



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113321732 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 17

(21) 申请号 202110419463.1	(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105 专利代理师 易方方
(22) 申请日 2015.06.18	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 113321732 A	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
(43) 申请公布日 2021.08.31	
(30) 优先权数据 1410825.2 2014.06.18 GB	
(62) 分案原申请数据 201580042718.X 2015.06.18	
(73) 专利权人 卑尔根生物股份公司 地址 挪威卑尔根	(56) 对比文件 CN 103080136 A,2013.05.01 WO 2011014457 A1,2011.02.03 审查员 刘帅
(72) 发明人 D.R.米克勒姆 S.基普里亚诺夫 L.H.尼尔森 L.艾哈迈德 H.豪根	
	权利要求书1页 说明书45页 序列表17页 附图11页

(54) 发明名称
抗AXL抗体

(57) 摘要
描述了特异性结合Ax I蛋白的抗体。还公开了生产和使用所述抗Ax1抗体的方法。

1. 组合物,其包含结合Ax1的抗体或所述抗体的免疫缀合物,连同载体、缓冲剂或稳定剂,其中所述抗体包含:

抗体VH结构域,其包含如SEQ ID NO.5的氨基酸序列所示的VH CDR1、如SEQ ID NO.6的氨基酸序列所示的VH CDR2和如SEQ ID NO.7的氨基酸序列所示的VH CDR3;和

抗体VL结构域,其包含如SEQ ID NO.8的氨基酸序列所示的VL CDR1、如SEQ ID NO.9的氨基酸序列所示的VL CDR2和如SEQ ID NO.10的氨基酸序列所示的VL CDR3。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO.3的氨基酸序列的VH结构域。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO.4的氨基酸序列的VL结构域。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述抗体为scFv抗体分子。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述抗体包含抗体恒定区。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述抗体为全抗体。

7. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述抗体为嵌合抗体。

8. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述抗体为人源化抗体。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中所述抗体与可检测标记、酶或毒素缀合。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述抗体经由肽键或接头与可检测标记、酶或毒素缀合。

11. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述毒素选自包含MMAE和MMAF的组。

12. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述可检测标记为FITC。

13. 免疫缀合物在制造用于治疗乳腺癌的药剂中的用途,其中所述免疫缀合物包含结合Ax1的抗体,所述抗体缀合至细胞毒性药物部分,以及所述抗体包含:

抗体VH结构域,其包含如SEQ ID NO.5的氨基酸序列所示的VH CDR1、如SEQ ID NO.6的氨基酸序列所示的VH CDR2和如SEQ ID NO.7的氨基酸序列所示的VH CDR3;和

抗体VL结构域,其包含如SEQ ID NO.8的氨基酸序列所示的VL CDR1、如SEQ ID NO.9的氨基酸序列所示的VL CDR2和如SEQ ID NO.10的氨基酸序列所示的VL CDR3。

14. 根据权利要求1的组合物在制造用于治疗乳腺癌的药剂中的用途;

其中所述组合物包含如权利要求1中定义的抗体,所述抗体缀合至细胞毒性药物部分。

15. 根据权利要求13或14所述的用途,其中将所述免疫缀合物或所述组合物配制为与另一种治疗剂组合施用,其中所述另一种治疗剂为:EGFR拮抗剂、止痛剂、止吐剂、免疫检查点调节剂(ICM)或抗癌剂。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中所述免疫检查点调节剂(ICM)为免疫检查点抑制剂(ICI)。

抗AXL抗体

[0001] 本发明是基于申请日为2015年6月18日,申请号为“201580042718.X”(国际申请号为PCT/EP2015/063704),发明名称为“抗AXL抗体”的专利申请的分案申请。

[0002] 本公开涉及特异性结合Ax1蛋白的抗体。还公开了生产和使用抗Ax1抗体的方法。

背景

[0003] Ax1是共享维生素K依赖性配体Gas6(生长抑制特异性蛋白6)的TAM(Tyro3-Ax1-Mer)受体酪氨酸激酶(RTK)的成员。TAM家族RTK调节各种各样的细胞反应,包括细胞存活、增殖、自体吞噬、迁移、血管生成、血小板聚集和自然杀伤细胞分化。Ax1在许多胚胎组织中表达并且被认为涉及间叶细胞和神经发育,在成体组织中的表达主要限于平滑肌细胞(MGI Gene Expression Database;www.informatics.jax.org)。Ax1活化与几种信号转导途径关联,包括Akt、MAP激酶、NF- κ B、STAT等。最初被鉴定为来自于有慢性骨髓性白血病的患者的转化基因,Ax1一直以来与各种高等级癌症相关并且与不良预后有关联。

[0004] 已经在各种各样的实体瘤和髓性白血病中检测出Ax1受体过表达(Linger等,Adv Cancer Res.100:35,2008;Linger等,Expert Opin Ther Targets.14:1073,2010)。

[0005] Ax1表达与恶性进展相关联并且是在包括胰腺(Song等,Cancer.117:734,2011)、前列腺(Paccez等,Oncogene.32:698,2013)、肺(Ishikawa等,Ann Surg Oncol.2012;Zhang等,Nat Genet.44:852,2012)、乳腺(Gjerdrum,Proc natl Acad Sci USA 107:1124,2010)、结肠癌(Yuen等,PLoS One,8:e54211,2013)和急性髓性白血病(AML)(Ben-Batalla等,Blood 122:2443,2013)在内的几种恶性肿瘤中对状况不良患者在存活期间的独立预测因子。

[0006] Ax1信号转导受肿瘤相关巨噬细胞(Loges等,Blood.115:2264,2010)或自分泌机制(Gjerdrum,Proc natl Acad Sci USA 107:1124,2010)分泌的蛋白配体(Gas6)激活,所述蛋白配体驱动受体二聚化、自体磷酸化和下游信号传导,例如经由PI3激酶(PI3K)-AKT,特别是AKT和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径(Korshunov,Clinical Science.122:361,2012)。还报道称会发生与其它酪氨酸激酶受体,例如表皮生长因子受体(EGFR)的异源二聚化(Linger等,Expert Opin Ther Targets.14:1073,2010;Meyer等,Science Signalling 6:ra66,2013)。肿瘤细胞中Ax1的异常活化与对体外和体内靶向治疗剂的获得性药物抗性广泛相关(Zhang等,Nat Genet.44:852,2012;Byers等,Clin Cancer Res.19:279,2013)。在几种癌症实验模型,包括三阴性乳腺癌、激素抗性前列腺癌和肺腺癌中,Ax1靶向剂通过逆转EMT/CSC特征而阻断肿瘤形成、转移和逆转药物抗性(例如,对埃罗替尼(erlotinib))(Holland等,Cancer Res 70:1544,2010;Gjerdrum,Proc natl Acad Sci USA107:1124,2010;Zhang等,Nat Genet.44:852,2012;Paccez等,Oncogene.32:698,2013)。

[0007] 涉及Ax1和抗Ax1抗体的其它申请包括EP2267454A2[Diagnosis and prevention of cancer cell invasion measuring...Ax1-Max Planck];W02009063965[anti Ax1-Chugai Pharmaceutical];W02011159980A1[anti-Ax1-Genentech];W02011014457A1[combination treatments Ax1 and VEGF antagonists-Genentech];W02012-175691A1

[Anti Ax120G7-D9-INSERM];W02012-175692A1[Anti Ax1 3E3E8-INSERM];W02009/062690A1[anti Ax1-U3 Pharma]和W02010/130751A1[humanised anti Ax1-U3 Pharma]。

[0008] 鉴于Ax1在肿瘤生成中的作用,期望鉴定更多具有有利特性的特异性结合Ax1的抗体。本公开涉及此类抗体。

附图简述

[0009] 图1

[0010] 流式细胞术中单克隆抗体 (MAb) 5F11与Ax1+三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231的结合。MAb 5F11与Ax1表达敲减(敲减96%)的MDA-MB-231细胞或与经对照shRNA转染的细胞一起孵育。用APC缀合的驴抗小鼠IgG (H+L) 二级抗体 (Jackson Laboratories) 检测结合的抗体。使用BD LSR Fortessa™细胞分析仪 (BD Biosciences) 测量细胞染色。使用几何平均荧光强度值测量敲减水平。

[0011] 图2

[0012] 来自于显示MAb 5F11与重组人 (rh) Ax1、rhMer和rhTyro3的相互作用的结合分析的传感图的重叠图。示出了减去空白表面信号之后的曲线。

[0013] 图3

[0014] 配体 (MAb 5F11和rmGas6) 与涂有rhAx1、rmAx1和rhTyro3-Fc的传感器芯片CM5相互作用的Biacore分析。示出了减去空白表面信号之后的曲线。

[0015] 图4

[0016] MAb 5F11与固定在Biacore传感器芯片表面的rhAx1相互作用的动力学分析。示出了不同浓度(0.06-30.0nM)的MAb 5F11的传感图的重叠图。使用BIA评估软件进行精确的动力学分析并且根据1:1朗格缪尔结合模型 (Langmuir binding model) 进行曲线拟合。插入表中示出了亲和力常数(动态和稳态)以及计算的25℃下抗原结合的半衰期。

[0017] 图5

[0018] 使用Biacore 3000对MAb 5F11(第1样品)与抗Ax1 MAb 5F11、MAB154 (R&D Systems)、MAb 1-3、rhGas6和rmGas6(第2样品)之间竞争的分析。示出了使用不同的第2样品的传感图的重叠图。用箭头指出了注射第1样品(5F11)和第2样品的起始点。

[0019] 图6

[0020] 在还原和非还原条件下对结合重组人 (rh) Mer-Fc和Ax1-Fc抗原的抗Ax1 MAb 5F11的蛋白质印迹分析。泳道:M,分子量标记(魔法标记),左侧示出了按kDa计的分子量值;1,rhAx1-Fc,非还原;2,rhMer-Fc,非还原;3,rhAx1-Fc,还原;4,rhMer-Fc,还原。用箭头指出了对应于rhAx1-Fc的蛋白质条带。

[0021] 图7

[0022] 源自抗Ax1单克隆抗体5F11的VH和VL结构域的氨基酸序列。重链和轻链的CDR区加有下划线。CDR-H2中的潜在N-糖基化位点用黑体示出。

[0023] 图8

[0024] 抗Ax1小鼠抗体5F11及其嵌合(小鼠可变/人恒定)对应物与Ax1阳性细胞的剂量依赖性结合。在流式细胞术中测试了不同浓度的小鼠(m 5F11)和嵌合(ch 5F11)抗体与三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231的结合。分别用对小鼠IgG (H+L) (1:500稀释) 或人IgG (H+L) (1:

300稀释) (两者均来自于Jackson ImmunoResearch) 有特异性的APC缀合驴F(ab')₂片段检测结合的小鼠和嵌合抗体。使用Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences) 测量细胞染色。MFI, 几何平均荧光强度。

[0025] 图9

[0026] 嵌合MAb ch5F11与固定在Biacore传感器芯片表面的rhAx1相互作用的动力学分析。示出了不同浓度(0.06-30.0nM)的MAb ch5F11的传感图的重叠图。使用BIA评估软件进行精确的动力学分析并且根据1:1朗格缪尔结合模型进行曲线拟合。插入表中示出了亲和常数(动态和稳态)以及计算的25℃下抗原结合的半衰期。

[0027] 图10

[0028] 鼠抗体5F11与涂有人Ax1-Fc、食蟹猴Ax1-Fc和恒河猴Ax1-Fc的传感器芯片相互作用的Biacore分析。

[0029] 图11

[0030] 使用抗体-皂草素(Saporin)缀合物的肿瘤细胞杀伤。未缀合的皂草素和与皂草素(对照SAP)偶联的同型对照抗体(人IgG1)用作阴性对照。插入表中示出了导致50%细胞杀伤(EC₅₀, pM)的有效浓度。

[0031] 发明的公开内容

[0032] 本文公开了以下序列(完整序列, 参见下面的‘序列’部分):

[0033] SEQ ID NO.1→编码5F11 VH的核苷酸序列

[0034] SEQ ID NO.2→编码5F11 VL的核苷酸序列

[0035] SEQ ID NO.3→编码5F11 VH的氨基酸序列

[0036] SEQ ID NO.4→编码5F11 VL的氨基酸序列

[0037] SEQ ID NO.5→编码5F11 VH CDR1的氨基酸序列

[0038] SEQ ID NO.6→编码5F11 VH CDR2的氨基酸序列

[0039] SEQ ID NO.7→编码5F11 VH CDR3的氨基酸序列

[0040] SEQ ID NO.8→编码5F11 VL CDR1的氨基酸序列

[0041] SEQ ID NO.9→编码5F11 VL CDR2的氨基酸序列

[0042] SEQ ID NO.10→编码5F11 VL CDR3的氨基酸序列

[0043] SEQ ID NO.11→编码5F11 VH FR1的氨基酸序列

[0044] SEQ ID NO.12→编码5F11 VH FR2的氨基酸序列

[0045] SEQ ID NO.13→编码5F11 VH FR3的氨基酸序列

[0046] SEQ ID NO.14→编码5F11 VH FR4的氨基酸序列

[0047] SEQ ID NO.15→编码5F11 VL FR1的氨基酸序列

[0048] SEQ ID NO.16→编码5F11 VL FR2的氨基酸序列

[0049] SEQ ID NO.17→编码5F11 VL FR3的氨基酸序列

[0050] SEQ ID NO.18→编码5F11 VL FR4的氨基酸序列

[0051] SEQ ID NO.19→编码人Ax1的氨基酸序列

[0052] SEQ ID NO.20→编码鼠Ax1的氨基酸序列

[0053] SEQ ID NO.21→编码人Tyro3的氨基酸序列

[0054] SEQ ID NO.22→编码人Mer的氨基酸序列

[0055] 一方面,本发明提供了一种分离的抗体,其结合Ax1并且包含5F11 VH结构域(SEQ ID NO:3)和/或5F11 VL结构域(SEQ ID NO:4)。优选地结合的Ax1为人Ax1。

[0056] 通常,虽然如下面进一步所讨论的那样,单独的VH结构域可用于结合抗原,但是VH结构域与VL结构域配对以提供抗体抗原结合位点。在一个优选的实施方案中,5F11 VH结构域(SEQ ID NO:3)与5F11 VL结构域(SEQ ID NO:4)配对,使得形成包含5F11 VH和VL结构域两者的抗体抗原结合位点。在其它实施方案中,5F11 VH结构域与除5F11 VL以外的VL结构域配对。本领域中明确了轻链混杂性。

[0057] 可从5F11 VH或VL结构域取得一个或多个CDR并且并入合适骨架中。这在下面有进一步讨论。5F11 VH CDR 1、2和3分别示于SEQ ID No 5、6和7中。5F11 VL CDR 1、2和3分别示于SEQ ID No8、9和10中。

[0058] 在本发明的一个方面中,提供了一种抗体,其结合Ax1并且其包含:

[0059] 抗体VH结构域,其选自5F11 VH结构域(SEQ ID NO.3)和VH结构域,所述VH结构域包含具有SEQ ID NO.7的氨基酸序列的VH CDR3和任选地具有选自SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.5的氨基酸序列的一个或多个VH CDR;和/或

[0060] 抗体VL结构域,其选自5F11 VL结构域(SEQ ID NO.4)和VL结构域,所述VL结构域包含具有选自SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10的氨基酸序列的一个或多个VL CDR。

[0061] 例如,所述抗体可包含具有SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.7的氨基酸序列的VH CDR的抗体VH结构域。所述抗体还可包含抗体VL结构域,所述抗体VL结构域包含具有SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10的氨基酸序列的VL CDR。

[0062] 在一些实施方案中所述抗体包含:(i)抗体VH结构域,其包含具有SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.7的氨基酸序列的VH CDR,和(ii)抗体VL结构域,其包含具有SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10的氨基酸序列的VL CDR。

[0063] 所述抗体可包含5F11 VH结构域(SEQ ID NO.3)并且任选地,还包含5F11 VL结构域(SEQ ID NO.4)。

[0064] 优选地,所述抗体与包含5F11 VH结构域(SEQ ID NO.3)和5F11VL结构域(SEQ ID NO.4)的抗体的Ax1结合结构域竞争结合人Ax1。

[0065] 根据本发明的另一方面,提供了所述VH和VL结构域的变体,本文列出了其序列并且其可用于Ax1的抗体中并且可借助于序列改变或突变和筛选的方法获得。本发明也提供了此类方法。

[0066] 正如所讨论的,可根据本发明采用本文特别公开其序列的任何VH和VL结构域的可变结构域氨基酸序列变体。特定变体可包括一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入),可能少于约20个改变,少于约15个改变,少于约10个改变或少于约5个改变、4、3、2或1个。可在一个或多个骨架区和/或一个或多个CDR中产生改变。

[0067] 根据本发明所述的抗体可以是与任何抗体竞争结合抗原的抗体,所述抗体结合抗原且包含本文公开的抗体VH和/或VL结构域或本文公开的VH CDR3或这些中任一个的变体。即,在一些实施方案中,根据本发明所述的抗体是结合与包含本文公开的抗体VH和/或VL结构域或本文公开的VH CDR3或这些中任一个的变体的抗体相同的表位或重叠的表位的抗体。抗体间的竞争可在体外容易地测定,例如使用ELISA,在Biacore 3000机器中使用结合

分析,和/或通过将特定报告分子标记到在其它未标记抗体的存在下可以被检测出的一种抗体上,以使得鉴定结合相同表位或重叠表位的抗体成为可能。

[0068] 因此,本发明包含本文特别公开的任一种的变体,其中所述变体包含一个或多个骨架区和/或一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸序列改变。例如,变体抗体可在任一CDR中包含不超过4个序列改变,例如不超过3个,不超过2个,不超过1个序列改变,或在任一CDR(如VH结构域的CDR3)中无序列改变。变体抗体可与包含1H12VH结构域(SEQ ID NO.3)和5F11 VL结构域(SEQ ID NO.4)的抗体的Ax1结合结构域竞争结合Ax1(例如,人Ax1)。

[0069] 因此本发明的另一方面提供了包含与5F11竞争结合人Ax1的人抗体抗原结合位点的抗体。

[0070] 在本领域中有各种方法可用于获得针对Ax1并且可与5F11竞争结合Ax1的抗体。

[0071] 另一方面,本发明提供了一种获得能够结合抗原的一种或多种抗体的方法,该方法包括使根据本发明所述的抗体库和所述抗原接触,并且选择该库中能够结合所述抗原的一个或多个抗体成员。

[0072] 该库可展示在噬菌体颗粒的表面,每个颗粒含有编码展示在其表面的抗体VH可变结构域,和任选展示的VL结构域(若存在)的核酸。

[0073] 选择能够结合抗原并且展示在噬菌体颗粒上的抗体之后,可从展示所述选定抗体的噬菌体颗粒取得核酸。通过由具有取自展示所述选定抗体的噬菌体颗粒的核酸的序列的核酸表达,此类核酸可用于抗体或抗体VH可变结构域(任选地抗体VL可变结构域)的后续生产。

[0074] 具有所述选定抗体的抗体VH可变结构域的氨基酸序列的抗体VH可变结构域可呈分离形式提供,正如包含此类VH结构域的抗体可能的那样。

[0075] 可进一步测试结合Ax1的能力,还有与5F11竞争结合Ax1的能力。

[0076] 根据本发明所述的抗体可以5F11的亲合力结合Ax1。

[0077] 本发明的抗体可结合鼠、大鼠、猴、非人灵长类和/或人Ax1。优选地,该抗体结合人和猴Ax1。在一些实施方案中该抗体特异性结合灵长类Ax1。例如,该抗体可特异性结合人和猴Ax1。在一个实施方案中,该抗体仅特异性结合人Ax1。

[0078] 该抗体可为嵌合、人源化或CDR移植抗Ax1抗体。例如,该抗体可为嵌合人/小鼠抗体。

[0079] 可在适当条件下比较不同抗体的结合亲和力和中和效力。

[0080] 除抗体序列以外,根据本发明所述的抗体可包含其它氨基酸,例如形成肽或多肽,如折叠结构域,或赋予分子除结合抗原的能力以外的其它功能特征。

[0081] 本发明的抗体可携带可检测标记,或可与毒素(如细胞毒素)、酶或有机部分缀合(例如经由肽键或接头)。

[0082] 本领域的技术人员将知道许多将分子与蛋白质化学缀合的方法。在本发明的一个实施方案中,抗体可与可检测、荧光标记,例如异硫氰酸荧光素(FITC),或与报告酶如辣根过氧化物酶(HRP)缀合。

[0083] 在优选的实施方案中,抗体与细胞毒性药物缀合,形成抗体-药物缀合物(ADC)。当抗体供制药用时,连接抗体和药物的键优选在循环(例如,血液循环)中稳定,但缀合物一旦被隔绝在细胞内就不稳定。因此,缀合为免疫缀合物的抗体可用于治疗(例如)癌症的方法

中。

[0084] 在另外的方面中,本发明提供了一种分离的核酸,该核酸包含编码根据本发明所述的抗体、VH结构域和/或VL结构域的序列,并且提供了制备本发明的抗体、VH结构域和/或VL结构域的方法,该方法包括在引起所述抗体、VH结构域和/或VL结构域产生的条件下表达所述核酸,并且将其回收。

[0085] 根据本发明所述的抗体可用于治疗或诊断人或动物身体的方法,例如治疗(可包括预防性治疗)人患者中的疾病或病症的方法中,该方法包括向所述患者施用有效量的本发明的抗体或其缀合物或药物缀合物。可根据本发明治疗的疾患包括本文别处所讨论的那些。

[0086] 根据本发明所述的抗体可用于成像方法中,例如以确定与抗体结合的细胞的存在或位置。

[0087] 另一方面,本发明提供了一种诊断试剂盒,其包含根据本发明所述的抗体和用于测定抗体与抗原的结合的一种或多种试剂。

[0088] 本发明的另一方面提供了编码本文公开的抗体VH可变结构域(SEQ ID NO:3)和/或VL可变结构域(SEQ ID NO:4)的核酸,通常是分离的。在一些实施方案中VH编码核酸具有SEQ ID NO:1中所列的序列。在一些实施方案中VL编码核酸具有SEQ ID NO:2中所列的序列。

[0089] 本发明的另一方面提供了编码本文公开的VH CDR或VL CDR序列,尤其是选自SEQ ID NO 5、6和7的VH CDR和选自SEQ ID NO8、9或10的VL CDR,最优选5F11 CDR3(SEQ ID NO:7)的核酸,通常是分离的。

[0090] 另一方面提供了一种经本发明的核酸转化的宿主细胞。

[0091] 再一方面提供了一种生产抗体VH可变结构域的方法,该方法包括致使由编码核酸表达。此类方法可包括在用于生产所述抗体VH可变结构域的条件下培养宿主细胞。

[0092] 作为本发明的其它方面提供了生产VL可变结构域和包含VH和/或VL结构域的抗体的类似方法。

[0093] 生产方法可包括分离和/或纯化产物的步骤。

[0094] 生产方法可包括将产物配制成包括至少一种另外的组分,如药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0095] 本发明的这些和其它方面在下面有更详细地描述。

[0096] 抗体性质

[0097] 对Ax1的高亲和力

[0098] 本文描述的5F11抗体以高亲和力结合人Ax1。如实施例4中所描述,经测定5F11抗体具有 5.80×10^{-12} M的 K_D 。这是至今对于抗Ax1抗体描述的最低 K_D 。

[0099] 出乎意料的是,嵌合MAb ch5F11(参见实施例9和图9)还具有更高的亲和力, $K_D = 4.99 \times 10^{-12}$ M;这个数字比亲本鼠抗体低~15%,这可能是由于固定在人恒定结构域支架上时 V_H 和 V_L 结构域的定向更佳。

[0100] 因此,本文描述的抗体以高亲和力结合Ax1;优选地以高亲和力结合人Ax1。在一些实施方案中,抗体结合Ax1(或人Ax1), K_D 不大于 10^{-6} M,如不大于 5×10^{-7} M,不大于 10^{-7} M,不大于 5×10^{-8} M,不大于 10^{-8} M,不大于 5×10^{-9} M,不大于 10^{-9} M,不大于 5×10^{-10} M,不大于 10^{-10} M,不

大于 $5 \times 10^{-11} \text{M}$, 不大于 10^{-11}M , 不大于 $5 \times 10^{-12} \text{M}$, 不大于 $6 \times 10^{-12} \text{M}$, 不大于 10^{-12}M , 不大于 $5 \times 10^{-13} \text{M}$, 不大于 10^{-13}M , 不大于 $5 \times 10^{-14} \text{M}$, 不大于 10^{-14}M , 不大于 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 或 不大于 10^{-15}M 。

[0101] 在一些实施方案中, 抗体结合Ax1 (或人Ax1), K_D 为 10^{-8}M 至 10^{-10}M , 10^{-10}M 至 10^{-12} , 10^{-12}M 至 10^{-14} , 或 10^{-14}M 至 10^{-16} 。

[0102] 可如实施例4中所述测定和计算 K_D 。

[0103] 本文描述的5F11抗体特征在于具有极快的缔合速率($k_{\text{结合}}$)。具体地, 在实施例4中经测定5F11抗体具有极快的缔合速率($k_{\text{结合}} = 2.15 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)。因此, 本文描述的抗体优选以快速缔合速率结合人Ax1。

[0104] 出乎意料的是, 嵌合MAb ch5F11 (参见实施例9和图9) 还具有更高的缔合速率, $k_{\text{结合}} = 3.46 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

[0105] 在一些实施方案中, 抗体结合Ax1 (或人Ax1), $k_{\text{结合}}$ 不低于 $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 例如不低于 $5 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $2 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $3 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 不低于 $5 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, 或不低于 $10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。

[0106] 特异性结合

[0107] 通常, 术语‘特异性’和‘特异性结合’可用于指抗体不会对除其特异性结合伴侣之外的分子显示出任何显著结合的情形。例如, ‘特异性结合’人Ax1的抗体不会对鼠Ax1显示出任何显著结合。

[0108] 例如当抗体对许多抗原携带的特定表位有特异性时该术语也适用, 在这种情况下‘特异性结合’表位的抗体将能够结合携带所识别表位的所有不同抗原。

[0109] 通常, 特异性可借助于结合测定法如采用一组抗原的ELISA来测定。

[0110] 本文描述的5F11抗体以高特异性结合人Ax1。即, 5F11抗体‘特异性结合’人Ax1。这在实施例中得以证明, 其中显示:

[0111] (1) 在实施例2中, 5F11对源自hMer和hTyro3 (人TAM受体酪氨酸激酶家族的其它成员) 的重组抗原, 未显示出显著结合。

[0112] (2) 在实施例3中, 5F11强烈结合人Ax1, 但对鼠Ax1未显示出结合 (这与鼠Ax1配体, 即鼠Gas 6相反, 其强烈结合鼠和人Ax1两者, 以及 (更弱地) 结合人Tyro3)。

[0113] 因此, 本文描述的抗体优选特异性结合灵长类Ax1。在一些实施方案中本文描述的抗体特异性结合人和猴Ax1。在一个实施方案中该抗体仅特异性结合人Ax1。

