



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106659801 B

(45)授权公告日 2019.12.10

(21)申请号 201580030255.5

(22)申请日 2015.04.27

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106659801 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(30)优先权数据  
61/986,520 2014.04.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.12.07

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2015/027791 2015.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/168019 EN 2015.11.05

(73)专利权人 辉瑞大药厂  
地址 美国纽约州  
专利权人 艾伯维施特姆森特克斯有限责任公司

(72)发明人 M·I·达梅林 P·萨普拉  
A·J·班科维奇 S·J·迪拉

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 韩威威

(51)Int.Cl.

A61K 47/68(2017.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

W0 2013072813 A2,2013.05.23,

CN 103547597 A,2014.01.29,

CA 2854720 A1,2013.05.16,

W0 2007067730 A2,2007.06.14,

W0 2012162482 A1,2012.11.29,

Doronina S.O.等.Enhanced activity of  
monomethylauristatin F through monoclonal  
antibody delivery: effects of linker  
technology on efficacy and toxicity.

《Bioconjug Chem》.2006,第17卷(第1期),

Silvia Gartner等.PTK 7 is a  
transforming gene and prognostic marker  
for breast cancer and nodal metastasis  
involvement.《PLOS ONE》.2014,第9卷(第1期),

审查员 屈小又

权利要求书2页 说明书105页  
序列表33页 附图23页

(54)发明名称

抗-PTK7抗体-药物缀合物

(57)摘要

本发明提供抗-PTK7抗体-药物缀合物和其  
制备和使用方法。



15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述白血病是成人骨髓性白血病(AML)或急性淋巴细胞性白血病(ALL)。

## 抗-PTK7抗体-药物缀合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请主张2014年4月30日提出申请的临时美国申请号 61/986,520的优先权,所述临时申请以其整体通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请经由EFS-Web电子申请且包括.txt格式的电子呈送的序列 表。.txt文件含有标题为“PC072045\_Sequence\_Listing.txt”的序列表,其于2014年4月30日创建且具有57.7KB的大小。该.txt文件中含有的序列表是说明书的一部分且以其整体通过引用并入本文。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及蛋白质酪氨酸激酶7 (PTK7) 抗体和抗体-药物缀合物。本发明进一步涉及使用此类抗体和抗体-药物缀合物用于治疗癌症的 方法。

[0006] 发明背景

[0007] 蛋白质酪氨酸激酶7 (PTK7) (也称为结肠癌激酶4 (CCK4)) 是最初 从正常人黑色素细胞和单独从结肠癌组织克隆的受体酪氨酸激酶。已 在多种肿瘤细胞 (包括膀胱、乳房、结肠直肠、肾和肺癌和黑素瘤) 中 鉴定了高水平的PTK7。还在成人骨髓性白血病 (AML) 和急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 细胞上观察到PTK7表达。

[0008] 在过去十年中,已用作为首要治疗选择的手术、辐射治疗和化学 治疗改善了癌症的治疗。此类治疗在许多患者中可延长存活和/或减轻 症状,但对于许多患者不可能产生治愈。因此,仍迫切需要癌症的额 外治疗选择。

[0009] 为此,本发明提供靶向PTK7阳性癌症的新颖抗体-药物缀合物。公开的抗-PTK7抗体-药物缀合物可对表达PTK7的肿瘤细胞发挥临 床上有用的细胞毒性效应,而不对不表达PTK7的细胞发挥不期望效 应。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供PTK7抗体-药物缀合物和其在PTK7相关的病症的检 测、预防和治疗中的用途。本发明的PTK7抗体-药物缀合物通常具有 下式:Ab-(L-D),其中Ab是结合至PTK7的抗体或其抗原结合片段 或其PTK7-结合片段;且L-D是接头-药物部分,其中L是接头,且 D是药物。

[0012] 公开的抗体-药物缀合物的Ab可以是任何PTK7-结合抗体。在本 发明的一些方面,Ab是嵌合、CDR移植、人源化或重组人抗体或其 PTK7-结合片段。在本发明的一些方面,Ab是内化抗体和/或中和抗 体。

[0013] 本发明还提供PTK7抗体-药物缀合物和其在PTK7相关的病症的 检测、预防和治疗中的用途。本发明的PTK7抗体-药物缀合物通常具 有下式:Ab-(L-D),其中Ab是结合至PTK7的抗体或其抗原结合片 段或其PTK7-结合片段;且L-D是接头-药物部分,其中L是接头, 且D是奥里斯他汀 (auristatin)。

[0014] 在本发明的特定方面,Ab是hu23、hu24或hu58抗体、或与hu23、 hu24或hu58竞争结



合至人PTK7的抗体和/或与hu23、hu24或hu58 抗体结合至相同表位的抗体。例如,Ab可与包含以下的抗体竞争结合 至人PTK7和/或结合相同表位:(a)如SEQ ID NO:1所示的重链可变区和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变区;(b)如SEQ ID NO:25所示的重链可变区和如SEQ ID NO:39所示的轻链可变区;或(c)如SEQ ID NO:49所示的重链可变区和如SEQ ID NO:63所述的轻链可变区。

[0015] 在与hu23竞争结合至人PTK7、和/或与hu23结合至相同表位的 Ab中,可用于制备本发明的PTK7抗体-药物缀合物的代表性Ab包 括包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体,其中至少 一个重链可变区包含三个由SEQ ID NO:3、7和11定义的CDR。额外Ab包括包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体,其中至少一个轻链可变区包含三个定义为SEQ ID NO:17、19和21 的CDR。其它Ab包括包含以下的抗体:(a)包含三个如SEQ ID NO:3、7和11所示的CDR的重链可变区;和(b)包含三个如SEQ ID NO:17、19和21所示的CDR的轻链可变区。

[0016] 在本发明的其他PTK7抗体-药物缀合物中,Ab包含具有与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:15至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区,例如,如SEQ ID NO:1所示的重链可变区和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变区。

[0017] 在与hu24竞争结合至人PTK7和/或与hu24结合至相同表位的 Ab中,可用于制备本发明的PTK7抗体-药物缀合物的代表性Ab包 括包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体,其中至少 一个重链可变区包含三个由SEQ ID NO:27、31和35定义的CDR。额外Ab包括包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体,其中至少一个轻链可变区包含三个定义为SEQ ID NO:41、43和45 的CDR。其它Ab包括包含以下的抗体:(a)包含三个如SEQ ID NO: 27、31和35所示的CDR的重链可变区;和(b)包含三个如SEQ ID NO: 41、43和45所示的CDR的轻链可变区。

[0018] 在本发明的其他PTK7抗体-药物缀合物中,Ab包含具有与SEQ ID NO:25至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:39至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区,例如,如SEQ ID NO:25所示的重链可变区和如SEQ ID NO:39所示的轻链可变区。

[0019] 在与hu58竞争结合至人PTK7和/或与hu58结合至相同表位的 Ab中,可用于制备本发明的PTK7抗体-药物缀合物的代表性Ab包 括包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体,其中至少 一个重链可变区包含三个由SEQ ID NO:51、55和59定义的CDR。额外Ab包括包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体,其中至少一个轻链可变区包含三个定义为SEQ ID NO:65、67和69 的CDR。额外Ab包括包含以下的抗体:(a)包含三个如SEQ ID NO: 51、55和59所示的CDR的重链可变区;和(b)包含三个如SEQ ID NO: 65、67和69所示的CDR的轻链可变区。

[0020] 在本发明的其他PTK7抗体-药物缀合物中,Ab包含具有与SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:63至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区,例如,如SEQ ID NO:49所示的重链可变区和如SEQ ID NO:63所示的轻链可变区。

[0021] 在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物含有包含IgG1重 链恒定区、 $\kappa$ 轻链恒定区、或IgG1重链恒定区和 $\kappa$ 轻链恒定区的Ab。例如,可用于制备本发明的PTK7抗体-药物缀合物的Ab包括包含如 SEQ ID NO:13所述的重链、如SEQ ID NO:23所示的轻链或如SEQ ID NO:13所述的重链和如SEQ ID NO:23所示的轻链的抗体。额外 实例包括包含如SEQ ID

NO:37所述的重链、如SEQ ID NO:47所示的轻链、或如SEQ ID NO:37所述的重链和如SEQ ID NO:47所示的轻链的抗体。又一些实例包括包含如SEQ ID NO:61所示的重链、如SEQ ID NO:71所示的轻链、或如SEQ ID NO:61所示的重链和如SEQ ID NO:71所示的轻链的抗体。

[0022] 在本发明的其他方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物包含具有如SEQ ID NO:1、25或49所示的重链可变区的抗体。在本发明的其他方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物包含具有如SEQ ID NO:15、39或63所示的轻链可变区的抗体。

[0023] 在本发明的特定方面,Ab是hu23、hu24或hu58抗体、或与hu23、hu24或hu58抗体竞争结合至人PTK7的抗体和/或与hu23、hu24或hu58抗体结合至相同表位的抗体。例如,Ab可与包含以下的抗体竞争结合至人PTK7和/或结合至相同表位:(a) SEQ ID NO:13的重链可变区和SEQ ID NO:23的轻链可变区;(b) SEQ ID NO:25的重链可变区和SEQ ID NO:39的轻链可变区;或(c) SEQ ID NO:49的重链可变区和SEQ ID NO:63的轻链可变区。

[0024] 在本发明的另一个方面,Ab是人源化单克隆抗体,例如hu23、hu24或hu58抗体。

[0025] 本文公开的PTK7抗体-药物缀合物中的任一种都可用可裂解或不可裂解的接头制备。在一个方面,可裂解接头可以是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc)。在另一个方面,可裂解接头可以是4-(4'-乙酰基苯氧基)丁酸(AcBut)。在另一个方面,不可裂解接头可以是马来酰亚胺基己酰基(mc)。

[0026] 本文公开的PTK7抗体药物缀合物中的任一种都可用药物奥里斯他汀制备。在一个方面,奥里斯他汀可以是0101 (2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-{[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)。在另一个方面,奥里斯他汀可以是8261 (2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)。

[0027] 本文公开的PTK7抗体药物缀合物中的任一种都可用药物制备,该药物是卡里奇霉素(calicheamicin),包括卡里奇霉素的N乙酰基衍生物,例如N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素和N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰胺(CM)。

[0028] 本文公开的PTK7抗体中的任一种都可通过与接头-药物部分(L-D)缀合用于抗体-药物缀合物。在一个方面,L-D可以是vc0101 (N-[6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-L-缬氨酰基-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-丁-2-基]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-{[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-2-氧代乙基)-18,18,23-三甲基-3,16,19,22-四氧代-21-(丙-2-基)-2,7,10,13,26-五氧杂-4,17,20,23-四氮杂二十七-1-基]苯基}-N~5~-氨基甲酰基-L-鸟氨酰胺)。在另一个方面,L-D可以是mc8261 (N-[6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)。在又一个方面,L-D可以是AcButCM (4-(4'-乙酰基苯氧基)丁酸N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰胺)。本文公开的PTK7抗体-药物缀合物中的任一种都可具有1至8的药物:抗体比率(DAR)。

[0029] 在本发明的特定方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:23所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0030] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:37所示的重链和如SEQ ID NO:47所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0031] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:61所示的重链和如SEQ ID NO:71所述的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0032] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:23所述的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基(mc),且其中药物是8261。

[0033] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:37所示的重链和如SEQ ID NO:47所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基(mc),且其中药物是8261。

[0034] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:61所示的重链和如SEQ ID NO:71所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基(mc),且其中药物是8261。

[0035] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:23所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是AcBut (4 (4' 乙酰基苯氧基) 丁酸) 且其中药物是CM(N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰胺)。

[0036] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:37所示的重链和如SEQ ID NO:47所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是AcBut (4 (4' 乙酰基苯氧基) 丁酸) 且其中药物是CM(N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰胺)。

[0037] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:61所示的重链和如SEQ ID NO:71所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是AcBut (4 (4' 乙酰基苯氧基) 丁酸) 且其中药物是CM(N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰胺)。

[0038] 本发明提供包含多种本文公开的抗体-药物缀合物和任选的药物载体的组合物,其中该组合物具有1至8范围内的平均DAR。在本发明的特定方面,该组合物可具有3至5范围内的平均DAR。在本发明的另一个方面,该组合物具有3至4范围内的平均DAR。在本发明

的 另一个方面,该组合物具有约4的平均DAR。

[0039] 本发明进一步提供包含多种本文公开的抗体-药物缀合物和任选 的药物载体的组合物,其中该组合物具有至少50%抗体-药物缀合物 且具有3至5的DAR。在本发明的另一个方面,该组合物具有至少 60%抗体-药物缀合物且具有3至5的DAR。

[0040] 本发明进一步提供PTK7抗体-药物缀合物,其通常具有下式: Ab-(L-D),其中Ab是结合至PTK7的抗体或其抗原结合片段或其 PTK7-结合片段;且L-D是接头-药物部分,其中L是vc或mc或 AcBut,且D是药物。

[0041] 本发明进一步提供PTK7抗体-药物缀合物,其通常具有下式: Ab-(L-D),其中Ab是结合至PTK7的抗体或其抗原结合片段或其 PTK7-结合片段;且L-D是接头-药物部分,其中L是接头,且D是 奥里斯他汀(例如0101或8261)或CM。

[0042] 本发明进一步提供制备本文公开的PTK7抗体-药物缀合物的方 法。例如,产生抗体-药物缀合物的方法可包括以下步骤:(a) 将接头连 接至药物;(b) 将接头-药物部分缀合至抗体;和(c) 纯化抗体-药物缀合 物。

[0043] 本发明的另一个方面包括本文公开的抗体-药物缀合物的制造方 法、制备方法、合成方法、缀合方法和纯化方法和用于制备、合成和 缀合本文公开的抗体-药物缀合物的中间体。

[0044] 进一步提供包含本文公开的PTK7抗体-药物缀合物和药学上可 接受的载体的药物组合物。

[0045] 在其他方面,提供通过施用治疗有效量的包含本文公开的PTK7 抗体-药物缀合物的组合物而治疗PTK7相关的病症的方法。代表性 PTK7相关的病症包括过度增殖性病症,诸如赘瘤性病症,诸如实体 瘤(例如,乳癌、诸如三阴性乳癌(TNBC)、孕酮-受体阳性乳癌(PR +)、雌激素-受体阳性乳癌(ER+)和双阳性乳癌;卵巢癌;结肠直肠癌;食 道癌;胃癌;黑色素瘤;肉瘤;肾癌;胰腺癌;前列腺癌;肝癌,诸如 肝细胞癌(HCC);和肺癌,诸如非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌 (SCLC)等)和血液恶性肿瘤(例如,白血病,诸如成人骨髓性白血病(AML)或急性淋巴母细胞性白血病(ALL)等)。还提供公开的PTK7抗 体-药物缀合物用于制造用于治疗受试者的PTK7相关的病症的药剂 的用途。还提供PTK7抗体-药物缀合物,其用于治疗PTK7相关的病 症。

[0046] 在其他方面,本发明提供通过施用治疗有效量的包含本文公开的 PTK7抗体-药物缀合物和化学治疗剂的组合物治疗受试者的PTK7相 关的病症的方法。

[0047] 本发明的另一个方面包括用本文公开的抗体-药物缀合物治疗患 者的特征在于PTK7过表达的病症的方法。在其他方面,本发明提供 用本文公开的抗体-药物缀合物治疗患者的特征在于PTK7过表达的 癌症的方法。

[0048] 在还有其他方面,本发明提供减少肿瘤细胞群体中的肿瘤起始细 胞的方法。例如,该方法可包括使肿瘤细胞群体与PTK7抗体-药物缀 合物接触,其中该群体包含肿瘤起始细胞和除肿瘤起始细胞外的肿瘤 细胞;由此降低肿瘤细胞群体中的肿瘤起始细胞的频率。接触步骤可 在体外或体内实施。

[0049] 本发明的另一个方面包括本文公开的化合物和组合物的诊断和治 疗用途。

[0050] 本发明的其他方面包括制品,即试剂盒,其包含本文公开的抗体- 药物缀合物、容器和指示治疗的包装插页或标记。

- [0051] 通过综述整个申请将理解本发明的这些和其他方面。
- [0052] 附图简述
- [0053] 图1提供代表性全长PTK7蛋白质的氨基酸序列 (SEQ ID NO.73)
- [0054] 图2A-B显示, hu24结合与PTK7的细胞表达相关。(A) 用抗-PTK7 和抗GAPDH抗体免疫印迹全细胞裂解物。免疫印迹信号先前已通过 显示在PTK7基因表达由siRNA抑制时的信号损失进行验证。(B) 来自流式细胞术的平均荧光强度值, 其中抗-PTK7 (hu24) 在与免疫印迹 中相同的癌细胞系上。虚线代表在一级抗体是阴性对照抗体而非hu24 时的信号。
- [0055] 图3显示通过免疫组织化学的来自七个PDX模型的组织样品上的 PTK7表达。染色指示PTK7。显示每一模型的代表性显微照片。比例 尺, 100 $\mu$ M。
- [0056] 图4A-C是显示原发性肿瘤中的PTK7 mRNA表达的图。显示 (A) 乳癌; (B) NSCLC癌症和 (C) 卵巢癌。
- [0057] 图5是显示NSCLC患者中较高PTK7 mRNA表达与较差整体存 活率之间的关联的图。
- [0058] 图6是显示健康人和代表8种不同肿瘤类型的癌症患者的血清中 的PTK7蛋白质水平的图。水平线指示每一组的平均值。
- [0059] 图7提供hu24-vc0101的疏水性相互作用色谱 (HIC) 分析。
- [0060] 图8是显示乳房-13 (BR13) 三阴性乳癌 (TNBC) PDX中抗 -PTK7-vc0101 ADC的效力的图。
- [0061] 图9是显示BR13 TNBC PDX中hu24-vc0101和抗-PTK7-mc8261 ADC的效力的数据表。
- [0062] 图10是显示图9的BR13 TNBC PDX中hu24-vc0101和抗 -PTK7-mc8261 ADC的效力的数据的表。
- [0063] 图11是显示乳房-22 (BR22) TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC 的效力的图。
- [0064] 图12是显示BR22 TNBC PDX中hu23-vc0101和抗 -PTK7-mc8261 ADC的效力的数据表。
- [0065] 图13是显示图12的BR22 TNBC PDX中hu23-vc0101和抗 -PTK7-mc8261 ADC的效力的数据的图。
- [0066] 图14是显示乳房-31 (BR31) TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC 的效力的图。
- [0067] 图15是显示乳房-64 (BR64) TNBC PDX中hu24-vc0101 ADC的 效力的图。
- [0068] 图16是显示BR5 TNBC PDX中hu24-vc0101 ADC的效力的图。
- [0069] 图17是显示BR36 PR+TNBC PDX中hu24-vc0101 ADC的效力 的图。
- [0070] 图18A-B是显示两种不同SCLC PDX模型 (A) H1048 PDX模型和 (B) SCLC 95 PDX模型中hu24-vc0101和hu23-AcBut CM的效力的图。
- [0071] 图19A-B是显示两种不同SCLC PDX模型 (A) SCLC 117 PDX模 型和 (B) SCLC 102 PDX模型中hu24-AcButCM的效力的图。
- [0072] 图20是显示肺-135 (LU135) 非小细胞肺癌 (NSCLC) PDX中 hu24-vc0101 ADC的效力的图。
- [0073] 图21是显示肺-176 (LU176) 非小细胞肺癌 (NSCLC) PDX中 hu24-vc0101 ADC的效力的图。
- [0074] 图22显示在用4 $\mu$ g/mL hu24-vc0101 ADC、4 $\mu$ g/mL未缀合hu24 mAb、4 $\mu$ g/mL阴性对

照ADC或0.1nM游离0101奥里斯他汀治疗后 微管结构的显微照片。将H661细胞处理48小时且随后针对抗微管蛋白和DAPI染色以使DNA显现。

[0075] 图23显示hu24-vc0101 ADC对内皮细胞的体外效应。

[0076] 发明详述

[0077] 本发明提供结合至PTK7的抗体-药物缀合物,使用PTK7抗体、接头和药物制备缀合物的方法。本发明的抗体-药物缀合物可用于制备 和制造组合物,诸如药剂,其可用于诊断、预防和/或治疗特征在于 PTK7表达的过度增殖性病征。在本发明的一些方面,所公开抗体-药物缀合物可降低肿瘤起始细胞(TIC)的频率,所述肿瘤起始细胞涵盖肿瘤永存细胞(TPC)和高度增殖性肿瘤祖细胞(TProg)。

[0078] I.PTK7生理学

[0079] 蛋白质酪氨酸激酶(PTK7)(也称为结肠癌激酶4(CCK4))是最初从 正常人黑色素细胞(Lee等人,Oncogene 8(12):3403-3410,1993)和单独 从结肠癌组织(Mossie等人,Oncogene 11(10):2179-2184,1995)克隆的 受体酪氨酸激酶。PTK7基因位于6p21.1-p12.2处。已从睾丸cDNA 克隆人PTK7的五种剪接同种型(Jung,等人,Biochim Biophys Acta 1579,2002)。同种型相对于彼此的相对丰度在睾丸和肝细胞瘤或结肠 癌系之间不同,但這些同种型的功能意义(如果有的话)未知。生物信息分析已表明,小鼠可从替代剪接的mRNA表达可溶性PTK7同种型(Forrest,Taylor等人,Genome Biol 7,2006)。

[0080] 全长PTK7蛋白质是I型跨膜蛋白质,其具有674氨基酸细胞外 结构域(ECD)、随后为短TM跨越部分和345氨基酸细胞质结构域。PTK7的代表性全长氨基酸序列显示于图1中(SEQ ID NO.73)。代表性PTK7同种型的氨基酸序列鉴于GenBank登录号EAX04154.1(同种型a)、EAX04155.1(同种型b)、EAX04156.1(同种型c)、EAX04157.1(同种型d)、EAX04158.1(同种型e)、EAX04159.1(同种型f)和 EAX04160.1(同种型g)。所有同种型都编码相同的细胞内结构域。人 PTK7的代表性同种型(即转录变体PTK7-1)的完整核酸序列具有 GenBank登录号NM\_002821。

[0081] 成熟全长PTK7 ECD包含七个免疫球蛋白样结构域,而各种剪接 变体编码其ECD结构不同的PTK7同种型。所有同种型都含有与酪氨酸激酶的一般类别中发现的结构域具有实质同源性的细胞质结构域。然而,PTK7缺乏可检测的酪氨酸激酶活性,且因此属伪激酶的 亚家族,其中各种保守激酶亚结构域的几种氨基酸变化导致ATP的结合受损(Boudeau等人,Trends Cell Biol.16,2006)。具体地,亚结构域 I和VII中的关键残基在PTK7中改变,使得与ATP的不可转移磷酸盐的直接相互作用、以及桥接这些磷酸盐的Mg<sup>2+</sup>辅因子的整合可受损。

[0082] PTK7功能的生物重要性可从水螅属(Hydra)至果蝇属(Drosophila)至鸡和人的保守直向同源物(其各自通过序列分析预测无 激酶活性)的存在来推断。基于与螺旋-螺旋缔合的倾向相关的特定TM 结构域基序,已表明TM结构域可介导PTK7二聚化。预期PTK7伪激酶结构域自身不直接传递信号,但其可作为信号传导途径中的其他 分子的支架相互作用,或可招募其他酪氨酸激酶。已显示PTK7可在 细胞粘附、细胞迁移、细胞极性、增殖、肌动蛋白细胞骨架组织和细胞凋亡中发挥功能以调节胚胎发生、上皮组织构造、神经元管闭合、神经元脊形成和轴突导向(Peradziryi,H.等人Arch Biochem Biophys. 524,2012)。

[0083] 据报道表达PTK7的正常组织和细胞包括肺、甲状腺、卵巢、CD4<sup>+</sup> 最近胸腺移出的T

细胞和正常骨髓性祖细胞和CD34+CD38-骨髓细胞。关于癌性组织,也在结肠癌细胞、成人骨髓性白血病(AML)样品、CD34-pre-TALL细胞和胃癌中发现PTK7表达。在含有染色体6p21缺失的某些乳癌中可丢失PTK7,尽管表达在乳癌细胞系中可变。PTK7还在肺腺癌中表达。骨肉瘤中的6p12-p21区的扩增的精细定位已显示基因拷贝数增加不一定导致PTK7过表达,如通过qRT-PCR所测定。

[0084] PTK7的一种或多种配体是未知的,尽管PTK7与多种生物信号传导途径和发育过程相关。例如,PTK7在非典型(也称为Wnt/平面细胞极性信号传导)和典型Wnt信号传导途径中充当共受体。在非典型Wnt途径中,PTK7通过与RACK1直接相互作用和将DSH招募至膜定位受体复合物中而活化下游信号传导。PTK7经由竞争膜表面处的卷曲受体结合而对典型Wnt途径信号转导发挥抑制效应。PTK7基因表达由Cdx调节,而蛋白质稳定性由膜相关蛋白醇降解调节。PTK7靶向由金属蛋白酶MMP14和Adam17脱落的蛋白水解降解和细胞外结构域,导致增强的细胞增殖、迁移和促进的癌细胞侵袭(Peradziryi等人Arch Biochem Biophys.524,2012)。可溶性PTK7(sPTK7)用于显示PTK7在VEGF诱导的血管生成、以及体外管形成、人内皮细胞的迁移和侵袭中的作用。

[0085] 在癌性组织内,除其调节Wnt途径的潜能外,PTK似乎在HCT116结肠癌系中传递促增殖和抗细胞凋亡信号,其表型可通过PTK7的RNAi介导的敲低逆转(Meng,等人,2010, PLoS One 5(11):e14018)。PTK7抗细胞凋亡信号对成人骨髓性白血病(AML)胚细胞中的蒽环霉素介导的细胞杀死传递抗性,其可使用可溶性PTK7-Fc蛋白质逆转(Prebet等人,2010,Blood 116(13):2315-23)。在使用结合PTK7且随后内化的适配体将道诺霉素靶向递送至培养物中的T-ALL细胞的策略中利用特定癌细胞的PTK7过表达。

#### [0086] II.PTK7抗体-药物缀合物

[0087] 本发明提供式Ab-(L-D)的抗体-药物缀合物,其中(a)Ab是结合至PTK7的抗体或其抗原结合片段,且(b)L-D是接头-药物部分,其中L是接头,且D是药物。还提供制备和制造此类抗体-药物缀合物的方法和其在临床应用中的用途。“抗体-药物缀合物”或“ADC”是指结合至PTK7且缀合至药物(诸如细胞毒性剂、细胞生长抑制剂和/或治疗剂,如下文进一步描述)的抗体或其抗原结合片段,包括抗体衍生物。例如,细胞毒性剂可连接或缀合至如本文所述的抗-PTK7抗体用于将细胞毒性剂靶向局部递送至肿瘤(例如,表达PTK7的肿瘤)。

[0088] 如本文所使用的术语“PTK7”包括变体、同种型、同系物、直向同源物和旁向同源物。PTK7在本领域中也称为结肠癌激酶4(CCK4或CCK-4)。出于本申请的目的,应理解,术语“PTK7”和“CCK4”可互换使用且包括人PTK7或人CCK4的剪接变体、同种型、物种直向同源物和同系物。应进一步理解,所述术语也可指含有PTK7抗体可特异性结合的表位的PTK7或CCK4的天然或变体形式的任何衍生物或片段。

[0089] 在本发明的一些方面,抗体和抗体-药物缀合物与来自除人外的物种的PTK7(诸如小鼠、大鼠或灵长类动物的PTK7)以及不同形式的PTK7(例如,糖基化PTK7)交叉反应。在其他方面,抗体和抗体-药物缀合物可对人PTK7具有完全特异性且可不表现出物种或其他类型的交叉反应性。除非上下文另有规定,否则如本文所使用的术语PTK7是指天然存在的人PTK7。因此,“PTK7抗体”或“抗-PTK7抗体”或其他类似名称意指与人PTK7或其片段或衍生物缔合、结合或反应的任何抗体(如本文中所定义)。此外,“PTK7抗体-药物缀合物”或

“抗-PTK7抗体-药物缀合物”意指与人PTK7或其片段或衍生物缔合、结合或反应的任何抗体-药物缀合物或ADC(如本文中所定义)。

[0090] “接头(L)”描述抗体与药物的直接或间接连接。接头附接至抗体可以多种方式完成,诸如经由表面赖氨酸、还原性偶联至氧化碳水化合物、通过还原链间二硫键释放的半胱氨酸残基、在特定位置处改造的反应性半胱氨酸残基、和含有酰基供体谷氨酰胺的标签或通过在转谷氨酰胺酶和胺存在下多肽改造使得具有反应性的内源性谷氨酰胺。多种ADC连接系统是本领域已知的,包括基于胺-、二硫化物-和肽-的连接。

[0091] “药物(D)”是任何具有生物或可检测活性的物质,例如治疗剂、可检测标记、结合剂等和在体内代谢成活性剂的前药。术语药物、有效载荷和化合物可互换使用。

[0092] “L-D”是从药物(D)连接至接头(L)导致产生的接头-药物部分。

[0093] 除非本文另有指示,否则结合本发明使用的额外科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。此外,除非上下文另有需求,否则单数术语应包括复数形式且复数术语应包括单数形式。通常,结合本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学和杂交使用的术语和其技术是本领域众所周知且常用的那些。

[0094] 在本发明的特定方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:1所示的重链可变区和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0095] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:13所示的重链和如SEQ ID NO:23所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0096] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:25所示的重链可变区和如SEQ ID NO:39所示的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0097] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:37所示的重链和如SEQ ID NO:47所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0098] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:49所述的重链可变区和如SEQ ID NO:63所述的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。

[0099] 在本发明的另一个方面,式Ab-(L-D)的PTK7抗体-药物缀合物包含(a)包含如SEQ ID NO:61所示的重链和如SEQ ID NO:71所示的轻链的抗体或其抗原结合片段,Ab;和(b)接头-药物部分,L-D,其中L是接头,且D是药物,其中接头是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc),且其中药物是0101。



[0100] 指示每个抗体缀合的药物分子的数目的DAR (药物:抗体比率)或 载药量可以是1至8。多种抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂 的特征可在于平均DAR。DAR和平均DAR可通过各种常规方式 (诸如UV光谱学、质谱、ELISA测定、放射性测量方法、疏水性相互作用 色谱(HIC)、电泳和HPLC)测定。

[0101] 在本发明的特定方面,纯化的抗-PTK7ADC可不存在未缀合的抗 体(游离抗体)。在本发明的其他方面,纯化的抗-PTK7ADC可以是单 体ADC,且不存在聚集物和二聚体。在本发明的其他方面,纯化的抗 -PTK7ADC可不存在游离药物。在本发明的其他方面,纯化的抗 -PTK7ADC可以是单体ADC且不存在游离药物。

#### [0102] IIA.PTK7抗体

[0103] 对于本发明的PTK7抗体-药物缀合物的制备,抗体或其抗原结合 片段可以是特异性结合PTK7的任何抗体或其抗原结合片段。本发明 抗体进一步公开并表征于PCT国际公开号W0 2012/112943中,其以 其整体通过引用并入本文。更具体地,其中公开的PTK7抗体(包括完 整重链和轻链、其可变区和其CDR)的序列通过引用并入本文。对于 在PTK7抗体-药物缀合物的制备中的使用,抗体或其抗原结合片段可 进行分离、纯化或衍生化。

[0104] “抗体”或“Ab”是能够经由位于免疫球蛋白分子的可变区中的至 少一个抗原识别位点识别并结合至特异性目标或抗原(诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等)的免疫球蛋白分子。如本文所使用的术 语“抗体”可涵盖任何类型的抗体,包括,但不限于,单克隆抗体、多 克隆抗体、保留特异性结合给定抗原(例如PTK7)的能力的完整抗体的 “抗原结合片段”(或部分)(诸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、Fc等)、分离的互补决定区(CDR)、双特异性抗体、异源缀合物抗体、其突变 体、具有抗体或其抗原结合片段(例如,结构域抗体)的融合蛋白质、单链(ScFv)和单一结构域抗体(例如,鲨鱼和骆驼科动物抗体)、大抗体、微小 抗体、细胞内抗体、二价抗体、三价抗体、四价抗体、v-NAR和 双-scFv(参见,例如,Holliger和Hudson,2005,Nature Biotechnology 23(9):1126-1136)、人源化抗体、嵌合抗体和包括所需特异性的抗原识 别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型,包括抗体的糖基化变 体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体可以是鼠、大鼠、人或任何其他来源(包括嵌合或人源化抗体)。在本发明的一些方面,公开的PTK7抗体-药物缀合物的抗体或其抗原结合片段是嵌合、人源 化或重组人抗体或其PTK7-结合片段。

[0105] “特异性结合”或“优先结合”(在本文中可互换使用)至目标或抗原 (例如,PTK7蛋白质)的抗体、抗体-药物缀合物或多肽是本领域充分 理解的术语,且测定此类特异性或优先结合的方法也是本领域众所周 知的。如果分子与特定细胞或物质比其与替代细胞或物质更频繁、更 快速、以更大持续时间和/或以更大亲和力反应或缔合,则其被称为表 现出“特异性结合”或“优先结合”。如果抗体比其结合至其他物质以更 大亲和力、亲合力、更容易和/或以更大持续时间结合,则其“特异性 结合”或“优先结合”至目标或抗原。例如,特异性或优先结合至PTK7 表位的抗体是比其结合至其他PTK7表位或非PTK7表位以更大亲和 力、亲合力、更容易和/或以更大持续时间结合该表位的抗体。

[0106] 如本文所使用的术语“结合亲和力”或“K<sub>D</sub>”意指特定抗原-抗体相 互作用的平衡解离常数。K<sub>D</sub>是解离速率(rate of dissociation,也称为“解离速率”(“off-rate”)或 “K<sub>d</sub>”)与缔合速率(rate of association或 “on-rate”)或“K<sub>a</sub>”的比率。因此,K<sub>D</sub>等于K<sub>d</sub>/K<sub>a</sub>且表示为摩尔浓度(M)。结果就是,K<sub>D</sub>越小,则结合亲和力越强。因此,与1nM的K<sub>D</sub>相比,1μM的

K<sub>D</sub>指示弱结合亲和力。可使用本领域充分确立的方法测定抗体的K<sub>D</sub>值。一种测定抗体的K<sub>D</sub>的方法是通过使用表面等离子共振、通常使用生物传感器系统(诸如**BIACORE**<sup>®</sup>系统)。

[0107] 公开的PTK7抗体-药物缀合物的特异性结合是指在具有多种不同抗原的非均相样品中抗体-药物缀合物优先结合至人PTK7抗原。通常,如果抗体-药物缀合物或其抗体部分(Ab)的结合亲和力为至少约 $10^{-7}$ M或更高(诸如至少约 $10^{-8}$ M或更高,包括至少约 $10^{-9}$ M或更高、至少约 $10^{-10}$ M或更高、至少约 $10^{-11}$ M或更高或至少约 $10^{-12}$ M或更高),则发生特异性结合。例如,本发明的抗体-药物缀合物或其抗体部分(Ab)与人PTK7抗原的特异性结合包括以至少约 $1 \times 10^{-7}$ M至约 $1 \times 10^{-12}$ M范围内、诸如在约 $1 \times 10^{-8}$ M至约 $1 \times 10^{-12}$ M的范围内、或在约 $1 \times 10^{-8}$ M至约 $1 \times 10^{-11}$ M的范围内、或在约 $1 \times 10^{-8}$ M至约 $1 \times 10^{-10}$ M的范围内、或在约 $1 \times 10^{-9}$ M至约 $1 \times 10^{-10}$ M的范围内结合。特异性结合也是指在向受试者施用抗体后,PTK7抗体-药物缀合物或其抗体部分(Ab)选择性靶向表达PTK7的细胞。

[0108] 还应理解,特异性或优先结合至第一目标的抗体(或部分或表位)可或可不特异性或优先结合至第二目标。因此,“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管其可包括)排他性结合。通常,但不一定,在提及结合时意指优先结合。

[0109] 如本文所使用的“表位”包括能够特异性结合至免疫球蛋白或T细胞受体或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团(诸如,氨基酸或碳水化合物或糖侧链)组成,且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。表位可以是“线性”或“构象”的。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(诸如抗体)之间的所有相互作用点都沿蛋白质的主要氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用点包括蛋白质上彼此分离的氨基酸残基。一旦测定抗原上的期望表位,就可(例如)使用本发明中所述的技术生成针对该表位的抗体。或者,在发现过程期间,抗体的生成和表征可阐明关于期望表位的信息。根据该信息,则可竞争性筛选结合至相同表位的抗体。实现这一点的方法是进行交叉竞争研究以发现彼此竞争性结合的抗体,即抗体竞争结合至抗原。基于抗体的交叉竞争的“分拣(binining)”抗体的高通量方法描述于PCT国际公开号WO 03/48731中。如本文所使用的术语“分拣”是指基于抗体的抗原结合特征和与彼此的竞争将抗体分组的方法。

[0110] 如本文所使用,“分离抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合PTK7的分离抗体基本上不含特异性结合除PTK7外的抗原的抗体)。此外,分离抗体可基本上不含其他细胞材料和/或化学品。然而,特异性结合PTK7的分离抗体可与来自其他物种(即直向同源物)的其他抗原(诸如PTK7分子)或与PTK7的多种同种型具有交叉反应性。

[0111] 在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物包括与具有以下抗体或其抗原结合片段竞争结合至人PTK7和/或结合相同表位的抗体:(a)如SEQ ID NO:1所述的重链可变区和如SEQ ID NO:15所示的轻链可变区;或(c)如SEQ ID NO:25所示的重链可变区和如SEQ ID NO:39所示的轻链可变区;或(c)如SEQ ID NO:49所示的重链可变区和如SEQ ID NO:63所示的轻链可变区。

[0112] 如本文关于抗体使用的术语“竞争”意指第一抗体或其抗原结合片段以足够类似于第二抗体或其抗原结合片段的结合的方式结合至表位,使得与在第二抗体不存在下第

一抗体的结合相比,在第二抗体存在下第一抗体与其同源表位的结合的结果可检测地降低。在第一抗体存在下第二抗体与其表位的结合也可检测地降低的替代方案可,但不必,如此。即,第一抗体可抑制第二抗体与其表位的结合,而第二抗体不抑制第一抗体与其分别表位的结合。然而,如果每一抗体可检测地抑制另一抗体与其同源表位或配体的结合(无论抑制至相同、更大或更小水平),则该抗体被称为与彼此“交叉竞争”结合其分别表位。本发明涵盖竞争和交叉竞争抗体两者。无论此类竞争或交叉竞争发生的机制(例如,立体阻碍、构象变化或结合至共同表位或其部分),技术人员应理解,基于本文提供的技术,涵盖此类竞争和/或交叉竞争抗体且其可用于本文公开的方法。

[0113] 天然或自然存在的抗体和天然免疫球蛋白通常是约150,000道尔顿的异四倍体糖蛋白,其由两条相同轻(L)链和两条相同重(H)链构成。每一轻链由一个共价二硫键连接至重链,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间不同。每一重链和轻链也具有规则隔开的链内二硫键。每一重链在一端均具有可变结构域(VH),随后为多个恒定结构域。每一轻链在一端均具有可变结构域(VL)且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域比对,且轻链可变结构域与重链可变结构域比对。特定氨基酸残基据信在轻链和重链可变结构域之间形成界面。术语“可变”是指可变结构域的某些部分在抗体间序列差异极大的事实。

[0114] 抗体和上述抗体结构域可描述为“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”,即任何长度、优选相对短(例如,10-100个氨基酸)的氨基酸的链。该链可以是直链或支链的,其可包含修饰氨基酸,和/或可间插非氨基酸。应进一步理解,多肽可以作为单链或相关链存在。氨基酸在本文中可由其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB Biochemical推荐的一字母符号提及。术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”还涵盖天然或通过干预修饰的氨基酸链;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰,诸如与标记组分缀合。该定义内还包括,例如,含有一种或多种氨基酸类似物(例如,包括非天然氨基酸等)的多肽、以及本领域已知的其他修饰。氨基酸修饰可通过本领域已知的任何方法进行且许多此类方法是技术人员众所周知且常见的。例如,但不限于,可使用任何众所周知的基于PCR的技术完成氨基酸取代、缺失和插入。氨基酸取代可通过定点诱变进行(例如,参见 Zoller和Smith,1982,Nucl. Acids Res. 10:6487-6500;和Kunkel,1985,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488)。

[0115] 抗体的“恒定区”是指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。嵌合和人源化PTK7抗体的恒定区可衍生自IgA、IgD、IgE、IgG、IgM和其同种型(例如,IgG的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型)以及其亚类和突变版本中任一种的恒定区。根据抗体重链的恒定区的抗体氨基酸序列,可将免疫球蛋白归类为不同种类。存在5大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且这些种类中的几种可进一步分成亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同种类的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同种类的免疫球蛋白的亚单元结构和三维构型是众所周知的。

[0116] 恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应物功能,诸如Fc受体(FcR)结合、使抗体参与抗体依赖性细胞毒性、调理作用、补体依赖性细胞毒性的起始和肥大细胞脱粒。如本领域所知,术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可变化,但通常将

人IgG重链Fc区定义为从Cys226位处的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基末端。Fc区中残基的编号如Kabat中的EU索引。Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991。免疫球蛋白的Fc区通常具有两个恒定区, CH2和CH3。

[0117] 如本领域所使用, “Fc受体”和“FcR”描述结合至抗体的Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外, 优选的FcR是结合IgG抗体的FcR( $\gamma$ 受体)且包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII亚类的受体, 包括这些受体的等位基因变体和替代剪接形式。Fc $\gamma$ RII受体包括Fc $\gamma$ RIIA(“活化受体”)和Fc $\gamma$ RIIB(“抑制受体”), 两者均具有类似氨基酸序列, 其主要在其胞质结构域中不同。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92, 1991; Capel等人, *Immunomethods*, 4:25-34, 1994; 和de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41, 1995。“FcR”还包括负责将母体IgG转移至胎儿中的新生受体FcRn (Guyer 等人, *J. Immunol.*, 117:587-593 (1976); 和Kim等人, *European J. Immunol.*, 24:2429-2434 (1994))。

[0118] 先前已报道, 抗体重链的CH2或CH3结构域的表面上、或轻链的恒定结构域上据推测存在或以其他方式可及的某些残基适于用(例如)半胱氨酸取代天然存在的野生型氨基酸, 且因此可用于改造能够缀合至各种试剂的位点。

[0119] 如术语“改造的Fc多肽”、“改造的Fc区”和“改造的Fc”在本文中可互换使用, 意指包含至少一个突变(例如, 引入缀合位点的氨基酸取代)的Fc多肽或其部分。突变在该位置处引入半胱氨酸代替天然存在的氨基酸残基, 其中突变产生反应性位点(例如, 反应性巯基)用于使部分缀合至Fc。

[0120] 如本文所使用的术语“含有酰基供体谷氨酰胺的标签”或“谷氨酰胺标签”是指含有一个或多个充当转谷氨酰胺酶受体的Gln残基的多肽或蛋白质。

[0121] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。如本领域所知, 重链和轻链的可变区各自由四个由三个互补决定区(CDR, 也称为超变区)连接的框架区(FR)组成。每一链中的CDR通过FR保持紧密靠近在一起, 且与来自另一链的CDR一起促进形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种测定CDR的技术: (1)基于交叉物种序列可变性的方法(即, Kabat等人 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (第5版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); 和(2)基于抗原-抗体复合物的结晶学研究的方法 (Al-Lazikani等人, *J. Molec. Biol.* 273:927-948 (1997))。如本文所使用, CDR可是指通过任一方法或通过两种方法的组合定义的CDR。

[0122] 可变结构域的CDR是根据Kabat、Chothia、Kabat和Chothia 两者的累积、VBASE2、AbM、接触和/或构象定义或本领域众所周知的任一CDR测定方法的定义鉴定的可变区内的氨基酸残基。抗体CDR可鉴定为最初由Kabat等人定义的超变区。参见, 例如, Kabat 等人, 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, NIH, Washington D.C.。CDR的位置也可鉴定为最初由Chothia和其他人定义的结构环结构。参见, 例如, Chothia 等人, *Nature* 342:877-883, (1989)。CDR位置也可衍生自VBASE2数据库的分析。(参见, 例如, Retter等人, 2005, *Nucleic Acids Res.* 33(Database Issue):D671-D674)。

[0123] CDR鉴定的其他方法包括“AbM定义”, 其为Kabat和Chothia 之间的折衷且使用

Oxford Molecular's AbM抗体建模软件(现为 **ACCELRYs**<sup>®</sup>)或基于抗原接触中观察的CDR的“接触定义”衍生,如 MacCallum等人,J.Mol.Biol.,262:732-745,(1996)中所述。在另一方法(在本文中称作CDR的“构象定义”)中,CDR的位置可鉴定为对抗原结合作出焓贡献的残基。参见,例如,Makabe等人,Journal of Biological Chemistry,283:1156-1166,2008。还有其他CDR边界定义可不严格地遵循上述方法之一,但将与Kabat CDR的至少一部分重叠,尽管其可根据特定残基或残基组或甚至整个CDR不显著地影响抗原结合的预测或实验发现来缩短或延长。如本文所使用,CDR可是指通过本领域已知的任一方法(包括方法的组合)定义的CDR。如本文所使用的方法可利用根据这些方法中的任一种定义的CDR。对于本文所述PTK7抗体-药物缀合物,CDR可根据Kabat、Chothia、延伸、VBASE2、AbM、接触和/或构象定义中的任一种定义。

[0124] 在本发明的其他方面,PTK7抗体或其抗原结合片段包括抗体的一个或多个CDR(诸如1、2、3、4、5或所有6个CDR)。

[0125] 对于本发明,下表1中所述的hu23、hu24和hu58的CDR(SEQ ID NO:1-72)使用Kabat和Chothia衍生。如PCT国际公开号WO 2012/112943(其通过引用并入本文)的图6中所述的CDR衍生自VBASE2数据库的分析。因此,具有由所有此类命名法定义的CDR的抗体明确包括于本发明的范围内。更广泛地,术语“可变区CDR氨基酸残基”包括如通过使用上述任何基于序列或结构的方法鉴定的CDR中的氨基酸。

[0126] 在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物包括具有hu23抗体的CDR的抗体或其抗原结合片段。例如,PTK7抗体-药物缀合物可包括抗体或其抗原结合片段,其包括至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区,其中至少一个重链可变区具有三个如SEQ ID NO:3、7和11所示的CDR。在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个轻链可变区具有三个如SEQ ID NO:17、19和21所示的CDR。本发明的PTK7抗体-药物缀合物也可包括抗体或其抗原结合片段,其包括(a)具有三个如SEQ ID NO:3、7和11所示的CDR的重链可变区;和(b)具有三个如SEQ ID NO:17、19和21所示的CDR的轻链可变区。

[0127] 在本发明的还有其它方面,PTK7抗体-药物缀合物包括抗体或其抗原结合片段,其具有一个或多个根据Chothia定义或衍生自VBASE2数据库的分析的hu23 CDR。例如,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个重链可变区包括三个由Chothia定义的hu23 CDR(参见表1)或三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu23 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)。作为另一个实例,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个轻链可变区包括三个由Chothia定义的hu23 CDR(参见表1)或三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu23 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)。在本发明的一些方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括具有以下抗体或其抗原结合片段:(a)具有三个根据Chothia定义的hu23 CDR的重链可变区(参见表1);和(b)具有三个根据Chothia定义的hu23 CDR(参见表1)的轻链可变区。在本发明的一些方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括具有以下抗体或其抗原结合片段:(a)包括三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu23 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)的重链可变区;和(b)包括三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu23 CDR(参见PCT

国际公开号WO 2012/112943)的轻链可变区。

[0128] 在本发明的其他方面,PTK7抗体-药物缀合物包括具有hu24抗体的CDR的抗体或其抗原结合片段。例如,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个重链可变区包括三个如SEQ ID NO:27、31和35所示的CDR。在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个轻链可变区包括三个如SEQ ID NO:41、43和45所示的CDR。本发明的PTK7抗体-药物缀合物也可包括(a)具有三个如SEQ ID NO:27、31和35所示的CDR的重链可变区;和(b)具有三个如SEQ ID NO:41、43和45所示的CDR的轻链可变区。

[0129] 在本发明的其他方面,PTK7抗体-药物缀合物包括抗体或其抗原结合片段,其具有一个或多个根据Chothia定义或衍生自VBASE2数据库的分析的hu24 CDR。例如,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个重链可变区包括三个由Chothia定义的hu24 CDR(参见表1)或三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu24 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)。作为另一个实例,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个轻链可变区包括三个由Chothia定义的hu24 CDR(参见表1)或三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu24 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)。在本发明的一些方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括具有以下的抗体或其抗原结合片段:(a)具有三个根据Chothia定义的hu24 CDR(参见表1)的重链可变区;和(b)具有三个根据Chothia定义的hu24 CDR(参见表1)的轻链可变区。在本发明的一些方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括具有以下的抗体或其抗原结合片段:(a)包括三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu24 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)的重链可变区;和(b)包括三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu24 CDR(参见PCT国际公开号WO 2012/112943)的轻链可变区。

[0130] 在本发明的其他方面,PTK7抗体-药物缀合物包括具有hu58抗体的CDR的抗体或其抗原结合片段。例如,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个重链可变区包括三个如SEQ ID NO:51、55和59所示的CDR。在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个轻链可变区包括三个如SEQ ID NO:65、67和69所示的CDR。本发明的PTK7抗体-药物缀合物也可包括(a)具有三个如SEQ ID NO:51、55和59所示的CDR的重链可变区;和(b)具有三个如SEQ ID NO:65、67和69所示的CDR的轻链可变区。

[0131] 在本发明的其他方面,PTK7抗体-药物缀合物包括抗体或其抗原结合片段,其具有一个或多个根据Chothia定义或衍生自VBASE2数据库的分析的hu58 CDR。例如,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个重链可变区包括三个由Chothia定义的hu58 CDR或三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu58 CDR。作为另一个实例,PTK7抗体-药物缀合物可包括具有至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中至少一个轻链可变区包括三个由Chothia定义的hu58 CDR或三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu58

CDR。在本发明的一些方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括具有以下的抗体或其抗原结合片段:(a)具有三个根据 Chothia定义的hu58 CDR的重链可变区;和(b)具有三个根据Chothia 定义的hu58 CDR的轻链可变区。在本发明的一些方面,本发明的 PTK7抗体-药物缀合物可包括具有以下的抗体或其抗原结合片段:(a) 包括三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu58 CDR的重链可变区; 和(b)包括三个衍生自VBASE2数据库的分析的hu24 CDR的轻链可变 区。

[0132] 在本发明的一些方面,用于制备本发明的PTK7抗体-药物缀合物 的抗体将是单克隆抗体。术语“单克隆抗体”或“mAb”是指从基本上同 源的抗体群体获得的抗体,即,除可能存在少量天然存在的突变外, 构成该群体的个别抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,其针 对一个单个抗原性位点。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不 同抗体的多克隆抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决 定簇。修饰词“单克隆”表明抗体的特征在于从基本上同源的抗体群体 获得,且不应解释为需要通过任何特定方法来产生该抗体。例如,待 根据本发明使用的单克隆抗体可通过首先由Kohler和Milstein, Nature 256:495-497 (1975)描述的杂交瘤方法制备或可通过(诸如)美国 专利号4,816,567中描述的重组DNA方法制备。单克隆抗体也可从使 用(例如)McCafferty等人,Nature 348:552-554 (1990)中所述的技术生 成的噬菌体文库分离。

[0133] 在本发明的一些方面,用于制备本发明的抗体-药物缀合物的抗体 可以是单价的,即每个分子(例如,IgG或Fab)具有一个抗原结合位点。在一些情况下,单价抗体可具有 多于一个抗原结合位点,但所述结合 位点来自不同抗原。在本发明的一些方面,本发明的 抗体-药物缀合物 的抗体或其抗原结合片段可包括“二价抗体”,即,每分子(例如,IgG) 具有两个抗原结合位点。在一些情况下,两个结合位点具有相同抗原 特异性。或者,二价抗体 可具有双特异性。“双特异性”、“双重特异性” 或“双功能”抗体是具有两个不同抗原结合位 点的杂合抗体。双特异性 抗体的两个抗原结合位点结合至两个可驻留于相同或不同蛋白 质目标 上的不同表位。

