



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111263770 A

(43)申请公布日 2020.06.09

(21)申请号 201880068759.X

(22)申请日 2018.09.10

(30)优先权数据

62/557,870 2017.09.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2018/051108 2018.09.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/051586 EN 2019.03.21

(71)申请人 加拿大国家研究委员会

地址 加拿大安大略

(72)发明人 K·亨利 M·L·贾拉米洛

C·R·麦肯齐 A·马西尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 陈晓娜

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/68(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 7/01(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书5页 说明书60页

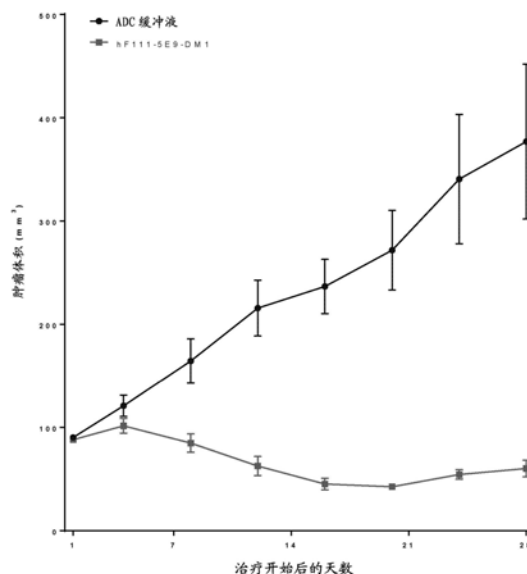
序列表72页 附图19页

(54)发明名称

AXL-特异性抗体及其用途

(57)摘要

描述了AXL-特异性抗体及其用途,所述抗体包括单克隆抗体和单结构域抗体。此类抗体在AXL胞外结构域的免疫球蛋白样(IgL)结构域中的表位处与细胞表面表达的人AXL结合。所述抗体可以用于抗体-药物缀合物(ADC),例如用于癌症的治疗、检测或分期。所述抗体可以是双互补位的。



1. 一种分离的或纯化的抗体,其特异性地结合人AXL胞外结构域(ECD)的免疫球蛋白样(IgL)结构域中的表位。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述AXL ECD具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列。
3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述表位位于AXL的IgL1或IgL2中。
4. 根据权利要求1所述的抗体,其能够内在化到表达AXL的肿瘤细胞中。
5. 根据权利要求1所述的抗体,其是单结构域抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双互补位抗体、双特异性抗体、或其结合AXL的抗体片段。
6. 根据权利要求5所述的抗体,其中所述嵌合抗体包含来自人IgG1的框架区。
7. 根据权利要求6所述的抗体,其中所述嵌合抗体包含来自人 κ 轻链和人IgG重链的框架区。
8. 根据权利要求1所述的抗体,其包含来自IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的框架区。
9. 根据权利要求1所述的抗体,其包含全长IgG、Fv、scFv、Fab、或F(ab')₂、VHH、VL或VH。
10. 根据权利要求1所述的抗体,其具有的针对人AXL胞外结构域的平衡解离常数(K_D) $\leq$ 50nM。
11. 根据权利要求1所述的抗体,其中和AXL ECD的IgL结构域中的表位的结合不与生长停滞-特异性6(Gas6)配体和AXL的结合竞争。
12. 一种抗体或其片段,包含选自由下列各项组成的组的可变轻链(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列:
SEQ ID NO:98、99和100;
SEQ ID NO:92、93和94;
SEQ ID NO:110、111和112;
SEQ ID NO:86、87和88;
SEQ ID NO:80、81和82;
SEQ ID NO:104、105和106;
SEQ ID NO:116、117和118;以及
与它们基本上相同的序列。
13. 一种抗体或其片段,包含选自由下列各项组成的组的可变轻链(VL)序列:
SEQ ID NO:38;
SEQ ID NO:40;
SEQ ID NO:42;
SEQ ID NO:44;
SEQ ID NO:46;
SEQ ID NO:74;
SEQ ID NO:76;以及
与它们基本上相同的序列。
14. 一种抗体或其片段,包含选自由下列各项组成的组的可变重链(VH)CDR1、CDR2和CDR3序列:
SEQ ID NO:95、96和97;
SEQ ID NO:89、90和91;

SEQ ID NO:107、108和109;
SEQ ID NO:83、84和85;
SEQ ID NO:77、78和79;
SEQ ID NO:101、102和103;
SEQ ID NO:113、114和115;以及
与它们基本上相同的序列。

15. 一种抗体或其片段, 包含选自由下列各项组成的组的可变重链 (VH) 序列:

SEQ ID NO:39;
SEQ ID NO:41;
SEQ ID NO:43;
SEQ ID NO:45;
SEQ ID NO:47;
SEQ ID NO:73;
SEQ ID NO:75;以及
与它们基本上相同的序列。

16. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其片段, 包含选自由下列各项组成的组的可变重链 (VL) CDR1、CDR2和CDR3序列和 (VH) CDR1、CDR2和CDR3序列:

VL, SEQ ID NO:98-100; 和VH, SEQ ID NO:95-97;
VL, SEQ ID NO:92-94; 和VH, SEQ ID NO:89-91;
VL, SEQ ID NO:110-112; 和VH, SEQ ID NO:107-109;
VL, SEQ ID NO:86-88; 和VH, SEQ ID NO:83-85;
VL, SEQ ID NO:80-82; 和VH, SEQ ID NO:77-79;
VL, SEQ ID NO:104-106; 和VH, SEQ ID NO:101-103;
VL, SEQ ID NO:116-118; 和VH, SEQ ID NO:113-115; 以及
与它们基本上相同的序列。

17. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体或其片段, 包含选自由下列各项组成的组的单结构域 (sd) 重链可变 (VHH) 结构域CDR1、CDR2、和CDR3序列:

SEQ ID NO:127、128和129;
SEQ ID NO:130、131和132;
SEQ ID NO:133、134和135;
SEQ ID NO:136、137和138;
SEQ ID NO:139、140和141;
SEQ ID NO:142、143和144;
SEQ ID NO:145、146和147;
SEQ ID NO:148、149和150; 以及
与它们基本上相同的序列。

18. 一种抗体或其片段, 包含选自由下列各项组成的组的单结构域 (sd) 重链可变 (VHH) 结构域序列:

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSFDIMGWYRQAPGKQRELVAAITTLDIANYRDSVKGRFTISR

NAKNTVYLQMDSLKPEDTARYHCAAFQSDQNYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:119) ;

QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSAVMAWFRQAPEKVRDFVGFITNSGNILYDDSVKGRFTISRDN
AQNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAKWSFSSGYGDLRRAAMYDYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:120) ;

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDTYAIGWFRQAPGKERELVAAITSGGNTDYAESAKGRFRISRDN
SKNTIYLMNSLKPEDTGYYCAARRGGARGEYDWDQGTQVTVSS (SEQ ID NO:121) ;

QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAFSRGAFDTYEIGWFRQAPGKEREFVAAVTRNGDSVVYADSLKARFTASRN
NAVNTAYLHMNILQPEDTATYYCAANWRPLRTSSGADDYADWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:122) ;

QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAASGSISSINTIGWFRQAPGKQRELVAASDSGANRNYADSVKGRFTISRDN
NAKNTVYLQMNNLKPEDTAIYYCRAWGTGTISTMYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:123) ;QVKLEESGGGLVQA
GASLRLSCVASESIFGFNTMGWYRQAPGNERELVASISNSKRTMYADSVKGRFTISRDNNAKNTVNLQMNNLKPEDT
AVYYCRAWGIITSATVYWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:124) ;QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSA
VMAWFRQAPEKERDFVGFISNSGSVYYDDSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRF
NTWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:125) ;

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSGMINTMGWYRQAPGKQRELVARRSTGGTTNYADSVKGRFTISRDN
DANNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO:126) ;以及

与它们基本上相同的序列。

19. 一种抗体或其片段,选自由下列各项组成的组:

SEQ ID NO:39的VH,和SEQ ID NO:38的VL;

SEQ ID NO:41的VH,和SEQ ID NO:40的VL;

SEQ ID NO:43的VH,和SEQ ID NO:42的VL;

SEQ ID NO:45的VH,和SEQ ID NO:44的VL;

SEQ ID NO:47的VH,和SEQ ID NO:46的VL;

SEQ ID NO:73的VH,和SEQ ID NO:74的VL;

SEQ ID NO:75的VH,和SEQ ID NO:76的VL;

SEQ ID NO:119的VHH;

SEQ ID NO:120的VHH;

SEQ ID NO:121的VHH;

SEQ ID NO:122的VHH;

SEQ ID NO:123的VHH;

SEQ ID NO:124的VHH;

SEQ ID NO:125的VHH;

SEQ ID NO:126的VHH;以及

与它们具有85%或更大同一性的序列。

20. 根据权利要求19所述的抗体或片段,其中所述序列同一性 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 或 $\geq 98\%$ 。

21. 根据权利要求1所述的抗体,其包含SEQ ID NO:1、2和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:3、4和5的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;其中所述抗体结合AXL的IgL1结构域中的表位,而不结合IgL2结构域中的表位。

22. 根据权利要求1所述的抗体,其包含SEQ ID NO:1、6和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序

列;和SEQ ID NO:7、8和5的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;其中所述抗体结合AXL的IgL1结构域中的表位,而不结合IgL2结构域中的表位。

23.根据权利要求1所述的抗体,其包含SEQ ID NO:9、10和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:12、13和14的重链CDR1、CDR2和CDR3序列。

24.根据权利要求1所述的抗体,其包含SEQ ID NO:15、16和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的抗体,其不与Gas6竞争和AXL的结合。

26.根据权利要求5所述的抗体,其中所述抗体是双互补位的并且包含sdAb001/005或sd Ab 001/006。

27.一种抗体药物缀合物(ADC),其包含与药物部分缀合的权利要求1-24中任一项所述的抗体。

28.根据权利要求27所述的抗体药物缀合物,其中所述药物部分是抗癌药物。

29.根据权利要求27所述的抗体药物缀合物,其中所述药物部分是DM1。

30.一种药物组合物,其包含权利要求22所述的ADC和药学上可接受的赋形剂。

31.一种融合蛋白,其包含权利要求1所述的抗体和人IgG1 Fc。

32.一种核酸分子,其编码权利要求1-24中任一项所述的抗体。

33.一种载体,其包含权利要求32所述的核酸分子。

34.一种宿主细胞,其包含权利要求33所述的载体。

35.根据权利要求34所述的宿主细胞,其是重组微生物宿主细胞或是哺乳动物细胞。

36.根据权利要求32或33所述的宿主细胞,其中所述细胞产生权利要求1所述的抗体。

37.一种杂交瘤或生物体,其产生权利要求1所述的抗体。

38.根据权利要求1-24中任一项所述的抗体,其中所述抗体被固定化至表面上。

39.根据权利要求1-24中任一项所述的抗体,其中所述抗体连接到货物分子。

40.根据权利要求39所述的抗体,其中所述货物分子是检测剂、治疗剂、药物、肽、酶、生长因子、细胞因子、受体陷阱、其抗体、化学化合物、碳水化合物部分、基于DNA的分子、细胞毒性剂或病毒载体。

41.根据权利要求39所述的抗体,其中所述货物分子的大小为约1kDa至约500kDa。

42.根据权利要求40所述的抗体,其中所述货物分子负载在一个或多个脂质体或纳米载体中。

43.根据权利要求42所述的抗体,其中所述纳米载体包括一个或多个纳米粒子、纳米线、纳米管或量子点。

44.根据权利要求40所述的抗体,其中所述病毒载体是腺病毒载体、慢病毒载体或逆转录病毒载体。

45.根据权利要求40所述的抗体,其中所述基于DNA的分子包括反义寡核苷酸、微小RNA、siRNA或质粒。

46.根据权利要求39-42中任一项所述的抗体,其中所述货物分子是细胞毒性剂。

47.一种体外检测AXL的方法,其包括:

a)使样品和与检测剂连接的权利要求1-24中任一项所述的一种或多种分离的或纯化的抗体接触;以及

- b) 检测与所述样品中的AXL结合的其抗体上所连接的所述检测剂。
48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述方法检测循环细胞中的AXL, 并且所述样品是血清样品。
49. 根据权利要求47或48所述的方法, 其中所述检测步骤使用光学成像、免疫组织化学、分子诊断成像或ELISA执行。
50. 一种体内检测受试者中的AXL表达的方法, 包括:
- a) 向所述受试者施用与检测剂连接的权利要求1-24中任一项所述的一种或多种抗体; 以及
- b) 检测与AXL结合的其抗体上所连接的所述检测剂。
51. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述检测步骤使用PET、SPECT或荧光成像执行。
52. 一种将感兴趣分子运输到表达AXL的细胞中的方法, 其包括向受试者施用与所述感兴趣分子连接的权利要求1所述的一种或多种抗体, 其中所述抗体将所述感兴趣分子递送到所述受试者的表达AXL的细胞。
53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述感兴趣分子是检测剂、治疗剂、药物、肽、酶、生长因子、细胞因子、受体陷阱、其抗体、化学化合物、碳水化合物部分、基于DNA的分子、细胞毒性剂或病毒载体。
54. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述感兴趣分子负载在一个或多个脂质体或纳米载体上。
55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述纳米载体包括一个或多个纳米粒子、纳米线、纳米管或量子点。
56. 根据权利要求52-55中任一项所述的方法, 其中所述感兴趣分子包括细胞毒性剂。
57. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述细胞毒性剂用于治疗癌症。
58. 一种治疗癌症的方法, 其包括向有需要的受试者施用包含权利要求1-24中任一项所述的抗体的抗癌抗体药物缀合物。
59. 一种治疗癌症的方法, 其包括施用包含权利要求1-24中任一项所述的抗体的细胞疗法、嵌合抗原受体 (CAR-T细胞) 疗法或溶瘤病毒。
60. 根据权利要求1-24中任一项所述的抗体在制备用于治疗有需要的受试者中的癌症的包含抗癌抗体药物缀合物的药品中的用途。
61. 包含权利要求1-24中任一项所述的抗体的抗癌抗体药物缀合物用于治疗有需要的受试者中的癌症的用途。
62. 根据权利要求1-24中任一项所述的抗体在制备细胞疗法、嵌合抗原受体 (CAR-T细胞) 疗法或溶瘤病毒中的用途。

AXL-特异性抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年9月13日提交的美国临时专利申请62/557,870的优先权权益,该申请通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及AXL-特异性抗体及其用途。此类抗体结合细胞表面表达的人AXL并且可以用在融合体或用于抗体-药物缀合物中。

背景技术

[0004] AXL是Tyro3-AXL-Mer (TAM) 受体酪氨酸激酶亚家族的成员。AXL结构域结构的示意图在图1的现有技术图示中示出。AXL蛋白(100)的细胞外结构域显示具有所指示的外显子(1-20)。AXL蛋白(100)包含2个免疫球蛋白样结构域(102)和2个纤连蛋白III型(FNIII)重复区(104)。跨膜结构域(106)跨越细胞膜,接着是细胞内激酶结构域(108)。剪接(指示在110处)产生稍短的转录物。

[0005] 在AXL细胞外结构域与生长停滞-特异性6 (Gas6) 蛋白(一种维生素K依赖性蛋白)结合后,AXL能够转导参与数种细胞功能的信号,所述细胞功能包括多种细胞类型的生长、迁移、聚集和抗炎(Holland等人,2005;Li等人,2009)。AXL最初被鉴定为慢性髓性白血病中的癌基因(O' Bryan等人,1991)。后来,据报道AXL的表达在多种癌症中上调,所述癌症包括乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌和肺癌(Linger等人,2008;Paccez等人,2014)。

[0006] AXL还参与上皮-间质转化(Gjerdrum等人,2010),这是一个与恶性细胞的侵袭迁移性和转移密切相关的过程。此外,AXL表达显示与患者的生存期负相关(Linger等人,2008;Gjerdrum等人,2010)。最近几项研究报道AXL在几个耐药的癌细胞系中过表达并活化(Asiedu等人,2014;Meyer等人,2013;Thomson等人,2011),提示AXL可能在化疗和其他分子靶向疗法的耐药中起一定作用。最近还表明在低氧症期间AXL表达是增加的(Rankin等人,2014),低氧症是当实体肿瘤变大和侵袭性变强时经常发生的一种病况。总之,这些数据表明AXL是一种有前途的用于癌症的诊断、预后和治疗靶标。

[0007] 最近的研究使用基因敲除或RNAi验证了在细胞系和小鼠模型中抑制AXL的治疗价值。另外,已经开发了几种小分子AXL抑制剂并在市场上销售,包括:由辉瑞制药公司(Pfizer Inc.)以BOSULIFTM的商品名销售的一种蛋白-酪氨酸激酶抑制剂BOSUTINIBTM,也称作SKI-606,辉瑞制药公司的产品号为PF-5208763(Lee等人,2014);由Exelixis以COMETRIQTM的商品名销售的一种酪氨酸激酶c-Met和VEGFR2的小分子抑制剂CABOZANTINIBTM,产品号为XL184(Yakes等人,2011);以及由辉瑞制药公司以SUTENTTM的商品名销售的SUNITINIBTM,产品号为SU11248(Kitagawa等人,2013)。这些药物靶向多种激酶,并抑制AXL活性,其有效性不如它们的基础激酶靶标(Feneyrolles等人,2014)。

[0008] 其他小分子药物处于临床和临床前开发的早期阶段,包括BergenBio (Bergen, Norway) 和Rigel制药(Rigel Pharmaceuticals, San Francisco, CA, USA) 的BGB324TM(以前

称为R428),目前是最有效的AXL选择性抑制剂之一。其显示具有14nM的IC₅₀,并且对AXL的选择性比测试的其他激酶强得多(Holland等人,2010);然而,其还显示对Tie-2、Flt-4、Flt-1、Ret、Abl以及TAM家族的其他成员Tyro-3和Mer的活性。在临床前乳腺癌动物模型中其阻断AXL促进血管生成和转移的能力(Holland等人,2010)并在2013年进入I期临床用于治疗侵袭性和转移性癌症。在缺少AXL激酶结构域的三维结构的情况下,小分子AXL抑制剂的开发是有挑战性的,并且脱靶毒性的可能性仍然是个主要的问题。

[0009] 为了克服小分子的一些缺陷,可以考虑抗AXL抗体。Li等人(2009)开发了针对AXL的单克隆抗体(12A11),在皮下非小细胞肺癌(NSCLC)模型中该抗体不干扰Gas6结合,抑制AXL激活,诱导AXL下调,并且减少肿瘤异种移植物的生长。随后,Ye等人(2010)开发了单克隆抗体(YW327.6S2),该抗体识别人和鼠AXL两者的细胞外结构域并阻断Gas6结合。该抗体显示在NSCLC模型以及乳腺癌的原位转移模型中使异种移植肿瘤生长消退。另外,用YW327.6S2治疗增强了厄洛替尼(erlotinib)和化疗减少NSCLC肿瘤生长的作用以及加强了抗VEGF治疗在乳腺癌和NSCLC小鼠异种移植模型中的作用。Leconet等人(2014)记载了抗-AXL单克隆抗体,该抗体不干扰Gas6结合,抑制AXL激活,并诱导其从细胞表面下调。该主题抗体在体内减少了皮下和原位胰腺肿瘤异种移植物的生长。

[0010] 减小AXL活性的治疗性抗体的一个缺点是它们有可能遇到治疗耐药性,所述耐药性的性质是天生的或获得性的,天生的耐药性是由于固有的缺乏敏感性引起,获得性耐药性是由于在治疗的选择压力期间出现的旁路机制引起。因此,需要有活性的和特异性的AXL抑制剂,其具有较少的脱靶效应,并且具有减少的或可接受的毒性和治疗耐药性。

[0011] 抗体-药物缀合物是高度复杂的实体,其典型地经由接头组合了抗体和药物。由Genmab A/S(Copenhagen,Denmark)和Seattle Genetics(Washington,USA)开发中的抗体-药物缀合物HUMAX-AXL-ADCTM包含与一甲基奥瑞他汀E(MMAE)缀合的不竞争Gas6结合的AXL-特异性单克隆抗体。HUMAX-AXL-ADCTM在NSCLC异种移植模型中在给予单剂量1mg/kg后有效地诱导肿瘤消退,并且在患者来源的异种移植模型(其中AXL表达是异源的)中具有相似效应。与AXL结合的不竞争Gas6结合的抗体记述于国际专利公布W02016/005593A1(Breij等人)。

[0012] 其中抗-AXL抗体用来递送有效细胞毒性药物的抗体-药物缀合物(ADC)方式增加了可能对药物反应的患者群体。甚至在对抗体有获得性耐药性的情况下,ADC也是可以使用的。

[0013] 需要用于疾病监测、分期和/或疗法的AXL-特异性抗体。

发明内容

[0014] 本发明的目的是提供AXL-特异性抗体。描述了AXL-特异性单克隆和单结构域抗体和也称作抗体的抗原结合片段,及其用途。此类AXL-特异性抗体结合细胞表面表达的人AXL。描述了抗体-药物缀合物和融合体。

[0015] 本发明提供了一种分离的或纯化的抗体,其特异性地结合人AXL胞外结构域(ECD)的免疫球蛋白样(IgL)结构域中的表位。

[0016] 还提供了一种抗体或其片段,其包含选自由下列各项组成的组的可变轻链(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:98-100;SEQ ID NO:92-94;SEQ ID NO:110-112;SEQ ID

N0:86-88;SEQ ID NO:80-82;SEQ ID NO:104-106;SEQ ID NO:116-118;以及与它们基本上相同的序列。

[0017] 本文还提供了一种抗体或其片段,其包含选自由下列各项组成的组的可变轻链(VL)序列:SEQ ID NO:38;SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:42;SEQ ID NO:44;SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:74;SEQ ID NO:76;以及与它们基本上相同的序列。

[0018] 此外,提供了一种抗体或其片段,其包含选自由下列各项组成的组的可变重链(VH)CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:95-97;SEQ ID NO:89-91;SEQ ID NO:107-09;SEQ ID NO:83-85;SEQ ID NO:77-79;SEQ ID NO:101-103;SEQ ID NO:113-115;以及与它们基本上相同的序列。

[0019] 本文提供了一种抗体或其片段,其包含选自由下列各项组成的组的可变重链(VH)序列:SEQ ID NO:39;SEQ ID NO:41;SEQ ID NO:43;SEQ ID NO:45;SEQ ID NO:47;SEQ ID NO:73;SEQ ID NO:75;以及与它们基本上相同的序列。

[0020] 此外,提供了一种抗体或其片段,其包含选自由下列各项组成的组的单结构域(sd)重链可变(VHH)结构域序列:SEQ ID NO:119-126;以及与它们基本上相同的序列。

[0021] 还提供了一种抗体或其片段,其选自由下列各项组成的组:SEQ ID NO:39的VH,和SEQ ID NO:38的VL;SEQ ID NO:41的VH,和SEQ ID NO:40的VL;SEQ ID NO:43的VH,和SEQ ID NO:42的VL;SEQ ID NO:45的VH,和SEQ ID NO:44的VL;SEQ ID NO:47的VH,和SEQ ID NO:46的VL;SEQ ID NO:73的VH,和SEQ ID NO:74的VL;SEQ ID NO:75的VH,和SEQ ID NO:76的VL;SEQ ID NO:119的VHH;SEQ ID NO:120的VHH;SEQ ID NO:121的VHH;SEQ ID NO:122的VHH;SEQ ID NO:123的VHH;SEQ ID NO:124的VHH;SEQ ID NO:125的VHH;SEQ ID NO:126的VHH;以及与它们具有85%或更大同一性的序列。

[0022] 描述了包含所述抗体的抗体药物缀合物(ADC)、药物组合物和融合蛋白。还提供了编码所述抗体的核酸分子,和包含所述核酸分子的载体或宿主细胞。

[0023] 描述了体外和体内检测AXL的方法。描述了将感兴趣分子运输到表达AXL的细胞中的方法。提供了所述抗体用于采用抗体药物缀合物治疗癌症的方法和用途。

[0024] 在结合附图参阅了下面对具体实施方案的描述后,本发明的其他方面和特征对于本领域普通技术人员是显而易见的。

附图说明

[0025] 现在将参考附图对本发明的实施方案仅作为实例进行描述。

[0026] 图1(现有技术)是AXL结构域结构的示意图。

[0027] 图2示出了抗-AXL mAb对A549细胞存活率的作用的结果。

[0028] 图3示出了确定抗-AXL mAb与H292细胞上的细胞表面表达的AXL的结合特性的流式细胞术实验的结果。

[0029] 图4示出了抗-AXL-DM1缀合物对H292肿瘤细胞系、A549细胞系、人乳腺癌MDA-MB-231肿瘤细胞系和永生HaCaT角质形成细胞的细胞活力的活性的结果。

[0030] 图5是人AXL蛋白胞外结构域(hAXL-ECD)和跨膜结构域的示意性图示。对hAXL-ECD的十个肽片段显示结构域结合。

[0031] 图6是分离抗-rhAXL ECD单结构域抗体(sdAb)的策略的示意性图示。

[0032] 图7示出了mAb V_H/V_L结构域的氨基酸序列,其中CDR使用IMGT定义,以带下划线的粗体显示。

[0033] 图8示出了VHH的氨基酸序列,其中CDR使用IMGT定义,以带下划线的粗体显示。

[0034] 图9示出了肺癌 (H292)、乳腺癌 (MDA-MB-231)、卵巢癌 (SKOV3) 和胶质母细胞瘤 (U87) 细胞系中的抗体结合能力。

[0035] 图10示出了确定抗-AXL hIgG和sdAb在肺癌 (NCI-H292)、乳腺癌 (MDA-MB-231) 和卵巢癌 (SKOV3) 细胞系中的结合特性的流式细胞术实验的结果。

[0036] 图11示出了hIgG Ab和sdAb在三个肿瘤细胞系中的生长抑制结合曲线。

[0037] 图12示出了在存在和不存在Gas6的情况下hIgG-F11-5E9-DM1和hIgG-F107-10G1-DM1在H292细胞系中的生长抑制结合曲线。

[0038] 图13示出了在SKOV3细胞系中与单互补位 (monoparatopic) 亲代ADC相比抗-AXL双互补位构建体ADC的生长抑制结合曲线。

[0039] 图14示出了所选择的测试抗体对SKOV3荷瘤小鼠中肿瘤生长的抑制。

[0040] 图15示出了所选择的测试抗体对SKOV3荷瘤小鼠中肿瘤生长的抑制。

[0041] 图16示出了实施例17中MDA-MB-231-Luc荷瘤小鼠中的研究设计和肿瘤生长测量的时间点。

[0042] 图17示出了实施例17中至治疗起始后37天hF111-5E9-DM1对体重的作用。

[0043] 图18示出了实施例17中至治疗起始后28天hF111-5E9-DM1对肿瘤生长的作用。

[0044] 图19示出了在实施例18中评价的FC5Hfc1X0 (阳性对照)、TWIN200-hIgG1 (阴性对照) 和7种抗-AXL sdAb的Papp值。

具体实施方式

[0045] 总体来说,本发明提供了用于疾病诸如癌症的治疗、鉴定/诊断和分期/预后的抗-AXL单克隆抗体和单结构域抗体。

[0046] 描述了一种分离的或纯化的抗体,其特异性地结合人AXL胞外结构域 (ECD) 的免疫球蛋白样 (IgL) 结构域中的表位。例如,AXL ECD可以具有SEQ ID NO:71的氨基酸序列。所述抗体的表位可以位于AXL的IgL1或IgL2中。所述抗体能够内在化至表达AXL的肿瘤细胞中。

[0047] 所述抗体可以是单结构域抗体、单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、双互补位抗体 (biparatopic antibody)、双特异性抗体,或者可以是它们的AXL-结合抗体片段。如果所述抗体是嵌合抗体,则其可以包含来自人IgG1的框架区,并且可以包含来自人κ轻链和人IgG重链的框架区。所述抗体可以包含来自IgA、IgD、IgE、IgG或IgM的框架区。

[0048] 所述抗体可以是全长IgG、Fv、scFv、Fab、或F(ab')₂、VHH、VL或VH。所述抗体可以具有<50nM的对人AXL胞外结构域的平衡解离常数(KD)。任选地,与AXL ECD的IgL结构域中的表位结合可以是不与生长停滞-特异性6 (Gas6) 配体和AXL的结合竞争的结合。

[0049] 所述抗体或片段可以具有选自由下列各项组成的组的可变轻链 (VL) CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:98、99和100;SEQ ID NO:92、93和94;SEQ ID NO:110、111和112;SEQ ID NO:86、87和88;SEQ ID NO:80、81和82;SEQ ID NO:104、105和106;SEQ ID NO:116、117和118;以及与它们基本上相同的序列。

[0050] 所述抗体或其片段可以是包含选自由下列各项组成的组的可变轻链 (VL) 序列的

抗体或其片段:SEQ ID NO:38;40;42;44;46;74;76;以及与它们基本上相同的序列。所述抗体或片段可以包含选自下列各项组成的组的可变重链(VH)CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:95-97;89-91;107-109;83-85;77-79;101-103;113-115;以及与它们基本上相同的序列。

[0051] 描述了一种抗体或其片段,其包含选自下列各项组成的组的可变重链(VH)序列:SEQ ID NO:39;41;43;45;47;73;75;以及与它们基本上相同的序列。

[0052] 所述抗体或其片段可以是包含选自下列各项组成的组的可变重链(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列和(VH)CDR1、CDR2和CDR3序列的抗体或其片段:VL,SEQ ID NO:98-100和VH,SEQ ID NO:95-97;VL,SEQ ID NO:92-94和VH,SEQ ID NO:89-91;VL,SEQ ID NO:110-112和VH,SEQ ID NO:107-109;VL,SEQ ID NO:86-88和VH,SEQ ID NO:83-85;VL,SEQ ID NO:80-82和VH,SEQ ID NO:77-79;VL,SEQ ID NO:104-106和VH,SEQ ID NO:101-103;VL,SEQ ID NO:116-118和VH,SEQ ID NO:113-115;以及与它们基本上相同的序列。

[0053] 所述的抗体可以包含选自下列各项组成的组的单结构域(sd)重链可变(VHH)结构域CDR1、CDR2、和CDR3序列:SEQ ID NO:127-129;SEQ ID NO:130-132;SEQ ID NO:133-135;SEQ ID NO:136-138;SEQ ID NO:139-141;SEQ ID NO:142-144;SEQ ID NO:145-147;SEQ ID NO:148-150;以及与它们基本上相同的序列。

[0054] 描述了一种抗体或其片段,其具有选自下列任一项组成的组的单结构域(sd)重链可变(VHH)结构域序列:SEQ ID NO:119-126;以及与它们基本上相同的序列。

[0055] 描述了一种抗体或其片段,其选自下列各项组成的组:SEQ ID NO:39的VH,和SEQ ID NO:38的VL;SEQ ID NO:41的VH,和SEQ ID NO:40的VL;SEQ ID NO:43的VH,和SEQ ID NO:42的VL;SEQ ID NO:45的VH,和SEQ ID NO:44的VL;SEQ ID NO:47的VH,和SEQ ID NO:46的VL;SEQ ID NO:73的VH,和SEQ ID NO:74的VL;SEQ ID NO:75的VH,和SEQ ID NO:76的VL;和SEQ ID NO:119-126的VHH序列;以及与它们具有85%或更大同一性的序列。

[0056] 例如,所述抗体或其片段可以具有与本文列举的具体示例性序列相比>90%、>95%或>98%的序列同一性。

[0057] 所述的抗体可以包含SEQ ID NO:1、2和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:3、4和5的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;其中所述抗体结合AXL的IgL1结构域中的表位,而不结合IgL2结构域中的表位。所述抗体可以包含SEQ ID NO:1、6和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:7、8和5的重链CDR1、CDR2和CDR3序列;其中所述抗体结合AXL的IgL1结构域中的表位,而不结合IgL2结构域中的表位。

[0058] 所述抗体可以包含SEQ ID NO:9、10和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:12、13和14的重链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0059] 备选地,所述抗体可以包含SEQ ID NO:15、16和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列;和SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0060] 所述抗体可以是不与Gas6竞争AXL结合的抗体。

[0061] 所述抗体可以是双互补位的抗体。此类双互补位抗体可以是,例如:sdAb001/005或sdAb001/006。

[0062] 描述了一种抗体药物缀合物(ADC),其包含与药物部分缀合的本文所述的抗体。所述药物部分可以是,例如,抗癌药物。示例性的药物部分是DM1。

[0063] 描述了一种药物组合物,其包含ADC和药学上可接受的赋形剂。

[0064] 描述了一种融合蛋白,其包含本文所述的抗体和人IgG1Fc。

[0065] 描述了一种核酸分子,其编码所述抗体。描述了一种包含核酸分子的载体。病毒载体可以是腺病毒载体、慢病毒载体或逆转录病毒载体。

[0066] 描述了一种宿主细胞,其可以包含上述的载体。所述宿主细胞可以是重组微生物宿主细胞或可以是哺乳动物细胞,并且所述细胞可以产生本文所述的抗体。

[0067] 还提供了产生所述抗体的杂交瘤或生物体。

[0068] 在一些情况下,所述抗体可以被固定化至表面上。此外,所述抗体可以连接到货物分子(cargo molecule)。任选地,所述货物分子可以是检测剂、治疗剂、药物、肽、酶、生长因子、细胞因子、受体陷阱(receptor trap)、其抗体、化学化合物、碳水化合物部分、基于DNA的分子、细胞毒性剂或病毒载体。

[0069] 当所述抗体具有货物分子时,所述货物分子的示例性尺寸可以为约1kDa至约500kDa。所述货物分子可以负载在脂质体或纳米载体中。此类纳米载体可以包括一个或多个纳米粒子、纳米线、纳米管或量子点。所述货物分子可以是细胞毒性剂。

[0070] 所述基于DNA的分子可以包括反义寡核苷酸、微小RNA、siRNA或质粒。

[0071] 描述了一种体外检测AXL的方法,包括:a)使样品和与检测剂连接的一种或超过一种分离的或纯化的抗体接触;以及b)检测与所述样品中的AXL结合的其抗体上所连接的所述检测剂。

[0072] 描述了一种检测循环细胞中的AXL的方法,其中所述样品可以是血清样品。

[0073] 在所述方法中的检测步骤可以使用光学成像、免疫组织化学、分子诊断成像或ELISA执行。

[0074] 本文中描述了一种体内检测受试者中的AXL表达的方法,包括:a)向所述受试者施用与检测剂连接的本文所述的一种或多种抗体;以及b)检测与AXL结合的其抗体上所连接的所述检测剂。

[0075] 任选地,所述检测步骤可以使用PET、SPECT或荧光成像执行。

[0076] 描述了一种将感兴趣分子运输到表达AXL的细胞中的方法,包括向受试者施用与所述感兴趣分子连接的一种或多种抗体,其中所述抗体将所述感兴趣分子递送到所述受试者的表达AXL的细胞。可以存在感兴趣分子,诸如检测剂、治疗剂、药物、肽、酶、生长因子、细胞因子、受体陷阱、其抗体、化学化合物、碳水化合物部分、基于DNA的分子、细胞毒性剂或病毒载体。在此类方法中,所述感兴趣分子可以负载在一个或多个脂质体或纳米载体上。所述纳米载体可以包括一个或多个纳米粒子、纳米线、纳米管或量子点。此外,所述感兴趣分子可以包括细胞毒性剂,诸如用于治疗癌症的细胞毒性剂。

[0077] 描述了一种治疗癌症的方法,包括向有需要的受试者施用抗癌抗体药物缀合物(包含本文所述的抗体)。此外,本文中描述了一种治疗癌症的方法,包括施用细胞疗法、嵌合抗原受体(CAR-T细胞)疗法或溶瘤病毒。