[0114] 在本发明的一些实施方案中, 本文描述的抗体对人Tyro3和/或人Mer未显示出显著结合。在一些实施方案中, 本文描述的抗体对鼠Ax1未显示出显著结合。在一些实施方案中, 本文描述的抗体对人Tyro3、人Mer或鼠Ax1中的任一种未显示出显著结合。

[0115] 技术人员可以使用, 例如实施例2和3中描述的技术容易地确定抗体是否未对抗原显示出“显著结合”。在一些实施方案中, 如果抗体以大于 10^{-3}M , 例如大于 10^{-2}M , 大于 10^{-1}M , 或大于 1M 的 K_D 结合抗原, 则将其视为对特定抗原未显示出“显著结合”。可如实施例4所示测定和计算 K_D 。

[0116] 一方面, 本发明的抗体结合与5F11抗体相同的表位, 或与5F11抗体结合的表位重叠的表位。不同抗体间的竞争可在体外容易地测定, 例如使用ELISA和/或通过特定报告分子标记到其它未标记抗体的存在下可以被检测出的一个结合成员上, 以使得鉴定结合

相同表位或重叠表位的抗体成为可能。

[0117] 抗体内化

[0118] 本文描述的5F11抗体在结合其靶标Ax1之后展示出良好的细胞内化。当抗体与细胞毒素,如皂草素缀合时,也观察到内化(参见实施例11和图11)。

[0119] 因此,本发明的抗体或其缀合物优选在结合细胞表面存在的Ax1之后内化。

[0120] Ax1表达和/或活性的下调

[0121] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体诱导细胞表面(例如,肿瘤细胞表面)的Ax1受体表达下调。

[0122] 在一些实施方案中,细胞表面Ax1表达降低到无Ax1抗体处理时Ax1细胞表面表达的少于80%。在一些实施方案中,细胞表面Ax1表达降低到无Ax1抗体处理时Ax1细胞表面表达的少于70%、少于60%、少于50%以或少于40%。

[0123] 在一些实施方案中,细胞(例如,肿瘤细胞)内的总Ax1表达降低到无Ax1抗体处理时的总Ax1表达的少于80%。在一些实施方案中,总Ax1表达降低到无Ax1抗体处理时的总Ax1表达的少于70%、少于60%、少于50%或少于40%。在一些实施方案中,Ax1表达的下调迅速发生并且持续至少24小时。

[0124] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体抑制组成型Ax1活性。

[0125] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体抑制Ax1活性。

[0126] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体,例如通过凋亡促进细胞死亡,例如肿瘤细胞,如A549肿瘤细胞;这可通过,例如BrdU掺入测定法、MTT、 $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶掺入(例如,TopCount测定法(PerkinElmer))、细胞活力测定法(例如,CellTiter-Glo(Promega))、DNA片段测定法、半胱天冬酶活化测定法、台盼蓝拒染法、染色质形态测定法等测量。

[0127] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体抑制Ax1下游信号传导。在一些实施方案中,抗Ax1抗体抑制Gas6依赖性细胞增殖。

[0128] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体抑制肿瘤相关巨噬细胞的炎性细胞因子表达。

[0129] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体通过调节肿瘤间质功能抑制肿瘤生长和/或转移。

[0130] 定义

[0131] 抗体

[0132] 这个术语描述天然的或部分或完全合成产生的免疫球蛋白。该术语还包括包含抗体抗原结合结构域的任何多肽或蛋白质。包含抗体抗原结合结构域的抗体片段包括全抗体(例如包含呈规范排列的VH、CH1、CH2、CH3、VL和CL结构域的IgG抗体)或全抗体的保持其对靶抗原的结合活性的片段。此类片段包括Fv(可变片段)、Fab(抗体结合片段)和F(ab')₂片段,以及单链Fv抗体(scFv)、dsFv、微型抗体、双抗体(diabodies)、单链双抗体、串联scFv、TandAb、双链抗体、三链抗体、 $\kappa(\lambda)$ 抗体、BiTE、DVD-Ig、SIP、SMIP或DART。此外,抗体及其片段可为人源化抗体,例如EP239400A中所述。例如:单克隆和多克隆抗体、重组抗体、抗体的蛋白水解和重组片段(Fab、Fv、scFv、双抗体)、单结构域抗体(VHH、sdAb、纳米抗体、IgNAR、VNAR)和与抗体无关,已经工程化为具有抗体样特异性结合的蛋白质(抗体模拟物),例如以下,但不限于:

名称	基础
Adnectin/单体	人纤连蛋白的第 10 个 III 型结构域(10Fn3), 10 kDa
亲和体	蛋白 A、Z 结构域 6 kDa)
[0133] Affilin	人 γ -晶体/人遍在蛋白(10-20 kDa)
Affitin	Sac7d(来自于嗜酸热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)), 7 kDa
Anticalin	脂质运载蛋白(Lipocalin), 20 kDa
Avimer	各种膜受体的结构域, 9-18 kDa
DARPin	锚蛋白重复基序, 14 kDa
Evibody	细胞毒性 T-淋巴细胞抗原 4(CTLA-4), 15 kDa
[0134] Fynomer	Fyn, SH3 结构域, 7 kDa
Kunitz 结构域肽	各种蛋白酶抑制剂, 6 kDa

[0135] 抗体可包含抗体重链恒定区和/或抗体轻链恒定区的全部或一部分。

[0136] 可能获得单克隆和其它抗体并且使用重组DNA技术生产保持原抗体特异性的工程化抗体或嵌合分子。此类技术可涉及连接编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补决定区(CDR)的DNA片段与编码不同免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区或恒定区加上骨架区的基因。参见,例如,EP-A-184187、GB 2188638A或EP-A-239400。产生抗体的杂交瘤或其它细胞可经受基因突变或可能改变或可能不改变所产抗体的结合特异性的其它变化。

[0137] 因为可按许多方式修饰抗体,所以术语“抗体分子”应被解释为包括具有带所需特异性的抗体来源的抗原结合结构域的任何多肽或其它分子。因此,这个术语包括抗体片段和衍生物,包括天然或完全或部分合成的包含免疫球蛋白结合结构域的任何多肽。因此包括包含与另一多肽融合的免疫球蛋白结合结构域或等效物的嵌合分子。在EP-A-0120694和EP-A-0125023中描述了嵌合抗体的克隆和表达。

[0138] 已经证实,全抗体的片段可执行结合抗原的功能。结合片段的实例为(i)由VL、VH、CL和CH1结构域组成的Fab片段;(ii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iii)由单抗体的VL和VH结构域组成的Fv片段;(iv)由VH结构域组成的dAb片段(Ward,E.S.等人,Nature 341, 544-546 (1989));(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')₂片段,即包含两个相连Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH结构域和VL结构域通过允许两个结构域缔合形成抗原结合位点的肽接头连接(Bird等人,Science,242,423-426,1988;Huston等人,PNAS USA, 85,5879-5883,1988);(viii)双特异性单链Fv二聚体(PCT/US92/09965)和(ix)“双抗体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(W094/13804;P.Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90,6444-6448,1993)。Fv、scFv或双抗体分子可通过并入连接VH和VL结构域的二硫桥稳定(Y.Reiter等人,Nature Biotech,14,1239-1245,1996)。也可产生包含与CH3结构域连接的scFv的微型抗体(S.Hu等人,Cancer Res.,56,3055-3061,

1996)。

[0139] 抗体可为双特异性或多特异性。要使用双特异性抗体时,这些可为常规双特异性抗体,其可通过各种方式制造(Holliger,P.和Winter G.Current Opinion Biotechnol.4, 446-449(1993)),例如化学制备或来自于杂交体杂交瘤,或可为以上提到的任何双特异性抗体片段。可以不用Fc区,仅使用可变结构域构建双抗体和scFv,可能减少副作用,例如由于抗体效应功能引起的副作用,或在使用鼠类来源的抗体的情况下减少人抗小鼠抗体(HAMA)反应。

[0140] 与双特异性全抗体完全不同,双特异性双抗体也可特别有用,因为它们可容易地构建并且在细菌(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*))中表达。可使用噬菌体展示(W094/13804)从抗体库容易地选出适当结合特异性的双抗体(和许多其它多肽如抗体片段)。如果保持双抗体的一条臂恒定,例如,具有针对Ax1的特异性,则可产生其中另一条臂改变的文库并选择适当特异性的抗体。可通过“钮入孔洞”工程化制备双特异性全抗体(J.B.B.Ridgeway等人,Protein Eng.,9,616-621,1996)。

[0141] 抗原结合结构域

[0142] 这描述了包含识别并特异性结合抗原的一部分或全部且与之互补的抗体分子部分。抗原较大时,抗体可仅结合抗原的特定部分,该部分称为表位。抗原结合结构域可由一个或多个抗体可变结构域(例如,由VH结构域组成的所称的Fd抗体片段)提供。优选地,抗原结合结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0143] 特异性蛋白

[0144] 人Ax1

[0145] 如本文中所用,‘人Ax1’是指人TAM受体酪氨酸激酶家族的Ax1成员。在一些实施方案中,人Ax1多肽对应于Genbank登录号AAH32229,版本号AAH32229.1 GI:21619004,记录更新日期:2012年3月6日下午01:18(SEQ ID NO.19)。在一个实施方案中,编码人Ax1多肽的核酸对应于Genbank登录号M76125,版本号M76125.1GI:292869,记录更新日期:2010年6月23日上午08:53。

[0146] 鼠Ax1

[0147] 如本文中所用,‘鼠Ax1’是指鼠TAM受体酪氨酸激酶家族的Ax1成员。在一些实施方案中,鼠Ax1多肽对应于Genbank登录号AAH46618,版本号AAH46618.1 GI:55777082,记录更新日期:2012年3月6日下午01:36(SEQ ID NO.20)。在一个实施方案中,编码鼠Ax1多肽的核酸对应于Genbank登录号NM_009465,版本号NM_009465.4GI:300794836,记录更新日期:2014年3月12日下午03:52。

[0148] 人Tyro3

[0149] 如本文中所用,‘人Tyro3’是指人TAM受体酪氨酸激酶家族的Tyro3成员。在一些实施方案中,人Tyro3多肽对应于Genbank登录号Q06418,版本号Q06418.1 GI:1717829,记录更新日期:2014年4月22日下午12:07(SEQ ID NO.21)。在一个实施方案中,编码人Tyro3多肽的核酸对应于Genbank登录号BC051756,版本号BC051756.1GI:30704372,记录更新日期:2010年3月6日下午01:43。

[0150] 人Mer

[0151] 如本文中所用,‘人Mer’是指人TAM受体酪氨酸激酶家族的Mer成员。在一些实施方

案中,人Mer多肽对应于Genbank登录号AAI14918,版本号AAI14918.1 GI:109732052,记录更新日期:2012年3月6日下午04:21(SEQ ID NO.22)。在一个实施方案中,编码人Mer多肽的核酸对应于Genbank登录号NM_006343,版本号NM_006343.2GI:66932917,记录更新日期:2014年3月16日下午08:52。

[0152] BSA

[0153] 如本文中所用,‘BSA’是指牛血清白蛋白。在一些实施方案中,BSA对应于Genbank登录号CAA76847,版本号CAA76847.1GI:3336842,记录更新日期:2011年1月7日下午02:30。

[0154] 包含

[0155] 这通常是在“包括”的意义上使用,即允许存在一种或多种特征或组分。

[0156] 分离的

[0157] 这是指根据本发明,本发明的抗体或编码此类抗体的核酸通常所呈的状态。抗体和核酸将不含或基本上不含与之天然缔合的物质,如在其自然环境或其制备环境(例如细胞培养物)中(当此类制备是通过在体外或体内实践的重组DNA技术时)中与之一起发现的其它多肽或核酸。抗体和核酸可与稀释剂或佐剂一起配制并且实际上仍可为分离的-例如如果用于涂布用于免疫测定的微量滴定板时抗体通常会与明胶或其它载体混合,或在用于诊断或治疗时会与药学上可接受的载体或稀释剂混合。抗体可天然地或受异源真核细胞(例如CHO或NS0(ECACC 85110503)细胞)系统糖基化,或它们可以(例如,如果通过在原核细胞中产生时)是非糖基化的。

[0158] 基本上如所列

[0159] 用‘基本上如所列’意指本发明的有关CDR或VH或VL结构域将与本文列出其序列的指定区域相同或高度相似。通过“高度相似”,预计在CDR和/或VH或VL结构域中可产生1至5个,优选1至4个如1至3个或1个或2个或3个或4个氨基酸取代。

[0160] 支撑CDR的骨架

[0161] 用于携带本发明CDR的结构通常将具有抗体重链或轻链序列或其实质性部分,其中CDR位于对应重排免疫球蛋白基因编码的天然存在的VH和VL抗体可变结构域的CDR的位置。可参考(Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest.第4版.US Department of Health and Human Services.1987及其更新,现在在互联网上可用(<http://immuno.bme.nwu.edu>或使用任何搜索引擎找到“Kabat”)确定免疫球蛋白可变结构域的结构和位置。

[0162] 本发明采用的可变结构域可从任何种系或重排小鼠或人可变结构域获得,或可为基于已知小鼠或人可变结构域的共有序列的合成可变结构域。可使用重组DNA技术将本发明的CDR序列(例如CDR3)引入缺乏CDR(例如CDR3)的可变结构域库中。

[0163] 例如,Marks等人(Bio/Technology,1992,10:779-783)描述了产生抗体可变结构域库的方法,其中指向或邻近可变结构域5'-末端的共有引物连同VH基因第三骨架区的共有引物一起使用以提供缺乏CDR3的VH可变结构域库。Marks等人还描述了如何将该库与特定抗体的CDR3组合。使用类似技术,本发明的CDR3来源的序列可经缺乏CDR3的VH或VL结构域库改组,并且改组的完整VH或VL结构域与同源VL或VH结构域组合以提供本发明的抗体。然后该库可展示在合适的宿主系统,如W092/01047的噬菌体展示系统中,以便可以选择合适的抗体。库可由来自于 10^4 个单独抗体,例如 10^6 至 10^8 个或 10^{10} 个抗体的任何部分组成。

[0164] Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391) 也公开了类似改组或组合技术, Stemmer 描述了关于 β -内酰胺酶基因的DNA改组技术, 但是观察到该方法可用于产生抗体。

[0165] 另一替代方案是使用一个或多个选定的VH和/或VL基因的随机诱变在整个可变结构域中产生突变, 产生携带本发明的CDR来源的序列的新VH或VL区。Gram等人(1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580) 描述了此类方法, Gram等人使用易错PCR。

[0166] 可用的另一种方法是使诱变指向VH或VL基因的CDR区。Barbas等人(1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) 和Schier等人(1996, J. Mol. Biol. 263:551-567) 公开了此类技术。

[0167] 已知上述技术全部如同在本领域中一样并且本身不构成本发明的一部分。技术人员将能够使用此类技术, 使用本领域的常规方法提供本发明的抗体。

[0168] 表位特异性抗体

[0169] 本发明的另一方面提供了一种获得对Ax1表位有特异性的抗体的方法, 该方法包括通过本文列出的VH结构域的氨基酸序列中的一个或多个氨基酸的添加、缺失、取代或插入提供为所述VH结构域的氨基酸序列变体的VH结构域, 任选地将这样提供的VH结构域与一个或多个VL结构域组合, 并测试VH结构域或VH/VL组合以鉴定对Ax1有特异性的抗体或抗体抗原结合结构域。所述VL结构域可具有基本上如本文所列的氨基酸序列。

[0170] 可采用类似方法, 其中将本文公开的VL结构域的一个或多个序列变体与一个或多个VH结构域组合。

[0171] 本发明的另一方面提供了一种制备对Ax1有特异性的抗体的方法, 该方法包括:

[0172] (a) 提供起始核酸库, 所述起始核酸库编码包括待置换的CDR3或缺乏CDR3编码区的VH结构域;

[0173] (b) 将所述库与编码基本上如本文对VH CDR3所列的氨基酸序列的供体核酸组合, 使得所述供体核酸插入所述库的CDR3区内, 以便提供编码VH结构域的产物核酸库;

[0174] (c) 表达所述库的核酸;

[0175] (d) 选择对Ax1有特异性的抗体; 并且

[0176] (e) 回收所述抗体和/或编码所述抗体的核酸。

[0177] 同样, 可采用类似方法, 其中将本发明的VL CDR3与编码包括待置换的CDR3或缺乏CDR3编码区的VL结构域的起始核酸库组合。

[0178] 类似地, 一个或多个或全部三个CDR可移植到VH或VL结构域库中, 然后筛选该库中对Ax1有特异性的一种或多种抗体。

[0179] 免疫球蛋白可变结构域的很大一部分将包含至少三个CDR区及其插入骨架区。优选地, 该部分还将包括第一和第四骨架区中任一个或两个的至少约50%, 这50%是第一骨架区的C端50%和第四骨架区的N端50%。可变结构域很大一部分的N端和C端处另外的残基可以是通常与天然存在的可变结构域区不相关的那些残基。例如, 通过重组DNA技术制成的本发明抗体的构建可导致由引入的接头所编码的N或C端残基的引入以利于克隆或其它操纵步骤。其它操纵步骤包括引入接头以将本发明的可变结构域连接到包括免疫球蛋白重链、其它可变结构域(例如, 在双抗体生产中) 或下文更加详细讨论的蛋白质标记的其它蛋白质序列中。

[0180] 虽然在本发明的优选方面中, 优选包含一对VH和VL结构域的抗体, 但是基于VH或

VL结构域序列的单结合结构域形成了本发明的其它方面。已知单免疫球蛋白结构域,特别是VH结构域,能够以特异性方式结合靶抗原。

[0181] 在任一种单结合结构域的情况下,这些结构域可用于筛选能够形成能够结合Ax1的双结构域抗体的互补结构域。

[0182] 这可以使用如W092/01047所公开的所谓分级双重组合法,通过噬菌体展示筛选法实现,其中使用含有H或L链克隆物的单独菌落感染编码另一条链(L或H)的整个克隆物文库并且根据噬菌体展示技术如该参考文献中描述的那些技术选择所得双链抗体。这种技术还公开于在Marks等人,同上。

[0183] 本发明的抗体还可包含抗体恒定区或其部分。例如,本发明的抗体可包含CL、CH1、CH2和/或CH3结构域(或其任何组合)。VL结构域可于其C端附接于包括人C κ 或C λ 链,优选C κ 链的抗体轻链恒定结构域。类似地,基于VH结构的抗体可于其C端附接于源自任何抗体同种型,例如IgG、IgA、IgE和IgM及任何同种型亚类的整个免疫球蛋白重链或其一部分。可以采用Fc区如W099/58572中公开的 Δ nab和 Δ nac。

[0184] 嵌合、人源化和CDR移植抗体

[0185] 如本文中所用,“嵌合”抗体或“人源化”抗体或“CDR移植”抗体包括本文所述抗Ax1抗体或源自其中的任何CDR与源自非鼠类,优选人抗体的一种或多种蛋白质或肽的任何组合。

[0186] 嵌合或人源化抗体包括其中CDR源自一种或多种本文所述的抗Ax1抗体并且抗体的至少一部分或剩余部分源自一种或多种人抗体的那些抗体。因此,抗体的人部分可包括骨架、CL(例如C κ 或C λ)、CH结构域(例如CH1、CH2、CH3)、铰链区(其在人中基本上无免疫原性)。

[0187] 源自人抗体的抗体区域不需要与人抗体具有100%的同一性。在优选实施方案中,为了可以忽略免疫原性而保留尽可能少的小鼠氨基酸残基,但必要时可以保留小鼠残基以支撑由CDR形成的抗原结合位点,而同时使抗体的人源化增加到最大限度。相对于非修饰抗体,此类变化或变型任选且优选地保持或降低在人或其它物种中的免疫原性。

[0188] 应该注意的是,人源化抗体可由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(例如,重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。进一步地,当抗体为单链抗体时,其可以包含在天然人抗体中未发现的接头肽。例如,scFv可以包含接头肽,例如二至约二十个甘氨酸或其它氨基酸残基(优选甘氨酸和丝氨酸残基(例如,Gly₄Ser或Gly₂Ser重复序列)),其连接重链的可变区和轻链的可变区。此类接头肽被认为在人是无免疫原性的。在一些实施方案中接头长度为至少12个氨基酸。

[0189] 可以通过,例如合成包含与许多单独人骨架框内融合的非人靶单克隆抗体的全部六个CDR的组合文库来进行抗体人源化。可以利用含有代表所有已知重链和轻链人种序列的基因的人骨架文库。然后可以筛选所得组合文库以与目标抗原结合。这种方法可允许选择在维持与亲本抗体的结合活性方面,最有利的全人骨架组合。然后可以通过各种技术进一步优化人源化抗体。

[0190] 对于全长抗体分子而言,可以从杂交瘤细胞系的基因组DNA或mRNA获得免疫球蛋白基因。在哺乳动物载体系统中克隆抗体重链和轻链。通过使用本领域已知的方法测序来确认组装。抗体构建体可以在其它人或哺乳动物宿主细胞系中表达。然后可通过瞬时转染

测定法和目标表达抗体的蛋白质印迹分析来验证所述构建体。可以使用快速测定法分离和筛选具有最高生产率的稳定细胞系。

[0191] 编码人源化抗体、片段和区域的恒定区(C)的人基因可通过已知方法源自人胎肝脏文库。人C区基因可源自任何人细胞,包括表达和产生人免疫球蛋白的细胞。人CH区可源自任何已知类别或同种型的人重链,包括其 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 及其亚类,如G1、G2、G3和G4。因为重链同种型负责抗体的各种效应功能,所以CH结构域的选择将由所需效应功能来指导,如补体固定或抗体依赖的细胞毒性(ADCC)中的活性。优选地,CH结构域源自 $\gamma 1$ (IgG1)。

[0192] 人CL区可源自任一人L链同种型, κ 或 λ ,优选 κ 。

[0193] 编码人免疫球蛋白C区的基因是通过标准克隆技术从人细胞获得的(Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)以及Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology(1987-1993))。人C区基因可容易地从含有代表两类轻链、五类重链及其亚类的基因的已知克隆物获得。

[0194] 嵌合抗体片段,如Fab和 $F(ab')_2$,可通过设计被适当截短的嵌合重链基因来制备。例如,编码 $F(ab')_2$ 片段的重链部分的嵌合基因将包括编码重链的CH1结构域和铰链区的DNA序列,其后是翻译终止密码子,以得到截短分子。

[0195] 工程化或人源化非人或人抗体的方法可以使用并且是本领域中公知的。通常,人源化或工程化抗体具有来自于非人来源的一个或多个氨基酸残基,所述来源例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类或其它哺乳动物。这些人氨基酸残基常常被称为“导入”残基,其通常取自已知人序列的“导入”可变、恒定结构域或其它结构域。公开了已知的人Ig序列,例如www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/lmmune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/mcb.harvard.edu/BioLinks/lmmunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufi.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AH0seminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;

www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat__aim.html;www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;www.jerini.de/fr__products.htm;www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Dept.Health(1983),其各自通过引用整体并入本文。

[0196] 如本领域已知,此类导入序列可用于降低免疫原性或降低、增强或改变结合、亲和力、结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其它合适特征。通常,在可变和恒定区的非人序列经人或其它氨基酸置换时,保持了部分或全部非人或人CDR序列。

[0197] 抗体也可以任选地人源化,保持对抗原的高亲和力和其它有利的生物学性质。为了实现这个目标,任选地可以通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可用并且为本领域的技术人员所熟悉。说明并展示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序可用。对这些展示的检查容许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能上的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可以选择FR残基并且由共有和导入序列组合,以便实现所需抗体特征,如对靶抗原增加的亲和力。

[0198] 一般而言,CDR残基直接且最显著地涉及影响抗原结合。人源化或工程化抗体可以使用任何已知方法进行,例如但不限于以下所述的那些方法:Winter等人,Nature 321:522(1986);Riechmann等人,Nature 332:323(1988);Verhoeyen等人,Science 239:1534(1988),Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901(1987),Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993),美国专利第5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539号;4,816,567、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755;W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246。

[0199] 人源化抗体的人恒定区可以是任何类别或同种型(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD等)并且可包含 κ 或 λ 轻链。在一个实施方案中,人恒定区包含IgG重链或限定片段,例如IgG亚类中的至少一种,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0200] 标记抗体

[0201] 本发明的抗体可标记有可检测或功能标记。可检测标记包括放射性标记如 $[^{131}\text{I}]$ 或 $[^{99}\text{Tc}]$,可以使用放射性免疫缀合物领域中已知的常规化学方法使标记附接于本发明的抗体。标记还包括酶标记如辣根过氧化物酶。标记还包括化学部分,如生物素,其可经由与特定同源可检测部分,例如标记的亲合素(avidin)或链霉亲和素(streptavidin)的结合来检测。优选地,标记还包括荧光标记如FITC。

[0202] 有机部分

[0203] 经修饰的抗体和抗原结合片段可包含一个或多个有机部分,该有机部分直接或间接地与抗体共价键合。与本文所述的抗体或抗原结合片段键合的每个有机部分可独立地为亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文中所用,术语“脂肪酸”涵盖一元羧

酸和二元羧酸。“亲水性聚合物基团”，如同该术语在本文中使用时一样，是指在水中比在辛烷更易溶的有机聚合物。例如，聚赖氨酸在水中比在辛烷更易溶。因此，通过聚赖氨酸共价衔接而修饰的抗体为本公开所涵盖。适于修饰本文所述的抗体的亲水性聚合物可为直链或支链并且包括，例如聚烷烃二醇（例如聚乙二醇（PEG）、单甲氧基聚乙二醇（mPEG）、PPG等）、碳水化合物（例如，葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等）、亲水性氨基酸的聚合物（例如，聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等）、聚氧化烷烃（例如，聚氧化乙烯、聚氧化丙烯等）和聚乙烯吡咯烷酮。优选地，修饰本文所述的抗体的亲水性聚合物具有作为单独分子实体的约800至约150,000道尔顿的分子量。例如，可以使用PEG5000和PEG20,000，其中下标是按道尔顿计的聚合物的平均分子量。亲水性聚合物基团可经一至约六个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。可经脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可采用合适的方法制备。例如，包含胺基的聚合物可偶联至脂肪酸或脂肪酸酯的碳水化合物，并且脂肪酸或脂肪酸酯上的活化碳水化合物（例如，经N,N-羰二咪唑活化）可偶联至聚合物上的羟基。

[0204] 适于修饰本文所述的抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或者可以含有一个或多个不饱和单元。适于修饰本文所述的抗体的脂肪酸包括，例如正十二烷酸（C12，月桂酸）、正十四烷酸（C14，肉豆蔻酸）、正十八烷酸（C18，硬脂酸）、正二十烷酸（C20，花生酸）、正二十二烷酸（C22，山嵛酸）、正三十烷酸（C30）、正四十烷酸（C40）、顺- δ^9 -十八烷酸（C18，油酸）、所有顺- $\delta^5,8,11,14$ -二十烷酸（C20，花生四烯酸）、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括含直链或支链低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可包含一至约十二个，优选一至约六个碳原子。

