(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118994402 A
(43)申请公布日 2024.11.22

(21)申请号 202411101789.X
(22)申请日 2019.12.18
(30)优先权数据
62/783,565 2018.12.21 US
62/803,110 2019.02.08 US
(62)分案原申请数据
201980083268.7 2019.12.18
(71)申请人 诺华股份有限公司
地址 瑞士
(72)发明人 M·比尔热 J·A·达莱西奥
T·弗莱明 V·劳尼亚尔
E·M·罗伯斯 C·昆兹
M·沃尔杜贝尔
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 胡志君 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书12页 说明书226页
序列表（电子公布） 附图15页

(54)发明名称

针对PMEL17的抗体及其缀合物

(57)摘要

本申请披露了抗PMEL17抗体、其抗原结合片段、以及缀合至GNAQ/GNA11抑制剂的所述抗体或抗原结合片段的抗体药物缀合物。本发明还涉及使用所述抗体、抗原结合片段和抗体药物缀合物治疗或预防癌症的方法。本文还披露了制备所述抗体、抗原结合片段和抗体药物缀合物的方法，以及使用所述抗体和抗原结合片段作为诊断试剂的方法。

CN 118994402 A

1.一种结合PMEL17的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

a.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1、4、5或7的重链CDR1(互补性决定区1),SEQ ID NO:2、6或8的重链CDR2(互补性决定区2),以及SEQ ID NO:3或9的重链CDR3(互补性决定区3);以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:14、17或20的轻链CDR1(互补性决定区1),SEQ ID NO:15或18的轻链CDR2(互补性决定区2),以及SEQ ID NO:16或19的轻链CDR3(互补性决定区3);

b.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:33、36、37或39的重链CDR1,SEQ ID NO:34、38或40的重链CDR2,SEQ ID NO:35或41的重链CDR3;SEQ ID NO:46、49或52的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:48或51的轻链CDR3;

c.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:5、7、57或60的重链CDR1,SEQ ID NO:58、61或62的重链CDR2,SEQ ID NO:59或63的重链CDR3;SEQ ID NO:68、71或74的轻链CDR1,SEQ ID NO:69或72的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:70或73的轻链CDR3;

d.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:79、82、83或85的重链CDR1,SEQ ID NO:80、84或86的重链CDR2,SEQ ID NO:81或87的重链CDR3;SEQ ID NO:92、95或98的轻链CDR1,SEQ ID NO:93或96的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:94或97的轻链CDR3;

e.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQ ID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ ID NO:105或111的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:117或118的轻链CDR3;

f.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:123、126、127或129的重链CDR1,SEQ ID NO:124、128或130的重链CDR2,SEQ ID NO:125或131的重链CDR3;SEQ ID NO:136、139或142的轻链CDR1,SEQ ID NO:137或140的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:138或141的轻链CDR3;

g.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:123、126、127或129的重链CDR1,SEQ ID NO:124、128或130的重链CDR2,SEQ ID NO:147或148的重链CDR3;SEQ ID NO:153、156或158的轻链CDR1,SEQ ID NO:50或154的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:155或157的轻链CDR3;

h.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQ ID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ ID NO:163或164的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:169或170的轻链CDR3;

i.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:175、178、179或181的重链CDR1,SEQ ID NO:176、180或182的重链CDR2,SEQ ID NO:177或183的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:188或189的轻链CDR3;

j.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQ ID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ ID NO:194或195的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:200或201的轻链CDR3;

k.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的重链CDR1,SEQ ID NO:207、211或213的重链CDR2,SEQ ID NO:208或214的重链CDR3;SEQ ID NO:153、156或158的轻链CDR1,SEQ ID NO:50或154的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:219或220的轻链CDR3;

1.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的重链CDR1,SEQ ID NO:207、211或213的重链CDR2,SEQ ID NO:225或226的重链CDR3;SEQ ID NO:136、139或142的轻链CDR1,SEQ ID NO:137或140的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:231或232的轻链CDR3;

m.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的HCDR1,SEQ ID NO:207、211或213的HCDR2,以及SEQ ID NO:237或238的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQID NO:243、245或247的LCDR1,SEQ ID NO:47或50的LCDR2,以及SEQ ID NO:244或246的LCDR3;

n.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的HCDR1,SEQ ID NO:207、211或213的HCDR2,以及SEQ ID NO:252或253的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153、156或158的LCDR1,SEQ ID NO:50或154的LCDR2,以及SEQ ID NO:258或259的LCDR3;

o.SEQ ID NO:1的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:14的轻链CDR1、SEQ ID NO:15的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

p.SEQ ID NO:4的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:14的轻链CDR1、SEQ ID NO:15的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

q.SEQ ID NO:5的重链CDR1、SEQ ID NO:6的重链CDR2、SEQ ID NO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:17的轻链CDR1、SEQ ID NO:18的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:19的轻链CDR3;

r.SEQ ID NO:7的重链CDR1、SEQ ID NO:8的重链CDR2、SEQ ID NO:9的重链CDR3、SEQ ID NO:20的轻链CDR1、SEQ ID NO:18的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

s.SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2、SEQ ID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:46的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

t.SEQ ID NO:36的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2、SEQ ID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:46的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

u.SEQ ID NO:37的重链CDR1、SEQ ID NO:38的重链CDR2、SEQ ID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:51的轻链CDR3;

v.SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2、SEQ ID NO:41的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

w.SEQ ID NO:57的重链CDR1、SEQ ID NO:58的重链CDR2、SEQ ID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:68的轻链CDR1、SEQ ID NO:69的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

x.SEQ ID NO:60的重链CDR1、SEQ ID NO:58的重链CDR2、SEQ ID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:68的轻链CDR1、SEQ ID NO:69的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

y.SEQ ID NO:5的重链CDR1、SEQ ID NO:61的重链CDR2、SEQ ID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:71的轻链CDR1、SEQ ID NO:72的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:73的轻链CDR3;

z.SEQ ID NO:7的重链CDR1、SEQ ID NO:62的重链CDR2、SEQ ID NO:63的重链CDR3、SEQ ID NO:74的轻链CDR1、SEQ ID NO:72的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

aa.SEQ ID NO:79的重链CDR1、SEQ ID NO:80的重链CDR2、SEQ ID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:92的轻链CDR1、SEQ ID NO:93的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

bb.SEQ ID NO:82的重链CDR1、SEQ ID NO:80的重链CDR2、SEQ ID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:92的轻链CDR1、SEQ ID NO:93的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

cc.SEQ ID NO:83的重链CDR1、SEQ ID NO:84的重链CDR2、SEQ ID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:95的轻链CDR1、SEQ ID NO:96的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:97的轻链CDR3;

dd.SEQ ID NO:85的重链CDR1、SEQ ID NO:86的重链CDR2、SEQ ID NO:87的重链CDR3、

SEQ ID NO:98的轻链CDR1、SEQ ID NO:96的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3；

ee.SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3；

ff.SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3；

gg.SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:118的轻链CDR3；

hh.SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:111的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3；

ii.SEQ ID NO:123的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ ID NO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3；

jj.SEQ ID NO:126的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ ID NO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3；

kk.SEQ ID NO:127的重链CDR1、SEQ ID NO:128的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:139的轻链CDR1、SEQ ID NO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:141的轻链CDR3；

ll.SEQ ID NO:129的重链CDR1、SEQ ID NO:130的重链CDR2、SEQ ID NO:131的重链CDR3、SEQ ID NO:142的轻链CDR1、SEQ ID NO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3；

mm.SEQ ID NO:123的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ ID NO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3；

nn.SEQ ID NO:126的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ ID NO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3；

oo.SEQ ID NO:127的重链CDR1、SEQ ID NO:128的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:156的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:157的轻链CDR3；

pp.SEQ ID NO:129的重链CDR1、SEQ ID NO:130的重链CDR2、SEQ ID NO:148的重链CDR3、SEQ ID NO:158的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3；

qq.SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链

CDR3;

rr.SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

ss.SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:170的轻链CDR3;

tt.SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:164的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

uu.SEQ ID NO:175的重链CDR1、SEQ ID NO:176的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

VV.SEQ ID NO:178的重链CDR1、SEQ ID NO:176的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

Ww.SEQ ID NO:179的重链CDR1、SEQ ID NO:180的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:189的轻链CDR3;

XX.SEQ ID NO:181的重链CDR1、SEQ ID NO:182的重链CDR2、SEQ ID NO:183的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

yy.SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

ZZ.SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

aaa.SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:201的轻链CDR3;

bbb.SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:195的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

CCc.SEQ ID NO:206的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ ID NO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

ddd.SEQ ID NO:209的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ ID NO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链

CDR3;

eee.SEQ ID NO:210的重链CDR1、SEQ ID NO:211的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:156的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:220的轻链CDR3;

fff.SEQ ID NO:212的重链CDR1、SEQ ID NO:213的重链CDR2、SEQ ID NO:214的重链CDR3、SEQ ID NO:158的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

ggg.SEQ ID NO:206的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ ID NO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

hhh.SEQ ID NO:209的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ ID NO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

iii.SEQ ID NO:210的重链CDR1、SEQ ID NO:211的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:139的轻链CDR1、SEQ ID NO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:232的轻链CDR3;

jjj.SEQ ID NO:212的重链CDR1、SEQ ID NO:213的重链CDR2、SEQ ID NO:226的重链CDR3、SEQ ID NO:142的轻链CDR1、SEQ ID NO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

kkk.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243的LCDR1、SEQ ID NO:47的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

lll.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:209的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243的LCDR1、SEQ ID NO:47的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

mmm.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:210的HCDR1、SEQ ID NO:211的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:245的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:246的LCDR3;

nnn.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:212的HCDR1、SEQ ID NO:213的HCDR2、以及SEQ ID NO:238的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:247的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

ooo.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153的LCDR1、SEQ ID NO:154的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3;

ppp.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:209的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153的LCDR1、SEQ ID NO:154的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3;

qqq.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:210的HCDR1、SEQ ID NO:211的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:156

的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:259的LCDR3;或

rrr.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:212的HCDR1、SEQ ID NO:213的HCDR2、以及SEQ ID NO:253的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:158的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3。

2.一种结合PMEL17的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

a.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

b.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

c.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

d.含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

e.含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

f.含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

g.含有SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:119的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

h.含有SEQ ID NO:132的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:143的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

i.含有SEQ ID NO:149的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:159的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

j.含有SEQ ID NO:165的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:171的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

k.含有SEQ ID NO:184的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:190的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

1.含有SEQ ID NO:196的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:202的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

m.含有SEQ ID NO:215的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:221的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

n.含有SEQ ID NO:227的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:233的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

o.含有SEQ ID NO:239的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:248的氨基酸序列的轻链可变区(VL);或

p.含有SEQ ID NO:254的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:260的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

3.一种结合PMEL17的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

a.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻

链;

b.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链;

c.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链;

d.含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的轻链;

e.含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的轻链;

f.含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的轻链;

g.含有SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:121的氨基酸序列的轻链;

h.含有SEQ ID NO:134的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链;

i.含有SEQ ID NO:151的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:161的氨基酸序列的轻链;

j.含有SEQ ID NO:167的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:173的氨基酸序列的轻链;

k.含有SEQ ID NO:186的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:192的氨基酸序列的轻链;

1.含有SEQ ID NO:198的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:204的氨基酸序列的轻链;

m.含有SEQ ID NO:217的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:223的氨基酸序列的轻链;

n.含有SEQ ID NO:229的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:235的氨基酸序列的轻链;

o.含有SEQ ID NO:241的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:250的氨基酸序列的轻链;或

p.含有SEQ ID NO:256的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:262的氨基酸序列的轻链。

4.如权利要求1-3中任一项所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含一个或多个半胱氨酸取代。

5.如权利要求4所述的抗体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含一个或多个半胱氨酸取代,所述一个或多个半胱氨酸取代选自所述抗体或其抗原结合片段的S152C、S375C、或S152C和S375C二者,其中所述位置是根据EU系统编号的。

6.如权利要求1-5中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

7.一种抗体药物缀合物,所述抗体药物缀合物包含式(C)

$$Ab-(L_A-(D)_n)_y \qquad (C)$$

其中：

D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂；

Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

L_A是接头；

n是1、2、3或4，并且

y是1、2、3或4。

8.如权利要求7所述的抗体药物缀合物，其中所述n是1。

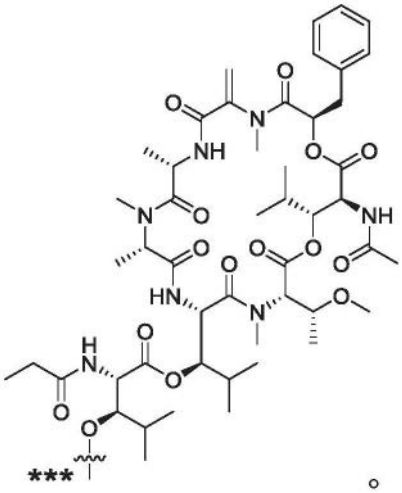
9.如权利要求7或8中任一项所述的抗体药物缀合物，其中所述y是约1至约4。

10.如权利要求7-9中任一项所述的抗体药物缀合物，其中所述接头是可裂解接头或不可裂解接头。

11.如权利要求10所述的抗体药物缀合物，其中所述接头包含ValCit肽接头。

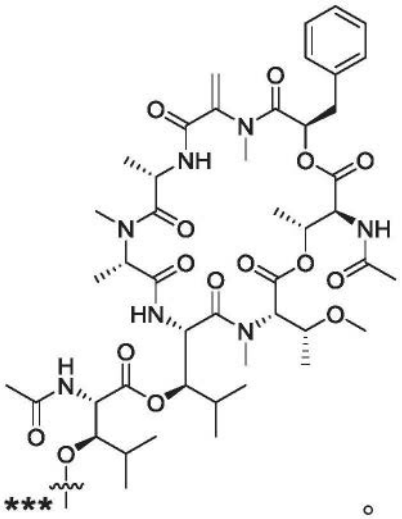
12.如权利要求7-11中任一项所述的抗体药物缀合物，其中所述药物部分是GNAQ和GNA11的抑制剂。

13.如权利要求7-11中任一项所述的抗体药物缀合物，其中所述D是



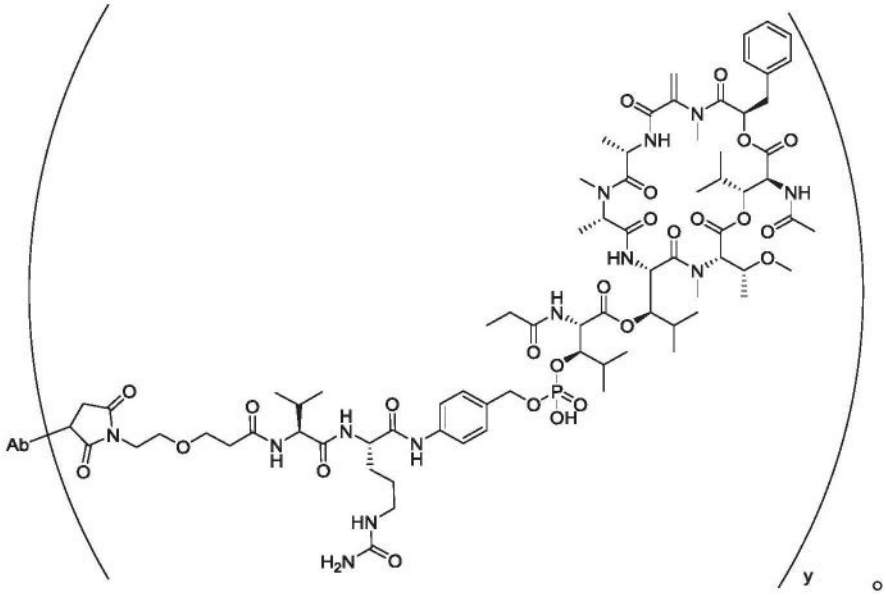
。

14.如权利要求7-11中任一项所述的抗体药物缀合物，其中D是

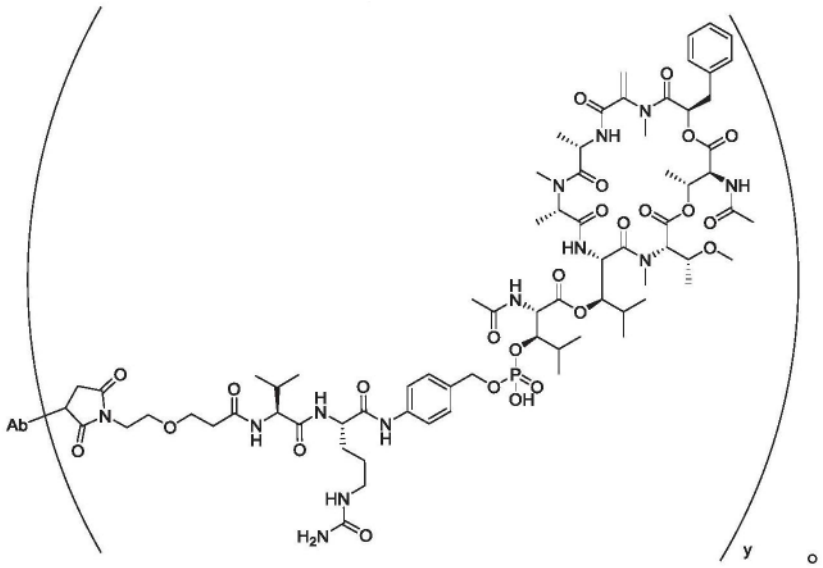


。

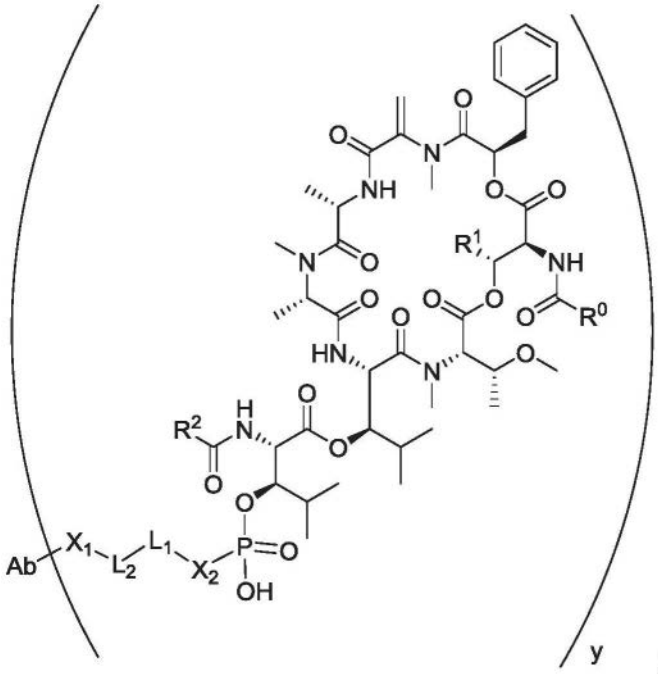
15.如权利要求7-14中任一项所述的抗体药物缀合物，所述抗体药物缀合物具有以下结构，



16.如权利要求7-14中任一项所述的抗体药物缀合物,所述抗体药物缀合物具有以下结构,



17.一种抗体药物缀合物,所述抗体药物缀合物具有以下式(C-2):



(C-2),

其中：

R^0是甲基或乙基；

R^1是甲基或异丙基；

R^2是甲基或乙基；

Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

X_1是二价偶联基团；

X_2是自杀式间隔子；

L_1是二价肽接头；

L_2是键或接头，并且

y是1、2、3或4。

18.一种药物组合物，所述药物组合物包含如权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，以及药学上可接受的载剂。

19.一种药物组合物，所述药物组合物包含如权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物，以及药学上可接受的载剂。

20.一种在有需要的患者中治疗或预防癌症的方法，所述方法包括向所述患者施用如权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物、或如权利要求18或19中任一项所述的药物组合物，其中所述癌症表达PMEL17，含有GNAQ或GNA11基因突变，或所述癌症表达PMEL17，并含有GNAQ突变、GNA11突变、或二者的突变。

21.如权利要求20所述的方法，其中将所述抗体药物缀合物或药物组合物与一种或多种另外的治疗性化合物组合施用至所述患者。

22.如权利要求21所述的方法，其中所述一种或多种另外的治疗性化合物选自标准护理化学治疗剂、MDM2抑制剂、MRC2抑制剂、PKC抑制剂、MAPK抑制剂、共刺激分子或检查点抑制剂。

23.如权利要求22所述的方法，其中所述共刺激分子选自OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、

LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3、STING或CD83配体的激动剂。

24.如权利要求22所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFRβ的抑制剂。

25.如权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物、或如权利要求18或19中任一项所述的药物组合物,用于作为药物使用。

26.如权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物、或如权利要求18或19中任一项所述的药物组合物,用于在有需要的患者中治疗或预防表达PMEL17的癌症或含有GNAQ或GNA11基因突变的癌症使用。

27.如权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物、或如权利要求18或19中任一项所述的药物组合物用于在有需要的患者中治疗或预防表达PMEL17的癌症或含有GNAQ或GNA11基因突变的癌症的用途。

28.如权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求7-17中任一项所述的抗体药物缀合物、或如权利要求18或19中任一项所述的药物组合物在制造药物中的用途。

29.如权利要求20-24中任一项所述的方法、如权利要求25-26中任一项所述的抗体药物缀合物、或如权利要求27-28中任一项所述的用途,其中所述癌症表达PMEL17或含有GNAQ或GNA11基因突变。

30.如权利要求28所述的方法、抗体药物缀合物或用途,其中所述癌症是葡萄膜黑色素瘤、皮下黑色素瘤、肝细胞癌、或其转移性癌。

31.一种核酸,所述核酸编码如权利要求1-6中任一项所述的抗体或抗原结合片段。

32.如权利要求31所述的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:13、24、28、32、45、56、67、78、91、102、115、122、135、146、152、162、168、174、187、193、199、205、218、224、230、236、242、251、257、或263的核苷酸序列。

33.一种载体,所述载体包含如权利要求31或32所述的核酸。

34.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求33所述的载体、或如权利要求31或32所述的核酸。

35.一种用于产生抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括培养如权利要求34所述的宿主细胞并且从细胞培养物中回收所述抗体。

36.如权利要求35所述的方法,其中从细胞培养物回收所述抗体包括以下步骤:

a)回收细胞并且过滤所述培养物;

b)通过亲和色谱法纯化所述培养物;

c)通过将pH调整至3.4-3.6将所述培养物中的任何病毒灭活,然后将pH再调整至5.8-6.2并且过滤所述培养物;

d)通过阳离子交换色谱法纯化所述培养物并且对所述培养物进行柱上还原;

e)对所述培养物进行阴离子交换色谱法;

f)通过纳米过滤去除病毒;

g)过滤含有所述抗体的所述培养物;以及

h)获得经纯化的抗体。

37.一种用于产生抗PMEL17抗体药物缀合物的方法,所述方法包括:

(a)预先形成具有以下式(B)的接头-药物部分:

R^8-L_B-(D)$_n$ (B)

其中:

D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

R^8是反应性基团;

L_B是可裂解或不可裂解接头,并且

n是1、2、3或4;

(b)将所述接头-药物部分与如权利要求35所述的从所述细胞培养物回收的抗体缀合以产生抗体药物缀合物;以及

(c)纯化所述抗体药物缀合物。

38.一种诊断试剂,所述诊断试剂包含如权利要求1-6中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

39.如权利要求38所述的诊断试剂,其中将所述抗体或其抗原结合片段用放射标记、荧光团、发色团、成像剂或金属离子进行标记。

针对PMEL17的抗体及其缀合物

[0001] 本申请是中国专利申请201980083268.7的分案申请,原申请的申请日是2019年12月18日,发明名称是“针对PMEL17的抗体及其缀合物”。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含一个序列表,该序列表已以ASCII格式以电子方式提交,并通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2019年12月6日,名为PAT058359-WO-PCT_SL.txt,大小为285,253字节。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及抗PMEL17抗体或其片段、其缀合物(包括其GNAQ/GNA11抑制剂缀合物),以及它们用于治疗或预防癌症的用途。

背景技术

[0005] PMEL17(也称为gp100和SILV)是由黑色素细胞产生并参与黑色素合成的单通路I型跨膜蛋白。随着其成熟,PMEL17在运输至黑色素体之前在细胞表面瞬时表达,在所述黑色素体中PMEL17降解为多个结构域,所述结构域多聚化以形成纤维状片层。然后,这种模式可作为捕获黑色素的支撑。黑色素体PMEL17的表达受谱系致癌基因MITF调控,并且发现其在多种原发性和转移性皮下及葡萄膜黑色素瘤中被上调。PMEL17的瞬时细胞表面表达和随后的内化使其成为开发治疗黑色素瘤的抗体药物缀合物(ADC)的合适靶标。

[0006] PMEL17和癌症

[0007] 随着其成熟,PMEL17被前蛋白(pro-protein)转化酶大量加工。蛋白质在V467/K468之间裂解,形成两个亚结构域,即N末端处的M_{α}和C末端处的Mβ,据推测二者是通过二硫桥维持的。离开高尔基体后,一些PMEL17分子在细胞表面瞬时表达。然后,大多数PMEL17重定向到黑色素细胞以进一步成熟,而一些PMEL17似乎脱落了。经过另外的酶促裂解后,PMEL17降解为多个结构域,所述结构域重组并形成发生黑色素聚合的纤维状片层(Valencia JC等人Sorting of Pmel17 to melanosomes through the plasma membrane by AP1 and AP2:evidence for the polarized nature of melanocytes.[AP1和AP2通过质膜将Pmel17分选为黑色素体:黑色素细胞极化性质的证据]J Cell Sci.[细胞科学杂志]2006年3月15日;119(Pt 6):1080-91;Theos AC等人The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20:controversial in name and in function.[银基因座产品Pmel17/gp100/Silv/ME20:名称和功能上有争议]Pigment CellRes.[色素细胞研究]2005年10月;18(5):322-36)。

[0008] PMEL17构成了治疗黑色素瘤的潜在治疗性靶标。如mRNA表达研究所观察到的,PMEL17是黑色素瘤中的一种谱系致癌基因MITF的直接转录靶标(Du J等人MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma.[MLANA/MART1和SILV/PMEL17/GP100受黑色素细胞和黑色素瘤中MITF的转录调控]Am J Pathol.[美国病理学杂志]2003年7月;163(1):333-43)。PMEL17表达限于黑

色素细胞谱系,包括皮肤黑色素细胞、毛球黑色素细胞、视网膜色素上皮细胞、色素性睫状上皮细胞以及可能地视网膜中的脉络膜黑色素细胞。PMEL17在黑色素细胞谱系肿瘤(如皮下和葡萄膜黑色素瘤)中也高度表达。相比之下,mRNA研究表明PMEL17表达在其他肿瘤类型和正常组织上受到限制(Wagner SN,Wagner C,Schultewolter T,Goos M.Analysis of Pmel17/gp100expression in primary human tissue specimens:implications for melanoma immuno-and gene-therapy.[人原始组织标本中Pmel17/gp100表达的分析:对黑色素瘤免疫和基因疗法的启示]Cancer Immunol Immunother.[癌症免疫疗法]1997年6月;44(4):239-47)。此外,此前已经描述了靶向PMEL17的ADC和ImmTAC化合物在体内和体外特异性诱导黑色素瘤的杀伤,并且目前正在临床试验中对其进行评估(Chen Y等人The melanosomal protein PMEL17 as a target for antibody drug conjugate therapy in melanoma.[黑色素体蛋白PMEL17作为黑色素瘤抗体药物缀合物疗法的靶标]J Biol Chem.[生物化学杂志]2012年7月13日;287(29):24082-91.doi:10.1074/jbc.M112.361485.Epub 2012年5月21日)。

[0009] GNAQ/GNA11和癌症

[0010] GNAQ和GNA11基因编码异三聚体G蛋白Gq/11的α亚基,所述蛋白几乎被泛表达并作为在活化的鸟苷三磷酸(GTP)结合状态和灭活的鸟苷二磷酸(GDP)结合状态之间循环的二态分子开关。GTP结合的Gαq和Gα11激活磷脂酶C的β-同种型,从而通过生成第二信使IP3和DAG触发多个信号转导途径。这些Gα蛋白的固有GTP酶活性介导的GTP水解触发信号传导终止。已显示Gq和G11参与多种生理功能,包括血小板活化、心肌肥大和平滑肌紧张性(smooth muscle tone)。

[0011] GNAQ或GNA11中的致癌基因突变发生在多达90%的葡萄膜黑色素瘤(UM)和约2%-3%的皮肤黑色素瘤中。这些突变中大约95%影响Ras样结构域中的密码子209(Q209),导致GTP酶活性完全或部分丧失,从而将GNAQ/11锁定在其活性状态。Q209 GNAQ/11是主要的起作用的致癌基因,可通过触发包括PKC/MAPK、Rho/Rac、β-联蛋白(catenin)、和YAP在内的多种途径的活化来转化黑色素细胞。尽管PKC/MAPK途径已显示是GNAQ介导的肿瘤发生的一个促成因素,但多种证据表明,突变体GNAQ/11支配着也可能在UM肿瘤发生中起作用的另外的途径(即YAP、β-联蛋白)。有趣的是,最近描述了GNAQ(R183Q)中的另一种体细胞活化突变是斯特奇-韦伯综合征(Sturge-Weber syndrome,SWS)的病因,所述疾病是一种以毛细血管畸形(葡萄酒色斑)以及脉络膜和柔脑膜血管畸形为特征的神经皮肤障碍。因此,GNAQ和GNA11构成了治疗葡萄膜和皮肤黑色素瘤的潜在治疗性靶标。

[0012] 抗体药物缀合物

[0013] 抗体药物缀合物(“ADC”)已用于在癌症治疗中局部递送细胞毒性剂(参见例如,Lambert,Curr.Opinion In Pharmacology[药理学新见]5:543-549,2005)。ADC允许靶向递送药物部分,其中可以实现具有最小毒性的最大功效。ADC包含针对结合经靶向用于治疗干预的细胞的能力而选择的抗体,所述抗体与针对其细胞抑制或细胞毒活性而选择的药物连接。从而,抗体与靶细胞的结合将药物递送至需要其治疗效果的位点。

[0014] 已经披露了许多识别并选择性结合靶细胞(例如,癌细胞)的抗体用于在ADC中使用。尽管对ADC进行了大量工作,但与特定的目的靶标结合的抗体不足以预测ADC应用的成功。可以影响ADC治疗效果的因素(除了靶标内在特征之外)的实例包括需要定制微调的各

个方面,如作为靶介导处置(TMDD)与功效驱动暴露之间平衡的最佳抗体亲和力、对Fc介导的功能(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,ADCC)的评价、缀合方法(位点特异性与否)、与每种抗体缀合的药物/有效负载分子的比率("DAR"或"药物抗体比率")、接头的可裂解性或稳定性、ADC的稳定性、以及ADC聚集的趋势。

[0015] 仍然需要具有改善特性的抗体、附接方法和细胞毒性有效负载,以用作有效的ADC治疗组合物和方法。

发明内容

[0016] 在一个实施例中,本申请披露了一种结合PMEL17的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

[0017] a.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:1、4、5或7的重链CDR1(互补性决定区1),SEQ ID NO:2、6或8的重链CDR2(互补性决定区2),以及SEQ ID NO:3或9的重链CDR3(互补性决定区3);以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:14、17或20的轻链CDR1(互补性决定区1),SEQ ID NO:15或18的轻链CDR2(互补性决定区2),以及SEQ ID NO:16或19的轻链CDR3(互补性决定区3);

[0018] b.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:33、36、37或39的重链CDR1,SEQ ID NO:34、38或40的重链CDR2,SEQ ID NO:35或41的重链CDR3;SEQ ID NO:46、49或52的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:48或51的轻链CDR3;

[0019] c.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:5、7、57或60的重链CDR1,SEQ ID NO:58、61或62的重链CDR2,SEQ ID NO:59或63的重链CDR3;SEQ ID NO:68、71或74的轻链CDR1,SEQ ID NO:69或72的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:70或73的轻链CDR3;

[0020] d.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:79、82、83或85的重链CDR1,SEQ ID NO:80、84或86的重链CDR2,SEQ ID NO:81或87的重链CDR3;SEQ ID NO:92、95或98的轻链CDR1,SEQ ID NO:93或96的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:94或97的轻链CDR3;

[0021] e.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQ ID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ IDNO:105或111的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:117或118的轻链CDR3;

[0022] f.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:123、126、127或129的重链CDR1,SEQ ID NO:124、128或130的重链CDR2,SEQ IDNO:125或131的重链CDR3;SEQ ID NO:136、139或142的轻链CDR1,SEQ ID NO:137或140的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:138或141的轻链CDR3;

[0023] g.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:123、126、127或129的重链CDR1,SEQ ID NO:124、128或130的重链CDR2,SEQ IDNO:147或148的重链CDR3;SEQ ID NO:153、156或158的轻链CDR1,SEQ ID NO:50或154的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:155或157的轻链CDR3;

[0024] h.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQ ID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ IDNO:163或164的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:169或170的轻链CDR3;

[0025] i.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:175、178、179或181的重链CDR1,

SEQ ID NO:176、180或182的重链CDR2,SEQ IDNO:177或183的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:188或189的轻链CDR3;

[0026] j.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQ ID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ IDNO:194或195的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:200或201的轻链CDR3;

[0027] k.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的重链CDR1,SEQ ID NO:207、211或213的重链CDR2,SEQ IDNO:208或214的重链CDR3;SEQ ID NO:153、156或158的轻链CDR1,SEQ ID NO:50或154的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:219或220的轻链CDR3;

[0028] l.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的重链CDR1,SEQ ID NO:207、211或213的重链CDR2,SEQ IDNO:225或226的重链CDR3;SEQ ID NO:136、139或142的轻链CDR1,SEQ ID NO:137或140的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:231或232的轻链CDR3;

[0029] m.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的HCDR1,SEQ ID NO:207、211或213的HCDR2,以及SEQ IDNO:237或238的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQID NO:243、245或247的LCDR1,SEQ ID NO:47或50的LCDR2,以及SEQ ID NO:244或246的LCDR3;

[0030] n.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的HCDR1,SEQ ID NO:207、211或213的HCDR2,以及SEQ ID NO:252或253的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153、156或158的LCDR1,SEQ ID NO:50或154的LCDR2,以及SEQID NO:258或259的LCDR3;

[0031] o.SEQ ID NO:1的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ IDNO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:14的轻链CDR1、SEQ ID NO:15的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

[0032] p.SEQ ID NO:4的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ IDNO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:14的轻链CDR1、SEQ ID NO:15的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

[0033] q.SEQ ID NO:5的重链CDR1、SEQ ID NO:6的重链CDR2、SEQ IDNO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:17的轻链CDR1、SEQ ID NO:18的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:19的轻链CDR3;

[0034] r.SEQ ID NO:7的重链CDR1、SEQ ID NO:8的重链CDR2、SEQ IDNO:9的重链CDR3、SEQ ID NO:20的轻链CDR1、SEQ ID NO:18的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

[0035] s.SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2、SEQID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:46的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

[0036] t.SEQ ID NO:36的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2、SEQID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:46的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

[0037] u.SEQ ID NO:37的重链CDR1、SEQ ID NO:38的重链CDR2、SEQID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:51的轻链CDR3;

[0038] v.SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2、SEQID NO:41的重链

CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

[0039] w.SEQ ID NO:57的重链CDR1、SEQ ID NO:58的重链CDR2、SEQ ID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:68的轻链CDR1、SEQ ID NO:69的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

[0040] x.SEQ ID NO:60的重链CDR1、SEQ ID NO:58的重链CDR2、SEQID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:68的轻链CDR1、SEQ ID NO:69的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

[0041] y.SEQ ID NO:5的重链CDR1、SEQ ID NO:61的重链CDR2、SEQID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:71的轻链CDR1、SEQ ID NO:72的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:73的轻链CDR3;

[0042] z.SEQ ID NO:7的重链CDR1、SEQ ID NO:62的重链CDR2、SEQID NO:63的重链CDR3、SEQ ID NO:74的轻链CDR1、SEQ ID NO:72的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

[0043] aa.SEQ ID NO:79的重链CDR1、SEQ ID NO:80的重链CDR2、SEQ ID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:92的轻链CDR1、SEQ ID NO:93的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

[0044] bb.SEQ ID NO:82的重链CDR1、SEQ ID NO:80的重链CDR2、SEQ ID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:92的轻链CDR1、SEQ ID NO:93的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

[0045] cc.SEQ ID NO:83的重链CDR1、SEQ ID NO:84的重链CDR2、SEQ ID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:95的轻链CDR1、SEQ ID NO:96的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:97的轻链CDR3;

[0046] dd.SEQ ID NO:85的重链CDR1、SEQ ID NO:86的重链CDR2、SEQ ID NO:87的重链CDR3、SEQ ID NO:98的轻链CDR1、SEQ ID NO:96的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

[0047] ee.SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3;

[0048] ff.SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3;

[0049] gg.SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:118的轻链CDR3;

[0050] hh.SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:111的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3;

[0051] ii.SEQ ID NO:123的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3;

[0052] jj.SEQ ID NO:126的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3;

[0053] kk.SEQ ID NO:127的重链CDR1、SEQ ID NO:128的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:139的轻链CDR1、SEQ IDNO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:141的轻链CDR3;

[0054] ll.SEQ ID NO:129的重链CDR1、SEQ ID NO:130的重链CDR2、SEQ ID NO:131的重链CDR3、SEQ ID NO:142的轻链CDR1、SEQ IDNO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3;

[0055] mm.SEQ ID NO:123的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3;

[0056] nn.SEQ ID NO:126的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3;

[0057] oo.SEQ ID NO:127的重链CDR1、SEQ ID NO:128的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:156的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:157的轻链CDR3;

[0058] pp.SEQ ID NO:129的重链CDR1、SEQ ID NO:130的重链CDR2、SEQ ID NO:148的重链CDR3、SEQ ID NO:158的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3;

[0059] qq.SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO;47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

[0060] rr.SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

[0061] ss.SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:170的轻链CDR3;

[0062] tt.SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:164的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

[0063] uu.SEQ ID NO:175的重链CDR1、SEQ ID NO:176的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

[0064] vv.SEQ ID NO:178的重链CDR1、SEQ ID NO:176的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

[0065] ww.SEQ ID NO:179的重链CDR1、SEQ ID NO:180的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:189的轻链CDR3;

[0066] xx.SEQ ID NO:181的重链CDR1、SEQ ID NO:182的重链CDR2、SEQ ID NO:183的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

[0067] yy.SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

[0068] ZZ.SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

[0069] aaa.SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:201的轻链CDR3;

[0070] bbb.SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:195的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

[0071] CCc.SEQ ID NO:206的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

[0072] ddd.SEQ ID NO:209的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

[0073] eee.SEQ ID NO:210的重链CDR1、SEQ ID NO:211的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:156的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:220的轻链CDR3;

[0074] fff.SEQ ID NO:212的重链CDR1、SEQ ID NO:213的重链CDR2、SEQ ID NO:214的重链CDR3、SEQ ID NO:158的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

[0075] ggg.SEQ ID NO:206的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

[0076] hhh.SEQ ID NO:209的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ ID NO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

[0077] iii.SEQ ID NO:210的重链CDR1、SEQ ID NO:211的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:139的轻链CDR1、SEQ ID NO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:232的轻链CDR3;

[0078] jjj.SEQ ID NO:212的重链CDR1、SEQ ID NO:213的重链CDR2、SEQ ID NO:226的重链CDR3、SEQ ID NO:142的轻链CDR1、SEQ ID NO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

[0079] kkk.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243的LCDR1、SEQ ID NO:47的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

[0080] lll.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:209的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243的LCDR1、SEQ ID NO:47的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

[0081] mmm.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:210的HCDR1、SEQ ID NO:211的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:245的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:246的LCDR3;

[0082] nnn.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:212的HCDR1、SEQ ID NO:213的HCDR2、以及SEQ ID NO:238的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:247的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

[0083] ooo.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153的LCDR1、SEQ ID NO:154的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3;

[0084] ppp.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:209的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153的LCDR1、SEQ ID NO:154的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3;

[0085] qqq.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:210的HCDR1、SEQ ID NO:211的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:156的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:259的LCDR3;或

[0086] rrr.重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:212的HCDR1、SEQ ID NO:213的HCDR2、以及SEQ ID NO:253的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:158的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3。

[0087] 本申请的结合PMEL17的抗体或其抗原结合片段还可以包含:

[0088] a.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0089] b.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0090] c.含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0091] d.含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0092] e.含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的轻链可变区(VL);

[0093] f.含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:99的

氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0094] g.含有SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:119的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0095] h.含有SEQ ID NO:132的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:143的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0096] i.含有SEQ ID NO:149的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:159的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0097] j.含有SEQ ID NO:165的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:171的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0098] k.含有SEQ ID NO:184的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:190的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0099] 1.含有SEQ ID NO:196的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:202的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0100] m.含有SEQ ID NO:215的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:221的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0101] n.含有SEQ ID NO:227的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:233的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；

[0102] o.含有SEQ ID NO:239的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:248的氨基酸序列的轻链可变区(VL)；或

[0103] p.含有SEQ ID NO:254的氨基酸序列的重链可变区(VH)以及含有SEQ ID NO:260的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0104] 在另一个实施例中,所述结合PMEL17的抗体或其抗原结合片段包含:

[0105] a.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链；

[0106] b.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链；

[0107] c.含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链；

[0108] d.含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的轻链；

[0109] e.含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的轻链；

[0110] f.含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的轻链；

[0111] g.含有SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:121的氨基酸序列的轻链；

[0112] h.含有SEQ ID NO:134的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链；

[0113] i.含有SEQ ID NO:151的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:161的氨基酸序

列的轻链;

[0114] j.含有SEQ ID NO:167的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:173的氨基酸序列的轻链;

[0115] k.含有SEQ ID NO:186的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:192的氨基酸序列的轻链;

[0116] l.含有SEQ ID NO:198的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:204的氨基酸序列的轻链;

[0117] m.含有SEQ ID NO:217的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ IDNO:223的氨基酸序列的轻链;

[0118] n.含有SEQ ID NO:229的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:235的氨基酸序列的轻链;

[0119] o.含有SEQ ID NO:241的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:250的氨基酸序列的轻链;或

[0120] p.含有SEQ ID NO:256的氨基酸序列的重链,以及含有SEQ ID NO:262的氨基酸序列的轻链。

[0121] 如本文所述的抗体或其抗原结合片段可以包含一个或多个半胱氨酸取代。在一个实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含一个或多个半胱氨酸取代,所述一个或多个半胱氨酸取代选自所述抗体或其抗原结合片段的重链的S152C、S375C、或S152C和S375C二者,其中所述位置是根据EU系统编号的。如本文披露的抗体可以是单克隆抗体。

[0122] 在一个方面,本发明的抗体药物缀合物是具有式(C)的缀合物:

[0123] $Ab-(L_A-(D)_n)_y$ (C)

[0124] 其中:

[0125] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0126] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段;

[0127] L_A是接头;

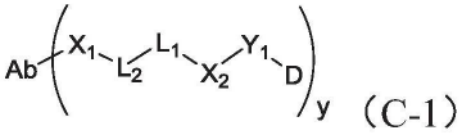
[0128] n是1、2、3或4,并且

[0129] y是1、2、3或4,

[0130] 其中接头-药物部分-$(L_A-(D)_n)$共价附接至抗体或其抗原结合片段。

[0131] 在具有式(C)的抗体药物缀合物的另一方面,L_A是可裂解接头,其包含一个或多个接头组分,所述接头组分选自自杀式(self-immolative)间隔子、磷酸基团、碳酸基团和二价肽接头。

[0132] 在另一方面,所述具有式(C)的抗体药物缀合物是具有式(C-1)的缀合物:

[0133] 

(C-1)

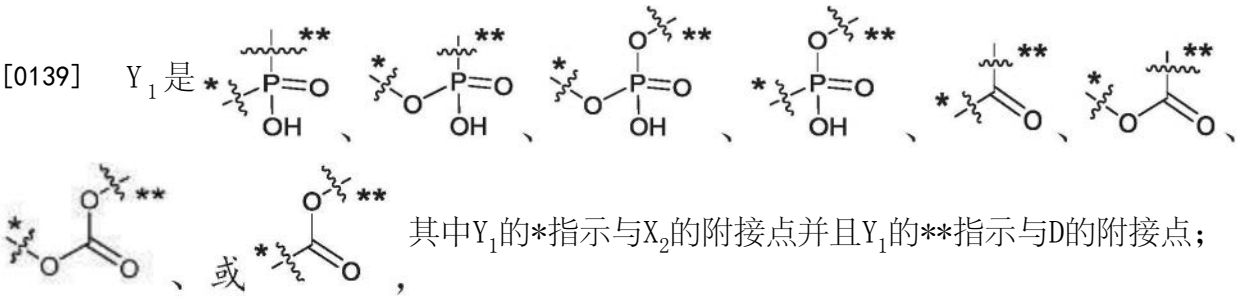
[0134] 其中:

[0135] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0136] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段;

[0137] X_1是二价偶联基团;

[0138] X_2是自杀式间隔子；

[0139] Y_1是  其中Y_1的*指示与X_2的附接点并且Y_1的**指示与D的附接点；

[0140] L_1是二价肽接头；

[0141] L_2是键或接头，并且

[0142] y是1、2、3或4。

[0143] 本申请还披露了药物组合物，所述药物组合物包含本文披露的抗体或其抗原结合片段、以及药学上可接受的载剂。本申请还披露了药物组合物，所述药物组合物包含本文披露的抗体药物缀合物、以及药学上可接受的载剂。

[0144] 本申请还披露了治疗或预防有需要的患者的癌症的方法，所述方法包括向所述患者施用本文披露的抗体药物缀合物或药物组合物，其中所述癌症表达PMEL17，含有GNAQ或GNA11基因突变，或者所述癌症表达PMEL17，并含有GNAQ突变、GNA11突变、或二者的突变。

[0145] 在所述治疗或预防癌症的方法的一些实施例中，将所述抗体药物缀合物或药物组合物与一种或多种另外的治疗性化合物组合施用至所述患者。在一个实施例中，所述一种或多种另外的治疗性化合物选自标准护理化学治疗剂、MDM2抑制剂、MRC2抑制剂、PKC抑制剂、MAPK抑制剂、共刺激分子或检查点抑制剂。在一个实施例中，所述共刺激分子选自OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3、STING或CD83配体的激动剂。在另一个实施例中，所述检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFRβ的抑制剂。

[0146] 本申请还披露了本文披露的抗体药物缀合物或药物组合物，用于作为药物使用。在一个实施例中，本文披露的抗体药物缀合物或药物组合物用于在有需要的患者中治疗或预防表达PMEL17的癌症或含有GNAQ或GNA11基因突变的癌症使用。

[0147] 在一个实施例中，本申请披露了如本文披露的抗体或其抗原结合片段、抗体药物缀合物、或药物组合物用于在有需要的患者中治疗或预防表达PMEL17的癌症的用途。

[0148] 在一个实施例中，本申请披露了如本文披露的抗体或其抗原结合片段、抗体药物缀合物、或药物组合物用于在有需要的患者中治疗或预防表达PMEL17的癌症或含有GNAQ或GNA11基因突变的癌症的用途。在一个实施例中，本申请披露了如本文披露的抗体或其抗原结合片段、抗体药物缀合物、或药物组合物在制造药物中的用途。

[0149] 在一个实施例中，所述癌症表达PMEL17或含有GNAQ或GNA11基因突变。在一个实施例中，所述癌症是葡萄膜黑色素瘤、皮下黑色素瘤、肝细胞癌、或其转移性癌。

[0150] 本申请还披露了核酸，所述核酸编码如本文披露的抗体或抗原结合片段。在一个实施例中，所述核酸包含SEQ ID NO:13、24、28、32、45、56、67、78、91、102、115、122、135、146、152、162、168、174、187、193、199、205、218、224、230、236、242、251、257、或26的核苷酸序列。本申请还披露了包含所述核酸的载体、和包含所述载体或核酸的宿主细胞。本申请还

披露了一种用于产生本文披露的抗体或抗原结合片段的方法,所述方法包括培养所述宿主细胞并且从细胞培养物回收所述抗体。在一个实施例中,从细胞培养物回收所述抗体的方法包括以下步骤:

[0151] a)回收细胞并且过滤所述培养物;

[0152] b)通过亲和色谱法纯化所述培养物;

[0153] c)通过将pH调整至3.4-3.6将所述培养物中的任何病毒灭活,然后将pH再调整至5.8-6.2并且过滤所述培养物;

[0154] d)通过阳离子交换色谱法纯化所述培养物并且对所述培养物进行柱上还原;

[0155] e)对所述培养物进行阴离子交换色谱法;

[0156] f)通过纳米过滤去除病毒;

[0157] g)过滤含有所述抗体的所述培养物;以及

[0158] h)获得经纯化的抗体。

[0159] 本申请还披露了用于产生抗PMEL17抗体药物缀合物的方法,所述方法包括:

[0160] (a)预先形成具有以下式(B)的接头-药物部分:

[0161] R^8-L_B-(D)$_n$ (B)

[0162] 其中:

[0163] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0164] R^8是反应性基团;

[0165] L_B是可裂解或不可裂解接头,并且

[0166] n是1、2、3或4;

[0167] (b)使用本文披露的用于产生抗体或抗原结合片段的方法,将所述接头-药物部分与从所述细胞培养物回收的抗体缀合以产生抗体药物缀合物;以及

[0168] (c)纯化所述抗体药物缀合物。

[0169] 本申请还披露了一种诊断试剂,所述诊断试剂包含如本文披露的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,将所述抗体或其抗原结合片段用放射标记、荧光团、发色团、成像剂或金属离子进行标记。

附图说明

[0170] 图1A-1B显示了GNAQ/11抑制剂化合物(A1)和化合物(A2)的体外抗UM活性的示例性数据。

[0171] 图2显示了GNAQ/11抑制剂化合物(A1)和化合物(A2)诱导葡萄膜黑色素瘤细胞凋亡的活性的示例性数据。

[0172] 图3A-3C显示了化合物(A1)和化合物(A2)对GNAQ/11抑制的示例性数据。化合物(A1)和化合物(A2)降低了92.1细胞中的IP1水平(图3A)和相对增殖(图3B)。用化合物(A1)和化合物(A2)处理的92.1细胞的免疫印迹显示ERK信号传导减少(图3C)。

[0173] 图4A-4D显示了化合物(A1)的代谢稳定性和PK特性的示例性数据。在24小时期间监测化合物(A1)的消失(图4A)以及开环形式化合物(A8)的出现(图4B)。除大鼠外,添加%剩余化合物(A1)和%形成的化合物(A8)显示24小时期间的化学计量(图4C)。在小鼠中静脉内给药后,化合物(A1)的PK的特征在于非常高的清除率和中至高的分布体积(图4D)。

[0174] 图5A＝5D显示了化合物(A1)和化合物(A2)的代谢稳定性和PK特性的示例性数据。在来自不同物种的血浆和血液中测试化合物(A2)的体外稳定性(图5A)。化合物(A2)在三种不同的系统中均显示出良好的化学稳定性(图5B)。在雌性balb/c小鼠中,化合物(A2)的PK表现出高清除率和短消除半衰期(图5C)。化合物(A1)和化合物(A2)在pH 5.6的缓冲液和在溶酶体中在4小时期间是稳定的(图5D)。

[0175] 图6A-6B显示了抗PMEL17-(B1)ADC的体外抗葡萄膜黑色素瘤活性的示例性数据。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)。

[0176] 图7显示了在葡萄膜黑色素瘤细胞中诱导细胞凋亡的抗PMEL17-(B1) ADC的示例性数据。数据表示为3次独立重复的平均值。

[0177] 图8A-8B显示了抗PMEL17-(B2)ADC和抗PMEL17 mAb的体外抗葡萄膜黑色素瘤活性的示例性数据。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)。

[0178] 图9显示了葡萄膜黑色素瘤细胞中抗PMEL17-(B1)和抗PMEL17-(B2)ADC对GNAQ/11抑制的示例性数据。IP1水平(nM)表示为3次独立重复的平均值。

[0179] 图10A-10D显示了抗PMEL17抗体与完整血小板和葡萄膜黑色素瘤细胞结合活性的示例性数据。

[0180] 图11A-11C显示了化合物(A1)和抗PMEL17-(B1)ADC对人血小板聚集的影响的示例性数据。

[0181] 图12A-12E显示了抗PMEL17-(B1)ADC的体内抗肿瘤活性的示例性数据。G1-(B1)以剂量依赖性方式抑制肿瘤生长(图12A)。值是平均值±SEM;样品量(n＝5-12只小鼠/组)。第0天的初始肿瘤体积约为200-250 mm^3。处理后长达14天未观察到体重减轻(图12B)。值是平均值±SEM;样品量(n＝4只小鼠/组)。G1-(B1)处理分别导致GNAQ信号传导抑制和肿瘤细胞增殖抑制,如pERK和Ki67水平降低所指示(图12C)。此外,与媒介物处理的和同种型对照3207-(B1)处理的小鼠相比,G1-(B1)诱导细胞凋亡,这与通过IgG染色检测到的G1-(B1)ADC的肿瘤细胞累积有关(图12C)。GNAQ抑制后未观察到MITF和PMEL17水平发生变化(图12C)。在长达7天的时间里,在G1-(B1)处理的小鼠中未观察到血小板聚集抑制(图12D和E)。

[0182] 图13A-13C显示了G1-(B1)ADC对葡萄膜黑色素瘤的肝和肺转移小鼠模型的影响的示例性数据。静脉注射92.1-荧光素酶细胞(就在开始处理之前)后第45天和治疗后12天(图13A和13B),呈现每只小鼠的单独图片;样品量(n＝6只小鼠/组)。在第0天肝转移的初始BLI约为2.8*109p/sec/cm2。黑色箭头表示图13B中的肺部肿瘤(生物发光信号)。在用20mg/kg G1-(B1)进行处理之前和之后,每周评估2-3次相应的体重调节(相对于第15天的%)(灰色圆圈)。图13C中的值为平均值±SEM;样品量(n＝5-6只小鼠/组)。第15天的初始体重约为21g。

[0183] 图14A-14E显示了G1-(B1)ADC的PK特性的示例性数据。G1-(B1)的药代动力学曲线(总IgG水平)显示裸鼠的剂量在7.5至30mg/kg之间时,暴露呈轻微超比例增加(图14A)。在携带肿瘤的小鼠中,给药靶结合G1-(B1)或同种型对照3207-(B1)后测量游离有效负载浓度。使用靶向ADC可以观察到化合物(A1)有效负载的肿瘤递送明显增加(>4倍)(图14B)。在小鼠体内显示出在与抗体缀合的同时化合物(A1)(空心圆圈)向其开环形式化合物(A8)(实心圆圈)的转化(图14C)。将两种不同的DAR2格式与G1-(B1)的DAR4格式以及与DAR4 Fc-沉默格式进行比较,体内功效研究中的暴露显示DAR2(E152C)和DAR4 Fc-沉默ADC的清除率最

低,而DAR2(S375C)暴露下降得更快(图14D)。图14E显示了3207(同种型对照抗体)-(B1)DAR4(E152C、S375C)和3207(同种型对照抗体)-(B1)DAR4 Fc-沉默缀合物随时间的浓度。

[0184] 图15A-15C显示了抗PMEL17-GNAQ/11i ADC在缓冲液、小鼠、大鼠和人血浆中的体外稳定性以及抗PMEL17-GNAQ/11i ADC在小鼠中的体内稳定性的示例性数据。

[0185] 图16A-16B显示了G1-E152C-DAR2-(B1)、G1-S375C-DAR2-(B1)、Fc-沉默G1-(B1)在葡萄膜黑色素瘤的异种移植物模型中的体内功效的示例性数据。值代表平均值±SEM;样品量(n=5-6只小鼠/组)。第0天的初始肿瘤体积约为300-325 $_{mm}^{3}$。

[0186] 图17A-17B显示了抗PMEL17-(B1)ADC的体外抗葡萄膜黑色素瘤活性的示例性数据。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)。

[0187] 图18显示了抗PMEL17-(B1)ADC的体内抗肿瘤活性的示例性数据。

[0188] 图19A-19B显示了来自转移性葡萄膜黑色素瘤患者的肿瘤活检的免疫组织化学分析的示例性数据。

[0189] 图20A-20C显示了示例性传感图数据以评估抗PMEL抗体的表位分级(epitope binning)。图20A示出了结合步骤。图20B示出了当抗体G13J LC首先被固定并且17A9流过时的传感图。图20C显示了17A9首先被固定且G13J LC流过时的传感图。在两种情况下,当第二抗体流过时都观察到结合,这表明G13J LC和17A9结合人PMEL的不同表位。

具体实施方式

[0190] 定义

[0191] 除非另外声明,否则如本文所用以下术语和短语意在具有以下意思:

[0192] 术语“烷基”是指具有指定碳原子数目的单价饱和烃链。例如,C_1-C_6烷基是指具有从1至6个碳原子的烷基基团。烷基基团可以是直链的或支链的。代表性的支链烷基基团具有一个、两个或三个分支。烷基基团的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基(正丙基和异丙基)、丁基(正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基)、戊基(正戊基、异戊基和新戊基)以及己基。

[0193] 如本文所用,“可裂解的”是指通过共价连接来连接两个部分,但是在生理学相关条件下分解以切断部分之间的共价连接的连接基团或接头组分,典型地,与在细胞外环境时相比可裂解的连接基团在细胞内环境内更快速地体内切断,导致有效负载的释放优先发生在靶细胞内。裂解可以是酶促的或非酶促的,但通常从抗体释放有效负载而不降解抗体。裂解可以留下附接基团或接头组分的一些部分附接至有效负载上,或者它可以释放不具有附接基团的任何残基的有效负载。

[0194] 如本文所用,“不可裂解的”是指在生理条件下不特别易于分解的连接基团或接头基团,例如,它至少与缀合物的抗体或抗原结合片段部分一样稳定。此类连接基团有时被称为“稳定的”,这意味着它们足以抵抗降解以保持有效负载与抗体或抗原结合片段连接,直到抗体或抗原结合片段本身至少部分降解,即,抗体或抗原结合片段的降解在体内裂解连接基团之前。具有稳定或不可裂解的附接基团的ADC的抗体部分的降解可以留下附接基团的一些或全部(例如,来自抗体的一个或多个氨基酸基团)附接至递送在体内的有效负载或药物部分上。

[0195] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白家族的多肽,所述多肽能够非共价、可逆并以特异性方式结合相应的抗原。例如,天然存在的IgG抗体是包含通过二硫键相互连接的

至少两条重(H)链和两条轻(L)链的四聚体。每条重链由重链可变区(本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH和VL区可进一步细分为高变区,称为互补性决定区(CDR),其间穿插有称为框架区(FR)的较保守区。每个VH和VL由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。所述抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(Clq))的结合。

[0196] 术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和抗独特型(抗Id)抗体(包括例如针对本发明抗体的抗Id抗体)。抗体可以属于任何同种型/类别(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0197] “互补性决定结构域”或“互补决定区”(“CDR”)可互换地是指VL和VH的高变区。CDR是抗体链的靶蛋白结合位点,所述结合位点携带针对这种靶蛋白的特异性。每种人VL或VH中存在三个CDR(CDR1-3,从N末端顺序编号),构成约15%-20%的可变结构域。CDR在结构上与靶蛋白的表位互补并因此直接负责结合特异性。剩余的VL或VH区段(所谓的框架区)表现出较少的氨基酸序列变异(Kuby,Immunology[免疫学],第4版,第4章,弗里曼出版公司(W.H.Freeman&Co.),纽约,2000)。

[0198] CDR和框架区的位置可以使用本领域熟知的多种定义确定,例如,卡巴特(Kabat)、乔西亚(Chothia)、国际免疫遗传学数据库(IMGT)(在互联网以下网址:www.imgt.org/)和AbM(参见例如,Johnson等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究],29:205-206(2001);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901-917(1987);Chothia等人,Naturc[自然],342:877-883(1989);Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],227:799-817(1992);Al-Lazikani等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],273:927-748(1997))。抗原结合位点的定义还在以下文献中描述:Ruiz等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究],28:219-221(2000);和Lefranc,M.P.,Nucleic Acids Res.[核酸研究],29:207-209(2001);MacCallum等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],262:732-745(1996);和Martin等人,Proe.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],86:9268-9272(1989);Martin等人,Methods Enzymol.[酶学方法],203:121-153(1991);和Rees等人,于:Sternberg M.J.E.(编辑),Protein Structure Prediction[蛋白结构预测],Oxford Univcrsity Press[牛津大学出版社],Oxford[牛津],141-172(1996)。

[0199] 将轻链和重链二者分成结构同源性区和功能同源性区。所述术语“恒定”和“可变”是在功能上使用。在这点上,应当理解轻链(VL)和重链(VH)部分的可变结构域均决定抗原识别和特异性。相反地,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要生物学特性例如分泌、经胎盘移动性(transplacentalmobility)、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域离抗体的抗原结合位点或者氨基末端越远,它的编号越大。N末端是可变区并且在C末端是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基末端结构域。

[0200] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指抗体的一个或多个部分,所述一个或多个部分保留与抗原的表位特异性地相互作用(例如,通过结合、空间位阻、稳定/去稳定、空间分布)的能力。结合片段的实例包括但不限于单链Fv(scFv)、骆驼抗体、二硫键连接的Fv

(sdFv)、Fab片段、F(ab')片段,一种由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab)2片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,Nature[自然]341:544-546,1989);和分离的互补性决定区(CDR)、或抗体的其他表位结合片段。

[0201] 此外,虽然F_v片段的两个结构域VL和VH是由单独的基因编码的,但是可以使用重组方法将这两个结构域通过能够使它们形成为单条蛋白质链的合成接头来相连,其中VL区和VH区配对形成单价分子(被称为单链Fv("scFv");参见例如,Bird等人,Science[科学]242:423-426,1988;和Huston等人Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]85:5879-5883,1988)。术语"抗原结合片段"也意在涵盖此类单链抗体。所述抗原结合片段是使用本领域的技术人员已知的常规技术获得的,并且以与完整抗体相同的方式针对效用来筛选所述片段。

[0202] 抗原结合片段还可以掺入到单结构域抗体、大型抗体(maxibodies)、微型抗体(minibodies)、单结构域抗体、细胞内抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体、v-NAR和bis-scFv中(参见例如,Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology[自然生物技术]23:1126-1136,2005)。可以将抗原结合片段移植到基于多肽如III型纤连蛋白(Fn3)的支架中(参见美国专利号6,703,199,所述专利描述了纤连蛋白多肽单体)。

[0203] 可以将抗原结合片段掺入到包含一对串联F_v区段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,Protein Eng.[蛋白质工程]8:1057-1062,1995;和美国专利号5,641,870)。

[0204] 如本文所用,术语"单克隆抗体"或"单克隆抗体组合物"是指具有基本上相同的氨基酸序列或衍生自相同遗传源的多肽,包括抗体和抗原结合片段等。此术语还包括具有单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0205] 如本文所用,术语"人抗体"包括具有可变区的抗体,其中框架和CDR区均衍生自人源序列。此外,如果抗体含有恒定区,则恒定区也衍生自此类人序列,例如人种系序列,或人种系序列的突变形式或含有衍生自人框架序列分析的共有框架序列的抗体,例如如Knappik等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]296:57-86,2000中所述。还包括衍生自人序列的抗体,其中已经为了亲和力成熟或出于制造/有效负载缀合目的突变一个或多个CDR。参见Kilpatrick等人,"Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS[使用RIMMS进行的亲和成熟单克隆抗体的快速开发],"Hybridoma[杂交瘤].1997年8月;16(4):381-9。

[0206] 本发明的人抗体可以包括不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过在体外随机诱变或位点特异性诱变、或通过在体内体细胞突变、或保守取代来引入突变以促进稳定性或生产)。

[0207] 如本文所用,术语"识别"是指发现其表位并与之相互作用(例如,结合)的抗体或其抗原结合片段,无论该表位是否为线性或构象的。术语"表位"是指抗原上与本发明的抗体或抗原结合片段特异性结合的位点。表位可以从连续氨基酸或因蛋白质的立体折叠而并置的非连续氨基酸中形成。从连续氨基酸形成的表位一般在暴露于变性溶剂时保留,而因

立体折叠形成的表位用变性溶剂处理时一般丧失。表位典型地包含至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13,14或15个处于独特空间构象的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术,例如,x射线结晶学和二维核磁共振(参见,例如Epitope Mapping Protocols inMethods in Molecular Biology[分子生物学中的方法中的表位映射协议],第66卷,G.E.Morris编辑(1996))。

[0208] 如本文所用,术语“亲和力”是指抗体与抗原之间在单个抗原位点处相互作用的强度。在每个抗原位点内,抗体“臂”的可变区通过弱非共价力在许多位点处与抗原相互作用;相互作用越多,亲和力越强。

[0209] 术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。然而,特异性结合一种抗原的分离的抗体可以对其他抗原具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学品。

[0210] 术语“相应的人种系序列”是指编码人可变区氨基酸序列或子序列的核酸序列,与由人种系免疫球蛋白可变区序列编码的其他全部可变区氨基酸序列相比,所述人可变区氨基酸序列或子序列与参考可变区氨基酸序列或子序列共有确定的最高氨基酸序列同一性。相应的人种系序列还可以是指与全部其他评价的可变区氨基酸序列相比,与参考可变区氨基酸序列或子序列具有最高氨基酸序列同一性的人可变区氨基酸序列或子序列。相应的人种系序列可以仅是框架区、仅是互补性决定区、是框架区和互补性决定区、可变区段(如上文所定义),或包含可变区的序列或子序列的其他组合。可以使用本文所述的方法,例如,使用BLAST、ALIGN或本领域已知的另一种比对算法比对两个序列,确定序列同一性。相应的人种系核酸或氨基酸序列可以与参考可变区核酸或氨基酸序列具有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。可以例如通过可公开获得的国际免疫遗传学数据库(IMGT)(在互联网上以下网址:www.imgt.org/)和V-碱基(在互联网上以下网址:vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk),确定相应的人种系序列。

[0211] 在描述抗原(例如,蛋白质)与抗体、抗体片段或抗体衍生的结合剂之间相互作用的语境中使用时,短语“特异性结合”或“选择性结合”是指确定抗原在蛋白质异质群体和其他生物制品中例如在生物样品(例如,血液、血清、血浆或组织样品)中存在的结合反应。因此,在某些指明的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合剂与特定抗原的结合至少两倍于背景并且所述抗体或结合剂基本上不以显著的量与样品中存在的其他抗原结合。在一个实施例中,在指明的免疫测定条件下,具有特定结合特异性的抗体或结合剂与特定抗原的结合至少十(10)倍于背景并且所述抗体或结合剂基本上不以显著的量与样品中存在的其他抗原结合。在此类条件下与抗体或结合剂特异性结合可能需要已经就其针对特定蛋白质的特异性选择的抗体或结合剂。如果需要或适当,可以通过扣除与来自其他物种(例如,小鼠或大鼠)或其他亚型的分子交叉反应的抗体,实现这种选择。可替代地,在一些实施例中,选择与某些所期望分子交叉反应的抗体或抗体片段。

[0212] 多种免疫测定方式可以用来选择与特定蛋白特异性免疫反应的抗体。例如,固相ELISA免疫测定常规地用来选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(关于可以用来确定特异免疫反应性的免疫测定方式和条件的描述,参见例如Harlow和Lane,Using Antibodies,A Laboratory Manual[使用抗体:实验室手册](1998))。典型地,特异性或选择性结合反应将产生高于背景信号至少2倍和更典型地高于背景至少10至100倍的信号。

[0213] 术语“平衡解离常数(KD,M)”是指解离速率常数(kd,时间-1)除以缔合速率常数(ka,时间-1,M-1)。可以使用本领域的任何已知方法,测量平衡解离常数。本发明的抗体通常将具有小于约10^{-7}或10^{-8}M,例如,小于约10^{-9}M或10^{-10}M,在一些实施例中,小于约10^{-11}M、10^{-12}M或10^{-13}M的平衡解离常数。

[0214] 术语“生物利用率”是指施用至患者的给定量的药物的全身性利用率(即,血液/血浆水平)。生物利用率是一个绝对术语,所述绝对术语指示从所施用剂型到达总循环的药物时间(速率)和总量(程度)的度量。

[0215] 如本文所用,短语“基本上由.....组成”是指方法或组合物中所包含的活性药剂以及对所述方法或组合物的预期目的而言无活性的任何赋形剂的类属或物种。在一些实施例中,短语“基本上由.....组成”明确排除包含除本发明的抗体药物缀合物之外的一种或多种另外的活性剂。在一些实施例中,短语“基本上由.....组成”明确地排除了包含除本发明的抗体药物缀合物和第二共同施用的药剂之外的一种或多种另外的活性剂。

[0216] 术语“氨基酸”是指天然存在的、合成的和非天然的氨基酸,以及以类似于天然存在氨基酸的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-邻磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构(即与氢、羧基基团、氨基基团和R基团结合的α-碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有经修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有如下结构的化合物,所述结构与氨基酸的一般化学结构不同但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用。

[0217] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列二者。对于特定核酸序列,经保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者在所述核酸不编码氨基酸序列的情况下,是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指定丙氨酸的每个位置,所述密码子可以改变为任何所述的相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是经保守修饰变异中的一种。本文编码多肽的每个核酸序列也描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员应认识到,核酸中的每个密码子(除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG)均可以被修饰以产生功能上相同的分子。因此,在每个所述序列中均隐含了编码多肽的核酸的每一种沉默变异。

[0218] 对于多肽序列,“保守修饰的变体”包括对多肽序列的单独取代、缺失或添加,它们导致某个氨基酸取代为化学上相似的氨基酸。提供在功能上相似的氨基酸的保守取代表在本领域是熟知的。此类保守修饰的变体是对本发明的多态变体、种间同源物和等位基因的补充,并且不排除所述多态变体、种间同源物和等位基因。以下8组含有互为保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如,Creighton,Proteins[蛋白质](1984))。在一些实施例中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0219] 如本文所用,术语“优化的”是指已经改变核苷酸序列以使用在生产性细胞或生物体(通常是真核细胞,例如酵母细胞、毕赤酵母属(Pichia)细胞、真菌细胞、木霉属(Trichoderma)细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞)中为优选的密码子编码氨基酸序列。优化的核苷酸序列被工程化以完全或尽可能多地保留最初由起始核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述起始核苷酸序列也称为“亲代”序列。

[0220] 在两个或更多个核酸序列或多肽序列的语境中,术语“相同百分比”或“同一性百分比”是指两个或更多个序列或子序列相同的程度。如果两个序列在正在比较的区域上具有相同的氨基酸序列或核苷酸序列,则它们是“相同的”。当在比较窗口或指定区域内进行比较和比对以寻求使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的最大对应时,如果两个序列具有规定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在规定区域上或当没有规定时则在整个序列上,60%同一性,任选65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),则两个序列是“基本上相同的”。任选地,同一性存在于长度为至少约30个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地在长度为100至500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域上。

[0221] 对于序列比较,典型地一个序列充当参考序列,将测试序列与该参考序列比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入到计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数,或者可以指定替代参数。然后,序列比较算法将基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0222] 如本文所用,“比较窗”包括提及选自由20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150组成的组的多个邻接位置中的任何一个的区段,其中在两个序列最佳比对后,可以将序列与相同数量的邻接位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域中是熟知的。例如通过Smith和Waterman Adv.Appl.Math.[应用数学进展]2:482c(1970)的局部同源性算法,通过Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.[分子生物学期刊]48:443(1970)的同源性比对算法,通过Pearson和Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:2444(1988)的相似性方法研究,通过这些算法(威斯康星州麦迪逊的科学大道575号遗传学计算机小组(Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,WI)的威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA、和TFASTA)的计算机实现,或通过手动比对和目测检查(参见例如,Brent等人,Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验指南],2003),可以进行用于比较的序列的最佳比对。