[0134] 术语“嵌合抗体”意指其中部分或全部可变区序列系衍生自一种物 种且恒定区序 列衍生自另一物种的抗体,诸如其中可变区序列衍生自 小鼠抗体且恒定区序列衍生自人 抗体的抗体。

[0135] 如本文所使用,“人源化”或“CDR移植”抗体是指非人(例如鼠)抗 体的形式,其为 含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合免疫球蛋 白、免疫球蛋白链或其片段(诸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其 他抗原结合序列)。优选地,人源化抗体是人免疫球蛋白 (受体抗体), 其中来自受体的一个或多个互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种 (供体 抗体)诸如小鼠、大鼠或兔的一个或多个CDR且具有期望特异 性、亲和力和能力的残基置 换。

[0136] 在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基由相应非人 残基置换。此外, 人源化抗体可包括既不存在于抗体中、也不存在于 导入CDR或框架序列中、但被包括以进 一步改进并优化抗体性能的 残基。一般而言,人源化抗体将包括实质上全部的至少一个、 且通常 两个可变结构域,其中全部或实质上全部的CDR区对应于非人免疫 球蛋白的CDR 区,且全部或实质上全部FR区是人免疫球蛋白共有序 列的FR区。人源化抗体最佳地还包括 至少一部分免疫球蛋白恒定区 或结构域(Fc)(通常为人免疫球蛋白的恒定区或结构域)。

在本发明的一些方面,所述抗体具有如PCT国际公开号W0 99/58572中所述修饰的Fc区。人源化抗体的其他形式具有一个或多个可关于原始抗体改变的CDR(CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2或CDR H3),其也称为“衍生自”原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0137] 人源化可基本上遵循Winter和同事的方法(Jones等人,Nature 321:522-525 (1986);Riechmann等人,Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人,Science 239: 1534-1536 (1988))通过用啮齿类动物或突变啮齿类动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来进行。还参见美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;5,859,205;其以其整体通过引用并入本文。在一些情况下,人免疫球蛋白的一个或多个可变区的框架区内的残基由相应非人残基置换(参见,例如,美国专利号5,585,089;5,693,761;5,693,762;和6,180,370)。此外,人源化抗体可包括未存在于受体抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能(例如,以获得期望亲和力)。一般而言,人源化抗体将包括实质上全部的至少一个、且通常两个可变结构域,其中全部或实质上全部的超变区对应于非人免疫球蛋白的超变区,且全部或实质上全部的框架区是人免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体任选地还包括免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常为人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分。关于进一步详情,参见Jones等人,Nature 321:522-525 (1986); Riechmann等人,Nature 332:323-327 (1988);和Presta Curr. Op.Struct.Biol.2:593-596 (1992);其以其整体通过引用并入本文。因此,此类“人源化”抗体可包括其中实质上小于一个完整人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代的抗体。实际上,人源化抗体通常为人抗体,其中一些CDR残基和可能一些框架残基被来自啮齿类动物抗体中类似位点的残基取代。参见,例如,美国专利号5,225,539;5,585,089;5,693,761;5,693,762;5,859,205。还参见美国专利号6,180,370和PCT国际公开号W0 01/27160,其中公开了人源化抗体和产生对预定抗原具有改善亲和力的人源化抗体的技术。

[0138] “重组人抗体”或“完全人抗体”是指具有对应于由人产生和/或使用本领域技术人员已知或本文公开的制备人抗体的任何技术制备的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的那些抗体。人抗体的该定义包括具有至少一种人重链多肽或至少一种人轻链多肽的抗体。一个此类实例是具有鼠轻链和人重链多肽的抗体。人抗体可使用本领域已知的各种技术制备。例如,人抗体选自噬菌体文库,其中该噬菌体文库表达人抗体(Vaughan等人,Nature Biotechnology,14:309-314, (1996);Sheets 等人,Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 95:6157-6162, (1998);Hoogenboom 和Winter,J.Mol.Biol.,227 (2):381-388 (1992);Marks等人,J.Mol. Biol.,222 (3):581-597 (1991))。人抗体也可通过免疫动物制备,其中已向所述动物中转基因引入人免疫球蛋白基因座代替内源性基因座,例如其中内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全灭活的小鼠。该方法描述于美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016中。或者,人抗体可通过使产生针对目标抗原的抗体的人B淋巴细胞(此类B淋巴细胞可从个体或从cDNA的单一细胞克隆回收,或可在体外免疫)永生化来制备。参见,例如,Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77, (1985);Boerner 等人,J.Immunol.,147 (1):86-95, (1991);和美国专利号5,750,373。

[0139] 本发明抗体可使用本领域众所周知的技术(例如,重组技术、噬菌体展示技术、合



成技术或此类技术的组合或本领域易知的其他技术) 产生(参见,例如,Jayasena,S.D., Clin.Chem.,45:1628-50(1999)和 Fellouse,F.A.,等人,J.Mol.Biol.,373(4):924-40(2007))。额外指南可 见于Sambrook J.&Russell D.Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2000);Ausubel等人,Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Wiley,John&Sons,Inc.(2002);Harlow和Lane Using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1998);和Coligan等人, Short Protocols in Protein Science,Wiley,John&Sons,Inc.(2003)。代表性方法还描述于下文实施例1中。

[0140] 一般而言,对于杂交瘤细胞系的产生,宿主动物的免疫的途径和 时间表通常与用于抗体刺激和产生的确立且常规技术一致。考虑任何 哺乳动物受试者(包括人或从其产生抗体的细胞)可被操纵以充当用于 产生哺乳动物(包括人和杂交瘤细胞系)的基础。通常,向宿主动物腹 膜内、肌肉内、经口、皮下、足跖和/或真皮内接种一定量的免疫原(包 括如本文所述的免疫原)。

[0141] 杂交瘤可从淋巴细胞和永生化的骨髓瘤细胞使用Kohler,B.和 Milstein,C., Nature 256:495-497,1975或如由Buck,D.W.,等人,In Vitro,18:377-381,1982修改的一般体细胞杂交技术来制备。可得的骨 髓瘤系(包括,但不限于X63-Ag8.653和来自Salk Institute,Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA的那些)可用于杂交中。通常,该技术涉及使用融合剂(诸如聚乙二醇)或通过本领域技术人员众 所周知的电方式融合骨髓瘤细胞和淋巴样细胞。在融合后,从融合培 养基分离细胞并使其在选择性生长培养基(诸如次黄嘌呤-氨嘌呤-胸苷 (HAT) 培养基)中生长以消除未杂交的亲代细胞。补充有或未补充血清 的本文所述的任何培养基都可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作 为细胞融合技术的另一替代方案,EBV永生化的B细胞可用于产生本 发明的PTK7单克隆抗体。将杂交瘤扩增并亚克隆(如果期望),并通 过常规免疫测定程序(例如,放射免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫测 定)测定上清液的抗免疫原活性。可用作抗体的来源的杂交瘤涵盖产生对PTK7特异性的单克隆抗体或其部分的亲代杂交瘤的所有衍生物、后代细胞。

[0142] 可使用已知程序使产生此类抗体的杂交瘤在体外或体内生长。如 果期望,可通过常规免疫球蛋白纯化程序(诸如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱和超滤)从培养基或体 液分离单克隆抗体。可通过例如使制 剂流经由附接至固相的免疫原制备的吸附剂并从免疫原洗脱或释放期 望抗体来去除不期望活性(如果存在)。用人PTK7或含有缀合至在待 免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质(例如,钥孔**蛾**血蓝蛋白、血清白 蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)的目标氨基酸序列的片 段使用双功能试剂或衍生剂(例如,马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰 亚胺酯(经由半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(经由赖氨酸残 基)、戊二醛、琥珀酸酐、 $\text{SOCl}_2$ 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R和 $\text{R}^1$ 是不同 烷基)免疫宿主动物可得到抗体(例如,单克隆抗体)的群体。

[0143] 如果期望,可对目标PTK7抗体(单克隆或多克隆)进行测序且然 后可将多核苷酸序列克隆至载体中用于表达或繁殖。可将编码目标抗 体的序列维持于宿主细胞中的载体中且然后可使宿主细胞扩增并冷冻 用于将来使用。可通过本领域已知的方式经由从B细胞

克隆抗体基因 在细胞培养中产生重组单克隆抗体。参见,例如,Tiller等人,J. Immunol.Methods 329:112-124(2008);美国专利号7,314,622。

[0144] “宿主细胞”包括可以是或已为载体受体的个别细胞或细胞培养物,所述载体用于并入多核苷酸插入物。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代,且后代可由于天然、偶然或有意突变而不必与初始亲代细胞完全相同(在形态上或在基因组DNA互补序列上)。宿主细胞包括在体内用本发明的多核苷酸转染的细胞。

[0145] 术语“载体”意指能够递送且优选地表达宿主细胞中的一个或多个目标基因或序列的构建体。载体的实例包括,但不限于,病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阴离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体、包封于脂质体中的DNA或RNA表达载体和某些真核细胞(诸如产生细胞)。

[0146] 术语“表达控制序列”意指引导核酸转录的核酸序列。表达控制序列可以是启动子(诸如组成型或诱导型启动子)或增强子。表达控制序列可操作连接至待转录的核酸序列。

[0147] 或者,多核苷酸序列可用于遗传操纵以“人源化”抗体或改善抗体的亲和力或其他特征。例如,如果抗体用于人中的临床试验和治疗中,则恒定区可进行改造以更接近类似于人恒定区以避免免疫反应。期望遗传操纵抗体序列以获得针对PTK7的更大亲和力和抑制PTK7的更大效力。

[0148] 存在四个可用于人源化单克隆抗体的一般步骤:(1)测定起始抗体轻和重可变结构域的核苷酸和预测氨基酸序列,(2)设计人源化抗体,即,决定在人源化过程期间使用何种抗体框架区,(3)实际人源化方法/技术和(4)人源化抗体的转染和表达。参见,例如,美国专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;6,331,415;5,530,101;5,693,761;5,693,762;5,585,089;和6,180,370。

[0149] 可使用多种方法中的任一种(包括镶饰(veneering)、互补决定区(CDR)的移植、缩短CDR的移植、特异性决定区(SDR)的移植和Frankenstein组装,如下文所述)制备人源化抗体。人源化抗体还包括超人源化抗体,其中已在CDR中引入一个或多个变化。例如,可用人残基取代CDR中的非人残基。可将这些一般方法与标准诱变和合成技术组合以产生任何期望序列的抗-PTK7抗体。

[0150] 镶饰基于以下概念:通过用人氨基酸序列对抗体的溶剂可及外部进行表面重修来减少啮齿类动物或其他非人抗体中的潜在免疫原性氨基酸序列。因此,镶饰的抗体对人细胞似乎比未修饰的非人抗体具有较少外来性。参见Padlan(1991)Mol.Immunol.28:489-98。通过鉴定非人抗体中暴露的外部框架区残基(其不同于人抗体的框架区中的相同位置处的残基)并用通常占据人抗体中的这些相同位置的氨基酸置换鉴定的残基来镶饰非人抗体。

[0151] CDR的移植通过用供体抗体(例如非人抗体)的CDR置换受体抗体(例如,人抗体或具有期望框架残基的其他抗体)的一个或多个CDR来进行。可基于候选受体抗体与供体抗体之间框架残基的相似性来选择受体抗体。例如,根据Frankenstein方法,将人框架区鉴定为与相关非人抗体的各框架区具有实质序列同源性,且将非人抗体的CDR移植至不同人框架区的复合物上。还可用于制备本发明抗体的相关方法描述于美国专利号7,321,026中。

[0152] 缩短CDR的移植是相关方法。缩短CDR包括特异性决定残基和 相邻氨基酸,包括轻链中位置27d-34、50-55和89-96处的氨基酸和重 链中位置31-35b、50-58和95-101处的氨基酸(Kabat等人(1987)的编 号惯例)。参见(Padlan等人(1995)FASEB J.9:133-9)。特异性决定残 基(SDR)移植依据以下理解:抗体组合位点的结合特异性和亲和力由 各互补决定区(CDR)内最高度可变残基来决定。可使用抗体-抗原复合 物的三维结构的分析以及可用氨基酸序列数据的分析基于CDR内各 位置处存在的氨基酸残基的结构差异对序列可变性建模。将SDR鉴定 为由接触残基组成的免疫原性最小的多肽序列。参见Padlan等人 (1995)FASEB J.9:133-139。

[0153] 一般而言,人受体框架基于其实质上类似于供体抗体的框架区或 其最类似于可变区亚家族的共有序列进行选择。在移植后,可在供体 和/或受体序列中进行额外改变以优化抗体结合、功能、密码子使用、表达水平等,包括向框架区中引入非人残基。参见,例如,PCT国际 公开号W0 91/09967。

[0154] 对于将CDR移植至重链可变框架区上,有用的框架序列可衍生 自DP-21 (VH7)、DP-54 (VH3-07)、DP-47 (VH3-23)、DP-53 (VH-74)、DP-49 (VH3-30)、DP-48 (VH3-13)、DP-75、DP-8 (VH1-2)、DP-25、VI-2b和VI-3 (VH1-03)、DP-15和V1-8 (VH1-08)、DP-14和V1-18 (VH1-18)、DP-5和V1-24P (VH1-24)、DP-4 (VH1-45)、DP-7 (VH1-46)、DP-10、DA-6和YAC-7 (VH1-69)、DP-88 (VH1-e)、DP-3和DA-8 (VH1-f)。对于将CDR移植至轻链可变区框架区上,有用的框架序列可衍生自DPK24亚组IV种系克隆、W111亚组 (DPK23、DPK22、DPK20、DPK21)或V $\kappa$ I亚组种系克隆 (DPK9、DPK1、02、DPK7)。

[0155] 可通过如上所述重组方法(即,单一或融合多肽)或通过化学合成 通过抗体的蛋白水解或其他降解产生抗原结合片段或抗体片段。通过 化学合成便利地制备抗体的多肽、尤其最多达约50个氨基酸的较短多 肽。化学合成方法是本领域已知的且市售。例如,可通过采用固相方 法的自动化多肽合成仪产生抗体或抗体片段。还参见美国专利号 5,807,715;4,816,567;和6,331,415。

[0156] 在本发明的其他方面,PTK7抗体-药物缀合物包括抗体或其抗原 结合片段,其具有hu23、hu24或hu58重链和/或轻链可变区或实质 上类似于hu23、hu24或hu58重链或轻链可变区的可变区。

[0157] 如应用于多肽,术语“实质同一性”或“实质相似性”意指两个氨基 酸序列在诸如通过程序GAP或BESTFIT使用如与程序一起供应的默 认空位权重最佳比对时共享至少70%、75%或80%序列同一性、优选 至少90%或95%序列同一性且更优选至少97%、98%或99%序列同 一性。在一些实质上类似的氨基酸序列中,不相同的残基位置由于保 守氨基酸取代而不同。

[0158] 实质上类似的多肽还包括保守取代的变体,其中一个或多个残基 被功能上类似的残基保守取代。保守取代的实例包括用一个非极性(疏 水)残基(诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸)取代另一个残基; 用一个极性(亲水)残基取代另一个残基,诸如精氨酸和赖氨酸之间的 取代、谷氨酰胺和天冬酰胺之间的取代、甘氨酸和丝氨酸之间的取代; 用一个碱性残基(诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)取代另一个残基;或 用一个酸性残基(例如天冬氨酸或谷氨酸)取代另一个残基。

[0159] 两种蛋白质实质上相同的进一步指示在于其共享整体三维结构, 或者是生物功

能等效物。

[0160] 在本发明的一些方面,结合至PTK7的抗体-药物缀合物包括具有如SEQ ID NO:1、25或49中的任一种所示的重链可变区和/或如SEQ ID NO:15、39或63中的任一种所述的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段。例如,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括具有具有与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:15至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段;或具有如SEQ ID NO:1所示的重链可变区和具有如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段。作为另一个实例,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括拥有具有与SEQ ID NO:25至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:39至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段;或具有如SEQ ID NO:25所述的重链可变区和具有如SEQ ID NO:39所述的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段。作为另一个实例,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可包括拥有具有与SEQ ID NO:49至少90%相同的氨基酸序列的重链可变区和具有与SEQ ID NO:63至少90%相同的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段;或具有如SEQ ID NO:49所述的重链可变区和具有如SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或其抗原结合片段。

[0161] 抗体也可在例如重链和/或轻链的可变结构域中进行修饰以,例如,改变抗体的结合特性。例如,可在一个或多个CDR区进行突变以增加或减少抗体对PTK7的 $K_D$ 、增加或减少 $K_{off}$ 或改变抗体的结合特异性。定点诱变中的技术是本领域众所周知的。参见,例如, Sambrook等人和Ausubel等人,同上。

[0162] 也可在框架区或恒定区中进行修饰或突变以增加PTK7抗体的半衰期。参见,例如, PCT国际公开号W0 00/09560。也可在框架区或恒定区中进行突变以改变抗体的免疫原性、提供共价或非共价结合至另一分子的位点或改变特性诸如补体固定、FcR结合和抗体依赖性介导的细胞毒性。根据本发明,单一抗体可在可变结构域的CDR或框架区中的任何一个或多个中或在恒定区中具有突变。

[0163] 在称作“种系化”的过程中,VH和VL序列中的某些氨基酸可进行突变以匹配种系VH和VL序列中天然发现的氨基酸。具体而言,VH和VL序列中的框架区的氨基酸序列可进行突变以匹配种系序列以降低在施用抗体时免疫原性的风险。如本文所使用的术语“种系”是指抗体基因和基因区段的核苷酸序列和氨基酸序列,因为其经由生殖细胞从亲代传递至后代。该种系序列不同于编码成熟B细胞中的抗体的核苷酸序列,所述成熟B细胞在B细胞成熟期间通过重组和高变事件进行改变。“利用”特定种系的抗体具有与该种系核苷酸序列或与其指定的氨基酸序列最紧密比对的核苷酸或氨基酸序列。与种系序列相比,此类抗体通常被突变。人VH和VL基因的种系DNA序列是本领域已知的(参见,例如,the “Vbase”human germline sequence database;还参见Kabat,E.A.,等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242;Tomlinson等人,J.Mol.Biol. 227:776-798,1992;和Cox等人,Eur.J.Immunol.24:827-836,1994。

[0164] 可进行的另一类型的氨基酸取代是去除抗体中的潜在蛋白水解位点。此类位点可在抗体的可变结构域的CDR或框架区或恒定区中出现。半胱氨酸残基的取代和蛋白水解位点的去除可降低抗体产物中的异质性的风险且因此增加其均质性。另一类型的氨基酸

取代通过改变 一个或两个残基消除天冬酰胺-甘氨酸对,所述天冬酰胺-甘氨酸对形成潜在在去酰胺位点。在另一个实例中,本发明的PTK7抗体的重链的 C-末端赖氨酸可被裂解。在本发明的各个方面,PTK7抗体的重链和 轻链可任选地包括信号序列。

[0165] 为了表达本发明的PTK7抗体,可首先使用上述方法中的任一种 获得编码VH和VL区的DNA片段。如本领域所知,“多核苷酸”、“核 酸/核苷酸”和“寡核苷酸”在本文中可互换使用,且包括任何长度的聚 合形式的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)、其类似物或可通过 DNA或RNA聚合酶并入链中的任何底物。多核苷酸可具有任何三维 结构,且可行使任何已知或未知功能。以下是多核苷酸的非限制性实 例:基因或基因片段、外显子、内含子、信使RNA (mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、DNA、cDNA、基因组DNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离 RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以是天然存在的、合成的、重组 的或其任何组合。多核苷酸可包括修饰核苷酸,诸如甲基化核苷酸和 其类似物。如果存在,可在组装链之前或之后赋予对核苷酸结构的修 饰。非核苷酸组分可中断核苷酸序列。多核苷酸可在聚合后通过(诸如) 与标记组分缀合而进一步修饰。其他类型的修饰包括,例如,“帽”、用类似物取代天然存在的核苷酸中的一个或多个、核苷酸间修饰,诸 如例如具有不带电连接(例如,膦酸甲基酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有带电连接(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等) 的那些、含有突出部分(诸如例如,蛋白质(例如,核酸酶、毒素、抗 体、信号肽、聚-L-赖氨酸等)的那些、具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨 脂素等)的那些、含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化金 属等)的那些、含有烷基化剂的那些、具有修饰连接(例如, $\alpha$ 异头核糖 等)的那些以及多核苷酸的未修饰形式。此外,通常在糖中存在的任何 羟基都可例如被膦酸酯基团、磷酸酯基团置换,被标准保护基团保护, 或被活化以制备与额外核苷酸的额外连接,或可缀合至固体载体。5' 和3' 末端OH可被胺或1至20个碳原子的有机封端基团磷酸化或取 代。其他羟基也可衍生化成标准保护基团。多核苷酸也可含有通常本 领域已知的核糖或脱氧核糖糖的类似形式,包括,例如,2' -O-甲基-、2' -O-烯丙基、2' -氟-或2' -叠氮基-核糖、碳环糖类类似物、 $\alpha$ -或 $\beta$ -异头 糖、差向异构糖(诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖)、吡喃糖糖、呋喃糖 糖、景天庚酮糖、非环类似物和无碱基核苷类似物(诸如甲基核苷)。一个或多个磷酸二酯连接可由替代连接基团置换。这些替代连接基团 包括,但不限于,如下特征,其中磷酸酯由P(O)S(“硫代酯”)、P(S)S(“二 硫代酯”)、(O)NR<sub>2</sub>(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH<sub>2</sub>(“甲 乙缩醛”)置换,其中每个R或R' 都独立地是H或任选地含有醚(-O-) 连接的取代或未取代的烷基(1-20个C)、芳基、烯基、环烷基、环烯 基或araldyl。不是多核苷酸中的所有连接都需要相同。前述说明适用 于本文中提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0166] 编码抗-PTK7抗体重链和轻链可变区的代表性DNA描述为SEQ ID NO:2(hu23 VH DNA)、SEQ ID NO:16(hu23 VL DNA)、SEQ ID NO:26(hu24 VH DNA)、SEQ ID NO:40(hu24 VL DNA)、SEQ ID NO: 50(hu58 VH DNA)和SEQ ID NO:64(hu58 VL DNA)。编码抗-PTK7 抗体重链和轻链的代表性DNA描述为SEQ ID NO:14(hu23 HC DNA)、SEQ ID NO:24(hu23 LC DNA)、SEQ ID NO:38(hu24 HC DNA)、SEQ ID NO:48(hu24 LC DNA)、SEQ ID NO:62(hu58 HC DNA)和SEQ ID NO:72(hu58 LC DNA)。

[0167] 还可使用本领域技术人员已知的标准方法将各种修饰(例如突变、取代、缺失和/或添加)引入hu23、hu24和hu58 DNA序列中。例如,可使用标准方法(诸如PCR介导的诱变)

实施诱变,其中将突变核苷酸 引入PCR引物,使得PCR产物含有期望突变或定点诱变。

[0168] 因此,基于本申请的公开内容,本领域技术人员应容易地认识到 实质上类似于 hu23、hu24和hu58 DNA的DNA的序列。术语“实质 相似性”或“实质序列相似性”当指核酸或其片段时意指,当与另一核酸 (或其互补链) 最佳比对且具有适当核苷酸插入或缺失时,在至少约 85%、优选至少约90%且更优选至少约95%、96%、97%、98%或 99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性,如通过序列同一性的任 何众所周知算法 (诸如FASTA、BLAST或Gap) 所测量。

[0169] 术语“百分比序列同一性”在核酸序列的背景下意指两个序列中的 残基当针对最大对应比对时相同。序列同一性比较的长度可在至少约 9个核苷酸、通常至少约18个核苷酸、更通常至少约24个核苷酸、典型地至少约28个核苷酸、更典型地至少约32个核苷酸且优选至少 约36、48或更多个核苷酸的链段。存在多种本领域已知可用于测量核 苷酸序列同一性的不同算法。例如,可使用FASTA、Gap或Bestfit (其 为Wisconsin Package 10.0版, Genetics Computer Group (GCG) , Madison,Wisconsin中的程序) 比较多核苷酸序列。FASTA (其包括, 例如,程序FASTA2和FASTA3) 提供询问和搜索序列之间的最佳重 叠的区域的比对和百分比序列同一性 (Pearson,Methods Enzymol. 183:63-98 (1990) ;Pearson, Methods Mol.Biol.132:185-219 (2000) ; Pearson,Methods Enzymol.266:227-258 (1996) ;Pearson,J.Mol.Biol. 276:71-84 (1998) ;其以其整体通过引用并入本文)。除非另外规定,否 则针对特定程序或算法使用默认参数。例如,可使用FASTA与其默 认参数 (对于得分矩阵,6的字长和NOPAM因子) 或使用Gap与其默 认参数 (如GCG 6.1版中所提供,其以其整体通过引用并入本文) 测定 核酸序列之间的百分比序列同一性。

[0170] 两个核酸序列实质上相同的进一步指示在于由核酸编码的蛋白质 实质上相同,共享整体三维结构,或者是生物功能等效物。这些术语 在下文中进一步进行定义。如果相应蛋白质实质上相同,则在严格条 件下彼此不杂交的核酸分子仍实质上相同。这可例如当两个核苷酸序 列包含如由遗传代码允许的保守取代的变体时发生。

[0171] 保守取代的变体是具有简并密码子取代的核酸序列,其中一个或 多个所选 (或全部) 密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取 代。参见Batzer等人, (1991) Nucleic Acids Res.19:5081;Ohtsuka等 人, (1985) J.Biol.Chem.260:2605-2608;and Rossolini等人, (1994) Mol.Cell Probes 8:91-98。

[0172] 例如可进行的一种类型的取代是将抗体中的一个或多个可化学反 应性的半胱氨酸变为另一残基 (诸如,但不限于,丙氨酸或丝氨酸)。例如,可存在非典型半胱氨酸的取 代。该取代可在抗体的可变结构域 的CDR或框架区中或恒定区中进行。作为另一个实例,半 胱氨酸可 以是典型的。

[0173] 一旦获得编码本发明的VH和VL区段的DNA片段,这些DNA 片段就可通过标准重组 DNA技术进一步操纵以例如将可变区基因转 化成全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操纵中,编 码VL或VH的DNA片段可操作连接至编码另一蛋白质的另一DNA 片段, 诸如抗体恒定区或柔性接头。如本上下文中使用的术语“可操作 连接”意指接合两个DNA片 段,使得由两个DNA片段编码的氨基酸 序列保持同框。

[0174] 可通过将编码VH的DNA可操作连接至编码重链恒定区 (CH1、CH2和CH3) 的另一DNA 分子将编码VH区的分离DNA转化成全长 重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知



的(参见,例如, Kabat, E.A., 等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242) 且可通过标准 PCR 扩增获得涵盖这些区域的 DNA 片段。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区, 但最优选为 IgG1 或 IgG2 恒定区。IgG 恒定区序列可以是已知在不同个体中出现的各种等位基因或同种异型中的任一种, 例如 Gm(1)、Gm(2)、Gm(3) 和 Gm(17)。这些同种异型代表 IgG1 恒定区中的天然存在的氨基酸取代。对于 Fab 片段重链基因, 可将编码 VH 的 DNA 可操作连接至仅编码重链 CH1 恒定区的另一 DNA 分子。CH1 重链恒定区可衍生自任何重链基因。

[0175] 可通过将编码 VL 的 DNA 可操作连接至编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子, 将编码 VL 区的分离 DNA 转化成全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(参见, 例如, Kabat, E.A. 等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公开号 91-3242) 且可通过标准 PCR 扩增法获得涵盖这些区域的 DNA 片段。轻链恒定区可以是  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区。 $\kappa$  恒定区可以是已知在不同个体中出现的各种等位基因中的任一种, 诸如 Inv(1)、Inv(2) 和 Inv(3)。 $\lambda$  恒定区可衍生自三个  $\lambda$  基因中的任一种。

[0176] 为了产生 scFv 基因, 将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段可操作连接至编码柔性接头的另一片段, 使得 VH 和 VL 序列可作为连续单链蛋白质表达, 其中 VL 和 VH 区由柔性接头结合(参见, 例如, Bird 等人, 1988, Science 242:423-426; Huston 等人, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty 等人, 1990, Nature 348:552-554)。如果仅使用单一 VH 和 VL, 则单链抗体可以是单价的, 如果使用两个 VH 和 VL, 则单链抗体可以是二价, 或如果使用多于两个 VH 和 VL, 则单链抗体可以是多价。可产生特异性结合至 PTK7 和另一分子的双特异性或多价抗体。

[0177] 在本发明的另一个方面, 可制备融合抗体或免疫粘附素, 其包括连接至另一多肽的本发明的 PTK7 抗体的全部或一部分。在另一个方面, 仅 PTK7 抗体的可变结构域连接至多肽。在另一个方面, PTK7 抗体的 VH 结构域连接至第一多肽, 而 PTK7 抗体的 VL 结构域连接至第二多肽, 所述第二多肽与第一多肽的缔合方式使得 VH 和 VL 结构域可彼此相互作用以形成抗原结合位点。在另一个方面, 通过接头将 VH 结构域与 VL 结构域分开, 使得 VH 和 VL 结构域可彼此相互作用。然后使 VH-接头-VL 抗体连接至目标多肽。另外, 可产生其中两种(或更多种)单链抗体彼此连接的融合抗体。如果希望在单一多肽链上产生二价或多价抗体或如果希望产生双特异性抗体, 则这是有用的。

[0178] 可使用编码 PTK7 抗体的核酸分子制备其他修饰抗体。例如, 可使用标准分子生物技术遵循说明书的教导制备“ $\kappa$  体”(Illi 等人, Protein Eng. 10:949-57, 1997)、“微小抗体”(Martin 等人, EMBO J., 13:5303-9, 1994)、“二价抗体”(Holliger 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993)或“Janusin”(Traunecker 等人, EMBO J. 10:3655-3659, 1991 和 Traunecker 等人, Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52, 1992)。

[0179] 可通过多种方法(包括杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接)产生双特异性抗体或抗原结合片段。参见, 例如, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990, Kostelny 等人, J. Immunol. 148:1547-1553, 1992。另外, 双特异性抗体可以形成为“二价抗体”或“Janusins”。在本发明的一些方面, 双特异性抗体结合至 PTK7 的两个不同表位。在

其他方面,上述修饰抗体使用来自本文提供的PTK7 抗体的可变结构域或CDR区中的一个或多个制备。

[0180] 为了用于制备抗体-药物缀合物,本文所述的PTK7抗体可以是实质上纯的,即,至少50%纯的(即,不含污染物)、更优选至少90%纯 的、更优选至少95%纯的、仍更优选至少98%纯的且最优选至少99% 纯的。

[0181] 表1提供本发明的人源化抗-PTK7抗体的氨基酸(蛋白质)序列和 相关核酸(DNA)序列。

[0182] 如由Kabat和Chothia定义的hu23 VH、hu23 VL、hu24 VH、 hu24 VL、hu58 VH和hu58 VL的CDR被描述为单独序列。

[0183] 表1.人源化抗-PTK7抗体的序列。



[0184]

SEQ ID NO.	描述	序列
1	hu23 VH 蛋白质	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSNMGVGVWIR QPPGKALEWLAHIWWDDDKYYSPSLKSRLTITKDTSKNQ VVLTMNMDPVDATYYCVRSNYGYAWFAYWGQGLTV TVSS
2	hu23 VH DNA	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGA AACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCT GGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATGGGTGTGGGCT GGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCT TGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCC CATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACAC CTCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGG ACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGTTCGAAGT AACTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA
3	hu23 VH CDR1 蛋白质 -Kabat	TSNMGVG
4	hu23 VH CDR1 蛋白质 -Chothia	GFSLSTSNM
5	hu23 VH CDR1 DNA -Kabat	ACTAGTAACATGGGTGTGGGC
6	hu23 VH CDR1 DNA -Chothia	GGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATG
7	hu23 VH CDR2 蛋白质 -Kabat	HIWWDDDKYYSPSLKS
8	hu23 VH CDR2 蛋白质 -Chothia	WWDDD
9	hu23 VH CDR2 DNA-Kabat	CACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCCCATC TCTGAAGAGC

[0185]

10	hu23 VH CDR2 DNA -Chothia	TGGTGGGATGATGAT
11	hu23 VH CDR3 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	SNYGYAWFAY
12	hu23 VH CDR3 DNA -Kabat 和 Chothia	AGTAACTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTAC
13	hu23 HC 蛋 白 质 -HuIgG1	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSNMGVGVWIR QPPGKALEWLAHIWWDDDKYYSPSLKSRLTITKDTSKNQ VVLTMNTNMDPVDATYYCVRSNYGYAWFAYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

[0186]

14	hu23 HC DNA- HuIgG1	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGA AACCACACAGACCCTCAGCTGACCTGCACCTTCTCT GGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATGGGTGTGGGCT GGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCT TGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCC CATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACAC CTCCAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGG ACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGTTCGAAGT AACTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAG GGACTCTGGTCACTGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCGAGCAAGAGCA CCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTTCGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGT
15	hu23 VL 蛋白质	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIYPYLNWFQQKP GKAPKTLIYRTNRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPE DIATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEIK

[0187]

16	hu23 VL DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGATAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCG AGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAACTGGTTCCAACA AAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTA CAAATAGATTGCTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT GGCAGTGGATCTGGAACAGATTTTACTTTCACCATCAG CAGCCTGCAACCTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTC TACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGG ACCAAGCTGGAAATCAAA
17	hu23 VL CDR1 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	KASQDIYPYLN
18	hu23 VL CDR1 DNA -Kabat 和 Chothia	AAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAAC
19	hu23 VL CDR2 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	RTNRLLD
20	hu23 VL CDR2 DNA -Kabat 和 Chothia	CGTACAAATAGATTGCTAGAT
21	hu23 VL CDR3 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	LQYDEFPLT
22	hu23 VL CDR3 DNA -Kabat 和 Chothia	CTACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACG
23	hu23 LC 蛋白质-K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYPYLNWFQQKP GKAPKTLIYRTNRLLDGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPE DIATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0188]

24	hu23 LC DNA- K	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGC ATCTGTAGGAGATAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCG AGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAACTGGTTCCAACA AAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTA CAAATAGATTGCTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT GGCAGTGGATCTGGAACAGATTTTACTTTCACCATCAG CAGCCTGCAACCTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTC TACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGG ACCAAGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCAA GTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
25	hu24 VH 蛋白质	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVHWVR QAPGKRLEWIGVISTYNDYTYNNQDFKGRVTMTRDTSAS TAYMELSRLRSEDVAVYYCARGNSYFYALDYWGQGTSV TVSS
26	hu24 VH DNA	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTC TGGATACACCTTCACTGACTATGCTGTGCATTGGGTGC GCCAGGCCCCCGGAAAAAGGCTTGAGTGGATTGGAGT GATCAGCACTTACAATGATTACACATAACAATAACCAGG ACTTCAAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACATC CGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGA TCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTA ACTCCTACTTCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
27	hu24 VH CDR1 蛋白质 -Kabat	DYAVH
28	hu24 VH CDR1 蛋白质 -Chothia	GYTFTDY
29	hu24 VH CDR1 DNA-Kabat	GACTATGCTGTGCAT

[0189]

30	hu24 VH CDR1 DNA -Chothia	GGATACACCTTCACTGACTAT
31	hu24 VH CDR2 蛋 白 质 -Kabat	VISTYNDYTYNNQDFKG
32	hu24 VH CDR2 蛋 白 质 -Chothia	STYNDY
33	hu24 VH CDR2 DNA -Kabat	GTGATCAGCACTTACAATGATTACACATACAATAACCA GGACTTCAAGGGC
34	hu24 VH CDR2 DNA -Chothia	AGCACTTACAATGATTAC
35	hu24 VH CDR3 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	GNSYFYALDY
36	hu24 VH CDR3 DNA -Kabat 和 Chothia	GGTAACTCCTACTTCTATGCTTTGGACTAC
37	hu24 HC 蛋 白 质 -HuIgG1	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVHWVR QAPGKRLEWIGVISTYNDYTYNNQDFKGRVTMTRDTSAS TAYMELSRLRSED TAVYYCARGNSYFYALDYWGQGTSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

[0190]

38	hu24 HC DNA- HuIgG1	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTC TGGATACACCTTCACTGACTATGCTGTGCATTGGGTGC GCCAGGCCCCCGGAAAAAGGCTTGAGTGGATTGGAGT GATCAGCACTTACAATGATTACACATAACAATAACCAGG ACTTCAAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACATC CGCGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGA TCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTA ACTCCTACTTCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCGAGCAAGAGCACC TCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCTGTGGAATC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGA
39	hu24 VL 蛋白质	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMHWY QQKPGQAPRLLIYRASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIK

[0191]

40	hu24 VL DNA	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTGAGAGTGTTGACAGCTATGGCAAAAGTTTTATGCA CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATAGGGCATCCAACCTGGAATCTGGCATCCC AGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGC AGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
41	hu24 VL CDR1 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	RASESVDSYGKSFMH
42	hu24 VL CDR1 DNA -Kabat 和 Chothia	AGGGCCAGTGAGAGTGTTGACAGCTATGGCAAAAGTT TTATGCAC
43	hu24 VL CDR2 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	RASNLES
44	hu24 VL CDR2 DNA -Kabat 和 Chothia	AGGGCATCCAACCTGGAATCT
45	hu24 VL CDR3 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	QQSNEPWT
46	hu24 VL CDR3 DNA -Kabat 和 Chothia	CAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGACG
47	hu24 LC 蛋白质-K	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFMH WYQQKPGQAPRLLIYRASNLESGIPARFSGSGTDFLT ISSLEPEDFAVYYCQQSNEDPWTFGGGKLEIKRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC



[0192]

48	hu24 LC DNA- K	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTGAGAGTGTTGACAGCTATGGCAAAAGTTTTATGCA CTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATAGGGCATCCAACCTGGAATCTGGCATCCC AGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGC AGTTTATTACTGTCAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGA CGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGAC TGTGGCTGCACCAAGTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGT
49	hu58 VH 蛋白质	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDfsRYWMSWVR QAPGKGLEWIGDLNPdSSAINyVDSVKGRFTISRdNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCTLITTLVPYTMDFWGQGTSV TVSS
50	hu58 VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTGACTTTAGTAGATATTGGATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGCG ACCTAAACCAGATTCAAGTGCGATAAACTATGTGGAC TCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACG CCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACACTCATTAC TACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTCTGGGGTCAAG GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
51	hu58 VH CDR1 蛋白质 -Kabat	RYWMS
52	hu58 VH CDR1 蛋白质 -Chothia	GFDFSRY
53	hu58 VH CDR1 DNA -Kabat	AGATATTGGATGAGC

[0193]

54	hu58 CDR1 DNA -Chothia	VH	GGATTCGACTTTAGTAGATAT
55	hu58 CDR2 蛋 白 质 -Kabat	VH	DLNPDSSAINYVDSVKG
56	hu58 CDR2 蛋 白 质 -Chothia	VH	NPDSSA
57	hu58 CDR2 DNA-Kabat	VH	GACCTAAACCCAGATTCAAGTGCGATAAACTATGTGGA CTCTGTGAAGGGC
58	hu58 CDR2 DNA -Chothia	VH	AACCCAGATTCAAGTGCG
59	hu58 CDR3 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	VH	ITTLPVPTMDF
60	hu58 CDR3 DNA -Kabat 和 Chothia	VH	ATTACTACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTC
61	hu58 HC 蛋 白 质 -HuIgG1		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDfsRYWMSWVR QAPGKGLEWIGDLNPDSSAINYVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCTLITTLVPYTMDFWGQGTSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG

[0194]

62	hu58 HC DNA- HuIgG1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTTCGACTTTAGTAGATATTGGATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGCG ACCTAAACCCAGATTCAAGTGCGATAAACTATGTGGAC TCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACG CCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACACTCATTAC TACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTCTGGGGTCAAG GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCGAGCAAGAGC ACCTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGTCTGTGGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG GCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGT
63	hu58 VL 蛋白质	ETTTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWYQQK PGEAAILLISEGNGLRPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESE DAAYYFCLQSDNLPLTFGSGTKLEIK

[0195]

64	hu58 VL DNA	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTTCATGTCAGC GACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGCATAACCA ACACAGACATTGATGATGATATGAACTGGTACCAACAG AAACCAGGAGAAGCTGCTATTCTCCTTATTTTCAGAAGG TAATGGTCTCCGTCCTGGAATCCACCTCGATTTCAGTG GCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAAT AACATAGAATCTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCT ACAAAGTGATAACTTGCCTCTCACGTTCCGGCTCGGGG ACAAAGTTGGAAATAAAA
65	hu58 VL CDR1 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	ITNTDIDDDMN
66	hu58 VL CDR1 DNA -Kabat 和 Chothia	ATAACCAACACAGACATTGATGATGATATGAAC
67	hu58 VL CDR2 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	EGNGLRP
68	hu58 VL CDR2 DNA -Kabat 和 Chothia	GAAGGTAATGGTCTCCGTCCT
69	hu58 VL CDR3 蛋 白 质 -Kabat 和 Chothia	LQSDNLPLT
70	hu58 VL CDR3 DNA -Kabat 和 Chothia	CTACAAAGTGATAACTTGCCTCTCACG
71	hu58 LC 蛋白质-K	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWYQQK PGEAAILLISEGNGLRPGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNI ESE DAAYYFCLQSDNLPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

[0196]

72	hu58 LC DNA- K	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTTCATGTCAGC GACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTGCATAACCA ACACAGACATTGATGATGATATGAACTGGTACCAACAG AAACCAGGAGAAGCTGCTATTCTCCTTATTTCAGAAGG TAATGGTCTCCGTCCTGGAATCCCACCTCGATTGAGTG GCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAAT AACATAGAATCTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCT ACAAAGTGATAACTTGCCCTCTCACGTTCCGGCTCGGGG ACAAAGTTGGAAATAAAACGGACTGTGGCTGCACCAA GTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAC CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
----	-------------------	--

[0197] II.B. 接头

[0198] 本发明的抗-PTK7抗体-药物缀合物可使用接头以使药物连接或 缀合至抗-PTK7抗体来制备。接头是双功能化合物,其可用于连接药 物和抗体以形成抗体药物缀合物(ADC)。此类缀合物可用于,例如, 形成针对肿瘤相关抗原的免疫缀合物。此类缀合物允许细胞毒性药物 选择性递送至肿瘤细胞。合适接头包括,例如,可裂解和不可裂解接 头。可裂解接头在细胞内条件下通常易于裂解。缀合药物从抗体裂解 的主要机制包括在溶酶体(胍、缩醛和顺式-乌头酸盐样酰胺)的酸性pH 中水解、通过溶酶体酶(组织蛋白酶和其他溶酶体酶)的肽裂解和二硫 化物的还原。作为这些变化的裂解机制,将药物连接至抗体的机制也 广泛变化且可使用任何合适接头。

[0199] 合适可裂解接头包括,例如,可通过细胞内蛋白酶(诸如溶酶体蛋 白酶或内体蛋白酶)裂解的肽接头。在本发明的方面,接头可以是二肽 接头,诸如缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、苯丙氨酸-赖氨酸(phe-lys)接头或 马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc)接头。在另一个方面,接头可以是磺基琥珀酰亚胺基-4-[N马来酰亚胺基 甲基] 环己烷-1-甲酸酯(smcc)。磺基-smcc缀合经由马来酰亚胺基团发生,所述马来酰亚胺基团与巯基(硫醇、-SH)反应,而其磺基-NHS酯对于 伯胺(如赖氨酸和蛋白质或肽N-末端中所发现)具有反应性。此外,接 头可以是马来酰亚胺基己酰基(mc)。

[0200] 其他合适接头包括可在特定pH或pH范围下水解的接头,诸如 胍接头。额外合适可裂解接头包括二硫化物接头。接头可共价结合至 抗体至抗体必须在细胞内降解以使药物释放的程序,例如mc接头等。

[0201] 在本发明的特定方面,本发明的PTK7抗体-药物缀合物的接头可 以是马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基氧基羰基(vc)、马来酰亚胺基己酰基(mc)或AcBut。

[0202] 合适缀合程序的实例依赖于酰肼和其他亲核剂与通过氧化抗体上 天然存在的碳

水化合物而生成的醛的缀合。可用提供期望药物释放性质的引入羰基制备含脎的缀合物。还可用于一端具有二硫化物、在中间具有烷基链且在另一端具有胍衍生物的接头制备缀合物。蒽环霉素类可使用该技术缀合至抗体的细胞毒素的一个实例。

[0203] 含有除脎外的官能团的接头具有在溶酶体的酸性环境中裂解的潜能。例如，缀合物可从硫醇反应性接头制备，所述接头含有细胞内可裂解的除脎外的位点，诸如酯、酰胺和缩醛/缩酮。喜树碱是可使用这些接头缀合的一种细胞毒性剂。也可使用由5至7元环酮制备且一个氧附接至细胞毒性剂且另一个氧附接至用于抗体附接的接头的缩酮类。蒽环霉素类也是与这些接头一起使用的合适细胞毒素的实例。

[0204] 一类pH敏感性接头的另一个实例是顺式-乌头酸盐类，其具有并置于酰胺键的羧酸。羧酸在酸性溶酶体中加速酰胺水解。也可使用具有几种其他类型的结构且实现类似类型的水解速率加速的接头。类美登素(maytansinoid)是可与在C-9处附接的接头缀合的细胞毒素的实例。

[0205] 药物缀合物的另一潜在释放方法是肽由溶酶体酶进行酶促水解。在一个实例中，肽经由酰胺键附接至对氨基苄醇，然后在苄醇和细胞毒性剂之间制备氨基甲酸酯或碳酸酯。肽的裂解导致氨基甲酸酯或碳酸酯塌陷或自我牺牲。用该策略列举的细胞毒性剂包括蒽环霉素类、紫杉烷类、丝裂霉素C和奥里斯他汀类。在一个实例中，苯酚也可通过接头代替氨基甲酸酯的塌陷来释放。在另一变化中，使用二硫化物还原以起始氨基甲酸对巯基苄酯或碳酸酯的塌陷。

[0206] 许多缀合至抗体的细胞毒性剂在水中具有极小(如果存在)溶解性且可由于缀合物的聚集限制缀合物上的载药量。一种克服这一点的方 法是将增溶基团添加至接头。可使用由PEG和二肽组成的接头制备的缀合物，包括具有附接至抗体的PEG-二酸、硫醇-酸或马来酰亚胺-酸、二肽间隔基和至蒽环霉素或多卡米星(duocarmycin)类似物的胺的酰胺键的那些。另一个实例是用键合至细胞毒性剂的含有PEG的接头二硫化物和键合至抗体的酰胺制备的缀合物。并入PEG基团的方法可有利于克服聚集和载药量限制。

[0207] 美国专利号5,773,001(其以其整体通过引用并入本文)公开可与从卡里奇霉素制备的亲核药物、具体而言酰肼和相关亲核剂一起使用的接头。这些接头尤其可用于在药物和接头之间形成的连接可水解时获得更好活性的那些情况。这些接头含有两个官能团，包括(1)用于与抗体反应的基团(例如，羧酸)，和(2)用于与药物反应的羰基(例如，醛或酮)。羰基可与药物上的酰肼基团反应以形成脎连接。该连接可裂解水解，允许在结合至目标细胞后从缀合物释放治疗剂。在本发明的特定方面，本发明的PTK7抗体-药物缀合物的接头可以是4-(4-乙酰基苯氧基)丁酸(AcBut)。在本发明的其他方面，抗体-药物缀合物可使用(3-乙酰基苯基)乙酸(AcPAc)或4-巯基-4-甲基-戊酸(酰胺)作为接头分子来制备。

[0208] N-羟基琥珀酰亚胺(OSu)酯或其他相当活化酯可用于生成活化可水解接头-药物部分。其他合适活化酯的实例包括NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)、磺基-NHS(磺化NHS)、PFP(五氟苯基)、TFP(四氟苯基)和DNP(二硝基苯基)。

[0209] 在本发明的一些方面，抗体-药物缀合物通过使卡里奇霉素或其衍生物、AcBut接头和本发明的抗-PTK7抗体反应来制备。参见，例如，美国专利号5,773,001。AcBut接头产生在循环中实质上稳定、当在37℃下在人血浆中体外测定时每天释放估计2%卡里奇霉素的缀合物。缀合物在酸性溶酶体中释放卡里奇霉素。

[0210] 在本发明的一些方面,AcButCM部分可使用本领域(诸如PCT国际公开号W0 08/147765和美国专利号8,273,862,其以其整体通过引用并入本文)所述的方法和工艺生成。在本发明的一些方面,AcButCM 部分可使用如美国临时申请号61/899,682(其以其整体通过引用并入本文)中所述的改进合成方法生成。

[0211] 可用于放射性同位素的缀合的代表性接头包括二乙烯三胺五乙酸酯(DTPA)-异硫氰酸酯、6-胍鎓烟酸琥珀酰亚胺基酯盐酸盐(SHNH)和六甲基亚丙基胺肟(HMPAO)(Bakker等人(1990) J. Nucl. Med. 31: 1501-1509, Chattopadhyay等人(2001) Nucl. Med. Biol. 28:741-744, Dewanjee等人(1994) J. Nucl. Med. 35:1054-63, Krenning等人(1989) Lancet 1:242-244, Sagiuchi等人(2001) Ann. Nucl. Med. 15:267-270); 美国专利号6,024,938)。或者,靶向分子可进行衍生化,使得放射性同位素可与其直接结合(Yoo等人(1997) J. Nucl. Med. 38:294-300)。碘化方法也是本领域已知的,且代表性方案可见于,例如,Krenning等人(1989) Lancet 1:242-4和Bakker等人(1990) J. Nucl. Med. 31: 1501-9。

## [0212] II.C. 药物

[0213] 可用于制备公开的PTK7抗体-药物缀合物的药物包括具有生物或可检测活性的任何物质(例如治疗剂、可检测标记、结合剂等)和在体内代谢成活性剂的前药。药物也可以是药物衍生物,其中药物已官能化以使得能够与本发明抗体缀合。根据公开的方法,药物用于制备式Ab-(L-D)的抗体-药物缀合物,其中(a) Ab是结合至PTK7的抗体或其抗原结合片段;且(b) L-D是接头-药物部分,其中L是接头,且D是药物。药物:抗体比率(DAR)或载药量指示每抗体缀合的药物(D)分子的数目。本发明的抗体-药物缀合物具有1至8范围内的DAR。因此,在本发明的方面,PTK7抗体-药物缀合物可包括1个药物分子(1的DAR)、或2个药物分子(2的DAR)、或3个药物分子(3的DAR)、或4个药物分子(4的DAR)、或5个药物分子(5的DAR)、或6个药物分子(6的DAR)、或7个药物分子(7的DAR)、或8个药物分子(8的DAR)。DAR可通过各种常规方式(诸如UV光谱学、质谱、ELISA测定、放射性测量方法、疏水性相互作用色谱(HIC)、电泳和HPLC)测定。

[0214] 式Ab-(L-D)的抗体-药物缀合物(ADC)的组合物、批料和/或制剂可包括多种抗体,每一抗体都缀合至特定数目的药物分子(DAR为1至8)。组合物、批料和/或制剂具有平均DAR。

[0215] 在本发明的特定方面,抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂特征可在于约1至约8的范围内的平均DAR,例如约2至约7的范围内的平均DAR,或约3至约6的范围内的平均DAR,或约4至约5的范围内的平均DAR,或约5至约7的范围内的平均DAR,或约6至约8至范围内的平均DAR。在一些方面,抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂可具有约1的平均DAR,或约2的平均DAR,或约3的平均DAR,或约4的平均DAR,或约5的平均DAR,或约6的平均DAR,或约7的平均DAR,或约8的平均DAR。如平均DAR的上述范围中所使用,术语“约”意指 $\pm 0.5\%$ 。

[0216] 此外,抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂的特征可在于优选范围的平均DAR,例如约3至约5的范围内的平均DAR,约3至约4的范围内的平均DAR,或约4至约5的范围内的平均DAR。此外,抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂的特征可在于优选范围的平均DAR,例如,3至5的范围内的平均DAR,3至4的范围内的平均DAR,或4至5的范围内的

