



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114867746 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202080069762.0

(22) 申请日 2020.08.07

(30) 优先权数据

62/884,818 2019.08.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/045466 2020.08.07

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/030209 EN 2021.02.18

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

申请人 退伍军人事务部所代表的美国政府

(72) 发明人 T·迈尔斯 L·L·K·梁

M·J·莫塞尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 岑晓东

(51) Int.Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

权利要求书4页 说明书40页

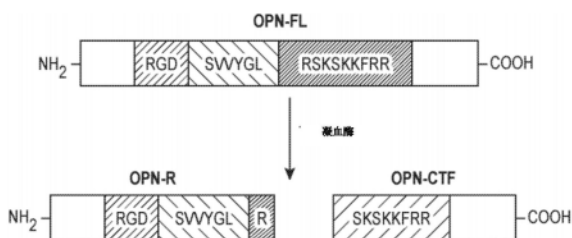
序列表35页 附图14页

(54) 发明名称

抗骨桥蛋白的治疗性抗体

(57) 摘要

本发明提供了对骨桥蛋白具有特异性的治疗性抗体以及使用其治疗骨桥蛋白相关病症的方法。详细地讲,本发明提供了抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或阻断骨桥蛋白凝血酶裂解片段的活性的抗体或其抗原结合片段。此外,本发明还提供了抗体缀合物、包含所述抗体或抗体缀合物的药物组合物或制剂以及包括所述抗体、缀合物或制剂的试剂盒。



1. 一种与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与所述骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:29所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:30所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:31所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:32所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:33所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:34所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 包含所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列或与所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及

b) 包含所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列或与所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

4. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:35所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:36所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:37所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:38所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:39所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:40所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

5. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 包含所述序列号:22所示氨基酸序列或与所述序列号:22所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及

b) 包含所述序列号:24所示氨基酸序列或与所述序列号:24所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:41所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:42所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:43所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:44所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:45所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:46所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a) 包含所述序列号:26所示氨基酸序列或与所述序列号:26所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及

b) 包含所述序列号:28所示氨基酸序列或与所述序列号:28所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

8. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述骨桥蛋白的凝血酶裂解片段为OPN-R片段或OPN-CTF片段。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体抑制整合素与所述OPN-R片段的结合。

10. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体与包含骨桥蛋白的Arg168(相对于所述序列号:8所示参考序列进行编号)的表位特异性结合。

11. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体与包含选自自由序列号:1-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列或由所述序列组成的骨桥蛋白肽特异性结合。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体选自由单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、纳米抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F<sub>v</sub>片段和scFv片段组成的群组。

13. 一种用于治疗骨桥蛋白相关病症的组合物,其包含根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的赋形剂或载体。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述药学上可接受的载体选自由乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米颗粒和软膏组成的群组。

16. 根据权利要求14或15所述的组合物,其进一步包含抗癌治疗剂。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述抗癌治疗剂选自由化疗剂、免疫治疗剂、生物治疗剂、促凋亡剂、血管生成抑制剂、光活化剂、放射增敏剂和放射性同位素组成的群组。

18. 根据权利要求13至17中任一项所述的组合物,其中所述骨桥蛋白相关病症是炎症、心脏肥大、心肌纤维化、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌或肺癌。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其进一步包含B-Raf抑制剂、丝裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制剂或其组合。

20. 一种治疗骨桥蛋白相关病症的方法,所述方法包含向有相应需求的受试者施用治疗有效量的根据权利要求13至19中任一项所述的组合物。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

22. 根据权利要求20或21所述的方法,其进一步包含施用至少一种另外的抗癌治疗剂。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述抗癌治疗剂选自由化疗剂、免疫治疗剂、生物治疗剂、促凋亡剂、血管生成抑制剂、光活化剂、放射增敏剂和放射性同位素组成的群组。

24. 根据权利要求20至23中任一项所述的方法,其中所述骨桥蛋白相关病症是与骨桥蛋白过表达相关的炎症或癌症。

25. 根据权利要求20至24中任一项所述的方法,其中所述骨桥蛋白相关病症是心脏肥大、心肌纤维化、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌或肺癌。

26. 根据权利要求24所述的方法,其进一步包含施用B-Raf抑制剂、丝裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制剂或其组合。

27. 根据权利要求25所述的方法,其中所述B-Raf抑制剂选自由达拉菲尼、维莫非尼、索拉非尼、LGX818、GDC-0879和PLX-4720组成的群组。

28. 根据权利要求25所述的方法,其中所述MEK抑制剂选自由曲美替尼、考比替尼、比美替尼、司美替尼和PD-325901组成的群组。

29. 根据权利要求20至28中任一项所述的方法,其中所述抗体按照每日给药方案给药或间歇性给药。

30. 根据权利要求20至29中任一项所述的方法,其中在一段足以实现肿瘤至少部分缓解的时间内向所述受试者给予多个治疗周期的治疗。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述时间段为至少6个月。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述时间段为至少12个月。

33. 根据权利要求20至32中任一项所述的方法,其中实现肿瘤完全缓解。

34. 根据权利要求20至33中任一项所述的方法,其中所述抗体不会干扰所述受试者中的凝血酶促凝血活性。

35. 一种用于抑制受试者中肿瘤细胞生长和/或增殖的方法,其包含向所述受试者施用有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

36. 一种试剂盒,其包含根据权利要求13至19中任一项所述的组合物以及使用所述试剂盒治疗癌症或炎症的说明书。

37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其进一步包含用于向受试者施用所述组合物的装置。

38. 一种产生根据权利要求1所述的抗体的方法,所述方法包含在受试者中引发针对免疫原性肽的免疫应答,所述免疫原性肽包含选自由序列号:5-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列。

39. 一种缀合物,其包含根据权利要求1至12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及选自由抗癌治疗剂、可检测标记和显像剂组成的群组的药剂。

40. 根据权利要求39所述的缀合物,其中所述抗癌治疗剂选自由细胞毒剂、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、硼化合物、光活化剂和放射性同位素组成的群组。

41. 一种分离的核酸,其包含:

a) 选自由序列号:13、序列号:17、序列号:21和序列号:25组成的群组的核苷酸序列;

b) 编码重链的核苷酸序列,所述重链包含选自由序列号:14、序列号:18、序列号:22和序列号:26组成的群组的氨基酸序列;

c) 选自由序列号:15、序列号:19、序列号:23和序列号:27组成的群组的核苷酸序列;

d) 编码轻链的核苷酸序列,所述轻链包含选自由序列号:16、序列号:20、序列号:24和序列号:28组成的群组的氨基酸序列;

e) 与a) -d) 中核苷酸序列的序列同一性达到90%的核苷酸序列;以及

f) a) -e) 的补充。

42. 一种重组核酸,其包含与根据权利要求41所述的核酸可操作地连接的启动子。

43. 一种包含一种或更多种编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:29所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:30所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:31所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述

序列号:32所示氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1) ;包含所述序列号:33所示氨基酸序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2) ;以及包含所述序列号:34所示氨基酸序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3) 。

44. 根据权利要求43所述的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列或与所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及包含所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列或与所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

45. 一种包含一种或更多种编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:35所示氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR-H1) ;包含所述序列号:36所示氨基酸序列的重链互补决定区2 (CDR-H2) ;包含所述序列号:37所示氨基酸序列的重链互补决定区3 (CDR-H3) ;包含所述序列号:38所示氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1) ;包含所述序列号:39所示氨基酸序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2) ;以及包含所述序列号:40所示氨基酸序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3) 。

46. 根据权利要求45所述的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:22所示氨基酸序列或与所述序列号:22所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及包含所述序列号:24所示氨基酸序列或与所述序列号:24所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

47. 一种包含一种或更多种编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:41所示氨基酸序列的重链互补决定区1 (CDR-H1) ;包含所述序列号:42所示氨基酸序列的重链互补决定区2 (CDR-H2) ;包含所述序列号:43所示氨基酸序列的重链互补决定区3 (CDR-H3) ;包含所述序列号:44所示氨基酸序列的轻链互补决定区1 (CDR-L1) ;包含所述序列号:45所示氨基酸序列的轻链互补决定区2 (CDR-L2) ;以及包含所述序列号:46所示氨基酸序列的轻链互补决定区3 (CDR-L3) 。

48. 根据权利要求47所述的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:26所示氨基酸序列或与所述序列号:26所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及包含所述序列号:28所示氨基酸序列或与所述序列号:28所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

49. 根据权利要求43至48中任一项所述的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段是嵌合的或人源化的。

50. 一种包含根据权利要求43至49中任一项所述的载体系统的宿主细胞。

51. 一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包含:

a) 在适合产生所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养根据权利要求50所述的宿主细胞;以及

b) 从所述宿主细胞中分离所述抗体或其抗原结合片段。

## 抗骨桥蛋白的治疗性抗体

### 背景技术

[0001] 骨桥蛋白(OPN)是一种多功能基质细胞蛋白,具有高度保守的RGD结构域,可与多种整合素结合。凝血酶在小鼠中的Arg153(人中的Arg168)处裂解产生OPN-Arg(OPN-R)和OPN-C端片段(OPN-CTF)。在其C端具有SVVYGLR(序列号:3)的OPN-R与全长OPN不会结合的整合素亚群( $\cdot 4 \cdot 1$ 和 $\cdot 9 \cdot 1$ )结合。OPN-R片段的生理作用被视为包括作为免疫调节剂促进细胞粘附、迁移和存活的作用(Kahles F.等人(2014),分子代谢,3:384)。目前尚未对OPN-CTF片段的作用进行充分研究,但据证实,它可与树突状细胞相互作用,从而提高其在响应于趋化因子时的趋化性(Shao Z.等人(2014),生物化学杂志,289:27146)。OPN-R与类风湿性关节炎等炎症病症有关(Song JJ.等人(2011),临床研究杂志,121:3517),但它在癌症中所起的作用依旧不明(Castello LM.等人(2017),炎症介质,2017:4049098)。羧肽酶B2(CPB2)或羧肽酶N(CPN)可去除OPN-R中的C端精氨酸,将OPN-R转化为OPN-Leu(OPN-L),从而消除整合素与所述SVVYGLR(序列号:3)结合基序的结合(Myles T.等人(2003),生物化学杂志,278(51):51059-51067;Shao Z.等人(2014),生物化学杂志,289:27146)。在类风湿性关节炎患者的滑液样本中发现OPN-R和OPN-L水平升高,但其在骨关节炎或银屑病关节炎患者中未见升高(Sharif S.等人(2009),关节炎与风湿病,60:2902)。OPN-CTF的作用也在鼠实验性自身免疫性脑炎(EAE)模型中得到证实,该模型表明针对OPN-CTF的抗体具有保护作用(Clemente N.等人(2017),免疫学前沿,8:321)。

### 发明内容

[0002] 本发明提供了对骨桥蛋白具有特异性的治疗性抗体以及使用其治疗骨桥蛋白相关病症的方法。详细地讲,抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或骨桥蛋白的凝血酶裂解片段与整合素和/或其他细胞受体相互作用的抗体可用于治疗骨桥蛋白相关病症(例如炎症、心脏肥大、心肌纤维化)和过表达骨桥蛋白的癌症(例如黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌和肺癌)。

[0003] 在一方面,提供了与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与OPN-R片段或OPN-CTF片段特异性结合。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与包含骨桥蛋白的Arg168的表位特异性结合。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与包含选自序列号:1-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列或由所述序列组成的骨桥蛋白肽特异性结合。

[0004] 在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:29所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:30所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:31所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:32所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:33所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:34所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重

链包含所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0005] 在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:35所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:36所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:37所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:38所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:39所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:40所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:22所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:24所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0006] 在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:41所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:42所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:43所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:44所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:45所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:46所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:26所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:28所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0007] 在某些实施例中,所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、纳米抗体、双特异性抗体、双特异性T细胞接合抗体、三特异性抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F<sub>v</sub>片段或scFv片段。

[0008] 在另一方面,提供了治疗骨桥蛋白相关病症的组合物,所述组合物包含本文所述的与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与所述骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合。在一些实施例中,所述骨桥蛋白相关病症是黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、心脏肥大、心肌纤维化或炎症。

[0009] 在某些实施例中,所述组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂或载体。在一些实施例中,所述药学上可接受的载体选自由乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米颗粒和软膏组成的群组。

[0010] 在某些实施例中,所述组合物进一步包含抗癌治疗剂,所述抗癌治疗剂包括但不限于化疗剂、免疫治疗剂、生物治疗剂、促凋亡剂、血管生成抑制剂、光活化剂、放射增敏剂和放射性同位素或其组合。

[0011] 在某些实施例中,所述组合物进一步包含B-Raf抑制剂、MEK抑制剂或其组合。示例性B-Raf抑制剂包括但不限于达拉菲尼、维莫非尼、索拉非尼、LGX818、GDC-0879和PLX-4720。示例性MEK抑制剂包括但不限于曲美替尼、考比替尼、比美替尼、司美替尼和PD-325901。

[0012] 在另一方面,提供了治疗骨桥蛋白相关病症的方法,所述方法包含向有相应需求的受试者施用治疗有效量的本文所述的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与骨桥蛋白(在凝血酶裂解位点结合)或骨桥蛋白的凝血酶裂解片段特异性结合。在某些实施例中,所述抗体与OPN-R片段或OPN-CTF片段特异性结合。在一些实施例中,所述抗体抑制整合素与OPN-R片段的结合。优选地,所述抗体不会干扰所述受试者中的凝血酶促凝血活性。

[0013] 在某些实施例中,所述骨桥蛋白相关病症是过表达骨桥蛋白的癌症。例如,过表达骨桥蛋白的癌症包括但不限于黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌和肺癌。在一些实施例中,所述方法进一步包含施用至少一种另外的抗癌治疗剂,所述抗癌治疗剂包括但不限于化疗剂、免疫治疗剂、生物治疗剂、促凋亡剂、血管生成抑制剂、光活化剂、放射增敏剂和放射性同位素或其组合。

[0014] 在某些实施例中,所述方法进一步包含施用B-Raf抑制剂。示例性B-Raf抑制剂包括但不限于达拉菲尼、维莫非尼、索拉非尼、LGX818、GDC-0879和PLX-4720。

[0015] 在某些实施例中,所述方法进一步包含施用丝裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制剂。示例性MEK抑制剂包括但不限于曲美替尼、考比替尼、比美替尼、司美替尼和PD-325901。

[0016] 在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段按照每日给药方案给药或间歇性给药。可以在一段足以实现肿瘤至少部分缓解,或者更优选地,肿瘤完全缓解的时间内向所述受试者给予多个治疗周期的治疗。在一些实施例中,所述时间段为至少6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1.5年、2年或更长。

[0017] 在另一方面,提供了抑制受试者中肿瘤细胞生长和/或增殖的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的本文所述的抗体或其抗原结合片段(其与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合),其中所述抗体或其抗原结合片段抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合。

[0018] 在另一方面,提供了缀合物,其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段,以及选自

由抗癌治疗剂、可检测标记和显像剂组成的群组的药剂。示例性抗癌治疗剂包括但不限于细胞毒剂、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节剂、促凋亡剂、抗血管生成剂、硼化合物、光活化剂和放射性同位素。

[0019] 在另一方面,提供了试剂盒,所述试剂盒包含组合物(其包含本文所述的抗体或其抗原结合片段)以及使用所述试剂盒治疗骨桥蛋白相关病症的说明书。所述试剂盒进一步包含用于向受试者施用所述组合物的装置。

[0020] 在另一方面,提供了产生抗体的方法,所述方法包含在受试者中引发针对免疫原性肽的免疫应答,所述免疫原性肽包含选自由序列号:5-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列。

[0021] 在另一方面,提供了分离的核酸,其包含:a)选自由序列号:13、序列号:17、序列号:21和序列号:25组成的群组的核苷酸序列;b)编码重链的核苷酸序列,所述重链包含选自由序列号:14、序列号:18、序列号:22和序列号:26组成的群组的氨基酸序列;c)选自由序列号:15、序列号:19、序列号:23和序列号:27组成的群组的核苷酸序列;d)编码轻链的核苷酸序列,所述轻链包含选自由序列号:16、序列号:20、序列号:24和序列号:28组成的群组的氨基酸序列;e)与a)-d)中核苷酸序列的序列同一性达到80-100%的核苷酸序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;以及f) a) -e)的补充。

[0022] 在另一方面,提供了重组核酸,其包含与本文所述的核酸可操作地连接的启动子。

[0023] 在另一方面,提供了包含一种或更多种编码本文所述的抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统。

[0024] 在某些实施例中,所述载体系统包含一种或更多种编码抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:29所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:30所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:31所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:32所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:33所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:34所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列或与所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及包含所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列或与所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

[0025] 在某些实施例中,所述载体系统包含一种或更多种编码抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:35所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:36所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:37所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:38所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:39所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:40所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所

述序列号:22所示氨基酸序列或与所述序列号:22所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及包含所述序列号:24所示氨基酸序列或与所述序列号:24所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

[0026] 在某些实施例中,所述载体系统包含一种或更多种编码抗体或其抗原结合片段的载体的载体系统,其中所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:41所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:42所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:43所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:44所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:45所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:46所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:26所示氨基酸序列或与所述序列号:26所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的重链;以及包含所述序列号:28所示氨基酸序列或与所述序列号:28所示氨基酸序列的序列同一性至少为80%的序列的轻链。

[0027] 在某些实施例中,本文所述的载体系统编码嵌合或人源化抗体或其抗原结合片段。

[0028] 在另一方面,提供了包含本文所述的载体系统的宿主细胞。

[0029] 在另一方面,提供了产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包含:a)在适合产生所述抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含本文所述的载体系统的宿主细胞;b)从所述宿主细胞中分离所述抗体或其抗原结合片段。

[0030] 在另一方面,提供了产生本文所述的抗体的杂交瘤。

## 附图说明

[0031] 结合附图阅读以下详细说明,可获得对本发明最全面的理解。需要强调的是,根据惯例,附图的各个特征未按比例绘制。相反,为了清楚起见,可任意扩大或缩小各个特征的尺寸。附图中包括以下图示:

[0032] 图1展示了凝血酶和CPB2介导的OPN裂解的示意图。

[0033] 图2A-2B展示了OPN KO和OPNR153A KI小鼠相较于WT小鼠B16肿瘤生长减慢的情况。

[0034] 图3A-3B表明,在OPN KO和OPN KI小鼠的转移模型中,B16肿瘤生长受到类似抑制。

[0035] 图4A-4B表明,用达比加群酯治疗胁腹携带B16黑色素瘤的小鼠时,可抑制WT小鼠但无法抑制OPN-KI小鼠中的肿瘤生长。

[0036] 图5A-5B表明,用达比加群酯治疗B16黑色素瘤肺转移小鼠时,可抑制WT小鼠但无法抑制OPN-KO或OPN-KI小鼠中的肿瘤生长。

[0037] 图6展示了OPN-KI小鼠相较于WT小鼠Id8卵巢癌生长减慢的情况。

[0038] 图7展示了鉴定与全长骨桥蛋白(OPN-FL)结合并阻断其被凝血酶裂解的单克隆抗体(Mab)的筛选策略。展示了以下物种的凝血酶裂解位点周围的OPN蛋白序列(单字母氨基酸代码):家兔、大鼠、小鼠、人、恒河猴、食蟹猴和猪。氨基酸的颜色表示其化学性质。黑框包围凝血酶裂解位点。星号标记保守氨基酸。在家兔中使用与钥孔血蓝蛋白共价结合的肽抗原YGLRSKS(序列号:11,以粗体显示的氨基酸被凝血酶裂解)来产生抗体,以得到兔单克

隆抗体。选择家兔的原因在于其凝血酶裂解位点周围的OPN序列与小鼠或人序列：**YRLKRSKS** (序列号:47,以粗体显示的氨基酸被凝血酶裂解)有所不同。产生与肽抗原结合的抗体的细胞克隆其重链和轻链cDNA,并将其插入表达兔IgG的表达载体中。接着,将这些表达载体转染至HEK293F细胞中,并进行培养基测定。然后,使用抗体筛选来鉴定产生与小鼠、大鼠和人骨桥蛋白反应的抗体的克隆。接下来,以更大的规模进行(参见图9)克隆培养,收获培养基并纯化IgG。

[0039] 图8展示了在针对OPN抗原肽的直接ELISA中筛选兔单克隆克隆的结果。鉴定了35个阳性结果(已示出)。对于鉴定产生抗OPN IgG的克隆的测定,将2ug/mL亲和素包被于96孔板上过夜,然后加入用生物素标记的OPN抗原肽,放置30分钟。接着,将克隆上清液按1:50的比例稀释,然后用稀释了 $10^3$ 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔IgG Fc进行检测。加入HRP底物并测量颜色。为了确定克隆上清液中IgG的浓度,将2ug/mL抗兔IgG包被于96孔板上过夜。接着,将克隆上清液按1:50的比例稀释,然后用稀释了 $10^3$ 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔IgG Fc进行检测。加入HRP底物并测量颜色。依据兔IgG的标准稀释曲线计算克隆上清液中的IgG浓度。

[0040] 图9展示了在针对抗原肽(中灰色,数据源自图8)、小鼠OPN-FL(浅灰色)和人OPN-FL(深灰色)的直接ELISA中筛选兔单克隆抗体的结果。鉴定了与人OPN-FL或小鼠OPN-FL结合的克隆。基于其与小鼠或人OPN-FL的结合选定了四种克隆(箭头指示位置)作进一步研究。

[0041] 图10展示了肽抗原结合测定中四种克隆的 $EC_{50}$ 的确定。为了确定纯化抗OPN IgG的 $EC_{50}$ ,将2ug/mL亲和素包被于96孔板上过夜,然后加入用生物素标记的OPN抗原肽,放置30分钟。接着,通过与蛋白A/G Sepharose磁珠结合并洗脱来纯化选定克隆上清液中的IgG。然后,连续稀释纯化IgG,然后用稀释了 $10^3$ 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔IgG Fc进行检测。加入HRP底物并测量颜色。

[0042] 图11展示了OPN抗原肽结合中四种克隆的 $EC_{50}$ 值。基于图4中的数据,利用图10中的数据使用Prism Graphpad通过4参数拟合方程计算 $EC_{50}$ 值。 $A_2=2.6\text{ng/mL}$ , $A_6=3.2\text{ng/mL}$ ;  $E_5=4.0\text{ng/mL}$ , $G_7=93.2\text{ng/mL}$ 。

[0043] 图12展示了在针对小鼠OPN-FL的直接结合ELISA中四种克隆的 $EC_{50}$ 值的确定。克隆A2、A6和E5与小鼠OPN-FL结合。将含有山羊多克隆抗小鼠骨桥蛋白IgG( $2\mu\text{g/ml}$ ) (R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)的PBS缓冲液包被于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。用含有1%BSA的PBS稀释重组小鼠骨桥蛋白(R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)(从 $200\text{ng/ml}$ 开始并予以稀释),并孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品( $500\text{ng/ml}$ )置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG抗体( $100\text{ng/ml}$ )置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后,将四甲基联苯胺底物孵育10分钟,然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。

[0044] 图13展示了在针对人OPN-FL的直接结合ELISA中四个选定克隆的 $EC_{50}$ 值的确定。所有这四种克隆都与人OPN-FL结合。将含有小鼠单克隆抗人骨桥蛋白抗体( $4\mu\text{g/ml}$ ) (R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)的PBS缓冲液包被于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。用含有1%BSA的PBS稀释重组人骨桥蛋白(GST-OPN-

his,内部纯化) (从200ng/ml开始并予以稀释),并孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品(500ng/ml)置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG抗体(100ng/ml)置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后,将四甲基联苯胺底物孵育10分钟,然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。

[0045] 图14展示了在针对OPN-R的特异性ELISA中四种克隆对人OPN-FL凝血酶裂解的抑制作用的测定(这通过测定裂解产物中其中一种(即,OPN-R)的产生情况来确定)。所有这四种克隆都抑制人OPN-FL的凝血酶裂解。在含或不含纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品(浓度如数据所示)的情况下,将3.2 $\mu$ M重组人骨桥蛋白(按以下出版物中所述进行纯化:Myles T.等人(2003),生物化学杂志,278(51):51059-51067;其内容以引用方式并入本文)置于室温下孵育20分钟。向样本中加入人凝血酶(32nM)(R&D Systems),并将其置于37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟,然后加入PPACK,使浓度达到4.8 $\mu$ M。用含有1%BSA的PBS按1/300的比例稀释样本,然后通过OPN-R特异性ELISA测量所产生的OPN-R。人OPN-R ELISA:将含有小鼠单克隆抗人骨桥蛋白抗体(4 $\mu$ g/ml)(R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)的PBS缓冲液包被于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。用含有1%BSA的PBS稀释带有谷胱甘肽s-转移酶标签的重组人OPN-R蛋白(GST-OPN-R,Myles等人(2003),同上)(从200ng/ml开始并予以稀释),将所得溶液用作校准标准品。将标准品和凝血酶裂解产物样本(从1/300稀释度开始并作进一步稀释)孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和生物素化兔多克隆抗OPN-R抗体(500ng/ml)(Sharif等人,2009 A+R)置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后,将样本与过氧化物酶缀合的链霉亲和素(100ng/ml)置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后,将四甲基联苯胺底物孵育10分钟,然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。基于OPN-R ELISA中的OPN-R标准,计算每个样本中产生的OPN-R的量,然后相较于不含抗体的对照品,计算不同浓度下每种抗体克隆对凝血酶裂解的抑制程度并绘制相应图表。

[0046] 图15展示了四种克隆基于图14中的数据在抑制人OPN-FL裂解方面的抑制率。A2=82%;A6=95.4%;E5=77.2%;G7=60.1%

[0047] 图16展示了在针对OPN-R的特异性ELISA中四种克隆对小鼠OPN-FL凝血酶裂解的抑制作用的测定(这通过测定裂解产物中其中一种(即,OPN-R)的产生情况来确定)。所有这四种克隆都抑制小鼠OPN-FL的凝血酶裂解。在含或不含纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品(2 $\mu$ M)的情况下,将重组小鼠骨桥蛋白(R&D systems)(2 $\mu$ M)置于室温下孵育20分钟。向样本中加入人凝血酶(20nM)(R&D Systems),并将其置于37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟,然后加入PPACK,使浓度达到4.7 $\mu$ M。用含有1%BSA的PBS按1/100或1/30的比例稀释样本,然后通过小鼠OPN-R特异性ELISA测量所产生的OPN-R。基于OPN-R ELISA中的OPN-R标准,计算每个样本中产生的OPN-R的量,然后计算不同浓度下每种抗体克隆对凝血酶裂解的抑制程度并绘制相应图表。

### 实施方式

[0048] 本发明提供了对骨桥蛋白具有特异性的治疗性抗体以及使用其治疗骨桥蛋白相关病症的方法。详细地讲,本发明提供了抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或阻断骨桥蛋白凝血酶裂解片段的活性的抗体或其抗原结合片段。此外,本发明还提供了抗体缀合物、包含所述

抗体或抗体缀合物的药物组合物或制剂以及包括所述抗体、缀合物或制剂的试剂盒。

[0049] 在描述治疗性抗体以及使用其治疗骨桥蛋白相关病症的方法之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定方法或组合物,因为在实际实施中一定会存在差异。还应当理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实施例,而无意限制本发明构思,本发明的范围将仅由所附权利要求书限定。

[0050] 在提供数值范围的情况下,应当理解,该范围的上限和下限之间的每个中间值都明确地公开。除非上下文另有明确规定,否则每个中间值应低至下限单位的十分之一。本发明涵盖了在所述范围内的任何所述值或介入值与在所述范围内的任何其他所述值或介入值之间的每个较小范围。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在所述范围内或排除在所述范围外,并且本发明也涵盖一个限值、无限值或两个限值包括在所述较小范围内的各范围,同时需遵守所述范围内任何特别排除的限值的要求。在所述范围包括一个或两个限值的条件下,排除了那些所包括限值中的任一个或两个的范围也包括在本发明内。

