



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110049999 B

(45) 授权公告日 2023.12.19

(21) 申请号 201780044227.8

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

(22) 申请日 2017.08.18

公司 11285

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 曲蕾 张广育

申请公布号 CN 110049999 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2019.07.23

C07K 16/30 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 47/68 (2006.01)

1614162.4 2016.08.18 GB

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.01.16

WO 2015057250 A1, 2015.04.23

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 104379178 A, 2015.02.25

PCT/GB2017/052448 2017.08.18

WO 2009017823 A2, 2009.02.05

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 104870021 A, 2015.08.26

W02018/033749 EN 2018.02.22

CN 101160324 A, 2008.04.09

(73) 专利权人 阿布泽纳(英国)有限公司

CN 101891818 A, 2010.11.24

地址 英国剑桥

WO 2015177360 A1, 2015.11.26

(72) 发明人 R·G·E·霍尔盖特 A·R·赫恩

CN 105246504 A, 2016.01.13

审查员 李雪莹

权利要求书6页 说明书34页

序列表21页 附图11页

(54) 发明名称

抗PSMA抗体、其用途及其缀合物

(57) 摘要

抗体或其抗原结合部分,其与PSMA结合并包含含有以下序列的重链可变区:CDR1:EYTIH (SEQ ID NO:33) CDR2:NINPNX¹GGTTYNQKFED (SEQ ID NO:34) CDR3:X²⁻⁵DY (SEQ ID NO:35),其中,X¹是N或Q,并且X²⁻⁵是YWLF、GWTF或AWTM,并且其中如果X²⁻⁵是GWTF或AWTM,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是G;并且如果X²⁻⁵是YWLF,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是A。本发明还提供了包括抗体或其抗原结合部分的化合物,例如缀合物,以及它们在治疗或诊断疾病,特别是癌症,尤其是前列腺癌中的用途。

1. 一种抗体或其抗原结合部分, 其与PSMA结合并包含重链可变区和轻链可变区, 其中重链可变区包含以下序列:

CDR1:EYTIH (SEQ ID NO:33)

CDR2:NINPNX¹GGTTYNQKFED (SEQ ID NO:34)

CDR3:X²⁻⁵DY (SEQ ID NO:35)

其中,

X¹是N, 并且

X²⁻⁵是GWTF,

并且其中基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是G; 并且其中轻链可变区包含以下序列:

CDR1:KASQDVGTAVD (SEQ ID NO:36)

CDR2:WASTRHT (SEQ ID NO:37)

CDR3:QQX¹⁻⁵LT (SEQ ID NO:38)

其中X¹⁻⁵是FTRYP; 或

其中重链可变区包含以下序列:

CDR1:EYTIH (SEQ ID NO:33)

CDR2:NINPNX¹GGTTYNQKFED (SEQ ID NO:34)

CDR3:X²⁻⁵DY (SEQ ID NO:35)

其中,

X¹是N, 并且

X²⁻⁵是AWTM,

并且其中基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是G; 并且其中轻链可变区包含以下序列:

CDR1:KASQDVGTAVD (SEQ ID NO:36)

CDR2:WASTRHT (SEQ ID NO:37)

CDR3:QQX¹⁻⁵LT (SEQ ID NO:38)

其中X¹⁻⁵是FTRYP; 或

其中重链可变区包含以下序列:

CDR1:EYTIH (SEQ ID NO:33)

CDR2:NINPNX¹GGTTYNQKFED (SEQ ID NO:34)

CDR3:X²⁻⁵DY (SEQ ID NO:35)

其中,

X¹是N, 并且

X²⁻⁵是YWLF,

并且其中基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是A; 并且其中轻链可变区包含以下序列:

CDR1:KASQDVGTAVD (SEQ ID NO:36)

CDR2:WASTRHT (SEQ ID NO:37)

CDR3:QQX¹⁻⁵LT (SEQ ID NO:38)

其中X¹⁻⁵是YNAYS。

2. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,

其中重链可变区包含SEQ ID NO:29中给出的序列,其中

SEQ ID NO:29是:

EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT EYTIHWVRQA PGKGLEWIGN
INPNNGGTTY NQKFEDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAX⁹⁸X⁹⁹
¹⁰²DYWGQGTT VTVSS

其中,

X⁹⁸⁻¹⁰²是GGWTF,

由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:29的第1-30、36-49、67-97和104-115位中的任一位置处包含最多达12个氨基酸序列修饰;和

其中轻链可变区包含SEQ ID NO:31中给出的序列,其中

SEQ ID NO:31是:

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYW
ASTRHTGVPD RFSGSGSGTD FTLTISRLQP EDFAVYYCQQ X⁹¹⁻⁹⁵LTFGQ
GTKVDIK

其中

X⁹¹⁻⁹⁵是FTRYP,

由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:31的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达10个氨基酸序列修饰;

或其中在SEQ ID NO:29中,X⁹⁸⁻¹⁰²是GAWTM,由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:29的第1-30、36-49、67-97和104-115位中的任一位置处包含最多达12个氨基酸序列修饰;和

在SEQ ID NO:31中,X⁹¹⁻⁹⁵是FTRYP,由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:31的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达10个氨基酸序列修饰;

或其中在SEQ ID NO:29中,X⁹⁸⁻¹⁰²是AYWLF,由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:29的第1-30、36-49、67-97和104-115位中的任一位置处包含最多达12个氨基酸序列修饰;和

在SEQ ID NO:31中,X⁹¹⁻⁹⁵是YNAYS,由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:31的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达10个氨基酸序列修饰。

3. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,

其中重链可变区包含SEQ ID NO:30中给出的序列,其中

SEQ ID NO:30是:

EVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKV SCKX²⁴SGYTFT EYTIHWVX³⁸QA
X⁴¹GKGLEWIGN INPNX⁵⁵GGTTY NQKFEDRX⁶⁸TX⁷⁰ TVDKSTSTAY
MELSSX⁸⁶RSED TAVYYCAX⁹⁸X⁹⁹X¹⁰⁰ X¹⁰¹X¹⁰²DYWGQGTT VTVSS

其中,

X⁹是A或P

X¹¹是V或L

X²⁴是A或T

X³⁸是R或K

X⁴¹是P或H

X⁵⁵是N

X⁶⁸是V或A

X⁷⁰是I或L,

X⁸⁶是L或P,并且

X⁹⁸⁻¹⁰²是GGWTF,

由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:30的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰;和

其中轻链可变区包含SEQ ID NO:32中给出的序列,其中

SEQ ID NO:32是:

DIX³MTQSPSX¹⁰ LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYW

ASTRHTGVPD RFX⁶³GSGSGTD FTLTISRLQX⁸⁰ EDFAX⁸⁵YX⁸⁷CQQ X⁹¹⁻⁹⁵LTFGQ

GTX¹⁰³VDIK

其中,

X³是Q或V

X¹⁰是T或F

X⁶³是S或T

X⁸⁰是P或S

X⁸⁵是V或D

X⁸⁷是Y或F

X⁹¹⁻⁹⁵是FTRYP;并且

X¹⁰³是K或M

由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:32的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰;

或其中在SEQ ID NO:30中,

X⁹是A或P

X¹¹是V或L

X²⁴是A或T

X³⁸是R或K

X⁴¹是P或H

X⁵⁵是N

X⁶⁸是V或A

X⁷⁰是I或L,

X⁸⁶是L或P,并且

X⁹⁸⁻¹⁰²是GAWTM,

由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:30的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰;和

其中在SEQ ID NO:32中，

X³是Q或V

X¹⁰是T或F

X⁶³是S或T

X⁸⁰是P或S

X⁸⁵是V或D

X⁸⁷是Y或F

X⁹¹⁻⁹⁵是FTRYP; 并且

X¹⁰³是K或M

由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:32的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最
多达3个氨基酸序列修饰;

或其中在SEQ ID NO:30中，

X⁹是A或P

X¹¹是V或L

X²⁴是A或T

X³⁸是R或K

X⁴¹是P或H

X⁵⁵是N

X⁶⁸是V或A

X⁷⁰是I或L,

X⁸⁶是L或P, 并且

X⁹⁸⁻¹⁰²是AYWLF,

由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:30的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含
最
多
达
3
个
氨
基
酸
序

其中在SEQ ID NO:32中，

X³是Q或V

X¹⁰是T或F

X⁶³是S或T

X⁸⁰是P或S

X⁸⁵是V或D

X⁸⁷是Y或F

X⁹¹⁻⁹⁵是YNAYS; 并且

X¹⁰³是K或M

由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:32的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最
多
达
3
个
氨
基
酸
序

4. 权利要求3的抗体或其抗原结合部分, 其中在SEQ ID NO:33中,X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A
或T、X³⁸为R或K、X⁴¹为P、X⁵⁵为N、X⁶⁸为V或A、X⁷⁰为I并且X⁸⁶为L或P。

5. 权利要求4的抗体或其抗原结合部分, 其中X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A、X³⁸为R、X⁴¹为P、X⁵⁵为
N、X⁶⁸为V、X⁷⁰为I并且X⁸⁶为L或P。

6. 权利要求3的抗体或其抗原结合部分,其中在SEQ ID N0:32中,X³为Q或V、X¹⁰为T、X⁶³为S或T、X⁸⁰为P或S、X⁸⁵为V或D、X⁸⁷为Y或F并且X¹⁰³为K。

7. 权利要求6的抗体或其抗原结合部分,其中X³为Q、X¹⁰为T、X⁶³为S、X⁸⁰为P、X⁸⁵为V、X⁸⁷为Y并且X¹⁰³为K。

8. 一种与PSMA结合的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含:

(i) 序列为SEQ ID N0:5的重链可变区和序列为SEQ ID N0:6的轻链可变区;

(ii) 序列为SEQ ID N0:11的重链可变区和序列为SEQ ID N0:10的轻链可变区;或

(iii) 序列为SEQ ID N0:12的重链可变区和序列为SEQ ID N0:10的轻链可变区。

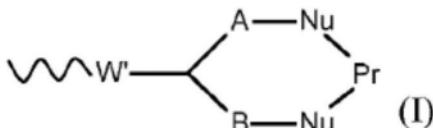
9. 一种多核苷酸,其编码权利要求1至8中任一项的抗体或其抗原结合部分。

10. 一种载体,其包含权利要求9的多核苷酸。

11. 一种宿主细胞,其包含权利要求10的载体。

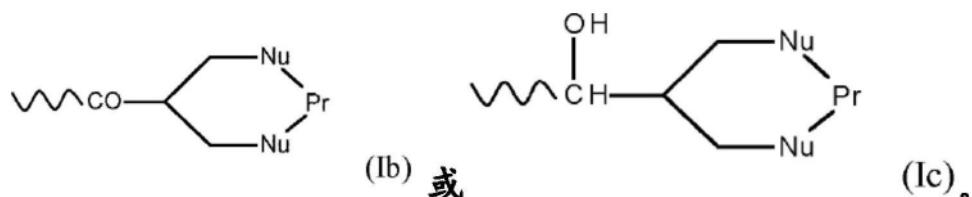
12. 一种抗体缀合物,其包含权利要求1至8中任一项的抗体或其抗原结合部分以及有效负载。

13. 权利要求12的抗体缀合物,其中所述有效负载是经由具有以下通式的键合部分与所述抗体或其抗原结合部分键合:

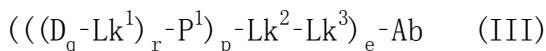


其中Pr代表所述抗体或其抗原结合部分,每个Nu代表存在于或连接至所述抗体或其抗原结合部分的亲核试剂,A和B各自独立地代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基链,并且W'是酮基-CO-、酯基-OCO-或砜基-SO₂-,或通过还原这些基团之一获得的基团。

14. 权利要求13的缀合物,其中所述键合部分具有下式:



15. 权利要求12的缀合物,其具有以下通式:



其中D代表有效负载;

q代表1至10的整数;

Lk¹代表接头;

r代表1至10的整数;

P¹代表键或c-价基团-P²-NH-,其中c为2至11,并且P²为含有至少一个亚乙基单元-CH₂-CH₂-或乙二醇单元-0-CH₂-CH₂-的基团;

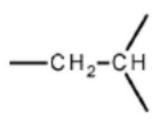
p代表1至10的整数;

Lk²代表键或d-价接头——其中d为2至11并且其由1至9个天冬氨酸和/或谷氨酸残基组成;

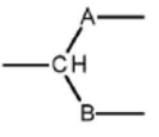
Lk³代表以下通式的接头:

-CO-Ph-Y-Z- (AII)

其中,Ph是任选取代的苯基;Y代表CO基团或CH.0H基团;并且Z代表下式的基团:



(AIII) 或



(AIV)

其中,A和B各自代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基;

Ab代表权利要求1至5中任一项的抗体或其抗原结合部分,其经由来自所述抗体或其抗原结合部分中的二硫键的两个硫原子与Lk³键合;并且

e代表1至s的整数,其中s是在缀合至Lk³之前所述抗体或其抗原结合部分中存在的二硫键的数目。

16. 权利要求12至15中任一项的缀合物,其中所述有效负载是奥瑞斯他汀或美登木素。

17. 权利要求16的缀合物,其中所述有效负载是奥瑞斯他汀。

18. 权利要求1至8中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求12的抗体缀合物用于制备用于诊断由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的诊断剂的用途。

19. 权利要求16的抗体缀合物在制备用于治疗前列腺癌的药物中的用途。

20. 一种用于检测样品中PSMA抗原的存在的非诊断目的的方法,其使用权利要求1至8中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求12的抗体缀合物。

抗PSMA抗体、其用途及其缀合物

[0001] 本发明涉及与PSMA结合的新的人源化抗体，所述抗体和包括所述抗体的化合物（例如抗体的缀合物，例如抗体-药物缀合物）的用途。本发明的抗体和缀合物可用于治疗或诊断疾病，特别是癌症，尤其是前列腺癌。

背景技术

[0002] 抗体对靶细胞和分子的表面上的特定抗原的特异性已经使得它们被广泛用作各种诊断和治疗试剂的载体。例如，与标记物和报告基团（如荧光团、放射性同位素和酶）缀合的抗体可用于标记和成像应用，而与细胞毒性试剂和化疗药物的缀合使得能够将这类试剂靶向递送到特定的组织或结构（例如，特定的细胞类型或生长因子），将对正常、健康组织的影响最小化并显著降低与化学疗法治疗相关的副作用。抗体-药物缀合物在一些疾病领域具有广泛的潜在的治疗应用。

[0003] 前列腺癌，也称为前列腺瘤，是在前列腺——男性生殖系统中的腺体——中形成癌症。在全球范围内，其是第二种最常见的癌症类型，并且是男性癌症相关死亡的第五大原因。晚期前列腺癌的一线治疗是雄激素剥夺。在进展之后，化疗提供了益处，但是反应是短暂的，并且没有已显示出在初始化疗之后提高存活率的疗法。转移性前列腺癌对常规化疗反应差。因此仍需要改进的疗法。

[0004] 前列腺特异性膜抗原（PSMA）表达与前列腺癌和其他实体瘤高度相关。PSMA存在于一些正常前列腺上皮细胞、正常肾近端小管细胞、近端小肠和一些星形胶质细胞（存在于脑中的）的细胞表面上。PSMA在前列腺癌（PCa）细胞中高度上调/过表达。PSMA的表达水平随着前列腺癌进展而增加，并且早期前列腺癌中的高PSMA水平预示复发的可能性增加。相当大比例的实体瘤在其肿瘤新血管系统中表达PSMA，而正常血管内皮是PSMA阴性的。已观察到PSMA通过水解谷氨酸化的叶酸来增加可用的叶酸。据推测，PSMA通过增加癌细胞用于存活和生长的叶酸水平来刺激前列腺癌的形成。

[0005] 之前已产生了抗PSMA抗体（参见例如W098/03973），并且已制备了在人体中具有降低的免疫原性的经修饰的抗体（参见例如W02004/098535）。结合PSMA的去免疫的IgG单克隆抗体的实例是J591。小鼠J591抗体的重链可变区的氨基酸序列在本文以SEQ ID NO:1给出，相应的轻链在本文以SEQ ID NO:2给出。去免疫的抗体J591的重链可变区的氨基酸序列在本文以SEQ ID NO:3给出，相应的轻链在本文以SEQ ID NO:4给出。去免疫的J591已经以放射性标记的形式用于临床中，并且已被证明具有良好的耐受性和非免疫原性（参见Tagawa et al., Cancer, 2010, 116 (4), 1075-1083）。

[0006] 在W003/034903及其家族成员（包括US 8,470,330B）中公开了结合PSMA的抗体的其他实例。例如，抗体“AB-PG1-XG1-006”在这些公开文本中具有重链和轻链序列SEQ ID NO 15和SEQ ID NO 17（在本文以SEQ ID NO 13和14给出），抗体“AB-PG1-XG1-026”在这些公开文本中具有重链和轻链序列SEQ ID NO 19和SEQ ID NO 21（在本文以SEQ ID NO 15和16给出）。

[0007] 除了具有良好的靶标结合亲和力、低脱靶结合性和低免疫原性，作为药物候选物

的抗体(无论是单独的还是与另一种活性成分缀合的)还应具有良好的稳定性。也就是说,其应该具有较低的变性或聚集、或解离成组分片段的倾向。鉴于这组苛刻的性质,仍需要开发其他有益的抗PSMA抗体。

发明内容

[0008] 本发明涉及与PSMA结合的新的人源化抗体。本发明提供了抗体或其抗原结合部分,其与PSMA结合并包含含有以下序列的重链可变区:

[0009] CDR1:EYTIH (SEQ ID NO:33)

[0010] CDR2:NINPNX¹GGTTYNQKFED (SEQ ID NO:34)

[0011] CDR3:X²⁻⁵DY (SEQ ID NO:35)

[0012] 其中,

[0013] X¹是N或Q,并且

[0014] X²⁻⁵是YWLF、GWTF或AWTM,

[0015] 并且其中

[0016] 如果X²⁻⁵是GWTF或AWTM,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是G;并且

[0017] 如果X²⁻⁵是YWLF,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是A。

[0018] 优选地,X¹是N。

[0019] 重链的CDR可分别被指定为CDRH1、CDRH2和CDRH3。根据Kabat编号系统(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda), CDRH1位于位置H31至H35, CDRH2为H50至H65, 和CDRH3为H95至H102。

[0020] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:29中给出的序列的重链可变区,其中

[0021] SEQ ID NO:29是:

[0022] EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT EYTIHWVRQA PGKGLEWIGNINPNNGGTTY
NQKFEDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAX⁹⁸X⁹⁹⁻¹⁰²DYWGQGTT VTVSS

[0023] 其中,

[0024] X⁹⁸⁻¹⁰²是AYWLF、GGWTF或GAWTM,

[0025] 由此,所述重链可变区在SEQ ID NO:29的第1-30、36-49、67-97和104-115位中的任一位置处包含最多达12个氨基酸序列修饰。

[0026] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:30中给出的序列的重链可变区,其中

[0027] SEQ ID NO:30是:

[0028] EVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKV SCKX²⁴SGYTFT EYTIHWVX³⁸QAX⁴¹GKGLEWIGN
INPNX⁵⁵GGTTY NQKFEDRX⁶⁸TX⁷⁰TVDKSTSTAYMELSSX⁸⁶RSED TAVYYCAX⁹⁸X⁹⁹X¹⁰⁰X¹⁰¹X¹⁰²DYWGQGTT
VTVSS

[0029] 其中,

[0030] X⁹是A或P

[0031] X^{11} 是V或L

[0032] X^{24} 是A或T

[0033] X^{38} 是R或K

[0034] X^{41} 是P或H

[0035] X^{55} 是N或Q

[0036] X^{68} 是V或A

[0037] X^{70} 是I或L,

[0038] X^{86} 是L或P,并且

[0039] X^{98-102} 是AYWLF、GGWTF或GAWTM,

[0040] 由此,除了上文具体列举的那些之外,所述重链可变区在SEQ ID NO:30的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间还包含最多达3个氨基酸序列修饰。

[0041] SEQ ID NO:29和30中的 X^{98} 对应于基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)。

[0042] 本发明还提供了抗体或其抗原结合部分,其与PSMA结合并包含含有以下序列的轻链可变区:

[0043] CDR1:KASQDVGTAVD (SEQ ID NO:36)

[0044] CDR2:WASTRHT (SEQ ID NO:37)

[0045] CDR3:QQX¹⁻⁵LT (SEQ ID NO:38)

[0046] 其中

[0047] X^{1-5} 是FTRYP或YNAYS。

[0048] 轻链的CDR可分别被指定为CDRH1、CDRH2和CDRH3。根据Kabat编号系统(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda), CDRH1位于位置L20至L34, CDRH2为L50至L56, 和CDRH3为L89至L97。

[0049] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:31中给出的序列的轻链可变区,其中

[0050] SEQ ID NO:31是:

[0051] DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYWASTRHTGVPD
RFSGSGSGTD FTLTISRLQP EDFAVYYCQQ X^{91-95} LTFGQGTKVDIK

[0052] 其中

[0053] X^{91-95} 是FTRYP或YNAYS,

[0054] 由此,所述轻链可变区在SEQ ID NO:31的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达10个氨基酸序列修饰。

[0055] 在其他优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分包含含有SEQ ID NO:32中给出的序列的轻链可变区,其中

[0056] SEQ ID NO:32是:

[0057] DIX³MTQSPSX¹⁰LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYWASTRHTGVPD

RFX⁶³GSGSGTD FTLTISRLQX⁸⁰EDFAX⁸⁵YX⁸⁷CQQ X⁹¹⁻⁹⁵LTFGQQGTX¹⁰³VDIK

[0058] 其中，

[0059] X³是Q或V

[0060] X¹⁰是T或F

[0061] X⁶³是S或T

[0062] X⁸⁰是P或S

[0063] X⁸⁵是V或D

[0064] X⁸⁷是Y或F

[0065] X⁹¹⁻⁹⁵是FTRYP或YNAYS；并且

[0066] X¹⁰³是K或M

[0067] 由此，除了上文具体列举的那些之外，所述轻链可变区在SEQ ID NO:32的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间还包含最多达3个氨基酸序列修饰。

[0068] 在优选的实施方案中，所述抗体或其抗原结合部分包含本发明的重链可变区和本发明的轻链可变区。

[0069] 本发明的抗体和抗原结合部分具有与PSMA的强结合力，特别是它们比上述的去免疫的J591抗体具有更强的结合力。对其抗原具有高亲和力的抗体是有利的，因为它们可以以少量被治疗性地使用，并且它们具有较低的脱靶效应风险。

[0070] 此外，本发明的优选的抗体和抗原结合部分具有良好的稳定性。具有良好稳定性的抗体是有利的，因为其具有较小的变性或聚集、或解离成组分片段的倾向。因此，其可能更长时间地以天然构象存在于循环中。由于片段化抗体（或抗体-药物缀合物）失去其与靶抗原结合的能力，所以减少的片段化是有利的。细胞毒性药物往往是疏水性的，因此其在溶液中显示出聚集的趋势。降低的聚集趋势也是抗体-药物缀合物的优势。聚集体可促进免疫反应，也就是说，它们可具有免疫原性。包含本发明的抗体或抗原结合部分的抗体-药物缀合物具有良好的稳定性和降低的在溶液中聚集的趋势。

[0071] 本发明的抗体和抗原结合部分也显示出良好的表达效率。抗体的表达效率是抗体或抗体-药物缀合物生产中的重要因素。例如，获得抗体的稳定的、高产量的表达对于用于诊断或治疗用途的生产是重要的，其中甚至需要大量的抗体进行临床试验。因此，在整个表达和纯化过程中轻链或重链的表达水平及其易于操作可影响对选择用于生产的抗体的选择。优选具有高溶解度和低聚集倾向的表达良好的抗体。

附图说明

[0072] 图1(a)示出了重链可变区的pANT表达载体的结构(pANT17.2)。

[0073] 图1(b)示出了轻链可变区的pANT表达载体的结构(pANT13.2)。

[0074] 图2示出了通过FACS所分析的AB-01和现有技术抗体AB-10对PSMA抗原的竞争性结合的比较。

[0075] 图3示出了本文示例的抗体的氨基酸序列。

[0076] 图4示出了用于表达本文示例的抗体的所用的DNA序列。

[0077] 图5示出了彼此比对的本文示例的某些抗体的序列。

具体实施方式

[0078] CDR区在上文的序列SEQ ID NO:29至32中以下划线示出。

[0079] 本发明包括抗体及其抗原结合部分,其包含含有SEQ ID NO:29中给出的序列、并且在如上定义的CDR区外具有最多达12个氨基酸序列修饰的重链可变区,和/或含有SEQ ID NO:31中给出的序列、并且在如上定义的CDR区外具有最多达10个氨基酸序列修饰的轻链可变区。

[0080] 例如,这种修饰可以改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。氨基酸序列修饰可通过将合适的核苷酸变化引入到抗体核酸中或通过肽合成来制备。这种修饰包括,例如,抗体的氨基酸序列内的残基的缺失、和/或插入和/或置换。可进行缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体,只要所述最终构建体具有所需特征。置换可以是保守性置换或非保守性置换。氨基酸变化也可改变抗体的翻译后过程,例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0081] 例如,当氨基酸序列修饰是置换时,优选是保守性置换,即,基本上不降低抗体或其抗原结合部分对抗原的特异性结合(例如,通过 K_d 测量的)的氨基酸置换(例如,增加结合、不显著改变结合或降低结合不超过约40%、通常不超过约30%、更通常不超过约20%、甚至更通常不超过约10%、或最通常不超过约5%的置换,如通过标准结合测定法(例如,ELISA)测定的)。

[0082] 本发明还包括抗体及其抗原结合部分,其包含含有SEQ ID NO:30中给出的序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:32中给出的序列的轻链可变区,并且在重链和轻链可变区之一或两者中具有在如上所定义的CDR区外的额外的最多达3个氨基酸序列修饰,例如0、1或2个氨基酸序列修饰。

[0083] 本发明还包括抗体及其抗原结合部分,其包含含有SEQ ID NO:29中给出的序列的重链可变区和/或含有SEQ ID NO:31中给出的序列的轻链可变区,并且除了在SEQ ID NO:29的第1-30、36-49、67-97和104-115位中的任一位置处的最多达12个氨基酸序列修饰或在SEQ ID NO:31的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间的最多达10个氨基酸序列修饰之外,在重链和轻链可变区之一或两者中还具有在如上所定义的CDR区外的额外的最多达3个氨基酸序列修饰,例如0、1或2个氨基酸序列修饰。也就是说,本发明包括包含在如上定义的CDR区外具有最多达15个氨基酸序列修饰的SEQ ID NO:29中给出的序列的重链可变区和/或包含在如上定义的CDR区外具有最多达13个氨基酸序列修饰的SEQ ID NO:31中给出的序列的轻链可变区。

[0084] 例如,在含有SEQ ID NO:30中给出的序列的重链中的CDR区外的0、1或2个残基,以及在含有SEQ ID NO:32中给出的序列的轻链中的CDR区外的0、1或2个残基可被另一个氨基酸替换。例如,在重链中的CDR区外的0或1个残基可被另一个氨基酸替换。例如,在轻链中的CDR区外的0或1个残基可被另一个氨基酸替换。优选地,序列SEQ ID NO:30和32中没有残基被改变为除了具体列举的氨基酸之外的氨基酸。

[0085] 例如,SEQ ID NO:29或30可以是SEQ ID:5、SEQ ID:7、SEQ ID:9或SEQ ID:11的序列。

[0086] 在SEQ ID NO:30中,优选:

[0087] X^9 为A、 X^{11} 为V、 X^{24} 为A或T、 X^{38} 为R或K、 X^{41} 为P、 X^{55} 为N或Q、 X^{68} 为V或A、 X^{70} 为I,并且 X^{86}

是L或P。例如,SEQ ID NO:30可以是SEQ ID:5、SEQ ID:7、SEQ ID:9或SEQ ID:11的序列。

[0088] 在SEQ ID NO:30中,还优选:

[0089] X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A、X³⁸为R、X⁴¹为P、X⁵⁵为N或Q、X⁶⁸为V、X⁷⁰为I,并且X⁸⁶是L或P。例如,SEQ ID NO:30可以是SEQ ID:5、SEQ ID:7、SEQ ID:9或SEQ ID:11的序列。

[0090] 特别地,特别优选:

[0091] X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A、X³⁸为R、X⁴¹为P、X⁵⁵为N、X⁶⁸为V、X⁷⁰为I,并且X⁸⁶是L。例如,SEQ ID NO:30可以是SEQ ID:5、SEQ ID:7或SEQ ID:9的序列。

[0092] 另一个特别优选的实施方案是:

[0093] X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A、X³⁸为R、X⁴¹为P、X⁵⁵为N、X⁶⁸为V、X⁷⁰为I,并且X⁸⁶是P。例如,SEQ ID NO:30可以是SEQ ID:11的序列。

[0094] 在SEQ ID NO:32中,优选:

[0095] X³是Q或V、X¹⁰是T、X⁶³是S或T、X⁸⁰是P或S、X⁸⁵是V或D、X⁸⁷是Y或F,并且X¹⁰³是K。例如,SEQ ID NO:32可以是SEQ ID:6、SEQ ID:8或SEQ ID:10的序列。

[0096] 在SEQ ID NO:32中,还优选:

[0097] X³是Q或V、X¹⁰是T、X⁶³是S、X⁸⁰是P、X⁸⁵是V或D、X⁸⁷是Y,并且X¹⁰³是K。例如,SEQ ID NO:32可以是SEQ ID:6、SEQ ID:8或SEQ ID:10的序列。

[0098] 在SEQ ID NO:32中,特别优选:

[0099] X³是Q、X¹⁰是T、X⁶³是S、X⁸⁰是P、X⁸⁵是V、X⁸⁷是Y,并且X¹⁰³是K。例如,SEQ ID NO:32可以是SEQ ID:6、SEQ ID:8或SEQ ID:10的序列。

[0100] 在优选的实施方案中,本发明的抗体包含具有SEQ ID:5、SEQ ID:7、SEQ ID:9或SEQ ID:11的序列的重链可变区和具有SEQ ID:6、SEQ ID:8或SEQ ID:10的序列的轻链可变区。

[0101] 例如,本发明的抗体包含SEQ ID NO:5的重链可变区和SEQ ID NO:6的轻链可变区(称为'AB-02');或SEQ ID NO:7的重链可变区和SEQ ID NO:8的轻链可变区(称为'AB-03');或SEQ ID NO:9的重链可变区和SEQ ID NO:8的轻链可变区(称为'AB-04');或SEQ ID NO:5的重链可变区和SEQ ID NO:10的轻链可变区(称为'AB-05');或SEQ ID NO:11的重链可变区和SEQ ID NO:10的轻链可变区(称为'AB-06');或SEQ ID NO:12的重链可变区和SEQ ID NO:10的轻链可变区(称为'AB-07')。

[0102] 本发明还提供了与PSMA结合并包含重链可变区的抗体或其抗原结合部分,所述重链可变区包含具有序列X²⁻⁵DY(SEQ ID NO:35)的CDR3,

[0103] 其中X²⁻⁵是YWLF、GWTF或AWTM,

[0104] 并且其中

[0105] 如果X²⁻⁵是GWTF或AWTM,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是G;并且

[0106] 如果X²⁻⁵是YWLF,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是A,

[0107] 以及任选的以下序列之一或两者:

[0108] CDR1:EYTIH(SEQ ID NO:33)

[0109] CDR2:NINPNX¹GGTTYNQKFED(SEQ ID NO:34),其中X¹是N或Q。

[0110] 优选地,X¹是N。

[0111] 本发明还提供了与PSMA结合并包含轻链可变区的抗体或其抗原结合部分,所述轻链可变区包含具有序列QQX¹⁻⁵LT (SEQ ID NO:38)的CDR3,

[0112] 其中X¹⁻⁵是FTRYP或YNAYS,

[0113] 以及任选的以下序列之一或两者:

[0114] CDR1:KASQDVGTAVD (SEQ ID NO:36)

[0115] CDR2:WASTRHT (SEQ ID NO:37)。

[0116] 本发明还提供了与PSMA结合并包含以下的抗体或其抗原结合部分:

[0117] 包含以下序列的重链可变区:

[0118] CDR1:EYTIH (SEQ ID NO:33)

[0119] CDR2:NINPNX¹GTTYNQKFED (SEQ ID NO:34)

[0120] CDR3:X²⁻⁵DY (SEQ ID NO:35)

[0121] 其中,

[0122] X¹是N或Q,优选N,并且

[0123] X²⁻⁵是YWLF、GWTF或AWTM,

[0124] 并且其中

[0125] 如果X²⁻⁵是GWTF或AWTM,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是G;并且

[0126] 如果X²⁻⁵是YWLF,则基于Kabat编号的重链可变区中位置H94处的氨基酸残基是A,

[0127] 以及

[0128] 包含以下序列的轻链可变区:

[0129] CDR1:KASQDVGTAVD (SEQ ID NO:36)

[0130] CDR2:WASTRHT (SEQ ID NO:37)

[0131] CDR3:QQX¹⁻⁵LT (SEQ ID NO:38)

[0132] 其中X¹⁻⁵是FTRYP或YNAYS。

[0133] 本发明的抗体是与PSMA(例如人PSMA)结合的人源化抗体,其平衡解离常数(Kd)为10⁻⁸M或更低,例如10⁻⁹M或更低,例如750×10⁻¹²M或更低,例如500×10⁻¹²M或更低。例如,本发明的抗体特异性地与人前列腺癌细胞结合。

[0134] 与某些现有技术人源化的(或去免疫的)抗PSMA抗体相比,本发明的抗体具有改善的稳定性。因此,本发明的抗体具有更小的变性或聚集、或解离成组分片段的倾向。因此,可假设其更长时间地以天然构象保持在循环中。对于抗体-药物缀合物和产生这些缀合物的试剂而言,降低的聚集倾向是特别有利的;细胞毒性药物往往是疏水性的,因此缀合试剂和具有细胞毒性药物的抗体-药物缀合物具有在溶液中聚集的趋势,这显著降低了它们的有效性。片段化的抗体(包括作为抗体-药物缀合物的一部分)失去其与靶抗原结合的能力。因此,对片段化的敏感性降低的抗体也是有利的。

[0135] 本发明的抗体可具有同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD或IgE的重链。IgG1、IgG2、IgG3和IgG4是特别优选的。或者,其可具有改变的IgG恒定区,例如以增加或降低与Fc受体的结合或增加或降低与补体的结合,例如,IgG恒定区可以是IgG4k或IgG1k。本发明的抗体可具有为κ轻链的抗体轻链。

[0136] 本发明化合物可以是全长抗体(例如IgG4或IgG1抗体)。或者,其可仅包括抗原结

合部分。例如,本发明的化合物可以是Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fd链、Fv片段或单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fy(sdfv)、仅包含V_H结构域的片段,包括来自骆驼、美洲驼等的纳米抗体或片段。本发明还提供了双特异性和多特异性抗体(被连接在一起以产生两种或更多种不同的特异性的两种或更多种不同的抗体分子),包括如上所述的至少一种抗体或其抗原结合部分。抗原结合部分可以是,例如,由scFv片段或双抗体和Fc片段或C_H结构域的不同排列组成的微抗体,例如scFv-Fc、scFv-Fc-scFv、(Fab' ScFv)₂、scDiabody-Fc、scDiabody-C_H3、scFv-C_H3、scFV-C_H2-C_H3融合蛋白等。抗体片段可通过酶促切割、合成或重组技术产生。

[0137] 本发明的抗体或其抗原结合部分可通过哺乳动物细胞系(尤其是CHO或NS0细胞)产生。例如,本发明的抗体可以是单克隆抗体。

[0138] 本发明的抗体或其抗原结合部分可用作体内和体外的诊断剂或治疗剂。

[0139] 另一方面,本发明提供了编码本发明的人源化抗体或其抗原结合部分的核酸分子。因此,本发明还涵盖包括本发明的编码抗体的核酸的重组表达载体和转染有这些载体的宿主细胞,以及通过培养这些宿主细胞制备本发明的抗体的方法。例如,本发明的抗体或其抗原结合部分可由具有SEQ ID NO:21、23、25或27(重链)或SEQ ID NO:22、24或26(轻链)所示的序列的人IgG重链核酸和人κ轻链核酸或其变体编码。

[0140] 例如,可确定变体核酸在本发明的范围内,其中包括含有SEQ ID NO:21、23、25或27或基本上与其相同的序列,例如通过其在严格条件下与本发明的核酸(例如SEQ ID NO:21、23、25或27的核酸)杂交的能力来确定的。术语“杂交”是指当特定核苷酸序列存在于复杂混合物(例如总细胞或文库DNA或RNA)中时,分子与该序列在严格杂交条件下的结合、双链体化或杂交,其中至少在约10倍的背景下检测所述特定核苷酸序列。选择严格杂交条件为,例如,比特定序列在确定的离子强度和pH下的热熔点(Tm)低5-10℃。例如,严格的杂交条件可以是:

[0141] • 50%去离子甲酰胺

[0142] • 2x盐水柠檬酸钠(SSC) *

[0143] • 50mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄缓冲液;pH7.0

[0144] • 1mM EDTA

[0145] • 靶DNA/RNA(每种1mg/ml)

[0146] • 探针(约20-200ng/ml)