平均DAR。

[0217] 式Ab-(L-D)的ADC的组合物、批料和/或制剂可通过DAR分布来表征。DAR分布提供各种ADC物质的百分比或分数,例如ADC的组合物、批料和/或制剂中可存在的DAR 1至8。ADC的组合物、批料和/或制剂的DAR分布可通过本领域已知的方法(诸如毛细管等电聚焦(cIEF))测定。

[0218] 在本发明的一个方面,式Ab-(L-D)的ADC的组合物、批料和/或制剂的DAR分布的特征可在于具有宽DAR分布的ADC的高度非均相混合物,通常含有具有1至8的DAR的宽范围的ADC物质。

[0219] 在本发明的另一个方面,ADC的组合物、批料和/或制剂的DAR分布的特征可在于具有窄DAR分布的高度均质混合物,通常含有具有特定DAR(诸如3至5的DAR)的窄范围的ADC物质。

[0220] 例如,治疗剂是对癌细胞或活化免疫细胞发挥细胞毒性、细胞生长抑制和/或免疫调节效应的药剂。治疗剂的实例包括细胞毒性剂、化学治疗剂、细胞生长抑制剂和免疫调节剂。化学治疗剂是可用于治疗癌症的化学化合物。

[0221] 治疗剂是可用于治疗或预防有需要的受试者的病症的组合物。可用于本发明中的治疗剂包括抗癌剂,即在表达PTK7的细胞中具有抗癌活性的药剂,所述细胞系诸如来自以下的癌细胞:乳癌,诸如三阴性乳癌(TNBC)、孕酮-受体阳性乳癌(PR+)、雌激素-受体阳性乳癌(ER+)和双阳性乳癌;卵巢癌;结肠直肠癌;白血病,诸如急性骨髓性白血病(AML)和急性淋巴母细胞性白血病(ALL);食道癌;胃癌;黑素瘤;肉瘤;肾癌;胰腺癌;前列腺癌;肝癌,诸如肝细胞癌(HCC);和肺癌,诸如非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC)。

[0222] 代表性治疗剂包括细胞毒素、细胞毒性剂和细胞生长抑制剂。细胞毒性效应是指缺失、消除和/或杀死目标细胞。细胞毒性剂是指对细胞具有细胞毒性和/或细胞生长抑制效应的药剂。细胞生长抑制效应是指抑制细胞增殖。细胞生长抑制剂是指对细胞具有细胞生长抑制效应、由此抑制细胞的特定亚组的生长和/或扩增的药剂。

[0223] 额外代表性治疗剂包括放射性同位素、化学治疗剂、免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂、促细胞凋亡剂和细胞裂解酶(例如,RNase)。药剂还包括治疗性核酸,诸如编码免疫调节剂、抗血管生成剂、抗增殖剂或促细胞凋亡剂的基因。这些药物描述词并不互斥,且因此,可使用一个或多个上述术语描述治疗剂。例如,所选放射性同位素也是细胞毒素。治疗剂可制备为上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。通常,具有放射性同位素作为药物的缀合物被称为放射性免疫缀合物且具有化学治疗剂作为药物的那些被称为化学免疫缀合物。

[0224] 细胞毒性剂的实例包括,但不限于,蒽环霉素、奥里斯他汀、CC-1065、尾海兔素(dolastatin)、多卡米星、烯二炔、格尔德霉素(geldanamycin)、美登素(maytansine)、嘌呤霉素、紫杉烷、长春花生物碱、SN-38、微管溶素(tubulysin)、hemiasterlin和其立体异构体、等排物、类似物或衍生物。也可使用化学治疗剂、植物毒素、其他生物活性蛋白质、酶(即,ADEPT)、放射性同位素、光敏剂(即,用于光动力学治疗)。在一个实施方案中,细胞毒性剂不是核糖体灭活蛋白质。在一个更具体实施方案中,细胞毒性剂不是肥皂草毒蛋白(saporin)。

[0225] 蒽环霉素类衍生自细菌链霉菌属(*Streptomyces*)且已用于治疗多种癌症,诸如白

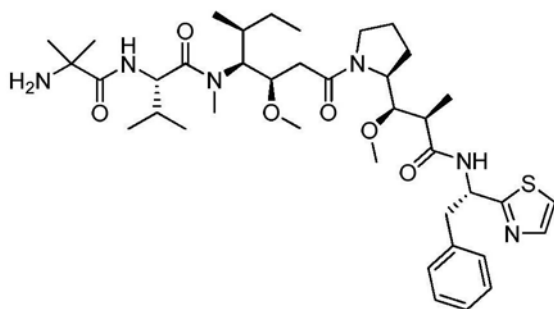


血病、淋巴瘤、乳癌、子宫癌、卵巢癌和肺癌。示例性 蒽环霉素类包括,但不限于,道诺霉素、多柔比星(即,阿霉素 (adriamycin))、表柔比星、伊达比星、戊柔比星和米托蒽醌。

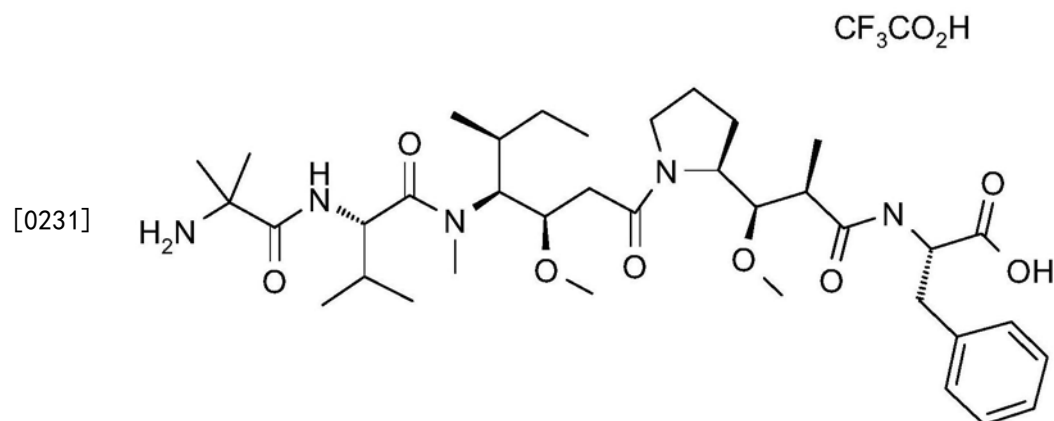
[0226] 尾海兔素和其肽类似物和衍生物奥里斯他汀是高度有效的抗有丝分裂剂,已显示其具有抗癌和抗真菌活性。参见,例如,美国专利号 5,663,149和Pettit等人, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, (1998)。示例性尾海兔素和奥里斯他汀包括,但不限于,尾海兔素10、奥里斯他汀E、奥里斯他汀EB (AEB)、奥里斯他汀EFP (AEFP)、MMAD(单甲基奥里斯他汀D或单甲基尾海兔素10)、MMAF(单甲基 奥里斯他汀F或N-甲基缬氨酸-缬氨酸-D,L-异亮氨酸 (dolaisoleuine)-D,L-脯氨酸 (dolaproine)-苯丙氨酸)、MMAE (单甲基奥 里斯他汀E或N-甲基缬氨酸-缬氨酸-D,L-异亮氨酸-D,L-脯氨酸-降麻 黄碱)、5-苯甲酰基戊酸-AE酯 (AEVB)。

[0227] 在本发明的一些方面,本文使用PCT国际公开号W0 2013/072813(其以其整体通过引用并入本文)中描述的奥里斯他汀和产生那些奥里斯他汀的方法。

[0228] 例如,奥里斯他汀系0101, (2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺),其具有以下结构:



[0230] 在另一个实例中,奥里斯他汀系8261, (8261 2-甲基丙氨酰基 -N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺),其具有以下结构:



[0232] 多卡米星和CC-1065是具有细胞毒性功效的DNA烷基化剂。参见Boger和Johnson, *PNAS* 92:3642-3649, 1995。示例性尾海兔素和奥 里斯他汀包括,但不限于, (+)-多卡米星A和 (+)-多卡米星SA和 (+)-CC-1065。

[0233] 烯二炔类是一类抗肿瘤细菌产品,其特征存在于9元和10元环或存在共轭的三键-双键-三键的环状系统。示例性烯二炔类包括,但不限于,卡里奇霉素、埃斯波霉素(esperamicin)和达内霉素(dynemicin)。

[0234] 在本发明的一些方面,细胞毒性剂是抗生素,诸如卡里奇霉素,也称为LL-E33288复合物,例如 $\beta$ -卡里奇霉素、 $\gamma$ -卡里奇霉素或N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素( $\gamma$ -卡里奇霉素( $\gamma$ 1))。适用于本发明中的卡里奇霉素的实例公开于,例如,美国专利号4,671,958、4,970,198、5,053,394、5,037,651、5,079,233和5,108,912中,其以其整体通过引用并入本文。这些化合物含有甲基三硫化物,其可与适当硫醇反应以形成二硫化物,同时引入官能团(诸如酰肼或用于将卡里奇霉素缀合至抗-PTK7抗体的其他官能团)。也可使用卡里奇霉素的二硫化物类似物,例如美国专利号5,606,040和5,770,710(其以其整体通过引用并入本文)中描述的类似物。在本发明的一些方面,二硫化物类似物系N-乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰肼(下文为“CM”)。

[0235] 格尔德霉素是结合至Hsp90(热休克蛋白质90)的苯醌霉素(ansamycin)抗生素且已用作抗肿瘤药物。示例性格尔德霉素包括,但不限于,17-AAG(17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素)和17-DMAG(17-二甲基氨基乙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素)。

[0236] 美登素类或其衍生物类美登素类通过在有丝分裂期间经由抑制微管蛋白聚合抑制微管形成来抑制细胞增殖。参见Remillard等人, Science 189:1002-1005,1975。示例性美登素类和类美登素类包括,但不限于,mertansine(DM1)和其衍生物以及安丝菌素(ansamitocin)。

[0237] 紫杉烷类是充当抗微管蛋白剂或有丝分裂抑制剂的二萜类。示例性紫杉烷类包括,但不限于,紫杉醇(例如,**TAXOL<sup>®</sup>**)和多西他赛(**TAXOTERE<sup>®</sup>**)。

[0238] 长春花生物碱类也是抗微管蛋白剂。示例性长春花生物碱类包括,但不限于,长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0239] 在本发明的一些方面,药剂是免疫调节剂。免疫调节剂的实例包括,但不限于,更昔洛韦(gancyclovir)、依那西普(etanercept)、他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司(sirolimus)、伏环孢素(voclosporin)、环孢素(cyclosporine)、雷帕霉素(rapamycin)、环磷酰胺、硫唑嘌呤、吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil)、甲氨蝶呤(methotrexate)、糖皮质激素和其类似物、细胞因子、黄嘌呤、干细胞生长因子、淋巴毒素、肿瘤坏死因子(TNF)、造血因子、白介素(例如,白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18和IL-21)、集落刺激因子(例如,粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF))、干扰素(例如,干扰素- $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ )、命名为“S1因子”的干细胞生长因子、促红细胞生成素和促血小板生成素或其组合。

[0240] 可用于本发明中的免疫调节剂还包括阻断对肿瘤的激素作用的抗激素类和抑制细胞因子产生、下调自体抗原表达或遮蔽MHC抗原的免疫抑制剂。代表性抗激素类包括抗雌激素类,包括,例如,他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制4(5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY 117018、onapristone和托瑞米芬(toremifene);和抗雄激素类,例如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin);和抗肾上腺剂。代表性免疫抑制剂包括2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶、硫唑嘌呤、环磷酰胺、溴隐亭(bromocryptine)、达那唑(danazol)、氨苯砒(dapsone)、

戊二醛、MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体、环孢素A、类固醇(诸如糖皮质类固醇类)、细胞因子或细胞因子受体拮抗剂(例如,抗干扰素抗体、抗IL10抗体、抗TNF $\alpha$ 抗体、抗IL2抗体)、链激酶、TGF $\beta$ 、雷帕霉素、T细胞受体、T细胞受体片段和T细胞受体抗体。

[0241] 在本发明的一些方面,药物是治疗性蛋白质,包括,但不限于,毒素、激素、酶和生长因子。

[0242] 毒素蛋白质(或多肽)的实例包括,但不限于,白喉(例如,白喉A链)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)外毒素和内毒素、蓖麻毒蛋白(例如,蓖麻毒蛋白A链)、相思豆毒素(abrin)(例如,相思豆毒素A链)、蒴莲根毒素(modeccin)(例如,蒴莲根毒素A链)、 $\alpha$ -帚曲毒素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白质、石竹素蛋白质、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌(*Staphylococcal*)肠毒素-A、商陆(*pokeweed*)抗病毒蛋白质、白树毒素(gelonin)、白喉菌毒素毒素、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白质(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、有丝分裂素、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)、新月毒素(tricothecene)、抑制剂胱氨酸结(ICK)肽(例如,角毒素(ceratotoxin))和芋螺毒素(conotoxin)(例如,KIIIA或SmIIIA)。

[0243] 激素的实例包括,但不限于,雌激素、雄激素、孕激素和皮质类固醇。

[0244] 在本发明的一些方面,细胞毒性剂可使用脂质体或生物相容聚合物制备。如本文所述的抗-PTK7抗体可缀合至生物相容性聚合物以增加血清半衰期和生物活性,和/或延长体内半衰期。生物相容性聚合物的实例包括水溶性聚合物(诸如聚乙二醇(PEG)或其衍生物)和含有两性离子的生物相容性聚合物(例如,含有磷酸胆碱的聚合物)。

[0245] 在本发明的一些方面,药物是寡核苷酸,诸如反义寡核苷酸。

[0246] 可用于本发明中的额外药物包括抑制血管形成的抗血管生成剂,例如法尼基(farnesyl)转移酶抑制剂、COX-2抑制剂、VEGF抑制剂、bFGF抑制剂、类固醇硫酸酯酶抑制剂(例如,2-甲氧基雌二醇双-氨基磺酸酯(2-MeOE2bisMATE))、白介素-24、血小板反应蛋白、金属反应蛋白、I类干扰素、白介素12、鱼精蛋白、血管抑素、层粘连蛋白、内皮抑素和泌乳素片段。

[0247] 抗增殖剂和促细胞凋亡剂包括PPAR- $\gamma$ 的活化剂(例如,环戊烯酮前列腺素(cyPG))、类维生素A、三萜类(例如,环菠萝烷(cycloartane)、羽扇烷(lupane)、乌斯烷(ursane)、齐墩果烷(oleanane)、木栓烷(friedelane)、达玛烷(dammarane)、葫芦素(cucurbitacin)和柠檬苦素类似物(limonoid)三萜类)、EGF受体(例如,HER4)的抑制剂、雷帕霉素、**CALCITRIOL**<sup>®</sup>(1,25-二羟基胆钙化醇(维生素D))、芳香酶抑制剂(**FEMARA**<sup>®</sup>(来曲松(letrozole)))、端粒酶抑制剂、铁螯合剂(例如,3-氨基吡啶-2-甲醛缩氨基硫脲(Triapine))、凋亡素(apoptin)(病毒蛋白3-VP3,来自鸡贫血病毒)、Bcl-2和Bcl-X(L)的抑制剂、TNF- $\alpha$ 、FAS配体、TNF相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL/Apo2L)、TNF- $\alpha$ /FAS配体/TNF相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL/Apo2L)信号传导的活化剂和PI3K-Akt存活途径信号传导的抑制剂(例如,UCN-01和格尔德霉素)。

[0248] 代表性化学治疗剂包括烷基化剂,诸如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺;磺酸烷酯,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,

诸如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedopa) 和乌瑞替派 (uredopa); 亚乙基 亚胺和甲基蜜胺, 包含六甲蜜胺 (altretamine)、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺; 氮芥类, 诸如苯 丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、氯磷酰胺 (cholophosphamide)、雌氮芥 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、甲基二氯乙基胺 (mechlorethamine)、氧化氮芥盐酸盐 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯乙酸氮芥胆甾醇酯 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfarnide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝基脲类, 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine)、雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、欧洛霉素 (authramycin)、重氮丝氨酸 (azaserine)、博莱霉素 (bleomycin)、放线菌素 (cactinomycin)、卡里奇 霉素、卡柔比星 (carabycin)、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素D (dactinomycin)、道诺霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L- 正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星 (esorubicin)、伊达比星、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、普非洛霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链 脲菌素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物, 诸如甲氨喋 呤和5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲 氨喋呤、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫 鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎 胞苷 (azacitidine)、6-阿扎尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿 糖胞苷 (cytarabine)、二脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine)、5-FU; 雄激素类, 诸如卡普甾酮 (calusterone)、丙酸甲雄烷酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺试剂类, 诸如氨鲁米特 (arninoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂类, 诸如亚叶酸; 醋葡萄糖内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基酮戊酸 (arninolevulinic acid); 安吖啶 (amsacrine); 贝斯特氮芥 (bestrabucil); 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamine); 秋水仙胺 (demecolcine); 地吖醌 (diaziquone); 伊尔福 尼辛 (elformithine); 依利醋铵 (elliptinium acetate); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明 (lonidamine); 米 托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌; 莫哌达醇 (mopidamol); 硝氨丙吖 啶 (nitracrine); 喷司他汀 (pentostatin); 苯来美特 (phenamet); 吡柔比 星 (pirarubicin); 足叶草酸; 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼 (procarbazine); 雷佐生 (razoxane); 西佐喃 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细 交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌; 2,2',2'-三氯三乙胺; 乌拉 坦 (urethan); 长春地辛; 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀

(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);加赛特辛(gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside)(Ara-C);环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类,诸如紫杉醇(paclitaxel)(**TAXOL**<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, N.J.)和多西他赛(**TAXOTERE**<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer of Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂(carboplatin);长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维苯(navelbine);novantrone;替尼泊苷(teniposide);道诺霉素;aininopterin;卡培他滨(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);视黄酸;埃斯波霉素类;和卡培他滨(capecitabine)。

[0249] 可根据本发明使用的额外治疗剂包括用于光动力治疗的光敏剂,诸如美国专利号7,498,029和5,952,329,其以其整体通过引用并入本文;用于热疗法的磁颗粒,例如美国专利号6,997,863,其以其整体通过引用并入本文;结合剂,诸如肽、配体、细胞粘附配体等和可转化成更有活性且无细胞毒性的药物的前药,诸如含有磷酸酯的前药、含有硫代磷酸酯的前药、含有硫酸酯的前药、含有肽的前药、含有β-内酰胺的前药、含有取代的苯氧基乙酰胺的前药或含有取代的苯基乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和其他5-氟尿苷前药。

[0250] 对于使用抗-PTK7抗体的诊断方法,药物可包括用于在体外或体内检测表达PTK7的细胞的存在可检测标记。在体内可检测的放射性同位素(诸如可使用闪烁法、磁共振成像或超声波检测的那些标记)可用于临床诊断应用中。有用的闪烁法标记包括正电子发射体和γ-发射体。用于磁源成像的代表性对比剂是顺磁或超顺磁离子(例如,铁、铜、锰、铬、钼、钨、镉、钽和钇)、氧化铁颗粒和水溶性对比剂。对于超声波检测,可将气体或液体诱捕于作为微气泡对比剂释放的多孔无机颗粒中。对于体外检测,有用的检测标记包括荧光团、可检测表位或结合剂和放射性标记。

[0251] 因此,在本发明的一些方面,药物是成像剂(例如,荧光团或PET(正电子发射断层摄影)标记、SPECT(单光子发射计算机断层摄影)标记)或MRI(磁共振成像)标记。

[0252] 术语“标记”当本文中使用时是指直接或间接缀合至抗体以便生成“标记的”抗体的可检测化合物或组合物。标记可以是自身可检测(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或在酶促标记的情况下,标记可催化底物化合物或组合物可检测的化学变化。可充当可检测标记的放射性核素包括,例如,I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、和Pd-109。标记也可以是不可检测的实体,诸如毒素。

[0253] 荧光团的实例包括,但不限于,荧光素异硫氰酸酯(FITC)(例如,5-FITC)、荧光素酰亚胺酯(FAM)(例如,5-FAM)、曙红(eosin)、羧基荧光素、赤藓红(erythrosine)、Alexa **Fluor**<sup>®</sup>(例如,Alexa 350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、647、660、680、700或750)、羧基四甲基若丹明(TAMRA)(例如,5'-TAMRA)、四甲基若丹明(TMR)和磺酰若丹明(sulforhodamine,SR)(例如,SR101)。

[0254] 治疗性或诊断性放射性同位素或其他标记(例如,PET或SPECT标记)可并入用于缀合至如本文所述的抗-PTK7抗体的试剂中。同位素可在抗体中存在的(例如)半胱氨酸残基处直接结合至抗体,或螯合剂可用于介导抗体和放射性同位素的结合。适于放射疗法的

放射性同位素包括,但不限于, $\alpha$ -发射体、 $\beta$ -发射体和俄歇电子(auger electron)。对于诊断应用,有用的放射性同位素包括正电子发射体和 $\gamma$ -发射体。本发明的抗-PTK7抗体可在(例如)抗体的酪氨酸残基上进一步碘化以有利于抗体的检测或治疗效应。

[0255] 放射性同位素或其他标记的实例包括,但不限于, $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{95}\text{Ru}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{103}\text{Ru}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{105}\text{Ru}$ 、 $^{107}\text{Hg}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{121}\text{Te}$ 、 $^{122}\text{Te}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{125}\text{Te}$ 、 $^{126}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{133}\text{I}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{153}\text{Pb}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{165}\text{Tm}$ 、 $^{166}\text{Dy}$ 、 $^{166}\text{H}$ 、 $^{167}\text{Tm}$ 、 $^{168}\text{Tm}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{189}\text{Re}$ 、 $^{197}\text{Pt}$ 、 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{203}\text{Hg}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{223}\text{Ra}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ 和 $^{225}\text{Ac}$ 。

#### [0256] II.D. 制备PTK7抗体-药物缀合物的方法

[0257] 还提供用于制备本发明的抗体-药物缀合物的方法。例如,用于产生如本文公开的PTK7抗体-药物缀合物的方法可包括(a)将接头连接至药物;(b)将接头-药物部分缀合至抗体;和(c)纯化抗体-药物缀合物。用于合成vc0101和mc8261的代表性方法描述于实施例9中,且缀合抗-PTK7-vc0101、抗-PTK7-mc8261 ADC和抗-PTK7-AcButCM ADC的代表性方法描述于实施例10中。

[0258] 在一个方面,式Ab-(L-D)的抗体-药物缀合物可通过以下制备:(a)向抗-PTK7抗体或其抗原结合片段添加接头-药物部分(例如vc0101或mc8261),其中在范围为约0-37°C的温度下在范围为约30分钟至16小时的时间段内,抗-PTK7抗体可在含有以下的溶液中部分还原:2-10摩尔过量的三(2-羧基乙基)膦(TCEP)、具有6-9的pH的100mM 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES)和1mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)。然后在范围为约0-37°C的温度下在范围为约30分钟至16小时的孵育时间段内,可以约4-10的接头-有效载荷/抗体摩尔比添加vc0101或mc8261接头-有效载荷与二甲基乙酰胺(DMA)。随后,可用N-乙基马来酰亚胺封端未反应的硫醇且可用L-Cys淬灭未反应的接头-有效载荷。

[0259] 在另一个方面,式Ab-(L-D)的抗体-药物缀合物可通过以下制备:(a)将接头-药物部分(例如AcButCM)添加至抗-PTK7抗体或其抗原结合片段,其中抗体的浓度可范围为1-25mg/ml且接头-药物部分与抗-PTK7抗体的摩尔比范围为约1至15:1;(b)在pH约7至9范围内的非亲核蛋白质相容的缓冲溶液中孵育接头-药物部分和抗-PTK7抗体以产生单体抗体-药物缀合物,其中溶液进一步包含(i)合适的有机助溶剂,和(ii)具有至少一个C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub>羧酸或其盐的添加剂,且其中孵育在范围为约0°C至约45°C的温度下进行范围为约1分钟至约24小时的时间段;和(c)使步骤(b)中产生的缀合物经色谱分离过程以分离具有1至8的DAR的抗体-药物缀合物;且从未缀合的抗-PTK7抗体、接头-药物部分和聚集缀合物提供低于10%的低缀合分数(LCF)。

[0260] 形成缀合物的最佳反应条件可通过反应变量(诸如温度、pH、接头-有效载荷部分输入和添加剂浓度)的变化凭经验确定。适于缀合其他药物的条件可由本领域技术人员确定而无需过多实验。

[0261] 在一些方面,药物可进行修饰以包括与抗体上的缀合点反应的基团。例如,药物可通过烷基化(例如,在抗体的 $\epsilon$ 氨基赖氨酸或N-末端处)、氧化碳水化合物化合物的还原性胺化、羟基与羧基之间的转酯化、氨基或羧基处的酰胺化和与硫醇的缀合来附接。在一些实施方案中,每个抗体分子缀合的药物(D)分子的数目范围为1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3

或1至2。在其他实施方案中,每个抗体缀合的药物(D)分子的数目为1、2、3、4、5、6、7或8。在一些实施方案中,多种抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂的特征可在于平均DAR。平均DAR范围为约1至约8、约1至约7、约1至约6、约1至约5、约1至约4、约1至约3、约1至约2。在一些实施方案中,多种抗体-药物缀合物的组合物、批料和/或制剂的平均DAR范围为约2至约8、约2至约7、约2至约6、约2至约5、约2至约4、约2至约3或约3至约5。如平均DAR的上述范围中使用的术语“约”意指 $\pm 0.5\%$ 。对于可用于缀合的化学法的实例,参见,例如,Current Protocols in Protein Science(John Wiley&Sons, Inc.),第15章(Cheical Modifications of Proteins)。

[0262] 用于制备抗体-药物缀合物的其他方法已描述于各种出版物中。例如,可在抗体中经由赖氨酸侧链胺或经由通过还原链间二硫键活化的半胱氨酸巯基进行化学修饰用于发生缀合反应。参见,例如,Tanaka 等人,FEBS Letters 579:2092-2096,2005和Gentle等人,Bioconjugate Chem.15:658-663,2004。此外,也已描述在抗体的特定位点改造的反应性半胱氨酸残基,用于以确定化学计量的特定药物缀合。参见,例如,Junutula等人,Nature Biotechnology,26:925-932,2008。

[0263] 进一步如国际公开号W0 2013/093809中所述,抗体的重链的CH2或CH3结构域表面上、或轻链的恒定结构域上据推测存在或以其他方式可及的某些残基适于用例如半胱氨酸取代天然存在的野生型氨基酸,且因此可用于改造能够缀合至各种试剂的位点。

[0264] 在一些方面,本发明的改造的Fc多肽可用于制备PTK7抗体或抗体-药物缀合物,使得抗体或其片段由此包含改造的Fc区,其可用于在改造残基(即,与野生型未修饰的Fc相比取代的氨基酸)处缀合多种药剂。

[0265] 本发明的PTK7抗体和抗体-药物缀合物可涵盖改造的Fc多肽,其中亲代、天然或野生型抗体的抗体重链(HC)的选自位置347、392、398、422和443的1个、2个或更多个氨基酸被另一氨基酸(包括天然和非天然/合成氨基酸)取代,其中恒定区的编号系统是根据Kabat的EU索引的编号系统。

[0266] 应注意,例如半胱氨酸残基的Fc多肽中的单一取代由于IgG抗体分子的同二聚体性质而通常导致展示所得IgG抗体中的两个相应残基。因此,出于缀合至药物或化合物的目的,本发明的所得改造的IgG抗体可展示至少1、2、3、4或更多个反应基团。在一个方面,一个或多个取代是利用半胱氨酸残基,且出于缀合至药物或化合物的目的,所得改造的抗体可展示至少1、2、3、4或更多个硫醇基团。

[0267] 在另一个方面,本公开的改造的Fc多肽可包含抗体的重链(HC)的一个或多个选自位置347、392、398、422和443的取代,其中恒定区的编号系统是如Kabat中所述的EU索引的编号系统,且其中重链的氨基酸序列选自SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:61。

[0268] 本发明的PTK7抗体和抗体-药物缀合物可涵盖改造的抗体轻链恒定区(LC)或其部分,其中亲代、天然或野生型抗体的抗体轻链的选自位置111、183或188的1、2或3个氨基酸被另一氨基酸(包括天然和非天然/合成氨基酸)取代,其中轻链恒定区的编号系统是根据Kabat的编号系统。

[0269] 在一些方面,本公开的改造的LC多肽包含抗体轻链的一个或多个来自位置111、183或188的取代,其中轻链的氨基酸序列选自SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:

71。

[0270] 在其他方面,由于抗体的二聚体性质(例如,IgG包含两条轻链和 两条重链,每一重链都包含Fc多肽),本发明抗体可包含至少一种改 造的Fc多肽且可进一步包含至少一种改造的轻链恒定多肽,由此提供 至少两个位点特异性缀合位点—一个在Fc多肽中且另一个在LC多肽 中。

[0271] 在本发明的一些方面,公开的PTK7抗体-药物缀合物的抗体或其 抗原结合片段包括IgG1重链恒定区,例如如SEQ ID NO:13所述的 hu23重链、如SEQ ID NO:37所述的hu24重链或如SEQ ID NO:61 所述的hu58重链。在其他方面,公开的PTK7抗体-药物缀合物的抗 体或其抗原结合片段包括κ轻链恒定区,例如如SEQ ID NO:23所述 的hu23轻链、如SEQ ID NO:47所述的hu24轻链或如SEQ ID NO:71 所述的hu58轻链。在本发明的特定方面,PTK7抗体-药物缀合物可 包括IgG1重链恒定区和κ轻链恒定区,例如如SEQ ID NO:13所述 的重链和如SEQ ID NO:23所述的轻链;或作为另一个实例,如SEQ ID NO:37所述的重链和如SEQ ID NO:47所述的轻链;或作为另一 个实例,如SEQ ID NO:61所述的重链和如SEQ ID NO:71所述的轻 链。

[0272] 同样,如国际公开号W02012/059882中所述,缀合方法包括使用 含有酰基供体谷氨酰胺的标签或通过转谷氨酰胺酶和胺(例如,包含 或附接至反应性胺的细胞毒性剂)存在的情况下多肽改造使得具有反 应性(即,作为酰基供体形成共价键的能力)的内源性谷氨酰胺。

[0273] 在一些方面,PTK7抗体或抗体-药物缀合物可包含在PTK7抗体 的抗体的特异性位点处(例如,羧基末端、氨基末端或在另一位点处) 改造的含有酰基供体谷氨酰胺的标签。在一些方面,所述标签包含氨 基酸谷氨酰胺(Q)或氨基酸序列GLLQGG(SEQ ID NO:74)、LLQGA(SEQ ID NO:75)、GLLQGA(SEQ ID NO:76)、LLQ、LLQGPGK(SEQ ID NO:77)、LLQGPG(SEQ ID NO:78)、LLQGPA (SEQ ID NO:79)、LLQGP(SEQ ID NO:80)、LLQP(SEQ ID NO: 81)、LLQPGK(SEQ ID NO:82)、LLQGAPGK(SEQ ID NO:83)、LLQGAPG(SEQ ID NO:84)、LLQGAP(SEQ ID NO:85)、LLQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(其中X<sub>1</sub>是G或P,其中X<sub>2</sub>是A、G、P或不存在, 其中X<sub>3</sub>是A、G、K、P或不存在,其中X<sub>4</sub>是G、K或不存在,且其 中X<sub>5</sub>是K或不存在)(SEQ ID NO:86)或LLQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(其 中X<sub>1</sub>是 任何天然存在的氨基酸且其中X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>和X<sub>5</sub>是任何天然存在的氨 基酸或不存在)(SEQ ID NO:87)。在一些实施方案中,PTK7抗体或抗 体-药物缀合物可包含在PTK7抗体的297位处从天冬酰胺(N)至谷氨 酰胺(Q)的氨基酸取代。

[0274] 在另一个方面,PTK7抗体或抗体-药物缀合物可包含含有酰基供 体谷氨酰胺的标记和抗体的位置222、340或370处的氨基酸修饰(EU 编号方案),其中修饰是氨基酸缺失、插入、取代、突变或其任何组合。因此,在一些方面,PTK7抗体或抗体-药物缀合物可包含在 PTK7抗 体的特异性位点处(例如,在重链或轻链的羧基末端处或在另一位点处) 缀合的含有酰基供体谷氨酰胺的标签(例如,Q、GLLQGG(SEQ ID NO:74)、LLQGA(SEQ ID NO:75)、GLLQGA(SEQ ID NO:76)、LLQ、LLQGPGK(SEQ ID NO:77)、LLQGPG(SEQ ID NO:78)、LLQGPA (SEQ ID NO:79)、LLQGP(SEQ ID NO:80)、LLQP(SEQ ID NO:81)、LLQPGK(SEQ ID NO:82)、LLQGAPGK(SEQ ID NO: 83)、LLQGAPG(SEQ ID NO:84)、LLQGAP(SEQ ID NO:85)、LLQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(其中X<sub>1</sub>是G或P,其中X<sub>2</sub>是A、G、P或不存在, 其中X<sub>3</sub>是A、G、K、P或不存在,其中X<sub>4</sub>是G、K或不存在,且其 中X<sub>5</sub>是K或不存在)(SEQ ID NO:86)或LLQX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>(其中X<sub>1</sub>是 任何



天然存在氨基酸且其中X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>和X<sub>5</sub>是任何天然存在的氨基酸 或不存在) (SEQ ID NO:87) 和抗体的位置222、340或370 (EU编号方 案) 处的氨基酸修饰。

[0275] 为了进一步增加每抗体-药物缀合物的药物分子的数目,药物可缀 合至聚乙二醇 (PEG) (包括直链或支链聚乙二醇聚合物) 和单体。PEG 单体具有下式:—(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)—。药物 和/或肽类似物可直接或间接(即 经由适当间隔团,诸如糖) 结合至PEG。PEG-抗体-药物组 合物也可包 括额外亲脂性和/或亲水性部分以有利于药物稳定性和递送至体内目 标位 点。用于制备含有PEG的组合物的代表性方法尤其可见于美国专 利号6,461,603;6,309, 633;和5,648,095。

[0276] 例如,为了增加本文公开的PTK7抗体-药物缀合物中的奥里斯他 汀或卡里奇霉素的 量,抗体在与药物缀合之前可例如使用PEG-SPA、PEG-SBA或PEG-双-马来酰亚胺缀合至 PEG。使用PEG制备的抗体 -药物缀合物可显示对目标抗原降低的结合亲和力,但由于增加的 药物 载量仍然有效。

[0277] 在缀合后,可通过常规方法从未缀合反应物和/或缀合物的聚集形 式分离并纯化 缀合物。这可包括方法诸如尺寸排阻色谱 (SEC)、超滤/ 渗滤、离子交换色谱 (IEC)、色谱聚 焦 (CF) HPLC、FPLC或Sephacryl S-200色谱。分离也可通过疏水性相互作用色谱 (HIC) 完成。 合适的 HIC介质包括Phenyl Sepharose 6快速流动色谱介质、Butyl Sepharose 4快速流 动色谱介质、Octyl Sepharose 4快速流动色谱介质、Toyopearl Ether-650M色谱介质、 Macro-Prep甲基HIC介质或Macro-Prep叔 丁基HIC介质。

[0278] 在本发明的一些方面,分离可使用Butyl Sepharose 4快速流动色 谱介质进行。 当使用定制梯度时,去除仍结合至柱的较高DAR物质。在一些方面,纯化方法可包括离心细 胞去除步骤、任选地蛋白质A亲 和力捕获步骤、随后一个或两个正交色谱精制步骤、病毒过 滤步骤和 切向流过滤步骤用于浓缩和配制。

[0279] III. 用于表征PTK7抗体-药物缀合物的功能测定

[0280] 本发明进一步公开体外和体内测定以表征PTK7抗体-药物缀合 物的活性,包括 PTK7结合活性、在结合至细胞表面上呈递的PTK7 抗原后的细胞内化和靶向受试者中的表 达PTK7的细胞。在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物的特征在于抗体或其抗原结 合片段 的中和或缺失方面。在本发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀合物的 特征在于与替 代药物缺乏效力相比,特定药物具有意外的效力。在本 发明的一些方面,PTK7抗体-药物缀 合物的特征为表现胜过与药物具 有相同作用模式的标准护理治疗剂。

[0281] 用于检测PTK7抗体-药物缀合物与PTK7抗原或其他PTK7抗原 的结合的技术是本 领域已知的,包括例如**BIACORE**<sup>®</sup>测定。额外代表 性技术包括离心、亲和力和色谱和其他 免疫化学方法。参见,例如, Manson (1992) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, N.J., United States of America; Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Elsevier, Amsterdam/New York。抗原 结合测定可使用分离的PTK7 抗原或表达PTK7的细胞进行。

[0282] PTK7抗体-药物缀合物的结合特异性可通过结合表位的定义(即 残基的鉴定,包 括参与抗原结合的非相邻残基) 和/或影响抗原结合的 残基的定义进一步描述。

[0283] 可通过观察随时间结合至表达PTK7的细胞表面的抗体或缀合物 的量测定PTK7抗 体-药物缀合物由表达PTK7的细胞的内化。参见, 例如, 实施例7。所选PTK7配体或其同种型

可以可溶性形式存在,且至少一些PTK7可能仍与细胞表面缔合,由此允许内化本文公开的抗体。因此,本发明的抗-PTK7抗体-药物缀合物可由表达PTK7的细胞内化。例如,结合至肿瘤起始细胞表面上的PTK7的抗-PTK7抗体-药物缀合物可由肿瘤起始细胞内化。内化的ADC分子的数目可足够或充分杀死表达PTK7的细胞、尤其表达PTK7的肿瘤细胞。根据ADC的功效,在一些情况下,单一ADC分子摄取至细胞中足以杀死ADC结合的目标细胞。例如,某些毒素在杀死中高度有效,使得缀合至抗体的一分子毒素的内化足以杀死肿瘤细胞。

[0284] 可使用功能测定评价PTK7抗体的内化,其中将细胞与PTK7抗体和缀合至肥皂草毒蛋白毒素的二级抗体Fab片段一起孵育。然后通过任何合适方法测量细胞活力,其中细胞毒性指示抗体内化。参见实施例7。

[0285] 在本发明的一些方面,公开的PTK7抗体-药物缀合物的抗体或其抗原结合片段是以最广泛含义使用的“拮抗剂”,即部分或完全阻断、抑制或中和本文公开的天然目标或其转录或翻译的生物活性的任何分子。如本文中关于本发明抗体的生物活性使用术语“抑制”或“中和”意指抗体实质上拮抗、禁止、阻止、限制、减缓、破坏、消除、停止、减轻或逆转例如所抑制者(包括,但不限于,生物活性)的进展或严重度的能力。例如,在本发明的一些方面,抗-PTK7抗体-药物缀合物有利于在内化抗体-药物缀合物后的细胞杀死。例如,中和抗体或拮抗剂优选将PTK7功能减小至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。

[0286] 在本发明的其他方面,本发明的抗-PTK7抗体-药物缀合物可以是消耗抗体。术语消耗抗体是指结合至细胞表面上或其附近的PTK7或与其缔合且诱导、促进或引起细胞的死亡或消除(例如,通过补体依赖性细胞毒性或抗体依赖性细胞毒性)的抗体。优选地,消耗抗体将能够去除、消除或杀死定义细胞群体中的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%或99%的肿瘤永存细胞。

[0287] 功能测定还包括用于评价抗体-药物缀合物的抗癌活性(例如,破坏现有癌细胞或延长或阻止癌细胞生长的能力)的方法。由本发明的抗体-药物缀合物靶向的癌症包括受试者中任何组织的原发性和转移性肿瘤和癌症,包括癌和造血恶性肿瘤,诸如白血病和淋巴瘤。

[0288] 具有生长抑制活性的PTK7抗体-药物缀合物可消除表达PTK7的细胞或阻止或降低表达PTK7的癌细胞的增殖。细胞生长抑制的快速体外评价的代表性方法描述于Jones等人(2001) *J. Immunol. Methods* 254:85-98。

[0289] PTK7抗体-药物缀合物也可包括诱导细胞死亡、例如特征在于核DNA降解、核变性和缩聚、膜完整性损失和吞噬作用的程序化细胞死亡的能力。评价细胞的代表性分析描述于Hoves等人(2003) *Methods* 31:127-34; Peng等人(2002) *Chin. Med. Sci. J.* 17:17-21; Yasuhara等人(2003) *J. Histochem. Cytochem.* 51:873-885中。

[0290] 例如,为了评价PTK7抗体-药物缀合物的体外细胞毒性,在PTK7抗体-药物缀合物存在的情况下和单独在游离药物下培养表达PTK7的癌细胞和对照细胞。每种药剂的细胞毒性被报道为ED50 (ng/ml),其为作为缀合物或作为游离药物给出的药物引起细胞培养物相对于未处理的对照减少50%的量。在药物暴露后使用活体染料(MTS)测定培养物中的细胞的数目。参见实施例12。

[0291] 为了评价PTK7抗体-药物缀合物的体内细胞毒性,在NOD/SCID、裸(nu/nu)或其他

品系的免疫受损小鼠中通过皮下注射各种癌细胞来制备肿瘤。可例如通过腹膜内注射向携带肿瘤的小鼠施用 PTK7 抗体-药物缀合物和对照化合物,一周两次,持续两周(q4dx4)。可测量的治疗结果包括肿瘤细胞生长的抑制。参见实施例13。

[0292] 此外,本发明提供PTK7抗体-药物缀合物,其根据例如抗-PTK7 抗体或给药和递送方法可经由多种机制(包括激动或拮抗所选途径或 消除特定细胞)来缺失、沉默、中和、消除或抑制肿瘤细胞(包括肿瘤 起始细胞(TIC))的生长、繁殖或存活和/或相关赘瘤形成。

[0293] 如本文所使用的术语肿瘤起始细胞(TIC)涵盖肿瘤永存细胞(TPC;即,癌症干细胞或CSC)和高度增殖性肿瘤祖细胞(TProg)两者,其一起通常包括体肿瘤或团块的独特亚群体(即0.1-40%)。出于本发明的目的,术语肿瘤永存细胞和癌症干细胞是等效的且在本文中可互换 使用。相反,TPC与TProg的不同的处在于其可完全概括肿瘤内存在的肿瘤细胞的组成且具有无限自我更新能力,如通过低数目分离细胞的连续移植(经由小鼠两代或更多代)所表明。如本文所使用的术语“肿瘤起始细胞”也是指各种血液恶性肿瘤的癌症干细胞,其特征不在于 肿瘤本身。

[0294] 本发明提供PTK7抗体-药物缀合物,其靶向肿瘤起始细胞(TIC) 和尤其肿瘤永存细胞(TPC),由此有利于赘瘤性病症和过度增殖性病症的治疗、管控或预防。更具体地,特定肿瘤细胞亚群体表达PTK7 且可能修改对癌症干细胞自我更新和细胞存活重要的形态发生素信号 传导的定位协调。因此,PTK7抗体-药物缀合物可用于在施用于受试 者后降低TIC的频率。肿瘤起始细胞频率的降低可由于以下发生:a) 消除、缺失、致敏、沉默或抑制肿瘤起始细胞;b) 控制肿瘤起始细胞 的生长、扩增或复发;c) 中断肿瘤起始细胞的起始、繁殖、维持或增殖;或d) 通过以其他方式阻碍致瘤细胞的存活、再生和/或转移。在本 发明的一些方面,肿瘤起始细胞频率的降低由于一个或多个生理途径 的变化而发生。途径的变化(无论是通过减少或消除肿瘤起始细胞或通 过修改其潜能(例如,诱导的分化、生态位破坏)或以其他方式干扰其 对肿瘤环境或其他细胞发挥效应的能力)进而允许通过抑制肿瘤形成、肿瘤维持和/或转移和复发更有效治疗PTK7相关的病症。

[0295] 可用于评价此类肿瘤起始细胞频率的降低的方法是体外或体内限 制稀释分析、优选随后使用Poisson分布统计学或评价预定明确事件 (诸如体内生成或不生成肿瘤的能力)的频率的列举。也可经由众所周 知的流式细胞术或免疫组织化学方式测定频率值的降低。关于所有上 文提及的方法,参见,例如,Dylla等人2008,PMCID:PMC2413402 和Hoey等人2009,PMID:19664991,其各自以其整体通过引用并入 本文。与本发明相容的可用于计算肿瘤起始细胞频率的其他方法包括 可定量流式细胞技术和免疫组织化学染色程序。

[0296] 使用上文提及的任何方法,则可根据本文的教导定量由公开的 PTK7抗体-药物缀合物提供的TIC(或其中的TPC)的频率降低。在 一些情况下,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可使TIC的频率降低(通 过上述多种机制,包括消除、诱导分化、生态位破坏、沉默等) 10%、15%、20%、25%、30%或甚至35%。在本发明的其他方面,TIC的 频率的降低可以是约40%、45%、50%、55%、60%或65%。在本发 明的某些方面,公开的化合物可将TIC的频率降低70%、75%、80%、85%、90%或甚至95%。应理解,TIC频率的任何降低都可能引起 赘 瘤形成的致瘤性、持久性、复发性和侵袭性的相应降低。

[0297] 累积证据支持以下假设:肿瘤生长、对疗法的抗性和病症复发由 TPC控制。TPC的频率可在肿瘤类型中或在与病症阶段和/或肿瘤内 的分化程度的产物具有相同肿瘤类型

的患者之间变化。可使用细胞表面标志物组鉴定并富集TPC,所述细胞表面标志物的表达经常在具有某些类型的癌症的患者中重叠。TPC由其在连续移植后起始肿瘤的功能能力最佳定义,而非致瘤(NTG)细胞缺乏该能力。首先在乳癌中鉴定出针对独特肿瘤起始能力富集的实体瘤细胞;然而,乳癌包括一系列恶性肿瘤。迄今为止,科学界未能将特定TPC身份与特定病症亚型相关联,这可作为跨越各组和各组内的差异结果的基础且也可增加不能转移至诊所的可能性。

[0298] 本发明提供改善TPC的富集的新细胞表面标志物的组合。在一个特定方面,本发明提供促进三阴性乳癌(TNBC) TPC的富集的新细胞表面标志物的组合。本发明进一步鉴定PTK7作为TNBC中的新颖 TPC相关治疗目标;其表达水平显著高于其他乳癌亚型和正常组织中。

[0299] 可在各种动物中评估PTK7抗体-药物缀合物的药代动力学并与未缀合抗体的药代动力学进行比较。例如,这可在以下之后完成:在雌性NOD/SCID、裸(nu/nu)或其他品系的免疫受损小鼠、雄性 Sprague-Dawley大鼠和雌性食蟹猴中单一静脉内大剂量施用。PTK7抗体-药物缀合物的药代动力学通常特征在于在各种物种中的低清除率、低体积分布和长表观终末半衰期。预期未缀合的奥里斯他汀衍生物的血清浓度低于定量限值。预期单一剂量毒性范围研究中这些缀合物的毒性概况类似于对于相当剂量的其他抗体-药物缀合物观察到的毒性概况。

[0300] “诱导细胞凋亡”的抗体、抗体-药物缀合物或其他试剂是诱导程序化细胞死亡的抗体、抗体-药物缀合物或其他试剂,如通过膜联蛋白V的结合、DNA的碎片化、细胞皱缩、内质网的扩张、细胞碎片化和/或膜囊泡(称作细胞凋亡体)的形成所测定。细胞是肿瘤细胞,例如乳房、卵巢、结肠直肠、前列腺、肝和肺肿瘤细胞。各种方法可用于评估与细胞凋亡相关的细胞事件。例如,可通过膜联蛋白结合测量磷脂酰丝氨酸(PS)易位;可经由DNA梯带法评估DNA碎片化;且可通过亚二倍体细胞的任何增加来评估核/染色质缩聚连同DNA碎片化。

[0301] 如本文所使用的“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别目标细胞上的结合抗体且随后引起目标细胞的裂解。可使用体外ADCC测定(诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的测定)评价目标分子的ADCC活性。可用于此类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。可替代或另外,可在体内(例如在动物模型诸如公开于Clynes等人PNAS(USA),95:652-656(1998)中的动物模型中)评价目标分子的ADCC活性。

[0302] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下目标细胞的裂解。补体活化途径通过补体系统(C1q)的第一组分和与同源抗原复合的分子(例如抗体)的结合来起始。为了评价补体活化,可进行CDC测定,例如如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods,202:163-171(1997)中所述。

[0303] “人效应细胞”是表达一种或多种FcR且行使效应物功能的白细胞。所述细胞可表达Fc $\gamma$ RIII且实施抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)效应物功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括但不限于外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞,其中PBMC和NK细胞是优选的。具有ADCC活性的抗体通

常是IgG1或IgG3同种型。此类ADCC介导的抗体也可通过将非ADCC抗体的可变区或可变区片段改造成IgG1或IgG3同种型恒定区来制备。

#### [0304] IV.PTK7抗体-药物缀合物的用途

[0305] 本发明的抗体和抗体药物-缀合物可用于各种应用,包括但不限于,治疗性治疗方法和诊断性治疗方法。

#### [0306] IV.A. 体外应用

[0307] 本发明提供使用PTK7抗体-药物缀合物的体外方法。例如,公开的抗体可单独或与细胞毒性剂或其他药物组合使用以特异性结合PTK7阳性癌细胞以便从细胞样品消耗此类细胞。还提供经由使表达PTK7的细胞与PTK7抗体-药物缀合物接触来诱导细胞凋亡和/或细胞增殖抑制的方法。在上文中在“用于表征PTK7抗体-药物缀合物的功能测定”的标题下描述代表性体外方法。

[0308] 本发明的PTK7抗体-药物缀合物也基于其特异性结合PTK7抗原的能力在PTK7阳性细胞的体外检测中具有效用。用于检测表达PTK7的细胞的方法可包括:(a)制备具有细胞的生物样品;(b)使PTK7抗体-药物缀合物与生物样品在体外接触,其中药物是可检测标记;和(c)检测PTK7抗体-药物缀合物的结合。

[0309] 本文公开的PTK7抗体-药物缀合物也可用于降低肿瘤样品中肿瘤起始细胞的频率。例如,所述方法可包括使肿瘤细胞群体(其中所述群体包含肿瘤起始细胞和除肿瘤起始细胞外的肿瘤细胞)与PTK7抗体-药物缀合物体外接触的步骤;由此细胞群体中肿瘤起始细胞的百分比降低。如本文所使用的术语“肿瘤起始细胞”也是指各种血液恶性肿瘤的癌症干细胞,其特征不在于肿瘤本身。代表性肿瘤样品包括含有肿瘤细胞的任何生物或临床样品,例如组织样品、活检样品、血液样品、血浆、唾液、尿液、精液等。

#### [0310] IV.B. 治疗性应用

[0311] PTK7相关的病症或病况包括,但不限于,间皮瘤、肝胆(肝和胆管)癌、肝细胞癌、原发性或继发性CNS肿瘤、原发性或继发性脑瘤、肺癌(NSCLC和SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、胃肠癌(诸如胃、结肠直肠和十二指肠癌)、乳癌(诸如三阴性乳癌(TNBC)、孕酮-受体阳性乳癌(PR+)、雌激素-受体阳性乳癌(ER+)和双阳性乳癌)、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、白血病(诸如急性骨髓性白血病(AML)和急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病)、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘瘤、原发性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、脊轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和表8和9中显示的由表达PTK7的细胞类型代表的所有癌症或本文公开的一种或多种癌症的组合。

[0312] 如本文所使用的短语“有效量”、“有效剂量”是指实现一种或多种有益或期望治疗结果所需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防性应用,有益或期望结果包括消除或降低病症的风险、减轻其严重度或延迟其发作,所述病症包括病症的生物化学、组织学和/或行为症状、其在病症发展期间呈现的并发症和中间病理学表型。对于治疗性应用,有益或期望结果包括临床结果,诸如降低各种PTK7相关的病症的一种或多种症状的发病

率或改善所述症状、降低治疗病症所需的其他药剂的剂量、增强另一药剂的效应和/或延迟患者的PTK7相关的病症的进展。

[0313] 在一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的与PTK7表达相关的病症的方法。本发明还提供如本文所述的抗体-药物缀合物或药物组合物,其用于治疗受试者中的与PTK7表达相关的病症的方法中。本发明进一步提供如本文所述的抗体-药物缀合物或药物组合物在制造用于治疗受试者中的与PTK7表达相关的病症的药剂中的用途。

