



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103080136 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201180039943. X

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 17

C07K 16/30(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/356, 508 2010. 06. 18 US

(56) 对比文件

WO 2007056470 A2, 2007. 05. 18, 全文.

WO 2009062690 A1, 2009. 05. 22, 全文.

US 20100150919 A1, 2010. 06. 17, 全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 02. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/040825 2011. 06. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/159980 EN 2011. 12. 22

(73) 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 L·裴 吴雁 X·叶

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

审查员 夏颖

(51) Int. Cl.

C07K 16/46(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

A61P 37/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书1页 说明书65页

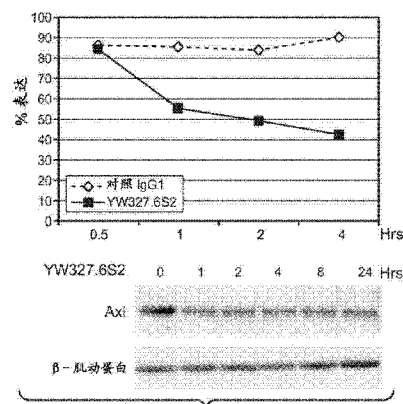
序列表43页 附图27页

(54) 发明名称

抗 Ax1 抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了抗 Ax1 抗体及其使用方法。



1. 与人 Ax1 结合的分离的抗体,其中该抗体包含 (a) 氨基酸序列 SEQ ID NO:7 所示 HVR-H1, (b) 氨基酸序列 SEQ ID NO:8 所示 HVR-H2,和 (c) 氨基酸序列 SEQ ID NO:9 所示 HVR-H3,且进一步包含 (a) 氨基酸序列 SEQ ID NO:10 所示 HVR-L1 ;(b) 氨基酸序列 SEQ ID NO:11 所示 HVR-L2 ;和 (c) 氨基酸序列 SEQ ID NO:12 所示 HVR-L3,进一步包含图 3A-B、4、5 或 6 中所示重链可变域框架序列或轻链可变域框架序列。

2. 权利要求 1 的抗体,包含 VH 序列 SEQ ID NO:103 和 / 或 VL 序列 SEQ ID NO:104。

3. 权利要求 1-2 任一项的抗体,其中该抗体促进 Ax1 受体下调和 / 或抑制组成性 Ax1 激活。

4. 权利要求 1-2 任一项的抗体,其中该抗体结合包含氨基酸序列 SEQ ID NO:111、基本上由氨基酸序列 SEQ ID NO:111 组成或由氨基酸序列 SEQ ID NO:111 组成的多肽。

5. 权利要求 1-2 任一项的抗体,其为单克隆抗体。

6. 权利要求 1-2 任一项的抗体,其为全长 IgG1 抗体。

7. 权利要求 1-2 任一项的抗体,其为人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、或结合 Ax1 的抗体片段。

8. 分离的核酸,其编码权利要求 1-2 任一项的抗体。

9. 宿主细胞,其包含权利要求 8 的核酸。

10. 生产抗体的方法,包括培养权利要求 9 的宿主细胞使得生成该抗体。

11. 权利要求 10 的方法,进一步包括自该宿主细胞回收该抗体。

12. 免疫偶联物,其包含权利要求 1-2 任一项的抗体和细胞毒剂。

13. 药物配制剂,其包含权利要求 1-2 任一项的抗体和药学可接受载体。

14. 权利要求 13 的药物配制剂,进一步包含其它的治疗剂,其中该其它的治疗剂选自 VEGF 拮抗剂、EGFR 拮抗剂,和化疗剂。

15. 权利要求 1-2 任一项的抗体在制备用于治疗非小细胞肺癌、乳腺癌、或骨转移的药物中的用途。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述药物进一步包括其它的治疗剂,其中该其它的治疗剂选自下组:VEGF 拮抗剂,EGFR 拮抗剂和化疗剂。

17. 权利要求 1-2 任一项的抗体在制备用于抑制组成性 Ax1 激活的药物中的用途。

抗 Ax1 抗体及使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请依据 35USC § 119 要求 2010 年 6 月 18 日提交的美国临时申请号 61/356, 508 的优先权, 通过述及完整收录其内容。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表, 已经以 ASCII 格式经 EFS-Web 提交且通过述及完整收入本文。

发明领域

[0005] 本发明涉及抗 Ax1 抗体及其使用方法。

[0006] 发明背景

[0007] Ax1 是 TAM (Tyro3, Ax1, 和 Mer) 受体酪氨酸激酶家族的一个成员 (O' Bryan 等人, 1991; Lai 等人, 1991)。它最初鉴定为血液学恶性肿瘤中的一种转化因子 (O' Bryan 等人, 1991; Janssen 等人, 1991)。Ax1 或其配体 Gas6 的失调涉及多种人癌症的发病机理。已经报告了 Ax1 在极其多种人癌症中过表达 (Berclaz 等人, 2001; Craven 等人, 1995; Shieh 等人, 2005; Sun 等人, 2004; Ito 等人, 1999) 且与肺癌 (Shieh 等人, 2005)、前列腺癌 (Sainaghi 等人, 2005)、乳腺癌 (Meric 等人, 2002; Zhang 等人, 2008)、胃癌 (Wu 等人, 2002)、和胰腺癌 (Koorstra 等人, 2009)、肾细胞癌 (Chung 等人, 2003), 以及成胶质细胞瘤 (Hutterer 等人, 2008) 中的侵入和转移有关。最近, 通过磷酸酪氨酸信号传导序型分析, 在约 5% 的 NSCLC 原发性肿瘤中检测到活化的 Ax1 蛋白 (Rikova 等人, 2007)。Ax1 表达受靶向和化疗药物诱导, 而且药物诱导的 Ax1 表达在急性髓样白血病中赋予对化疗的抗性 (Hong 等人, 2008), 以及在胃肠基质肿瘤 (Mehadevan, et al, 2007) 和乳腺癌 (Liu 等人, 2009) 中分别赋予对伊马替尼 (imatinib) 和拉帕替尼 (Lapatinib)/Herceptin 的抗性。涉及 Ax1 和抗 Ax1 抗体的其它出版物包括 W02004/039955; W02009/063965; 2009 年 7 月 27 日提交的共同拥有的美国申请 No. 61/228, 915; W02009/062690; W02004/008147; 5, 468, 634。

[0008] 清楚的是仍然需要具有最适于开发成治疗剂的临床属性的药剂。本文所述发明满足了此需求并提供了其它好处。

[0009] 通过述及而完整收录本文中引用的所有参考文献 (包括专利申请和出版物)。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供抗 Ax1 抗体及其使用方法。一方面, 本发明提供了与人 Ax1 结合的分离的抗体, 其中该抗体以 $\leq 600\text{pM}$ 的亲和力结合人 Ax1, 其中该抗体以 $\leq 1\text{nM}$ 的亲和力结合小鼠 Ax1。在一些实施方案中, 该抗体促进 Ax1 受体下调。在一些实施方案中, 该抗体抑制组成性 Ax1 激活。在一些实施方案中, 该抗体结合包含下述氨基酸序列、基本上由下述氨基酸序列组成或由下述氨基酸序列组成的多肽: MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVG (SEQ ID NO: 111)。

[0012] 在又一些实施方案中, 该抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中, 该抗体为人抗体、人源化抗体、或嵌合抗体。在一些实施方案中, 该抗体为结合 Ax1 的抗体片段。在一些

实施方案中,该抗体为人抗体。

[0013] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其中该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含 $\text{GFX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{H}$,其中 X_1 为 S 或 T; X_2 为 L, F 或 V; X_3 为 S, T, 或 R; X_4 为 G 或 S; X_5 为 S, H, T 或 I; X_6 为 W 或 G; X_7 为 I 或 L (SEQ ID NO:112), (b)HVR-H2,其包含 $\text{X}_1\text{X}_2\text{IX}_3\text{PX}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}\text{YYADSVKG}$,其中 X_1 为 G 或 A; X_2 为 W 或 G; X_3 为 N, S, A 或 P; X_4 为 Y, A 或 V; X_5 为 R, G, 或 S; X_6 为 G, R 或 S; X_7 为 Y, S, H 或 Y; X_8 为 A, T, 或 P (SEQ ID NO:113) 和 / 或 HVR-H2,其包含 $\text{X}_1\text{X}_2\text{IX}_3\text{PX}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}\text{YYADSVKG}$,其中 X_1 为 G 或 A; X_2 为 W 或 G; X_3 为 N, S, A 或 P; X_4 为 Y, A 或 V; X_5 为 R, G, 或 S; X_6 为 G, R 或 S; X_7 为 Y, S, H 或 Y; X_8 为 A, T, 或 P; X_9 为任何氨基酸或缺失; X_{10} 为任何氨基酸或缺失 (SEQ ID NO:166); (c)HVR-H3,其包含 $\text{ARX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}\text{X}_{11}\text{X}_{12}\text{X}_{13}\text{MDY}$,其中 X_1 为 E 或 W; X_2 为 Y 或 R; X_3 为 S, N 或 P; X_4 为 G, D, 或 L; X_5 为 W 或 S; X_6 为 G, R, A, 或 S; X_7 为 G 或 S; X_8 为 S 或缺失; X_9 为 S, Y 或缺失; X_{10} 为 V, I 或缺失; X_{11} 为 G 或缺失; X_{12} 为 Y 或缺失; X_{13} 为 A, E 或缺失 (SEQ ID NO:114); (d)HVR-L1,其包含 $\text{RASQX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{A}$,其中 X_1 为 D, I 或 S; X_2 为 V 或 I; X_3 为 S, G 或 R; X_4 为 T, I, N 或 R; X_5 为 A 或 S; X_6 为 V 或 L (SEQ ID NO:115); (e)HVR-L2,其包含 $\text{X}_1\text{ASX}_2\text{LX}_3\text{S}$,其中 X_1 为 S, A, 或 V; X_2 为 F, N 或 S; X_3 为 Y 或 A (SEQ ID NO:116); 和 (f)HVR-L3,其包含 $\text{QQX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{T}$,其中 X_1 为 S 或 A; X_2 为 Y, K 或 N; X_3 为 T, S, Y, M, R 或 A; X_4 为 T, N, S, 或 F; X_5 为 P 或 R; X_6 为 P, Y, S 或 L (SEQ ID NO:117)。

[0014] 另一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其中该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含 $\text{GFX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{GX}_4\text{WIH}$,其中 X_1 为 T 或 S; X_2 为 F 或 L; X_3 为 T 或 S; X_4 为 H, S 或 T (SEQ ID NO:118); (b)HVR-H2,其包含 $\text{GWIX}_1\text{PYX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{YYADSVKG}$,其中 X_1 为 S, N 或 A; X_2 为 G, R 或 S; X_3 为 G 或 R; X_4 为 S, Y 或 H; X_5 为 T, A 或 P (SEQ ID NO:119); (c)HVR-H3,其包含 $\text{AREYX}_1\text{X}_2\text{WX}_3\text{X}_4\text{SX}_5\text{X}_6\text{GYX}_7\text{MDY}$,其中 X_1 为 S, N 或 P; X_2 为 G 或 D; X_3 为 G, R, 或 A; X_4 为 G 或 S; X_5 为 S 或 Y; X_6 为 V 或 I; X_7 为 A 或 E (SEQ ID NO:120); 和 (d)HVR-L3,其包含 $\text{QQSYX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{T}$,其中 X_1 为 T, S 或 Y; X_2 为 T, N, S 或 F; X_3 为 P 或 R; X_4 为 P, Y 或 S (SEQ ID NO:121)。

[0015] 另一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含 (a)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9, (b)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12, 和 (c)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8。

[0016] 另一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7, (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8, 和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。

[0017] 另一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10; (b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11; 和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0018] 另一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10; (b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11; 和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0019] 在一些实施方案中,该抗体进一步包含图 3A-B, 4, 5 或 6 中所示重链可变域或轻链可变域框架序列。

[0020] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含 (a)VH 序列,其与氨基酸序列 SEQ ID

NO:103 具有至少 95% 序列同一性 ;(b) VL 序列,其与氨基酸序列 SEQ ID NO:104 具有至少 95% 序列同一性 ;或 (c) (a) 中的 VH 序列和 (b) 中的 VL 序列。在一些实施方案中,该抗体包含 VH 序列 SEQ ID NO:103。在一些实施方案中,该抗体包含 VL 序列 SEQ ID NO:104。在一些实施方案中,该抗体包含 VH 序列 SEQ ID NO:103 和 VL 序列 SEQ ID NO:104。

[0021] 在一些实施方案中,该抗体为全长 IgG1 抗体。

[0022] 本发明还提供了分离的核酸,其编码本发明的任何抗体。

[0023] 本发明还提供了宿主细胞,其包含本发明的核酸。

[0024] 本发明还提供了生产抗体的方法包括培养本发明的宿主细胞使得生成该抗体。在一些实施方案中,该方法进一步包括自该宿主细胞回收该抗体。

[0025] 本发明还提供了免疫偶联物,其包含本发明的任何抗 Ax1 抗体和细胞毒剂。

[0026] 本发明还提供了药物配制剂,其包含本发明的任何抗 Ax1 抗体和药学可接受载体。在一些实施方案中,该药物配制剂进一步包含其它的治疗剂。在一些实施方案中,该其它的治疗剂选自 VEGF 拮抗剂、EGFR 拮抗剂、和化疗剂。

[0027] 本发明还提供了本文所述任何抗 Ax1 抗体,其用作药物。在一些实施方案中,用途为治疗癌症。在一些实施方案中,用途为治疗免疫病症、心血管病症、血栓形成或糖尿病。在一些实施方案中,用途为抑制细胞增殖。在一些实施方案中,用途为促进 Ax1 下调。在一些实施方案中,用途为抑制血管发生。

[0028] 本发明还提供了本文所述任何抗 Ax1 抗体,其用于制备药物。在一些实施方案中,该药物用于治疗癌症。在一些实施方案中,该药物用于治疗免疫病症、心血管病症、血栓形成或糖尿病。在一些实施方案中,该药物用于抑制细胞增殖、抑制血管发生、促进 Ax1 下调、抑制转移、抑制血管发生。

[0029] 本发明还提供了治疗具有癌症的个体的方法,包括对个体施用有效量的本文中公开的任何抗 Ax1 抗体。在一些实施方案中,该方法进一步包括对个体施用其它的治疗剂。在一些实施方案中,该其它的治疗剂选自下组 :VEGF 拮抗剂,EGFR 拮抗剂和化疗剂。

[0030] 本发明还提供了治疗具有免疫病症、心血管病症、血栓形成或糖尿病的个体的方法,包括对个体施用有效量的本文中公开的任何抗 Ax1 抗体。

[0031] 本发明还提供了在个体在抑制血管发生、抑制细胞增殖、促进 Ax1 受体下调或抑制转移的方法,包括对个体施用有效量的本文中公开的任何抗 Ax1 抗体以抑制血管发生、抑制细胞增殖、促进 Ax1 受体下调或抑制转移。

[0032] 本发明还提供了抑制组成性 Ax1 激活的方法,包括对个体施用有效量的本文中公开的任何抗 Ax1 抗体以抑制组成性 Ax1。

[0033] 一方面,本发明提供了用于治疗患有与 EGFR 激活突变或 EGFR 基因扩增有关的癌症的受试者的方法,其中该受试者已经对 EGFR 拮抗剂治疗形成抗性,包括确定该受试者是否具有 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,并对那些具有 Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增的受试者施用 EGFR 拮抗剂和本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0034] 一方面,本发明提供了用于治疗患有与 EGFR 激活突变或 EGFR 基因扩增有关的癌症的受试者的方法,包括 : (i)监测正在用 EGFR 拮抗剂治疗的受试者以确定该受试者是否形成 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,并(ii)在该受试者已经形成 Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增的情况中,修改该受试者的治疗方案以在该 EGFR 拮抗剂之外还包括本文所述

任何抗 Ax1 抗体。

[0035] 一方面,本发明提供了用于治疗患有与 EGFR 激活突变或 EGFR 基因扩增有关的癌症的受试者的方法,包括:(i)监测正在用 EGFR 拮抗剂治疗的受试者以确定该受试者是否形成对该抑制剂的抗性,(ii)测试该受试者以确定该受试者是否具有 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,并(iii)在该受试者具有 Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增的情况中,修改该受试者的治疗方案以在该 EGFR 拮抗剂之外还包括本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0036] 一方面,本发明提供了用于评估 EGFR 拮抗剂的方法,包括:(i)监测正在用 EGFR 拮抗剂治疗的受试者群体以鉴定那些对该治疗剂形成抗性的受试者,(ii)测试抗性受试者以确定该受试者是否具有 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,并(iii)在该受试者具有 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增的情况中,修改该受试者的治疗方案以在该 EGFR 拮抗剂之外还包括本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0037] 一方面,本发明提供了用于降低癌细胞中 EGFR 磷酸化的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触的步骤。

[0038] 一方面,本发明提供了用于降低癌细胞中 PI3K 介导的信号传导的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触的步骤。

[0039] 一方面,本发明提供了用于降低癌细胞中 EGFR 介导的信号传导的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触。

[0040] 一方面,本发明提供了用于恢复癌细胞对 EGFR 拮抗剂的敏感性的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触。

[0041] 一方面,本发明提供了用于降低癌细胞生长或增殖的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触的步骤。

[0042] 一方面,本发明提供了用于提高癌细胞凋亡的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触的步骤。

[0043] 一方面,本发明提供了用于降低癌细胞对 EGFR 拮抗剂的抗性的方法,其中所述癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性,且其中所述细胞包含 Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触的步骤。

[0044] 一方面,本发明提供了用于治疗癌细胞中获得性 EGFR 拮抗剂的方法,其中所述细胞包含 Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增,包括使该细胞与本文所述任何抗 Ax1 抗体和 EGFR 拮抗剂接触。

[0045] 在一些实施方案中,该癌细胞为任何 EGFR 衍生癌症。在一些实施方案中,该癌细胞包含 EGFR 激活突变。在一些实施方案中,该癌细胞包含 EGFR 基因扩增。在一些实施方案中,该 EGFR 基因扩增为至少 2 倍。在一些实施方案中,该 Ax1 扩增为至少 2 倍。在一些实施方案中,该癌细胞包含与对 EGFR 拮抗剂的抗性升高有关的 EGFR 基因突变。在一些实

施方案中,该与对 EGFR 拮抗剂的抗性升高有关的 EGFR 基因突变为 EGFR 的 T790M 突变。在一些实施方案中,该 EGFR 拮抗剂为小分子治疗剂、核酸治疗剂、或蛋白质治疗剂。在一些实施方案中,该 EGFR 拮抗剂为抗体、反义分子、或小分子激酶抑制剂。在一些实施方案中,该 EGFR 拮抗剂为选自下组的 EGFR 激酶抑制剂:吉非替尼 (gefitinib),厄洛替尼,西妥昔单抗 (cetuximab), panitumumab。在一些实施方案中,该 EGFR 拮抗剂为选自下组的抗 EGFR 抗体:西妥昔单抗, panitumumab。在一些实施方案中,该核酸治疗剂为 siRNA 分子。

[0046] 一方面,本发明提供了用于鉴定作为 EGFR 拮抗剂和本文所述任何抗 Ax1 抗体治疗候选者的受试者的方法,其中所述受试者已经用 EGFR 拮抗剂治疗过且患有已经对所述 EGFR 拮抗剂获得了抗性的癌症,包括检测来自所述受试者的癌细胞中的 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增。

[0047] 一方面,本发明提供了用于鉴定正在用 EGFR 拮抗剂治疗且有风险对所述 EGFR 拮抗剂获得抗性的受试者的方法,包括检测来自所述受试者的癌细胞中 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增的存在,其中所述 Ax1 表达、Ax1 激活突变或 Ax1 基因扩增的存在指示获得所述抗性的风险。

[0048] 一方面,本发明提供了用于治疗患有对 EGFR 拮抗剂治疗有抗性的癌症的受试者的方法,包括对该受试者施用 EGFR 拮抗剂和本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0049] 一方面,本发明提供了用于治疗患有与 EGFR 激活突变或 EGFR 基因扩增有关的癌症的受试者的方法,其中该受试者已经对 EGFR 拮抗剂治疗形成抗性,包括确定该受试者是否具有 Ax1 表达,诸如升高的 Ax1 水平和 / 或活性,并对那些具有 Ax1 表达,诸如升高的 Ax1 活性的受试者施用 EGFR 拮抗剂和本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0050] 一方面,本发明提供了用于治疗患有与 EGFR 激活突变或 EGFR 基因扩增有关的癌症的受试者的方法,包括:(i)监测正在用 EGFR 拮抗剂治疗的受试者以确定该受试者是否形成 Ax1 表达,诸如升高的水平和 / 或 Ax1 活性,并(ii)在该受试者已经形成 Ax1 表达,诸如升高的 Ax1 水平和 / 或活性的情况中,修改该受试者的治疗方案以在该 EGFR 拮抗剂之外还包括本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0051] 一方面,本发明提供了用于治疗患有与 EGFR 激活突变或 EGFR 基因扩增有关的癌症的受试者的方法,包括:(i)监测正在用 EGFR 拮抗剂治疗的受试者以确定该受试者是否形成对该抑制剂的抗性,(ii)测试该受试者以确定该受试者是否具有 Ax1 表达,诸如升高的 Ax1 水平和 / 或活性,并(iii)在该受试者具有升高的 Ax1 水平和 / 或活性的情况中,修改该受试者的治疗方案以在该 EGFR 拮抗剂之外还包括本文所述任何抗 Ax1 抗体。

[0052] 另一方面,本发明提供了用于(i)恢复癌细胞对 EGFR 拮抗剂的敏感性,(ii)降低癌细胞对 EGFR 拮抗剂的抗性,和 / 或(iii)治疗癌细胞中获得性 EGFR 拮抗剂的方法,其通过使该细胞与 EGFR 拮抗剂和本文所述任何抗 Ax1 抗体接触来进行。在例示性实施方案中,该癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性且包含升高的 Ax1 活性和 / 或表达水平,例如与 Ax1 基因中的激活突变、Ax1 基因扩增、或 Gas6 介导的 Ax1 激活有关的。本文中公开的方法可用于恢复癌细胞的敏感性、降低癌细胞的抗性、和 / 或治疗癌细胞的获得性抗性。

[0053] 另一方面,本发明提供了用于降低癌细胞生长和 / 或增殖或提高癌细胞凋亡的方法,其通过使该细胞与 EGFR 拮抗剂和本文所述任何抗 Ax1 抗体接触来进行。在例示性实施方案中,该癌细胞已经对 EGFR 拮抗剂获得了抗性且包含升高的 Ax1 活性和 / 或表达,例如

与 Ax1 基因中的激活突变、Ax1 基因扩增、或 Gas6 介导的 Ax1 激活有关的。

[0054] 附图简述

[0055] 图 1A-F:抗 FGFR3 抗体的重链和轻链 HVR 环序列。该图显示重链 HVR 序列, H1, H2, 和 H3, 和轻链 HVR 序列, L1, L2, 和 L3。氨基酸位置依照 Kabat 编号系统来编号, 如本文中描述的。

[0056] 图 2:描绘抗 Ax1 抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0057] 图 3A-B 和 4:描绘在实施本发明中使用的例示性受体人共有框架序列, 序列标示符如下:

[0058] 可变重(VH)共有框架(图 3A-B)

[0059] 人 VH 亚组 I 共有框架减去 Kabat CDR (以出现的次序分别为 SEQ ID NO:131-133 和 125)

[0060] 人 VH 亚组 I 共有框架减去延伸的高变区(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:134-135, 133, 125, 134-136, 125, 134-135, 137 和 125)

[0061] 人 VH 亚组 II 共有框架减去 Kabat CDR(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:138-140 和 125)

[0062] 人 VH 亚组 II 共有框架减去延伸的高变区(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:141-142, 140, 125, 141-143, 125, 141-142, 144 和 125)

[0063] 人 VH 亚组 II 共有框架减去延伸的人 VH 亚组 III 共有框架减去 Kabat CDR(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:145-147 和 125)

[0064] 人 VH 亚组 III 共有框架减去延伸的高变区(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:122-123, 147, 125, 122-123, 148, 125 和 122-125)

[0065] 人 VH 受体框架减去 Kabat CDR(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:149, 146, 150 和 125)

[0066] 人 VH 受体框架减去延伸的高变区(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:122-123, 150, 125, 122-123, 151 和 125)

[0067] 人 VH 受体 2 框架减去 Kabat CDR (以出现的次序分别为 SEQ ID NO:149, 146, 152 和 125)

[0068] 人 VH 受体 2 框架减去延伸的高变区(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:122-123, 152, 125, 122-123, 153, 125, 122-123, 154 和 125)

[0069] 可变轻(VL)共有框架 s (图 4)

[0070] 人 VL 卡帕亚组 I 共有框架(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:126-129)

[0071] 人 VL 卡帕亚组 II 共有框架(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:155-157 和 129)人 VL 卡帕亚组 III 共有框架(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:158-160 和 129)人 VL 卡帕亚组 IV 共有框架(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:161-163 和 129)

[0072] 图 5:描绘 huMAb4D5-8 轻链(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:126-127, 164 和 129)和重链(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:122-123, 154 和 125)的框架区序列。以上标 / 粗体表示的数字指出依照 Kabat 的氨基酸位置。

[0073] 图 6:描绘 huMAb4D5-8 轻链(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:126-129)和重链(以出现的次序分别为 SEQ ID NO:122-125)的修饰的 / 变异的框架区序列。以上标 / 粗体表

示的数字指出依照 Kabat 的氨基酸位置。

[0074] 图 7A-H :Ax1 单抗 YW327.6S2 的表征。A-B。使用 BIAcore 进行的 YW327.6S2 的亲合力测量。使用一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型来计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。以比率 k_{on}/k_{off} 推导平衡解离常数(Kd)。C。YW327.6S2 的交叉反应性。YW327.6S2 与鼠和猕猴 Ax1 但不与 Tyro3 或 Mer 交叉反应。将板用抗人 IgG Fc 包被,然后与人 Ax1、Mer、Tyro3Fc、小鼠或猕猴 Ax1Fc 一起温育。清洗后,添加同种型对照抗体或 YW327.6S2,接着是 HRP 偶联的抗人 IgG。D-E。YW327.6S2 阻断 Gas6 结合 Ax1。图 7D :ELISA。将板用抗人 IgG Fc 包被,并与人 Ax1-Fc 一起温育。清洗后,在有或无抗体的情况中添加 Gas6。通过生物素化抗 Gas6 抗体和链霉亲和素-HRP 偶联物来检测 Gas6 的结合。图 7E :FACS。收获 HUVEC,并用 YW327.6S2 或对照抗体处理,然后与 Gas6 一起在冰上温育 30 分钟。通过生物素化抗 Gas6 抗体和链霉亲和素-PE 偶联物来检测 Gas6 对细胞表面的结合。F。YW327.6S2 下调 Ax1 表达。将 A549 细胞与 $1\mu\text{g/ml}$ YW327.6S2 一起温育所示时间,并通过 FACS 来测定细胞表面 Ax1 表达(上部小图),通过 Western 印迹分析来测定总蛋白质表达(下部小图)。G。YW327.6S2 抑制 Gas6 诱导的 Ax1 磷酸化和信号传导。将 H1299 细胞在无血清培养基中培养过夜,与 YW327.6S2 一起预温育 4 小时,并用 Gas6 处理 30 分钟。通过 ELISA 来测量磷酸化的 Ax1 (上部小图),并通过 Western 印迹分析来测量磷酸化的 Akt (下部小图)。H。YW327.6S2 抑制 Baf3Ax1 细胞生长。使 Baf3Ax1 细胞在含有 200ng/ml Gas6 的培养基中生长,并以所示浓度用 YW327.6S2 处理 72 小时。通过 CellTiter Glo 测定法来测量细胞存活力。

