



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112533958 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 15

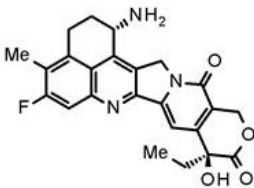
(21) 申请号 201980050318.1
(22) 申请日 2019.07.26
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 112533958 A
(43) 申请公布日 2021.03.19
(30) 优先权数据
 2018-140912 2018.07.27 JP
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2021.01.27
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2019/029379 2019.07.26
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/022475 JA 2020.01.30
(73) 专利权人 第一三共株式会社
 地址 日本东京都
(72) 发明人 相马雅子 久我洋 益田刚
 河村淳子 石桥裕美 安田哲
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 司 72001
 专利代理师 甘霖 梅黎
(51) Int.Cl.
 C07K 16/44 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
(56) 对比文件
 EP 3101032 A1, 2016.12.07
 W0 2017002776 A1, 2017.01.05
 Yusuke Ogitani等. Wide application of
a novel topoisomerase I inhibitor-based
drug conjugation technology. Bioorg Med
Chem Lett.. 2016, 第26卷5069-5072.
审查员 许慧娜

权利要求书8页 说明书49页
序列表34页 附图25页

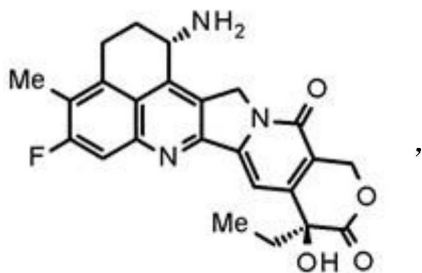
(54) 发明名称
 识别抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白
(57) 摘要

识别抗体-药物缀合物(其中由下式代表的
药物经由接头缀合至抗体)的药物部分的蛋白;
用于测量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳
动物中的抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方
法;以及用于检查使用所述蛋白的哺乳动物中的
抗体-药物缀合物的组织分布的方法。



1. 识别抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白,其中由下式代表的药物经由接头与抗体缀合:

[式1]



其中所述蛋白是:

a) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3:

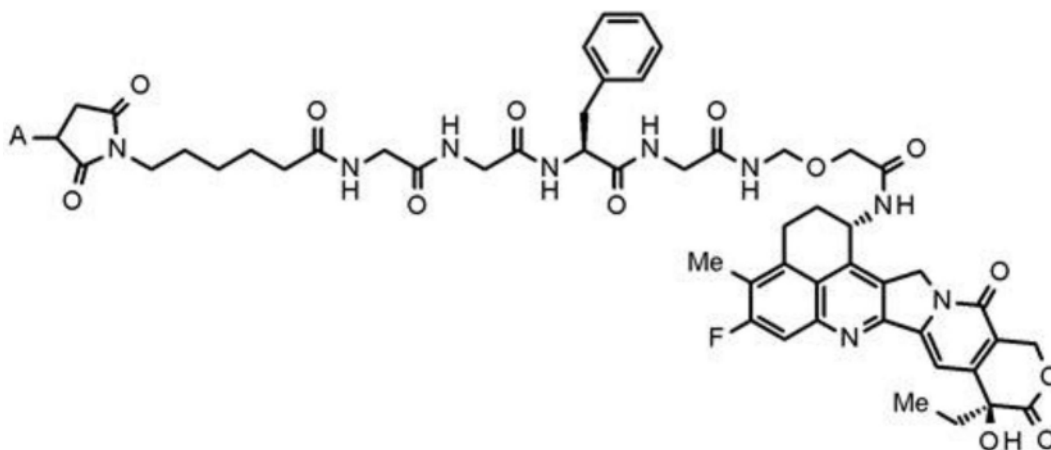
b) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3:

c) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;或

d) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由WAS代表的三肽组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3。

2. 根据权利要求1所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头由下式代表:

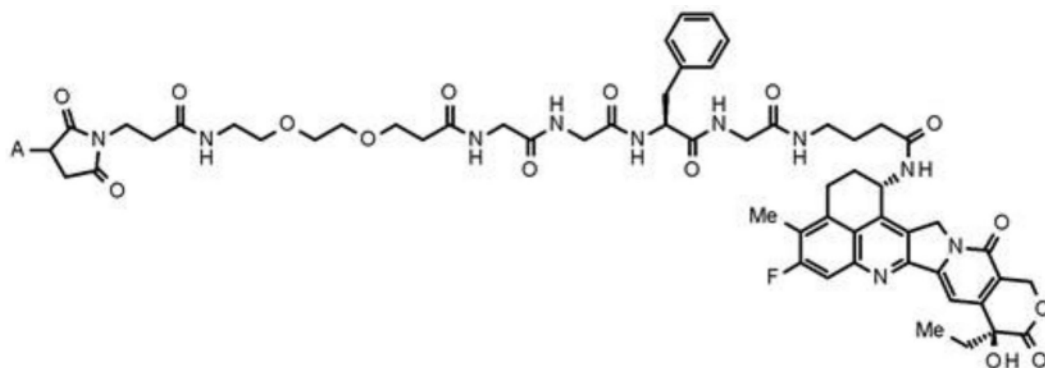
[式2]



其中A代表与所述抗体的连接位置,且

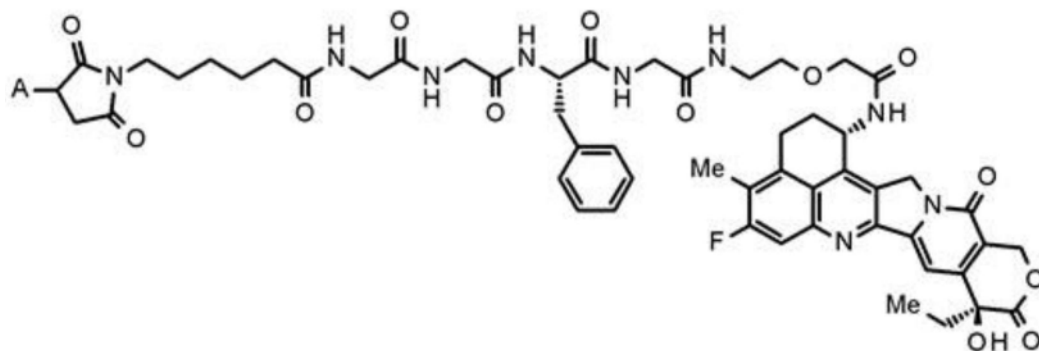
所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

3. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头由下式代表:
[式3]



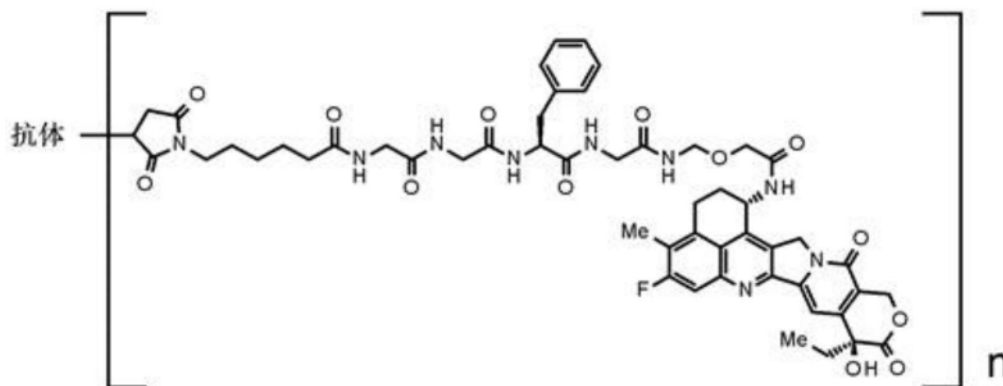
其中A代表与所述抗体的连接位置, 且
所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

4. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头由下式代表:
[式4]



其中A代表与所述抗体的连接位置, 且
所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

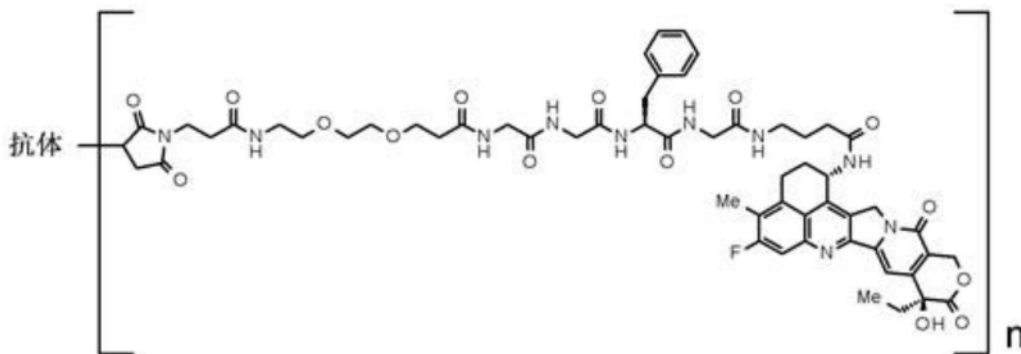
5. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头经由硫醚键与
所述抗体缀合, 且所述抗体-药物缀合物由下式代表:
[式5]



其中n代表每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

6. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头经由硫醚键
与所述抗体缀合, 且所述抗体-药物缀合物由下式代表:

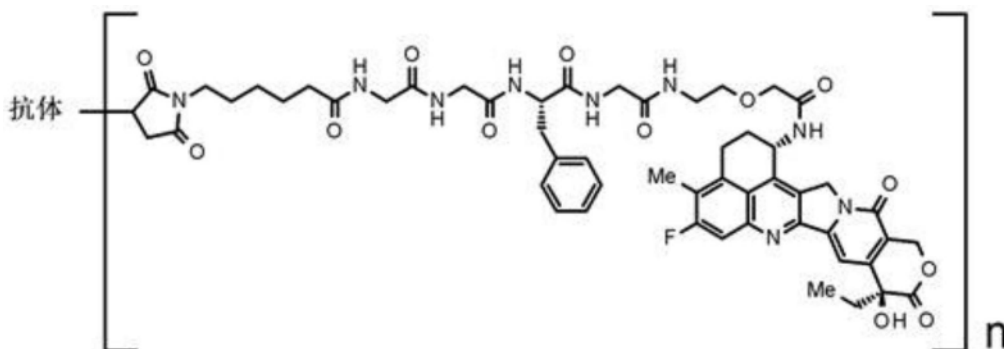
[式6]



其中n代表每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

7. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合, 且所述抗体-药物缀合物由下式代表:

[式7]



其中n代表每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

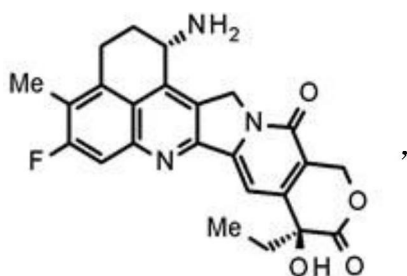
8. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合, 且所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数在2至8的范围内。

9. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗GPR20抗体或抗CDH6抗体。

10. 根据权利要求1所述的蛋白, 其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合, 且所述蛋白对所述抗体-药物缀合物的识别特性独立于所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数的任何差异。

11. 识别由下式代表的药物的蛋白:

[式8]



其中所述蛋白是:

a) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

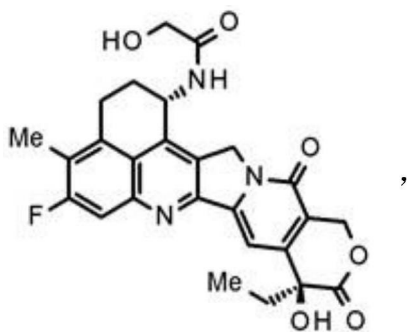
b) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

c) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;或

d) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由WAS代表的三肽组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3。

12. 识别由下式代表的药物的蛋白:

[式9]



其中所述蛋白是:

a) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

b) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

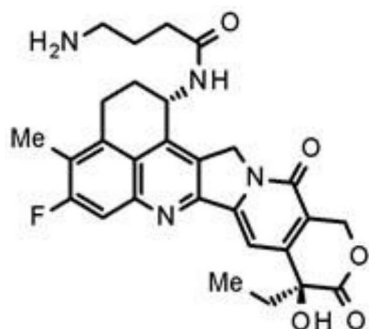
c) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;或

d) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的

CDRH1、由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由WAS代表的三肽组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3。

13. 识别由下式代表的药物的蛋白:

[式10]



其中所述蛋白是:

a) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

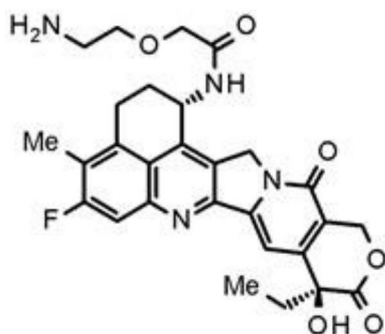
b) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

c) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;或

d) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由WAS代表的三肽组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3。

14. 识别由下式代表的药物的蛋白:

[式11]



其中所述蛋白是：

a) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

b) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;

c) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3;或

d) 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由WAS代表的三肽组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由氨基酸序列组成的重链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至141组成;且所述轻链包含由氨基酸序列组成的轻链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至127组成。

16. 根据权利要求15所述的蛋白,其中所述蛋白是小鼠抗体。

17. 根据权利要求15所述的蛋白,其中所述蛋白是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成的氨基酸序列,且所述轻链包含由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列。

18. 根据权利要求15所述的蛋白,其中所述蛋白是嵌合抗体。

19. 根据权利要求15所述的蛋白,其中所述蛋白是兔嵌合抗体。

20. 根据权利要求15所述的蛋白,其中所述蛋白是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成的氨基酸序列,且所述轻链包含由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列。

21. 根据权利要求1-14中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是其中包含如下重链和轻链的抗体的重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体,其中所述重链包含由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成的氨基酸序列且所述轻链包含由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列;或者所述重链包含由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成的氨基酸序列,且所述轻链包含由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列。

22. 根据权利要求1-14中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成的氨基酸序列,且所述轻链包含由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列,或者是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成的氨基酸序列,且所述轻链包含

由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列。

23.根据权利要求1-14中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是与包含如下重链和轻链的抗体竞争对所述药物的识别特性的抗体,其中所述重链包含由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成的氨基酸序列且所述轻链包含由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列;或者所述重链包含由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成的氨基酸序列,且所述轻链包含由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列。

24.根据权利要求1至14中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是根据权利要求1-23中任一项中限定的抗体的抗原结合片段。

25.根据权利要求24所述的蛋白,其中所述抗体的抗原结合片段是Fab、F(ab')₂、Fab'或Fv。

26.通过使用根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白来定量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的所述抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法,其中所述方法不用于疾病诊断或治疗的目的。

27.根据权利要求26所述的方法,其包括以下步骤:(1)使血浆中的抗体-药物缀合物与具有在其上固定的抗体-药物缀合物的靶抗原的板接触,以形成复合物;(2)使用标志物标记的根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物;且然后(3)检测所述标志物。

28.根据权利要求26所述的方法,其包括以下步骤:(1)使血浆中的抗体-药物缀合物与具有在其上固定的根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白的板接触,以形成复合物;(2)使能够识别所述抗体-药物缀合物的抗体部分并用标志物标记的第二蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物;且然后(3)检测所述标志物。

29.通过使用根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白来定量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的从所述抗体-药物缀合物释放的药物的血浆中的浓度的方法,其中所述方法不用于疾病诊断或治疗的目的。

30.根据权利要求29所述的方法,其包括以下步骤:(1)在用标志物标记的竞争性药物存在的情况下,使血浆中的从所述抗体-药物缀合物释放的药物与具有在其上固定的根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白的板接触,以形成复合物;和(2)检测所述标志物。

31.使用根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白来鉴定已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的所述抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物的组织分布的方法,其中所述方法不用于疾病诊断或治疗的目的。

32.根据权利要求31所述的方法,其包括以下步骤:(1)使组织中的抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物与根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白接触,以形成复合物,(2)使能够识别根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白并用标志物标记的第二蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物,且然后(3)检测所述标志物。

33.根据权利要求31所述的方法,其包括以下步骤:(1)使组织中的抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物与用标志物标记的根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白接触,以形成复合物;且然后(2)检测所述标志物。

34.根据权利要求27、28、30、32或33所述的方法,其中所述标志物是荧光物质,且通过感测由所述标志物发射的荧光来进行所述标志物的检测。

35. 根据权利要求27、28、30、32或33所述的方法,其中所述标志物是酶,且所述标志物的检测通过感测由底物和酶之间的反应引起的发光或显色来进行。

36. 根据权利要求27、28、30、32或33所述的方法,其中所述标志物是发光物质,且所述标志物的检测通过感测基于电化学反应的所述标志物的发光来进行。

37. 多核苷酸,其编码根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白。

38. 载体,其包含根据权利要求37所述的多核苷酸。

39. 转化的宿主细胞,其包含根据权利要求37所述的多核苷酸。

40. 转化的宿主细胞,其包含根据权利要求38所述的载体。

41. 用于产生根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白的方法,其包括以下步骤:培养根据权利要求39或40所述的宿主细胞;且然后从培养步骤中获得的培养产物纯化蛋白。

42. 组合物,其包含根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白。

43. 试剂盒,其包含根据权利要求1-25中任一项所述的蛋白或根据权利要求42所述的组合物。

44. 根据权利要求43所述的试剂盒,其用于定量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀合物释放的药物的血浆中的浓度。

45. 根据权利要求43所述的试剂盒,其用于鉴定已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀合物释放的药物的组织分布。

46. 包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由氨基酸序列组成的重链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至141组成;且所述轻链包含由氨基酸序列组成的轻链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至127组成。

47. 根据权利要求46所述的包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成;且所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成。

48. 根据权利要求46所述的包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成;且所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成。

识别抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白

[0001] [技术领域]

[0002] 本发明涉及识别具有依沙替康(exatecan)的衍生物作为组分的抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白;用于通过使用所述蛋白定量用所述抗体-药物缀合物施用的哺乳动物中的所述抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法;和用于确定其组织分布的方法。

[0003] [背景技术]

[0004] 具有与抗体(其结合在癌细胞的表面上表达的抗原并且还能够细胞内化)缀合的具有细胞毒性的药物的抗体-药物缀合物(ADC)可以将药物选择性递送至癌细胞,且因此预期其引起药物在癌细胞内积聚并杀死癌细胞(非专利参考文献1至5)。

[0005] 与开发小分子化合物和抗体相似,在将抗体-药物缀合物开发为药物产品时,药代动力学研究(PK研究)是必不可少的。这是因为,通过基于动物中的PK研究结果和药理学研究结果以及安全性试验结果之间的相关性的理解在人中实施PK研究,可以获得对计划临床试验设计以及考虑人中的有效性和安全性有用的信息。

[0006] 抗体-药物缀合物的PK研究基本上通过定量施用的抗体-药物缀合物的血浆中的浓度来实施。作为用于定量抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法,可以例举ELISA方法。例如,抗体-药物缀合物的血浆中的浓度可以通过以下步骤来定量:(1)使抗体-药物缀合物与具有固定在其上的抗原的板接触以形成复合物,(2)使能够识别所述抗体-药物缀合物并用标志物标记的蛋白与所述复合物接触以形成进一步的复合物;且然后,(3)基于通过酶促反应产生的颜色/光检测所述标志物。

[0007] 然而,如果使用识别抗体-药物缀合物的抗体部分的蛋白,则通过计算定量血浆-浓度,不仅包括保留所述药物的抗体-药物缀合物的浓度,而且还包括从其中释放所述药物的抗体-药物缀合物的浓度(更具体地,基本上是单独的抗体部分),并且不能准确地进行测定。

[0008] 用于通过ELISA方法使用识别抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白定量抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法是已知的(非专利参考文献6至11)。

[0009] 作为抗体-药物缀合物之一,具有抗体和作为拓扑异构酶I抑制剂的依沙替康的衍生物作为其组分的抗体-药物缀合物是已知的(专利参考文献1至7,非专利参考文献12至15)。由于这些抗体-药物缀合物发挥特别优异的抗肿瘤作用并且具有安全性,因此它们目前在临床研究中。

[0010] 尚不知道用于在保留药物的同时定量具有依沙替康的衍生物作为组分的抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法。

[0011] [引文列表]

[0012] [专利文献]

[0013] [专利参考文献1] 国际公开号W0 2014/057687

[0014] [专利参考文献2] 国际公开号W0 2014/061277

[0015] [专利参考文献3] 国际公开号W0 2015/098099

[0016] [专利参考文献4] 国际公开号W0 2015/115091

- [0017] [专利参考文献5] 国际公开号W0 2015/146132
- [0018] [专利参考文献6] 国际公开号W0 2015/155976
- [0019] [专利参考文献7] 国际公开号W0 2015/155998
- [0020] 非专利文献
- [0021] [非专利参考文献1] Ducry, L., 等人, Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.
- [0022] [非专利参考文献2] Alley, S. C., 等人, Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.
- [0023] [非专利参考文献3] Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.
- [0024] [非专利参考文献4] Senter P. D., 等人, Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.
- [0025] [非专利参考文献5] Howard A. 等人, J Clin Oncol 29: 398-405.
- [0026] [非专利参考文献6] Xie H. 等人, J Pharmacol Exp Ther. (2004) 308 (3), 1073-1082.
- [0027] [非专利参考文献7] Sanderson RJ. 等人, Clinical Cancer Research (2005) Vol.11, 843-852.
- [0028] [非专利参考文献8] Stephan JP. 等人, Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1673-1683.
- [0029] [非专利参考文献9] Stephan JP. 等人, Bioanalysis (2011) 3 (6), 677-700.
- [0030] [非专利参考文献10] Kaur S. 等人, Bioanalysis (2013) 5 (2), 201-226.
- [0031] [非专利参考文献11] Dere R. 等人, Bioanalysis (2013) 5 (9), 1025-1040.
- [0032] [非专利参考文献12] Ogitan Y. 等人, Clinical Cancer Research (2016) 22 (20), 5097-5108.
- [0033] [非专利参考文献13] Ogitan Y. 等人, Cancer Science (2016) 107, 1039-1046.
- [0034] [非专利参考文献14] Doi T, 等人, Lancet Oncol 2017; 18: 1512-22.
- [0035] [非专利参考文献15] Takegawa N, 等人, Int. J. Cancer: 141, 1682-1689 (2017)。
- [0036] [发明概述]
- [0037] [技术问题]
- [0038] 本发明的一个目标是提供识别具有依沙替康的衍生物作为组分的抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白;用于通过使用所述蛋白定量用所述抗体-药物缀合物施用的哺乳动物中的所述抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法;和用于确定其组织分布的方法。
- [0039] [问题的解决方案]
- [0040] 作为解决上述问题的努力研究的结果,本发明人发现,通过特异性免疫筛选获得的蛋白特异性识别具有依沙替康的衍生物作为组分的抗体-药物缀合物的药物部分。此外,他们建立了用于通过使用所述蛋白定量用所述抗体-药物缀合物施用的哺乳动物中的所述

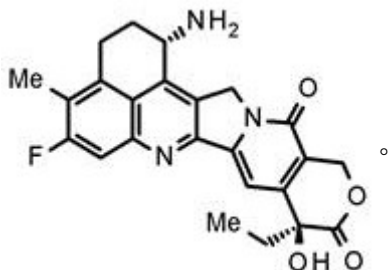
抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法;和用于确定其组织分布的方法。

[0041] 因此,本发明提供了以下[1]至[51]。

[0042] [1] 识别抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白,其中由下式代表的药物经由接头与抗体缀合:

[0043] [式1]

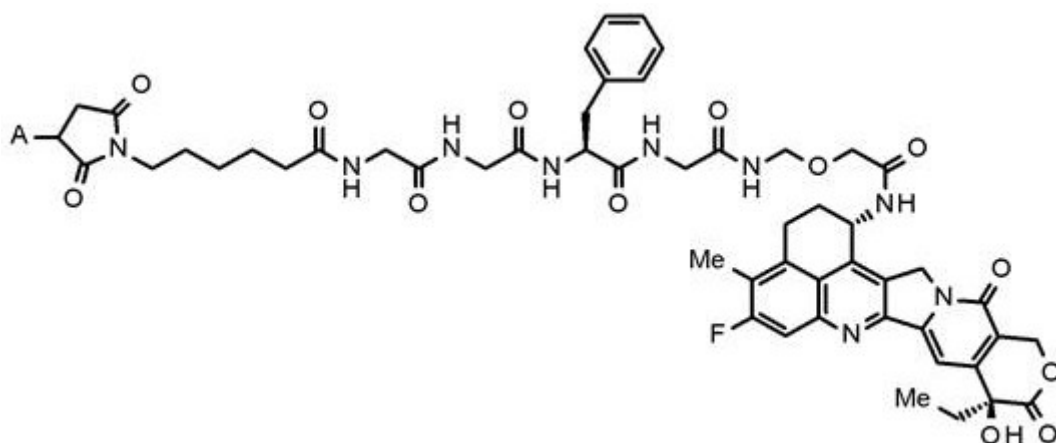
[0044]



[0045] [2] 根据[1]所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头由下式代表:

[0046] [式2]

[0047]



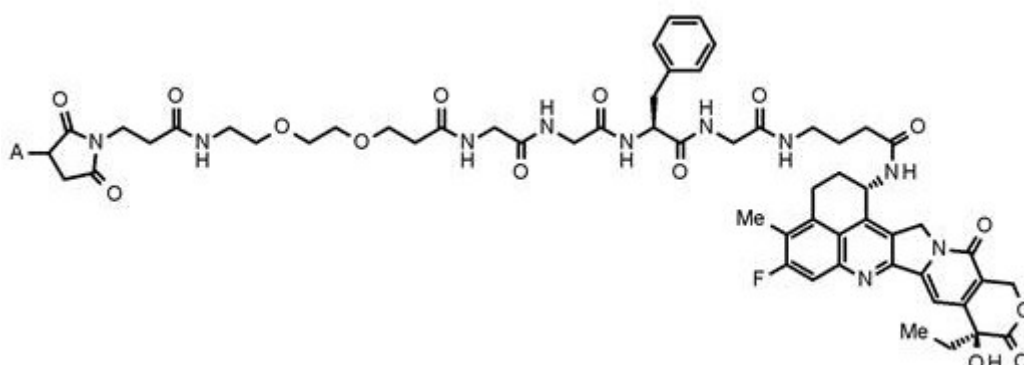
[0048] 其中A代表与所述抗体的连接位置,且

[0049] 所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

[0050] [3] 根据[1]所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头由下式代表:

[0051] [式3]

[0052]

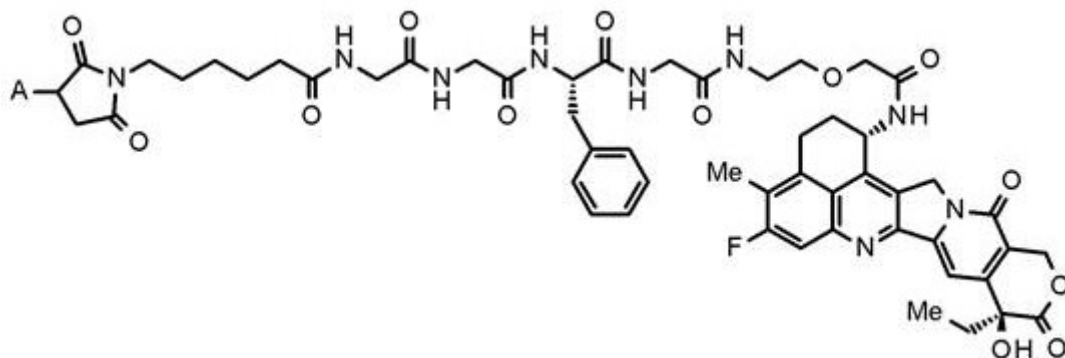


[0053] 其中A代表与所述抗体的连接位置,且

[0054] 所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

[0055] [4] 根据[1]所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物中的药物-接头由下式代表:

[0056] [式4]



[0057]

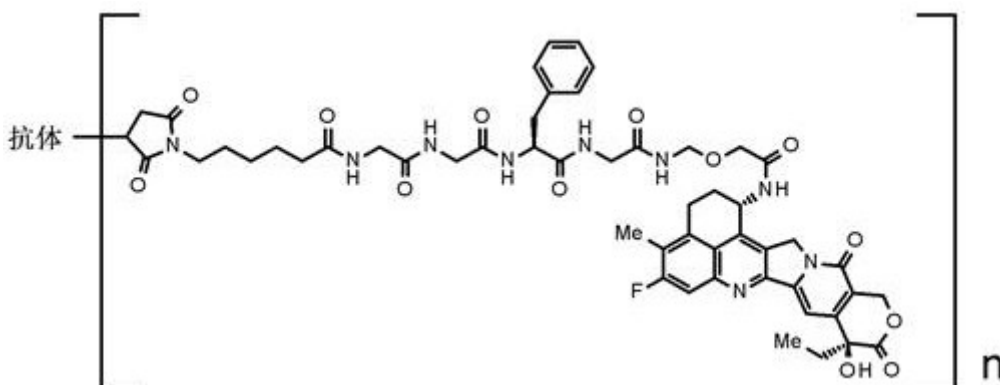
[0058] 其中A代表与所述抗体的连接位置,且

[0059] 所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

[0060] [5] 根据[1]所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物由下式代表:

[0061] [式5]

[0062]

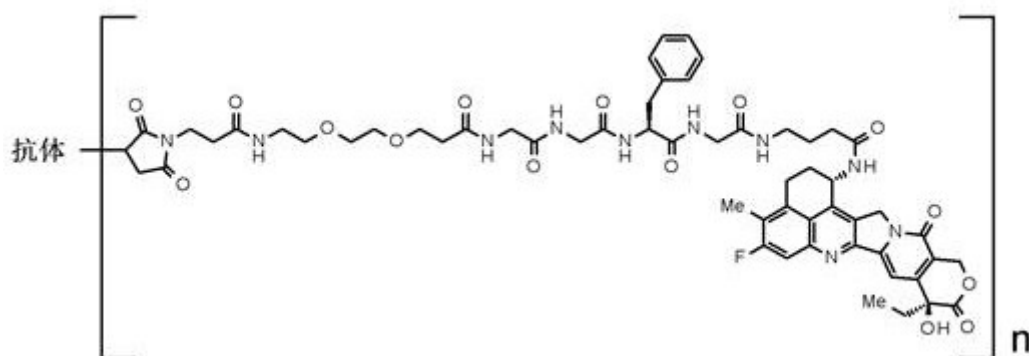


[0063] 其中所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合,且n代表每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

[0064] [6] 根据[1]所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物由下式代表:

[0065] [式6]

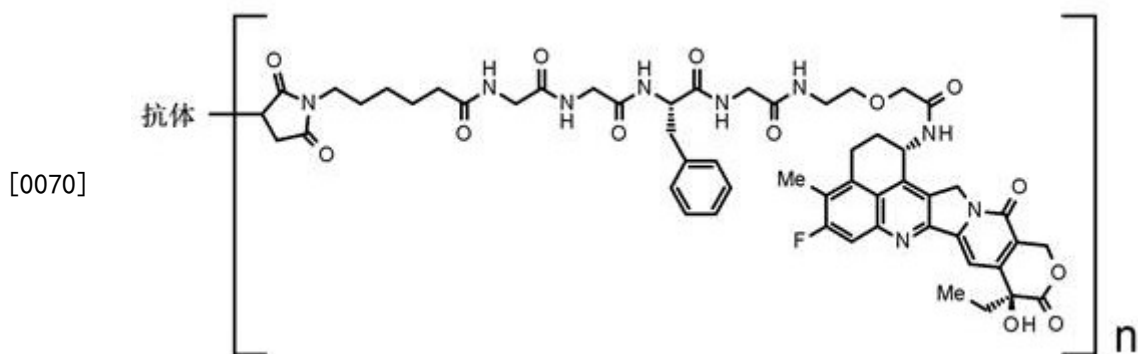
[0066]



[0067] 其中所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合,且n代表每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

[0068] [7] 根据[1]所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物由下式代表:

[0069] [式7]



[0071] 其中所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合,且n代表每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