[0205] 经修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备，例如通过与一种或多种修饰剂反应。“修饰剂”，如同该术语在本文中使用时一样，是指包含活化基团的合适有机基团（例如，亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯）。“活化基团”是在适当条件下，可与第二化学基团反应，从而在修饰剂和第二化学基团之间形成共价键的化学部分或官能团。例如，胺反应性活化基团包括亲电子基团如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、卤素（氯、溴、氟、碘）、N-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）等。可以与硫醇反应的活化基团包括，例如马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇（TNB-硫醇）等。醛官能团可偶联至含胺或酰肼的分子，并且叠氮基可与三价磷基反应形成氨基磷酸酯或磷酰亚胺连键。向分子中引入活化基团的合适方法是本领域中已知的（参见例如，Hernanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)）。活化基团可直接键合到有机基团（例如，亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯），或通过接头部分，例如二价C1-C12基团键合，其中一个或多个碳原子可以被杂原子如氧、氮或硫置换。合适的接头部分包括，例如四-乙二醇、-- $(CH_2)_3$ --、--NH- $(CH_2)_6$ -NH--、-- $(CH_2)_2$ -NH--和--CH₂--O--CH₂--CH₂--O--CH₂--CH₂--O--CH--NH--。可以生成包含接头部分的修饰剂，例如通过使单-Boc-烷基二胺（例如，单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷）与脂肪酸在1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺（EDC）的存在下反应以在游离胺和脂肪酸羧酸酯之间形成酰胺键。可通过用三氟乙酸（TFA）处理从产物上去除Boc保护基团以暴露伯胺，其可以偶联至所述另一羧酸酯，或可与马来酸酐反应并且所得产物环化生成脂肪酸的活化马来酸衍生物。（参见，例如，Thompson等人，WO 92/16221）。

[0206] 可通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应而产生经修饰的抗体。例如，可采用胺反应性修饰剂，例如PEG的NHS酯，以非位点特异性方式使有机部分键合至所述抗体。也

可通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(例如,链内二硫键)来制备经修饰的人抗体或抗原结合片段。然后还原的抗体或抗原结合片段可与硫醇反应性修饰剂反应以产生本文所述的经修饰抗体。可使用合适的方法,如逆蛋白水解(Fisch等人,Bioconjugate Chem.,3:147-153(1992);Werlen等人,Bioconjugate Chem.,5:411-417(1994);Kumaran等人,Protein Sci.6(10):2233-2241(1997);Itoh等人,Bioorg.Chem.,24(1):59-68(1996);Capellas等人,Biotechnol.Bioeng.,56(4):456-463(1997)),和Hermanson,G.T.,Bioconjugate Techniques,Academic Press:San Diego,Calif.(1996)中描述的方法,制备包含与本文所述抗体的特定位点键合的有机部分的经修饰的人抗体和抗原结合片段。

[0207] 免疫缀合物

[0208] 本发明还提供了免疫缀合物,其包含本文与一种或多种细胞毒性剂(如化疗剂或药物)、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的蛋白质毒素、酶活性毒素或其片段)或放射性同位素缀合的抗Ax1抗体。

[0209] 在一个实施方案中,免疫缀合物为抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,所述药物包括但不限于类美坦素(maytansinoid)(参见美国专利第5,208,020、5,416,064号和欧洲专利EP 0 425 235B1);奥瑞他汀(auristatin),如一甲基澳瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利第5,635,483和5,780,588及7,498,298号);尾海兔素(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见美国专利第5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296号;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);及Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环霉素如道诺霉素(daunomycin)或阿霉素(doxorubicin)(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic & Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.& Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);及美国专利第6,630,579号);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷如多西他赛(docetaxel)、紫杉醇(paclitaxel)、拉洛他赛(larotaxel)、替司他赛(tesetaxel)和奥他赛(ortataxel);单端孢霉烯(trichothecene);及CC1065。

[0210] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文所述的抗体,所述毒素或其片段包括但不限于白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素(ricin)A链、相思豆毒素(abrin)A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α -八叠球菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆毒蛋白(*Phytolacca americana* proteins)(P API、P APII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒素(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯。

[0211] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合形成放射性免疫缀合物的如本文所述的抗体。各种放射性同位素可用于生产放射性免疫缀合物。实例包括 $[^{211}\text{At}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{90}\text{Y}]$ 、 $[^{186}\text{Re}]$ 、 $[^{188}\text{Re}]$ 、 $[^{153}\text{Sm}]$ 、 $[^{212}\text{Bi}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{212}\text{Pb}]$ 和Lu的放射性同位素。

当放射性免疫缀合物用于检测时,其可包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如 $[^{99}\text{Tc}]$ 或 $[^{123}\text{I}]$,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记,如同样是碘-123、碘-131、镅-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0212] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可使用各种双功能蛋白偶联剂制成,如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚氨二甲酯HCl)、活化酯类(如双琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛类(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮(bis-diazonium)衍生物(如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)及双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如Vitetta等,Science 238:1098(1987)所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳-14-标记的3-甲基二亚乙基三胺戊乙酸1-异硫氰酸苄酯(MXDTPA)是使放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。所述接头可为利于细胞毒性药物在细胞中释放的“可裂解接头”。例如,可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利第5,208,020号)。

[0213] 本文的免疫缀合物或ADC明确地包括但不限于此类用交联试剂制备的缀合物,交联试剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺-(4-乙烯基)苯甲酸酯),其可商购获得(例如,来自于Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.)。

[0214] 糖基化变体

[0215] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。抗体糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列,以便产生或去除一个或多个糖基化位点而便利地实现。

[0216] 抗体包含Fc区时,可改变与之附接的碳水化合物。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链、双触角型寡糖,该寡糖通常通过N-连键附接于Fc区CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角型寡糖结构的“茎部”中附接于GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可进行本发明抗体中寡糖的修饰以便产生具有某些改良性质的抗体变体。

[0217] 在一个实施方案中,提供了具有缺乏附接于(直接或间接)Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。例如,此类抗体中岩藻糖的量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。例如W02008/077546中所述,如通过MALDI-TOF质谱法所测量的,通过相对于附接于Asn297的所有糖基结构(例如,复合、杂交和高甘露糖结构)的总和,计算糖连内Asn297处岩藻糖的平均量测定岩藻糖的量。Asn297是指位于Fc区大约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);然而,由于抗体中的较小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游大约 ± 3 个氨基酸处,即介于位置294和300之间。此类岩藻糖基化变体可具有改良的ADCC功能。参见,例如,美国专利公布第US 2003/0157108(Presta, L.)、US 2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。关于“脱岩藻糖基化”或“岩藻糖不足的”抗体变体的公布的实例包括:US2003/01571;W02000/61739;W02001/29246;US2003/0115614;

US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;W02003/085119;W02003/084570;W02005/035586;W02005/035778;W02005/053742;W02002/031140;Okazaki等人J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004)。

[0218] 能够产生脱岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化不足的Lec13 CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请公布第US 2003/0157108 A1号,Presta,L;和W0 2004/056312 A1,Adams等人,尤其是实施例11),及敲除细胞系,如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因、FUT8、敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和W02003/085107)。

[0219] 还提供了具有二等分寡糖的抗体变体,例如,其中附接于抗体Fc区的双触角型寡糖被GlcNAc二等分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改良的ADCC功能。例如,在W0 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利第6,602,684号(Umana等人);和US2005/0123546(Umana等人)中描述了此类抗体变体的实例。还提供了在附接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有改良的CDC功能。例如,在W0 1997/30087(Patel等人);W0 1998/58964(Raju,S.);和W0 1999/22764(Raju,S.)中描述了此类抗体变体。

[0220] Fc区变体

[0221] 在某些实施方案中,可向本文提供的抗体Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰,从而产生Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其包含在一个或多个氨基酸位置的氨基酸修饰(例如取代)。

[0222] 在某些实施方案中,本发明考虑到了具有一些但非所有效应功能的抗体变体,这使其成为应用的可取候选物,在所述应用中体内抗体的半衰期很重要,而某些效应功能(如补体固定和ADCC)是不必要或有害的。可进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/损耗。例如,可进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ 结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保持FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞,即NK细胞,仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)第464页的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。在美国专利第5,500,362号(参见,例如Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337号(参见Bruggemann,M.等人J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中描述了评估目标分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性实例。可选地,可采用非放射性测定法(参见,例如,ACTI™ non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox96®non-radioactive cytotoxicity assay(Promega,Madison,WI))。用于此类测定法的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选地,或另外,可在体内,例如在动物模型中如Clynes等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)公开的动物模型中评估目标分子的ADCC活性。也可进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q并且因此缺乏补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。参见,例如,W02006/029879和W02005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为评估补体活化,可进行CDC测定(参见,

例如, Gazzano-Santoro等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S.等人, Blood 101:1045-1052 (2003); 及Cragg, M.S.和M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)。也可使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除率/半衰期Fc测定(参见, 例如, Petkova, S.B.等人, Int' J. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006))。

[0223] 效应功能降低的抗体包括Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个被取代的抗体(美国专利第6,737,056号)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两处或多处具有取代的Fc突变体, 包括残基265和297取代为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利第7,332,581号)。

[0224] 描述了与FcR的结合提高或削弱的某些抗体变体(参见, 例如, 美国专利第6,737,056号; WO 2004/056312, 和Shields等人, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001))。

[0225] 在某些实施方案中, 抗体变体包含具有一个或多个提高ADCC活性的氨基酸取代的Fc区, 例如, Fc区的位置298、333和/或处(残基的EU编号)的取代。

[0226] 在一些实施方案中, 在Fc区中产生改变, 其导致C1q结合和/或CDC活性改变(即, 提高或削弱), 例如, 如美国专利第6,194,551号、WO 99/51642和Idusogie等人 J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) 中所述。

[0227] 在US2005/0014934A1 (Hinton等人) 中描述了半衰期增加且与新生儿Fc受体(FcRn)的结合提高的抗体, 新生儿Fc受体负责将母体IgG转移给胎儿(Guyer等人, J. Immunol. 117:587 (1976) 和Kim等人, J. Immunol. 24:249 (1994))。那些抗体包含在其中具有一个或多个取代的Fc区, 所述取代提高Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在一个或多个Fc区残基处具有取代的那些: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434, 例如Fc区残基434的取代(美国专利第7,371,826号)。还参见Duncan和Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利第5,648,260号; 美国专利第5,624,821号; 及涉及Fc区变体的其它实例的WO 94/29351。

[0228] 半胱氨酸工程化抗体变体

[0229] 在某些实施方案中, 可能需要产生半胱氨酸工程化抗体, 例如“thioMAb”, 其中抗体的一个或多个残基经半胱氨酸残基取代。

[0230] 在特定实施方案中, 在抗体的可及位点存在经取代的残基。通过用半胱氨酸取代那些残基, 从而使反应性硫醇基团位于抗体的可及位点并且可用于使抗体缀合至其它部分, 如药物部分或接头-药物部分, 以产生如本文进一步描述的免疫缀合物。在某些实施方案中, 下列残基中的任一个或多个可经半胱氨酸取代: 轻链的V205 (Kabat编号); 重链的A118 (EU编号); 和重链Fc区的S400 (EU编号)。例如, 美国专利第7,521,541号中所述, 可产生半胱氨酸工程化抗体。

[0231] 诊断和治疗方法

[0232] 本发明的抗体设计为用于人或动物受试者, 优选人中的诊断或治疗方法中。

[0233] 因此, 本发明的其它方面提供了诊断方法, 其包括施用, 与一种或多种试剂一起提供, 例如缀合至可检测标记如FITC的抗体。所提供的抗体可用于开发对源自活检组织的癌细胞的迅速可靠测试。例如, 所述抗体可用作对转移性癌细胞, 如循环肿瘤细胞的测试, 可发现循环肿瘤细胞在体液如血液或淋巴中循环。其它目标癌症包括乳腺癌、肺癌、胃癌、头颈癌、结直肠癌、肾癌、胰腺癌、子宫癌、肝癌、膀胱癌、子宫内膜癌和前列腺癌以及淋巴瘤

(例如,非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma),NHL)和白血病(特别是急性髓性白血病,AML)。

[0234] 本发明的其它方面提供了治疗方法,其包括施用所提供的抗体、包含此类抗体的药物组合物、如本文所述用于治疗方法中的抗体、如本文所述用于治疗本文所述特定临床适应症的方法中的抗体,及此类抗体用于制造供施用的药剂,例如用于制备药剂或药物组合物的方法中的用途,所述制备方法包括用药学上可接受的赋形剂配制抗体。

[0235] 临床适应症

[0236] 可以使用对人Ax1具有高特异性的抗体来提供治疗益处的临床适应症包括其中Ax1过表达,或其中Ax1拮抗作用将提供临床益处的任何疾患。这些包括免疫失调、心血管病症、血栓形成、糖尿病、免疫检查点病症或增生性疾病,如癌症,特别是转移性癌症。此外,已知Ax1会在许多上皮源癌症中起作用。

[0237] 目标免疫检查点病症包括:慢性病毒感染、黑素瘤、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、肾细胞癌、胰腺癌、食道癌、膀胱癌、骨髓瘤、肾癌、膀胱癌、脑部肿瘤和淋巴瘤。

[0238] 目标癌症包括:白血病,例如但不限于急性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病(如成髓细胞性、早幼粒细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性、红血性白血病和骨髓发育异常综合征)、慢性白血病,例如但不限于慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病;真性红细胞增多;淋巴瘤,例如但不限于霍奇金病(Hodgkin's disease)、非霍奇金病;多发性骨髓瘤,例如但不限于冒烟型多发性骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤;华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia);未明的单克隆丙球蛋白病;良性单克隆丙种球蛋白病;重链病;骨骼和结缔组织肉瘤,例如但不限于骨肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma)、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、血管肉瘤、(血管内皮瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、转移性癌症、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤;脑部肿瘤,例如但不限于胶质瘤、成胶质细胞瘤、星细胞瘤、脑干胶质瘤、室鼓膜瘤、少突神经胶质瘤、非胶质瘤、听神经瘤、颅咽管瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、成松果体细胞瘤、原发性脑淋巴瘤;乳腺癌,包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、管内癌、乳房髓样癌、粘液性乳腺癌、乳腺小管癌、乳头状乳腺癌、原发性、佩吉特病(Paget's disease)和炎症性乳腺癌;肾上腺癌,例如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌;甲状腺癌例如但不限于乳头状或滤泡性甲状腺癌、甲状腺髓样癌和未分化甲状腺癌;胰腺癌,例如但不限于胰岛瘤、胃泌素瘤、高血糖素瘤、舒血管肠肽瘤、生长抑素分泌肿瘤和类癌瘤或胰岛细胞瘤;垂体癌,例如但不限于库兴氏病(Cushing's disease)、催乳素分泌瘤、肢端肥大症、尿崩症;眼癌,例如但不限于眼黑素瘤如虹膜黑素瘤、脉络膜黑素瘤和睫状体黑素瘤,及视网膜母细胞瘤;阴道癌如鳞状细胞癌、腺癌和黑素瘤;外阴癌如鳞状细胞癌、黑素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特病;宫颈癌,例如但不限于鳞状细胞癌和腺癌;子宫癌,例如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;卵巢癌,例如但不限于卵巢上皮癌、交界性肿瘤、生殖细胞瘤和间质瘤;食道癌,例如但不限于鳞癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞癌、肉瘤、黑素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌;胃癌,例如但不限于腺癌、蕈样(息肉状)、溃疡性、表浅扩散型、广泛扩散型、恶

性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤；结肠癌；直肠癌；肝癌，例如但不限于肝细胞癌和肝母细胞癌；胆囊癌，例如但不限于腺癌；胆管癌，例如但不限于乳头状、结节状和弥漫性胆管癌；肺癌，如非小细胞肺癌（NSCLC）、鳞状细胞癌（表皮样癌）、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌（SCLC）；睾丸癌，例如但不限于生殖细胞瘤、精原细胞瘤、未发育、经典（典型）、精母细胞性细胞瘤、非精原细胞瘤、胚胎瘤、畸胎瘤、绒膜瘤（卵黄囊瘤）；前列腺癌，例如但不限于腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤；生殖器癌，如阴茎癌；口腔癌，例如但不限于鳞状细胞癌；基底癌；唾液腺癌，例如但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺样囊性癌；咽癌，例如但不限于鳞状细胞癌和疣；皮肤癌，例如但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑素瘤、表浅扩散型黑素瘤、结节性黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、肢端雀斑样痣黑素瘤；肾癌，例如但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌（肾盂和/或输尿管）；维尔姆斯瘤（Wilms' tumor）；膀胱癌，例如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。另外，癌症包括粘液肉瘤、骨源性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管瘤内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌。优选地，所述癌症选自乳腺癌、黑素瘤、前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌、肺癌或胶质瘤。更优选地，所述癌症为转移性乳腺癌或肺癌。设想到了对循环肿瘤细胞的靶向和治疗。

[0239] 转移性癌症的治疗取决于原发性肿瘤所在的位置。当乳腺癌扩散到肺部时，例如，仍然是乳腺癌并且通过乳腺中的转移性癌症来源，而不是通过其现在处于肺部中的事实来确定治疗。约5%的时间，发现转移性癌症，但无法鉴定原发性肿瘤。这些转移性癌症的治疗受其位置而非其来源指示。转移性癌症通过原肿瘤的组织（若已知）来命名。例如，已经扩散到脑部的乳腺癌被称为至脑部的转移性乳腺癌。

[0240] 根据本发明的抗Ax1治疗可用于为具有其中Ax1过表达，或其中Ax1拮抗作用将提供临床益处的疾患的患者提供明显益处。治疗可通过注射（例如，经静脉）或通过局部递送方法给予。所提供的抗体可用于指示药物组合物向靶组织或全身性的递送，以便靶向（例如）循环肿瘤细胞（CTC）或其它转移细胞。

[0241] 在本发明的另一方面，提供了一种抑制受试者中的癌症干细胞的方法，该方法包括使受试者接触如本文所述的抗体（或其缀合物）。还设想到了用于此类方法中的抗体和缀合物。

[0242] EGFR拮抗作用

[0243] 本发明还提供了抑制组成型Ax1活化的方法，其包括向个体施用有效量的本文公开用于抑制组成型Ax1的任一种抗Ax1抗体。

[0244] 一方面，本发明提供了治疗患有与EGFR活化突变或EGFR基因扩增相关的癌症的受试者的方法，其中所述受试者已经发展出对EGFR拮抗剂治疗的抗性，所述方法包括确定受试者是否具有Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增，并且向具有Ax1活化突变或Ax1基因扩增的那些受试者施用EGFR拮抗剂和本文所述任何抗Ax1抗体。

[0245] 一方面，本发明提供了治疗患有与EGFR活化突变或EGFR基因扩增相关的癌症的受试者的方法，其包括：(i) 监测正在用EGFR拮抗剂治疗的受试者以确定受试者是否发展出Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增，并且(ii) 在受试者已经发展出Ax1活化突变或Ax1基因扩增时，将受试者的治疗方案修改为除EGFR拮抗剂外还包括本文所述任何抗Ax1抗体。

[0246] 一方面，本发明提供了治疗患有与EGFR活化突变或EGFR基因扩增相关的癌症的受

试者的方法,其包括:(i)监测正在用EGFR拮抗剂治疗的受试者以确定受试者是否发展出对抑制剂的抗性,(ii)对受试者进行测试以确定受试者是否具有Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,并且(iii)在受试者具有Ax1活化突变或Ax1基因扩增时,将受试者的治疗方案修改为除EGFR拮抗剂外还包括本文所述任何抗Ax1抗体。

[0247] 一方面,本发明提供了评价EGFR拮抗剂的方法,其包括:(i)监测正在用EGFR拮抗剂治疗的一群受试者以鉴定对该治疗剂发展出抗性的那些受试者,(ii)对抗性受试者进行测试以确定受试者是否具有Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,并且(iii)当受试者具有Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增时,将受试者的治疗方案修改为除EGFR拮抗剂外还包括本文所述任何抗Ax1抗体。

[0248] 一方面,本发明提供了减少癌细胞中的EGFR磷酸化的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触的步骤。

[0249] 一方面,本发明提供了减少癌细胞中PBK介导的信号传导的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触的步骤。

[0250] 一方面,本发明提供了减少癌细胞中EGFR介导的信号传导的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触。

[0251] 一方面,本发明提供了恢复癌细胞对EGFR拮抗剂的敏感性的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触。

[0252] 一方面,本发明提供了降低癌细胞的生长或扩增的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触的步骤。

[0253] 一方面,本发明提供了增加癌细胞凋亡的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触的步骤。

[0254] 一方面,本发明提供了降低癌细胞对EGFR拮抗剂的抗性的方法,其中所述癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性,并且其中所述细胞包含Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触的步骤。

[0255] 一方面,本发明提供了治疗癌细胞中的获得性EGFR拮抗剂抗性的方法,其中所述细胞包含Ax1活化突变或Ax1基因扩增,所述方法包括使细胞与本文所述任何抗Ax1抗体和EGFR拮抗剂接触。

[0256] 在一些实施方案中,癌细胞是任何EGFR驱动的癌症。在一些实施方案中,癌细胞包含EGFR活化突变。在一些实施方案中,癌细胞包含EGFR基因扩增。在一些实施方案中,EGFR基因扩增为至少2倍。在一些实施方案中,Ax1扩增为至少2倍。在一些实施方案中,癌细胞包含与对EGFR拮抗剂的抗性增强相关的EGFR基因突变。在一些实施方案中,与对EGFR拮抗剂的抗性增强相关的EGFR基因突变为EGFR的T790M突变。

[0257] 在一些实施方案中,EGFR拮抗剂为小分子治疗剂、核酸治疗剂或蛋白质治疗剂。在

一些实施方案中,EGFR拮抗剂为抗体、反义分子或小分子激酶抑制剂。在一些实施方案中,EGFR拮抗剂为选自以下的EGFR激酶抑制剂:吉非替尼(gefitinib)、埃罗替尼、西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(pantimumab)。在一些实施方案中,EGFR拮抗剂为选自以下的抗EGFR抗体:西妥昔单抗、帕尼单抗。在一些实施方案中,核酸治疗剂为siRNA分子。

[0258] 一方面,本发明提供了鉴定作为EGFR拮抗剂和本文所述任何抗Ax1抗体治疗候选者的受试者的方法,其中所述受试者已经用EGFR拮抗剂治疗过且患有对所述EGFR拮抗剂具有获得性抗性的癌症,所述方法包括检测来自所述受试者的癌细胞中的Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增。

[0259] 一方面,本发明提供了鉴定正在用EGFR拮抗剂治疗且有风险对所述EGFR拮抗剂获得抗性的受试者的方法,其包括检测来自所述受试者的癌细胞中Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增的存在,其中所述Ax1表达、Ax1活化突变或Ax1基因扩增的存在指示获得所述抗性的风险。

[0260] 一方面,本发明提供了治疗患有对EGFR拮抗剂治疗有抗性的癌症的受试者的方法,其包括对该受试者施用EGFR拮抗剂和本文所述任何抗Ax1抗体。

[0261] 一方面,本发明提供了治疗患有与EGFR活化突变或EGFR基因扩增相关的癌症的受试者的方法,其中该受试者已经发展出对EGFR拮抗剂治疗的抗性,所述方法包括确定该受试者是否具有Ax1表达,如升高的Ax1水平和/或活性,并对那些具有Ax1表达,如升高的Ax1活性的受试者施用EGFR拮抗剂和本文所述任何抗Ax1抗体。

[0262] 一方面,本发明提供了治疗患有与EGFR活化突变或EGFR基因扩增相关的癌症的受试者的方法,其包括:(i)监测正在用EGFR拮抗剂治疗的受试者以确定该受试者是否发展出Ax1表达,如升高的水平和/或Ax1活性,并且(ii)在受试者已经发展出Ax1表达,如升高的Ax1水平和/或活性时,将受试者的治疗方案修改为除EGFR拮抗剂外还包括本文所述任何抗Ax1抗体。

[0263] 一方面,本发明提供了治疗患有与EGFR活化突变或EGFR基因扩增相关的癌症的受试者的方法,其包括:(i)监测正在用EGFR拮抗剂治疗的受试者以确定受试者是否发展出对抑制剂的抗性,(ii)对受试者进行测试以确定受试者是否具有Ax1表达,如升高的Ax1水平和/或活性,并且(iii)在受试者具有升高的Ax1水平和/或活性时,将受试者的治疗方案修改为除EGFR拮抗剂外还包括本文所述任何抗Ax1抗体。

[0264] 另一方面,本发明提供了(i)恢复癌细胞对EGFR拮抗剂的敏感性,(ii)降低癌细胞对EGFR拮抗剂的抗性,和/或(iii)治疗癌细胞中的获得性EGFR拮抗剂抗性的方法,其通过使细胞与EGFR拮抗剂和本文所述任何抗Ax1抗体接触来进行。

[0265] 在示例性实施方案中,该癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性且包含升高水平的Ax1活性和/或表达,例如与Ax1基因中的活化突变、Ax1基因扩增或Gas6介导的Ax1活化相关。本文中公开的方法可用于恢复癌细胞的敏感性、降低癌细胞的抗性和/或治疗癌细胞的获得性抗性。

[0266] 另一方面,本发明提供了降低癌细胞的生长和/或增殖,或提高癌细胞凋亡的方法,其通过使细胞与EGFR拮抗剂和本文所述任何抗Ax1抗体接触来进行。在示例性实施方案中,癌细胞对EGFR拮抗剂具有获得性抗性且包含升高的Ax1活性和/或表达,例如与Ax1基因中的活化突变、Ax1基因扩增或Gas6介导的Ax1活化相关。

[0267] 药物组合物

[0268] 本发明的抗体通常将呈药物组合物的形式施用,除抗体以外药物组合物还包含至少一种组分。

[0269] 因此根据本发明所述并根据本发明使用的药物组合物,除活性成分外,还可包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员公知的其它材料。此类材料应无毒并且不应干扰活性成分的功效。载体或其它材料的确切性质将取决于施用途,可为口服,或通过注射,例如静脉注射。药物组合物可用于人和兽医学中供人或动物使用。

[0270] 对于本文所述各种不同形式的药物组合物而言此类合适赋形剂的实例可在由A Wade和PJ Weller编辑的“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第2版,(1994)中找到。

[0271] 供治疗用的可接受的载体或稀释剂在制药领域中公知并且,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro编辑1985)中有描述。合适载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨糖醇等。合适稀释剂的实例包括乙醇、甘油、水和缓冲盐水。

[0272] 对于预期施用途和标准药学实践可以进行药物载体、赋形剂或稀释剂的选择。药物组合物可以包含作为或除载体、赋形剂或稀释剂外的任何合适的粘合剂、润滑剂、助悬剂、包衣剂、助溶剂、缓冲剂、调味剂、表面活性剂、增稠剂、防腐剂(包括抗氧化剂)等,以及为了致使配制剂与预期受者血液等渗而被包括在内的物质。

[0273] 合适粘合剂的实例包括淀粉、明胶、天然糖(如葡萄糖)、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂、天然和合成橡胶(如阿拉伯树胶、黄芪胶或海藻酸钠)、羧甲基纤维素和聚乙二醇。

[0274] 合适润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。在药物组合物中可提供防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸和对羟基苯甲酸酯。也可使用抗氧化剂和助悬剂。