[0314] 在本发明的一些方面,治疗受试者中的与PTK7表达相关的病症的方法包括向有需要的受试者施用有效量的具有如本文所述的PTK7抗体-药物缀合物的组合物(例如,药物组合物)。与PTK7表达相关的病症包括,但不限于,异常PTK7表达、改变或异常PTK7表达、PTK7过表达和增殖病症(例如,癌症)。

[0315] 在本发明的一个方面,所述病症是癌症,包括,但不限于,间皮瘤、肝胆癌(肝和胆管)、肝细胞癌、原发性或继发性CNS肿瘤、原发性或继发性脑瘤、肺癌(NSCLC和SCLC)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、胃肠癌(诸如胃、结肠直肠和十二指肠癌)、乳癌(诸如三阴性乳癌(TNBC)、孕酮-受体阳性乳癌(PR+)、雌激素-受体阳性乳癌(ER+)和双阳性乳癌)、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、白血病(诸如急性骨髓性白血病(AML)和急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病)、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘瘤、原发性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、脊轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、肾上腺皮质癌、胆囊癌、多发性骨髓瘤、胆管癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和表8和9中显示的由表达PTK7的细胞类型代表的所有癌症或本文公开的一种或多种癌症的组合。

[0316] 在另一个实施方案中,适于使用抗-PTK7抗体-药物缀合物靶向的癌症包括表达PTK7的原发性和转移性癌症,诸如乳癌(诸如三阴性乳癌(TNBC)、孕酮-受体阳性乳癌(PR+)、雌激素-受体阳性乳癌(ER+)和双阳性乳癌);卵巢癌;结肠直肠癌;食道癌;胃癌;黑素瘤;肉瘤;肾癌;胰腺癌;前列腺癌;肝癌,诸如肝细胞癌(HCC);和肺癌,诸如非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC)。

[0317] 在一个更具具体实施方案中,适于使用抗-PTK7抗体-药物缀合物靶向的癌症包括表达PTK7的原发性和转移性癌症,诸如乳癌(诸如三阴性乳癌(TNBC)、孕酮-受体阳性乳癌(PR+)、雌激素-受体阳性乳癌(ER+)和双阳性乳癌)NSCLC、前列腺癌和食道癌。在一个更具具体实施方案中,适于使用抗-PTK7抗体-药物缀合物靶向的癌症包括表达PTK7的原发性和转移性癌症,诸如乳癌(诸如三阴性乳癌(TNBC))和NSCLC。

[0318] 在本发明的一些方面,提供抑制患有表达PTK7的肿瘤的受试者中的肿瘤生长或进展的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的具有如本文所述PTK7抗体-药物缀合物的组合物。在本发明的其他方面,提供抑制受试者中的表达PTK7的癌转移的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的具有如本文所述PTK7抗体-药物缀合物的组合物。在本发明的其他方面,提供诱导受试者中的表达PTK7的肿瘤消退的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的具有如本文所述PTK7抗体-药物缀合物的组合物。在其他方面,本发明提供如本文所述抗体-药物缀合物或药物组合物,其用于如上文所述的方法中。在其他

方面,本发明提供如本文所述的抗体-药物缀合物或药物组合物在 制造用于上述方法中的药剂中的用途。

[0319] 因此,可基于生物标志物表达选择待用本发明的PTK7抗体-药物 缀合物治疗的患者,所述生物标志物表达包括,但不限于,体肿瘤样 品的mRNA (qPCR) 和PTK7抗原的升高表达,其导致产生针对富集目 标表达而非肿瘤来源或组织学选择的患者群体。目标表达可测量为与 细胞染色的数目组合的细胞染色的强度的函数。例如,PTK7的高表 达的分类包括通过免疫组织化学染色测试大于30% (即,40%、50%或 60%) 的细胞以3+ (利用1至4的量表) 的水平PTK7阳性的那些患者, 而PTK7的中度表达可包括大于20%的细胞以1+至2+细胞染色的那 些患者。目标表达也可通过检测如本文所述的肿瘤起始细胞 (TIC) 上的 PTK7表达来测量。

[0320] 除PTK7表达外的生物标志物也可用于患者选择,例如,包括基 于多药物抗性 (MDR) 的肿瘤的表征。几乎50%人癌症完全抵抗化学治 疗或仅瞬时反应,其后其不再受常用抗癌药物影响。该现象被称为 MDR且由一些肿瘤类型固有地表达,而其他在暴露于化学 治疗治疗 后获得MDR。药物流出泵P-糖蛋白介导与细胞毒性化学治疗相关的 大多数MDR。可进行癌症患者肿瘤样本中存在的MDR机制的表型和 功能分析以使特定肿瘤类型中特定MDR机制与对化学治疗的抗性相 关联。

[0321] 癌症生长或异常增殖是指多个指数中的任一种,所述指数表明至 更发展癌症形式或疾病状态的细胞内的变化。癌细胞或非赘瘤性增殖 病症的细胞的生长的抑制可通过本领域已知的方法 (诸如延迟肿瘤生 长和癌转移抑制) 来测定。用于测量癌症生长的抑制的其他指数包括癌 症细胞存活减少、肿瘤体积或形态减少 (例如,如使用计算机断层摄影 (CT)、超声波扫描或其他成像方法所测定)、肿瘤血管分布的破坏、延 迟过敏性皮肤测试中改善的性能、细胞裂解T-淋巴细胞的活性增加和 肿瘤特异性抗原的水平下降。

[0322] 公开的治疗方法的期望结果通常是与对照或基线测量相比的可定 量量度。如本文所使用,有关术语诸如“改善”、“增加”或“降低”表明 相对于对照的值,诸如在起始本文所述治疗之前相同个体中的测量或 在本文所述治疗不存在下对照个体 (或多个对照个体) 中的测量。代表 性对照个体是患有与所治疗个体相同形式的过度增殖性病症的个体, 其与所治疗个体的年龄大约相同 (以确保所治疗个体与对照个体的病 症阶段是相当的)。

[0323] 对治疗的反应的变化或改善通常是统计学显著的。如本文所使用 的术语“显著性”或“显著的”是指两个或更多个实体之间存在非随机缔 合的概率的统计学分析。为了确定关系是否是“显著的”或具有“显著 性”,数据的统计学操纵可以是“p值”。将低于使用者定义的截止点的 那些p值视为显著的。将小于或等于0.1、小于0.05、小于0.01、小 于0.005或小于0.001的p值视为显著的。

[0324] 如上文在标题“III. 用于表征PTK7抗体-药物缀合物的功能测 定”下所描述,本发明还提供靶向肿瘤起始细胞的方法。更具体地,本 发明的PTK7抗体-药物缀合物可消耗、沉默、中和、消除或抑制肿瘤 细胞 (包括肿瘤起始细胞) 的生长、繁殖或存活。

[0325] 因此,本文公开的PTK7抗体-药物缀合物也可用于降低肿瘤样品 中肿瘤起始细胞的频率。例如,该方法可包括使肿瘤细胞群体 (其中所 述群体包含肿瘤起始细胞和除肿瘤起始细胞外的肿瘤细胞) 与PTK7 抗体-药物缀合物接触的步骤;由此细胞群体中肿瘤起始细胞的百分比 降低。如本文所使用的术语“肿瘤起始细胞”也是指各种血液恶性肿瘤 的癌



症干细胞,其特征不在于肿瘤本身。该接触步骤可在体外进行,其中肿瘤细胞群体包含于生物样品中,如上文所述。或者,该接触步骤可在体内进行,如在向受试者施用PTK7抗体-药物缀合物后发生。

#### [0326] IV.C. 体内检测和诊断

[0327] 在另一个方面,提供检测、诊断和/或监测与PTK7表达相关的病症的方法。例如,可用于可检测部分(诸如成像剂和酶-底物标记)标记如本文所述的PTK7抗体。如本文所述的抗体也可用于体内诊断测定(诸如体内成像(例如,PET或SPECT))或染色试剂。

[0328] 在向受试者施用PTK7抗体-药物缀合物后(其中药物是可检测标记)和在足够结合的时间后,可显现由抗体结合的表达PTK7的细胞的生物分布。公开的诊断方法可与治疗方法组合使用。另外,本发明的PTK7抗体-药物缀合物可出于检测和治疗的双重目的而施用。

[0329] 代表性非侵袭性检测方法包括闪烁法(例如,SPECT(单光子发射计算机断层摄影)、PET(正电子发射断层摄影)、 $\gamma$ 相机成像和直线扫描)、磁共振成像(例如,常规磁共振成像、磁化传递成像(MTI)、质子磁共振光谱法(MRS)、扩散加权成像(DWI)和功能MR成像(fMRI))和超音波。

#### [0330] IV.D. 制剂

[0331] 本发明进一步提供包括任何本文公开的PTK7抗体-药物缀合物和药学上可接受的载体的药物组合物。此外,所述组合物可包括多于一种PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物(例如,识别PTK7的不同表位的PTK7抗体的混合物)。其他示例性组合物包括多于一种PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物,其识别结合至PTK7(例如,人PTK7)的不同表位的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的相同表位或不同种类。

[0332] 本发明中使用的组合物可进一步包括冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and practice of Pharmacy第21版,2005,Lippincott Williams and Wilkins,编辑K.E.Hoover)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在剂量和浓度下对受体无毒性,且可包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;盐形成抗衡离子,诸如钠;金属络合物(诸如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子型表面活性剂,例如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。如本文所使用的“药学上可接受的盐”是指分子或大分子的药学上可接受的有机或无机盐。本文中进一步描述药学上可接受的赋形剂。

[0333] PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的各种制剂可用于施用。在本发明的一些方面,PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物可净施用。PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物和药学上可接受的赋形剂可在各种制剂中。药学上可接受的赋形剂是本领域已知的,且为有利于药理学有效物质的施用的相对惰性物质。例如,赋形剂可产生形式或同一性,或充当稀释



剂。合适的赋形剂包括,但不限于,稳定剂、润湿和 乳化剂、用于改变重量摩尔渗透压浓度的盐、包封剂、缓冲剂和皮肤 渗透促进剂。用于肠胃外和非肠胃外药物递送的赋形剂以及制剂描述 于Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版, Mack Publishing, 2000中。

[0334] 在本发明的一些方面,这些试剂被配制用于通过注射(例如,腹膜 内、静脉内、皮下、肌肉内等)施用。因此,这些试剂可与药学上可接 受的媒介物(诸如盐水、Ringer氏溶液、右旋糖溶液等)组合。特定剂 量方案(即剂量、时机和重复)将取决于特定个体和该个体的病史。

[0335] 通过混合具有期望纯度的抗体与冻干制剂或水溶液形式的任选药 学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington, The Science and Practice of Pharmacy第21版. Mack Publishing, 2005)来制备根据本 发明使用的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的治疗性制剂用于储 存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对受体无毒性,且可包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;盐,诸 如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷 基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、 丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯 甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子 量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球 蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他 碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;盐形成抗衡离子,诸如钠;金 属络合物(诸如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂, 诸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0336] 含有PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的脂质体通过本领域已 知方法制备,所述方法诸如描述于以下中的方法:Eppstein等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980); 和美国专利号4,485, 045和 4,544,545。具有增强循环时间的脂质体公开于美国专利号5,013,556 中。特别有用的脂质体可通过反相蒸发方法用脂质组合物(包括磷脂酰 基胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰基乙醇胺(PEG-PE))生成。经由 具有定义孔径的过滤器挤出脂质体以获得具有期望直径的脂质体。

[0337] 也可将活性成分包埋入例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合制 备的微胶囊中,例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲 酯)微胶囊,所述微胶囊分别为胶体药物递送系统(例如,脂质体、白 蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)形式或粗乳液形式。此类 技术公开于Remington, The Science and Practice of Pharmacy第21 版. Mack Publishing, 2005中。

[0338] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的 固态疏水性聚合物的半渗透性基质,所述基质为成型对象形式,例如 薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2- 羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专 利号3,773,919)、L-谷氨酸和7乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯 酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸- 乙醇酸共聚物和乙酸亮丙 瑞林构成的可注射微球体))、蔗糖乙酸异丁 酸酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0339] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这容易通过例如经由无菌过滤膜过滤来完成。通常将治疗性PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物置于具有无菌出入孔的容器中,例如具有可由皮下注射针头刺入的塞子的静脉内溶液袋或小瓶中。

[0340] 根据本发明的组合物可为用于经口、肠胃外或直肠施用或通过吸入或吹入施用的单元剂型,诸如片剂、丸剂、胶囊、粉剂、颗粒、溶液或悬浮液或栓剂。

[0341] 为了制备固体组合物(诸如片剂),将主要活性成分与药物载体(例如常规制锭成分,诸如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶)和其他药物稀释剂(例如水)混合,以形成含有本发明化合物或其无毒性药学上可接受的盐的均质混合物的固体预配制组合物。在提及这些预配制组合物为均相时,意味着活性成分被均匀分散于整个组合物中,使得可容易地将组合物再分成相等有效的单位剂型,诸如片剂、丸剂和胶囊。然后将该固体预配制组合物再分成上述类型的单位剂型,其含有0.1mg至约500mg本发明的活性成分。新颖组合物的片剂或丸剂可进行包衣或复合以提供具有持久作用优点的剂型。例如,片剂或丸剂可包括内部剂量组分和外部剂量组分,后者为前者的包膜形式。两种组分可通过肠溶性层分开,所述肠溶性层用以抵抗胃内的崩解并允许内部组分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于此类肠溶性层或包衣,此类材料包括多种聚合酸和聚合酸与材料诸如虫胶、十六烷醇和乙酸纤维素的混合物。

[0342] 合适的表面活性剂包括,具体而言,非离子试剂,诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇(例如TWEEN™ 20、40、60、80或85)和其他脱水山梨糖醇(例如Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性剂的组合物将便利地包括0.05%至5%的表面活性剂,且可为0.1%至2.5%。应理解,如果需要,可添加其他成分,例如甘露醇或其他药学上可接受的媒介物。

[0343] 合适乳液可使用市售脂肪乳液(诸如INTRALIPID™、LIPOSYN™、INFONUTROL™、LIPOFUNDIN™和LIPIPHYSAN™)制备。可将活性成分溶解于预混合乳液组合物中或可替代地可将其溶解于油(例如,大豆油、红花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中且在与磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合后形成乳液。应理解,可添加其他成分(例如甘油或葡萄糖)以调节乳液的张力。合适乳液通常将含有最多达20%油,例如5%至20%油。脂肪乳液可包括0.1μm至1.0μm、具体地0.1μm至0.5μm的脂肪微滴,且具有5.5至8.0范围内的pH。

[0344] 乳液组合物可以通过混合PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物与INTRALIPID™或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)制备的那些。

[0345] 用于吸入或吹入的组合物包括药学上可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液、以及粉末。所述液体或固体组合物可含有上文所述的药学上可接受的合适赋形剂。在本发明的一些方面,所述组合物通过经口或经鼻呼吸途径施用用于局部或全身效应。优选无菌药学上可接受的溶剂中的组合物可通过使用气体雾化。雾化的溶液可直接从雾化装置吸入或可将该雾化装置附装至面罩、帐篷或间歇式正压呼吸机。溶液、悬浮液或粉末组合物可优选经口或经鼻从以适当方式递送制剂的装置施用。

[0346] 本发明还提供用于本发明方法的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个包括如本文所述的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的容器和根据本发明所述的任何本发明方法使用的说明书。通常,这些说明书包括施用PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物用于上述治疗性治疗的描述。

[0347] 涉及如本文所述的PTK7抗体或PTK7抗体缀合物的使用的说明书通常包括关于用于预期治疗的剂量、给药时间表和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、体包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。本发明试剂盒中供应的说明书通常是标记或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸页)上的书面说明书,但机器可读说明书(例如,磁性或光学存储盘上的说明书)也是可接受的。

[0348] 本发明的试剂盒在合适包装中。合适包装包括,但不限于,小瓶、瓶、广口瓶、柔性包装(例如,密封Mylar或塑料袋)等。还涵盖与特定装置(诸如吸入器、经鼻施用装置(例如,雾化器)或输注装置(诸如微型泵)组合使用的包装。试剂盒可具有无菌出入孔(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。容器也可具有无菌出入孔(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物。容器可进一步包括第二药理学活性剂。

[0349] 试剂盒可任选地提供额外组分,诸如缓冲液和解释性信息。通常,试剂盒包括容器和该容器上或与该容器结合的标记或包装插页。

#### [0350] IV.E. 剂量和施用

[0351] 对于体外和体内应用,PTK7抗体-药物缀合物以有效剂量提供或施用。在临床背景下,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以实现直接或间接预防性或治疗性治疗的量。有效剂量可以一次或多次施用来施用。药物、化合物或药物组合物的有效剂量可结合或不结合另一药物、化合物或药物组合物来实现。因此,可在施用一种或多种治疗剂的背景下考虑“有效剂量”,且如果与一种或多种其他药剂结合可实现或实现期望结果,则可认为单一药剂以有效量给予。对于使用公开的PTK7抗体-药物缀合物的PTK7阳性细胞的检测,向受试者施用可检测量的本发明组合物,即,使得可在体外或体内测定缀合物的存在的剂量的缀合物。

[0352] 例如,当施用于携带癌症的受试者时,有效量包括足以引发抗癌活性(包括癌细胞裂解、抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞细胞凋亡、减少癌细胞抗原、延迟肿瘤生长和/或抑制转移)的量。肿瘤皱缩被广泛接受为效力的临床替代标记。效力的另一广泛接受的标记是无进展的存活。

[0353] PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物可经由任何合适途径施用于个体。本领域技术人员应理解,本文所述的实施例并不意欲具有限制性,而是说明可用技术。因此,在本发明的一些方面,PTK7抗体或PTK7抗体缀合物根据已知方法、诸如静脉内施用(例如作为大剂量或通过在一段时间内连续输注)、通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、颅内、经皮、皮下、关节内、舌下、滑膜内、经由吹入、鞘内、经口、吸入或局部途径施用于个体。施用可以是全身性施用(例如静脉内施用)或局部施用。用于液体制剂的市售雾化器(包括喷射雾化器和超声波雾化器)可用于施用。液体制剂可直接雾化且冻干粉末可在重构后雾化。或者,PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物可使用氟碳制剂和定量吸入器气溶胶化或作为冻干且研磨的粉末吸入。

[0354] 在本发明的一些方面,PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物经由位点特异性或靶向局部递送技术施用。位点特异性或靶向局部递送技术的实例包括PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的多种可植入储库源或局部递送导管,诸如输注导管、留置导管、或针导管、合成

移植 物、外膜套、分流器和支架或其他可植入装置、位点特异性载体、直接注射或直接施加。参见,例如,PCT国际公开号W0 2000/53211 和美国专利号5,981,568。

[0355] 如本文所述的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物可使用任何合适方法(包括通过注射(例如,腹膜内、静脉内、皮下、肌肉内等))施用。PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物也可经由吸入施用,如本文所述。通常,对于PTK7抗体和PTK7抗体-药物缀合物的施用,初始候选剂量可以是约2mg/kg。出于本发明的目的,根据上文提及的因素,典型日剂量可范围为3 $\mu$ g/kg至30 $\mu$ g/kg至300 $\mu$ g/kg至3mg/kg、至30mg/kg、至100mg/kg或更大的大约任一者。例如,可使用约1mg/kg、约2.5mg/kg、约5mg/kg、约10mg/kg和约25mg/kg的剂量。对于经几天或更长时间的重复施用,根据病症,持续治疗直至出现症状的期望抑制或直至实现足够治疗水平以例如抑制或延迟肿瘤生长/进展或癌细胞的转移。示例性给药方案包括施用约2mg/kg的初始剂量,随后每周约1mg/kg PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的维持剂量、或随后每隔一周约1mg/kg的维持剂量。其他示例性给药方案包括施用递增剂量(例如,1mg/kg的初始剂量且逐渐增加至每周或更长时间段的一个或多个更高剂量)。根据从业人员希望实现的药代动力学衰减的模式,其他剂量方案也可以是有用的。例如,在本发明的一些方面,考虑每周给药一至四次。在其他方面,考虑每月一次或每隔一个月一次或每三个月一次给药,以及每周、每两周和每三周施用。该治疗的进展可通过常规技术和测定来容易地监测。给药方案(包括所用的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物)可随时间变化。

[0356] 出于本发明的目的,PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的适当剂量将取决于所用的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物(或其组合)、待治疗的病症的类型和严重度、药剂是否出于治疗目的施用、先前治疗、患者的临床史和对药剂的反应、患者对于所施用药剂的清除率和主治医师的决定。临床医师可施用PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物,直至实现获得期望结果和以上的剂量。剂量和/或频率可在疗程内变化,但同样可保持恒定。经验考虑因素(诸如半衰期)通常将促使剂量的测定。例如,可使用与人免疫系统相容的抗体(诸如人源化抗体或完全人抗体)以延长抗体的半衰期并防止抗体由宿主的免疫系统攻击。可确定施用频率且在疗程内进行调节,且通常,但不必,基于症状的治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟,例如肿瘤生长抑制或延迟等。或者,PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的持续连续释放制剂可以是适当的。用于实现持续释放的各种制剂和装置是本领域已知的。

[0357] 在本发明的一些方面,可在已给予PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的一次或多次施用的个体中凭经验测定PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的剂量。给予个体PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的递增剂量。为了评价效力,可追踪病症的指示因子。

[0358] 根据例如受体的生理病症、施用目的是治疗性还是预防性和熟练从业人员已知的其他因素,根据本发明方法的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的施用可以是连续或间歇的。PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物的施用可以在预选时间段内基本上连续的或可以在一系列间隔性剂量中。

#### [0359] IV.F. 组合治疗

[0360] 在本发明的一些方面,本文所述的方法进一步包括用其他形式的疗法治疗受试者的步骤。在一些方面,其他形式的疗法是其他抗癌疗法,包括,但不限于,化学疗法、辐射、手术、激素疗法和/或其他免疫疗法。

[0361] 公开的PTK7抗体-药物缀合物可作为初始治疗施用,或用于治疗 对常规疗法无反应的病症。另外,PTK7抗体-药物缀合物可与其他疗法(例如,手术切除、放射、其他抗癌药物等)组合使用以由此引发累 加或加强一些抗癌剂的治疗效应和/或降低一些抗癌剂的肝细胞毒性。本发明的PTK7抗体-药物缀合物可与其他药剂共施用或共配制,或进行配制用于与其他药剂以任何顺序施用。

[0362] 可用于组合疗法的代表性药剂包括如在副标题“药物”下可用于 制备PTK7抗体-药物缀合物的上文所述的任何药物。本发明的PTK7 抗体-药物缀合物也可与其他治疗性抗体和抗体-药物缀合物(包括除公 开的抗-PTK7抗体外的抗-PTK7抗体以及靶向不同抗原的抗体和缀合 物)组合使用。可单独使用或作为抗体-药物缀合物使用的代表性抗体 包括抗5T4抗体(例如,A1、A2和A3)、抗CD19抗体、抗CD20抗 体(例如,

**RITUXAN<sup>®</sup>**、**ZEVALIN<sup>®</sup>**、**BEXXAR<sup>®</sup>**)、抗CD22抗体、抗 CD33抗体(例如, **MYLOTARG<sup>®</sup>**)、抗CD33抗体-药物缀合物、抗Lewis Y抗体(例如,Hu3S193、Mthu3S193、AGmthu3S193)、抗HER-2抗 体(例如,**HERCEPTIN<sup>®</sup>**(曲妥珠单抗)、MDX-210、**OMNITARG<sup>®</sup>**(帕妥珠单抗、rhuMAb 2C4))、抗CD52抗体(例如,**CAMPATH<sup>®</sup>**)、抗 EGFR抗体(例如,**ERBITUX<sup>®</sup>**(西妥昔单抗)、ABX-EGF(帕尼单抗))、抗VEGF抗体(例如,**AVASTIN<sup>®</sup>**(贝伐珠单抗))、抗DNA/组织蛋白复 合抗体(例如,ch-TNT-1/b)、抗CEA抗体(例如,CEA-Cide、YMB-1003) hLM609、抗CD47抗体(例如,6H9)、抗VEGFR2(或含有激酶插入结 构域的受体,KDR)抗体(例如,IMC-1C11)、抗Ep-CAM抗体(例如, ING-1)、抗FAP抗体(例如,西罗珠单抗)、抗DR4抗体(例如, TRAIL-R)、抗孕酮受体抗体(例如,2C5)、抗CA19.9抗体(例如, **GIVAREX<sup>®</sup>**)和抗纤维蛋白抗体(例如,MH-1)。

[0363] 公开的PTK7抗体-药物缀合物也可与作为治疗方案的一部分的 细胞毒性剂的一种或多种组合一起施用。出于该目的的有用的细胞毒 性制剂包括CHOPP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼);CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松);COP(环磷 酰胺、长春新碱、泼尼松);CAP-BOP(环磷酰胺、多柔比星、丙卡巴 肼、博来霉素、长春新碱和泼尼松);m-BACOD(甲氨喋呤、博来霉素、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和甲酰四氢叶酸); ProMACE-MOPP(泼尼松、甲氨喋呤、多柔比星、环磷酰胺、依托泊 苷、甲酰四氢叶酸、二氯甲基二乙胺(mechloethamine)、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼); ProMACE-CytaBOM(泼尼松、甲氨喋呤、多柔 比星、环磷酰胺、依托泊苷、甲酰四氢叶酸、阿糖胞苷、博来霉素和 长春新碱);MACOP-B(甲氨喋呤、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、泼尼松、博来霉素和甲酰四氢叶酸);MOPP(二氯甲基二乙胺、长春 新碱、泼尼松和丙卡巴肼);ABVD(阿霉素/多柔比星、博来霉素、长 春碱和达卡巴嗪);与ABV(阿霉素/多柔比星、博来霉素、长春碱)交 替的MOPP(二氯甲基二乙胺、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼);与 ABVD(阿霉素/多柔比星、博来霉素、长春碱和达卡巴嗪)交替的 MOPP(二氯甲基二乙胺、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼);ChIVPP(苯 丁酸氮芥、长春碱、丙卡巴肼、泼尼松);IMVP-16(异环磷酰 胺、甲 氨喋呤、依托泊苷);MIME(甲基-gag、异环磷酰胺、甲氨喋呤、依托 泊苷);DHAP(地塞米松、高剂量阿糖胞苷和顺铂);ESHAP(依托泊苷、 甲基泼尼松龙、HD阿糖胞苷和顺铂);CEPP(B)(环磷酰胺、依托泊苷、 丙卡巴肼、泼尼松和博来霉素);CAMP(洛莫司汀、米托蒽醌、

阿糖胞苷和泼尼松);和CVP-1(环磷酰胺、长春新碱和泼尼松);DHAP(顺铂、高剂量阿糖胞苷和地塞米松);CAP(环磷酰胺、多柔比星、顺铂);PV(顺铂、长春碱或长春地辛);CE(卡铂、依托泊苷);EP(依托泊苷、顺铂);MVP(丝裂霉素、长春碱或长春地辛、顺铂);PFL(顺铂、5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸);IM(异环磷酰胺、丝裂霉素);IE(异环磷酰胺、依托泊苷);IP(异环磷酰胺、顺铂);MIP(丝裂霉素、异环磷酰胺、顺铂);ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷);PIE(顺铂、异环磷酰胺、依托泊苷);长春瑞滨和顺铂;卡铂和紫杉醇;CAV(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱);CAE(环磷酰胺、多柔比星、依托泊苷);CAVE(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱、依托泊苷);EP(依托泊苷、顺铂);和CMCv(环磷酰胺、甲氨蝶呤、洛莫司汀、长春新碱)。

[0364] PTK7抗体-药物缀合物可与全身性抗癌药物(诸如epithilones(BMS-247550、Epo-906)、紫杉烷的再制剂(Abraxane、Xyotax)、微管蛋白抑制剂(MST-997、TTI-237))或与靶向细胞毒素(诸如CMD-193和SGN-15)组合使用。其他有用的抗癌剂包括**TAXOTERE<sup>®</sup>**、**TARCEVA<sup>®</sup>**、**GEMZAR<sup>®</sup>**(吉西他滨)、5-FU、

**AVASTIN<sup>®</sup>**、**ERBITUX<sup>®</sup>**、**TROVAX<sup>®</sup>**、anatumomab mafenatox、来曲唑、多西他赛和蒽环霉素类。

[0365] 对于组合疗法,PTK7抗体-药物缀合物和/或一种或多种其他治疗剂或诊断剂在适于预期治疗或诊断的性能的任何时间段内施用。因此,单一药剂可实质上同时施用(即,以单一制剂形式或在数分钟或小时内)或以任一顺序连续施用。例如,单一药剂治疗可在彼此约1年内、诸如在约10、8、6、4或2个月内、或在4、3、2或1周内、或在约5、4、3、2或1天内施用。PTK7抗体-药物缀合物与第二治疗剂的组合的施用优选引发比单独任一者更大的效应。

[0366] 在本发明的一些方面,其他形式的疗法包括除如本文所述的PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物外还施用一种或多种治疗剂。治疗剂包括,但不限于,第二抗体(例如,抗VEGF抗体、抗HER2抗体、抗CD25抗体和/或抗CD20抗体)、血管生成抑制剂、细胞毒性剂、抗炎剂(例如,紫杉醇、多西他赛、顺铂、多柔比星、泼尼松、丝裂霉素、孕酮、他莫昔芬或氟尿嘧啶)。

[0367] 在本发明的一些方面,可存在多于一种PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物。可存在至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种不同或更多PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物。通常,那些PTK7抗体或PTK7抗体-药物缀合物可具有不会不利地影响彼此的互补活性。例如,可使用以下PTK7抗体中的一种或多种:针对PTK7上的一个表位的第一PTK7抗体和针对PTK7上的不同表位的第二PTK7抗体。

[0368] 公开的组合疗法可引发协同治疗效应,即比其个别效应或治疗结果之和更大的效应。本文描述可测量的治疗结果。例如,协同治疗效应可以由单一药剂引发的治疗效应或由给定组合的单一药剂引发的治疗效应之和的至少约2倍、或至少约5倍、或至少约10倍、或至少约20倍、或至少约50倍、或至少约100倍的效应。协同治疗效应也可观察为与由单一药剂引发的治疗效应或由给定组合的单一药剂引发的治疗效应之和相比,治疗效应增加至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%或更多。协同效应也是当组合使用治疗剂时允许其减少给予的效应。

[0369] 如整个详述中所使用,除非另外指示,否则术语“约”意指在术语“约”之后的值的值 $\pm 1\%$ 。

## 实施例

[0370] 提供以下实施例仅用于说明性目的,而不意欲以任何方式限制本发明的范围。实际上,除那些本文显示和描述的那些以外的本发明的各种修改,本领域技术人员根据上述说明将是显而易见的,且所述修改落入随附权利要求的范围内。

### [0371] 实施例1

#### [0372] 抗-PTK7抗体的生成和人源化

[0373] 鼠抗体形式的PTK-7抗体根据本领域已知且如PCT国际公开案号W0 2012/112943中所述的程序产生。使用互补决定区(CDR)移植人源化所生成的鼠抗体。重链和轻链的人框架基于关于功能人种系基因的序列和结构相似性进行选择。通过比较小鼠典型CDR结构与具有相同典型结构的人候选者评估功能相似性,如Chothia等人(上文文献)中所述。

[0374] 更具体地,使用计算机辅助的CDR-移植方法(Abysis Database, UCL Business Plc.)和标准分子改造技术人源化PCT国际公开号W0 2012/112943中所述的本文中命名为mu23、mu24和mu58的鼠抗体,以提供人源化mu23、mu24和mu58(下文中分别为hu23、hu24和hu58)。可变区的人框架区基于其与小鼠框架序列和其典型结构的最高序列同源性进行选择。出于分析的目的,将氨基酸分配至CDR结构域中的每一个根据Kabat等人的编号。制造几种人源化抗体变体以便通常保留与人框架区缔合的小鼠杂交瘤的抗原结合互补决定区(CDR)的人源化抗体生成最佳人源化抗体。Hu23、hu24和hu58 mAb 以与其鼠对应体类似的亲和力结合至人PTK7抗原,如使用 **BIACORE**<sup>®</sup>系统所测量。

[0375] 使用本领域公认的技术进行分子改造程序。根据制造商的方案(**TRIZOL**<sup>®</sup> Plus RNA纯化系统,Life Technologies)从杂交瘤提取总 mRNA。被设计以扩增每一杂交瘤的序列特异性5'前导序列引物与3'人C $\gamma$ 1引物组合使用以扩增并克隆每一人源化抗体的可变区。类似地,被特定设计以扩增每一Vk区的5'Vk前导序列与对人 $\kappa$ 恒定区特异性的单一反向引物组合用于扩增并克隆 $\kappa$ 轻链。将扩增片段克隆为嵌合人 $\gamma$ 1/ $\kappa$ 链且充当每一人源化mAb的基准。

[0376] 根据核苷酸序列信息,获得关于鼠抗体mu23、mu24和mu58的重链和轻链的V、D和J基因区段的数据。基于序列数据,设计对抗体的Ig VH和Vk链的前导序列特异性的新引物组用于重组单克隆抗体的克隆。随后,将V-(D)-J序列与小鼠Ig种系序列进行比对。

[0377] mu23的重链基因被鉴定为VH3609(V)、DSP2.3(D)和JH3。mu24的重链基因被鉴定为VHJ558(V)、DSP2.7(D)和JH4。mu58的重链基因被鉴定为IGHV 4-1(V)、DFL 16.1(D)和JH4。所有三条轻链都是 $\kappa$ 类别。对于mu23,轻链基因被鉴定为IGKV14-111和JK5,对于mu24而言鉴定为IGKV3-5和JK1,且对于mu58而言鉴定为IGKV17-121和JK4种系序列。这些结果概述于下表2中。

### [0378] 表2

#### [0379]

克隆	VH	DH	JH	VL	JL
----	----	----	----	----	----

mu23	VH3609	DSP2.3	JH3	IGKVI4-111	JK5
mu24	VHJ558	DSP2.7	JH4	IGKV3-5	JK1
mu58	IGHV4-1	DFL16.1	JH4	IGKV17-121	JK4

[0380] 将从所有三个克隆获得的重链和轻链序列与功能人可变区序列进行比对且针对同源性和典型结构进行审查。对于人源化抗-PTK7抗体 hu23、hu24和hu58,人源化重链和轻链分析的结果分别显示于下表3 和4中。

[0381] 表3

[0382]

人 源 化 mAb	人 VH	人 DH	人 JH	与人种系序列 的%同源性	与小鼠种系序列 的%同源性
hu23	VH2-5	IGHD5-5	JH4	91	81
hu24	VH1-3	IGHD4-23	JH6	82	82
hu58	VH3-7	IGHD2-8	JH6	86	88

[0383] 表4

[0384]

人 源 化 mAb	人 VK	人 JK	与人种系序列的% 同源性	与小鼠序列的%同 源性
hu23	O8	JK5	91	81
hu24	L6	JK1	82	82
hu58	B2	JK4	86	88

[0385] hu23、hu24和hu58的氨基酸序列和相关核酸序列在上文中显示于上表1中。hu23、hu24和hu58的VH区的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:49中,且相应核酸序列分别描述于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:50中。hu23、hu24和hu58的κVL区的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:63中,且相应核酸序列分别描述于SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:64中。

[0386] 如下文实施例中所表明,上文提及的人源化抗体中的每一者充当根据本文教导的有效抗-PTK7抗体-药物缀合物。

[0387] 实施例2

[0388] 人源化抗体的表达

[0389] 使用本领域公认的技术且如PCT国际公开号W0 2012/112943中所述表达并分离抗-PTK7抗体hu23、hu24和hu58。将重链的合成人源化可变DNA片段(Integrated DNA Technologies)克隆至人IgG 1表达载体中。将可变轻链片段克隆至人C-κ表达载体中。通过将相应重链和轻链共转染至CHO细胞中表达每一抗体。

[0390] 更具体地,对于抗体产生,将人源化可变基因PCR产物定向克隆至人免疫球蛋白表达载体中。Ig基因特异性PCR中所用的所有引物包括IgH的限制位点AgeI和XhoI、Igk的



限制位点XmaI和DraIII,其允许定向克隆至分别含有人IgG 1和Igk恒定区的表达载体中。简而言之,用Qiaquick PCR纯化试剂盒(Qiagen,Inc.)纯化PCR产物,随后分别用AgeI和XhoI (IgH)、XmaI和DraIII (Igk)消化。纯化消化的PCR产物,然后连接至表达载体中。连接反应以10μL的总体积用200U T4-DNA连接酶(New England Biolabs)、7.5μL消化且纯化的基因特异性PCR产物和25ng线性化载体DNA进行。用3μL连接产物经由在42℃下热休克转化感受态大肠杆菌DH10B细菌(Life Technologies)并将其置于氨苄青霉素板(100μg/mL)上。随后将VH区的AgeI-EcoRI片段插入pEE6.4HulgG1(Lonza AG)表达载体的相同位点中,同时将合成XmaI-DraIII Vκ插入物克隆至分别pEE12.4Hu-κ表达载体的XmaI-DraIII位点中。

[0391] 通过使用293fectin用适当质粒转染HEK 293细胞生成产生人源化抗体的细胞。用QIAprep Spin柱(Qiagen)纯化质粒DNA。在标准条件下在补充有10%热灭活FCS、100μg/mL链霉素、100U/mL青霉素G(所有都来自Life Technologies)的Dulbecco氏改良的Eagle培养基(DMEM)中在150mm板(Falcon, Becton Dickinson)中培养人胚肾(HEK) 293T(ATCC编号CRL-11268)细胞。

[0392] 对于瞬时转染,使细胞生长至80%汇合。向与1.5mL opti-MEM中的50μL HEK 293转染试剂混合的1.5mL OptiMEM中添加相等量的IgH和相应IgL链载体DNA(12.5μg每一载体DNA)。将混合物在室温下孵育30分钟并均匀分布至培养板。转染后三天收获上清液,由20mL补充有10%FBS的新鲜DMEM更换且在转染后第6天再次收获。通过以800xg离心10分钟从细胞碎片澄清培养上清液并在4℃下储存。用蛋白质G珠粒(GE Healthcare)纯化重组嵌合和人源化抗体。需要通过离子交换色谱进一步纯化hu23和hu24以实现与vc0101和mc8261的一致、可再现的生物缀合。在无额外纯化步骤的情况下,实施例10中所述的硫醇还原的效率和因此所得的ADC药物:抗体比率(DAR)显著且不可预测地波动。未预期对额外纯化的需求,但凭经验测定。

[0393] 实施例3

[0394] hu24结合的表征

[0395] 通过SPR使用Biacore™ 2000(GE Healthcare)测定嵌合和人源化克隆24mAb的比较。使用抗人抗体捕获试剂盒以便将捕获mAb固定于CM5生物传感器芯片上。在每一抗原注射周期之前,将2μg/mL的浓度的人源化mAb捕获于表面上,其中接触时间为2分钟且流速为5μL/分钟。从基线的捕获mAb载量恒定为80-120反应单位。在测试对象捕获和1分钟基线后,使单体人PTK7蛋白质以50、25和12.5nM的浓度流经表面用于2分钟缔合期,随后为2分钟解离期,流速为5μL/分钟。在每一周期后,用3M MgCl<sub>2</sub>的30秒接触时间以10μL/分钟再生抗人捕获表面。

[0396] 通过最初从特异性mAb结合表面减去对照IgG表面来处理Biacore™数据。随后将反应数据截短至缔合和解离期。使用利用三种不同抗原浓度的所得反应曲线以拟合1:1 Langmuir结合模型并通过计算的K<sub>on</sub>和K<sub>off</sub>动力学常数生成表观亲和力,且平衡解离常数定义为K<sub>d</sub>=K<sub>off</sub>/K<sub>on</sub>。所有数据分析步骤都在BiaEvaluation软件3.1(GE Healthcare)中完成。

[0397] 嵌合和人源化mAb之间的计算的亲和力和动力学常数被测定在2倍内(表5)。

[0398] 表5. 嵌合和人源化克隆24 mAb对人PTK7的亲和力常数

[0399]

测试 mAb	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	Kd (nM)
嵌合克隆 24	3.9 E+05	2.3 E-04	0.6
人源化克隆 24 (hu24)	2.7 E+05	3.1 E-04	1.2

[0400]  $K_{on}$  = 缔合速率常数;  $K_{off}$  = 解离速率常数; Kd = 平衡解离常数; M = 摩尔浓度; mAb = 单克隆抗体; s = 秒; nM = 纳米摩尔浓度; 使用重组人PTK7胞外结构域。

[0401] 为了测定由hu24 mAb鉴定的表位, 评估其与PTK7胞外结构域的几种变体的结合。PTK7胞外结构域由7个Ig结构域构成, 且设计变体以包括两个或更多个邻接Ig结构域。变体表达为Fc融合蛋白质, 且通过ELISA测定hu24结合。

[0402] 用扩增如通过结构同源性预测的各种邻接PTK7Ig结构域的引物设计构建体。使用标准分子生物学技术使所得序列与人免疫球蛋白G2 (IgG2) Fc结构域同框且在其上游融合。将Fc融合蛋白质转染至哺乳动物细胞中且72小时后收获上清液。通过ELISA测试抗-PTK7 mAb hu24结合至具有定义Ig结构域的PTK7蛋白质变体的能力。

[0403] 结果显示, hu24结合至PTK7需要Ig结构域1-4 (表6), 且暗示mAb识别PTK7的三级结构特征。

[0404] 表6. hu24 mAb与PTK7结构域的结合

[0405]

构建体中的 PTK7 ECD Ig 结构域	1-2	2-3	1-4	1-5	3-7	6-7	1-7
hu24 mAb 结合	-	-	+	+	-	-	+

[0406] ECD = 细胞外结构域。Ig = 免疫球蛋白。

[0407] 结构域1-2 = 残基31-236;

[0408] 结构域2-3 = 残基110-321;

[0409] 结构域1-4 = 残基31-409;

[0410] 结构域1-5 = 残基31-510;

[0411] 结构域3-7 = 残基230-703;

[0412] 结构域6-7 = 残基503-703;

[0413] 结构域1-7 = 全长ECD, 残基31-703。

[0414] 进行实验以表征抗-PTK7 mAb hu24的细胞结合性质。为了确认抗原特异性, 在如通过免疫印迹所测定具有实质或可忽略PTK7表达的细胞系中评估结合。

[0415] 通过凝胶电泳解析全细胞提取物并将其转移至硝基纤维素膜。将膜与hu6M024在具有0.1% Tween-20 (TBST) (其具有5%重量/体积的脱脂乳)的Tris-缓冲盐水中一起孵育,然后用TBST洗涤,与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人抗体(Santa Cruz Biotechnology No sc-2453)一起孵育并在暴露于化学发光底物之前充分洗涤。

[0416] 免疫印迹指示细胞系BxPC3和MDAMB436中的PTK7的实质上表达且细胞系ASPC1中的PTK7的可忽略表达(图2A)。用hu24的基于流式细胞术的细胞结合结果与免疫印迹数据完全一致(图2B),其表明hu24的抗原特异性。

[0417] 进行额外流式细胞术实验以评估hu24mAb与具有PTK7的内源性表达的癌细胞系的结合。简而言之,用TrypLE™ Express (Gibco® No 12604-021)解离粘附细胞,然后用培养基中和。通过离心收获悬浮细胞。将细胞再悬浮于具有所述浓度的mAb的染色缓冲液(具有3% BSA的PBS)中并在冰上孵育30分钟。将细胞在染色缓冲液中洗涤,再悬浮于具有藻红素(PE)标记的抗人抗体(Jackson ImmunoResearch No 109-115-098)的染色缓冲液中并在冰上孵育30分钟。将细胞洗涤,再悬浮于具有7-AAD存活染料(BD Biosciences, Pharmingen No 51-68981E)的染色缓冲液中并通过流式细胞术用BD FACSCalibur™进行分析。针对每一样品测定活细胞群体的PE通道中的平均荧光强度(MFI)。

[0418] Hu24 mAb在测试的最低浓度(0.1μg/ml)下表现出与各种癌细胞系的结合。相反,对照抗体在测试的最高浓度(10μg/ml)下不显示可感知的结合(表7)。

[0419] 表7.hu24 mAb与癌细胞系的结合性质

[0420]

癌细胞系 (肿瘤类型)	MFI, 对照 mAb	MFI, hu6M024 mAb		
	10 μg/mL	0.1 μg/mL	1 μg/mL	10 μg/mL
H661 (肺癌)	4.2	60	243	309
H446 (肺癌)	11	95	342	411
U2OS (骨肉瘤)	5.3	122	385	431

[0421] mAb=单克隆抗体;MFI=平均荧光强度;μg/mL=微克/毫升。

[0422] 实施例4

[0423] 各种癌细胞系中的PTK7的表达

[0424] 抗-PTK7抗体hu23和hu24表现出特异性结合至培养的癌细胞系,其从宽范围的肿瘤类型(包括实体和血液适应症)确立,参见下表8。使用TrypLE Express (GIBCO)解离粘附细胞,用细胞培养基中和并计数。将细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞/100μL培养基/孔铺板于U形底96孔板中。在4℃下将板以300xg离心5分钟以沉淀细胞并弃去上清液。将每一沉淀再悬浮于PBS中的3%BSA中的10μg/mL hu23、hu24或非结合对照抗体中,且将板在冰上孵育30分钟。将板离心并将细胞沉淀在200μL PBS中的冰冷3%BSA中洗涤。将每一细胞沉淀再悬浮于1:50稀释于PBS中的3%BSA的100μL R-藻红素(PE)缀合的山羊抗人IgG Fc片段中,且将板在冰上孵育30分钟。将板离心并于4℃下将细胞沉淀在200μL PBS中的3%BSA中洗涤。将每一沉淀再悬浮于100μL PBS中的3%BSA中并转移至含有250μL PBS中的3%BSA的5mL聚碳酸

酯管。通过流式细胞术每样品使用5μL 7-氨基-放线菌素D (7-AAD) 染色溶液作为存活染料来分析样品。从分析排除无活力细胞。

[0425] 表8中的数据显示通过流式细胞术的结合至癌细胞系的抗体的平均荧光强度(MFI)。细胞与人源化抗体hu23和hu24的结合指示多种细胞系中的PTK7表达。PTK7表达在各种非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、结肠、乳房、胰脏和红白血病癌细胞系中是显著的。不结合至PTK7的阴性对照抗体用于比较。

[0426] 表8

[0427]

细胞系	来源的肿瘤类型	平均荧光强度 (10μg/ml Ab)		
		hu24	hu23	阴性对照 Ab
H520	肺癌(NSCLC)	1384	1212	4.8
H446	肺癌(SCLC)	937	915	7.1
H1048	肺癌(SCLC)	955	900	4.4
DMS114	肺癌(SCLC)	793	568	9.9
HCT116	结肠癌	629	436	17.8
H69	肺癌(SCLC)	404	391	11.2
MDAMB468	乳癌(BR)	364	302	12
MDAMB361-DYT2	乳癌(BR)	295	227	8.7
BxPC3	胰腺癌	207	192	4.6
MDAMB436	乳癌(BR)	189	171	3.5
H1299	肺癌(NSCLC)	70.9	59.2	3
SKBR3	乳癌(BR)	39.7	31.2	14.9

[0428]

<b>DU4475</b>	乳癌(BR)	<b>697</b>	<b>ND</b>	<b>3.8</b>
<b>DMS79</b>	肺癌(SCLC)	<b>682</b>	<b>ND</b>	<b>8.5</b>
<b>H522</b>	肺癌(NSCLC)	<b>672</b>	<b>ND</b>	<b>3.8</b>
<b>MiaPaca</b>	胰腺癌	<b>611</b>	<b>ND</b>	<b>3.5</b>
<b>H358</b>	肺癌(NSCLC)	<b>474</b>	<b>ND</b>	<b>4.5</b>
<b>HCC70</b>	乳癌(BR)	<b>474</b>	<b>ND</b>	<b>9.4</b>
<b>H1975</b>	肺癌(NSCLC)	<b>444</b>	<b>ND</b>	<b>4.8</b>
<b>H526</b>	肺癌(NSCLC)	<b>438</b>	<b>ND</b>	<b>12.2</b>
<b>H661</b>	肺癌(NSCLC)	<b>376</b>	<b>ND</b>	<b>3.8</b>
<b>HCC1937</b>	乳癌(BR)	<b>370</b>	<b>ND</b>	<b>7.8</b>
<b>H596</b>	肺癌(NSCLC)	<b>355</b>	<b>ND</b>	<b>21.4</b>
<b>HCC827</b>	肺癌(NSCLC)	<b>251</b>	<b>ND</b>	<b>5.8</b>
<b>Hs700T</b>	胰腺癌	<b>241</b>	<b>ND</b>	<b>4.9</b>
<b>HCC38</b>	乳癌(BR)	<b>227</b>	<b>ND</b>	<b>7.2</b>
<b>TF1a</b>	红白血病(AML)	<b>208</b>	<b>ND</b>	<b>6.2</b>
<b>H2110</b>	肺癌(NSCLC)	<b>171</b>	<b>ND</b>	<b>4.9</b>
<b>KG1</b>	红白血病(AML)	<b>159</b>	<b>ND</b>	<b>5.2</b>
<b>TF1</b>	红白血病(AML)	<b>135</b>	<b>ND</b>	<b>5.9</b>
<b>Hs578T</b>	乳癌(BR)	<b>124</b>	<b>ND</b>	<b>2.7</b>
<b>BT-549</b>	乳癌(BR)	<b>114</b>	<b>ND</b>	<b>3.6</b>
<b>HCC1806</b>	乳癌(BR)	<b>77.5</b>	<b>ND</b>	<b>4.6</b>
<b>Kasumi-1</b>	红白血病(AML)	<b>68.2</b>	<b>ND</b>	<b>5.3</b>
<b>K562</b>	慢性髓性白血病(CML)	<b>56.1</b>	<b>ND</b>	<b>54.7</b>
<b>HEL</b>	红白血病(AML)	<b>46</b>	<b>ND</b>	<b>15.7</b>
<b>RL</b>	非霍奇金淋巴瘤(NHL)	<b>44.2</b>	<b>ND</b>	<b>29.8</b>
<b>Raji</b>	非霍奇金淋巴瘤(NHL)	<b>36.3</b>	<b>ND</b>	<b>20.3</b>
<b>HL60 MX2</b>	早幼粒细胞性白血病(AML)	<b>25.7</b>	<b>ND</b>	<b>25.2</b>
<b>HEL92.1</b>	红白血病(AML)	<b>23</b>	<b>ND</b>	<b>7.7</b>
<b>NB4</b>	早幼粒细胞性白血病(AML)	<b>19.5</b>	<b>ND</b>	<b>6.8</b>

[0429]

<b>RPMI8226</b>	<b>多发性骨髓瘤</b>	<b>17.8</b>	<b>ND</b>	<b>8.3</b>
<b>HL60</b>	<b>早幼粒细胞性白血病(AML)</b>	<b>12.7</b>	<b>ND</b>	<b>10.9</b>
<b>MV411</b>	<b>单核细胞性白血病</b>	<b>10.1</b>	<b>ND</b>	<b>7.7</b>
<b>U937</b>	<b>单核细胞性白血病</b>	<b>5.8</b>	<b>ND</b>	<b>5.0</b>
<b>ASPC1</b>	<b>胰腺癌</b>	<b>4.5</b>	<b>ND</b>	<b>2.6</b>
<b>THP-1</b>	<b>单核细胞性白血病</b>	<b>4.0</b>	<b>ND</b>	<b>4.0</b>
<b>EKVX</b>	<b>肺癌(NSCLC)</b>	<b>3.8</b>	<b>ND</b>	<b>3.1</b>

[0430] ND=无数据。

[0431] 使用Agilent SurePrint GE 8x60 v2阵列使用从PDX肿瘤细胞分离的总RNA生成表9中所示针对29种PDX肿瘤系的微阵列数据。用单色收集的原始微阵列数据的处理包括背景减去和分位数均一化。将均一化数据转化为以2为底的对数,生成用于下游分析中的基因表达值。该数据反映与指示PDX细胞系相关的PTK7表达的相对量。BR=乳房,LU-肺,OV=卵巢,SK=黑素瘤,CR=结肠直肠,LIV=肝。