[0078] 本文所述的抗体的用途可以是用于制备包含抗癌抗体药物缀合物的药物。所述抗体可用于治疗有需要的受试者中的癌症。描述了进一步的用途,其中使用抗癌抗体药物缀合物来治疗有需要的受试者中的癌症。

[0079] 描述了此类抗体的用途,所述抗体可以用于制备细胞疗法、嵌合抗原受体(CAR-T

细胞) 疗法或溶瘤病毒。

[0080] 本文描述了抗-AXL抗体药物缀合物作为癌症治疗药物的用途。期望提供拥有强力和选择性抗癌活性的免疫治疗剂和免疫缀合物。基于作为癌症靶标的AXL治疗癌症的抗体-药物缀合物(ADC) 要求开发可以在缀合物中发挥作用的抗体。AXL在受体酪氨酸激酶的TAM家族中, 在大量的人癌症中已经检测到其过表达。本文描述了适合于AXL ADC的抗体, 部分地基于在几个细胞系癌症模型中对超过250种单克隆抗体(mAb) 的替代ADC筛选和与用于毒性测试的来自食蟹猴的AXL蛋白的交叉反应性来确定。描述了用于ADC开发的抗-AXL抗体, 并且本文提供了Gas6竞争和单结构域抗体(sdAb) 表征数据。

[0081] Gas6竞争。在抗-AXL ADC中, Gas6 (AXL配体) 阻断抗体与AXL结合的能力是AXL ADC选择的重要特征。此能力在本文中称作Gas6竞争。存在于全身或存在于肿瘤微环境中(但在培养中生长的肿瘤细胞系中没有发现) 的高浓度Gas6配体可以解释体内与体外相比所见的抗体结合活性的差异。因此, 选择活性不受Gas6影响或受Gas6弱影响的抗体将确保在体内抗体结合不受Gas6妨碍。

[0082] 单克隆抗体(mAb)。从抗-AXL小鼠mAb文库内筛选AXL ADC以鉴定活性不受Gas6的存在影响的强力ADC内在化剂($IC_{50} < 1nM$)。

[0083] 单结构域抗体(sdAb)。通过从噬菌体展示文库淘选从分离的抗-AXL单结构域抗体(sdAb, 仅重链可变结构域VHH) 中鉴定AXL ADC候选物。本文中用于评估sdAb的技术包括内在化测定和竞争结合测定。获得Gas6竞争和sdAb表征数据。通常, 单结构域抗体的长度可以至多达约110个氨基酸, 包含重链抗体的一个可变结构域(VH)。sdAb缺少Fc区, 因此可以制备sdAb-Fc融合体。

[0084] 表位。本文描述了表位和/或结合结构域。

[0085] 术语“抗体”在本领域中也称作“免疫球蛋白”(Ig), 如本文所用是指由配对的重多肽链和轻多肽链构成的蛋白; 存在各种Ig同种型, 包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。本文描述了单结构域sdAb以及单克隆抗体mAb。当抗体被正确折叠时, 每条链折叠成大量截然不同的由更多的线性多肽序列连接的球状结构域。例如, 免疫球蛋白轻链折叠成可变(VL) 和恒定(CL) 结构域, 而重链折叠成可变(VH) 和三个恒定(CH, CH₂, CH₃) 结构域。重链和轻链可变结构域(VH和VL) 的相互作用导致形成抗原结合区(Fv)。每个结构域均具有本领域技术人员所熟悉的确定结构。

[0086] 术语“抗体”还可以用来指免疫球蛋白分子的片段, 或所述分子的衍生物, 其保留了特异性结合抗原持续以如对免疫球蛋白所观察到的典型相当的时间段的能力。抗体的结合区或结合结构域可以包括免疫球蛋白分子的重链和轻链两者的可变区, 或可以是单结构域(VHH) 分子。术语“抗体”用来涵盖抗体的保留了抗原结合的此类片段(在本文中其可以称作“抗体片段”或简称“片段”)。保留了结合能力的片段可以包括Fab' 或Fab片段, 可以具有VL、VH、CL和CH₁结构域的单价片段, F(ab')₂片段, 双互补位片段, 双价片段, 具有VH和CH₁结构域的Fd片段, 骆驼抗体、纳米抗体, 分离的互补决定区(CDR), 由接头连接的多个片段, 和其他此类分子。

[0087] 术语“抗体”涵盖多克隆抗体、单克隆抗体、单结构域抗体、抗体样多肽、人源化抗体、嵌合抗体分子、双特异性或双互补位抗体、以及本文中没有具体提及的能够结合抗原的任意片段。所述抗体片段可以是天然存在的抗体片段, 可以通过对天然存在的抗体操作或

通过使用重组方法获得,并且可以是非天然存在的抗体或片段。例如,抗体片段可以包括,但不限于,Fv,单链Fv(scFv;由VL和VH通过肽接头连接构成的分子),Fab,F(ab')₂,和这些中任一种的多价形式。诸如刚刚描述的那些的抗体片段可以需要接头序列、二硫键或其他类型的共价键来连接所述片段的不同部分;本领域技术人员熟悉各种方式。单结构域抗体片段以及单克隆抗体片段都涵盖在术语“抗体”范围内。

[0088] 在非限制性实例中,抗体片段可以是天然来源衍生的sdAb。骆驼来源的重链抗体缺少轻链,因此它们的抗原结合位点由一个称作V_HH的结构域组成。sdAb也在鲨鱼中观察到,并命名为V_{NAR}。其他sdAb可以基于人Ig重链和轻链序列进行改造。如本文所用,术语“sdAb”包括从任意来源的V_H、V_HH、V_L或V_{NAR}库中通过噬菌体展示或其他技术直接分离的那些sdAb,从前述的sdAb衍生的sdAb,重组产生的sdAb,以及通过人源化、亲和成熟、稳定化、增溶、骆驼化或抗体工程的其他方法对此类sdAb进一步修饰生成的那些sdAb。还涵盖保留了sdAb的抗原结合功能和特异性的同源物、衍生物或片段。

[0089] SdAb拥有抗体分子的期望特性,诸如高热稳定性、高耐洗涤剂性、相对高的耐蛋白酶性和高收率。它们还可以通过从免疫文库分离或通过体外亲和性成熟而被改造成具有非常高的亲和性。还可以对sdAb带来进一步的修饰以增加稳定性,诸如引入非典型二硫键。

[0090] 单结构域抗体的结构已建立并众所周知。一个sdAb包含单个免疫球蛋白结构域,其保留了免疫球蛋白折叠;最值得注意的是,仅三个CDR/高变环形成抗原结合位点。然而,不是所有CDR都可以是结合抗原所必需的。例如,且非限制性地,所述CDR中的一个、两个或三个可以促进本文所述的sdAb对抗原的结合和识别。sdAb或可变结构域的CDR在本文中称为CDR1、CDR2和CDR3。

[0091] 所述抗体(包括其片段)对AXL(受体酪氨酸激酶亚家族的一部分)特异。AXL(Entrez Gene:558)包含894个氨基酸,它们被组织成包含2个免疫球蛋白样结构域和2个纤连蛋白III型重复的细胞外结构域;跨膜结构域;和包含酪氨酸激酶结构域的细胞内结构域(参见现有技术图1)。AXL蛋白结合配体Gas6(一种维生素K-依赖性蛋白)。AXL通常在许多细胞类型中表达,但在一些疾病状态下表达水平增加。

[0092] 所述抗体应当表现出高度内在化。对于术语“高度内在化”,其意指抗体在已知表达AXL的不止一个的肿瘤细胞系中在皂草素-或DM1-缀合的二抗细胞毒性筛选测定中表现出亚nM(IC₅₀)功效。本发明所述的抗体结合细胞表面AXL受体的细胞外结构域。所述抗体然后可以被细胞内在化并递送到亚细胞器,包括内体和溶酶体。所述抗体也可以包括中和功能,即,其可以阻断通过AXL受体的信号传导。

[0093] 轻链和重链可变区负责结合靶抗原并且因此可以显示出抗体间的显著序列多样性。恒定区显示出较少的序列多样性,并负责结合许多天然蛋白以引起重要的生化事件。抗体的可变区包含分子的抗原结合决定簇,因此决定抗体对其靶抗原的特异性。大部分序列变异性发生在6个高变区中,每个可变重链(VH)和轻链(VL)结构域有3个高变区;高变区组合形成抗原结合位点,并且促进抗原决定簇的结合和识别。抗体对其抗原的特异性和亲和性由高变区的结构以及它们的大小、形状和它们递呈到抗原的表面的化学决定。存在多种方案用于鉴定高变性的区域,其中一个(Kabat方案)基于在VH和VL结构域的抗原结合区处的序列可变性限定“互补决定区”(CDR)。另一方案(Clotheta方案)基于VH和VL结构域中结构环区的位置限定“高变环”(H或L)。因为这些单个方案限定邻近或重叠的CDR和高变环区,抗

体领域中的技术人员经常互换使用术语“CDR”和“高变环”，它们在本文中可以这样使用。在本文中使用国际免疫遗传学信息系统 (IMGT)，还示出了Kabat编号体系。开发了IMGT编号系统以有助于比较可变结构域。在此系统中，保守氨基酸 (诸如Cys23、Trp41、Cys104、Phe/Trp118和位置89处的疏水残基) 常常具有相同的位置。另外，提供了框架区 (FR1:位置1-26; FR2:39-55;FR3:66-104;和FR4:118-129) 和CDR (CDR1:27-38,CDR2:56-65;和CDR3:105-117) 的标准化定界。

[0094] 在本文中，作为IMGT注明的CDR序列由跟着-A的描述性名称鉴定，而Kabat序列的描述性名称跟着-B。

[0095] CDR/环在本文中对于CDR H1适用Chothia方案，对于所有其他CDR适用Kabat方案。本文所述的抗体的CDR对于轻链中的CDR称作CDR L1,L2,L3,对于重链中的CDR称作CDR H1,H2,H3。

[0096] SEQ ID NO:72提供了已知的AXL全长His6序列，并仅用于提供信息。

[0097] 除了导致缀合的或结合的细胞毒性剂的内在化和激活，抗体可以引起抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。如本领域技术人员已知的，ADCC和CDC活性通过各种抗体结构中存在的恒定结构域介导。

[0098] 抗体可以来自任意来源，人，鼠或其他来源；可以是任意的同种型，包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM；并且可以是任意类型的片段，包括但不限于Fv、scFv、Fab、F(ab')₂。

[0099] 抗体也可以是嵌合的，作为源自多于一种物种的蛋白序列的组合形成。如本领域技术人员已知的那样，嵌合抗体通过将来自非人来源 (例如但不限于鼠) 的遗传物质与来自人的遗传物质组合而产生。例如，人恒定结构域可以与小鼠VH和VL序列融合。

[0100] 抗体可以使用本领域中已知的任何合适方法“人源化”，例如，但不限于CDR移植和镶嵌。抗体的人源化包括将序列中的氨基酸替换为人的对应序列，如人共有序列中存在的序列，而不会丧失抗原结合能力或特异性；当引入至人受试者中时此方式减少了抗体的免疫原性。在CDR移植的过程中，一个或多于一个的本文所定义的重链CDR可以融合或移植到人可变区 (VH或VL)，或其他人抗体 (IgA、IgD、IgE、IgG和IgM) 或片段框架区 (Fv、scFv、Fab) 或相似大小和性质的其上可以移植CDR的蛋白 (例如，参见Nicaise等人，2004)。在这种情况下，所述一个或多于一个的高变环的构型有可能保留，并且抗体对其靶标 (即，AXL) 的亲合性和特异性有可能很少受影响。CDR移植在本领域中是已知的。在此类人源化抗体的一个非限制性实例中，如上所述的来自小鼠来源的CDR可以移植到人轻链和重链框架区上。

[0101] 镶嵌，在本领域中也称作“可变区表面重塑”，其涉及将抗体的溶剂暴露位置人源化。因此，保留可能对CDR构象很重要的被包埋的非人源化残基，同时使针对溶剂暴露区的免疫反应可能性最小化。镶嵌在本领域中是已知的并且基本上涉及将天然抗体或其片段的框架区中的暴露残基替换为其人对应序列中的氨基酸残基 (Padlan,1991;Gonzales等人2005)。

[0102] 本领域技术人员也充分熟悉制备此类人源化抗体片段和人源化氨基酸位置的方法。参见，例如，Vincke等人，2009。如本领域技术人员已知的那样，可以有必要将某些天然氨基酸残基掺入到人框架中以便保留结合和特异性。通过CDR移植进行人源化在本领域中是已知的 (例如，参见Tsurushita等人，2005;Jones等人，1986;Tempest等人，1991;Riechmann等人，1988;Queen等人，1989;Gonzales等人，2005)，因此技术人员足够熟悉制备

此类人源化抗体或其片段的方法。

[0103] 分离的或纯化的AXL特异性抗体可以是包含如上所定义的VH和VL以及人IgG1框架的嵌合抗体。例如,人IgG1框架可以包含人 κ 轻链和人IgG1重链。

[0104] 单克隆抗体

[0105] 描述了针对AXL的高亲和性单克隆抗体(mAb)。所述mAb通过遗传免疫生成(即,通过注射编码rhAXL-ECD的DNA)。所述mAb使用被设计用来鉴定表现出高度内在化的抗体的功能测定来筛选。

[0106] 对鉴定的5个抗-hAXL mAb作为抗体-药物缀合物(ADC)的潜力进行功能表征。这些抗体在本文中标注为:F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8和F107-10G1。选择这些抗-人AXL抗体是因为它们在下列细胞系的至少两个中在基于皂草素-缀合的二抗的细胞毒性测定中表现出亚nM(IC₅₀)功效:U87成胶质细胞瘤、A549肺泡型腺癌和MDA-MB-231乳腺癌。当与DM1缀合时,它们还对H292肺癌细胞、A549细胞和MDA-MB-231细胞显示出毒性。表位分组分析(epitope binning analyse)指示基于在缀合二抗筛选测定中的功效对这些抗体的选择使得所有5种mAb与下列表位的结合:两个位于AXL的Ig-样结构域1(F107-7H5和F107-8D12)中,一个位于Ig-样结构域2(F111-3C8和F111-5E9)中。要注意F107-10G1的结合也在Ig-样结构域1中,但在与F107-7H5和F107-8D12截然不同的位点处。

[0107] 序列同一性和特征

[0108] 基本上相同的序列可以包括一个或多个保守氨基酸突变。本领域中已知对参考序列的一个或多个保守氨基酸突变可以产生与参考序列相比在生理、化学、生理-化学或功能特性方面基本上没有改变的突变肽;在这种情况下,所述参考序列和突变序列将被认为是“基本上相同的”多肽。保守氨基酸置换在本文中被定义为将氨基酸残基置换为具有相似化学特性(例如,大小、电荷或极性)的另一氨基酸残基。这些保守氨基酸突变可以对抗体的框架区进行,同时保留上面列举的CDR序列和抗体的整体结构;因此,抗体的特异性和结合得以保留。

[0109] 在非限制性实例中,保守突变可以是氨基酸置换。此类保守氨基酸置换可以将碱性、中性、疏水或酸性氨基酸置换为相同组中的另一个。作为术语“碱性氨基酸”,其意指具有大于7的侧链pK值的亲水性氨基酸,其在生理pH下典型地带正电荷。碱性氨基酸包括组氨酸(His或H)、精氨酸(Arg或R)和赖氨酸(Lys或K)。术语“中性氨基酸”(也称为“极性氨基酸”)意指在生理pH下侧链不带电荷的亲水性氨基酸,但其具有至少一个键,在该键中被两个原子共用的电子对更靠近其中一个原子。极性氨基酸包括丝氨酸(Ser或S)、苏氨酸(Thr或T)、半胱氨酸(Cys或C)、酪氨酸(Tyr或Y)、天冬酰胺(Asn或N)和谷氨酰胺(Gln或Q)。术语“疏水性氨基酸”(也称作“非极性氨基酸”)意指包括根据标准化一致疏水性量表(normalized consensus hydrophobicity scale)显示大于0的疏水性的氨基酸。疏水性氨基酸包括脯氨酸(Pro或P)、异亮氨酸(Ile或I)、苯丙氨酸(Phe或F)、缬氨酸(Val或V)、亮氨酸(Leu或L)、色氨酸(Trp或W)、甲硫氨酸(Met或M)、丙氨酸(Ala或A),和甘氨酸(Gly或G)。“酸性氨基酸”是指侧链pK值小于7的亲水性氨基酸,其在生理pH下典型地带负电荷。酸性氨基酸包括谷氨酸盐(Glu或E),和天冬氨酸盐(Asp或D)。

[0110] 序列同一性用来评价两条序列的相似性;当比对两条序列的残基位置之间的最大对应性时,其通过计算相同残基的百分比来确定。可以使用任意已知的方法来计算序列同

一性；例如，可获得计算机软件来计算序列同一性。序列同一性可以例如通过软件诸如由 Swiss Institute of Bioinformatics 维持的 NCBI BLAST2 服务，BLAST-P，Blast-N 或 FASTA-N，或本领域中已知的任意其他适宜的软件来计算。

[0111] 如本文所述，基本上相同的序列可以在氨基酸水平与本文所述的序列至少 90% 相同；在另一个实例中，基本上相同的序列可以与本文所述的序列至少 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100% 相同，或其间的任意百分比。重要地是，基本上相同的序列保留了参考序列的活性和特异性。在非限制性实施方案中，序列同一性的差异可以由一个或多个保守氨基酸突变引起。在非限制性实例中，涵盖包含与本文所述的特定序列至少 85%、90%、95%、98% 或 99% 相同的序列的抗体。

[0112] 当比较序列时，标注为 mAb 3C7、8D12 和 7H5 的本发明的抗体彼此相关联，具有约 90% 或更高的相似性（或 $\geq 90\%$ 同一性）。尽管如此，产生基本上相同活性的序列变异将被认为是基本上相同的序列。

[0113] 由于改变诸如人源化所引起的序列变化可以以可预测的方式改变序列，并且是本领域技术人员所理解的。因此，此类改变的序列可以具有大量的被改变的残基使得同一性低于上面提到的 90% 的值。序列的变异可以存在于 CDR 以外的区域中，或可以在 CDR 内，条件是实现基本上相同的结合。

[0114] 抗体也可以包含附加序列以辅助重组抗体的表达、检测或纯化。可以使用本领域技术人员已知的任意此类序列或标签。例如，抗体可以包含靶向或信号序列（例如，但不限于 ompA）、检测/纯化标签（例如，但不限于 c-Myc、His₅、His₆ 或 His₈G）、或其组合。在另一个实例中，信号肽可以是 MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO:59) 或 MDWTWRILFLVAAATGTHA (SEQ ID NO:60)。在进一步的实例中，附加序列可以是生物素识别位点。如本领域技术人员也已知的是，接头序列可以与附加序列或标签一起使用，或可以充当检测/纯化标签。

[0115] 多聚化、连接和货物分子

[0116] 抗体可以是多价展示形式，在本文中也称作多价递呈。多聚化可以通过本领域中已知的任何合适方法来实现。例如，且非以任何方式限制，多聚化可以使用自组装分子，和/或通过表达包含抗体和 AB₅ 毒素家族的 B-亚基的五聚化结构域的融合蛋白产生五聚体来实现。然后五聚化结构域组装成五聚体。多聚体也可以使用多聚化结构域来形成，其可以称作“combody”形式来描述抗体的融合体，其中卷曲螺旋肽产生多聚分子。其他形式的多价展示也涵盖在本文中。例如，且非限制性地，抗体可以作为二聚体、三聚体或任意其他合适的寡聚体呈现。这可以通过本领域中已知的方法来实现，例如，利用直接连接相连，利用 c-jun/Fos 相互作用，使用杵臼 (knob into hole) 相互作用。

[0117] 上述多聚体的每个亚基可以包含相同或不同的抗体，它们可以具有相同或不同的特异性。另外，多聚化结构域可以根据需要使用接头连接到抗体；此类接头应当具有足够的长度和适宜的组成以提供两个分子的柔性附接，但不应当妨碍抗体的抗原结合特性。例如，且非以任何方式限制，所述抗体可以连接到货物分子。货物分子可以是任意合适的分子。例如，货物分子可以是检测剂、治疗剂、药物、肽、酶、生长因子、细胞因子、受体陷阱、抗体或其片段（例如，IgG、scFv、Fab、V_HH、V_H、V_L，等）、化学化合物、碳水化合物部分、基于 DNA 的分子（反义寡核苷酸、微小 RNA、siRNA、质粒）、细胞毒性剂、病毒载体（腺病毒-、慢病毒-、逆转录病毒-）、一个或多个负载有任一种前述类型的货物分子的脂质体或纳米载体、或一个或多

个纳米粒子、纳米线、纳米管或量子点。所述抗体可以使用本领域中已知的任意方法(重组技术、化学缀合等)连接到货物分子。

[0118] 在一个非限制性实例中,货物分子可以是可检测标记、放射性同位素、顺磁标记诸如钆或氧化铁、荧光团、荧光剂、近红外(NIR)荧光色素或染料诸如Cy5.5、声振含气微泡、亲和标记物(例如生物素、亲和素等)、基于可检测蛋白的分子、核苷酸、量子点、纳米粒子、纳米线或纳米管或可以通过成像方法检测的任何其他合适的试剂。在具体的非限制性实例中,抗-AXL抗体可以连接到近红外荧光(NIRF)成像染料,例如,Cy5.5、Alexa680、Dylight680或Dylight800。

[0119] 本文所述的抗体可以用于细胞疗法、嵌合抗原受体(CAR-T细胞)疗法、溶瘤病毒中,以及用于制备这些和用于其他治疗性组合中。

[0120] 在另一个具体的非限制性实施方案中,所述抗体连接到药物,由此提供抗体-药物缀合物(ADC)。所述药物可以是任意类型的药物,例如但不限于细胞毒性剂或化疗剂。细胞毒性剂或化疗剂可以包括,但不限于微管抑制剂(诸如美登素和奥瑞他汀)、DNA损伤剂(诸如卡奇霉素和倍癌霉素(duocarmycin))、RNA聚合酶抑制剂(诸如 α -amanitin)、抗代谢药、与DNA反应的药剂(诸如烷化剂、配位化合物、铂络合物、DNA交联化合物等)、转录酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、DNA小沟结合化合物、抗有丝分裂剂(诸如长春花生物碱和紫杉烷)、抗肿瘤抗生素、激素、酶和其他有效药物。如本领域技术人员已知的那样,抗体-药物缀合物允许靶向递送药物,由此限制全身性暴露。在此构建体中,抗体结合细胞表面AXL受体的细胞外结构域;连接到抗体的药物由此被内在化并被递送到细胞内。所述药物然后在细胞中直接发挥活性或首先通过内体被活化,然后可以作用于细胞。

[0121] 如本文所述的货物分子可以通过本领域中已知的任何合适的方法连接到(在本文中也称作“缀合到”)抗体。例如,且非限制性地,货物分子可以通过共价键或离子相互作用连接到肽。连接可以通过化学交联反应,或使用重组DNA技术与任意肽表达系统(诸如基于细菌、酵母或哺乳动物细胞的系统)组合通过融合来实现。当将货物分子缀合到抗体时,可以使用合适的接头。将抗体连接到货物分子诸如治疗剂或检测剂的方法对于本领域技术人员是众所周知的。

[0122] 还涵盖编码如本文所述的分子的核酸序列。鉴于遗传密码的简并性,如技术人员容易理解的那样,大量核苷酸序列将具有编码期望多肽的作用。所述核酸序列可以进行密码子优化用于在各种微生物体中表达。还涵盖包含刚描述的核酸的载体。此外,涵盖包含所述的核酸和/或载体的细胞。

[0123] 分离的或纯化的抗体可以使用各种技术固定化在表面上;例如,抗体可以通过His-标签偶联、生物素结合、共价结合、吸附或通过其他途径连接或偶联在表面上。抗体的固定化可以用于各种应用中用于俘获、纯化或分离蛋白质。固相表面可以是任意合适的表面,例如,但不限于微量滴定板的孔表面,表面等离子体共振(SPR)传感器芯片的通道,膜,珠子(诸如基于磁或基于琼脂糖的珠子或其他色谱树脂),玻璃,塑料,不锈钢,薄膜,或任何其他有用的表面诸如纳米粒子、纳米线和悬臂梁表面。固定化到表面上的纯化抗体可以用于多种方法中,包括诊断方法。

[0124] 描述了体外检测AXL的方法,包括使样品与一种或多于一种的与检测剂连接的分离的或纯化的抗体接触。AXL-抗体复合物然后可以使用本领域中已知的检测和/或成像技

术检测。刚才所述的方法中的样品可以是任何合适的组织样品,例如但不限于血清样品、脉管组织样品或肿瘤组织样品;所述样品可以来自人或动物受试者。接触的步骤在本领域技术人员已知的合适条件下完成,所述条件用于形成抗体和AXL的复合物。检测的步骤可以通过本领域已知的任何合适的方法实现,例如,但不限于光学成像、免疫组织化学、分子诊断成像、ELISA或其他合适的方法。例如,与检测剂连接的所述分离的或纯化的抗体可以用于免疫测定(IA)中,所述免疫测定包括,但不限于酶IA(EIA)、ELISA、“快速抗原俘获”、“快速色谱IA”和“快速EIA”。在具体的非限制性实施方案中,所述体外方法用于检测循环细胞中的AXL,所述样品是血清样品。

[0125] AXL检测和疾病诊断

[0126] 描述了体内检测受试者中的AXL表达的方法。所述方法包括向受试者施用一种或多种与检测剂连接的分离的或纯化的抗体,然后检测与AXL结合的标记的抗体。检测的步骤可以包括本领域中已知的任何合适的方法,例如,但不限于PET、SPECT、或荧光成像、或任何其他合适的方法。刚才所述的方法可以用于检测组织中AXL的表达,所述组织例如但不限于肿瘤组织。

[0127] 上述方法中的体内检测步骤可以是用于诊断目的的全身成像或在特定部位处的局部成像,诸如但不限于实体瘤生长的部位,以定量的方式来评估疾病的进展或宿主对治疗方案的应答。上述方法中的检测步骤可以是免疫组织化学,或无创(分子)诊断成像技术(包括但不限于:光学成像);正电子发射计算机断层扫描术(PET),其中所述检测剂是同位素,诸如 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{124}I 、 ^{76}Br 、 ^{82}Rb 和 ^{68}Ga ,其中 ^{18}F 是临床上最多使用的;单光子发射计算机断层扫描术(SPECT),其中所述检测剂是放射性示踪剂,诸如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{201}Tl 、 ^{133}Xe ,取决于具体的应用;磁共振成像(MRI),其中所述检测剂可以是,例如且不限于钆、氧化铁纳米粒子和碳包覆的铁-钴纳米粒子,由此增加MRI对斑块检测的灵敏度;或造影增强超声(CEUS)或超声,其中所述检测剂是至少一种声敏的且充满气体的微泡。超声是一种广泛使用的用于筛查和早期检测人类疾病的技术,其比MRI或闪烁显影术廉价,并且因为其不涉及辐射要比分子成像模态(诸如放射性核素显影)更安全。

[0128] 将分子递送至表达AXL的细胞

[0129] 描述了一种将感兴趣分子运输到表达AXL的细胞中的方法。所述方法包括向受试者施用与抗体连接的分子。所述分子可以是任何期望的分子,包括如前所述的货物分子;所述分子可以使用任何合适的方法“连接”到抗体,包括但不限于缀合或作为融合蛋白表达。所述施用可以通过任何合适的方法,例如胃肠外施用,包括但不限于静脉内(iv)、皮下(sc)、和肌内(im)施用。以此方法,所述抗体将期望的分子以靶向的方式递送到细胞。

[0130] 组合物

[0131] 提供了组合物,其包含一种或多种的分离的或纯化的抗体。所述组合物可以包含如上所述的单一抗体,或可以是抗体的混合物。此外,在包含抗体混合物的组合物中,所述抗体可以具有相同的特异性,或可以具有不同的特异性;例如,所述组合物可以包含对AXL(相同或不同的表位)特异的抗体。所述抗体可以是双互补位的。所述组合物还可以包含与一种或多种货物分子连接的一种或多种抗体。例如,所述组合物可以包含一种或多种如本文所述的ADC。

[0132] 其中抗-AXL抗体用来递送有效细胞毒性剂的抗体-药物缀合物(ADC)方式增加了

有可能对药物应答的患者群体。不受理论约束,这很大程度上可能是由于需要AXL的表达增加而不是需要持续存在的AXL活性所产生的。另一优势是在对抗体有获得性耐药性的情况下,可以多次给予ADC。

[0133] 其中提供了所述抗体的组合物还可以包含药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。所述稀释剂、赋形剂或载体可以是本领域中已知的任何合适的稀释剂、赋形剂或载体,并且必须与所述组合物中的其他成分相容,与递送所述组合物的方法相容,且对所述组合物的受者无害。所述组合物可以为任何合适的形式;例如,所述组合物可以以混悬剂形式、粉剂形式(例如,但不限于冻干的或封入胶囊的)、胶囊或片剂形式提供。例如,当所述组合物以混悬剂形式提供时,载体可以包括水、盐水、合适的缓冲液或添加剂以提高溶解度和/或稳定性;在合适的pH下在缓冲液中实现重构以产生混悬液以确保抗体的活力。干粉也可以包含添加剂以提高稳定性和/或包含载体以增加容积/体积;例如干粉组合物可以包含蔗糖或海藻糖。在具体的非限制性实例中,所述组合物可以被配制成将抗体递送至受试者的胃肠道中。因此,所述组合物可以包括包封、缓释或其他合适的技术用于递送抗体。制备包含本发明的化合物的合适组合物在本领域技术人员的能力范围内。

[0134] 所述抗体可以用于治疗其中AXL表达失调的疾病或病况,或可以用于制备用于此类用途的药物。所述抗体可以连接至货物分子,或可以包含在组合物中。可以使用本文所述的抗体治疗的疾病和病况包括,但不限于:实体癌症肿瘤,包括,但不限于,乳腺癌、肾癌、子宫内膜癌、卵巢癌、甲状腺癌和非小细胞肺癌、黑色素瘤、前列腺癌、肉瘤、胃癌和葡萄膜黑色素瘤;液体肿瘤,包括但不限于,白血病(特别是髓性白血病)和淋巴瘤;子宫内膜异位症,脉管疾病/损伤(包括但不限于再狭窄、动脉粥样硬化和血栓形成),银屑病;由于黄斑变性引起的视觉缺陷;糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病变;肾病(包括但不限于肾小球肾炎、糖尿病肾病和肾移植排斥),类风湿性关节炎;骨关节炎、骨质疏松症和白内障。可以治疗的疾病和病况还包括被下列生物过程影响的那些:如在癌症中表现的侵袭、迁移、转移或耐药性;如在癌症中表现的干细胞生物学;侵袭、迁移、粘附或血管形成;血管重构;骨稳态;病毒感染;或如在肥胖症中表现的分化。式(I)的化合物还可以用来通过治疗脓毒症来调节炎症性过程,充当疫苗佐剂,和/或增强免疫受损患者中的免疫应答。在一个非限制性实施例中,所述疾病或病况可以是转移癌。

[0135] 本发明将在下面的实施例中进一步说明。然而,要理解的是这些实施例仅用于说明的目的,不应当用于以任何方式限制本发明的范围。

[0136] 实施例

[0137] 实施例1:抗-AXL抗体的制备

[0138] 通过用重组人AXL蛋白的细胞外结构域(rhAXL-ECD;SEQ ID NO:58)免疫小鼠以及通过遗传免疫生成针对AXL的单克隆抗体(mAb)。

[0139] 制备rhAXL-ECD:包含C-末端His8-标记的重组人(rh)AXL细胞外结构域(ECD;SEQ ID NO:71)的合成重组片段的pTT5构建体在CHO细胞中表达,通过Ni-琼脂糖纯化并通过SDS-PAGE验证(数据未显示)。

[0140] 免疫:通过遗传免疫生成小鼠mAb。对于遗传免疫,将小鼠采血(免疫前血清)并在第0天和第42天通过流体动力学尾静脉递送技术(HTV)使用100μg用于表达可溶性rhAXL-ECD的pTT40表达质粒进行免疫。7-10天后将小鼠采血,通过ELISA测量血清滴度。4-5个月

后,在融合实验前3-4天通过HTV使用100 μ g pTT40-AXL-H8G完成加强注射。

[0141] 融合实验和杂交瘤选择。所有操作在无菌条件下完成。在IMDM (Hy-Clone) 中收获脾细胞并使用PEG融合方案将其与NS0骨髓瘤细胞系融合。为此,将脾细胞和骨髓瘤细胞在IMDM中洗涤,在RBC裂解缓冲液(Sigma)中计数并以5:1的比率混合在一起。沉淀的细胞通过在1分钟内逐滴添加1ml在PBS中的50%PEG 4000 (EMD-Millipore) 溶液融合在一起,并在37 $^{\circ}$ C另外温育90秒。通过在22 $^{\circ}$ C在2分钟内添加30ml IMDM终止反应。温育10min后,将刚融合的细胞以233 $\times$ g离心10分钟。细胞在补充有10%热灭活FBS的IMDM (Sigma) 中洗涤一次,并以 2×10^5 个输入骨髓瘤细胞/ml的浓度悬浮在HAT选择培养基(IMDM)中,所述HAT选择培养基(IMDM)含有20%热灭活FBS、青霉素-链霉素(Sigma)、1ng/ml小鼠IL-6 (Biosource)、HAT培养基补充剂(Sigma)和L-谷氨酰胺,并在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂温育。第二天,洗涤杂交瘤细胞并以 2×10^5 个输入骨髓瘤细胞/ml的浓度悬浮在补充了5%热灭活FBS、1ng/ml小鼠IL-6和10 μ g/ml FITC-Fab' 2山羊抗-小鼠IgG (H+L) (Jackson) 的半固体培养基D (StemCell) 中。将细胞混合物接种在皮氏培养皿 (Genetix) 中并进一步在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂温育6-7天。然后使用哺乳动物细胞克隆采集器 (CLONEPIXTM FL, Molecular Devices) 将分泌性克隆转移到无菌96孔板 (Costar),所述无菌96孔板 (Costar) 含有补充有20%热灭活FBS、青霉素-链霉素(Sigma)、1ng/ml小鼠IL-6 (Biosource)、HT培养基补充剂(Sigma)和L-谷氨酰胺的200 μ l IMDM,并在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂温育2-3天。

[0142] 收集杂交瘤上清液并通过ELISA评价与rhAXL-ECD蛋白的结合。为此,用25 μ l在PBS中的5 μ g/ml rhAXL-ECD包被96孔半区培养板 (Costar),并在4 $^{\circ}$ C温育过夜。用PBS将微量培养板洗涤3次,用PBS-BSA1%封闭,并加入25 μ l杂交瘤上清液并在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂温育2小时。用PBS-TWEENTM 20 0.05%洗板4次,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂与25 μ l在封闭缓冲液中稀释1/3000的二抗碱性磷酸酶缀合的F(ab)' 2山羊抗小鼠IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) 温育1小时。用PBS-TWEENTM 20 0.05%洗涤4次后,加入25 μ l的1mg/ml pNPP底物溶液,并在37 $^{\circ}$ C进一步温育1小时。使用酶标仪 (Spectramax 340PC, Molecular Devices) 完成OD405nm测量。