[0147] 温度:37至42℃;杂交时间:5分钟--16小时

[0148] * SSC:1x SSC=150mM NaCl,15mM柠檬酸钠;pH7.0。

[0149] 缀合物

[0150] 本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合部分,例如,Fab,其经由接头与有效负载缀合,所述有效负载可以是另一种功能性分子(例如治疗剂、诊断剂或标记试剂)和/或聚合物。可存在另一种功能性分子的单一分子,或可存在两个或更多个分子。通常优选抗体药物缀合物应含有多拷贝的药物。所述功能性分子可以是例如另一种肽或蛋白质,例如,Fab'片段。优选包含一个或多个药物分子,例如细胞毒性剂或毒素。奥瑞斯他汀类(Auristatins)和关登木素类(maytansinoids)是典型的细胞毒性药物。标记试剂(其应被理解为包括成像试剂)可例如包括放射性核素、荧光剂(例如胺衍生的荧光探针,例如5-二甲基氨基萘-1-(N-(2-氨基乙基))磺酰胺-丹磺酰基乙二胺、**OregonGreen®488** 尸胺

(目录号0-10465,Molecular Probes)、丹磺酰尸胺、N-(2-氨基乙基)-4-氨基-3,6-二硫代-1,8-萘酰亚胺、二钾盐(荧光黄乙二胺)、或罗丹明B乙二胺(目录号L 2424,Molecular Probes)、或硫醇衍生的荧光探针,例如**BODIPY®FLL**-胱氨酸(目录号B-20340,Molecular Probes))。标记试剂也可以是染料、造影剂、生物发光剂、酶、增强剂或纳米颗粒。还可以使用生物素。

[0151] 在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合部分与治疗剂缀合。本文使用的“治疗剂”是可用于治疗由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括但不限于药物、化学治疗剂、治疗性抗体和抗体片段、毒素、放射性同位素、酶(例如,在抗原结合构建体结合位点将前药切割成细胞毒性剂的酶)、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物、光活性剂和染料、以及纳米颗粒。

[0152] 在一些实施方案中,治疗方法包括通过连接适当的放射性标记(例如碘-131、 β -发射体、例如钇-90、镥-177、铜-67、砹-211、铅-212/铋-212、锕-225/铋-213,和钍)进行的放射免疫疗法,其可以对靶组织造成细胞损伤和死亡。

[0153] 在一些实施方案中,将纳米颗粒在治疗应用中用作药物载体,当与抗体或其抗原结合部分缀合时,其将化学治疗剂、激素治疗剂、放射治疗剂、毒素或任何本领域中已知的其他细胞毒性剂或抗癌剂递送至过表达PSMA的癌细胞中。本文所述的任何抗体或其抗原结合部分可进一步与一种或多种额外的治疗剂、可检测的标记物、纳米颗粒、载体或其组合缀合。例如,抗体或其抗原结合部分可以用碘-131放射性标记并与脂质载体缀合,以使得抗PSMA-脂质缀合物形成胶束。胶束可掺入一种或多种治疗的或可检测的标记物。或者,除载体外,抗原结合构建体还可以用碘-131I放射性标记(例如,在酪氨酸残基处)并与药物缀合(例如,在赖氨酸残基的 ϵ 氨基处),并且载体可以掺入额外的治疗的或可检测的标记物。

[0154] 在一些实施方案中,本发明的抗原结合部分与治疗剂缀合。虽然与全长抗体相比,这些抗原结合部分可具有更短的循环半衰期,但在一些实施方案中,这些形式可基于其较小的尺寸表现出改善的肿瘤穿透性,并且当适当地装备有细胞毒性药物或放射性同位素时是治疗有效的。在一些实施方案中,可使用抗体药物-缀合物方法。在一些实施方案中,用这些装备有细胞毒性药物或放射性核素的片段进行治疗导致较少的非特异性毒性,因为它们会更快地从体内清除。

[0155] 在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合部分与可检测的标记物缀合。本文使用的“可检测的标记物”包括可用于诊断、检测或可视化细胞、组织、器官等中的PSMA抗原的位置和/或量的原子、分子或化合物。可根据本文的实施方案使用的可检测的标记物包括但不限于放射性物质(例如,放射性同位素、放射性核素、放射性标记物或放射性示踪剂)、染料、造影剂、荧光化合物或分子、生物发光化合物或分子、酶和增强剂(例如,顺磁离子)。另外,本领域已知一些纳米颗粒,例如量子点和金属纳米颗粒,适合用作检测剂。在一些实施方案中,可检测的标记物是吲哚菁绿(ICG)、镥-89、IR800和/或另一种近红外染料。

[0156] 可根据本文的实施方案用作可检测的标记物的示例性的放射性物质包括但不限于 ^{18}F 、 ^{18}F -FAC、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Sc 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 $^{154\text{--}158}\text{Gd}$ 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。可用作可检测的标记物的示例性的顺磁离

子物质包括但不限于过渡金属和镧系金属(例如原子序数为6-9、21-29、42、43、44或57-71的金属)的离子。这些金属包括Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb和Lu的离子。

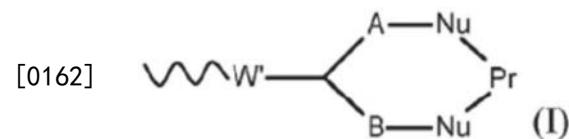
[0157] 可根据本公开内容的实施方案用作可检测的标记物的示例性的造影剂包括但不限于钡、泛影葡胺、乙氧基化油、柠檬酸镓、碘卡酸、碘酸胺酸、碘达酸、胆影酸、碘沙酸、iogulamide、碘海醇、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘砜葡胺、iosemetic acid、碘酞硫、碘替酸、碘他拉酸、碘曲西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸、丙碘酮、氯化亚锡,或其组合。

[0158] 可根据本公开内容的实施方案用作可检测的标记物的生物发光和荧光化合物或分子和染料包括但不限于荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、OREGON GREENTM、罗丹明、德克萨斯红、四罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)、Cy3、Cy5等、荧光标记物(例如,绿色荧光蛋白(GFP)、藻红蛋白等)、由肿瘤相关蛋白酶激活的自动淬灭的荧光化合物、酶(例如荧光素酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、纳米颗粒、生物素、洋地黄毒苷,或其组合。

[0159] 可根据本公开内容的实施方案用作可检测的标记物的酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶或 β -内酰胺酶。这些酶可以与色原、荧光化合物或发光化合物组合使用以产生可检测的信号。

[0160] 用于将有效负载连接到抗体或其抗原结合部分的合适接头是下文关于缀合试剂的部分中描述的那些。所述接头是有利地可降解的,如下所述。在一些优选的实施方案中,所述接头包括聚合物,如下所述。

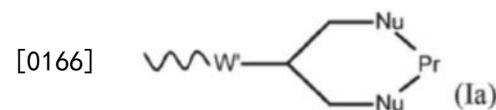
[0161] 本发明的优选缀合物是其中有效负载与抗体或其抗原结合部分的键合是经由具有以下通式的键合部分进行的那些:



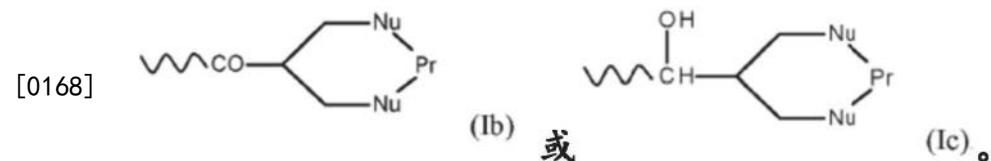
[0163] 其中Pr代表所述抗体或其抗原结合部分,每个Nu代表存在于或连接至所述抗体或其抗原结合部分的亲核试剂,A和B各自独立地代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基链,并且W'代表吸电子基团或通过还原吸电子基团得到的基团。

[0164] 吸电子基团W'可以是例如酮基-CO-、酯基-OCO-或砜基-SO₂-。优选地,W'代表这些基团之一或如下所述通过还原这些基团之一获得的基团。优选地,W'代表酮基或通过还原酮基获得的基团,特别是CH.OH基团。

[0165] 优选地,所述基团(grouping)具有下式:



[0167] 尤其是



[0169] 抗体或其抗原结合部分中的亲核基团是例如由半胱氨酸、赖氨酸或组氨酸残基提

供，并且Nu可以例如是硫原子或胺基团。在本发明的一个优选实施方案中，每个Nu代表存在于抗体或其抗原结合部分中存在的半胱氨酸残基中的硫原子。根据本发明的抗体通常含有四个链间二硫键。这些中的每一个可以被还原以提供充当亲核试剂的游离巯基。如果这些二硫键中的每一个如上式I所示桥接，则将产生药物-抗体比例(DAR)为4的缀合物。在另一个实施方案中，每个Nu代表存在于与所述抗体或其抗原结合部分连接的多聚组氨酸标签中存在的组氨酸残基中的咪唑基团。

[0170] 本发明的缀合物可以，例如，具有以下通式：

[0171] $((D_q-Lk^1)_p-P^1-Lk^2-Lk^3)_e-Ab$ (III)

[0172] 其中D代表有效负载；

[0173] q代表1至10的整数；

[0174] Lk^1 代表接头；

[0175] r代表1至10的整数；

[0176] P^1 代表键或c-价基团- P^2-NH- ，其中c为2至11，并且 P^2 为含有至少一个亚乙基单元- CH_2-CH_2- 或乙二醇单元- $O-CH_2-CH_2-$ 的基团；

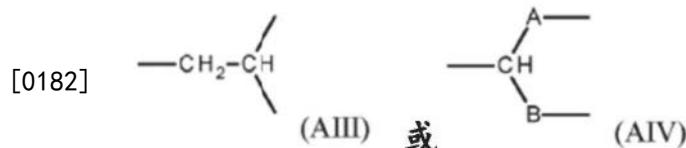
[0177] e代表1至10的整数；

[0178] Lk^2 代表键或d-价接头——其中d为2至11并且其由1至9个天冬氨酸和/或谷氨酸残基组成；

[0179] Lk^3 代表以下通式的接头：

[0180] -CO-Ph-Y-Z- (AII)

[0181] 其中，Ph是任选取代的苯基；Y代表CO基团或CH.OH基团；并且Z代表下式的基团：



[0183] 其中，A和B各自代表 C_{1-4} 亚烷基或亚烯基；

[0184] Ab代表本发明的抗体或其抗原结合部分，其经由来自所述抗体或其抗原结合部分中的二硫键的两个硫原子与 Lk^3 键合；并且

[0185] e代表1至s的整数，其中s是在缀合至 Lk^3 之前所述抗体或其抗原结合部分中存在的二硫键的数目。

[0186] q、r、e、c和d的含义决定了所存在的D基团的总数。该数目可例如最高达20，例如最高达15，例如最高达10，例如1、2、3或4。

[0187] 缀合试剂

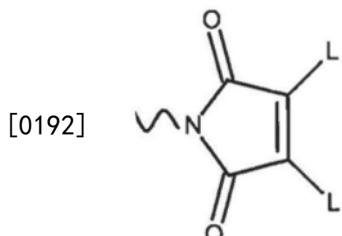
[0188] 根据本发明的缀合物可以通过使缀合试剂与本发明的抗体或其抗原结合部分反应来制备。缀合可以例如通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式进行，但优选通过化学偶联进行。通常，缀合试剂将包含能够与至少一种亲电试剂或尤其是抗体或其抗原结合部分中存在的亲核试剂共价反应的官能团，该官能团经由接头与有效负载连接。可用于将有效负载与抗体或其抗原结合部分缀合的许多缀合试剂是已知的，并且这些中的任何一种都可用于制备本发明的缀合物。

[0189] 例如，所述试剂可含有马来酰亚胺基团，点击化学基团例如叠氮基或炔基，胺基

团,羧基或活性酯基团。其他可能的方法包括使用已经用特异性用于缀合的氨基酸(例如经改造的半胱氨酸或非天然氨基酸)进行重组改造的抗体,以及通过特定的酶促反应(例如使用转谷氨酰胺酶)进行酶促缀合。抗体或其抗原结合部分上的反应位点在性质上可以是亲核的或亲电子的。常见的蛋白质缀合位点为处于赖氨酸或半胱氨酸氨基酸残基或碳水化合物部分。或者,缀合可发生在多聚组氨酸标签上,所述标签已经连接至所述抗体或其抗原结合部分。

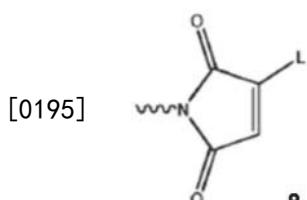
[0190] 有利地,缀合试剂能够与所述抗体或其抗原结合部分中的亲核试剂反应,从而与其化学键合。因此,缀合试剂通常包括至少一个离去基团,其在与亲核试剂反应时失去。缀合试剂可例如包括两个或更多个离去基团。优选地,缀合试剂能够与两个亲核试剂反应。有利地,缀合试剂包含至少两个离去基团。如果存在两个或更多个离去基团,它们可以是相同的或不同的。或者,缀合试剂可含有单个基团,其在化学上等价于两个离去基团,并且该单个基团能够与两个亲核试剂反应。

[0191] 一组试剂是基于如Smith et al., J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 1960-1965和Schumaker et al., Bioconj. Chem., 2011, 22, 132-136中所描述的双-卤代-或双-硫代-马来酰亚胺和其衍生物。这些试剂包含以下官能团:



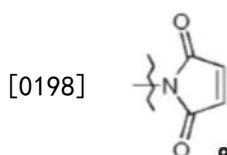
[0193] 其中每个L为离去基团。马来酰亚胺环的氮原子可直接或间接地携带有效负载。

[0194] 类似地,可使用含有单个离去基团L的马来酰亚胺:



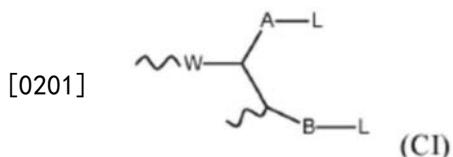
[0196] 同样地,马来酰亚胺环的氮原子直接或间接地携带有效负载。

[0197] 此外,可使用缺少离去基团的马来酰亚胺:



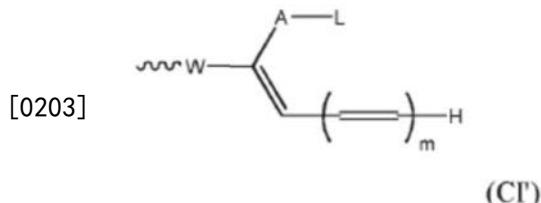
[0199] 同样地,马来酰亚胺环的氮原子直接或间接地携带有效负载。

[0200] 在优选的实施方案中,缀合试剂含有以下官能团:



[0202] 其中W代表吸电子基团,例如酮基、酯基-0-CO-、砜基-SO₂-或氰基;A代表C₁₋₅亚烷

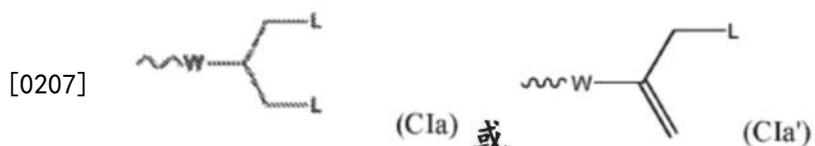
基或亚烯基链;B代表键或C₁₋₄亚烷基或亚烯基链;并且每个L独立地代表离去基团,或两个L一起代表离去基团。这种类型的试剂记载于Bioconj. Chem 1990(1), 36-50, Bioconj. Chem 1990(1), 51-59和J. Am. Chem. Soc. 110, 5211-5212中。当含有这些基团的试剂与抗体或其抗原结合部分反应时,失去第一离去基团L以原位形成含有下式官能团的缀合试剂:



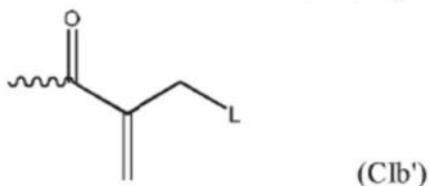
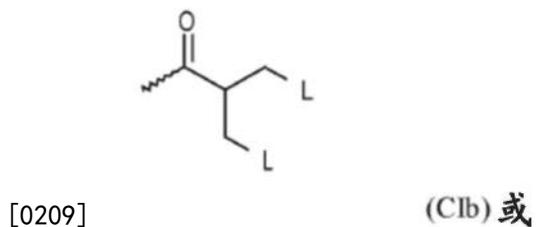
[0204] 其中m为0至4,其与第一亲核试剂反应。然后失去第二个离去基团L,并发生与第二亲核试剂的反应。作为使用含有官能团CI的试剂作为起始原料的替代方案,含有官能团CI'的试剂可用作起始原料。

[0205] 优选地,W代表酮基。优选地,A代表-CH₂-,B代表键。

[0206] 特别优选的式CI和CI'的官能团具有下式:



[0208] 例如,所述基团可具有下式:



[0210] 另一组缀合试剂含有以下官能团:

[0211] ~W-CR⁴R^{4'}-CR⁴L.L' (CII)

[0212] 其中W具有以上给出的含义和优选的含义,并且

[0213] 每个R⁴代表氢原子或C₁₋₄烷基,R^{4'}代表氢原子,并且每个L独立地代表离去基团,或者两个L一起代表离去基团;或者

[0214] 每个R⁴代表氢原子或C₁₋₄烷基,L代表离去基团,并且R^{4'}和L'一起代表键。

[0215] 另一组缀合试剂包括以下官能团:

[0216] ~W-(CH=CH)_p-(CH₂)₂-L (CIII) 或

[0217] ~W-(CH=CH)_p-CH=CH₂ (CIII')

[0218] 其中W具有以上给出的含义和优选的含义,并且p代表0或1至4的整数,优选0。特别优选的这类试剂包括以下官能团:

[0219] ~NH-CO-Ar-CO-(CH₂)₂-L (CIIIa) 或

[0220] $\sim\text{NH}-\text{CO}-\text{Ar}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (CIIa')