[0223] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,它们分别描述于Altschul等人,Nuc.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402,1977;和Altschul等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410,1990。用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Centerfor Biotechnology Information)公开地获得。此算法包括首先通过鉴定查询序列中长度为W的短字来鉴定高评分序列对(HSP),当与数据库序列中的相同长度的字比对时,所述长度为W的短字匹配或满足一些正值阈值得分T。T被称为邻域字得分阈值(Altschul等人,同上)。这些最初的邻域字命中点作为种子,用于启动搜索以找到包含它们的更长的HSP。字命中点沿着每个序列在两个方向上扩展,远至可以增加累积比对得分。对于核苷酸序列,使用参数M(一对匹配残基的奖励得分;总是>0)和N(错配残基的罚分;总是<0)计算累积得分。对于氨基酸序列,使用

评分矩阵来计算累积得分。当出现以下情形时,字命中点向各方向的延伸终止:累积比对得分从其最大获得值跌落数量X;由于一个或多个负评分残基比对的累积,累积得分走向零或更低;或到达任一序列的一端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)11、期望值(E)10、M=5、N=-4和两条链比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长3和期望值(E)10以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:10915)比对(B)50、期望值(E)10、M=5、N=-4和两条链比较作为默认值。

[0224] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如,Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:5873-5787,1993)。由BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2、更优选地小于约0.01、最优选地小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0225] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比也可以使用已并入ALIGN程序(2.0版)中的E.Meyers和W.Miller,Comput.Appl.Biosci.[计算机应用生物科学],4:11-17(1988)的算法,利用PAM120权重残基表、空位长度罚分12、空位罚分4来确定。此外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用已经并入GCG软件包中的GAP程序(可从www.gcg.com获得)中的Needleman和Wunsch,J.Mol,Biol.[分子生物学杂志]48:444-453,(1970)算法,利用BLOSUM62矩阵或PAM250矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4以及长度权重1、2、3、4、5或6来确定。

[0226] 除了上述序列同一性百分比之外,两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体进行免疫交叉反应,如下所述。因此,多肽典型地与第二多肽基本上相同,例如其中两种肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或它们的补体在严格条件下彼此杂交,如下所述。两个核酸序列基本上相同的又另一个指示是可使用相同的引物来扩增序列。

[0227] 所述术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用,并且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或连接的核酸,所述核酸是合成的、天然存在的和非天然存在的,具有与参考核酸相似的结合特性,并且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性-甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0228] 除非另有说明,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、和互补序列以及明确指明的序列。具体地,如下文详述,简并密码子取代可以通过产生如下序列而实现,在这些序列中,一个或多个所选择的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,(1991)Nucleic Acid Res.[核酸研究]19:5081;Ohtsuka等人,(1985)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]260:2605-2608;和Rossolini等人,(1994)Mol.Cell.Probes[分子与细胞探针]8:91-98)。

[0229] 术语“可操作地连接”在核酸的语境中是指两个或更多个多核苷酸(例如,DNA)区段之间的功能性关系。典型地,它是指转录调节序列与已转录序列的功能性关系。例如,如果启动子或增强子序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,

则所述启动子或增强子序列可操作地连接至编码序列。通常,与转录序列可操作地连接的启动子转录调节序列与转录序列在物理上邻接,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调控序列如增强子不需要在物理上邻接或位于极为接近这些转录调控序列增强其转录的编码序列的位置。

[0230] 所述术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另外说明,否则特定的多肽序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体。

[0231] 如本文所用,术语“抗体药物缀合物”或“免疫缀合物”是指抗体或其抗原结合片段与另一种药剂如化学治疗剂、毒素、免疫治疗剂、成像探针等连接。所述连接可以是共价键或非共价相互作用,如借助静电力。可以采用本领域已知的多种接头以形成抗体药物缀合物。另外,可以将抗体药物缀合物以可能是从编码免疫缀合物的多核苷酸表达的融合蛋白的形式提供。如本文所用,“融合蛋白”是指通过连接最初编码分离的蛋白质(包括肽和多肽)的两个或更多个基因或基因片段产生的蛋白质。融合基因的翻译产生具有从每种原始蛋白质衍生的功能特性的单一蛋白。

[0232] 所述术语“受试者”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物如非人类灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非指出时,否则所述术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。

[0233] 如本文所用,术语“细胞毒素”或“细胞毒性剂”是指对细胞的生长和增殖有害并可以发挥作用以减少、抑制或摧毁细胞或恶性肿瘤的任何药剂。

[0234] 如本文所用,术语“抗癌剂”是指可以用来治疗或预防细胞增殖性障碍如癌症的任何药剂,包括但不限于细胞毒性剂、化学治疗剂、放射疗法和放射治疗剂、靶向抗癌剂和免疫治疗剂。

[0235] 如本文所用,术语“药物部分”或“有效负载”是指与本发明的抗体或抗原结合片段缀合的化学部分,并且可包括任何治疗剂或诊断剂,例如抗癌剂、抗炎剂、抗感染剂(例如,抗真菌剂、抗细菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂)或麻醉剂。例如,药物部分可以是抗癌剂,如细胞毒素。在某些实施例中,药物部分是靶向抑制剂化合物。此外,有效负载可以是生物物理探针、荧光团、自旋标记、红外探针、亲和探针、螯合剂、光谱探针、放射性探针、脂质分子、聚乙二醇、聚合物、自旋标记、DNA、RNA、蛋白质、肽、表面、抗体、抗体片段、纳米粒子、量子点、脂质体、PLGA粒子、糖或多糖。

[0236] 在一些实施例中,所述药物部分或有效负载是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。在一些实施例中,GNAQ/11抑制剂是抑制GNAQ/11介导的IP3产生和/或在依赖于GNAQ/11信号传导的细胞(即GNAQ/11突变型葡萄膜黑色素瘤细胞)中表现出剂量应答抗增殖作用的分子。在一些实施例中,GNAQ/11抑制剂是将GNAQ/11稳定在非活性GDP结合状态并防止GDP释放或者与活性GTP结合状态结合并防止GNAQ/11与下游效应子相互作用的化合物。在一些实施例中,GNAQ/11抑制剂通过抑制突变型GNAQ和/或GNA11(例如包含Q209L/P突变的GNAQ和/或GNA11)起作用。与本领域已知的方法一起,本披露中给出了将此类药物部分附接至与靶向部分相容的接头的方法。例如参见,Singh等人,(2009)Therapeutic Antibodies:Methods and Protocols[治疗性抗体:方法和方案],第

525卷,445-457。

[0237] GNAQ(鸟嘌呤核苷酸结合蛋白G(q)亚基α,也称为CMC1、G-α-q、GAQ、SWS和G蛋白亚基αq)和GNA11(鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基α-11,也称为FBH、FBH2、FHH2、GNA-11、HHC2、HYPOC2、和G蛋白亚基α11)是密切相关的GTP酶,它们构成在G蛋白偶联受体(GPCR)下游起作用的异三聚G蛋白的α亚基。α亚基可作为通过将鸟苷二磷酸(GDP)交换为鸟苷三磷酸(GTP)激活G蛋白的开关,从而激活不同的下游效应子。当GTP水解为GDP时,激活会被固有的GTP酶活性终止(Van Raamsdonk等人,2010,N Engl J Med.[新英格兰医学杂志];363(23):2191-9)。Gq蛋白级联的经典激活是经由磷脂酶C-β(PLC-β)发生的,所述PLC-β水解磷脂磷脂酰肌醇4,5-二磷酸酯,以释放出两个有效的第二信使:D-肌醇1,4,5-三磷酸酯(IP3)和二酰基甘油(DAG)。随着细胞内$Ca2^{+}$的瞬时增加,IP3迅速转化为IP2、IP1和肌醇。另一方面,DAG激活蛋白激酶C(PKC),导致一系列的RAF、MEK和ERK磷酸化,所述PKC易位至细胞核以调节细胞增殖和存活(Krantz等人,2017,Clin Ophthalmol.[临床眼科学];11:279-289)。

[0238] 人GNAQ的核酸和氨基酸序列已以以下登录号公布于GenBank中:

[0239] NP_002063(SEQ ID NO:268)

[0240]
1 mtlesimacc lseeakearr indeierqlr rdkrdarrel kllllgtges gkstfikqmr

61 iihgsgysde dkrgftklvy qniftamqam iramdtlkip ykyehnkaha qlvrevdvek

121 vsafenpyvd aikslwndpg iqecydrrre yqlsdstkyy lndldrvadp aylptqqdvl

181 rvrvpttgii eypfdlqsvi frmvdvggqr serrkwihcf envtsimflv alseydqvlv

241 esdnenrmee skalfrtiit ypwfqnssvi lflnkkdlle ekimyshlvd yfpeydgpqr

301 daqaarefil kmfvdlnpds dkiiyshftc atdtenirfv faavkdtilq lnlkeynlv

[0241] NM_002072(SEQ ID NO:269)

[0242]
1 agactatccg ctcccaccgc gccccggcc cacctggtgg ccccggccct ggccgccgcc

61 cccgcggcgg ttcccggagc tcgtcccgga cgcgcgcccg ggcggcgggg gctcggcggc

121 caccgctgcc tcgggggagc gagggcggga gggtgtgtgt gcgcgctgtg agcaggggggt

181 gccggcgggg ctgcagcgga ggcactttgg aagaatgact ctggagtcca tcatggcgtg

241 ctgcctgagc gaggaggcca aggaagcccg gcggatcaac gacgagatcg agcggcagct

301 ccgcagggac aagcgggacg cccgccggga gctcaagctg ctgctgctcg ggacaggaga

361 gagtggcaag agtacgttta tcaagcagat gagaatcatc catgggtcag gatactctga

421 tgaagataaa aggggcttca ccaagctggt gtatcagaac atcttcacgg ccatgcaggc

481 catgatcaga gccatggaca cactcaagat cccatacaag tatgagcaca ataaggctca

541 tgcacaatta gttcgagaag ttgatgtgga gaaggtgtct gcttttgaga atccatatgt

601 agatgcaata aagagtttat ggaatgatcc tggaatccag gaatgctatg atagacgacg

661 agaatatcaa ttatctgact ctaccaaata ctatcttaat gacttggacc gcgtagctga

721 ccctgcctac ctgcctacgc aacaagatgt gcttagagtt cgagtcccca ccacagggat

781 catcgaatac ccctttgact tacaaagtgt cattttcaga atggtcgatg taggggggcca

841 aaggtcagag agaagaaaat ggatacactg ctttgaaaat gtcacctcta tcatgtttct

901 agtagcgctt agtgaatatg atcaagttct cgtggagtca gacaatgaga accgaatgga

[0243]

961 ggaaagcaag gctctcttta gaacaattat cacatacccc tggttccaga actcctcggt

1021 tattctgttc ttaaacaaga aagatcttct agaggagaaa atcatgtatt cccatctagt

1081 cgactacttc ccagaatatg atggacccca gagagatgcc caggcagccc gagaattcat

1141 tctgaagatg ttcgtggacc tgaacccaga cagtgacaaa attatctact cccacttcac

1201 gtgcgccaca gacaccgaga atatccgctt tgtctttgct gccgtcaagg acaccatcct

1261 ccagttgaac ctgaaggagt acaatctggt ctaattgtgc ctcctagaca cccgccctgc

1321 ccttccctgg tgggctattg aagatacaca agagggactg tatttctgtg gaaaacaatt

1381 tgcataatac taatttattg ccgtcctgga ctctgtgtga gcgtgtccac agagtttgta

1441 gtaaatatta tgattttatt taaactattc agaggaaaaa cagaggatgc tgaagtacag

1501 tcccagcaca tttcctctct atctttttt taggcaaaac cttgtgactc agtgtatttt

1561 aaattctcag tcatgcactc acaaagataa gacttgtttc tttctgtctc tctctctttt

1621 tcttttctat ggagcaaaac aaagctgatt tccctttttt cttccccccgc taattcatac

1681 ctccctcctg atgtttttcc caggttacaa tggcctttat cctagttcca ttcttggtca

1741 agtttttctc tcaaatgata cagtcaggac acatcgttcg atttaagcca tcatcagctt

[0244]

1801 aatttaagtt tgtagttttt gctgaaggat tatatgtatt aatacttacg gttttaaatg

1861 tgttgctttg gatacacaca tagtttcttt tttaatagaa tatactgtct tgtctcactt

1921 tggactggga cagtggatgc ccatctaaaa gttaagtgtc atttctttta gatgtttacc

1981 ttcagccata gcttgattgc tcagagaaat atgcagaagg caggatcaaa gacacacagg

2041 agtcctttct tttgaaatgc cacgtgccat tgtctttcct cccttctttg cttctttttc

2101 ttaccctctc tttcaattgc agatgccaaa aaagatgcca acagacacta cattacccta

2161 atggctgcta cccagaacct ttttataggt tgttcttaat ttttttgttg ttgttgttca

2221 agcttttcct ttctttttt tcttggtgtt tgggccacga ttttaaaatg acttttatta

2281 tgggtatgtg ttgccaaagc tggctttttg tcaaataaaa tgaatacgaa cttaaaaaat

2341 aaaagctggt atcttaaaat gtaagagagt aagactgtga agcctaaaat gactggctga

2401 gaatgaacca gaaatgccat ttgccaaaca gttgtaacta gaaatttgat tctcacggtc

2461 cattcttttc tttgtcctta agatgacatt gttagtgttc acgtcccatg ttcagtgtcc

2521 aaaccggcaa tgtaaaaagt atcctgtgtg gtttaacagg aaatctgttt atgtctcttt

2581 atttgaaacc agttttactc tcagtggttc tttaagttca atgaagtctg ccaggaacat

2641 tggttggtag tattattccg acacctttaa tttccaaaat ctgaagttcc tgctagttta

2701 ccaccttcat gatcttcttg aactggtaac tgattaggtt gaacttatgg aagatttgtg

2761 gacttaactc aaaagtaacc tctcagtgtt ctatagaaca tgtatttgtg taactgaacc

2821 taccaggaga aatgtttgga attctatatg tgcaattttt caacaaatgc aaaaaaaata

2881 cagcacatgt attgacaagc ttctgtcaag cagcttgagt tgaaatttga tttaagaaaa

2941 taaatcatga ttgttcaaag ctgctgggac gttagaatta ggccatgata ctggtctcat

3001 tttaactaca gtggtatttg gcactagtgt aaacttccat ataaatcact cttttggaac

3061 aacaaagggg gagggagaaa aatcacggcc tgttaaatga gtaccaaagc cgcccaacag

3121 taatgagatg ttctcatcct tgattctccc agcctcaaac aacacagctt actttttttt

3181 tcccttgctc agaaagtacc tgtaatttaa caaacagact gcctgtaggt atagtgcaat

3241 tacaaatgct ctaatcattg tacatacatc tctcttgata ttgcagcatc catactggct

3301 ttgtaatcat taatttttg gcagattgaa tgtgctgtat tgatatgtat ctatgtaatt

3361 gtattgtatg tctatagcta attcacgttt tgaataatgt tattttattt actttttaa

3421 gagaggagaa tgtaaatttg tcagtttatt tctgactagg gatattttct ttccatttag

3481 aaaagaagaa aaaaaaaaaa ccttactgtc atacagagcg gtactagcgt cgtgctgtat

3541 aaaatcattt gcacattcct gagtagaggt atactgatta taagacccaa aggtaatttc

3601 atagcaaaat acataaaatc agtcggagct tttatacaaa catggaaacc aactttgtag

3661 aacttttgcc atttgatcta ggattggaat atgagctttt atacaattca tattcttatt

3721 tggcaaatgc acagtttagt attacctctc tgatggcctt tactagaaag gcagttttag

3781 aagctattgt gatccactaa ggaaatgttt taacagctag agaccactgc ttgcctgaaa

3841 gggcgttctt aaatttggtg cagcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ttaaacaaca

3901 acatttgaag gcctacagtg tgtatagaga aaacctcatc acaagatcat aagtgttaca

3961 gttttaggga atcaagatat tctatttaat agagctatag taaatgtagt caattaaacc

4021 tgatctcaaa gcttgaagaa gctgagcaaa acagggaaag attgttatat ttgtctttat

4081 gaaattggga tggaatttgc tatgcagaat tgaggtttgt ggcttcgctg ttcctgtagg

4141 gtgcatgaca agatcccttc tcttgagaaa ggaaaaaatt gatcacccta gcagcagtga

4201 tgcatagaaa cctaatttta gccacaccag tcaatcgaag ctaaaggatt ttctttttg

4261 tttcttcggg gttttattga aggggctagg ggcgggacgg gattcttttc agttttgtat

[0245]

4321 aaaaacaaag tttactcatg ctttatatta tattgtgatt gcaagcgtta taagcgtgtg

4381 ccactggcct cctattgttg atgcttaggt aatggaggcc tgtggtgagt tttatggtga

4441 cttgggcatg tcttattcaa aaacaaaaac ataaaacaca gaaacctttc ttcagcatac

4501 caaggcaagc agccatttca tgactcactt aacacattgc agtgtaccag tttacagatg

4561 atttttccct ttttgcgtga catggcagtt ctaaccccca gagaattcct tatttgtaaa

4621 ttggaagttt ctactatgcc ttacagagct taaattcaga agtttgtgcc tcatatctga

4681 aacaaaggga aataacacac ccattcaaaa gtaaataaat ctcctagaag tttttgtttt

4741 taacatttcc atataaagag ctctgttgaa tgtcatgaat agactggaaa aaaaaatttt

4801 aagaacctgc atatgttgtt tactagcaga tgacaactac aaaaggaatc tgaagaacac

4861 gtaaaacttg tatttttttt tttttggtag attaactagc aggcctattt taaaaaggta

4921 attcagctaa agggcaattt actttttgt acttcagact atcttgattg tcaaagtgta

4981 cgaactgtaa ttttaaaatt tatactgcca catgattgta aattttagtt gtcttaagtt

5041 aggaattggt gaaaagctat ttatgctgga tttgggtcaa aatgacttat ttgcaaaaaa

5101 ataaataatg ggaagaaagg gctgtataat gaaatactgc aagactcaca tattggttgg

5161 aaatttccct caaatcacct accgattacc cttgatttcc ctttgttttc agtttctcaa

5221 aacgaatgaa atgaaatata gcagaatgtt aacccatata aaaataaagt gtacccaaat

5281 attgtaatgt atattgctgc tcttcttcaa attaaataag ggtttaaaac cacttaattg

5341 gtaatcaaca tctcaattga tacaaataag gtgtgcttgg tatacattaa tattttcttc

5401 caaagatata tctttggtta gaaacacaaa aaaataaaac tagtaatatt gtatgtttat

5461 ctatctctac atatttccag catatgtagc gttaatagat ctgtcctggt aactgtgtct

5521 ttgggatttc attttggttc catcaaatta ggaaaagaaa tggcttagtt gtatatgatt

5581 agctagagat ttttggagcc agacacctgc tgtttagtag ataacttagt acagacccta

5641 aacttgtcat ttgtttttct cacagaatag ccatttcctg ctgtcttccc aatgatcact

5701 gcccttttcaa taacactctt gcctctagaa tcatatgttc aaagtatgaa tacacaccta

[0246]

5761 gcacatagta ggtgctcaaa tattaatttc ctccttgcct tccttatcta ccctgtgtcc

5821 tccatttccc cgtatgattc caacccaata tagcaaatga catttacatg ttatgaaaac

5881 atctattggg taaaatcaga tcttggataa agaaattctg acttttatat aagcttttgg

5941 tagacagaaa aaacagaaag gtattcgttg gtagaacatt tttaagttca ggaaagaaag

6001 ctggaataat actacgtaac tttgtccagg ttactttgac tgaaacacgt ttttggtgga

6061 tttcttttcc tcaaagaact ctctaaatgc aactccttgc tggattcctc acccatcatc

6121 ctgttggaaa cccttactag acctatgtat ttagggagtt ttgtcagaaa acatttttaa

6181 cttgcagtat ttaaaagaat atttactgtt cctaaaatgt cattcaaatg catgtactgt

6241 ctattgtttg gggatgggaa ctagttttgc aaaaaacacc taatgttgta taataatgcc

6301 ccaatgatct tgctggttaa aaatacagta tttttggcca taa

[0247] 人GNA11的核酸和氨基酸序列已以以下登录号公布于GenBank中：

NP_002058（SEQ ID NO: 270）

1 mtlesmmacc lsdevkeskr inaeiekqlr rdkrdarrel kllllgtges gkstfikqmr

61 iihgagysee dkrgftklvy qniftamqam irametlkil ykyeqnkana llirevdvek

[0248] 121 vttfehqyvs aiktlwedpg iqecydrrre yqlsdsakyy ltdvdriatl gylptqqdvl

181 rvrvpttgii eypfdlenii frmvdvggqr serrkwihcf envtsimflv alseydqvlv

241 esdnenrmee skalfrtiit ypwfqnssvi lflnkkdlle dkilyshlvd yfpefdgpqr

301 daqaarefil kmfvdlnpds dkiiyshftc atdtenirfv faavkdtilq lnlkeynlv

[0249] NM_002067δSEQ ID NO:271ε

1 aggttgtccg gcgctgtcgc tcggttgcgg cggctgcggt tggcggtggc tgcggcggcg

61 gcgcgggctg agtgcggccg cgcgggagtc cgcggctggc gcggcccgag cggggacccg

121 gcggctcgcc aggcggcggc cgaggcgggg cgggccggcc cggggccgag ggccggtggc

181 cgaggccgga gggccgcggc gggcggcggc cgaggcggct ccggccaggg ccgggccggg

241 ggccgggggg cggcggcggg caggcggccg cgtcggccgg ggccgggacg atgactctgg

301 agtccatgat ggcgtgttgc ctgagcgatg aggtgaagga gtccaagcgg atcaacgccg

361 agatcgagaa gcagctgcgg cgggacaagc gcgacgcccg gcgcgagctc aagctgctgc

421 tgctcggcac gggcgagagc gggaagagca cgttcatcaa gcagatgcgc atcatccacg

481 gcgccggcta ctcggaggag gacaagcgcg gcttcaccaa gctcgtctac cagaacatct

541 tcaccgccat gcaggccatg atccgggcca tggagacgct caagatcctc tacaagtacg

601 agcagaacaa ggccaatgcg ctcctgatcc gggaggtgga cgtggagaag gtgaccacct

661 tcgagcatca gtacgtcagt gccatcaaga ccctgtggga ggacccgggc atccaggaat

721 gctacgaccg caggcgcgag taccagctct ccgactctgc caagtactac ctgaccgacg

[0250] 781 ttgaccgcat cgccaccttg ggctacctgc ccacccagca ggacgtgctg cgggtccgcg

841 tgcccaccac cggcatcatc gagtaccctt tcgacctgga gaacatcatc ttccggatgg

901 tggatgtggg gggccagcgg tcggagcgga ggaagtggat ccactgcttt gagaacgtga

961 catccatcat gtttctcgtc gccctcagcg aatacgacca agtcctggtg gagtcggaca

1021 acgagaaccg gatggaggag agcaaagccc tgttccggac catcatcacc tacccctggt

1081 tccagaactc ctccgtcatc ctcttcctca acaagaagga cctgctggag gacaagatcc

1141 tgtactcgca cctggtggac tacttccccg agttcgatgg tccccagcgg gacgcccagg

1201 cggcgcggga gttcatcctg aagatgttcg tggacctgaa ccccgacagc gacaagatca

1261 tctactcaca cttcacgtgt gccaccgaca cggagaacat ccgcttcgtg ttcgcggccg

1321 tgaaggacac catcctgcag ctcaacctca aggagtacaa cctggtctga gcgcccaggc

1381 ccagggagac gggatggaga cacggggcag gaccttcctt ccacggagcc tgcggctgcc

1441 gggcgggtgg cgctgccgag tccgggccgg ggcctctgcc cgcgggagga gatttttttt

1501 tttcatattt ttaacaaatg gtttttattt cacagttatc aggggatgta catctctccc

1561 tccgtacact tcgcgcacct tctcaccttt tgtcaacggc aaaggcagcc tttttctggc

1621 cttgacttat ggctcgcttt tttctaaaaa aaaaaaaaaa agaaagaaag aaaaaaagca

1681 acgaaacata aaacacacaa gcgccccgtg cccccagtga ctctgggcct cacagagccc

1741 ccgccagcca gcatggggcc ccgccctgca gccagtcacg cgccccccaca ccgcagcccc

1801 ccgtggctgt ccttccaacc ccacgtgctt tttctttctc ctgcccgctt cttttcttca

1861 tcacaaaagg cgtggagact cggagacgga cgtttttccc ctttttaag ttattgacgc

1921 ccagcgcgcc tcgcctcttc acccatcaac gctgtgcttt gcccactgga ctcctgaaga

1981 gggggtgggg ggctccctcg gtcgcccacc ctgggaagtg cctaaccttt tattttattt

2041 tatttttttg aggaaaaaga acgcctgact cacaggttga agaaacaccc tgggccctct

2101 ctcatggccg ggttccccgt ccctctgcag aggctgggaa gggtccccgg gctggagcca

2161 cgggggcttc tctgggctgt gcctccgggg ccaacactgg ctgcttgggg ctgcccgggg

2221 actccagagg gctgcacggc caccctgccc tggctagagc gcaccccacc ggagcccacg

2281 tgggctgggc ggctggaggg atggtccccc ggtgacactg ggagaaaggc cacttggatg

2341 ggggcgtttc tgttttgttc cgctttgtga tgtcaccaat ttggaaacag cgagggtggg

2401 tggggacttt tacagaatat tctcaggtgt gtacccgaga ggcagagaga gggacgtggc

[0251]

2461 cggcagctct gtgcgtggcc ttgtcccaag cacttgcgcc cgccccccgag cgccgccccc

2521 ggggagcggg aagccagcac tcgcactttg gccaggggcg cgtggaaggt ggtggcaggc

2581 accggcctgg gcagcttcca ggcctggctg gccacgacca cggcccgagg gggagcccgc

2641 caggccacgc cgcactgagc cacagccccg ggggccgcct cccggggccc cttgaggcac

2701 tgaggcaccg agactggttc tccccgagag actcggaagg tggggaacga ggggactgtg

2761 tttggggagg tggctttttc gtctgctgtt gactgaacac tacagcgccc tgtggttccg

2821 ggcttcgcac agctgtccca gggatggatc gcctgtgctg ccttcgcccg ccgccacacc

2881 gggaccctgc acggctgctt ctggcctcga cagatgacaa aagaaacagc cccaaaatac

2941 gaccactcca accagcagtt cccgcctgcc tgcccgccac tgtcaggcct gccctggcct

3001 cctcgtccgc agggctgtct gctggcttct gggggcagaa gagcggggag ccccgtggaa

3061 gggtcagggg agaccaggtc agggcagcta catttctggt gatcagcccc atggggagac

3121 ggggctggcg ggataccccc cccccggctt ccccacacca cttctgtctc acccggaagc

3181 gtccttttt tgtgccaggt gtctacctaa gagggttggt gccagaagcc ccccatggcg

3241 agtgctgggg cccggcggtg ccctgggggа gcagatgggg ccacccctgg cagggccgct

3301 acaacctttt ccagcagcgg agccctctgg ggggcctgtg cttgtggcat ctctgagggc

3361 ctagattgca caaggtgacc tggccgtggc ctgagggtgg agtcgcccag cacgcaggcc

3421 ggggcgctgc ggggctaagt attaggcctt cccagggagg gggcgtgcca agcatcccag

3481 agccgggctg ggaccgccaa aacgtcgtgg cctggatcct ctgggtctga gtgcctgatc

3541 ccctgccccc caaaaaagca gaggtaggtg ttgcaggccc agggcagggg tgcctgcccc

3601 aggagagtcc caggcagtgg ttctcgtgcc agtggcaccc aggggcaagg acagccaacc

3661 cccaccttg ccacgtgtgg ggccacgtgg gcatgtgggg tgtgtgtttt taccttggtg

[0252] 3721 aatctcacct gccaacgatt tctcgtgagt gccgaccacc ttctccgacc atgttacgcc

3781 cgggcggcag cagcccccgg ccactgcaaa cccatgccct gggtcccccg gctcccccag

3841 ggaggcatcc ccgtgccaat gtcccccagt ggtggcagca gatcctgtgg ccggcctggc

3901 ggacgggacc cagtgatact tgtatattac acagtcctga tttcagacaa tttcaacctt

3961 aatctattta aaaaagaata ttctatacaa gctgttttta agccttttac catttgaaat

4021 gcatgtgttg tgcgcgttgg ggatgggagg aggggctgag gagcggctca gtgtcacctc

4081 ccacagccac cggccctgac ccttaatcca gacaccgatg gaagtcgact tttcatatct

4141 ttctcctgaa atgaactctg ttttaaattg gaataaattt tgttcctaaa

[0253] “肿瘤”是指无论是恶性还是良性的赘生性细胞生长和增殖,以及所有癌变前和癌变的细胞和组织。

[0254] 术语“抗肿瘤活性”意指肿瘤细胞的增殖速率、活力或转移活性的降低。例如,抗肿瘤活性可以由治疗期间出现的异常细胞的生长速率下降或肿瘤尺寸稳定或减小或与无治疗的对照相比因治疗所致的存活期更长显示。这种活性可使用公认的体外或体内肿瘤模型评估,这些肿瘤模型包括但不限于异种移植模型、同种异体移植模型、MMTV模型和本领域已知的用于研究抗肿瘤活性的其他已知模型。

[0255] 术语“恶性肿瘤”是指非良性肿瘤或癌症。如本文所用,术语“癌症”包括以失调或失控的细胞生长为特征的恶性肿瘤。示例性癌症包括:癌、肉瘤、白血病和淋巴瘤。

[0256] 术语“癌症”包括原发性恶性肿瘤(例如,其细胞未移行至受试者身体中除原始肿瘤部位之外部位的那些)和继发性恶性肿瘤(例如,因转移、肿瘤细胞移行至与原始肿瘤部位不同的继发部位而产生的那些)。

[0257] 术语“PMEL17”(也称为前黑色素体蛋白(PMEL)、D12S53E、ME20、ME20-M、ME20M、P1、P100、gp100、SI、SIL、和银基因座蛋白同系物(silver locus protein homolog,SILV))是指通过由黑色素细胞产生并参与黑色素合成的单通路I型跨膜蛋白。人PMEL17的核酸和氨基酸序列已以以下登录号公布于GenBank中:NP_008859、NP_001307050、NP_001307051、NP_001186982、NP_001186983(氨基酸序列)、和NM_006928、NM_001200053、NM_001200054、NM_001320121、NM_001320122(核苷酸序列)。如本文所用,将术语“PMEL17”用于共同指PMEL17蛋白的所有天然存在的同种型、或其变体。

[0258] NP_008859(SEQ ID NO:272)

1 mdlvlkrcll hlavigalla vgatkvprnq dwlgvsrqlr tkawnrqlyp ewteaqrldc

61 wrggqvslkv sndgptliga nasfsialnf pgsqkvlpdg qviwvnntii ngsqvwggqp

121 vypqetddac ifpdggpcps gswsqkrsfv yvwktwgqyw qvlggpvsgl sigtgramlg

181 thtmevtvyh rrgsrsyvpl ahsssaftit dqvpfsvsvs qlraldggnk hflrnqpltf

241 alqlhdpsgy laeadlsytw dfgdssgtli sralvvthty lepgpvtaqv vlqaaiplts

[0259]

301 cgsspvpgtt dghrptaeap nttagqvptt evvgttpgqa ptaepsgtts vqvpttevis

361 tapvqmptae stgmtpekvp vsevmgttla emstpeatgm tpaevsivvl sgttaaqvtt

421 tewvettare lpipepegpd assimstesi tgslgplldg tatlrlvkrq vpldcvlyry

481 gsfsvtldiv qgiesaeilq avpsgegdaf eltvscqggl pkeacmeiss pgcqppaqrl

541 cqpvlpspac qlvlhqilkg gsgtyclnvs ladtnslavv stqlimpgqe aglgqvpliv

601 gillvlmavv lasliyrrrl mkqdfsvpql phssshwlrl prifcscpig enspllsgqq

661 v

[0260] NP_001307050(SEQ ID NO:273)

1 mdlvlkrcll hlavigalla vgatkvprnq dwlgvsrqlr tkawnrqlyp ewteaqrldc

[0261] 61 wrggqvslkv sndgptliga nasfsialnf pgsqkvlpdg qviwvnntii ngsqvwggqp

121 vypqetddac ifpdggpcps gswsqkrsfv yvwktwgqyw qvlggpvsgl sigtgramlg

181 thtmevtvyh rrgsrsyvpl ahsssaftit dqvpfsvsvs qlraldggnk hflrnqpltf

241 alqlhdpsgy laeadlsytw dfgdssgtli sralvvthty lepgpvtaqv vlqaaiplts

301 cgsspvpgtt dghrptaeap nttagqvptt evvgttpgqa ptaepsgtts vqvpttevis

361 tapvqmptae staaqvttte wvettarelp ipepegpdas simstesitg slgplldgta

421 tlrlvkrqvp ldcvlyrygs fsvtldivqg iesaeilqav psgegdafel tvscqgglpk

481 eacmeisspg cqppaqrlcq pvlpspacql vlhqilkggs gtyclnvsla dtnslavvst

541 qlimpvpgil ltgqeaglgq vplivgillv lmavvlasli yrrrlmkqdf svpqlphsss

601 hwlrlprifc scpigenspl lsgqqv

NP_001307051（SEQ ID NO: 274）

[0262]

1 mdlvlkrcll hlavigalla vgatkvprnq dwlgvsrqlr tkawnrqlyp ewteaqrldc

61 wrggqvslkv sndgptliga nasfsialnf pgsqkvlpdg qviwvnntii ngsqvwggqp

121 vypqetddac ifpdggpcps gswsqkrsfv yvwktwgqyw qvlggpvsgl sigtgramlg

181 thtmevtvyh rrgsrsyvpl ahsssaftit dqvpfsvsvs qlraldggnk hflrnqpltf

241 alqlhdpsgy laeadlsytw dfgdssgtli sralvvthty lepgpvtaqv vlqaaiplts

301 cgsspvpgtt dghrptaeap nttagqvptt evvgttpgqa ptaepsgtts vqvpttevis

361 tapvqmptae staaqvttte wvettarelp ipepegpdas simstesitg slgplldgta

421 tlrlvkrqvp ldcvlyrygs fsvtldivqg iesaeilqav psgegdafel tvscqgglpk

481 eacmeisspg cqppaqrlcq pvlpspacql vlhqilkggs gtyclnvsla dtnslavvst

541 qlimpgqeag lgqvplivgi llvlmavvla sliyrrrlmk qdfsvpqlph ssshwlrlpr

601 ifcscpigen spllsgqqv

[0263] NP_001186982δSEQ ID NO:275ε

1 mdlvlkrcll hlavigalla vgatkgsqvw ggqpvypqet ddacifpdgg pcpsgswsqk

61 rsfvyvwktw gqywqvlggp vsglsigtgr amlgthtmev tvyhrrgsrs yvplahsssa

121 ftitdqvpfs vsvsqlrald ggnkhflrnq pltfalqlhd psgylaeadl sytwdfgdss

[0264] 181 gtlisralvv thtylepgpv taqvvlqaai pltscgsspv pgttdghrpt aeapnttagq

241 vpttevvgtt pgqaptaeps gttsvqvptt evistapvqm ptaestgmtp ekvpvsevmg

301 ttlaemstpe atgmtpaevs ivvlsgttaa qvtttewvet tarelpipep egpdassims

361 tesitgslgp lldgtatlrl vkrqvpldcv lyrygsfsvt ldivqgiesa eilqavpsge

421 gdafeltvsc qgglpkeacm eisspgcqpp aqrlcqpvlp spacqlvlhq ilkggsgtyc

[0265] 481 lnvsladtns lavvstqlim pgqeaglgqv plivgillvl mavvlasliy rrrlmkqdfs

541 vpqlphsssh wlrlprifcs cpigenspll sgqqv

[0266] NP_001186983δSEQ ID NO:276ε

1 mdlvlkrcll hlavigalla vgatkvprnq dwlgvsrqlr tkawnrqlyp ewteaqrldc

61 wrggqvslkv sndgptliga nasfsialnf pgsqkvlpdg qviwvnntii ngsqvwggqp

121 vypqetddac ifpdggpcps gswsqkrsfv yvwktwgqyw qvlggpvsgl sigtgramlg

181 thtmevtvyh rrgsrsyvpl ahsssaftit dqvpfsvsvs qlraldggnk hflrnqpltf

241 alqlhdpsgy laeadlsytw dfgdssgtli sralvvthty lepgpvtaqv vlqaaiplts

[0267] 301 cgsspvpgtt dghrptaeap nttagqvptt evvgttpgqa ptaepsgtts vqvpttevis

361 tapvqmptae stgmtpekvp vsevmgttla emstpeatgm tpaevsivvl sgttaaqvtt

421 tewvettare lpipepegpd assimstesi tgslgplldg tatlrlvkrq vpldcvlyry

481 gsfsvtldiv qgiesaeilq avpsgegdaf eltvscqggl pkeacmeiss pgcqppaqrl

541 cqpvlpspac qlvlhqilkg gsgtyclnvs ladtnslavv stqlimpvpg illtgqeagl

601 gqvplivgil lvlmavvlas liyrrrlmkq dfsvpqlphs sshwlrlpri fcscpigens

661 pllsgqqv

[0268] NM_006928δSEQ ID NO:277ε

1 cccagcgctc ctccccgcaa atgatcccgc cccaggggcc tatcccagtc cccccagtgc

61 ctttggttgc tggagggaag aacacaatgg atctggtgct aaaaagatgc cttcttcatt

121 tggctgtgat aggtgctttg ctggctgtgg gggctacaaa agtacccaga aaccaggact

181 ggcttggtgt ctcaaggcaa ctcagaacca aagcctggaa caggcagctg tatccagagt

241 ggacagaagc ccagagactt gactgctgga gaggtggtca agtgtccctc aaggtcagta

[0269] 301 atgatgggcc tacactgatt ggtgcaaatg cctccttctc tattgccttg aacttccctg

361 gaagccaaaa ggtattgcca gatgggcagg ttatctgggt caacaatacc atcatcaatg

421 ggagccaggt gtggggagga cagccagtgt atccccagga aactgacgat gcctgcatct

481 tccctgatgg tggaccttgc ccatctggct cttggtctca gaagagaagc tttgtttatg

541 tctggaagac ctggggccaa tactggcaag ttctaggggg cccagtgtct gggctgagca

601 ttgggacagg cagggcaatg ctgggcacac acaccatgga agtgactgtc taccatcgcc

661 ggggatcccg gagctatgtg cctcttgctc attccagctc agccttcacc attactgacc

721 aggtgccttt ctccgtgagc gtgtcccagt tgcgggcctt ggatggaggg aacaagcact

781 tcctgagaaa tcagcctctg acctttgccc tccagctcca tgaccccagt ggctatctgg

841 ctgaagctga cctctcctac acctgggact ttggagacag tagtggaacc ctgatctctc

901 gggcacttgt ggtcactcat acttacctgg agcctggccc agtcactgcc caggtggtcc

961 tgcaggctgc cattcctctc acctcctgtg gctcctcccc agttccaggc accacagatg

1021 ggcacaggcc aactgcagag gcccctaaca ccacagctgg ccaagtgcct actacagaag

1081 ttgtgggtac tacacctggt caggcgccaa ctgcagagcc ctctggaacc acatctgtgc

1141 aggtgccaac cactgaagtc ataagcactg cacctgtgca gatgccaact gcagagagca

1201 caggtatgac acctgagaag gtgccagttt cagaggtcat gggtaccaca ctggcagaga

1261 tgtcaactcc agaggctaca ggtatgacac ctgcagaggt atcaattgtg gtgctttctg

1321 gaaccacagc tgcacaggta acaactacag agtgggtgga gaccacagct agagagctac

1381 ctatccctga gcctgaaggt ccagatgcca gctcaatcat gtctacggaa agtattacag

[0270]

1441 gttccctggg ccccctgctg gatggtacag ccaccttaag gctggtgaag agacaagtcc

1501 ccctggattg tgttctgtat cgatatggtt ccttttccgt caccctggac attgtccagg

1561 gtattgaaag tgccgagatc ctgcaggctg tgccgtccgg tgagggggat gcatttgagc

1621 tgactgtgtc ctgccaaggc gggctgccca aggaagcctg catggagatc tcatcgccag

1681 ggtgccagcc ccctgcccag cggctgtgcc agcctgtgct acccagccca gcctgccagc

1741 tggttctgca ccagatactg aagggtggct cggggacata ctgcctcaat gtgtctctgg

1801 ctgataccaa cagcctggca gtggtcagca cccagcttat catgcctggt caagaagcag

1861 gccttgggca ggttccgctg atcgtgggca tcttgctggt gttgatggct gtggtccttg

1921 catctctgat atataggcgc agacttatga agcaagactt ctccgtaccc cagttgccac

1981 atagcagcag tcactggctg cgtctacccc gcatcttctg ctcttgtccc attggtgaga

2041 acagcccccc cctcagtggg cagcaggtct gagtactctc atatgatgct gtgattttcc

2101 tggagttgac agaaacacct atatttcccc cagtcttccc tgggagacta ctattaactg

2161 aaataaatac tcagagcctg aaaaaaaaaa aaaaa

[0271] NM_001200053δSEQ ID NO:278ε

[0272] 1 gggcctatcc cagtcccccc agtgcctttg gttgctggag ggaagaacac aatggatctg

61 gtgctaaaaa gatgccttct tcatttggct gtgataggtg ctttgctggc tgtgggggct

121 acaaaagggga gccaggtgtg gggaggacag ccagtgtatc cccaggaaac tgacgatgcc

181 tgcatcttcc ctgatggtgg accttgccca tctggctctt ggtctcagaa gagaagcttt

241 gtttatgtct ggaagacctg gggccaatac tggcaagttc taggggggccc agtgtctggg

301 ctgagcattg ggacaggcag ggcaatgctg ggcacacaca ccatggaagt gactgtctac

361 catcgccggg gatcccggag ctatgtgcct cttgctcatt ccagctcagc cttcaccatt

421 actgaccagg tgcctttctc cgtgagcgtg tcccagttgc gggccttgga tggagggaac

481 aagcacttcc tgagaaatca gcctctgacc tttgccctcc agctccatga ccccagtggc

541 tatctggctg aagctgacct ctcctacacc tgggactttg gagacagtag tggaaccctg

601 atctctcggg cacttgtggt cactcatact tacctggagc ctggcccagt cactgcccag

661 gtggtcctgc aggctgccat tcctctcacc tcctgtggct cctccccagt tccaggcacc

721 acagatgggc acaggccaac tgcagaggcc cctaacacca cagctggcca agtgcctact

781 acagaagttg tgggtactac acctggtcag gcgccaactg cagagccctc tggaaccaca

841 tctgtgcagg tgccaaccac tgaagtcata agcactgcac ctgtgcagat gccaactgca

[0273]

901 gagagcacag gtatgacacc tgagaaggtg ccagtttcag aggtcatggg taccacactg

961 gcagagatgt caactccaga ggctacaggt atgacacctg cagaggtatc aattgtggtg

1021 ctttctggaa ccacagctgc acaggtaaca actacagagt gggtggagac cacagctaga

1081 gagctaccta tccctgagcc tgaaggtcca gatgccagct caatcatgtc tacggaaagt

1141 attacaggtt ccctgggccc cctgctggat ggtacagcca ccttaaggct ggtgaagaga

1201 caagtccccc tggattgtgt tctgtatcga tatggttcct tttccgtcac cctggacatt

1261 gtccagggta ttgaaagtgc cgagatcctg caggctgtgc cgtccggtga gggggatgca

1321 tttgagctga ctgtgtcctg ccaaggcggg ctgcccaagg aagcctgcat ggagatctca

1381 tcgccagggt gccagccccc tgcccagcgg ctgtgccagc ctgtgctacc cagcccagcc

1441 tgccagctgg ttctgcacca gatactgaag ggtggctcgg ggacatactg cctcaatgtg

1501 tctctggctg ataccaacag cctggcagtg gtcagcaccc agcttatcat gcctggtcaa

1561 gaagcaggcc ttgggcaggt tccgctgatc gtgggcatct tgctggtgtt gatggctgtg

1621 gtccttgcat ctctgatata taggcgcaga cttatgaagc aagacttctc cgtaccccag

1681 ttgccacata gcagcagtca ctggctgcgt ctaccccgca tcttctgctc ttgtcccatt

1741 ggtgagaaca gccccctcct cagtgggcag caggtctgag tactctcata tgatgctgtg

[0274] 1801 attttcctgg agttgacaga aacacctata tttcccccag tcttccctgg gagactacta

1861 ttaactgaaa taaatactca gagcctgaaa aaaaaaaaaa aa

[0275] NM_001200054δSEQ ID NO:279ε

1 gggcctatcc cagtcccccc agtgcctttg gttgctggag ggaagaacac aatggatctg

61 gtgctaaaaa gatgccttct tcatttggct gtgataggtg ctttgctggc tgtgggggct

121 acaaaagtac ccagaaacca ggactggctt ggtgtctcaa ggcaactcag aaccaaagcc

181 tggaacaggc agctgtatcc agagtggaca gaagcccaga gacttgactg ctggagaggt

241 ggtcaagtgt ccctcaaggt cagtaatgat gggcctacac tgattggtgc aaatgcctcc

301 ttctctattg ccttgaactt ccctggaagc caaaaggtat tgccagatgg gcaggttatc

361 tgggtcaaca ataccatcat caatgggagc caggtgtggg gaggacagcc agtgtatccc

421 caggaaactg acgatgcctg catcttccct gatggtggac cttgcccatc tggctcttgg

481 tctcagaaga gaagctttgt ttatgtctgg aagacctggg gccaatactg gcaagttcta

541 gggggcccag tgtctgggct gagcattggg acaggcaggg caatgctggg cacacacacc

601 atggaagtga ctgtctacca tcgccgggga tcccggagct atgtgcctct tgctcattcc

661 agctcagcct tcaccattac tgaccaggtg cctttctccg tgagcgtgtc ccagttgcgg

[0276] 721 gccttggatg gagggaacaa gcacttcctg agaaatcagc ctctgacctt tgccctccag

781 ctccatgacc ccagtggcta tctggctgaa gctgacctct cctacacctg ggactttgga

841 gacagtagtg gaaccctgat ctctcgggca cttgtggtca ctcatactta cctggagcct

901 ggcccagtca ctgcccaggt ggtcctgcag gctgccattc ctctcacctc ctgtggctcc

961 tccccagttc caggcaccac agatgggcac aggccaactg cagaggcccc taacaccaca

1021 gctggccaag tgcctactac agaagttgtg ggtactacac ctggtcaggc gccaactgca

1081 gagccctctg gaaccacatc tgtgcaggtg ccaaccactg aagtcataag cactgcacct

1141 gtgcagatgc caactgcaga gagcacaggt atgacacctg agaaggtgcc agtttcagag

1201 gtcatgggta ccacactggc agagatgtca actccagagg ctacaggtat gacacctgca

1261 gaggtatcaa ttgtggtgct ttctggaacc acagctgcac aggtaacaac tacagagtgg

1321 gtggagacca cagctagaga gctacctatc cctgagcctg aaggtccaga tgccagctca

1381 atcatgtcta cggaaagtat tacaggttcc ctgggccccc tgctggatgg tacagccacc

1441 ttaaggctgg tgaagagaca agtccccctg gattgtgttc tgtatcgata tggttccttt

1501 tccgtcaccc tggacattgt ccagggtatt gaaagtgccg agatcctgca ggctgtgccg

1561 tccggtgagg gggatgcatt tgagctgact gtgtcctgcc aaggcgggct gcccaaggaa

1621 gcctgcatgg agatctcatc gccagggtgc cagcccccctg cccagcggct gtgccagcct

1681 gtgctaccca gcccagcctg ccagctggtt ctgcaccaga tactgaaggg tggctcgggg

1741 acatactgcc tcaatgtgtc tctggctgat accaacagcc tggcagtggt cagcacccag

[0277] 1801 cttatcatgc ctgtgcctgg gattcttctc acaggtcaag aagcaggcct tgggcaggtt

1861 ccgctgatcg tgggcatctt gctggtgttg atggctgtgg tccttgcatc tctgatatat

1921 aggcgcagac ttatgaagca agacttctcc gtaccccagt tgccacatag cagcagtcac

1981 tggctgcgtc taccccgcat cttctgctct tgtcccattg gtgagaacag ccccctcctc

2041 agtgggcagc aggtctgagt actctcatat gatgctgtga ttttcctgga gttgacagaa

2101 acacctatat ttcccccagt cttccctggg agactactat taactgaaat aaatactcag

2161 agcctgaaaa aaaaaaaaaa a

[0278] NM_001320121δSEQ ID NO:280ε

1 gggcctatcc cagtcccccc agtgcctttg gttgctggag ggaagaacac aatggatctg

61 gtgctaaaaa gatgccttct tcatttggct gtgataggtg ctttgctggc tgtgggggct

121 acaaaagtac ccagaaacca ggactggctt ggtgtctcaa ggcaactcag aaccaaagcc

181 tggaacaggc agctgtatcc agagtggaca gaagcccaga gacttgactg ctggagaggt

241 ggtcaagtgt ccctcaaggt cagtaatgat gggcctacac tgattggtgc aaatgcctcc

301 ttctctattg ccttgaactt ccctggaagc caaaaggtat tgccagatgg gcaggttatc

[0279] 361 tgggtcaaca ataccatcat caatgggagc caggtgtggg gaggacagcc agtgtatccc

421 caggaaactg acgatgcctg catcttccct gatggtggac cttgcccatc tggctcttgg

481 tctcagaaga gaagctttgt ttatgtctgg aagacctggg gccaatactg gcaagttcta

541 gggggcccag tgtctgggct gagcattggg acaggcaggg caatgctggg cacacacacc

601 atggaagtga ctgtctacca tcgccgggga tcccggagct atgtgcctct tgctcattcc

661 agctcagcct tcaccattac tgaccaggtg cctttctccg tgagcgtgtc ccagttgcgg

721 gccttggatg gagggaacaa gcacttcctg agaaatcagc ctctgacctt tgccctccag

781 ctccatgacc ccagtggcta tctggctgaa gctgacctct cctacacctg ggactttgga

841 gacagtagtg gaaccctgat ctctcgggca cttgtggtca ctcatactta cctggagcct

901 ggcccagtca ctgcccaggt ggtcctgcag gctgccattc ctctcacctc ctgtggctcc

961 tccccagttc caggcaccac agatgggcac aggccaactg cagaggcccc taacaccaca

1021 gctggccaag tgcctactac agaagttgtg ggtactacac ctggtcaggc gccaactgca

1081 gagccctctg gaaccacatc tgtgcaggtg ccaaccactg aagtcataag cactgcacct

1141 gtgcagatgc caactgcaga gagcacagct gcacaggtaa caactacaga gtgggtggag

1201 accacagcta gagagctacc tatccctgag cctgaaggtc cagatgccag ctcaatcatg

1261 tctacggaaa gtattacagg ttccctgggc cccctgctgg atggtacagc caccttaagg

1321 ctggtgaaga gacaagtccc cctggattgt gttctgtatc gatatggttc cttttccgtc

1381 accctggaca ttgtccaggg tattgaaagt gccgagatcc tgcaggctgt gccgtccggt

[0280] 1441 gaggggggatg catttgagct gactgtgtcc tgccaaggcg ggctgcccaa ggaagcctgc

1501 atggagatct catcgccagg gtgccagccc cctgcccagc ggctgtgcca gcctgtgcta

1561 cccagcccag cctgccagct ggttctgcac cagatactga agggtggctc ggggacatac

1621 tgcctcaatg tgtctctggc tgataccaac agcctggcag tggtcagcac ccagcttatc

1681 atgcctgtgc ctgggattct tctcacaggt caagaagcag gccttgggca ggttccgctg

1741 atcgtgggca tcttgctggt gttgatggct gtggtccttg catctctgat atataggcgc

1801 agacttatga agcaagactt ctccgtaccc cagttgccac atagcagcag tcactggctg

1861 cgtctacccc gcatcttctg ctcttgtccc attggtgaga acagcccccc cctcagtggg

1921 cagcaggtct gagtactctc atatgatgct gtgattttcc tggagttgac agaaacacct

1981 atatttcccc cagtcttccc tgggagacta ctattaactg aaataaatac tcagagcctg

2041 a

[0281] NM_001320122δSEQ ID NO:281ε

1 gggcctatcc cagtcccccc agtgcctttg gttgctggag ggaagaacac aatggatctg

61 gtgctaaaaa gatgccttct tcatttggct gtgataggtg ctttgctggc tgtgggggct

121 acaaaagtac ccagaaacca ggactggctt ggtgtctcaa ggcaactcag aaccaaagcc

[0282]

181 tggaacaggc agctgtatcc agagtggaca gaagcccaga gacttgactg ctggagaggt

241 ggtcaagtgt ccctcaaggt cagtaatgat gggcctacac tgattggtgc aaatgcctcc

301 ttctctattg ccttgaactt ccctggaagc caaaaggtat tgccagatgg gcaggttatc

361 tgggtcaaca ataccatcat caatgggagc caggtgtggg gaggacagcc agtgtatccc

421 caggaaactg acgatgcctg catcttccct gatggtggac cttgcccatc tggctcttgg

481 tctcagaaga gaagctttgt ttatgtctgg aagacctggg gccaatactg gcaagttcta

541 gggggcccag tgtctgggct gagcattggg acaggcaggg caatgctggg cacacacacc

601 atggaagtga ctgtctacca tcgccgggga tcccggagct atgtgcctct tgctcattcc

661 agctcagcct tcaccattac tgaccaggtg cctttctccg tgagcgtgtc ccagttgcgg

721 gccttggatg gagggaacaa gcacttcctg agaaatcagc ctctgacctt tgccctccag

781 ctccatgacc ccagtggcta tctggctgaa gctgacctct cctacacctg ggactttgga

841 gacagtagtg gaaccctgat ctctcgggca cttgtggtca ctcatactta cctggagcct

901 ggcccagtca ctgcccaggt ggtcctgcag gctgccattc ctctcacctc ctgtggctcc

961 tccccagttc caggcaccac agatgggcac aggccaactg cagaggcccc taacaccaca

1021 gctggccaag tgcctactac agaagttgtg ggtactacac ctggtcaggc gccaactgca

1081 gagccctctg gaaccacatc tgtgcaggtg ccaaccactg aagtcataag cactgcacct

1141 gtgcagatgc caactgcaga gagcacagct gcacaggtaa caactacaga gtgggtggag

[0283]

1201 accacagcta gagagctacc tatccctgag cctgaaggtc cagatgccag ctcaatcatg

1261 tctacggaaa gtattacagg ttccctgggc cccctgctgg atggtacagc caccttaagg

1321 ctggtgaaga gacaagtccc cctggattgt gttctgtatc gatatggttc cttttccgtc

1381 accctggaca ttgtccaggg tattgaaagt gccgagatcc tgcaggctgt gccgtccggt

1441 gagggggatg catttgagct gactgtgtcc tgccaaggcg ggctgcccaa ggaagcctgc

1501 atggagatct catcgccagg gtgccagccc cctgcccagc ggctgtgcca gcctgtgcta

1561 cccagcccag cctgccagct ggttctgcac cagatactga agggtggctc ggggacatac

1621 tgcctcaatg tgtctctggc tgataccaac agcctggcag tggtcagcac ccagcttatc

1681 atgcctggtc aagaagcagg ccttgggcag gttccgctga tcgtgggcat cttgctggtg

1741 ttgatggctg tggtccttgc atctctgata tataggcgca gacttatgaa gcaagacttc

1801 tccgtacccc agttgccaca tagcagcagt cactggctgc gtctaccccg catcttctgc

1861 tcttgtccca ttggtgagaa cagccccctc ctcagtgggc agcaggtctg agtactctca

1921 tatgatgctg tgattttcct ggagttgaca gaaacaccta tatttccccc agtcttccct

1981 gggagactac tattaactga aataaatact cagagcctga

[0284] 术语“变体”是指与参考多肽具有基本上相同的氨基酸序列、或由基本上相同的核苷酸序列编码，并且能够具有参考多肽的一种或多种活性的多肽。例如，变体与参考多肽可

以具有约85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高序列同一性,同时保留参考多肽的一种或多种活性。

[0285] 如本文所用,术语任何疾病或障碍的“治疗(treat、treating或treatment)”在一个实施例中,是指减轻疾病或障碍(即,减慢或停滞或减少疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一个实施例中,“治疗(treat、treating或treatment)”是指减轻或缓解至少一种身体参数、包括不能被患者辨别的那些。在又另一个实施例中,“治疗(treat、treating或treatment)”是指在身体上(例如,可辨别的症状的稳定化)、在生理上(例如,身体参数的稳定化)或二者调节疾病或障碍。

[0286] 如本文所用,术语任何疾病或障碍的“预防(prevent、preventing或prevention)”是指疾病或障碍的预防性治疗;或延迟疾病或障碍的发作或进展。

[0287] 术语“治疗上可接受的量”或“治疗有效剂量”可互换地指足以实现所期望结果(即,肿瘤尺寸减小、抑制肿瘤生长、防止转移、抑制或防止病毒、细菌、真菌或寄生虫感染)的量。在一些实施例中,治疗上可接受的量不诱导或不引起不期望的副作用。在一些实施例中,治疗上可接受的量诱导或引起副作用,但仅是由医疗服务提供者就患者的状况而言可接受的那些。可以通过首先施用低剂量并且随后递增地增加所述剂量直至实现所期望效果来确定治疗上可接受的量。本发明分子的“预防有效剂量”和“治疗有效剂量”可以分别防止疾病症状发作或导致疾病症状的严重程度下降,这些疾病症状包括与癌症相关的症状。

[0288] 术语“共同施用”是指个体的血液中存在两种活性药剂。共同施用的活性试剂可以并行或依序递送。

[0289] 本发明提供了结合PMEL17的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)、及其药物缀合物,即抗体药物缀合物或ADC。特别地,本发明提供了结合PMEL17并且在这种结合时内化的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)。本发明的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)可用于产生抗体药物缀合物。此外,本发明提供了抗体药物缀合物,这些抗体药物缀合物具有期望的药代动力学特征和其他期望属性,并且因此可用于治疗或预防表达PMEL17的癌症。本发明进一步提供了包含本发明的抗体药物缀合物的药物组合物、以及制备此类药物组合物和使用它们治疗或预防癌症的方法。

[0290] 药物部分(D)

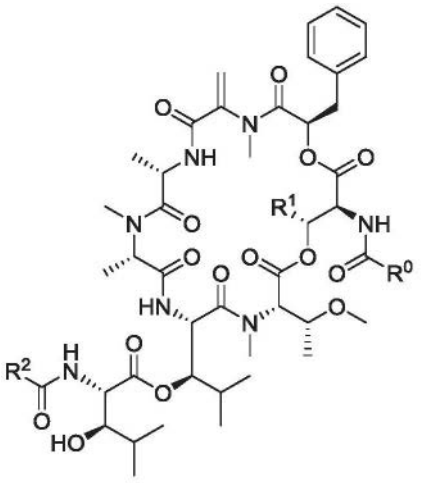
[0291] 在一个方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分(D)是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂、或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

[0292] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分(D)是GNAQ抑制剂。

[0293] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分(D)是GNA11抑制剂。

[0294] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分(D)是GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

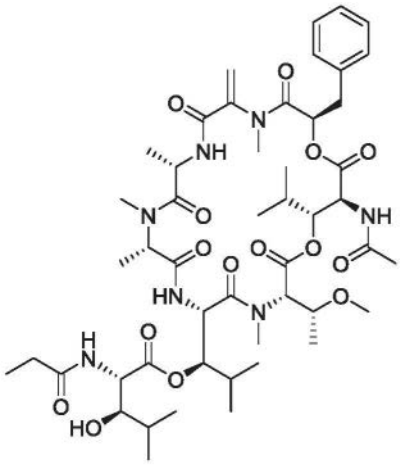
[0295] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分(D)是具有式(A)的结构的化合物:

[0296] 

(A),

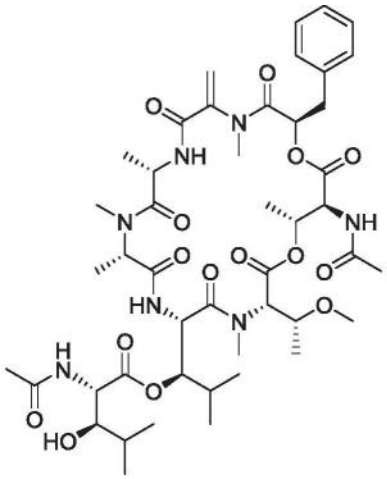
[0297] 其中R_0是甲基或乙基,R_1是甲基或异丙基,并且R_2是甲基或乙基。

[0298] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分是具有以下结构的化合物(A1):

[0299] 

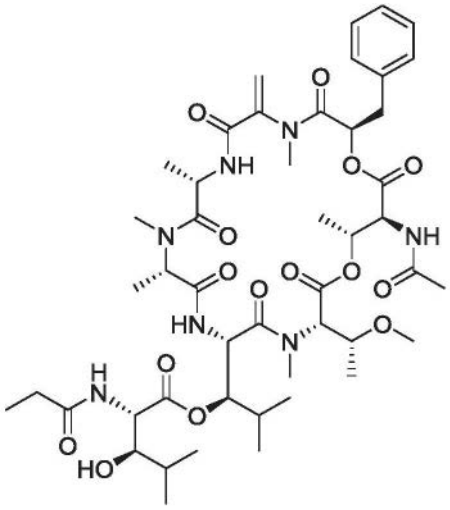
(A1)。

[0300] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分是具有以下结构的化合物(A2):

[0301] 

(A2)。

[0302] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的药物部分是具有以下结构的化合物(A3):

[0303] 

(A3)。

[0304] 表1给出了使用实例5中所述的测定法获得的化合物(A1)、(A2)和(A3)的抑制活性。

[0305] 表1

[0306]

化合物	GI_{50}（nM） 92.1GNAQ ^{Q209L}
A1	0.467
A2	22.1
A3	9.3

[0307] 接头-药物部分L_A-$(D)_n$)

[0308] 在第二个方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分((L_A-$(D)_n$))包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

[0309] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分((L_A-$(D)_n$))包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ抑制剂。

[0310] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分((L_A-$(D)_n$))包含与接头(L_A)附接的一个或多个药物部分,其中所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNA11抑制剂。

[0311] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分((L_A-$(D)_n$))包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

[0312] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分((L_A-$(D)_n$))包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(L_A)是可裂解接头并且所述一个或多

个药物部分各自独立地选自GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

[0313] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(L_A)是可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ抑制剂。

[0314] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(LA)是可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNA11抑制剂。

[0315] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(L_A)是可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

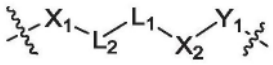
[0316] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(L_A)是不可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

[0317] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(LA)是不可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ抑制剂。

[0318] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(LA)是不可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNA11抑制剂。

[0319] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)包含与接头(L_A)共价附接的一个或多个药物部分,其中所述接头(L_A)是不可裂解接头并且所述一个或多个药物部分各自独立地选自GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂)。

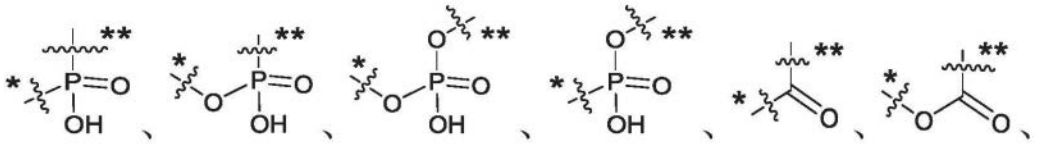
[0320] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分($(L_A-(D)_n)$)的接头(L_A)具有以下式:

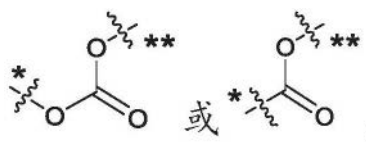
[0321] 

[0322] 其中:

[0323] X_1是二价偶联基团;

[0324] X_2是自杀式间隔子;

[0325] Y_1是 

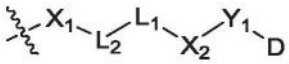


其中Y_1的*指示与X_2的附接点并且Y_1的**指示其他附接点;

[0326] L_1是二价肽接头,并且

[0327] L_2是键或接头。

[0328] 在另一方面,本发明的抗体药物缀合物的接头-药物部分((L_A-(D)$_n$))具有以下式:

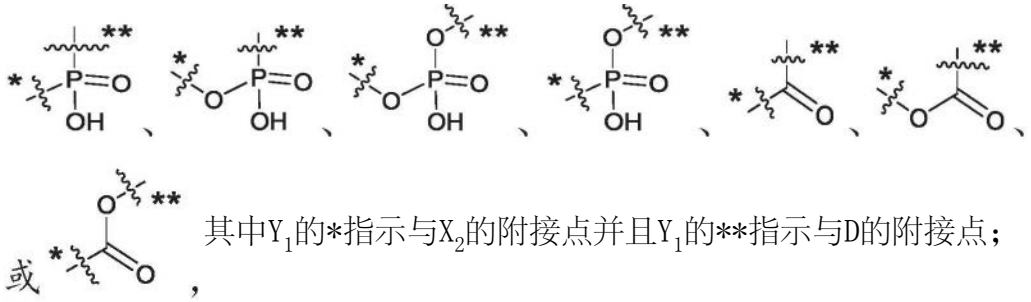
[0329] 

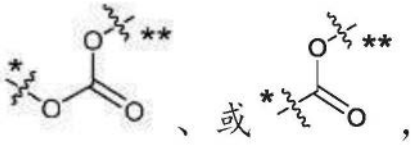
[0330] 其中:

[0331] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0332] X_1是二价偶联基团;

[0333] X_2是自杀式间隔子;

[0334] Y_1是 



其中Y_1的*指示与X_2的附接点并且Y_1的**指示与D的附接点;

[0335] L_1是二价肽接头,并且

[0336] L_2是键或接头。

[0337] 接去-药物化合物(L_B-(D)$_n$)

[0338] 在一个方面,本发明的接头-药物是具有式(B)的结构的化合物、或其立体异构体或药学上可接受的盐,

[0339] R^8-L_B-(D)$_n$ (B)

[0340] 其中:

[0341] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0342] R^8是反应性基团;

[0343] L_B是可裂解接头或不可裂解接头,并且

[0344] n是1、2、3或4。

[0345] 在一个方面,本发明的接头-药物具有式(B)的结构的化合物、或其立体异构体或药学上可接受的盐,其中

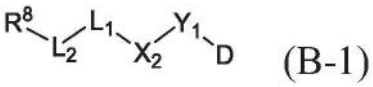
[0346] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0347] R^8是反应性基团;

[0348] L_B是可裂解接头,其包含一个或多个接头组分,所述接头组分选自自杀式间隔子、磷酸基团、碳酸基团和二价肽接头,并且

[0349] n是1、2、3或4。

[0350] 在一个方面,本发明的接头-药物是具有式(B-1)的结构的化合物、或其立体异构体或药学上可接受的盐,

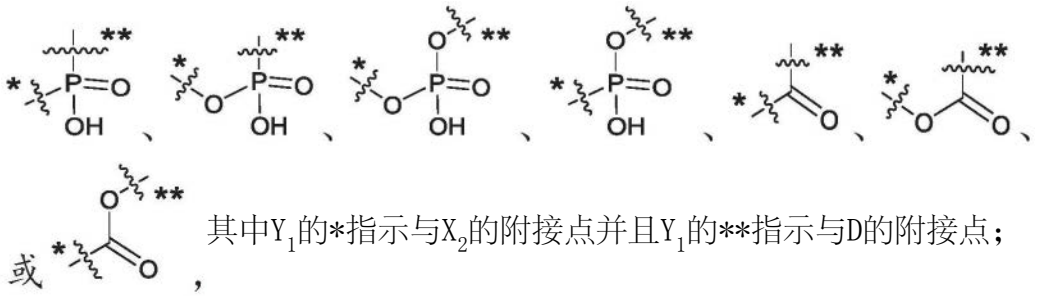
[0351]  (B-1)

[0352] 其中:

[0353] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0354] R^8是反应性基团;

[0355] X_2是自杀式间隔子；

[0356] Y_1是  其中Y_1的*指示与X_2的附接点并且Y_1的**指示与D的附接点；

[0357] L_1是二价肽接头，并且

[0358] L_2是键或接头。

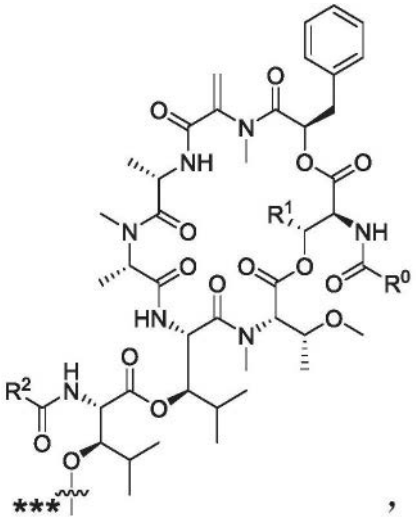
[0359] 本发明的接头-药物化合物的某些方面及实例是提供在另外的枚举型实施例的下列列表中。应认识到，每个实施例中指定的特征可以与其他指定特征组合以提供本发明的另外实施例。

[0360] 实施例1.具有式(B)或式(B-1)的化合物，或其立体异构体或药学上可接受的盐，其中D是GNAQ抑制剂。

[0361] 实施例2.具有式(B)或式(B-1)的化合物，或其立体异构体或药学上可接受的盐，其中D是GNA11抑制剂。

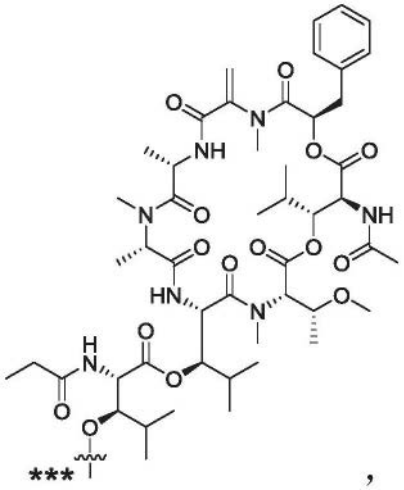
[0362] 实施例3.具有式(B)或式(B-1)的化合物，或其立体异构体或药学上可接受的盐，其中D是GNAQ和GNA11的抑制剂。

[0363] 实施例4.具有式(B)或式(B-1)的化合物，或其立体异构体或药学上可接受的盐，其中D是

[0364] 

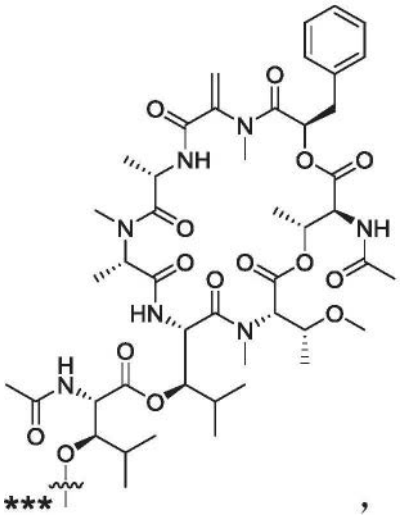
[0365] 其中R^0是甲基或乙基，R^1是甲基或异丙基，R^2是甲基或乙基，并且***指示与L_B或Y_1的附接点。

[0366] 实施例5.具有式(B)或式(B-1)的化合物，或其立体异构体或药学上可接受的盐，其中D是

[0367] 

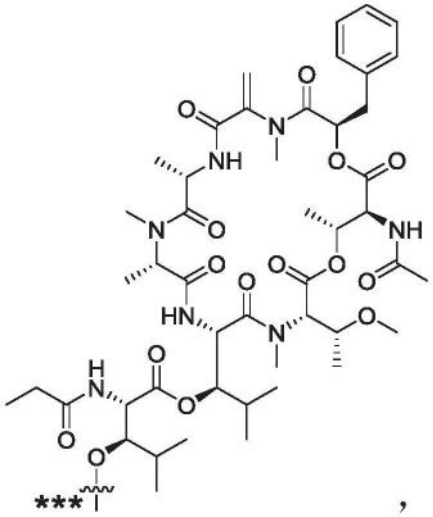
[0368] 其中***指示与L_B或Y_1的附接点。

[0369] 实施例6.具有式(B)或式(B-1)的化合物,或其立体异构体或药学上可接受的盐,其中D是

[0370] 