[0051] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本文所描述的方法和材料类似或等同的方法和材料也可用于本发明的实施或测试中,但下文描述了一些潜在和首选的方法和材料。本文提及的所有出版物均以引用方式并入本文,以公开和描述与所引用出版物有关的方法和/或材料。应当理解,当存在矛盾时,本发明内容应取代所引用出版物中的任何公开内容。

[0052] 在阅读本发明后,以下内容对所属领域的技术人员来说是显而易见的,本文所描述和列出的每个单独的实施例都具有分层的组分和特征,这些组分和特征可在不脱离本发明的范围和精神的情况下与其他几个实施例中任一实施例的特征进行快速分解或合并。可按陈述的事件顺序或逻辑上可能的任何其他顺序实施任何陈述的方法。

[0053] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所使用的单数形式的“一”、“一个”和“所述/该”包括复数指代对象,除非上下文另有明确说明。因此,举例而言,“一种抗体”的指代对象包括多种此类抗体而“所述癌性细胞”指的是一种或更多种癌性细胞及所属领域技术人员已知的等效物,例如癌细胞、肿瘤细胞、赘生性细胞和恶性细胞,等等。

[0054] 术语“抗体”涵盖单克隆抗体、多克隆抗体以及杂合抗体、改变的抗体、嵌合抗体和人源化抗体。术语抗体包括:杂合(嵌合)抗体分子(参见,例如,Winter等人(1991),自然,349:293-299;以及第4,816,567号美国专利);双特异性抗体、双特异性T细胞接合抗体(BiTE)、三特异性抗体和其他多特异性抗体(参见,例如,Fan等人(2015),血液肿瘤学杂志,8:130;Krishnamurthy等人,(2018),药理学与治疗学,185:122-134)、F(ab')<sub>2</sub>和F(ab)片段;F<sub>v</sub>分子(非共价异二聚体,参见,例如,Inbar等人(1972),美国国家科学院院刊,69:2659-2662;以及Ehrlich等人(1980),生物化学,19:4091-4096);单链Fv分子(scFv)(参见,例如,Huston等人(1988),美国国家科学院院刊,85:5879-5883);纳米抗体或单域抗体(sdAb)(参见,例如,Wang等人(2016),国际纳米医学杂志,11:3287-3303;Vincke等人(2012),分子生物学方法,911:15-26;二聚体和三聚体抗体片段构建体;微型抗体(参见,例如,Pack等人(1992),生物化学,31:1579-1584;Cumber等人(1992),免疫学杂志,149B:120-126);人源化抗体分子(参见,例如,Riechmann等人(1988),自然,332:323-327;Verhoeyan等人(1988),科学,239:1534-1536;以及第GB 2,276,169号英国专利公开出版物,于1994年9月21日公开);以及通过此类分子获得的任何功能片段,其中此类片段保留有亲本抗体分

子的特异性抗原结合特性。

[0055] 有关抗体与抗原(例如,骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段)结合的短语“特异性(或选择性)结合”是指确定蛋白异质群体和其他生物制剂中抗原存在的结合反应。因此,在指定免疫测定条件下,指定抗体与特定抗原结合的相应值至少比背景高两倍,并且基本上不与样本中存在的其他抗原大量结合。在此类条件下与抗原的特异性结合可能需要根据其特定抗原的特异性而选择的抗体。例如,可选择针对特定物种如大鼠、小鼠或人的抗原产生的抗体,以仅获得对抗原具有特异性免疫反应性的抗体,而非其他蛋白,但多态变体和等位基因除外。这种选择可以通过去除与源自其他物种的分子发生交叉反应的抗体来实现。可以使用多种免疫测定方式来选择对特定抗原具有特异性免疫反应性的抗体。例如,固相ELISA免疫测定通常用于选择与蛋白发生特异性免疫反应的抗体(参见,例如,Harlow和Lane,抗体,实验室手册(1988),用于描述可用于测定特异性免疫反应性的免疫测定方式和条件)。通常,特异性或选择性反应至少是背景信号或噪声的两倍,更为典型的是背景的10至100倍以上。

[0056] 本文中使用的“抗体片段”及其所有语法变体被定义为完整抗体的一部分,其包含完整抗体的抗原结合位点或可变区,其中所述部分不含完整抗体Fc区的恒定重链结构域(即,CH2、CH3和CH4,具体取决于抗体同种型)。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;任何抗体片段,即初级结构由连续氨基酸残基的一个不间断序列构成的多肽(本文称为“单链抗体片段”或“单链多肽”),包括但不限于(1)单链Fv(scFv)分子;(2)仅含有一个轻链可变结构域或其片段(含有所述轻链可变结构域的三个CDR)的单链多肽,无相关重链部分;(3)仅含有一个重链可变结构域或其片段(含有所述重链可变结构域的三个CDR)的单链多肽,无相关轻链部分;以及(4)包含源自非人物种的单Ig结构域或其他特异性单结构域结合模块的纳米抗体;以及由抗体片段形成的多特异性或多价结构。在包含一条或更多条重链的抗体片段中,重链可含有在完整抗体的非Fc区中发现的任何恒定结构域序列(例如,IgG同种型中的CH1),和/或可含有在完整抗体中发现的任何铰链区序列,和/或可含有与重链的铰链区序列或恒定结构域序列融合或位于其中的亮氨酸拉链序列。

[0057] “人源化抗体”是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的免疫球蛋白分子。人源化抗体包括人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠或兔)的CDR的残基(具有所需的特异性、亲和力和能力)取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基取代。人源化抗体还可以包含在接受者抗体或导入的CDR或框架序列中均未发现的残基。通常情况下,人源化抗体基本上包含至少一个,通常是两个可变结构域的全部,其中所有或基本上所有的CDR区均对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而所有或基本上所有的框架(FR)区是人免疫球蛋白共有序列的相应区。最优地,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白恒定区的一部分。

[0058] 本发明中使用的术语“表位”是指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常由具有化学活性的表面分子簇构成,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。

[0059] 涉及多肽时,“分离的”是指所示分子从整个生物体中分离和分开,所述整个生物

体中天然发现所述分子或者所述分子在基本无相同类型的其他生物大分子情况下存在。对于多核苷酸,术语“分离的”是指完全或部分缺乏以下各项的核酸分子:通常与其天然相关的序列;其天然存在但具有与之相关的异源序列的序列;或与染色体分离的分子。

[0060] 术语“缀合的”是指通过共价或非共价方式将两种化合物或药剂连接在一起。

[0061] 本文中使用的术语“治疗”等通常是指获得期望的药理学和/或生理学作用。预防作用指的是对疾病或其症状的完全或部分预防,治疗作用指的是对疾病和/或疾病导致的不良反应实现部分或完全稳定或治愈。术语“治疗”涵盖了哺乳动物,特别是人类疾病的任何治疗,包括:(a)防止受试者患上疾病和/或出现症状,其中所述受试者可能易患上该疾病或出现该症状但尚未确诊;(b)抑制该疾病和/或症状,即阻止其发展;或(c)缓解该疾病和/或症状,即使疾病和/或症状消退。需要接受治疗的受试者包括受影响的受试者(例如患癌者)以及需要预防的受试者(例如癌症易感性增加者、疑似患癌者、有复发风险者等)。

[0062] 本文中使用的术语“单位剂型”是指物理上分散的、适用于人和动物受试者的单一剂型,各单位含有预定量的本发明所述的化合物,其以与药学上可接受的稀释剂、载体或溶媒混合足以产生所需效果的量计算。新单位剂型的规格取决于所采用的具体化合物、要达到的效果以及各化合物在宿主中的药物动力学特性。

[0063] “骨桥蛋白相关病症”包括与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段水平升高相关的任何疾病或病症,包括但不限于炎症、心脏肥大、心肌纤维化和过表达骨桥蛋白的癌症如黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌和肺癌。

[0064] 术语“肿瘤”、“癌症”和“瘤形成”可互换使用,是指哺乳动物中生长、增殖或存活水平平均高于正常对应细胞的生长、增殖或存活水平的细胞或细胞群体,例如细胞增殖、过度增殖或分化障碍。通常,这种生长是不受控制的。术语“恶性”是指对邻近组织的侵袭。术语“转移”或继发性、复发性或反复性肿瘤、癌症或瘤形成是指肿瘤、癌症或瘤形成扩散或播散到受试者体内的其他部位、位置或区域,其中这些部位、位置或区域不同于肿瘤或癌症原发部位、位置或区域。瘤形成、肿瘤和癌症包括良性、恶性、转移和非转移类型,并且包括任何分期(I、II、III、IV或V)或级别(G1、G2、G3等)的瘤形成、肿瘤或癌症,或正在进展、正在恶化、已稳定或已缓解的瘤形成、肿瘤、癌症或转移。详细地讲,术语“肿瘤”、“癌症”和“瘤形成”包括癌,例如鳞状细胞癌、腺癌、腺鳞癌、间变性癌、大细胞癌和小细胞癌,并且包括癌症,例如(但不限于)头颈癌、皮肤癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、胰腺癌、周围神经瘤、胶质母细胞瘤、肾上腺皮质癌、艾滋病相关淋巴瘤、肛门癌、膀胱癌、脑膜瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、宫颈癌、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、食管癌、尤因肉瘤、颅外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、妊娠滋养细胞肿瘤、毛细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、下咽癌、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤、喉癌、白血病、唇癌、口腔癌、肝癌、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、髓母细胞瘤、梅克尔细胞癌、转移性颈部鳞状细胞癌、多发性骨髓瘤和其他浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿病和塞扎里综合征、骨髓增生异常综合征、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、口咽癌、骨癌(包括骨肉瘤和骨恶性纤维组织细胞瘤)、鼻窦癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、小肠癌、软组织肉瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、松果体母细胞瘤、睾丸癌、胸腺瘤、胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、尿道癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、维尔姆斯瘤和其他儿童肾脏肿瘤。

[0065] 详细地讲,术语“黑色素瘤”包括任何分期、任何类型的黑色素瘤,包括转移性黑色素瘤。例如,术语“黑色素瘤”包括但不限于恶性雀斑样痣、恶性雀斑样痣黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、肢端雀斑样痣黑色素瘤、黏膜黑色素瘤、结节性黑色素瘤、息肉样黑色素瘤和结缔组织增生性黑色素瘤。黑色素瘤的基因组DNA序列可能含有变化(突变),这意味着黑色素瘤细胞编码的蛋白与患者身体其他部位的蛋白有所不同。例如,参与向细胞发出生长信号的蛋白B-RAF可能会发生突变。因此,该术语还包括B-RAF突变的黑色素瘤,包括但不限于包含V600E突变或V600K突变的黑色素瘤。

[0066] “抗肿瘤活性”意指细胞增殖速率降低,从而使现有肿瘤或治疗期间出现的肿瘤的生长速率下降;和/或现有赘生性(肿瘤)细胞或新形成的赘生性细胞遭到破坏,从而使治疗期间肿瘤的整体尺寸缩小。此类活性可使用动物模型进行评估。

[0067] 与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的抗体或其抗原结合片段的“治疗有效剂量或量”意指如本文所述施用产生积极治疗效果(例如抗肿瘤活性或抗炎活性)的量。所需的确切量因受试者而异,具体取决于受试者的物种、年龄和全身情况、接受治疗的病状的严重程度、所用的特定药物、给药方式等。基于本文提供的信息,本领域普通技术人员可以通过常规实验确定任何个体情况下适合的“有效”量。

[0068] 本文中使用的术语“肿瘤缓解”是指所有可测量病灶的减少或消除。肿瘤缓解的标准基于WHO报告标准[WHO Offset Publication,48-世界卫生组织,瑞士日内瓦(1979)]确定。理想情况下,应在每次评估时测量所有一维或二维可测量病灶。任何器官中存在多个病灶时,可能无法进行此类测量,在此类情况下,应当选择至多6个具有代表性的病灶(如有)。

[0069] 本文中使用的术语“完全缓解”(CR)是指所有临床上可检测到的恶性疾病完全消失,这通过相隔至少4周的2次评估确定。

[0070] 本文中使用的术语“部分缓解”(PR)是指在可评价疾病无进展且无证据表明出现任何新病灶的情况下,所有可测量疾病的最长垂直直径的乘积之和相较于基线减少50%或更多,这通过相隔至少四周的连续两次评估确定。评估应当显示溶骨性病灶的大小部分缩小、溶骨性病灶再钙化或急变性病灶密度降低。

[0071] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”可互换使用,是指由氨基酸残基构成的聚合物。该术语也适用于其中一种或更多种氨基酸是相应天然存在的氨基酸的化学类似物或修饰衍生物的氨基酸聚合物。

[0072] “基本上纯化的”通常是指物质(例如抗体、缀合物、化合物、药物、核酸、多核苷酸、蛋白、多肽或肽)的分离,使得该物质构成其所处样本的大部分,且被定义为占总样本的百分比。通常在样本中,基本纯化的组分占样本的50%,优选地为80%-85%,更优选地为90-95%。用于纯化目的物质的技术为本领域所熟知,且包括,例如,离子交换色谱法、亲和色谱法和基于密度的沉降法。

[0073] 术语“受体”、“个人”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用,指的是需要诊断、治疗或疗法治疗的任何哺乳动物受试者,尤其是人类。用于治疗目的“哺乳动物”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人类、家畜和农场动物,以及动物园动物、竞技动物或宠物,例如狗、马、猫、牛、绵羊、山羊、猪等。优选地,所述哺乳动物是人类。

[0074] “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可以任选地包括在本发明的组合物中且不会对患者产生明显不利的毒理效应的赋形剂。

[0075] “药学上可接受的盐”包括但不限于氨基酸、用无机酸制备的盐(例如氯化物、硫酸盐、磷酸盐、二磷酸盐、溴化物和硝酸盐)、或者用前述任一项的相应无机酸形式制备的盐(例如盐酸盐等)、或者用有机酸制备的盐(例如苹果酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙基琥珀酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、乳酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、对甲苯磺酸盐、扑酸盐、水杨酸盐和硬脂酸盐,以及丙酸酯月桂硫酸盐、葡庚糖酸盐和乳糖醛酸盐)。类似地,含有药学上可接受的阳离子的盐包括但不限于钠、钾、钙、铝、锂和铵(包括取代铵)。

[0076] 本文中使用的术语“可检测标记”、“检测剂”、“显像剂”和“可检测部分”可互换使用,是指能够检测的分子或物质,包括但不限于荧光剂、化学发光剂、发色团、生物发光蛋白、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂、同位素标记物、半导体纳米颗粒、染料、金属离子、金属溶胶、配体(例如,生物素、链霉亲和素或半抗原)等。术语“荧光剂”是指能够在可检测范围内显示出荧光的物质或其部分。用于实施本发明的可检测标记的具体示例包括同位素标记,包括放射性和非放射性同位素,例如 $^3\text{H}$ 、 $^2\text{H}$ ,  $^{120}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{110}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Cu}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{94}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{154}\text{Gd}$ 、 $^{155}\text{Gd}$ 、 $^{156}\text{Gd}$ 、 $^{157}\text{Gd}$ 、 $^{158}\text{Gd}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{51}\text{M}$ 、 $^{52\text{m}}\text{Mn}$ 、 $^{55}\text{Co}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{75}\text{Br}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{82\text{m}}\text{Rd}$ 和 $^{83}\text{Sr}$ 。详细地讲,可检测标记可以包含适合于PET成像的正电子发射放射性核素,例如(但不限于) $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{82}\text{Rb}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ 和 $^{18}\text{F}$ ;或适用于单光子发射计算机断层扫描(SPECT)成像的伽马发射放射性核素,例如(但不限于) $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{123}\text{I}$ 和 $^{131}\text{I}$ 。可检测标记还可以包括适用于MRI成像的非放射性顺磁性金属离子,例如(但不限于) $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Gd}^{3+}$ 、 $\text{Ti}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 。可检测标记还可以包括荧光团,包括但不限于SYBR green、SYBR gold、CAL Fluor染料(例如CAL Fluor Gold 540、CAL Fluor Orange 560、CAL Fluor Red 590、CAL Fluor Red 610和CAL Fluor Red 635)、Quasar染料(例如Quasar 570、Quasar 670和Quasar 705)、Alexa Fluor(例如Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647和Alexa Fluor 784)、花青染料(例如Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7)荧光素、2',4',5',7'-四氯-4-7-二氯荧光素(TET)、羧基荧光素(FAM)、6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE)、六氯荧光素(HEX)、罗丹明、羧基-X-罗丹明(ROX)、四甲基罗丹明(TAMRA)、FITC、丹磺酰基、伞形酮、二甲基吡啶酯(DMAE)、Texas red、鲁米诺和量子点;以及酶,例如碱性磷酸酶(AP)、 $\beta$ -内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、腺苷脱氨酶(ADA)、氨基糖苷磷酸转移酶( $\text{neo}^{\text{r}}$ 、G418 $^{\text{r}}$ )、二氢叶酸还原酶(DHFR)、潮霉素-B-磷酸转移酶(HPH)、胸苷激酶(TK)、 $\beta$ -半乳糖苷酶(lacZ)和黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(xGPRT)、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(gus)、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)和分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)。酶标签与其同源底物结合使用。该术语还包括化学发光标记,例如鲁米诺、异鲁米诺、吡啶酯、过氧化草酸酯和生物发光蛋白(例如萤火虫荧光素酶、细菌荧光素酶、海肾荧光素酶和水母发光蛋白)。该术语还包括具有已知荧光强度的颜色编码微球(参见,例如,Luminex(德克萨斯州奥斯汀)生产的融合xMAP技术的微球;含有量子点纳米晶体的微球,例如,含有不同比例和量子点颜色组合(例如,Life Technologies(加利福尼亚州卡尔斯巴德)生产的Qdot纳米晶体;玻璃包覆金属纳米颗粒(参见,例如,Nanoplex Technologies, Inc.(加利福尼亚州山景城)生产的SERS纳米标签;条形码材料(例如,亚微米级条纹金属棒,例如,Nanoplex Technologies, Inc.生产的纳米条形码)、具有彩色条形

码的编码微粒(参见,例如,Vitra Bioscience生产的CellCard,vitrabio.com)、具有数字全息代码图像的玻璃微粒(例如,Illumina(加利福尼亚州圣地亚哥)生产的CyVera微珠)、近红外(NIR)探针和纳米壳。该术语还包括造影剂,例如超声造影剂(例如,包含六氟化硫的SonoVue微泡、包含白蛋白外壳和八氟丙烷气芯的Optison微泡、包含脂质/半乳糖外壳和气芯的Levovist微泡、包含全氟化碳微泡的Perflerane脂质微球、包含包封于脂质外壳中的八氟丙烷的Perflutren脂质微球)、磁共振成像(MRI)造影剂(例如,钆双胺、钆贝酸、钆喷酸、钆特醇、钆磷维塞、钆弗塞胺、钆塞酸)和放射性造影剂,例如用于计算机断层扫描(CT)、射线照相术或荧光镜检查的造影剂(例如,泛影酸、甲泛影酸、碘酰胺、碘他拉酸、碘羟拉酸、碘格利酸、乙碘苯酸、碘卡酸、碘甲磺、碘沃酮、甲泛葡胺、碘海醇、碘克沙酸、碘帕醇、碘普罗胺、碘曲伦、碘佛醇、碘喷托、碘克沙醇、碘美普尔、碘比醇、碘昔兰、碘沙酸、碘托西酸、碘甘卡酸、胆影酸、碘苯扎酸、碘番酸、碘西他酸、碘泊酸钠、碘苄丁酸和碘泊酸钙)。所述可检测标记或显像剂可以间接或直接与抗体连接,其中所述标记或造影剂有助于所述抗体在成像中的使用。

[0077] “同源性”是指两个多核苷酸或两个多肽分子之间的同一性百分比。当两个核酸序列或两个多肽序列在限定长度的分子中展现出至少约50%的序列同一性,优选地为至少约75%的序列同一性,更优选地为至少约80%85%的序列同一性,更优选地为至少约90%的序列同一性,最优选地为至少约95%98%的序列同一性时,所述两个核酸序列或两个多肽序列彼此“基本上同源”。在用于本文时,基本上同源还指相对于指定序列显示完全同一性的序列。通常情况下,“同一性”是指两个多核苷酸间确切的核苷酸与核苷酸对应或两个多肽序列间确切的氨基酸与氨基酸对应。同一性百分比可以通过直接比较两个分子之间的序列信息确定,具体方式如下:比对序列,计算两个比对序列之间匹配的确切数量,除以较短序列的长度,然后将结果乘以100。可以使用现成的计算机程序来辅助分析,例如ALIGN( Dayhoff, M.O., 蛋白质序列与结构图谱, M.O. Dayhoff编, 增刊5, 3:353-358, 国家生物医学研究基金会, 华盛顿特区), 其采用了局部同源性算法(Smith和Waterman, 应用数学进展, 2:482-489, 1981)进行肽分析。用于确定核苷酸序列同一性的程序可在第8版Wisconsin序列分析包(可获取自Genetics Computer Group, 威斯康星州麦迪逊)中获得, 例如BESTFIT、FASTA和GAP程序, 这些程序也依赖于Smith和Waterman算法。这些程序易于与制造商推荐的默认参数一起使用, 详见上文提及的Wisconsin序列分析包。例如, 特定核苷酸序列与参考序列的同一性百分比可以使用Smith和Waterman的同源性算法(采用默认评分表和六个核苷酸位置的空位罚分)确定。

[0078] 在本发明的环境中确定同一性百分比的另一种方法是使用MPSRCH程序包, 该程序包由John F. Collins和Shane S. Sturrok开发, 并由IntelliGenetics, Inc. (加州山景城)分销, 相应版权归爱丁堡大学所有。在该套程序包中, 可以采用Smith Waterman算法, 其中默认参数可用于评分表(例如, 空位开放罚分12, 空位扩展罚分1, 空位罚分6)。依据生成的数据, “匹配”值反映了“序列同一性”。其他用于计算序列间的同一性百分比或相似性百分比的合适程序通常是本领域已知的程序, 例如, 另一种比对程序是BLAST, 其与默认参数一起使用。例如, 可以通过以下默认参数来使用BLASTN和BLASTP: 遗传密码=标准; 筛选=无; 链=双; 临界值=60; 期望值=10; 矩阵=BLOSUM62; 描述=50个序列; 排序方式=高分; 数据库=非冗余, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+Swiss蛋白+Spupdate+PIR。

可以轻易获得这些程序的详细信息。

[0079] 或者,多核苷酸间序列的同源性可以通过以下方式确定:在允许同源区之间形成稳定双链体的条件下进行多核苷酸杂交,继以用单链特异性核酸酶消化,并确定消化后片段的大小。可在Southern杂交实验中鉴定DNA序列基本上同源,所述实验是在诸如根据该特定系统定义的严格条件下进行的。确定合适的杂交条件涵盖在本发明的范围内。参见,例如,Sambrook等人,同上;DNA克隆,同上;核酸杂交,同上。

[0080] 本文中用于描述核酸分子的“重组体”是指基因组、eDNA、病毒、半合成或合成来源的多核苷酸,由于其来源或操作,由于其来源或操作的缘故,该多核苷酸与与实际上相关的多核苷酸完全或部分不相关。对于蛋白或多肽,术语“重组体”是指通过重组多核苷酸表达产生的多肽。通常情况下,克隆目的基因,然后在转化的生物体中表达(进一步描述见下文)。宿主生物在表达条件下表达外源基因,从而产生该蛋白。

[0081] 术语“转化”是指将外源性多核苷酸插入宿主细胞,而不考虑用于插入的方法。例如,包括直接摄取、转导或f<sub>+</sub>交配。外源性多核苷酸可以保持为非整合载体(例如质粒),也可以整合到宿主基因组中。

[0082] “重组宿主细胞”、“宿主细胞”、“细胞”、“细胞系”、“细胞培养物”和其他表示作为单细胞实体培养的微生物或高等真核细胞系的术语是指能用作或者已经用作重组载体或其他转移DNA的接受者,并且包括已转染原始细胞的初始后代的细胞。

[0083] “编码序列”或“编码”选定多肽的序列是置于合适调节序列(或“控制元件”)控制下时体内转录(对于DNA)和翻译(对于mRNA)成多肽的核酸分子。编码序列的边界可由5′(氨基)端起始密码子和3′(羧基)端翻译终止密码子确定。编码序列可包括但不限于来自病毒、原核或真核mRNA的eDNA,来自病毒或原核DNA或RNA的基因组DNA序列,甚至是合成的DNA序列。转录终止序列可以位于编码序列的3′端。

[0084] 典型的“控制元件”包括但不限于转录启动子、转录增强子元件、转录终止信号、聚腺苷酸化序列(位于翻译终止密码子的3′端)、翻译起始优化序列(位于编码序列的5′端)和翻译终止序列。

[0085] “可操作地连接”是指指配置所述组分以便行使其常见功能的元件排列。因此,当存在合适的酶时,与编码序列可操作地连接的给定启动子能影响编码序列的表达。启动子可不必与编码序列毗连,只要其能发挥指导编码序列表达的功能即可。因此,例如,间插非翻译和尚未转录序列可在启动子序列和编码序列之间出现,仍可认为该启动子序列与该编码序列“可操作地连”。

[0086] “表达盒”或“表达构建体”是指能够指导目的序列或基因表达的组件。表达盒通常包括如上所述的控制元件,例如与目的序列或基因可操作地连接的启动子(以便指导其转录),并且通常还包括聚腺苷酸化序列。在本发明的某些实施例中,本文所述的表达盒可以包含在供体多核苷酸、质粒或病毒载体构建体中。除表达盒的组分外,所述构建体还可以包括一种或更多种选择标记、允许构建体作为单链DNA存在的信号(例如,M13复制起点)、至少一个多克隆位点和“哺乳动物”复制起点(例如,SV40或腺病毒复制起点)。

[0087] “纯化的多核苷酸”是指目的多核苷酸或其片段,其基本上无所述多核苷酸天然结合的蛋白,例如含有少于约50%、优选地少于约70%、更优选地少于约至少90%的所述蛋白。用于纯化目的多核苷酸的技术为本领域所熟知,并且包括,例如,用离液剂破坏含有多

核苷酸的细胞以及通过离子交换色谱法、亲和色谱法和基于密度的沉降法分离多核苷酸和蛋白。

[0088] 术语“转染”用于指细胞摄取外源DNA。当外源DNA被引入细胞膜内时,细胞被“转染”。许多转染技术为本领域中通常已知的技术。参见,例如,Graham等人(1973),病毒学,52:456;Sambrook等人(2001),分子克隆,实验室手册,第3版,冷泉港实验室,纽约;Davis等人(1995),分子生物学基本方法,第2版;McGraw-Hill和Chu等人(1981),基因,13:197。此类技术可用于将一种或更多种外源DNA部分引入合适的宿主细胞。该术语是指遗传物质的稳定和瞬时摄取,包括肽或抗体连接的DNA的摄取。

[0089] “载体”能将核酸序列转移至靶细胞(例如,病毒载体、非病毒载体、微粒载体和脂质体)。通常,“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”是指能够指导目的核酸表达且可将核酸序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此,该术语包括克隆和表达载体以及质粒和病毒载体。

[0090] 本文所讨论的出版物仅供在本专利的申请日之前披露。本文中无任何内容可以解释为承认由于之前的发明使得本发明无权早于此类出版物。此外,所提供的出版日期可能与实际出版日期不同,可能需要单独确认。

[0091] 对于本领域普通技术人员而言显而易见的是,可以在不偏离本发明的精神或范围的情况下进行各种改变和修改。

#### 抗骨桥蛋白抗体

[0092] 本发明提供了与骨桥蛋白的一个或多个表位特异性结合的抗骨桥蛋白抗体。在一些实施例中,所述抗骨桥蛋白抗体在凝血酶裂解位点特异性结合,抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解和/或与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段(例如,OPN-R片段或OPN-CTF片段)特异性结合,并降低所述凝血酶裂解片的生物活性。在某些实施例中,所述抗骨桥蛋白抗体与包含骨桥蛋白的Arg168的表位特异性结合。上述编号是相对于人骨桥蛋白的参考氨基酸序列(序列号:8)的编号,应当理解,从其他物种中获得的骨桥蛋白中的相应位置也意在涵盖在本发明的范围内。

