗体包含至少一个和通常两个可变域中基本上所有，其中所有或基本上所有高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有构架(FR)区为人类免疫球蛋白序列的构架区。人源化抗体任选地还包含通常为人类免疫球蛋白的恒定区的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。人源化抗体可以通过Fv构架区中和/或被替换的非人类残基中的残基的取代而进行进一步修饰以改善和优化抗体特异性、亲和力和/或活性。

[0072] 如本文所用，术语“抗原结合片段”或抗体的“抗原结合部分”是指保留特异性结合于抗原(例如FRA)的能力的抗体的一个或多个片段。抗原结合片段优选还保留内化至表达抗原的细胞的能力。在一些实施方案中，抗原结合片段还保留免疫效应活性。已经展示全长抗体的片段可以执行全长抗体的抗原结合功能。涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i)Fab片段，由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的单价片段；(ii)$F(ab')_2$片段，包含两个由铰链区的二硫键连接的Fab片段的二价片段；(iii)Fd片段，由V_H和C_{H1}结构域组成；(iv)Fv片段，由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成；(v)dAb片段，其包含单个可变域，例如V_H结构域(参见例如Ward等人(1989)Nature 341:544-6;和Winter等人，WO 90/05144)；和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外，虽然Fv片段的两个结构域V_L和V_H由单独的基因编码，但其可以使用重组方法，通过能够将其制成其中V_L与V_H区配对形成单价分子的单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv))的合成连接子接合。参见例如Bird等人(1988)Science 242:423-6;和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-83。这类单链抗体也意图涵盖于术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”内，且在本领域中被公认为在结合时可以内化至细胞的结合片段的一种示例性类型。参见例如Zhu等人(2010)9:2131-41;He等人(2010)J.Nucl.Med.51:427-32;和Fitting等人(2015)MAbs 7:390-402。在某些实施方案中，scFv分子可以并入融合蛋白中。还涵盖单链抗体的其它形式，例如双功能抗体。双功能抗体为二价双特异性抗体，其中V_H和V_L结构域在单个多肽链上表达，但使用的连接子太短而无法在同一链上的两个结构域之间配对，因此迫使结构域与另一链的互补结构域配对且产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-8;和Poljak等人(1994)Structure 2:1121-3)。使用本领域技术人员已知的常规技术获得抗原结合片段，且以与完整抗体相同的方式，针对效用(例如结合亲和力、内在化)来筛选结合片段。抗原结合片段可以通过例如用蛋白酶或化学裂解使完整蛋白质裂解来制备。

[0073] 如本文关于抗体或抗原结合片段所用，“内化”是指在结合于细胞时，能够通过细胞脂质双层膜至内部隔室(即“内化”)，优选至细胞中的降解隔室中的抗体或抗原结合片段。举例来说，内化抗FRA抗体为在结合于细胞膜上的FRA后能够进入细胞的抗体。

[0074] 如本文所用，术语“叶酸受体α”或“FRA”是指人类FRA的任何天然形式。所述术语涵

盖全长FRA(例如NCBI参考序列:NP_000793;SEQ ID NO:19),以及由细胞加工产生的人类FRA的任何形式。所述术语还涵盖天然存在的FRA变异体,包括(但不限于)剪接变异体、等位基因变异体和同工型。FRA可以从人类分离,或可以重组或通过合成方法产生。

[0075] 术语"抗FRA抗体"或"特异性结合FRA的抗体"是指特异性结合FRA的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要所述片段特异性结合FRA即可。用于本文中公开的ADC中的抗FRA抗体优选为内化抗体或内化抗体片段。MORAb-003为一种示例性内化抗人类FRA抗体。如本文所用,术语"特异性"、"特异性结合"和"特异性地结合"是指抗体选择性结合于标靶表位。可以通过在给定的一组条件下,比较结合于适当抗原与结合于不相关抗原或抗原混合物,来测试抗体的结合特异性。如果抗体结合于适当抗原的亲和力比结合于不相关抗原或抗原混合物的亲和力大至少2、5、7和优选10倍,那么其被视为特异性。在一个实施方案中特异性抗体为仅结合FRA抗原,而不结合(或显示最低程度的结合)其它抗原的抗体。

[0076] 术语"人类表皮生长因子受体2"、"her2"或"her2/neu"是指人类her2的任何天然形式。所述术语涵盖全长her2(例如NCBI参考序列:NP_004439.2;SEQ ID NO:21),以及由细胞加工产生的人类her2的任何形式。所述术语还涵盖天然存在的her2变异体,包括(但不限于)剪接变异体、等位基因变异体和同工型。Her2可以从人类分离,或可以重组或通过合成方法产生。

[0077] 术语"抗her2抗体"或"特异性结合her2的抗体"是指特异性结合her2的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要所述片段特异性结合her2即可。美国专利No.5,821,337(以引用的方式并入本文中)提供示例性her2结合序列,包括示例性抗her2抗体序列。用于本文中公开的ADC中的抗her2抗体优选为内化抗体或内化抗体片段。曲妥珠单抗(Trastuzumab)为一种示例性内化抗人类her2抗体。

[0078] 术语"表位"是指能够被抗体识别且特异性结合的抗原部分。当抗原为多肽时,表位可以由通过多肽三级折叠而并置的邻接氨基酸或非邻接氨基酸形成。抗体所结合的表位可以使用本领域中已知的任何表位定位技术鉴别,包括X射线晶体分析法,其通过将抗原-抗体复合物直接可视化,以及监测抗体与抗原的片段或突变变体的结合,或监测抗体和抗原的不同部分的溶剂可及性来鉴别表位。用于定位抗体表位的示例性策略包括(但不限于)基于阵列的寡肽扫描、限制性蛋白酶解、定点诱变、高通量诱变定位、氢-氘交换和质谱分析(参见例如Gershoni等人(2007)21:145-56;以及Hager-Braun和Tomer(2005)Expert Rev.Proteomics 2:745-56)。

[0079] 竞争性结合和表位分组也可以用于测定共享一致或重叠表位的抗体。竞争性结合可以使用交叉阻断测定,例如"Antibodies,ALaboratory Manual,"Cold Spring Harbor Laboratory,Harlow和Lane(第一版1988,第二版2014)中描述的测定来评估。在一些实施方案中,当在交叉阻断测定中测试抗体或结合蛋白(例如包含选自表2、4和6中鉴别的CDR和/或可变域的CDR和/或可变域的结合蛋白)使参考抗体或结合蛋白与标靶抗原(例如FRA或her2)的结合减少至少约50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%或更多,或之间的任何百分比)时,和/或相反情况,确定竞争性结合。在一些实施方案中,竞争性结合可以归因于共享或类似(例如部分重叠)的表位,或归因于抗体或结合蛋白结合在附近

表位的位阻。参见例如Tzartos,Methods in Molecular Biology(Morris编辑(1998)第66卷,第55-66页)。在一些实施方案中,竞争性结合可以用于将共享类似表位的结合蛋白组分类,例如竞争结合的结合蛋白可以"分组"为具有重叠或接近表位的一组结合蛋白,而不竞争的结合蛋白处于不具有重叠或接近表位的另一组结合蛋白中。

[0080] 术语"k_{on}"或"k_a"是指抗体与抗原缔合形成抗体/抗原复合物的缔合速率常数。可以使用标准测定,例如Biacore或ELISA测定来测定此速率。

[0081] 术语"k_{off}"或"k_d"是指抗体从抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。可以使用标准测定,例如Biacore或ELISA测定来测定此速率。

[0082] 术语"K_D"是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。K_D由k_a/k_d算得。可以使用标准测定,例如Biacore或ELISA测定来测定速率。

[0083] 术语"p"或"抗体:药物比率"或"药物抗体比率"或"DAR"是指每一抗体部分的药物部分数目,即药物负载,或式I的ADC中每一抗体或抗原结合片段(Ab)的-L-D部分数目。在包含多个拷贝的式I的ADC的组合物中,"p"是指每一抗体或抗原结合片段的-L-D部分的平均数目,又称为平均药物负载。

[0084] "连接子"或"连接子部分"为能够将化合物,通常药物部分(例如化学治疗剂)共价接合于另一部分(例如抗体部分)的任何化学部分。在化合物或抗体保持活性的条件下连接子容易或基本上抵抗酸诱发性裂解、肽酶诱发性裂解、基于光的裂解、酯酶诱发性裂解和/或二硫键裂解。

[0085] 术语"剂"在本文中用以指化合物、化合物的混合物、生物大分子或从生物物质工艺制得的提取物。术语"治疗剂"、"药物"或"药物部分"是指能够调节生物过程和/或具有生物活性的药剂。

[0086] 术语"化学治疗剂"或"抗癌剂"在本文中用以指不管作用机制如何,都有效治疗癌症的所有化合物。转移或血管生成的抑制时常为化学治疗剂的特性。化学治疗剂的非限制性实例包括烷基化剂,例如氮芥、伸乙基亚胺化合物和烷基磺酸酯;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;抗有丝分裂剂,例如抗微管蛋白剂,例如艾日布林或艾日布林甲磺酸盐(Halaven™)或其衍生物、长春花生物碱和奥瑞他汀(auristatin);细胞毒性抗生素;破坏或干扰DNA表达或复制的化合物,例如DNA小沟结合剂;和生长因子受体拮抗剂。另外,化学治疗剂包括抗体、生物分子和小分子。化学治疗剂可以为细胞毒性或细胞生长抑制剂。术语"细胞生长抑制剂"是指抑制或遏制细胞生长和/或细胞繁殖的剂。

[0087] 术语"细胞毒性剂"是指主要通过干扰细胞的表达活性和/或功能而引起细胞死亡的物质。细胞毒性剂的实例包括(但不限于)抗有丝分裂剂,例如艾日布林、奥瑞他汀(例如单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF))、类美登素(maytansinoid)(例如美登素(maytansine))、海兔毒素(dolastatin)、多司他汀(duostatin)、念珠藻环肽(cryptophycin)、长春花生物碱(例如长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine))、紫杉烷(taxane)、紫杉醇(taxol)和秋水仙碱;蒽环类药物(例如道诺霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxyanthracindione));细胞毒性抗生素(例如丝裂霉素(mitomycin)、放线菌素(actinomycin)、倍癌霉素(duocarmycin)(例如CC-1065)、金霉素(auromycin)、多霉素(duomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、内孢霉素(endomycin)、酚霉素(phenomycin));烷基化剂(例如顺铂(cisplatin));插入剂(例如溴化

乙锭(ethidium bromide));拓扑异构酶抑制剂(例如依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide));放射性同位素,例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}或Bi^{213}、p^{32}和镥的放射性同位素(例如Lu^{177});以及细菌、真菌、植物或动物来源的毒素(例如蓖麻毒素(例如蓖麻毒素A链)、白喉毒素、假单胞细菌外毒素A(例如PE40)、内毒素、米托菌素(mitogellin)、考布他汀(combrestatin)、局限曲菌素(restrictocin)、白树毒素(gelonin)、α-八迭球菌、相思子毒素(例如相思子毒素A链)、蒴莲根毒素(modeccin)(例如蒴莲根毒素A链)、达托霉素(curicin)、巴豆毒素、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、糖皮质激素)。

[0088] 如本文所用,术语“艾日布林”是指软海绵素B(最初从海绵冈田软海绵(Halichondria okadais)分离的大环化合物)的合成类似物。术语“艾日布林药物部分”是指具有艾日布林结构并经由其C-35胺附接于ADC的连接子的ADC的组分。艾日布林为微管动力学抑制剂,认为其结合微管蛋白并通过抑制有丝分裂纺锤体组件,在G2/M期引起细胞周期停滞。术语“艾日布林甲磺酸盐”是指艾日布林的甲磺酸盐,其以商品名Halaven™出售。

[0089] 术语“同源性”是指通过例如具有在对应位置相同或类似的化学残基的序列,显示与另一分子的同源性的分子。

[0090] 如本文所用,术语“抑制(inhibit或inhibition)”意指减少可测量的量,且可以包括但不需要完全预防或抑制。

[0091] 术语“标靶阴性”或“标靶抗原阴性”是指细胞或组织缺乏标靶抗原表达。术语“标靶阳性”或“标靶抗原阳性”是指存在标靶抗原表达。举例来说,不表达标靶抗原的细胞或细胞系可以被描述为标靶阴性,而表达标靶抗原的细胞或细胞系可以被描述为标靶阳性。

[0092] 术语“旁观杀死”或“旁观者效应”是指在标靶阳性细胞存在下杀死标靶阴性细胞,其中在标靶阳性细胞缺乏下未观察到标靶阴性细胞的杀死。细胞-细胞接触或标靶阳性与标靶阴性细胞之间至少邻近能够进行旁观杀死。这类杀死可同“脱靶杀死”区分,脱靶杀死是指标靶阴性细胞的无差别杀死。可以在标靶阳性细胞缺乏下观察到“脱靶杀死”。

[0093] 术语“癌症”是指哺乳动物中细胞群体的特征为不受调控的细胞生长的生理病状。癌症的实例包括(但不限于)癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这类癌症的更特定实例包括鳞状上皮细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、骨肉瘤、黑素瘤、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜(例如浆液小)或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各类头颈癌。三阴性乳腺癌是指对于雌激素受体(ER)、孕酮受体(PR)或Her2/neu的基因的表达呈阴性的乳腺癌。

[0094] 术语“肿瘤”和“赘生物”是指由良性或恶性的过度细胞生长或增殖产生的任何组织块,包括癌前病变。

[0095] 术语“癌细胞”和“肿瘤细胞”是指来源于肿瘤的个别细胞或细胞总群体,包括非致癌细胞与癌症干细胞。如本文所用,当仅仅提及无法更新和分化的那些肿瘤细胞时术语“肿瘤细胞”将由术语“非致瘤性”修饰,以区分那些肿瘤细胞与癌症干细胞。

[0096] 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,是指任何动物,例如任何哺乳动物,包括(但不限于)人类、非人类灵长类动物、啮齿类动物等等。在一些实施方案中,哺乳动物为小鼠。在一些实施方案中,哺乳动物为人类。

[0097] 术语“共同施用”或“组合”一种或多种治疗剂施用包括以任何次序同时和连续施用。

[0098] “药物组合物”是指呈允许施用并随后提供活性成分的所欲生物活性和/或实现治疗作用的形式且不含毒性为制剂所投受试者无法接受的其它组分的制剂。药物组合物可以为无菌的。

[0099] “药物赋形剂”包含例如佐剂、载体、pH调整和缓冲剂、张力调整剂、润湿剂、防腐剂等物质。

[0100] “药学上可接受”意指经或能够经联邦政府或州政府的管理机构批准，或美国药典或其它公认药典中所列，用于动物中且更尤其用于人类中。

[0101] 如本文中公开的ADC的“有效量”为足够执行特别说明的目的，例如在施用后产生治疗作用，例如降低肿瘤生长速率或肿瘤体积、减少癌症症状或治疗功效的一些其它征候的量。有效量可以用关于所述目的的常规方式测定。术语“治疗有效量”是指有效治疗受试者的疾病或病症的ADC的量。在癌症情况下，治疗有效量的ADC可以减少癌细胞数目，减小肿瘤尺寸，抑制(例如减慢或终止)肿瘤转移，抑制(例如减慢或终止)肿瘤生长，和/或减轻一种或多种症状。“预防有效量”是指在必需的剂量下和时间段内有效实现预防结果所需的量。通常，因为在患病前或在疾病早期，预防剂量用于受试者中，所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0102] 如本文所用，“治疗(treat)”或“治疗(therapeutic)”和语法上相关的术语是指任何疾病后果的任何改善，例如存活期延长、发病率较小和/或作为替代治疗方式的副产物的副作用减轻。如本领域中容易了解，疾病完全根除为优选的，但并不是治疗行为的必要条件。如本文所用，“治疗(Treatment或treat)”是指向受试者(例如患者)施用所述ADC。治疗可以为治愈、医治、缓和、减轻、改变、医治、改善、减弱、好转或影响病症、病症的症状或例如癌症的患病倾向性。

[0103] 在一些实施方案中，使用标记的ADC。合适“标记”包括放射性核素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光部分、化学发光部分、磁性颗粒等。

[0104] 如本文所用，“蛋白质”意指至少两个共价附接的氨基酸。所述术语涵盖多肽、寡肽和肽。在一些实施方案中，两个或更多个共价附接的氨基酸通过肽键附接。例如当蛋白质使用表达系统和宿主细胞重组制造时，蛋白质可以由天然存在的氨基酸和肽键组成。或者，蛋白质可以包括合成氨基酸(例如高苯丙氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸和正亮氨酸)或肽模拟结构，即“肽或蛋白质类似物”，例如类肽。类肽为肽模拟物的一种示例性类别，其侧链侧接于肽主链的氮原子，而非α-碳(如其在氨基酸中)，且与肽相比，具有不同氢键和构形特征(参见例如Simon等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:9367)。因而，类肽可以抵抗蛋白水解或其它生理或存储条件，并有效渗透细胞膜。尤其当抗体通过本领域中熟知的常规方法在体外合成时，可以掺入这类合成氨基酸。另外，可以使用肽模拟、合成和天然存在的残基/结构的任何组合。“氨基酸”还包括亚氨基酸残基，例如脯氨酸和羟脯氨酸。氨基酸“R基团”或“侧链”可以呈(L)-或(S)-构型。在一特定实施方案中，氨基酸呈(L)-或(S)-构型。

[0105] “重组蛋白”为使用重组技术，使用本领域中已知的任何技术和方法，即通过表达重组核酸制造的蛋白质。本领域中众所周知用于产生重组蛋白的方法和技术。

[0106] “分离”蛋白不含在自然状态中通常相关联的至少一些物质，例如占给定样品中总

蛋白质的至少约5重量％或至少约50重量％。应了解，分离蛋白可以占总蛋白质含量的5重量％至99.9重量％，取决于环境。举例来说，蛋白质可以通过使用诱寻型启动子或高表达启动子而以显著更高的浓度制成，使得蛋白质以增加的浓度水平制成。定义包括抗体在本领域中已知的多种生物体和/或宿主细胞中产生。

[0107] 对于氨基酸序列，可以使用本领域中已知的标准技术或通过目测确定序列同一性和/或相似性，包括(但不限于)Smith和Wateman(1981)Adv.Appl.Math.2:482的局部序列同一性算法;Needleman和Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:443的序列同一性比对算法;Pearson和Lipman(1988)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85:2444的相似性搜索法;这些算法的计算机化执行(GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA，Wisconsin Genetics Software Package中，Genetics Computer Group，575Science Drive，Madison，Wis.);Devereux等人(1984)Nucl.Acid Res.12:387-95描述的Best Fit序列程序，优选使用默认设置。优选地，同一性％通过FastDB，基于以下参数计算:错配罚分1;间隙罚分1;间隙尺寸罚分0.33;和接合罚分30(“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis”，Macromolecule Sequencing and Synthesis，Selected Methods and Applications，第127-149页(1988)，Alan R.Liss，Inc)。

[0108] 适用算法的一个实例为PILEUP。PILEUP从一组相关序列，使用渐进成对比对来产生多个序列比对。其也可以绘出树，显示用于产生比对的聚类关系。PILEUP使用Feng和Doolittle(1987)J.Mol.Evol.35:351-60的渐进比对方法的简化;所述方法类似于Higgins和Sharp(1989)CABIOS 5:151-3描述的方法。适用PILEUP参数包括3.00的预设间隙权重、0.10的预设间隙长度权重和加权末端间隙。

[0109] 适用算法的另一实例为以下中描述的BLAST算法:Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-10;Altschul等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402;和Karin等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-87。一种尤其适用的BLAST程序为WU-BLAST-2程序，其是从Altschul等人(1996)Methods in Enzymology 266:460-80获得。WU-BLAST-2使用若干搜索参数，其中大多数被设定为默认值。可调参数设定为以下值:重叠间隔＝1，重叠分数＝0.125，单字阈值(T)＝II。HSP S和HSP S2参数为动力学值且由程序本身建立，视特定序列的组成和相关序列所搜索的特定数据库的组成而定;然而，所述值可以进行调整以增加灵敏度。

[0110] 另一适用算法为间隙BLAST，如Altschul等人(1993)Nucl.Acids Res.25:3389-402所报道。间隙BLAST使用BLOSUM-62取代得分;阈值T参数设定为9;双碰撞方法，触发无间隙延伸，给予间隙长度k为10+k的成本;Xu设定为16;且针对数据库搜索阶段，Xg设定为40，且对于算法输出阶段，为67。间隙比对通过对应于约22位的得分触发。

[0111] 一般来说，本文中公开的蛋白质与其变异体(包括FRA的变异体、her2的变异体、微管蛋白序列的变异体和抗体可变域的变异体(包括个别变异CDR))之间的氨基酸同源性、相似性或同一性为与本文中描绘的序列至少80％，且更通常优选地，至少85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％和几乎100％或100％的递增同源性或同一性。

[0112] 以类似方式，关于本文中鉴别的抗体和其它蛋白的核酸序列的“核酸序列同一性百分比(％)”被定义为候选序列中与抗原结合蛋白的编码序列中核苷酸残基一致的核苷酸

残基百分比。一种特定方法利用被设置为预设参数的WU-BLAST-2的BLASTN模块，其中重叠间隔和重叠分数分别被设置为1和0.125。

[0113] 虽然用于引入氨基酸序列变异的位点或区域预先确定，但突变本身无须预先确定。举例来说，为使给定位点上突变的效能优化，可以在标靶密码子或区域进行随机诱变且针对所需活性的最优组合筛选表达的抗原结合蛋白CDR变异体。众所周知用于在具有已知序列的DNA中预先确定位点处进行取代突变的技术，例如MI3引物诱变和PCR诱变。

[0114] 抗体-药物偶联物

[0115] 本公开的化合物包括具有抗癌活性的化合物。具体地说，化合物包括偶联(即通过连接子共价附接)于药物部分的抗体部分(包括其抗原结合片段)，其中药物部分在未偶联于抗体部分时具有细胞毒性或细胞抑制作用。在各种实施方案中，药物部分在偶联物中结合时显示减少的细胞毒性或无细胞毒性，但在从连接子和抗体部分裂解后恢复细胞毒性。在各种实施方案中，药物部分在偶联物中结合(例如使用不可裂解连接子)时显示减少的旁观杀死或无旁观杀死，但在从偶联物(例如具有可裂解Val-Cit可裂解部分的偶联物)裂解后旁观杀死增加。

[0116] 用作人类治疗剂，例如肿瘤剂的ADC的研发和产生可能需要超过对能够结合于所需标靶且附接于自身用于治疗癌症的药物的抗体的鉴别。将抗体连接于药物可能对抗体和药物中的一个或两个的活性具有显著和不可预知的作用，所述作用将取决于所选连接子和/或药物的类型而变化。在一些实施方案中，因此，ADC的组分经过选择，以(i)保留分离的抗体和药物部分所显示的一种或多种治疗特性；(ii)维持抗体部分的特定结合特性；(iii)使药物负载和药物与抗体比率优化；(iv)允许药物部分经由稳定附接于抗体部分而递送，例如细胞内递送；(v)保留ADC稳定性为完整偶联物，直至输送或递送至标靶位点；(vi)使ADC在施用之前或之后的聚集最少；(vii)允许药物部分在细胞环境中裂解后具有治疗作用，例如细胞毒性作用；(viii)展现可与分离的抗体和药物部分相比较或优于其的体内抗癌治疗功效；(ix)使药物部分的脱靶杀死最少；和/或(x)展现合乎需要的药物动力学和药效学特性、可配制性和毒物学/免疫学型态。可能需要筛选这些特性中的每一个以鉴别改善的用于治疗用途的ADC(Ab等人(2015)Mol.Cancer Ther.14:1605-13)。

[0117] 在各种实施方案中，本文中公开的ADC展现上列一些或每一种类的意外有利的特性。举例来说，在一些实施方案中，与使用其它可裂解或不可裂解连接子结构的ADC相比，包含Mal附接于抗体、PEG间隔子单元(优选短PEG间隔子单元)和/或肽可裂解连接子(例如Val-Cit连接子)的ADC构筑体展现意外有利的药物负载、聚集和/或稳定性型态，和/或保留抗体结合功能、药物活性和/或改善的旁观杀死，同时减少脱靶杀死。

[0118] 在一些实施方案中，与将艾日布林接合于抗体部分的其它可裂解或不可裂解连接子相比，包含将艾日布林接合于抗体(例如抗FRA抗体，例如MORAb-003)的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC显示所列种类中的尤其有利的特性。在一些实施方案中，与不可裂解ADC相比，包含将艾日布林接合于抗体(例如抗FRA抗体，例如MORAb-003)的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC显示尤其有利的旁观杀死特性。在一些实施方案中，与使用替代的可裂解连接子结构的ADC相比，包含将艾日布林接合于抗体(例如抗FRA抗体，例如MORAb-003)的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC显示尤其有利的旁观杀死特性。

[0119] 在一些实施方案中，相对于例如包含经由替代部分(例如丁二酰亚胺部分)附接于

抗体的连接子的ADC，包含将艾日布林接合于MORAb-003的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC显示更高且更合乎需要的药物：抗体比率（即约3-4的比率）。在一些实施方案中，相对于例如包含更长间隔子单元（例如$(PEG)_8$）的ADC，包含将艾日布林接合于MORAb-003的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC显示更高且更合乎需要的药物：抗体比率和/或更低的聚集水平。在一些实施方案中，相对于例如包含替代的可裂解部分（即非肽可裂解部分，例如可裂解二硫化物或磺酰胺）的ADC，包含将艾日布林接合于MORAb-003的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的ADC显示更高且更合乎需要的药物：抗体比率、更低的聚集水平、增加的靶向杀死和/或减少的脱靶杀死。在一些实施方案中，相对于例如包含替代的氨基酸单元（例如Ala-Ala-Asn）或替代的可裂解部分（例如可裂解二硫化物或磺酰胺）的ADC，包含将艾日布林接合于MORAb-003的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC显示增加的稳定性、增加的靶向杀死、减少的脱靶杀死、更低的聚集水平和/或更高且更合乎需要的药物：抗体比率。

[0120] 在一些实施方案中，以上针对包含将艾日布林接合于MORAb-003的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的ADC所述的一些或所有合乎需要的特征可以在包含结合于her2抗体（例如曲妥珠单抗）或抗间皮素抗体的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林连接子-毒素的ADC下观察到。

[0121] 本公开的ADC化合物可以选择性地递送有效剂量的细胞毒性或细胞生长抑制剂至癌细胞或肿瘤组织。已经发现所公开的ADC针对表达各自的标靶抗原（例如FRA或her2）的细胞具有有效的细胞毒性和/或细胞抑制活性。在一些实施方案中，ADC的细胞毒性和/或细胞抑制活性取决于细胞中标靶抗原的表达水平。在一些实施方案中，与以低水平表达相同抗原的癌细胞比，所公开的ADC尤其有效地杀死以高水平表达标靶抗原的癌细胞。在一些实施方案中，与以低水平表达相同抗原的癌细胞比，所公开的ADC尤其有效地杀死以中等水平表达标靶抗原的癌细胞。示例性高FRA表达癌症包括（但不限于）卵巢癌（例如浆液性卵巢癌、透明细胞卵巢癌）、肺类癌瘤、三阴性乳腺癌、子宫内膜癌和非小细胞肺癌（例如腺癌）。示例性中等FRA表达癌症包括（但不限于）胃癌和结肠直肠癌。示例性低FRA表达癌症包括（但不限于）黑素瘤和淋巴瘤。示例性高her2表达癌症包括（但不限于）乳腺癌、胃癌、食道癌、卵巢癌和子宫内膜癌。示例性中等her2表达癌症包括（但不限于）肺癌和膀胱癌。

[0122] 在一些实施方案中，ADC的裂解从抗体部分和连接子释放艾日布林。在一些实施方案中，艾日布林的裂解和释放提高ADC的细胞毒性。在一些实施方案中，与用包含不可裂解连接子的ADC的可比较治疗相比，包含可裂解连接子的ADC尤其有效地杀死癌细胞，包括旁观杀死。在一些实施方案中，相对于包含不可裂解连接子（例如不可裂解$(PEG)_2$或$(PEG)_4$连接子）的ADC，尤其在用ADC治疗的细胞和/或癌症未表达高水平标靶抗原下，包含可裂解连接子（例如Val-Cit连接子）的ADC显示增加的靶向杀死和/或减少的脱靶杀死。

[0123] 在一些实施方案中，所公开的ADC还显示旁观杀死活性，但脱靶细胞毒性低。不受理论束缚，ADC的旁观杀死活性在其渗透至实体肿瘤有限和/或肿瘤细胞中标靶抗原表达不均匀的情况下可能尤其有益。在一些实施方案中，与用包含不可裂解连接子的ADC的可比较治疗相比，包含可裂解连接子的ADC尤其有效地进行旁观杀死和/或显示改善的旁观杀死活性。

[0124] 本文中提供ADC化合物，其包含靶向肿瘤细胞的抗体或其抗原结合片段（Ab）、药物部分（D）和将Ab共价附接于D的连接子部分（L）。在某些方面中，抗体或抗原结合片段能够以

高特异性和高亲和力结合于肿瘤相关抗原(例如FRA或her2)。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段在结合时内化至标靶细胞,例如内化至细胞中的降解隔室中。因此,优选ADC为在结合时内化至标靶细胞,经历降解,且释放药物部分以杀死癌细胞的ADC。药物部分可以通过酶促作用、水解、氧化或任何其它机制,从ADC的抗体和/或连接子部分释放。

[0125] 一种示例性ADC具有式I

[0126] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0127] 其中Ab=抗体部分(即抗体或抗原结合片段),L=连接子部分,D=药物部分,且p=每一抗体部分的药物部分数目。

[0128] 抗体

[0129] 式I的抗体部分(Ab)在其范围内包括特异性结合于癌细胞上标靶抗原的任何抗体或抗原结合片段。如例如 BIAcore®分析所测量,抗体或抗原结合片段可以在离解常数(K_D)≤1mM、≤100nM或≤10nM或其间的任何量结合于标靶抗原。在某些实施方案中,K_D为1pM至500pM。在一些实施方案中,K_D在500pM至1μM、1μM至100nM或100mM至10nM之间。

[0130] 在一些实施方案中,抗体部分为包含两个重链和两个轻链的四链抗体(又称为免疫球蛋白)。在一些实施方案中,抗体部分为两链半体(一个轻链和一个重链)或免疫球蛋白的抗原结合片段。

[0131] 在一些实施方案中,抗体部分为内化抗体或其内化抗原结合片段。在一些实施方案中,内化抗体结合于在细胞表面上表达的标靶癌症抗原且在结合时进入细胞。在一些实施方案中,在ADC进入且存在于表达标靶癌症抗原的细胞后(即在ADC已内化后),ADC的药物部分从ADC的抗体部分释放。

[0132] 本公开的示例性抗体的氨基酸和核酸序列阐述于表1-9中。

[0133] 表1.抗体

[0134]

mAb	类别/同型	标靶
MORAb-003	人源化	人类叶酸受体α
MORAb-009	小鼠-人类嵌合	人类间皮素
曲妥珠单抗	人源化	人类her2/neu
33011-xi	兔-人类嵌合	人类间皮素
33011-zu	人源化	人类间皮素
111B10-xi	兔-人类嵌合	人类间皮素
111B10-zu	人源化	人类间皮素
201C15-xi	兔-人类嵌合	人类间皮素
201C15-zu	人源化	人类间皮素
346C6-xi	兔-人类嵌合	人类间皮素
346C6-zu	人源化	人类间皮素

[0135] 缩写:xi-嵌合;zu-人源化。

[0136] 表2.mAb可变区的氨基酸序列

[0137]

	mAb	IgG链	SEQ ID NO	氨基酸序列
1	MORAb-003	重链	23	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCS ASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGL EWVAMISSGGSYTYYADSVKGR FAISRDNAKNTLFLQMDSLRPED TGVYFCARHGDDPAWFAYWGQ GTPVTVSS
2	MORAb-003	轻链	24	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS VSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKP WIYGTSNLASGVPSRFSGSGSGT DYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSS YPYMYTFGQGTKVEIK
3	MORAb-009	重链	25	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCK ASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSL EWIGLITPYNGASSYNQKFRGKA TLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDS AVYFCARGGYDGRGFDYWGSG TPVTVSS
4	MORAb-009	轻链	26	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCS ASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRW IYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNS YSLTISSVEAEDDATYYCQQWSK HPLTFGSGTKVEIK
5	曲妥珠单抗	重链	27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWG QGTLVTVSS
6	曲妥珠单抗	轻链	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIK
7	33011-xi	重链	29	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGISLSSDAISWVRQAPGKGLEYI GIINGGGNTYYASWAKGRFTISK TSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAR GIQHGGGNSDYYYYGMDLWGP GTLVTVSS

[0138]

8	33011-xi	轻链	30	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTIKC QASQSISSVLSWYQQKPGQPPKL LIYLASTLASGVPSRFSGSRSGTE FTLTISDLECDDAATYYCQTNYG TSSSNYGFAFGGGTEVVVK
9	33011-zu	重链	31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGISLSSDAISWVRQAPGKGLE YIGIINGGGNTYYASWAKGRFTI SRHNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGIQHGGGNSDYYYYG MDLWGQGTLVTVSS
10	33011-zu	轻链	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQ ASQSISSVLSWYQQKPGKAPKLL IYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQCEDIATYYCQTNYGTS SSNYGFAFGGGTKVEIK
11	111B10-xi	重链	33	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGFSLNNYAMSWVRQAPGKGLE WIGSISTGGLAFYANWAKGRFTI SRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYF CGRNGGGSYIFYYFDLWGQGTL VTVSS
12	111B10-xi	轻链	34	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKCQ ASQSISSYLSWYQQKPGQPPKLLI YSASTLASGVSSRFKGSGSGTEY TLTISDLECADAATYFCQSYYDI GTSTFGGGTEVVVK
13	111B10-zu	重链	35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLNNYAMSWVRQAPGKGL EWIGSISTGGLAFYANWAKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARNGGGSYIFYYFDLWGQ GTLVTVSS
14	111B10-zu	轻链	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQ ASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLL IYSASTLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQCEDAATYYCQSYYDI GTSTFGGGTKVEIK
15	201C15-xi	重链	37	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTV SGIDLSSYAMGWFRQAPGKGLE YIGTINIGGRVYYASWAKGRFTIS RTSTTVDLKAPSLTAEDTATYFC ARYYNGGSYDIWGPGTLVTVSL

[0139]

16	201C15-xi	轻链	38	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIKCQASESIYRVLAWYQQKPGQPPKLLIYDTSTLASGAPSRFKGSGYGTEFTLTISGVQCEDAATYYCQGGYYADSYGIAFGGGTEVVVK
17	201C15-zu	重链	39	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGTINIGGRVYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYNGGSYDIWGQGTLVTVSS
18	201C15-zu	轻链	40	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASESIYRVLAWYQQKPGKAPKLLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQCDDAATYYCQGGYYADSYGIAFGGGTKVEIK
19	346C6-xi	重链	41	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCTASGFSLSSYAMIWVRQAPGEGLEWIGTISTGGITYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGGYAASSAYYLPYYFDLWGQGTLVTVSS
20	346C6-xi	轻链	42	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNNLAWFQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGGCDDDADTFAFGGGTEVVVK
21	346C6-zu	重链	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSYAMIWVRQAPGKGLEWIGTISTGGITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYAASSAYYLPYYFDLWGQGTLVTVSS
22	346C6-zu	轻链	44	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYNNNNLAWYQQKPGKVPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCEDAATYYCLGGCDDDADTFAFGGGTKVEIK

[0140] 表3.编码mAb可变区的核酸序列

[0141]

	mAb	IgG 链	SEQ	核酸序列

[0142]

			ID NO	
1	MORAb-003	重链	45	GAGGTCCAACTGGTGGAGAGC GGTGGAGGTGTTGTGCAACCTG GCCGGTCCCTGCGCCTGTCCTG CTCCGCATCTGGCTTCACCTTC AGCGGCTATGGGTTGTCTTGGG TGAGACAGGCACCTGGAAAAG GTCTTGAGTGGGTTGCAATGAT TAGTAGTGGTGGTAGTTATACC TACTATGCAGACAGTGTGAAGG GTAGATTTGCAATATCGCGAGA CAACGCCAAGAACACATTGTTC CTGCAAATGGACAGCCTGAGA CCCGAAGACACCGGGGTCTATT TTTGTGCAAGACATGGGGACGA TCCCGCCTGGTTCGCTTATTGG GGCCAAGGGACCCCGGTCACC GTCTCCTCA
2	MORAb-003	轻链	46	GACATCCAGCTGACCCAGAGCC CAAGCAGCCTGAGCGCCAGCG TGGGTGACAGAGTGACCATCAC CTGTAGTGTCAGCTCAAGTATA AGTTCCAACAACTTGCACTGGT ACCAGCAGAAGCCAGGTAAGG CTCCAAAGCCATGGATCTACGG CACATCCAACCTGGCTTCTGGT GTGCCAAGCAGATTCAGCGGTA GCGGTAGCGGTACCGACTACAC CTTCACCATCAGCAGCCTCCAG CCAGAGGACATCGCCACCTACT ACTGCCAACAGTGGAGTAGTTA CCCGTACATGTACACGTTCGGC CAAGGGACCAAGGTGGAAATC AAA
3	MORAb-009	重链	47	CAGGTACAACTGCAGCAGTCTG GGCCTGAGCTGGAGAAGCCTG GCGCTTCAGTGAAGATATCCTG CAAGGCTTCTGGTTACTCATTC ACTGGCTACACCATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAAGA GCCTTGAGTGGATTGGACTTAT TACTCCTTACAATGGTGCTTCT

[0143]

				AGCTACAACCAGAAGTTCAGG GGCAAGGCCACATTAACTGTAG ACAAGTCATCCAGCACAGCCTA CATGGACCTCCTCAGTCTGACA TCTGAAGACTCTGCAGTCTATT TCTGTGCAAGGGGGGGTTACGA CGGGAGGGGTTTTGACTACTGG GGATCCGGGACCCCGGTCACCG TCTCCTCA
4	MORAb -009	轻链	48	GACATCGAGCTCACTCAGTCTC CAGCAATCATGTCTGCATCTCC AGGGGAGAAGGTCACCATGAC CTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTA AGTTACATGCACTGGTACCAGC AGAAGTCAGGCACCTCCCCCAA AAGATGGATTTATGACACATCC AAACTGGCTTCTGGAGTCCCAG GTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTC TGGAAACTCTTACTCTCTCACA ATCAGCAGCGTGGAGGCTGAA GATGATGCAACTTATTACTGCC AGCAGTGGAGTAAGCACCCTCT CACGTTCGGATCCGGGACCAAG GTGGAAATCAAA
5	33011-xi	重链	49	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGG GGTCGCCTGGTCACGCCTGGGA CACCCCTGACACTCACCTGCAC CGTCTCTGGAATCTCCCTCAGT AGCGATGCAATAAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC TCGAATACATCGGAATCATTAA TGGTGGTGGTAACACATACTAC GCGAGCTGGGCGAAAGGCCGA TTCACCATCTCCAAAACCTCGA CCACGGTGGATCTGAAAATCAC CAGTCCGACAACCGAGGACAC GGCCACCTATTTCTGTGCCAGA GGCATTCAACATGGTGGTGGTA ATAGTGATTATTATTATTACGG CATGGACCTCTGGGGCCCAGGC ACCCTGGTCACTGTCTCTTCA
6	33011-xi	轻链	50	GAAGTGTTGATGACCCAGACTC CATCCTCCGTGTCTGCAGCTGT

[0144]

				GGGAGACACAGTCACCATCAA GTGCCAGGCCAGTCAGAGCATT AGTAGTGTCTTGTCCTGGTATC AGCAGAAACCAGGGCAGCCTC CCAAGCTCCTGATCTATCTGGC ATCCACTCTGGCATCTGGGGTC CCATCGCGGTTCAGCGGCAGTA GATCTGGGACAGAGTTCACTCT CACCATCAGCGACCTGGAGTGT GACGATGCTGCCACTTACTACT GTCAAACCAATTATGGTACTAG TAGTAGTAATTATGGTTTTGCT TTCGGCGGAGGGACCGAGGTG GTCGTCAAA
7	33011-zu	重链	51	GAAGTCCAACTGGTGGAAAGC GGGGGAGGACTGGTGCAGCCG GGCGGATCCCTCCGGCTGTCAT GTGCTGCATCGGGAATTTCCCT CTCCTCCGACGCGATTAGCTGG GTCAGACAGGCCCCCGGAAAG GGGCTGGAGTACATCGGTATCA TCAACGGCGGCGGAAACACCT ACTACGCCTCCTGGGCCAAGGG CCGCTTCACCATCTCGCGGCAT AATTCCAAGAACACTCTGTACT TGCAAATGAACTCCCTGAGGGC CGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCGCGCGGCATCCAGCACG GTGGTGGAAACAGCGACTACT ACTACTATGGGATGGATCTGTG GGGCCAGGGAACTCTTGTGACC GTGTCGTCA
8	33011-zu	轻链	52	GACATTCAGATGACCCAGTCCC CAAGCTCGCTGTCCGCCTCCGT GGGCGACCGCGTGACCATCAC GTGCCAGGCGTCCCAGTCAATT AGCAGCGTGCTCTCCTGGTACC AACAGAAGCCGGGGAAAGCAC CCAAGCTGCTGATCTACTTGGC CTCCACTCTGGCCTCGGGAGTG CCTTCACGGTTCTCCGGATCGG GATCTGGTACTGATTTCACCCT CACCATCTCGAGCCTTCAGTGC

[0145]

				GAGGACATCGCTACTTACTATT GTCAAACCAACTACGGAACCTC CAGCTCCAACTACGGCTTTGCC TTCGGTGGCGGGACCAAGGTCG AAATCAAA
9	111B10-xi	重链	53	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGG GGTCGCCTGGTCACGCCTGGGA CACCCCTGACACTCACCTGCAC AGTCTCTGGATTCTCCCTCAAT AACTATGCAATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC TGGAATGGATCGGATCCATTAG TACTGGTGGTCTCGCATTCTAC GCGAACTGGGCAAAAGGCCGA TTCACCATCTCCAGAACCTCGA CCACGGTGGATCTGAAAATGAC CAGTCTGACAACCGAGGACAC GGCCACCTATTTCTGTGGCAGA AATGGTGGTGGTAGTTATATTT TCTATTATTTTGACTTGTGGGG CCAAGGCACCCTCGTCACTGTC TCTTCA
10	111B10-xi	轻链	54	GCATTCGAATTGACCCAGACTC CATCCTCCGTGGAGGCAGCTGT GGGAGGCACAATCACCATCAA GTGCCAGGCCAGTCAGAGCATT AGTAGTTACTTATCCTGGTATC AGCAGAAACCAGGGCAGCCTC CCAAGCTCCTGATCTATTCTGC ATCCACTCTGGCATCTGGGGTC TCATCGCGGTTCAAAGGCAGTG GATCTGGGACAGAGTACACTCT CACCATCAGCGACCTGGAGTGT GCCGATGCTGCCACTTACTTCT GTCAAAGCTATTATGATATTGG TACTAGTACTTTCGGCGGAGGG ACCGAGGTGGTCGTCAAA
11	111B10-zu	重链	55	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTG GCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGATCTCTGAGACTGTCTTG TGCCGCCTCCGGCTTCTCCCTG AACAACTACGCCATGTCCTGGG TGCGACAGGCCCCTGGCAAAG

[0146]

				GCCTGGAATGGATCGGCTCCAT CAGCACAGGCGGCCTGGCCTTC TACGCCAATTGGGCCAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAA CTCCAAGAACACCCTGTACCTC CAGATGAACTCCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTACTG TGCCAGAAACGGCGGAGGCTC CTACATCTTCTACTACTTCGAC CTGTGGGGCCAGGGCACCCTCG TGACAGTGTCATCT
12	111B10-zu	轻链	56	GATATTCAGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGTCCGCTTCTGT GGGCGACAGAGTGACCATCAC CTGTCAGGCCTCCCAGTCCATC TCCTCCTACCTGTCCTGGTATC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC CCAAGCTGCTGATCTACTCTGC CTCCACACTGGCCTCCGGCGTG CCCTCTAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCGACTTTACCCT GACCATCAGCTCCCTCCAGTGC GAGGATGCCGCCACCTACTACT GCCAGTCCTACTACGACATCGG CACCTCCACCTTCGGCGGAGGC ACCAAGGTGGAAATCAAA
13	201C15-xi	重链	57	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGG GGTCGCCTGGTCACGCCTGGGA CACCCCTGACACTCACCTGCAC AGTCTCTGGAATCGACCTCAGT AGCTATGCAATGGGCTGGTTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGC TGGAATACATCGGAACCATTAA TATTGGTGGTCGCGTATATTAC GCGAGCTGGGCAAAAGGCCGA TTCACCATCTCCAGAACCTCGA CCACGGTGGATCTGAAAGCGCC CAGTCTGACAGCCGAGGACAC GGCCACCTATTTCTGTGCCAGA TATTATAATGGTGGTAGTTATG ACATCTGGGGCCCAGGCACCCT GGTCACCGTCTCTTTA
1	201C15-	轻链	58	GATGTTGTGATGACCCAGACTC

[0147]

4	xi			CAGCCTCCGCGTCTGAACCTGT GGGAGGCACAGTCACCATCAA GTGCCAGGCCAGTGAGAGCATT TATCGCGTATTGGCCTGGTATC AGCAGAAACCAGGGCAGCCTC CCAAGCTCCTGATCTATGATAC ATCCACTCTGGCATCTGGGGCC CCATCGCGGTTCAAAGGCAGTG GATATGGGACAGAGTTCACTCT CACCATCAGCGGCGTGCAGTGT GAAGATGCTGCCACTTACTACT GTCAAGGCGGTTATTATGCTGA TAGTTATGGTATTGCTTTCGGC GGAGGGACCGAGGTGGTGGTC AAA
15	201C15-zu	重链	59	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTG GCGGAGGACTGGTGCAGCCTG GCGGCTCTCTGAGACTGTCCTG TTCCGCCTCCGGAATCGACCTG TCCTCCTACGCTATGGGCTGGG TGCGACAGGCTCCTGGCAAGG GCCTGGAGTACATCGGCACCAT CAACATCGGCGGCAGAGTGTA CTACGCCTCCTGGGCCAAGGGC CGGTTCACCATCTCCAGAGACA ACTCCAAGAACACCCTGTACCT CCAGATGAACTCCCTGCGGGCC GAGGACACCGCCGTGTACTACT GCGCCCGGTACTACAACGGCG GCTCCTACGATATCTGGGGCCA GGGCACACTCGTGACCGTGTCC TCT
16	201C15-zu	轻链	60	GATATCCAGATGACCCAGTCCC CCTCCACCCTGTCTGCCTCTGT GGGCGACAGAGTGACCATCAC CTGTCAGGCCTCCGAGTCCATC TACCGGGTGCTGGCCTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC CCAAGCTGCTGATCTACGACAC CAGCACACTGGCCTCCGGCGTG CCCTCTAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCGAGTTTACCCT GACCATCTCCAGCCTCCAGTGC

[0148]

				GACGACGCCGCCACCTACTATT GTCAGGGCGGCTACTACGCCGA CTCCTACGGAATCGCTTTCGGC GGAGGCACCAAGGTGGAAATC AAA
17	346C6-xi	重链	61	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGC GGTCGCCTGGTAAAGCCTGACG AATCCCTGACACTCACCTGCAC AGCCTCTGGATTCTCCCTCAGT AGTTATGCAATGATCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGGAGGGGC TGGAATGGATCGGAACCATTAG TACTGGTGGTATCACATACTAC GCGAGCTGGGCGAAAGGCCGA TTCACCATCTCCAAAACCTCGA CCACGGTGGATCTGAAAATCAC CAGTCCGACAACCGAGGACAC GGCCACCTATTTCTGTGCCAGA GGGGGATATGCTGCTAGTAGTG CTTATTATCTCCCGTACTACTTT GACTTGTGGGGCCAAGGGACC CTGGTCACCGTCTCCTCA
18	346C6-xi	轻链	62	GCAGCCGTGCTGACCCAGACAC CATCACCCGTGTCTGCAGCTGT GGGAGGCACAGTCACCATCAG TTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTT TATAATAATAACAACTTAGCCT GGTTTCAGCAGAAACCCGGGC AGCCTCCCAAGCTTCTGATCTA TCTGGCATCCACTCTGGCATCT GGGGTCCCATCACGGTTCAGCG GCAGTGGATCTGGGACACAGTT CACTCTCACCATCAGCGGCGTG CAGTGTGACGATGCTGCCACTT ATTACTGTCTAGGTGGTTGTGA TGATGATGCTGATACTTTTGCT TTCGGCGGAGGGACTGAGGTG GTGGTCAAA
19	346C6-zu	重链	63	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTG GCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGATCTCTGAGACTGTCTTG TGCCGCCTCCGGCTTCTCCCTG TCCTCCTACGCTATGATCTGGG

				TGCGACAGGCCCCTGGCAAGG GCCTGGAATGGATCGGCACCAT CTCTACCGGCGGAATTACCTAC TACGCCTCCTGGGCCAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAA CTCCAAGAACACCCTGTACCTC CAGATGAACTCCCTGCGGGCCG AGGACACCGCCGTGTACTATTG TGCTAGAGGCGGCTACGCCGCC AGCTCCGCTTACTACCTGCCCT ACTACTTCGACCTGTGGGGCCA GGGCACCCTCGTGACAGTGTCA TCT
20	346C6-zu	轻链	64	GATATTCAGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGTCCGCTTCTGT GGGCGACAGAGTGACCATCAC CTGTCAGTCCTCCCAGTCCGTG TATAACAACAACAACCTGGCCT GGTATCAGCAGAAACCCGGCA AGGTGCCCAAGCTGCTGATCTA CCTGGCCTCCACACTGGCCTCT GGCGTGCCCTCTAGATTCTCCG GCTCTGGCTCTGGCACCGACTT TACCCTGACCATCAGCTCCCTC CAGTGCGAGGATGCCGCCACCT ACTATTGCCTGGGCGGCTGCGA CGACGACGCCGATACCTTTGCT TTTGGCGGAGGCACCAAGGTG GAAATCAAA

[0149]

[0150] 表4.mAb Kabat CDR的氨基酸序列

[0151]

	mAb	IgG 链	SEQ ID NO	氨基酸序列
1	MORAb-003	HC CDR1	2	GYGLS
2	MORAb-003	HC CDR2	3	MISSGGSYTYYADSVKG
3	MORAb-003	HC CDR3	4	HGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CDR1	7	SVSSSISSNNLH
5	MORAb-003	LC CDR2	8	GTSNLAS
6	MORAb-003	LC CDR3	9	QQWSSYPYMYT
7	MORAb-009	HC CDR1	65	GYTMN

[0152]

8	MORAb-009	HC CDR2	66	LITPYNGASSYNQKFRG
9	MORAb-009	HC CDR3	67	GGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CDR1	68	SASSSVSYMH
11	MORAb-009	LC CDR2	69	DTSKLAS
12	MORAb-009	LC CDR3	70	QQWSKHPLT
13	曲妥珠单抗	HC CDR1	71	DTYIH
14	曲妥珠单抗	HC CDR2	72	RIYPTNGYTRYADSVKG
15	曲妥珠单抗	HC CDR3	73	WGGDGFYAMDY
16	曲妥珠单抗	LC CDR1	74	RASQDVNTAVA
17	曲妥珠单抗	LC CDR2	75	SASFLYS
18	曲妥珠单抗	LC CDR3	76	QQHYTTPPT
19	33011-xi	HC CDR1	77	SDAIS
20	33011-xi	HC CDR2	78	IINGGGNTYYASWAKG
21	33011-xi	HC CDR3	79	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
22	33011-xi	LC CDR1	80	QASQSISSVLS
23	33011-xi	LC CDR2	81	LASTLAS
24	33011-xi	LC CDR3	82	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	HC CDR1	83	SDAIS
26	33011-zu	HC CDR2	84	IINGGGNTYYASWAKG
27	33011-zu	HC CDR3	85	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
28	33011-zu	LC CDR1	86	QASQSISSVLS
29	33011-zu	LC CDR2	87	LASTLAS
30	33011-zu	LC CDR3	88	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	HC CDR1	89	NYAMS
32	111B10-xi	HC CDR2	90	SISTGGLAFYANWAKG
33	111B10-xi	HC CDR3	91	NGGGSYIFYYFDL
34	111B10-xi	LC CDR1	92	QASQSISSYLS
35	111B10-xi	LC CDR2	93	SASTLAS
36	111B10-xi	LC CDR3	94	QSYYDIGTST
37	111B10-zu	HC CDR1	95	NYAMS
38	111B10-zu	HC CDR2	96	SISTGGLAFYANWAKG
39	111B10-zu	HC CDR3	97	NGGGSYIFYYFDL
40	111B10-zu	LC CDR1	98	QASQSISSYLS
41	111B10-zu	LC CDR2	99	SASTLAS
42	111B10-zu	LC CDR3	100	QSYYDIGTST
43	201C15-xi	HC CDR1	101	SYAMG
44	201C15-xi	HC CDR2	102	TINIGGRVYYASWAKG
45	201C15-xi	HC CDR3	103	YYNGGSYDI
46	201C15-xi	LC CDR1	104	QASESIYRVLA

[0153]

47	201C15-xi	LC CDR2	105	DTSTLAS
48	201C15-xi	LC CDR3	106	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	HC CDR1	107	SYAMG
50	201C15-zu	HC CDR2	108	TINIGGRVYYASWAKG
51	201C15-zu	HC CDR3	109	YYNGGSYDI
52	201C15-zu	LC CDR1	110	QASESIYRVLA
53	201C15-zu	LC CDR2	111	DTSTLAS
54	201C15-zu	LC CDR3	112	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	HC CDR1	113	SYAMI
56	346C6-xi	HC CDR2	114	TISTGGITYYASWAKG
57	346C6-xi	HC CDR3	115	GGYAASSAYYLPYYFDL
58	346C6-xi	LC CDR1	116	QSSQSVYNNNNLA
59	346C6-xi	LC CDR2	117	LASTLAS
60	346C6-xi	LC CDR3	118	LGGCDDDADTFA
61	346C6-zu	HC CDR1	119	SYAMI
62	346C6-zu	HC CDR2	120	TISTGGITYYASWAKG
63	346C6-zu	HC CDR3	121	GGYAASSAYYLPYYFDL
64	346C6-zu	LC CDR1	122	QSSQSVYNNNNLA
65	346C6-zu	LC CDR2	123	LASTLAS
66	346C6-zu	LC CDR3	124	LGGCDDDADTFA

[0154] 表5.编码mAb Kabat CDR的核酸序列

[0155]

	mAb	IgG 链	SEQ ID NO	核酸序列
1	MORAb-003	HC CDR1	125	GGCTATGGGTTGTCT
2	MORAb-003	HC CDR2	126	ATGATTAGTAGTGGT GGTAGTTATACCTAC TATGCAGACAGTGTG AAGGGT
3	MORAb-003	HC CDR3	127	CATGGGGACGATCCC GCCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	LC CDR1	128	AGTGTCAGCTCAAGT ATAAGTTCCAACAAC TTGCAC
5	MORAb-003	LC CDR2	129	GGCACATCCAACCTG GCTTCT
6	MORAb-003	LC CDR3	130	CAACAGTGGAGTAGT TACCCGTACATGTAC ACG
7	MORAb-009	HC	131	GGCTACACCATGAAC

[0156]

		CDR1		
8	MORAb-009	HC CDR2	132	CTTATTACTCCTTACA ATGGTGCTTCTAGCT ACAACCAGAAGTTCA GGGGC
9	MORAb-009	HC CDR3	133	GGGGGTTACGACGGG AGGGGTTTTGACTAC
10	MORAb-009	LC CDR1	134	AGTGCCAGCTCAAGT GTAAGTTACATGCAC
11	MORAb-009	LC CDR2	135	GACACATCCAAACTG GCTTCT
12	MORAb-009	LC CDR3	136	CAGCAGTGGAGTAAG CACCCTCTCACG
13	33011-xi	HC CDR1	137	AGCGATGCAATAAGC
14	33011-xi	HC CDR2	138	ATCATTAATGGTGGT GGTAACACATACTAC GCGAGCTGGGCGAAA GGC
15	33011-xi	HC CDR3	139	GGCATTCAACATGGT GGTGGTAATAGTGAT TATTATTATTACGGC ATGGACCTC
16	33011-xi	LC CDR1	140	CAGGCCAGTCAGAGC ATTAGTAGTGTCTTGT CC
17	33011-xi	LC CDR2	141	CTGGCATCCACTCTG GCATCT
18	33011-xi	LC CDR3	142	CAAACCAATTATGGT ACTAGTAGTAGTAAT TATGGTTTTGCT
19	33011-zu	HC CDR1	143	TCCGACGCGATTAGC
20	33011-zu	HC CDR2	144	ATCATCAACGGCGGC GGAAACACCTACTAC GCCTCCTGGGCCAAG GGC
21	33011-zu	HC CDR3	145	GGCATCCAGCACGGT GGTGGAAACAGCGAC TACTACTACTATGGG ATGGATCTG
22	33011-zu	LC	146	CAGGCGTCCCAGTCA

[0157]

		CDR1		ATTAGCAGCGTGCTC TCC
23	33011-zu	LC CDR2	147	TTGGCCTCCACTCTG GCCTCG
24	33011-zu	LC CDR3	148	CAAACCAACTACGGA ACCTCCAGCTCCAAC TACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	HC CDR1	149	AACTATGCAATGAGC
26	111B10-xi	HC CDR2	150	TCCATTAGTACTGGT GGTCTCGCATTCTAC GCGAACTGGGCAAAA GGC
27	111B10-xi	HC CDR3	151	AATGGTGGTGGTAGT TATATTTTCTATTATT TTGACTTG
28	111B10-xi	LC CDR1	152	CAGGCCAGTCAGAGC ATTAGTAGTTACTTAT CC
29	111B10-xi	LC CDR2	153	TCTGCATCCACTCTG GCATCT
30	111B10-xi	LC CDR3	154	CAAAGCTATTATGAT ATTGGTACTAGTACT
31	111B10-zu	HC CDR1	155	AACTACGCCATGTCC
32	111B10-zu	HC CDR2	156	TCCATCAGCACAGGC GGCCTGGCCTTCTAC GCCAATTGGGCCAAG GGC
33	111B10-zu	HC CDR3	157	AACGGCGGAGGCTCC TACATCTTCTACTACT TCGACCTG
34	111B10-zu	LC CDR1	158	CAGGCCTCCCAGTCC ATCTCCTCCTACCTGT CC
35	111B10-zu	LC CDR2	159	TCTGCCTCCACACTG GCCTCC
36	111B10-zu	LC CDR3	160	CAGTCCTACTACGAC ATCGGCACCTCCACC
37	201C15-xi	HC CDR1	161	AGCTATGCAATGGGC
38	201C15-xi	HC	162	ACCATTAATATTGGT

[0158]

		CDR2		GGTCGCGTATATTAC GCGAGCTGGGCAAAA GGC
39	201C15-xi	HC CDR3	163	TATTATAATGGTGGT AGTTATGACATC
40	201C15-xi	LC CDR1	164	CAGGCCAGTGAGAGC ATTTATCGCGTATTG GCC
41	201C15-xi	LC CDR2	165	GATACATCCACTCTG GCATCT
42	201C15-xi	LC CDR3	166	CAAGGCGGTTATTAT GCTGATAGTTATGGT ATTGCT
43	201C15-zu	HC CDR1	167	TCCTACGCTATGGGC
44	201C15-zu	HC CDR2	168	ACCATCAACATCGGC GGCAGAGTGTACTAC GCCTCCTGGGCCAAG GGC
45	201C15-zu	HC CDR3	169	TACTACAACGGCGGC TCCTACGATATC
46	201C15-zu	LC CDR1	170	CAGGCCTCCGAGTCC ATCTACCGGGTGCTG GCC
47	201C15-zu	LC CDR2	171	GACACCAGCACACTG GCCTCC
48	201C15-zu	LC CDR3	172	CAGGGCGGCTACTAC GCCGACTCCTACGGA ATCGCT
49	346C6-xi	HC CDR1	173	AGTTATGCAATGATC
50	346C6-xi	HC CDR2	174	ACCATTAGTACTGGT GGTATCACATACTAC GCGAGCTGGGCGAAA GGC
51	346C6-xi	HC CDR3	175	GGGGGATATGCTGCT AGTAGTGCTTATTAT CTCCCGTACTACTTTG ACTTG
52	346C6-xi	LC CDR1	176	CAGTCCTCCCAGTCC GTGTATAACAACAAC AACCTGGCC

[0159]

53	346C6-xi	LC CDR2	177	CTGGCATCCACTCTG GCATCT
54	346C6-xi	LC CDR3	178	CTAGGTGGTTGTGAT GATGATGCTGATACT TTTGCT
55	346C6-zu	HC CDR1	179	TCCTACGCTATGATC
56	346C6-zu	HC CDR2	180	ACCATCTCTACCGGC GGAATTACCTACTAC GCCTCCTGGGCCAAG GGC
57	346C6-zu	HC CDR3	181	GGCGGCTACGCCGCC AGCTCCGCTTACTAC CTGCCCTACTACTTCG ACCTG
58	346C6-zu	LC CDR1	182	CAGTCCTCCCAGTCC GTGTATAACAACAAC AACCTGGCC
59	346C6-zu	LC CDR2	183	CTGGCCTCCACACTG GCCTCT
60	346C6-zu	LC CDR3	184	CTGGGCGGCTGCGAC GACGACGCCGATACC TTTGCT

[0160] 表6.mAb IMGT CDR的氨基酸序列

[0161]

	mAb	IgG 链	SEQ ID NO	氨基酸序列
1	MORAb-003	HC CDR1	13	GFTFSGYG
2	MORAb-003	HC CDR2	14	ISSGGSYT
3	MORAb-003	HC CDR3	15	ARHGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CDR1	16	SSISSNN
5	MORAb-003	LC CDR2	17	GTS
6	MORAb-003	LC CDR3	18	QQWSSYPYMYT
7	MORAb-009	HC CDR1	185	GYSFTGYT
8	MORAb-009	HC CDR2	186	ITPYNGAS
9	MORAb-009	HC CDR3	187	ARGGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CDR1	188	SSVSY
11	MORAb-009	LC CDR2	189	DTS
12	MORAb-009	LC CDR3	190	QQWSKHPLT
13	曲妥珠单抗	HC CDR1	191	GFNIKDTY
14	曲妥珠单抗	HC CDR2	192	IYPTNGYT

[0162]

15	曲妥珠单抗	HC CDR3	193	SRWGGDGFYAMDY
16	曲妥珠单抗	LC CDR1	194	QDVNTA
17	曲妥珠单抗	LC CDR2	195	SAS
18	曲妥珠单抗	LC CDR3	196	QQHYTTPPT
19	33011-xi	HC CDR1	197	GISLSSDA
20	33011-xi	HC CDR2	198	INGGGNT
21	33011-xi	HC CDR3	199	ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL
22	33011-xi	LC CDR1	200	QSISSV
23	33011-xi	LC CDR2	201	LAS
24	33011-xi	LC CDR3	202	QTNYGTSSSNYGFA
25	33011-zu	HC CDR1	203	GISLSSDA
26	33011-zu	HC CDR2	204	INGGGNT
27	33011-zu	HC CDR3	205	ARGIQHGGGNSDYYYYGMDL
28	33011-zu	LC CDR1	206	QSISSV
29	33011-zu	LC CDR2	207	LAS
30	33011-zu	LC CDR3	208	QTNYGTSSSNYGFA
31	111B10-xi	HC CDR1	209	GFSLNNYA
32	111B10-xi	HC CDR2	210	ISTGGLA
33	111B10-xi	HC CDR3	211	GRNGGGSYIFYYFDL
34	111B10-xi	LC CDR1	212	QSISSY
35	111B10-xi	LC CDR2	213	SAS
36	111B10-xi	LC CDR3	214	QSYYDIGTST
37	111B10-zu	HC CDR1	215	GFSLNNYA
38	111B10-zu	HC CDR2	216	ISTGGLA
39	111B10-zu	HC CDR3	217	ARNGGGSYIFYYFDL
40	111B10-zu	LC CDR1	218	QSISSY
41	111B10-zu	LC CDR2	219	SAS
42	111B10-zu	LC CDR3	220	QSYYDIGTST
43	201C15-xi	HC CDR1	221	GIDLSSYA
44	201C15-xi	HC CDR2	222	INIGGRV
45	201C15-xi	HC CDR3	223	ARYYNGGSYDI
46	201C15-xi	LC CDR1	224	ESIYRV
47	201C15-xi	LC CDR2	225	DTS
48	201C15-xi	LC CDR3	226	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	HC CDR1	227	GIDLSSYA
50	201C15-zu	HC CDR2	228	INIGGRV

[0163]

51	201C15-zu	HC CDR3	229	ARYYNGGSYDI
52	201C15-zu	LC CDR1	230	ESIYRV
53	201C15-zu	LC CDR2	231	DTS
54	201C15-zu	LC CDR3	232	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	HC CDR1	233	GFSLSSYA
56	346C6-xi	HC CDR2	234	ISTGGIT
57	346C6-xi	HC CDR3	235	ARGGYAASSAYYL PYYFDL
58	346C6-xi	LC CDR1	236	QSVYNNNN
59	346C6-xi	LC CDR2	237	LAS
60	346C6-xi	LC CDR3	238	LGGCDDDADTFA
61	346C6-zu	HC CDR1	239	GFSLSSYA
62	346C6-zu	HC CDR2	240	ISTGGIT
63	346C6-zu	HC CDR3	241	ARGGYAASSAYYL PYYFDL
64	346C6-zu	LC CDR1	242	QSVYNNNN
65	346C6-zu	LC CDR2	243	LAS
66	346C6-zu	LC CDR3	244	LGGCDDDADTFA

[0164] 表7.编码mAb IMGT CDR的核酸序列

[0165]

	mAb	**IgG 链**	**SEQ ID NO**	**核酸序列**
1	MORAb-003	HC CDR1	245	GGCTTCACCTTCAGCG GCTATGGG
2	MORAb-003	HC CDR2	246	ATTAGTAGTGGTGGT AGTTATACC
3	MORAb-003	HC CDR3	247	GCAAGACATGGGGAC GATCCCGCCTGGTTCG CTTAT
4	MORAb-003	LC CDR1	248	TCAAGTATAAGTTCCA ACAAC
5	MORAb-003	LC CDR2	249	GGCACATCC
6	MORAb-003	LC CDR3	250	CAACAGTGGAGTAGT TACCCGTACATGTACA CG
7	MORAb-009	HC CDR1	251	GGTTACTCATTCACTG GCTACACC
8	MORAb-009	HC CDR2	252	ATTACTCCTTACAATG GTGCTTCT
9	MORAb-009	HC CDR3	253	GCAAGGGGGGGTTAC GACGGGAGGGGTTTT

[0166]

				GACTAC
10	MORAb-009	LC CDR1	254	TCAAGTGTAAGTTAC
11	MORAb-009	LC CDR2	255	GACACATCC
12	MORAb-009	LC CDR3	256	CAGCAGTGGAGTAAG CACCCTCTCACG
13	33011-xi	HC CDR1	257	GGAATCTCCCTCAGTA GCGATGCA
14	33011-xi	HC CDR2	258	ATTAATGGTGGTGGT AACACA
15	33011-xi	HC CDR3	259	GCCAGAGGCATTCAA CATGGTGGTGGTAAT AGTGATTATTATTATT ACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	LC CDR1	260	CAGAGCATTAGTAGT GTC
17	33011-xi	LC CDR2	261	CTGGCATCT
18	33011-xi	LC CDR3	262	CAAACCAATTATGGT ACTAGTAGTAGTAATT ATGGTTTTGCT
19	33011-zu	HC CDR1	263	GGAATTTCCCTCTCCT CCGACGCG
20	33011-zu	HC CDR2	264	ATCAACGGCGGCGGA AACACC
21	33011-zu	HC CDR3	265	GCGCGCGGCATCCAG CACGGTGGTGGAAAC AGCGACTACTACTACT ATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	LC CDR1	266	CAGTCAATTAGCAGC GTG
23	33011-zu	LC CDR2	267	TTGGCCTCC
24	33011-zu	LC CDR3	268	CAAACCAACTACGGA ACCTCCAGCTCCAACT ACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	HC CDR1	269	GGATTCTCCCTCAATA ACTATGCA
26	111B10-xi	HC CDR2	270	ATTAGTACTGGTGGTC TCGCA
27	111B10-xi	HC CDR3	271	GGCAGAAATGGTGGT GGTAGTTATATTTTCT ATTATTTTGACTTG
28	111B10-xi	LC CDR1	272	CAGAGCATTAGTAGT TAC

[0167]

29	111B10-xi	LC CDR2	273	TCTGCATCC
30	111B10-xi	LC CDR3	274	CAAAGCTATTATGAT ATTGGTACTAGTACT
31	111B10-zu	HC CDR1	275	GGCTTCTCCCTGAACA ACTACGCC
32	111B10-zu	HC CDR2	276	ATCAGCACAGGCGGC CTGGCC
33	111B10-zu	HC CDR3	277	GCCAGAAACGGCGGA GGCTCCTACATCTTCT ACTACTTCGACCTG
34	111B10-zu	LC CDR1	278	CAGTCCATCTCCTCCT AC
35	111B10-zu	LC CDR2	279	TCTGCCTCC
36	111B10-zu	LC CDR3	300	CAGTCCTACTACGAC ATCGGCACCTCCACC
37	201C15-xi	HC CDR1	301	GGAATCGACCTCAGT AGCTATGCA
38	201C15-xi	HC CDR2	302	ATTAATATTGGTGGTC GCGTA
39	201C15-xi	HC CDR3	303	GCCAGATATTATAAT GGTGGTAGTTATGAC ATC
40	201C15-xi	LC CDR1	304	GAGAGCATTTATCGC GTA
41	201C15-xi	LC CDR2	305	GATACATCC
42	201C15-xi	LC CDR3	306	CAAGGCGGTTATTAT GCTGATAGTTATGGTA TTGCT
43	201C15-zu	HC CDR1	307	GGAATCGACCTGTCCT CCTACGCT
44	201C15-zu	HC CDR2	308	ATCAACATCGGCGGC AGAGTG
45	201C15-zu	HC CDR3	309	GCCCGGTACTACAAC GGCGGCTCCTACGAT ATC
46	201C15-zu	LC CDR1	310	GAGTCCATCTACCGG GTG
47	201C15-zu	LC CDR2	311	GACACCAGC
48	201C15-zu	LC CDR3	312	CAGGGCGGCTACTAC GCCGACTCCTACGGA ATCGCT
49	346C6-xi	HC CDR1	313	GGATTCTCCCTCAGTA

				GTTATGCA
50	346C6-xi	HC CDR2	314	ATTAGTACTGGTGGTA TCACA
51	346C6-xi	HC CDR3	315	GCCAGAGGGGGATAT GCTGCTAGTAGTGCTT ATTATCTCCCGTACTA CTTTGACTTG
52	346C6-xi	LC CDR1	316	CAGAGTGTTTATAATA ATAACAAC
53	346C6-xi	LC CDR2	317	CTGGCATCC
54	346C6-xi	LC CDR3	318	CTAGGTGGTTGTGATG ATGATGCTGATACTTT TGCT
55	346C6-zu	HC CDR1	319	GGCTTCTCCCTGTCCT CCTACGCT
56	346C6-zu	HC CDR2	320	ATCTCTACCGGCGGA ATTACC
57	346C6-zu	HC CDR3	321	GCTAGAGGCGGCTAC GCCGCCAGCTCCGCTT ACTACCTGCCCTACTA CTTCGACCTG
58	346C6-zu	LC CDR1	322	CAGTCCGTGTATAAC AACAACAAC
59	346C6-zu	LC CDR2	323	CTGGCCTCC
60	346C6-zu	LC CDR3	324	CTGGGCGGCTGCGAC GACGACGCCGATACC TTTGCT

[0168]

[0169] 表8.全长mAb Ig链的氨基酸序列

	mAb	**IgG 链**	**SEQ ID NO**	**氨基酸序列**
1	MORAb-003	重链	1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASG FTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMIS SGGSYTYYADSVKGRFAISRDNAKNT LFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDDPA WFAYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

[0170]

[0171]

				AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
2	MORAb-003	轻链	6	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSI SSNNLHWYQQKPGKAPKPWIYGTSNL ASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPED IATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
3	MORAb-009	重链	325	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASG YSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLIT PYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSST AYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDG RGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
4	MORAb-009	轻链	326	DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASS SVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSVEA EDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
5	曲妥珠单抗	重链	327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

[0172]

				LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
6	曲妥珠单抗	轻链	328	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
7	33011-xi	重链	329	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISL SSDAISWVRQAPGKGLEYIGIINGGGN TYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSP TTEDTATYFCARGIQHGGGNSDYYYY GMDL WGPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	33011-xi	轻链	330	EVLMTQTPSSVSAAVGDTVTIKCQAS QSISSVLSWYQQKPGQPPKLLIYLAST LASGVPSRFSGSRSGTEFTLTISDLECD DAATYYCQTNYGTSSSNYGFAFGGGT EVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
9	33011-zu	重链	331	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGI SLSSDAISWVRQAPGKGLEYIGIINGG GNTYYASWAKGRFTISRHNSKNTLYL

				QMNSLRAEDTAVYYCARGIQHGGGN SDYYYYGMDLWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
	10	33011-zu	轻链	332	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ SISSVLSWYQQKPGKAPKLLIYLASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCED IATYYCQTNYGTSSSNYGFAFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
[0173]	11	111B10-xi	重链	333	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFS LNNYAMSWVRQAPGKGLEWIGSISTG GLAFYANWAKGRFTISRTSTTVDLKM TSLTTEDTATYFCGRNGGGSYIFYYFD LWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	12	111B10-xi	轻链	334	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKCQASQ SISSYLSWYQQKPGQPPKLLIYSASTL ASGVSSRFKGSGSGTEYTLTISDLECA DAATYFCQSYYDIGTSTFGGGTEVVV KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

[0174]

13	111B10-zu	重链	335	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLNNYAMSWVRQAPGKGLEWIGSIS TGGLAFYANWAKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGGSY IFYYFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
14	111B10-zu	轻链	336	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ SISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYSASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQCED AATYYCQSYYDIGTSTFGGGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
15	201C15-xi	重链	337	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGID LSSYAMGWFRQAPGKGLEYIGTINIG GRVYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKA PSLTAEDTATYFCARYYNGGSYDIWG PGTLVTVSLASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	201C15-xi	轻链	338	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIKCQAS ESIYRVLAWYQQKPGQPPKLLIYDTST LASGAPSRFKGSGYGTEFTLTISGVQC EDAATYYCQGGYYADSYGIAFGGGT EVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL

[0175]

				QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
17	201C15-zu	重链	339	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGI DLSSYAMGWVRQAPGKGLEYIGTINI GGRVYYASWAKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARYYNGGSY DIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
18	201C15-zu	轻链	340	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASE SIYRVLAWYQQKPGKAPKLLIYDTST LASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQCD DAATYYCQGGYYADSYGIAFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
19	346C6-xi	重链	341	QSVEESGGRLVKPDESLTLTCTASGFS LSSYAMIWVRQAPGEGLEWIGTISTG GITYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKIT SPTTEDTATYFCARGGYAASSAYYLP YYFDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
20	346C6-xi	轻链	342	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQ SVYNNNNLAWFQQKPGQPPKLLIYLA

[0176]

				STLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQ CDDAATYYCLGGCDDDADTFAFGGG TEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
21	346C6-zu	重链	343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSYAMIWVRQAPGKGLEWIGTIST GGITYYASWAKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARGGYAASS AYYLPYYFDLWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
22	346C6-zu	轻链	344	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQ SVYNNNNLAWYQQKPGKVPKLLIYL ASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QCEDAATYYCLGGCDDDADTFAFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

[0177] 表9.编码全长mAb Ig链的核酸序列+

[0178]

	mAb	IgG 链	SEQ ID NO	核酸序列
1	MORAb-003	重链	345	GAGGTCCAACTGGTGGAGAGCGGTG GAGGTGTTGTGCAACCTGGCCGGTC CCTGCGCCTGTCCTGCTCCGCATCTG GCTTCACCTTCAGCGGCTATGGGTT GTCTTGGGTGAGACAGGCACCTGGA AAAGGTCTTGAGTGGGTTGCAATGA TTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTA CTATGCAGACAGTGTGAAGGGTAGA TTTGCAATATCGCGAGACAACGCCA

[0179]

				AGAACACATTGTTCCTGCAAATGGA CAGCCTGAGACCCGAAGACACCGGG GTCTATTTTTGTGCAAGACATGGGG ACGATCCCGCCTGGTTCGCTTATTGG GGCCAAGGGACCCCGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATT CAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
2	MORAb-003	轻链	346	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAA GCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGTGA CAGAGTGACCATCACCTGTAGTGTC AGCTCAAGTATAAGTTCCAACAACT TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGG

				TAAGGCTCCAAAGCCATGGATCTAC GGCACATCCAACCTGGCTTCTGGTG TGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGG TAGCGGTACCGACTACACCTTCACC ATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACA TCGCCACCTACTACTGCCAACAGTG GAGTAGTTACCCGTACATGTACACG TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAA
3	MORAb-009	重链	347	CAGGTACAACTGCAGCAGTCTGGGC CTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTC AGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCT GGTTACTCATTCACTGGCTACACCAT GAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGG AAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACTT ATTACTCCTTACAATGGTGCTTCTAG CTACAACCAGAAGTTCAGGGGCAAG GCCACATTAACTGTAGACAAGTCAT CCAGCACAGCCTACATGGACCTCCT CAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCA GTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTT ACGACGGGAGGGGTTTTGACTACTG GGGATCCGGGACCCCGGTCACCGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAT CGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCG TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACC

[0180]

[0181]

				TGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAAT GA
4	MORAb-009	轻链	348	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAG CAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGA GAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCC AGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACT GGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTC CCCCAAAAGATGGATTTATGACACA TCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAG GTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG AAACTCTTACTCTCTCACAATCAGC AGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAA CTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAA GCACCCTCTCACGTTCGGATCCGGG ACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTG TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC

[0182]

				TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGTTAA
5	33011-xi	重链	349	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTC GCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACCGTCTCTGGA ATCTCCCTCAGTAGCGATGCAATAA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTCGAATACATCGGAATCATT AATGGTGGTGGTAACACATACTACG CGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAAAACCTCGACCACGGTG GATCTGAAAATCACCAGTCCGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTG TGCCAGAGGCATTCAACATGGTGGT GGTAATAGTGATTATTATTATTACG GCATGGACCTCTGGGGCCCAGGCAC CCTGGTCACTGTCTCTTCAGCATCCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT GTGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA

[0183]

				GCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCCGGGAAATGA
6	33011-xi	轻链	350	GAAGTGTTGATGACCCAGACTCCAT CCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGA CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCC AGTCAGAGCATTAGTAGTGTCTTGT CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCA GCCTCCCAAGCTCCTGATCTATCTGG CATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCC ATCGCGGTTCAGCGGCAGTAGATCT GGGACAGAGTTCACTCTCACCATCA GCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGC CACTTACTACTGTCAAACCAATTAT GGTACTAGTAGTAGTAATTATGGTT TTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGT GGTCGTCAAACGAACTGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGTTGA
7	33011-zu	重链	351	GAAGTCCAACTGGTGGAAAGCGGG GGAGGACTGGTGCAGCCGGGCGGAT CCCTCCGGCTGTCATGTGCTGCATCG GGAATTTCCCTCTCCTCCGACGCGAT TAGCTGGGTCAGACAGGCCCCCGGA AAGGGGCTGGAGTACATCGGTATCA TCAACGGCGGCGGAAACACCTACTA CGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGCTTC ACCATCTCGCGGCATAATTCCAAGA ACACTCTGTACTTGCAAATGAACTC CCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCGCGCGCGGCATCCAGC ACGGTGGTGGAAACAGCGACTACTA CTACTATGGGATGGATCTGTGGGGC CAGGGAACTCTTGTGACCGTGTCGT

[0184]

				CAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCA AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCCGGGAAATGA
8	33011-zu	轻链	352	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCAA GCTCGCTGTCCGCCTCCGTGGGCGA CCGCGTGACCATCACGTGCCAGGCG TCCCAGTCAATTAGCAGCGTGCTCT CCTGGTACCAACAGAAGCCGGGGAA AGCACCCAAGCTGCTGATCTACTTG GCCTCCACTCTGGCCTCGGGAGTGC CTTCACGGTTCTCCGGATCGGGATCT GGTACTGATTTCACCCTCACCATCTC GAGCCTTCAGTGCGAGGACATCGCT

[0185]

				ACTTACTATTGTCAAACCAACTACG GAACCTCCAGCTCCAACTACGGCTT TGCCTTCGGTGGCGGGACCAAGGTC GAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGTTGA
	9	111B10-xi	重链	353	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTC GCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGA TTCTCCCTCAATAACTATGCAATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGATCGGATCCATT AGTACTGGTGGTCTCGCATTCTACG CGAACTGGGCAAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAGAACCTCGACCACGGTG GATCTGAAAATGACCAGTCTGACAA CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTG TGGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTAT ATTTTCTATTATTTTGACTTGTGGGG CCAAGGCACCCTCGTCACTGTCTCTT CAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC CCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACA TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC

[0186]

				AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCA AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCCGGGAAATGA
10	111B10-xi	轻链	354	GCATTCGAATTGACCCAGACTCCAT CCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGG CACAATCACCATCAAGTGCCAGGCC AGTCAGAGCATTAGTAGTTACTTAT CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCA GCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTCTG CATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTC ATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCT GGGACAGAGTACACTCTCACCATCA GCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGC CACTTACTTCTGTCAAAGCTATTATG ATATTGGTACTAGTACTTTCGGCGG AGGGACCGAGGTGGTCGTCAAACGA ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
11	111B10-zu	重链	355	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATC TCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCG

[0187]

				GCTTCTCCCTGAACAACTACGCCAT GTCCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGC AAAGGCCTGGAATGGATCGGCTCCA TCAGCACAGGCGGCCTGGCCTTCTA CGCCAATTGGGCCAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTCCAGATGAACTC CCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGTGCCAGAAACGGCGGAG GCTCCTACATCTTCTACTACTTCGAC CTGTGGGGCCAGGGCACCCTCGTGA CAGTGTCATCTGCATCCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CTTATATTCAAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAG

[0188]

				AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGA AATGA
12	111B10-zu	轻链	356	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCT CCAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCC TCCCAGTCCATCTCCTCCTACCTGTC CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAG GCCCCCAAGCTGCTGATCTACTCTG CCTCCACACTGGCCTCCGGCGTGCC CTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTG GCACCGACTTTACCCTGACCATCAG CTCCCTCCAGTGCGAGGATGCCGCC ACCTACTACTGCCAGTCCTACTACG ACATCGGCACCTCCACCTTCGGCGG AGGCACCAAGGTGGAAATCAAACG AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCT CAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
13	201C15-xi	重链	357	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTC GCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT GACACTCACCTGCACAGTCTCTGGA ATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGG GCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATACATCGGAACCATT AATATTGGTGGTCGCGTATATTACG CGAGCTGGGCAAAAGGCCGATTCAC CATCTCCAGAACCTCGACCACGGTG GATCTGAAAGCGCCCAGTCTGACAG CCGAGGACACGGCCACCTATTTCTG TGCCAGATATTATAATGGTGGTAGT TATGACATCTGGGGCCCAGGCACCC TGGTCACCGTCTCTTTAGCATCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC

[0189]

				CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACTCACACATGCCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG GACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCCGGGAAATGA
14	201C15-xi	轻链	358	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAG CCTCCGCGTCTGAACCTGTGGGAGG CACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCC AGTGAGAGCATTTATCGCGTATTGG CCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCA GCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGAT ACATCCACTCTGGCATCTGGGGCCC CATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATA TGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC AGCGGCGTGCAGTGTGAAGATGCTG CCACTTACTACTGTCAAGGCGGTTA TTATGCTGATAGTTATGGTATTGCTT TCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG

[0190]

				AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TGA
15	201C15-zu	重链	359	CAGGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTC TCTGAGACTGTCCTGTTCCGCCTCCG GAATCGACCTGTCCTCCTACGCTAT GGGCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGC AAGGGCCTGGAGTACATCGGCACCA TCAACATCGGCGGCAGAGTGTACTA CGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGTTC ACCATCTCCAGAGACAACTCCAAGA ACACCCTGTACCTCCAGATGAACTC CCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTG TACTACTGCGCCCGGTACTACAACG GCGGCTCCTACGATATCTGGGGCCA GGGCACACTCGTGACCGTGTCCTCT GCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC AAATCTTGTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG

[0191]

				CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCCGGGAAATGA
	16	201C15-zu	轻链	360	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCT CCACCCTGTCTGCCTCTGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCC TCCGAGTCCATCTACCGGGTGCTGG CCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA GGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGAC ACCAGCACACTGGCCTCCGGCGTGC CCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCT GGCACCGAGTTTACCCTGACCATCT CCAGCCTCCAGTGCGACGACGCCGC CACCTACTATTGTCAGGGCGGCTAC TACGCCGACTCCTACGGAATCGCTT TCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCC ATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TGA
	17	346C6-xi	重链	361	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTC GCCTGGTAAAGCCTGACGAATCCCT GACACTCACCTGCACAGCCTCTGGA TTCTCCCTCAGTAGTTATGCAATGAT CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAG GGGCTGGAATGGATCGGAACCATTA GTACTGGTGGTATCACATACTACGC GAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACC ATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGG ATCTGAAAATCACCAGTCCGACAAC

[0192]

				CGAGGACACGGCCACCTATTTCTGT GCCAGAGGGGGATATGCTGCTAGTA GTGCTTATTATCTCCCGTACTACTTT GACTTGTGGGGCCAAGGGACCCTGG TCACCGTCTCCTCAGCATCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCC GGGAAATGA
18	346C6-xi	轻链	362	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCAT CACCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGG CACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCC AGTCAGAGTGTTTATAATAATAACA ACTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACC

				CGGGCAGCCTCCCAAGCTTCTGATC TATCTGGCATCCACTCTGGCATCTGG GGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGT GGATCTGGGACACAGTTCACTCTCA CCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGA TGCTGCCACTTATTACTGTCTAGGTG GTTGTGATGATGATGCTGATACTTTT GCTTTCGGCGGAGGGACTGAGGTGG TGGTCAAACGAACTGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAA ACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGTTGA
[0193]	19	346C6-zu	重链	363	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCG GCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATC TCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCG GCTTCTCCCTGTCCTCCTACGCTATG ATCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGCA AGGGCCTGGAATGGATCGGCACCAT CTCTACCGGCGGAATTACCTACTAC GCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAACTCCAAGAA CACCCTGTACCTCCAGATGAACTCC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGT ACTATTGTGCTAGAGGCGGCTACGC CGCCAGCTCCGCTTACTACCTGCCCT ACTACTTCGACCTGTGGGGCCAGGG CACCCTCGTGACAGTGTCATCTGCA TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCC

[0194]

				ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCCGGGAAATGA
20	346C6-zu	轻链	364	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCT CCAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGA CAGAGTGACCATCACCTGTCAGTCC TCCCAGTCCGTGTATAACAACAACA ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACC CGGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATC TACCTGGCCTCCACACTGGCCTCTG GCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCT GGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGA CCATCAGCTCCCTCCAGTGCGAGGA TGCCGCCACCTACTATTGCCTGGGC GGCTGCGACGACGACGCCGATACCT TTGCTTTTGGCGGAGGCACCAAGGT GGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG

[0195]

				AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGTTGA

[0196] [+]所列核酸序列不包括前导序列。

[0197] 在各种实施方案中,本文中公开的ADC可以包含以上表中所列的任何组的重链和轻链可变域(例如MORAb-003重链和轻链可变域,或曲妥珠单抗重链和轻链可变域),或来自重链和轻链组的六个CDR序列组。在一些实施方案中,ADC进一步包含人类重链和轻链恒定域或其片段。举例来说,ADC可以包含人类IgG重链恒定域(例如IgG1)和人类κ或λ轻链恒定域。在各种实施方案中,所述ADC的抗体部分包含人类免疫球蛋白G亚型1(IgG1)重链恒定域与人类Igκ轻链恒定域。

[0198] 在各种实施方案中,ADC的标靶癌症抗原为叶酸受体α(“FRA”)。

[0199] 在各种实施方案中,抗FRA抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:2组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:3组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:4组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:7组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:8组成的轻链CDR2(LCDR2)和由SEQ ID NO:9组成的轻链CDR3(LCDR3),如Kabat编号系统所定义(Kabat,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987和1991)))。

[0200] 在一些实施方案中,抗FRA抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:13组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:14组成的重链CDR2、由SEQ ID NO:15组成的重链CDR3;由SEQ ID NO:16组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:17组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:18组成的轻链CDR3,如IMGT编号系统所定义(International ImMunoGeneTics Information System(IMGT®))。

[0201] 在各种实施方案中,抗FRA抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗FRA抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列,或与以上所提及的序列至少95%同一的序列。在一些实施方案中,抗FRA抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:23至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的重链可变区氨基酸序列和与SEQ ID NO:24至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的轻链可变区氨基酸序列。

[0202] 在各种实施方案中,抗FRA抗体包含人类IgG1重链恒定域和人类Igκ轻链恒定域。

[0203] 在各种实施方案中,抗FRA抗体包含SEQ ID NO:1的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:1至少95%同一的序列,和SEQ ID NO:6的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:6至少95%同一的序列。在特定实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:1的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:6的轻链氨基酸序列,或与以上所提及的序列至少95%同一的序列。在一些实施方案中,抗FRA抗体具有与SEQ ID NO:1至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的重链氨基酸序列,和/或与SEQ ID NO:6至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,抗FRA抗体包含由SEQ ID NO:11(具有编码前导序列的核苷酸)或SEQ ID NO:345(不具有编码前导序列的核苷酸)的核苷酸序列编码的重链;和由SEQ ID

NO:12(具有编码前导序列的核苷酸)或SEQ ID NO:346(不具有编码前导序列的核苷酸)的核苷酸序列编码的轻链。在一些实施方案中,重链氨基酸序列缺乏C端赖氨酸。在各种实施方案中,抗FRA抗体具有由根据布达佩斯条约(the Budapest Treaty)的条款于2006年4月24日以登记号PTA-7552保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC,10801 University Blvd.,Manassas,Va.20110-2209)的细胞系产生的抗体的氨基酸序列,或缺乏重链C端赖氨酸的这类序列。在各种实施方案中,抗FRA抗体为MORAb-003(USAN名称:法乐单抗(farletuzumab))(Ebel等人(2007)Cancer Immunity 7:6)或其抗原结合片段。

[0204] 在各种其它实施方案中,ADC的标靶癌症抗原为人类表皮生长因子受体2(“her2”)。

[0205] 在各种实施方案中,抗her2抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:71组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:72组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:73组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:74组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:75组成的轻链CDR2(LCDR2)和由SEQ ID NO:76组成的轻链CDR3(LCDR3),如Kabat编号系统所定义。

[0206] 在一些实施方案中,抗her2抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:191组成的重链CDR1、由SEQ ID NO:192组成的重链CDR2、由SEQ ID NO:193组成的重链CDR3;由SEQ ID NO:194组成的轻链CDR1、由SEQ ID NO:195组成的轻链CDR2和由SEQ ID NO:196组成的轻链CDR3,如IMGT编号系统所定义。

[0207] 在各种实施方案中,抗her2抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗her2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:27的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:28的轻链可变区氨基酸序列,或与以上所提及的序列至少95%同一的序列。在一些实施方案中,抗her2抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:27至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:28至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的轻链可变区氨基酸序列。

[0208] 在各种实施方案中,抗her2抗体包含人类IgG1重链恒定域和人类Igκ轻链恒定域。

[0209] 在各种实施方案中,抗her2抗体包含SEQ ID NO:327的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:327至少95%同一的序列,和SEQ ID NO:328的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:328至少95%同一的序列。在特定实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:327的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:328的轻链氨基酸序列,或与以上所提及的序列至少95%同一的序列。在一些实施方案中,抗her2抗体具有与SEQ ID NO:327至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的重链氨基酸序列,和与SEQ ID NO:328至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的轻链氨基酸序列。在各种实施方案中,抗her2抗体为曲妥珠单抗或其抗原结合片段。

[0210] 在各种实施方案中,抗FRA抗体或其抗原结合片段包含MORAb-003的三个重链CDR和三个轻链CDR,或其中CDR包括以下各CDR的至多一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、缺失或取代:HCDR1(根据Kabat的SEQ ID NO:2,或根据IMGT的SEQ ID NO:13)、HCDR2(根据Kabat的SEQ ID NO:3,或根据IMGT的SEQ ID NO:14)、HCDR3(根据Kabat的SEQ ID NO:4,或根据IMGT的SEQ ID NO:15);LCDR1(根据Kabat的SEQ ID NO:7,或根据IMGT的SEQ ID NO:16)、LCDR2(根据Kabat的SEQ ID NO:8,或根据IMGT的SEQ ID NO:17)和LCDR3

(根据Kabat的SEQ ID NO:9,或根据IMGT的SEQ ID NO:18)。

[0211] 在各种其它实施方案中,抗her2抗体或其抗原结合片段包含曲妥珠单抗的三个重链CDR和三个轻链CDR,或其中CDR包括以下各CDR的至多一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、缺失或取代:HCDR1(根据Kabat的SEQ ID NO:71,或根据IMGT的SEQ ID NO:191)、HCDR2(根据Kabat的SEQ ID NO:72,或根据IMGT的SEQ ID NO:192)、HCDR3(根据Kabat的SEQ ID NO:73,或根据IMGT的SEQ ID NO:193);LCDR1(根据Kabat的SEQ ID NO:74,或根据IMGT的SEQ ID NO:194)、LCDR2(根据Kabat的SEQ ID NO:75,或根据IMGT的SEQ ID NO:195)和LCDR3(根据Kabat的SEQ ID NO:76,或根据IMGT的SEQ ID NO:196)。

[0212] 在各种实施方案中,氨基酸取代为单个残基。插入通常将为约1个至约20个氨基酸残基,不过只要保留生物功能(例如结合于FRA或her2),可以允许更大插入。缺失通常在约1个至约20个氨基酸残基范围内,不过在一些情况下缺失可以大得多。取代、缺失、插入或其任何组合可以用于得到最终衍生物或变异体。一般来说,对一些氨基酸进行这些改变,以使分子的改变最少,尤其抗原结合蛋白的免疫原性和特异性。然而,在某些情形下,可以允许较大的改变。根据以下描述为表10的图表,进行保守性取代。

[0213] 表10

[0214]

原始残基	示例性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile
Phe	Met、Leu、Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp、Phe
Val	Ile、Leu

[0215]

[0216] 通过选择不如表10中所示的取代保守的取代,使得功能或免疫同一性发生实质改变。举例来说,可以制造更显著地影响以下的取代:在改变区域内的多肽主链的结构,例如α-螺旋或β-片状结构;分子在标靶位点的电荷或疏水性;或侧链的体积。一般预期使多肽特性产生最大改变的取代为如下取代:(a)例如丝氨酰基或苏氨酰基的亲水性残基取代例如

亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基的疏水性残基(或经其取代)；(b)半胱氨酸或脯氨酸取代任何其它残基(或经其取代)；(c)具有正电性侧链的残基(例如赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基)取代负电性残基(例如谷氨酰基或天冬氨酰基)(或经其取代)；或(d)具有大体积侧链的残基(例如苯丙氨酸)取代不具有侧链的残基(例如甘氨酸)(或经其取代)。

[0217] 在变异抗体序列用于ADC的各种实施方案中，变异体通常展现相同的定性生物活性并引起相同的免疫反应，不过需要时也可以选择改变抗原结合蛋白的特征的变异体。可替代地，变异体可以设计成改变抗原结合蛋白的生物活性。举例来说，如本文中论述，可以改变或去除糖基化位点。

[0218] 各种抗体可以用于本文中使用的ADC来靶向癌细胞。如下所示，本文中公开的ADC中的连接子-毒素在不同肿瘤抗原靶向抗体下惊人地有效。本领域中已知在肿瘤细胞上而非健康细胞上表达或在肿瘤细胞上的表达水平高于健康细胞上的合适抗原，还已知针对其的抗体。这些抗体可以用于本文中公开的连接子和毒素(例如艾日布林)。在一些实施方案中，抗体部分靶向FRA。在一些实施方案中，靶向FRA的抗体部分为MORAb-003。在一些实施方案中，虽然所公开的连接子和毒素(艾日布林)在若干不同肿瘤靶向抗体下惊人地有效，但例如MORAb-003的靶向FRA的抗体部分尤其改善药物：抗体比率、肿瘤靶向、旁观杀死、治疗功效且减少脱靶杀死。改善的治疗功效可以在体外或体内测量，且可以包括肿瘤生长速率降低和/或肿瘤体积减小。

[0219] 在某些实施方案中，使用针对其它抗原标靶的抗体且提供包含靶向FRA的抗体部分(例如MORAb-003)的ADC的至少一些有利的功能特性(例如改善的药物：抗体比率、改善的治疗功效、减少的脱靶杀死等等)。在一些实施方案中，当所公开的连接子和毒素(艾日布林)结合于靶向her2的抗体部分(例如曲妥珠单抗)时，观察到一些或所有这些有利的功能特性。在一些实施方案中，抗体部分靶向her2。在一些实施方案中，靶向her2的抗体部分为曲妥珠单抗。在一些实施方案中，当所公开的连接子和毒素(艾日布林)结合于靶向MSLN的抗体部分(例如MORAb-009)时，观察到一些或所有这些有利的功能特性。在一些实施方案中，抗体部分靶向MSLN。在一些实施方案中，靶向MSLN的抗体部分为MORAb-009。

[0220] 连接子

[0221] 在各种实施方案中，ADC中的连接子在细胞外足够稳定，从而治疗有效。在一些实施方案中，连接子在细胞外稳定，使得ADC在存在于细胞外条件下时保持完整(例如在输送或递送至细胞前)。在ADC的背景下使用的术语“完整”意指抗体部分保持附接于药物部分。如本文所用，当ADC存在于细胞外条件下时，在连接子或包含连接子的ADC的背景下“稳定”意指ADC样品中至多20％、至多15％、至多10％、至多5％、至多3％或至多约1％连接子(或其间的任何百分比)裂解(或在整个ADC的情况下，以其它方式不完整)。

[0222] 可以例如通过在血浆中包括ADC达预定时间段(例如2、4、6、8、16或24小时)，然后对血浆中存在的游离药物部分的量进行定量，来确定连接子在细胞外是否稳定。稳定性可以允许ADC按时定位至靶向肿瘤细胞且防止药物提前释放，药物提前释放可以通过无差别地破坏正常组织与肿瘤组织而降低ADC的治疗指数。在一些实施方案中，连接子在标靶细胞外稳定且一旦在细胞内，那么从ADC释放药物部分，使得药物部分可以结合于其标靶(例如微管)。因此，有效连接子将：(i)维持抗体部分的特异性结合特性；(ii)允许药物部分经由

稳定附接于抗体部分而递送、例如细胞内递送;(iii)保持稳定和完整,直至ADC已输送或递送至其标靶位点;和(iv)允许药物部分在裂解后具有治疗作用,例如细胞毒性作用。

[0223] 连接子可以影响ADC的物理化学特性。因为许多细胞毒性剂在本质上为疏水性的,所以用另一疏水性部分将其连接于抗体可能引起聚集。ADC聚集体不能溶解并经常限制抗体上能够实现的药物负载,这可能负面影响ADC的效力。一般来说,还连接生物制品的蛋白质聚集体以增加免疫原性。如下所示,本文中公开的连接子产生具有低聚集水平和合乎需要的药物负载水平的ADC。

[0224] 连接子可以为“可裂解”或“不可裂解”(Ducry和Stump,Bioconjugate Chem.(2010)21:5-13)。可裂解连接子被设计成在经受某些环境因子时,例如在内化至标靶细胞时,释放药物,而不可裂解连接子一般依赖于抗体部分本身的降解。

[0225] 在一些实施方案中,连接子为不可裂解连接子。在一些实施方案中,ADC的药物部分通过抗体部分的降解而释放。不可裂解连接子趋向于在标靶细胞内化和在标靶细胞内降解时保持与抗体和药物的至少一个氨基酸共价缔合。不可裂解连接子通常包括硫醚键,硫醚键通过药物或抗体上的硫醇基分别与抗体或药物上的顺丁烯二酰亚胺基或卤乙酰胺基结合来制备(Goldmacher等人,Cancer Drug Discovery and Development:Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins(G.L.Phillips编,Springer,2013))。一种示例性不可裂解连接子包含硫醚、环己基、4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1甲酸N-丁二酰亚胺基酯(SMCC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)或一个或多个聚乙二醇(PEG)部分,例如1、2、3、4、5或6个PEG部分。在一些实施方案中,不可裂解连接子包含$(PEG)_2$。在其它实施方案中,不可裂解连接子包含$(PEG)_4$。

[0226] 在一些实施方案中,连接子为可裂解连接子。可裂解连接子是指包含可裂解部分的任何连接子。如本文所用,术语“可裂解部分”是指可裂解的任何化学键。合适可裂解化学键为本领域中众所周知,且包括(但不限于)对酸不稳的键、对蛋白酶/肽酶不稳的键、对光不稳的键、二硫键和对酯酶不稳的键。包含可裂解部分的连接子可以允许药物部分经由连接子中的特定位点裂解从ADC释放。在各种实施方案中,抗体从连接的毒素裂解活化或增加毒素的活性。在一些实施方案中,与包含不可裂解连接子(例如不可裂解$(PEG)_2$或$(PEG)_4$连接子)的ADC相比,包含可裂解连接子(例如Val-Cit连接子)的ADC显示增加的靶向细胞杀死和/或减少的脱靶细胞杀死。在一些实施方案中,当用ADC治疗的细胞和/或癌症未表达高水平标靶抗原(例如FRA或her2)时,相对于包含不可裂解连接子的ADC,包含可裂解连接子的ADC显示改善的治疗功效。在一些实施方案中,需要抗体从连接的毒素裂解以实现如体外和/或体内所测量,ADC改善的治疗功效。

[0227] 在一些实施方案中,连接子在细胞内条件下能够裂解,使得连接子的裂解足够在细胞内环境中从抗体部分释放药物部分,以活化药物和/或使药物治疗有效。在一些实施方案中,直至ADC进入表达对ADC的抗体部分具有特异性的抗原的细胞时,药物部分才从抗体部分裂解,并在进入细胞时药物部分从抗体部分裂解。在一些实施方案中,连接子包含被定位成使得所述连接子或所述抗体部分中没有部分在裂解后保持结合于药物部分的可裂解部分。示例性可裂解连接子包括对酸不稳的连接子、对蛋白酶/肽酶敏感的连接子、对光不稳的连接子、含有二甲基、二硫化物或磺酰胺的连接子。

[0228] 在一些实施方案中,连接子为pH值敏感性连接子,且容易在某些pH值下水解。通

常，pH值敏感性连接子在酸性条件下能够裂解。此裂解策略一般利用与细胞溶质(约pH 7.4)相比，内体(约pH 5-6)和溶酶体(约pH 4.8)细胞内隔室中较低的pH值，以引发连接子中对酸不稳的基团(例如腙)水解(Jain等人(2015)Pharm Res 32:3526-40)。在一些实施方案中，连接子为对酸不稳和/或可水解的连接子。举例来说，可以使用在溶酶体中可水解且含有对酸不稳的基团(例如腙、缩氨基脲、缩氨硫脲、顺式-乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮等等)的对酸不稳的连接子。参见例如美国专利No.5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker(1999)Pharm.Therapeutics 83:67-123;Neville等人(1989)Biol.Chem.264:14653-61。这类连接子在中性pH值条件，例如血液中的pH值条件下相对稳定，但在低于pH 5.5或5.0(接近溶酶体的pH值)下不稳定。在某些实施方案中，可水解连接子为硫醚连接子(例如经由酰腙键附接于治疗剂的硫醚)。参见例如美国专利No.5,622,929。

[0229] 在一些实施方案中，连接子在还原条件下可裂解。在一些实施方案中，连接子在例如谷胱甘肽或二硫苏糖醇的还原剂存在下能够裂解。在一些实施方案中，连接子为可裂解二硫化物连接子或可裂解磺酰胺连接子。

[0230] 在一些实施方案中，连接子为可裂解二硫化物连接子。本领域中已知多种二硫化物连接子，包括例如可以使用SATA(N-丁二酰亚胺基-5-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB(N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)和SMPT(N-丁二酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫基)甲苯)、SPDB和SMPT形成的二硫化物连接子。参见例如Thorpe等人(1987)Cancer Res.47:5924-31;Wawrzynczak等人，Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编，Oxford U.Press,1987)。又参见美国专利No.4,880,935。二硫化物连接子通常用于利用大量细胞内硫醇，硫醇可以促进其二硫键的裂解。最丰富的细胞内硫醇还原谷胱甘肽的细胞内浓度一般在1-10nM范围内，约为血液中最丰富的低分子量硫醇(即半胱氨酸)的浓度(约5μM)的1,000倍(Goldmacher等人，Cancer Drug Discovery and Development:Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins(G.L.Phillips编，Springer,2013))。蛋白质二硫化物异构酶家族的胞内酶也可以促进二硫化物连接子的细胞内裂解。如本文所用，可裂解二硫化物连接子是指包含可裂解二硫化物部分的任何连接子。术语“可裂解二硫化物部分”是指可以例如通过硫醇或酶裂解和/或还原的二硫键。在一些实施方案中，可裂解二硫化物部分为二硫基-二甲基。

[0231] 在一些实施方案中，连接子为可裂解磺酰胺连接子。如本文所用，可裂解磺酰胺连接子是指包含可裂解磺酰胺部分的任何连接子。术语“可裂解磺酰胺部分”是指磺酰胺基，即连接于胺基的磺酰基，其中硫-氮键可以裂解。

[0232] 在一些实施方案中，连接子可以为树枝状类型连接子，其通过分支的多官能连接子部分将超过一个药物部分共价附接于抗体部分。参见例如Sun等人(2002)Bioorg.Med.Chem.Lett.12:2213-5;Sun等人(2003)Bioorg.Med.Chem.11:1761-8。树枝状连接子可以增加药物比抗体的摩尔比，即药物负载，其与ADC的效力有关。因此，在抗体部分仅载有一个例如反应性半胱氨酸硫醇基的情况下，众多药物部分可以通过树枝状连接子附接。在一些实施方案中，连接子部分或连接子-药物部分可以经由还原二硫桥化学或限制性赖氨酸利用技术附接于抗体。参见例如Intl.Publ.No.WO2013173391和WO2013173393。

[0233] 在一些实施方案中，连接子可以通过例如酶的存在于细胞内环境中(例如溶酶体或内体或质膜微囊)的裂解剂裂解。连接子可以为例如通过细胞内肽酶或蛋白酶(包括(但不限于)溶酶体或内体蛋白酶)裂解的肽连接子。在一些实施方案中，连接子为可裂解肽连接子。如本文所用，可裂解肽连接子是指包含可裂解肽部分的任何连接子。术语“可裂解肽部分”是指可以通过存在于细胞内环境中的试剂裂解的任何化学键连接的氨基酸(天然或合成氨基酸衍生物)。举例来说，连接子可以包含能够通过肽酶(例如组织蛋白酶，例如组织蛋白酶B)裂解的丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)序列或缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)序列。

[0234] 在一些实施方案中，连接子为酶能够裂解的连接子且连接子中的可裂解肽部分能够由酶裂解。在一些实施方案中，可裂解肽部分能够由溶酶体酶(例如组织蛋白酶)裂解。在一些实施方案中，连接子为组织蛋白酶能够裂解的连接子。在一些实施方案中，连接子中的可裂解肽部分可以由溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、F、H、K、L、O、S、V、X或W)裂解。在一些实施方案中，可裂解肽部分能够由组织蛋白酶B裂解。能够由组织蛋白酶B裂解的一种示例性二肽为缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)(Dubowchik等人(2002)Bioconjugate Chem.13:855-69)。在一些实施方案中，相对于包含替代可裂解部分(例如可裂解二硫化物部分或可裂解磺酰胺部分)的ADC，包含可裂解肽部分的ADC显示较低的聚集水平，和/或较高的药物负载(p)。

[0235] 在一些实施方案中，连接子或连接子中的可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施方案中，所述氨基酸单元允许连接子由蛋白酶裂解，因此在暴露于一种或多种细胞内蛋白酶(例如一种或多种溶酶体酶)时促进药物部分从ADC释放(Doronina等人(2003)Nat.Biotechnol.21:778-84;Dubowchik和Walker(1999)Pharm.Therapeutics 83:67-123)。示例性氨基酸单元包括(但不限于)二肽、三肽、四肽和五肽。示例性二肽包括(但不限于)缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Asn)、丙氨酸-苯丙氨酸(Ala-Phe)、苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Lys)、丙氨酸-赖氨酸(Ala-Lys)、丙氨酸-缬氨酸(Ala-Val)、缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)、缬氨酸-赖氨酸(Val-Lys)、赖氨酸-赖氨酸(Lys-Lys)、苯丙氨酸-瓜氨酸(Phe-Cit)、亮氨酸-瓜氨酸(Leu-Cit)、异亮氨酸-瓜氨酸(Ile-Cit)、色氨酸-瓜氨酸(Trp-Cit)和苯丙氨酸-丙氨酸(Phe-Ala)。示例性三肽包括(但不限于)丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)、甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Gly-Val-Cit)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-Gly)、苯丙氨酸-苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Phe-Lys)和甘氨酸-苯丙氨酸-赖氨酸(Gly-Phe-Lys)。其它示例性氨基酸单元包括(但不限于)Gly-Phe-Leu-Gly、Ala-Leu-Ala-Leu、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg和Phe-N^9-硝基-Arg，如例如美国专利No.6,214,345中所述。在一些实施方案中，连接子中的氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施方案中，连接子中的氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中，相对于包含替代氨基酸单元或替代可裂解部分的ADC，包含Val-Cit的ADC显示减少的脱靶细胞杀死，增加的靶向细胞杀死，较低的聚集水平，和/或较高的药物负载(p)。氨基酸单元可以包含天然存在的氨基酸残基和/或次要氨基酸和/或非天然存在的氨基酸类似物，例如瓜氨酸。氨基酸单元可以被设计和优化成由特定酶，例如肿瘤相关蛋白酶、溶酶体蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、D或S)或血纤蛋白溶酶蛋白酶进行酶裂解。

[0236] 在一些实施方案中，本文中公开的任何ADC中的连接子可以包含至少一种将抗体

部分接合于药物部分的间隔子单元。在一些实施方案中，间隔子单元将连接子中的裂解位点(例如可裂解肽部分)接合于抗体部分。在一些实施方案中，连接子和/或连接子中的间隔子单元基本上为亲水性的。亲水性连接子可以用于降低药物通过多药耐药性(MDR)或功能类似的转运体可能从抗性癌细胞泵出的程度。在一些方面中，连接子包括一个或多个聚乙二醇(PEG)部分，例如1个、2个、3个、4个、5个或6个PEG部分。在一些实施方案中，连接子为较短PEG连接子，且相比于较长PEG连接子，提供改善的稳定性和减少的聚集。

[0237] 在一些实施方案中，连接子中的间隔子单元包含一个或多个PEG部分。在一些实施方案中，间隔子单元包含-$(PEG)_m$-，且m为1至10的整数。在一些实施方案中，m在1至10、2至8、2至6、2至5、2至4或2至3的范围内。在一些实施方案中，m为8。在一些实施方案中，m为4。在一些实施方案中，m为3。在一些实施方案中，m为2。在一些实施方案中，间隔子单元包含$(PEG)_2$、$(PEG)_4$、$(PEG)_8$、$(PEG)_9$、$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$、$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$或二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$。在一些优选实施方案中，间隔子单元包含$(PEG)_2$。在一些实施方案中，相对于包含较长间隔子单元(例如$(PEG)_8$)的ADC，包含较短间隔子单元(例如$(PEG)_2$)的ADC显示较低的聚集水平和/或较高的药物负载(p)。

[0238] 在一些实施方案中，连接子中的间隔子单元包含烷基部分。在一些实施方案中，间隔子单元包含-$(CH_2)_n$-，且n为整数1至10(即，n可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一些实施方案中，n为5。在一些实施方案中，相对于包含较长间隔子单元(例如$(PEG)_8$)的ADC，包含较短间隔子单元(例如$(CH_2)_5$)的ADC显示较低的聚集水平和/或较高的药物负载(p)。

[0239] 间隔子单元可以用于例如直接或间接将抗体部分连接于药物部分。在一些实施方案中，间隔子单元直接将抗体部分连接于药物部分。在一些实施方案中，抗体部分和药物部分经由包含一个或多个PEG部分(例如$(PEG)_2$或$(PEG)_4$)的间隔子单元附接。在一些实施方案中，间隔子单元间接将抗体部分连接于药物部分。在一些实施方案中，间隔子单元经由可裂解部分(例如可裂解肽、可裂解二硫化物或可裂解磺酰胺)和/或将间隔子单元接合于抗体部分的附接部分(例如顺丁烯二酰亚胺部分)间接将抗体部分连接于药物部分。

[0240] 在各种实施方案中，间隔子单元经由顺丁烯二酰亚胺部分(Mal)附接于抗体部分(即抗体或抗原结合片段)。在一些实施方案中，相对于包含经由替代附接部分(例如丁二酰亚胺部分)附接于抗体部分的连接子的ADC，包含经由顺丁烯二酰亚胺部分附接于抗体部分的连接子的ADC显示较高的药物负载(p)。

[0241] 经由Mal附接于抗体或抗原结合片段的间隔子单元在本文中称为“Mal-间隔子单元”。如本文所用，术语“顺丁烯二酰亚胺部分”意指含有顺丁烯二酰亚胺基且与硫氢基(例如抗体部分上半胱氨酸残基的氢硫基)反应的化合物。与硫氢基(硫醇)反应的其它官能团包括(但不限于)碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸酯和异硫氰酸酯。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元与抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元经由半胱氨酸残基接合于抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元包含烷基部分。

[0242] 在某些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单元和可裂解肽部分。在一些实施方案中，可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施方案中，氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施方案中，氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单

元和Val-Cit。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_2$和Val-Cit。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_m$和Val-Cit，其中m为2至8或2至5或2、3、4或5。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_8$和Val-Cit。在某些实施方案中，连接子包含Mal-$(CH_2)_5$和Val-Cit。在一些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单元和Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_2$和Ala-Ala-Asn。

[0243] 在一些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单元和可裂解二硫化物部分。在一些实施方案中，可裂解二硫化物部分为二硫基-二甲基。在一些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单元和二硫基-二甲基。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$和二硫基-二甲基。

[0244] 在一些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单元和可裂解磺酰胺部分。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$和磺酰胺。

[0245] 在各种实施方案中，间隔子单元经由丁二酰亚胺部分(OSu)附接于抗体或抗原结合片段。经由OSu附接于抗体或抗原结合片段的间隔子单元在本文中称为“OSu-间隔子单元”。如本文所用，术语“丁二酰亚胺部分”意指含有丁二酰亚胺基且与胺基(例如抗体部分上赖氨酸残基的胺基)反应的化合物。一示例性丁二酰亚胺部分为N-羟基丁二酰亚胺(NHS)。在一些实施方案中，OSu-间隔子单元与抗体或抗原结合片段上的赖氨酸残基反应。在一些实施方案中，OSu-间隔子单元经由赖氨酸残基接合于抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，OSu-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，OSu-间隔子单元包含烷基部分。

[0246] 在某些实施方案中，连接子包含OSu-间隔子单元和可裂解肽部分。在一些实施方案中，可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施方案中，氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施方案中，氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中，连接子包含OSu-间隔子单元和Val-Cit。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_2$和Val-Cit。在其它实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_9$和Val-Cit。在其它实施方案中，连接子包含OSu-$(CH_2)_5$和Val-Cit。在某些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$和Val-Cit。在一些实施方案中，连接子包含OSu-间隔子单元和Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_2$和Ala-Ala-Asn。

[0247] 在一些实施方案中，连接子包含OSu-间隔子单元和可裂解二硫化物部分。在一些实施方案中，可裂解二硫化物部分为二硫基-二甲基。在一些实施方案中，连接子包含OSu-间隔子单元和二硫基-二甲基。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$和二硫基-二甲基。在其它实施方案中，连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$和二硫基-二甲基。

[0248] 在一些实施方案中，连接子包含OSu-间隔子单元和可裂解磺酰胺部分。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$和磺酰胺。在其它实施方案中，连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$和磺酰胺。

[0249] 在一些实施方案中，Mal-间隔子单元或OSu-间隔子单元将抗体部分(即抗体或抗原结合片段)附接于连接子中的可裂解部分。在一些实施方案中，Mal-间隔子单元或OSu-间隔子单元将抗体或抗原结合片段附接于可裂解肽部分。在一些实施方案中，可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施方案中，连接子包含Mal-间隔子单元-氨基酸单元或OSu-间隔

子单元-氨基酸单元。在一些实施方案中,Mal-间隔子单元或OSu-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中,Mal-间隔子单元或OSu-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施方案中,氨基酸单元包含Val-Cit。在其它实施方案中,氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。

[0250] 在一些实施方案中,连接子包含结构:Mal-间隔子单元-Val-Cit。在一些实施方案中,连接子包含结构:Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit。在一些实施方案中,连接子包含结构:Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit。在某些实施方案中,连接子包含Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit。在一些实施方案中,连接子包含Mal-间隔子单元-Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn。

[0251] 在一些实施方案中,连接子包含OSu-间隔子单元-Val-Cit。在一些实施方案中,连接子包含OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit。在其它实施方案中,连接子包含OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit。在其它实施方案中,连接子包含OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit。在其它实施方案中,连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-Val-Cit。在一些实施方案中,连接子包含OSu-间隔子单元-Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中,连接子包含OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn。

[0252] 在各种实施方案中,Mal-间隔子单元或OSu-间隔子单元将抗体或抗原结合片段附接于可裂解二硫化物部分。在一些实施方案中,连接子包含Mal-间隔子单元-二硫化物或OSu-间隔子单元-二硫化物。在一些实施方案中,二硫化物为二硫基-二甲基。在一些实施方案中,连接子包含Mal-间隔子单元-二硫基-二甲基。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$-二硫基-二甲基。在其它实施方案中,连接子包含OSu-间隔子单元-二硫基-二甲基。在一些实施方案中,连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-二硫基-二甲基。在其它实施方案中,连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$-二硫基-二甲基。

[0253] 在某些实施方案中,Mal-间隔子单元或OSu-间隔子单元将抗体或抗原结合片段附接于可裂解磺酰胺部分。在一些实施方案中,连接子包含Mal-间隔子单元-磺酰胺或OSu-间隔子单元-磺酰胺。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$-磺酰胺。在一些实施方案中,连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-磺酰胺。在其它实施方案中,连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$-磺酰胺。

[0254] 在各种实施方案中,连接子中的可裂解部分直接接合于药物部分。在其它实施方案中,另一间隔子单元用于将连接子中的可裂解部分附接于药物部分。在各种实施方案中,药物部分为艾日布林。在各种实施方案中,艾日布林通过间隔子单元附接于连接子中的可裂解部分。在一些实施方案中,艾日布林通过自消耗间隔子单元附接于连接子中的可裂解部分。在某些实施方案中,艾日布林通过自消耗间隔子单元附接于连接子中的可裂解部分,可裂解部分包含Val-Cit,且包含PEG的另一间隔子单元将可裂解部分接合于抗体部分。在某些实施方案中,艾日布林经由连接子中接合于Val-Cit可裂解部分的Mal-间隔子单元和pAB自消耗间隔子单元接合于抗FRA抗体。在某些其它实施方案中,艾日布林经由连接子中接合于Val-Cit可裂解部分的Mal-间隔子单元和pAB自消耗间隔子单元接合于抗her2抗体。

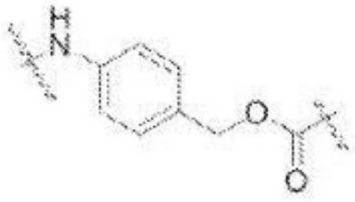
[0255] 间隔子单元可为“自消耗”或“非自消耗”的。“非自消耗”间隔子单元为其中部分或所有间隔子单元在连接子裂解后保持结合于药物部分的间隔子单元。非自消耗间隔子单元的实例包括(但不限于)甘氨酸间隔子单元和甘氨酸-甘氨酸间隔子单元。非自消耗间隔子单元最后可以随着时间推移而降解,但在细胞条件下不容易整个释放所连接的天然药物。“自消耗”间隔子单元容许天然药物部分在细胞内条件下释放。“天然药物”为其中在间隔子

单元裂解/降解后无间隔子单元部分或其它化学修饰残留的药物。

[0256] 自消耗化学作用为本领域中已知的且容易针对所公开的ADC来选择。在各种实施方案中,将连接子中的可裂解部分附接于药物部分(例如艾日布林)的间隔子单元为自消耗的,且与可裂解部分在细胞内条件下裂解同时或在即将裂解时或在裂解后不久即进行自消耗。

[0257] 在某些实施方案中,连接子中的自消耗间隔子单元包含对氨基苯甲基单元。在一些实施方案中,对氨基苯甲醇(pABOH)经由酰胺键附接于氨基酸单元或连接子中的其它可裂解部分,且在pABOH与药物部分之间形成氨基甲酸酯基、甲基氨基甲酸酯基或碳酸酯基(Hamann等人(2005)Expert Opin.Ther.Patents 15:1087-103)。在一些实施方案中,自消耗间隔子单元为或包含对氨基苯甲氧基羰基(pAB)。不受理论束缚,认为pAB的自消耗涉及自发的1,6-消去反应(Jain等人(2015)Pharm Res 32:3526-40)。

[0258] 在各种实施方案中,所公开的ADC中使用的对氨基苯甲氧基羰基(pAB)的结构如下所示:

[0259] 

对氨基苯甲氧基羰基

[0260] 在各种实施方案中,自消耗间隔子单元将连接子中的可裂解部分附接于艾日布林上的C-35胺。在一些实施方案中,自消耗间隔子单元为pAB。在一些实施方案中,pAB将连接子中的可裂解部分附接于艾日布林上的C-35胺。在一些实施方案中,pAB在可裂解部分裂解时进行自消耗,且艾日布林呈其天然活性形式从ADC释放。在一些实施方案中,抗FRA抗体(例如MORAb-003)通过包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的连接子接合于艾日布林的C-35胺。在其它实施方案中,抗her2抗体(例如曲妥珠单抗)通过包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的连接子接合于艾日布林的C-35胺。

[0261] 在一些实施方案中,pAB在连接子中的可裂解部分裂解时进行自消耗。在一些实施方案中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施方案中,连接子包含氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中,氨基酸单元为Val-Cit。在一些实施方案中,连接子包含Val-Cit-pAB(VCP)。在某些实施方案中,氨基酸单元为Ala-Ala-Asn。在一些实施方案中,连接子包含Ala-Ala-Asn-pAB。

[0262] 在一些实施方案中,pAB在连接子中的可裂解二硫化物部分裂解时进行自消耗。在一些实施方案中,连接子包含二硫化物-pAB。在一些实施方案中,连接子包含二硫基-二甲基-pAB。

[0263] 在一些实施方案中,pAB在连接子中的可裂解磺酰胺部分裂解时进行自消耗。在一些实施方案中,连接子包含磺酰胺-pAB。

[0264] 在各种方面中,ADC的抗体部分经由连接子结合于药物部分,其中连接子包含Mal-间隔子单元、可裂解氨基酸单元和pAB。在一些实施方案中,间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中,间隔子单元包含烷基部分。在一些实施方案中,连接子包含Mal-$(PEG)_2$-氨

基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB。在其它实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn-pAB。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_8$-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_8$-Val-Cit-pAB。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(CH_2)_5$-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB。

[0265] 在各种实施方案中，ADC的抗体部分经由连接子结合于药物部分，其中连接子包含Mal-间隔子单元-二硫化物-pAB。在一些实施方案中，间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$-二硫化物-pAB。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$-二硫基-二甲基-pAB。

[0266] 在一些实施方案中，ADC的抗体部分经由连接子结合于药物部分，其中连接子包含Mal-间隔子单元-磺酰胺-pAB。在一些实施方案中，间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，连接子包含Mal-$(PEG)_4$-三唑-$(PEG)_3$-磺酰胺-pAB。

[0267] 在一些方面中，ADC的抗体部分经由连接子结合于药物部分，其中连接子包含OSu-间隔子单元-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，间隔子单元包含烷基部分。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_2$-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB。在其它实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_2$-Ala-Ala-Asn-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_9$-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_9$-Val-Cit-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(CH_2)_5$-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-氨基酸单元-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-Val-Cit-pAB。

[0268] 在一些实施方案中，ADC的抗体部分经由连接子结合于药物部分，其中连接子包含OSu-间隔子单元-二硫化物-pAB。在一些实施方案中，间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-二硫化物-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-二硫基-二甲基-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$-二硫化物-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$-二硫基-二甲基-pAB。

[0269] 在一些实施方案中，ADC的抗体部分经由连接子结合于药物部分，其中连接子包含OSu-间隔子单元-磺酰胺-pAB。在一些实施方案中，间隔子单元包含PEG部分。在一些实施方案中，连接子包含OSu-$(PEG)_3$-三唑-$(PEG)_3$-磺酰胺-pAB。在一些实施方案中，连接子包含OSu-二苯甲基环辛烯-三唑-$(PEG)_3$-磺酰胺-pAB。

[0270] 在各种实施方案中，连接子被设计成在连接子-药物部分和/或单独药物部分进行细胞内化和扩散至相邻细胞后通过裂解促进旁观杀死(相邻细胞的杀死)。在一些实施方案中，连接子促进细胞内化。在一些实施方案中，连接子被设计成使细胞外环境中的裂解减至最少，因此减少对脱靶组织(例如非癌组织)的毒性，同时保持ADC结合于标靶组织，和不表达ADC的抗体部分所靶向的抗原但在表达所述抗原的标靶癌症组织周围的癌组织的旁观杀死。在一些实施方案中，包含顺丁烯二酰亚胺部分(Mal)、聚乙二醇(PEG)部分、缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit或“vc”)和pAB的连接子提供这些功能特征。在一些实施方案中，包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的连接子尤其有效地提供这些功能特征，例如当例如MORAb-003的抗

FRA抗体部分与例如艾日布林的药物部分接合时。在一些实施方案中，在无抗FRA抗体部分和/或无MORAb-003下也可以观察到这些功能特征中的至少一些。举例来说，在一些实施方案中，包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的连接子有效地提供这些功能特征中的一些或所有，例如当例如曲妥珠单抗的抗her2抗体部分与例如艾日布林的药物部分接合时。

[0271] 在一些实施方案中，抗体部分经由包含顺丁烯二酰亚胺部分(Mal)、聚乙二醇(PEG)部分、缬氨酸瓜氨酸(Val-Cit或“vc”)和pAB的连接子结合于药物部分。在这些实施方案中，顺丁烯二酰亚胺部分将连接子-药物部分共价附接于抗体部分，且pAB充当自消耗间隔子单元。这类连接子可以称为“m-vc-pAB”连接子、“Mal-VCP”连接子、“Mal-$(PEG)_2$-VCP”连接子或“Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB”连接子。在一些实施方案中，药物部分为艾日布林。Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林的结构提供于表46中。Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的pAB附接于艾日布林上的C-35胺。

[0272] 已经发现包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林的ADC显示具有合乎需要的特性的特定组合，尤其当与例如MORAb-003的抗FRA抗体或其抗原结合片段配对时。这些特性包括(但不限于)有效水平的药物负载(p～4)、低聚集水平、在存储条件下或当在身体内循环时的稳定性(例如血清稳定性)、保留可与未偶联抗体相比较的对表达标靶的细胞的亲和力、针对表达标靶的细胞的有效细胞毒性、低水平的脱靶细胞杀死、高水平的旁观杀死和/或有效的体内抗癌活性，这些都与使用其它连接子-毒素和/或抗体部分的ADC进行比较。虽然许多连接子选择和间隔子与裂解位点的组合为本领域中已知的且可以提供这些功能类别中的一种或多种的某些益处，但将艾日布林接合于例如抗FRA抗体(例如MORAb-003)的抗体部分的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的特定组合可以为治疗性ADC提供在合乎需要的功能特性范围内良好或优良的特性。在一些实施方案中，由将艾日布林接合于抗体部分的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB连接子的特定组合所提供的良好或优良功能特性可以在此连接子-毒素结合于例如抗her2抗体(例如曲妥珠单抗)下观察到。

[0273] 在一些实施方案中，ADC包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林和包含保留靶向肿瘤细胞且在肿瘤细胞中内化的能力的内化抗体或其抗原结合片段的抗体部分。在一些实施方案中，ADC包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林和靶向表达FRA的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段。在一些实施方案中，靶向表达FRA的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含如Kabat编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:2(HCDR1)、SEQ ID NO:3(HCDR2)和SEQ ID NO:4(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:7(LCDR1)、SEQ ID NO:8(LCDR2)和SEQ ID NO:9(LCDR3)的氨基酸序列；或如IMGT编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列。在一些实施方案中，靶向表达FRA的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中，靶向表达FRA的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。

[0274] 在一些实施方案中，ADC具有式I：

[0275] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0276] 其中：

[0277] (i)Ab为内化抗叶酸受体α(FRA)抗体或其内化抗原结合片段，其包含：如Kabat编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:2(HCDR1)、SEQ ID NO:3(HCDR2)和SEQ ID NO:4(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:7(LCDR1)、SEQ ID NO:8(LCDR2)和SEQ ID NO:9(LCDR3)的氨基酸序列；或如IMGT编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列；

[0278] (ii)D为艾日布林；

[0279] (iii)L为包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子；且

[0280] (iv)p为整数1至20。

[0281] 在一些实施方案中，内化抗体或其内化抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中，内化抗体为MORAb-003。在一些实施方案中，p为1至8或1至6。在一些实施方案中，p为2至8或2至5。在一些实施方案中，p为3至4。在一些实施方案中，p为4。

[0282] 在其它实施方案中，ADC包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林和靶向表达her2的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段。在一些实施方案中，靶向表达her2的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含：如Kabat编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:71(HCDR1)、SEQ ID NO:72(HCDR2)和SEQ ID NO:73(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:74(LCDR1)、SEQ ID NO:75(LCDR2)和SEQ ID NO:76(LCDR3)的氨基酸序列；或如IMGT编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:191(HCDR1)、SEQ ID NO:192(HCDR2)和SEQ ID NO:193(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:194(LCDR1)、SEQ ID NO:195(LCDR2)和SEQ ID NO:196(LCDR3)的氨基酸序列。在一些实施方案中，靶向表达her2的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中，靶向表达her2的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。

[0283] 在一些实施方案中，ADC具有式I：

[0284] Ab-$(L-D)_p$ (I)

[0285] 其中：

[0286] (i)Ab为内化抗人类表皮生长因子受体2(her2)抗体或其内化抗原结合片段，其包含：如Kabat编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:71(HCDR1)、SEQ ID NO:72(HCDR2)和SEQ ID NO:73(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:74(LCDR1)、SEQ ID NO:75(LCDR2)和SEQ ID NO:76(LCDR3)的氨基酸序列；或如IMGT编号系统所定义，三个重链互补决定区(HCDR)，其包含SEQ ID NO:191(HCDR1)、SEQ ID NO:192(HCDR2)和SEQ ID NO:193(HCDR3)的氨基酸序列；和三个轻链互补决定区(LCDR)，其包含SEQ ID NO:194(LCDR1)、SEQ ID NO:195(LCDR2)和SEQ ID NO:196(LCDR3)的氨基酸序列；

[0287] (ii)D为艾日布林;

[0288] (iii)L为包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子;且

[0289] (iv)p为整数1至20。

[0290] 在一些实施方案中,内化抗体或其内化抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,内化抗体为曲妥珠单抗。在一些实施方案中,p为1至8或1至6。在一些实施方案中,p为2至8或2至5。在一些实施方案中,p为3至4。在一些实施方案中,p为4。

[0291] 在其它实施方案中,ADC包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林和靶向表达间皮素(MSLN)的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段。在一些实施方案中,靶向表达MSLN的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含:如Kabat编号系统所定义,三个重链互补决定区(HCDR),其包含SEQ ID NO:65(HCDR1)、SEQ ID NO:66(HCDR2)和SEQ ID NO:67(HCDR3)的氨基酸序列;和三个轻链互补决定区(LCDR),其包含SEQ ID NO:68(LCDR1)、SEQ ID NO:69(LCDR2)和SEQ ID NO:70(LCDR3)的氨基酸序列;或如IMGT编号系统所定义,三个重链互补决定区(HCDR),其包含SEQ ID NO:185(HCDR1)、SEQ ID NO:186(HCDR2)和SEQ ID NO:187(HCDR3)的氨基酸序列;和三个轻链互补决定区(LCDR),其包含SEQ ID NO:188(LCDR1)、SEQ ID NO:189(LCDR2)和SEQ ID NO:190(LCDR3)的氨基酸序列。在一些实施方案中,靶向表达MSLN的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,靶向表达MSLN的肿瘤细胞的内化抗体或其内化抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域和Igκ轻链恒定域。

[0292] 在一些实施方案中,ADC具有式I:

[0293] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0294] 其中:

[0295] (i)Ab为内化抗间皮素抗体或其内化抗原结合片段,其包含:如Kabat编号系统所定义,三个重链互补决定区(HCDR),其包含SEQ ID NO:65(HCDR1)、SEQ ID NO:66(HCDR2)和SEQ ID NO:67(HCDR3)的氨基酸序列;和三个轻链互补决定区(LCDR),其包含SEQ ID NO:68(LCDR1)、SEQ ID NO:69(LCDR2)和SEQ ID NO:70(LCDR3)的氨基酸序列;或如IMGT编号系统所定义,三个重链互补决定区(HCDR),其包含SEQ ID NO:185(HCDR1)、SEQ ID NO:186(HCDR2)和SEQ ID NO:187(HCDR3)的氨基酸序列;和三个轻链互补决定区(LCDR),其包含SEQ ID NO:188(LCDR1)、SEQ ID NO:189(LCDR2)和SEQ ID NO:190(LCDR3)的氨基酸序列;

[0296] (ii)D为艾日布林;

[0297] (iii)L为包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子;且

[0298] (iv)p为整数1至20。

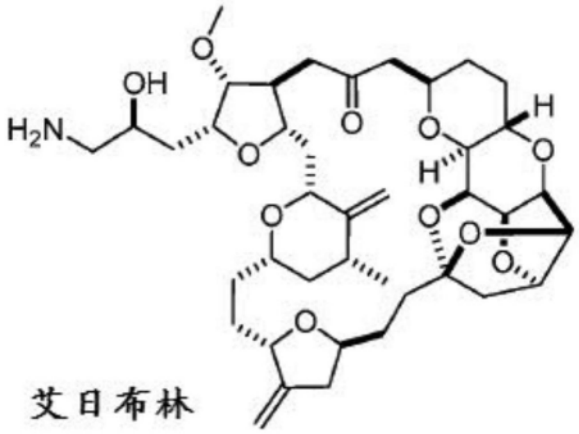
[0299] 在一些实施方案中,内化抗体或其内化抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,内化抗体为MORAb-003、MORAb-009或曲妥珠单抗。在一些实施方案中,p为为1至8或1至6。在一些实施方案中,p为2至8或2至5。在一些实施方案中,p为3至4。在一些实施方案中,p为4。

[0300] 药物部分

[0301] 本文中描述ADC的药物部分(D)可以为任何化学治疗剂。适用类别的化学治疗剂包括例如抗微管蛋白剂。在某些实施方案中，药物部分为抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂的实例包括念珠藻环肽和艾日布林。用于所述ADC的优选药物部分为艾日布林。

[0302] 在各种实施方案中，药物部分为艾日布林。在这些实施方案中，ADC的连接子经由艾日布林上的C-35胺附接。

[0303] 在各种实施方案中，用于接合于连接子和抗体部分的艾日布林的天然形式展示于下文中：

[0304] 

艾日布林

[0305] 在某些实施方案中，作为连接子前体的中间体与药物部分在适当条件下反应。在某些实施方案中，反应基团用于药物和/或中间体或连接子上。药物与中间体之间的反应产物或衍生化药物随后与抗体或抗原结合片段在适当条件下反应。或者，连接子或中间体可以首先与抗体或衍生化抗体反应，然后与药物或衍生化药物反应。

[0306] 许多不同反应可用于将药物和/或连接子共价附接于抗体部分。这常常通过抗体分子的一个或多个氨基酸残基(包括赖氨酸的胺基、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基、半胱氨酸的硫氢基和芳族氨基酸的各种部分)实现。举例来说，可以使用碳化二亚胺反应将化合物上的羧基(或氨基)连接于抗体部分上的氨基(或羧基)，来进行非特异性共价附接。另外，例如二醛或亚氨酸酯的双官能试剂也可以用于将化合物上的氨基连接于抗体部分上的氨基。席夫碱反应(Schiff base reaction)也可以用于将药物附接于结合剂。这种方法包括含有二醇或羟基的药物的过碘酸盐氧化，因此形成醛，接着醛与结合剂反应。经由与结合剂的氨基形成席夫碱，进行附接。异硫氰酸盐也可以用作用于将药物共价附接于结合剂的偶合剂。其它技术为熟练技术人员所知并在本公开的范围内。

[0307] 药物负载

[0308] 药物负载由p表示，且在本文中又称为药物-抗体比率(DAR)。药物负载可以在每一抗体部分1至20个药物部分的范围内。在一些实施方案中，p为整数1至20。在一些实施方案中，p为整数1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2。在一些实施方案中，p为整数2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3。在一些实施方案中，p为整数3至4。在其它实施方案中，p为1、2、3、4、5或6，优选为3或4。

[0309] 药物负载可能受抗体部分上的附接位点数目限制。在一些实施方案中，ADC的连接子部分(L)通过抗体部分上的一个或多个氨基酸残基上的化学活性基团附接于抗体部分。举例来说，连接子可以经由游离氨基、亚氨基、羟基、硫醇或羧基附接于抗体部分(例如N或C

端、一个或多个赖氨酸残基的ε氨基、一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧酸基或一个或多个半胱氨酸残基的硫氢基)。连接子附接的位点可以为抗体部分的氨基酸序列中的天然残基,或其可以例如通过DNA重组技术(例如通过将半胱氨酸残基引入氨基酸序列中)或通过蛋白质生物化学(例如通过还原、pH调整或水解)引入抗体部分中。

[0310] 在一些实施方案中,可以结合于抗体部分的药物部分数目受游离半胱氨酸残基的数目限制。举例来说,在附接为半胱氨酸硫醇基的情况下,抗体可以仅仅具有一个或几个半胱氨酸硫醇基,或可以仅仅具有一个或几个可附接连接子的足够反应性硫醇基。一般来说,抗体不含许多可连接于药物部分的游离和反应性半胱氨酸硫醇基。实际上,抗体中的大多数半胱氨酸硫醇残基呈二硫键形式存在。连接子-毒素过度附接于抗体可能通过将可利用的半胱氨酸残基还原,形成二硫键而使抗体不稳定。因此,在不会使抗体部分不稳定的情况下,最佳药物:抗体比率将增加ADC的效力(通过增加每一抗体的附接药物部分数目)。在一些实施方案中,最佳比率可以为约3-4。

[0311] 在一些实施方案中,通过Mal部分附接于抗体部分的连接子提供约3-4的比率。在一些实施方案中,通过替代部分(例如OSu部分)附接于抗体部分的连接子可以提供次佳比率(例如较低比率,例如约0-3)。在一些实施方案中,包含短间隔子单元(例如短PEG间隔子单元,例如$(PEG)_2$或$(PEG)_4$,或短烷基间隔子单元,例如$(CH_2)_5$)的连接子提供约3-4的比率。在一些实施方案中,包含较长间隔子单元(例如$(PEG)_8$)的连接子可以提供次佳比率(例如较低比率,例如约0-3)。在一些实施方案中,包含肽可裂解部分的连接子提供约3-4的比率。在一些实施方案中,包含替代可裂解部分(例如可裂解二硫化物或可裂解磺酰胺)的连接子可以提供次佳比率(例如较低比率,例如约0-3)。在一些实施方案中,包含接合于抗体、例如抗FRA抗体(例如MORAb-003)的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林的ADC具有约3-4的比率。在一些实施方案中,在包含接合于例如抗her2抗体(例如曲妥珠单抗)的不同抗体的Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林的ADC下观察到约3-4的比率。在一些实施方案中,在包含Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林连接子-毒素的ADC下观察到的最佳比率与抗体无关。

[0312] 在一些实施方案中,抗体部分在结合前暴露于还原条件,以产生一个或多个游离半胱氨酸残基。在一些实施方案中,抗体可以用例如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)的还原剂在部分或总还原条件下还原,产生反应性半胱氨酸硫醇基。未配对半胱氨酸可以通过用有限摩尔当量的TCEP进行部分还原来产生,其优先还原连接轻链与重链(每一H-L配对的一对)和铰链区中的两个重链(在人类IgG1情况下每一H-H配对的两对)的链间二硫键,而使链内二硫键完整(Stefano等人(2013)Methods Mol.Biol.1045:145-71)。在实施方案中,抗体内的二硫键例如通过采用应用交替还原和氧化电压的工作电极来电化学还原。这种方法可以允许二硫键还原在线连接至分析装置(例如电化学检测装置、NMR波谱仪或质谱仪)或化学分离装置(例如液相色谱仪(例如HPLC)或电泳装置(参见例如美国公布No.20140069822))。在某些实施方案中,抗体经受变性条件,以露出例如赖氨酸或半胱氨酸的氨基酸残基上的反应性亲核基团。

[0313] ADC的药物负载可以用不同方式,例如通过以下来控制:(i)限制药物-连接子中间体或连接子试剂相对于抗体的摩尔过量;(ii)限制结合反应时间或温度;(iii)半胱氨酸硫醇修饰的部分还原条件或限制还原条件;和/或(iv)通过重组技术工程化抗体的氨基酸序

列,以便改变半胱氨酸残基的数目和位置,从而控制连接子-药物附接的数目和/或位置。

[0314] 在一些实施方案中,游离半胱氨酸残基引入抗体部分的氨基酸序列中。举例来说,可以制备其中亲本抗体的一个或多个氨基酸经半胱氨酸氨基酸替换的半胱氨酸工程化抗体。因此抗体的任何形式可以进行工程化,即突变。举例来说,亲本Fab抗体片段可以进行工程化以形成称为"ThioFab"的半胱氨酸工程化Fab。类似地,亲本单克隆抗体可以进行工程化,形成"ThioMab"。单位点突变在ThioFab中产生单个工程化半胱氨酸残基,而由于IgG抗体的二聚性,所以单位点突变在ThioMab中产生两个工程化半胱氨酸残基。可以通过本领域中已知的多种方法(参见例如WO 2006/034488中描述的方法)制备编码亲本多肽的氨基酸序列变异体的DNA。这些方法包括(但不限于)通过定点(或寡核苷酸介导)诱变、PCR诱变和早先制备的编码多肽的DNA的盒式诱变。重组抗体的变异体也可以通过限制性片段操纵或通过重叠延伸PCR,利用合成寡核苷酸来构筑。式I的ADC包括(但不限于)具有1个、2个、3个或4个工程化的半胱氨酸氨基酸的抗体(Lyon等人(2012)Methods Enzymol.502:123-38)。在一些实施方案中,在不使用工程化下,一个或多个游离半胱氨酸残基已存在于抗体部分中,在此情况下存在的游离半胱氨酸残基可以用于将抗体部分结合于药物部分。

[0315] 在一些实施方案中,较高药物负载(例如p>5)可引起某些抗体-药物偶联物的聚集、不溶、毒性或细胞渗透性损失。较高药物负载也会负面影响某些ADC的药物代谢动力学(例如清除率)。在一些实施方案中,较低药物负载(例如p<3)会降低某些ADC针对表达标靶的细胞和/或旁邻细胞的效力。在一些实施方案中,本公开的ADC的药物负载在1至约8、约2至约6、约2至约5、约3至约5或约3至约4的范围内。

[0316] 在包含多个拷贝的抗体部分和连接子部分的反应混合物中超过一个亲核基团与药物-连接子中间体或连接子部分试剂、接着药物部分试剂反应的情况下,所得产物可以为ADC化合物的混合物,其中在混合物中分配一个或多个药物部分附接于抗体部分的每个拷贝。在一些实施方案中,由偶联反应产生的ADC的混合物中药物负载在每一抗体部分附接1至20个药物部分的范围内。每一抗体部分的药物部分平均数目(即平均药物负载或平均p)可以通过本领域中已知的任何常规方法,例如通过质谱分析(例如反相LC-MS)和/或高效液相色谱(例如HIC-HPLC)计算。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目通过疏水作用色谱-高效液相色谱(HIC-HPLC)测定。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目通过反相液相色谱-质谱分析(LC-MS)测定。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为约3至约4;约3.1至约3.9;约3.2至约3.8;约3.2至约3.7;约3.2至约3.6;约3.3至约3.8;或约3.3至约3.7。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为约3.2至约3.8。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为约3.8。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为3至4;3.1至3.9;3.2至3.8;3.2至3.7;3.2至3.6;3.3至3.8;或3.3至3.7。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为3.2至3.8。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为3.8。

[0317] 在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为约3.5至约4.5;约3.6至约4.4;约3.7至约4.3;约3.7至约4.2;或约3.8至约4.2。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为约3.6至约4.4。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为约4.0。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均数目为3.5至4.5;3.6至4.4;3.7至4.3;3.7至4.2;或3.8至4.2。在一些实施方案中,每一抗体部分的药物部分平均

数目为3.6至4.4。在一些实施方案中，每一抗体部分的药物部分平均数目为4.0。

[0318] 在各种实施方案中，如关于每一抗体部分的药物部分平均数目使用的术语“约”意指+/-10％。

[0319] 混合物中的个别ADC化合物或“物质”可以通过质谱分析鉴别并通过UPLC或HPLC，例如疏水作用色谱(HIC-HPLC)分离。在某些实施方案中，具有单负载值的均质或几乎均质ADC可以例如通过电泳或色谱从偶联混合物分离。

[0320] 在一些实施方案中，约4的药物负载和/或平均药物负载提供有益的特性。在一些实施方案中，小于约4的药物负载和/或平均药物负载会导致未偶联的抗体物质的水平高至无法接受，未偶联的抗体物质可能与ADC竞争结合于标靶抗原和/或降低治疗功效。在一些实施方案中，超过约4的药物负载和/或平均药物负载可能导致产物非均质性和/或ADC聚集的水平高至无法接受。由于使抗体部分稳定所需的一个或多个化学键损失，所以超过约4的药物负载和/或平均药物负载也会影响ADC的稳定性。

[0321] 在一些实施方案中，ADC具有式I：

[0322] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0323] 其中：

[0324] (i)Ab为内化抗叶酸受体α抗体或其抗原结合片段，其包含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区；

[0325] (ii)D为艾日布林；

[0326] (iii)L为包含$Mal-(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子；且

[0327] (iv)p为整数3至4。

[0328] 在其它实施方案中，ADC具有式I：

[0329] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0330] 其中：

[0331] (i)Ab为内化抗人类表皮生长因子受体2抗体或其抗原结合片段，其包含有包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区；

[0332] (ii)D为艾日布林；

[0333] (iii)L为包含$Mal-(PEG)_2$-Val-Cit-pAB的可裂解连接子；且

[0334] (iv)p为整数3至4。

[0335] 在一些实施方案中，p为4。

[0336] 本公开包括产生所述ADC的方法。简单地说，ADC包含作为抗体部分的抗体或抗原结合片段、药物部分和将药物部分与抗体部分接合的连接子。在一些实施方案中，ADC可以使用具有共价附接于药物部分和抗体部分的反应官能团的连接子制备。举例来说，在一些实施方案中，抗体部分的半胱氨酸硫醇可以与连接子或药物连接子中间体的反应性官能团(例如顺丁烯二酰亚胺部分)形成键，得到ADC。ADC的产生可以通过熟练技术人员已知的任何技术实现。

[0337] 在一些实施方案中，ADC通过抗体部分与连接子和药物部分以相继方式接触而产生，使得抗体部分首先共价连接于连接子，然后预先形成的抗体-连接子中间体与药物部分反应。在接触药物部分前，抗体-连接子中间体可以经受或可以不经受纯化步骤。在其它实

施方案中，ADC通过抗体部分与预先通过连接子与药物部分反应而形成的连接子药物化合物接触来产生。在接触药物部分前，预先形成的连接子-药物化合物可以经受或可以不经受纯化步骤。在其它实施方案中，在一种反应混合物中抗体部分接触连接子和药物部分，允许抗体部分与连接子之间和连接子与药物部分之间同时形成共价键。这种产生ADC的方法可以包括其中在添加连接子至反应混合物前抗体部分接触抗体部分的反应，反之亦然。在某些实施方案中，ADC通过使抗体部分与接合于药物部分的连接子(例如Mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-pAB-艾日布林)在允许偶联的条件下反应而产生。

[0338] 根据上述方法制备的ADC可以经受纯化步骤。纯化步骤可以包括本领域中已知的用于纯化蛋白质的任何生物化学方法或其任何方法组合。这些方法包括(但不限于)切向流过滤法(TFF)、亲和色谱法、离子交换色谱法、基于任何电荷或等电点的色谱法、混合模式色谱法(例如CHT(陶瓷羟磷灰石))、疏水作用色谱法、空间排阻色谱法、渗析法、过滤法、选择性沉淀法或其任何组合。

[0339] 治疗用途和组合物

[0340] 本文中公开使用所公开的ADC治疗受试者的病症，例如肿瘤病症的方法。ADC可以单独或与第二治疗剂组合施用，且可以呈任何药学上可接受的制剂、剂量和给药方案施用。可以针对毒性以及功效的指标评估ADC治疗功效，并相应调整。功效量度包括(但不限于)在体外或体内观察到的细胞抑制和/或细胞毒性作用、肿瘤体积减小、肿瘤生长抑制和/或存活延长。