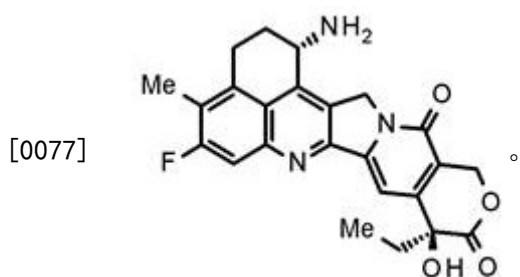
[0072] [8] 根据[1]至[7]中任一项所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数在2至8的范围内。

[0073] [9] 根据[1]至[8]中任一项所述的蛋白,其中所述抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗GPR20抗体或抗CDH6抗体。

[0074] [10] 根据[1]至[9]中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白对所述抗体-药物缀合物的识别特性基本上独立于所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数的任何差异。

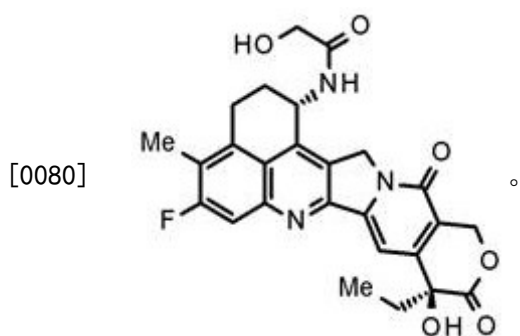
[0075] [11] 识别由下式代表的药物的蛋白:

[0076] [式8]



[0078] [12] 识别由下式代表的药物的蛋白:

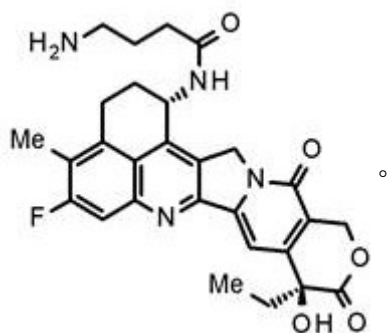
[0079] [式9]



[0081] [13] 识别由下式代表的药物的蛋白:

[0082] [式10]

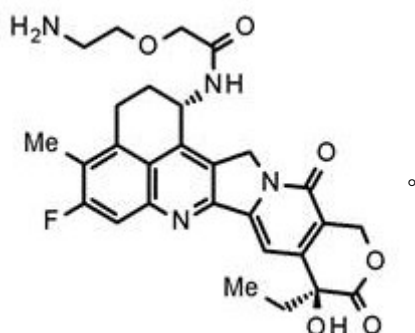
[0083]



[0084] [14] 识别由下式代表的药物的蛋白：

[0085] [式11]

[0086]



[0087] [15] 根据[1]至[14]中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是抗体。

[0088] [16] 根据[15]所述的蛋白,其中所述蛋白是

[0089] a) 由重链和轻链组成的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3,

[0090] b) 由重链和轻链组成的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3,

[0091] c) 由重链和轻链组成的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3,或

[0092] d) 由重链和轻链组成的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3;且所述轻链包含由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1、由WAS代表的三肽组成的CDRL2和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3。

[0093] [17] 根据[16]所述的蛋白,其中所述蛋白是由重链和轻链组成的抗体,所述重链包含由氨基酸序列组成的重链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至141组成;且所述轻链包含由氨基酸序列组成的轻链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:

16的氨基酸残基21至127组成。

[0094] [18] 根据[17]所述的蛋白,其中所述蛋白是小鼠抗体。

[0095] [19] 根据[17]所述的蛋白,其中所述蛋白是由重链和轻链组成的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成;且所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成。

[0096] [20] 根据[17]所述的蛋白,其中所述蛋白是嵌合抗体。

[0097] [21] 根据[17]所述的蛋白,其中所述蛋白是兔嵌合抗体。

[0098] [22] 根据[17]所述的蛋白,其中所述蛋白是由重链和轻链组成的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成;且所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成。

[0099] [23] 根据[15]所述的蛋白,其中所述蛋白是其中根据[19]或[22]所述的抗体的重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的抗体。

[0100] [24] 根据[15]所述的蛋白,其中所述蛋白是由与根据[19]或[22]所述的抗体的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列组成的抗体。

[0101] [25] 根据[15]所述的蛋白,其中所述蛋白是由与根据[19]或[22]所述的抗体的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列组成的抗体。

[0102] [26] 根据[15]所述的蛋白,其中所述蛋白是与根据[19]或[22]所述的抗体竞争对所述药物的识别特性的抗体。

[0103] [27] 根据[1]至[14]中任一项所述的蛋白,其中所述蛋白是根据[15]至[26]中任一项所述的抗体的抗原结合片段。

[0104] [28] 根据[27]所述的蛋白,其中所述抗体的抗原结合片段是Fab、F(ab')₂、Fab'或Fv。

[0105] [29] 通过使用根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白来定量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的所述抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法。

[0106] [30] 根据[29]所述的方法,其包括以下步骤:(1)使血浆中的抗体-药物缀合物与具有在其上固定的抗体-药物缀合物的靶标抗原的板接触,以形成复合物;(2)使用标志物标记的根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物;且然后(3)检测所述标志物。

[0107] [31] 根据[29]所述的方法,其包括以下步骤:(1)使血浆中的抗体-药物缀合物与具有在其上固定的根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白的板接触,以形成复合物;(2)使能够识别所述抗体-药物缀合物的抗体部分并用标志物标记的第二蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物;且然后(3)检测所述标志物。

[0108] [32] 通过使用根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白来定量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的从所述抗体-药物缀合物释放的药物的血浆中的浓度的方法。

[0109] [33] 根据[32]所述的方法,其包括以下步骤:(1)在用标志物标记的竞争性药物存在的情况下,使血浆中的从所述抗体-药物缀合物释放的药物与具有在其上固定的根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白的板接触,以形成复合物;和(2)检测所述标志物。

[0110] [34] 使用根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白来鉴定已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的所述抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物的组

织分布的方法。

[0111] [35] 根据[34]所述的方法,其包括以下步骤:(1)使组织中的抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物与根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白接触,以形成复合物,(2)使能够识别根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白并用标志物标记的第二蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物,且然后(3)检测所述标志物。

[0112] [36] 根据[34]所述的方法,其包括以下步骤:(1)使组织中的抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物与用标志物标记的根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白接触,以形成复合物;且然后(2)检测所述标志物。

[0113] [37] 根据[30]、[31]、[33]、[35]或[36]所述的方法,其中所述标志物是生色试剂,且通过感测所述标志物的颜色来进行所述标志物的检测。

[0114] [38] 根据[30]、[31]、[33]、[35]或[36]所述的方法,其中所述标志物是酶,且所述标志物的检测通过感测由底物和酶之间的反应引起的发光或显色来进行。

[0115] [39] 根据[30]、[31]、[33]、[35]或[36]所述的方法,其中所述标志物是发光物质,且所述标志物的检测通过感测基于电化学反应的所述标志物的发光来进行。

[0116] [40] 多核苷酸,其编码根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白。

[0117] [41] 载体,其包含根据[40]所述的多核苷酸。

[0118] [42] 转化的宿主细胞,其包含根据[40]所述的多核苷酸。

[0119] [43] 转化的宿主细胞,其包含根据[41]所述的载体。

[0120] [44] 用于产生根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白的方法,其包括以下步骤:培养根据[42]或[43]所述的宿主细胞;且然后从培养步骤中获得的培养产物纯化蛋白。

[0121] [45] 组合物,其包含根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白。

[0122] [46] 试剂盒,其包含根据[1]至[28]中任一项所述的蛋白或根据[45]所述的组合物。

[0123] [47] 根据[46]所述的试剂盒,其用于定量已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀合物释放的药物的血浆中的浓度。

[0124] [48] 根据[46]所述的试剂盒,其用于鉴定已经向其施用抗体-药物缀合物的哺乳动物中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀合物释放的药物的组织分布。

[0125] [49] 抗体,其包含重链和轻链,所述重链包含由氨基酸序列组成的重链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至141组成;且所述轻链包含由氨基酸序列组成的轻链可变区,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至127组成。

[0126] [50] 根据[49]所述的抗体,其包含重链和轻链,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至477组成;且所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至234组成。

[0127] [51] 根据[49]所述的抗体,其包含重链和轻链,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成;且所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成。

[0128] [本发明的有利效果]

[0129] 本发明提供了识别具有依沙替康的衍生物作为组分的抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白;通过使用所述蛋白定量用所述抗体-药物缀合物施用的哺乳动物中的抗体-药物

缀合物的血浆中的浓度的方法;和用于确定其组织分布的方法。

[0130] [附图简述]

[0131] [图1]图1显示小鼠抗体1A3的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:15)。

[0132] [图2]图2显示小鼠抗体1A3的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。

[0133] [图3]图3显示编码小鼠抗体1A3的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:17)。

[0134] [图4]图4显示编码小鼠抗体1A3的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:18)。

[0135] [图5]图5显示兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:19)。

[0136] [图6]图6显示兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。

[0137] [图7]图7显示抗HER2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:21)。

[0138] [图8]图8显示抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。

[0139] [图9]图9显示抗HER3抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:23)。

[0140] [图10]图10显示抗HER3抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:24)。

[0141] [图11]图11显示抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:25)。

[0142] [图12]图12显示抗TROP2抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:26)。

[0143] [图13]图13显示抗B7-H3抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。

[0144] [图14]图14显示抗B7-H3抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:28)。

[0145] [图15]图15显示当小鼠抗体1A3用作捕获试剂时HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0146] [图16]图16显示当小鼠抗体8B2用作捕获试剂时HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0147] [图17]图17显示当小鼠抗体11B1用作捕获试剂时HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0148] [图18]图18显示当小鼠抗体1A3用作检测试剂时HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0149] [图19]图19显示当小鼠抗体8B2用作检测试剂时HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0150] [图20]图20显示当小鼠抗体11B1用作检测试剂时HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0151] [图21]图21显示当小鼠抗体1A3用作检测试剂时B7-H3-ADC (I) (DAR8)和B7-H3-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0152] [图22]图22显示当小鼠抗体8B2用作检测试剂时B7-H3-ADC (I) (DAR8)和B7-H3-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0153] [图23]图23显示当小鼠抗体11B1用作检测试剂时B7-H3-ADC (I) (DAR8)和B7-H3-ADC (I) (DAR4)的校准曲线。

[0154] [图24]图24显示用于定量小鼠中的HER2-ADC (I)的血浆中的浓度的校准曲线。

[0155] [图25]图25显示用于定量猴中的HER3-ADC (I)的血浆中的浓度的校准曲线。

[0156] [图26]图26显示用于定量猴中的TROP2-ADC (I)的血浆中的浓度的校准曲线。

- [0157] [图27]图27显示用于定量猴中的B7-H3-ADC (I)的血浆中的浓度的校准曲线。
- [0158] [图28]图28显示编码人轻链信号序列和人 κ 链恒定区的氨基酸序列的核苷酸序列 (SEQ ID NO:29)。
- [0159] [图29]图29显示编码兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列的核苷酸序列 (SEQ ID NO:30)。
- [0160] [图30]图30显示编码兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列的核苷酸序列 (SEQ ID NO:31)。
- [0161] [图31]图31显示抗GPR20抗体的重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:32)。
- [0162] [图32]图32显示抗GPR20抗体的轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:33)。
- [0163] [图33]图33显示抗CDH6抗体的重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:34)。
- [0164] [图34]图34显示抗CDH6抗体的轻链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:35)。
- [0165] [图35]图35显示使用兔嵌合抗体1A3的免疫染色的图像。比较裸小鼠的免疫染色的图像,向所述裸小鼠中皮下移植人头颈癌细胞系FaDu并分别用TROP2-ADC (I)和抗TROP2 Ab施用。
- [0166] [图36]图36显示使用兔嵌合抗体1A3的免疫染色的图像。比较裸小鼠的图像,向所述裸小鼠皮下移植过表达GPR20的人胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1/GPR20并用GPR20-ADC (I)施用,和不用GPR20-ADC (I)施用。
- [0167] [图37]图37显示使用兔嵌合抗体1A3的免疫染色的图像。比较裸小鼠的图像,向所述裸小鼠皮下移植取自具有透明细胞肾细胞癌的患者肿瘤组织并用CDH6-ADC (I)施用,和不用CDH6-ADC (I)施用。
- [0168] [图38]图38显示使用兔嵌合抗体1A3的免疫染色的图像。比较裸小鼠的图像,向所述裸小鼠皮下移植取自具有透明细胞肾细胞癌的患者肿瘤组织,用CDH6-ADC (I)施用,并用先前制备或未制备的小鼠抗体1A3和化合物(2)的混合物或小鼠抗体1A3和SN-38的混合物染色。
- [0169] [图39]图39显示用于定量小鼠中的GPR20-ADC (I)的血浆中的浓度的校准曲线。
- [0170] [图40]图40显示用于定量人中的HER2-ADC (I)的血浆中的浓度的校准曲线。
- [0171] [图41]图41显示竞争性抑制小鼠抗体1A3对HER2-ADC (I)的识别的化合物的抑制率。
- [0172] [实施方案的描述]
- [0173] 在下文中,描述了用于实施本发明的优选模式。给出以下描述的实施方案仅仅用于举例说明本发明的典型实施方案的一个实例,而无意于限制本发明的范围。
- [0174] 1. 定义
- [0175] 在本发明中,“蛋白”与“肽”或“多肽”同义。
- [0176] 在本发明中,“蛋白”优选是抗体或抗体的抗原结合片段。只要其具有类似于抗体的识别抗原的功能,“蛋白”可以是除了抗体和抗体的抗原结合片段以外的任何蛋白(抗体替代物)。抗体替代物的实例包括支架蛋白,诸如纤连蛋白、蛋白A、脂质运载蛋白、TrxA、A-结构域、锚蛋白重复序列、APPI和结合Ras的AF-6 (Kasper Binz H. 等人, Current Opinion in Biotechnology 2005, 16: 459-469, Kasper Binz H. 等人, Nature Biotechnology 23 (10) 2005, 1257-1268, Skerra A., Current Opinion in

Biotechnology 2007, 18: 295-304, Nygren P., FEBS Journal 275 (2008) 2668-2676, Gronwall C. 等人, Journal of Biotechnology 140 (2009) 254-269)。

[0177] 在本发明中,“抗体”是指具有识别特定抗原的功能的糖蛋白。抗体的实例包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、兔型抗体、人源化抗体和人抗体。

[0178] 在本发明中,有时以“免疫原”的含义使用“抗原”。

[0179] 在本发明中,“抗体的抗原结合片段”是指具有识别抗原的功能的抗体的部分片段,并且与“抗体的功能片段”同义。抗体的抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、F(ab')₂、scFv、Fab'和单链免疫球蛋白。抗体的功能片段可以通过用酶、诸如木瓜蛋白酶和胃蛋白酶处理全长抗体分子来获得。除此之外,抗体的功能片段可以是使用重组基因在适当的宿主细胞中产生的重组蛋白。

[0180] 本发明的蛋白“识别”抗原的短语是指本发明的蛋白通过分子间的力(诸如静电相互作用、范德华力和氢键)结合抗原。可以例如通过检测由各种免疫化学方法生成的信号来检查本发明的蛋白对抗原的“识别”。

[0181] 本发明的蛋白对抗原的“识别特性”是不同的短语意指本发明的蛋白与抗原的结合强度和行为是基本上不同的。可以例如通过比较由各种免疫化学方法生成的信号强度和/或比较代表抗原的浓度和信号的强度的校准曲线来检查本发明的蛋白对抗原的“识别特性”是否不同。

[0182] 被本发明的蛋白识别的“部分”是指被本发明的蛋白识别的靶标中的特定部分结构。被本发明的蛋白识别的靶标被称为“抗原”,且被本发明的蛋白识别的特定部分有时被称为“表位”。

[0183] 已知抗体的每条重链和轻链具有三个互补决定区(CDR)。互补决定区也称为高变区(高变结构域),其为抗体的每条重链和轻链的可变区内存在并且具有特别高的一级结构突变率的位点。CDR通常存在于重链和轻链的多肽链各自的一级结构上的三个离散位点中。在本发明中,抗体的互补决定区表达如下:重链中的互补决定区从重链氨基酸序列的氨基末端起依次表示为CDRH1、CDRH2和CDRH3;而轻链中的互补决定区从轻链氨基酸序列的氨基末端起依次表示为CDRL1、CDRL2和CDRL3。在三级结构中,这些区域彼此靠近存在,并且参与对抗原的特异性的确定。

[0184] 在本发明中,“基因”是指包含编码蛋白或其互补链的氨基酸的核苷酸序列的核苷酸,例如,在“基因”的含义中包括多核苷酸、寡核苷酸、DNA、mRNA、cDNA和cRNA,其为包含编码蛋白的氨基酸的核苷酸序列或其互补链的核苷酸。如上所提及的基因由单链、双链或三链或更大链的核苷酸组成。一对DNA链和RNA链、核糖核苷酸(RNA)和脱氧核糖核苷酸(DNA)在单一核苷酸链上共同存在,并且在“基因”的含义中包括包含这种核苷酸链的双链或三链或更大链。

[0185] 在本发明中,“核苷酸”与“核酸”同义;例如,在“核苷酸”的含义中包括DNA、RNA、探针、寡核苷酸、多核苷酸和引物。这种核苷酸是由单链、双链或三链体链或更大链组成的核苷酸。一对DNA链和RNA链、核糖核苷酸(RNA)和脱氧核糖核苷酸(DNA)在单一核苷酸链上共同存在,并且在“核苷酸”的含义中包括一对包含这种核苷酸链的双链或三链或更大链。

[0186] 在本发明中,“细胞”包括源自动物的各种细胞,继代培养细胞,原代培养细胞,细胞株,重组细胞和微生物。

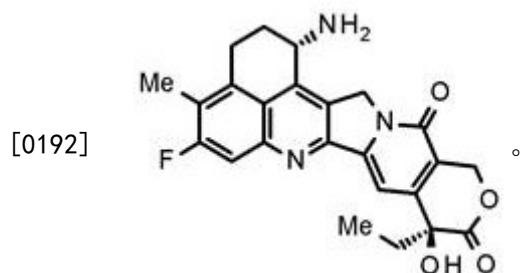
[0187] 2. 抗体-药物缀合物

[0188] 在本发明中,“抗体-药物缀合物”是指经由接头缀合抗体和药物而获得的缀合物。

[0189] 在本发明中,“药物-接头”是指抗体-药物缀合物的部分结构,且其由接头和药物组成。

[0190] 本发明的蛋白的特征在于识别抗体-药物缀合物(在下文中被称为“根据本发明的抗体-药物缀合物”)的药物部分,其中由下式代表的药物(在下文中被称为“化合物(1)”)和抗体经由接头缀合:

[0191] [式12]



[0193] 化合物(1)是一种被称为依沙替康的抗肿瘤药(也可以由IUPAC名称表示:(1S, 9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮,或化学名称:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13 (9H,15H)-二酮),且已知其具有拓扑异构酶I抑制活性。

[0194] 注意,本发明的蛋白还可以识别化合物(1)本身。

[0195] 根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体的实例包括但不限于抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗CD3抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD37抗体、抗CD56抗体、抗CD98抗体、抗DR5抗体、抗EGFR抗体、抗EPHA2抗体、抗FGFR2抗体、抗FGFR4抗体、抗FOLR1抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD70抗体、抗PSMA抗体、抗CEA抗体、抗间皮素抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗Cripto抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GPNMB抗体、抗整联蛋白抗体、抗腱生蛋白-C抗体、抗SLC44A4抗体、抗GPR20抗体和抗CDH6抗体。此外,可以优选地例举抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗GPR20抗体和抗CDH6抗体。

[0196] 在本发明中,“抗HER2抗体”是指特异性结合HER2(人表皮生长因子受体2型;ErbB-2)且优选地通过结合HER2而在表达HER2的细胞中具有内化活性的抗体。

[0197] 抗HER2抗体的实例包括曲妥珠单抗(美国专利号5821337)和帕妥珠单抗(国际公开号WO 01/00245)。优选地,可以例举曲妥珠单抗。

[0198] 在本发明中,“抗HER3抗体”是指特异性结合HER3(人表皮生长因子受体3型;ErbB-3)且优选地通过结合HER3而在表达HER3的细胞中具有内化活性的抗体。

[0199] 抗HER3抗体的实例包括帕特里单抗(U3-1287),U1-59(国际公开号WO 2007/077028),MM-121(seribantumab),国际公开号WO 2008/100624中描述的抗ERBB3抗体,RG-7116(lumretuzumab)和LJM-716(elgemtumab)。优选地,可以例举帕特里单抗和U1-59。

[0200] 在本发明中,“抗TROP2抗体”是指特异性结合TROP2(TACSTD2:肿瘤相关钙信号转导子2;EGP-1)且优选地通过结合TROP2而在表达TROP2的细胞中具有内化活性的抗体。

[0201] 抗TROP2抗体的实例包括hTINA1-H1L1 (国际公开号W0 2015/098099)。

[0202] 在本发明中,“抗-B7-H3抗体”是指特异性结合B7-H3 (B细胞抗原#7同源物3;PD-L3;CD276) 且优选地通过结合B7-H3而在表达B7-H3的细胞中具有内化活性的抗体。

[0203] 抗B7-H3抗体的实例包括M30-H1-L4 (国际公开号W0 2014/057687)。

[0204] 在本发明中,“抗GPR20抗体”是指特异性结合GPR20 (G蛋白偶联受体20) 且优选地通过结合GPR20而在表达GPR20的细胞中具有内化活性的抗体。

[0205] 抗GPR20抗体的实例包括h046-H4e/L7 (国际公开号W0 2018/135501)。

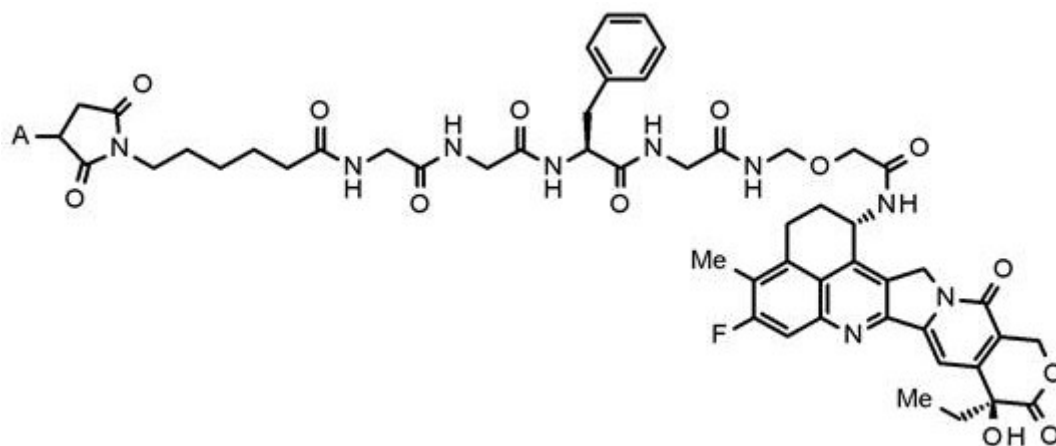
[0206] 在本发明中,“抗CDH6抗体”是指特异性结合CDH6 (钙黏着蛋白-6) 且优选地通过结合CDH6而在表达CDH6的细胞中具有内化活性的抗体。

[0207] 抗CDH6抗体的实例包括H01L02 (国际公开号W0 2018/212136)。

[0208] 本发明的蛋白的特征在于特异性识别优选具有由下式代表的药物-接头的抗体-药物缀合物(在下文中被称为“抗体-药物缀合物(I)”)的药物部分:

[0209] [式13]

[0210]

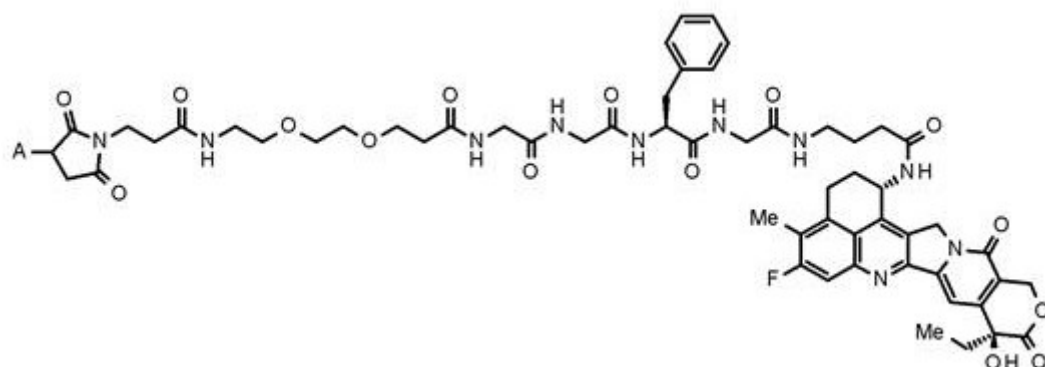


[0211] 其中A代表与抗体的连接位置,且所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合;

[0212] 具有由下式代表的药物-接头的抗体-药物缀合物(下文中被称为“抗体-药物缀合物(II)”):

[0213] [式14]

[0214]

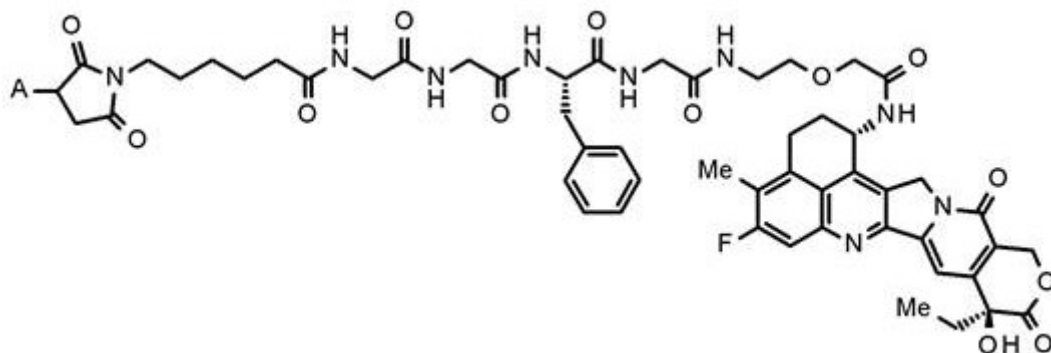


[0215] 其中A代表与抗体的连接位置,且所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合;或

[0216] 具有由下式代表的药物-接头的抗体-药物缀合物(下文中被称为“抗体-药物缀合物(III)”):

[0217] [式15]

[0218]



[0219] 其中A代表与抗体的连接位置,所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。

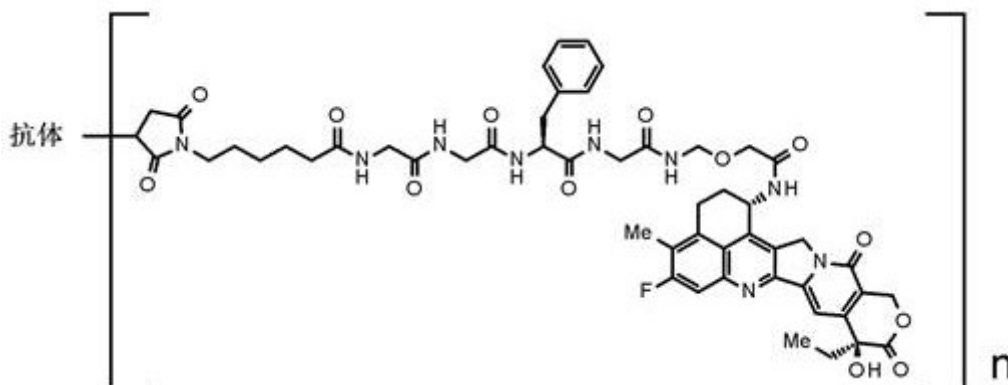
[0220] 抗体-药物缀合物(I)至(III)的每个药物-接头连接至在链间二硫键位点(重链之间的两个位点,以及重链和轻链之间的两个位点)处形成的硫醇基团(换言之,半胱氨酸残基的硫原子)。

[0221] 更优选地,本发明的蛋白的特征在于特异性识别抗体-药物缀合物(I)的药物部分。

[0222] 抗体-药物缀合物(I)也可以由下式代表:

[0223] [式16]

[0224]



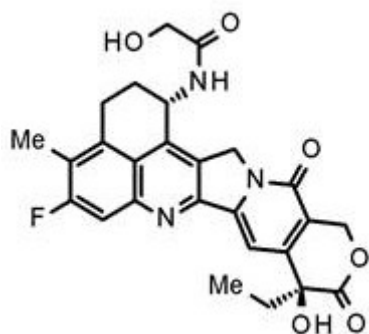
[0225] 其中所述药物-接头经由硫醚键与所述抗体缀合。n的含义与所谓缀合的药物分子的平均数(DAR;药物:抗体比)的含义相同,并且指示每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

[0226] 注意,根据本发明的抗体-药物缀合物的每个抗体分子的缀合的药物分子的平均数可以例如通过如下来测定:基于抗体-药物缀合物及其缀合前体在280nm和370nm的两个波长处的UV吸光度的测量值的计算方法(UV方法),或基于对通过用还原剂处理抗体-药物缀合物获得的片段的HPLC测量值定量的计算方法(HPLC方法)。

[0227] 在迁移至癌细胞中之后,抗体-药物缀合物(I)在接头部分处切割,以释放由下式代表的化合物:

[0228] [式17]

[0229]

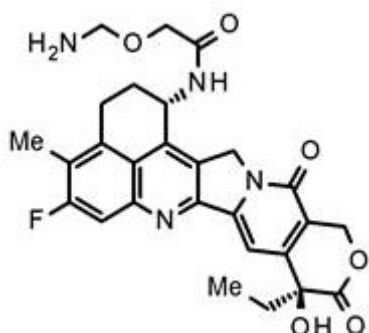


[0230] (下文中被称为“化合物(2)”)。

[0231] 推测化合物(2)通过分解由下式代表的化合物的缩醛胺结构而形成：

[0232] [式18]

[0233]



[0234] (下文中被称为“化合物(3)”)。

[0235] 推测其通过切割本发明中使用的抗体-药物缀合物的接头部分而形成。

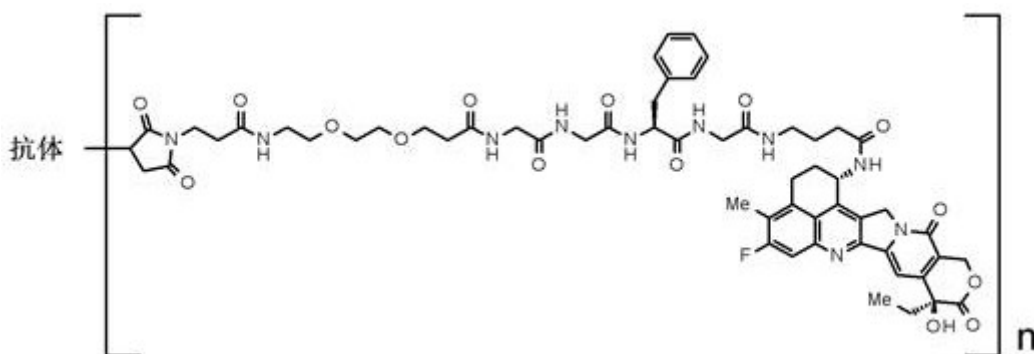
[0236] 推测化合物(2)是抗体-药物缀合物(I)的抗肿瘤活性的原始来源,并且已经证实其具有拓扑异构酶I抑制作用(Ogitani Y. 等人, Clinical Cancer Research, 2016, Oct 15;22 (20): 5097-5108, Epub 2016 Mar 29)。

[0237] 注意,本发明的蛋白还可以识别从抗体-药物缀合物(I)释放的化合物(2)本身。

[0238] 抗体-药物缀合物(II)也可以由下式代表：

[0239] [式19]

[0240]

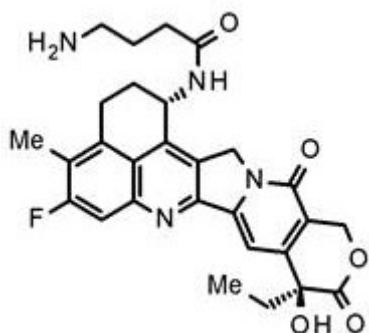


[0241] 其中所述药物-接头经由硫醚键与抗体缀合。 n 的含义与所谓DAR的含义相同,并且指示每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