[0093] 本文中使用的术语“抗骨桥蛋白抗体”涵盖全长抗体及其抗原结合片段(其包括抗体的抗原结合区,例如,包括抗骨桥蛋白抗体的CDR如Fab、F(ab')<sub>2</sub>或F<sub>v</sub>片段的分子)、单链可变片段(scFv)或任何其他类型的目的抗体片段(参见上文术语“抗体”的定义)。可用于实施标的方法的抗骨桥蛋白抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、杂合抗体、改变的抗体、嵌合抗体和人源化抗体,以及:杂合(嵌合)抗体分子(参见,例如,Winter等人(1991),自然,349:293-299;以及第4,816,567号美国专利)、F(ab')<sub>2</sub>和F(ab)片段;F<sub>v</sub>分子(非共价异二聚体,参见,例如,Inbar等人(1972),美国国家科学院院刊,69:2659-2662;以及Ehrlich等人(1980),生物化学,19:4091-4096);单链F<sub>v</sub>分子(sFv)(参见,例如,Huston等人(1988),美国国家科学院院刊,85:5879-5883);纳米抗体或单域抗体(sdAb)(参见,例如,Wang等人(2016),国际纳米医学杂志,11:3287-3303;Vincke等人(2012),分子生物学方法,911:15-26;二聚体和三聚体抗体片段构建体;微型抗体(参见,例如,Pack等人(1992),生物化学,31:1579-1584;Cumber等人(1992),免疫学杂志,149B:120-126);人源化抗体分子(参见,例如,Riechmann等人(1988),自然,332:323-327;Verhoeyan等人(1988),科学,239:1534-1536;以及第GB 2,276,169号英国专利公开出版物,于1994年9月21日公开);以及通过此类

分子获得的任何功能片段,其中此类片段保留有亲本抗体分子的特异性结合特性。

[0094] 在某些实施例中,所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段与包含选自序列号:1-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列或由所述序列组成的骨桥蛋白肽特异性结合。

[0095] 在某些实施例中,所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:29所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:30所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:31所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:32所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:33所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:34所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0096] 在某些实施例中,所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:35所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:36所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:37所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:38所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:39所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:40所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:22所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:24所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0097] 在某些实施例中,所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:41所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:42所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:43所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:44所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:45所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:46所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:26所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至

少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:28所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0098] 可以使用本领域已知的任何合适的方法制备于凝血酶裂解位点处与骨桥蛋白特异性结合或与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段(例如,OPN-R片段或OPN-CTF片段)特异性结合的抗体。参见,例如,Coligan,免疫学实验室指南(1991);Harlow和Lane,抗体:实验室手册(1988);Goding,单克隆抗体:原理与实践(第2版,1986);以及Kohler和Milstein,自然,256:495-497(1975)。例如,包含骨桥蛋白的肽片段(包括骨桥蛋白凝血酶裂解位点)或骨桥蛋白的凝血酶裂解片段(例如,OPN-R片段或OPN-CTF片段)的抗原可用于在哺乳动物(例如小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、猴或人)中引发免疫应答,以产生多克隆抗体。可用于引发免疫应答以产生抗骨桥蛋白抗体的示例性肽包括但不限于骨桥蛋白肽,其包含选自序列号:1-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列或由所述序列组成(另见示例)。如有需要,可将抗原与载体蛋白如牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白和钥孔血蓝蛋白缀合。基于宿主物种,可以使用多种佐剂来提高免疫应答。此类佐剂包括但不限于弗氏佐剂、矿物凝胶(例如,氢氧化铝)和表面活性物质(例如,溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、钥孔血蓝蛋白和二硝基苯酚)。在用于人体的佐剂中,BCG(卡介苗)和小棒状杆菌是特别有用的。

[0099] 与骨桥蛋白抗原特异性结合的单克隆抗体可以使用任何能够通过培养中的连续细胞系产生抗体分子的技术来制备。这些技术包括但不限于杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术和EBV杂交瘤技术(Kohler等人,自然,256,495-97,1985;Kozbor等人,免疫学方法杂志,81,3142,1985;Cote等人,美国国家科学院院刊,80,2026-30,1983;Cole等人,分子与细胞生物学,62,109-20,1984)。

[0100] 此外,可以使用为生产“嵌合抗体”而开发的技术,即将小鼠抗体基因与人抗体基因剪接以获得具有适当抗原特异性和生物活性的分子(Morrison等人,美国国家科学院院刊,81,6851-55,1984;Neuberger等人,自然,312,604-08,1984;Takeda等人,自然,314,452-54,1985)。单克隆抗体和其他抗体也可以“人源化”以防止患者在该抗体用于治疗时产生针对该抗体的免疫应答。此类抗体在序列上可能与直接用于治疗的人抗体足够类似,或者可能需要改变一些关键残基。啮齿类动物抗体与人序列之间的序列差异可以通过个别残基定点诱变或通过对整个互补决定区设门置换与人序列中不同的残基来实现最小化。

[0101] 或者,可以使用如下所述的重组方法产生人源化抗体。与特定抗原特异性结合的抗体可以含有部分或完全人源化的抗原结合位点,如第5,565,332号美国专利所公开。人单克隆抗体可以在体外制备,制备方式请见以下出版物:Simmons等人,PLoS,药物,4(5),928-36,2007。

[0102] 或者,可使用本领域已知的方法调整用于产生单链抗体的技术,从而产生与特定抗原特异性结合的单链抗体。具有相关特异性但有不同独特型组成的抗体可以通过随机组合免疫球蛋白文库的链替换产生(Burton,美国国家科学院院刊,88,11120-23,1991)。也可

以使用DNA扩增方法(例如PCR),将杂交瘤cDNA作为模板构建单链抗体(Thirion等人,欧洲癌症预防杂志,5,507-11,1996)。单链抗体可以是单特异性抗体或双特异性抗体,并且可以是二价或四价抗体。例如,四价双特异性单链抗体的构建方法详见以下出版物:Coloma和Morrison,自然:生物技术,15,159-63,1997。二价双特异性单链抗体的构建方法详见以下出版物:Mallender和Voss,生物化学杂志,269,199-206,1994。

[0103] 编码单链抗体的核苷酸序列可以通过手动或自动核苷酸合成构建,然后使用标准重组DNA方法将其克隆至表达构建体中,而后引入细胞中以表达如下所述的编码序列。或者,可以使用诸如丝状噬菌体技术直接产生单链抗体(Verhaar等人,国际癌症杂志,61,497-501,1995;Nicholls等人,免疫学方法杂志,165,81-91,1993)。

[0104] 与骨桥蛋白抗原特异性结合的抗体也可以通过在淋巴细胞群体中诱导体内产生,或者通过筛选免疫球蛋白文库或文献中公开的高特异性结合试剂套组来产生(Orlandi等人,美国国家科学院院刊,86,38333837,1989;Winter等人,自然,349,293299,1991)。

[0105] 嵌合抗体可以按W0 93/03151中所公开的方式构建。还可以制备衍生自免疫球蛋白的多价多特异性结合蛋白,例如,W0 94/13804中所述的“双抗体”。

[0106] 在一些实施例中,源自B淋巴细胞的抗骨桥蛋白抗体从供血者中获得并进行了克隆。编码抗体轻链和重链的核酸或其含有可变结构域互补决定区(例如Fab)的片段可以通过PCR扩增并克隆至载体中。ScFv抗体可以通过将构建体克隆至载体中来产生,该构建体通过一个开放阅读框中的连接子连接轻链和重链。所述供血者可以是任何物种。在一些实施例中,人类供血者用于产生人类抗体。在其他实施例中,骆驼科供血者用于产生骆驼抗体。骆驼科抗体可以源自,例如,单峰骆驼、双峰驼、美洲驼和羊驼。此类骆驼科动物可产生一种缺乏轻链的独特型抗体。重链抗体(HCAb)或其可变结构域片段(例如,单域抗体或纳米抗体)也可用于标的方法中(参见,例如,Vincke等人(2012),分子生物学方法,911:15-26;Krah等人(2016),免疫药理学与免疫毒理学,38(1):21-8;其内容以引用方式并入本文)。

[0107] 可以通过本领域所熟知的方法纯化抗体。例如,可以通过使其穿过相关抗原所结合的纯化柱亲和纯化抗体。然后,可使用具有高盐浓度的缓冲液洗脱纯化柱中已结合的抗体。

#### 嵌合和人源化抗体

[0108] 合适的抗骨桥蛋白抗体包括此类抗体的全人、人源化或嵌合形式。例如,因具有低抗原性,人源化抗体适用于人体内应用。类似地,犬源化、猫源化等抗体分别适用于狗、猫和其他物种应用。目的抗体包括人源化抗体,或犬源化、猫源化、马源化、牛源化、猪源化等抗体及其变体。

[0109] 可以使用本领域已知的标准程序产生嵌合单克隆抗体,其中非人(例如小鼠)单克隆抗体的可变Ig结构域与人恒定Ig结构域融合(参见,Morrison等人,美国国家科学院院刊,81,6841-6855(1984);以及Boulianne等人,自然,312,643-646,(1984))。

[0110] 人源化抗体可通过多种方法获得,例如:(1)将非人互补决定区(CDR)嫁接到人框架和恒定区上(本领域中称为通过“CDR嫁接”人源化的过程);(2)移植整个非人可变结构域,然后通过置换表面残基将它们用人样表面“遮盖”(本领域中称为“镶饰”的过程);(3)取代位于确定不太可能对抗原结合或蛋白质折叠产生不利影响,但可能降低人体环境中的免疫原性的位置的人类氨基酸(例如,人体工程)。在本发明中,人源化抗体可以包括“人源

化”、“镶饰”和/或“人工程化”抗体。这些方法公开于诸如以下出版物之类的文件中：例如，Jones等人，自然，321:522-525 (1986)；Morrison等人，美国国家科学院院刊，81:6851-6855 (1984)；Morrison和Oi，免疫学进展，44:65-92 (1988)；Verhoeyer等人，科学，239:1534-1536 (1988)；Padlan，分子免疫学，28:489-498 (1991)；Padlan，分子免疫学，31:169-217 (1994)；Studnicka等人，第5,766,886号美国专利；Studnicka等人，(蛋白质工程，7:805-814,1994)；Co等人，免疫学杂志，152,2968-2976 (1994)；Riechmann等人，自然，332:323-27 (1988)；以及Kettleborough等人，蛋白质工程，4:773-783 (1991)，这些出版物中的内容均以引用方式并入本文。

[0111] CDR嫁接涉及将来自小鼠重链和轻链可变Ig结构域的一个或更多个引入人可变Ig结构域的几个适当框架区中。该技术 (Riechmann等人，自然，332:323-27 (1988)) 利用保守框架区 (FR1-FR4) 作为支架来支持作为抗原主要触点的CDR环。然而，CDR嫁接的缺点是它会导致人源化抗体的结合亲和力明显低于原始小鼠抗体，因为框架区的氨基酸可以促进抗原结合，而且CDR环的氨基酸可以影响两个可变Ig结构域之间的关联性。为了保持人源化单克隆抗体的亲和力，可以通过以下措施来改善CDR移植技术：选择与原始小鼠抗体的框架区最为相似的人框架区；以及借助抗原结合位点的计算机建模，定点诱变框架或CDR内的单种氨基酸 (例如，Co等人，免疫学杂志，152,2968-2976 (1994))。

#### 抗体片段

[0112] 抗骨桥蛋白抗体可以是抗体片段形式。抗体片段包含完整全长抗体的一部分，且可包括所述完整抗体的抗原结合或可变区。抗体片段的示例包括Fab；Fab'；F(ab')<sub>2</sub>；Fv片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子 (例如，scFv)；多特异性抗体片段，例如双特异性、三特异性等抗体 (例如，双抗体、三抗体、四抗体)；微型抗体；螯合重组抗体；三抗体或双抗体；胞内抗体；纳米抗体；小型模块化免疫药物 (SMIP)、结合结构域免疫球蛋白融合蛋白；骆驼源化抗体；含有VHH的抗体；以及其他由抗体片段形成的多肽。参见，例如，Holliger和Hudson (自然：生物技术，23:1126-36 (2005))。

[0113] 抗体经木瓜蛋白酶消化后会产生两个相同的称为“Fab”片段的抗原结合片段和残余“Fc”片段，“Fab”片段是由VL、VH、CL和CH结构域 (每个均含有单一抗原结合位点) 组成的单价片段，而Fc的名称反映了其容易形成结晶的能力。胃蛋白酶处理后产生F(ab')<sub>2</sub>片段，即，包含两个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段，它具有两个包含抗体VH和VL结构域的“单链Fv”或“scFv”抗体片段，其中这些结构域都存在于单条多肽链中。所述Fv多肽可进一步包含位于VH与VL结构域之间的多肽连接子，其使所述Fv能够形成抗原结合所需的结构，从而产生单链抗体 (scFv)，其中VL和VH区通过合成连接子配对形成单价分子，所述连接子能将它们制成单条蛋白质链 (Bird等人，科学，242:423-426,1988；以及Huston等人，美国国家科学院院刊，85:5879-5883,1988)。有关scFv的综述，请参阅Pluckthun，单克隆抗体药理学，第1-13卷，Rosenburg和Moore编纂，Springer-Verlag，纽约，第269-315页 (1994)。Fd片段由VH和CH1结构域组成。

[0114] 另外的抗体片段包括由VH结构域组成的结构域抗体 (dAb) 片段 (Ward等人，自然，341:544-546,1989)。双抗体是二价抗体，其中VH和VL结构域在单条多肽链上表达，但使用的连接子过短而无法在同一条链上的两个结构域之间配对，从而迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点 (参见，例如，EP 404097；WO 93/11161；

Holliger等人,美国国家科学院院刊,90:6444-6448,1993;以及Poljak等人,结构,2:1121-1123,1994)。双抗体可以是双特异性抗体或单特异性抗体。

#### 抗骨桥蛋白抗体的生产立法

[0115] 如上所述,本发明提供了与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的抗体,其中所述抗体抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或骨桥蛋白凝血酶裂解片段与整合素和/或其他细胞受体的相互作用。制作抗骨桥蛋白抗体的示例性方法详见下文。

[0116] 可以使用本领域已知的多种技术制备抗体,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。例如,可以使用噬菌体展示方法制造和分离抗体。所述抗体也可以从用包含骨桥蛋白的免疫原性组合物免疫的动物宿主的血清中分离出来,所述免疫原性组合物包括完整蛋白及其片段。示例性抗体包括能与骨桥蛋白(例如,在骨桥蛋白的凝血酶裂解位点)或骨桥蛋白的凝血酶裂解片段特异性结合的分离的抗体。

[0117] 包被用于噬菌体展示淘选的孔的抗原或用于促使产生本发明的抗体的免疫原性组合物可以包含一种或更多种抗原的聚集体。所述方法可以涉及使抗原暴露于聚集条件,从而形成聚集体。因此,上述生产方法可以进一步包括形成所述分离抗原的聚集体的步骤。所述聚集条件的示例包括加热、加入促进聚集的赋形剂等。

[0118] 用于包被孔以进行噬菌体淘选或促使产生本发明的抗体的抗原可以与另一分子缀合。例如,通过诸如靶向特定细胞(例如癌细胞、心肌细胞等)或细胞位置(例如质膜、溶酶体、内体、线粒体等)、组织或其他身体位置(例如血液、特定器官、肿瘤等等),所述抗原可与有助于改善溶解度、储存或其他处理特性、细胞渗透性、半衰期、控释和/或分布的第二分子如肽、多肽、脂质、碳水化合物等缀合。

[0119] 与第二分子缀合的抗原的具体实施例是其中所述第二分子是免疫调节剂。“免疫调节剂”是直接或间接改变免疫应答的分子。特定类别的免疫调节剂包括刺激或有助于刺激免疫应答的调节剂。示例包括抗原和抗原载体如毒素或其衍生物,包括破伤风类毒素。

#### 噬菌体展示

[0120] 噬菌体展示用于蛋白质相互作用的高通量筛选。噬菌体可用于展示由库或组合抗体文库(例如,人或鼠)表达的抗原结合结构域。可以诸如使用标记的骨桥蛋白或结合于或捕获至固体表面或磁珠的骨桥蛋白,选择或鉴定表达抗原结合结构域的噬菌体,其中所述抗原结合结构域与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段结合。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,其包括由噬菌体表达的具有Fab、Fv(来自轻链或重链的单个Fv区)的fd和M13结合结构域,或与噬菌体基因III或基因VIII蛋白重组融合的二硫键稳定的Fv抗体结构域。示例性方法载于诸如以下出版物之类的文件中:EP 368 684 B1;第5,969,108号美国专利, Hoogenboom, H.R. 和Chames, 今日免疫学, 2000, 21:371; Nagy等人, 自然:医学, 2002, 8:801; Huie等人, 美国国家科学院院刊, 2001, 98:2682; Lui等人, 分子生物学杂志, 2002, 315:1063; 这些出版物中的内容均以引用方式并入本文。一些出版物(例如, Marks等人, 生物技术, 1992, 10:779-783)介绍了通过链替换以及组合感染和体内重组产生高亲和力人抗体作为构建大噬菌体文库的策略。在另一实施例中,核糖体展示可用于替代噬菌体作为展示平台(参见,例如, Hanes等人, 自然:生物技术, 2000, 18:1287; Wilson等人, 美国国家科学院院刊, 2001, 98:3750; 或Irving等人, 免疫学方法杂志, 2001, 248:31)。可以针对抗体进行细胞表面文库筛选(Boder等人, 美国国家科学院院刊, 2000, 97:10701; Daugherty等人, 免疫学

方法杂志,2000,243:211)。此类程序为单克隆抗体分离及后续克隆提供了有别于传统杂交瘤技术的替代方法。

[0121] 在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示于携带编码其的多核苷酸序列的噬菌体颗粒表面上。例如,在动物cDNA文库(例如人或鼠淋巴组织cDNA文库)或合成cDNA文库中扩增编码重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区的DNA序列或以其他方式将所述序列从中分离出来。编码VH区和VL区的DNA可以利用scFv连接子通过PCR连接在一起,并克隆至噬菌粒载体(例如,p CANTAB 6或pComb 3 HSS)中。在大肠埃希菌中电穿孔所述载体,并用辅助噬菌体感染所述大肠埃希菌。所述VH或VL区通常与所述噬菌体基因III或基因VIII重组融合。可以用抗原选择或鉴定表达与目的抗原结合的抗原结合结构域(例如,骨桥蛋白的丝氨酸蛋白酶结构域)的噬菌体,例如,使用标记的抗原或结合于或捕获至固体表面或磁珠的抗原。

[0122] 可用于制造所述抗体的噬菌体展示方法的其他示例包括以下出版物中所公开的方法:第PCT/GB91/01134号PCT专利申请案;第WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401号PCT出版物;以及第5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108号美国专利;这些出版物中的内容均以引用方式全文并入本文。

[0123] 如上文列出的参考文献所述,在噬菌体选择之后,可以分离所述噬菌体中的所述抗体编码区,用于生成完整抗体,包括人抗体,或任何其他所需的抗原结合片段,并在任何所需的宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌。例如,还可使用本领域已知的方法,采用重组产生Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段的技术,例如以下出版物中所公开的方法:第WO 92/22324号PCT出版物;Mullinax等人,生物技术,1992,12:864-869;Sawai等人,AJRI,1995,34:26-34;以及Better等人,科学,1988,240:1041-1043(所述参考文献均以引用方式全文并入本文)。

#### 免疫和抗体产生

[0124] 在宿主动物中促使产生抗体的方法涉及向所述宿主动物(即,合适的哺乳动物如小鼠、家兔或豚鼠,合适的禽类如鸡,或骆驼)施用有效量的骨桥蛋白或其片段作为抗原,以促使产生与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的抗体。可用于在宿主动物中引发免疫应答以产生抗骨桥蛋白抗体的示例性免疫原性肽包括但不限于包含选自由序列号:5-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列或由所述序列组成的免疫原性肽(另见示例)。动物免疫方法(包括所使用的佐剂、加强针时间安排、注射部位、合适的动物等)是本领域所熟知的方法,例如,Harlow等人(抗体:实验室手册,第一版(1988),纽约冷泉港),且针对若干哺乳动物和鸟类,描述了将活细胞施用于动物的情况,例如,McKenzie等人(致癌基因,4:543-8,1989)、Scuderi等人(医学肿瘤学与肿瘤药物治疗,2:233-42,1985)、Roth等人(外科,96:264-72,1984)和Drebin等人(自然,312:545-8,1984)。接下来,生成抗体产生细胞群体。在一实施例中,使用本领域技术人员所熟知的杂交瘤方法产生所述细胞群体(参见,例如,Harlow,抗体:实验室手册,第一版(1988),纽约冷泉港)。细胞与永生化细胞融合,例如骨髓瘤细胞或转化细胞,这些细胞能够在细胞培养中无限复制,从而产生永生化的免疫球蛋白分泌细胞系。可以选择所使用的缺乏利用某些营养素所必需的酶的永生化细胞系。许

多此类细胞系(例如骨髓瘤)是本领域技术人员已知的细胞系,并且包括,例如:胸苷激酶(TK)或次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT)。这些缺乏允许根据融合细胞在诸如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷培养基(HAT)上的生长能力来选择融合细胞。在替代实施例中,可以使用噬菌体展示方法制备表达单克隆抗体的细胞群体。

[0125] 抗骨桥蛋白抗体,包括抗骨桥蛋白抗体的抗原结合片段,也可以通过基因工程产生。在这种技术中,与标准杂交瘤程序一样,抗体产生细胞对所需的抗原或免疫原较为敏感。使用从免疫脾细胞或杂交瘤中分离出的信使RNA作为模板,通过PCR扩增制备cDNA。通过将所述扩增的免疫球蛋白cDNA的适当部分插入所述表达载体中产生载体文库,每个载体均含有一个重链基因和一个轻链基因,所述基因保留有初始抗原特异性。可以通过将所述重链基因文库与所述轻链基因文库组合来构建组合文库。由此得到了共表达重链和轻链(类似于抗体分子的Fab片段或抗原结合片段)的克隆文库。将携带这些基因的载体共转染至宿主(例如细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞或其他合适的蛋白产生宿主细胞)中。在转染宿主中诱导抗体基因合成时,所述重链和轻链蛋白自组装以产生活性抗体,所述抗体可以通过抗原或免疫原筛选来检测。

#### 噬菌体淘选和筛选

[0126] 抗体产生细胞或噬菌体群体产生后,使用多种测定中的一种或组合来筛选所述抗体。通常情况下,这些测定为功能测定,并且可以分组如下:检测抗体的结合亲和力或特异性的测定,以及检测抗体引发或抑制过程的能力的测定。

[0127] 例如,所述抗原与磁珠或孔或其他固体支持物偶联,并与展示所述目的抗体的噬菌体一起孵育。洗涤后,通过接种对数期大肠埃希菌细胞来回收结合的噬菌体。用辅助噬菌体使所述细胞生长和扩增。重复步骤以扩增结合较紧密的噬菌体。收获几轮富集后得到的噬菌体感染的大肠埃希菌菌落,并纯化周质部分中的Fab抗体。然后,根据本领域已知的方法分析所述纯化的抗体。某些示例性示例详见下文。

[0128] 针对与所述多种抗原中的单一抗原(即,不与所述多种抗原中的其他抗原混合的抗原)在体外或原位(例如,在细胞上)结合的情况,进一步分析和/或筛选从噬菌体感染的细胞或杂交瘤中分离出来的抗体群体。可以根据本领域常规且已知的方法进行免疫特异性结合。可使用的免疫测定包括但不限于使用诸如蛋白质印迹之类的技术的竞争性和非竞争性测定系统、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、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射分析测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定,此处仅列举几例。参见,例如,Ausubel等人,编辑,1994,分子生物学实验指南,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,纽约,其以引用方式全文并入本文。

[0129] 本发明的抗体也可以进行体内筛选。所述方法涉及将抗骨桥蛋白抗体施用于疾病或病症(即,骨桥蛋白相关病症)的动物模型,并确定所述抗体对所述模型动物的所述疾病或病症的影响。本发明的体内测定包括对照品,其中合适的对照品包括不存在抗体的样本。通常情况下,用不同浓度的抗体并行处理多份测定混合物,以获得对多种浓度的不同应答。通常,这些浓度中的其中一种用作阴性对照,即,零浓度或低于检测水平。

[0130] 目的单克隆抗体是相较于不含抗体的对照品,调节,即,使动物模型疾病或病症的症状减轻或加重至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约

40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多的抗体。通常情况下,目的单克隆抗体会使得受试动物的状况与未患有疾病或病症的等效动物更为相似。使用本发明的方法和组合物鉴定的具有治疗价值的抗体称之为“治疗性”抗体。

[0131] 可以在体外(使用常规组织培养方法)或体内(使用哺乳动物受试者)扩增选定的目的单克隆抗体。例如,可以将含有对数期杂交瘤细胞的PBS接种于降植烷诱发小鼠,以便产生腹水。在进一步纯化之前,可将腹水储存于-70℃下。

#### 筛选方法

[0132] 本发明提供的筛选方法可以涉及使用噬菌体文库来筛选与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的抗体,并且任选地具有本文所述的任何附加特征(例如,抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合)。可以根据其对骨桥蛋白的有效抑制和/或其特异性结合亲和来选择所述结合剂。可以根据上述噬菌体展示方法执行所述方法。

[0133] 简而言之,骨桥蛋白或其片段可以通过共价或非共价相互作用如疏水性吸附、生物素-亲和素相互作用和 $\text{Ni}^{2+}$ -6×His相互作用固定于ELISA板上或磁珠上。然后,将所述噬菌体文库与固定的抗原/蛋白酶一起孵育,洗涤并回收。在淘选和选择过程中,在大肠埃希菌中回收和扩增所述结合的噬菌体。多轮连续选择确保选择展示多肽的噬菌体,所述多肽充当对骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段具有特异性的抗体。在多轮(例如三轮)选择中,洗涤严格程度增加。可以采用本领域所熟知的许多技术来提高回收的噬菌体的特异性。示例包括增加洗涤时间、提高去污剂浓度、增加盐浓度以及加入已知的大分子抑制剂(例如,小肽底物、BPTI、Ecotin和/或先前鉴定的抗体抑制剂)。抑制性抗体的鉴定可以包括ELISA和抑制测定。上文讨论了在选择和分离抗骨桥蛋白抗体的方法中进行的测定的详细信息。

[0134] 本发明还涵盖编码本文所述的候选抗骨桥蛋白抗体的核酸构建体文库。所述文库编码多种候选抗骨桥蛋白抗体,所述抗体可以具有一个或更多个共同多肽区(例如至少一个重链或轻链CDR)以及至少一个另外的多肽区(其不同于所述群体中的多肽区)。

#### 编码抗骨桥蛋白抗体的核酸、载体和载体系统

[0135] 在某些实施例中,抗骨桥蛋白抗体重链和轻链或其抗体片段(例如,Fab片段、Fab'片段、 $\text{F(ab}')_2$ 片段、 $\text{F}_v$ 片段或scFv片段)通过载体产生。“载体”是可用于将目的核酸递送至细胞内部的物质的组合物。编码抗体轻链和/或重链的多核苷酸或其片段可以用单一载体或通过单独载体(即,载体系统)引入细胞。可以凭经验确定构建体产生抗骨桥蛋白抗体的能力。

[0136] 许多载体是本领域已知的载体,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。病毒载体的示例包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。表达构建体可以在活细胞中复制,也可以合成制得。就本专利申请案而言,术语“表达构建体”、“表达载体”和“载体”可互换使用,以笼统地、例证性地展示本发明的应用,而无意限制本发明构思。

[0137] 在一实施例中,用于表达抗骨桥蛋白抗体的表达载体包含与编码抗骨桥蛋白重链和/或轻链的多核苷酸或其片段(例如,包含其可变结构域CDR的片段)“可操作地连接”的启