[0143] 选择ELISA阳性抗体(包括克隆F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8和F107-10G1)并以10ml体积的杂交瘤上清液完成小规模纯化。mAb通过吸附到蛋白质G Mag SEPHAROSETM Extra (GE Healthcare Life Sciences#28-9670-70) 上,在PBS中洗涤,利用200 μ l的甘氨酸200mM pH 2.5洗脱两次,在TRIS-HCl 1M pH 9.0中中和进行纯化。纯化的抗体使用在PBS中预平衡的Zeba Spin树脂 (Pierce) 脱盐,并通过0.22 μ m膜 (Millipore) 进行滤膜过滤。抗体溶液的终浓度通过nano-drop (#ND-1000) 测定。

[0144] 实施例2:抗-AXL mAb的交叉反应性评估

[0145] 评价了在实施例1中纯化的抗-hAXL单克隆抗体对重组AXL胞外结构域的交叉反应性结合特性。

[0146] 为了评价mAb与TAM受体酪氨酸激酶亚家族的其他成员的交叉反应性,通过ELISA测量所述mAb与rhAXL-ECD、rhMER-ECD、rhTyro-3和BSA (阴性对照) 的结合。将96孔半区培养板 (Costar) 用25 μ l在PBS中的5 μ g/ml rhAXL-ECD、rhMER-ECD、rhTyro-3或BSA包被并在4 $^{\circ}$ C温育过夜。微量培养板用PBS洗涤3次,用PBS-BSA 1%封闭,加入25 μ l在PBS-BSA 1%中稀释的10 μ g/ml,并在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂温育2小时。用PBS-TWEENTM 20 0.05%洗板4次,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂与25 μ l在封闭缓冲液中稀释1/5000的二抗碱性磷酸酶缀合的F(ab)' 2山羊抗小鼠IgG (H

+L) (Jackson Immunoresearch) 温育1小时。用PBS-TWEEN 20 0.05%洗涤4次后,加入25μl 的1mg/ml pNPP底物溶液,并在37℃进一步温育1小时。使用酶标仪 (Spectramax 340PC, Molecular Devices) 完成OD405nm测量。

[0147] 表1提供了抗-AXL单克隆抗体对来自相同蛋白家族的其他靶标的交叉反应性评估的结果。显示了在OD405nm的测量值。

[0148]

表 1				
抗-AXL mAb 的交叉反应性评估				
纯化的抗体	包被抗原			
	AXL	MER	Tyro3	BSA
F107-7H5-2	2,403	0,000	0,000	0,000
F107-8D12-2	2,592	0,000	0,000	0,000
F107-10G1-3	1,758	0,000	0,000	0,000
F111-3C8-2	2,301	0,000	0,000	0,000
F111-5E9-2	1,364	0,000	0,000	0,000

[0149] 交叉反应性评估的结果表明所述5个mAb特异性地结合AXL的细胞外结构域,即,它们不与BSA或TAM家族的其他成员的细胞外结构域(即,Tyro3和MER)交叉反应。

[0150] 实施例3:ADC潜力的功能表征

[0151] 在ADC替代物筛选测定中评价实施例1中纯化的抗-hAXL-ECD单克隆抗体的内在化能力和抗体-药物缀合物(ADC)潜力。使用非小细胞肺癌(NSCLC) A549细胞、乳腺癌MDA-MB 231细胞或成胶质细胞瘤U87MG细胞,它们全部都表达中水平至高水平的AXL。选择在基于二级缀合物皂草素的细胞毒性筛选中在已知表达感兴趣的肿瘤靶标(即,AXL)的多于一个的肿瘤细胞系中显示低或亚nM(IC₅₀) 功效的mAb。

[0152] 细胞培养。下列的细胞系获自ATCC并根据供应商的建议进行培养:A549人非小细胞肺癌(NSCLC)、MDA-MB-231三阴(ER-/PR-/HER2低) 乳腺癌(TNBC) 和U87MG成胶质细胞瘤细胞系。通常,细胞一周传代一次或两次,并对于所有试验在4-6周内使用。

[0153] 对作为抗体-药物缀合物的抗体介导的细胞毒性的评价。一级小鼠抗体(典型地浓度为1nM) 和等摩尔浓度的与皂草素毒素(一种需要被内在化以引起细胞死亡的核糖体灭活酶) 化学缀合的抗-小鼠二抗(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) 一起温育。然后将抗体复合物加入至所指示的细胞类型(一式三份地接种) 并在37℃温育3天后测量它们对细胞活力的作用。使用与无一级抗体(仅二抗) 或无关一级抗体(对照人IgG) 温育来评估无靶标靶向的细胞毒性。使用常规方法测量细胞活力&代谢,诸如使用类似resurizin染料的阿尔玛蓝(Alamar Blue) 或诸如磺酰罗丹明B的测量蛋白含量的试剂。

[0154] 将A549NSCLC细胞以在100μl RPMI-5%FBS中2000个细胞/孔的密度接种在96孔板中的RPMI-5%FBS中。第二天,20nM抗-AXL mAb与20nM的Mab-Zap二抗(Advanced Targeting

Systems, San Diego, CA) 混合,并在室温温育30min;将11 μ l的该混合物一式三份地加入至细胞,使得1nM终浓度的抗-AXL mAb (F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8或F107-10G1) 和皂草素缀合的抗-小鼠二抗 (Mab-Zap) 的1:1复合物与所述细胞温育。温育 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 湿化培养箱) 72小时后,使用阿尔玛蓝根据生产厂商的指导 (BIOSOURCE) 测定细胞活力。随后,还使用上述的方法测试在1nM浓度时导致A549细胞活力超过50%减小的抗体对乳腺癌MDA-MB 231细胞或成胶质细胞瘤U87MG细胞系的细胞毒性作用。

[0155] 图2显示了对抗-hAXL-ECD mAb的ADC替代物筛选测定的结果。与用单独二级缀合物 (Mab-Zap) 处理的细胞相比,所述测定中的抗体导致A549细胞存活率显著减小。显示了三次试验的平均值+SEM。

[0156] 在图2中,相对于单独mAb-ZAP二级缀合物的细胞存活率 (显示为100%) 来表示细胞的存活率。所选的mAb克隆 (F107-7H5、F107-8D12、F107-10G1、F111-3C8和F111-5E9) 导致A549细胞和至少又一种细胞系的活力减小50%以上,并且被选择用于与高细胞毒性药物DM1的直接缀合。从被测试的超过250种一级小鼠mAb中,与这5种抗体相关的高度细胞毒性 (IC₅₀<1nM) 证明了它们表现出高度的内在化和适宜的细胞内途径以实现皂草素毒素的活化,使得它们理想地用于ADC开发。并不意外,在此筛选中鉴定的抗体全部都表现出与肿瘤细胞表面上的AXL的大量结合 (图3)。

[0157] 图3显示了测定抗-AXL mAb与细胞表面表达的AXL的结合特性的流式细胞试验的结果。图面A显示了线性标度剂量响应曲线,图面B显示了对数标度剂量响应曲线。

[0158] 实施例4:DM1缀合和ADC测试

[0159] 将实施例1中纯化的抗-hAXL-ECD单克隆抗体通过赖氨酸残基缀合至与N2'-去乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素 (DM1) 连接的琥珀酰亚胺基反式-4-[马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸酯 (SMCC)。

[0160] 产物纯度和药物:通过基于UPLC的尺寸排阻色谱 (SEC) 确定抗体比率。

[0161] 缀合:使用预先平衡的离心脱盐柱将纯化的抗-hAXL-ECD mAb (F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8或F107-10G1;实施例1) 缓冲液交换至缀合缓冲液 (100mM磷酸钠, 20mM NaCl, 2mM EDTA pH 7.2) 中。利用缀合缓冲液将每种mAb的浓度调整至2mg/mL并每种使用总计200 μ g用于缀合。在二甲基乙酰胺 (DMA) 中制备SMCC-DM1储备液。将来自DMA储备液的SMCC-DM1加入至每种mAb以实现SMCC-DM1:mAb摩尔比为10.0。将所述溶液充分混合并在37 $^{\circ}$ C温育3小时。通过使反应混合物通过在添加了0.02%w/v聚山梨醇酯-20的缀合缓冲液中平衡的两个离心脱盐柱来终止反应。

[0162] 通过将来自280nm和252nm两处的UPLC-SEC色谱图的单峰积分并将它们与在相同波长处的未缀合抗体和游离药物的消光系数比进行比较来测定药物-抗体比 (DAR)。由在色谱图所观察到的单体、高分子量种类和低分子量种类的总积分面积测定单体百分比。结果显示在表2中,表2提供了对与DM1缀合的F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8和F107-10G1通过UPLC-SEC测定的药物-抗体比和聚集体百分比。

表 2
药物-抗体比和聚集体百分比

mAb	DAR	聚集体百分比
F111-3C8	7.21	27.0
F107-7H5	5.46	1.1
F107-8D12	4.90	1.8
F107-10G1	5.21	0.7
F111-5E9	5.22	1.1

[0163]

[0164] 细胞培养。NCI-H292和A549人非小细胞肺癌 (NSCLC) 和MDA-MB-231三阴 (ER-/PR-/HER2低) 乳腺癌 (TNBC) 细胞系获自ATCC并根据供应商的推荐进行培养。HaCaT细胞是一种自发生化的人角质形成细胞,其已经被广泛用于研究皮肤生物学和分化。该细胞系获自Cell Line Services (DKFZ, Heidelberg, 德国) 并根据供应商的推荐进行培养。通常,细胞一周传代一次或两次,并对于所有试验在4-6周内使用。

[0165] ADC测试:测试上面制备的抗-AXL ADC对已知表达AXL的各种培养细胞系的活力的作用,所述细胞系包括非小细胞肺癌 (NSCLC) NCI-H292和A549细胞系、人乳腺癌MDA-MB-231肿瘤细胞系以及永生化角质形成细胞。暴露5天后,使用磺酰罗丹明B试剂评估细胞生长/活力并生成剂量-响应曲线从而使用来自GraphPad Prism v6.0软件的log (抑制剂) 相对于应答-可变斜率 (四参数) 模型来测量它们的功效 (IC₅₀) 和效力 (%最大抑制)。

[0166] 图4显示了抗-AXL-DM1缀合物对表达AXL的H292肿瘤细胞系、A549细胞系、人乳腺癌MDA-MB-231肿瘤细胞系以及永生化HaCaT角质形成细胞的细胞活力的活性结果。

[0167] 与非靶向的无关人IgG-DM1缀合物阴性对照相比,DM1-缀合的抗-AXL抗体证明在被分析的肿瘤细胞系中有良好的效力 (55-74%最大生长抑制) 和强功效 (IC₅₀<0.1nM)。相比之下,在表达AXL的非致瘤性永生化HaCaT角质形成细胞上观察到非常小的毒性。

[0168] 表3提供了对抗-AXL抗体的ADC测试的结果。%max inh=最大抑制百分比。

表 3
对抗-AXL 抗体的 ADC 测试的结果。

细胞系		F107-7H5-DM1	F107-8D12-DM1	F107-10G1-DM1	F111-3C8-DM1	F111-5E9-DM1	hIgG-DM1
H292	IC ₅₀ (nM)	0.113	0.176	0.044	0.419	0.159	>10
	% max inh	74.0	72.8	57.7	70.3	64.6	不完全
A549	IC ₅₀ (nM)	0.120	0.218	0.058	0.313	0.169	>10
	% max inh	58.5	61.8	55.7	71.2	70.0	不完全
231	IC ₅₀ (nM)	0.037	0.056	~ 0.029	0.147	0.067	>10
	% max inh	71.4	73.4	64.9	77	69.2	不完全
HaCaT	IC ₅₀ (nM)	无作用	无作用	无作用	无作用	无作用	无作用
	% max inh	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全	不完全

[0169] 实施例5:通过流式细胞术测试细胞表面结合

[0171] 使用H292细胞系(因为其被抗-hAXL-ECD mAb强烈抑制(参见实施例2))通过流式细胞术评价在实施例1中纯化的抗-hAXL-ECD单克隆抗体对细胞表面上的AXL的结合特性。

[0172] 通过流式细胞术检测抗体与表面AXL的结合。在分析前,接种细胞使得它们在分析当天不超过80%汇合。细胞在PBS中洗涤,并通过添加细胞解离缓冲液(Sigma)收获。包含 2.5×10^5 个细胞(在500 μ l相应的细胞培养基中)的细胞悬液与各种浓度(0.01-10nM)的抗-AXL抗体在4℃温育2h(以防止内在化)。在用细胞培养基洗涤一次后,将一抗与2 μ g DYLIGHT™ 488缀合的AffiniPure山羊抗-小鼠IgG Alexa 488二抗(Jackson ImmunoResearch)在100 μ l培养基中在4℃温育1h。在分析前,将细胞沉淀物重悬在300-500 μ l培养基中并通过50 μ m尼龙网过滤器过滤以移除细胞聚集物。使用BD LSRII流式细胞仪(Becton-Dickinson Biosciences, CA, USA)和标准滤光片组使用BD FACSDiva™采集软件根据厂商的说明书对关于前向散射、侧向散射参数和碘化丙啶染料排除设门控的10,000个有活力的细胞进行流式细胞分析。

[0173] 对抗体结合的特异性检测计算为在减去在缺少一抗(但含有检测抗体)的情况下结合的平均荧光强度的背景水平后与每种一抗结合的平均荧光强度。然后利用GraphPad Prism v 6.0中的Hill斜率模型使用单位点-特异性结合测定结合参数B_{max}(在受体饱和时的最大荧光信号)和K_D(表观细胞结合常数)。

[0174] 结果显示在图3和表4中。这些结果显示与阴性结合对照(300nM小鼠IgG)相比,mAb 7H5、8D12和5E9强烈结合(表观结合常数K_D≤1nM)。

[0175] 表4提供了抗-AXL mAb与H292细胞上的基于细胞的AXL的结合特性。

表 4
抗-AXL mAb 与 H292 细胞上的基于细胞的 AXL 的结合特性

[0176]

最佳拟合值	F107-8D12	F107-7H5	F111-3C8	F107-10G1	F111-5E9
Bmax (MFI)	1309	1431	1477	937	1149
Kd (nM)	0.08802	0.1038	1.227	0.1005	0.1767

[0177] 实施例6:表位分组实验

[0178] 为了评价实施例1的抗-hAXL-ECD mAb是否结合相同的表位区域,进行表面等离子体共振表位分组实验。

[0179] 抗体直接固定化在芯片表面上(‘mAb1’),之后使rhAXL ECD流动,接着使相同或不同的抗体(‘mAb2’)流动。所有试验在ProteOn XPR36生物传感器上在25℃执行,使用PBST作为运行缓冲液(含有0.05%v/v Tween20的PBS)。GLM传感器芯片和偶联剂(10mM乙酸钠,pH 4.5,磺基-N-羟基琥珀酰亚胺(SNHS),1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC),和乙醇胺)购自BioRad,Inc (Hercules,CA)。

[0180] 建立抗体阵列。抗体(Mab1)以30μl/min固定化在GLM芯片表面上。活化试剂(以在水中的0.4M EDC和0.1M SNHS的储备液浓度)在水中各自稀释20倍。利用稀释的活化试剂活化顶部(A1)水平通道(Proteon控制软件中的分析物通道)3分钟。下一步,mAb(实施例1)各自在10mM乙酸钠pH4.5中稀释到20μg/ml并在单独的垂直(L1至L6)通道(Proteon控制软件中的配体通道)中注入3分钟,接着注入乙醇胺3分钟以封闭各个斑点。然后旋转多通道模块(MCM)并在活化的水平通道(A1)上完成另一个3分钟乙醇胺注入。然后在每个水平通道(A2至A6)上重复此四步“活化-结合-和-2次失活”步骤。

[0181] 夹心表位分组。以30μl/min在分析物方向上完成两步夹心表位分组。将100nM rhAXL-ECD蛋白注入3分钟,接着立即是100nM mAb2的3分钟注入。固定化mAb(mAb1)表面通过以100μl/min注入0.85%磷酸18秒再生。对每个单个mAb2重复此两步注入(rhAXL-ECD-mAb2)。每个mAb还与mAb1(固定化在芯片上)和mAb2(在溶液中)同时测试。为了监测从固定化mAb1上的AXL解离,注入PBST代替mAb2。

[0182] 表5提供了对mAb的表位分组结果。标记为“nc”的细胞表示没有竞争,“sc”细胞表示自竞争,“C”细胞表示竞争。

表 5
mAb 的表位分组结果

[0183]

	F107-8d12	F107-7H5	F111-3C8	F111-5E9	F107-10G1
F107-8D12	sc	C	nc	nc	nc
F107-7H5	C	sc	nc	nc	nc

[0184]

F111-3C8	nc	nc	sc	C	nc
F111-5E9	nc	nc	C	sc	nc
F107-10G1	nc	nc	nc	nc	sc

[0185] 从表5中显示的结果,可以看出4个mAb落入2个表位箱(bin),即,它们彼此竞争与AXL的结合;7H5竞争8D12,反之亦然;3C8竞争5E9,反之亦然。10G1不与其他mAb竞争。相反,没有基于在ADC替代物测定中内在化的能力选择的抗-AXL mAb倾向于将它们自身分布到大量的箱中(数据未显示)。该数据提示对内在化抗体的功能选择产生了选择性地与AXL细胞外结构域上的3个主要位点结合的亚组。而且,另外的使用相似方法的SPR结合研究证明这些位点对应于免疫球蛋白样结构域-1和-2内的区域。利用单个AXL细胞外亚结构域(免疫球蛋白样结构域或纤连蛋白III型-样结构域)执行的表位分组实验(与上面相同的方法)显示mAb F107-10G1结合免疫球蛋白样结构域-1中的序列,其不与测试的其他所有IgL1-结合抗体竞争,与利用全长AXL胞外结构域的结果一致。这些结果表明在与ADC mAb相互作用的免疫球蛋白样结构域-1内存在至少两个独立的表位。

[0186] 实施例7:通过酵母表面展示进行表位定位

[0187] 使用酵母表面展示来定位与实施例1的抗-hAXL-ECD mAb结合的序列。

[0188] 表位定位。表达hAXL胞外结构域(ECD)及其片段并使用酵母表面展示方法(Feldhaus等人,2003)将其共价展示在酵母细胞的表面上。YSD载体(pPNL6)来自美国的太平洋西北国家实验室(The Pacific Northwest National Laboratory,USA)。覆盖整个hAXL-ECD的hAXL片段(图5)作为融合蛋白(Aga2-HA-(hAXL)-MYC表达在酵母细胞表面上。展示的hAXL片段用来定位与实施例1的抗-hAXL-ECD mAb结合的hAXL的结构域。使用全酵母细胞ELISA执行mAb与酵母细胞的结合。展示的融合蛋白的相对量通过用抗-MYC抗体探测,接着使用HRP-缀合的二抗来测量,并用来归一化实施例1的mAb的结合信号。

[0189] 图5是人AXL胞外结构域和跨膜结构域的示意性图示。覆盖整个hAXL-ECD的十个肽在酵母膜上表达以定位抗-AXL mAb的结合表位。给出所述肽并编号为1-10。

[0190] 表6显示了与展示在酵母细胞上的AXL细胞外结构域中的各个区域的抗-AXL mAb结合的结果。实施例1的mAb结合两个区域:免疫球蛋白样结构域1(IgL1,对应于aa 26-138)或免疫球蛋白样结构域2(IgL2,对应于aa 135-226)。这些结果与实施例6中获得的结果一致。

[0191]

表 6		
针对 AXL 细胞外结构域中的各个区域的抗-AXL mAb 结合的结果		
mAb	表位位置	表位构象
F107-7H5	IgL1	构象的
F107-8D12	IgL1	构象的
F111-5E9	IgL2	构象的
F111-3C8	IgL2	构象的
F107-10G1	IgL1	构象的

[0192] 表位的性质。为了确定用于mAb的表位是连续的(线性)还是非连续的(构象的),表达IgL1或IgL2结构域的各种片段并将其展示在酵母细胞上,并使用如上所述的细胞ELISA测定与mAb的结合。任一个IgL结构域的亚片段中没有一个是与实施例1的任一个mAb显著结合,尽管通过抗-MYC信号的信号判断这些亚片段良好地展示在酵母细胞的表面上。这些结果强烈提示用于实施例1的mAb的表位需要IgL结构域的整体序列信息,因此大部分是构象的。

[0193] 实施例8:抗体测序

[0194] 将实施例1的抗-hAXL mAb的VH和VL结构域测序并分析。

[0195] VH和VL结构域以及CDR区的序列显示在表7中。使用基于互联网的软件对VH和VL链的CDR1-3区的共有结合序列进行序列分析。该分析的结果表明mAb F107-7H5的VH和VL区两者的CDR区与F107-8D12的非常相似(有2个氨基酸改变)。这些抗体聚集在一起并识别IgL1内的共用线性表位。相反,其余的抗体倾向于形成较小的分化簇,大部分结合IgL2,F107-10G1例外(其结合IgL1上的位点,与所选择的大多数IgL1结合抗体不同)。

[0196]

表 7				
mAb F107-7H5、F107-8D12、F111-5E9、F111-3C8 和 F107-10G1 的 CDR 序列				
mAb	轻链 CDR		重链 CDR	
F107-7H5	V _L	SEQ ID NO:38	V _H	SEQ ID NO:39
	L1	KSSQSLLNSRTRKIYLA (SEQ ID NO:9)	H1	GYTFTSYWIN (SEQ ID NO:12)
	L2	WASTRQS (SEQ ID NO:10)	H2	NIYPDSSSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:13)
	L3	KQSYNLWT (SEQ ID NO:11)	H3	DTYGGSPDY (SEQ ID NO:14)
F107-8D12	V _L	SEQ ID NO:40	V _H	SEQ ID NO:41
	L1	KSSQSLLNTRTRKKNYLA (SEQ ID NO:15)	H1	GYTFISFWIN (SEQ ID NO:17)
	L2	WASTRES (SEQ ID NO:16)	H2	NIFPGSSSTNYNEKFKS (SEQ ID NO:18)
	L3	KQSYNLWT (SEQ ID NO:11)	H3	DYYGGSPDY (SEQ ID NO:19)
F111-3C8	V _L	SEQ ID NO:42	V _H	SEQ ID NO:43
	L1	SASSSVSYMY (SEQ ID NO:26)	H1	GYTFTSYWMH (SEQ ID NO:29)
	L2	RTSNLAS (SEQ ID NO:27)	H2	NINPNSTSADYNEKFKR (SEQ ID NO:30)
	L3	QQYHNPPT (SEQ ID NO:28)	H3	PLMGPYWYFDV (SEQ ID NO:31)
F111-5E9	V _L	SEQ ID NO:44	V _H	SEQ ID NO:45
	L1	RASQDINNYLN (SEQ ID NO:20)	H1	KYGMN (SEQ ID NO:23)
	L2	YISRLHS	H2	WINTYTGEPTYADDFKG

[0197]

		(SEQ ID NO:21)		(SEQ ID NO:24)
	L3	QQGNTLPFT (SEQ ID NO:22)	H3	GGYYSNPIYPMDY (SEQ ID NO:25)
F107-10G1	V _L	SEQ ID NO:46	V _H	SEQ ID NO:46
	L1	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO:32)	H1	NYGMS (SEQ ID NO:35)
	L2	WASTRHT (SEQ ID NO:33)	H2	SISGGGGRTYYLDNVKG (SEQ ID NO:36)
	L3	QQHFTTPLT (SEQ ID NO:34)	H3	GARASYFAMDY (SEQ ID NO:37)

[0198] 实施例9: 重组抗体制备和纯化

[0199] 为了有助于大规模mAb制备和制备之间的一致性,在CHO细胞中重组产生实施例8中鉴定的抗-hAXL-ECD mAb。

[0200] V_H和V_L区(参见实施例8)作为与人IgG1恒定区(分别为人IgG1重链和人κ轻链)的融合体克隆到pTT5载体中,由此生成嵌合mAb。

[0201] 表8提供了各个嵌合mAb的序列:hFC-F107-7H5,hFC-F107-8D12,hFC-F111-5E9,hFC-F111-3C8和hFC-F107-10G1。另外,所有轻链序列包含N-末端处的信号序列MVLQTQVFISLLLWISGAYG(SEQ ID NO:59),而重链序列包含N-末端处的信号序列MDWTWRILFLVAAATGTHA(SEQ ID NO:60)。

[0202]

表 8 嵌合 mAb 的序列	
mAb	序列
hFC-F107-7H5 轻链	SEQ ID NO:48
hFC-F107-7H5 重链	SEQ ID NO:49
hFC-F107-8D12 轻链	SEQ ID NO:50
hFC-F107-8D12 重链	SEQ ID NO:51
hFC-F111-3C8 轻链	SEQ ID NO:52
hFC-F111-3C8 重链	SEQ ID NO:53

[0203]

hFC-F111-5E9 轻链	SEQ ID NO:54
hFC-F111-5E9 重链	SEQ ID NO:55
hFC-F107-10G1 轻链	SEQ ID NO:56
hFC-F107-10G1 重链	SEQ ID NO:57

[0204] 经2mL表达scout验证嵌合mAb表达:CHO细胞用包含V_L和V_H的构建体(1:1比率)瞬时转染;在第7天收获条件培养基(CM),并通过SDS-PAGE评价mAb表达水平(数据未显示)。嵌

合mAb表达良好,通过以相同的构建体比率瞬时转染CHO细胞启动小规模制备(50mL)。在第7天收获条件培养基(CM),将嵌合mAb纯化(ProtA)、定量并通过SDS-PAGE评价。数据显示所有5种嵌合mAb均被瞬时转染的CHO细胞良好表达。

[0205] 为了确认重组表达的嵌合mAb与杂交瘤表达的mAb表现类似,进行SPR结合实验以确保AXL结合没有减弱。

[0206] 实施例10:分离抗-AXL mAb和sdAb

[0207] 在此实施例中,进行针对人AXL胞外结构域的美洲驼sdAb的分离。

[0208] 材料和方法

[0209] 重组人AXL胞外结构域(rhAXL ECD)的制备。将包含C-末端His₈-标记的重组人AXL胞外结构域的合成重组片段的哺乳动物表达载体(pTT5)瞬时转染到CHO细胞中,通过Ni-琼脂糖纯化,并通过SDS-PAGE验证(数据未显示)。

[0210] 美洲驼单结构域抗体(sdAb)生成。通过用rhAXL ECD蛋白免疫美洲驼,接着淘选从外周血淋巴细胞构建的噬菌体展示的VHH文库,从而生成美洲驼sdAb(VHH)。简言之,在第0、21、28、35和42天用100μg rhAXL免疫一只美洲驼(Lama glama)。在第0天抗原与弗氏完全佐剂混合,在第21、28、35和42天与弗氏不完全佐剂混合。在第0天的第一次免疫前(免疫前)以及第35和49天抽取血清,然后使用蛋白质A和蛋白质G亲和层析从重链IgG(hcIgG)分级出单独的常规IgG(cIgG)。对未分级和分级的血清针对rhAXL进行ELISA。简言之,将1μg在PBS中稀释的rhAXL在96孔MAXISORP™板(Nalge Nunc International,Rochester,NY)中包被过夜(100μl/孔,18h,4℃)。将板用5%脱脂奶/PBST封闭,用PBS-T(PBS+0.05%(v/v) Tween 20)洗涤,并施加免疫前总(未分级的)血清、免疫后总血清(第35天和第49天)和分级的血清(第49天;100μg/ml起始浓度)的连续稀释液。在室温温育1.5小时并用PBS-T洗涤后,加入山羊抗-美洲驼IgG-HRP(在PBS中1:10,000)在37℃持续1h。进行最后的PBS-T洗涤,然后加入100μl/孔的TMB底物(KPL,Gaithersburg,MD)持续10分钟。利用100μl/孔的1M H3PO4终止反应,并在BioRad酶标仪(Hercules,CA)上在450nm读数。

[0211] 对于噬菌体展示的VHH文库构建,使用QIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN, Mississauga,ON,Canada)从在免疫后第35天和第49天采集的大约 5×10^7 个淋巴细胞分离RNA。使用大约10μg的总RNA作为模板,利用低聚dT引物使用第一链cDNA合成试剂盒(GE Healthcare,Baie-d'Urfé, QC,加拿大)进行第一链cDNA合成。通过三个可变区特异性正义引物(MJ1、MJ2和MJ3)和两个反义CH2-特异性引物(CH2和CH2b3)的等摩尔混合物PCR扩增cDNA。简言之,以下列的成分在50μl的总体积中建立PCR反应混合物:5μl cDNA,5pmol MJ1-3引物混合物,5pmol CH2或CH2b3引物,5μl 10x反应缓冲液,1μl 10mM dNTP和2.5单位的**PLATINUM®**Taq DNA聚合酶(Invitrogen/Life Technologies,Burlington,ON,加拿大)。PCR方案由下面步骤组成:初始步骤在94℃ 3min,接着30个循环的94℃ 30s,57℃ 45s,72℃ 1min,和最后的延伸步骤在72℃ 10min。扩增的PCR产物在2%琼脂糖凝胶中泳动,观察到两个主要的条带:一个约850bp的条带,对应于常规IgG,和约600bp的第二个条带,对应于重链抗体(hcIgG)。切下较小的条带并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(QIAGEN)纯化并使用1μl DNA模板、各5pmol的MJ7引物和MJ8引物、5μl 10x反应缓冲液,1μl 10mM dNTP和2.5单位**Platinum®**Taq DNA聚合酶以50μl的总体积在第二次PCR中再扩增。PCR方案由下面步骤组成:初始步骤在94℃ 3min,接着30个循环的94℃ 30s,57℃ 30s,72℃ 1min,和最后的

延伸步骤在72℃ 7min。扩增的PCR产物,范围在340bp至420bp之间,对应用于hcIgG的VHH片段,使用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN)纯化,用SfiI限制性酶(New England BioLabs, Pickering, ON, 加拿大)消化并使用相同的试剂盒再纯化。50微克pMED1噬菌粒用SfiI在50℃消化过夜。

[0212] 为了尽量减小自连接,加入20单位的XhoI和PstI限制性酶,并将消化反应物在37℃温育另外2小时。20微克的已消化的噬菌粒DNA与6μg的已消化VHH片段在室温使用T4DNA连接酶(Invitrogen)及其试验方案连接3h。连接的材料使用QIAquick PCR纯化试剂盒以100μl的终体积纯化,并如所述的那样以5μl的份量电穿孔到市售的电感受态TG1大肠杆菌细胞(Stratagene, La Jolla, CA)。如所述的那样确定文库的大小。文库在2% (w/v) 葡萄糖的存在下在37℃以250rpm生长2h。将细菌细胞离心沉淀,重悬于含有35% (v/v) 甘油的2xYT/Amp/Glu(含有100μg/ml氨苄青霉素和2% (w/v) 葡萄糖的2xYT培养基)中,并以小的等分试样保存在-80℃。

[0213] 使用M13K07辅助噬菌体拯救噬菌体展示文库。使用两种策略从文库中选择AXL-特异性VHH。在第一种策略中,如Zhou等人,2010中所述同时针对固定化rhAXL ECD和A549肿瘤细胞淘选文库。在第二种策略中,针对rhAXL ECD淘选文库,并如Henry等人,2016中所述与AXL-特异性鼠mAb (5E9和10G1) 竞争性洗脱VHH-展示噬菌体。如Henry等人,2016中所述使用Illumina MiSeq下一代DNA测序解读文库噬菌体和从淘选中洗脱的噬菌体。

[0214] 结果

[0215] 如上面方法章节中所述,通过从免疫的美洲驼构建噬菌体展示VHH文库并对文库进行各种选择来鉴定针对rhAXL ECD的VHH。将输入(文库)VHH-展示噬菌体和输出(洗脱的)VHH-展示噬菌体测序,并鉴定在特定选择中选择性富集的单个VHH序列。

[0216] 图6图示了分离抗-rhAXL ECD sdAb的策略。在图面A和C中,从用rhAXL-ECD免疫的美洲驼构建的噬菌体展示VHH文库同时对固定化rhAXL和对AXL+A549肿瘤细胞进行淘选。鉴定了同时被富集用于与rhAXL ECD结合并内在化至A549细胞中的VHH(NRC-sdAb001, SEQ ID NO:119;NRC-sdAb002, SEQ ID NO:120) 以及被富集用于仅内在化至A549细胞中的VHH(NRC-sdAb003, SEQ ID NO:121;NRC-sdAb004, SEQ ID NO:122)。在图面B和D中,从用rhAXL-ECD免疫的美洲驼构建的噬菌体展示VHH文库针对rhAXL-ECD进行淘选,并使用AXL-特异性mAb 5E9或8D12竞争性洗脱VHH。使用下一代DNA测序鉴定使用此选择策略富集的VHH。

[0217] 实施例11:测定抗-AXL mAb和sdAb的DNA和氨基酸序列

[0218] 在此实施例中,描述了抗-AXL mAb和sdAb(根据实施例10分离)的DNA和氨基酸序列。

[0219] 材料和方法

[0220] 对于鼠mAb测序,从杂交瘤克隆提取总RNA(Qiagen, RNEasy),并逆转录成cDNA(SuperScript™, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)。使用在FR1中退火的简并正向引物和CH1中退火的单一反向引物的混合物(Novagen/EMD Millipore cat.no 69831-3)对编码VH和VL结构域的DNA进行PCR扩增(Platinum Taq或等效物)。将得到的扩增子亚克隆(TOPO-TA)并在ABI 3730xl仪器上使用Sanger法测序。

[0221] 对于美洲驼VHH DNA序列的测定,使噬菌体展示VHH文库接受多种体外选择(描述于实施例10中)并在Illumina MiSeq仪器上使用2×250bp读长(reads)测序。通过与选择前

相比选择后频率增加鉴定感兴趣的VHH序列。商业 (Geneart, Life Technologies) 合成编码VHH的DNA构建体, 并将其亚克隆进细菌表达载体中, 然后再次在ABI 3730xl仪器上使用Sanger法确认。

[0222] 结果

[0223] 通过对来源于杂交瘤细胞的扩增子的Sanger测序测定7个鼠mAb的VH和VL结构域的DNA序列。在含有片段可结晶区 (Fc区) 的哺乳动物表达载体中商业合成编码mAb VH/VL结构域的DNA构建体, 并通过Sanger测序验证。

[0224] 图7示出了具有以带下划线的粗体表示的使用International ImMunoGeneTics (IMGT) 信息系统定义的CDR的mAb VH/VL结构域的氨基酸序列。在本文中当提及CDR序列时使用IMGT定义。CDR的Kabat定义在图7中作为带阴影字体显示, 作为IMGT的备选定义, 主要仅为兴趣显示。CDR的IMGT定义可以包括稍多的N-末端序列, 而Kabat定义显示CDR的起始较靠后并更多向C-末端延伸。

[0225] 在Illumina MiSeq仪器上使用2×250bp读长测定8个美洲驼VHH的DNA序列 (如实施例10中所述, 测定序列作为分离这些VHH的一部分)。在细菌表达载体中商业 (GeneArt, Life Technologies) 合成编码VHH的DNA构建体并使用Sanger测序确认它们的序列。

[0226] 图8示出了具有CDR的VHH的氨基酸序列, 使用IMGT定义, 以带下划线的粗体表示。在本文中当提及CDR序列时使用IMGT定义。CDR的Kabat定义在图8中以带阴影字体显示, 作为IMGT的备选定义。示出了作为NRC-sdAb001至NRC-sdAb008提及的序列。