[0221] 其中,Ar代表任选取代的芳基,尤其是苯基。

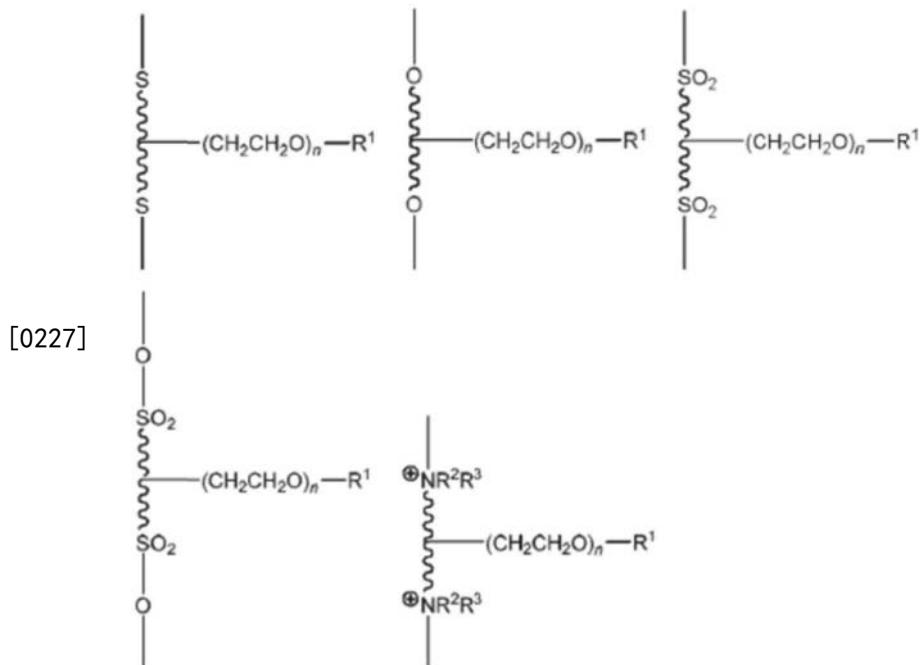
[0222] 例如,离去基团L可以是-SP、-OP、-SO₂P、-OSO₂P、-N⁺PR²R³、卤素、-OOR,其中P代表氢原子、烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基)、或烷基-芳基(优选C₁₋₆烷基-苯基),或是包括部分-(CH₂CH₂O)_n——其中n是2或更大、特别是6或更大的数——的基团,并且R²和R³各自独立地代表氢原子、C₁₋₄烷基或基团P,并且O代表取代的芳基(尤其是苯基),其含有至少一个取代基,例如-CN、-CF₃、-NO₂、-CO₂R'、-COH、-CH₂OH、-COR'、-OR'、-OCOR'、-OCO₂R'、-SR'、-SOR'、-SO₂R'、-NHCOR'、-NR'COR'、-NHCO₂R'、-NR'CO₂R'、-NO、-NHOH、-NR'OH、-CH=N-NR'COR'、-N⁺R'₃、卤素(尤其是氯或尤其是氟)、-C=CR'和-CH=CR'₂,其中每个R'代表氢原子或烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基),或烷基-芳基(优选C₁₋₈烷基-苯基)。吸电子取代基的存在是优选的。

[0223] 其中P代表包括部分-(CH₂CH₂O)_n——其中n是2或更大的数——的基团的缀合试剂是本发明人的共同悬而未决的申请GB 1418186.1——现公开为W02016/059377的PCT/GB2015/052952要求其优先权——的主题。该申请公开了以下内容:

[0224] “离去基团可以例如包括-(CH₂CH₂O)_n-R¹,其中R¹是封端基团。可以使用非常宽范围的封端基团。R¹可以例如是氢原子、烷基(尤其是C₁₋₄烷基,特别是甲基),或任选取代的芳基(例如任选取代的苯基,例如甲苯基)。或者,封端基团可包括官能团,例如羧基或胺基团。这些封端基团可例如具有式-CH₂CH₂CO₂H或-CH₂CH₂NH₂,并且可以通过官能化-(CH₂CH₂O)_n-链的末端单元来制备。或者,不同于由封端基团封端,-(CH₂CH₂O)_n-基团可在缀合试剂内具有两个连接点,以使得在化学上存在两个离去基团的等价物,能够与两个亲核试剂结合。

[0225] 离去基团的-(CH₂CH₂O)_n-部分是基于PEG(聚乙二醇)。PEG可以是直链或支链的,并且可以是以任何方式衍生的或官能化的。n是2或更大的数,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10。例如,n可以是5至9。或者,n可以是10或更大的数。n没有具体的上限。n可以例如是150或更小,例如120或更小,例如100或更小。例如,n可以是2至150,例如7至150,例如7至120。离去基团的PEG部分-(CH₂CH₂O)_n-可以例如具有1至5kDa的分子量;其可以是例如1kDa、2kDa、3kDa、4kDa或5kDa。如果需要,离去基团可以含有两个或更多个由一个或多个间隔物隔开的部分-(CH₂CH₂O)_n-。

[0226] 根据本发明的试剂中的离去基团适当地具有式-SP、-OP、-SO₂P、-OSO₂P、-N⁺PR²R³,其中P是包含部分-(CH₂CH₂O)_n-的基团,并且R²和R³各自独立地代表氢原子、C₁₋₄烷基或基团P。优选地,R²和R³各自代表C₁₋₄烷基,尤其是甲基,或尤其是氢原子。或者,缀合试剂可包括下式的基团:-S-P-S-;-O-P-O-;-SO₂-P-SO₂-;-OSO₂-P-OSO₂-;和-N⁺R²R³-P-N⁺R²R³-。这种类型的具体基团包括-S-(CH₂CH₂O)_n-S-,-O-(CH₂CH₂O)_n-O-,-SO₂-(CH₂CH₂O)_n-SO₂-;-OSO₂-(CH₂CH₂O)_n-OSO₂-;或-N⁺R²R³-(CH₂CH₂O)_n-N⁺R²R³-。它们还可以包括以下类型的基团:

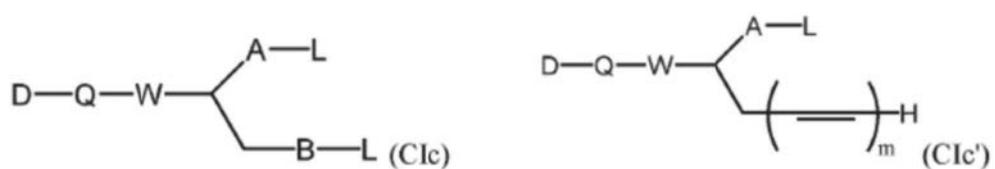


[0228] 其中- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -基团由任意合适的连接基团(例如烷基)携带。这些二价基团在化学上等价于能够与两个亲核试剂反应的两个离去基团。”

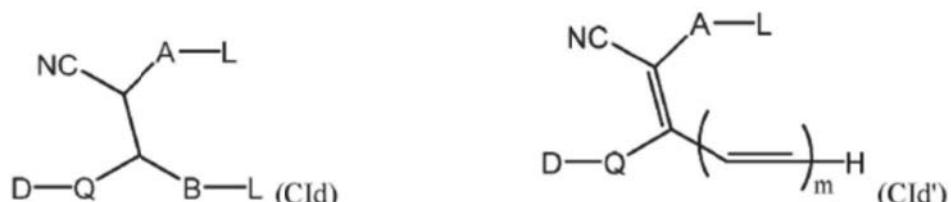
[0229] 存在于缀合试剂中的特别优选的离去基团L是-SP或-SO₂P,尤其是-SO₂P。在该基团中,一个优选的实施方案是其中P代表苯基或尤其是甲苯磺酰基。另一个优选的实施方案是其中P代表包括部分- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -的基团,尤其是其中n具有上述值之一、特别是7的基团。特别优选的离去基团L是-SO₂- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -H/Me,特别是-SO₂- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7$ -H/Me。在整个说明书中,对离去基团L的任何提及都应理解为包括对这些优选基团,特别是-SO₂- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ -H/Me,更特别是-SO₂- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7$ -H/Me的具体提及。

[0230] 缀合试剂可含有超过一个的官能团。例如,试剂可含有在分子的一端处的上述C型官能团,和一种或多种能够在分子的其他部分处与抗体或其抗原结合部分或任何其他分子缀合的其他官能团。这种结构记载于例如Belcheva et al., J.Biomater.Sei Polymer Edn.9(3), 207-226中,并且可用于合成含有多种蛋白的缀合物。

[0231] 含有式CI/CI'的单元的缀合试剂可具有式(CIc)或(CIc')或,其中W代表氰基,(CId)或(CId'):

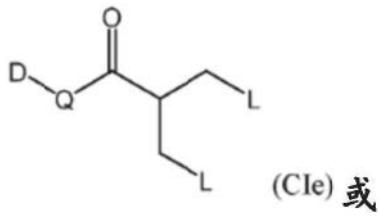


[0232]

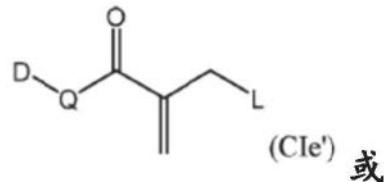


[0233] 其中,D代表有效负载并且Q代表连接基团。

[0234] 优选的缀合试剂包括以下:



[0235]



[0236] D-Q-NH-CO-Ar-CO-(CH₂)₂-L (CIIb) 或

[0237] D-Q-NH-CO-Ar-CO-CH=CH₂ (CIIb') .。

[0238] 其中D代表有效负载并且Q代表连接基团。

[0239] 缀合试剂可例如具有以下通式:

[0240] ((D_q-LK¹)_r-P¹)₂-Lk²-Lk³- (L)_z (II)

[0241] 其中D代表有效负载;

[0242] q代表1至10的整数;

[0243] Lk¹代表接头;

[0244] r代表1至10的整数;

[0245] P¹代表键或c-价基团-P²-NH-,其中c为2至11,并且P²为含有至少一个亚乙基单元-CH₂-CH₂-或乙二醇单元-0-CH₂-CH₂-的基团;

[0246] z代表1至10的整数;

[0247] Lk²代表键或d-价接头——其中d为2至11并且其由1至9个天冬氨酸和/或谷氨酸残基组成;

[0248] Lk³代表以下通式的接头:

[0249] -CO-Ph-Y-Z- (EII)

[0250] 其中Ph是任选取代的苯基;Y代表CO基团或CH(OH)基团;并且Z代表下式的基团:



[0252] 其中A和B各自代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基;并且其中L是离去基团,例如下面描述的那些之一。

[0253] 可以使用任何合适的连接基团Q或Lk¹。在一个实施方案中,Q或Lk¹可为,例如直接键、亚烷基(优选C₁₋₁₀亚烷基)、或任选取代的芳基或杂芳基,其中任何一个可被一个或多个以下的原子或基团封端或中断:氧原子、硫原子、-NR"基团(其中R"代表氢原子或烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基),或烷基-芳基(优选C₁₋₆烷基-苯基))、酮基、-OCO-基团、-COO-基团、-O-CO-O-、-O-CO-NR"、-NR"-COO-、-CONR"-和/或-NR"CO-基团。这些芳基和杂芳基Q形成

了本发明的一个优选实施方案。合适的芳基包括苯基和萘基,而合适的杂芳基包括吡啶、吡咯、呋喃、吡喃、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶和嘌呤。特别合适的连接基团Q或Lk¹是杂芳基,或尤其是芳基,尤其是苯基基团。这些可具有与治疗剂D的连接基团,例如,是或者包含-NR"-CO-或-CO-NR"-基团(例如-NH-CO-或-CO-NH-基团)的基团。

[0254] 可存在于任选取代的芳基(特别是苯基)或杂芳基上的取代基包括,例如选自以下的一种或多种相同或不同的取代基:烷基(优选C₁₋₄烷基,特别是甲基,任选被OH或CO₂H取代)、CN、-NO₂、-CF₃、NR"₂、-CO₂R"、-COH、-CH₂OH、-COR"、-OR"、-OCOR"、-OCO₂R"、-SR"、-SOR"、-SO₂R"、-NR"COR"、-NR".CO₂R"、-NO、-NHOH、-NR".OH、-CH=N-NR".COR"、-N⁺R"₃、卤素(例如氟或氯)、-C≡CR"和-CH=CR"₂,其中每个R"独立地代表氢原子或烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基),或烷基-芳基(优选C₁₋₆烷基-苯基)基团。尤其优选存在吸电子取代基。优选的取代基包括,例如CN、-CF₃、-NO₂、-OR"、-OCOR"、-SR"、-NR"COR"、-NHOH和-NR"CO₂R"。

[0255] 在另一个实施方案中,根据本发明的缀合物中的接头Lk、Q或Lk¹或任何其他接头可含有可降解的基团,即,其可含有在生理条件下断裂的基团,将有效负载从与其键合的抗体或其抗原结合部分中分离。或者,其可以是在生理条件下不可切割的接头。

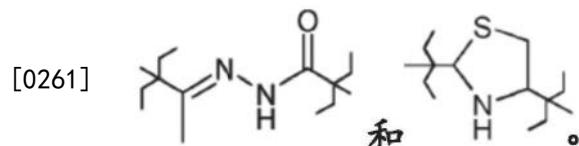
[0256] 合适的可降解的接头在下文更详细地讨论。

[0257] q、r、z、c和d的含义决定了所存在的D基团的总数。该数目可以例如最高达20、例如最高达15、例如最高达10、例如1、2、3或4。

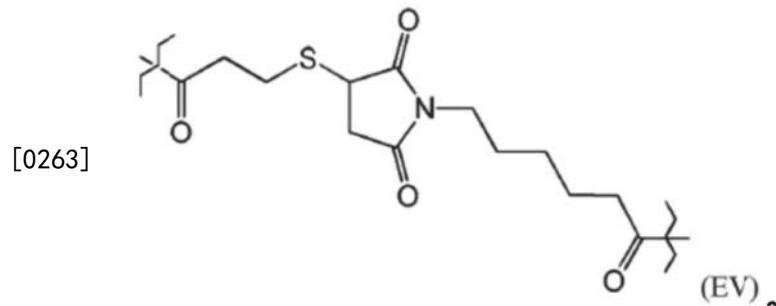
[0258] 接头

[0259] 本发明的缀合物和适于制备它们的缀合试剂含有将抗体或其抗原结合部分连接至有效负载的接头。该接头在生理条件下可以是不可降解的或可降解的。有利地,缀合物包含可降解的接头,其包含在生理条件下断裂的基团,将有效负载从与其或最终将与其键合的抗体或其抗原结合部分中分离。当接头在生理条件下断裂时,优选其在细胞内条件下是可切割的。当靶标是在细胞内时,优选地,接头对细胞外条件基本上不敏感(即,使得足够剂量的治疗剂向细胞内靶标的递送不被禁止)。合适的可降解的接头在下文更详细地讨论。

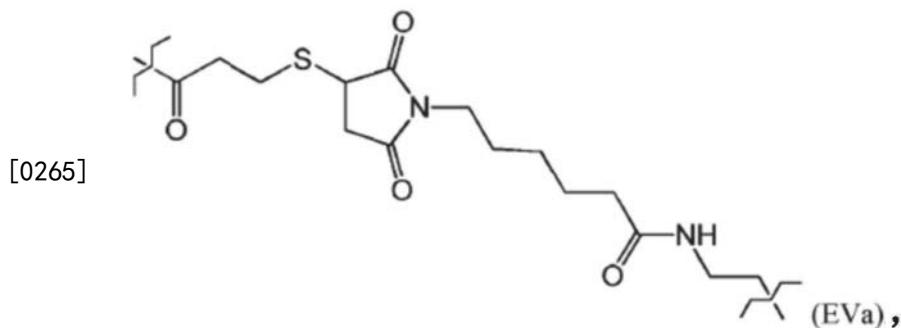
[0260] 当接头(例如Q或Lk¹)含有可降解的基团时,其通常对水解条件敏感,例如其可以在某些pH值(例如酸性条件)下降解的基团。水解/酸性条件可以例如在内体或溶酶体中存在。在酸性条件下易于水解的基团的实例包括腙、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺式乌头酰胺、原酸酯和缩酮。对水解条件敏感的基团的实例包括:



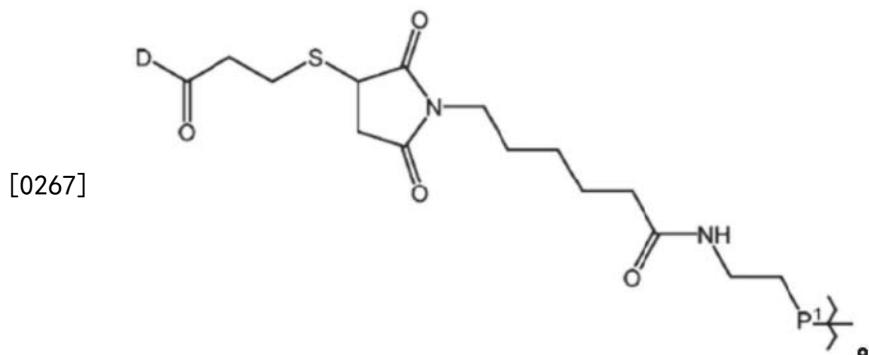
[0262] 在优选的实施方案中,接头(例如Q或Lk¹)是或包括:



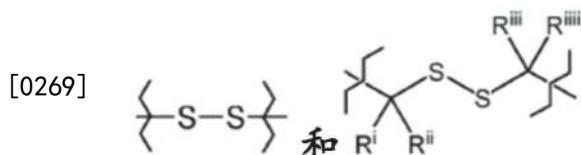
[0264] 例如,接头(例如Q或Lk¹)可以是:



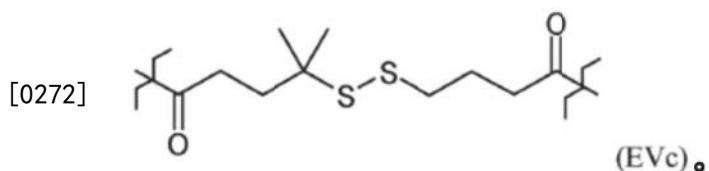
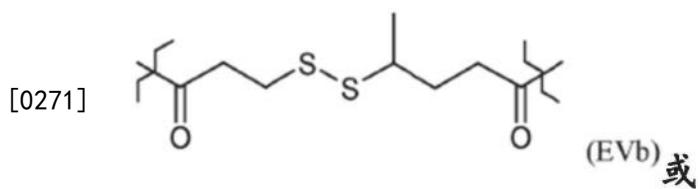
[0266] 在这种情况下,其优选如下所示与D和P¹基团键合:



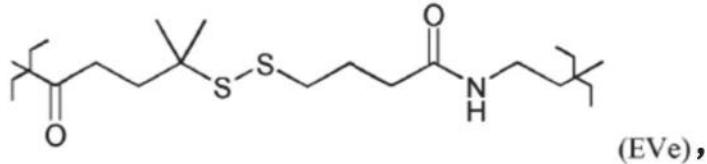
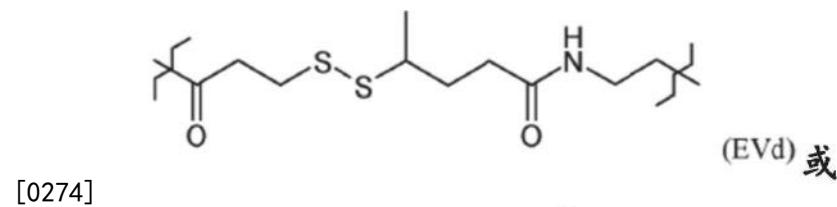
[0268] 接头在还原条件下也可易于降解。例如,其可含有二硫化物基团,其在暴露于生物还原剂(例如硫醇)时是可裂解的。二硫化物基团的实例包括:



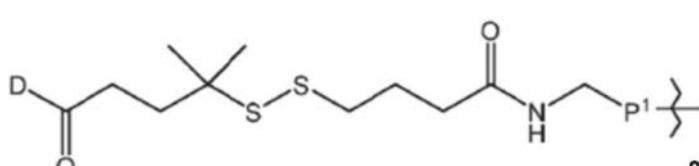
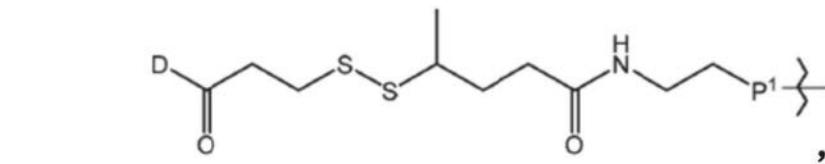
[0270] 其中,Rⁱ、Rⁱⁱ、Rⁱⁱⁱ和Rⁱⁱⁱⁱ各自独立地为氢或C₁₋₄烷基。在优选的实施方案中,接头(例如Q或Lk¹),是或包括:



[0273] 例如,其可以是:

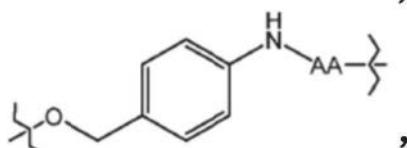
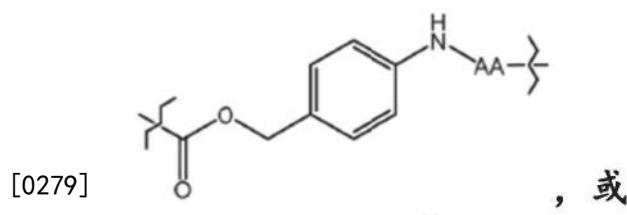


[0275] 在这种情况下,接头优选如下所示与D和P¹基团键合:



[0277] 接头,例如Q或Lk¹,也可含有易于酶促降解的基团,例如其可能易被蛋白酶(例如溶酶体或内体蛋白酶)或肽酶切割。例如,其可包含含有至少一个,例如至少两个,或至少三个氨基酸残基(例如,Phe-Leu、Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys)的肽基。例如,其可以是具有1至5个,例如2至4个氨基酸的氨基酸链。

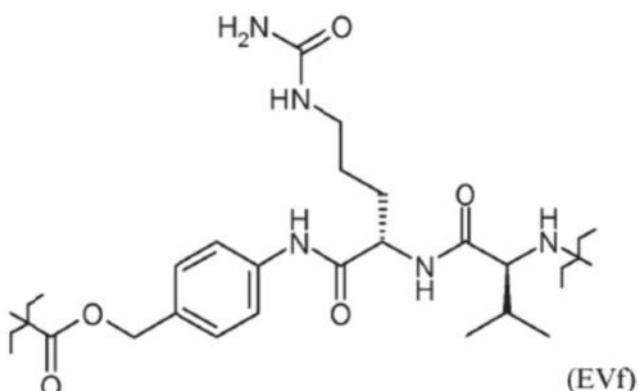
[0278] 易于酶促降解的基团的另一个实例是:



[0280] 其中AA代表氨基酸序列,尤其是含有1或2个氨基酸残基的氨基酸序列,尤其是两个残基的蛋白酶特异性氨基酸序列,例如Val-Cit。

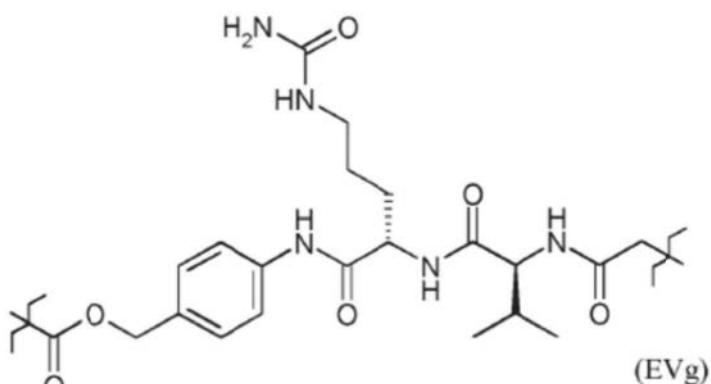
[0281] 在优选的实施方案中,接头(例如Q或Lk¹)是或包括:

[0282]

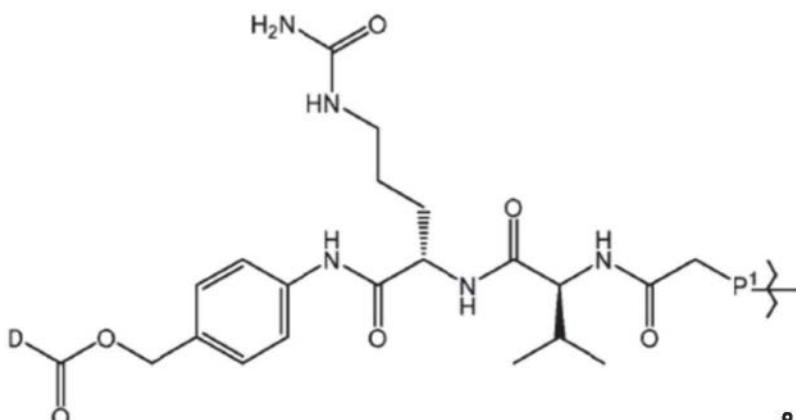


[0283] 例如,其可以是

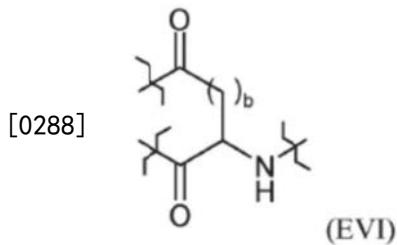
[0284]

[0285] 在这种情况下,其优选如下所示与有效负载D和P¹基团键合:

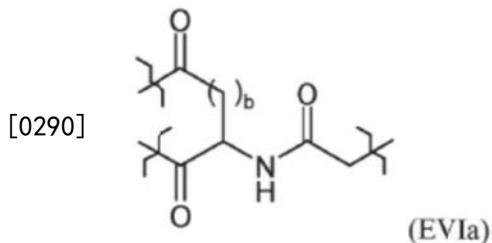
[0286]



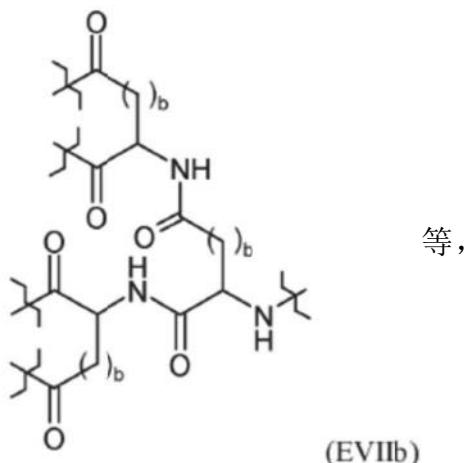
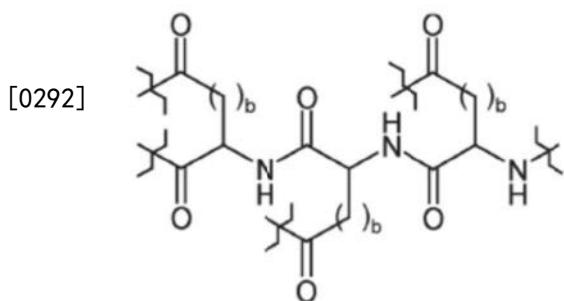
[0287] 在一个实施方案中,接头(例如Q或Lk¹)携带单个有效负载(即,在式(II)的缀合试剂中q=1)。以上所示的特定接头(EVa)、(EVd)和(EVe)是这种类型。在另一个实施方案中,接头携带多个有效负载(即在式(II)的缀合试剂中q>1,例如为2、3或4),并且接头被用作将超过一个的拷贝的治疗剂纳入至本发明的缀合物中的工具。在一个实施方案中,这可通过使用支化接头Lk¹和/或Lk²来实现,其可以例如纳入天冬氨酸或谷氨酸或类似残基。这引入了下式的支化元素:



[0289] 其中b为1、2或3,b=1则为天冬氨酸,b=2则为谷氨酸,b=3则代表一个优选实施方案。式EVI中的每个酰基部分可经由合适的接头Lk^{1a}与有效负载偶联,其中Lk^{1a}是任何合适的接头,例如纳入上述连接体之一的可降解的接头。在具体的实施方案中,Lk^{1a}代表上文所示的基团(EVa)、(EVd)或(EVe)。天冬氨酸或谷氨酸或类似残基的氨基可以通过任何合适的方式与P¹键合,例如,连接可经由酰胺键,例如,上述文化基团可经由-CO-CH₂-基团与P¹连接,因此:

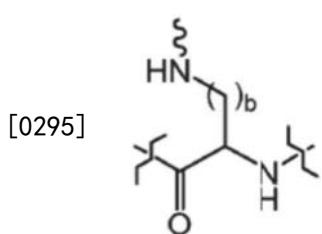


[0291] 如果需要,天冬氨酸或谷氨酸或类似残基可与其他天冬氨酸和/或谷氨酸和/或类似残基偶联,例如:

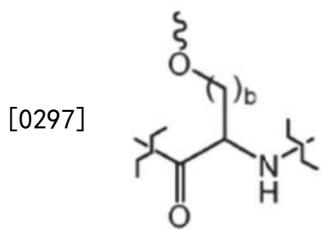


[0293] 使得有可能纳入很多单元的治疗剂。如上所述,每个有效负载单元可以经由任何合适的接头Lk^{1a}与天冬氨酸/谷氨酸或类似残基连接。

[0294] 以类似的方式,可以引入氨基酸赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、精氨酸或酪氨酸或类似残基以形成文化基团,因此:



[0296] 其中,对于赖氨酸,b为4,并且



[0298] 其中,对于丝氨酸,b为1。

[0299] 聚合物

[0300] 本发明的缀合物可含有低聚物或聚合物(为方便起见,在本文统称为“聚合物”),以及本发明的抗体或其抗原结合部分。例如,所述抗体或其抗原结合部分可经由接头与聚合物缀合。或者,所述接头本身可包括聚合物,并且其可与抗体或其结合抗原部分缀合。聚合物尤其是水溶性的、合成的聚合物,特别是聚亚烷基二醇。聚合物可以是,例如聚亚烷基二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯(例如聚丙烯酰吗啉)、聚甲基丙烯酸酯、聚噁唑啉、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酰胺(例如聚羧基甲基丙烯酰胺)、或HPMA共聚物。另外,所述聚合物可以是易于酶促降解或水解降解的聚合物。这种聚合物包括,例如聚酯、聚缩醛、聚(原酸酯)、聚碳酸酯、聚(亚氨基碳酸酯)和聚酰胺(如聚(氨基酸))。聚合物可以是同聚物、无规共聚物或结构确定的共聚物(如嵌段共聚物),例如其可以是衍生自两种或更多种环氧烷烃、或衍生自聚(环氧烷)和聚酯、聚缩醛、聚(原酸酯)或聚(氨基酸)的嵌段共聚物。可使用的多官能聚合物包括二乙烯醚-马来酸酐和苯乙烯-马来酸酐的共聚物。

[0301] 还可使用天然存在的聚合物,例如多糖,如壳多糖、葡聚糖、糊精、壳聚糖、淀粉、纤维素、糖原、聚(唾液酸)、透明质酸及其衍生物。还可使用聚合物如聚谷氨酸,以及衍生自天然单体(如糖或氨基酸)和合成单体(如环氧乙烷或甲基丙烯酸)的杂化聚合物。

[0302] 如果所述聚合物是聚亚烷基二醇,其优选地为含有C₂和/或C₃单元的聚亚烷基二醇,尤其是聚乙二醇。聚合物,尤其是聚亚烷基二醇,可含有单个直链,或其可具有由许多小的或大的链组成的支链形态。所谓的泊洛沙姆(Pluronics)是一类重要的PEG嵌段共聚物。它们衍生自环氧乙烷和环氧丙烷嵌段。可使用取代的或封端的聚亚烷基二醇,例如甲氧基聚乙二醇。

[0303] 所述聚合物可以是,例如通过WO 2004/113394(其内容以引用的方式纳入本文)中描述的方法产生的梳形聚合物。例如,所述聚合物可以是具有以下通式的梳形聚合物:

[0304] (F)_f - (G)_g - (H)_h

[0305] 其中:

[0306] F,在存在的情况下,可通过一种或多种烯键式不饱和单体的加成聚合反应获得,所述单体不是如G中所定义的:

[0307] G可通过多个单体的加成聚合反应获得,所述单体是直链的、支链的或星形的,取代的或未取代的,并且具有烯键式不饱和部分;

[0308] H,在存在的情况下,可通过一种或多种烯键式不饱和单体的加成聚合反应获得,所述单体不是如G中所定义的;

[0309] f和h是0和500之间的整数;

[0310] g是0至1000的整数;

[0311] 其中F和G中至少一个是存在的。

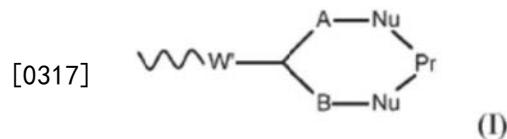
[0312] 所述聚合物可任选地是以任何所需的方式衍生化或官能化。可通过悬垂接头 (pendent linkers) 将反应基连接在聚合物终点或端基, 或沿着聚合物链连接; 在这种情况下, 所述聚合物是, 例如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯或马来酸酐共聚物。如需要, 可使用常规方法将所述聚合物偶联到固体支持体上。

[0313] 当然, 聚合物的最佳分子量取决于预期的应用。可使用长链聚合物, 例如数均分子量可最高达约 75,000g/mol, 例如最高达 50,000g/mol、40,000g/mol、30,000g/mol。例如, 数均分子量可在 500g/mol 至约 75,000g/mol 的范围内。但是, 由具有例如少至 2 个重复单元 (例如 2 到 50 个重复单元) 的离散的 PEG 链组成的非常小的低聚物可用于一些应用, 并且存在于本发明的一个优选的实施方案中。例如, 可使用可含有 2 至 48、例如 2 至 36、例如 2 至 24 个单元的聚合物。例如, 可使用具有 12、20、24、36、40 或 48 个重复单元的直链或支链 PEG。当所述缀合物旨在离开循环并渗入组织时 (例如用于治疗由恶性肿瘤、感染或自身免疫疾病、或由外伤引起的炎症), 使用在最高达 30,000g/mol 范围内的较低分子量聚合物可能是有利的。对于所述缀合物旨在保留在循环中的应用而言, 使用更高分子量的聚合物 (例如在 20,000-75,000g/mol 范围内) 可能是有利的。

[0314] 优选地, 所述聚合物是合成的聚合物, 且优选地, 其是水溶性聚合物。许多应用尤其优选使用水溶性聚乙二醇。

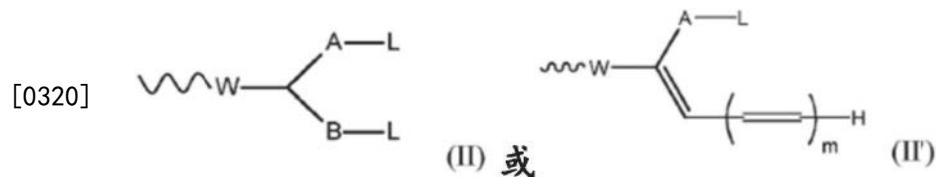
[0315] 公开为 WO2016/063006 的、PCT/GB2015/052953 要求其优先权的本发明人的共同悬而未决的申请 GB 1418986.4 涉及具有特定结构的含 PEG 的接头的用途, 并且这些可用于本发明。该申请公开了以下内容:

[0316] “本发明提供了蛋白或肽与治疗剂、诊断剂或标记试剂的缀合物, 所述缀合物含有蛋白或肽键合部分和聚乙二醇部分; 其中所述蛋白或肽键合部分具有以下通式:



[0318] 其中 Pr 代表所述蛋白或肽, 每个 Nu 代表存在于或连接至所述蛋白或肽的亲核试剂, A 和 B 各自独立地代表 C_{1-4} 亚烷基或亚烯基链, 并且 W' 代表吸电子基团或通过还原吸电子基团获得的基团; 并且, 其中所述聚乙二醇部分是或包括悬垂的聚乙二醇链, 其具有式- CH_2CH_2OR 的末端基团, 其中 R 代表氢原子、烷基 (例如 C_{1-4} 烷基、尤其是甲基)、或任选取代的芳基 (尤其是苯基、尤其是未取代的苯基)。

[0319] 本发明还提供了能够与蛋白或肽反应的缀合试剂, 包括治疗剂、诊断剂或标记试剂和聚乙二醇部分; 所述缀合试剂包括下式的基团:



[0321] 其中 W' 代表吸电子基团, A 和 B 具有上述含义, m 为 0 至 4, 并且每个 L 独立地代表离去基团; 并且, 其中所述聚乙二醇部分是或包括悬垂的聚乙二醇链, 其具有式- CH_2CH_2OR 的末端基团, 其中 R 代表氢原子、烷基 (例如 C_{1-4} 烷基、尤其是甲基)、或任选取代的芳基 (尤其是苯基、尤其是未取代的苯基)。

[0322] 本发明还提供了制备本发明的缀合物的方法,其包括使蛋白或肽与本发明的缀合试剂反应。

[0323] 本发明的缀合物可示意性地通过下式表示:



[0325] 其中D代表治疗剂、诊断剂或标记试剂,F'代表式I的基团,并且PEG代表具有式-CH₂CH₂O的末端基团的悬垂的聚乙二醇链。

[0326] 本发明的试剂可示意性地通过下式表示:



[0328] 其中D代表治疗剂、诊断剂或标记试剂,F'代表式II或II'的基团,并且PEG代表具有式-CH₂CH₂OR的末端基团的悬垂的聚乙二醇链。官能团F能够与蛋白或肽中存在的两个亲核试剂反应,如下文所解释的。

[0329] 本发明的缀合物和试剂的聚乙二醇(PEG)部分是或包括悬垂的PEG链,其具有式-CH₂CH₂OR的末端基团,其中R代表氢原子、烷基(例如C₁₋₄烷基、尤其是甲基)、或任选取代的芳基(尤其是苯基、尤其是未取代的苯基)。优选地,R是甲基或氢原子。

[0330] 当然,PEG部分的总大小取决于预期的应用。对于一些应用,可使用高分子量的PEG,例如数均分子量可最高达约75,000,例如最高达50,000、40,000或30,000g/mol。例如,数均分子量可在500g/mol至约75,000的范围内。但是,对于一些应用,较小的PEG部分可能是优选的。

[0331] 在一个优选的实施方案中,PEG部分中的所有PEG都存在于悬垂的PEG链中。在另一个实施方案中,PEG也可存在于分子的骨架中,这将在下面更详细地讨论。

[0332] 与PEG部分一样,悬垂的PEG链的大小取决于预期的应用。对于一些应用,可以使用高分子量的悬垂的PEG链,例如数均分子量可最高达约75,000,例如最高达50,000、40,000或30,000g/mol。例如,数均分子量可以在500g/mol至约75,000的范围内。但是,对于许多应用,可使用较小的悬垂的PEG链。例如,所述PEG链可具有最高达3,000g/mol的分子量。但是,由具有例如少至2个重复单元(例如2到50个重复单元)的离散的PEG链组成的非常小的低聚物可用于一些应用,并且以所述PEG链存在于本发明的优选的实施方案中。悬垂的PEG侧链可以是直链或支链的。例如,可使用PEG链,例如具有12、20、24、36、40或48个重复单元的直链或支链。”