[0341] 已知确定ADC是否对细胞发挥细胞抑制和/或细胞毒性作用的方法。举例来说，ADC的细胞毒性或细胞抑制活性可以通过以下来测量：将表达ADC的标靶蛋白的哺乳动物细胞暴露于细胞培养基；将细胞培养约6小时至约5天的时期；以及测量细胞活力。基于细胞的体外测定也可以用于测量活力(增殖)、细胞毒性和ADC对细胞凋亡的诱发(卡斯蛋白酶活化)。

[0342] 为了确定抗体-药物偶联物是否发挥细胞抑制作用，可以使用胸苷掺入测定。举例来说，表达标靶抗原的癌细胞可以按96孔板5,000个细胞/孔的密度培养72小时时间段，并在72小时时间段的最后8小时期间，暴露于0.5μCi ^{3}H-胸苷。在ADC的存在和缺乏下测量^{3}H-胸苷在培养物的细胞中的掺入。

[0343] 为了测定细胞毒性，可以测量坏死或细胞凋亡(程序化细胞死亡)。坏死通常伴有质膜的渗透性增加；细胞膨胀，和质膜破裂。细胞凋亡典型的特征为细胞膜起泡，细胞质凝聚，以及内源性核酸内切酶活化。对癌细胞的任一这些作用的确定均指示ADC可用于治疗癌症。

[0344] 细胞活力可以例如通过测定细胞中例如中性红、锥虫蓝、结晶紫或ALAMAR™蓝的染料的吸收来测量(参见例如Page等人(1993)Intl.J.Oncology 3:473-6)。在这类测定中，细胞在含有染料的培养基中孵育，洗涤细胞，并以分光光度法测量剩余染料，此反映了细胞对染料的吸收。在某些实施方案中，使用结晶紫测定来评定所制备的ADC的体外效力。结晶紫为一种积累在活细胞的细胞核中的三芳基甲烷染料。在此测定中，细胞暴露于ADC或对照试剂，历时一段界定时间，接着，细胞用结晶紫染色，用水充分洗涤，接着用1％SDS溶解并以分光光度法读取。结合蛋白质的染料磺基若丹明B(SRB)也可以用于测量细胞毒性(Skehan等人(1990)J.Natl.Cancer Inst.82:1107-12)。

[0345] 细胞凋亡可以例如通过测量DNA断裂来定量。可利用用于体外定量测量定DNA断裂

的商业光度测量法。这类测定的实例包括TUNEL(其检测片段化DNA中标记核苷酸的掺入)和基于ELISA的测定,如Biochemica(1999)第2期,第34-37页(Roche Molecular Biochemicals)中所描述。

[0346] 还可以通过测量细胞中的形态改变来测定细胞凋亡。举例来说,与坏死情况一样,可以通过测量某些染料(例如荧光染料,例如吖啶橙或溴化乙锭)的吸收来测定质膜完整性的丧失。用于测量细胞凋亡细胞数目的方法已经由Duke和Cohen,Current Protocols in Immunology(Coligan等人编,(1992)第3.17.1-3.17.16页)描述。细胞还可以用DNA染料(例如吖啶橙、溴化乙锭或碘化丙锭)标记并观察细胞的染色质凝聚和沿着内核膜的边移。可以进行测量以确定细胞凋亡的其它形态改变包括例如细胞质凝聚、细胞膜起泡增加和细胞收缩。

[0347] 还可以评估所公开的ADC的旁观杀死活性。可以例如通过采用两种细胞系(一种对标靶抗原呈阳性,且一种对标靶抗原呈阴性)的测定,测定旁观杀死活性。细胞系优选进行标记以对其进行区分。举例来说,经Nuclight™绿(NLG)标记的IGROV1细胞(FRA+)和经Nuclight™红(NLR)标记的HL-60(FRA--)可以共同培养,用抗FRA ADC处理,接着监测细胞毒性。当与标靶抗原阳性细胞混合时标靶抗原阴性细胞的杀死表明旁观杀死,而在缺乏标靶抗原阳性细胞下标靶抗原阴性细胞的杀死表明脱靶杀死。

[0348] 在一些方面中,本公开特征在于一种通过破坏微管蛋白来杀死癌细胞或组织、抑制或调节其生长或干扰其代谢的方法。所述方法可以用于其中破坏微管蛋白提供治疗益处的任何受试者。可以受益于破坏微管蛋白的受试者包括(但不限于)患有以下疾病或处于患上以下疾病的风险的受试者:胃癌、卵巢癌(例如浆液性卵巢癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、子宫内膜癌(例如浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、睾丸生殖细胞癌、白血病、淋巴瘤(例如霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤)、骨髓瘤、头颈部癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌(例如胶质母细胞瘤)、甲状腺癌、结肠直肠癌和/或皮肤癌(例如黑素瘤)或其任何转移(Dumontet和Jordan(2010)Nat.Rev.Drug Discov.9:790-803)。在各种实施方案中,所公开的ADC可以施用于表达FRA的任何细胞或组织,例如表达FRA的癌细胞或组织。一种示例性实施方案包括一种抑制FRA介导的细胞信号传导的方法或杀死细胞的方法。所述方法可以用于表达FRA的任何细胞或组织,例如癌细胞或转移病变。表达FRA的癌症的非限制性实例包括胃癌、浆液性卵巢癌、透明细胞卵巢癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、三阴性乳腺癌、子宫内膜癌、浆液性子宫内膜癌、肺类癌和骨肉瘤。表达FRA的细胞的非限制性实例包括IGROV1和OVCAR3人类卵巢癌瘤细胞、NCI-H2110人类非小细胞肺癌细胞和包含编码FRA的重组核酸或其部分的细胞。

[0349] 在各种其它实施方案中,所公开的ADC可以施用于表达her2的任何细胞或组织,例如表达her2的癌细胞或组织。一种示例性实施方案包括一种抑制her2介导的细胞信号传导的方法或杀死细胞的方法。所述方法可以用于表达her2的任何细胞或组织,例如癌细胞或转移病变。表达her2的癌症的非限制性实例包括乳腺癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮细胞癌、食道癌、肺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌(English等人2013)Mol.Diagn.Ther.17:85-99)。表达her2的细胞的非限制性实例包括NCI-N87-luc人类胃癌细胞、ZR75和BT-474人类乳房导管癌细胞和包含编码her2的重组核酸或其部分的细胞。

[0350] 在各种实施方案中，所公开的ADC可以施用于表达间皮素(MSLN)的任何细胞或组织，例如表达MSLN的癌细胞或组织。一种示例性实施方案包括一种抑制MSLN介导的细胞信号传导的方法或杀死细胞的方法。所述方法可以用于表达MSLN的任何细胞或组织，例如癌细胞或转移病变。表达MSLN的癌症的非限制性实例包括间皮瘤、胰腺癌(例如胰腺腺癌)、卵巢癌和肺癌(例如肺腺癌)(Wang等人(2012)PLoS ONE 7:e33214)。表达MSLN的细胞的非限制性实例包括OVCAR3人类卵巢癌细胞、HEC-251人类子宫内膜样细胞、H226人类肺鳞状上皮细胞间皮瘤细胞和包含编码MSLN的重组核酸或其部分的细胞。

[0351] 示例性方法包括使细胞与有效量，即足够杀死细胞的量的如本文中描述的ADC接触的步骤。所述方法可以用于培养的细胞上，例如体外、体内、离体或原位。举例来说，表达FRA、her2和/或MSLN的细胞(例如通过肿瘤或转移病变的活检收集的细胞；来自建立的癌细胞系的细胞；或重组细胞)可以在体外在培养基中培养且可以通过添加ADC至培养基来实现接触步骤。所述方法将杀死表达FRA、her2和/或MSLN的细胞，尤其包括表达FRA、her2和/或MSLN的肿瘤细胞。或者，ADC可以通过任何合适的施用途径(例如静脉内、皮下或直接接触肿瘤组织)施用于受试者以在体内发挥作用。

[0352] 所公开的ADC治疗组合物的体内作用可以在合适的动物模型中进行评估。举例来说，可以使用异种癌症模型，其中癌症外植体或传代异种移植组织引入免疫受损动物，例如裸小鼠或SCID小鼠中(Klein等人(1997)Nature Med.3:402-8)。可以使用测量肿瘤形成的抑制、肿瘤消退或转移等等的测定预测功效。

[0353] 还可以使用评估细胞凋亡的促进的体内测定。在一个实施方案中，可以针对细胞凋亡病灶的存在检查来自载有经治疗组合物处理的肿瘤的小鼠的异种移植物，且与未经处理的载有异种移植物的对照小鼠进行比较。在经处理小鼠的肿瘤中发现细胞凋亡病灶的程度指示组合物的治疗效能。

[0354] 本文中进一步提供治疗癌症的方法。本文中公开的ADC可以施用于非人类哺乳动物或人类受试者以达成治疗的目的。所述治疗方法需向具有肿瘤的哺乳动物施用生物学有效量的ADC，所述ADC包含与结合于所表达的抗原(可结合或位于癌细胞表面上)的靶向抗体连接的所选化学治疗剂(例如艾日布林)。一种示例性实施方案为一种将化学治疗剂递送至表达FRA的细胞的方法，其包括将化学治疗剂与免疫特异性结合于FRA表位的抗体偶联且将细胞暴露于ADC。指示本公开的ADC所针对的表达FRA的示例性肿瘤细胞包括来自胃癌、浆液性卵巢癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺类癌瘤、骨肉瘤、子宫内膜癌和具有浆液状组织学的子宫内膜癌的细胞。

[0355] 另一示例性实施方案为一种将化学治疗剂递送至表达her2的细胞的方法，其包括将化学治疗剂与免疫特异性结合于her2表位的抗体偶联且将细胞暴露于ADC。指示本公开的ADC所针对的表达her2的示例性肿瘤细胞包括来自乳腺癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮细胞癌、食道癌、肺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌的细胞。

[0356] 另一示例性实施方案为一种将化学治疗剂递送至表达MSLN的细胞的方法，其包括将化学治疗剂与免疫特异性结合于MSLN表位的抗体偶联且将细胞暴露于ADC。指示本公开的ADC所针对的表达MSLN的示例性肿瘤细胞包括来自间皮瘤、胰腺癌(例如胰腺腺癌)、卵巢癌和肺癌(例如肺腺癌)的细胞。

[0357] 另一示例性实施方案为一种治疗患有表达ADC的抗体部分的标靶抗原(例如FRA、

her2或MSLN)的癌症或处于患上所述癌症的风险中的患者的方法,其包括向患者施用治疗有效量的本公开的ADC。在一些实施方案中,当抗FRA抗体单独施用时,所述患者对用其治疗不起反应或反应不良,和/或当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,所述患者对用其治疗不起反应或反应不良。在其它实施方案中,当抗her2抗体单独施用时,所述患者对用其治疗不起反应或反应不良,和/或当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,所述患者对用其治疗不起反应或反应不良。在其它实施方案中,当抗MSLN抗体单独施用时,所述患者对用其治疗不起反应或反应不良,和/或当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,所述患者对用其治疗不起反应或反应不良。在其它实施方案中,当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,所述患者对用其治疗不耐受。举例来说,患者可能需要多剂艾日布林治疗癌症,这会引起全身性毒性,这可以通过靶向递送至表达ADC的抗体部分的标靶抗原(例如FRA、her2或MSLN)的癌症克服,因此减少脱靶杀死。

[0358] 另一示例性实施方案为一种减少或抑制表达标靶抗原的肿瘤(例如表达FRA的肿瘤、表达her2的肿瘤或表达MSLN的肿瘤)的生长的方法,其包括施用治疗有效量的ADC。在一些实施方案中,治疗足够减少或抑制患者肿瘤的生长,减少转移病变的数目或尺寸,降低肿瘤负载,降低原发性肿瘤负载,降低侵袭性,延长存活时间,和/或维持或改善生活质量。在一些实施方案中,当抗FRA抗体单独施用时,肿瘤对用其治疗具有抗性或为其难治,和/或当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,肿瘤对用其治疗具有抗性或为其难治。在其它实施方案中,当抗her2抗体单独施用时,肿瘤对用其治疗具有抗性或为其难治,和/或当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,肿瘤对用其治疗具有抗性或为其难治。在一些实施方案中,当抗MSLN抗体单独施用时,肿瘤对用其治疗具有抗性或为其难治,和/或当药物部分(例如艾日布林)单独施用时,肿瘤对用其治疗具有抗性或为其难治。

[0359] 此外,本公开的抗体可以施用于表达ADC能够结合的抗原的用于达成兽医学目的或作为人类疾病动物模型的非人类哺乳动物。关于后者,这类动物模型可用于评估所公开的ADC的治疗效能(例如测试施用剂量和时程)。

[0360] 本文中进一步提供了所公开ADC的治疗用途。一示例性实施方案为ADC的用途,其用于治疗表达标靶抗原的癌症(例如表达FRA的癌症、表达her2的癌症或表达MSLN的癌症)。还公开了用于治疗表达标靶抗原的癌症(例如表达FRA的癌症、表达her2的癌症或表达MSLN的癌症)的ADC。用于鉴别患有表达FRA、her2和/或MSLN的癌症的受试者的方法为本领域中已知的且可以用于鉴别适合用所公开的ADC治疗的患者。

[0361] 另一示例性实施方案为ADC的用途,其用于制造供治疗表达标靶抗原的癌症(例如表达FRA的癌症、表达her2的癌症或表达MSLN的癌症)的药剂的方法。

[0362] 用于实施上述方法的治疗组合物可以被配制成包含适于所需递送方法的药学上可接受的载体的药物组合物。一示例性实施方案为一种药物组合物,其包含本公开的ADC和药学上可接受的载体。合适载体包括在与治疗组合物组合时,保留治疗组合物的抗肿瘤功能且一般不与患者的免疫系统发生反应的任何物质。药学上可接受的载体包括在生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂等等。药学上可接受的载体的实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、丙三醇、乙醇、甲磺酸盐等等中的一种或多种,以及和其组合。在许多情况下,组合物中优选包括等张剂,例如糖、多元醇(例如甘露糖醇、山梨糖醇或氯化钠)。药学上可接受的载体可以进一步包含少量辅助物

质，例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，所述物质增强ADC的存放期或效力。

[0363] 治疗制剂可以溶解且经由能够将治疗组合物递送至肿瘤部位的任何途径施用。潜在有效的施用途径包括(但不限于)静脉内、不经肠、腹膜内、肌肉内、肿瘤内、皮内、器官内、原位等等。治疗蛋白制剂可以冻干且呈无菌粉末，优选在真空下存储，接着在注射前在抑菌水(含有例如苯甲醇防腐剂)中或在无菌水中复原。治疗制剂可以包含ADC或其药学上可接受的盐，例如甲磺酸盐。

[0364] 本文中公开的ADC可以在约0.2mg/kg至约10mg/kg范围内的剂量下施用于有需要的患者。在一些实施方案中，ADC每天、每两月或其间的任何时间段施用于患者。使用上述方法治疗癌症的剂量和施用方案将随方法和目标癌症而变化，且将一般视本领域中了解的许多其它因素而定。

[0365] 已知各种递送系统且可用于施用一种或多种本公开的ADC。施用ADC的方法包括(但不限于)不经肠施用(例如皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下)、硬膜外施用、肿瘤内施用和粘膜施用(例如鼻内和经口途径)。另外，采用经肺施用，可以例如通过使用吸入器或喷雾器，和用雾化剂配制。参见例如以下中所述的经肺施用的组合物和方法：美国专利No.6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078；以及PCT公布No.WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903。ADC可以通过任何适宜途径，例如通过输注或快速注射，或通过经上皮细胞或粘膜皮肤内层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)施用。施用可以为全身性或局部的。

[0366] 本文中公开的治疗组合物可以为无菌的且在制造和存储条件下稳定。在一些实施方案中，一种或多种ADC或药物组合物呈干的杀菌冻干粉末或无水浓缩物供应于密闭容器中，且可以复原(例如用水或盐水)成适当浓度以施用于受试者。优选地，一种或多种预防剂或治疗剂或药物组合物呈干的无菌冻干粉末以至少5mg、至少10 mg、至少15mg、至少25mg、至少35mg、至少45mg、至少50mg、至少75mg或至少100mg或其间任何量供应于密闭容器。在一些实施方案中，冻干ADC或药物组合物在原始容器中存储在2℃与8℃之间。在一些实施方案中，本文中描述的一种或多种ADC或药物组合物呈液体形式供应于密闭容器中，例如指示剂的数量和浓度的容器。在一些实施方案中，所施用组合物的液体形式以至少0.25mg/mL、至少0.5mg/mL、至少1mg/mL、至少2.5mg/mL、至少5mg/mL、至少8mg/mL、至少10mg/mL、至少15mg/mL、至少25mg/mL、至少50mg/mL、至少75mg/mL或至少100mg/mL ADC供应于密闭容器中。液体形式可以在原始容器中存储在2℃与8℃之间。

[0367] 在一些实施方案中，所公开的ADC可以掺入适于不经肠施用的药物组合物中。可注射溶液可以由燧石或琥珀色小瓶、安瓿或预填充注射器或其它已知的递送或存储装置中的液体或冻干剂型构成。

[0368] 本文中描述的组合物可以呈多种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型，例如液体溶液(例如可注射和可输注溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。优选形式视所欲施用模式和治疗应用而定。

[0369] 在各种实施方案中，治疗包括单次推注或经由可接受的给药途径重复施用ADC制剂。

[0370] 可以评估患者的给定样品中标靶抗原的水平(例如表达标靶抗原的细胞的水平)以帮助确定最有效的给药方案等等。一示例性实施方案为一种确定患者是否将对用本公开

的ADC治疗起反应的方法，其包括提供来自患者的生物样品且使生物样品与ADC接触。示例性生物样品包括组织或体液，例如炎症渗出液、血液、血清、肠液、粪便样品或肿瘤活检(例如来源于患有表达标靶抗原的癌症(例如表达FRA的癌症、表达her2的癌症或表达MSLN的癌症)或处于其风险中的患者的肿瘤活检)。在一些实施方案中，样品(例如组织和/或体液)可以从受试者获得，且合适免疫方法可以用于检测和/或测量标靶抗原(例如FRA、her2或MSLN)的蛋白质表达。这类评估还用于达成在整个疗法中监测的目的，且可用于与其它参数的评估组合，估计治疗的成功。

[0371] 在一些实施方案中，ADC的功效可以通过使来自受试者的肿瘤样品与ADC接触且评估肿瘤生长速率或体积来评估。在一些实施方案中，当已确定ADC有效时，其可以施用于受试者。

[0372] 以上治疗方法可以与多种其它手术、化学治疗或放射治疗方案中的任一种组合。

[0373] 本文中还公开了一种或多种所公开的ADC的用途，其用于制造供例如根据上述方法治疗癌症的药剂。在一些实施方案中，本文中公开的ADC用于例如根据上述方法治疗癌症。

[0374] 在各种实施方案中，用于本文中描述的实验室和治疗应用的试剂盒在本公开的范围内。这类试剂盒可以包括被划分成容纳一个或多个容器(例如小瓶、管等等)的载体、包装或容器，每一容器包含用于本文中公开的方法中的单独要素之一，以及包含使用指导(例如本文中描述的用途)的标签或插页。试剂盒可以包括包含药物部分的容器。本公开还提供了一种或多种ADC或其药物组合物，其包装在密闭容器，例如安瓿或药囊中，指示所述剂的量。

[0375] 试剂盒可以包括上述容器和一个或多个与其相联的其它容器，包含从商业和使用者立场合乎需要的物质，包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器；列出使用内容和/或指导的载体、包装、容器、小瓶和/或管标签和关于使用指导的包装说明书。

[0376] 标签可以存在于容器上或与容器一起存在以指示组合物用于特定疗法或非治疗应用，例如预测、预防、诊断或实验室应用。标签也可以指示关于体内或体外使用，例如本文中描述的用途的指导。指导和或其它信息也可以包括在插页或标签上，插页或标签与试剂盒一起包括或包括在试剂盒上。标签可以在容器上或与其相联。当形成标签的字母、数字或其它特性模制或蚀刻至容器自身时，标签可以在容器上。标签可以与也容纳容器的贮器或载体相联，例如呈包装说明书形式。标签可以指示组合物用于诊断或治疗病状，例如本文中描述的癌症。

[0377] 本领域技术人员容易显而易见，本文中描述的本发明的方法的其它合适修改和更改为明显的，且可以使用合适的同等物，在不偏离本发明的范围或本文中公开的实施方案下进行。现详细描述本发明，通过提及以下实施例，将更清楚地了解其，包括所述实施例仅仅是为了达成说明的目的，且不意图进行限制。

[0378] 实施例1

[0379] 1.材料与方法

[0380] 用于制备ADC的MORAb-003来自于货号AA 0312。

[0381] 1.1细胞毒素

[0382] 可偶联细胞毒素的结构展示于表11中。

[0383]

表 11. 可偶联细胞毒素

化合物名称	连接子	细胞毒素	可裂解性	结构
PEG3-Bz-二硫基-二甲基-念珠藻环肽	顺丁烯二酰亚胺基-PEG3-苯甲基-二硫基-二甲基	念珠藻环肽	是	
LL2-念珠藻环肽	LL2	念珠藻环肽	是	
LL3-念珠藻环肽	LL3	念珠藻环肽	是	
VCP-念珠藻环肽	顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-Val-Cit-pAB	念珠藻环肽	是	

[0384]

VCP-艾日布林 (ER-001159569)	顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-Val-Cit-pAB	艾日布林	是
ER-001161318	顺丁烯二酰亚胺基-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (氮丙啶基-美登素-P3)	是
ER-001161319	顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (氮丙啶基-美登素-P3)	是
ER-001159200	顺丁烯二酰亚胺基-$(CH_2)_5$	美登素 DM1	否

[0385]

M-MMAE	顺丁烯二酰亚胺基-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB	单甲基奥瑞他汀 E	是	
NHS-PEG2-AuF	NHS-PEG2	奥瑞他汀 F	否	
M-DM1	SMCC	美登素 DM1	否	
M-0285	PEG-pAB	多司他汀 3	是	还原二硫化物桥接化学
M-0115	Asn-Ala	多司他汀 -5	是	
M-172	环己基	多司他汀	否	还原二硫化物连接化学

[0386]

		3		
M-174	环己基	多司他汀 3	否	还原二硫化物连接化学
M-158	PEG-pAB	多司他汀 10	是	还原二硫化物连接化学
M-0384	PEG-硫醚	多司他汀 14	否	还原二硫化物连接化学
M-0302	PEG-Asn	多司他汀 14	否	还原二硫化物连接化学
M-292	PEG-Asn	多司他汀 14	是	还原二硫化物连接化学
M-0026	PEG	多司他汀 14	是	还原二硫化物连接化学
M-0267	PEG-硫醚	多霉素 7	否	还原二硫化物连接化学
M-0272	Asn-Ala	多霉素 7	是	还原二硫化物连接化学
M-0260	PEG-pAB	多霉素 7	是	还原二硫化物连接化学
M-0276	Asn-Ala	多霉素 7	是	还原二硫化物连接化学
M-015-0913	环己基	多司他汀 3	否	限制性赖氨酸利用
M-030-0132	PEG-pAB	多司他汀 6	是	限制性赖氨酸利用
M-0161	环己基	多司他汀 10	否	限制性赖氨酸利用

[0387]

M-0157	PEG-pAB	多司他汀10	是	限制性赖氨酸利用
M-027-0381	硫醚	多司他汀14	否	限制性赖氨酸利用
M-0025	PEG	多司他汀14	否	限制性赖氨酸利用
M-0301	PEG-Asn	多司他汀14	否	限制性赖氨酸利用
M-030-0011	PEG-pAB	多司他汀14	是	限制性赖氨酸利用
M-030-0291	PEG-Asn	多司他汀14	是	限制性赖氨酸利用
M-0114	PEG-pAB	多司他汀-5	是	还原二硫化物桥接化学

缩写：Ala，丙氨酸；Asn，天冬酰胺；Cit，瓜氨酸；NHS，N-羟基丁二酰亚胺；pAB，对氨基苯甲氧基羰基；PEG，聚乙二醇；SMCC，4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸丁二酰亚胺基酯；Val，缬氨酸；VCP，Val-Cit-pAB。

[0388] 1.2抗体-药物偶联

[0389] 1.2.1使用TCEP部分还原

[0390] MORAb-003的部分还原条件通过改变非硫醇还原剂三(2-羧乙基)膦(TCEP)的浓度、抗体浓度和还原时间来建立。MORAb-003被缓冲液交换成含有1mM乙二胺四乙酸(EDTA)的杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco′s Phosphate-Buffered Saline,DPBS),接着使用离心浓缩,利用10kD分子量截止值(MWCO)离心过滤器浓缩成10mg/mL。将抗体稀释至适当浓度且添加所指示的最终浓度的TCEP,并在室温下轻缓混合1小时。通过根据制造商的方案,使用5或10mL Zeba™旋转脱盐柱,以DPBS/1mM EDTA作为缓冲剂(Thermo Fisher,40kD MWCO)进行脱盐,来去除TCEP。使用硫醇荧光定量试剂盒(Abcam),根据制造商的方案,分析样品的游离硫醇含量。如部分1.3.3中所述,进行非还原条件下的SDS-PAGE分析,以测定二硫键破坏的程度和位置。在一些情况下,脱盐MAb通过在DPBS中稀释而达至1-2mg/mL且经受生物素化,以测定可偶联性和药物比抗体(DAR)比率。将含10mM顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-生物素(Thermo Fisher)的二甲亚砜(DMSO)以10∶1的摩尔比添加至抗体(mAb)且在轻缓搅拌下在室温下孵育4小时。在偶联后,通过使用Zeba™旋转脱盐柱(Thermo Fisher)脱盐,来去除未反应的化合物。接着通过LC-MS分析样品以确定DAR,如部分1.3.4中所详述。

[0391] 1.2.2细胞毒素偶联

[0392] 部分还原的抗体在0.5X DPBS、0.5mM EDTA中达至2.5mg/mL,并充分混合。接着添加有机共溶剂(如果使用)并充分混合。所检查的共溶剂为丙二醇(20％和50％最终浓度)、二甲亚砜(DMSO)(10％)、N,N-二甲基甲酰胺(20％)、N,N-二甲基乙酰胺(20％)和N,N-二甲基丙酰胺(20％)。将经顺丁烯二酰亚胺基修饰的细胞毒素(DMSO中6mM储备液)以1∶6(mAb∶化合物)的摩尔比添加至抗体并充分混合。在轻缓混合下在室温下偶联3.5小时。选择50％下50％丙二醇作为最终有机改性剂且用于所有随后偶联反应。

[0393] 1.2.3纯化

[0394] 使用26/10 HiTrap®脱盐柱(GE Healthcare)纯化偶联抗体,其中色谱在快速蛋白质液相色谱(FPLC)(GE Healthcare)上进行,以去除未反应的顺丁烯二酰亚胺基-细胞毒素和丙二醇。MORAb-003 ADC,包括MORAb-003-mal-VCP-艾日布林(MORAb-202),在DPBS(在FPLC色谱期间配制缓冲液用作操作缓冲液)中配制。

[0395] 1.3生物物理学表征

[0396] 1.3.1 BCA测定

[0397] 将所制备的二喹啉甲酸(BCA)试剂(200μL)添加至25μL连续稀释的ADC或牛γ球蛋白(Thermo Fisher)2mg/mL标准品,并充分混合样品。将样品在37℃下孵育20min。在SpectraMax® M5板式读数器(Molecular Devices)上在595nm下读取板。使用SoftMax® Pro(ver 3.2),利用4参数拟合模型分析数据。

[0398] 1.3.2 SEC-HPLC分析

[0399] 通过尺寸排阻高效液相色谱(SEC-HPLC),使用Agilent 1100分析抗体聚集。mAb在DPBS中稀释至1mg/mL。将抗体(20μL)注射至TSKgel® SuperSW保护柱(4.6mm×3.5cm,4μm孔径,Tosoh Bioscience),接着TSKgel® SuperSW3000柱(4.6mm×30em,4μm孔径),用含有0.15M NaCl和0.05％NaN_3的0.1M磷酸钠(pH 7.4),以0.3mL/min的流速从柱洗脱20min。使用Agilent ChemStation软件分析所有数据。聚集％计算为[$PA_{聚集}/PA_{外}$]×100,其中PA＝

积分峰面积。

[0400] 1.3.3 SDS-PAGE分析

[0401] 用十二烷基硫酸锂(LDS)样品缓冲液使蛋白质样品(0.1-10μg)达至1X。对于未还原样品,在室温下孵育10min,接着进行电泳。对于还原样品,添加二硫苏糖醇(DTT)达至20mM的最终浓度并将样品加热至95℃,历时10min,且置于冰上,接着进行电泳。将样品负载至10孔、12孔或15孔Bis-Tris SDS-PAGE凝胶(Thermo Fisher)上,以1X MOPS或1X MES作为操作缓冲液。在185V(恒定电压)下电泳1小时。凝胶用InstantBlue染色溶液(Expedeon)染色并在水中脱色。在UltraLum凝胶成像系统上使用600nm橙色滤镜进行成像。

[0402] 1.3.4药物抗体比率(DAR)的UPLC/ESI-MS分析

[0403] 使用PNGase F(New England BioLabs)将ADC去糖基化。将G7缓冲液(10μL)和PNGase F(2μL)添加至mAb(90μL,1mg/mL于DPBS中)。反应在Discover微波(CEM)中孵育2个周期:(1)微波功率10W,37℃,10min;接着暂停5min;(2)微波功率2W,37℃,10min。通过添加DTT达至20mM的最终浓度,还原一部分样品,接着在60℃下孵育3min。接着使用Waters Acquity超高效液相色谱(UPLC)和四极飞行时间(Q-Tof)Premier质谱仪分析样品。在65℃下将样品(各0.5-2μg)注射至MassPrep™微型脱盐柱上,以0.05mL/min,从柱洗脱,其中在95%流动相A中平衡5min,10min梯度(5-90%B),和在95%流动相A中再平衡10min。流动相A为含0.1%甲酸的水。流动相B为含0.1%甲酸的乙腈。Q-Tof质谱仪呈正离子电压模式操作,检测在500-4000m/z范围内。源参数如下:毛细管电压,2.25kV(完整抗体)-2.50kV(还原抗体);取样锥电压,65.0V(完整抗体)或50.0V(还原抗体);源温,100℃;脱溶剂温度,250℃;脱溶剂气体流速,550L/小时。使用MassLynx®MaxEnt 1函数将蛋白质峰反卷积。使用下式,将每个未偶联、单偶联和多偶联的重链和轻链质量的相对强度组合以计算整个DAR:

[0404] $2[[I_{LC+1}+2(I_{LC+2})+3(I_{LC+3})+...n(I_{LC+n})]/\Sigma I_{LC}总]+2[[I_{HC+1}+2(I_{HC+2})+3(I_{HC+3})+...n(I_{HC+n})]/\Sigma I_{HC}总]$

[0405] 其中I_{LC+1}为与一种细胞毒素偶联的轻链的质量强度,I_{LC+2}为与两种细胞毒素偶联的轻链的质量强度等等。I_{HC}为来自对应偶联重链的强度,且ΣI_{LC}总和ΣI_{HC}总分别为所有未偶联和偶联轻链和重链的组合强度。

[0406] 1.3.5 HIC-HPLC DAR分析

[0407] 除通过UPLC电喷射离子化(ESI)-MS分析进行DAR分析外,还使用疏水相互作用HPLC(HIC-HPLC)分析MORAb-003-vcp-艾日布林DAR和MORAb-003-0285DAR。将样品注射至TSKgel®Ether-5PW(7.5mm ID×7.5cm,10μM孔径)上,且以0.7mL/min从柱洗脱,其中在100%流动相A中平衡3min,15min梯度(0-100%B),5min保持在100%B中,1min变成100%A,和在100%流动相A中再平衡5min。流动相A为25mM磷酸钠、1.5M硫酸铵pH 7.0。流动相B为25mM磷酸钠、25%异丙醇,pH 7.0。检测在280nm(参考320nm)下进行。通过下式确定DAR:

[0408] $[AUC_{+1}+2(AUC_{+2})+3(AUC_{+3})+...n(AUC_{+n})]/\Sigma AUC_{总}]$

[0409] 其中AUC_{+1}为对应于与一种细胞毒素偶联的ADC的mAb峰的曲线下面积,AUC_{+2}为对应于与两种细胞毒素偶联的ADC的mAb峰的曲线下面积等等。$\Sigma AUC_{总}$为所有峰值的组合曲线下面积。

[0410] 1.4细胞毒性分析

[0411] 1.4.1结晶紫测定

[0412] 将IGROV1(FR^{hi})和SJSA-1(FR^{neg})细胞在96孔组织培养板中在完全生长培养基中以10,000细胞/孔传代培养和接种,在37℃、5%CO_2下孵育过夜(16小时)。通常,测试试剂以1:4在2mL深孔稀释板中连续稀释,起始于1μM(共稀释10次)。将100μL稀释样品添加至细胞板(测试样品的起始浓度为500nM)。板在37℃、5%CO_2下再孵育48小时。将培养基丢弃,用200μL DPBS洗涤板一次,在室温下用50μL 0.2%结晶紫溶液染色15min,接着用自来水大量洗涤。将板进行空气干燥,且用200μL 1%SDS溶液溶解结晶紫。在570nm下读取板。使用GraphPad Prism 6分析数据。使用每孔1,000个细胞的接种密度进行测定且化合物共暴露5天。当需要较短时间暴露时,在4小时后去除含有细胞毒性剂的培养基且在5天孵育前替换为新鲜生长培养基。对于OVCAR3、CaOV3和NCI-H2110,细胞以3,000个细胞/孔接种且与ADC一起孵育5天。对于竞争实验,将滴定的ADC与2μM(最终)未偶联的MORAb-003一起预先孵育,接着与细胞一起孵育。

[0413] 1.4.2旁观杀死测定

[0414] 在开始研究前一天,将Nuclight^{TM}绿(NLG)IGROV1细胞以5,000个细胞/孔接种至96孔圆底板中,接着在室温下在1,000rpm下离心3min,以确保形成细胞团块。将板置于Incucyte Zoom® (EssenBio science)的容器中且在37℃/5%CO_2下孵育过夜。设定程序以每两小时收集细胞生长的影像,且测定核染绿和核染红的细胞的总数以及细胞的相汇合。在实验当天,MORAb-003 ADC或游离药物在完全RPMI培养基中稀释且连续稀释,起始于400nM。将50μL细胞毒素溶液添加至NLG-IGROV1细胞且孵育30min。在孵育期期间,将Nuclight^{TM}红(NLR)HL-60(FR^{neg})细胞用新鲜培养基稀释至2×10^5、1×10^5或5×10^4个细胞/毫升。将50μL单独NLR-HL60细胞悬浮液或培养基添加至NLG-IGROV1孔,接着在室温下在1,000rpm下离心3min,以确保再次形成细胞团块。将板置回Incucyte Zoom(EssenBio science)的容器中且在37℃/5%CO_2下孵育多达5天。通过与未添加ADC或添加单独游离药物的样品相比,使用绿细胞计数,确定NLG-IGROV1的相对细胞生长。除确定红细胞计数外,HL 60的相对细胞生长类似进行。使用Prism (GraphPad)确定NLG-IGROV1与NLR-HL-60的IC_{50}值。

[0415] 1.4.3血清稳定性测定

[0416] 将20μL MORAb-003 ADC与80μL DPBS、正常汇集人类血清(Bioreclamation,货号BRH552911)或正常汇集小鼠血清(Bioreclamation,货号MSE152591)充分混合,且在37℃下孵育0小时、4小时、24小时和48小时。在孵育后,将样品冰冻并存储在-20℃下,直至在细胞毒性和结合测定中进行评估。对于细胞毒性分析,对IGROV1和SJSA-1细胞评估样品,如部分1.4.1中所详述。对于结合评定,使用基于溶液的MSD ECL测定来评估样品。将样品与生物素化的叶酸受体α和磺基-标签抗MORAb-003一起孵育,接着在抗生蛋白链菌素板上捕捉,且使用电化学发光,利用MSD Sector成像器2400检测。

[0417] 2.结果

[0418] 2.1制备MORAb-003 ADC

[0419] 为选择与MORAb-003偶联的连接子与细胞毒素的最佳组合,使用三种方法制备ADC。根据图1中展示的偶联策略,通过用有限摩尔当量的非硫醇还原剂TCEP部分还原,产生未配对半胱氨酸。此策略优先还原连接轻链与重链(每一H-L配对的一对)和铰链区中的两

个重链(在人类IgG1情况下每一H-H配对的两对)的链间二硫键,而使链内二硫键完整。

[0420] 用于制备MORAb-003 ADC的第二偶联策略利用还原二硫化物桥接化学。还原二硫化物桥接化学将在部分还原过程期间释放的半胱氨酸残基的游离硫醇再次桥接,模拟二硫键的作用,因此维持ADC的稳定性和功能。

[0421] 用于制备MORAb-003 ADC的第三个偶联策略采用限制性赖氨酸利用。限制性赖氨酸利用导致非常有限数目的估计70+的暴露溶剂的可用赖氨酸偶联在典型人类IgG分子上,且可能得到相对于涉及半胱氨酸修饰的策略,具有较低均质性的ADC产物的混合物。

[0422] 2.1.1制备VCP-艾日布林用于MORAb-003 ADC

[0423] 使艾日布林(1)(10mg,14μmol)(图2)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(1mL)中,且充分混合。添加N,N-二异丙基乙胺(许尼希氏碱(Hunig′s Base)或iPr_2NEt)(3.6μL,21μmol)和Fmoc-Val-Cit-对氨基苯甲基-对硝基苯酚(Fmoc-VCP-PNP)(2)(16mg,21μmol,Concortis Biosystems,目录号VC1003)。将反应混合物在室温下搅拌4-16小时,使用茚三酮测试试剂盒(Anaspec,目录号25241)监测,直至反应完成。接着将二乙胺(Et_2NH)(0.014mL,0.14mmol)添加至反应混合物,在18-25℃下搅拌2小时,以去除Fmoc保护基。使用茚三酮测试试剂盒监测反应。完成后,溶剂真空蒸发,得到粗VCP-艾日布林(3)(16mg),使用ZOBAX SB-C18柱(5μm,孔径9.4×150mm),在Waters Alliance e2695 HPLC系统上,在含有0.1%甲酸的H_2O-CH_3CN的流动相中,通过15-70%B的梯度纯化。使VCP-艾日布林(3)(16mg)溶解于DMF(1mL)中。添加许尼希氏碱(7.2μL,41μmol)和顺丁烯二酰亚胺基-PEG_2-NHS(4)(9.7mg,27μmol)。在18-25℃下搅拌反应混合物3小时。通过HPLC(H_2O-CH_3CN,含有0.1%甲酸),通过15-70%B的梯度,纯化反应混合物。通过冻干来去除溶剂,得到mal-$(PEG)_2$-Val-Cit-对氨基苯甲氧基羰基(pAB)-艾日布林(mal-$(PEG)_2$-VCP-艾日布林)(5)。

[0424] 2.1.2还原条件优化

[0425] 通过用有限摩尔当量的非硫醇还原剂三(2-羧乙基)膦(TCEP)部分还原,产生未配对半胱氨酸,来制备MORAb-003 ADC。对MORAb-003进行初始研究,其中改变抗体浓度、TCEP浓度和孵育时间,目标为每一抗体分子产生平均4个可偶联位点。使用荧光测定硫醇定量测定,测定游离硫醇位点数目。此分析的结果展示于表12中。还通过SDS-PAGE分析在孵育10min、30min、60min或120min后H-H和H-L键断裂的程度(图3)。对于此分析,将未还原和还原样品负载在SDS-PAGE凝胶上,且在185V下进行电泳1小时。在图3中,泳道M对应于蛋白质标准品。泳道1对应于未经处理的未还原MORAb-003。泳道2对应于在70.6μM TCEP中还原的MORAb-003(5.3mg/mL)。泳道3对应于在141.2μM TCEP中还原的MORAb-003(5.3mg/mL)。泳道4对应于在20μM TCEP中还原的MORAb-003(1.5mg/mL),泳道5对应于在40μM TCEP中还原的MORAb-003(1.5mg/mL)。每个亮带的身分指示在右下凝胶上。“H”指示重链,而“L”指示轻链。

[0426] 表12.MORAb-003的还原条件的优化

[0427]

		10 min		30 min		60 min		120 min	
MORAb-003 浓度 μM (mg/ml)	TCEP 浓度 μM	游离硫醇 μM	每一MAb还原的二硫键	游离硫醇 μM	每一MAb还原的二硫键	游离硫醇 μM	每一MAb还原的二硫键	游离硫醇 μM	每一MAb还原的二硫键
35.3 (5.3)	70.6	215	3.0	247.5	3.5	297.6	4.2	266.8	3.8
35.3 (5.3)	141.2	339	4.8	372.8	5.3	384.2	5.4	479.8	6.8
10 (1.5)	20	13.3	0.7	14.7	0.7	15.2	0.8	14.6	0.7
10 (1.5)	40	21.8	1.1	25.6	1.3	26.9	1.3	27.4	1.4

[0428] SDS-PAGE和硫醇含量的分析表明,5.3mg/mL mAb在TCEP比mAb的4倍摩尔比率下孵育60min提供合理的起始点,因为似乎存在分子内二硫化物的有限还原(如通过游离硫醇含量所确定),且几乎未剩下未还原的mAb(未还原的mAb充当使用制备的ADC的体外和体内研究中的竞争性抑制物)。利用MORAb-003,在5.0mg/mL起始浓度下,进行进一步研究,以使用SDS-PAGE分析证实TCEP比mAb的此优化摩尔比(图4)。图4中,泳道1对应于蛋白质标准品。泳道2对应于未经处理的未还原MORAb-003。泳道3对应于在1:1的MORAb-003:TCEP比率下处理的MORAb-003。泳道4对应于在1:2的MORAb-003:TCEP比率下处理的MORAb-003。泳道5对应于在1:3的MORAb-003:TCEP比率下处理的MORAb-003。泳道6对应于在1:4的MORAb-003:TCEP比率下处理的MORAb-003。在还原和去除TCEP后,还使用顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-生物素进行偶联,以模拟用于ADC制备的细胞毒素的偶联。使用LC-MS进行DAR分析。这些研究的结果提供于表13中。

[0429] 表13.MORAb-003的还原条件的优化-利用顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-生物素的偶联水平

[0430]

TCEP		MORAb-003		
TCEP:mAb	TCEP (μM)	LC	HC	DAR
1	33.3	0.29	0.34	1.26
2	66.7	0.48	0.83	2.62
3	100	0.63	1.21	3.68
4	133.2	0.73	1.70	4.86

[0431] LC,轻链生物素水平;HC,重链生物素水平;DAR,每一mAb的生物素[DAR=2(LC)+2(HC)]

[0432] 在生物素偶联后,游离硫醇分析表明无游离硫醇存在于MORAb-003-生物素中。此表明在还原二硫键后,通常在所产生的两个硫醇处发生偶联,且任何未偶联的经还原的二硫化物进行再氧化,从而重新形成二硫键。选择用于还原以产生ADC的最终条件为5.0mg/mL的抗体浓度、110μM的TCEP浓度和60min的孵育时间。在偶联后此得到DAR为4的mAb。

[0433] 2.1.3 ADC偶联优化

[0434] 因为用于制备ADC的第一个细胞毒素为念珠藻环肽(一种疏水性化合物),所以用在特定位置具有两个可用于偶联的未配对半胱氨酸(每一轻链一个)的“替代”抗人类间皮

素抗体进行初始偶联优化实验。此大大地促进了质谱分析对偶联效率的分析，因为仅仅需要分析轻链。在顺丁烯二酰亚胺基-LL3-念珠藻环肽偶联于替代抗体期间进行丙二醇的滴定，接着通过LC-MS分析轻链的偶联效率(表14)。

[0435] 表14.偶联反应中丙二醇浓度的优化

[0436]

丙二醇(%)	偶联的 Ab LC (%)
0	8 %
20	48 %
50	100 %

LC 质量: 未偶联, 23536 Da; 偶联, 24367 Da。

[0437] 50％丙二醇引起可利用位点全部被占据，且被选择用作最终浓度进行使用。在偶联后未观察到mAb偶联的损失(数据未示)，表明丙二醇对抗体无有害作用。因此，所选的最终偶联反应条件为2.5mg/mLmAb最终、0.5X DPBS(添加丙二醇后最终浓度)中顺丁烯二酰亚胺基-连接子-细胞毒素:mAb的6:1摩尔比、0.5mM EDTA、50％丙二醇，pH 7.2，在室温下3.5-4小时。在这些反应中，在添加顺丁烯二酰亚胺基-连接子-细胞毒素前添加丙二醇。

[0438] 2.1.4制备ADC和生物物理学表征

[0439] 部分2.1.2中描述的所建立的还原和偶联条件用于制备表15中所列的前10个MORAb-003 ADC。除M-MMAE和M-DM1外，通过还原二硫化物桥接或限制性赖氨酸利用，制备剩余ADC。通过Concortis Biosystems公司制备M-MMAE和M-DM1，且呈偶联形式接收。

[0440] 还原二硫化物桥接化学将在部分还原过程期间产生的游离硫醇桥接，使每一还原二硫化物得到一种细胞毒素。理论上，DAR＝4的抗体将H-L与铰链二硫化物再桥接，提供稳定性和均质性均超过传统偶联方法的ADC。限制性赖氨酸利用导致非常有限数目的估计70+的暴露溶剂的可用赖氨酸偶联在典型人类IgG分子上。使用此方法制备的MORAb-003偶联物得到2.0的DAR，表明每一H-L对利用单个赖氨酸。

[0441] 通过HiPrep 26/10脱盐色谱纯化所有ADC并配制至DPBS中。通过LC-MS，在所有制备的ADC上进行DAR分析，且通过SEC-HPLC测定聚集水平。这些DAR和聚集分析的结果列于表15中，紧邻各别ADC。

[0442] 表15.MORAb-003 ADC的生物物理学分析

[0443]

	化合物名称	DAR	聚集(%)
1	PEG3-Bz-二硫基-二甲基-念珠藻环肽	3.7 - 3.9	29
2	LL2-念珠藻环肽	3.2	18 - 36
3	LL3-念珠藻环肽	3.2 - 3.7	22 - 36
4	VCP-念珠藻环肽	3.4	50
5	VCP-艾日布林	3.6	0 - 2.6
6	ER-001161318	3.5	3.2
7	ER-001161319	3.5	3.1
8	ER-001159200	2.8	
9	M-MMAE	4.0	2
10	NHS-PEG2-AuF	5.0	
11	M-DM1	3.6	1.8
12	M-0285	4.0	1.2
13	M-0115	4.0	0.4
14	M-172	3.1	3.6
15	M-174	2.8	4.4
16	M-158	4.5	3.8
17	M-0384	4.2	4.2
18	M-0302	4.3	3.3
19	M-292	4.0	4.5
20	M-0026	4.2	3.3
21	M-0267	4.0	2.9
22	M-0272	3.3	1.5
23	M-0260	3.2	1
24	M-0276	4.6	6.2
25	M-015-0913	2.0	<1
26	M-030-0132	2.0	<1
27	M-0161	2.1	2.4
28	M-0157	2.0	<1
29	M-027-0381	2.0	<1
30	M-0025	2.0	1.7
31	M-0301	2.0	1.4
32	M-030-0011	2.0	<1
33	M-030-0291	2.0	<1
34	M-0255	3.6	5.9

[0444]

35	M-0114	4.0	3.9

[0445] 所有ADC的DAR值都在预先确定的范围内(3与4之间的DAR)。基于念珠藻环肽的ADC的聚集水平显著高于所需(>10%),而基于艾日布林(VCP艾日布林)和基于美登素的顺丁

烯二酰亚胺基-连接子-细胞毒素(ER-001161318、ER-001161319和M-MMAE)都证明可接受的聚集水平。使用VCP-念珠藻环肽,对与MORAb-003的偶联反应,进行其它有机共溶剂的研究。所测试的共溶剂为DMSO(10%)、N,N-二甲基甲酰胺(20%)、N,N-二甲基乙酰胺(20%)和N,N--二-甲基丙酰胺(20%)。使用这些共溶剂进行偶联后的聚集水平均等于或高于50%丙二醇。

[0446] 对ADC子集进行非还原SDS-PAGE分析(图5)。因为确定所有这些ADC的DAR为4,所以认为这些ADC作为约160kD的完整IgG迁移,这是因为H-L与两个铰链的二硫化物都应再桥接。此ADC子集包括M-MMAE(泳道2)、M-DM1(泳道3)、M-0026(泳道4)、M-0260(泳道5)、M-0267(泳道6)、M-0272(泳道7)、M-0285(泳道8)、M-292(泳道9)、M-027-0381(泳道10)和M-0384(泳道11)(图5)。图5中,泳道1对应于蛋白质标准品。

[0447] 由此分析清楚,对于还原二硫化物桥接化学ADC(泳道4-9、11),除完整ADC外,存在显著H-L单价物质(80kD)。此表明除链间铰链桥接外,还存在显著的链内铰链二硫化物桥接。SEC-HPLC分析指示ADC作为单一完整IgG迁移,这表明对于具有链内H-H桥接的那些ADC,在最终ADC中重链非共价缔合。

[0448] 2.2MORAb-003 ADC的体外效力分析

[0449] 2.2.1对IGROV1和SJSA-1细胞的细胞毒性

[0450] 如部分1.4.1中所详述,使用结晶紫测定来评定所制备的ADC的体外效力。

[0451] 在IGROV1($FR^{hi(+++)}$)和SJSA-1($FR^{neg(-)}$)细胞上,对所有MORAb-003 ADC进行初始筛选。IGROV1细胞来源于人类卵巢上皮癌,且表达高水平的叶酸受体α(FR)-MORAb-003的标靶抗原。SJSA-1细胞为对叶酸受体α呈阴性的人类骨肉瘤肿瘤细胞系。还在CaOV3(人类卵巢癌,$FR^{med(++)}$)、NCI-H2110(人类非小细胞肺癌,$FR^{med(++)}$)和/或OVCAR3(人类卵巢癌,$FR^{med(++)}$)细胞中进行所选ADC的筛选。此筛选的结果提供于表16中。

[0452] 表16.在各种肿瘤细胞系上MORAb-003 ADC的细胞毒性(IC_{50})筛选

[0453]

化合物名称	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
PEG3-Bz-二硫基-二甲基-念珠藻环肽	0.067	0.41			
LL2-念珠藻环肽	0.023	4.7	0.33		
LL3-念珠藻环肽	0.086	12.7	0.19		0.094
VCP-念珠藻环肽	0.03	~100	0.02		
VCP-艾日布林	0.054	>100	3.7	0.73	0.16
ER-001161318	0.26	>100	3.1		
ER-001161319	0.49	>100	11.3		
ER-001159200	6.5	>100	9.2		
M-MMAE	0.2	253			
NHS-PEG2-AuF	0.2	>500			
M-DM1	55	132			
M-0285	0.3	>100		14	8.8
M-0115	0.54	>100			
M-172	>500	>500			
M-174	>500	>500			
M-158	>500	>500			
M-0384	2.25	2.45			
M-0302	330	>500			
M-292	1.7	>500			
M-0026	1.38	540			
M-0267	0.029	0.028			
M-0272	0.252	1.02			
M-0260	0.383	0.036			
M-0276	0.43	30			

[0454]

M-015-0913	>500	>500			
M-030-0132	>500	17.3			
M-0161	>500	>500			
M-0157	>500	>500			
M-027-0381	14.5	28			
M-0025	>500	>500			
M-0301	>500	>500			
M-030-0011	61.6	>500			
M-030-0291	>500	105			
M-0255	0.12	0.46			
M-0114	144	>100			

[0455] 所有值都为IC_{50},以nM为单位,且为进行的重复实验的平均值。

[0456] VCP-艾日布林ADC对IGROV1细胞有效(54pM)且对SJSA-1细胞很少杀死。对于这些细胞系,相对于具有同等DAR值的ADC,例如M-MMAE和M-DM 1,VCP-艾日布林ADC证明高效力和特异性。VCP-艾日布林ADC还证明对卵巢(CaOV3和OVCAR3)和非小细胞肺癌(NC-H2110)来源的其它表达FR的肿瘤细胞系具有有效细胞毒性。

[0457] ADC VCP-艾日布林、LL2-念珠藻环肽、LL3-念珠藻环肽、VCP-念珠藻环肽、ER-001161318、ER-001161319和ER-001159200在CaOV3($FR^{med(++)}$)细胞中呈现特异性细胞毒性(>2-log特异性)。许多这些ADC呈现低于纳米摩尔的效力。念珠藻环肽偶联物还证明在IGROV1细胞中高效力水平(23pM-86pM),但除VCP-念珠藻环肽外,还证明对SJSA-1细胞的可测量的细胞毒性。可裂解美登素偶联物ER-001161318和ER-001161319对IGROV1(0.26nM和0.49nM)具有中等效力且对SJSA-1细胞的脱靶杀死很少。

[0458] 所有限制性赖氨酸利用偶联物未证明特异性且不作进一步评估。使用多司他汀-3(M-0285)、多司他汀-5(M-0115)和多司他汀-14(M-292和M-0026)的还原二硫化物桥接技术的可裂解偶联物都证明对IGROV1细胞系的特异性细胞毒性,其中对SJSA-1细胞系的细胞毒性很小。多司他汀-3和多司他汀-5偶联物(奥瑞他汀衍生物)的效力比多司他汀-14偶联物(美登素衍生物)略高。效力和特异性与使用Val-Cit-pAB(VCP)连接子附接于单甲基E的M-MMAE偶联物可比。不可裂解的还原二硫化物化学偶联物都缺乏足够效力或特异性,且不作进一步分析。

[0459] 2.2.2对表达人类叶酸受体的卵巢癌细胞系CaOV3的细胞毒性

[0460] 还在人类卵巢肿瘤细胞系OVCAR3和CaOV3上,以及人类NSCLC细胞系NCI-H2110上测定所选MORAb-003 ADC的效力(表16)。在人类卵巢细胞系CaOV3上,念珠藻环肽偶联物证明比VCP-艾日布林偶联物可测量得高的效力,不像在IGROV1细胞中所观察到。这可能归因于与IGROV1相比较,CaOV3细胞上叶酸受体α的表达水平较低,或与艾日布林相比,念珠藻环肽在这些细胞上的效力较高。基于美登素的偶联物ER-001161318、ER-001161319和ER-001159200的效力都类似于或低于VCP-艾日布林。

[0461] 2.3VCP-艾日布林、ER-001161318和M-0285的旁观杀死

[0462] 为评定旁观杀死活性,使用两种标记细胞系建立测定。在此测定中,经Nuclight™绿标记的IGROV1细胞(FR^{hi})和经Nuclight™红标记的HL-60(FR^{neg})以不同细胞数目比率共同培养,且用MORAb-003 ADC VCP-艾日布林、ER-001161318或M-0285的滴定液处理。VCP-艾日布林为包含顺丁烯二酰亚胺基-PEG_2-Val-Cit-pAB可裂解连接子的基于艾日布林的ADC,而ER-001161318为包含顺丁烯二酰亚胺基-$(CH_2)_5$-Val-Cit-pAB可裂解连接子的基于美登素的ADC,且M-0285为包含PEG-pAB可裂解连接子的基于多司他汀的ADC。通过Incucyte Zoom®细胞成像器监测细胞毒性。此旁观者细胞毒性分析的结果展示于表17和图6A-6C中。

[0463] 表17.VCP-艾日布林对FR阳性与FR阴性细胞系的共同培养物的旁观杀死活性

[0464]

EC_{50} (nM)			
IGROV-1	HL-60	HL-60 (与 IGROV-1 共同培养)	HL-60 (艾日布林)
0.0005972	39.74	0.2399	0.1702

[0465] 当HL-60(FR^{neg})细胞与IGROV1(FR^{hi})细胞以2:1比率培养时,用MORAb003-VCP-艾日布林处理引起与单独HL-60细胞相比杀死增加2-log(表17和图6A)。这些数据表明当与FR标靶阳性细胞共同培养时,MORAb003-VCP-艾日布林更有效地杀死叶酸受体α(FR)标靶阴性细胞,本文中称为旁观杀死。将旁观杀死与脱靶杀死相区分,脱靶杀死的定义为在缺乏与标靶阳性细胞共同培养下且不依赖于与标靶阳性细胞共同培养,独立杀死标靶阴性细胞。所观察到的旁观杀死增加也与在用游离艾日布林处理HL-60细胞后观察到的增加几乎一致,表明旁观作用的潜在机制。不希望受任何理论束缚,在FR阳性IGROV1细胞中或接近FR阳性IGROV1细胞中,MORAb003-VCP-艾日布林可裂解,所述细胞还经历细胞凋亡且释放游离艾日布林至培养物中。所释放的细胞毒素可以杀死FR阴性HL-60细胞。

[0466] 相比之下,对MORAb003-ER-001161318仅观察到轻微移动(图6B),且对于MORAb003-0285未观察到移动(图6C)。相对于单独HL-60细胞,对于MORAb003-ER-001161318,当HL-60:IGROV1比率从2:1降至1:2时,观察到HL-60细胞的可测量杀死,而对于MORAb003-0285,旁观作用虽然可检测但仍然低。这些数据表明,就旁观杀死而言,所评估的MORAb-003 ADC可以排列为VCP-艾日布林>ER-001161318>M-0285。

[0467] 2.4血清稳定性分析

[0468] 假定ADC在体内具有长循环半衰期且在细胞毒素释放在循环中的情况下可能具有毒性,ADC应显示在血清中稳定。MORAb-003 ADC VCP-艾日布林、ER-001161319和M-0285在人类或小鼠血清中在37℃下预先孵育多达48小时,接着在细胞毒性测定中使用IGROV1和SJSA-1细胞评估。ER-001161319为包含与VCP-艾日布林相同的连接子(顺丁烯二酰亚胺基-PEG_2-Val-Cit-pAB)的基于美登素的ADC。包括PBS和血清对照以校正血清对测定效能的任何作用。此研究的结果展示于表18中。

[0469] 表18.所选MORAb-003 ADC的血清稳定性

[0470]

		基于细胞的细胞毒性测定，EC_{50}，nM								
		MORAb003-VCP 艾日布林			MORAb003-ER001161319			MORAb003-0285		
	时间	PBS	人类血清	小鼠血清	PBS	人类血清	小鼠血清	PBS	人类血清	小鼠血清
IGROV1	0小时-PBS	0.021	0.013	0.02	0.28	0.15	0.2	0.074	0.089	ND
	0小时-血清	0.022	0.014	0.01	0.15	0.15	0.2	0.063	0.078	0.049
	4小时	0.03	0.018	0.019	0.14	0.17	0.25	0.065	0.075	0.049
	24小时	0.024	0.019	ND	ND	0.27	0.9	0.059	0.074	0.044
	48小时	0.022	0.021	0.03	0.21	0.73	2.56	0.043	0.05	0.051
SJSA-1	0小时-PBS	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	0小时-血清	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	4小时	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	24小时	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	48小时	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

[0471] 阴影方框指示效力从T＝0样品显著降低

[0472] 虽然VCP-艾日布林和M-0285在任一血清中至少稳定48小时，但ER-001161319显示在48小时后效力显著下降。这可能归因于氮丙啶基-氨基甲酸酯与美登素的连接，这在先前文献中未曾描述。所释放的化合物的形式可能效力不高，因为在SJSA-1细胞上未看见细胞毒性增加。

[0473] 2.5利用MORAb003-VCP-艾日布林的体外研究

[0474] 2.5.1 DAR和产物非均质性的HIC-HPLC分析

[0475] 通过HIC-HPLC分析MORAb003-VCP-艾日布林和MORAb003-0285以通过另一方法评估DAR且检查产物非均质性和未偶联抗体(竞争者)的含量。展示MORAb003-VCP-艾日布林具有0、2、4和6的DAR物质，此与用于还原和偶联的方法一致(图7A)。观察到极低量的DAR＝0物质。基于AUC计算，整体DAR为3.80，符合LC-MS测定的值。通过HIC-HPLC，MORAb003-0285呈单

峰迁移,这表明单个DAR物质(图7B)。此分配为DAR 4.0。

[0476] 2.5.2通过竞争测定确定的特异性

[0477] 使用竞争测定格式,针对VCP-艾日布林偶联物,证明MORAb-003-VCP-艾日布林细胞毒性的抗原特异性(图8)。在此实验中,MORAb-003-VCP-艾日布林的滴定液(起始浓度100nM)与2μM未偶联的MORAb-003共同孵育。未偶联的MORAb-003在IGROV1细胞上效力变化2-log,类似于在KB细胞上在IMGN853(来自Immunogen的抗人类叶酸受体α-美坦生ADC,现在处于II期临床试验中)下获得的结果(Moore等人,2015 American Society of Clinical Oncology(ASCO)Annual Meeting,Abstract 5518)。

[0478] 2.5.3对NCI-H2110NSCLC细胞的细胞毒性

[0479] 使用结晶紫测定,进行MORAb003-VCP-艾日布林和MORAb003-0285对人类NSCLC细胞系NCI-H2110的细胞毒性。此测定的结果展示于表16中。MORAb003-VCP-艾日布林具有0.73nM的IC_{50},而MORAb003-0285具有14nM的IC_{50}。

[0480] 2.6体内研究

[0481] 2.6.1 CD-1小鼠品系中MORAb-003-VCP-艾日布林(MORAb-202)的最大耐受剂量(MTD)

[0482] 根据表19中的时程,将未处理CD-1小鼠静脉内注射200μL MORAb-202。在给药当天给药前、给药后24小时和其后一周三次测量体重。在整个研究持续时间期间观察动物的临床健康。给药两周后,测量终点体重且记录。在研究结束时处理处死的小鼠(以及在研究期间有任何小鼠处死或发现死亡的情况下)进行尸体解剖。检查器官的组织损伤征象。

[0483] 表19.研究设计

[0484]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
1	3	媒介物*	0	单次推注	i.v.
2		MORAb-202	10		
3			20		
4			40		
5			80		

[0485] 与PBS处理的对照组相比,在任何处理组中都未观察到显著体重损失,或在处理期间未观察到指示毒性的任何临床发现。个别小鼠的体重展示于表20中,且组平均数和SEM展示于表21中。每组的体重改变动力学(组平均数和SEM)展示于图9中。MORAb-202在多达80mg/kg的剂量下经由快速静脉内施用未产生毒性。因此,MTD超过80mg/kg。

[0486]

表 20

Rx后天数	PBS对照			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg			MORAb-202 80mg/kg		
	AWT	AW2	AW3	BW1	BW2	BW3	CW1	CW2	CW3	DW1	DW2	DW3	EW1	EW2	EW3
0	22.30	20.60	21.20	22.60	23.60	21.20	27.40	28.20	23.70	23.90	23.20	21.70	27.90	28.60	25.80
1	20.80	21.50	22.00	22.80	21.80	20.30	28.80	27.50	23.40	23.80	21.60	21.40	25.10	27.60	27.20
2	21.30	21.50	22.00	21.55	24.70	22.90	29.30	28.00	22.10	23.60	24.80	21.80	23.30	28.50	26.30
4	23.30	21.90	22.20	23.30	23.90	23.30	30.20	31.60	23.30	24.40	24.70	22.70	27.65	29.60	28.80
7	23.90	23.10	22.70	24.80	25.20	24.90	28.80	32.00	24.00	25.10	25.50	23.60	25.90	30.40	30.10
9	24.60	22.50	22.80	24.90	25.30	25.50	30.50	31.70	23.40	25.80	24.20	21.70	25.30	31.00	30.20
11	24.20	21.40	23.20	24.30	26.10	24.30	31.00	33.40	23.80	25.30	25.00	23.60	25.10	29.10	28.40
14	24.00	23.50	24.40	25.80	24.90	25.70	33.20	32.40	24.10	25.70	25.30	23.70	25.40	28.40	28.90

表 21

注射后天数	PBS			MORAb-202 10 mg/kg			MORAb-202 20mg/kg			MORAb-202 40mg/kg			MORAb-202 80mg/kg		
	平均值 (g)	sem	n	平均值 (g)	sem	n	平均值 (g)	sem	n	平均值	平均值 (g)	n	平均值	平均值 (g)	n
0	21.4	0.6	3	22.6	0.5	3	24.9	2.0	5	23.9	0.5	3	24.7	1.5	5
1	22.2	0.6	3	25.2	0.3	3	25.9	2.5	3	22.9	0.7	3	26.2	1.6	5
2	22.4	0.5	3	23.4	0.3	3	26.8	2.4	3	23.3	0.8	3	25.6	1.7	3
4	22.4	0.5	3	25.5	0.2	3	28.1	2.5	5	23.7	0.5	3	27.2	1.9	5
7	23.2	0.4	3	25.0	0.1	3	28.5	2.4	3	24.7	0.6	3	27.9	2.3	5
9	23.3	0.7	3	25.1	0.1	3	28.6	2.6	3	24.9	0.6	3	28.3	2.3	3
11	23.6	0.3	3	24.6	0.3	3	29.1	2.7	3	24.7	0.5	3	27.2	2.1	3
14	24.0	0.3	3	25.7	0.1	3	29.9	2.9	3	25.8	0.5	3	26.3	2.3	5

[0487] 2.6.2 CD-1小鼠中艾日布林的最大耐受剂量

[0488] 根据表22中的时程,将未处理CD-1小鼠静脉内注射200μL艾日布林。包括在每次给

药当天给药前和每次给药后24小时，一周三次测量体重。在整个研究持续时间期间观察动物的临床健康(最后一次给药后两周)。测量终点体重且记录。在研究结束时处理处死的小鼠(以及在研究期间有任何小鼠处死或发现死亡的情况下)进行尸体解剖。检查器官的组织损伤征象。

[0489] 表22.研究设计

[0490]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
1	3	PBS	0	q4d×3	i.v.
2		艾日布林	0.4		
3			0.8		
4			1.6		
5			3.2		

[0491] 在使用q4d×3给药方案(每四日一次，共3剂)，施用多达1.6mg/kg剂量的艾日布林的动物中未观察到体重显著损失或指示毒性的临床发现。根据相同程序，施用3.2mg/kg在第二剂后诱发所有三只小鼠中竖毛。与PBS处理的对照相比，观察到严重重量损失(第二剂后一只小鼠中23％损失，#552；第三剂后其余中17％和8％，#551和#552)。在尸体解剖期间未观察到小鼠器官的宏观改变。个别小鼠的体重展示于表23中，且组平均数和SEM展示于表24中。每组的体重改变动力学(组平均数和SEM)展示于图10中。

[0492] 使用q4d×3给药方案，多达1.6mg/kg剂量的艾日布林未产生毒性，而3.2mg/kg诱发严重重量损失。因此，此研究中艾日布林的MTD为1.6mg/kg，q4d×3。

[0493]

表 23

天数	PBS			艾日布林 0.4mg/kg			艾日布林 0.8mg/kg			艾日布林 1.6mg/kg			艾日布林 3.2mg/kg		
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3	C:Y1	C:Y2	C:Y3	D:Y1	D:Y2	D:Y3	E:Y1	E:Y2	E:Y3
0	25.85	24.40	23.40	24.80	24.00	23.15	25.90	25.30	25.15	25.90	24.40	23.75	24.30	25.50	22.65
1	28.15	24.30	24.90	27.94	24.05	22.45	28.05	24.90	24.45	27.15	24.15	24.35	27.31	23.47	20.55
4	25.85	25.55	24.45	22.75	24.00	24.00	23.80	24.40	24.55	25.75	24.10	23.28	22.98	22.20	17.85
5	29.45	24.85	24.55	22.30	24.10	23.45	24.10	24.00	24.85	25.50	24.50	24.10	23.50	22.75	16.80
8	27.50	25.75	24.80	23.50	25.70	25.25	24.00	24.80	25.50	27.95	24.85	24.28	27.85	25.95	9003 死
9	27.65	25.50	24.45	22.95	23.45	25.45	24.70	25.35	25.35	25.80	24.80	24.25	28.20	23.65	
11	27.50	25.85	24.45	22.60	25.95	25.85	24.70	25.10	25.05	22.25	25.70	24.70	28.05	25.30	
13	27.45	26.80	25.45	23.70	23.85	25.80	25.50	25.60	25.80	22.85	25.85	25.28	27.45	25.70	
16	27.30	25.80	26.25	24.70	24.10	26.75	25.45	25.90	26.45	25.40	26.70	26.10	28.80	24.30	
18	27.60	27.45	27.30	24.30	24.95	27.90	26.25	26.70	27.90	24.70	27.95	25.20	25.95	25.90	
20	28.10	27.65	28.05	24.30	25.70	28.05	25.45	27.20	28.10	25.45	29.05	28.05	25.85	28.05	

各列表示个别动物。

*9003：重量损失>20%，处死。

表 24

注射后天数	PBS			艾日布林 0.4mg/kg			艾日布林 0.8mg/kg			艾日布林 1.6mg/kg			艾日布林 3.2mg/kg		
	平均值 (g)	sem	n	平均值 (g)	sem	n	平均值 (g)	sem	n	平均值	平均值 (g)	n	平均值	平均值 (g)	n
0	24.8	0.9	3	23.4	0.6	3	24.8	0.5	3	23.9	0.7	3	23.8	0.9	3
1	25.9	1.2	3	22.8	0.7	3	23.7	0.4	3	23.1	1.0	3	22.1	0.8	3
4	25.0	0.3	3	23.6	0.4	3	24.2	0.2	3	23.0	0.7	3	20.2	1.4	3
5	25.2	0.6	3	23.3	0.5	3	24.3	0.3	3	23.4	0.9	3	20.2	1.7	3
8	25.9	0.9	3	24.1	0.6	3	24.9	0.6	3	23.5	0.8	3	22.9	0.9	2
9	25.8	0.9	3	23.9	0.8	3	24.7	0.4	3	23.6	0.9	3	21.8	1.1	2
11	25.8	0.9	3	24.0	0.9	3	25.3	0.4	3	24.2	1.0	3	21.7	1.3	2
13	26.5	0.6	3	24.7	0.8	3	25.8	0.4	3	24.6	0.9	3	23.6	0.9	2
16	26.8	0.3	3	25.2	0.8	3	25.9	0.3	3	25.4	1.0	3	24.0	0.3	2
18	27.2	0.1	3	25.7	1.1	3	27.4	0.6	3	26.3	0.9	3	25.9	0.0	2
20	27.4	0.5	3	26.8	0.9	3	27.2	0.9	3	26.8	1.1	3	26.4	0.5	2

[0494] 2.6.3 CB17-SCID小鼠中hNSCLC NCI-H2110模型中MORAb003-VCP-艾日布林(MORAb-202)的最低有效剂量的评估

[0495] 将人类NSCLC NCI-H2110细胞第47继代皮下植入30只CB17 SCID小鼠(雌性,5至6周龄,重20克)中。移植14天后,小鼠随机化至五个组。在处理当天(第0天)每组中的平均肿瘤体积在154-175mm^3之间的范围内(表27)。根据研究设计,招募小鼠用MORAb003-VCP-艾日布林(MORAb-202)(货号NB2900-87E 10/07/15)以1、2.5或5mg/kg处理,或用MORAb-003-0285(货号042--150-002)作为对照以5mg/kg处理,或用PBS处理(表25)。当组中任何动物的肿瘤体积＞2000mm^3时,从所述研究去除每组。最后一组在第61天终止。

[0496] 表25.研究设计

[0497]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
1	5	PBS	0	单次推注	i.v.
2	5	MORAb-003-VCP-艾日布林	1		
3	5	MORAb-003-VCP-艾日布林	2.5		
4	4[1]	MORAb-003-VCP-艾日布林	5		
5	5	MORAb003-0285	5		

[1] 此组中四只小鼠。一只小鼠由于处理注射误差而从此组排除，这通过基于电化学发光免疫测定(ECLIA)数据，动物血清中缺少化合物来证实。

[0498] 个别小鼠中的肿瘤体积展示于表26中,且组平均数和SEM展示于表27中。每组的肿瘤生长动力学(组平均数和平均值的标准误差,SEM)展示于图11中,且个别小鼠中的肿瘤体积以及组平均数和SEM展示于图12中。基于第17天肿瘤体积(当观察到第一肿瘤体积＞2000mm^3时),MORAb-202在1mg/kg下引起肿瘤生长抑制(TGI)47％(对比盐水,p＝0.002),在2.5mg/kg下TGI 96％(对比盐水,p＜0.0001)。然而,在处理结束后一至两周,消退的肿瘤重新生长。在用5mg/kg MORAb-202处理的小鼠中未检测到肿瘤。在单个剂量处理后超过60天,这些小鼠保持无肿瘤。MORAb-003-0285在5mg/kg下引起TGI 89.7％(对比盐水,p＜0.0001)。

[0499] 个别小鼠的体重展示于表28中,且组平均数和SEM展示于表29中。每组的体重改变动力学(组平均数和SEM)展示于图13中。

[0500] 与对照相比,在任一处理组中,未观察到显著体重损失。

[0501] MORAb-202对NCI-H2110肿瘤生长展示显著影响。通过在2.5mg/kg下推注处理,实现肿瘤消退,TGI为94％(对比PBS)。因此,MORAb-202的最低有效剂量为2.5mg/kg,在此模型中测试。通过5mg/kg的单个剂量实现肿瘤完全根除。超过60天,未观察到肿瘤生长。

[0502]

表26. 肿瘤体积

随机化后天数	PBS				MORAb-202 1mg/kg				MORAb-202 2.5 mg/kg				MORAb-202 5mg/kg				003-0285 5mg/kg			
0	164	195	137	300	80	178	218	133	118	150	187	189	92	120	236	110	202	159	146	65	208	241	243	97
3	368	413	279	587	171	178	207	104	106	216	144	97	65	69	148	40	115	68	68	83	259	358	292	164
5	327	481	285	555	190	161	193	83	95	215	75	51	37	35	56	14	52	22	37	54	160	168	239	105
6	467	758	541	894	275	257	258	139	160	348	61	52	58	33	57	7	28	25	20	43	197	235	247	129
7	642	815	621	1055	395	317	306	182	167	476	64	54	53	36	57	8	48	16	20	52	192	255	266	128
10	891	1238	895	1328	662	506	494	230	285	708	24	37	35	15	71	0	0	0	0	39	155	240	181	86
12	993	1274	983	1519	1115	638	655	371	361	865	40	21	51	9	69	0	0	0	0	32	106	206	223	83
14	981	1410	1131	1695	971	848	812	402	418	901	41	30	37	0	89	0	0	0	0	31	115	235	157	79
17	1320	1723	1319	2089	1466	955	980	727	592	946	46	33	64	0	161	0	0	0	0	28	114	346	251	74
19						838	1030	856	602	953	56	37	90	0	282	0	0	0	0	27	144	438	359	94
24											102	37	197	0	702	0	0	0	0	46	391	1244	824	187
26											168	102	319	0	790	0	0	0	0	103	564	1470	1030	287
28											269	54	474	9	990	0	0	0	0	125	703	1898	1112	375
31											362	105	558	13	1187	0	0	0	0	225	1144	2427	1413	657
33											496	124	588	9	1461	0	0	0	0					
35											573	212	669	16	1847	0	0	0	0					
38											764	348	952	20	2367	0	0	0	0					
40																0	0	0	0					
42																0	0	0	0					
45																0	0	0	0					
47																0	0	0	0					
52																0	0	0	0					
54																0	0	0	0					
59																0	0	0	0					
61																0	0	0	0					