[0227] 实施例12: mAb和sdAb与重组AXL细胞外结构域 (ECD) 的结合

[0228] 本实施例的目的是表征mAb/sdAb与重组AXL细胞外结构域 (ECD) 的结合, 评价亲和性和动力学, 物种交叉反应性以及结构域和表位定位。

[0229] 材料和方法

[0230] 鼠mAb的制备。鼠mAb从杂交瘤上清液中直接纯化或通过瞬时转染CHO细胞重组制备 (具有人IgG1Fc区)。对于从10mL杂交瘤上清液的小规模纯化, mAb通过吸附到蛋白质G Mag Sepharose™ Extra (GE Healthcare Life Sciences#28-9670-70) 上, 在PBS中洗涤, 利用200μl的甘氨酸200mM pH 2.5洗脱两次, 在TRIS-HCl 1M pH 9.0中中和进行纯化。纯化的mAb使用在PBS中预平衡的Zeba Spin树脂 (Pierce) 脱盐, 并通过0.22μm膜 (Millipore) 进行过滤除菌。mAb的终浓度通过nano-drop (#ND-1000) 测定。对于重组制备, 在CHO细胞中瞬时转染DNA构建体并如Raymond等人 (2015) 中所述进行纯化。

[0231] VHH和VHH-Fc的制备。如以前由Baral等人 (2013) 所述, VHH作为6xHis-和Myc-标记的单体在大肠杆菌中制备。通过用编码N-末端融合到人IgG1Fc的VHH的DNA瞬时转染HEK293细胞制备VHH-Fc, 如Zhang等人, 2009中所述。

[0232] 表面等离子体共振。对于鼠mAb, 使用Biacore T200仪器评估与人和食蟹猴AXL ECD的结合。简言之, 使用在乙酸盐缓冲液中的氨偶联将抗-小鼠或抗-人Fc抗体固定化到研究级CM5系列S传感器芯片上。俘获鼠或重组嵌合鼠-人mAb (小鼠VH/VL; 人恒定区), 然后使重组人或食蟹猴AXL ECD根据抗体以不同的浓度范围 (0.1-500nM) 在表面上流过。运行缓冲液为PBS/Tween-20, 流速为100uL/min。所有结合研究在25℃进行。表面使用10mM甘氨酸, pH 1.5再生。

[0233] 对于VHH和VHH-Fc, 使用Biacore T200仪器或Biacore 3000仪器评估与人和食蟹

猴AXL ECD的结合。使用在乙酸盐缓冲液中的氨偶联将人AXL ECD或抗-人Fc抗体固定化到研究级CM5系列S传感器芯片(T200, rhAXL ECD)上或C1传感器芯片(3000, 抗-人Fc)上。VHH-Fc被俘获在抗-人Fc表面上。单体VHH(用于rhAXL ECD表面)或人和食蟹猴AXL ECD(用于VHH-Fc表面)以不同的浓度范围在表面上流过。运行缓冲液为HBS-EP(3000)和HBS-EP+(T200)。流速为10-40ul/min。所有结合研究在25℃进行。表面使用10mM甘氨酸, pH 1.5再生。

[0234] 对于表位分组实验, 首先将两个测试物品(VHH或mAb)分别注入(50nM mAb; 对于VHH单体25-倍K_D)并使其解离。然后再次注入mAb(50nM)并在反应的峰值时, 注入VHH(25-倍K_D)和mAb(50nM)的混合物以观察任何额外的结合。

[0235] ELISA。通过将100ng每种蛋白质固定到Nunc MaxiSorp微量培养板的孔中过夜来进行针对人、食蟹猴和小鼠AXL ECD的ELISA。如实施例10中所述重组制备人AXL(aa 1-451)和食蟹猴AXL(aa 1-449)。小鼠AXL购自Sino(cat. 51026-M08H)。第二天, 用在PBS中的5%(w/v)奶粉封闭培养板。鼠mAb(杂交瘤制备的或重组制备的)或VHH-Fc在含有1%BSA和0.1%Tween-20的PBS中稀释并加入孔中在室温放置2小时。孔用含有0.1%Tween-20的PBS洗涤5次, 然后将HRP-标记的蛋白质A(在含有1%BSA和0.1%TweenTM-20的PBS中稀释1:1000)加入至孔中在室温放置1小时。孔用PBS/0.1%Tween-20再次洗涤5次, 并使用TMB底物显影。测量在450nm处的吸光度。作为小鼠AXL结合的阳性对照, 使用市售抗-小鼠AXL mAb(克隆175128, R&D Systems MAB8541, 大鼠IgG2A), 并使用驴抗-小鼠:HRP二抗检测。

[0236] 酵母表面展示。进行的人AXL、Tyro3和Mer细胞外结构域的酵母表面展示。简言之, 用编码与Aga2p蛋白融合的myc-标记的TAM-家族RTK胞外结构域的DNA构建体转化酵母。设计构建体编码完整AXL ECD(aa 1-449)或单个亚结构域(从N-至C-末端, Ig1、Ig2、Fn1、Fn2)。对于精细表位定位, 在构建体中用Ala替换AXL ECD的单个氨基酸。得到的表达部分或完整AXL、Tyro3和Mer细胞外结构域的酵母细胞吸附在微孔板中, 并通过ELISA评估mAb/VHH-Fc的结合, 并使用山羊抗-人F(ab')₂-HRP检测。抗-AXL mAb/VHH-Fc结合针对抗-myc抗体与对照的结合水平进行归一化用于获得表达水平。

[0237] 结果

[0238] 在使用重组制备的嵌合鼠-人mAb的SPR中评估鼠mAb与人和食蟹猴AXL ECD的结合。在使用单体VHH和嵌合重组VHH-hIgG1 Fc融合体两者的SPR中评估美洲驼VHH与人和食蟹猴AXL ECD的结合。

[0239] 通过SPR进行亲和性测定。鼠mAb对重组人和食蟹猴AXL ECD的亲和性和动力学显示在表9中。

[0240]

表 9 mAb 对重组人和食蟹猴 AXL ECD 的亲合性和动力学						
mAb	人 AXL			食蟹猴 AXL		
	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	K_D (nM)	$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	K_D (nM)
mAb F107-10G1	1.1×10^6 ^a	5.9×10^{-4} ^b	0.5 ^a	8.2×10^5 ^a	4.3×10^{-4} ^a	0.5 ^a
	1.2×10^6 ^b	5.6×10^{-4} ^b	0.4 ^b	1.8×10^6 ^b	2.3×10^{-4} ^b	0.2 ^b
mAb F111- 5E9	7.8×10^5 ^a	1.8×10^{-3} ^a	2 ^a	6.9×10^5 ^a	2.7×10^{-3} ^a	4 ^a

[0241]

mAb F107-8D12	2.7×10^6 ^a	1.3×10^{-2} ^a	5 ^a	-	-	1835 ^c
mAb F107- 7H5	1.4×10^6	1.5×10^{-3}	1 ^a	-	-	925 ^c
mIgG2 F155-3C7	5.6×10^5 ^b	1.8×10^{-3} ^b	3 ^b	2.9×10^5 ^b	7.3×10^{-3}	25 ^b
mAb F111- 3C8	8.6×10^4 ^a	1.0×10^{-3} ^a	12 ^a	6.0×10^4	1.1×10^{-3}	18 ^a
mIgG2 F149-4G4	7.5×10^5 ^b	1.2×10^{-3} ^b	1 ^b	-	-	>160 ^b
^a 使用单循环动力学测量 ^b 使用多循环动力学测量 ^c 使用稳态分析测量						

[0242] 表10中的数据指示美洲驼VHH对重组人和食蟹猴AXL细胞外结构域(ECD)的亲合性和动力学。

表 10

美洲驼 V_HH 对重组人和食蟹猴 AXL ECD 的亲亲和动力学

sdAb	人 AXL			食蟹猴 AXL		
	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
NRC-sdAb001	8.5×10 ⁶ ^a	3.7×10 ⁻² ^a	4 ^a			
	1.3×10 ⁶ ^c	7.2×10 ⁻³ ^c	6 ^c	9.2×10 ⁵ ^c	7.2×10 ⁻³ ^c	8 ^c
NRC-sdAb002	-	-	96 ^c	nd	nd	nd
NRC-sdAb003	8.5×10 ³ ^a	5.4×10 ⁻³ ^a	955 ^a	nd	nd	nd
NRC-sdAb005	1.7×10 ⁵ ^b	9.7×10 ⁻³ ^b	58 ^b			
	1.2×10 ⁵ ^c	4.1×10 ⁻³ ^c	34 ^c	1.3×10 ⁵ ^c	4.6×10 ⁻³ ^c	35 ^c
NRC-sdAb006	2.4×10 ⁵ ^b	4.5×10 ⁻³ ^b	19 ^b			
	8.9×10 ⁴ ^c	2.1×10 ⁻³ ^c	24 ^c	1.0×10 ⁵ ^c	2.6×10 ⁻³ ^c	26 ^c
NRC-sdAb007	-	-	>100 ^c	nd	nd	nd
NRC-sdAb008	3.3×10 ⁶ ^d	3.3×10 ⁻³ ^d	1 ^d			
	5.3×10 ⁶ ^c	8.2×10 ⁻³ ^c	2 ^c	-	-	>200 ^c
^a 使用单循环动力学测量(固定化 AXL ECD, 流动的 VHH 单体) ^b 使用多循环动力学测量(固定化 AXL ECD, 流动的 VHH 单体)						

^c 使用单浓度动力学评估(俘获 VHH-Fc, 流动的 AXL ECD)^d 使用单循环动力学测量(俘获 VHH-Fc, 流动的 AXL ECD)^e 使用稳态分析测量

[0245] 测定了食蟹猴和鼠AXL的交叉反应性,结果显示在下面的表11中。这些数据显示了在ELISA中mAb/sdAb与重组人和小鼠AXL ECD结合的半-最大有效浓度EC₅₀。

表 11
用于结合 ELISA 的半-最大有效浓度

mAb/sdAb	人 AXL (nM)	小鼠 AXL (nM)
MAB8541 (R&D)	61	1
mAb F107-10G1	2	n.b.
mAb F111- 5E9	2	n.b.
mAb F107- 8D12	1	n.b.
mAb F107- 7H5	6	n.b.
mIgG2 F155- 3C7	14	n.b.
mAb F111- 3C8	ND	ND
mIgG2 F149-4G4	15	n.b.
NRC-sdAb001	1	n.b.
NRC-sdAb002	ND	ND
NRC-sdAb003	ND	ND
NRC-sdAb005	1	n.b.
NRC-sdAb006	1	n.b.
NRC-sdAb007	ND	ND
NRC-sdAb008	1	n.b.
n.b., 无结合; ND, 未测定到		

[0246]

[0247] 使用酵母表面展示测定了与TAM家族RTK (Mer, Tyro3) 的交叉反应性, 结果显示在表12中。

表 12

使用酵母表面展示测定与 TAM 的交叉反应性

	山羊抗人 F(ab') ₂ -HRP, ~1:5000					抗-Myc-HRP
	hFC-10 7-10G1	NRC-sdAb0 001-Fc	NRC-sdAb0 002-Fc	NRC-sdAb 0003-Fc	hFC- 抗 -RSV	myc
[0248] huAXL-ECD	1.392	1.026	0.882	0.659	0.087	1.000
cyAXL-ECD	1.141	0.824	0.760	0.668	-0.004	1.000
huMER-ECD	-0.020	-0.010	0.010	-0.009	-0.001	1.000
huTyro3-ECD	-0.023	0.017	-0.004	-0.005	0.059	1.000
pNL6 载体	-0.039	-0.025	0.020	-0.025	-0.036	1.000
	未变性的酵母: 针对 myc 表达水平归一化					

[0249] 评估了表位分组, 数据总结在表13中。显示了被抗-AXL mAb/sdAb靶向的表位箱。评价了使用酵母表面展示的结构域定位。

表 13

被抗-AXL mAb/sdAb 靶向的表位箱

mAb/sdAb	结构域	表位箱
mAb F107-10G1	Ig1	1A
mAb F111- 5E9	Ig2	2
mAb F107- 8D12	Ig1	1B
mAb F107- 7H5	Ig1	1B
[0250] mIgG2 F155- 3C7	ND	ND
mAb F111- 3C8	Ig2	ND
mIgG2 F149-4G4	ND	ND
NRC-sdAb001	ND (基于分组的 Ig1) 基于结合竞争与 10G1 相似的表位	1A
NRC-sdAb002	ND	ND
NRC-sdAb003	ND (基于分组的 Ig1)	1A
NRC-sdAb005	ND (基于分组的 Ig2)	2
NRC-sdAb006	ND (基于分组的 Ig2)	2
[0251] NRC-sdAb007	ND (基于分组的 Ig1)	1B
NRC-sdAb008	ND (基于分组的 Ig1)	1B

[0252] 实施例13: 对与肿瘤细胞系结合的表征

[0253] 本实施例的目的是表征mAbs/sdAb与表达中水平至高水平的AXL的肿瘤细胞系的

结合,以Kd和最大抗体结合(Bmax)计。

[0254] 材料和方法

[0255] 细胞培养。NCI-H292人非小细胞肺癌(NSCLC)和SKOV3(人卵巢腺癌)细胞系获自ATCC并根据供应商的建议进行培养。MDA-MB-231三阴(ER-/PR-/HER2低)乳腺癌(TNBC)购自Cedarlane Labs(Burlington NC,USA)。生成带有萤火虫荧光素酶基因的稳定转染物。此细胞系培养在RPMI-1640+5%FBS中。如上面实施例3中所述,使用U87成胶质细胞瘤细胞。细胞一周传代两次,所有细胞系在4-6周内使用。

[0256] FACS结合测定。贴壁细胞使用非酶性Sigma细胞解离溶液(目录号C5789)解离。将细胞悬液加入至聚丙烯V形底96孔板中并与处于100nM至0.001nM范围内的浓度或处于单一剂量100nM(用于非特异性对照)的一抗在冰上温育2小时。在温育和洗涤后,细胞与荧光标记的二抗(来自Jackson的Alexa**Fluor**® 488抗-人IgG,目录号709-546-098)一起在冰上温育1小时,然后洗涤。细胞活力使用可固定的死活细胞鉴定染料450(Fixable viability dye 450,在冰上20min)测定。染色的细胞在4℃固定在1%甲醛中,并在4℃保存直至第二天进行采集。

[0257] 在装有FACS Diva软件和HTS装置(在96孔板中自动采样)的LSR-Fortessa流式细胞仪(Beckton Dickinson)中进行数据采集。FACS数据输出到Excel数据文件,取AF488-染色的有活力的(单一细胞)峰的MFI(平均荧光强度)用于计算。使用在缺少二抗的情况下温育的细胞的MFI值对所有孔计算背景扣除。

[0258] 扣除背景的数据在GraphPad™ 6.0中利用Hill斜率非线性回归曲线拟合模型使用单位点特异性结合进行分析以确定每个测试物品的表观Bmax和Kd。使用的模型依据式I。

[0259] 模型
$$Y = \frac{B_{max} \times X^h}{K_d^h + X^h} \quad (\text{式 I})$$

[0260] Bmax是最大特异性结合,与Y的单位相同。

[0261] Kd是在平衡时达到最大结合的一半所需的配体浓度,以与X相同的单位表示。

[0262] 变量“h”是hill斜率。

[0263] AXL受体密度测量。使用10μl人AXL Alexa Fluor 488 MAbs(克隆108724)在4℃标记Quantum™ Simply Cellular Beads(目录号814,获自Bangs Laboratories,Fishers,IN,USA) 30min,或在4℃标记表达AXL的细胞系(100000个细胞/测试) 2小时。

[0264] 在相同的FACS设置下对珠子和细胞进行数据采集并使用FlowJo™软件分析。使用GeoMean生成标准曲线并插入每个细胞类型的值。空白珠子值被认为是检测阈值,并在每例中从GeoMean值中减去未染色细胞的值。得到的抗体结合容量用作被测试的每种细胞系的受体密度的测量。

[0265] 结果

[0266] 通过如上所述的FACS评估重组嵌合Ab与三种细胞系的结合。表观Bmax和Kd测定值显示在下面的表14中。

表 14
在三种表达 AXL 的细胞系中含人 Fc 的 mAb 的表观 Kd

[0267]

一级 Ab	SKOV3 Kd (nM)	NCI-H292 Kd (nM)	MDA-MB-231 荧光素酶 Kd (nM)
NRC-sdAb001	0.1122	0.1053	0.2327
NRC-sdAb005	2.0330	1.4740	1.4720
NRC-sdAb006	13.4300	2.1170	0.8317
NRC-sdAb008	0.0549	0.0414	0.1216
hIgG-F107-10G1	0.0608	0.0708	0.1012
hIgG-F107-7H5	0.0700	0.0509	0.1696
hIgG-F111-5E9	ND*	ND*	0.3659
*不完全曲线			

[0268] 图9图示了基于下列细胞系中的受体密度(受体数/细胞)的AXL的抗体结合容量: H292、MDA-MB-231、SKOV和U87成胶质细胞瘤。

[0269] 图10图示了在肺癌、乳腺癌和卵巢癌三种细胞系中人(h) IgG Ab和sdAb的FACS结合曲线。在所有情况下非特异性结合(x)显示是可忽略不计的,而在一些情况下,hIgG曲线(F107-10G1,F107-7H5,F111-5E9)显示比sdAb(sdAB001,sdAb008,sdAb006)稍高的荧光强度(MFI)均值。

[0270] 实施例14:体外细胞毒性测定

[0271] 在本实施例中,在生长抑制测定中在表达AXL的细胞中,按功效(IC₅₀)和最大生长抑制百分比(效力)评价抗-AXL单克隆抗体的内在化能力和抗体-药物缀合物(ADC)潜力。

[0272] 材料和方法

[0273] 细胞培养。NCI-H292人非小细胞肺癌(NSCLC)和SKOV3(人卵巢腺癌)细胞系获自ATCC并根据供应商的建议进行培养。MDA-MB-231三阴(ER-/PR-/HER2低)乳腺癌(TNBC)细胞系购自Cedarlane Labs。由Perkin Elmer生成带有萤火虫荧光素酶基因的稳定转染物。此细胞系培养在RPMI-1640+5%FBS中。细胞一周传代两次,所有细胞系在4-6周内使用。

[0274] 生长抑制测定。测试抗-AXL ADC对已知表达AXL的各种培养细胞系的活力的作用,所述细胞系包括NCI-H292(非小细胞肺癌)、MDA-MB-231(人乳腺腺癌)和SKOV3(卵巢癌)。将三种细胞系的细胞分别以125、200和200个细胞/孔接种在384孔板(Corning® 384孔白色平底聚苯乙烯TC-处理的微量培养板,Cat.#3570)中。使细胞在100nM-0.0017nM的测试物品或基准对照的系列稀释液的存在下以及在存在或缺少添加的Gas6配体(2μg/mL,R&D CF885)的条件下生长5天。在5天(37℃,5%CO₂,湿化培养箱)后,使用CellTiterGlo™(Promega, Madison),基于每孔中存在的ATP的量化(其信号代表有代谢活性的细胞的存在),测定培养物中有活力的细胞的数目。

[0275] 在积分时间设为0.1秒的发光读板机(Envision,Perkin Elmer)上测量信号输出。在高ATP浓度下将积分时间调整至最小信号饱和度。

[0276] 数据分析。将每个浓度点(S)针对阴性对照孔(NC)归一化,并根据式II计算表示为存活率(%)。

$$[0277] \quad \text{存活率(\%)} = \frac{NC - S}{NC \times 100} \quad (\text{式 II})$$

[0278] 存活率(%)相对于对数浓度的剂量响应曲线使用GraphPad™ Prism 6.0拟合,利用4参数逻辑模型来估计IC₅₀和最大效力。根据式III利用模型Y计算。

$$[0279] \quad \text{模型} Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}}} \quad (\text{式 III})$$

[0280] IC₅₀是在得到Bottom(低值)和Top(高值)之间一半的反应的激动剂浓度。

[0281] HillSlope描述了曲线的倾斜度。

[0282] Top(高值)和Bottom(低值)是Y轴单元中的平台。

[0283] 结果

[0284] 如上所述评估与DM1或MMAE缀合的重组嵌合Ab在三个细胞系中的生长抑制活性。

[0285] 评价作为直接药物缀合物的细胞活性,如表15中所示。在三个表达AXL的细胞系中抗AXL ADC的功效(IC₅₀)和效力(%最大抑制)。结果表示为:平均数+/-stdev (N)。

[0286]

表 15						
在表达 AXL 的细胞系中抗 AXL ADC 的功效和效力。						
	SKOV3		MDA-MB-231-luc		NCI-H292	
	IC50 (nM)	%最大抑制	IC50 (nM)	%最大抑制	IC50 (nM)	%最大抑制
hFc-F111-5E9-VC-MMAE	0.021 +/- 0.006 (2)	75 +/- 3 (2)	0.942 (1)	105 (1)	~1 (1)	不完全曲线 (1)
hFc-F111-5E9-DM1	0.038 +/- 0.043 (3)	73 +/- 7 (3)	0.452 +/- 0.279 (6)	82 +/- 20 (6)	0.084 +/- 0.060 (9)	78 +/- 9 (9)
hFc-sdAb005-DM1	0.631 +/- 0.202 (2)	78 +/- 6 (2)	ND	ND	6.664 +/- 1.718 (6)	83 +/- 4 (6)
hFc-sdAb006-DM1	0.162 +/- 0.03 (2)	76 +/- 6 (2)	0.869 +/- 0.001 (2)	83 +/- 2 (2)	2.714 +/- 0.871 (2)	87 +/- 13 (6)
hFc-F107-10G1-DM1	0.022 (1)	66 (1)	0.029 +/- 0.037	62 +/- 9 (2)	0.013 +/- 0.014	71 +/- 5 (4)

表 15

在表达 AXL 的细胞系中抗 AXL ADC 的功效和效力。

[0287]

	SKOV3		MDA-MB-231-luc		NCI-H292	
	IC50 (nM)	%最大抑制	IC50 (nM)	%最大抑制	IC50 (nM)	%最大抑制
			(2)		(4)	
hFc-sdAb001-DM1	0.055 +/- 0.006 (2)	81 +/- 0 (2)	ND	ND	0.887 +/- 0.218 (6)	81 +/- 3 (6)
hFc-F107-7H5-DM1	0.014 +/- 0.019 (2)	91 +/- 31 (2)	0.076 +/- 0.079 (2)	65 +/- 13 (2)	0.014 +/- 0.026 (9)	97 +/- 50 (9)
hFc-F107-8D12-DM1	0.001 (1)	103 (1)	0.033 (1)	72. (1)	0.011 +/- 0.006 (3)	89 +/- 1 (3)
hFc-sdAb008-DM1	~0.001	~80	ND	ND	0.034 +/- 0.012 (6)	83 +/- 8 (6)
mIgG-F155-3C7-DM1	0.092 (1)	89 (1)	0.630 (1)	74 (1)	0.327 +/- 0.098 (8)	82 +/- 5 (8)
mIgG-F149-4G4-DM1	0.005 (1)	90 (1)	0.051 (1)	64 (1)	0.015 +/- 0.009 (8)	79 +/- 4 (8)

[0288] Gas6敏感性的评估。评价了抗-AXL ADC在NCI-H292中在存在或缺少Gas6配体 (2 μ g/mL) 的情况下的功效 (IC₅₀)。在表16中结果表示为:平均数+/-stdev (N)。

表 16

Gas6 敏感性的评估

[0289]

	-Gas6 IC50 (nM)	+Gas6 IC50 (nM)
hFc-F111-5E9-VC-MMAE	~1 (1)	ND
hFc-F111-5E9-DM1	0.084 +/- 0.060 (9)	0.074 +/- 0.050 (2)
hFc-sdAb006-DM1	2.714 +/- 0.871 (2)	2.2.6 (1)
hFc-F107-10G1-DM1	0.013 +/- 0.014 (4)	0.460 (1)
hFc-sdAb001-DM1	0.887 +/- 0.218 (6)	不收敛 (1)
hFc-F107-7H5-DM1	0.014 +/- 0.026 (9)	0.098 +/- 0.035 (2)
hFc-F107-8D12-DM1	0.011 +/- 0.006 (3)	0.296 (1)
hFc-sdAb008-DM1	0.034 +/- 0.012 (6)	0.240 (1)

[0290]

mIgG-F155-3C7-DM1	0.327 +/- 0.098 (8)	3.900 +/- 0.780 (2)
mIgG-F149-4G4-DM1	0.015 +/- 0.009 (8)	0.013 +/- 0.002 (2)
hFc-sdAb005-DM1	6.664 +/- 1.718 (6)	3.777 (1)

[0291] 评估了生长抑制, hIgG Ab和sdAb在三个肿瘤细胞系中的生长抑制结合曲线显示在图11中。显示了肺癌、乳腺癌和卵巢癌细胞系 (分别为H292、MDA-MB-231荧光素酶和SKOV3)。评价了存活率百分比 (5天)。

[0292] 在1类中,对所有细胞显示hIgG-F107-10G1-DM1相对于非特异性结合的比较,sdAb001也对H292进行评价。

[0293] 在2类中,对MDa-MB-231荧光素酶和SKOV3细胞显示hIgG-F107-7H5-DM1和hIgG-F107-8D12-DM1相对于非特异性结合曲线的比较。对H292评价sdAb008和hIgG-F107-7H5-DM1相对于非特异性结合的比较。

[0294] 在3类中,对所有细胞显示hIgG-F111-5E9-DM1和hIgG-F111-5E9-MMAE相对于非特异性结合的比较,还对H292评价sdAb006。

[0295] 图12图示了在H292细胞系中在存在和缺少Gas6的情况下与非特异性结合相比,hIgG-F11-5E9-DM1和hIgG-F107-10G1-DM1的生长抑制结合曲线。

[0296] 实施例15:评估双互补位/单价抗-AXL抗体的活性。

[0297] 在本实施例中,制备双互补位/单价抗-AXL抗体并评估其功效和效力。

[0298] 靶向两个不重叠表位的双互补位抗体可以诱导靶标聚集,接着促进受体靶标(包括HER2)的强力内在化、溶酶体转运(Li等人2016)。本实施例评价了单结构域抗-AXL抗体的双互补位(同一靶标上的2个表位)组合的ADC功效。含有人Fc的双互补位抗体根据Strop等人(2012)所发表的方法构建,其中在人IgG1Fc区中改造互补的点突变(RRR,EEE)以促进半单体交换并稳定双特异性抗体。可以单独地表达和纯化感兴趣的两个抗体,并在适宜的氧化还原条件下将它们混合在一起,导致形成稳定的双特异性抗体。在所有情况下,双互补位ADC的活性与它们所来源的基于同源二价单互补位sdAb的ADC的功效进行比较。

[0299] 表17示出了在SKOV3细胞系中与单互补位(二价)亲本ADC相比,抗AXL双互补位构建体ADC的功效(IC₅₀)和效力(%最大抑制)。在适用时,结果表示为:平均值+/-stdev(N)。

[0300]

表 17 在 SKOV 细胞系中抗 AXL 双互补位和单互补位(二价)ADC 的功效(IC ₅₀)和效力(%最大抑制)					
样品名称	抗体设计	MW	DAR	IC ₅₀ (nM)	%最大抑制
sdAb001-DM1	单互补位	77200	3.13	0.055 +/- 0.006 (2)	81 +/- 0 (2)
sdAb005-DM1	单互补位	77200	3.05	0.631 +/- 0.202 (2)	78 +/- 6 (2)
sdAb006-DM1	单互补位	77800	2.77	0.162 +/- 0.03 (2)	76 +/- 6 (2)
sdAb008-DM1	单互补位	78200	3.08	<0.001	~80
sdAb 001R/005E-DM1	双互补位	77200	3.6	0.008	89
sdAb 001R/006E-DM1	双互补位	77500	3.39	0.0004	73
sdAb 008R/005E-DM1	双互补位	77700	2.61	0.014	78
sdAb 008R/006E-DM1	双互补位	78000	2.69	0.003	70

[0301] 初步结果表明,与来源于相应的二价含Fc的sdAb的ADC相比,包含针对存在于结构域1A/结构域2中的表位的双互补位sdAb的两个ADC(sdAb 001R/005E-DM1, sdAb 001R/006E-DM1)显示高得多的功效(7-100x)。在本实施例中测试的其他双互补位组合没有显示功效增加。

[0302] 图13显示了在SKOV3细胞系中与单互补位/二价亲本ADC相比,抗AXL双互补位/单价构建体ADC的生长抑制结合曲线。5天后存活率百分比相对于对数浓度(nM)作图。图面A提供了SKOV3组合008R/005E的图,比较了sdAb008-DM1(正方形)、sdAb005-DM1(三角形)和双互补位008/005(星形)。图面B提供了图示的SKOV3组合008R/006E图:比较了sdAb006-DM1(菱形)、sdAb008-DM1(正方形)和双互补位008/006(空心圆)。图面C提供了hFc/sdAb001R/005E的图,比较了sdAb005-DM1(三角形)、sdAb001-DM1(实心圆)和双互补位001/005构建体(显示为“X”)。图面D提供了SKOV3组合001R/006E的图,比较了sdAb001-DM1(实心圆)、sdAb006-DM1(菱形)和双互补位001/006构建体(大星号)。

[0303] 实施例16:在SKOV3肿瘤异种移植小鼠模型中ADC的体内肿瘤生长抑制

[0304] 在本实施例中,使用在SKOV3细胞中的肿瘤生长抑制评价体外细胞毒性。评价抗-hAXL抗体-药物缀合物ADC在表达AXL的异种移植模型中导致肿瘤生长抑制的能力。

[0305] 材料和方法

[0306] 实验方案。在本研究中涉及动物的看护和使用的实验方案和程序由Ottawa-NRC动

物保护委员会 (Protocol#2014.02) 审查并批准。6周龄18-20克雌性CD1 Albino小鼠 (Cr1: CD1-Foxn1nu) 订购自Charles River Canada (St-Constant, Quebec, 加拿大)。根据加拿大动物保护协会 (CCAC) 的指南看护和使用动物。

[0307] 抗-hAXL-ECD单克隆抗体如实施例1中所述进行纯化, 并如实施例4中通过赖氨酸残基缀合至与N2'-去乙酰基-N2'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素 (DM1) 连接的琥珀酰亚胺基反式-4-[马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-甲酸酯 (SMCC)。

[0308] 细胞培养和肿瘤生长测量。SKOV3 (人卵巢腺癌) 细胞获自ATCC并根据供应商的推荐培养。MDA-MB-231三阴 (ER-/PR-/HER2低) 乳腺癌 (TNBC) 购自ATCC (Cedarlane Labs)。由Perkin Elmer生成带有萤火虫荧光素酶基因的稳定转染物。该细胞系在RPMI-1640+5%FBS中培养。

[0309] 细胞一周传代两次, 所有细胞系在4-6周内使用。在无菌条件下将细胞皮下接种 (每个注射部位在0.1mL PBS的体积中 5×10^6 个细胞) 在异氟烷麻醉的裸鼠 ($n=8$) 的左侧腹中。使肿瘤生长至体积为80-100mm³的大小, 之后在给药前一天将动物随机化以确保每个群组包含具有可变的肿瘤大小的动物。在给药当天为每只动物准备适当体积的测试/对照物品并静脉注射 (i.v.)。在第0天和第4天 (间隔96小时) 用测试物品以5mg/kg经尾静脉向小鼠注射。对照组用盐水治疗。

[0310] 在治疗后每三天通过游标卡尺测量监测肿瘤生长持续29天或直至它们因伦理原因被处死 (人道终点)。

[0311] 根据式IV计算肿瘤体积:

[0312] 估计的肿瘤体积 [mm³] = $\pi/6$ (长度 [mm]) $\times$ (宽度 [mm] $\times$ 高度 [mm]) (式IV)

[0313] 每组中的肿瘤体积显示为均数 $\pm$ SEM并且作为SKOV3细胞接种后测量时间的函数作图。使用GraphPad Prism version 7.0使用双因素ANOVA采用Tukey多重比较检验进行肿瘤体积数据的分组比较。治疗组与对照组之间的差异以 $P<0.05$ 为统计学显著。

[0314] 结果

[0315] 在媒介物 (PBS对照) 治疗的动物相比, 以5mg/kg (mpk) 给药的AXLADC显示在SKOV3肿瘤异种移植小鼠模型 ($n=2$) 中引起显著的肿瘤生长抑制。在两个独立的研究 (在本文中称为“研究15A”和“研究15b”) 中在对照组和治疗组两者中观察到肿瘤生长的高再现性。来自这两个独立研究的数据显示在图14和图15中。

[0316] 图14示出了在研究15a中用所选择的ADC以5mg/kg治疗两次 (第0天和第4天) 对SKOV3荷瘤小鼠的肿瘤生长抑制。使用的ADC为:hF107-10G1-DM1 (2a), hF111-5E9-DM1 (3a); hF107-7H5-DM1 (4a); hF107-8D12-DM1 (5a); mF149-4G4-DM1 (6a); 和mF155-3C7-DM1 (7a), 与盐水 (1a) 比较。每三天记录肿瘤体积 (mm³)。每个数据点代表均数 $\pm$ SEM, ($n=8$)。

[0317] 图15示出了在研究15b中用所选择的ADC以5mg/kg治疗两次 (第0天和第4天) 对SKOV3荷瘤小鼠的肿瘤生长抑制。使用的ADC为:hF111-5E9-DM1 (2b); hF107-7H5-DM1 (3b); hF107-10G1-DM1 (4b); sdAb001-DM1 (6b); sdAb006-DM1 (7b); sdAb008-DM1 (8b); 和mF149-4G4-DM1 (9b), 用于与盐水对照 (1b) 比较。每三天记录肿瘤体积 (mm³)。每个数据点代表均数 $\pm$ SEM, ($n=8$)。

[0318] 从第13-18天至第28天观察到ADC-治疗组和盐水治疗组之间对肿瘤生长的作用是统计学显著的 ($p<0.05$), 在第28天肿瘤体积减小为37.0%至66.9%。

[0319] 表18示出了对于研究15a和15b的数据(分别参见图14和图15),在治疗开始后第28天时与对照组(盐水)相比肿瘤体积减小的百分比。与对照相比肿瘤体积(TV)减小的百分比计算为:

[0320] $\% \text{减小} = (\text{TV}_{\text{对照}} - \text{TV}_{\text{治疗}}) / \text{TV}_{\text{对照}} * 100$ (式V)。

[0321]

表 18		
在 SKOV3 异种移植物小鼠模型中 ADC 引起的肿瘤体积减小的百分比		
研究编号	测试 ADC	与对照相比肿瘤体积减小的%
研究 15A 图 14	hF107-10G1-DM1	57.9 ± 2.9
	hF111-5E9-DM1	62.5 ± 5.0
	hF107-7H5-DM1	48.9 ± 3.2
	hF107-8D12-DM1	55.4 ± 4.4
	mF149-4G4-DM1	54.4 ± 9.0
	mF155-3C7-DM1	38.4 ± 10.7
研究 15B 图 15	hF111-5E9-DM1	61.0 ± 5.1
	hF107-7H5-DM1	66.9 ± 3.1
	hF107-10G1-DM1	63.7 ± 7.3
	sdAb001-DM1	47.6 ± 6.8
	sdAb006-DM1	47.7 ± 9.48
[0322]	sdAb008-DM1	37.0 ± 16.0
	mF149-4G4-DM1	54.2 ± 10.3

[0323] 实施例17:对在MDA-MB-231-Luc异种移植物小鼠中在反复静脉内给药后抗-AXL ADC命中的效力的评价

[0324] AXL在多种类型癌症中表达并且与侵袭、转移以及血管生成有关。生成的抗-AXL ADC使抗-AXL抗体通过SMCC接头与微管抑制剂美登素(DM1)缀合。这些ADC在多种细胞系中显示出有前途的体外效力,并且已经基于功效和Gas6敏感性进行了选择。在本实施例中,筛选了几个抗-AXL ADC命中,并评价了Gas6敏感性对抗-AXL ADC的体内效力的作用。