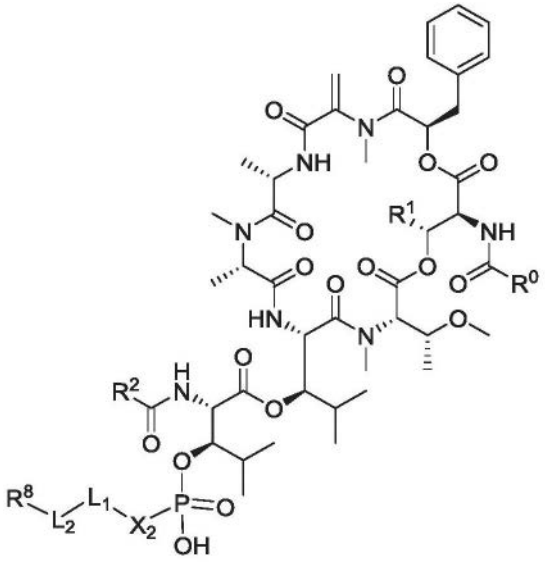
[0371] 其中***指示与L_B或Y_1的附接点。

[0372] 实施例7.具有式(B)或式(B-1)的化合物,或其立体异构体或药学上可接受的盐,其中D是

[0373] 

[0374] 其中***指示与L_B或Y_1的附接点。

[0375] 实施例8.具有式(B)或式(B-1)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐,具有式(B-2)的结构的化合物或其药学上可接受的盐:

[0376] 

(B-2),

[0377] 其中:

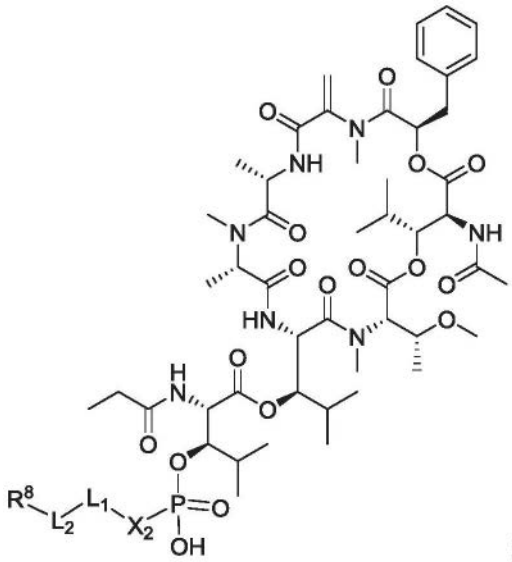
[0378] R^0是甲基或乙基;

[0379] R^1是甲基或异丙基;

[0380] R^2是甲基或乙基,并且

[0381] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0382] 实施例9.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐,具有式(B-2a)的结构的化合物或其药学上可接受的盐:

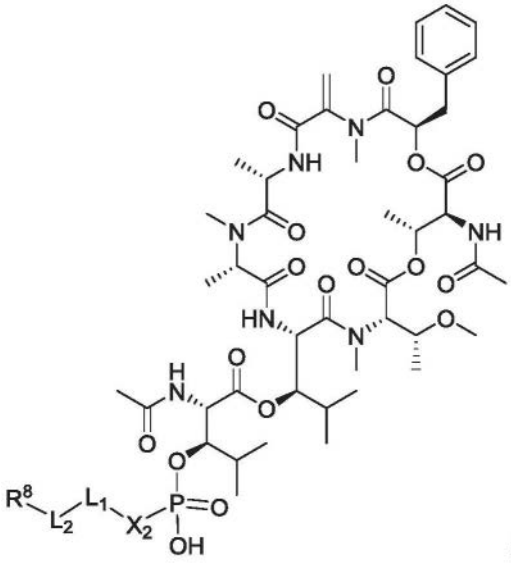
[0383] 

(B-2a),

[0384] 其中:

[0385] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0386] 实施例10.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐,具有式(B-2b)的结构的化合物或其药学上可接受的盐:

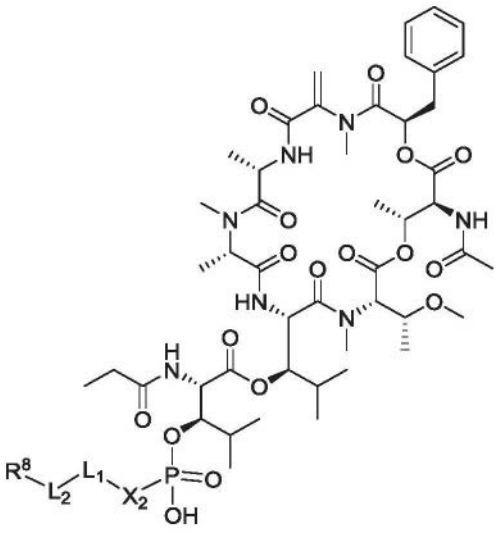
[0387] 

(B-2b),

[0388] 其中：

[0389] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0390] 实施例11.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐,具有式(B-2c)的结构的化合物或其药学上可接受的盐：

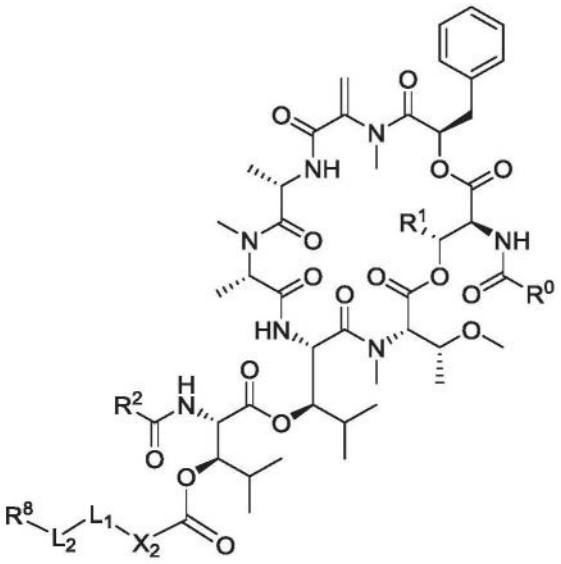
[0391] 

(B-2c),

[0392] 其中：

[0393] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0394] 实施例12.具有式(B)或式(B-1)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐,具有式(B-3)的结构的化合物或其药学上可接受的盐：

[0395] 

(B-3),

[0396] 其中：

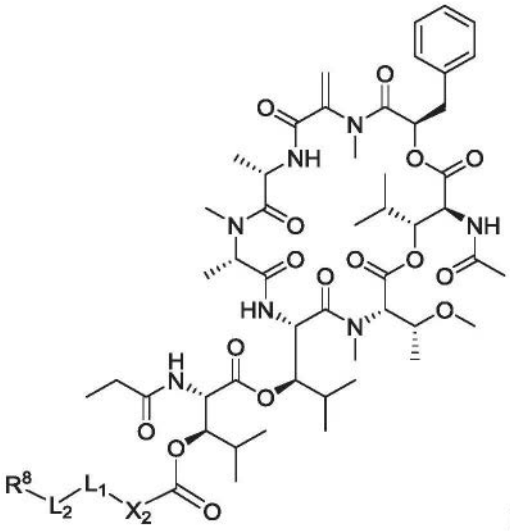
[0397] R^0是甲基或乙基；

[0398] R^1是甲基或异丙基；

[0399] R^2是甲基或乙基，并且

[0400] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0401] 实施例13.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐，具有式(B-3a)的结构的化合物或其药学上可接受的盐：

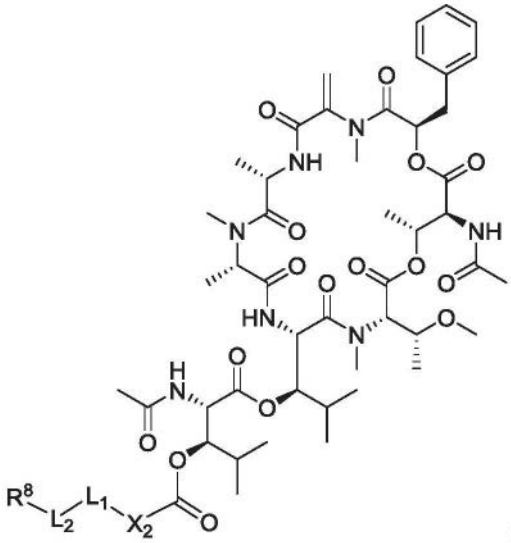
[0402] 

(B-3a),

[0403] 其中：

[0404] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0405] 实施例14.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐，具有式(B-3b)的结构的化合物或其药学上可接受的盐：

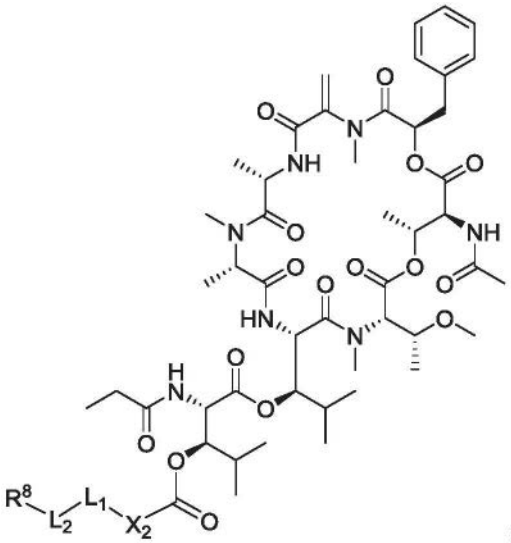
[0406] 

(B-3b),

[0407] 其中：

[0408] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

[0409] 实施例15.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物或其立体异构体或药学上可接受的盐,具有式(B-3c)的结构的化合物或其药学上可接受的盐：

[0410] 

(B-3c),

[0411] 其中：

[0412] X_2、L_1、L_2和R^8式如具有上式(B-1)的化合物中定义的。

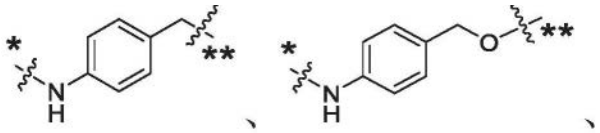
[0413] 实施例16.实施例8所述的具有式(B-2)的化合物、实施例12所述的具有式(B-3)的化合物、或其药学上可接受的盐：

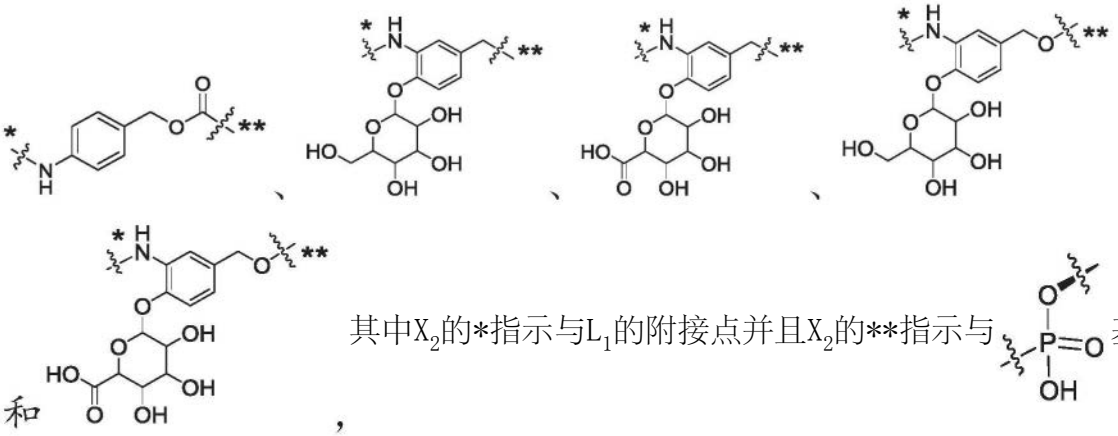
[0414] 其中：

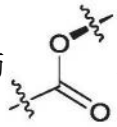
[0415] R^0是甲基或乙基；

[0416] R^1是甲基或异丙基；

[0417] R^2是甲基或乙基；

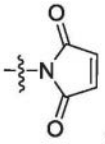
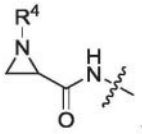
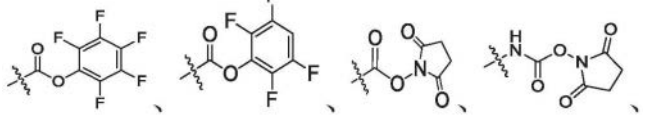
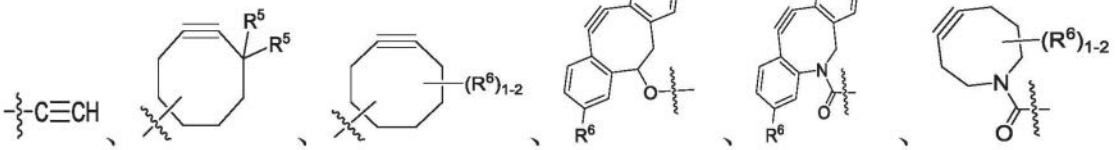
[0418] X_2是选自以下的自杀式间隔子：

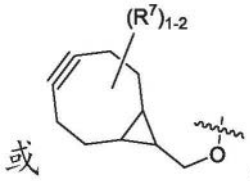


其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与基团的附接点或与基团的附接点；

[0419] L_1是包含2至4个氨基酸残基的二价肽接头；

[0420] L_2是接头，

[0421] R^8选自、$-N_3$、$-ONH_2$、$-NR^4C(=O)CH=CH_2$、SH、SSR^{13}、$-S(=O)_2(CH=CH_2)$、$-NR^4S(=O)_2(CH=CH_2)$、$-NR^4C(=O)CH_2Br$、$-NR^4C(=O)CH_2I$、$-NHC(=O)CH_2Br$、$-NHC(=O)CH_2I$、$-C(=O)NHNH_2$、、$-CO_2H$、$-NH_2$、、

[0422] 其中：

[0423] 每个R^4独立地选自H和C_1-C_6烷基；

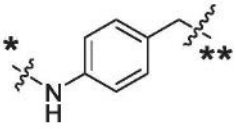
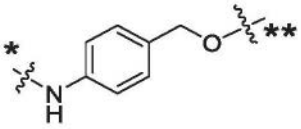
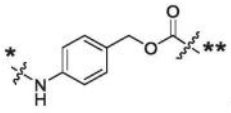
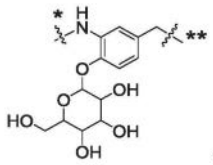
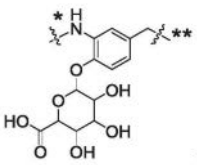
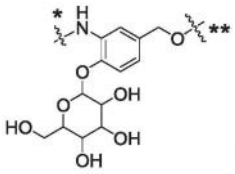
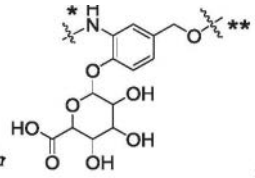
[0424] 每个R^5独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、C1和-OH；

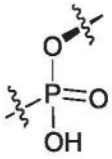
[0425] 每个R^6独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、C1、$-NH_2$、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、-CN、$-NO_2$和-OH，

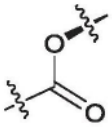
[0426] 并且

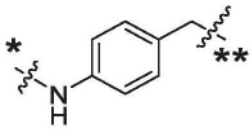
[0427] 每个R^7独立地选自H、C_{1-6}烷基、氟、被-C(=O)OH取代的苄氧基、被-C(=O)OH取代的苄基、被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基。

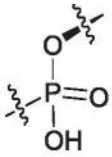
[0428] 实施例17.如实施例1至16中任一项所述的化合物，其中X2是选自以下的自杀式间

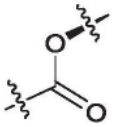
隔子：、、、、、和，

其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与Y_1的附接点、与基团的附接点或与

基团的附接点。

[0429] 实施例18.如实施例1至17中任一项所述的化合物，其中X_2是，

其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与Y_1的附接点、与基团的附接点或与

基团的附接点。

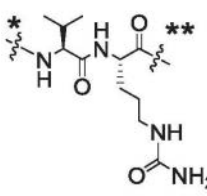
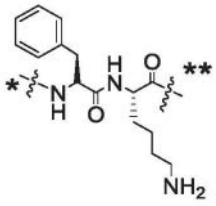
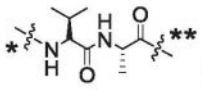
[0430] 实施例19.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中L_1是包含2至4个氨基酸残基的二价肽接头。

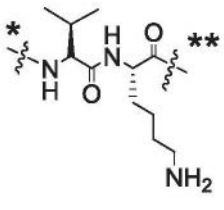
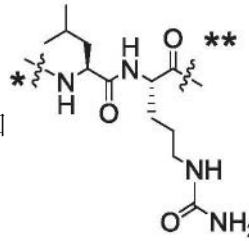
[0431] 实施例20.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中L_1是包含氨基酸残基的二价肽接头，所述氨基酸残基选自缬氨酸、瓜氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、色氨酸和酪氨酸。

[0432] 实施例21.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中L_1是包含至少一个缬氨酸(Val)或瓜氨酸(Cit)残基的二价肽接头。

[0433] 实施例22.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中L_1是选自ValCit、PheLys、ValAla和ValLys的二价二肽接头。

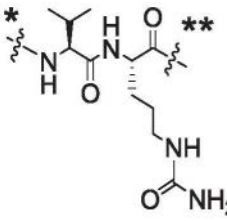
[0434] 实施例23.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中L_1是选自

(ValCit)、(PheLys)、(ValAla)、


（ValLys）和
（LeuCit）的二价二肽接头，其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点。

[0435] 实施例24.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中L_1是ValCit。

[0436] 实施例25.如实施例1至18中任一项所述的化合物，其中

[0437] L_1是
（ValCit），其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点。

[0438] 实施例26.如实施例1至25中任一项所述的化合物，其中L_2是接头。

[0439] 实施例27.如实施例1至25中任一项所述的化合物，其中L_2是选自以下的接头：

[0440] -*C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_p$(CH$_2$)$_m$**、-*C(=O)(CH$_2$)$_m$**、-*C(=O)(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_m$**、-*C(=O)(CH$_2$)$_m$NHC(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_p$(CH$_2$)$_m$**、-*((CH$_2$)$_m$O)$_p$(CH$_2$)$_m$**、-*((CH$_2$)$_m$O)$_p$(CH$_2$)$_m$**、-(CH$_2$)$_m$-、-*(CH$_2$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_m$**、-*(CH$_2$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_m$C(=O)NH(CH$_2$)$_m$**-、-*((CH$_2$)$_m$O)$_p$(CH$_2$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_m$**、-**((CH$_2$)$_m$O)$_p$CH$_2$)$_m$C(=O)NH(CH$_2$)$_m$**-、-*(CH$_2$)$_m$C(R$_3$)$_2$**-、和-*(CH$_2$)$_m$C(R$_3$)$_2$SS(CH$_2$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_m$**-，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点；

[0441] 并且其中：

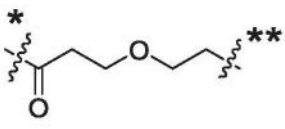
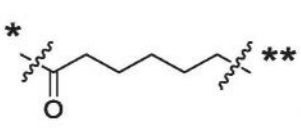
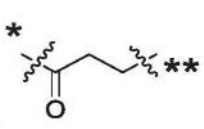
[0442] 每个R_3独立地选自H和C_1-C_6烷基；

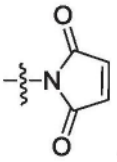
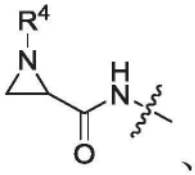
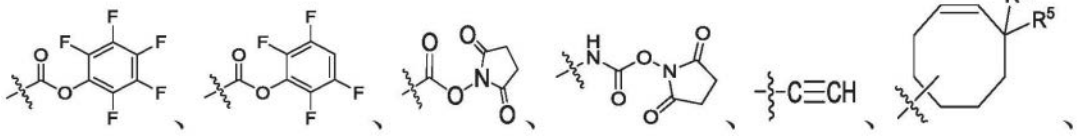
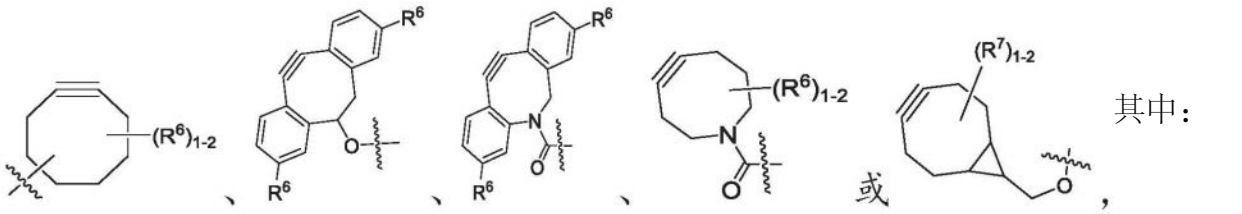
[0443] 每个m独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10，并且

[0444] 每个p独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14。

[0445] 实施例28.如实施例1至25中任一项所述的化合物，其中L_2是-*C(=O)((CH$_2$)$_m$O)$_p$(CH$_2$)$_m$**-或-*C(=O)(CH$_2$)$_m$**-，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点，

[0446] 并且其中每个m独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10并且p是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。

[0447] 实施例29.如实施例1至25中任一项所述的化合物，其中L_2是
、
、或
，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点。

[0448] 实施例30.如实施例1至29中任一项所述的化合物,其中R^8是 $-N_3$、$-ONH_2$、$-NR^4C(=O)CH=CH_2$、SH、$-SSR^{13}$、$-S(=O)_2(CH=CH_2)$、$-NR^4S(=O)_2(CH=CH_2)$、$-NR^4C(=O)CH_2Br$、$-NR^4C(=O)CH_2I$、$-NHC(=O)CH_2Br$、$-NHC(=O)CH_2I$、$-C(=O)NHNH_2$、 $-CO_2H$、$-NH_2$、  其中:

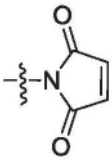
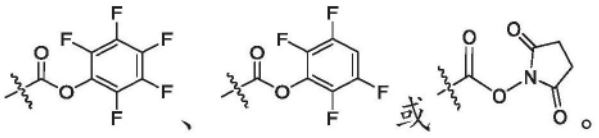
[0449] 每个R^4独立地选自H和C_1-C_6烷基;

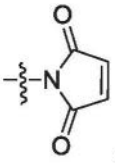
[0450] 每个R^5独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、C1和-OH;

[0451] 每个R^6独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、C1、$-NH_2$、$-OCH_3$、$-OCH_2CH_3$、$-N(CH_3)_2$、-CN、$-NO_2$和-OH,

[0452] 并且

[0453] 每个R^7独立地选自H、C_{1-6}烷基、氟、被-C(=O)OH取代的苄氧基、被-C(=O)OH取代的苄基、被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基。

[0454] 实施例31.如实施例1至29中任一项所述的化合物,其中R^8是 $-ONH_2$、。

[0455] 实施例32.如实施例1至29中任一项所述的化合物,其中R^8是。

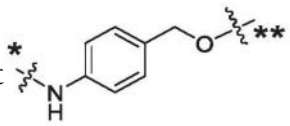
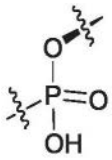
[0456] 实施例33.如实施例8所述的具有式(B-2)的化合物或其药学上可接受的盐:

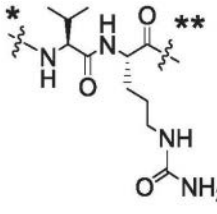
[0457] 其中:

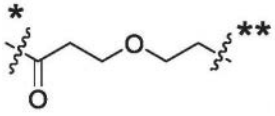
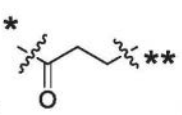
[0458] R^0是甲基或乙基;

[0459] R^1是甲基或异丙基;

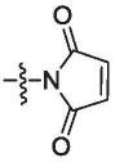
[0460] R^2是甲基或乙基；

[0461] X_2是，其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与基团的附接点；

[0462] L_1是（ValCit），其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点；

[0463] L_2是或，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点，

[0464] 并且

[0465] R^8是。

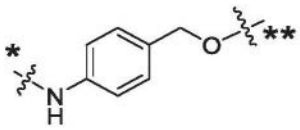
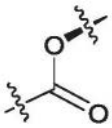
[0466] 实施例34.如实施例12所述的具有式(B-3)的化合物或其药学上可接受的盐：

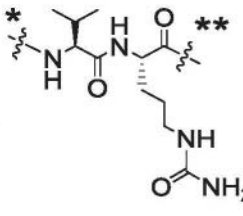
[0467] 其中：

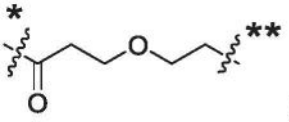
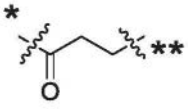
[0468] R^0是甲基或乙基；

[0469] R^1是甲基或异丙基；

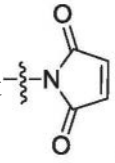
[0470] R^2是甲基或乙基；

[0471] X_2是，其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与基团的附接点；

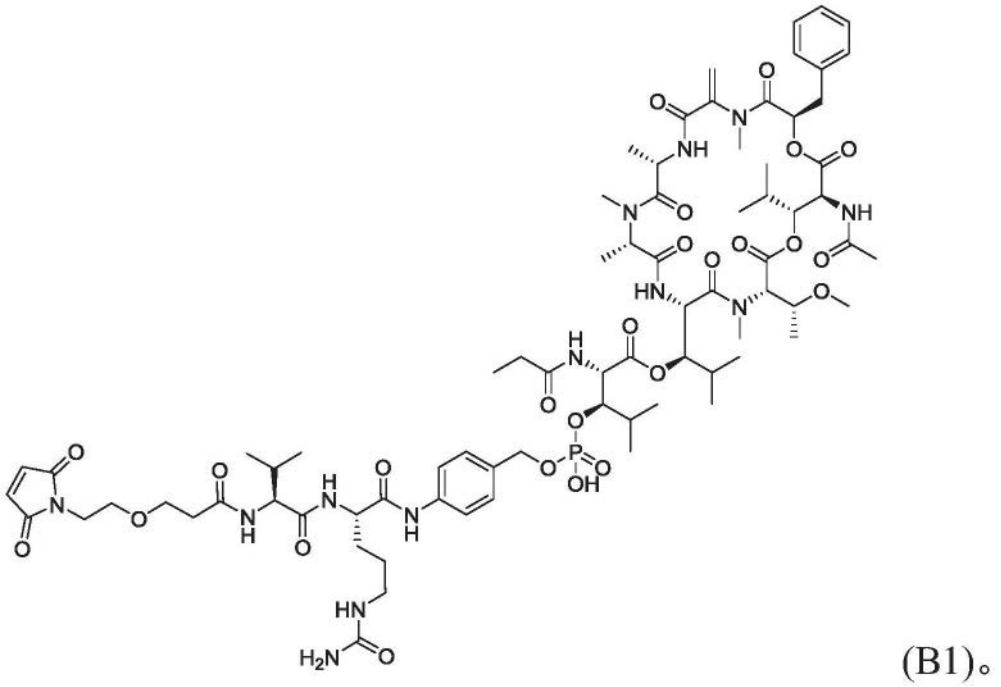
[0472] L_1是（ValCit），其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点；

[0473] L_2是 或 ，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点，

[0474] 并且

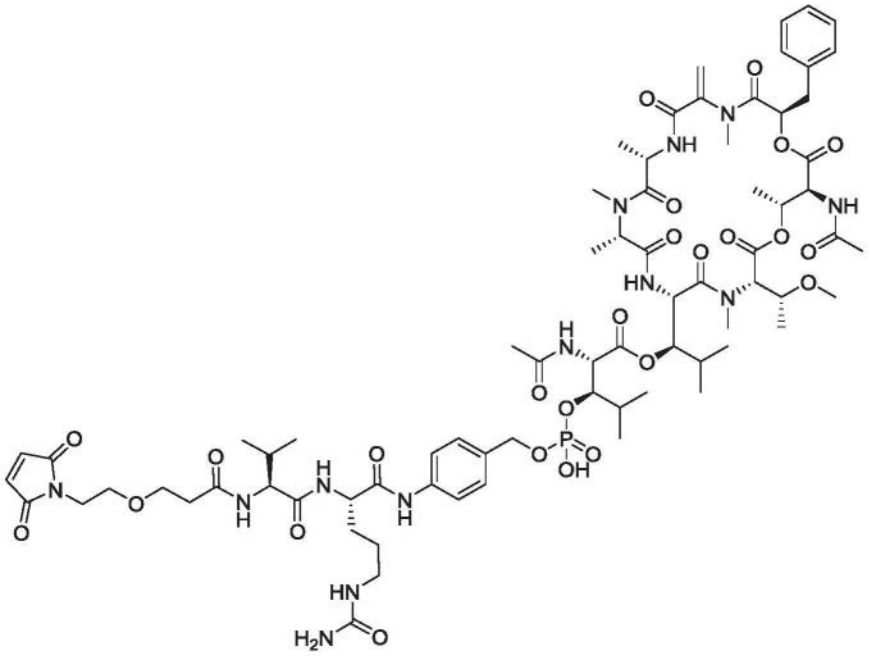
[0475] R^8是。

[0476] 实施例35.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物，其中所述化合物是

[0477] 

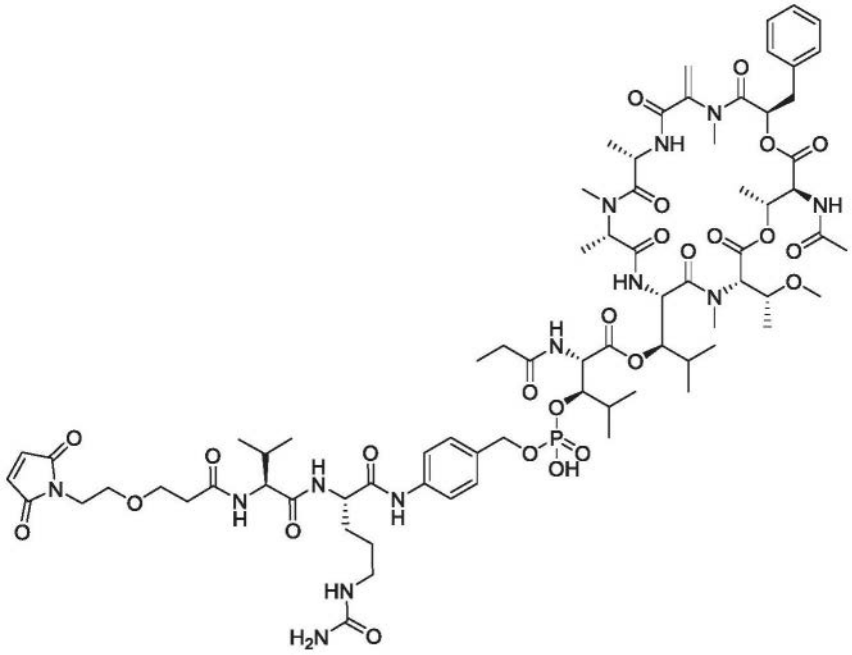
(B1)。

[0478] 实施例36.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物，其中所述化合物是

[0479] 

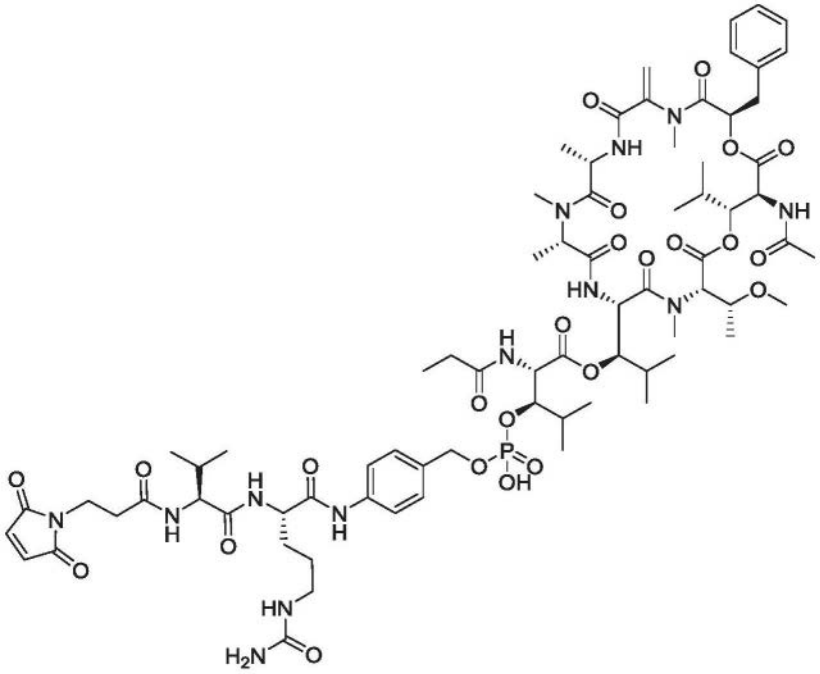
(B2)。

[0480] 实施例37.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物,其中所述化合物是

[0481] 

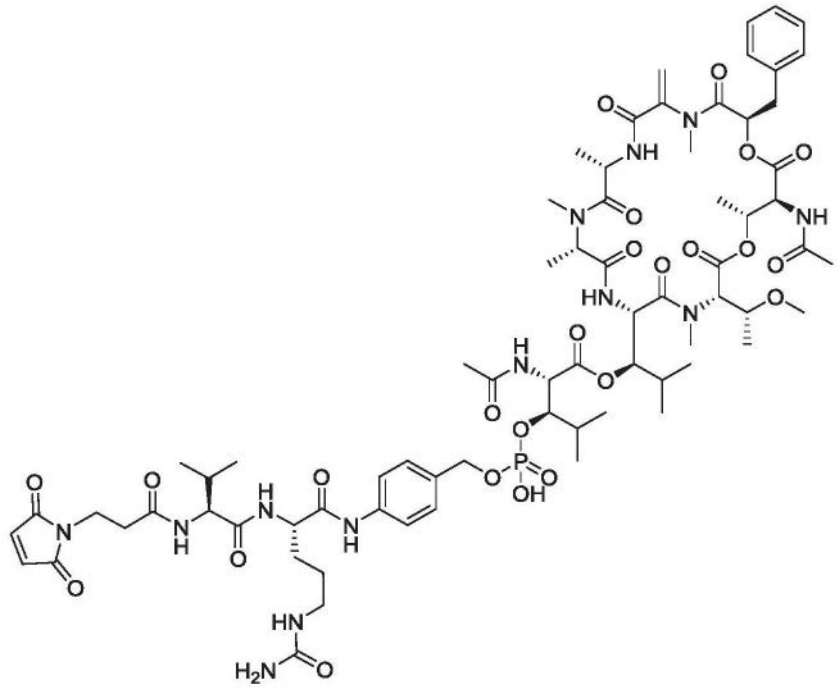
(B3)。

[0482] 实施例38.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物,其中所述化合物是

[0483] 

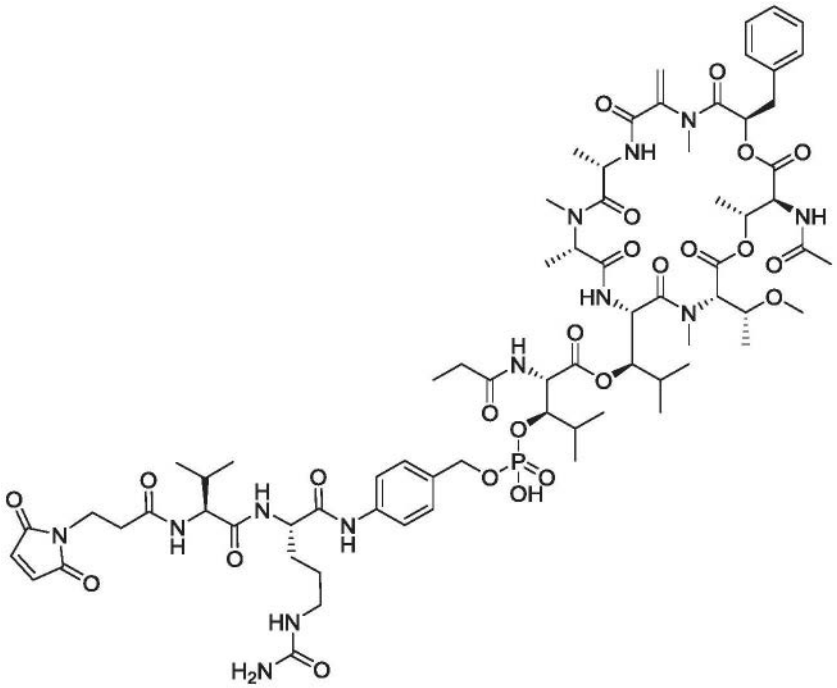
(B4)。

[0484] 实施例39.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物,其中所述化合物是

[0485] 

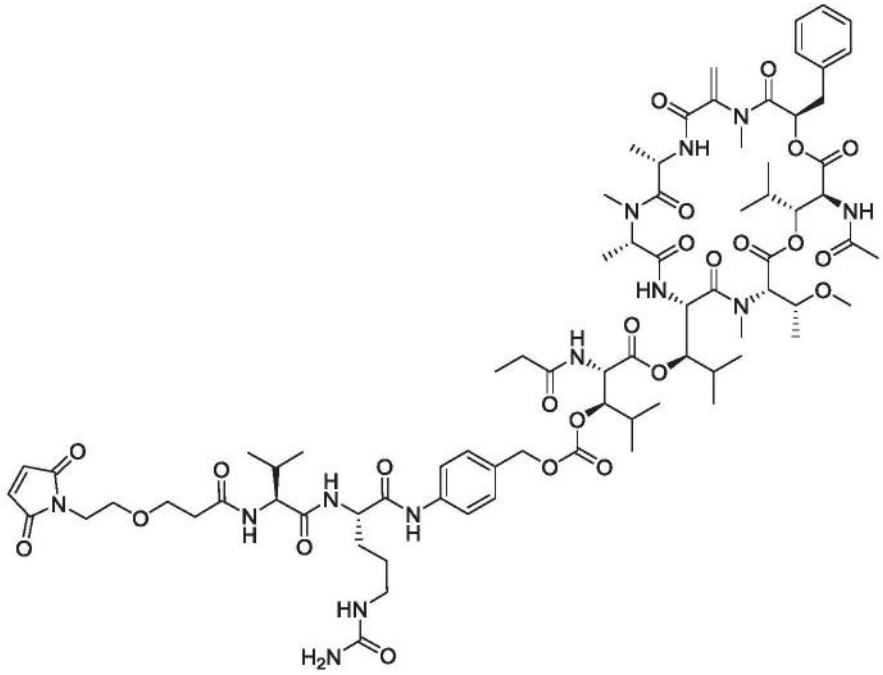
(B5)。

[0486] 实施例40.具有式(B)、式(B-1)或式(B-2)的化合物,其中所述化合物是

[0487] 

(B6)。

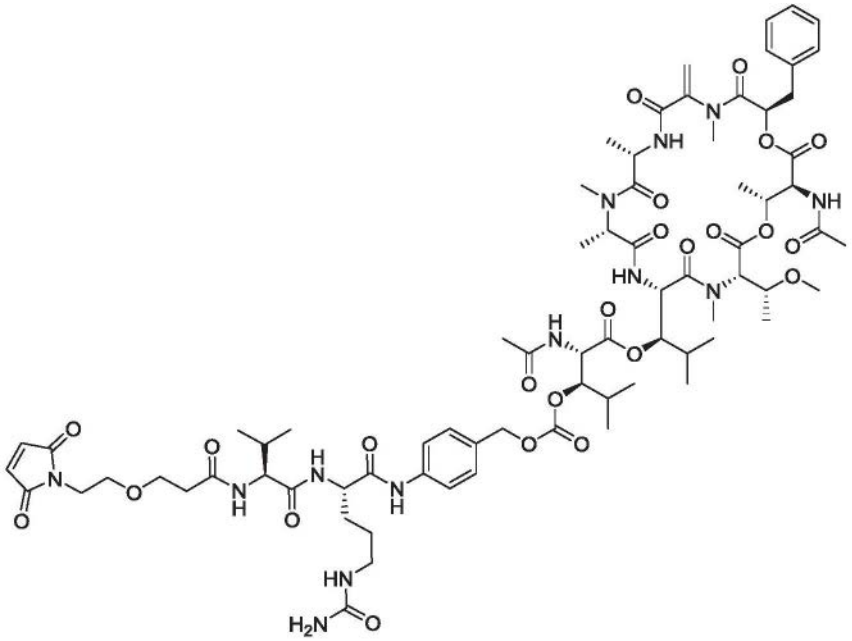
[0488] 实施例41.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物,其中所述化合物是

[0489] 

(B7)。

[0490] 实施例42.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物,其中所述化合物是

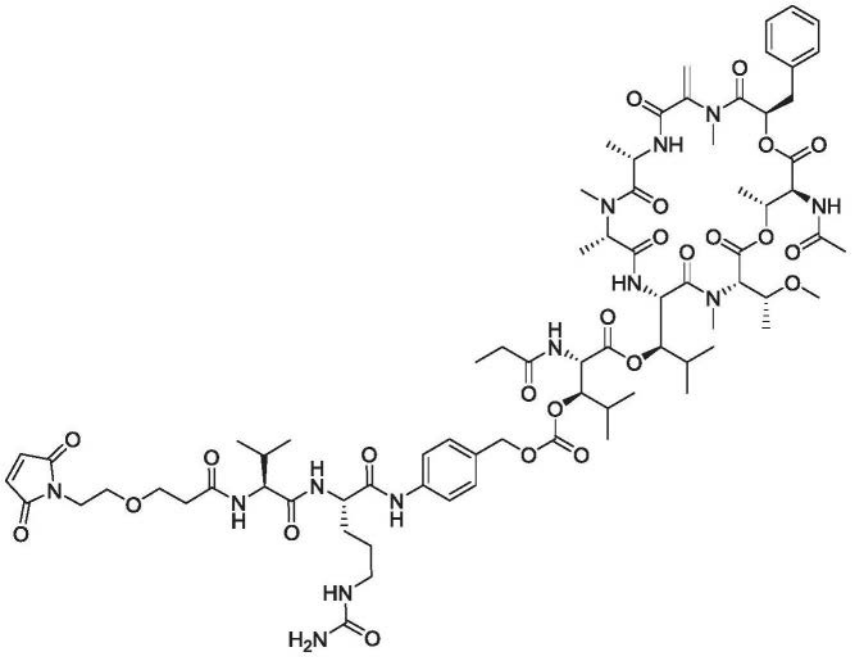
[0491]



(B8)。

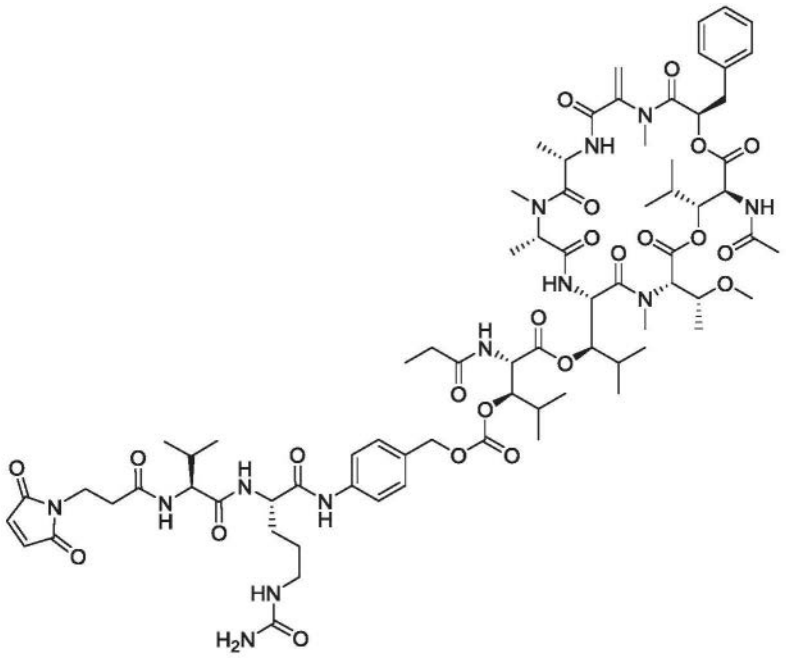
[0492] 实施例43.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物,其中所述化合物是

[0493]



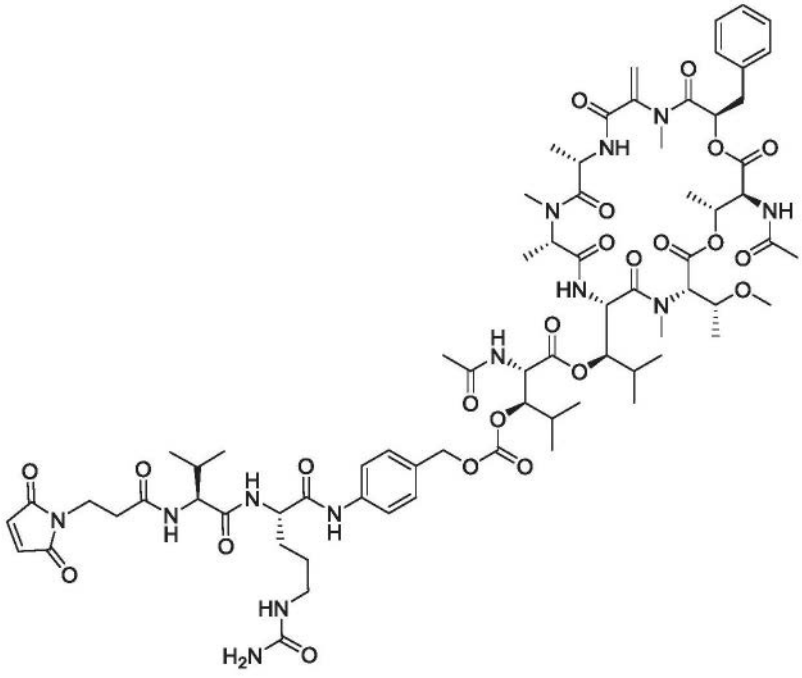
(B9)。

[0494] 实施例44.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物,其中所述化合物是

[0495] 

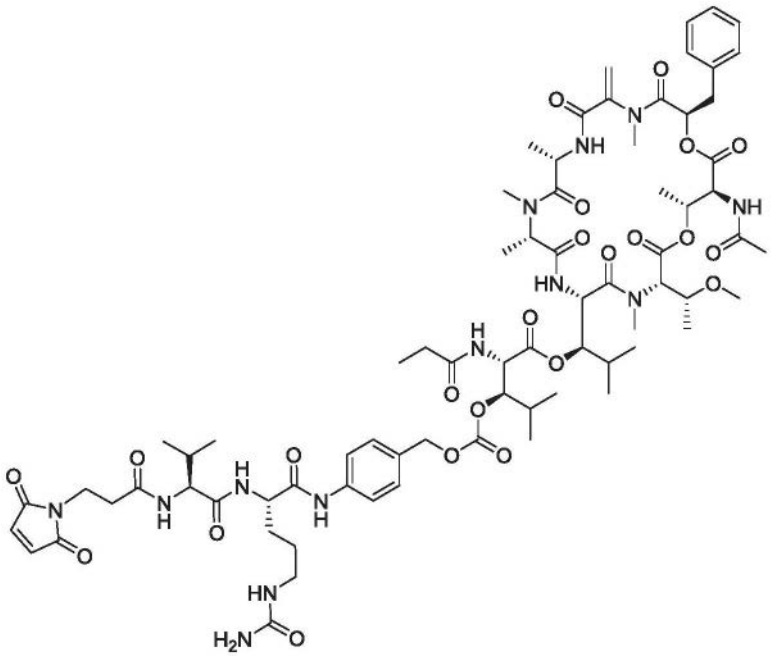
(B10)。

[0496] 实施例45.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物,其中所述化合物是

[0497] 

(B11)。

[0498] 实施例46.具有式(B)、式(B-1)或式(B-3)的化合物,其中所述化合物是

[0499] 

(B12)。

[0500] 抗体药物缀合物

[0501] 在一个方面,本发明的抗体药物缀合物是具有式(C)的缀合物:

[0502] $Ab-(L_A-(D)_n)_y$ (C)

[0503] 其中:

[0504] D是药物部分;

[0505] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段;

[0506] L_A是接头;

[0507] n是1、2、3或4,并且

[0508] y是1、2、3或4,

[0509] 其中所述接头-药物部分$(L_A-(D)_n)$共价附接至抗体或其抗原结合片段。

[0510] 在一个方面,本发明的抗体药物缀合物具有式(C)的结构,其中:

[0511] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0512] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段;

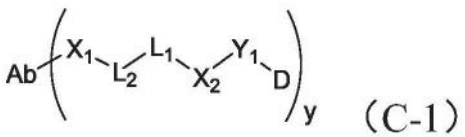
[0513] L_A是可裂解接头,其包含一个或多个接头组分,所述接头组分选自自杀式间隔子、磷酸基团、碳酸基团和二价肽接头;

[0514] n是1、2、3或4,并且

[0515] y是1、2、3或4,

[0516] 其中所述接头-药物部分$(L_A-(D)_n)$共价附接至抗体或其抗原结合片段。

[0517] 在一个方面,所述具有式(C)的抗体药物缀合物是具有式(C-1)的缀合物:

[0518] 

(C-1)

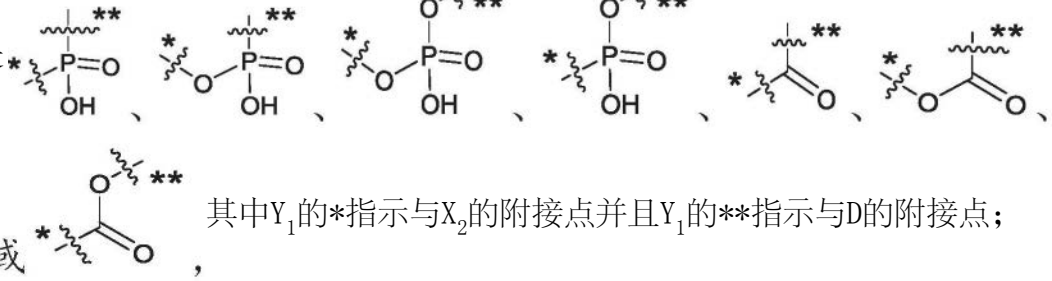
[0519] 其中:

[0520] D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂或GNAQ和GNA11的抑制剂;

[0521] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0522] X_1是二价偶联基团；

[0523] X_2是自杀式间隔子；

[0524] Y_1是

其中Y_1的*指示与X_2的附接点并且Y_1的**指示与D的附接点；

[0525] L_1是二价肽接头；

[0526] L_2是键或接头，并且

[0527] y是1、2、3或4。

[0528] 在具有式(C)的缀合物中，一个或多个接头-药物部分(L_B-(D)$_n$)可以与抗体或其抗原结合片段Ab共价附接，从而通过接头L_A将一个或多个药物部分D与抗体或其抗原结合片段Ab共价附接。L_A是能够将抗体或其抗原结合片段Ab与一个或多个药物部分D连接的任何化学部分。可以使用具有一个或多个相同的或不同的反应性官能团的双功能或多功能接头试剂形成具有式(C)的缀合物，其中一个或多个药物部分D与抗体或其抗原结合片段Ab共价连接。双功能或多功能接头试剂的反应性官能团之一用于与抗体或其抗原结合片段Ab上的基团例如硫醇或胺(例如半胱氨酸、N末端或氨基酸侧链如赖氨酸)反应以与接头L_A的一端形成共价键。双功能或多功能接头试剂的此类反应性官能团包括但不限于马来酰亚胺、硫醇和NHS酯。双功能或多功能接头试剂的一个或多个其他反应性官能团用于将一个或多个药物部分D共价附接至接头L_A。

[0529] 在一个方面，L_A是可裂解接头。在另一方面，L_A是不可裂解接头。在一些方面，L_A是酸不稳定接头、光不稳定接头、肽酶可裂解接头、酯酶可裂解接头、糖苷酶可裂解接头、磷酸二酯酶可裂解接头、二硫键可还原接头、亲水接头、或基于二羧酸的接头。

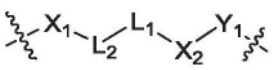
[0530] 在一个方面，L_A是可裂解接头，其包含一个或多个接头组分，所述接头组分选自自杀式间隔子、磷酸基团、碳酸基团和二价肽接头。

[0531] 在一个方面，L_A是可裂解接头，其包含一个或多个接头组分，所述接头组分选自自杀式间隔子、磷酸基团、碳酸基团、二价肽接头和二价偶联基团。

[0532] 在一个方面，L_A是可裂解接头，其包含一个或多个接头组分，所述接头组分选自自杀式间隔子、磷酸基团和二价肽接头。

[0533] 在一个方面，L_A是可裂解接头，其包含一个或多个接头组分，所述接头组分选自自杀式间隔子、磷酸基团、二价肽接头和二价偶联基团。

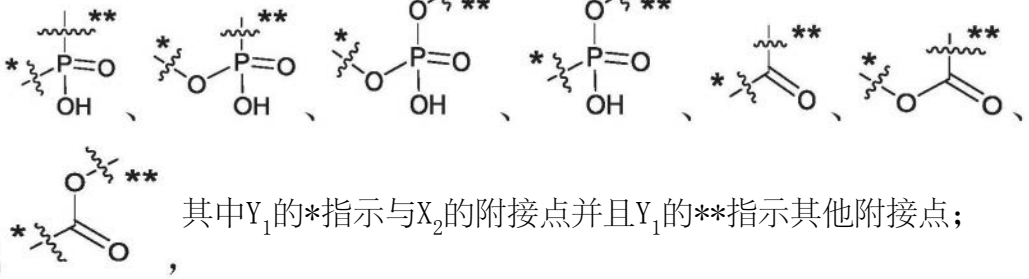
[0534] 在另一方面，所述接头(LA)具有以下式：

[0535] 

[0536] 其中：

[0537] X_1是二价偶联基团；

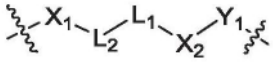
[0538] X_2是自杀式间隔子；

[0539] Y_1是其中Y_1的*指示与X_2的附接点并且Y_1的**指示其他附接点；

[0540] L_1是二价肽接头，并且

[0541] L_2是键或接头。

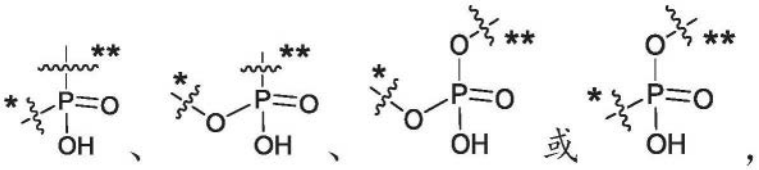
[0542] 在另一方面，所述接头(LA)具有以下式：

[0543] 

[0544] 其中：

[0545] X_1是二价偶联基团；

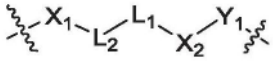
[0546] X_2是自杀式间隔子；

[0547] Y_1是其中Y_1的*指示与X_2的附接点；

[0548] L_1是二价肽接头，并且

[0549] L_2是键或接头。

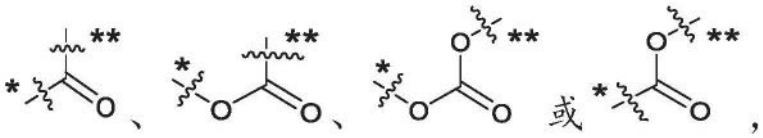
[0550] 在另一方面，所述接头(LA)具有以下式：

[0551] 

[0552] 其中：

[0553] X_1是二价偶联基团；

[0554] X_2是自杀式间隔子；

[0555] Y_1是其中Y_1的*指示与X_2的附接点；

[0556] L_1是二价肽接头，并且

[0557] L_2是键或接头。

[0558] 虽然特定的缀合物分子的药物与抗体的比率具有精确的整数值(例如，式(C)中的n和y的乘积)，但应理解所述值通常为用于描述含有许多分子的样品的平均值，由于某种程度的异质性，通常与缀合步骤相关。缀合物样品的平均载量在本文中称为药物对抗体比率或“DAR”。在一些方面，DAR在约1与约5之间，并且典型地是约1、2、3或4。在一些方面，按重量计至少50％的样品是具有平均DAR加或减2的化合物，并且优选地至少50％的样品是含有平均DAR加或减1的缀合物。其他方面包括其中DAR是约2的缀合物。在一些方面，“约y”的DAR意

指DAR的测量值在式(I)中n和y的乘积的20％内。在一些方面,“约n”的DAR意指DAR的测量值在式(II)中n的20％内。

[0559] 在一个方面,在具有式(C)的缀合物中药物与抗体的平均摩尔比(即,n和y的乘积的平均值,也称为药物与抗体的比率(DAR))是约1至约10、约1至约6(例如,0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0)、约1至约5、约1.5至约4.5、或约2至约4。

[0560] 在由本披露提供的一个方面,缀合物具有实质上高的纯度并且具有以下特征中的一个或多个:(a)大于约90％(例如大于或等于约91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、或100％)、优选大于约95％的缀合物种类是单体的,(b)缀合物制剂中的未缀合的接头水平小于约10％(例如小于或等于约9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、或0％)(相对于总接头),(c)小于10％的缀合物种类是交联的(例如小于或等于约9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、或0％),(d)缀合物制剂中的游离药物(ADP诱导的血小板凝集抑制剂,例如GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂、或GNAQ和GNA11的抑制剂)水平小于约2％(例如小于或等于约1.5％、1.4％、1.3％、1.2％、1.1％、1.0％、0.9％、0.8％、0.7％、0.6％、0.5％、0.4％、0.3％、0.2％、0.1％、或0％)(相对于总药物的mol/mol)。

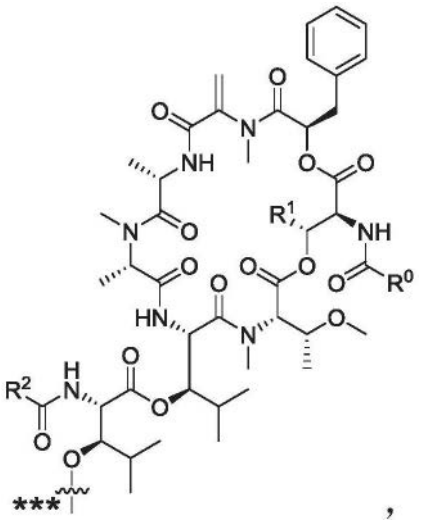
[0561] 本发明的抗体药物缀合物的某些方面及实例是提供在另外的枚举型实施例的下列列表中。应认识到,每个实施例中指定的特征可以与其他指定特征组合以提供本发明的另外实施例。

[0562] 实施例47.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是GNAQ抑制剂。

[0563] 实施例48.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是GNA11抑制剂。

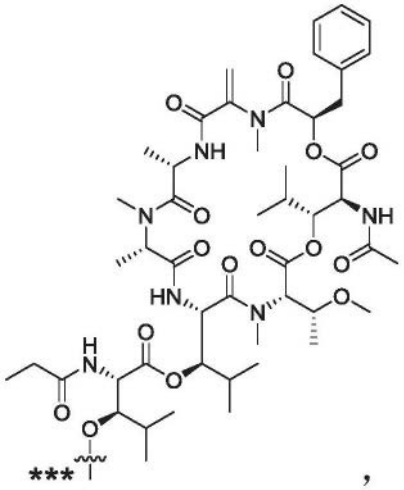
[0564] 实施例49.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是GNAQ和GNA11的抑制剂。

[0565] 实施例50.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是

[0566] 

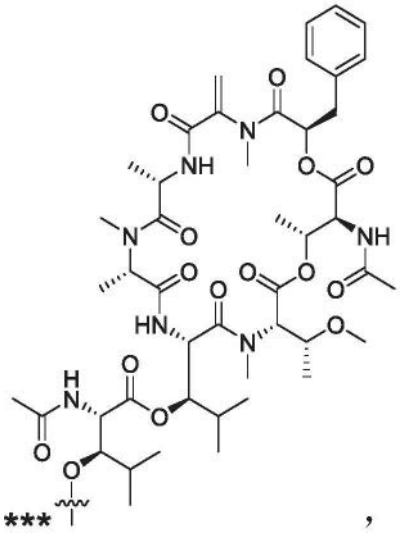
[0567] 其中R^0是甲基或乙基,R_1是甲基或异丙基,R_2是甲基或乙基,并且***指示与L_A或Y_1的附接点。

[0568] 实施例51.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是

[0569] 

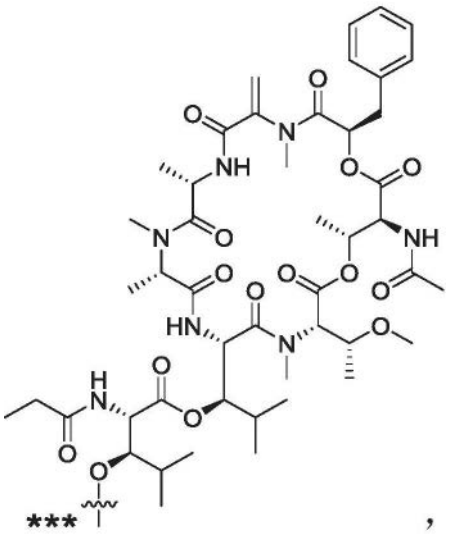
[0570] 其中***指示与L_A或Y_1的附接点。

[0571] 实施例52.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是

[0572] 

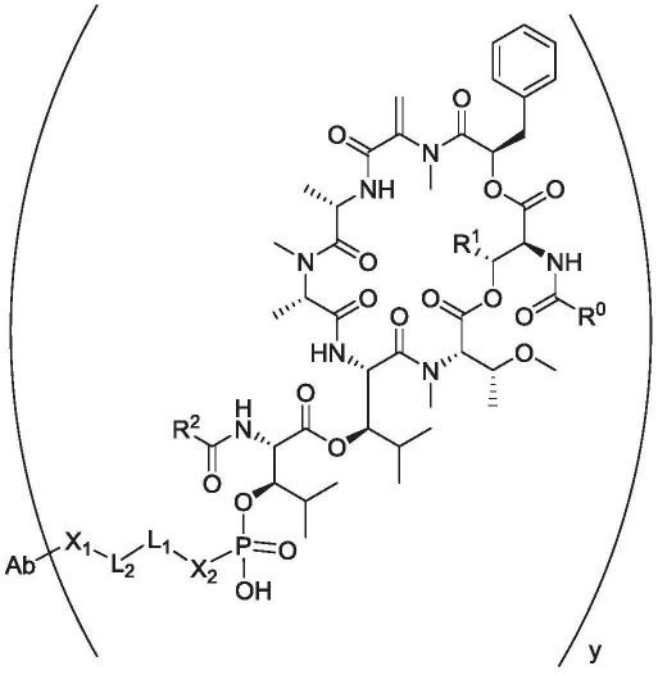
[0573] 其中***指示与L_A或Y_1的附接点。

[0574] 实施例53.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,其中D是

[0575] 

[0576] 其中***指示与L_A或Y_1的附接点。

[0577] 实施例54.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,具有式(C-2)的结构:

[0578] 

(C-2),

[0579] 其中:

[0580] R^0是甲基或乙基;

[0581] R^1是甲基或异丙基;

[0582] R^2是甲基或乙基;

[0583] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段;

[0584] X_1是二价偶联基团;

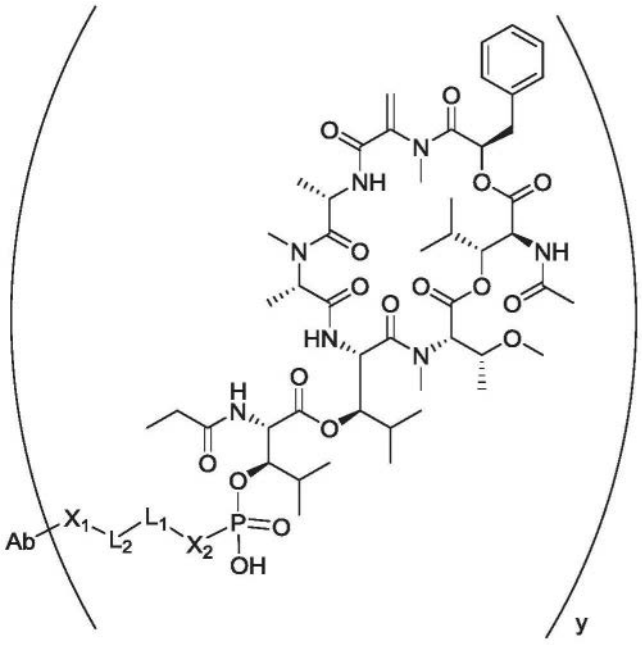
[0585] X_2是自杀式间隔子;

[0586] L_1是二价肽接头;

[0587] L_2是键或接头,并且

[0588] y是1、2、3或4。

[0589] 实施例55.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,具有式(C-2a)的结构:

[0590] 

(C-2a),

[0591] 其中：

[0592] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0593] X_1是二价偶联基团；

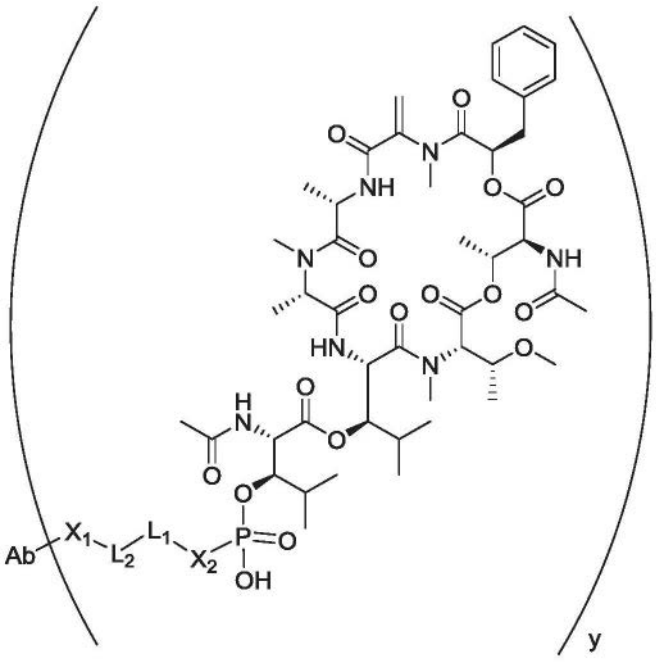
[0594] X_2是自杀式间隔子；

[0595] L_1是二价肽接头；

[0596] L_2是键或接头，并且

[0597] y是1、2、3或4。

[0598] 实施例56.具有式(C)或式(C-1)的缀合物，具有式(C-2b)的结构：

[0599] 

(C-2b),

[0600] 其中：

[0601] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0602] X_1是二价偶联基团;

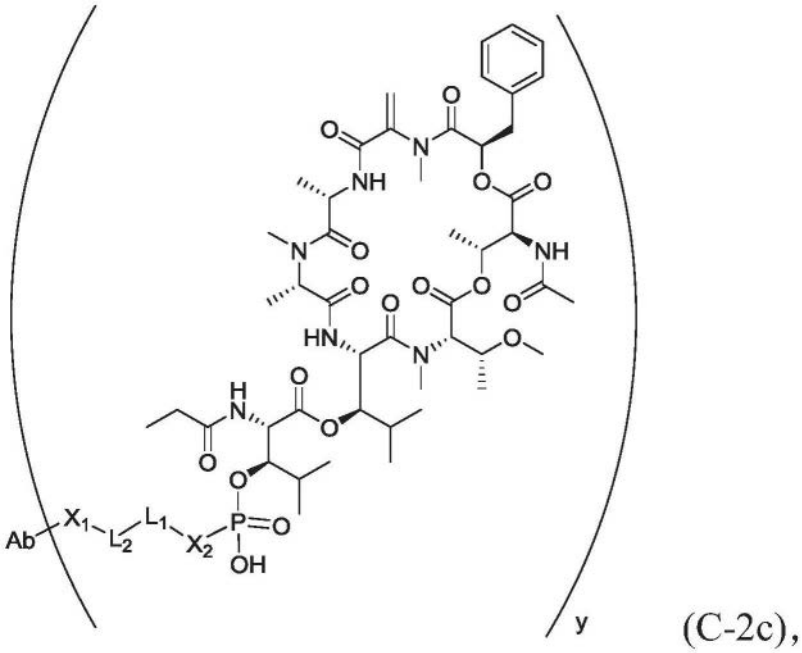
[0603] X_2是自杀式间隔子;

[0604] L_1是二价肽接头;

[0605] L_2是键或接头,并且

[0606] y是1、2、3或4。

[0607] 实施例57.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,具有式(C-2c)的结构:

[0608] 

(C-2c),

[0609] 其中:

[0610] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段;

[0611] X_1是二价偶联基团;

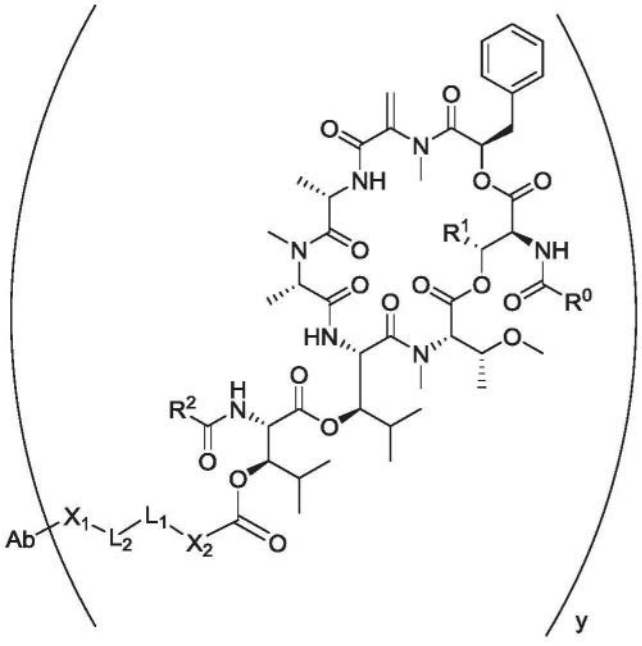
[0612] X_2是自杀式间隔子;

[0613] L_1是二价肽接头;

[0614] L_2是键或接头,并且

[0615] y是1、2、3或4。

[0616] 实施例58.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,具有式(C-3)的结构:

[0617] 

(C-3),

[0618] 其中：

[0619] R^0是甲基或乙基；

[0620] R^1是甲基或异丙基；

[0621] R^2是甲基或乙基；

[0622] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0623] X_1是二价偶联基团；

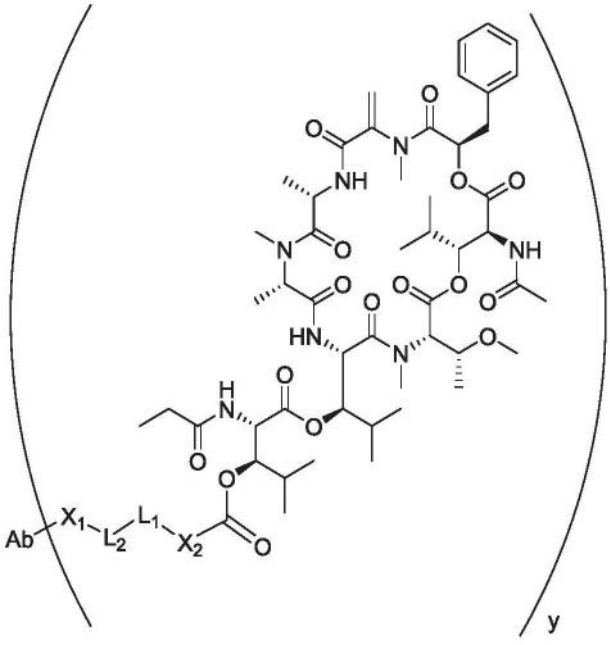
[0624] X_2是自杀式间隔子；

[0625] L_1是二价肽接头；

[0626] L_2是键或接头,并且

[0627] y是1、2、3或4。

[0628] 实施例59.具有式(C)或式(C-1)的缀合物,具有式(C-3a)的结构：

[0629] 