[0242] 在迁移至癌细胞中之后,抗体-药物缀合物(II)在接头部分处切割,以释放由下式代表的化合物：

[0243] [式20]

[0244]



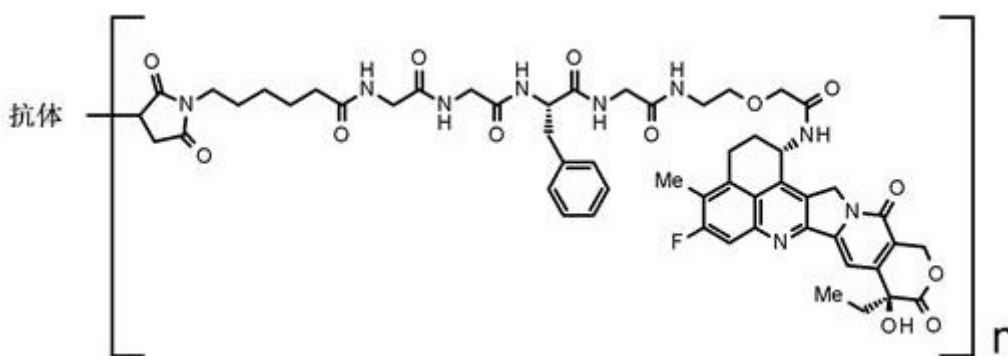
[0245] (下文中被称为“化合物(4)”)

[0246] 注意,本发明的蛋白还可以识别从抗体-药物缀合物(II)释放的化合物(4)本身。

[0247] 所述抗体-药物缀合物(III)也可以由下式代表:

[0248] [式21]

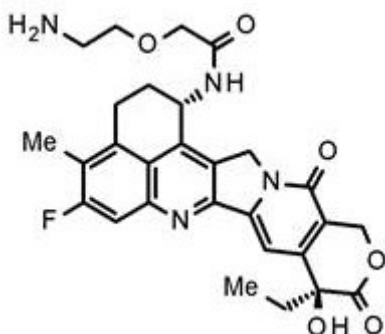
[0249]

[0250] 其中所述药物-接头经由硫醚键与抗体缀合。 n 的含义与所谓DAR的含义相同,并且指示每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数。

[0251] 在迁移至癌细胞中之后,抗体-药物缀合物(III)在接头部分处切割,以释放由下式代表的化合物(下文中被称为“化合物(5)”):

[0252] [式22]

[0253]



[0254] 注意,本发明的蛋白还可以识别从抗体-药物缀合物(III)释放的化合物(5)本身。

[0255] 在本发明中,“抗HER2抗体-药物缀合物”是指抗体-药物缀合物,使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER2抗体。

[0256] 所述抗HER2抗体优选为包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:21的氨基酸残基1至449组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:22的氨基酸残基1至214组成的氨基酸序列组成;或为包含由SEQ ID NO:21代表的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID

N0:2代表的氨基酸序列组成的轻链的抗体。

[0257] 所述抗HER2抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为7.5至8,且甚至更优选为约8。

[0258] 所述抗HER2抗体-药物缀合物可以参考公开、诸如国际公开号W0 2015/115091中的描述来产生。

[0259] 在本发明中,“抗HER3抗体-药物缀合物”是指抗体-药物缀合物,使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER3抗体。

[0260] 所述抗HER3抗体优选为抗体,其包含重链和轻链,所述重链由以下组成:由SEQ ID N0:23的氨基酸残基26至35的氨基酸序列组成的CDRH1,由SEQ ID N0:23的氨基酸残基50至65的氨基酸序列组成的CDRH2,和由SEQ ID N0:23的氨基酸残基98至106的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链由以下组成:由SEQ ID N0:24的氨基酸残基24至39的氨基酸序列组成的CDRL1,由SEQ ID N0:24的氨基酸残基56至62的氨基酸序列组成的CDRL2,和由SEQ ID N0:24的氨基酸残基95至103的氨基酸序列组成的CDRL3;

[0261] 更优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID N0:23的氨基酸残基1至117的氨基酸序列组成的重链可变区,且所述轻链包含由SEQ ID N0:24的氨基酸残基1至113组成的轻链可变区;和甚至更优选地,包含由SEQ ID N0:23代表的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID N0:24代表的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中所述重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的所述抗体的变体。

[0262] 所述抗HER3抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为7.5至8,且甚至更优选为约8。

[0263] 所述抗HER3抗体-药物缀合物可以参考公开、诸如国际公开号W0 2015/155998中的描述来产生。

[0264] 在本发明中,“抗TROP2抗体-药物缀合物”是指抗体-药物缀合物,使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗TROP2抗体。

[0265] 所述抗TROP2抗体优选为包含重链和轻链的抗体,所述重链由以下组成:由SEQ ID N0:25的氨基酸残基50至54的氨基酸序列组成的CDRH1,由SEQ ID N0:25的氨基酸残基69至85的氨基酸序列组成的CDRH2,和由SEQ ID N0:25的氨基酸残基118至129的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链包含:由SEQ ID N0:26的氨基酸残基44至54的氨基酸序列组成的CDRL1,由SEQ ID N0:26的氨基酸残基70至76的氨基酸序列组成的CDRL2,和由SEQ ID N0:26的氨基酸残基109至117的氨基酸序列组成的CDRL3;

[0266] 更优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID N0:25的氨基酸残基20至140的氨基酸序列组成的重链可变区,且所述轻链包含由SEQ ID N0:26的氨基酸残基21至129组成的轻链可变区;和

[0267] 甚至更优选地,包含由SEQ ID N0:25的氨基酸残基20至470的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID N0:26的氨基酸残基21至234的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中所述重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的所述抗体的变体。

[0268] 所述抗TROP2抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数

优选为2至8,更优选为3至5,甚至更优选为3.5至4.5,且甚至更优选为约4。

[0269] 所述抗TROP2抗体-药物缀合物可以参考公开、诸如国际公开号W0 2015/098099中的描述来产生。

[0270] 在本发明中,“抗B7-H3抗体-药物缀合物”是指抗体-药物缀合物,使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗B7-H3抗体。

[0271] 所述抗B7-H3抗体优选为包含重链和轻链的抗体,所述重链包含:由SEQ ID NO:27的氨基酸残基50至54的氨基酸序列组成的CDRH1,由SEQSEQ NO:27的氨基酸残基69至85的氨基酸序列组成的CDRH2,和由SEQ ID NO:27的氨基酸残基118至130的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链由以下组成:由SEQ ID NO:28的氨基酸残基44至53的氨基酸序列组成的CDRL1,由SEQ ID NO:28的氨基酸残基69至75的氨基酸序列组成的CDRL2,和由SEQ ID NO:28的氨基酸残基108至116的氨基酸序列组成的CDRL3;

[0272] 更优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链含有由SEQ ID NO:27的氨基酸残基20至141的氨基酸序列组成的重链可变区,且所述轻链包含由SEQ ID NO:28的氨基酸残基21至128组成的轻链可变区;和

[0273] 甚至更优选地,包含由SEQ ID NO:27的氨基酸残基20至471的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:28的氨基酸残基21至233的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中所述重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的所述抗体的变体。

[0274] 所述抗B7-H3抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数优选为2至8,更优选为3至5,甚至更优选为3.5至4.5,且甚至更优选为约4。

[0275] 所述抗B7-H3抗体-药物缀合物可以参考公开、诸如国际公开号W0 2014/057687中的描述来产生。

[0276] 在本发明中,“抗GPR20抗体-药物缀合物”是指抗体-药物缀合物,使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗GPR20抗体。

[0277] 所述抗GPR20抗体优选为包含重链和轻链的抗体,所述重链由以下组成:由SEQ ID NO:32的氨基酸残基45至54的氨基酸序列组成的CDRH1,由SEQSEQ NO:32的氨基酸残基69至78的氨基酸序列组成的CDRH2,和由SEQ ID NO:32的氨基酸残基118至131的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链由以下组成:由SEQ ID NO:33的氨基酸残基44至54的氨基酸序列组成的CDRL1,由SEQ ID NO:33的氨基酸残基70至76的氨基酸序列组成的CDRL2,和由SEQ ID NO:33的氨基酸残基109至117的氨基酸序列组成的CDRL3;

[0278] 更优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链含有由SEQ ID NO:32的氨基酸残基20至142的氨基酸序列组成的重链可变区,且所述轻链含有由SEQ ID NO:33的氨基酸残基21至129组成的轻链可变区;和

[0279] 甚至更优选地,包含由SEQ ID NO:32的氨基酸残基20至472的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:33的氨基酸残基21至234的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中所述重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的所述抗体的变体。

[0280] 所述抗GPR20抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为7.5至8,且甚至更优选为约8。

[0281] 所述抗GPR20抗体-药物缀合物可以参考公开、诸如国际公开号W0 2018/135501中

的描述来产生。

[0282] 在本发明中,“抗CDH6抗体-药物缀合物”是指抗体-药物缀合物,使得根据本发明的抗体-药物缀合物中的抗体是抗CDH6抗体。

[0283] 所述抗CDH6抗体优选为包含重链和轻链的抗体,所述重链由以下组成:由SEQ ID NO:34的氨基酸残基45至54的氨基酸序列组成的CDRH1,由SEQ ID NO:34的氨基酸残基69至78的氨基酸序列组成的CDRH2,和由SEQ ID NO:34的氨基酸残基118至130的氨基酸序列组成的CDRH3,且所述轻链由以下组成:由SEQ ID NO:35的氨基酸残基44至54的氨基酸序列组成的CDRL1,由SEQ ID NO:35的氨基酸残基70至76的氨基酸序列组成的CDRL2,和由SEQ ID NO:35的氨基酸残基109至116的氨基酸序列组成的CDRL3;

[0284] 更优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链包含由SEQ ID NO:34的氨基酸残基20至141的氨基酸序列组成的重链可变区,且所述轻链包含由SEQ ID NO:35的氨基酸残基21至128组成的轻链可变区;和

[0285] 甚至更优选地,包含由SEQ ID NO:34的氨基酸残基20至471的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:35的氨基酸残基21至233的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或其中所述重链的羧基末端的赖氨酸残基缺失的所述抗体的变体。

[0286] 所述抗CDH6抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,进一步更优选为7.5至8,且甚至更优选为约8。

[0287] 所述抗CDH6抗体-药物缀合物可以参考公开、诸如国际公开号W0 2018/212136中的描述来产生。

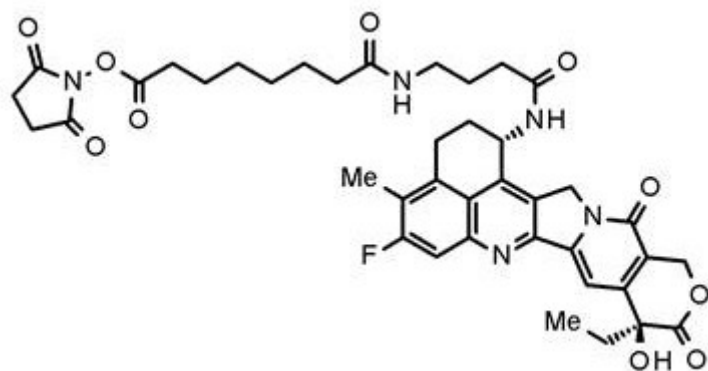
[0288] 3. 本发明的蛋白的产生

[0289] 本发明的蛋白可以优选作为抗体(在下文中被称为“本发明的抗体”)获得。本发明的抗体可以通过如下获得:用通过经由接头缀合化合物(1)或其衍生物和载体蛋白而获得的抗原蛋白免疫动物,和收集体内产生的抗体,且然后将其纯化。

[0290] 作为抗原蛋白,可以使用通过将载体蛋白添加至例如由下式代表的化合物而制备的蛋白:

[0291] [式23]

[0292]



[0293] (在下文中被称为“化合物”(6))。

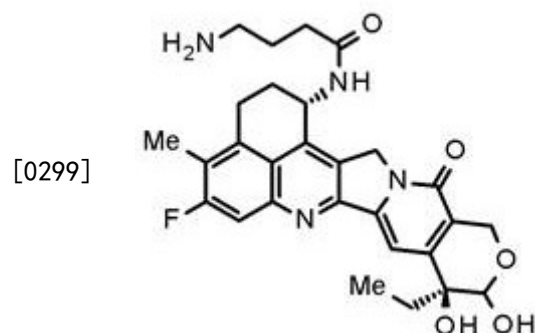
[0294] 载体蛋白没有特别限制,只要其可以诱导免疫应答,即使其为小抗原诸如小分子化合物或肽。例如,可以使用牛甲状腺球蛋白和牛血清白蛋白(BSA)和匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)。

[0295] 从获得的抗血清中,可以使用阳性对照和阴性对照通过ELISA方法选择具有期望特性的抗血清。

[0296] 作为阳性对照,例如,可以例举化合物(1)、化合物(2)和化合物(6)。可以使用这些作为阳性对照来选择具有高抑制作用的抗血清。

[0297] 注意,已知在酸性水性溶剂(例如,约pH3)中,化合物(1)的内酯环的平衡向闭环移动;而在碱性水性溶剂(例如,约pH10)中,该环向开环移动。为了选择无论内酯环是开环还是闭环都识别化合物(1)本身的基本骨架的抗体,可以使用具有还原的内酯环的化合物,例如由下式代表的化合物:

[0298] [式24]

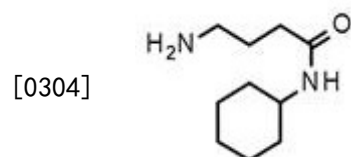


[0300] (在下文中被称为“化合物(7)”)作为阳性对照。可以选择具有高抑制作用的抗血清作为阳性对照。注意,为了在相同水平选择识别抗体的化合物(1)和化合物(7),优选排除特别高地识别化合物(7)而不是化合物(1)的抗体部分。

[0301] 可以将根据本发明的抗体-药物缀合物(优选地,抗体-药物缀合物(I)、(II)和(III))用作阳性对照。可以使用这些作为阳性对照来选择具有高抑制作用的抗血清。

[0302] 为了排除识别远离化合物(1)的基本骨架定位的部分的抗体,例如,可以使用由环己烷环、靠近接头的部分结构组成且由下式代表的化合物:

[0303] [式25]



[0305] (在下文中被称为“化合物(8)”)作为阴性对照。使用此作为阴性对照,可以排除表现出高抑制作用的抗血清。

[0306] 可以通过克隆如上所提及选择的抗血清来获得产生本发明的抗体的细胞。

[0307] 根据本领域已知的方法(例如,Kohler和Milstein, Nature (1975) 256, p.495-497, Kennet, R. 编, Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)),将产生本发明的抗体的细胞与骨髓瘤细胞融合以建立杂交瘤细胞,从其中可以获得单克隆抗体。这种方法的实例更具体地描述于在2009年4月16日公开的国际公开号W009/48072和W010/117011(在2010年10月14日公开)中。

[0308] 可以均匀地纯化获得的抗体。为了分离和纯化抗体,可以使用用于蛋白的常规分离和纯化方法。可以适当地选择和组合例如柱色谱、通过过滤器过滤、超滤、盐析、透析、用

于制备的聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电点电泳来分离和纯化抗体 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak等人,编, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996), Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988);然而,分离和纯化方法不限于这些。

[0309] 色谱的实例包括亲和色谱、离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤色谱、反相色谱和吸附色谱。这些色谱方法可以使用液相色谱诸如HPLC和FPLC实施。待用于亲和色谱中的柱包括蛋白A柱和蛋白G柱。使用蛋白A柱的柱的实例包括Hyper D、POROS和Sephacrose F.F. (Pharmacia)。还可以使用具有在其上固定的抗原的载体和利用对抗原的结合能力来纯化抗体。

[0310] 本发明的抗体的进一步特征在于其对根据本发明的抗体-药物缀合物的识别特性基本上独立于所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的单元的平均数(DAR)的任何差异。所述抗体具有这种特征的事实可以例如基于以下事实来证实:对具有高DAR (DAR8)的抗体-药物缀合物的校准曲线与对具有低DAR (DAR4)的抗体-药物缀合物的校准曲线基本上没有不同。

[0311] 作为如上所述获得的本发明的抗体,例如,可以例举小鼠抗体1A3。小鼠抗体1A3的重链可变区的氨基酸序列是由SEQ ID NO:15的氨基酸残基20至141组成的氨基酸序列,且编码所述氨基酸序列的核苷酸序列是由SEQ ID NO:17的核苷酸残基58至423组成的核苷酸序列。小鼠抗体1A3的轻链可变区的氨基酸序列是由SEQ ID NO:16的氨基酸残基21至127组成的氨基酸序列;且编码所述氨基酸序列的核苷酸序列是由SEQ ID NO:18的核苷酸残基61至381组成的核苷酸序列。

[0312] 如果本发明的抗体是具有源自小鼠抗体1A3的所有6个CDR序列的抗体,并且特异性识别根据本发明的抗体-药物缀合物的药物部分,则其为令人满意的。已知几种用于确定CDR序列的方法。例如,例举Abm定义、Chothia定义、Kabat定义和Imgt (注册商标) (国际ImMunoGeneTics信息系统(注册商标))。本发明的抗体的CDR序列可以通过所述方法中的任一种来定义。

[0313] 根据Abm定义,本发明的抗体的重链可变区具有由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFTFSDYGMV),由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (YISSGSSAIY),和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (PPRYDVYSAWFAY);且本发明的抗体的轻链可变区具有由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (KASQDVGSADV),由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2 (WASTRHT),和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0314] 根据Chothia定义,本发明的抗体的重链可变区具有由SEQ ID NO:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFTFSDY),由SEQ ID NO:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (SSGSSA),和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (PPRYDVYSAWFAY);且本发明的抗体的轻链可变区具有由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (KASQDVGSADV),由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2 (WASTRHT),和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0315] 根据Kabat定义,本发明的抗体的重链可变区具有由SEQ ID NO:9代表的氨基酸序

列组成的CDRH1 (DYGMV),由SEQ ID NO:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (YISSGSSAIYYADTVKG),和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (PPRYDVYSAWFAY);且本发明的抗体的轻链可变区具有由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (KASQDVGSADV),由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2 (WASTRHT),和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0316] 根据Imgt (注册商标)定义,本发明的抗体的重链可变区具有由SEQ ID NO:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFTFSDYG),由SEQ ID NO:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (ISSGSSAI),和由SEQ ID NO:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (ARPPRYDVYSAWFAY);且本发明的抗体的轻链可变区具有由SEQ ID NO:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (QDVGSA),由WAS(色氨酸-丙氨酸-丝氨酸)代表的三肽组成的CDRL2,和由SEQ ID NO:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0317] 本发明的抗体不仅包括上面提及的单克隆抗体,还包括通过添加用于降低异源抗原性的人工修饰而获得的基因重组抗体,诸如嵌合抗体、人源化抗体、兔型抗体或小鼠型抗体。这些抗体可以使用已知方法产生。

[0318] 作为嵌合抗体,可以例举其中抗体可变区和恒定区源自不同物种的抗体,例如,其中小鼠或大鼠来源的抗体可变区与人来源的抗体恒定区连接的嵌合抗体(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984))。作为另一个实例,可以例举其中小鼠或大鼠来源的抗体可变区连接至兔来源的抗体恒定区的嵌合抗体。

[0319] 作为兔嵌合抗体的具体实例,可以例举抗体(兔嵌合抗体1A3),其包含含有小鼠抗体1A3来源的重链可变区和兔抗体来源的重链恒定区的重链和含有小鼠抗体1A3来源的轻链可变区和兔抗体来源的轻链恒定区的轻链。所述兔嵌合抗体1A3的重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:19的氨基酸残基20至464组成;而所述兔嵌合抗体1A3的轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:20的氨基酸残基21至233组成。

[0320] 作为用于癌症研究的非临床动物模型,经常使用小鼠。如果使用小鼠抗体,为了避免与内源性小鼠IgG竞争,可以使用的方法受到限制。然后,使用兔嵌合抗体,因为可以在同一平台上比较小鼠来源的样品和人类来源的样品,并且对转化研究有用。

[0321] 作为人源化抗体,可以例举通过将单独的互补决定区(CDR)整合至人来源的抗体中而获得的抗体(Nature (1986) 321, pp. 522-525),以及通过将框架的氨基酸残基的一部分以及CDR序列移植至人抗体而获得的抗体(WO 90/07861)。作为兔型抗体,可以例举通过将单独的互补决定区(CDR)整合至兔来源的抗体中而获得的抗体,以及通过将框架的氨基酸残基的一部分以及CDR序列移植至兔抗体中而获得的抗体。

[0322] 已知在通过培养哺乳动物细胞产生的抗体中,在重链的羧基末端的赖氨酸残基被缺失(Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995))。还已知从重链羧基末端缺失两个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸),并且将位于羧基末端的脯氨酸残基新酰胺化(Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007))。然而,重链序列的这种缺失和修饰不影响抗体的抗原-结合亲和力和效应子功能(补体的活化、抗体-依赖性细胞的细胞毒性等)。因此,在本发明中,包括进行这种修饰的抗体,并且可以例举其中在重链的羧基末端已经缺失一个或两个氨基酸的缺失变体,通过缺失变体的酰胺化而获得的变体(例如,其中羧基末端脯氨酸残基已被酰胺化的重链)等。根据本发明在抗体的重链的羧基末端具有缺失

的缺失变体的类型不限于上述变体的类型,只要抗原结合亲和力和效应子功能是保守的。构成根据本发明的抗体的两条重链可以是选自全长重链和上述缺失变体或这些中的任何两者的组合的重链中的任一种。每种缺失变体的量的比率有时可能受到产生根据本发明的抗体的培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件的影响;然而,作为本发明的抗体的主要组分,可以例举其中在两条重链的两者中已经缺失在羧基末端的一个氨基酸残基的情况。

[0323] 本发明的抗体可以是由与小鼠抗体1A3或兔嵌合抗体1A3的氨基酸序列具有至少95%(优选至少99%)同一性的氨基酸序列组成的抗体,只要维持本发明的抗体的特征。

[0324] 两种类型的氨基酸序列之间的同一性可以通过使用Blast的默认参数确定(Nucl. Acids Res., 25, p.3389-3402 (1997))。可以通过访问互联网www.ncbi.nlm.nih.gov/blast来使用Blast。

[0325] 本发明的抗体可以是与小鼠抗体1A3或兔嵌合抗体1A3竞争根据本发明的对抗体-药物缀合物的药物部分的识别特性的抗体。

[0326] 关于根据本发明的对抗体-药物缀合物的药物部分的识别特性评估通过如上文所提及的方法获得的抗体。以这种方式,可以选择合适的抗体。作为用于比较抗体的特性的另一指标,可以例举抗体的稳定性。差示扫描量热法(DSC)是一种快速且准确地测量转变中点温度(T_m)的方法,所述转变中点温度(T_m)是蛋白结构的相对稳定性的良好指标。可以通过DSC测量 T_m 值并进行比较它们来比较热稳定性的差异。已知抗体的储存稳定性在一定程度上显示与抗体的热稳定性的相关性(Lori Burton, 等人, *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, p.265-273)。可以基于热稳定性作为指标来选择合适的抗体。可以例举用于选择抗体的另一种指标,在适当的宿主细胞中的高产率和在水溶液中的低粘结性。由于最高产生的抗体并不总是具有高热稳定性,因此有必要基于上面提及的指标通过综合判断来选择最合适的抗体。

[0327] 通过使用适当的接头连接抗体的重链和轻链的全长序列来获得单链免疫球蛋白的方法是已知的(Lee, H-S, 等人, *Molecular Immunology* (1999) 36, p.61-71, Shirrmann, T. 等人, *mAbs* (2010), 2, (1) p.1-4)。如果将这种单链免疫球蛋白二聚化,则可以获得与基本上为四聚体的抗体的那些相似的结构和活性。本发明的抗体可以是具有单个重链可变区而没有轻链序列的抗体。这种抗体(被称为单结构域抗体(sdAb)或纳米抗体)实际上在骆驼或美洲驼中发现,并且被报道具有抗原结合能力(Muyldemans S. 等人, *Protein Eng.* (1994) 7 (9), 1129-35, Hamers-Casterman C. 等人, *Nature* (1993) 363 (6428) 446-8)。上述抗体可以被解释为本发明的抗体的抗原结合片段。

[0328] 如果通过一次分离抗体基因且然后将其引入适当的宿主中来产生抗体,则可以使用宿主和表达载体的适当组合。作为抗体基因的实例,可以例举具有编码说明书中所述的抗体的重链序列的基因和编码轻链序列的基因的組合的抗体基因。如果转化宿主细胞,则可以将具有重链序列的基因和具有轻链序列的基因插入相同的表达载体或不同的表达载体中。如果使用真核细胞作为宿主,则可以使用动物细胞、植物细胞和真核微生物。动物细胞的实例包括(1)哺乳动物细胞,例如,猴细胞,诸如COS细胞(Gluzman, Y. *Cell* (1981) 23, p.175-182, ATCC CRL-1650),小鼠成纤维细胞NIH3T3(ATCC No. CRL-1658)和中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞,ATCC CCL-61)二氢叶酸还原酶缺陷株(Urlaub, G.和Chasin, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1980) 77, p.4126-4220)。如果使用原核细胞,例

如,可以列举大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。通过转化将期望的抗体基因引入这些细胞并在体外培养转化体来获得抗体。在以下的培养方法中,产率根据抗体的序列而不同。可以基于作为指标的产率从具有等效结合活性的抗体选择作为药物容易生产的抗体。

[0329] 本发明的抗体的同种型不受限制,例如,可以例举IgG (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA (IgA1、IgA2)、IgD或IgE。可以例举优选地,IgG或IgM,进一步优选地,IgG1或IgG2。

[0330] 本发明的抗体可以是具有抗体的抗原结合位点的抗体的抗原结合片段或其修饰片段。抗体的片段可以通过如下获得:用蛋白酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体或通过基因工程改造方法修饰抗体基因,并在适当的培养细胞中表达修饰的基因。在这些抗体片段中,具有全长抗体分子的全部或部分功能的片段可以被称为抗体的抗原结合片段。

[0331] 抗体片段的实例包括Fab、F(ab')₂、Fv、通过经由适当的接头连接重链和轻链的Fv而获得的单链Fv (scFv)、一种或多种双抗体、线性抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。此外,在抗体片段中包括Fab' (其为通过在还原条件下处理F(ab')₂而获得的抗体的可变区的单价片段)。

[0332] 本发明的抗体可以是对至少两种类型的抗原具有特异性的多特异性抗体。通常,这种分子结合两种类型的抗原(即,双特异性抗体)。本发明的多特异性抗体包括对两种类型或更多种类型的抗原(例如,3种类型)具有特异性的抗体。

[0333] 本发明的多特异性抗体可以是全长抗体或该抗体的片段(例如,F(ab')₂双特异性抗体)。所述双特异性抗体可以通过如下产生:连接两种类型的抗体的重链和轻链(HL对)或将产生不同单克隆抗体的杂交瘤细胞融合以产生产生双特异性抗体的融合细胞(Millstein等人, Nature (1983) 305, p.537-539)。

[0334] 本发明的抗体可以是单链抗体(也称为scFv)。通过将重链可变区和轻链可变区经由多肽接头连接来获得单链抗体(Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113 (由Rosenberg和Moore编辑, Springer Verlag, New York, p.269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, p.1126-1136)。或者,通过经由多肽接头连接两个scFv产生的BiscFv片段可以用作双特异性抗体。

[0335] 用于产生单链抗体的方法是本领域中已知的(参见,例如,美国专利号4,946,778,美国专利号5,260,203,美国专利号5,091,513,美国专利号5,455,030)。在scFv中,重链可变区和轻链可变区经由将不形成缀合物的接头、优选多肽接头连接(Huston, J. S. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85, p.5879-5883)。scFv中的重链可变区和轻链可变区可以衍生自相同的抗体或不同的抗体。作为连接可变区的多肽接头,例如,使用由12至19个残基组成的单链肽。

[0336] 编码scFv的DNA可以如下获得。在编码抗体的重链或重链可变区的DNA和编码轻链或轻链可变区的DNA中,选择编码氨基酸序列的全部或期望部分的DNA。使用选择为模板的DNA和定义其两个末端的引物对,实施PCR扩增。另外,使用编码多肽接头部分的DNA与限定两个末端以分别连接至重链和轻链的引物对的组合,实施扩增。

[0337] 一旦产生编码scFv的DNA,就可以根据常规方法获得包含DNA的表达载体和用所述表达载体转化的宿主。而且,使用宿主,可以根据常规方法获得scFv。这些抗体片段可以以与上述相同的方式(即获得基因并通过使用宿主表达该基因)产生。

[0338] 本发明的抗体可以被多聚化并且对抗原的亲和力增强。待多聚化的抗体可以是识

别相同抗原的多个表位的单一类型或多种抗体。作为使抗体多聚化的方法,可以例举IgG CH3结构域和两个scFv的结合,与链霉抗生物素蛋白的结合以及螺旋-转角-螺旋基序的引入等。

[0339] 本发明的抗体可以是多克隆抗体,其是氨基酸序列不同的多种类型的抗体的集合。作为多克隆抗体,例如,可以例举CDR不同的多种类型的抗体的集合。作为多克隆抗体,培养产生不同抗体的细胞的集合,并且可以使用从培养物纯化的抗体(参见W02004/061104)。

[0340] 为了修饰抗体,可以使用与各种分子、诸如聚乙二醇(PEG)结合的抗体。

[0341] 本发明的抗体可以是其中抗体与另一种药物缀合的缀合物(免疫缀合物)。这种抗体的实例包括与放射性物质和具有药理学作用的化合物结合的抗体(Nature Biotechnology (2005) 23, p.1137-1146)。

[0342] 4. 本发明的蛋白的用途

[0343] 本发明的蛋白可以用于检测方法、诸如ELISA(酶联免疫吸附测定)方法、ECL(电化学发光)方法、RIA(放射免疫测定)方法、ELISPOT(酶联免疫斑点)方法、斑点印迹方法、octalony方法、CIE(对流免疫电泳)方法、CLIA(化学发光免疫测定)和FCM(流式细胞术);和免疫组织化学(IHC)方法中,且优选用于ELISA方法、ECL方法和IHC方法中。

[0344] ELISA和ECL方法可以用作用于定量用本发明的抗体-药物缀合物施用的哺乳动物(本发明中的“哺乳动物”的实例包括但不限于人、小鼠、大鼠、猴和兔)中的抗体-药物缀合物的血浆中的浓度的方法。

[0345] 更具体地,包括以下步骤:(1)使血浆中含有的抗体-药物缀合物与具有在其上固定的抗体-药物缀合物的抗原的板接触,以形成复合物,(2)使用标志物标记的本发明的蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物,且然后,(3)检测所述标志物。

[0346] 此外,可以包括以下步骤:(1)使血浆中含有的抗体-药物缀合物与具有在其上固定的本发明的蛋白的板接触,以形成复合物,(2)使能够识别所述抗体-药物缀合物的抗体部分并用标志物标记的第二蛋白与所述复合物接触,以形成另外的复合物,且然后,(3)检测所述标志物。

[0347] ELISA和ECL方法也可以用作用于定量用本发明的抗体-药物缀合物施用的哺乳动物中的从所述药物-缀合物释放的药物(例如,化合物(1)、化合物(2)、化合物(4)和化合物(5))的血浆中的浓度的方法。

[0348] 更具体地,包括以下步骤:(1)在用标志物标记的竞争性药物存在的情况下,使血浆中含有的从抗体-药物缀合物释放的药物与具有在其上固定的本发明的蛋白的板接触以形成复合物和(2)检测所述标志物。

[0349] IHC方法可以用作用于测定用本发明的抗体-药物缀合物施用的例如哺乳动物中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀合物释放的药物的组织分布的方法。

[0350] 更具体地,包括以下步骤:(1)使组织中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀合物释放的药物与本发明的蛋白接触以形成复合物,(2)使能够识别本发明的蛋白并用标志物标记的第二种蛋白与所述复合物接触以形成另外的复合物,且然后,(3)检测所述标志物。