[0325] 在对雌性NU/NU裸鼠进行两次静脉内推注给药后评价了几种抗-AXL ADC的效力和药代动力学。本实施例进一步调查了Gas6敏感性对抗-AXL ADC的效力的作用。

[0326] 方法

[0327] 细胞系。MDA-MB-231是三阴(ER⁻, PR⁻, HER2⁻)人乳腺腺癌细胞系,其是最初来源于一名51岁白种人女性患者的上皮贴壁细胞。这些细胞在裸鼠中是致瘤的,形成与原发卵巢肿瘤一致的中等程度良好分化的腺癌。MDA-MB-231细胞是成瘤细胞,其表达表皮生长因子(EGF)和转化生长因子 α (TGF α)。这些细胞在经ALS处理的BALB/c小鼠中形成分化差的腺癌(III级)并在裸鼠中形成分化差的腺癌(III级)。该细胞系最初获自美国组织培养保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia, USA)。

[0328] 细胞在ATCC-配制的含有10%胎牛血清(FBS, Hyclone SH30070.03)的RPMI 1640培养基(ATCC catalog#:30-2001)中生长至最大80%汇合。将细胞保持在37℃于湿化的5% CO₂气氛中。通过胰蛋白酶消化(0.25%胰蛋白酶/EDTA, Gibco/BRL 15090-046)将它们收获,接着在冷磷酸盐缓冲盐水溶液(PBS)中洗涤并通过排除台盼蓝染料的能力评估活力。用于在小鼠中作为异种移植物生长的所有细胞群的活力最小为98%。

[0329] 动物管理:接收、生理适应、圈养和处置。在本研究中涉及动物的看护和使用的实验方案和程序由Ottawa-NRC动物保护委员会(Protocol#2014.02)审查并批准。根据加拿大动物保护协会(CCAC)的指南看护和使用动物。6周龄18-20克雌性CD1 Albino小鼠(Cr1:CD1-Foxn1nu)订购自Charles River Canada(18 LaSalle, St-Constant, Quebec, 加拿大)。收到后,由工作人员对小鼠进行一般体格检查以确保正常健康状态。在收到的动物中没有检查到明显的异常。使小鼠适应至少5天的时间使得它们习惯圈养环境。在聚碳酸酯笼中在玉米芯垫料上以每笼4只圈养小鼠,笼中装有顶部过滤器(filter top)以避免污染。每个笼子清晰地标记以彩色编码的笼卡片,指示试验编号、项目负责人的名字、动物编号和性别。每只小鼠使用耳朵穿孔来进行唯一标识。

[0330] 将小鼠圈养在正压的Tecniplast Green Line独立通气笼(IVC)中,该笼在下列条件下设定每小时75次换气;温度:23-24℃;湿度:50%;光照周期:12小时光照和12小时黑暗。

[0331] 当处置小鼠时均使用无菌技术。在本研究中使用的所有设备在使用前使用70%乙醇消毒。在生物安全柜(BSC)处置动物,该柜在每次使用前也用70%乙醇消毒。所有处置小鼠的个体均穿戴蒸汽消毒罩衣、面罩、发套和无菌手套。在BSC中每周至少更换一次填充有1/8"辐照的玉米芯垫料(Envigo, Madison, WI)和小体积的Enviro-dri纸(Shepherds Specialty Papers)的高压灭菌的IVC笼。

[0332] 饮食。所有动物自由进食和饮水。水瓶中装有超滤水并放置盖子,所述盖子单独在旧的小鼠鞋盒笼中并经蒸汽高压灭菌。一旦进行高压灭菌,就装上盖子,同时在BSC的范围内工作。当水位低时,每周更换水瓶一次或更多次。在适应期间和实验期间内动物随意进食 γ -射线照射的维持性啮齿动物饲料(2914 Teklad Global 14%蛋白维持性饲料, Envigo)。

[0333] 皮下异种移植物肿瘤模型。在无菌条件下将细胞皮下接种(每个注射部位在0.1mL PBS的体积中 5×10^6 个细胞)在异氟烷麻醉的裸鼠(n=8)的左侧腹中。使肿瘤生长至体积为80-100mm³的大小,之后在给药日前一天将动物随机化以确保每个群组包含具有可变的肿瘤大小的动物。

[0334] 肿瘤监测。治疗后每三天通过游标卡尺测量监测肿瘤生长持续29天或直至它们因

伦理原因被处死(人道终点):1) 超过10%体重减轻,在48小时内体重没有恢复;2) 肿瘤体积超过2500mm³;3) 肿瘤溃疡;和4) 明显的痛苦征象,诸如不动和整理毛次数减少等。

[0335] 根据式IV计算肿瘤体积:

[0336] 估计的肿瘤体积[mm³]= $\pi/6$ (长度[mm]) $\times$ (宽度[mm] $\times$ 高度[mm])) (式IV)

[0337] 测试物品和媒介物。所有测试物品从NRC蒙特利尔冷链运输至渥太华并在给药前在4℃保存。ADC, hF111-5E9-DM1制成批号:CC31MAY 2016;药物抗体比(DAR):2.62;浓度:1.31mg/mL;等分试样体积:3.7mL;储存条件:4℃;内毒素水平:<0.15;在加拿大魁北克省蒙特利尔NRC机构HHT Montreal (Montreal, Quebec, Canada) 制备。

[0338] 用于治疗媒介物是具下列特性的ADC缓冲液:无菌性:无菌过滤的;储存条件:20-25℃;供应商:NRC-HHT Montreal。

[0339] 给药制剂准备。在给药当天准备每个制剂。为了获得5mg/kg的剂量水平,基于它们的储备液浓度和动物的体重计算测试/对照物品的注射体积。在清洁的HEPA/UV灯生物罩下通过添加盐水以获得所需体积,完成最终的给药溶液的准备。在准备期间将测试/对照物品保持在4℃。用于每只动物的适宜体积的测试/对照物品经静脉内注射。

[0340] 临床观察和体重。每天一次观察所有动物的死亡率和不健康的征象。在治疗当天以及之后每三天测量并记录动物的个体体重和肿瘤尺寸。

[0341] 治疗。用测试物品以5mg/kg在第0天和第4天(96h间隔)经尾静脉向小鼠注射。对照组用盐水治疗。记录注射当天的动物体重和注射体积。

[0342] 样品采集、处理和储存。在第二次给药后1、2、4、6、24、48、96、120、168、216、264和336小时每个时间点从三只动物经下颌静脉采集血样。

[0343] 图16示出了研究设计,包括在下列时间点在何处获取血样:第二次给药前、1h、2h、4h、6h、24h、48h、96h、120h、168h、216h、264h和336h。获取肿瘤体积测量值,并在第1天和第4天给药,同时以指示的间隔获得肿瘤体积测量值。在图16中在研究设计下面还显示了动物数量和研究的时间点。使大约80-100μL获得的血液在室温凝固15-30分钟,然后在室温以1500g离心10分钟。在离心后,将液体成分(血清)立即转移到预先标记的试管中,在干冰上立即速冻,并保存在-80℃。

[0344] 在研究结束时,收集肿瘤。将每个肿瘤的一半在室温在4%多聚甲醛中固定过夜,用PBS洗涤,石蜡包埋。随后,将根据项目负责人的决定处理石蜡包埋的肿瘤用于AXL表达。肿瘤的另一半使用干冰速冻并保存在-80℃用于进一步分析。

[0345] 统计学分析。每组中的肿瘤体积显示为均数±SEM并作为MDA-MB-231-Luc细胞接种后的测量时间的函数作图。使用GraphPad™ Prism version 7.0使用双因素ANOVA采用Tukey多重比较检验进行肿瘤体积数据的分组比较。治疗组和对照组之间的差异以P<0.05为统计学显著。使用Grubbs检验来确定对照组/治疗组内的离群值($\alpha=0.05$)。

[0346] 结果&讨论

[0347] 图17示出了抗-AXL ADC对体重的作用,作为在用hF111-5E9-DM1以5mg/kg治疗两次(第0天和第4天)后MDA-MB-231-Luc荷瘤小鼠中初始体重(BW)的百分比。图示了ADC缓冲液(圆圈)和hF111-5E9-DM1(三角形)组。

[0348] 测量体重作为脱靶潜在毒性的指标。在对照动物(ADC缓冲液组)和hF111-5E9-DM1治疗的动物之间没有观察到显著差异。在实验期间两组小鼠体重增加约10%。

[0349] 图18示出了抗-AXL ADC对肿瘤生长的作用,作为肿瘤体积评估。显示了在用ADC缓冲液(CTR)或5mg/kg hF111-5E9-DM1治疗两次(第0天和第4天)的MDA-MB-231-Luc荷瘤小鼠中的肿瘤生长曲线,每三天记录肿瘤体积(mm^3)。对于ADC缓冲液(圆圈)和hF111-5E9-DM1(三角形),每个数据点表示均数 $\pm$ SEM。

[0350] 从第8天至第28天在hF111-5E9-DM1治疗组和ADC缓冲液治疗组之间观察到对肿瘤生长的统计学显著($p < 0.05$)作用。来自hF111-5E9-DM1组的一只动物与同一组的其余动物相比显示显著更高的肿瘤生长速度。

[0351] 使用Grubbs检验($\alpha = 0.05$)将该动物进一步鉴定为离群者。

[0352] 与对照组相比,在hF111-5E9-DM1治疗组中的平均肿瘤体积减小为约 $90\text{--}60\text{mm}^3$,对照组在第28天时所经历的肿瘤生长为约 $90\text{--}360\text{mm}^3$ 。

[0353] 在肿瘤体积减小方面的这种显著差异表明抗-AXL ADCx可以减小乳腺癌肿瘤模型中的肿瘤体积。

[0354] 实施例18:体外评价抗-AXL sdAb穿过血脑屏障的能力

[0355] 在本实施例中评价了抗-AXL抗体穿过血脑屏障的能力。由于AXL在中枢神经系统(CNS)中表达,靶向AXL并与毒素(诸如DM1, MMAE等)连接的抗体如果能够穿过血脑屏障(BBB),则其在脑中可以表现出非常强力的中靶毒性。因此,使用人体外BBB模型评价抗-AXL sdAb穿过BBB的能力。

[0356] 材料和方法

[0357] 人血脑屏障模型。使用基于干细胞的人BBB模型。该模型利用产生自人羊水-来源的诱导性多能干细胞的脑内皮细胞(BEC)。此体外人血脑屏障(BBB)模型能够临床前筛选有前途的BBB-通透性化合物和CNS-靶向抗体。这些BEC表现出基本的屏障特性,诸如组织良好的连续紧密连接、高跨内皮电阻(TEER)以及流出物和受体介导的转胞吞(RMT)转运子的极性表达。

[0358] 基于Transwell的体外BBB模型。Transwell BBB测定由接种在明胶包被的可通透Transwell膜插入物上的BEC构成,所述Transwell膜插入物放置在12-孔配套板中。BEC以500,000个细胞/膜接种在处于1mL不含酚红的BEC培养基中的大鼠尾胶原包被的 $1\mu\text{m}$ 孔径的 0.83cm^2 Falcon™细胞插入物上。12孔组织培养板(即,用于转运的底室)的孔含有2mL不含酚红的BEC培养基。测量每个插入物的TEER值,仅 $\text{TEER} > 300\ \Omega\ \text{cm}^2$ 的插入物用于转胞吞研究。在转运缓冲液(在磷酸盐缓冲盐水中10mM HEPES, 5mM MgCl_2 , 和0.01% BSA, pH 7.4; 1mL上室和2mL底室)中以“多重”方式通过下述进行转运试验:将测试抗体(表19)和阴性对照(A20.1)以每种 $1.25\mu\text{M}$ 的混合物加入至上室,并在15、30、60和90分钟时从底室收集100 μL 等分试样(在每次收集等分试样后更换100 μL 转运缓冲液进入底室),用于通过nanoLC-MS/MS(多级反应监测-MRM)同时定量所有测试抗体。

[0359] 测定用于测试物品和用于A20.1的特异性肽特征用于MRM分析。对于测试抗体,通过MRM检测Fc肽(TTPPVLDSDGSFFLYSK; SEQ ID NO:187),对于阴性对照,检测A20.1肽(EFVAAGSSTGR; SEQ ID NO:188)。在测定时段期间BBB的完整性通过在每个测试样品中加入不穿过BBB的sdAb(A20.1)来监测。使用FC5Hfc1X0作为阳性对照, TWIN200-hIgG1作为阴性对照。在本研究中评价的sdAb和对照测试物品归纳在表19中。试验重复三次。

[0360]

表 19										
在体外 BBB 测定中使用的测试物品(与 hIgG1 的 Fc 结构域融合的抗-AXL sdAb)和对照分子*										
代码	插入物#	时间 (min)	测试抗体				阴性对照			
			名称	详情	MW	上部 μM	名称	详情	MW	上部 μM
AOL	3	90	FC5hFc1X0	AP160 408	78334	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOM	3	90	NRC-sdAb001-hIgG1	-	76853	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AON	2	90	NRC-sdAb002-hIgG1	-	79514	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOO	1	90	NRC-sdAb003-hIgG1	-	77267	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOP	2	90	NRC-sdAb004-hIgG1	-	78810	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOQ	3	90	NRC-sdAb005-hIgG1	-	76915	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOR	3	90	NRC-sdAb006-hIgG1	-	77496	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOS	3	90	NRC-sdAb008-hIgG1	-	77838	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
AOT	1	90	TWIN200-hIgG1		79009	1.25	A20.1	140915	15670	1.25
*对于测试抗体, 监测 Fc 肽(SEQ ID NO:187)以及对于阴性对照, 监测 A20.1 肽(SEQ ID NO:188)										

[0361]

(MRM)。

[0362] 结果

[0363] 图19中示出了FC5Hfc1X0 (阳性对照)、TWIN200-hIgG1 (阴性对照) 和7种抗-AXL sdAb的体外Papp值的比较。各种分子量的对照分子,15.6kDa (A20.1) 和79.0kDa (TWIN200-hIgG1), 显示相似的低Papp值, 范围为约9.0-15.0x 10⁻⁶cm/min; 相反, FC5Hfc1X0的Papp值为约175x 10⁻⁶cm/min (>10-倍高于A20.1)。所有抗-AXL sdAb表现出类似于阴性对照的Papp值, 表明没有显著的体外BBB通透性, 例外的是NRC-sdAb004和NRC-sdAb005抗体, 它们显示相对于其各自对照的低Papp值(约2-倍)。图底部的灰线指示定量下限 (LLOQ)。图中对NRC-sdAb006-hIgG1显示的星号指示泄露的插入物AOR1数据被去除。

[0364] 表20提供了Papp数据, 并显示了与A20.1 (阴性对照) 相比, 对测试物品的Papp值的统计学分析。

[0365]

表 20 Papp 值和统计学显著性			
测试 Ab	测试 Ab 的 Papp	A20.1 的 Papp	p-值(测试品相 对于 A20.1)
FC5hFc	175.8 ± 26.3	11.9 ± 0.8	$p < 0.001$
NRC-sdAb001-hIgG1	9.56 ± 1.52	10.7 ± 2.6	ns
NRC-sdAb001-hIgG1	7.02 ± 1.04	14.1 ± 2.2	ns
NRC-sdAb002-hIgG1	5.22 ± 0.0	9.15 ± 0.0	ns
NRC-sdAb003-hIgG1	9.17 ± 0.21	12.5 ± 0.3	ns
NRC-sdAb004-hIgG1	17.1 ± 8.3	9.75 ± 1.25	$p = 0.01$
NRC-sdAb005-hIgG1	24.3 ± 10.2	10.9 ± 0.2	$p = 0.01$
NRC-sdAb006-hIgG1	11.4 ± 3.3	11.8 ± 2.9	ns
NRC-sdAb008-hIgG1	13.6 ± 0.0	12.5 ± 0.0	ns

[0366] 在前面的描述中,为了解释的目的,给出了大量的细节以便提供对实施方案的充分理解。然而,本领域技术人员显而易见的是这些具体的细节不是必需的。

[0367] 上述的实施方案意在仅是实例。本领域技术人员可以对具体的实施方案做出改变、修改和变化。权利要求的范围不应当受本文中所给出的具体实施方案所限制,而是应当以与说明书一致的方式作为整体来解释。

[0368] 序列

[0369] 本文中所提及的序列的统一列表参见表21。

表 21
序列的统一列表

[0370]

SEQ ID NO:	序列	描述
1	KSSQSLNX ₁ RTRKX ₂ YLA, X ₁ =S 或 T; X ₂ =I 或 N	CDR L1-B 共有
2	WASTRX ₁ X ₂ , 其中 X ₁ =E, H 或 Q 和 X ₂ =S 或 T	CDR L2-B 共有
3	GX ₁ TFX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ , X ₁ =F 或 Y; X ₂ =I, S 或 T; X ₃ =S, N 或 K; X ₄ =F 或 Y; X ₅ =G 或 W; X ₆ =I 或 M; X ₇ =N, S 或 H	CDR H1-B 共有
4	NIX ₁ PX ₂ SX ₃ SX ₄ X ₅ YNEKFKX ₆ , X ₁ =F, N, 或 Y; X ₂ =G, N, 或 D; X ₃ =S 或 T; X ₄ =A 或 T; X ₅ =N 或 D; X ₆ =S 或 R	CDR H2-B 共有
5	DX ₁ YGGSPDY, X ₁ =T 或 Y	CDR H3-B 共有
6	WASTRX ₁ S, X ₁ =E 或 Q	CDR L2-B 共有 (2)
7	GYTFTSX ₁ WIN, X ₁ =F 或 Y	CDR H1-B 共有 (2)
8	NIX ₁ PX ₂ SSSTNYNEKFKS, X ₁ =F 或 Y 和 X ₂ =G 或 D	CDR H2-B 共有 (2)
9	KSSQSLNSRTRKIYLA	F107-7H5 CDR L1-B
10	WASTRQS	F107-7H5 CDR L2-B
11	KQSYNLWT	F107-7H5/F107 & 8D12 CDR L3-B
12	GYTFTSYWIN	F107-7H5 CDR H1-B
13	NIYPDSSSTNYNEKFKS	F107-7H5 CDR H2-B
14	DTYGGSPDY	F107-7H5 CDR H3-B
15	KSSQSLNTRTRKNYLA	F107-8D12 CDR L1-B
16	WASTRES	F107-8D12 CDR L2-B
17	GYTFISFWIN	F107-8D12 CDR H1-B
18	NIFPGSSSTNYNEKFKS	F107-8D12 CDR H2-B
19	DYYGGSPDY	F107-8D12 CDR H3-B

[0371]

20	RASQDINNYLN	F111-5E9 CDR L1-B
21	YISRLHS	F111-5E9 CDR L2-B
22	QQGNTLPFT	F111-5E9 CDR L3-B
23	KYGMN	F111-5E9 CDR H1-B
24	WINTYTGEPTYADDFKG	F111-5E9 CDR H2-B
25	GGYYSNPIYPMDY	F111-5E9 CDR H3-B
26	SASSSVSYMY	F111-3C8 CDR L1-B
27	RTSNLAS	F111-3C8 CDR L2-B
28	QQYHNPPT	F111-3C8 CDR L3-B
29	GYTFTSYWMH	F111-3C8 CDR H1-B
30	NINPNSTSADYNEKFKR	F111-3C8 CDR H2-B
31	PLMGPYWYFDV	F111-3C8 CDR H3-B
32	KASQDVTTAVA	F107-10G1 CDR L1-B
33	WASTRHT	F107-10G1 CDR L2-B
34	QQHFTTPLT	F107-10G1 CDR L3-B
35	NYGMS	F107-10G1 CDR H1-B
36	SISGGGGRTYLDNVKG	F107-10G1 CDR H2-B
37	GARASYFAMDY	F107-10G1 CDR H3-B
38	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRKIYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK	F107-7H5 VL
39	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRP GQGLEWIGNIYPDSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYIQFS SLTSEDSAVYYCTRDYGGSPDYWGQGTTLTVSS	F107-7H5 VH
40	DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLNTRTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK	F107-8D12 VL
41	QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFISFWINWVKQRP QGLEWMGNIFPGSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARDYYGGSPDYWGQGTTLTVSS	F107-8D12 VH
42	QIVLTQSPAISASPGKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSP KPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CQQYHNPPTFGGGTKLEIK	F111-3C8 VL
43	QVQLQQPGAELGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRVP GQGLEWIGNINPNSTSADYNEKFKRKATLTVDKSSSTAYMQL STLTSEDSAVYYCTRPLMGPYWYFDVWGTGTTTVTVSS	F111-3C8 VH

[0372]

44	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDG TVKLLIYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEEDVATY FCQQGNTLPFTFGSGTKLEIK	F111-5E9 VL
45	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQAPG KGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLTTEDMVTYFCAGGGYYSNPIYPMDYWGQGSVTVSS	F111-5E9 VH
46	VIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPG QSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYSLTISNVQTEDLA FYYCQQHFTTPTFGAGTKLELK	F107-10G1 VL
47	EVNLVESGGGVVKPGASLKLSCASGFTFSNYGMSWVRQTS DKRLEWVASISGGGGRTYYLDNVKGRFIISRENAKNTLYLQM SSLKSEDTALFYCARGARASYFAMDYWGQGSSVTVSS	F107-10G1 VH
48	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSTRKIYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNFPYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVT KSFNRGEC	嵌合 F107-7H5 轻链
49	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRP GQGLEWIGNIYPDSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSTTAYIQFS SLTSEDSAVYYCTRDYGGSPDYWGQGTTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPG	嵌合 F107-7H5 重链
50	DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLNTRTRKKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNFPYAPREKVKWVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVT KSFNRGEC	嵌合 F107-8D12 轻链
51	QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFISFWINWVKQRP QGLEWMGNIFGSSSTNYNEKFKSKATLTVDKSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARDYYGGSPDYWGQGTTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE	嵌合 F107-8D12 重链

[0373]

	QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
52	QIVLTQSPAISASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSP KPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYY CQQYHNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	嵌合 F111-3C8 轻链
53	QVQLQQPGAELGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRVP GQGLEWIGNINPNSTSDADYNEKFKRKATLTVDKSSSTAYMQL STLTSEDSAVYYCTRPLMGPIYFDVWGTGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	嵌合 F111-3C8 重链
54	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITISCRASQDINNYLNWYQQKPDG TVKLLIYYISRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLELEDVATY FCQQGNTLPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	嵌合 F111-5E9 轻链
55	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTKYGMNWVKQAPG KGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLTTEDMVTYFCAKGGYYSNPIYPMQDYWGQGSVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	嵌合 F111-5E9 重链
56	VIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTAVAWYQQKPG QSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDYSLTISNVQTEDLA FYQCQQHFTTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN	嵌合 F107-10G1 轻链

[0374]

	RGEC	
57	EVNLVESGGGVVKPGASLKLSCEASGFTFSNYGMSWVRQTS DKRLEWVASISGGGGRTYYLDNVKGRFIISRENAKNTLYLQM SSLKSEDALFYCARGARASYFAMDYWGQGSSVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	嵌合 F107-10G1 重链
58	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQGILELADST QTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQ TFVSQPGYVGLLELPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPE PVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCAEHN AKGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGI YPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLR LGLSLHPTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPE NISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVL MDIGLRQEVTLLELQGDGSVSNLTVCVAAAYTAAGDGPWSLPV PLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWGSGGGSSTG	rhAXL-ECD
59	MVLQTQVFISLLLWISGAYG	轻链信号序列
60	MDWTWRILFLVAAATGTHA	重链信号序列
61	gacattgtgatgtcacagtcctcctcctggctgtgtcagcaggagagaaggtcactatgagc tgcaaatccagtcagagctgtctcaacagtagaaccgaaagatctacttggtggtaccagca gaaaccaggtcagtcctcctaaactgctgatctattgggcatccactaggcaatctggggtccctga tcgttcacaggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagtggtcaggtgaag acctggcagtttattactgcaagcaatcttataatctgtggacgttcggtggaggcaccagctgga aatcaaacgg	F107-7H5 VL 序列
62	caggccaactgcagcagcctggggctgagctgtgaagcctggggcttcagtgaactgtcctg caaggcttctggctacactttcaccagctactggataaactgggtgaagcagaggcctggacaag gccttgagtggattggaaatattatcctgatagtagtagtactaactacaatgagaagtcaagag caaggccacactgactgtagacaagtcctccaccacagcctacatacagttcagcagcctgacat ctgaggactctgcggtctattattgtacaagagatacctatggtggtagccctgactactggggcc aaggcaccactctcacagtctcctca	F107-7H5 VH 序列
63	gacattgtgatgtcacagtcctcctcctggctgtgtcagcaggagagagggtcactatgagc tgcaaatccagtcagagctgtctcaacactagaaccgaaagaactacttggtggtaccagca gaaaccagggcagtcctcctaaactgctgatctactgggcatccactagggaatctggggtccctg atcgcttcacaggcagtggtatctgggacagatttactctcaccatcagcagtggtcaggtgaa gacctggcagtttattactgcaagcaatcttataatctgtggacgttcggtggaggcaccagctg gaaatcaaa	F107-8D12 VL 序列

[0375]

64	cagggtccaactgcagcagcctggggctgagcttggaagcctggggcttcagtgagctgtcct gcaaggcttctggctacactttcatcagcttctggataaactgggtgaagcagaggcctggacaa ggccttgagtgatgggaaatattttcctggtagtagtagtacgaactacaatgagaagtcaaga gcaaggccacactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgac atctgaggactctgcggtctattttgtgcaagagattactatggtgtagccctgactactggggc caaggcaccactctcacagtytctca	F107-8D12 VH 序列
65	gatatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggagacagagtcaccatcagt tgcaaggcgaagtcaggacattaacaattatttaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgtt aaactcctgatctactacatatcaagattacactcaggagtcctcatcaagggtcagtggcagtggt ctggaacagattattctcaccattagcaacctggagctagaagatgttgcacttactttgcaa cagggttaatacgttccattcacgttcggctcggggacaaagtggaaataaaa	F111-5E9 VL 序列
66	cagatccagttgggtgagctcggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcagatctcct gcaaggcttctgggtataccttcacaaaatatggaatgaactgggtaaagcaggctccaggaaag ggtttaaagtggatgggtggataaacactacactggagagccaacatagctgatgacttcaa gggacggtttgccttctctttgaaacctctgccagcactgcctatttgcagatcaacaacctcaca actgaggacatggtcacatattctgtgcaaaaggggggtattatagtaacctatctatcctatgg actactgggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctca	F111-5E9 VH 序列
67	caaattgttctcaccagctcaccagaatcatgtctgcctcaggggagaaggtcaccatatacct gcagtgccagctcaagtgaagtacatgtattggtaccagcagaagccaggatcctccccc ccctggatttatcgacatccaacctggcttctggagtcctctgctcgttcagtgccagtggtctg ggacctcttactctcacaatcagcagcatggaggtgaagatgctgccacttattactgccagc agtatcataattaccacccacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgg	F111-3C8 VL 序列
68	cagggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggcaagcctgggacatcagtgaaagtgtcct gcaaggcttctggctacaccttcaccagctattggatgcactgggtgaagcgggtgcctggacaa ggccttgagtgattggaaatattaatcctaatagtactagtctgactacaatgagaagtcaaga ggaaggccacattgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcaccctgac atctgaggactctgcggtctactactgtacaagaccctaatgggtccttactggtacttcgatgtct ggggcacaggggaccacgggtcaccgtctcctca	F111-3C8 VH 序列
69	gtcattgtgatgaccagctcacaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagtatcacct gcaaggccagtcaggatgtgactactgtgtagcctgggtatcaaaaaaccaggggcaatctcct aaactactgatttactgggcaccccggcacactggagtcctgatcgttcacaggcagtggt atctgggacagattattctcaccatcagcaatgtgcagactgaagacctggcattttattactgtc agcaacattttaccactcctctcacgttcggtgctgggaccaagtggagctgaaa	F107-10G1 VL 序列
70	gaagtgaacctgggtgagctctgggggaggcgtagtgaagcctggagcgtctctgaaactcct gtgaagcctctggattcactttcagtaactatggcatgtcttgggttcgccagacttcagacaagag gctggagtggtcgcacccattagtgggtggtggtgtagaacctactatctagacaatgtaaagg ccgattcatctcagagagaatgccaagaacacctgtacctgcaaatgagtagtctgaagtc tgaggacacggccttgtttactgtgcaagaggagctcgggcctcttactttgctatggactactgg ggtcaagggaagtgcagtcaccgtctcctca	F107-10G1 VH 序列
71	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLCRLQLVQGEPEVHWLRDQILELADST QTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQ	(rh)AXL-ECD His8

[0376]

	TFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPE PVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHN AKGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGI YPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLR LGS LHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPE NISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVL MDIGLRQEVTLELQGDGSVSNLTVCVAAAYTAAGDGPWSLPV PLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWGSGGGSSTGHH HHHHHHG	
72	MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGN PGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWLRDQGILELADST QTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQ TFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPE PVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHN AKGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPTLEVAWTPGLSGI YPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLR LGS LHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPE NISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVL MDIGLRQEVTLELQGDGSVSNLTVCVAAAYTAAGDGPWSLPV PLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAA ACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGELVVRYRVRKS YSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEG EFGAVMEGQLNQDDSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAV CMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDH SFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSKRFIHR DLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMP VKWIAIESLADRVTYSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVE NSEIYDYLRRGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSF TELREDLENTLALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAG GADPPTQDPKDSCLTAAEVHPAGRYVLCPTTTPSPAQPAD RGSPAAPGQEDGAYLECGRYASHHHHHH	AXL-全长 His6
73	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYIFTNFWINWVKQRPG QGLEWIGNIFPGSNSSNYNEKFKNKATLTVDKSSSTAYMHLSS LTSEDSAVYYCYRDYYGGSPDYWGQGTTLTVSS	F155-3C7 VH
74	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSKTRKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPARFTGSGSGTDFTLTISVQ AEDLAIIYCKHSYNLWTFGGGTKLEIR	F155-3C7 VL
75	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFTYYGINWVKQAPG KGLEWMGWINTYLGEPYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLRDEDMATYFCTRGTMSYSFDYWGQGTALTVSS	F149-4G4 VH
76	QNVLTQSPAIMSASPGEVMTMCRASSSVSSSYLHWYQQKSG ASPKLWIYSTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISVVEAEDAAT YYCHQYSGDPLTFGSGTKLEVK	F149-4G4 VL

[0377]

77	GFTFSNYG	F107-10G1 CDR H1-A
78	ISGGGGRT	F107-10G1 CDR H2-A
79	ARGARASYFAMDY	F107-10G1 CDR H3-A
80	QDVTTA	F107-10G1 CDR L1-A
81	WAS	F107-10G1 CDR L2-A
82	QQHFTTPLT	F107-10G1 CDR L3-A
83	GYTFTKYG	F111-5E9 CDR H1-A
84	INTYTGEP	F111-5E9 CDR H2-A
85	AKGGYYSNPIYPMDY	F111-5E9 CDR H3-A
86	QDINNY	F111-5E9 CDR L1-A
87	YIS	F111-5E9 CDR L2-A
88	QQGNTLPFT	F111-5E9 CDR L3-A
89	GYTFISFW	F107-8D12 CDR H1-A
90	IFPGSSST	F107-8D12 CDR H2-A
91	ARDYYGGSPDY	F107-8D12 CDR H3-A
92	QSLNTRTRKNY	F107-8D12 CDR L1-A
93	WAS	F107-8D12 CDR L2-A
94	KQSYNLWT	F107-8D12 CDR L3-A
95	GYTFTSYW	F107-7H5 CDR H1-A
96	IYPDSSST	F107-7H5 CDR H2-A
97	TRDTYGGSPDY	F107-7H5 CDR H3-A
98	QSLNSRTRKIY	F107-7H5 CDR L1-A
99	WAS	F107-7H5 CDR L2-A
100	KQSYNLWT	F107-7H5 CDR L3-A
101	GYIFTNFW	F155-3C7 CDR H1-A
102	IFPGSNSS	F155-3C7 CDR H2-A
103	VRDYYGGSPDY	F155-3C7 CDR H3-A
104	QSLNSKTRKNY	F155-3C7 CDR L1-A
105	WAS	F155-3C7 CDR L2-A
106	KHSYNLWT	F155-3C7 CDR L3-A
107	GYTFTSYW	F111-3C8 CDR H1-A
108	INPNSTSA	F111-3C8 CDR H2-A
109	TRPLMGPYWYFDV	F111-3C8 CDR H3-A

[0378]

110	SSVSY	F111-3C8 CDR L1-A
111	RTS	F111-3C8 CDR L2-A
112	QQYHNPPT	F111-3C8 CDR L3-A
113	GYTFTYYG	F149-4G4 CDR H1-A
114	INTYLGEPT	F149-4G4 CDR H2-A
115	TRGTMSYSFDY	F149-4G4 CDR H3-A
116	SSSVSSSY	F149-4G4 CDR L1-A
117	STS	F149-4G4 CDR L2-A
118	HQYSGDPLT	F149-4G4 CDR L3-A
119	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTASASISSFDIMGWYRQAPG KQRELVAAITTLDIANYRDSVKGRFTISRDNANTVYVLQMDS LKPEDTARYHCAAFQSDQNYWGQGTQVTVSS	NRC-sdAb001
120	QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSAVMAWFRQAP EKVRDFVGFITNSGNILYDDSVKGRFTISRDNANTVYVLQMN SLKPEDTAVYYCAAKWSFSSGYGDLRRAAMYDYWGQGTQV TVSS	NRC-sdAb002
121	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVTLDTAIGWFRQAP GKERELVAAITSGGNTDYAESAKGRFRISRDNSKNTIYLMNS LKPEDTGVIYCAARRGGARGEYDYWDQGTQVTVSS	NRC-sdAb003
122	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAFSRGAFDTYEIGWFRQAPG KEREFVAAVTRNGDSVYADSLKARFTASRNNVNTAYLHM NILQPEDTATYYCAANWRPLRTSSGADDYADWGQGTQVTVS S	NRC-sdAb004
123	QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAASGSISSINTIGWFRQAPGK QRELVAASDSGANRNYADSVKGRFTISRDNANTVYVLQMNN LKPEDTAIYYCRAWGTGTISTMYWGQGTQVTVSS	NRC-sdAb005
124	QVKLEESGGGLVQAGASLRLSCVASESIFGFNTMGWYRQAPG NERELVASISNSKRTMYADSVKGRFTISRDNANTVNLQMNN LKPEDTAVYYCRAWGIITSATVYWGQGTQVTVSS	NRC-sdAb006
125	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCATSTRTVSSAVMAWFRQAP EKERDFVGFISNSGSVYYDDSVKGRFTISRDNANTVYVLQMN SLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQVTVSS	NRC-sdAb007
126	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSGMINTMGWYRQAP GKQRELVARRSTGGTTNYADSVKGRFTISRDDANNTVYLM NSLKPEDTAVYYCAIIWRTSDLTGRFNTWGQGTQVTVSS	NRC-sdAb008

[0379]

127	ASISSFDI	NRC-sdAb001 CDR1-A
128	ITTLDIA	NRC-sdAb001 CDR2-A
129	AAFQSDQNY	NRC-sdAb001 CDR3-A
130	TRTVSSAV	NRC-sdAb002 CDR1-A
131	ITNSGNI	NRC-sdAb002 CDR2-A
132	AAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY	NRC-sdAb002 CDR3-A
133	GVTLDYTA	NRC-sdAb003 CDR1-A
134	ITSGGNT	NRC-sdAb003 CDR2-A
135	AARRGGARGEYDY	NRC-sdAb003 CDR3-A
136	RGAFDTYE	NRC-sdAb004 CDR1-A
137	VTRNGDSV	NRC-sdAb004 CDR2-A
138	AANWRPLRTSSGADDYAD	NRC-sdAb004 CDR3-A
139	GSISSINT	NRC-sdAb005 CDR1-A
140	SDSGANR	NRC-sdAb005 CDR2-A
141	RAWGTGTISTMY	NRC-sdAb005 CDR3-A
142	ESIFGFNT	NRC-sdAb006 CDR1-A
143	ISNSKRT	NRC-sdAb006 CDR2-A
144	RAWGIITSATVY	NRC-sdAb006 CDR3-A
145	TRTVSSAV	NRC-sdAb007 CDR1-A
146	ISNSGSV	NRC-sdAb007 CDR2-A
147	AIIWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb007 CDR3-A
148	GSSGMINT	NRC-sdAb008 CDR1-A
149	RSTGGTT	NRC-sdAb008 CDR2-A
150	AIIWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb008 CDR3-A
151	NFWIN	F155-3C7 CDR H1-B
152	NIFPGSNSSNYNEKFKN	F155-3C7 CDR H2-B

[0380]

153	DYYGGSPDY	F155-3C7 CDR H3-B
154	KSSQSLNSKTRKNYLA	F155-3C7 CDR L1-B
155	WASTRES	F155-3C7 CDR L2-B
156	KHSYNLWT	F155-3C7 CDR L3-B
157	YYGIN	F149-4G4 CDR H1-B
158	WINTYLGEPTYADDFKG	F149-4G4 CDR H2-B
159	GTMSYSFDY	F149-4G4 CDR H3-B
160	RASSSVSSSYLH	F149-4G4 CDR L1-B
161	STSKLAS	F149-4G4 CDR L2-B
162	HQYSGDPLT	F149-4G4 CDR L3-B
163	FDIMG	NRC-sdAb001 CDR1-B
164	AITTLDIANYRDSVKG	NRC-sdAb001 CDR2-B
165	FQSDQNY	NRC-sdAb001 CDR3-B
166	SAVMA	NRC-sdAb002 CDR1-B
167	FITNSGNILYDDSVKG	NRC-sdAb002 CDR2-B
168	KWSFSSGYGDLRRAAMYDY	NRC-sdAb002 CDR3-B
169	YTAIG	NRC-sdAb003 CDR1-B
170	AITSGGNTDYAESAKG	NRC-sdAb003 CDR2-B
171	RRGGARGEYDY	NRC-sdAb003 CDR3-B
172	TYEIG	NRC-sdAb004 CDR1-B
173	AVTRNGDSVVYADSLKA	NRC-sdAb004 CDR2-B
174	NWRPLRTSSGADDYAD	NRC-sdAb004 CDR3-B
175	ASDSGANRNYADSVKG	NRC-sdAb005 CDR1-B
176	ASDSGANRNYADSVKG	NRC-sdAb005 CDR2-B
177	WGTGTISTMY	NRC-sdAb005 CDR3-B
178	FNTMG	NRC-sdAb006 CDR1-B
179	SISNSKRTMYADSVKG	NRC-sdAb006 CDR2-B
180	WGIITSATVY	NRC-sdAb006 CDR3-B

[0381]	181	SAVMA	NRC-sdAb007 CDR1-B
	182	FISNSGSVYYDDSVKG	NRC-sdAb007 CDR2-B
	183	IWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb007 CDR3-B
	184	INTMG	NRC-sdAb008 CDR1-B
	185	RRSTGGTTNYADSVKG	NRC-sdAb008 CDR2-B
	186	IWRTSDLTGRFNT	NRC-sdAb008 CDR3-B
	187	TTPPVLDSDGSFFLYSK	Fc 肽
	188	EFVAAGSSTGR	A20.1 肽
注- CDR 序列描述跟着“-A”表示 IMGT CDR 惯用法。 CDR 序列描述跟着“-B” 表示 Kabat CDR 惯用法。			

[0382] 参考文献:

[0383] 本文中提及的所有出版物通过引用并入本文。

[0384] 国际专利申请公开号W02016/005593 A1 (Breij等人)

[0385] 美国专利申请公开号US 2014/0227283 A1 (Robert等人)

[0386] Asiedu MK, Beauchamp-Perez FD, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL. (2014) AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene*.33(10):1316-24.