[0333] 缀合方法

[0334] 含有能够与本发明的抗体或其抗原结合部分反应的官能团的缀合试剂可与抗体或抗原结合部分反应以形成缀合物,并且这种反应形成了本发明的其他方面。在本发明的该其他方面的优选实施方案中,具有上述结构CI、CI'、CII或CIII之一(包括所有优选的亚结构)的缀合试剂与抗体或其抗原结合部分反应以形成缀合物。使用这些试剂之一的缀合方法的直接产物是含有吸电子基团W的缀合物。但是,在合适的条件下,所述缀合方法是可逆的。这对于一些应用来说可能是期望的,例如需要快速释放有效负载时,但是对于其他应用而言,有效负载的快速释放可能是不期望的。因此,需要通过还原吸电子部分W以得到阻

止有效负载释放的部分来稳定缀合物。因此,上述方法可包括额外的任选步骤:还原所述缀合物中的吸电子基团W。特别优选使用硼氢化物(例如硼氢化钠、氰基硼氢化钠、硼氢化钾或三乙酰氧基硼氢化钠)作为还原剂。可使用的其他还原剂包括,例如氯化亚锡(II)、醇盐(如烷醇铝)和氢化铝锂。

[0335] 因此,例如,可将含酮基的部分W还原成含CH(OH)基团的部分;可通过羟基与醚化剂的反应来获得醚基;可通过羟基与酰化剂的反应来获得酯基;可通过还原胺化由酮制备胺基团;或者可通过胺的酰化来形成酰胺。可将砜还原成亚砜、硫化物或硫醚(thiol ether)。可将氰基还原成胺基团。

[0336] 使用上述式CI或CII的缀合试剂的关键特征是 α -亚甲基离去基团和双键与充当迈克尔活化部分的吸电子官能团交叉共轭。如果所述离去基团易于在交叉官能的试剂中被消除而不是被直接置换,并且所述吸电子基团是适合用于迈克尔反应的活化部分,则可通过连续的迈克尔和逆迈克尔反应进行相继的分子内双-烷基化。所述离去基团用于掩护潜在的缀合双键,所述双键在第一次烷基化发生之后才暴露以得到式CI'的试剂,并且双-烷基化是相继的且交互的迈克尔和逆迈克尔反应的结果。交叉官能的烷基化试剂可包含与双键缀合的或位于离去基团和吸电子基团之间的多重键。

[0337] 当与抗体或其抗原结合部分的键合是经由来自所述抗体或抗原结合部分中的二硫键的两个硫原子时,该方法可通过如下进行:原位还原二硫键,然后使还原产物与具有上述结构C之一的缀合试剂反应。优选地,在引入缀合试剂之前,还原二硫键并例如通过缓冲液交换除去任何过量的还原剂。可例如使用常规方法用二硫苏糖醇、巯基乙醇或三羧基乙基膦还原二硫键。

[0338] 缀合反应可在与已知缀合方法类似的条件下进行,包括现有技术中公开的条件。例如,当使用具有上述结构C之一的缀合试剂时,根据本发明的缀合反应可在与WO 2005/007197、WO 2009/047500、WO2010/100430、WO 2014/064423和WO 2014/064424中描述的反应条件类似的反应条件下进行。例如,所述方法可在所有反应物都可溶于其中的溶剂或溶剂混合物中进行。例如,可使蛋白在含水反应介质中与聚合物缀合试剂直接反应。该反应介质也可以是缓冲的,这取决于亲核试剂的pH要求。反应的最佳pH通常为至少4.5,一般在约5.0至约8.5之间,优选约6.0至7.5。当然,最佳反应条件取决于所使用的具体反应物。

[0339] 当使用含水反应介质时,3-40°C之间的反应温度通常是合适的。在有机介质(例如THF、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、DMF、DMSO)中进行的反应通常在最高达环境温度的温度下进行。在一个优选的实施方案中,反应在含水缓冲液中进行,所述含水缓冲液可含有一定比例的有机溶剂,例如最多达20体积%的有机溶剂,一般为5-20体积%的有机溶剂。

[0340] 可使用化学计量等量的或稍过量的缀合试剂将抗体或抗原结合部分有效地缀合。但是,也可以用过量的缀合试剂进行缀合反应,这对一些蛋白而言可能是合乎需要的。在随后的缀合物的纯化过程中,可通过常规方法(例如离子交换色谱或HPLC色谱)容易地将过量的试剂除去。

[0341] 当然,在抗体含有足够的合适的连接点时,可以将多于一种的缀合试剂与抗体或抗原结合部分缀合。例如,在含有两个不同的二硫键的抗体中,或在含有一个二硫键并且还带有多聚组氨酸标签的抗体中,每分子抗体可以缀合两个试剂分子。抗体通常含有4个合适的二硫键,并且可通过合适地选择反应条件来将携带有效负载的接头横跨(across)每个二

硫键进行缀合。如果每个接头携带单个有效负载，则得到药物抗体比例(DAR)为4的缀合物。可以通过使用如上所述的支链接头连接额外拷贝的有效负载。

[0342] 当将抗体或其抗原结合片段与放射性金属离子或顺磁离子缀合时，则在一些实施方案中，所述放射性金属离子或顺磁离子可与具有长尾部的试剂反应，其中一个或多个螯合基团连接至所述长尾部用于结合这些离子。在一些实施方案中，所述试剂可携带被设计以共价连接抗体或其抗原结合部分的反应基团。所述长尾部可以是聚合物，例如聚赖氨酸、多糖、聚乙二醇(PEG)或具有可与螯合基团结合以结合离子的悬垂基团的其他衍生的或可衍生的链。可根据本文的实施方案使用的螯合基团的实例包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、DOTA、NOTA、NODAGA、NETA、去铁胺(Df，其也可称为DFO)、卟啉、多胺、冠醚、双缩氨基硫脲、多肟等基团。当与非放射性金属(例如锰、铁和钆)络合时，在与本文所述的抗体或其抗原结合部分和载体一起使用时，相同的螯合物可用于MRI。大环螯合物(如NOTA、NODAGA、DOTA和TETA)可分别与多种金属和放射性金属一起使用，该放射性金属包括但不限于镓、钇和铜的放射性核素。可使用其他环型螯合物(如大环聚醚)，其对于稳定结合放射性核素(如用于放射性免疫疗法(RAIT)的镥-223)是有意义的。在某些实施方案中，螯合部分可用于将PET成像剂(如铝-¹⁸F或镥-89复合物)连接至靶向分子以用于PET分析。

[0343] 用途和组合物

[0344] 本发明的抗体及其抗原结合部分和本发明的缀合物可用于治疗、预防或诊断由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病和病症。因此，本发明提供了本发明的抗体或其抗原结合部分或本发明的缀合物，其用于诊断或治疗，特别是用于诊断、治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症。本发明还提供了治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的方法，包括将本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物以治疗或预防所述疾病或病症的有效量给予需要其的受试者。本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物在制备用于诊断、治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的药物中的用途。

[0345] 在一些实施方案中，所述PSMA介导的疾病是癌症，例如前列腺癌或非前列腺癌(包括本文其他地方描述的非前列腺癌)。非前列腺癌优选选自膀胱癌，包括移行细胞癌；胰腺癌，包括胰管癌；肺癌，包括非小细胞肺癌；肾癌，包括常规肾细胞癌；肉瘤，包括软组织肉瘤；肝癌，包括转移性腺癌；乳腺癌，包括乳腺癌；脑癌，包括多形性胶质母细胞瘤；神经内分泌癌；结肠癌，包括结肠癌；睾丸癌，包括睾丸胚胎癌；和黑色素瘤，包括恶性黑色素瘤。最有效的癌症治疗通常需要几种药物共同给药。因此，优选本发明的活性剂与至少一种其他化疗剂联合给药。

[0346] 另一方面，本发明提供了使用本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物在体外或体内检测样品中PSMA抗原的存在(例如用于诊断PSMA相关的疾病(例如人PSMA相关的疾病))的方法。在一些方法中，这通过在允许在抗体和PSMA之间形成复合物的条件下，使待测样品以及对照样品与本发明的抗体或其抗原结合部分或本发明的缀合物(包括双特异性或多特异性分子)接触来实现。这种测定可在体外进行。然后在测试样品中检测复合物形成(例如，通过ELISA)，并且在所述测试样品和对照样品之间复合物形成的任何统计学上显著的增加都指示测试样品中存在PSMA。

[0347] 在其他实施方案中,本发明可用于诊断由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的方法中,包括将本发明的抗体或其抗原结合部分或与诊断剂缀合的缀合物给予具有或疑似具有由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的受试者;将所述受试者暴露于成像方法以使经标记的抗体或其抗原结合部分或缀合物可视化,并确定所述受试者患有由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症。

[0348] 对于体内诊断目的,本发明的抗体或其抗原结合部分优选为缀合物形式,其中所述抗体用如上所述的可检测的标记物标记。可检测的标记物包括放射性标记物或荧光标记物。可用于待给予的抗体或抗原-结合抗体片段的放射性标记物包括例如锕(²²⁵Ac)、砹(²¹¹At)、铋(²¹³Bi或²¹²Bi)、碳(¹⁴C)、钴(⁵⁷Co)、铜(⁶⁷Cu)、氟(¹⁸F)、镓(⁶⁸Ga或⁶⁷Ga)、钬(¹⁶⁶Ho)、铟(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In或¹¹¹In)、碘(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I或¹²¹I)、铅(²¹²Pb)、镥(¹⁷⁷Lu)、钯(¹⁰³Pd)、磷(³²P)、铂(¹⁹⁵Pt)、铼(¹⁸⁶Re或¹⁸⁸Re)、铑(¹⁰⁵Rh)、钌(⁹⁷Ru)、钐(¹⁵³Sm)、钪(⁴⁷Sc)、锝(⁹⁹Tc)、镱(¹⁶⁹Yb或¹⁷⁵Yb),或钇(⁹⁰Y)。适用于抗体和抗体片段的荧光标记物也是本领域公知的。

[0349] 当用适当的放射性核素(例如用于PET成像的正电子发射体碘-124、铜-64、氟-18、镓-68和/或锝-99)或荧光团(用于荧光成像)标记时,抗体或其抗原结合部分可用于临床前成像和/或患者的临床成像。通过简单地将放射性标记改变为单光子发射放射性核素(如铟-111、碘-123和镥-177),抗体或其抗原结合部分也可用作潜在的SPECT(单光子发射捕获计算机化断层显像)成像剂。

[0350] 另一方面,本发明提供了药物组合物或诊断组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合部分,或本发明的缀合物,以及可药用的载体。如需要,所述组合物还可含有额外的活性成分。

[0351] 实施例

[0352] 除非另有说明,根据制造商的说明,使用实施例中提及的市售试剂。实施例和整个说明书中的细胞来源每次都由ECACC或ATCC登录号鉴定。ECACC是欧洲细胞培养物保藏中心(Salisbury,英格兰),而ATCC是美国典型培养物保藏中心(Manassas,美国)。除非另有说明,本文使用的所有技术术语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所理解的含义相同。尽管与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于本发明的实施或测试,但示例性的方法和材料如下所述。所述材料、方法和实施例仅是说明性的,不意图对范围进行限制。

[0353] 缩写列表

缩写	说明
2TYAG	含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和指定百分比的葡萄糖的 2x TY 肉汤
2TYAK	含有氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 2x TY 肉汤
CD40L	CD40 配体
CDR	抗体的互补决定区，每个可变区编号为 1 至 3
CMV	巨细胞病毒
Ec(0.1%)	1 mg/ml 的蛋白溶液的吸光度
ELISA	酶联免疫吸附试验
FW	抗体可变区的框架区
HBS-EP+	含 3 mM EDTA 和 0.05% v/v 表面活性剂 P20 的 HEPES 缓冲盐水
IC ₅₀	抑制竞争者结合达 50% 的测试抗体的浓度
[0354]	
IgG	免疫球蛋白 G
IPTG	异丙基 β -D-1-硫代吡喃半乳糖苷
k _a	结合速率常数
k _d	解离速率常数
K _D	解离常数 (k_d/k_a)
MHC	主要组织相容性复合物
M _w	分子量
OD _{280nm}	在 280 nm 处测量的光密度
PBS	磷酸盐缓冲盐水
PBSM	含有 3% w/v Marvel 奶粉的磷酸盐缓冲盐水
PBST	含有 0.05% v/v Tween-20 的磷酸盐缓冲盐水
PCR	聚合酶链式反应
R _{max}	以 RU 计的分析物结合水平

RU	共振单位
scFv	单链可变片段
SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
S_m	结合化学计量
[0355] TES	200 mM Tris HCl pH 8.0、0.5 mM EDTA、0.5 M 蔗糖
TMB	3,3,5,5'-四甲基联苯胺
V 区	抗体链的可变区
VH	重链可变区
V_k	κ 轻链可变区

[0356] 实施例1:抗体的产生和纯化

[0357] 将VH和V_k变体以及比较器现有技术抗体序列亚克隆到pANT表达载体中,对于IgG1重链和κ(Km3)轻链,分别为pANT17.2和pANT13.2(图1)。使用引入侧翼限制酶位点以用于克隆的引物对VH和V_k序列进行PCR扩增。使用具有人γ1重链基因(G1m3(G1m(f))同种异型)的框架内的MluI和HindIII位点克隆VH区,并使用具有人κ轻链恒定区基因(Kmm3同种异型)的框架内的BssHII和BamHI限制位点克隆V_k区。重链和轻链基因的转录都在CMV I/E启动子的控制下,并且pANT17质粒含有在SV40启动子的控制下的突变dhfr小基因和用于在真核细胞中进行选择的polyA序列。通过测序确认所有构建体。pANT17.2和pANT13.2都含有用于原核细胞选择的β-内酰胺酶(Ap^R)基因和用于在原核细胞中繁殖的pMB1复制起点。所有质粒都在大肠杆菌(E. coli)XL1-blue(Stratagene)中繁殖。

[0358] 选择四条重链(称为SEQ ID No 5、7、9和11)和三条轻链序列(称为SEQ ID No 6、8和10)。将VH变体DNA与V_k变体DNA组合。使用PEI转染方法将这些组合瞬时转染到HEK EBNA贴壁细胞(ATCC[®], CRL-10852TM)中并在转染后孵育5-7天。将上清液用于单循环SPR分析,或者将抗体在Protein A琼脂糖柱(GE Healthcare)上从细胞培养物上清液中纯化,经缓冲交换至PBS pH 7.2中,并使用基于预测的氨基酸序列的消光系数通过OD_{280nm}进行定量。制备的抗体如表1所示:

[0359] 表1:

[0360]	抗体名称	重链	轻链
	亲本/模板AB-01	SEQ D No 12	SEQ ID No 6
	AB-02	SEQ ID No 5	SEQ ID No 6
	AB-03	SEQ ID No 7	SEQ ID No 8
	AB-04	SEQ ID No 9	SEQ ID No 8
	AB-05	SEQ ID No 5	SEQ ID No 10
	AB-06	SEQ ID No 11	SEQ ID No 10
	AB-07	SEQ ID No 12	SEQ ID No 10
	AB-08	SEQ ID No 13	SEQ ID No 14

AB-09	SEQ ID No 15	SEQ ID No 16
去免疫的J591 AB-10	SEQ ID No 3	SEQ ID No 4

[0361] 抗体AB-08、AB-09和AB-10是现有技术的抗体。小鼠J591抗体具有重链氨基酸SEQ ID No 1和轻链氨基酸SEQ ID No 2。图5中示出了彼此比对的序列。

[0362] 用于表达各种抗体链的DNA序列示于图4中。

[0363] 实施例2:通过竞争性FACS ELISA对抗体的分析

[0364] 在与去免疫的J591参照抗体(AB-10)的竞争性FACS ELISA中,评估J591变体与PSMA抗原的结合。使用AlexaFluor 488抗体标记试剂盒(Molecular Probes, Paisley, UK)对AB-10抗体进行荧光标记。收获表达PSMA的NS0细胞(克隆6/2F4,每次染色 3×10^5 个细胞),用Dulbecco's PBS(PAA Laboratories, Yeovil, UK)洗涤一次,重悬于封闭缓冲液(含1% BSA/0.05%叠氮化钠、2.5%山羊血清的PBS)并在室温下孵育30分钟。将各种浓度的测试人源化抗体与恒定浓度的Alexa-fluor 488标记的AB-10抗体(终浓度为0.5 μ g/mL)预混合。然后将封闭的细胞重悬于150 μ L/孔的预稀释的抗体混合物中并在冰上孵育1h。孵育后,将细胞用含1% BSA/0.05%的叠氮化钠的PBS洗涤2次,转移至FACS管中并在Becton Dickinson(Becton Dickinson, Oxford, UK) FACScalibur仪器上分析,每管收集15000个事件。通过绘制相对于测试抗体浓度的几何平均荧光强度来分析数据。如图2所示,AB-01显示出与AB-10非常相似的结合谱,IC50分别为0.46和0.42 μ g/ml。

[0365] 实施例3:通过Biacore测量亲和力成熟的抗体

[0366] 在Biacore T200上进行动力学实验,运行Biacore T200评估软件V2.0.1。所有实验均在25°C下用HBS-EP+运行缓冲液(Hepes缓冲盐水+3mM EDTA和0.05% (v/v) 表面活性剂P20, pH7.4) (GE Healthcare) 运行。

[0367] 使用重组人PSMA (R&D System) 作为分析物进行所有动力学实验。对于所有实验,将抗体固定在Series S Protein A传感芯片(GE Healthcare)表面上。对于动力学实验,需要限制固定/捕获的配体的量以避免芯片表面上的传质效应,并且理想地,表面应具有50-150RU的分析物结合水平(R_{max})。使用MW为80kDa的PSMA分析物、150kDa的抗体配体(IgG的估计值)、50RU的 R_{max} 并且由于每个抗体结合2个靶分子的能力而使用为2的化学计量(S_m),设定~50RU的目标响应水平用于所有样品抗体的捕获。

[0368] 单循环分析

[0369] 对瞬时转染的HEK EBNA细胞的上清液进行单循环动力学分析。将抗体在HBS-EP+中稀释至浓度为0.5 μ g/ml(如通过IgG定量ELISA测定的)。在每个循环开始时,将抗体上样到蛋白A芯片的Fc2、Fc3和Fc4上并以10 μ l/min的流速捕获IgG以得到~50的RU。然后使表面稳定。以40 μ l/min的流速获得单循环动力学数据,以最小化任何潜在的传质效应。进行AB-01抗体的多次重复以检查表面和分析物在动力学循环中的稳定性。从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参照通道F_c1(无抗体)的信号以校正与参照表面的非特异性结合中的差异。使用各浓度之间无再生的12.5至50nM PSMA的3点2倍稀释范围。监测增加浓度的PSMA的3次注射的结合阶段持续200秒,并且在最后一次注射PSMA后测量单个解离阶段持续300秒。通过注射2次10mM甘氨酸HCL, pH 1.5进行Protein A表面的再生,然后进行400秒的稳定期。