[0275] 药物配制剂包括适于口服、局部(包括皮肤、颊部和舌下)、直肠或肠胃外(包括皮下、皮内、肌肉内和静脉)、鼻部和肺部施用(例如通过吸入)的那些药物配制剂。该配制剂在适当时可便于呈离散剂量单位呈现并且可通过药学领域公知的任何方法制备。所有方法均包括使活性化合物与液体载体或细分固体载体或两者缔合的步骤,然后,如有必要,使产物成型为所需配制剂。其中载体为固体的适于口服施用的药物配制剂最优选作为单位剂量配制剂如药丸、胶囊或片剂呈现,其各自含有预定量的活性剂。片剂可通过任选地与一种或多种辅助成分一起压缩或模制而制成。可通过在合适的机器中压缩呈自由流动形式如粉末或颗粒,任选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、润滑剂、表面活性剂或分散剂混合的活性剂来制备压缩片剂。可通过模制具有惰性液体稀释剂的活性剂制成模制片剂。片剂可任选地有包衣并且,若无包衣,可任选地有刻痕。可通过将单独的或与一种或多种辅助成分混合的活性剂填充到胶囊壳中,然后以通常方式将其密封来制备胶囊。扁囊剂类似于胶囊,其中活性剂连同任何辅助成分一起密封在米纸袋中。活性剂还可配制成可分散粒剂,例如可以在施用之前将其悬浮在水中,或撒在食物上。粒剂可包装在(例如)小袋中。其中载体为液体的适于口服施用的配制剂可作为于水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油液体乳液呈现。

[0276] 供口服施用的配制剂包括控释剂型,例如片剂,其中活性剂配制于适当的控释基质中,或用合适的控释薄膜包衣。此类配制剂可特别便于预防使用。

[0277] 其中载体为固体的适于直肠施用的药物配制剂最优选作为单位剂量栓剂呈现。合适的载体包括可可油和本领域中常用的其它材料。栓剂可方便地通过活性剂与软化或融化载体混合,接着于模具中冷却成型而形成。

[0278] 适于肠胃外施用的药物配制剂包括活性剂于水性或油性媒介物中的无菌溶液或悬浮液。

[0279] 注射制剂可适于快速浓注或连续输注。此类制剂便于在单位剂量或多剂量容器中呈现,所述容器在引入所述配制剂后被密封直至需要使用。可选地,活性剂可呈粉末形式,其可在使用之前用合适的媒介物,如无菌、无热原水复水。

[0280] 活性化合物也可配制成长效贮库制剂,其可通过肌肉注射或通过植入(例如皮下或肌肉内)来施用。贮库制剂可包括,例如,合适的聚合或疏水性材料,或离子交换树脂。此类长效配制剂特别便于预防使用。

[0281] 呈现适于经由颊腔进行肺部施用的配制剂,使得含有活性化合物并且理想地具有在0.5至7微米范围内的直径的颗粒在受者支气管树中递送。作为一种可能性,此类配制剂呈细粉碎粉末的形式呈现,细粉碎粉末可便于在可刺穿胶囊,例如适当的明胶中呈现,供吸入装置中使用,或可选地作为包含活性剂、合适的液体或气体推进剂和任选地其它成分(如表面活性剂和/或固体稀释剂)的自我推进配制剂呈现。合适的液体推进剂包括丙烷和含氯氟烃,并且合适的气体推进剂包括二氧化碳。也可采用自我推进配制剂,其中活性剂呈溶液或悬浮液的液滴形式分散。

[0282] 此类自我推进配制剂类似于本领域中已知的那些并且可通过规定程序制备。适宜地将其在设有具有所需喷雾特征的可手动操作或自动工作阀的容器中呈现;有利的是,该阀为计量型,其每次操作后递送固定体积,例如25至100微升。

[0283] 作为另一种可能性,活性剂可呈溶液或悬浮液形式,供喷雾器或雾化器中使用,从而采用加速气流或超声搅拌产生供吸入的细小雾滴。

[0284] 适于鼻部施用的配制剂包括通常类似于以上对于肺部施用所描述的那些的制剂。分散时,此类配制剂应理想地具有在10至200微米范围内的粒径以确保留在鼻腔内;这可视情况而定,通过使用合适粒度的粉末或选择适当的阀来实现。其它合适的配制剂包括具有在20至500微米范围内的粒径,用于通过鼻部通道从靠近鼻部的容器快速吸入而施用的粗粉,及在水性或油性溶液或悬浮液中含0.2至5%w/v活性剂的鼻滴剂。

[0285] 药学上可接受的载体是本领域技术人员公知的并且包括但不限于0.1M和优选0.05M磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。另外,此类药学上可接受的载体可为水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射有机酯(如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏或不挥发性油。也可存在防腐剂和/或其它添加剂,例如,抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0286] 适于局部配制的配制剂可(例如)作为凝胶、霜剂或软膏提供。此类制剂可应用于(例如)伤口或溃疡,直接涂在伤口或溃疡的表面或载于可应用于待治疗区域处或上方的合

适支撑物如绷带、纱布、网状织物等的上面。

[0287] 也可提供液体或粉末配制剂,可将其直接喷或撒在待治疗部位,例如伤口或溃疡上。可选地,可为载体如绷带、纱布、网状织物等喷或撒配制剂,然后应用于待治疗部位。

[0288] 根据本发明的另一方面,提供了一种制备如上所述的药物或兽用组合物的方法,所述方法包括例如通过混合,使活性化合物与载体缔合。一般而言,通过使活性剂与液体载体或细分固体载体或两者均匀且紧密地缔合,然后如有必要使产物成型。本发明延伸到制备药物组合物的方法,其包括使试剂与药学上或兽医学上可接受的载体或媒介物缔合。

[0289] 施用

[0290] 本发明的药物组合物可适于口服、直肠、鼻部、支气管内、局部(包括颊部和舌下)、阴道或肠胃外(包括皮下、肌肉内、静脉、动脉和皮内)、腹膜内和鞘内施用。优选地,所述配制剂为静脉或皮下施用的配制剂。

[0291] 所述配制剂可便于呈单位剂量形式,即呈含有一个单位剂量、多个单位剂量或单位剂量的亚单位的离散部分的形式呈现。举例而言,所述配制剂呈片剂和缓释胶囊的形式,并且可通过药学领域公知的任何方法制备。

[0292] 本发明中供口服施用的配制剂可作为以下形式呈现:各自含有预定量的活性剂的离散单元,如胶囊、软胶囊(gellule)、滴剂、扁囊剂、丸剂或片剂;作为粉剂或粒剂;作为活性剂于水性液体或非水性液体中的溶液、乳液或悬浮液;或作为水包油液体乳液或油包水液体乳液;或作为药丸等。优选地,这些组合物每个剂量含有1至250mg且更优选地10-100mg活性成分。

[0293] 对于口服施用的组合物(例如片剂和胶囊),术语“可接受的载体”包括媒介物如常见赋形剂,例如结合剂,例如糖浆、阿拉伯树胶、明胶、山梨糖醇、黄芪胶、聚乙烯吡咯烷酮(聚维酮)、甲基纤维素、乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基-甲基纤维素、蔗糖和淀粉;填料和载体,例如玉米淀粉、明胶、乳糖、蔗糖、微晶纤维素、高岭土、甘露糖醇、磷酸二钙、氯化钠和海藻酸;和润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸钠和其它金属硬脂酸盐、硬脂酸甘油酯硬脂酸、硅酮油、滑石蜡、油和胶体氧化硅。也可使用调味剂如薄荷、冬青油、樱桃香料等。可能可取的是添加着色剂以制备易于鉴定的剂量形式。也可通过本领域公知的方法为片剂包衣。

[0294] 片剂可通过任选地与一种或多种辅助成分一起压缩或模制而制成。可通过在合适的机器中压缩呈自由流动形式如粉末或颗粒,任选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、润滑剂、表面活性剂或分散剂混合的活性剂来制备压缩片剂。可通过在合适的机器中模制经惰性液体稀释剂润湿的粉状化合物的混合物制成模制片剂。片剂可任选地有包衣或有刻痕并且可经配制以便提供活性剂的缓释或控释。

[0295] 适于口服施用的其它配制剂包括在调味基质(通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶)中包含活性剂的糖锭;在惰性基质如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶中包含活性剂的锭剂;及在合适的液体载体中包含活性剂的漱口水。

[0296] 其它施用形式包括溶液或乳液,其可静脉、动脉、鞘内、皮下、皮内、腹膜内或肌肉内注射,并且其可由无菌或可灭菌溶液制备。可注射形式通常每个剂量含有10-1000mg,优选10-250mg活性成分。

[0297] 本发明的药物组合物也可呈栓剂、子宫托、悬浮液、乳液、洗剂、软膏、霜剂、明胶、喷雾、溶液或扑粉的形式。

[0298] 经皮施用的替代方式是通过使用皮肤贴片。例如,活性成分可掺入到由聚乙二醇或液体石蜡的水性乳液组成的霜剂中。活性成分也可按1至10重量%的浓度掺入到由白蜡或白色软石蜡基质连同可能需要的此类稳定剂和防腐剂一起组成的软膏中。

[0299] 替代性配制策略可提供适于口服或栓剂途径的制剂。施用途径可通过治疗的物理化学特性,通过对疾病、优化功效或最小化副作用的特别考虑来确定。

[0300] 另一种施用模式采用预包衣或以其它方式掺入到内在装置中,对其而言将通过适当实验确定抗体的最优量。

[0301] 在本发明的一些优选实施方案中抗体分子为单体片段,如Fab或scFv。此类抗体片段可具有半衰期相对较短的特征。

[0302] 剂量

[0303] 本领域的普通技术人员可容易地测定要向受试者施用的当前组合物的适当剂量,无需过度实验。通常,医师会确定将最适合个体患者的实际剂量并且实际剂量将取决于各种因素,包括采用的特定试剂的活性、该试剂的代谢稳定性和作用时长、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用模式和时间、排泄率、药物组合、特定疾患的严重程度及个体正在进行的疗法。

[0304] 根据本发明,可向个体患者施用提供的组合物。施用优选地按“治疗有效量”,这足以对患者显示益处。此类益处可以是至少改善至少一种症状。施用的实际量及施用速率和时程将取决于正在治疗的疾病的特性和严重程度。治疗处方,例如剂量的决定等,在普通医师和其它医学博士的责任范围之内。抗体的适当剂量是本领域公知的;参见Ledermann J.A.等人(1991) *Int. J. Cancer* 47:659-664; Bagshawe, K.D.等人(1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4:915-922。

[0305] 确切剂量将取决于许多因素,包括抗体是用于诊断还是用于治疗,待治疗区域的尺寸和位置,抗体(例如全抗体、抗体片段或双抗体)的确切特性及附接于抗体的任何可检测标记或其它分子的特性。典型抗体剂量可作为药丸静脉施用。其它施用模式包括经几个小时静脉输注,以达到相似总累积剂量。这是用于成年患者单次治疗的剂量,该剂量对于儿童和婴儿可按比例调整并且对于其它抗体形式而言也可与分子量成比例调整。听凭医师处理,按每天一次、每种两次、每种一次或每月一次的间隔重复治疗。

[0306] 本文公开的剂量是平均情况的实例。当然可存在更高或更低剂量范围有益的个别情况,并且这在本发明的范围之内。

[0307] 根据本发明,可施用有效量的试剂以抑制Ax1。当然,将根据试剂的施用类型进一步修改这个剂量。例如,为达到急性治疗的“有效量”,优选肠胃外施用。静脉输注于水或正常盐水中的5%葡萄糖中的化合物,或具有合适赋形剂的类似配制剂是最有效的,尽管肌肉内快速浓注也有用。通常,肠胃外剂量将为约0.01至约100mg/kg;优选0.1至20mg/kg,以将血浆中的药物浓度维持在有效抑制激酶或使靶受体饱和的浓度。可按达到约0.4至约400mg/kg/天的总日剂量的水平每天施用所述试剂一至四次。治疗有效的活性剂的确切量,及此类试剂的最佳施用途径,易于由本领域的普通技术人员通过将所述试剂的血液水平与具有疗效所需的浓度做比较来确定。

[0308] 本发明的试剂也可由患者以使得药物浓度足以实现本文公开的一种或多种治疗指征的方式口服施用。通常,含所述试剂的药物组合物按约0.1至约50mg/kg的口服剂量,以

符合患者疾患的方式施用。优选地口服剂量将为约0.5至约20mg/kg。

[0309] 可在几种生物学测定中的任一项中测试本发明的试剂以测定具有指定药理效应所需的试剂浓度。

[0310] 联合疗法

[0311] 组合物可以单独地或与其它治疗组合,根据待治疾患同时或依序施用。例如,本发明的抗体或其缀合物可用作抗癌单一疗法或与下文所提及的其它癌症治疗一起用于联合疗法中。其它治疗可包括施用适量的疼痛缓解药物如非甾体抗炎药(例如阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)或酪洛芬(ketoprofen))或鸦片制剂(如吗啡)或止吐剂。

[0312] 在一个优选的方面中,本发明的抗体(或其缀合物)与免疫检查点调节剂(ICM),如免疫检查点抑制剂(ICI)组合施用。通常,ICM是结合靶受体的试剂,如适体或抗体。

[0313] 与本发明的抗体(或其缀合物)组合使用的ICM可为本领域已知的任何合适的ICM。具体而言,合适的免疫检查点调节剂包括:

[0314] CTLA-4靶向剂,包括伊匹单抗(Ipilimumab)和曲美木单抗(Tremelimumab)。

[0315] PD-1靶向剂,包括派姆单抗(Pembrolizumab)、纳武单抗(Mivolumab)和AMP-514/MEDI0680。

[0316] BD-L1靶向剂,包括MPDL3280A、MEDI4736、MSB0010718C和BMS-936559。

[0317] 4-1BB靶向剂,包括乌瑞芦单抗(Urelumab)和PF-05082566。

[0318] OX-40靶向剂,包括MEDI6469、MEDI6383(rOX40L)和MOXR0916。

[0319] GITR靶向剂,包括TRX518。

[0320] CD27靶向剂,包括CDX-1127。

[0321] CD40靶向剂,包括CP-870,893。

[0322] LAG3靶向剂,包括BMS-986016。

[0323] 为免疫系统中的抑制途径的免疫检查点,可受肿瘤占有以诱导免疫抗性。使用试剂阻断或调节免疫检查点,包括T细胞刺激性和抑制性受体及树突细胞刺激性受体,并因此降低或逆转癌症的免疫抗性,是癌症研究中的重要途径。

[0324] 可通过使用ICM调节的T细胞刺激性受体包括CD28、ICOS、4-1BB、OX40、GITR、CD27、TWEAKR、HVEM和TIM-1。可通过使用ICM调节的T细胞抑制性受体包括PD-L1、CTLA-4、PD-1、BTLA、TIM-3、VISTA、LAG-3和TIGIT。可通过使用ICM调节的树突细胞刺激性受体包括CD40和4-1BB。

[0325] ICM的组合连同本发明的抗体(或其缀合物)一起使用时,全部ICM可靶向抑制性受体,所用全部ICM可靶向刺激性受体,或者可使用靶向抑制性受体和刺激性受体的ICM的组合。

[0326] 因此,这样提供了用于癌症治疗方法中的本发明的抗体(或其缀合物),其中所述治疗还包括施用一种或多种ICM。类似地,提供了本发明的抗体(或其缀合物)在制造用于癌症治疗的药剂中的用途,其中所述治疗还包括施用一种或多种免疫检查点调节剂。

[0327] 还提供了用于治疗癌症的方法中的本发明的抗体(或其缀合物),或此类抗体(或其缀合物)在制造用于癌症治疗的药剂中的用途,其中所述治疗还包括施用一种或多种选自以下的免疫检查点调节剂:伊匹单抗、曲美木单抗、派姆单抗、纳武单抗、AMP-514/MEDI0680、MPDL3280A、MEDI4736、MSB0010718C、BMS-936559、乌瑞芦单抗、PF-05082566、

MEDI6469、MEDI6383(rOX40L)、MOXR0916、TRX518、CDX-1127、CP-870,893和BMS-986016。

[0328] 本发明的抗体(或其缀合物)可在一种或多种ICM之前,与所述一种或多种ICM同时,或在所述一种或多种ICM之后施用。

[0329] 还提供了用于癌症治疗的本发明的抗体(或其缀合物),或此类抗体(或其缀合物)在制造用于癌症治疗的药剂中的用途,其中所述治疗还包括一种或多种ICM,并且其中所述癌症选自肺癌、黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌或癌瘤。

[0330] -----

[0331] 用于联合疗法的合适试剂

[0332] 这些包括烷化剂,例如烷基磺酸盐如白消安(busulfan);

[0333] 氮芥如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、美法仑(melphalan)和尿嘧啶芥(uramustine)、乙烯亚胺衍生物(如噻替派(thiotepa));

[0334] 亚硝基脲如卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)和链佐星(streptozocin),三氮烯如达卡巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbazine)和替莫唑胺(temozolamide);

[0335] 铂类化合物如顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、赛特铂(satraplatin)和吡铂(picoplatin)、奥纳铂(onnaplatin)、四铂(tetraplatin)、螺铂(sprioplatin)、异丙铂(iproplatin)、氯代(二亚乙基二氨)氯化铂(II)、二氯(亚乙基二氨)氯化铂(II)、(2-乙基丙二酸)二氨合铂(II)、(1,2-二氨基环己烷)丙二酸铂(II)、(4-羧基邻苯二甲酸)-(1,2-二氨基环己烷)铂(II)、(1,2-二氨基环己烷)-(异柠檬酸)铂(II)和(1,2-二氨基环己烷)-顺-(丙酮酸)铂(II);

[0336] 抗代谢物,包括抗叶酸制剂(antifolate)如甲氨蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(permetrexed)、雷替曲塞(raltitrexed)和三甲曲沙(trimetrexate);

[0337] 嘧啶类似物如阿扎胞苷(azacitidine)、卡培他滨(capecitabin)、阿糖胞苷(cytarabine)、依达曲沙(edatrexate)、氟尿苷(floxuridine)、氟尿嘧啶(flurouracil)、吉西他滨(gemcitabine)和曲沙他滨(troxacitabine);

[0338] 嘌呤类似物如克拉屈滨(cladribine)、氯脱氧腺苷、氯法拉滨(clofarabine)、氟达拉滨(fludarabine)、巯基嘌呤、喷司他丁(pentostatin)和硫鸟嘌呤;

[0339] 天然产品,包括抗肿瘤抗生素如博来霉素(bleomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、光神霉素(mithramycin)、丝裂霉素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、泊非霉素(porfiromycin)和蒽环霉素(anthracycline)(如柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)和戊柔比星(valrubicin));

[0340] 有丝分裂抑制剂如长春花生物碱即长春花碱(vinblastine)、vinvesir、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vinorelbine);

[0341] 酶类如L-天冬酰胺酶和PEG-L-天冬酰胺酶;

[0342] 微管聚合物稳定剂如紫杉烷(taxane)紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel);

[0343] 拓扑异构酶I抑制剂如喜树碱伊立替康(irinotecan)和拓扑替康(topotecan);拓

扑异构酶II抑制剂如鬼臼毒素 (podophyllotoxin)、安吡啶 (amsacrine)、依托泊苷 (etoposide)、替尼泊苷 (teniposide)、洛索蒽醌 (losoxantrone) 和放线菌素 (actinomycin);

[0344] 激素和激素拮抗剂,包括雄性激素如氟甲睾酮 (fluoxymesterone) 和睾内酯 (testolactone),

[0345] 抗雄激素如比卡鲁胺 (bicalutamide)、环丙孕酮 (cyproterone)、氟他胺 (flutamide) 和尼鲁米特 (nilutamide);

[0346] 皮质类固醇如地塞米松 (dexamethasone) 和强的松 (prednisone);

[0347] 芳香酶抑制剂如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、阿那曲唑 (anastrozole)、依西美坦 (exemestane)、福美司坦 (formestane) 和来曲唑 (letrozole);

[0348] 雌激素如己烯雌酚;

[0349] 抗雌激素如氟维司群 (fulvestrant)、雷洛昔芬 (raloxifene)、它莫西芬 (tamoxifen) 和托瑞米芬 (toremifene);

[0350] 促黄体激素释放激素 (LHRH) 激动剂和拮抗剂如阿巴瑞克 (abarelix)、布舍瑞林 (buserelin)、戈舍瑞林 (goserelin)、亮丙瑞林 (leuprolide)、组氨瑞林 (histrelin)、德舍瑞林 (desorelin)、醋酸那法瑞林 (nafarelin acetate) 和曲普瑞林 (triptorelin);

[0351] 孕酮如醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮,和甲状腺激素如左旋甲状腺素 (levothyroxine) 和三碘甲状腺氨酸 (liothyronine);

[0352] PKB途径抑制剂,包括哌立福辛 (perifosine)、盐酸恩扎滔林 (enzastaurin hydrochloride) 和曲西立滨 (triciribine);

[0353] PI3K抑制剂如semaphore和SF1126;

[0354] mTOR抑制剂如雷帕霉素 (rapamycin) 和类似物;

[0355] CDK抑制剂,包括色立昔布 (seliciclib)、阿伏昔地 (alvocidib) 和7-羟基羟基星形孢菌素;

[0356] COX-2抑制剂,包括塞来昔布 (celecoxib);

[0357] HDAC抑制剂,包括曲古抑菌素A (trichostatin A)、辛二酰苯胺异羟肟酸和克林霉素 (chlamydocin);

[0358] DNA甲基酶抑制剂,包括替莫唑胺 (temozolomide);及

[0359] 其它试剂,包括六甲蜜胺 (altretamine)、三氧化二砷 (arsenic trioxide)、沙立度胺 (thalidomide)、来那度胺 (lenalidomide)、硝酸镓、左旋咪唑 (levamisole)、米托坦 (mitotane)、羟基脲、奥曲肽 (octreotide)、丙卡巴肼 (procarbazine)、苏拉明 (suramin)、光动力化合物 (如甲氧苄二氧嘧啶 (methoxsalen) 和卟吩姆钠 (sodium porfimer)) 及蛋白酶体抑制剂 (如硼替佐米 (bortezomib))。

[0360] 分子靶向治疗剂包括:

[0361] 功能治疗剂,例如基因治疗剂;

[0362] 反义治疗剂;

[0363] 酪氨酸激酶抑制剂如盐酸埃罗替尼、吉非替尼、甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate) 和semaxanib;

[0364] RAF抑制剂如索拉非尼 (sorafenib);

[0365] 基因表达调节剂如类维生素A和维甲酸(rexinoid),例如阿达帕林(adapalene)、贝沙罗汀(bexarotene)、反式维甲酸、9-顺式维甲酸和N-(4-羟苯基)维甲酰胺;

[0366] 表型定向治疗剂,包括单克隆抗体如阿仑单抗(alemtuzumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、利妥昔单抗(rituximab)和曲妥珠单抗(trastuzumab);

[0367] 免疫毒素(如安坦辛(emtansine))、放射免疫缀合物(如1-托西莫单抗(1-tositumobab))、粘合剂(如适体,其靶向本文所述任一种分子靶标),

[0368] 和

[0369] 癌症疫苗。

[0370] 生物治疗剂包括:

[0371] 干扰素如干扰素- $[\alpha]2a$ 和干扰素- $[\alpha]2b$,和白细胞介素如阿地白介素(aldesleukin)、地尼白介素(denileukin diftitox)和奥普瑞白介素(oprelvekin)。Ax1抑制剂包括1-(6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚[1,2-c]吡嗪-3-基)-N3-((7-(S)-吡咯烷-1-基)-6,7,8,9-四氢-5H-苯并[7]环轮烯-2-基)-1H-1,2,4-三唑-3,5-二胺(BGB324/R428)、CH5451098(Roche)及通过引用并入本文的PCT/US07/089177、PCT/US2010/021275和PCT/EP2011/004451中描述的Ax1抑制剂。

[0372] 除预期对癌细胞起作用的这些试剂外,抗癌疗法还包括使用保护剂或辅助剂,包括:

[0373] 细胞保护剂如阿米福汀(amifostine)和右雷佐生(dexrazoxane);

[0374] 膦酸盐如帕米膦酸盐(pamidronate)和唑来膦酸(zoledronic acid);及

[0375] 刺激因子如依伯汀(epoetin)、达依泊汀(darbeopetin)、非格司亭(filgrastim)、PEG-非格司亭和沙格司亭(sargramostim)。

[0376] 许多联合化疗方案为本领域已知,如单独的或与卡铂等进一步组合的卡铂/紫杉醇、卡培他滨(capecitabine)/多西他赛、氟尿嘧啶/左旋咪唑、氟尿嘧啶/甲酰四氢叶酸(leucovorin)、甲氨蝶呤/甲酰四氢叶酸及曲妥珠单抗/紫杉醇的组合。

[0377] -----

[0378] 在说明书全篇,优选地在体外或在活体外进行本文描述的方法。

[0379] -----

[0380] 本发明提供了引起或允许如本文所提供的抗体与Ax1结合的方法。正如所指出的,此类结合可在体内发生,例如在施用抗体或编码抗体的核酸之后,或其可在体外发生,例如在ELISA、蛋白质印迹分析、免疫细胞化学、免疫组织化学、免疫沉淀或亲和色谱法中。

[0381] 与Ax1受体结合的抗体的量可测定。定量可与试样中抗原的量有关,这可能引起诊断兴趣。

[0382] 样品中抗体的反应性可通过任何适当方式测定。放射免疫测定法(RIA)是一种可能。放射性标记抗原与未标记抗原(试样)混合并允许与抗体结合。通过物理方式将结合的抗原与未结合的抗原分开并测定与抗体结合的放射性抗原的量。试样中存在的抗原越多,与抗体结合的放射性抗原会越少。也可使用竞争结合测定法,用非放射性抗原,使用与受体分子连接的抗原或类似物。受体分子可以是具有光谱上分离的吸收或发射特征的荧光色素、磷或激光染料。合适的荧光色素包括荧光素、若丹明(rhodamine)、藻红蛋白

(phycoerythrin) 和德州红 (Texas Red)。合适的产色染料包括二氨基联苯胺 (diaminobenzidine)。

[0383] 其它报告因子包括大分子胶体粒子或颗粒材料如有色、磁性或顺磁性的乳胶珠粒,及可直接或间接导致可检测信号在视觉上被观察到,被电子检测到或以其它方式记录的生物或化学活性剂。这些分子可以是催化显色或变色或引起电气性质(例如)变化的反应的酶类。它们可以是分子易激的,使得能量状态间的电子跃迁导致特征谱吸收或发射。它们可包括连同生物传感器一起使用的化学实体。可采用生物素/亲和素或生物素/链霉亲和素和碱性磷酸酶检测系统。