[0075] 图 8A-F :YW327.6S2 削弱 A549 异种移植物肿瘤生长且增强抗 VEGF 的效果。A。肿瘤生长曲线。在均值肿瘤尺寸达到 100mm^3 时(第 0 天)开始,每周两次,以 10mg/kg (YW327.6S2 和同种型对照抗体)或 1mg/kg (抗 VEGF) IP 施用单抗。误差棒代表均值的标准误差(每项实验中的每个组 $n=10$)。 $p=0.0003$ (YW327.6S2 对对照), $p=10^{-11}$ (YW327.6S2 对组合)。B。各个处理组的 Kaplan-Meier 曲线。当小鼠的肿瘤尺寸达到 800mm^3 时,自研究移除小鼠,并对每组中剩余的动物(% 剩余)绘图。C。12A11 增强抗 VEGF 的效果。在均值肿瘤尺寸达到 100mm^3 时(第 0 天)开始,每周两次,分别以 30mg/kg 和 1mg/kg IP 施用 12A11 和抗 VEGF。误差棒代表均值的标准误差(每项实验中的每个组 $n=10$)。 $p=0.006$ (12A11 对对照); $p=0.0001$ (12A11 对组合)。D。YW327.6S2 下调 Ax1 表达。以 10mg/kg 用 YW327.6S2 处理小鼠,并在所示时间点取出肿瘤。通过 Western 印迹对来自肿瘤的细胞裂解物分析 Ax1 表达。E。YW327.6S2 诱导凋亡。取出用对照或 YW327.6S2 处理 2 周的肿瘤,并实施 CC3IHC 以测量凋亡。F。YW327.6S2 增强抗 VEGF 在降低肿瘤内血管密度方面的效果。在给药后 0 和 72 小时自如上文 D 中所述处理的小鼠取出肿瘤,并且肿瘤血管系统通过 MECA32 免疫组织化学染色来显现并通过图像分析来定量(表述成平方微米)。对每一对实施 Student's t 检验(对照对组合为 $p<0.05$)。

[0076] 图 9A-B :YW327.6S2 在 A549 异种移植物模型中增强厄洛替尼和化疗的抗肿瘤效果。A。YW327.6S2 增强厄洛替尼的效果。抗体施用与图 2 中的相同。通过口腔管饲法以 100mg/kg/d 施用厄洛替尼。每组 $n=10$ 。 $p=1.7\times 10^{-9}$ (YW327.6S2 对对照), $p=2.3\times 10^{-10}$ (YW327.6S2 对组合)。B。YW327.6S2 增强化疗。抗体施用与图 2 中的相同。分别以持续 5 天 6.25mg/kg/d 及处理开始时(第 0 天)单剂 100mg/kg 皮下施用帕利他赛和卡铂。每组

$n=10$ 。 $p=3 \times 10^{-5}$ (YW327.6S2 对对照), $p=10^{-9}$ (化疗对对照), $p=10^{-5}$ (组合对单独的化疗)。

[0077] 图 10A-G: YW327.6S2 通过调控肿瘤基质功能来削弱 MDA-MB-231 异种移植肿瘤生长。A 和 B。YW327.6S2 而非 12A11 降低 MDA-MB-231 肿瘤生长且增强抗 VEGF 的效果。在均值肿瘤尺寸达到 100mm^3 时(第 0 天)开始,每周两次,以 20mg/kg (YW327.6S2 和同种型对照抗体)、 30mg/kg (12A11)和 2mg/kg (抗 VEGF)IP 施用单抗。误差棒代表均值的标准误差(每项实验中的每个组 $n=10$)。 $p=8.5 \times 10^{-6}$ (YW327.6S2 对对照), $p=2.8 \times 10^{-8}$ (YW327.6S2 对组合), $p=0.05$ (12A11 对对照), $p=0.145$ (抗 VEGF 对组合)。C 和 D。YW327.6S2 下调 Ax1 表达。以 20mg/kg 用单抗处理携带 MDA-MB231 异种移植肿瘤(平均尺寸 500mm^3)的小鼠,并在所示时间点取出肿瘤。在 Ax1 表达的 Western 印迹分析中使用来自肿瘤的组织裂解物。E。YW327.6S2 降低肿瘤相关血管系统的密度。在给药后 0 小时和 1 周取出如上文 C 中所述处理的小鼠的肿瘤,并且肿瘤血管系统通过 MECA32 免疫组织化学染色显现并通过图像分析来定量(表述成平方微米)。对每一对实施 Student's t 检验(YW327.6S2 对对照、抗 VEGF 对对照、和抗 VEGF 对组合为 $p<0.05$)。F。Ax1 在原发性人乳腺癌的浸润巨噬细胞中高表达。使用免疫组织化学来检查 79 份原发性肿瘤。这些肿瘤中 21% 在浸润巨噬细胞中表达高水平的 Ax1。通过抗 CD68 染色来鉴定巨噬细胞,并通过抗 Ax1/CD68 双重 IHC 来测定巨噬细胞上的 Ax1 表达。使用连续切片。G。YW327.6S2 抑制来自肿瘤相关巨噬细胞的炎性细胞因子/趋化因子分泌。以 20mg/kg 用对照抗体、YW327.6S2 或 12A11 处理携带 MDA-MB231 异种移植肿瘤(平均尺寸 500mm^3)的小鼠,并在 I 周处理后取出肿瘤。通过分选 F4/80 阳性细胞来分离肿瘤相关巨噬细胞,并培养过夜。使用 Bio-Plex 小鼠细胞因子测定试剂盒来测量分泌入培养基中的细胞因子和趋化因子。

[0078] 图 11A-B: YW327.6S2 降低 MDA-MB-231 乳腺癌细胞对骨的转移。A。尾静脉注射肿瘤细胞后 4 周的生物发光成像。给小鼠腹膜内(i.p.)注射 $200\text{ }\mu\text{L}$ 含 25mg/ml D- 萤光素(Invitrogen)的 PBS,并在成像期间使用异氟烷经鼻锥麻醉。在具有加强式电荷耦合器件照相机的 Photon Imager (Biospace Lab, Paris, France)上捕捉生物发光图像。B。胫骨切片的 H&E 染色。在实验结束时收集组织,在 4% 甲醛中固定,切片并用 H&E 染色。上部小图中的圆圈显示侵入骨的肿瘤细胞。下部小图显示骨髓中增生性细胞的详情。

[0079] 图 12: 一种例示性人 Ax1 序列, RefSeq NM_001699 (SEQ ID NO:165)。

[0080] 发明详述

[0081] I. 定义

[0082] 出于本文中的目的,“受体人框架”指包含自人免疫球蛋白框架或如下文定义的人共有框架衍生的轻链可变域(VL)框架或重链可变域(VH)框架的氨基酸序列的框架。自人免疫球蛋白框架或人共有框架“衍生”的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是 10 或更少、9 或更少、8 或更少、7 或更少、6 或更少、5 或更少、4 或更少、3 或更少、或 2 或更少。在一些实施方案中,VL 受体人框架与 VL 人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。

[0083] “亲和力”指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有指示,如本文中使用的,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可以用解离常数(Kd)来表述。亲和力可以通过本领域知道的常用方法来测

量,包括本文中所描述的方法。下文描述了用于测量结合亲和力的具体的说明性和例示性的实施方案。

[0084] “亲和力成熟的”抗体指在一个或多个高变区(HVR)中具有一处或多处改变的抗体,与不拥有此类改变的亲本抗体相比,此类改变导致该抗体对抗原的亲和力改善。

[0085] “血管发生病症”指血管发生的任何失调,包括非新生物的和新生物的疾患。新生物疾患包括但不限于下文所描述的那些(见例如“癌症”)。非新生物病症包括但不限于不想要的或异常的肥大、关节炎、类风湿性关节炎(RA)、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化斑块、糖尿病性和其它增殖性视网膜病包括早产儿视网膜病、晶状体后纤维组织增生、新血管性青光眼(neovascular glaucoma)、年龄相关黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、角膜移植片排斥、视网膜/脉络膜新血管形成、眼角的新血管形成(发红)、眼新血管疾病、血管再狭窄、动静脉畸形(AVM)、脑脊膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生(包括格雷夫斯氏(Graves)病)、角膜和其它组织移植、慢性炎症、肺炎、急性肺损伤/ARDS、败血症、原发性肺动脉高压、恶性肺积液(malignant pulmonary effusion)、脑水肿(例如与急性中风/闭合性头部外伤/创伤有关的)、滑膜炎(synovial inflammation)、RA中的血管翳形成、骨化性肌炎、肥大性骨形成、骨关节炎(OA)、顽固性腹水、多囊卵巢病、子宫内膜异位症、第三空间流体病(3rd spacing of fluid diseases)(胰腺炎、间隔综合征、烧伤、肠病)、子宫纤维瘤(uterine fibroids)、早产、慢性炎症诸如IBD(克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎)、肾同种异体移植排斥、炎症肠病、肾病综合征、不想要的或异常的组织块生长(非癌性的)、血友病性关节、肥厚性瘢痕、毛发生长的抑制、奥-韦二氏(Osler-Weber)综合征、脓性肉芽肿晶状体后纤维组织增生、硬皮病、沙眼、血管粘连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液(诸如与心包炎有关的)和胸腔积液。

[0086] “抗血管发生剂”指阻断或在某种程度上干扰血管发育的化合物。抗血管发生因子可以是例如结合涉及促进血管发生的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。在一个实施方案中,抗血管发生剂是结合血管内皮生长因子(VEGF)的抗体,诸如贝伐单抗(AVASTIN®)。

[0087] 术语“抗Ax1抗体”和“结合Ax1的抗体”指能够以足够亲和力结合Ax1,使得该抗体可作为诊断剂和/或治疗剂用于靶向Ax1的抗体。在一个实施方案中,根据例如通过放射免疫测定法(RIA)的测量,抗Ax1抗体结合无关的、非Ax1的蛋白质的程度小于该抗体对Ax1的结合的约10%。在某些实施方案中,结合Ax1的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、或 $\leq 0.01\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 到 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 到 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗Ax1抗体结合在来自不同物种的Ax1中保守的Ax1表位。

[0088] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们展现出期望的抗原结合活性。

[0089] “抗体片段”指与完整抗体不同的分子,其包含完整抗体中结合完整抗体结合的抗原的部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0090] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中将参照抗体对其抗原的结合阻断 50% 或更多的抗体,且相反,参照抗体在竞争测定法中将该抗体对其抗原的结合阻断 50% 或更多。本文中提供了例示性的竞争测定法。

[0091] 在用于本文时,术语“Axl”指来自任何脊椎动物来源,包括哺乳动物诸如灵长类(例如人)和啮齿类(例如小鼠和大鼠)的任何天然 Axl,除非另有说明。该术语涵盖“全长”,未加工的 Axl 以及 Axl 因细胞中的加工所致的任何形式。该术语还涵盖 Axl 的天然存在变体,例如剪接变体或等位变体。一种例示性人 Axl 的氨基酸序列显示于图 12。

[0092] “Axl 活化”指 Axl 受体的活化或磷酸化。一般而言,Axl 活化导致信号转导(例如由 Axl 受体的细胞内激酶结构域引起的,磷酸化 Axl 或底物多肽中的酪氨酸残基)。Axl 活化可以由 Axl 配体(Gas6)结合感兴趣 Axl 受体来介导。Gas6 对 Axl 的结合可活化 Axl 的激酶结构域并由此导致 Axl 中酪氨酸残基的磷酸化和/或其它的底物多肽中酪氨酸残基的磷酸化。

[0093] 术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中典型特征为细胞生长/增殖不受调控的生理疾患。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝肉瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌(liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病和其它淋巴增殖性病症、及各种类型的头和颈癌。

[0094] 术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症指癌症。

[0095] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的实例包括烷化剂类(alkylating agents),诸如塞替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide) (**CYTOXAN®**);磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates),诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedpa)和乌瑞替派(uredepa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯类(acetogenin)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌(lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙素类(colchicines);白桦脂酸(betulinic acid);喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11(伊立替康(irinotecan), **CAMPTOSAR®**),乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和 9-氨基喜树碱);苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素(podophyllotoxin);鬼臼酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素 1 和隐藻素 8);多拉司他汀(dolastatin);duocarmycin(包括合成类似物,KW-2189 和

CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediynes) (如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Nicolaou 等人., Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994))); CDP323, 一种口服 α -4 整联蛋白抑制剂; 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂 (**DOXIL®**)、脂质体多柔比星 TLC D-99 (**MYOCET®**)、PEG 化脂质体多柔比星 (**CAELYX®**)、和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤、吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**)、替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**)、卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**)、埃坡霉素 (epothilone) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡萄糖内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide

glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defosfamide); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin) A、杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) ("Ara-C"); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇 (taxoids), 例如帕利他塞 (paclitaxel) (**TAXOL®**)、清蛋白改造的纳米颗粒剂型帕利他塞 (ABRAXANE™) 和多西他塞 (doxetaxel) (**TAXOTERE®**); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 6-硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptapurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) (例如 **ELOXATIN®**) 和卡铂 (carboplatin); 长春药类 (vincas), 其阻止微管蛋白聚合形成微管, 包括长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**), 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**), 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**), 和长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 亚叶酸 (leucovorin); 能灭瘤 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 伊本膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类维 A 酸 (retinoids), 诸如维 A 酸 (retinoic acid), 包括贝沙罗汀 (bexarotene) (**TARGRETIN®**); 二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) (例如 **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、依替膦酸钠 (etidronate) (**DIDROCAL®**), NE-58095、唑来膦酸 / 唑来膦酸盐 (zoledronic acid / zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿伦膦酸盐 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、帕米膦酸盐 (pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸盐 (tiludronate) (**SKELID®**) 或利塞膦酸盐 (risedronate) (**ACTONEL®**); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗, 诸如 **THERATOPE®** 疫苗和基因疗法疫苗, 例如

ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和 VAXID®疫苗；拓扑异构酶 1 抑制剂（例如 LURTOTECAN®）；rmRH（例如 ABARELIX®）；BAY439006（sorafenib；Bayer）；SU-11248（sunitinib，SUTENT®，Pfizer）；哌立福辛（perifosine），COX-2 抑制剂（如塞来考昔（celecoxib）或艾托考昔（etoricoxib）），蛋白体抑制剂（例如 PS341）；bortezomib（VELCADE®）；CCI-779；tipifarnib（R11577）；orafenib，ABT510；Bcl-2 抑制剂，诸如 oblimersen sodium（GENASENSE®）；pixantrone；EGFR 抑制剂（见下文定义）；酪氨酸激酶抑制剂（见下文定义）；丝氨酸 - 苏氨酸激酶抑制剂，诸如雷帕霉素（rapamycin）（sirolimus，RAPAMUNE®）；法尼基转移酶抑制剂，诸如 lonafarnib（SCH6636，SARASARTM）；及任何上述各项的药学可接受盐、酸或衍生物；以及两种或更多种上述各项的组合，诸如 CHOP（环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写）和 FOLFOX（奥沙利铂（ELOXATIN™）联合 5-FU 和亚叶酸的治疗方案的缩写）。

[0096] 如本文中定义的化疗剂包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果作用的“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”类。它们自身可以是激素，包括但不限于：具有混合的激动剂 / 拮抗剂特性的抗雌激素类，包括他莫昔芬（tamoxifen）（NOLVADEX）、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬（toremifene）（FARESTON®）、艾多昔芬（idoxifene）、屈洛昔芬（droloxifene）、雷洛昔芬（raloxifene）（EVISTA®）、曲沃昔芬（trioxifene）、那洛昔芬（keoxifene），和选择性雌激素受体调节剂类（SERM），诸如 SERM3；没有激动剂特性的纯的抗雌激素类，诸如氟维司群（fulvestrant）（FASLODEX®）和 EM800（此类药剂可阻断雌激素受体（ER）二聚化、抑制 DNA 结合、提高 ER 周转、和 / 或遏制 ER 水平）；芳香酶抑制剂类，包括类固醇芳香酶抑制剂类，诸如福美坦（formestane）和依西美坦（exemestane）（AROMASIN®），和非类固醇芳香酶抑制剂类，诸如阿那曲唑（anastrozole）（ARIMIDEX®）、来曲唑（letrozole）（FEMARA®）和氨基葡萄糖（aminoglutethimide），和其它芳香酶抑制剂类，包括伏氯唑（vorozole）（RIVISOR®）、醋酸甲地孕酮（megestrol acetate）（MEGASE®）、法屈唑（fadrozole）和 4(5)-咪唑；促黄体生成激素释放激素激动剂类，包括亮丙瑞林（leuprolide）（LUPRON®和 ELIGARD®）、戈舍瑞林（goserelin）、布舍瑞林（buserelin）和曲普瑞林（triptorelin）；性类固醇类（sex steroids），包括妊娠素类（progestine），诸如醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮（medroxyprogesterone acetate），雌激素类，诸如二乙基己烯雌酚（diethylstilbestrol）和普雷马林（premarin），和雄激素类 / 类视黄酸类，诸如氟甲睾酮（fluoxymesterone）、所有反式视黄酸（transretionic acid）和芬维 A 胺（fenretinide）；奥那司酮（onapristone）；抗孕酮类；雌激素受体下调剂类（ERD）；抗雄激素类，诸如氟他米特（flutamide）、尼鲁米特（nilutamide）和比卡米特（bicalutamide）；及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物；以及两种或多种上述物质的组合。

[0097] 术语“嵌合”抗体指其中的重和 / 或轻链的一部分自特定的来源或物种衍生，而重和 / 或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

[0098] 抗体的“类”指其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。抗体有 5 大类：IgA、IgD、IgE、IgG、和 IgM，并且这些中的几种可以进一步分成亚类（同种型），例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、和 IgA₂。与不同类免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。

[0099] 如本文中所使用的,如例如应用于受体激酶活性,术语“组成性”指受体不依赖配体或其它活化性分子的存在的持续信号传导活性。根据受体的性质,所有活性可以是组成性的,或者受体的活性可以通过其它分子(例如配体)的结合而进一步活化。导致受体活化的细胞事件是本领域普通技术人员公知的。例如,活化可包括寡聚化(例如二聚化,三聚化,等)成高级受体复合物。复合物可包含单一种类的蛋白质,即同聚复合物。或者,复合物可包含至少两种不同蛋白质种类,即异聚复合物。可以通过例如受体的正常或突变体形式在细胞表面上的过表达来引起复合物形成。也可以通过受体中的一处或多处特定突变来引起复合物形成。

[0100] 术语“细胞抑制剂”指在体外或在体内阻滞细胞生长的化合物或组合物。如此,细胞抑制剂可以是显著降低处于 S 期的细胞百分比的药剂。细胞抑制剂的其它例子包括通过诱导 G0/G1 停滞或 M 期停滞来阻断细胞周期行进的药剂。人源化抗 Her2 抗体曲妥单抗(**HERCEPTIN®**)是诱导 G0/G1 阻滞的细胞抑制剂的一个例子。经典的 M 期阻断剂包括长春药类(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、紫杉烷类(taxanes)、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。某些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和 ara-C。更多信息可参见 Mendelsohn 和 Israel 编,《The Molecular Basis of Cancer》,第 1 章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antieoplastic drugs”, Murakami 等, W.B. Saunders, Philadelphia, 1995, 例如第 13 页。紫杉烷类(帕利他塞(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel))是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛(**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer)是帕利他塞(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。帕利他塞和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定,导致对细胞中有丝分裂的抑制。

[0101] 在用于本文时,术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒剂包括但不限于:放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和 Lu 的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱类(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素(mitomycin)C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;及下文公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0102] “效应器功能”指那些可归于抗体 Fc 区且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括:C1q 结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如 B 细胞受体)下调;和 B 细胞活化。

[0103] 药剂(例如药物配制剂)的“有效量”指在必需的剂量和时段上有效实现期望的治

疗或预防结果的量。

[0104] 本文中的术语“Fc 区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区一部分的 C 端区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在一个实施方案中,人 IgG 重链 Fc 区自 Cys226,或自 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而,Fc 区的 C 端赖氨酸 (Lys447) 可以存在或不存在。除非本文中另有规定,Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照 EU 编号系统,又称作 EU 索引,如记载于 Kabat 等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版 Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991。

[0105] “框架”或“FR”指除高变区 (HVR) 残基外的可变域残基。一般地,可变域的 FR 由 4 个 FR 域组成:FR1、FR2、FR3、和 FR4。因而,HVR 和 FR 序列在 VH (或 VL) 中一般以如下的顺序出现:FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4。

[0106] 术语“全长抗体”、“完整抗体”、“和“全抗体”在本文中可互换使用,指与天然抗体结构具有基本上类似的结构或者具有含有如本文中所限定的 Fc 区的重链的抗体。

[0107] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”、“和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已经导入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。

[0108] “人抗体”指拥有与由人或人细胞生成的或利用人抗体全集或其它人抗体编码序列自非人来源衍生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0109] “人共有框架”指代表人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列选集中最常存在的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列选集来自可变域序列亚组。通常,序列亚组是如 Kabat 等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication91-3242,Bethesda MD(1991),第 1-3 卷中的亚组。在一个实施方案中,对于 VL,亚组是如 Kabat 等,见上文中的亚组 κ I。在一个实施方案中,对于 VH,亚组是如 Kabat 等,见上文中的亚组 III。

[0110] “人源化”抗体指包含来自非人 HVR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体会包含至少一个,通常两个基本上整个可变域,其中所有或基本上所有 HVR (例如,CDR) 对应于非人抗体的那些,且所有或基本上所有 FR 对应于人抗体的那些。任选地,人源化抗体可以至少包含自人抗体衍生的抗体恒定区的一部分。抗体,例如非人抗体的“人源化形式”指已经经历人源化的抗体。

[0111] 在用于本文时,术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中在序列上高变的和 / 或形成结构上限定的环(“高变环”)的每个区。一般地,天然的 4 链抗体包含 6 个 HVR;三个在 VH 中(H1、H2、H3),且三个在 VL 中(L1、L2、L3)。HVR 一般包含来自高变环和 / 或来自“互补决定区”(CDR) 的氨基酸残基,后一种是最高序列变异性的和 / 或牵涉抗原识别。例示性的高变环存在于氨基酸残基 26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)、和 96-101(H3)。(Chothia 和 Lesk,J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。例示性的 CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、和 CDR-H3) 存在于 L1 的氨基酸残基 24-34、L2 的 50-56、L3 的 89-97、H1 的 31-35B、H2 的 50-65、和 H3 的 95-102(Kabat 等,Sequences

of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除了 VH 中的 CDR1 外, CDR 一般包含形成高变环的氨基酸残基。CDR 还包含“特异性决定残基”, 或“SDR”, 其是接触抗原的残基。SDR 包含在称作缩短的 -CDR, 或 a-CDR 的 CDR 区内。例示性的 a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、和 a-CDR-H3) 存在于 L1 的氨基酸残基 31-34、L2 的 50-55、L3 的 89-96、H1 的 31-35B、H2 的 50-58、和 H3 的 95-102 (见 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))。除非另有指示, 可变域中的 HVR 残基和其它残基 (例如, FR 残基) 在本文中依照 Kabat 等, 见上文编号。

[0112] “免疫缀合物”指与一种或多种异源分子, 包括但不限于细胞毒剂缀合的抗体。

[0113] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物 (例如, 牛、绵羊、猫、犬、和马)、灵长类 (例如, 人和非人灵长类诸如猴)、家兔、和啮齿类 (例如, 小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 个体或受试者是人。

[0114] “抑制细胞生长或增殖”意味着将细胞的生长或增殖降低至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或 100%, 而且包括诱导细胞死亡。

[0115] “分离的”抗体指已经与其天然环境的组分分开的抗体。在一些实施方案中, 抗体纯化至大于 95% 或 99% 的纯度, 如通过例如电泳 (例如, SDS-PAGE、等电聚焦 (IEF)、毛细管电泳) 或层析 (例如, 离子交换或反相 HPLC) 测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述, 见例如 Flatman 等, J. Chromatogr. B848:79-87 (2007)。

[0116] “分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子, 但是核酸分子在染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置处存在。

[0117] “编码抗 Ax1 抗体的分离的核酸”指编码抗体重和轻链 (或其片段) 的一种或多种核酸分子, 包括单一载体或不同载体中的此类核酸分子, 和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0118] 如本文中所使用的, 如例如应用于受体信号传导活性, 术语“不依赖配体的”指不依赖配体的存在的信号传导活性。具有不依赖配体的激酶活性的受体不会必然排除配体结合该受体以产生额外的激酶活性活化。

[0119] 在用于本文时, 术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即构成群体的各个抗体是相同的和 / 或结合相同表位, 除了例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的生成期间发生的可能的变体抗体外, 此类变体一般以极小量存在。与通常包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制备物不同, 单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。如此, 修饰语“单克隆”指示抗体自一群基本上同质的抗体获得的特性, 而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如, 可以通过多种技术来生成要依照本发明使用的单克隆抗体, 包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示方法、和利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法, 本文中描述了用于生成单克隆抗体的此类方法和其它例示性方法。

[0120] “裸抗体”指未与异源模块 (例如细胞毒性模块) 或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物配制剂中。

[0121] “天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如, 天然 IgG 抗体

是约 150,000 道尔顿的异四聚糖蛋白,由二硫化物键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从 N 至 C 端,每条重链具有一个可变区 (VH),又称作可变重域或重链可变域,接着是三个恒定域 (CH1、CH2、和 CH3)。类似地,从 N 至 C 端,每条轻链具有一个可变区 (VL),又称作可变轻域或轻链可变域,接着是一个恒定轻 (CL) 域。根据其恒定域氨基酸序列,抗体轻链可归入两种类型中的一种,称作卡帕 (κ) 和拉姆达 (λ)。

[0122] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书,其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和 / 或警告的信息。