[0370] 多循环分析

[0371] 对于多循环动力学分析,以溶于HBS-EP+中的0.5 μ g/ml的蛋白浓度固定经纯化的

抗体。在每个循环开始时,在Protein A上捕获抗体,得到~50的RU并使表面稳定。以35 μ l/min的流速获得动力学数据,以最小化任何潜在的传质效应。将空白(无PSMA)的多次重复和单个浓度的分析物的重复编程到动力学运行以检查表面和分析物在动力学循环中的稳定性。对于动力学分析,从100至3.125nM PSMA选择2倍稀释范围。监测PSMA的结合阶段持续600秒并且测量解离阶段持续1200秒。在每个循环结束时通过注射2次10mM甘氨酸-HCL pH 1.5进行Protein A表面的再生。

[0372] 从Fc2、Fc3和Fc4的信号中减去来自参照通道Fc1的信号以校正与参照表面的非特异性结合中的差异,在1对1结合模型中使用全局 R_{max} 参数。通过将变体的 K_D 除以相同芯片上的AB-01mAb的 K_D 来计算与AB-01mAb相比的相对 K_D 。

[0373] 表2a:

[0374]	抗体名称	KD (M)	相对KD
	AB-01	5.53 E-10	1.00
	AB-02	2.80 E-10	1.98
	AB-04	3.54 E-10	1.56

[0375] 表2b:

[0376]	抗体名称	KD (M)	相对KD
	AB-01	4.45 E-10	1.00
	AB-03	2.45 E-10	1.82

[0377] 表2c:

[0378]	抗体名称	KD (M)	相对KD
	AB-01	4.13 E-10	1.00
	AB-05	2.24 E-10	1.84

[0379] 表2d:

[0380]	抗体名称	KD (M)	相对KD
	AB-01	5.05 E-10	1.00
	AB-06	3.42 E-10	1.48

[0381] 表2e:

[0382]	抗体名称	KD (M)	相对KD
	AB-01	4.69 E-10	1.00
	AB-07	3.58 E-10	1.31

[0383] 表2a至2e中示出的数据显示,如使用Biacore分析所分析的,这些抗体中的每一种都比AB-01抗体具有更好的对PSMA抗原的亲和力。因为AB-01抗体与已知的去免疫的J591抗体(在本文为AB-10,参见上文实施例2)具有基本相同的对PSMA抗原的亲和力,可见本发明的抗体比现有技术的J591抗体具有更好的对PSMA抗原的亲和力。

[0384] 实施例4:通过热应激测试比较抗PSMA抗体的稳定性

[0385] 将抗体样品(溶于PBS中的0.5mg/mL)在75°C下孵育30分钟,随后在冰浴中孵育5分钟,然后分析其聚集程度。通过尺寸排阻色谱法(SEC)和浊度测量进行抗体溶液的分析。

[0386] SEC:

[0387] 使用TOSOH Bioscience TSK gel Super SW 3000柱进行SEC。在用0.2M磷酸钾缓冲液(pH 6.8) (0.2M氯化钾和15%异丙醇)等度洗脱期间监测280nm处的UV吸光度。洗脱时间和峰数指示样品是否含有聚集的、降解的或天然的抗体。将曲线下面积% (Abs280) 用于测定SEC分析中存在的每个种类的量。

[0388] 结果：

[0389] 稳定性测定的结果示于表3中。从该分析可以看出,现有技术抗体AB-08、AB-09和AB-10不如本发明的AB-02至AB-06抗体稳定。

[0390] 表3:

抗体分析-应激测试后	天然构象形式的Ab (%)	聚集形式的Ab (%)
AB-02	10	90
AB-03	36	64
AB-04	27	73
AB-05	2	98
AB-06	2	98
去免疫的 J591 AB-10	0.4	99.6
AB-08	0	100
AB-09	0	100

[0392] 实施例5:用于产生缀合物的抗PSMA抗体与马来酰亚胺试剂mc-vc-PAB-MMAE的缀合

[0393] 将抗PSMA抗体、AB-02、AB-03、AB-04、AB-05、AB-06、AB-08和AB-09如下所述缀合以分别产生缀合物1、2、3、4、5、6和7。

[0394] 将溶于反应缓冲液(20mM磷酸钠、150mM NaCl、20mM EDTA、pH 7.5)中的各自浓度为5.2mg/mL的抗PSMA抗体加热至40℃,保持15分钟。将TCEP(2当量)加入到各mAb溶液中,轻轻混合,并在40℃下孵育1h,然后使其冷却至22℃。将马来酰亚胺试剂mc-val-cit-PAB-MMAE(Consortis Biopharma)溶解在DMF中,得到2.1mM储备液。用反应缓冲液将经还原的mAb溶液稀释至4.2mg/mL。加入mc-val-cit-PAB-MMAE(每种mAb 4当量),将反应轻轻混合并在22℃下孵育1h。将反应最后用50mM N-乙酰基-L半胱氨酸(相对于试剂为20当量)处理,并使其在22℃下孵育1h。通过疏水相互作用色谱法分析粗缀合混合物。将粗反应用DPBS, pH7.1-7.5渗滤(Vivaspin 6,30kDa PES膜)以除去反应物并浓缩缀合物。将经浓缩的样品经缓冲交换到DPBS pH7.1-7.5中,然后无菌过滤(0.22μm PVDF膜)。

[0395] 使用TOSOH TSK-凝胶Butyl-NPR柱通过疏水相互作用色谱法(HIC)分析经纯化的缀合物。分析每种药物与抗体比例(DAR)变体(通过药物(248nm)和抗体(280nm)的UV吸光度最大值的比率以及峰洗脱的顺序确定)所获得的每个峰面积。通过将每个DAR变体的积分面积之和乘以DAR并将该值除以总积分面积来计算平均DAR。每次缀合所获得的平均DAR值为3.5(±0.2)。

[0396] 实施例6:通过体外细胞活力测定对抗体药物缀合物和游离有效负载的分析

[0397] 通过测量它们对过表达PSMA的癌细胞系的细胞生长的抑制作用来确定如实施例4所述制备的ADC 1至7的体外功效。

[0398] 在体外用细胞毒性药物或ADC处理后肿瘤细胞活力的丧失可通过使细胞系在增加浓度的药物或ADC的存在下生长并使用**CellTiterGlo®**发光试剂(Promega Corp.)定量增殖或代谢活性的丧失来测量。所述方案描述了细胞接种、药物处理和基于ATP合成——其与孔中存在的细胞数目直接相关——测定相对于未经处理的细胞的细胞活力。

[0399] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC)购买肿瘤细胞系LNCaP(CRL-1740)。使LNCaP和C4-2细胞在含2mM谷氨酰胺(Life **Technologies®**)、10%胎牛血清、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中生长。如产品信息表中所述并遵循关于组织培养的ATCC一般推荐维持细胞。根据ATCC推荐和本文引用的参考文献(例如,Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique by R.Ian Freshney第3版,由Alan R.Liss出版,N.Y.1994,或由Wiley-Liss出版的第5版,N.Y.2005)培养细胞。

[0400] 如制造商的说明书(Promega Corp.Techical Bulletin TB288;Lewis Phillips G.D,Cancer Res 2008;68:9280-9290)所述,使用Cell-Titer**Glo®**发光试剂进行细胞活力测定。使用酶标仪(例如Molecular Devices Spectramax M3酶标仪)记录发光值,随后使用四参数非线性回归模型分析数据。

[0401] 如果绘制成图,则将活力表示为%未经处理的细胞,并使用以下公式计算:

$$[0402] \% \text{活力} = 100 \times \frac{\text{发光值}_{\text{样品}} - \text{发光值}_{\text{非细胞对照}}}{\text{发光值}_{\text{未处理}} - \text{发光值}_{\text{非细胞对照}}}$$

[0403] 相对于以nM计的药物浓度的对数(X轴)对%活力(Y轴)作图,以外推所有缀合物以及游离药物的IC50值。

[0404] 用TrypLE分离PSMA阳性LNCaP(克隆FGC)细胞和C4-2细胞并重悬于完全培养基中。使用一次性Neubauer计数室对细胞计数,并分别将LNCaP和C4-2的细胞密度调整至 10×10^4 个细胞/mL和 2×10^4 个细胞/mL。将细胞接种(100μL/孔)到组织培养物处理的(C4-2)或聚-D-赖氨酸包被的(LNCaP)、白色不透明壁的96孔板中,并在测定前在37°C和5%CO₂下孵育24h。

[0405] 在相关培养基中制备ADC或游离药物的8点连续稀释物。用50-0.00064nM浓度的ADC处理细胞系。将MMAE以500-0.0064nM用于C4-2细胞,以10,000-0.128nM用于LNCaP细胞。将含有贴壁细胞的平板中的培养基除去并用100μL/孔的连续稀释的化合物替换。然后将细胞在37°C和5%CO₂下再孵育96h。

[0406] 如表4所示,在所测试的浓度范围内,所有ADC都能够特异性地抑制表达PSMA的LNCaP和C4-2细胞的增殖。

[0407] 表4.显示出ADC和游离有效负载对LNCaP和C4-2细胞的抗增殖作用的IC₅₀值。

[0408]

ADC/ 药物	LNCaP	C4-2
	IC50 (nM)	IC50 (nM)
<u>1</u> AB-02-mc-val-cit-PAB-MMAE	0.61	0.18
<u>2</u> AB-03-mc-val-cit-PAB-MMAE	0.70	0.22
<u>3</u> AB-04-mc-val-cit-PAB-MMAE	0.67	0.21
<u>4</u> AB-05-mc-val-cit-PAB-MMAE	1.27	0.41
<u>5</u> AB-06-mc-val-cit-PAB-MMAE	0.78	0.26
<u>6</u> AB-08-mc-val-cit-PAB-MMAE	1.03	0.31
<u>7</u> AB-09-mc-val-cit-PAB-MMAE	0.89	0.24
MMAE	2.23	0.63

序列表

<110> 宝力泰锐克斯有限公司
<120> 抗PSMA抗体、其用途及其缀合物
<130> P025441W0
<150> GB 1614165.4
<151> 2016-08-19
<160> 38
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 115
<212> PRT
<213> 合成的构建体 (synthetic construct)
<400> 1

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

Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

[0001]

Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

[0002] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Met Leu Asp Leu Lys
100 105

<210> 3

<211> 115

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 4

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

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

[0003] Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Pro Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 5

<211> 115

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

[0004] Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 6

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

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

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 7

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

[0005] Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Trp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 8

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

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

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Arg Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 115

[0006] <212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 9

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Ala Trp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 10

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

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

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0007] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ala Tyr Ser Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 115

<212> PRT

[0008] <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 12

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

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

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

100

105

110

Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 142
<212> PRT
<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 13

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Gly Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Arg Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0009] 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asp Phe Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
115 120 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 14
<211> 127
<212> PRT
<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 14

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

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

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

Lys Phe Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

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

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

[0010] Ser Ala Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 115 120 125

<210> 15

<211> 143

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 15

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Leu Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

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

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

Ser Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Glu Tyr His Tyr Tyr
115 120 125

Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 16

<211> 127

<212> PRT

<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 16

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Pro
1 5 10 15

[0011]

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

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

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

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

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

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

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

<210>	17	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	17	
gagggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctgaagaagc ctgggacttc agtgaggata		60
tcctgcaaga cttctggata cacattcaact gaatacacca tccactgggt gaagcagagc		120
catggaaaga gccttgagtg gattggaaac attaatccta acaatggtg tactacctac		180
aaccagaagt tcgaggacaa ggcacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac		240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc agctgggtgg		300
aactttgact actggggcca aggcaccacg ctcaccgtct cctca		345
<210>	18	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	18	
gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc		60
[0012] atcatctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgttag actggtatca acagaaacca		120
ggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat		180
cgcttcacag gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcaccaa tgtcagttct		240
gaagacctgg cagattattt ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcggcgcc		300
gggaccatgc tggatctcaa a		321
<210>	19	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	19	
gaggtccaaac tggcacagtc tggacctgaa gtgaagaagc ctggggctac agtgaagata		60
tcctgcaaga cttctggata cacattcaact gaatataccca tacactgggt gaagcaggcc		120
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac atcaatccta acaatggtg taccacctac		180
aatcagaagt tcgaggacaa ggcacacta actgtagaca agtccaccga tacagcctac		240
atggagctca gcagcctaag atctgaggat actgcagtct attattgtgc agctgggtgg		300
aactttgact actggggcca agggaccctg ctcaccgtct cctca		345

<210>	20	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	20	60
gacatccaga tgacccagtc tccctcatcc ctgtccacat cagtaggaga cagggtcacc		
ctcacctgta aggccagtca agatgtgggt actgctgtag actggttatca acagaaacca		120
ggaccatctc ctaaactact gatttattgg gcatccactc ggcacactgg aatccctagt		180
cgcttctcag gcagtggatc tgggacagac ttcactctca ccatttctag tcttcagcct		240
gaagactttg cagattatta ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcggtcct		300
gggaccaagg tggacatcaa a		321
<210>	21	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	21	60
gagggtccagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc		
[0013] tcctgcaagg cttctggata cacattcaact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc		120
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaatccta acaatggtg tactacctac		180
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgttagaca agtccaccag cacagectac		240
atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agcttactgg		300
ctgttcact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca		345
<210>	22	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	22	60
gacattcaga tgacccagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc		
atcacttgca aggccagtca ggtatgtgggt actgctgtag actggttatca acagaaacca		120
gggcaagctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgtat		180
cgcttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag actgcagcct		240
gaagactttg cagtttatta ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcgccag		300
gggaccaagg tggatatacaa a		321

<210>	23	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	23	
gaggtccagc tggcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60	
tcctgcaagg cttctggata cacattcaact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc	120	
cctggaaagg gccttgagt gattggaaac attaatccta acaatggtg tactacctac	180	
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgttagaca agtccaccag cacagcctac	240	
atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc aggtgggtgg	300	
acttcgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca	345	
<210>	24	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	24	
gacattcaga tgacccagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc	60	
[0014] atcacttgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgttag actggtatca acagaaacca	120	
ggcaagctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	180	
cgcttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag actgcagcct	240	
gaagactttt cagtttatta ctgtcagcag ttcaccaggt atcctctcac gttcggccag	300	
gggaccaagg tggatataa a	321	
<210>	25	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	25	
gaggtccagc tggcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60	
tcctgcaagg cttctggata cacattcaact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc	120	
cctggaaagg gccttgagt gattggaaac attaatccta acaatggtg tactacctac	180	
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgttagaca agtccaccag cacagcctac	240	
atggagctca gcagcctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc aggtgcgtgg	300	
accatggact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca	345	

<210>	26	
<211>	321	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	26	
gacattcaga tgacccagtc tcccagcacc ctgtccgcat cagtaggaga cagggtcacc	60	
atcacttgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag actggttatca acagaaacca	120	
ggccaagctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	180	
cgttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag actgcagcct	240	
gaagactttg cagtttatta ctgtcagcaa tataacgcgt actcggtgac gttcggccag	300	
gggaccaagg tggatataa a	321	
<210>	27	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	27	
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60	
[0015] tcctgcaagg cttctggata cacattcaact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc	120	
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaatccta acaatggtgg tactacctac	180	
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgttagaca agtccaccag cacagcctac	240	
atggagctca gcagcccgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agctgggtgg	300	
aactttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca	345	
<210>	28	
<211>	345	
<212>	DNA	
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)	
<400>	28	
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggc	60	
tcctgcaagg cttctggata cacattcaact gaatacacca tccactgggt gaggcaggcc	120	
cctggaaagg gccttgagtg gattggaaac attaatccta acaatggtgg tactacctac	180	
aaccagaagt tcgaggacag agtcacaatc actgttagaca agtccaccag cacagcctac	240	
atggagctca gcagccctgag atctgaggat actgcagtct attactgtgc agctgggtgg	300	
aactttgact actggggcca aggcaccacg gtcaccgtct cctca	345	

<210> 29
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (98)..(102)
 <223> 这些位置的残基选自以下序列: Ala Tyr Trp Leu Phe, Gly Gly Trp Thr Phe, 或
 Gly Ala Trp Thr Met

<400> 29

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

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

Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0016] 50 55 60

Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Ala Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (9)..(9)
 <223> 该残基选自Ala或Pro

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (11)..(11)
 <223> 该残基选自Val或Leu

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (24)..(24)
 <223> 该残基选自Ala或Thr

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (38)..(38)
 <223> 该残基选自Arg或Lys

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (41)..(41)
 <223> 该残基选自Pro或His

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (55)..(55)
 <223> 该残基选自Asn或Gln

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (68)..(68)
 <223> 该残基选自Val或Ala

[0017] <220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (70)..(70)
 <223> 该残基选自Ile或Leu

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (86)..(86)
 <223> 该残基选自Leu或Pro

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (98)..(102)
 <223> 这些位置的残基选自以下序列: Ala Tyr Trp Leu Phe, Gly Gly Trp Thr Phe, 或 Gly Ala Trp Thr Met

<400> 30

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30

Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
----	----	----

Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50						55					60				

Glu	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	

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

Ala	Ala	Tyr	Trp	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
				100				105				110			

Val	Ser	Ser
	115	

<210>	31
<211>	107
<212>	PRT
<213>	合成的构建体 (synthetic construct)

[0018]

<220>	
<221>	变体 (varient)
<222>	(91)..(95)
<223>	这些位置的残基选自以下序列: Phe Thr Arg Tyr Pro 或 Tyr Asn Ala Tyr Ser
<400>	31

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

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

Val	Asp	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35			40					45			

Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
				50			55				60				

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

Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Thr	Arg	Tyr	Pro	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (3)..(3)
 <223> 该残基选自Gln或Val

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (10)..(10)
 <223> 该残基选自Thr或Phe

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (63)..(63)
 <223> 该残基选自Ser或Thr

[0019] <220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (80)..(80)
 <223> 该残基选自Pro或Ser

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (85)..(85)
 <223> 该残基选自Val或Asp

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (87)..(87)
 <223> 该残基选自Tyr或Phe

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (91)..(95)
 <223> 这些位置的残基选自以下序列: Phe Thr Arg Tyr Pro 或 Tyr Asn Ala Tyr Ser

<220>
 <221> 变体 (varient)
 <222> (103)..(103)
 <223> 该残基选自Lys或Met

<400> 32

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

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

Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Thr Arg Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

[0020] <210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 33

Glu Tyr Thr Ile His
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<220>
<221> 变体 (varient)
<222> (6)..(6)
<223> 该残基选自Asn或Gln

<400> 34

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

Asp

<210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<220>
 <221> 变体
 <222> (1)..(4)
 <223> 这些位置的残基选自以下序列: Tyr Trp Leu Phe, Gly Trp Thr Phe 或 Ala Tyr Thr Met

<400> 35

Tyr Trp Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 36

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Asp
1 5 10

[0021]

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 合成的构建体 (synthetic construct)

<400> 37

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成的序列 (synthetic sequence)

<220>
 <221> 变体
 <222> (3)..(7)
 <223> 这些位置的残基选自以下序列: Phe Thr Arg Tyr Pro 或 Tyr Asn Ala Tyr Ser