每列代表个别动物。

[0503]

表 27

随机化后天数	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2.5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-003-0285 5mg/kg		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
0	175.2	36.41527	5	159.4	17.68781	5	164.8	25.8917	5	154.25	16.95792	4	170.8	37.46065	5
3	363.6	69.3831	5	162.2	24.14101	5	104.6	17.7581	5	72.75	13.88661	4	231.2	48.4055	5
5	367.6	66.21275	5	149.4	26.13343	5	50.8	7.242607	5	31.25	7.500133	4	145.2	31.14683	5
6	587	108.7468	5	232.4	37.74183	5	52.2	5.005179	5	20	4.140008	4	170.2	37.81015	5
7	705.6	109.7441	5	289.6	55.74694	5	52.8	4.611415	5	23	7.76666	4	178.6	40.08123	5
10	1002.8	122.532	5	444.6	85.61518	5	36.4	9.499597	5	0	0	4	140.2	35.30937	5
12	1176.8	100.25	5	578	95.18355	5	38	10.62087	5	0	0	4	130	36.5513	5
14	1237.6	138.8994	5	676.2	109.4307	5	39.4	14.30871	5	0	0	4	123.4	34.69758	5
17	1583.4	146.0629	5	840	76.78507	5	60.8	27.09899	5	0	0	4	162.6	58.96373	5
19				855.8	72.16584	5	93	49.35207	5	0	0	4	212.4	79.06236	5
24							207.6	127.8177	5	0	0	4	538.4	219.5123	5
26							275.8	138.3498	5	0	0	4	690.8	249.2466	5
28							359.2	177.874	5	0	0	4	842.6	310.8641	5
31							445	208.4929	5	0	0	4	1173.2	373.2365	5
33							535.6	255.2269	5	0	0	4			
35							663.4	318.1881	5	0	0	4			
38							890.2	402.5237	5	0	0	4			
40										0	0	4			
42										0	0	4			
45										0	0	4			
47										0	0	4			
52										0	0	4			
54										0	0	4			
59										0	0	4			
61										0	0	4			

[0504]

表 28

随机化后天数			PBS			MORAb-202 1mg/kg				MORAb-202 2.5 mg/kg					MORAb-202 5mg/kg					MORAb-003-0285 5mg/kg				
0	19.1	18.2	18.4	18.9	18.8	19.1	18.6	19.3	20.6	18.4	17.8	18.1	18	19.8	16.3		17.6	18.7	16.1	19.7	20.5	17.4	18	17.4	18.8
3	19.6	18.2	18.9	18.9	19.3	19.3	18.4	20.2	20.9	18.6	18.4	19.1	18.6	19.9	16.4		17.5	18.8	15.9	19.9	20.8	17	18.1	16.3	18.5
6	19.7	18.4	18.4	19.1	19.1	19	18.3	20.3	21.3	19	18.5	19.4	18.7	20	16.4		17.5	19.3	16.3	19.6	20.8	17.7	18.2	16.8	18.7
7	19.7	18	18.9	18.8	18.9	18.9	18	20	21.2	18.9	18.7	18.7	18.7	19.7	16.5		17.4	19.4	16.5	19.2	20.6	17.7	18.5	16.8	19
10	19.7	18	19.2	18.5	19.1	18.4	18	20.1	20.9	19	19.3	19.7	18.8	19.8	16.6		17.6	19.4	16.7	20	20.5	18.2	18.6	17.5	20.3
12	19.8	17.7	19.1	18.4	19	18.3	17.8	20.5	20.9	19.5	18.9	20	19.7	20.2	17.2		17.9	19.6	16.9	20.2	20.4	18.3	18.8	18.1	20.4
14	18.8	17.4	18.4	18.2	17.5	17.9	17.7	20.3	21.2	19.9	18.8	19.6	19	19.3	17		17.5	19.3	17	19.2	20	18.2	18.9	18.4	19.7
17	18.8	17.2	18.3	17.5	17.2	17.4	17.7	20.4	20.7	19.2	18.8	19.8	19.7	19.2	17.3		17.9	20	17.3	19.7	19.8	17.9	18.9	18.6	19.5
19						16.7	17.2	19.9	20.7	18.9	18.3	19.8	18.7	19.5	16.8		18.1	20	17.1	20.2	19.7	18	19.3	18.4	19.6
24											18.8	20.2	19.2	19.9	16.9		18.5	20.7	17.5	20.2	20.1	18.5	20	19.1	18.9
26											18.9	19.6	18.9	19.5	16.5		18.3	20.7	17.6	19.7	20.6	18.4	19.9	18.6	19.1
28											18.8	19.6	19.5	19.6	16.6		18.6	21.3	17.6	20.1	20.8	18.5	19.9	18.8	19.5
31											18.9	20.1	19.6	20.7	17		18.6	20.4	17.9	20.9	20.7	18.2	20.9	19.6	19.5
33											18.9	19.8	19.4	21.2	17.6		18.8	19.6	18.2	21.3					
35											19.2	19.7	19.5	20.7	17.4		18.7	20.2	18.1	19.6					
38											19.6	20	19.7	20.6	18		18.8	20.4	19	17.2					
40																	19.4	20.4	18.7	19.3					
42																	19.9	20.4	18.8	20.6					
45																	19.8	21	18.3	21.7					
47																	19.7	20.7	18.3	21.1					
52																	20.2	21.1	18.5	21.9					
54																	20.3	21.4	18.6	22.6					
59																	20	21.6	18.8	21.7					
61																	20.5	22.1	19.2	21.3					

[0505]

表 29

随机化后天数	PBS			MORAb-202 1mg/kg			MORAb-202 2.5mg/kg			MORAb-202 5mg/kg			MORAb-003-多司他汀 5mg/kg		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
0	18.68	0.165239	5	19.2	0.385328	5	18	0.554902	5	18.025	0.689078	4	18.42	0.578982	5
3	18.98	0.234959	5	19.48	0.47393	5	18.48	0.579842	5	18.025	0.769253	4	18.14	0.76975	5
6	18.94	0.245739	5	19.58	0.537015	5	18.6	0.609565	5	18.175	0.694839	4	18.44	0.667108	5
7	18.86	0.268971	5	19.4	0.549488	5	18.46	0.525953	5	18.125	0.628577	4	18.52	0.638721	5
10	18.9	0.29444	5	19.28	0.537015	5	18.84	0.585996	5	18.425	0.68618	4	19.02	0.590063	5
12	18.8	0.352933	5	19.4	0.600608	5	19.2	0.545849	5	18.65	0.678513	4	19.2	0.502108	5
14	18.06	0.267112	5	19.4	0.685817	5	18.74	0.454832	5	18.25	0.523801	4	19.04	0.352368	5
17	17.8	0.320373	5	19.08	0.673649	5	18.96	0.451533	5	18.725	0.592675	4	18.94	0.33497	5
19				18.68	0.764423	5	18.62	0.527655	5	18.85	0.670634	4	19	0.338521	5
24							19	0.579498	5	19.225	0.663539	4	19.32	0.313137	5
26							18.68	0.563279	5	19.075	0.621135	4	19.32	0.41086	5
28							18.82	0.573795	5	19.4	0.728103	4	19.5	0.407939	5
31							19.26	0.636533	5	19.45	0.638148	4	19.78	0.484329	5
33							19.38	0.585826	5	19.475	0.60047	4			
35							19.3	0.536644	5	19.15	0.416401	4			
38							19.58	0.430983	5	18.85	0.584918	4			
40										19.45	0.314619	4			
42										19.925	0.359691	4			
45										20.2	0.665164	4			
47										19.96	0.549137	4			
52										20.425	0.651414	4			
54										20.725	0.758819	4			
59										20.525	0.620064	4			
61										20.775	0.552051	4			

[0506] 2.6.4 CB17-SCID小鼠中hNSCLC NCI-H2110模型中艾日布林的最低有效剂量的评估

[0507] 将人类NSCLC H2110细胞第46继代皮下植入30只CB17SCID小鼠(雌性,5至6周龄,重20克)。移植11天后,小鼠随机化至五个组。排除五只肿瘤体积最偏离平均数的动物。在处理当天(第0天)每组中的平均肿瘤体积在87.6-89.4mm^{3}之间的范围内(表32)。根据研究设计,招募的小鼠用0.05、0.2、0.8或1.6mg/kg艾日布林(货号N1201193)或PBS处理(表30)。当在组内第一次观察到肿瘤体积>2000mm^{3}时,分别终止每组。在第38天(最后一次给药后30天)终止研究。

[0508] 表30.研究设计

[0509]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
1	5	PBS	0	q4d×3	i.v.
2		艾日布林	0.05		
3			0.2		
4	4*		0.8		
5	5		1.6		

[0510] 个别小鼠中的肿瘤体积展示于表31中,且组平均数和SEM展示于表32中。每组的肿瘤生长动力学(组平均数和SEM)展示于图14中,且第24天(当在PBS处理小鼠中观察到肿瘤体积>2000mm^{3}时)个别小鼠中的肿瘤体积以及组平均数和SEM展示于图15中。0.05mg/kg下艾日布林引起TGI 50.5%(未观察到肿瘤消退)(对比盐水,p=0.0026);0.2、0.8或1.6mg/kg下TGI约99%(当与盐水相比时。所有三组,p值<0.0001)。诱发肿瘤消退的最低有效剂量为0.2mg/kg。然而,这些小鼠中多数消退肿瘤(0.2mg/kg组中3/5,0.8mg/kg组中4/5,和1.6mg/kg组中2/5)在整个研究持续时间期间(最后一次给药后30天)重新生长或仍然可测量。

[0511] 个别小鼠的体重展示于表33中,且组平均数和SEM展示于表34中。每组的体重改变动力学(组平均数和SEM)展示于图16中。

[0512] 与盐水处理的对照组相比,在任一处理组中,未观察到显著体重损失。在处理期间未观察到指示毒性的临床发现。

[0513] q4d×3i.v.施用的0.2mg/kg和更高剂量的艾日布林展示显著影响H2110肿瘤生长。实现肿瘤消退。当施用较低剂量(0.05mg/kg)时,未实现肿瘤消退。因此,此研究中测试的最低有效剂量为0.2mg/kg。

[0514]

表 31

第一次给药后之天数	媒介物					艾日布林 0.05mg/kg					艾日布林 0.2mg/kg					艾日布林 0.8mg/kg					艾日布林 1.6mg/kg				
0	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
3	62	179	219	236	173	175	149	117	161	64	68	62	52	79	61	54	55	40	51	33	50	44	44	44	47
5	80	255	436	283	257	231	157	228	261	132	60	60	48	90	51	32	29	34	42	25	25	22	32	24	24
7	111	433	440	472	446	357	171	269	247	102	48	47	39	49	47	26	34	17	21	24	19	12	31	15	11
10	230	555	747	622	489	370	200	413	376	226	33	39	28	36	47	17	22	19	5	21	15	0	29	14	0
12	263	677	722	877	620	539	265	448	350	135	19	41	23	13	14	15	23	16	12	24	13	0	14	0	0
17	720	959	960	1158	885	725	514	751	620	531	0	0	0	0	13	17	38	0	0	26	0	0	0	0	0
19	862	1314	940	1097	941	869	437	908	776	837	27	39	29	29	16	0	20	18	0	27	0	0	19	0	0
24	1886	2308	1854	2760	1671	712	718	1489	1225	1040	0	15	19	23	11	14	0	20	0	33	18	0	19	0	0
26											0	24	0	11	14	0	8	14	14	15	8	0	17	0	0
28											0	7	0	14	83	0	16	20	14	17	0	0	16	0	0
31											0	16	0	10	31	0	10	15	26	29	11	0	17	0	0
33											0	27	0	13	22	0	13	8	18	44	8	0	28	0	0
35											0	19	0	16	42	0	13	0	22	50	14	0	17	0	0
38											0	19	0	14	45	0	11	13	13	54	11	0	20	0	0

[0515]

表 32

第一次给药后之天数	PBS			艾日布林 0.05mg/kg			艾日布林 0.2mg/kg			艾日布林 0.8mg/kg			艾日布林 1.6mg/kg		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
0	89.4	9.34	5	87.6	8.18	5	88.2	12.56	5	88.6	10.02	5	88.4	8.11	5
3	173.8	30.31	5	133.2	19.74	5	64.4	4.45	5	46.6	4.31	5	45.8	1.20	5
5	262.2	56.43	5	201.8	24.37	5	61.8	7.43	5	32.4	2.83	5	25.4	1.72	5
7	380.4	67.55	5	229.2	43.40	5	46	1.79	5	24.4	2.83	5	17.6	3.62	5
10	528.6	85.83	5	317	43.21	5	36.6	3.17	5	16.8	3.07	5	11.6	5.42	5
12	631.8	101.42	5	347.4	70.14	5	22	5.07	5	18	2.34	5	5.4	3.30	5
17	936.4	70.46	5	628.2	48.40	5	2.6	2.60	5	16.2	7.39	5	0	0.00	5
19	1030.8	80.29	5	765.4	84.75	5	28	3.65	5	13	5.50	5	3.8	3.79	5
24	2095.8	195.76	5	1036.8	149.24	5	13.6	3.94	5	13.4	6.26	5	7.4	4.53	5
26							9.8	4.54	5	10.2	2.83	5	5	3.37	5
28							20.8	15.74	5	13.4	3.48	5	3.2	3.19	5
31							11.4	5.77	5	16	5.29	5	5.6	3.55	5
33							12.4	5.53	5	16.6	7.45	5	7.2	5.42	5
35							15.4	7.72	5	17	9.22	5	6.2	3.82	5
38							15.6	8.25	5	18.2	9.25	5	6.2	4.05	5

[0516]

表 33

第一次给药后之天数	媒介物					艾日布林 0.05mg/kg					艾日布林 0.2mg/kg					艾日布林 0.8mg/kg					艾日布林 1.6mg/kg				
0	18.5	16.7	19.1	20.4	19.6	19.1	16.4	18.6	20.1	17.9	18.2	18.5	16.7	19.8	18.9	18.6	17.8	18.4	17.8	18.1	18.2	18.3	19.4	16.3	19.0
3	18.8	16.6	19.6	20.9	20.0	19.4	17.1	18.5	20.4	18.7	18.6	18.5	16.9	19.6	19.8	18.8	18.0	18.4	18.1	19.0	17.8	18.3	20.1	15.8	19.6
5	18.8	16.8	19.3	21.2	20.0	19.4	16.5	18.4	20.4	19.4	18.5	19.1	16.9	20.2	20.1	18.9	18.1	18.5	17.6	18.2	18.1	18.1	19.5	16.0	19.3
7	18.6	16.5	19.3	21.2	19.8	19.4	16.3	18.7	20.3	19.1	18.5	18.5	17.1	19.6	20.7	19.1	18.1	19.0	17.8	19.0	18.1	18.2	19.5	16.3	19.4
8	18.3	16.7	18.8	21.1	19.6	19.3	16.3	18.4	20.4	19.4	18.6	19.1	17.0	19.6	19.9	19.2	18.0	19.0	17.7	18.8	18.0	18.3	20.1	16.2	19.4
9	18.4	16.4	18.5	21.0	19.5	18.8	16.1	18.6	19.9	19.1	18.3	20.0	16.8	19.5	19.5	19.2	17.7	18.5	17.5	18.5	17.4	18.0	19.6	15.8	19.4
10	19.0	17.2	19.2	21.6	20.3	19.7	16.3	19.4	20.5	20.0	18.7	19.4	17.1	20.0	20.1	19.0	17.7	18.9	17.8	19.1	18.1	18.5	21.0	16.1	20.0
12	19.0	15.9	18.5	21.3	19.2	18.8	15.9	18.6	19.6	19.7	18.3	19.3	16.9	19.7	19.9	18.9	17.8	19.0	17.8	19.0	18.0	18.8	20.5	16.3	20.1
17	18.8	15.5	17.8	20.4	18.3	17.5	16.0	18.5	18.0	19.7	19.0	19.3	17.4	20.5	20.0	19.2	18.0	18.8	18.1	19.1	19.0	19.2	21.0	16.4	19.4
19	18.9	15.6	17.2	20.6	18.1	17.8	16.3	18.4	18.0	19.4	19.1	19.0	17.1	21.1	21.0	19.1	17.7	19.4	18.7	19.1	19.1	19.5	21.1	16.3	19.8
24	18.2	15.8	17.4	20.3	18.2	18.8	16.5	18.8	17.4	18.0	19.3	20.2	18.8	21.7	22.0	20.1	18.5	20.3	19.1	20.3	19.4	20.6	21.7	18.1	20.7
26											19.8	20.9	18.6	22.0	20.4	20.3	18.1	19.9	19.3	20.9	19.5	20.7	21.6	18.3	20.6
28											20.1	20.6	18.1	21.5	21.0	20.3	17.8	20.2	19.6	20.6	19.6	20.3	21.2	17.6	21.1
31											18.7	20.1	18.7	22.0	21.2	20.1	18.2	20.3	19.5	20.7	19.8	20.4	21.9	18.1	21.9
33											20.0	20.3	18.4	22.2	21.8	20.2	18.3	21.0	19.2	20.2	20.1	19.9	21.7	17.9	20.7
35											19.5	20.1	18.7	22.1	21.4	20.1	17.8	21.0	19.3	20.3	20.3	18.2	21.8	18.2	20.9
38											19.8	20.8	18.3	21.6	21.6	20.4	18.1	21.4	19.4	21.2	20.0	21.0	21.9	18.4	20.3

各列表示个别动物。

[0517]

表 34

第一次给药后之天数		PBS		艾日布林 0.05mg/kg			艾日布林 0.2mg/kg			艾日布林 0.8mg/kg			艾日布林 1.6mg/kg		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
0	18.9	0.62	5	18.4	0.62	5	18.4	0.51	5	18.1	0.16	5	18.2	0.53	5
3	19.2	0.73	5	18.8	0.54	5	18.7	0.51	5	18.5	0.19	5	18.3	0.75	5
5	19.2	0.73	5	18.8	0.66	5	19.0	0.60	5	18.3	0.22	5	18.2	0.62	5
7	19.1	0.77	5	18.8	0.67	5	18.9	0.60	5	18.6	0.27	5	18.3	0.58	5
10	18.9	0.72	5	18.8	0.69	5	18.8	0.51	5	18.5	0.29	5	18.4	0.67	5
12	18.8	0.76	5	18.5	0.65	5	18.8	0.59	5	18.3	0.30	5	18.0	0.69	5
17	19.5	0.73	5	19.2	0.74	5	19.1	0.55	5	18.5	0.32	5	18.7	0.84	5
19	18.8	0.86	5	18.5	0.68	5	18.8	0.56	5	18.5	0.28	5	18.7	0.77	5
24	18.2	0.79	5	17.9	0.60	5	19.3	0.53	5	18.6	0.24	5	19.0	0.73	5
26							19.5	0.74	5	18.8	0.30	5	19.2	0.79	5
28							20.4	0.63	5	19.7	0.36	5	20.1	0.62	5
31							20.3	0.56	5	19.7	0.48	5	20.1	0.57	5
33							20.3	0.59	5	19.7	0.50	5	20.0	0.66	5
35							20.1	0.66	5	19.8	0.43	5	20.4	0.71	5
38							20.5	0.68	5	19.8	0.47	5	20.1	0.62	5

[0518] 实施例2

[0519] 1.材料与方法

[0520] 通过将MORAb-003(人源化抗人类叶酸受体α)偶联于实施例3的部分1.1中描述的MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001159569)化合物来合成MORAb003-VCP-艾日布林(MORAb-202)。偶联方法描述于实施例4的部分1.4.1中。

[0521] 1.1肿瘤模型

[0522] 用于MORAb-202的另外体外评估的人类肿瘤细胞系包括IGROV1(人类卵巢癌,$FR^{hi(+++)}$)、OVCAR3(人类卵巢癌,$FR^{med(++)}$)、NCI-H2110(人类非小细胞肺癌,$FR^{med(++)}$)、A431-A3(经人类间皮素转染的A431亲本细胞系,$FR^{lo(+/-)}$)、SJSA-1(人类骨肉瘤,$FR^{neg(-)}$)和HL-60(人类白血病,$FR^{neg(-)}$)。所有这些细胞系都直接从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)获得。对于体内研究,非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌和子宫内膜癌患者来源的异种移植小鼠模型分别在Oncotest GmbH(Freiburg,Germany)、Oncodesign(Dijon,France)和EPO Berlin-Buch GmbH(Berlin,Germany)建立和维持。

[0523] 1.2体外细胞毒性分析

[0524] 1.2.1结晶紫测定

[0525] 将IGROV1($FR^{hi(+++)}$)、A431-A3($FR^{lo(+/-)}$)和SJSA-1($FR^{neg(-)}$)细胞在96孔组织培养板中在完全生长培养基中以10,000细胞/孔传代培养和接种,在37℃、5%CO_2下孵育过夜(16小时)。通常,测试试剂以1:4在2mL深孔稀释板中连续稀释,起始于1μM(共稀释10次)。将100μL稀释样品添加至细胞板(测试样品的起始浓度为100nM)。板在37℃、5%CO_2下再孵育48小时。将培养基丢弃,用200μL DPBS洗涤板一次,在室温下用50μL 0.2%结晶紫溶液染色15min,接着用自来水大量洗涤。将板进行空气干燥,且用200μL 1%SDS溶液溶解结晶紫。在570nm下读取板。使用GraphPad Prism 6分析数据。对于OVCAR3($FR^{med(++)}$)和NCI-H2110($FR^{med(++)}$),细胞以3,000个细胞/孔接种且与MORAb-202一起孵育5天。

[0526] 1.3体内研究

[0527] 1.3.1 NCI-H2110异种移植模型

[0528] 动物准备:图养CB17 SCID小鼠(雌性,6周龄),每一通风笼5只小鼠。动物可随意取食灭菌食物颗粒和水瓶。在肿瘤移植前,使动物适应新环境5-7天。

[0529] 细胞培养:将NCI-H2110细胞从冰冻原料(NB2813-65)解冻且在5%CO_2中在37℃下在补充有10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养基中培养。继代两次后,在汇合大约70%后,通过使用细胞解离溶液收获细胞,用无血清培养基洗涤两次且计数。

[0530] 肿瘤移植:将含细胞悬浮液的无血清培养基与冰冷基质胶以1:1(v:v)混合,达至1.0×10^8个细胞/毫升的最终浓度。每只小鼠皮下注射100μL 1.0×10^7个细胞/小鼠的混合物。27G针用于所有注射。监测小鼠的临床健康,且通过数字卡尺每周测量肿瘤三次,在移植后第3天开始。使用下式计算肿瘤体积(mm^3):W(mm)×L(mm)×D(mm)×π/6。当肿瘤达至约100mm^3(平均>70至约130mm^3)时,动物随机化至每组4-5只。排除5只肿瘤体积最偏离平均数的动物。

[0531] 研究设计:根据研究设计(表35),在随机化当天,招募的实验小鼠静脉内注射200μL媒介物或1.0、2.5和5mg/kg的MORAb-202。在给药前测量体重,且在研究期间每周测量两次。在研究结束时,测量终点体重且记录。当个别肿瘤体积超过2000mm^3时,处死动物。在达到最大允许肿瘤体积前的早期终止标准包括:(1)肿瘤溃烂大于肿瘤的50%(v:v);(2)瘫痪;(3)体重损失>20%;和(4)组内50%动物适宜终止。在上述终止程序后,处理在研究期

间处死或发现死亡的任何小鼠。

[0532] 表35.研究设计

[0533]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
1	5	媒介物	0	单次推注	i.v.
2		MORAb-202	1		
3			2.5		
4			5		

[0534] 1.3.2患者来源的异种移植(PDx)模型

[0535] 1.3.2.1非小细胞肺癌(NSCLC)PDx模型:LXFA-737(Oncotest)

[0536] 肿瘤移植:从裸小鼠中连续继代的LXFA-737肿瘤异种移植物获得NSCLC肿瘤片段。从供体小鼠去除后,将肿瘤切割成片段(边长3-4mm)并置于含有10%青霉素/链霉素的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。通过吸入异氟烷,将接受动物麻醉,且在腰窝中皮下接受单侧或双侧肿瘤植入物。以<65%的获取速率,每只小鼠,肿瘤异种移植物植入一或两个肿瘤。在双侧获取的情况下,在随机化前移植这些肿瘤之一。每天监测动物和肿瘤植入物,直至在足够数目的动物中可检测到实体瘤生长。在随机化时,测定生长肿瘤的体积。满足随机化标准(即载有50-250mm^3,优选80-200mm^3的肿瘤)的动物分配至由每组5-6只动物组成的实验组中,目标为大约100-120mm^3的可比中位和平均组肿瘤体积。处死未用于实验的动物。随机化之日被指定为实验第0天。

[0537] 实验设计:根据研究设计(表36),在随机化当天,招募的实验小鼠静脉内注射媒介物、5mg/kg的MORAb-003或5mg/kg的MORAb-202。在每个给药日在给药前测量体重,且在研究期间每周测量两次。在研究结束时,测量终止体重且记录。当个别肿瘤体积超过2000mm^3时,处死动物。

[0538] 表36.研究设计

[0539]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
1	6	媒介物	0	单次推注	i.v.
2	6	MORAb-003	5		
3	6	MORAb-202	5		

[0540] 1.3.2.2三阴性乳腺癌(TNBC)PDx模型:OD-BRE-0631(Oncodesign)

[0541] 肿瘤植入:皮下注射患者来源的TNBC肿瘤片段至九只雌性SWISS裸小鼠的右腰窝中。当肿瘤体积达到500-1000mm^3时,处死载有肿瘤的小鼠,并通过手术切除肿瘤。在用γ源照射整个身体(2Gy,60Co,BioMEP,France)后24至72小时,肿瘤片段(30-50mg)原位植入34只SWISS裸小鼠的乳脂垫区域。当肿瘤达到200-300mm^3的平均体积时,总共34只动物中的24只根据其个别肿瘤体积,使用Vivo Manager®软件(Biosystemes,Couternon,France)随机化至两组(n=12只动物)。进行统计检验(方差分析)以评估各组之间的均质性。随机化之日被指定为实验第0天。

[0542] 研究设计:在第1天(随机化后的一天和处理前的两天),来自两个未经处理组中的每一个的3只小鼠被终止。根据研究设计(表37),在第3天,剩余实验小鼠静脉内注射媒介物或5mg/kg的MORAb-202。在第8天(处理后的五天),来自两个处理组中的每一个的3只小鼠被终止。在终止后立即收集肿瘤组织并固定在4%中性缓冲福尔马林中24至48小时,接着包埋于石蜡(Histosec®,Merck,Darmstadt,Germany)中。被石蜡包埋的样品存储在室温下供随后免疫组织化学分析。

[0543] 表37.研究设计

[0544]

组	小鼠数目	处理	剂量 (mg/kg)	方案	途径
1	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	媒介物	0	单次推注	i.v.
2	3	n/a	n/a	n/a	n/a
	9	MORAb-202	5	单次推注	i.v.

[0545]

[0546] 免疫组织化学(IHC)分析:对被福尔马林固定的石蜡包埋的肿瘤组织进行IHC染色,以评估MORAb-202占据和与癌症相关的成纤维细胞的表达。在染色前,将载玻片脱蜡且在Lab Vision™PT模块(Thermo Scientific)中在预温热至85℃的柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中使用以下程序重新找回抗原:温热至97℃;在97℃下孵育30min;冷却至60℃。接着在室温下将载玻片转移至重蒸馏水,历时5min。在Vision™自动染色器360(Thermo Scientific)中进行染色。简单地说,将载玻片在1X Tris缓冲盐水/Tween-20(TBST)中洗涤两次,每次洗涤历时6min。接着组织切片在阻断缓冲液(300μL)(10%山羊血清(Jackson Immunoresearch Laboratory公司,目录号005-000-121),在3%牛血清白蛋白(BSA)-磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释)中孵育1小时,在偶联抗体(200μL)(表38)中孵育1小时,并在1X TBST中洗涤五次,每次洗涤历时6min。将载玻片在安装培养基中以DAPI复染,且使盖玻片硬化30min。将载玻片在Panoramic MIDI扫描仪(3DHISTECH)上处理,并使用Halo软件(Indica Labs)分析IHC影像。用于此分析的抗体靶向α-平滑肌肌动蛋白(SMA)(其为与癌症相关的成纤维细胞的特定标记物)和人类IgG(其可以检测MORAb-202的存在)。

[0547] 表38.IHC抗体

[0548]

抗体	偶联	供货商	目录号	货号	储备溶液	工作溶液
α-平滑肌肌动蛋白(SMA)-FITC	FITC	Sigma	F3777	124M4775V	2.0 mg/mL	5.0 μg/mL
小鼠IgG1,κ同型对照	AF488	Biolegend	400129	B128493	0.2 mg/mL	1:1000
山羊抗人类IgG	AF555	Mol. Probes	A21433	1709318	n/a	1:200

[0549] 1.3.2.3子宫内膜癌PDx模型:Endo-12961和Endo-10590(EPO Berlin)

[0550] 肿瘤植入:从连续继代的Endo-12961和Endo-10590肿瘤异种移植物获得子宫内膜癌肿瘤片段,且作为原料存储于液氮中。肿瘤片段皮下植入40只NMRI nu/nu雌性小鼠的左腰窝中,且监测肿瘤体积。肿瘤体积为100-160mm^3的小鼠随机化至4组之一(组A-D,表39)。用于随机化的卫星小鼠包括于第五组(组E,表39)中。每组由8只动物组成。随机化之日被指定为实验第0天。

[0551] 研究设计:根据研究设计(表39),在随机化当天,招募的实验小鼠静脉内注射PBS、3.2mg/kg或0.1mg/kg艾日布林或5mg/kg的MORAb-202。通过每周测量两个垂直直径两次来评估肿瘤生长,且计算肿瘤体积(TV)、相对肿瘤体积(RTV)和处理/对照(T/C)值。每周还评估体重两次,作为毒性的参数,其中计算每组的体重和相对于处理开始的体重改变(BWC)。当个别肿瘤体积超过1cm^3时,或在研究结束时,处死动物。

[0552] 表39.研究设计

[0553]

组	小鼠数目	处理	剂量(mg/kg)	方案	途径
A	8	PBS	0	单次推注	i.v.
B		艾日布林	3.2		
C		艾日布林	0.1		
D		MORAb-202	5		
E		n/a	n/a	n/a	n/a

[0554] 1.4作用机制

[0555] 1.4.1 zPredicta中的三维(3D)共同培养系统

[0556] 所有含间质干细胞(MSC)的3D共同培养实验都在zPredicta中,使用器官特定的3D细胞外基质系统,例如rStomach™进行。rStomach™中骨髓间质干细胞(BM-MSC)与Nuc Red Light MKN-74胃癌细胞系以48孔格式一式四份地共同培养12天。先前已经展示MKN-74细胞表达足够叶酸受体α(FR)进行MORAb-202处理,引起细胞凋亡。在培养前,通过流式细胞术,评估BM-MSC的标靶抗原表达和MSC分化的标记物(表40)。

[0557] 表40.MSC分化的标记物

[0558]

细胞群体	标记物
间质干细胞(MSC)	Stro-1^{+}/CD105^{+}
前脂肪细胞	CD34^{+}/CD31^{-}
脂肪细胞	油红
与癌症相关的成纤维细胞(CAF)	α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA),波形蛋白
前周细胞/周细胞	NG2^{+}、CD13^{+}、CD146^{+}
所有	FRA

[0559] 如表41中所述,rStomach^{TM}培养物用MORAb-202、未偶联的MORAb-003抗体、艾日布林或对照处理。对照包括未经处理和媒介物处理(PBS和DMSO)的培养物。通过光学显微术监测MSC分化。一旦观察到可见的分化,则收获样品用于染色和流式细胞术分析。

[0560] 表41.共同培养处理

[0561]

试剂	工作浓度
MORAb-202	10nM
MORAb-003(未偶联抗体)	10nM
艾日布林	1.7nM和0.2nM
PBS	
DMSO	0.1%
未处理对照	

[0562] 1.4.2 MORAb-202对与癌症相关的成纤维细胞的作用的时程分析

[0563] 如部分1.3.1中所述,制备载有皮下H2110异种移植肿瘤的小鼠。在施用媒介物或5mg/kg MORAb-202后0天、3天、5天、7天和9天收获肿瘤样品。在载玻片上处理所收集的肿瘤样品,且如部分1.3.2.2中所述,通过IHC,分析与癌症相关的成纤维细胞的表达。

[0564] 2.结果

[0565] 2.1.体外细胞毒性分析

[0566] 2.1.1 MORAb-202的细胞毒性

[0567] 如部分1.2.1中所详述,使用结晶紫测定,评估MORAb-202的体外效力。在IGROV1(FR$^{hi(+++)}$)、OVCAR3(FR$^{med(++)}$)、NCI-H2110(FR$^{med(++)}$)、A431-A3(FR$^{lo(+/-)}$)和SJSA-1(FR$^{neg(-)}$)细胞上进行筛选。此筛选的结果提供于图17和表42中。

[0568] 表42.在各种肿瘤细胞系上MORAb-202的细胞毒性(EC_{50})筛选

[0569]

EC_{50} (nM)				
IGROV I	OVCAR3	NCI-H2110	A431-A3	SJSA-1

[0570]

(FR+++)	(FR++)	(FR++)	(FR+/-)	(FR-)
0.01	0.16	0.74	23	> 100

[0571] MORAb-202显示针对肿瘤细胞系的细胞毒性取决于叶酸受体α表达,和低水平的脱靶杀死。MORAb-202展示在IGROV1细胞上效力水平最高(0.01nM),在叶酸受体α阴性SJSA-1细胞上细胞毒性很小(>100nM)。在OVCAR3和NCI-H2110细胞中观察到中等效力(0.16nM和

0.74nM)。

[0572] 2.2体内研究

[0573] 2.2.1 MORAb-202在NC1-H2110异种移植模型中的功效

[0574] 载有皮下H2110肿瘤的小鼠静脉内注射媒介物或1、2.5和5mg/kg的MORAb-202。在单剂5mg/kg MORAb-202后观察到显著肿瘤消退(图18和表43)。使用具有高叶酸受体α表达和施用单剂的此异种移植模型,展示MORAb-202对于延迟肿瘤生长的治疗窗为1mg/kg(疾病稳定)且对于肿瘤消退的治疗窗≥2.5mg/kg。在此研究中,2.5mg/kg的MORAb-202引起部分反应,且5mg/kg的MORAb-202引起完全反应。

[0575] 表43.MORAb-202在NC1-H2110异种移植模型中的抗肿瘤活性

[0576]

	肿瘤体积,mm^3 (肿瘤生长抑制,%)	
	第 17 天	第 31 天
媒介物(n=5)	1583.4 ± 146.1 (100)	n/a
MORAb-202, 1 mg/kg, 单剂(n=5)	840.0 ± 76.8 (53.1)	n/a
MORAb-202, 2.5 mg/kg, 单剂(n=5)	60.8 ± 27.1 (3.8)	1173.2 ± 373.2
MORAb-202, 5 mg/kg, 单剂(n=4)	0.0 (0.0)	0 (0.0)

[0577] 2.2.2 MORAb-202在NSCLC PDx模型LXFA-737中的功效

[0578] 载有皮下NSCLC PDx肿瘤的小鼠静脉内注射媒介物、5mg/kg的MORAb-003或5mg/kg的MORAb-202。与未显示显著抗肿瘤活性的单剂未偶联MORAb-003抗体(5mg/kg)对比,单剂MORAb-202(5mg/kg)在此模型中引起显著肿瘤消退(图19A)。总共六只用MORAb-202处理的小鼠中的五只在研究第32天被视为无肿瘤(表44),且至第74天(研究终止)四只保持无肿瘤。另外,与媒介物处理的对照组相比,处理组中未观察到显著体重损失,表明在处理期间无毒性(图19B)。

[0579] 表44.MORAb-202在NSCLC PDx模型中的抗肿瘤活性

[0580]

	肿瘤体积, mm^3 (肿瘤生长抑制, %)		
	第 21 天	第 32 天	第 74 天
媒介物(n=6)	1004.5 (100)	1561.3 (100)	n/a
MORAb-003, 5 mg/kg, 单剂 (n=6)	860.7 (85.7)	1572.1 (100.7)	n/a
MORAb-202, 5 mg/kg, 单剂 (n=6)	22.9 (2.3)	4.7 (0.3)	418.3 (4/6 无肿瘤)

[0581] 2.2.3 MORAb-202和艾日布林在子宫内膜癌PDx模型Endo-12961和Endo-10590中

的相对功效

[0582] Endo-12961和Endo-10590异种移植物表达高水平的叶酸受体α。载有皮下子宫内膜癌PDx肿瘤的小鼠静脉内注射PBS、3.2mg/kg或0.1mg/kg艾日布林或5mg/kg MORAb-202。艾日布林在此模型中的最大耐药量(MTD)为3.2mg/kg,而0.1mg/kg等同于以5mg/kg施用的MORAb-202所提供的艾日布林剂量。贯穿研究开始,在两种动物模型中,在用MORAb-202(5mg/kg)和MTD剂量的艾日布林(3.2mg/kg)处理后,观察到显著抗肿瘤活性,而在用0.1mg/kg处理后未观察到显著抗肿瘤活性(图20A和20C)。然而,用3.2mg/kg艾日布林处理的小鼠中消退的肿瘤在研究持续时间期间开始重新生长,而在用MORAb-202处理的小鼠中注意到肿瘤未显著重新生长。在此研究中,发现MORAb-202比艾日布林显著更有效。艾日布林处理还在处理后第一周暂时影响体重(图20B和20D)。相比之下,在用MORAb-202处理的动物中未观察到体重损失。

[0583] 2.3 MORAb-202的作用机制

[0584] 2.3.1 MORAb-202在TNBC PDx模型:OD-BRE-0631中的IHC和功效

[0585] 载有皮下TNBC PDx肿瘤的小鼠静脉内注射媒介物或5mg/kg MORAb-202。在处理前(第1天)和处理后(第8天)从每组中的小鼠收集肿瘤组织。所收集的肿瘤组织的IHC分析揭露在第3天施用单剂(5mg/kg)后,在处理后五天(第8天)MORAb-202占据表达叶酸受体α的肿瘤细胞。使用抗人类IgG抗体评估细胞占据(图21A)。MORAb-202处理还展示减少与癌症相关的成纤维细胞的结构,如利用抗α-平滑肌肌动蛋白(SMA)-FITC抗体的IHC染色所示(图21B)。就功效而言,MORAb-202处理引起处理后11天最大程度的肿瘤消退,如0.62的相对肿瘤体积(RTV)所测量(图21C)。

[0586] 2.3.2 MORAb-202、MORAb-003和艾日布林对3D共同培养系统的作用

[0587] rStomach™中骨髓间质干细胞(BM-MSC)与MKN-74胃癌细胞系共同培养12天。在培养前,通过流式细胞术,评估BM-MSC的叶酸受体α表达和MSC分化的标记物。接着rStomach™培养物用MORAb-202、未偶联MORAb-003抗体、艾日布林或对照处理。一旦通过光学显微术观察到可见的MSC分化,则收获样品用于染色和流式细胞术分析。这些分析的结果展示于图22中。

[0588] 7天的总处理持续时间(在此时间段期间补充处理)足够对与MKN-74细胞一起培养的人类BM-MSC的分化产生可测量的作用。相对于媒介物对照,用MORAb-202(10nM)处理引起MSC和脂肪细胞群体增加,和周细胞群体减少(表45)。这些数据表明MORAb-202能够对肿瘤微环境具有显著作用。

[0589] 表45.MORAb-202、MORAb-003和艾日布林对3D共同培养系统的作用

[0590]

	活细胞百分比		
处理	MSC	脂肪细胞	周细胞
PBS	32.3%	0.72%	14.6%
MORAb-202	43.7%	22.6%	11.4%
MORAb-003	37.1%	0.69%	24.0%
艾日布林	29.9%	2.68%	25.8%

[0591] 2.3.3 MORAb-202对与癌症相关的成纤维细胞的作用的时程分析

[0592] 在施用媒介物或5mg/kg MORAb-202后第0天、第3天、第5天、第7天和第9天，从载有皮下H2110异种移植肿瘤的小鼠收获肿瘤样品。在载玻片上处理所收集的肿瘤样品，且通过IHC分析与癌症相关的成纤维细胞(CAF)表达。如通过用抗α-平滑肌肌动蛋白(SMA)-FITC抗体染色所评估和定量，CAF网状结构在施用单剂5mg/kg MORAb-202后第3天和第5天为显著的(图23)。然而，至第7天，大部分这种结构显著减少。

[0593] 实施例3

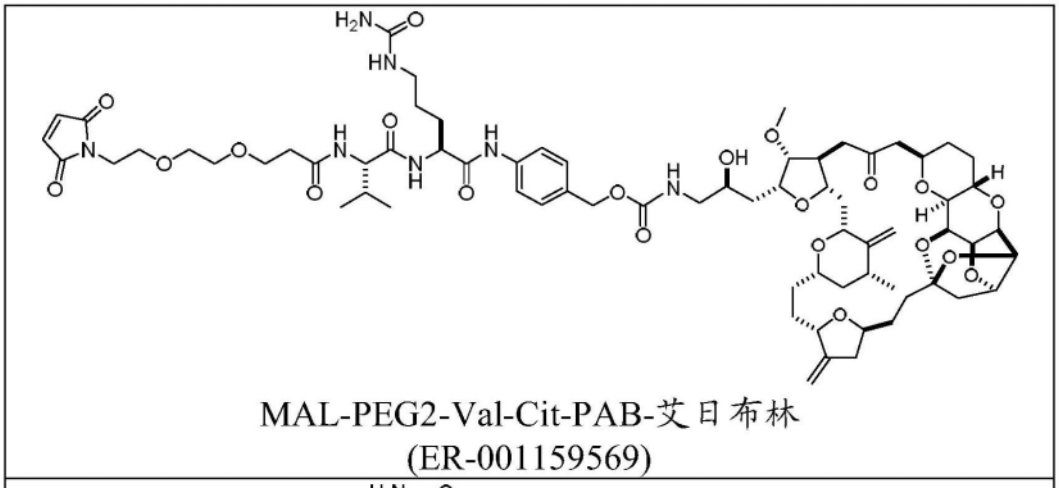
[0594] 1.材料与方法

[0595] 具有表46中所示结构的可偶联的艾日布林化合物根据以下程序合成，且用于制备ADC(实施例4)。

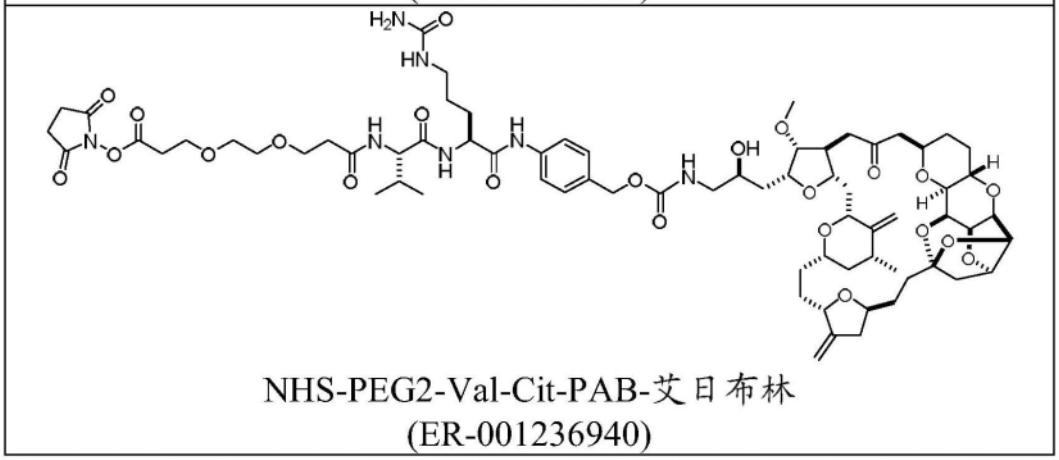
[0596] 所有用于合成反应中的溶剂都为无水级(EMD Millipore)。所有用于处理或纯化的溶剂都为高效液相色谱(HPLC)级(EMD Millipore)。除非另外指示，否则所有化学品都可购得。使用Biotage® SP4进行柱色谱法。使用旋转蒸发器(Büchi Labortechik AG)或离心蒸发器(Genevac，SP scientific)去除溶剂。使用WatersAutoPurification系统和XTerra MS C18柱(5μm，19mm×100mm)在酸性流动相条件下，进行制备型液相色谱-质谱分析(LC/MS)。除非另有说明，否则使用氘化氯仿($CDCl_3$)取得核磁共振(NMR)谱，且使用Varian仪器(Agilent Technologies)在400MHz或500MHz下记录。使用Waters Acquity超高效LC/MS取得质谱。如本文所用，术语“惰性”是指反应器(例如反应容器、烧瓶、玻璃反应器)中空气经基本上无水分的惰性气体，例如氮气或氩气替换。使用以下缩写指示多重峰：s＝单峰，d＝二重峰，t＝三重峰，q＝四重峰，quint＝五重峰，sxt＝六重峰，m＝多重峰，dd＝双二重峰，ddd＝两个双二重峰，dt＝双三重峰，br s＝宽单峰。

[0597] 表46.可偶联的艾日布林化合物

[0598]

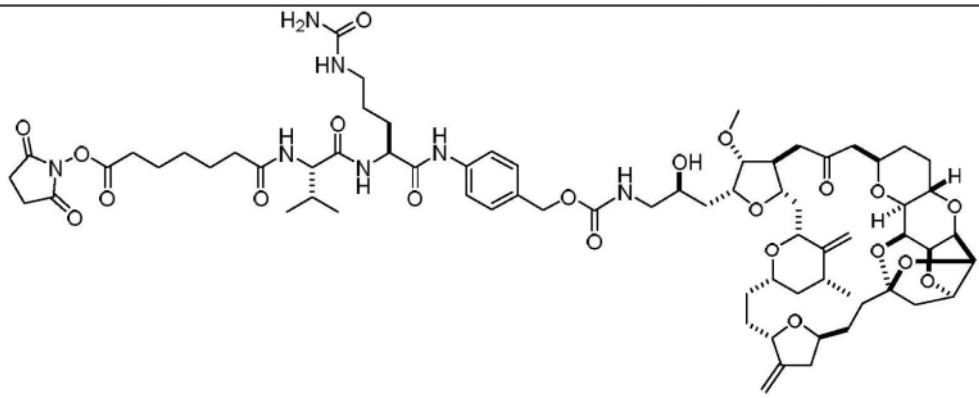


MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001159569)

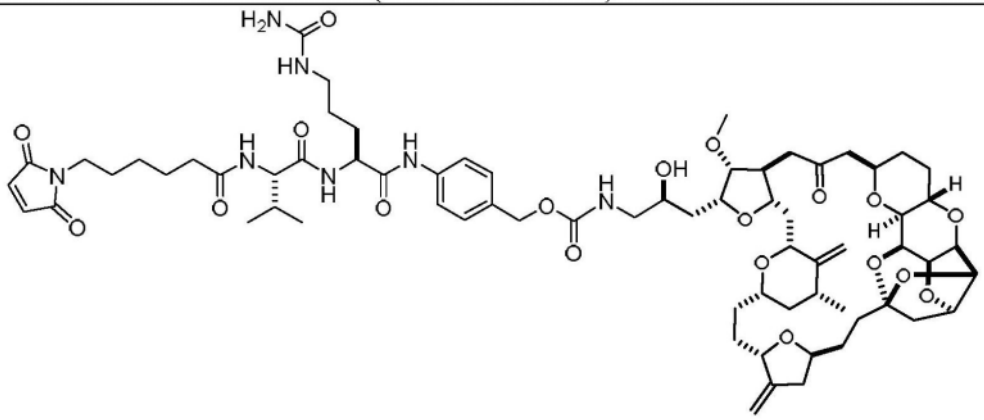


NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001236940)

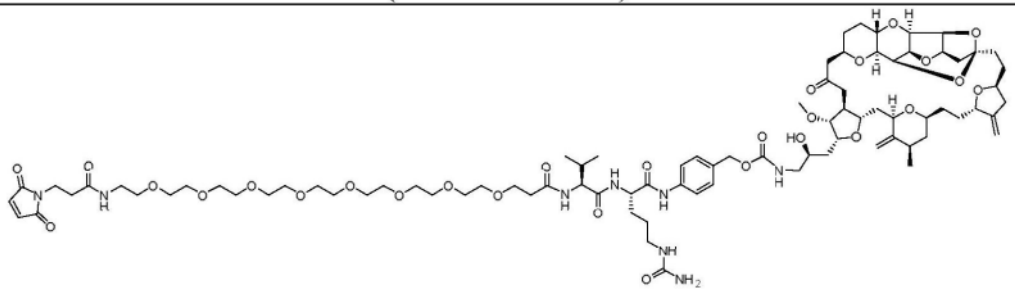
[0599]



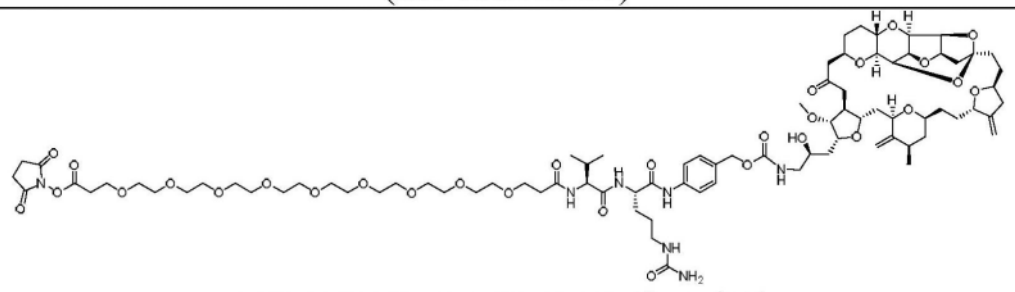
NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001236941)



Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001235638)

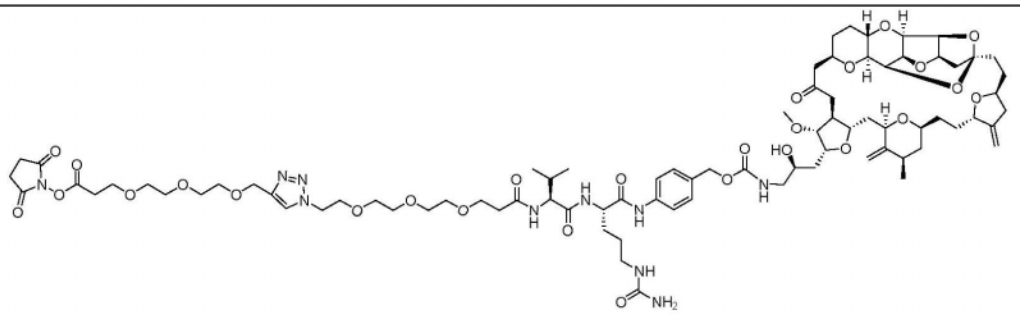


Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001242287)

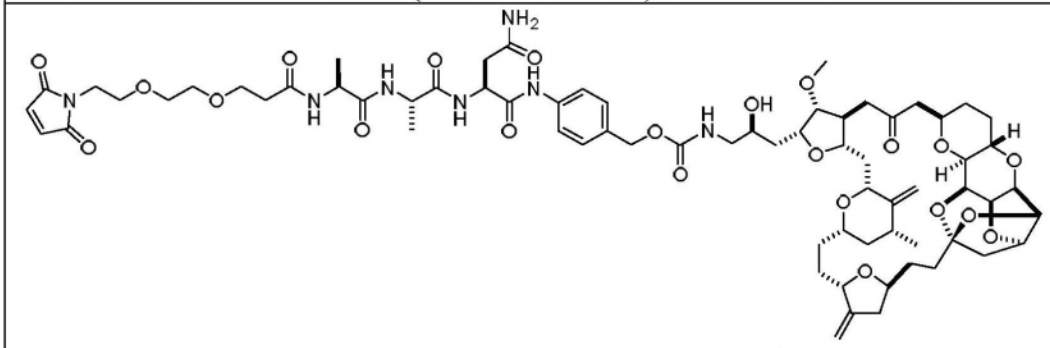


NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001242288)

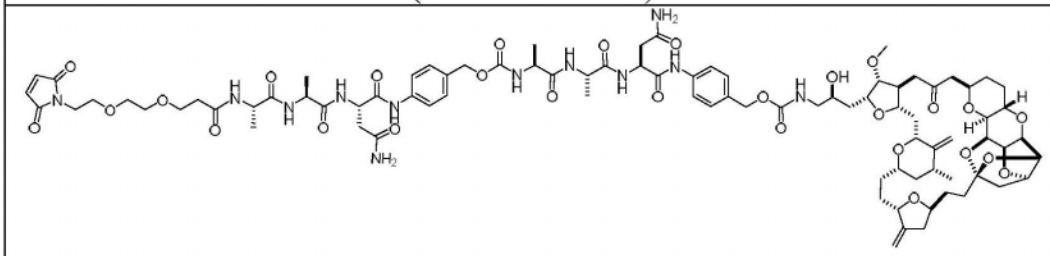
[0600]



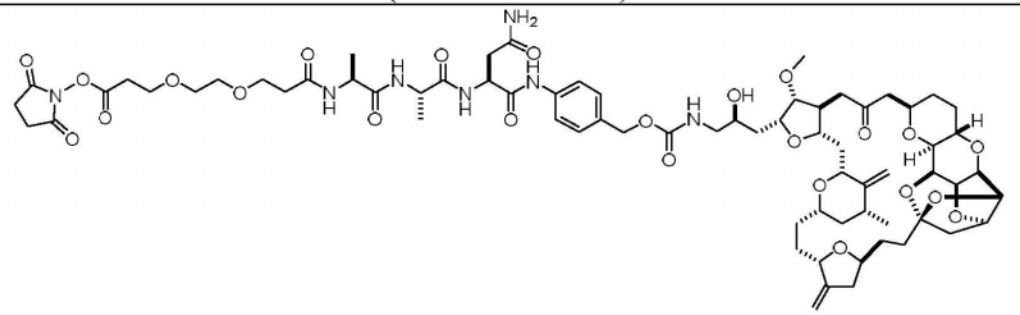
NHS-PEG3-三唑-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林
(ER-001243700)



Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林
(ER-001231679)

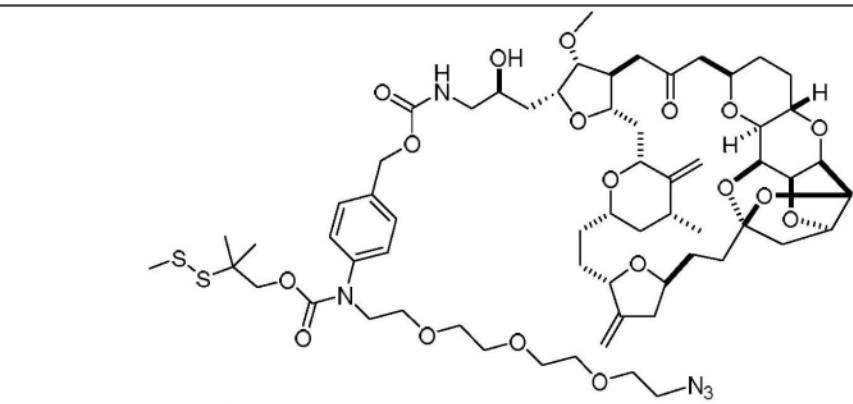


Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-艾日布林
(ER-001231690)

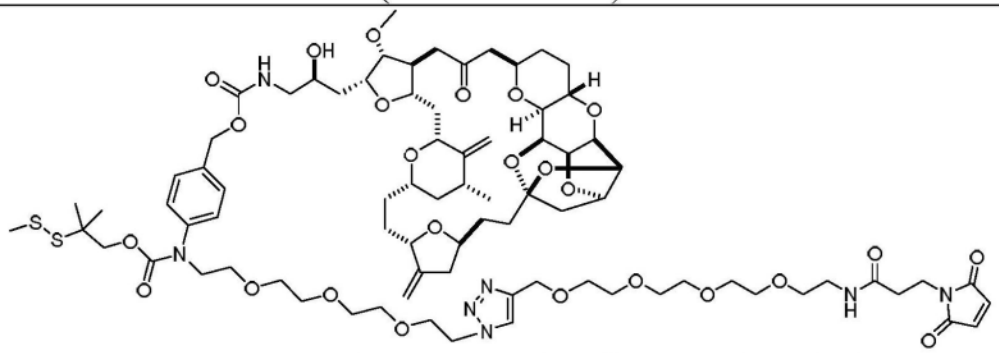


NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林
(ER-001231691)

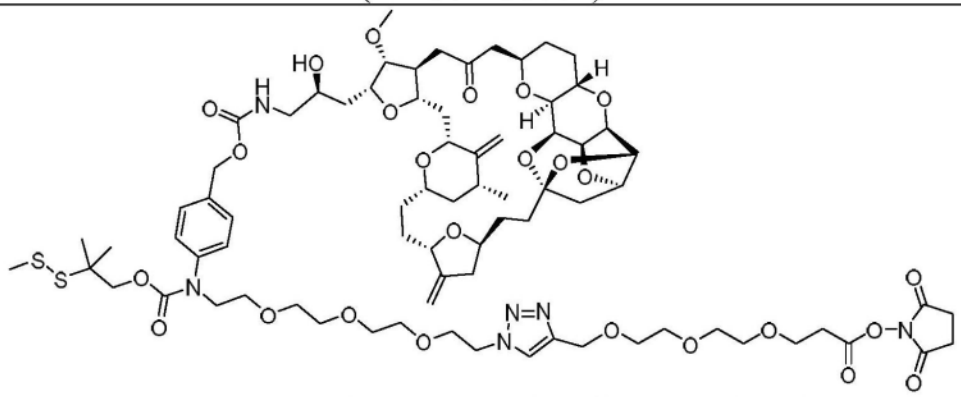
[0601]



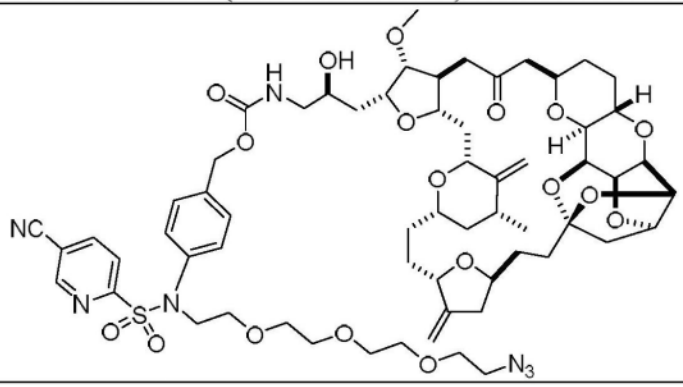
叠氮化物-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林
(ER-001237508)



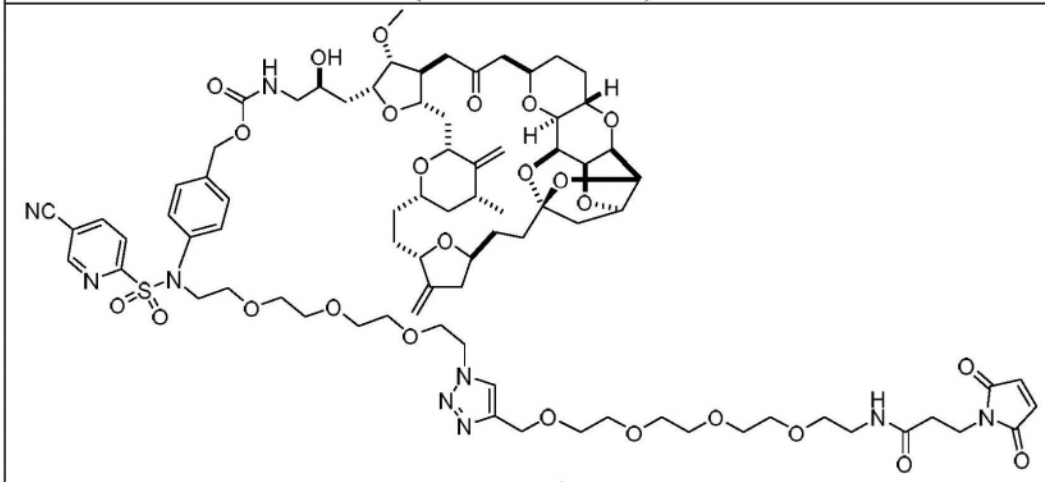
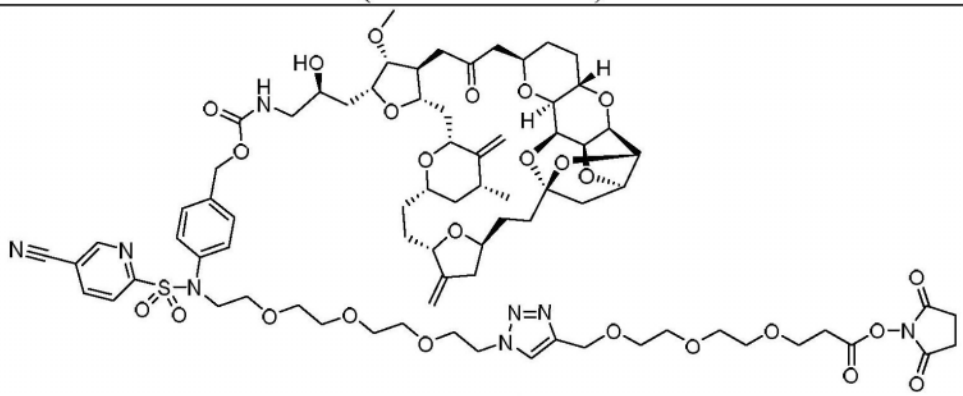
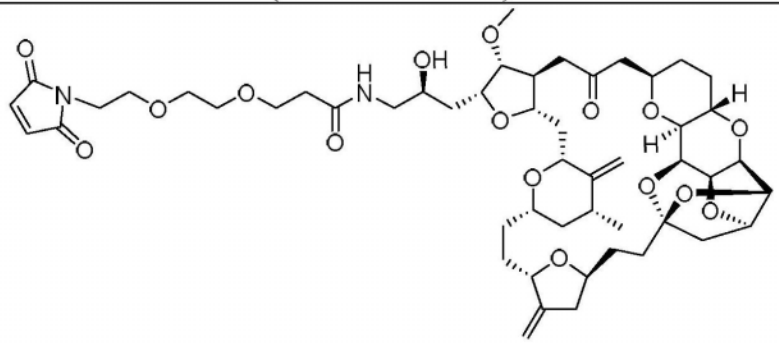
Mal-PEG4-三唑-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林
(ER-001237504)



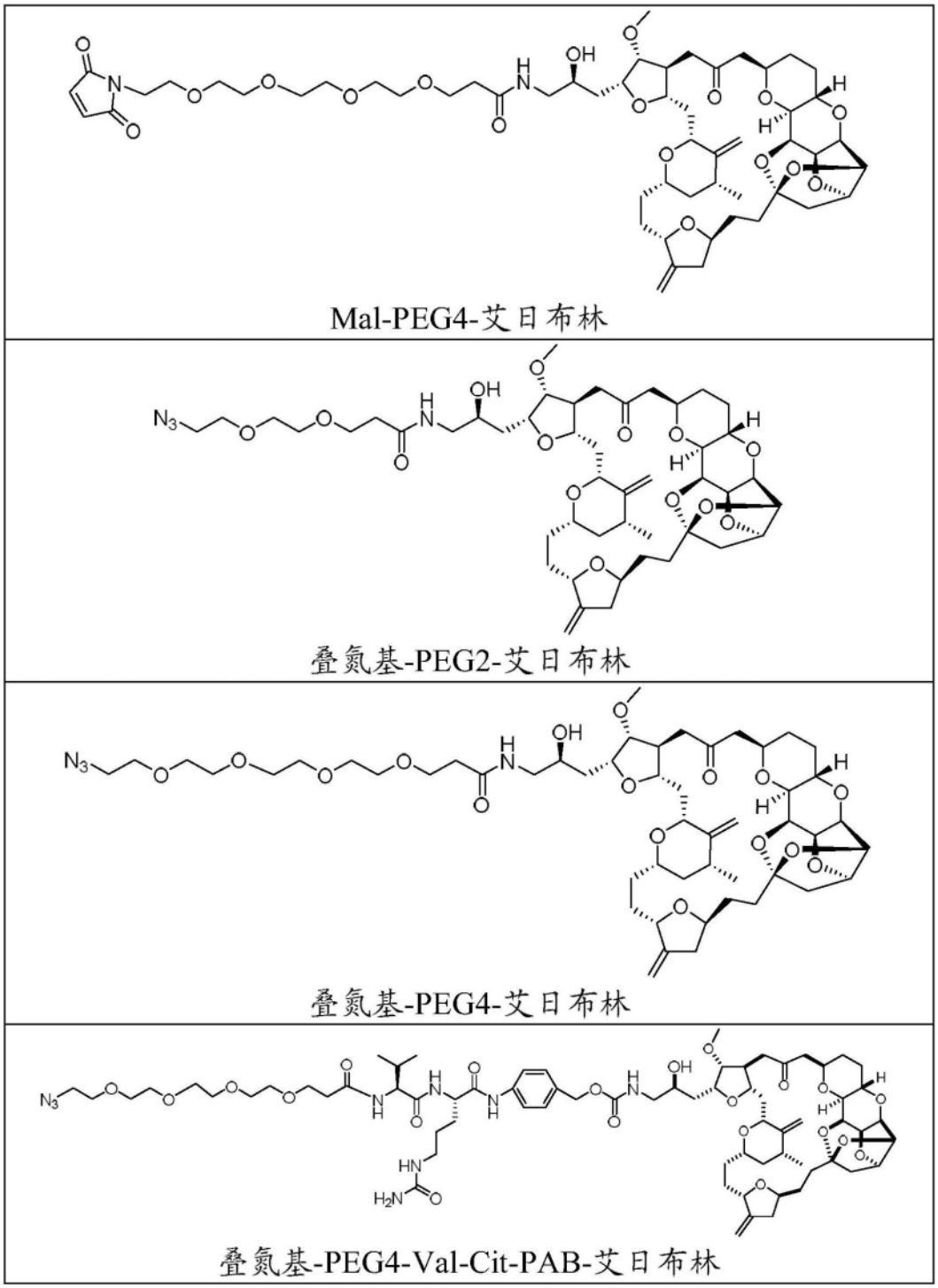
NHS-PEG3-三唑-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林
(ER-001244129)



[0602]

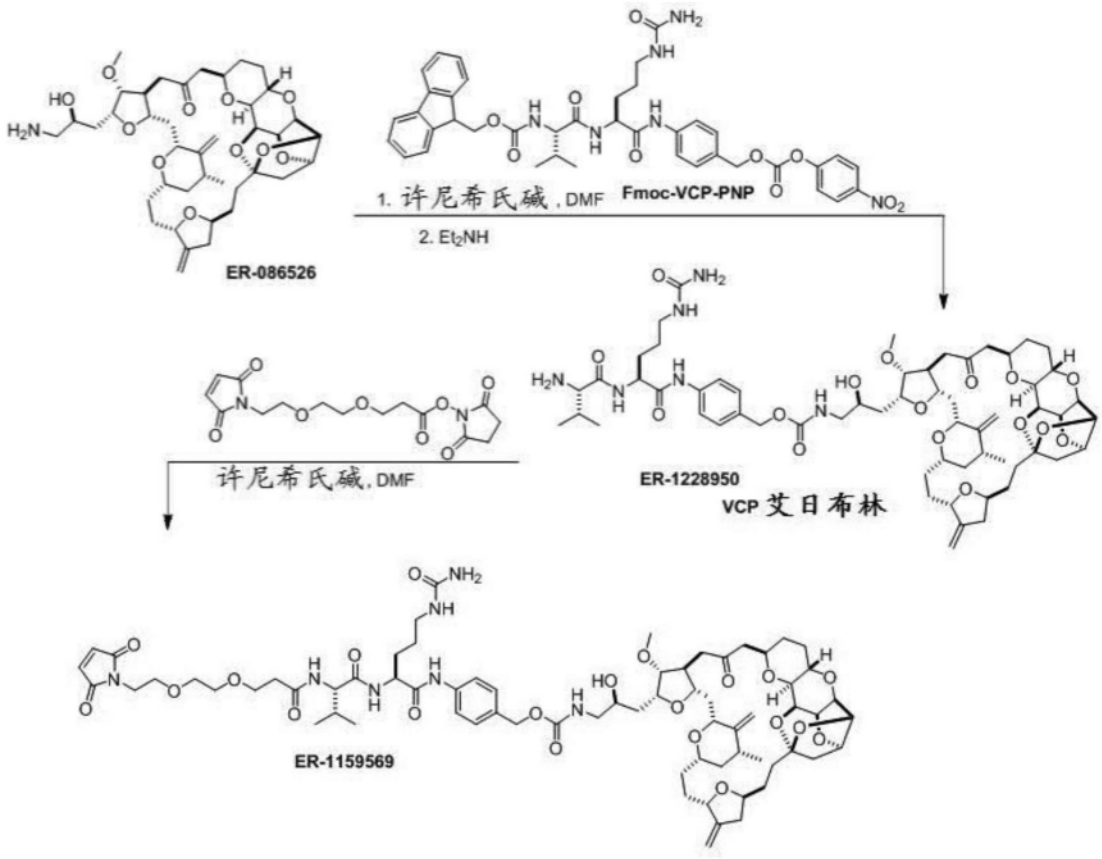
叠氮化物-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林 (ER-001138856)
 Mal-PEG4-三唑-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林 (ER-001237505)
 NHS-PEG3-三唑-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林 (ER-001244623)
 Mal-PEG2-艾日布林

[0603]



[0604] 1.1制备MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001159569)

[0605]

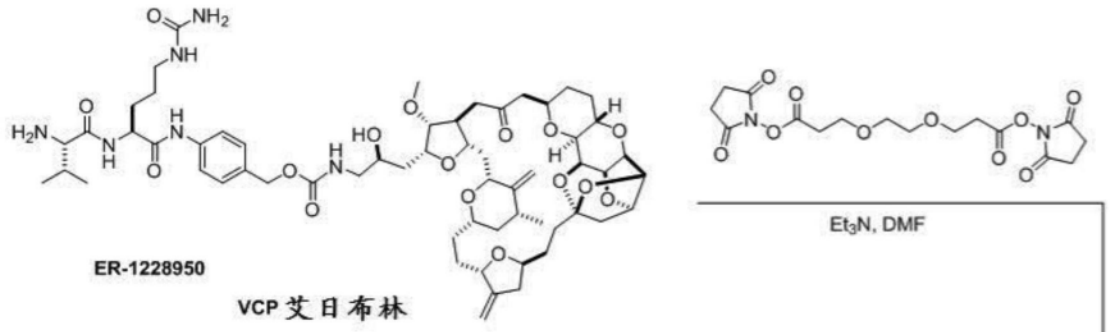


[0606] 使艾日布林(ER-000086526)(61.5mg,0.074mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(6.0mL)且接着与许尼希氏碱(0.027mL,0.156mmol)和Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP(86mg,0.112mmol)混合。将反应在室温下搅拌18小时直至完全偶合,如通过高效液相色谱(HPLC)分析所确定。将二乙胺(0.078mL,0.745mmol)添加至混合物,且将混合物再搅拌2小时,直至反应结束。通过蒸发去除溶剂,且残余物通过快速色谱法纯化,得到呈白色固体状的Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001228950)(60mg,71%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.56(d,J=8.4Hz,2H),7.32(d,J=8.4Hz,2H),5.14(s,1H),5.06(d,J=12.4Hz,1H),5.03(s,1H),5.01(d,J=12.4Hz,1H),4.87(s,1H),4.83(s,1H),4.71(t,J=4.4Hz,1H),4.62(t,J=4.4Hz,1H),4.57(dd,J=4.8,8.8Hz,1H),4.47(d,J=10.8Hz,1H),4.32-4.27(m,2H),4.18(dd,J=4.8,6.4Hz,1H),4.13-4.07(m,2H),3.98(t,J=10.4Hz,1H),3.88-3.82(m,3H),3.76-3.70(m,4H),3.60(d,J=6.0Hz,1H),3.38(s,3H),3.26-3.10(m,3H),2.93(dd,J=2.0,11.2Hz,1H),2.91-2.84(m,1H),2.75-2.64(m,2H),2.44-2.29(m,5H),2.21-1.97(m,8H),1.93-1.83(m,3H),1.79-1.72(m,5H),1.68-1.29(m,8H),1.11(d,J=6.8Hz,3H),1.07-1.01(m,1H),1.06(d,J=7.2Hz,3H),1.02(d,J=7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)=1135.7。

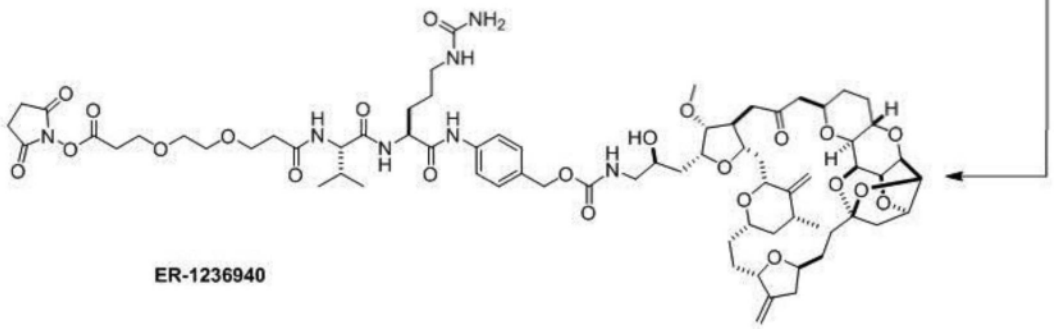
[0607] 使Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001228950)(16mg,14μmol)溶解于DMF(1mL)。接着在室温下将N,N-二异丙基乙胺(7.2μL,41μmol)和Mal-PEG2-NHS(9.7mg,27μmol)添加至此溶液,且将反应混合物在室温下搅拌1小时。反应结束后,粗混合物通过逆相HPLC,使用含有0.1%甲酸的乙腈-水流动相纯化。合并的洗脱份在未加热的水浴中在室温下真空浓缩,得到Mal-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001159569)(7.1mg,5.2μmol,38%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.59(d,J=8.4Hz,2H),7.31(d,J=8.4Hz,2H),6.81(s,2H),5.13(s,