[0432] 表9

<b>PDX 细胞系</b>	<b>相对 mRNA 水平</b>
<b>BR13</b>	<b>484.4</b>
<b>BR22</b>	<b>714.1</b>
<b>BR31</b>	<b>210.8</b>
<b>BR56</b>	<b>393.4</b>
<b>BR64</b>	<b>237.2</b>
<b>BR120</b>	<b>319.6</b>
<b>BR36</b>	<b>324.0</b>
<b>BR133</b>	<b>639.1</b>
<b>LU176</b>	<b>643.6</b>
<b>LU135</b>	<b>576.0</b>
<b>LU58</b>	<b>113.8</b>
<b>OV39</b>	<b>238.9</b>
<b>OV45</b>	<b>410.1</b>

[0433]

[0434]

<b>OV55</b>	<b>364.6</b>
<b>SK23</b>	<b>464.7</b>
<b>SK25</b>	<b>171.3</b>
<b>SK19</b>	<b>484.4</b>
<b>LU86</b>	<b>288.0</b>
<b>LU95</b>	<b>377.4</b>
<b>LU64</b>	<b>247.3</b>
<b>LU49</b>	<b>56.5</b>
<b>LU70</b>	<b>221.3</b>
<b>LU50</b>	<b>195.4</b>
<b>CR2</b>	<b>286.0</b>
<b>CR14</b>	<b>187.4</b>
<b>CR42</b>	<b>471.1</b>
<b>CR88</b>	<b>143.0</b>
<b>LIV13</b>	<b>75.6</b>
<b>LIV40</b>	<b>254.2</b>

[0435] 还在免疫受损小鼠中的七个PDX模型中通过免疫组织化学评估 PTK7表达:四个三阴性乳癌PDX (BR13、BR22、BR31和BR5);一个孕酮受体阳性 (PR+) 乳癌PDX (BR36);和两个NSCLC PDX (NSCLC135和NSCLC176)。

[0436] 简而言之,使用标准组织学程序将来自每一异种移植物的组织片段福尔马林固定,处理并石蜡包埋 (FFPE)。将5微米切片切割至带电载片上,干燥,在二甲苯中去石蜡化并用分级醇再水合成蒸馏水。在 Borg Decloaker (Biocare Medical) 中使用Retriever 2100压力锅 (Electron Microscopy Sciences) 进行热诱导的表位恢复并冷却至室温 (RT) 并保持20分钟 (min)。在RT下将内源性过氧化酶用Peroxidazed 1 (Biocare Medical) 淬灭10min。在RT下用Background Punisher (Biocare Medical) 阻断非特异性蛋白质相互作用10min。在RT下将组织切片与一级抗体以0.5μg/mL一起孵育1小时。一级抗体是兔抗 - PTK7克隆 (Stem CentRx™ Inc) 或兔同种型对照 (DA1E) mAb免疫球蛋白G (IgG) **XP®** (Cell Signaling Technologies no.3900)。在RT下用 **SignalStain®** Boost IHC检测试剂 (Cell Signaling Technologies no. 8114) 检测一级抗体的结合30min。在RT下用DAB+ (3',3'-二氨基联苯胺;DAKO) 使染色显色5min。将载片在CAT苏木素 (Biocare Medical) 中短暂复染,在水中洗涤,在分级醇中脱水,在二甲苯中清洁,并用Permount™封固剂 (Fisher Chemicals) 盖上盖片。

[0437] 在所有PDX模型中在血浆膜上观察PTK7 (图3)。

[0438] 实施例5

[0439] 各种肿瘤组织中的PTK7的表达

[0440] 在原发性人肿瘤中测定PTK7 mRNA表达。简而言之,使冷冻肿瘤和正常组织片段化,并用Qiagen RNeasy Mini试剂盒(Qiagen,目录号74106)分离mRNA。使用HT RNA微流体LabChip测定和LabChip GX微流体毛细管电泳仪器(Perkin Elmer)进行RNA定量和质量评价。稀释每一样品的RNA,使得该量落入仪器的线性范围(25-250ng/ $\mu$ L)内。使用Life Technologies,High Capacity RNA-to-cDNA试剂盒(目录号4387406)遵循制造商的指导中概述的方案将分离RNA样品逆转录成cDNA。使用基于TaqMan Probe的基因表达分析和ABI ViiA7实时PCR系统(Life Technologies)进行qRT-PCR反应。对于设定于预制造的TaqMan低密度阵列卡上的每一探针一式四份地运行目标基因和内源性对照。使用ExpressionSuite 软件v1.0.3(Life Technologies)生成用于大多数样品的信号扩增的自动化阈值。很少对自动化阈值进行人工调节。弃去产生Ct值>35的扩增曲线,如同生成Ct值但不表现出对数扩增的趋势的那些曲线。所有Ct值都从ExpressionSuite软件导出且在Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Inc)中进行相对定量计算。

[0441] 图4A-C显示(A)乳癌、(B)NSLC和(C)卵巢癌中的PTK7 mRNA的水平。使用相对倍数差异(RQ)或比较Ct方法、使用方程 $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )方法评价PTK7表达的定量。RQ数据代表相对于对照RNA样品的PTK7表达倍数差异。对于乳癌样品,使用自BioChain(Newark, CA,目录号R1234086-50,批号B610189,75岁女性)购买的正常乳房RNA样品生成RQ数据。对于肺癌,报告的RQ数据代表相对于从Life Technologies(目录号AM7968,批号1308017,80岁女性)购买的正常肺RNA的PTK7表达的倍数差异。对于卵巢癌样品,报告的RQ数据代表相对于从由Cleveland Clinic(Cleveland, OH)提供的正常卵巢组织(组织ID编号0204C011C)分离的RNA的PTK7表达的倍数差异。还相对于来自正常人组织的RNA合并物(BioChain,目录号R4234565,批号B611043)、以及Universal Human Reference RNA合并物(Agilent,目录号740000)(其由10个独特癌细胞系的相等份数的RNA构成)计算所有肿瘤的RQ值。

[0442] 乳房、NSCLC和卵巢肿瘤显示与相应正常组织相比PTK7 mRNA表达增加(图4A-C)。TNBC中的过表达最值得注意,而卵巢肿瘤中的过表达是中等的。

[0443] 图5显示NSCLC患者中较高PTK7 mRNA表达和较差整体存活之间的关联。为了确定PTK7表达是否与肺癌中的存活终点相关,用免费软件<http://kmplot.com/analysis> (Gyorffy et al., 2013, PloS One. 18;8(12):e82241)将Kaplan-Meier分析应用至生物信息数据集。使用工具的自动选择最佳截止值针对719个NSCLC-腺癌患者绘制PTK7 mRNA水平和患者存活数据。高PTK7表达与较短存活相关(危险比HR=4.06,对数秩P=1.1E-16)。

[0444] 在食道癌中观察PTK7蛋白质表达。使用组织微阵列(ES1502,来自US Biomax)进行免疫组织化学。简而言之,将来自福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤块的切片以5微米切割且烘焙至载片上。将载片在二甲苯中清洁并在分级醇洗涤液中再水合,在去离子水中结束。在Retriever 2100(电子显微镜)中在pH6柠檬酸盐HIER缓冲液中恢复载片。将Peroxidazed(一种过氧化氢封闭溶液)(Biocare Medical)应用至载片持续10分钟。将载片用TBST洗涤2次,随后用Background Punisher(一种蛋白质组件)(Biocare Medical)洗



涤10分钟。将一级抗体H.235(批号:110325MM,储存液浓度:12.7mg/mL)以2ug/mL的浓度应用60分钟。在用TBST(2×)洗涤后,将二级抗体DAKO抗小鼠 Envision+应用30分钟。在用TBST(2×)再次洗涤后,将载片用Betazoid DAB+(Biocare Medical)显色5分钟。然后将载片在CAT苏木素(Biocare Medical)中复染30秒并盖上盖片。

[0445] 70个肿瘤样品中的40个评分为细胞膜上的PTK7表达阳性。在PTK7阳性的40个样品中,1个表现出高表达,11个表现出中度表达且28个表现出低表达。

[0446] 在前列腺癌中观察PTK7蛋白质表达。如上文针对食道癌所述,使用组织微阵列(BC19013,来自Biomax)进行免疫组织化学。26个肿瘤样品中的11个评分为PTK7表达阳性。在PTK7阳性的11个样品中,2个表现出中度表达且9个表现出低表达。

[0447] 实施例6

[0448] 血清中PTK7蛋白质的测量

[0449] 文献中报道已表征质膜处PTK7的裂解,其导致细胞外结构域的一部分脱落(Golubkov等人,2010,J Biol Chem 285(46):35740-9; Golubkov等人,2012,J Biol Chem 287(50):42009-18;Na等人,2012,J Biol Chem 287(30):25001-9)。循环抗原可影响治疗性化合物(诸如PTK7 ADC)的药代动力学。从各种血清来源评估脱落PTK7的循环水平。用定量彻底使用Meso Scale Discovery(**MSD**<sup>®</sup>)平台测量PTK7蛋白质水平。

[0450] 来自健康人的血清样品从Stanford University血库购买。来自癌症患者的血清样品从Asterand Inc和Bioreclamation Inc购买。食蟹猴血清样品从Bioreclamation Inc购买。

[0451] 小鼠血清样品从携带人肿瘤异种移植物的免疫受损小鼠获得。雌性非肥胖型糖尿病-严重合并性免疫缺陷症(NOD-scid)小鼠从Harlan **Laboratories**<sup>®</sup>购买且根据Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)指南圈养。通过直接植入新鲜切除的人肿瘤样品确立患者衍生的异种移植物(PDX)并通过使异种移植物传代至未经处理的动物中繁殖。异种移植物衍生自原发性肿瘤切除样品,所述样品遵循Institutional Review Board for the Protection of Human Subjects批准且根据Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA)法规购自临床地点。

[0452] 测量PTK7蛋白质水平的测定利用两种通过杂交瘤技术生成的特异性抗-PTK7单克隆抗体(mAb)。mAb结合人和食蟹猴PTK7,但不结合鼠PTK7。在**MSD**<sup>®</sup>平台上开发测定并针对线性反应优化。将**MSD**<sup>®</sup>高结合板用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的PTK7特异性mAb H2.35以1ug/ml包被。将板在4℃下孵育过夜。次日,将板洗涤并添加第二mAb。对于人和猴样品,在**MSD**<sup>®</sup>稀释剂2(MSD#R51BB-4)中以0.5ug/ml添加25ul碘基标记的PTK7特异性mAb 6M38,且对于携带肿瘤的小鼠样品,在**MSD**<sup>®</sup>稀释剂2(MSD#R51BB-4)中以0.5ug/ml添加生物素化6M38,随后添加辣根过氧化酶缀合的链霉抗生物素蛋白。在振荡下将板孵育30分钟。在孵育后,在未洗涤情况下,向孔中添加血清样品或不同量的重组PTK7蛋白质并在板振荡器上孵育2小时。将血清样品在**MSD**<sup>®</sup>稀释剂2中稀释4×至最终25%。将板用具有0.2%Tween-20的磷酸盐缓冲盐水洗涤3次。向板中添加**MSD**<sup>®</sup>1x读取缓冲液(MSD#

R92TC-3) (150 $\mu$ l/孔),并在**MSD**<sup>®</sup>Sector Imager上对 板进行读数。从基于重组蛋白质的标准曲线内插血清样品的值。

[0453] 在来自健康人和代表8种肿瘤类型的癌症患者的样品中测量人血 清中的PTK7蛋白质水平。结果概述于表10中。每一种类中的报道值 指示所有个别样品的平均值。来自健康人的血清中的PTK7的平均值 是 $12.4 \pm 3.3$  ng/mL。一般而言,癌症患者的平均值稍微更高,范围最 高达 $24.6 \pm 3.8$  ng/mL且个别值的分布更宽(图6)。

[0454] 表10.人血清中的PTK7蛋白质水平

[0455]

样品类型	样品的数量	PTK7蛋白质水平 (ng/mL)
健康人	30	$12.4 \pm 3.3$
乳腺癌患者	29	$24.0 \pm 24.1$
结肠直肠癌患者	17	$13.3 \pm 4.3$
黑素瘤患者	6	$15.4 \pm 7.4$
非小细胞肺癌患者	21	$19.8 \pm 12.1$
卵巢癌患者	7	$17.9 \pm 8.1$
胰腺癌患者	9	$20.4 \pm 6.5$
前列腺癌患者	14	$16.2 \pm 5.7$
小细胞肺癌患者	7	$24.6 \pm 3.8$

[0456] ng/mL=纳克/毫升。

[0457] 测量提供为平均值 $\pm$ 独立生物样品的平均值的标准偏差。

[0458] 在来自29个动物的样品中测量未经处理的食蟹猴血清中的PTK7 蛋白质的水平。平均值是 $35.8 \pm 13.4$  ng/mL(表11),其比健康人和癌 症患者的相应值更高。

[0459] 表11.食蟹猴血清中的PTK7蛋白质水平

[0460]

样品类型	样品的数量	PTK7 蛋白质水平 (ng/mL)
健康食蟹猴	29	$35.8 \pm 13.4$

[0461] ng/mL=纳克/毫升。

[0462] 测量提供为平均值 $\pm$ 独立生物样品的平均值的标准偏差。

[0463] 小鼠血清样品从具有人肿瘤异种移植物的免疫受损小鼠获得。具 体地,异种移植 物是PDX,其通常保存衍生其的人肿瘤的架构和基因 型(DeRose等人,2011,Nat Med 17 (11):1514-20)。所有11个肿瘤类型 的血清中的PTK7蛋白质的平均值对于所有肿瘤类型都是 $<1$  ng/mL(表 12),因此,显著低于针对人和猴获得的值。由于测定中所用的mAb 不与鼠 PTK7交叉反应,所以所述值理解为从肿瘤异种移植植物而非正 常鼠组织脱落的人PTK7蛋白 质。

[0464] 表12.携带肿瘤的小鼠血清中的PTK7蛋白质水平

[0465]

肿瘤异种移植	肿瘤模型的数量	PTK7 蛋白质水平 (ng/mL)
未经处理(无异种移植)	不适用	0 ± 0
乳癌	11	0.454 ± 0.872
结肠直肠癌	29	0.023 ± 0.083
头颈癌	2	0.355 ± 0.501
肾癌	7	0.004 ± 0.009
肝癌	7	0.008 ± 0.021
非小细胞肺癌	20	0.065 ± 0.104
卵巢癌	9	0.053 ± 0.086
胰腺癌	9	0.018 ± 0.055
前列腺癌	2	0 ± 0
皮肤癌	9	0.208 ± 0.307

[0466]

肿瘤异种移植	肿瘤模型的数量	PTK7 蛋白质水平 (ng/mL)
小细胞肺癌	10	0.004 ± 0.011

[0467] ng/mL=纳克/毫升。

[0468] 测量提供为平均值±肿瘤模型的平均值的标准偏差。个别模型的值是1至12个携

[0469] 带肿瘤的动物的测量的中值。

[0470] 实施例7

[0471] 内化

[0472] 抗体内化是针对表达PTK7的细胞中的细胞毒性递送ADC的关键特征。观察到抗-PTK7抗体hu24内化至癌细胞中,这表明抗体是适于向细胞中递送毒素的媒介物。使用TrypLE Express (Gibco) 解离粘附细胞,用细胞培养基中和,然后计数。将细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞/100 $\mu$ L 培养基/孔等分至U形底96孔板中。在4℃下将板以300xg离心5分钟以沉淀细胞并抽吸上清液。所有试剂都保持在冰上用于接下来步骤。

[0473] 将每一细胞沉淀再悬浮于100 $\mu$ L PBS中的3%BSA中的3 $\mu$ g/ml hu24或非结合抗体(Human IgG,Thermo Scientific)中。将板在冰上孵育30分钟,然后离心,并将细胞沉淀在PBS中的200 $\mu$ L 3%BSA中洗涤。将细胞沉淀再悬浮于100 $\mu$ L 37℃预温热的细胞培养基中并在37℃培养箱中放置1或4小时。将待在4℃下孵育的细胞沉淀类似地再悬浮,然后置于冰

上。在孵育后,离心样品,抽吸上清液并用200μL/ 孔的冰冷的PBS中的3%BSA洗涤并再悬浮于100μL/孔的冰冷的PBS 中的3%BSA中并置于冰上。随后离心所有样品,抽吸上清液,将每一细胞沉淀再悬浮于100μL冰冷的PBS中的3%BSA中1:50稀释的 别藻蓝蛋白 (APC) 缀合的抗人IgG Fc片段中。将板在冰上孵育30分 钟,然后离心,且将细胞沉淀在200μL PBS中的3%BSA中洗涤,再 悬浮于100μL PBS中的3%BSA中,并转移至含有250μL PBS中的 3%BSA的5mL聚碳酸酯管。通过流式细胞术每样品使用5μL 7-AAD 作为存活染料来分析样品。针对每一样品测量平均荧光强度 (MFI) , 且从分析排除无活力细胞。”内化%”的值计算为(100%-[孵育后的 MFI/孵育前的MFI])。表13中的结果指示,hu24抗体内化至所有测 试的细胞系中,且内化是温度依赖性的,因此反映由细胞的主动(非被 动)内化。

[0474] 表13

[0475]

细胞系	%内化(相对于实验的起始)				实验的数量
	37℃ 1 小时	37℃4 小时	4℃ 1 小时	4℃ 4 小时	
BT549	14.3 ± 9.8	42.5± 9.1	4.3± 8.1	8.5± 7.7	6
H661	21.2 ±12.7	36±17.4	2.2±11.5	2±5.6	5
MDAMB468	21.7 ± 5.7	34.3 ± 9.0	7.0 ± 0.8	9.3± 2.5	3

[0476] 实施例8

[0477] 由肥皂草毒蛋白缀合的抗人Fab片段介导的细胞毒性

[0478] 进行体外细胞毒性测定以确定hu23或hu24抗体是否可介导细胞 毒性剂至细胞系的递送。在这方面,将共价连接至肥皂草毒蛋白毒素 (Advanced Targeting Systems)的抗人IgG Fab片段与未标记的hu23、 hu24或8.84Ab(未结合,阴性对照抗体)组合,然后与细胞一起孵育4 天(表达PTK7的细胞H446和DMS114) 或7天 (OE19非表达PTK7的 细胞;OE21表达PTK7的细胞),其后测量细胞活力。

[0479] 在一个实验中,将H446或DMS114癌细胞系以9600个细胞/孔 (H446) 或6400个细胞/孔 (DMS114) 铺板至透明平底组织培养板中的 100μl细胞培养基中。将细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育过夜。次日,以10点浓度曲线以一式三份样品向细胞中添加以1:2摩尔比与 肥皂草毒蛋白缀合的抗人IgG Fab (Fab-ZAP;Advanced Targeting Systems) 预混合的50μl hu23、hu24或8.84Ab,以1μg/ml开始,且在 细胞培养基中1:3稀释。将板在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育4天。为了测量细胞活力,根据供应商的说明书使用MTS测定 (Promega Cell Titer 96水性非放射性细胞增殖测定)。向每一孔中添加30μL合并的 MTS试剂。将板在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育2小时。在490nm 下用96孔板读数器测定光密度 (OD)。从具有细胞的孔的读数减去仅 具有培养基的孔的平均读数以针对背景OD进行对照。使数据经受逻辑非线性回归分析 (GraphPad Prism软件) 以测定将细胞活力抑制 50%的一级抗体的浓度 (IC<sub>50</sub>)。

[0480] 表14中的数据表明,抗-PTK7抗体hu23和hu24两者都向H446 和DMS114细胞赋予肥

皂草毒蛋白介导的细胞毒性,而8.84阴性对照 抗体则没有。结果表明,hu23和hu24的活性对表达PTK7的细胞是 特异性的。

[0481] 表14

[0482]

细胞系	IC50 值(ng/mL)		
	hu23+Fab-ZAP	hu24+Fab-ZAP	8.84+Fab-ZAP
<b>H446</b>	<b>44.7</b>	<b>60.3</b>	<b>&gt;1000</b>
<b>DMS114</b>	<b>10.3</b>	<b>12.0</b>	<b>&gt;1000</b>

[0483] 在另一实验中,在两个衍生自食道癌 的细胞系OE19和 OE21 (Sigma Aldrich) 上进行肥皂草毒蛋白测定。为了测定细胞系上的 PTK7表达,培养细胞并使用Versene (Invitrogen) 分离单细胞悬浮液。将细胞在PBS/2%FCS中洗涤并以5 $\mu$ g/mL的浓度与hu24 抗体或 HuIgG1 (同种型对照) 一起孵育30分钟。将细胞在PBS/2%FCS中再 次洗涤,然后与 抗人Alexa Fluor647 (Jackson ImmunoResearch) 以1: 200一起孵育20分钟。将细胞再次洗 涤,再悬浮于DAPI中,然后在 BD FACSCanto上分析以测定平均荧光强度变化( $\Delta$  MFI)。OE19 细胞 没有表现出高于同种型对照的染色荧光( $\Delta$  MFI=0),而OE21细胞表现 出荧光强度的 几乎两个对数的增加( $\Delta$  MFI=5976),这表明PTK7在 OE21 (一种食道鳞状细胞癌)的表面上 表达。

[0484] 为了测定hu24是否可介导细胞毒性剂的递送,将2500个细胞/ 孔的来自OE21或 OE19的解离单一细胞悬浮液铺板于BD组织培养 板(BD Biosciences)上的培养基中。在铺 板后一天,向培养物中添加不 同浓度的纯化hu24和固定浓度的共价连接至肥皂草毒蛋白 (Advanced Targeting Systems)的4nM抗HuIgG Fab片段。7天孵育后,根据制 造商的说明 书使用CELL TITER **GLO**<sup>®</sup> (Promega) 列举活细胞数目。将使用含有细胞与肥皂草毒蛋白 Fab片段的培养物的原始发光计数设 定为100%参考值且相应地计算所有其他计数(称作“ 均一化RLU”)。使用该测定,表明hu24介导针对OE21细胞、而非OE19细胞的细胞 毒性,且同 种型对照不影响细胞计数,如表15中所示。这些结果表明, 需要抗体hu24的细胞结合以引 发肥皂草毒蛋白介导的对表达PTK7 的细胞的细胞毒性,但对不表达PTK7的细胞无效应。

[0485] 表15

细胞系	IC50 值( $\mu$ g/ml)	
	hu24+Fab-ZAP	HuIgG1 对照 + Fab-ZAP
<b>OE21</b>	<b>0.5</b>	<b>&gt;100</b>
<b>OE19</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&gt;100</b>

[0487] 实施例9

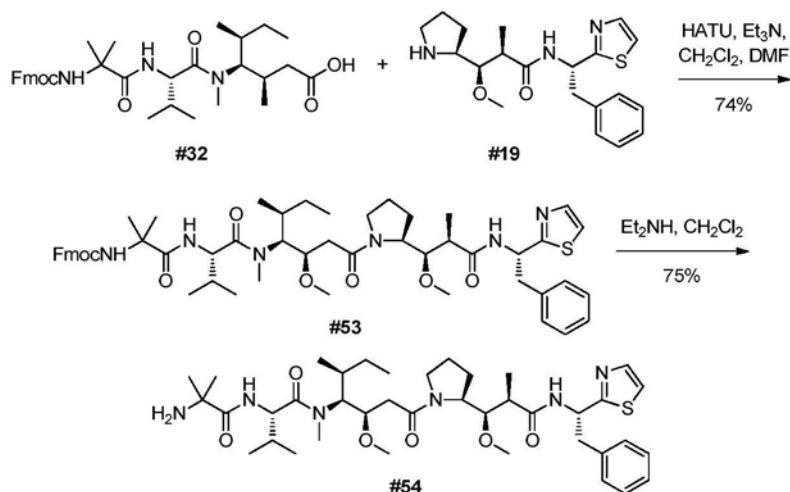
[0488] vc0101和mc8261的合成

[0489] vc0101(vc是接头且0101是药物)和mc8261(mc是接头且8261 是药物)的合成根据

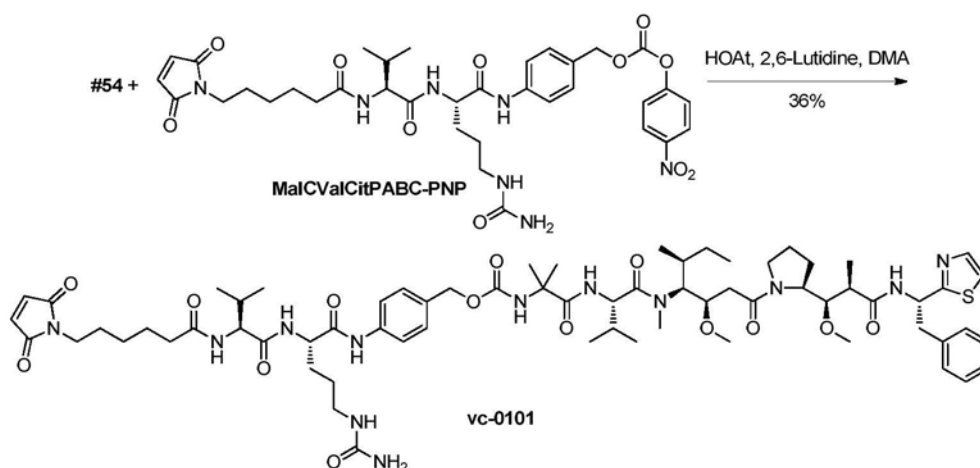
国际公开号W0/2013/072813中所述的方法制备, 该国际公开以其整体通过引用并入本文。

[0490] A. 用于合成vc0101的实验方法

[0491] N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-L-缬氨酰基-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-丁-2-基]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基)吡咯烷-1-基]-2-氧代乙基)-18,18,23-三甲基-3,16,19,22-四氧代-21-(丙-2-基)-2,7,10,13,26-五氧杂-4,17,20,23-四氮杂二十七-1-基]苯基}-N~5~-氨基甲酰基-L-鸟氨酸胺(vc0101)的制备。



[0492]



[0493] 步骤1.N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(#53)的合成。向化合物#32(2.05 g, 2.83mmol, 1当量)于二氯甲烷(20mL, 0.1M)和N,N-二甲基甲酰胺(3mL)中的溶液中添加胺#19(2.5g, 3.4mmol, 1.2当量)、HATU(1.29 g, 3.38mmol, 1.2当量)和三乙胺(1.57mL, 11.3mmol, 4当量)。将混合物在室温下搅拌,同时通过LC-MS和TLC监测反应进程。一旦完成,在真空中浓缩反应物,将残余物与庚烷共沸三次,且通过硅胶色谱(梯度:庚烷中的0%至55%丙酮)纯化所得粗产物,产生作为固体的化合物#53(2.42g, 74%)。LC-MS:m/z 965.7[M+H<sup>+</sup>], 987.6[M+Na<sup>+</sup>], 保留时间=1.04分钟(方案H-下文);HPLC(方案A-下文):m/z 965.4[M+H<sup>+</sup>], 保留时间=11.344分钟(纯度>97%);<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 假定为旋转异构物的混合物,特征信号:δ7.86-7.91(m, 2H), [7.77(d, J=

3.3Hz)和7.79(d, J=3.2Hz), 总共1H], 7.67-7.74(m, 2H), [7.63(d, J=3.2Hz)和7.65(d, J=3.2Hz), 总共1H], 7.38-7.44(m, 2H), 7.30-7.36(m, 2H), 7.11-7.30(m, 5H), [5.39(ddd, J=11.4, 8.4, 4.1 Hz)和5.52(ddd, J=11.7, 8.8, 4.2Hz), 总共1H], [4.49(dd, J=8.6, 7.6 Hz)和4.59(dd, J=8.6, 6.8Hz), 总共1H], 3.13, 3.17, 3.18和3.24(4s, 总共6H), 2.90和3.00(2br s, 总共3H), 1.31和1.36(2br s, 总共6H), [1.05(d, J=6.7Hz)和1.09(d, J=6.7Hz), 总共3H]。

[0494] 步骤2.0101:2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(#54)的合成。

[0495] 向化合物#53(701mg, 0.726mmol)于二氯甲烷(10mL, 0.07M)中的溶液中添加二乙胺(10mL), 并将反应混合物在室温下搅拌, 同时通过LC-MS和TLC监测反应进程。一旦完成, 在真空中浓缩反应物, 将残余物与庚烷共沸三次, 且通过硅胶色谱(梯度: 二氯甲烷中的0%至10%甲醇)纯化所得粗产物。将残余物用乙醚和庚烷稀释并在真空中浓缩, 以得到作为白色固体的#54(406mg, 75%)。LC-MS: m/z 743.6 [M+H<sup>+</sup>], 保留时间=0.70分钟(方案F-下文); HPLC(方案A-下文): m/z 743.4 [M+H<sup>+</sup>], 保留时间=6.903分钟, (纯度>97%); <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 假定为旋转异构物的混合物, 特征信号: δ[8.64(br d, J=8.5Hz)和8.86(br d, J=8.7Hz), 总共1H], [8.04(br d, J=9.3Hz)和8.08(br d, J=9.3Hz), 总共1H], [7.77(d, J=3.3Hz)和7.80(d, J=3.2 Hz), 总共1H], [7.63(d, J=3.3Hz)和7.66(d, J=3.2Hz), 总共1H], 7.13-7.31(m, 5H), [5.39(ddd, J=11, 8.5, 4Hz)和5.53(ddd, J=12, 9, 4 Hz), 总共1H], [4.49(dd, J=9, 8Hz)和4.60(dd, J=9, 7Hz), 总共1H], 3.16, 3.20, 3.21和3.25(4s, 总共6H), 2.93和3.02(2br s, 总共3H), 1.21(s, 3H), 1.13和1.13(2s, 总共3H), [1.05(d, J=6.7Hz)和1.10(d, J=6.7Hz), 总共3H], 0.73-0.80(m, 3H)。

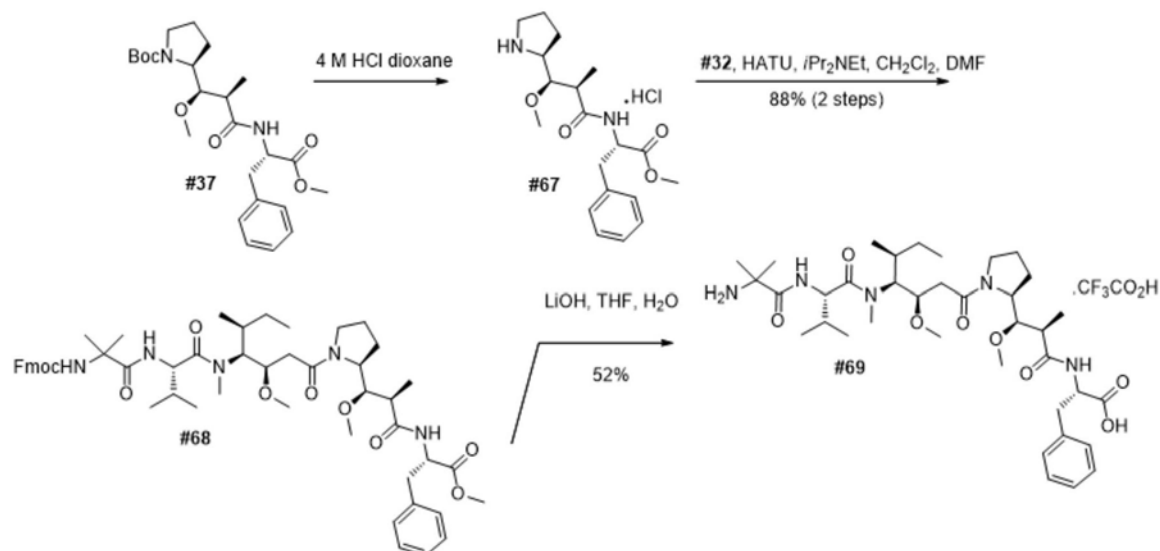
[0496] 步骤3.vc0101: N-[6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-L-缬氨酰基-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-丁-2-基]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]吡咯烷-1-基}-2-氧代乙基)-18,18,23-三甲基-3,16,19,22-四氧代-21-(丙-2-基)-2,7,10,13,26-五氧杂-4,17,20,23-四氮杂二十七-1-基]苯基}-N~5~-氨基甲酰基-L-鸟氨酸的合成。

[0497] 根据一般程序E(下文)使用适当量的DMA作为溶剂、以及HOAT和2,6-二甲基吡啶作为添加剂完成化合物0101(#54)与接头vc(N-[6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-L-缬氨酰基-N<sup>5</sup>-氨基甲酰基-N-[4-({[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基}甲基)苯基]-L-鸟氨酸)(MalcValCitPABC-PNP)的偶联, 且根据方法D(下文)纯化所得粗制期望物质, 以得到33mg(36%)期望产物。在方案A(下文)指定且柱维持在45℃的条件下, 该物质得到9.114分钟的HPLC保留时间(方案A-下文); LC-MS: m/z 1342.6 [M+H<sup>+</sup>], 保留时间3.48分钟(方案H-下文)。

[0498] B. 用于合成mc8261的实验方法

[0499] N-[6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(mc8261)的制备。

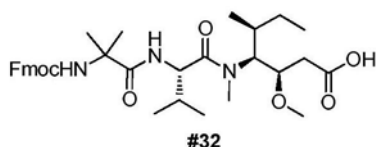
[0500]



[0501] 步骤1. N-[(2R,3R)-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2S)-吡咯烷-2-基]丙酰基]-L-苯基丙氨酸甲酯盐酸盐(#67)的合成。根据一般程序C(下文),从 #37 (2.39g, 5.33mmol, 1当量)、二氧杂环己烷(10mL, 0.53M)和二氧杂环己烷中的4M盐酸溶液(10mL, 40mmol, 7.5当量)合成作为白色固体的#67 (2.21g), 其未经进一步纯化即用于下一步骤。LC-MS:  $m/z$  349.2  $[M+H]^+$ , 保留时间=0.53分钟;  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.45-9.58 (br m, 1H), 8.63 (d,  $J=8.1$ Hz, 1H), 8.51-8.62 (br m, 1H), 7.25-7.33 (m, 4H), 7.18-7.25 (m, 1H), 4.50 (ddd,  $J=10.8, 8.1, 4.5$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.54 (dd,  $J=6.8, 4.5$ Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.11 (dd,  $J=13.8, 4.5$ Hz, 1H), 2.99-3.14 (br m, 3H), 2.89 (dd,  $J=13.8, 10.9$ Hz, 1H), 2.44-2.50 (m, 1H, 假定; 被溶剂峰部分遮蔽), 1.77-1.89 (m, 1H), 1.60-1.73 (m, 2H), 1.46-1.57 (m, 1H), 1.05 (d,  $J=6.8$ Hz, 3H)。

[0502] 步骤2. N-[(9H-芴-9-基甲氧基)羰基]-2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-3-[(2S)-1-甲氧基-1-氧代-3-苯基丙-2-基]氨基]-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺(#68)的合成。根据一般程序D(下文),从二氯甲烷(10mL, 0.04M)中的#32 (353mg, 0.488mmol, 1当量)、

[0503]



[0504] 胺#67 (271mg,  $\leq 0.588$ mmol, 1.3当量)、HATU (223mg, 0.586 mmol, 1.2当量)和二异丙基乙胺 (238 $\mu$ L, 1.71mmol, 3.5当量)合成粗期望物质,通过硅胶色谱(梯度:庚烷中的0%至40%丙酮)进行纯化,得到作为固体的#68 (404mg, 经两个步骤为88%)。LC-MS:  $m/z$  940.7  $[M+H]^+$ , 962.7  $[M+Na]^+$ , 保留时间=1.04分钟; HPLC(方案C-下文): 保留时间=9.022分钟;  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ), 假定为旋转异构物的混合物, 特征信号:  $\delta$  [8.25 (br d,  $J=8$ Hz) 和 8.48 (br d,  $J=8$ Hz), 总共1H], 7.89 (d,  $J=7.4$ Hz, 2H), 7.67-7.75 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.14-7.24 (m, 5H), 4.43-4.69 (m, 3H), 4.17-4.26 (m, 3H), 3.91-3.99 (br m, 1H), 3.63和3.65 (2s, 总共3H), 3.19和3.24 (2s, 总共3H), 3.14和3.15

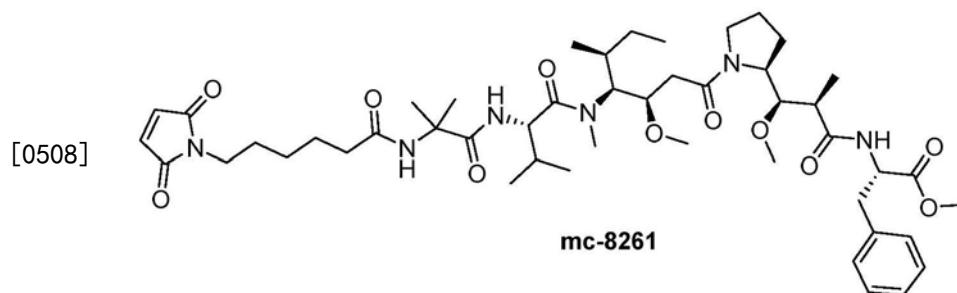


(2s, 总共3H), 2.90和2.99 (2br s, 总共3H), 1.36和1.37 (2br s, 总共3H), 1.30和1.32 (2s, 总共3H), [1.02 (d, J=6.8Hz) 和1.06 (d, J=6.6Hz), 总共3H]。

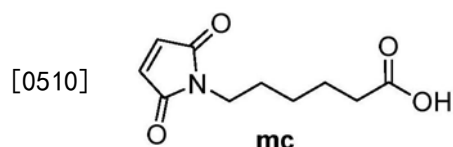
[0505] 步骤3A.8261:2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺,三氟乙酸盐 (#69) 的合成。

[0506] 向#68 (143mg, 0.152mmol, 1当量) 于四氢呋喃 (5mL, 0.02M) 中的溶液中添加氢氧化锂 (9.10mg, 0.378mmol, 2.5当量) 于水 (3mL) 中的溶液。5小时后, 在真空中浓缩反应物, 与庚烷共沸三次, 溶解于二甲基亚砜 (2.2mL) 中并通过反相色谱 (方法C-下文) 纯化, 以得到#69 (56mg, 52%)。HPLC (方案A-下文, 在45℃下): 704.4[M+H<sup>+</sup>], 保留时间=6.623分钟; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), 假定为旋转异构物的混合物, 特征信号: δ8.08-8.22和8.37-8.49 (2m, 总共5H), 7.12-7.28 (m, 5H), 3.18, 3.20和3.24 (3s, 总共6H), 2.95和3.04 (2br s, 总共3H), 1.52和1.53 (2s, 总共3H), 1.39和1.41 (2s, 总共3H), [1.02 (d, J=6.8 Hz) 和1.05 (d, J=6.6Hz), 总共3H], 0.74-0.81 (m, 3H)。

[0507] 步骤4:mc8261:N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-2-甲基丙氨酰基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]氨基}-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基]吡咯烷-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚-4-基]-N-甲基-L-缬氨酰胺的合成。



[0509] 化合物8261 (#69) 与接头马来酰亚胺基己酰基 (mc) 的偶联



[0511] 根据一般程序D (下文) 完成且根据方法C (下文) 纯化所得粗期望物质, 以得到 30.2mg (24%) 期望产物。在方案A (下文) 指定且柱维持在 45℃ 的条件下, 该物质得到9.058 分钟的HPLC保留时间 (方案A-下文); LC-MS: m/z 897.7[M+H<sup>+</sup>], 保留时间0.81分钟 (方案H-下文)。

[0512] C. 一般程序、方法和方案

[0513] 一般程序C: 使用二氧杂环己烷中的盐酸的Boc移除或叔丁基酯 (也称为t-Bu酯) 裂解。向含有Boc的化合物或含有叔丁基酯的化合物于二氧杂环己烷 (或在一些情况下无溶液或其他相关溶剂) 中的溶液中添加盐酸于二氧杂环己烷中的4M溶液。通过LC-MS (或HPLC 或TLC) 监测反应进程。在真空中浓缩反应物且在一些情况下与庚烷共沸一至四次。

[0514] 一般程序D: 与O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 (HATU) 的偶联。向胺 (1.0当量) 和酸 (1.0-2.0当量) 于二氯甲烷中的搅拌溶液中添加N,N-

二甲基甲酰胺(也称为DMF)或两者的混合物,添加HATU(1.0-2.0当量),随后添加三乙胺(2.0-4.0当量)或二异丙基乙胺(2.0-4.0当量,也称为Hunig碱)。通过LC-MS(或HPLC或TLC)监测反应进程;反应通常在3小时内完成。在真空中移除溶剂。通过硅胶或反相色谱纯化残余物或在一些情况下与庚烷共沸三次,用少量乙酸乙酯稀释,然后在二氧化硅或C18键合的二氧化硅上减少并通过硅胶或反相色谱纯化。

[0515] 一般程序E:与N-[6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-L-缬氨酰基-N<sup>5</sup>-氨基甲酰基-N-[4-([ (4-硝基苯氧基)羰基]氧基)甲基]苯基]-L-鸟氨酸酰胺(MalValCitPABC-PNP)的偶联。向有效载荷胺(1当量)和N-[6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-L-缬氨酰基-N<sup>5</sup>-氨基甲酰基-N-[4-([ (4-硝基苯氧基)羰基]氧基)甲基]苯基]-L-鸟氨酸酰胺(MalValCitPABC-PNP,欧洲专利申请(1994),EP624377,1.0-2.0当量)于N,N-二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺(也称为DMA)中的混合物中添加吡啶(0.0-4.0当量)、二异丙基乙胺(0.0-4.0当量),2,6-二甲基吡啶(0.0-4.0当量,也称为2,6-二甲基吡啶)和1-羟基苯并三唑水合物(0.01-1.1当量,也称为HOBT)或3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-醇(0.01-1.1当量,也称为HOAT)。在40℃-50℃下搅拌1-48小时后,在真空中浓缩反应混合物并与庚烷共沸三次。通过反相色谱根据指定方法纯化粗物质,以得到期望物质。

[0516] 方法C:柱:Phenomenex Luna C18,100×30mm,10μm;流动相A:水中的0.02%三氟乙酸(v/v);流动相B:甲醇中的0.02%三氟乙酸(v/v);梯度:经20分钟10%至90%B;流速:20mL/分钟。温度:未控制;检测:DAD 210nm,254nm;注射体积:变量;仪器:Gilson。

[0517] 方法D:柱:Phenomenex Synergi Max-RP,150×21.2mm,4μm;流动相A:水中的0.1%甲酸;流动相B:乙腈中的0.1%甲酸;梯度:30%B持续1.5分钟,经8.5分钟30%至60%B,经0.5分钟60%至100%B,然后经2分钟100%B;流速:27mL/分钟;检测:DAD 210-360nm;MS(+)范围为150-2000道尔顿;仪器:Waters FractionLynx。

[0518] 方案A:柱:Phenomenex Luna C18(2),150×3.0mm,5μm;流动相A:水中的0.1%甲酸(v/v);流动相B:乙腈中的0.1%甲酸(v/v);梯度:经1.5分钟5%B,经8.5分钟5%至100%B,然后100%B持续1分钟;流速:0.75mL/分钟。温度:25℃;检测:DAD 215nm;MS(+)范围为150-2000道尔顿;注射体积:10μL,仪器:Agilent 1200 LCMS。

[0519] 方案C:柱:Phenomenex Luna C18(2),150×3.0mm,5μm;流动相A:水中的0.02%三氟乙酸(v/v);流动相B:甲醇中的0.02%三氟乙酸(v/v);梯度:经10分钟50%至100%B;流速:0.75mL/分钟。温度:未控制;检测:DAD 215nm,254nm;注射体积:10μL;仪器:Agilent 1100 HPLC。

[0520] 方案F:柱:Waters Acquity UPLC BEH,C18,2.1×50mm,1.7μm;流动相A:水中的0.1%甲酸(v/v);流动相B:乙腈中的0.1%甲酸(v/v);梯度:经0.1分钟5%B,经0.7分钟5%至95%B,经0.1分钟95%B;流速:1.25mL/分钟。温度:60℃;检测:200-450nm;MS(+)范围为100-1200道尔顿;注射体积:5μL;仪器:Waters Acquity。

[0521] 方案H:柱:Phenomenex Gemini-NX,C18,4.6×50mm,3μm,**110Å**;流动相A:水中的0.1%甲酸(v/v);流动相B:乙腈中的0.1%甲酸(v/v);梯度:经4.10分钟0%至100%B,线性,然后经0.4分钟100%B;流速:1.5mL/分钟。温度:60℃;检测:DAD 200-450nm;MS(+)范围为100-2000道尔顿;注射体积:5μL;仪器:Agilent。

[0522] 实施例10

[0523] 抗-PTK7抗体的生物缀合

[0524] A. 抗-PTK7-vc0101抗体-药物缀合物

[0525] 在本发明中, 抗-PTK7抗体hu23、hu24和hu58缀合至vc0101 以生成hu23-vc0101 ADC、hu24-vc0101 ADC和hu58-vc0101 ADC, 或缀合至mc8261以生成hu23-mc8261 ADC、hu24-mc8261 ADC和 hu58-mc8261 ADC。hu23、hu24和hu58与vc0101 mc8261的缀合通 过半胱氨酸残基的侧链的衍生实现。这些半胱氨酸通常配对为链间半 胱氨酸二硫桥, 其中在 IgG1抗体上存在4个保守对 (涉及8个半胱氨酸残基)。这些二硫键的部分还原提供游离硫醇的分布, 所述游离硫醇 可用vc接头上的马来酰亚胺柄官能化。具体地, 在37℃下经由添加 100mM HEPES (4- (2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸缓冲液, pH 7.0) 和 1mM二乙烯三胺五乙酸 (DTPA) 中的2.4摩尔浓度过量的三 (2-羧基乙 基) 膦 (TCEP) 将本发明的抗-PTK7抗体部分还原2小时。然后以7的 接头-有效载荷/抗体摩尔比向反应混合物中添加vc0101或mc8261接 头-有效载荷并在25℃下在15%v/v的二甲基乙酰胺 (DMA) 存在下反 应额外1小时。1小时孵育时段后, 添加3倍过量的N-乙基马来酰亚 胺以封端未反应的硫醇并使其反应15分钟, 随后添加6倍过量的 L-Cys以淬灭任何未反应的接头-有效载荷。

[0526] 将反应混合物在4℃下在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.4) 中透析过 夜, 并经由尺寸排阻色谱 (SEC; AKTA explorer, Superdex 200) 纯化。在20mM组氨酸、85mg/mL蔗糖、pH 5.8 缓冲液中配制最终ADC药 物质。

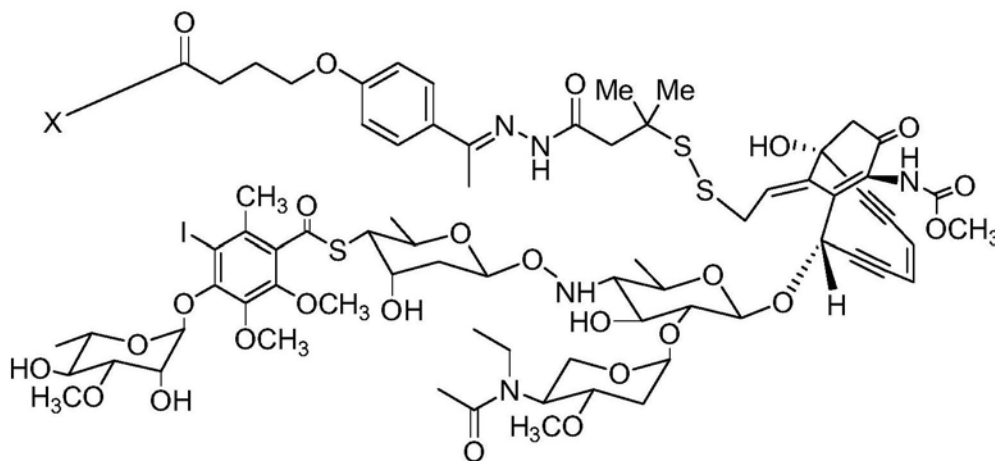
[0527] 经由用于纯度的SEC和疏水性相互作用色谱 (HIC) 和液相色谱电 喷雾离子化质谱 (LC-ESI MS) (其用于计算药物-抗体比率 (载药量)) 进 一步表征抗PTK7抗体-药物缀合物。经由紫外 (UV) 分光光度法测定蛋 白质浓度。该方法提供作为官能化抗体的非均相混合物的 抗体-药物缀 合物, 所述抗体含有约4mol/mol的平均药物: 抗体比率 (DAR)。

[0528] 针对hu24-vc0101经由HIC评价药物分布概况且提供于图7中的 色谱图中。简而言之, 在TSK凝胶丁基-NPR柱上进行分析型HIC。在1.5M硫酸铵、50mM磷酸氢二钾 (pH 7) 中使 ADC结合至柱并用 50mM磷酸氢二钾和20%异丙醇 (IPA) (pH 7) 洗脱。

[0529] B. 抗-PTK7-AcBut CM抗体-药物缀合物

[0530] 在本发明中, 抗-PTK7抗体hu23、hu24和hu58缀合至AcBut-N- 乙酰基- $\gamma$ -卡里奇霉素二甲基酰肼 (AcButCM) Osu酯以生成 hu23-AcButCM ADC、hu24-AcButCM ADC和hu58-AcButCM ADC, 如下文所示, 其中X可以是任何抗体, 例如hu23、hu24和hu58。

[0531]



[0532] 反应混合物包括摩尔比为4-4.5:1的10mg/ml或较少抗-PTK7抗体和AcButCM OSu酯。在向混合涡旋机中添加AcButCM期间进行高搅动。反应pH是8.3且其他反应组分的浓度如下:180mM HEPES 缓冲液、41mM癸酸钠和8% (v/v) 乙醇。将反应在33℃下进行5分钟。在完成缀合反应后,在混合下将反应混合物用1.3体积的调节至pH 8.5 的1M  $K_2HPO_4$ 缓慢稀释。

[0533] 为了纯化,将上述稀释的反应混合物上样于Butyl Sepharose-4 Fast Flow HIC柱(GE Healthcare)的两个批料上,该柱先前在5柱体积(cv)的0.52M磷酸钾缓冲液(pH 8.5)中平衡。上样于柱上的蛋白质为3.5mg/ml的床体积。经由样品上样,流速为15ml/分钟,且在整个色谱的洗涤和洗脱期,流速为22ml/分钟。这种改善的梯度移除结合至柱的较高DAR ADC。

[0534] 上样期间未结合级分主要是反应试剂和大部分未缀合抗体,将其弃去。然后将柱用0.3cv的0.52M磷酸钾缓冲液(pH 8.5)洗涤以移除任何剩余试剂。然后使用具有1cv的0.52M至0.4M磷酸钾缓冲液(pH 8.5)的分级梯度以洗脱任何松散结合的未缀合抗体连同低负载的抗-PTK7-AcButCM(如果存在)。然后使用1cv的0.4M至5mM磷酸钾缓冲液(pH 8.5)的分级梯度洗脱主要级分,以随着梯度结束提供具有3至5范围内的DAR的抗-PTK7-AcButCM。如果存在具有较高DAR的抗-PTK7-AcButCM缀合物,则使用2cv的5mM磷酸钾缓冲液(pH 8.5)的梯度洗脱该级分,且然后洗脱纯去离子水。使用2cv的10mM含有20%乙醇的氢氧化钠洗脱任何具有较高DAR且在去离子水洗脱后保持结合的抗-PTK7-AcButCM缀合物。纯化批料含有具有3至5的DAR的抗-PTK7-AcButCM缀合物。

[0535] 这种改善的缀合和纯化方法生成具有小于6、且在一些方面在3至5范围内的DAR的ADC。此外,所述方法生成载量的较窄分布,例如产物内较小异质性。对缀合和纯化方法的改善进一步包括:1)将AcButCM:抗-PTK7抗体比率减小至4-4.5:1,以生成具有较低DAR的ADC,2)在向抗-PTK7抗体添加AcButCM期间进行高搅动,以生成具有低量的未缀合抗体(游离抗体)的ADC,3)与60-90分钟相比,将孵育时间减少至5分钟,以提供低聚集物,和4)乙醇量降低至6-8%以提供低聚集物。将来自两个批料的纯化的合并峰针对配制的缓冲液透析两次以促进以冷冻状态储存。配制的缓冲液组合物为20mM Tris、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨醇酯80、10mM NaCl (pH 8.0)。