[0387] Baral等人 (2013) Single-domain antibodies and their utility. *Curr Protoc Immunol*.2013Nov 18;103:Unit 2.17.

[0388] Feneyrolles c, Spenlinhauer A, Guet L, Fauvel B, Daydé-Cazals B, Warnault P, ChevêG, Ysri A. (2014) AXL Kinase as a Key Target for Oncology: Focus on Small Molecule Inhibitors. *Mol. Cancer Ther*.13;2141-2148.

[0389] Gjerdrum C, Tiron C, Høiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, Collett K, Li S, McCormack E, Gjertsen BT, Micklem DR, Akslen LA, Glackin C, Lorens JB (2010) AXL is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*.107(3):1124-9.

[0390] Gonzales NR, DePascalis R, Schlom J, Kashmiri SVS (2005) Minimizing the Immunogenicity of Antibodies for Clinical Application. *Tumor Biol* 26,31-43.

[0391] Henry等人, 2016, “Isolation of TGF- β -neutralizing single-domain antibodies of predetermined epitope specificity using next-generation DNA sequencing”, *Protein Engineering, Design and Selection*, pp.1-5, 2016-09-08 (PEDS)

[0392] Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieria AM, Atchison RE, McLaughlin J, Swift SE, Pali ES, Yam G, Wong S, Lasaga J, Shen MR, Yu S, Xu W, Hitoshi Y, Bogenberger J, Nör JE, Payan DG, Lorens JB. (2005) Multiple roles for the

receptor tyrosine kinase AXL in tumor formation. *Cancer Res.* 65 (20) :9294-303.

[0393] Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, Duan M, Torneros A, Yu J, Heckrodt TJ, Zhang J, Ding P, Apatira A, Chua J, Brandt R, Pine P, Goff D, Singh R, Payan DG, Hitoshi Y. R428, a selective small molecule inhibitor of AXL kinase blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2010 Feb 15; 70 (4) :1544-54.

[0394] Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.

[0395] Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, Narumi Y, Ohmoto H, Nishiwaki E, Akita K, Kirii Y. (2013) Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells.* 18 (2) :110-22.

[0396] Leconet 等人, (2014) Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene* 33, 5405-5414 (20 November 2014) .

[0397] Lee HJ, Jeng YM, Chen YL, Chung L, Yuan RH. (2014) Gas6/AXL pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of Slug in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 35:769-775.

[0398] Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009) AXL as a potential therapeutic target in cancer: role of AXL in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene.* 28:3442-3455.

[0399] Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, Hinrichs MJ, Bezabeh BZ, Fleming RL, Dimasi N, Feng H, Toader D, Yuan AQ, Xu L, Lin J, Gao C, Wu H, Dixit R, Osbourn JK, Coats SR. A Biparatopic HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate Induces Tumor Regression in Primary Models Refractory to or Ineligible for HER2-Targeted Therapy. *Cancer Cell.* 2016 Jan 11; 29 (1) :117-29.

[0400] Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008) TAM receptor tyrosine kinases: Biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 100:35-83.

[0401] Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, Lauffenburger DA. (2013) The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Sci Signal.* 6 (287) .

[0402] O' Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. (1991) AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 11:5016-5031.

[0403] Pacciez JD, Vogelsang M, Parker MI, Zerbini LF. (2014) The receptor tyrosine kinase AXL in cancer: biological functions and therapeutic implications. *Int J Cancer.* 134 (5) :1024-33.

- [0404] Padlan EA(1991)A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties.Mol Immunol 28,489-498.
- [0405] Queen C,Schneider WP,Selick HE,Payne PW,Landolfi NF,Duncan JF,Avdalovic NM,Levitt M,Junghans RP,Waldmann TA(1989)A humanized antibody that binds to the interleukin 2receptor.Proc Natl Acad Sci USA 86,10029-10033.
- [0406] Raymond等人(2015)Production of α 2,6-sialylated IgGlin CHO cells.MAbs 7 (3) :571-583.
- [0407] Rankin EB,Fuh KC,Castellini L,Viswanathan K,Finger EC,Diep AN,LaGory EL,Kariolis MS,Chan A,Lindgren D,Axelson H,Miao YR,Krieg AJ,Giaccia AJ. (2014) Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET.Proc Natl Acad Sci U S A.111(37) :13373-8.
- [0408] Riechmann L,Clark M,Waldmann H,Winter G(1988)Reshaping human antibodies for therapy.Nature 332,323-327.
- [0409] Strop P,Ho WH,Boustany LM,Abdiche YN,Lindquist KC,Farias SE,Rickert M,Appah CT,Pascua E,Radcliffe T,Sutton J,Chaparro-Riggers J,Chen W,Casas MG,Chin SM,Wong OK,Liu SH,Vergara G,Shelton D,Rajpal A,Pons J.Generating bispecific human IgG1 and IgG2antibodies from any antibody pair.J Mol Biol 2012;420 (3) :204-219.
- [0410] Tempest PR,Bremmer P,Lambert M,Taylor G,Furze JM,Carr FJ,Harris WJ (1991)Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo.Biotechnology 9,266-271.
- [0411] Thomson S,Petti F,Sujka-Kwok I,Mercado P,Bean J,Monaghan M,Seymour SL,Argast GM,Epstein DM,Haley JD. (2011)A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states.Clin Exp Metastasis.28(2) :137-55.
- [0412] Tsurushita N,Hinton,RP,Kumar S(2005)Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax.Methods 36,69-83.
- [0413] Vincke C,等人,General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold.J Biol Chem.2009Jan 30;284(5) :3273-84.
- [0414] Yakes FM,Chen J,Tan J,Yamaguchi K,Shi YC,Yu PW,Qian F,Chu FL,Bentzien F,Cancilla B,Orf J,You A,Laird AD,Engst S,Lee L,Lesch J,等人(2011) Cabozantinib(XL184),a Novel MET and VEGFR2Inhibitor,Simultaneously Suppresses Metastasis,Angiogenesis,and Tumor Growth.Molecular cancer therapeutics.10: 2298-2308.
- [0415] Zhang等人,2009,Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies.Protein Expression and Purification,May;65(1) :77-82.
- [0416] Zhou等人,2010,J Mol Biol,Nov 19;404(1) :88-99Internalizing cancer antibodies from phage libraries selected on tumor cells and yeast displayed

tumor antigen.

序列表

<110> 加拿大国家研究委员会

<120> AXL-特异性抗体及其用途

<130> PAT 86600W-90

<150> US 62/557,870

<151> 2017-09-13

<160> 188

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L1-B共有

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa = S或T

<220>

<221> misc_feature

<222> (14) .. (14)

<223> Xaa = I或N

<400> 1

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Arg Thr Arg Lys Xaa Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L2-B共有

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa is E, H或Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)
<223> Xaa是S或T
<400> 2
Trp Ala Ser Thr Arg Xaa Xaa
1 5
<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H1-B共有
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> Xaa是F或Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa是I, S, 或T
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa是S, N, 或K
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7) .. (7)
<223> Xaa是F或Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> Xaa是G或W
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9) .. (9)
<223> Xaa是i或M
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa是N, S, 或H

<400> 3

Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2-B共有

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa是F, N, 或Y

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa是G, N, 或D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa是S或T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa是A或T

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10) .. (10)

<223> Xaa是N或D

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa是S或R

<400> 4

Asn Ile Xaa Pro Xaa Ser Xaa Ser Xaa Xaa Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Xaa

<210> 5

<211> 9

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR H3-B共有
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa是T或Y
 <400> 5
 Asp Xaa Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr
 1 5
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR L2-B共有 (2)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa是E或Q
 <400> 6
 Trp Ala Ser Thr Arg Xaa Ser
 1 5
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> CDR H1-B共有 (2)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa是F或Y
 <400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Xaa Trp Ile Asn
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CDR H2-B共有 (2)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> Xaa是F或Y
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> Xaa是G或D
<400> 8
Asn Ile Xaa Pro Xaa Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Ser
<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-7H5 CDR L1-B
<400> 9
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Ile Tyr Leu
1 5 10 15
Ala
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-7H5 CDR L2-B
<400> 10
Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser
1 5
<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5/F107 & 8D12 CDR L3-B

<400> 11

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 CDR H1-B

<400> 12

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn

1 5 10

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 CDR H2-B

<400> 13

Asn Ile Tyr Pro Asp Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 CDR H3-B

<400> 14

Asp Thr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR L1-B

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR L2-B

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR H1-B

<400> 17

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe Trp Ile Asn
1 5 10

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR H2-B

<400> 18

Asn Ile Phe Pro Gly Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR H3-B

<400> 19

Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR L1-B

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR L2-B

<400> 21

Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR L3-B

<400> 22

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR H1-B

<400> 23

Lys Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR H2-B

<400> 24

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR H3-B

<400> 25

Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 CDR L1-B

<400> 26

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 CDR L2-B

<400> 27

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 CDR L3-B

<400> 28

Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 CDR H1-B

<400> 29

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5 10

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 CDR H2-B

<400> 30

Asn Ile Asn Pro Asn Ser Thr Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Arg

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 CDR H3-B

<400> 31

Pro Leu Met Gly Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR L1-B

<400> 32

Lys Ala Ser Gln Asp Val Thr Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR L2-B

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR L3-B

<400> 34

Gln Gln His Phe Thr Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR H1-B

<400> 35

Asn Tyr Gly Met Ser

1 5

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR H2-B

<400> 36

Ser Ile Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val Lys

1	5	10	15
Gly			
<210> 37			
<211> 11			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> F107-10G1 CDR H3-B			
<400> 37			
Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr			
1	5	10	
<210> 38			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> F107-7H5 VL			
<400> 38			
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly			
1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
	20	25	30
Arg Thr Arg Lys Ile Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65		70	75
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln			
	85	90	95
Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
<210> 39			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> F107-7H5 VH			
<400> 39			

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5					10						15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25						30	
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr
65					70				75						80
Ile	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Asp	Thr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 VL

<400> 40

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

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 VH

<400> 41

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

<210> 42

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 VL

<400> 42

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

				85					90					95			
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys								
				100					105								
<210> 43																	
<211> 120																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列																	
<220>																	
<223> F111-3C8 VH																	
<400> 43																	
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Gly	Lys	Pro	Gly	Thr		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
		35					40					45					
Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Thr	Ser	Ala	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe		
	50					55				60							
Lys	Arg	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70				75					80			
Met	Gln	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90				95				
Thr	Arg	Pro	Leu	Met	Gly	Pro	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Thr		
			100					105					110				
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115				120										
<210> 44																	
<211> 107																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列																	
<220>																	
<223> F111-5E9 VL																	
<400> 44																	
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr		
			20					25					30				
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile		
			35				40					45					

Tyr Tyr Ile Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Leu
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 VH

<400> 45

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Thr Thr Glu Asp Met Val Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 VL

<400> 46

Val Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

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

<210> 47

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 VH

<400> 47

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Ser Ile Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Phe Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Ser Ser Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 48

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F107-7H5轻链

<400> 48

Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
			20					25					30		
Arg	Thr	Arg	Lys	Ile	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
		35					40					45			
Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Gln	Ser	Gly	Val
	50					55					60				
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75				80	
Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Gln
				85					90					95	
Ser	Tyr	Asn	Leu	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
		115					120						125		
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
	130						135					140			
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
145					150					155				160	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
				165					170				175		
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
			180					185					190		
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
		195					200					205			
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
		210					215								

<210> 49

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F107-7H5重链

<400> 49

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25						30	
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40						45		
Gly	Asn	Ile	Tyr	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Ile	Gln	Phe	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Thr	Arg	Asp	Thr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105						110	
Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115					120						125		
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
		130				135					140				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145					150					155					160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170					175	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		195					200					205			
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
		210				215					220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
		290				295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr

305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445
<210> 50			
<211> 219			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 嵌合F107-8D12轻链			
<400> 50			
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Thr			
	20	25	30
Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln			
	85	90	95
Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			

115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 51		
<211> 447		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 嵌合F107-8D12重链		
<400> 51		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Gln Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe		
20	25	30
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Asn Ile Phe Pro Gly Ser Ser Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		

145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val	Leu Gln
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val	Pro Ser Ser
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His	Lys Pro Ser
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp	Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys	Asp Lys Thr
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly	Gly Pro Ser
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val	Asp Val Ser His	Glu Asp Pro
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val	His Asn Ala
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile	Glu Lys Thr
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Asp	Glu Leu Thr Lys	Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val	Asp Lys Ser
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met	His Glu Ala
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser	Pro Gly
435	440	445	

<210> 52

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F111-3C8轻链

<400> 52

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 53

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F111-3C8重链

<400> 53

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

<210> 54

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F111-5E9轻链

<400> 54

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1			5					10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	Tyr
			20					25				30			
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Tyr	Ile	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55				60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu
65				70					75					80	
Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Phe
			85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	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
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> 55		
<211> 451		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 嵌合F111-5E9重链		
<400> 55		
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr		
20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Thr Thr Glu Asp Met Val Thr Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		

130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu		
225	230	235
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445

Ser Pro Gly

450

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F107-10G1轻链

<400> 56

Val Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Thr

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe Thr Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu 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> 57

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合F107-10G1重链

<400> 57

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

<210> 58

<211> 460

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> rhAXL-ECD

<400> 58

Met	Ala	Trp	Arg	Cys	Pro	Arg	Met	Gly	Arg	Val	Pro	Leu	Ala	Trp	Cys
1				5				10					15		
Leu	Ala	Leu	Cys	Gly	Trp	Ala	Cys	Met	Ala	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Ala
			20					25					30		
Glu	Glu	Ser	Pro	Phe	Val	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Ile	Thr	Gly	Ala	Arg
		35					40					45			
Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Pro
		50				55					60				
Pro	Glu	Val	His	Trp	Leu	Arg	Asp	Gly	Gln	Ile	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp

65	70	75	80
Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp			
	85	90	95
Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr			
	100	105	110
Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser			
	115	120	125
Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu			
	130	135	140
Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys			
145	150	155	160
Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp			
	165	170	175
Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu			
	180	185	190
His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His			
	195	200	205
Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu			
	210	215	220
Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu			
225	230	235	240
Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr			
	245	250	255
His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln			
	260	265	270
Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser			
	275	280	285
Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro			
	290	295	300
Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp			
305	310	315	320
Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro			
	325	330	335
Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His			
	340	345	350
Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg			
	355	360	365
Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly			
	370	375	380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
 385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Thr Gly
 450 455 460

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 轻链信号序列

<400> 59

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

Gly Ala Tyr Gly
 20

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链信号序列

<400> 60

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Thr His Ala

<210> 61

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 VL序列

<400> 61

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagat ctacttggct 120
tggtaccagc agaaaccagg tcagtctcct aaactgctga tctattgggc atccactagg 180
caatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacgg 339

<210> 62

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 VH序列

<400> 62

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaaactg 60
tcctgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggaaat atttactctg atagtagtag tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240
atacagttca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtac aagagatacc 300
tatggtggta gccctgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 63

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 VL序列

<400> 63

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gagggtcact 60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacactagaa cccgaaagaa ctacttggct 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 64

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 VH序列

<400> 64

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgcagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta cactttcatc agcttctgga taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatgggaaat attttctctg gtagtagtag tacgaactac 180
aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttttgtgc aagagattac 300
tatggtggta gccctgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtytc ctca 354

<210> 65

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 VL序列

<400> 65

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac atatcaagat tacactcagg agtcccata 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcta 240
gaagatgttg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccattcac gttcggctcg 300
gggacaaaagt tggaaataaa a 321

<210> 66

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 VH序列

<400> 66

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aaatatggaa tgaactgggt aaagcaggct 120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct aactggaga gccaacatat 180
gctgatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
ttgcagatca acaacctcac aactgaggac atggtcacat atttctgtgc aaaagggggg 300
tattatagta accctatcta tcctatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgctc 360
tcctca 366

<210> 67

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 VL序列

<400> 67

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atatcctgca gtgccagctc aagtgtagt tacatgtatt ggtaccagca gaagccagga 120
tcctccccc aaccctggat ttatcgaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtat cataattacc caccacgtt cggagggggg 300
accaagctgg aaataaaacg g 321

<210> 68

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-3C8 VH序列

<400> 68

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggcaagc ctgggacatc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctattgga tgcactgggt gaagcgggtg 120
cctggacaag gccttgagt gattggaaat attaatccta atagtactag tgctgactac 180
aatgagaagt tcaagaggaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcaccctgac atctgaggac tctgcggtct actactgtac aagacccta 300
atgggtcctt actggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctctca 360

<210> 69

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 VL序列

<400> 69

gtcattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt 60
atcacctgca aggccagtca ggatgtgact actgctgtag cctggatatca aaaaaacca 120
gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccacc ggcacactgg agtcctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa tgtgcagact 240
gaagacctgg cattttatta ctgtcagcaa cattttacca ctctctcac gttcggtgct 300
gggaccaagt tggagctgaa a 321

<210> 70

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 VH序列

<400> 70

gaagtgaacc tgggtggagtc tggggggaggc gtagtgaagc ctggagcgtc tctgaaactc 60
 tcctgtgaag cctctggatt cactttcagt aactatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 tcagacaaga ggctggagtg ggtcgcattc attagtgggt gtggtggttag aacctactat 180
 ctagacaatg taaagggccg attcatcatc tccagagaga atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gtagtctgaa gtctgaggac acggccttgt ttactgtgc aagaggagct 300
 cgggcctctt actttgctat ggactactgg ggtcaaggaa gttcagtcac cgtctcctca 360

<210> 71

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> (rh)AXL-ECD His8

<400> 71

Met	Ala	Trp	Arg	Cys	Pro	Arg	Met	Gly	Arg	Val	Pro	Leu	Ala	Trp	Cys
1				5				10					15		
Leu	Ala	Leu	Cys	Gly	Trp	Ala	Cys	Met	Ala	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Ala
			20					25					30		
Glu	Glu	Ser	Pro	Phe	Val	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Ile	Thr	Gly	Ala	Arg
			35					40					45		
Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Pro
			50					55					60		
Pro	Glu	Val	His	Trp	Leu	Arg	Asp	Gly	Gln	Ile	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp
65				70						75				80	
Ser	Thr	Gln	Thr	Gln	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Asp	Glu	Gln	Asp	Asp	Trp
				85						90				95	
Ile	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Thr
				100						105				110	
Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser
				115						120				125	
Gln	Pro	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu
				130						135				140	
Pro	Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys
145						150					155			160	
Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp
						165					170			175	
Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu
				180						185				190	
His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His
				195						200				205	

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu		
210	215	220
Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu		
225	230	235 240
Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr		
	245	250 255
His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln		
	260	265 270
Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser		
	275	280 285
Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro		
	290	295 300
Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp		
305	310	315 320
Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro		
	325	330 335
Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His		
	340	345 350
Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg		
	355	360 365
Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly		
	370	375 380
Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser		
385	390	395 400
Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro		
	405	410 415
Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln		
	420	425 430
Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp		
	435	440 445
Pro Trp Trp Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Thr Gly His His His His		
	450	455 460
His His His His Gly		
465		
<210> 72		
<211> 909		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> AXL - 全长His6

<400> 72

Met	Ala	Trp	Arg	Cys	Pro	Arg	Met	Gly	Arg	Val	Pro	Leu	Ala	Trp	Cys
1				5				10					15		
Leu	Ala	Leu	Cys	Gly	Trp	Ala	Cys	Met	Ala	Pro	Arg	Gly	Thr	Gln	Ala
			20					25					30		
Glu	Glu	Ser	Pro	Phe	Val	Gly	Asn	Pro	Gly	Asn	Ile	Thr	Gly	Ala	Arg
			35					40					45		
Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Glu	Pro
			50					55				60			
Pro	Glu	Val	His	Trp	Leu	Arg	Asp	Gly	Gln	Ile	Leu	Glu	Leu	Ala	Asp
65						70				75					80
Ser	Thr	Gln	Thr	Gln	Val	Pro	Leu	Gly	Glu	Asp	Glu	Gln	Asp	Asp	Trp
					85					90					95
Ile	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Asp	Thr
					100					105					110
Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	His	Gln	Thr	Phe	Val	Ser
					115					120					125
Gln	Pro	Gly	Tyr	Val	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Phe	Leu	Glu	Glu
					130					135					140
Pro	Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Asn	Leu	Ser	Cys
145						150					155				160
Gln	Ala	Gln	Gly	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Gln	Asp
						165									175
Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Pro	Gln	Arg	Ser	Leu
					180					185					190
His	Val	Pro	Gly	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Ser	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His
					195					200					205
Asn	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Thr	Ser	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Thr	Val	Leu
					210										220
Pro	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Val	Ser	Arg	Gln	Pro	Thr	Glu
225						230					235				240
Leu	Glu	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Gly	Leu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr
					245						250				255
His	Cys	Thr	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	Asp	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Gln
					260										270
Ala	Gly	Glu	Pro	Asp	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser
					275										285
Val	Pro	Pro	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	His	Thr	Pro

290	295	300
Tyr His Ile Arg Val	Ala Cys Thr Ser Ser	Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305	310	315
Thr His Trp Leu Pro	Val Glu Thr Pro Glu Gly	Val Pro Leu Gly Pro
325	330	335
Pro Glu Asn Ile Ser	Ala Thr Arg Asn Gly	Ser Gln Ala Phe Val His
340	345	350
Trp Gln Glu Pro Arg	Ala Pro Leu Gln Gly	Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
355	360	365
Leu Ala Tyr Gln Gly	Gln Asp Thr Pro Glu	Val Leu Met Asp Ile Gly
370	375	380
Leu Arg Gln Glu Val	Thr Leu Glu Leu Gln	Gly Asp Gly Ser Val Ser
385	390	395
Asn Leu Thr Val Cys	Val Ala Ala Tyr Thr	Ala Ala Gly Asp Gly Pro
405	410	415
Trp Ser Leu Pro Val	Pro Leu Glu Ala Trp	Arg Pro Gly Gln Ala Gln
420	425	430
Pro Val His Gln Leu	Val Lys Glu Pro Ser	Thr Pro Ala Phe Ser Trp
435	440	445
Pro Trp Trp Tyr Val	Leu Leu Gly Ala Val	Val Ala Ala Ala Cys Val
450	455	460
Leu Ile Leu Ala Leu	Phe Leu Val His Arg	Arg Lys Lys Glu Thr Arg
465	470	475
Tyr Gly Glu Val Phe	Glu Pro Thr Val Glu	Arg Gly Glu Leu Val Val
485	490	495
Arg Tyr Arg Val Arg	Lys Ser Tyr Ser Arg	Arg Thr Thr Glu Ala Thr
500	505	510
Leu Asn Ser Leu Gly	Ile Ser Glu Glu Leu	Lys Glu Lys Leu Arg Asp
515	520	525
Val Met Val Asp Arg	His Lys Val Ala Leu	Gly Lys Thr Leu Gly Glu
530	535	540
Gly Glu Phe Gly Ala	Val Met Glu Gly Gln	Leu Asn Gln Asp Asp Ser
545	550	555
Ile Leu Lys Val Ala	Val Lys Thr Met Lys	Ile Ala Ile Cys Thr Arg
565	570	575
Ser Glu Leu Glu Asp	Phe Leu Ser Glu Ala	Val Cys Met Lys Glu Phe
580	585	590
Asp His Pro Asn Val	Met Arg Leu Ile Gly	Val Cys Phe Gln Gly Ser
595	600	605

Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys		
610	615	620
His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln		
625	630	635 640
Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile		
	645	650 655
Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp		
	660	665 670
Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val		
	675	680 685
Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg		
	690	695 700
Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser		
705	710	715 720
Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly		
	725	730 735
Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly		
	740	745 750
Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Arg Gly Asn Arg Leu		
	755	760 765
Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg		
	770	775 780
Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg		
785	790	795 800
Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro		
	805	810 815
Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu		
	820	825 830
Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro		
	835	840 845
Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly		
	850	855 860
Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala		
865	870	875 880
Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala Tyr Leu		
	885	890 895
Glu Cys Gly Arg Tyr Ala Ser His His His His His His		
	900	905

<210> 73

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 VH

<400> 73

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

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 VL

<400> 74

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Lys His
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
 100 105 110

<210> 75

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 VH

<400> 75

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Asp Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Thr Met Ser Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ala Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 VL

<400> 76

Gln Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Glu Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp

35	40	45
Ile Tyr Ser Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu		
65	70	75
Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Gly Asp Pro		
85	90	95
Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys		
100	105	

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR H1-A

<400> 77

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR H2-A

<400> 78

Ile Ser Gly Gly Gly Gly Arg Thr

1 5

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-10G1 CDR H3-A

<400> 79

Ala Arg Gly Ala Arg Ala Ser Tyr Phe Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> F107-10G1 CDR L1-A
<400> 80
Gln Asp Val Thr Thr Ala
1 5
<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-10G1 CDR L2-A
<400> 81
Trp Ala Ser Thr
1
<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-10G1 CDR L3-A
<400> 82
Gln Gln His Phe Thr Thr Pro Leu Thr
1 5
<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-5E9 CDR H1-A
<400> 83
Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr Gly
1 5
<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-5E9 CDR H2-A

<400> 84

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR H3-A

<400> 85

Ala Lys Gly Gly Tyr Tyr Ser Asn Pro Ile Tyr Pro Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR L1-A

<400> 86

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr

1 5

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR L2-A

<400> 87

Tyr Ile Ser Arg

1

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F111-5E9 CDR L3-A

<400> 88

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR H1-A

<400> 89

Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Phe Trp

1 5

<210> 90

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR H2-A

<400> 90

Ile Phe Pro Gly Ser Ser Ser Thr

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR H3-A

<400> 91

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-8D12 CDR L1-A

<400> 92

Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 93

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> F107-8D12 CDR L2-A
<400> 93
Trp Ala Ser Thr
1
<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-8D12 CDR L3-A
<400> 94
Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
1 5
<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-7H5 CDR H1-A
<400> 95
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5
<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-7H5 CDR H2-A
<400> 96
Ile Tyr Pro Asp Ser Ser Ser Thr
1 5
<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F107-7H5 CDR H3-A

<400> 97

Thr Arg Asp Thr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 98

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 CDR L1-A

<400> 98

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Ile Tyr

1 5 10

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 CDR L2-A

<400> 99

Trp Ala Ser Thr

1

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F107-7H5 CDR L3-A

<400> 100

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 101

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 CDR H1-A

<400> 101

Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Phe Trp

1 5

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 CDR H2-A

<400> 102

Ile Phe Pro Gly Ser Asn Ser Ser

1 5

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 CDR H3-A

<400> 103

Val Arg Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr

1 5 10

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 CDR L1-A

<400> 104

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Lys Thr Arg Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 105

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F155-3C7 CDR L2-A

<400> 105

Trp Ala Ser Thr

1

<210> 106

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR L3-A
<400> 106
Lys His Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
1 5
<210> 107
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-3C8 CDR H1-A
<400> 107
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5
<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-3C8 CDR H2-A
<400> 108
Ile Asn Pro Asn Ser Thr Ser Ala
1 5
<210> 109
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-3C8 CDR H3-A
<400> 109
Thr Arg Pro Leu Met Gly Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 110
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-3C8 CDR L1-A

<400> 110
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 111
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-3C8 CDR L2-A

<400> 111
Arg Thr Ser Asn
1

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F111-3C8 CDR L3-A

<400> 112
Gln Gln Tyr His Asn Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR H1-A

<400> 113
Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Gly
1 5

<210> 114
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR H2-A

<400> 114
Ile Asn Thr Tyr Leu Gly Glu Pro
1 5

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR H3-A
<400> 115
Thr Arg Gly Thr Met Ser Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR L1-A
<400> 116
Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5
<210> 117
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR L2-A
<400> 117
Ser Thr Ser Lys
1
<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR L3-A
<400> 118
His Gln Tyr Ser Gly Asp Pro Leu Thr
1 5
<210> 119
<211> 115
<212> PRT

85 90 95

Ala Lys Trp Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Gly Asp Leu Arg Arg Ala Ala
 100 105 110

Met Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 121

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb003

<400> 121

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Val Thr Leu Asp Tyr Thr
 20 25 30

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

Ala Ala Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys
 50 55 60

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

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Ala Arg Gly Glu Tyr Asp Tyr Trp Asp Gln Gly
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 122

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb004

<400> 122

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

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

Glu Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

121

<223> NRC-sdAb006

<400> 124

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Glu Ser Ile Phe Gly Phe Asn
 20 25 30
 Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Asn Glu Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Asn Ser Lys Arg Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asn Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg
 85 90 95
 Ala Trp Gly Ile Ile Thr Ser Ala Thr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Gln Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 125

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb007

<400> 125

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

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb008

<400> 126

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ser Gly Met Ile Asn
20 25 30
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45
Ala Arg Arg Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Asn Asn Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Ile Ile Trp Arg Thr Ser Asp Leu Thr Gly Arg Phe Asn Thr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 127

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb001 CDR1-A

<400> 127

Ala Ser Ile Ser Ser Phe Asp Ile
1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb001 CDR2-A

<400> 128

Ile Thr Thr Leu Asp Ile Ala

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb001 CDR3-A

<400> 129

Ala Ala Phe Gln Ser Asp Gln Asn Tyr

1 5

<210> 130

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb002 CDR1-A

<400> 130

Thr Arg Thr Val Ser Ser Ala Val

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb002 CDR2-A

<400> 131

Ile Thr Asn Ser Gly Asn Ile

1 5

<210> 132

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb002 CDR3-A

<400> 132

Ala Ala Lys Trp Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Gly Asp Leu Arg Arg Ala

1	5	10	15
Ala Met Tyr Asp Tyr			
	20		
<210> 133			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> NRC-sdAb003 CDR1-A			
<400> 133			
Gly Val Thr Leu Asp Tyr Thr Ala			
1	5		
<210> 134			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> NRC-sdAb003 CDR2-A			
<400> 134			
Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr			
1	5		
<210> 135			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> NRC-sdAb003 CDR3-A			
<400> 135			
Ala Ala Arg Arg Gly Gly Ala Arg Gly Glu Tyr Asp Tyr			
1	5	10	
<210> 136			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> NRC-sdAb004 CDR1-A			
<400> 136			
Arg Gly Ala Phe Asp Thr Tyr Glu			
1	5		

<210> 137

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb004 CDR2-A

<400> 137

Val Thr Arg Asn Gly Asp Ser Val

1 5

<210> 138

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb004 CDR3-A

<400> 138

Ala Ala Asn Trp Arg Pro Leu Arg Thr Ser Ser Gly Ala Asp Asp Tyr

1 5 10 15

Ala Asp

<210> 139

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb005 CDR1-A

<400> 139

Gly Ser Ile Ser Ser Ile Asn Thr

1 5

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb005 CDR2-A

<400> 140

Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg

1 5

<210> 141

<211> 12

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb005 CDR3-A
<400> 141
Arg Ala Trp Gly Thr Gly Thr Ile Ser Thr Met Tyr
1 5 10
<210> 142
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb006 CDR1-A
<400> 142
Glu Ser Ile Phe Gly Phe Asn Thr
1 5
<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb006 CDR2-A
<400> 143
Ile Ser Asn Ser Lys Arg Thr
1 5
<210> 144
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb006 CDR3-A
<400> 144
Arg Ala Trp Gly Ile Ile Thr Ser Ala Thr Val Tyr
1 5 10
<210> 145
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> NRC-sdAb007 CDR1-A
<400> 145
Thr Arg Thr Val Ser Ser Ala Val
1 5
<210> 146
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb007 CDR2-A
<400> 146
Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val
1 5
<210> 147
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb007 CDR3-A
<400> 147
Ala Ile Ile Trp Arg Thr Ser Asp Leu Thr Gly Arg Phe Asn Thr
1 5 10 15
<210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb008 CDR1-A
<400> 148
Gly Ser Ser Gly Met Ile Asn Thr
1 5
<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb008 CDR2-A
<400> 149
Arg Ser Thr Gly Gly Thr Thr