[0123] 关于参照多肽序列的“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”定义为比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式进行,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以决定用于比对序列的合适参数,包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而,为了本发明的目的,% 氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序 ALIGN-2 产生的。ALIGN-2 序列比较计算机程序由 Genentech, Inc. 编写,并且源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局 (US Copyright Office, Washington D. C., 20559), 其中其以美国版权注册号 TXU510087 注册。公众自 Genentech, Inc., South San Francisco, California 可获得 ALIGN-2 程序,或者可以从源代码编译。ALIGN2 程序应当编译成在 UNIX 操作系统,包括数码 UNIX V4.0D 上使用。所有序列比较参数由 ALIGN-2 程序设定且不变。

[0124] 在采用 ALIGN-2 来比较氨基酸序列的情况中,给定氨基酸序列 A 相对于 (to)、与 (with)、或针对 (against) 给定氨基酸序列 B 的 % 氨基酸序列同一性 (或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列 B 的某一 % 氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列 A) 如下计算:

[0125] 分数 X/Y 乘 100 其中 X 是由序列比对程序 ALIGN-2 在该程序的 A 和 B 比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数,且其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。应当领会,若氨基酸序列 A 的长度与氨基酸序列 B 的长度不相等,则 A 相对于 B 的 % 氨基酸序列同一性将不等于 B 相对于 A 的 % 氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中所使用的所有 % 氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用 ALIGN-2 计算机程序获得的。

[0126] 术语“药物配制剂”指处于如下的形式,使得容许其中含有的活性成分的生物学活性是有效的,且不含对会接受配制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的其它的组分的制剂。

[0127] “药学可接受载体”指药物配制剂中与活性成分不同的,且对受试者无毒的成分。药学可接受载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂、或防腐剂。

[0128] 在用于本文时,“治疗 / 处理” (及其语法变型) 指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预,并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻 / 减少疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速率、改善或减轻疾病状态、和消退或改善的预后。在一些实施方

案中,使用本发明的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

[0129] 术语“肿瘤”指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

[0130] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重或轻链中牵涉抗体结合抗原的域。天然抗体的重链和轻链可变域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,其中每个域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)。(见例如Kindt等Kuby Immunology,第6版,W. H. Freeman and Co.,第91页(2007))。单个VH或VL域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,可以分别使用来自结合抗原的抗体的VH或VL域筛选互补VL或VH域的文库来分离结合特定抗原的抗体。见例如,Portolano等,J. Immunol. 150:880-887(1993);Clarkson等,Nature352:624-628(1991)。

[0131] 在用于本文时,术语“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制型核酸结构的载体及整合入接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0132] “VH亚组III共有框架”包含自Kabat等人的可变重亚组III中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中,VH亚组III共有框架氨基酸序列包含下述序列每一项的至少部分或整个:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(SEQ ID NO:122)-H1-WVRQAPGKGLEWV(SEQ ID NO:123)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC(SEQ ID NO:124)-H3-WGQGTTLTVSS(SEQ ID NO:125)。“VL亚组I共有框架”包含自Kabat等人的可变轻卡帕亚组I中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中,VL亚组I共有框架氨基酸序列包含下述序列每一项的至少部分或整个:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:126)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:127)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:128)-L3-FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:129)。

[0133] II. 组合物和方法

[0134] 一方面,本发明部分基于多种Ax1结合剂(诸如抗体及其片段)的鉴定。Ax1代表一种重要且有利的治疗靶,而且本发明提供了基于药剂对Ax1的结合的组合物和方法。如本文中描述的,本发明的Ax1结合剂提供重要的治疗剂和诊断剂,用于靶向与Ax1信号传导途径的表达和/或活性有关的病理状况。在某些实施方案中,提供了与Ax1结合的抗体。本发明的抗体可用于例如癌症的诊断和治疗。

[0135] A. 例示性抗Ax1抗体

[0136] 一方面,本发明提供了与Ax1结合的分选的抗体。在某些实施方案中,抗Ax1抗体以 $\leq 550\text{pM}$ 的亲和力结合人Ax1,而且在一些实施方案中,以 $\leq 1\text{nM}$ 的亲和力结合小鼠Ax1。在一些实施方案中,抗Ax1抗体结合人和小鼠Ax1。

[0137] 在一些实施方案中,抗Ax1抗体诱导细胞表面(例如肿瘤细胞表面)上的Ax1受体表达下调。在一些实施方案中,细胞表面Ax1表达降低至Ax1抗体处理缺失下Ax1细胞表面表达的80%。在一些实施方案中,细胞表面表达降低至Ax1抗体处理缺失下Ax1细胞表面表达的少于70%、少于60%、少于50%或少于40%。在一些实施方案中,细胞(例如肿瘤细胞)中的总Ax1表达降低至少于Ax1抗体处理缺失下总Ax1表达的80%。在一些实施方案中,总Ax1表达降低至Ax1抗体处理缺失下总Ax1表达的少于70%、少于60%、少于50%或少于

40%。在一些实施方案中, Ax1 表达的下调快速发生且持续至少 24 小时。

[0138] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体抑制组成性 Ax1 活性。

[0139] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体不与 Sky 或 Mer 发生显著交叉反应。在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体不与 Sky 或 Mer 发生显著结合, 而且结合人和小鼠 Ax1。

[0140] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体抑制 Ax1 活性。

[0141] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体促进细胞(例如肿瘤细胞, 诸如 A549 肿瘤细胞)的凋亡。在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体抑制 Ax1 配体(例如 Gas6)与 Ax1 结合。在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体抑制 Ax1 下游信号传导。在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体抑制 Gas-6 依赖性细胞增殖。在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体抑制来自肿瘤相关巨噬细胞的炎性细胞因子表达。在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体通过调控肿瘤基质功能来抑制肿瘤生长和 / 或转移。

[0142] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体结合包含下述氨基酸序列、基本上由下述氨基酸序列组成或由下述氨基酸序列组成的多肽: MAWRCPMRGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPPEVHWLRDQGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSPQGYVG (SEQ ID NO:111)。

[0143] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体结合包含下述氨基酸序列、基本上由下述氨基酸序列组成或由下述氨基酸序列组成的多肽: ITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (SEQ ID NO:130)。

[0144] 在一些实施方案中, 该抗体结合包含成熟 Ax1 氨基酸序列氨基酸编号 1-122、基本上由成熟 Ax1 氨基酸序列氨基酸编号 1-122 组成或由成熟 Ax1 氨基酸序列氨基酸编号 1-122 组成的多肽。

[0145] 在一些实施方案中, 该抗体结合包含成熟 Ax1 氨基酸序列氨基酸编号 221-234、基本上由成熟 Ax1 氨基酸序列氨基酸编号 221-234 组成或由成熟 Ax1 氨基酸序列氨基酸编号 221-234 组成的多肽。

[0146] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体结合与序列 MAWRCPMRGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPPEVHWLRDQGQILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSPQGYVG (SEQ ID NO:111) 具有至少 70%、80%、90%、95%、98% 序列同一性或相似性的氨基酸序列。

[0147] 在一些实施方案中, 抗 Ax1 抗体结合与序列 ITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (SEQ ID NO:130) 具有至少 70%、80%、90%、95%、98% 序列同一性或相似性的氨基酸序列。

[0148] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR: (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6。

[0149] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR: (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸

序列 SEQ ID NO:8 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0150] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:13 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:14 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:16 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:17 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18。

[0151] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:19 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:20 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:22 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24。

[0152] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:25 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:26 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30。

[0153] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:31 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:32 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:34 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:35 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。

[0154] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:38 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:40 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:41 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。

[0155] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:43 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:44 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:46 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:48。

[0156] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:49 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:50 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:53 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54。

[0157] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六

种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:55 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:56 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:58 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:59 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:60。

[0158] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:61 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:63 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:64 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:65 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:66。

[0159] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:67 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:68 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:70 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:71 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:72。

[0160] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:73 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:74 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:76 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:77 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:78。

[0161] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:79 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:82 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:83 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84。

[0162] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:85 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:86 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:88 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:90。

[0163] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:91 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:92 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:94 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:95 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:96。

[0164] 一方面, 本发明提供了抗 Ax1 抗体, 其包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:97 ; (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:98 ; (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99 ; (d) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:100 ; (e) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:101 ; 和 (f) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:102。

[0165] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3。

[0166] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。

[0167] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:13;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:14;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15。

[0168] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:19;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:20;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21。

[0169] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:25;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:26;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27。

[0170] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:31;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:32;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33。

[0171] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:38;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39。

[0172] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:43;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:44;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45。

[0173] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:49;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:50;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51。

[0174] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:55;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:56;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57。

[0175] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:61;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:63。

[0176] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:67;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:68;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69。

[0177] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:73;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:74;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75。

[0178] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:79;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80;和(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81。

[0179] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:85;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:86;和(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87。

[0180] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:91;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:92;和(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93。

[0181] 一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体,其包含至少一种、两种或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:97;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:98;和(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99。

[0182] 在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:63。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99。

[0183] 在另一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3 和 HVR-L3,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45,该 HVR-L3 包含氨基酸序列

个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3、HVR-L3 和 HVR-H2,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:78,该 HVR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:74。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3、HVR-L3 和 HVR-H2,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84,该 HVR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3、HVR-L3 和 HVR-H2,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:90,该 HVR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:86。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3、HVR-L3 和 HVR-H2,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:96,该 HVR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:92。在一个实施方案中,该抗体包含 HVR-H3、HVR-L3 和 HVR-H2,该 HVR-H3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99,该 HVR-L3 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:102,该 HVR-H2 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:98。

[0185] 在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:13;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:14;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:19;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:20;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:25;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:26;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:31;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:32;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:38;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:43;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:44;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:49;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:50;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:55;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:56;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:61;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:63。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:67;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:68;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:73;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:74;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:79;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81。在又一个实施方案中,

该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:85 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:86 ;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:91 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:92 ;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93。在又一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:97 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:98 ;和 (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99。

[0186] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6。

[0187] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0188] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:16 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:17 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18。

[0189] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:22 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24。

[0190] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30。

[0191] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:34 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:35 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。

[0192] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:40 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:41 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。

[0193] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:46 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:48。

[0194] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:53 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54。

[0195] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:58 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:59 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:60。

[0196] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:64 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:65 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:66。

[0197] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:70;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:71;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:72。

[0198] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:76;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:77;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:78。

[0199] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:82;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:83;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84。

[0200] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:88;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:90。

[0201] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:94;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:95;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:96。

[0202] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:100;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:101;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:102。

[0203] 在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:16;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:17;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:22;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:34;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:35;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:40;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:41;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:46;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:48。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:53;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:58;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:59;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:60。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:64;(b)HVR-L2,其包含氨

氨基酸序列 SEQ ID NO:65 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:66。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:70 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:71 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:72。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:76 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:77 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:78。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:82 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:83 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:88 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:90。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:94 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:95 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:96。在一个实施方案中,该抗体包含 (a)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:100 ;(b)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:101 ;和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:102。

[0204] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列 : (i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3 ;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列 : (i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6。

[0205] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列 : (i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9 ;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列 : (i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0206] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列 : (i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:13, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:14,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15 ;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列 : (i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:16, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:17,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18。

[0207] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列 : (i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:19, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:20,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21 ;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列 : (i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:22, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24。

[0208] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列 : (i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:25, (ii)HVR-H2,其包

含氨基酸序列 SEQ ID NO:26, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29, 和 (c)HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30。

[0209] 另一方面, 本发明的抗体包含 (a)VH 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列: (i)HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:31, (ii)HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:32, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:34, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:35, 和 (c)HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。

[0210] 另一方面, 本发明的抗体包含 (a)VH 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列: (i)HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37, (ii)HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:38, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:40, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:41, 和 (c)HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。

[0211] 另一方面, 本发明的抗体包含 (a)VH 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列: (i)HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:43, (ii)HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:44, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:46, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47, 和 (c)HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:48。

[0212] 另一方面, 本发明的抗体包含 (a)VH 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列: (i)HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:49, (ii)HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:50, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:53, 和 (c)HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54。

[0213] 另一方面, 本发明的抗体包含 (a)VH 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列: (i)HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:55, (ii)HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:56, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:58, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:59, 和 (c)HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:60。

[0214] 另一方面, 本发明的抗体包含 (a)VH 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列: (i)HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:61, (ii)HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62, 和 (iii)HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:63; 和 (b)VL 域, 其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列: (i)HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:64, (ii)HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:65, 和 (c)HVR-L3, 其

包含氨基酸序列 SEQ ID NO:66。

[0215] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:67, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:68,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:70, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:71,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:72。

[0216] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:73, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:74,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:76, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:77,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:78。

[0217] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:79, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:82, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:83,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84。

[0218] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:85, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:86,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:88, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:90。

[0219] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:91, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:92,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:94, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:95,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:96。

[0220] 另一方面,本发明的抗体包含 (a) VH 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VH HVR 序列:(i)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:97, (ii)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:98,和 (iii)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99;和 (b) VL 域,其包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下述的 VL HVR 序列:(i)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:100, (ii)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:101,和 (c)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:102。

[0221] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID

NO:3 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6。

[0222] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0223] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:13 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:14 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:15 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:16 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:17 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18。

[0224] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:19 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:20 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:21 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:22 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:24。

[0225] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:25 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:26 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:27 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:29 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30。

[0226] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:31 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:32 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:33 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:34 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:35 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:36。

[0227] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:37 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:38 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:39 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:40 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:41 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:42。

[0228] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:43 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:44 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:45 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:46 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:47 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:48。

[0229] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:49 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:50 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:51 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:52 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:53 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:54。

[0230] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:55 ; (b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:56 ; (c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:57 ; (d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:58 ; (e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:59 ; 和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:60。

[0231] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID

NO:61 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:62 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:63 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:64 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:65 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:66。

[0232] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:67 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:68 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:69 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:70 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:71 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:72。

[0233] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:73 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:74 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:75 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:76 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:77 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:78。

[0234] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:79 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:80 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:81 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:82 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:83 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:84。

[0235] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:85 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:86 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:87 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:88 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:89 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:90。

[0236] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:91 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:92 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:93 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:94 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:95 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:96。

[0237] 另一方面,本发明提供了一种抗体,其包含 (a)HVR-H1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:97 ;(b)HVR-H2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:98 ;(c)HVR-H3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:99 ;(d)HVR-L1,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:100 ;(e)HVR-L2,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:101 ;和 (f)HVR-L3,其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:102。

[0238] 在某些实施方案中,上文提供的抗 Ax1 抗体中下述 HVR 位置处的任何一个或多个氨基酸被替代或缺失 :

[0239] - 在 HVR-H1 (SEQ ID NO:7) 中 :位置 2、3、4、5、6、7、8、9、和 10 ;

[0240] - 在 HVR-H2 (SEQ ID NO:8) 中 :位置 1、2、4、6、7、8、9、和 10 ;

[0241] - 在 HVR-H3 (SEQ ID NO:9) 中 :位置 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或 15 ;

[0242] - 在 HVR-L1 (SEQ ID NO:10) 中 :位置 5、6、7、8、9、和 10 ;

[0243] - 在 HVR-L2 (SEQ ID NO:11) 中 :位置 1、4、和 6 ;

[0244] - 在 HVR-L3 (SEQ ID NO:12) 中 :位置 3、4、5、6、7、和 8。

[0245] 在某些实施方案中,所述替代是保守替代,如本文中提供的。在某些实施方案中,任何一项或多项下述替代可以以任意组合进行 :

[0246] - 在 HVR-H1 (SEQ ID NO:7) 中 :S28T ;L29F 或 V ;S30T 或 R ;G31S ;S32H、T、或 I ;W33G ;I34L ;

[0247] - 在 HVR-H2 (SEQ ID NO:8) 中 :G49A ;W50G ;N52S、A、或 P ;Y53A 或 V ;R54G 或 S ;G55S 或 R ;Y56S 或 H ;A57T 或 P ;

[0248] - 在 HVR-H3 (SEQ ID NO:9) 中 :E95W ;Y96R ;S97N 或 P ;G98D 或 L ;W99S ;G100R、A、或 S ;G100aS ;S100b 缺失 ;S100cY 或缺失 ;V100dI 或缺失 ;G100e 或缺失 ;Y100f 或缺失, A100gE 或缺失 ;

[0249] - 在 HVR-L1 (SEQ ID NO:10) 中 :D28I 或 S ;V29I ;S30G 或 R ;T31I、N 或 R ;A32S ;V33L ;

[0250] - 在 HVR-L2 (SEQ ID NO:11) 中 :S50A 或 V ;F53N 或 S ;Y55A ;

[0251] - 在 HVR-L3 (SEQ ID NO:12) 中 :S91A ;Y92K 或 N ;T93S、Y、M、R、或 A ;T94N、F、或 S ;P95R ;P96Y、S、或 L。

[0252] 在某些实施方案中,任何一项或多项下述替代可以以任意组合进行 :

[0253] - 在 HVR-H1 (SEQ ID NO:7) 中 :S28T ;L29F 或 V ;S30T ;G31S ;S32H、T 或 I ;

[0254] - 在 HVR-H2 (SEQ ID NO:8) 中 :N52S 或 A ;R54G 或 S ;G55R ;Y56S 或 H ;A57T 或 P ;

[0255] - 在 HVR-H3 (SEQ ID NO:9) 中 :S97N 或 P ;G98D ;G100S ;

[0256] - 在 HVR-L3 (SEQ ID NO:12) 中 :T93S、或 Y ;T94N、F、或 S。

[0257] 下述共有序列涵盖上述替代的所有可能组合 :

[0258] - 在 HVR-H1 (SEQ ID NO:112) 中 :GFX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇H, 其中 X₁ 为 S 或 T ;X₂ 为 L、F 或 V ;X₃ 为 S、T、或 R ;X₄ 为 G 或 S ;X₅ 为 S、H、T 或 I ;X₆ 为 W 或 G ;X₇ 为 I 或 L ;

[0259] - 在 HVR-H2 (SEQ ID NO:113) 中 :X₁X₂IX₃PX₄X₅X₆X₇X₈YYADSVKG, 其中 X₁ 为 G 或 A ;X₂ 为 W 或 G ;X₃ 为 N、S、A 或 P ;X₄ 为 Y、A 或 V ;X₅ 为 R、G、或 S ;X₆ 为 G R 或 S ;X₇ 为 Y、S、H 或 Y ;X₈ 为 A、T、或 P ;和 / 或 (SEQ ID NO:166) 中 :X₁X₂IX₃PX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀YYADSVKG, 其中 X₁ 为 G 或 A ;X₂ 为 W 或 G ;X₃ 为 N、S、A 或 P ;X₄ 为 Y、A 或 V ;X₅ 为 R、G、或 S ;X₆ 为 G R 或 S ;X₇ 为 Y、S、H 或 Y ;X₈ 为 A、T、或 P ;X₉ 为任何氨基酸或缺失 ;X₁₀ 为任何氨基酸或缺失 ;

[0260] - 在 HVR-H3 (SEQ ID NO:114) 中 :ARX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃MDY, 其中 X₁ 为 E 或 W ;X₂ 为 Y 或 R ;X₃ 为 S、N 或 P ;X₄ 为 G、D、或 L ;X₅ 为 W 或 S ;X₆ 为 G、R、A、或 S ;X₇ 为 G 或 S ;X₈ 为 S 或缺失 ;X₉ 为 S、Y 或缺失 ;X₁₀ 为 V、I 或缺失 ;X₁₁ 为 G 或缺失 ;X₁₂ 为 Y 或缺失 ;X₁₃ 为 A、E 或缺失 ;

[0261] - 在 HVR-L1 (SEQ ID NO:115) 中 :RASQX₁X₂X₃X₄X₅X₆A, 其中 X₁ 为 D、I 或 S ;X₂ 为 V 或 I ;X₃ 为 S、G 或 R ;X₄ 为 T、I、N 或 R ;X₅ 为 A 或 S ;X₆ 为 V 或 L ;

[0262] - 在 HVR-L2 (SEQ ID NO:116) 中 :X₁ASX₂LX₃S, 其中 X₁ 为 S、A、或 V ;X₂ 为 F、N 或 S ;X₃ 为 Y 或 A ;

[0263] - 在 HVR-L3 (SEQ ID NO:117) 中 :QQX₁X₂X₃X₄X₅X₆T, 其中 X₁ 为 S 或 A ;X₂ 为 Y、K 或 N ;X₃ 为 T、S、Y、M、R 或 A ;X₄ 为 T、N、S、或 F ;X₅ 为 P 或 R ;X₆ 为 P、Y、S 或 L。

[0264] 在一些实施方案中,提供下述共有序列 :

[0265] - 在 HVR-H1 (SEQ ID NO:118) 中 :GFX₁X₂X₃GX₄WIH, 其中 X₁ 为 T 或 S, X₂ 为 F 或 L, X₃ 为 T 或 S, X₄ 为 H、S 或 T ;

[0266] - 在 HVR-H2 (SEQ ID NO:119) 中 :GWIX₁PYX₂X₃X₄X₅YYADSVKG, 其中 X₁ 为 S、N 或 A ;X₂ 为 G、R 或 S ;X₃ 为 G 或 R ;X₄ 为 S、Y 或 H ;X₅ 为 T、A 或 P ;

[0267] - 在 HVR-H3 (SEQ ID NO:120) 中 :AREYX₁X₂WX₃X₄SX₅X₆GYX₇MDY, 其中 X₁ 为 S、N 或 P ;

X_2 为 G 或 D ; X_3 为 G、R、或 A ; X_4 为 G 或 S ; X_5 为 S 或 Y ; X_6 为 V 或 I ; X_7 为 A 或 E ;

[0268] - 中 HVR-L3 (SEQ ID NO:121) 中 :QQSYX₁X₂X₃X₄T, 其中 X_1 为 T、S 或 Y ; X_2 为 T、N、S 或 F ; X_3 为 P 或 R ; X_4 为 P、Y 或 S。

[0269] 另一方面, 抗 Ax1 抗体包含重链可变域 (VH) 序列, 其与氨基酸序列 SEQ ID NO:103、105、107 或 109 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 序列同一性。在某些实施方案中, 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 同一性的 VH 序列相对于参照序列含有替代(例如保守替代)、插入或删除, 但是包含该序列的抗 Ax1 抗体保留与 Ax1 结合的能力。在某些实施方案中, 在 SEQ ID NO:103、105、107 或 109 中替代、插入和 / 或删除了总共 1 至 10 个氨基酸。在某些实施方案中, 替代、插入、或删除发生在 HVR 以外的区域(即 FR)。任选地, 抗 Ax1 抗体包含 SEQ ID NO:103、105、107 或 109 中的 VH 序列, 包括该序列的翻译后修饰。在一个特其它的实施方案中, VH 包含一种、两种或三种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、或 97, (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2、8、14、20、26、32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、或 98, 和 (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:3、9、15、21、27、33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93 或 99。在一个特其它的实施方案中, VH 包含一种、两种或三种选自下述的 HVR : (a) HVR-H1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:7, (b) HVR-H2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:8, 和 (c) HVR-H3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:9。

[0270] 另一方面, 提供了抗 Ax1 抗体, 其中该抗体包含轻链可变域 (VL), 其与氨基酸序列 SEQ ID NO:104、106、108 或 110 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100% 序列同一性。在某些实施方案中, 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 同一性的 VL 序列相对于参照序列含有替代(例如保守替代)、插入或删除, 但是包含该序列的抗 Ax1 抗体保留与 Ax1 结合的能力。在某些实施方案中, 在 SEQ ID NO:104、106、108 或 110 中替代、插入和 / 或删除了总共 1 至 10 个氨基酸。在某些实施方案中, 替代、插入、或删除发生在 HVR 以外的区域(即 FR)。任选地, 抗 Ax1 抗体包含 SEQ ID NO:104、106、108 或 110 中的 VL 序列, 包括该序列的翻译后修饰。在一个特其它的实施方案中, VL 包含一种、两种或三种选自下述的 HVR : (a) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:4、10、16、22、28、34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、或 100 ; (b) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:5、11、17、23、29、35、41、47、53、59、65、77、83、89、95、或 101 ; 和 (c) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、96 或 102。在一个特其它的实施方案中, VL 包含一种、两种或三种选自下述的 HVR : (a) HVR-L1, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:10 ; (b) HVR-L2, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11 ; 和 (c) HVR-L3, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO:12。

[0271] 另一方面, 提供了抗 Ax1 抗体, 其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的 VH。在一些实施方案中, 该抗体进一步包含 VL。在一个实施方案中, 该抗体包含 SEQ ID NO:103 中的 VH 序列。在一个实施方案中, 该抗体包含 SEQ ID NO:105 中的 VH 序列。在一个实施方案中, 该抗体包含 SEQ ID NO:107 中的 VH 序列。在一个实施方案中, 该抗体包含 SEQ ID NO:109 中的 VH 序列。

[0272] 另一方面, 提供了抗 Ax1 抗体, 其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的 VL。

在一些实施方案中,该抗体进一步包含 VH。在一个实施方案中,该抗体包含 SEQ ID NO:104 中的 VL 序列。在一个实施方案中,该抗体包含 SEQ ID NO:106 中的 VL 序列。在一个实施方案中,该抗体包含 SEQ ID NO:108 中的 VL 序列。在一个实施方案中,该抗体包含 SEQ ID NO:110 中的 VL 序列。

[0273] 另一方面,提供了抗 Ax1 抗体,其中该抗体包含上文提供的任何实施方案中的 VH 和上文提供的任何实施方案中的 VL。在一个实施方案中,该抗体包含分别在 SEQ ID NO:103 和 SEQ ID NO:104 中的 VH 和 VL 序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在 SEQ ID NO:105 和 SEQ ID NO:106 中的 VH 和 VL 序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在 SEQ ID NO:107 和 SEQ ID NO:108 中的 VH 和 VL 序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别在 SEQ ID NO:109 和 SEQ ID NO:110 中的 VH 和 VL 序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0274] 本发明的抗体可包含任何合适的框架可变域序列,前提条件是基本上保留了对 Ax1 的结合活性。例如,在一些实施方案中,本发明的抗体包含人亚组 III 重链框架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中,框架共有序列包含在第 71、73 和 / 或 78 位的替代。在这些抗体的一些实施方案中,第 71 位是 A、第 73 位是 T 和 / 或第 78 位是 A。在一个实施方案中,这些抗体包含 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (也参见美国专利 No. 6, 407, 213 和 5, 821, 337, 和 Lee 等, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5):1073-1093) 的重链可变域框架序列。在一个实施方案中,这些抗体进一步包含人 κ I 轻链框架共有序列。在一个特其它的实施方案中,这些抗体包含如美国专利 No. 6, 407, 213 和 5, 821, 337 中所描述的 huMAb4D5-8 的轻链 HVR 序列。在一个实施方案中,这些抗体包含 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) 的轻链可变域序列 (也参见美国专利 No. 6, 407, 213 和 5, 821, 337, 和 Lee 等, J. Mol. Biol. (2004), 340 (5):1073-1093)。在一个实施方案中,抗 Ax1 抗体包含任何上述实施方案中的 HVR, 且进一步包含 VH 和 / 或 VL, 其包含图 2、3A-B、4、5 或 6 中所示 FR1、FR2、FR3 或 FR4 序列。