动子。本文中使用的短语“可操作地连接”或“在转录控制下”是指启动子相对于多核苷酸的位置和朝向恰当,能通过RNA聚合酶和多核苷酸的表达来控制转录起始。

[0138] 在某些实施例中,编码目的多核苷酸的核酸在启动子的转录控制下。“启动子”是指由细胞合成机制识别或引入合成机制的DNA序列,为基因特异性转录起始所需。本文使用术语启动子来指代聚集在RNA聚合酶I、II或III的起始位点周围的一组转录控制模块。用于哺乳动物细胞表达的典型启动子包括SV40早期启动子、CMV启动子如CMV立即早期启动子(参见,第5,168,062和5,385,839号美国专利,其以引用方式全文并入本文)、小鼠乳腺肿瘤病毒LTR启动子、腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP)和单纯疱疹病毒启动子等。其他非病毒启动子(例如源自鼠金属硫蛋白基因的启动子)也可用于哺乳动物表达。这些启动子和其他启动子均可使用本领域所熟知的技术利用市售质粒获得。参见,例如,Sambrook等人,同上。增强子元件可以与启动子结合使用,以提高构建体的表达水平。示例包括SV40早期基因增强子,详见以下出版物:Di jkema等人,欧洲分子生物学组织期刊,(1985),4:761;源自劳斯肉瘤病毒的长末端重复(LTR)的增强子/启动子,详见以下出版物:Gorman等人,美国国家科学院院刊(1982b),79:6777;以及源自人类CMV的元件,详见以下出版物:Boshart等人,细胞(1985)41:521,例如包括在CMV内含子A序列中的元件。

[0139] 通常,表达构建体中也存在转录终止子/聚腺苷酸化信号。此类序列的示例包括但不限于衍生自SV40的序列,详见以下出版物:Sambrook等人,同上;以及牛生长激素终止子序列(参见,例如,第5,122,458号美国专利)。此外,5'-UTR序列可与所述编码序列毗邻放置,以增强其表达。此类序列可以包括包含内部核糖体进入位点(IRES)的UTR。

[0140] 包括IRES即允许通过载体翻译一个或更多个开放阅读框。IRES元件吸引真核核糖体翻译起始复合物并促进翻译起始。参见,例如,Kaufman等人,核酸研究(1991),19:4485-4490;Gurtu等人,生物化学与生物物理研究通讯(1996),229:295-298;Rees等人,生物技术(1996),20:102-110;Kobayashi等人,生物技术(1996),21:399-402;以及Mosser等人,生物技术(1997)22 150-161。许多IRES序列是已知的,包括衍生自多种病毒的序列,例如小核糖核酸病毒的前导序列如脑心肌炎病毒(EMCV)UTR(Jang等人,病毒学杂志(1989),63:1651-1660)、脊髓灰质炎前导序列、甲型肝炎病毒前导序列、丙型肝炎病毒IRES、人鼻病毒2型IRES(Dobrikova等人,美国国家科学院院刊(2003),100(25):15125-15130)、源自口蹄疫病毒的IRES元件(Ramesh等人,核酸研究(1996)24:2697-2700)、贾第虫病毒IRES(Garlapati等人,生物化学杂志(2004),279(5):3389-3397)等。本文中还使用了多种非病毒IRES序列,包括但不限于源自酵母的IRES序列以及人血管紧张素II1型受体IRES(Martin等人,分子与细胞内分泌学(2003),212:51-61)、成纤维细胞生长因子IRES(FGF-1 IRES和FGF-2 IRES, Martineau等人(2004),分子与细胞生物学,24(17):7622-7635)、血管内皮生长因子IRES(Baranick等人(2008),美国国家科学院院刊,105(12):4733-4738;Stein等人(1998),分子与细胞生物学,18(6):3112-3119;Bert等人(2006),RNA,12(6):1074-1083)和胰岛素样生长因子2 IRES(Pedersen等人(2002),生物化学杂志,363(Pt 1):37-44)。这些元件可以商购获得,其位于诸如由Clontech(加州山景城)、Invivogen(加州圣地亚哥)、Addgene(马萨诸塞州坎布里奇)和GeneCopoeia(马里兰州罗克维尔)出售的质粒中。另请参阅IRESite:经实验验证的IRES结构数据库(iresite.org)。载体中可以包括IRES序列,例如,以表达与来自表达盒的抗骨桥蛋白抗体轻链或其片段组合的抗骨桥蛋白抗体重链或其片段。

[0141] 或者,编码病毒T2A肽的多核苷酸可用于通过单一载体得到多种蛋白质产物(例如,与抗骨桥蛋白抗体轻链或其片段组合的抗骨桥蛋白抗体重链或其片段)。将2A连接肽插入多顺反子构建体的编码序列之间。自裂解的2A肽允许来自多顺反子构建体的共表达蛋白质以等摩尔水平产生。可以使用来自多种病毒的2A肽,包括但不限于衍生自口蹄疫病毒、马鼻肺炎病毒、明脉扁刺蛾病毒和猪捷申-1的2A肽。参见,例如, Kim等人(2011), PLoS One 6(4):e18556; Trichas等人(2008) BMC生物学, 6:40; Provost等人(2007), Genesis, 45(10):625-629; Furler等人(2001), 基因治疗, 8(11):864-873; 其内容以引用方式全文并入本文。

[0142] 包含一种或更多种载体的表达载体或载体系统可用于转化分离的细胞、细胞系或细胞群体,其中目的基因产物(例如,抗体轻链和重链或其片段)由所述一个或多个细胞选择性表达。在一些实施例中,产生和分泌抗骨桥蛋白抗体。所述转化的细胞将所述抗体分泌至周围介质中。所述载体可包括某些调节序列以增强分泌,例如使用组织纤溶酶原激活物(TPA)前导序列、干扰素(或)信号序列或源自已知分泌蛋白的其他信号肽序列增强。然后,可以通过本文所述的各种技术分离所述分泌的抗体,例如,使用标准纯化技术,例如但不限于羟基磷灰石树脂、柱色谱法、离子交换色谱法、尺寸排除色谱法、电泳、HPLC、免疫吸附技术、亲和色谱法、免疫沉淀等。

[0143] 或者,不分泌蛋白,并且使用化学、物理或机械手段破坏转化的细胞,这些手段使细胞裂解且无法使重组蛋白保持基本完整。胞内蛋白也可以通过去除细胞膜上的成分来获得,例如,使用去污剂或有机溶剂去除所述成分,从而引起多肽渗漏。此类方法是本领域技术人员已知的方法,详见,例如,蛋白质纯化应用:实用方法(Simon Roe, 编, 2001)。

[0144] 例如,破坏细胞的方法包括但不限于:声波处理或超声波处理;搅动;液体或固体挤压;热处理;冻融;干燥;爆炸性减压;渗透休克;用裂解酶处理,包括蛋白酶如胰蛋白酶、神经氨酸酶和溶菌酶;碱处理;以及使用清洁剂和溶剂如胆盐、十二烷基硫酸钠、Triton、NP40和CHAPS。用于破坏细胞的特定技术在很大程度上是一个选择问题,其取决于表达多肽的细胞类型、培养条件和使用的任何预处理。

[0145] 细胞遭到破坏后,通常通过离心去除细胞碎片,并使用标准纯化技术进一步纯化细胞内产生的多肽,所述纯化技术诸如(但不限于)柱色谱法、离子交换色谱法、尺寸排除色谱法、电泳、HPLC、免疫吸附技术、亲和色谱法、免疫沉淀等。

[0146] 可以使用亲和纯化来纯化包括重链和轻链或其片段的抗体,例如通过蛋白A亲和色谱法、使用与抗骨桥蛋白重链或轻链表位结合的抗体的免疫亲和色谱法或使用已固定的骨桥蛋白抗原的抗原特异性亲和色谱法进行纯化。本领域技术人员负责选择合适的亲和树脂。在亲和纯化之后,可以使用本领域所熟知的常规技术进一步纯化已表达的抗体,例如通过上述技术中的任一项纯化。

#### 抗体缀合物

[0147] 抗骨桥蛋白抗体也可用于治疗 and 诊断(例如,体内成像等)应用。例如,此类抗体可以与payload缀合,例如治疗剂(例如,细胞毒性payload)或标记剂(例如,体内显像剂),其中所述抗体与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段结合后,所述治疗剂或标记剂被选择性地递送至骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段水平升高的靶细胞(例如,过表达骨桥蛋白的癌细胞)中。所述治疗剂或显像剂对过表达骨桥蛋白的细胞的选择性靶向减少了非靶细胞对治疗剂的非预期暴露,并且可以降低给药时的毒性。此外,在成像应用中(例如,用于诊断、预后和/或

任何其他目的的体内成像),所述抗体对过表达骨桥蛋白的细胞的选择性结合使得显影剂浓缩于此类细胞中,从而使所得图像的信噪比和诊断/预后价值提高。

[0148] 因此,本文所述的任何抗骨桥蛋白抗体可以是未缀合形式的抗体,或者可以与药剂如治疗和/或显像(例如,诊断)剂直接缀合,或者可以与包含此类其他治疗剂或显像剂的载体聚合物间接缀合。

[0149] 在一些实施例中,将所述抗体与细胞毒剂如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)缀合。合适的化疗剂包括:道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等人,(1986)同上)。合适的毒素包括:细菌毒素如白喉毒素;植物毒素如蓖麻毒素;小分子毒素如格尔德霉素(Mandler等人,国立癌症研究所杂志,92(19):1573-81(2000);Mandler等人,生物有机化学与医药化学通讯,10:1025-1028(2000);Mandler等人,生物缀合化学,13:786-91(2002))、美登素(EP 1391213;Liu等人,美国国家科学院院刊,93:8618-23(1996))、auristatins(Doronina等人,自然:生物技术,21:778-84(2003))和卡奇霉素(Lode等人,癌症研究,58:2928(1998);Hinman等人,癌症研究,53:3336-3342(1993))。

[0150] 可以使用放射性同位素、亲和标记(例如生物素、亲和素等)、酶标记(例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光或发光或生物发光标记(例如FITC或罗丹明等)、顺磁性原子等对抗体进行可检测标记。完成此类标记的程序是已知的;例如,参见(Sternberger, L.A.等人,组织化学与细胞化学杂志,18:315(1970);Bayer, E.A.等人, Meth. Enzym., 62:308(1979);Engval, E.等人,免疫学,109:129(1972);Goding, J.W., 免疫学方法杂志,13:215(1976))。

[0151] 在某些方面,本发明的抗骨桥蛋白抗体缀合物的显像剂是可用于体内成像的显像剂,例如近红外(NIR)光学成像、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)/CT成像等。可用于此类应用的标记剂包括但不限于荧光标记和放射性同位素等。在某些方面,所述标记剂是允许使用两种或更多种成像方法进行体内成像的多模式体内显像剂(例如,参见Thorp-Greenwood和Coogan(2011),道尔顿汇刊,40:6129-6143)。

[0152] 抗体部分的缀合请见第6,306,393号美国专利。常规技术另请见以下出版物:Shih等人,国际癌症杂志,41:832-839(1988);Shih等人,国际癌症杂志,46:1101-1106(1990);以及Shih等人,第5,057,313号美国专利。所述常规方法包括使具有氧化碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一种游离胺官能团且负载有多种药物、毒素、螯合剂、硼加成物或其他治疗剂的载体聚合物反应。所述反应可产生初始席夫碱(亚胺)键,其可以通过还原成仲胺来稳定,从而形成最终的缀合物。

[0153] 所述载体聚合物可以是,例如,氨基右旋糖酐或具有至少50个氨基酸残基的多肽。用于将药物或其他药剂与所述载体聚合物缀合的多种技术是本领域中已知的技术。可以用多肽载体代替氨基右旋糖酐,但所述多肽载体的链中应当具有至少50个氨基酸残基,可以是约100-5000个氨基酸残基。至少一些氨基酸应当是赖氨酸残基或谷氨酸或天冬氨酸残基。赖氨酸残基的侧胺和谷氨酰胺与天冬氨酸的侧羧酸酯便于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼加成物或其他治疗剂。合适的多肽载体的示例包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚天冬氨酸、其共聚物,以及这些氨基酸和其他氨基酸如丝氨酸的混合聚合物,以赋予所得负载载体和缀合物所需的溶解度特性。可与所述抗体缀合的药剂的示例包括本文所述的任何细

胞毒性化疗剂。

[0154] 可以通过将抗体组分与治疗剂或标记剂直接缀合来制备缀合的抗体。除了将治疗剂或标记剂与氧化的抗体组分直接连接之外,所述常规程序与所述间接缀合方法类似。例如,抗体的碳水化合物部分可与聚乙二醇连接,从而延长半衰期。

[0155] 治疗剂或标记剂可通过二硫键形成或使用异双功能交联剂如N-琥珀酰基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)与还原抗体组分的铰链区连接。Yu等人,国际癌症杂志,56:244(1994)。此类缀合的常规技术是本领域所熟知的技术。参见,例如,Wong,蛋白缀合与交联的化学反应(CRC Press 1991);Upeslakis等人,“通过化学方法修饰抗体”,单克隆抗体:原理与应用,Birch等人,(编),第187-230页(Wiley-Liss,Inc.1995);Price,“合成肽衍生抗体的生产和表征”,单克隆抗体:生产、工程改造和临床应用,Ritter等人,(编),第60-84页(剑桥大学出版社,1995年)。多种双功能蛋白偶联剂是本领域已知的偶联剂,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫醇烷(IT)、亚氨基酯的双功能衍生物(例如己二酸二甲酯HCL)、活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、乙醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

#### 药物组合物

[0156] 可将抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)配制成任选地包含一种或更多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。示例性赋形剂包括但不限于碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱及其组合。适用于可注射组合物的赋形剂包括水、醇、多元醇、甘油、植物油、磷脂和表面活性剂。碳水化合物如糖、衍生糖如糖醇、醛糖酸、酯化糖和/或糖聚合物可以赋形剂形式存在。具体的碳水化合物赋形剂包括,例如:单糖,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖酐、淀粉等;以及糖醇,例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、吡喃山梨糖醇、肌醇等。赋形剂还可包括无机盐或缓冲液,例如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠及其组合。

[0157] 组合物还可包括用于防止或阻止微生物生长的抗微生物剂。适用于本发明的抗微生物剂的非限制性示例包括苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、氯化十六烷基吡啶、氯丁醇、苯酚、苯乙醇、硝酸苯汞、硫柳汞及其组合。

[0158] 抗氧化剂也可以存在于所述组合物中。抗氧化剂用于防止氧化,从而防止抗体或制剂的其他组分变质。适用于本发明的合适的抗氧化剂包括,例如,抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、次磷酸、硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸氢钠、焦亚硫酸钠及其组合。

[0159] 表面活性剂可以赋形剂的形式存在。示例性表面活性剂包括:聚山梨醇酯如“Tween 20”和“Tween 80”,以及普郎尼克类如F68和F88(BASF,新泽西州芒特奥利夫);山梨糖醇酯;脂质如磷脂,例如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(尽管优选地并非脂质体形式)、脂肪酸和脂肪酯;类固醇如胆固醇;螯合剂如EDTA;以及锌和其他合适的阳离子。

[0160] 酸或碱可以作为赋形剂存在于组合物中。可以使用的酸的非限制性示例包括选自

由盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸及其组合组成的群组的酸。合适的碱的示例包括但不限于选自由氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、

富马酸钾及其组合组成的群组的碱。

[0161] 所述组合物中任何单种赋形剂的量将根据赋形剂的性质和功能以及所述组合物的特定需求而定。通常,任何单种赋形剂的最佳量均是通过常规实验确定的,即,制备含有不同量的赋形剂(从低到高)的组合物,测定稳定性和其他参数,然后确定实现最佳性能且无明显不良反应的量的范围。然而,通常情况下,所述组合物中存在的所述赋形剂的量为约1%至约99%(按重量计),优选地为约5%至约98%(按重量计),更优选地为约15%至约95%(按重量计),最优选地为浓度低于30%(按重量计)。上述这些药用赋形剂以及其他赋形剂详见以下出版物:“雷明顿:药理学与实践”,第19版,Williams&Williams,(1995);“医师手册”,第52版,Medical Economics,新泽西州蒙特威尔(1998);以及Kibbe,A.H.,药用赋形剂手册,第3版,美国制药协会,华盛顿特区,2000。

[0162] 所述组合物涵盖所有类型的制剂,尤其是适合注射的制剂,例如可在使用前用溶剂复溶的粉末或冻干物、即用型注射液或混悬液、在使用前与溶媒混合的干燥不溶性组合物以及在给药前稀释的乳剂和液体浓缩物。用于在注射前复溶固体组合物的合适稀释剂的示例包括抑菌性注射用水、5%右旋糖水溶液、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、生理盐水、无菌水、去离子水及其组合。对于液体药物组合物,设想为溶液和悬浮液。其他优选的组合物包括用于口服或局部递送的组合物。

[0163] 依据预期的递送和使用方式,本文所述的药物制剂也可以装在注射器、植入器械等中。优选地,本文所述的包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)的组合物以单位剂型形式存在,意指一定量的所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)适合以预先测量或预先包装的形式用于单剂量给药。

[0164] 本文所述的组合物可以任选地包括一种或更多种另外的药剂,例如用于治疗骨桥蛋白相关病症的药物或用于治疗受试者的病症或疾病的其他药物。例如,复合制剂可以包括抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)以及一种或更多种用于治疗癌症的药物,例如(但不限于)化疗剂、免疫治疗剂、生物治疗剂、促凋亡剂、血管生成抑制剂、光活化剂、放射增敏药物和放射性同位素。对于黑色素瘤治疗,复合制剂可以包括B-Raf抑制剂、MEK抑制剂或其组合。示例性B-Raf抑制剂包括但不限于达拉菲尼、维莫非尼、索拉非尼、LGX818、GDC-0879和PLX-4720。示例性MEK抑制剂包括但不限于曲美替尼、考比替尼、比美替尼、司美替尼和PD-325901。或者,此类药剂可包含在与包含所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)的组合物分开的组合物中,并且在包含所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)的组合物施用之时、之前或之后联合施用。

#### 治疗骨桥蛋白相关病症的方法

[0165] 本发明提供了治疗与骨桥蛋白活性相关的骨桥蛋白相关病症的方法。示例性骨桥蛋白相关病症包括与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段水平升高相关的任何疾病或病症,包括但不限于炎症、心脏肥大、心肌纤维化和过表达骨桥蛋白的癌症如黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌和肺癌。

[0166] 所述方法通常包括向有相应需求的受试者单独(例如,单一疗法)或与一种或更多

种另外的治疗剂(例如,抗癌治疗剂、B-Raf抑制剂和/或MEK抑制剂)联合(例如,联合疗法)施用治疗有效量的本文所述的任何抗骨桥蛋白抗体、抗原结合片段或缀合物。在某些方面,所述方法包括通过向有相应需求的患者施用治疗有效量的抗骨桥蛋白抗体(例如,本发明的与骨桥蛋白或凝血酶裂解片段特异性结合的抗体,其中所述抗体抑制骨桥蛋白凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白凝血酶裂解片段的结合)来治疗骨桥蛋白相关病症。

[0167] 可以根据所述方法对多个宿主进行治疗。通常情况下,此类宿主是“哺乳动物”,此术语被广泛地用于描述属于哺乳动物类的生物体,包括食肉动物(例如狗和猫)、啮齿类动物(例如小鼠、豚鼠和大鼠)以及灵长类动物(例如人、黑猩猩和猴子)。在多个实施例中,所述宿主是人类。

[0168] 本发明的抗体组合物的前药也涵盖在本文所述的方法中。通常情况下,此类前药是所述化合物的功能衍生物,此类功能衍生物在体内可轻易转化为所需的化合物。因此,在本发明的方法中,术语“施用”涵盖施用具体公开的化合物或未具体公开但施用于有相应需求的患者后在体内转化为特定化合物的化合物。有关用于选择和制备合适的前药衍生物的常规程序请参阅,例如,Wermuth,“设计前药和生物前体”,Wermuth编,药物化学实践,第2版,第561-586页(Academic Press 2003)。前药包括在体内(例如在人体内)水解得到本文所述的化合物的酯。合适的酯基包括但不限于由药学上可接受的脂族羧酸,尤其是链烷酸、链烯酸、环烷酸和链烷二酸衍生的基团,其中各烷基或烯基部分所具有的碳原子不超过6个。示例性酯包括甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯、柠檬酸酯、琥珀酸酯和乙基琥珀酸酯。

### 剂量

[0169] 在本发明的方法中,向有相应需求的受试者施用有效量的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或包括其的缀合物)。所述给药量依据给药目的、治疗的特定骨桥蛋白相关病症、治疗个体的健康状况和身体状况、年龄、治疗个体的分类群(例如人、非人灵长类动物、灵长类动物等)、预期的消退程度、抗骨桥蛋白抗体或缀合物的剂型、主治医师对疾病的评估以及其他相关因素。预计所述量会落在可通过常规试验确定的相对较宽的范围内。例如,用于抑制炎症、心脏肥大、心肌纤维化或癌细胞生长、转移和/或侵袭的抗骨桥蛋白抗体或缀合物的量不超过大致可能对受试者产生不可逆毒性的量(即,最大耐受剂量)。在其他情况下,所述量接近所述毒性阈值甚至远低于毒性阈值,但仍处于有效浓度范围内,甚至低至阈值剂量。

[0170] 个体剂量通常不低于对受试者产生可测量效应所需的量,其可以基于所述抗体或缀合物的吸收、分布、代谢和排泄(“ADME”)的药代动力学和药理学来确定,并且因此,可以基于所述组合物在所述受试者体内的处置情况确定。这包括考虑给药途径和剂量,其可以针对诸如胃肠外(通过消化道以外的途径施用以获得全身或局部效应)给药进行调整。例如,抗骨桥蛋白抗体或缀合物的给药方式通常为局部给药或通过注射(例如,静脉内、肌内或肿瘤内)给药或其组合。

[0171] 所述抗体或缀合物在受试者体内的处置情况及其相应生物活性通常根据目的靶标存在处的抗体占比来衡量。例如,施用后,抗体可在生物靶标(例如骨桥蛋白)处积聚,所述生物靶标将所述物质浓缩于骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段水平升高的患病细胞中。因此,其中施用抗体以便随时间积聚于目的靶标中的给药方案可以是允许施用较低个体剂量

的策略的一部分。这也可能意味着,例如,相对于体外测定计算得出的有效浓度,可以降低体内清除速率更慢的抗体的剂量(例如,体外有效量接近mM浓度,与体内有效量低于mM浓度)。

[0172] 例如,剂量或给药方案的有效量可以根据给定抗体抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合的IC<sub>50</sub>来衡量。“IC<sub>50</sub>”意指体外50%抑制所需的浓度。或者,可以根据给定抗体浓度的EC<sub>50</sub>来衡量所述有效量。“EC<sub>50</sub>”意指在体内获得最大效应的50%所需的血浆浓度。

[0173] 通常情况下,对于本发明的抗骨桥蛋白抗体或缀合物,有效量通常不超过计算得出的IC<sub>50</sub>的200倍。通常,所施用的抗体或缀合物的量相较于计算得出的IC<sub>50</sub>低于约200倍、低于约150倍、低于约100倍,且多个实施例中低于约75倍、低于约60倍、50倍、45倍、40倍、35倍、30倍、25倍、20倍、15倍、10倍,甚至低于约8倍或2倍。在一实施例中,所述有效量是计算得出的IC<sub>50</sub>的约1倍至50倍,有时是计算得出的IC<sub>50</sub>的约2倍至40倍、约3倍至30倍或约4倍至20倍。在其他实施例中,所述有效量与所述计算得出的IC<sub>50</sub>相同,并且在某些实施例中,所述有效量大于计算得出的IC<sub>50</sub>。

[0174] 有效量不得超过计算得出的EC<sub>50</sub>的100倍。例如,所施用的抗体或缀合物的量相较于计算得出的EC<sub>50</sub>低于约100倍、低于约50倍、低于约40倍、35倍、30倍、25倍,且多个实施例中低于约20倍、低于约15倍,甚至低于约10倍、9倍、9倍、7倍、6倍、5倍、4倍、3倍、2倍、1倍。在一实施例中,所述有效量是计算得出的EC<sub>50</sub>的约1倍至30倍,有时是计算得出的EC<sub>50</sub>的约1倍至20倍或约1倍至10倍。在其他实施例中,所述有效量与所述计算得出的EC<sub>50</sub>相同,并且在某些实施例中,所述有效量大于计算得出的EC<sub>50</sub>。

[0175] 有效量可以在测定、安全性和剂量递增和剂量范围试验、个体临床医生-患者关系以及体外和体内试验中轻易地凭经验确定。

#### 给药

[0176] 施用抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合的至少一种治疗有效剂量的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)。抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段的“治疗有效剂量或量”意指在施用时对个体骨桥蛋白相关病症的治疗产生积极治疗效果的量。特别受关注的是提供抗肿瘤或抗炎效应或缓解心脏肥大或心肌纤维化的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段的量。“积极治疗效果”是指接受本发明的治疗的个体中其正在接受相应治疗的骨桥蛋白相关病症的一种或更多种症状有所改善。

[0177] 因此,例如,“积极治疗效果”是与治疗相关的疾病的改善,和/或与治疗相关的疾病的一种或更多种症状的改善。例如,癌症治疗的积极治疗效果是指以下疾病症状改善中的一项或更多项:(1)肿瘤大小缩小;(2)癌细胞数量减少;(3)抑制(即,在一定程度上减缓,优选地停止)肿瘤生长;(4)抑制(即,在一定程度上减缓,优选地停止)癌细胞浸润至外周器官;(5)抑制(即,在一定程度上减缓,优选地停止)肿瘤转移;以及(6)在一定程度上缓解与癌症相关的一种或更多种症状。此类治疗效果可以进一步表征为改善程度。因此,例如,改善可以表征为完全缓解。“完全缓解”是指经体格检查、实验室、核和放射学研究(即,CT(计算机断层扫描)和/或MRI(磁共振成像))以及在参加研究时对所有初始异常或阳性部位重复进行的其他非侵入性程序证实,所有可测量或可评价疾病的所有症状和体征消失。或者,所述疾病的改善可归类为部分缓解。“部分缓解”意指与治疗前测量结果(仅针对具有可评

价缓解的患者,部分缓解不适用)相比,所有可测量病灶的垂直直径的乘积之和减少50%以上。

[0178] 在某些实施例中,多种治疗有效剂量的组合物(其包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物))和/或一种或更多种其他治疗剂(例如用于治疗癌症、炎症、心脏肥大、心肌纤维化的其他药物)或其他用药将按照每日给药方案给药或间歇性给药。例如,可以一周一天、一周两天、一周三天、一周四天或一周五天等施用治疗有效剂量。“间歇性”给药意指可以诸如每隔一天、每隔两天、每隔三天等施用治疗有效剂量。例如,在一些实施例中,抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)在较长时间(例如,1、2、3、4、5、6、7、8...10...15...24周等)内每周施用两次或每周施用三次。“每周两次”意指在从给药第一周的第1天开始起计的7天期限内,向受试者施用两次治疗有效剂量的所讨论的药剂,两次给药之间的间隔时间至少为72小时,至多为96小时。“每周三次”意指在7天期限内,向受试者施用三次治疗有效剂量,使得两次给药之间的间隔时间至少为48小时,至多为72小时。就本发明而言,这种类型的给药被称为“间歇性”治疗。根据本发明的方法,受试者可以接受间歇性治疗(即,每周两次或每周三次施用治疗有效剂量),持续一个或更多个周期(一周为一周期),直到达到预期治疗效果。可以通过如下文所述的任何可接受的给药途径施用所述药剂。

[0179] 包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(其缀合物)的所述组合物通常(但不一定)口服、通过注射(皮下、静脉内或肌内)、通过输注外部或局部给药。还涵盖了其他给药方式,例如动脉内、腹膜内、肺、鼻、经皮、病灶内、胸膜内、实质内、直肠、经皮、经粘膜、鞘内、心包、动脉内、眼内给药等。抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)通过注射给药时,可以通过连续输注或通过单次或多次推注给药。