1 5
<210> 150
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb008 CDR3-A
<400> 150
Ala Ile Ile Trp Arg Thr Ser Asp Leu Thr Gly Arg Phe Asn Thr
1 5 10 15
<210> 151
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR H1-B
<400> 151
Asn Phe Trp Ile Asn
1 5
<210> 152
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR H2-B
<400> 152
Asn Ile Phe Pro Gly Ser Asn Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asn
<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR H3-B
<400> 153
Asp Tyr Tyr Gly Gly Ser Pro Asp Tyr
1 5
<210> 154

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR L1-B
<400> 154
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Lys Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala
<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR L2-B
<400> 155
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5
<210> 156
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F155-3C7 CDR L3-B
<400> 156
Lys His Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
1 5
<210> 157
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> F149-4G4 CDR H1-B
<400> 157
Tyr Tyr Gly Ile Asn
1 5
<210> 158
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 CDR H2-B

<400> 158

Trp Ile Asn Thr Tyr Leu Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 CDR H3-B

<400> 159

Gly Thr Met Ser Tyr Ser Phe Asp Tyr

1 5

<210> 160

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 CDR L1-B

<400> 160

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His

1 5 10

<210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 CDR L2-B

<400> 161

Ser Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F149-4G4 CDR L3-B

<400> 162

His Gln Tyr Ser Gly Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 163

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb001 CDR1-B

<400> 163

Phe Asp Ile Met Gly

1 5

<210> 164

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb001 CDR2-B

<400> 164

Ala Ile Thr Thr Leu Asp Ile Ala Asn Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb001 CDR3-B

<400> 165

Phe Gln Ser Asp Gln Asn Tyr

1 5

<210> 166

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb002 CDR1-B

<400> 166

Ser Ala Val Met Ala

1 5
<210> 167
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb002 CDR2-B
<400> 167
Phe Ile Thr Asn Ser Gly Asn Ile Leu Tyr Asp Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15
<210> 168
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb002 CDR3-B
<400> 168
Lys Trp Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Gly Asp Leu Arg Arg Ala Ala Met
1 5 10 15
Tyr Asp Tyr
<210> 169
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb003 CDR1-B
<400> 169
Tyr Thr Ala Ile Gly
1 5
<210> 170
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> NRC-sdAb003 CDR2-B
<400> 170
Ala Ile Thr Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Ala Lys Gly
1 5 10 15
<210> 171

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb003 CDR3-B

<400> 171

Arg Arg Gly Gly Ala Arg Gly Glu Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 172

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb004 CDR1-B

<400> 172

Thr Tyr Glu Ile Gly

1 5

<210> 173

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb004 CDR2-B

<400> 173

Ala Val Thr Arg Asn Gly Asp Ser Val Val Tyr Ala Asp Ser Leu Lys

1 5 10 15

Ala

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb004 CDR3-B

<400> 174

Asn Trp Arg Pro Leu Arg Thr Ser Ser Gly Ala Asp Asp Tyr Ala Asp

1 5 10 15

<210> 175

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb005 CDR1-B

<400> 175

Ala Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 176

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb005 CDR2-B

<400> 176

Ala Ser Asp Ser Gly Ala Asn Arg Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 177

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb005 CDR3-B

<400> 177

Trp Gly Thr Gly Thr Ile Ser Thr Met Tyr

1 5 10

<210> 178

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb006 CDR1-B

<400> 178

Phe Asn Thr Met Gly

1 5

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb006 CDR2-B

<400> 179

Ser Ile Ser Asn Ser Lys Arg Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 180

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb006 CDR3-B

<400> 180

Trp Gly Ile Ile Thr Ser Ala Thr Val Tyr

1 5 10

<210> 181

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb007 CDR1-B

<400> 181

Ser Ala Val Met Ala

1 5

<210> 182

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb007 CDR2-B

<400> 182

Phe Ile Ser Asn Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Asp Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 183

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb007 CDR3-B

<400> 183

Ile Trp Arg Thr Ser Asp Leu Thr Gly Arg Phe Asn Thr

1 5 10

<210> 184

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb008 CDR1-B

<400> 184

Ile Asn Thr Met Gly

1 5

<210> 185

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb008 CDR2-B

<400> 185

Arg Arg Ser Thr Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 186

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> NRC-sdAb008 CDR3-B

<400> 186

Ile Trp Arg Thr Ser Asp Leu Thr Gly Arg Phe Asn Thr

1 5 10

<210> 187

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc肽

<400> 187

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

1 5 10 15

Lys

<210> 188

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A20.1肽

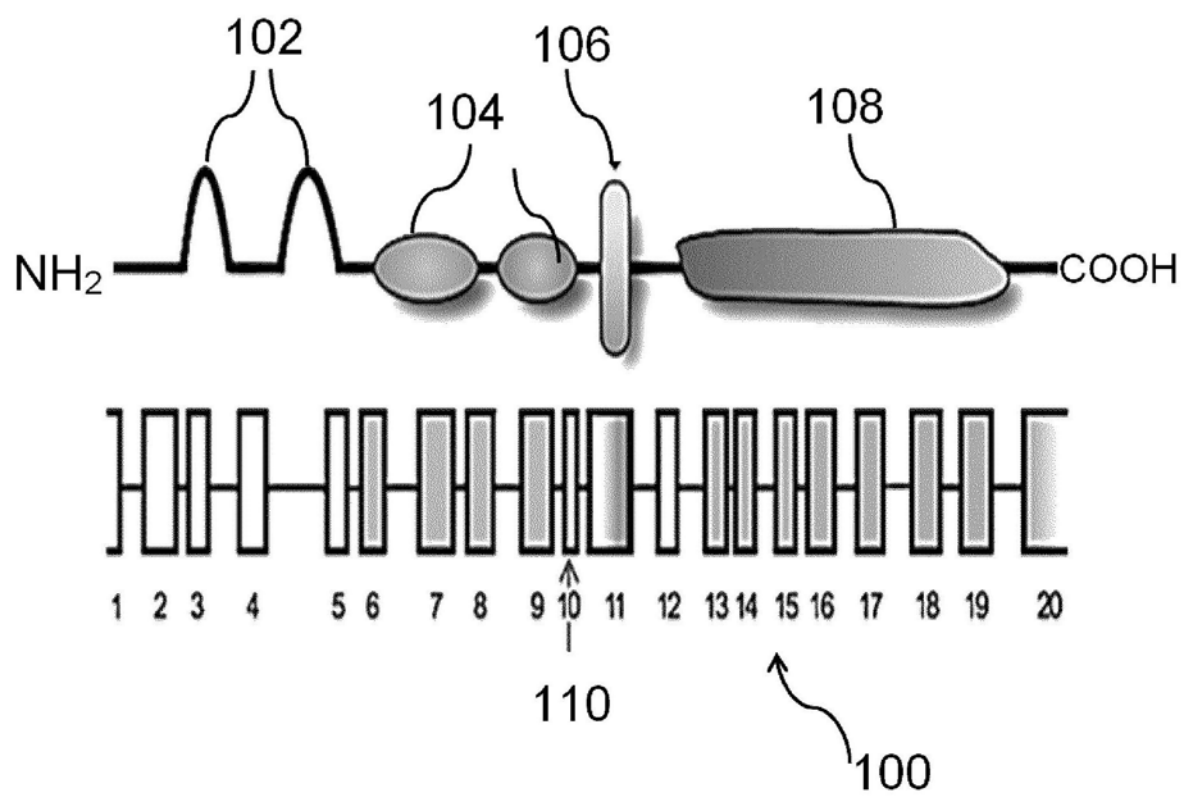
<400> 188

Glu Phe Val Ala Ala Gly Ser Ser Thr Gly Arg

1

5

10



现有技术

图1

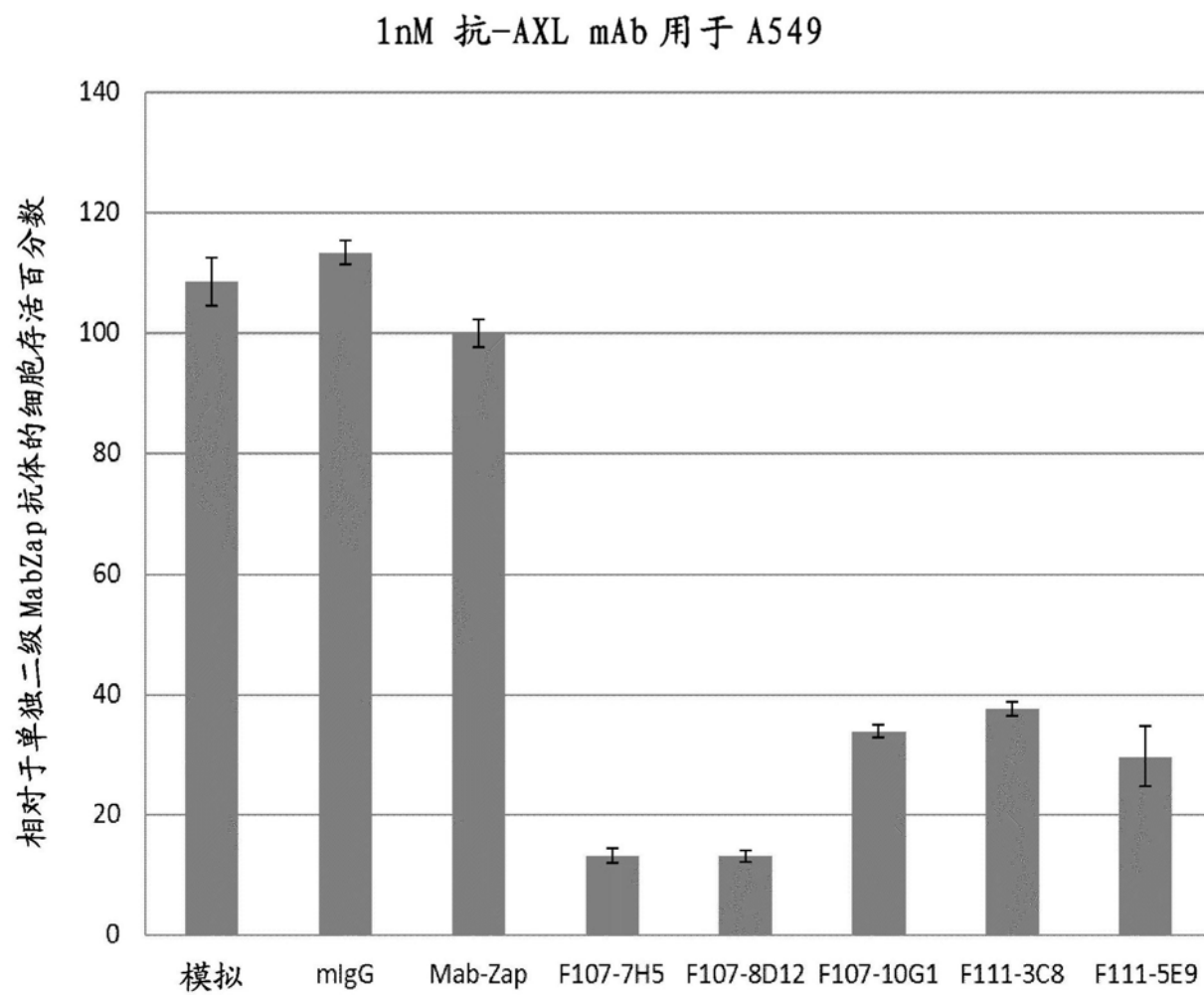
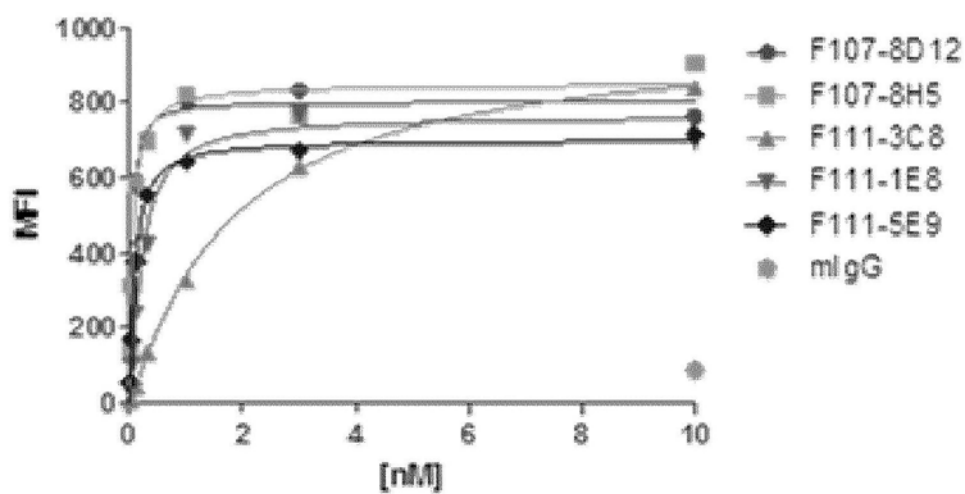


图2

A



B

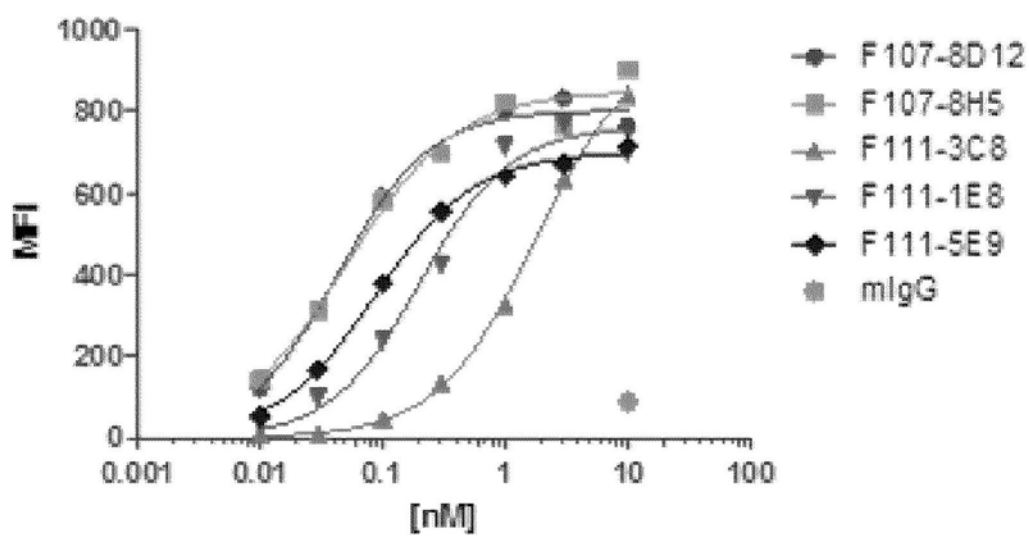


图3

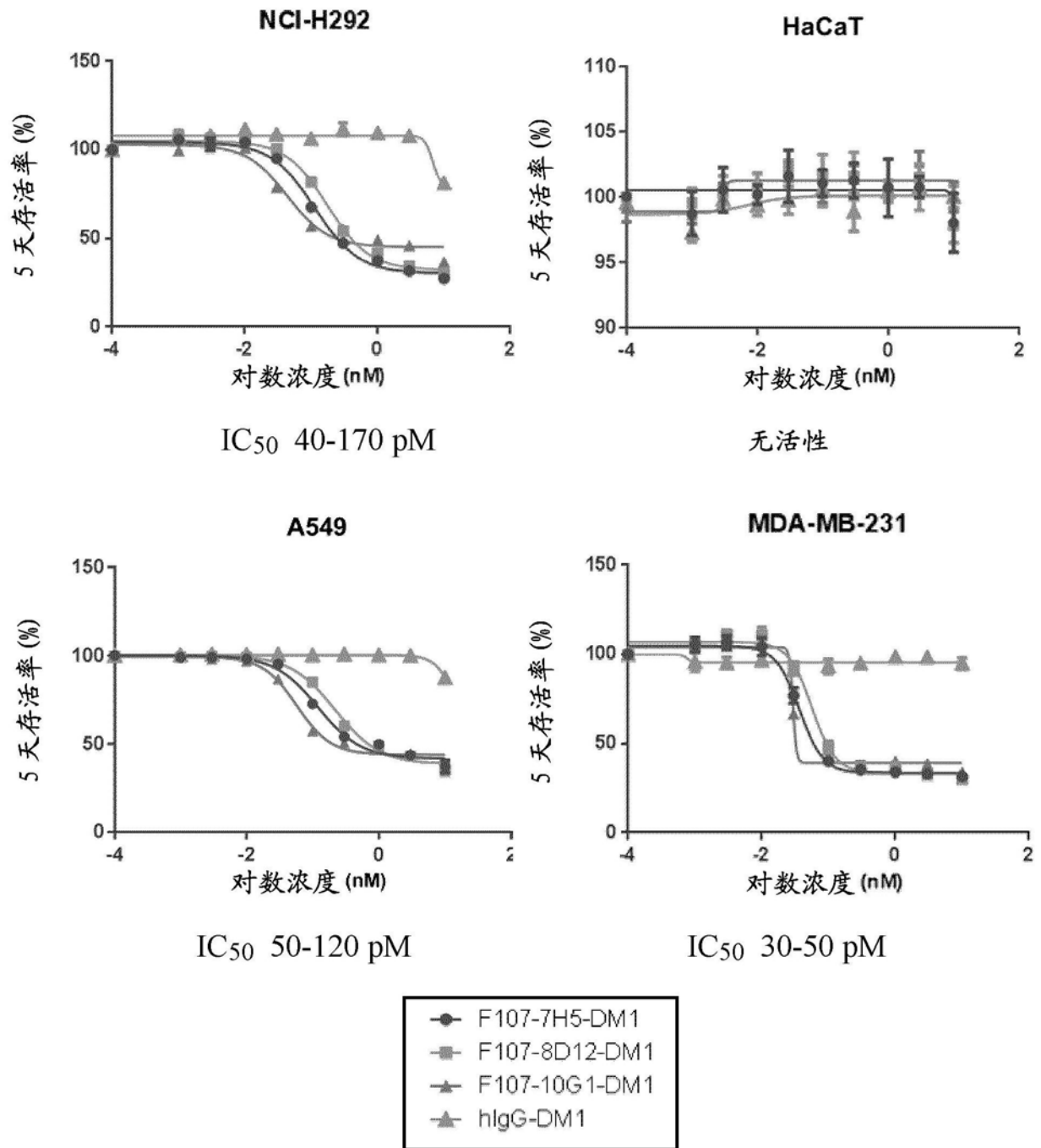


图4

AXL 蛋白胞外结构域

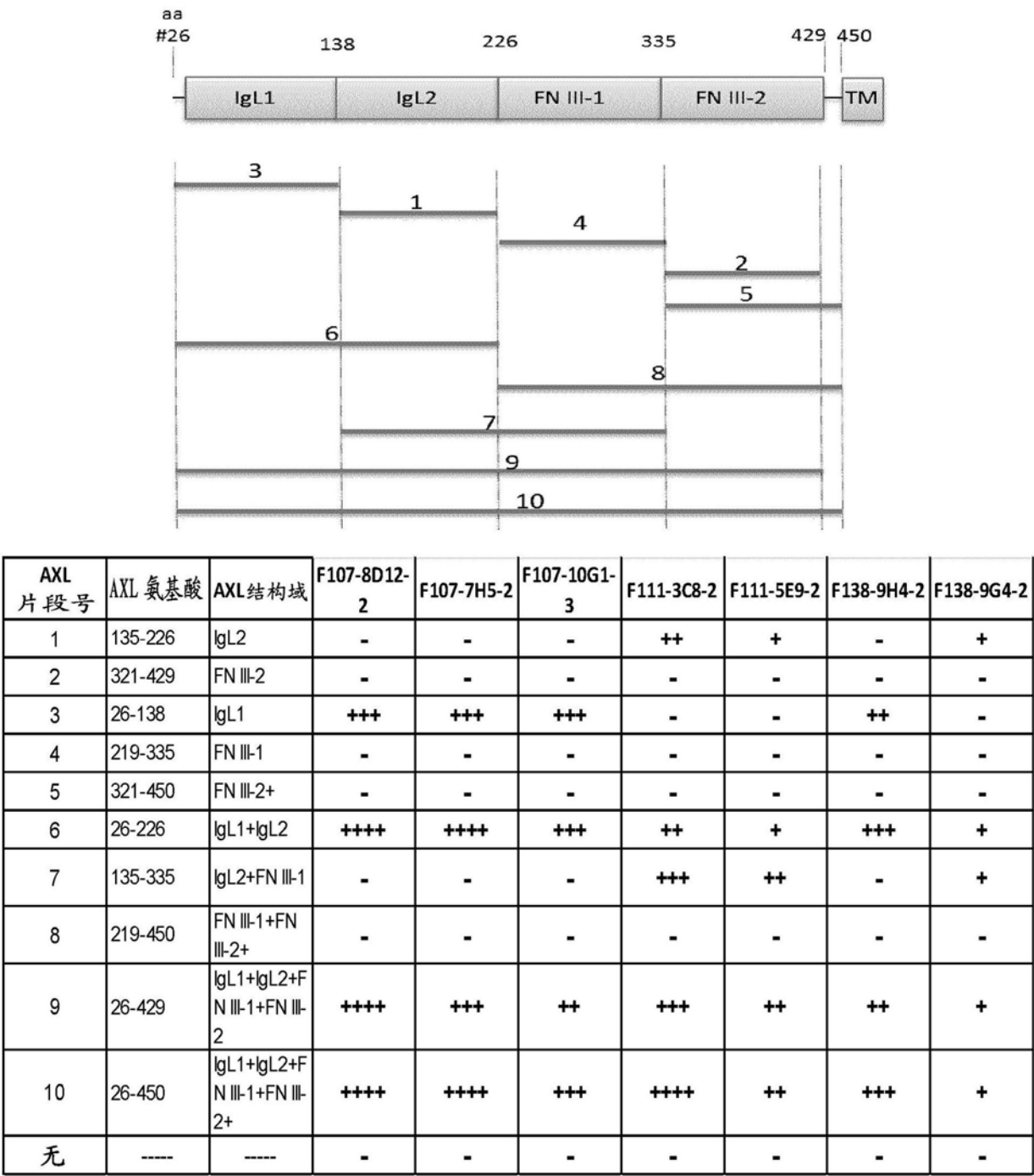


图5

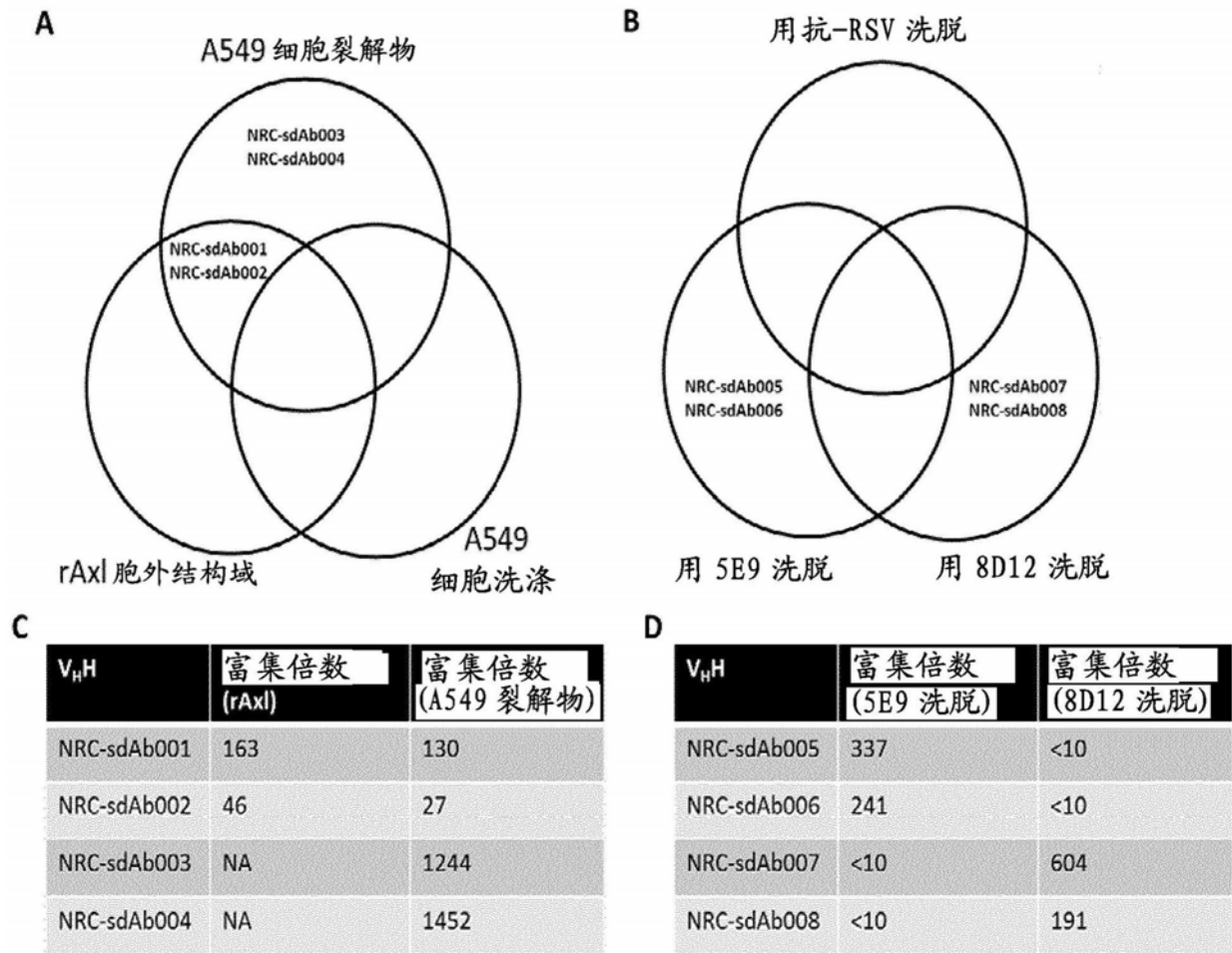


图6

>F107.10G1(重链)>EVNLVESGGGVVKPGASLKLSCEASGFTFSNYGMSWVRQTSDKRLEWVASISGGGGRTYYLD
NVKGRFIISRENAKNTLYLQMSSSLKSEDTALFYCARGARASYFAMDYWGQGSSVTVSS (SEQ ID:47, 77-79, 35-37)

>F107.10G1(kappa)>VIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVTTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDR
FTGSGSGTDYSLTISNVQTEDLAFYYCQQHFTTPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO:46, NO: 80-82 and NO:32-34)

>F111.5E9(重链)>QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTKYGMNWWKQAPGKGLKWMGWWINTYTGEPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLTEDMVTYFCAKGGYYSNPIYPM DYWGQGTSTVTVSS (SEQ:45, 83-85, 23-25)

>F111.5E9(kappa)>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYISRLHSGVPSRFSGS
GSGTDYSLTISNLEEDVATYFCQOGNTLPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:44, NO: 86-88 and NO:20-22)

>F107.8D12(重链)>QVQLQQPGAELVKPGASVQLSCKASGYTFISFWINWVKQRPQGQGLEWMGNIFPGSSSTNYN
EKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDYYGGSPDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:41, 89-91, 17-19)

>F107.8D12(kappa)>DIVMSQSPSSLAVSAGERVTMSCKSSQSLNTRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:40, NO: 92-94, 15,16,11)

>F107.7H5(重链)>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGQGLEWIGNNIYDSSSTNYNEK
FKSKATLTVDKSSSTAYIQFSSLTSEDSAVYYCTRDYYGGSPDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:39, 95-97, 12-14)

>F107.7H5(kappa)>DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKIYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRQSGVP
DRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:38, NO: 98-100, 9-11)

>F155.3C7(重链)>QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYIFTNFWINWVKQRPQGQGLEWIGNIFPGSNSSNYNEK
FKNKATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCVRDYYGGSPDYWGQGTTTLTVSS (SEQ NO:73, 101-103, 151-153)

>F155.3C7(kappa)>DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSKTRKNIYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PARFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYYCKHSYNLWTFGGGTKLEIR (SEQ:74, 104-106, 154-156)

>F111.3C8(重链)>QVQLQQPGAELGKPGTSVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKRVPQGQGLEWIGNNINPNSTADYN
EKFKRKATLTVDKSSSTAYMQLSTLTSEDSAVYYCTRPLMGPYWYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ:43, 107-109, 29-31)

>F111.3C8(kappa)>QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPKWIYRTSNLASGVPARFSGSG
SGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQYHNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:42, 110-112, and 26-28)

>F149.4G4(重链)>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFTYYGINWVKQAPGKGLEWMGWWINTYLGEPTYADD
FKGRFAFSLETSASTAYLQINNLRDEDMATYFCTRGTMSYSFDYWGQGTALT TVSS (SEQ:75, 113-115, 157-159)

>F149.4G4(kappa)>QNVLTQSPAIMSASPGEVMTMCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSKLASGVPARFS
GSGSGTSYSLTISSVEAEDAATYYCHQYSGDPLTFGSGTKLEVK (SEQ ID NO:76, NO: 116-118, 160-162)

图7

>NRC-sdAb001

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCTAS**ASISSFDI**MGWYRQAPGKQRELVA**AITL****DI**ANYRDSVKGRFTISRDNAKNTVY
LQMDSLKPEDTARYHC**AAFQSDQNY**WGQGTQVTSS (SEQ ID NO: 119, NO: **127-129**, 163-165)

>NRC-sdAb002

QVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAT**STRTVSSAV**MAWFRQAPEKVRDFVGF**ITNSGN**ILYDDSVKGRFTISRDNAQNT
VYLQMNSLKPEDTAVYYC**AAKWSFSSGYGDLRRAAMYDY**WGQGTQVTSS (SEQ NO:120, **130-132**, 166-168)

>NRC-sdAb003

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GVTL****DYTA**IGWFRQAPGKERELVA**AITSGGNT**DYAESAKGRFRISRDNSKNTIY
LQMNSLKPEDTGVYYC**AARRGGARGEYDY**WDQGTQVTSS (SEQ ID NO:121, NO: **133-135**, 169-171)

>NRC-sdAb004

QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAF**SRGAFD****TYE**IGWFRQAPGKEREFVA**AVTRNGDSV**VYADSLKARFTASRNNAV
TAYLHMNILQPEDTATYYC**AANWRPLRTSSGADDYAD**WGQGTQVTSS (SEQ ID NO:122, **136-138**, 172-174)

>NRC-sdAb005

QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAAS**GSISSINT**IGWFRQAPGKQRELVA**SDSGANR**NYADSVKGRFTISRDNAKNTV
YLQMNNLKPEDTAIYYC**RAWGTGTISTMY**WGQGTQVTSS (SEQ ID NO:123, NO:**139-141**, and 175-177)

>NRC-sdAb006

QVKLEESGGGLVQAGASRLSCVAS**ESIFGFNT**MGWYRQAPGNERELVAS**ISNSKRT**MYADSVKGRFTISRDNAKNTV
NLQMNNLKPEDTAVYYC**RAWGIITSATVY**WGQGTQVTSS (SEQ ID NO:124, NO: **142-144**, 178-180)

>NRC-sdAb007

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAT**STRTVSSAV**MAWFRQAPEKERDFVGF**ISNSGSV**YYDDSVKGRFTISRDNAQNTV
YLQMNSLKPEDTAVYYC**AIIWRTSDLTGRFNT**WGQGTQVTSS (SEQ ID NO:125, NO:**145-147**, 181-183)

>NRC-sdAb008

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GSSGMINT**MGWYRQAPGKQRELVA**RSTGGTT**NYADSVKGRFTISRDDANN
TVYLQMNSLKPEDTAVYYC**AIIWRTSDLTGRFNT**WGQGTQVTSS (SEQ ID NO:126, NO:**148-150**, 184-186)