[0351] 而且,可以包括以下步骤:(1)使组织中的抗体-药物缀合物和/或从抗体-药物缀

合物释放的药物与用标志物标记的本发明的蛋白接触以形成复合物,且然后,(2)检测所述标志物。

[0352] 在本发明中,“标志物”是指生成可检测信号的物质或作用于另一种物质以生成可检测信号的物质。所述标志物的实例包括荧光物质、酶、酶片段、酶底物、酶抑制剂、辅酶、催化剂、染料、发光材料、敏化剂和放射性物质。

[0353] 在本发明中,短语“用标志物标记”意指标记直接连接或用插入它们之间的部分结构(例如,接头)连接。标记中包括使用生物素和抗生物素蛋白(或链霉抗生物素蛋白)之间相互作用的连接。

[0354] 为了用标志物标记本发明的蛋白,例如,使具有标志物作为组分的试剂(具有活性酯基)与本发明的蛋白的赖氨酸残基反应以形成酰胺键;然而,标记方法不限于此。

[0355] 如果所述标志物是荧光物质,则可以通过感测标志物的荧光来检测标志物。

[0356] 荧光物质的实例包括DyLight (注册商标) 350,DyLight (注册商标) 405,DyLight (注册商标) 488,DyLight (注册商标) 550,DyLight (注册商标) 594,DyLight (注册商标) 633,DyLight (注册商标) 650,DyLight (注册商标) 680,DyLight (注册商标) 747,DyLight (注册商标) 755,DyLight (注册商标) 800,Alexa Fluor (注册商标) 350,Alexa Fluor (注册商标) 405,Alexa Fluor (注册商标) 488,Alexa Fluor (注册商标) 532,Alexa Fluor (注册商标) 546,Alexa Fluor (注册商标) 555,Alexa Fluor (注册商标) 568,Alexa Fluor (注册商标) 594,Alexa Fluor (注册商标) 647,Alexa Fluor (注册商标) 680,Alexa Fluor (注册商标) 750,BODIPY (注册商标) FL,香豆素,Cy (注册商标) 3,Cy (注册商标) 5,Cy (注册商标),Fluorescein (FITC) Oregon Green (注册商标),Pacific Blue,Pacific Green,Pacific Orange,四甲基罗丹明(TRITC)和Texas Red (注册商标)。

[0357] 此外,可以使用纳米晶体、诸如Qdot (注册商标) 525,Qdot (注册商标) 565,Qdot (注册商标) 605,Qdot (注册商标) 655,Qdot (注册商标) 705和Qdot (注册商标) 800和荧光蛋白、诸如别藻蓝蛋白(APC),R-藻红蛋白(R-PE),青色荧光蛋白(CFP),绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(RFP)作为荧光物质。

[0358] 如果所述标志物是酶,则通过感测由酶和底物之间的反应产生的光或颜色来检测标志物。

[0359] 作为酶,例如,可以例举过氧化物酶(例如,辣根过氧化物酶;HRP等)。在这种情况下,作为酶的底物,例如,可以例举TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺),DAB (3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐),OPD(邻苯二胺)和ABTS (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)。

[0360] 作为另一种酶,可以例举碱性磷酸酶。在这种情况下,作为酶的底物,例如,可以例举BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯)和PNPP (p-硝基苯基磷酸酯)。

[0361] 作为另一种酶,可以例举荧光素酶。在这种情况下,作为酶的底物,例如,可以例举荧光素和腔肠素(Coelenterazine)。

[0362] 作为另一种酶,可以例举 β -半乳糖苷酶。在这种情况下,作为酶的底物,例如,可以例举邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)。

[0363] 如果所述标志物是发光材料,则通过基于电化学反应感测来自所述标志物的发光来检测所述标志物。

[0364] 作为发光材料,例如,可以例举钆络合物,优选钆-吡啶络合物,且更优选钆(II)三(联吡啶)络合物。

[0365] 所述电化学反应可以在例如三丙胺(TPA)存在的情况下实施。更具体地,TPA阳离子自由基和三价钆络合物通过电极反应产生。TPA阳离子自由基立即损失氢离子为具有强还原作用的TPA自由基,其与三价钆络合物反应以发光。

[0366] 如果所述标志物是放射性物质,则通过感测从所述标志物发出的辐射来检测所述标志物。

[0367] 所述放射性物质的实例包括氚(^3H)、碳-14 (^{14}C)、氮-15 (^{15}N)、硫-35 (^{35}S)、钇-90 (^{90}Y)、锝-99 (^{99}Tc)、铟-111 (^{111}In)、碘-125 (^{125}I)和碘-131 (^{131}I)。

[0368] 本发明的蛋白可以用作通过添加pH缓冲剂、渗透压调节剂、盐、稳定剂、防腐剂、显影剂、敏化剂和抗凝剂等而形成的组合物(在下文中被称为“本发明的组合物”)的组分。

[0369] 本发明的蛋白(或本发明的组合物)可以用作包含组合的用于测定的材料和试剂的试剂盒(在下文中被称为“本发明的试剂盒”)的组分。所述试剂可以以液体或冻干状态在相同容器或不同容器中提供,这取决于稳定性的程度。可以选择在本发明的试剂盒中提供的试剂的量和比率,使得可以为特定用途提供最佳的结果。除了本发明的蛋白(或本发明的组合物)以外,本发明的试剂盒还可以含有例如用于附接标志物的试剂,酶的底物,封闭剂,聚合物试剂,抗原活化溶液,校准物,稀释缓冲液,洗涤缓冲液,固定缓冲液,固定的抗体,检测抗体和微量滴定孔等。此外,可以含有用于使用本发明的试剂盒的说明书。使用该试剂盒,可以证实所述抗体-药物缀合物和/或从所述抗体-药物缀合物释放的药物的组织分布,并且可以定量血浆-浓度等。

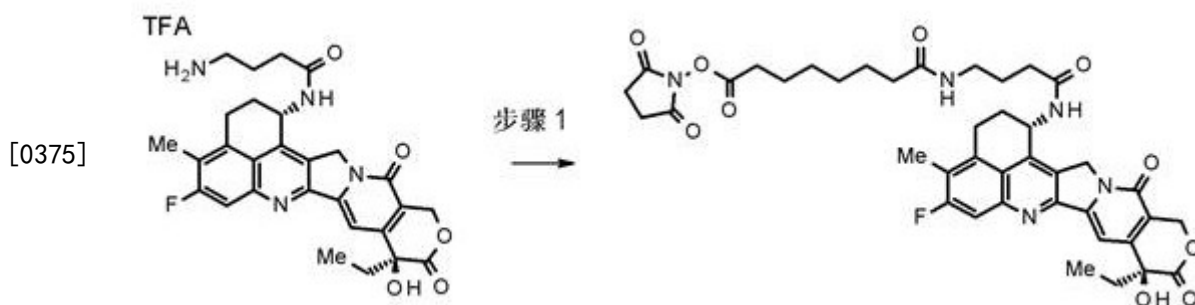
[0370] [实施例]

[0371] 将通过以下所示的实施例的方式具体描述本发明。然而,本发明不限于这些。这些实施例不应被解释为以任何方式限制本发明。注意,除非另有指明,否则以下实施例中关于基因操作的各个操作根据“Molecular Cloning”(由Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T.撰写,由Cold Spring Harbor Laboratory Press在1989年出版)中描述的方法或根据市售试剂和试剂盒(如果采用它们的话)所附的说明书进行实施。在说明书中,未指定的试剂、溶剂和起始原料可以容易地从商业来源获得。

[0372] [实施例1] 化合物的合成

[0373] i) 8-[(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)氧基]-N-(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-4-氧代丁基)-8-氧代辛烷酰胺(化合物(6))的合成

[0374] [式26]



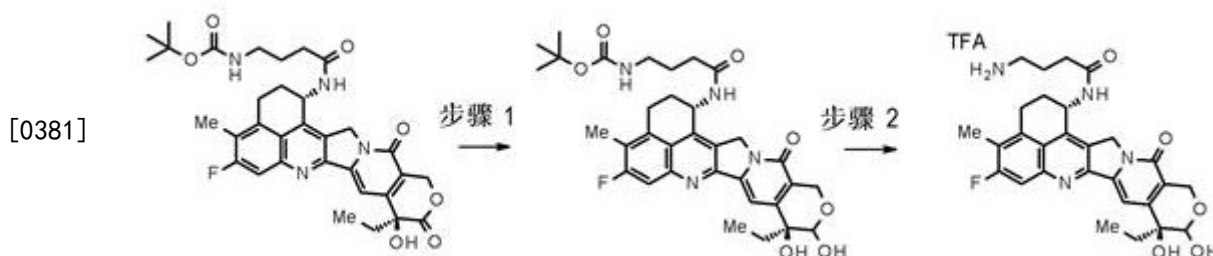
[0376] 向4-氨基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]丁酰胺(0.032 g, 0.050 mmol) (国际公开号W0 2014/057687中描述的实施例1的步骤2中获得的化合物)的N,N-二甲基甲酰胺(0.5 mL)溶液中添加三乙胺(7 μ L, 0.050 mmol)和辛二酸二(N-琥珀酰亚胺基)酯(20.4 mg, 0.055 mmol)。将反应溶液在室温下搅拌20分钟。在减压下蒸发溶剂。获得的残余物通过硅胶柱色谱法[氯仿:氯仿:甲醇= 9 : 1 (v/v)]纯化,以获得作为浅黄色固体的标题化合物(16.0 mg, 41%)。

[0377] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87 (3H, t, J = 7.6 Hz), 1.18-1.37 (4H, m), 1.40-1.50 (2H, m), 1.54-1.64 (2H, m), 1.65-1.74 (2H, m), 1.78-1.93 (2H, m), 2.02 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.09-2.20 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.60-2.68 (2H, m), 2.80 (4H, s), 3.00-3.08 (2H, m), 3.13-3.21 (2H, m), 5.19 (2H, dd, J = 32.0, 18.0 Hz), 5.37-5.47 (2H, m), 5.53-5.60 (1H, m), 6.52 (1H, s), 7.30 (1H, s), 7.74-7.82 (2H, m), 8.44 (1H, d, J = 8.5 Hz)。

[0378] MS (APCI) m/z : 774 (M+H) $^+$

[0379] ii) 4-氨基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9,10-二羟基-4-甲基-13-氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]丁酰胺三氟乙酸盐(化合物(7))的合成

[0380] [式27]



[0382] 步骤1:

[0383] 首先,将(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-4-氧代丁基)氨基甲酸叔丁酯(0.092 g, 0.148 mmol) (国际公开号W0 2014/057687中描述的实施例1的步骤1中获得的化合物)溶解于甲醇(1.6 mL)中并在冰上冷却。向其中添加硼氢化钠(0.028 g, 0.740 mmol),并将反应溶液在冰冷却下搅拌20分钟。将所述溶液用甲醇(10 mL)和氯仿(50 mL)稀释,并向其中添加10%柠檬酸水溶液,且然后用氯仿萃取。将获得的有机层用10%柠檬酸水溶液洗涤,随后用饱和盐水溶液洗涤,经硫酸钠干燥并过滤。在减压下蒸发溶剂。获得的残余物通过硅胶柱色谱法[氯仿:甲醇= 100 : 0 - 95 : 5 (v/v)]纯化,以获得作为浅黄色固体的(4-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-13-氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-4-氧代丁基)氨基甲酸叔丁酯(0.078 g, 85%)。

[0384] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.89 (3H, t, J = 7.4 Hz), 1.31 (9H, s), 1.62-1.73 (4H, m), 2.08-2.18 (4H, m), 2.39 (3H, s), 2.91 (2H, q, J = 6.5 Hz), 3.12-3.20 (2H, m), 4.49 (1H, d, J = 17.2 Hz), 4.61 (1H, d, J = 17.2 Hz), 4.97

(1H, s), 4.99 (1H, d, J = 4.7 Hz), 5.10 (2H, d, J = 18.8 Hz), 5.21 (2H, d, J = 18.8 Hz), 5.54-5.58 (1H, m), 6.74-6.82 (2H, m), 7.33 (1H, s), 7.78 (1H, d, J = 11.0 Hz), 8.40 (1H, d, J = 8.6 Hz)。

[0385] 步骤2:

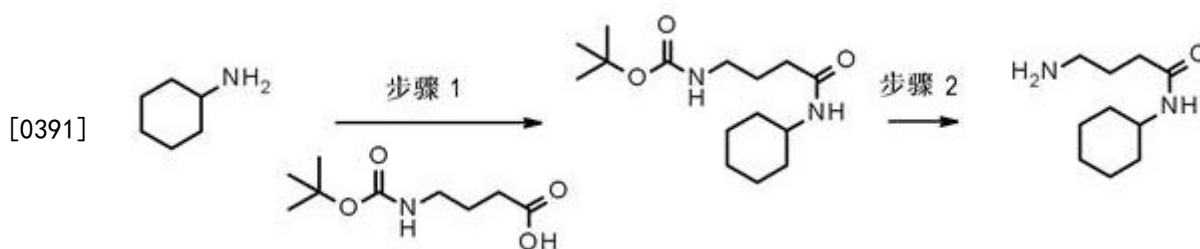
[0386] 将以上步骤1中获得的化合物 (0.078 g, 0.125 mmol) 添加至二氯甲烷 (2 mL) 中。将反应溶液在冰上冷却, 并添加三氟乙酸盐 (2 mL)。将反应溶液搅拌 40 分钟。在减压下蒸发溶剂。获得的残余物通过硅胶柱色谱法 [氯仿-具有氯仿: 甲醇: 水 = 7 : 3 : 1 (v/v/v) 的分配比的有机层] 纯化。将获得的固体溶解于甲醇中, 并添加乙醚。将所得沉淀物过滤并在真空下干燥以获得黄色-固体的标题化合物 (0.045 g, 56%)。

[0387] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0.89 (3H, t, J = 7.4 Hz), 1.71 (2H, q, J = 7.4 Hz), 1.80-1.88 (2H, m), 2.09-2.19 (2H, m), 2.27 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.40 (3H, s), 2.84 (2H, t, J = 7.6 Hz), 3.13-3.20 (2H, m), 4.50 (1H, d, J = 17.2 Hz), 4.62 (1H, d, J = 17.2 Hz), 4.97-5.02 (2H, m), 5.09 (1H, d, J = 18.8 Hz), 5.21 (1H, d, J = 18.8 Hz), 5.55-5.59 (1H, m), 6.79 (1H, d, J = 4.7 Hz), 7.34 (1H, s), 7.64-7.75 (3H, m), 7.79 (1H, d, J = 11.3 Hz), 8.53 (1H, d, J = 8.6 Hz)。

[0388] MS (APCI) m/z: 523 (M+H) $^+$

[0389] iii) 4-氨基-N-环己基-丁酰胺盐酸盐 (化合物 (8)) 的合成

[0390] [式28]



[0392] 步骤1:

[0393] 首先, 将 4-(叔丁氧基羰基氨基) 丁酸 (0.492 g, 2.42 mmol) 溶解于二氯甲烷 (15 mL) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (2 mL) 中, 且然后添加 N-羧基琥珀酰亚胺 (0.279 g, 2.42 mmol) 和 EDCI (1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐) (0.464 g, 2.42 mmol)。将反应溶液在室温下搅拌 30 分钟。将反应溶液逐滴添加至环己胺 (0.200 g, 2.02 mmol) 的二氯甲烷溶液 (2 mL) 中, 并在室温下搅拌 20 分钟。将反应溶液用二氯甲烷稀释, 并添加 10% 柠檬酸水溶液, 且然后用二氯甲烷萃取。将获得的有机层用饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 经硫酸钠干燥并过滤。在减压下蒸发溶剂。获得的残余物通过硅胶柱色谱法 [己烷: 乙酸乙酯 = 50 : 50 - 25 : 75 (v/v)] 纯化, 以获得作为无色油状物的 N-[4-(环己基氨基)-4-氧代-丁基] 氨基甲酸叔丁酯 (0.308 g, 54%)。

[0394] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.08-1.23 (4H, m), 1.29-1.42 (2H, m), 1.44 (9H, s), 1.66-1.75 (2H, m), 1.77-1.83 (2H, m), 1.86-1.95 (2H, m), 2.17 (2H, t, J = 7.0 Hz), 3.11-3.21 (2H, m), 3.69-3.82 (1H, m), 4.75 (1H, brs), 5.89 (1H, brs)。

[0395] 步骤2:

[0396] 将以上步骤1中获得的化合物(0.200 g, 0.703 mmol)溶解于乙酸乙酯(50 mL)和二氧杂环己烷(10 mL)中。添加4N二氧杂环盐酸盐(10 mL),并将混合物搅拌2小时。过滤生成的沉淀,在真空下干燥,以获得作为无色固体的标题化合物(0.098 g, 63%)。

[0397] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 1.06-1.30 (5H, m), 1.50-1.58 (1H, m), 1.62-1.82 (6H, m), 2.16 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 2.69-2.79 (2H, m), 3.45-3.58 (1H, m), 4.73 (1H, brs), 7.89 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 7.96-8.10 (2H, m)。

[0398] MS (APCI) m/z : 185 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

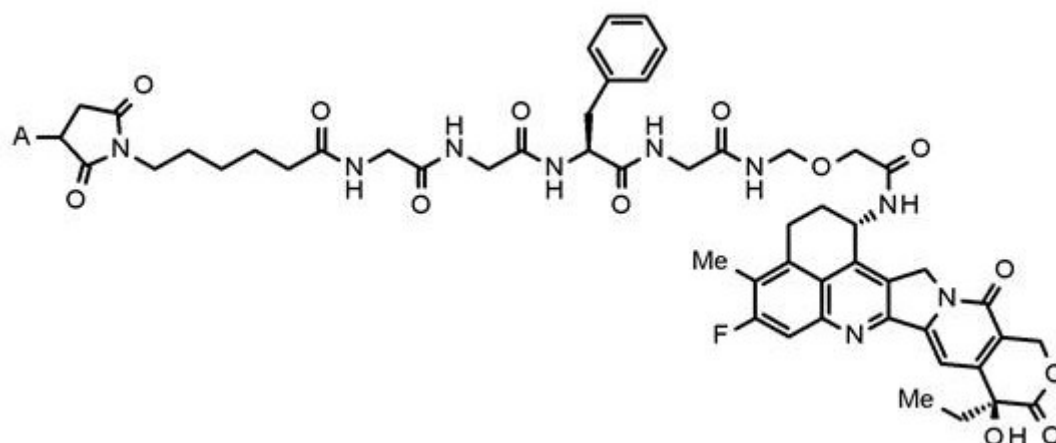
[0399] [实施例2]抗体-药物缀合物的产生

[0400] i) 抗B7-H3抗体-药物缀合物的产生(1)

[0401] 根据国际公开号W0 2014/057687中所述的产生方法并使用抗B7-H3抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:27的氨基酸残基20至471组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:28的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列组成),产生抗B7-H3抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗B7-H3抗体缀合(在本发明中被称为“B7-H3-ADC (I)”):

[0402] [式29]

[0403]



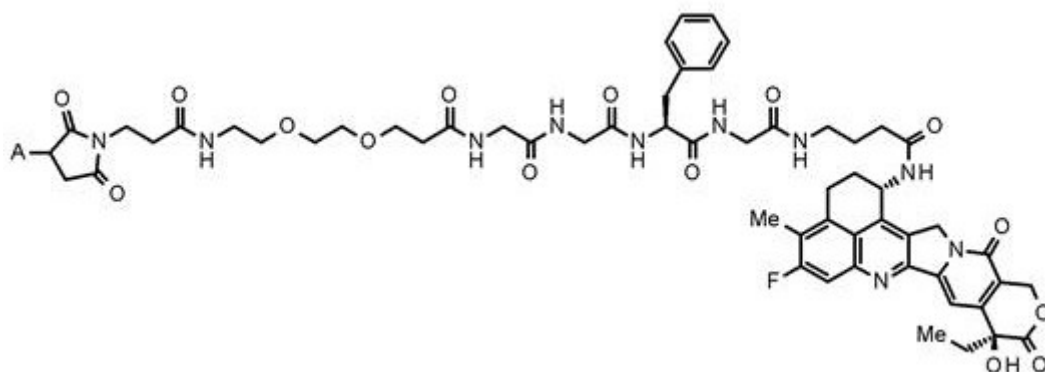
[0404] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0405] ii) 抗B7-H3抗体-药物缀合物的产生(2)

[0406] 根据国际公开号W0 2014/057687中所述的产生方法并使用抗B7-H3抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:27的氨基酸残基20至471组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:28的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列组成),产生抗B7-H3抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗B7-H3抗体缀合(在本发明中被称为“B7-H3-ADC (II)”):

[0407] [式30]

[0408]



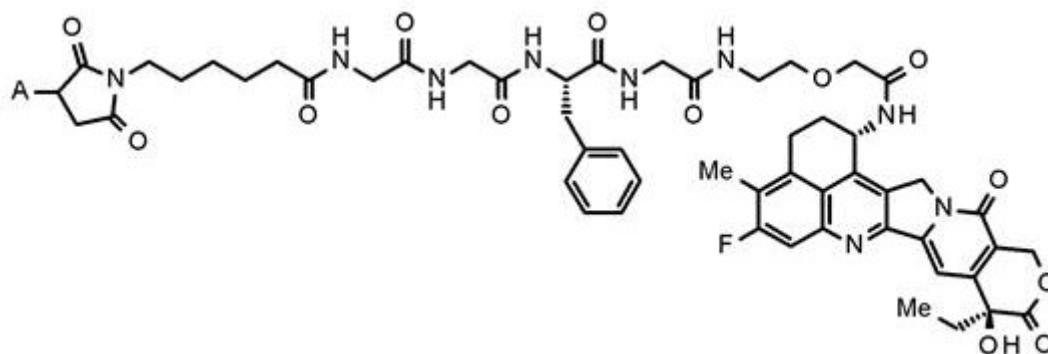
[0409] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0410] iii) 抗B7-H3抗体-药物缀合物的产生 (3)

[0411] 根据国际公开号W0 2014/057687中所述的产生方法并使用抗B7-H3抗体 (包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:27的氨基酸残基20至471组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:28的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列组成),产生抗B7-H3抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗B7-H3抗体缀合 (在本发明中被称为“B7-H3-ADC (III)”):

[0412] [式31]

[0413]



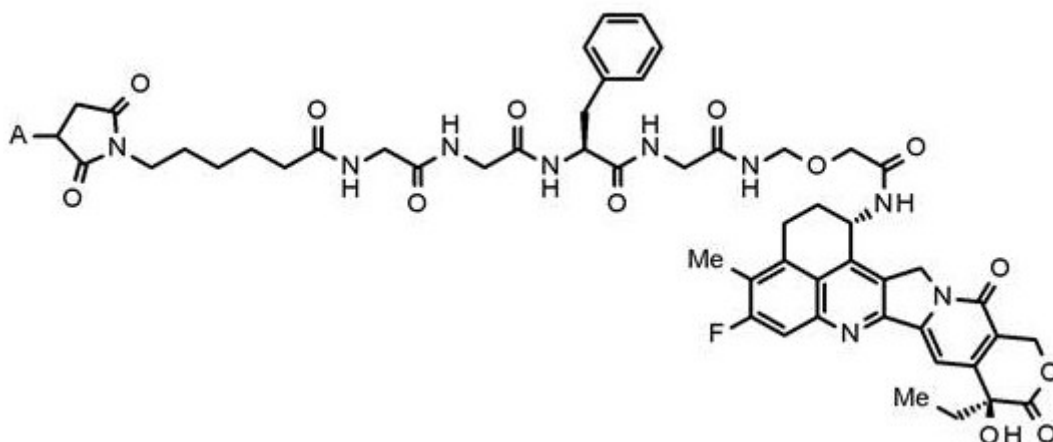
[0414] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0415] iv) 抗HER2抗体-药物缀合物的产生 (1)

[0416] 根据国际公开号W0 2015/115091中所述的产生方法并使用抗HER2抗体 (包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:21的氨基酸残基1至449组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:22的氨基酸残基1至214组成的氨基酸序列组成),产生抗HER2抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合 (在本发明中被称为“HER2-ADC (I)”):

[0417] [式32]

[0418]



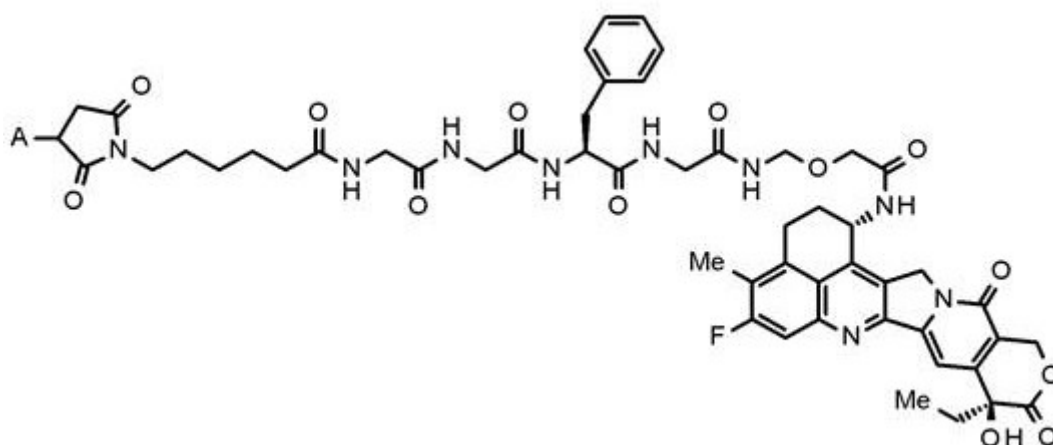
[0419] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0420] v) 抗HER3抗体-药物缀合物的产生(1)

[0421] 根据国际公开号W0 2015/155998中所述的产生方法并使用抗HER3抗体(包含由SEQ ID NO:23代表的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:24代表的氨基酸序列组成的轻链的抗体),产生抗HER3抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗HER3抗体缀合(在本发明中被称为“HER3-ADC (I)”):

[0422] [式33]

[0423]



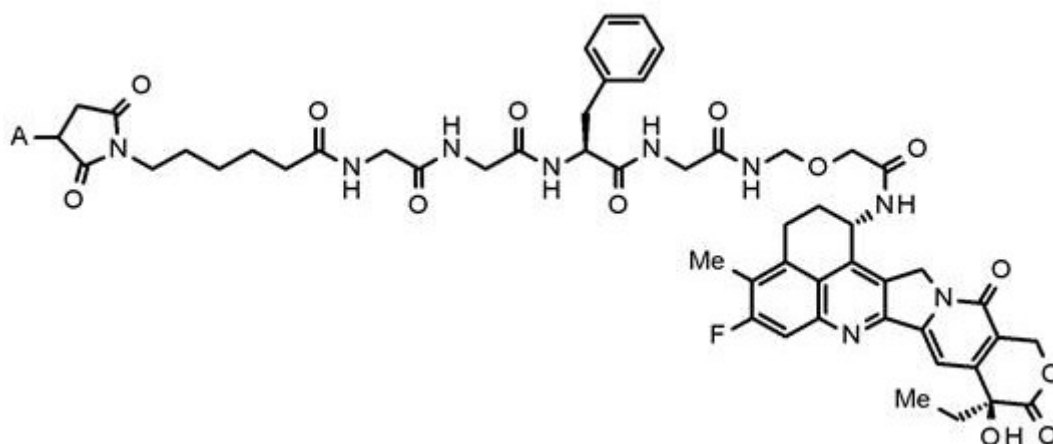
[0424] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0425] vi) 抗TROP2抗体-药物缀合物的产生(1)

[0426] 根据国际公开号W0 2015/098099中所述的产生方法并使用抗TROP2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:25的氨基酸残基20至470组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:26的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成),产生抗HER3抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗TROP2抗体缀合(在本发明中被称为“TROP2-ADC (I)”):

[0427] [式34]

[0428]



[0429] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0430] [实施例3] 单克隆抗体的产生

[0431] i) 抗原蛋白的制备

[0432] 作为抗原蛋白,使用通过将充当载体蛋白的牛甲状腺球蛋白添加至化合物(6)而制备的抗原蛋白(在下文中被称为“抗原蛋白(1)”)和通过将BSA添加至化合物(6)而制备的抗原蛋白(在下文中被称为“抗原蛋白(2)”)。

[0433] ii) 免疫

[0434] 在免疫中,使用BALB/cAnNCr1Cr1j (BALB/c) 小鼠(4个个体)和B6D2F1/Cr1j (BDF1) 雌性小鼠(4个个体)(Charles River Laboratories Japan Inc.)。在初级免疫时,皮下和皮内施用抗原蛋白(1)和弗氏完全佐剂(由Wako Pure Chemical Industries Ltd. 制造)的混合物。第二次免疫以后,皮下和皮内施用抗原蛋白(1)和弗氏不完全佐剂(由Wako Pure Chemical Industries Ltd. 制造)的混合物。以7天的间隔实施施用,总共4次。

[0435] iii) 评估抗血清的抗体滴度

[0436] 在免疫之前和通过四次施用免疫后,将BALB/c小鼠(4个个体)和BDF1小鼠(4个个体)的血清各自稀释最多达200至204800倍。使用抗原蛋白(2)和B7-H3-ADC(II)作为阳性对照以及BSA作为阴性对照检查稀释液的抗体滴度。将抗原蛋白(2)、B7-H3-ADC(II)和BSA固定至ELISA免疫板。使免疫之前和通过四次施用免疫之后的稀释小鼠血清在37℃下与免疫板反应30分钟。洗涤后,使辣根过氧化物酶缀合的抗小鼠IgG(抗小鼠IgG-HRP)在37℃下反应30分钟。洗涤后,添加邻苯二胺二盐酸盐(OPD)溶液。显色终止后,测量490 nm处的吸光度。证实针对阳性对照的抗体滴度在所有个体中都增加。

[0437] iv) 抑制ELISA

[0438] 通过四次施用免疫后,向BALB/c小鼠(4个个体)和BDF1小鼠(4个个体)的血清中添加化合物(6)、化合物(7)和化合物(1)作为阳性对照以及化合物(8)作为阴性对照并计算抗原蛋白(2)的未吸收率。将稀释至50000倍的小鼠血清以及经制备以具有12.5、25、50和100 μg/mL的浓度的化合物(6)、化合物(8)、化合物(7)和化合物(1)混合,并使其在4℃下反应过夜,且然后添加至具有在其上固定的抗原蛋白(2)的ELISA免疫板中,并使其在37℃下反应30分钟。洗涤后,使抗小鼠IgG-HRP在37℃下反应30分钟。洗涤后,添加OPD溶液。显色终止后,测量490 nm处的吸光度。根据以下表达式计算未吸收率:

[0439] 未吸收率(%) = (a/b) × 100

[0440] a:添加浓度为12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的阳性对照或阴性对照的吸光度

[0441] b:不含阳性对照的样品或不含阴性对照的样品的吸光度

[0442] 在小鼠血清中的任一种中,发现作为阳性对照的化合物(6)和化合物(1)以及一些个体中的化合物(7)具有高抑制作用。然而,在所述血浆中均未发现对作为阴性对照的化合物(8)的高抑制作用。从具有表现出对化合物(7)的高抑制作用且对化合物(8)的无高抑制作用的血清的BALB/c小鼠和BDF1小鼠各自中,选择个体。淋巴结和脾脏取自每个个体,并用于产生杂交瘤。

[0443] v) 杂交瘤的产生

[0444] 通过PEG方法将取自iv)中选择的个体的淋巴结细胞和脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合。使用出现的杂交瘤细胞的培养上清液,筛选产生抗体的杂交瘤细胞。

[0445] vi) 评估与抗原蛋白的特异性结合(2)

[0446] 将抗原蛋白(2)固定至ELISA免疫板,并将培养的产生抗体的杂交瘤细胞的上清液稀释两倍,并在37°C下反应120分钟。洗涤后,使抗小鼠IgG-HRP在37°C下反应30分钟。洗涤后,添加OPD溶液。显色终止后,测量490 nm处的吸光度。选择产生显示0.2或以上的OD值的培养上清液的11种杂交瘤株系作为阳性。