[0180] 例如,所述抗骨桥蛋白抗体或缀合物可以通过输注或通过局部注射给药,例如,通过以约50mg/h至约400mg/h,包括约75mg/h至约375mg/h、约100mg/h至约350mg/h、约150mg/h至约350mg/h、约200mg/h至约300mg/h、约225mg/h至约275mg/h的速率输注给药。预期治疗剂量的示例性输注速率可以达到,例如,约0.5毫克/平方米/天至约10毫克/平方米/天,包括约1毫克/平方米/天至约9毫克/平方米/天、约2毫克/平方米/天至约8毫克/平方米/天、约3毫克/平方米/天至约7毫克/平方米/天、约4毫克/平方米/天至约6毫克/平方米/天、约4.5毫克/平方米/天至约5.5毫克/平方米/天。可以在预期期限内重复给药(例如,通过输注),例如在约1天至约5天的期限内重复给药或每隔若干天(例如,约5天、约1个月、约2个月等)重复给药一次。

[0181] 根据本发明的制剂也适用于局部治疗。在一具体实施例中,组合物用于局部递送抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物),以治疗癌症。例如,可以将组合物直接施用于肿瘤或癌细胞。可以通过局部导管灌注或直接病灶内注射给药。对于黑色素瘤的治疗,组合物可以局部给药,例如,以施用于病灶部位的皮肤上的含有抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)的乳膏或凝胶形式给药。

[0182] 所述药物制剂在给药前可以液体溶液或悬浮液的形式存在,但也可以另一种形式存在,例如糖浆、乳膏、软膏、片剂、胶囊、粉剂、凝胶、基质、栓剂等。可以根据本领域已知的任何医学上可接受的方法,使用相同或不同的给药途径施用包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)和其他药剂的所述药物组合物。

[0183] 在另一实施例中,预防性施用包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)和/或其他药剂的所述药物组合物,例如,以防止骨桥蛋白相关病症发展或进展。对于具有较高癌症进展或心脏肥大或纤维化风险的受试者而言,此类预防用途具有特殊价值。

[0184] 在本发明的另一实施例中,包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)和/或其他药剂的所述药物组合物处于缓释制剂或使用缓释器械给药的制剂中。此类器械是本领域所熟知的器械,并且包括,例如,透皮贴剂和微型植入泵,其可以在多种剂量下以连续、稳态的方式随时间递送药物,使非缓释药物组合物达到缓释效果。

[0185] 本发明还提供了向骨桥蛋白相关病症患者施用包含本文提供的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段的缀合物(例如,与治疗剂、可检测标记或显像剂缀合)的方法。所述方法包含通过本文所述的任何方式施用治疗有效量的所述缀合物或药物递送系统,优选地作为药物组合物的一部分提供。所述施用方法可用于治疗对抗骨桥蛋白抗体治疗有反应的任何骨桥蛋白相关病症。更具体地讲,本文所述的组合物可有效治疗与骨桥蛋白表达升高相关的炎症、心脏肥大/纤维化和癌症。

[0186] 本领域普通技术人员将认识到抗骨桥蛋白抗体可以有效治疗哪些病症。待施用的实际剂量将依据受试者的年龄、体重和全身情况以及正在接受治疗的病症的严重程度、医护人员的判断以及正在施用的缀合物而定。本领域技术人员负责确定治疗有效量,并根据每个具体病例的具体要求进行调整。

[0187] 通常情况下,治疗有效量的范围为每天约0.50mg至5g抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物),更优选地为每天约5mg至2g,甚至更优选地为约每天7mg至1.5g。优选地,此类剂量的范围为10-600mg每日四次(QID)、200-500mg QID、25-600mg每日三次(TID)、25-50mg TID、50-100mg TID、50-200mg TID、300-600mg TID、200-400mg TID、200-600mg TID、100-700mg每日两次(BID)、100-600mg BID、200-500mg BID或200-300mg BID。施用的化合物的量将取决于特异性抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)的效力以及预期的效应尺度或效果以及给药途径。

[0188] 按照基于临床医师的判断、患者的需求等得出多种给药时间安排,纯化的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物(再次优选地作为药物制剂的一部分提供)可以单独施用,也可以与一种或更多种用于治疗骨桥蛋白相关病症的另外的治疗剂组合施用,例如抗癌治疗剂,例如化疗、免疫治疗、生物或靶向治疗剂或用于治疗特定病症或疾病的其他用药。所述具体的给药时间安排是本领域普通技术人员已知的时间安排,或者可以使用常规方法通过实验确定。示例性给药时间安排包括但不限于每天施用五次、每天施用四次、每天施用三次、每天施用两次、每天施用一次、每周施用三次、每周施用两次、每周施用一次、每月施用两次、每月施用一次及其任意组合。优选的组合物是每天给药不超过一次的组合物。

[0189] 抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物可以在其他药剂施用之前、之时或之后施用。如果与其他药剂同时提供,则所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物可以相同或不同的组合物提供。因此,所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物和其他药剂可以通过同时治疗的方式施用于所述个体。“同时治疗”意指施用于受试者,使得物质组合在接受治疗的受试者中产生治疗效果。例如,根据特定给药方案,可以通过施用一剂包含抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物的药物组合物以及一剂包含至

少一种其他药剂(例如治疗癌症的另一种药物)的药物组合物来实现同时治疗,其组合起来包含治疗有效剂量。类似地,所述抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物和一种或更多种其他治疗剂可以至少一种治疗剂量施用。所述单独的药物组合物的给药可以同时进行,也可以在不同时间(即,依次、按任意顺序、在同一天或在不同日期)进行,前提是这些物质的组合在接受治疗的受试者中产生治疗效果。

[0190] 根据前述给药方案接受治疗的受试者在经历较长的缓解期后表现出部分缓解或复发时,其后续可能需要接受同时治疗疗程,以实现疾病的完全缓解。因此,在第一个治疗期结束一段时间后,受试者可以接受一个或更多个另外的用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物治疗的治疗期。两个治疗期之间的这样一段时期在本文中被称为停药期。应当认识到,停药期的时长取决于用这些治疗剂进行同时治疗的任何既往治疗期所实现的肿瘤缓解程度(即,完全缓解与部分缓解)。

[0191] 在癌症患者中,使用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物进行的治疗可以与任何其他癌症医学治疗组合,例如(但不限于)手术、放疗、化疗、激素治疗、免疫治疗或分子靶向或生物治疗。这些其他医学治疗方法与抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物的任何组合可用于有效治疗受试者的癌症。

[0192] 例如,使用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物进行的治疗可以与使用一种或更多种化疗剂进行的化疗组合,所述化学剂诸如(包括但不限于)阿比曲沙、阿霉素、阿霉素、阿霉素、氨苄青霉素、天冬酰胺酶、蒽环类、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、BicNU、硫酸博来霉素、白消安、博来霉素、喜树碱、喜树碱、卡铂、卡莫司汀、盐酸佐柔比星、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、更生霉素、阿糖胞苷、赛德萨、环磷酰胺、环磷酰胺、放线菌素、多西紫杉醇、多柔比星、柔红霉素、表阿霉素、爱施巴、表柔比星、依托泊苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟达拉、吉西他滨、吉扎尔、美新、羟基脲、爱治、伊达霉素、伊达比星、异环磷酰胺、环磷酰胺、伊立替康、兰维斯、白细胞介素、亮抑素、甲基苄肼、氮芥、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托蒽醌、光神霉素、密吐霉素、马勒兰、阿托胞苷、诺维本、喷司他丁、盐酸米托恩醌、长春碱、奥沙利铂、紫杉醇、伯尔定、脱氧助间型霉素、顺氯氨铂、普卡霉素、甲苄肼、乐疾宁、雷替曲塞、泰索帝、泰素、替尼泊甙、硫鸟嘌呤、雷替曲塞、拓扑替康、戊柔比星、长春花碱、凡毕士、长春碱、长春地辛、长春新碱、长春瑞滨、VP-16和足叶噻吩昔。

[0193] 在另一示例中,使用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物进行的治疗可以与使用一种或更多种小分子抑制剂或单克隆抗体进行的靶向治疗组合,所述靶向治疗剂诸如(但不限于)酪氨酸激酶抑制剂,例如甲磺酸伊马替尼(Gleevec,也称为STI-571)、吉非替尼(Iressa,也称为Zd1839)、厄洛替尼(市售Tarceva)、索拉非尼(Nexavar)、舒尼替尼(Sutent)、达沙替尼(Sprycel)、拉帕替尼(Tykerb)、尼洛替尼(Tasigna)和硼替佐米(Velcade);Janus激酶抑制剂,例如托法替尼;ALK抑制剂,如克唑替尼;Bcl-2抑制剂,例如甲磺酸盐和棉酚;PARP抑制剂,例如Iniparib和奥拉帕尼;PI3K抑制剂,例如哌立福新;VEGF受体2抑制剂,例如阿帕替尼;与[D-Lys(6)]-LHRH连接的AN-152(AEZS-108)多柔比星;Braf抑制剂,例如维罗非尼、达拉菲尼和LGX818;MEK抑制剂,例如曲美替尼;CDK抑制剂,例如PD-0332991和LEE011;Hsp90抑制剂,例如盐霉素;小分子药物缀合物,例如长春瑞滨;丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂,例如替西罗莫司(Torisel)、依维莫司(Afinitor)、维罗非尼(Zelboraf)、曲美替尼(Mekinist)和达拉菲尼(Tafinlar);以及单克隆抗体,例如利妥昔单

抗(以MabThera或Rituxan的名称市售)、曲妥珠单抗(Herceptin)、阿仑单抗、西妥昔单抗(以Erbix的名称市售)、帕尼单抗、贝伐单抗(以Avastin的名称市售)和伊匹单抗(Yervoy)。

[0194] 在另一示例中,使用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物进行的治疗可以与使用以下任何一项进行的免疫治疗组合,包括但不限于:癌症疫苗(例如,E75HER2衍生的肽疫苗,nelipepimut-S (NeuVax)、Sipuleucel-T)、抗体治疗(例如,曲妥珠单抗、恩美曲妥珠单抗、阿仑单抗、伊匹单抗、奥法木单抗、纳武单抗、派姆单抗或利妥昔单抗)、细胞因子治疗(例如,干扰素,包括I型(IFN $\alpha$ 和IFN $\beta$ )、II型(IFN $\gamma$ )和III型(IFN $\lambda$ )以及白介素,包括白介素-2(IL-2)、辅助免疫化疗(例如,多糖-K)、过继性T细胞治疗和免疫检查点阻断治疗。

[0195] 在另一示例中,使用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物进行的治疗可以与使用放射性同位素进行的放疗组合,包括但不限于碘-131、锶-89、钷-153和镭-223。此外,放疗可以与放射增敏药物的施用组合,例如但不限于顺铂、尼莫拉唑和西妥昔单抗。

[0196] 对于黑色素瘤患者,使用抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段或其缀合物进行的治疗可以与B-Raf抑制剂、MEK抑制剂或其组合的施用组合。示例性B-Raf抑制剂包括但不限于达拉菲尼、维莫非尼、索拉非尼、LGX818、GDC-0879和PLX-4720。示例性MEK抑制剂包括但不限于曲美替尼、考比替尼、比美替尼、司美替尼和PD-325901。

#### 试剂盒

[0197] 试剂盒可以包括本文所述的任何组合物。例如,试剂盒可以包括:包含抗骨桥蛋白抗体、其抗原结合片段、抗骨桥蛋白抗体缀合物的组合物;包含抗骨桥蛋白抗体和/或其缀合物的药物制剂;编码抗骨桥蛋白抗体和/或宿主细胞的重组核酸或载体系统(用编码抗骨桥蛋白抗体的重组核酸或载体系统转染或分开)。

[0198] 在一些实施例中,所述试剂盒包含与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段特异性结合的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体抑制骨桥蛋白的凝血酶裂解或整合素与骨桥蛋白的凝血酶裂解片段的结合。在某些实施例中,所述试剂盒包含抗骨桥蛋白抗体缀合物或包括所述抗体和/或缀合物的制剂。

[0199] 在某些实施例中,所述试剂盒中包括的所述抗体或其抗原结合片段与OPN-R片段或OPN-CTF片段特异性结合。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与包含骨桥蛋白的Arg168的表位特异性结合。在某些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段与包含选自序列号:1-7、序列号:9-12和序列号:47组成的群组的序列的骨桥蛋白肽特异性结合。

[0200] 在某些实施例中,所述试剂盒中包括的所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:29所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:30所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:31所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:32所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:33所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:34所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:14或序列号:18所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:16或序列号:20所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0201] 在某些实施例中,所述试剂盒中包括的所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:35所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:36所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:37所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:38所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:39所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:40所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:22所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:24所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0202] 在某些实施例中,所述试剂盒中包括的所述抗体或其抗原结合片段包含以下各项:包含所述序列号:41所示氨基酸序列的重链互补决定区1(CDR-H1);包含所述序列号:42所示氨基酸序列的重链互补决定区2(CDR-H2);包含所述序列号:43所示氨基酸序列的重链互补决定区3(CDR-H3);包含所述序列号:44所示氨基酸序列的轻链互补决定区1(CDR-L1);包含所述序列号:45所示氨基酸序列的轻链互补决定区2(CDR-L2);以及包含所述序列号:46所示氨基酸序列的轻链互补决定区3(CDR-L3)。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链,所述重链包含所述序列号:26所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。在一些实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含轻链,所述轻链包含所述序列号:28所示氨基酸序列,或与所述氨基酸序列的序列同一性至少约为80-100%的序列,包括此范围内的任何同一性百分比,例如与所述氨基酸序列的序列同一性为81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0203] 在某些实施例中,所述试剂盒中包括的所述抗骨桥蛋白抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、纳米抗体、双特异性抗体、双特异性T细胞接合抗体、三特异性抗体、Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F<sub>v</sub>片段或scFv片段。

[0204] 所述试剂盒可以包括一种或更多种包括本文所述的抗体组合物的药物制剂。因此,所述试剂盒可以包括以一种或更多种单位剂量形式存在的单一药物组合物。在其他实施例中,所述试剂盒可以包括两种或更多种单独的药物组合物。在一些实施例中,所述药物

组合物适用于局部递送(例如,包含用于治疗黑色素瘤的抗体或缀合物的凝胶或乳膏)。

[0205] 在一些实施例中,所述试剂盒可以进一步包括包含B-Raf抑制剂、MEK抑制剂或其组合的组合物。

[0206] 在一些实施例中,所述试剂盒进一步包括包含一种或更多种抗癌治疗剂的组合物,所述抗癌治疗剂包括但不限于化疗剂、免疫治疗剂、生物治疗剂、促凋亡剂、血管生成抑制剂、光活化剂、放射增敏剂和放射性同位素或其组合。

[0207] 组合物可以是液体组合物,也可以是冻干组合物。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可以由各种材料制成,例如玻璃或塑料。容器具有无菌入口(例如,所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。所述试剂盒可进一步包含容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液或右旋糖溶液。它还可以含有对最终用户有用的其他物质,包括其他药学上可接受的配制溶液如缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器或其他递送器械。所述试剂盒还可以提供预填充有抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)的递送器械。

[0208] 除上述组分外,标的试剂盒可以进一步包括(在某些实施例中)用于实施标的方法的说明书(即,治疗本文所述的骨桥蛋白相关病症的说明书)。这些说明书可能以多种形式存在于标的试剂盒中,其中一种或更多种可能存在于所述试剂盒中。这些说明书可能存在的一种形式是印在合适的介质或基材(例如,其上印有信息的一张纸或几张纸)、试剂盒包装、包装说明书等之上的印刷信息。这些说明书存在的另一种形式是其上已记录有信息的计算机可读介质,例如,软盘、光盘(CD)、DVD、蓝光光盘、便携式闪存驱动器等。这些说明书可能存在的另一种形式是网址,可以借此通过互联网访问远程网站上的信息。

#### 效用

[0209] 本文所述的抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)可用于治疗骨桥蛋白相关病症,其包括与骨桥蛋白或其凝血酶裂解片段水平升高相关的任何疾病或病症,例如炎症、心脏肥大、心肌纤维化和过度表达骨桥蛋白的癌症如黑色素瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、乳腺癌和肺癌。

[0210] 详细地讲,抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)可用于治疗黑色素瘤,包括但不限于恶性雀斑样痣、恶性雀斑样痣黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、肢端雀斑样痣黑色素瘤、黏膜黑色素瘤、结节性黑色素瘤、息肉样黑色素瘤和结缔组织增生性黑色素瘤。黑色素瘤细胞的基因组DNA序列可能含有变化(突变),这意味着黑色素瘤细胞编码的蛋白与患者身体其他部位的蛋白有所不同。例如,参与向细胞发出生长信号的蛋白B-RAF可能会发生突变。详细地讲,抗骨桥蛋白抗体或其抗原结合片段(或其缀合物)可用于治疗B-RAF突变的黑色素瘤,包括但不限于包含V600E突变或V600K突变的黑色素瘤。抗骨桥蛋白抗体(或其抗原结合片段)可用于治疗任何分期的黑色素瘤,包括转移性黑色素瘤。

#### 实验

[0211] 提出以下示例是为了向本领域普通技术人员完整地公开并叙述构建及使用本发明的方法,并且无意限制发明人所认为其发明的范围,也无意表示以下实验是全部或唯一进行的实验。已经努力确保所使用数字(例如数量、温度等)的准确性,但是应该考虑到一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数为重量份数,分子量为重均分子量,温度为摄氏度,压力指大气压或接近大气压。

[0212] 在本说明书中引用的所有出版物和专利申请通过引用方式并入本文中,犹如每一单独出版物或专利申请被具体地和单独地表明通过引用方式并入。

为了包括本发明优选的实施方式,已根据发明人发现或提出的特定实施例来描述本发明。本领域技术人员应当理解,根据本发明所述,在不脱离本发明的预定范围的情况下,可对例举的特定实施例做出大量修改和变更。例如,由于密码子冗余,可以在不影响蛋白质序列的情况下改变潜在的DNA序列。此外,出于对生物功能等效性的考虑,可以在不影响生物作用种类或数量的情况下改变蛋白质的结构。所有这些修改都会包括在所附权利要求的范围内。

#### 示例1

##### 骨桥蛋白的凝血酶裂解促进黑色素瘤的生长和进展

[0213] 骨桥蛋白(OPN)是一种多功能基质细胞蛋白,具有高度保守的RGD结构域,可与多种整合素结合。凝血酶使OPN裂解成两个片段,即,具有新整合素结合位点的OPN-R以及增强趋化性的C端片段(CTF)(图1)。C端具有SVVYGLR(序列号:3)的OPN-R与整合素·4·1和·9·1结合。凝血酶裂解位点的精氨酸突变为丙氨酸(R153A)使OPN对凝血酶裂解具有抗性。据Nemoto等人(骨与矿物质研究杂志,2001)报告称,B16黑色素瘤的生长在缺乏OPN的小鼠(OPN基因敲除[KO]小鼠)中受到抑制。然而,尽管对OPN在癌症进展中的重要性开展了大量研究,但仍不清楚OPN凝血酶裂解的作用。

[0214] 为了进一步了解OPN凝血酶裂解在炎性疾病和癌症的病理学中的作用,通过在实验小鼠模型中将Arg153Ala突变引入OPN基因来消除OPN的凝血酶裂解位点。通过用Ala(OPNR153A;OPN敲入[KI])置换Arg153,得到具有抗凝血酶裂解的OPN的小鼠。将B16黑色素瘤细胞皮下接种于小鼠肋腹,监测肿瘤生长情况,并在小鼠处死后测量其肿瘤重量。在转移模型中,通过尾静脉向小鼠静脉注射B16黑色素瘤细胞,小鼠处死后,通过目测结节数量以及测定黑色素含量(黑色素是肺中黑色素瘤细胞数量的公认衡量标准),量化肺中的黑色素瘤。向一些小鼠喂食含有凝血酶抑制剂达比加群酯的食物。

[0215] 在野生型(WT)小鼠中观察到肿瘤稳健生长,而在监测处死之前体积随时间的变化或重量时,OPN基因敲除(KO)和OPNR153A-KI小鼠的肿瘤生长被抑制到大致相同的程度(图2A-2B)。在转移模型中,与OPN KI小鼠相比,WT小鼠肺部的肿瘤结节更多,且肺部的黑色素更多(图3A-3B)。

[0216] 通过用特定的口服凝血酶抑制剂达比加群酯(DE)处理小鼠,证实了OPN凝血酶裂解的作用。在用DE处理的野生型小鼠(WT)中,肋腹上的肿瘤生长(图4A-4B)降低至在OPN-KI小鼠中观察到的相同水平。类似地,在转移模型中,WT小鼠中的转移减少至在OPN-KI和OPN-KO小鼠中观察到的相同水平(图5A-5B)。

[0217] 为了证明OPN的凝血酶裂解在其他癌症中的重要性,使用了卵巢癌模型,其中Id8细胞(卵巢癌)经腹膜间注射。对小鼠进行称重,因为体重增加量即为肿瘤生长量。与WT小鼠相比,OPN-KI小鼠中Id8卵巢癌肿瘤的生长显著减慢。

[0218] 我们的数据首次证实了OPN凝血酶裂解在癌症生物学中的重要性。在OPN KI小鼠中,B16肿瘤生长减慢至相等于无OPN的水平,这表明宿主OPN的凝血酶裂解在体内黑色素瘤生长中起关键作用。此外,与WT小鼠相比,OPN KI小鼠中的Id8卵巢癌生长受到抑制。用凝血酶抑制剂达比加群酯处理时,可使皮下植入和转移模型中B16黑色素瘤的生长减慢,达到与

在缺乏OPN的小鼠或具有凝血酶无法裂解的OPN的小鼠中观察到的相似的水平。

### 示例2

#### 治疗性单克隆抗体

[0219] 使用OPN-KI小鼠的黑色素瘤和卵巢癌研究(示例1)的结果表明,阻断OPN裂解和/或阻断OPN片段具有治疗性干预黑色素瘤和其他癌症的潜力。针对以下靶标生成不同形式(mAB、双特异性、三特异性、纳米抗体等)的单克隆抗体:

OPN-FL:阻断OPN裂解的抗体:

针对人OPN中的SVVGLR(序列号:1)或SKSKKF(序列号:2)或与凝血酶阴离子结合外位点1和2结合的OPN序列的抗体。

OPN-R:使用针对人OPN中暴露的SVVYGLR(序列号:3)的抗体阻断整合素与OPN-R结合的抗体

OPN-CTF:在人OPN中阻断SKSKKFRR(序列号:4)序列从而阻断CTF多聚化的抗体应用:

[0220] 可以使用抗体作为单一疗法用药或与标准疗法联用的药物来治疗黑色素瘤和其他癌症。产生用于功能性阻断OPN凝血酶裂解位点(SVVYGLRSSKKKF,序列号:9)、OPN-RSVVYGLR(序列号:3)整合素结合基序和OPN-CTF区SKSKKFRRPD(序列号:10)的单克隆抗体可以获得疗效,这与癌症中的CTF多聚化有关。靶向OPN在凝血酶上的结合位点、外位点1和2的抗体也可用于减少凝血酶对OPN的裂解。与凝血酶结合外位点1和2特异性结合但不干扰凝血酶促凝血活性的肽也可能有用。

[0221] 如果使用凝血酶抑制剂或其他抗凝剂,则抗体可用于实现预防OPN裂解的有益效果,且无出血风险副作用。

### 示例3

#### 抑制凝血酶裂解骨桥蛋白的单克隆抗体的产生

[0222] 我们的目标是鉴定与全长骨桥蛋白(OPN-FL)结合并阻断其被凝血酶裂解的单克隆抗体(Mab)。图7展示了源自家兔、大鼠、小鼠、人、恒河猴、食蟹猴和猪的凝血酶裂解位点周围的OPN蛋白序列的比对情况。在家兔中使用与钥孔血蓝蛋白(KLH)共价结合的肽抗原**YGLRSKS**(序列号:11,以粗体显示的氨基酸被凝血酶裂解)来产生抗体,以得到兔单克隆抗体。用聚乙二醇(增加溶解度)和6-氨基己酸(Ahx)连接子(C端Cys与Ahx(PEG)<sub>3</sub>-YGLRSKS-Ahx-C)连接)修饰肽抗原。选择家兔的原因在于其凝血酶裂解位点周围的OPN序列与小鼠和人序列:**YRLKRSKS**(序列号:47,以粗体显示的氨基酸被凝血酶裂解)有所不同。产生与肽抗原结合的抗体的细胞克隆其重链和轻链cDNA,并将其插入表达兔IgG的表达载体中。接着,将这些表达载体转染至HEK293F细胞中,并进行培养基测定。然后,使用抗体筛选来鉴定产生与小鼠、大鼠和人OPN反应的抗体的克隆。

[0223] 使用针对OPN抗原肽的直接ELISA筛选兔单克隆克隆(图8)。鉴定了35个阳性结果(已示出)。对于鉴定产生抗OPN IgG的克隆的测定,将2·g/mL亲和素涂覆于96孔板上过夜,然后加入用生物素标记的OPN抗原肽,放置30分钟。接着,将克隆上清液按1:50的比例稀释,然后用稀释了10<sup>3</sup>倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔IgG Fc进行检测。加入HRP底物并测量颜色。

[0224] 为了确定克隆上清液中IgG的浓度,将2·g/mL抗兔IgG涂覆于96孔板上过夜。接

着,将克隆上清液按1:50的比例稀释,然后用稀释了 $10^3$ 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔IgG Fc进行检测。加入HRP底物并测量颜色。依据兔IgG的标准稀释曲线计算克隆上清液中的IgG浓度。

[0225] 图9展示了在针对抗原肽、小鼠OPN-FL和人OPN-FL的直接ELISA中筛选兔单克隆抗体的结果。鉴定了与源自人或小鼠的OPN-FL结合的克隆。选定了四种克隆(A2、A6、E5和G7)作进一步研究。在肽抗原结合测定中确定这四种克隆的 $EC_{50}$ (图10)。为了确定纯化抗OPN IgG的 $EC_{50}$ ,将 $2 \cdot g/mL$ 亲和素涂覆于96孔板上过夜,然后加入用生物素标记的OPN抗原肽,放置30分钟。接着,通过与蛋白A/G Sepharose磁珠结合并洗脱来纯化选定克隆上清液中的IgG。连续稀释纯化IgG,然后用稀释了 $10^3$ 倍的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔IgG Fc进行检测。加入HRP底物并测量颜色。

[0226] 图11展示了OPN抗原肽结合中四种克隆的 $EC_{50}$ 值。基于图10中的数据,使用Prism Graphpad通过4参数拟合方程计算 $EC_{50}$ 值。对于A2克隆、A6克隆、E5克隆和G7克隆, $EC_{50}$ 值分别为 $2.6ng/mL$ 、 $3.2ng/mL$ 、 $4.0ng/mL$ 和 $93.2ng/mL$ 。

[0227] 在针对小鼠OPN-FL的直接结合ELISA中确定四种克隆的 $EC_{50}$ 值(图12),并且发现所有克隆,包括A2、A6和E5,都与小鼠OPN-FL结合。将含有山羊多克隆抗小鼠骨桥蛋白IgG( $2\mu g/ml$ )(R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)的PBS缓冲液包被于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。用含有1%BSA的PBS稀释重组小鼠骨桥蛋白(R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)(从 $200ng/ml$ 开始并予以稀释),并孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品( $500ng/ml$ )置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG抗体( $100ng/ml$ )置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后,将四甲基联苯胺底物孵育10分钟,然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。

[0228] 此外,在针对人OPN-FL的直接结合ELISA中确定了四种克隆的 $EC_{50}$ 值,发现所有这四种克隆都与人OPN-FL结合(图13)。将含有小鼠单克隆抗人骨桥蛋白抗体( $4 \cdot g/ml$ )(R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波里斯)的PBS缓冲液涂覆于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。用含有1%BSA的PBS稀释重组人骨桥蛋白(GST-OPN-his,内部纯化)(从 $200ng/ml$ 开始并予以稀释),并孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品( $500ng/ml$ )置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后,将样本和过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG抗体( $100ng/ml$ )置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后,将四甲基联苯胺底物孵育10分钟,然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。