[0536] 实施例11

[0537] hu24 mAb和hu24 ADC的结合特征

[0538] 为了确定hu24 mAb和hu24-vc0101 ADC是否结合至PTK7的食蟹猴直向同源物,克隆食蟹猴PTK7蛋白质并表达。序列分析揭示,该蛋白质与人PTK7蛋白质97.9%相同。

[0539] 进行表面等离子共振 (SPR) 分析以表征mAb和ADC与人和食蟹猴PTK7蛋白质胞外结构域的结合特征。通过SPR分析测定结合相当。mAb和ADC对人或食蟹猴PTK7蛋白质的亲和力之间无显著差异(表 16)。所有 $K_{on}$ 测量值都在3倍内,且所有 $K_{off}$ 测量值都在2倍内,现场考虑的范围都在典型系统误差内,且因此不可能是生理学显著的。

[0540] 表16.hu24和hu24-vc0101对人PTK7和食蟹猴PTK7的亲和力常数

[0541]

测试物	抗原物种	$K_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{off} (s^{-1})$	$K_d (nM)$
hu24 mAb	人	7.9E+05	5.4E-04	0.7

	食蟹猴	4.3E+05	5.2E-04	1.2
hu24-vc0101	人	5.1E+05	5.3E-04	1.4
	食蟹猴	2.8E+05	1.0E-03	3.6

[0542]  $K_{on}$ ＝缔合速率常数; $K_{off}$ ＝解离速率常数; $K_d$ ＝平衡解离常数; M＝摩尔浓度;mAb＝单克隆抗体;nM＝纳米摩尔浓度;s＝秒

[0543] 还通过夹心ELISA评估抗-PTK7 mAb结合至PTK7直向同源物 的能力。简而言之,通过直接包被将人、食蟹猴、大鼠或小鼠PTK7-His 标记的蛋白质捕获于ELISA板上。以1μg/ml、100μl/孔捕获所有抗原。以810ng/ml开始将Hu24 mAb和hu24-vc0101 ADC连续稀释并添加 至经洗涤且封闭的孔中以测试与抗原的结合。通过多克隆抗人IgG辣 根过氧化酶缀合物检测mAb和ADC结合并用TMB底物进行读数。

[0544] 通过ELISA,mAb和ADC相当结合至人和食蟹猴PTK7蛋白 质(表17)。与SPR结果一起,这些结果确认与食蟹猴PTK7的交叉反 应性且显示生物缀合过程不改变观察到的mAb的结合特征。然而, 在观察与人PTK7的结合所需的100倍抗原浓度下,mAb和ADC都 不表现出与大鼠或小鼠PTK7蛋白质的可检测的结合(表17)。通过结 合至已知交叉反应性抗体来确认大鼠和小鼠抗原被正确折叠(数据未 显示)。

[0545] 表17.通过ELISA的hu24和hu24-vc0101与PTK7蛋白质的结 合

[0546]

	ED50 值(ng/mL)			
	人 PTK7	食 蟹 猴 PTK7	大鼠 PTK7	小鼠 PTK7
hu24 mAb	4.7	5.0	未结合	未结合
hu24-vc0101	6.6	7.4	未结合	未结合

[0547] ADC＝抗体-药物缀合物;ED50＝产生50％最大信号的有效剂量; mAb＝单克隆抗体;ng/mL＝纳克/毫升

[0548] 通过流式细胞术使用实施例3中所述的方法比较未缀合hu24和 缀合至vc0101的hu24结合至表达PTK7的细胞的能力。简而言之, 收获培养的H1975或EKVX细胞并在4℃下与hu24-vc0101 ADC或 未缀合hu24 mAb一起孵育,随后与荧光团缀合的二级mAb和存活染料一起孵育,然后通过流式细胞术分析。

[0549] 表18提供活细胞群体的平均通道荧光。在独立重复实验中获得相 当数据,因此,hu24与接头有效载荷的缀合不改变其与表达PTK7的 细胞的结合。

[0550] 表18.缀合和未缀合的hu24的相当的细胞结合

[0551]

细胞系	测试物	hu24-vc0101 ADC 或 hu24 mAb 的浓度			
		0.1 $\mu\text{g/mL}$	0.3 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$
H1975	hu24-vc0101 ADC	94	196	302	341
	hu24 mAb	91	183	310	348
EKVX	hu24-vc0101 ADC	4	4	4	5
	hu24 mAb	4	4	4	5

[0552] 实施例12

[0553] 体外细胞毒性测定

[0554] 在表达目标PTK7的细胞系上评估抗体-药物缀合物hu24-vc0101 的细胞毒性。将改造的HEK293T-PTK7过表达细胞系以500个细胞 /180 $\mu\text{L}$ 细胞培养基/孔铺板于透明平底组织培养板(BD Falcon)中。还 在该测定中测试人癌细胞系并将其以先前测定根据其生长速率对于每一细胞系最佳的密度(H661 1500个细胞/孔和H446 9600个细胞/孔, 在150 $\mu\text{L}$ 中)铺板。将细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在5% $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育过夜。在 次日,根据10点浓度曲线以一式三份样品向细胞添加hu24-vc0101 ADC和8.84 Ab-vc0101 ADC(阴性对照),以3或10 $\mu\text{g/mL}$ 开始,并 在细胞培养基中以1:3稀释。将板在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育4 天。根据供应商的说明书使用MTS测定(Promega CellTiter 96水性非 放射性细胞增殖测定)。向每一孔中添加30 $\mu\text{L}$ (H446,H661)或 40 $\mu\text{L}$ (HEK293T-PTK7)合并MTS试剂,并将板在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育2小时。在490nm下用96孔板读数器测定OD。从具有 细胞的孔的读数减去仅具有培养基的孔的平均读数以针对背景OD进 行对照。使数据进行逻辑非线性回归分析(GraphPad Prism软件)以测 定将细胞活力抑制50%的抗体-药物缀合物的浓度(IC50)。

[0555] 表19提供细胞毒性测定中hu24-vc0101 ADC的IC50值。在所有 三种细胞系中,hu24-vc0101引发有效的细胞毒性,而未结合8.84 Ab-vc0101不引发;这些数据表明,hu24-vc0101的有效的细胞毒性取 决于抗-PTK7抗体。

[0556] 表19

[0557]

细胞系	IC50 值(ng/mL)		
	hu24-vc0101 ADC	8.84 Ab-vc0101 ADC	Free 0101
HEK293-PTK7	1.7	>3000	ND
H661	27.5 ± 20.5	>10000	0.33
H446	7.6 ± 5.0	>10000	0.59

[0558] ND=未测定

[0559] 实施例13

[0560] 抗-PTK7抗体-药物缀合物的体内效力

[0561] 进一步评估抗-PTK7抗体-药物缀合物对人肿瘤患者衍生的异种 移植物(PDX)的体内生长的影响。原发性肿瘤切除样品遵循 Institutional Review Board for the Protection of人Subjects批准且根据HIPAA法规购自临床地点。在Hypothermasol (Biolife Solutions) 中在冰上储存并运输肿瘤片段并将其包埋于含有生长因子的专门混合物的基质胶(BD)中并在切除的24小时内皮下植入雌性NOD/SCID小鼠的乳腺脂肪垫中。每日监测小鼠的健康状态且最初通过目视检查每周两次监测肿瘤生长。一旦肿瘤可触及,肿瘤体积的测量开始追踪肿瘤生长并估计细胞倍增时间。使用方程 $V = (A \cdot B^2) / 2$ 估计肿瘤体积,其中A是长轴且B是短轴。在肿瘤达到500mm<sup>3</sup>至1,500mm<sup>3</sup>的体积时,将其收获用于研究并用于再移植作为患者衍生的异种移植物(PDX)。根据该系,可使用机械和/或化学解离以分离个别细胞用于传代。将活细胞以10,000至50,000个细胞/动物接种至未经处理的动物中。

[0562] 对于效力研究,从传代研究收获肿瘤并将细胞解离至单细胞悬浮液中。使用台盼蓝排除对制剂的活细胞进行计数并在基质胶中每小鼠接种10,000至50,000个细胞。为了考虑PDX的差异生长速率,开始至少25%更多动物以允许随机化时的最小肿瘤体积方差。肿瘤生长,随后最初可触及,一旦肿瘤体积达到约30mm<sup>3</sup>就开始测量。一旦携带肿瘤的小鼠的组群达到140mm<sup>3</sup>至180mm<sup>3</sup>就基于肿瘤大小将研究随机化。通过腹膜内注射给予动物,每周两次持续两周(q4dx4)。随访研究组,直至个别小鼠或整个组肿瘤测量达到1200mm<sup>3</sup>,此时根据IACUC方案指示处死。对于选择给药研究,在2小时、36小时和72小时进行药代动力学下颌下流血。立刻将10μL体积的血液移取至90μL HBS-P(GE Healthcare)中。在分析之前将样品储存于-80℃下。对于每一肿瘤测量,提供肿瘤体积±平均值的标准误差(SEM)。GT=由于大的肿瘤尺寸终止的组。所有研究都包括对照抗体药物缀合物,其由缀合至所分析的相同接头-有效载荷的未结合hIgG1抗体构成且具有相当的药物:抗体比率(DAR)和载量分布。

[0563] 表20-37表明使用各种人肿瘤细胞确立的PDX模型中抗体-药物缀合物hu23-vc0101、hu24-vc0101、hu58-vc0101、hu23-AcButCM、hu24-AcButCM和hu58-AcButCM的有效性,其具有测定为低、中等或高的相对PTK7表达。

[0564] A. 乳癌 (BR)

[0565] 表20和图8显示,与媒介物和药物对照相比,hu23-vc0101、hu24-vc0101和hu58-vc0101 ADC在使用人乳房-13 (BR13) 三阴性乳癌 (TNBC) PDX模型 (高PTK7表达) 的PDX模型中都有效。在BR13 PDX 模型中,hu24-vc0101 ADC比hu23-vc0101和hu58-vc0101两者都更有效。所有测试的PTK7 ADC都比多柔比星 (其为用于TNBC的标准 护理治疗) 更有效。

[0566] 表20. BR13 TNBC PDX中的抗-PTK7-vc0101 ADC的效力

[0567]

天	媒介物	1 mg/kg 多柔比星	3mg/kg 对照-vc0101	3mg/kg hu23-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu58-vc0101
0		144±13	156± 13	153± 9	154±9	153±10
7		174±13	219±29	211±17	199±12	194 ±12
14		255±22	295 ±39	277±28	206±16	175 ±17
21		349±40	353±45	323±44	116±16	97±11
28		428±48	432±50	413±48	48±7	41±4
35		734±74	696±84	537 ±66	39±6	37±5
42		940±105	1001±159	591±74	23±7	20±5
49	GT	GT	775 ±87	23±7	19±7	40±5
56	GT	GT	952±89	15± 6	4 ± 4	32±3
63	GT	GT	1181±119	6 ±4	0± 0	40 ±6
70	GT	GT	1287±98	7±5	0± 0	48±7
77	GT	GT	1449±125	8±5	0±0	64±10
84	GT	GT	GT	14±10	0± 0	85±15
91	GT	GT	GT	20±11	0±0	119±28
98	GT	GT	GT	39± 18	0± 0	165± 26
105	GT	GT	GT	52±22	0± 0	236± 29
112	GT	GT	GT	94± 41	0± 0	314±37
119	GT	GT	GT	116±50	0±0	389±51
126	GT	GT	GT	123±52	0± 0	538±73
133	GT	GT	GT	152±71	0± 0	624±76
140	GT	GT	GT	204±97	0± 0	849±78
147	GT	GT	GT	257±125	0±0	935±74
154	GT	GT	GT	318±141	0± 0	954±65
161	GT	GT	GT	352±148	0±0	GT



[0568] 图9和10显示与hu24-vc0101相比, hu23-mc8261、hu24-mc8261 和hu58-mc8261 ADC在BR13 TNBC PDX模型(高PTK7表达)中的效力。用hu24-vc0101治疗产生超过200天的持续肿瘤消退且表明与抗-PTK7-mc8261 ADC相比更大的肿瘤生长抑制。

[0569] 表21和图11显示, 与媒介物和药物对照相比, hu23-vc0101、 hu24-vc0101和hu58-vc0101 ADC在使用人乳房-22 (BR22) TNBC PDX 模型(高PTK7表达)的PDX模型中都有效。在该模型中, hu23-vc0101 和hu24-vc0101 ADC比hu58-vc0101更有效, 表明针对相同目标(PTK7) 的类似抗体具有不同程度的效力。所有测试的PTK7 ADC都比多西他赛(其为用于TNBC的标准护理治疗)更有效。尤其地, 多西他赛和ADC 的药物组分奥里斯他汀0101具有类似的作用机制, 因为其抑制微管蛋白聚合。

[0570] 表21. BR22 TNBC PDX中的抗-PTK7-vc0101 ADC的效力。

[0571]

天	媒介物	20mg/kg 多西他赛	3mg/kg 对照-vc0101	1mg/kg hu24- vc0101	3mg/kg hu24- vc0101	3mg/kg hu58-vc0101	3mg/kg hu23-vc0101
0		171±19	182±21	164±14	172±22	170±19	143±7
7		354±52	154±23	221±34	245±28	89±22	169±13
14		655±99	107±51	207±49	157±48	21±5	49±12
21		1028±142	218±98	129±40	213±97	0±0	38±24
28	GT	418±165	209±71	266±114	0±0	84±55	1±1
35	GT	1191±264	482±142	357±156	0±0	38±24	1±1
42	GT	GT	724 ±212	758±225	0±0	84±55	0±0
49	GT	GT	1054±308	912±203	0±0	157±91	0±0
56	GT	GT	GT	GT	0±0	584±339	0±0
63	GT	GT	GT	GT	0±0	813 ±381	0±0
70	GT	GT	GT	GT	0±0	943 ±409	0±0
77	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
84	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
91	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0

[0572]

98	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
105	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
112	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
119	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
126	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
133	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
140	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
147	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
154	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0
161	GT	GT	GT	GT	0±0	GT	0±0

[0573] 表22显示与媒介物和药物对照相比, hu23-AcButCM、hu24-AcButCM和hu58-AcButCM ADC在BR22 TNBC PDX模型(高 PTK7表达)中都有效。然而, hu58-AcButCM比hu23-AcButCM和 hu24-AcButCM两者都更有效, 说明具有针对相同目标的类似抗体的 各种有效载荷的使用的不可预测性质。hu23-vc0101和hu24-vc0101 ADC比hu58-vc0101更有效, 而hu58-AcButCM比hu23-AcButCM 和hu24-AcButCM ADC两者都更有效。所有测试的PTK7 ADC都比 多柔比星(其为用于TNBC的标准护理治疗)更有效。

[0574] 表22.BR22 TNBC PDX中的ADC的效力。

[0575]

天	媒介物	1.5mg/kg 多柔比星	0.3mg/kg 对照 - AcButCM	0.3mg/kg hu23-AcButCM	0.3mg/kg hu58-AcButCM	0.3mg/kg hu24-AcButCM
0	303±16	297±17	186±16	186± 15	157±13	193±16
14	797±71	641±39	456 ±55	140± 15	30±5	185±71
28	GT	GT	1019±148	11±2	0±0	32±28
63	GT	GT	GT	100±83	10±10	118±117
91	GT	GT	GT	652±479	67±67	723±695
119	GT	GT	GT	999±527	125±125	862±797

[0576]

133	GT	GT	GT	GT	125±125	968±794
161	GT	GT	GT	GT	125±125	1538±1098
175	GT	GT	GT	GT	150±150	GT

[0577] 图12和13显示与hu23-vc0101相比, hu23-mc8261、hu24-mc8261 和hu58-mc8261 ADC在BR22 TNBC PDX模型(高PTK7表达)中的效力。用hu23-vc0101治疗产生超过200天的持续肿瘤消退且表明与抗-PTK7-mc8261 ADC相比更大的肿瘤生长抑制。

[0578] 表23-25和图14显示hu23-vc0101、hu24-vc0101、hu58-vc0101、 hu23-mc8261和hu24-mc8261、hu58-mc8261和hu23-AcButCM、 hu24-AcButCM、hu58-AcButCM ADC在乳房-31 (BR31) TNBC PDX 模型(高PTK7表达)中的效力。在该模型中, 具有vc0101接头-有效载荷的所有三种ADC都比具有AcButCM或mc8261的ADC更有效。该结果是意外的, 因为在测试的体内PDX模型中, AcButCM接头有效载荷通常比vc0101接头有效载荷更有效。另外, PTK7-vc0101 ADC 比多西他赛更有效且PTK7-AcButCM ADC比多柔比星更有效。多西 他赛和多柔比星两者都是用于TNBC的标准护理。

[0579] 表23. BR31 TNBC PDX中的抗-PTK7-vc0101 ADC的效力。

[0580]

天	媒介物	20mg/kg 多 西他赛	3mg/kg 对照-vc0101	3mg/kg hu23-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu58-vc0101
0	159±10	259±47	148±12	164±14	159±15	158±12
7	269±17	331±70	227±23	178±23	188±12	170±25
14	425±32	371±82	133±10	79±8	82±7	100±11
21	668±50	451±91	101±21	28±7	21±3	38±3
28	1088±93	510±103	70±17	8±3	0±0	21±7
35	GT	614±117	105±28	0±0	0±0	8±5
42	GT	790±117	21±76	0±0	0±0	0±0
49	GT	837±126	234±83	2±0	0±0	30±18
56	GT	ND	393±103	2±1	0±0	3±1

[0581]

63	GT	1131±148	680±181	2±1	0±0	17±9
70	GT	1317±182	1169±300	8±3	0±0	35±18
77	GT	GT	1300±331	13±4	1±1	70±24
84	GT	GT	GT	32±10	2±2	108±32
91	GT	GT	GT	59±24	10±10	143±36
98	GT	GT	GT	59±15	13±13	213±46
105	GT	GT	GT	115±35	111±92	295±68
112	GT	GT	GT	249±75	370±269	551±155
119	GT	GT	GT	293±72	521±429	691±143
126	GT	GT	GT	449±100	551±428	826±155
133	GT	GT	GT	541±135	745±499	914±155
140	GT	GT	GT	658±130	765±494	GT
147	GT	GT	GT	810±145	794±488	GT

[0582] 表24.BR31 TNBC PDX中的抗-PTK7-mc8261 ADC的效力

[0583]

天	媒介物	10mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261
0	159 ± 10	154 ± 8	154 ± 9	161 ± 13
7	269 ± 17	238 ± 7	202 ± 20	225 ± 21
14	425 ± 32	304 ± 12	275 ± 35	280 ± 29
21	668 ± 50	383 ± 32	370 ± 53	390 ± 39
28	1088 ± 93	601 ± 70	609 ± 81	635 ± 55
35	GT	857 ± 88	862 ± 139	889 ± 118

[0584] 表25.BR31 TNBC PDX中的抗-PTK7-AcButCM ADC的效力。

[0585]

天	媒介物	1.5mg/kg 多柔比星	0.3mg/kg 对照-AcButCM	0.3mg/kg hu58-AcButCM	0.3mg/kg hu23-AcButCM	0.3mg/kg hu24-AcButCM
0		159 ± 10	160 ± 11	145 ± 11	145 ± 12	144 ± 9
7		269 ± 17	304 ± 20	223 ± 25	199 ± 21	236 ± 20
28		1088 ± 93	759 ± 111	675 ± 158	270 ± 42	236 ± 36
35	GT	GT	869 ± 204	381 ± 46	339 ± 69	139 ± 15
63	GT	GT	GT	885 ± 150	920 ± 208	299 ± 41
77	GT	GT	GT	GT	GT	590 ± 104
84	GT	GT	GT	GT	GT	882 ± 183

[0586] 表26和图15显示与媒介物和药物对照相比, hu24-vc0101 ADC 在人乳房-64 (BR64) TNBC PDX模型 (中等PTK7表达) 中是有效的。数据表明, 用hu24-vc0101有效地靶向具有中度PTK7目标表达的PDX 模型。Hu24-vc0101比多西他赛 (一种用于TNBC的标准护理) 更有效。

[0587] 表26.BR64 TNBC PDX中的hu24-vc0101的效力。

[0588]

天	媒介物	20mg/kg 多西他赛	3mg/kg 对照-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101
0		499 ± 36	543 ± 46	190 ± 30
7		832 ± 119	1112 ± 97	418 ± 62
14		1768 ± 284	1805 ± 206	839 ± 91
21	GT	GT	1907 ± 576	96 ± 30
28	GT	GT	GT	53 ± 21
35	GT	GT	GT	15 ± 6
42	GT	GT	GT	27 ± 22
49	GT	GT	GT	65 ± 58
56	GT	GT	GT	144 ± 141
63	GT	GT	GT	394 ± 392

[0589]

<b>70</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>422 ± 385</b>
<b>77</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>690 ± 460</b>
<b>84</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>1094 ± 594</b>

[0590] 图16显示在BR5 TNBC PDX模型中hu24-vc0101具有效力且未缀合hu24缺乏效力。向携带Br5人乳癌异种移植物的老鼠给予 hu24-vc0101 ADC、未缀合hu24 mAb或媒介物,每四天一次持续四个周期(Q4Dx4)。使用数字测径器每周两次记录肿瘤测量且显示为平均值±SEM。3mg/kg剂量的hu24-vc0101 ADC到第49天引起肿瘤消退而无肿瘤生长。相反,未缀合hu24 mAb不抑制肿瘤生长(图16)。因此,观察到的效力取决于接头-有效载荷的递送。

[0591] 图17显示与紫杉醇相比,hu24-vc0101在BR36 PR+TNBC PDX 模型中的效力。向携带BR36人乳癌异种移植物的老鼠Q4Dx4给予 hu24-vc0101 ADC、紫杉醇、阴性对照ADC或媒介物。使用数字测径器每周两次记录肿瘤测量且显示为平均值±SEM。3mg/kg剂量的hu24-vc0101 ADC到第103天引起肿瘤消退而无肿瘤生长。Hu24-vc0101好于MTD时施用的紫杉醇。阴性对照ADC仅表现出中等活性(图17)。

[0592] B. 小细胞肺癌(SCLC)

[0593] 表27-28中的数据说明hu24-vc0101和hu24-AcButCM ADC在小细胞肺癌-64(LU64)PDX模型(低PTK7表达)中的有效性。在该模型中,两种ADC都显示在低PTK7表达的该PDX中是有效的,但具有AcButCM接头有效载荷的ADC比具有vc0101接头有效载荷的ADC更有效。hu24-vc0101和hu24-AcButCM两者都比SCLC的标准护理(其为顺铂加上依托泊苷)更有效。

[0594] 表27.LU64 PDX中的hu24-vc0101 ADC的效力。

[0595]

天	媒介物	5mg/kg 顺铂 + 24mg/kg 依托泊苷	3mg/kg 对照-vc0101	10mg/kg 对照-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	10mg/kg hu24-vc0101
<b>0</b>	<b>139 ± 12</b>	<b>139 ± 10</b>	<b>156 ± 11</b>	<b>168 ± 14</b>	<b>166 ± 15</b>	<b>178 ± 19</b>
<b>7</b>	<b>241 ± 25</b>	<b>25 ± 5</b>	<b>255 ± 26</b>	<b>312 ± 38</b>	<b>252 ± 11</b>	<b>348 ± 32</b>
<b>14</b>	<b>376 ± 33</b>	<b>31 ± 5</b>	<b>379 ± 26</b>	<b>433 ± 49</b>	<b>310 ± 38</b>	<b>391 ± 42</b>
<b>21</b>	<b>613 ± 39</b>	<b>77 ± 22</b>	<b>493 ± 38</b>	<b>619 ± 72</b>	<b>389 ± 35</b>	<b>377 ± 66</b>
<b>28</b>	<b>1087 ± 86</b>	<b>151 ± 38</b>	<b>718 ± 92</b>	<b>824 ± 85</b>	<b>537 ± 67</b>	<b>500 ± 76</b>
<b>35</b>	<b>GT</b>	<b>214 ± 54</b>	<b>912 ± 158</b>	<b>GT</b>	<b>651 ± 70</b>	<b>618 ± 113</b>
<b>42</b>	<b>GT</b>	<b>285 ± 72</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>932 ± 128</b>	<b>773 ± 141</b>
<b>49</b>	<b>GT</b>	<b>738 ± 127</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>838 ± 171</b>
<b>56</b>	<b>GT</b>	<b>1011 ± 172</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>1054 ± 185</b>
<b>63</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>1367 ± 290</b>

[0596] 表28.LU64 PDX中的抗hu24-AcButCM ADC的效力。

[0597]

天	媒介物	5mg/kg 顺铂 + 24mg/kg 依 托泊苷	0.1mg/kg 对照- AcButCM	0.02mg/kg hu24- AcButCM	0.05mg/kg hu24- AcButCM	0.1mg/kg hu24- AcButCM
0	139 ± 12	139 ± 10	171 ± 11	137 ± 10	137 ± 10	136 ± 9
21	613 ± 39	77 ± 22	575 ± 45	13 ± 4	1 ± 1	0 ± 0
28	1087 ± 86	151 ± 38	723 ± 77	12 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
35	GT	214 ± 54	998 ± 107	24 ± 10	0 ± 0	0 ± 0
42	GT	285 ± 72	GT	36 ± 17	0 ± 0	0 ± 0
56	GT	1011 ± 172	GT	168 ± 55	0 ± 0	0 ± 0
63	GT	GT	GT	274 ± 89	0 ± 0	0 ± 0
105	GT	GT	GT	760 ± 206	0 ± 0	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0
168	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0

[0598] 表29显示hu23-mc8261、hu24-mc8261和hu58-mc8261 ADC在 LU64 PDX模型(低PTK7表达)中的效力。在该模型中,用hu24-vc0101 治疗显示比抗mc8261 ADC更大的肿瘤生长抑制。

[0599] 表29.LU64 PDX中的抗-PTK7-mc8261 ADC的效力

[0600]

天	媒介物	10mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261
0	184 ± 24	171 ± 11	170 ± 12	177 ± 15
7	269 ± 26	239 ± 14	257 ± 29	279 ± 32
14	417 ± 16	311 ± 19	330 ± 45	364 ± 31
21	591 ± 37	455 ± 38	435 ± 76	517 ± 47
28	738 ± 103	572 ± 51	622 ± 119	760 ± 74
35	771 ± 92	770 ± 92	903 ± 197	1029 ± 95
42	970 ± 64	1088 ± 116	GT	GT

[0601] 表30-31显示hu24-vc0101、hu23-vc0101和hu24-AcButCM ADC 在小细胞肺癌-86 (LU86) PDX模型(高PTK7表达)中的效力。在该模型 中,hu24-vc0101和hu23-vc0101两者都

有效抑制肿瘤生长。Hu24-vc0101比对照-vc0101 ADC更有效。然而,hu24-AcButCM ADC 比具有vc0101接头有效载荷的两种ADC都更有效(表22),提供与 SCLC模型中的vc0101相比AcButCM的一般更大功效的进一步实例。Hu24-AcButCM比顺铂加上依托泊苷(其为用于SCLC的标准护理)更有效。

[0602] 表30.LU86 PDX中的抗-PTK7-vc0101 ADC的效力。

[0603]

天	媒介物	3mg/kg 对照-vc0101	0.3mg/kg hu24-vc0101	1mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu23-vc0101
0	139±11	164±19	145±11	143±12	141±11	200±23
7	334±44	228±45	362±39	282±46	194±24	42±11
14	758±100	310±39	758±62	363±77	56±11	0±0
21	1213±140	394±57	1441±97	420±115	5±4	0±0

[0604]

28	GT	748±102	GT	621±159	0±0	0±0
35	GT	1279±198	GT	784±141	0±0	0±0
42	GT	GT	GT	915±105	0±0	0±0
49	GT	GT	GT	GT	0±0	0±0
56	GT	GT	GT	GT	0±0	0±0
63	GT	GT	GT	GT	17±17	0±0
70	GT	GT	GT	GT	73±45	0±0
77	GT	GT	GT	GT	121±67	0±0
84	GT	GT	GT	GT	204±90	0±0
91	GT	GT	GT	GT	477±272	0±0
98	GT	GT	GT	GT	570±270	0±0
105	GT	GT	GT	GT	689±281	19±19
112	GT	GT	GT	GT	GT	72±72
119	GT	GT	GT	GT	GT	154±154
203	GT	GT	GT	GT	GT	154±154

[0605] 表31.LU86 PDX中的hu24-AcButCM ADC的效力。



[0606]

天	媒介物	5mg/kg 顺铂 + 24mg/kg 依 托泊苷	0.3mg/kg 对 照 - AcButCM	0.03mg/kg hu24- AcButCM	0.1mg/kg hu24- AcButCM	0.3mg/kg hu24- AcButCM
0		206±25	149±13	158±20	147±13	143±12
14		1019±6	468±47	393±115	756±79	443±90
21	GT	946±77	571±173	1245±138	548±120	18±5
28	GT	GT	788±166	GT	761±154	3±2
35	GT	GT	962±176	GT	908±155	0±0
42	GT	GT	GT	GT	GT	0±0
112	GT	GT	GT	GT	GT	0±0
140	GT	GT	GT	GT	GT	0±0
154	GT	GT	GT	GT	GT	0±0
203	GT	GT	GT	GT	GT	0±0

[0607] 表32显示hu23-mc8261、hu24-mc8261和hu58-mc8261 ADC在 LU86 PDX模型(高PTK7表达)中的效力。用hu23-vc0101治疗在LU86 PDX模型中产生持续肿瘤消退且显示与抗-PTK7-mc8261 ADC相比 更大的肿瘤生长抑制。

[0608] 表32.LU86 PDX中的抗-PTK7-mc8261 ADC的效力。

[0609]

天	媒介物	10mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261
0		147 ± 11	159 ± 13	159 ± 14
7		158 ± 15	228 ± 29	257 ± 27
14		317 ± 33	225 ± 20	300 ± 37
21		672 ± 62	321 ± 34	340 ± 48
28	GT	1233 ± 83	383 ± 65	425 ± 42
35	GT	455 ± 68	544 ± 90	574 ± 57
42	GT	740 ± 78	815 ± 117	736 ± 76
49	GT	870 ± 99	903 ± 157	887 ± 106
		1165 ± 137	1333 ± 173	1265 ± 206

[0610] 图18A-B显示两种不同SCLC PDX模型(分别为H1048 PDX模型(高PTK7表达)和SCLC 95 PDX模型(高PTK7表达))中缀合至0101 或CM的PTK7 ADC的效力。

[0611] 图19A-B显示两种不同SCLC PDX模型(分别为SCLC 117 PDX 模型(中度PTK7表达)和SCLC 102 PDX模型(低PTK7表达))中 hu24-AcBut CM的效力。结果表明,hu24-AcButCM或hu23-AcButCM ADC针对SCLC比hu24-vc0101 ADC更有效。根据其他肿瘤类型(诸如TNBC和NSCLC)的PDX模型中hu24-vc0101的强抗肿瘤活性,该发现是意外的。另外,结果表明,ADC的活性与PTK7的表达相关,因为hu24-AcButCM ADC在具有低PTK7表达的SCLC102中引发最弱反应。

[0612] C. 非小细胞肺癌 (NSCLC)

[0613] 表33和图20显示与媒介物和药物对照相比,hu24-vc0101 ADC 在人非小细胞肺癌-135 (LU135) PDX模型(高PTK7表达)中有效。该数据表明在NSCLC PDX中hu24-vc0101在抑制肿瘤生长中的有效性。Hu24-vc0101比紫杉醇(其为NSCLC中的标准护理)更有效。

[0614] 表33.LU135 PDX中的hu24-vc0101的效力。

[0615]

天	媒介物	20mg/kg Paclitaxel	1mg/kg 对照-vc0101	3mg/kg 对照-vc0101	1mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101
0		162±17	175±24	161±15	168±18	158±18
7		446±28	77±13	461±19	329±39	369±53
14		615±34	58±12	655±39	337±50	520±81
21		830±71	60±11	752±46	414±31	651±95
28		982±68	93±20	815±101	488±40	838±133
35	GT	110±31	GT	627±60	GT	104±17
42	GT	184±48	GT	871±117	GT	175±26
49	GT	284±78	GT	GT	GT	244±19
56	GT	384±106	GT	GT	GT	347±34
63	GT	538±178	GT	GT	GT	387±47
70	GT	667±174	GT	GT	GT	502±96
77	GT	724±171	GT	GT	GT	628±152

[0616] 表34和图21显示与媒介物和药物对照相比,hu24-vc0101 ADC在人非小细胞肺癌-176 (LU176) PDX模型(高PTK7表达)中有效。该数据表明在NSCLC PDX中hu24-vc0101在抑制肿瘤生长中的有效性。Hu24-vc0101比顺铂(其为NSCLC中的标准护理)更有效。

[0617] 表34.LU176 PDX中的hu24-vc0101的效力。

[0618]

天	媒介物	5mg/kg 顺铂	3mg/kg 对照-vc0101	1mg/kg hu24-vc0101	3mg/kg hu24-vc0101
0	262±17	259±26	139±9	148±12	138±10
7	658±71	124±30	245±29	446±222	77±21
14	964±196	97±22	208±26	401±214	27±6

[0619]

21	2087±381	102±24	244±54	458±204	34±9
28	GT	179±71	366±88	685±193	21±3
35	GT	207±69	679±154	1046±288	22±8
42	GT	297±97	955±129	GT	20±7
49	GT	619±262	GT	GT	28±14
56	GT	GT	GT	GT	14±4
63	GT	GT	GT	GT	10±4
70	GT	GT	GT	GT	5±2
77	GT	GT	GT	GT	9±5
84	GT	GT	GT	GT	8±8
91	GT	GT	GT	GT	11±11
98	GT	GT	GT	GT	21±16
105	GT	GT	GT	GT	28±27
112	GT	GT	GT	GT	46±44
119	GT	GT	GT	GT	140±140
126	GT	GT	GT	GT	281±281
133	GT	GT	GT	GT	366±366
140	GT	GT	GT	GT	649±649

[0620] D. 卵巢癌 (OV)

[0621] 表35显示与媒介物和药物对照相比, hu24-vc0101和 hu24-AcButCM ADC在卵巢-55 (OV55) PDX模型 (中等PTK7表达) 中的效力。该数据表明, 通过两种ADC有效地靶向具有中度PTK7目标表达的卵巢PDX模型。令人惊讶地, 在终止实验时, 用hu24-vc0101治疗的动物无肿瘤, 且hu24-AcButCM ADC在该模型中不那么有效。

[0622] 表35 OV55 PDX中的hu24 ADC的效力。

[0623]

天	0.1mg/kg 对照- AcButCM	3mg/kg 对照-vc0101	0.1mg/kg hu24- AcButCM	3mg/kg hu24-vc0101
0	168 ± 7	167 ± 7	162 ± 6	166 ± 8
14	438 ± 58	134 ± 46	105 ± 15	33 ± 6
35	1204 ± 46	427 ± 196	137 ± 101	0 ± 0
42	GT	564 ± 210	194 ± 158	0 ± 0
49	GT	807 ± 265	294 ± 204	0 ± 0
77	GT	GT	895 ± 169	0 ± 0
84	GT	GT	GT	0 ± 0
133	GT	GT	GT	0 ± 0
168	GT	GT	GT	0 ± 0
182	GT	GT	GT	0 ± 0

[0624] E. 黑素瘤 (SK)

[0625] 表36显示与媒介物和药物对照相比, hu24-vc0101 ADC在人黑素瘤-23 (SK23) PDX模型 (中等PTK7表达) 中有效。该数据表明 hu24-vc0101在具有中度PTK7目标表达的黑色素瘤PDX模型中的有效性, 提供使用ADC的潜在指示。

[0626] 表36. SK23 PDX中的hu24-vc0101的效力。

[0627]

天	2mg/kg 对照-vc0101	4mg/kg 对照-vc0101	2mg/kg hu24-vc0101	4mg/kg hu24-vc0101
0	183 ± 20	184 ± 14	187 ± 11	196 ± 17
7	587 ± 82	541 ± 54	432 ± 28	356 ± 45
14	871 ± 107	697 ± 61	456 ± 36	227 ± 45
21	1123 ± 86	910 ± 93	509 ± 51	150 ± 33
28	GT	GT	679 ± 65	135 ± 41
35	GT	GT	793 ± 65	166 ± 58
42	GT	GT	868 ± 63	178 ± 62

[0628]

<b>49</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>228 ± 81</b>
<b>56</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>250 ± 93</b>
<b>63</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>295 ± 103</b>
<b>70</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>398 ± 130</b>
<b>77</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>568 ± 181</b>
<b>84</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>GT</b>	<b>688 ± 167</b>

[0629] F. 乳房和NSCLC PDX模型中的肿瘤生长抑制

[0630] 通过腹膜内注射向动物给药,每四天一次持续四个周期(Q4Dx4),除了以相同时间表通过静脉内注射的BR5研究。使用数字测径器每周一次或两次记录肿瘤测量且使用方程 $V = (A \times B^2) / 2$ 估计肿瘤体积,其中A为长轴且B为短轴。至少一周一次测量并记录动物体重。随访研究组,直至个别小鼠或整个组肿瘤测量达到 $1200\text{mm}^3$ ,此时根据IACUC方案指示处死。对于BR5研究,在根据IACUC方案分期时,一旦肿瘤体积接近体重的15%,就处死动物。

[0631] 使用方程 $\text{TGI}\% = [1 - (\text{治疗者的平均肿瘤体积}) / (\text{媒介物的平均肿瘤体积})]$ 计算肿瘤生长抑制(TGI)。在最近可能时间点时计算TGI,该时间点通常为如上所述中断对照组之前的最后测量。肿瘤消退被定义为给药后平均肿瘤体积减少。在肿瘤消退的情况下,至进展的时间(TTP)指示在首次剂量与平均肿瘤体积从前一次测量增加至统计上显著程度的时间之间的天数。如果肿瘤在实验过程期间不再生长,则TTP是首次剂量与实验结束之间的天数。

[0632] 为了确认效力研究中hu24-vc0101 ADC的暴露,针对两种PDX模型(BR13 PDX和BR22 PDX)测定ADC和总抗体的血浆浓度。在第三次施用ADC后的三个时间点采集样品且通过配体结合测定(LBA)测量浓度(数据未显示)。数据指示,药物暴露在这些肿瘤模型中是相当的。

[0633] Hu24-vc0101 ADC在乳癌和NSCLC肿瘤模型中引发抗肿瘤活性。肿瘤在治疗后消退且通常在最后施用ADC后数月不再生长。未缀合hu24 mAb在表明奥里斯他汀依赖性作用机制的测试模型中不引发抗肿瘤活性。结果概述于表37中。

[0634] 表37. 用hu24-vc0101 ADC的体内药理学研究的概述

[0635]

肿瘤模型	通过 IHC 的目标表 达	给药方案	暴露数据	hu24-vc0101 剂 量 水 平 (mg/kg)	消退 (TTP, 天)或% TGI
BR13 TNBC PDX	高	Q4Dx4 ip	是	1	37% TGI
				2	消退(35)
				4	消退(105)
BR22 TNBC PDX	高	Q4Dx4 ip	是	0.3	无
				1	消退(21)
				3	消退(205)
BR31 TNBC PDX	中度	Q4Dx4 ip	否	3	消退(105)
BR5 TNBC PDX	高	Q4Dx4 iv	否	3	消退(49)
				hu24 mAb, 3 mg/kg	无
BR36 PR+ PDX	高	Q4Dx4 ip	否	3	消退(103)
NSCLC135 PDX	高	Q4Dx4 ip	否	1	15% TGI
				3	消退 (32)
NSCLC176 PDX	高	Q4Dx4 ip	否	1	78% TGI
				3	消退(98)

[0636] % = 百分比; BR = 乳癌; IHC = 免疫组织化学; ip = 腹腔内; iv = 静脉内; mAb = 单克隆抗体; mg/kg = 毫克/公斤; NSCLC = 非小细胞肺癌; PDX = 患者衍生的异种移植物; PR+ = 孕酮受体阳性; Q4Dx4 = 剂量每4天一次持续4个周期; TGI = 肿瘤生长抑制; TNBC = 三阴

性乳癌;TTP= 至进展的时间。

[0637] 实施例14

[0638] 0101的作用机制

[0639] 为了研究hu24-vc0101 ADC的作用机制,将细胞用ADC处理,然后评价其微管结构。奥里斯他汀是微管蛋白聚合的完全合成的基于 尾海兔素的五肽抑制剂,其在低皮摩尔浓度细胞内浓度下诱导G2/M 细胞周期停滞和细胞死亡(Sapra等人,2011,Expert Opin Investig Drugs 20(8):1131-49和Turner等人,1998,Prostate 34(3):175-81)。

[0640] 将H661肺癌细胞接种至具有CC2包被生长表面的4孔室载片系统(Thermo Scientific)上并用0-4 $\mu$ g/mL的hu24-vc0101、阴性对照 ADC、未缀合hu24mAb或0.1-10nM的游离0101奥里斯他汀处理48 小时。然后将细胞固定于3%多聚甲醛中,用PBS洗涤,用PBS中的 0.5% **Triton-X**<sup>®</sup> (Sigma Chemical)透化,用PBS洗涤,并与封闭缓冲液(5%正常山羊血清和0.2%Tween-20,在PBS中)一起孵育。在室温 下将细胞与一级抗 $\alpha$ -微管蛋白抗体(Sigma NoT9026,克隆DM1A)在 封闭缓冲液中一起孵育1小时。其后,将细胞用PBS洗涤并与 Alexa **Fluor** <sup>®</sup> 488缀合的二级抗体(Invitrogen Corp)和4',6-二甲脒基-2-苯 基吡啶(DAPI)一起孵育30分钟以染色DNA。在Zeiss LSM 510 Meta 共焦显微镜上使细胞显现。

[0641] 用游离0101或hu24-vc0101 ADC处理细胞破坏微管结构且导致 G2/M细胞周期停滞。相反,未缀合hu24 mAb和阴性对照mAb都不 引发这些反应(图22)。这些结果表明,hu24-vc0101 ADC可通过破坏 微管结构并引起G2/M停滞以抗原依赖性方式引发细胞毒性。该机制 与关于未缀合奥里斯他汀的先前研究一致。

[0642] 实施例15

[0643] hu24-vc0101 ADC对内皮细胞的效应

[0644] 图23显示在标准体外HUVEC发芽测定中,hu24-vc0101 ADC 抑制血管生成。简而言之,以约1x10<sup>6</sup>个细胞/2500个珠粒的比率使用 HUVEC细胞(Lonza-#CC-2517)以包被Cytodex珠粒(Sigma #C0646-5G),且然后在具有内皮细胞生长培养基(Lonza#CC-3162)的37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中放置过夜。次日,将珠粒用内皮细胞生长培养基洗涤,并再悬浮于2.0mg/ml纤维蛋白原I型(过滤灭菌)于DPBS中的溶液和0.15单位/ml抑肽酶(Aprotinin)中。在添加500 $\mu$ l珠粒溶液 之前向24孔板的每一孔中添加0.3125单位凝血酶。为了促进凝血,将板在37 $^{\circ}$ C培养箱中放置15分钟。最后,将悬浮于内皮细胞生长培养基中的皮肤成纤维细胞(Detroit 551-ATCC#CCL-110)小心地放在 形成的纤维蛋白原凝块的顶部上。每隔一天向细胞饲喂其各自药物治疗并使其生长8天。观察HUVEC发芽和分支血管的形成的程度。

[0645] 在该测定中,Hu24-vc0101 ADC在1 $\mu$ g/mL抑制发芽血管生成,而阴性对照ADC不抑制。该结果表明,抗-PTK7 ADC可以目标特异性方式抑制血管生成。

[0646] 实施例16

[0647] 肿瘤起始细胞(TIC)的减少

[0648] 为了确定抗-PTK7抗体-药物缀合物治疗是否降低肿瘤中的肿瘤 起始细胞(TIC)频率,将BR13 TNBC乳房肿瘤用4mg/kg hu24-vc0101 ADC、4mg/kg对照IgG ADC或20mg/kg多西他赛化学治疗治疗,每周两次,总共3个剂量(第0、3和7天)。在第10天时从解离肿瘤分

离活的残余人肿瘤细胞(即hESA<sup>+</sup>mCD45<sup>-</sup>mH-2Kd<sup>-</sup>)并在限制稀释分析(LDA)中将其再植入未经处理的动物中。在移植后监测所得肿瘤发病率长达40周。基于在hu24-vc0101暴露后肿瘤开始消退的时间选择肿瘤收获日(第10天)和连续移植日。将肿瘤解离并用抗人ESA、抗小鼠CD45和抗小鼠H-2Kd抗体染色。合并三个肿瘤/治疗组,并通过流式细胞术分选活的人肿瘤细胞。向10只小鼠的组注射293、73、37或15个从对照IgG ADC处理的肿瘤分选的肿瘤细胞;159、90、40或10个从hu24-vc0101处理的肿瘤分选的肿瘤细胞;或257、33或15个从多西他赛处理的肿瘤分选的肿瘤细胞。每周测量受体小鼠中的肿瘤并将受体小鼠中超过200mm<sup>3</sup>的肿瘤分选为阳性。使用Poisson分布统计经由L-Calculator软件(Stemcell Technologies, Vancouver, BC),使用直至移植后40周有和无肿瘤的受体的注射细胞剂量以计算每次处理后的TIC的频率。

[0649] hu24-vc0101处理的肿瘤中的TIC频率比对照IgG ADC处理的肿瘤低5.5倍(p=0.0013;表38)。多西他赛处理的肿瘤中的TIC频率比对照IgG ADC处理的肿瘤低2.1倍(p=0.09;表38)。总之,注射hu24-vc0101处理的肿瘤细胞的小鼠比注射类似数目的对照IgG ADC处理的肿瘤细胞的小鼠一致地产生更少肿瘤,这表明hu24-vc0101处理尤其降低TIC。

[0650] 表38.BR13肿瘤模型中的肿瘤起始细胞频率(TIC)。

[0651]

预处理	组别	每只动物植入的细胞数	具有肿瘤的 动物数	组中的动物数	TIC 频率	相对于对照 ADC 的 p-值
对照 ADC (4 mpk)	A1	293	9	9	1 in 71	不适用
	A2	73	6	8		
	A3	37	3	8		
	A4	15	0	8		
hu24-vc0101 (4 mpk)	B1	159	3	7	1 in 393	0.0013
	B2	90	2	8		
	B3	40	0	10		
	B4	10	0	8		
多西他赛 (20 mpk)	C1	257	8	9	1 in 149	0.09
	C2	33	1	8		
	C3	15	0	6		



[0001]	序列表
[0002]	<110> 辉瑞大药厂
[0003]	M·I·达梅林
[0004]	<120> 抗-PTK7抗体-药物缀合物
[0005]	<130> PC72045
[0006]	<160> 87
[0007]	<170> PatentIn 版本 3.5
[0008]	<210> 1
[0009]	<211> 120
[0010]	<212> PRT
[0011]	<213> Artificial Sequence
[0012]	<220>
[0013]	<223> Synthetic peptide sequence
[0014]	<400> 1
[0015]	Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
[0016]	1 5 10 15
[0017]	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
[0018]	20 25 30
[0019]	Asn Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
[0020]	35 40 45
[0021]	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
[0022]	50 55 60
[0023]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
[0024]	65 70 75 80
[0025]	Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
[0026]	85 90 95
[0027]	Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0028]	100 105 110
[0029]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0030]	115 120
[0031]	<210> 2
[0032]	<211> 360
[0033]	<212> DNA
[0034]	<213> Artificial Sequence
[0035]	<220>
[0036]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0037]	<400> 2
[0038]	cagatcacct tgaaggagtc tggctctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
[0039]	acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt 120
[0040]	cagccccag gaaaggccct ggagtggctt gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
[0041]	tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240

[0042] gtccttaca tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tggttcgaagt 300  
[0043] aactatgggtt acgcctgggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctcttca 360  
[0044] <210> 3  
[0045] <211> 7  
[0046] <212> PRT  
[0047] <213> Artificial Sequence  
[0048] <220>  
[0049] <223> Synthetic peptide sequence  
[0050] <400> 3  
[0051] Thr Ser Asn Met Gly Val Gly  
[0052] 1 5  
[0053] <210> 4  
[0054] <211> 9  
[0055] <212> PRT  
[0056] <213> Artificial Sequence  
[0057] <220>  
[0058] <223> Synthetic peptide sequence  
[0059] <400> 4  
[0060] Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asn Met  
[0061] 1 5  
[0062] <210> 5  
[0063] <211> 21  
[0064] <212> DNA  
[0065] <213> Artificial Sequence  
[0066] <220>  
[0067] <223> Synthetic nucleotide sequence  
[0068] <400> 5  
[0069] actagtaaca tgggtgtggg c 21  
[0070] <210> 6  
[0071] <211> 27  
[0072] <212> DNA  
[0073] <213> Artificial Sequence  
[0074] <220>  
[0075] <223> Synthetic nucleotide sequence  
[0076] <400> 6  
[0077] gggttctcac tcagcactag taacatg 27  
[0078] <210> 7  
[0079] <211> 16  
[0080] <212> PRT  
[0081] <213> Artificial Sequence  
[0082] <220>  
[0083] <223> Synthetic peptide sequence

[0084]	<400> 7
[0085]	His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
[0086]	1 5 10 15
[0087]	<210> 8
[0088]	<211> 5
[0089]	<212> PRT
[0090]	<213> Artificial Sequence
[0091]	<220>
[0092]	<223> Synthetic peptide sequence
[0093]	<400> 8
[0094]	Trp Trp Asp Asp Asp
[0095]	1 5
[0096]	<210> 9
[0097]	<211> 48
[0098]	<212> DNA
[0099]	<213> Artificial Sequence
[0100]	<220>
[0101]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0102]	<400> 9
[0103]	cacatttggt gggatgatga taagtactac agcccatctc tgaagagc 48
[0104]	<210> 10
[0105]	<211> 15
[0106]	<212> DNA
[0107]	<213> Artificial Sequence
[0108]	<220>
[0109]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0110]	<400> 10
[0111]	tggtgggatg atgat 15
[0112]	<210> 11
[0113]	<211> 10
[0114]	<212> PRT
[0115]	<213> Artificial Sequence
[0116]	<220>
[0117]	<223> Synthetic peptide sequence
[0118]	<400> 11
[0119]	Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
[0120]	1 5 10
[0121]	<210> 12
[0122]	<211> 30
[0123]	<212> DNA
[0124]	<213> Artificial Sequence
[0125]	<220>

[0126]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0127]	<400> 12
[0128]	agtaactatg gttacgctg gtttgcttac 30
[0129]	<210> 13
[0130]	<211> 449
[0131]	<212> PRT
[0132]	<213> Artificial Sequence
[0133]	<220>
[0134]	<223> Synthetic peptide sequence
[0135]	<400> 13
[0136]	Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
[0137]	1 5 10 15
[0138]	Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
[0139]	20 25 30
[0140]	Asn Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
[0141]	35 40 45
[0142]	Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
[0143]	50 55 60
[0144]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
[0145]	65 70 75 80
[0146]	Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
[0147]	85 90 95
[0148]	Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0149]	100 105 110
[0150]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
[0151]	115 120 125
[0152]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
[0153]	130 135 140
[0154]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
[0155]	145 150 155 160
[0156]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
[0157]	165 170 175
[0158]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
[0159]	180 185 190
[0160]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
[0161]	195 200 205
[0162]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[0163]	210 215 220
[0164]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
[0165]	225 230 235 240
[0166]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0167]	245 250 255