[0447] vii) 交叉检查

[0448] 使用化合物(6)、化合物(1)、B7-H3-ADC (II)、B7-H3-ADC (I)和B7-H3-ADC (III)作为阳性对照以及化合物(8)和化合物(7)作为用于证实反应是否进行的化合物,将vi)中选择为阳性的11种株系进行抑制ELISA。将选择为阳性并在vi)中获得的11种株系的培养上清液稀释两倍。向每种培养上清液中添加如上所提及的阳性对照和用于证实反应是否进行的化合物,以便获得25 $\mu\text{g/mL}$ 的最终浓度。在4°C下实施反应过夜后,将反应溶液添加至具有在其上固定的抗原蛋白(2)的ELISA免疫板中,并使其在37°C下反应30分钟。洗涤后,使抗小鼠IgG-HRP在37°C下反应30分钟。洗涤后,添加OPD溶液。显色终止后,测量490 nm处的吸光度。选择表现出对抗原蛋白(2)的高反应性并被证实阳性对照具有抑制作用的八种株系并进行初级克隆。

[0449] viii) 初级克隆、初级筛选

[0450] 通过有限稀释克隆在vii)中选择的八种株系。接种杂交瘤以满足60个细胞/96孔板的比率,并添加小鼠胸腺细胞以满足 5×10^6 个细胞/孔的比率。使用含有TIL (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.)的10% FBS实施培养。抑制ELISA以与vii)中相同的方式实施。选择八种株系 $\times$ 6个亚克隆,其被证实具有特异性。

[0451] ix) 初级交叉检查

[0452] 检查在viii)中选择的8种株系 $\times$ 6个亚克隆对B7-H3-ADC (II)和B7-H3-ADC (I)的反应性。将B7-H3 C1结构域LotB7_0mJ1用固定缓冲液稀释至1 $\mu\text{g/mL}$,以100 μL /板的比率添加至Maxi-Sorp板中,并使其在4°C下固定过夜。第二天,从板移取培养基,并以180 μL /板的比率添加含有5% BSA的PBS。使板在室温下静置3小时。用含有0.05% Tween20的PBS洗涤两次后,以100 μL 的比率添加经制备以具有0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度的B7-H3-ADC (II)和B7-H3-ADC (I)并使其在室温下静置约一小时。用含有0.05% Tween20的PBS洗涤两次后,每板添加50 μL 从900 $\mu\text{g/mL}$ 以3的共同比率连续稀释7次的杂交瘤上清液。使板在室温下静置一小时。用含有0.05% Tween20的PBS洗涤两次后,每板添加100 μL 稀释5000倍的过氧化酶

AffiniPure山羊抗小鼠IgG, Fc γ 片段特异性 (Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC.)。使板在室温下静置一小时。用含有0.05% Tween20的PBS洗涤3次后,每板添加100 μ L HRP底物(OPD片剂)并实施显色反应。通过每板添加100 μ L 1M HCl终止显色反应后,通过ARVO (PerkinElmer)测量450 nm处的吸光度。在所有8种株系 $\times$ 6个亚克隆中,证实对B7-H3-ADC (II)和B7-H3-ADC (I)的反应性。其中,高度反应性的4种株系 $\times$ 6个亚克隆通过初级校准曲线进行证实。

[0453] x) 通过初级校准曲线进行证实

[0454] 通过ELISA检查在ix)中选择的4种株系 $\times$ 6个亚克隆对B7-H3-ADC (I) (DAR7)和B7-H3-ADC (I) (DAR5)的反应性。将AffiniPure山羊抗小鼠IgG, Fc γ 片段特异性 (Jackson Immuno Research Inc.)用包被缓冲液稀释至1 μ g/mL,并以100 μ L/板的比率添加至Maxi-Sorp板,且然后,使其在4 $^{\circ}$ C下固定过夜。第二天,从板移取培养基。用PBS洗涤后,以100 μ L/板的比率添加含有10% BSA的PBS。使板在37 $^{\circ}$ C下静置2.5小时。从板移取培养基,将杂交瘤4种株系 $\times$ 6个亚克隆用含有2% BSA和0.2%聚山梨醇酯20(在下文中被称为“PS20”)的PBS稀释至最高达10、25和100 ng/mL。将每种稀释液以100 μ L/板的比率添加至板中。使板在37 $^{\circ}$ C下静置一小时。用含有0.05% PS20的PBS洗涤四次后,将B7-H3-ADC (I) (DAR7)和B7-H3-ADC (I) (DAR5)用含有2% BSA、0.2% Tween20的PBS稀释至1、2.5、10、25、100和250 ng/mL。以100 μ L/板的比率添加每种稀释液。使板在37 $^{\circ}$ C下静置一小时。用含有0.05% PS20的PBS洗涤四次后,以100 μ L/板的比率添加用含有2% BSA、0.2% PS20的PBS稀释至7500倍的山羊抗人 κ -HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc.)。使板在室温下静置一小时。用含有0.05% PS20的PBS洗涤四次后,以100 μ L/孔的比率添加TMB可溶性试剂(ScyTek Laboratories),并实施显色反应。在通过以100 μ L/孔的比率添加TMB终止缓冲液(ScyTek Laboratories)终止显色反应后,通过VersaMax (由Molecular Devices制造)测量450 nm处的吸光度(参考650 nm)。根据以下表达式计算相对误差,并选择具有较小值的克隆

[0455] 相对误差(%) = $\{(\text{测量值DAR7})/(\text{DAR5的测量值}) - 1\} \times 100$

[0456] 其中,对4种株系 $\times$ 2个亚克隆进行次级克隆。

[0457] xi) 次级克隆,筛选

[0458] 对x)中选择的4种株系 $\times$ 2个亚克隆进行次级克隆。每个克隆从阳性孔选择三个孔。以该方式,选择总共24个克隆。以与vi)中相同的方式检查针对抗原蛋白(2)的抗体滴度。此外,使用化合物(6)、化合物(1)、B7-H3-ADC (II), B7-H3-ADC (I)和B7-H3-ADC (III)作为阳性对照以及化合物(8)和化合物(7)作为用于证实反应是否进行的化合物,以与vii)中相同的方式实施抑制ELISA。

[0459] xii) 通过次级校准曲线进行证实

[0460] 在xi)中选择的24个克隆中,消除与化合物(1)相比表现出对化合物(7)的特别高的反应性的6个克隆。剩余18个克隆经证实对HER2-ADC (I) (DAR8)、HER2-ADC (I) (DAR4)和HER2-ADC (I) (DAR2)的反应性以及通过Gyrolab xP工作站(GYROS PROTEIN Technologies)实施的校准曲线的形成。作为捕获试剂,使用生物素-SP-缀合的AffiniPure山羊抗小鼠IgG, Fc γ 特异性 (Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC.),并用含有0.01% PS20的PBS将其浓度控制为172.5 nM。将细胞培养上清液的浓度用Rexxip CCS

(GYROS PROTEIN Technologies) 控制为200 ng/mL。将HER2-ADC (I) (DAR8)、HER2-ADC (I) (DAR4)和HER2-ADC (I) (DAR2)用含有0.01% PS20的PBS从1000 ng/mL以4的共同比率连续稀释6倍。作为检测试剂,使用Alexa Fluor (注册商标) 647标记试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc.)标记山羊抗人 κ (Southern Biotechnology Associates, Inc.),并将其浓度用Rexxip F控制为10 nM。将以上制备的试剂、细胞培养上清液和用于校准曲线的样品添加于96-孔PCR板中,并与Gyrolab Bioaffy 200一起设置在Gyrolab xP工作站中。通过4-步(2xC)-A-D (向导方法)实施测量。使用Gyrolab Evaluator软件,根据4-参数逻辑模型(权重:响应)实施校准曲线的回归。评估的所有18个克隆都与HER2-ADC (I)的DAR无关,并且未发现株系之间的反应性的差异。因此,选择源自同一株系并且具有高IgG浓度的三个克隆(1A3、8B2、11B1),并进行小量生产。

[0461] xiii) 制备用蛋白A纯化的抗体并进行交叉检查

[0462] 将xii)中选择的三个克隆(1A3、8B2、11B1)各自在滚瓶中的无血清培养基(ASF104(N))中培养。收集培养上清液后,实施通过0.45 μ m过滤器的过滤和通过蛋白A柱的纯化。向具有以50 ng/孔/50 μ L的比率固定的抗原蛋白(2)的ELISA免疫板中,添加含有用蛋白A纯化的三个克隆并从5 μ g/mL以2的共同比率连续稀释10倍的溶液(50 μ L),并使其在37°C下反应30分钟。洗涤后,使抗小鼠IgG-HRP在37°C下反应30分钟。洗涤后,添加OPD溶液。显色终止后,测量490 nm处的吸光度。所有用蛋白A纯化的抗体都显示令人满意的对抗原蛋白(2)的反应性。

[0463] xiv) 证实用蛋白A纯化的抗体的校准曲线

[0464] 通过使用Gyrolab xP工作站检查xiii)中用蛋白A纯化的三个克隆(1A3、8B2、11B1)对HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)和B7-H3-ADC (I) (DAR8)和B7-H3-ADC (I) (DAR4)的反应性。

[0465] 作为捕获试剂,使用用蛋白A纯化并用EZ-Link NHS-LC-生物素(Thermo Fisher Scientific Inc.)标记的三个克隆,并将其浓度用含有0.01% PS20的PBS控制为700 nM。将HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)各自用Rexxip HN从1000 ng/mL以4的共同比率连续稀释6倍。作为本文使用的检测试剂,使用通过Alexa Fluor (注册商标) 647标记试剂盒标记的山羊抗人 κ (Southern Biotechnology Associates, Inc.),并将其浓度用Rexxip F控制为10 nM。将制备的试剂和抗体-药物缀合物(用于校准曲线的样品)添加于96-孔PCR板中,并与Gyrolab Bioaffy 200一起设置在Gyrolab xP工作站中。通过200-3W-001-A (向导方法)实施测量。使用4-参数逻辑模型(权重:响应)和Gyrolab Evaluator软件实施校准曲线的回归。克隆1A3的校准曲线显示于图15中,克隆8B2的校准曲线显示于图16中,且克隆11B1的校准曲线显示于图17中。所有克隆都显示对HER2-ADC (I)的反应性,而与DAR无关。

[0466] 此外,作为捕获试剂,使用用EZ-Link NHS-LC-生物素标记的人Her2/ErbB2蛋白(ACROBiosystems)和也用生物素标记的B7-H3 C1结构域。将它们的浓度用含有0.01% PS20的PBS控制为700 nM。将HER2-ADC (I) (DAR8)和HER2-ADC (I) (DAR4)和B7-H3-ADC (I) (DAR8)和B7-H3-ADC (I) (DAR4)用Rexxip HN从1000 ng/mL以4的共同比率连续稀释6倍。作为检测试剂,使用用蛋白A纯化并使用DyLight650 (注册商标)标记试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc.)标记的三个克隆(1A3、8B2、11B1)。将它们的浓度用Rexxip F控

制为10 nM。将制备的试剂和用于抗体-药物缀合物的校准曲线的样品添加于96-孔PCR板中,将其与Gyrolab Bioaffy 200一起设置在Gyrolab xP工作站中。通过200-3W-001-A (向导方法)实施测量。根据4-参数逻辑模型(加权;响应)通过Gyrolab Evaluator软件实施校准曲线的回归。关于对HER2-ADC (I)的反应性,克隆1A3的校准曲线显示于图18中,克隆18B2的校准曲线显示于图19中,且克隆11B1的校准曲线显示于图20中。关于对B7-H3-ADC (I)的反应性,克隆1A3的校准曲线显示于图21中,克隆8B2的校准曲线显示于图22中,且克隆11B1的校准曲线显示于图23中。所有克隆都显示对HER2-ADC (I)和B7-H3-ADC (I)的反应性,而与DAR无关。

[0467] 从所述结果证实,所有克隆都具有对抗体-药物缀合物的反应性,而与DAR和抗体部分的差异无关,并且可用作捕获试剂和检测试剂两者。在克隆中,选择表现出最大信号值的克隆1A3,并意欲用于检测根据本发明的抗体-药物缀合物。

[0468] xv) 小鼠单克隆抗体的同种型的确定

[0469] 通过小鼠单克隆同种型分析测试试剂盒(由AbD Serotec制造)来确定xiv)中获得的克隆1A3的小鼠单克隆抗体(在下文中被称为“小鼠抗体1A3”)的同种型。作为结果,证实同种型为IgG2b, κ 链。

[0470] xvi) 单克隆抗体的基因克隆和N末端氨基酸的测序分析

[0471] 使用TRIzol试剂(LIFE TECHNOLOGIES)从产生小鼠抗体1A3的杂交瘤制备总RNA。对纯化的小鼠抗体1A3的N末端氨基酸实施测序分析(Edman测序)。此外,通过抗体基因克隆分析克隆1A3的核苷酸序列。作为抗体基因克隆的结果,获得重链可变区的单一序列和轻链可变区的单一序列。作为分析的结果,证实纯化的小鼠抗体1A3的N末端氨基酸序列与通过抗体基因克隆获得的克隆1A3的核苷酸序列的N末端氨基酸序列匹配。

[0472] 小鼠抗体1A3的重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:15代表。由SEQ ID NO:15的氨基酸残基1至19组成的氨基酸序列代表信号序列;由其氨基酸残基20至141组成的氨基酸序列代表重链可变区;且由其氨基酸残基142至477组成的氨基酸序列代表重链恒定区。

[0473] 小鼠抗体1A3的轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:16代表。由SEQ ID NO:16的氨基酸残基1至20组成的氨基酸序列代表信号序列;由其氨基酸残基21至127组成的氨基酸序列代表轻链可变区;且由其氨基酸残基128至234组成的氨基酸序列代表轻链恒定区。

[0474] 编码小鼠抗体1A3的重链的氨基酸序列的核苷酸序列由SEQ ID NO:17代表。由SEQ ID NO:17的核苷酸残基1至57组成的核苷酸序列代表信号序列;且由其核苷酸残基58至423组成的核苷酸序列编码重链可变区的氨基酸序列。

[0475] 编码小鼠抗体1A3的轻链的氨基酸序列的核苷酸序列由SEQ ID NO:18代表。由SEQ ID NO:18的核苷酸残基1至60组成的核苷酸序列代表信号序列;且其核苷酸61至459的核苷酸序列编码重链可变区的氨基酸序列。

[0476] 此外,分析了CDR。

[0477] 根据Abm的定义,发现小鼠抗体1A3的重链可变区具有由SEQ ID NO:1代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFTFSDYGMV),由SEQ ID NO:2代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (YISSGSSAIY),和由SEQ ID NO:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (PPRYDVYSAWFAY);且小鼠抗体1A3的轻链可变区具有由SEQ ID NO:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (KASQDVGS AVV),由SEQ ID NO:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2 (WASTRHT),和由SEQ ID

N0:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0478] 根据Chothia的定义,发现小鼠抗体1A3的重链可变区具有由SEQ ID N0:7代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFTFSDY),由SEQ ID N0:8代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (SSGSSA),和由SEQ ID N0:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (PPRYDVYSAWFAY);且小鼠抗体1A3的轻链可变区具有由SEQ ID N0:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (KASQDVGS AVV),由SEQ ID N0:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2 (WASTRHT),和由SEQ ID N0:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0479] 根据Kabat的定义,发现小鼠抗体1A3的重链可变区具有由SEQ ID N0:9代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (DYGMV),由SEQ ID N0:10代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (YISSGSSAIYYADTVKG),和由SEQ ID N0:3代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (PPRYDVYSAWFAY);且小鼠抗体1A3的轻链可变区具有由SEQ ID N0:4代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (KASQDVGS AVV),由SEQ ID N0:5代表的氨基酸序列组成的CDRL2 (WASTRHT),和由SEQ ID N0:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0480] 根据Imgt (注册商标)的定义,发现小鼠抗体1A3的重链可变区具有由SEQ ID N0:11代表的氨基酸序列组成的CDRH1 (GFTFSDYG),由SEQ ID N0:12代表的氨基酸序列组成的CDRH2 (ISSGSSAI),和由SEQ ID N0:13代表的氨基酸序列组成的CDRH3 (ARPPRYDVYSAWFAY);且小鼠抗体1A3的轻链可变区具有由SEQ ID N0:14代表的氨基酸序列组成的CDRL1 (QDVGSA),由WAS(色氨酸-丙氨酸-丝氨酸)代表的三肽组成的CDRL2,和由SEQ ID N0:6代表的氨基酸序列组成的CDRL3 (QQYSSYPVT)。

[0481] [实施例4]非临床研究中的血浆浓度的测量

[0482] 使用实施例2中获得的小鼠抗体1A3,开发用于测量小鼠中的HER2-ADC (I)的血浆中的浓度的方法和用于测量猴中的HER3-ADC (I)、TROP2-ADC (I)和B7-H3-ADC (I)的血浆中的浓度的方法。可以通过用充当检测试剂的DyLight650(注册商标)或Alexa Fluor(注册商标) 647标记小鼠抗体1A3来使用它。即使选择其中之一,也可以测量根据本发明的抗体-药物缀合物的血浆浓度。此外,可以制备校准曲线,其与DAR和抗体部分的差异无关,并且可以将其用于测量根据本发明的抗体-药物缀合物的血浆中的浓度。

[0483] i) HER2-ADC (I)

[0484] 用于测量小鼠中的HER2-ADC (I)的血浆中的浓度的方法由Gyrolab xP工作站开发。作为捕获试剂,生物素化的小鼠抗(抗HER2 Ab)独特型Ab(本文中,“(抗HER2 Ab)”)是指包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID N0:21的氨基酸残基1至449组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID N0:22的氨基酸残基1至214组成的氨基酸序列组成(13C1)(IBL)。用含有0.1% PS20的PBS将其浓度控制为350 nM。通过用以Rexxip HN稀释100倍的小鼠血浆将HER2-ADC (I)的浓度控制为0、0.150、0.200、0.600、1.60、4.00、16.0、40.0、100和140 µg/mL来制备用于校准曲线的样品。使用通过DyLight650(注册商标)标记试剂盒标记的小鼠抗体1A3作为检测试剂,并用Rexxip F将其浓度控制为10 nM。将这些试剂和用于校准曲线的样品添加至96-孔PCR板中,并在Gyrolab xP工作站中与Gyrolab Bioaffy 200一起设置。使用200-3W-002-A (PMT1)作为测量向导。使用Gyrolab Evaluator 3.3.9.175根据5-参数逻辑模型实施回归分析。校准曲线显示于图24中。

[0485] 用于测量小鼠中的总抗体(抗HER2抗体和HER2-ADC(I))的血浆中的浓度的方法由

Gyrolab xP工作站开发。使用生物素化的小鼠抗(抗HER2 Ab)独特型Ab (13C1) (IBL)作为捕获试剂,并用含有0.1% PS20的PBS将其浓度控制为350 nM。通过用以Rexxip HN稀释100倍的小鼠血浆将HER2-ADC (I)的浓度控制为0、0.150、0.200、0.600、1.60、4.00、16.0、40.0、100和140 $\mu\text{g/mL}$ 来制备用于校准曲线的样品。使用Alexa Fluor (注册商标) 647抗人IgG, Fc γ 抗体(Jakckson Immno Research Laboratories, Inc.)作为检测试剂,并用Rexxip F将其浓度控制为10 nM。将制备的这些试剂和用于校准曲线的样品添加至96-孔PCR板中,并在Gyrolab xP工作站中与Gyrolab Bioaffy 200一起设置。使用200-3W-002-A (PMT1)作为测量向导。使用Gyrolab Evaluator 3.3.9.175根据5-参数逻辑模型实施回归分析。

[0486] 浓度的测量结果显示于表1中。

[0487] [表1]

时间 (d)	平均血浆浓度 ($\mu\text{g/mL}$)						
	0.00347	0.292	1	3	7	14	21
总 Ab	66.9 $\pm$ 4.9	41.3 $\pm$ 1.4	27.9 $\pm$ 1.4	24.3 $\pm$ 2.3	17.0 $\pm$ 1.2	10.7 $\pm$ 0.5	6.66 $\pm$ 1.19
HER2-ADC(1)	73.4 $\pm$ 6.6	44.8 $\pm$ 6.0	30.3 $\pm$ 1.2	23.5 $\pm$ 1.7	16.9 $\pm$ 0.4	8.92 $\pm$ 0.91	5.20 $\pm$ 0.98

[0489] ii) HER3-ADC (I)

[0490] 用于测量猴中的HER3-ADC (I)的血浆中的浓度的方法由Gyrolab xP工作站开发。获得验证。使用用EZ-Link 磺基-NHS-LC-生物素 (Thermo Fisher Scientific Inc.)标记的HER3 (重组人ErbB-3/HER3蛋白, ACRO biosystems)作为捕获试剂,并用含有0.1% PS20的PBS将其浓度控制为700 nM。用于校准曲线的样品通过如下制备:用猴血浆将HER3-ADC (I)的浓度控制为0、0.0750、0.100、0.250、0.750、2.25、6.75、20.0、38.0和48.0 $\mu\text{g/mL}$,并用含有聚山梨醇酯20的PBS和Rexxip AN (GYROS PROTEIN Technologies)将其进一步稀释100倍。使用用Alexa Fluor (注册商标) 647标记试剂盒标记的小鼠抗体1A3作为检测试剂,并用Rexxip F将其浓度控制为10 nM。将制备的这些试剂和用于校准曲线的样品添加至96-孔PCR板中,并设置在Gyrolab xP工作站中。使用200-3W-002-A (PMT5)作为测量向导。使用Gyrolab Evaluator 3.3.7.171根据4-参数逻辑模型(权重:响应)实施回归分析。校准曲线显示于图25中。

[0491] iii) TROP2-ADC (I)

[0492] 用于测量猴中的TROP2-ADC (I)的血浆中的浓度的方法由Gyrolab xP工作站开发。获得验证。使用用EZ-Link 磺基-NHS-LC-生物素标记的新的hTrop2 (批号V35, Daiichi Sankyo co., ltd.)作为捕获试剂,并用含有0.1% PS20的PBS将其浓度控制为350 nM。使用的用于校准曲线的样品是通过用猴血浆将TROP2-ADC (I)的浓度控制为0、0.00750、0.0100、0.0250、0.0750、0.250、0.750、2.50、7.50和10.0 $\mu\text{g/mL}$ 来制备的那些,并用Rexxip HN (GYROS PROTEIN Technologies)将样品进一步稀释10倍。使用用Alexa Fluor (注册商标) 647标记试剂盒标记的小鼠抗体1A3作为检测试剂,并用Rexxip F将其浓度控制为10 nM。将这些试剂和用于校准曲线的样品添加至96-孔PCR板中,并设置在Gyrolab xP工作站中。使用200-3W-002-A (PMT1)作为测量向导。使用Gyrolab Evaluator 3.3.7.171根据4-参数逻辑模型(权重:响应)实施回归分析。校准曲线显示于图26中。

[0493] iv) B7-H3-ADC (I)

[0494] 用于测量猴中的B7-H3-ADC (I)的血浆测量中的浓度的方法由Gyrolab xP工作站开发。获得验证。使用用EZ-Link 磺基-NHS-LC-生物素 (Thermo Fisher Scientific Inc.)标记的B7-H3 C1结构域(批号B7_0mJ1, Daiichi Sankyo co., ltd.)作为捕获试剂,并用含有0.1% PS20的PBS将其浓度控制为700 nM。用于校准曲线的样品通过如下制备:用小鼠血浆将B7-H3-ADC (I)的浓度控制为0、0.0750、0.100、0.250、0.750、2.25、6.75、20.0、38.0和48.0 $\mu\text{g/mL}$,并用含有聚山梨醇酯20的PBS和Rexxip HN (GYROS PROTEIN Technologies)将其进一步稀释50倍。使用用Alexa Fluor (注册商标)647标记试剂盒标记的小鼠抗体1A3作为检测试剂,并用Rexxip F将其浓度控制为10 nM。将这些试剂和用于校准曲线的样品添加至96-孔PCR板中,并设置在Gyrolab xP工作站中。使用200-3W-001-A (PMT5)作为测量向导。使用Gyrolab Evaluator 3.3.7.171根据4-参数逻辑模型(权重:响应)实施回归分析。校准曲线显示于图27中。

[0495] [实施例5]使用小鼠抗体1A3的免疫染色

[0496] i) 使用皮下移植的人来源的肿瘤证实可染色性

[0497] 向高度免疫缺陷的小鼠(NOG小鼠)中皮下移植人来源的肿瘤。在施用根据本发明的抗体-药物缀合物之后,取出肿瘤组织以制备石蜡包埋的样本。然后,检查小鼠抗体1A3的可染色性。肿瘤组织取自未施用根据本发明的抗体-药物缀合物的NOG小鼠,并用作阴性对照。使用Autostainer Link预处理系统(PT Link,由DAKO制造)和抗原修复溶液(Target Retrieval Solution Low pH,由DAKO制造)实施脱蜡和抗原活化。使用自动染色装置(Dako Autostainer Link 48;由DAKO制造)实施以下染色操作。用EnVision FLEX WASH BUFFER(由DAKO制造)洗涤后,添加Peroxidase Block 3% H_2O_2 (由DAKO制造);实施孵育;并用EnVision FLEX WASH BUFFER实施洗涤。添加无血清的Protein Block(由DAKO制造);实施孵育;并通过吹气除去液体。小鼠抗体1A3用REAL Antibody Diluent(由DAKO制造)稀释并反应。用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤后,添加EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse #K4000(由DAKO制造);实施孵育;且然后实施用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤。

[0498] 添加DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogen System并实施孵育;且实施用EnVision FLEX WASH BUFFER进行洗涤。添加EnVision FLEX Hematoxylin并实施孵育;并实施用EnVision FLEX WASH BUFFER和离子交换水洗涤。

[0499] 证实用根据本发明的抗体-药物缀合物施用的NOG小鼠可以用小鼠抗体1A3令人满意地染色,并且染色强度随着小鼠抗体1A3的浓度增加而增加。另外,证实未用根据本发明的抗体-药物缀合物施用的NOG小鼠没有用小鼠抗体1A3染色。注意,由于NOG小鼠在B细胞中有缺陷,已知背景没有用小鼠来源的内源性IgG染色(Ito M, 等人 Blood 100 (9): 3175-3182, 2002)。

[0500] ii) 小鼠抗体1A3的特异性的证实

[0501] 将小鼠抗体1A3与化合物(2)或SN-38混合后,将混合物用于免疫染色。基于分子量,抗体1A3:化合物(2):SN-38的混合比被定义为0.1:0.04:0.03。以与i)中相同的方式实施染色。

[0502] 证实通过将其与化合物(2)混合,小鼠抗体1A3的可染色性消失。还证实通过将其

与SN-38混合,小鼠抗体1A3的可染色性不会消失。

[0503] [实施例6]兔嵌合抗体的制备

[0504] i) 设计源自小鼠抗体1A3的兔嵌合抗体

[0505] 如下设计源自小鼠抗体1A3的兔嵌合抗体(在下文中被称为“兔嵌合抗体1A3”)。通过将兔的重链恒定区IGHG*02和轻链恒定区IGKC2*01连接至克隆1A3的两条链的相应可变区,参照IMGT(注册商标)设计兔嵌合抗体的序列。

[0506] 兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:19代表。由SEQ ID NO:19的氨基酸残基1至19组成的氨基酸序列代表信号序列;由其氨基酸残基20至141组成的氨基酸序列代表重链可变区,且其氨基酸残基142至464的氨基酸序列代表重链恒定区。

[0507] 兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:20代表。由SEQ ID NO:20的氨基酸残基1至20组成的氨基酸序列代表信号序列;由其氨基酸残基21至127组成的氨基酸序列代表轻链可变区;且由其氨基酸残基128至233组成的氨基酸序列代表轻链恒定区。

[0508] ii) 抗体表达载体pCMA-LK的构建

[0509] 通过使用In-Fusion Advantage PCR克隆试剂盒(CLONTECH),将通过用限制性酶XbaI和PmeI消化质粒pcDNA3.3-TOP0/LacZ (Invitrogen)而获得的片段(约5.4 kb)连接至具有编码人轻链信号序列和人κ链恒定区的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:29)的DNA片段,以获得pcDNA3.3/LK。

[0510] 通过从pcDNA3.3/LK除去新霉素表达单位来构建pCMA-LK。

[0511] iii) 兔嵌合抗体1A3重链表达载体的构建

[0512] 合成具有编码兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:19)的核苷酸序列(SEQ ID NO:30)的DNA片段(GENEART)。SEQ ID NO:30的核苷酸残基26至82的核苷酸序列代表信号序列;核苷酸残基83至448的核苷酸序列编码重链可变区的氨基酸序列;且核苷酸残基449至1417的核苷酸序列编码恒定区的氨基酸序列。

[0513] 将通过使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒(CLONTECH)合成的DNA片段连接至DNA片段(其通过用XbaI和PmeI消化pCMA-LK并除去编码轻链信号序列和人κ链恒定区的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO:29)而制备),以构建兔嵌合抗体1A3重链表达载体。

[0514] iv) 兔嵌合抗体1A3轻链表达载体的构建

[0515] 合成具有编码兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)的核苷酸序列(SEQ ID NO:31)的DNA片段(GENEART)。SEQ ID NO:31的核苷酸残基26至85的核苷酸序列代表信号序列;核苷酸残基86至406的核苷酸序列编码轻链可变区的氨基酸序列;且核苷酸残基407至724的核苷酸序列编码恒定区的氨基酸序列。以与iii)中相同的方式构建兔嵌合抗体1A3轻链表达载体。

[0516] v) 兔嵌合抗体1A3的产生

[0517] 根据手册将FreeStyle 293F细胞(Invitrogen)继代培养。将对数生长期期间的FreeStyle 293F细胞(Invitrogen) (2.4×10^9) 接种于Optimum Growth 5L Flask (Thomson)中,用FreeStyle293表达培养基(Invitrogen)稀释以制备 1.88×10^6 个细胞/mL。向Opti-Pro SFM培养基(Invitrogen) (40 mL)中,添加0.48 mg兔嵌合抗体1A3重链表达载体、0.72 mg兔嵌合抗体1A3轻链表达载体和3.6 mg聚乙烯亚胺(Polyscience #24765)。将混合物轻轻搅拌,再使其静置5分钟,且然后添加至FreeStyle 293F细胞中。将混合物在

8% CO₂培养箱中在37℃下孵育4小时,同时以90 rpm的速率摇动。此后,添加1200 mL的EX-CELL VPRO培养基(SAFC Biosciences)、18 mL的GlutaMAX I (GIBCO)和60 mL的Yeastolate Ultrafiltrate (GIBCO)。将混合物在8% CO₂培养箱中在37℃下培养7天,同时以90 rpm的速率摇动。通过一次性胶囊滤器(Advantec #CCS-045-E1H)过滤所得的培养上清液,以获得含有兔嵌合抗体1A3的培养上清液。

[0518] vi) 兔嵌合抗体1A3的纯化

[0519] v) 中获得的培养物上清液通过rProtein A亲和色谱的单一步骤进行纯化。将培养上清液施加至用以PBS平衡的MabSelectSuRe装入的柱(由GE Healthcare Bioscience制造),且然后用PBS(体积为柱子体积的两倍或更多倍)洗涤。随后,用2M精氨酸盐酸盐溶液(pH4.0)进行洗脱,并收集含有抗体的级分。透析收集的级分(Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette,公司:Thermo Scientific)以进行PBS缓冲液置换。通过Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20(截止分子量UF10K,公司:Sartorius)浓缩抗体,并将IgG的浓度控制为2 mg/mL或以上。最后,通过Minisart-Plus过滤器(Sartorius)进行过滤以获得纯化的兔嵌合抗体1A3的样品。

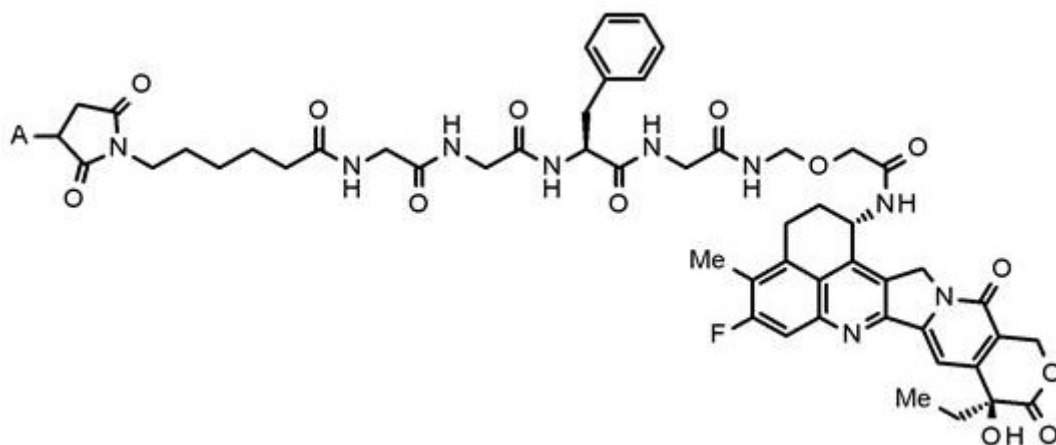
[0520] [实施例7] 抗体-药物缀合物的产生

[0521] i) 抗GPR20抗体-药物缀合物的产生(1)