(C-3a),

[0630] 其中：

[0631] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0632] X_1是二价偶联基团；

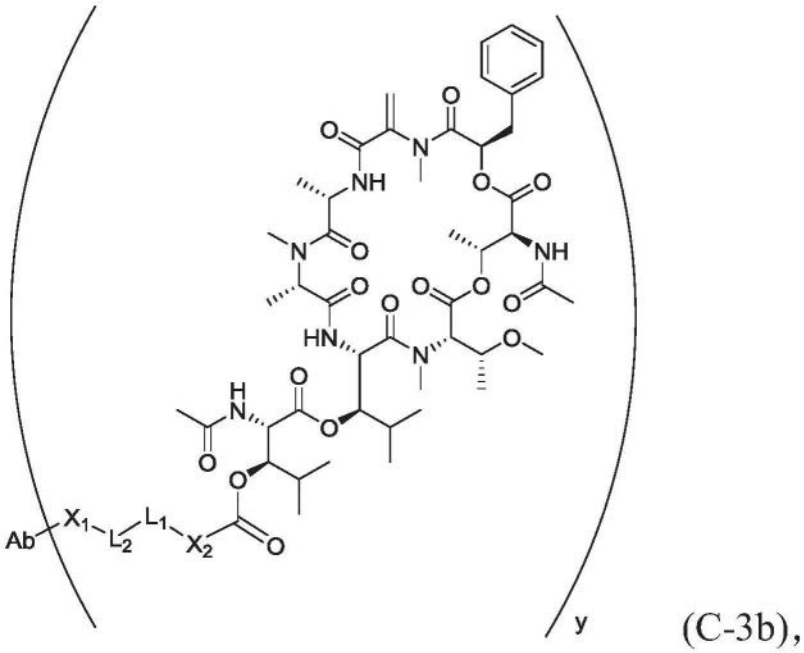
[0633] X_2是自杀式间隔子；

[0634] L_1是二价肽接头；

[0635] L_2是键或接头，并且

[0636] y是1、2、3或4。

[0637] 实施例60.具有式(C)或式(C-1)的缀合物，具有式(C-3b)的结构：

[0638] 

(C-3b)，

[0639] 其中：

[0640] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0641] X_1是二价偶联基团；

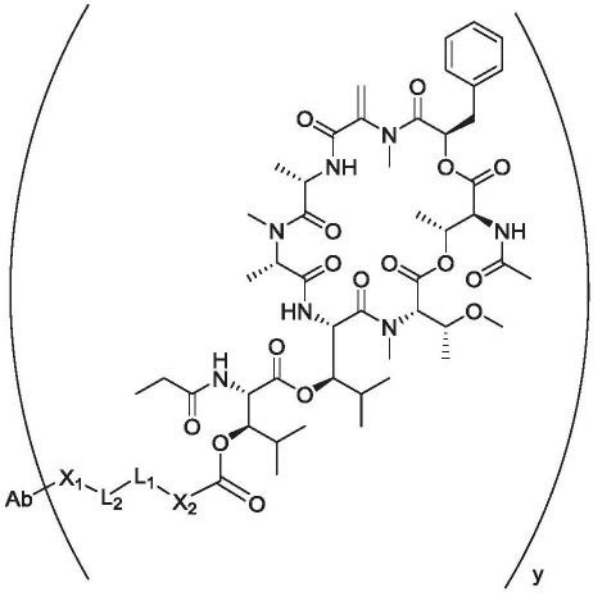
[0642] X_2是自杀式间隔子；

[0643] L_1是二价肽接头；

[0644] L_2是键或接头，并且

[0645] y是1、2、3或4。

[0646] 实施例61.具有式(C)或式(C-1)的缀合物，具有式(C-3c)的结构：

[0647] 

(C-3c),

[0648] 其中：

[0649] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

[0650] X_1是二价偶联基团；

[0651] X_2是自杀式间隔子；

[0652] L_1是二价肽接头；

[0653] L_2是键或接头，并且

[0654] y是1、2、3或4。

[0655] 实施例62.如实施例54所述的具有式(C-2)缀合物或如实施例58所述的具有式(C-3)的缀合物：

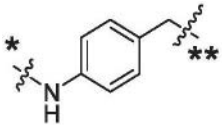
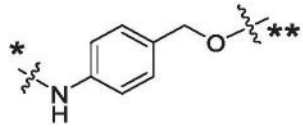
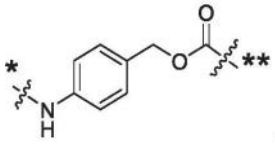
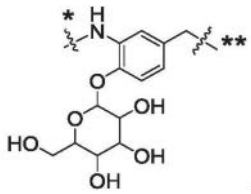
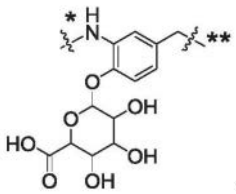
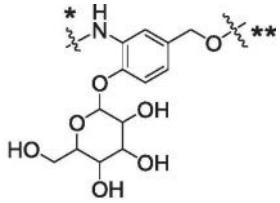
[0656] 其中：

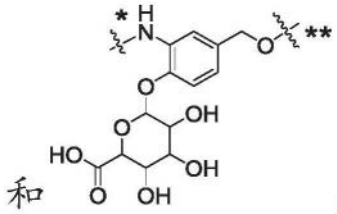
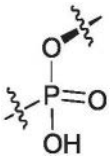
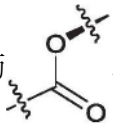
[0657] R^0是甲基或乙基；

[0658] R^1是甲基或异丙基；

[0659] R^2是甲基或乙基；

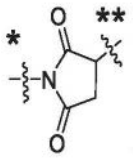
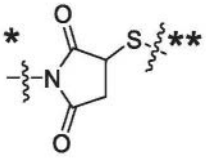
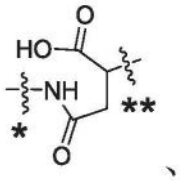
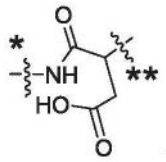
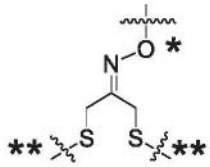
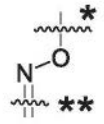
[0660] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

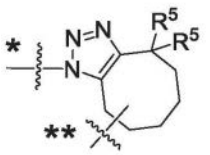
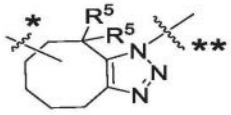
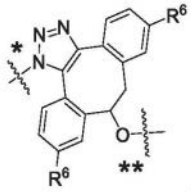
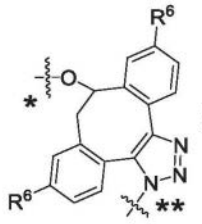
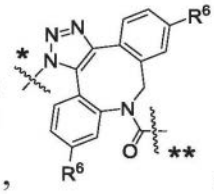
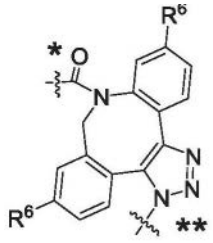
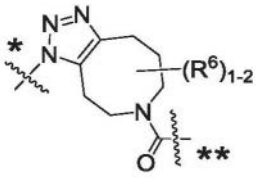
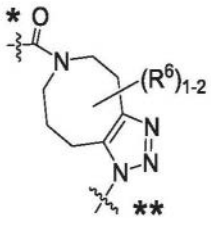
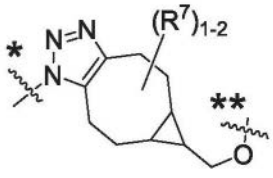
[0661] X_2是选自以下的自杀式间隔子：、、、、、


和 
其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与 基团的附接点或与  基团的附接点；

[0662] L_1是包含2至4个氨基酸残基的二价肽接头；

[0663] L_2是接头；

[0664] X_1是选自以下的二价偶联基团：、、、、、、-*$NR^4C(=O)CH_2$**-、-*NHC(=O)CH_2**-、-*S(=O)$_2CH_2CH_2$**-、-*$(CH_2)_2S(=O)_2CH_2CH_2$**-、-*$NR^4S(=O)_2CH_2CH_2$**-、-*$NR^4C(=O)CH_2CH_2$**-、-NH-、-C(=O)-、-*NHC(=O)**-、-*$CH_2NHCH_2CH_2$**-、-*$NHCH_2CH_2$**-、-S-、

[0665] 、、、、、、、、、**-，其中X_1的*指示与L_2的附接点并且X_1的**指示与Ab的附接点；

[0666] 并且其中：

[0667] 每个R^4独立地选自H和C_1-C_6烷基；

[0668] 每个R^5独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、Cl和-OH；

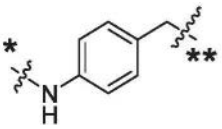
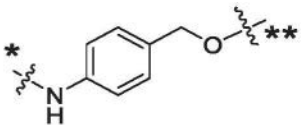
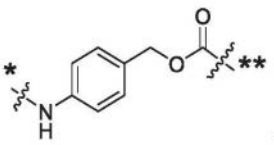
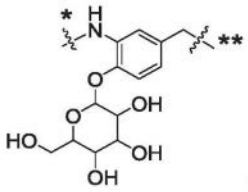
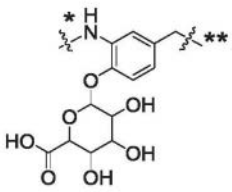
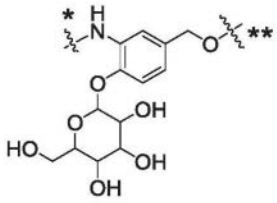
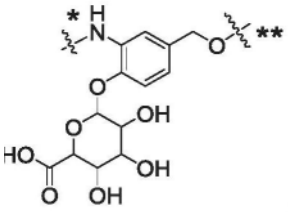
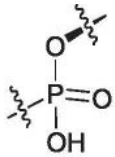
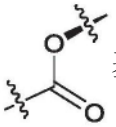
[0669] 每个R^6独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、Cl、-NH_2、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-$N(CH_3)_2$、-CN、-NO_2和-OH，

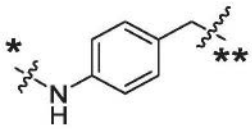
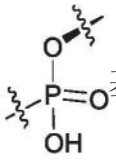
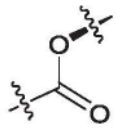
[0670] 并且

[0671] 每个R^7独立地选自H、C_{1-6}烷基、氟、被-C(=O)OH取代的苄氧基、被-C(=O)OH取代的苄基、被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基，

[0672] 并且

[0673] y是1、2、3或4。

[0674] 实施例63.如实施例54至62中任一项所述的缀合物，其中X_2是选自以下的自杀式间隔子：、、、、、和，其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的料指示与Y_1的附接点、或与基团的附接点或与基团的附接点。

[0675] 实施例64.如实施例54至63中任一项所述的缀合物，其中X_2是，其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与Y_1的附接点、或与基团的附接点或与基团的附接点。

[0676] 实施例65.如实施例54至64中任一项所述的缀合物，其中L_1是包含2至4个氨基酸残基的二价肽接头。

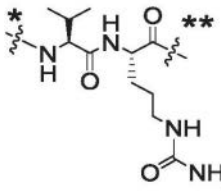
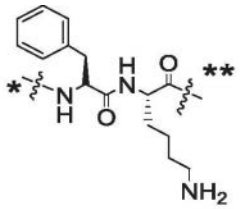
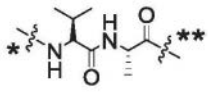
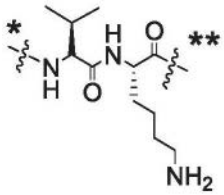
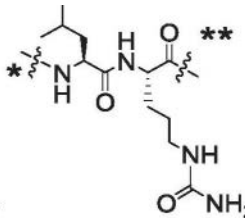
[0677] 实施例66.如实施例54至65中任一项所述的缀合物，其中L_1是包含氨基酸残基的二价肽接头，所述氨基酸残基选自缬氨酸、瓜氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、色氨酸和酪氨酸。

[0678] 实施例67.如实施例54-64中任一项所述的缀合物，其中L_1是包含至少一个缬氨酸(Val)或瓜氨酸(Cit)残基的二价肽接头。

[0679] 实施例68.如实施例54至64中任一项所述的缀合物，其中L_1是选自ValCit、

PheLys、ValAla和ValLys的二价二肽接头。

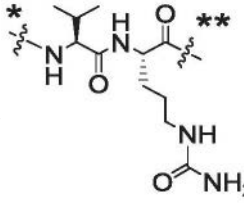
[0680] 实施例69.如实施例54至64中任一项所述的缀合物,其中L_1是选自


（ValCit）、

（PheLys）、

(ValAla)、

（ValLys）和

（LeuCit）的二价二肽接

头,其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点。

[0681] 实施例70.如实施例54至64中任一项所述的缀合物,其中L_1是ValCit。

[0682] 实施例71.如实施例54至64中任一项所述的缀合物,其中

[0683] L_1是

（ValCit），其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点。

[0684] 实施例72.如实施例54至71中任一项所述的缀合物,其中L_2是接头。

[0685] 实施例73.如实施例54至71中任一项所述的缀合物,其中L_2是选自以下的接头:

[0686] -*C(=O)$((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$**、-*C(=O)$(CH_2)_m$**、-*C(=O)$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_m$**、-*C(=O)$(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$**、-*$((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$**、-*$((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$**、-$(CH_2)_m$-、-*$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$**、-*$(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$**-、-*$((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$**、-**$((CH_2)_mO)_pCH_2)_mC(=O)NH(CH_2)_m$**-、-*$(CH_2)_mC(R_3)_2$**-、和-*$(CH_2)_mC(R_3)_2SS(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m$**-,其中$L_2$的*指示与$L_1$的附接点并且$L_2$的**指示与$X_1$的附接点;

[0687] 并且其中:

[0688] 每个R_3独立地选自H和C_1-C_6烷基;

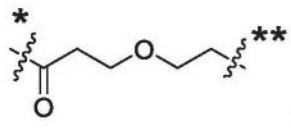
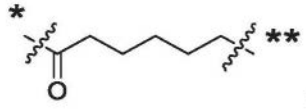
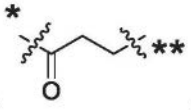
[0689] 每个m独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9和10,以及

[0690] 每个p独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14。

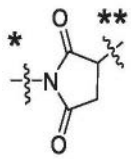
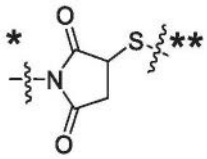
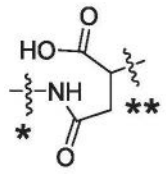
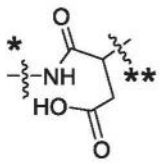
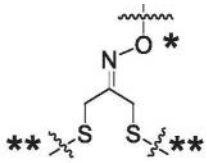
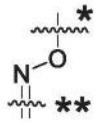
[0691] 实施例74.如实施例54至71中任一项所述的缀合物,其中L_2是-*C(=O)$((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m$**-或-*C(=O)$(CH_2)_m$**-,其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与X_1的附接点,

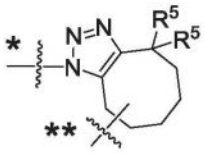
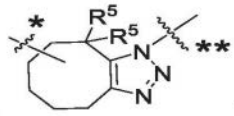
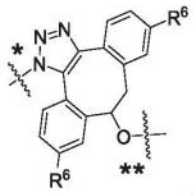
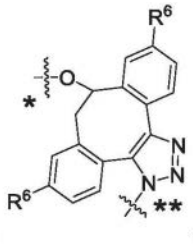
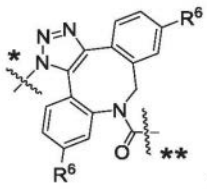
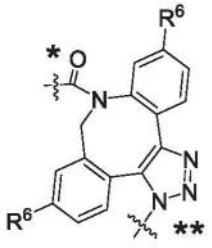
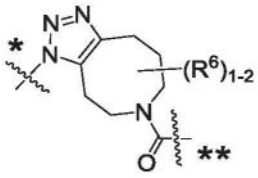
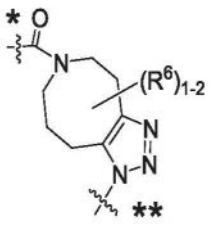
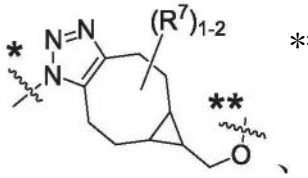
[0692] 并且其中每个m独立地选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10并且p是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。

[0693] 实施例75.如实施例54至71中任一项所述的缀合物,其中L_2是


、

、或

，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与X_1的附接点。

[0694] 实施例76.如实施例54至75中任一项所述的缀合物，

[0695] 其中X_1是选自以下的二价偶联基团：

、

、

、

、

、

、-*$NR^4C(=O)CH_2$**-、-*NHC(=O)CH_2**-、-*S(=O)$_2CH_2CH_2$**-、-*$(CH_2)_2S(=O)_2CH_2CH_2$**-、-*$NR^4S(=O)_2CH_2CH_2$**-、-*$NR^4C(=O)CH_2CH_2$**-、-NH-、-C(=O)-、-*NHC(=O)**-、-*$CH_2NHCH_2CH_2$**-、-*$NHCH_2CH_2$**-、-S-、

[0696]

、

、

、

、

、

、

、

、

、**-，其中X_1的*指示与L_2的附接点并且X_1的**指示与Ab的附接点；

[0697] 并且其中：

[0698] 每个R^4独立地选自H和C_1-C_6烷基；

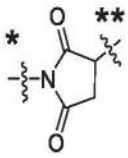
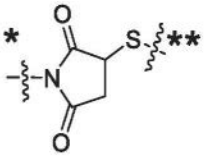
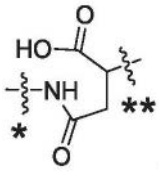
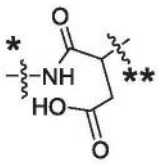
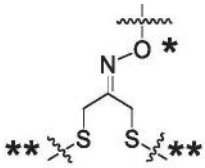
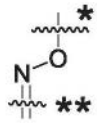
[0699] 每个R^5独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、Cl和-OH；

[0700] 每个R^6独立地选自H、C_1-C_6烷基、F、Cl、-NH_2、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-$N(CH_3)_2$、-CN、-NO_2和-OH，

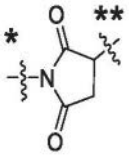
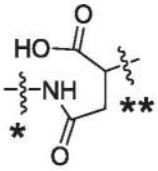
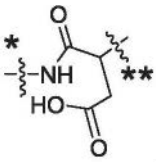
[0701] 并且

[0702] 每个R^7独立地选自H、C_{1-6}烷基、氟、被-C(=O)OH取代的苄氧基、被-C(=O)OH取代的苄基、被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和被-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基。

[0703] 实施例77.如实施例54至75中任一项所述的缀合物，

[0704] 其中X_1是选自以下的二价偶联基团：、、、、和，其中X_1的*指示与L_2的附接点并且X_1的**指示与Ab的附接点。

[0705] 实施例78.如实施例54至75中任一项所述的缀合物，

[0706] 其中X_1是选自以下的二价偶联基团：、和，其中X_1的*指示与L_2的附接点并且X_1的**指示与Ab的附接点。

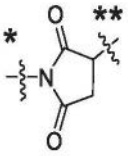
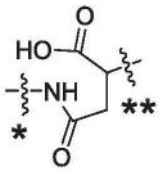
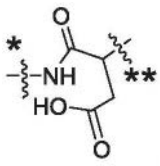
[0707] 实施例79.如实施例54所述的具有式(C-2)的缀合物，其中：

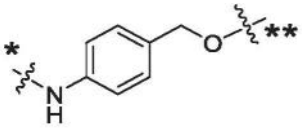
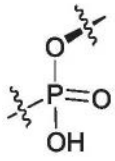
[0708] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

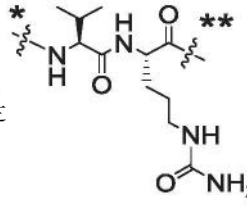
[0709] R^0是甲基或乙基；

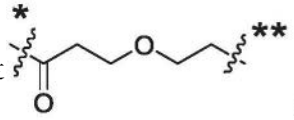
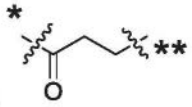
[0710] R^1是甲基或异丙基；

[0711] R^2是甲基或乙基；

[0712] X_1是选自以下的二价偶联基团：、和，其中X_1的*指示与L_2的附接点并且X_1的**指示与Ab的附接点；

[0713] X_2是，其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与基团的附接点；

[0714] L_1是（ValCit），其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点；

[0715] L_2是 或 ，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点，

[0716] 并且

[0717] y是1、2、3或4。

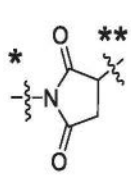
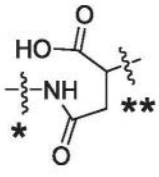
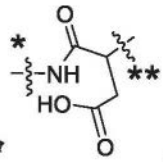
[0718] 实施例80.如实施例58所述的具有式(C-3)的缀合物，其中：

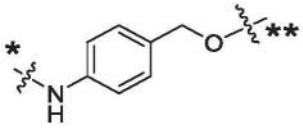
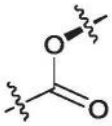
[0719] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段；

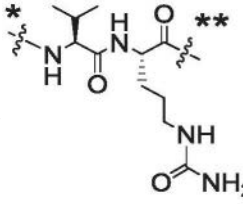
[0720] R^0是甲基或乙基；

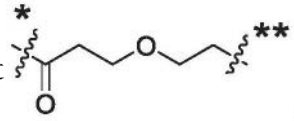
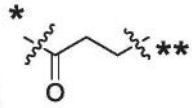
[0721] R^1是甲基或异丙基；

[0722] R^2是甲基或乙基；

[0723] X_1是选自以下的二价偶联基团：、、和，其中X_1的*指示与L_2的附接点并且X_1的**指示与Ab的附接点；

[0724] X_2是，其中X_2的*指示与L_1的附接点并且X_2的**指示与基团的附接点；

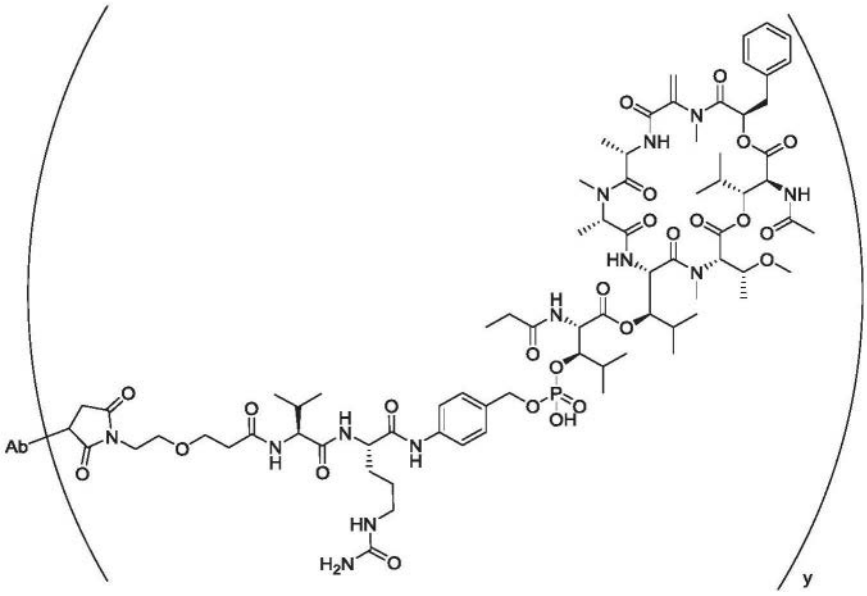
[0725] L_1是（ValCit），其中L_1的*指示与L_2的附接点并且L_1的**指示与X_2的附接点；

[0726] L_2是 或 ，其中L_2的*指示与L_1的附接点并且L_2的**指示与R_8的附接点，

[0727] 并且

[0728] y是1、2、3或4。

[0729] 实施例81.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-2)的缀合物：

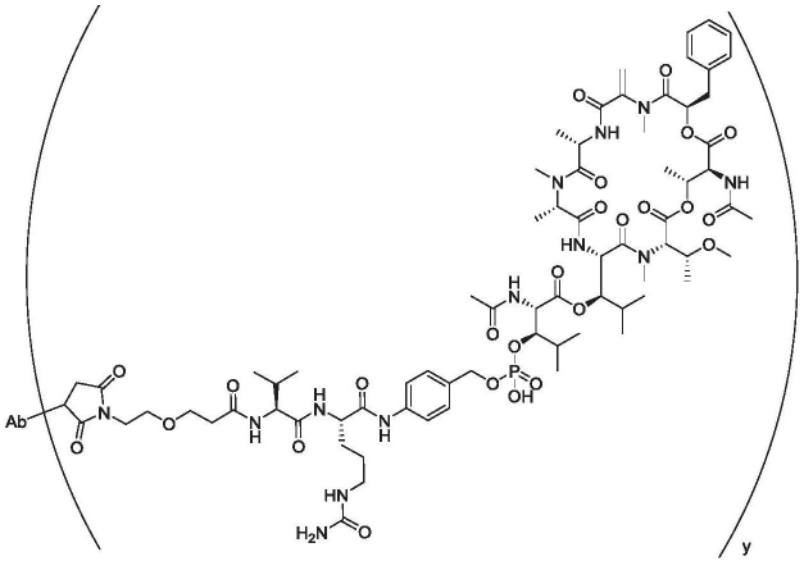
[0730] 

[0731] 其中：

[0732] y是2或4,并且

[0733] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0734] 实施例82.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-2)的缀合物：

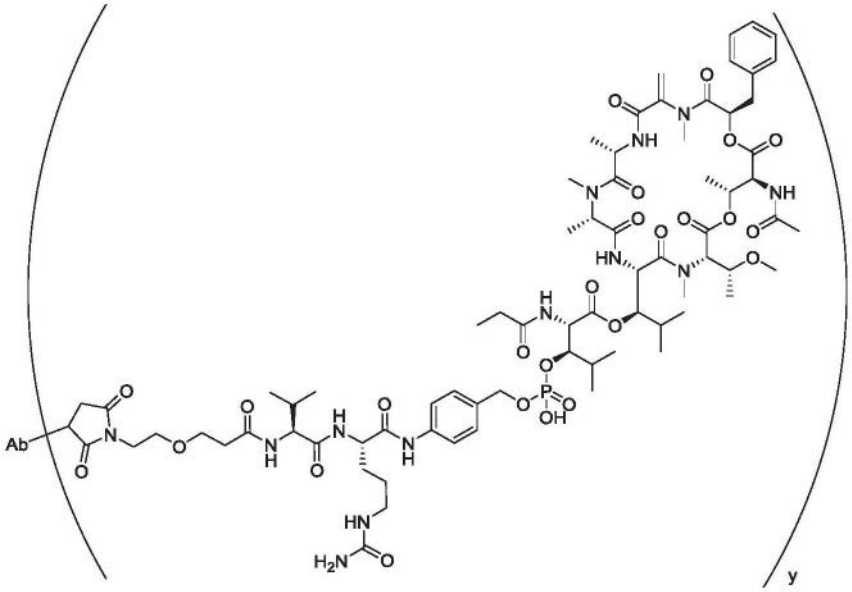
[0735] 

[0736] 其中：

[0737] y是2或4,并且

[0738] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0739] 实施例83.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-2)的缀合物：

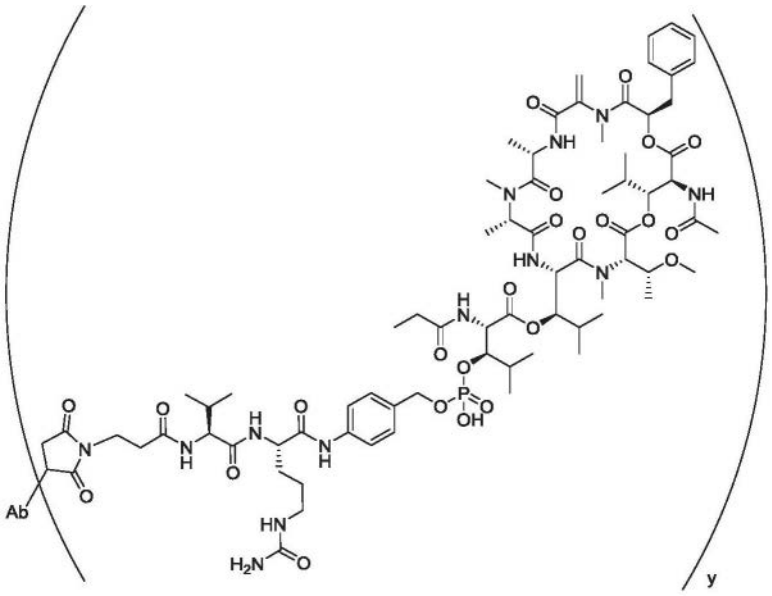
[0740] 

[0741] 其中：

[0742] y是2或4,并且

[0743] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0744] 实施例84.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-2)的缀合物：

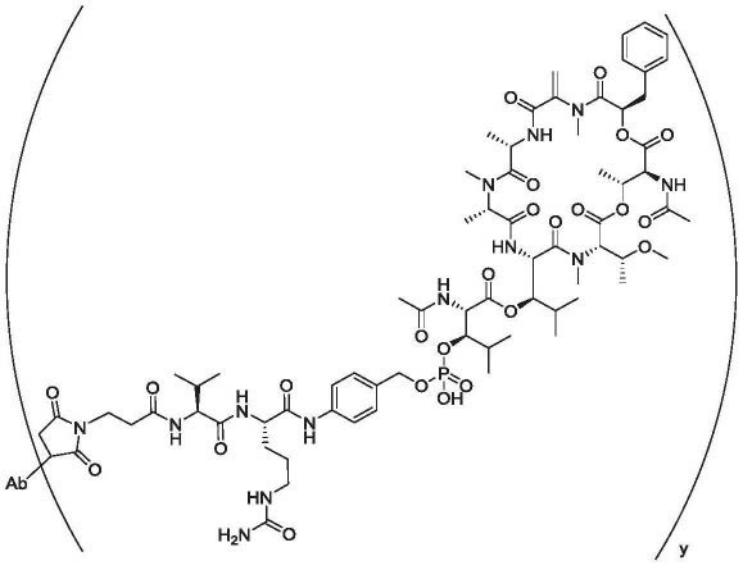
[0745] 

[0746] 其中：

[0747] y是2或4,并且

[0748] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0749] 实施例85.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-2)的缀合物：

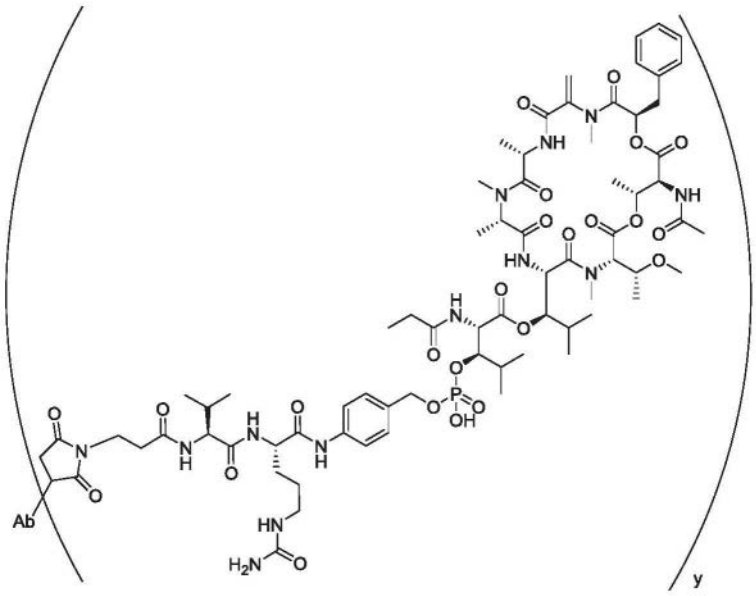
[0750] 

[0751] 其中：

[0752] y是2或4,并且

[0753] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0754] 实施例86.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-2)的缀合物：

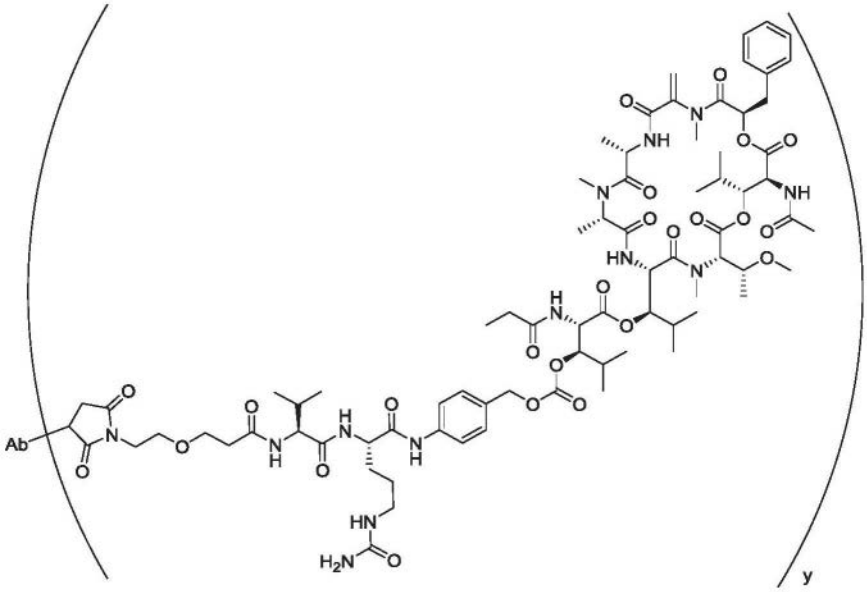
[0755] 

[0756] 其中：

[0757] y是2或4,并且

[0758] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0759] 实施例87.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-3)的缀合物：

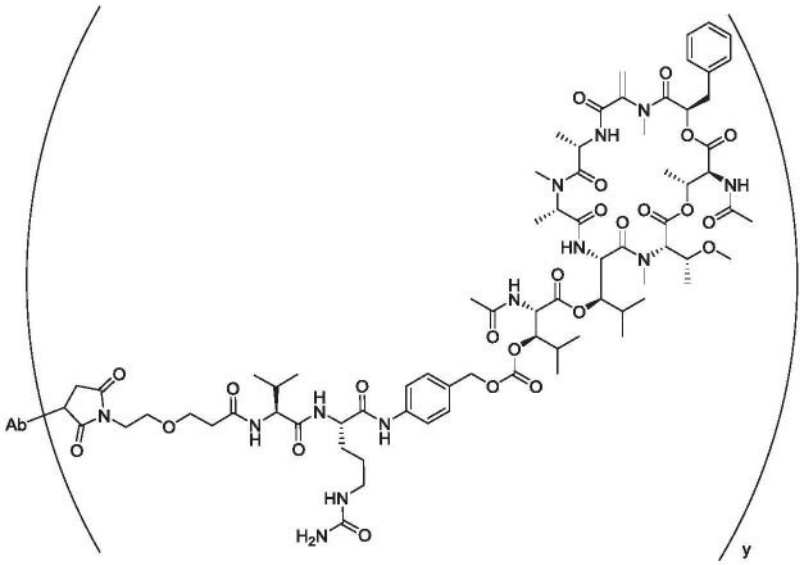
[0760] 

[0761] 其中：

[0762] y是2或4,并且

[0763] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0764] 实施例88.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-3)的缀合物：

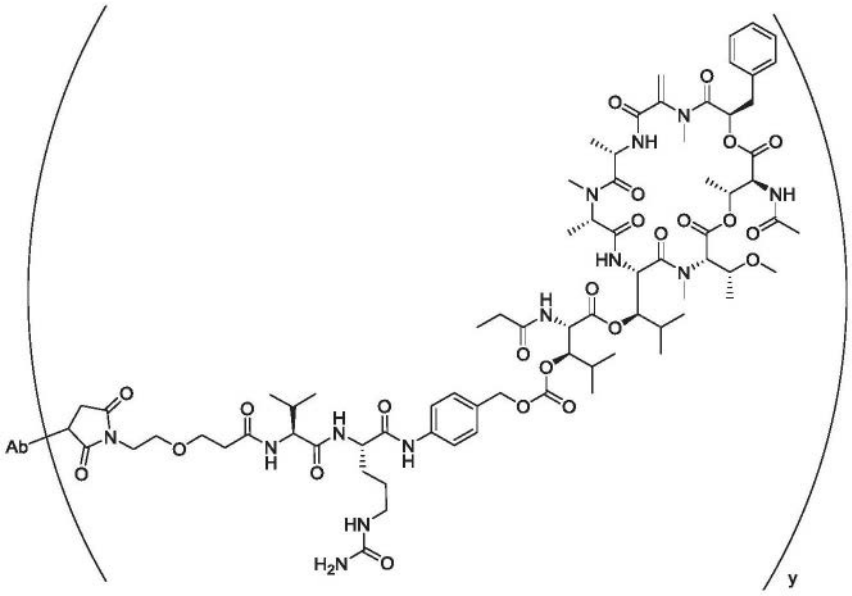
[0765] 

[0766] 其中：

[0767] y是2或4,并且

[0768] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0769] 实施例89.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-3)的缀合物：

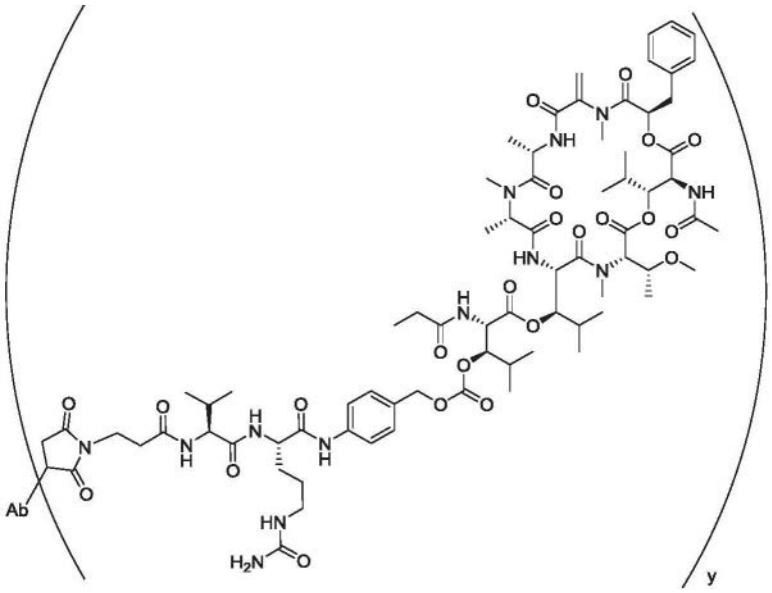
[0770] 

[0771] 其中：

[0772] y是2或4,并且

[0773] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0774] 实施例90.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-3)的缀合物：

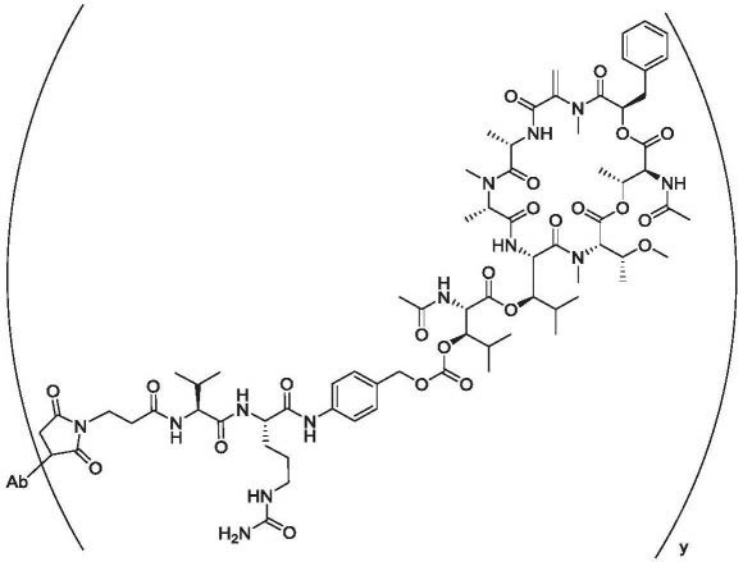
[0775] 

[0776] 其中：

[0777] y是2或4,并且

[0778] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0779] 实施例91.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-3)的缀合物：

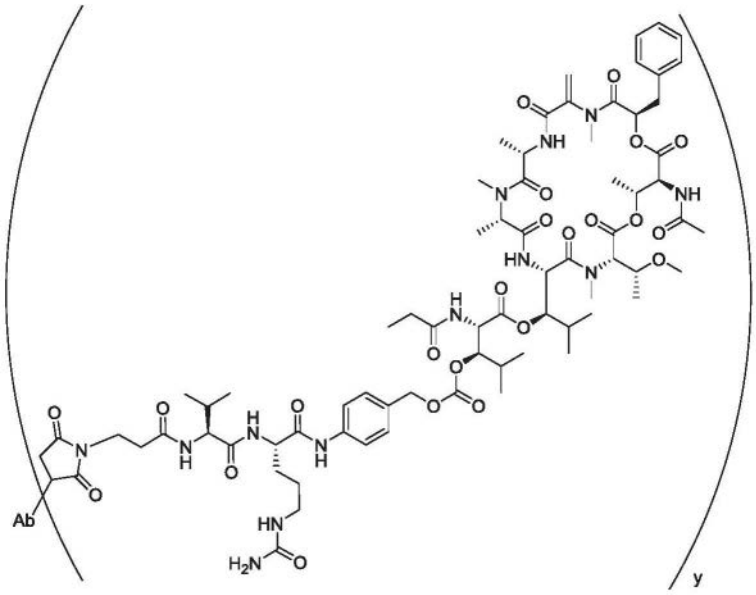
[0780] 

[0781] 其中：

[0782] y是2或4,并且

[0783] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0784] 实施例92.具有以下结构的具有式(C)、式(C-1)或式(C-3)的缀合物：

[0785] 

[0786] 其中：

[0787] y是2或4,并且

[0788] Ab是结合人PMEL17蛋白的抗体或其抗原结合片段。

[0789] 此外,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物可以与调节给定生物学应答的药物部分缀合。药物部分不应该解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所期望生物活性的蛋白质、肽或多肽。此类蛋白质可包括例如毒素,如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子、α-干扰素、β-干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物、细胞因子、凋亡剂、抗血管生成剂;或生物应答调节剂如淋巴因子。

[0790] 在一个实施例中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物与

药物部分,如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性毒素缀合。细胞毒素的实例包括但不限于紫杉烷(参见例如,国际(PCT)专利号申请号WO 01/38318和PCT/US03/02675)、DNA-烷基化剂(例如,CC-1065类似物)、蒽环类、微管溶素(tubulysin)类似物、多卡米星类似物、澳瑞司他汀E、澳瑞司他汀F、类美登素、吡咯并苯并二嗪(PBD)和包含反应性聚乙二醇部分的细胞毒性剂(参见例如,Sasse等人,J.Antibiot.[抗生素杂志](东京),53,879-85(2000);Suzawa等人,Bioorg.Med.Chem.[生物有机医学与化学],8,2175-84(2000);Ichimura等人,J.Antibiot.[抗生素杂志](东京),44,1045-53(1991);Francisco等人,Blood[血液学](2003)(电子出版先于印刷出版);美国专利号5,475,092、6,340,701、6,372,738和6,436,931、美国专利申请公开号2001/0036923A1、等待审批的美国专利申请序列号10/024,290和10/116,053,以及国际(PCT)专利申请号WO 01/49698)、泰素(taxon)、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗剂还包括例如抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺)、消融剂(例如氮芥、塞替派苯丁酸氮芥、美法仑(meiphalan)、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂、蒽环类(例如,柔红霉素(旧称道诺霉素)和多柔比星)、抗生素类(例如更生霉素(旧称放线菌素)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素(AMC))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春花碱)。(参见例如,西雅图遗传学公司(Seatle Genetics)US20090304721)。

[0791] 可以与本发明的抗体、抗体片段(抗原结合片段)或功能等同物缀合的细胞毒素的其他实例包括多卡米星、加利车霉素(calicheamicin)、美登素和澳瑞司他汀及其衍生物。

[0792] 多种类型的细胞毒素、接头和用于将治疗剂与抗体缀合的方法是本领域已知的,参见例如,Saito等人,(2003)Adv.Drug Deliv.Rev.[先进药物递送综述]55:199-215;Trail等人,(2003)Cancer Immunol.Immunother.[癌症免疫学和免疫治疗]52:328-337;Payne,(2003)Cancer Cell[癌症细胞]3:207-212;Allen,(2002)Nat.Rev.Cancer[自然综述:癌症]2:750-763;Pastan和Kreitman,(2002)Curr.Opin.Investig.Drugs[药物调研新见]3:1089-1091;Senter和Springer,(2001)Adv.Drug Deliv.Rev.[先进药物递送综述]53:247-264。

[0793] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物也可以与放射性同位素缀合以产生细胞毒性放射药物,称之为放射免疫缀合物。可以与抗体缀合的用于诊断或治疗性用途的放射性同位素的实例包括但不限于碘-131、铟-111、钇-90和镥-177。本领域中建立了用于制备放射免疫缀合物的方法。放射免疫缀合物的实例是可商业获得的,包括Zevalin™(DEC制药公司(DEC Pharmaceuticals))和Bexxar™(科里克萨制药公司(Corixa Pharmaceuticals)),并且可以利用本发明的抗体使用类似方法来制备放射免疫缀合物。在某些实施例中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N",N"'-四乙酸(DOTA),其可以经由接头分子附接至抗体。此类接头分子是本领域公知的,并且描述于Denardo等人,(1998)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]4(10):2483-90;Peterson等人,(1999)Bioconjug.Chem.[生物缀合化学]10(4):553-7;和Zimmerman等人,(1999)

Nucl.Med.Biol.[核医学和生物学]26(8):943-50,每一篇文献均通过引用以其全文并入。

[0794] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物还可以与异源蛋白或多肽(或其片段、优选地与至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的多肽)缀合以产生融合蛋白。特别地,本发明提供了融合蛋白,这些融合蛋白包含本文所述的抗体片段(例如,抗原结合片段)(例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、$F(ab)_2$片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)和异源蛋白质、多肽或肽。

[0795] 可以通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为"DNA改组")的技术生成另外的融合蛋白。可采用DNA改组来改变本发明抗体或其片段的活性(例如,具有较高亲和力和较低解离速率的抗体或其片段)。通常参见,美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252、和5,837,458;Patten等人,(1997)Curr.Opinion Biotechnol.[当前生物技术观点]8:724-33;Harayama,(1998)TrendsBiotechnol.[生物技术趋势]16(2):76-82;Hansson等人,(1999)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]287:265-76;和Lorenzo和Blasco,(1998)Biotechniques[生物技术]24(2):308-313(这些专利和出版物中的每一篇均据此通过引用以其全文并入)。抗体或其片段、或编码的抗体或其片段可以通过在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变来改变。编码特异性结合抗原的抗体或其片段的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0796] 此外,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物可以与标志物序列如肽缀合以促进纯化。在优选的实施例中,标志物氨基酸序列是六组氨酸肽(SEQ ID NO:267),例如pQE运载体中提供的标签(凯杰公司(QIAGEN,Inc.),伊顿大街(Eton Avenue)9259号,加利福尼亚州查茨沃思(Chatsworth),91311)等,其中许多是商购可得的。如Gentz等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:821-824中所述,例如六组氨酸(SEQ ID NO:267)为纯化融合蛋白提供便利。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于,对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位的血凝素("HA")标签(Wilson等人,(1984)Cell[细胞]37:767)和"FLAG"标签(A.Einhauer等人,J.Biochem.Biophys.Methods[生化和生物物理方法杂志]49:455-465,2001)。根据本发明,抗体或抗原结合片段也可以与渗透肿瘤的肽缀合以提高它们的功效。

[0797] 在其他实施例中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物与诊断剂或可检测剂缀合。此类免疫缀合物可用于监测或预后疾病或障碍的发作、发展、进展和/或严重程度以作为临床试验程序(如确定特定疗法的功效)的一部分。这种诊断和检测可以通过将抗体与可检测物质偶联来实现,这些可检测物质包括但不限于各种酶,如但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;荧光材料,如但不限于Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、AlexaFluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor700、Alexa Fluor 750、伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如但不限于鲁米诺;生物发光材料,例如但

不限于萤光素酶、萤光素和水母素;放射性材料,如但不限于碘(^{131}I、^{125}I、^{123}I和^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、铟(^{115}In、^{113}In、^{112}In和^{111}In)、锝(^{99}Tc)、铊(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga、^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、^{153}Sm、^{177}Lu、^{159}Gd、^{149}pm、^{140}La、^{175}Yb、^{166}Ho、^{90}Y、^{47}Sc、^{186}Re、^{188}Re、^{142}pr、^{105}Rh、^{97}Ru、^{68}Ge、^{57}Co、^{65}Zn、^{85}Sr、^{32}p、^{153}Gd、^{169}Yb、^{51}Cr、^{54}Mn、^{75}Se、^{64}Cu、^{113}Sn和^{117}Sn;以及使用各种正电子发射断层扫描的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

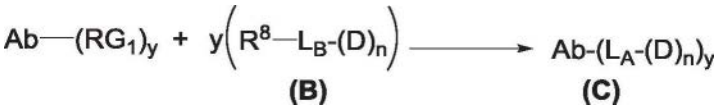
[0798] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或功能等同物也可以附接至特别可用于靶抗原的免疫测定法或纯化的固体支持物。这种固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0799] 3.ADC的缀合和制备

[0800] 制备具有式(C)、式(C-1)和式(C-2)的抗体缀合物的方法

[0801] 形成具有式(C)的缀合物的一般反应方法显示在以下方案1中:

[0802] 方案1

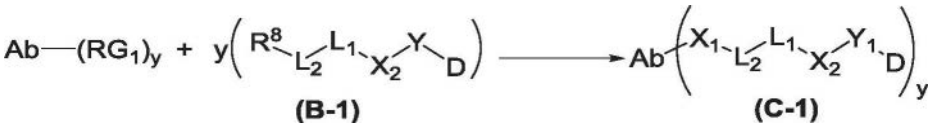
[0803] 

[0804] 其中:RG_1是抗体或其抗原结合片段Ab上的反应性基团(仅举例来说,硫醇、胺或酮),所述反应性基团与附接至接头-药物化合物的相容性反应性基团R^8反应,从而将抗体或其抗原结合片段Ab与一个或多个接头-药物部分共价附接。RG_1和R^8基团的此类反应的非限制性实例是马来酰亚胺(R^8)与硫醇(RG_1)反应得到琥珀酰亚胺环,或羟胺(R^8)与酮(RG_1)反应得到肟。

[0805] 在一个实施例中,D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂、或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂),L_a是接头(其进一步包含当RG_1和R^8反应时形成的二价偶联基团),n是1、2、3或4,并且y是1、2、3或4。

[0806] 形成具有式(C-1)的缀合物的一般反应方法显示在以下方案2中:

[0807] 方案2

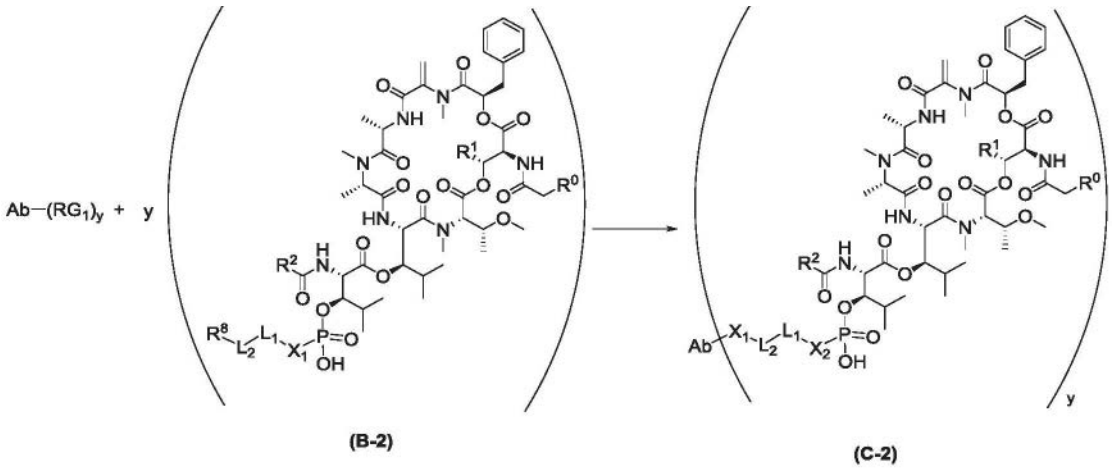
[0808] 

[0809] 其中:RG_1是抗体或其抗原结合片段Ab上的反应性基团(仅举例来说,硫醇、胺或酮),所述反应性基团与附接至接头-药物部分的相容性反应性基团R^8反应,从而将抗体或其抗原结合片段Ab与一个或多个接头-药物部分共价附接。RG_1和R^8基团的此类反应的非限制性实例是马来酰亚胺(R^8)与硫醇(RG_1)反应得到琥珀酰亚胺环,或羟胺(R^8)与酮(RG_1)反应得到肟。

[0810] 在一个实施例中,D是GNAQ抑制剂、GNA11抑制剂、或GNAQ和GNA11的抑制剂(GNAQ/GNA11抑制剂),X_1是当RG_1和R^8反应时形成的二价偶联基团(例如,琥珀酰亚胺环或肟),Y_1是磷酸基团,X_2是自杀式间隔子,L_1是二价肽接头,L_2是键或接头,并且y是1、2、3或4。

[0811] 形成具有式(C-2)的缀合物的一般反应方法显示在以下方案3中:

[0812] 方案3

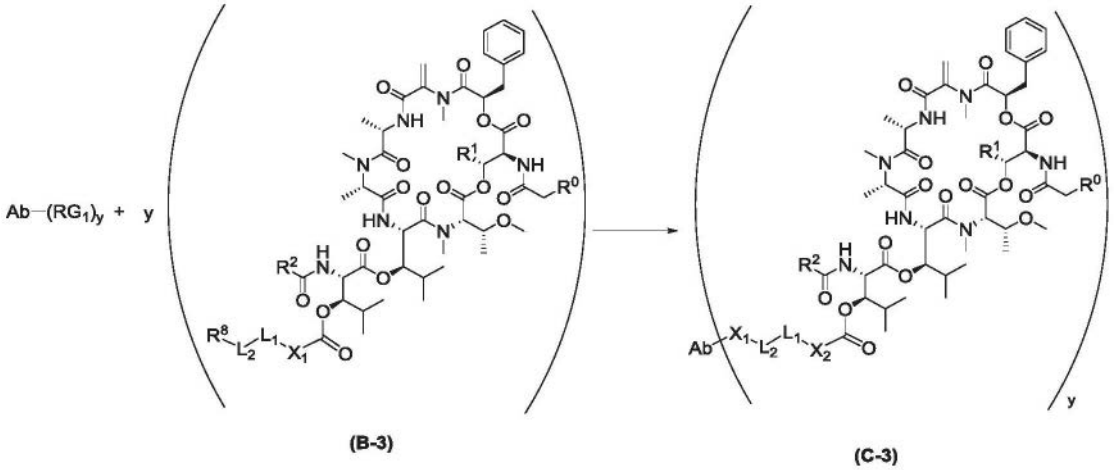
[0813] 

[0814] 其中:RG_1是抗体或其抗原结合片段Ab上的反应性基团(仅举例来说,硫醇、胺或酮),所述反应性基团与附接至接头-药物部分的相容性反应性基团R^8反应,从而将抗体或其抗原结合片段Ab与一个或多个接头-药物部分共价附接。RG_1和R^8基团的此类反应的非限制性实例是马来酰亚胺(R^8)与硫醇(RG_1)反应得到琥珀酰亚胺环,或羟胺(R^8)与酮(RG_1)反应得到肟。

[0815] 在此,R^0是甲基或乙基,R^1是甲基或异丙基,R^2是甲基或乙基,X_1是当RG_1和R^8反应时形成的二价偶联基团(例如,琥珀酰亚胺环或肟),X_2是自杀式间隔子,L_1是二价肽接头,L_2是键或接头,并且y是1、2、3或4。

[0816] 形成具有式(C-2)的缀合物的一般反应方法显示在以下方案4中:

[0817] 方案4

[0818] 

[0819] 其中:RG_1是抗体或其抗原结合片段Ab上的反应性基团(仅举例来说,硫醇、胺或酮),所述反应性基团与附接至接头-药物部分的相容性反应性基团R^8反应,从而将抗体或其抗原结合片段Ab与一个或多个接头-药物部分共价附接。RG_1和R^8基团的此类反应的非限制性实例是马来酰亚胺(R^8)与硫醇(RG_1)反应得到琥珀酰亚胺环,或羟胺(R^8)与酮(RG_1)反应得到肟。

[0820] 在此,R^0是甲基或乙基,R^1是甲基或异丙基,R^2是甲基或乙基,X_1是当RG_1和R^8反应时形成的二价偶联基团(例如,琥珀酰亚胺环或肟),X_2是自杀式间隔子,L_1是二价肽接头,L_2是键或接头,并且y是1、2、3或4。

[0821] 用于与工程化半胱氨酸抗体残基缀合的方法

[0822] 可以使用通过例如定点诱变工程化到抗体中的半胱氨酸残基来制备本发明的缀合物。此类位点特异性缀合物是均质的并且具有改善的特性(Junutula JR,Raab H,Clark S,Bhakta S,Leipold DD,Weir S,Chen Y,Simpson M,Tsai SP,Dennis MS,Lu Y,Meng YG,Ng C,Yang J,Lee CC,Duenas E,Gorrell J,Katta V,Kim A,McDorman K,Flagella K,Venook R,Ross S,Spencer SD,Lee Wong W,Lowman HB,Vandlen R,Sliwkowski MX,Scheller RH,Polakis P,Mallet W.(2008)Nature Biotechnology[自然生物技术]26:925-932)。

[0823] 因为在哺乳动物细胞中表达的抗体中的工程化半胱氨酸在其生物合成期间通过加合物(二硫化物)如谷胱甘肽(GSH)和/或半胱氨酸修饰(Chen等人2009),所以最初表达的产物中的工程化半胱氨酸残基对硫醇反应性试剂(如马来酰亚胺基或溴乙酰胺或碘乙酰胺基团)不起反应。为了将有效负载与表达后的工程化半胱氨酸缀合,需要通过还原这些二硫化物加合物去除谷胱甘肽或半胱氨酸加合物,这通常还需要还原表达的蛋白质中的天然二硫化物。经加合的工程化半胱氨酸的脱保护可以通过以下方式完成:首先将抗体暴露于还原剂,例如二硫苏糖醇(DTT)、TCEP、或还原的半胱氨酸,然后是允许再氧化抗体的所有天然二硫键以恢复和/或稳定化功能性抗体结构的程序。

[0824] 可以采用若干种方法来还原和再氧化具有工程化半胱氨酸残基以用于制备抗体药物缀合物的抗体。尝试使用高浓度的$CuSO_4$遵循文献中先前描述的再氧化方案导致蛋白质沉淀(Junutula JR,Raab H,Clark S,Bhakta S,Leipold DD,Weir S,Chen Y,Simpson M,Tsai SP,Dennis MS,Lu Y,Meng YG,Ng C,Yang J,Lee CC,Duenas E,Gorrell J,Katta V,KimA,McDorman K,Flagella K,Venook R,Ross S,Spencer SD,Lee Wong W,Lowman HB,Vandlen R,Sliwkowski MX,Scheller RH,Polakis P,Mallet W.(2008)Nature Biotechnology[自然生物技术]26:925)。我们已经用若干种不同的还原和抗体再氧化方法成功制备并获得了抗体药物缀合物。

[0825] 以下是还原和再氧化具有工程化半胱氨酸残基以用于制备抗体药物缀合物的抗体的方法:将新鲜制备的DTT添加到纯化的Cys突变型抗体中至最终浓度为10mM。在与DTT在室温下孵育1小时后,将混合物在4℃下用PBS透析3天,每天更换缓冲液以去除DTT并再氧化抗体的天然二硫键。一种替代性方法是通过用PBS平衡的脱盐柱如SephadexG-25去除还原剂。一旦蛋白质完全还原,任选地将1mM氧化的抗坏血酸盐(脱氢-抗坏血酸)添加到脱盐样品,并且进行再氧化孵育20-24小时。

[0826] 在另一个示例性方法中,通过将20mM浓度的完全还原的半胱氨酸添加到与蛋白A-琼脂糖树脂结合的抗体来完成工程化Cys残基的脱保护。通过以下方式来实现对Cys加合物的还原:在室温下孵育大约30-60分钟,然后通过用50个床的PBS洗涤树脂来快速去除还原剂。通过在添加或不添加50-2000nM $CuCl_2$作为加速剂的情况下在室温下孵育洗涤的浆液来实现对还原的抗体的再氧化。除了使用硫酸铜之外,本文的实例使用本文所述的每种方案,具有类似的结果。再氧化恢复链内二硫化物,而透析、脱盐或蛋白A色谱法去除还原剂以及最初与抗体的一个或多个工程化半胱氨酸连接的半胱氨酸和谷胱甘肽。HPLC反相色谱法典型地用于监测再氧化过程:将抗体加载到加热至80℃的PLRP-S柱(4000Å,50mm x2.1mm,安捷伦(Agilent))上,并且使用含有0.1%TFA的30%-45%CH3CN的水溶液的线性梯度以1.5mL/min洗脱,并且在215、254和280nm处进行峰值检测。

[0827] 再氧化后,将抗体缀合至例如具有式(B)、式(B-1)、式(B-2)或式(B-3)的化合物的接头-药物化合物(参见方案1-4)。例如,将具有式(B)、式(B-1)、式(B-2)或式(B-3)的化合物以相对于PBS缓冲液(pH 7.2)中的抗体的5-10摩尔当量添加到再氧化的Cys突变型抗体中。进行孵育1-2小时。通过反相HPLC监测缀合过程,所述反相HPLC能够将缀合的抗体与非缀合的抗体分离。将缀合反应混合物在加热至80℃的PRLP-S柱(4000 Å,50mm x2.1mm,安捷伦)上分析,并且通过含有0.1%TFA的30%-60%乙腈的水溶液的线性梯度进行柱洗脱,流速为1.5ml/min。在280nm、254nm和215nm处监测来自柱的蛋白质的洗脱。

[0828] 可替代地,对于与蛋白A树脂结合的抗体,一旦抗体被再氧化,则用10倍柱体积的PBS洗涤树脂,然后将树脂重悬于等体积的PBS中并添加8倍过量的具有式(B)、式(B-1)、式(B-2)或式(B-3)的化合物(在DMSO中)并在室温下孵育2小时。然后用50倍柱体积的PBS洗涤树脂,从蛋白A树脂上洗脱得到的抗体药物缀合物,用1/10体积的1M Tris pH 9.0中和,将缓冲液更换为合适的缓冲液以进行制备型尺寸排阻色谱法(如果需要)。

[0829] 免疫缀合物的特征还在于药物部分与抗体结合部分的平均负载量,通常称为药物对抗体比率(DAR)。例如,从还原和去糖基化样品的LC-MS数据外推出DAR值。LC/MS允许定量ADC中附接至抗体的有效负载(药物部分)分子的平均数。HPLC将抗体分离成轻链和重链,并且还根据每条链的接头-有效负载基团的数量分离重链(HC)和轻链(LC)。质谱数据能够鉴定混合物中的组分种类,例如LC、LC+1、LC+2、HC、HC+1、HC+2等。根据LC和HC链的平均负载量,可以计算ADC的平均DAR。给定免疫缀合物样品的DAR表示附接至含有两条轻链和两条重链的四聚体抗体的药物(有效负载)分子的平均数。

[0830] 贯穿在本申请的全文中,如果说明书的文本与序列表之间存在差异,则以说明书的文本为准。

[0831] 表2.本发明的抗PMEL17抗体的实例

[0832]

G1 E152C_S375C_wt LC		
SEQ ID NO: 1	HCDR1（组合的）	GGTFSDYAIT
SEQ ID NO: 2	HCDR2（组合的）	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3（组合的）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 4	HCDR1（卡巴特）	DYAIT
SEQ ID NO: 2	HCDR2（卡巴特）	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3（卡巴特）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 5	HCDR1（乔西亚）	GGTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2（乔西亚）	IPIFGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3（乔西亚）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（IMGT）	GGTFSDYA

[0833]

SEQ ID NO: 8	HCDR2（IMGT）	IIPIFGTA
SEQ ID NO: 9	HCDR3（IMGT）	AREGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REGGLLTDISYSRYWFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 11	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGA CTACGCTATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCC GGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTAT CATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTGGTCTG CTGACTGACATCTCTTACTCTCGTTACTGGTT CGCTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC TGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 12	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REGGLLTDISYSRYWFAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPC PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL

[0834]

		SLSPGK
SEQ ID NO: 13	DNA 重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGA CTACGCTATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCC GGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTAT CATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTGGTCTG CTGACTGACATCTCTTACTCTCGTTACTGGTT CGCTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC TGTTAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTA CTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCC TGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGAC AGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG GTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACC CAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCT GCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGG GAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGAC CCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGG CAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCA

		GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCC CAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCC CGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTG CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 14	LCDR1（组合的）	SGDALRDKFVY
SEQ ID NO: 15	LCDR2（组合的）	DDNNRPS
SEQ ID NO: 16	LCDR3（组合的）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 14	LCDR1（卡巴特）	SGDALRDKFVY
SEQ ID NO: 15	LCDR2（卡巴特）	DDNNRPS
SEQ ID NO: 16	LCDR3（卡巴特）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 17	LCDR1（乔西亚）	DALRDKF
SEQ ID NO: 18	LCDR2（乔西亚）	DDN
SEQ ID NO: 19	LCDR3（乔西亚）	WDHSYSLV
SEQ ID NO: 20	LCDR1（IMGT）	ALRDKF
SEQ ID NO: 18	LCDR2（IMGT）	DDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3（IMGT）	QSWDHSYSLVV

[0835]

[0836]

SEQ ID NO: 21	VL	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDALRDKFVY WYQQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDHSYSLV VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 22	DNA VL	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTG AGCGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATT ACCTGTAGCGGCGATGCTCTGCGTGACAAAT TCGTTTACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCA GGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACGACAA CAACCGTCCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTT AGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACC CTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGGAAGAC GAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACC ATTCTTACTCTCTGGTTGTGTTTGGCGGCGG CACGAAGTTAACTGTCCTG
SEQ ID NO: 23	轻链	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDALRDKFVY WYQQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQAEDEADYYCQSWDHSYSLV VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 24	DNA 轻链	GATATCGAACTGACCCAGCCGCCGAGCGTG AGCGTGAGCCCGGGCCAGACCGCGAGCATT ACCTGTAGCGGCGATGCTCTGCGTGACAAAT TCGTTTACTGGTACCAGCAGAAACCGGGCCA GGCGCCGGTGCTGGTGATCTACGACGACAA CAACCGTCCGAGCGGCATCCCGGAACGTTTT AGCGGATCCAACAGCGGCAACACCGCGACC CTGACCATTAGCGGCACCCAGGCGGAAGAC GAAGCGGATTATTACTGCCAGTCTTGGGACC ATTCTTACTCTCTGGTTGTGTTTGGCGGCGG CACGAAGTTAACTGTCCTGGGACAACCTAAG GCCGCTCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCCCC AGCTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCC

[0837]

		ACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCG ACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGA CAACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAA GTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC CCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAGCTA CAGCTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAGCAC CGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTG CAGC
G1 E152C_S375C_3J LC		
SEQ ID NO: 1	HCDR1（组合的）	GGTFSDYAIT
SEQ ID NO: 2	HCDR2（组合的）	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3（组合的）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 4	HCDR1（卡巴特）	DYAIT
SEQ ID NO: 2	HCDR2（卡巴特）	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3（卡巴特）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 5	HCDR1（乔西亚）	GGTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2（乔西亚）	IPIFGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3（乔西亚）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（IMGT）	GGTFSDYA
SEQ ID NO: 8	HCDR2（IMGT）	IIPIFGTA
SEQ ID NO: 9	HCDR3（IMGT）	AREGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD

			YAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REGGLLTDISYSRYWFAYWGQGTLVTVSS
	SEQ ID NO: 11	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGA CTACGCTATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCC GGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTAT CATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTGGTCTG CTGACTGACATCTCTTACTCTCGTTACTGGTT CGCTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC TGTTAGCTCA
[0838]	SEQ ID NO: 12	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REGGLLTDISYSRYWFAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPC PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
	SEQ ID NO: 13	DNA 重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGA CTACGCTATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCC

[0839]

		GGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTAT CATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTGGTCTG CTGACTGACATCTCTTACTCTCGTTACTGGTT CGCTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC TGTTAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTA CTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCC TGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGAC AGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG GTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCC AGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG CCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGG AGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG TCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACA ACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA

[0840]

		GAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 14	LCDR1 （组合的）	SGDALRDKFVY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 （组合的）	DDNNRPS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 （组合的）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 （卡巴特）	SGDALRDKFVY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 （卡巴特）	DDNNRPS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 （卡巴特）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 17	LCDR1 （乔西亚）	DALRDKF
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （乔西亚）	DDN
SEQ ID NO: 19	LCDR3 （乔西亚）	WDHSYSLV
SEQ ID NO: 20	LCDR1 （IMGT）	ALRDKF
SEQ ID NO: 18	LCDR2 （IMGT）	DDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 （IMGT）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 25	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDALRDKFVY WYQQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCQSWDHSYSLV VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 26	DNA VL	AGCTACGAGCTGACCCAGCCGCTGTCGGTG

			TCAGTCGCCCTGGGACAAACTGCCAGGATCA CTTGTTCCGGGGACGCATTGCGGGACAAGTT CGTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCGGGTCA AGCCCCAGTGCTCGTGATCTACGACGACAAC AACCGGCCTTCCGGTATCCCCGAACGCTTCT CCGGATCCAATAGCGGAAACACCGCCACCCT GACCATTTCGAGAGCTCAGGCCGGGGATGA AGCGGACTACTACTGCCAGTCATGGGATCAC TCGTACTCCCTCGTCGTGTTTGGAGGCGGCA CGAAGCTTACTGTGCTG
	SEQ ID NO: 27	轻链	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDALRDKFVY WYQQKPGQAPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCQSWDHSYSLV VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
[0841]	SEQ ID NO: 28	DNA 轻链	AGCTACGAGCTGACCCAGCCGCTGTCGGTG TCAGTCGCCCTGGGACAAACTGCCAGGATCA CTTGTTCCGGGGACGCATTGCGGGACAAGTT CGTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCGGGTCA AGCCCCAGTGCTCGTGATCTACGACGACAAC AACCGGCCTTCCGGTATCCCCGAACGCTTCT CCGGATCCAATAGCGGAAACACCGCCACCCT GACCATTTCGAGAGCTCAGGCCGGGGATGA AGCGGACTACTACTGCCAGTCATGGGATCAC TCGTACTCCCTCGTCGTGTTTGGAGGCGGCA CGAAGCTTACTGTGCTGGGCCAGCCTAAGG CCGCTCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCCCCAG CTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCAC CCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCT GGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGAC AGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACA ACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGT ACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCC

[0842]

		CCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAGCTACA GCTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAGCACCG TGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCA GC
G1 E152C_S375C_3R LC		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 （组合的）	GGTFSDYAIT
SEQ ID NO: 2	HCDR2 （组合的）	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 （组合的）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 4	HCDR1 （卡巴特）	DYAIT
SEQ ID NO: 2	HCDR2 （卡巴特）	GIIPIFGTANYAQKFQG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 （卡巴特）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 5	HCDR1 （乔西亚）	GGTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 （乔西亚）	IPIFGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 （乔西亚）	EGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 7	HCDR1 （IMGT）	GGTFSDYA
SEQ ID NO: 8	HCDR2 （IMGT）	IIPIFGTA
SEQ ID NO: 9	HCDR3 （IMGT）	AREGGLLTDISYSRYWFAY
SEQ ID NO: 10	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REGGLLTDISYSRYWFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 11	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA

[0843]

		GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGA CTACGCTATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCC GGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTAT CATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTGGTCTG CTGACTGACATCTCTTACTCTCGTTACTGGTT CGCTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC TGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 12	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REGGLLTDISYSRYWFAYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPC PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
SEQ ID NO: 13	DNA 重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTGA CTACGCTATCACTTGGGTGCGCCAGGCCCC GGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCGGTAT CATCCCGATCTTCGGCACTGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC

[0844]

		CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGGTGGTCTG CTGACTGACATCTCTTACTCTCGTTACTGGTT CGCTTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTGAC TGTTAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTA CTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCC TGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGAC AGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG GTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCC AGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG CCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGG AGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTG TCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACA ACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAG ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA

[0845]

		GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 14	LCDR1（组合的）	SGDALRDKFVY
SEQ ID NO: 15	LCDR2（组合的）	DDNNRPS
SEQ ID NO: 16	LCDR3（组合的）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 14	LCDR1（卡巴特）	SGDALRDKFVY
SEQ ID NO: 15	LCDR2（卡巴特）	DDNNRPS
SEQ ID NO: 16	LCDR3（卡巴特）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 17	LCDR1（乔西亚）	DALRDKF
SEQ ID NO: 18	LCDR2（乔西亚）	DDN
SEQ ID NO: 19	LCDR3（乔西亚）	WDHSYSLV
SEQ ID NO: 20	LCDR1（IMGT）	ALRDKF
SEQ ID NO: 18	LCDR2（IMGT）	DDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3（IMGT）	QSWDHSYSLVV
SEQ ID NO: 29	VL	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDALRDKFVY WYQQKPGQSPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSWDHSYSLV VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 30	DNA VL	TCGTACGAGCTCACTCAACCGCCTTCTGTGT CCGTGTCACCCGGGCAGACTGCCTCCATTAC CTGTTCGGGAGATGCCCTGCGCGACAAGTTT GTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAG TCGCCAGTGCTCGTCATCTATGACGACAACA ACAGACCTTCCGGTATCCCGGAACGGTTCAG

[0846]

		CGGAAGCAATTCCGGCAACACCGCTACCCTG ACCATTAGCGGCACTCAGGCCATGGACGAA GCGGATTACTACTGCCAATCCTGGGACCACT CATACTCCCTTGTGGTGTTCGGTGGCGGAAC GAAGCTGACCGTCCTG
SEQ ID NO: 31	轻链	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDALRDKFVY WYQQKPGQSPVLVIYDDNNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISGTQAMDEADYYCQSWDHSYSLV VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 32	DNA 轻链	TCGTACGAGCTCACTCAACCGCCTTCTGTGT CCGTGTCACCCGGGCAGACTGCCTCCATTAC CTGTTCGGGAGATGCCCTGCGCGACAAGTTT GTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGACAG TCGCCAGTGCTCGTCATCTATGACGACAACA ACAGACCTTCCGGTATCCCGGAACGGTTCAG CGGAAGCAATTCCGGCAACACCGCTACCCTG ACCATTAGCGGCACTCAGGCCATGGACGAA GCGGATTACTACTGCCAATCCTGGGACCACT CATACTCCCTTGTGGTGTTCGGTGGCGGAAC GAAGCTGACCGTCCTGGGCCAGCCTAAGGC CGCTCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGC TCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGGCCACC CTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCTG GCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACA GCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACAA CCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTA CGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCC CGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAGCTACAG CTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAGCACCGT GGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGAGTGCAG C
G4 E152_S375C		

[0847]

SEQ ID NO: 33	HCDR1（组合的）	GGTFSTYAIS
SEQ ID NO: 34	HCDR2（组合的）	RIIPILGIANYAQKFQG
SEQ ID NO: 35	HCDR3（组合的）	EVRMIFDY
SEQ ID NO: 36	HCDR1（卡巴特）	TYAIS
SEQ ID NO: 34	HCDR2（卡巴特）	RIIPILGIANYAQKFQG
SEQ ID NO: 35	HCDR3（卡巴特）	EVRMIFDY
SEQ ID NO: 37	HCDR1（乔西亚）	GGTFSTY
SEQ ID NO: 38	HCDR2（乔西亚）	IPILGI
SEQ ID NO: 35	HCDR3（乔西亚）	EVRMIFDY
SEQ ID NO: 39	HCDR1（IMGT）	GGTFSTYA
SEQ ID NO: 40	HCDR2（IMGT）	IIPILGIA
SEQ ID NO: 41	HCDR3（IMGT）	AREVRMIFDY
SEQ ID NO: 42	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFST YAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REVRMIFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 43	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTAC TTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCG GGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCCGTATC ATCCCGATCCTGGGCATCGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG

[0848]

		CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGTTCGTATG ATCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCA
SEQ ID NO: 44	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFST YAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA REVRMIFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 45	DNA 重链	CAGGTGCAATTGGTGCAGAGCGGTGCCGAA GTGAAAAAACCGGGCAGCAGCGTGAAAGTTA GCTGCAAAGCATCCGGAGGGACGTTTTCTAC TTACGCTATCTCTTGGGTGCGCCAGGCCCCG GGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGCCGTATC ATCCCGATCCTGGGCATCGCGAACTACGCC CAGAAATTTCAGGGCCGGGTGACCATTACCG CCGATGAAAGCACCAGCACCGCCTATATGGA ACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGTTCGTATG ATCTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGG TGACTGTTAGCTCAGCCTCTACGAAAGGCCC AAGCGTATTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAAT CAACCTCAGGTGGTACAGCAGCCCTTGGCT GCCTGGTCAAAGACTATTTCCCCTGTCCGGT GACCGTCTCATGGAACTCAGGTGCTTTGACA

[0849]

		TCTGGTGTGCATACATTCCCAGCTGTGCTGC AAAGTAGTGGACTGTACAGCCTTTCCAGCGT GGTCACGGTGCCAAGTAGCTCCTTGGGTACT CAGACTTATATCTGCAATGTGAACCACAAGC CCTCTAACACGAAGGTGGACAAGCGCGTGG AGCCCAAATCTTGCGATAAGACGCATACTTG TCCCCCATGCCCTGCTCCTGAGCTGTTGGGA GGCCCGTCAGTGTTCTTGTTCCCTCCGAAGC CTAAGGACACTTTGATGATAAGTAGGACACC AGAGGTGACTTGCGTGGTGGTTGATGTGTCC CATGAAGATCCCGAGGTCAAATTTAATTGGT ACGTAGATGGTGTCGAAGTTCACAATGCTAA GACTAAGCCAAGGGAAGAGCAGTACAACAGT ACATATAGGGTAGTCTCCGTGCTGACAGTCC TCCACCAGGACTGGTTGAACGGCAAGGAATA CAAATGTAAGGTGTCAAACAAAGCTCTGCCT GCTCCCATTGAGAAAACAATCTCTAAAGCCA AAGGCCAGCCGAGAGAGCCCCAAGTCTACA CTTTGCCCCCGAGCAGGGAGGAAATGACCA AGAATCAGGTGAGTCTGACGTGCCTCGTCAA AGGATTTTATCCATGCGATATTGCAGTTGAAT GGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACT ATAAAACCACACCACCCGTGCTCGACTCTGA TGGCAGCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTGACA GTCGATAAATCTCGCTGGCAGCAAGGCAATG TGTTCTCCTGCTCCGTCATGCACGAGGCTTT GCATAACCATTATACTCAAAAATCTCTGTCCC TGTCACCTGGTAAA
SEQ ID NO: 46	LCDR1 （组合的）	RASQSISSYLA
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （组合的）	AASSLQS
SEQ ID NO: 48	LCDR3 （组合的）	QQSYDYYT
SEQ ID NO: 46	LCDR1	RASQSISSYLA

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 47	LCDR2（卡巴特）	AASSLQS
SEQ ID NO: 48	LCDR3（卡巴特）	QQSYDYYT
SEQ ID NO: 49	LCDR1（乔西亚）	SQSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 51	LCDR3（乔西亚）	SYDYY
SEQ ID NO: 52	LCDR1（IMGT）	QSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 48	LCDR3（IMGT）	QQSYDYYT

[0850]

SEQ ID NO: 53	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL AWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYDYYTFG QGTKVEIK
SEQ ID NO: 54	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACC ATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTT CTTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGG CAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACGCTGCT TCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCA CCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGAAGA CTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTCTTAC GACTACTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAG TTGAAATTAAA
SEQ ID NO: 55	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL AWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYDYYTFG

[0851]

		QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 56	DNA 轻链	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGGCGATCGCGTGACC ATTACCTGCAGAGCCAGCCAGTCTATTTCTT CTTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCGGG CAAAGCGCCGAAACTATTAATCTACGCTGCT TCTTCTCTGCAAAGCGGCGTGCCGAGCCGC TTTAGCGGCAGCGGATCCGGCACCGATTTCA CCCTGACCATTAGCTCTCTGCAACCGGAAGA CTTTGCGACCTATTATTGCCAGCAGTCTTAC GACTACTACACCTTTGGCCAGGGCACGAAAG TTGAAATTAAACGTACGGTGGCAGCTCCGTC TGTTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAA CTCAAAAGTGGTACAGCATCCGTGGTTTGTC TGCTGAACAATTTTTACCCCAGGGAGGCTAA GGTCCAGTGGAAAGTCGATAACGCTCTTCAG TCTGGCAACAGTCAGGAGAGCGTCACAGAG CAGGACTCTAAGGATAGCACTTATAGTCTGT CCTCCACGCTGACACTGTCTAAAGCGGATTA TGAGAAGCACAAGGTTTACGCCTGTGAGGTA ACGCACCAAGGACTCTCCTCCCCAGTTACCA AATCTTTCAACAGAGGAGAATGT
MOR024353 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 57	HCDR1 （组合的）	GGTFSDYAIS
SEQ ID NO: 58	HCDR2 （组合的）	GIIPIFGDANYAQKFQG
SEQ ID NO: 59	HCDR3 （组合的）	EGSSYFYMAY
SEQ ID NO: 60	HCDR1 （卡巴特）	DYAIS
SEQ ID NO: 58	HCDR2	GIIPIFGDANYAQKFQG

[0852]

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 59	HCDR3（卡巴特）	EGSSYFYMAY
SEQ ID NO: 5	HCDR1（乔西亚）	GGTFSDY
SEQ ID NO: 61	HCDR2（乔西亚）	IPIFGD
SEQ ID NO: 59	HCDR3（乔西亚）	EGSSYFYMAY
SEQ ID NO: 7	HCDR1（IMGT）	GGTFSDYA
SEQ ID NO: 62	HCDR2（IMGT）	IIPIFGDA
SEQ ID NO: 63	HCDR3（IMGT）	AREGSSYFYMAY
SEQ ID NO: 64	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGDANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AREGSSYFYMAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 65	DNA VH	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAAGCAAGCGGCGGCACCTTCAGC GATTACGCCATCTCTTGGGTCCGACAGGCCC CTGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGGCA TCATCCCCATCTTCGGCGACGCCAATTACGC CCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACC GCCGACGAGTCTACAAGCACCGCCTACATG GAACTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGGCAGC AGCTACTTCTACATGGCCTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTAGCTCT
SEQ ID NO: 66	重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSD YAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGDANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AREGSSYFYMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSV

			FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
[0853]	SEQ ID NO: 67	DNA 重链	CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCTGGCAGCAGCGTGAAGGTG TCCTGCAAAGCAAGCGGCGGCACCTTCAGC GATTACGCCATCTCTTGGGTCCGACAGGCCC CTGGACAAGGCTTGGAATGGATGGGCGGCA TCATCCCCATCTTCGGCGACGCCAATTACGC CCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCATCACC GCCGACGAGTCTACAAGCACCGCCTACATG GAACTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACACC GCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGGCAGC AGCTACTTCTACATGGCCTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCACAGTTAGCTCTGCTAGCAC CAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCC CAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCT GCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC CCTGTCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGC TCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTC CAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCT

[0854]

		GTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGT GGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGA GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAA GTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATC GAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCC CCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCT ACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGA CCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 68	LCDR1 （组合的）	SGDNIGSKLAS
SEQ ID NO: 69	LCDR2 （组合的）	DDSNRPS
SEQ ID NO: 70	LCDR3 （组合的）	AATAGDRWAYV
SEQ ID NO: 68	LCDR1 （卡巴特）	SGDNIGSKLAS
SEQ ID NO: 69	LCDR2 （卡巴特）	DDSNRPS
SEQ ID NO: 70	LCDR3 （卡巴特）	AATAGDRWAYV
SEQ ID NO: 71	LCDR1 （乔西亚）	DNIGSKL

[0855]

SEQ ID NO: 72	LCDR2（乔西亚）	DDS
SEQ ID NO: 73	LCDR3（乔西亚）	TAGDRWAY
SEQ ID NO: 74	LCDR1（IMGT）	NIGSKL
SEQ ID NO: 72	LCDR2（IMGT）	DDS
SEQ ID NO: 70	LCDR3（IMGT）	AATAGDRWAYV
SEQ ID NO: 75	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKLAS WYQQKPGQAPVLVIYDDSNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCAATAGDRWAY VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 76	DNA VL	AGCTATGAGCTGACACAGCCTCTGTCCGTGT CTGTGGCTCTGGGACAGACCGCCAGAATCA CCTGTAGCGGCGACAACATCGGCAGCAAGC TGGCCTCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA GGCCCCTGTGCTGGTCATCTACGACGACAG CAATAGACCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTC AGCGGCAGCAATAGCGGCAATACCGCCACA CTGACCATCAGCAGAGCACAGGCTGGCGAC GAGGCCGATTACTATTGTGCTGCCACAGCCG GCGACAGATGGGCCTATGTTTTTGGCGGCG GAACAAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 77	轻链	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKLAS WYQQKPGQAPVLVIYDDSNRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCAATAGDRWAY VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 78	DNA 轻链	AGCTATGAGCTGACACAGCCTCTGTCCGTGT CTGTGGCTCTGGGACAGACCGCCAGAATCA CCTGTAGCGGCGACAACATCGGCAGCAAGC

[0856]

		TGGCCTCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA GGCCCCTGTGCTGGTCATCTACGACGACAG CAATAGACCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTC AGCGGCAGCAATAGCGGCAATACCGCCACA CTGACCATCAGCAGAGCACAGGCTGGCGAC GAGGCCGATTACTATTGTGCTGCCACAGCCG GCGACAGATGGGCCTATGTTTTTGGCGGCG GAACAAAGCTGACCGTGCTGGGACAGCCTA AGGCCGCTCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCC CCAGCTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGG CCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTA CCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGC CGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGA GACAACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAA CAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCT GACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAG CTACAGCTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAG CACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGA GTGCAGC
MOR024354 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 79	HCDR1（组合的）	GFTFSSFGMS
SEQ ID NO: 80	HCDR2（组合的）	AISYSGSDTYYADSVKG
SEQ ID NO: 81	HCDR3（组合的）	DVGVMDY
SEQ ID NO: 82	HCDR1（卡巴特）	SFGMS
SEQ ID NO: 80	HCDR2（卡巴特）	AISYSGSDTYYADSVKG
SEQ ID NO: 81	HCDR3（卡巴特）	DVGVMDY
SEQ ID NO: 83	HCDR1（乔西亚）	GFTFSSF
SEQ ID NO: 84	HCDR2	SYSGSD

	（乔西亚）	
SEQ ID NO: 81	HCDR3（乔西亚）	DVGVMDY
SEQ ID NO: 85	HCDR1（IMGT）	GFTFSSFG
SEQ ID NO: 86	HCDR2（IMGT）	ISYSGSDT
SEQ ID NO: 87	HCDR3（IMGT）	ARDVGVMDY
SEQ ID NO: 88	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSAISYSGSDTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDVGVMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 89	DNA VH	CAGGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTTTGGCATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATC AGCTACAGCGGCAGCGATACCTACTACGCC GACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCA GAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGAGATGTGGGCGT GATGGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGT CACCGTTAGCTCT
SEQ ID NO: 90	重链	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSAISYSGSDTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDVGVMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

[0857]

[0858]

		CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 91	DNA 重链	CAGGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTTTGGCATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAATGGGTGTCCGCCATC AGCTACAGCGGCAGCGATACCTACTACGCC GACAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCA GAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCA GATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGAGATGTGGGCGT GATGGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGT CACCGTTAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCA AGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGT CTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGT GACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACT TCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTG CAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGC GTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAG TGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGC TGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCC CAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGA CGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCA GTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGT GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA

[0859]

		CGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAAC AAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGA TATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA GCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCC AGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAG GTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG CAAG
SEQ ID NO: 92	LCDR1（组合的）	SGDNLGTYYAH
SEQ ID NO: 93	LCDR2（组合的）	SQSHRPS
SEQ ID NO: 94	LCDR3（组合的）	GAWDAPSPELV
SEQ ID NO: 92	LCDR1（卡巴特）	SGDNLGTYYAH
SEQ ID NO: 93	LCDR2（卡巴特）	SQSHRPS
SEQ ID NO: 94	LCDR3（卡巴特）	GAWDAPSPELV
SEQ ID NO: 95	LCDR1（乔西亚）	DNLGTYY
SEQ ID NO: 96	LCDR2（乔西亚）	SQS
SEQ ID NO: 97	LCDR3（乔西亚）	WDAPSPEL
SEQ ID NO: 98	LCDR1（IMGT）	NLGTYY
SEQ ID NO: 96	LCDR2	SQS

[0860]

	（IMGT）	
SEQ ID NO: 94	LCDR3（IMGT）	GAWDAPSPELV
SEQ ID NO: 99	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGTYYAH WYQQKPGQAPVLVIYSQSHRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCGAWDAPSPEL VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 100	DNA VL	AGCTATGAGCTGACACAGCCTCTGTCCGTGT CTGTGGCTCTGGGACAGACCGCCAGAATCA CCTGTAGCGGCGATAACCTGGGCACCTACTA CGCCCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA GGCTCCCGTGCTGGTCATCTACAGCCAGTCT CACAGACCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTC AGCGGCAGCAATAGCGGCAATACCGCCACA CTGACCATCAGCAGAGCACAGGCTGGCGAC GAGGCCGATTACTATTGTGGCGCTTGGGAC GCCCCATCTCCTGAGCTTGTTTTTGGCGGAG GCACCAAGCTGACAGTGCTG
SEQ ID NO: 101	轻链	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNLGTYYAH WYQQKPGQAPVLVIYSQSHRPSGIPERFSGSN SGNTATLTISRAQAGDEADYYCGAWDAPSPEL VFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 102	DNA 轻链	AGCTATGAGCTGACACAGCCTCTGTCCGTGT CTGTGGCTCTGGGACAGACCGCCAGAATCA CCTGTAGCGGCGATAACCTGGGCACCTACTA CGCCCACTGGTATCAGCAGAAGCCTGGACA GGCTCCCGTGCTGGTCATCTACAGCCAGTCT CACAGACCCAGCGGCATCCCCGAGAGATTC AGCGGCAGCAATAGCGGCAATACCGCCACA CTGACCATCAGCAGAGCACAGGCTGGCGAC GAGGCCGATTACTATTGTGGCGCTTGGGAC GCCCCATCTCCTGAGCTTGTTTTTGGCGGAG

[0861]

		GCACCAAGCTGACAGTGCTGGGACAGCCTA AGGCCGCTCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCC CCAGCTCCGAGGAACTGCAGGCCAACAAGG CCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTA CCCTGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGC CGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGA GACAACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAA CAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCT GACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGAAG CTACAGCTGCCAGGTCACCCACGAGGGCAG CACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCACCGA GTGCAGC
Y010341 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 103	HCDR1（组合的）	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 104	HCDR2（组合的）	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 105	HCDR3（组合的）	AFRLYWLDV
SEQ ID NO: 106	HCDR1（卡巴特）	SYAMS
SEQ ID NO: 104	HCDR2（卡巴特）	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 105	HCDR3（卡巴特）	AFRLYWLDV
SEQ ID NO: 107	HCDR1（乔西亚）	GFTFSSY
SEQ ID NO: 108	HCDR2（乔西亚）	SGSGGS
SEQ ID NO: 105	HCDR3（乔西亚）	AFRLYWLDV
SEQ ID NO: 109	HCDR1（IMGT）	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 110	HCDR2（IMGT）	ISGSGGST

[0862]

SEQ ID NO: 111	HCDR3（IMGT）	ARAFRLYWLDV
SEQ ID NO: 112	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARAFRLYWLDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 113	DNA VH	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAG CTACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGCCATC TCTGGCTCTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAGAGCCTTCCGGCTGT ACTGGCTGGATGTTTGGGGACAGGGCACCC TGGTCACAGTGTCATCT
SEQ ID NO: 114	重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARAFRLYWLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO: 115	DNA 重链	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT

[0863]

		CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAG CTACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGCCATC TCTGGCTCTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAGAGCCTTCCGGCTGT ACTGGCTGGATGTTTGGGGACAGGGCACCC TGGTCACAGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGG CCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAG CAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTC CCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCT GACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCC CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG TGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGA CAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGG AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTG

[0864]

		TGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGCAAG
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （组合的）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （组合的）	AASSLQS
SEQ ID NO: 117	LCDR3 （组合的）	QQVYSAPVT
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （卡巴特）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （卡巴特）	AASSLQS
SEQ ID NO: 117	LCDR3 （卡巴特）	QQVYSAPVT
SEQ ID NO: 49	LCDR1 （乔西亚）	SQSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2 （乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 118	LCDR3 （乔西亚）	VYSAPV
SEQ ID NO: 52	LCDR1 （IMGT）	QSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2 （IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 117	LCDR3 （IMGT）	QQVYSAPVT
SEQ ID NO: 119	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYSAPVTF

[0865]

		GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 120	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTCTA CAGCGCCCCTGTGACATTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 121	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYSAPVTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 122	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTCTA CAGCGCCCCTGTGACATTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG

[0866]

		TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
Y010355 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 123	HCDR1（组合的）	GFTFSNYWIS
SEQ ID NO: 124	HCDR2（组合的）	RIKSKTYGGTTDYAEPVKG
SEQ ID NO: 125	HCDR3（组合的）	TSRRSYAFDY
SEQ ID NO: 126	HCDR1（卡巴特）	NYWIS
SEQ ID NO: 124	HCDR2（卡巴特）	RIKSKTYGGTTDYAEPVKG
SEQ ID NO: 125	HCDR3（卡巴特）	TSRRSYAFDY
SEQ ID NO: 127	HCDR1（乔西亚）	GFTFSNY
SEQ ID NO: 128	HCDR2（乔西亚）	KSKTYGGT
SEQ ID NO: 125	HCDR3（乔西亚）	TSRRSYAFDY
SEQ ID NO: 129	HCDR1（IMGT）	GFTFSNYW
SEQ ID NO: 130	HCDR2（IMGT）	IKSKTYGGTT
SEQ ID NO: 131	HCDR3（IMGT）	ARTSRRSYAFDY
SEQ ID NO: 132	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNY WISWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTYGGTTDYA EPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARTSRRSYAFDYWGQGTLVTVSS

[0867]

SEQ ID NO: 133	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA CTACTGGATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCTACGGCGGCACCACCGA TTATGCCGAGCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAACCA GCAGAAGAAGCTACGCCTTCGACTACTGGG GCCAGGGCACACTGGTTACCGTTAGCTCT
SEQ ID NO: 134	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNY WISWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTYGGTTDYA EPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARTSRRSYAFDYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
SEQ ID NO: 135	DNA 重链	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA CTACTGGATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCTACGGCGGCACCACCGA TTATGCCGAGCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTG

[0868]

		TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAACCA GCAGAAGAAGCTACGCCTTCGACTACTGGG GCCAGGGCACACTGGTTACCGTTAGCTCTGC TAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTG GCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGA ACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTGTCCTGGA ACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC CCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGC CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAA GTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGC CCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG GCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC

[0869]

		CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 136	LCDR1 （组合的）	RASQSISSWLA
SEQ ID NO: 137	LCDR2 （组合的）	DASSLES
SEQ ID NO: 138	LCDR3 （组合的）	QQITRYPVT
SEQ ID NO: 136	LCDR1 （卡巴特）	RASQSISSWLA
SEQ ID NO: 137	LCDR2 （卡巴特）	DASSLES
SEQ ID NO: 138	LCDR3 （卡巴特）	QQITRYPVT
SEQ ID NO: 139	LCDR1 （乔西亚）	SQSISSW
SEQ ID NO: 140	LCDR2 （乔西亚）	DAS
SEQ ID NO: 141	LCDR3 （乔西亚）	ITRYPV
SEQ ID NO: 142	LCDR1 （IMGT）	QSISSW
SEQ ID NO: 140	LCDR2 （IMGT）	DAS
SEQ ID NO: 138	LCDR3 （IMGT）	QQITRYPVT
SEQ ID NO: 143	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQITRYPVTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 144	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCACA CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCTCCT CTTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGATGC

[0870]

		CAGCAGCCTGGAAAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGATCAC AAGATACCCCGTGACCTTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 145	轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQITRYPVTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 146	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCACA CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCTCCT CTTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGATGC CAGCAGCCTGGAAAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGATCAC AAGATACCCCGTGACCTTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC

[0871]

Y010356 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 123	HCDR1（组合的）	GFTFSNYWIS
SEQ ID NO: 124	HCDR2（组合的）	RIKSKTYGGTTDYAEPVKG
SEQ ID NO: 147	HCDR3（组合的）	VSGYYSHSGGFDV
SEQ ID NO: 126	HCDR1（卡巴特）	NYWIS
SEQ ID NO: 124	HCDR2（卡巴特）	RIKSKTYGGTTDYAEPVKG
SEQ ID NO: 147	HCDR3（卡巴特）	VSGYYSHSGGFDV
SEQ ID NO: 127	HCDR1（乔西亚）	GFTFSNY
SEQ ID NO: 128	HCDR2（乔西亚）	KSKTYGGT
SEQ ID NO: 147	HCDR3（乔西亚）	VSGYYSHSGGFDV
SEQ ID NO: 129	HCDR1（IMGT）	GFTFSNYW
SEQ ID NO: 130	HCDR2（IMGT）	IKSKTYGGTT
SEQ ID NO: 148	HCDR3（IMGT）	ARVSGYYSHSGGFDV
SEQ ID NO: 149	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNY WISWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTYGGTTDYA EPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVSGYYSHSGGFDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 150	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA CTACTGGATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCTACGGCGGCACCACCGA

[0872]

		TTATGCCGAGCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGTC TGGCTACTACTCTCACAGCGGCGGCTTTGAT GTGTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTT AGTTCT
SEQ ID NO: 151	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNY WISWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTYGGTTDYA EPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVSGYYSHSGGFDVWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPC PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
SEQ ID NO: 152	DNA 重链	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA CTACTGGATCAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGCAAAGGACTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCTACGGCGGCACCACCGA TTATGCCGAGCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGTC TGGCTACTACTCTCACAGCGGCGGCTTTGAT GTGTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTT AGTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGT

[0873]

		TTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTC CGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTG TCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGC AGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTG ACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCC CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCC CCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCC GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCC TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAA GGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGG TGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 153	LCDR1 （组合的）	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 154	LCDR2	AASTLQS

[0874]

	（组合的）	
SEQ ID NO: 155	LCDR3（组合的）	QKTWRTPGT
SEQ ID NO: 153	LCDR1（卡巴特）	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 154	LCDR2（卡巴特）	AASTLQS
SEQ ID NO: 155	LCDR3（卡巴特）	QKTWRTPGT
SEQ ID NO: 156	LCDR1（乔西亚）	SQGISNY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 157	LCDR3（乔西亚）	TWRTPG
SEQ ID NO: 158	LCDR1（IMGT）	QGISNY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 155	LCDR3（IMGT）	QKTWRTPGT
SEQ ID NO: 159	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYL AWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKTWRTPGT FGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 160	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACGCTG CCAGCACACTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCA GATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTT CACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAG GACGTGGCCACCTACTACTGTCAGAAAACCT GGCGGACCCCTGGCACATTTGGCCAGGGAA

[0875]

		CAAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 161	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYL AWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKTWRTPGT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 162	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACGCTG CCAGCACACTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCA GATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTT CACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAG GACGTGGCCACCTACTACTGTCAGAAAACCT GGCGGACCCCTGGCACATTTGGCCAGGGAA CAAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGG GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGC GAGTGC
Y010415 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 103	HCDR1（组合的）	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 104	HCDR2（组合的）	AISGSGGSTYYADSVKG

[0876]

SEQ ID NO: 163	HCDR3（组合的）	SRLIAPWLDY
SEQ ID NO: 106	HCDR1（卡巴特）	SYAMS
SEQ ID NO: 104	HCDR2（卡巴特）	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 163	HCDR3（卡巴特）	SRLIAPWLDY
SEQ ID NO: 107	HCDR1（乔西亚）	GFTFSSY
SEQ ID NO: 108	HCDR2（乔西亚）	SGSGGS
SEQ ID NO: 163	HCDR3（乔西亚）	SRLIAPWLDY
SEQ ID NO: 109	HCDR1（IMGT）	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 110	HCDR2（IMGT）	ISGSGGST
SEQ ID NO: 164	HCDR3（IMGT）	ARSRLIAPWLDY
SEQ ID NO: 165	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSRLIAPWLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 166	DNA VH	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAG CTACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGCCATC TCTGGCTCTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAGAAGCAGACTGATCG CCCCTTGGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCA

		CACTGGTCACCGTGTCATCT
SEQ ID NO: 167	重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSRLIAPWLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
SEQ ID NO: 168	DNA 重链	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAG CTACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGCCATC TCTGGCTCTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAGAAGCAGACTGATCG CCCCTTGGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCA CACTGGTCACCGTGTCATCTGCTAGCACCAA GGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCC CTGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCT GTCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGG CTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGC CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTC

[0877]

[0878]

		TCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAG ACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCA GAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGT TCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGT GGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGT GAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAA AGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAC GGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCA GCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCC CTGTGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA CGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCAC CCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCC CCGGCAAG
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （组合的）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （组合的）	AASSLQS
SEQ ID NO: 169	LCDR3 （组合的）	QQVYGSPPT
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （卡巴特）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2	AASSLQS

[0879]

	（卡巴特）	
SEQ ID NO: 169	LCDR3（卡巴特）	QQVYGSPPT
SEQ ID NO: 49	LCDR1（乔西亚）	SQSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 170	LCDR3（乔西亚）	VYGSPP
SEQ ID NO: 52	LCDR1（IMGT）	QSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 169	LCDR3（IMGT）	QQVYGSPPT
SEQ ID NO: 171	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYGSPPTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 172	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTCTA CGGCAGCCCTCCTACATTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 173	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVYGSPPTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES

[0880]

		VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 174	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGTCTA CGGCAGCCCTCCTACATTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
Y010417 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 175	HCDR1 （组合的）	GYSFTSYWIG
SEQ ID NO: 176	HCDR2 （组合的）	IIYPGDSDTRYSPSFQG
SEQ ID NO: 177	HCDR3 （组合的）	GSSAASGLSGDL
SEQ ID NO: 178	HCDR1 （卡巴特）	SYWIG
SEQ ID NO: 176	HCDR2 （卡巴特）	IIYPGDSDTRYSPSFQG

[0881]

SEQ ID NO: 177	HCDR3（卡巴特）	GSSAASGLSGDL
SEQ ID NO: 179	HCDR1（乔西亚）	GYSFTSY
SEQ ID NO: 180	HCDR2（乔西亚）	YPGDSD
SEQ ID NO: 177	HCDR3（乔西亚）	GSSAASGLSGDL
SEQ ID NO: 181	HCDR1（IMGT）	GYSFTSYW
SEQ ID NO: 182	HCDR2（IMGT）	IYPGDSDT
SEQ ID NO: 183	HCDR3（IMGT）	ARGSSAASGLSGDL
SEQ ID NO: 184	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGSSAASGLSGDLWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 185	DNA VH	GAAGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCTGAAGATC TCCTGCAAAGGCAGCGGCTACAGCTTCACCA GCTACTGGATCGGCTGGGTCCGACAGATGC CTGGCAAAGGCCTTGAGTGGATGGGCATCAT CTACCCCGGCGACAGCGACACCAGATACAG CCCTAGCTTTCAGGGCCAAGTGACCATCAGC GCCGACAAGAGCATCAGCACAGCCTACCTG CAGTGGTCCAGCCTGAAGGCCTCTGACACC GCCATGTACTACTGTGCCAGAGGAAGCTCTG CCGCCTCTGGACTGTCTGGCGATCTTTGGG GACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGT
SEQ ID NO: 186	重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARGSSAASGLSGDLWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVT

			VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
[0882]	SEQ ID NO: 187	DNA 重链	GAAGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCTGAAGATC TCCTGCAAAGGCAGCGGCTACAGCTTCACCA GCTACTGGATCGGCTGGGTCCGACAGATGC CTGGCAAAGGCCTTGAGTGGATGGGCATCAT CTACCCCGGCGACAGCGACACCAGATACAG CCCTAGCTTTCAGGGCCAAGTGACCATCAGC GCCGACAAGAGCATCAGCACAGCCTACCTG CAGTGGTCCAGCCTGAAGGCCTCTGACACC GCCATGTACTACTGTGCCAGAGGAAGCTCTG CCGCCTCTGGACTGTCTGGCGATCTTTGGG GACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGTG CTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGG AACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGA CTACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTGTCCTGG AACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC CCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGC CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA

[0883]

		CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAA GTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGC CCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG GCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （组合的）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （组合的）	AASSLQS
SEQ ID NO: 188	LCDR3 （组合的）	QQDYYSPFT
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （卡巴特）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （卡巴特）	AASSLQS
SEQ ID NO: 188	LCDR3 （卡巴特）	QQDYYSPFT
SEQ ID NO: 49	LCDR1 （乔西亚）	SQSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2	AAS

[0884]

	（乔西亚）	
SEQ ID NO: 189	LCDR3（乔西亚）	DYYSPF
SEQ ID NO: 52	LCDR1（IMGT）	QSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 188	LCDR3（IMGT）	QQDYYSPFT
SEQ ID NO: 190	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDYYSPFTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 191	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACTA CTACAGCCCCTTCACCTTTGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 192	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDYYSPFTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 193	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG

[0885]

		GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGACTA CTACAGCCCCTTCACCTTTGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
Y010429 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 103	HCDR1 （组合的）	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 104	HCDR2 （组合的）	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 194	HCDR3 （组合的）	AYKLSWLDL
SEQ ID NO: 106	HCDR1 （卡巴特）	SYAMS
SEQ ID NO: 104	HCDR2 （卡巴特）	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 194	HCDR3 （卡巴特）	AYKLSWLDL
SEQ ID NO: 107	HCDR1 （乔西亚）	GFTFSSY
SEQ ID NO: 108	HCDR2 （乔西亚）	SGSGGS

[0886]

SEQ ID NO: 194	HCDR3（乔西亚）	AYKLSWLDL
SEQ ID NO: 109	HCDR1（IMGT）	GFTFSSYA
SEQ ID NO: 110	HCDR2（IMGT）	ISGSGGST
SEQ ID NO: 195	HCDR3（IMGT）	ARAYKLSWLDL
SEQ ID NO: 196	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARAYKLSWLDLWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 197	DNA VH	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAG CTACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGCCATC TCTGGCTCTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAGAGCCTACAAGCTGA GCTGGCTGGATCTTTGGGGCCAGGGCACAC TGGTCACAGTGTCATCT
SEQ ID NO: 198	重链	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARAYKLSWLDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL

[0887]

		PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO: 199	DNA 重链	GAAGTTCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCAG CTACGCCATGAGCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTTGAATGGGTGTCCGCCATC TCTGGCTCTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCG GGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCC GTGTACTATTGTGCCAGAGCCTACAAGCTGA GCTGGCTGGATCTTTGGGGCCAGGGCACAC TGGTCACAGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGG CCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAG CAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCTGTC CCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGGGGCTCT GACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCT GGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACC CACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCC CCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCA GCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG TGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCT

[0888]

		GAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGA CAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGG AGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGCC GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTG TGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG CCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGCAAG
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （组合的）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （组合的）	AASSLQS
SEQ ID NO: 200	LCDR3 （组合的）	QQVWYAPVT
SEQ ID NO: 116	LCDR1 （卡巴特）	RASQSISSYLN
SEQ ID NO: 47	LCDR2 （卡巴特）	AASSLQS
SEQ ID NO: 200	LCDR3 （卡巴特）	QQVWYAPVT
SEQ ID NO: 49	LCDR1 （乔西亚）	SQSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2 （乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 201	LCDR3 （乔西亚）	VWYAPV
SEQ ID NO: 52	LCDR1 （IMGT）	QSISSY
SEQ ID NO: 50	LCDR2	AAS

[0889]

	（IMGT）	
SEQ ID NO: 200	LCDR3（IMGT）	QQVWYAPVT
SEQ ID NO: 202	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWYAPVT FGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 203	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAAGTTTG GTACGCCCCTGTGACCTTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 204	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQVWYAPVT FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 205	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCAGCA GCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCCTAAACTGCTGATCTATGCCGC CAGCTCTCTGCAGTCTGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAAGTTTG GTACGCCCCTGTGACCTTTGGCCAGGGCAC

[0890]

		CAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
Y010900 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 206	HCDR1 （组合的）	GFTFSNAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2 （组合的）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 208	HCDR3 （组合的）	TIYPSAPSSSLDY
SEQ ID NO: 209	HCDR1 （卡巴特）	NAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2 （卡巴特）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 208	HCDR3 （卡巴特）	TIYPSAPSSSLDY
SEQ ID NO: 210	HCDR1 （乔西亚）	GFTFSNA
SEQ ID NO: 211	HCDR2 （乔西亚）	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 208	HCDR3 （乔西亚）	TIYPSAPSSSLDY
SEQ ID NO: 212	HCDR1 （IMGT）	GFTFSNAW
SEQ ID NO: 213	HCDR2 （IMGT）	IKSKTDAGTT

[0891]

SEQ ID NO: 214	HCDR3（IMGT）	ARTIYPSAPSSSLDY
SEQ ID NO: 215	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARTIYPSAPSSSLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 216	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAACAAT CTACCCCAGCGCTCCTAGCAGCAGCCTGGA TTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGT GTCATCT
SEQ ID NO: 217	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARTIYPSAPSSSLDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
SEQ ID NO: 218	DNA 重链	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA

[0892]

		CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAACAAT CTACCCCAGCGCTCCTAGCAGCAGCCTGGA TTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGT GTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTG TTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTT CCGGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGACAGT GTCCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGG CGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAG CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGT GACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAG CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGC CCCCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGGCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGT CCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACA ACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAG

[0893]

		ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC TGGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 153	LCDR1（组合的）	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 154	LCDR2（组合的）	AASTLQS
SEQ ID NO: 219	LCDR3（组合的）	QQLIFFPLT
SEQ ID NO: 153	LCDR1（卡巴特）	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 154	LCDR2（卡巴特）	AASTLQS
SEQ ID NO: 219	LCDR3（卡巴特）	QQLIFFPLT
SEQ ID NO: 156	LCDR1（乔西亚）	SQGISNY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 220	LCDR3（乔西亚）	LIFFPL
SEQ ID NO: 158	LCDR1（IMGT）	QGISNY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 219	LCDR3（IMGT）	QQLIFFPLT
SEQ ID NO: 221	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYL AWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS

[0894]

		GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQLIFFPLTFG QGTKVEIK
SEQ ID NO: 222	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACGCTG CCAGCACACTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCA GATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTT CACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAG GACGTGGCCACCTACTATTGCCAGCAGCTGA TCTTCTTCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 223	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYL AWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQLIFFPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 224	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACGCTG CCAGCACACTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCA GATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTT CACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAG GACGTGGCCACCTACTATTGCCAGCAGCTGA TCTTCTTCCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCAC CAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGC TCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAC GAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG

[0895]

		CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCG AGTGC
Y010903 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 206	HCDR1 （组合的）	GFTFSNAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2 （组合的）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 225	HCDR3 （组合的）	ASHRLHSLFDV
SEQ ID NO: 209	HCDR1 （卡巴特）	NAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2 （卡巴特）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 225	HCDR3 （卡巴特）	ASHRLHSLFDV
SEQ ID NO: 210	HCDR1 （乔西亚）	GFTFSNA
SEQ ID NO: 211	HCDR2 （乔西亚）	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 225	HCDR3 （乔西亚）	ASHRLHSLFDV
SEQ ID NO: 212	HCDR1 （IMGT）	GFTFSNAW
SEQ ID NO: 213	HCDR2 （IMGT）	IKSKTDAGTT
SEQ ID NO: 226	HCDR3 （IMGT）	ARASHRLHSLFDV
SEQ ID NO: 227	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY

[0896]

		YCARASHRLHSLFDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 228	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGCCTC TCACAGACTGCACAGCCTGTTTGACGTGTGG GGCCAGGGAACACTGGTCACCGTTAGTTCT
SEQ ID NO: 229	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARASHRLHSLFDVWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
SEQ ID NO: 230	DNA 重链	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC

[0897]

		ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG
		TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG
		ACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGCCTC
		TCACAGACTGCACAGCCTGTTTGACGTGTGG
		GGCCAGGGAACACTGGTCACCGTTAGTTCTG
		CTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCT
		GGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGG
		AACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGA
		CTACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTGTCCTGG
		AACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACA
		CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC
		TGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC
		CCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT
		CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC
		AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC
		TGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGC
		CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC
		GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA
		CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGA
		CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG
		ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
		CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA
		GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA
		CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA
		CCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAA
		GTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGC
		CCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAG
		GGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC
		CTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG
		AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG
		GCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTG
		GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA
		CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGA
		CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC
		GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC

[0898]

		GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 136	LCDR1 （组合的）	RASQSISSWLA
SEQ ID NO: 137	LCDR2 （组合的）	DASSLES
SEQ ID NO: 231	LCDR3 （组合的）	QQGLFYPHT
SEQ ID NO: 136	LCDR1 （卡巴特）	RASQSISSWLA
SEQ ID NO: 137	LCDR2 （卡巴特）	DASSLES
SEQ ID NO: 231	LCDR3 （卡巴特）	QQGLFYPHT
SEQ ID NO: 139	LCDR1 （乔西亚）	SQSISSW
SEQ ID NO: 140	LCDR2 （乔西亚）	DAS
SEQ ID NO: 232	LCDR3 （乔西亚）	GLFYPH
SEQ ID NO: 142	LCDR1 （IMGT）	QSISSW
SEQ ID NO: 140	LCDR2 （IMGT）	DAS
SEQ ID NO: 231	LCDR3 （IMGT）	QQGLFYPHT
SEQ ID NO: 233	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQGLFYPHTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 234	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCACA CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCTCCT CTTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTG

		GCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGATGC CAGCAGCCTGGAAAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGGGCCT GTTCTACCCTCACACCTTTGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 235	轻链	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWL AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQGLFYPHTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 236	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCCAGCACA CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGAGCATCTCCT CTTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTG GCAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTACGATGC CAGCAGCCTGGAAAGCGGCGTGCCAAGCAG ATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGAGTTC ACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGG ACTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGGGCCT GTTCTACCCTCACACCTTTGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA CAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA

[0899]

[0900]

		GTGC
Y010906 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 206	HCDR1（组合的）	GFTFSNAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2（组合的）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 237	HCDR3（组合的）	DEYPWGWFDV
SEQ ID NO: 209	HCDR1（卡巴特）	NAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2（卡巴特）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 237	HCDR3（卡巴特）	DEYPWGWFDV
SEQ ID NO: 210	HCDR1（乔西亚）	GFTFSNA
SEQ ID NO: 211	HCDR2（乔西亚）	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 237	HCDR3（乔西亚）	DEYPWGWFDV
SEQ ID NO: 212	HCDR1（IMGT）	GFTFSNAW
SEQ ID NO: 213	HCDR2（IMGT）	IKSKTDAGTT
SEQ ID NO: 238	HCDR3（IMGT）	ARDEYPWGWFDV
SEQ ID NO: 239	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARDEYPWGWFDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 240	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT

[0901]

		CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGATGA GTACCCCTGGGGATGGTTCGATGTGTGGGG ACAGGGAACCCTGGTCACCGTTAGTTCT
SEQ ID NO: 241	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARDEYPWGWFDVWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
SEQ ID NO: 242	DNA 重链	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGATGA GTACCCCTGGGGATGGTTCGATGTGTGGGG ACAGGGAACCCTGGTCACCGTTAGTTCTGCT AGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTG

[0902]

		GCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGA ACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTGTCCTGGA ACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGC CCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGC TGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGC CCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCC GTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA CGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA CCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAA GTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGC CCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG GCTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTA CAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACC GTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC GTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 243	LCDR1 （组合的）	RASQGISSWLA
SEQ ID NO: 47	LCDR2	AASSLQS

[0903]

	（组合的）	
SEQ ID NO: 244	LCDR3（组合的）	QQYIFYPLT
SEQ ID NO: 243	LCDR1（卡巴特）	RASQGISSWLA
SEQ ID NO: 47	LCDR2（卡巴特）	AASSLQS
SEQ ID NO: 244	LCDR3（卡巴特）	QQYIFYPLT
SEQ ID NO: 245	LCDR1（乔西亚）	SQGISSW
SEQ ID NO: 50	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 246	LCDR3（乔西亚）	YIFYPL
SEQ ID NO: 247	LCDR1（IMGT）	QGISSW
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 244	LCDR3（IMGT）	QQYIFYPLT
SEQ ID NO: 248	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIFYPLTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 249	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCG TGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCA TCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCTCTTC TTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGG CAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCT TCCAGTCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGA TTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCA CCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGGA CTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACATC TTCTACCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCA

[0904]

		AGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 250	轻链	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWL AWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIFYPLTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 251	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCTCCG TGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCA TCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCTCTTC TTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGG CAAGGCCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCT TCCAGTCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGA TTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCA CCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAGGA CTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACATC TTCTACCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCA AGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTC CCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC CTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCC CCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
Y010910 E152C_S375C		
SEQ ID NO: 206	HCDR1（组合的）	GFTFSNAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2（组合的）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG

[0905]

SEQ ID NO: 252	HCDR3（组合的）	VASPSAPGGFDY
SEQ ID NO: 209	HCDR1（卡巴特）	NAWMS
SEQ ID NO: 207	HCDR2（卡巴特）	RIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 252	HCDR3（卡巴特）	VASPSAPGGFDY
SEQ ID NO: 210	HCDR1（乔西亚）	GFTFSNA
SEQ ID NO: 211	HCDR2（乔西亚）	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 252	HCDR3（乔西亚）	VASPSAPGGFDY
SEQ ID NO: 212	HCDR1（IMGT）	GFTFSNAW
SEQ ID NO: 213	HCDR2（IMGT）	IKSKTDAGTT
SEQ ID NO: 253	HCDR3（IMGT）	ARVASPSAPGGFDY
SEQ ID NO: 254	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVASPSAPGGFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 255	DNA VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGG CTTCTCCTTCTGCTCCCGGCGGATTCGATTA

		TTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTGTC TAGT
SEQ ID NO: 256	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNA WMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDAGTTDYA APVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVY YCARVASPSAPGGFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
SEQ ID NO: 257	DNA 重链	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGCGGA CTTGTGAAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGA GCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCAA TGCCTGGATGAGCTGGGTCCGACAGGCCCC TGGAAAAGGCCTTGAGTGGGTCGGACGGAT CAAGAGCAAGACCGATGCCGGCACCACCGA TTATGCTGCCCCTGTGAAGGGCAGATTCACC ATCAGCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTG TACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGTGG CTTCTCCTTCTGCTCCCGGCGGATTCGATTA TTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTGTC TAGTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTT CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCC GGCGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTG AAGGACTACTTCCCCTGTCCCGTGACAGTGT CCTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCG TGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCA

[0906]

[0907]

		GCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGA CCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCC CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCC CCCCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGG GCCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCC GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACC GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAA GAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCC TGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAA GGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGG TGTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCTGTGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAG AACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 153	LCDR1 （组合的）	RASQGISNYLA
SEQ ID NO: 154	LCDR2 （组合的）	AASTLQS
SEQ ID NO: 258	LCDR3 （组合的）	QQSLFAPFT
SEQ ID NO: 153	LCDR1 （卡巴特）	RASQGISNYLA

SEQ ID NO: 154	LCDR2（卡巴特）	AASTLQS
SEQ ID NO: 258	LCDR3（卡巴特）	QQSLFAPFT
SEQ ID NO: 156	LCDR1（乔西亚）	SQGISNY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（乔西亚）	AAS
SEQ ID NO: 259	LCDR3（乔西亚）	SLFAPF
SEQ ID NO: 158	LCDR1（IMGT）	QGISNY
SEQ ID NO: 50	LCDR2（IMGT）	AAS
SEQ ID NO: 258	LCDR3（IMGT）	QQSLFAPFT
SEQ ID NO: 260	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYL AWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQSLFAPFTF GQGTKVEIK
SEQ ID NO: 261	DNA VL	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACGCTG CCAGCACACTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCA GATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTT CACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAG GACGTGGCCACCTACTACTGTCAGCAGAGC CTGTTCGCCCCTTTCACCTTTGGCCAGGGCA CCAAGGTGGAAATCAAG
SEQ ID NO: 262	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYL AWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQSLFAPFTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS

[0908]

[0909]

		VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 263	DNA 轻链	GACATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGC CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCAGC AACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCG GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACGCTG CCAGCACACTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCA GATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTT CACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCAGAG GACGTGGCCACCTACTACTGTCAGCAGAGC CTGTTCGCCCCTTTCACCTTTGGCCAGGGCA CCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGTGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGG GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGC GAGTGC

[0910] 本发明的其他抗体包括如下那些抗体,其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经突变,但与表2中所述的序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%同一性。在一些实施例中,当与表2中所述序列中绘示的可变区相比时,在可变区中1、2、3、4或5个氨基酸已经突变,但同时保留与表2中列出的抗体基本上相同的治疗活性。

[0911] 由于这些抗体中的每一种都可以结合PMEL17,因此VH、VL、全长轻链和全长重链序列(氨基酸序列和编码氨基酸序列的核苷酸序列)可以是“混合且匹配的”以产生本发明的其他PMEL17结合抗体。可以使用本领域已知的结合测定(例如,ELISA和实例部分中描述的其他测定)来测试此类“混合且匹配的”PMEL17结合抗体。当这些链被混合且匹配时,来自特定VH/VL配对的VH序列应当用结构上相似的VH序列替代。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列应当用结构上相似的全长重链序列替代。同样,来自特定VH/VL配对的VL序列应当用结构上相似的VL序列替代。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列应当用结构上相似的全长轻链序列替代。因此,在一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体或其抗原结合区,所述单克隆抗体或其抗原结合区具有:重链可变区,所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:10、42、64、88、112、132、149、165、184、196、215、227、239

或254组成的组的氨基酸序列;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含选自由SEQ ID NO:21、25、29、53、75、99、119、143、159、171、190、202、221、233、248或260组成的组的氨基酸序列;其中抗体特异性结合PMEL17。

[0912] 在另一方面,本发明提供了(i)一种分离的单克隆抗体,所述单克隆抗体具有:全长重链,所述全长重链包含选自由SEQ ID NO:12、44、66、90、114、134、151、167、186、198、217、229、241或256组成的组、已针对在哺乳动物表达系统的细胞中的表达进行优化的氨基酸序列;和全长轻链,所述全长轻链包含选自由SEQ ID NO:23、27、31、55、77、101、121、145、161、173、192、204、223、235、250或262组成的组、已针对在哺乳动物细胞中的表达进行优化的氨基酸序列;或(ii)包含其抗原结合部分的功能性蛋白。

[0913] 在另一方面,本发明提供了PMEL17结合抗体,所述PMEL17结合抗体包含如表2中所述的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3、或其组合。抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于,例如SEQ ID NO:1、4、5、7、33、36、37、39、57、60、79、82、83、85、103、106、107、109、123、126、127、129、175、178、179、181、206、209、210、和212中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于,例如SEQ ID NO:2、6、8、34、38、40、58、61、62、80、84、86、104、108、110、124、128、130、176、180、182、207、211、和213中。抗体的VH CDR3的氨基酸序列示于,例如SEQ ID NO:3、9、35、41、59、63、81、87、105、111、125、131、147、148、163、164、177、183、194、195、208、214、225、226、237、238、252、和253中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列示于,例如SEQ ID NO:14、17、20、46、49、52、68、71、74、92、95、98、116、136、139、142、153、156、158、243、245、和247中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列示于,例如SEQ ID NO:15、18、47、50、69、72、93、96、137、140、和154中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列示于,例如SEQ ID NO:16、19、48、51、70、73、94、97、117、118、138、141、155、157、169、170188、189、200、201、219、220、231、232、244、246、258、和259中。

[0914] 鉴于这些抗体中的每一种都可以结合PMEL17并且抗原结合特异性主要由CDR1、2和3区提供,VH CDR1、CDR2和CDR3序列以及VLCDR1、CDR2和CDR3序列可以“混合且匹配”(即,来自不同抗体的CDR可以被混合且匹配)。可以使用本领域已知的结合测定和实例中描述的那些结合测定(例如,ELISA)来测试此类“混合且匹配的”PMEL17结合抗体。当混合并匹配VH CDR序列时,来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应当置换为一种或多种结构上相似的CDR序列。同样,当混合并匹配VL CDR序列时,来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应当置换为一种或多种结构上相似的CDR序列。对于普通技术人员来说容易清楚的是,可以通过用来自本文针对本发明单克隆抗体所示的CDR序列的结构相似序列取代一个或多个VH和/或VLCDR区序列来产生新颖的VH和VL序列。

[0915] 因此,在一些实施例中,本方面提供了包含以下的分离的单克隆抗体或其抗原结合区:重链CDR1,所述重链CDR1包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、4、5、7、33、36、37、39、57、60、79、82、83、85、103、106、107、109、123、126、127、129、175、178、179、181、206、209、210、和212;重链CDR2,所述重链CDR2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2、6、8、34、38、40、58、61、62、80、84、86、104、108、110、124、128、130、176、180、182、207、211、和213;重链CDR3,所述重链CDR3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、9、35、41、59、63、81、87、105、111、125、131、147、148、163、164、177、183、194、195、208、214、225、226、237、238、252、和253;轻链CDR1,所述轻链CDR1包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、17、20、46、49、52、68、71、74、92、95、98、116、136、

139、142、153、156、158、243、245、和247;轻链CDR2,所述轻链CDR2包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:15、18、47、50、69、72、93、96、137、140、和154;以及轻链CDR3,所述轻链CDR3包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:16、19、48、51、70、73、94、97、117、118、138、141、155、157、169、170、188、189、200、201、219、220、231、232、244、246、258、和259;其中抗体特异性结合PMEL17。

[0916] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:1、4、5或7的重链CDR1,SEQ ID NO:2、6或8的重链CDR2,SEQ ID NO:3或9的重链CDR3;SEQ ID NO:14、17或20的轻链CDR1,SEQ ID NO:15或18的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:16或19的轻链CDR3。

[0917] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:33、36、37或39的重链CDR1,SEQ IDNO:34、38或40的重链CDR2,SEQ ID NO:35或41的重链CDR3;SEQID NO:46、49或52的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:48或51的轻链CDR3。

[0918] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:5、7、57或60的重链CDR1,SEQ ID NO:58、61或62的重链CDR2,SEQ ID NO:59或63的重链CDR3;SEQ IDNO:68、71或74的轻链CDR1,SEQ ID NO:69或72的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:70或73的轻链CDR3。

[0919] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:79、82、83或85的重链CDR1,SEQ IDNO:80、84或86的重链CDR2,SEQ ID NO:81或87的重链CDR3;SEQID NO:92、95或98的轻链CDR1,SEQ ID NO:93或96的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:94或97的轻链CDR3。

[0920] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ ID NO:105或111的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:117或118的轻链CDR3。

[0921] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:123、126、127或129的重链CDR1,SEQID NO:124、128或130的重链CDR2,SEQ ID NO:125或131的重链CDR3;SEQ ID NO:136、139或142的轻链CDR1,SEQ ID NO:137或140的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:138或141的轻链CDR3。

[0922] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:123、126、127或129的重链CDR1,SEQID NO:124、128或130的重链CDR2,SEQ ID NO:147或148的重链CDR3;SEQ ID NO:153、156或158的轻链CDR1,SEQ ID NO:50或154的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:155或157的轻链CDR3。

[0923] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ ID NO:163或164的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:169或170的轻链CDR3。

[0924] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:175、178、179或181的重链CDR1,SEQID NO:176、180或182的重链CDR2,SEQ ID

NO:177或183的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:188或189的轻链CDR3。

[0925] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:103、106、107或109的重链CDR1,SEQID NO:104、108或110的重链CDR2,SEQ ID NO:194或195的重链CDR3;SEQ ID NO:49、52或116的轻链CDR1,SEQ ID NO:47或50的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:200或201的轻链CDR3。

[0926] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:206、209、210或212的重链CDR1,SEQID NO:207、211或213的重链CDR2,SEQ ID NO:208或214的重链CDR3;SEQ ID NO:153、156或158的轻链CDR1,SEQ ID NO:50或154的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:219或220的轻链CDR3。

[0927] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含SEQ ID NO:206、209、210或212的重链CDR1,SEQID NO:207、211或213的重链CDR2,SEQ ID NO:225或226的重链CDR3;SEQ ID NO:136、139或142的轻链CDR1,SEQ ID NO:137或140的轻链CDR2,以及SEQ ID NO:231或232的轻链CDR3。

[0928] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的HCDR1,SEQ ID NO:207、211、213的HCDR2,以及SEQ ID NO:237或238的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243、245或247的LCDR1,SEQ ID NO:47或50的LCDR2,以及SEQ ID NO:244或246的LCDR3。

[0929] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206、209、210或212的HCDR1,SEQ ID NO:207、211、213的HCDR2,以及SEQ ID NO:252或253的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153、156或158的LCDR1,SEQ ID NO:50或154的LCDR2,以及SEQ ID NO:258或259的LCDR3。

[0930] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0931] a)SEQ ID NO:1的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ IDNO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:14的轻链CDR1、SEQ ID NO:15的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

[0932] b)SEQ ID NO:4的重链CDR1、SEQ ID NO:2的重链CDR2、SEQ IDNO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:14的轻链CDR1、SEQ ID NO:15的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3;

[0933] c)SEQ ID NO:5的重链CDR1、SEQ ID NO:6的重链CDR2、SEQ IDNO:3的重链CDR3、SEQ ID NO:17的轻链CDR1、SEQ ID NO:18的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:19的轻链CDR3;或

[0934] d)SEQ ID NO:7的重链CDR1、SEQ ID NO:8的重链CDR2、SEQ IDNO:9的重链CDR3、SEQ ID NO:20的轻链CDR1、SEQ ID NO:18的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:16的轻链CDR3。

[0935] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0936] a)SEQ ID NO:33的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2、SEQID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:46的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

[0937] b)SEQ ID NO:36的重链CDR1、SEQ ID NO:34的重链CDR2、SEQID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:46的轻链CDR1、SEQ ID NO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3;

[0938] c)SEQ ID NO:37的重链CDR1、SEQ ID NO:38的重链CDR2、SEQID NO:35的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:51的轻链CDR3:或

[0939] d)SEQ ID NO:39的重链CDR1、SEQ ID NO:40的重链CDR2、SEQID NO:41的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:48的轻链CDR3。

[0940] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0941] a)SEQ ID NO:57的重链CDR1、SEQ ID NO:58的重链CDR2、SEQID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:68的轻链CDR1、SEQ ID NO:69的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

[0942] b)SEQ ID NO:60的重链CDR1、SEQ ID NO:58的重链CDR2、SEQID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:68的轻链CDR1、SEQ ID NO:69的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3;

[0943] c)SEQ ID NO:5的重链CDR1、SEQ ID NO:61的重链CDR2、SEQID NO:59的重链CDR3、SEQ ID NO:71的轻链CDR1、SEQ ID NO:72的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:73的轻链CDR3;或

[0944] d)SEQ ID NO:7的重链CDR1、SEQ ID NO:62的重链CDR2、SEQID NO:63的重链CDR3、SEQ ID NO:74的轻链CDR1、SEQ ID NO:72的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:70的轻链CDR3。

[0945] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0946] a)SEQ ID NO:79的重链CDR1、SEQ ID NO:80的重链CDR2、SEQID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:92的轻链CDR1、SEQ ID NO:93的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

[0947] b)SEQ ID NO:82的重链CDR1、SEQ ID NO:80的重链CDR2、SEQID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:92的轻链CDR1、SEQ ID NO:93的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3;

[0948] c)SEQ ID NO:83的重链CDR1、SEQ ID NO:84的重链CDR2、SEQID NO:81的重链CDR3、SEQ ID NO:95的轻链CDR1、SEQ ID NO:96的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:97的轻链CDR3;或

[0949] d)SEQ ID NO:85的重链CDR1、SEQ ID NO:86的重链CDR2、SEQID NO:87的重链CDR3、SEQ ID NO:98的轻链CDR1、SEQ ID NO:96的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:94的轻链CDR3。

[0950] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0951] a)SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链

CDR3;

[0952] b)SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3;

[0953] c)SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:105的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:118的轻链CDR3;或

[0954] d)SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:111的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:117的轻链CDR3。

[0955] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0956] a)SEQ ID NO:123的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3;

[0957] b)SEQ ID NO:126的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3;

[0958] c)SEQ ID NO:127的重链CDR1、SEQ ID NO:128的重链CDR2、SEQ ID NO:125的重链CDR3、SEQ ID NO:139的轻链CDR1、SEQ IDNO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:141的轻链CDR3;或

[0959] d)SEQ ID NO:129的重链CDR1、SEQ ID NO:130的重链CDR2、SEQ ID NO:131的重链CDR3、SEQ ID NO:142的轻链CDR1、SEQ IDNO;140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:138的轻链CDR3。

[0960] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0961] a)SEQ ID NO:123的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3;

[0962] b)SEQ ID NO:126的重链CDR1、SEQ ID NO:124的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3;

[0963] c)SEQ ID NO:127的重链CDR1、SEQ ID NO:128的重链CDR2、SEQ ID NO:147的重链CDR3、SEQ ID NO:156的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:157的轻链CDR3;或

[0964] d)SEQ ID NO:129的重链CDR1、SEQ ID NO:130的重链CDR2、SEQ ID NO:148的重链CDR3、SEQ ID NO:158的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:155的轻链CDR3。

[0965] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含

选自以下的CDR序列:

[0966] a)SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

[0967] b)SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3;

[0968] c)SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:163的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:170的轻链CDR3;或

[0969] d)SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:164的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:169的轻链CDR3。

[0970] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0971] a)SEQ ID NO:175的重链CDR1、SEQ ID NO:176的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

[0972] b)SEQ ID NO:178的重链CDR1、SEQ ID NO:176的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3;

[0973] c)SEQ ID NO:179的重链CDR1、SEQ ID NO:180的重链CDR2、SEQ ID NO:177的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:189的轻链CDR3;或

[0974] d)SEQ ID NO:181的重链CDR1、SEQ ID NO:182的重链CDR2、SEQ ID NO:183的重链CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:188的轻链CDR3。

[0975] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0976] a)SEQ ID NO:103的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

[0977] b)SEQ ID NO:106的重链CDR1、SEQ ID NO:104的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:116的轻链CDR1、SEQ IDNO:47的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3;

[0978] c)SEQ ID NO:107的重链CDR1、SEQ ID NO:108的重链CDR2、SEQ ID NO:194的重链CDR3、SEQ ID NO:49的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:201的轻链CDR3;或

[0979] d)SEQ ID NO:109的重链CDR1、SEQ ID NO:110的重链CDR2、SEQ ID NO:195的重链

CDR3、SEQ ID NO:52的轻链CDR1、SEQ ID NO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:200的轻链CDR3。

[0980] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0981] a)SEQ ID NO:206的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

[0982] b)SEQ ID NO:209的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:153的轻链CDR1、SEQ IDNO:154的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3;

[0983] c)SEQ ID NO:210的重链CDR1、SEQ ID NO:211的重链CDR2、SEQ ID NO:208的重链CDR3、SEQ ID NO:156的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:220的轻链CDR3;或

[0984] d)SEQ ID NO:212的重链CDR1、SEQ ID NO:213的重链CDR2、SEQ ID NO:214的重链CDR3、SEQ ID NO:158的轻链CDR1、SEQ IDNO:50的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:219的轻链CDR3。

[0985] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0986] a)SEQ ID NO:206的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

[0987] b)SEQ ID NO:209的重链CDR1、SEQ ID NO:207的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:136的轻链CDR1、SEQ IDNO:137的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3;

[0988] c)SEQ ID NO:210的重链CDR1、SEQ ID NO:211的重链CDR2、SEQ ID NO:225的重链CDR3、SEQ ID NO:139的轻链CDR1、SEQ IDNO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:232的轻链CDR3;或

[0989] d)SEQ ID NO:212的重链CDR1、SEQ ID NO:213的重链CDR2、SEQ ID NO:226的重链CDR3、SEQ ID NO:142的轻链CDR1、SEQ IDNO:140的轻链CDR2、以及SEQ ID NO:231的轻链CDR3。

[0990] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0991] a)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243的LCDR1、SEQ ID NO:47的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

[0992] b)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:209的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:243的LCDR1、SEQ ID NO:47的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3;

[0993] c)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:210的HCDR1、SEQ ID NO:211的

HCDR2、以及SEQ ID NO:237的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:245的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:246的LCDR3;或

[0994] d)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:212的HCDR1、SEQ ID NO:213的HCDR2、以及SEQ ID NO:238的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:247的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:244的LCDR3。

[0995] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)包含选自以下的CDR序列:

[0996] a)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:206的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153的LCDR1、SEQ ID NO:154的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3;

[0997] b)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:209的HCDR1、SEQ ID NO:207的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:153的LCDR1、SEQ ID NO:154的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3;

[0998] c)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:210的HCDR1、SEQ ID NO:211的HCDR2、以及SEQ ID NO:252的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:156的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:259的LCDR3;或

[0999] d)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:212的HCDR1、SEQ ID NO:213的HCDR2、以及SEQ ID NO:253的HCDR3;以及轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:158的LCDR1、SEQ ID NO:50的LCDR2、以及SEQ ID NO:258的LCDR3。

[1000] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1001] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1002] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1003] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1004] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1005] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1006] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:112的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:119的氨基酸

序列的轻链可变区(VL)。

[1007] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:132的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:143的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1008] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:149的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:159的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1009] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:165的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:171的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1010] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:184的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:190的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1011] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:196的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:202的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1012] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:215的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:221的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1013] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:227的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:233的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1014] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:239的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:248的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1015] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:254的氨基酸序列的重链可变区(VH)、以及含有SEQ ID NO:260的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[1016] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链。

[1017] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的轻链。

[1018] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链。

[1019] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的轻链。

[1020] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的轻链。

[1021] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包

含含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的轻链。

[1022] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:114的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:121的氨基酸序列的轻链。

[1023] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:134的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:145的氨基酸序列的轻链。

[1024] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:151的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:161的氨基酸序列的轻链。

[1025] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:167的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:173的氨基酸序列的轻链。

[1026] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:186的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:192的氨基酸序列的轻链。

[1027] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:198的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:204的氨基酸序列的轻链。

[1028] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:217的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:223的氨基酸序列的轻链。

[1029] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:229的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:235的氨基酸序列的轻链。

[1030] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:241的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:250的氨基酸序列的轻链。

[1031] 在具体实施例中,特异性结合PMEL17的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包含含有SEQ ID NO:256的氨基酸序列的重链、以及含有SEQ ID NO:262的氨基酸序列的轻链。

[1032] 在某些实施例中,特异性结合PMEL17的抗体是表2所述的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)。

[1033] 1.对表位和结合相同表位的抗体的鉴定

[1034] 本发明还提供了特异性结合与表2中所述的抗PMEL17抗体相同的表位、或与表2中所述的抗体交叉竞争的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)。因此可以基于在PMEL17结合测定(例如,经由BIACORE或本领域技术人员已知用于测量结合的测定)中与本发明的其他抗体交叉竞争(例如,以统计显著方式竞争性抑制结合)的能力来鉴定另外的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)。测试抗体抑制本发明的抗体和抗体片段(例如,抗原结合片段)

与PMEL17(例如,人PMEL17)结合的能力表明,测试抗体可以与这种抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)竞争结合PMEL17;根据非限制性理论,这种抗体可以结合PMEL17蛋白上与所述抗体竞争的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)相同或相关(例如,结构上相似或空间上接近或重叠)的表位。在某些实施例中,结合PMEL17上与表2中所述抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)相同的表位结合的抗体是人单克隆抗体或人源化单克隆抗体。可如本文所述那样制备和分离此类人单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

[1035] 2.对Fc区框架的进一步改变

[1036] 本发明的免疫缀合物可以包含经修饰的抗体或其抗原结合片段,所述经修饰的抗体或其抗原结合片段进一步在VH和/或VL内部包含对框架残基的修饰,例如以改善抗体的特性。在一些实施例中,进行这种框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个框架残基"回复突变"为相应的种系序列。更具体地,已经历体细胞突变的抗体可以含有与衍生出抗体的种系序列不同的框架残基。可以通过将抗体框架序列与衍生抗体的种系序列进行比较来鉴定此类残基。为了使框架区序列恢复为其种系构型,可以通过例如定点诱变将体细胞突变"回复突变"为种系序列。此类"回复突变的"抗体也旨在为本发明所涵盖。

[1037] 另一种类型的框架修饰包括使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变以去除T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。此方法也称为"去免疫化",并且在Carr等人的美国专利公开号20030153043中有进一步详细描述。

[1038] 除了在框架或CDR区内进行的修饰之外或在于框架或CDR区内进行的修饰的替代方案中,可以将本发明的抗体工程化以包含Fc区内的修饰,典型地是为了改变抗体的一种或多种功能特性,如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性(ADCC)。此外,本发明的抗体可以经化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以附接至抗体)或经修饰以改变其糖基化,从而再次改变抗体的一种或多种功能特性。以下更详细地描述了这些实施例中的每一个。

[1039] 在一个实施例中,修饰CH1的铰链区,使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。所述方法在Bodmer等人的美国专利号5,677,425中进一步描述。改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目,以便例如促进轻链和重链的组装或增加或降低抗体的稳定性。

[1040] 在一些实施例中,本文披露的抗体或抗体片段包含经修饰或工程化的氨基酸残基,例如一个或多个半胱氨酸残基,以作为用于与药物部分缀合的位点(Junutula JR等人:Nat Biotechnol[自然生物技术]2008,26:925-932)。在一个实施例中,本发明提供了一种经修饰的抗体或抗体片段,所述经修饰的抗体或抗体片段包含在本文所述的位置处用半胱氨酸对一个或多个氨基酸的取代。用于半胱氨酸取代的位点是在抗体或抗体片段的恒定区中并且因此适用于多种抗体或抗体片段,并且选择位点以提供稳定且均质的缀合物。经修饰的抗体或片段可以具有一个、两个或更多个半胱氨酸取代,并且这些取代可以与如本文所述的其他修饰和缀合方法组合使用。用于将半胱氨酸插入在抗体的特定位置处的方法是本领域已知的,参见例如Lyons等人,(1990)Protein Eng.[蛋白质工程],3:703-708、WO 2011/005481、WO2014/124316、WO 2015/138615。在某些实施例中,经修饰的抗体包含在其选自以下位置的恒定区上用半胱氨酸对一个或多个氨基酸的取代:抗体的重链的位置117、