1H),5.06(d,J＝12.4Hz,1H),5.02(s,1H),5.01(d,J＝12.4Hz,1H),4.87(s,1H),4.82(s,1H),4.71(t,J＝4.0Hz,1H),4.61(t,J＝4.4Hz,1H),4.50(dd,J＝5.2,9.2Hz,1H),4.47(d,J＝10.8Hz,1H),4.32-4.27(m,2H),4.19(dd,J＝6.8,11.6Hz,1H),4.13-4.07(m,2H),3.98(t,J＝10.4Hz,1H),3.88-3.82(m,3H),3.76-3.64(m,6H),3.62-3.51(m,6H),3.38(s,3H),3.22-3.08(m,4H),2.93(dd,J＝2.4,9.6Hz,1H),2.92-2.84(m,1H),2.76-2.63(m,2H),2.52(t,J＝6.0Hz,2H),2.44-2.29(m,5H),2.21-1.97(m,8H),1.93-1.83(m,3H),1.80-1.66(m,5H),1.66-1.28(m,10H),1.11(d,J＝6.4Hz,3H),1.07-1.01(m,1H),0.99(d,J＝6.8Hz,3H),0.97(d,J＝6.4Hz,3H)。LCMS(M+H)＝1374.9。

[0608] 1.2制备NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236940)

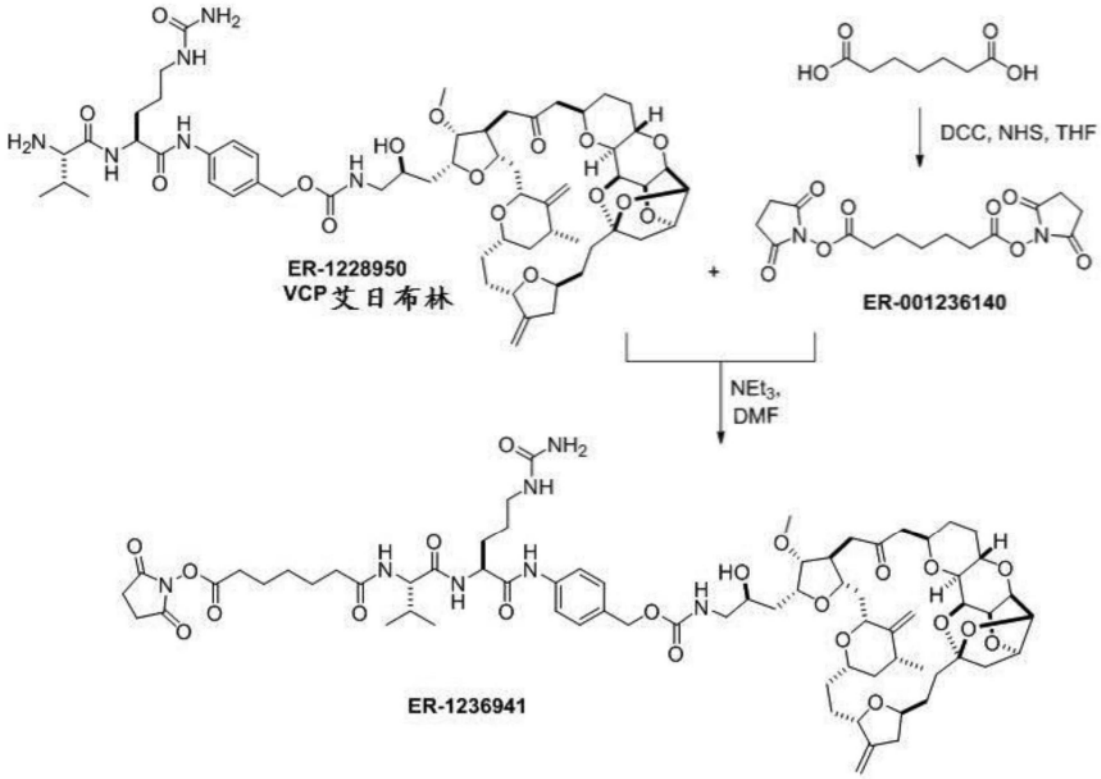


[0609]



[0610] 将Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001228950)(45mg,0.04mmol)和3,3′-(乙烷-1,2-二基双(氧基))二丙酸双(2,5-二氧代基吡咯烷-1-基)酯(79mg,0.198mmol)混合在DMF(1.5mL)中,且接着添加Et_3N(44.2μl,0.317mmol)。将混合物搅拌18小时,直至反应结束,如通过HPLC分析所确定。蒸发溶剂且残余物通过快速色谱法纯化,得到呈白色固体状的NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236940)(38mg,68%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.58(d,J＝8.4Hz,2H),7.33(d,J＝8.4Hz,2H),5.14(s,1H),5.05(d,J＝12.4Hz,1H),5.03(s,1H),5.01(d,J＝12.4Hz,1H),4.87(s,1H),4.83(s,1H),4.71(t,J＝4.4Hz,1H),4.62(t,J＝4.4Hz,1H),4.51(dd,J＝4.8,8.8Hz,1H),4.50-4.47(m,1H),4.32-4.27(m,2H),4.21(dd,J＝4.8,6.4Hz,1H),4.14-4.08(m,2H),3.99(t,J＝10.4Hz,1H),3.88-3.82(m,3H),3.78-3.70(m,4H),3.62(s,2H),3.62-3.58(m,1H),3.50-3.46(m,2H),3.39(s,4H),3.36(s,3H),3.22-3.08(m,3H),2.93(dd,J＝2.0,11.2Hz,1H),2.91-2.87(m,1H),2.84(s,2H),2.80(s,2H),2.75-2.64(m,2H),2.59-2.52(m,2H),2.44-2.29(m,5H),2.21-1.97(m,10H),1.93-1.83(m,3H),1.79-1.72(m,5H),1.68-1.29(m,8H),1.11(d,J＝6.8Hz,3H),1.08-0.98(m,1H),1.00(d,J＝7.2Hz,3H),0.98(d,J＝7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)＝1421.0。

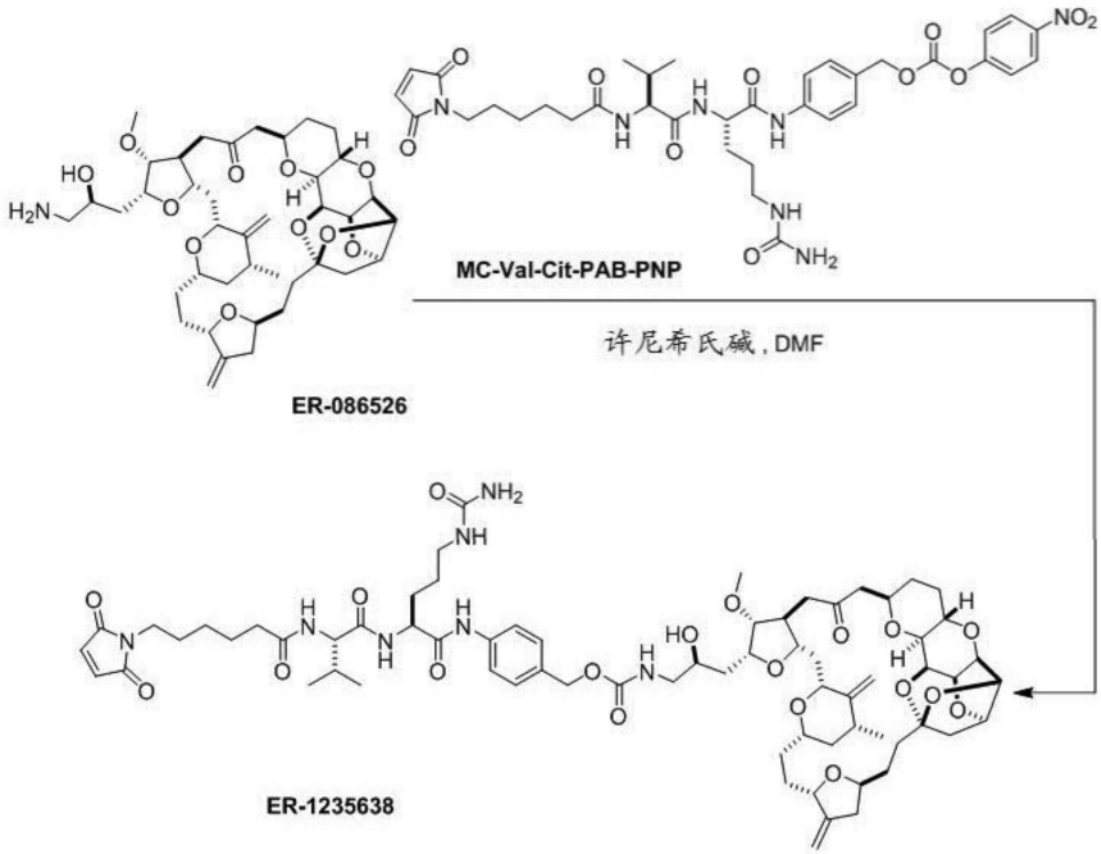
[0611] 1.3制备NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236941)

[0612] 

[0613] 使庚二酸(1.6g,9.99mmol)溶解于四氢呋喃(THF)(100mL),且接着添加1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(2.299g,19.98mmol),接着添加DCC(4.12g,19.98mmol)。将混合物在室温下搅拌18小时直至HPLC分析指示反应结束。固体通过经硅藻土垫过滤来去除,且用THF(3×2mL)洗涤。将合并的滤液浓缩且通过快速色谱法纯化,得到呈白色固体状的庚二酸双(2,5-二氧代基吡咯烷-1-基)酯(ER-001236140)(2.5g,71%产率)。^{1}HNMR(400MHz)δppm 2.83(s,8H),2.64(t,J=7.6Hz,4H),1.80(dt,J=7.6Hz,4H),1.59-1.51(m,2H)。LCMS(M+H)=355.2。

[0614] 使用与以上针对制备NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236940)所述相同的程序,由VCP-艾日布林(ER-001228950)和庚二酸双(2,5-二氧代基吡咯烷-1-基)酯(ER-001236140)制备NHS-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236941)(8.5mg,47%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.56(d,J=8.4Hz,2H),7.30(d,J=8.4Hz,2H),5.13(s,1H),5.04(d,J=12.0Hz,1H),5.01(s,1H),5.00(d,J=12.4Hz,1H),4.86(s,1H),4.82(s,1H),4.70(t,J=4.4Hz,1H),4.60(t,J=4.4Hz,1H),4.50(dd,J=4.8,8.8Hz,1H),4.46(d,J=10.8Hz,1H),4.36-4.25(m,2H),4.17(dd,J=4.8,6.4Hz,1H),4.13-4.06(m,2H),3.97(t,J=10.4Hz,1H),3.87-3.80(m,3H),3.74-3.68(m,2H),3.37(s,3H),3.20-3.06(m,4H),2.94(dd,J=2.0,11.2Hz,1H),2.90-2.82(m,1H),2.82(s,4H),2.74-2.65(m,2H),2.61(t,J=8.0Hz,2H),2.46-2.26(m,7H),2.24-1.81(m,13H),1.78-1.28(m,19H),1.10(d,J=6.8Hz,3H),1.06-0.96(m,1H),0.97(d,J=7.2Hz,3H),0.95(d,J=7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)=1375.1。

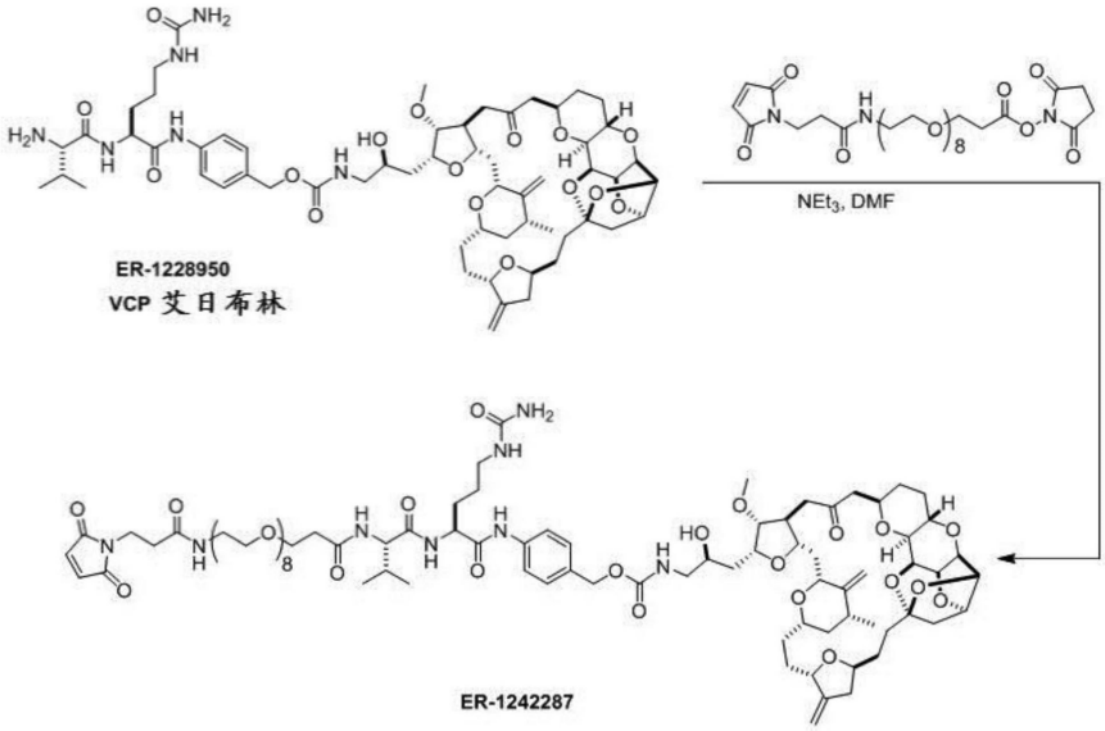
[0615] 1.4制备Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001235638)



[0616]

[0617] 使艾日布林(ER-000086526)(10mg,0.012mmol)溶解于DMF(1mL),且与MC-Val-Cit-PAB-PNP(9.02mg,0.012mmol)和许尼希氏碱(4.44μL,0.025mmol)混合。接着将混合物在室温下搅拌12小时,直至HPLC分析指示反应结束。将反应混合物浓缩且通过快速色谱法纯化,得到呈白色固体状的Mal-$(CH_2)_5$-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001235638)(11.3mg,63%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.57(d,J=8.4Hz,2H),7.31(d,J=8.4Hz,2H),6.79(s,2H),5.13(s,1H),5.05(d,J=12.4Hz,1H),5.02(s,1H),5.00(d,J=12.4Hz,1H),4.87(s,1H),4.83(s,1H),4.71(t,J=4.4Hz,1H),4.61(t,J=4.4Hz,1H),4.56-4.46(m,3H),4.35-4.27(m,2H),4.20-4.07(m,4H),3.98(t,J=10.8Hz,1H),3.87-3.83(m,3H),3.73-3.70(m,2H),3.48(t,J=7.6Hz,2H),3.38(s,3H),3.20-3.08(m,4H),2.93(dd,J=1.6,9.6Hz,1H),2.89-2.85(m,1H),2.69(dt,J=11.2,16.8Hz,2H),2.44-2.33(m,5H),2.27-1.83(m,13H),1.78-1.68(m,5H),1.66-1.27(m,14H),1.11(d,J=7.2Hz,3H),1.07-0.98(m,1H),0.98(d,J=7.2Hz,3H),0.96(d,J=7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)=1328.9。

[0618] 1.5制备Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001242287)

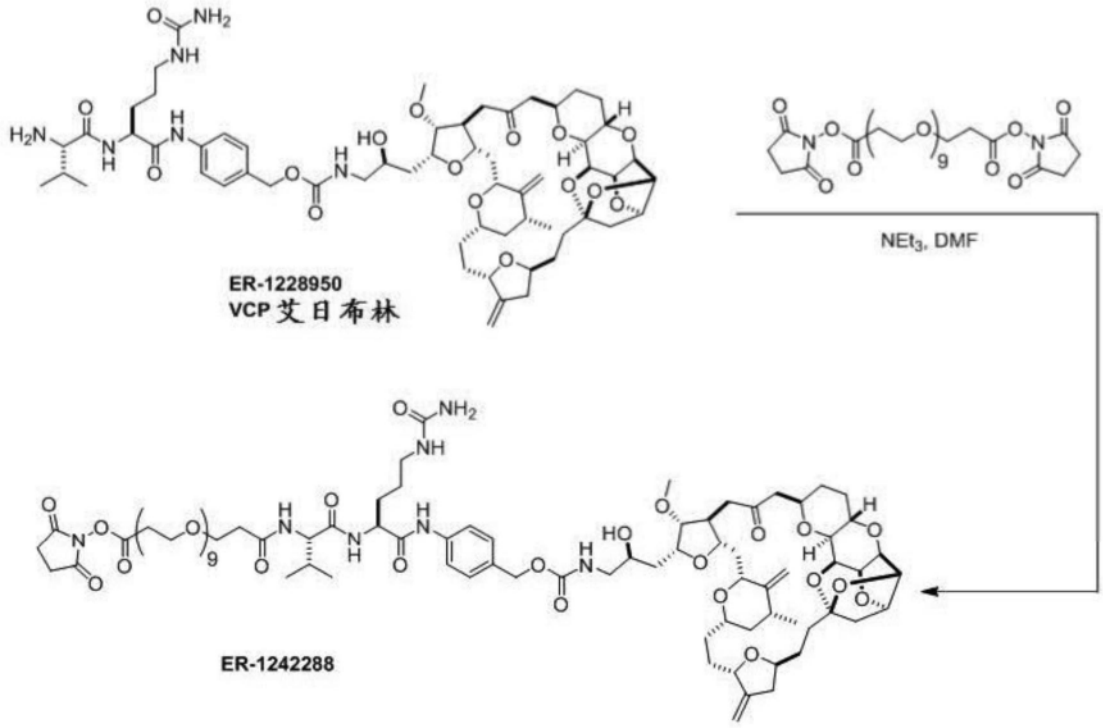


[0619]

[0620] 将VCP-艾日布林(ER-001228950)(10mg,8.808μmol)和1-(2,5-二氧代基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-3-氧代基-7,10,13,16,19,22,25,28-八氧杂-4-氮杂三十一烷-31-酸2,5-二氧代基吡咯烷-1-基酯(6.07mg,8.808μmol)混合在DMF(1mL)中,接着添加Et_3N(9.82μl,0.07mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时,直至HPLC分析指示反应结束。通过蒸发去除溶剂,且残余物通过快速色谱法纯化,得到呈白色固体状的Mal-PEG8-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001242287)(3.0mg,20%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm7.58(d,J=8.4Hz,2H),7.29(d,J=8.4Hz,2H),6.80(s,2H),5.12(s,1H),5.04(d,J=12.4Hz,1H),5.01(s,1H),4.99(d,J=12.4Hz,1H),4.85(s,1H),4.80(s,1H),4.69(t,J=4.4Hz,1H),4.59(t,J=4.4Hz,1H),4.50-4.42(m,2H),4.32-4.24(m,2H),4.20-4.14(m,2H),4.12-4.04(m,3H),3.96(t,J=10.4Hz,1H),3.86-3.80(m,3H),3.76-3.57(m,4H),3.48(t,J=6.0Hz,1H),3.36(s,3H),3.20-3.08(m,3H),2.91(dd,J=2.0,11.2Hz,1H),2.90-2.82(m,1H),2.74-2.60(m,2H),2.44-2.29(m,5H),2.21-1.97(m,10H),1.93-1.83(m,3H),1.79-1.20(m,19H),1.09(d,J=6.8Hz,3H),1.04-0.98(m,1H),0.99(d,J=7.2Hz,3H),0.97(d,J=7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)=1711.6。

[0621] 1.6制备NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001242288)

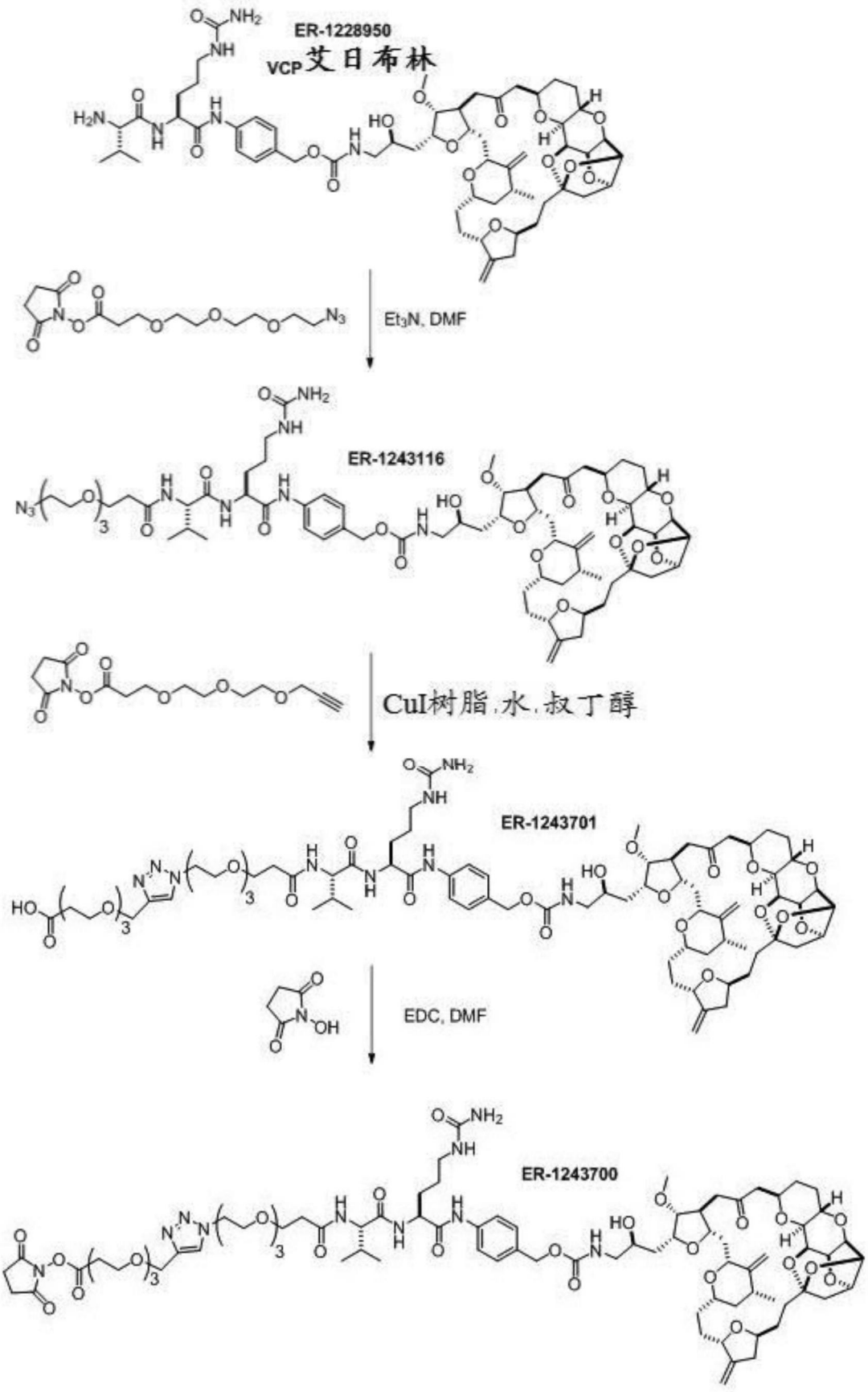
[0622]



[0623] 使用与以上针对制备NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236940)所述相同的程序,由VCP-艾日布林(ER-001228950)和BisNHS-PEG9制备NHS-PEG9-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001242288)(13mg,85%产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm7.61(d,J=8.4Hz,2H),7.32(d,J=8.4Hz,2H),5.16(s,1H),5.06(d,J=12.4Hz,1H),5.01(s,1H),5.00(d,J=12.4Hz,1H),4.87(s,1H),4.82(s,1H),4.71(t,J=4.4Hz,1H),4.61(t,J=4.4Hz,1H),4.52-4.45(m,2H),4.34-4.26(m,2H),4.20-4.19(m,1H),4.14-4.06(m,2H),3.98(t,J=10.4Hz,1H),3.88-3.80(m,3H),3.76-3.70(m,4H),3.66-3.58(m,37H),3.38(s,3H),3.24-3.10(m,3H),2.93(dd,J=2.0,11.2Hz,1H),2.91-2.84(m,1H),2.84(s,4H),2.76-2.64(m,2H),2.58-2.50(m,4H),2.46-2.28(m,5H),2.22-1.96(m,8H),1.91-1.82(m,3H),1.79-1.68(m,5H),1.64-1.24(m,8H),1.11(d,J=6.8Hz,3H),1.08-0.96(m,1H),0.99(d,J=7.2Hz,3H),0.97(d,J=7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)=1729.7。

[0624] 1.7制备NHS-PEG3-三唑-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001243700)

[0625]



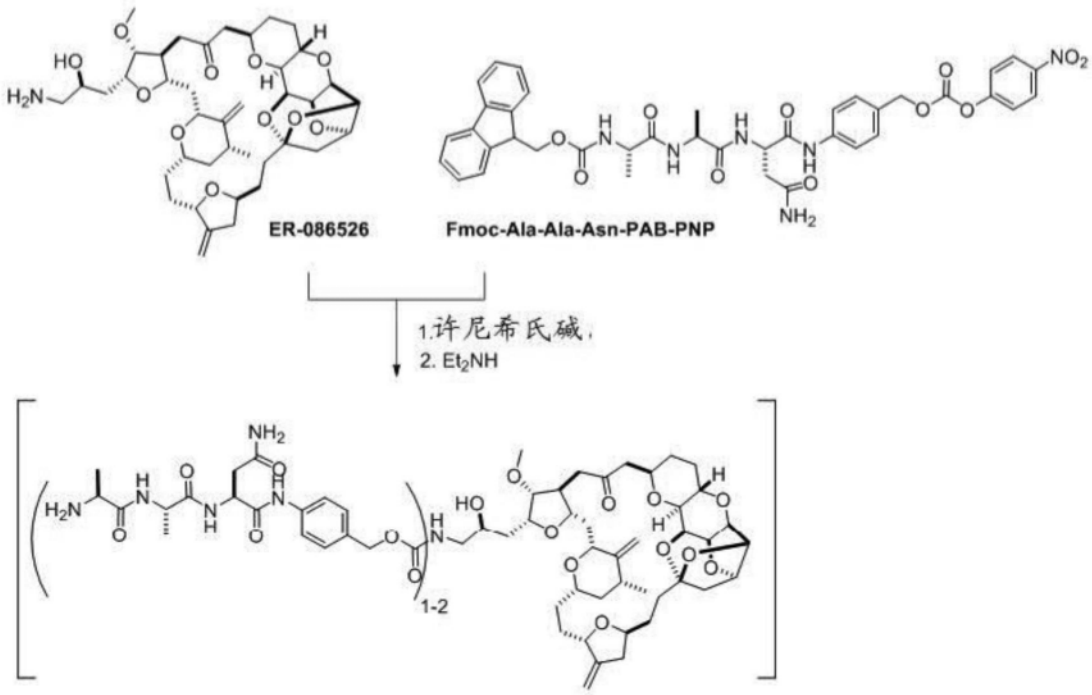
[0626] 使VCP-艾日布林(ER-001228950)(25mg,0.022mmol)溶解于DMF(2.5mL),且接着与Et_3N(24.55μl,0.176mmol)和叠氮化物-PEG3-NHS(8.34mg,0.024mmol)混合。将混合物在室

温下搅拌18小时，直至HPLC分析指示反应结束。将混合物真空浓缩，且残余物通过制备型HPLC(含0.1％甲酸的MeCN和水)纯化。含有叠氮化物-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林的洗脱份用二氯甲烷(CH_2Cl_2)(3×20mL)萃取，且蒸发CH_2Cl_2，得到呈白色固体状的叠氮化物-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001243116)(18.9mg,63％产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm7.58(d,J＝8.4Hz,2H),7.30(d,J＝8.4Hz,2H),5.14(s,1H),5.04(d,J＝12.4Hz,1H),5.03(s,1H),5.01(d,J＝12.4Hz,1H),4.85(s,1H),4.81(s,1H),4.70(t,J＝4.4Hz,1H),4.61(t,J＝4.4Hz,1H),4.52-4.48(m,2H),4.31-4.25(m,2H),4.20-4.15(m,1H),4.13-4.07(m,2H),3.99(t,J＝10.4Hz,1H),3.84-3.79(m,3H),3.77-3.65(m,4H),3.64-3.56(m,13H),3.38(s,3H),3.20-3.05(m,3H),2.95-2.80(m,2H),2.75-2.60(m,2H),2.55-2.50(m,2H),2.43-2.25(m,5H),2.21-1.97(m,8H),1.93-1.83(m,3H),1.79-1.72(m,5H),1.68-1.29(m,10H),1.08(d,J＝6.8Hz,3H),1.05-0.95(m,1H),0.98(d,J＝7.2Hz,3H),0.95(d,J＝7.2Hz,3H)。LCMS(M+H)＝1365.1。

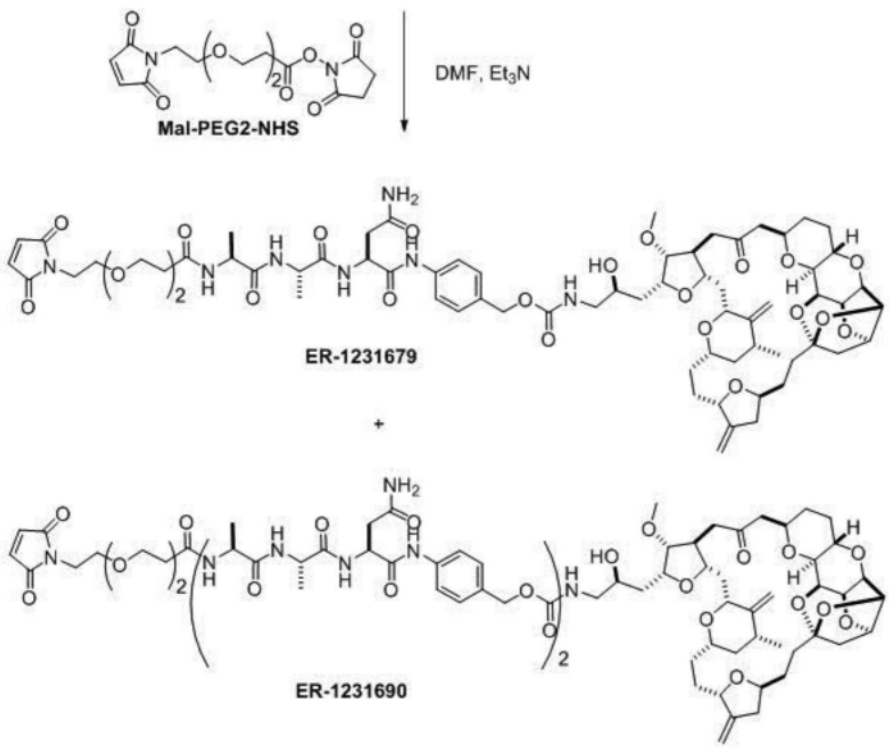
[0627] 将叠氮化物-PEG3-VCP-艾日布林(ER-001243116)(9.6mg,7.035μmol)和3-(2-(2-(丙-2-炔-1-基氧基)乙氧基)乙氧基)丙酸2,5-二氧代基吡咯烷-1-基酯(6.61mg,0.021mmol)混合在水(0.6mL)和叔丁醇(1.8mL)中。混合物用N_2鼓泡45min。将amberlyst-21上碘化铜(1.23mmol/g,10mg)添加至混合物且N_2鼓泡穿过混合物又30min。接着将反应混合物在室温下搅拌72小时，直至起始物质完成消耗。通过LCMS分析未观察到所需NHS酯产物，仅仅水解的羧酸。混合物经短硅藻土垫过滤以去除CuI树脂。滤液真空浓缩，且所得残余物通过制备型薄层色谱法(制备型TLC)(20％MeOH/CH_2Cl_2)纯化，得到呈白色固体状的酸-PEG3-三唑-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001243701)(3.7mg,33％产率)。LCMS(ES)(M+H)＝1581.2。

[0628] 使酸-PEG3-三唑-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001243701)(3.0mg,1.898μmol)溶解于DMF(200μL)且添加1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(0.437mg,3.796μmol)，接着添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)(0.728mg,3.796μmol)。在室温下搅拌18小时后，反应约完成50％。添加EDC(1.46mg,7.8μmol)，且将混合物再搅拌18小时，直至HPLC分析指示＞95％转变成NHS-PEG3-三唑-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林。混合物真空浓缩，且残余物通过制备型TLC(15％MeOH/CH_2Cl_2)纯化，得到呈白色固体状的NHS-PEG3-三唑-PEG3-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001243700)(2.2mg,69％产率)。^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 8.00(s,1H),7.59(d,J＝8.0Hz,2H),7.31(d,J＝8.4Hz,2H),5.13(s,1H),5.04(d,J＝12.4Hz,1H),5.02(s,1H),5.00(d,J＝12.4Hz,1H),4.87(s,1H),4.83(s,1H),4.71(t,J＝4.0Hz,1H),4.63(s,2H),4.61(t,J＝4.4Hz,1H),4.57-4.55(m,2H),4.51-4.45(m,1H),4.32-4.28(m,2H),4.21-4.17(m,2H),4.13-4.10(m,2H),3.98(t,J＝10.8Hz,1H),3.88-3.80(m,5H),3.75-3.70(m,4H),3.68-3.55(m,18H),3.45-3.40(m,2H),3.38(s,3H),3.20-3.08(m,4H),2.93-2.80(m,2H),2.75-2.50(m,2H),2.68(s,4H),2.48-2.30(m,7H),2.28-1.92(m,10H),1.90-1.68(m,8H),1.65-1.27(m,8H),1.11(d,J＝6.8Hz,3H),1.05-0.95(m,1H),0.99(d,J＝7.2Hz,3H),0.97(d,J＝6.8Hz,3H)。LCMS(M+H)＝1678.3。

[0629] 1.8制备Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231679)和Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-艾日布林(ER-001231690)



[0630]



[0631] 使艾日布林(ER-000086526)(10mg,0.014mmol)溶解于DMF(0.5mL),且与许尼希氏碱(3.59μL,0.021mmol)混合。接着添加((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-氨基-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1,4-二氧代基丁-2-基)氨基)-1-氧代基丙-2-基)氨基)-1-氧代基丙-2-基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(15.76mg,0.021mmol),且将所得黄色溶液在室温下搅拌3天,直至HPLC分析指示起始物质完全耗尽。将二乙胺(14.23μL,0.137mmol)添加至反应混合物,其接着在室温下再搅拌2小时,直至Fmoc保护基100%裂解。将反应混合物浓缩以去除二乙胺,且残余物再溶于DMF(1.5mL)中。在室温下添加Et_3N(0.015mL,0.11mmol),接着添加3-(2-(2-(2,5-二氧代基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧

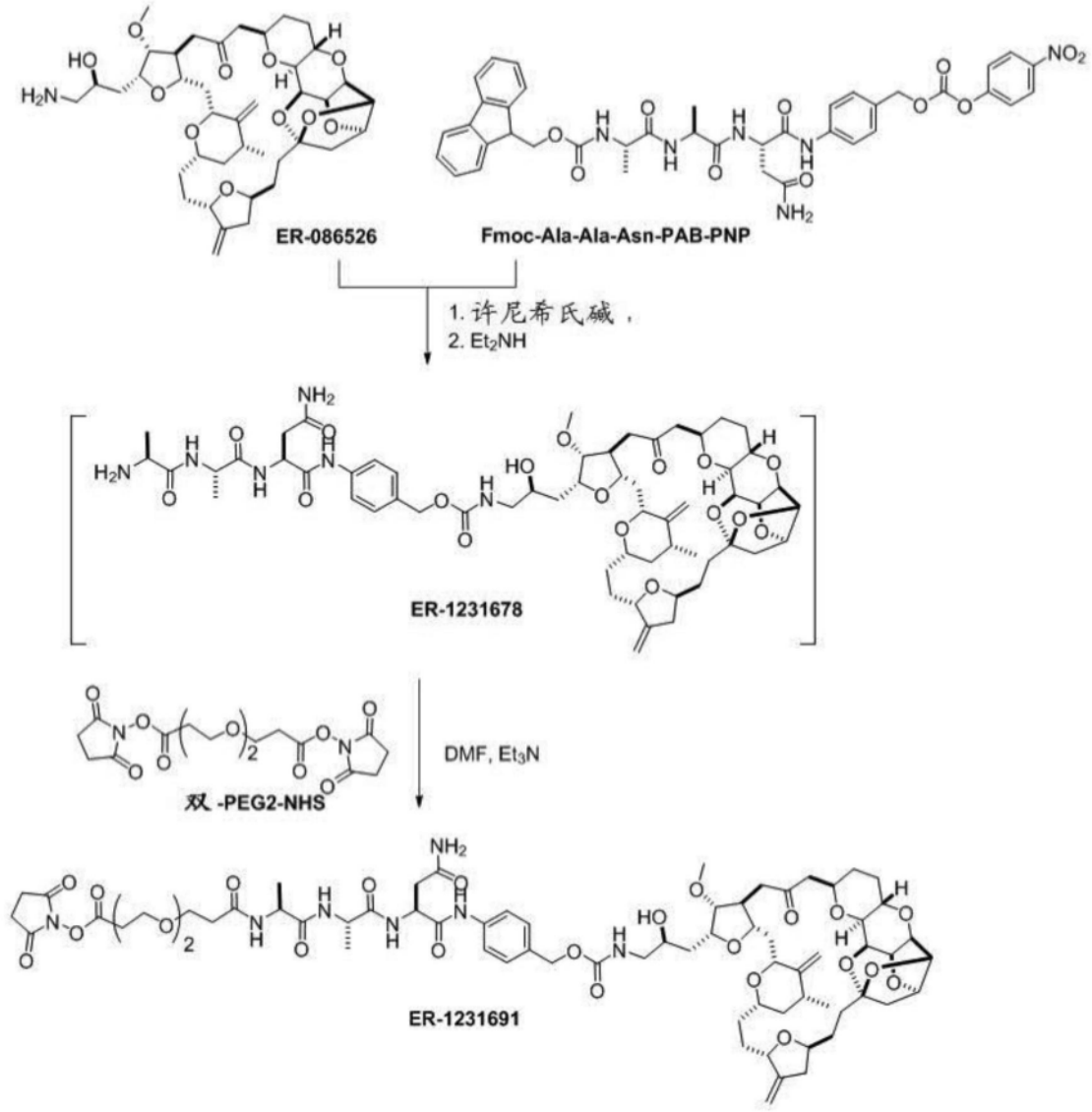
基)乙氧基)丙酸2,5-二氧代基吡咯烷-1-基酯(9.71mg,0.027mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时,直至反应结束,如通过LCMS分析所确定。混合物真空浓缩,且通过快速色谱法纯化,得到呈无色油状的Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231679)(9.2mg,49%产率)和Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-艾日布林(ER-001231690)(6.0mg,18%产率)。

[0632] Mal-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231679):^{1}HNMR(400MHz)δppm 9.23(s,1H),8.00(d,J=7.6Hz,1H),7.61(d,J=8.4Hz,2H),7.38(d,J=6.8Hz,1H),7.24(d,J=8.4Hz,2H),7.13(d,J=7.2Hz,1H),6.68(s,2H),6.30(br s,1H),6.04-6.00(m,1H),5.77(br s,1H),5.42(br s,1H),5.07(s,1H),5.06-4.98(m,2H),4.93(s,1H),4.88(s,1H),4.90-4.82(m,1H),4.80(s,1H),4.69(t,J=4.0Hz,1H),4.60(t,J=4.0Hz,1H),4.49-4.42(m,1H),4.38-4.25(m,4H),4.19(t,J=4.8Hz,1H),4.15-4.08(m,1H),4.03(t,J=4.8Hz,1H),3.97-3.85(m,3H),3.83-3.50(m,12H),3.41(s,3H),3.50-3.10(m,3H),3.02-2.64(m,6H),2.52-2.30(m,7H),2.30-1.65(m,14H),1.65-1.20(m,12H),1.10(d,J=6.8Hz,3H),1.13-1.05(m,1H)。LCMS(M+Na)=1396.6。

[0633] Mal-PEG2-(Ala-Ala-Asn-PAB)2-艾日布林(ER-001231690):^{1}HNMR(400MHz,CD_3OD)δppm 7.65(d,J=8.4Hz,2H),7.60(d,J=8.4Hz,2H),7.28(d,J=8.8Hz,2H),7.23(d,J=8.4Hz,2H),6.79(s,2H),5.13(s,1H),5.02(s,1H),5.06-4.98(m,4H),4.87(s,1H),4.82(s,1H),4.85-4.72(m,2H),4.71(t,J=4.8Hz,1H),4.61(t,J=4.4Hz,1H),4.47(d,J=11.2Hz,1H),4.30-4.06(m,9H),3.97(t,J=4.8Hz,1H),3.89-3.80(m,3H),3.75-3.48(m,12H),3.38(s,3H),3.17(d,J=6.8Hz,2H),2.94-2.62(m,8H),2.50-2.28(m,7H),2.22-1.65(m,14H),1.58-1.30(m,18H),1.10(d,J=6.8Hz,3H),1.06-0.97(m,1H)。LCMS(M+Na)=1802.8。

[0634] 1.9制备NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231691)

[0635]

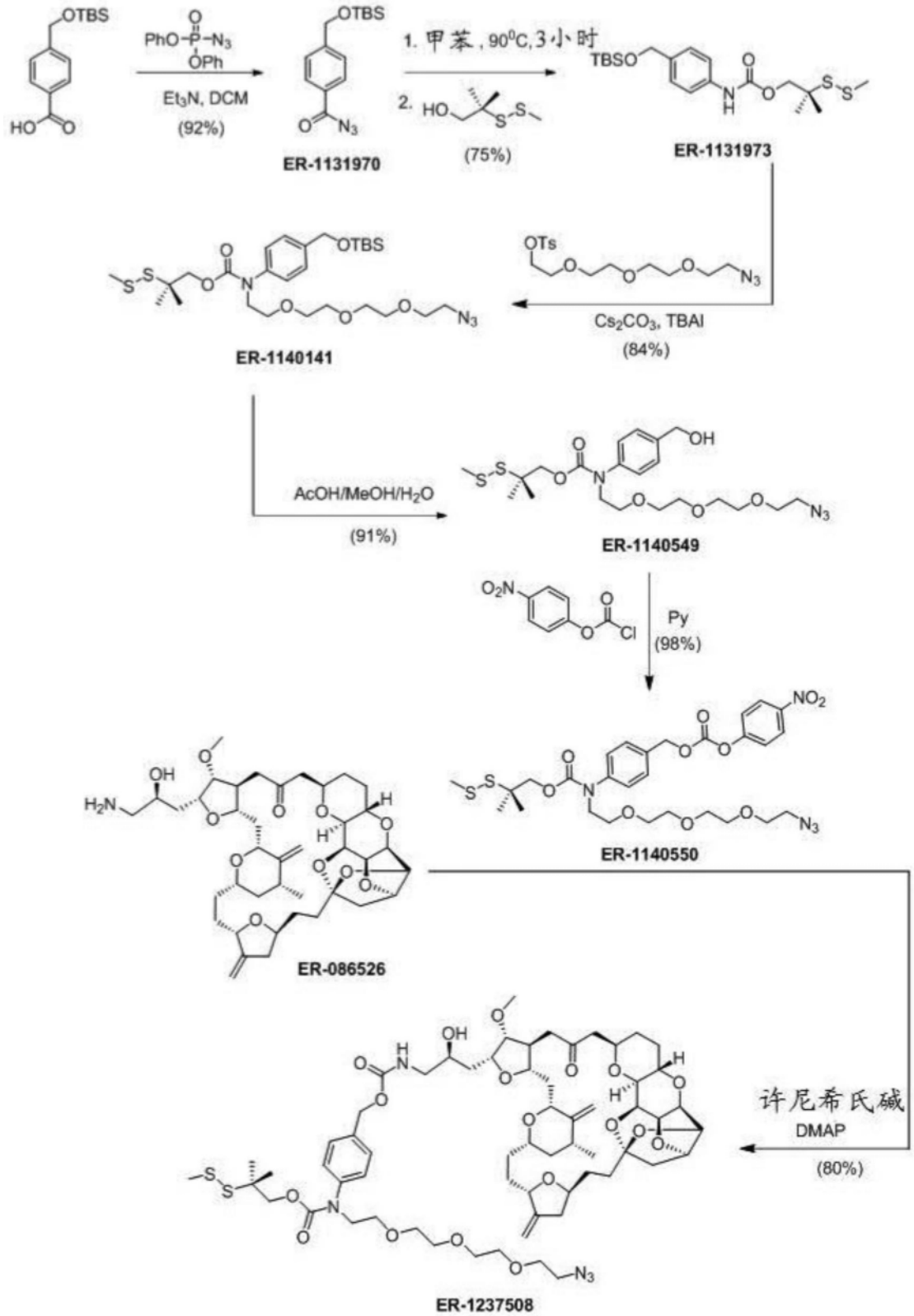


[0636] 使用与以上针对制备Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001228950)所述相同的程序，由艾日布林(ER-000086526)和Fmoc-Ala-Ala-Asn-PAB-PNP制备Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231678)(15mg，产率定量)。LCMS(M+H)＝1135.5。

[0637] 使用与以上针对制备NHS-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001236940)所述相同的程序，由Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231678)和双NHS-PEG2制备NHS-PEG2-Ala-Ala-Asn-PAB-艾日布林(ER-001231691)(12.4mg，64％产率)。^{1}HNMR(400MHz)δppm 9.21(s，1H)，7.95(d，J＝8.0 Hz，1H)，7.62(d，J＝8.8Hz，2H)，7.58-7.52(m，1H)，7.28(br s，1H)，7.24(d，J＝8.4Hz，2H)，7.10(br s，1H)，6.29(d，J＝12.4Hz，1H)，5.83(br s，1H)，5.38(br s，1H)，5.07(s，1H)，5.05-4.95(m，2H)，4.93(s，1H)，4.88(s，1H)，4.90-4.83(m，1H)，4.81(s，1H)，4.69(t，J＝4.4Hz，1H)，4.60(t，J＝4.4Hz，1H)，4.46-4.41(m，1H)，4.36-4.25(m，4H)，4.19(dd，J＝4.8，6.0Hz，1H)，4.15-4.09(m，1H)，4.03(dd，J＝4.8，6.0Hz，1H)，3.99-3.89(m，3H)，3.85-3.50(m，10H)，3.41(s，3H)，3.40-3.10(m，3H)，3.01-2.60(m，10H)，2.60-2.35(m，7H)，2.35-1.65(m，14H)，1.65-1.20(m，14H)，1.10(d，J＝6.8Hz，3H)，1.15-1.03(m，1H)。LCMS(ES)(M+H)＝1442.7。

[0638] 1.10制备叠氮化物-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林(ER-001237508)

[0639]



[0640] 使4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯甲酸(1.0g,3.754mmol)溶于冷却至0℃的二氯甲烷(DCM)(25mL)。接着添加三乙胺(0.549mL,3.941mmol),接着添加叠氮磷酸二苯酯(1.085mg,3.941mmol)。反应混合物缓慢升温至室温且搅拌14小时。将粗混合物用乙酸乙酯(EtOAc)/Hep(1:1,100mL)稀释,且通过短二氧化硅塞,用EtOAc/Hep(50%)洗脱。真空去除溶剂,得到1.10g 4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯甲酰基叠氮化物(ER-

001131970)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 7.98(d,2H,J＝8.0Hz),7.40(d,2H,J＝8.0Hz),4.79(s,2H),0.94(s,9H),0.10(s,6H)。

[0641] 将溶于甲苯(20mL)中的4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯甲酰基叠氮化物(ER-001131970)(1.1g,3.775mmol)在110℃下加热3小时。虽然产物未展示为单个斑点,但薄层色谱(TLC)分析表明起始物质耗尽。接着反应混合物冷却至室温,且转移至密封在氮气下的小瓶且呈甲苯溶液存储(1mL＝32.6mg)在-20℃下。

[0642] 将三乙胺(0.099mL,0.709mmol)添加至叔丁基((4-异氰酸基苯甲基)氧基)二甲基硅烷(165mg,0.626mmol)于甲苯(5mL)中的溶液,接着添加醇(90.0mg,0.591mmol),且将反应混合物在36℃下搅拌6小时。通过UPLC/MS监测反应进展。接着添加饱和碳酸氢钠($NaHCO_3$)溶液(10mL),用EtOAc/Hep(1∶1,60mL)萃取,用盐水洗涤,经硫酸钠干燥,且浓缩。粗物质通过快速色谱法(EtOAc/Hep 10%至40%)纯化,得到215mg(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001131973)。^{1}H NMR(400MHz,)δppm 7.34(d,2H,J＝8.4Hz),7.26(d,2H,J＝7.6Hz),6.63(br.s,1H),4.69(s,2H),4.17(s,2H),2.42(s,3H),1.35(s,6H),0.93(s,9H),0.08(s,6H)。

[0643] 使(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001131973)(198mg,0.476mmol)和4--甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯(325mg,0.87mmol)溶于DMF(6.6mL)中。接着添加碳酸铯(621mg,1.905mmol),接着添加四丁基碘化铵(45mg,0.122mmol),且将反应混合物在36℃下搅拌15小时。通过UPLC/MS监测反应进展。接着添加饱和NH_4Cl溶液(30mL),用EtOAc/Hep(2∶1,150mL)萃取,用盐水(10mL)洗涤,经硫酸钠干燥,且真空浓缩。粗物质通过快速色谱法(EtOAc/Hep 20%至50%)纯化,得到248mg(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001140141)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 7.28(d,2H,J＝8.4Hz),7.20(d,2H,J＝8.0Hz),4.73(s,2H),4.06(br.s,2H),3.83(dd,2H,J＝6.4,5.6Hz),3.68-3.56(m,12H),3.37(dd,2H,J＝5.6,5.2Hz),2.33(s,3H),1.14(br.s,6H),0.93(s,9H),0.09(s,6H)。

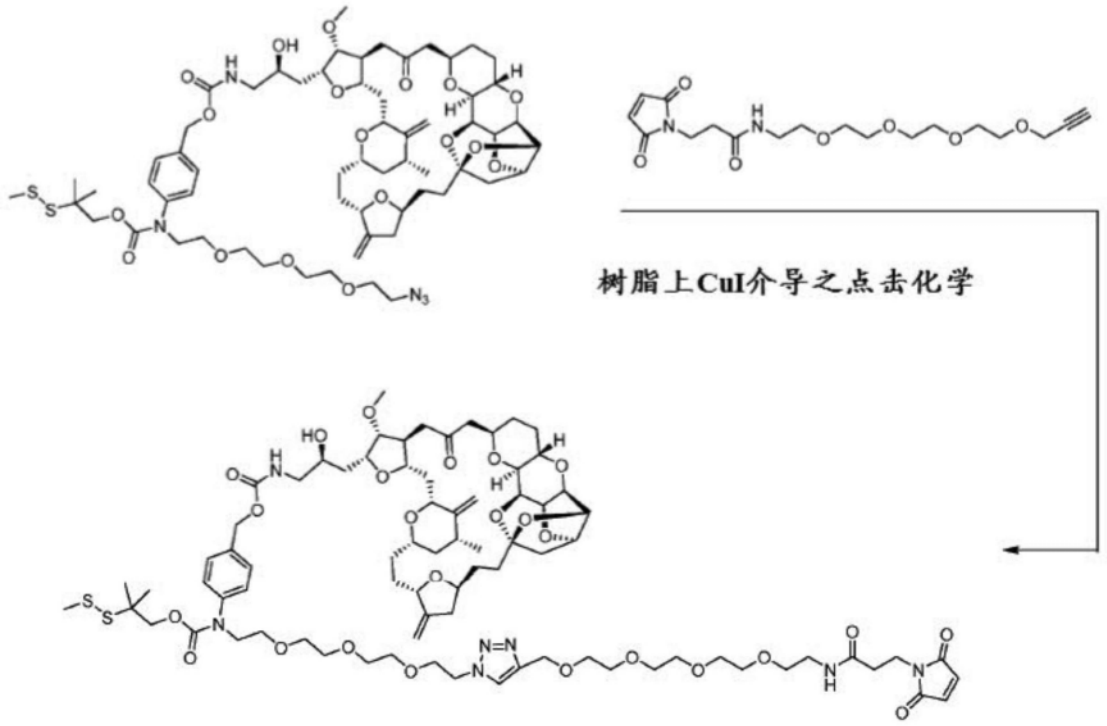
[0644] 使(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001140141)(81mg,0.131mmol)溶解于甲醇(5mL)与水(0.5mL)的混合物。接着将乙酸(0.5mL,8.734mmol)添加至反应混合物,且在38℃下搅拌14小时。反应混合物冷却至室温,且真空去除溶剂。残余物用EtOAc(30mL)稀释,用水(2×5mL)、$NaHCO_3$和盐水(3mL)洗涤,经硫酸钠干燥,且真空浓缩。粗物质通过快速色谱法(EtOAc/Hep30%至90%)纯化,得到61.0mg(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)(4-(羟基甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001140549)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 7.34(d,2H,J＝8.8Hz),7.26(d,2H,J＝8.0Hz),4.69(d,2H,J＝4.4Hz),4.06(br.s,2H),3.84(dd,2H,J＝6.2,6.2Hz),3.66-3.56(m,12H),3.37(dd,2H,J＝5.2,5.2Hz),2.33(s,3H),1.74(br.s,1H),1.14(br.s,6H)。

[0645] 使(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)(4-(羟基甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001140549)(60mg,0.119mmol)溶解于冷却至0℃的DCM(2mL)和Py(0.019mL,0.239mmol)。接着添加含氯甲酸4-硝基苯酯(38.5mg,0.191mmol)的DCM(2mL)和二甲基氨基吡啶(DMAP)(2.9mg,0.024mmol),且将反应混合物在0℃下搅拌

30min。反应混合物缓慢升温至室温，且搅拌直至起始物质耗尽(大约2.5小时)。接着溶剂真空去除，且残余物通过快速色谱法(EtOAc/Hep 10％至35％)纯化，得到78mg(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)(4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001140550)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 8.27(dd,2H,J＝6.8,2.4Hz),7.41(d,2H,J＝8.8Hz),7.37(dd,2H,J＝7.2,2.4Hz),7.33(d,2H,J＝8.8Hz),5.27(s,2H),4.08(br.s,2H),3.85(dd,2H,J＝5.8,5.8Hz),3.66-3.57(m,12H),3.36(dd,2H,J＝5.2,5.2Hz),2.33(br.s,3H),1.19(br.s,6H)。

[0646] 将含(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)(4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基甲酸2-甲基-2-(甲基二硫基)丙酯(ER-001140550)(30mg,0.045mmol)的DCM(3mL,46.625mmol)置于氮气下25ml烧瓶，且冷却至0℃。添加含胺(40.8mg,0.049mmol)的DCM(2mL)和许尼希氏碱(0.024mL,0.135mmol)，接着添加DMAP(1.4mg,0.011mmol)。反应混合物接着缓慢升温至室温，搅拌3小时，真空浓缩，且通过快速色谱法(EtOAc/Hep 50％至100％，接着MeOH/EtOAc 3％至8％)纯化，得到45.0mg纯叠氮化物-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林(ER-001237508)。^{1}H NMR(400MHz)δppm7.32(d,2H,J＝8.0Hz),7.25(d,2H,J＝7.2Hz),5.28(dd,1H,J＝5.6,5.6Hz),5.11-5.04(m,3H),4.93(s,1H),4.88(s,1H),4.81(s,1H),4.69(dd,1H,J＝4.4,4.4Hz),4.60(dd,1H,J＝4.2,4.2Hz),4.36(br.s,1H),4.33(dd,1H,J＝4.0,2.0),4.29(ddd,1H,J＝9.6,4.4,4.4Hz),4.18(dd,1H,J＝6.4,4.4Hz),4.14-4.04(m,3H),4.03(dd,1H,J＝6.4,4.4Hz),3.97-3.89(m,3H),3.84-3.78(m,3H),3.67-3.56(m,14H),3.42(s,3H),3.40-3.35(m,1H),3.37(dd,2H,J＝5.2,5.2Hz),3.27(d,1H,J＝3.2Hz),3.20(ddd,1H,J＝12.8,6.0,6.0Hz),2.91-2.83(m,2H),2.70(dd,1H,J＝16.0,10.0Hz),2.52-2.40(m,3H),2.35-2.13(m,9H),2.10-2.06(m,1H),2.01-1.89(m,4H),1.78-1.64(m,4H),1.60-1.52(m,4H),1.49-1.28(m,5H),1.22-1.07(m,6H),1.09(d,3H,J＝6.0Hz)。

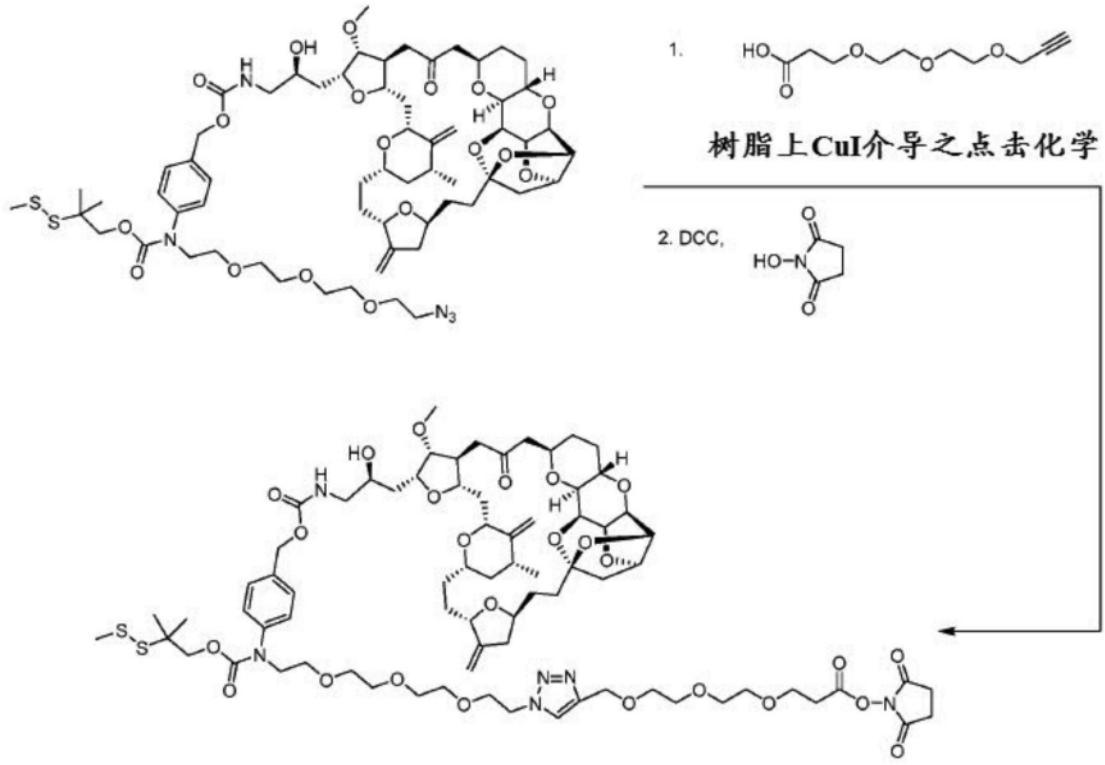
[0647] 1.11制备Mal-PEG4-三唑-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林(ER-001237504)



[0648]

[0649] 使叠氮化物(9.0mg,7.151μmol)和3-(2,5-二氧代基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(3,6,9,12-四氧杂十五-14-炔-1-基)丙酰胺(6.8mg,0.018mmol)于叔丁醇(1.5mL)和水(0.5mL)中的混合物脱气45min。接着添加amberlyst-21(1.23mmol/g,10mg)上碘化铜,且再脱气30min。将反应混合物在室温下搅拌18小时,且通过UPLC/MS监测。大部分起始物质耗尽,且所需产物展示为主要峰。混合物接着从树脂分离,且在HPLC(乙腈/水,含0.05%甲酸)上纯化,得到1.5mg Mal-PEG4-三唑-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林(ER-001237504)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 7.74(s,1H),7.32(d,2H,J=8.4Hz),7.27-7.25(m,2H),6.69(br.s,2H),5.43(dd,1H,J=5.6,5.6Hz),5.14-5.06(m,3H),4.95(s,1H),4.89(s,1H),4.82(s,1H),4.70(dd,1H,J=4.4,4.4Hz),4.66(s,2H),4.62(dd,1H,J=4.4,4.4Hz),4.52(dd,1H,J=5.2,5.2Hz),4.38-4.31(m,2H),4.30(ddd,1H,J=10.4,4.0,4.0Hz),4.20(dd,1H,J=6.4,4.4Hz),4.16-4.05(m,3H),4.04(dd,1H,J=6.4,4.4Hz),3.99-3.91(m,3H),3.87-3.80(m,6H),3.70-3.59(m,22H),3.53(dd,2H,J=5.2,5.2Hz),3.44(s,3H),3.43-3.36(m,3H),3.29(d,1H,J=2.8Hz),3.18(ddd,1H,J=12.9,6.2,6.2Hz),2.92-2.84(m,2H),2.72(dd,1H,J=16.0,10.0Hz),2.54-2.42(m,5H),2.37-1.90(m,19H),178-1.52(m,3H),1.50-1.14(m,16H),1.10(d,3H,J=6.0Hz)。LCMS(M+H)=1642.1。

[0650] 1.12制备NHS-PEG3-三唑-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林(ER-001244129)

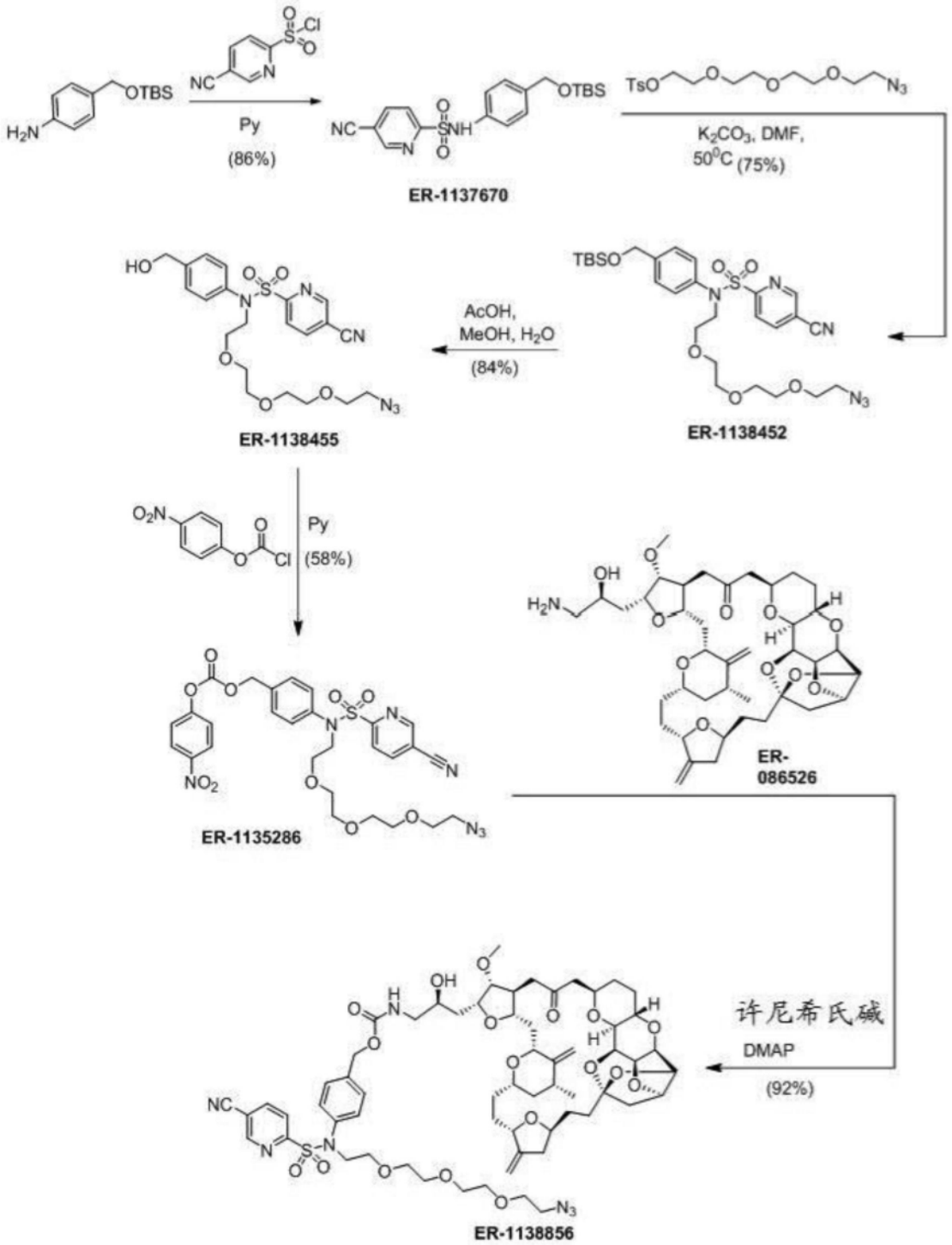


[0651]

[0652] 使叠氮化物(9mg,7.151μmol)和3-(2-(2-(丙-2-炔-1-基氧基)乙氧基)乙氧基)丙酸2,5-二氧代基吡咯烷-1-基酯(4.5mg,14.30μmol)于叔丁醇(1mL)和水(0.5mL)中的混合物脱气45min。接着添加amberlyst-21上碘化铜(1.23mmol/g,10mg,7.151μmol),且再脱气30min。将反应混合物在室温下搅拌18小时,且通过UPLC/MS监测。大部分起始物质耗尽,且所需产物展示为主要峰。混合物接着通过过滤从树脂分离,用DCM(15mL)萃取,用盐水(3×3mL)洗涤,经硫酸钠干燥,且真空浓缩。残余物(5mg,3.39μmol)与甲苯共沸,溶于THF(1mL),且冷却至0℃。添加DCC(4.2mg,0.02mmol),接着添加1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(2.2mg,0.019mmol),且将反应混合物在室温下搅拌18小时。大部分起始物质耗尽,且如通过UPLC/MS确定,所需产物展示为主要峰。接着将反应混合物浓缩且在制备型TLC(DCM/异丙醇,8%)上纯化,得到2.5mg呈无色油状的NHS-PEG3-三唑-PEG3-二硫化物-PAB-艾日布林(ER-001244129)。^{1}H NMR(400MHz,CD_2Cl_2)δppm 7.72(s,1H),7.32(d,2H,J=8.8Hz),7.25(d,2H,J=8.8Hz),5.08-5.04(m,3H),4.93(s,1H),4.85(s,1H),4.78(s,1H),4.64(dd,1H,J=4.4,4.4Hz),4.58(s,2H),4.55(dd,1H,J=4.4,4.4Hz),4.48(dd,2H,J=5.0,5.0Hz),4.32(d,1H,J=6.6Hz),4.27-4.22(m,2H),4.14(dd,1H,J=6.6,4.8Hz),4.10-4.01(m,3H),4.00(dd,1H,J=6.8,4.4Hz),3.92-3.78(m,9H),3.65-3.53(m,19H),3.44-3.39(m,4H),3.37(s,3H),3.26(d,1H,J=3.2Hz),3.13(ddd,1H,J=12.4,6.0,6.0Hz),2.91-2.73(m,11H),2.70-2.64(m,2H),2.54-2.41(m,3H),2.38-1.80(m,16H),1.74-1.52(m,3H),1.41-1.13(m,10H),1.07(d,3H,J=6.4Hz)。LCMS(M+H)=1572.3。

[0653] 1.13制备叠氮化物-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林(ER-001138856)

[0654]



[0655] 使4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯胺(315mg,1.327mmol)溶解于冷却至0℃的DCM(10mL)。接着添加吡啶(0.268mL,3.317mmol),接着经15min添加含5-氰基吡啶-2-磺酰氯(365mg,1.801mmol)的DCM(10mL)。反应混合物经1小时缓慢升温至室温,且搅拌2小时。反应混合物用EtOAc(50mL)稀释,用盐水洗涤,经硫酸钠干燥,且真空浓缩,得到610mg(103%)N-(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)-5-氰基吡啶-2-磺酰胺(ER-001137670)。粗产物理论上是纯的,不过有颜色。^{1}H NMR(400MHz)δppm 8.94(dd,1H,J=1.8,0.6Hz),8.10(dd,1H,J=8.4,2.0Hz),7.99(dd,1H,J=8.0,0.8Hz),7.18(d,2H,J=8.2Hz),7.15(br.s,1H),7.11(dd,2H,J=6.8,0.8Hz),4.64(s,2H),0.90(s,9H),0.05(s,

6H)。

[0656] 使N-(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)-5-氰基吡啶-2-磺酰胺(ER-001137670)(105.0mg,0.26mmol)和4-甲基苯磺酸2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙酯(143mg,0.383mmol)溶于DMF(4mL)中。接着添加碳酸钾(K_2CO_3)(144mg,1.041mmol),接着添加四丁基碘化铵(19.2mg,0.052mmol),且将反应混合物在50℃下搅拌36小时。通过UPLC/MS监测反应进展。添加饱和NH_4Cl溶液(10mL),用EtOAc/Hep(2:1,30mL)萃取,用盐水洗涤,经硫酸钠干燥,且浓缩。粗物质通过快速色谱法(EtOAc/Hep 25%至80%)纯化,得到118.0mg N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)-5-氰基吡啶-2-磺酰胺(ER-001138452)(75%)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 8.99(dd,1H,J=1.8,0.6Hz),8.08(dd,1H,J=8.2,2.2Hz),7.86(dd,1H,J=8.0,0.8Hz),7.24(d,2H,J=10Hz),7.09(d,2H,J=8.8Hz),4.69(s,2H),4.06(dd,2H,J=6.0,6.0Hz),3.67(dd,2H,J=5.2,5.2Hz),3.65-3.62(m,4H),3.58(dd,2H,J=6.2,6.2Hz),3.56-3.53(m,4H),3.38(dd,2H,J=5.2,5.2Hz),0.93(s,9H),0.08(s,6H)。

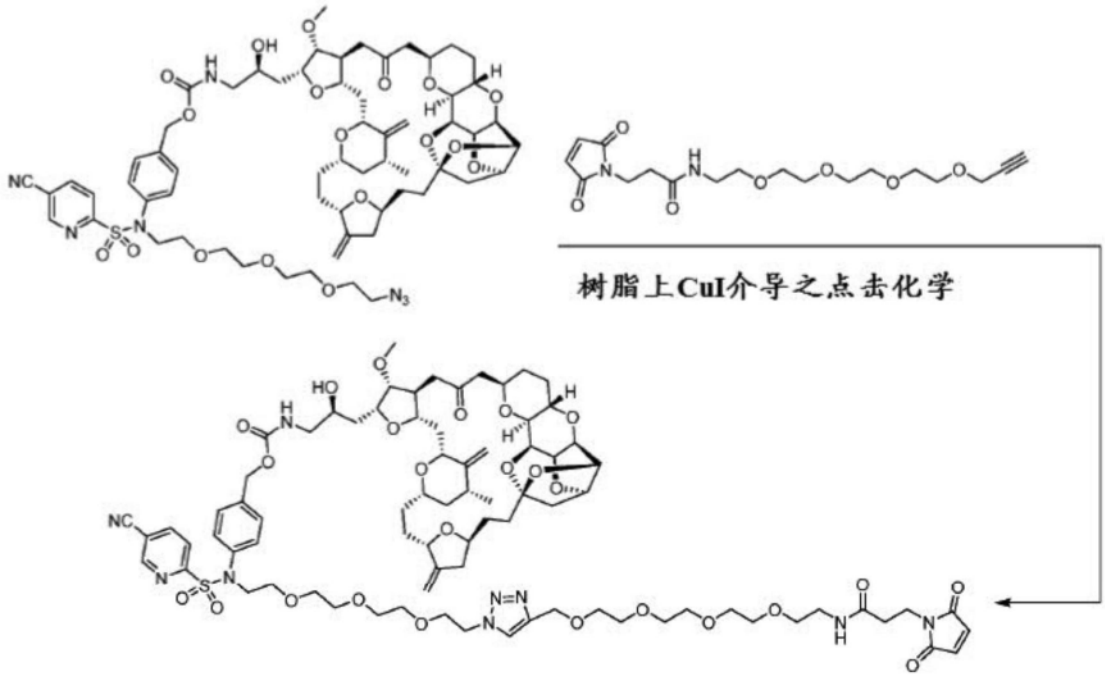
[0657] 使N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-N-(4-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)苯基)-5-氰基吡啶-2-磺酰胺(ER-001138452)(150mg,0.248mmol)溶解于甲醇(6mL)。接着添加水(0.60mL),接着添加乙酸(AcOH)(0.60mL,10.481mmol)。反应混合物缓慢升温至38℃,且搅拌14小时。真空去除大部分溶剂。残余物用EtOAc(30mL)稀释,用水(2×5mL)、$NaHCO_3$和盐水洗涤,经硫酸钠干燥,且真空浓缩。粗物质通过快速色谱法(EtOAc/Hep 35%至90%)纯化,得到105.0mg N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-5-氰基-N-(4-(羟基甲基)苯基)吡啶-2-磺酰胺(ER-001138455)(84%)。^{1}H NMR(400MHz)δppm 8.99(d,1H,J=1.2Hz),8.09(dd,1H,J=8.4,2.0Hz),7.88(dd,1H,J=8.4,0.8Hz),7.30(d,2H,J=8.8Hz),7.15(d,2H,J=8.4Hz),4.67(s,2H),4.06(dd,2H,J=6.2,6.2Hz),3.66(dd,2H,J=5.0,5.0Hz),3.65-3.58(m,6H),3.55-3.51(m,4H),3.38(dd,2H,J=5.2,5.2Hz。

[0658] 使N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-5-氰基-N-(4-(羟基甲基)苯基)吡啶-2-磺酰胺(ER-001138455)(45mg,0.092mmol)溶解于DCM(3mL),且在添加吡啶(0.015mL,0.183mmol)后冷却至0℃。接着添加含氯甲酸4-硝基苯酯(20.3mg,0.101mmol)的DCM(2mL)和DMAP(2.3mg,0.018mmol)。反应混合物缓慢升温至室温且搅拌2小时。UPLC/MS指示剩余一些起始物质。反应混合物接着真空浓缩,且通过快速色谱法(EtOAc/Hep 12%至40%)纯化,得到35mg碳酸4-((N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-5-氰基吡啶)-2-磺酰胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(ER-001235286)(58%)和20mg起始物质。^{1}H NMR(400MHz)δppm 8.99(d,1H,J=0.8Hz),8.27(dd,2H,J=9.2,2.0Hz),8.12(dd,1H,J=7.6,2.0Hz),7.92(d,1H,J=8.4Hz),7.38(d,4H,J=9.6Hz),7.26(d,2H,J=8.8Hz),5.45(s,2H),4.06(dd,2H,J=5.8,5.8Hz),3.67-3.58(m,8H),3.58-3.50(m,4H),3.38(dd,2H,J=6.1,6.1Hz)。