[0275] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与本文中提供的抗 Ax1 抗体结合相同表位。例如,在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含 VH 序列 SEQ ID NO:103 和 VL 序列 SEQ ID NO:104 的抗 Ax1 抗体结合相同表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含 VH 序列 SEQ ID NO:107 和 VL 序列 SEQ ID NO:108 的抗 Ax1 抗体结合相同表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合由氨基酸 MAWRCPMRGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDGGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVG (SEQ ID NO:111) 组成的 Ax1 片段内的表位。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其结合由氨基酸 ITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (SEQ ID NO:130) 组成的 Ax1 片段内的表位。

[0276] 又一方面,本发明提供了一种抗体,其与包含 VH 序列 SEQ ID NO:103 和 VL 序列 SEQ ID NO:104 的抗 Ax1 抗体竞争对人 Ax1 的结合。在某些实施方案中,提供了一种抗体,其与包含 VH 序列 SEQ ID NO:107 和 VL 序列 SEQ ID NO:108 的抗 Ax1 抗体竞争对人 Ax1 的结合。

[0277] 在本发明的又一个方面,依照任何上述实施方案的抗 Ax1 抗体是单克隆抗体,包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中,抗 Ax1 抗体是抗体片段,例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体、或 F(ab')₂ 片段。在另一个实施方案中,抗体是全长抗体,例如完整 IgG 抗体或其它抗体类或同种型,如本文中定义的。

[0278] 在又一个方面,依照任何上述实施方案的抗 Ax1 抗体可单一地或组合地掺入下文 1-7 节中描述的任何特征:

[0279] 1. 抗体亲和力

[0280] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如, 10^{-9}M 至 10^{-13}M) 的解离常数 (Kd)。

[0281] 在一个实施方案中, Kd 是通过如下述测定法所述用 Fab 型式的感兴趣抗体及其抗原实施的放射性标记抗原结合测定法 (RIA) 来测量的。通过在存在未标记抗原的滴定系列的情况中用最小浓度的 (^{125}I) 标记抗原平衡 Fab,然后用抗 Fab 抗体包被板捕捉结合的抗原来测量 Fab 对抗原的溶液结合亲和力(见例如 Chen 等, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999))。为了建立测定法的条件,将 **MICROTITER®** 多孔板 (Thermo Scientific) 用 50mM 碳酸钠 (pH9.6) 中的 $5 \mu\text{g/ml}$ 捕捉用抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被过夜,随后用 PBS 中的 2%(w/v) 牛血清清蛋白于室温(约 23°C) 封闭 2-5 小时。在非吸附板 (Nunc#269620) 中,将 100pM 或 $26\text{pM}^{125}\text{I}$ - 抗原与连续稀释的感兴趣 Fab (例如与 Presta 等, Cancer Res. 57:4593-4599(1997) 中抗 VEGF 抗体, Fab-12 的评估一致) 混合。然后将感兴趣的 Fab 温育过夜;然而,温育可持续更长时间(例如约 65 小时) 以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板,于室温温育(例如 1 小时)。然后除去溶液,并用 PBS 中的 0.1% 聚山梨酯 20 (**TWEEN-20®**) 洗板 8 次。平板干燥后,加入 $150 \mu\text{l}$ / 孔闪烁液 (MICROSCINT-20™; Packard),然后在 TOPCOUNT™ 伽马计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 给出小于或等于最大结合之 20% 的浓度用于竞争性结合测定法。

[0282] 依照另一个实施方案, Kd 是使用表面等离子共振测定法使用 **BIACore®** -2000 或 **BIACore®** -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于 25°C 使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测量的。简言之,依照供应商的用法说明书用盐酸 N- 乙基 -N'-(3- 二甲氨基丙基)- 碳二亚胺 (EDC) 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠 pH4.8 稀释至 $5 \mu\text{g/ml}$ (约 $0.2 \mu\text{M}$),然后以 $5 \mu\text{l}$ / 分钟的流速注射以获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,于 25°C 以约 $25 \mu\text{l}$ / 分钟的流速注入在含 0.05% 聚山梨酯 20 (**TWEEN-20™**) 表面活性剂的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一朗格缪尔结合模型 (**BIACORE®** Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 计算平衡解离常数 (Kd)。见例如 Chen 等, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$,那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-AMINCO™ 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯的测量,在存在浓度渐增的抗原的情况中,测量 PBS

pH7.2 中 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 于 25℃ 的荧光发射强度 (激发 =295nm ;发射 =340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

[0283] 2. 抗体片段

[0284] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、和 scFv 片段,及下文所描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,见 Hudson 等 Nat. Med. 9:129-134(2003)。关于 scFv 片段的综述,见例如 Pluckthün, 于 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, (Springer-Verlag, New York), 第 269-315 页 (1994); 还可见 W093/16185; 及美国专利 No. 5, 571, 894 和 5, 587, 458。关于包含补救受体结合表位残基,并且具有延长的体内半衰期的 Fab 和 F(ab')₂ 片段的讨论,见美国专利 No. 5, 869, 046。

[0285] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。见例如 EP404, 097; W01993/01161; Hudson 等, Nat. Med. 9:129-134(2003); 及 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也记载于 Hudson 等, Nat. Med. 9:129-134(2003)。

[0286] 单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 见例如美国专利 No. 6, 248, 516B1)。

[0287] 可以通过多种技术,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化及重组宿主细胞 (例如大肠杆菌或噬菌体) 的生成来生成抗体片段,如本文中所描述的。

[0288] 3. 嵌合的和人源化的抗体

[0289] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体记载于例如美国专利 No. 4, 816, 567; 及 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。在一个例子中,嵌合抗体包含非人可变区 (例如,自小鼠、大鼠、仓鼠、家兔、或非人灵长类,诸如猴衍生的可变区) 和人恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是“类转换的”抗体,其中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0290] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中 HVR, 例如 CDR (或其部分) 自非人抗体衍生,而 FR (或其部分) 自人抗体序列衍生。任选地,人源化抗体还会至少包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些 FR 残基用来自非人抗体 (例如衍生 HVR 残基的抗体) 的相应残基替代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0291] 人源化抗体及其生成方法综述于例如 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008), 并且进一步记载于例如 Riechmann 等, Nature 332:323-329(1988); Queen 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA86:10029-10033(1989); 美国专利 No. 5, 821, 337, 7, 527, 791, 6, 982, 321 和 7, 087, 409; Kashmiri 等, Methods 36:25-34(2005) (描述了 SDR(a-CDR) 嫁接); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991) (描述了“重修表面”); Dall'Acqua 等, Methods 36:43-60(2005) (描述了“FR 改组”); 及 Osbourn 等, Methods 36:61-68(2005) 和 Klimka 等, Br. J. Cancer, 83:252-260(2000) (描述了 FR 改组的“引导选择”方法)。

[0292] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于：使用“最佳拟合 (best-fit)”方法选择的框架区(见例如 Sims 等 J. Immunol. 151:2296(1993))；自轻或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(见例如 Carter 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992)；及 Presta 等 J. Immunol., 151:2623(1993))；人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(见例如 Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008))；和通过筛选 FR 文库衍生的框架区(见例如 Baca 等, J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997) 及 Rosok 等, J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996))。

[0293] 4. 人抗体

[0294] 在某些实施方案中，本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种技术来生成抗体。一般地，人抗体记载于 van Dijk 和 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001) 及 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008)。

[0295] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体，所述转基因动物已经修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有所有或部分人免疫球蛋白基因座，其替换内源免疫球蛋白基因座，或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中，一般已经将内源免疫球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述，见 Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)。还可见例如美国专利 No. 6, 075, 181 和 6, 150, 584，其描述了 XENOMOUSE™ 技术；美国专利 No. 5, 770, 429，其描述了 HUMAB® 技术；美国专利 No. 7, 041, 870，其描述了 K-M MOUSE® 技术，和美国专利申请公开文本 No. US2007/0061900，其描述了 VELOCIMOUSE® 技术)。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0296] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系(见例如 Kozbor J. Immunol., 133:3001(1984)；Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及 Boerner 等, J. Immunol., 147:86(1991))。经由人 B 细胞杂交瘤技术生成的人抗体也记载于 Li 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006)。其它方法包括那些例如记载于美国专利 No. 7, 189, 826 (其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人 IgM 抗体) 和 Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268(2006) (其描述了人-人杂交瘤) 的。人杂交瘤技术(Trioma 技术) 也记载于 Vollmers 和 Brandlein, Histology&Histopathology, 20(3):927-937(2005) 及 Vollmers 和 Brandlein, Methods&Findings in Exp. & Clin. Pharmacology, 27(3):185-91(2005)。

[0297] 也可以通过分离自人衍生的噬菌体展示文库选择的 Fv 克隆可变域序列生成抗体。然后，可以将此类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择人抗体的技术。

[0298] 5. 文库衍生的抗体

[0299] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如，用于生成噬菌体展示文库并对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如 Hoogenboom 等于 Methods in Molecular

Biology 178:1-37 (O'Brien 等编, Human Press, Totowa, NJ, 2001), 并且进一步记载于例如 McCafferty 等, Nature 348:552-554; Clackson 等, Nature 352:624-628 (1991); Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks 和 Bradbury, 于 Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee 等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fello use, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及 Lee 等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)。

[0300] 在某些噬菌体展示方法中, 将 VH 和 VL 基因的全集分别通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆, 并在噬菌体文库中随机重组, 然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体, 如记载于 Winter 等, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) 的。噬菌体通常以单链 Fv (scFv) 片段或以 Fab 片段展示抗体片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体, 而不需要构建杂交瘤。或者, 可以(例如自人) 克隆天然全集以在没有任何免疫的情况下提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源, 如由 Griffiths 等, EMBO J, 12:725-734 (1993) 描述的。最后, 也可以通过自干细胞克隆未重排的 V 基因区段, 并使用含有随机序列的 PCR 引物编码高度可变的 CDR3 区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库, 如由 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) 所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开文本包括例如: 美国专利 No. 5, 750, 373、和美国专利公开文本 No. 2 005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 和 2009/0002360。

[0301] 认为自人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0302] 6. 多特异性抗体

[0303] 在某些实施方案中, 本文中提供的抗体是多特异性抗体, 例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 结合特异性之一针对 Ax1, 而另一种针对任何其它抗原。在某些实施方案中, 双特异性抗体可以结合 Ax1 的两个不同表位。也可以使用双特异性抗体来将细胞毒剂定位于表达 Ax1 的细胞。双特异性抗体可以以全长抗体或抗体片段制备。

[0304] 用于生成多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(见 Milstein 和 Cuello, Nature 305:537 (1983))、W093/08829、和 Traunecker 等, EMBO J. 10:3655 (1991)、和“突起-入-空穴”工程化(见例如美国专利 No. 5, 731, 168)。也可以通过用于生成抗体 Fc- 异二聚体分子的工程化静电操纵效应 (W02009/089004A1); 交联两个或更多个抗体或片段(见例如美国专利 No. 4, 676, 980, 及 Brennan 等, Science, 229:81 (1985)); 使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体(见例如 Kostelny 等, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)); 使用用于生成双特异性抗体片段的“双抗体”技术(见例如 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); 及使用单链 Fv (sFv) 二聚体(见例如 Gruber 等, J. Immunol., 152:5368 (1994)); 及如例如 Tutt 等 J. Immunol. 147:60 (1991) 中所描述的, 制备三特异性抗体来生成多特异性抗体。

[0305] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化改造抗体, 包括“章鱼抗体”(见例如 US2006/0025576A1)。

[0306] 本文中的抗体或片段还包括包含结合 Ax1 及另一种不同抗原的抗原结合位点的

“双重作用 Fab”或“DAF”(见例如 US2008/0069820)。

[0307] 7. 抗体变体

[0308] 在某些实施方案中,涵盖本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可以期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将合适的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗体的氨基酸序列内的残基的删除、和/或插入和/或替代。可以进行删除、插入、和替代的任何组合以得到最终的构建体,只要最终的构建体拥有期望的特征,例如,抗原结合。

[0309] a) 替代、插入、和删除变体

[0310] 在某些实施方案中,提供了具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱变感兴趣的位点包括 HVR 和 FR。保守替代在表 1 中在“保守替代”的标题下显示。更实质的变化在表 1 中在“例示性替代”的标题下提供,并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中,并且对产物筛选期望的活性,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的 ADCC 或 CDC。

[0311] 表 1

[0312]

初始残基	例示性替代	优选的替代
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp, Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0313] 依照共同的侧链特性,氨基酸可以如下分组:

[0314] (1) 疏水性的:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0315] (2) 中性、亲水性的:Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0316] (3) 酸性的:Asp, Glu;

[0317] (4) 碱性的:His, Lys, Arg;

[0318] (5) 影响链取向的残基:Gly, Pro;

[0319] (6) 芳香族的:Trp, Tyr, Phe。

[0320] 非保守替代会需要用这些类别之一的成员替换另一个类其它的。

[0321] 一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,为进一步研究选择的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性的改变(例如改善)(例如升高的亲和力、降低的免疫原性)和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。例示性的替代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术诸如本文中所描述的那些技术来方便地生成。简言之,将一个或多个 HVR 残基突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力)。

[0322] 可以对 HVR 做出变化(例如,替代),例如以改善抗体亲和力。可以对 HVR “热点”,即由在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子编码的残基(见例如 Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)),和/或 SDR(a-CDR) 做出此类变化,其中对所得的变体 VH 或 VL 测试结合亲和力。通过次级文库的构建和再选择进行的亲和力成熟已经记载于例如 Hoogenboom 等于 Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien 等编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易错 PCR、链改组、或寡核苷酸指导的诱变)将多样性引入为成熟选择的可变基因。然后,创建次级文库。然后,筛选文库以鉴定具有期望的亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法牵涉 HVR 指导的方法,其中将几个 HVR 残基(例如,一次 4-6 个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定牵涉抗原结合的 HVR 残基。特别地,经常靶向 CDR-H3 和 CDR-L3。

[0323] 在某些实施方案中,可以在一个或多个 HVR 内发生替代、插入、或删除,只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以对 HVR 做出保守变化(例如,保守替代,如本文中提供的),其不实质性降低结合亲和力。此类变化可以在 HVR “热点”或 SDR 外部。在上文提供的变体 VH 和 VL 序列的某些实施方案中,每个 HVR 是未改变的,或者含有不超过

1、2 或 3 处氨基酸替代。

[0324] 一种可用于鉴定抗体中可以作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”，如由 Cunningham 和 Wells(1989) Science, 244:1081-1085 所描述的。在此方法中，将残基或靶残基的组(例如，带电荷的残基诸如 arg、asp、his、lys、和 glu) 鉴定，并用中性或带负电荷的氨基酸(例如，丙氨酸或多丙氨酸) 替换以测定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始替代表明功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的替代。或者 / 另外，利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原间的接触点。作为替代的候选，可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0325] 氨基酸序列插入包括长度范围为 1 个残基至含有 100 或更多个残基的多肽的氨基和 / 或羧基端融合，及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的 N 或 C 端与酶(例如对于 ADEPT) 或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0326] b) 糖基化变体

[0327] 在某些实施方案中，改变本文中提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列，使得创建或消除一个或多个糖基化位点来方便地实现对抗体的糖基化位点的添加或删除。

[0328] 在抗体包含 Fc 区的情况中，可以改变其附着的碳水化合物。由哺乳动物细胞生成的天然抗体通常包含分支的、双触角寡糖，其一般通过 N 连接附着于 Fc 区的 CH2 域的 Asn297。见例如 Wright 等 TIBTECH15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物，例如，甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、半乳糖、和唾液酸，以及附着于双触角寡糖结构“主干”中的 GlcNAc 的岩藻糖。在一些实施方案中，可以对本发明抗体中的寡糖进行修饰以创建具有某些改善的特性的抗体变体。

[0329] 在一个实施方案中，提供了抗体变体，其具有缺乏附着(直接或间接)于 Fc 区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如，此类抗体中的岩藻糖量可以是 1% 至 80%、1% 至 65%、5% 至 65% 或 20% 至 40%。通过相对于附着于 Asn297 的所有糖结构(例如，复合的、杂合的和甘露糖的结构)的总和，计算 Asn297 处糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖量，如通过 MALDI-TOF 质谱术测量的，例如如记载于 W02008/077546 的。Asn297 指位于 Fc 区中的约第 297 位(Fc 区残基的 Eu 编号方式)的天冬酰胺残基；然而，Asn297 也可以由于抗体中的微小序列变异而位于第 297 位上游或下游约 ± 3 个氨基酸，即在第 294 位和第 300 位之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的 ADCC 功能。见例如美国专利公开文本 No. US2003/0157108(Presta, L.) ; US2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。涉及“脱岩藻糖基化的”或“岩藻糖缺乏的”抗体变体的出版物的例子包括 :US2003/0157108; W02000/61739; W02001/29246; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; W02003/085119; W02003/084570; W02005/035586; W02005/035778; W02005/053742; W02002/031140; Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249(2004); Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87:614(2004)。能够生成脱岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的 Lec13CHO 细胞(Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545(1986); 美国专利申请 No US2003/0157108A1, Presta, L.; 及 W02004/056312A1, Adams 等，尤其在实施例 11)，和敲除细胞系，诸如 α -1,6-岩

藻糖基转移酶基因 FUT8 敲除 CHO 细胞(见例如 Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87:614(2004);Kanda, Y 等, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688(2006); 及 W02003/085107)。

[0330] 进一步提供了具有两分型寡糖的抗体变体,例如其中附着于抗体 Fc 区的双触角寡糖是通过 GlcNAc 两分的。此类抗体变体可以具有降低的岩藻糖基化和 / 或改善的 ADCC 功能。此类抗体变体的例子记载于例如 W02003/011878 (Jean-Mairet 等);美国专利 No. 6,602,684 (Umana 等);及 US2005/0123546 (Umana 等)。还提供了在附着于 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的 CDC 功能。此类抗体变体记载于例如 W01997/30087 (Patel 等);W01998/58964 (Raju, S.);及 W01999/22764 (Raju, S.)。

[0331] c)Fc 区变体

[0332] 在某些实施方案中,可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的 Fc 区中,由此生成 Fc 区变体。Fc 区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如替代)的人 Fc 区序列(例如,人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。

[0333] 在某些实施方案中,本发明涵盖拥有一些但不是所有效应器功能的抗体变体,所述效应器功能使其成为如下应用的期望候选物,其中抗体的体内半衰期是重要的,而某些效应器功能(诸如补体和 ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和 / 或体内细胞毒性测定法以确认 CDC 和 / 或 ADCC 活性的降低 / 消减。例如,可以进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定法以确保抗体缺乏 Fc γ R 结合(因此有可能缺乏 ADCC 活性),但是保留 FcRn 结合能力。介导 ADCC 的主要细胞 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。在 Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991) 的第 464 页上的表 3 中汇总了造血细胞上的 FcR 表达。评估感兴趣分子的 ADCC 活性的体外测定法的非限制性例子记载于美国专利 No. 5,500,362 (见例如 Hellstrom, I. 等 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA83:7059-7063(1986)) 和 Hellstrom, I 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA82:1499-1502(1985);5,821,337 (见 Bruggemann, M. 等, J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987))。或者,可以采用非放射性测定方法(见例如用于流式细胞术的 ACTI™非放射性细胞毒性测定法 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA;和 CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定法 (Promega, Madison, WI))。对于此类测定法有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外,可以在体内评估感兴趣分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如披露于 Clynes 等 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA95:652-656(1998) 的。也可以实施 C1q 结合测定法以确认抗体不能结合 C1q,并且因此缺乏 CDC 活性。见例如 W02006/029879 和 W02005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体激活,可以实施 CDC 测定法(见例如 Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods202:163(1996);Cragg, M. S. 等, Blood101:1045-1052(2003);及 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域中已知的方法来实施 FcRn 结合和体内清除 / 半衰期测定(见例如 Petkova, S. B. 等, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006))。

[0334] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有 Fc 区残基 238, 265, 269, 270, 297, 327 和 329 中的一个或多个的替代的(美国专利 No. 6,737,056)。

此类 Fc 突变体包括在氨基酸位置 265、269、270、297 和 327 中的两处或更多处具有替代的 Fc 突变体,包括残基 265 和 297 替代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc 突变体(美国专利 No. 7, 332, 581)。

[0335] 描述了具有改善的或降低的对 FcR 的结合的某些抗体变体(见例如美国专利 No. 6, 737, 056;W02004/056312,及 Shields 等, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001))。

[0336] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有改善 ADCC 的一处或多处氨基酸替代,例如 Fc 区的位置 298、333、和 / 或 334 (残基的 EU 编号方式)的替代的 Fc 区。

[0337] 在一些实施方案中,对 Fc 区做出改变,其导致改变的(即,改善的或降低的)C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC),例如,如记载于美国专利 No. 6, 194, 551、W099/51642、及 Idusogie 等 J. Immunol. 164:4178-4184(2000) 的。

[0338] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合的抗体记载于 US2005/0014934A1 (Hinton 等),新生儿 Fc 受体 (FcRn) 负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等, J. Immunol. 117:587(1976) 及 Kim 等, J. Immunol. 24:249(1994))。那些抗体包含其中具有改善 Fc 区对 FcRn 结合的一处或多处替代的 Fc 区。此类 Fc 变体包括那些在 Fc 区残基 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 或 434 中的一处或多处具有替代,例如, Fc 区残基 434 的替代的(美国专利 No. 7, 371, 826)。

[0339] 还可见 Duncan 和 Winter, Nature322:738-40(1988); 美国专利 No. 5, 648, 260; 美国专利 No. 5, 624, 821; 及 W094/29351,其关注 Fc 区变体的其它例子。

[0340] d) 经半胱氨酸工程化改造的抗体变体

[0341] 在某些实施方案中,可以期望创建经半胱氨酸工程化改造的抗体,例如,“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基替代。在具体的实施方案中,替代的残基存在于抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸替代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于抗体的可接近位点,并且可以用于将抗体与其它模块,诸如药物模块或接头-药物模块缀合,以创建免疫缀合物,如本文中进一步描述的。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸替代下列残基之任一个或多个:轻链的 V205 (Kabat 编号方式);重链的 A118 (EU 编号方式);和重链 Fc 区的 S400 (EU 编号方式)。可以如例如美国专利 No. 7, 521, 541 所述生成经半胱氨酸工程化改造的抗体。

[0342] e) 抗体衍生物

[0343] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。适合于抗体衍生化的模块包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇 / 丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1, 3- 二氧戊环、聚-1, 3, 6- 三噁烷、乙烯 / 马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和右旋糖苷或聚(n- 乙烯吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷 / 环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化,而且如果附着了超过一个聚合物,那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和 / 或类型,包括但不限于抗体要改进的

具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

[0344] 在另一个实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射选择性加热的非蛋白质性质模块的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质性质模块是碳纳米管(Kam等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA102:11600-11605(2005))。辐射可以是任何波长的,并且包括但不限于对普通细胞没有损害,但是将非蛋白质性质模块加热至抗体-非蛋白质性质模块附近的细胞被杀死的温度的波长。

[0345] B. 重组方法和组合物

[0346] 可以使用重组方法和组合物来生成抗体,例如,如记载于美国专利 No. 4,816,567 的。在一个实施方案中,提供了编码本文中所描述的抗 Ax1 抗体的分离的核酸。此类核酸可以编码包含抗体 VL 的氨基酸序列和 / 或包含 VH 的氨基酸序列(例如,抗体的轻和 / 或重链)。在又一个实施方案中,提供了包含此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在又一个实施方案中,提供了包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如,已经用下列载体转化):(1) 包含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列和包含抗体的 VH 的氨基酸序列,或 (2) 第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码包含抗体的 VL 的氨基酸序列的核酸,所述第二载体包含编码包含抗体的 VH 的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中,宿主细胞是真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴瘤细胞(例如,Y0、NS0、Sp20 细胞)。在一个实施方案中,提供了生成抗 Ax1 抗体的方法,其中该方法包括在适合于表达抗体的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞,如上文提供的,并且任选地,自宿主细胞(或宿主细胞培养液)回收抗体。

[0347] 对于抗 Ax1 抗体的重组生成,将编码抗体的核酸(例如如上文所描述的)分离,并插入一种或多种载体中,以在宿主细胞中进一步克隆和 / 或表达。可以使用常规规程将此类核酸容易地分离并测序(例如,通过使用寡核苷酸探针来进行,所述寡核苷酸探针能够特异性结合编码抗体的重和轻链的基因)。

[0348] 适合于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括本文中所描述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中生成抗体,特别是在不需要糖基化和 Fc 效应器功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,见例如美国专利 No. 5,648,237, 5,789,199 和 5,840,523 (还可见 Charlton,Methods in Molecular Biology, 第 248 卷(B. K. C. Lo 编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第 245-254 页,其描述了抗体片段在大肠杆菌(E.coli.)中的表达)。表达后,可以将抗体在可溶性级分中自细菌细胞团糊分离,并可以进一步纯化。

[0349] 在原核生物外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是适合于抗体编码载体的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”,导致生成具有部分或完全人的糖基化样式的抗体的真菌和酵母菌株。见 Gerngross,Nat. Biotech. 22:1409-1414(2004),及 Li 等,Nat. Biotech. 24:210-215(2006)。

[0350] 适合于表达糖基化抗体的宿主细胞也自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)衍生。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株,其可以与昆虫细胞一起使用,特别是用于转染草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞。

[0351] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。见例如美国专利 No. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 和 6,417,429 (其描述了用于在转基因植物中生成抗体的 PLANTIBODIES™技术)。

[0352] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,适合于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是经 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7);人胚肾系(293 或 293 细胞,如记载于例如 Graham 等, *J. Gen. Virol.* 36:59(1977)的);幼年仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞托利(sertoli)细胞(TM4 细胞,如记载于例如 Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980)的);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);牛鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳房肿瘤(MMT060562);TRI 细胞,如记载于例如 Mather 等, *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44-68(1982)的;MRC5 细胞;和 FS4 细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括 DHFR⁻CHO 细胞(Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系诸如 Y0、NS0 和 Sp2/0。关于适合于抗体生成的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,见例如 Yazaki 和 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第 248 卷(B. K. C. Lo 编, Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 页(2003)。

[0353] C. 测定法

[0354] 可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 Ax1 抗体鉴定、筛选、或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