[0168]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
[0169]	260	265	270
[0170]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
[0171]	275	280	285
[0172]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
[0173]	290	295	300
[0174]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
[0175]	305	310	315
[0176]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
[0177]	325	330	335
[0178]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
[0179]	340	345	350
[0180]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
[0181]	355	360	365
[0182]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
[0183]	370	375	380
[0184]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
[0185]	385	390	395
[0186]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
[0187]	405	410	415
[0188]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0189]	420	425	430
[0190]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
[0191]	435	440	445
[0192]	Gly		
[0193]	<210> 14		
[0194]	<211> 1347		
[0195]	<212> DNA		
[0196]	<213> Artificial Sequence		
[0197]	<220>		
[0198]	<223> Synthetic nucleotide sequence		
[0199]	<400> 14		
[0200]	cagatcacct tgaaggagtc tggctctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgtg	60	
[0201]	acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt	120	
[0202]	cagccccag gaaaggccct ggagtggctt gcacacattt ggtgggatga tgataagtac	180	
[0203]	tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg	240	
[0204]	gtccttaca tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca catattactg tgttcgaagt	300	
[0205]	aactatggtt acgcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca	360	
[0206]	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cgagcaagag cacctctggg	420	
[0207]	ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagccggt gacggtgtcg	480	
[0208]	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	540	
[0209]	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccagacc	600	

[0210]	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660
[0211]	aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720
[0212]	ccgtcagtct tectcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc cgggaccct 780
[0213]	gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840
[0214]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900
[0215]	agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960
[0216]	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020
[0217]	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080
[0218]	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140
[0219]	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200
[0220]	ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260
[0221]	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 1320
[0222]	cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347
[0223]	<210> 15
[0224]	<211> 107
[0225]	<212> PRT
[0226]	<213> Artificial Sequence
[0227]	<220>
[0228]	<223> Synthetic peptide sequence
[0229]	<400> 15
[0230]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0231]	1 5 10 15
[0232]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr
[0233]	20 25 30
[0234]	Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
[0235]	35 40 45
[0236]	Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0237]	50 55 60
[0238]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0239]	65 70 75 80
[0240]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
[0241]	85 90 95
[0242]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0243]	100 105
[0244]	<210> 16
[0245]	<211> 321
[0246]	<212> DNA
[0247]	<213> Artificial Sequence
[0248]	<220>
[0249]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0250]	<400> 16
[0251]	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60

[0252] atcacttgca aggcgagtca ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120  
[0253] gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180  
[0254] aggttcagtg gcagtggatc tggaacagat tttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240  
[0255] gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300  
[0256] gggaccaagc tggaatcaa a 321  
[0257] <210> 17  
[0258] <211> 11  
[0259] <212> PRT  
[0260] <213> Artificial Sequence  
[0261] <220>  
[0262] <223> Synthetic peptide sequence  
[0263] <400> 17  
[0264] Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr Leu Asn  
[0265] 1 5 10  
[0266] <210> 18  
[0267] <211> 33  
[0268] <212> DNA  
[0269] <213> Artificial Sequence  
[0270] <220>  
[0271] <223> Synthetic nucleotide sequence  
[0272] <400> 18  
[0273] aaggcgagtc aggacattta tccctattta aac 33  
[0274] <210> 19  
[0275] <211> 7  
[0276] <212> PRT  
[0277] <213> Artificial Sequence  
[0278] <220>  
[0279] <223> Synthetic peptide sequence  
[0280] <400> 19  
[0281] Arg Thr Asn Arg Leu Leu Asp  
[0282] 1 5  
[0283] <210> 20  
[0284] <211> 21  
[0285] <212> DNA  
[0286] <213> Artificial Sequence  
[0287] <220>  
[0288] <223> Synthetic nucleotide sequence  
[0289] <400> 20  
[0290] cgtacaaata gattgctaga t 21  
[0291] <210> 21  
[0292] <211> 9  
[0293] <212> PRT

[0294]	<213> Artificial Sequence
[0295]	<220>
[0296]	<223> Synthetic peptide sequence
[0297]	<400> 21
[0298]	Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
[0299]	1 5
[0300]	<210> 22
[0301]	<211> 27
[0302]	<212> DNA
[0303]	<213> Artificial Sequence
[0304]	<220>
[0305]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0306]	<400> 22
[0307]	ctacagtatg atgagtttcc gctcacg 27
[0308]	<210> 23
[0309]	<211> 214
[0310]	<212> PRT
[0311]	<213> Artificial Sequence
[0312]	<220>
[0313]	<223> Synthetic peptide sequence
[0314]	<400> 23
[0315]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0316]	1 5 10 15
[0317]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr
[0318]	20 25 30
[0319]	Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
[0320]	35 40 45
[0321]	Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0322]	50 55 60
[0323]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0324]	65 70 75 80
[0325]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
[0326]	85 90 95
[0327]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[0328]	100 105 110
[0329]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[0330]	115 120 125
[0331]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[0332]	130 135 140
[0333]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[0334]	145 150 155 160
[0335]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser



[0336]	165	170	175
[0337]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
[0338]	180	185	190
[0339]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[0340]	195	200	205
[0341]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0342]	210		
[0343]	<210> 24		
[0344]	<211> 642		
[0345]	<212> DNA		
[0346]	<213> Artificial Sequence		
[0347]	<220>		
[0348]	<223> Synthetic nucleotide sequence		
[0349]	<400> 24		
[0350]	gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60		
[0351]	atcacttgca aggcgagtc ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120		
[0352]	gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180		
[0353]	aggttcagtg gcagtggatc tggaacagat ttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240		
[0354]	gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300		
[0355]	gggaccaagc tggaaatcaa acggactgtg gctgcaccaa gtgtcttcat cttcccgcca 360		
[0356]	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420		
[0357]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480		
[0358]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540		
[0359]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600		
[0360]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642		
[0361]	<210> 25		
[0362]	<211> 119		
[0363]	<212> PRT		
[0364]	<213> Artificial Sequence		
[0365]	<220>		
[0366]	<223> Synthetic peptide sequence		
[0367]	<400> 25		
[0368]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0369]	1 5 10 15		
[0370]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[0371]	20 25 30		
[0372]	Ala Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile		
[0373]	35 40 45		
[0374]	Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe		
[0375]	50 55 60		
[0376]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
[0377]	65 70 75 80		

[0378]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0379]	85 90 95
[0380]	Ala Arg Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0381]	100 105 110
[0382]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0383]	115
[0384]	<210> 26
[0385]	<211> 357
[0386]	<212> DNA
[0387]	<213> Artificial Sequence
[0388]	<220>
[0389]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0390]	<400> 26
[0391]	caggtccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
[0392]	tcttgaagg cttctggata caccttact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120
[0393]	cccgaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180
[0394]	aaccaggact tcaagggcag agtcaccatg accagggaca catccgcgag cacagcctac 240
[0395]	atggagctga gcagactgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggtaac 300
[0396]	tctacttct atgctttgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357
[0397]	<210> 27
[0398]	<211> 5
[0399]	<212> PRT
[0400]	<213> Artificial Sequence
[0401]	<220>
[0402]	<223> Synthetic peptide sequence
[0403]	<400> 27
[0404]	Asp Tyr Ala Val His
[0405]	1 5
[0406]	<210> 28
[0407]	<211> 7
[0408]	<212> PRT
[0409]	<213> Artificial Sequence
[0410]	<220>
[0411]	<223> Synthetic peptide sequence
[0412]	<400> 28
[0413]	Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0414]	1 5
[0415]	<210> 29
[0416]	<211> 15
[0417]	<212> DNA
[0418]	<213> Artificial Sequence
[0419]	<220>

- [0420] <223> Synthetic nucleotide sequence
- [0421] <400> 29
- [0422] gactatgctg tgcat 15
- [0423] <210> 30
- [0424] <211> 21
- [0425] <212> DNA
- [0426] <213> Artificial Sequence
- [0427] <220>
- [0428] <223> Synthetic nucleotide sequence
- [0429] <400> 30
- [0430] ggatacacct tcactgacta t 21
- [0431] <210> 31
- [0432] <211> 17
- [0433] <212> PRT
- [0434] <213> Artificial Sequence
- [0435] <220>
- [0436] <223> Synthetic peptide sequence
- [0437] <400> 31
- [0438] Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe Lys
- [0439] 1 5 10 15
- [0440] Gly
- [0441] <210> 32
- [0442] <211> 6
- [0443] <212> PRT
- [0444] <213> Artificial Sequence
- [0445] <220>
- [0446] <223> Synthetic peptide sequence
- [0447] <400> 32
- [0448] Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr
- [0449] 1 5
- [0450] <210> 33
- [0451] <211> 51
- [0452] <212> DNA
- [0453] <213> Artificial Sequence
- [0454] <220>
- [0455] <223> Synthetic nucleotide sequence
- [0456] <400> 33
- [0457] gtgatcagca cttacaatga ttacacatac aataaccagg acttcaaggg c 51
- [0458] <210> 34
- [0459] <211> 18
- [0460] <212> DNA
- [0461] <213> Artificial Sequence

[0462]	<220>
[0463]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0464]	<400> 34
[0465]	agcacttaca atgattac 18
[0466]	<210> 35
[0467]	<211> 10
[0468]	<212> PRT
[0469]	<213> Artificial Sequence
[0470]	<220>
[0471]	<223> Synthetic peptide sequence
[0472]	<400> 35
[0473]	Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr
[0474]	1 5 10
[0475]	<210> 36
[0476]	<211> 30
[0477]	<212> DNA
[0478]	<213> Artificial Sequence
[0479]	<220>
[0480]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0481]	<400> 36
[0482]	ggtaactcct acttctatgc tttggactac 30
[0483]	<210> 37
[0484]	<211> 448
[0485]	<212> PRT
[0486]	<213> Artificial Sequence
[0487]	<220>
[0488]	<223> Synthetic peptide sequence
[0489]	<400> 37
[0490]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0491]	1 5 10 15
[0492]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0493]	20 25 30
[0494]	Ala Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
[0495]	35 40 45
[0496]	Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe
[0497]	50 55 60
[0498]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0499]	65 70 75 80
[0500]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0501]	85 90 95
[0502]	Ala Arg Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0503]	100 105 110

[0504]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
[0505]	115	120	125
[0506]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
[0507]	130	135	140
[0508]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
[0509]	145	150	155
[0510]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
[0511]	165	170	175
[0512]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
[0513]	180	185	190
[0514]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
[0515]	195	200	205
[0516]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
[0517]	210	215	220
[0518]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
[0519]	225	230	235
[0520]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
[0521]	245	250	255
[0522]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
[0523]	260	265	270
[0524]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
[0525]	275	280	285
[0526]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
[0527]	290	295	300
[0528]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
[0529]	305	310	315
[0530]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
[0531]	325	330	335
[0532]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
[0533]	340	345	350
[0534]	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
[0535]	355	360	365
[0536]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
[0537]	370	375	380
[0538]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
[0539]	385	390	395
[0540]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
[0541]	405	410	415
[0542]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0543]	420	425	430
[0544]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0545]	435	440	445

[0546]	<210> 38
[0547]	<211> 1344
[0548]	<212> DNA
[0549]	<213> Artificial Sequence
[0550]	<220>
[0551]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0552]	<400> 38
[0553]	caggtccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
[0554]	tcctgcaagg cttctggata caccttcact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120
[0555]	cccgaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180
[0556]	aaccaggact tcaaggcag agtcaccatg accagggaca catccgcgag cacagcctac 240
[0557]	atggagctga gcagactgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggtaac 300
[0558]	tcctacttct atgctttgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcagcc 360
[0559]	tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcga gcaagagcac ctctgggggc 420
[0560]	acagcgcccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg agccgggtgac ggtgtcgtgg 480
[0561]	aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcttaca gtctcagga 540
[0562]	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
[0563]	atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660
[0564]	tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
[0565]	tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 780
[0566]	gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactgtgtac 840
[0567]	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
[0568]	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
[0569]	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020
[0570]	gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
[0571]	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
[0572]	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccagcc tcccggtgtg 1200
[0573]	gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
[0574]	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggetc tgcacaacca ctacacgcag 1320
[0575]	aagagcctct ccctgtctcc ggga 1344
[0576]	<210> 39
[0577]	<211> 111
[0578]	<212> PRT
[0579]	<213> Artificial Sequence
[0580]	<220>
[0581]	<223> Synthetic peptide sequence
[0582]	<400> 39
[0583]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0584]	1 5 10 15
[0585]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
[0586]	20 25 30
[0587]	Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

[0588]	35	40	45
[0589]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
[0590]	50	55	60
[0591]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[0592]	65	70	75
[0593]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
[0594]	85	90	95
[0595]	Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0596]	100	105	110
[0597]	<210> 40		
[0598]	<211> 333		
[0599]	<212> DNA		
[0600]	<213> Artificial Sequence		
[0601]	<220>		
[0602]	<223> Synthetic nucleotide sequence		
[0603]	<400> 40		
[0604]	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60		
[0605]	ctctcctgca gggccagtga gagggttgac agctatggca aaagttttat gcaactgtac 120		
[0606]	caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctata gggcatccaa cctggaatct 180		
[0607]	ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240		
[0608]	agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg 300		
[0609]	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333		
[0610]	<210> 41		
[0611]	<211> 15		
[0612]	<212> PRT		
[0613]	<213> Artificial Sequence		
[0614]	<220>		
[0615]	<223> Synthetic peptide sequence		
[0616]	<400> 41		
[0617]	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Lys Ser Phe Met His		
[0618]	1	5	10
[0619]	<210> 42		
[0620]	<211> 45		
[0621]	<212> DNA		
[0622]	<213> Artificial Sequence		
[0623]	<220>		
[0624]	<223> Synthetic nucleotide sequence		
[0625]	<400> 42		
[0626]	agggccagtg agagtgttga cagctatggc aaaagtttta tgcac 45		
[0627]	<210> 43		
[0628]	<211> 7		
[0629]	<212> PRT		

[0630]	<213> Artificial Sequence
[0631]	<220>
[0632]	<223> Synthetic peptide sequence
[0633]	<400> 43
[0634]	Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
[0635]	1 5
[0636]	<210> 44
[0637]	<211> 21
[0638]	<212> DNA
[0639]	<213> Artificial Sequence
[0640]	<220>
[0641]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0642]	<400> 44
[0643]	agggcatcca acctggaatc t 21
[0644]	<210> 45
[0645]	<211> 9
[0646]	<212> PRT
[0647]	<213> Artificial Sequence
[0648]	<220>
[0649]	<223> Synthetic peptide sequence
[0650]	<400> 45
[0651]	Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
[0652]	1 5
[0653]	<210> 46
[0654]	<211> 27
[0655]	<212> DNA
[0656]	<213> Artificial Sequence
[0657]	<220>
[0658]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0659]	<400> 46
[0660]	cagcagagta atgaggatcc gtggacg 27
[0661]	<210> 47
[0662]	<211> 218
[0663]	<212> PRT
[0664]	<213> Artificial Sequence
[0665]	<220>
[0666]	<223> Synthetic peptide sequence
[0667]	<400> 47
[0668]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0669]	1 5 10 15
[0670]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
[0671]	20 25 30



[0672]	Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
[0673]	35	40 45
[0674]	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala	
[0675]	50	55 60
[0676]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
[0677]	65	70 75 80
[0678]	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn	
[0679]	85	90 95
[0680]	Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
[0681]	100	105 110
[0682]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	
[0683]	115	120 125
[0684]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	
[0685]	130	135 140
[0686]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	
[0687]	145	150 155 160
[0688]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	
[0689]	165	170 175
[0690]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys	
[0691]	180	185 190
[0692]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro	
[0693]	195	200 205
[0694]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
[0695]	210	215
[0696]	<210> 48	
[0697]	<211> 654	
[0698]	<212> DNA	
[0699]	<213> Artificial Sequence	
[0700]	<220>	
[0701]	<223> Synthetic nucleotide sequence	
[0702]	<400> 48	
[0703]	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60	
[0704]	ctctcctgca gggccagtga gagtgttgac agctatggca aaagttttat gcaactggtac 120	
[0705]	caacagaaac ctggccaggc tcccaggtc ctcactata gggcatccaa cctggaatct 180	
[0706]	ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240	
[0707]	agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg 300	
[0708]	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggactg tggctgcacc aagtgtcttc 360	
[0709]	atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420	
[0710]	aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 480	
[0711]	ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540	
[0712]	agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600	
[0713]	acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654	

[0714]	<210> 49
[0715]	<211> 120
[0716]	<212> PRT
[0717]	<213> Artificial Sequence
[0718]	<220>
[0719]	<223> Synthetic peptide sequence
[0720]	<400> 49
[0721]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0722]	1 5 10 15
[0723]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
[0724]	20 25 30
[0725]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0726]	35 40 45
[0727]	Gly Asp Leu Asn Pro Asp Ser Ser Ala Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val
[0728]	50 55 60
[0729]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0730]	65 70 75 80
[0731]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0732]	85 90 95
[0733]	Thr Leu Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
[0734]	100 105 110
[0735]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0736]	115 120
[0737]	<210> 50
[0738]	<211> 360
[0739]	<212> DNA
[0740]	<213> Artificial Sequence
[0741]	<220>
[0742]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0743]	<400> 50
[0744]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
[0745]	tcctgtgcag cctctggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
[0746]	ccaggaagg ggctggagtg gatcggcgac ctaaaccag attcaagtgc gataaactat 180
[0747]	gtggactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
[0748]	ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact 300
[0749]	acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360
[0750]	<210> 51
[0751]	<211> 5
[0752]	<212> PRT
[0753]	<213> Artificial Sequence
[0754]	<220>
[0755]	<223> Synthetic peptide sequence

[0756]	<400>	51		
[0757]	Arg Tyr Trp Met Ser			
[0758]	1	5		
[0759]	<210>	52		
[0760]	<211>	7		
[0761]	<212>	PRT		
[0762]	<213>	Artificial Sequence		
[0763]	<220>			
[0764]	<223>	Synthetic peptide sequence		
[0765]	<400>	52		
[0766]	Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr			
[0767]	1	5		
[0768]	<210>	53		
[0769]	<211>	15		
[0770]	<212>	DNA		
[0771]	<213>	Artificial Sequence		
[0772]	<220>			
[0773]	<223>	Synthetic nucleotide sequence		
[0774]	<400>	53		
[0775]	agatattgga tgagc	15		
[0776]	<210>	54		
[0777]	<211>	21		
[0778]	<212>	DNA		
[0779]	<213>	Artificial Sequence		
[0780]	<220>			
[0781]	<223>	Synthetic nucleotide sequence		
[0782]	<400>	54		
[0783]	ggattcgact ttagtagata t	21		
[0784]	<210>	55		
[0785]	<211>	17		
[0786]	<212>	PRT		
[0787]	<213>	Artificial Sequence		
[0788]	<220>			
[0789]	<223>	Synthetic peptide sequence		
[0790]	<400>	55		
[0791]	Asp Leu Asn Pro Asp Ser Ser Ala Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys			
[0792]	1	5	10	15
[0793]	Gly			
[0794]	<210>	56		
[0795]	<211>	6		
[0796]	<212>	PRT		
[0797]	<213>	Artificial Sequence		

[0798]	<220>
[0799]	<223> Synthetic peptide sequence
[0800]	<400> 56
[0801]	Asn Pro Asp Ser Ser Ala
[0802]	1 5
[0803]	<210> 57
[0804]	<211> 51
[0805]	<212> DNA
[0806]	<213> Artificial Sequence
[0807]	<220>
[0808]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0809]	<400> 57
[0810]	gacctaaacc cagattcaag tgcgataaac tatgtggact ctgtgaaggg c 51
[0811]	<210> 58
[0812]	<211> 18
[0813]	<212> DNA
[0814]	<213> Artificial Sequence
[0815]	<220>
[0816]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0817]	<400> 58
[0818]	aaccagatt caagtgcg 18
[0819]	<210> 59
[0820]	<211> 11
[0821]	<212> PRT
[0822]	<213> Artificial Sequence
[0823]	<220>
[0824]	<223> Synthetic peptide sequence
[0825]	<400> 59
[0826]	Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe
[0827]	1 5 10
[0828]	<210> 60
[0829]	<211> 33
[0830]	<212> DNA
[0831]	<213> Artificial Sequence
[0832]	<220>
[0833]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[0834]	<400> 60
[0835]	attactacgt tagtacccta tactatggac ttc 33
[0836]	<210> 61
[0837]	<211> 449
[0838]	<212> PRT
[0839]	<213> Artificial Sequence

[0840]	<220>
[0841]	<223> Synthetic peptide sequence
[0842]	<400> 61
[0843]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0844]	1 5 10 15
[0845]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
[0846]	20 25 30
[0847]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0848]	35 40 45
[0849]	Gly Asp Leu Asn Pro Asp Ser Ser Ala Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val
[0850]	50 55 60
[0851]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[0852]	65 70 75 80
[0853]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0854]	85 90 95
[0855]	Thr Leu Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
[0856]	100 105 110
[0857]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
[0858]	115 120 125
[0859]	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
[0860]	130 135 140
[0861]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
[0862]	145 150 155 160
[0863]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
[0864]	165 170 175
[0865]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
[0866]	180 185 190
[0867]	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
[0868]	195 200 205
[0869]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
[0870]	210 215 220
[0871]	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
[0872]	225 230 235 240
[0873]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0874]	245 250 255
[0875]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[0876]	260 265 270
[0877]	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0878]	275 280 285
[0879]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
[0880]	290 295 300
[0881]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

[0882]	305	310	315	320
[0883]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
[0884]		325	330	335
[0885]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
[0886]		340	345	350
[0887]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
[0888]		355	360	365
[0889]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
[0890]		370	375	380
[0891]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
[0892]		385	390	395
[0893]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
[0894]		405	410	415
[0895]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
[0896]		420	425	430
[0897]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
[0898]		435	440	445
[0899]	Gly			
[0900]	<210> 62			
[0901]	<211> 1347			
[0902]	<212> DNA			
[0903]	<213> Artificial Sequence			
[0904]	<220>			
[0905]	<223> Synthetic nucleotide sequence			
[0906]	<400> 62			
[0907]	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc	60		
[0908]	tcctgtgcag cctctggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct	120		
[0909]	ccaggaagg ggctggagtg gatcggcgac ctaaaccag attcaagtgc gataaactat	180		
[0910]	gtggactctg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat	240		
[0911]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact	300		
[0912]	acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca	360		
[0913]	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cgagcaagag cacctctggg	420		
[0914]	ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgagccggt gacggtgtcg	480		
[0915]	tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctca	540		
[0916]	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	600		
[0917]	tacatctgca acgtgaatca caagccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	660		
[0918]	aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	720		
[0919]	ccgtcagtct tectcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaacct	780		
[0920]	gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	840		
[0921]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	900		
[0922]	agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag	960		
[0923]	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	1020		

[0924]	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccac cccggatgag	1080
[0925]	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	1140
[0926]	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg	1200
[0927]	ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	1260
[0928]	cagcagggga acgtctcttc atgtccctgt atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag	1320
[0929]	cagaagagcc tctccctgtc tccgggt	1347
[0930]	<210>	63
[0931]	<211>	107
[0932]	<212>	PRT
[0933]	<213>	Artificial Sequence
[0934]	<220>	
[0935]	<223>	Synthetic peptide sequence
[0936]	<400>	63
[0937]	Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly	
[0938]	1 5 10 15	
[0939]	Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp	
[0940]	20 25 30	
[0941]	Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Leu Leu Ile	
[0942]	35 40 45	
[0943]	Ser Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly	
[0944]	50 55 60	
[0945]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser	
[0946]	65 70 75 80	
[0947]	Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu	
[0948]	85 90 95	
[0949]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0950]	100 105	
[0951]	<210>	64
[0952]	<211>	321
[0953]	<212>	DNA
[0954]	<213>	Artificial Sequence
[0955]	<220>	
[0956]	<223>	Synthetic nucleotide sequence
[0957]	<400>	64
[0958]	gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac	60
[0959]	atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca	120
[0960]	ggagaagctg ctattctcct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtcctgg aatcccacct	180
[0961]	cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat ttaccctca caattaataa catagaatct	240
[0962]	gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgctctctac gttcggctcg	300
[0963]	gggacaaagt tggaataaaa a	321
[0964]	<210>	65
[0965]	<211>	11

[0966] <212> PRT  
[0967] <213> Artificial Sequence  
[0968] <220>  
[0969] <223> Synthetic peptide sequence  
[0970] <400> 65  
[0971] Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn  
[0972] 1 5 10  
[0973] <210> 66  
[0974] <211> 33  
[0975] <212> DNA  
[0976] <213> Artificial Sequence  
[0977] <220>  
[0978] <223> Synthetic nucleotide sequence  
[0979] <400> 66  
[0980] ataaccaaca cagacattga tgatgatatg aac 33  
[0981] <210> 67  
[0982] <211> 7  
[0983] <212> PRT  
[0984] <213> Artificial Sequence  
[0985] <220>  
[0986] <223> Synthetic peptide sequence  
[0987] <400> 67  
[0988] Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro  
[0989] 1 5  
[0990] <210> 68  
[0991] <211> 21  
[0992] <212> DNA  
[0993] <213> Artificial Sequence  
[0994] <220>  
[0995] <223> Synthetic nucleotide sequence  
[0996] <400> 68  
[0997] gaaggtaatg gtctccgtcc t 21  
[0998] <210> 69  
[0999] <211> 9  
[1000] <212> PRT  
[1001] <213> Artificial Sequence  
[1002] <220>  
[1003] <223> Synthetic peptide sequence  
[1004] <400> 69  
[1005] Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr  
[1006] 1 5  
[1007] <210> 70



[1008]	<211> 27
[1009]	<212> DNA
[1010]	<213> Artificial Sequence
[1011]	<220>
[1012]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[1013]	<400> 70
[1014]	ctacaaagtg ataacttgcc tctcacg 27
[1015]	<210> 71
[1016]	<211> 214
[1017]	<212> PRT
[1018]	<213> Artificial Sequence
[1019]	<220>
[1020]	<223> Synthetic peptide sequence
[1021]	<400> 71
[1022]	Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
[1023]	1 5 10 15
[1024]	Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp
[1025]	20 25 30
[1026]	Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Leu Leu Ile
[1027]	35 40 45
[1028]	Ser Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
[1029]	50 55 60
[1030]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
[1031]	65 70 75 80
[1032]	Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
[1033]	85 90 95
[1034]	Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
[1035]	100 105 110
[1036]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
[1037]	115 120 125
[1038]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
[1039]	130 135 140
[1040]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
[1041]	145 150 155 160
[1042]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
[1043]	165 170 175
[1044]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
[1045]	180 185 190
[1046]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
[1047]	195 200 205
[1048]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[1049]	210

[1050]	<210> 72
[1051]	<211> 642
[1052]	<212> DNA
[1053]	<213> Artificial Sequence
[1054]	<220>
[1055]	<223> Synthetic nucleotide sequence
[1056]	<400> 72
[1057]	gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60
[1058]	atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120
[1059]	ggagaagctg ctattctcct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtcctgg aatcccacct 180
[1060]	cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240
[1061]	gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgctctctcac gttcggctcg 300
[1062]	gggacaaagt tggaataaaa acggactgtg gctgcaccaa gtgtcttcat cttcccgcga 360
[1063]	tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
[1064]	cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
[1065]	gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
[1066]	ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
[1067]	ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642
[1068]	<210> 73
[1069]	<211> 1070
[1070]	<212> PRT
[1071]	<213> Homo sapiens
[1072]	<400> 73
[1073]	Met Gly Ala Ala Arg Gly Ser Pro Ala Arg Pro Arg Arg Leu Pro Leu
[1074]	1 5 10 15
[1075]	Leu Ser Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Gly Thr Gln Thr Ala Ile
[1076]	20 25 30
[1077]	Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly Arg Arg
[1078]	35 40 45
[1079]	Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His Val Tyr
[1080]	50 55 60
[1081]	Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg Phe Ala
[1082]	65 70 75 80
[1083]	Gln Gly Ser Ser Leu Ser Phe Ala Ala Val Asp Arg Pro Gln Asp Ser
[1084]	85 90 95
[1085]	Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Ala
[1086]	100 105 110
[1087]	Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala Gly Pro
[1088]	115 120 125
[1089]	Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro Gln Thr
[1090]	130 135 140
[1091]	Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro Thr Tyr

[1092]	145	150	155	160
[1093]	Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His			
[1094]		165	170	175
[1095]	Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala Gly Pro			
[1096]		180	185	190
[1097]	Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln			
[1098]		195	200	205
[1099]	Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe			
[1100]		210	215	220
[1101]	Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu			
[1102]	225	230	235	240
[1103]	Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu			
[1104]		245	250	255
[1105]	Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro			
[1106]		260	265	270
[1107]	Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu			
[1108]		275	280	285
[1109]	Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln			
[1110]		290	295	300
[1111]	Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala			
[1112]	305	310	315	320
[1113]	Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly			
[1114]		325	330	335
[1115]	Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro			
[1116]		340	345	350
[1117]	Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg			
[1118]		355	360	365
[1119]	Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser			
[1120]		370	375	380
[1121]	Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg			
[1122]	385	390	395	400
[1123]	Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys			
[1124]		405	410	415
[1125]	Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp			
[1126]		420	425	430
[1127]	Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn			
[1128]		435	440	445
[1129]	Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly			
[1130]		450	455	460
[1131]	Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg			
[1132]	465	470	475	480
[1133]	Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val			

[1134]		485		490		495
[1135]	Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln					
[1136]		500		505		510
[1137]	Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly					
[1138]		515		520		525
[1139]	Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu					
[1140]		530		535		540
[1141]	Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val					
[1142]		545		550		555
[1143]	Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro					
[1144]		565		570		575
[1145]	Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile					
[1146]		580		585		590
[1147]	Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr					
[1148]		595		600		605
[1149]	Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln					
[1150]		610		615		620
[1151]	Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg					
[1152]		625		630		635
[1153]	Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro					
[1154]		645		650		655
[1155]	Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile					
[1156]		660		665		670
[1157]	Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu					
[1158]		675		680		685
[1159]	Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr					
[1160]		690		695		700
[1161]	Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu					
[1162]		705		710		715
[1163]	Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln					
[1164]		725		730		735
[1165]	Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly					
[1166]		740		745		750
[1167]	Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala					
[1168]		755		760		765
[1169]	Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser					
[1170]		770		775		780
[1171]	Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr					
[1172]		785		790		795
[1173]	Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln					
[1174]		805		810		815
[1175]	Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu					

[1176]	820	825	830
[1177]	Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu		
[1178]	835	840	845
[1179]	Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu		
[1180]	850	855	860
[1181]	Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu		
[1182]	865	870	875 880
[1183]	Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys		
[1184]	885	890	895
[1185]	Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr		
[1186]	900	905	910
[1187]	Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His		
[1188]	915	920	925
[1189]	Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val		
[1190]	930	935	940
[1191]	Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr		
[1192]	945	950	955 960
[1193]	Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu		
[1194]	965	970	975
[1195]	Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe		
[1196]	980	985	990
[1197]	Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly		
[1198]	995	1000	1005
[1199]	Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys		
[1200]	1010	1015	1020
[1201]	Ala Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg		
[1202]	1025	1030	1035
[1203]	Leu Met Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser		
[1204]	1040	1045	1050
[1205]	Phe Ser Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser Thr Val Asp Ser		
[1206]	1055	1060	1065
[1207]	Lys Pro		
[1208]	1070		
[1209]	<210> 74		
[1210]	<211> 7		
[1211]	<212> PRT		
[1212]	<213> Artificial Sequence		
[1213]	<220>		
[1214]	<223> Synthetic peptide sequence		
[1215]	<400> 74		
[1216]	Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly		
[1217]	1	5	

[1218] <210> 75  
[1219] <211> 5  
[1220] <212> PRT  
[1221] <213> Artificial Sequence  
[1222] <220>  
[1223] <223> Synthetic peptide sequence  
[1224] <400> 75  
[1225] Leu Leu Gln Gly Ala  
[1226] 1 5  
[1227] <210> 76  
[1228] <211> 7  
[1229] <212> PRT  
[1230] <213> Artificial Sequence  
[1231] <220>  
[1232] <223> Synthetic peptide sequence  
[1233] <400> 76  
[1234] Gly Gly Leu Leu Gln Gly Ala  
[1235] 1 5  
[1236] <210> 77  
[1237] <211> 7  
[1238] <212> PRT  
[1239] <213> Artificial Sequence  
[1240] <220>  
[1241] <223> Synthetic peptide sequence  
[1242] <400> 77  
[1243] Leu Leu Gln Gly Pro Gly Lys  
[1244] 1 5  
[1245] <210> 78  
[1246] <211> 6  
[1247] <212> PRT  
[1248] <213> Artificial Sequence  
[1249] <220>  
[1250] <223> Synthetic peptide sequence  
[1251] <400> 78  
[1252] Leu Leu Gln Gly Pro Gly  
[1253] 1 5  
[1254] <210> 79  
[1255] <211> 6  
[1256] <212> PRT  
[1257] <213> Artificial Sequence  
[1258] <220>  
[1259] <223> Synthetic peptide sequence

---

[1260]	<400> 79
[1261]	Leu Leu Gln Gly Pro Ala
[1262]	1 5
[1263]	<210> 80
[1264]	<211> 5
[1265]	<212> PRT
[1266]	<213> Artificial Sequence
[1267]	<220>
[1268]	<223> Synthetic peptide sequence
[1269]	<400> 80
[1270]	Leu Leu Gln Gly Pro
[1271]	1 5
[1272]	<210> 81
[1273]	<211> 4
[1274]	<212> PRT
[1275]	<213> Artificial Sequence
[1276]	<220>
[1277]	<223> Synthetic peptide sequence
[1278]	<400> 81
[1279]	Leu Leu Gln Pro
[1280]	1
[1281]	<210> 82
[1282]	<211> 6
[1283]	<212> PRT
[1284]	<213> Artificial Sequence
[1285]	<220>
[1286]	<223> Synthetic peptide sequence
[1287]	<400> 82
[1288]	Leu Leu Gln Pro Gly Lys
[1289]	1 5
[1290]	<210> 83
[1291]	<211> 8
[1292]	<212> PRT
[1293]	<213> Artificial Sequence
[1294]	<220>
[1295]	<223> Synthetic peptide sequence
[1296]	<400> 83
[1297]	Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly Lys
[1298]	1 5
[1299]	<210> 84
[1300]	<211> 7
[1301]	<212> PRT

---

[1302]	<213> Artificial Sequence
[1303]	<220>
[1304]	<223> Synthetic peptide sequence
[1305]	<400> 84
[1306]	Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly
[1307]	1 5
[1308]	<210> 85
[1309]	<211> 6
[1310]	<212> PRT
[1311]	<213> Artificial Sequence
[1312]	<220>
[1313]	<223> Synthetic peptide sequence
[1314]	<400> 85
[1315]	Leu Leu Gln Gly Ala Pro
[1316]	1 5
[1317]	<210> 86
[1318]	<211> 8
[1319]	<212> PRT
[1320]	<213> Artificial Sequence
[1321]	<220>
[1322]	<223> Synthetic peptide sequence
[1323]	<220>
[1324]	<221> MISC_FEATURE
[1325]	<222> (4) .. (4)
[1326]	<223> Xaa can be G or P
[1327]	<220>
[1328]	<221> MISC_FEATURE
[1329]	<222> (5) .. (5)
[1330]	<223> Xaa can be A, G, P, or absent
[1331]	<220>
[1332]	<221> MISC_FEATURE
[1333]	<222> (6) .. (6)
[1334]	<223> Xaa can be A, G, K, P, or absent
[1335]	<220>
[1336]	<221> MISC_FEATURE
[1337]	<222> (7) .. (7)
[1338]	<223> Xaa can be G, K, or absent
[1339]	<220>
[1340]	<221> MISC_FEATURE
[1341]	<222> (8) .. (8)
[1342]	<223> Xaa can be K or absent
[1343]	<400> 86



[1344]	Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
[1345]	1 5
[1346]	<210> 87
[1347]	<211> 8
[1348]	<212> PRT
[1349]	<213> Artificial Sequence
[1350]	<220>
[1351]	<223> Synthetic peptide sequence
[1352]	<220>
[1353]	<221> MISC_FEATURE
[1354]	<222> (4) .. (4)
[1355]	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
[1356]	<220>
[1357]	<221> MISC_FEATURE
[1358]	<222> (5) .. (5)
[1359]	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
[1360]	<220>
[1361]	<221> MISC_FEATURE
[1362]	<222> (6) .. (6)
[1363]	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
[1364]	<220>
[1365]	<221> MISC_FEATURE
[1366]	<222> (7) .. (7)
[1367]	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
[1368]	<220>
[1369]	<221> MISC_FEATURE
[1370]	<222> (8) .. (8)
[1371]	<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid or absent
[1372]	<400> 87
[1373]	Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
[1374]	1 5

>gi | 47938093 | gb | AAH71557.1 | PTK7 蛋白质酪氨酸激酶7[智人]

```

1  MGAARGSPAR PRRLPLLSVL LLPLLGGTQT AIVFIKQPSS QDALQGRRAL LRCEVEAPGP
61  VHVYWLLDGA PVQDTERRFA QGSSLSFAAV DRPQDSGTFQ CVARDDVTGE EARSANASFN
121 IKWIEAGPVV LKHPASEAEI QPQTQVTLRC HIDGHRPTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
181 KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNFTLSIA DESFARVLA PQDVVVARYE
241 EAMFHCQFSA QPPPSLQWLF EDETPITNRS RPPHLRRATV FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR
301 CIGQGQRGPP IILEATLHLA EIEDMPLFEP RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG
361 VRLPTHGRVY QKGHELVLAN IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDVNITVAT VPSWLKKPQD
421 SQLEEGKPGY LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSRFEV FKNGTLRINS VEVYDGTWYR
481 CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPPQP QQCMEDKEA TVPCSATGRE KPTIKWERAD
541 GSSLPEWVTD NAGTLHFARV TRDDAGNYTC IASNGPQGOI RAHVQLTVAV FITFKVEPER
601 TTVYQGHTAL LQCEAQGDPK PLIQWKGKDR ILDPTKLGPR MHIFQNGSLV IHDVAPEDSG
661 RYTCIAGNSC NIKHTEAPLY VVDKPVPEES EGPGSPPPYK MIQTIGLSVG AAVAYIIAVL
721 GLMFYCKKRC KAKRLQKQPE GEEPEMECLN GGPLQNGQPS AEIQEEVALT SLGSGPAATN
781 KRHSTSDKM HFRSSLQPIT TLGKSEFGEV FLAKAQGLEE GVAETLVLVK SLQSKDEQQQ
841 LDFRRELEMF GKLNHANVVR LLGLCREAEP HYMVLEYVDL GDLKQFLRIS KSKDEKLKSQ
901 PLSTKQKVAL CTQVALGMEH LSNNRFVHKD LAARNCLVSA QRQVKVSALG LSKDVYNSEY
961 YHFRQAWVPL RWMSPEAILE GDFSTKSDVW AFGVLMWEVF THGEMPHGGQ ADDEVVLADLQ
1021 AGKARLPQPE GCPSKLYRLM QRCWALSPKD RPSFSEIASA LGDSTVDSKP
(SEQ ID NO 73)