[0229] 接下来,在针对OPN-R的特异性ELISA中,通过检测对裂解产物中其中一种(即,OPN-R)的产生的抑制,确定源自这四种克隆的单克隆抗体抑制人OPN-FL凝血酶裂解的能力。发现所有这四种克隆都抑制人OPN-FL的凝血酶裂解(图14)。在含或不含纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品的情况下,将重组人骨桥蛋白( $3.2 \cdot M$ ,内部纯化)置于室温下孵育20分钟。向样本中加入人凝血酶( $32nM$ )(R&D Systems),并将其置于 $37^\circ C$ 下孵育10分钟,然后加入PPACK,使浓度达到 $4.8\mu M$ 。用含有1%BSA的PBS按1/300的比例稀释样本,然后通过OPN-R特异性ELISA测量所产生的OPN-R。

人OPN-R ELISA:

[0230] 将含有小鼠单克隆抗人骨桥蛋白抗体 ( $4 \cdot \text{g/ml}$ ) (R&D Systems, 明尼苏达州明尼阿波里斯) 的PBS缓冲液涂覆于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。用含有1%BSA的PBS稀释重组人OPN-R蛋白 (GST-OPN-R, Myles等人, 2003, JBC) (从200ng/ml开始并予以稀释), 将所得溶液用作标准品。将标准品和凝血酶裂解产物样本 (从1/300稀释度开始并作进一步稀释) 孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后, 将样本和生物素化兔多克隆抗OPN-R抗体 ( $500\text{ng/ml}$ ) (Sharif等人, 2009A+R) 置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后, 将样本与过氧化物酶缀合的链霉亲和素 ( $100\text{ng/ml}$ ) 置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后, 将四甲基联苯胺底物孵育10分钟, 然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。基于OPN-R ELISA中的OPN-R标准, 计算每个样本中产生的OPN-R的量, 然后计算不同浓度下每种抗体克隆对凝血酶裂解的抑制程度并绘制相应图表。图15展示了四种克隆在抑制人OPN-FL裂解方面的抑制率: A2的抑制率为82%; A6的抑制率为95.4%; E5的抑制率为77.2%, G7的抑制率为60.1%。

[0231] 我们还在针对OPN-R的特异性ELISA中, 通过测定裂解产物中其中一种 (即, OPN-R) 的产生情况, 评估四种克隆对小鼠OPN-FL凝血酶裂解的抑制作用。发现所有这四种克隆都抑制小鼠OPN-FL的凝血酶裂解 (图16)。在含或不含纯化抗体A2、A6、E5、G7或IgG对照品 ( $2\mu\text{M}$ ) 的情况下, 将重组小鼠骨桥蛋白 (R&D systems) ( $2 \cdot \text{M}$ ) 置于室温下孵育20分钟。向样本中加入人凝血酶 ( $20\text{nM}$ ) (R&D Systems), 并将其置于 $37^\circ\text{C}$ 下孵育10分钟, 然后加入PPACK, 使浓度达到 $4.7\mu\text{M}$ 。用含有1%BSA的PBS按1/100或1/30的比例稀释样本, 然后通过OPN-R特异性ELISA测量所产生的OPN-R。

#### 小鼠OPN-RELISA:

[0232] 将含有山羊多克隆抗小鼠骨桥蛋白IgG ( $4 \cdot \text{g/ml}$ ) (R&D Systems, 明尼苏达州明尼阿波里斯) 的PBS缓冲液涂覆于96孔ELISA板上,并用含有1%BSA的PBS阻断非特异性结合位点1小时。将凝血酶裂解产物样本 (从1/30或1/100稀释度开始并作进一步稀释) 孵育2小时。在用含有0.05%Tween 20的PBS洗涤后, 将样本和生物素化兔多克隆抗OPN-R抗体 ( $2\mu\text{g/ml}$ ) (Sharif等人, 2009 A+R) 置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后, 将样本与过氧化物酶缀合的链霉亲和素 ( $100\text{ng/ml}$ ) 置于含有1%BSA的PBS中孵育1小时。洗涤后, 将四甲基联苯胺底物孵育10分钟, 然后加入终止溶液并测量450nm处的吸光度。基于OPN-R ELISA中的OPN-R标准, 计算每个样本中产生的OPN-R的量, 然后计算不同浓度下每种抗体克隆对凝血酶裂解的抑制程度并绘制相应图表。

[0233] 对克隆进行测序。确定了A2、A6、E5和G7单克隆抗体重链和轻链的氨基酸序列、编码它们的核酸序列以及其CDR的序列, 详见序列列表中的序列号: 13-46。

## 序列表

<110> 小利兰.斯坦福大学董事会  
退伍军人事务部所代表的美国政府

<120> 抗骨桥蛋白的治疗性抗体

<130> STAN-1658 (S19-253)

<150> 62/884,818

<151> 2019-08-09

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 骨桥蛋白表位

<400> 1

Ser Val Val Gly Leu Arg

1                   5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 骨桥蛋白表位

<400> 2

Ser Lys Ser Lys Lys Phe

1                   5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 骨桥蛋白表位

<400> 3

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1                   5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 骨桥蛋白表位

<400> 4

Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg

1                   5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性肽

<400> 5

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg

1                   5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性肽

<400> 6

Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Arg Ser Phe Gln Val Ser

1                   5                   10                   15

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫原性肽

<400> 7

Ser Lys Ser Arg Ser Phe Gln Val Ser

1                   5

<210> 8

<211> 314

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<300>

<308> NCBI/NP\_001035147  
 <309> 2019-06-18  
 <313> (1) .. (314)  
 <400> 8  
 Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu  
                   20                   25                   30  
 Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro  
                   35                   40                   45  
 Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu  
                   50                   55                   60  
 Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu  
 65                   70                   75                   80  
 Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His  
                   85                   90                   95  
 Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp  
                   100                   105                   110  
 Asp Thr Asp Asp Ser His Gln Ser Asp Glu Ser His His Ser Asp Glu  
                   115                   120                   125  
 Ser Asp Glu Leu Val Thr Asp Phe Pro Thr Asp Leu Pro Ala Thr Glu  
                   130                   135                   140  
 Val Phe Thr Pro Val Val Pro Thr Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly  
 145                   150                   155                   160  
 Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg  
                   165                   170                   175  
 Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr Asp Glu Asp Ile Thr Ser His  
                   180                   185                   190  
 Met Glu Ser Glu Glu Leu Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala  
                   195                   200                   205  
 Gln Asp Leu Asn Ala Pro Ser Asp Trp Asp Ser Arg Gly Lys Asp Ser  
                   210                   215                   220  
 Tyr Glu Thr Ser Gln Leu Asp Asp Gln Ser Ala Glu Thr His Ser His  
 225                   230                   235                   240  
 Lys Gln Ser Arg Leu Tyr Lys Arg Lys Ala Asn Asp Glu Ser Asn Glu  
                   245                   250                   255  
 His Ser Asp Val Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu  
                   260                   265                   270  
 Phe His Ser His Glu Phe His Ser His Glu Asp Met Leu Val Val Asp

275	280	285
Pro Lys Ser Lys Glu Glu Asp Lys His Leu Lys Phe Arg Ile Ser His		
290	295	300
Glu Leu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Val Asn		
305	310	
<210> 9		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 骨桥蛋白凝血酶裂解位点		
<400> 9		
Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser Lys Lys Phe		
1	5	10
<210> 10		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> OPN-CTF区		
<400> 10		
Ser Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp		
1	5	10
<210> 11		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 免疫原性肽		
<400> 11		
Tyr Gly Leu Arg Ser Lys Ser		
1	5	
<210> 12		
<400> 12		
000		
<210> 13		
<211> 1386		
<212> DNA		
<213> 人工序列		

<220>

<223> 编码A2单克隆抗体重链3的克隆

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1383)

<400> 13

```

atg gag act ggg ctg cgc tgg ctt ctc ctg gtc gct gtg ctc aaa ggt 48
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1           5           10           15
gtc cag tgt cag tcg gtg aag gag tcc gag gga ggt ctc ttc aag cca 96
Val Gln Cys Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro
           20           25           30
acg gat acc ctg aca ctc acc tgc aaa gcc tct gga ttc acc gtc agt 144
Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser
           35           40           45
agt tac gac atg ggc tgg ctc cgc cag gct cca ggg aac ggg ctt gaa 192
Ser Tyr Asp Met Gly Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu
           50           55           60
tct atc gga gcc att ggt agt gat ggt agt gag tac tat gtg agc tgg 240
Ser Ile Gly Ala Ile Gly Ser Asp Gly Ser Glu Tyr Tyr Val Ser Trp
           65           70           75           80
gcg aga ggc cga acc gcc atc acc aga aac acc aac cag aac acg gtg 288
Ala Arg Gly Arg Thr Ala Ile Thr Arg Asn Thr Asn Gln Asn Thr Val
           85           90           95
act ctg aaa atg acc agt ctg aca gcc gcg gac acg gcc acc tat ttc 336
Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
           100          105          110
tgt gcg aga gac tca cac tat agc tat ggc tat gat tat gat atc tgg 384
Cys Ala Arg Asp Ser His Tyr Ser Tyr Gly Tyr Asp Tyr Asp Ile Trp
           115          120          125
ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggg caa cct aag gct cca 432
Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro
           130          135          140
tca gtc ttc cca ctg gcc ccc tgc tgc ggg gac aca ccc agc tcc acg 480
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr
           145          150          155          160
gtc acc ctg ggt tgt ctt gtg aag gga tac ctc ccg gaa ccc gtg acc 528
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr
           165          170          175

```

gtg acc tgg aac tcc ggc acc ctg acc aat gga gtg cgg acc ttc ccg 576  
 Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro  
 180 185 190

agc gtc agg cag tcc tcc ggg ttg tac agc ttg tct agc gtg gtg tcc 624  
 Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser  
 195 200 205

gtg acg tcg tca agc cag cct gtg act tgc aat gtg gcc cat ccg gcc 672  
 Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala  
 210 215 220

acc aac acc aag gtc gac aag acc gtg gcg cct tcc acc tgt tcc aag 720  
 Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys  
 225 230 235 240

ccc act tgc ccg ccg cct gag ctc ctg gga gga ccg tcc gtg ttc atc 768  
 Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
 245 250 255

ttc cct cca aaa ccc aag gat acc ctg atg att agc cgc act ccc gaa 816  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 260 265 270

gtc act tgc gtg gtc gtg gac gtg tcg cag gac gat cct gag gtg cag 864  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln  
 275 280 285

ttc act tgg tac atc aac aac gaa caa gtc cgg aca gct aga cca ccg 912  
 Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro  
 290 295 300

ctg cgc gag cag cag ttc aac tca act atc cgg gtg gtg tcc acc ctg 960  
 Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu  
 305 310 315 320

ccg atc gcg cat cag gat tgg ctg cgg ggg aag gag ttc aag tgc aaa 1008  
 Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys  
 325 330 335

gtc cac aac aag gcc ctg ccc gcc ccc atc gaa aag acc atc tcc aag 1056  
 Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 340 345 350

gct cgg ggc cag cct ctg gag ccc aaa gtg tac acc atg gcc ccg cct 1104  
 Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro  
 355 360 365

cgc gag gag ctc tcc tca cgc tcg gtg tcg ctg act tgc atg att aac 1152  
 Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn  
 370 375 380

```

ggc ttc tac cct tcc gac atc tcc gtg gaa tgg gag aag aac gga aaa 1200
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys
385                390                395                400
gcc gaa gat aac tac aag acc acg ccc gcc gtg ctg gac tcc gac gga 1248
Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly
                405                410                415
agc tat ttc ctg tac tcc aag ctc tcc gtc ccc act tcg gaa tgg cag 1296
Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln
                420                425                430
agg ggg gac gtg ttc act tgc tcc gtg atg cac gag gca ctc cac aac 1344
Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
                435                440                445
cac tac acc caa aag agc att tcg cgg tca cct ggc aag taa 1386
His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
                450                455                460
<210> 14
<211> 461
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建物
<400> 14
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1                5                10                15
Val Gln Cys Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro
                20                25                30
Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser
                35                40                45
Ser Tyr Asp Met Gly Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu
                50                55                60
Ser Ile Gly Ala Ile Gly Ser Asp Gly Ser Glu Tyr Tyr Val Ser Trp
65                70                75                80
Ala Arg Gly Arg Thr Ala Ile Thr Arg Asn Thr Asn Gln Asn Thr Val
                85                90                95
Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
                100                105                110
Cys Ala Arg Asp Ser His Tyr Ser Tyr Gly Tyr Asp Tyr Asp Ile Trp
                115                120                125
Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro

```

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460  
 <210> 15  
 <211> 714  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 编码A2单克隆抗体轻链1的克隆  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (711)  
 <400> 15  
 atg gac acg agg gcc ccc act cag ctg ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48  
 Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
 ctc cca ggt gcc aca ttt gcc caa gtg ctg acc cag act cca tcc cct 96  
 Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro  
 20 25 30  
 gtg tct gca gct gtg gga ggc aca gtc agc atc agt tgc cag tcc agt 144  
 Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser  
 35 40 45  
 cag agt att tat agt aac tac tta tcc tgg tat cag cag aaa cca ggg 192  
 Gln Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 cag cct ccc aag ctc ctg atc tat tat gca tcc act ctg gca tct ggg 240  
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80  
 gtc cct tcg cgg ttc aaa ggc agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc 288  
 Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu  
 85 90 95  
 acc atc agc ggc gtg cag tgt gat gat gct gcc act tac tac tgt caa 336  
 Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110  
 ggc act tat tat gtc act ggt tgg tac gac gct ttc ggc gga ggg acc 384  
 Gly Thr Tyr Tyr Val Thr Gly Trp Tyr Asp Ala Phe Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125  
 gag gtg gtg gtc aaa ggt gat cca gtt gca cct act gtc ctc atc ttc 432  
 Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe  
 130 135 140

cca cca gct gct gat cag gtg gca act gga aca gtc acc atc gtg tgc 480  
 Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys  
 145 150 155 160  
 gtg gct aac aag tac ttc ccg gac gtg acc gtg acc tgg gaa gtc gac 528  
 Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp  
 165 170 175  
 gga acc act cag acc act ggt atc gag aac agc aag acg ccc cag aac 576  
 Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn  
 180 185 190  
 tcc gcc gat tgt act tat aac ctg tcc tcc aca ctg acc ctc acc tcg 624  
 Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser  
 195 200 205  
 acc cag tac aat tcc cac aag gag tac act tgc aaa gtc acc cag gga 672  
 Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly  
 210 215 220  
 acc act tca gtg gtg cag agc ttc aac cgg ggg gat tgc tga 714  
 Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
 225 230 235  
 <210> 16  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建物  
 <400> 16  
 Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser  
 35 40 45  
 Gln Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu  
 85 90 95  
 Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110

Gly Thr Tyr Tyr Val Thr Gly Trp Tyr Asp Ala Phe Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125  
 Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe  
 130 135 140  
 Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys  
 145 150 155 160  
 Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp  
 165 170 175  
 Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn  
 180 185 190  
 Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser  
 195 200 205  
 Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly  
 210 215 220  
 Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
 225 230 235

<210> 17

<211> 1386

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码A6单克隆抗体重链1的克隆

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1383)

<400> 17

atg gag act ggg ctg cgc tgg ctt ctc ctg gtc gct gtg ctc aaa ggt 48  
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
 gtc cag tgt cag tcg gtg aag gag tcc gag gga ggt ctc ttc aag cca 96  
 Val Gln Cys Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro  
 20 25 30  
 acg gat acc ctg aca ctc acc tgc aaa gcc tct gga ttc acc gtc agt 144  
 Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser  
 35 40 45  
 agt tac gac atg ggc tgg ctc cgc cag gct cca ggg aac ggg ctt gaa 192  
 Ser Tyr Asp Met Gly Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu  
 50 55 60  
 tct atc gga gcc att ggt agt gat ggt agt gag tac tat gtg agc tgg 240



Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln  
 275 280 285  
 ttc act tgg tac atc aac aac gaa caa gtc cgg aca gct aga cca ccg 912  
 Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro  
 290 295 300  
 ctg cgc gag cag cag ttc aac tca act atc cgg gtg gtg tcc acc ctg 960  
 Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu  
 305 310 315 320  
 ccg atc gcg cat cag gat tgg ctg cgg ggg aag gag ttc aag tgc aaa 1008  
 Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys  
 325 330 335  
 gtc cac aac aag gcc ctg ccc gcc ccc atc gaa aag acc atc tcc aag 1056  
 Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 340 345 350  
 gct cgg ggc cag cct ctg gag ccc aaa gtg tac acc atg ggc ccg cct 1104  
 Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro  
 355 360 365  
 cgc gag gag ctc tcc tca cgc tcg gtg tcg ctg act tgc atg att aac 1152  
 Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn  
 370 375 380  
 ggc ttc tac cct tcc gac atc tcc gtg gaa tgg gag aag aac gga aaa 1200  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys  
 385 390 395 400  
 gcc gaa gat aac tac aag acc acg ccc gcc gtg ctg gac tcc gac gga 1248  
 Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 405 410 415  
 agc tat ttc ctg tac tcc aag ctc tcc gtc ccc act tcg gaa tgg cag 1296  
 Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln  
 420 425 430  
 agg ggg gac gtg ttc act tgc tcc gtg atg cac gag gca ctc cac aac 1344  
 Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 435 440 445  
 cac tac acc caa aag agc att tcg cgg tca cct ggc aag taa 1386  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 18

<211> 461

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成构建物

&lt;400&gt; 18

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

Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro  
 290 295 300  
 Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys  
 325 330 335  
 Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 340 345 350  
 Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro  
 355 360 365  
 Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn  
 370 375 380  
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys  
 385 390 395 400  
 Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 405 410 415  
 Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln  
 420 425 430  
 Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn  
 435 440 445  
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

<210> 19

<211> 714

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码A6单克隆抗体轻链4的克隆

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (711)

<400> 19

atg gac acg agg gcc ccc act cag ctg ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48  
 Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
 ctc cca ggt gcc aca ttt gcc caa gtg ctg acc cag act cca tcc cct 96  
 Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro  
 20 25 30  
 gtg tct gca gct gtg gga ggc aca gtc agc atc agt tgc cag tcc agt 144

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser  
 35 40 45  
 cag agt att tat agt aac tac tta tcc tgg tat cag cag aaa cca ggg 192  
 Gln Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly  
 50 55 60  
 cag cct ccc aag ctc ctg atc tat tat gca tcc act ctg gca tct ggg 240  
 Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80  
 gtc cct tcg cgg ttc aaa ggc agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc 288  
 Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu  
 85 90 95  
 acc atc agc ggc gtg cag tgt gat gat gct gcc act tac tac tgt caa 336  
 Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110  
 ggc act tat tat gtc act ggt tgg tac gac gct ttc ggc gga ggg acc 384  
 Gly Thr Tyr Tyr Val Thr Gly Trp Tyr Asp Ala Phe Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125  
 gag gtg gtg gtc aaa ggt gat cca gtt gca cct act gtc ctc atc ttc 432  
 Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe  
 130 135 140  
 cca cca gct gct gat cag gtg gca act gga aca gtc acc atc gtg tgc 480  
 Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys  
 145 150 155 160  
 gtg gct aac aag tac ttc ccg gac gtg acc gtg acc tgg gaa gtc gac 528  
 Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp  
 165 170 175  
 gga acc act cag acc act ggt atc gag aac agc aag acg ccc cag aac 576  
 Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn  
 180 185 190  
 tcc gcc gat tgt act tat aac ctg tcc tcc aca ctg acc ctc acc tcg 624  
 Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser  
 195 200 205  
 acc cag tac aat tcc cac aag gag tac act tgc aaa gtc acc cag gga 672  
 Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly  
 210 215 220  
 acc act tca gtg gtg cag agc ttc aac cgg ggg gat tgc tga 714  
 Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
 225 230 235  
 <210> 20



<213> 人工序列

<220>

<223> 编码E5单克隆抗体重链1的克隆

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1368)

<220>

<221> 混杂特征

<222> (54) .. (54)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<220>

<221> 混杂特征

<222> (58) .. (59)

<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 21

```

atg gag act ggg ctg cgc tgg ctt ctc ctg gtc gct gtg ctc aaa ggt 48
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1           5           10           15
gtc can tgt nng tcg gtg aag gag tcc gag gga ggt ctc ttc aag cca 96
Val Xaa Cys Xaa Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro
           20           25           30
acg gct acc ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt 144
Thr Ala Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
           35           40           45
agc tac gac atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aac ggg ctg gaa 192
Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu
           50           55           60
tgg atc gga tac ctt agt agt gat ggt cgc gca tac tac gcg agc tgg 240
Trp Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Asp Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp
65           70           75           80
gcg aaa agc cga tcc acc atc acc aga aac acc aac ctg aac acg gtg 288
Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Leu Asn Thr Val
           85           90           95
act ctg aaa atg acc agt ctg aca gcc gcg gac acg gcc acc tat ttc 336
Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
           100          105          110
tgt gcg aga ggt gat aat act gct gac atc tgg ggc cca ggc acc ctg 384
Cys Ala Arg Gly Asp Asn Thr Ala Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
           115          120          125

```

gtc acc gtc tcc tca ggg caa cct aag gct cca tca gtc ttc cca ctg 432  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 130 135 140  
 gcc ccc tgc tgc ggg gac aca ccc agc tcc acg gtc acc ctg ggt tgt 480  
 Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys  
 145 150 155 160  
 ctt gtg aag gga tac ctc ccg gaa ccc gtg acc gtg acc tgg aac tcc 528  
 Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser  
 165 170 175  
 ggc acc ctg acc aat gga gtg cgg acc ttc ccg agc gtc agg cag tcc 576  
 Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser  
 180 185 190  
 tcc ggg ttg tac agc ttg tct agc gtg gtg tcc gtg acg tgc tca agc 624  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser  
 195 200 205  
 cag cct gtg act tgc aat gtg gcc cat ccg gcc acc aac acc aag gtc 672  
 Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val  
 210 215 220  
 gac aag acc gtg gcg cct tcc acc tgt tcc aag ccc act tgc ccg ccg 720  
 Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro  
 225 230 235 240  
 cct gag ctc ctg gga gga ccg tcc gtg ttc atc ttc cct cca aaa ccc 768  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 245 250 255  
 aag gat acc ctg atg att agc cgc act ccc gaa gtc act tgc gtg gtc 816  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 260 265 270  
 gtg gac gtg tgc cag gac gat cct gag gtg cag ttc act tgg tac atc 864  
 Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile  
 275 280 285  
 aac aac gaa caa gtc cgg aca gct aga cca ccg ctg cgc gag cag cag 912  
 Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln  
 290 295 300  
 ttc aac tca act atc cgg gtg gtg tcc acc ctg ccg atc gcg cat cag 960  
 Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln  
 305 310 315 320  
 gat tgg ctg cgg ggg aag gag ttc aag tgc aaa gtc cac aac aag gcc 1008  
 Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala  
 325 330 335

ctg ccc gcc ccc atc gaa aag acc atc tcc aag gct cgg ggc cag cct 1056  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro  
                   340                                  345                                  350  
 ctg gag ccc aaa gtg tac acc atg ggc ccg cct cgc gag gag ctc tcc 1104  
 Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser  
                   355                                  360                                  365  
 tca cgc tcg gtg tcg ctg act tgc atg att aac ggc ttc tac cct tcc 1152  
 Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser  
                   370                                  375                                  380  
 gac atc tcc gtg gaa tgg gag aag aac gga aaa gcc gaa gat aac tac 1200  
 Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr  
 385                                  390                                  395                                  400  
 aag acc acg ccc gcc gtg ctg gac tcc gac gga agc tat ttc ctg tac 1248  
 Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr  
                                   405                                  410                                  415  
 tcc aag ctc tcc gtc ccc act tcg gaa tgg cag agg ggg gac gtg ttc 1296  
 Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe  
                                   420                                  425                                  430  
 act tgc tcc gtg atg cac gag gca ctc cac aac cac tac acc caa aag 1344  
 Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
                   435                                  440                                  445  
 agc att tcg cgg tca cct ggc aag taa 1371  
 Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
                   450                                  455

<210> 22

<211> 456

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 混杂特征

<222> (18) .. (18)

<223> 位置18处的'Xaa'代表Gln, 或 His.

<220>

<221> 混杂特征

<222> (20) .. (20)

<223> 位置20处的'Xaa'代表Lys, Arg, Thr, Met, Glu, Gly, Ala, Val, Gln, Pro, Leu, Trp, 或 Ser.