[0384] 其它报告因子包括DNA标签。这些标签可通过,例如qPCR容易地量化。

[0385] 单独的抗体-报告引起缀合物产生的信号可用于推导样品(正常和测试)中相关抗体结合的可量化的绝对或相对数据。

[0386] 本发明还提供了如上所述抗体在竞争测定法中用于测量抗原水平的用途,即在竞争测定法中通过采用如本发明所提供的抗体测量样品中的抗原水平的方法。这可以是不需要物理分离结合与未结合抗原。使报告分子与抗体连接使得在结合时发生物理或光学变化是一种可能。报告分子可直接或间接产生可检测且优选可测量的信号。报告分子的连接可以是直接或间接的、共价(例如经由肽键)或非共价的。经由肽键的连接可能是由于编码抗体和报告分子的基因融合体的重组表达。

[0387] 本发明还提供了例如在生物传感器系统中通过采用根据本发明的抗体,直接测量抗原水平。

[0388] 测定结合的模式不是本发明的特征并且本发明的技术人员能够根据其偏好和常识选择合适的模式。

[0389] 本发明还延伸到与结合抗原且包含包括具有基本上如本文所列氨基酸的CDR的抗体可变结构域(VH或VL或两者)或具有基本上如本文所列氨基酸序列的可变结构域的任何抗体竞争结合Ax1的抗体。抗体间的竞争可在体外容易地测定,例如通过将特定报告分子标记到在其未标记结合成员的存在下可以被检测出的一个结合成员上,以使得鉴定结合相同表位或重叠表位的抗体成为可能。例如可使用ELISA或流式细胞术测定竞争。可选地,如实施例5所述,可使用Biacore仪器经由表面等离子体共振 (SPR) 技术鉴定竞争性抗体。

[0390] 在对竞争的测试中,可采用抗原的肽片段,特别是包括目标表位的肽。可用具有表位序列加上任一末端的一个或多个氨基酸的肽。可称此类肽“基本上由”指定序列组成。根据本发明所述的抗体可以是这样的,使其与抗原的结合受具有或包括给定序列的肽抑制。在对此的测试中,可用具有任一序列加上一个或多个氨基酸的肽。

[0391] 结合特定肽的抗体例如可通过用该肽淘选从噬菌体展示文库中分离。

[0392] 本发明还提供了编码本发明的抗体的分离的核酸。核酸包括DNA和RNA。在一个优选的方面,本发明提供了编码如以上所定义的本发明的CDR、VH或VL结构域的核酸。

[0393] 本发明还提供了呈包含如上所述至少一个多聚核苷酸的质粒、载体、转录或表达盒的形式的构建体。

[0394] 本发明还提供了包含如上所述一种或多种构建体的重组宿主细胞。编码所提供的任何CDR、VH或VL结构域或抗体的核酸本身形成了本发明的一个方面,产生编码产物的方法也如此,该方法包括由其编码核酸表达。表达可便于通过在适当条件下培养含有该核酸的

重组宿主细胞而实现。通过表达产生之后,可使用本领域已知的任何合适技术分离和/或纯化VH或VL结构域或抗体。

[0395] 可提供根据本发明所述的抗体、VH和/或VL结构域及编码核酸分子和载体,例如从其自然环境分离和/或纯化的,呈基本上纯净或均匀的形式,或在核酸的情况下,不含或基本上不含除编码具有所需功能的多肽的序列以外的来源的核酸或基因。根据本发明所述的核酸可包含DNA或RNA并且可以是完全或部分合成的。除非上下文另有要求,否则提到如本文所列的核苷酸序列涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有指定序列,其中U取代为T的RNA分子。

[0396] 用于各种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母、杆状病毒和昆虫细胞系统。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、NS0和SP2/0小鼠骨髓瘤细胞、YB2/0大鼠骨髓瘤细胞、人细胞系HEK-293和PER.C6及许多其它细胞。常见、优选的细菌宿主为大肠杆菌(E.coli)。

[0397] 在原核细胞如大肠杆菌中抗体和抗体片段的表达在本领域中是确定的。对于综述,参见例如Plückthun, A. *Bio/Technology* 9:545-551 (1991)。培养中在真核细胞中的表达也可为本领域技术人员所用,作为产生抗体的一种选择,参见对于综述,例如Ref, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4:573-576; Trill J.J. 等人(1995) *Curr. Opinion Biotech* 6:553-560。

[0398] 可以选择或构建合适的载体,其含有适当的调控序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和适当的其它序列。视情况而定,载体可为质粒、病毒如噬菌体或噬菌粒(Sambrook和Russell, 2001, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。在 *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2版, Ausubel 等人编辑, John Wiley & Sons, 1992 中详细描述了操纵核酸的许多已知技术和方案,例如核酸构建体的制备、诱变、测序、DNA向细胞中的引入和基因表达及蛋白质分析中。

[0399] 因此,本发明的另一方面提供了含有如本文所公开的核酸的宿主细胞。再一个方面提供了包括将此类核酸引入宿主细胞的方法。引入可采用任何可用技术。对于真核细胞而言,合适的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如牛痘)转导(或对于昆虫细胞、杆状病毒而言)。对于细菌细胞而言,合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体转染。

[0400] 引入后可引起或允许由核酸进行表达,例如通过在用于基因表达的条件下培养宿主细胞。

[0401] 在一个实施方案中,本发明的核酸整合到宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准技术,可通过包括促进与基因组的重组的序列而促进整合。

[0402] 本发明还提供了包括在表达系统中使用如上所述的构建体以便表达如上所述的抗体或多肽的方法。

[0403] 现将通过举例的方式,参考以下实验来说明本发明的方面和实施方案。

[0404] 本说明书中任一处所引用的所有文件均通过引用并入。

[0405] 发明声明

[0406] 以下段落描述了本发明的许多具体设想的实施方案和组合。

[0407] 1. 一种结合Ax1的抗体, 且其包含:

[0408] 抗体VH结构域, 其选自5F11 VH结构域 (SEQ ID NO.3) 和VH结构域, 所述VH结构域包含具有SEQ ID NO.7的氨基酸序列的VH CDR3和任选地具有选自SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.5的氨基酸序列的一个或多个VH CDR; 和/或

[0409] 抗体VL结构域, 其选自5F11 VL结构域 (SEQ ID NO.4) 和VL结构域, 所述VL结构域包含具有选自SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9和SEQ ID NO.10的氨基酸序列的一个或多个VL CDR。

[0410] 2. 根据段落1所述的抗体, 其包含抗体VH结构域, 所述抗体VH结构域包含具有SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6和SEQ ID NO.7的氨基酸序列的VH CDR的抗体VH结构域, 所述抗体与包含所述5F11VH结构域 (SEQ ID NO.3) 和所述5F11 VL结构域 (SEQ ID NO.4) 的抗体的Ax1结合结构域竞争结合Ax1。

[0411] 3. 根据段落1或段落2所述的抗体, 其包含所述5F11 VH结构域 (SEQ ID NO.3)。

[0412] 4. 根据段落3所述的抗体, 其包含所述5F11 VL结构域 (SEQ ID NO.4)。

[0413] 5. 一种根据权利要求1-4中任一项所述的抗体的变体, 其中所述变体包含一个或多个骨架区和/或一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸序列改变。

[0414] 6. 根据段落1-5中任一项所述的抗体, 其以与由所述5F11 VH结构域 (SEQ ID NO.3) 和所述1H12 VL结构域 (SEQ ID NO.4) 形成的Ax1抗原结合位点的亲和力相等或更优的亲和力结合Ax1, 所述抗体的亲和力和所述抗原结合位点的亲和力是在相同条件下测定的。

[0415] 7. 根据段落1-6中任一项所述的抗体, 其包含scFv抗体分子。

[0416] 8. 根据段落1-6中任一项所述的抗体, 其包含抗体恒定区。

[0417] 9. 根据段落8所述的抗体, 其包含全抗体。

[0418] 10. 根据段落1-6中任一项所述的抗体, 其中所述抗体为结合抗原的抗体片段, 如单结构域抗体、Fv、scFv、dsFv、Fd、Fab、F(ab')₂、微型抗体、双抗体、单链双抗体、串联scFv、TandAb、双链抗体、三链抗体、 $\kappa(\lambda)$ 抗体、BiTE、DVD-1g、SIP、SMIP或DART。

[0419] 11. 根据段落1-10中任一项所述的抗体, 其包含另外的氨基酸, 所述氨基酸提供除结合抗原的能力外的其它功能特征。

[0420] 12. 根据段落1-10中任一项所述的抗体, 其以不大于 6×10^{-12} M的 K_D 结合Ax1。

[0421] 13. 根据段落1-10中任一项所述的抗体, 其以不大于 5×10^{-12} M的 K_D 结合Ax1。

[0422] 14. 根据段落1-11中任一项所述的抗体, 其以不低于 $2 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的 $k_{\text{结合}}$ 结合Ax1。

[0423] 15. 根据段落1-11中任一项所述的抗体, 其以不低于 $3 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的 $k_{\text{结合}}$ 结合Ax1。

[0424] 16. 根据段落1-12中任一项所述的抗体, 其中所述Ax1为人Ax1。

[0425] 17. 根据段落1-13中任一项所述的抗体, 其特异性结合灵长类Ax1。

[0426] 18. 根据段落1-17中任一项所述的抗体, 其:

[0427] (i) 以高于 10^{-3} M的 K_D 结合鼠Ax1;

[0428] (ii) 以高于 10^{-3} M的 K_D 结合人Mer; 和/或

[0429] (iii) 以高于 10^{-3} M的 K_D 结合人Tyro3。

[0430] 19. 根据段落1-18中任一项所述的抗体, 其中所述抗体为嵌合抗体。

- [0431] 20.根据段落1-18中任一项所述的抗体,其中所述抗体为人源化抗体。
- [0432] 21.根据段落1-20中任一项所述的抗体,其中所述抗体结合:
- [0433] (i) 与所述1H12抗体相同的表位,或
- [0434] (ii) 与被所述1H12抗体结合的表位重叠的表位。
- [0435] 22.根据段落1-21中任一项所述的抗体,其中所述抗体在结合细胞表面存在的Ax1之后内化。
- [0436] 23.根据段落1-22中任一项所述的抗体,其任选地经由肽键或接头与可检测标记、酶或毒素缀合。
- [0437] 24.根据段落23所述的抗体,其中所述毒素选自包含MMAE和MMAF的组。
- [0438] 25.根据段落23所述的抗体,其中所述可检测标记为FITC。
- [0439] 26.一种分离的核酸,其包含编码根据段落1-22中任一项所述的抗体或抗体的抗体VH或VL结构域的核苷酸序列。
- [0440] 27.一种宿主细胞,其根据段落26所述的核酸转化。
- [0441] 28.一种生产抗体或抗体VH或VL结构域的方法,所述方法包括在用于生产所述抗体或抗体VH或VL结构域的条件下培养根据段落27所述的宿主细胞。
- [0442] 29.根据段落28所述的方法,其还包括分离和/或纯化所述抗体或抗体VH或VL可变结构域。
- [0443] 30.根据段落28或段落29所述的方法,其还包括将所述抗体或抗体VH或VL可变结构域配制成包括至少一种另外的组分的组合物。
- [0444] 31.一种获得结合Ax1的抗体的方法,所述方法包括
- [0445] 通过在所述5F11 VH结构域(SEQ ID NO.3)的氨基酸序列中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸的方式,提供各自为所述5F11 VH结构域的氨基酸序列变体的一个或多个VH结构域,任选地将这样提供的一个或多个VH结构域氨基酸序列变体与一个或多个VL结构域组合以提供一个或多个VH/VL组合;和/或
- [0446] 通过在所述5F11 VL结构域(SEQ ID NO.4)的氨基酸序列中添加、缺失、取代或插入一个或多个氨基酸的方式,提供为所述5F11 VL结构域的氨基酸序列变体的VL结构域,并且将这样提供的一个或多个VL结构域氨基酸序列变体与一个或多个VH结构域组合以提供一个或多个VH/VL结构域组合;
- [0447] 并且
- [0448] 测试所述VH结构域氨基酸序列变体或VH/VL组合或多个组合以鉴定结合Ax1的抗体。
- [0449] 32.一种获得结合Ax1的抗体的方法,所述方法包括:
- [0450] 提供起始核酸,所述起始核酸编码包含待置换的CDR3或缺乏CDR3编码区的一个或多个VH结构域,并且将所述起始核酸与编码SEQ ID NO.7的所述VH CDR3氨基酸序列的供体核酸组合,使得所述供体核酸插入所述起始核酸的所述CDR3区内,以便提供编码VH结构域的产物核酸;或
- [0451] 提供起始核酸,所述起始核酸编码包含待置换的CDR3或缺乏CDR3编码区的一个或多个VL结构域,并且将所述起始核酸与编码SEQ ID NO.10的所述VL CDR3氨基酸序列的供体核酸组合,使得所述供体核酸插入所述起始核酸的所述CDR3区内,以便提供编码VL结构

域的产物核酸；

[0452] 表达编码VH结构域的所述产物核酸的核酸并且任选地将这样产生的所述VH结构域与一个或多个VL结构域组合以提供VH/VL组合,和/或表达编码VL结构域的所述产物核酸的核酸并且将这样产生的所述VL结构域与一个或多个VH结构域组合以提供VH/VL组合；

[0453] 选择包含VH结构域或VH/VL组合的抗体,所述抗体结合Ax1;并且

[0454] 回收结合Ax1的所述抗体和/或编码结合Ax1的所述抗体的核酸。

[0455] 33.根据段落31或段落32所述的方法,其中结合Ax1的所述抗体是包含VH结构域和VL结构域的抗体片段。

[0456] 34.根据段落33所述的方法,其中所述抗体片段为scFv抗体分子。

[0457] 35.根据段落33所述的方法,其中所述抗体片段为Fab抗体分子。

[0458] 36.根据段落34或段落35所述的方法,其还包括提供全抗体中所述抗体片段的所述VH结构域和/或所述VL结构域。

[0459] 37.根据段落31-36中任一项所述的方法,其还包括将结合Ax1的所述抗体或结合Ax1的所述抗体的抗体VH或VL可变结构域配制成包括至少一种另外的组分的组合物。

[0460] 38.根据段落28-37中任一项所述的方法,其还包括使结合Ax1的抗体与Ax1或Ax1的片段结合。

[0461] 39.一种方法,其包括使根据段落1-22中任一项所述的结合Ax1的抗体与Ax1或Ax1的片段结合。

[0462] 40.根据段落38或段落39所述的方法,其中所述结合发生在体外。

[0463] 41.根据段落38-40中任一项所述的方法,其包括测定抗体与Ax1或Ax1的片段结合的量。

[0464] 42.根据段落28-37中任一项所述的方法,其还包括将所述抗体用于制造治疗特征在于Ax1过表达的疾病或病症的药剂。

[0465] 43.根据段落1-25中任一项所述的抗体,或其与另一种治疗剂组合的免疫缀合物。

[0466] 44.一种组合物,其包含根据段落1-25中任一项所述的抗体,或其免疫缀合物,连同药学上可接受的赋形剂。

[0467] 45.根据段落44所述的组合物,其还包含另一种治疗剂。

[0468] 46.根据段落43所述的抗体或根据段落45所述的组合物,其中所述另一种治疗剂为免疫检查点调节剂(ICM),如免疫检查点抑制剂(ICI)。

[0469] 47.根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体,或根据段落44-46中任一项所述的组合物,其用于治疗方法中。

[0470] 48.根据段落47所述的抗体或组合物,其用于治疗增生性疾病的方法中。

[0471] 49.根据段落48所述的抗体或组合物,其中所述增生性疾病为癌症,如AML。

[0472] 50.根据段落49所述的抗体或组合物,其中所述癌症为转移性癌症。

[0473] 51.根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体,或根据段落44-46中任一项所述的组合物,在制造治疗特征在于Ax1过表达的疾病或病症的药剂中的用途。

[0474] 52.一种治疗特征在于Ax1过表达的疾病或病症的方法,所述方法包括向有所述疾病或病症或处于发展所述疾病或病症的风险的患者,施用根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体,或根据段落44-46中任一项所述的组合物。

[0475] 53. 根据段落48所述的方法, 其中所述抗体指示药物组合物的递送以靶向转移性癌细胞。

[0476] 54. 根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体和允许测定所述抗体与转移性癌细胞的结合的一种或多种试剂, 在制造用于检测特征在于Ax1过表达的疾病或病症的诊断剂中的用途。

[0477] 55. 一种诊断特征在于Ax1过表达的疾病或病症的方法, 所述方法包括向有所述疾病或病症或处于发展所述疾病或病症的风险的患者, 施用根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体, 或根据段落44-46中任一项所述的组合物, 和允许测定所述抗体与转移性癌细胞的结合的一种或多种试剂。

[0478] 56. 一种诊断试剂盒, 其包含根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体和允许测定所述组成部分与转移性癌细胞的结合的一种或多种试剂。

[0479] 57. 一种试剂盒, 其包含根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体, 或根据段落44-46中任一项所述的组合物。

[0480] 58. 一种药物组合物, 其包含有效量的作为有效成分的根据段落1-25、43或46中任一项所述的抗体, 连同药学上可接受的赋形剂。

实施例

[0481] 实施例1: 小鼠抗AXL单克隆抗体的产生

[0482] 通过用包含与人IgG1 Fc结构域(rhAx1-Fc; R&D Systems)融合的人Ax1胞外结构域的重组抗原免疫接种有免疫力的0F1小鼠(Charles River)产生针对人Ax1受体的单克隆抗体(MAb)。

[0483] 来自于显示血液中存在rhAx1特异性抗体的小鼠的脾细胞用于根据标准方案与小鼠骨髓瘤细胞融合。该细胞在板中(10^5 个细胞/孔)用次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(HAT)培养基培养进行杂交瘤选择。选择12天之后, 收获上清液并且在酶联免疫吸附测定(ELISA)和流式细胞术中测试Ax1结合。扩张在通过有限稀释法进行第二轮亚克隆后显示出最高抗原结合活性的5种阳性克隆物以在体外进行大规模抗体生产。通过蛋白G亲和色谱法从细胞培养上清液纯化MAb。

[0484] 选择在流式细胞术(图1)中显示与Ax1⁺细胞特异性结合的抗体克隆物5F11做进一步表征。

[0485] 对于流式细胞术, 用PBS洗涤培养中的粘附细胞, 通过胰蛋白酶(0.25%)处理1分钟分离并且击打培养皿以完全分离。通过向组织培养瓶中添加完全培养基, 接着用PBS洗涤细胞而猝灭胰蛋白酶。在洗涤步骤期间, 通过200g离心5分钟收集细胞。稀释抗体达到在PBS中含有0.02%牛血清白蛋白(BSA)的总浓度。

[0486] 在室温下使用200 μ L包含 10^5 个细胞的细胞悬浮液进行细胞染色20分钟。用PBS 0.02% BSA进行两个洗涤步骤之后, 细胞重新悬浮于200 μ L中, 在室温下用APC缀合的驴抗小鼠IgG(H+L)二级抗体(Jackson Laboratories, 产品目录号715-136-150)在2 μ g/mL的浓度下孵育20分钟。用PBS/0.02% BSA洗涤染色细胞两次并且在使用BD LSR Fortessa细胞分析仪(BD Biosciences)分析之前保持在冰上。

[0487] 实施例2: 小鼠单克隆抗体5F11不与人TAM受体家族的其它成员交叉反应

[0488] 所有结合实验都是在25℃下使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)进行的。使用胺偶联法分别按393.0、303.6和364.0个共振单位的表面密度将对应于人TAM受体家族成员,Ax1(rhAx1-Fc嵌合体;R&D Systems,产品目录号154-AL)、Mer(rhMer-Fc嵌合体;R&D Systems,产品目录号891-MR)和Tyro3(rhTyro3/Dtk-Fc嵌合体;R&D Systems,产品目录号859-DK)的胞外结构域的可溶性重组抗原固定在CM5传感器芯片的表面上。Biacore运行在自动模式下使用结合分析向导进行。在具有固定抗原的表面上按30μL/分钟的流量注射在HBS-EP缓冲液(GE Healthcare)中含浓度为10μg/mL的MAb 5F11的样品3分钟(缔合),接着解离5分钟。

[0489] 图2所示的结果证明MAb 5F11与人Ax1特异性结合而不与重组人Mer和Tyro3抗原结合。

[0490] 实施例3:小鼠单克隆抗体5F11不与小鼠AXL交叉反应

[0491] 结合实验是在25℃下使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)进行的。使用胺偶联法分别按1,308.0、2,115.9和1,429.0RU的表面密度将对应于人Ax1(rhAx1-Fc嵌合体;R&D Systems,产品目录号154-AL)、小鼠Ax1(rmAxl-Fc嵌合体;R&D Systems,产品目录号854-AX)和人Tyro3(rhTyro3/Dtk-Fc嵌合体;R&D Systems,产品目录号859-DK)的可溶性重组抗原固定在CM5传感器芯片的表面上。Biacore运行在自动模式下使用结合分析向导进行。

[0492] 在具有固定抗原的表面上按30μL/分钟的流量注射在HBS-EP缓冲液(GE Healthcare)中含浓度为10μg/mL的MAb 5F11或重组小鼠(rm)Ax1-配体Gas6(R&D Systems,产品目录号986-GS/CF)的样品3分钟(缔合),接着解离5分钟。

[0493] 图3所示的结果证明MAb 5F11与人Ax1特异性相互作用而不与重组小鼠Ax1和人Mer抗原结合(图3,上图)。相反,用作对照的小鼠Gas6,证明与人和小鼠Ax1两者结合并且与人Tyro3的结合略弱(图3,下图)。

[0494] 实施例4:小鼠单克隆抗体5F11的亲合力测定

[0495] 抗Ax1抗体5F11的亲合力测定在25℃下使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振测量来进行。使用具有密度为190RU的固定rhAx1-Fc嵌合体(R&D Systems,产品目录号154-AL)的传感器芯片CM5作为固体抗体涂布表面。

[0496] 对于动力学测量而言,按30μL/分钟的流量注射于HBS-EP缓冲液(Biacore,产品目录号BR-1001-88)中不同浓度的抗Ax1 MAb 5F11(0.06至30.0nM),注射时间3分钟,接着解离5分钟(单独的缓冲液)。每个循环之后,通过按50μL/分钟的流量30秒注射再生液(10mM HCl、1M NaCl)使表面再生。

[0497] 传质对照实验证明对于MAb 5F11而言不存在明显的传质限制。另外的缀合反应对照实验并未揭示对于MAb 5F11的缀合反应,因为在注射1、3或20分钟之后解离相几乎相同或只有一种分析物浓度(30nM或4.5μg/mL)。

[0498] 使用BIA评估软件和1:1朗缪尔结合模型(Langmuir binding model)计算动力学缔合(结合率, $k_{\text{结合}}$)和解离(解离率, $k_{\text{解离}}$)速率。按 $k_{\text{解离}}/k_{\text{结合}}$ 比率计算平衡解离常数(K_D)。按 $\ln 2/k_{\text{解离}}$ 比率计算形成的抗体-抗原复合物的半衰期($t_{1/2}$)。

[0499] 如图4所示,小鼠MAb 5F11展示出极高亲和力($K_D=5.8\text{pM}$),主要是由于缔合速率极快($k_{\text{结合}}=2.15\times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。

[0500] 实施例5:小鼠单克隆抗体5F11不阻断Gas6与AXL的结合

[0501] 使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)和结合分析向导,以几次循环注射两份样品进行竞争结合研究。作为第一样品,按30 μ L/分钟的流量在涂有rhAx1-Fc(使用胺偶联法)的CM5传感器芯片的表面上注射饱和浓度的MAb 5F11(666.7nM或100 μ g/mL)3分钟,接着在注射第二样品之前稳定2.5分钟(单独的HBS-EP缓冲液)。使用以下的第二样品:重组人(rh)Gas6(R&D Systems,产品目录号885-GS)、重组小鼠(rm)Gas6(R&D Systems,产品目录号986-GS/CF)和一组抗Ax1抗体,如MAb1、MAb3、MAB154(R&D Systems,产品目录号MAB154);全部浓度为25 μ g/mL。作为对照,在相同条件下(25 μ g/mL)使用MAb 5F11作为第二样品。注射第二样品3分钟,接着稳定2.5分钟(单独的缓冲液)并且通过按50 μ L/分钟的流量30秒注射再生液(10mM HCl、1M NaCl)使表面再生。

[0502] 图5所示的结果证明MAb 5F11不与Gas6(人和小鼠两种)和实验中所用的任何其它抗Ax1抗体竞争结合Ax1。

[0503] 实施例6:在蛋白质印迹分析中小鼠单克隆抗体5F11结合还原和非还原变性AXL

[0504] 对于蛋白质印迹分析,使用预测分子质量为71.7kDa(在还原条件下的SDS-PAGE中对应于100-110kDa)的重组人(rh)Ax1-Fc嵌合体(R&D Systems,产品目录号154-AL)和预测分子质量为78.9kDa(在还原条件下的SDS-PAGE中对应于100-110kDa)的rhMer-Fc(R&D Systems,产品目录号891-MR)作为抗原。使含该抗原的样品在还原剂(Life Technologies)存在或不存在时变性并且上样到NuPAGE 3-8%Tris-醋酸盐聚丙烯酰胺(PAA)凝胶的孔,1.0mm x 12孔(Invitrogen)中。作为分子量标记,使用SeeBlue Plus2预染分子量标记(Novex LC5925)。

[0505] 在推荐条件(Life Technologies)下使用Tris-醋酸盐SDS电泳缓冲液进行电泳并且,正如XCell IITM Blot Module(Invitrogen)手册中对于2种凝胶所述,使用具有20%甲醇的转移缓冲液,将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。在10mL封闭缓冲液,即具有5%脱脂奶的TBS/0.1%吐温20(TBST)中在室温下孵育所述膜1小时,接着在4℃下在5mL含有1 μ g/mL MAb 5F11的孵育缓冲液(具有3%脱脂奶的TBST)中孵育过夜。各用10mL的TBST洗涤膜三次,每次5分钟,接着在室温下用山羊抗小鼠IgG(H+L)HRP-缀合的二级抗体(1:3000)于5mL孵育缓冲液中边轻轻摇晃边孵育1小时。之后,膜在10mL的TBST中洗涤三次,每次5分钟并用10mL的TBS缓冲液洗涤两次。膜在室温下用1mL ECL底物孵育1分钟。抽吸过量底物溶液,使用ChemiDocTMXRS+成像仪(Bio Rad)和Image lab软件使印迹可视化。

[0506] 图6所示的结果证明,抗体5F11与还原和非还原的变性Ax1抗原特异性相互作用。未检测到与rhMer-Fc结合。结果表明MAb 5F11识别Ax1受体胞外部分上的线性表位。

[0507] 实施例7:小鼠单克隆抗体5F11的测序

[0508] 杂交瘤5F11细胞在标准条件下繁殖。根据标准方案使用5x10⁶个细胞进行mRNA分离和cDNA合成。对于编码重链和轻链可变区(分别为VH和VL)的基因的PCR扩增,使用小鼠IgG库引物组(Progen,Heidelberg,Germany,产品目录号F2010)。使用不同引物组合的PCR扩增导致,对于VH基因而言使用7种不同的引物组合由PCR产生14个序列并且对于VL基因而言使用2种不同的引物组合由PCR产生5个序列。选择克隆物VH4(D8-7)和V κ 3(H4-3)的序列,如与IMGT数据库的核苷酸比对所测定的,基于与相应种系序列的最高同源性做进一步工作。