```

图1

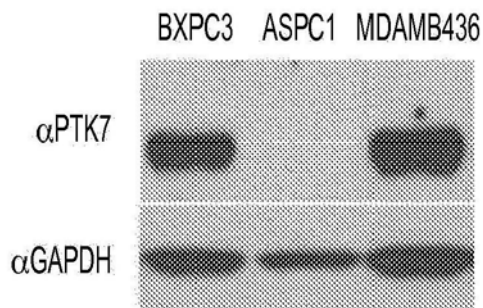


图2A

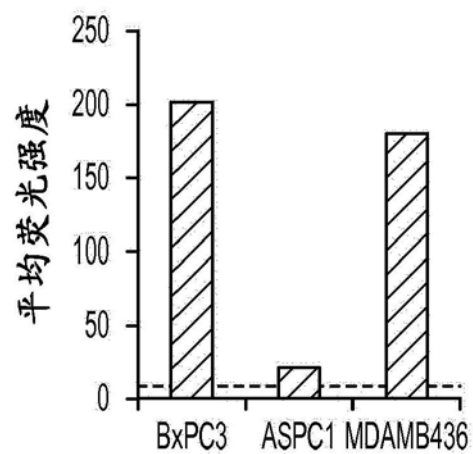


图2B

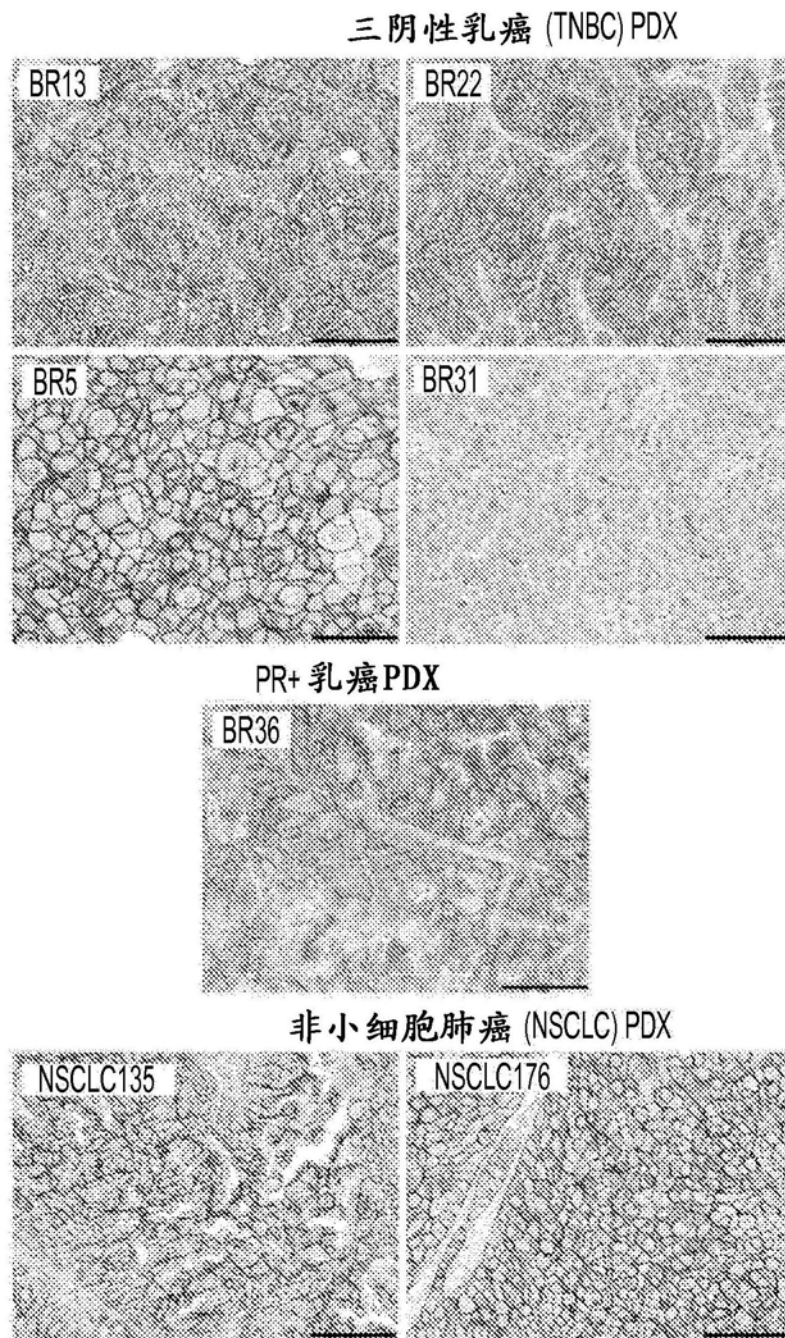


图3

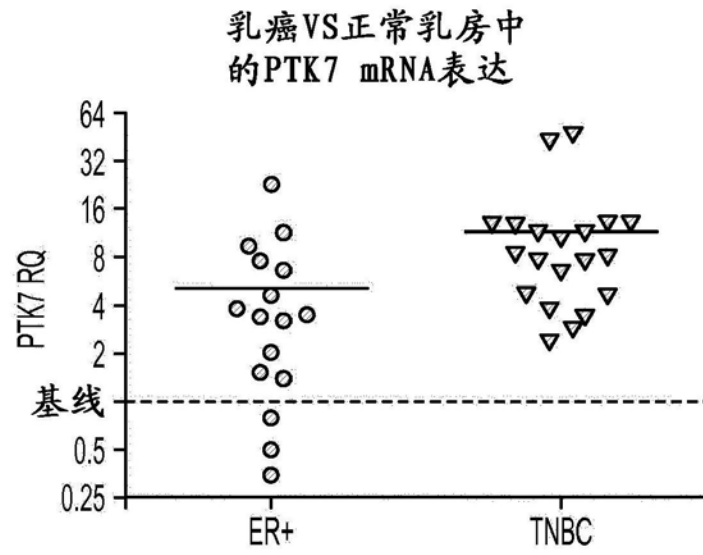


图4A

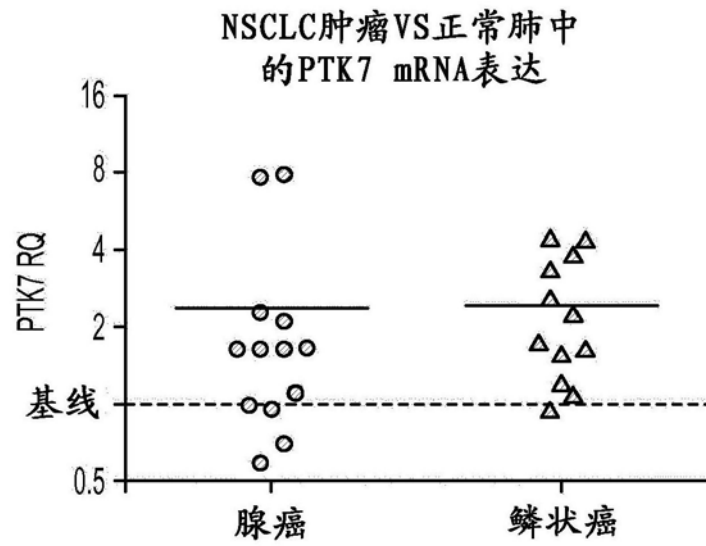


图4B

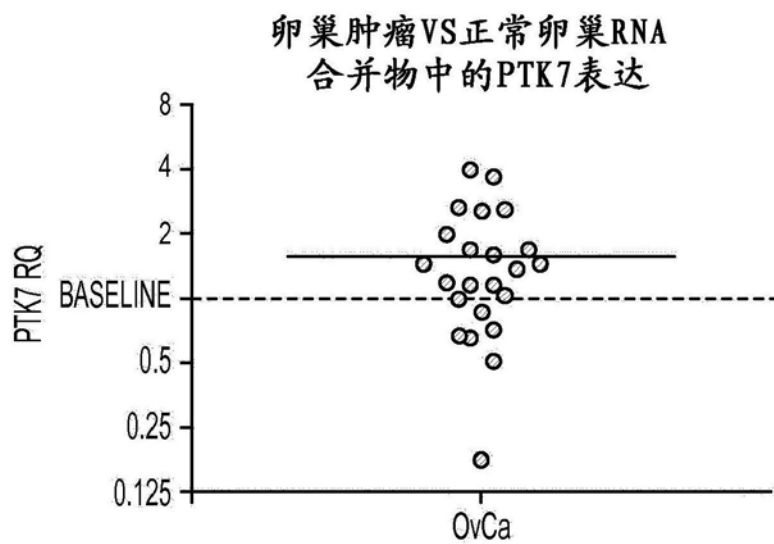


图4C

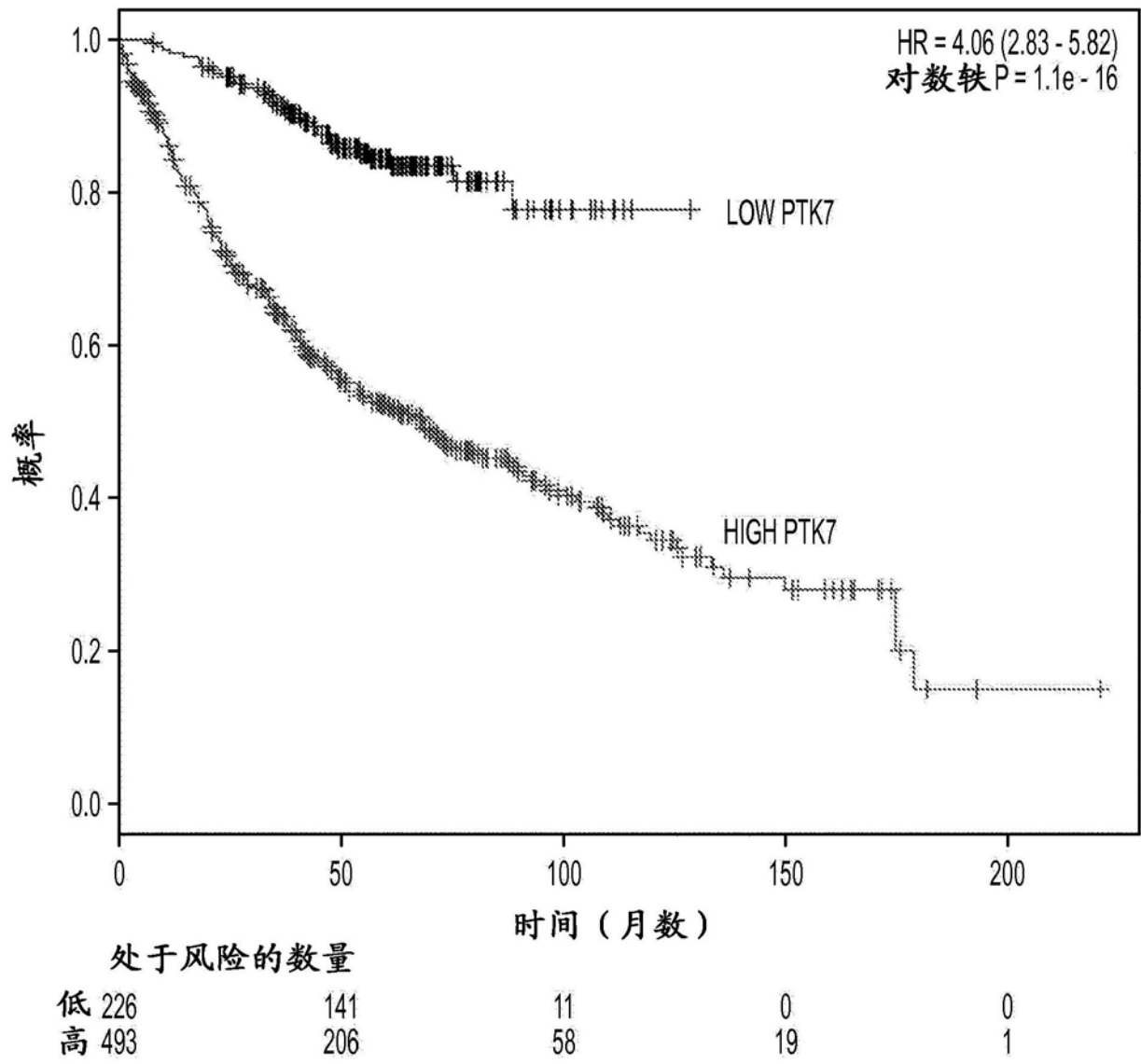


图5

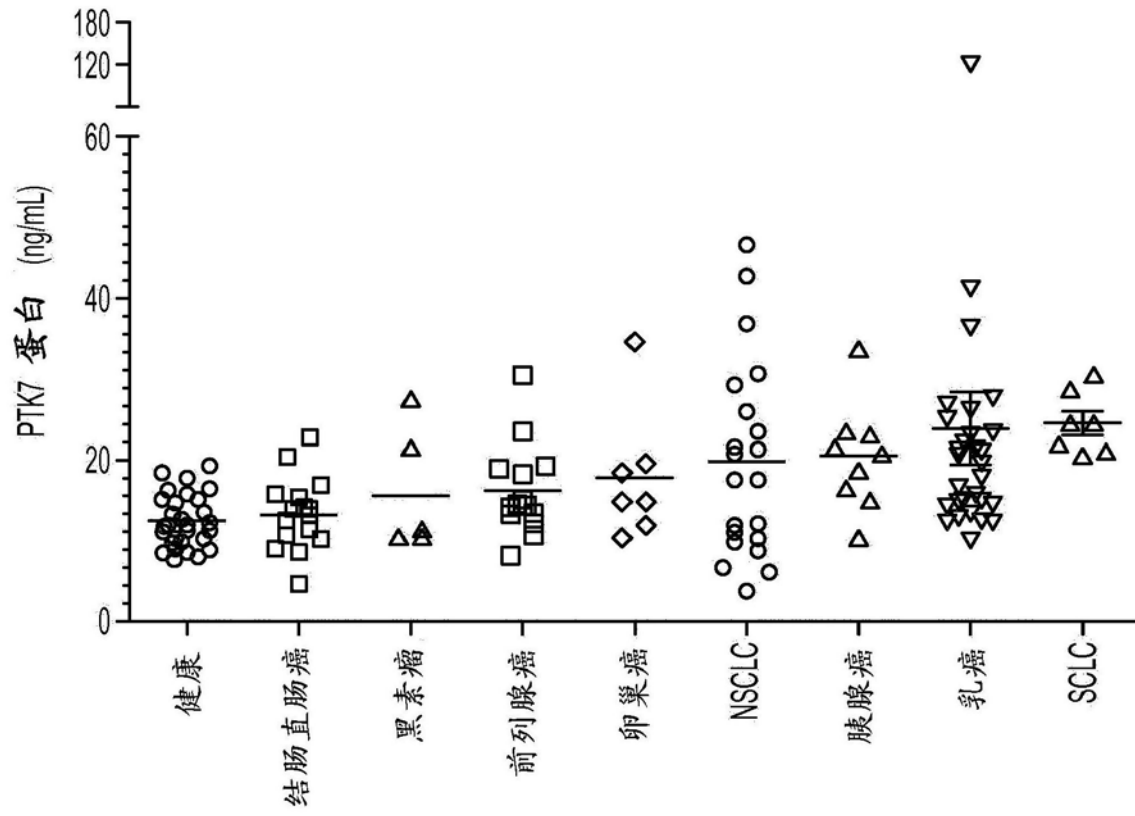


图6



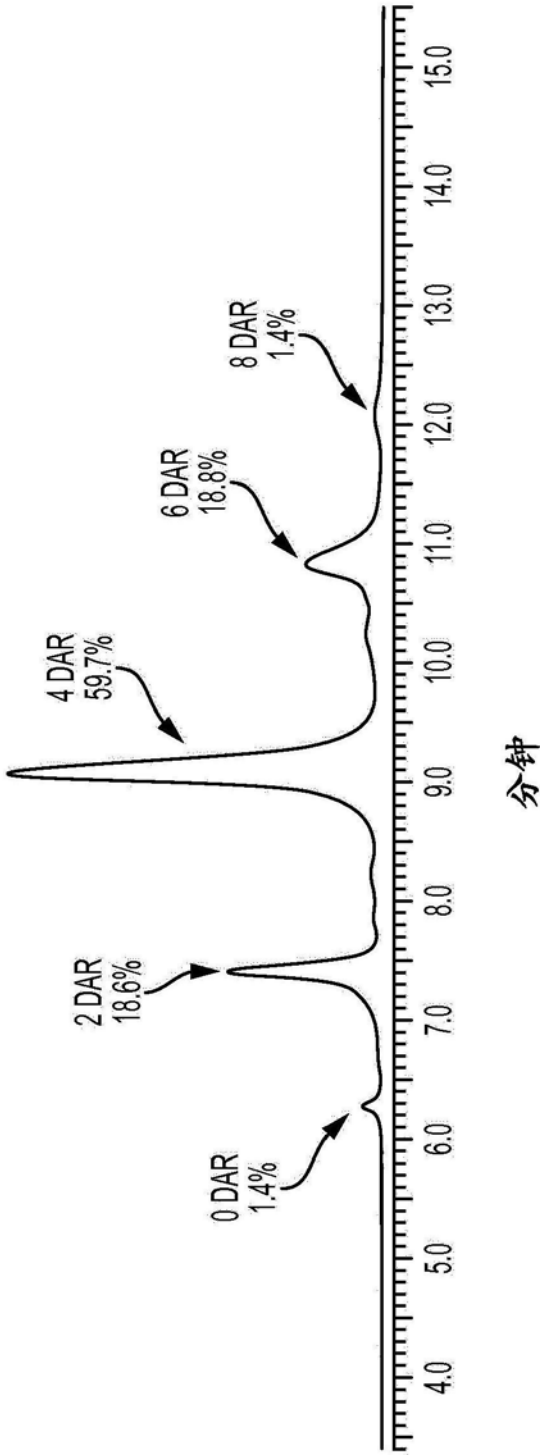


图7

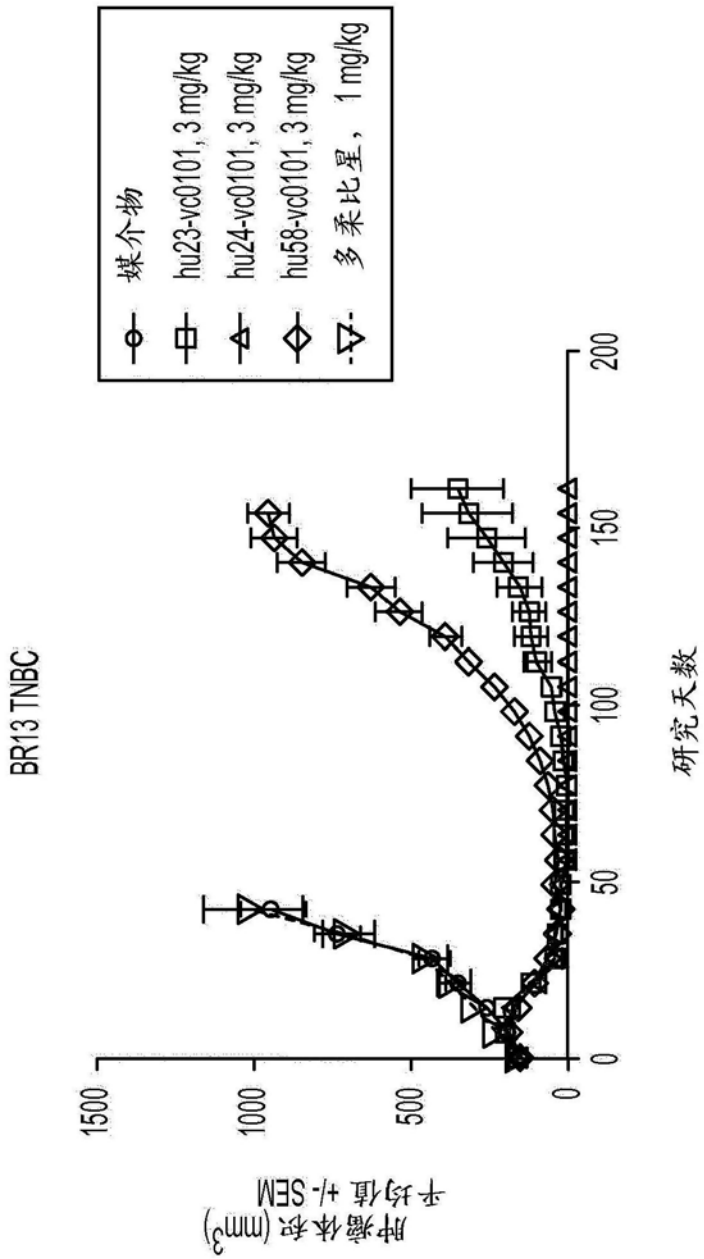


图8

BR13 TNBC PDX中的抗-PTK7 ADC的效力。

天	媒介物	10mg/kg hu24- vc0101	10mg/kg hu23- mc8261	3mg/kg hu23- mc8261	10mg/kg hu24- mc8261	3mg/kg hu24- mc8261	10mg/kg hu58- mc8261	3mg/kg hu58- mc8261
0	144 ± 13	192 ± 23	157 ± 11	162 ± 8	196 ± 26	160 ± 12	163 ± 14	153 ± 8
7	255 ± 22	203 ± 30	205 ± 12	188 ± 11	248 ± 23	196 ± 21	233 ± 15	230 ± 20
14	349 ± 40	136 ± 14	142 ± 12	203 ± 13	243 ± 30	188 ± 23	249 ± 20	277 ± 29
21	428 ± 48	36 ± 6	148 ± 21	125 ± 12	166 ± 19	150 ± 15	301 ± 24	366 ± 26
28	650 ± 62	20 ± 5	169 ± 19	159 ± 15	158 ± 23	187 ± 25	525 ± 77	463 ± 51
35	734 ± 74	4 ± 2	286 ± 41	207 ± 26	216 ± 41	237 ± 37	717 ± 78	599 ± 55
42	940 ± 105	6 ± 3	404 ± 53	286 ± 40	276 ± 53	310 ± 46	GT	688 ± 64
49	GT	5 ± 2	629 ± 83	394 ± 54	419 ± 97	435 ± 76	GT	GT
56	GT	3 ± 3	776 ± 54	611 ± 63	582 ± 130	587 ± 95	GT	GT
63	GT	3 ± 2	935 ± 115	700 ± 76	798 ± 53	650 ± 102	GT	GT
70	GT	0 ± 0	1166 ± 81	1024 ± 100	1107 ± 240	924 ± 117	GT	GT
77	GT	4 ± 2	GT	GT	1215 ± 207	GT	GT	GT
84	GT	3 ± 2	GT	GT	GT	GT	GT	GT
91	GT	3 ± 3	GT	GT	GT	GT	GT	GT
98	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
105	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
112	GT	9 ± 9	GT	GT	GT	GT	GT	GT
119	GT	10 ± 10	GT	GT	GT	GT	GT	GT
126	GT	11 ± 11	GT	GT	GT	GT	GT	GT
133	GT	1 ± 1	GT	GT	GT	GT	GT	GT
140	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
147	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
154	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
161	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
168	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
175	GT	9 ± 9	GT	GT	GT	GT	GT	GT
182	GT	10 ± 10	GT	GT	GT	GT	GT	GT
189	GT	15 ± 15	GT	GT	GT	GT	GT	GT
196	GT	19 ± 19	GT	GT	GT	GT	GT	GT
203	GT	28 ± 28	GT	GT	GT	GT	GT	GT
210	GT	30 ± 30	GT	GT	GT	GT	GT	GT
217	GT	34 ± 34	GT	GT	GT	GT	GT	GT
224	GT	65 ± 65	GT	GT	GT	GT	GT	GT
231	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT

图9

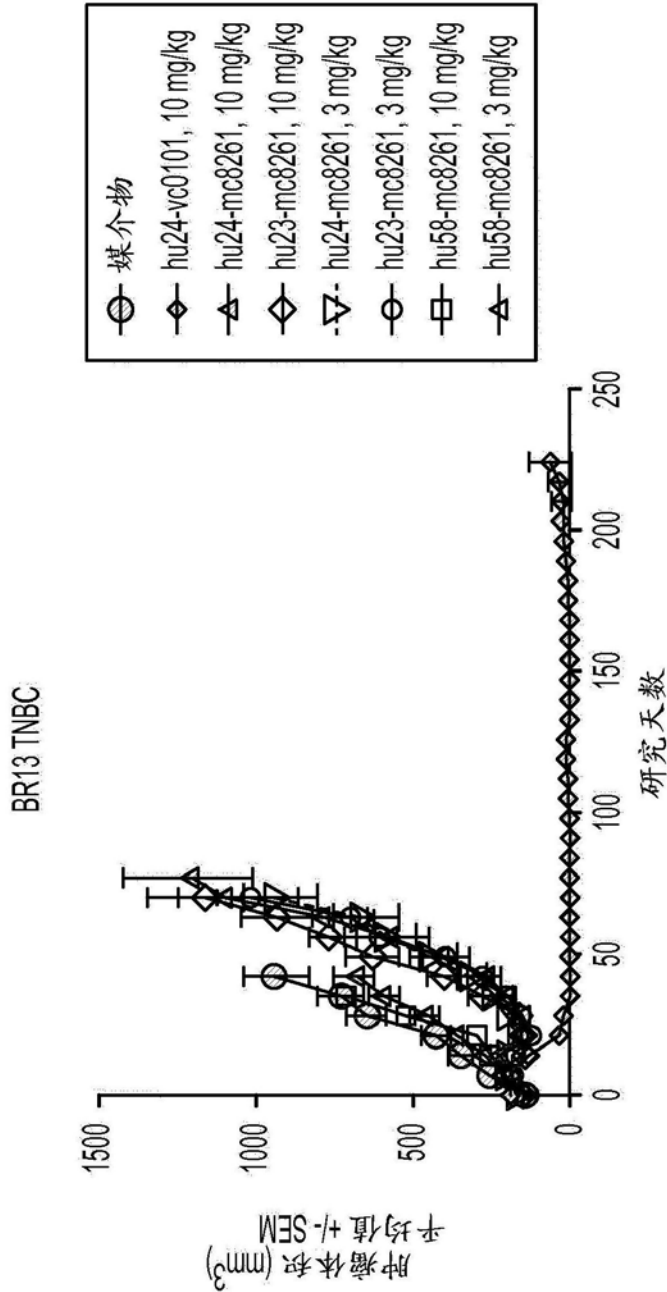


图10

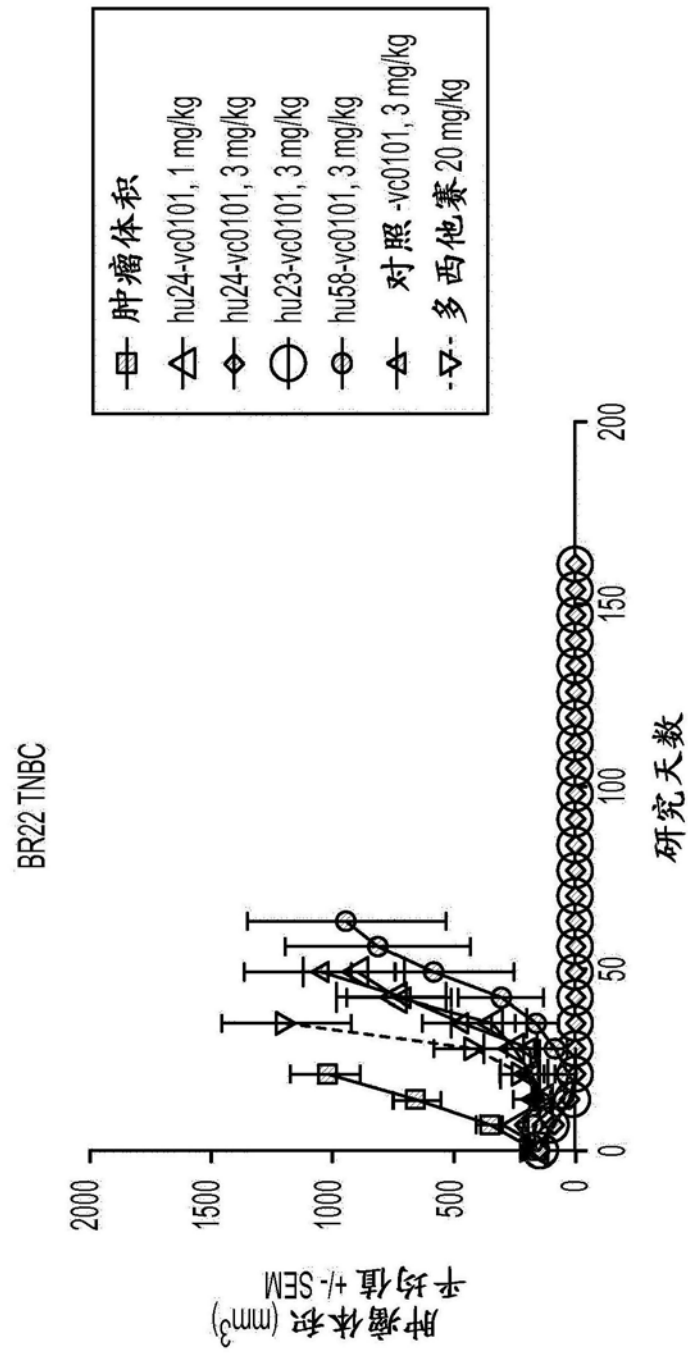


图11

BR22 TNBC PDX中的抗-PTK7 ADC的效力。

天	媒介物	10mg/kg hu23- vc0101	10mg/kg hu23- mc8261	3mg/kg hu23- mc8261	10mg/kg hu24- mc8261	3mg/kg hu24- mc8261	1mg/kg hu24- mc8261	10mg/kg hu58- mc8261	3mg/kg hu58- mc8261
0	195 ± 17	166 ± 24	164 ± 19	156 ± 12	188 ± 13	185 ± 10	184 ± 13	164 ± 17	149 ± 12
7	376 ± 43	69 ± 14	258 ± 50	335 ± 41	359 ± 24	315 ± 17	413 ± 44	289 ± 35	370 ± 19
14	564 ± 54	12 ± 3	364 ± 40	360 ± 59	588 ± 42	633 ± 55	750 ± 69	563 ± 69	672 ± 39
21	819 ± 97	0 ± 0	701 ± 106	916 ± 93	878 ± 79	1265 ± 218	1134 ± 112	1133 ± 133	984 ± 65
28	GT	0 ± 0	1189 ± 176	1534 ± 112	GT	GT	GT	GT	1555 ± 121
35	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
42	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
49	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
56	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
63	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
70	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
77	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
84	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
91	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
98	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
105	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
112	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
119	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
126	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
133	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
140	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
147	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
154	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
161	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
168	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
175	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
182	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
189	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
196	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT

图12

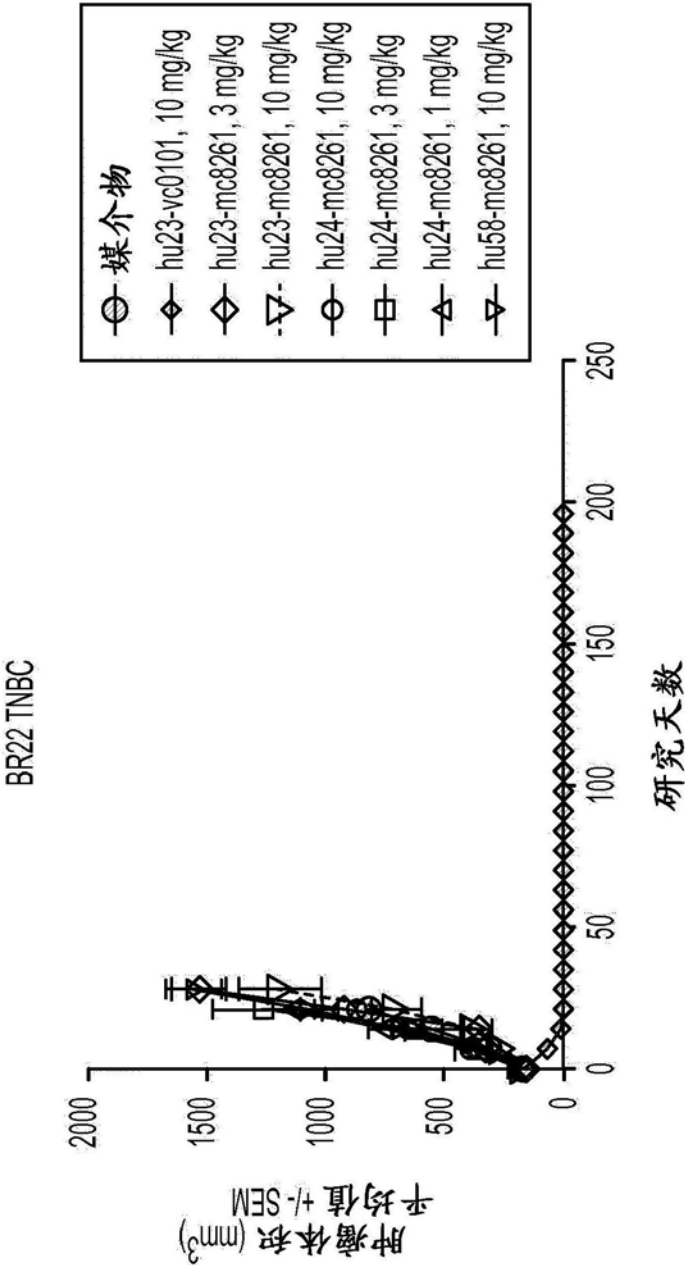


图13

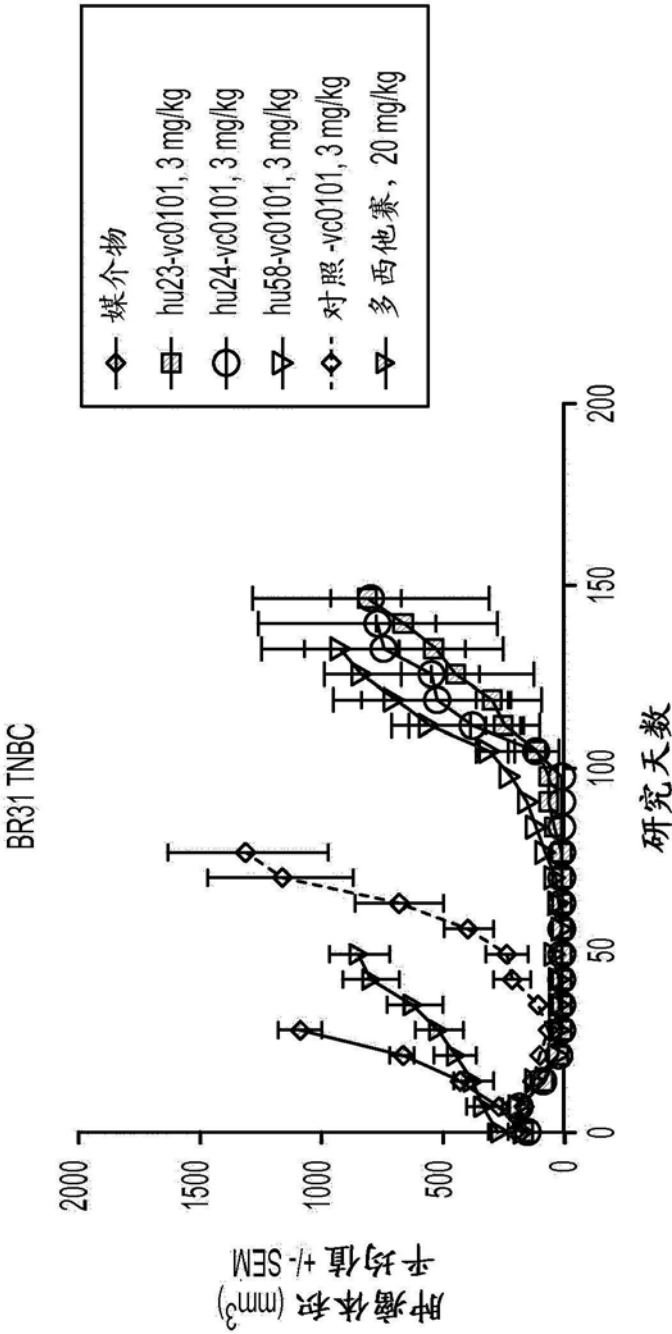


图14



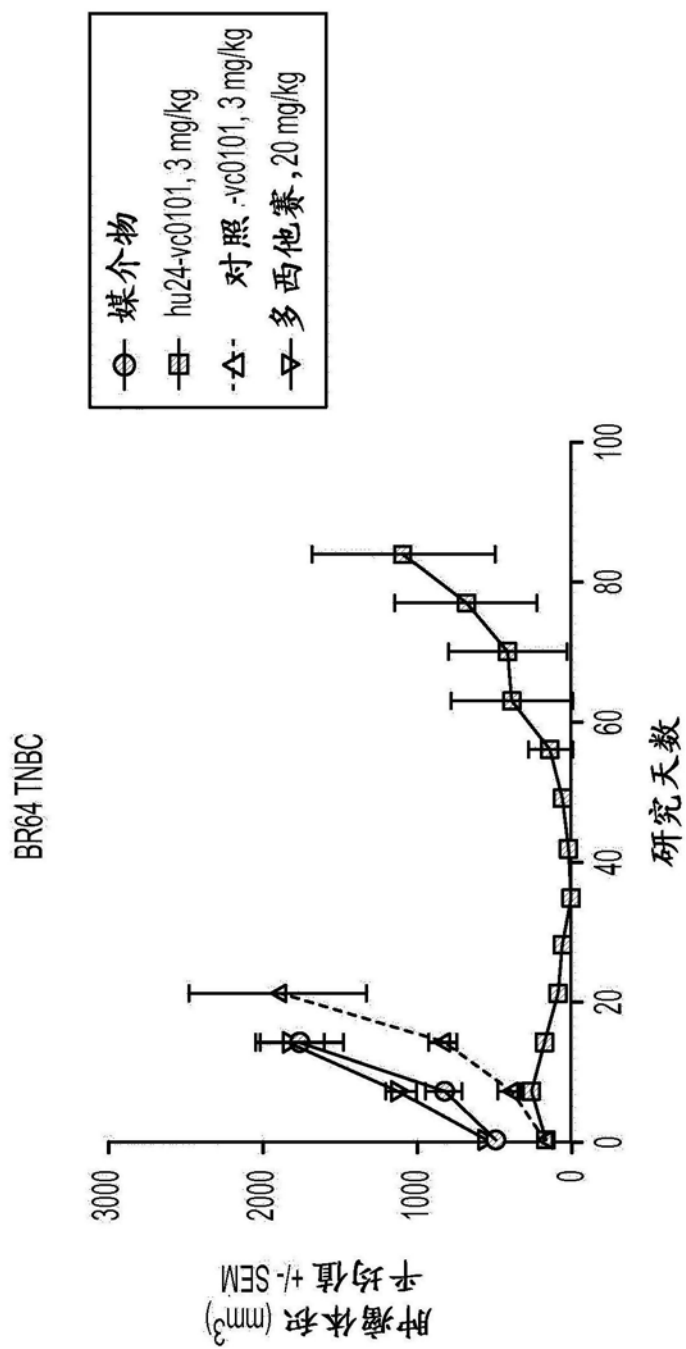


图15

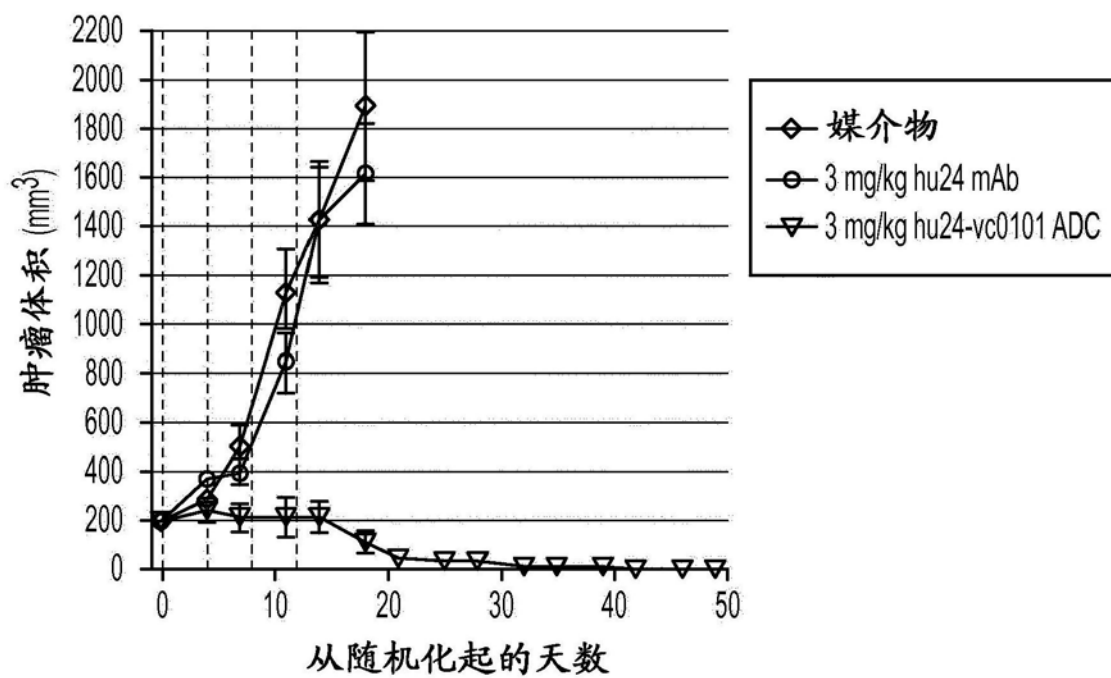


图16

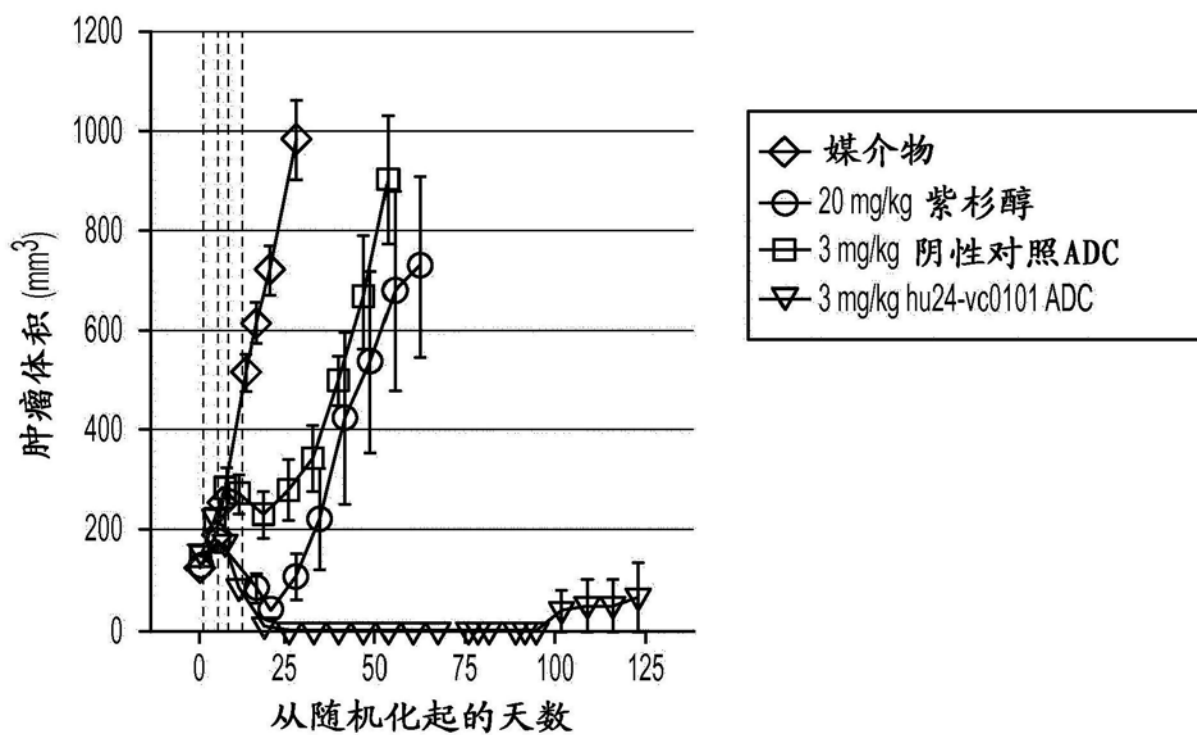


图17

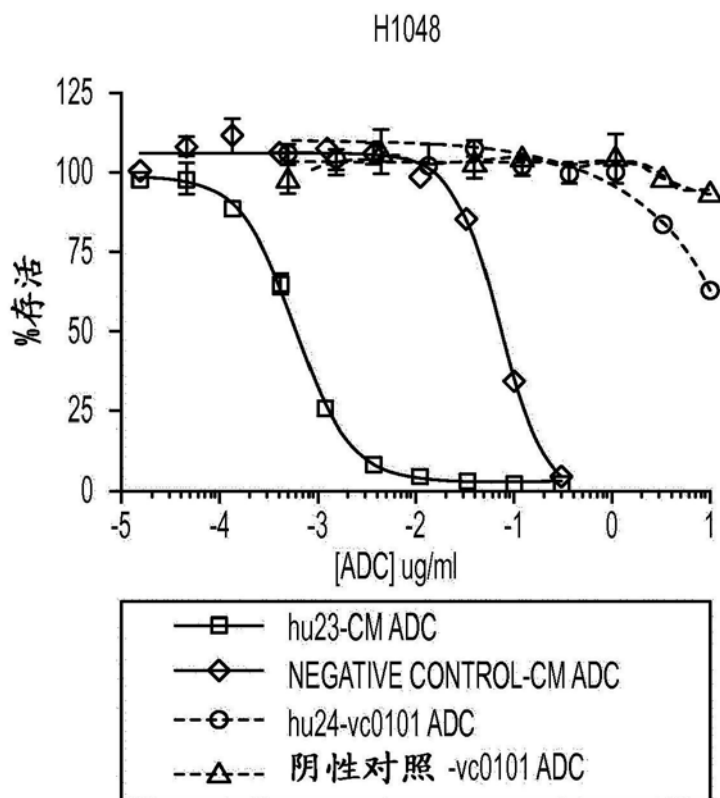


图18A

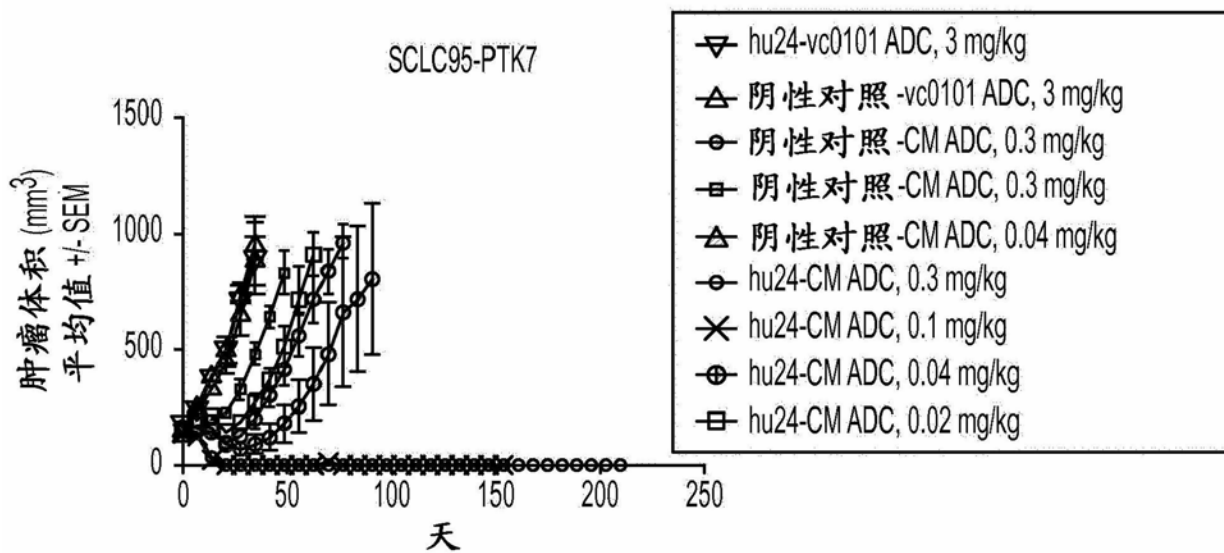


图18B

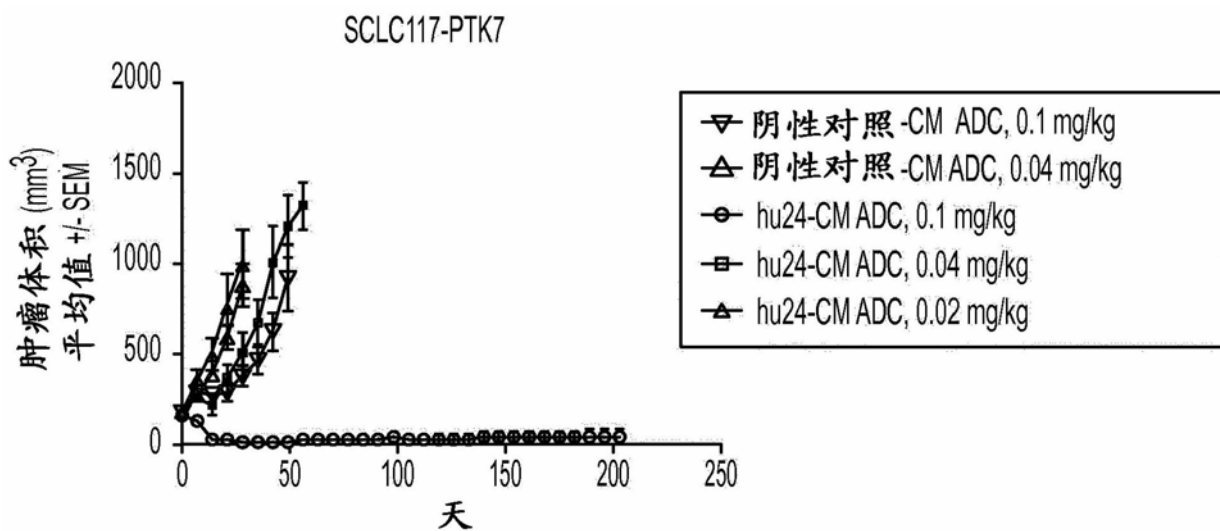


图19A

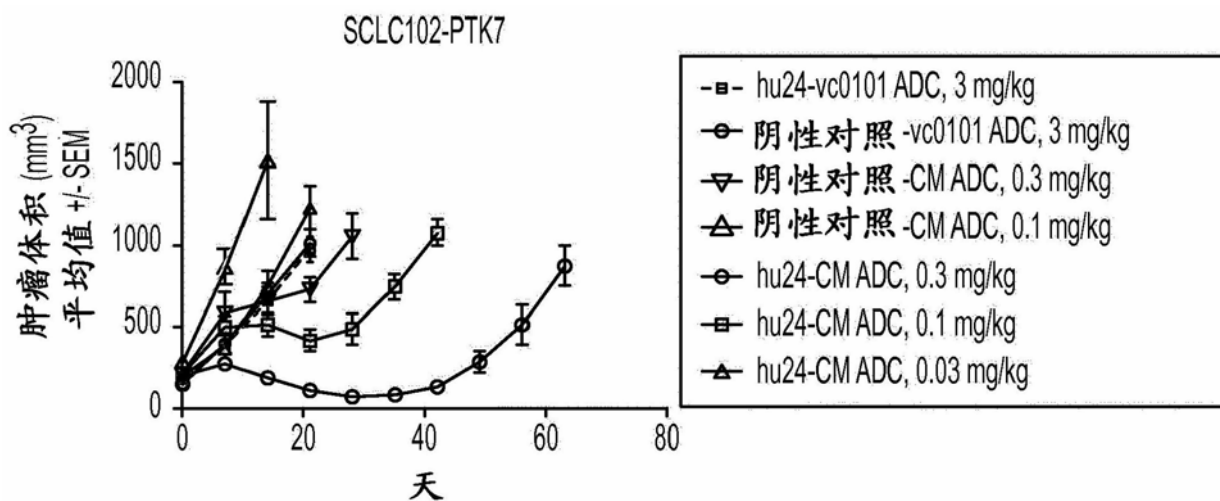


图19B

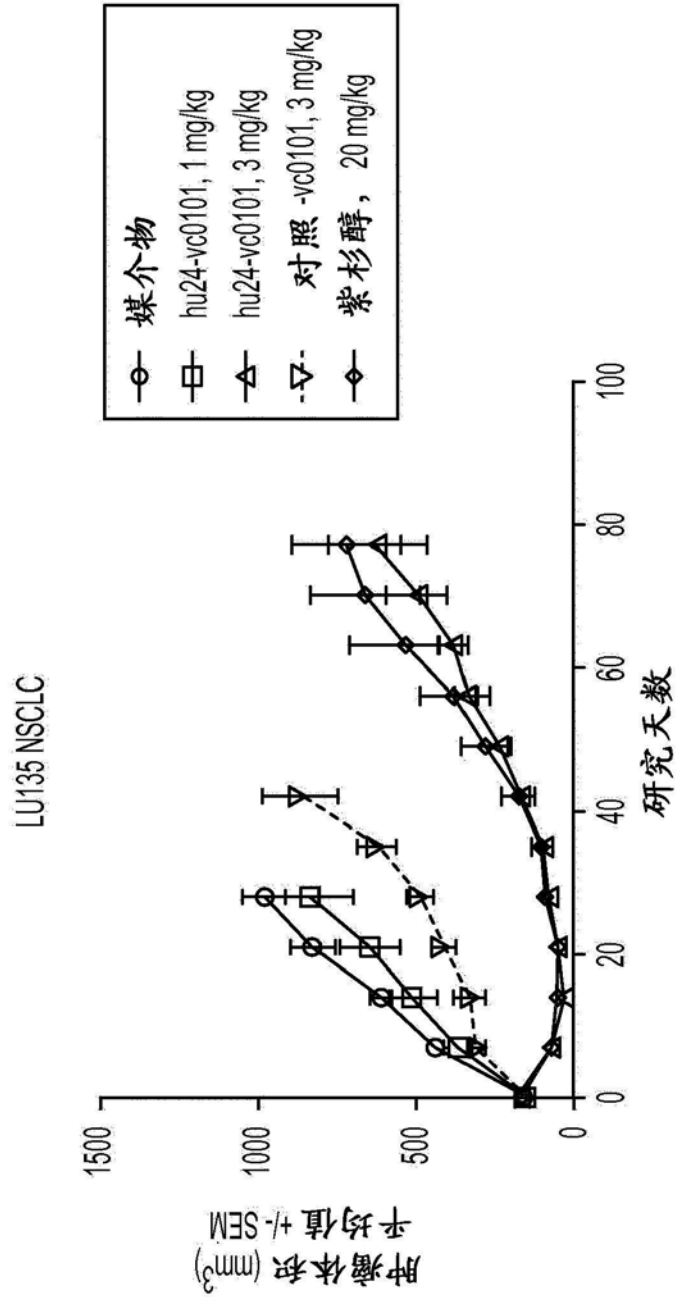


图20

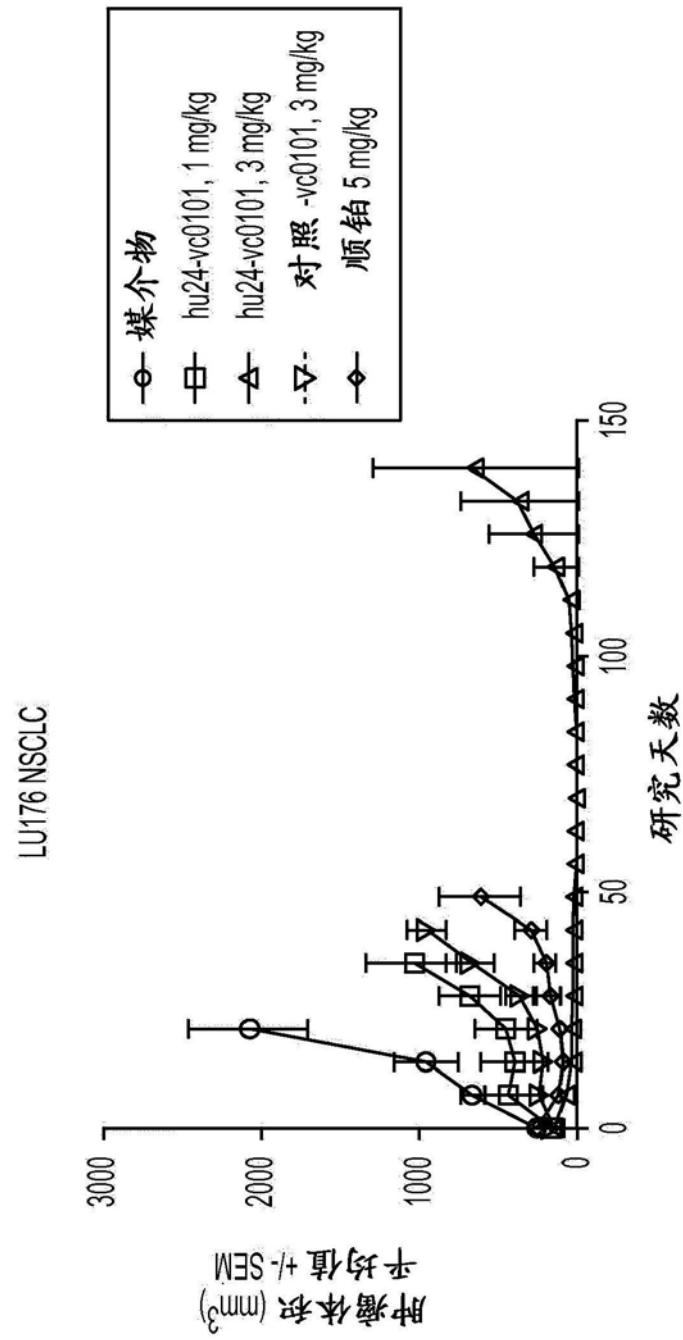


图21

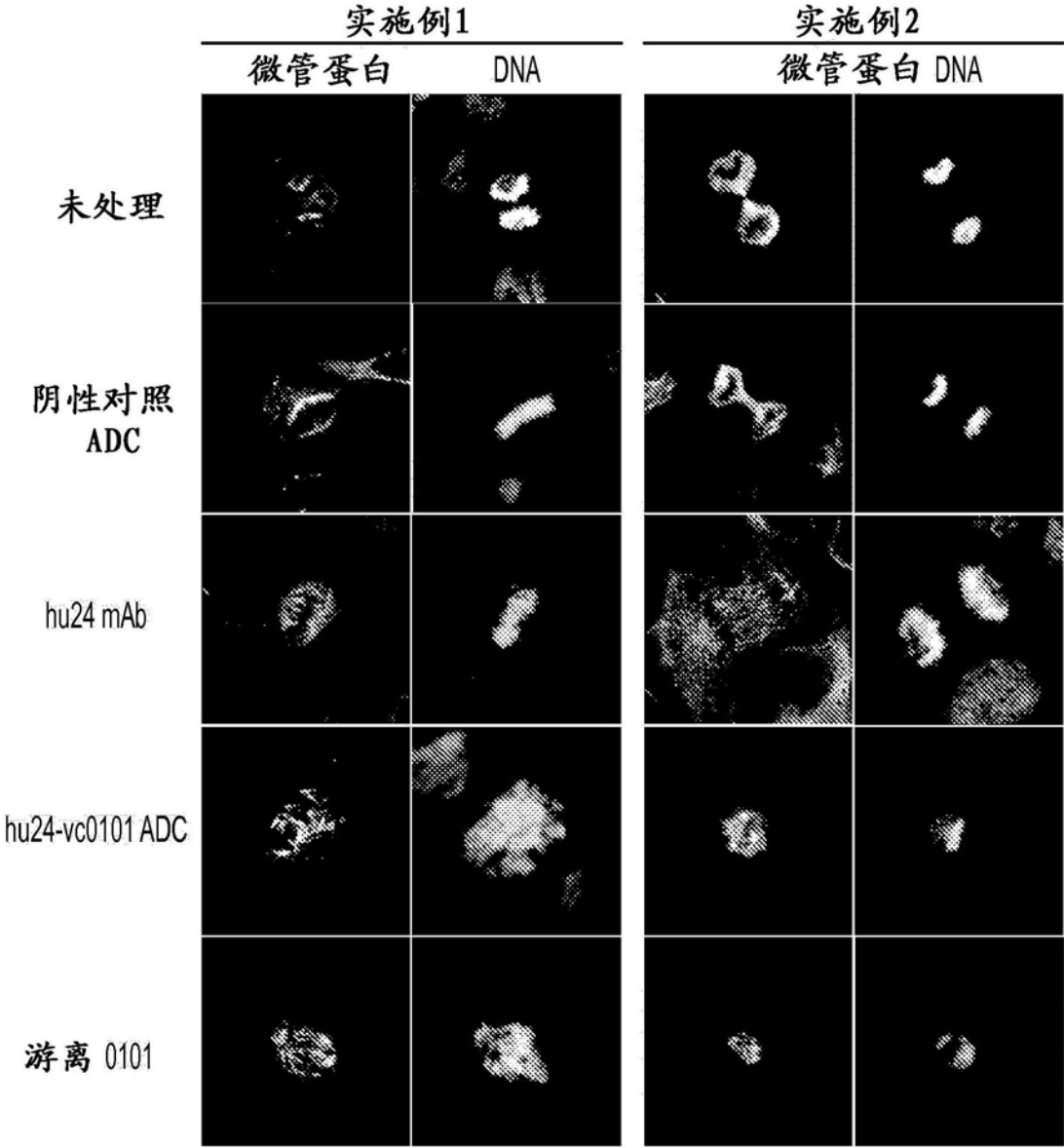


图22

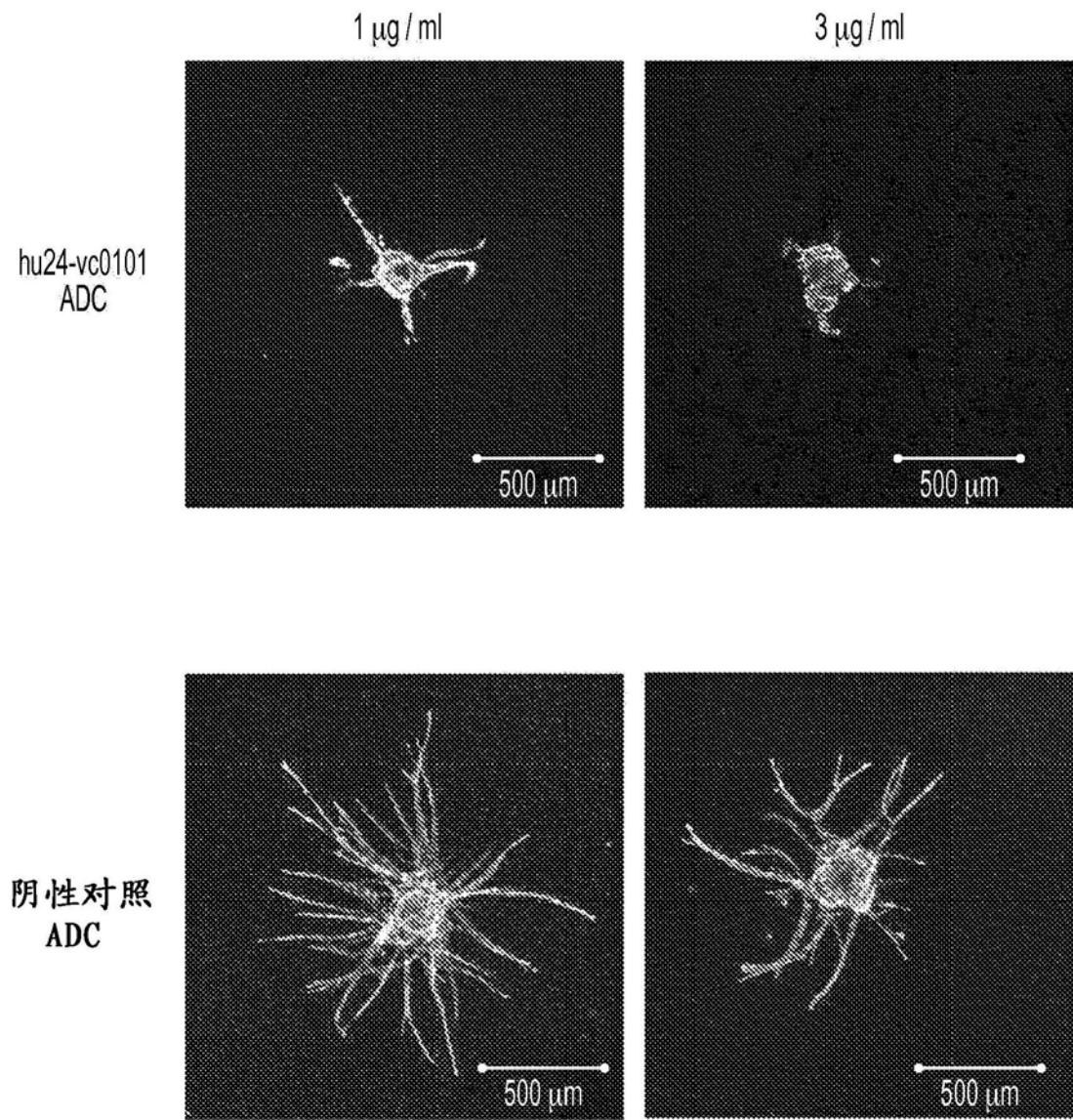


图23