[0659] 将碳酸4-(N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-5-氰基吡啶-2-磺酰胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(ER-001235286)(35.0mg,0.053mmol)置于氮气下25mL烧瓶中,且冷却至0℃。接着添加含胺(48.5mg,0.059mmol)的DCM(3mL,46.625mmol)和许尼希氏碱(0.037mL,0.214mmol),接着添加DMAP(2.61mg,0.021mmol)。将反应混合物在0℃下搅

拌30min,且接着在室温下再搅拌6小时。反应混合物真空浓缩,且通过快速色谱法(EtOAc/Hep 50%至100%,接着MeOH/EtOAc 3%至8%)纯化,得到61.0mg纯叠氮化物-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林(ER-001138856)。^{1}H NMR(400MHz)δppm8.98(d,1H,J=1.2Hz),8.10(dd,1H,J=8.2,1.8Hz),7.87(d,1H,J=8.0Hz),7.26(d,2H,J=6.8Hz),7.13(d,2H,J=8.4Hz),5.29(dd,1H,J=5.6,5.6Hz),5.08-5.00(m,3H),4.92(s,1H),4.87(s,1H),4.80(s,1H),4.68(dd,1H,J=4.6,4.6Hz),4.59(dd,1H,J=4.6,4.6Hz),4.38-4.30(m,2H),4.28(ddd,1H,J=10.4,4.0,4.0,Hz),4.17(dd,1H,J=6.2,4.6Hz),4.13-4.01(m,4H),3.97-3.88(m,3H),3.82-3.78(m,1H),3.67-3.50(m,15H),3.41(s,3H),3.40-3.33(m,1H),3.37(dd,2H,J=4.8,4.8Hz),3.27(d,1H,J=3.2Hz),3.15(ddd,1H,J=12.8,6.4,6.4Hz),2.90-2.82(m,2H),2.70(dd,1H,J=16.0,10.0Hz),2.51-2.40(m,3H),2.34-2.13(m,7H),2.10-2.05(m,1H),1.99-1.88(m,4H),1.78-1.64(m,5H),1.62-1.52(m,2H),1.50-1.29(m,4H),1.08(d,3H,J=6.8Hz)。

[0660] 1.14制备Mal-PEG4-三唑-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林(ER-001237505)

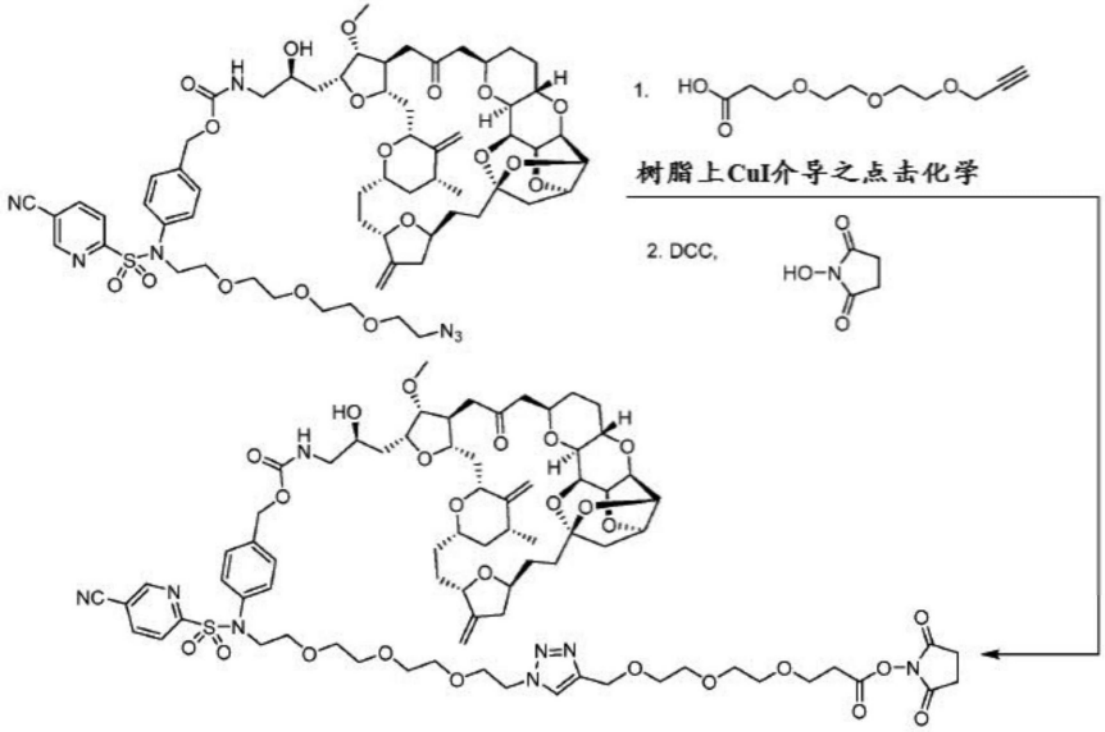
[0661] 

[0662] 使叠氮化物(10mg,8.023μmol)和3-(2,5-二氧代基-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(3,6,9,12-四氧杂十五-14-炔-1-基)丙酰胺(9.20mg,0.024mmol)于叔丁醇(2.1mL)和水(0.7mL)中的混合物脱气45min。接着添加amberlyst-21上的碘化铜(1.23mmol/g,15mg),且再脱气30min。将反应混合物在室温下搅拌18小时,且通过UPLC/MS监测。大部分起始物质耗尽,且所需产物展示为主要峰。反应混合物接着从树脂分离,且在制备型TLC(DCM/甲醇,7%)上纯化,得到5.5mgMal-PEG4-三唑-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林(ER-001237505)。^{1}H NMR(400MHz,CD_2Cl_2)δppm 9.01(s,1H),8.15(dd,1H,J=8.0,1.8Hz),7.87(d,1H,J=8.0Hz),7.75(s,1H),7.28(d,2H,J=8.0Hz),7.14(d,2H,J=8.4Hz),6.68(s,2H),6.47(br.s,1H),5.44(br.s,1H),5.10-5.02(m,3H),4.94(s,1H),4.86(s,1H),4.80(s,1H),4.68(dd,1H,J=4.4,4.4Hz),4.59(s,2H),4.56(dd,1H,J=4.4,4.4Hz),4.51(dd,2H,J=5.2,5.2,Hz),4.34(d,1H,J=7.6,Hz),4.30-4.23(m,2H),4.19-4.14(m,2H),4.08(dd,1H,J=

4.0,4.0Hz),4.03-3.98(m,2H),3.94-3.72(m,8H),3.68-3.46(m,28H),3.38(s,3H),3.38-3.33(m,3H),3.27(d,1H,J＝3.2Hz),3.16-3.02(m,2H),2.90-2.81(m,2H),2.68(dd,1H,J＝16.2,9.8Hz),2.54-2.40(m,7H),2.40-1.8(m,11H),1.80-1.50(m,3H),1.48-1.25(m,3H),1.09(d,3H,J＝6.4Hz)。LCMS(M+H)＝1630.0。

[0663] 1.15制备NHS-PEG3-三唑-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林(ER-001244623)

[0664]



[0665] 使叠氮化物(14mg,0.011mmol)和3-(2-(2-(丙-2-炔-1-基氧基)乙氧基)乙氧基)丙酸2,5-二氧代基吡咯烷-1-基酯(8.80mg,0.028mmol)于叔丁醇(2mL)和水(1mL)中的混合物脱气45min。接着添加amberlyst-21上的碘化铜(1.23mmol/g,20mg),且再脱气30min。将反应混合物在室温下搅拌18小时,且通过UPLC/MS监测。大部分起始物质耗尽,且所需产物展示为主要峰。反应混合物接着通过用DCM(2×10mL)萃取从树脂分离。DCM层用盐水(4×5mL)洗涤,经硫酸钠干燥,且浓缩成所需产物(其未经任何进一步纯化即用于下一步)。

[0666] 使粗酸(15.0mg,10.255μmol)溶解于THF(1.5mL),且冷却至0℃。接着添加DCC(15.2mg,0.074mmol),接着添加1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(8.3mg,0.072mmol)。将反应混合物在室温下搅拌18小时。UPLC/MS指示大部分起始物质耗尽,且所需产物展示为主要峰。反应混合物浓缩,且在制备型TLC(DCM/异丙醇,8%)上纯化,得到2.5mg NHS-PEG3-三唑-PEG3-磺酰胺-PAB-艾日布林(ER-001244623)。^{1}H NMR(400MHz,CD_2Cl_2)δppm9.00(s,1H),8.12(d,1H,J＝8.4Hz),8.00(d,1H,J＝8.0Hz),7.72(s,1H),7.26(d,2H,J＝8.0Hz),7.12(d,2H,J＝8.0Hz),5.37(br.s,1H),5.08-5.02(m,3H),4.93(s,1H),4.85(s,1H),4.78(s,1H),4.66-4.62(m,1H),4.58-4.56(m,4H),4.33(d,1H,J＝10.8Hz),4.29-4.21(m,2H),4.10-3.96(m,4H),3.93-3.76(m,6H),3.74-3.44(m,27H),3.36(s,3H),3.34-3.24(m,2H),3.15-3.06(m,1H),2.97(br.s,1H),2.90-2.78(m,8H),2.74-2.08(m,13H),2.05-1.78(m,5H),1.73-1.50(m,2H),1.41-1.25(m,4H),1.07(d,3H,J＝6.0Hz)。LCMS(M+H)＝1560.0。

[0667] 1.16制备Mal-PEG2-艾日布林

[0668] 使艾日布林(5mg,7μmol)溶解于DMF(0.5mL),且与顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-NHS(5mg,14μmol;Broadpharm,目录号BP-21680)和许尼希氏碱(2.4μL,14μmol)混合。将反应混合物在室温下搅拌2小时。反应混合物接着通过HPLC(水-乙腈梯度30-70%,含有0.1%甲酸)纯化。洗脱剂以质量计来收集,且冻干至干燥。最终产率为3.7mg(3.8μmol,54%)。预测精确质量为968.5Da。测量质量为969.6Da[M+H]。

[0669] 1.17制备Mal-PEG4-艾日布林

[0670] 使艾日布林(5mg,7μmol)溶解于DMF(0.5mL),且与顺丁烯二酰亚胺基-PEG4-NHS(6.2mg,14μmol;Broadpharm,目录号BP-20554)和许尼希氏碱(2.4μL,14μmol)混合。将反应混合物在室温下搅拌2小时。反应混合物接着通过HPLC(水-乙腈梯度30-70%,含有0.1%甲酸)纯化。洗脱剂以质量计来收集,且冻干至干燥。最终产率为3.7mg(3.5μmol,50%)。预测精确质量为1056.5Da。测量质量为1057.7Da[M+H]。

[0671] 1.18制备叠氮基-PEG2-艾日布林

[0672] 使艾日布林(5mg,7μmol)溶解于DMF(0.5mL),且与叠氮基-PEG2-NHS(4.2mg,14μmol;Broadpharm,目录号BP-20524)和许尼希氏碱(2.4μL,14μmol)混合。将反应混合物在室温下搅拌2小时。反应混合物接着通过HPLC(水-乙腈梯度30-70%,含有0.1%甲酸)纯化。洗脱剂以质量计来收集,且冻干至干燥。最终产率为2.2mg(2.4μmol,34%)。预测精确质量为914.5Da。测量质量为915.7Da[M+H]。

[0673] 1.19制备叠氮基-PEG4-艾日布林

[0674] 使艾日布林(5mg,7μmol)溶解于DMF(0.5mL),且与叠氮基-PEG4-NHS(5.5mg,14μmol;Broadpharm,目录号BP-20518)和许尼希氏碱(2.4μL,14μmol)混合。将反应混合物在室温下搅拌2小时。反应混合物接着通过HPLC(水-乙腈梯度30-70%,含有0.1%甲酸)纯化。洗脱液以质量计来收集,且冻干至干燥。最终产率为3.0mg(3.0μmol,43%)。预测精确质量为1002.5Da。测量质量为1003.7Da[M+H]。

[0675] 1.20制备叠氮基-PEG4-Val-Cit-PAB-艾日布林

[0676] 使艾日布林(15mg,21μmol)溶解于DMF(1.5mL),且充分混合。接着添加许尼希氏碱(5.5μL,32μmol)和Fmoc-VCP-PNP(24mg,22μmol;Levena Biopharma,目录号VC1003)。将反应混合物在室温下搅拌过夜(16小时)。反应结束后,将二乙胺(20μL,0.21mmol)添加至反应混合物,且在室温下搅拌2小时以去除Fmoc保护基。使用Waters SQD质谱仪监测脱除保护基反应。反应结束后,将反应混合物转移至预称重的1.5mL微量离心管。使用冷冻Centrivap浓缩器将溶剂真空蒸发,温度设定在30℃。产率为16mg(14μmol)粗NH2-Val-Cit-pAB-艾日布林(精确质量1134.6Da,67%产率)。

[0677] 使NH2-Val-Cit-pAB-艾日布林(16mg,14.1μmol)溶解于DMF(1.5mL)。接着添加许尼希氏碱(7.2μL,41μmol)和叠氮基-PEG4-NHS(11mg,28.2μmol)。将反应混合物在室温下搅拌3小时。反应混合物接着通过HPLC(水-乙腈梯度48-72%,含有0.1%甲酸)纯化。在m/z 1409下收集洗脱液,且冻干得到叠氮基-PEG4-Val-Cit-PAB-艾日布林(精确质量1407.7Da)。获得13mg(9.2μmol)叠氮基-PEG4-Val-Cit-PAB-艾日布林(65%分步产率,整体44%)。

[0678] 实施例4

[0679] 1.材料与方法

[0680] 除非另有指示，否则所有使用的试剂都从商业供应者以研究级别或更高级别获得。

[0681] 1.1抗体

[0682] 用于以下研究中的MORAb-003(人源化抗人类叶酸受体α，25mg/mL)和MORAb-009(小鼠-人类嵌合抗人类间皮素，25mg/mL)分别来自货号NB02962-19和货号030A14。曲妥珠单抗可购得(Clingen)，且来自货号503345。

[0683] 在LCcys80具有未配对半胱氨酸的兔-人类嵌合和人源化抗人类间皮素抗体(表1)在293F细胞中短暂表达或表达为稳定选择的汇集物。条件培养基如部分1.4.1.2.1中所述纯化和脱半胱氨酸化。

[0684] 1.2细胞毒素

[0685] 可偶联艾日布林化合物如实施例3中所述合成(表46)。原料(10mM)在DMSO中制备且存储在-20℃下，直至使用。

[0686] 1.3肿瘤细胞系

[0687] 在MORAb-003、MORAb-009和用顺丁烯二酰亚胺基/丁二酰亚胺(OSu)/叠氮基-连接子-艾日布林化合物制备的曲妥珠单抗ADC(表46)的分析中使用的人类肿瘤细胞系包括IGROV1(人类卵巢癌，FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)、NCI-H2110(人类非小细胞肺癌，FR^{med}、$MSLN^{med}$)、A431(FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)、NCI-N87-luc(人类胃癌，FR^{lo}、$MSLN^{med}$、$her2^{hi}$)、NUGC3(人类胃腺癌，FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{neg}$)、ZR75(人类乳房导管癌，FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{med}$)和BT-474(人类乳房导管癌，FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{hi}$)。在与MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001159569)偶联的兔-人类嵌合和人源化抗人类间皮素LCcys 80抗体的分析中使用的人类肿瘤细胞系为A3(经人类间皮素稳定转染的A431，$MSLN^{hi}$)、OVCAR3(人类卵巢癌，$MSLN^{hi}$)、HEC-251(人类子宫内膜样，$MSLN^{med}$)、H226(人类肺鳞状上皮细胞间皮瘤，$MSLN^{lo}$)和A431亲本($MSLN^{neg}$)。使用的所有细胞系直接获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)，其中例外为IGROV1(在许可下获自美国国家癌症研究所(National Cancer Institute))和A3(在Morphotek由亲本A431产生)。

[0688] 1.4抗体-药物偶联

[0689] 1.4.1使用顺丁烯二酰亚胺的基于半胱氨酸的偶联

[0690] 1.4.1.1偶联于链间二硫化物

[0691] 1.4.1.1.1部分还原

[0692] MORAb-003和MORAb-009经缓冲液更换至杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水(DPBS)，然后使用离心浓缩，浓缩至20mg/mL。添加同等体积的含270μM三(2-羧乙基)膦(TCEP)的具2mM EDTA的1X DPBS，且在室温下通过轻缓混合80min来还原。除了通过在室温下轻缓混合40min来还原，曲妥珠单抗以类似方式部分还原。

[0693] 1.4.1.1.2偶联

[0694] 将顺丁烯二酰亚胺基-连接子-艾日布林化合物(于DMSO中)以1:6(mAb:化合物)的摩尔比偶联于部分还原的抗体。将化合物添加至含50％丙二醇的DPBS且充分混合。接着添加同等体积的部分还原的抗体，且轻缓混合(最终丙二醇浓度为25％)。在室温下偶联3.5至4小时。

[0695] 1.4.1.2偶联于LCcys80

[0696] 1.4.1.2.1脱半胱氨酰化

[0697] 使用ÄKTA Explorer(GE Healthcare),蛋白A柱(GE Healthcare)用10柱体积(CV)20mM磷酸钠、10mM EDTA pH 7.2(平衡缓冲液)平衡。然后负载条件培养基,接着用10CV平衡缓冲液洗涤未偶联的物质。将柱用16CV 20mM磷酸钠、10mM EDTA、5mM半胱氨酸pH 7.2以0.5mL/min洗涤16小时,以去除封端基团。接着柱用60CV 20mM Tris pH 7.5以0.5mL/min洗涤60小时。使用5CV 0.1M甘氨酸pH 2.9洗脱脱半胱氨酰化的抗体,且使用5体积%2M Tris pH 9.0立即中和。将含有抗体的洗脱份汇集,且使用MWCO 20K Slide-A-Lyzer(Thermo Fisher),在DPBS中渗析。

[0698] 1.4.1.2.2偶联

[0699] 将脱半胱氨酰化抗体在DPBS、1mM EDTA中达至5.0mg/mL,且在DPBS、1mM EDTA中制备50%丙二醇。MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001159569)(DMSO中12mM)添加至50%丙二醇且充分混合。接着以1:4(mAb:化合物)的摩尔比添加同等体积的脱半胱氨酰化抗体,且轻缓混合。在室温下偶联3.5至4小时。

[0700] 1.4.2使用丁二酰亚胺的基于胺的偶联

[0701] 1.4.2.1偶联

[0702] 抗体(MORAb-003或MORAb-009,未还原)在0.1M碳酸氢钠pH 8.3中达至10.0mg/mL。在0.1M碳酸氢钠pH 8.3中制备50%丙二醇。将丁二酰亚胺(OSu)-连接子-艾日布林(于DMSO中)添加至50%丙二醇且充分混合。接着以1:4(mAb:化合物)的摩尔比添加同等体积的抗体,且充分混合。在室温下偶联1小时。通过添加1:20体积的1M Tris pH 8.0,淬灭偶联反应,且ADC如部分1.4.4中所述纯化。

[0703] 1.4.3使用张力促进的炔-叠氮化物化学(SPAAC)的两步基于胺的偶联

[0704] 1.4.3.1二苯甲基环辛炔(DBCO)衍生化

[0705] 抗体(MORAb-003或MORAb-009,未还原)在0.1M碳酸氢钠pH 8.3中达至10.0mg/mL。50%丙二醇在0.1M碳酸氢钠pH 8.3中制备。将NHS-PEG_4-DBCO(Click Chemistry Tools,DMSO中50mM)添加至50%丙二醇且充分混合。接着以1:4(mAb:化合物)的摩尔比添加同等体积的抗体,且充分混合。在室温下偶联1小时。如部分1.4.4中所述纯化,去除未反应的NHS-PEG_4-DBCO。

[0706] 1.4.3.2偶联

[0707] 在DPBS中制备50%丙二醇。将叠氮基-连接子-艾日布林化合物添加至50%丙二醇且充分混合。接着将同等体积的经DBCO修饰的MORAb-003或MORAb-009以1:4(mAb:化合物)的摩尔比添加至混合物,且充分混合。使SPAAC偶联在室温下进行过夜。如部分1.4.4中所述纯化,去除未反应的NHS-PEG_4-DBCO。

[0708] 1.4.4纯化

[0709] 使用HiTrap脱盐柱(GE Healthcare)纯化偶联的抗体。在快速蛋白质液相色谱(FPLC)(GE Healthcare)上,使用1X DPBS作为操作缓冲液,进行色谱法,以去除顺丁烯二酰亚胺基/OSu/叠氮基-连接子-艾日布林和丙二醇。如实施例1的部分1.3.1中所述,通过BCA测定来测定最终蛋白质含量。

[0710] 1.5生物物理学表征

[0711] 1.5.1SEC-HPLC分析

[0712] 通过尺寸排阻高效液相色谱(SEC-HPLC),使用Agilent 1260HPLC分析ADC的聚集。将ADC在DPBS中稀释至1mg/mL。接着将ADC(10μL)注射至Advanced SEC300A保护柱(4.6mm×3.5cm,2.7μm孔径,Agilent),接着AdvancedBio 300A柱(4.6mm×30cm,2.7μm孔径)。将ADC用含有0.15M NaCl和5%IPA pH 7.4的0.1M磷酸钠以0.25mL/min的流速从柱洗脱28min。使用Agilent ChemStation软件分析所有数据。聚集%计算为[$PA_{聚集}/PA_{全部}$]×100,其中PA=积分峰面积。

[0713] 1.5.2药物抗体比率(DAR)的HIC-HPLC分析

[0714] 使用疏水相互作用HPLC(HIC-HPLC)分析DAR。将样品注射至TSKgel® 丁基-NP5,4.6mm ID×3.5cm,2.5μM无孔尺寸柱(Tosoh Bioscience)上,且以0.7mL/min洗脱,其中在100%流动相A中平衡3min,15min梯度(0-100%B),5min保持在100%B中,1min变成100%A,和在100%流动相A中再平衡5min。流动相A为25mM磷酸钠、1.5M硫酸铵pH 7.0。流动相B为25mM磷酸钠、25%异丙醇pH 7.0。检测在280nm(参考320nm)下进行。通过下式确定DAR:

[0715] [AUC_{+1}+2(AUC_{+2})+3(AUC_{+3})+...n(AUC_{+11})]/Σ$AUC_{总}$]

[0716] 其中AUC_{+1}为对应于与一种细胞毒素偶联的ADC的抗体峰的曲线下面积,AUC_{+2}为对应于与两种细胞毒素偶联的ADC的抗体峰的曲线下面积等等。Σ$AUC_{总}$为所有峰值的组合曲线下面积。

[0717] 1.5.3 LC-MS DAR分析

[0718] 还使用LC-MS法,利用Waters Alliance HPLC与SQD/PDA检测,分析DAR。在65℃下将样品注射至Proteomix RP-1000柱(5μM,1000A,4.6mm×15cm,Sepax)上,且洗脱,其中在25%B中平衡3min,从25%-55%B为27min线性梯度,5min保持在55%B下,1min变成90%B,5min保持在90%B下,1min变回25%B,和在25%B下再平衡5min。流动相A为含0.1%TFA的水,且流动相B为含0.1%TFA的乙腈。接着洗脱液分开(10∶1)至PDA和SQD检测器。将SQD检测器设定为ES+,毛细管电压为3.2kV,锥电压为40V,提取器为3V,且RF镜为0.2V,源温为150℃,且脱溶剂温度为250℃。质量数据在200-2000m/z下获得,历时40min,连续模式,扫描时间1秒。使用MassLynx和MaxEnt 1分析数据且脱机反卷积。使用下式计算DAR:

[0719] 2[[AUC_{LC+1}+2(AUC_{LC+2})+3(AUC_{LC+3})+...n(AUC_{LC+n})]/ΣI_{LC}总]+

[0720] 2[[AUC_{HC+1}+2(AUC_{HC+2})+3(AUC_{HC+3})+...n(AUC_{HC+n})]/ΣAUC_{HC}总]

[0721] 其中AUC_{LC+1}为与一种细胞毒素偶联的轻链峰的曲线下面积,AUC_{LC+2}为与两种细胞毒素偶联的轻链峰的曲线下面积等等。AUC_{HC}为对应重链的曲线下面积,且ΣAUC_{LC}总和ΣAUC_{HC}总分别为所有未偶联和偶联的轻链和重链的组合曲线下面积。

[0722] 1.5.4 LCcys80 ADC的UPLC/ESI-MS DAR分析

[0723] 通过添加DTT达至20mM的最终浓度,还原ADC(1mg/mL),接着在60℃下孵育3min。接着使用Waters Acquity超高效液相色谱和Q-Tof Premier质谱仪分析样品。在65℃下将样品(各0.5-2μg)注射至MassPrep微型脱盐柱上,以0.05mL/min,从柱洗脱,其中在95%流动相A中平衡5min,10min梯度(5-90%B),和在95%流动相A中再平衡10min。流动相A为含0.1%甲酸的水。流动相B为含0.1%甲酸的乙腈。Q-Tof质谱仪呈正离子电压模式操作,检测在500-4000m/z范围内。源参数如下:毛细管电压,2.25kV(完整抗体)-2.50kV(还原抗体);取样锥电压,65.0V(完整抗体)或50.0V(还原抗体);源温,105℃;脱溶剂温度,250℃;脱溶剂气体流速,550L/小时。使用MassLynx MaxEnt 1函数将轻链蛋白质峰反卷积。未偶联和单

偶联的轻链质量的相对强度用于使用下式计算整体DAR：

[0724] $2[LC_{+1}/\Sigma LC_{总}]$

[0725] 其中LC_{+1}为与一种细胞毒素偶联的轻链的质量强度，$\Sigma LC_{总}$为未偶联和偶联的轻链的组合强度。

[0726] 1.6结合表征

[0727] 1.6.1 BIAcore

[0728] 在HBS-P+缓冲液(GE Healthcare)中抗体浓度调至2μg/mL。将未修饰的抗体或ADC以10μL/min的流速注射在BIAcore T100(GE Healthcare)上的抗人类IgG传感器上，历时1min。为记录抗原与捕捉抗体的缔合，将一系列递增浓度的抗原以30μL/min的流速注射300秒。对于抗间皮素抗体，浓度范围为10nM-0.041nM。对于MORAb-003和MORAb-009 ADC，浓度范围为100nM-0.41nM。在相同流速下监测抗原的解离30min。通过以30μL/min的流速注射3M $MgCl_2$达2×30秒，来使传感器表面再生。使用Biacore T100评估软件，使用1:1朗缪尔结合模型，分析传感器谱图。

[0729] 1.6.2 ELISA-叶酸受体α

[0730] 将重组人类叶酸受体α在涂布缓冲液(50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液，pH 9.6)中稀释至115ng/mL，且在4℃下涂布至96孔Maxisorp黑色板(Thermo，目录号43711，100微升/孔)过夜。丢弃涂布溶液，且使用1X具有0.05％Tween-20的PBS(PBST)缓冲液，洗涤板三次。在室温下在回转式震荡器上板在300μL阻断缓冲液(PBST中1％BSA)中阻断2小时。将MORAb-003和MORAb-003 ADC在阻断缓冲液中稀释至1000ng/mL，接着连续2倍稀释，得到1000ng/mL至0.98ng/mL的范围。丢弃阻断缓冲液且将100微升/孔稀释抗体添加至板。板在室温下在回转式震动器上孵育2小时。丢弃抗体溶液且板使用PBST洗涤三次。将100微升/孔山羊抗人类IgG(H+L)-HRP(阻断缓冲液中1:10,000稀释)溶液添加至板，且板在室温下在回转式震动器上孵育1小时。丢弃二级抗体溶液且板使用PBST洗涤三次。将100微升/孔QuantaBlu荧光过氧化物酶底物工作溶液(Thermo，目录号15169)添加至板，且板在室温下孵育30min。使用SpectraMax M5(Molecular Devices)，在激发325nm/发射420nm下读取荧光。使用SoftMaxPro 5.4.2软件，利用4参数拟合，分析数据。

[0731] 1.6.3 ELISA-间皮素

[0732] 将重组人类间皮素在涂布缓冲液(50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液，pH 9.6)中稀释至1μg/mL，且在4℃下涂布至96孔Maxisorp黑色板(Thermo，目录号43711，100微升/孔)过夜。丢弃涂布溶液，且使用1X具有0.05％Tween-20的PBS(PBST)缓冲液，洗涤板三次。在室温下在回转式震荡器上板在300μL阻断缓冲液(PBST中1％BSA)中阻断2小时。将MORAb009和MORAb-009 ADC在阻断缓冲液中稀释至1000ng/mL，接着连续2.5倍稀释，得到1000ng/mL至0.105ng/mL的范围。丢弃阻断缓冲液且将100微升/孔稀释抗体添加至板。板在室温下在回转式震动器上孵育2小时。丢弃抗体溶液且板使用PBST洗涤三次。将100微升/孔山羊抗人类IgG(H+L)-HRP(阻断缓冲液中1:10,000稀释)溶液添加至板，且板在室温下在回转式震动器上孵育1小时。丢弃二级抗体溶液且板使用PBST洗涤三次。将100微升/孔QuantaBlu荧光过氧化物酶底物工作溶液(Thermo，目录号15169)添加至板，且板在室温下孵育30min。使用SpectraMax M5(Molecular Devices)，在激发325nm/发射420nm下读取荧光。使用SoftMaxPro 5.4.2软件，利用4参数拟合，分析数据。

[0733] 1.7细胞毒性分析

[0734] 1.7.1结晶紫测定

[0735] 将IGROV1(FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)、NCI-H2110(FR^{med}、$MSLN^{med}$)和A431(FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)细胞在96孔组织培养板中在完全生长培养基中以5,000细胞/孔传代培养和接种,在37℃、5%CO_2下孵育过夜(16小时)。测试试剂以1:3在2mL深孔稀释板中连续稀释,起始于200nM(共稀释10次)。将稀释样品(100μL)添加至细胞板(测试样品的起始浓度为100nM)。将板在37℃、5%CO_2下再孵育5天。接着丢弃培养基。用200μL DPBS洗涤板一次,在室温下用50μL 0.2%结晶紫溶液染色15min,接着用自来水大量洗涤。将板进行空气干燥,且用200μL 1%SDS溶液溶解结晶紫。在570nm下读取板。使用GraphPad Prism 6分析数据。

[0736] 2.结果

[0737] 2.1 MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗ADC的生物物理学表征

[0738] 使用表46中所列的可偶联的艾日布林化合物,根据包括以下的三种偶联方法之一,制备MORAb-003(人源化抗人类叶酸受体α)、MORAb-009(小鼠-人类嵌合抗人类间皮素)和曲妥珠单抗(人源化抗人类her2)ADC:(1)使用非硫醇还原剂TCEP,将抗体链间二硫化物部分还原,接着使用硫醇反应性顺丁烯二酰亚胺基-间隔子-连接子-艾日布林构筑体偶联;(2)使用丁二酰亚胺(OSu)-间隔子-连接子-艾日布林构筑体,直接偶联于抗体赖氨酸残基;和(3)使用两步骤方法偶联于抗体赖氨酸残基,其中OSu-PEG4--二苯甲基环辛炔首先偶联于赖氨酸残基,接着使用SPAAC进行叠氮基-间隔子-连接子-艾日布林构筑体的正交偶联。

[0739] 在纯化后,通过SEC-HPLC测定所有MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗ADC的聚集水平,且使用逆相LC-MS和/或HIC-HPLC分析药物抗体比率(DAR)。使用逆相LC-MS和HIC-HPLC分析所有基于顺丁烯二酰亚胺的ADC的DAR。通常在所述两种方法之间观察到小于0.3的DAR值差异。相比之下,经由通过赖氨酸残基偶联而制备的所有ADC的DAR仅仅用LC-MS分析,因为这些ADC的高度非均质性阻止通过HIC-HPLC拆分个别DAR物质。对于MORAb-003和MORAb-009 ADC,还使用ELISA分析与标靶抗原的结合。DAR和聚集分析的结果展示于表47中,紧邻相应的ADC。

[0740]

表 47.
MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 的生物物理学分析

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原结合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	单体%	% Frag	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003		N/A	N/A	N/A			3.62	96.38	0	6.29	0.04
MORAb009		N/A	N/A	N/A			0	100	0	42.60	0.28
曲妥珠单抗		N/A	N/A	N/A			3.52	96.48	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1159569 (货号 NB3073-88L)	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-PAB	3.58	3.91	3.12	96.88	0	22.60	0.15
MORAb009-ER1159569 (货号 NB3073-88F)	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-PAB	3.63	3.93	3.23	96.77	0	43.70	0.29
MORAb003-ER1159569 (货号 NB3142-62A)	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-PAB	4.80	4.88	3.21	96.79	0	18.20	0.12
MORAb009-ER1159569 (货号 NB3142-62D)	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-PAB	4.68	4.57	0.90	99.10	0	33.10	0.22
曲妥珠单抗-ER1159569	曲妥珠单抗	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-PAB	3.10	3.11	1.26	98.74	0	N/A	N/A
MORAb003-ER1242287	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG8	val-cit-PAB	2.31	2.35	18.63	81.37	0	21.50	0.14
MORAb009-ER1242287	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG8	val-cit-PAB	1.13	2.00	11.24	88.76	0	58.60	0.39
MORAb003-ER1235638	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	戊基	val-cit-PAB	3.65	3.89	3.95	96.05	0	15.30	0.10
MORAb009-ER12356	MORAb-009	顺丁烯二	戊基	val-cit-p	3.99	4.10	4.5	95.5	0	65.60	0.44

[0741]

表 47.
MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 的生物物理学分析

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原结合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	单体%	% Frag	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
38		酰亚胺		AB							
MORAb003-ER12316 79	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3.60	3.83	3.09	96.91	0	18.30	0.12
MORAb009-ER12316 79	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	3.27	3.94	4.39	95.61	0	41.40	0.28
MORAb003-ER12316 90	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	3.02	3.23	4.44	95.56	0	8.92	0.06
MORAb009-ER12316 90	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	2.36	3.17	6.22	93.78	0	58.70	0.39
MORAb003-ER12375 04	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	0.52	1.61	13.73	86.27	0	29.80	0.20
MORAb009-ER12375 04	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	二硫基-二甲基	0.72	1.03	9.78	90.22	0	55.90	0.37

[0742]

表 47.
MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 的生物物理学分析

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原结合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	单体%	% Frag	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
				-pAB							
MORAb003-ER12375 05	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	磺酰胺	1.85	3.88	5.72	94.28	0	18.30	0.12
MORAb009-ER12375 05	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	磺酰胺	2.33	3.91	5.44	94.56	0	61.00	0.41
MORAb003-PEG2- 艾日布林	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	不可裂解	4.15	4.49	3.97	96.03	0	6.96	0.05
MORAb009-PEG2- 艾日布林	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	不可裂解	4.55	4.30	1.15	97.11	1.74	8.84	0.06
MORAb003-PEG4- 艾日布林	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG4	不可裂解	4.70	4.79	9.84	89.76	0	9.31	0.06
MORAb009-PEG4- 艾日布林	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG4	不可裂解	4.48	4.57	1.03	97.13	1.84	11.60	0.08
MORAb003-ER12369 40	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.72		3.65	96.35	0	17.00	0.11
MORAb009-ER12369 40	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.89		2.75	97.25	0	66.30	0.44
MORAb003-ER12422 88	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG9	val-cit-pAB	0.00		2.85	97.15	0	14.40	0.10
MORAb009-ER12422	MORAb-009	丁二酰亚	PEG9	val-cit-p	0.21		1.69	98.31	0	15.30	0.10

[0743]

表 47.
MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 的生物物理学分析

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原结合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	单体%	% Frag	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
88		胺		AB							
MORAb003-ER12369 41	MORAb-003	丁二酰亚胺	戊基	val-cit-pAB	0.77		3.13	96.87	0	13.00	0.09
MORAb009-ER12369 41	MORAb-009	丁二酰亚胺	戊基	val-cit-pAB	0.93		3.04	96.96	0	44.60	0.30
MORAb003-ER12437 00	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	val-cit-pAB	0.00		3.92	96.08	0	6.22	0.04
MORAb009-ER12437 00	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	val-cit-pAB	0.06		1.97	98.03	0	46.70	0.31
MORAb003-ER12316 91	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0.37		3.46	96.54	0	11.50	0.08
MORAb009-ER12316 91	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0.29		2.45	97.55	0	43.30	0.29
MORAb003-ER12441 29	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	0.24		10.87	89.13	0	14.30	0.10
MORAb009-ER12441 29	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	0.47		12.79	87.21	0	57.70	0.38

[0744]

表 47.
MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 的生物物理学分析

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	DAR		SEC-HPLC 分析			抗原结合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	单体%	% Frag	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
MORAb003-ER12446 23	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	磺酰胺	0.55		5.21	94.79	0	4.54	0.03
MORAb009-ER12446 23	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	磺酰胺	1.14		0	100	0	39.00	0.26
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	2.19		4.1	95.9	0	24.10	0.16
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	2.33		0	100	0	53.80	0.36
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	磺酰胺	1.82		3.49	96.51	0	15.00	0.10
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	磺酰胺	1.59		0	100	0	44.70	0.30
MORAb003-DBCO-PEG4 VCP 艾日布林	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG4	val-cit-pAB	3.09		2.87	97.13	0	16.00	0.11
MORAb009-DBCO-P	MORAb-009	丁二酰亚	二苯甲基	val-cit-p	2.91		0.22	99.78	0	33.70	0.22

[0745]

表 47.
MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 的生物物理学分析

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	DAR 分析		SEC-HPLC 分析			抗原结合	
					DAR (LC-MS)	DAR (HIC-HPLC)	% Aggr.	单体%	% Frag	ELISA, EC_{50}, ng/mL	ELISA, EC_{50}, nM
EG4 VCP 艾日布林		胺/点击	环辛烯-三唑-PEG4	AB							
MORAb003-DBCO-PEG2 艾日布林	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG2	不可裂解	3.43		3.88	96.12	0	19.10	0.13
MORAb009-DBCO-PEG2 艾日布林	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG2	不可裂解	3.07		1.15	98.85	0	23.30	0.16
MORAb003-DBCO-PEG4 艾日布林	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG4	不可裂解	2.96		3.64	96.36	0	13.30	0.09
MORAb009-DBCO-PEG4 艾日布林	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG4	不可裂解	2.8		1.12	98.88	0	45.20	0.30

缩写：% Aggr.，聚集%；% Frag，碎片%。

[0746] 2.1.1 MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗ADC

[0747] 就偶联效率与生物物理学参数而言，在MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗之间

未观察到显著差异。所有ADC证明类似的DAR值和聚集体形成水平。

[0748] 2.1.2基于顺丁烯二酰亚胺的ADC

[0749] 对于基于顺丁烯二酰亚胺的ADC，除低(＜5％)聚集水平外，通过逆相LC-MS和HIC-HPLC，与val-cit-pAB裂解位点配对的戊基和PEG_2间隔子以及与ala-ala-asn-pAB裂解位点配对的PEG_2间隔子都提供3.5与4.0之间的DAR值。然而，当间隔子加长至PEG_8(与val-cit-pAB裂解位点配对)时，聚集水平增加(11-18％)，且偶联效率降低，使得DAR值在1.1与2.3之间。参见例如表47中MORAb003/MORAb009-ER-001159569(短PEG连接子)和MORAb003/MORAb009-1242287(长PEG连接子)的聚集百分比和DAR值。

[0750] 对于用二硫基-pAB裂解位点制备的ADC，观察到低DAR值(1.0-1.6)，以及相对较高的聚集水平(10-14％)。与HIC-HPLC相比，当这些ADC通过LC-MS分析时，观察到显著较低的DAR值(参见例如表47中MORAb003/MORAb009-ER1237504和MORAb003/MORAb009-ER1237505的LC-MS/HIC-HPLC DAR值)。此结果表明连接子裂解位点显示pH不稳定性，因为LC-MS分析的流动相为大约3.0，而HIC-HPLC分析的流动相为中性。

[0751] 对于用磺酰胺裂解位点制备的ADC，观察到低(＜5％)聚集水平。类似于二硫基-pAB ADC，与HIC-HPLC(3.9)相比，当通过LC-MS(1.8-2.3)分析时，观察到较低DAR值，此再次表明连接子裂解位点显示pH不稳定性。

[0752] 对于PEG_2和PEG_4不可裂解连接子，观察到有效偶联，所得DAR值在4.0与4.7之间。使用这些不可裂解连接子的MORAb-009 ADC也显示低聚集水平(＜2％)，而对应MORAb-003 ADC则观察到略微较高的聚集水平(PEG_2和PEG_4分别为4％和10％)。

[0753] 2.1.3基于丁二酰亚胺的ADC

[0754] 使用与间隔子-连接子-艾日布林偶合的丁二酰亚胺制备的所有ADC得到DAR值＜1.0。为证实此较低偶联效率(相对于顺丁烯二酰亚胺)并非是偶联程序本身引起的，使用更高化合物:抗体比率重制这些ADC且使用相同DAR分析方法重新分析。获得类似结果，此表明不受理论限制，较低DAR值为丁二酰亚胺与艾日布林的组合的固有性质，且顺丁烯二酰亚胺可以更有效地偶联。通过使用两步法，增加丁二酰亚胺偶联的效率，其中使用NHS-DBCO将DBCO首先添加至抗体，接着添加至叠氮基化合物。如通过逆相HPLC分析所测量，与直接偶联于抗体赖氨酸残基相比，此方法产生更高的DAR值。对于具有磺酰胺(可裂解)、val-cit-PAB(可裂解)或PEG_2/PEG_4(不可裂解)连接子的基于丁二酰亚胺的ADC，由两步骤偶联所产生的DAR值类似于针对具有磺酰胺裂解位点的基于顺丁烯二酰亚胺的ADC所测定的DAR值。不受理论束缚，此结果再次表明丁二酰亚胺-间隔子-连接子-艾日布林偶联反应的较低DAR值为丁二酰亚胺与艾日布林的组合的固有性质。

[0755] 2.2 MORAb-003和MORAb-009 ADC的结合表征

[0756] 对于MORAb-003 ADC，就标靶抗原结合而言，在不可裂解的基于顺丁烯二酰亚胺的连接子-艾日布林ADC与亲本MORAb-003之间未观察到显著差异。对于其它基于顺丁烯二酰亚胺的连接子-艾日布林MORAb-003 ADC，典型地通过ELISA分析，观察到相对于亲本MORAb-003的标靶抗原结合2至3倍的损失。然而，连接子长度或连接子组成与较低EC_{50}值之间无明显相关性。类似地，对于基于丁二酰亚胺的连接子-艾日布林MORAb-003 ADC，一般观察到相对于未偶联的MORAb-003的标靶抗原结合0至3倍的损失。再次，连接子长度或连接子组成与较低EC_{50}值之间明显无相关性。对于MORAb-009 ADC，所有ADC的EC_{50}值相对于亲本MORAb-

009都减小2倍。

[0757] 2.3 MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗ADC的体外细胞毒性分析

[0758] 所制备的MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗ADC的体外效力使用结晶紫基于细胞的细胞毒性测定来评估。选择用于筛选MORAb-003和MORAb-009 ADC的细胞系为IGROV1、NCI-H2110和A431。IGROV1细胞来源于人类卵巢上皮癌，且表达高水平叶酸受体α，但无间皮素(即MORAb-003反应性)。NCI-H2110细胞来源于人类非小细胞肺癌，且表达中等水平的叶酸受体α和间皮素(即MORAb-003和MORAb-009反应性)。A431对照细胞来源于人类表皮癌且不表达任一标靶抗原。此筛选的结果展示于表48中。还在包括以下的其它胃癌和乳腺癌细胞系中评估MORAb-003、MORAb-009和包含连接子-毒素顺丁烯二酰亚胺基-PEG2-val-cit-pAB-艾日布林(VCP-艾日布林)的曲妥珠单抗ADC:NCI-N87(FR^{lo}、$MSLN^{med}$、$her2^{hl}$)、BT-474(FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{hi}$)、ZR-75(FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{med}$)和NUGC3(FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{neg}$)。此筛选的结果展示于表49中。

[0759]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
					IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MORAb009		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
曲妥珠单抗		N/A	N/A	N/A						
艾日布林	N/A	N/A	N/A	N/A	0.320	0.212	0.199	0.034	0.653	0.159
MORAb003-ER1159569（货号NB3073-88L）	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.155	0.064	3.685	0.417	>100	
MORAb009-ER1159569（货号NB3073-88F）	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	9.450	2.093	14.945	1.747	>100	
MORAb003-ER1159569（货号NB3142-62A）	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.020		1.550		>100	
MORAb009-ER1159569（货号NB3142-62D）	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	5.687		6.784		>100	
曲妥珠单抗-ER1159569	曲妥珠单抗	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB						

[0760]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
					IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003-E R1242287	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG8	val-cit-pAB	0.115	0.035	7.065	0.417	85.960	
MORAb009-E R1242287	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG8	val-cit-pAB	25.765	8.478	34.455	3.033	>100	
MORAb003-E R1235638	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	戊基	val-cit-pAB	0.105	0.092	3.920	1.032	>100	
MORAb009-E R1235638	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	戊基	val-cit-pAB	6.830	0.962	13.965	6.611	>100	
MORAb003-E R1231679	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	0.080	0.028	3.800	0.566	31.630	1.202
MORAb009-E R1231679	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	8.890	0.976	7.080	1.867	34.390	3.536
MORAb003-E R1231690	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	0.125	0.021	4.745	2.114	38.555	0.403
MORAb009-E R1231690	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	16.980	5.176	12.310	3.422	54.960	5.360
MORAb003-E R1237504	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	0.265	0.092	0.845	0.177	7.005	0.290
MORAb009-E	MORAb-00	顺丁烯二	PEG4-	二硫基-二甲	6.375	2.751	1.220	0.325	8.130	0.608

[0761]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
					IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
R1237504	9	酰亚胺	三唑-PEG3	基-pAB						
MORAb003-ER1237505	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	磺酰胺	0.370	0.269	0.690	0.283	6.800	0.834
MORAb009-ER1237505	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG4-三唑-PEG3	磺酰胺	6.370	3.012	0.990	0.453	9.030	1.527
MORAb003-PEG2-艾日布林	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	不可裂解	0.330		38.300		>100	
MORAb009-PEG2-艾日布林	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	不可裂解	42.770		50.040		>100	
MORAb003-PEG4-艾日布林	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG4	不可裂解	0.277		21.630		>100	
MORAb009-PEG4-艾日布林	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG4	不可裂解	76.320		31.600		>100	
MORAb003-ER1236940	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.325	0.106	30.545	3.132	>100	
MORAb009-ER1236940	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	31.915	2.510	36.500	11.031	90.060	
MORAb003-ER1242288	MORAb-003	丁二酰亚	PEG9	val-cit-pAB	38.105	45.601	64.010	8.075	>100	

[0762]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
		胺			IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb009-ER1242288	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG9	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003-ER1236941	MORAb-003	丁二酰亚胺	戊基	val-cit-pAB	0.330	0.071	42.105	12.594	>100	
MORAb009-ER1236941	MORAb-009	丁二酰亚胺	戊基	val-cit-pAB	>100		49.485	13.569	>100	
MORAb003-ER1243700	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	val-cit-pAB	1.150		>100		>100	
MORAb009-ER1243700	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
MORAb003-ER1231691	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	12.320		31.795	4.448	>100	
MORAb009-ER1231691	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG2	ala-ala-asn-pAB	>100		20.000	5.954	>100	
MORAb003-ER1244129	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	0.370	0.184	0.750	0.071	12.005	1.534
MORAb009-ER1244129	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG3-三唑	二硫基-二甲基-pAB	6.595	4.052	0.840	0.057	9.230	0.014

[0763]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
			-PEG3		IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
MORAb003-ER1244623	MORAb-003	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	磺酰胺	0.980	0.396	1.820	0.410	37.235	15.733
MORAb009-ER1244623	MORAb-009	丁二酰亚胺	PEG3-三唑-PEG3	磺酰胺	24.505	4.702	2.235	0.629	36.665	14.206
MORAb003-DBCO-ER1237508	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	0.545	0.389	0.900	0.071	9.670	0.382
MORAb009-DBCO-ER1237508	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	二硫基-二甲基-pAB	10.245	3.486	1.040	0.297	11.280	2.277
MORAb003-DBCO-ER1138856	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	磺酰胺	1.775	1.421	1.655	0.007	24.990	2.022
MORAb009-DBCO-ER1138856	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG3	磺酰胺	19.155	5.438	1.960	0.113	28.070	0.636

[0764]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
					IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
			-PEG3							
MORAb003-D BCO-PEG4 VCP 艾日布林	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG4	val-cit-pAB	0.038		4.281		>100	
MORAb009-D BCO-PEG4 VCP 艾日布林	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG4	val-cit-pAB	12.960		31.400		>100	
MORAb003-D BCO-PEG2 艾日布林	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG2	不可裂解	4.250		38.070		>100	
MORAb009-D BCO-PEG2 艾日布林	MORAb-009	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG2	不可裂解	75.680		85.680		>100	
MORAb003-D BCO-PEG4 艾日布林	MORAb-003	丁二酰亚胺/点击	二苯甲基环辛烯-三唑-PEG4	不可裂解	1.323		46.280		>100	
MORAb009-D	MORAb-009	丁二酰亚	二苯甲	不可裂解	61.490		39.330		>100	

[0765]

表 48. MORAb-003 和 MORAb-009ADC 对 IGROV1、NCI-H2110 和 A431 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

					细胞毒性分析					
					IGROV1 (FR^{hi}、$MSLN^{neg}$)		NCI-H2110 (FR^{med}、$MSLN^{med}$)		A431 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$)	
ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD	IC_{50} (nM)	SD
BCO-PEG4 艾日布林	9	胺/点击	基环辛烯-三唑-PEG4							

所有 IC_{50} 值都以 nM 为单位，且表示重复实验的平均值。SD-标准偏差。

表 49. MORAb-003、MORAb-009 和曲妥珠单抗 ADC 对 NCI-N87、BT-474、ZR-75 和 NUGC3 细胞的细胞毒性(IC_{50})筛选

					细胞毒性分析			
					NCI-N87-Luc (FR^{lo}、$MSLN^{med}$、$her2^{hi}$)	BT-474 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{hi}$)	ZR-75-1 (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{med}$)	NUGC3-Luc (FR^{neg}、$MSLN^{neg}$、$her2^{neg}$)
ADC	抗体	偶联化学	间隔子	裂解化学	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)	IC_{50} (nM)
MORAb003		N/A	N/A	N/A				
MORAb009		N/A	N/A	N/A				
曲妥珠单抗		N/A	N/A	N/A	0.78	0.641	>100	>100
艾日布林	N/A	N/A	N/A	N/A	0.257	0.151	0.236	0.445
MORAb003-ER1159569 (货号 NB3073-88L)	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB				

[0766]

MORAb009-ER1159569 (货号 NB3073-88F)	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB				
MORAb003-ER1159569 (货号 NB3142-62A)	MORAb-003	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	4.528	11.46	14.74	20.45
MORAb009-ER1159569 (货号 NB3142-62D)	MORAb-009	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.013	10.21	12.8	29.93
曲妥珠单抗-ER1159569	曲妥珠单抗	顺丁烯二酰亚胺	PEG2	val-cit-pAB	0.006	0.003	0.023	20.06

所有 IC_{50} 值都以 nM 为单位，且表示重复实验的平均值。SD-标准偏差。

[0767] 2.3.1基于顺丁烯二酰亚胺的ADC的细胞毒性

[0768] 所有基于顺丁烯二酰亚胺的MORAb-003和MORAb-009 ADC都在IGROV1细胞上呈现

特定细胞毒性，其中在抗体之间观察到效力相差2-3个数量级。val-cit-pAB-艾日布林MORAb-003 ADC显示在IGROV1细胞系上的效力高于PEG_2或PEG_4不可裂解MORAb-003 ADC，但特异性倍数不变。针对MORAb-009 ADC观察到类似倾向，其中不可裂解MORAb-009 ADC显示在IGROV1细胞上的细胞毒性低于val-cit-pAB-艾日布林MORAb-009 ADC。

[0769] 具有基于二硫基和磺酰胺的连接子的基于顺丁烯二酰亚胺的MORAb-009 ADC显示对NCI-H2110细胞系的效力高于IGROV1细胞系。如下所述，这可以归因于培养物中连接子的潜在不稳定性。在对应MORAb-003 ADC下也观察到有效细胞毒性。相比之下，具有不可裂解的连接子的基于顺丁烯二酰亚胺的MORAb-003和MORAb-009 ADC显示在NCI-H2110细胞上相对较低的效力。不受理论限制，此结果表明在较低标靶表达下，有效负载的有效裂解和释放可以提高细胞毒性。

[0770] 具有val-cit-pAB酶能够裂解的连接子或不可裂解连接子的ADC显示在A431对照细胞上低水平的脱靶杀死(IC_{50}＞100nM)，而具有ala-ala-asn-pAB酶能够裂解的连接子的ADC呈现弱的但可检测的这些对照细胞杀死。这表明val-cit-pAB酶能够裂解的连接子可能比培养物中ala-ala-asn-pAB酶能够裂解的连接子更稳定。另外，具有较短PEG_2间隔子的MORAb-009 ADC显示在IGROV1细胞中的细胞毒性高于具有较长PEG_8间隔子的对应ADC。在NCI-H2110细胞中，观察到MORAb-003和MORAb-009 ADC的此相同倾向，较短间隔子长度引起较高细胞毒性。

[0771] 具有基于磺酰胺的连接子的ADC一般显示比具有基于二硫基的连接子的对应ADC更高的DAR值和更低的聚集水平。然而，在这些类别的ADC中都观察到A431对照细胞的nM水平杀死，这表明基于二硫基和磺酰胺的连接子在培养物中在所检查的分析条件下不如酶能够裂解的连接子稳定。

[0772] 进一步检查特定连接子-毒素顺丁烯二酰亚胺基-PEG_2-val-cit-pAB-艾日布林(VCP-艾日布林)在不同胃癌和乳腺癌细胞系上的特异性和效力。除抗人类her2抗体曲妥珠单抗外，VCP-艾日布林偶联于MORAb-003和MORAb-009。MORAb-003-VCP-艾日布林显示对表达低水平的叶酸受体α(FR)的NCI-N87细胞的弱的但特异性的杀死，和对剩余三种FR阴性细胞系的较少杀死。MORAb-009-VCP-艾日布林还显示对表达中等水平的间皮素的NCI-N87细胞的有效细胞毒性。曲妥珠单抗-VCP-艾日布林对表达高水平her2的NCI-N87和BT-474细胞非常有效(3-6pM，IC_{50})，且还对仅仅中等表达her2的ZR-75乳腺癌细胞有效。MORAb-003、MORAb-009和曲妥珠单抗VCP-艾日布林ADC都显示对不表达FR、间皮素或her2(相应的标靶抗原)的NUGC3细胞的低细胞毒性。

[0773] 2.3.2基于丁二酰亚胺的ADC的细胞毒性

[0774] 对于IGROV1细胞，基于丁二酰亚胺的ADC的细胞毒性的倾向类似于基于顺丁烯二酰亚胺的ADC，其中除低DAR值外，PEG_8间隔子ADC还显示低细胞毒性。与对应的基于顺丁烯二酰亚胺的ADC相比较，一般观察到具有酶能够裂解的连接子的基于丁二酰亚胺的ADC对IGROV1与NCI-H2110细胞的较低细胞毒性，这很可能归因于较低非DAR值。类似于对应的基于顺丁烯二酰亚胺的ADC，在基于二硫基和磺酰胺的连接子下也观察到A431细胞的脱靶杀死。这表明增加的不稳定性可能由裂解位点引起，而非偶联化学。

[0775] 当进行两步骤偶联时，相对于由直接丁二酰亚胺偶联方法得到的DAR值，观察到较高DAR值。这些较高DAR值与较高效力相关。对于VCP-艾日布林MORAb-003 ADC，观察到对

IGROV1和NCI-H2110细胞的有效细胞毒性。虽然不可裂解的MORAb-003 ADC证明对IGROV1细胞有效(1-4nM),但其效力仍低于用此方法制备的VCP-艾日布林MORAb-003 ADC(38pM),即使DAR值可比。另外,使用两步法制备的不可裂解MORAb-003 ADC对IGROV1细胞系的效力略低于对应的基于顺丁烯二酰亚胺的ADC,这可能归因于其较低的DAR值。类似于其基于顺丁烯二酰亚胺的对应物,使用两步法制备的不可裂解ADC也丧失了对NCI-2110细胞几乎所有的细胞毒性。

[0776] 2.4抗人类间皮素(LCcys 80)ADC的生物物理学表征

[0777] MAL-PEG2-Val-Cit-PAB-艾日布林(ER-001159569)偶联于八种不同的抗人类间皮素抗体(表1)。如以上在部分1.6.1中所述,通过BIAcore分析来测定亲本抗体的结合亲和力。通过SEC-HPLC测定所有抗人类间皮素ADC的聚集水平,且使用HIC-HPLC分析DAR。使用结晶紫基于细胞的细胞毒性测定,在A3(经人类间皮素(MSLN)稳定转染的A431,$MSLN^{hi}$)、OVCAR3(人类卵巢,$MSLN^{hi}$)、HEC-251(人类子宫内膜样,$MSLN^{med}$)、H226(人类肺鳞状上皮细胞间皮瘤,$MSLN^{lo}$)和A431亲本($MSLN^{neg}$)细胞中评估体外效力。DAR、聚集和细胞毒性分析的结果展示于表50中。

[0778] 表50.抗人类间皮素(LCcys 80)ADC的生物物理学表征

[0779]

		亲本单抗			ADC							
		亲和力			有效负载	HIC	SEC-HPLC		基于细胞之细胞毒性测定, EC50, nM			
		k_a (10^5 $M^{-1}sec^{-1}$)	k_d (10^{-4} sec^{-1})	K_d (10^{-9} M)	药物-连接子	DAR	聚集%	单体%	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
33O11	xi				ER-001159569-000	1.92	8.97	91.03	40.67	0.008	3.950	>100	0.14
	zu	2.2	0.65	3.4	ER-001159569-000	1.69	1.42	98.58	~100	0.064	26.500	>100	0.28
111B10	xi	6.5	3.9	6.3	ER-001159569-000	1.90	4.25	95.75	38.10	0.004	13.950	~100	0.05
	zu	5.1	3	6.5	ER-001159569-000	1.81	3.64	96.36	68.92	0.014	27.42	>100	0.12
201C15	xi	2.4	0.26	1.1	ER-001159569-000	1.86	1.62	98.38	48.50	0.004	14.82	~100	0.27
	zu	3.1	1.1	4.2	ER-001159569-000	1.80	5.84	94.16	68.88	0.250	20.42	>100	0.41
346C6	xi	3.8	0.49	1.4	ER-001159569-000	1.56	5.28	94.72	84.49	0.087	5.73	~100	0.11
	zu	138	93	8.9	ER-001159569-000	1.63	4.48	95.52	72.86	1.180	32.54	>100	0.55

[0780] 缩写:xi-嵌合:zu-人源化。

[0781] 所有抗人类间皮素ADC都保持低聚集水平(<10%聚集体)且显示对标靶细胞系的高效力。在A3和OVCAR3上观察到高效力,而HEC-251和H226细胞对ADC细胞毒性具有相对抗性。

[0782] 所选序列:

[0783] SEQ ID NO:1(MORAb-003重链(HC))

[0784]

```
  1  EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM
 51  ISSGGSYTYY ADSVKGRFAI SRDNAKNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG
101  DDPAWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151  YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY
201  ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301  TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
351  YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
401  DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK
```

[0785] SEQ ID NO:2(MORAb-003 HC CDR1;Kabat):GYGLS

[0786] SEQ ID NO:3(MORAb-003 HC CDR2;Kabat):MISSGGSYTYYADSVKG

[0787] SEQ ID NO:4(MORAb-003 HC CDR3;Kabat):HGDDPAWFAY

[0788] SEQ ID NO:5(MORAb-003重链全长前体蛋白氨基酸序列;前导序列加下划线)

[0789]

```
  1   MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CSASGFTFSG
 51   YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYYA DSVKGRFAIS RDNAKNTLFL
101   QMDSLRPEDT GVYFCARHGD DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA
151   PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201   YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC
251   PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
301   DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351   APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
401   EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451   EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

[0790] SEQ ID NO:6(MORAb-003轻链(LC))

[0791]

```
  1   DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPWIY
 51   GTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTFTISSLQ PEDIATYYCQ QWSSYPYMYT
101   FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
151   WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT
201   HQGLSSPVTK SFNRGEC
```

[0792] SEQ ID NO:7(MORAb-003 LC CDR1;Kabat):SVSSSISSNNLH

[0793] SEQ ID NO:8(MORAb-003 LC CDR2;Kabat):GTSNLAS

[0794] SEQ ID NO:9(MORAb-003 LC CDR3;Kabat):QQWSSYPYMYT

[0795] SEQ ID NO:10MORAb-003轻链全长前体蛋白氨基酸序列(前导序列加下划线)

[0796]

```
  1   MGWSCIILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRVTI TCSVSSSISS
 51   NNLHWYQQKP GKAPKPWIYG TSNLASGVPS RFSGSGSGTD YTFTISSLQP
101   EDIATYYCQQ WSSYPYMYTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151   TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST
201   LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC
```

[0797] SEQ ID NO:11(MORAb-003 HC nt)

```
   1  ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
  51  CCACTCCGAG GTCCAACTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG
 101  GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTCAGCGGC
 151  TATGGGTTGT CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT
 201  TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA
 251  AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCCTG
 301  CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG
 351  ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTCGCTTA TTGGGGCCAA GGGACCCCGG
 401  TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA
 451  CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
 501  CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
 551  TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
 601  TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA
 651  GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
 701  AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 751  CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCAAA
 801  ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 851  TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 901  GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 951  CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
1001  GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
1051  GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
1101  ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG
1151  TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATCGCCGTG
1201  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
1251  CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG
1301  ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
1351  GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG
1401  GAAATGA
```

[0798]

[0799] SEQ ID NO:12(MORAb-003 LC nt)

```
   1  ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
  51  CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG
 101  TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC
 151  AACAACTTGC ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG
 201  GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTCAGCG
 251  GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA
 301  GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT
 351  GTACACGTTC GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG
 401  CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
 451  ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
 501  AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
 551  GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
 601  CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
 651  AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
 701  GAGAGTGTTA A
```

[0800]

[0801] SEQ ID NO:13(MORAb-003 HC CDR1;IMGT):GFTFSGYG

[0802] SEQ ID NO:14(MORAb-003 HC CDR2;IMGT):ISSGGSYT

[0803] SEQ ID NO:15(MORAb-003 HC CDR3;IMGT):ARHGDDPAWFAY

[0804] SEQ ID NO:16(MORAb-003 LC CDR1;IMGT):SSISSNN

[0805] SEQ ID NO:17(MORAb-003 LC CDR2;IMGT):GTS

[0806] SEQ ID NO:18(MORAb-003 LC CDR3;IMGT):QQWSSYPYMYT

[0807] SEQ ID NO:19(人类FRA)

[0808]

```
  1 maqrmttqll lllvwvavvg eaqtriawar tellnvcmna khhkekpgpe dklheqcrpw
 61 rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv
121 dqswrkervl nvplckedce qwwedcrtsy tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf
181 yfptptvlcn eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneevarfya aamsgagpwa
241 awpfllslal mllwlls
```

[0809] SEQ ID NO:20(人类FRA核苷酸)

[0810]

```
  1 cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg
 61 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg
121 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa
181 aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc
241 tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac
301 tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc
361 ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc
421 aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat
481 tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg
541 tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc
601 actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg
661 agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg
721 gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg
781 cttagcctgg ccctaatgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac
841 ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg
901 tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat
961 ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

[0811] SEQ ID NO:21(人类her2)

[0812]

```
1     melaalcrwg lllallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly
qgcqvvqgnl
61    eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvplqrlr ivrgtqlfed
nyalavldng
121   dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggvliqrnpq lcyqdtilwk
difhknnqla
181   ltlidtnrsr achpcspmck gsrcwgesse dcqsltrtvc aggcarckgp
lptdccheqc
241   aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvtyntdtfe smpnpegryt
fgascvtacp
301   ynylstdvgs ctlvcplhnq evtaedgtqr cekcskpcar vcyglgmehl
revravtsan
```

361 iqefagckki fgslaflpes fdgdpasnta plqpeqlqvf etleeitgyl yisawpdslp

421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysltlqglgi swlglrslre lgsglalihh nthlcfvhtv

481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wgpgptqcvn csqflrgqec

541 veecrvlqgl preyvnarhc lpchpecqpq ngsvtcfgpe adqcvacahy kdppfcvarc

601 psgvkpdlsy mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvdlddk gcpaeqrasp ltsiisavvg

661 illvvvlgvv fgilikrrqq kirkytmrrl lqetelvepl tpsgampnqa qmrilketel

721 rkvkvlgsga fgtvykgiwi pdgenvkipv aikvlrents pkankeilde ayvmagvgsp

[0813] 781 yvsrllgicl tstvqlvtql mpygclldhv renrgrlgsq dllnwcmqia kgmsyledvr

841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarll dideteyhad ggkvpikwma lesilrrrft

901 hqsdvwsygv tvwelmtfga kpydgipare ipdllekger lpqppictid vymimvkcwm

961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlgpaspl dstfyrslle dddmgdlvda

1021 eeylvpqqgf fcpdpapgag gmvhhrhrss strsgggdlt lglepseeea prsplapseg

1081 agsdvfdgdl gmgaakglqs lpthdpsplq rysedptvpl psetdgyvap ltcspqpeyv

1141 nqpdvrpqpp spregplpaa rpagatlerp ktlspgkngv vkdvfafgga venpeyltpq

1201 ggaapqphpp pafspafdnl yywdqdpper gappstfkgt ptaenpeylg ldvpv

[0814] SEQ ID NO:22(人类her2核苷酸)

1 ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC CCCCGGAGCC

61 GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCGAG

[0815] 121 ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA GGGAAACCTG

181 GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT CCAGGAGGTG

[0816]

241 CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCACTGCA GAGGCTGCGG

301 ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT AGACAATGGA

361 GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT GCGGGAGCTG

421 CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG GAACCCCCAG

481 CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA CCAGCTGGCT

541 CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG

601 GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG CACTGTCTGT

661 GCCGGTGGCT GTGCCCGCTG CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA TGAGCAGTGT

721 GCTGCCGGCT GCACGGGCCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA CTTCAACCAC

781 AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CACGTTTGAG

841 TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC

901 TACAACTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA

961 GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC CTGTGCCCGA

1021 GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC CAGTGCCAAT

1081 ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTTCT GCCGGAGAGC

1141 TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT CCAAGTGTTT

1201 GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA CAGCCTGCCT

1261 GACCTCAGCG TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA CAATGGCGCC

1321 TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC ACTGAGGGAA

1381 CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT GCACACGGTG

1441 CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC CAACCGGCCA

1501 GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG AGGGCACTGC

1561 TGGGGTCCAG GGCCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG CCAGGAGTGC

1621 GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC CAGGCACTGT

1681 TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG

1741 GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCGT GGCCCGCTGC

1801 CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC AGATGAGGAG

1861 GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG

1921 GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCATCTCTGC GGTGGTTGGC

1981 ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGGATCC TCATCAAGCG ACGGCAGCAG

[0817]

2041 AAGATCCGGA AGTACACGAT GCGGAGACTG CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCCGCTG

2101 ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCAGGCG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA GACGGAGCTG

2161 AGGAAGGTGA AGGTGCTTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGGG CATCTGGATC

2221 CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTTGAGGGA AAACACATCC

2281 CCCAAAGCCA ACAAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGCTGGTGT GGGCTCCCCA

2341 TATGTCTCCC GCCTTCTGGG CATCTGCCTG ACATCCACGG TGCAGCTGGT GACACAGCTT

2401 ATGCCCTATG GCTGCCTCTT AGACCATGTC CGGGAAAACC GCGGACGCCT GGGCTCCCAG

2461 GACCTGCTGA ACTGGTGTAT GCAGATTGCC AAGGGGATGA GCTACCTGGA GGATGTGCGG

2521 CTCGTACACA GGGACTTGGC CGCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCAA CCATGTCAAA

2581 ATTACAGACT TCGGGCTGGC TCGGCTGCTG GACATTGACG AGACAGAGTA CCATGCAGAT

2641 GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG
GCGGTTCACC
2701 CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC
TTTTGGGGCC
2761 AAACCTTACG ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA
GGGGGAGCGG
2821 CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA
ATGTTGGATG
2881 ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC
CCGCATGGCC
2941 AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCATCCAG AATGAGGACT TGGGCCCAGC
CAGTCCCTTG
3001 GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT
GGTGGATGCT
3061 GAGGAGTATC TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC
GGGCGCTGGG
3121 GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG
GGACCTGACA

[0818] 3181 CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC
CTCCGAAGGG
3241 GCTGGCTCCG ATGTATTTGA TGGTGACCTG GGAATGGGGG CAGCCAAGGG
GCTGCAAAGC
3301 CTCCCCACAC ATGACCCCAG CCCTCTACAG CGGTACAGTG AGGACCCCAC
AGTACCCCTG
3361 CCCTCTGAGA CTGATGGCTA CGTTGCCCCC CTGACCTGCA GCCCCCAGCC
TGAATATGTG
3421 AACCAGCCAG ATGTTCGGCC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT
GCCTGCTGCC
3481 CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAAGGCCC AAGACTCTCT CCCCAGGGAA
GAATGGGGTC
3541 GTCAAAGACG TTTTTGCCTT TGGGGGTGCC GTGGAGAACC CCGAGTACTT
GACACCCCAG
3601 GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACCCTCCT CCTGCCTTCA GCCCAGCCTT
CGACAACCTC
3661 TATTACTGGG ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGCTCCAC CCAGCACCTT
CAAAGGGACA
3721 CCTACGGCAG AGAACCCAGA GTACCTGGGT CTGGACGTGC CAGTGTGA

序列表

<110> 卫材研究发展管理有限公司

<120> 基于艾日布林的抗体-药物偶联物和使用方法

<130> 08061.0024-00304

<140> PCT/US2017/020529
<141> 2017-03-02

<150> 62/302,562
<151> 2016-03-02

<160> 368

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

[0001]

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

```
          195                 200                 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0002]

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

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 2

Gly Tyr Gly Leu Ser
1 5

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 3
Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 4
His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

[0003]

<210> 5
<211> 468
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 5
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

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

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

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0004]

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385                 390                 395                 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                405                 410                 415

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

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

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

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 6
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

[0005]

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

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 7
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 8
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

[0006]

<400> 9
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 10
<211> 236
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 10
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

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

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

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

Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

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

Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

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

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

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

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

[0007]

<210> 11
<211> 1407
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 11
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgag 60

gtccaactgg tggagagcgg tggaggtgtt gtgcaacctg gccggtccct gcgcctgtcc 120

tgctccgcat ctggcttcac cttcagcggc tatgggttgt cttgggtgag acaggcacct 180

ggaaaaggtc ttgagtgggt tgcaatgatt agtagtggtg gtagttatac ctactatgca 240

gacagtgtga agggtagatt tgcaatatcg cgagacaacg ccaagaacac attgttcctg 300

caaatggaca gcctgagacc cgaagacacc ggggtctatt tttgtgcaag acatggggac 360

gatcccgcct ggttcgctta ttggggccaa gggaccccgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380

agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1407

<210> 12
<211> 711
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 12
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60

atccagctga cccagagccc aagcagcctg agcgccagcg tgggtgacag agtgaccatc 120

acctgtagtg tcagctcaag tataagttcc aacaacttgc actggtacca gcagaagcca 180

ggtaaggctc caaagccatg gatctacggc acatccaacc tggcttctgg tgtgccaagc 240

agattcagcg gtagcggtag cggtaccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca 300

[0008] gaggacatcg ccacctacta ctgccaacag tggagtagtt acccgtacat gtacacgttc 360

ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a 711

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 13
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 14

Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 15
Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 16
Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn
1 5

<210> 17
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

[0009]

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

<400> 17
Gly Thr Ser
1

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 18
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 257
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19
Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

[0010] Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

<210> 20
<211> 982
<212> DNA
<213> 智人

<400> 20
cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcaggga cagacatggc tcagcggatg 60

acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg 120

attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa 180

aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc 240

tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac 300

tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc 360

ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc 420

aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat 480

tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg 540

tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt ccccacaccc 600

actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg 660

agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg 720

gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg 780

cttagcctgg ccctaatgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac 840

ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg 900

tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat 960

ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa 982

<210> 21
<211> 1255
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
35 40 45

[0011]

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
195 200 205

```
Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
    210                 215                 220

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

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

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
            260                 265                 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
        275                 280                 285

Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
    290                 295                 300

Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
305                 310                 315                 320

Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
                325                 330                 335

Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
            340                 345                 350
```

[0012]

```
Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
        355                 360                 365

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

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
385                 390                 395                 400

Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
                405                 410                 415

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
            420                 425                 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
        435                 440                 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
    450                 455                 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
465                 470                 475                 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
                485                 490                 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
            500                 505                 510
```

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
645 650 655

[0013] Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
660 665 670

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

```
Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
            820                 825                 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
        835                 840                 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
    850                 855                 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865                 870                 875                 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
                885                 890                 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
            900                 905                 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
        915                 920                 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
    930                 935                 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945                 950                 955                 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
                965                 970                 975
```

[0014]

```
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
            980                 985                 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu  Asp Ser Thr Phe Tyr  Arg Ser Leu
        995                 1000                1005

Leu Glu  Asp Asp Asp Met Gly  Asp Leu Val Asp Ala  Glu Glu Tyr
    1010                1015                1020

Leu Val  Pro Gln Gln Gly Phe  Phe Cys Pro Asp Pro  Ala Pro Gly
    1025                1030                1035

Ala Gly  Gly Met Val His His  Arg His Arg Ser Ser  Ser Thr Arg
    1040                1045                1050

Ser Gly  Gly Gly Asp Leu Thr  Leu Gly Leu Glu Pro  Ser Glu Glu
    1055                1060                1065

Glu Ala  Pro Arg Ser Pro Leu  Ala Pro Ser Glu Gly  Ala Gly Ser
    1070                1075                1080

Asp Val  Phe Asp Gly Asp Leu  Gly Met Gly Ala Ala  Lys Gly Leu
    1085                1090                1095

Gln Ser  Leu Pro Thr His Asp  Pro Ser Pro Leu Gln  Arg Tyr Ser
    1100                1105                1110