<400> 38

[0022]

Gln Gln Phe Thr Arg Tyr Pro Leu Thr
1 5

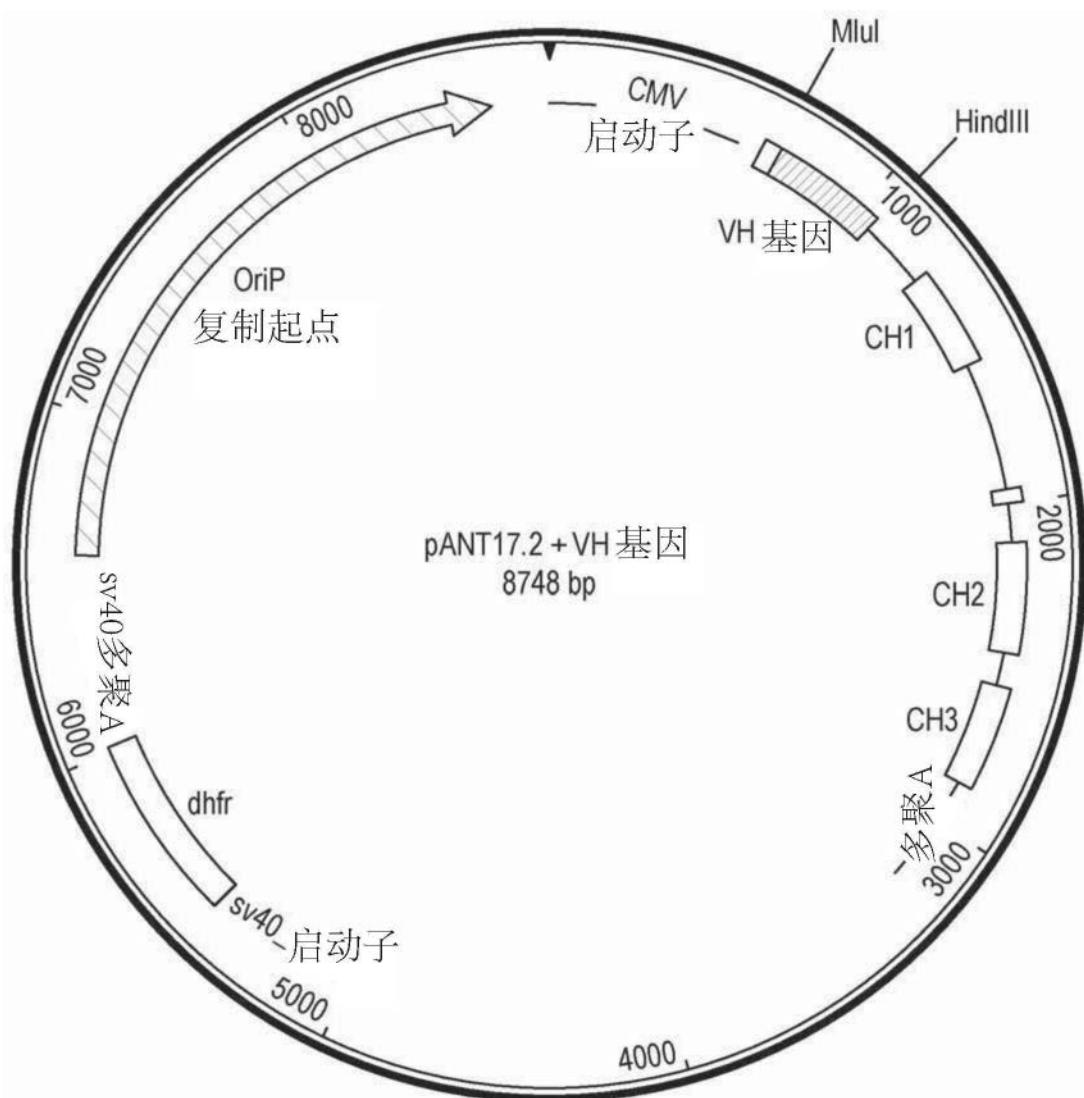


图1(a)

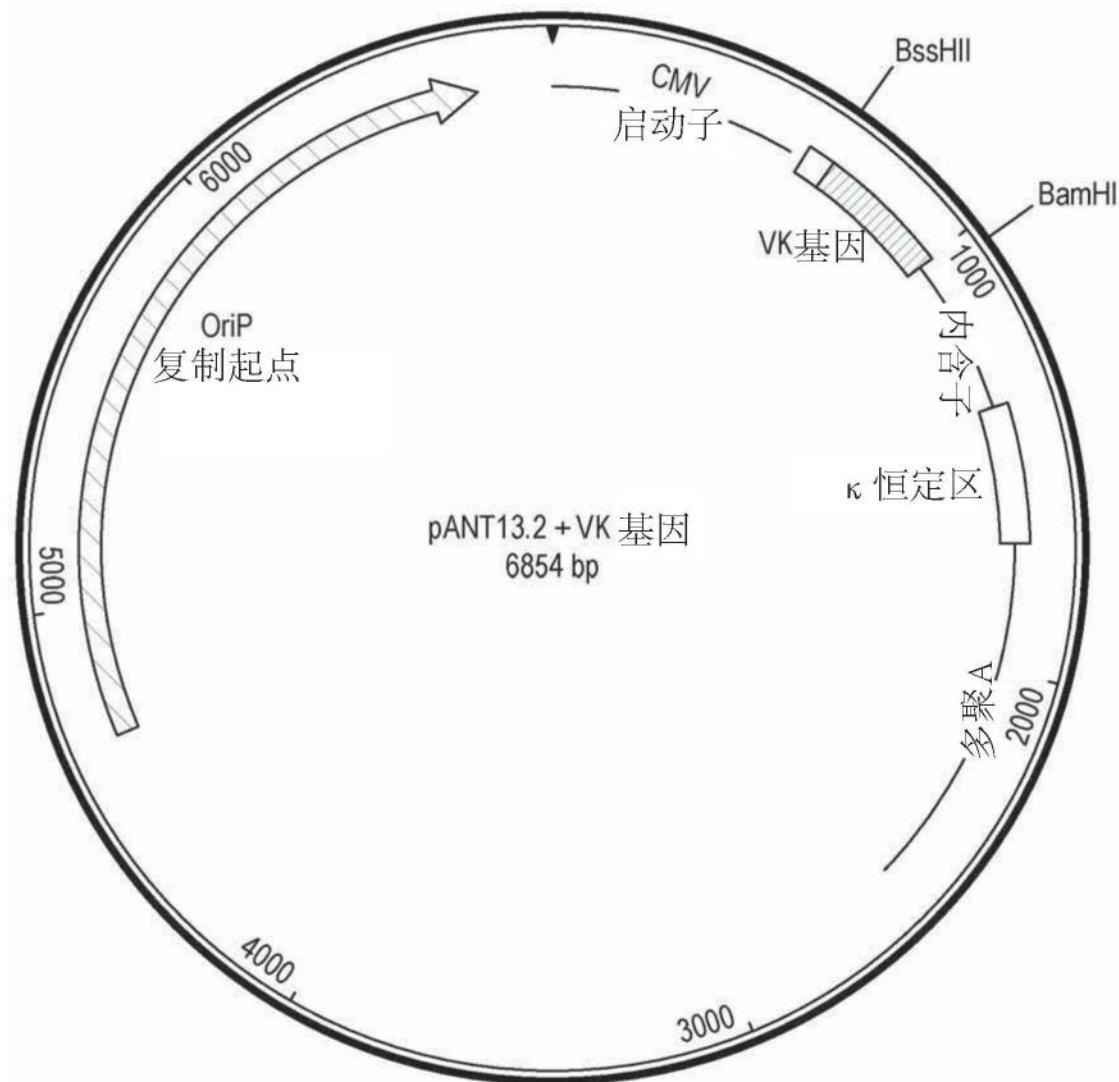


图1 (b)

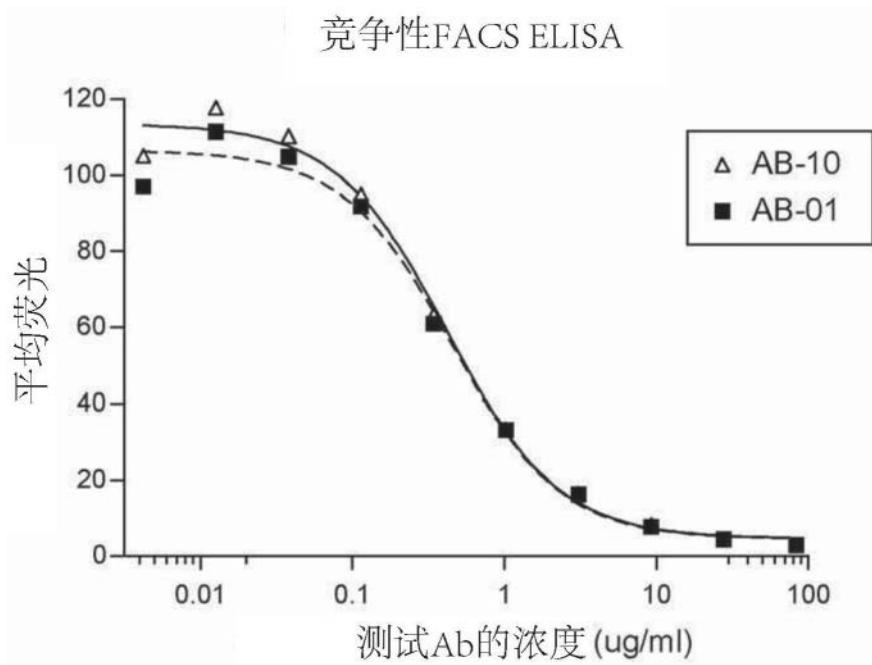


图2

氨基酸序列

小鼠 J591 VH 氨基酸 >Seq ID 1

EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGT
TYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLV
SS

小鼠 J591 V κ 氨基酸 >Seq ID 2

DIVMTQSHKFMSTSVDGRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK

AB-10 去免疫的 J591 VH 氨基酸 >Seq ID 3

EVQLVQSGPEVKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGG
TTYNQKFEDKATLTVDKSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTT
VSS

AB-10 去免疫的 J591 V κ 氨基酸 >Seq ID 4

DIQMTQSPSSLSTSVDRTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYWASTRHT
GIPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

AB-02 和 AB-05 VH 氨基酸 >Seq ID 5

EVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAYWLFDYWGQGTT
VSS

AB-01 和 AB-02 V κ 氨基酸 >Seq ID 6

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFLTISRLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTT
VSS

图3

AB-03 VH 氨基酸 >Seq ID 7

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGGWTFDYWGQGTTV
VSS

AB-03 和 AB-04 V κ 氨基酸 >Seq ID 8

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQFTRYPLTFGQGTVKVDIK

AB-04 VH 氨基酸 >Seq ID 9

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGAWTMDYWGQGTTV
TVSS

AB-05, AB-06 和 AB-07 V κ 氨基酸 >Seq ID 10

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLQPEDFAVYYCQQYNAYSLFGQGTVKVDIK

AB-06 VH 氨基酸 >Seq ID 11

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSPRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
VSS

AB-01 和 AB-07 VH 氨基酸 >Seq ID 12

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

图3续

AB-08 VH 氨基酸 >Seq ID 13

MELGLRWGFL VALLRGVQCQ VQLVESGGV VQPGRSLRLS CAASGFAFSR
YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTQYL
QMNSLRAEDT AVYYCARGGD FLYYYYYGM VWGQGTTVTV SS

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 15所示的序列

AB-08 VK 氨基酸 >Seq ID 14

MRVPAQLLGL LLLWLPDTRC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS
NYLAWYQQKT GKVPKFLIYE ASTLQSGVPS RFSGGGSGTD FTLTISSLQP
EDVATYYCQN YNSAPFTFGP GTKVDIK

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 17所示的序列

AB-09 VH 氨基酸 >Seq ID 15

MELGLRWVLL VALLRGVQCQ VQLVESGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSN
YVMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AVYYCAGGYN WNYEYHYYGM DVWGQGTTVT VSS

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 19所示的序列

AB-09 VK 氨基酸 >Seq ID 16

MRVPAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIT
NYLAWFQQKP GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGTD FSLTISSLQP
EDFATYYCQQ YNSYPITFGQ GTRLEIK

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 21所示的序列

图3续

DNA序列

小鼠 J591 VH DNA>Seq ID 17

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGACTTCAGTG
 AGGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAACAA
 ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTGACTGTAG
 ACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTC
 TGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACTTGACTACTGGGGCCAAGGCACC
 ACGCTCACCGTCTCCTCA

小鼠 J591 V κ DNA>Seq ID 18

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
 GTCAGCATCATCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
 AACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
 ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCT
 CACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTCTGTCAAGCAATAT
 AACAGCTATCCTCTCACGTTGGCGCCGGGACCATGCTGGATCTCAAA

AB-10 去免疫的 J591 VH DNA>Seq ID 19

GAGGTCCAACCTGGTACAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGCTACAGTG
 AAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATATACCATAACTGGG
 TGAAGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGAAACATCAATCCTAACAA
 ATGGTGGTACCCACCTACAATCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACACTAACTGTAG
 ACAAGTCCACCGATACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTAAGATCTGAGGATA
 CTGCAGTCTATTATTGTGCAGCTGGTTGGAACTTGACTACTGGGGCCAAGGGAC
 CCTGCTCACCGTCTCCTCA

图4

AB-10 去免疫的 J591V κ DNA>Seq ID 20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCATCCCTGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG
TCACCCCTCACCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCA
ACAGAAACCAGGACCATCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCAC
ACTGGAATCCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGACAGACTTCACTCTCA
CCATTCTAGTCTCAGCCTGAAGACTTGCAGATTATTACTGTCAGCAATATAAC
AGCTATCCTCTCACGTTGGTCCCTGGGACCAAGGTGGACATCAA

AB-02 和 AB-05 VH DNA>Seq ID 21

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCCCTGGATAACACATTCACTGAATAACACCCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACAA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTTACTGGCTGTTGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

AB-01 和 AB-02 V κ DNA>Seq ID 22

GACATTCAAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTGCAGTTATTACTGTCAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTGGCCAGGGACCAAGGTGGATATCAA

图4续

AB-03 VH DNA>Seq ID 23

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCACACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGGTGGTGGACCTCGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

AB-03 和 AB-04 V_k DNA>Seq ID 24

GACATTCAAGATGACCCAGTCTCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCACATCACTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTGCAGTTATTACTGTCAGCAGTTC
ACCAGGTATCCTCTCACGTTGCCAGGGACCAAGGTGGATATCAAA

AB-04 VH DNA>Seq ID 25

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCACACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGGTGCGTGGACCATGGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

图4续

AB-05, AB-06 和 AB-07 V κ DNA>Seq ID 26

GACATTCAAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCACATCACTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTGCAGTTATTACTGTCAGCAATAT
AACGCGTACTCGTTGACGTTGCCAGGGACCAAGGTGGATATCAAA

AB-06 VH DNA>Seq ID 27

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAAC
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTGGAACTTGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

AB-01 和 AB-07 VH DNA>Seq ID 28

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATAACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAAC
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTGGAACTTGACTACTGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

图4续

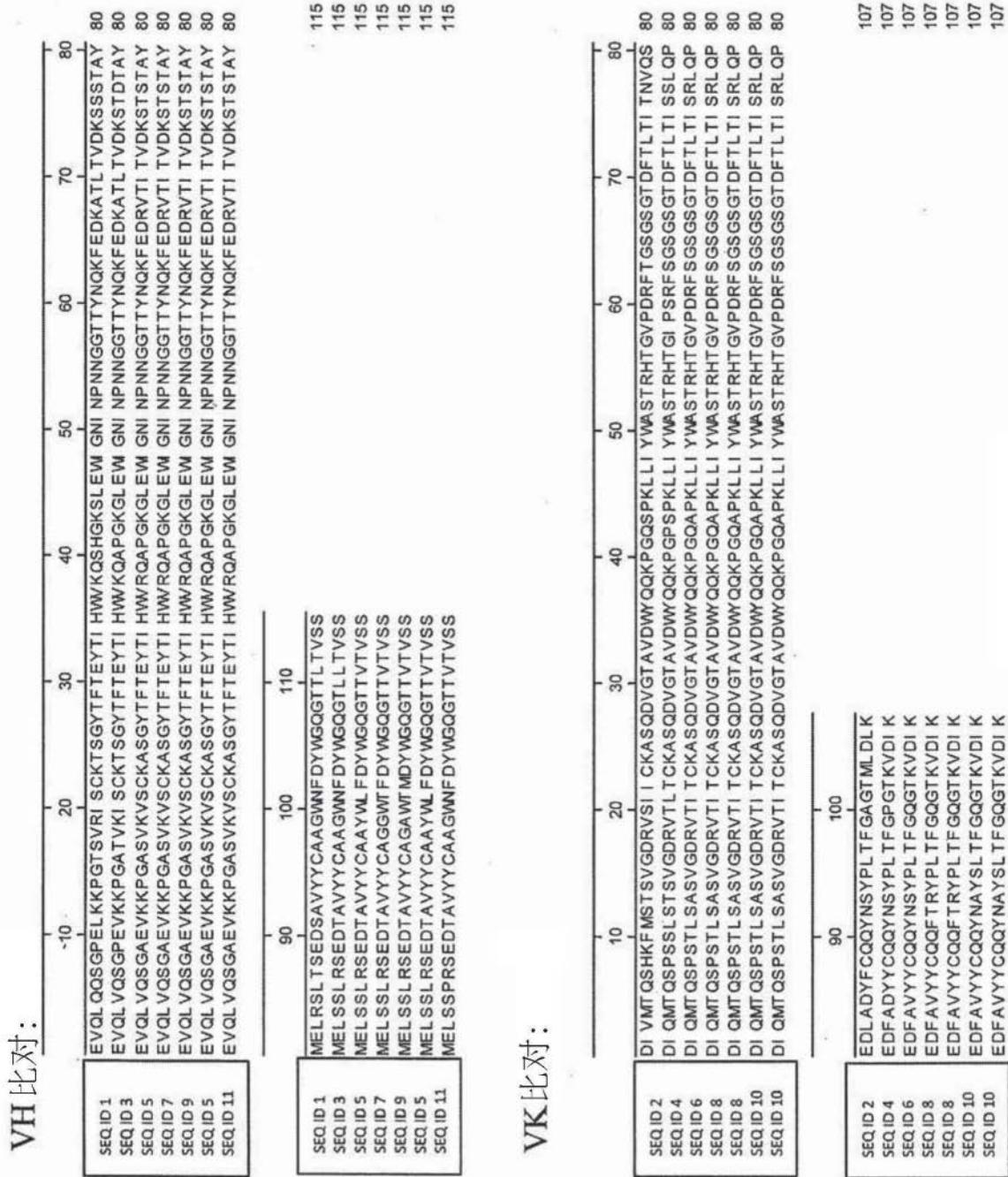


图5