[0509] 5F11 VH和VL结构域的推定氨基酸序列示于图7中。序列分析揭示在重链CDR2中存在潜在的N-糖基化位点(CDR-H2;图7中用黑体字示出了‘NYT’的糖基化位点)。

[0510] 实施例8:产生和测试嵌合单克隆抗体5F11

[0511] 从鼠杂交瘤5F11取回的VH和VL序列用于产生合成基因,经密码子优化在哺乳动物细胞(GeneArt)中表达。在适于哺乳动物细胞中的抗体产生的表达载体中,这些小鼠VH和VL基因与分别编码人IgG1重链和轻链(C- κ)的恒定结构域的遗传元件在框内连接。嵌合(小鼠可变/人恒定)IgG1抗体的产生通过在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中瞬时表达,接着使用蛋白A亲和和色谱法纯化来实现。在流式细胞术中分析纯化的嵌合抗体(>95%纯度)与Ax1阳性乳腺癌细胞系MDA-MB-231的结合。为了比较,使用亲本小鼠MAb 5F11。对于流式细胞术,用PBS洗涤培养中的粘附细胞,通过胰蛋白酶(0.25%)处理1分钟分离并且击打培养皿以完全分离。通过向组织培养瓶中添加完全培养基,接着用PBS洗涤细胞而猝灭胰蛋白酶。在洗涤步骤期间,通过200g离心5分钟收集细胞。稀释抗体达到在PBS中含有0.02%牛血清白蛋白(BSA)的总浓度。在室温下使用200 μ L包含 10^5 个细胞的细胞悬浮液进行细胞染色20分钟。分别用APC缀合的驴抗人或抗小鼠IgG(H+L)F(ab')₂片段(Jackson ImmunoResearch)检测细胞结合的抗体。用PBS/0.02%BSA进行两个洗涤步骤之后,细胞重新悬浮于200 μ L并且在Accuri C6流式细胞仪(BD Biosciences)上分析之前保持在冰上。图8所示的结果证明嵌合抗体与MDA-MB-231细胞强烈结合。

[0512] 实施例9:嵌合单克隆抗体ch5F11的亲合力测定

[0513] 在25℃下使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)通过表面等离子体共振测量进行抗Ax1嵌合(小鼠可变/人恒定IgG1)抗体ch5F11的亲合力测定。使用具有密度为190RU的固定rhAx1-Fc嵌合体(R&D Systems,产品目录号154-AL)的传感器芯片CM5作为固体抗原涂布表面。

[0514] 对于动力学测量而言,按30 μ L/分钟的流量注射于HBS-EP缓冲液(Biacore,产品目录号BR-1001-88)中不同浓度的抗Ax1嵌合MAb ch5F11(0.06至30.0nM),注射时间3分钟,接着解离5分钟(单独的缓冲液)。每个循环之后,通过按50 μ L/分钟的流量30秒注射再生液(10mM HCl、1M NaCl)使表面再生。

[0515] 传质对照实验证明对于MAb ch5F11而言不存在明显的传质限制。使用BIA评估软件和1:1朗缪尔结合模型计算动力学缔合(结合率, $k_{\text{结合}}$)和解离(解离率, $k_{\text{解离}}$)速率。按 $k_{\text{解离}}/k_{\text{结合}}$ 比率计算平衡解离常数(K_D)。按 $\ln 2/k_{\text{解离}}$ 比率计算形成的抗体-抗原复合物的半衰期($t_{1/2}$)。

[0516] 如图9所示,嵌合MAb ch5F11展示出极高亲和力($K_D=4.99\text{pM}$),主要是由于缔合速率极快($k_{\text{结合}}=3.46\times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。发现的亲和力值与亲本鼠抗体5F11非常相似。

[0517] 实施例10:小鼠单克隆抗体5F11不与来自非人灵长类动物的AXL交叉反应

[0518] 通过在CHO细胞中瞬时表达产生包含来自食蟹猴和恒河猴的Ax1受体的胞外部分(分别为cyno-Ax1和rhe-Ax1)的重组Ax1-Fc嵌合蛋白。使用胺偶联法分别按1,345.0和1,515.9RU的表面密度将重组cyno-Ax1和rhe-Ax1抗原固定在CM5传感器芯片的表面上。作为阳性对照,按1,234.9RU的密度将在相同条件下产生的hu-Ax1-Fc嵌合体固定在相同芯片上。

[0519] 在25℃下使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)进行结合实验。Biacore运行在

自动模式下使用结合分析向导进行。

[0520] 在具有固定抗原的表面上按30 μ L/分钟的流量注射在HBS-EP缓冲液(GE Healthcare)中含浓度为10 μ g/mL的MAb 5F11的样品3分钟(缔合),接着解离5分钟。

[0521] 图10所示的结果证明MAb 5F11与人Ax1强烈且特异性结合而与来自于食蟹猴和恒河猴的Ax1结合极弱(若有)。

[0522] 实施例11:使用与皂草素偶联的嵌合单克隆抗体ch5F11杀伤肿瘤细胞

[0523] 为了产生免疫毒素,使用FabFc-ZAP人缀合物(最终浓度4.5nM)(Advanced Targeting Systems,产品目录号IT-65)使嵌合MAb ch5F11非共价偶联至植物毒素皂草素。使用Ax1阳性肿瘤细胞系MDA-MB-231(人三阴性乳腺癌)测试ch5F11-皂草素内化对肿瘤细胞活力的影响。在96孔板中补充了10%FBS、L-谷氨酰胺(4mM)、链霉素(5 μ g/ml)和青霉素(5U/ml)的DMEM/F-12培养基中,每孔接种800个细胞并允许附着16小时。用免疫毒素ch5F11-皂草素的不同稀释液孵育细胞72小时。通过使用CLARIOstar[®]酶标仪(BMG LABTECH),进行XTT/PMS测定法来测定细胞的活力。

[0524] 图11所示的结果证明基于ch5F11的免疫毒素的良好内化和极强的细胞杀伤效力,EC₅₀值(导致50%细胞杀伤的有效浓度)在皮摩尔范围内。

[0525] 序列

[0526] SEQ ID NO.1[VH结构域(nt)]

GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGATCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCA
GGCTCCAGGGAAAGGGCTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGCAGTACGATA
AACTATACGCCATCTCTAAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAATACG
CTGTACCTGCAAATGAGCAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTATTACTGTGCAAG
CCCTTATTACTACGGCCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTG
CAGCCAAAACGACACCCCCATCTGACTATCCACTGGC

[0528] SEQ ID NO.2[VL结构域(nt)]

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCA
TCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTCAGTTTTGCTGGTACTAGTTTAATGCACTGG
TACCAACAGAAGCCAGGACAGCAACCCAACTCCTCATCTATCGTGCATCCAACCTAGA
AGCTGGATTTCTACCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGACTTCACCCTCAATA
TCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAGGGAATA
TCCTCGGACGTTCTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAGTCAAACGGGCTGATGCTGCACC
AACTGTATCC

[0530] SEQ ID NO.3[VH结构域(aa)]

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDPSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINY
TPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASPYYPGFAYWGQGLTVTSA

[0532] SEQ ID NO.4[VL结构域(aa)]

DIVLTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYQQKPGQPKLLIYRASNLEAGF
PTRFSGSGSRDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSREYPRTFGGGTKLEVK

- [0534] SEQ ID NO.5[重链CDR1]
[0535] **GFDfsRYWMS**
[0536] SEQ ID NO.6[重链CDR2]
[0537] **EINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNA**
[0538] SEQ ID NO.7[重链CDR3]
[0539] **PYYYGPFAY**
[0540] SEQ ID NO.8[轻链CDR1]
[0541] **KASQSVSFAGTSLMH**
[0542] SEQ ID NO.9[轻链CDR2]
[0543] **RASNLEA**
[0544] SEQ ID NO.10[轻链CDR3]
[0545] **QQSREYPRT**
[0546] SEQ ID NO.11[重链FR1]
[0547] **EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS**
[0548] SEQ ID NO.12[重链FR2]
[0549] **WVRQAPGKGLEWIG**
[0550] SEQ ID NO.13[重链FR3]
[0551] **KNTLYLQMSKVRSEDTALYYCAS**
[0552] SEQ ID NO.14[重链FR4]
[0553] **WGQGTLVTVSA**
[0554] SEQ ID NO.15[轻链FR1]
[0555] **DIVLTQSPASLAVSLGQRAIISC**
[0556] SEQ ID NO.16[轻链FR2]
[0557] **WYQQKPGQQP KLLIY**
[0558] SEQ ID NO.17[轻链FR3]
[0559] **GFPTRFSGSGSRTDFTLNHPVEEEDAATYYC**
[0560] SEQ ID NO.18[轻链FR4]
[0561] **GGGTKLEVK**
[0562] SEQ ID NO.19[人Ax1]

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQL
QVQGEPPPEVHWLRDGGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCL
VFLGHQTFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAV

[0563] PLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPT
ELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLH
PHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPL
QGTLGRLAYQQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLLELQGDGVSNSLTVCAAYTAAGDGPWSLP
VPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETR
YGEVFTEPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKT
LGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGV
CFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVLPTQMLVKFMADIASGMEYLS
TKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVY
TSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQPADCLDGLYALMSRC
WELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQ
PDPKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPTSTPSAQAQPADRGSPAAPGQEDGA

[0564] SEQ ID NO.20[鼠Ax1]

MGRVPLAWWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPP
EVVWLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRLISALQLSDAGEYQCMVHLEGRT
FVSQPGFVGLEGLPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLLWLQDAVPLAPVTGH
SSQHSLLQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTTELEVAWTP
GLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTPYHIRIS
CSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLVRWQEPRVPLQGTLGRL
AYRGQDTPEVLMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPG
[0565] QGQPLHHLVSEPPPRAFSWPWWYVLLGALVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFTEPTVE
RGELVVRYRVRKSYSRRTTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLEGEFGAVM
EGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSREGF
PEPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVLPTQMLVKFMADIASGMEYLSKRFIHRDLAA
RNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG
VTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQPVDCLDGLYALMSRCWELNPRDRPSF
AELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGSHLEPRGAAGGADPPTQPDPKDSCSCLTA
ADVHSAGRYVLCPTAPGPTLSADRGCPAPPGQEDGA

[0566] SEQ ID NO.21[人Tyro3]

MALRRSMGRPGLPPLPLPPPPRLGLLLAALASLLLPESSAAAGLKLMDGAPVKLTVSQGGQPVK
LNCSVEGMEEPDIQWVKDGAUVQNLQDLYIPVSEQHWIGFLSLKSVERSDAGRYWCQVED
GGETEISQPVWLTVEGVPFFTVEPKDLAVPPNAPFQLSCEAVGPPEPVTVWWRGTTKIGG
PAPSPSVLNVTVGTQSTMFSCAEHNLKGLASSRTATVHLQALPAAPFNITVTKLSSSNASVA
WMPGADGRALLQSCTVQVTQAPGGWEVLAVVVPVPPFTCLLRDLVPATNYSRLVRCANAL
GPSPYADWVPFQTKGLAPASAPQNLHAIRTDGSLILEWEEVIPEAPLEGPLGPYKLSWVQD

[0567]

NGTQDELTVETRANLTGWDPQKDLIVRVCVSNVAVGCGPWSQPLVSSSHDRAGQQGPPH
SRTSWVPVVLGVLTAALALILLRKRKTRFGQAFDSVMARGEPVHFRAARFNR
ERPERIEATLDSLGISDELKEKLEDVLIPEQQFTLGRMLGKGEFGSVREAQLKQEDGSFVKV
AVKMLKADIIASSDIEEFLREAACMKDFDHPHVAKLVGVSLRSRAKGRPLIPMVILPFMKHGD
LHAFLLASRIGENPFNLPLQTLIRFMVDIACGMEYLSSRNFIHRDLAARNCMLAEDMTVCVA
DFGLSRKIYSGDYRQGCASKLPVKWLALESADNLYTVQSDVWAFGVTMWEIMTRGQTP
YAGIENAEIYNYLIGGNRLKQPPECMEDVYDLMYQCWSADPKQRPSFTCLRMELENILGQL
SVLSASQDPLYINIERAEPTAGGSLELPGRDQPYSGAGDGSGMGAVGGTPSDCRYILTPG
GLAEQPGQAEHQEPESPLNETQRLLLLQQGLLPHSSC

[0568]

SEQ ID NO.22[人Mer]

MKINNEEIVSDPIYIEVQGLPHFTKQPESMNVTNRNTAFNLTCQAVGPPEPVNIFWVQNSSRV
NEQPEKSPSVLTVPLGTEMVAVFSCEAHNDKGLTVSKGVQINIKAIKPSPTTEVSIRNSTAHSILI
SWVPGFDGYSPFRNCSIQVKEADPLSNGSVMIFNTSALPHLYQIKQLQALANYSIGVSCMN
EIGWSAVSPWILASTTEGAPSVAPLNVTVFLNESSDNVDIRWMKPPTKQDQDGLVGYRISH
VWQSAGISKELLEEVGQNGSRARISVQVHNATCTVRIAAVTKGGVGPFSDPVKIFIPAHGW
VDYAPSSTPAPGNADPVLIIFGFCGFIIGLVLYISLAIRKRVQETKFGNAFTEEDSELVNYI
AKKSFCRRAIELTLHSLGVSEELQNKLEDVVIDRNLILGKILGEGEFGSVMEGNLKQEDGTS
LKVAVKTMKLDNSSQREIEEFLSEAACMKDFSHPNVIRLLGVCIEMSSQGIPKPMVILPFMKY
GDLHTYLLYSRLETGPKHIPLQTLKFMVDIALGMEYLSNRNLFHRDLAARNCMLRDDMTVC
VADFGLSKKIYSGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWAFGVTMWEIATRGMT
PYPGVQNHMYDYLLHGHRLKQPEDCLDELYEIMYSCWRTDPLDRPTFSVLRLQLEKLLES
LPDVRNQADVIVNTQLLESSEGLAQGSTLAPLDLNDPDSIIASCTPRAAISVVTAEVHDSKP
HEGRYILNGGSEEWEDLTSAPSAVTAEKNSVLPGERLVRNGVSWSHSSMLPLGSSLPDE
LLFADDSSEGSEVLM

[0569]

[0001]	序列表			
[0002]	<110>	BerGenBio AS		
[0003]	<120>	抗Ax1抗体		
[0004]	<130>	RKA/FP7126931		
[0005]	<150>	GB 1410825.2		
[0006]	<151>	2014-06-18		
[0007]	<160>	22		
[0008]	<170>	PatentIn 3.3版		
[0009]	<210>	1		
[0010]	<211>	389		
[0011]	<212>	DNA		
[0012]	<213>	小家鼠		
[0013]	<400>	1		
[0014]		gaggtgaagc tgggtggagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc	60	
[0015]		tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt agatactgga tgagttgggt ccggcaggct	120	
[0016]		ccagggaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac gataaactat	180	
[0017]		acgccatctc taaaggataa attcatcadc tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgtac	240	
[0018]		ctgcaaatga gcaaagttag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagcccttat	300	
[0019]		tactacggcc cctttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagccaaa	360	
[0020]		acgacacccc catctgacta tccactggc	389	
[0021]	<210>	2		
[0022]	<211>	360		
[0023]	<212>	DNA		
[0024]	<213>	小家鼠		
[0025]	<400>	2		
[0026]		gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccatc	60	
[0027]		atctcctgca aggccagcca aagtgtcagt tttgctggta ctagtttaac gcactggtac	120	
[0028]		caacagaagc caggacagca acccaaacct ctcactatc gtgcatccaa cctagaagct	180	
[0029]		ggatttccta ccaggttttag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caatatccat	240	
[0030]		cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaggga atatcctcgg	300	
[0031]		acgttcggtg gaggcaccaa gctggaagtc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	360	
[0032]	<210>	3		
[0033]	<211>	118		
[0034]	<212>	PRT		
[0035]	<213>	小家鼠		
[0036]	<400>	3		
[0037]		Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0038]		1 5 10 15		

[0039] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 [0040] 20 25 30
 [0041] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0042] 35 40 45
 [0043] Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 [0044] 50 55 60
 [0045] Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0046] 65 70 75 80
 [0047] Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0048] 85 90 95
 [0049] Ala Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0050] 100 105 110
 [0051] Leu Val Thr Val Ser Ala
 [0052] 115
 [0053] <210> 4
 [0054] <211> 111
 [0055] <212> PRT
 [0056] <213> 小家鼠
 [0057] <400> 4
 [0058] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 [0059] 1 5 10 15
 [0060] Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 [0061] 20 25 30
 [0062] Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 [0063] 35 40 45
 [0064] Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Phe Pro Thr
 [0065] 50 55 60
 [0066] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 [0067] 65 70 75 80
 [0068] Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 [0069] 85 90 95
 [0070] Glu Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
 [0071] 100 105 110
 [0072] <210> 5
 [0073] <211> 10
 [0074] <212> PRT
 [0075] <213> 小家鼠
 [0076] <400> 5
 [0077] Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser

[0078]	1	5	10
[0079]	<210>	6	
[0080]	<211>	26	
[0081]	<212>	PRT	
[0082]	<213>	小家鼠	
[0083]	<400>	6	
[0084]	Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys		
[0085]	1	5	10 15
[0086]	Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala		
[0087]		20	25
[0088]	<210>	7	
[0089]	<211>	9	
[0090]	<212>	PRT	
[0091]	<213>	小家鼠	
[0092]	<400>	7	
[0093]	Pro Tyr Tyr Tyr Gly Pro Phe Ala Tyr		
[0094]	1	5	
[0095]	<210>	8	
[0096]	<211>	15	
[0097]	<212>	PRT	
[0098]	<213>	小家鼠	
[0099]	<400>	8	
[0100]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His		
[0101]	1	5	10 15
[0102]	<210>	9	
[0103]	<211>	7	
[0104]	<212>	PRT	
[0105]	<213>	小家鼠	
[0106]	<400>	9	
[0107]	Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala		
[0108]	1	5	
[0109]	<210>	10	
[0110]	<211>	9	
[0111]	<212>	PRT	
[0112]	<213>	小家鼠	
[0113]	<400>	10	
[0114]	Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Arg Thr		
[0115]	1	5	
[0116]	<210>	11	

51

[0156]	20																
[0157]	<210> 16																
[0158]	<211> 15																
[0159]	<212> PRT																
[0160]	<213> 小家鼠																
[0161]	<400> 16																
[0162]	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr		
[0163]	1				5					10					15		
[0164]	<210> 17																
[0165]	<211> 32																
[0166]	<212> PRT																
[0167]	<213> 小家鼠																
[0168]	<400> 17																
[0169]	Gly	Phe	Pro	Thr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	
[0170]	1				5					10					15		
[0171]	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
[0172]				20					25					30			
[0173]	<210> 18																
[0174]	<211> 9																
[0175]	<212> PRT																
[0176]	<213> 小家鼠																
[0177]	<400> 18																
[0178]	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Val	Lys								
[0179]	1				5												
[0180]	<210> 19																
[0181]	<211> 894																
[0182]	<212> PRT																
[0183]	<213> 智人																
[0184]	<400> 19																
[0185]	Met	Ala	Trp	Arg	Cys	Pro	Arg	Met	Gly	Arg	Val	Pro	Leu	Ala	Trp	Cys	
[0186]	1				5					10					15		
[0187]	Leu	Ala	Leu	Cys	Gly	Trp	Ala	Cys	Met	Ala	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Ala	
[0188]				20					25					30			
[0189]	Glu	Glu	Ser	Pro	Phe	Val	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Ile	Thr	Gly	Ala	Arg	
[0190]		35						40				45					
[0191]	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Pro	
[0192]		50					55					60					
[0193]	Pro	Glu	Val	His	Trp	Leu	Arg	Asp	Gly	Gln	Ile	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp	
[0194]	65					70					75					80	

[0195]	Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp		
[0196]		85	90
[0197]	Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr		95
[0198]		100	105
[0199]	Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser		110
[0200]		115	120
[0201]	Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu		125
[0202]		130	135
[0203]	Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys		140
[0204]	145	150	155
[0205]	Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp		160
[0206]		165	170
[0207]	Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu		175
[0208]		180	185
[0209]	His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His		190
[0210]		195	200
[0211]	Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu		205
[0212]		210	215
[0213]	Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu		220
[0214]	225	230	235
[0215]	Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr		240
[0216]		245	250
[0217]	His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln		255
[0218]		260	265
[0219]	Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser		270
[0220]		275	280
[0221]	Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro		285
[0222]		290	295
[0223]	Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp		300
[0224]	305	310	315
[0225]	Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro		320
[0226]		325	330
[0227]	Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His		335
[0228]		340	345
[0229]	Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg		350
[0230]		355	360
[0231]	Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly		365
[0232]		370	375
[0233]	Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser		380

[0234]	385	390	395	400
[0235]	Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro			
[0236]	405	410	415	
[0237]	Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln			
[0238]	420	425	430	
[0239]	Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp			
[0240]	435	440	445	
[0241]	Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val			
[0242]	450	455	460	
[0243]	Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg			
[0244]	465	470	475	480
[0245]	Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val			
[0246]	485	490	495	
[0247]	Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr			
[0248]	500	505	510	
[0249]	Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp			
[0250]	515	520	525	
[0251]	Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu			
[0252]	530	535	540	
[0253]	Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser			
[0254]	545	550	555	560
[0255]	Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg			
[0256]	565	570	575	
[0257]	Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe			
[0258]	580	585	590	
[0259]	Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser			
[0260]	595	600	605	
[0261]	Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys			
[0262]	610	615	620	
[0263]	His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln			
[0264]	625	630	635	640
[0265]	Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile			
[0266]	645	650	655	
[0267]	Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp			
[0268]	660	665	670	
[0269]	Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val			
[0270]	675	680	685	
[0271]	Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg			
[0272]	690	695	700	

[0273]	Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
[0274]	705 710 715 720
[0275]	Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
[0276]	725 730 735
[0277]	Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
[0278]	740 745 750
[0279]	Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Arg Gly Asn Arg Leu
[0280]	755 760 765
[0281]	Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
[0282]	770 775 780
[0283]	Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
[0284]	785 790 795 800
[0285]	Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
[0286]	805 810 815
[0287]	Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
[0288]	820 825 830
[0289]	Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
[0290]	835 840 845
[0291]	Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
[0292]	850 855 860
[0293]	Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
[0294]	865 870 875 880
[0295]	Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
[0296]	885 890
[0297]	<210> 20
[0298]	<211> 888
[0299]	<212> PRT
[0300]	<213> 小家鼠
[0301]	<400> 20
[0302]	Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Trp Leu Ala Leu Cys Cys Trp Gly
[0303]	1 5 10 15
[0304]	Cys Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val
[0305]	20 25 30
[0306]	Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu
[0307]	35 40 45
[0308]	Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu
[0309]	50 55 60
[0310]	Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val
[0311]	65 70 75 80

[0312]	Pro	Leu	Gly	Glu	Asp	Trp	Gln	Asp	Glu	Trp	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu
[0313]					85					90					95	
[0314]	Arg	Ile	Ser	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gln	Cys	Met
[0315]					100					105					110	
[0316]	Val	His	Leu	Glu	Gly	Arg	Thr	Phe	Val	Ser	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Gly
[0317]					115					120					125	
[0318]	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Glu	Asp	Lys	Ala	Val
[0319]					130					135					140	
[0320]	Pro	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys	Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro
[0321]																
[0322]	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Pro
[0323]																
[0324]	Val	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Gln	Thr	Pro	Gly	Leu	Asn
[0325]																
[0326]	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr
[0327]																
[0328]	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Arg	Pro	His	His
[0329]																
[0330]	Leu	His	Val	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu	Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr
[0331]																
[0332]	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	His	Cys	Asn	Leu	Gln	Ala
[0333]																
[0334]	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Val	Gly	Ile	Trp	Leu	Gly	Lys	Ser	Asp	Pro
[0335]																
[0336]	Pro	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Val	Ser	Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu
[0337]																
[0338]	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Pro	His	Thr	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ile	Ser
[0339]																
[0340]	Cys	Ser	Ser	Ser	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Trp	Thr	His	Trp	Leu	Pro	Val
[0341]																
[0342]	Glu	Thr	Thr	Glu	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Pro	Glu	Asn	Val	Ser	Ala
[0343]																
[0344]	Met	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Gln	Glu	Pro	Arg	Val
[0345]																
[0346]	Pro	Leu	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Tyr	Arg	Gly	Gln
[0347]																
[0348]	Asp	Thr	Pro	Glu	Val	Leu	Met	Asp	Ile	Gly	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Thr
[0349]																
[0350]	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Asp	Arg	Pro	Val	Ala	Asn	Leu	Thr	Val	Ser	Val

[0351]	385	390	395	400
[0352]	Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gly Asp Gly Pro Trp Ser Leu Pro Val Pro			
[0353]	405	410	415	
[0354]	Leu Glu Pro Trp Arg Pro Gly Gln Gly Gln Pro Leu His His Leu Val			
[0355]	420	425	430	
[0356]	Ser Glu Pro Pro Pro Arg Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu			
[0357]	435	440	445	
[0358]	Leu Gly Ala Leu Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe			
[0359]	450	455	460	
[0360]	Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu			
[0361]	465	470	475	480
[0362]	Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys			
[0363]	485	490	495	
[0364]	Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile			
[0365]	500	505	510	
[0366]	Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His			
[0367]	515	520	525	
[0368]	Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val			
[0369]	530	535	540	
[0370]	Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val			
[0371]	545	550	555	560
[0372]	Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe			
[0373]	565	570	575	
[0374]	Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met			
[0375]	580	585	590	
[0376]	Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Asp Arg Glu Gly Phe Pro			
[0377]	595	600	605	
[0378]	Glu Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser			
[0379]	610	615	620	
[0380]	Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Phe Leu Pro Thr			
[0381]	625	630	635	640
[0382]	Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr			
[0383]	645	650	655	
[0384]	Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys			
[0385]	660	665	670	
[0386]	Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser			
[0387]	675	680	685	
[0388]	Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys			
[0389]	690	695	700	