[0522] 根据国际公开号W0 2018/135501中所述的产生方法并使用抗GPR20抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:32的氨基酸残基20至472组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:33的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成),产生抗GPR20抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗GPR20抗体缀合(在本发明中被称为“GPR20-ADC (I)”):

[0523] [式35]

[0524]



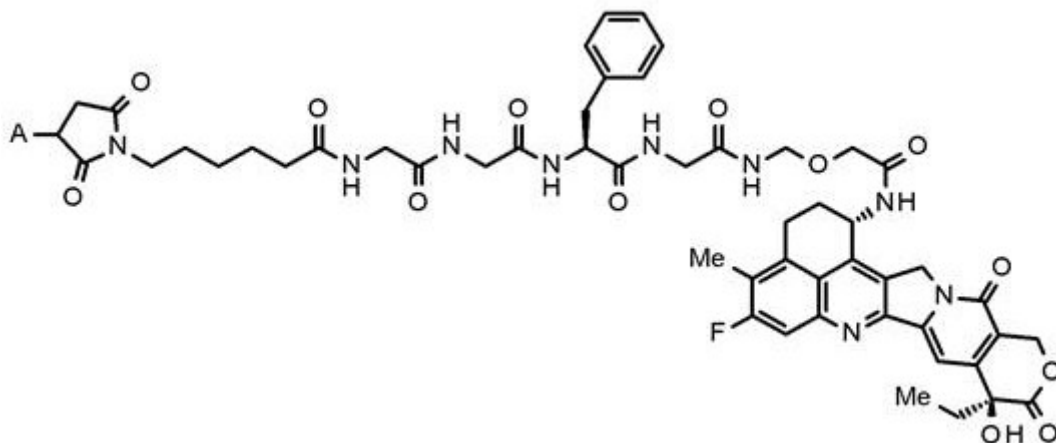
[0525] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0526] ii) 抗CDH6抗体-药物缀合物的产生(1)

[0527] 根据国际公开号W02018/212136中所述的产生方法并使用抗CDH6抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:34的氨基酸残基20至471组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:35的氨基酸残基21至233组成的氨基酸序列组成),产生抗CDH6抗体-药物缀合物,其中由下式代表的药物-接头经由硫醚键与抗CDH6抗体缀合(在本发明中被称为“CDH6-ADC (I)”):

[0528] [式36]

[0529]



[0530] 其中A代表与所述抗体的连接位置。

[0531] [实施例8]使用兔嵌合抗体1A3的免疫染色

[0532] i) 施用TROP2-ADC (I) 后使用皮下移植的人来源的肿瘤证实可染色性

[0533] 向免疫缺陷小鼠(裸小鼠)皮下移植人头颈癌细胞系FaDu。施用TROP2-ADC (I) 后,取出肿瘤组织以制备石蜡包埋的样本。然后,检查兔嵌合抗体1A3的可染色性。肿瘤组织取自向其施用抗TROP2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:25的氨基酸残基20至470的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:26的氨基酸残基21至234的氨基酸序列组成,在下文中被称为“Anti-TROP2 Ab”)的裸小鼠,并用作阴性对照。脱蜡和抗原活化使用Autostainer Link预处理系统(PT Link,由DAKO制造)和抗原修复溶液(Target Retrieval Solution Low pH,由DAKO制造)在97℃下实施40分钟。以下染色操作使用自动染色装置(Dako Autostainer Link 48;由DAKO制造)在室温下实施。用EnVision FLEX WASH BUFFER (由DAKO制造)洗涤一次后,添加REAL Peroxidase-Blocking Solution (由DAKO制造);实施孵育5分钟;并用EnVision FLEX WASH BUFFER实施洗涤一次。添加无血清的Protein Block (由DAKO制造);实施孵育30分钟,并通过吹气除去液体。将兔嵌合抗体1A3用REAL Antibody Diluent (由DAKO制造)稀释至0.1 μg/mL,并进行反应30分钟。用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤3次后,添加EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (由DAKO制造);实施孵育30分钟;且然后,实施用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤两次。

[0534] 添加DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogen System,并实施孵育,总共10分钟。并实施用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤一次。添加EnVision FLEX Hematoxylin,并实施孵育5分钟;并用EnVision FLEX WASH BUFFER和离子交换水洗涤总共3次。

[0535] 图35显示典型的染色图像。兔嵌合抗体1A3显示令人满意的对用TROP2-ADC (I) 施用的动物的皮下肿瘤组织的可染色性;相反,兔嵌合抗体1A3没有显示对用抗TROP2 Ab施用的动物的皮下肿瘤组织的可染色性。

[0536] ii) 施用GPR20-ADC (I) 后使用皮下移植的人来源的肿瘤证实可染色性

[0537] 向免疫缺陷小鼠(裸小鼠)皮下移植过表达GPR20的人胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1/GPR20。施用GPR20-ADC (I) 后,取出肿瘤组织以制备石蜡包埋的样本。然后,检查兔嵌合抗体1A3的可染色性。肿瘤组织取自未用GPR20-ADC (I) 施用的小鼠,并用作阴性对照。以与

i) 中相同的方式实施染色。

[0538] 图36显示典型的染色图像。兔嵌合抗体1A3显示令人满意的对用GPR20-ADC (I) 施用的动物的皮下肿瘤组织的可染色性;而兔嵌合抗体1A3没有显示对未用GPR20-ADC (I) 施用的动物的皮下肿瘤组织的可染色性。

[0539] [实施例9]使用小鼠抗体1A3的免疫染色

[0540] i) 施用CDH6-ADC (I) 后使用皮下移植的人来源的肿瘤证实可染色性

[0541] 向高度免疫缺陷的小鼠 (NOG小鼠) 皮下移植取自具有透明细胞肾细胞癌的患者的人肿瘤。施用CDH6-ADC (I) 后,取出肿瘤组织以制备石蜡包埋的样本。然后,检查小鼠抗体1A3的可染色性。肿瘤组织取自未向其施用CDH6-ADC (I) 的NOG小鼠,并用作阴性对照。脱蜡和抗原活化使用Autostainer Link预处理系统 (PT Link, 由DAKO制造) 和抗原修复溶液 (Target Retrieval Solution Low pH, 由DAKO制造) 在97°C下实施40分钟。以下染色操作使用自动染色装置 (Dako Autostainer Link 48; 由DAKO制造) 在室温下实施。用EnVision FLEX WASH BUFFER (由DAKO制造) 洗涤一次后,添加Peroxidase Block 3% H₂O₂ (由DAKO制造);实施孵育5分钟;并用EnVision FLEX WASH BUFFER实施洗涤一次。添加无血清的Protein Block (由DAKO制造);实施孵育30分钟,并通过吹气除去液体。将小鼠抗体1A3用REAL Antibody Diluent (由DAKO制造) 稀释以落入0.03 µg/mL至0.3 µg/mL的范围内,并进行反应60分钟。用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤3次后,添加EnVision + System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse #K4000 (由DAKO制造);实施孵育30分钟;且然后,实施用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤两次。

[0542] 添加DAKO Liquid DAB + Substrate Chromogen System,并实施孵育,总共10分钟;并实施用EnVision FLEX WASH BUFFER洗涤一次。添加EnVision FLEX Hematoxylin,并实施孵育5分钟;并实施用EnVision FLEX WASH BUFFER和离子交换水洗涤总共3次。

[0543] 图37显示典型的染色图像。小鼠抗体1A3显示令人满意的对用CDH6-ADC (I) 施用的动物的可染色性,并且染色强度随着小鼠抗体1A3的浓度增加而增加。相反,小鼠抗体1A3没有显示对用CDH6-ADC (I) 施用的动物的可染色性。注意,由于NOG小鼠在B细胞中有缺陷,因此已知在小鼠来源的内源IgG中未观察到背景染色 (Ito M, 等人 Blood 100 (9): 3175-3182, 2002)。

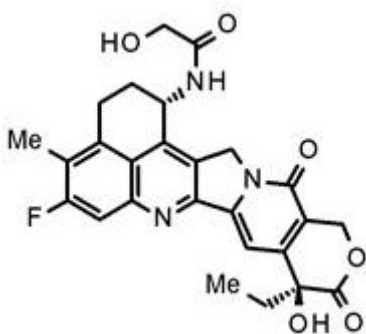
[0544] ii) 小鼠抗体1A3的特异性的证实

[0545] 将小鼠抗体1A3与化合物 (2) 或SN-38混合后,混合物用于免疫染色。

[0546] 注意,化合物 (2) 是由下式代表的化合物:

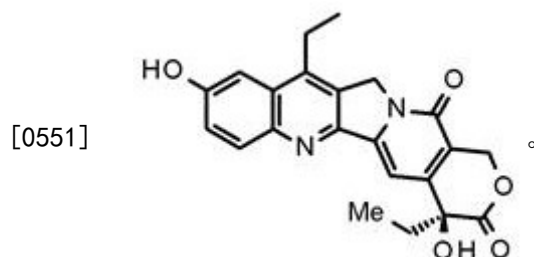
[0547] [式37]

[0548]



[0549] SN-38是由下式代表的化合物:

[0550] [式38]



[0552] 基于分子量,将小鼠抗体1A3:化合物(2):SN-38的混合比定义为0.1:0.04:0.03。以与i)中相同的方式进行染色。

[0553] 图38显示典型的染色图像。通过与化合物(2)混合,小鼠抗体1A3的染色能力消失,但通过与SN-38混合,则没有消失。由此证明,小鼠抗体1A3特异性识别组织中的化合物(2)。

[0554] [实施例10]非临床研究中的血浆中的浓度的测定

[0555] 由Gyrolab xP工作站(GYROS PROTEIN Technologies)开发用于测量小鼠中的GPR20-ADC (I)的血浆中的浓度的方法。作为捕获试剂,通过使用标记试剂盒(ChromaLink Biotin Protein Labeling Kit, Solulink)用生物素标记的小鼠抗体1A3,并将其浓度用含有0.1% PS20的PBS控制为700 nM。通过将GPR20-ADC (I)的浓度用小鼠血浆控制为0、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000、10000 ng/mL制备用于校准曲线的样品并用Rexxip AN (GYROS PROTEIN Technologies)稀释至10倍。作为检测试剂,小鼠抗-(抗-GPR20 Ab)(在本文中,“(抗-GPR20 Ab)”代表包含重链和轻链的抗体,所述重链由SEQ ID NO:32的氨基酸残基20至472组成的氨基酸序列组成,且所述轻链由SEQ ID NO:33的氨基酸残基21至234组成的氨基酸序列组成)独特型Ab (71C1) (IBL)用DyLight650(注册商标)标记试剂盒标记并投入使用,并将其浓度用Rexxip F (GYROS PROTEIN Technologies)控制为10 nM。将这些试剂和用于校准曲线的样品添加至96-孔PCR板中,并设置在Gyrolab xP工作站。使用Bioaffy200,通过200-3W-002-A (PMT1)测量向导。通过使用Gyrolab Evaluator 3.3.9.175在4-参数逻辑模型中实施回归分析(权重:响应)。校准曲线显示于图39中。

[0556] [实施例11]非临床研究中的血浆浓度的测定

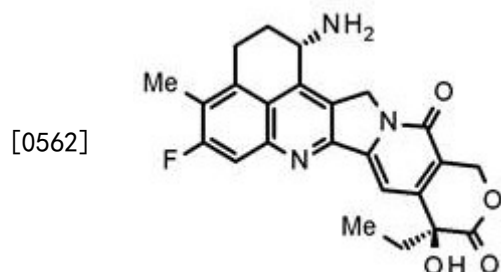
[0557] 通过使用ECL开发用于测量人中的HER2-ADC (I)的血浆中的浓度的方法。High Bind板(Meso Scale Diagnostics, LLC: MSD)用小鼠抗体1A3包被,且然后洗涤。用封闭缓冲液(含有BSA和PS20的PBS)进行封闭后,将HER2-ADC (I)的浓度控制为0、200、400、800、1600、3200、6400、12800、20000和25600 ng/mL,用测定稀释液稀释1000倍,并用作用于校准曲线的样品。将通过EZ-Link 磺基-NHS-LC-LC生物素(Thermo Fisher Scientific Inc.)和磺基-标签链霉抗生物素蛋白(MSD)用生物素标记的生物素化的小鼠抗-(抗-HER2)独特型Ab (13C1) (IBL)预孵育以制备检测溶液。向添加用于校准曲线的样品、孵育和洗涤的板中添加检测溶液,以形成复合物。然后,将4 × Read Buffer T (MSD)用纯净水稀释两倍,并添加至洗涤的板。通过MSD SECTOR Imager 6000(控制软件:MSD Discovery Workbench版本3.0.18)进行测量。通过4-参数逻辑模型(权重:1/响应²)进行回归分析。校准曲线显示于图40中。

[0558] [实施例12]被小鼠抗体1A3识别的化学结构的证实

[0559] 使用Gyrolab xP工作站(GYROS PROTEIN Technologies),通过与HER2-ADC (I)的竞争抑制来检查被小鼠抗体1A3识别的化学结构。作为用于竞争抑制中的化合物,选择化合物(1)、化合物(2)、化合物(7)、化合物(8)、化合物(9)、化合物(10)、化合物(11)、拓扑替康和鲁比替康。

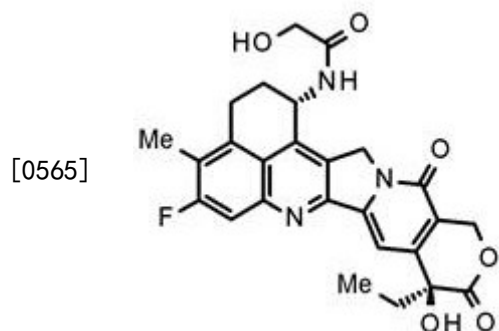
[0560] 注意,化合物(1)是由下式代表的化合物:

[0561] [式39]



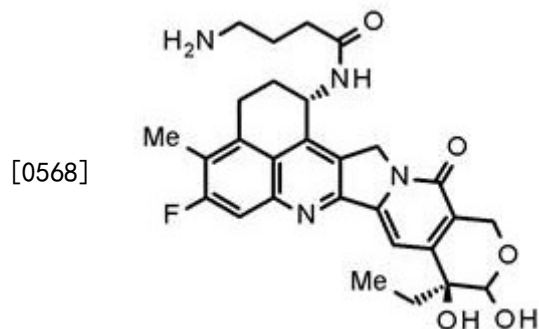
[0563] 化合物(2)是由下式代表的化合物:

[0564] [式40]



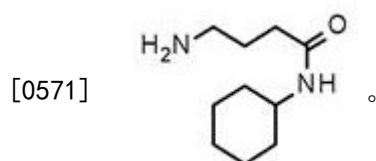
[0566] 化合物(7)是由下式代表的化合物:

[0567] [式41]



[0569] 化合物(8)是由下式代表的化合物:

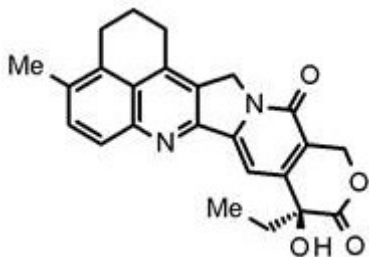
[0570] [式42]



[0572] 化合物(9)是由下式代表的化合物:

[0573] [式43]

[0574]

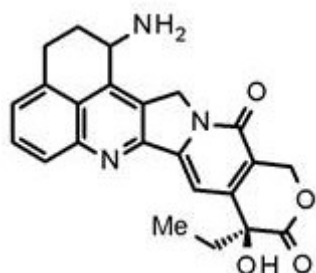


[0575] (Sugimori M. 等人, J Med. Chem. 1994, 3033-3039)。

[0576] 化合物(10)是由下式代表的化合物:

[0577] [式44]

[0578]

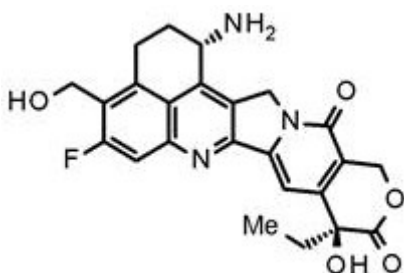


[0579] (美国专利号5834476)。

[0580] 化合物(11)是由下式代表的化合物:

[0581] [式45]

[0582]

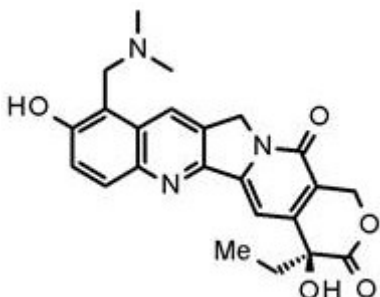


[0583] (Atsumi R. 等人, Arzneimittel-Forschung 2001, 253-257)。

[0584] 拓扑替康是由下式代表的化合物:

[0585] [式46]

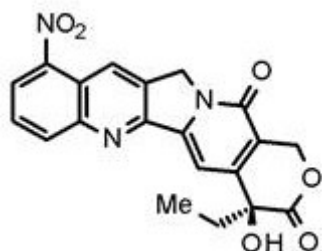
[0586]



[0587] 鲁比替康是由下式代表的化合物:

[0588] [式47]

[0589]



[0590] 作为捕获试剂,使用通过标记试剂盒 (ChromaLink Biotin Protein LABELING Kit, Solulink) 用生物素标记的小鼠抗体1A3。将其浓度用含有0.1%PS20的PBS控制为700 nM。用于竞争抑制中的化合物,化合物(1)、化合物(2)、化合物(7)、化合物(8)、化合物(9)、化合物(10)、化合物(11)、拓扑替康和鲁比替康分别溶解于DMSO中。将溶液各自用Rexxip HN (GYROS PROTEIN Technologies) 中的10%或20% DMSO稀释,以制备0.1和100 $\mu\text{g/mL}$ 稀释溶液。向其中各自以等量添加700 nM小鼠抗体1A3溶液。将混合物搅拌,并使其在室温下在暗处反应1小时或更长时间。将HER2-ADC (I) 的浓度用Rexxip HN控制为0、0.244、0.977、3.91、15.6、62.5、250和1000 ng/mL。作为检测试剂,小鼠抗-(抗-HER2 Ab) 独特型Ab (13C1) (IBL) 通过DyLight650(注册商标) 标记试剂盒标记并投入使用。将其浓度用Rexxip F (GYROS PROTEIN Technologies) 控制为10 nM。将上述溶液设置在Gyrolab xP工作站,并通过使用Gyrolab Bioaffy 200在200-3W-002-A (PMT5) 实施测量。通过使用Gyrolab Evaluator 3.4.0.24在4-参数逻辑模型中(权重:响应) 实施回归分析。根据竞争抑制化合物的浓度制备HER2-ADC (I) 的校准曲线。通过将浓度为250 ng/mL的HER2-ADC (I) 的响应与未添加化合物(浓度为0 ng/mL) 的情况下的响应进行比较,计算抑制率(%)。

[0591] 显示抑制率的图表显示于图41中。化合物(1)、化合物(2)、化合物(7)和化合物(9)显示强竞争抑制作用。相反,化合物(8)、化合物(10)、化合物(11)、拓扑替康和鲁比替康没有表现出竞争抑制。从结果证实,小鼠抗体1A3特异性识别具有化合物(1)的基本骨架和位置4处的甲基的化学结构。

[0592] [序列自由文本]

[0593] SEQ ID NO:1 - CDRH1

[0594] SEQ ID NO:2 - CDRH2

[0595] SEQ ID NO:3 - CDRH3

[0596] SEQ ID NO:4 - CDRL1

[0597] SEQ ID NO:5 - CDRL2

[0598] SEQ ID NO:6 - CDRL3

[0599] SEQ ID NO:7 - CDRH1

[0600] SEQ ID NO:8 - CDRH2

[0601] SEQ ID NO:9 - CDRH1

[0602] SEQ ID NO:10 - CDRH2

[0603] SEQ ID NO:11 - CDRH1

[0604] SEQ ID NO:12 - CDRH2

[0605] SEQ ID NO:13 - CDRH3

[0606] SEQ ID NO:14 - CDRL1

- [0607] SEQ ID NO:15 - 小鼠抗体1A3的重链的氨基酸序列
- [0608] SEQ ID NO:16 - 小鼠抗体1A3的轻链的氨基酸序列
- [0609] SEQ ID NO:17 - 编码小鼠抗体1A3的重链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列
- [0610] SEQ ID NO:18 - 编码小鼠抗体1A3的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列
- [0611] SEQ ID NO:19 - 兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列
- [0612] SEQ ID NO:20 - 兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列
- [0613] SEQ ID NO:21 - 抗HER2抗体的重链的氨基酸序列
- [0614] SEQ ID NO:22 - 抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列
- [0615] SEQ ID NO:23 - 抗HER3抗体的重链的氨基酸序列
- [0616] SEQ ID NO:24 - 抗HER3抗体的轻链的氨基酸序列
- [0617] SEQ ID NO:25 - 抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列
- [0618] SEQ ID NO:26 - 抗TROP2抗体的轻链的氨基酸序列
- [0619] SEQ ID NO:27 - 抗B7-H3抗体的重链的氨基酸序列
- [0620] SEQ ID NO:28 - 抗B7-H3抗体的轻链的氨基酸序列
- [0621] SEQ ID NO:29 - 编码人轻链信号序列和人κ链恒定区的氨基酸序列的核苷酸序列
- [0622] SEQ ID NO:30 - 编码兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列的核苷酸序列
- [0623] SEQ ID NO:31 - 编码兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列的核苷酸序列
- [0624] SEQ ID NO:32 - 抗GPR20抗体的重链的氨基酸序列
- [0625] SEQ ID NO:33 - 抗GPR20抗体的轻链的氨基酸序列
- [0626] SEQ ID NO:34 - 抗CDH6抗体的重链的氨基酸序列
- [0627] SEQ ID NO:35 - 抗CDH6抗体的轻链的氨基酸序列。

序列表

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> 识别抗体-药物缀合物的药物部分的蛋白

<130> DSPCT-FP1911

<150> JP2018-140912

<151> 2018-07-27

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Gly	Met	Val
1				5					10

[0001]

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

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

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Pro	Pro	Arg	Tyr	Asp	Val	Tyr	Ser	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr
1				5					10			

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1	5	10
	<210>	5	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	小家鼠	
	<400>	5	
	Trp Ala Ser Thr Arg His Thr		
	1	5	
	<210>	6	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	小家鼠	
	<400>	6	
	Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Val Thr		
	1	5	
[0002]	<210>	7	
	<211>	7	
	<212>	PRT	
	<213>	小家鼠	
	<400>	7	
	Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr		
	1	5	
	<210>	8	
	<211>	6	
	<212>	PRT	
	<213>	小家鼠	
	<400>	8	
	Ser Ser Gly Ser Ser Ala		
	1	5	
	<210>	9	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	小家鼠	
	<400>	9	
	Asp Tyr Gly Met Val		
	1	5	

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly
1 5

[0003]

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 12

Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile
1 5

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 13

Ala Arg Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 14

Gln Asp Val Gly Ser Ala
1 5

<210> 15
<211> 477
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 15

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

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

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

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

[0004]

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

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

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe
115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr
145 150 155 160

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

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

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser
210 215 220

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

Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys
245 250 255

His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
260 265 270

Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys
275 280 285

[0005]

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
290 295 300

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
305 310 315 320

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

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
340 345 350

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

Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro
370 375 380

Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val
385 390 395 400

Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His
405 410 415

Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430

Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu
435 440 445

Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn
450 455 460

Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 16
<211> 234
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 16

[0006] Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

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

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

Asp Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

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

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
100 105 110

Ser Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

	115	120	125	
	Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln 130 135 140			
	Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr 145 150 155 160			
	Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln 165 170 175			
	Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 180 185 190			
	Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg 195 200 205			
	His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro 210 215 220			
[0007]	Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys 225 230			
<210>	17			
<211>	504			
<212>	DNA			
<213>	小家鼠			
<400>	17			
	atggactcca ggctcaattt agttttcctt gtccttattt taaaaggtgt ccagtgtgag			60
	gtgaagctgg tggagtctgg gggaggetta gtgcagcctg gaggggtcccg gaaactctcc			120
	tgtgcagcct ctggattcac tttcagtac tacggaatgg tgtggattcg acaggtcca			180
	gggagggggc tggagtgggt tgcatacatt agtagtggca gtagtgccat ctactatgca			240
	gacacagtga aaggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttcctg			300
	caaatgaaca gtctaaggtc tgaggactcg gccatgtatt tctgtgcaag gccccccgt			360
	tatgatgttt actctgcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct			420
	gcagccaaaa caacaccccc atcagtctat ccactggccc ctgggtgtgg agatacaact			480
	ggttctctcg tgactctggg atgc			504

<210> 18
 <211> 459
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

 <400> 18
 atggagacac attctcaggt ctttgtatac atgttgctgt ggttgtctga tgttgaagga 60
 gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat ctgtaggaga cagggtcagc 120
 atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt agtgctgtag tctggtatca acagaaacct 180
 gggcactctc ctgacctact gatttactgg gcatccacc ggcacactgg agtccctgat 240
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcacgtca ccattggcaa tgtgcagtct 300
 gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagct atcctgtcac gttcggaggg 360
 gggaccaagc tggaataaaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtg 459

[0008]

<210> 19
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 19

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe
115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gln Pro
130 135 140

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

Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg
180 185 190

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

[0009]

Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala
210 215 220

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

Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
245 250 255

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro
275 280 285

Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala
290 295 300

Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Thr Leu Pro Ile Thr His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe
325 330 335

Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
340 345 350

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

Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys
370 375 380

Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys
385 390 395 400

Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp
405 410 415

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

[0010]

Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 20
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 20

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

	35	40	45
	Val Gly Ser Ala Val Val	Trp Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly His Ser Pro
	50	55	60
	Asp Leu Leu Ile Tyr	Trp Ala Ser Thr Arg	His Thr Gly Val Pro Asp
	65	70	75 80
	Arg Phe Thr Gly	Ser Gly Ser Gly Thr	Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly
	85	90	95
	Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala	Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser	
	100	105	110
	Ser Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
	115	120	125
	Asp Pro Val Ala Pro Ser Val Leu Leu Phe Pro Pro Ser Lys Glu Glu		
	130	135	140
[0011]	Leu Thr Thr Gly Thr Ala Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Phe Tyr		
	145	150	155 160
	Pro Ser Asp Ile Thr Val Thr Trp Lys Val Asp Gly Thr Thr Gln Gln		
	165	170	175
	Ser Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Ser Pro Glu Asp Asn Thr		
	180	185	190
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Ser Ala Gln Tyr Asn Ser		
	195	200	205
	His Ser Val Tyr Thr Cys Glu Val Val Gln Gly Ser Ala Ser Pro Ile		
	210	215	220
	Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys		
	225	230	
<210>	21		
<211>	450		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		

<220>

<223> 抗HER2抗体的重链

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

[0012]

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0013]

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 22
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER2抗体的轻链

<400> 22

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

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

[0014] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145	150	155	160
Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr
	180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr	His Gln Gly Leu Ser Ser	Pro Val Thr Lys Ser	
	195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			

<210> 23
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗HER3抗体的重链

[0015] <400> 23

Gln Val Gln Leu	Gln Gln Trp Gly	Ala Gly Leu Leu	Lys Pro Ser Glu
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu	Thr Cys Ala Val	Tyr Gly Gly Ser	Phe Ser Gly Tyr
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp	Ile Arg Gln Pro	Pro Gly Lys Gly	Leu Glu Trp Ile
	35	40	45
Gly Glu Ile Asn	His Ser Gly Ser	Thr Asn Tyr Asn	Pro Ser Leu Lys
	50	55	60
Ser Arg Val Thr	Ile Ser Val Glu	Thr Ser Lys Asn	Gln Phe Ser Leu
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser	Val Thr Ala Ala	Asp Thr Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala
	85	90	95
Arg Asp Lys Trp	Thr Trp Tyr Phe	Asp Leu Trp Gly	Arg Gly Thr Leu
	100	105	110

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

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

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

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

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

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

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

[0016]

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0017]

<210> 24
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER3抗体的轻链

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln	85	90	95
Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	100	105	110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	115	120	125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	130	135	140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	145	150	155
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	165	170	175
[0018] Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	220
<210> 25			
<211> 470			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 抗TROP2抗体的重链			
<400> 25			
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp	1	5	10
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	20	25	30

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

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

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

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

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

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

[0019]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0020]

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 26
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗TR0P2抗体的轻链

<400> 26

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

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

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

[0021] Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

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

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

	180	185	190
	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 195 200 205		
	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 210 215 220		
	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230		
	<210> 27 <211> 471 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 抗B7-H3抗体的重链		
	<400> 27		
[0022]	Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp 1 5 10 15		
	Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys 20 25 30		
	Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe 35 40 45		
	Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu 50 55 60		
	Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn 65 70 75 80		
	Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser 85 90 95		
	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 100 105 110		
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe 115 120 125		

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

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

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

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

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

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

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

[0023]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0024]

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 28
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗B7-H3抗体的轻链