119、121、124、139、152、153、155、157、164、169、171、174、189、191、195、197、205、207、246、258、269、274、286、288、290、292、293、320、322、326、333、334、335、337、344、355、360、375、382、390、392、398、400和422,并且其中位置是根据EU系统编号的。在一些实施例中,经修饰的抗体或抗体片段包含在其选自以下位置的恒定区上用半胱氨酸对一个或多个氨基酸的取代:抗体或抗体片段的轻链的位置107、108、109、114、129、142、143、145、152、154、156、159、161、165、168、169、170、182、183、197、199和203,其中位置是根据EU系统编号的,并且其中轻链是人K轻链。在某些实施例中,经修饰的抗体或其抗体片段包含在其恒定区上用半胱氨酸对两个或更多个氨基酸的取代组合,其中组合包括在抗体重链的位置375、抗体重链的位置152、抗体重链的位置360、或抗体轻链的位置107处的取代,并且其中位置是根据EU系统编号的。在某些实施例中,经修饰的抗体或其抗体片段包含在其恒定区上用半胱氨酸对一个氨基酸的取代,其中取代是抗体重链的位置375、抗体重链的位置152、抗体重链的位置360、抗体轻链的位置107、抗体轻链的位置165或抗体轻链的位置159并且其中位置是根据EU系统编号的,并且其中轻链是K链。在具体实施例中,经修饰的抗体或其抗体片段包含在其恒定区上用半胱氨酸对两个氨基酸的取代组合,其中组合包括在抗体重链的位置375和抗体重链的位置152处的取代,其中位置是根据EU系统编号的。在具体实施例中,经修饰的抗体或其抗体片段包含在抗体重链的位置360处用半胱氨酸对一个氨基酸的取代,其中位置是根据EU系统编号的。在其他具体实施例中,经修饰的抗体或其抗体片段包含在抗体轻链的位置107处用半胱氨酸对一个氨基酸的取代并且其中位置是根据EU系统编号的,并且其中轻链是K链。

[1041] 在另外的实施例中,可用于本发明的免疫缀合物的抗体或抗体片段(例如,抗原结合片段)包括经修饰或工程化的抗体,如以下抗体,所述抗体经修饰以引入一个或多个其他反应性氨基酸(除半胱氨酸外)(包括Pcl、吡咯赖氨酸、肽标签(如S6、A1和ybbR标签)和非天然氨基酸)以替代天然序列的至少一个氨基酸,从而在抗体或抗原结合片段上提供用于与具有互补反应性的药物部分或接头-药物部分缀合的反应位点。例如,可以修饰抗体或抗体片段以掺入Pcl或吡咯赖氨酸(W.O_u等人,(2011)PNAS[美国国家科学院院刊]108(26),10437-10442;WO2014124258)或非天然氨基酸(J.Y.Axup等人,Proc Natl Acad Sci U S A[美国国家科学院院刊],109(2012),第16101-16106页;审查参见C.C.Liu和P.G.Schultz(2010)Annu Rev Biochem[生物化学年鉴]79,413-444;C.H.Kim,等人,(2013)Curr Opin Chem Biol.[化学生物学研究现状]17,412-419)作为与药物缀合的位点。类似地,可以将用于酶学缀合方法的肽标签引入到抗体中(Strop P.等人,Chem Biol.[化学生物学]2013,20(2):161-7;Rabuka D.,Curr Opin Chem Biol.[化学生物学新见]2010年12月;14(6):790-6;Rabuka D,等人,Nat Protoc.[自然实验手册]2012,7(6):1052-67)。一个其他实例是使用4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)用于辅酶A类似物的缀合(WO 2013184514)和(Grünewald等人,(2015)Bioconjugate Chem.[生物缀合化学]26(12),2554-62)。用于将此类经修饰或工程化的抗体与有效负载或接头-有效负载组合缀合的方法是本领域已知的。

[1042] 在另一个实施例中,使抗体的Fc铰链区突变以缩短抗体的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域中,使得抗体具有相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合而言受损的葡萄球菌蛋白质A(SpA)结合。所述方法在Ward等人的美国专利号6,165,745中进一步详细描述。

[1043] 在又其他实施例中,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基置换一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。改变亲和力的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。所述方法在例如Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中得到描述。

[1044] 在另一个实施例中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基置换,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。所述方法在例如Idusogie等人的美国专利号6,194,551中得到描述。

[1045] 在另一个实施例中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。例如,Bodmer等人在PCT公开WO 94/29351中描述了这一方法。同种异型氨基酸残基包括但不限于:IgG1、IgG2、和IgG3亚类的重链的恒定区以及K同种型的轻链的恒定区,如Jefferis等人,MAbs.1:332-338(2009)所述。

[1046] 含有此类突变的抗体融合蛋白复合物介导降低的或没有的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基L234和L235被取代为A234和A235。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基N267被取代为A267。在一些实施例中,IgG1恒定区的氨基酸残基D265和P329被取代为A265和A329。也可以使用其他抗体Fc沉默突变。

[1047] 在另一个实施例中,改变一个或多个氨基酸残基,从而改变抗体固定补体的能力。该方法在例如Bodmer等人的PCT公开WO 94/29351中得到描述。在具体实施例中,本发明的抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸被一个或多个异型氨基酸残基替代。异型氨基酸残基也包括但不限于IgG1、IgG2和IgG3亚类的重链的恒定区以及K同种型的轻链的恒定区,如由Jefferis等人,MAbs.[单克隆抗体]1:332-338(2009)所述的。

[1048] 在还另一个实施例中,修饰抗体的糖基化。例如,可以制备无糖基化的抗体(即,抗体缺乏糖基化)。可以改变糖基化以例如增加抗体对“抗原”的亲和力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一个或多个氨基酸取代,这导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对于抗原的亲和力。这种方法在例如Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中得到描述。

[1049] 在另一个实施例中,修饰抗体以增加其生物半衰期。可以采用各种方法。例如,可以引入以下突变中的一种或多种:如在美国专利号6,277,375中由Ward所述的T252L、T254S、T256F。可替代地,为了增加生物半衰期,可以在CH1或CL区内改变抗体,以含有取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号5,869,046和6,121,022中所述。

[1050] 3.抗PMEL17抗体的产生

[1051] 可以通过本领域已知的任何手段产生抗PMEL17抗体及其抗体片段(例如,抗原结合片段),这些手段包括但不限于重组表达、化学合成和酶促消化抗体四聚体,而全长单克隆抗体可以通过例如杂交瘤或重组产生获得。重组表达可以来自本领域已知的任何适当的宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。

[1052] 本披露进一步提供了编码本文所述的抗体的多核苷酸,例如,编码包含如本文所

述的互补性决定区的重链或轻链可变区或区段的多核苷酸。在一些实施例中,编码重链可变区的多核苷酸与选自由SEQ ID NO:11、43、65、89、113、133、150、166、185、197、216、228、240、和255组成的组的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些实施例中,编码轻链可变区的多核苷酸与选自由SEQ ID NO:22、26、30、54、76、100、120、144、160、172、191、203、222、234、249、和261组成的组的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[1053] 在一些实施例中,编码重链的多核苷酸与SEQ ID NO:13、45、67、91、115、135、152、168、187、199、218、230、242、和257的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些实施例中,编码轻链的多核苷酸与SEQ ID NO:24、28、32、56、78、102、122、146、162、174、193、205、224、236、251、和263的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[1054] 本发明的多核苷酸可以仅编码抗PMEL17抗体的可变区序列。它们还可以编码抗体的可变区和恒定区。一些多核苷酸序列编码包含一种所例举小鼠抗PMEL17抗体的重链和轻链的可变区的多肽。一些其他多核苷酸编码分别与一种小鼠抗体的重链可变区和轻链可变区基本上相同的两个多肽区段。

[1055] 多核苷酸序列可以通过从头固相DNA合成或通过PCR诱变编码抗PMEL17抗体或其结合片段的现有序列(例如,如下文实例中所述的序列)来产生。核酸的直接化学合成可以通过本领域已知的方法完成,如Narang等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:90,1979;Brown等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]68:109,1979;Beaucage等人,Tetra.Lett.[四面体快报],22:1859,1981;和美国专利号4,458,066的固体支持方法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可以如以下文献中所述进行,例如PCRTechnology:Principles and Applications for DNA Amplification[PCR技术:DNA扩增的原理和应用],H.A.Erlich(编辑),Freeman Press[弗里曼出版社],纽约市,纽约州,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods andApplications[PCR方案:方法和应用指南],Innis等人,(编辑),AcademicPress[学术出版社],圣地亚哥,加利福尼亚州,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究]19:967,1991;以及Eckert等人,PCRMethods and Applications[PCR方法和应用]1:17,1991。

[1056] 本发明中还提供了用于产生上文描述的抗PMEL17抗体的表达载体和宿主细胞。多种表达载体可以用来表达编码抗PMEL17抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的运载体和非病毒表达运载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒运载体和系统包括质粒、附加型运载体(典型地具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)以及人类人工染色体(参见例如,Harrington等人,Nat Genet.[自然遗传学]15:345,1997)。例如,可用于哺乳动物(例如人)细胞中表达抗PMEL17多核苷酸和多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B和C、pcDNA™3.1/His、pEBVHis A、B和C(英杰公司(Invitrogen),圣地亚哥,加利福尼亚州)、MPSV载体和本领域已知用于表达其他蛋白质的许多其他载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体,基于SV40、乳头瘤病毒、HBP EB病毒、牛痘病毒载体和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)(SFV)的载体。参见Brent等人,同上;Smith,Annu.Rev.Microbiol.[微生物学年度评论]49:807,1995;和Rosenfeld等人,Cell

[细胞]68:143,1992。

[1057] 表达载体的选择取决于要表达所述载体的预期宿主细胞。典型地,表达载体含有与编码抗PMEL17抗体链或片段的多核苷酸可操作地连接的启动子和其他调节序列(例如,增强子)。在一些实施例中,采用诱导型启动子以防止插入的序列在诱导条件之外的条件下表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可以在非诱导条件下、而不在偏向宿主细胞更好耐受其表达产物的编码序列的群体的情况下扩大经转化的生物体的培养。除了启动子之外,还可能需要或期望其他调节元件以高效表达抗PMEL17抗体链或片段。这些元件典型地包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。此外,通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子,可以提高表达效率(参见例如,Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.[细胞分化中的结果和问题]20:125,1994;和Bittner等人,Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用来增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[1058] 表达载体还可以提供分泌信号序列位置,以与通过插入的抗PMEL17抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更常见的是,所插入的抗PMEL17抗体序列在包含在载体中之前与信号序列连接。用于接收编码抗PMEL17抗体轻链和重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。此类运载体允许将可变区表达为具有恒定区的融合蛋白,从而导致产生完整抗体或其片段。典型地,此类恒定区是人的。

[1059] 用于携带并表达抗PMEL17抗体链的宿主细胞可以是原核或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆并表达本发明多核苷酸的原核宿主。适合使用的其他微生物宿主包括杆菌(如枯草杆菌)和其他肠杆菌科(如沙门氏菌属、沙雷氏菌属)以及各种假单胞菌属的种。在这些原核宿主中,还可以制备表达载体,其通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制的起点)。此外,将存在任何数量的多种熟知的启动子,如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、β-内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体λ的启动子系统。启动子典型地任选使用操纵基因序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等,以用于启动和完成转录和翻译。其他微生物如酵母也可用于表达本发明的抗PMEL17多肽。也可以使用与杆状病毒载体组合的昆虫细胞。

[1060] 在一些优选实施例中,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本发明的抗PMEL17多肽。例如,它们可以是表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,如实例中所述的骨髓瘤杂交瘤克隆)或携带外源表达载体的哺乳动物细胞系(例如,下文例举的SP2/0骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常的必死或正常或异常的永生的动物或人细胞。例如,已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。利用哺乳动物组织细胞培养表达多肽一般在例如Winnacker,FROM GENES TO CLONES[从基因到克隆],VCH出版商,纽约市,纽约州,1987中讨论。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可包含表达控制序列,如复制起点、启动子和增强子(参见例如,Queen等人,Immunol.Rev.[免疫学评论]89:49-68,1986),和必要的处理信息位点,如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或衍生自哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的和/或可调控的或可调节的。可用启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、

SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如人CMV立即早期启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

[1061] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型而变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可以用于其他细胞宿主(通常参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第4版)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、冲击法、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合物(Elliot和O'Hare,Cell[细胞]88:223,1997)、药剂增强的DNA摄取和离体转导。对于重组蛋白的长期高产量产生,通常期望稳定的表达。例如,可以使用含有病毒复制起点或内源性表达元件和选择性标志物基因的本发明表达载体来制备稳定表达抗PMEL17抗体链或结合片段的细胞系。在引入载体之后,可以使细胞在富集的培养基中生长1-2天,之后将它们转换至选择性培养基。选择性标志物的目的是赋予选择抗性,并且它的存在允许在选择性培养基中成功地表达引入的序列的细胞的生长。可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖抗性、稳定转染的细胞。

[1062] 治疗用途

[1063] 本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物可用于多种应用,包括但不限于治疗或预防癌症,如实体癌症或血基质恶性肿瘤。在某些实施例中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物可用于抑制肿瘤生长、诱导分化、减小肿瘤体积、和/或降低肿瘤的致瘤性。使用方法可以是体外、离体或体内方法。

[1064] 在一个方面,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物可用于检测PMEL17在生物样品中的存在。如本文所用,术语"检测"涵盖定量或定性检测。在某些实施例中,生物样品包括细胞或组织。在某些实施例中,此类组织包含相对于其他组织以较高水平表达PMEL17的正常组织和/或癌性组织。

[1065] 在一个方面,本发明提供了一种检测PMEL17在生物样品中的存在的方法。在某些实施例中,所述方法包括使生物样品与抗PMEL17抗体在允许抗体与抗原结合的条件下接触,并且检测是否在抗体与抗原之间形成复合物。

[1066] 在一个方面,本发明提供了一种诊断与PMEL17表达增加相关的障碍的方法。在某些实施例中,所述方法包括使测试细胞与抗PMEL17抗体接触;通过检测抗PMEL17抗体与PMEL17抗原的结合,(定量或定性地)测定测试细胞上的PMEL17表达水平;并且比较测试细胞中的PMEL17表达水平与对照细胞(例如,与测试细胞相同的组织来源的正常细胞或以与这种正常细胞相当的水平表达PMEL17的细胞)上的PMEL17表达水平,其中与对照细胞相比,测试细胞上PMEL17的更高表达水平指示存在与PMEL17表达增加相关的障碍。在某些实施例中,测试细胞从疑似患有与PMEL17表达增加相关的障碍的个体获得。在某些实施例中,所述障碍是细胞增殖性疾病,如癌症或肿瘤。在某些实施例中,所述方法包括测量PMEL17基因在测试细胞中的拷贝数。

[1067] 在某些实施例中,所述诊断或检测方法(如上文所述的那些)包括检测抗PMEL17抗体与细胞表面上表达的或膜制备物中的PMEL17的结合,所述膜制备物从在其表面上表达PMEL17的细胞获得。用于检测抗PMEL17抗体与细胞表面上表达的PMEL17结合的示例性测定是"FACS"测定。

[1068] 某些其他方法可以用来检测抗PMEL17抗体与PMEL17的结合。此类方法包括但不限于本领域熟知的抗原结合测定,如蛋白质印迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、荧光免疫测定、蛋白A免疫测定和免疫组织化学(IHC)。

[1069] 在某些实施例中,抗PMEL17抗体是标记的。标记包括但不限于直接检测到的标记或部分(如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记),以及间接检测到(例如通过酶促反应或分子相互作用)的部分,如酶或配体。

[1070] 在某些实施例中,抗PMEL17抗体固定在不溶性基质上。固定化能够将抗PMEL17抗体与在溶液中保持游离的任何PMEL17蛋白分离。通过使抗PMEL17抗体在测定程序之前不溶,如通过吸附至水不溶性基质或表面(Bennich等人,美国专利号3,720,760)、或通过共价偶联(例如,使用戊二醛交联),或通过在抗PMEL17抗体与PMEL17蛋白之间形成复合物之后使抗PMEL17抗体不溶(例如,通过免疫沉淀),常规地完成这一点。

[1071] 可以使用本发明的免疫缀合物替代抗PMEL17抗体或除抗PMEL17抗体外还使用本发明的免疫缀合物,进行诊断或检测的任一个以上实施例。

[1072] 在一个实施例中,本发明提供了一种治疗或预防疾病的方法,所述方法包括将本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物施用至患者。本发明还提供了本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物治疗或预防患者的疾病的用途。在一些实施例中,本发明提供了本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物,用于治疗或预防患者的疾病。在另外的实施例中,本发明提供了本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物在制造用于治疗或预防患者的疾病的药物中的用途。

[1073] 在某些实施例中,用本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物治疗的疾病是癌症。在某些实施例中,所述癌症的特征在于表达PMEL17的细胞,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)和抗体药物缀合物结合所述细胞。在某些实施例中,所述癌症的特征在于相对于健康患者PMEL17表达增加。在一些实施例中,可以通过PMEL17 RNA的增加测量PMEL17的表达。在其他实施例中,所述癌症的特征在于PMEL17的DNA拷贝数增加。测量或测定PMEL17表达水平的其他方法是本领域技术人员已知的。在某些实施例中,所述癌症的特征在于突变,例如,影响GNAQ和/或GNA11基因中的Q209或R183的活化突变。可以治疗和/或预防的疾病的实例包括但不限于黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、肝细胞癌、及其转移性癌。

[1074] 本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物。在某些实施例中,所述癌症是实体癌,例如黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、肝细胞癌、或其转移性癌。在某些实施例中,所述受试者是人。在某些实施例中,所述癌症是抗性癌症和/或复发性癌症。

[1075] 在某些实施例中,本发明提供了抑制肿瘤生长的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物。在某些实施例中,所述肿瘤是实体癌,例如黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、肝细胞癌、或其转移性癌。在某些实施例中,所述受试者是人。在某些实施例中,所述受试者患有肿瘤或已去除肿瘤。

[1076] 在某些实施例中,所述肿瘤表达抗PMEL17抗体结合的PMEL17。在某些实施例中,所述肿瘤过表达人PMEL17。在某些实施例中,所述肿瘤具有增加的PMEL17基因拷贝数。在某些

实施例中,所述肿瘤的特征在于突变,例如,影响GNAQ和/或GNA11基因中的Q209或R183的活化突变。

[1077] 本发明还提供了用于选择患者以用本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物治疗的方法,所述方法包括施用治疗有效量的所述抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物。在本发明的某些方面,所述方法包括通过测量PMEL17的表达选择患者。在本发明的某些方面,所述方法包括通过鉴定突变,例如影响GNAQ或GNA11基因中的Q209或R183的活化突变来选择患者。在某些实施例中,所述方法包括测量患者中PMEL17表达水平以及检测GNAQ和/或GNA11基因。

[1078] 为了治疗或预防疾病,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物的适当剂量取决于多种因素,如待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和过程、疾病的应答性、既往疗法、患者临床史等。抗体或药剂可以一次性或经一系列治疗施用,持续几日至几个月或直至实现治愈或实现疾病状态的减轻(例如,肿瘤尺寸减小)。最佳给药方案可以从测量患者体内的药物累积量计算出并且将根据单独抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物的相对效力变化。治疗医师可以基于药物在体液或组织中的所测停留时间和浓度,估计重复给药率。

[1079] 组合疗法

[1080] 在某些情况下,将本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物与其他治疗性处理组合,例如手术和放射疗法、治疗剂,所述治疗剂如其他抗癌剂、抗过敏剂、抗恶心剂(或抗呕剂)、镇痛药、细胞保护剂及其组合。

[1081] 在一个实施例中,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物在药物组合配制品或作为组合疗法的给药方案中与具有抗癌特性的第二化合物组合。药物组合配制品或给药方案的第二化合物可以对所述组合的抗体或免疫缀合物具有互补活性,使得它们不彼此不利地影响。例如,本发明的抗体、抗体片段(例如,抗原结合片段)或抗体药物缀合物可以与但不限于化学治疗剂、免疫调节剂、酪氨酸激酶抑制剂、GNAQ/GNA11下游信号传导途径抑制剂、IAP抑制剂、Bc12抑制剂、Mc11抑制剂和其他GNAQ/GNA11抑制剂组合施用。

[1082] 如本文所用,术语“药物组合”是指在一个剂量单位形式中的固定组合、或用于组合施用的非固定组合或成套药盒,其中两种或更多种治疗剂可以在同一时间独立地施用或在时间间隔内分别施用,特别地其中这些时间间隔允许组合配偶体显示合作性例如协同效应。

[1083] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗或预防本披露中描述的治疗性病症或障碍。这种施用涵盖以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,如以具有固定比例的活性成分的单个胶囊施用。可替代地,这种施用涵盖在多个容器中或在每种活性成分的独立容器(例如,胶囊、粉末和液体)中共同施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所期望的剂量。此外,这种施用也涵盖在大致相同的时间或在不同的时间以依序方式使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下,治疗方案将在治疗或预防本文所述的病症或障碍方面提供药物组合的有益作用。

[1084] 组合疗法可以提供“协同”并且证明是“协同的”,即,当活性成分一起使用时所实现的效应大于由分别使用这些化合物所产生的效应的总和。当将活性成分为下述情形时可

以获得协同效应:(1)共同配制并以组合的单位剂量配制品的形式同时施用或递送;(2)以单独配制品的形式交替或平行递送;或(3)通过一些其他方案进行。当以交替疗法递送时,可以在依序(例如通过在单独注射器中不同的注射)施用或递送化合物时获得协同效应。通常,在交替疗法期间,将有效剂量的每种活性成分依序地即顺次地施用,而在组合疗法中,将有效剂量的两种或更多种活性成分一起施用。

[1085] 考虑用于组合疗法中的一般化学治疗剂包括阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(Casodex®)、硫酸博莱霉素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(放线菌素D、Cosmegan)、盐酸柔红霉素(Cerubidine®)、柠檬酸柔红霉素脂质体注射液(DaunoXome®)、地塞米松、多西他赛(Taxotere®)、盐酸阿霉素(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、替扎他滨(tezacitibine)、吉西他滨(双氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、亚叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(Novantrone®)、mylotarg、紫杉醇(Taxol®)、菲尼克斯(phoenix)(钇90/MX-DTPA)、喷司他丁(pentostatin)、聚苯丙生(polifeprosan)20与卡莫司汀的植入物(Gliadel®)、枸橼酸他莫西芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-硫代鸟嘌呤、噻替派、替拉扎明(Tirazone®)、注射用盐酸托泊替康(Hycamptin®)、长春花碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)和长春瑞滨(Navelbine®)、以及培美曲塞(pemetrexed)。

[1086] 在一个方面,本发明提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种MDM2抑制剂、PKC抑制剂、PRC2抑制剂、MAPK抑制剂、GPCR抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂(包括但不限于BTK抑制剂、EGFR抑制剂、Her2抑制剂、Her3抑制剂、IGFR抑制剂和Met抑制剂)组合的本发明抗体药物缀合物来治疗或预防癌症的方法。

[1087] 例如,MDM2抑制剂包括但不限于RG7112(RO5045337);RG7388(RO5503781,伊达努林(Idasanutlin));MI-77301(SAR405838);MK-8242(SCH-900242);AMG232;CGM097;DS3032b;HDM201;和ALRN-6924。

[1088] 例如,PKC激酶抑制剂包括但不限于Balanol;利鲁唑(Riluzole);星形孢菌素;恩扎滔林(Enzastaurin);δV1-1(KAI-9803或迪卡舍替);εV1-2(KAI-1678);阿普卡森(Aprinocarsen);米哚妥林(PKC412);UCN-01(7-羟基-星形孢菌素);粗糠柴苦素(Rottlerin)(5,7,二羟基-2,2-二甲基-6-(2,4,6-三羟基-3-甲基-5-乙酰苄基)-8-肉桂酰-1,2-色烯);和薛苔抑制素1。

[1089] 例如,PRC2抑制剂包括但不限于EI1;EPZ011989;EPZ005687;四甲基哌啶基苯甲酰胺;UNC1999;和GSK126。

[1090] 例如,MAPK抑制剂包括但不限于维拉非尼(Zelboraf);达拉非尼(Tafinlar);恩拉非尼(Braftovi);曲美替尼(Mekinist);卡比替尼(Cotellic);贝美替尼(Mektovi);和乌利替尼。

[1091] 例如,酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于依鲁替尼(Ibrutinib)(PCI-32765);盐酸厄洛替尼(Erlotinib)(Tarceva®);利尼法尼(Linifanib)(N-[4-(3-氨基-1H-吲唑-4-基)苯基]-N′-(2-氟-5-甲基苯基)脲,也称为ABT 869,可购自基因泰克公司(Genentech));苹果酸舒尼替尼(Sutent®);柏舒替尼(Bosutinib)(4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基)氨基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基]喹啉-3-甲腈,也称为SKI-606,并且描述于美国专利号6,780,996中);达沙替尼(Sprycel®);帕唑帕尼(Votrient®);索拉非尼(Nexavar®);凡德他尼(ZD6474);和伊马替尼或甲磺酸伊马替尼(Gilvec®和Gleevec®)。

[1092] 表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂包括但不限于盐酸埃罗替尼(erlotinib)(Tarceva®)、吉非替尼(Iressa®);N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[(3″S″)-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺,Tovok®);凡德他尼(Vandetanib)(Caprelsa®);拉帕替尼(Tykerb®);(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514);二盐酸卡奈替尼(CI-1033);6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788,CAS 497839-62-0);木利替尼(Mubritinib)(TAK165);培立替尼(EKB569);阿法替尼(BIBW2992);来那替尼(Neratinib)(HKI-272);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吲唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸,(3S)-3-吗啉基甲酯(BMS599626);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aα,5β,6aα)-八氢-2-甲基环戊二烯并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS781613-23-8);和4-[4-[[(1R)-1-苯乙基]氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166,CAS187724-61-4)。

[1093] EGFR抗体包括但不限于西妥昔单抗(Erbitux®);帕尼单抗(Vectibix®);马妥珠单抗(EMD-72000);尼妥珠单抗(hR3);扎妥木单抗(Zalutumumab);TheraCIM h-R3;MDX0447(CAS339151-96-1);和ch806(mAb-806,CAS 946414-09-1)。

[1094] 人表皮生长因子受体2(He_r2受体)(也称为Ne_u、ErbB-2、CD340或p185)抑制剂包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin®);帕妥珠单抗(Omnitarg®);恩美曲妥珠单抗

(trastuzumab emtansine)(Kadcyla®);来那替尼(HKI-272,(2E)N-[4-[[3-氯-4-[(吡啶-2-基)甲氧基]苯基]氨基]-3-氰基-7-乙氧喹啉-6-基]-4-(二甲基氨基)丁-2-烯酰胺,并且描述于PCT公开号WO 05/028443);拉帕替尼或二甲苯磺酸拉帕替尼(Tykerb®);(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514);(2E)N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[(3S)-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺(BIBW-2992,CAS 850140-72-6);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吲唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸、(3S)-3-吗啉基甲酯(BMS 599626,CAS 714971-09-2);二盐酸卡奈替尼(PD183805或CI-1033);和N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aα,5β,6aα)-八氢-2-甲基环戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647,CAS781613-23-8)。

[1095] Her3抑制剂包括但不限于LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111和MEHD-7945A。

[1096] MET抑制剂包括但不限于卡博替尼(Cabozantinib)(XL184,CAS849217-68-1);氟列替布(Foretinib)(GSK1363089,以前称为XL880,CAS 849217-64-7);替万替尼(Tivantinib)(ARQ197,CAS1000873-98-2);1-(2-羟基-2-甲基丙基)N-(5-(7-甲氧基喹啉-4-基氧基)吡啶-2-基)-5-甲基-3-氧代-2-苯基-2,3-二氢-1H-吡唑-4-甲酰胺(AMG 458);克唑替尼(Xalkori®,PF-02341066);(3Z)-5-(2,3-二氢-1H-吲哚-1-基磺酰基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-1,3-二氢-2H-吲哚-2-酮(SU11271);(3Z)N-(3-氯苯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亚甲基)-N-甲基-2-氧代吲哚啉-5-磺酰胺(SU11274);(3Z)N-(3-氯苯基)-3-{[3,5-二甲基-4-(3-吗啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基]亚甲基}-N-甲基-2-氧代吲哚啉-5-磺酰胺(SU11606);6-[二氟[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]哒嗪-3-基]甲基]-喹啉(JNJ38877605,CAS 943540-75-8);2-[4-[1-(喹啉-6-基甲基)-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡嗪-6-基]-1H-吡唑-1-基]乙醇(PF04217903,CAS 956905-27-4);N-((2R)-1,4-二噁烷-2-基甲基)-N-甲基-N′-[3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-氧代-5H-苯并[4,5]环庚并[1,2-b]吡啶-7-基]磺酰胺(MK2461,CAS 917879-39-1);6-[[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]哒嗪-3-基]硫代]-喹啉(SGX523,CAS1022150-57-7);和(3Z)-5-[[(2,6-二氯苯基)甲基]磺酰基]-3-[[3,5-二甲基-4-[[(2R)-2-(1-吡咯烷基甲基)-1-吡咯烷基]羰基]-1H-吡咯-2-基]亚甲基]-1,3-二氢-2H-吲哚-2-酮(PHA665752,CAS 477575-56-7)。

[1097] IGF1R抑制剂包括但不限于BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MEDI-573和BI836845。关于综述,参见例如,Yee,JNCI[国家癌症研究所杂志],104;975(2012)。

[1098] 在另一方面,本发明提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种GNAQ/GNA11下游信号传导途径抑制剂组合的本发明抗体药物缀合物来治疗或预防癌症的方法,所述一种或多种GNAQ/GNA11下游信号传导途径抑制剂包括但不限于β-抑制蛋白抑制剂、GRK抑制剂、MAPK抑制剂、PI3K抑制剂、JAK抑制剂等。

[1099] 例如,磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂包括但不限于艾拉利司(Idelalisib)(Zydelig,GS-1101,Cal-101)、4-[2-(1H-吲哚-4-基)-6-[[4-(甲磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]

噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也称为GDC 0941并且描述于PCT公开号WO 09/036082和WO 09/055730);2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-氧代-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氢咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(也称为BEZ 235或NVP-BEZ 235,并且描述于PCT公开号WO06/122806);4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(也称为BKM120或NVP-BKM120,并且描述于PCT公开号WO 2007/084786);托扎舍替(Tozasertib)(VX680或MK-0457,CAS 639089-54-6);(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK1059615,CAS 958852-01-2);(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙酰氧基)-1-[(二-2-丙烯基氨基)亚甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氢-11-羟基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-环戊二烯并[5,6]萘并[1,2-c]吡喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866,CAS 502632-66-8);和8-苯基-2-(吗啉-4-基)-色烯-4-酮(LY294002,CAS154447-36-6)。

[1100] 在又另一个方面,本发明提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种促凋亡剂组合的本发明抗体药物缀合物来治疗或预防癌症的方法,所述一种或多种促凋亡剂包括但不限于1AP抑制剂、Bcl2抑制剂、MC11抑制剂、Trail剂、Chk抑制剂。

[1101] 例如,IAP抑制剂包括但不限于LCL161、GDC-0917、AEG-35156、AT406、和TL32711。IAP抑制剂的其他实例包括但不限于WO 04/005284、WO 04/007529、WO 05/097791、WO 05/069894、WO 05/069888、WO 05/094818、US2006/0014700、US2006/0025347、WO 06/069063、WO 06/010118、WO 06/017295、和WO 08/134679(所有这些文献都通过引用并入本文)中披露的那些。

[1102] BCL-2抑制剂包括但不限于维奈妥拉(Venetoclax)(也称为GDC-0199、ABT-199、RG7601);4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-环己烯-1-基]甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[(1R)-3-(4-吗啉基)-1-[(苯基硫)甲基]丙基]氨基]-3-[(三氟甲基)磺酰基]苯基]磺酰基]苯甲酰胺(也称为ABT-263并且描述于PCT公开号WO 09/155386);四制癌素A;抗霉素;棉酚((-)BL-193);奥巴妥拉(Obatoclax);乙基-2-氨基-6-环戊基-4-(1-氰基-2-乙氧基-2-氧乙基)-4H色酮-3-甲酸酯(HA14-1);奥利默森(Oblimersen)(G3139,Genasense®);Bak BH3肽;(-)-棉酚乙酸(AT-101);4-[4-[(4′-氯[1,1′-二苯基]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[(1R)-3-(二甲基氨基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]氨基]-3-硝基苯基]磺酰基]-苯甲酰胺(ABT-737,CAS 852808-04-9);和那维托克莱克斯(Navitoclax)(ABT-263.CAS 923564-51-6)。

[1103] 促凋亡受体激动剂(PARA)包括DR4(TRAILR1)和DR5(TRAILR2),包括但不限于度拉纳明(Dulanermin)(AMG-951,RhApo2L/TRAIL);玛帕妥木单抗(Mapatumumab)(HRS-ETR1,CAS658052-09-6);来沙木单抗(Lexatumumab)(HGS-ETR2,CAS 845816-02-6);Apomab(Apomab®);西他土珠(Conatumumab)(AMG655,CAS 896731-82-1);和替加珠单抗(Tigatuzumab)(CS1008,CAS946415-34-5,可购自第一三共株式会社(Daiichi Sankyo))。

[1104] 检查点激酶(CHK)抑制剂包括但不限于7-羟基星形孢菌素(UCN-01);6-溴-3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-(3R)-3-哌啶基-吡唑并[1,5-a]嘧啶-7-胺(SCH900776,CAS 891494-63-6);5-(3-氟苯基)-3-脲基噻吩-2-羧酸N-[(S)-哌啶-3-基]酰胺(AZD7762,CAS 860352-01-8);4-[((3S)-1-氮杂二环[2.2.2]辛-3-基)氨基]-3-(1H-苯并咪唑-2-基)-6-氯喹啉-2(1H)-酮(CHIR 124,CAS 405168-58-3);7-氨基更生霉素(7-AAD)、

Isogranulatimide、debromohymenialdisine;N-[5-溴-4-甲基-2-[(2S)-2-吗啉基甲氧基]-苯基]-N′-(5-甲基-2-吡嗪基)脲(LY2603618,CAS911222-45-2);萝卜硫素(CAS 4478-93-7、4-甲基亚磺酰基丁基异硫氰酸盐);9,10,11,12-四氢-9,12-环氧-1H-二吲哚[1,2,3-fg:3′,2′,1′-kl]吡咯并[3,4-i][1,6]苯并二氮芳辛-1,3(2H)-二酮(SB-218078,CAS135897-06-2);和TAT-S216A(YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL(SEQ ID NO:282))、和CBP501((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqrr)。

[1105] 在另一个实施例中,本发明提供了一种通过向有需要的受试者施用与一种或多种免疫调节剂(例如共刺激分子的激活剂或免疫检查点分子的抑制剂中一者或多者)组合的本发明抗体药物缀合物来治疗或预防癌症的方法。

[1106] 在某些实施例中,所述免疫调节剂是共刺激分子的激活剂。在一个实施例中,所述共刺激分子的激动剂选自OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3、STING或CD83配体的激动剂(例如,激动性抗体或其抗原结合片段、或可溶性融合物)。

[1107] 在某些实施例中,所述免疫调节剂是免疫检查点分子的抑制剂。在一个实施例中,所述免疫调节剂是PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFRβ的抑制剂。在一个实施例中,所述免疫检查点分子的抑制剂抑制PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3或CTLA4、或其任何组合。术语“抑制”或“抑制剂”包括给定分子(例如免疫检查点抑制剂)的某些参数(例如活性)的降低。例如,所述术语包括至少5%、10%、20%、30%、40%、50%或更多的活性(例如PD-1或PD-L1活性)的抑制。因此,抑制不必是100%。

[1108] 抑制性分子的抑制可以在DNA、RNA或蛋白水平进行。在一些实施例中,抑制性核酸(例如,dsRNA、siRNA或shRNA)可以用于对抑制性分子的表达进行抑制。在其他实施例中,所述抑制信号的抑制剂是多肽,例如,可溶性配体(例如,PD-1-Ig或CTLA-4Ig)或与抑制性分子结合的抗体或其抗原结合片段;例如,与PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFRβ、或其组合结合的抗体或其片段(在本文中也称为“抗体分子”)。

[1109] 在一个实施例中,所述抗体分子是完全抗体或其片段(例如Fab、$F(ab')_2$、Fv、或单链Fv片段(scFv))。在又其他实施例中,所述抗体分子具有重链恒定区(Fc),所述重链恒定区(Fc)选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、和IgE的重链恒定区;具体地,选自例如IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4的重链恒定区,更具体地,选自IgG1或IgG4(例如人IgG1或IgG4)的重链恒定区。在一个实施例中,所述重链恒定区是人IgG1或人IgG4。在一个实施例中,改变(例如突变)恒定区以修饰抗体分子的特性(例如,以增加或减少以下中的一种或多种:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基数、效应细胞功能或补体功能)。

[1110] 在某些实施例中,所述抗体分子处于双特异性或多特异性抗体分子的形式。在一个实施例中,所述双特异性抗体分子具有针对PD-1或PD-L1的第一结合特异性,和第二结合特异性,例如针对TIM-3、LAG-3、或PD-L2的第二结合特异性。在一个实施例中,所述双特异性抗体分子与PD-1或PD-L1和TIM-3结合。在另一个实施例中,所述双特异性抗体分子与PD-1或PD-L1和LAG-3结合。在另一个实施例中,所述双特异性抗体分子与PD-1和PD-L1结合。在又另一个实施例中,所述双特异性抗体分子与PD-1和PD-L2结合。在另一个实施例中,所述

双特异性抗体分子与TIM-3和LAG-3结合。可以在多特异性抗体分子(例如,三特异性抗体)中产生前述分子的任何组合,所述三特异性抗体包含针对PD-1或PD-L1的第一结合特异性和针对以下两者或更多者的第二结合特异性和第三结合特异性:TIM-3、LAG-3或PD-L2。

[1111] 在某些实施例中,所述免疫调节剂是PD-1(例如,人PD-1)的抑制剂。在另一个实施例中,所述免疫调节剂是PD-L1(例如,人PD-L1)的抑制剂。在一个实施例中,PD-1或PD-L1的抑制剂是PD-1或PD-L1的抗体分子。PD-1或PD-L1抑制剂可以单独施用、或与其他免疫调节剂组合施用,例如与LAG-3、TIM-3或CTLA4的抑制剂组合施用。在示例性实施例中,将PD-1或PD-L1的抑制剂(例如,抗PD-1或PD-L1抗体分子)与LAG-3抑制剂(例如,抗LAG-3抗体分子)组合施用。在另一个实施例中,将PD-1或PD-L1的抑制剂(例如,抗PD-1或PD-L1抗体分子)与TIM-3抑制剂(例如,抗TIM-3抗体分子)组合施用。在又其他实施例中,将PD-1或PD-L1的抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子)与LAG-3抑制剂(例如,抗LAG-3抗体分子)和TIM-3抑制剂(例如,抗TIM-3抗体分子)组合施用。免疫调节剂与PD-1抑制剂(例如,PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和/或TGFR中一者或多者)的其他组合还处于本发明范围内。本领域已知的或本文披露的任何抗体分子均可用于上述检查点分子抑制剂的组合中。

[1112] 在一个实施例中,所述PD-1抑制剂是选自纳武单抗(Nivolumab)、派姆单抗(Pembrolizumab)或匹地利珠单抗(Pidilizumab)的抗PD-1抗体。在一些实施例中,所述抗PD-1抗体是纳武单抗。纳武单抗的替代性名称包括MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558。在一些实施例中,所述抗PD-1抗体是纳武单抗(CAS登记号:946414-94-4)。纳武单抗是特异性阻断PD1的完全人IgG4单克隆抗体。纳武单抗(克隆5C4)和特异性结合PD1的其他人单克隆抗体披露于美国专利号8,008,449和PCT公开号WO 2006/121168中。

[1113] 在其他实施例中,所述抗PD-1抗体是帕姆单抗。帕姆单抗(pembrolizumab)(商品名KEYTRUDA,以前称为Lambrolizumab,也称为Merck 3745、MK-3475或SCH-900475)是与PD1结合的人源化IgG4单克隆抗体。派姆单抗例如披露于Hamid,O.等人(2013)NewEngland Journal of Medicine[新英格兰医学杂志]369(2):134-44、PCT公开号WO 2009/114335和美国专利号8,354,509中。

[1114] 在一些实施例中,所述抗PD-1抗体是匹地利珠单抗。匹地利珠单抗(CT-011;治疗科技公司(Cure Tech))是与PD1结合的人源化IgG1k单克隆抗体。匹地利珠单抗和其他人源化抗PD-1单克隆抗体披露于PCT公开号WO 2009/101611中。其他抗PD1抗体披露于美国专利号8,609,089、美国公开号2010028330、和/或美国公开号20120114649中。其他抗PD1抗体包括AMP 514(安普利公司(Amplimmune))。

[1115] 在一些实施例中,所述PD-1抑制剂是PDR001,也称为斯巴达利珠单抗(spartalizumab),或WO 2015/112900中披露的任何其他抗PD-1抗体。

[1116] 在一些实施例中,所述PD-1抑制剂是免疫粘附素(例如包含融合到恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区)的PD-L1或PD-L2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施例中,所述PD-1抑制剂是AMP-224。

[1117] 在一些实施例中,所述PD-L1抑制剂是抗PD-L1抗体。在一些实施例中,所述抗PD-L1抑制剂选自例如WO 2013/0179174中披露的,并且具有本文披露的序列(或与其基本上相同或相似的序列,例如与指定序列至少85%、90%、95%相同或更高程度相同的序列)的

YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736或MDX-1105MSB-0010718C(也称为A09-246-2)。

[1118] 在一个实施例中,所述PD-L1抑制剂是MDX-1105。MDX-1105,也称为BMS-936559,是PCT公开号WO 2007/005874中描述的抗PD-L1抗体。

[1119] 在一个实施例中,所述PD-L1抑制剂是YW243.55.S70。YW243.55.S70抗体是PCT公开号WO 2010/077634中描述的抗PD-L1(重链可变区序列和轻链可变区序列分别示于SEQ ID No.20和21中)。

[1120] 在一个实施例中,所述PD-L1抑制剂是MDPL3280A(基因泰克公司/罗氏公司(Genentech/Roche))。MDPL3280A是与PD-L1结合的人Fc优化的IgG1单克隆抗体。MDPL3280A和针对PD-L1的其他人单克隆抗体披露于美国专利号:7,943,743和美国公开号:20120039906。

[1121] 在其他实施例中,所述PD-L2抑制剂是AMP-224。AMP-224是PD-L2 Fc融合可溶性受体,其阻断PD1和B7-H1之间的相互作用(B7-DCIg;安普利公司;例如,披露于PCT公开号WO 2010/027827和WO 2011/066342中)。

[1122] 在一个实施例中,所述LAG-3抑制剂是抗LAG-3抗体分子。在一个实施例中,所述LAG-3抑制剂是BMS-986016。在一个实施例中,所述LAG-3抑制剂是披露于WO 2015/138920中的LAG525或任何抗LAG3抗体。

[1123] 在一个实施例中,所述TIM-3抑制剂是抗TIM3抗体分子。在一个实施例中,所述TIM-3抑制剂是披露于WO 2015/117002中的MBG453或任何抗TIM3抗体。

[1124] 药物组合物

[1125] 为了制备包含免疫缀合物的药物组合物或无菌组合物,将本发明的免疫缀合物与药学上可接受的载剂或赋形剂混合。所述组合物可以另外含有一种或多种适合于治疗或预防表达PMEL17的癌症(包括但不限于皮下黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、肝细胞癌及其转移性癌)的其他治疗剂。

[1126] 治疗剂和诊断剂的配制品可以通过与生理学上可接受的载剂、赋形剂、或稳定剂以例如冻干粉末、浆液、水性溶液、洗剂或悬浮液的形式混合来制备(参见例如,Hardman等人,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics[Goodman和Gilman的治疗的药理学基础],McGraw-Hill[麦格劳-希尔集团],纽约市,纽约州,2001;Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药物科学与实践],Lippincott,Williams,and Wilkins[利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司],纽约市,纽约州,2000;Avis等人(编辑),PharmaceuticalDosage Forms:Parenteral Medications[药物剂型:肠胃外药物],MarcelDekker[马塞尔德克尔公司],纽约,1993;Lieberman等人(编辑),Pharmaceutical Dosage Forms:tablets[药物剂型:片剂],Marcel Dekker[马塞尔德克尔公司],纽约,1990;Lieberman等人(编辑)PharmaceuticalDosage Forms:Disperse Systems[药物剂型:分散系统],Marcel Dekker[马塞尔德克尔公司],纽约,1990;Weiner和Kotkoskie,Excipient Toxicity and Safety[赋形剂毒性和安全性],Marcel Dekker,Inc.[马塞尔德克尔公司],纽约市,纽约州,2000)。

[1127] 为治疗剂选择施用方案取决于若干种因素,包括实体的血清或组织周转速率、症状水平、实体的免疫原性和生物基质中的靶细胞可及性。在某些实施例中,施用方案使递送至患者的治疗剂的量最大化,与可接受水平的副作用一致。因此,递送的生物制品的量部分

地取决于具体实体和正在治疗的病症的严重程度。选择适当剂量的抗体、细胞因子和小分子的指南是可获得的(参见例如,Wawrzynczak,Antibody Therapy[抗体疗法],Bios Scientific Pub.Ltd[Bios科学出版社有限公司],Oxfordshire[牛津郡],英国,1996;Kresina(编辑),Monoclonal Antibodies,Cytokinesand Arthritis[单克隆抗体、细胞因子和关节炎],Marcel Dekker[马塞尔德克尔公司],纽约市,纽约州,1991;Bach(编辑),Monoclonal Antibodiesand Peptide Therapy in Autoimmune Diseases[自免疫疾病中的单克隆抗体和肽疗法],Marcel Dekker[马塞尔德克尔公司],纽约市,纽约州,1993;Baert等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]348:601-608,2003;Milgrom等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]341:1966-1973,1999;Slamon等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]344:783-792,2001;Beniaminovitz等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]342:613-619,2000;Ghosh等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]348:24-32,2003;Lipsky等人,New Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]343:1594-1602,2000)。

[1128] 由临床医生,例如,使用本领域已知或疑似影响治疗或预防或预计影响治疗或预防的参数或因素确定适当的剂量。通常,剂量始于或多或少小于最佳剂量的量并此后将它以小增量增加,直至相对于任何不利副作用,实现所期望的或最佳的效果。重要的诊断量值包括症状(例如炎症)的那些量值或产生的炎性细胞因子的水平。

[1129] 可以改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平,以便获得一定量的活性成分,所述活性成分的量有效地实现对于特定的患者、组合物和施用方式的所期望的治疗应答,而对患者没有毒性。所选的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、正在使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、正在治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康和既往病史、以及医学领域中已知的类似因素。

[1130] 包含本发明的抗体或其片段的组合物可通过连续输注提供,或通过例如一天、一周、或每周1-7次、每一周一次、每三周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、或每八周一次的间隔剂量提供。可通过静脉内、皮下、局部、口服、鼻、直肠、肌内、脑内或通过吸入来提供剂量。特定剂量方案是一个涉及避免明显不希望的副作用的最大剂量或给药频率的方案。

[1131] 对于本发明的免疫缀合物,施用至患者的剂量可以是0.0001mg/kg至100mg/kg患者体重。所述剂量可以在0.0001mg/kg患者体重与30mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重与20mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重与10mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重与5mg/kg患者体重之间、在0.0001患者体重与2mg/kg患者体重之间、在0.0001患者体重与1mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重与0.75mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重与0.5mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重至0.25mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重至0.15mg/kg患者体重之间、在0.0001mg/kg患者体重至0.10mg/kg患者体重之间、在0.001mg/kg患者体重至0.5mg/kg患者体重之间、在0.01mg/kg患者体重至0.25mg/kg或0.01mg/kg患者体重至0.10mg/kg患者体重之间。可以使用以千克(kg)计的患者体重乘以按mg/kg计的待施用的剂量,计算本发明的抗体或其片段的剂量。

[1132] 可以重复本发明的免疫缀合物的剂量并且各次施用可以相隔少于1天、至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天、3个月、4个月、5个月、或至少6个月。在一些实施例中,本发明的免疫缀合物可以每周给予两次、每周给予一次、每两周给予一次、每三周给予一次、每四周给予一次或较小频率地给予。在具体实施例中,本发明的免疫缀合物的剂量每2周重复一次。

[1133] 特定患者的有效量可以根据如以下的因素改变:所治疗的病症、患者的总体健康状况、施用的方法、途径和剂量和副作用的严重程度(参见例如,Maynard等人,A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice[用于良好临床实践的SOP指南],Interpharm Press[国际药物出版社],BocaRaton,Fla.[佛罗里达州波卡拉顿],1996;Dent,Good Laboratory and GoodClinical Practice[良好实验和良好临床实践],Urch Publ.[厄奇出版社],伦敦,英国,2001)。

[1134] 施用途径可以是通过例如局部或皮肤应用、通过皮下、静脉内、腹膜内、脑内、肌内、眼内、动脉内、脑脊内、病灶内施用进行的注射或输注、或通过持续释放系统或植入物(参见例如,Sidman等人,Biopolymers[生物聚合物]22:547-556,1983;Langer等人,J.Biomed.Mater.Res.[生物医学材料研究杂志]15:167-277,1981;Langer,Chem.Tech.[化学技术]12:98-105,1982;Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]82:3688-3692,1985;Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]77:4030-4034,1980;美国专利号6,350,466和6,316,024)。必要时,组合物也可以包含增溶剂或用于减轻注射部位疼痛的局部麻醉药如利多卡因,或二者。此外,也可以采用肺部施用,例如通过使用吸入器或雾化器以及含有雾化剂的配制品。参见例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;以及PCT公开号WO 92/19244、WO97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346和WO 99/66903,将这些专利中的每一个通过引用以其全文并入本文。

[1135] 本发明的组合物还可以经由一种或多种施用途径、使用在本领域中已知的各种方法中的一种或多种来施用。如本领域技术人员将理解的,施用途经和/或模式将根据所希望的结果而变化。所选择的用于本发明的免疫缀合物的施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。肠胃外施用可以代表除了肠道和局部施用以外的施用方式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬脑膜外以及胸骨内注射和输注。可替代地,本发明的组合物可以经由非肠胃外途径,如局部、表皮或黏膜施用途径施用,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。在一个实施例中,通过输注施用本发明的免疫缀合物。在另一个实施例中,皮下施用本发明的免疫缀合物。

[1136] 如果本发明的免疫缀合物在控制释放或持续释放系统中施用,则可以使用泵来实现控制释放或持续释放(参见Langer,同上;Sefton,CRC Crit.Ref Biomed.Eng.[CRC关键引用生物医学工程]14:20,1987;Buchwald等人,Surgery[外科学]88:507,1980;Saudek等人,N.Engl.J.Med.[新英格兰医学杂志]321:574,1989)。可以使用聚合物材料来实现本发明的疗法的控制释放或持续释放(参见例如,Medical Applications ofControlled Release[控制释放的医学应用],Langer和Wise(编辑),CRCPres.[CRC出版社],Boca Raton

[波卡拉顿],Fla.[佛罗里达州],1974;Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance[控制药物生物利用率、药物产品设计和性能],Smolen和Ball(编辑),Wiley[威利公],纽约,1984;Ranger和Peppas,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.[高分子科学杂志,高分子化学评论]23:61,1983;还参见Levy等人,Science[科学]228:190,1985;During等人,Ann.Neurol.[神经学记录]25:351,1989;Howard等人,J.Neurosurg.[神经外科杂志]71:105,1989;美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号WO 99/15154;以及PCT公开号WO 99/20253。用于缓释配制品中的聚合物的实例包括但不限于聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、以及聚原酸酯。在一个实施例中,用于缓释配制品的聚合物是惰性的,不含可浸出的杂质、在储存时稳定的、无菌的和可生物降解的。可以将控制释放系统或持续释放系统放置在预防性或治疗性靶附近,因此仅要求全身性剂量的一部分(参见例如,Goodson,于:Medical Applications of Controlled Release[控制释放的医学应用],同上,第2卷,第115-138页,1984)。

[1137] 在Langer,Science[科学]249:1527-1533,1990的综述中讨论了其他控制释放系统。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来产生包含本发明的一种或多种免疫缀合物的持续释放配制品。参见例如,美国专利号4,526,938;PCT公开WO 91/05548;PCT公开WO 96/20698;Ning等人,Radiotherapy&Oncology[放射疗法与肿瘤学]39:179-189,1996;Song等人,PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology[PDA药物科学与技术杂志]50:372-397,1995;Cleek等人,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.[国际研讨会论文集控释生物活性物质]24:853-854,1997;和Lam等人,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.[国际研讨会论文集控释生物活性物质]24:759-760,1997,这些文献中的每一篇均通过引用以其全文并入。

[1138] 如果局部施用本发明的免疫缀合物,则可以将它们以油膏剂、乳膏剂、透皮贴剂、洗剂、凝胶剂、喷雾剂、气溶胶、溶液剂、乳剂的形式或本领域技术人员熟知的其他形式配制。参见,例如,Remington'sPharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical DosageForms[雷明顿制药科学和药物剂型简介],第19版,Mack Pub.Co.(马克出版公司),伊斯顿,宾夕法尼亚州(1995)。对于不可喷雾的局部剂型,通常使用粘性至半固体或固体形式,其包含载剂或一种或多种与局部施用相容并且具有动态粘度的赋形剂,在一些情况下,其具有大于水的动态粘度。合适的配制品包括但不限于溶液、悬浮液、乳油剂、乳膏剂、软膏剂、粉剂、搽剂、油膏剂等,如果需要,可以是灭菌的或与辅助剂(例如,防腐剂、稳定剂、润湿剂、缓冲液、或盐)混合,用于影响多种特性,例如渗透压。其他合适的局部剂型包括可喷雾气溶胶制剂,其中与固体或液体惰性载剂组合的活性成分在一些情况下包装在具有加压的挥发性物质(例如,气态推进剂,如氟利昂)的混合物中或挤瓶中。如果需要,还可以将保湿剂或湿润剂添加至药物组合物和剂型中。此类另外的成分的实例是本领域熟知的。

[1139] 如果鼻内施用包含免疫缀合物的组合物,则可以将它以气溶胶形式、喷雾剂、雾化剂或以滴剂形式配制。特别地,根据本发明使用的预防剂或治疗剂可以在使用合适推进剂

(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适气体)的情况下,以从加压的包装或雾化器中提供的气溶胶喷雾剂形式便利地递送。在加压的气溶胶的情况下,可通过提供阀门来确定剂量单位,以递送经计量的量。在吸入器或吹入器中使用的胶囊剂和药筒(由例如明胶组成)可以配制成含有化合物和合适散剂基料(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[1140] 与第二治疗剂(例如,细胞因子、类固醇、化学治疗剂、抗生素或放射)共同施用或治疗的方法在本领域中是已知的(参见例如,Hardman等人,(编辑)(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis ofTherapeutics[Goodman和Gilman的治疗的药理学基础],第10版,McGraw-Hill[麦格劳-希尔集团],纽约市,纽约州;Poole和Peterson(编辑)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach[药物治疗学高级实践:实用方法],利平科特、威廉姆斯和威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams&Wilkins),费城,宾夕法尼亚州;Chabner和Longo(编辑)(2001)Cancer Chemotherapy and Biotherapy[癌症化学疗法和生物疗法],利平科特、威廉姆斯和威尔金斯出版公司(Lippincott,Williams&Wilkins),费城,宾夕法尼亚州)。治疗剂的有效量可以将症状减少至少10%;至少20%;至少约30%;至少40%、或至少50%。

[1141] 可以与本发明的免疫缀合物组合施用的另外疗法(例如,预防剂或治疗剂)可以与本发明的免疫缀合物相隔少于5分钟、相隔少于30分钟、相隔1小时、相隔约1小时、相隔约1小时至约2小时、相隔约2小时至约3小时、相隔约3小时至约4小时、相隔约4小时至约5小时、相隔约5小时至约6小时、相隔约6小时至约7小时、相隔约7小时至约8小时、相隔约8小时至约9小时、相隔约9小时至约10小时、相隔约10小时至约11小时、相隔约11小时至约12小时、相隔约12小时至18小时、相隔18小时至24小时、相隔24小时至36小时、相隔36小时至48小时、相隔48小时至52小时、相隔52小时至60小时、相隔60小时至72小时、相隔72小时至84小时、相隔84小时至96小时、或相隔96小时至120小时进行施用。两种或更多种疗法可以在同一患者访视中施用。

[1142] 在某些实施例中,可以配制本发明的免疫缀合物以确保适当的体内分布。例如,血脑屏障(BBB)排除许多高度亲水性化合物。为了确保本发明的治疗性化合物穿过BBB(如果需要),可以将它们配制在例如脂质体中。对于制造脂质体的方法,参见例如,美国专利号4,522,811、5,374,548;和5,399,331。脂质体可以包含一个或多个被选择性转运至特定细胞或器官中的部分,因而增强靶向的药物递送(参见例如,Ranade,(1989)J.Clin.Pharmacol.[临床药理学杂志]29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如,Low等人的美国专利号5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等人,1988,Biochem.Biophys.Res.Commun.[生物化学与生物物理研究通讯]153:1038);抗体(Bloeman等人,1995,FEBSLett.[欧洲生化学会联合会快报]357:140;Owais等人.,(1995)Antimicrob.Agents Chemother.[抗微生物剂化学疗法]39:180);表面活性剂蛋白质A受体(Briscoe等人,1995,Am.J.Physiol.[美国生理学杂志]1233:134);p 120(Schreier等人,(1994)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]269:9090);还参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods[免疫方法]4:273。

[1143] 本发明提供了用于向有需要的受试者单独或与其他疗法组合施用包含本发明的免疫缀合物的药物组合物的方案。本发明的组合疗法的疗法(例如,预防剂或治疗剂)可以

同时或顺序地施用于受试者。本发明的组合疗法的疗法(例如,预防剂或治疗剂)也可以循环施用。循环疗法涉及施用第一疗法(例如,第一预防剂或治疗剂)一段时间,随后施用第二疗法(例如,第二预防剂或治疗剂)一段时间并重复这种依序施用,即,所述循环,以减少对一种疗法(例如,药剂)的耐药性形成,以避免或减少一种疗法(例如,药剂)的副作用和/或以改善疗法的功效。

[1144] 本发明的组合疗法的疗法(例如,预防剂或治疗剂)可以并行施用于受试者。

[1145] 术语"并行"不限于在完全相同的时间施用疗法(例如,预防剂或治疗剂),而是意指将包含抗体或其片段的药物组合物以这样的顺序并在这样的时间间隔内施用至受试者,所述顺序和该时间间隔使得本发明的抗体药物缀合物可以与一种或多种其他疗法一起发挥作用,以提供与如果另外施用它们相比增加的益处。例如,可以将每种疗法在相同的时间或以任何次序依序在不同的时间点施用于受试者;然而,如果不在相同的时间施用,则它们应当在时间上充分接近地施用,从而以提供所需的治疗或预防效果。可以将每种疗法以任何适当的形式和通过任何合适的途径分别施用于受试者。在各种实施例中,将疗法(例如,预防剂或治疗剂)相隔少于5分钟、相隔少于15分钟、相隔少于30分钟、相隔少于1小时、相隔约1小时、相隔约1小时至约2小时、相隔约2小时至约3小时、相隔约3小时至约4小时、相隔约4小时至约5小时、相隔约5小时至约6小时、相隔约6小时至约7小时、相隔约7小时至约8小时、相隔约8小时至约9小时、相隔约9小时至约10小时、相隔约10小时至约11小时、相隔约11小时至约12小时、相隔24小时、相隔48小时、相隔72小时、或相隔1周施用于受试者。在其他实施例中,将两种或更多种疗法(例如,预防剂或治疗剂)在同一患者访视中施用。

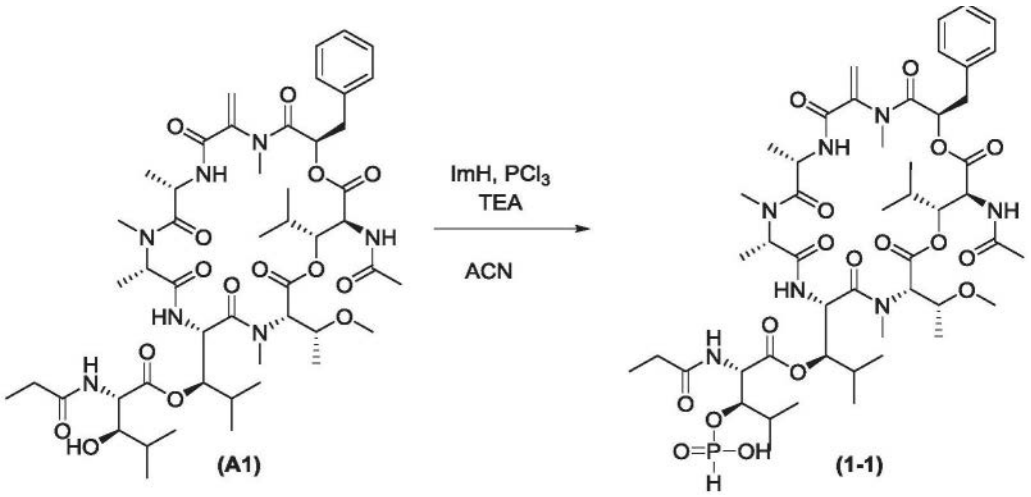
[1146] 组合疗法的预防剂或治疗剂可以在相同的药物组合物中施用至受试者。可替代地,组合疗法的预防剂或治疗剂可以在单独的药物组合物中并行施用于受试者。预防剂或治疗剂可以通过相同或不同施用途径施用于受试者。组合疗法的预防剂或治疗剂可以在相同的药物组合物中施用至受试者。可替代地,组合疗法的预防剂或治疗剂可以在单独的药物组合物中并行施用于受试者。预防剂或治疗剂可以通过相同或不同施用途径施用于受试者。

[1147] 实例

[1148] 实例1:示例性接头-药物化合物的合成

[1149] 实例1-1:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B1)的合成

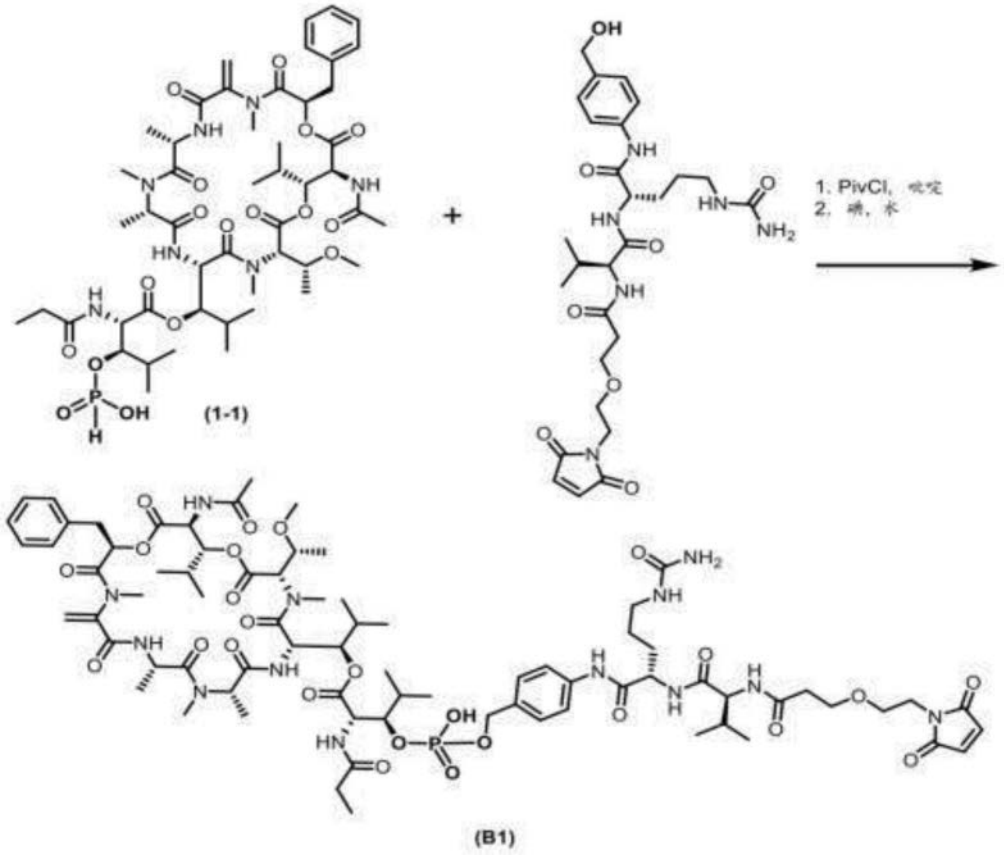
[1150] 步骤1:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((羟基氢磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(1-1)的合成:

[1151] 

[1152] 将咪唑(102mg,1.49mmol,15当量)溶解在乙腈(ACN)(1.4mL)中,并当仍很冷时将其在冰浴中冷却(观察到ImH粉碎,并将混合物从冰浴中升起以溶解ImH)。然后,逐滴添加三氯化磷(1.0 M,在ACN中)(499μl,0.499mmol,5当量)(得到白色悬浮液),并将混合物搅动10分钟。然后添加三乙胺(250μl,1.796mmol,18当量)并将混合物搅拌40min,然后添加(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-羟基-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(A1)(100mg,0.100mmol,1.0当量,使用实例3-1中所述的方法获得化合物(A1))在ACN(1.7mL)中的溶液。将橙黄色的异质混合物升温至室温,并搅动总共60分钟。用水(0.2mL)处理混合物,并通过反相快速色谱法(0%-100%ACN/水,40克C18柱,中性流动相)纯化材料,并收集产物级分并冻干,以得到H-膦酸酯(1-1),为黄白色无定形粉末。LCMS:MH+=1066.3,0.78min(Acquity UPLC BEH C18 1.7um柱,2%-98%2min,用水/MeCN+0.1%NH_4OH运行,基本方法)。

[1153] 步骤2:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B1)的合成:

[1154]

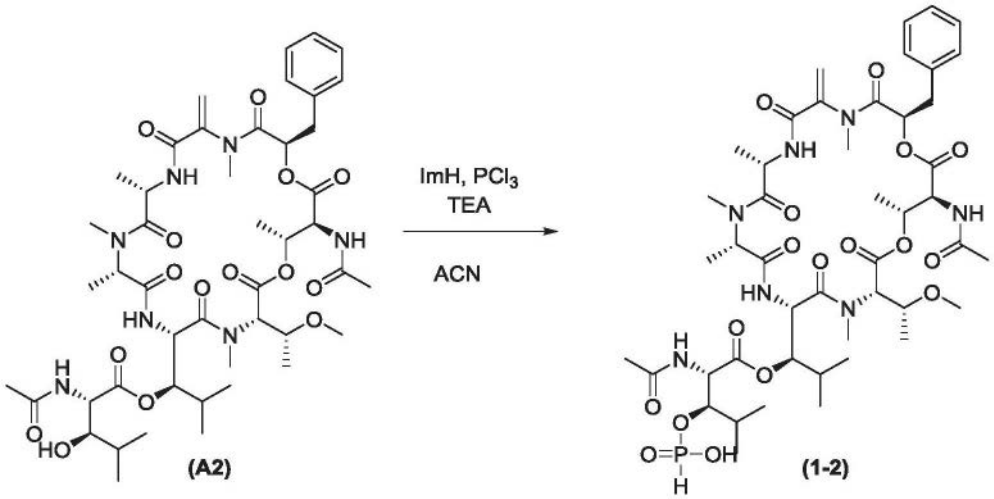


[1155] (R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((羟基氢磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(1-1)(100mg,0.094mmol,1.0当量)和(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(108mg,0.188mmol,2.0当量,CAS号是2055041-37-5)(将两种冻干的粉末转移到10mL小瓶中)并溶解在吡啶(4mL)中。然后,逐滴添加特戊酰氯(0.058mL,0.469mmol,5当量),以给出淡黄色溶液。将混合物在室温搅动10分钟,然后添加1.0当量另外的特戊酰氯。添加新鲜制备的碘(47.6mg,0.188mmol,2.0当量)在吡啶-水(14:1,750uL)中的溶液,以给出深棕色澄清溶液。将混合物搅动25分钟,并通过反相快速色谱法(40g C-18柱,0%Ac/MeCN 3分钟,然后0-60%ACN/水经15分钟,中性法)直接纯化以提供(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸(B-1)。HRMS;MH+=1638.7700,2.84min。

[1156] 实例1-2:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-

3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基戊酸酯(B2)的合成

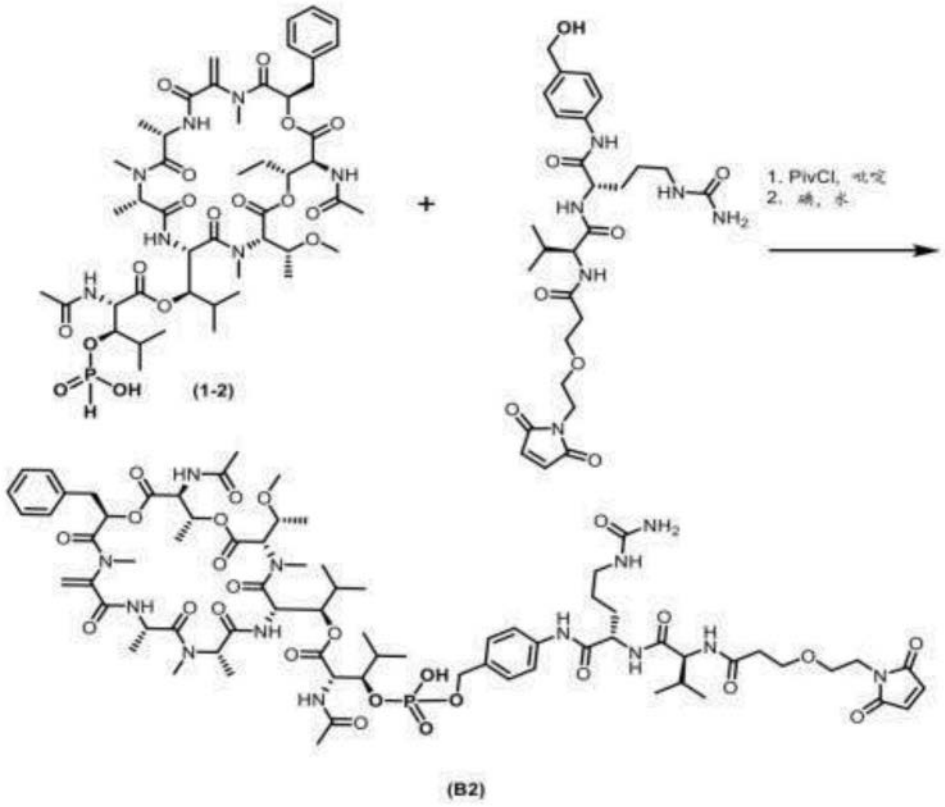
[1157] 步骤1:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((羟基氢磷酰基)氧基)-4-甲基戊酸酯(1-2)的合成:

[1158] 