[0355] 1. 结合测定法和其它测定法

[0356] 一方面,对本发明的抗体测试其抗原结合活性,例如通过已知的方法诸如 ELISA、Western 印迹等来进行。

[0357] 另一方面,可使用竞争测定法来鉴定与抗体 327.6、327.6.S2、327.6.S11、327.6.S50、327.6.S52、327.6.S65、327.42、327.42.S8、327.42.S31、327.42.S13、327.42.S43、327.42.S52、327.42.S63、327.42.S73、327.42.H2、327.42.H4、和/或 327.42.H20 中一种或多种竞争对 Ax1 的结合的抗体。在某些实施方案中,此类竞争性抗体结合与 327.6、327.6.S2、327.6.S11、327.6.S50、327.6.S52、327.6.S65、327.42、327.42.S8、327.42.S31、327.42.S13、327.42.S43、327.42.S52、327.42.S63、327.42.S73、327.42.H2、327.42.H4、和/或 327.42.H20 所结合表位相同的表位(例如线性或构象表位)。用于定位抗体所结合表位的详细例示性方法见 Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, *Methods in Molecular Biology* vol. 66(Humana Press, Totowa, NJ)。

[0358] 在一种例示性竞争测定法中,在包含第一经标记抗体(其结合 Ax1,例如 327.6、327.6.S2、327.6.S11、327.6.S50、327.6.S52、327.6.S65、327.42、327.42.S8、327.42.S31、327.42.S13、327.42.S43、327.42.S52、327.42.S63、327.42.S73、327.42.H2、327.42.H4、和/或 327.42.H20)和第二未标记抗体(其要测试与第一抗体竞争对 Ax1 的结合的能力)的溶液中温育固定化 Ax1。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一经标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育固定化 Ax1。在允许第一抗体结合 Ax1 的条件下温育后,除去过量的未结合抗体,并测量与固定化 Ax1 联合的标记物的量。如果测试样品中与固定化 Ax1 联合的标记物的量与对照样品相比实质性降低,那么这指示第二抗体与第一抗体竞争对 Ax1 的结合。参见 Harlow and Lane(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch. 14(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0359] 2. 活性测定法

[0360] 一方面,提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 Ax1 抗体的测定法。生物学活性可包括例如抑制 Gas6 结合 Ax1、抑制 Ax1 激活、抑制 Ax1 下游分子信号传导、抑制 Ax1 表达(例如 Ax1 细胞表面表达或细胞中的总 Ax1 表达,诸如肿瘤细胞)、抑制炎性细胞因子分泌、促进凋亡(例如通过抑制 Gas6 介导的凋亡抑制)、抑制肿瘤内血管系统、抑制肿瘤基质 Ax1 活性和 / 或表达和 / 或抑制转移。还提供了在体内和 / 或在体外具有此类生物学活性的抗体。

[0361] 在某些实施方案中,对本发明的抗体测试此类生物学活性。在某些实施方案中,对抗体测试其在体外促进凋亡(例如肿瘤细胞的凋亡)的能力。用于测定细胞生长和 / 或增殖和 / 或凋亡的例示性方法包括例如 BrdU 掺入测定法、MTT、[3H]- 胸苷掺入(例如 TopCount 测定法(PerkinElmer))、细胞存活力测定法(例如 CellTiter-Glo (Promega))、DNA 片段化测定法、胱天蛋白酶激活测定法、台盼蓝 (trypan blue) 排斥、染色质形态测定法等等。

[0362] 在某些实施方案中,对抗体测试抑制 Ax1 表达,例如使用本文中描述和例示的方法。在一个实施方案中,将抗 Ax1 抗体与合适的测试细胞(例如 NSCLC 细胞 A549)一起温育,并在合适的一段时间后,收获细胞裂解物并检查总 Ax1 水平。也可以在与候选抗 Ax1 抗体一起温育之后使用 FACS 分析来检查表面 Ax1 受体水平。在一个实施方案中,在用抗 Ax1 抗体处理之后对肿瘤样品检查 Ax1 表达。

[0363] 在某些实施方案中,对本发明的抗体测试其抑制炎性细胞因子分泌的能力,例如如本文中描述和例示的。

[0364] 在某些实施方案中,对本发明的抗体测试其降低肿瘤内血管系统和 / 或抑制肿瘤基质 Ax1 活性和 / 或表达的能力,例如如本文中例示的。在一些实施方案中,肿瘤基质 Ax1 活性为转移或肿瘤内血管系统形成。

[0365] 在某些实施方案中,对本发明的抗体测试其在体外抑制细胞生长或增殖的能力。抑制细胞生长或增殖的测定法是本领域公知的。细胞增殖的某些测定法,以本文所述“细胞杀伤”测定法为例,测量细胞存活力 (viability)。这样的一种测定法是 CellTiter-Glo™ 发光细胞存活力测定法,其可购自 Promega (Madison, WI)。该测定法基于存在的 ATP (有代谢活性的细胞的一项指标) 的量化来测定培养物中的可存活细胞数。参见 Crouch 等 (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; 美国专利 No. 6602677。该测定法可以以 96 孔或 384 孔形式进行,使之适应自动化高通量筛选 (HTS)。参见 Cree 等 (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404。该测定法规程牵涉直接向培养细胞添加单一试剂 (CellTiter-Glo® 试剂)。这导致细胞溶解和通过萤光素酶反应产生的发光信号的生成。发光信号与存在的 ATP 的量成正比,后者直接与培养物中存在的可存活细胞数成正比。可以通过光度计或 CCD 照相机成像装置来记录数据。发光输出表述成相对光单位 (RLU)。

[0366] 细胞增殖的另一种测定法是“MTT”测定法,一种测量 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑氮溴化物被线粒体还原酶氧化成甲臍 (formazan) 的比色测定法。像 CellTiter-Glo™ 测定法一样,此测定法指示细胞培养物中存在的有代谢活性的细胞的数目。参见例如 Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63; 及 Zhang 等 (2005) Cancer Res. 65:3877-3882。

[0367] 用于任何上述体外测定法的细胞包括天然表达 Ax1 或经改造而表达 Ax1 的细胞或细胞系。此类细胞包括相对于同一组织起源的正常细胞过表达 Ax1 的肿瘤细胞。此类细胞还包括表达 Ax1 的细胞系(包括肿瘤细胞系)和在正常情况下不表达 Ax1 但经编码 Ax1 的核

酸转染的细胞系。本文中提供的、供任何上述体外测定法中使用的例示性细胞系包括 NSCLC 细胞系 A549、NSCLC 细胞系 H1299、和乳腺癌细胞系 MDA-MB231。

[0368] 一方面,对本发明的抗 Ax1 抗体测试其在体内抑制细胞生长或增殖的能力。在某些实施方案中,对本发明的抗 Ax1 抗体测试其在体内抑制肿瘤生长的能力。体内模型系统,诸如异种移植物模型,可用于此类测试。在一种例示性异种移植物系统中,将人肿瘤细胞导入适当免疫受损的非人动物,例如无胸腺的“裸”小鼠。将本发明的抗体施用于所述动物。测量抗体抑制或降低肿瘤生长的能力。在上述异种移植物系统的某些实施方案中,所述人肿瘤细胞是来自人类患者的肿瘤细胞。此类异种移植物模型可购自 Oncotest GmbH(Friedberg, Germany)。在某些实施方案中,上述人肿瘤细胞是来自人肿瘤细胞系的细胞,诸如 MDA-MB-231 乳腺癌细胞或 A549 非小细胞肺癌细胞。在某些实施方案中,通过皮下注射或通过移植入合适的位点(诸如乳房脂肪垫),将人肿瘤细胞导入适当免疫受损的非人动物。

[0369] 要理解,任何上述测定法可以使用本发明的免疫偶联物替换或补充抗 Ax1 抗体来进行。

[0370] 要理解,任何上述测定法可以使用抗 Ax1 抗体和其它的治疗剂,诸如 VEGF 拮抗剂和 / 或 EGFR 拮抗剂和 / 或化疗剂来进行。

[0371] D. 免疫缀合物

[0372] 本发明还提供了包含与一种或多种细胞毒剂,诸如化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如,蛋白质毒素、细菌、真菌、植物、或动物起源的酶活性毒素、或其片段)、或放射性同位素缀合的本文中的抗 Ax1 抗体的免疫缀合物。

[0373] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,包括但不限于美登木素生物碱(见美国专利 No. 5,208,020、5,416,064 和欧洲专利 EP0425235B1);auristatin 诸如单甲基 auristatin 药物模块 DE 和 DF(MMAE 和 MMAF)(见美国专利 No. 5,635,483 和 5,780,588 及 7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物(见美国专利 No. 5,712,374,5,714,586,5,739,116,5,767,285,5,770,701,5,770,710,5,773,001 和 5,877,296;Hinman 等, Cancer Res. 53:3336-3342(1993);及 Lode 等, Cancer Res. 58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素诸如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(见 Kratz 等, Current Med. Chem. 13:477-523(2006);Jeffrey 等, Bioorganic&Med. Chem. Letters16:358-362(2006);Torgov 等, Bioconj. Chem. 16:717-721(2005);Nagy 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA97:829-834(2000);Dubowchik 等, Bioorg. &Med. Chem. Letters12:1529-1532(2002);King 等, J. Med. Chem. 45:4336-4343(2002);及美国专利 No. 6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛(vindesine);紫杉烷(taxane)诸如多西他赛(docetaxel)、帕利他塞、larotaxel、tesetaxel、和 ortataxel;单端孢霉素(trichothecene);和 CC1065。

[0374] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与酶活性毒素或其片段缀合的如本文中所描述的抗体,所述酶活性毒素包括但不限于白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)),蓖麻毒蛋白(ricin)A 链、相思豆毒蛋白(abrin)A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A 链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(Aleutites

fordii) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (Phytolaca americana) 蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (Momordica charantia) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (sapaonaria officinalis) 抑制剂、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。

[0375] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的如本文中所描述的抗体。多种放射性同位素可用于生成放射性缀合物。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。在使用放射性缀合物进行检测时,它可以包含供闪烁法研究用的放射性原子,例如 tc99m 或 I123,或供核磁共振 (NMR) 成像 (又称为磁共振成像, mri) 用的自旋标记物,诸如再一次的碘 -123、碘 -131、钼 -111、氟 -19、碳 -13、氮 -15、氧 -17、钆、锰或铁。

[0376] 可以使用多种双功能蛋白质偶联剂来生成抗体和细胞毒剂的缀合物,诸如 N- 琥珀酰亚氨基 3-(2- 吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP), 琥珀酰亚氨基 -4-(N- 马来酰亚氨基甲基) 环己烷 -1- 羧酸酯 (SMCC), 亚氨基硫烷 (IT), 亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对 - 叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对 - 重氮苯甲酰基) - 乙二胺)、二异硫氰酸酯 (诸如甲苯 2, 6- 二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1, 5- 二氟 -2, 4- 二硝基苯) 的双功能衍生物。例如,可以如 Vitetta 等, Science238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳 -14 标记的 1- 异硫氰酸苄基 -3- 甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头 (Chari 等, Cancer Res52:127-131 (1992); 美国专利 No. 5, 208, 020)。

[0377] 本文中的免疫缀合物或 ADC 明确涵盖,但不限于用交联试剂制备的此类缀合物,所述交联试剂包括但不限于 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC、和 sulfo-SMPB, 及 SVSB (琥珀酰亚氨基 -(4- 乙烯基砷) 苯甲酸酯), 它们是商品化的 (例如,来自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U. S. A)。

[0378] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0379] 在某些实施方案中,本文中提供的任何抗 Ax1 抗体可用于检测生物学样品中 Ax1 的存在。在用于本文时,术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中,生物学样品包含细胞或组织,诸如乳腺 / 乳房、胰、食管、肺和 / 或脑。

[0380] 在一个实施方案中,提供了在诊断或检测方法中使用的抗 Ax1 抗体。在又一方面,提供了检测生物学样品中 Ax1 的存在的方法。在某些实施方案中,该方法包括在容许抗 Ax1 抗体结合 Ax1 的条件下使生物学样品与抗 Ax1 抗体接触,如本文中所描述的,并检测是否在抗 Ax1 抗体与 Ax1 之间形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中,使用抗 Ax1 抗体来选择适合用抗 Ax1 抗体治疗的受试者,例如其中 Ax1 是一种用于选择患者的生物标志。

[0381] 可使用本发明的抗体来诊断的例示性病症包括癌症 (例如乳腺癌、肺癌、胰腺癌、

脑癌、肾癌、胃癌、白血病、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、肝癌、骨肉瘤、和 / 或黑素瘤)。

[0382] 在某些实施方案中,提供了经标记的抗 Ax1 抗体。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块(诸如荧光、发色、电子致密、化学发光、和放射性标记物)、及例如经由酶反应或分子相互作用间接检测的模块,诸如酶或配体。例示性的标记物包括但不限于放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、和 ^{131}I 、荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物、罗丹明(rhodamine)及其衍生物、丹酰、伞形酮、萤光素酶,例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利 No. 4, 737, 456)、萤光素、2, 3- 二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、 β - 半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖类氧化酶,例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、和葡萄糖-6- 磷酸脱氢酶、杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶(其与采用过氧化氢氧化染料前体的酶诸如 HRP 偶联)、乳过氧化物酶、或微过氧化物酶、生物素 / 亲合素、自旋标记物、噬菌体标记物、稳定的自由基、等等。

[0383] F. 药物配制剂

[0384] 通过混合具有期望纯度的此类抗体与一种或多种任选的药学可接受载体(Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. 编(1980))混合以冻干配制剂或水性溶液形式制备如本文中所描述的抗 Ax1 抗体的药物配制剂。一般地, 药学可接受载体在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 而且包括但不限于缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵、苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3- 戊醇; 和间甲酚); 低分子量(少于约 10 个残基)多肽; 蛋白质, 诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如 EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐相反离子, 诸如钠; 金属复合物(例如 Zn- 蛋白质复合物); 和 / 或非离子表面活性剂, 诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的例示性的药学可接受载体进一步包含间质药物分散剂诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP), 例如人可溶性 PH-20 透明质酸酶糖蛋白, 诸如 rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性的 sHASEGP 和使用方法, 包括 rHuPH20 记载于美国专利公开文本 No. 2005/0260186 和 2006/0104968。在一方面, 将 sHASEGP 与一种或多种其它的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0385] 例示性的冻干抗体配制剂记载于美国专利 No. 6, 267, 958。水性抗体配制剂包括那些记载于美国专利 No. 6, 171, 586 和 W02006/044908 的, 后一种配制剂包含组氨酸- 乙酸盐缓冲液。

[0386] 本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性组分, 优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如, 可能希望进一步提供 EGFR 拮抗剂(诸如厄洛替尼)、抗血管发生剂(诸如 VEGF 拮抗剂, 诸如抗 VEGF 抗体)、化疗剂(诸如紫杉烷类或铂剂)。此类活性组分适于以有效用于所需目的的量而组合存在。

[0387] 活性成分可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊), 在胶状药物投递系统中

(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊),或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)。

[0388] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适的例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形商品形式,例如膜,或微胶囊。

[0389] 用于体内施用的配制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现,例如通过穿过无菌滤膜过滤。

[0390] G. 治疗性方法和组合物

[0391] 可以在治疗性方法中使用本文中提供的任何抗 Ax1 抗体。

[0392] 在一方面,提供了作为药物使用的抗 Ax1 抗体。在其它的方面,提供了在治疗癌症(例如乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、脑癌,胰腺癌、脑癌、肾癌、胃癌、白血病、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、肝癌、骨肉瘤、和 / 或黑素瘤)中使用的抗 Ax1 抗体。在某些实施方案中,提供了在治疗方法中使用的抗 Ax1 抗体。在某些实施方案中,本发明提供了在治疗具有癌症的个体的方法中使用的抗 Ax1 抗体,所述方法包括对个体施用有效量的抗 Ax1 抗体。在某些实施方案中,本发明提供了在治疗具有免疫病症(例如自身免疫性病症)、心血管病症(例如动脉粥样硬化、高血压、血栓形成)、传染病(例如埃博拉病毒、马尔堡 (Marburg) 病毒)或糖尿病的个体的方法中使用的抗 Ax1 抗体,所述方法包括对个体施用有效量的抗 Ax1 抗体。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,例如如下文所描述的。在又一些实施方案中,本发明提供了在抑制血管发生、抑制细胞增殖、抑制免疫功能、抑制炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能中使用的抗 Ax1 抗体。

[0393] 在某些实施方案中,本发明提供了在个体在抑制血管发生、抑制细胞增殖、抑制免疫功能、抑制炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能的方法中使用的抗 Ax1 抗体,所述方法包括对个体施用有效量的抗 Ax1 抗体以抑制血管发生、抑制细胞增殖、抑制免疫功能、抑制炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统发育(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能。依照任何上述实施方案的“个体”优选是人。

[0394] 在又一方面,本发明提供了抗 Ax1 抗体在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,药物用于治疗癌症(在一些实施方案中,乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、脑癌,胰腺癌、脑癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、白血病、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、肝癌、骨肉瘤、和 / 或黑素瘤)。在又一个实施方案中,所述药物用于治疗癌症的方法,包括对具有癌症的个体施用有效量的药物。在又一个实施方案中,药物在治疗免疫病症(例如自身免疫性病症)、心血管病症(例如动脉粥样硬化、高血压、血栓形成)、传染病(例如埃博拉病毒、马尔堡 (Marburg) 病毒)或糖尿病的方法中使用,所述方法包括对个体施用有效量的抗 Ax1 抗体。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,例如如下文所描述的。在又一个实施方案中,药物用于抑制血管发生、抑制细胞增殖、抑制免疫功能、抑制炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能。在又一个实施方

案中,药物用于在个体中抑制血管发生、抑制细胞增殖、抑制免疫功能、抑制炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能的方法,所述方法包括对个体施用有效量的药物以抑制血管发生、抑制细胞增殖、促进免疫功能、诱导炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统发育(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能。依照任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0395] 在又一方面,本发明提供了治疗癌症的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对具有此类癌症的个体施用有效量的抗 Ax1 抗体。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,如下文所描述的。依照任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0396] 在又一方面,本发明提供了治疗免疫病症(例如自身免疫性病症)、心血管病症(例如动脉粥样硬化、高血压、血栓形成)、传染病(例如埃博拉病毒、马尔堡 (Marburg) 病毒)或糖尿病的方法。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括对个体施用有效量的至少一种其它的治疗剂,如下文所描述的。依照任何上述实施方案的“个体”可以是人。

[0397] 在又一个方面,本发明提供了用于在个体中抑制血管发生、抑制细胞增殖、抑制免疫功能、抑制炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能的方法。在一个实施方案中,所述方法包括对个体施用有效量的抗 Ax1 抗体以抑制血管发生、抑制细胞增殖、促进免疫功能、诱导炎性细胞因子分泌(例如来自肿瘤相关巨噬细胞)、抑制肿瘤血管系统发育(例如肿瘤内血管系统或肿瘤相关血管系统)、和 / 或抑制肿瘤基质功能。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0398] 在又一方面,本发明提供了药物配制剂,其包含本文中提供的任何抗 Ax1 抗体,例如在任何上述治疗性方法中使用。在一个实施方案中,药物配制剂包含本文中提供的任何抗 Ax1 抗体和药学可接受载体。在另一个实施方案中,药物配制剂包含本文中提供的任何抗 Ax1 抗体和至少一种其它的治疗剂,例如如下文所描述的。

[0399] 可以单独或与疗法中的其它药剂组合使用本发明的抗体。例如,可以与至少一种其它的治疗剂共施用本发明的抗体。在某些实施方案中,其它的治疗剂是抗血管发生剂。在某些实施方案中,其它的治疗剂是 VEGF 拮抗剂(在一些实施方案中,抗 VEGF 抗体,例如贝伐单抗)。在某些实施方案中,其它的治疗剂是 EGFR 拮抗剂(在一些实施方案中,厄洛替尼)。在某些实施方案中,其它的治疗剂是化学治疗剂和 / 或细胞抑制剂。在某些实施方案中,其它的治疗剂是紫杉烷类(例如帕利他赛)和 / 或铂剂(例如卡铂)。

[0400] 上文记录的此类联合疗法涵盖联合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在相同或不同配制剂中),和分开施用,在该情况中,可以在施用其它的治疗剂和 / 或佐剂之前、同时、和 / 或之后发生本发明的抗体的施用。也可以与放射疗法组合使用本发明的抗体。

[0401] 可以通过任何合适的手段,包括胃肠外、肺内、和鼻内,及若期望用于局部治疗的话,损伤内施用来施用本发明的抗体(和任何其它的治疗剂)。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的,剂量给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射进行。本文中涵盖各种剂量给药日程表,包括但不限于单次施用或在多个时间点里的多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0402] 本发明的抗体应当以一种符合良好的医学实践的方式配制、确定剂量及给药。关于这一点考虑的因素包括在治疗的特定病症、在治疗的特定哺乳动物、患者个体的临床状态、病因、药物递送部位、给药方法、服药日程以及其它为开业医生所知的因素。抗体无需但可任选地与一种或多种目前用于预防或治疗所述病症的药物一起配制。上述其它药物的有效量取决于配方中所存在的抗体的量、所治疗病症的类型、以及其它上述讨论的因素。这些药物通常以相同的剂量使用并具有本文中所描述的给药途径,或以约 1-99% 的本文所描述的剂量使用,或以任何剂量并通过任何途径使用,所述剂量和途径是凭经验确定的 / 经临床测定合适的。

[0403] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体(当单独或与一种或多种其它其它的治疗剂联合使用时)的合适剂量应取决于所要治疗的疾病的类型、抗体的种类、疾病的严重性和病程、所给予抗体的预防或治疗目的、之前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的斟酌决定。抗体适合于在一次或一系列的治疗中给予患者。取决于疾病的类型和严重性,约 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ - 40mg/kg 的抗体可作为首次候选用量给予患者,无论是例如通过一次或多次单独的给药或通过连续输注。取决于上述提及的因素,一个典型的日剂量可在约 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ - 100mg/kg 或更多的范围内。对于几天或更长时间的重复给药,取决于病情,治疗应通常持续直至出现病症得到期望的抑制为止。上述剂量可间歇给予,如每周或每三周给予一次(如使得患者得到约 2- 约 20 个,或例如约 6 个剂量的抗体)。可给予初始较高的负荷剂量,接着给予一个或多个较低的剂量。然而,可使用其它给药方案。通过常规技术和测定方法易于监测该治疗的进展。

[0404] 应当理解,可以替换抗 Ax1 抗体或在抗 Ax1 抗体外使用本发明的免疫缀合物实施任何上述配制剂或治疗性方法。

[0405] H. 制品

[0406] 在本发明的另一方面,提供了一种制品,其含有可用于治疗、预防和 / 或诊断上文所描述的病症的材料。制品包含容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、管形瓶、注射器、IV 溶液袋、等等。容器可以由多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器容纳单独或与另一种组合物组合有效治疗、预防和 / 或诊断状况的组合物,并且可以具有无菌存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可穿过的塞子的管形瓶或静脉内溶液袋)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示使用组合物来治疗选择的状况。此外,制品可以包含 (a) 具有其中含有的组合物的第一容器,其中组合物包含本发明的抗体;和 (b) 具有其中含有的组合物的第二容器,其中组合物包含其它的细胞毒性或其它方面治疗性的药剂。在本发明的此实施方案中的制品可以进一步包含包装插页,其指示可以使用组合物来治疗特定的状况。或者 / 另外,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,其包含药学可接受缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer 氏溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包含从商业和用户观点看期望的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、和注射器。

[0407] 应当理解,任何上述制品可包括本发明的免疫缀合物来代替或补充抗 Ax1 抗体。

[0408] III. 实施例

[0409] 材料和方法

[0410] 抗体和细胞系。抗体得自下述供应商:针对人 Ax1 的小鼠单克隆抗体(单抗)

(Abnova, Taiwan), 磷酸-Akt 小鼠单抗和 Akt 多克隆抗体 (Cell Signaling)。小鼠重组 Gas6 和用于磷酸-Ax1 的 ELISA 试剂盒购自 R&D System。人癌细胞系得自 ATCC, 并在补充有 10%FBS 的 PRMI1640 培养基中培养。杂交瘤抗人 Ax1 单克隆抗体 12A11 和 3G9 由 Genentech 提供(参见 Li (2009))。

[0411] 噬菌体抗 Ax1 单克隆抗体的生成。为了生成抗体, 使用在选定互补决定区(H1、H2、H3)中具有合成多样性、模拟人 IgG 全集天然多样性的人噬菌体抗体文库进行淘选。在 M13 噬菌体颗粒的表面上二价展示 Fab 片段(Lee 等人, 2004)。在交替轮次中针对人和鼠 Ax1 ECD 淘选噬菌体抗体文库。通过 ELISA 和 DNA 测序来鉴定结合至人 Ax1 ECD-His 和鼠 Ax1 ECD-Fc 融合蛋白的噬菌体抗体, 并将抗体克隆重定格式以表达全长 IgG (Liang 等人, 2007)。个别克隆在哺乳动物细胞中瞬时表达并用蛋白 A 柱纯化(Carter 等人, 1992)。

[0412] 对噬菌体克隆筛选它们抑制 Baf3-Ax1 细胞的 Gas6 依赖性增殖的能力。选择两个在抑制 Baf3Ax1 细胞增殖方面展现出最高效力的克隆进行亲和力成熟。

[0413] 为了亲和力成熟, 在 M13 噬菌体的表面上展示单价 Fab 的噬菌粒(Liang 等人, 2007)充当文库模板来嫁接噬菌体抗体的轻链(V_L)和重链(V_H)可变域。如(Liang 等人, 2007)所述采用软随机化策略进行亲和力成熟, 并如(Sidhu 等人, 2004)所述使用高通量单点竞争性噬菌体 ELISA 来快速筛选高亲和力克隆。

[0414] 抗 Ax1 抗体的亲和力测量。对于抗 Ax1 抗体的结合亲和力测定, 使用表面等离子共振(SRP)测量, 用 BIAcore™-3000 仪器。为了测量抗 Ax1 抗体和人 Ax1 ECD-His 蛋白之间的亲和力, 通过用小鼠抗人 IgG 包被以实现大约 250 个响应单位(RU)的 CM5 生物传感器芯片来捕捉抗 Ax1 人 IgG。对于动力学测量, 于 25° C 以流速 30 μ l/min 在 PBT 缓冲液(含 0.05%Tween20 的 PBS)中注射人 Ax1 ECD-His 的两倍连续稀释液(440nM - 28nM)。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software version 3.2)计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。以 k_{off}/k_{on} 比计算平衡解离常数(K_D)。为了测量抗 Ax1 抗体对鼠 Ax1 ECD-Fc 融合蛋白的亲和力, 通过用小鼠抗人 IgG 包被以实现大约 150 个响应单位(RU)的 CM5 生物传感器芯片来捕捉鼠 Ax1 ECD 人 IgG 融合蛋白。对于动力学测量, 于 25° C 以流速 30 μ l/min 在 PBST 缓冲液(含 0.05%Tween20 的 PBS)中注射抗 Ax1 Fab 片段的两倍连续稀释液(200nM - 12nM)。

[0415] 细胞增殖测定法。在 96 孔板中以 5000 个细胞/孔接种细胞, 并用多种浓度的 Ax1 单抗处理 72 小时。使用 CellTiter-Glo 发光细胞存活力测定法(Promega)依照制造商的说明书测量细胞增殖。