<220>

<223> 合成构建物

&lt;400&gt; 22

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



cag agt gtt tat aag aac aac gac tta gcc tgg tat cag cag aaa cta 192  
 Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu  
 50 55 60  
 ggg cag cct ccc aag ctc ctg atc tat ttt gca tcc act ctg gca tct 240  
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Leu Ala Ser  
 65 70 75 80  
 ggg gtc cca tcg cgg ttc aaa ggc agt gga tct ggg aca cag ttc act 288  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 85 90 95  
 ctc acc atc agc gac ctg gag tgt gac gat gct gcc act tat tac tgt 336  
 Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 100 105 110  
 gca ggc ggt tat agt ggt cct gtt ggt gct ttc ggc gga ggg acc gag 384  
 Ala Gly Gly Tyr Ser Gly Pro Val Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu  
 115 120 125  
 gtg gtg gtc aag agt gat cca gtt gca cct act gtc ctc atc ttc cca 432  
 Val Val Val Lys Ser Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro  
 130 135 140  
 cca gct gct gat cag gtg gca act gga aca gtc acc atc gtg tgc gtg 480  
 Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val  
 145 150 155 160  
 gct aac aag tac ttc ccg gac gtg acc gtg acc tgg gaa gtc gac gga 528  
 Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly  
 165 170 175  
 acc act cag acc act ggt atc gag aac agc aag acg ccc cag aac tcc 576  
 Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser  
 180 185 190  
 gcc gat tgt act tat aac ctg tcc tcc aca ctg acc ctc acc tcg acc 624  
 Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr  
 195 200 205  
 cag tac aat tcc cac aag gag tac act tgc aaa gtc acc cag gga acc 672  
 Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr  
 210 215 220  
 act tca gtg gtg cag agc ttc aac cgg ggg gat tgc tga 711  
 Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
 225 230 235  
 <210> 24  
 <211> 236  
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 1383

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码G7单克隆抗体重链1的克隆

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1380)

<400> 25

```

atg gag act ggg ctg cgc tgg ctt ctc ctg gtc gct gtg ctc aaa ggt 48
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1           5           10           15
gtc cag tgt cag tcg gtg aag gag tcc gag gga ggt ctc ttc aag cca 96
Val Gln Cys Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro
           20           25           30
acg gat acc ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt 144
Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
           35           40           45
agt tat gga gtg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aac ggg ctg gag 192
Ser Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu
           50           55           60
tgg atc gga ttc att gac aag tat gga cgc aca cac tac gcg agc tgg 240
Trp Ile Gly Phe Ile Asp Lys Tyr Gly Arg Thr His Tyr Ala Ser Trp
           65           70           75           80
gcg aaa agc cga tcc acc atc acc aga aat acc aac gag aac acg gtg 288
Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Glu Asn Thr Val
           85           90           95
act ctg aaa atg acc agt ctg aca gcc gcg gac acg gcc acc ttt ttg 336
Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Phe Leu
           100          105          110
tgt gcg aga gat gac tat cgt cct gct tat ggt ttc gac atc tgg ggc 384
Cys Ala Arg Asp Asp Tyr Arg Pro Ala Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly
           115          120          125
cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tea ggg caa cct aag gct cca tca 432
Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser
           130          135          140
gtc ttc cca ctg gcc ccc tgc tgc ggg gac aca ccc agc tcc acg gtc 480
Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val
           145          150          155          160
acc ctg ggt tgt ctt gtg aag gga tac ctc ccg gaa ccc gtg acc gtg 528
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val
           165          170          175
acc tgg aac tcc ggc acc ctg acc aat gga gtg cgg acc ttc ccg agc 576

```

Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser  
 180 185 190  
 gtc agg cag tcc tcc ggg ttg tac agc ttg tct agc gtg gtg tcc gtg 624  
 Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val  
 195 200 205  
 acg tcg tca agc cag cct gtg act tgc aat gtg gcc cat ccg gcc acc 672  
 Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr  
 210 215 220  
 aac acc aag gtc gac aag acc gtg gcg cct tcc acc tgt tcc aag ccc 720  
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro  
 225 230 235 240  
 act tgc ccg ccg cct gag ctc ctg gga gga ccg tcc gtg ttc atc ttc 768  
 Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 245 250 255  
 cct cca aaa ccc aag gat acc ctg atg att agc cgc act ccc gaa gtc 816  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 260 265 270  
 act tgc gtg gtc gtg gac gtg tcg cag gac gat cct gag gtg cag ttc 864  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 275 280 285  
 act tgg tac atc aac aac gaa caa gtc cgg aca gct aga cca ccg ctg 912  
 Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu  
 290 295 300  
 cgc gag cag cag ttc aac tca act atc cgg gtg gtg tcc acc ctg ccg 960  
 Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro  
 305 310 315 320  
 atc gcg cat cag gat tgg ctg cgg ggg aag gag ttc aag tgc aaa gtc 1008  
 Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val  
 325 330 335  
 cac aac aag gcc ctg ccc gcc ccc atc gaa aag acc atc tcc aag gct 1056  
 His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 340 345 350  
 cgg ggc cag cct ctg gag ccc aaa gtg tac acc atg ggc ccg cct cgc 1104  
 Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg  
 355 360 365  
 gag gag ctc tcc tca cgc tcg gtg tcg ctg act tgc atg att aac ggc 1152  
 Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly  
 370 375 380  
 ttc tac cct tcc gac atc tcc gtg gaa tgg gag aag aac gga aaa gcc 1200

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala  
 385 390 395 400  
 gaa gat aac tac aag acc acg ccc gcc gtg ctg gac tcc gac gga agc 1248  
 Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 405 410 415  
 tat ttc ctg tac tcc aag ctc tcc gtc ccc act tcg gaa tgg cag agg 1296  
 Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg  
 420 425 430  
 ggg gac gtg ttc act tgc tcc gtg atg cac gag gca ctc cac aac cac 1344  
 Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 435 440 445  
 tac acc caa aag agc att tcg cgg tca cct ggc aag taa 1383  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460  
 <210> 26  
 <211> 460  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建物  
 <400> 26  
 Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gln Cys Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Phe Lys Pro  
 20 25 30  
 Thr Asp Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser  
 35 40 45  
 Ser Tyr Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu  
 50 55 60  
 Trp Ile Gly Phe Ile Asp Lys Tyr Gly Arg Thr His Tyr Ala Ser Trp  
 65 70 75 80  
 Ala Lys Ser Arg Ser Thr Ile Thr Arg Asn Thr Asn Glu Asn Thr Val  
 85 90 95  
 Thr Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Phe Leu  
 100 105 110  
 Cys Ala Arg Asp Asp Tyr Arg Pro Ala Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly  
 115 120 125  
 Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser  
 130 135 140

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

```

450                               455                               460
<210> 27
<211> 720
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 编码G7单克隆抗体轻链1的克隆
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (717)
<400> 27
atg gac acg agg gcc ccc act cag ctg ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15
ctc cca ggt gcc aca ttt gcc caa gtg ctg acc cag act gca tgc ccc 96
Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro
           20           25           30
gtg tct gca gct gtg gga agc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt 144
Val Ser Ala Ala Val Gly Ser Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
           35           40           45
cag agt gtt tat aat aac aac tgg tta tcc tgg ttt cag cag aaa cca 192
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
           50           55           60
ggg cag cct ccc aag caa ctg ata tat ggt gca tcc act ctg cca tct 240
Gly Gln Pro Pro Lys Gln Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Pro Ser
65           70           75           80
ggg gtc tca tgc cgg ttc aaa ggc agt gga tct ggg aca cag ttc act 288
Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
           85           90           95
ctc acc atc agc gac gtg cag tgt gac gat gct gcc act tac tac tgt 336
Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
           100          105          110
ctg ggc ggt tat cat tgg agt act gct gat tgt aat gtt ttc ggc gga 384
Leu Gly Gly Tyr His Trp Ser Thr Ala Asp Cys Asn Val Phe Gly Gly
           115          120          125
ggg acc gag gtg gtg gtc aaa ggt gat cca gtt gca cct act gtc ctc 432
Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu
           130          135          140
atc ttc cca cca gct gct gat cag gtg gca act gga aca gtc acc atc 480

```

Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 145 150 155 160  
 gtg tgc gtg gct aac aag tac ttc ccg gac gtg acc gtg acc tgg gaa 528  
 Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu  
 165 170 175  
 gtc gac gga acc act cag acc act ggt atc gag aac agc aag acg ccc 576  
 Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro  
 180 185 190  
 cag aac tcc gcc gat tgt act tat aac ctg tcc tcc aca ctg acc ctc 624  
 Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 195 200 205  
 acc tcg acc cag tac aat tcc cac aag gag tac act tgc aaa gtc acc 672  
 Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr  
 210 215 220  
 cag gga acc act tca gtg gtg cag agc ttc aac cgg ggg gat tgc tga 720  
 Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys  
 225 230 235  
 <210> 28  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成构建物  
 <400> 28  
 Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Ala Val Gly Ser Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser  
 35 40 45  
 Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro  
 50 55 60  
 Gly Gln Pro Pro Lys Gln Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr  
 85 90 95  
 Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 100 105 110  
 Leu Gly Gly Tyr His Trp Ser Thr Ala Asp Cys Asn Val Phe Gly Gly

115	120	125
Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu		
130	135	140
Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile		
145	150	155
Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu		
	165	170
Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro		
	180	185
Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu		
	195	200
Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr		
	210	220
Gln Gly Thr Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys		
225	230	235
<210> 29		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> A2单克隆抗体的CDR-H1		
<400> 29		
Phe Thr Val Ser Ser Tyr Asp Met Gly		
1	5	
<210> 30		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> A2单克隆抗体的CDR-H2		
<400> 30		
Ser Ile Gly Ala Ile Gly Ser Asp Gly Ser Glu Tyr Tyr Val Ser Trp		
1	5	10
		15
Ala		
<210> 31		
<211> 14		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> A2单克隆抗体的CDR-H3

<400> 31

Ala Arg Asp Ser His Tyr Ser Tyr Gly Tyr Asp Tyr Asp Ile

1                    5                    10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A2单克隆抗体的CDR-L1

<400> 32

Gln Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Leu Ser

1                    5

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A2单克隆抗体的CDR-L2

<400> 33

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1                    5                    10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> A2单克隆抗体的CDR-L3

<400> 34

Gln Gly Thr Tyr Tyr Val Thr Gly Trp Tyr Asp Ala

1                    5                    10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E5单克隆抗体的CDR-H1