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

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

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

	50	55	60	
	Pro Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg			
	65	70	75	80
	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser			
		85	90	95
	Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asn Ser			
		100	105	110
	Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr			
		115	120	125
	Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu			
		130	135	140
	Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro			
	145	150	155	160
[0025]	Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly			
		165	170	175
	Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr			
		180	185	190
	Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His			
		195	200	205
	Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val			
		210	215	220
	Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	225	230		
	<210> 29			
	<211> 449			
	<212> DNA			
	<213> 智人			
	<400> 29			
	gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcattt ccctgctgct			60
	gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacggtgg ccgccccctc			120

	cgtgttcac	ttccccct	ccgacgagca	gctgaagtc	ggcaccgcct	ccgtgggtgtg	180
	cctgctgaat	aacttctacc	ccagagaggc	caaggtgcag	tggaagggtg	acaacgccct	240
	gcagtccggg	aactcccagg	agagcgtgac	cgagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	300
	cctgagcagc	accctgaccc	tgagcaaagc	cgactacgag	aagcacaagg	tgtacgcctg	360
	cgaggtgacc	caccagggcc	tgagctcccc	cgtcaccaag	agcttcaaca	ggggggagtg	420
	ttaggggccc	gtttaaacgg	gggaggcta				449
	<210>	30					
	<211>	1442					
	<212>	DNA					
	<213>	人工序列					
	<220>						
	<223>	合成核苷酸					
	<400>	30					
	ccagcctccg	gactctagag	ccacatgaa	gcacctgtgg	ttctttctgc	tgctggtggc	60
	cgctcctaga	tggtgtgtgt	ctgaagtga	gctggtggaa	tctggcgcg	gactggttca	120
[0026]	acctggcggc	tctagaaagc	tgagctgtgc	cgccagcggc	ttcaccttta	gcgattacgg	180
	catggtctgg	atccggcagg	ctcctggaag	aggccttgag	tggtgcct	acatcagctc	240
	tggaagcagc	gccatctact	acgccgacac	cgtgaagggc	agattcacca	tcagccggga	300
	caaccccaag	aataacctgt	tctgcagat	gaacagcctg	cggagcgagg	actccgccat	360
	gtacttttgt	gcccggcctc	ctagatacga	cgtgtacagc	gcttggtttg	cctactgggg	420
	ccagggcaca	ctggttacag	tttctgccgg	acagcccaag	gctccctccg	ttttccact	480
	ggctccctgc	tgtggcgata	ccctagctc	tacagtgacc	ctgggctgtc	tggtcaaggg	540
	ctatctgcct	gagcctgtga	ccgtgacctg	gaatagcggc	accctgacca	acggcgtgcg	600
	gacatttct	agcgtcagac	agagcagcgg	cctgtactct	ctgagcagcg	tggtgtctgt	660
	gaccagcagc	tctcagccag	tgacctgcaa	tgtggcccat	cctgccacca	acaccaaggt	720
	ggacaaaacc	gtggtccca	gcacctgtag	caagccca	tgtcctccac	ctgagctgct	780
	cggaggcccc	agcgtgttca	tctttccacc	taagcctaag	gacaccctga	tgatcagcag	840
	aaccctgaa	gtgacctgtg	tggtggtgga	cgtgtcccag	gatgatcccg	aggtgcagtt	900
	cacctggtac	atcaacaacg	agcaagtgcg	gaccgccaga	cctcctctga	gagagcagca	960
	gttcaacagc	accatcagag	tggtgtccac	actgcccac	acacaccagg	attggtctgcg	1020

	gggcaaagaa ttcaagtga aggtgcacaa caaggccctg cctgctccta tcgagaaaac	1080
	catcagcaag gccagaggcc agccactgga acccaaggtg tacacaatgg gccctccaag	1140
	agaggaactg agcagcagat ccgtgtctct gacctgcatg atcaacggct tctaccccag	1200
	cgacatcagc gtggaatggg agaagaatgg caaggccgag gacaactaca agacaacccc	1260
	tgccgtgctg gatagcgacg gcagctactt cctgtacaac aagctgtccg tgcctaccag	1320
	cgaatggcag cggggagatg tgtttacctg cagcgtgatg cacgaggccc tgcacaacca	1380
	ctacaccag aagtccatca gcaggtcccc aggcaaatga gtttaaacgg gggaggctaa	1440
	ct	1442
	<210> 31	
	<211> 749	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成核苷酸	
	<400> 31	
[0027]	ccagcctccg gactctagag ccacatggt tctgcagaca caggtgttca tcagcctgct	60
	gctgtggatc tctggcgctt acggcgatat cgtgatgacc cagagccaca agttcatgag	120
	caccagcgtg ggcgacagag tgtccatcac ctgtaaagcc agccaggatg tgggctctgc	180
	cgctcgtgtg tatcagcaga agccaggcca ctctcctgac ctgctgatct actgggccag	240
	caccagacat accggcgtgc ccgatagatt cacaggctct ggcagcggca ccgacttcac	300
	actgacaatc ggcaacgtgc agagcgagga cctggccgat tacttctgcc agcagtacag	360
	cagctacccc gtgacatttg gcggaggcac caagctggaa atcaagaggg atcccgtggc	420
	tccctccgtg ctgctgtttc ctccaagcaa agaggaaactg accaccggca ccgccaccat	480
	tgtgtgtgtg gccacaagt tctaccccag cgacatcacc gtgacctgga aggtggacgg	540
	cacaacacag cagagcggca tcgagaacag caagaccct cagagccccg aggacaacac	600
	atacagcctg agcagcacc tgagcctgac aagcggccag tacaatagcc acagcgtgta	660
	cacatgcgag gtggtgcagg gaagcgctc tcctatcgtg cagtccttca acagaggcga	720
	ctgctgagtt taaacggggg aggctaact	749
	<210> 32	
	<211> 472	

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗GPR20抗体的重链

<400> 32

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

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

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

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

Lys Tyr Met Gly Phe Ile Asn Pro Gly Ser Gly His Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

[0028]

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Leu Arg Ile Ile Thr Lys
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0029]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 33

<211> 234

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗GPR20抗体的轻链

<400> 33

[0030]

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Thr Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

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

Val Ser Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Gly Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
100 105 110

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

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

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

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

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

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

[0031] Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 34
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CDH6抗体的重链

<400> 34

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

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

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

Thr Arg Asn Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

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

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

[0032]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0033]

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 35
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CDH6抗体的轻链

<400> 35

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

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

[0034]

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

Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

[0035]

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

SEQ ID NO: 15-小鼠抗体1A3的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLVAAPRWVLSEVKLVESGGGLVQPGGSRK
LSCAASGFTFSDYGMVWIRQAPGRGLEWVAYISSGSSA
IYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMNSLRSEDSAMYF
CARPPRYDVYSAWFAYWGQGT LVT VSAAKTTPPSVYPL
APGCGDTTGSSVTSGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSS
VHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHP
ASSTTVDDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEG
GPSVFI FPPNIKDVLMI SLTPKVT CVVVDVSEDDPDVQ
ISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHGD
WMSGKEFKCKVNNKDLPSP IERTISKIKGLVRAPQVYT
LPPPAEQLSRKDVSLTCLVVG FNP GD ISVEWTSNGHTE
ENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLN MKTSKWEKTDSFSCN
VRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

信号序列(1-19)、重链可变区(20-141)、重链恒定区(142-477)

图 1

SEQ ID NO: 16-小鼠抗体1A3的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVS
ITCKASQDVGS AVVWYQQKPGHSPDLLIYWASTRHTGVPD
RFTGSGSGTDFTLTIGNVQSEDLADYFCQQYSSYPVTFGG
GTKLEIKRADAAPTVSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT
LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

信号序列(1-20)、轻链可变区(21-127)、轻链恒定区(128-234)

图 2

SEQ ID NO: 17-编码小鼠抗体1A3的重链可变区的氨基酸序列
的核苷酸序列

```
a t g g a c t c c a g g c t c a a t t t a g t t t t c c t t g t c c t t a t  
t t t a a a a g g t g t c c a g t g t G A G G T G A A G C T G G T G G A G T  
C T G G G G G A G G C T T A G T G C A G C C T G G A G G G T C C C G G A A A  
C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C A C T T T C A G T G A C T A  
C G G A A T G G T G T G G A T T C G A C A G G C T C C A G G G A G G G G G C  
T G G A G T G G G T T G C A T A C A T T A G T A G T G G C A G T A G T G C C  
A T C T A C T A T G C A G A C A C A G T G A A A G G C C G A T T C A C C A T  
C T C C A G A G A C A A T C C C A A G A A C A C C C T G T T C C T G C A A A  
T G A A C A G T C T A A G G T C T G A G G A C T C G G C C A T G T A T T T C  
T G T G C A A G G C C C C C C G T T A T G A T G T T T A C T C T G C C T G  
G T T T G C T T A C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T  
C T G C A g c c a a a a c a a c a c c c c c a t c a g t c t a t c c a c t g  
g c c c c t g g g t g t g g a g a t a c a a c t g g t t c c t c c g t g a c  
t c t g g g a t g c
```

信号序列 (1-57)、重链可变区 (58-423)

图 3

SEQ ID NO: 18-编码小鼠抗体1A3的轻链可变区的氨基酸序列的核苷酸序列

```
atggagacacattctcagggtctttgtatacatgttgct  
gtggttggtctgatgttgaagggaGACATTGTGATGACCC  
AGTCTCACAAATTTCATGTCCACATCTGTAGGAGACAGG  
GTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTAG  
TGCTGTAGTCTGGTATCAACAGAAACCTGGGGCACTCTC  
CTGACCTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGGCACACT  
GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGAC  
AGATTTTCACGCTCACCATTTGGCAATGTGCAGTCTGAAG  
ACTTGGCAGATTATTTCTGTTCAGCAATATAGCAGCTAT  
CCTGTTCACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA  
Acggggctgatgctgcaccaactgtatccatcttccac  
catccagtgagcagttaacatctggagggtgcctcagtc  
gtg
```

信号序列(1-60)、轻链可变区(61-381)

图 4

SEQ ID NO: 19-兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列

```
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVKLVESGGGLVQPGGSRKLS  
CAASGFTFSDYGMVWIRQAPGRGLEWVAYISSGSSAIYYA  
DTVKGRTISRDNPKNTLFLQMNSLRSEDSAMYFCARPPR  
YDVYSAWFAYWGQGLVTVSAGQPKAPSVFPLAPCCGDTP  
SSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQS  
SGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPST  
CSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
VDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQFNSTIRVV  
STLPITHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQP  
LEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEK  
NGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVF  
TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
```

信号序列(1-19)、重链可变区(20-141)、重链恒定区(142-464)

图 5

SEQ ID NO: 20-兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVS
ITCKASQDVGSAAVVWYQQKPGHSPDLLIWASTRHTGVDP
RFTGSGSGTDFTLTIGNVQSEDLADYFCQQYSSYPVTFGG
GTKLEIKRDPVAPSVLLFPPSKEELTTGTATIVCVANKFY
PSDITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQSPEDNTYSLSSSTLS
L TSAQYN SHSVYTCEVVQGSASPIVQSFNRGDC

信号序列(1-20)、轻链可变区(21-127)、轻链恒定区(128-233)

图 6

SEQ ID NO: 21-抗HER2抗体的重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 7

SEQ ID NO: 22-抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 8

SEQ ID NO: 23-抗HER3抗体的重链的氨基酸序列

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR
QPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 9

SEQ ID NO: 24-抗HER3抗体的轻链的氨基酸序列

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNY
LAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 10

SEQ ID NO: 25-抗TROP2抗体的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINTHSGV
PKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYY
CARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19)、可变区(20-140)、恒定区(141-470)

图 11

SEQ ID NO: 26-抗TROP2抗体的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYT
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYIT
PLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

信号序列(1-20)、可变区(21-129)、恒定区(130-234)

图 12

SEQ ID NO: 27-抗B7-H3抗体的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVK
VSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYND
VKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARWGYYGSPLYYFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19)、可变区(20-141)、恒定区(142-471)

图 13

SEQ ID NO: 28-抗B7-H3抗体的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASSRLIYMHYQQKPGQAPRPLIYATSNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWNSNP
PTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

信号序列(1-20)、可变区(21-128)、恒定区(129-233)