Glu Asp  Pro Thr Val Pro Leu  Pro Ser Glu Thr Asp  Gly Tyr Val
```

1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

[0015]

<210> 22
<211> 3768
<212> DNA
<213> 智人

<400> 22
atggagctgg cggccttgtg ccgctggggg ctcctcctcg ccctcttgcc ccccggagcc 60

gcgagcaccc aagtgtgcac cggcacagac atgaagctgc ggctccctgc cagtcccgag 120

acccacctgg acatgctccg ccacctctac cagggctgcc aggtggtgca gggaaacctg 180

gaactcacct acctgcccac caatgccagc ctgtccttcc tgcaggatat ccaggaggtg 240

cagggctacg tgctcatcgc tcacaaccaa gtgaggcagg tcccactgca gaggctgcgg 300

attgtgcgag gcacccagct ctttgaggac aactatgccc tggccgtgct agacaatgga 360

gacccgctga acaataccac ccctgtcaca ggggcctccc caggaggcct gcgggagctg 420

cagcttcgaa gcctcacaga gatcttgaaa ggaggggtct tgatccagcg gaaccccccag 480

ctctgctacc aggacacgat tttgtggaag gacatcttcc acaagaacaa ccagctggct 540

ctcacactga tagacaccaa ccgctctcgg gcctgccacc cctgttctcc gatgtgtaag 600

ggctcccgct gctggggaga gagttctgag gattgtcaga gcctgacgcg cactgtctgt 660

gccggtggct gtgcccgctg caaggggcca ctgcccactg actgctgcca tgagcagtgt 720

gctgccggct gcacgggccc caagcactct gactgcctgg cctgcctcca cttcaaccac 780

agtggcatct gtgagctgca ctgcccagcc ctggtcacct acaacacaga cacgtttgag 840

tccatgccca atcccgaggg ccggtataca ttcggcgcca gctgtgtgac tgcctgtccc 900

tacaactacc tttctacgga cgtgggatcc tgcaccctcg tctgcccct gcacaaccaa 960

gaggtgacag cagaggatgg aacacagcgg tgtgagaagt gcagcaagcc ctgtgcccga 1020

gtgtgctatg gtctgggcat ggagcacttg cgagaggtga gggcagttac cagtgccaat 1080

atccaggagt ttgctggctg caagaagatc tttgggagcc tggcatttct gccggagagc 1140

tttgatgggg acccagcctc caacactgcc ccgctccagc cagagcagct ccaagtgttt 1200

gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggccgga cagcctgcct 1260

gacctcagcg tcttccagaa cctgcaagta atccggggac gaattctgca caatggcgcc 1320

tactcgctga ccctgcaagg gctgggcatc agctggctgg ggctgcgctc actgagggaa 1380

ctgggcagtg gactggccct catccaccat aacacccacc tctgcttcgt gcacacggtg 1440

ccctgggacc agctctttcg gaacccgcac caagctctgc tccacactgc caaccggcca 1500

gaggacgagt gtgtgggcga gggcctggcc tgccaccagc tgtgcgcccg agggcactgc 1560

tggggtccag ggcccaccca gtgtgtcaac tgcagccagt tccttcgggg ccaggagtgc 1620

gtggaggaat gccgagtact gcaggggctc cccagggagt atgtgaatgc caggcactgt 1680

ttgccgtgcc accctgagtg tcagccccag aatggctcag tgacctgttt tggaccggag 1740

gctgaccagt gtgtggcctg tgcccactat aaggaccctc ccttctgcgt ggcccgctgc 1800

cccagcggtg tgaaacctga cctctcctac atgcccatct ggaagtttcc agatgaggag 1860

ggcgcatgcc agccttgccc catcaactgc acccactcct gtgtggacct ggatgacaag 1920

ggctgccccg ccgagcagag agccagccct ctgacgtcca tcatctctgc ggtggttggc 1980

attctgctgg tcgtggtctt gggggtggtc tttgggatcc tcatcaagcg acggcagcag 2040

aagatccgga agtacacgat gcggagactg ctgcaggaaa cggagctggt ggagccgctg 2100

[0016] acacctagcg gagcgatgcc caaccaggcg cagatgcgga tcctgaaaga gacggagctg 2160

aggaaggtga aggtgcttgg atctggcgct tttggcacag tctacaaggg catctggatc 2220

cctgatgggg agaatgtgaa aattccagtg gccatcaaag tgttgaggga aaacacatcc 2280

cccaaagcca acaaagaaat cttagacgaa gcatacgtga tggctggtgt gggctcccca 2340

tatgtctccc gccttctggg catctgcctg acatccacgg tgcagctggt gacacagctt 2400

atgccctatg gctgcctctt agaccatgtc cgggaaaacc gcggacgcct gggctcccag 2460

gacctgctga actggtgtat gcagattgcc aaggggatga gctacctgga ggatgtgcgg 2520

ctcgtacaca gggacttggc cgctcggaac gtgctggtca agagtcccaa ccatgtcaaa 2580

attacagact tcgggctggc tcggctgctg gacattgacg agacagagta ccatgcagat 2640

gggggcaagg tgcccatcaa gtggatggcg ctggagtcca ttctccgccg gcggttcacc 2700

caccagagtg atgtgtggag ttatggtgtg actgtgtggg agctgatgac ttttggggcc 2760

aaaccttacg atgggatccc agcccgggag atccctgacc tgctggaaaa gggggagcgg 2820

ctgccccagc cccccatctg caccattgat gtctacatga tcatggtcaa atgttggatg 2880

attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940

agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggcccagc cagtcccttg 3000

gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060

gaggagtatc tggtacccca gcagggcttc ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120

ggcatggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180

ctagggctgg agccctctga agaggaggcc cccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240

gctggctccg atgtatttga tggtgacctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300

ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtacagtg aggaccccac agtacccctg 3360

ccctctgaga ctgatggcta cgttgccccc ctgacctgca gcccccagcc tgaatatgtg 3420

aaccagccag atgttcggcc ccagcccccc tcgccccgag agggccctct gcctgctgcc 3480

cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct ccccagggaa gaatggggtc 3540

gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacaccccag 3600

ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gcccagcctt cgacaacctc 3660

tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720

cctacggcag agaacccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga 3768

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

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

[0017]

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 24
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

[0018]

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 26
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 27
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0019] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 29
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 29
[0020] Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

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

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
85 90 95

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 30
Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

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

[0021]

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 32
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

[0022] <220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 33
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
20 25 30

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

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 108

<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 34
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105

[0023]

<210> 35
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 36
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

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

[0024]

<210> 37
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 37
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

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

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Leu

<210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 38
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

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

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

[0025] Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 40
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
[0026] 85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 41
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

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

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

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

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 42
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

[0027]

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
100 105 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 44
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

[0028]

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

Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 45
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 45
gaggtccaac tggtggagag cggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60

tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120

cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180

gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300

gacgatcccg cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 46
<211> 330
<212> DNA

<213> 人工序列

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

<400> 46
gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag 120

ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tggtgtgcca 180

agcagattca gcggtagcgg tagcggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240

ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 47
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 47
caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

[0029] atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 48
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 48
gacatcgagc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 49
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 49
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatggtggtg gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact 360

gtctcttca 369

<210> 50
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 50
gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180

cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt 300

tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtc gtcaaa 336

[0030]

<210> 51
<211> 378
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 51
gaagtccaac tggtggaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg 60

tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120

cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240

caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300

cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360

cttgtgaccg tgtcgtca 378

<210> 52
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 52
gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60

atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg 120

gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180

cggttctccg gatcgggatc tggtactgat ttcaccctca ccatctcgag ccttcagtgc 240

gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300

tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaa 336

<210> 53
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 53
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatt ctacgcgaac 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat 300

attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ttca 354

<210> 54
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

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

[0031]

<400> 54
gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc 300

ggagggaccg aggtggtcgt caaa 324

<210> 55
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 55
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc 180

aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga 300

ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca 360

tct 363

<210> 56
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 56
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc 300

ggaggcacca aggtggaaat caaa 324

<210> 57
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 57
cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca 120

[0032] gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaagcgccc 240

agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tggtggtagt 300

tatgacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt ta 342

<210> 58
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 58
gatgttgtga tgacccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtga gagcatttat cgcgtattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg 180

cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt 240

gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggtattgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa 330

<210> 59
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成多核苷酸"

<400> 59
caggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300

ggcggctcct acgatatctg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcctc t 351

<210> 60
<211> 330
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 60
gatatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc 240

gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct 300

[0033] ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa 330

<210> 61
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 61
cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca 120

ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggggggata tgctgctagt 300

agtgcttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 62
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 62
gcagccgtgc tgacccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag 120

aaacccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact 300

tttgctttcg gcggagggac tgaggtggtg gtcaaa 336

<210> 63
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 63
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300

gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt catct 375

[0034]

<210> 64
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 64
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120

aaacccggca aggtgcccaa gctgctgatc tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180

ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240

cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300

tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 65
Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 66
Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 67
Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 68
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

[0035]

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 69
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 70
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

<223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 71
Asp Thr Tyr Ile His
1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 72
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 73
Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

[0036]

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 74
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 75
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 76

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 77
Ser Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 78
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 79
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

[0037]

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

<400> 79
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 80
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
1 5 10

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 81
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 82
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 82
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 83
Ser Asp Ala Ile Ser
1 5

<210> 84
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

[0038] <400> 84
Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 85
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 85
Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 86
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
1 5 10

<210> 87
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 87
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 88
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 88
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 89
Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

[0039]

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 90
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 91
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 92
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 92
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 93
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 94
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0040] <220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 95
Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 96
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 96
Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 97
Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 98
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 98
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 99
Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 100
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

[0041]

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 101
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 102
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 102
Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 103
Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5

<210> 104
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 104
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 105
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0042]

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

<400> 106
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 107
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 107
Ser Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 108
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 108
Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 109
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 109
Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 110
Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
1 5 10

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 111
Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

[0043]

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 112
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 113
Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 114
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 114
Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 115
Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 116
Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
1 5 10

[0044]

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 117
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 118
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 119
Ser Tyr Ala Met Ile
1 5

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 120
Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 121
Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 122
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

[0045] <220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 122
Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
1 5 10

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

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

<400> 123
Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 124
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 124
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 125

<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 125
ggctatgggt tgtct 15

<210> 126
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 126
atgattagta gtggtggtag ttatacctac tatgcagaca gtgtgaaggg t 51

<210> 127
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 127
catggggacg atcccgcctg gttcgcttat 30

[0046]

<210> 128
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 128
agtgtcagct caagtataag ttccaacaac ttgcac 36

<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 129
ggcacatcca acctggcttc t 21

<210> 130
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 130
caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33

<210> 131
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 131
ggctacacca tgaac 15

<210> 132
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 132
cttattactc cttacaatgg tgcttctagc tacaaccaga agttcagggg c 51

<210> 133
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 133
gggggttacg acgggagggg ttttgactac 30

[0047]

<210> 134
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 134
agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac 30

<210> 135
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 135
gacacatcca aactggcttc t 21

<210> 136
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 136
cagcagtgga gtaagcaccc tctcacg 27

<210> 137
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 137
agcgatgcaa taagc 15

<210> 138
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 138
atcattaatg gtggtggtaa cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 139
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 139
ggcattcaac atggtggtgg taatagtgat tattattatt acggcatgga cctc 54

[0048]

<210> 140
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 140
caggccagtc agagcattag tagtgtcttg tcc 33

<210> 141
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 141
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 142
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 142
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 143
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 143
tccgacgcga ttagc 15

<210> 144
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 144
atcatcaacg gcggcggaaa cacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 145
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 145
ggcatccagc acggtggtgg aaacagcgac tactactact atgggatgga tctg 54

[0049]

<210> 146
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 146
caggcgtccc agtcaattag cagcgtgctc tcc 33

<210> 147
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 147
ttggcctcca ctctggcctc g 21

<210> 148
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 148

caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42

<210> 149
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 149
aactatgcaa tgagc 15

<210> 150
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 150
tccattagta ctggtggtct cgcattctac gcgaactggg caaaaggc 48

<210> 151
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

[0050]

<400> 151
aatggtggtg gtagttatat tttctattat tttgacttg 39

<210> 152
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 152
caggccagtc agagcattag tagttactta tcc 33

<210> 153
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 153
tctgcatcca ctctggcatc t 21

<210> 154
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 154
caaagctatt atgatattgg tactagtact 30

<210> 155
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 155
aactacgcca tgtcc 15

<210> 156
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 156
tccatcagca caggcggcct ggccttctac gccaattggg ccaagggc 48

<210> 157
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

[0051]

<400> 157
aacggcggag gctcctacat cttctactac ttcgacctg 39

<210> 158
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 158
caggcctccc agtccatctc ctcctacctg tcc 33

<210> 159
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 159
tctgcctcca cactggcctc c 21

<210> 160
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 160
cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30

<210> 161
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 161
agctatgcaa tgggc 15

<210> 162
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 162
accattaata ttggtggtcg cgtatattac gcgagctggg caaaaggc 48

<210> 163
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

[0052]

<400> 163
tattataatg gtggtagtta tgacatc 27

<210> 164
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 164
caggccagtg agagcattta tcgcgtattg gcc 33

<210> 165
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 165
gatacatcca ctctggcatc t 21

<210> 166
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 166
caaggcggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 167
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 167
tcctacgcta tgggc 15

<210> 168
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 168
accatcaaca tcggcggcag agtgtactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 169
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0053] <221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 169
tactacaacg gcggctccta cgatatc 27

<210> 170
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 170
caggcctccg agtccatcta ccgggtgctg gcc 33

<210> 171
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 171
gacaccagca cactggcctc c 21

<210> 172
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 172
cagggcggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36

<210> 173
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 173
agttatgcaa tgatc 15

<210> 174
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 174
accattagta ctggtggtat cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

<210> 175
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

[0054]

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 175
gggggatatg ctgctagtag tgcttattat ctcccgtact actttgactt g 51

<210> 176
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 176
cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39

<210> 177
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 177
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 178
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 178
ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36

<210> 179
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 179
tcctacgcta tgatc 15

<210> 180
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 180
accatctcta ccggcggaat tacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 181
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

[0055]

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 181
ggcggctacg ccgccagctc cgcttactac ctgccctact acttcgacct g 51

<210> 182
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 182
cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39

<210> 183
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 183
ctggcctcca cactggcctc t 21

<210> 184
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 184
ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc tttgct 36

<210> 185
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 185
Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
1 5

<210> 186
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 186
Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser
1 5

[0056]

<210> 187
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 187
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 188
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 189
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 189
Asp Thr Ser
1

<210> 190
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 190
Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5

<210> 191
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 191
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

<210> 192
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

[0057]

<400> 192
Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
1 5

<210> 193
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 193
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 194
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 194
Gln Asp Val Asn Thr Ala
1 5

<210> 195
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 195
Ser Ala Ser
1

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 196
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 197
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 197
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5

[0058]

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 198
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 199
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 199
Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Leu
20

<210> 200
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 200
Gln Ser Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 201
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 201
Leu Ala Ser
1

<210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 202
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 203
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

[0059]

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

<400> 203
Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
1 5

<210> 204
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 204
Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
1 5

<210> 205
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 205
Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5 10 15

Gly Met Asp Leu

20

<210> 206
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 206
Gln Ser Ile Ser Ser Val
1 5

<210> 207
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 207
Leu Ala Ser
1

<210> 208
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
[0060] <223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 208
Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
1 5 10

<210> 209
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 209
Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1 5

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

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

<400> 210
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
1 5

<210> 211
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 211
Gly Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

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

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

<400> 212
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 213
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 213
Ser Ala Ser
1

[0061]

<210> 214
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 214
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 215
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 215
Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 216
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 216
Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala

1 5

<210> 217
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 217
Ala Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 218
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 218
Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 219
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
[0062] <223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 219
Ser Ala Ser
1

<210> 220
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 220
Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
1 5 10

<210> 221
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 221
Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 222
Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 223
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 223
Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 224
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 224
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5

[0063]

<210> 225
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 225
Asp Thr Ser
1

<210> 226
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 226
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 227
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 227
Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 228
Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
1 5

<210> 229
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 229
Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
1 5 10

<210> 230
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
[0064] <223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 230
Glu Ser Ile Tyr Arg Val
1 5

<210> 231
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 231
Asp Thr Ser
1

<210> 232
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 232
Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 233
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 233
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 234
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 234
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 235
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 235
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

[0065] Phe Asp Leu

<210> 236
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 236
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
1 5

<210> 237
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 237
Leu Ala Ser
1

<210> 238
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

<223> /注意="人工序列的描述：合成肽"

<400> 238
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 239
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 239
Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 240
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 240
Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
1 5

<210> 241
<211> 19
<212> PRT
[0066] <213> 人工序列

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

<400> 241
Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Leu

<210> 242
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 242
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
1 5

<210> 243
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 243

Leu Ala Ser
1

<210> 244
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 244
Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 245
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 245
ggcttcacct tcagcggcta tggg 24

<210> 246
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
[0067] <223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 246
attagtagtg gtggtagtta tacc 24

<210> 247
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 247
gcaagacatg gggacgatcc cgcctggttc gcttat 36

<210> 248
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 248
tcaagtataa gttccaacaa c 21

<210> 249
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源

<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 249
ggcacatcc 9

<210> 250
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 250
caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33

<210> 251
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 251
ggttactcat tcactggcta cacc 24

<210> 252
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

[0068]

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 252
attactcctt acaatggtgc ttct 24

<210> 253
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 253
gcaaggggg gttacgacgg gaggggtttt gactac 36

<210> 254
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 254
tcaagtgtaa gttac 15

<210> 255
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 255
gacacatcc 9

<210> 256
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 256
cagcagtgga gtaagcaccc tctcacg 27

<210> 257
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 257
ggaatctccc tcagtagcga tgca 24

<210> 258
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0069]

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 258
attaatggtg gtggtaacac a 21

<210> 259
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 259
gccagaggca ttcaacatgg tggtggtaat agtgattatt attattacgg catggacctc 60

<210> 260
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 260
cagagcatta gtagtgtc 18

<210> 261
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 261
ctggcatct 9

<210> 262
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 262
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 263
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 263
ggaatttccc tctcctccga cgcg 24

<210> 264
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0070]

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 264
atcaacggcg gcggaaacac c 21

<210> 265
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 265
gcgcgcggca tccagcacgg tggtggaaac agcgactact actactatgg gatggatctg 60

<210> 266
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 266
cagtcaatta gcagcgtg 18

<210> 267
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 267
ttggcctcc 9

<210> 268
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 268
caaaccaact acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42

<210> 269
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 269
ggattctccc tcaataacta tgca 24

<210> 270
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0071]

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 270
attagtactg gtggtctcgc a 21

<210> 271
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 271
ggcagaaatg gtggtggtag ttatattttc tattattttg acttg 45

<210> 272
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 272
cagagcatta gtagttac 18

<210> 273
<211> 9
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 273
tctgcatcc 9

<210> 274
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 274
caaagctatt atgatattgg tactagtact 30

<210> 275
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 275
ggcttctccc tgaacaacta cgcc 24

[0072]

<210> 276
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 276
atcagcacag gcggcctggc c 21

<210> 277
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 277
gccagaaacg gcggaggctc ctacatcttc tactacttcg acctg 45

<210> 278
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 278
cagtccatct cctcctac 18

<210> 279
<211> 9

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 279
tctgcctcc 9

<210> 280

<400> 280
000

<210> 281

<400> 281
000

<210> 282

<400> 282
000

<210> 283

<400> 283
000

[0073]

<210> 284

<400> 284
000

<210> 285

<400> 285
000

<210> 286

<400> 286
000

<210> 287

<400> 287
000

<210> 288

<400> 288
000

<210> 289

<400> 289

000

<210> 290

<400> 290
000

<210> 291

<400> 291
000

<210> 292

<400> 292
000

<210> 293

<400> 293
000

<210> 294

<400> 294
000

[0074]

<210> 295

<400> 295
000

<210> 296

<400> 296
000

<210> 297

<400> 297
000

<210> 298

<400> 298
000

<210> 299

<400> 299
000

<210> 300
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 300
cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30

<210> 301
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 301
ggaatcgacc tcagtagcta tgca 24

<210> 302
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 302
attaatattg gtggtcgcgt a 21

[0075]

<210> 303
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 303
gccagatatt ataatggtgg tagttatgac atc 33

<210> 304
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 304
gagagcattt atcgcgta 18

<210> 305
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 305
gatacatcc 9

<210> 306
<211> 36

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 306
caaggcggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 307
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 307
ggaatcgacc tgtcctccta cgct 24

<210> 308
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 308
atcaacatcg gcggcagagt g 21

[0076]

<210> 309
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 309
gcccggtact acaacggcgg ctcctacgat atc 33

<210> 310
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 310
gagtccatct accgggtg 18

<210> 311
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 311
gacaccagc 9

<210> 312

<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 312
cagggcggct actacgccga ctcctacgga atcgct 36

<210> 313
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 313
ggattctccc tcagtagtta tgca 24

<210> 314
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 314
attagtactg gtggtatcac a 21

[0077]

<210> 315
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 315
gccagagggg gatatgctgc tagtagtgct tattatctcc cgtactactt tgacttg 57

<210> 316
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 316
cagagtgttt ataataataa caac 24

<210> 317
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 317
ctggcatcc 9

<210> 318
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 318
ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36

<210> 319
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 319
ggcttctccc tgtcctccta cgct 24

<210> 320
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 320
atctctaccg gcggaattac c 21

[0078]

<210> 321
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 321
gctagaggcg gctacgccgc cagctccgct tactacctgc cctactactt cgacctg 57

<210> 322
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 322
cagtccgtgt ataacaacaa caac 24

<210> 323
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 323
ctggcctcc 9

<210> 324
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注意="人工序列的描述：合成寡核苷酸"

<400> 324
ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc tttgct 36

<210> 325
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 325
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

[0079]

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

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

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys

```
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0080]

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

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

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

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

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

Lys
```

<210> 326
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 326
```
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1               5                   10                  15
```

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0081] 165 170 175

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 327
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 327
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

[0082]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

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

Pro Gly Lys
    450
```

<210> 328
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 328

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

[0083]

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175
```

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 329
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 329
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

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

Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

[0084]

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
85 90 95

Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Ser 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

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 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

[0085] 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> 330
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 330
Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val

20 25 30

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

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

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

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

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

[0086]

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

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

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

<210> 331
<211> 456
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 331
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

```
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

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

Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
            100                 105                 110

Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120                 125

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

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

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

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
            180                 185                 190

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

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
    210                 215                 220
```

[0087]

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

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                245                 250                 255

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

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

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

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

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

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
        355                 360                 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
```

370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 332
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 332
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

[0088] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
20 25 30

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

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

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

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

Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

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

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

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

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

<210> 333
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 333
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
20 25 30

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

Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

[0089]

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

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
85 90 95

Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0090]

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

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

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

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

<210> 334
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 334
Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
[0091] 195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 335
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 335
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

[0092]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 336
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 336
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

[0093]

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 337
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 337
Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1 5 10 15

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

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

[0094] Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95

Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

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

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

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

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

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

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

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

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

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

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

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

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

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

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

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

[0095]

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 338
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 338
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30

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

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

```
Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
                85                  90                  95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
            100                 105                 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
        115                 120                 125

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145                 150                 155                 160

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

[0096]

<210> 339
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

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

```
<400> 339
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110
```

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220

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

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

[0097]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 340
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 340
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
65 70 75 80

[0098]

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 341
<211> 452

<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 341
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

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

Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

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

[0099]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

[0100]

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

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 342
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 342
Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

```
Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
                85                  90                  95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

[0101]

```
<210> 343
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 343
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
    50                  55                  60

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

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

Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
            100                 105                 110

Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        115                 120                 125
```

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

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

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

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

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

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

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225                 230                 235                 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
                245                 250                 255

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

[0102]