[0390]	Met	Pro	Val	Lys	Trp	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Ala	Asp	Arg	Val	Tyr
[0391]	705					710					715					720
[0392]	Thr	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Thr	Met	Trp	Glu	Ile
[0393]					725					730					735	
[0394]	Ala	Thr	Arg	Gly	Gln	Thr	Pro	Tyr	Pro	Gly	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Ile
[0395]				740					745					750		
[0396]	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Lys	Gln	Pro	Val	Asp	Cys
[0397]		755					760						765			
[0398]	Leu	Asp	Gly	Leu	Tyr	Ala	Leu	Met	Ser	Arg	Cys	Trp	Glu	Leu	Asn	Pro
[0399]	770					775						780				
[0400]	Arg	Asp	Arg	Pro	Ser	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Asn	Thr
[0401]	785					790					795					800
[0402]	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro	Ala	Gln	Glu	Pro	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Val
[0403]				805					810						815	
[0404]	Asn	Met	Asp	Glu	Gly	Gly	Ser	His	Leu	Glu	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly
[0405]			820						825					830		
[0406]	Gly	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Gln	Pro	Asp	Pro	Lys	Asp	Ser	Cys	Ser	Cys
[0407]		835					840						845			
[0408]	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Val	His	Ser	Ala	Gly	Arg	Tyr	Val	Leu	Cys	Pro
[0409]	850						855					860				
[0410]	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Pro	Thr	Leu	Ser	Ala	Asp	Arg	Gly	Cys	Pro	Ala
[0411]	865					870					875					880
[0412]	Pro	Pro	Gly	Gln	Glu	Asp	Gly	Ala								
[0413]				885												
[0414]	<210>	21														
[0415]	<211>	890														
[0416]	<212>	PRT														
[0417]	<213>	智人														
[0418]	<400>	21														
[0419]	Met	Ala	Leu	Arg	Arg	Ser	Met	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro
[0420]	1			5					10						15	
[0421]	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser
[0422]				20					25					30		
[0423]	Leu	Leu	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Ala
[0424]			35					40					45			
[0425]	Pro	Val	Lys	Leu	Thr	Val	Ser	Gln	Gly	Gln	Pro	Val	Lys	Leu	Asn	Cys
[0426]	50						55					60				
[0427]	Ser	Val	Glu	Gly	Met	Glu	Glu	Pro	Asp	Ile	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Gly
[0428]	65					70					75					80

[0429]	Ala Val Val Gln Asn Leu Asp Gln Leu Tyr Ile Pro Val Ser Glu Gln
[0430]	85 90 95
[0431]	His Trp Ile Gly Phe Leu Ser Leu Lys Ser Val Glu Arg Ser Asp Ala
[0432]	100 105 110
[0433]	Gly Arg Tyr Trp Cys Gln Val Glu Asp Gly Gly Glu Thr Glu Ile Ser
[0434]	115 120 125
[0435]	Gln Pro Val Trp Leu Thr Val Glu Gly Val Pro Phe Phe Thr Val Glu
[0436]	130 135 140
[0437]	Pro Lys Asp Leu Ala Val Pro Pro Asn Ala Pro Phe Gln Leu Ser Cys
[0438]	145 150 155 160
[0439]	Glu Ala Val Gly Pro Pro Glu Pro Val Thr Ile Val Trp Trp Arg Gly
[0440]	165 170 175
[0441]	Thr Thr Lys Ile Gly Gly Pro Ala Pro Ser Pro Ser Val Leu Asn Val
[0442]	180 185 190
[0443]	Thr Gly Val Thr Gln Ser Thr Met Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Leu
[0444]	195 200 205
[0445]	Lys Gly Leu Ala Ser Ser Arg Thr Ala Thr Val His Leu Gln Ala Leu
[0446]	210 215 220
[0447]	Pro Ala Ala Pro Phe Asn Ile Thr Val Thr Lys Leu Ser Ser Ser Asn
[0448]	225 230 235 240
[0449]	Ala Ser Val Ala Trp Met Pro Gly Ala Asp Gly Arg Ala Leu Leu Gln
[0450]	245 250 255
[0451]	Ser Cys Thr Val Gln Val Thr Gln Ala Pro Gly Gly Trp Glu Val Leu
[0452]	260 265 270
[0453]	Ala Val Val Val Pro Val Pro Pro Phe Thr Cys Leu Leu Arg Asp Leu
[0454]	275 280 285
[0455]	Val Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Leu Arg Val Arg Cys Ala Asn Ala Leu
[0456]	290 295 300
[0457]	Gly Pro Ser Pro Tyr Ala Asp Trp Val Pro Phe Gln Thr Lys Gly Leu
[0458]	305 310 315 320
[0459]	Ala Pro Ala Ser Ala Pro Gln Asn Leu His Ala Ile Arg Thr Asp Ser
[0460]	325 330 335
[0461]	Gly Leu Ile Leu Glu Trp Glu Glu Val Ile Pro Glu Ala Pro Leu Glu
[0462]	340 345 350
[0463]	Gly Pro Leu Gly Pro Tyr Lys Leu Ser Trp Val Gln Asp Asn Gly Thr
[0464]	355 360 365
[0465]	Gln Asp Glu Leu Thr Val Glu Gly Thr Arg Ala Asn Leu Thr Gly Trp
[0466]	370 375 380
[0467]	Asp Pro Gln Lys Asp Leu Ile Val Arg Val Cys Val Ser Asn Ala Val

[0468]	385	390	395	400
[0469]	Gly Cys Gly Pro Trp Ser Gln Pro Leu Val Val Ser Ser His Asp Arg			
[0470]		405	410	415
[0471]	Ala Gly Gln Gln Gly Pro Pro His Ser Arg Thr Ser Trp Val Pro Val			
[0472]		420	425	430
[0473]	Val Leu Gly Val Leu Thr Ala Leu Val Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu			
[0474]		435	440	445
[0475]	Ile Leu Leu Arg Lys Arg Arg Lys Glu Thr Arg Phe Gly Gln Ala Phe			
[0476]		450	455	460
[0477]	Asp Ser Val Met Ala Arg Gly Glu Pro Ala Val His Phe Arg Ala Ala			
[0478]	465	470	475	480
[0479]	Arg Ser Phe Asn Arg Glu Arg Pro Glu Arg Ile Glu Ala Thr Leu Asp			
[0480]		485	490	495
[0481]	Ser Leu Gly Ile Ser Asp Glu Leu Lys Glu Lys Leu Glu Asp Val Leu			
[0482]		500	505	510
[0483]	Ile Pro Glu Gln Gln Phe Thr Leu Gly Arg Met Leu Gly Lys Gly Glu			
[0484]		515	520	525
[0485]	Phe Gly Ser Val Arg Glu Ala Gln Leu Lys Gln Glu Asp Gly Ser Phe			
[0486]		530	535	540
[0487]	Val Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ala Asp Ile Ile Ala Ser Ser			
[0488]	545	550	555	560
[0489]	Asp Ile Glu Glu Phe Leu Arg Glu Ala Ala Cys Met Lys Glu Phe Asp			
[0490]		565	570	575
[0491]	His Pro His Val Ala Lys Leu Val Gly Val Ser Leu Arg Ser Arg Ala			
[0492]		580	585	590
[0493]	Lys Gly Arg Leu Pro Ile Pro Met Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His			
[0494]		595	600	605
[0495]	Gly Asp Leu His Ala Phe Leu Leu Ala Ser Arg Ile Gly Glu Asn Pro			
[0496]		610	615	620
[0497]	Phe Asn Leu Pro Leu Gln Thr Leu Ile Arg Phe Met Val Asp Ile Ala			
[0498]	625	630	635	640
[0499]	Cys Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser Arg Asn Phe Ile His Arg Asp Leu			
[0500]		645	650	655
[0501]	Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Ala Glu Asp Met Thr Val Cys Val Ala			
[0502]		660	665	670
[0503]	Asp Phe Gly Leu Ser Arg Lys Ile Tyr Ser Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln			
[0504]		675	680	685
[0505]	Gly Cys Ala Ser Lys Leu Pro Val Lys Trp Leu Ala Leu Glu Ser Leu			
[0506]		690	695	700

[0507]	Ala Asp Asn Leu Tyr Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val
[0508]	705 710 715 720
[0509]	Thr Met Trp Glu Ile Met Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Ala Gly Ile
[0510]	725 730 735
[0511]	Glu Asn Ala Glu Ile Tyr Asn Tyr Leu Ile Gly Gly Asn Arg Leu Lys
[0512]	740 745 750
[0513]	Gln Pro Pro Glu Cys Met Glu Asp Val Tyr Asp Leu Met Tyr Gln Cys
[0514]	755 760 765
[0515]	Trp Ser Ala Asp Pro Lys Gln Arg Pro Ser Phe Thr Cys Leu Arg Met
[0516]	770 775 780
[0517]	Glu Leu Glu Asn Ile Leu Gly Gln Leu Ser Val Leu Ser Ala Ser Gln
[0518]	785 790 795 800
[0519]	Asp Pro Leu Tyr Ile Asn Ile Glu Arg Ala Glu Glu Pro Thr Ala Gly
[0520]	805 810 815
[0521]	Gly Ser Leu Glu Leu Pro Gly Arg Asp Gln Pro Tyr Ser Gly Ala Gly
[0522]	820 825 830
[0523]	Asp Gly Ser Gly Met Gly Ala Val Gly Gly Thr Pro Ser Asp Cys Arg
[0524]	835 840 845
[0525]	Tyr Ile Leu Thr Pro Gly Gly Leu Ala Glu Gln Pro Gly Gln Ala Glu
[0526]	850 855 860
[0527]	His Gln Pro Glu Ser Pro Leu Asn Glu Thr Gln Arg Leu Leu Leu Leu
[0528]	865 870 875 880
[0529]	Gln Gln Gly Leu Leu Pro His Ser Ser Cys
[0530]	885 890
[0531]	<210> 22
[0532]	<211> 823
[0533]	<212> PRT
[0534]	<213> 智人
[0535]	<400> 22
[0536]	Met Lys Ile Asn Asn Glu Glu Ile Val Ser Asp Pro Ile Tyr Ile Glu
[0537]	1 5 10 15
[0538]	Val Gln Gly Leu Pro His Phe Thr Lys Gln Pro Glu Ser Met Asn Val
[0539]	20 25 30
[0540]	Thr Arg Asn Thr Ala Phe Asn Leu Thr Cys Gln Ala Val Gly Pro Pro
[0541]	35 40 45
[0542]	Glu Pro Val Asn Ile Phe Trp Val Gln Asn Ser Ser Arg Val Asn Glu
[0543]	50 55 60
[0544]	Gln Pro Glu Lys Ser Pro Ser Val Leu Thr Val Pro Gly Leu Thr Glu
[0545]	65 70 75 80

[0546]	Met	Ala	Val	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Asp	Lys	Gly	Leu	Thr	Val
[0547]					85					90					95	
[0548]	Ser	Lys	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Ile	Lys	Ala	Ile	Pro	Ser	Pro	Pro	Thr
[0549]					100					105					110	
[0550]	Glu	Val	Ser	Ile	Arg	Asn	Ser	Thr	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser	Trp
[0551]					115					120					125	
[0552]	Val	Pro	Gly	Phe	Asp	Gly	Tyr	Ser	Pro	Phe	Arg	Asn	Cys	Ser	Ile	Gln
[0553]					130					135					140	
[0554]	Val	Lys	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Ser	Asn	Gly	Ser	Val	Met	Ile	Phe	Asn
[0555]					145					150					155	
[0556]	Thr	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Leu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu
[0557]					165					170					175	
[0558]	Ala	Asn	Tyr	Ser	Ile	Gly	Val	Ser	Cys	Met	Asn	Glu	Ile	Gly	Trp	Ser
[0559]					180					185					190	
[0560]	Ala	Val	Ser	Pro	Trp	Ile	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser
[0561]					195					200					205	
[0562]	Val	Ala	Pro	Leu	Asn	Val	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	Glu	Ser	Ser	Asp	Asn
[0563]					210					215					220	
[0564]	Val	Asp	Ile	Arg	Trp	Met	Lys	Pro	Pro	Thr	Lys	Gln	Gln	Asp	Gly	Glu
[0565]					225					230					235	
[0566]	Leu	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Ser	His	Val	Trp	Gln	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser
[0567]					245					250					255	
[0568]	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Gly	Gln	Asn	Gly	Ser	Arg	Ala	Arg	Ile
[0569]					260					265					270	
[0570]	Ser	Val	Gln	Val	His	Asn	Ala	Thr	Cys	Thr	Val	Arg	Ile	Ala	Ala	Val
[0571]					275					280					285	
[0572]	Thr	Lys	Gly	Gly	Val	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Lys	Ile	Phe	Ile
[0573]					290					295					300	
[0574]	Pro	Ala	His	Gly	Trp	Val	Asp	Tyr	Ala	Pro	Ser	Ser	Thr	Pro	Ala	Pro
[0575]					305					310					315	
[0576]	Gly	Asn	Ala	Asp	Pro	Val	Leu	Ile	Ile	Phe	Gly	Cys	Phe	Cys	Gly	Phe
[0577]					325					330					335	
[0578]	Ile	Leu	Ile	Gly	Leu	Val	Leu	Tyr	Ile	Ser	Leu	Ala	Ile	Arg	Lys	Arg
[0579]					340					345					350	
[0580]	Val	Gln	Glu	Thr	Lys	Phe	Gly	Asn	Ala	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Ser	Glu
[0581]					355					360					365	
[0582]	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Ile	Ala	Lys	Lys	Ser	Phe	Cys	Arg	Arg	Ala	Ile
[0583]					370					375					380	
[0584]	Glu	Leu	Thr	Leu	His	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Asn	Lys

[0585]	385	390	395	400
[0586]	Leu Glu Asp Val Val Ile Asp Arg Asn Leu Leu Ile Leu Gly Lys Ile			
[0587]	405	410	415	
[0588]	Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ser Val Met Glu Gly Asn Leu Lys Gln			
[0589]	420	425	430	
[0590]	Glu Asp Gly Thr Ser Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Leu Asp			
[0591]	435	440	445	
[0592]	Asn Ser Ser Gln Arg Glu Ile Glu Glu Phe Leu Ser Glu Ala Ala Cys			
[0593]	450	455	460	
[0594]	Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Ile Arg Leu Leu Gly Val Cys			
[0595]	465	470	475	480
[0596]	Ile Glu Met Ser Ser Gln Gly Ile Pro Lys Pro Met Val Ile Leu Pro			
[0597]	485	490	495	
[0598]	Phe Met Lys Tyr Gly Asp Leu His Thr Tyr Leu Leu Tyr Ser Arg Leu			
[0599]	500	505	510	
[0600]	Glu Thr Gly Pro Lys His Ile Pro Leu Gln Thr Leu Leu Lys Phe Met			
[0601]	515	520	525	
[0602]	Val Asp Ile Ala Leu Gly Met Glu Tyr Leu Ser Asn Arg Asn Phe Leu			
[0603]	530	535	540	
[0604]	His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Arg Asp Asp Met Thr			
[0605]	545	550	555	560
[0606]	Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Ser Gly Asp			
[0607]	565	570	575	
[0608]	Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala			
[0609]	580	585	590	
[0610]	Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp			
[0611]	595	600	605	
[0612]	Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Met Thr Pro			
[0613]	610	615	620	
[0614]	Tyr Pro Gly Val Gln Asn His Glu Met Tyr Asp Tyr Leu Leu His Gly			
[0615]	625	630	635	640
[0616]	His Arg Leu Lys Gln Pro Glu Asp Cys Leu Asp Glu Leu Tyr Glu Ile			
[0617]	645	650	655	
[0618]	Met Tyr Ser Cys Trp Arg Thr Asp Pro Leu Asp Arg Pro Thr Phe Ser			
[0619]	660	665	670	
[0620]	Val Leu Arg Leu Gln Leu Glu Lys Leu Leu Glu Ser Leu Pro Asp Val			
[0621]	675	680	685	
[0622]	Arg Asn Gln Ala Asp Val Ile Tyr Val Asn Thr Gln Leu Leu Glu Ser			
[0623]	690	695	700	

[0624]	Ser	Glu	Gly	Leu	Ala	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Pro	Leu	Asp	Leu	Asn
[0625]	705					710					715					720
[0626]	Ile	Asp	Pro	Asp	Ser	Ile	Ile	Ala	Ser	Cys	Thr	Pro	Arg	Ala	Ala	Ile
[0627]						725					730					735
[0628]	Ser	Val	Val	Thr	Ala	Glu	Val	His	Asp	Ser	Lys	Pro	His	Glu	Gly	Arg
[0629]						740					745					750
[0630]	Tyr	Ile	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Glu	Glu	Trp	Glu	Asp	Leu	Thr	Ser	Ala
[0631]						755					760					765
[0632]	Pro	Ser	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Glu	Lys	Asn	Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Glu
[0633]						770					775					780
[0634]	Arg	Leu	Val	Arg	Asn	Gly	Val	Ser	Trp	Ser	His	Ser	Ser	Met	Leu	Pro
[0635]	785					790					795					800
[0636]	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Pro	Asp	Glu	Leu	Leu	Phe	Ala	Asp	Asp	Ser	Ser
[0637]						805					810					815
[0638]	Glu	Gly	Ser	Glu	Val	Leu	Met									
[0639]						820										