图 14

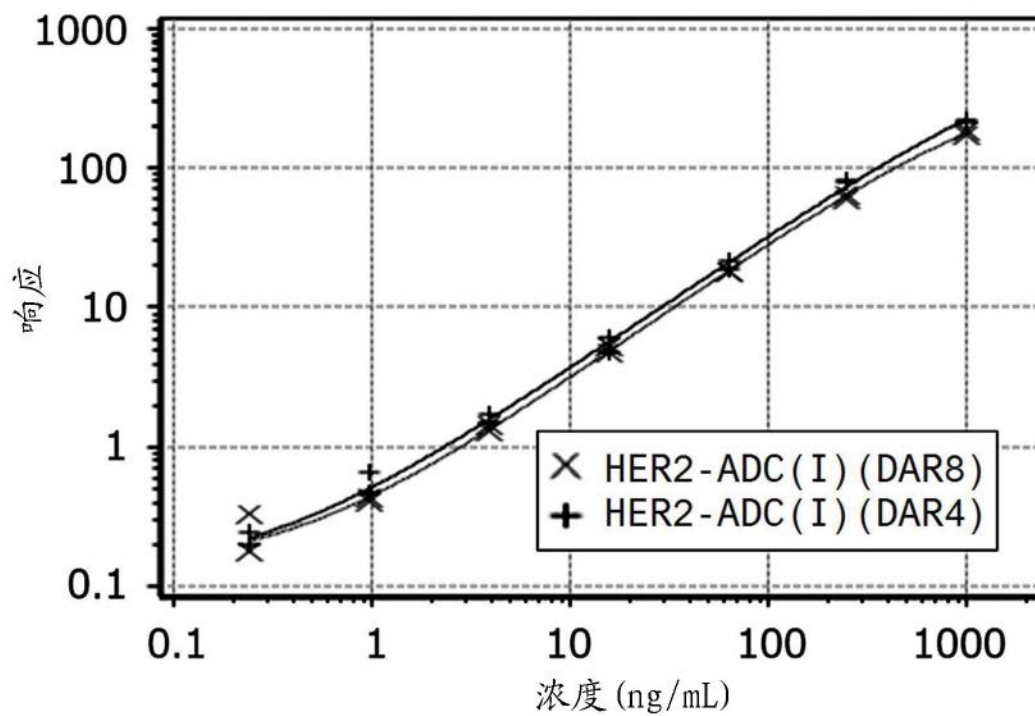


图 15

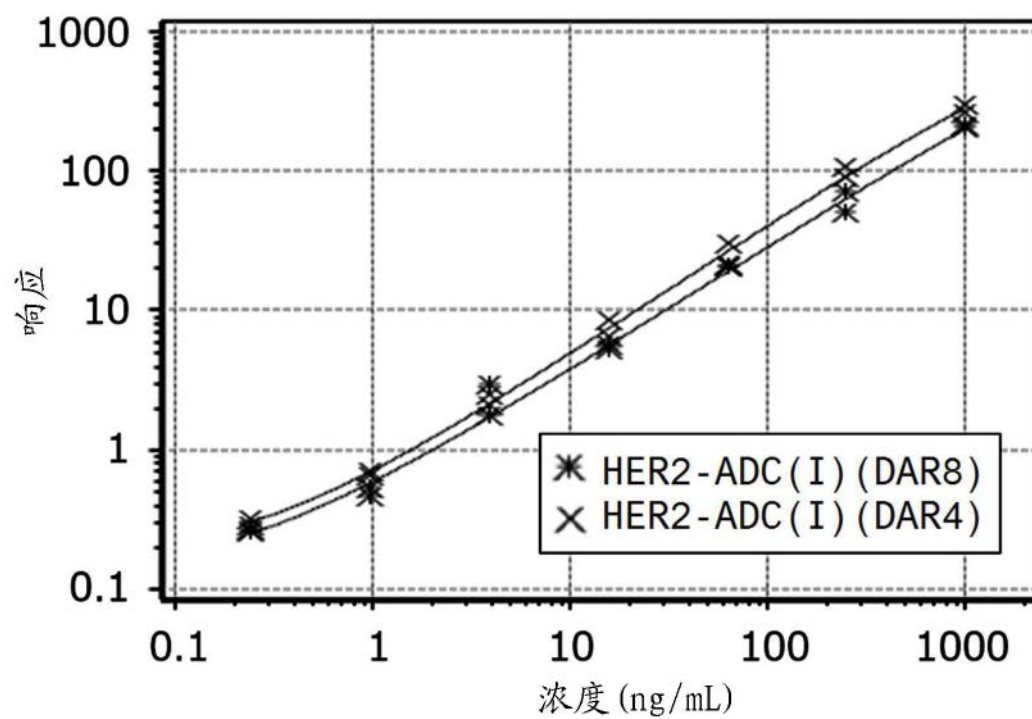


图 16

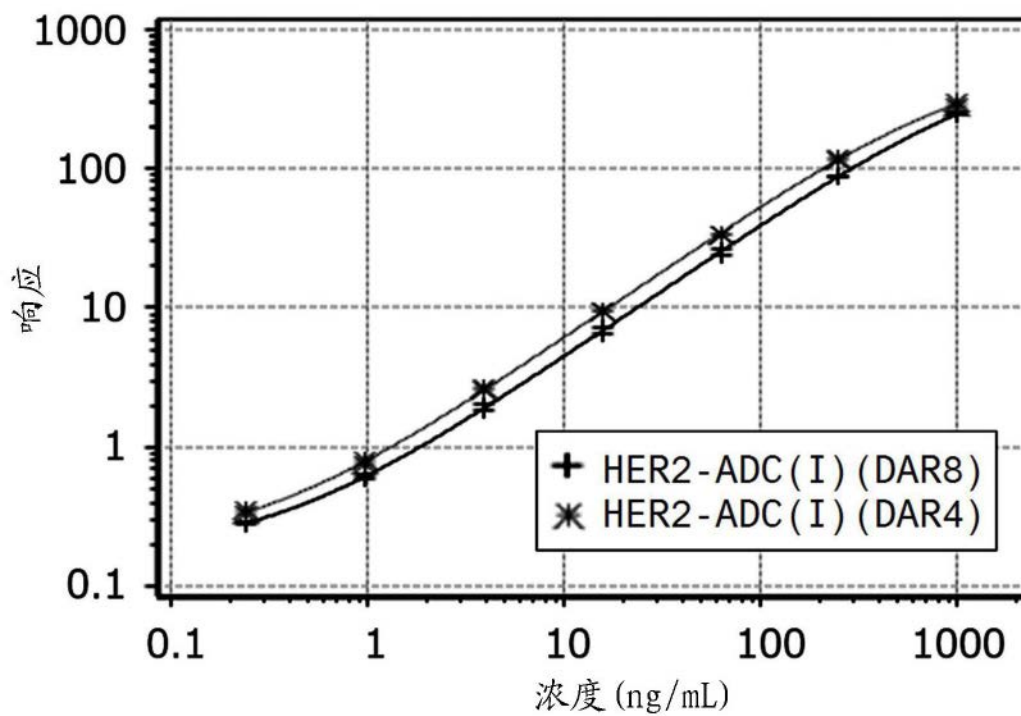


图 17

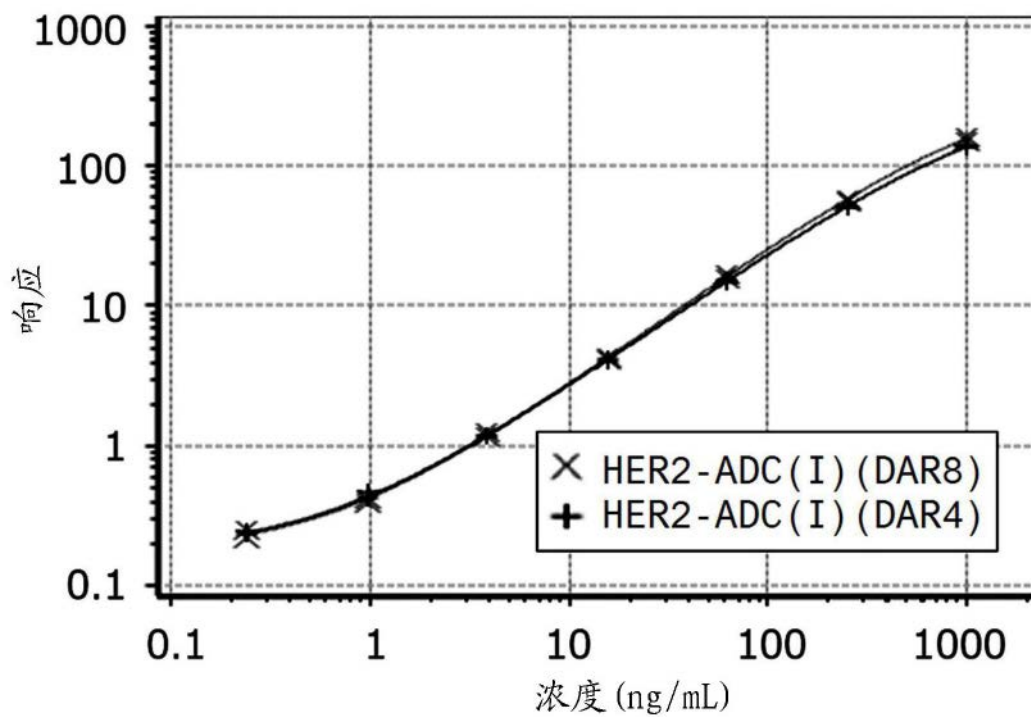


图 18

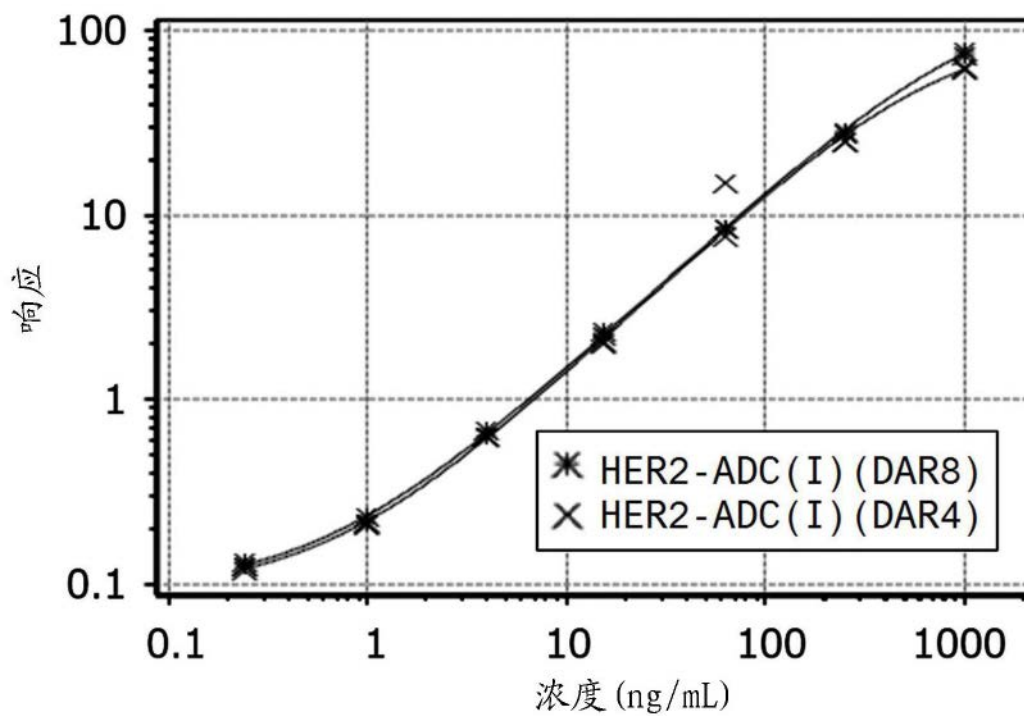


图 19

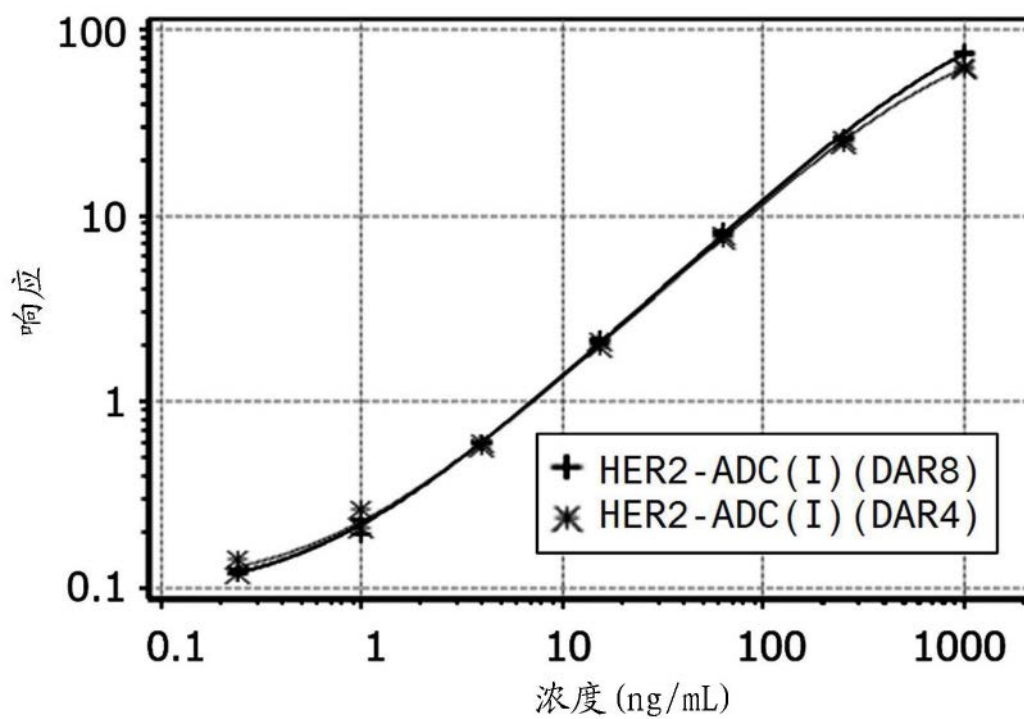


图 20

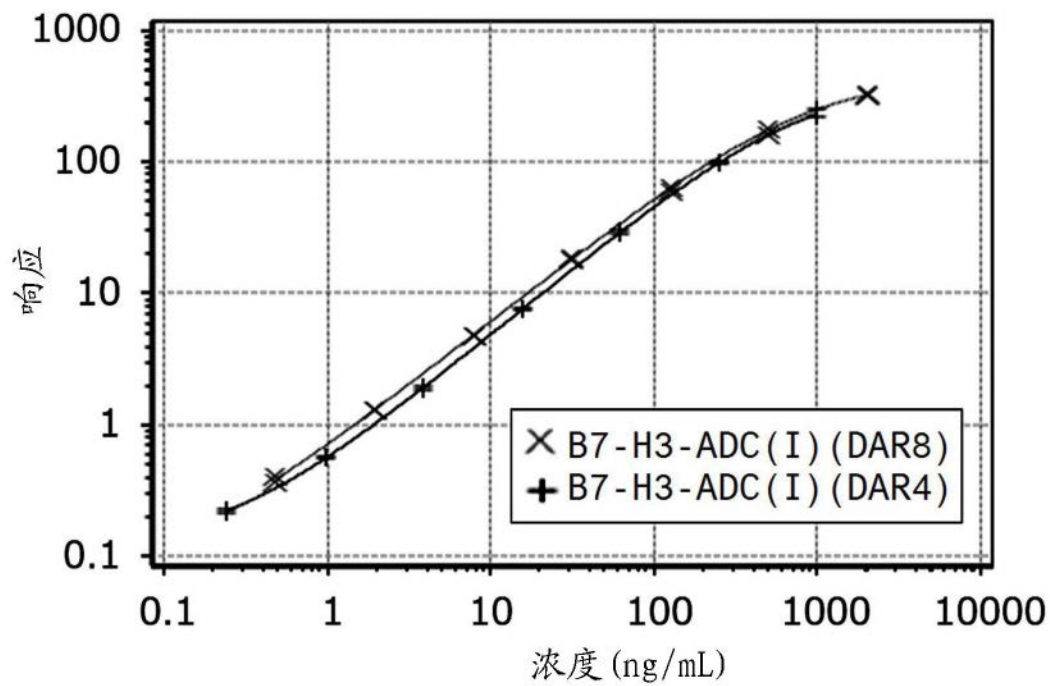


图 21

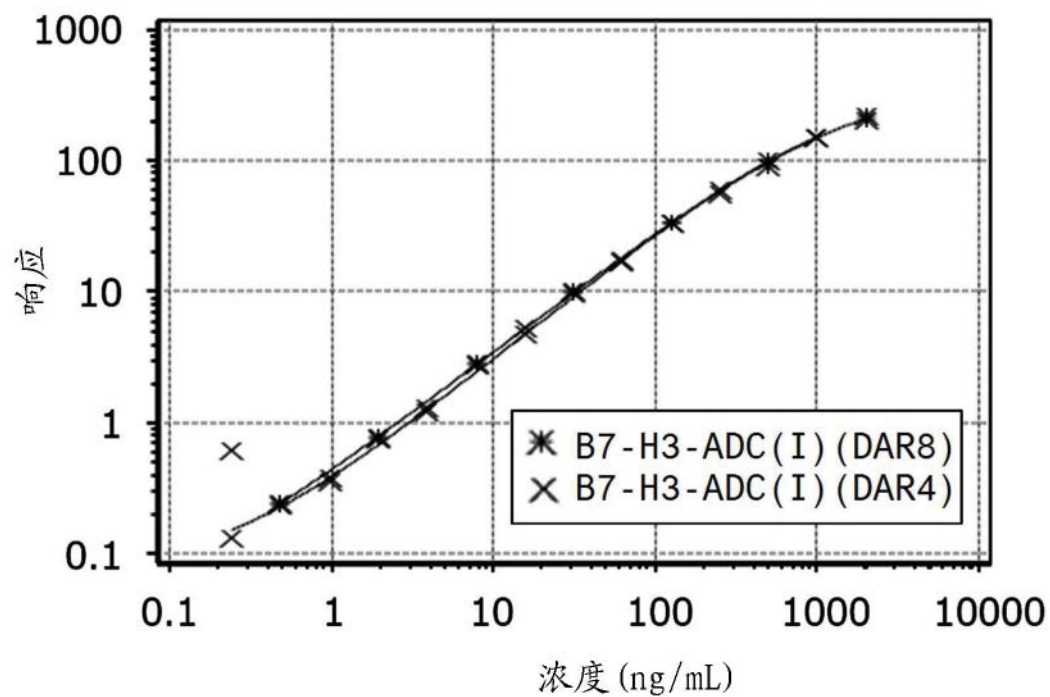


图 22

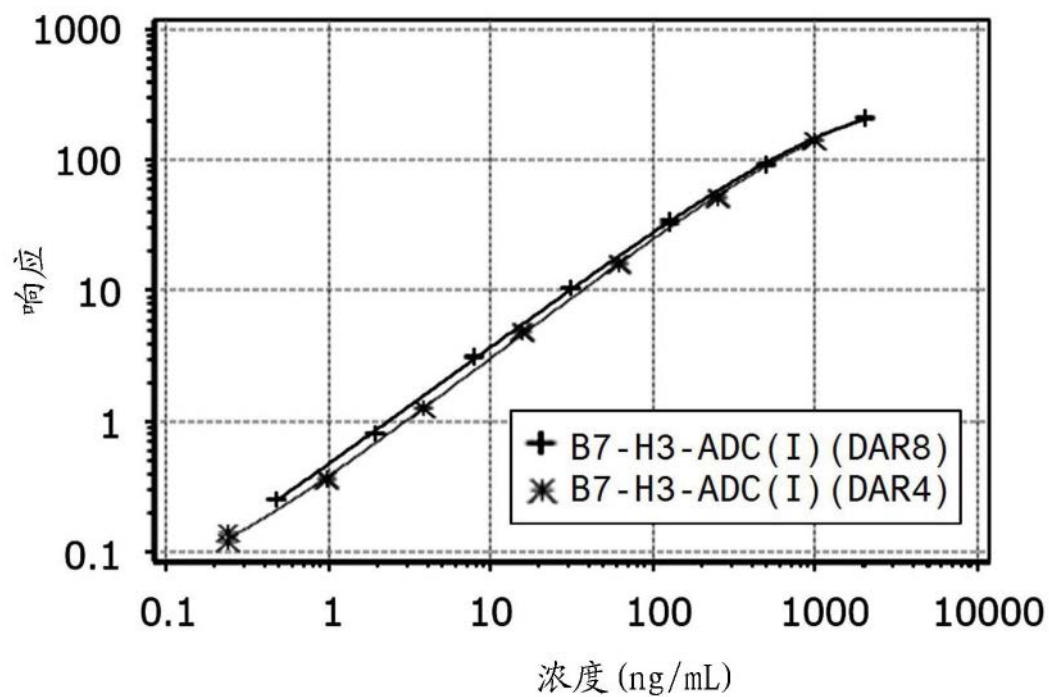


图 23

标准曲线图

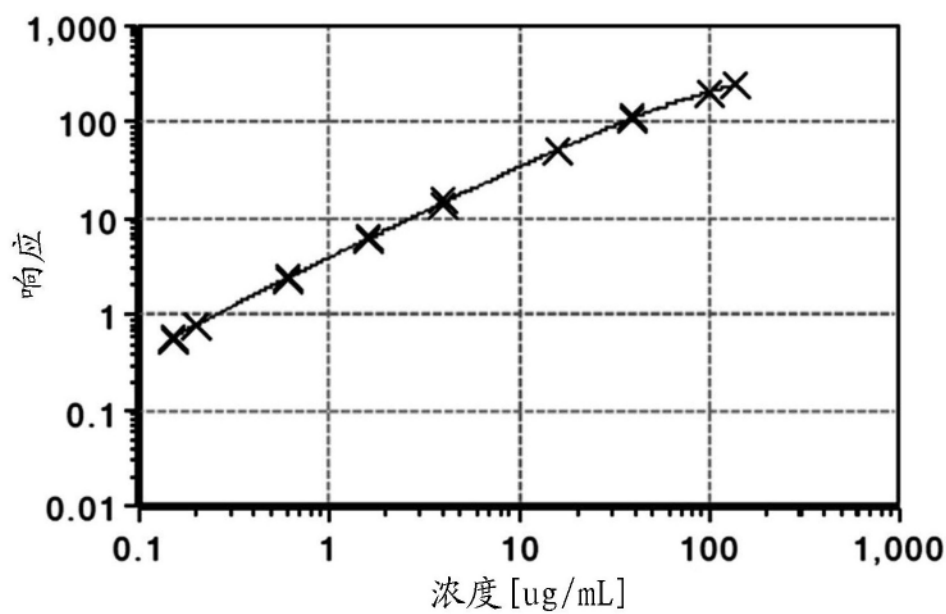


图 24

标准曲线图

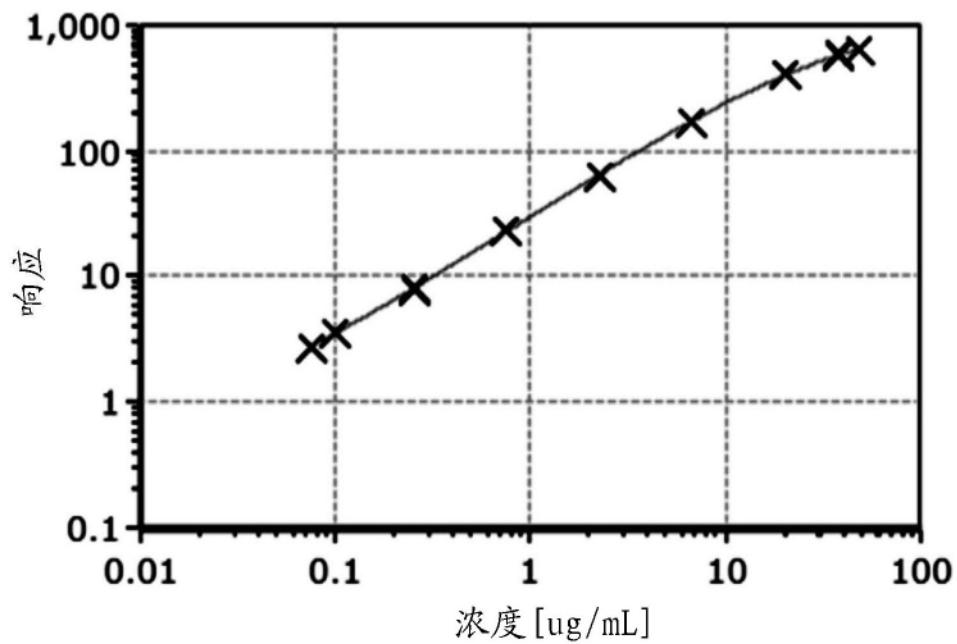


图 25

标准曲线图

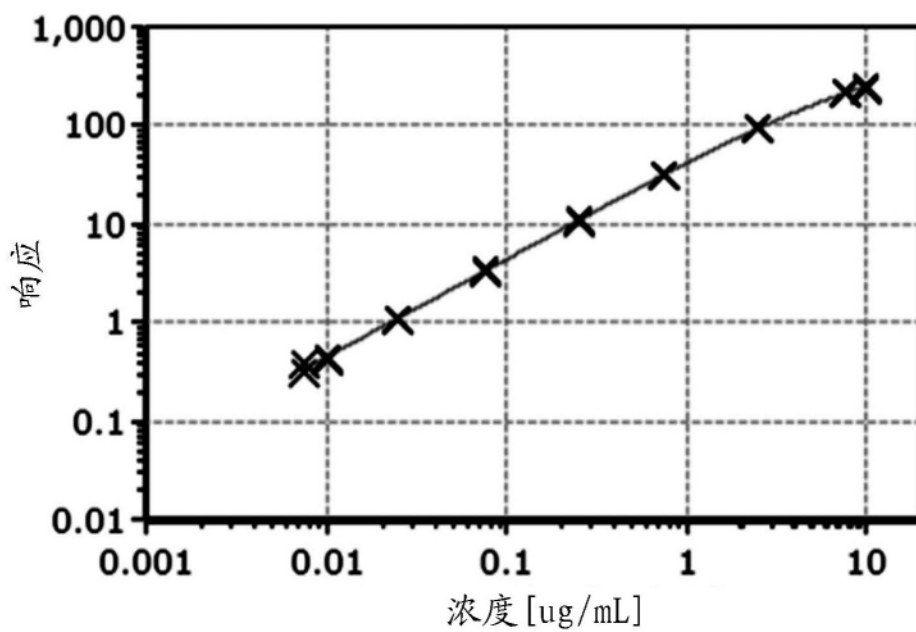


图 26

标准曲线图

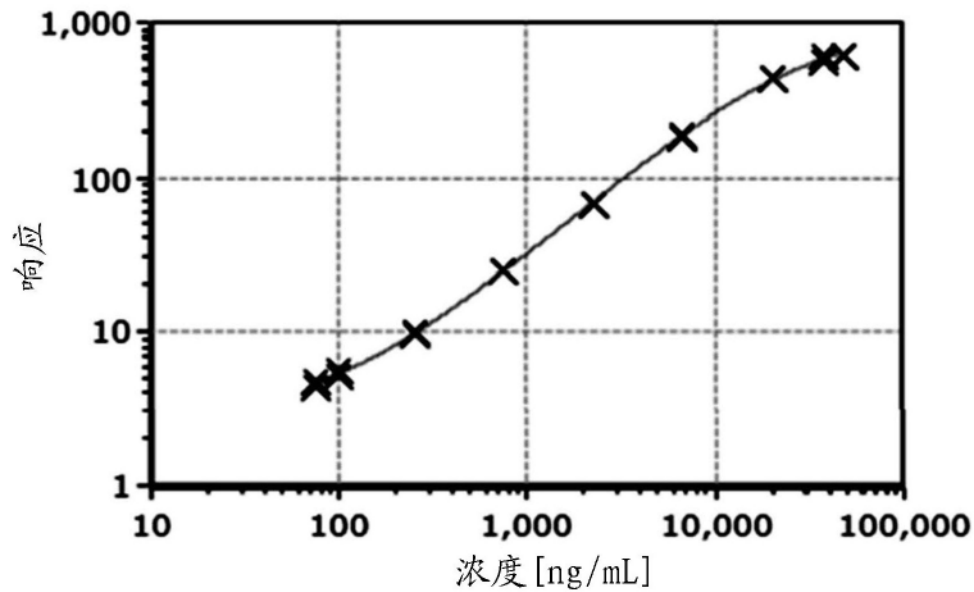


图 27

SEQ ID NO: 29-编码人轻链信号序列和人κ链恒定区的氨基酸序列的核苷酸序列

```

g c c t c c g g a c t c t a g a g c c a c c A T G G T G C T G C A G A C C C
A G G T G T T C A T C T C C C T G C T G C T G T G G A T C T C C G G C G C G
T A C G G C G A T A T C G T G A T G A T T A A A C G T A C G G T G G C C G C
C C C C T C C G T G T T C A T C T T C C C C C C C T C C G A C G A G C A G C
T G A A G T C C G G C A C C G C C T C C G T G G T G T G C C T G C T G A A T
A A C T T C T A C C C C A G A G A G G C C A A G G T G C A G T G G A A G G T
G G A C A A C G C C C T G C A G T C C G G G A A C T C C C A G G A G A G C G
T G A C C G A G C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T G
A G C A G C A C C C T G A C C C T G A G C A A A G C C G A C T A C G A G A A
G C A C A A G G T G T A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C A G G G C C
T G A G C T C C C C C G T C A C C A A G A G C T T C A A C A G G G G G G A G
T G T T A G g g g c c c g t t t a a a c g g g g g a g g c t a

```

信号序列 (23-82)、轻链恒定区 (107-421)

图 28

SEQ ID NO: 30-编码兔嵌合抗体1A3的重链的氨基酸序列的核苷酸序列

```
ccagcctccggactctagagccaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTTC
TGCTGCTGGTGGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCTGAAGTGAAGCTG
GTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGCTCTAGAAAGCT
GAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTTAGCGATTACGGCATGGTCT
GGATCCGGGCAGGCTCCTGGAAGAGGCCTTGAGTGGGTGCGCTACATC
AGCTCTGGAAGCAGCGCCATCTACTACGCCGACACCGTGAAGGGCAG
ATTACCATCAGCCGGGACAACCCCAAGAATACCCTGTTCTCCTGCAGA
TGAACAGCCTGCGGAGCGAGGACTCCGCCATGTACTTTTGTGCCCGG
CCTCCTAGATACGACGTGTACAGCGCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCA
GGGCACACTGGTTACAGTTTCTGCCGGACAGCCCAAGGCTCCCTCCG
TTTTTCCACTGGCTCCCTGCTGTGGCGATACCCCTAGCTCTACAGTG
ACCCTGGGCTGTCTGGTCAAGGGCTATCTGCCTGAGCCTGTGACCGT
GACCTGGAATAGCGGCACCCTGACCAACGGCGTGCGGACATTTCTTA
GCGTCAGACAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTGTCT
GTGACCAGCAGCTCTCAGCCAGTGACCTGCAATGTGGCCCATCCTGC
CACCAACACCAAGGTGGACAAAACCGTGGCTCCCAGCACCTGTAGCA
AGCCACATGTCTCTCCACCTGAGCTGCTCGGAGGCCCCAGCGTGTTCT
ATCTTTCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGATGATCCCGAGG
TGCAGTTCACCTGGTACATCAACAACGAGCAAGTGCGGACCGCCAGA
CCTCCTCTGAGAGAGCAGCAGTTCAACAGCACCATCAGAGTGGTGTC
CACACTGCCCATCACACACCAGGATTGGCTGCGGGGGCAAAGAATTCA
AGTGCAAGGTGCACAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACC
ATCAGCAAGGCCAGAGGCCAGCCACTGGAACCCAAGGTGTACACAAT
GGGCCCTCCAAGAGAGGAACTGAGCAGCAGATCCGTGTCTCTGACCT
GCATGATCAACGGCTTCTACCCCAGCGACATCAGCGTGGAATGGGAG
AAGAATGGCAAGGCCGAGGACAACCTACAAGACAACCCCTGCCGTGCT
GGATAGCGACGGCAGCTACTTCCTGTACAACAAGCTGTCCGTGCCTA
CCAGCGAATGGCAGCGGGGAGATGTGTTTACCTGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCAGCAGGTCCCC
AGGCAAAtgagtttaaaccgggggaggctaact
```

信号序列(26-82)、重链可变区(83-448)、重链恒定区(449-1417)

图 29

SEQ ID NO: 31-编码兔嵌合抗体1A3的轻链的氨基酸序列的核苷酸序列

```
ccagcctccggactctagagccaccATGGTTCTGCAGACACAGGTGT  
TCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCTCTGGCGCCTACGGCGATATCGTG  
ATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACAGAGT  
GTCCATCACCTGTAAAGCCAGCCAGGATGTGGGCTCTGCCGTCTGTGT  
GGTATCAGCAGAAGCCAGGCCACTCTCCTGACCTGCTGATCTACTGG  
GCCAGCACCAGACATACCGGCGTGCCCGATAGATTACAGGCTCTGG  
CAGCGGCACCGACTTCACACTGACAATCGGCAACGTGCAGAGCGAGG  
ACCTGGCCGATTACTTCTGCCAGCAGTACAGCAGCTACCCCGTGACA  
TTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGAGGGATCCCGTGGCTCC  
CTCCGTGCTGCTGTTTCTCCAAGCAAAGAGGAACTGACCACCGGCA  
CCGCCACCATTTGTGTGTGTGGCCAACAAGTTCTACCCAGCGACATC  
ACCGTGACCTGGAAGGTGGACGGCACAACACAGCAGAGCGGCATCGA  
GAACAGCAAGACCCCTCAGAGCCCCGAGGACAACACATACAGCCTGA  
GCAGCACCTGAGCCTGACAAGCGCCCAGTACAATAGCCACAGCGTG  
TACACATGCGAGGTGGTGCAGGGAAGCGCCTCTCCTATCGTGCAAGTC  
CTTCAACAGAGGCGACTGCTgaggtttaaacgggggaggctaact
```

信号序列 (26-85)、轻链可变区 (86-406)、轻链恒定区 (407-724)

图 30

SEQ ID NO: 32-抗GPR20抗体的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTSYYSWIRQAPGQGLKYMGINPGSGH
TNYNEKFKGRVTITADKSSSTATMELSSLRSED TAVYY
CARGAGGFLRIITKFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19)、可变区(20-142)、恒定区(143-472)

图 31

SEQ ID NO: 33-抗GPR20抗体的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDTQLTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASKSVSTYIHWYQQKPGKQPKLLIYSAGNLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYCQQINEL
PYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

信号序列(1-20)、可变区(21-129)、恒定区(130-234)

图 32

SEQ ID NO: 34-抗CDH6抗体的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE
TEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYY
CARGVYGGFAGGYFDFWQGQGLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19)、可变区(20-141)、恒定区(142-471)

图 33

SEQ ID NO: 35-抗CDH6抗体的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQT
GVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSG
WAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

信号序列(1-20)、可变区(21-128)、恒定区(129-233)

图 34

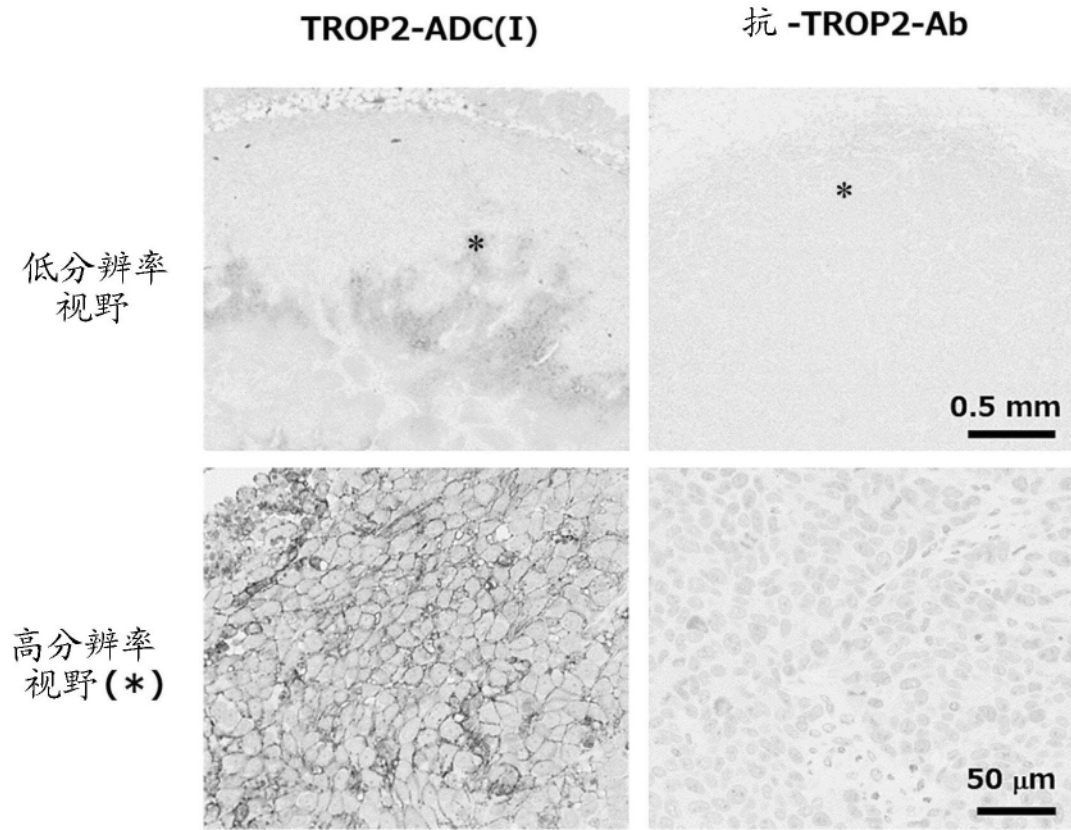


图 35

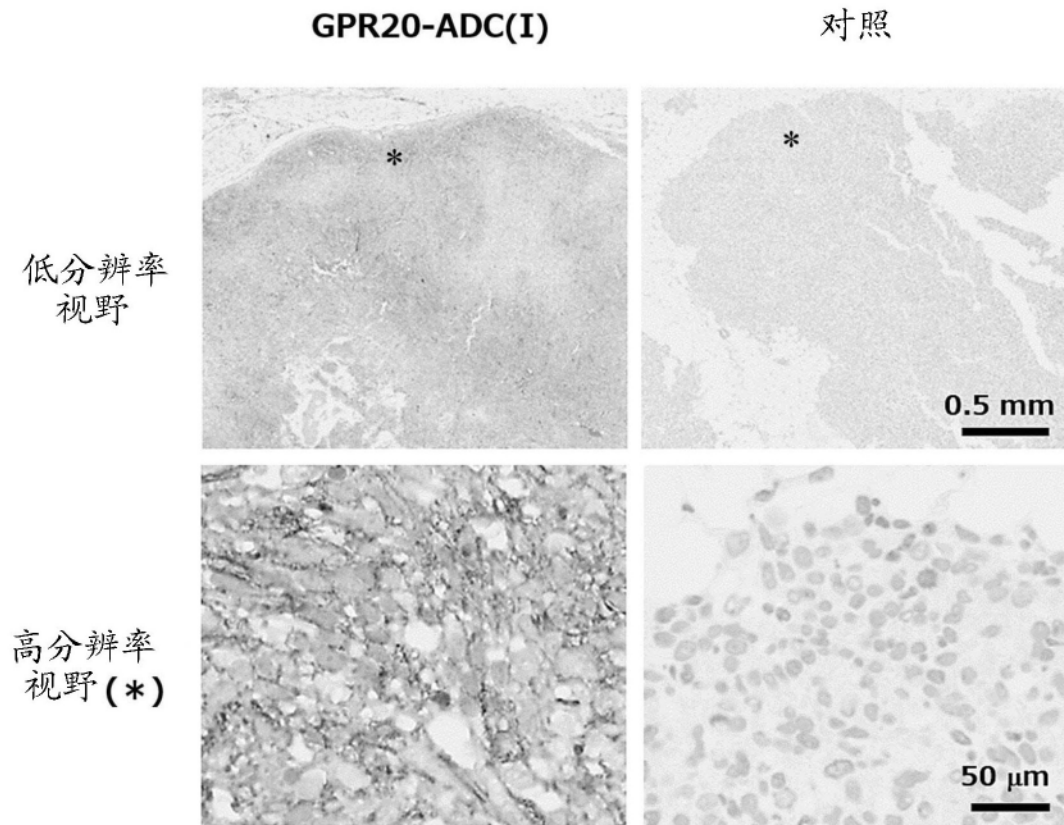


图 36

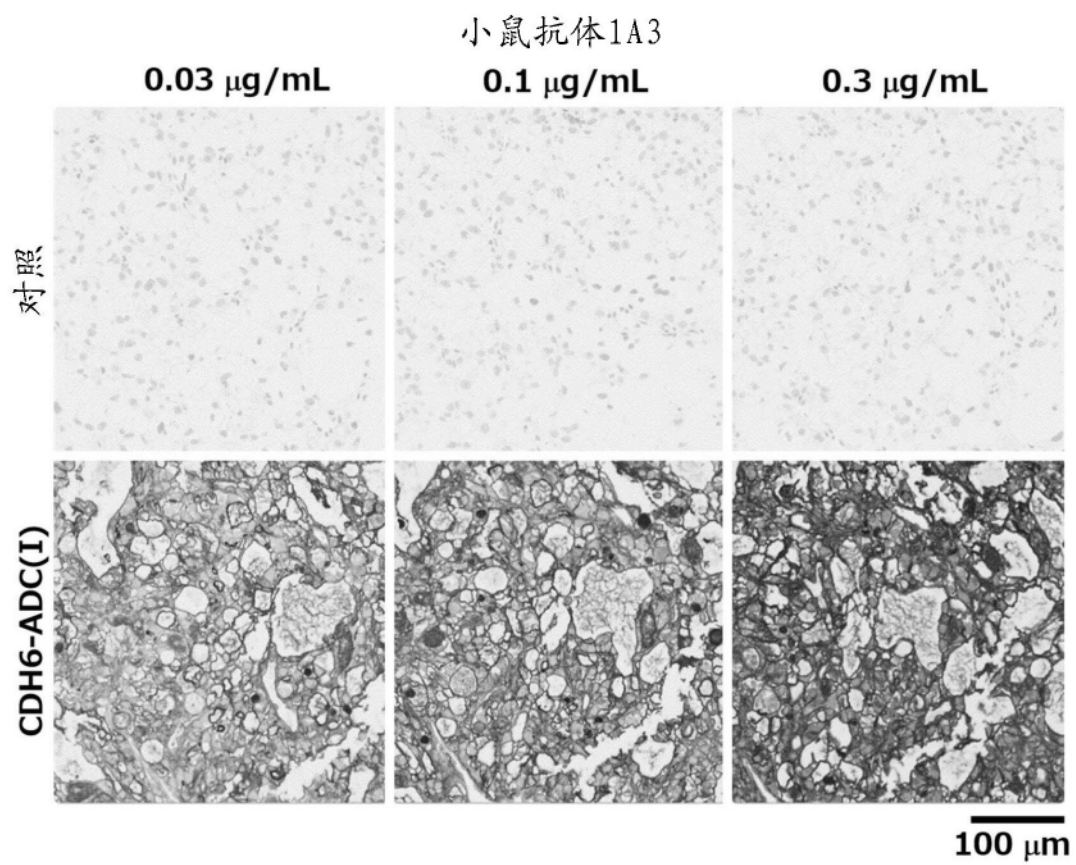


图 37

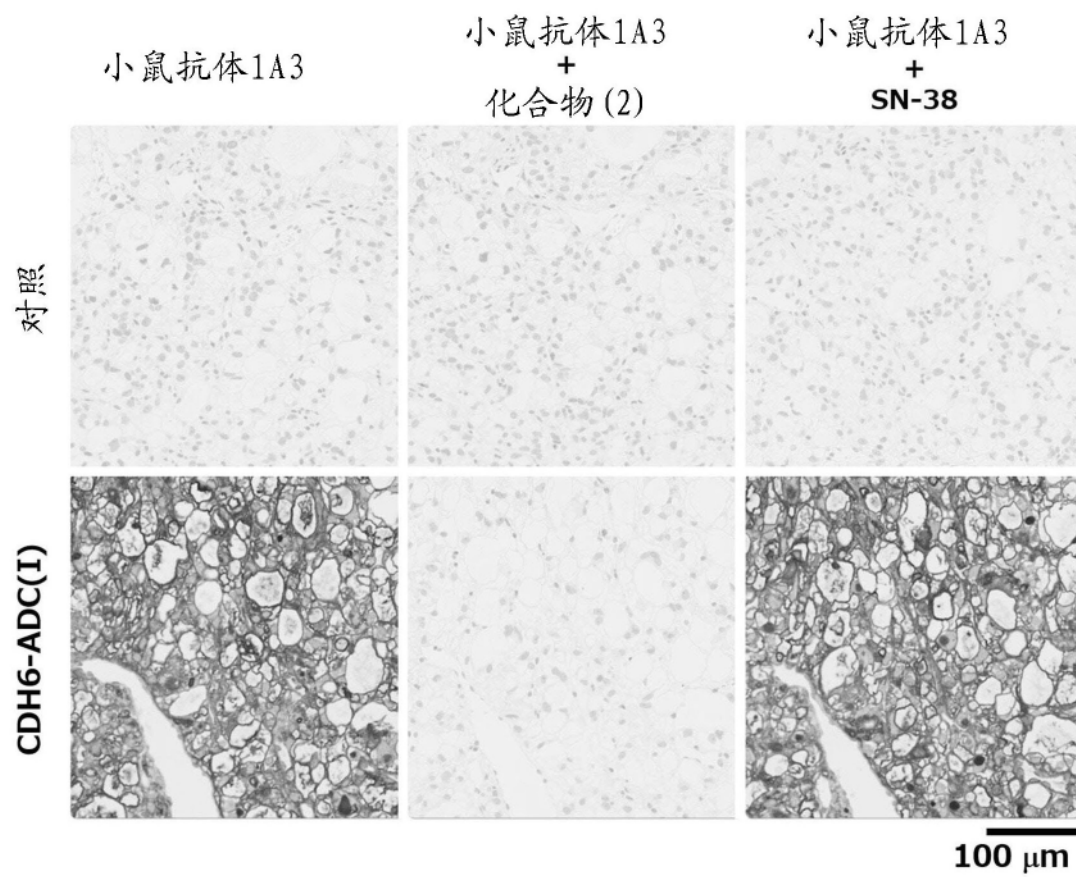


图 38

标准曲线图

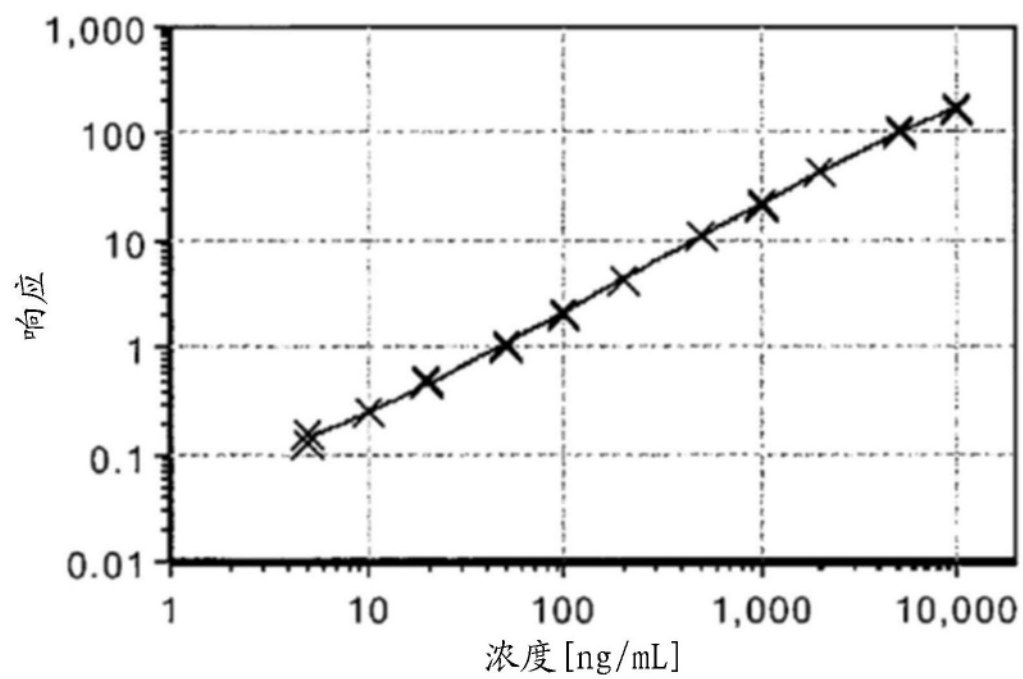


图 39

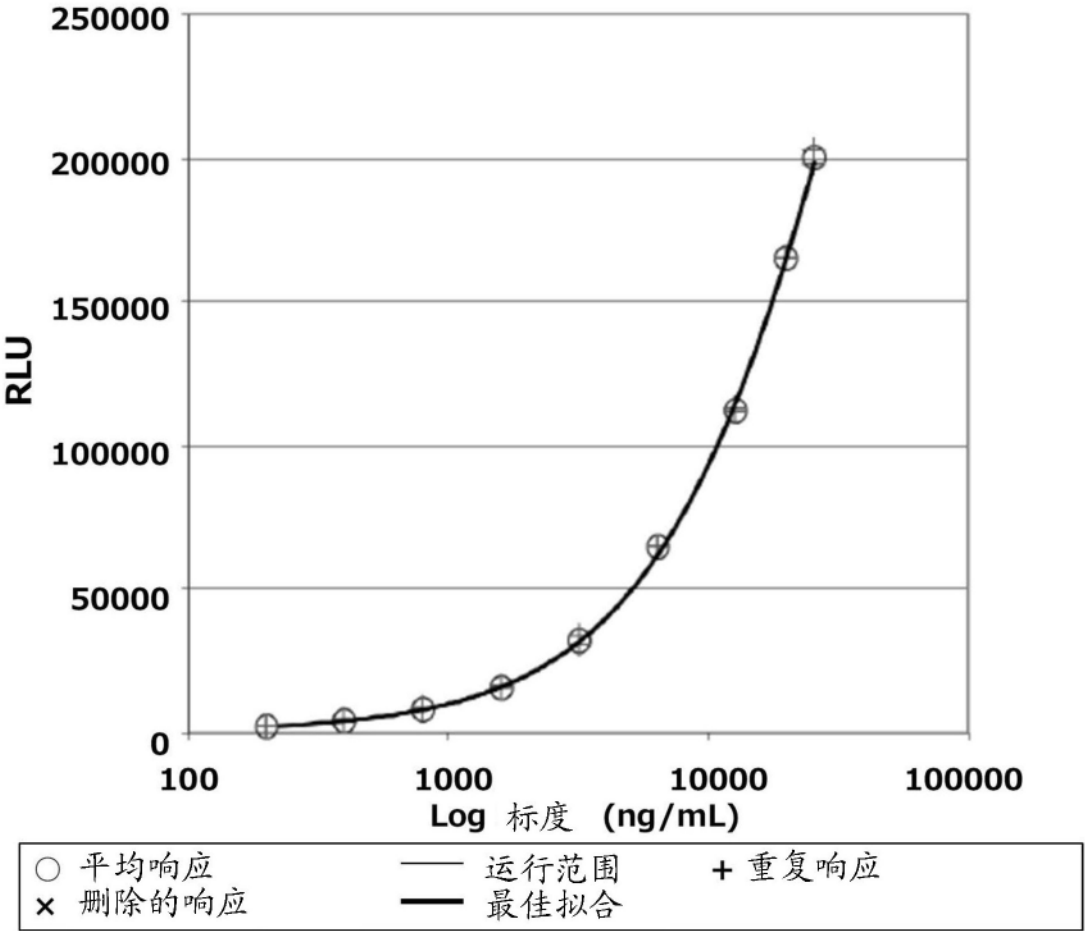


图 40

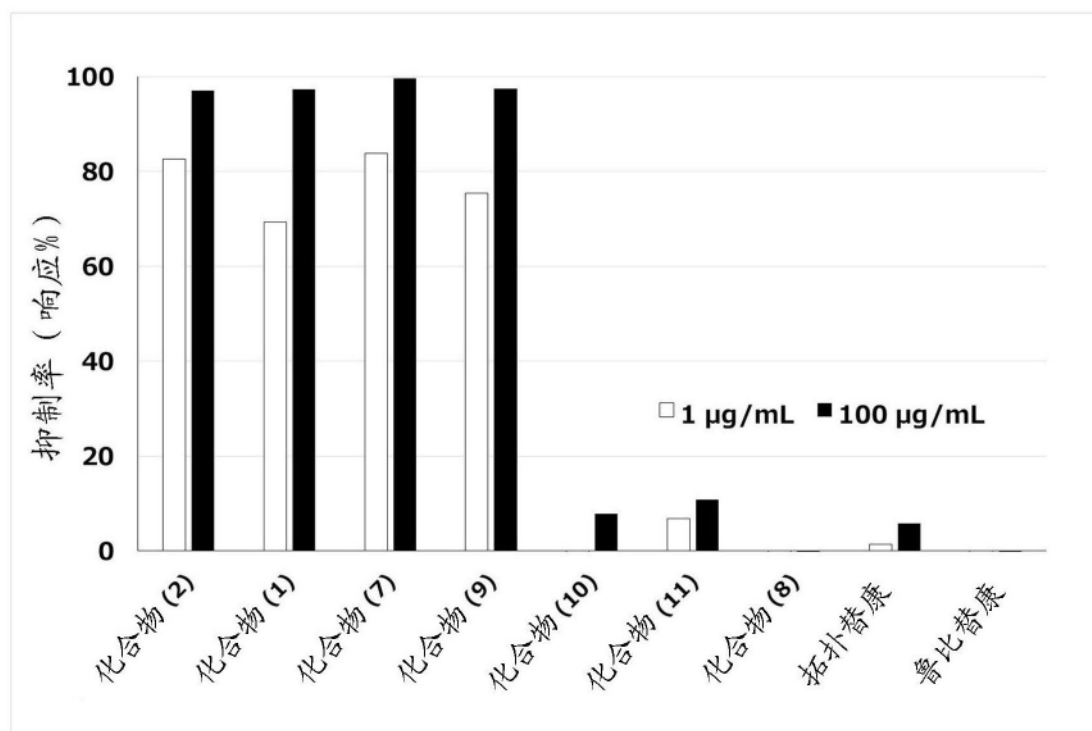


图 41