[0416] ELISA 和荧光激活细胞分选(FACS)。如下实施 ELISA 测定法: 用 0.5%BSA、PBS、0.05%Tween20 (PBST) 封闭山羊抗人 IgG Fc 包被的板。对于交叉反应测定法, 将经过包被的板与人 Ax1.Fc、小鼠 Ax1.Fc 或人 Mer.Fc、Tyro-3.Fc 一起于室温温育 1 小时, 在 PBST 中清洗四次, 与抗 Ax1 单抗和 HRP 偶联的抗小鼠 Ig 一起温育。对于结合测定法, 将经过包被的板与人 Ax1.Fc 一起于室温温育 1 小时, 在 PBST 中清洗四次, 与 rmGas6 和抗 Ax1 单抗一起于室温温育 1 小时。将板在 PBST 中清洗四次, 与生物素化抗 mGas6 和链霉亲和素-HRP 一起温育。使用 R&D ELISA 试剂盒依照制造商的说明书测量分泌的 Ang-2 和 DKK3。通过 FACS 使用标准技术测定细胞表面上的 Ax1 表达。简言之, 收获细胞, 用抗 Ax1 单抗(12A11, 10 μ g/ml)在冰上染色 30 分钟, 在 PBS 中清洗两次, 然后用 PE 偶联的二抗染色。为了测定阻

断 Gas6 结合细胞表面上 Ax1 的抗体,收获细胞,用抗 Ax1 单抗染色 30 分钟,并与 rmGas6 一起在冰上温育 30 分钟。将它们在 PBS 中清洗两次,并用生物素化抗 Gas6 和 PE 偶联的链霉亲合素染色。在 BD FACScalibur 流式细胞仪上分析样品。

[0417] 异种移植实验。所有研究依照“实验动物护理和使用指南”(NIH)进行,并得到了科研动物护理和使用委员会(IACUC)批准。将 Matrigel (MDA-MB-231)中的总共 5×10^6 (A549) 或 10^7 个细胞分别皮下植入裸(A549)或 SCID 小鼠(MDA-MB-231)的右体侧中。当平均肿瘤尺寸达到 100 mm^3 时,将小鼠随机分入不同处理组($n=10$ 只每组)。每周两次,经腹膜内注射(IP),以 $10\text{--}30 \text{ mg/kg}$ 施用抗 Ax1 或对照 IgG1 抗体,以 $1\text{--}2 \text{ mg/kg}$ 施用抗 VEGF。通过口腔管饲法以 100 mg/kg/d 施用厄洛替尼。分别以持续 5 天 6.25 mg/kg/d 及处理开始时单剂 100 mg/kg 皮下施用帕利他赛和卡铂。使用双向 Anova 实施统计分析,比较不同处理组中的肿瘤生长。

[0418] 对于药效学(PD)研究,将小鼠用抗体处理 0、24、72 和 168 小时。在每一个时间点,取出肿瘤,为免疫组织化学染色和图像分析进行加工,并用于生成细裂解物进行 Western 印迹分析。

[0419] 对于转移研究,经尾静脉注射将 5×10^5 个经萤光素酶报告基因(Li 等人,2009)稳定转染的 MDA-MB-231 细胞植入 SCID 小鼠中。如(Li 等人,2009)所述,通过生物发光检测来监测肿瘤细胞对各器官的转移。

[0420] 免疫组织化学。异种移植肿瘤样品在 10% 中性缓冲的福尔马林中固定,加工,在石蜡中包埋,并以 $4 \mu\text{m}$ 切片。然后将薄切片用针对 Ki67、经过切割的胰天蛋白酶 3 和 MECA32 的一抗处理,接着是生物素化二抗和 DAB 发色团。

[0421] 自 Cureline Inc 获得原发性人乳腺癌组织微阵列,包括导管和转移性腺癌。使用先前(Li 等人,2009)描述的抗 Ax1 单克隆抗体实施 Ax1 IHC,并使用 CD68 对巨噬细胞染色。对于双重 Ax1/CD68 IHC,首先使用 Vector ABC Elite HRP 试剂和 DAB 底物以 $2 \mu\text{g/ml}$ 实施 Ax1 染色。序贯地以 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 运行 CD68 染色,也使用 ABC Elite-HRP 试剂,但是改用 Vector SG 色原体(Blue/Grey)。在两种复合物之间实施一个第二靶抗原修复步骤以洗掉第一复合物,从而避免两种标志物的交叉反应性。

[0422] 血管密度测量和数据分析。用 MECA32,一种泛内皮细胞标志物对肿瘤样品染色。通过 Ariol SL-50 自动化载玻片扫描平台(Genetix Ltd.; Hampshire, UK)以 100 倍最终放大倍数获取图像。输出肿瘤特异性区域,在 Metamorph 软件包(MDS Analytical Technologies; Ontario, Canada)中作为个体 8 位图像进行分析。如(Brey 等人,2003)描述的,使用蓝色标准化算法自苏木精复染色分离出褐色 DAB 特异性染色。一种分段算法基于尺寸和形状来鉴定血管并除去噪声。细胞基于尺寸、形状、和苏木精染色密度而鉴定为肿瘤或非肿瘤。非肿瘤区域通过非肿瘤细胞对肿瘤细胞的密度来鉴定。分析完成后,人工检查图像以除去不正确地鉴定为血管或肿瘤区域的伪像。对各个血管,以及每一幅图像中的肿瘤和非肿瘤区域记录面积测量。使用 JMP8.0 软件(SAS Institute, Inc., North Carolina, USA)分析了基于图像分析的原始值。实施了 Student's t 检验来比较每一对均值, $p < 0.05$ 。

[0423] 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的分离和分泌性细胞因子的检测。解剖肿瘤,切成小块,并在含 2.5%FBS、 0.2 U/ml Liberase Blendzymes II 和 5 U/ml DNA 酶 I, (Roche)的 RPMI1640 培养基中温育。使用 MACS Dissociator (Miltenyi Biotec)解离肿瘤细胞,并于室温维持

20 分钟。添加 EDTA (终浓度 0.002%) 以终止反应。制备单细胞悬浮液, 并使用 RBC 裂解缓冲液(eBioscience)除去红细胞。将细胞以 10^7 个细胞 /ml 在含有 1%FBS 的 PBS 中重悬浮, 并与 $20 \mu\text{g/ml}$ FcRII、III 和 IV 一起温育 20 分钟。添加抗 F4/80-PE (eBioscience) 和抗 CD11c-APC (BD Pharmingen) ($0.2 \mu\text{g}/10^6$ 个细胞), 并在冰上温育 30 分钟。通过 FACS Aria (BD Biosciences) 分选 F4/80 和 CD11c 阳性细胞。在 96 孔板中接种总共 2×10^5 个 F4/80 和 CD11c 阳性细胞并温育过夜。收集培养液, 并使用 Bio-Plex 小鼠细胞因子测定法(Bio-Rad) 依照制造商的说明书测定细胞因子和趋化因子水平。

[0424] 表位作图

[0425] 通过标准分子生物学技术生成 Ax1-2 (PRK HuAx1 (1-134Aa) /HuIgG1Fc)、Ax1-3 (PRK HuAx1 (1-221Aa) /HuIgG1Fc)、Ax1-4 (PRK HuAx1 (1-324Aa) /HuIgG1Fc)、和 Ax1-5 (PRK HuAx1 (1-435Aa) /HuIgG1Fc) 质粒构建物。通过直接测序和 / 或限制性消化验证了所有质粒。使用 Promega L2080TNT SP6 快速转录 / 翻译系统试剂盒体外转录和翻译编码 Ax1 胞外域各个部分(aa1-134, aa1-221, aa1-324, aa1-435) 的质粒, 并在 ELISA 中用作抗原。这些实验中使用的 Ax1 各部分包括: 人 Ax1 的氨基酸 1-134 (包含 Ax1 的 Ig1): MAWRCP RMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQLQVQGEPEVHWLRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQRLRITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVG (SEQ ID NO:111), 和人 Ax1 的氨基酸 221-324 (包含 Ax1 纤连蛋白域): ITVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWL (SEQ ID NO:130)。

[0426] 抗体竞争实验。为了测定噬菌体抗 Ax1 单抗 YW327.6 或 YW327.42 是否与杂交瘤抗 Ax1 单抗 12A11 和 3G9 竞争, 将 A549 细胞用抗 Ax1 噬菌体抗体(每种 $50 \mu\text{g/ml}$) 和杂交瘤抗 Ax1 抗体(每种 $10 \mu\text{g/ml}$) 共染色 30 分钟。将细胞在 PBS 中清洗两次, 并用抗小鼠 Ig-PE 染色。如上文关于 FACS 分析所述, 在 BD FACScalibur 流式细胞仪(BD Biosciences) 上分析样品。

[0427] 结果

[0428] 阻断 Ax1 功能的噬菌体衍生单克隆抗体的生成。为了鉴定与鼠和人 Ax1 交叉反应的抗体, 我们采用了在选定互补决定区中具有合成多样性、模拟人 IgG 抗体天然多样性的噬菌体展示抗体文库(Lee 等人, 2004)。通过 ELISA 和 DNA 测序鉴定了结合人和鼠 Ax1 ECD 二者的噬菌体抗体, 并抗体克隆重定格式以表达全长 IgG (Liang 等人, 2007)。然后对一组全长 IgG 筛选它们抑制 Baf3Ax1 细胞的 Gas6 依赖性生长的能力(Li 等人, 2009), 并对克隆之一 YW327.6 进行亲和力成熟和纯化。

[0429] 亲和力成熟的 Ax1 单抗 YW327.6S2 以高亲和力与人和鼠 Ax1 二者结合, Kd 分别为约 1nM 和 545pM(图 7A-B)。具体而言, Ka 为 1.7×10^5 , kd 为 1.7×10^4 , 而 KD 为 9.9×10^{-10} 。此抗体还与猕猴 Ax1 结合, 但是它不与相关受体 Tyro3 和 Mer 交叉反应(图 7C)。YW327.6S2 以剂量依赖性方式(图 7D-E) 阻断配体 Gas6 结合 Ax1, 如无细胞 ELISA 和细胞表面 FACS 二者中证明的。

[0430] 还表征了亲和力成熟的 Ax1 单抗 YW327.6S11、YW327.42S8 和 YW327.42S31。YW327.6S11、YW327.42S8 和 YW327.42S31 以高亲和力结合人和鼠 Ax1 二者。例如, 抗体结合人 Ax1 的 Biacore 分析产生下述结果:

	Hu Axl	Ka	kd	KD
[0431]	YW327.6S11	1.7×10^5	1.7×10^4	1.3×10^9
	YW327.42S8	5.2×10^4	1.3×10^4	2.5×10^9
	YW327.42S31	6.3×10^4	1.5×10^4	2.4×10^9

[0432] 这些抗体不与 Tyro3 和 Mer 交叉反应。YW327.6S2 (和亲本抗体 YW327.6) 阻断配体 Gas6 结合 Axl, 而 YW327.42S8 和 YW327.42S31 (和亲本单抗 YW327.42) 不阻断配体 Gas6 结合 Axl。

[0433] Axl 表位分析。使用 ELISA 分析了结合人 Axl 胞外域各部分的 Axl 抗体。获得了结果。

		YW327.6	YW327.42
[0434]	Axl2 (aa1-134)	+	-
	Axl-3 (aa1-221)	+	-
[0435]	Axl-4 (aa1-324)	+	+

[0436] YW327.6 结合包含人 Axl 氨基酸 1-134 的 Axl-Fc 融合物。比较而言, YW327.42 结合包含人 Axl 氨基酸 1-324 的 Axl-Fc 融合物, 但是不结合包含氨基酸 1-134 和 1-221 的 Axl Fc 融合物。如此, 我们得出结论, YW327.6 结合由人 Axl 氨基酸 1-134 组成的多肽, 而且人 Axl 氨基酸 222-234 是 YW327.42 结合所需要的。氨基酸 1-134 含有 Axl IgI 域, 而氨基酸 222-234 含有 Axl 纤连蛋白域。

[0437] 与抗 Axl 杂交瘤抗体的比较实验。我们测定了抗体 YW326.6 和 YW327.42 是否能够与抗 Axl 杂交瘤抗体 12A11 和 3G9 (Li, (2009), 2009 年 7 月 27 日提交的美国专利申请 No. 61/228, 915) 竞争人 Axl 结合。在对人 Axl 的抗体竞争结合实验中, 抗体 YW327.6 不与杂交瘤抗体 12A11 或 3G9 竞争人 Axl 结合, 证明这些抗体不识别相同表位。抗体 YW327.42 与杂交瘤抗体 12A11 竞争人 Axl 结合, 但是不与杂交瘤抗体 3G9 竞争人 Axl 结合。

[0438] YW327.6S2 下调 Axl 表达, 抑制其激活、信号传导和 Gas6 依赖性 Baf3Axl 细胞增殖。为了测试 YW327.6S2 是否影响 Axl 生物学功能, 我们首先评估了它对 Axl 表达和信号传导的影响。用 YW327.6S2 处理 NSCLC 细胞系 A549 导致细胞表面上的 Axl 表达快速下调 (图 7F, 上部小图), 而且此下调持续 24 小时 (图 7F, 下部小图)。H1299NSCLC 细胞的 Gas6 处理诱导 Axl 磷酸化, 其在细胞与 YW327.6S2 一起预温育时受到抑制 (图 7G, 上部小图)。因此, H1299 细胞与 YW327.6S2 一起预温育阻断 Gas6 诱导的下游信号传导分子 Akt 磷酸化 (图 7G, 下部小图)。YW327.6S2 对 Axl 表达的下调和对其信号传导的灭活有力地抑制 Baf3Axl 细胞的 Gas6 依赖性生长, IC50 为 340ng/ml (图 7H)。

[0439] YW327.6S2 降低 A549 异种移植物生长且增强抗 VEGF 的效果。在一项先前的研究中, 我们显示了通过 RNAi 或抗人 Axl 杂交瘤单克隆抗体处理来抑制 Axl 显著削弱 A549NSCLC 肿瘤生长 (Li 等人, 2009)。因此, 我们首先在此模型中测试了 YW327.6S2 对肿瘤生长的影响。YW327.6S2 单独 10mg/kg、每周两次给药方案显著降低 A549 肿瘤生长 (图 8A), 而且此抑制效应与抗人 Axl 杂交瘤抗体相当 (图 8C)。

[0440] Axl 在内皮细胞上表达且增强 VEGF 诱导的内皮小管形成 (Li 等人, 2009; Holland 等人, 2005), 我们测试了抗 Axl 单抗是否能够增强抗 VEGF 的抗肿瘤生长特性 (Liang 等人,

2006)。单独的抗 VEGF 抗体和单独的 YW327.6S2 对 A549 肿瘤生长具有相似影响(图 8A)。两种抗体一起的组合导致与单独的任一抗体相比增强的肿瘤生长抑制,单一药剂的 30% 抑制对组合处理的 60% 抑制(图 8A)。

[0441] 给这些研究中的动物在 60 天里每周服药两次并跟踪至第 85 天以检查肿瘤生长的延迟(当肿瘤尺寸超过 800mm³时,自研究移除动物;没有动物因毒性而移除)。YW327.6S2 在与抗 VEGF 组合时与单一药剂相比显著延迟肿瘤生长(图 8A)。自最后一剂至实验结束(第 85 天)的时间期间组合处理组中没有肿瘤再生长,这导致实验结束时这组中的所有动物存活,如 Kaplan-Meier 图中所示(图 8B)。

[0442] 抗人 Ax1 杂交瘤单克隆抗体 12A11 不与鼠 Ax1 交叉反应,显著削弱 A549 异种移植肿瘤生长(Li 等人,2009),还增强抗 VEGF 的效果,如图 8C 中所示。这符合预期,因为 12A11 直接抑制肿瘤细胞生长而抗 VEGF 影响肿瘤血管系统。

[0443] YW327.6S2 下调受体表达且诱导 A549 肿瘤细胞凋亡。为了开始了解介导 YW327.6S2 降低肿瘤生长的效果的机制,我们实施了药效学研究。用 YW327.6S2 处理携带 A549 肿瘤的小鼠,并在给药后 0、24、72、和 168 小时取出肿瘤。肿瘤裂解物的 Western 印迹分析显示了 Ax1 表达在抗体施用后 24 小时下调并持续 168 小时(图 8D),提示 YW327.6S2 的抗肿瘤生长效果部分地通过下调 Ax1 表达来介导。

[0444] 为了测定 YW327.6S2 是否对肿瘤细胞增殖和凋亡具有直接影响,取出用对照或 YW327.6S2 处理两周的 A549 异种移植肿瘤,并实施了经过切割的胱天蛋白酶 3 (CC3) 和 Ki67IHC。用 YW327.6S2 处理的肿瘤展现出与对照相比升高的 CC3(图 8E),提示 YW327.6S2 诱导肿瘤细胞凋亡。在对照和 YW327.6S2 处理的肿瘤之间 Ki67 阳性核没有显著差异,提示 YW327.6S2 不直接影响肿瘤细胞增殖。

[0445] 为了调查 YW327.6S2 是否影响肿瘤相关血管系统,我们用单独的或与抗 VEGF 组合的 YW327.6S2 处理携带 A549 肿瘤的小鼠。取出肿瘤,并用 MECA32 (一种泛内皮标志物)染色以检查肿瘤内血管密度。单独的 YW327.6S2 与对照相比没有显著降低血管密度,但是与抗 VEGF 的组合导致肿瘤相关血管密度显著降低(图 8F)。比较而言,12A11 自身或与抗 VEGF 组合对肿瘤内血管密度没有显著影响。

[0446] YW327.6S2 增强厄洛替尼和化疗的效果。为了测试 YW327.6S2 是否能够增强 NSCLC 标准护理的治疗指数,我们实施了 YW327.6S2 与 EGFR 小分子抑制剂(SMI)厄洛替尼和化疗的组合处理。

[0447] A549 含有野生型 EGFR 且对厄洛替尼只是中度敏感(Yauch 等人,2005);因此,我们调查了抗 Ax1 单抗是否能使这些细胞变得对 EGFR SMI 敏感。YW327.6S2 和厄洛替尼在作为单一药剂施用时导致肿瘤生长降低 30%,但是组合将肿瘤生长速率降低多于 50%(图 9A),提示抗 Ax1 单抗增强厄洛替尼的抗肿瘤生长效果。

[0448] 然后,我们调查了抗 Ax1 单抗是否能够增强 NSCLC 标准护理的治疗指数。用一个周期的化疗处理携带 A549 异种移植的小鼠,该化疗由在处理开始(第 0 天,图 9B)时施用的帕利他赛(6.25mg/kg/d,5 天)和卡铂(100mg/kg,一剂)组成。单独的化疗与单独施用的 YW327.6S2 对肿瘤生长具有相似效果,而二者的组合导致增强的肿瘤生长抑制(图 9B)。

[0449] YW327.6S2 在 MDA-MB-231 乳腺癌异种移植模型中降低血管密度且抑制来自肿瘤相关巨噬细胞的炎性细胞因子分泌。由于通过 shRNA 实现的 Ax1 敲低对 MDA-MB-231 异种

移植物肿瘤生长只具有中等效果(Li 等人,2009),因此我们想问 YW327.6S2 在此模型中是否有效。单独的 YW327.6S2 能够降低肿瘤生长(25%),而且在此模型中与作为单一药剂使用的抗 VEGF 具有相似效果(图 10A)。组合疗法导致肿瘤生长降低 50%,提示 YW327.6S2 加强抗 VEGF 的效果(图 10A)。比较而言,抗 Ax1 杂交瘤抗体 12A11 (Li 等人,2009)不与鼠 Ax1 交叉反应,在此模型中作为单一药剂对肿瘤生长没有显著影响,也不影响抗 VEGF (图 10B)。Western 印迹分析显示了 YW327.6S2 和 12A11 都下调肿瘤中的 Ax1 表达(图 10C 和 D)。这些结果提示 YW327.6S2 的抗肿瘤生长效果可能通过调控肿瘤基质功能来介导。

[0450] 为了进一步调查 YW327.6S2 如何调控肿瘤基质功能,我们用单独的或与抗 VEGF 组合的 YW327.6S2 处理携带 MDA-MB-231 肿瘤的小鼠。在施用抗体后的多个时间点,取出肿瘤,并用 MECA32 染色以检查肿瘤内血管密度。YW327.6S2 和抗 VEGF 都与对照相比显著降低血管密度(图 10E)。而且,两种抗体的组合导致肿瘤相关血管密度进一步降低。这些结果提示 YW327.6S2 部分地通过改变血管功能来降低 MDA-MB-231 肿瘤生长。

[0451] 在原发性人乳腺癌标本中,我们发现了 Ax1 蛋白在浸润巨噬细胞中强表达(图 10F),因此想问 Ax1 单抗 YW327.6S2 是否影响肿瘤相关巨噬细胞(TAM)功能。将 MDA-MB-231 异种移植物肿瘤用 YW327.6S2、12A11 或对照抗体处理一周,并通过分选 F4/80 阳性细胞来分离 TAM。将细胞在无血清培养基中培养过夜,收集上清液并测定多种细胞因子和趋化因子的存在。来自用 YW327.6S2 和 12A11 处理的肿瘤的 TAM 生成与用对照抗体处理的 TAM 相比水平低得多的炎性细胞因子和趋化因子(图 10G)。任一 Ax1 单抗处理不影响 TAM 上的 Ax1 表达水平(数据未显示),与这些抗体对肿瘤细胞上 Ax1 表达的下调不同(图 10C 和 D)。这些结果提示 Ax1 单抗最有可能以间接方式调控来自 TAM 的炎性细胞因子 / 趋化因子分泌,可能是通过阻断肿瘤和基质细胞之间的交流(crosstalk)。

[0452] YW327.6S2 降低 MDA-MB-231 乳腺癌细胞转移至骨。在一项先前的研究中,我们显示了在正位模型中通过 shRNA 实现的 Ax1 敲低抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞转移至肺(Li 等人,2009),因此我们测试 YW327.6S2 是否影响这些细胞的转移。经尾静脉将稳定表达萤光素酶报告基因的 MDA-MB-231 细胞(20)注射入 SCID 小鼠中。注射后四周,在对照抗体处理组中的所有五只动物的颅面区、胫骨和股骨检测到强发光信号。在对照组中通过生物发光检测到的位点为每只动物中 5、5、4、3 和 1 个,总共 18 个(图 11A)。在用 YW327.6S2 处理的小鼠中,通过生物发光检测到的位点显著减少,每只动物中 0、1、2、3、和 1 个位点,整个组总共 7 个(图 11A)。骨中转移灶的存在得到了组织学分析的验证(图 11B)。这些结果提示 YW327.6S2 能够降低 MDA-MB-231 乳腺癌细胞转移至远端器官。

[0453] 讨论

[0454] 我们开发并表征了人抗 Ax1 单克隆抗体(YW327.6S2),其展现跨物种反应性且阻断 Ax1 在肿瘤发生中的各种功能。在作为对 Ax1 报告的第一种完全人源化阻断性抗体之外,YW327.6S2 不仅充当用于剖析 Ax1 激活 / 信号传导在癌症形成和进展的多个方面中的影响的一种有力工具,而且代表用于治疗多种癌症的一种潜在治疗剂。

[0455] 我们的结果显示了 YW327.6S2 阻断 Ax1 功能,这通过下调 Ax1 表达以及抑制配体 Gas6 结合受体,导致 Ax1 及其下游信号传导灭活来实现(图 7)。YW327.6S2 下调癌细胞中 Ax1 表达的能力代表它的抑制效果的一种重要机制,因为多种癌症组成性表达活化的 Ax1 且不再响应外源 Gas6 (Li 等人,2009)。

[0456] 在 A549NSCLC 模型中, YW327.6S2 在作为单一药剂施用显著削弱肿瘤生长(图 8A)。此抑制效果与抗 Ax1 杂交瘤抗体在此模型中的抑制效果相当(Li 等人(2009);图 8C)。YW327.6S2 快速下调异种移植物中的 Ax1 表达(图 8D), 且诱导肿瘤细胞凋亡(图 8E), 这很可能是介导它对肿瘤生长的抑制效果的机制之一。我们先前的发现, 即 Ax1 通过调节 DKK3 和血管生成素/Tie2 途径来调控内皮细胞功能(Li 等人, 2009), 提出了抗 Ax1 单抗增强抗 VEGF 在降低肿瘤生长方面的效果的可能性。我们的结果(图 8A 和 F)与这种假说一致, 即 YW327.6S2 通过增强抗 VEGF 降低肿瘤内血管密度的效果来影响肿瘤血管系统。确实, A549 模型中 YW327.6S2 和抗 VEGF 的共施用导致肿瘤停滞, 在处理停滞维持至少 4 周(图 8B)。杂交瘤抗体 12A11 在此模型中还增强抗 VEGF 的抗肿瘤效果(图 8C)。然而, 与 YW327.6S2 不同, 12A11 对肿瘤血管系统不具有直接影响;而是直接抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡(Li 等人, 2009)。12A11 对肿瘤生长和抗 VEGF 对肿瘤血管系统的效果在两种药剂一起使用时导致升高的效果。

[0457] EGFR 小分子抑制剂诸如厄洛替尼有效治疗包含 EGFR 突变或扩增的 NSCLC 肿瘤(Lynch 等人, 2004;Paez 等人, 2004;Eberhard 等人, 2005;Giaccone 等人, 2005;Tsao 等人, 2005)。还知道用 Her2/EGFR 小分子抑制剂拉帕替尼或抗 Her2 抗体 Herceptin 处理乳腺癌细胞导致诱导 Ax1 表达和因此导致癌细胞对这些疗法的抗性(Liu 等人, 2009)。我们最近发现了 Ax1 表达在已经对厄洛替尼获得了抗性的 HCC827NSCLC(一种包含 EGFR 突变和扩增二者的细胞系)细胞中得到诱导, 而且抗性细胞中的 Ax1 敲低恢复它们对厄洛替尼的敏感性, 提示 Ax1 在 NSCLC 中的厄洛替尼抗性中发挥作用。由于 A549 细胞含有野生型 EGFR 且只是在体外对 EGFR 抑制中度敏感(Yauch 等人, 2005), 因此我们想问抗 Ax1 单抗是否会使这些细胞对厄洛替尼敏感。我们的结果显示了 YW327.6S2 强化厄洛替尼在降低肿瘤生长方面的效果(图 9A), 提示抗 Ax1 单抗增强 EGFR 抑制剂在对单独的 EGFR 抑制不应的肿瘤中的功效, 可能是通过直接降低肿瘤细胞中的 Ax1 表达。