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

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

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

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

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
    370                 375                 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385                 390                 395                 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
            420                 425                 430
```

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 344
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 344
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

[0103] Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95

Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

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

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

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

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

<210> 345
<211> 1350
<212> DNA

<213> 人工序列

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

<400> 345
gaggtccaac tggtggagag cggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcctg 60

tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120

cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180

gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240

ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accggggtct atttttgtgc aagacatggg 300

gacgatcccg cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

[0104]

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cttatattca aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 346
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 346
gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60

atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag 120

ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tggtgtgcca 180

agcagattca gcggtagcgg tagcggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240

ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttaa 654

<210> 347
<211> 1350
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 347
caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

[0105] ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350

<210> 348
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 348

gacatcgagc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

gatgatgcaa cttattactg ccagcagtgg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 642

<210> 349
<211> 1362
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 349
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

[0106] gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatggtggtg gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatggtggt 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctggtcact 360

gtctcttcag catccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc 420

acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 480

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 540

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 600

acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa 660

gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720

ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 780

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 840

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900

cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960

aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1020

accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc 1080

cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc 1140

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200

cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcttatatt caaagctcac cgtggacaag 1260

agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320

cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cccgggaaat ga 1362

<210> 350
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 350
gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180

cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt 300

tttgctttcg gcggagggac cgaggtggtc gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 351
<211> 1371
[0107] <212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 351
gaagtccaac tggtggaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg 60

tcatgtgctg catcgggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120

cccggaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240

caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300

cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360

cttgtgaccg tgtcgtcagc atccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc ggcaccctcc 420

tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc 480

gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg 540

gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600

agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660

gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720

cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc 780

atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct 840

gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg 900

cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960

gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 1020

atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080

cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140

ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 1200

aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcttatattc aaagctcacc 1260

gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 1320

ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggaaatg a 1371

<210> 352
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 352
gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc 60

atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg 120

gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca 180

cggttctccg gatcgggatc tggtactgat ttcaccctca ccatctcgag ccttcagtgc 240

gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc 300

tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

[0108] ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 353
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 353
cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccccc gacactcacc 60

tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatt ctacgcgaac 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaaatgacc 240

agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatggtgg tggtagttat 300

attttctatt attttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcactgtctc ttcagcatcc 360

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ccttcttctt atattcaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtctcccgg gaaatga 1347

<210> 354
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列

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

[0109] <400> 354
gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc 60

atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180

cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt 240

gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc 300

ggagggaccg aggtggtcgt caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 355
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 355
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc 180

aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga 300

ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca 360

tctgcatcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggat 1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctta tattcaaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

[0110] acgcagaaga gcctctccct gtctcccggg aaatga 1356

<210> 356
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 356
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgac tttaccctga ccatcagctc cctccagtgc 240

gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc 300

ggaggcacca aggtggaaat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga 648

<210> 357
<211> 1335

<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 357
cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 60

tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattggtg gtcgcgtata ttacgcgagc 180

tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggatct gaaagcgccc 240

agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tggtggtagt 300

tatgacatct ggggcccagg caccctggtc accgtctctt tagcatccac caagggccca 360

tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 420

tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg 480

accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta ctccctcagc 540

agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat 600

cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact 660

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 720

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 780

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 900

[0111] agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 960

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1020

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1080

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1200

ttcttcttat attcaaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1260

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1320

tctcccggga aatga 1335

<210> 358
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 358
gatgttgtga tgacccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcaagtgcc aggccagtga gagcatttat cgcgtattgg cctggtatca gcagaaacca 120

gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg 180

cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt 240

gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc ggttattatg ctgatagtta tggtattgct 300

ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 359
<211> 1344
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 359
caggtgcagc tggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct 120

cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg gtactacaac 300

ggcggctcct acgatatctg gggccagggc acactcgtga ccgtgtcctc tgcatccacc 360

aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480

[0112] ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggatga gctgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcttata ttcaaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctcccgggaa atga 1344

<210> 360
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 360
gatatccaga tgacccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggtatca gcagaagcct 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct 180

agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc 240

gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct 300

ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 360

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 420

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 480

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 540

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 600

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga 654

<210> 361
<211> 1359
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 361
cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca 120

[0113] ggggaggggc tggaatggat cggaaccatt agtactggtg gtatcacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtggatct gaaaatcacc 240

agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggggggata tgctgctagt 300

agtgcttatt atctcccgta ctactttgac ttgtggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcat ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc 420

tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720

gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 780

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1020

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1080

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ttatattcaa agctcaccgt ggacaagagc 1260

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccc gggaaatga 1359

<210> 362
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 362
gcagccgtgc tgacccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc 60

atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag 120

aaacccgggc agcctcccaa gcttctgatc tatctggcat ccactctggc atctggggtc 180

ccatcacggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcggcgtg 240

cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctaggtggtt gtgatgatga tgctgatact 300

tttgctttcg gcggagggac tgaggtggtg gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

[0114]
<210> 363
<211> 1368
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 363
gaagtgcagc tggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60

tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180

tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300

gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcaccctc 360

gtgacagtgt catctgcatc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc 420

aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct 720

gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg 780

atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag 840

gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 900

gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 960

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1020

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1080

ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1140

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1200

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttct tatattcaaa gctcaccgtg 1260

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1320

cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctcccg ggaaatga 1368

<210> 364
<211> 660
<212> DNA
<213> 人工序列

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

<400> 364
gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120

aaacccggca aggtgcccaa gctgctgatc tacctggcct ccacactggc ctctggcgtg 180

ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240

cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300

[0115] tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 365
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 365
Ala His Lys Asp
1

<210> 366
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 366
Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 367
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 367
Gly Phe Leu Gly
1

[0116]

<210> 368
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

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

<400> 368
Ala Leu Ala Leu
1

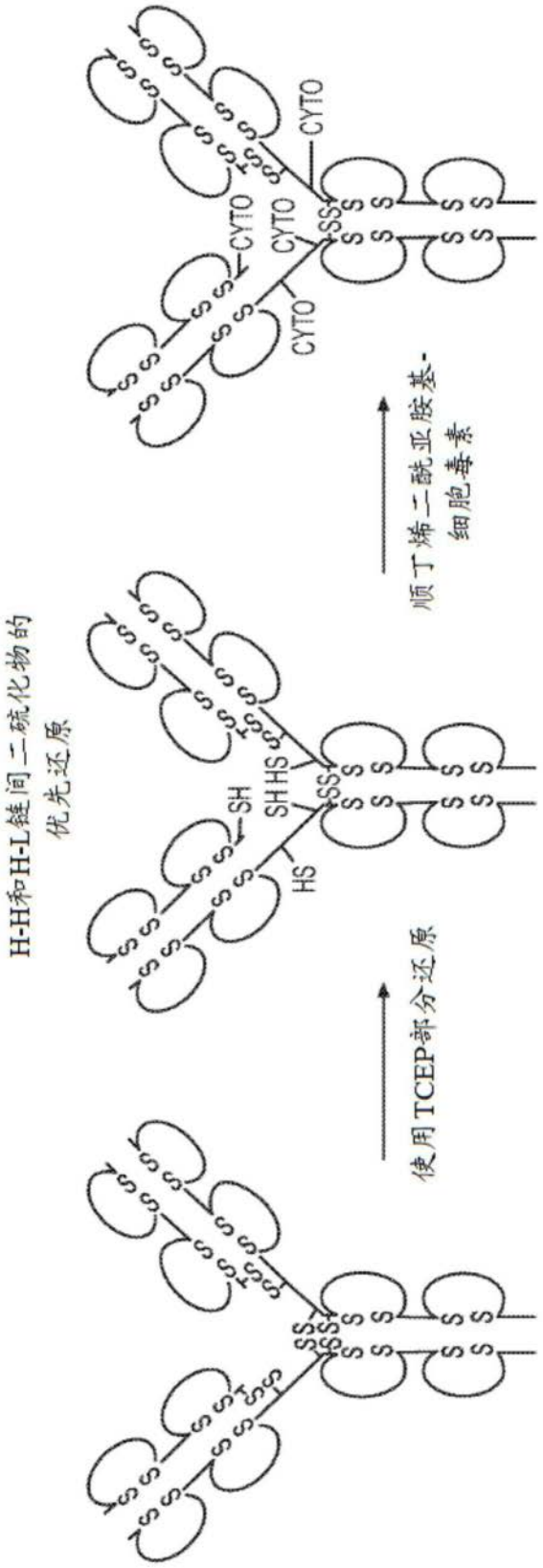

H-H和H-L链间二硫化物的
优先还原
使用TCEP部分还原
顺丁烯二酰亚胺基-
细胞毒素
SH
SH HS
HS
CYTO
CYTO
CYTO
CYTO

图1

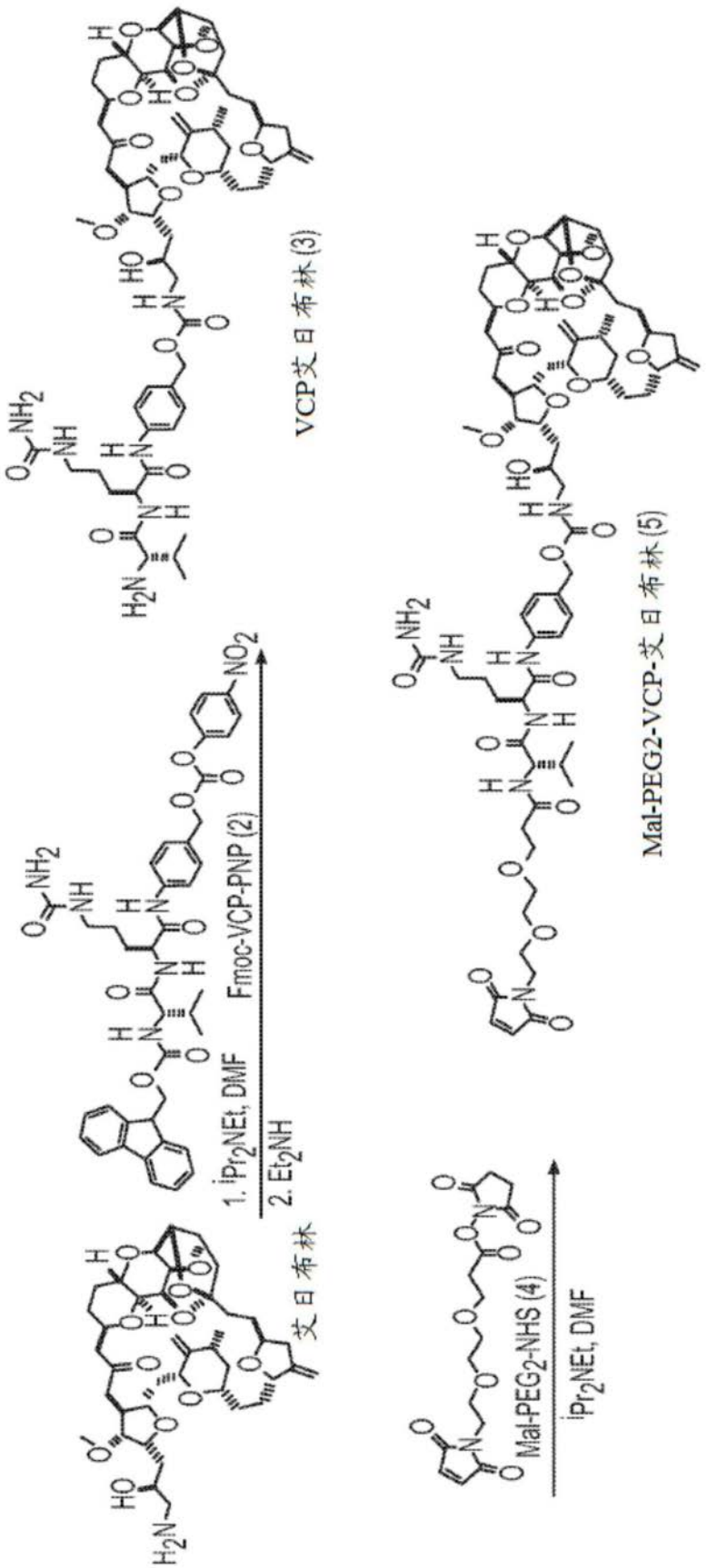

艾日布林
1. iPr2NEt, DMF
2. Et2NH
Fmoc-VCP-PNP (2)
VCP艾日布林(3)
Mal-PEG2-NHS (4)
iPr2NEt, DMF
Mal-PEG2-VCP-艾日布林(5)

图2

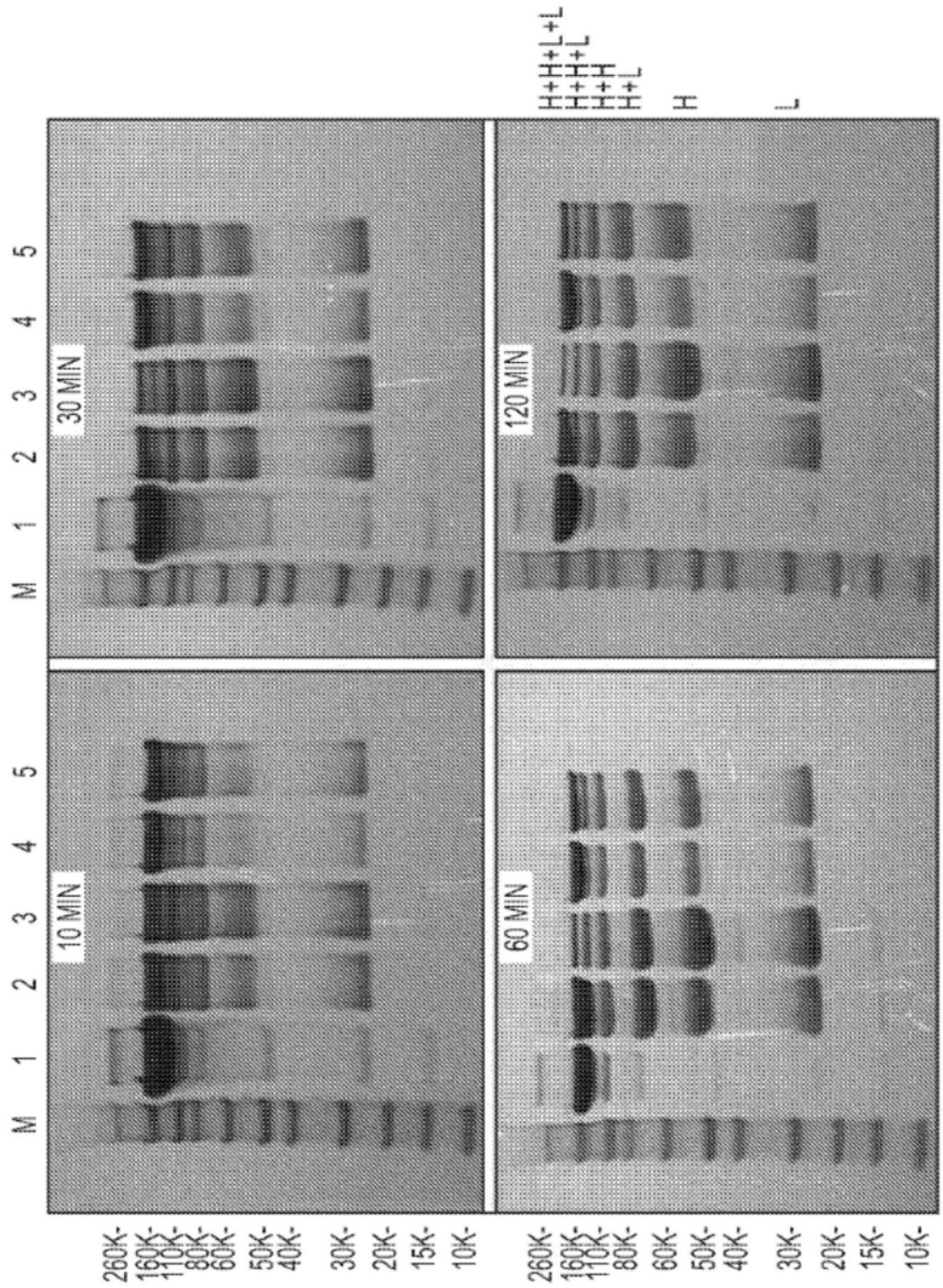

H+H+L+L
H+H+L
H+H+H
H+L
H
L
M 1 2 3 4 5
10 MIN
30 MIN
60 MIN
120 MIN
260K-
160K-
110K-
80K-
60K-
50K-
40K-
30K-
20K-
15K-
10K-

图3

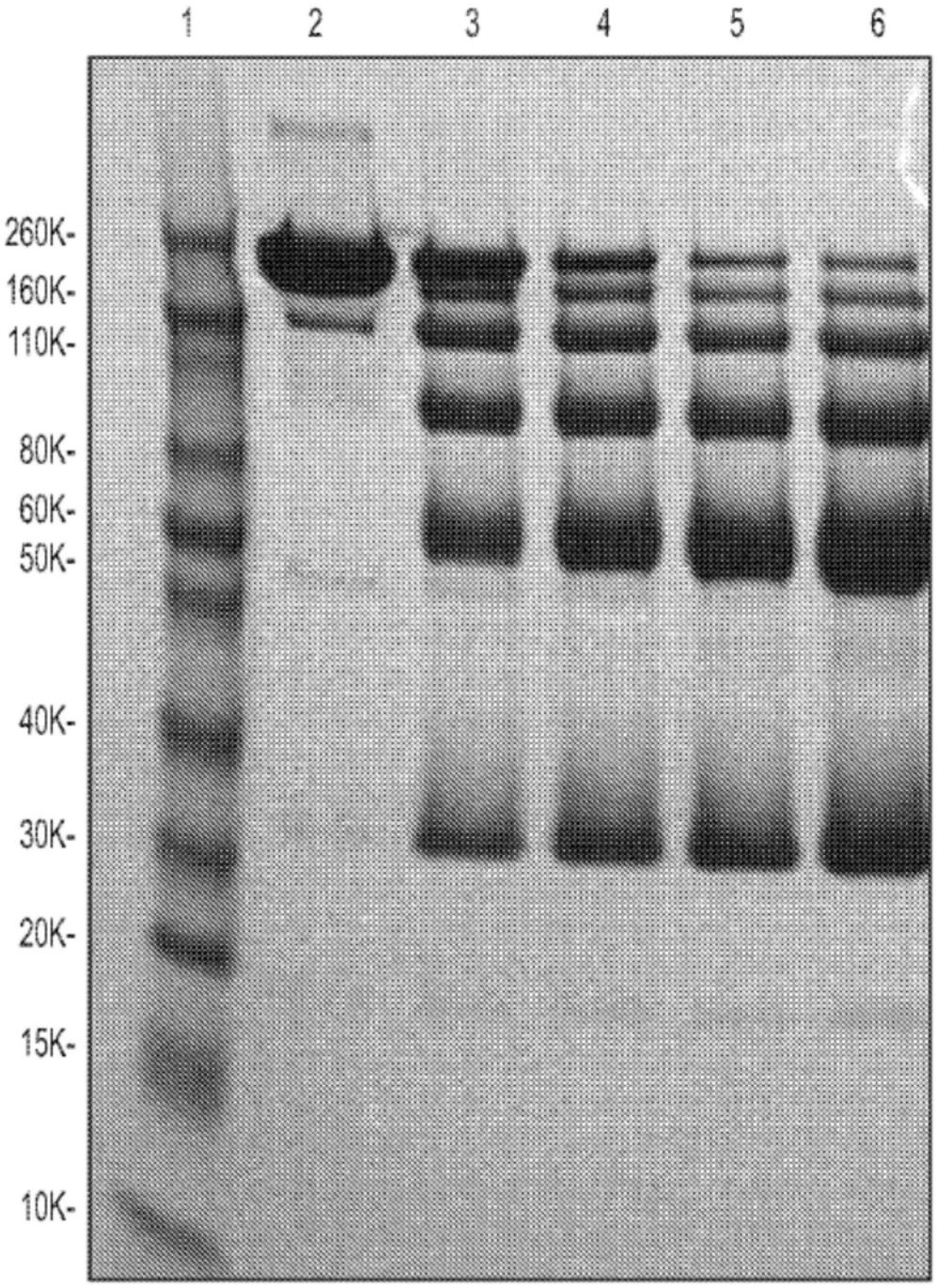


图4

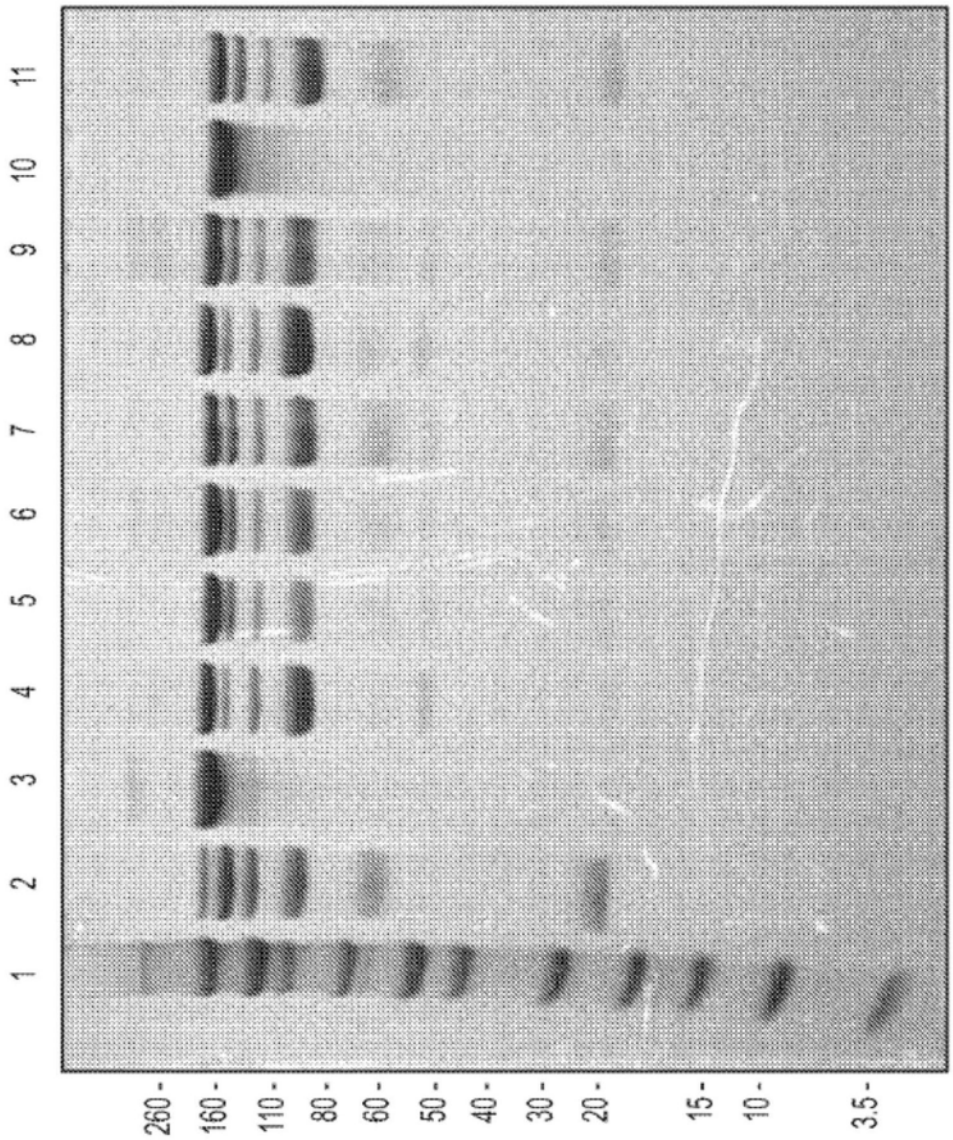


图5

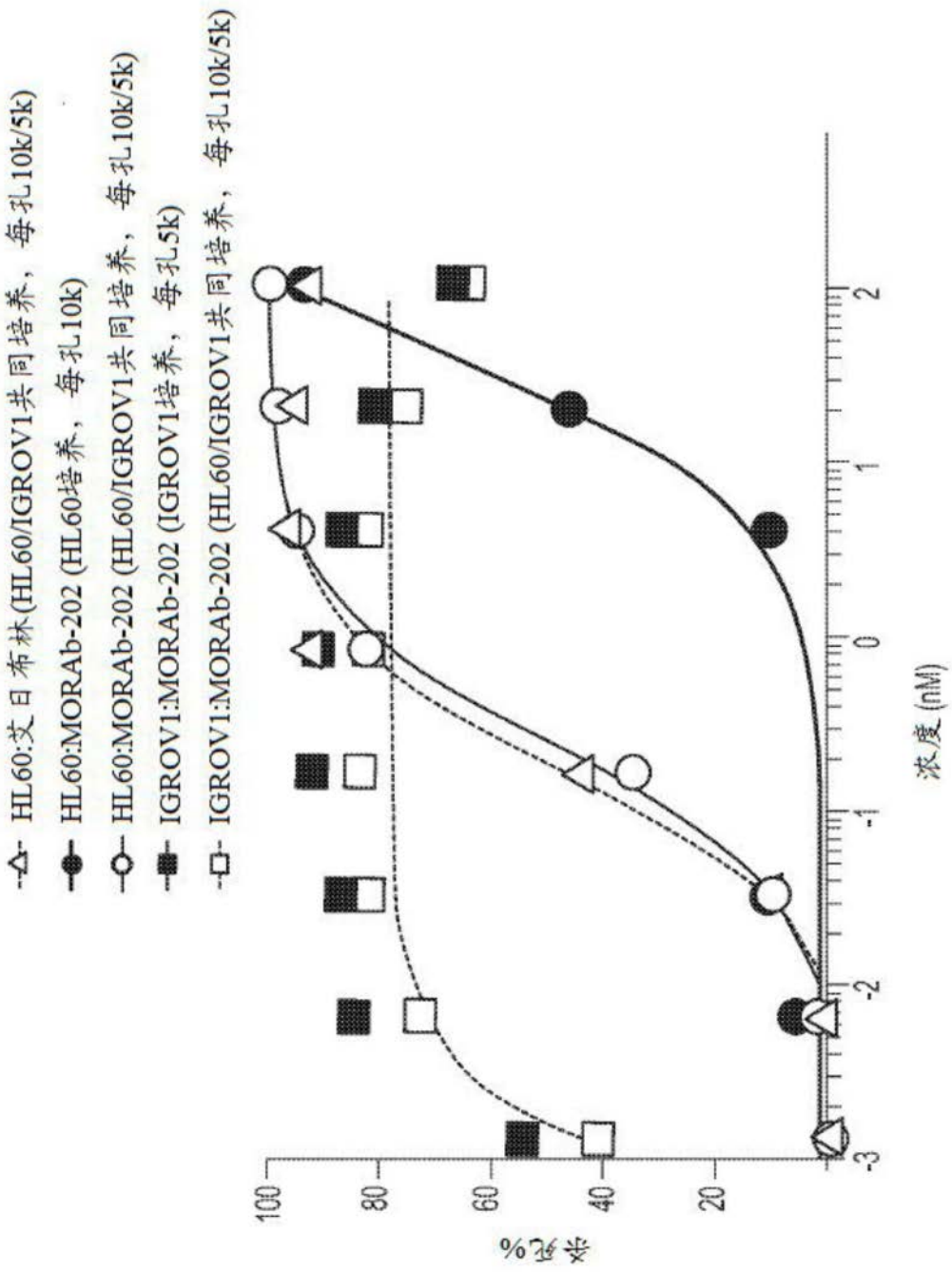

HL60:艾日布林(HL60/IGROV1共同培养，每孔10k/5k)
HL60:MORAb-202 (HL60培养，每孔10k)
HL60:MORAb-202 (HL60/IGROV1共同培养，每孔10k/5k)
IGROV1:MORAb-202 (IGROV1培养，每孔5k)
IGROV1:MORAb-202 (HL60/IGROV1共同培养，每孔10k/5k)
存活%
100
80
60
40
20
-3
-2
-1
0
1
2
浓度 (nM)

图6A

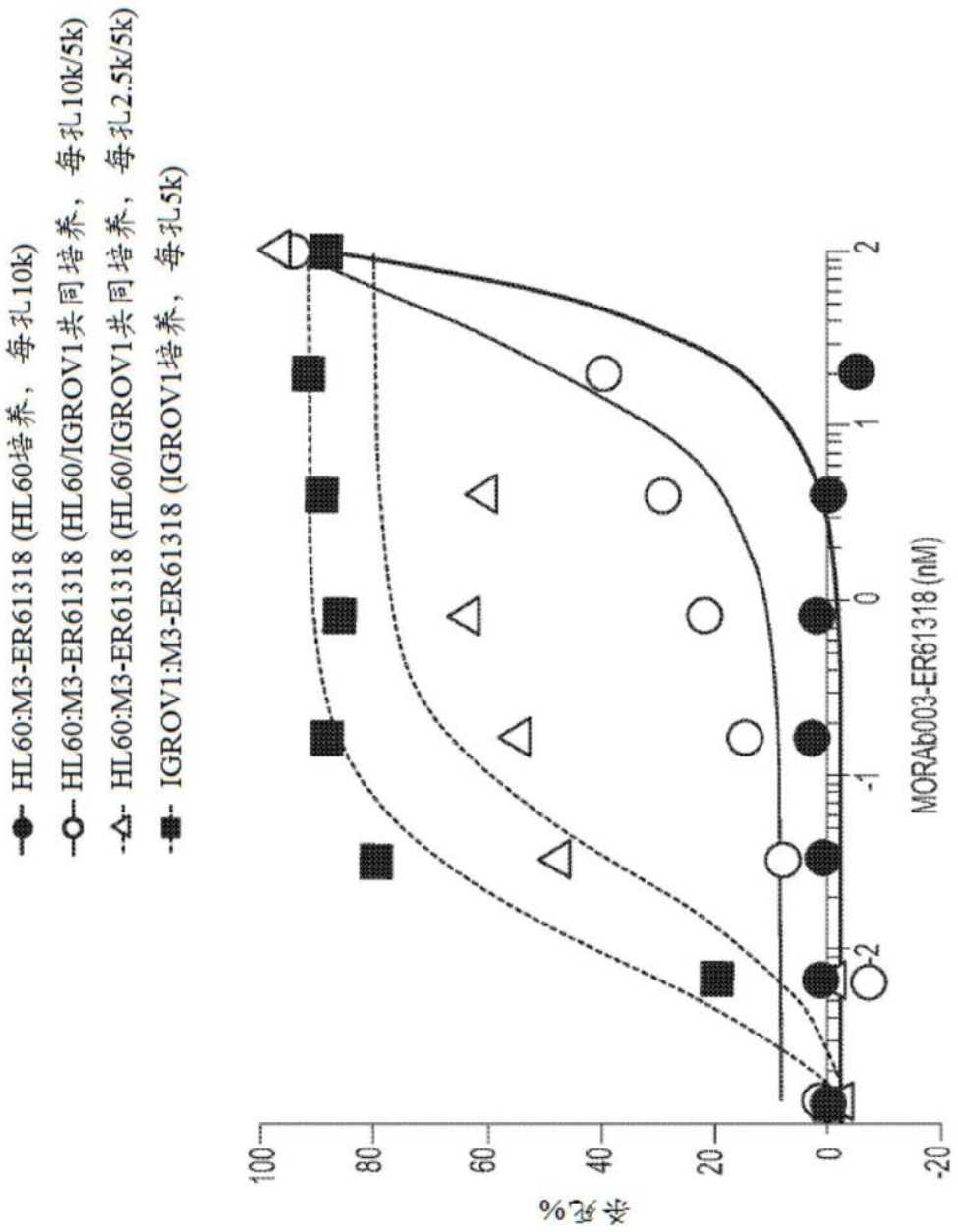

HL60:M3-ER61318 (HL60培养，每孔10k)
HL60:M3-ER61318 (HL60/IGROV1共同培养，每孔10k/5k)
HL60:M3-ER61318 (HL60/IGROV1共同培养，每孔2.5k/5k)
IGROV1:M3-ER61318 (IGROV1培养，每孔5k)
杀死%
100
80
60
40
20
0
-20
2
1
0
-1
-2
MORAb003-ER61318 (nM)

图6B

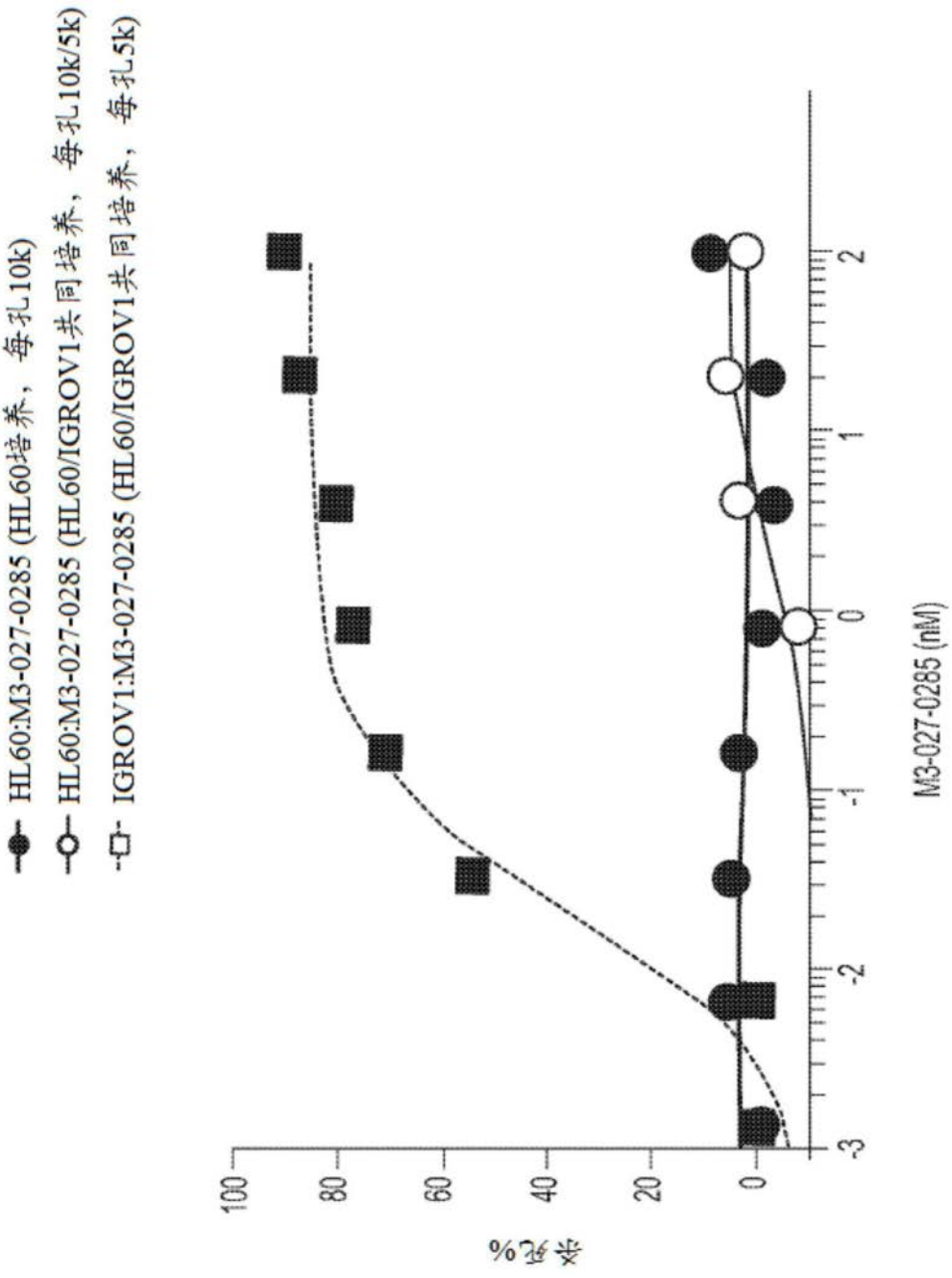

HL60:M3-027-0285 (HL60培养，每孔10k)
HL60:M3-027-0285 (HL60/IGROV1共同培养，每孔10k/5k)
IGROV1:M3-027-0285 (HL60/IGROV1共同培养，每孔5k)
杀死%
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
M3-027-0285 (nM)

图6C

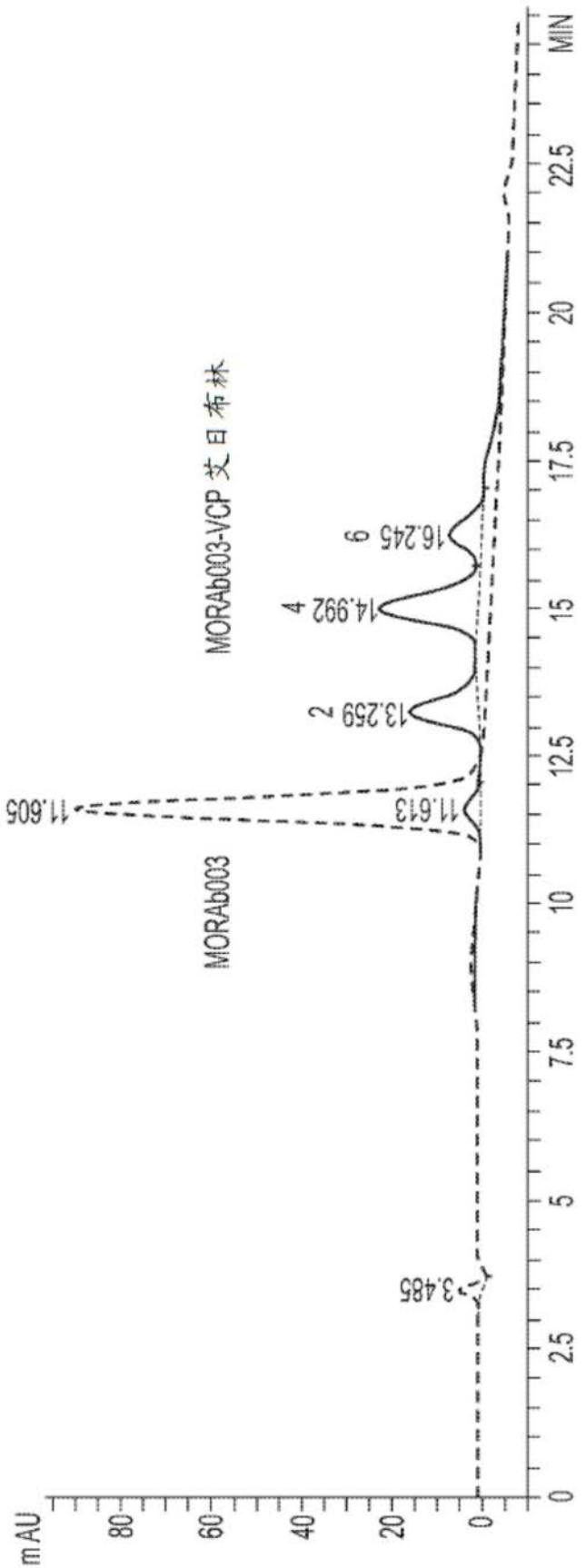

mAU
80
60
40
20
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
22.5
MIN
MORAb003
11.605
11.613
MORAb003-VCP 艾日布林
2
13.259
4
14.992
6
16.245
3.485

图7A

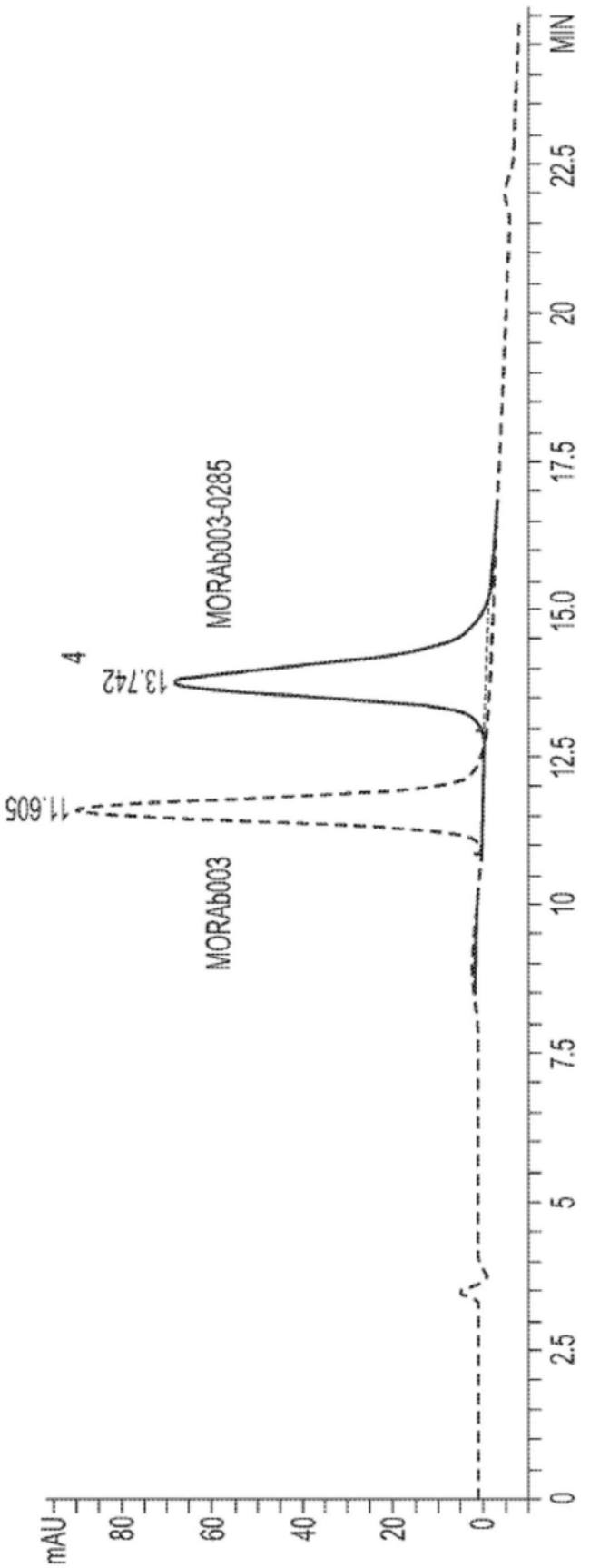

mAU
80
60
40
20
0
0
2.5
5
7.5
10
12.5
15.0
17.5
20
22.5
MIN
MORAb003
11.605
4
13.742
MORAb003-0285

图7B

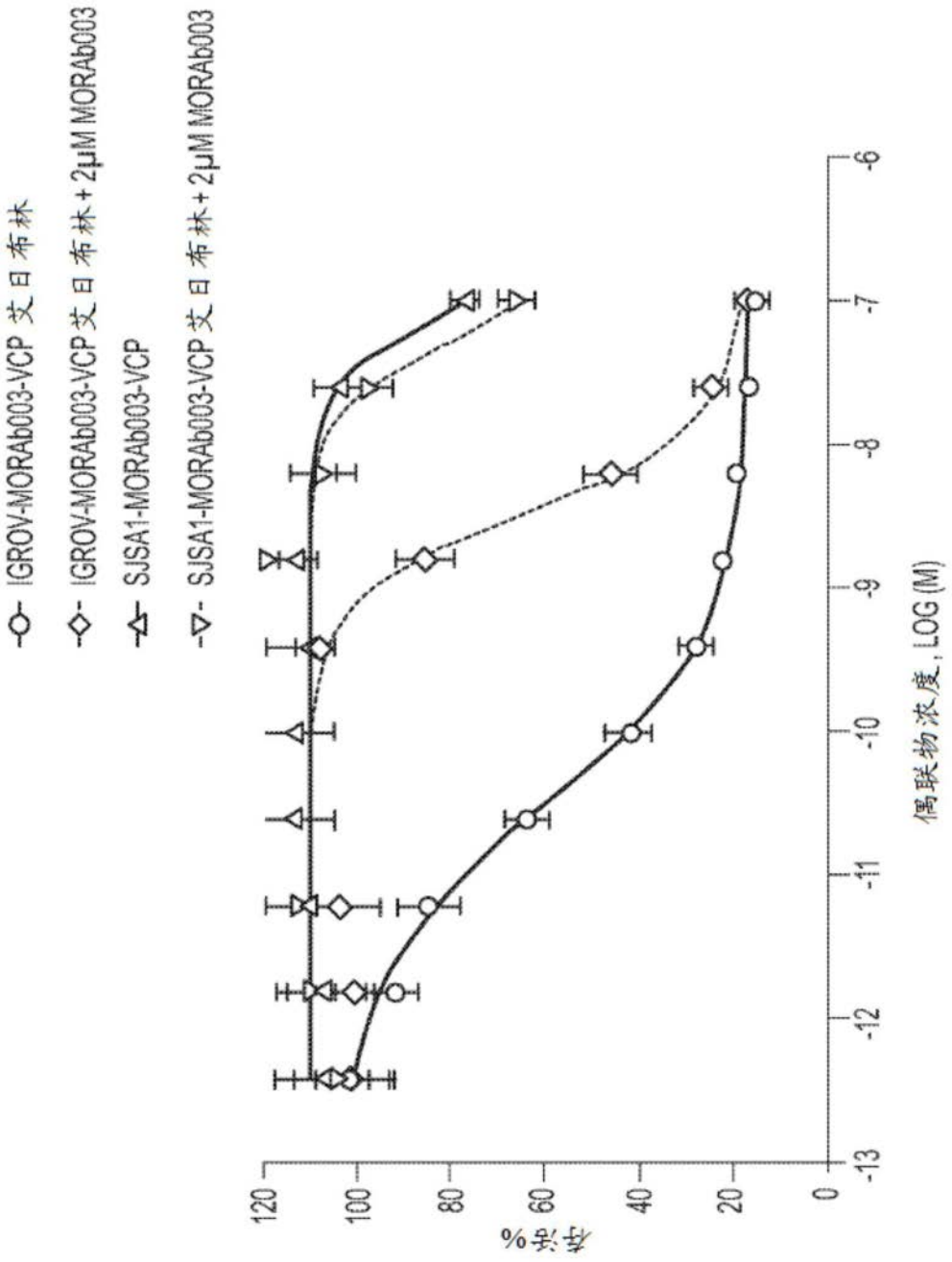

IGROV-MORAb003-VCP 艾日布林
IGROV-MORAb003-VCP 艾日布林 + 2μM MORAb003
SJSA1-MORAb003-VCP
SJSA1-MORAb003-VCP 艾日布林 + 2μM MORAb003
存活%
120
100
80
60
40
20
0
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
偶联物浓度, LOG (M)

图8

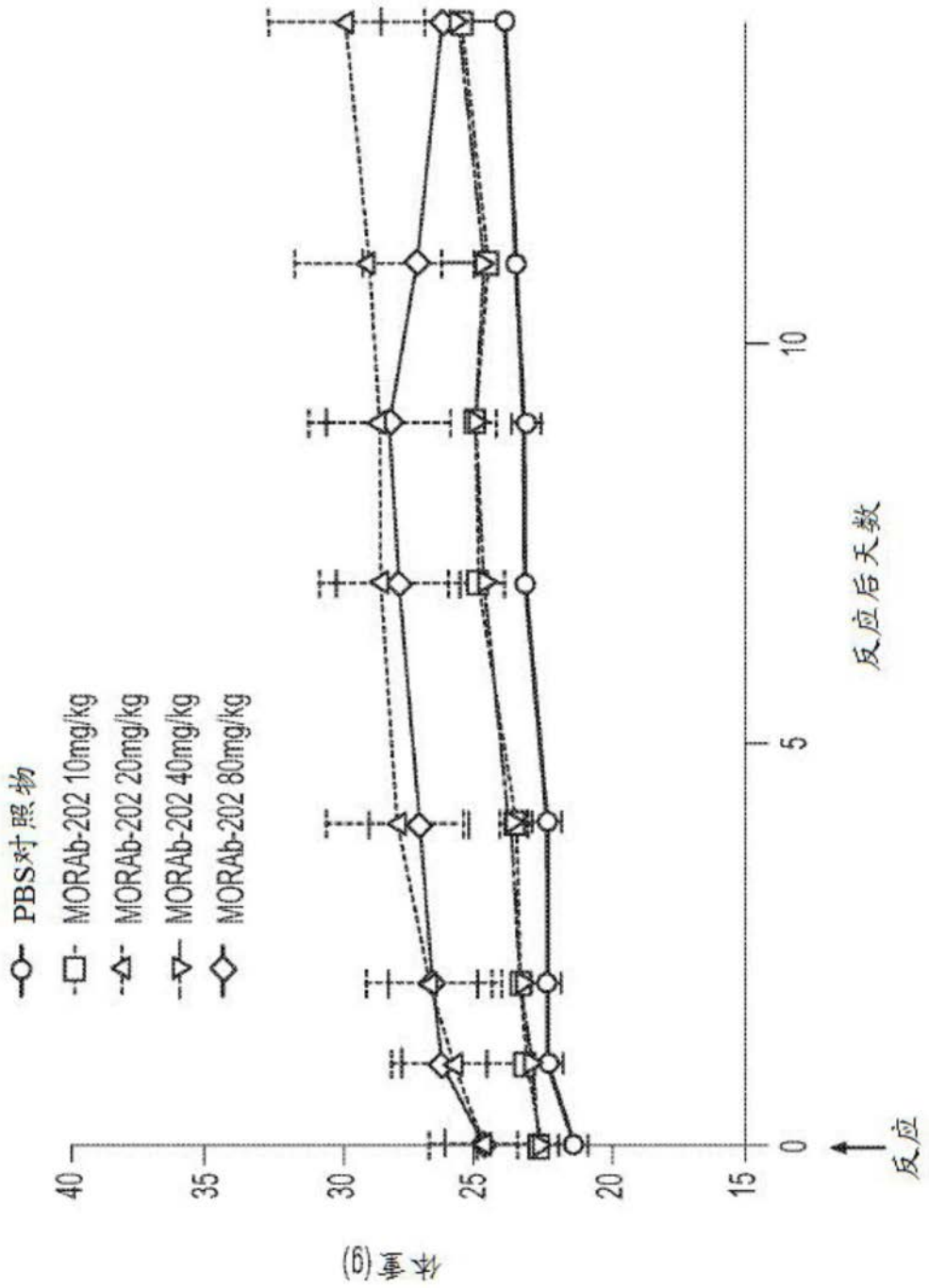

PBS对照物
MORAb-202 10mg/kg
MORAb-202 20mg/kg
MORAb-202 40mg/kg
MORAb-202 80mg/kg
体重(g)
40
35
30
25
20
15
0
5
10
反应
反应后天数

图9

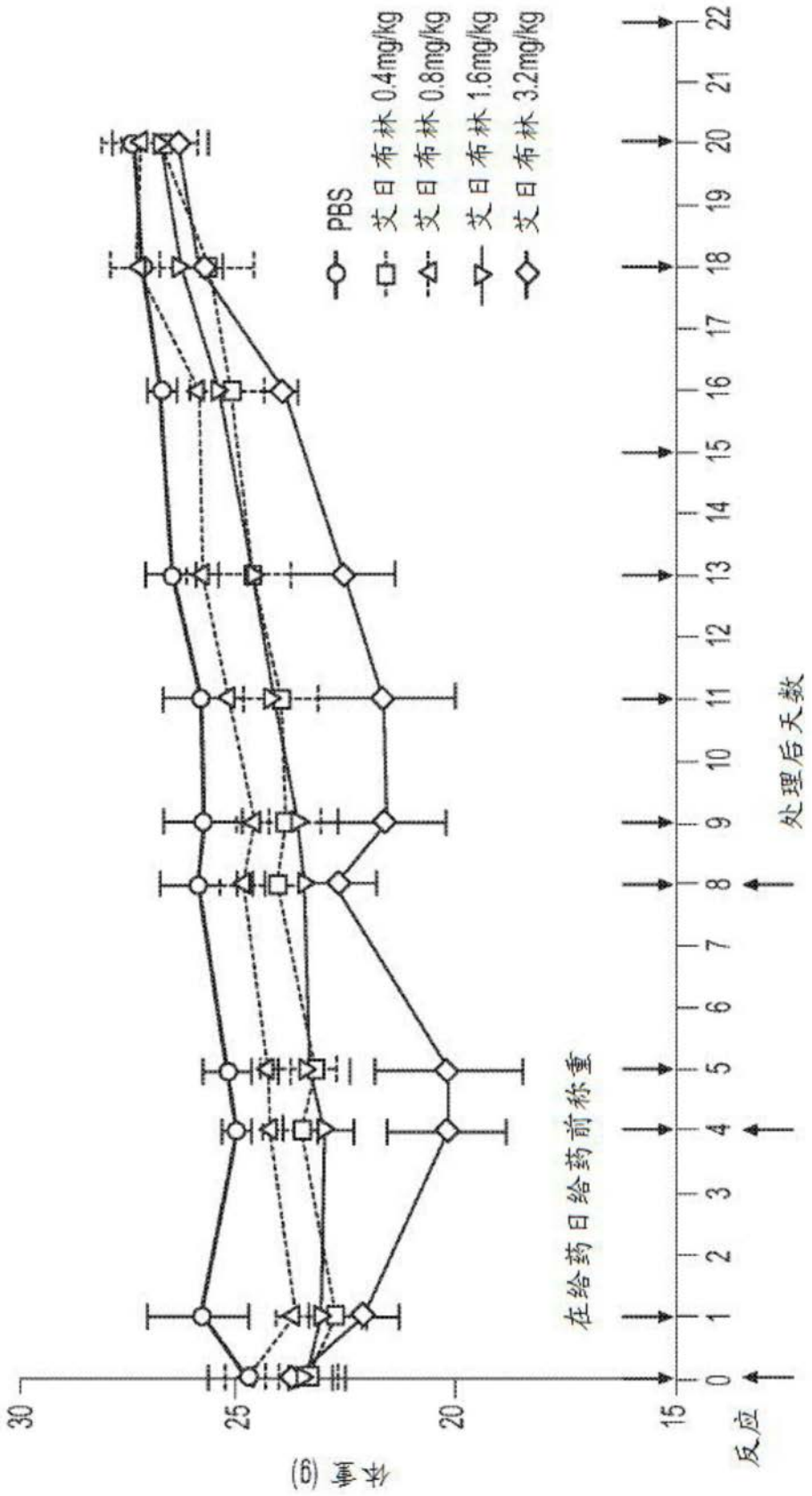

PBS
艾日布林 0.4mg/kg
艾日布林 0.8mg/kg
艾日布林 1.6mg/kg
艾日布林 3.2mg/kg
体重(g)
30
25
20
15
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
反应
在给药日给药前称重
处理后天数

图10

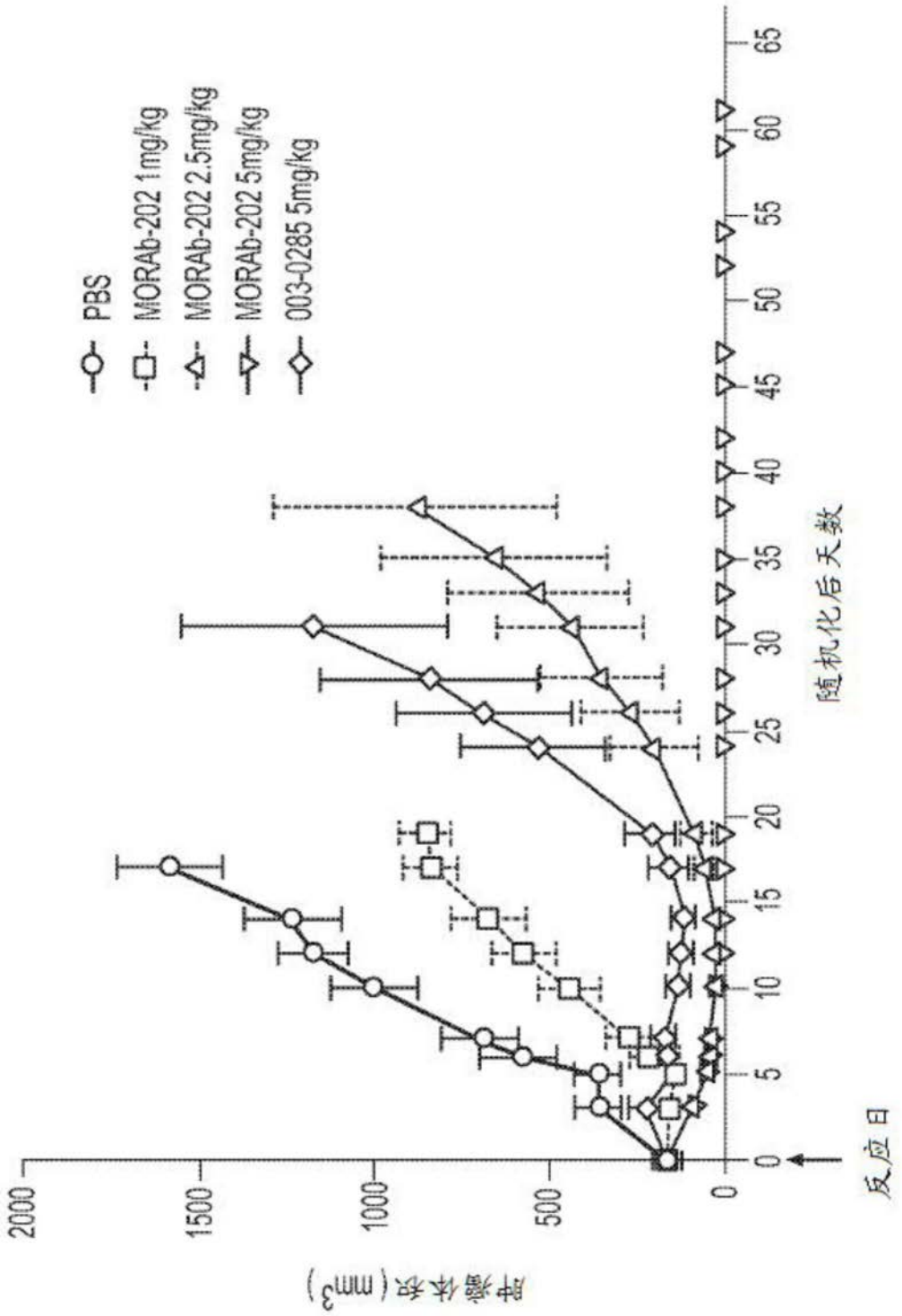

PBS
MORAb-202 1mg/kg
MORAb-202 2.5mg/kg
MORAb-202 5mg/kg
003-0285 5mg/kg
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
反应日
随机化后天数

图11

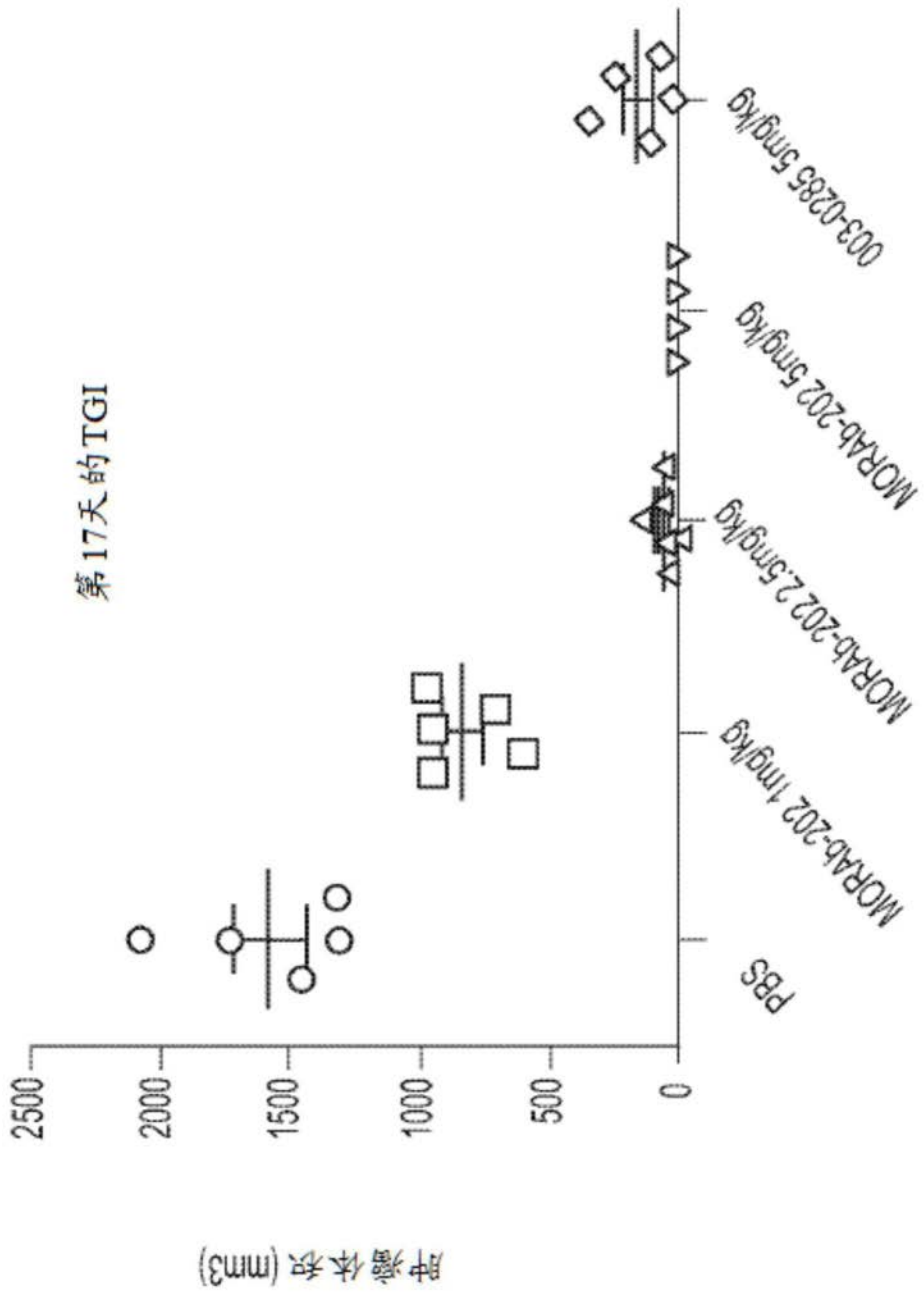

肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
第17天的TGI
PBS
MORAb-202 1mg/kg
MORAb-202 2.5mg/kg
MORAb-202 5mg/kg
003-0285 5mg/kg

图12

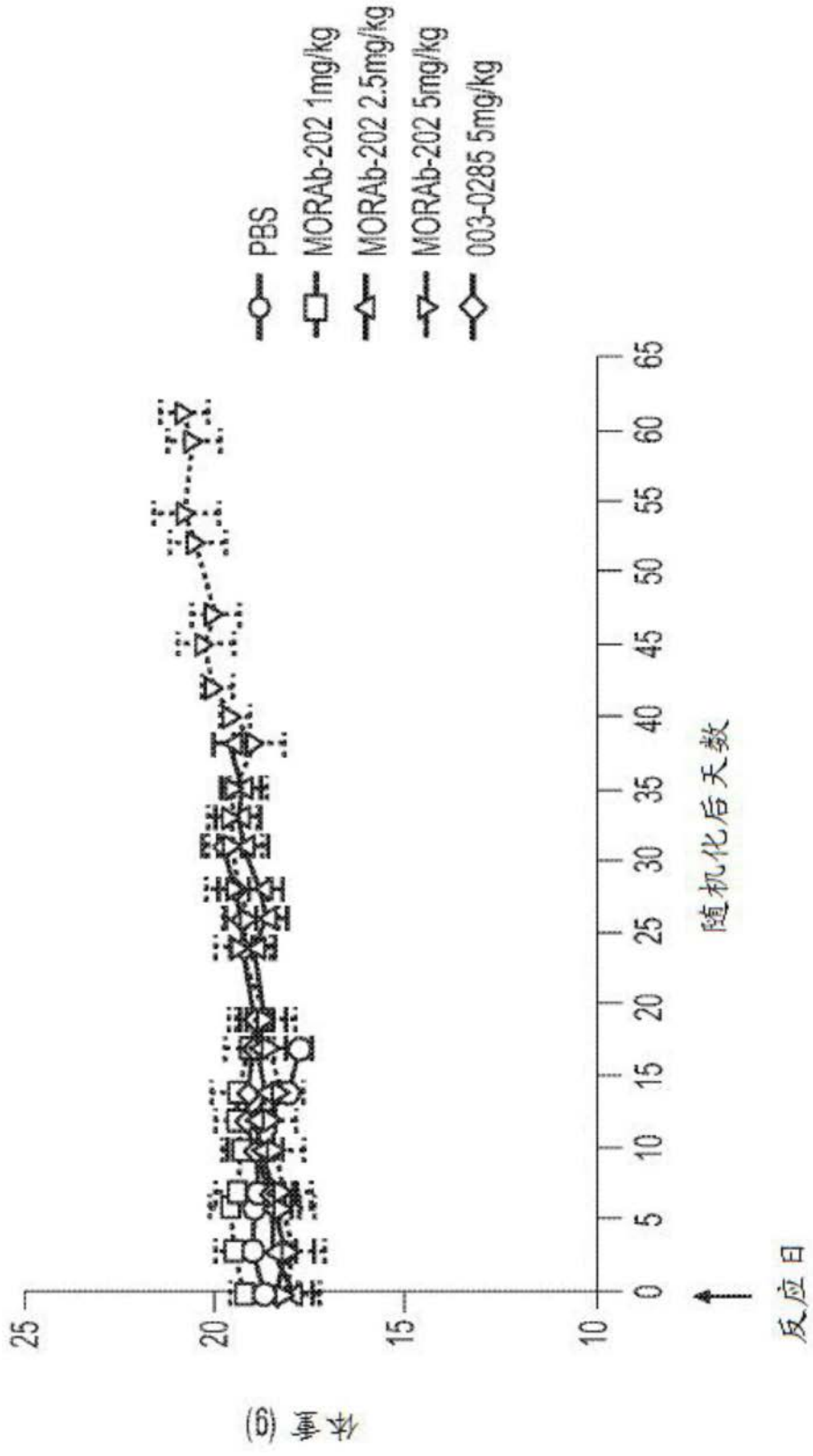

PBS
MORAb-202 1mg/kg
MORAb-202 2.5mg/kg
MORAb-202 5mg/kg
003-0285 5mg/kg
体重 (g)
25
20
15
10
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
随机化后天数
反应日

图13

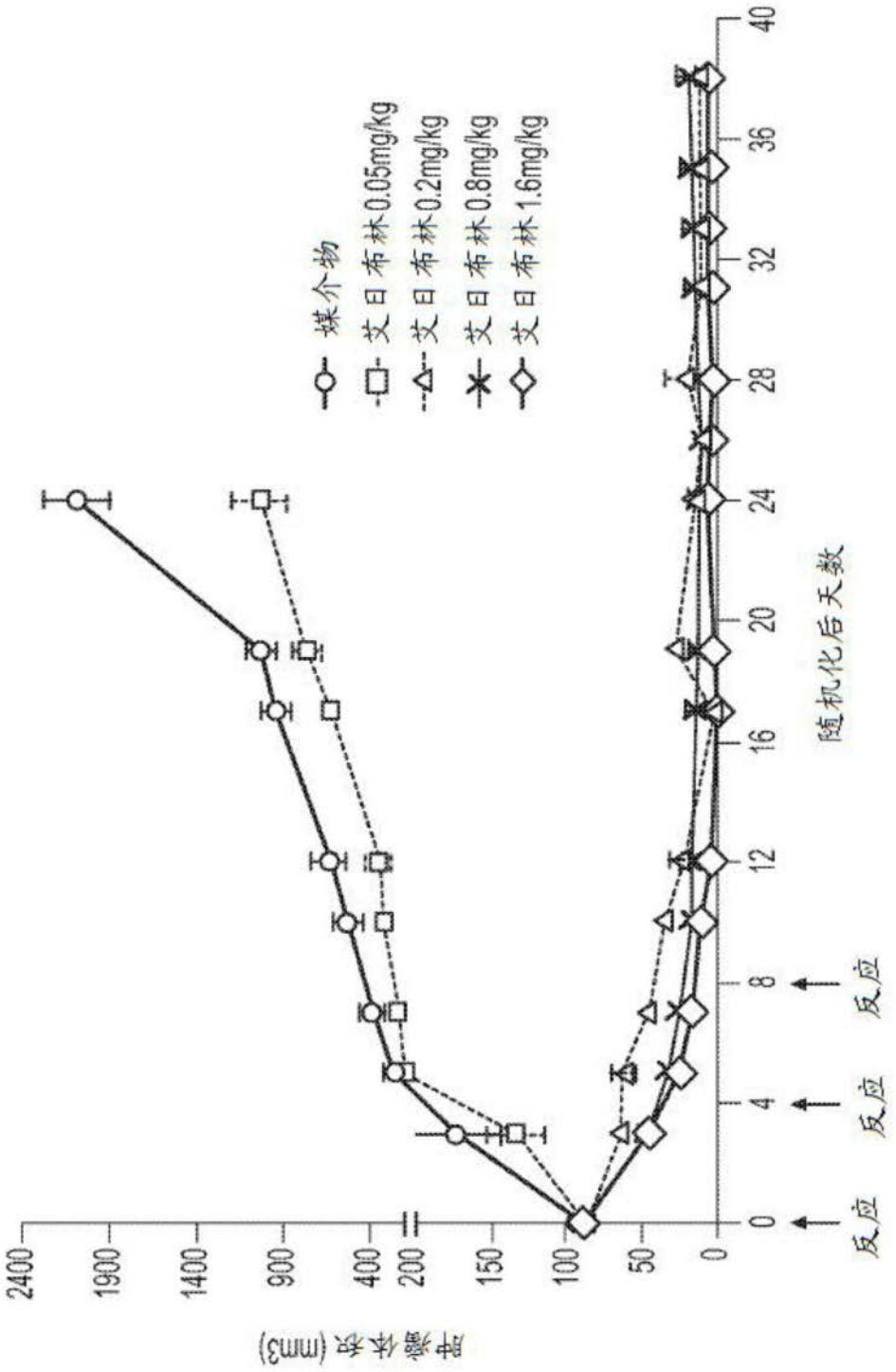

媒介物
艾日布林0.05mg/kg
艾日布林0.2mg/kg
艾日布林0.8mg/kg
艾日布林1.6mg/kg
平滑体积 (mm3)
2400
1900
1400
900
400
200
150
100
50
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
反应
反应
反应
随机化后天数

图14

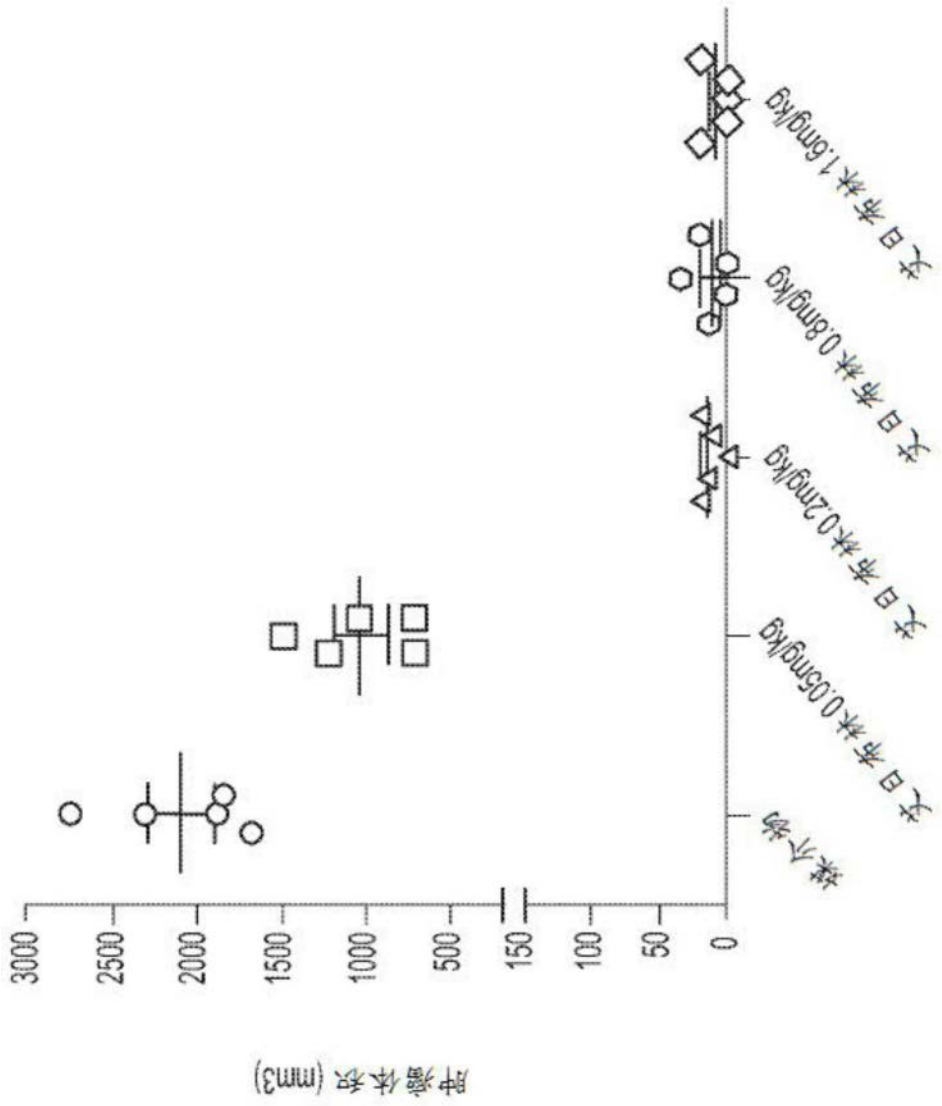

肿瘤体积 (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
150
100
50
0
媒介物
大白菊林0.05mg/kg
大白菊林0.2mg/kg
大白菊林0.8mg/kg
大白菊林1.6mg/kg

图15

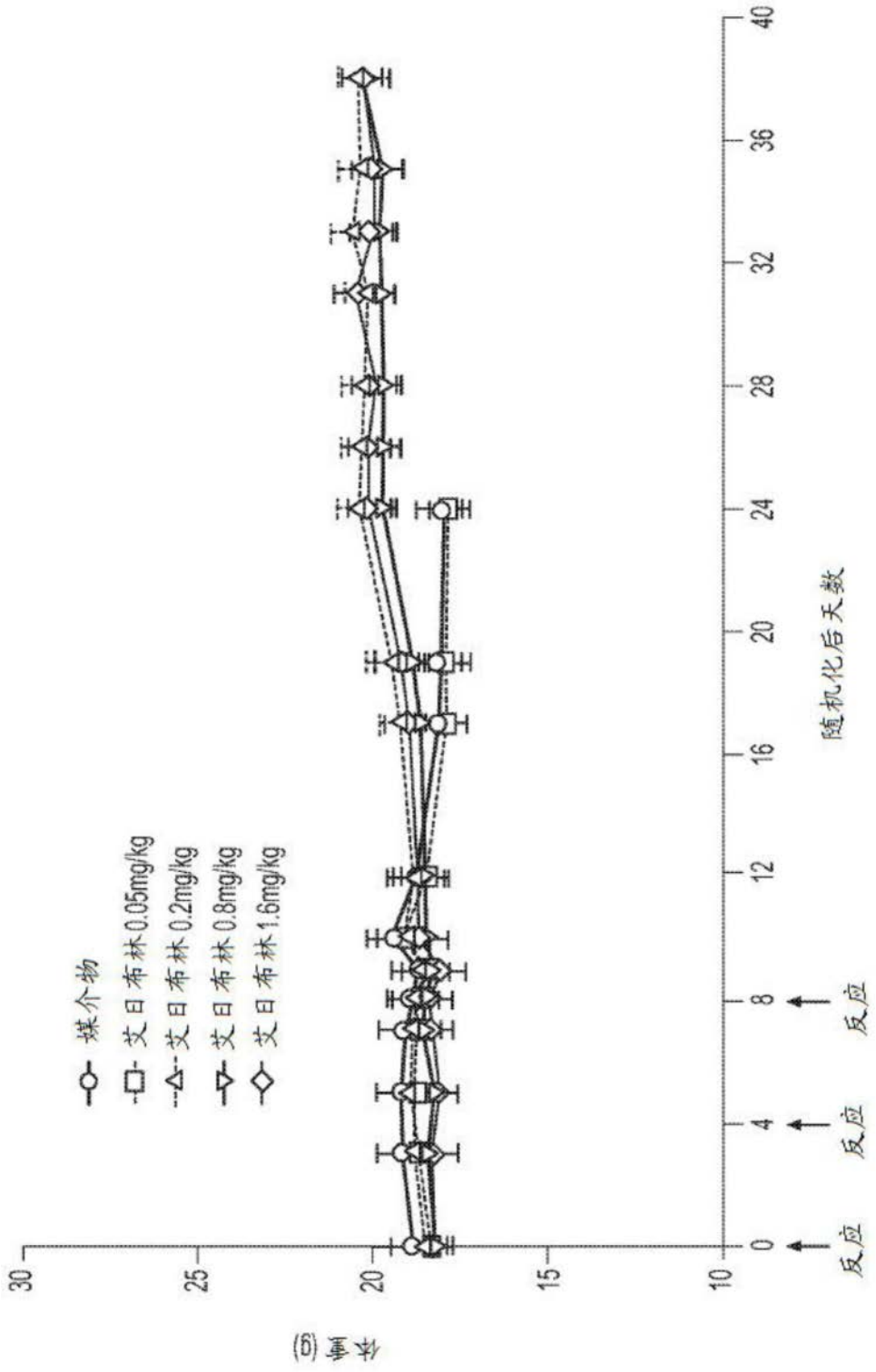

体重(g)
30
25
20
15
10
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
随机化后天数
反应
反应
反应
媒介物
艾日布林0.05mg/kg
艾日布林 0.2mg/kg
艾日布林 0.8mg/kg
艾日布林1.6mg/kg

图16

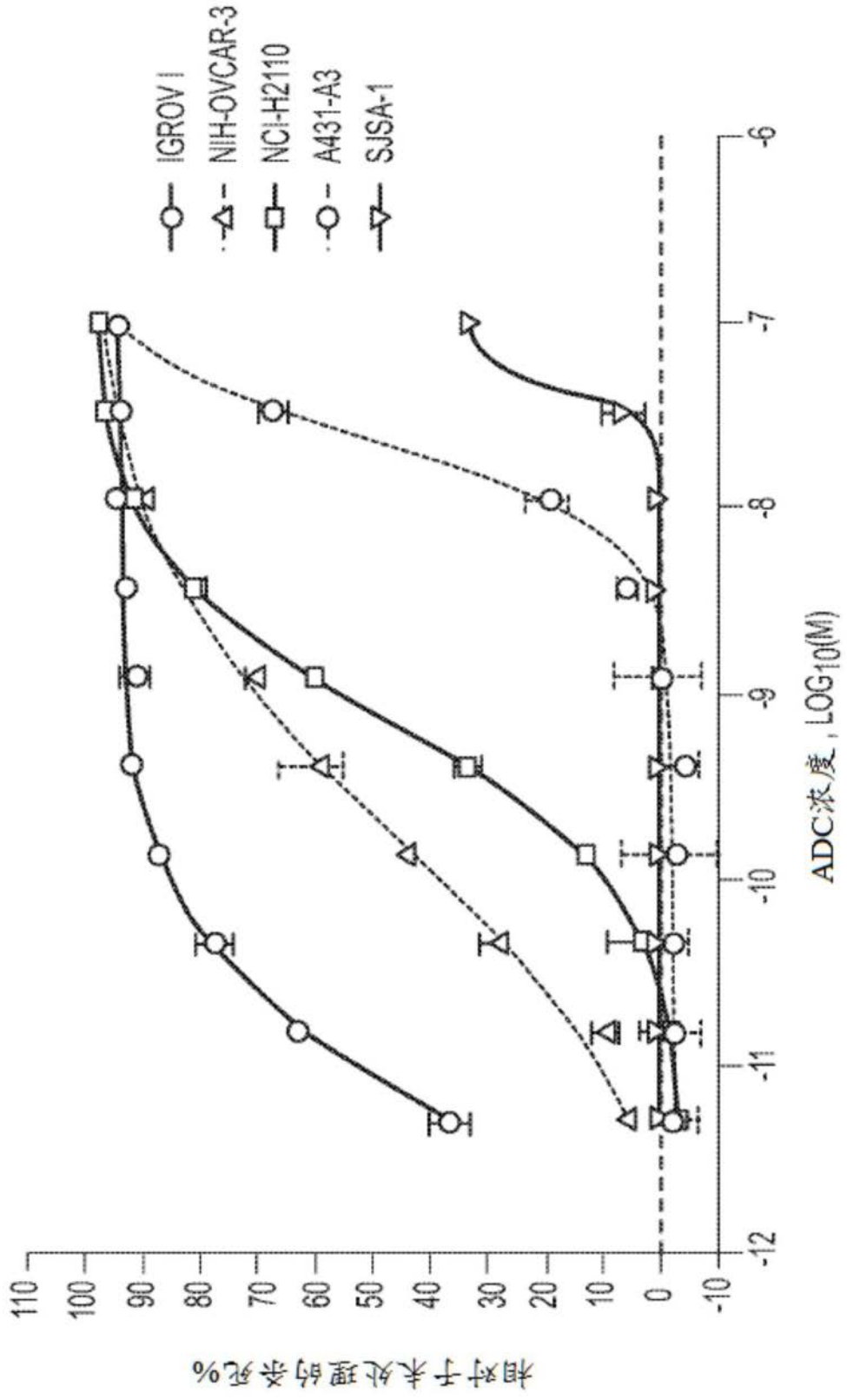

IGROV I
NIH-OVCAR-3
NCI-H2110
A431-A3
SJSA-1
相对于未处理的杀死%
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
ADC浓度，LOG10(M)

图17

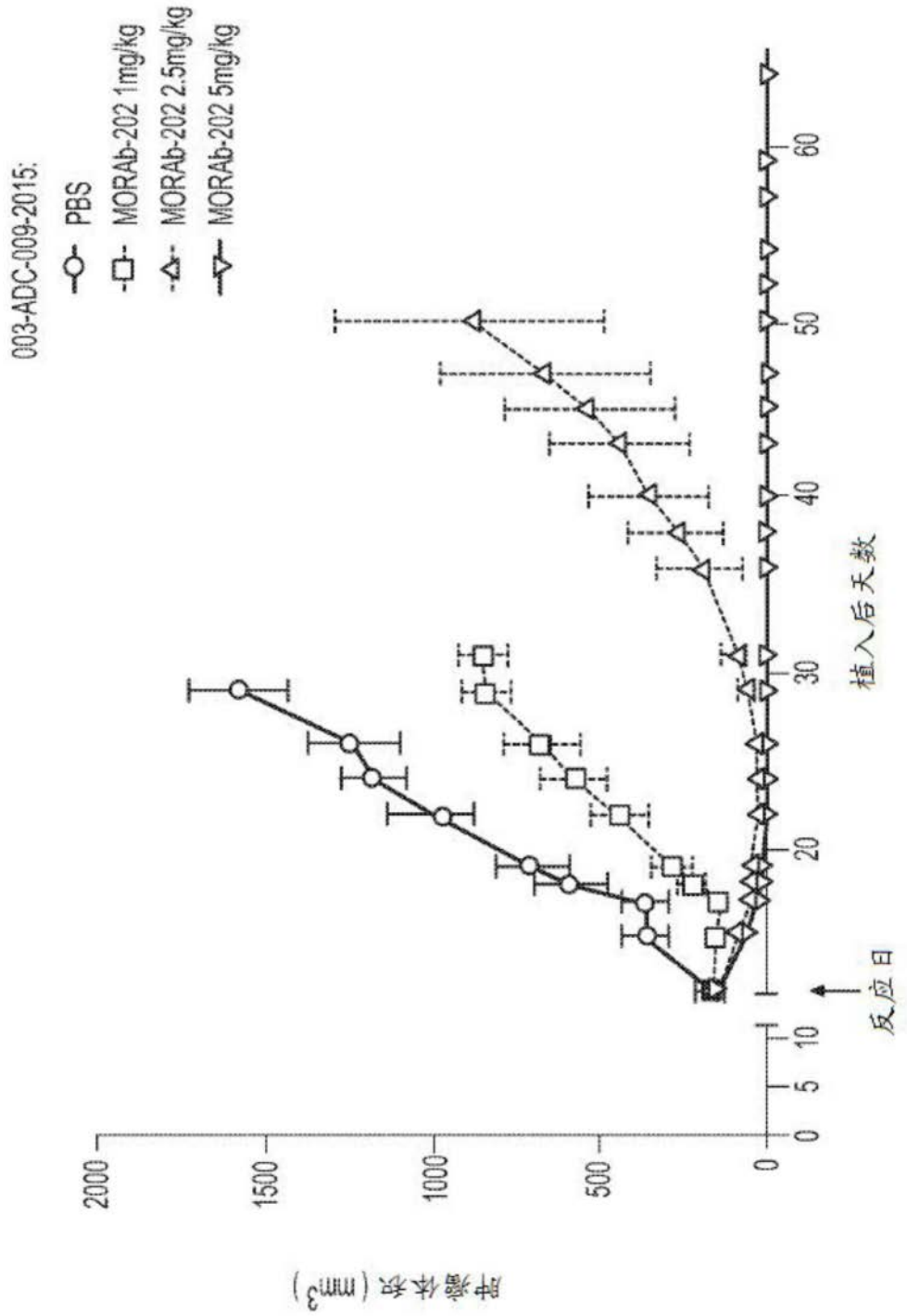

003-ADC-009-2015:
PBS
MORAb-202 1mg/kg
MORAb-202 2.5mg/kg
MORAb-202 5mg/kg
平均肿瘤体积 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
20
30
40
50
60
反应日
植入后天数

图18

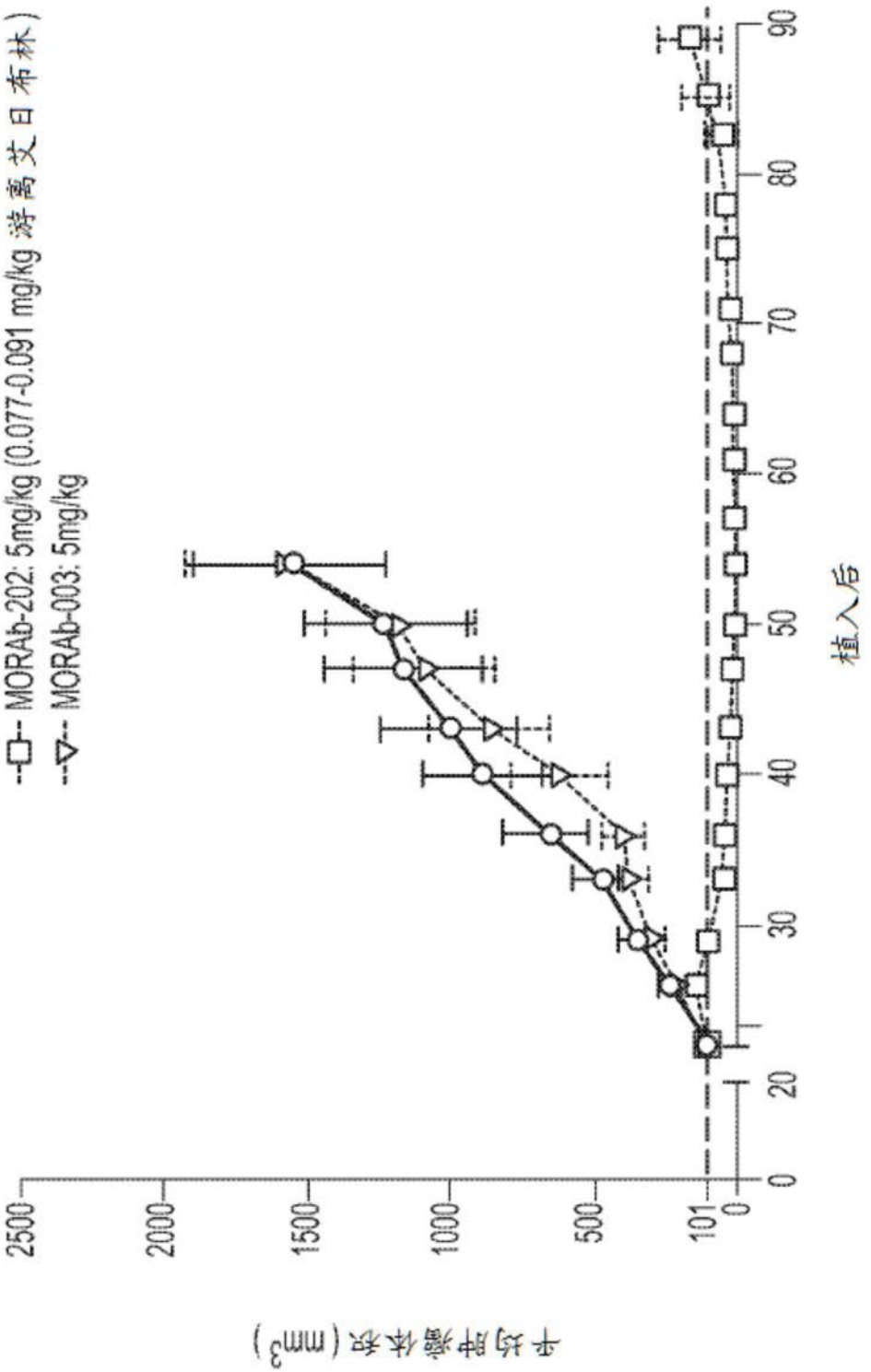

--□-- MORAb-202: 5mg/kg (0.077-0.091 mg/kg 游离艾日布林)
--▽-- MORAb-003: 5mg/kg
平均肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
101
0
0
20
30
40
50
60
70
80
90
植入后

图19A

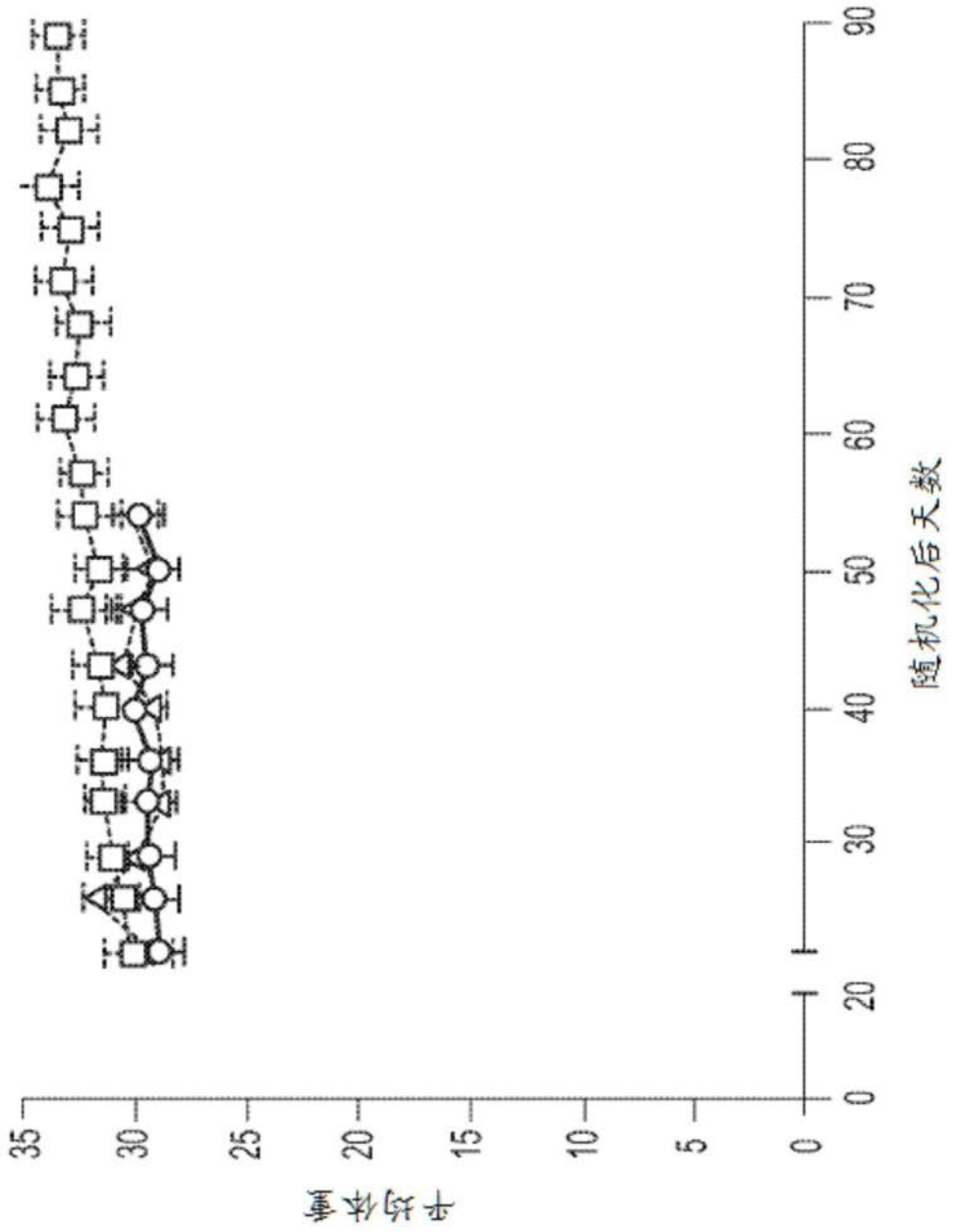


图19B

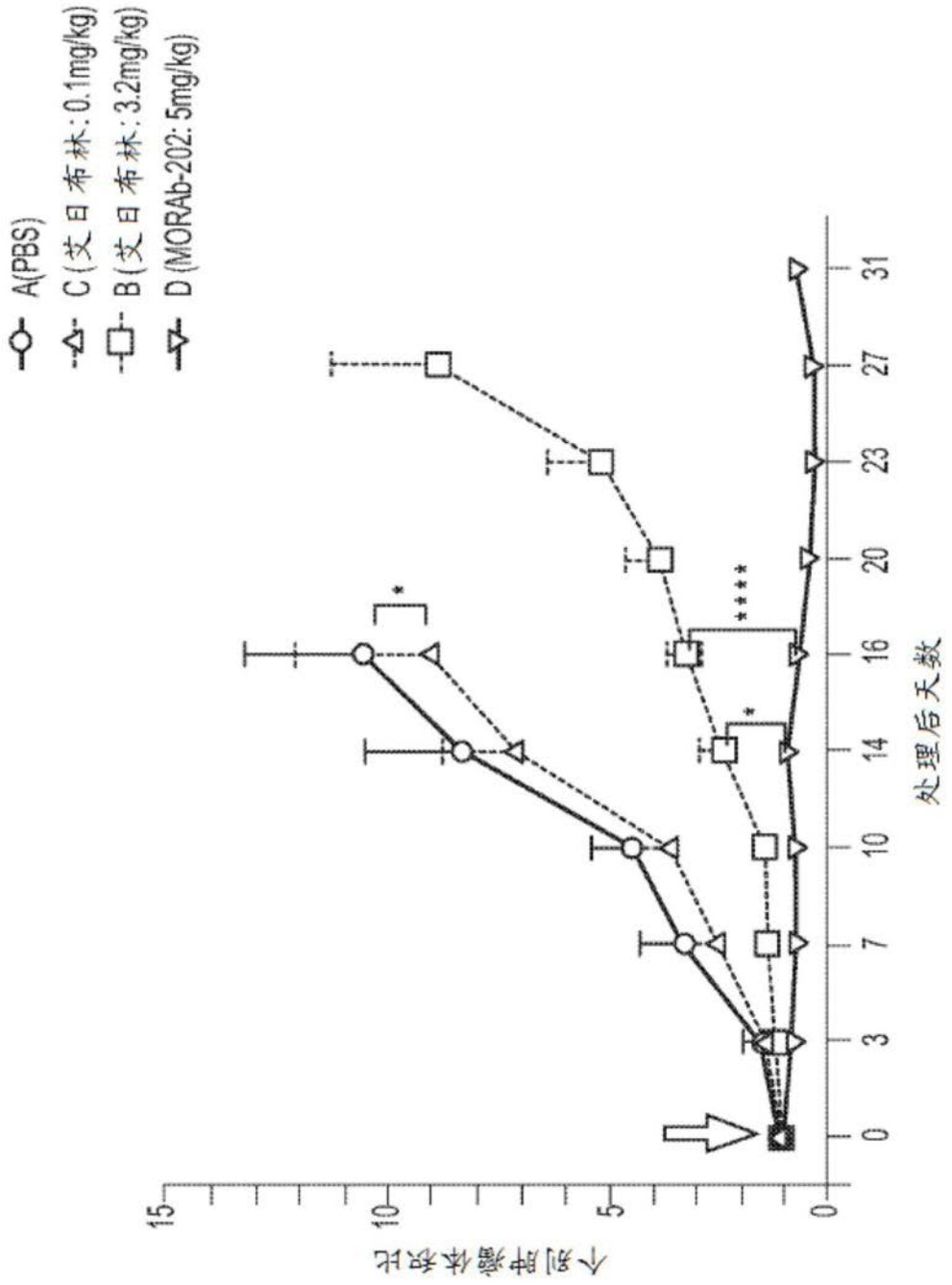

A(PBS)
C(艾日布林:0.1mg/kg)
B(艾日布林:3.2mg/kg)
D(MORAb-202:5mg/kg)
小鼠肿瘤体积比
处理后天数
0
5
10
15
0
3
7
10
14
16
20
23
27
31
*
*
****

图20A

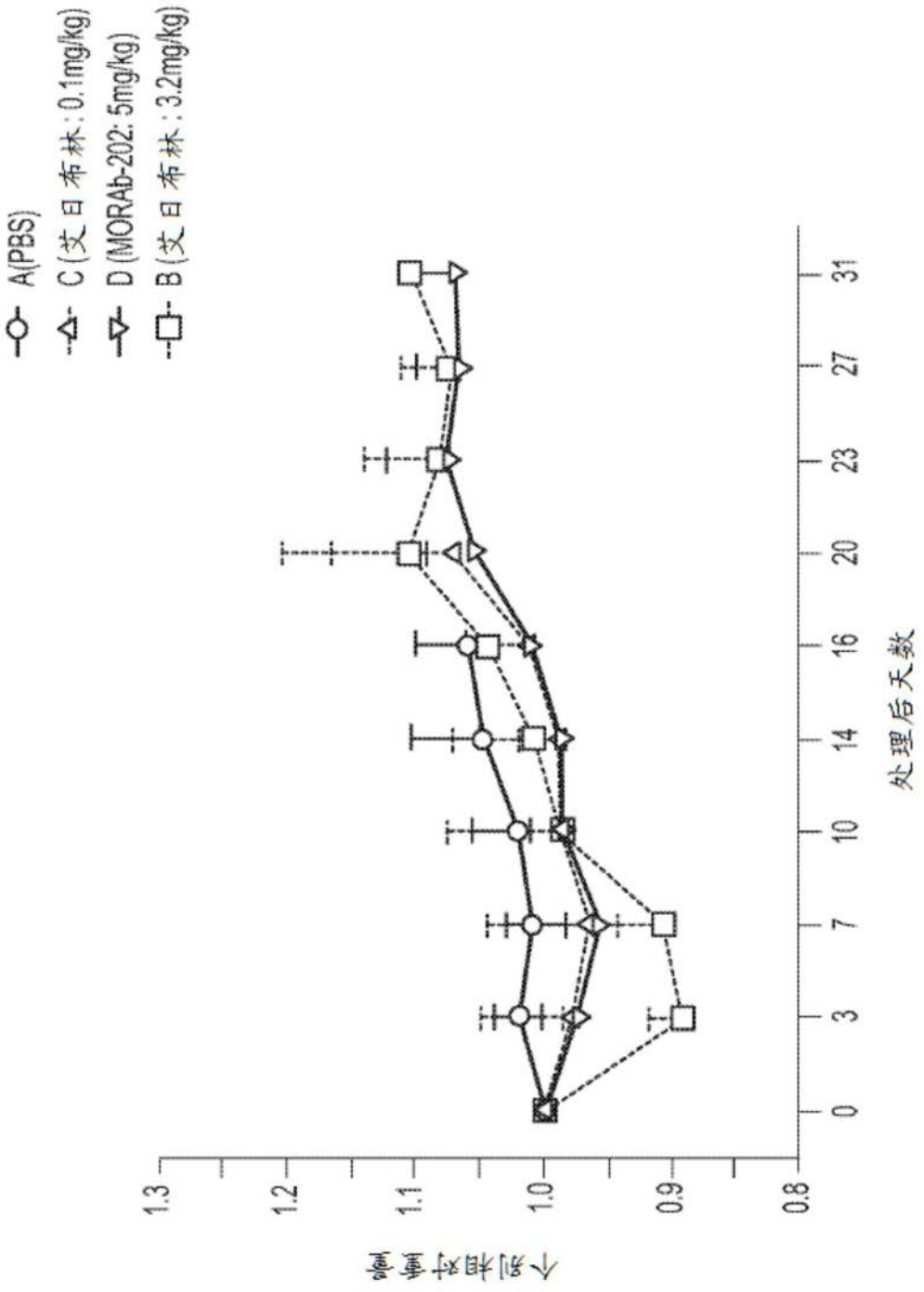

A(PBS)
C (艾日布林; 0.1mg/kg)
D (MORAb-202; 5mg/kg)
B (艾日布林; 3.2mg/kg)
个别相对肿瘤
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0
3
7
10
14
16
20
23
27
31
处理后天数

图20B

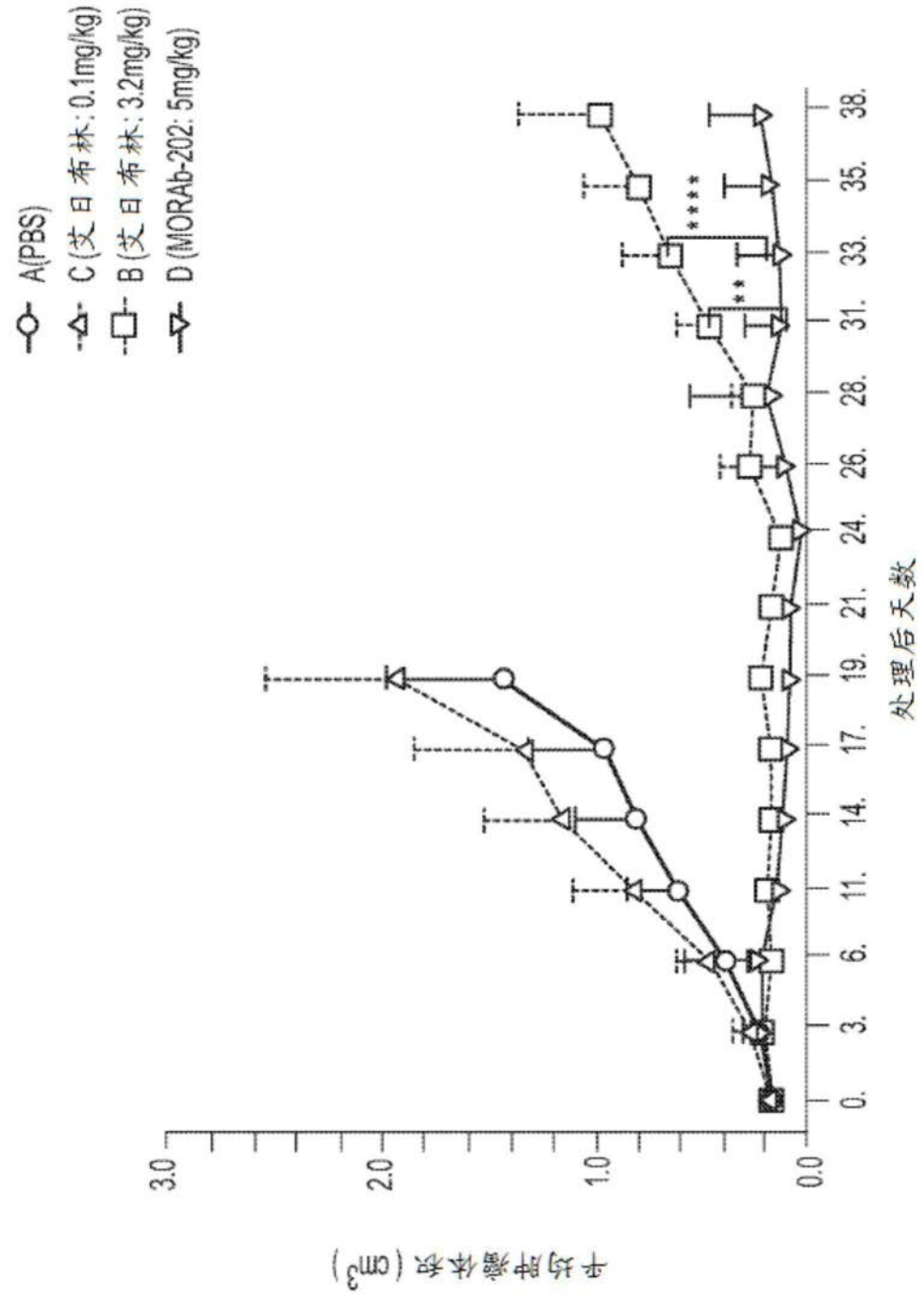

A(PBS)
C(艾日布林:0.1mg/kg)
B(艾日布林:3.2mg/kg)
D(MORAb-202:5mg/kg)
平均肿瘤体积(cm3)
3.0
2.0
1.0
0.0
0.
3.
6.
11.
14.
17.
19.
21.
24.
26.
28.
31.
33.
35.
38.
处理后天数
**
****

图20C

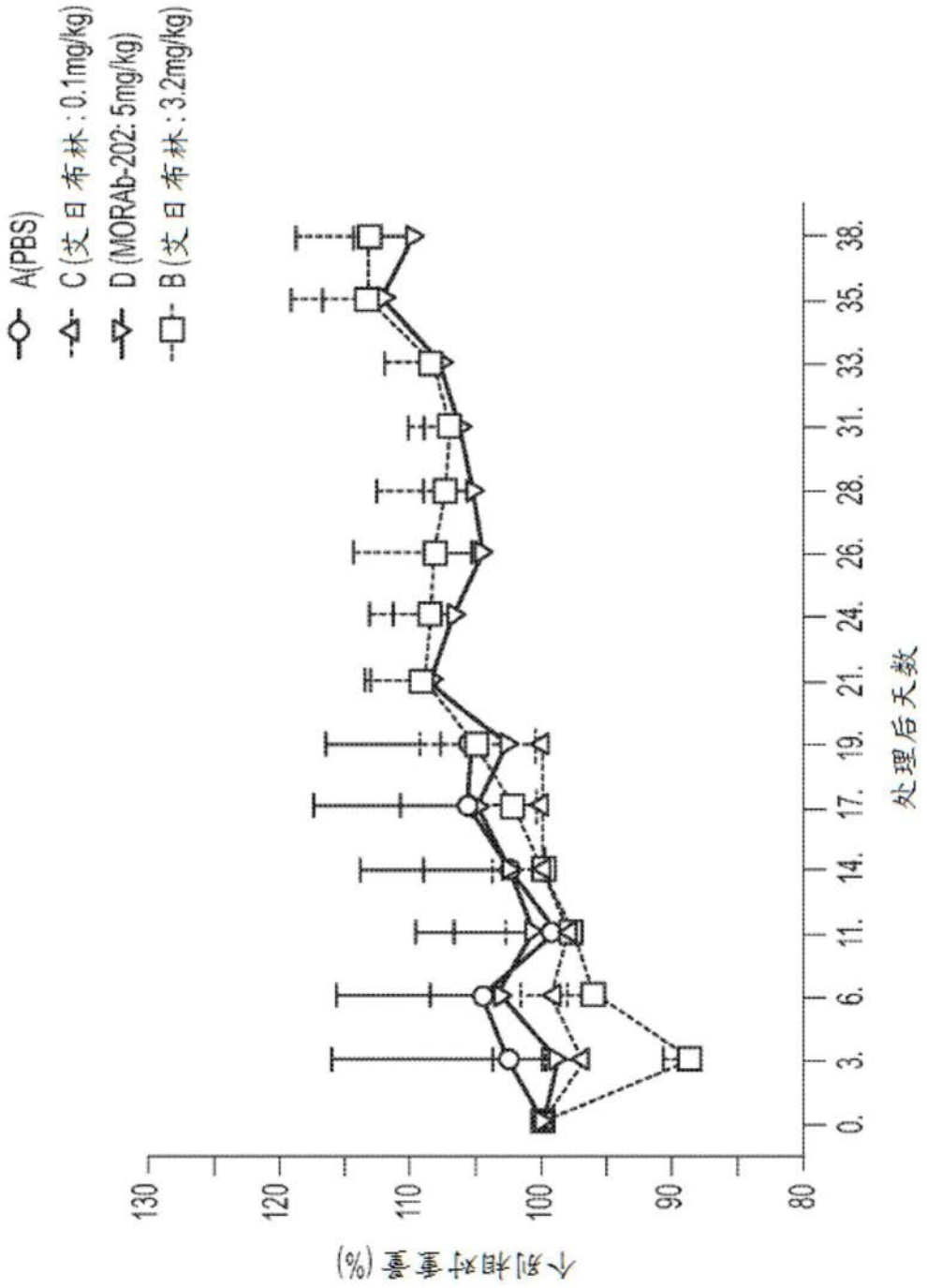

A(PBS)
C (艾日布林 : 0.1mg/kg)
D (MORAb-202: 5mg/kg)
B (艾日布林 : 3.2mg/kg)
个别相对肿瘤 (%)
130
120
110
100
90
80
0.
3.
6.
11.
14.
17.
19.
21.
24.
26.
28.
31.
33.
35.
38.
处理后天数

图20D

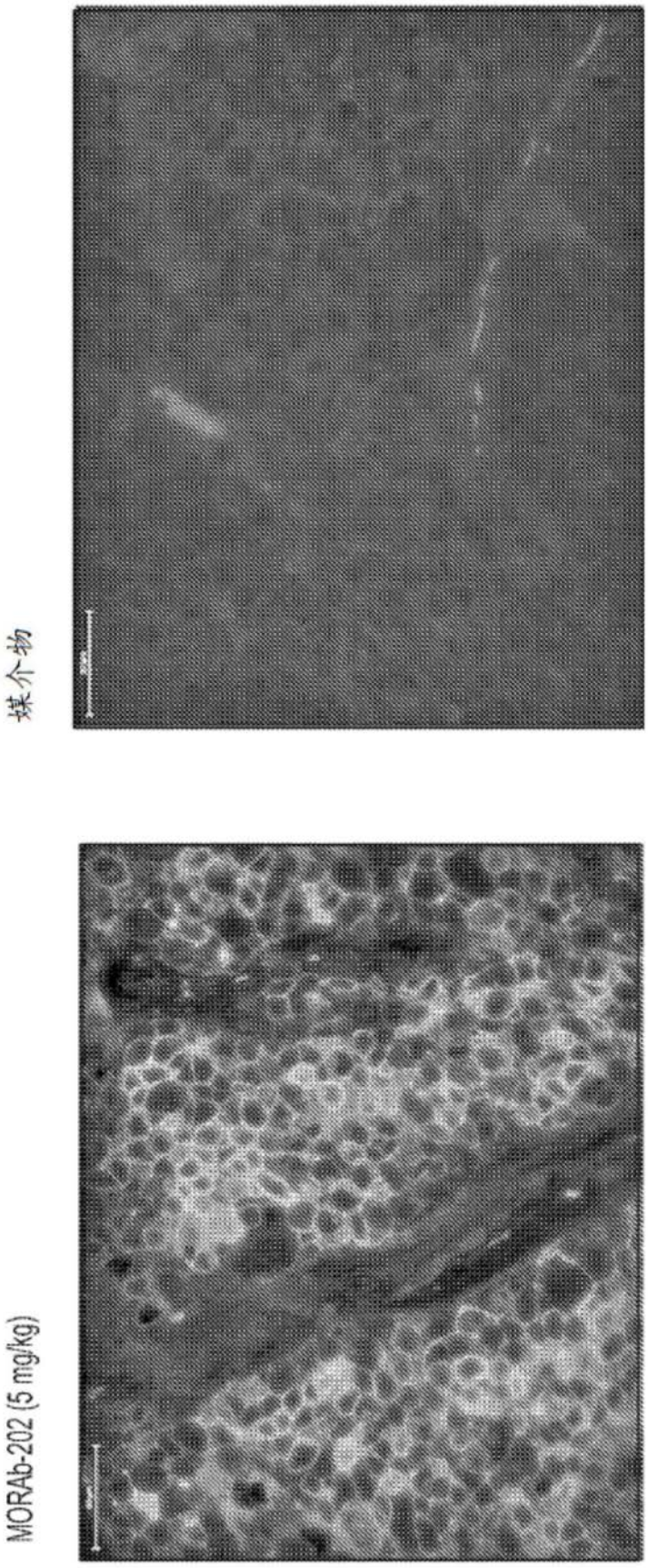


图21A

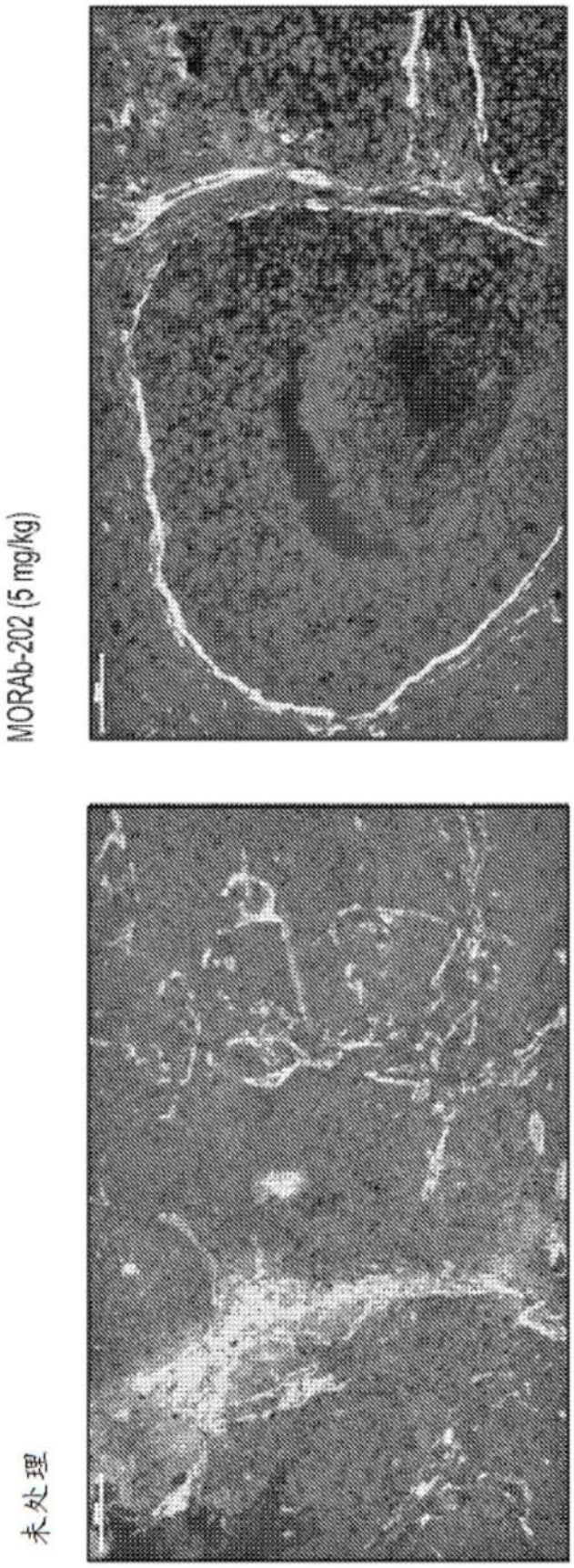


图21B

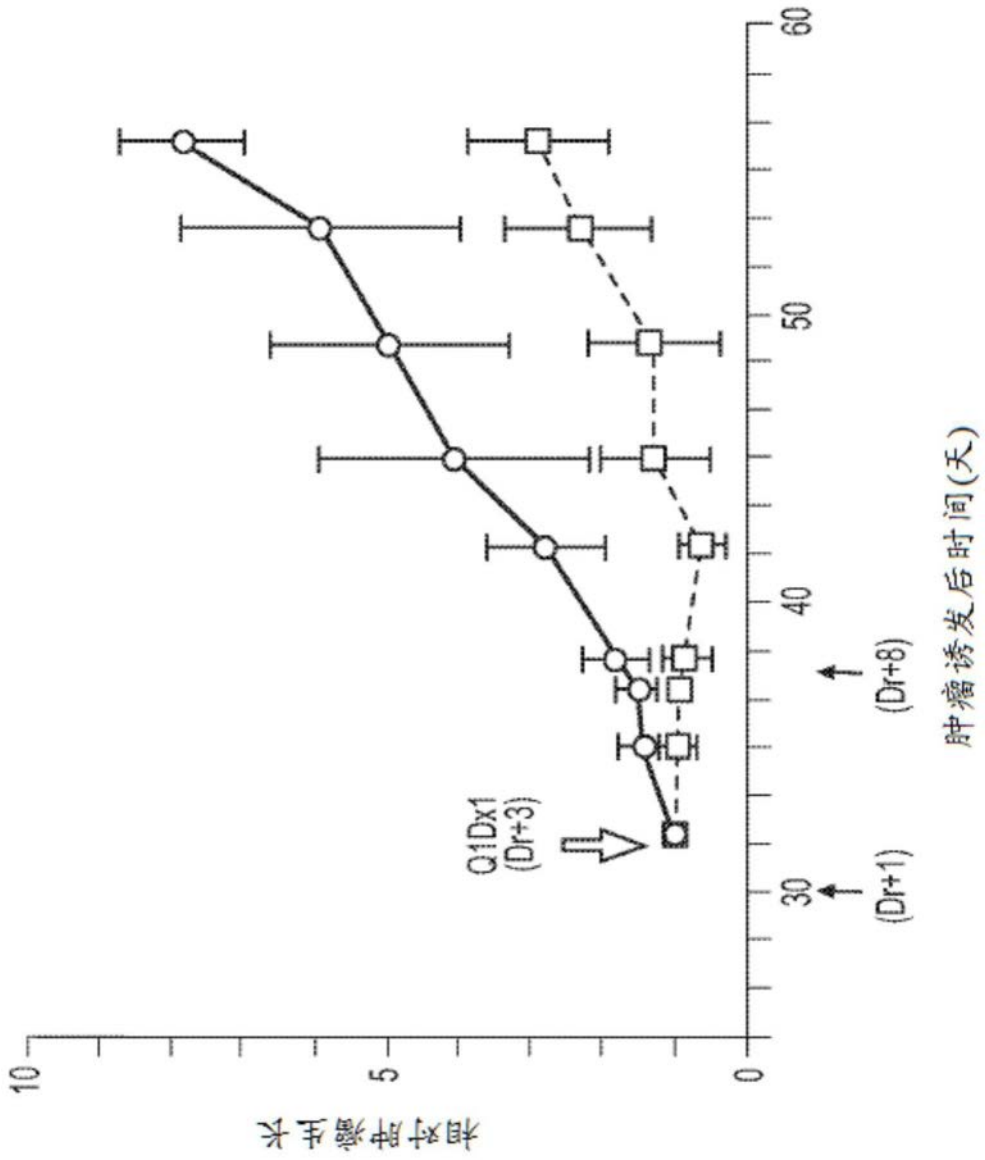


图21C

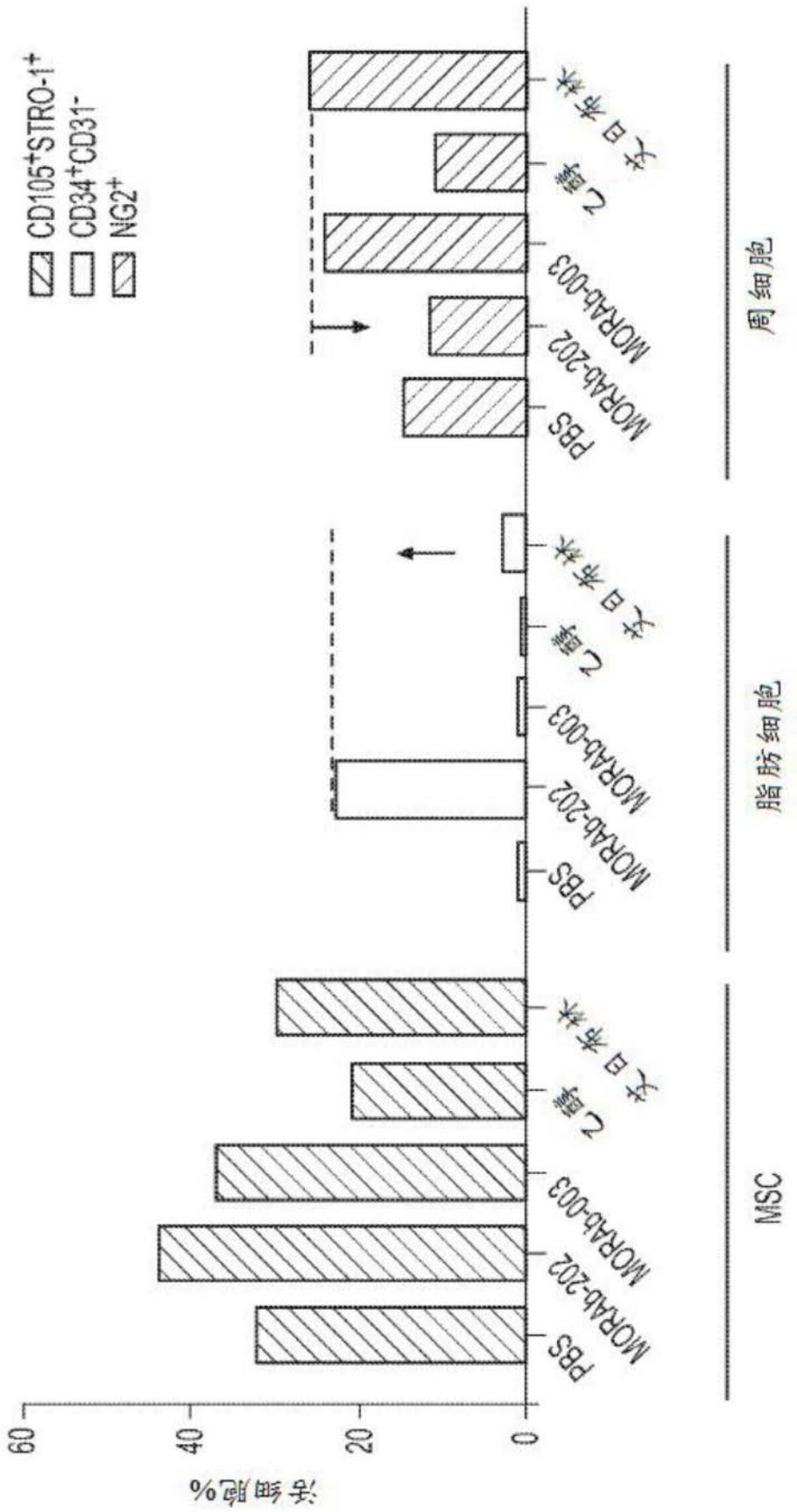

CD105+STRO-1+
CD34+CD31-
NG2+
活细胞%
60
40
20
0
PBS
MORAb-202
MORAb-003
2倍
大日本株
MSC
脂肪细胞
周细胞

图22

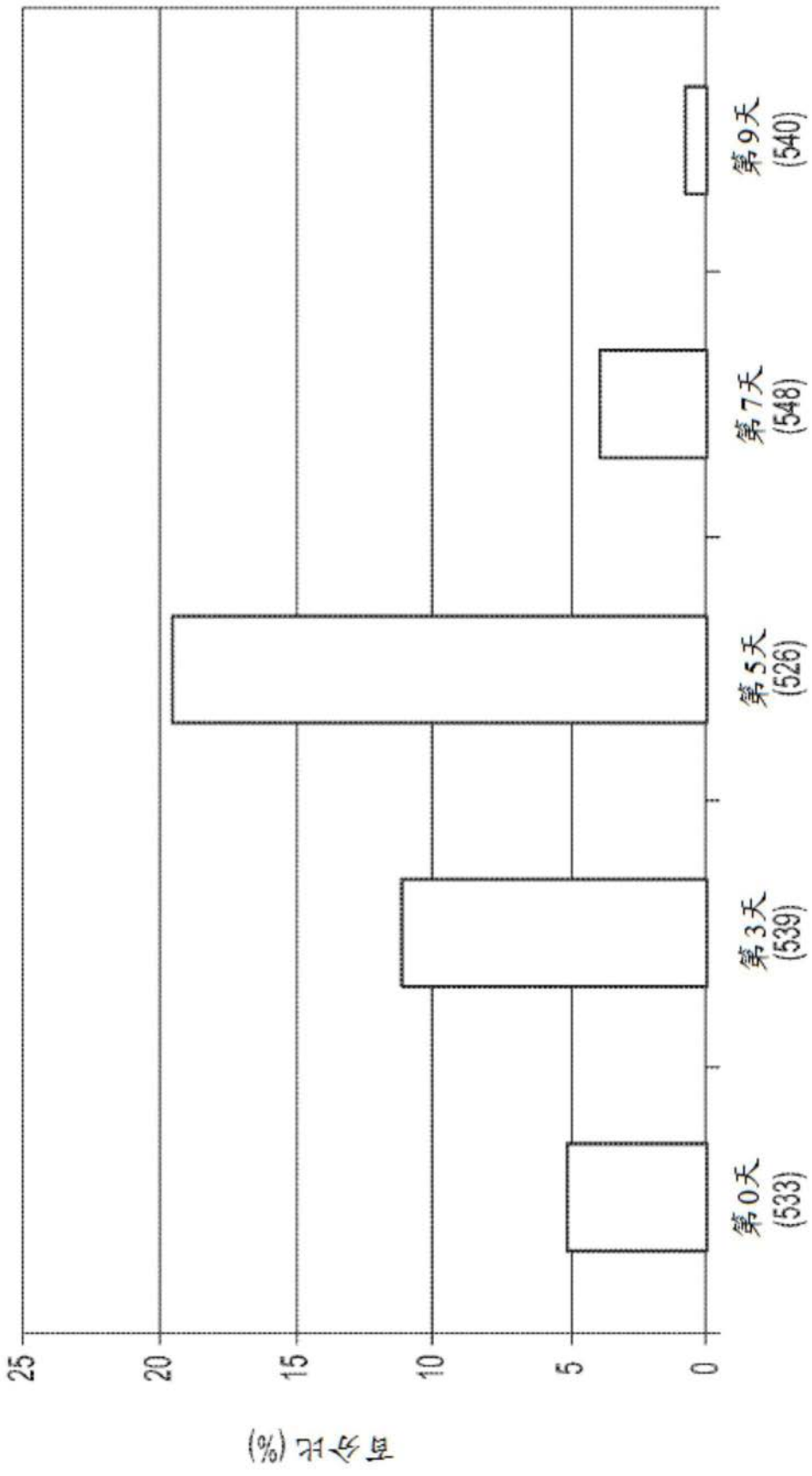


图23