MDA-MB-231 F511-Axl抗体

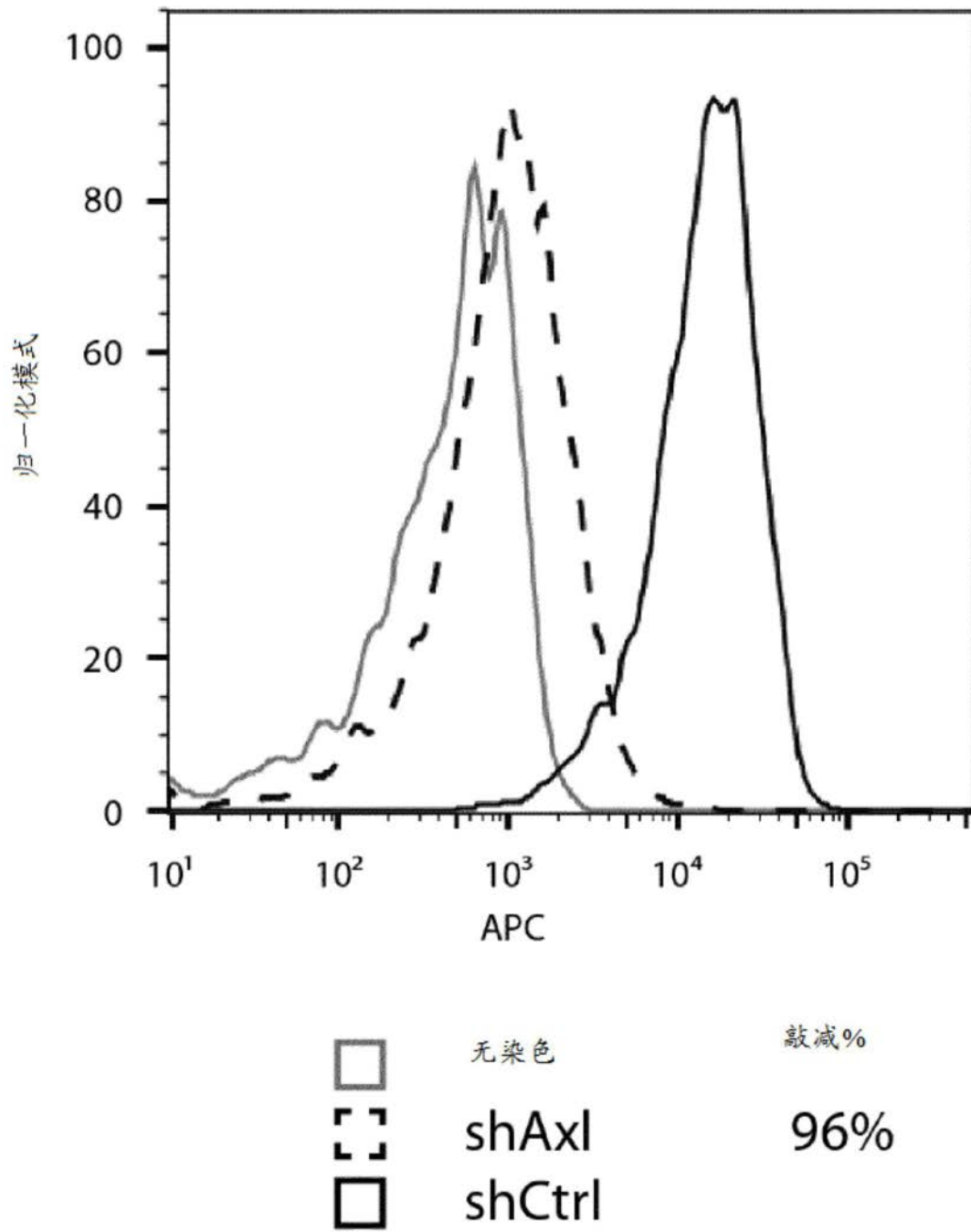


图1

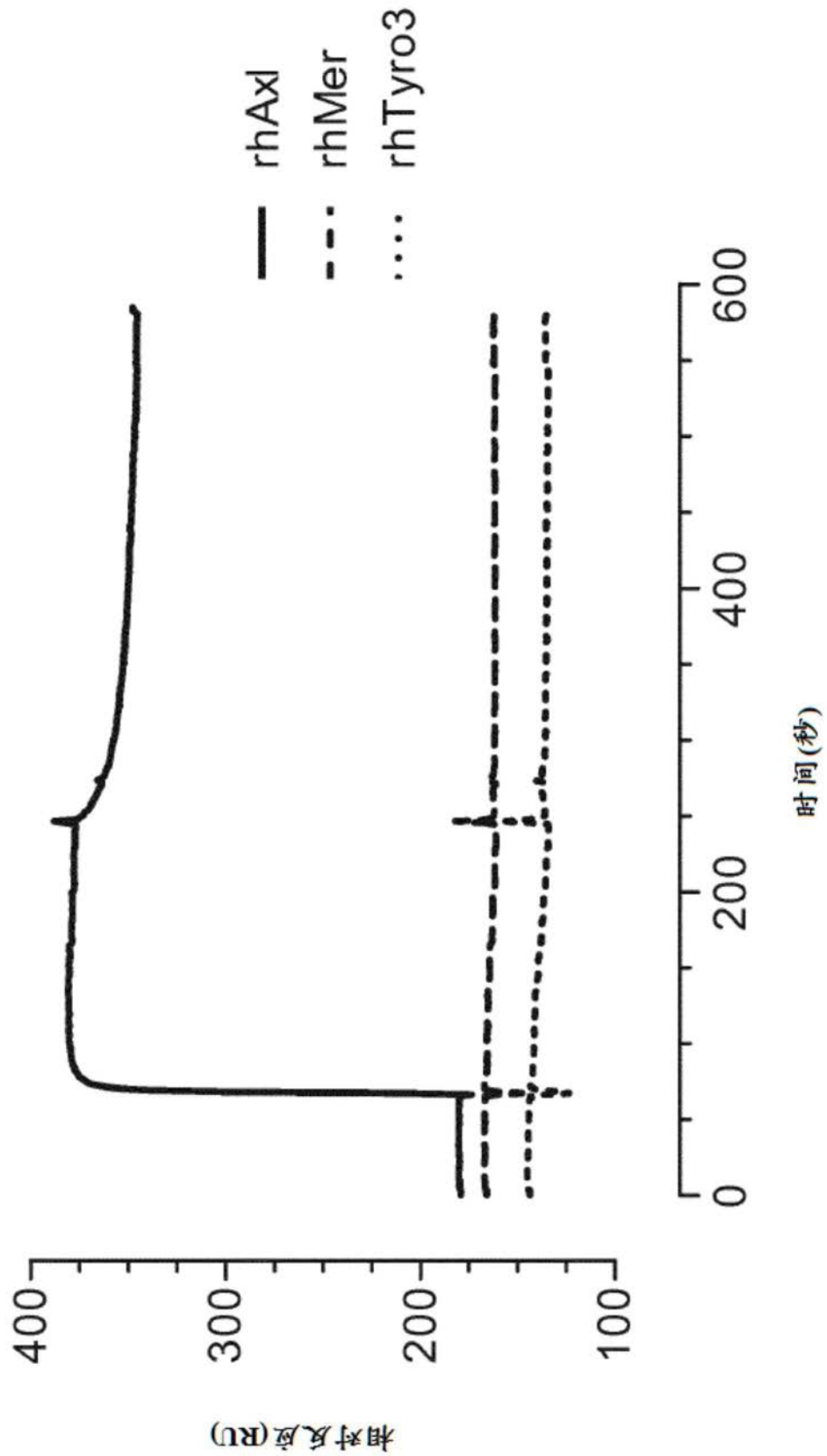


图2

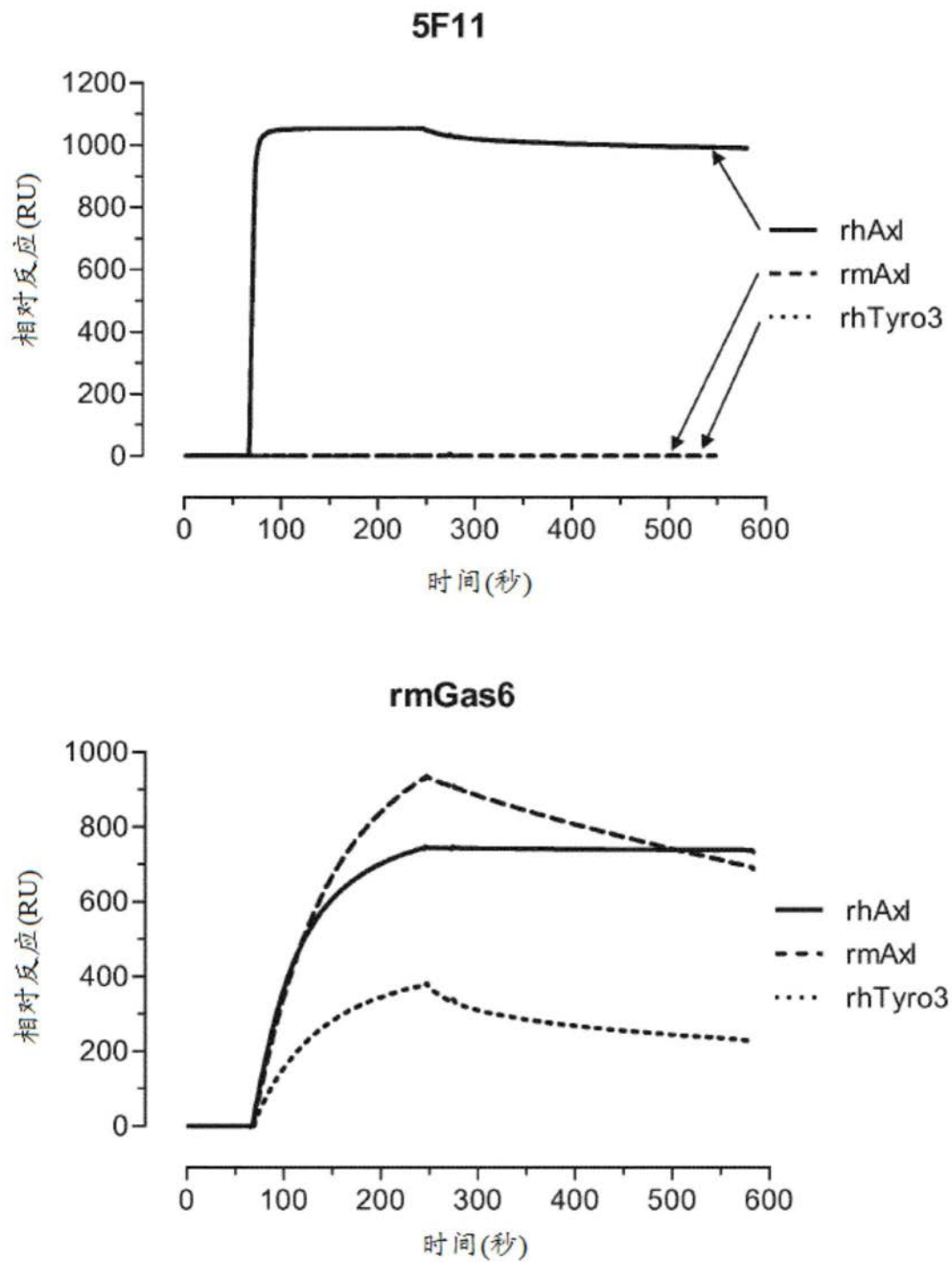


图3

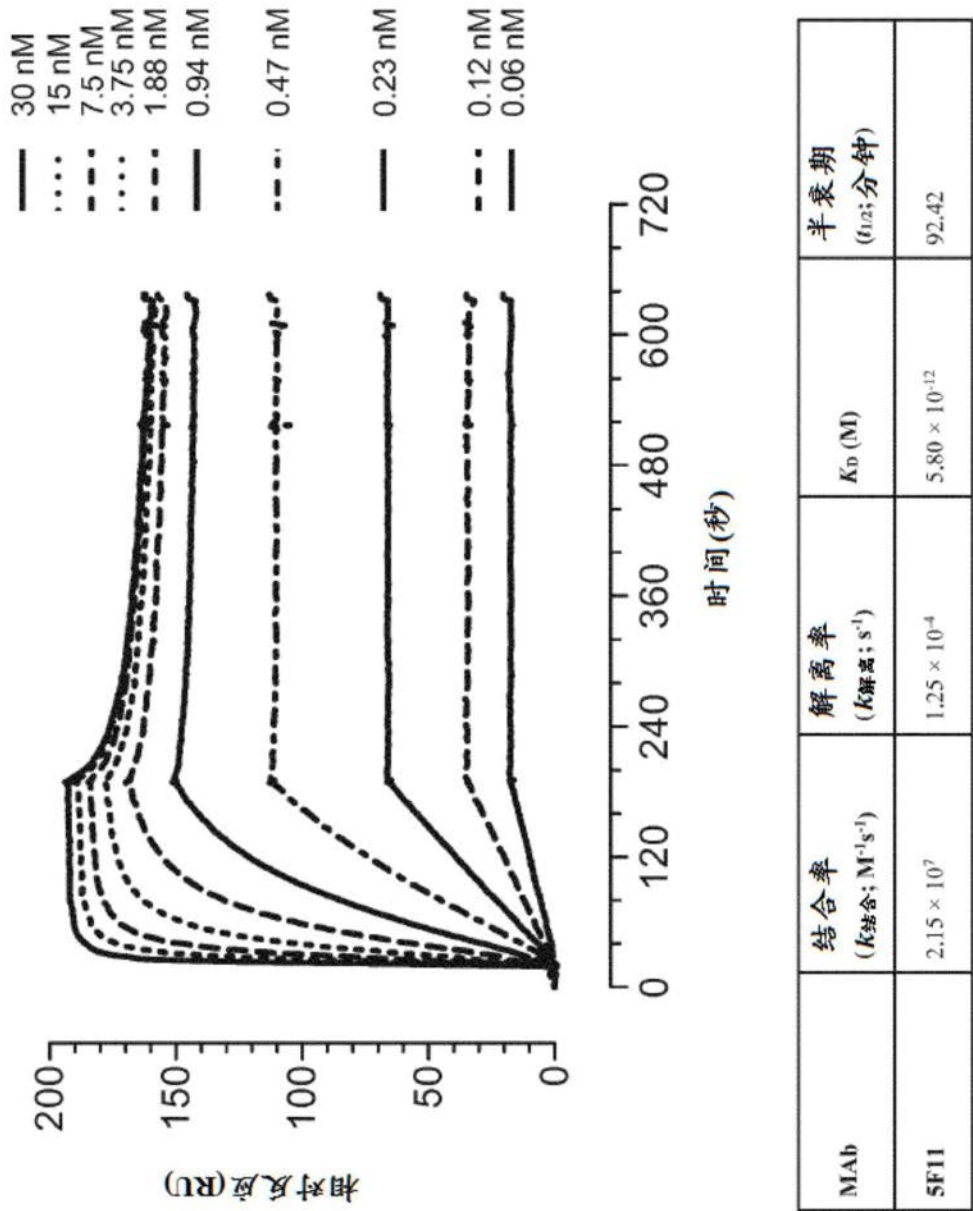


图4

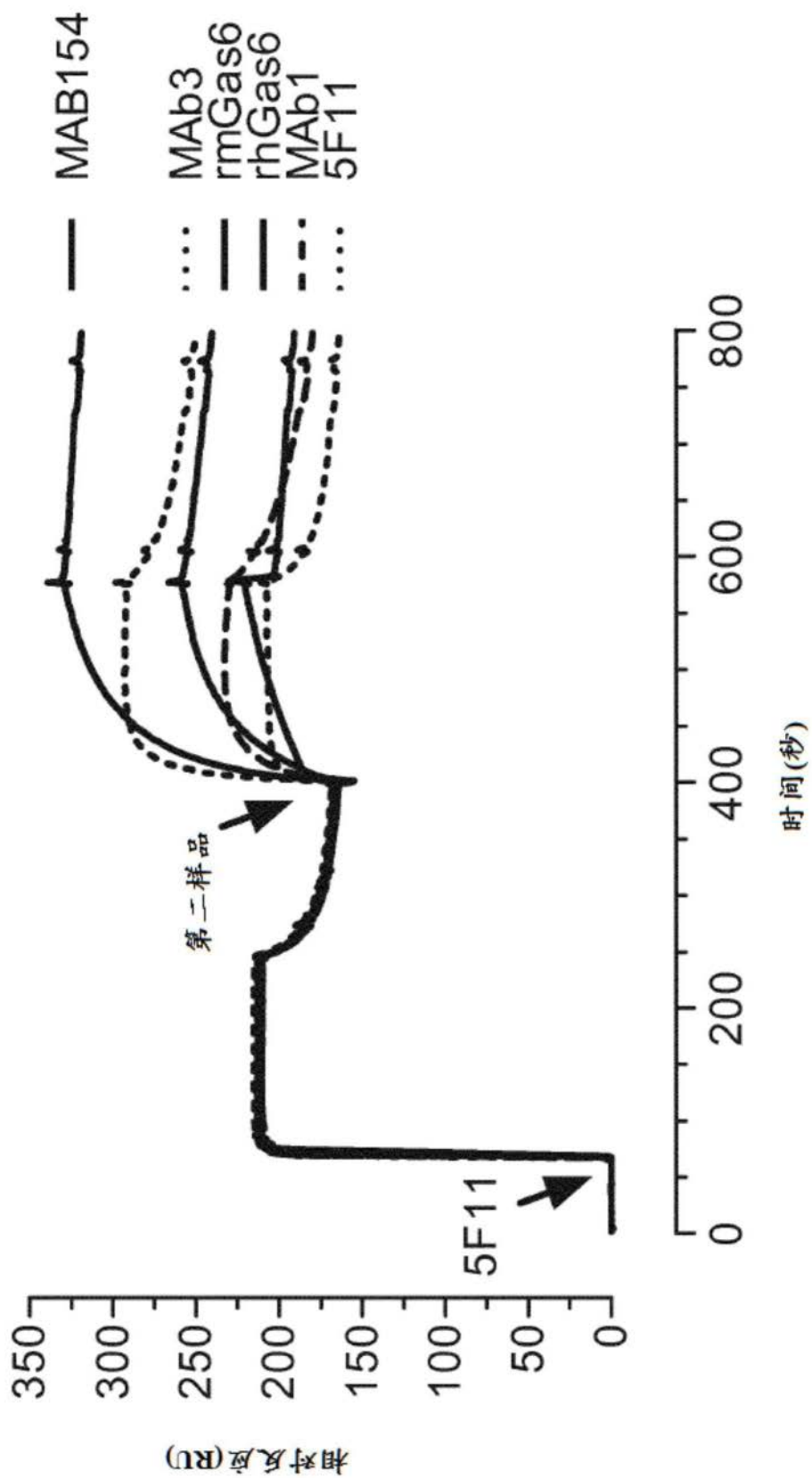


图5

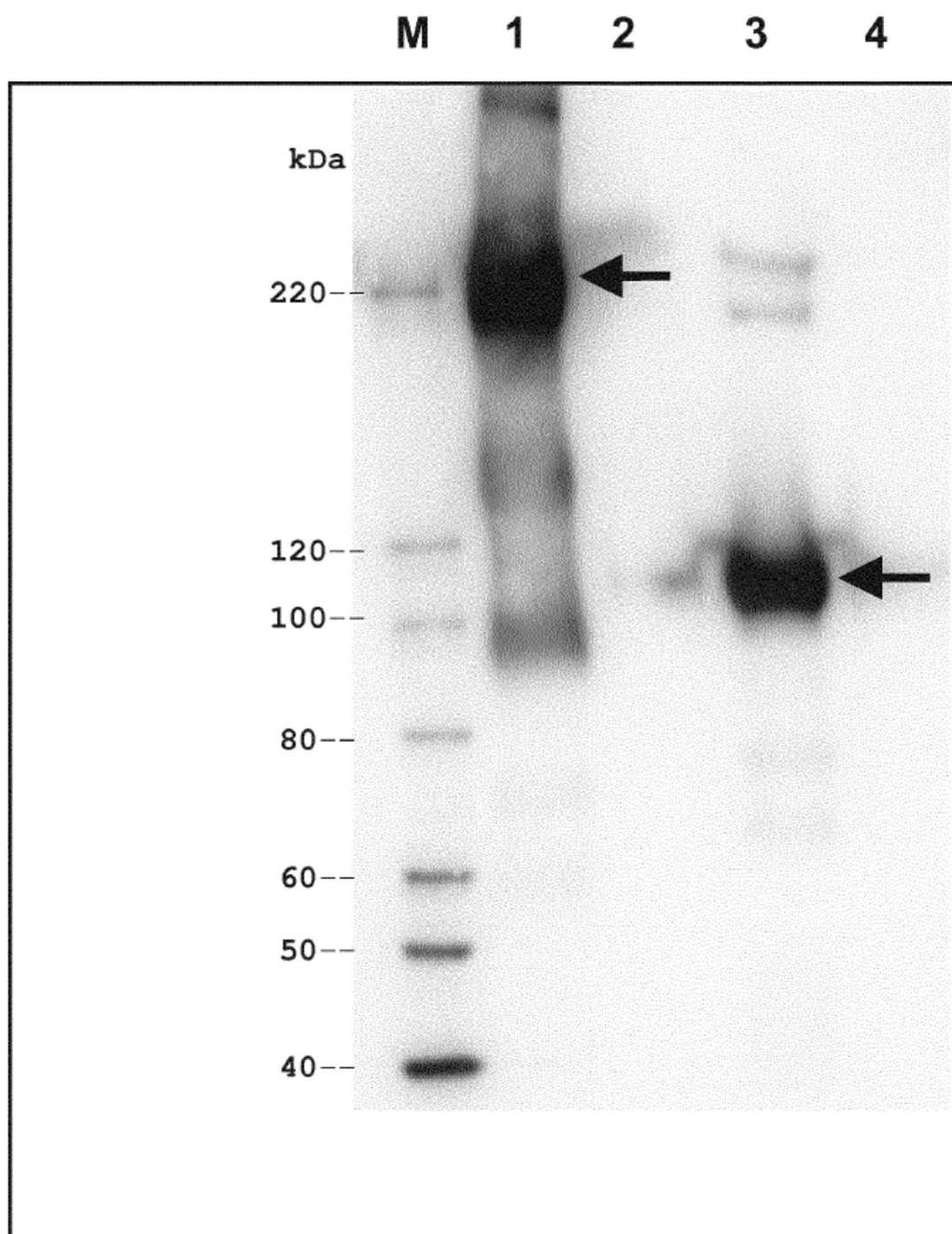


图6

VH4 D8-7

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINY
TPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASPYYYGPFAYWGQGTLVTVSA

Vk3 H4-3

DIVLTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYQQKPGQPKLLIYRASNLEAGF
PTRFSGSGSRDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSREYPRTFGGGKLEVK

图7

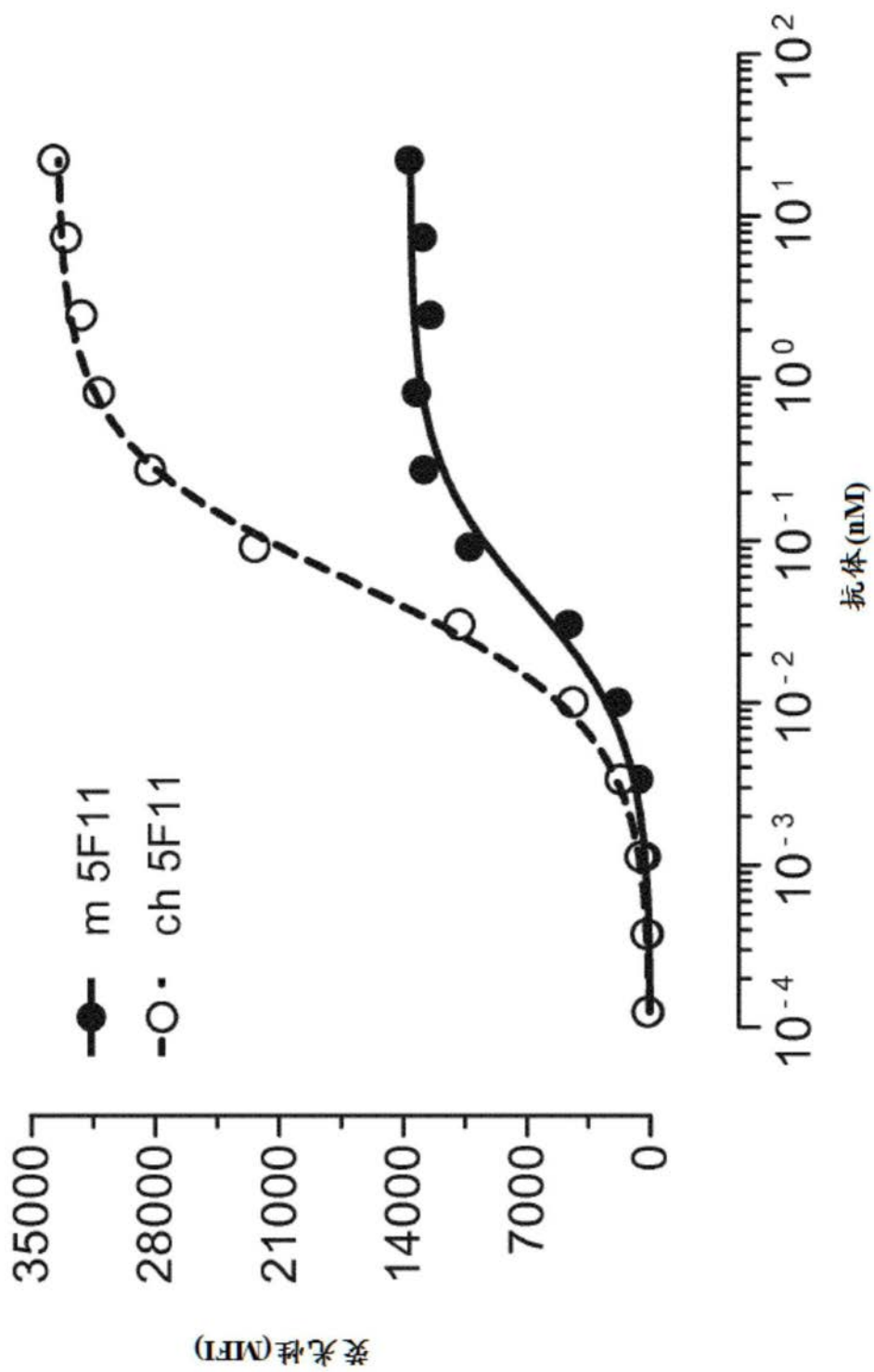


图8

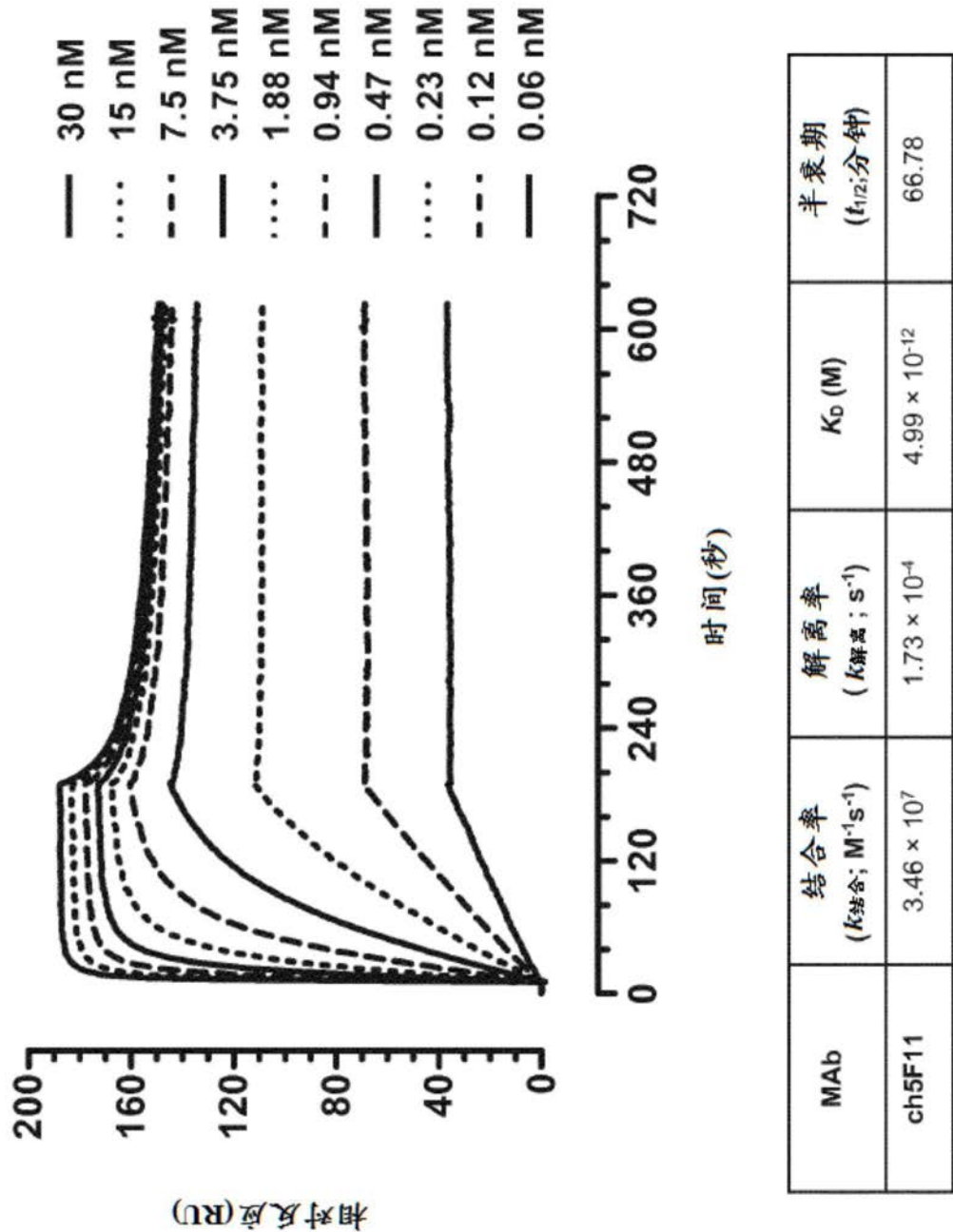


图9

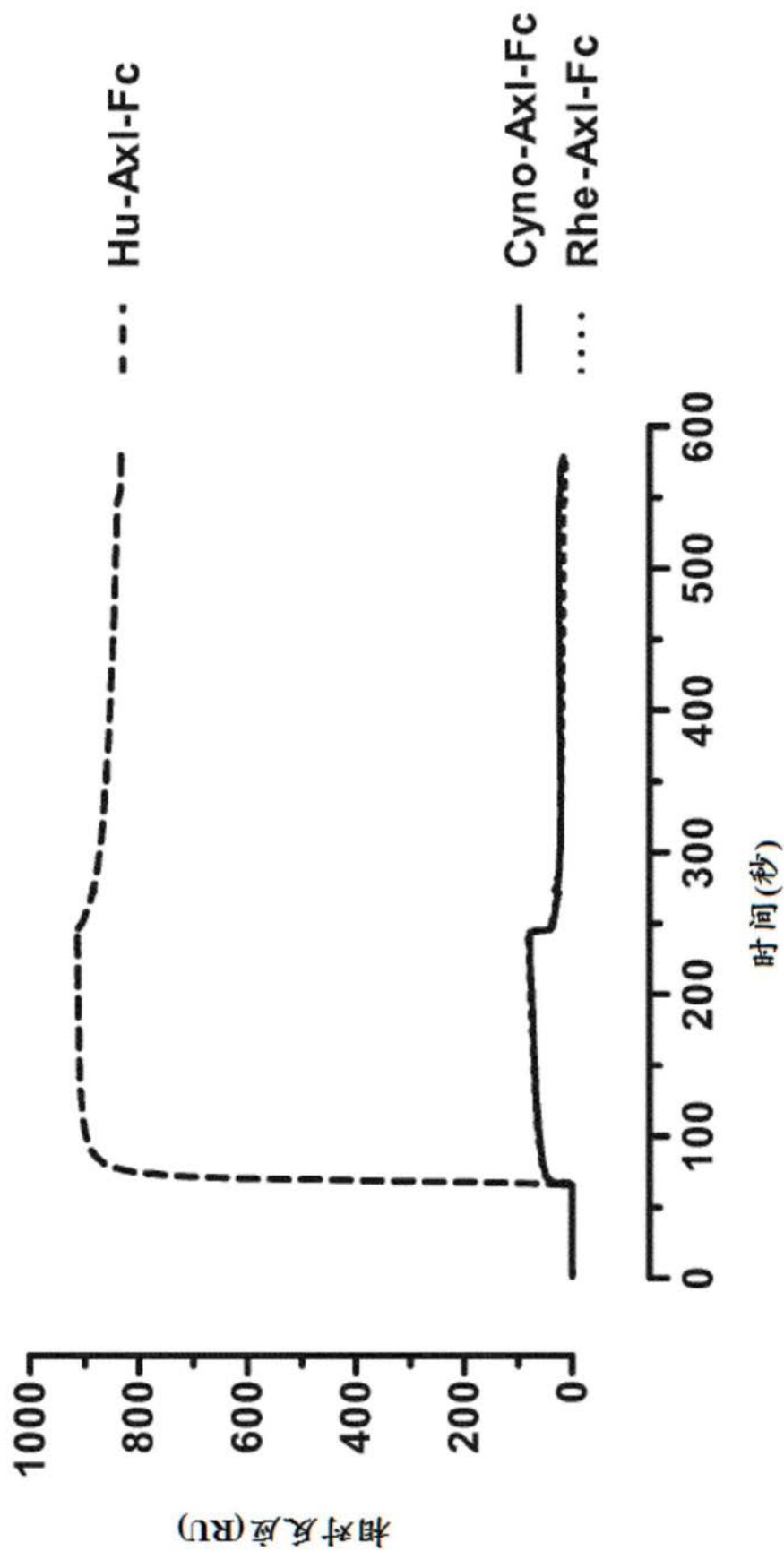


图10

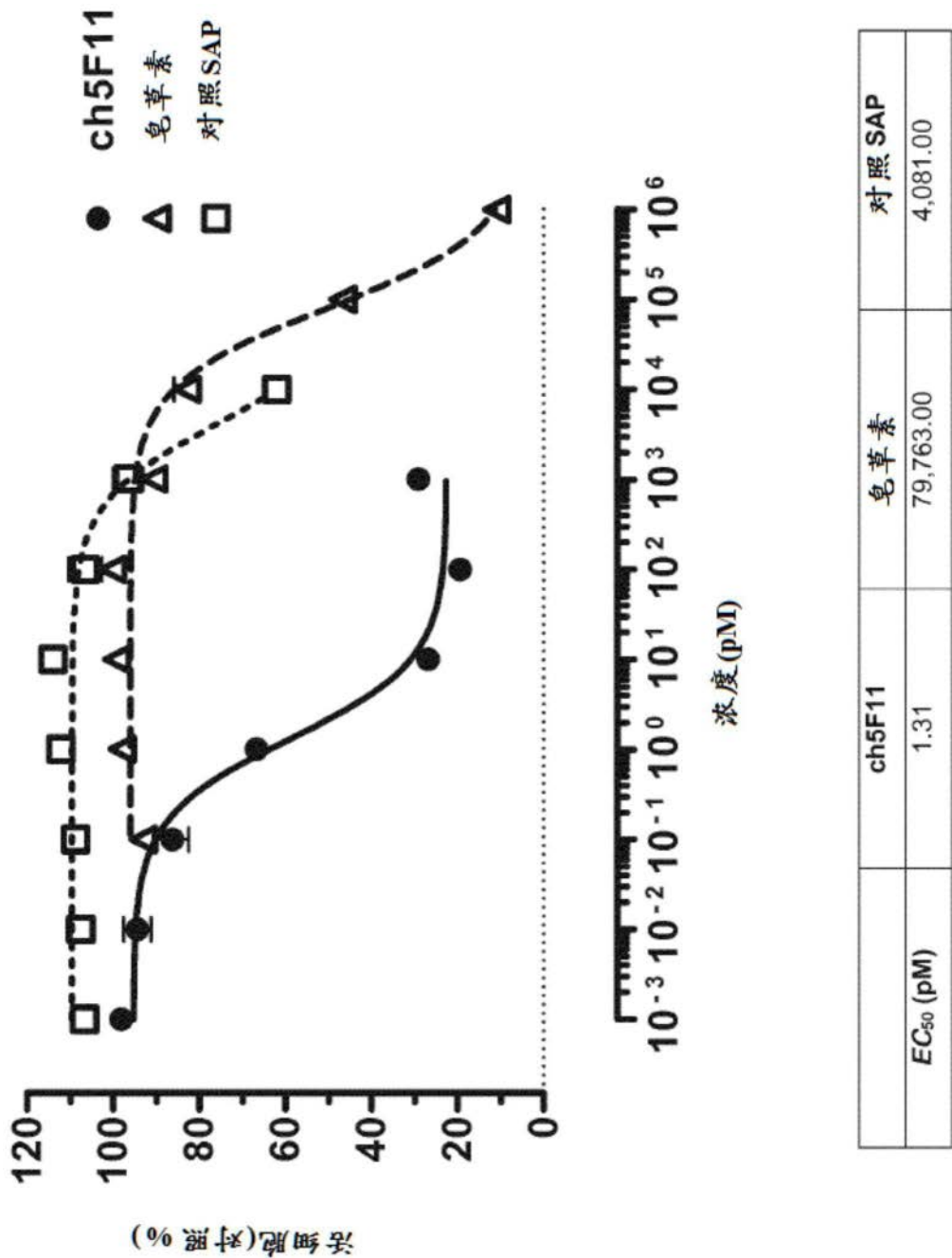


图11