[0458] 系统化疗在 NSCLC 的治疗范例中占最大部分。对于复发性或晚期疾病, 用由卡铂/帕利他赛组成的化疗治疗的患者具有 15% 的响应率和 10.3 个月的中值存活(Sandley 等人, 2006)。我们在 A549NSCLC 模型中得到的结果显示了 YW327.6S2 能够增强卡铂/帕利他赛的抗肿瘤功效(图 9B), 提示阻断 Ax1 功能改善化疗在此疾病中的治疗指数。我们的结果与一份最近的报告一致, 该报告证明了在 4T1 乳腺癌正位模型中 Ax1 小分子抑制剂与顺铂协同来遏制肝微转移(Holland 等人, 2010)。

[0459] 在 MDA-MB-231 乳腺癌模型中, 单独的 YW327.6S2 能够显著削弱肿瘤生长(图 10A)。该抗 Ax1 杂交瘤抗体不与鼠 Ax1 交叉反应且因此只会影响肿瘤细胞, 在此模型中对肿瘤生长没有显著影响(图 10B)。这些结果提示 YW327.6S2 很可能经由它对肿瘤基质的作用来发挥它的抗肿瘤效果。我们的结果显示了 YW327.6S2 降低肿瘤内血管密度(图 10E)且增强抗 VEGF 的效果。经由它对肿瘤血管系统的作用, YW327.6S2 影响肿瘤生长。

[0460] 早就认识到癌症形成和炎症之间的关联(Balkwill 和 Mantovani, 2001;Coussens 和 Werb, 2002)。与感染和刺激有关的慢性炎症可产生促成基因组损害和肿瘤启动的环境。越来越多的证据证明 TAM 在肿瘤进展中具有因果作用, 包括促进血管发生和基质再塑(Balkwill 等人, 2005;Pollard, 2004)。认为负责这个的信号是炎性细胞因子, 包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 6 (IL-6)和趋化因子过剩。这些细胞因子和趋化因子不仅将

免疫细胞募集至刺激肿瘤进展的特定部位,而且显示了它们的受体在肿瘤细胞上表达,它们在那里能提高肿瘤生长和迁移(Haghnegahdar 等人,2000)。在原发性人乳腺癌中,Ax1 蛋白在肿瘤相关巨噬细胞(TAM)上以高水平表达(图 10F)。我们在这里提供了证据来证明抗 Ax1 单抗能经由一种间接机制来调控这些细胞的功能。我们的数据显示了用 YW327.6S2 或 12A11 (其不与鼠 Ax1 交叉反应且因此不对 TAM 具有直接影响)处理 MDA-MB-231 异种移植抑制来自 TAM 的炎性细胞因子和趋化因子分泌(图 10G)。由于 Ax1 单抗似乎对 TAM 上的 Ax1 表达没有显著影响但下调肿瘤细胞上的受体表达,很可能抗 Ax1 单抗通过阻断肿瘤和基质细胞之间的交流来调控来自 TAM 的细胞因子/趋化因子分泌。这些结果与最近的报告一致,即肿瘤细胞能通过教导浸润白细胞来诱导 Gas6 表达来促进它们的生长(Loges 等人,2010);而且 Ax1 的小分子抑制剂降低 4T1 乳腺肿瘤细胞中的 GM-CSF 表达(Holland 等人,2010)。

[0461] 先前的研究已经确立了 Ax1 在促进肿瘤细胞迁移、侵入和转移中的作用(Zhang 等人,2008;Li 等人,2009;Tai 等人,2008;Vajkoczy 等人,2006;Gjerdrum 等人,2010)。我们在这里显示了 YW327.6S2 能够降低 MDA-MB-231 乳腺癌细胞对骨的转移。这些结果与我们先前的数据一致,即在一种正位模型中乳腺癌细胞中通过 RNAi 实现的 Ax1 沉默抑制它们对肺的转移(Li 等人,2009;Gjerdrum 等人,2010),提示此抗 Ax1 抗体不仅在原发性肿瘤的治疗中,而且在转移性疾病中具有治疗潜力。

[0462] 总之,我们开发了一种阻断 Ax1 功能的人单克隆抗体。此抗 Ax1 单抗经由多种机制来发挥它的抗肿瘤效果,包括诱导肿瘤细胞凋亡、调节血管发生和调控肿瘤相关免疫细胞功能。另外,此抗 Ax1 单抗增强抗 VEGF、EGFR SMI 以及化疗的抗肿瘤功效,因此代表这些疗法作为标准护理的临床设置中的一种新的治疗办法。

[0463] 部分参考文献列表

[0464] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? (2001). *Lancet* 357:539-45.

[0465] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 17:211-7.

[0466] Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. (2001). Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Ann Oncol* 12:819-24.

[0467] Brey EM, Lalani Z, Johnston C, Wong M, McIntire LV, Duke PJ, Patrick Jr CW. (2003). Automated Selection of DAB-labeled Tissue for Immunohistochemical Quantification. *J Histochem & Cytochem* 51:575-84.

[0468] Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kottis C, Carver ME, Shepard HM. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-89.

[0469] Chung BI, Malkowicz SB, Nguyen TB, Libertino JA, McGarvey T W. (2003). Expression of the proto-oncogene Ax1 in renal cell carcinoma. *DNA Cell*

Biol22:533-40.

[0470] Coussens LM, Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*420:860-7.

[0471] Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG. (1995). Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer*60:791-7.

[0472] Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, et al. (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol*23:5900 - 9.

[0473] Giaccone G. (2005). Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*23:3235 - 42.

[0474] Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, et al. (2010). Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*107:1124-29.

[0475] Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N,

[0476] Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A. (2000). The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukoc Biol*67:53-62.

[0477] Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieria AM, Atchison RE, et al. (2005). Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res*65:9294-303.

[0478] Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. (2010). R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res*70:1544-54.

[0479] Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin M T, Lai GM, Chuang SE. (2008). Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer Lett*268:314-24.

[0480] Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, et al. (2008). Axl and growth arrest-specific gene6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*14:130-8.

[0481] Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, Yamashita S, Sekine I. (1999). Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid*9:563-7.

[0482] Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR. (1991). A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*6:2113-20.

- [0483] Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJ, Alvarez
- [0484] H, Maitra A. (2009). The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 8:618-26.
- [0485] Lai C, Lemke G. (1991). An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* 6:691-704.
- [0486] Lee CV, Liang WC, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. (2004). High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J Mol Biol* 340:1073-93.
- [0487] Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L. (2009). Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* 28:3442-55.
- [0488] Lian WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, et al. (2006). Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 281:951-61.
- [0489] Liang WC, Dennis MS, Stawicki S, Chantery Y, Pan Q, Chen Y, Eigenbrot C, Yin J, Koch AW, Wu X, et al. (2007). Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol* 366:815-29.
- [0490] Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM. (2009). Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res* 69:6871-8.
- [0491] Loges S, Schmidt T, Tjwa M, van Geyte K, Lievens D, Lutgens E, et al. (2010). Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood* 115:2264-73.
- [0492] Lynch TJ, Bell TW, Sordella R, et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-39.
- [0493] Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, Wisner L, Iorio M, Shakalya K, Garewal H, Nagle R, Bearss D. (2007). A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 26:3909-19.
- [0494] Meric F, Lee WP, Sahin A, Zhang H, Kung HJ, Hung MC. (2002). Expression profile of tyrosine kinases in breast cancer. *Clin Cancer Res* 8:361-7.
- [0495] O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al. (1991). Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia

cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*11:5016-31.

[0496] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*304:1497 - 500.

[0497] Pollard JW. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*4:71-8.

[0498] Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*131:1190-203.

[0499] Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. (2005). Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*204:36-44.

[0500] Sandley A, Gray R, Perry MC et al. (2006). Palitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*355:2542-50.

[0501] Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu C W. (2005). Expression of axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia*7:1058-64.

[0502] Sidhu SS, Li B, Chen Y, Fellouse FA, Eigenbrot C, Fuh G. (2004). Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol*338:299-310.

[0503] Sun W, Fujimoto J, Tamaya T. (2004). Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. *Oncology*66:450-7.

[0504] Tai KY, Shieh YS, Lee CS, Shiah SG, Wu C W. (2008). Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF-kappaB and Brg-1. *Oncogene*27:4044-55.

[0505] Tsao MS, Sakurada A, Lorimer I, et al. (2005). Molecular analysis of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and protein expression in patients treated with erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) trial BR. 21. *J Clin Oncol*23:7007. Meeting Abstracts.

[0506] Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Koblighk H, et al. (2006). Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci USA*103:5799-5804.

[0507] Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, Lui WY, Lin WC. (2002). Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res*22:1071-8.

[0508] Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, et al. (2005). Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res*11:8686-98.

[0509] Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, et al. (2008). AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res* 68:1905-15.

[0510] 虽然出于清楚理解的目的, 前述发明已经作为例示和例子相当详细地进行了描述, 但是说明书和实施例不应解释为限制本发明的范围。通过提及而明确将本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容完整收录。

[0001]

序列表

<110> 基因泰克公司 (GENENTECH, INC.) et al.
<120> 抗 Ax1 抗体及使用方法
<130> P4436R1-W0
<140>
<141>
<150> 61/356,508
<151> 2010-06-18
<160> 166
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Thr Gly His Trp Ile His
1 5 10
<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽
<400> 2
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly
<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽
<400> 3
Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
1 5 10 15
Asp Tyr
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽
<400> 4
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

[0002]

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 5
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 6
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 7
Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 8
Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 9
Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
1 5 10 15

Asp Tyr

[0003]

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 10
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 11
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 12
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 13
Gly Phe Ser Phe Thr Gly Thr Trp Ile His
1 5 10

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 14
Gly Trp Ile Ala Pro Tyr Ser Arg His Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 15
Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 16
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 17
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 18
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 19
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 20
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

[0005]

Lys Gly

<210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 21
Ala Arg Glu Tyr Asn Asp Trp Arg Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 22
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 23
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 24
Gln Gln Ser Tyr Ser Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 25
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His
1 5 10

[0006]

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 26
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 27
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 27
Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Ala Ser Ser Tyr Val Gly Tyr Ala Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 28
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 29
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 30
Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 31
<211> 10

[0007]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 31
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 32
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 32
Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 33
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 33
Ala Arg Glu Tyr Pro Gly Trp Gly Gly Ser Ser Ile Gly Tyr Glu Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 34
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 35
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 36
Gln Gln Ser Tyr Tyr Phe Arg Ser Thr
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 37
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 38
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 39
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 40
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 41

[0009]

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 42
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 43
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 44
Ala Gly Ile Pro Pro Val Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 45
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 46
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 47
<211> 7

[0010]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 47
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 48
Gln Gln Ser Lys Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 49
Gly Phe Ser Phe Thr Ser Ile Gly Ile His
1 5 10

<210> 50
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 50
Ala Gly Ile Pro Pro Val Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 51
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

[0011]

<400> 52
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 53
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 54
Gln Gln Ser Tyr Met Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 55
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 56
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 56
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 57
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

[0012]

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 58
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 59
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 60
Gln Gln Ser Lys Arg Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 61
Gly Phe Ser Val Arg Gly Thr Gly Leu His
1 5 10

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 62
Ala Gly Ile Ser Pro Val Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0013]

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 63
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 64
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 65
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 66
Gln Gln Ala Lys Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 67
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 68
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 68
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

[0014]

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 69
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 70
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 71
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 72
Gln Gln Ala Lys Ser Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 73
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

[0015]

<400> 74
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 75
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 76
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 77
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 78
Gln Gln Ala Lys Arg Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 79
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

[0016]

<210> 80
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 80
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 81
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 82
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 83
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 84
Gln Gln Ala Lys Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0017]

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 85
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 86
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 86
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 87
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 88
Arg Ala Ser Gln Ile Ile Gly Ile Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 89
Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 90
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

[0018]

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 91
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 92
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 92
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 93
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 94
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 95
Val Ala Ser Ser Leu Ala Ser
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0019]

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 96
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 97
Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr Gly Ile His
1 5 10

<210> 98
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 98
Ala Gly Ile Ser Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 99
Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 100
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 100
Arg Ala Ser Gln Ile Ile Gly Arg Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 101

[0020]

Val Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 102
Gln Gln Ser Asn Ala Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 103
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 103
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Arg Gly Tyr Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120

<210> 104
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 104
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

[0021]

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val 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 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 105
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽
 <400> 105
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Gly Thr
 20 25 30
 Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Ala Pro Tyr Ser Arg His Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Trp Gly Gly Ser Ser Val Gly Tyr Ala Met
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120
 <210> 106
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽
 <400> 106
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0022]

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val 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 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 107
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽
 <400> 107
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Gly Thr
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Pro Pro Val Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val
 115
 <210> 108
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽
 <400> 108
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0023]

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val 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 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 109
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽
 <400> 109
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Ser Ile
 20 25 30
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Pro Pro Val Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Arg Ser Leu Ser Ser Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val
 115
 <210> 110
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽
 <400> 110
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

[0024]

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val 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 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Met Ser Pro Leu
85 90 95

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

<210> 111
<211> 134
<212> PRT
<213> 人

<400> 111
Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys
1 5 10 15

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly
130

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ser 或 Thr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Leu, Phe 或 Val

[0025]

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser, Thr 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Gly 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ser, His, Thr 或 Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Trp 或 Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Ile 或 Leu

<400> 112
Gly Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
1          5          10

<210> 113
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
      肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gly 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Trp 或 Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Asn, Ser, Ala 或 Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Tyr, Ala 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> Arg, Gly 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Tyr, Ser 或 His

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ala, Thr 或 Pro

<400> 113
Xaa Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1          5          10          15

```

[0026]

Lys Gly

<210> 114
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Glu 或 Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Tyr 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser, Asn 或 Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Gly, Asp 或 Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Trp 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Gly, Arg, Ala 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Gly 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ser 或不存在

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Ser, Tyr 或不存在

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Val, Ile 或不存在

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Gly 或不存在

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Tyr 或不存在

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Ala, Glu 或不存在

<400> 114

[0027]

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5).. (5)
<223> Asp, Ile 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6).. (6)
<223> Val 或 Ile

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7).. (7)
<223> Ser, Gly 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8).. (8)
<223> Thr, Ile, Asn 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9).. (9)
<223> Ala 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10).. (10)
<223> Val 或 Leu

<400> 115
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
1 5 10

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> Ser, Ala 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> Phe, Asn 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6).. (6)
<223> Tyr 或 Ala

<400> 116
Xaa Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser

[0028]

1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ser 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Tyr, Lys 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Thr, Ser, Tyr, Met, Arg 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Thr, Asn, Ser 或 Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Pro 或 Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Pro, Tyr, Ser 或 Leu

<400> 117
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Phe 或 Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Thr 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> His, Ser 或 Thr

<400> 118
Gly Phe Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Trp Ile His

[0029]

1	5	10
<210> 119 <211> 18 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的描述: 合成的肽 <220> <221> MOD-RES <222> (4)..(4) <223> Ser, Asn 或 Ala <220> <221> MOD-RES <222> (7)..(7) <223> Gly, Arg 或 Ser <220> <221> MOD-RES <222> (8)..(8) <223> Gly 或 Arg <220> <221> MOD-RES <222> (9)..(9) <223> Ser, Tyr 或 His <220> <221> MOD-RES <222> (10)..(10) <223> Thr, Ala 或 Pro <400> 119 Gly Trp Ile Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val 1 5 10 15 Lys Gly <210> 120 <211> 19 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 人工序列的描述: 合成的肽 <220> <221> MOD-RES <222> (5)..(5) <223> Ser, Asn 或 Pro <220> <221> MOD-RES <222> (6)..(6) <223> Gly 或 Asp <220> <221> MOD-RES <222> (8)..(8) <223> Gly, Arg 或 Ala <220> <221> MOD-RES <222> (9)..(9) <223> Gly 或 Ser <220> <221> MOD-RES <222> (11)..(11)		

[0030]

<223> Ser 或 Tyr

<220>

<221> MOD-RES

<222> (12)..(12)

<223> Val 或 Ile

<220>

<221> MOD-RES

<222> (15)..(15)

<223> Ala 或 Glu

<400> 120

Ala Arg Glu Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<220>

<221> MOD-RES

<222> (5)..(5)

<223> Thr, Ser 或 Tyr

<220>

<221> MOD-RES

<222> (6)..(6)

<223> Thr, Asn, Ser 或 Phe

<220>

<221> MOD-RES

<222> (7)..(7)

<223> Pro 或 Arg

<220>

<221> MOD-RES

<222> (8)..(8)

<223> Pro, Tyr 或 Ser

<400> 121

Gln Gln Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
1 5

<210> 122

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0031]

<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 123
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 124
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 124
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 125
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 126
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 126
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 127
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 127
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 128
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

[0032]

<400> 128
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 129
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 肽

<400> 129
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 130
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 130
 Ile Thr Val Leu Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Leu Thr His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly
 35 40 45

Met Gly Ile Gln Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr
 50 55 60

Ser Gln Ala Ser Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His
 65 70 75 80

Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly
 85 90 95

Pro Ser Ser Trp Thr His Trp Leu
 100

<210> 131
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的
 多肽

<400> 131
 Gln 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
 20 25 30

<210> 132
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0033]

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 132
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 133
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 133
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 134
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 134
Gln 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
20 25

<210> 135
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 135
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

<210> 136
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 136
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 137
<211> 30

[0034]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 137
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 138
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 138
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 139
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 139
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 140
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 140
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 141
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 141
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

[0035]

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 142
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 142
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 143
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 143
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 144
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 144
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

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

<210> 145
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 145
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 146
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

[0036]

<400> 146
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 147
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 147
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 148
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 148
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 149
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 149
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 150
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 150
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 151
<211> 31

[0037]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 151
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
20 25 30

<210> 152
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 152
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 153
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 153
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 154
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 154
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 155
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 155

[0038]

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 156
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 156
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 157
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 157
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Cys
20 25 30

<210> 158
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 158
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 159
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 159
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 160
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

[0039]

<400> 160
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Cys
20 25 30

<210> 161
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 161
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 162
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
肽

<400> 162
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 163
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 163
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 164
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的
多肽

<400> 164
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 165
<211> 885

[0040]

<212> PRT

<213> 人

<400> 165

```

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

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20      25      30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35      40      45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50      55      60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65      70      75      80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85      90      95

He Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100     105     110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115     120     125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130     135     140

Pro Glu Asp Arg Thr Val Ala Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys
145     150     155     160

Gln Ala Gln Gly Pro Pro Glu Pro Val Asp Leu Leu Trp Leu Gln Asp
165     170     175

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
180     185     190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
195     200     205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210     215     220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225     230     235     240

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
245     250     255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
260     265     270

Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
275     280     285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
290     295     300

```

[0041]

```

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305                      310                      315                      320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
                      325                      330                      335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
                      340                      345                      350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
                      355                      360                      365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
                      370                      375                      380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
385                      390                      395                      400

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

Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Val Lys Glu Pro
                      420                      425                      430

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala
                      435                      440                      445

Val Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His
450                      455                      460

Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val
465                      470                      475                      480

Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser
                      485                      490                      495

Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu
                      500                      505                      510

Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala
515                      520                      525

Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly
530                      535                      540

Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met
545                      550                      555                      560

Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu
                      565                      570                      575

Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile
                      580                      585                      590

Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val
595                      600                      605

Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu
610                      615                      620

```

[0042]

Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu
625 630 635 640

Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr
645 650 655

Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn
660 665 670

Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile
675 680 685

Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val
690 695 700

Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys
705 710 715 720

Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg
725 730 735

Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr
740 745 750

Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly
755 760 765

Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg
770 775 780

Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala
785 790 795 800

Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp
805 810 815

Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp
820 825 830

Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala
835 840 845

Ala Glu Val His Pro Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr
850 855 860

Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly
865 870 875 880

Gln Glu Asp Gly Ala
885

<210> 166
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽
肽

<220>
<221> MOD_RES

[0043]

```

<222> (1)..(1)
<223> Gly 或 Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Trp 或 Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Asn, Ser, Ala 或 Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Tyr, Ala 或 Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> Arg, Gly 或 Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Tyr, Ser 或 His

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ala, Thr 或 Pro

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(12)
<223> 任意氨基酸或不存在

<400> 166
Xaa Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Asp
1          5          10          15