[1159] 将咪唑(85mg,1.25mmol,15当量)溶解在乙腈(ACN)(2.5mL)中,并当仍很冷时将其在冰浴中冷却(观察到ImH粉碎,并将混合物从冰浴中升起以溶解ImH)。然后,逐滴添加三氯化磷(36.4μl,溶解在0.5mL MeCN中,0.417mmol,5当量)(得到白色悬浮液),并将混合物搅动10分钟。然后添加三乙胺(174μl,1.25mmol,15当量)并将混合物搅动40min,然后添加(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-羟基-4-甲基戊酸酯(A2)(80mg,0.084mmol,1.0当量,使用实例3-2中所述的方法获得化合物(A2))在ACN(1.7mL)中的溶液。将橙黄色的异质混合物升温至室温,并搅动总共30分钟。用水(1mL)处理混合物,并通过反相快速色谱法(0%-100%ACN/水,40克C18柱,中性流动相)纯化材料,并收集产物级分并冻干,以得到H-膦酸酯(1-2),为黄白色无定形粉末。LCMS:MH+=1024.3,0.78min(Acquity UPLC BEH C181.7um柱,2%-98%2min,用水/MeCN+0.1%NH_4OH运行,基本方法)。

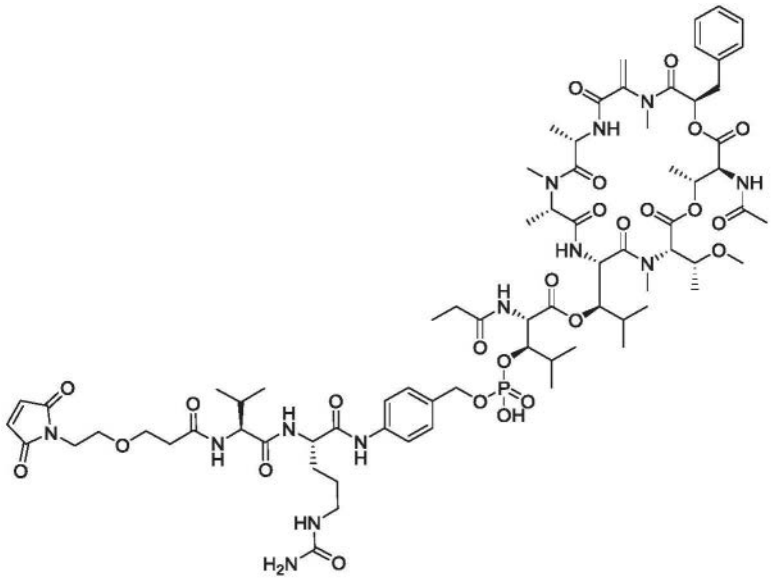
[1160] 步骤2:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基戊酸酯的合成:

[1161]



[1162] (R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((羟基氢磷酰基)氧基)-4-甲基戊酸酯(1-2)(50mg,0.049mmol,1.0当量)和(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号2055041-37-5)(33.7mg,0.059mmol,1.2当量)(将两种冻干的粉末转移到10mL小瓶中)并溶解在吡啶(1mL)中。然后,逐滴添加特戊酰氯(0.042mL,0.342mmol,7当量),以给出淡黄色溶液。将混合物在室温下搅动30分钟。添加新鲜制备的碘(49.6mg,0.195mmol,4当量)在吡啶-水(20:1,500uL)中的溶液,以给出深棕色澄清溶液。将混合物搅动30分钟,并通过反相快速色谱法(40g C-18柱,0%Ac/MeCN 3分钟,然后0-70% ACN/水经15分钟,中性法)直接纯化以提供(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸(B2)。HRMS;MH+=1595.7200.2.25min。

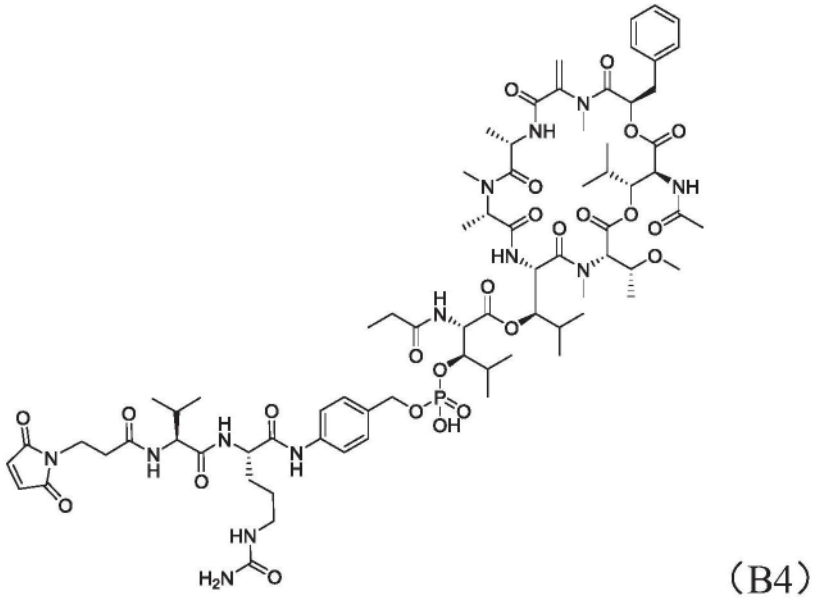
[1163] 实例1-3:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B3)的合成:

[1164] 

(B3)

[1165] 可以使用与实例1-1中所述的方法类似的程序获得化合物(B3),除了在步骤1中,使用化合物(A3)(来自实例3-3)代替化合物(A1)。

[1166] 实例1-4:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B4)的合成

[1167] 

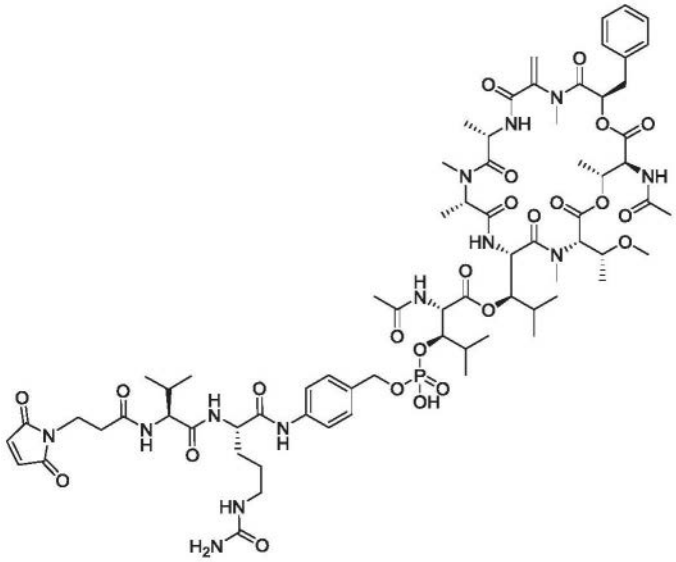
(B4)

[1168] 使用与实例1-1中所述的方法类似的程序获得化合物(B4),除了在步骤2中,使用(S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号1949793-46-7)代替(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号是2055041-37-5)。HRMS;MH+=1594.5400,2.88min。

[1169] 实例1-5:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-

二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基戊酸酯(B5)的合成

[1170]

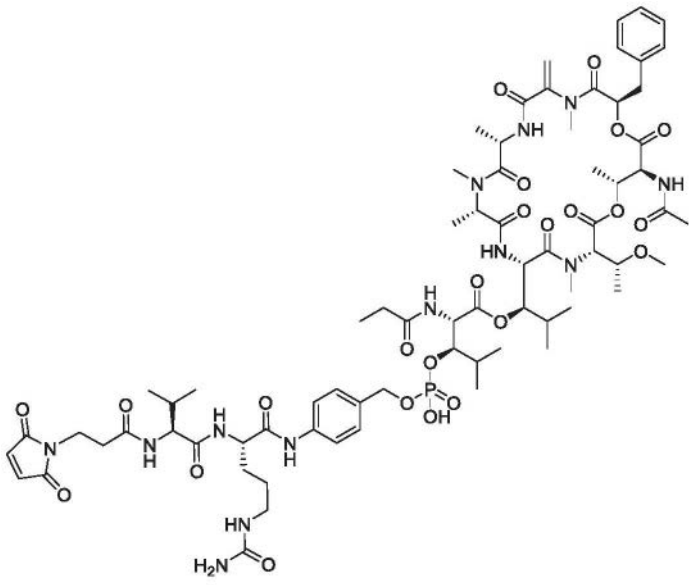


(B5)

[1171] 可以使用与实例1-1中所述的方法类似的程序获得化合物(B5),除了在步骤1中,使用化合物(A2)(来自实例3-2)代替化合物(A1),以及在步骤2中,使用(S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号1949793-46-7)代替(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号是2055041-37-5)。

[1172] 实例1-6:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B6)的合成

[1173]

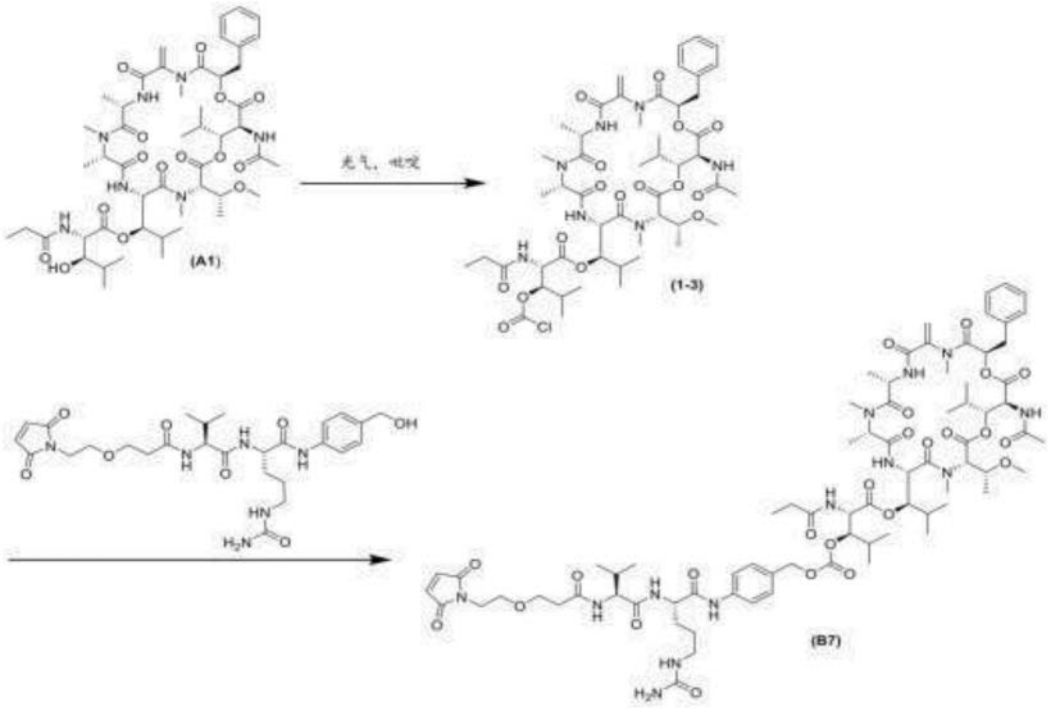


(B6)

[1174] 可以使用与实例1-1中所述的方法类似的程序获得化合物(B6),除了在步骤1中,使用化合物(A3)(来自实例3-3)代替化合物(A1),以及在步骤2中,使用(S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号1949793-46-7)代替(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号是2055041-37-5)。

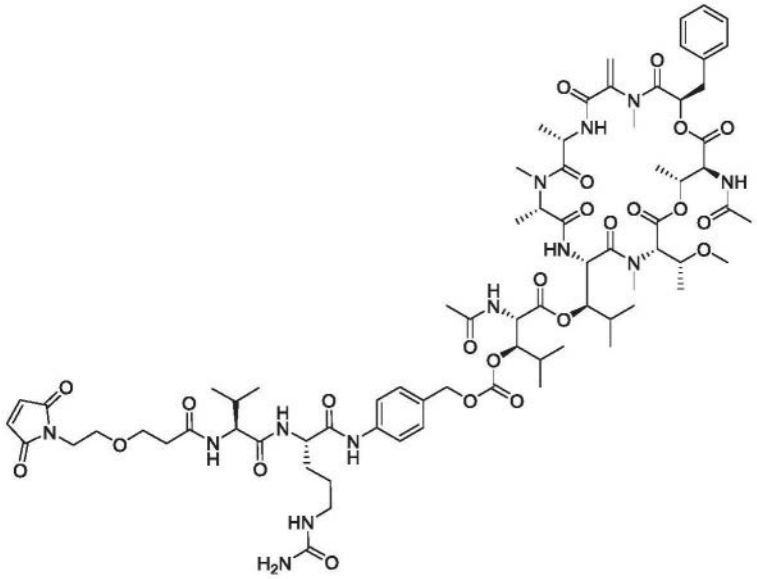
[1175] 实例1-7:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B7)的合成

[1176]



[1177] 可通过使氯甲酸酯(1-3)与(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号是2055041-37-5)反应而获得化合物(B7)。可通过使化合物(A1)与光气反应而获得氯甲酸酯(1-3)。

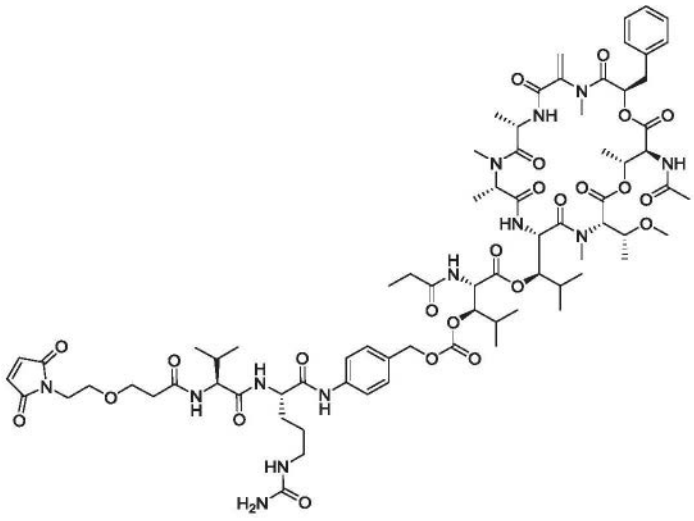
[1178] 实例1-8:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氧基)-4-甲基戊酸酯(B8)的合成

[1179] 

(B8)

[1180] 可以使用实例1-7中所述的方法获得化合物(B8),除了使用化合物(A2)代替化合物(A1)。

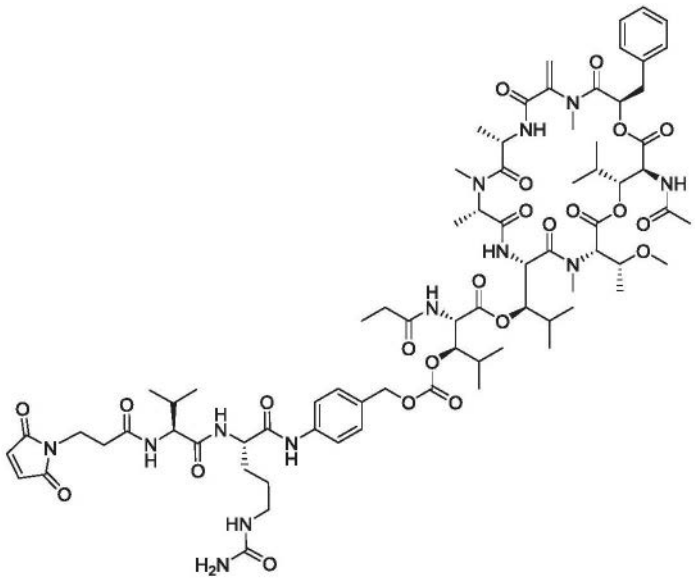
[1181] 实例1-9:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B9)的合成

[1182] 

(B9)

[1183] 可以使用实例1-7中所述的方法获得化合物(B9),除了使用化合物(A3)代替化合物(A1)。

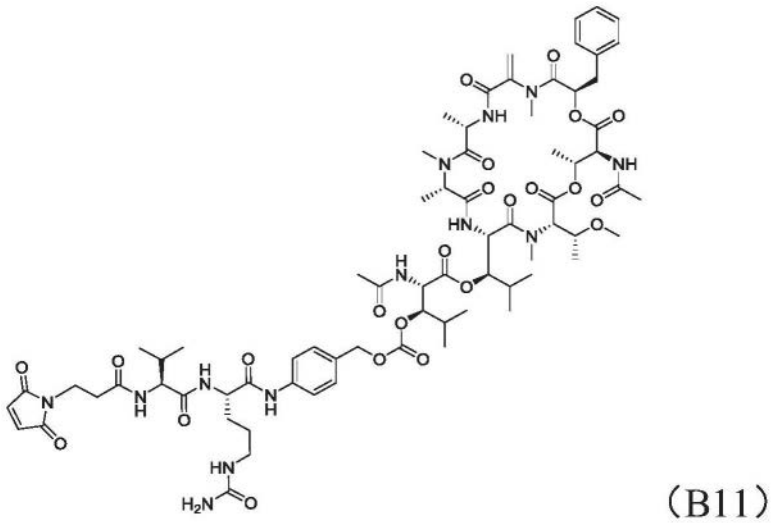
[1184] 实例1-10:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B10)的合成

[1185] 

(B10)

[1186] 可以使用实例1-7中所述的方法获得化合物(B10),除了使用(S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号1949793-46-7)代替(S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-N-(4-(羟甲基)苯基)-5-脲基戊酰胺(CAS号是2055041-37-5)。

[1187] 实例1-11:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-((((4-((S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氧基)-4-甲基戊酸酯(B11)的合成

[1188] 

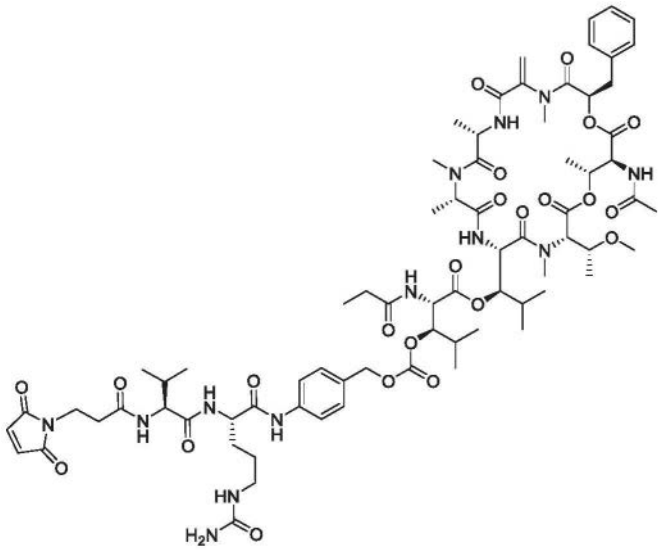
(B11)

[1189] 可以使用实例1-10中所述的方法获得化合物(B11),除了使用化合物(A2)代替化合物(A1)。

[1190] 实例1-12:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-((((4-

((S)-2-((S)-2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氧基)-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(B12)的合成

[1191]



(B12)

[1192] 可以使用实例1-10中所述的方法获得化合物(B12),除了使用化合物(A3)代替化合物(A1)。

[1193] 实例2:抗PMEL17抗体的产生

[1194] 实例2-1:表达PMEL17的细胞系的制备

[1195] 基于来自GenBank或Uniprot数据库的氨基酸序列,合成全长人、食蟹猴和大鼠PMEL17基因。将所有合成的DNA片段克隆到合适的表达载体中。

[1196] 产生了工程化的稳定的表达PMEL17的细胞系,并在适当的选择条件下进行培养,以产生稳定的表达PMEL17的细胞系。

[1197] 实例2-2:针对PMEL17的全细胞淘选

[1198] 噬菌粒文库基于HuCAL PLATINUM® (Knappik等人,2000)和Ylanthia概念(Tiller等人,2013),并采用CysDisplayTM技术在噬菌体表面上展示Fab(Lohning,2001)。

[1199] 对于每次淘选,在PBS/5%FCS中封闭约4x 10^{13}个HuCAL PLATINUM®或约1x 10^{14}个Ylanthia®噬菌体-抗体噬菌体-抗体。平行地,将每个噬菌体池中表达抗原PMEL17的0.5-1.0x10^7个靶细胞和不表达抗原PMEL17的0.5-1.0x10^7个吸附细胞重悬于1ml PBS/5%FCS中,以在冰上封闭。将封闭的靶细胞旋转沉降,重悬于预封闭的噬菌体颗粒中,并在旋转器上于4℃孵育2小时。将噬菌体-细胞复合物在PBS/5%FCS中洗涤3次。通过用0.1M甘氨酸-HCl/0.5M NaCl,pH 2.2进行10分钟酸性洗脱,从靶细胞中洗脱特异性结合的噬菌体。离心后,通过添加2M未缓冲的Tris中和上清液(洗脱液)。为了除去除靶抗原以外的与细胞表面分子结合的噬菌体,进行3次后吸附(post-adsorption),每次用0.5-1.0x 10^7个吸附细胞。将最终的上清液用于感染生长到OD600为0.6-0.8的14ml大肠杆菌TG1培养物。将培养物在37℃的水浴中孵育45分钟以进行噬菌体感染。将细菌沉淀重悬于2xYT培养基中,铺在LB/Cam琼脂板上,并在30℃下孵育过夜。从所述板上刮下菌落,并用于噬菌体拯救和噬菌体扩增。将扩增的噬菌体用于下一轮淘选。根据第一轮的方案进行第二和第三轮全细胞淘选。

[1200] 实例2-3:Fab片段的亚克隆、表达和筛选

[1201] 为了促进可溶性Fab的快速表达,将选择的HuCAL PLATINUM®噬菌体的编码Fab的插入物从pMORPH®30展示载体亚克隆到pMORPH®x11FH表达载体中。通过EcoRI、XbaI和BmtI进行三重消化进行亚克隆。大肠杆菌TG1-F-单一克隆表达转化后,并且如前所述进行含有HuCAL®-Fab片段的周质提取物的制备(Rauchenberger等人,2003)。

[1202] 将所选Ylanthia®噬菌体的编码Fab的插入物从pYPdis10展示载体亚克隆到pYBex10_Fab_FH表达载体中。经由XbaI、EcoRI-HF和PstI-HF的三重消化进行亚克隆。大肠杆菌TG1-F-单一克隆表达转化后,并且如前所述进行含有Ylanthia®-Fab片段的周质提取物的制备(Rauchenberger等人,2003)。

[1203] 在摇瓶培养物(使用500ml的2xYT培养基,其中补充0.1%葡萄糖和34μg/ml氯霉素)中进行pMORPH®x11_Fab_FH和pYBex10_Fab_FH编码的Fab片段在大肠杆菌TG1 F-细胞中的表达。将培养物在30℃振荡,直到OD_{600}达到值为0.5。通过添加终浓度为0.75mM的IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷)诱导Fab表达,并在30℃下进一步培养20小时。收获细胞并使用溶菌酶破坏。通过IMAC(伯乐公司(Bio-Rad),德国)并使用咪唑洗脱来分离His_6标签化的(SEQ ID NO:267)Fab片段。使用PD10柱(通用电气医疗集团(GE Healthcare),德国)进行缓冲液交换到1x杜氏PBS(Dulbecco's PBS)(pH 7.2)。将样品无菌过滤(0.2μm)。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度。在变性的还原性15%SDS-PAGE中分析所述样品的纯度。Fab制剂的均质性是通过具有校准标准的尺寸排阻色谱法(HP-SEC)在天然状态下确定的。

[1204] 在FACS筛选中,将纯化的Fab在多种表达PMEL17和非表达PMEL17的细胞系上滴定(用于对照)。使用Accutase收获细胞,调整至约4x 10^6个细胞/ml,进入FACS缓冲液(PBS,3%FCS和0,02%叠氮化钠)中,并置于冰上以避免内化。将15μl细胞悬液/孔转移至384孔V底板(葛莱娜公司(Greiner),目录号781280)中,并与15μl不同浓度的Fab(最常见的浓度为从200至3,5x 10^{-3}nm)在4℃下孵育1小时,轻轻振荡。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤3次。每个洗涤步骤后,将细胞离心(250xg,4min,4℃)并小心重悬。添加15μl与PE缀合的检测抗体(PE缀合的山羊抗人IgG,F(ab`)2片段特异性,在FACS缓冲液中为1:150;杰克森免疫研究公司(Jackson Immuno Research),#109-116-097)或与Alexa Fluor缀合的检测抗体(Alexa Fluor缀合的山羊抗人IgG,F(ab`)2片段特异性,在FACS缓冲液中为1:150;杰克森免疫研究公司,#109-606-097),并将样品在冰上在黑暗中孵育45分钟至1小时,轻轻振荡。3个洗涤步骤后,将细胞重悬于30μl FACS缓冲液中,并使用IntelliCyt HTFC设备测量样品。

[1205] 为了另外验证鉴定出的抗体的特异性,从细胞裂解物中免疫捕获了抗原,并将其用作基于ELISA的筛选的包被材料。将表达PMEL17的细胞和不表达PMEL17的细胞(用作阴性对照)进行离心(250g,5min),然后以1x10^7至1x10^8个细胞/mL重悬于含有蛋白酶抑制剂(完全不含EDTA的蛋白酶抑制剂混合物,罗氏公司(Roche),11873580001)的裂解缓冲液(MSD Tris裂解缓冲液,美莎帝公司(Meso Scale Discovery),R60TX-2)中,并在4℃下孵育30分钟。将裂解液以13000rpm旋转沉降5分钟以弃去细胞碎片,并将上清液等分并保存在-80℃下。初步测试表明,裂解物可以冷冻和融化3次,而ELISA中信号没有重大损失。

[1206] 为了进行筛选ELISA,将抗His IgG在maxisorb 384孔板(R&D系统公司(R&D systems),MAB050,10μg/ml,每孔20μl)上包被过夜。将板用3%BSA封闭,并将20μl纯化的

Fab以不同浓度(最常见的浓度为从400至0,2nM)转移至每个孔中持续1小时。将板洗涤3次,并以2x105个裂解细胞/孔的浓度添加20μl含PMEL17的细胞裂解液持续1小时。再洗涤3次后,使用工具生物素化的抗体PMEL17(5μg/ml,20μl/孔)和链霉亲和素-ECL(Dianova公司,13MSA37,1:1500,20μl/孔)显示PMEL17的存在。将20μl MSD读取缓冲液1X/孔(美莎帝公司,R92TC-2)添加至板中,并经由MSD Sector Imager 6000检测信号。

[1207] 实例2-4:转化为IgG

[1208] 通过基于PCR的方法以96孔形式将选择的Fab转化为IgG。将Fab细菌表达载体pMORPH®x11_FH和pYBex10_Fab_FH转化为IgG哺乳动物表达载体pMORPH®4和pYMex10(分别用于HuCAL和Ylanthia克隆)。

[1209] 首先使用特异于phoA前导区的生物素化引物和特异于细菌CL结构域的非生物素化引物通过PCR扩增pMORPHx11_FH质粒DNA。将扩增的产物捕获在链霉亲和素珠上,用BsiWI或HpaI(分别用于VLK或VLλ克隆)消化,洗涤,然后再次用MfeI消化。该程序导致纯化的载体主链释放到上清液中,现在缺少细菌恒定轻链区(CL)和phoA重链前导序列。然后将K或λ特异性哺乳动物pIN表达盒克隆到携带哺乳动物CL、多腺苷酸化(polyA)位点、CMV启动子和哺乳动物重链前导序列的载体主链中。在第二PCR步骤中,使用对CH1区具有特异性的生物素化引物和结合在细菌ompA前导区内的非生物素化引物,再次扩增新生成的Fab插入物。将PCR产物捕获在链霉亲和素珠上,用EcoRV消化,洗涤并用B1pI消化,从而将纯化的插入物释放到上清液中。最后将插入物克隆到Fab_Cvs受体载体中以在哺乳动物细胞中表达。

[1210] 首先使用特异于phoA前导区的生物素化引物和特异于细菌CL结构域的非生物素化引物通过PCR扩增pYBex10_Fab_FH质粒DNA。将扩增的产物捕获在链霉亲和素珠上,用NheI消化,洗涤,然后再次用KpnI消化。该程序导致纯化的载体主链释放到上清液中,现在缺少细菌恒定轻链区(CL)和phoA重链前导序列。然后将K或λ特异性哺乳动物pIN表达盒克隆到携带哺乳动物CL、多腺苷酸化(polyA)位点、CMV启动子和哺乳动物重链前导序列的载体主链中。在第二PCR步骤中,使用对CH1区具有特异性的生物素化引物和结合在细菌ompA前导区内的非生物素化引物,再次扩增新生成的Fab插入物。将PCR产物捕获在链霉亲和素珠上,用XhoI消化,洗涤并用NdeI消化,从而将纯化的插入物释放到上清液中。最后将插入物克隆到Fab Cys受体载体中以在哺乳动物细胞中表达。

[1211] 转化大肠杆菌XL-1蓝色细胞后,经由菌落PCR以及整个插入区的测序来控制单个克隆。

[1212] 实例2-5:人IgG的验证性筛选

[1213] 通过使用合适的DNA制备试剂盒与BioRobot®8000装置组合,制备单个菌落的DNA制剂。通过UV-分光光度法测定单独的DNA浓度。真核HEK293 c18细胞(ATCC#CRL-10852)被用于96孔表达系统中,用于产生含有全长IgG的条件化的细胞培养上清液。前一天,将真核HEK293 c18细胞接种到96孔平底板中,至密度为约$4x10^4$个细胞/50μl/孔,并用等量的Ig表达载体DNA转染。在37℃和6%CO2下孵育40-50小时后,将培养上清液转移至96孔U型底板并通过离心使其澄清。参照已知标准,通过抗Fd捕获ELISA测试所得的Ig上清液,以计算Ig浓度,并储存在-20℃下,以用于以后的特异性和/或功能筛选测定。

[1214] 使用针对VH结构域的(CTC TAG CGC CAC CAT GAA ACA(SEQ ID NO:264))的引物CMV_HC_和针对Fc结构域的(AGC CCA GCA ACA CCA AGG(SEQ ID NO:265))的IgG_const_对

目的克隆的DNA进行测序,然后用T7启动子引物(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG(SEQ ID NO:266))进行轻链测序,以获得完整的IgG序列信息。

[1215] 使用IntelliCyt的HTFC筛选平台,以384孔板形式进行FACS筛选。使用Accutase收获细胞,调整至约4x10^6个细胞/ml,进入FACS缓冲液(PBS,3%FCS和0,02%叠氮化钠)中,并置于冰上以避免内化。将15μl细胞悬液/孔转移至384孔V底板(葛莱娜公司,目录号781280)中,并与15μl含IgG的上清液(或稀释的纯化对照抗体)在4℃孵育1小时,轻轻振荡。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤3次。每个洗涤步骤后,将细胞离心(250xg,4min,4℃)并小心重悬。添加15μl与PE缀合的检测抗体(PE缀合的山羊抗人IgG,F(ab`)2片段特异性,在FACS缓冲液中为1:150;杰克森免疫研究公司(Jackson Immuno Research),#109-116-097),并将样品在冰上在黑暗中孵育45分钟至1小时,轻轻振荡。3个洗涤步骤后,将细胞重悬于30μl FACS缓冲液中,并使用IntelliCyt HTFC设备测量样品。

[1216] 实例2-6:人IgG和人Fab_Cys的产生

[1217] 将真核HKB11细胞用编码IgG的重链和轻链的pMORPH®4或pYMex10表达载体DNA转染。转染后第3或7天收获细胞培养物上清液。将细胞培养物上清液进行分别针对人IgG和人Fab_Cys的标准蛋白A亲和色谱法(MabSelect SURE,通用电气医疗集团)和捕获选择IgG-CH1(BAC)。如果未另外说明,将缓冲液交换进行到1x Dulbcecco的PBS(pH 7.2,英杰公司(Invitrogen))中,并将样品无菌过滤(0.2μm孔径)。使用Labchip系统(GXII,珀金埃尔默公司(Perkin Elmer),美国)或在SDS-PAGE上,在变性、还原和非还原条件下分析IgG的纯度。通过UV-分光光度法测定蛋白质浓度,并进行HP-SEC分析天然状态的IgG制剂。

[1218] 实例2-7:抗PMEL17G1和G4抗体的产生

[1219] 对于第一轮淘选,用PBS/5%FBS封闭约4x 10^{13}个HuCALPLATINUM®噬菌体。平行地,将每个噬菌体池中表达抗原PMEL17的1.0x 10^7个靶细胞和不表达抗原PMEL17的1.5-3.0x 10^7个吸附细胞重悬于1ml PBS/5%FCS中,以在冰上封闭。为了预清除非特异性结合,将噬菌体与0.5x 10^7个吸附细胞(不表达抗原PMEL17)/噬菌体池在冰上孵育30分钟。孵育后,通过离心沉淀细胞,并将上清液添加至具有0.5x10^7个吸附细胞(不表达抗原PMEL17)的新鲜样品中。应用相同的孵育条件,并且将预吸附再次应用于0.5x 10^7个吸附细胞(不表达抗原PMEL17)的新鲜样品,总共进行了三个预吸附回合。在最终的预吸附后,将上清液添加到表达抗原PMEL17的1.0x 10^7个靶细胞中,并在冰上孵育2小时,偶尔混合。将噬菌体-细胞复合物在PBS/5%FCS中洗涤3次。通过用0.1M甘氨酸-HCl/0.5M NaCl,pH 2.5进行10分钟酸性洗脱,从靶细胞中洗脱特异性结合的噬菌体。离心后,通过添加2M未缓冲的Tris中和上清液(洗脱液),并将该洗脱液用于感染生长到OD_{600}为0.6-0.8的14ml大肠杆菌TG1 F′培养物。将培养物在37℃下孵育20分钟,然后在37℃下伴随以200rpm振荡孵育另外的25分钟以进行噬菌体感染。将细菌沉淀重悬于2xYT培养基中,铺在LB/氯霉素琼脂板上,并在30℃下孵育过夜。从所述板上刮下菌落,并用于噬菌体拯救和噬菌体扩增。将扩增的噬菌体用于下一轮淘选。除了仅使用约1x 10^{12}个HuCAL噬菌体来减少背景并提高预清除效果外,类似地进行第二轮和第三轮的淘选。在最后一轮淘选之后,从每个噬菌体输出物制备质粒DNA,并将含有Fab的插入物克隆到细菌表达载体中。连接和转化后,将单独的菌落挑入2XT/氯霉素中并培养。通过在25℃在96孔微量滴定板中生长过夜的培养物中添加0.25mM IPTG来诱导Fab表达。将细胞沉淀用PBS中的0.1%溶菌酶裂解,然后通过添加BSA至终浓度1%进行封闭。在表

达PMEL17的细胞和对照细胞上进行FACS染色。

[1220] 实例2-8:抗PMEL17抗体的表观亲和力

[1221] 将纯化的IgG在多种表达PMEL17和非表达PMEL17的细胞系上滴定(用于对照),以确定EC50值。使用Accutase收获细胞,调整至约4x 106个细胞/ml,进入FACS缓冲液(PBS,3%FCS和0,02%叠氮化钠)中,并置于冰上以避免内化。将15μl细胞悬液/孔转移至384孔V底板(葛莱娜公司,目录号781280)中,并与15μl不同浓度的IgG(最常见的浓度为从200至3,5x 10-3nM)在4℃下孵育1小时,轻轻振荡。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤3次。每个洗涤步骤后,将细胞离心(250xg,5min,4℃)并小心重悬。添加15μl与PE缀合的检测抗体(PE缀合的山羊抗人IgG,F(ab`)2片段特异性,在FACS缓冲液中为1:150;杰克森免疫研究公司(Jackson Immuno Research),#109-116-097)或与Alexa Fluor缀合的检测抗体(Alexa Fluor缀合的山羊抗人IgG,F(ab`)2片段特异性,在FACS缓冲液中为1:150;杰克森免疫研究公司,#109-606-097),并将样品在冰上在黑暗中孵育45分钟至1小时,轻轻振荡。3个洗涤步骤后,将细胞重悬于30μl FACS缓冲液中,并使用IntelliCyt HTFC设备测量样品。使用Graphpad Prism软件计算EC50值。与HKB11-人PMEL17过表达性细胞系相比,G-361黑色素瘤细胞系以较低的水平表达人PMEL17,因此可以根据克隆的表观亲和力对其进行更精确的排序。如表3所示,达到各种EC50,范围从约200pM到约70nM。

[1222] 表3.抗PMEL17抗体的表观亲和力(FACS EC50(nM))和交叉反应性。

[1223]

	G-361 (PE)	G-361 (Alexa Fluor)	HKB11-食蟹猴 (Alexa Fluor)	HKB11-大鼠 (Alexa Fluor)	B16-F10 (小鼠) (Alexa Fluor)	UACC-62 (PE)	跨 spe 谱 (基于 C14 检测 ab)
Y101341	0.4		2.6	1.8	1.2	阴性	h/c/r/m
Y010906	-	2.0	2.0	21.7	139.8	阴性	h/c/r/m
Y010900	-	1.3	1.2	9.3	> 100	阴性	h/c/r/m
Y010355	0.5		3.9	0.8	0.8	阴性	h/c/r/m
Y010356	1.6		4.5	1.4	1.4	阴性	h/c/r/m
Y010429	2.5		10.7	1.5	60.2	阴性	h/c/r
MOR024354	-	1.7	2.1	2.4	> 100	阴性	h/c/r
Y010415	0.3		5.4	0.4	> 100	阴性	h/c/r
Y010903	-	3.2	2.0	5.6	927.5	阴性	h/c/(m)
Y010910	-	10.0	3.5	13.7	41.1	阴性	h/c/(m)
MOR024353	-	62.8	1.6	7.5	> 100	阴性	h/c
Y010417	2.8		6.3	> 100	> 100	阴性	h/c

[1224] 实例2-9:抗PMEL17抗体的交叉反应性

[1225] 在有关G-361(人黑色素瘤)、HKB11-食蟹猴-PMEL17、HKB11-大鼠PMEL17和B16-F10(小鼠PMEL17表达性黑色素瘤)的剂量应答FACS中评估了IgG的交叉特异性(表3)。使用标记至PE的检测抗体对G-361进行测试。相比之下,必须使用Alexa-Fluor标记的检测抗体来测试其他细胞系上的候选物,以达到可检测的信号。

[1226] 根据IgG的交叉特异性谱,将其分为几个表位组。然而,IgG的各种交叉反应谱表明它们靶向至少4个表位(人/食蟹猴/大鼠/小鼠、人/食蟹猴/大鼠、人/食蟹猴/小鼠和人/食蟹猴)。

[1227] 实例2-10:ADC测定

[1228] 在背驮式ADC测定中和直接偶联后,对IgG的内化能力和诱导对各种PMEL17表达性细胞杀伤的能力进行了剂量应答测试。

[1229] 对于背驮式ADC测定,使用了Fab-ZAP(山羊抗h_u-mAb-皂草素偶联的;ATS生物技术公司(ATS Biotechnology),目录号IT-51)化合物,所述化合物与人Fc特异结合,并与细胞毒素元件皂草素偶联。使用Accutase收获细胞,并调节至5x 10^4个细胞/ml。将50μl细胞悬浮液/孔转移到96孔平透明底白色板(康宁公司(Corning),3610)中,并在37℃,5%CO2下孵育过夜。在第二天,将抗体候选物以不同浓度(最常见的是从44至7x 10^{-3}nM)与8nM的Fab-ZAP化合物在37℃下孵育30分钟。然后将50μl的IgG-Fab-ZAP复合物/孔添加到靶细胞中。对于对照,制备仅含有细胞的孔,仅含有与候选IgG一起孵育的细胞的孔(=100%活力对照)和仅含有与Fab-ZAP一起孵育的细胞的孔(以检查第二试剂的非特异性杀伤)。IgG的终浓度为22至3,5x 10^{-3}nM,Fab-ZAP的终浓度为4nM。将板在37℃和5%CO2下孵育72小时。使用CellTiter-Glo(普洛麦格公司(Promega)#G7571)评估活细胞的数量,并用Tecan Infinite 500检测发光。然后将活力标准化至仅细胞+IgG对照。

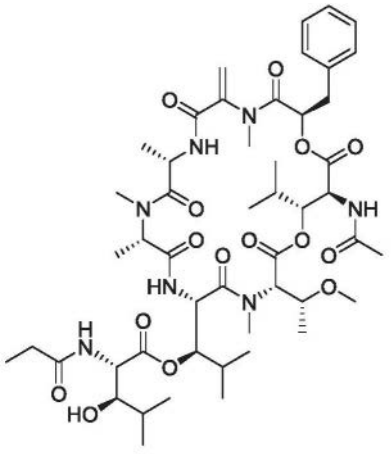
[1230] 几乎所有IgG都可以有效杀死G-361黑色素瘤(>80%的最大杀死率),并且对不表达PMEL17的293T细胞显示有限的杀伤作用(<30%最大杀伤率)。用可能与亲和力或表位有关的某个范围的EC50也可以实现G-361杀死。对于与人/食蟹猴/大鼠/小鼠、人/食蟹猴/大鼠和人/食蟹猴/小鼠具有反应性的大多数IgG,也可以确认交叉特异性,即对小鼠PMEL17具有特异性的IgG也可以杀死B16-F10(小鼠黑素瘤)。

[1231] 实例2-11:抗PMEL17抗体的工程化

[1232] 通常,所有工程化方法均使用基于PCR的策略进行。工程化方法涉及以下方面:种系化、去除PTM位点、pI工程化和密码子优化。通过重叠延伸PCR合成和组装后,将经过再设计的VH和VL片段亚克隆到合适的载体主链中,用于随后的IgG表达。

[1233] 实例3:化合物A1-A3的合成

[1234] 实例3-1:从朱砂根(Ardisia crenata)干叶分离(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-22-异丙基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16-五甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-羟基-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(A1)的方法

[1235] 

(A1)

[1236] 基于日本专利公开号JP 62283999中描述的方法分离化合物A1。步骤1:萃取:将25kg的朱砂根干叶研磨成细粉,并用500L甲醇萃取。过滤后,将提取物蒸发至干燥。将残余物溶解在100L乙酸乙酯中,并用100L去离子水萃取五次(添加氯化钠以改善相分离。将有机层蒸发至干燥。将残余物溶解在50L乙腈/水(9/1)中,并用50L庚烷萃取。蒸发乙腈/水层,直到仅剩下水。然后将其用50L乙酸乙酯萃取。将乙酸乙酯层蒸发至干燥,得到109g粗提取物。

[1237] 步骤2:脱脂:将粗提取物溶解在25L乙腈/水(9/1)中,并用25L庚烷萃取3次。蒸发乙腈/水层,直到仅剩下水。然后将其用25L乙酸乙酯萃取。将乙酸乙酯层蒸发至干燥,得到40g粗提取物。

[1238] 步骤3:快速色谱法:将粗提取物溶解在丙酮/甲醇(1/1)中,吸附到100g Isolute(硅藻土)上并蒸发至干燥。使用三元溶剂系统在硅胶上进行快速色谱法,所述系统使用环己烷(洗脱剂A)、乙酸乙酯(洗脱剂B)和甲醇(洗脱剂C)(实验细节:柱:RediSep Rf 120g;流速:85mL/min;梯度:0 min:75%A,25%B,0%C;3min:75%A,25%B,0%C;10min:0%A,100%B,0%C;17.5min:0%A,90%B 10%C;25min:0%A,50%B,50%C;30min:0%A,50%B,50%C;梯度的不同区段通过随时间的线性变化连接起来)。进行四次运行(10g提取物/次)。应用基于时间的分级,并通过UPLC-UV-MS分析收集的级分中是否存在化合物(A1)。合并含有化合物(A1)的级分,蒸发至干燥,得到25g的级分。

[1239] 步骤4:尺寸排阻色谱法(SEC):将25g级分溶解在400mL甲醇中,并通过在装有Sephadex LH20和甲醇作为洗脱剂的柱(长25cm,直径12.5cm)上通过SEC进一步分级。收集各级分200mL,并通过UPLC-UV-MS分析收集的级分中是否存在化合物(A1)。合并含有化合物(A1)的级分,蒸发至干燥,得到富集的6.2g的级分。

[1240] 步骤5:第一制备型HPLC:将富集的6.2g的级分溶解在12mL甲醇/二甲亚砜(1/1)中,并通过制备型HPLC进一步分级(实验细节:柱:Sunfire C18,30x 150mm,5μm粒径;洗脱液A:含有0.1%甲酸的去离子水,洗脱液B:含有0.1%甲酸的甲醇;流动速率60mL/min;梯度:0 min:35%A,65%B;0.5min:35%A,65%B;17min:15%A,85%B;15.0 min:0%A,100%B;19min:0%A,100%B;19.1min:35%A,65%B;20min:35%A,65%B;梯度的不同区段通过随时间的线性变化连接起来)。通过质谱法触发分级。进行15次运行(410mg富集的级分/次)。合并含有化合物(A1)的级分,蒸发至干燥,得到488mg的半纯级分,估计含量为70%化合物(A1)。

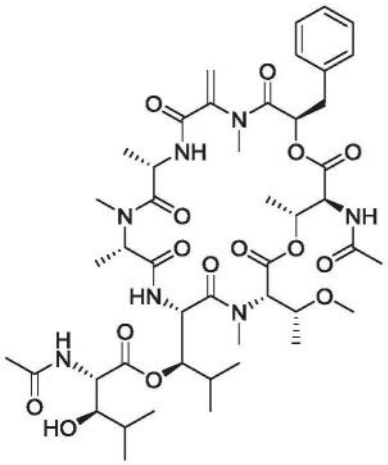
[1241] 步骤6:第二制备型HPLC:将半纯的488mg的级分溶解在4mL甲醇中,并通过制备型

HPLC进一步分级(实验细节:柱:X-Select PFP,19x 250mm,5μm粒径:洗脱液A:含0.1%甲酸的去离子水,洗脱液B:含0.1%甲酸的乙腈;流动速率30mL/min;梯度:0 min:45%A,55%B;0.5min:45%A,55%B;24min:25%A,75%B;24.0 min:0%A,100%B;27.5min:0%A,100%B;27.6min:45%A,55%B;30.5min:45%A,55%B;梯度的不同区段通过随时间的线性变化连接起来)。通过质谱法触发分级。进行五次运行(98mg半纯级分/次)。合并含有化合物(A1)的级分,蒸发至干燥,得到287mg纯度>95%的化合物(A1)。

[1242] 化合物(A1):保留时间:4.73min,分子式[M+H]+:C49H76N7O15+,计算的单一同位素质量[M+H]+:1002.5394Da,观察到的质量:1002.5391Da。实验细节:柱:ACQUITY UPLC BEH C18,2.1x 100mm,1.7μm粒径;洗脱液A:含有0.1%甲酸的去离子水,洗脱液B:含有0.1%甲酸的乙腈;流动速率0.9mL/min;线性梯度:0 min:95%A,5%B至6.4min:0%A,100%B.^{1}H NMR(600Mhz,乙腈-d_3)δ8.36(d,J=9.4Hz,1H),7.50(d,J=10.0Hz,1H),7.38-7.22(m,6H),6.94(d,J=4.4Hz,1H),6.77(d,J=9.9Hz,1H),5.39(d,J=9.8Hz,1H),5.34(dd,J=8.8,3.8Hz,1H),5.31-5.25(m,2H),5.21-5.15(m,2H),5.11(dd,J=9.9,1.9Hz,1H),4.90-4.84(m,1H),4.70(q,J=6.9Hz,1H),4.39(dd,J=7.7,2.1Hz,1H),4.10(d,J=9.8Hz,1H),3.82-3.74(m,1H),3.60(ddd,J=9.8,4.4,2.0 Hz,1H),3.38(s,3H),3.23(s,3H),3.16-3.11(m,1H),2.94-2.85(m,1H),2.84(s,3H),2.66(s,3H),2.55-2.43(m,2H),2.16(s,3H),1.96-1.90(m,1H),1.89-1.74(m,2H),1.37(d,J=7.0Hz,3H),1.32(d,J=6.6Hz,3H),1.19(d,J=6.5Hz,3H),1.17(d,J=6.0Hz,3H),1.12(d,J=7.7Hz,3H),1.06(d,J=6.8Hz,3H),0.96(d,J=6.6Hz,3H),0.88(d,J=6.6Hz,3H),0.85(d,J=7.0Hz,3H),0.77(d,J=6.5Hz,3H)。

[1243] 实例3-2:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-2-乙酰胺基-3-羟基-4-甲基戊酸酯(A2)的产生方法

[1244]



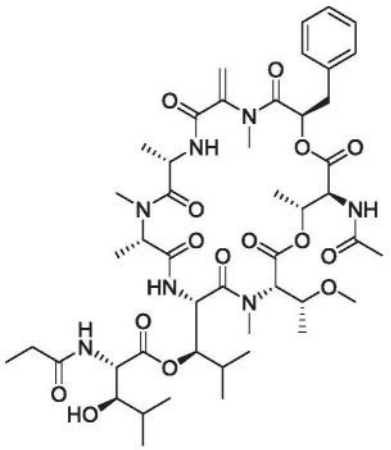
(A2)

[1245] 化合物(A2)是使用[M.Taniguchi等人,Tetrahedron[四面体快报]59(2003)4533-4538]中描述的方法获得的。使用实例3-1中针对化合物(A1)所述的方法进行分离。然后通过UPLC-UV-HRMS、1D-NMR-和2D-NMR-实验对材料进行表征。化合物(A2):保留时间:4.20min,分子式[M+H]+:C46H70N7O15+,计算的单一同位素质量[M+H]+:960.4924Da,观察到的质量:960.4914Da。^{1}H NMR(600MHz,1,4-二噁烷-d_8)δ8.36(d,J=9.2Hz,1H),7.37(d,J

＝10.0Hz,1H),7.31-7.21(m,4H),7.21-7.16(m,2H),6.79-6.72(m,2H),5.40-5.37(m,1H),5.36-5.33(m,1H),5.30-5.28(m,2H),5.20(dd,J＝9.0,3.7Hz,1H),5.13(d,J＝1.9Hz,1H),5.04(dd,J＝9.9,1.4Hz,1H),4.89-4.82(m,1H),4.73(q,J＝6.9Hz,1H),4.39(dd,J＝8.0,2.0 Hz,1H),4.04(d,J＝9.9Hz,1H),3.80-3.73(m,1H),3.65(ddd,J＝9.8,4.3,1.9Hz,1H),3.37(s,3H),3.21(s,3H),3.11(dd,J＝14.7,3.7Hz,1H),2.89(dd,J＝14.7,8.9Hz,1H),2.84(s,3H),2.62(s,3H),2.14(s,3H),2.12(s,3H),1.99-1.90(m,1H),1.75-1.69(m,1H),1.35(d,J＝6.8Hz,3H),1.30(d,J＝6.5Hz,3H),1.18-1.14(m,6H),1.11(d,J＝6.5Hz,3H),1.04(d,J＝6.7Hz,3H),0.86(d,J＝6.8Hz,3H),0.78(d,J＝6.6Hz,4H)。

[1246] 实例3-3:(R)-1-((3S,6S,9S,12S,18R,21S,22R)-21-乙酰胺基-18-苄基-3-((R)-1-甲氧基乙基)-4,9,10,12,16,22-六甲基-15-亚甲基-2,5,8,11,14,17,20-七氧代-1,19-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂环二十二烷-6-基)-2-甲基丙基(2S,3R)-3-羟基-4-甲基-2-丙酰胺基戊酸酯(A3)的产生方法

[1247]



(A3)

[1248] 化合物(A3)是使用[M.Taniguchi等人,Tetrahedron[四面体快报]59(2003)4533-4538]中描述的方法获得的。使用实例3-1中针对化合物(A1)所述的方法进行分离。然后通过UPLC-UV-HRMS、1D-NMR-和2D-NMR-实验对材料进行表征。化合物(A3):保留时间:4.42min,分子式[M+H]+:C47H72N7O15+,计算的单一同位素质量[M+H]+:974.5081Da,观察到的质量:974.5098Da。^{1}H NMR(600MHz,1,4-二噁烷-d_8)δ8.37(d,J＝9.1Hz,1H),7.38(d,J＝9.9Hz,1H),7.31-7.23(m,4H),7.22-7.16(m,1H),7.12(d,J＝7.7Hz,1H),6.78-6.72(m,2H),5.41-5.33(m,2H),5.32-5.26(m,2H),5.20(dd,J＝8.8,3.7Hz,1H),5.12(d,J＝2.2Hz,1H),5.04(dd,J＝9.9,1.7Hz,1H),4.89-4.81(m,1H),4.72(q,J＝7.0 Hz,1H),4.40(dd,J＝7.8,2.1Hz,1H),4.04(d,J＝9.8Hz,1H),3.81-3.73(m,1H),3.68-3.64(m,1H),3.38(s,3H),3.21(s,3H),3.11(dd,J＝14.6,3.7Hz,1H),2.89(dd,J＝14.7,8.9Hz,1H),2.83(s,3H),2.62(s,3H),2.51-2.41(m,2H),2.14(s,3H),1.99-1.89(m,1H),1.78-1.68(m,1H),1.34(d,J＝6.9Hz,3H),1.30(d,J＝6.5Hz,3H),1.18-1.14(m,6H),1.13-1.08(m,6H),1.04(d,J＝6.7Hz,3H),0.86(d,J＝6.8Hz,3H),0.78(d,J＝6.6Hz,3H)。

[1249] 实例4:抗PMEL17抗体药物缀合物的产生方法

[1250] 将抗体与RMP蛋白A树脂(GE)以10mg Ab比1ml树脂的比例在PBS中一起孵育15分钟,同时在适当大小的一次性柱中混合。添加半胱氨酸HCl至终浓度为20mM,并在室温伴随搅动孵育30分钟,以使反应性半胱氨酸解粘连。用50倍柱体积的PBS在真空歧管上快速洗涤

树脂。然后将树脂重悬在含有250nM $CuCl_2$的等体积PBS中。通过采取时间点来监测抗体链间二硫键的重新形成。在每个时间点,除去25μL树脂浆液,添加1μL 20mM的化合物(B1)或化合物(B2),并将管轻弹几次。旋转沉降树脂,除去上清液,然后用50μL抗体洗脱缓冲液(赛默飞世尔公司(Thermo))洗脱。沉淀树脂,并使用安捷伦PLRP-S4000A 5um,4.6x 50mm柱(缓冲液A为水、0.1%TFA,缓冲液B乙腈、0.1%TFA,柱保持在80C,流速1.5ml/min)通过反相色谱法分析上清液。

[1251] 一旦确定抗体已重新形成其链间二硫键,则用10倍柱体积的PBS洗涤树脂,并将树脂重悬于等体积的PBS中,并添加8当量的在DMSO中的接头-有效负载(20mM),然后在室温下孵育2小时。然后用50倍柱体积的PBS洗涤树脂。用抗体洗脱缓冲液从蛋白A树脂洗脱ADC,并用1/10体积的1M Tris pH 9.0中和。然后将ADC缓冲液更换为PBS或其他合适的缓冲液,并根据需要进行制备型尺寸排阻色谱法以去除聚集物(S200 Increase;GE公司)。进行了以下分析:分析型SEC以确定单体百分比,质谱以确定DAR,LAL试验以确定内毒素载荷,以及蛋白浓度由A280利用消光系数和抗体分子量确定。

[1252] 实例5:GNAQ/11抑制剂化合物(A1)和化合物(A2)的体外抗葡萄膜黑色素瘤活性

[1253] 将92.1葡萄膜黑色素瘤和MIAPACA胰腺导管腺癌细胞以低细胞密度接种在96孔板中,并按指示用浓度增加的化合物(A1)或化合物(A2)处理。药物处理96或120小时后,使用基于刃天青($_{resa}zuri_n$)的活力测定法测定细胞活力和增殖。简而言之,将细胞与基于刃天青的溶液一起孵育,并通过分光光度计的吸光度检测颜色变化,并将其用作细胞活力的读数。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)。表4显示了化合物(A2)和化合物(A1)的生长抑制50%(GI_{50})。化合物(A2)和化合物(A1)显示出有效的靶标依赖性抗UM活性(图1)。

[1254] 表4.化合物(A1)和化合物(A2)在UM细胞中的生长抑制活性

[1255]

细胞系	突变	化合物(A1) GI_{50} nM	化合物(A2) GI_{50} nM
92.1	$GNAQ^{Q209L}$	0.18	7.7
MIAPACA	WT	> 10 μM	> 10 μM

[1256] 实例6:化合物(A1)和化合物(A2)诱导葡萄膜黑色素瘤细胞的细胞凋亡

[1257] 将92.1和MIAPACA细胞接种到96孔板中(5000个细胞/孔),并按指示用浓度增加的化合物(A1)、化合物(A2)和固定剂量的星形孢菌素(100nM,阳性对照)处理。药物处理96小时后,使用偶联至荧光染料的$Annexi_n$ V抗体对细胞进行荧光激活的流式细胞术。数据表示为3次独立重复的平均值。化合物(A2)和化合物(A1)以GNAQ/11依赖性方式诱导UM细胞的细胞凋亡(图2)。

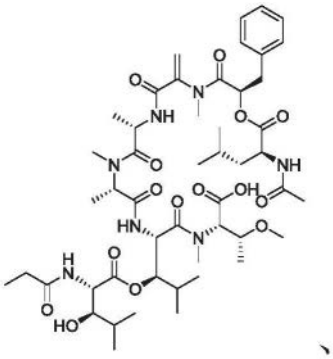
[1258] 实例7:葡萄膜黑色素瘤细胞中化合物(A1)和化合物(A2)对GNAQ/11抑制的分析

[1259] 按指示用浓度增加的化合物(A1)或化合物(A2)处理92.1葡萄膜黑色素瘤。药物过夜处理,使用TR-FRET(时间分辨的荧光共振能量转移)处理细胞以确定IP1水平,或通过蛋白质印迹法确定蛋白质水平。图3A显示了在用DMSO(对照)、化合物(A2)或化合物(A1)处理的92.1细胞中的IP1水平($_nM$)。图3B显示了在化合物(A1)处理的92.1细胞中IP1水平和相对

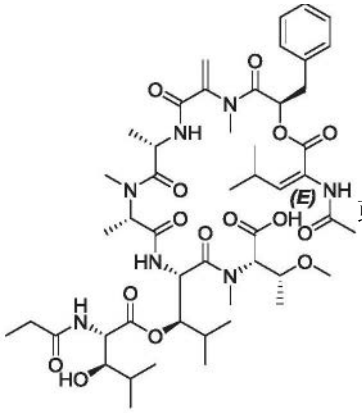
增殖之间的相关性。图3C显示了用化合物(A1)和化合物(A2)处理的92.1细胞的免疫印迹，以确定对ERK信号传导的作用。

[1260] 实例8:化合物(A1)的代谢稳定性和PK特性

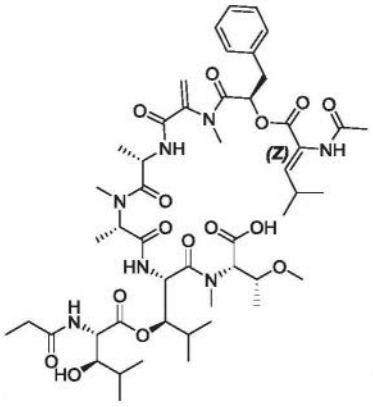
[1261] 在小鼠、大鼠、猴和人血浆中研究了化合物(A1)的血浆稳定性，并与缓冲液进行了比较。在24小时期间监控化合物(A1)的消失(图4A)以及具有化合物(A4)



化合物(A6)



或化合物(A8



)的结构的化合物(A1)的开环形式的出现(图4B)。与其他物种相比，人血浆中的转化似乎略快。除大鼠外，添加%剩余化合物(A1)和%形成的化合物(A8)显示24小时期间的化学计量，表明其他转化看起来不起重要作用(图4C)。

[1262] 在小鼠中静脉内给药后，化合物(A1)的PK的特征在于非常高的清除率和中至高的分布体积。0.2-0.8mg/kg的范围内观察到随剂量变化的暴露呈轻微超比例增加(图4D)。以下示出总结了所有PK值的表5。

[1263] 表5.化合物(A1)的PK特性

[1264]

	剂量（mg/kg）		
	0.2	0.4	0.8
Cmax（nM）	31	83	240
Cmax/D（nM/（mg/kg））	156	208	300

[1265]

AUCinf（nM*h）	16	47	137
AUCinf/D（nM*h/（mg/kg））	82	118	171
C0（nM）	43	108	380
C0/D(nM/(mg/kg))	217	270	475
CL [mL/min/kg]	204	141	97
Vss [L/kg]	8.6	4.9	4.6

[1266] 实例9:化合物(A2)的代谢稳定性和PK特性

[1267] 在来自不同物种的血浆和血液中测试化合物(A2)的体外稳定性(图5A)。化合物(A2)在三种不同的系统中均显示出良好的化学稳定性(图5B)。在雌性balb/c小鼠中,化合物(A2)的PK表现出高清除率和短消除半衰期(图5C)。表6总结了一些PK值。化合物(A2)在小鼠、大鼠和人的肝微粒体中显示高的固有清除率,但在肝细胞中显示低的清除率,这可能是由于有限的膜通透性所致(表7)。化合物(A2)在肝S9级分中和血浆中的孵育显示出相似的半衰期。化合物(A2)和化合物(A1)在pH 5.6的缓冲液和在溶酶体中在4小时期间是稳定的(图5D)。

[1268] 表6.雌性balb/c小鼠(1mg/kg iv)中化合物(A2)的PK特性

[1269]

CL(mL • min^{-1} • kg^{-1})	175±29
$t_{1/2}$(h)	0.4±0.01
AUC i.v.d.n.(nM • h)	101±16

[1270] 表7.化合物(A2)的稳定性

[1271]

	小鼠	大鼠	人
肝微粒体（ul/min/kg）	107	33	44
肝细胞（ul/min/10^6个细胞）	-	8	<4
肝 S9 (+/- NADPH) t1/2（h）	1.9/> 2	> 2/> 2	1.9/> 2

[1272]

血浆 t1/2（h）	2.1	4.1	2.0

[1273] 实例10:抗PMEL17-(B1)ADC的体外抗葡萄膜黑色素瘤活性

[1274] 将亲本和非靶向对照(NT)转导的或PMEL17-shRNA转导的92.1细胞以低细胞密度接种在96孔板中,并按指示用浓度增加的3207-(B1)(同种型对照)、G4-(B1)、和G1-(B1),在存在或不存在强力霉素的情况下处理。药物处理96或120小小时后,使用基于刃天青的活力测定法测定细胞活力和增殖。简而言之,将细胞与基于刃天青的溶液一起孵育,并通过分光

光度计的吸光度检测颜色变化,并将其用作细胞活力的读数。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)(图6)。抗PMEL17-(B1)ADC以PMEL17和剂量依赖性方式抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖。

[1275] 实例11:抗PMEL17＝(B1)ADC诱导葡萄膜黑色素瘤细胞的细胞凋亡

[1276] 将92.1细胞接种到96孔板中(5000个细胞/孔),并按指示用浓度增加的化合物(A1)、3207-(B1)(同型对照)、G4-(B1)和G1-(B1)处理。药物处理96小时后,使用偶联至荧光染料的Annexi$_n$ V抗体对细胞进行荧光激活的流式细胞术。数据表示为3次独立重复的平均值。G4-(B1)和G1-(B1)均以剂量依赖性方式诱导92.1细胞的细胞凋亡(图7)。

[1277] 实例12:抗PMEL17＝(B2)ADC和抗PMEL17 mAb的体外抗葡萄膜黑色素瘤活性

[1278] 将92.1葡萄膜黑色素瘤细胞以低细胞密度接种到96孔板中,并按指示用浓度增加的3207-(B2)(同种型对照)、G4-(B2)和G1-(B2)以及抗PMEL17-B1和-G4 mAb处理。药物处理96或120小时后,使用基于刃天青的活力测定法测定细胞活力和增殖。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)(图8)。抗PMEL17-(B2) ADC和抗PMEL17mAb在葡萄膜黑色素瘤细胞中表现出最小的抗增殖作用。

[1279] 实例13:葡萄膜黑色素瘤细胞中抗PMEL17＝(B1)和抗PMEL17＝(B2)ADC对GNAQ/11抑制的分析

[1280] 按指示将92.1葡萄膜黑色素瘤细胞用DMSO、化合物(A1)(8$_n$M)和浓度增加的同种型-(B1)、抗PMEL17-(B1)和抗PMEL17-(B2)ADC处理。药物处理2天后,使用TR-FRET(时间分辨荧光共振能量转移)处理细胞以确定IP1水平。IP1水平(nM)表示为3次独立重复的平均值。如IP1水平降低所表明的,G1-(B1)和G1-(B2)均以剂量依赖性方式抑制突变型GNAQ和GNA11(图9)。

[1281] 实例14:抗PMEL17抗体与完整血小板和葡萄膜黑色素瘤细胞的结合分析

[1282] 使用抗PMEL17抗体G1(黑线)和G4(灰线)以及缀合至荧光染料的抗人IgG第二抗体,或仅使用缀合的第二抗体,将葡萄膜黑素瘤细胞系92.1和从人类富含血小板血浆(来自3个人类供体的PRP)中分离的血小板进行荧光激活流式细胞术(图10)。与92.1葡萄膜黑色素瘤细胞相反,人血小板未显示PMEL17的细胞表面表达。

[1283] 实例15:化合物(A1)和抗PMEL17-(B1)ADC对人血小板聚集的影响

[1284] 将人类富血小板血浆(PRP)和ADC 17A9-(B1)、与B1或化合物(A1)(0.1、1和150$_n$M)缀合的抗PMEL Ab一起孵育4、16或24h。然后在用32$_u$M的凝血酶受体激活肽6(TRAP6)处理后测量血小板聚集。尽管化合物(A1)诱导了血小板聚集,但抗PMEL17-(B1)直到24小时都没有诱导血小板聚集(图11)。

[1285] 实例16:抗PMEL17-(B1)ADC抑制小鼠模型中的肿瘤生长

[1286] 将携带92.1-荧光素酶皮下异种移植物的雌性裸鼠用单次静脉注射指定剂量的3207-(B1)、G1-(B1)或媒介物处理。肿瘤接种后17天进行处理(单剂量静脉注射)。值为平均值±SEM;样品量(n＝5-12只小鼠/组)。第0天的初始肿瘤体积约为200-250mm^3。G1-(B1)以剂量依赖性方式抑制肿瘤生长(图12A)。

[1287] 在指定的剂量下监测G1-(B1)处理后的雌性初治裸鼠的体重变化。在第0天进行处理(单剂量静脉注射)。值为平均值±SEM;样品量(n＝4只小鼠/组)。在第0天的初始体重约为24g。药物处理后每天测量体重持续14天。处理后长达14天未观察到体重减轻(图12B)。

[1288] 对来自用媒介物、3207-(B1)(7.5mg/kg体重)或G1-(B1)(7.5mg/kg体重)处理的92.1-荧光素酶皮下异种移植物的肿瘤组织进行了免疫组织化学分析。在室温下,将肿瘤在10%(vol/vol)的中性福尔马林缓冲液中固定24小时,然后在PBS中冲洗,进行脱水处理,清除并包埋在石蜡中。制备3μm切片并进行苏木精和伊红(H&E)染色以及免疫组织化学处理。使用用于进行抗hIgG(赛默飞世尔(ThermoFischer))和抗gp100(PMEL17)(克隆EP4863;艾博抗公司(Abcam))染色的Bond-RX(莱卡集团(Leica))全自动系统,以及用于进行抗Ki67(克隆Sp6;NeoMarkers公司)、抗pERK1/2(克隆D13.14.4E;细胞信号传导公司(Cell Signaling))、抗MITF(西格玛公司)和抗裂解的半胱天冬酶-3(细胞信号传导公司)染色的Discovery XT(文塔纳医疗系统公司(Ventana Medical System))全自动系统,对福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片进行免疫组织化学染色。简而言之,G1-(B1)处理分别导致GNAQ信号传导抑制和肿瘤细胞增殖抑制,如pERK和Ki67水平降低所指示(图12C)。此外,与媒介物处理的和3207-(B1)处理的小鼠相比,G1-(B1)诱导细胞凋亡,这与通过IgG染色检测到的G1-(B1)ADC的肿瘤细胞累积有关(图12C)。G1-(A1)处理后未观察到MITF和PMEL17水平发生变化(图12C)。

[1289] 测试了用媒介物、G1-(B1)(20mg/kg体重)或化合物(A1)(0.01、0.03、0.1和0.3mg/kg体重)处理的初治小鼠的全血血小板聚集。单次静脉内给药后5分钟对动物实施安乐死并通过腔静脉收集血液。1h后,以6.5$_u$M的ADP激活血小板后,测量全血聚集(图12D)。与化合物(A1)相反,G1-(B1)在体内对ADP诱导的血小板聚集没有任何显著影响。

[1290] 在给药后24h或7天,测量了用媒介物和G1-(B1)(7.5和30mg/kg体重)处理的初治小鼠的全血血小板聚集。单次静脉内给药后24h或7天对小鼠实施安乐死并通过腔静脉收集血液。1h后,以6.5$_u$M的ADP激活血小板后,测量全血聚集。在长达7天的时间里,在G1-(B1)处理的小鼠中未观察到血小板聚集抑制(图12E)。

[1291] 实例17:G1-(B1)对葡萄膜黑色素瘤的肝和肺转移小鼠模型的影响

[1292] 给雌性NOD-Scid小鼠静脉注射92.1-荧光素酶细胞(约200万个细胞/只动物),每周两次测量生物发光以评估肿瘤形成。45天后,如通过生物发光信号(BLI)检测到的,所有注射的小鼠均发生肝和肺转移(图13A和13B)。用单次静脉注射G1-(B1)(20mg/kg体重)处理携带肿瘤的小鼠,且随时间监测生物发光作为肿瘤进展的读数。静脉注射92.1-荧光素酶细胞(就在开始处理之前)后第45天和治疗后12天(图13A和13B),呈现每只小鼠的单独图片;样品量(n=6只小鼠/组)。在第0天肝转移的初始BLI约为$2.8*10^9$p/sec/cm^2。黑色箭头表示图13B中的肺部肿瘤(生物发光信号)。如体内和离体生物发光减少所表明的,G1-(B1)在单次静脉注射剂量20mg/kg后诱导肝和肺转移的消退。

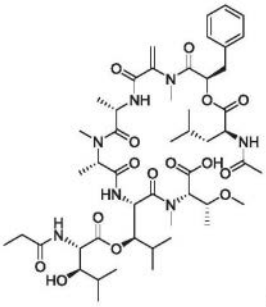
[1293] 在用20mg/kg G1-(B1)进行处理之前和之后,每周评估2-3次相应的体重调节(相对于第15天的%)(灰色圆圈)。值为平均值±SEM;样品量(n=5-6只小鼠/组)。第15天的初始体重约为21g。在葡萄膜黑色素瘤的肝和肺转移模型中,G1-(B1)处理可导致体重恢复。

[1294] 实例18:G1-(B1)ADC的PK特性。

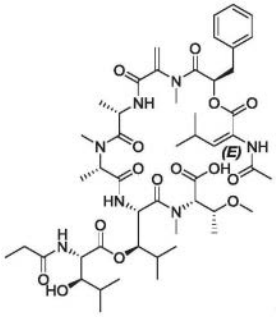
[1295] G1-(B1)的药代动力学曲线显示裸鼠的剂量在7.5至30mg/kg之间时,暴露呈轻微超比例增加(图14A)。清除、分布体积和半衰期在ADC的典型范围内。表8总结了一些PK值。

[1296] 在携带肿瘤的小鼠中,给药靶结合G1-(B1)或同种型对照3207-(B1)后测量游离有效负载浓度。使用靶向ADC可以观察到化合物(A1)有效负载的肿瘤递送明显增加(>4倍)(图

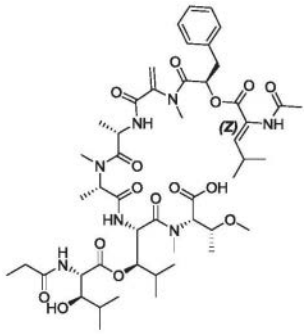
14B)。在小鼠体内显示出在与抗体缀合的同时化合物(A1)(空心圆圈)向其具有化合物(A4)