<400> 35

Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Ser







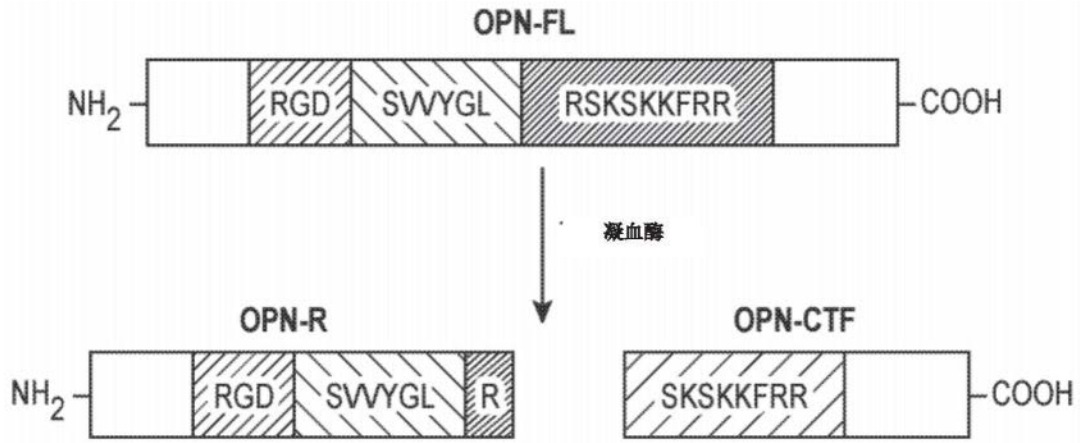


图1

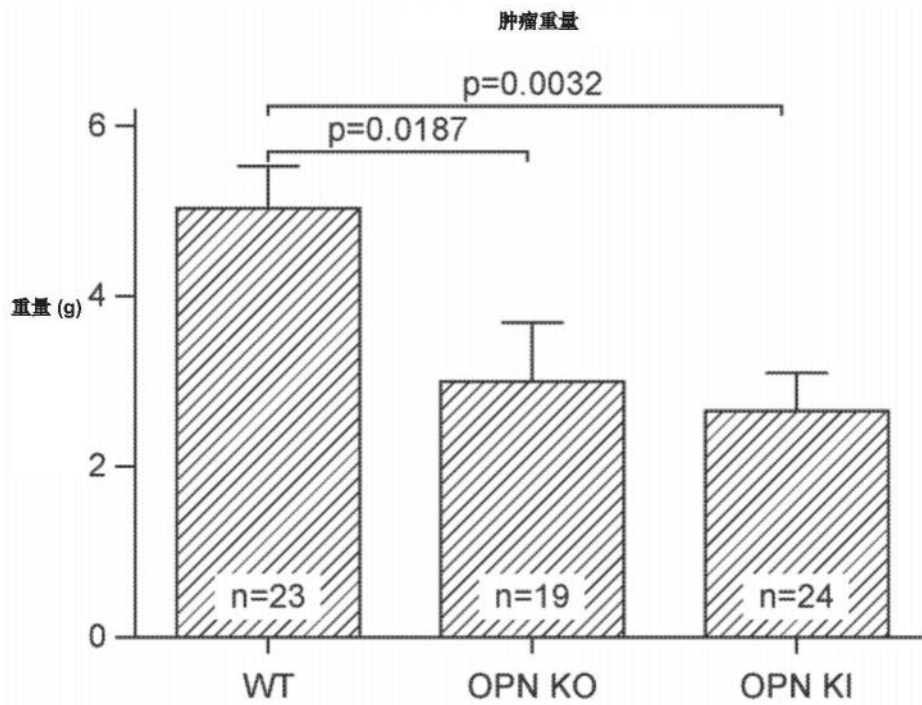


图2A

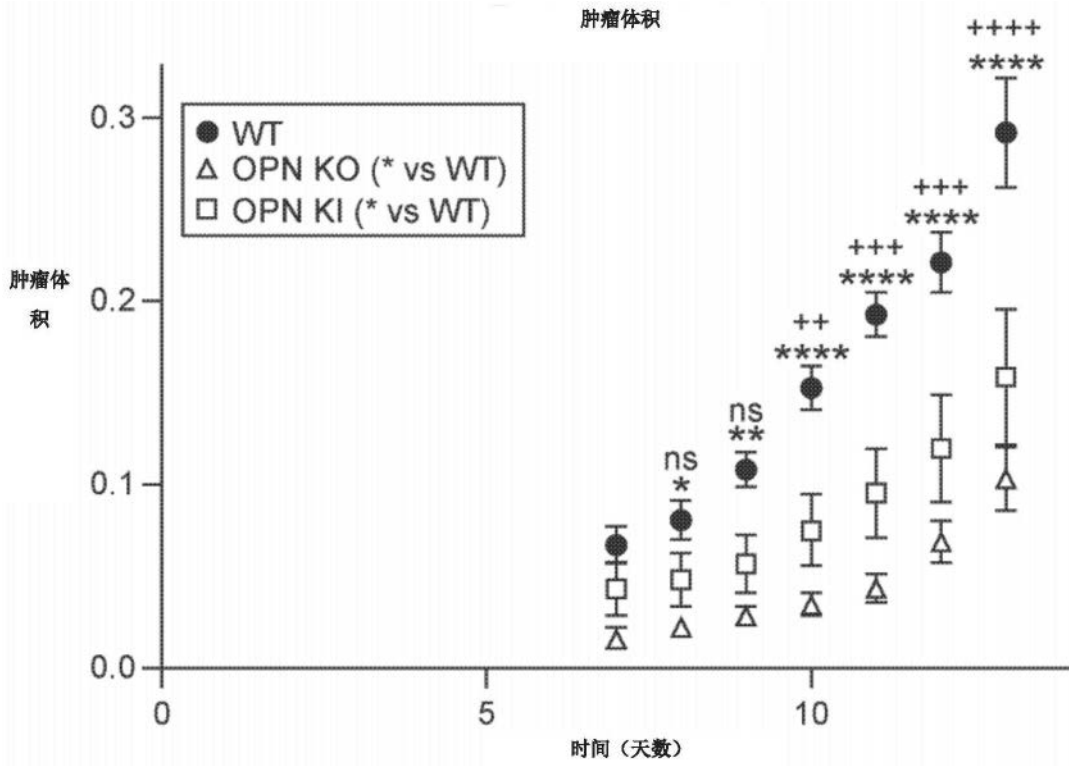


图2B

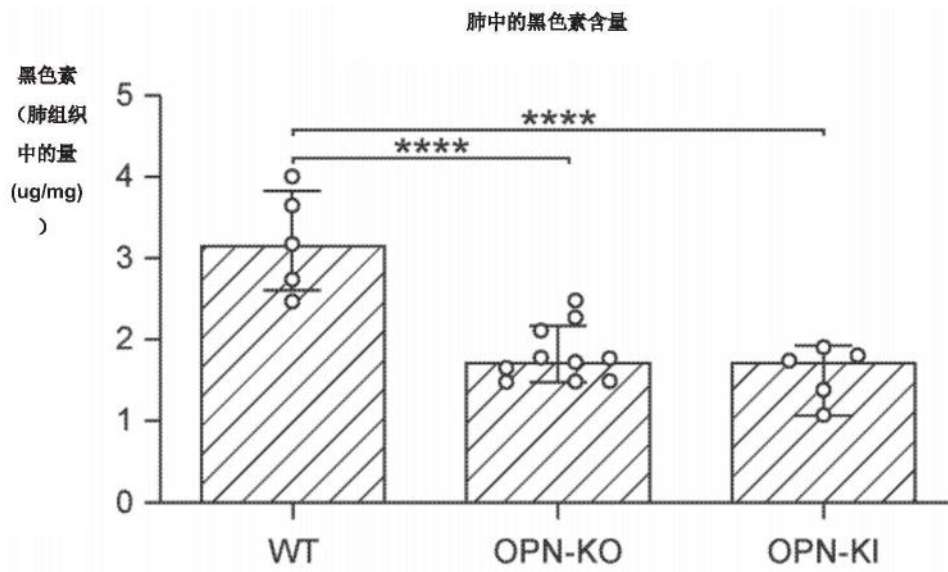


图3A

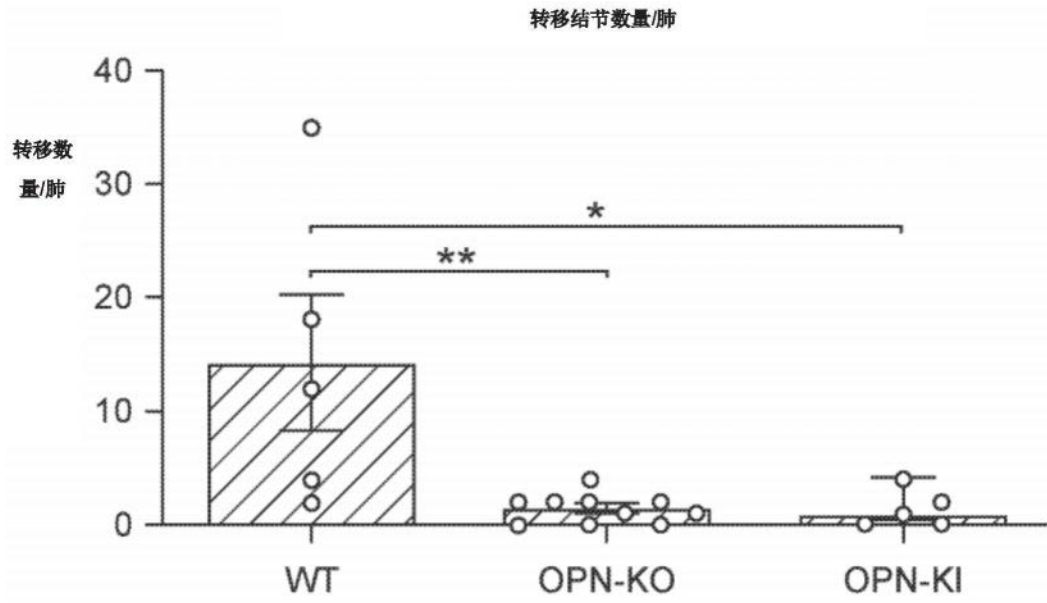


图3B

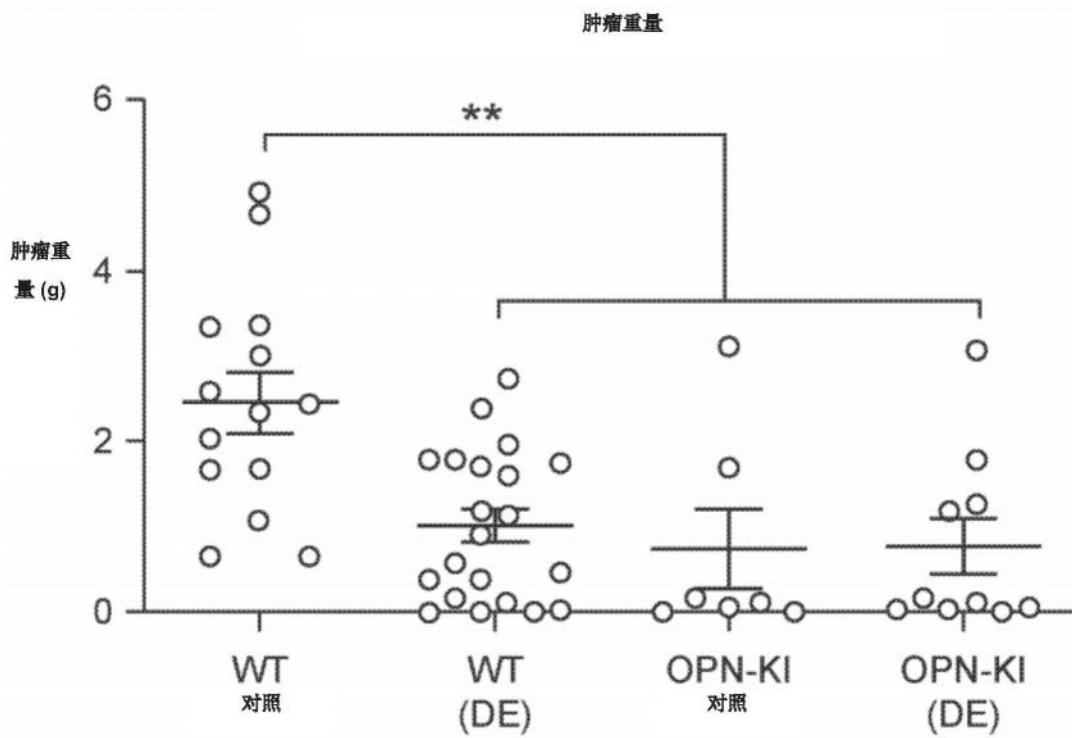


图4A

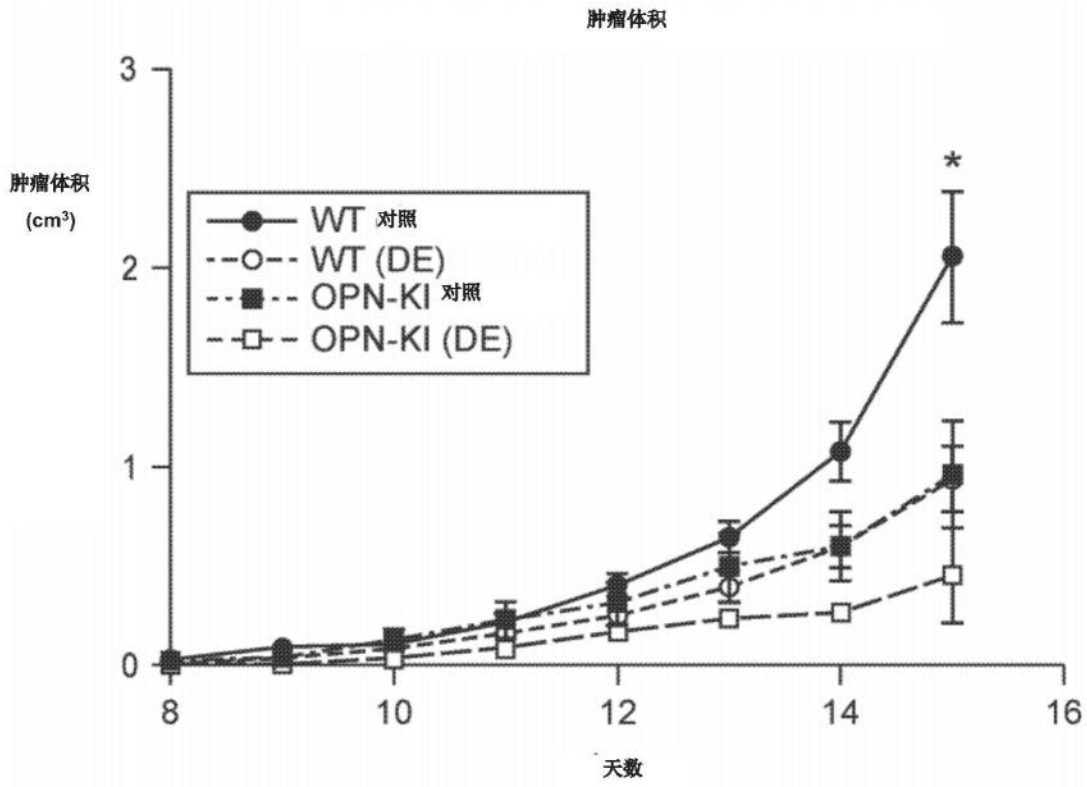


图4B

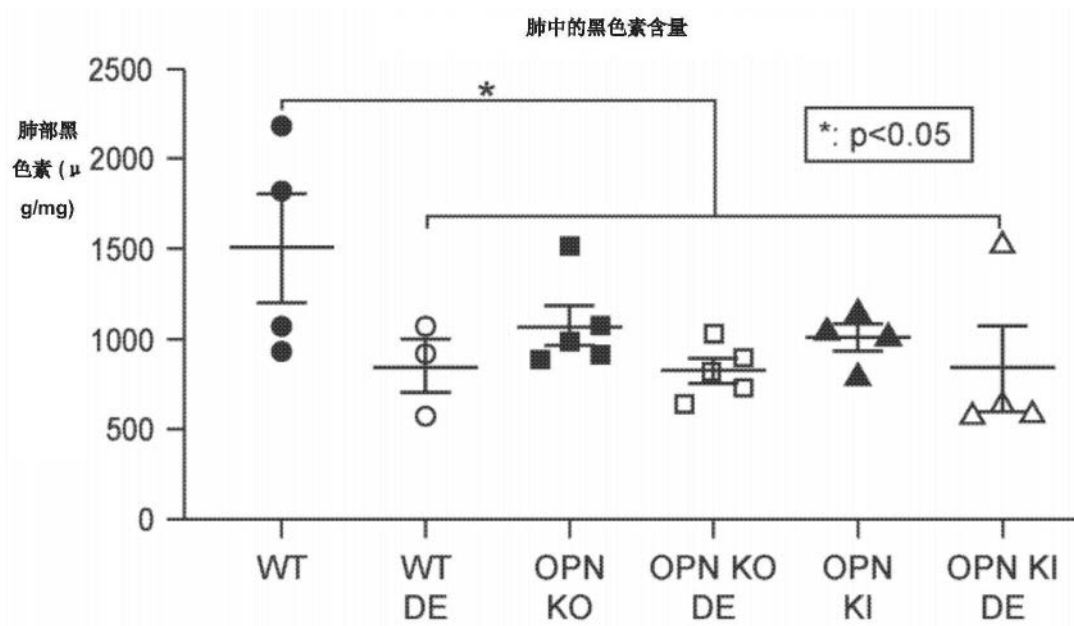


图5A

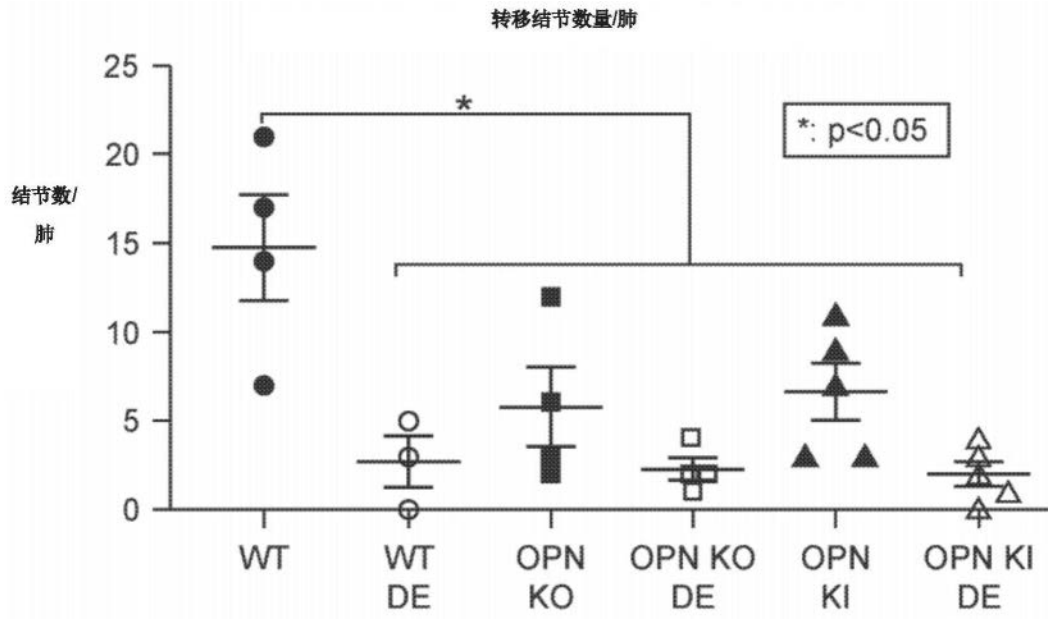


图5B

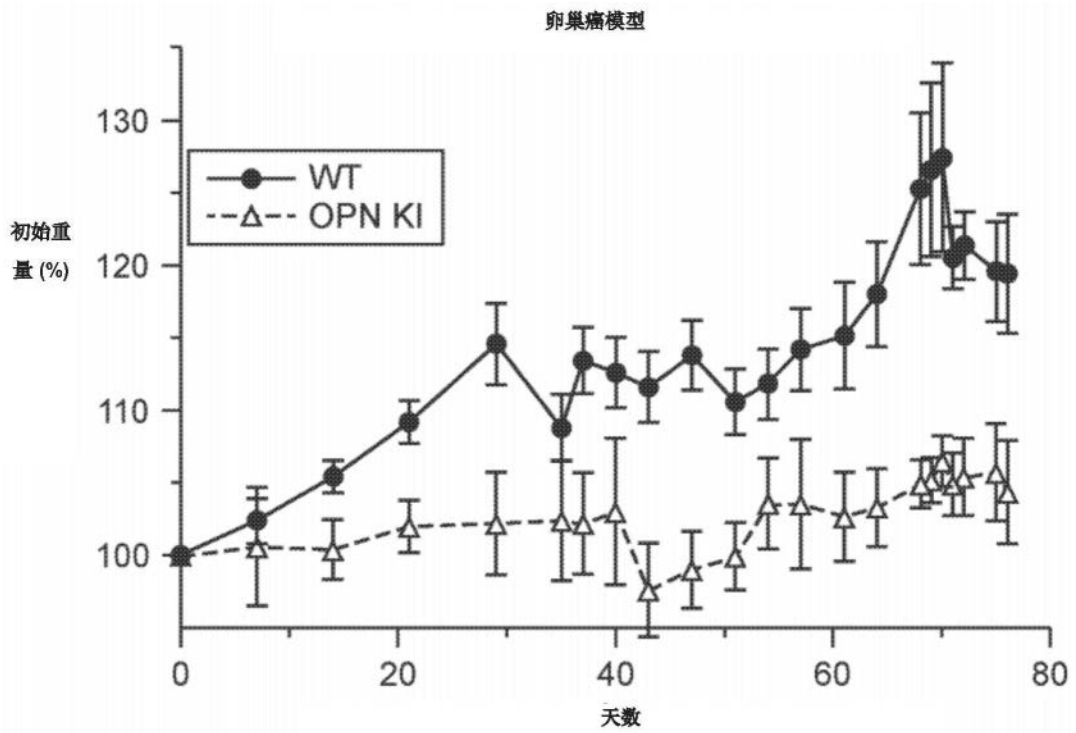


图6



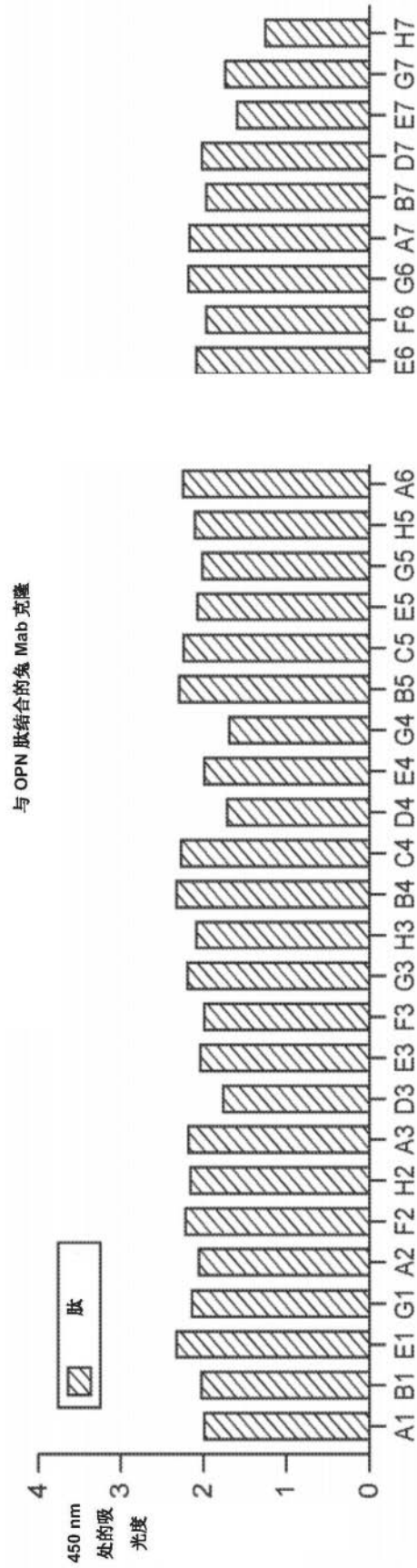


图8

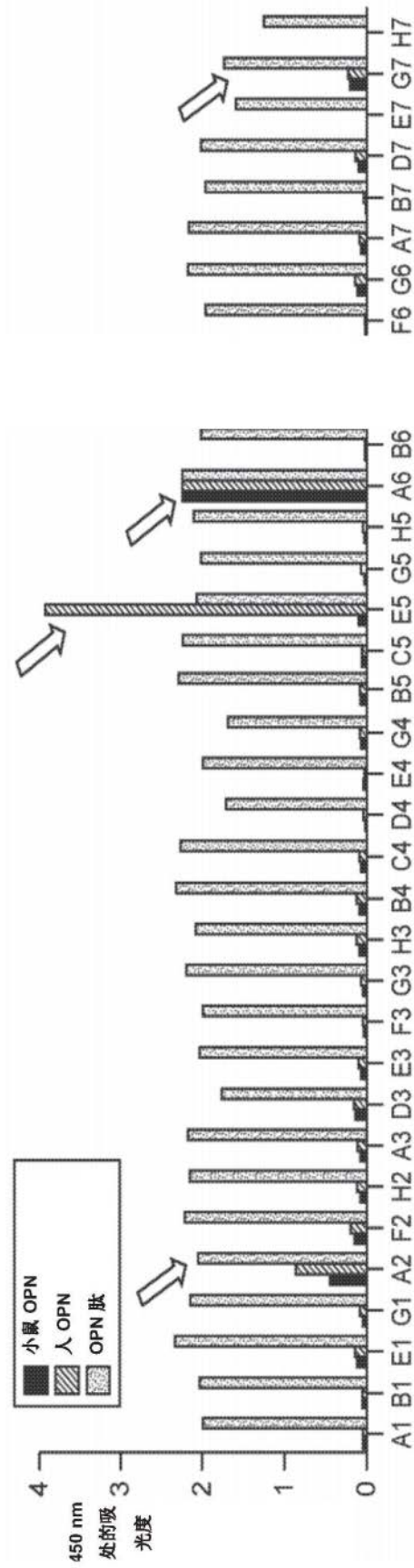


图9

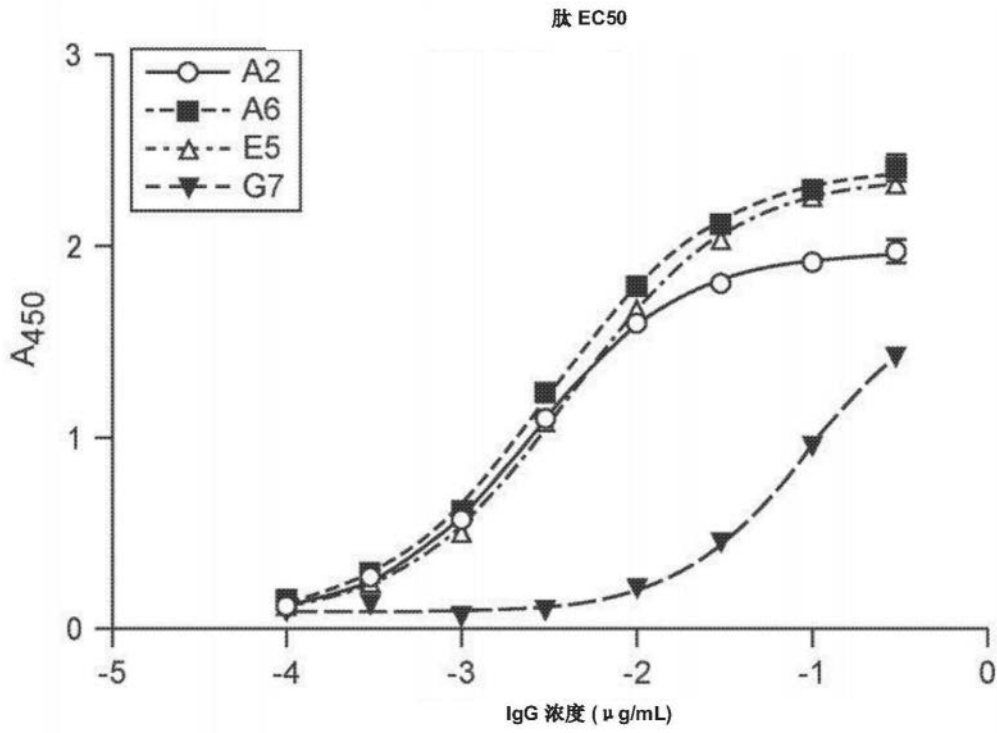


图10

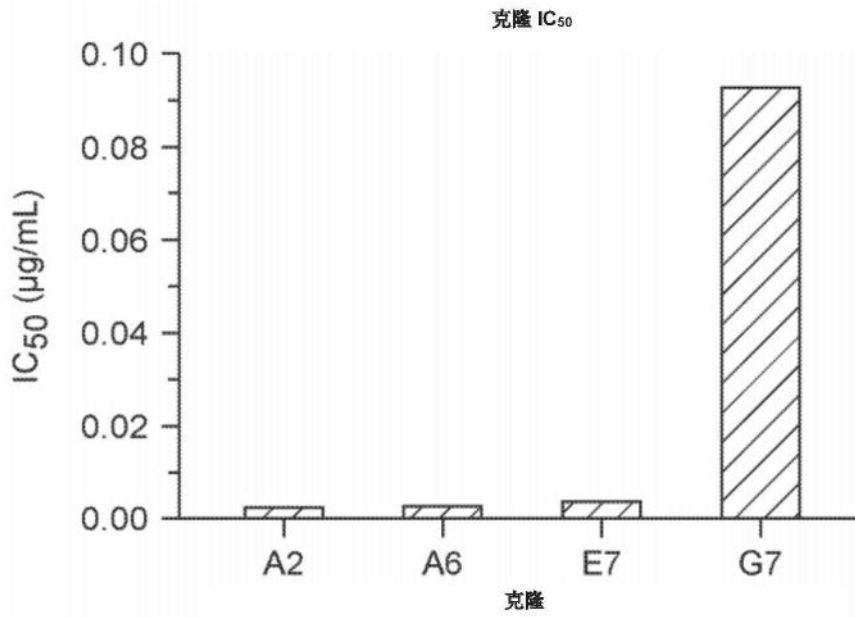


图11

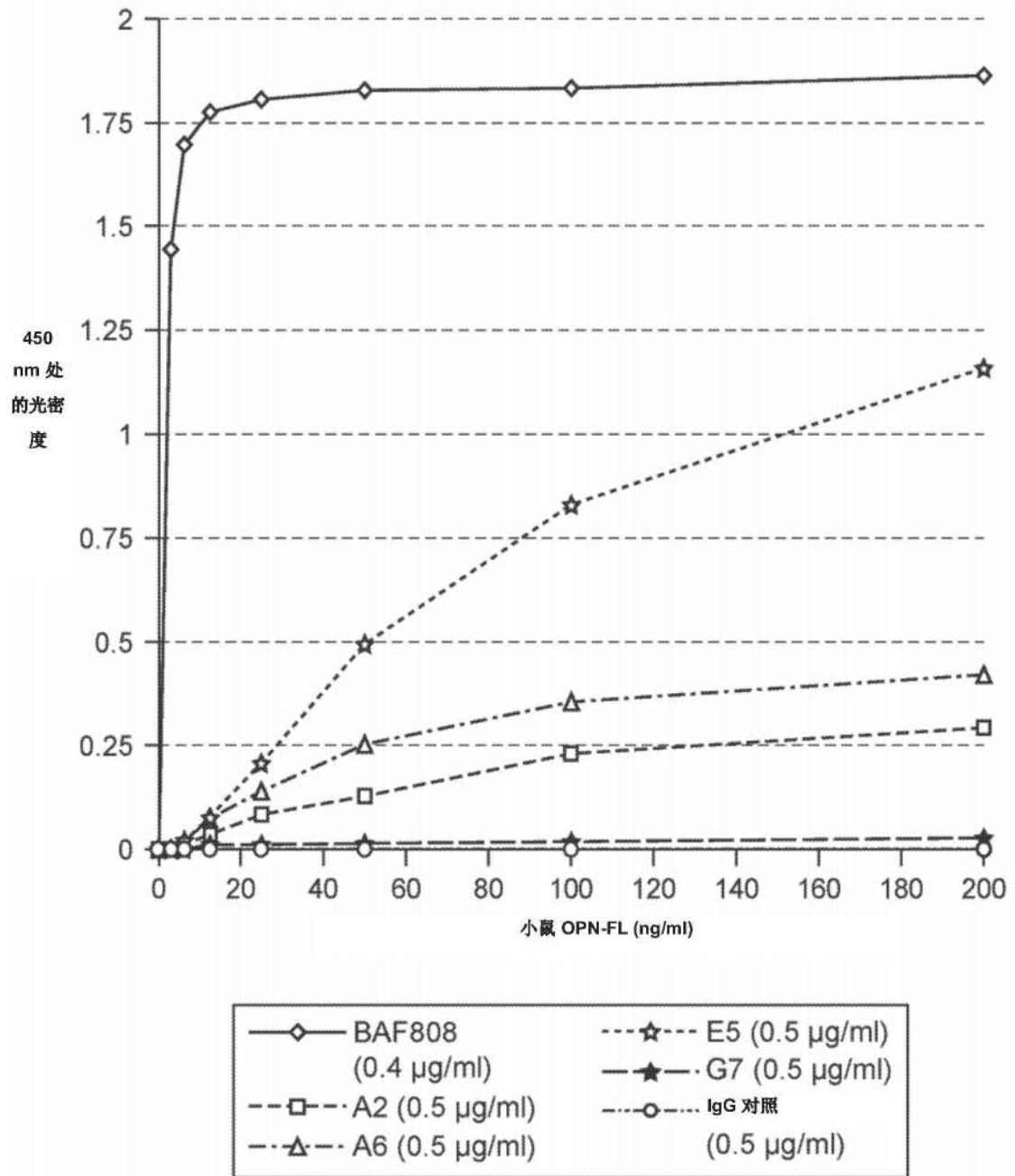


图12

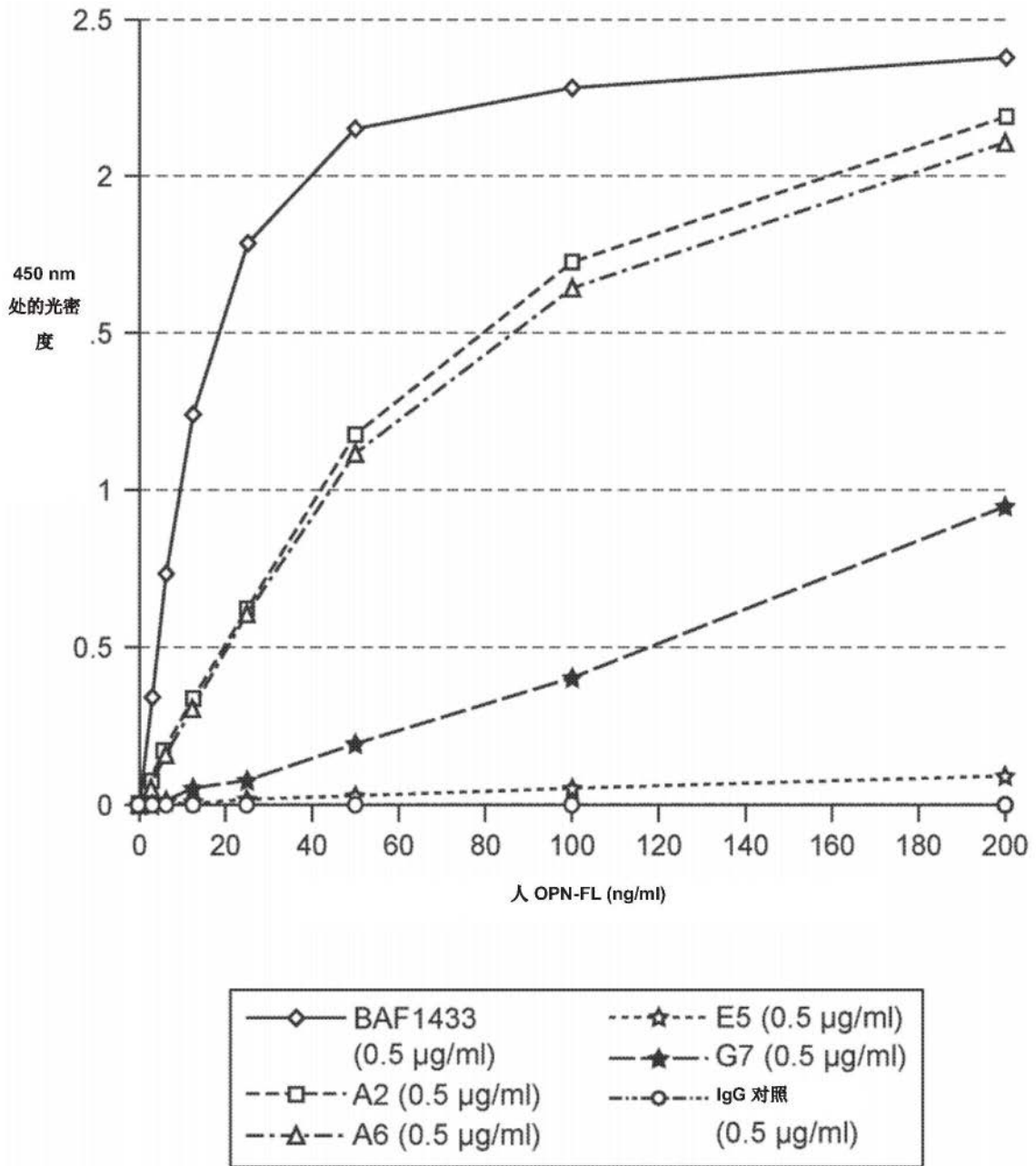


图13

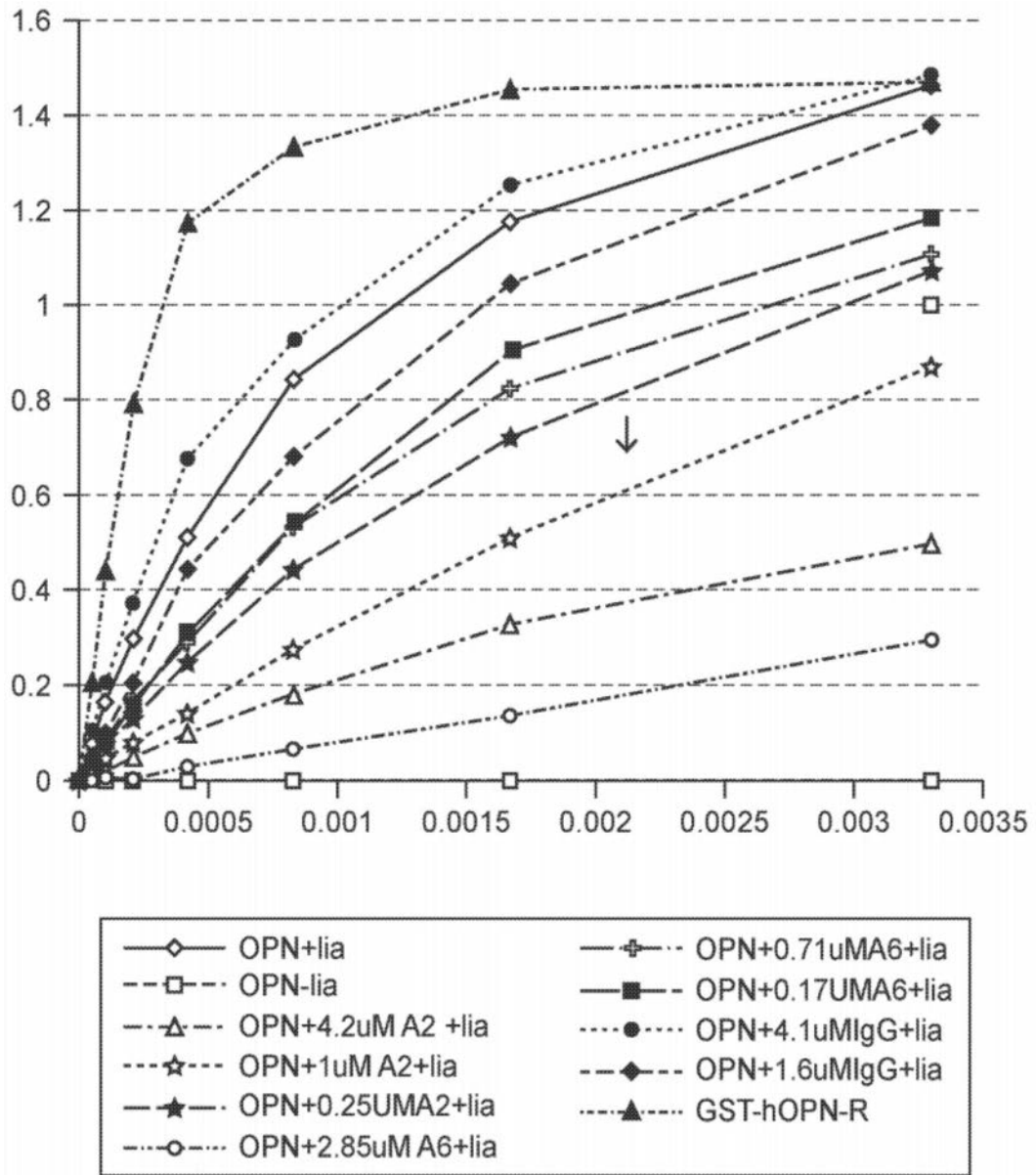


图14

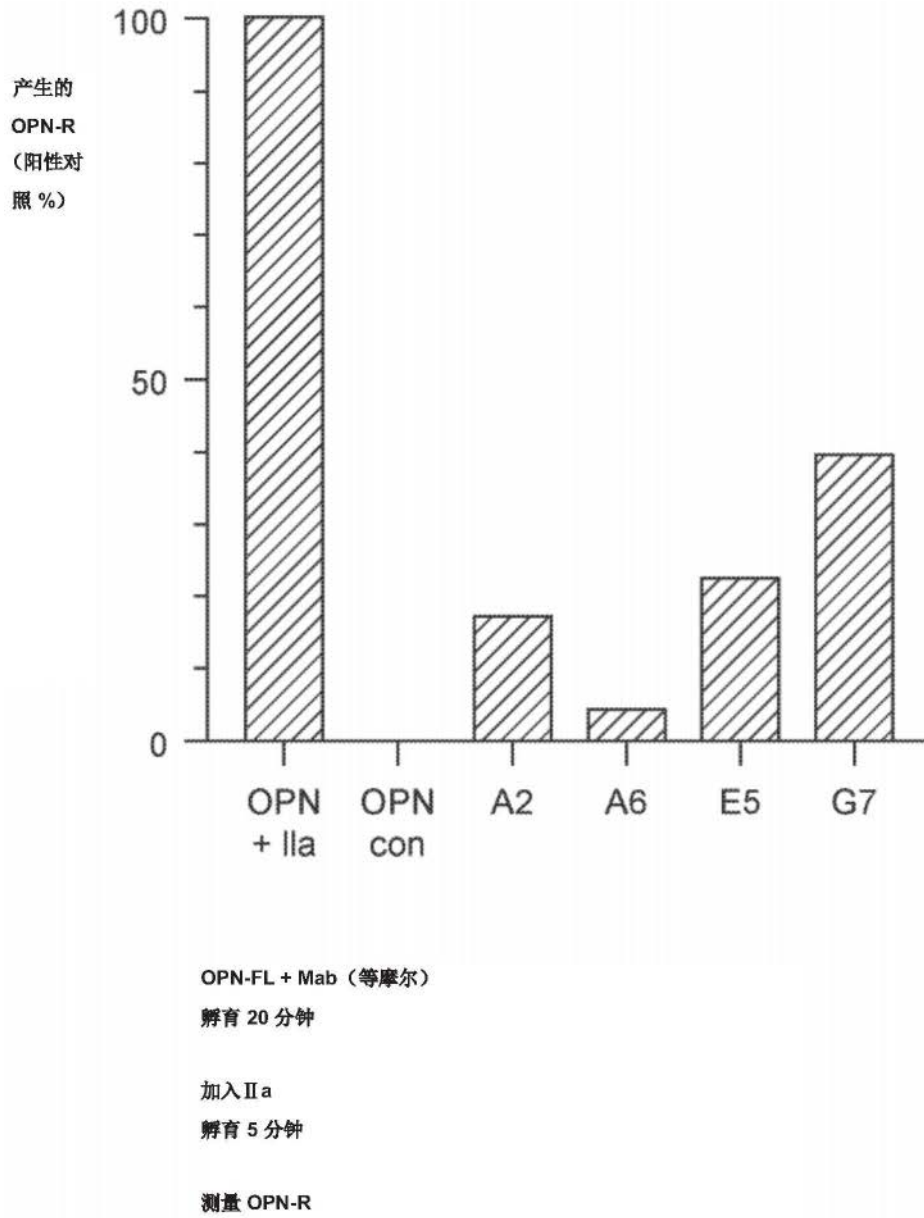


图15

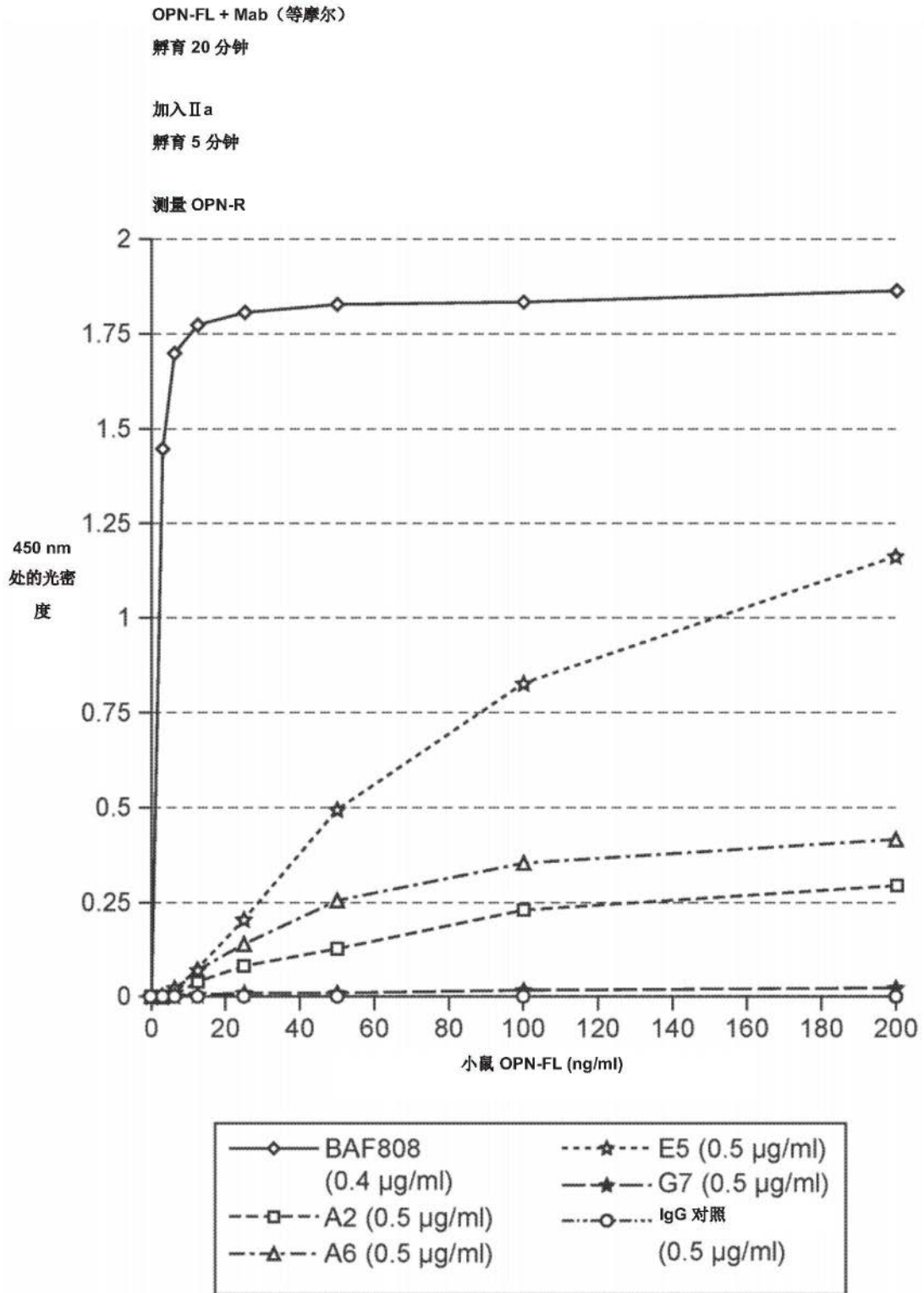


图16