图8

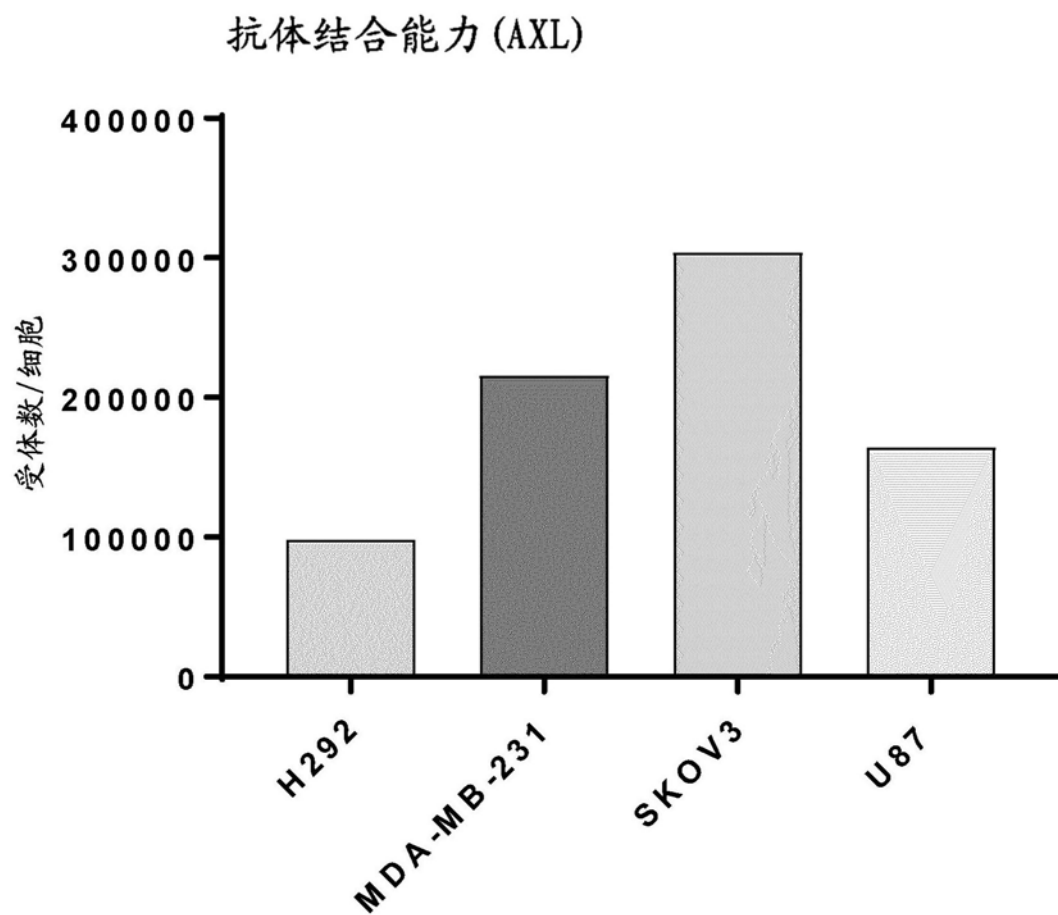


图9

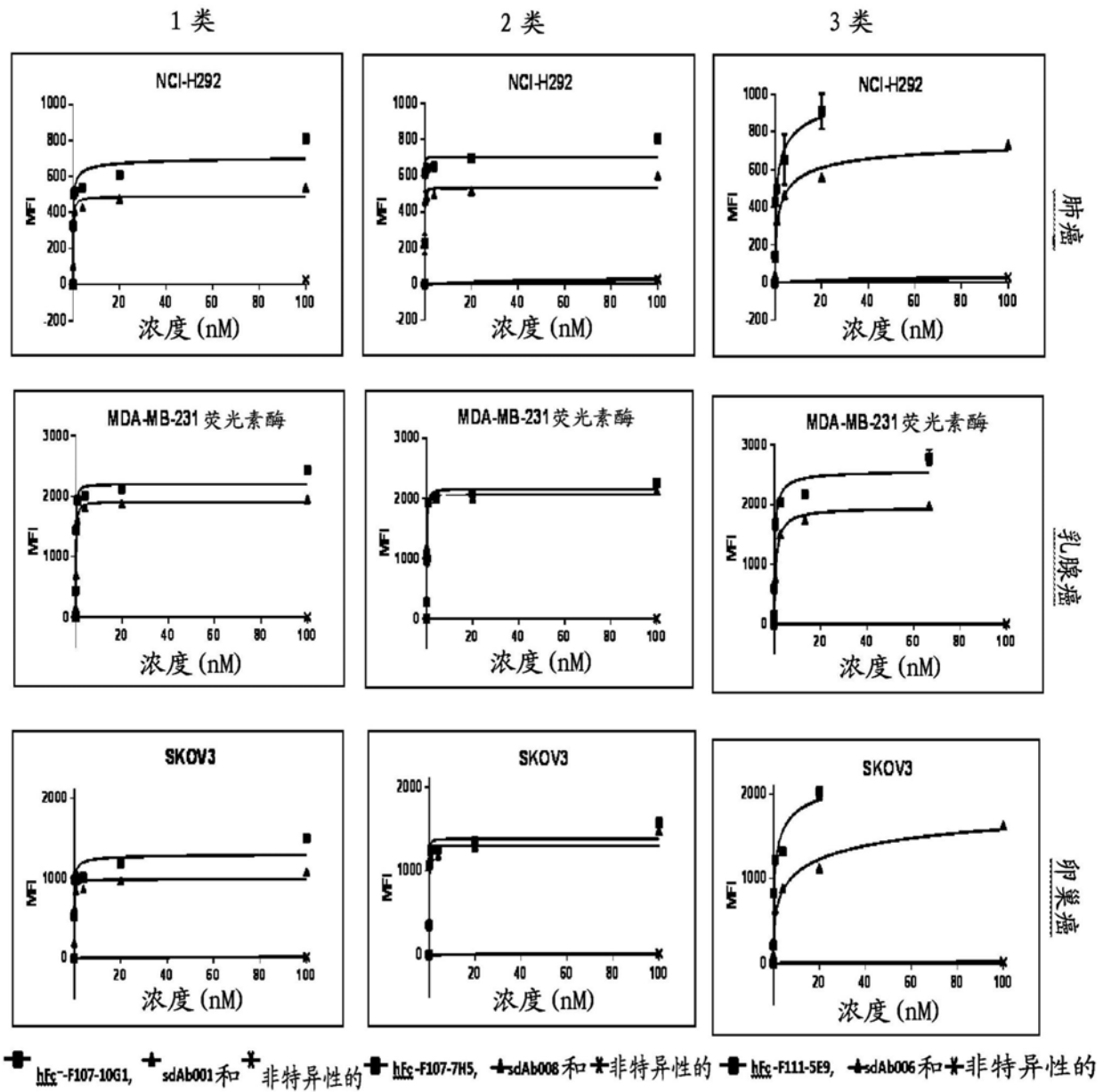


图10

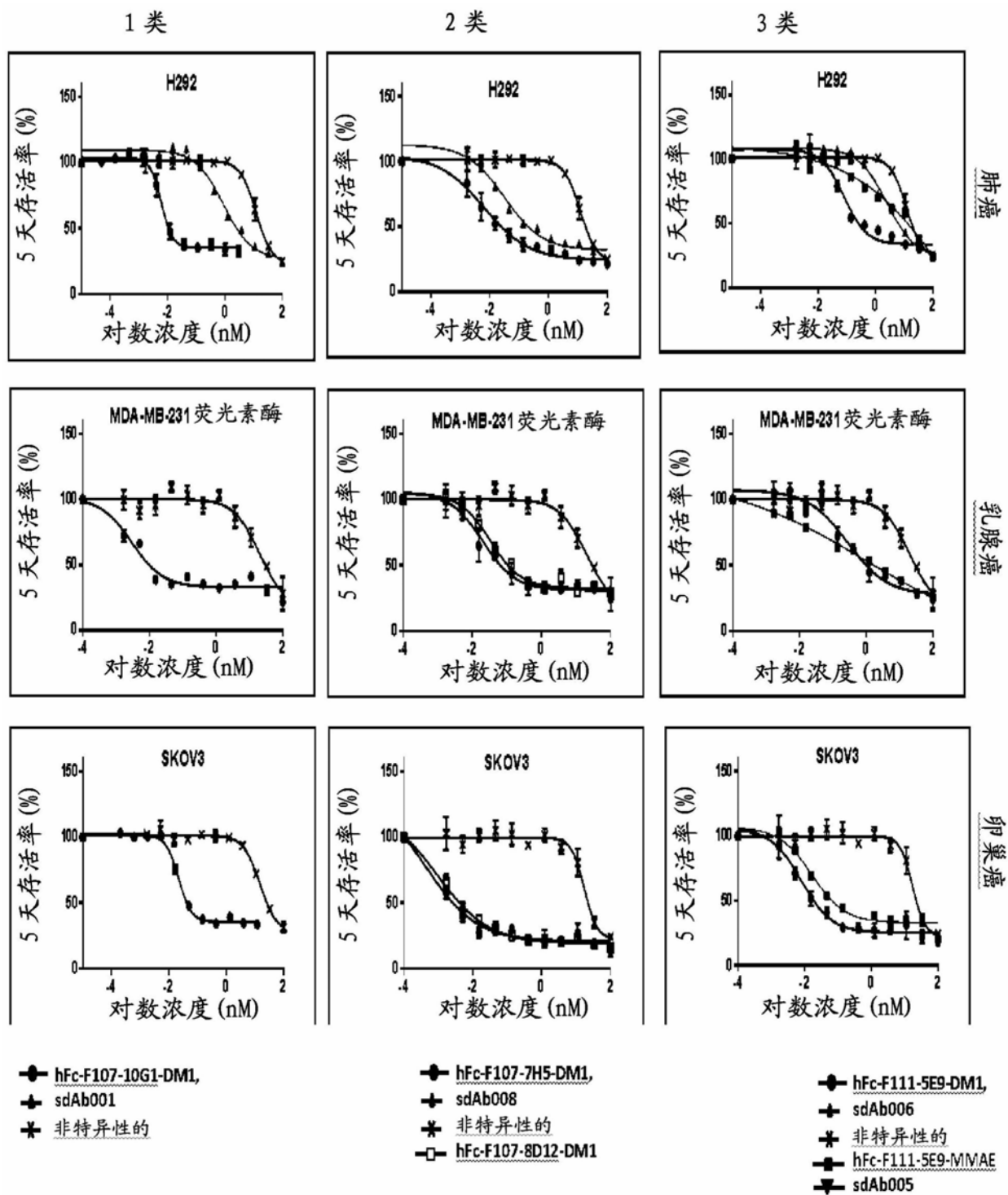


图11

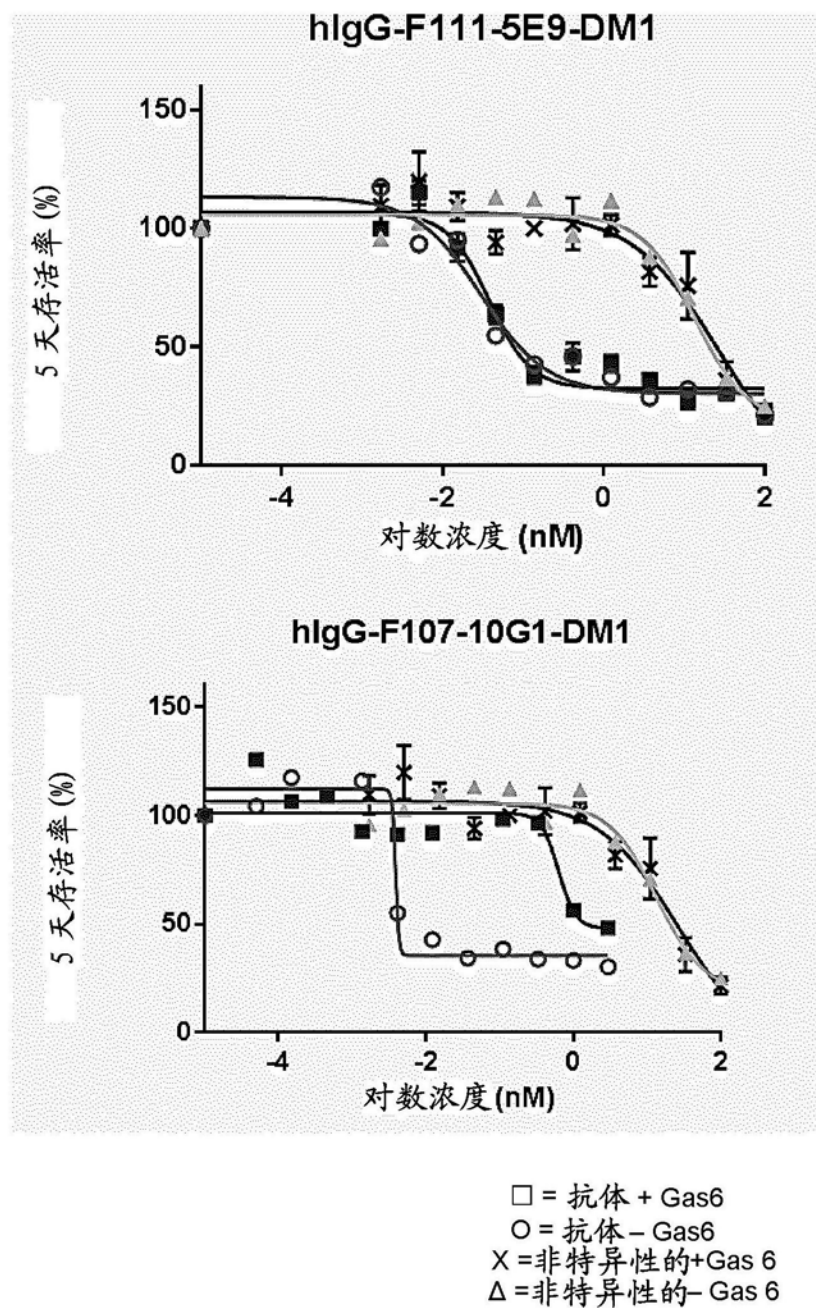


图12

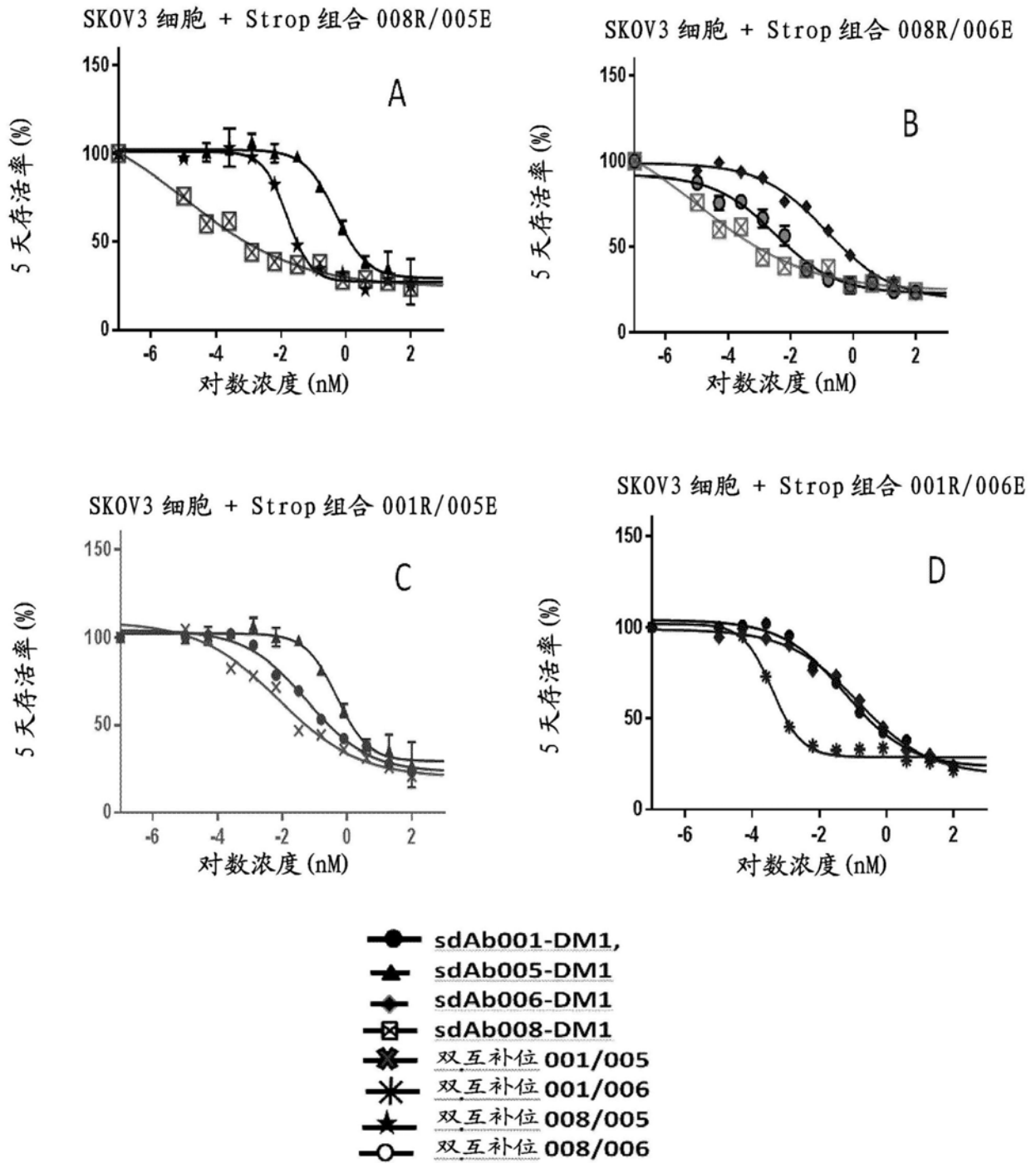


图13

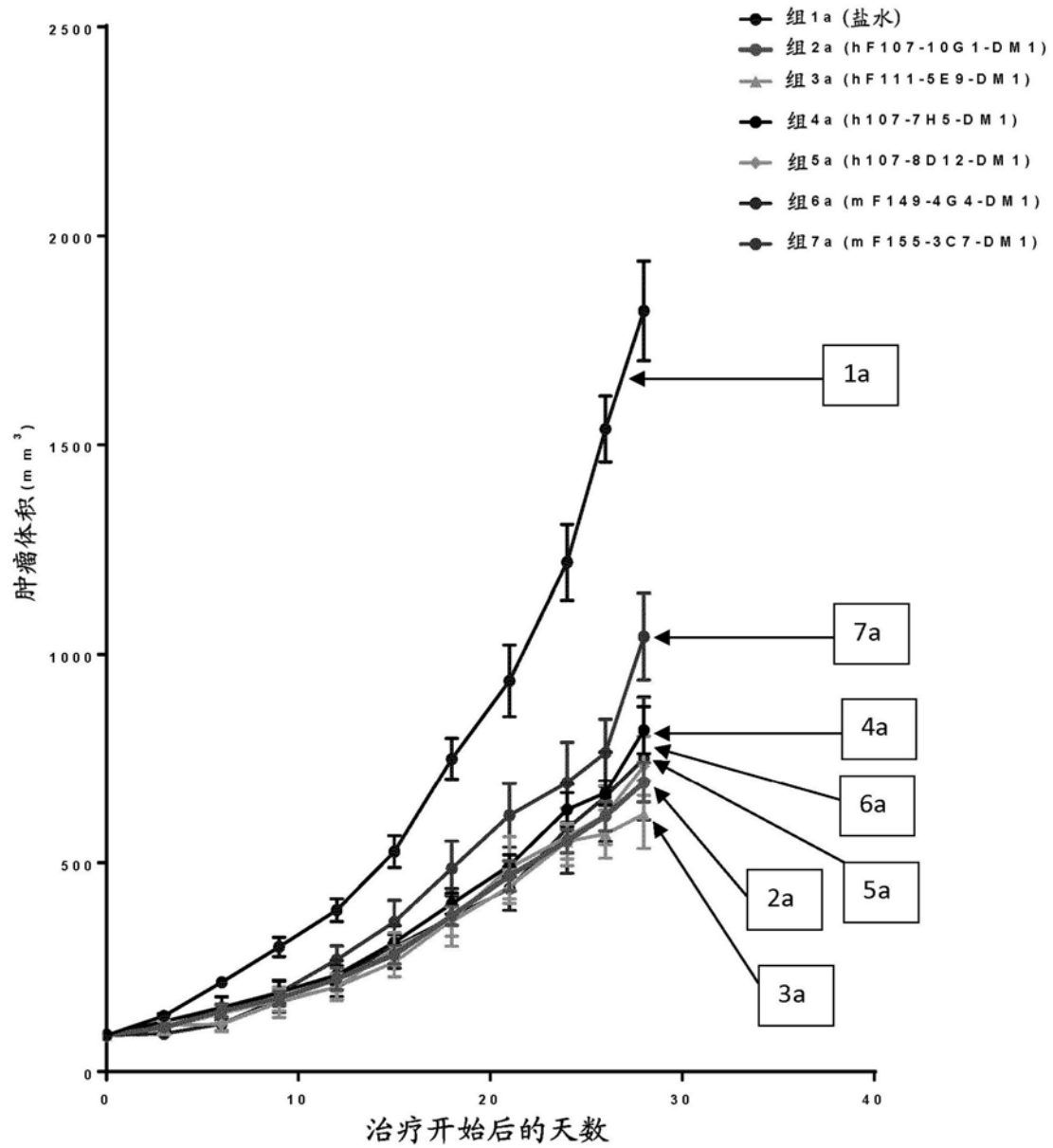


图14

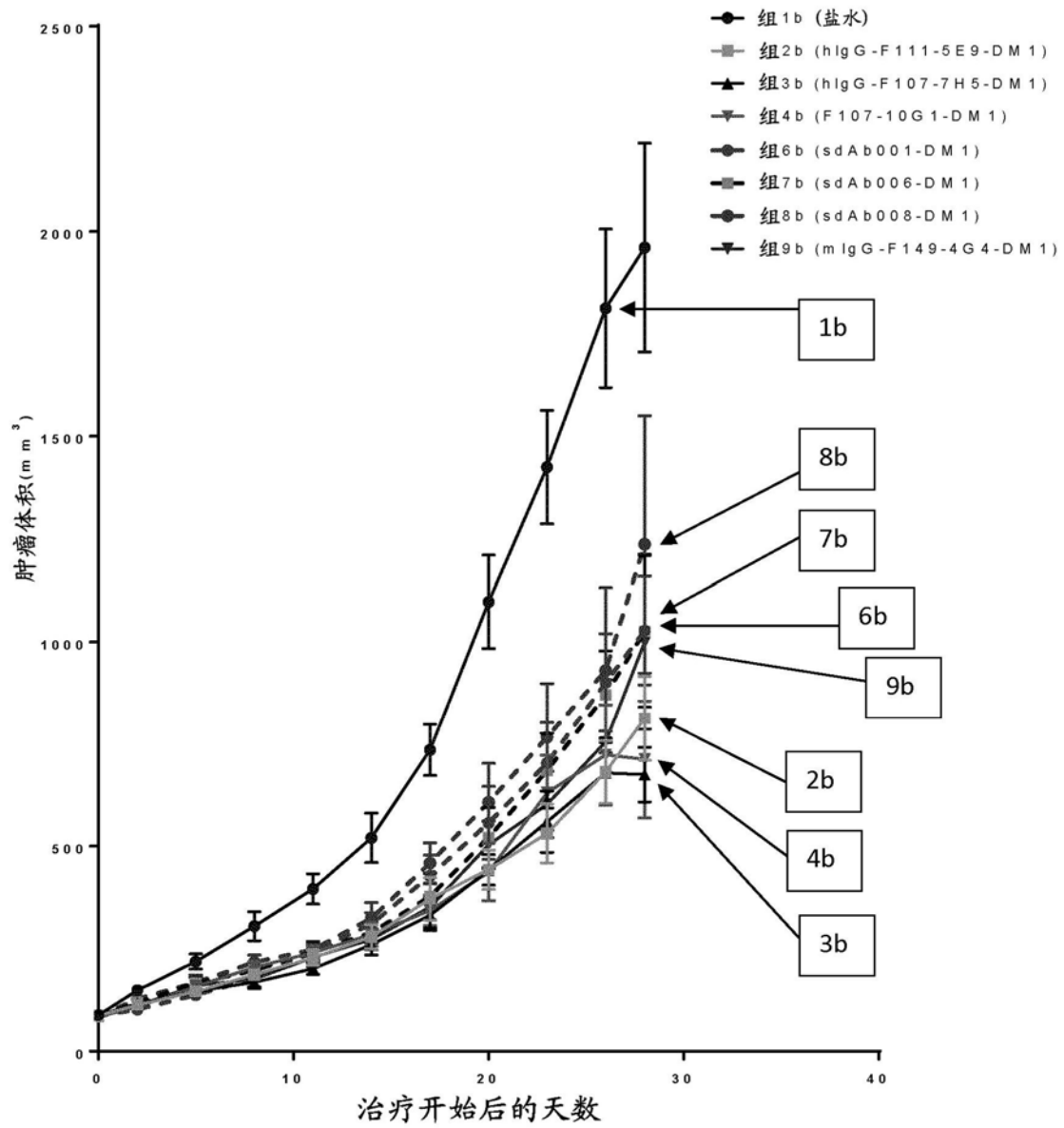
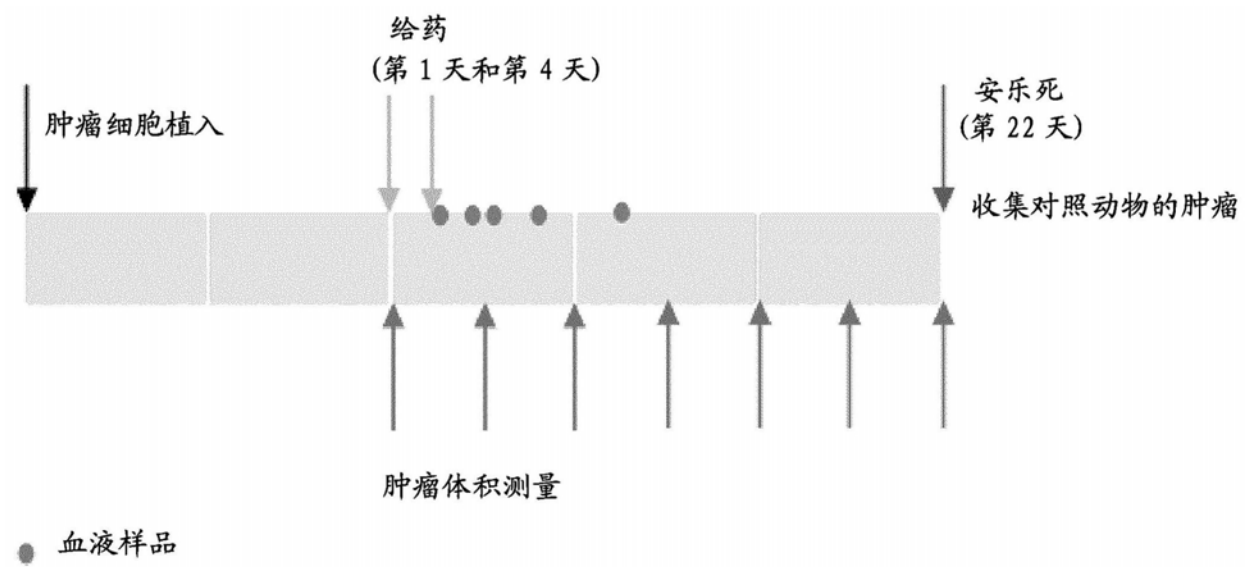


图15



组	动物的只数/时间点 ^a	第二次给药前	第二次给药后											
			1 h	2 h	4 h	6 h	24 h	48 h	96 h	120 h	168 h	216 h	264 h	336 h
2 至 3	1	x				x				x				x
	1	x				x				x				x
	1	x				x				x				x
	1		x				x				x			
	1		x				x				x			
	1			x				x				x		
	1			x				x				x		
	1				x				x				x	
	1				x				x					x
	1				x				x					x
	1				x				x					x
	1				x				x					x

图16

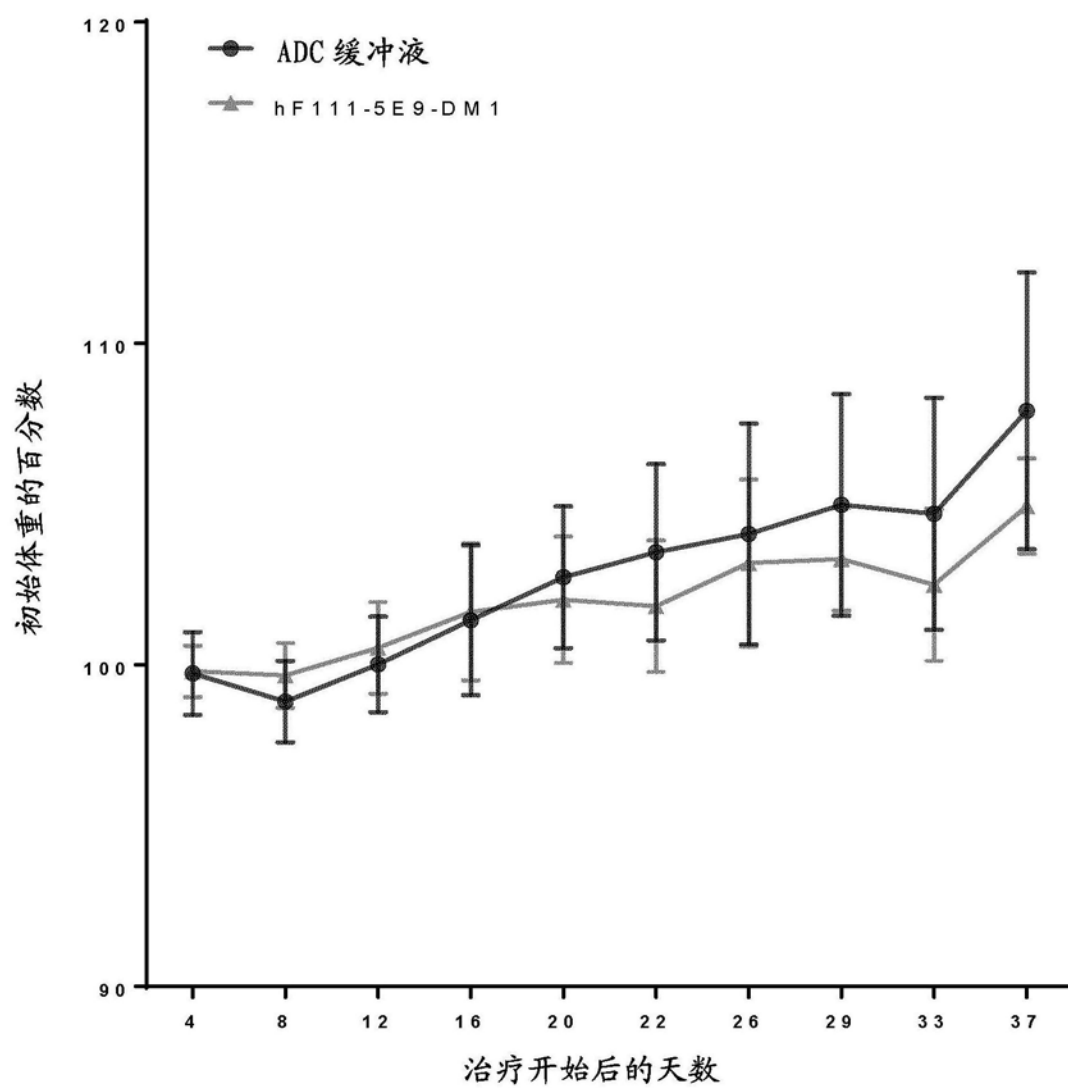


图17

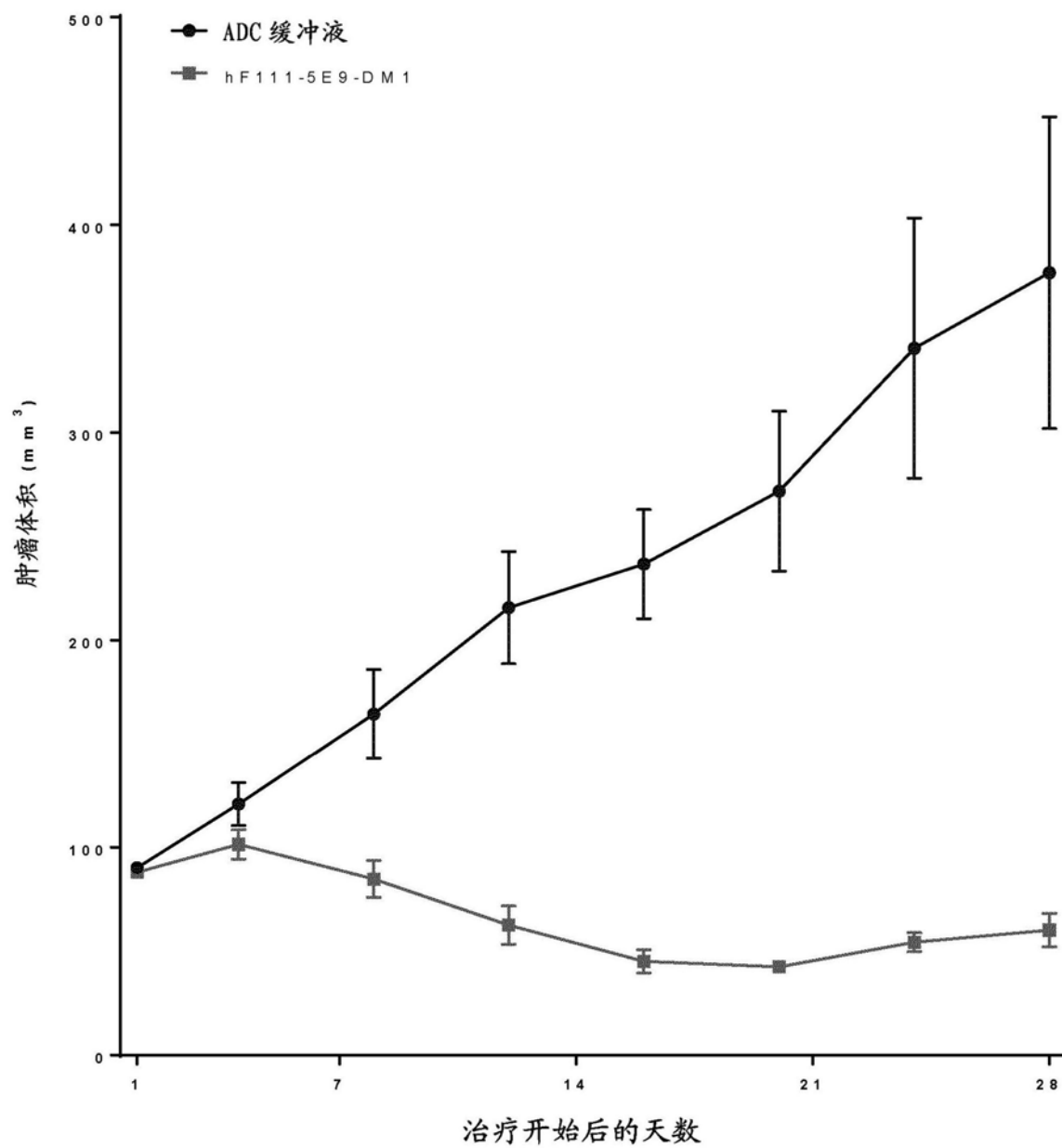


图18

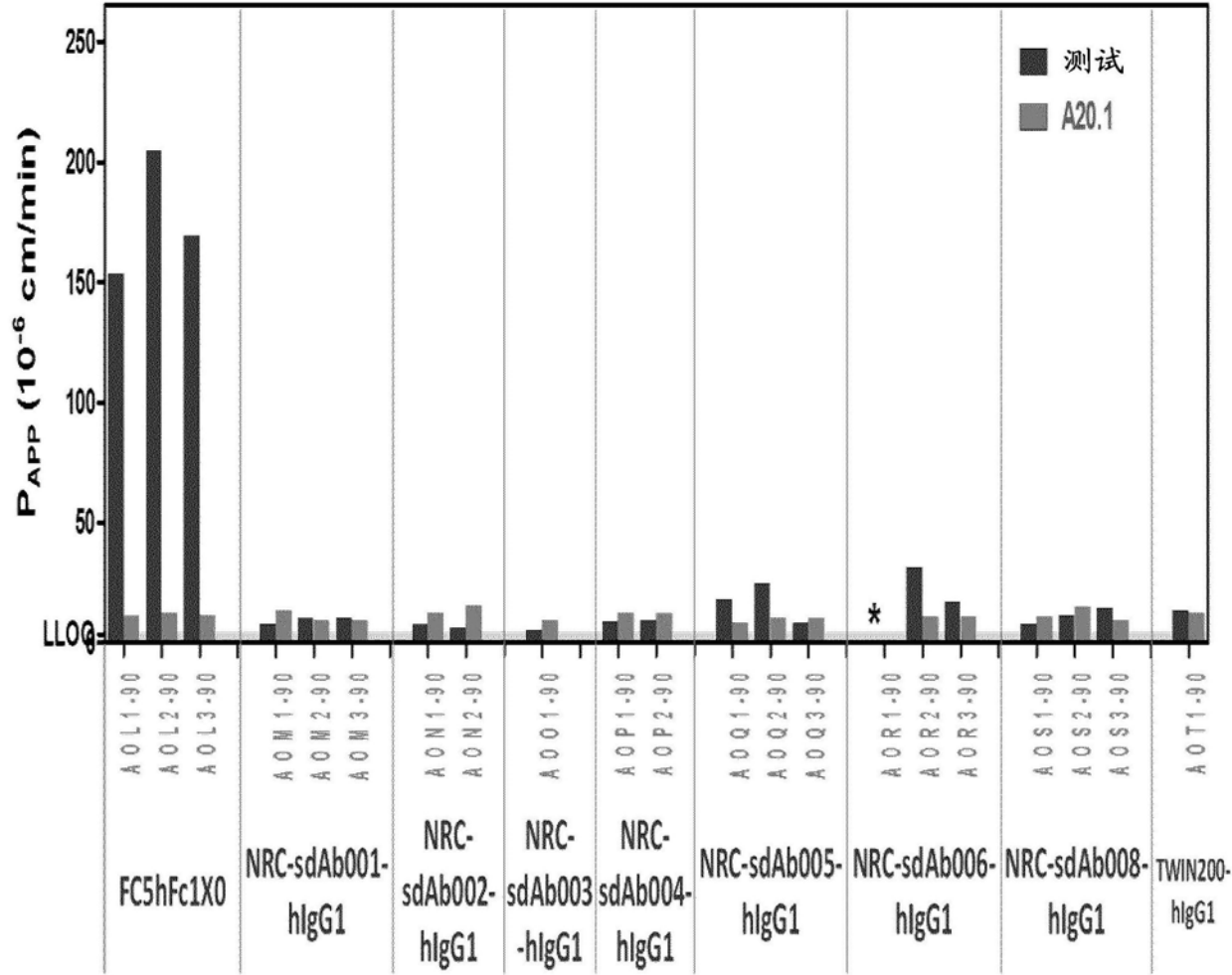


图19