化合物(A6)



或化合物(A8)



的结构的化合物(A1)的开环形式(实心圆圈)的转化(图14C)。将两种不同的DAR2格式与G1-(B1)的DAR4格式以及与DAR4 Fc-沉默格式进行比较,体内功效研究中的暴露显示DAR2(E152C)和DAR4 Fc-沉默ADC的清除率最低,而DAR2(S375C)暴露下降得更快(图14D)。通过比较非靶向3207-ADC的PK(图14E),可以推断出Fc沉默对降低DAR4形式的清除率具有显著作用。

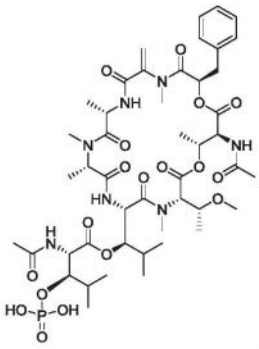
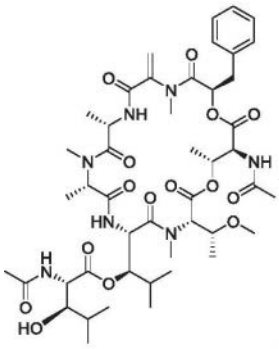
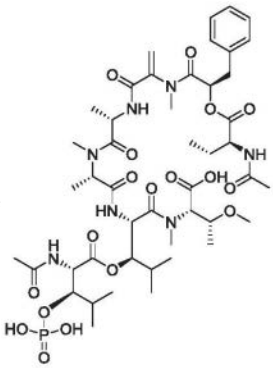
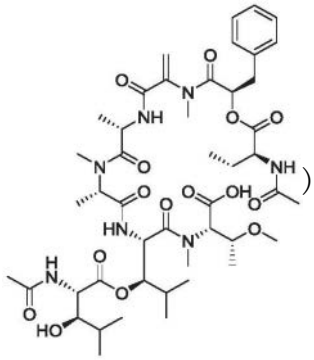
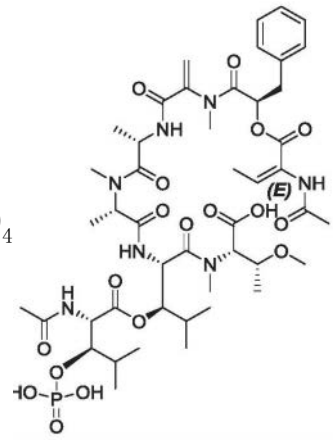
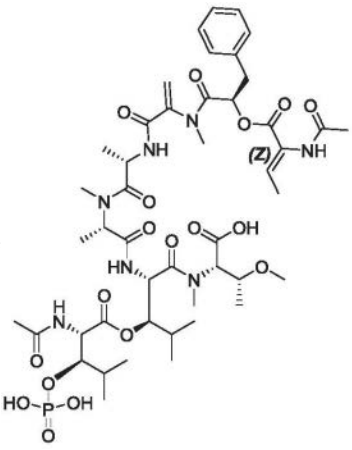
[1297] 表8.G1-(B1)ADC的PK特性

[1298]

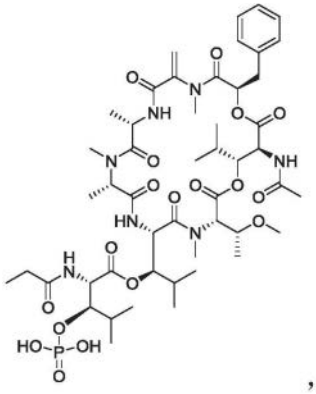
裸鼠 - 剂量(mg/kg)	7.5	30
AUC_{last} (ug/mL*h)	6`779 ± 1`061	45`346 ± 3`785
AUC_{last} (ug/mL*h) 剂量标准化	904	1`511
AUC_{inf} (ug/mL*h)	9`211 ± 2`337	73`680 ± 9`867
AUC extrap (%)	25 ± 9	38 ± 3
CL (mL/h/kg)	0.9 ± 0.3	0.4 ± 0.05
Vz (L/kg)	0.21 ± 0.01	0.15 ± 0.01
app. t_{elim} (h)	176 ± 37	259 ± 25

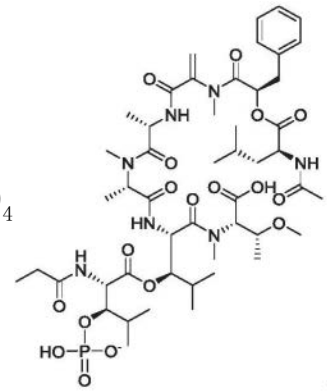
[1299] 实例19:抗PMEL17-GNAQ/11i ADC在缓冲液、小鼠、大鼠和人血浆中的体外稳定性以及抗PMEL17-GNAQ/11i ADC在小鼠中的体内稳定性

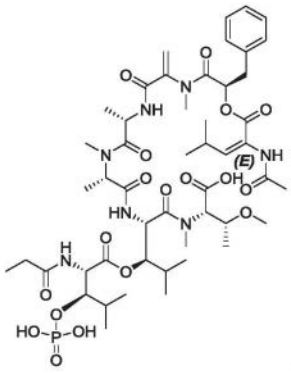
[1300] 将抗PMEL17G1_E152C_S375C_(B2)(G1-(B2))以100μg/mL掺入各自的基质中,并在37℃下孵育。通过在-70℃下快速冷冻,分别在0、1、2和4小时收集样品。使用Capture Select FcXL磁珠对每个样品的等分试样进行免疫沉淀,并与含有木瓜蛋白酶的缓冲液一起孵育,以从磁珠捕获的ADC中释放出负载。然后通过HPLC MS分析释放的有效负载,以确定

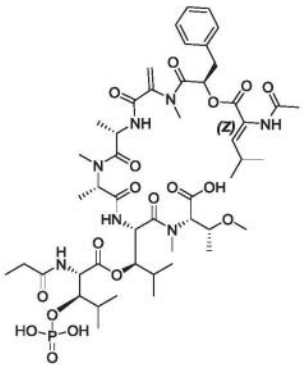
化合物(A2)-PO_4(即来自参见实例1.2),以及具有化合物(A5)-PO_4(即化合物(A5)-PO_4来自)、化合物(A7)-PO_4或化合物(A9)-PO_4(其中开环的化合物(A2)-PO_4-失活有效负载)的结构的开环化合物(A2)-PO_4的相对水平。该图描述了在实验的时间进程中作为化合物(A2)-PO_4存在的释放的有效负载的百分比(图15A)。

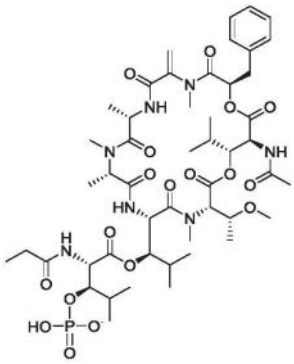
[1301] 抗PMEL17G1_E152C_S375C_(B1)(G1-(B1))、抗PMEL17G1_E152C_(B1)(G1-E152C-DAR2-(B1))、抗PMEL17G1_S375C_(B1)(G1-S375C-DAR2-(B1))、和Fc-沉默抗PMEL17G1_E152C_S375C_(B1)(Fc-沉默G1-(B1))以100μg/mL掺入各自的基质中,并在37℃下孵育。通过在-70℃下快速冷冻,分别在0、2、4和6小时收集样品。使用Capture Select FcXL磁珠对每个样品的等分试样进行免疫沉淀,并与含有木瓜蛋白酶的缓冲液一起孵育,以从磁珠捕获的ADC中释放出负载。然后通过HPLC MS分析释放的有效负载,以确定化合物(A1)-PO_4、


以及具有化合物(A4)-PO_4

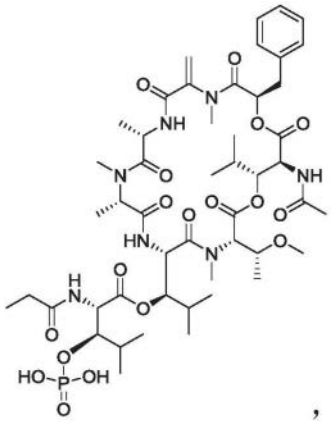

化合物(A6)-PO_4

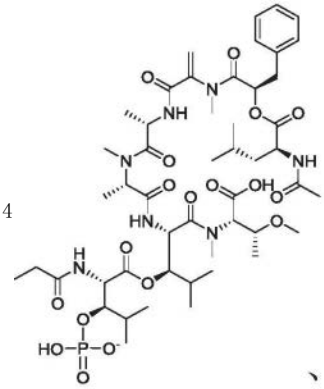

或化合物(A8)-PO_4

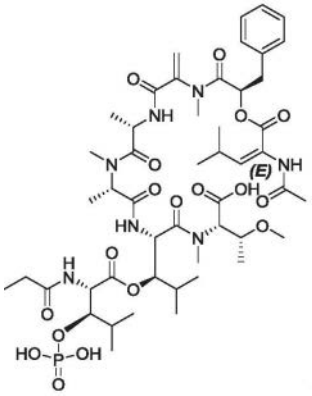

(其中化合物(A1)-PO_4

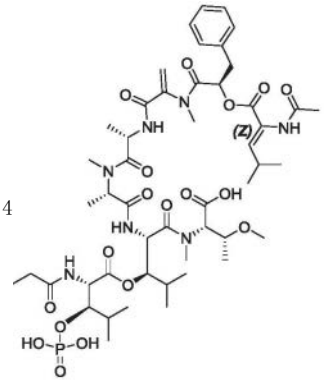

的开环的化合物是-失活有效负载)的结构的开环化合物(A1)-PO_4的相对水平。该图描述了对于每种不同ADC构建体,在实验的时间进程中作为化合物(A1)-PO_4存在的释放的有效负载的百分比(图15B)。

[1302] 在裸鼠中分别以20mg/kg(体重)静脉注射抗PMEL17G1_E152C_S375C_(B1)(G1-(B1))、抗PMEL17G1_E152C_(B1)(G1-E152C-DAR2-(B1))、抗PMEL17G1_S375C_(B1)(G1-S375C-DAR2-(B1))、和Fc-沉默抗PMEL17G1_E152C_S375C_(B1)(Fc-沉默G1-(B1))。给九只小鼠给药上述的每个ADC构建体。在给药后24小时、第7天和第14天,将每组三只动物(ADC构建体)末端放血以收集血清样品用于分析。使用Capture Select FcXL磁珠对每个样品的等分试样进行免疫沉淀,并与含有木瓜蛋白酶的缓冲液一起孵育,以从磁珠捕获的ADC中释放出负载。然后通过HPLC MS分析释放的有效负载,以确定化合物(A1)-PO_4


以及具有化合物(A4)-PO_4


化合物(A6)-PO_4


或化合物(A8)-PO_4


(其中化合物(A1)-PO_4的开环的化合物是-失活有效负载)的结构的开环化合物(A1)-PO_4的相对水平。该图显示了以化合物(A1)-PO_4的活性形式存在于ADC上的有效负载的百分比(假设化合物(A1)-PO_4+化合物(A8)-PO_4=100%)(图15C)。基于体外实验结果估算初始值。

[1303] 实例20:G1-E152C-DAR2-(B1)、G1-S375C-DAR2-(B1)、Fc-沉默G1-(B1)在葡萄膜黑色素瘤的异种移植模型中的体内功效

[1304] 用浓度为7.5mg/kg的3207-E152C_S375C-DAR4-(B1)、G1-E152C_S375C-DAR4-(B1)、G1-E152C-DAR2-(B1)、G1-S375C-DAR2-(B1)、Fc-沉默3207-(B1)、和Fc-沉默G1-DAR4处理携带92.1-荧光素酶皮下异种移植物的雌性裸鼠。肿瘤接种后17天进行处理(单剂量静脉注射)。值代表平均值±SEM;样品量(n=5-6只小鼠/组)。第0天的初始肿瘤体积约为300-325mm^3。(图16)。G1-E152C-DAR2-(B1)、Fc-沉默G1-DAR4、和G1-E152C_S375C-DAR4-(B1)在葡萄膜黑色素瘤的92.1异种移植物模型中表现出相当的抗肿瘤活性,而G1-S375C-DAR2-(B1)和非靶向3207-ADC对肿瘤的生长没有影响。

[1305] 实例21:G1-3J-DAR4-(B1)、G1-3R-DAR4-(B1)、G1-DAR4-(B1)、G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、Fc沉默G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、3207-DAR2(E152C)-(B1)、和G1-DAR2(E152C)-(B1)的体外活性

[1306] 在图17A中,将92.1(左图)和MP41(右图)细胞以低细胞密度接种在96孔板中,并按指示用浓度增加的G1-3J-DAR4-(B1)、G1-3R-DAR4-(B1)、G1-DAR4-(B1)处理。药物处理96或120小时后,使用基于刃天青的活力测定法测定细胞活力和增殖。简而言之,将细胞与基于刃天青的溶液一起孵育,并通过分光光度计的吸光度检测颜色变化,并将其用作细胞活力的读数。数据表示为3次独立重复的平均值,且相对于PBS处理的细胞(对照)。表9描绘了每个ADC和细胞系的GI50(最大抑制细胞增殖50%的浓度)值。抗PMEL17-(B1)ADC以PMEL17和

剂量依赖性方式抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的增殖。

[1307] 表9.G1-3J-DAR4-(B1)、G1-3R-DAR4-(B1)、G1-DAR4-(B1)在UM细胞中的生长抑制活性

[1308]

细胞系	G1-3J-DAR4-(B1) GI_{50} nM	G1-3R-DAR4-(B1) GI_{50} nM	G1-DAR4-(B1) GI_{50} nM
92.1	0.850	0.811	0.722
MP41	0.582	0.654	0.563

[1309] 图17B描绘了在如图17A中所述的具有G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、Fc沉默G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、3207-DAR2(E152C)-(B1)、和G1-DAR2(E152C)-(B1)的92.1细胞系中细胞增殖测定的结果。G150描绘于表10中。

[1310] 表10.G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、Fc沉默G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、3207-DAR2(E152C)-(B1)、和G1-DAR2(E152C)-(B1)在UM细胞中的生长抑制活性

[1311]

细胞系	G1-3J-DAR2 (E152C)-(B1) GI_{50} nM	Fc沉默G1-3J-DAR2 (E152C)-(B1) GI_{50} nM	3207-DAR2 (E152C)-(B1) GI_{50} nM	G1-DAR2 (E152C)-(B1) GI_{50} nM
92.1	0.309	0.278	> 150	0.365

[1312] 实例22:抗PMEL17-(B1)ADC抑制小鼠模型中的肿瘤生长

[1313] 将携带92.1-荧光素酶皮下异种移植物的雌性裸鼠用单次静脉注射指定剂量的3207-(B1)、G1-3J(E152C)、G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、Fc沉默G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)、G1-DAR2(E152C)-(B1)或媒介物处理。肿瘤接种后14-17天进行处理(单剂量静脉注射)。值为平均值±SEM;样品量(n=5-12只小鼠/组)。第0天的初始肿瘤体积约为200-250 $_{mm}3$。G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)和Fc沉默G1-3J-DAR2(E152C)-(B1)以剂量依赖性方式抑制肿瘤的生长(图18)。

[1314] 实例23:来自转移性葡萄膜黑色素瘤患者的肿瘤活检的免疫组织化学分析

[1315] 在室温下,将肿瘤在10%(vol/vol)的中性福尔马林缓冲液中固定24小时,然后在PBS中冲洗,进行脱水处理,清除并包埋在石蜡中。制备3μm切片并进行免疫组织化学处理。使用用于进行抗gp100(PMEL17)(小鼠单克隆HMB45)染色的Bond-RX(莱卡集团)全自动系统,对福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片进行免疫组织化学染色。转移性葡萄膜黑色素瘤样品表现出高且相对同质的PMEL17表达(图19A)。转移性葡萄膜黑色素瘤患者样品中PMEL17表达水平和PMEL17阳性细胞比例的定量(图19B,图19C)。

[1316] 实例24:竞争性结合测定

[1317] 将SPR用于在T200 Biacore仪器(目录号28975001,通用电气医疗生命科学公司集团(GE Healthcare Life Sciences))上评估抗PMEL抗体的表位分级。

[1318] 表面等离子体共振(SPR)是一种在无标记环境中实时测量双分子相互作用的技术。分子被固定在样品溶液流过的传感器表面上。固定分子与流动样品之间的相互作用导

致折射率变化。折射率变化是减小强度的偏振光从支撑玻璃平面反射的角度的改变。该角度变化是由于分子与传感器表面的结合或解离引起的,并且与结合的材料的质量成比例,并且由仪器记录在传感图中。当分子相互作用时,传感图显示出增加的应答,如果相互作用达到平衡,则应答保持恒定,并且当样品被缓冲液替换且相互作用的各方解离时,应答降低。根据缔合和解离事件应答,确定缔合率(ka)、解离率(kd)和总体亲和力(KD)。对于表位分级,未确定KD。

[1319] 在第一步中,将G1 LC 3J和17A9抗体经由胺偶联直接固定在CM5芯片表面上,以分别在Fc2和Fc3上达到大约2000RU。流动小室1上没有固定抗体,可以用作参考Fc。在Fc2和Fc3上的固定抗体是实验中的基础抗体。

[1320] 固定后,第二步中的人PMEL以20nM流经所有流动小室,以30ul/min持续60秒。

[1321] 第三也是最后一步具有单独的G1 LC 3J抗体或G1 LC 3J抗体加流经Fc2的17A9抗体,或者单独的17A9抗体或17A9抗体加流经Fc3的G1 LC 3J抗体(图20A)。抗体以30ul/min以500nM总浓度流过两个流动小室120秒,以进行缔合,随后以30ul/min用运行缓冲液进行120秒的解离相。

[1322] 如所期望的,当G1 LC 3J是基础抗体时,当G13J流过时未观察到任何结合信号。当17A9流过时观察到100RU结合,暗示其结合与G1 LC3J不同的表位(图20B)。当17A9是基础抗体时,观察到相似的趋势。在步骤3中,本身没有观察到结合,但是当G1 LC 3J流过时观察到结合(图20C)。这表明G1 LC 3J和17A9与不同的表位结合。

[1323] 在每个循环结束时对所有流动小室进行再生。再生缓冲液是甘氨酸2.0,其以30μl/min流动30秒。

[1324] 使用Biacore T200评估软件3.0版分析数据。

[1325] 应理解,本文描述的实例和实施例仅用于举例说明目的,其各种修饰或改变对于本领域技术人员将是明了的,并包括在本申请的精神和范围内和所附权利要求书的范围内。

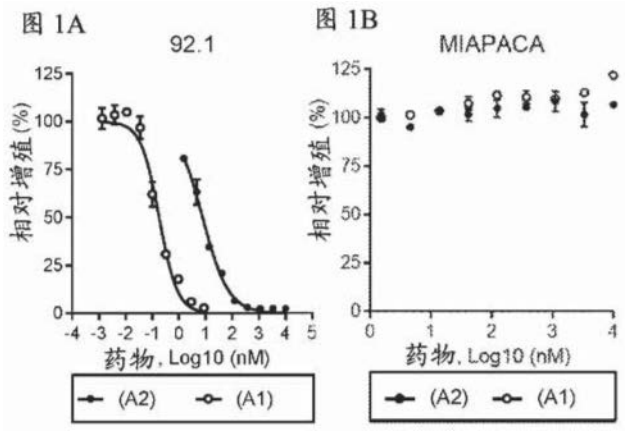

图 1A
92.1
相对增殖 (%)
药物, Log10 (nM)
(A2)
(A1)
图 1B
MIAPACA
相对增殖 (%)
药物, Log10 (nM)
(A2)
(A1)

图1

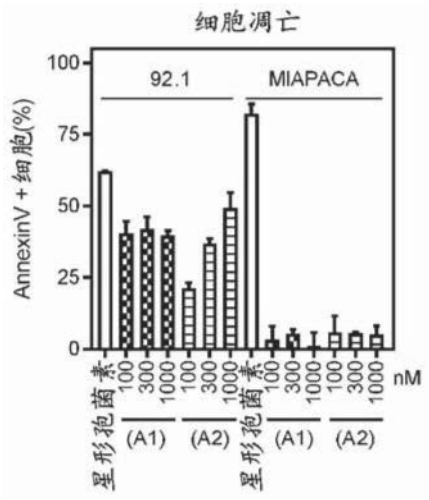

细胞凋亡
92.1
MIAPACA
AnnexinV + 细胞(%)
星形孢菌素
(A1)
(A2)
nM

图2

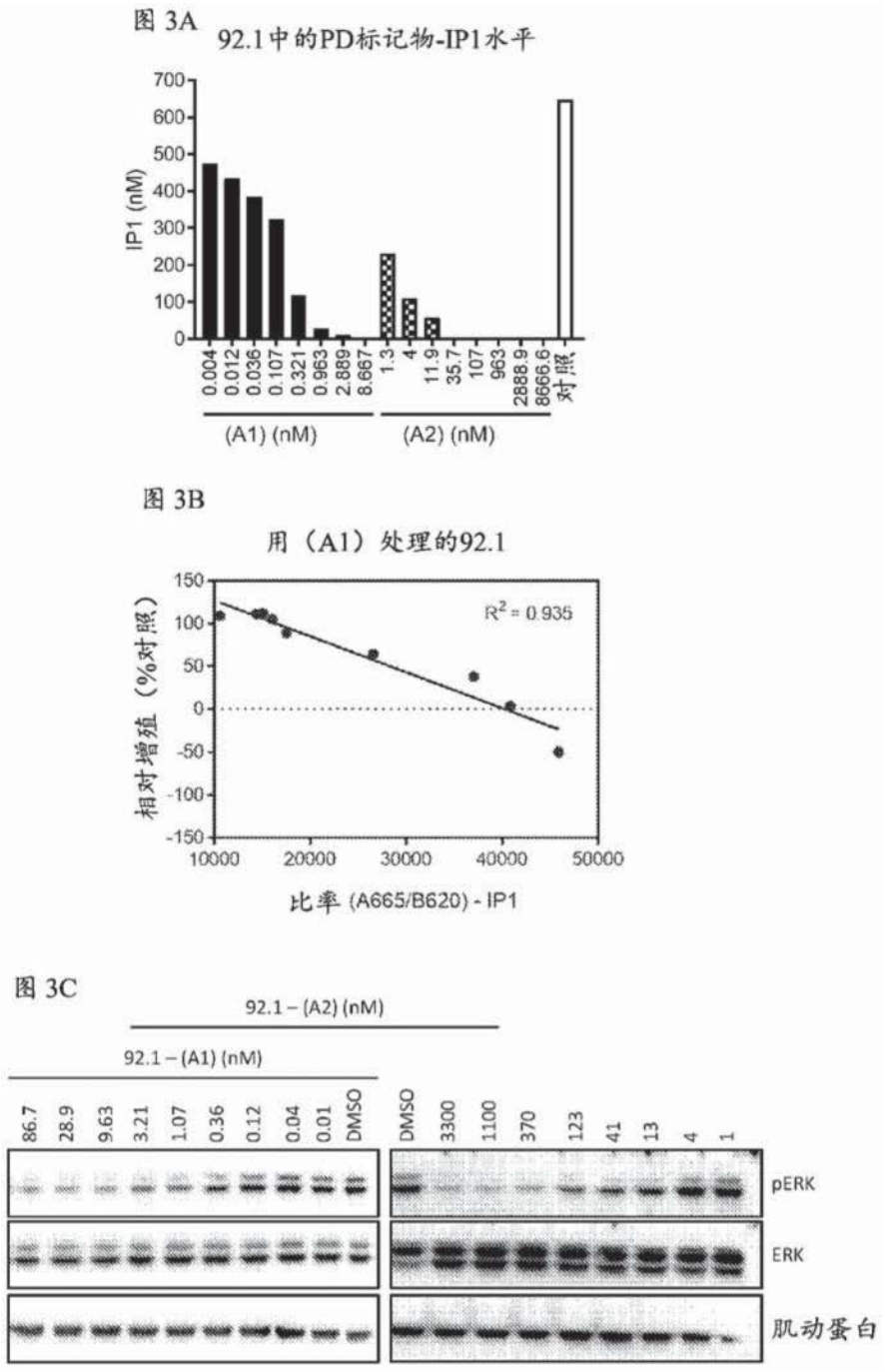

图 3A
92.1中的PD标记物-IP1水平
IP1 (nM)
700
600
500
400
300
200
100
0
0.004
0.012
0.036
0.107
0.321
0.963
2.889
8.667
1.3
4
11.9
35.7
107
963
2888.9
8666.6
对照
(A1) (nM)
(A2) (nM)
图 3B
用（A1）处理的92.1
相对增殖（%对照）
150
100
50
0
-50
-100
-150
R^2 = 0.935
10000
20000
30000
40000
50000
比率 (A665/B620) - IP1
图 3C
92.1 – (A2) (nM)
92.1 – (A1) (nM)
86.7
28.9
9.63
3.21
1.07
0.36
0.12
0.04
0.01
DMSO
DMSO
3300
1100
370
123
41
13
4
1
pERK
ERK
肌动蛋白

图3

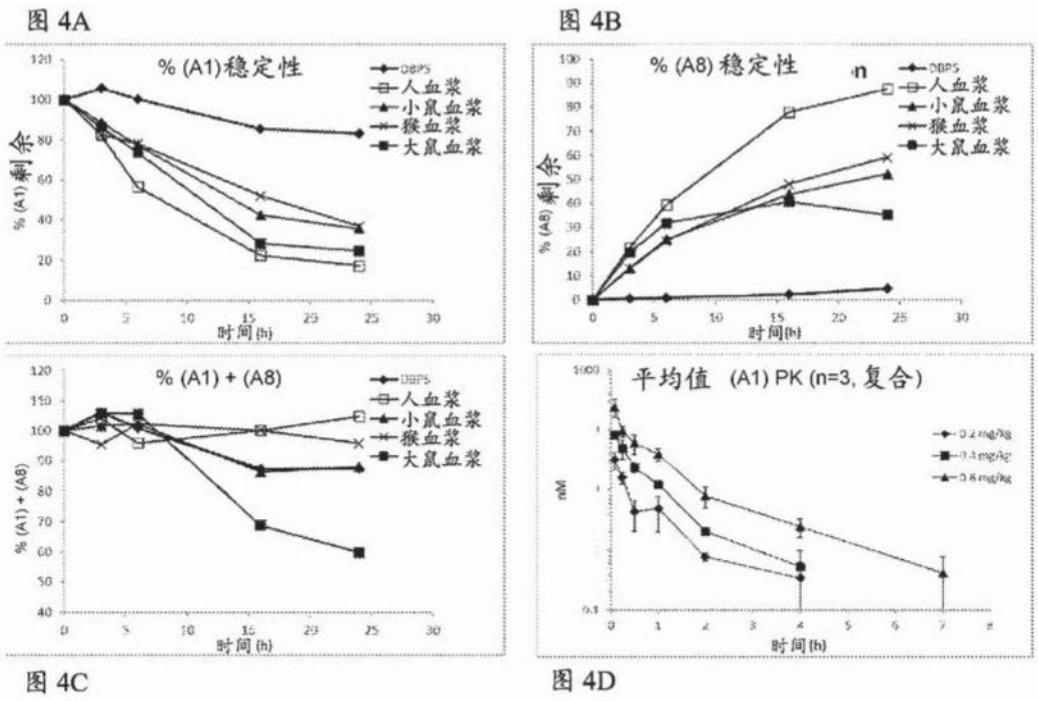

图 4A
% (A1)稳定性
% (A1)剩余
时间(h)
DBPS
人血浆
小鼠血浆
猴血浆
大鼠血浆
图 4B
% (A8) 稳定性
% (A8)剩余
时间(h)
DBPS
人血浆
小鼠血浆
猴血浆
大鼠血浆
图 4C
% (A1) + (A8)
% (A1) + (A8)
时间(h)
DBPS
人血浆
小鼠血浆
猴血浆
大鼠血浆
图 4D
平均值 (A1) PK (n=3, 复合)
nM
时间(h)

图4

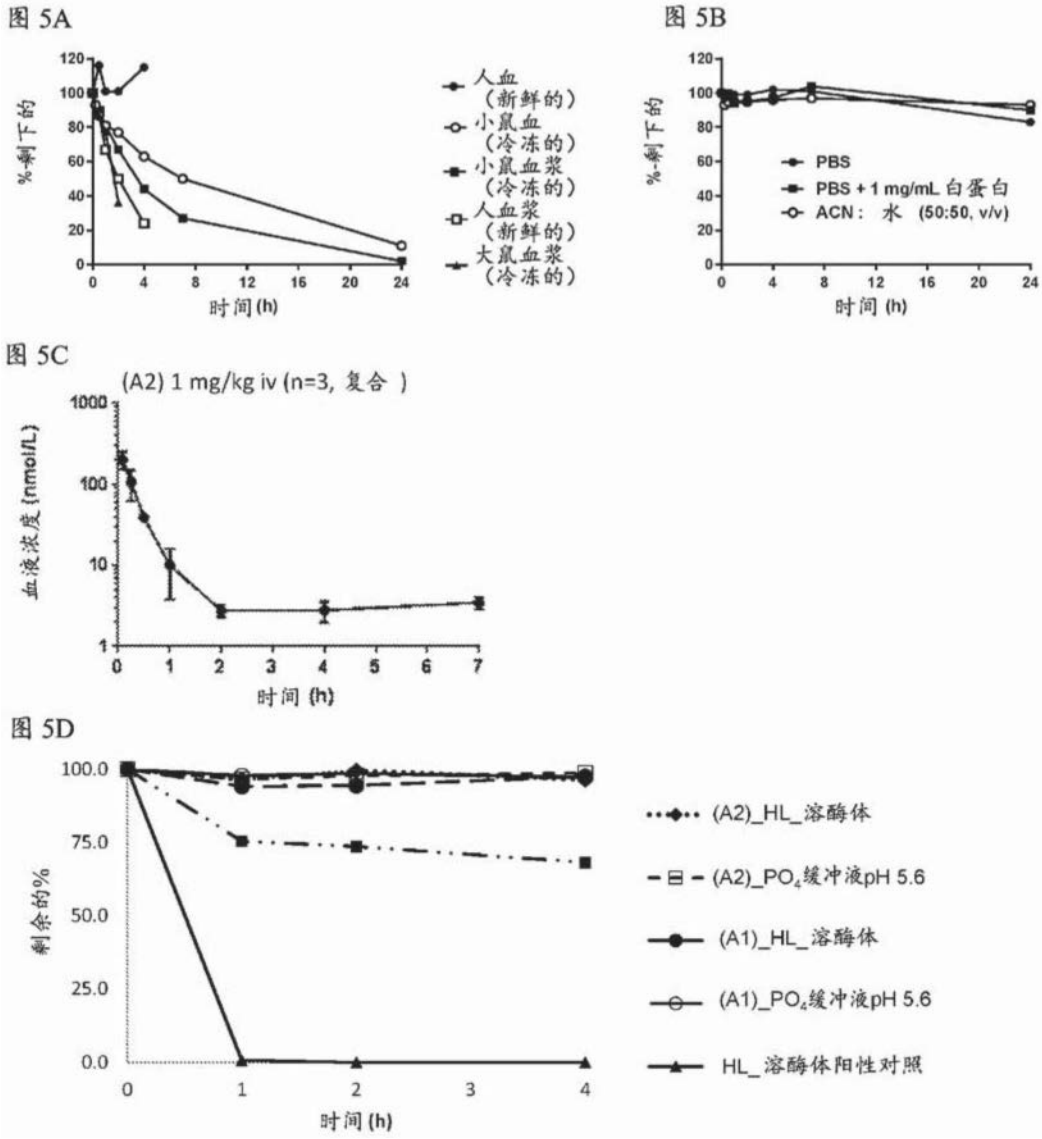

图 5A
%剩下的
时间(h)
人血（新鲜的）
小鼠血（冷冻的）
小鼠血浆（冷冻的）
人血浆（新鲜的）
大鼠血浆（冷冻的）
图 5B
%-剩下的
PBS
PBS + 1 mg/mL 白蛋白
ACN： 水 (50:50, v/v)
时间 (h)
图 5C
(A2) 1 mg/kg iv (n=3, 复合)
血液浓度 (nmol/L)
时间 (h)
图 5D
剩余的%
时间 (h)
(A2)_HL_溶酶体
(A2)_PO4缓冲液pH 5.6
(A1)_HL_溶酶体
(A1)_PO4缓冲液pH 5.6
HL_溶酶体阳性对照

图5

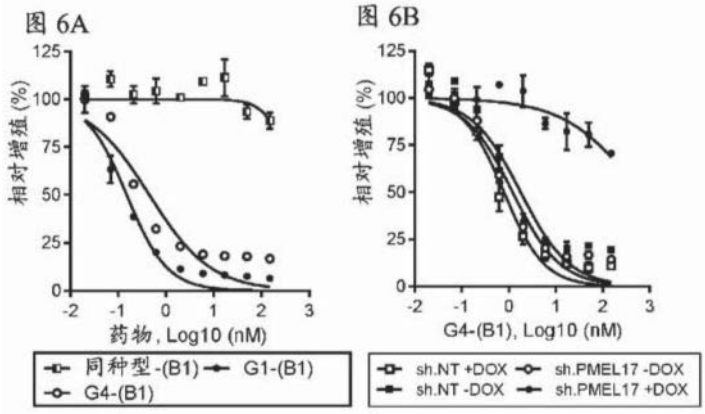

图 6A
相对增殖 (%)
药物, Log10 (nM)
同种型-(B1)
G1-(B1)
G4-(B1)
图 6B
相对增殖 (%)
G4-(B1), Log10 (nM)
sh.NT +DOX
sh.PMEL17 -DOX
sh.NT -DOX
sh.PMEL17 +DOX

图6

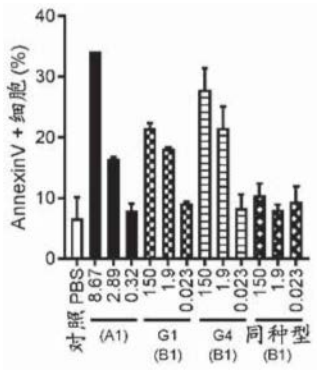

AnnexinV + 细胞 (%)
40
30
20
10
0
对照 PBS
8.67
2.89
0.32
150
1.9
0.023
150
1.9
0.023
150
1.9
0.023
(A1)
G1 (B1)
G4 (B1)
同种型 (B1)

图7

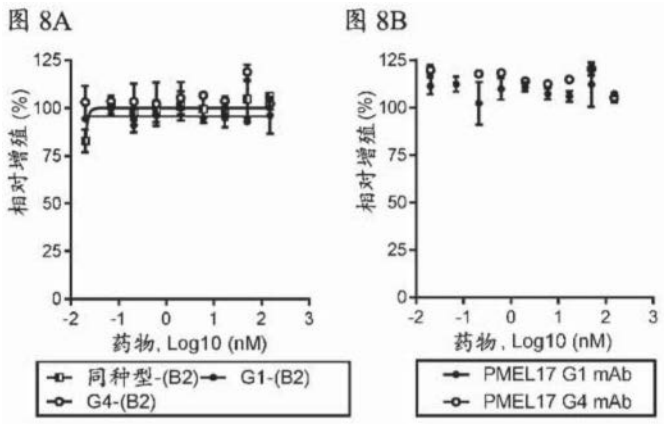

图 8A
相对增殖 (%)
125
100
75
50
25
0
-2
-1
0
1
2
3
药物, Log10 (nM)
同种型-(B2)
G1-(B2)
G4-(B2)
图 8B
相对增殖 (%)
药物, Log10 (nM)
PMEL17 G1 mAb
PMEL17 G4 mAb

图8

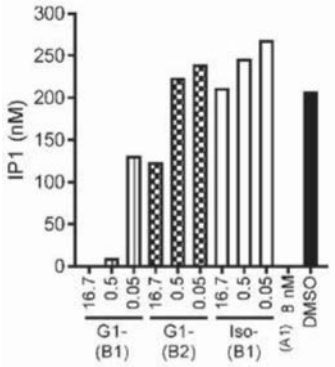

IP1 (nM)
300
250
200
150
100
50
0
16.7
0.5
0.05
16.7
0.5
0.05
16.7
0.5
0.05
8 nM
DMSO
G1- (B1)
G1- (B2)
Iso- (B1)
(A1)

图9

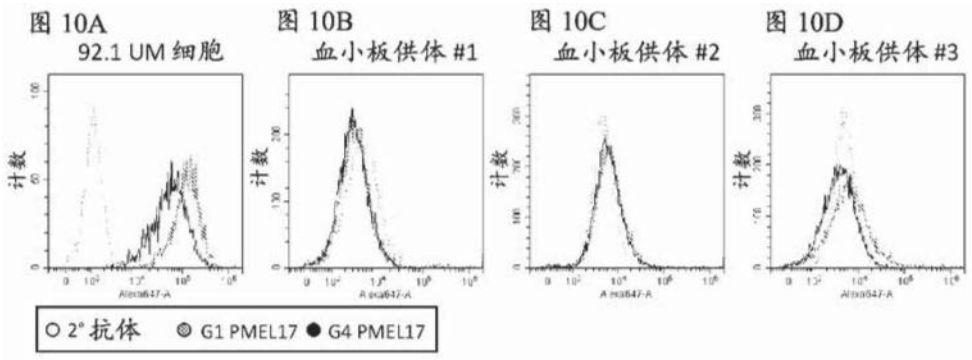

图 10A
92.1 UM 细胞
图 10B
血小板供体 #1
图 10C
血小板供体 #2
图 10D
血小板供体 #3
计数
2° 抗体
G1 PMEL17
G4 PMEL17

图10

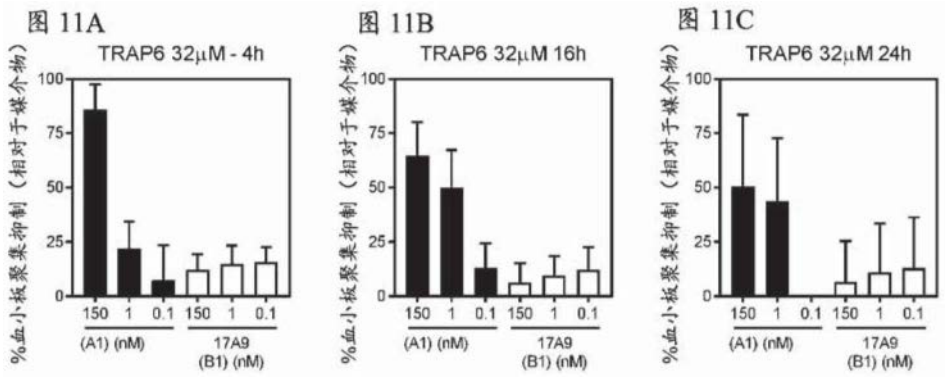

图 11A
TRAP6 32μM - 4h
图 11B
TRAP6 32μM 16h
图 11C
TRAP6 32μM 24h
%血小板聚集抑制（相对于媒介物）
150 1 0.1 150 1 0.1
(A1) (nM)
17A9
(B1) (nM)

图11

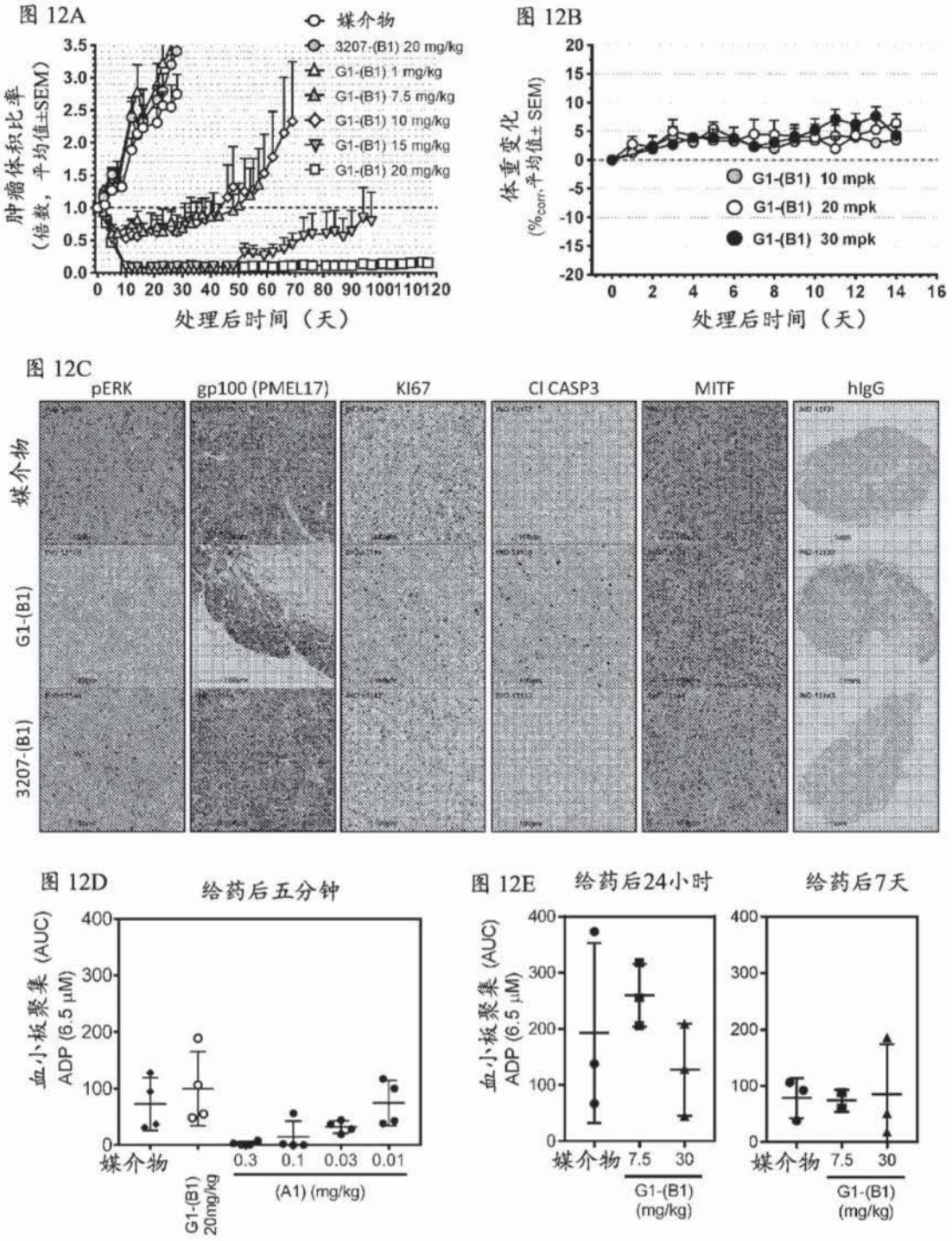

图 12A
媒介物
3207-(B1) 20 mg/kg
G1-(B1) 1 mg/kg
G1-(B1) 7.5 mg/kg
G1-(B1) 10 mg/kg
G1-(B1) 15 mg/kg
G1-(B1) 20 mg/kg
肿瘤体积比率
（倍数，平均值±SEM）
处理后时间（天）
图 12B
体重变化
(%corr.平均值± SEM)
G1-(B1) 10 mpk
G1-(B1) 20 mpk
G1-(B1) 30 mpk
处理后时间（天）
图 12C
pERK
gp100 (PMEL17)
KI67
Cl CASP3
MITF
hIgG
媒介物
G1-(B1)
3207-(B1)
图 12D
给药后五分钟
血小板聚集 (AUC)
ADP (6.5 μM)
媒介物
G1-(B1) 20mg/kg
0.3
0.1
0.03
0.01
(A1) (mg/kg)
图 12E
给药后24小时
给药后7天
血小板聚集 (AUC)
ADP (6.5 μM)
媒介物
7.5
30
G1-(B1) (mg/kg)

图12

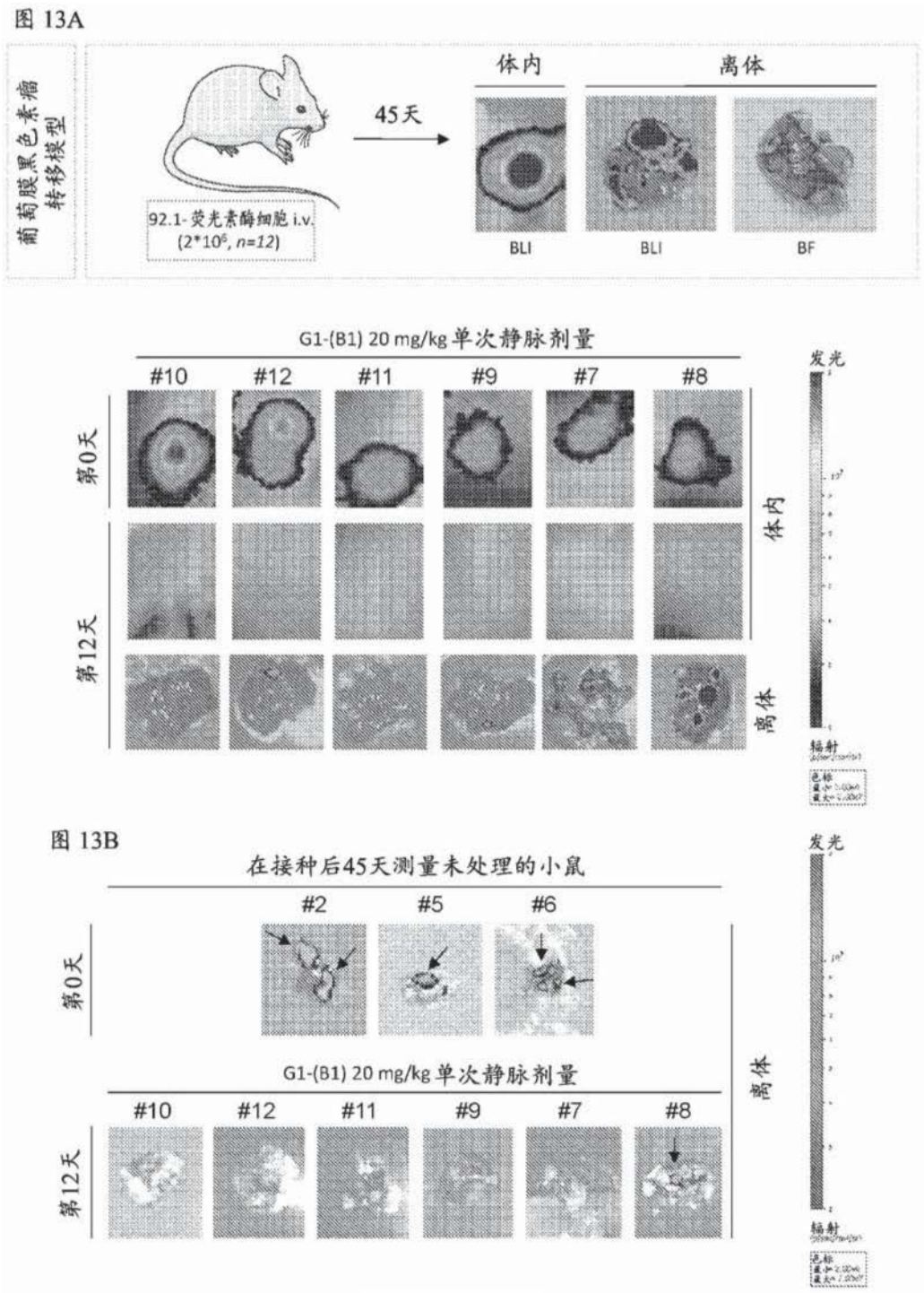

图 13A
葡萄膜黑色素瘤转移模型
92.1-荧光素酶细胞 i.v.
(2*10^6, n=12)
45天
体内
离体
BLI
BLI
BF
G1-(B1) 20 mg/kg单次静脉剂量
#10
#12
#11
#9
#7
#8
第0天
第12天
体内
离体
发光
辐射
图 13B
在接种后45天测量未处理的小鼠
#2
#5
#6
第0天
G1-(B1) 20 mg/kg单次静脉剂量
#10
#12
#11
#9
#7
#8
第12天
离体
发光
辐射

图13

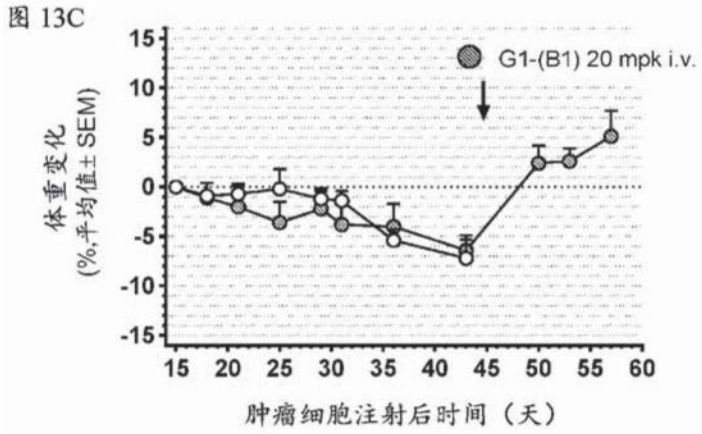

图 13C
G1-(B1) 20 mpk i.v.
体重变化
(%,平均值± SEM)
15
10
5
0
-5
-10
-15
15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
肿瘤细胞注射后时间（天）

图13续

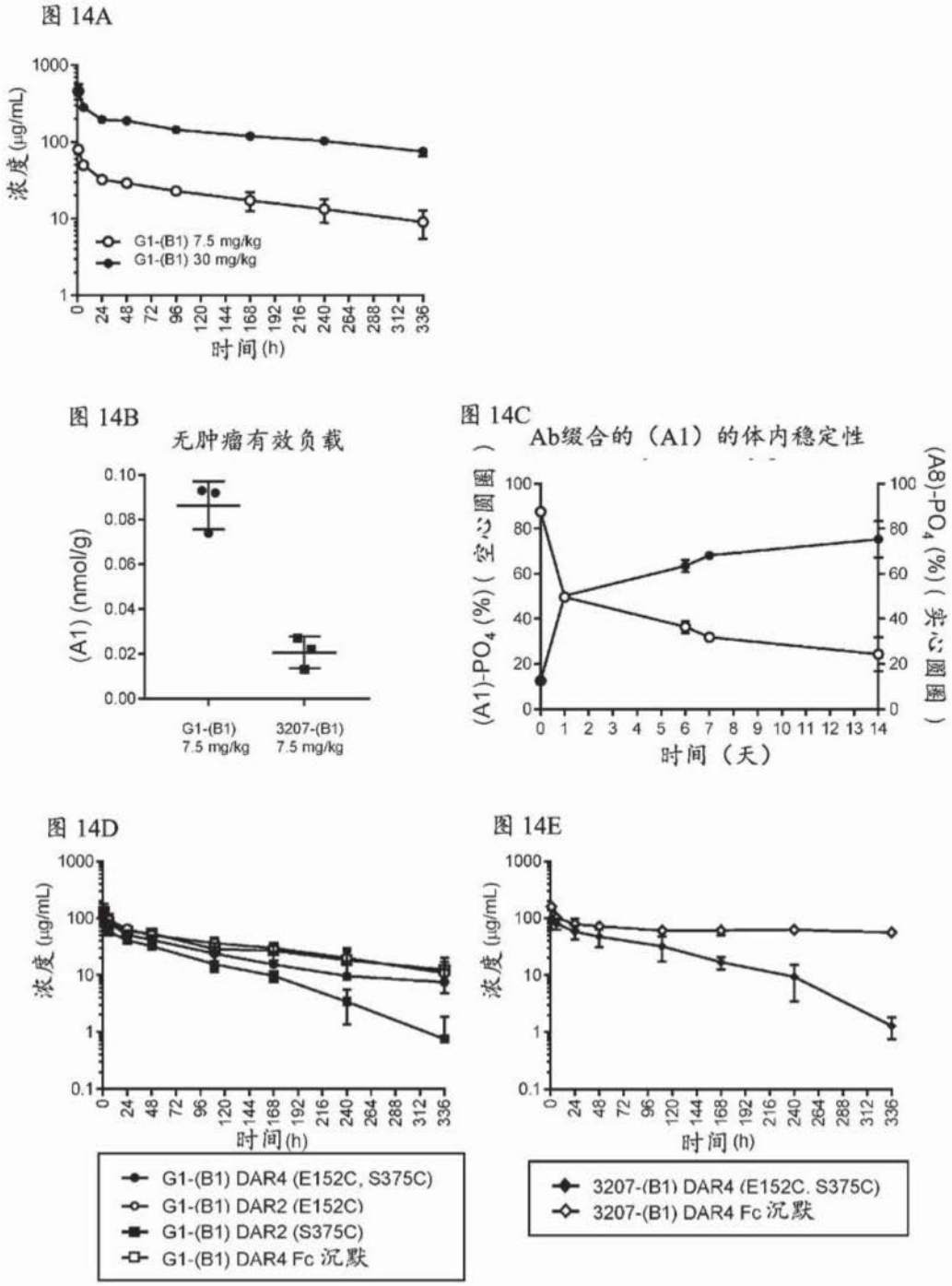

图 14A
浓度 (μg/mL)
时间 (h)
G1-(B1) 7.5 mg/kg
G1-(B1) 30 mg/kg
图 14B
无肿瘤有效负载
(A1) (nmol/g)
G1-(B1) 7.5 mg/kg
3207-(B1) 7.5 mg/kg
图 14C
Ab缀合的（A1）的体内稳定性
(A1)-PO4 (%)（空心圆圈）
(A8)-PO4 (%)（实心圆圈）
时间（天）
图 14D
浓度 (μg/mL)
时间 (h)
G1-(B1) DAR4 (E152C, S375C)
G1-(B1) DAR2 (E152C)
G1-(B1) DAR2 (S375C)
G1-(B1) DAR4 Fc 沉默
图 14E
浓度 (μg/mL)
时间 (h)
3207-(B1) DAR4 (E152C. S375C)
3207-(B1) DAR4 Fc 沉默

图14

图 15A

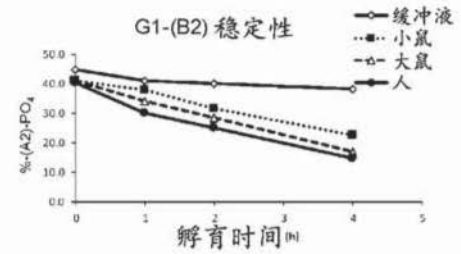


图 15B

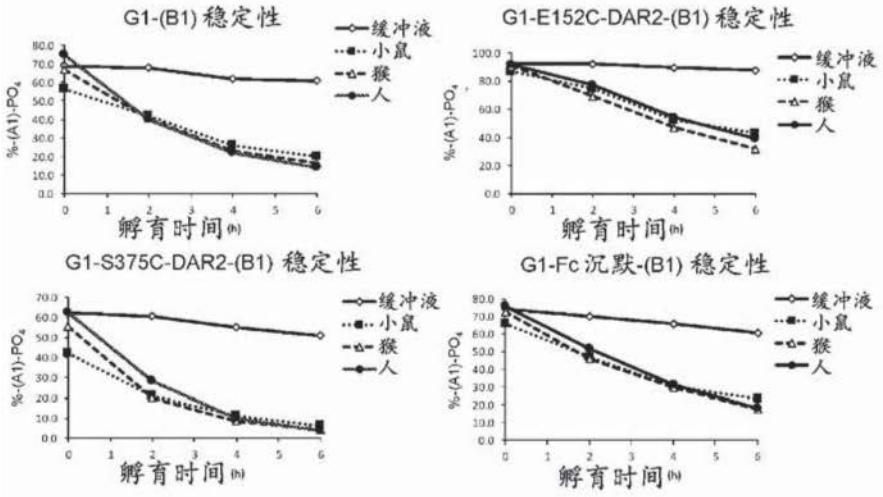


图 15C

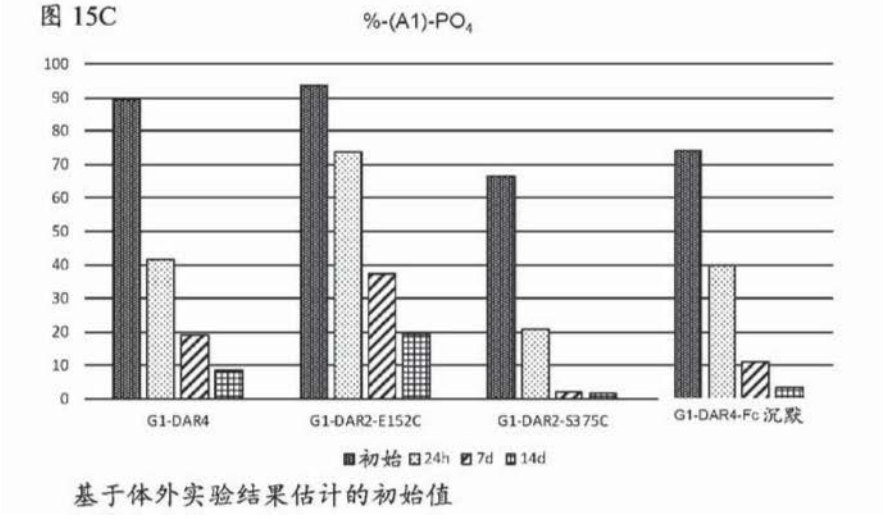


图15

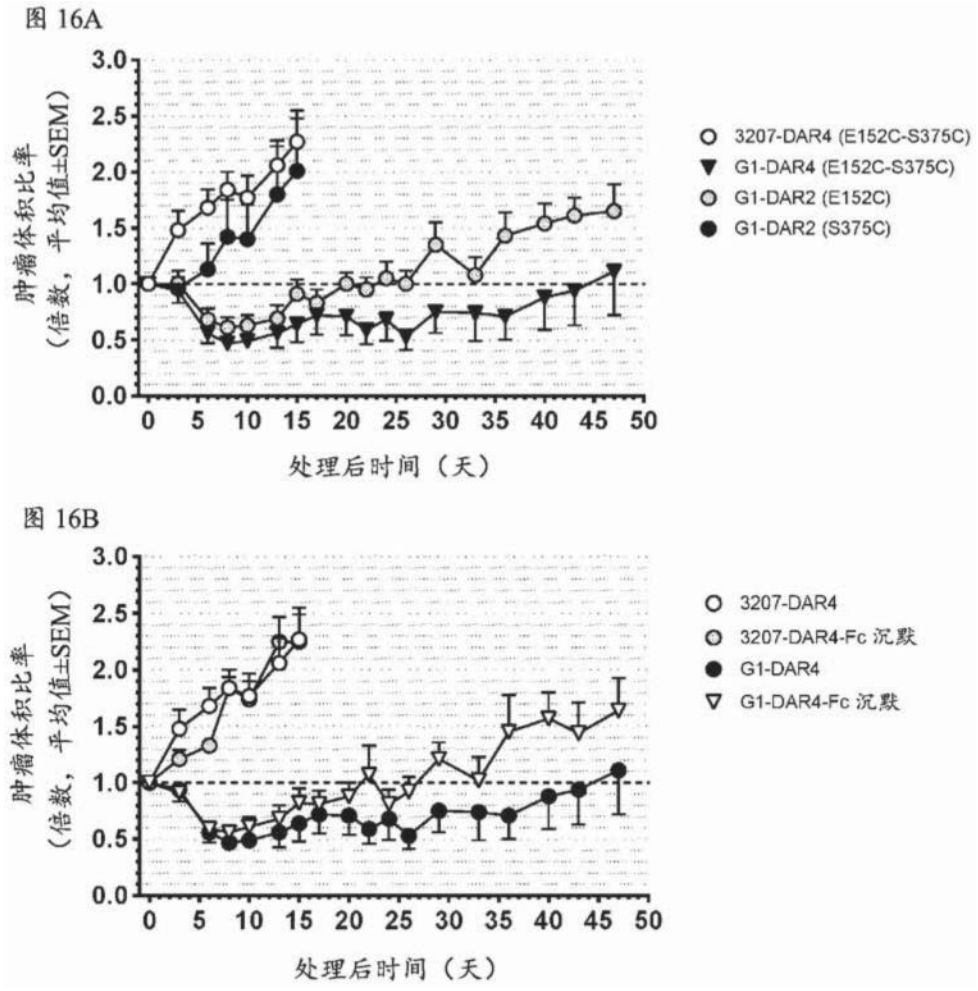

图 16A
肿瘤体积比率
（倍数，平均值±SEM）
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
处理后时间（天）
3207-DAR4 (E152C-S375C)
G1-DAR4 (E152C-S375C)
G1-DAR2 (E152C)
G1-DAR2 (S375C)
图 16B
肿瘤体积比率
（倍数，平均值±SEM）
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
处理后时间（天）
3207-DAR4
3207-DAR4-Fc 沉默
G1-DAR4
G1-DAR4-Fc 沉默

图16

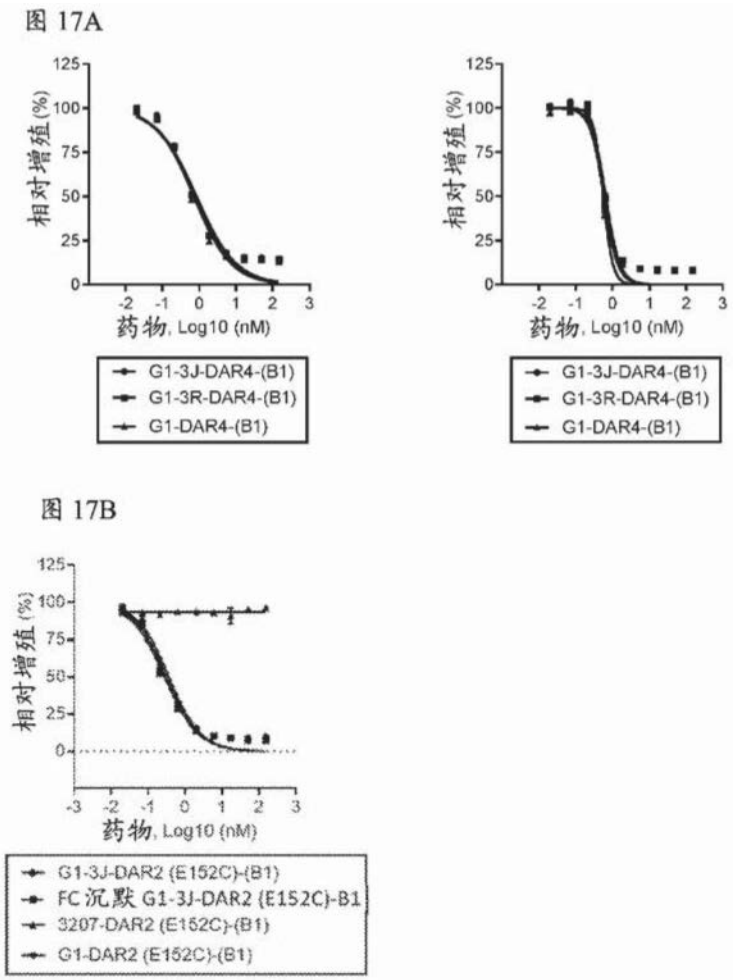

图 17A
相对增殖(%)
药物, Log10 (nM)
G1-3J-DAR4-(B1)
G1-3R-DAR4-(B1)
G1-DAR4-(B1)
图 17B
相对增殖(%)
药物, Log10 (nM)
G1-3J-DAR2 (E152C)-(B1)
FC 沉默 G1-3J-DAR2 (E152C)-B1
3207-DAR2 (E152C)-(B1)
G1-DAR2 (E152C)-(B1)

图17

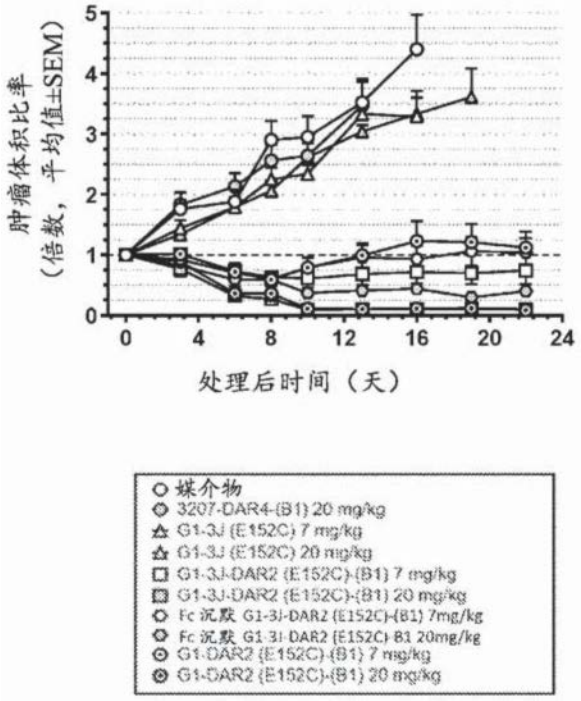

肿瘤体积比率
（倍数，平均值±SEM）
处理后时间（天）
媒介物
3207-DAR4-(B1) 20 mg/kg
G1-3J (E152C) 7 mg/kg
G1-3J (E152C) 20 mg/kg
G1-3J-DAR2 (E152C)-(B1) 7 mg/kg
G1-3J-DAR2 (E152C)-(B1) 20 mg/kg
Fc 沉默 G1-3J-DAR2 (E152C)-(B1) 7mg/kg
Fc 沉默 G1-3J-DAR2 (E152C)-B1 20mg/kg
G1-DAR2 (E152C)-(B1) 7 mg/kg
G1-DAR2 (E152C)-(B1) 20 mg/kg

图18

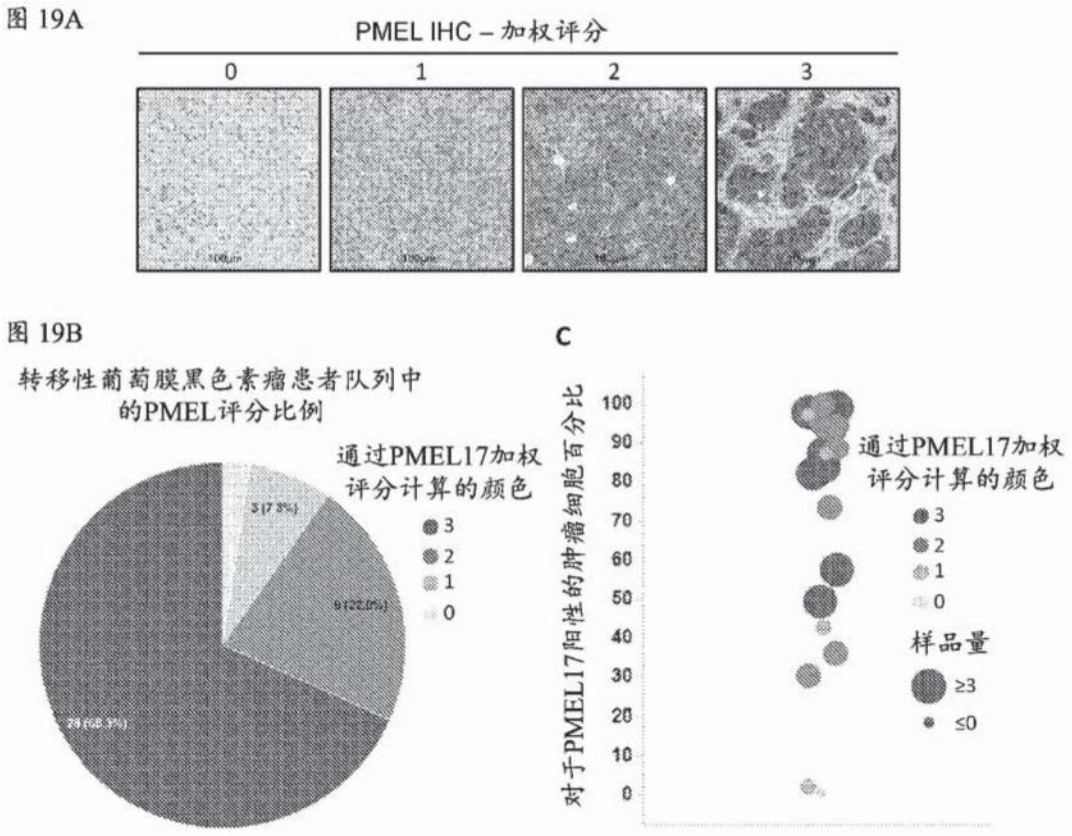

图 19A
PMEL IHC – 加权评分
0
1
2
3
图 19B
转移性葡萄膜黑色素瘤患者队列中的PMEL评分比例
通过PMEL17加权评分计算的颜色
3
2
1
0
C
对于PMEL17阳性的肿瘤细胞百分比
通过PMEL17加权评分计算的颜色
样品量
≥3
≤0

图19

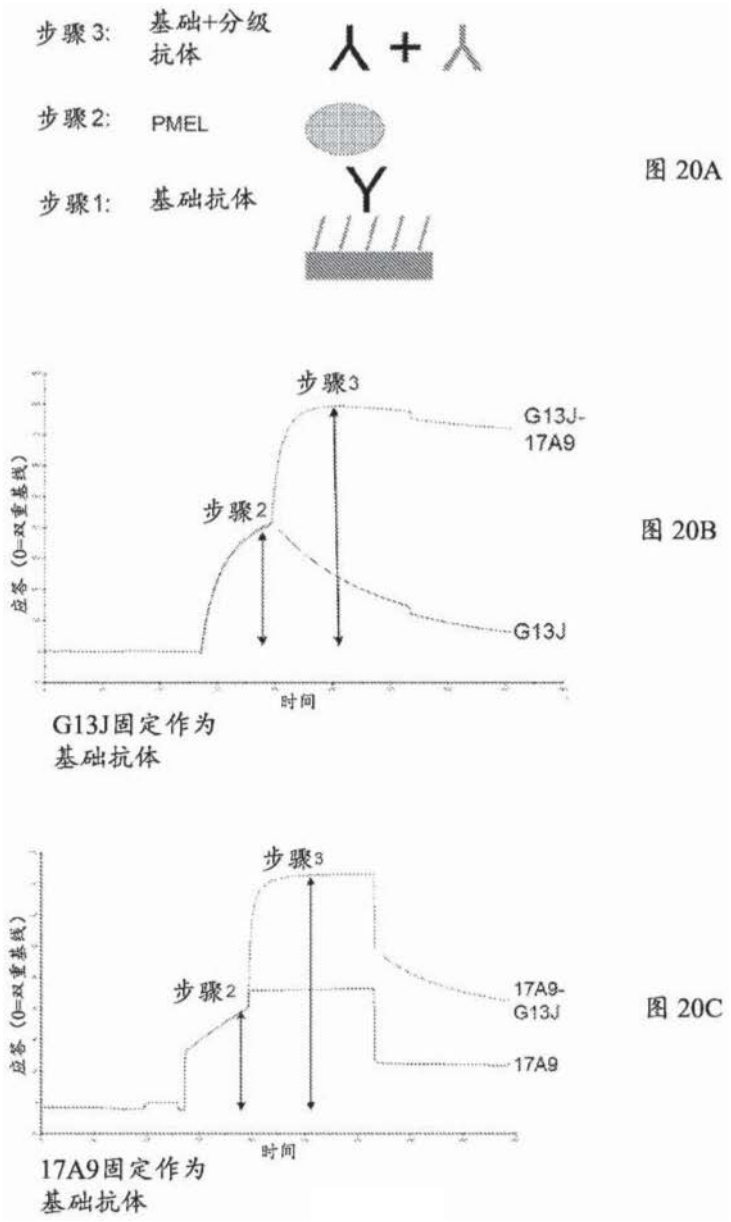

步骤3:
基础+分级抗体
步骤2:
PMEL
步骤1:
基础抗体
图 20A
步骤3
G13J-17A9
步骤2
G13J
应答（0=双重基线）
时间
G13J固定作为基础抗体
图 20B
步骤3
步骤2
17A9-G13J
17A9
应答（0=双重基线）
时间
17A9固定作为基础抗体
图 20C

图20