Ser Val Lys Gly
          20

```


克隆编号	H2	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	SEQ ID NO:
327.6	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	2
327.6.S2	G	W	I	N	P	Y	R	G	Y	A	Y	Y	A	D	S	V	K	G	8
327.6.S11	G	W	I	A	P	Y	S	R	H	P	Y	Y	A	D	S	V	K	G	14
327.6.S50	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	20
327.6.S52	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	26
327.6.S65	G	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	32
327.42	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	38
327.42.S8	A	G	I	P	P	V	G	S	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	44
327.42.S31	A	G	I	P	P	V	G	R	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	50
327.42.S13	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	56
327.42.S43	A	G	I	S	P	V	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	62
327.42.S52	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	68
327.42.S63	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	74
327.42.S73	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	80
327.42.H2	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	86
327.42.H4	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	92
327.42.H20	A	G	I	S	P	A	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	98

图 1B

[illegible]

*空白项表示不存在的氨基酸残基

图 1C

克隆编号	L1	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	SEQ ID NO:
	24											
327.6	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	4
327.6.S2	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	10
327.6.S11	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	16
327.6.S50	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	22
327.6.S52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	28
327.6.S65	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	34
327.42	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	40
327.42.S8	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	46
327.42.S31	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	52
327.42.S13	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	58
327.42.S43	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	64
327.42.S52	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	70
327.42.S63	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	76
327.42.S73	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	82
327.42.H2	R	A	S	Q	I	I	G	I	S	L	A	88
327.42.H4	R	A	S	Q	S	I	R	N	S	L	A	94
327.42.H20	R	A	S	Q	I	I	G	R	S	L	A	100

图 1D

克隆编号	L2									SEQ ID NO:
	50	51	52	53	54	55	56			
327.6	S	A	S	F	L	Y	S			5
327.6.S2	S	A	S	F	L	Y	S			11
327.6.S11	S	A	S	F	L	Y	S			17
327.6.S50	S	A	S	F	L	Y	S			23
327.6.S52	S	A	S	F	L	Y	S			29
327.6.S65	S	A	S	F	L	Y	S			35
327.42	S	A	S	F	L	Y	S			41
327.42.S8	S	A	S	F	L	Y	S			47
327.42.S31	S	A	S	F	L	Y	S			53
327.42.S13	S	A	S	F	L	Y	S			59
327.42.S43	S	A	S	F	L	Y	S			65
327.42.S52	S	A	S	F	L	Y	S			71
327.42.S63	S	A	S	F	L	Y	S			77
327.42.S73	S	A	S	F	L	Y	S			83
327.42.H2	A	A	S	N	L	A	S			89
327.42.H4	V	A	S	S	L	A	S			95
327.42.H20	V	A	S	N	L	A	S			101

图 1E

[illegible]

图 1F

克隆 YW327.6S2

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLSGSWIH WVRQAPGKGLEWV
GWINPYRGYAYYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
AREYSGWGGSSVGYAMDY WGQGTLV (SEQ ID NO: 103)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 104)

克隆 YW327.6S11

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFTGTWIH WVRQAPGKGLEWV
GWIAPYSRHPYYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
AREYSGWGGSSVGYAMDY WGQGTLV (SEQ ID NO: 105)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 106)

克隆 YW327.42.S8

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFTGTGIH WVRQAPGKGLEWV
AGIPPVGSYTTYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWRSLSGMDY
WGQGTLV (SEQ ID NO: 107)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSKTTPPT FGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 108)

克隆 YW327.42.S31

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFTSIGIH WVRQAPGKGLEWV
AGIPPVGRYTTYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWRSLSGMDY
WGQGTLV (SEQ ID NO: 109)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIY SASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYMSPLT FGQGTKVEIKR
(SEQ ID NO: 110)

图 2

I	A	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 19
	B	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 20
	C	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 21
	D	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 22
II	A	VDTSKNQFSLKLSVTA	ADTAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 23
	B	VDTSKNQFSLKLSVTA	ADTAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 24
	C	VDTSKNQFSLKLSVTA	ADTAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 25
	D	VDTSKNQFSLKLSVTA	ADTAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 26
III	A	RDNSKNTLYLQMNSLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 27
	B	RDNSKNTLYLQMNSLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 28
	C	RDNSKNTLYLQMNSLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 29
	D	RDNSKNTLYLQMNSLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 30
	受体					
	A	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCSR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 31
	B	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCSR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 32
	C	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCS	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 33
	第二受体					
	A	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 34
	B	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 35
	C	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYCA	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 36
	D	ADTSKNTAYLQMNSLRAED	TAVYYC	-H3-	WGQGLVTVSS	SEQ ID NO: 37

图 3B

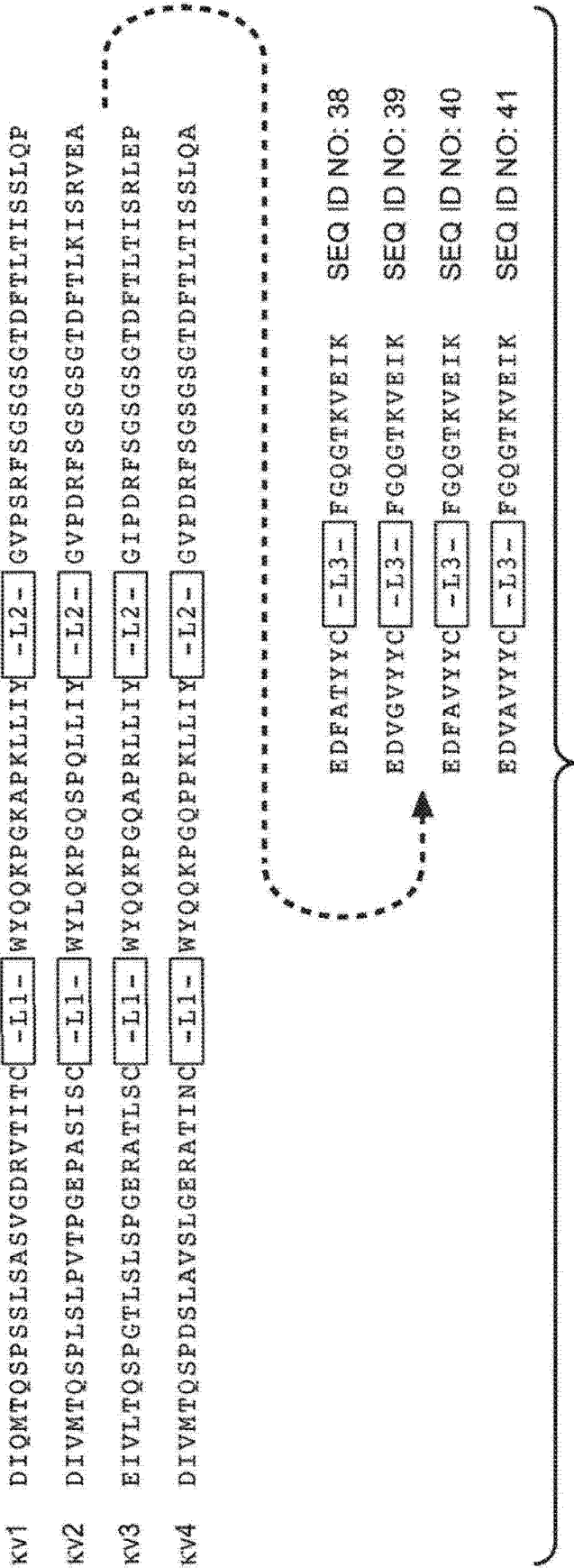


图 4

huMAb4D5-8 轻链的框架序列

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 126)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 127)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 164)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 129)

huMAb4D5-8 重链的框架序列

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 122)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 123)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 154)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 125)

图 5

第 66 位修饰 (下划线) 的 huMAb4D5-8 轻链的框架序列

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 126)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 127)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 128)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 129)

第 71 位、第 73 位和第 78 位修饰 (下划线) 的 huMAb4D5-8 重链的框架序列

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 122)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 123)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEQ ID NO: 124)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 125)

图 6

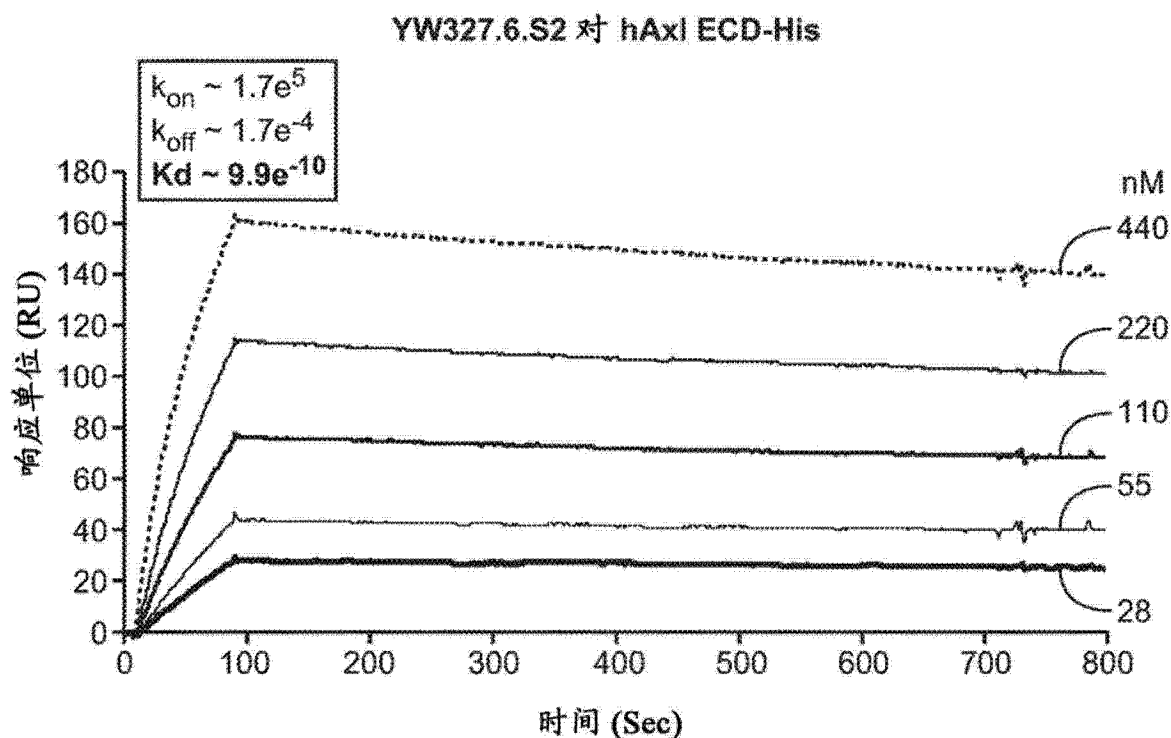


图 7A

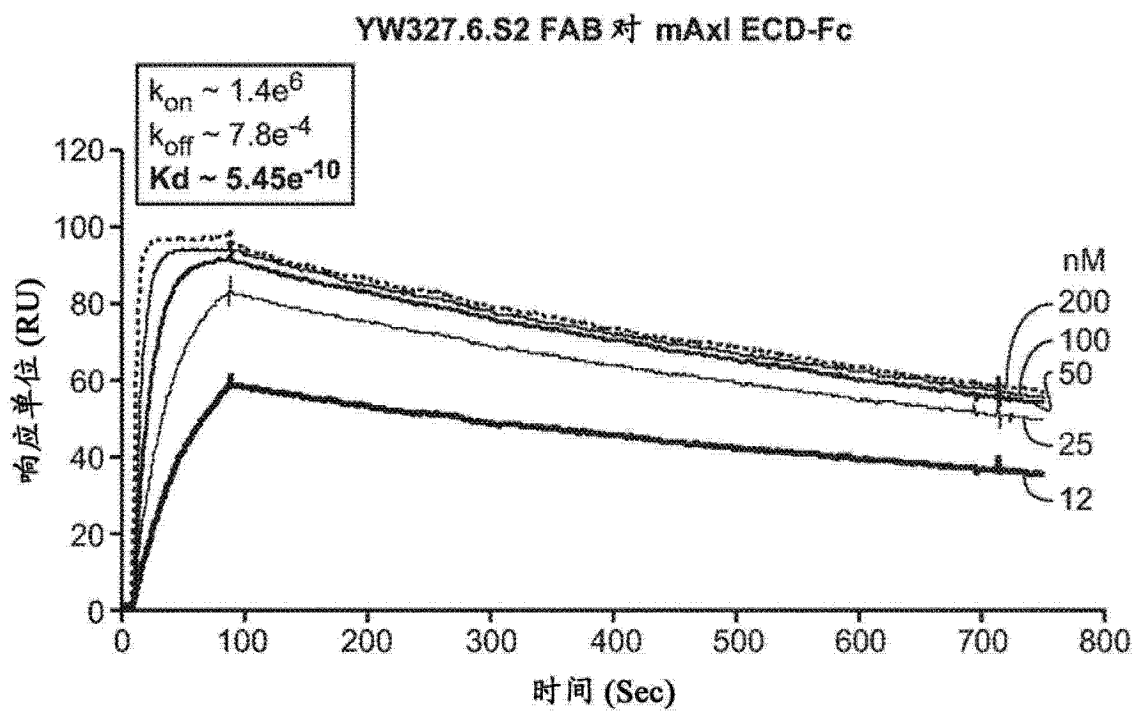


图 7B

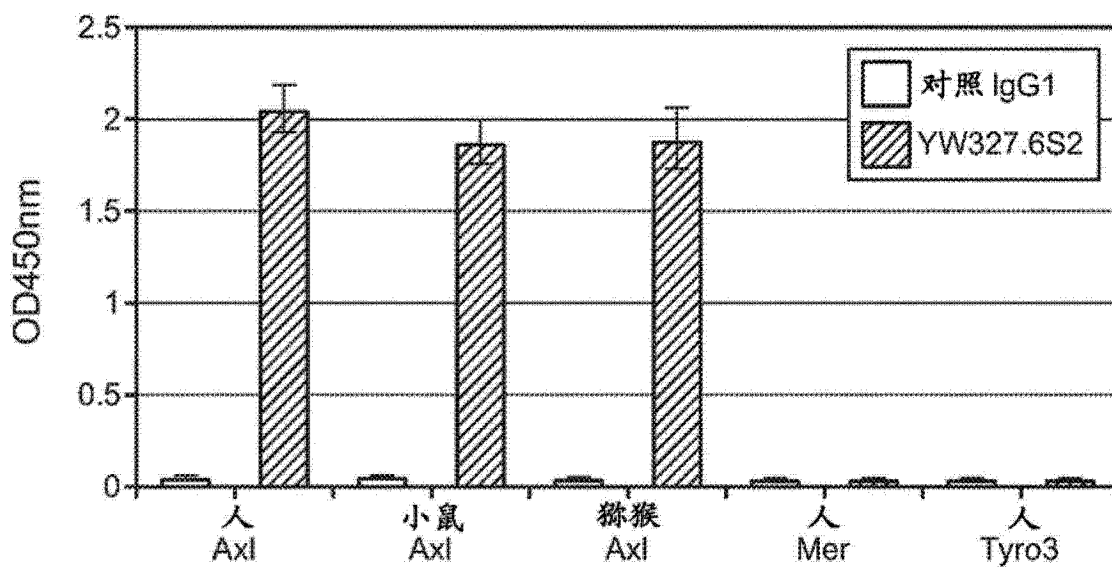


图 7C

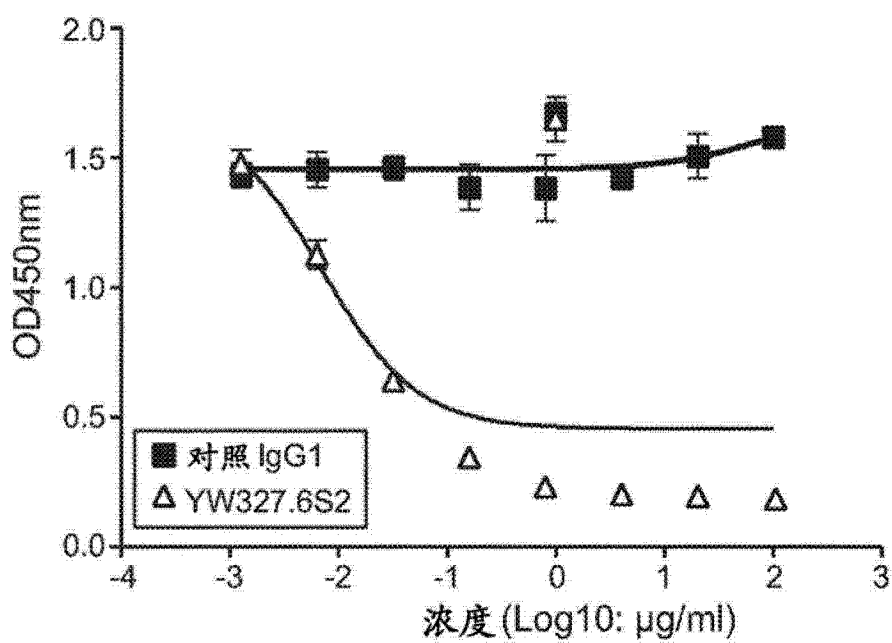


图 7D

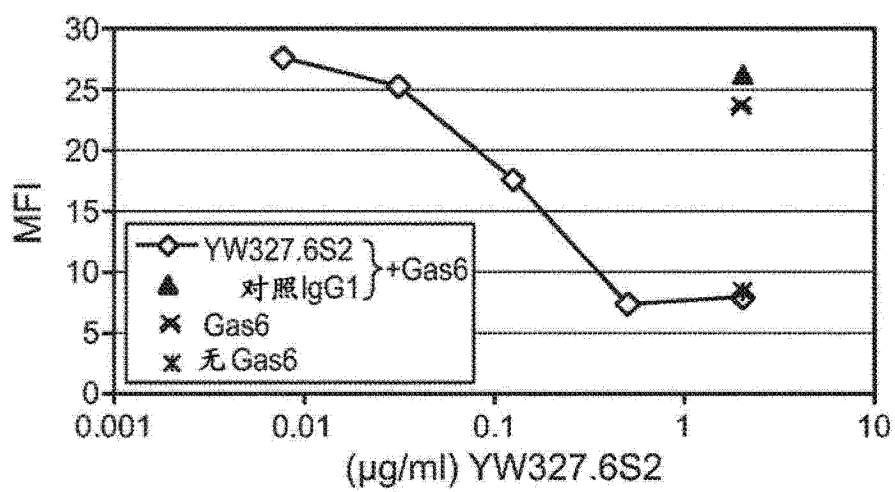


图 7E

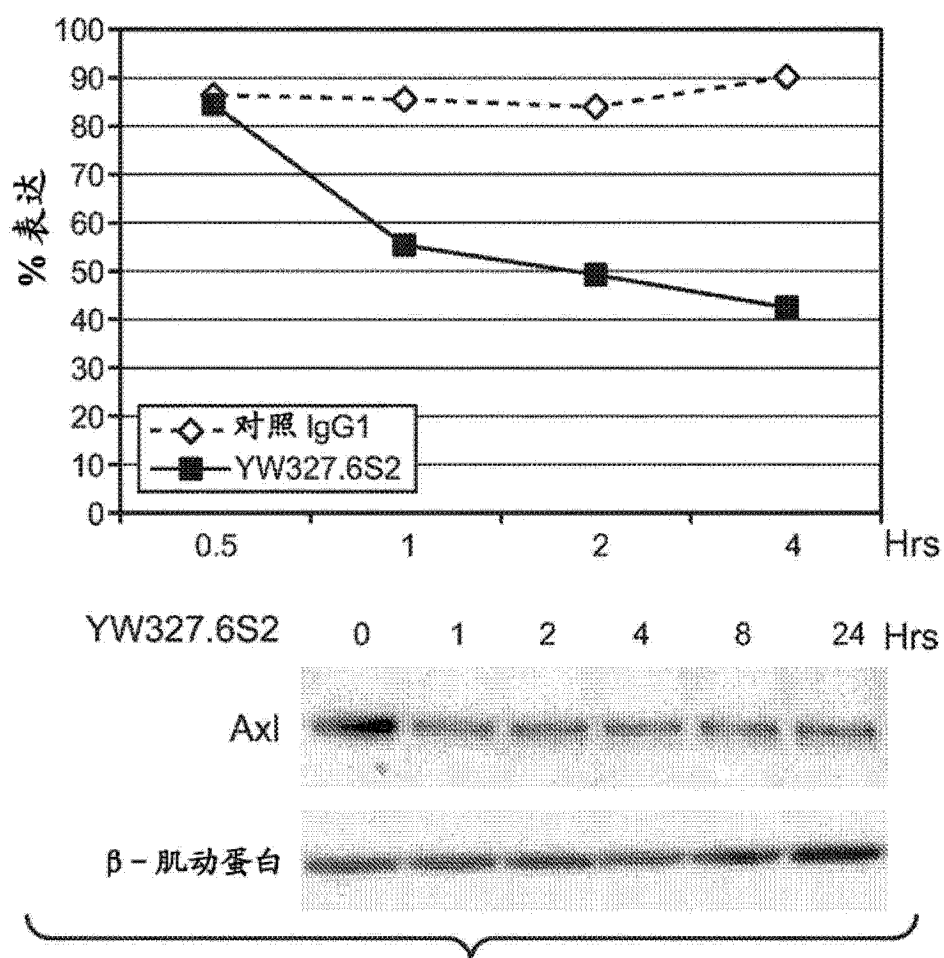


图 7F

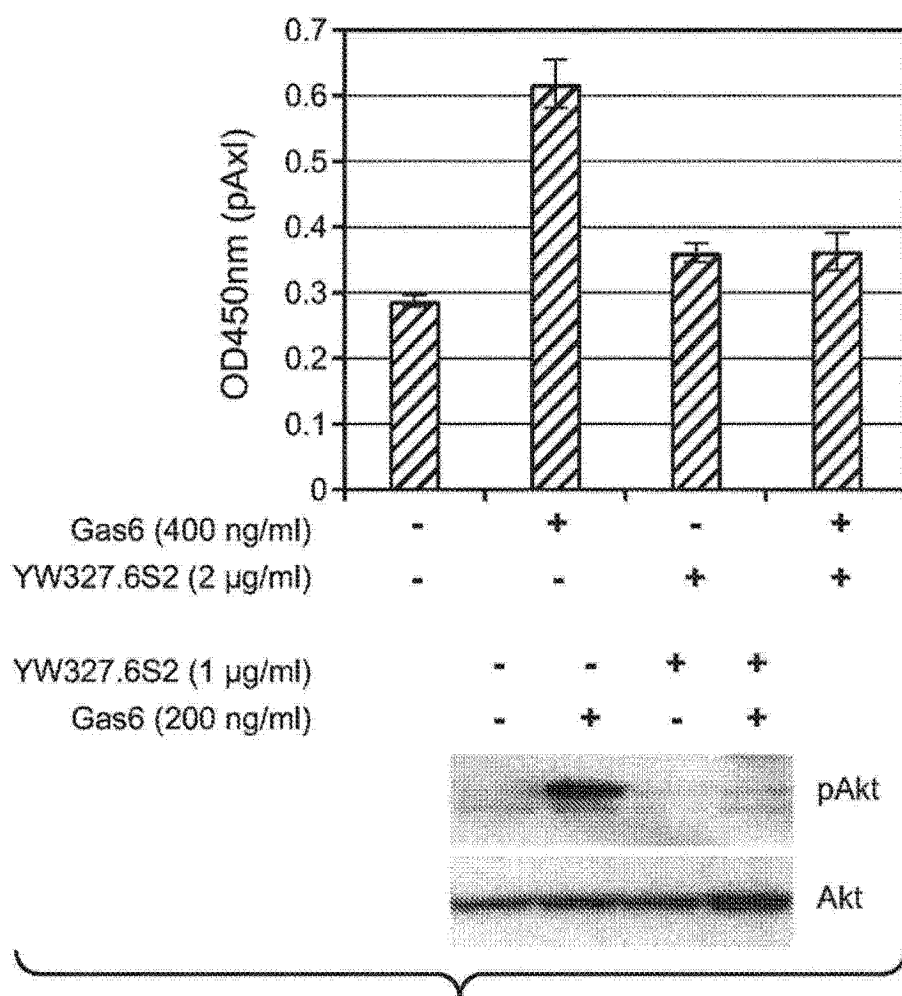


图 7G

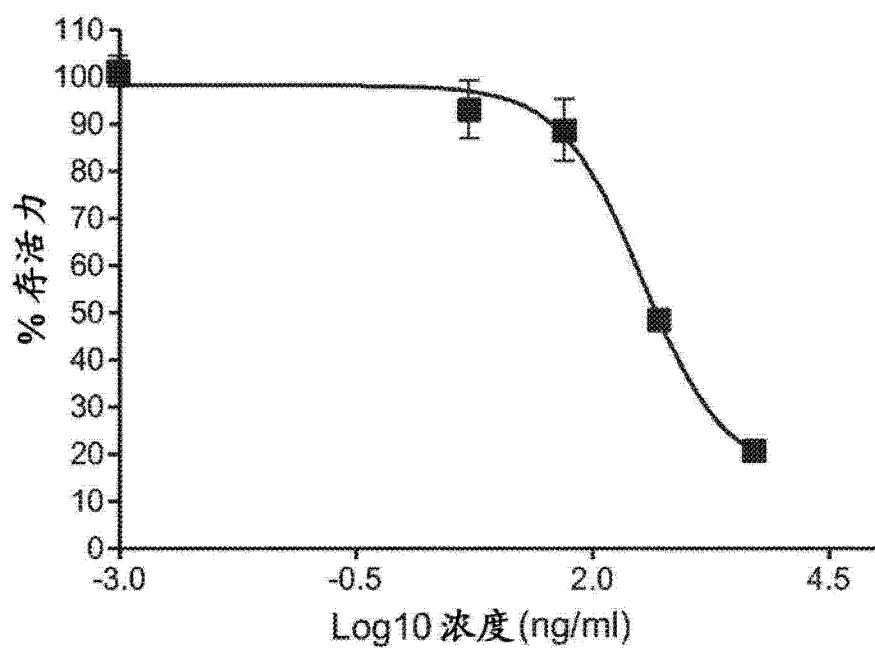


图 7H

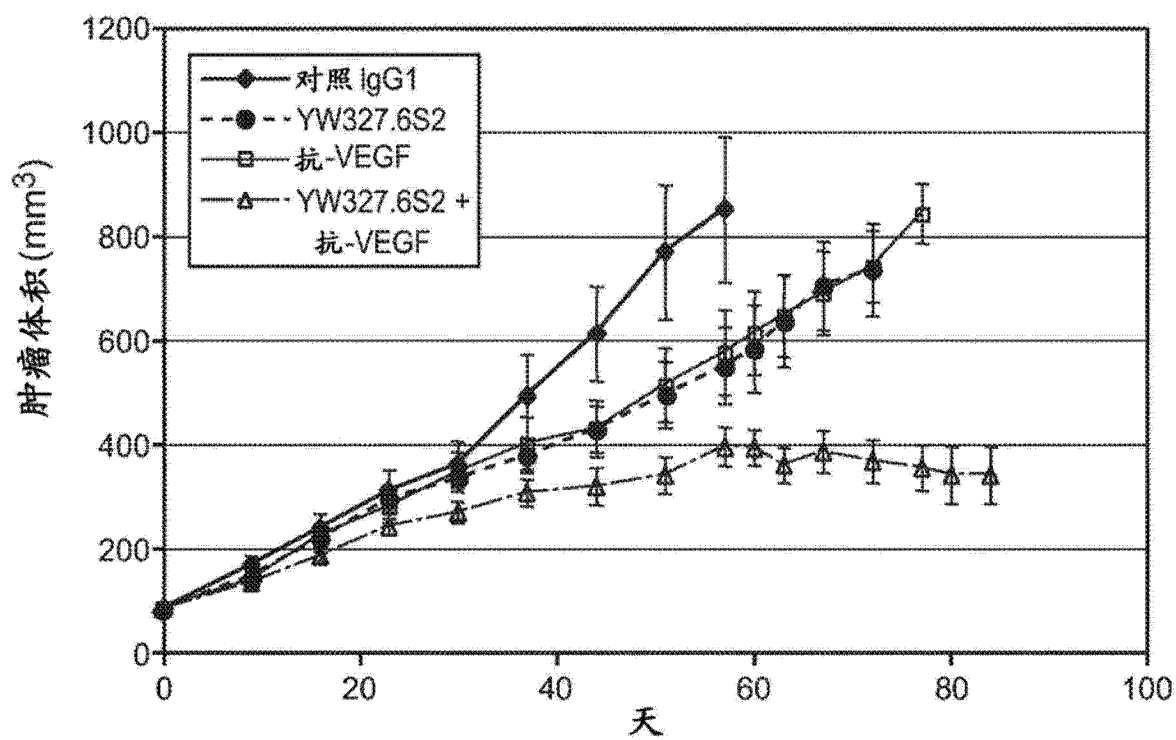


图 8A

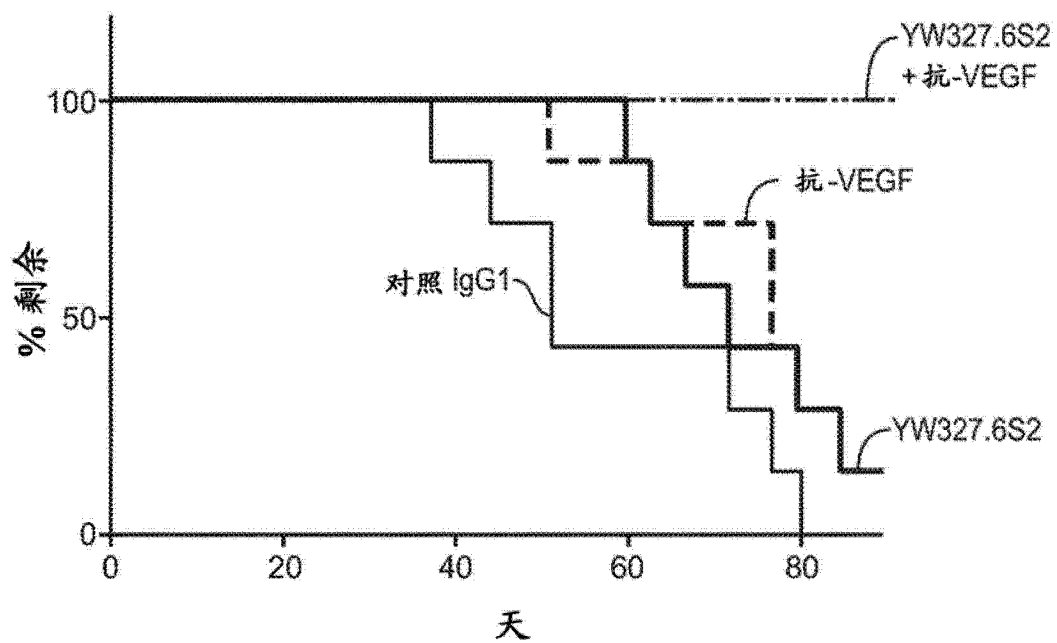


图 8B

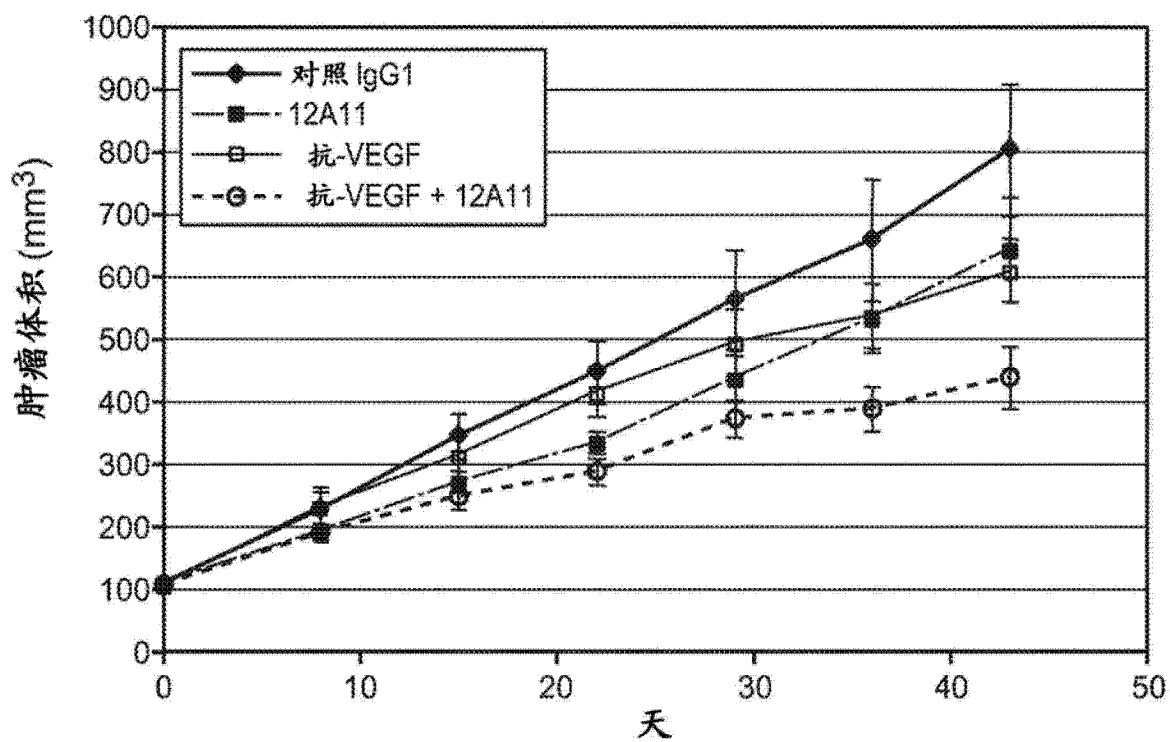


图 8C

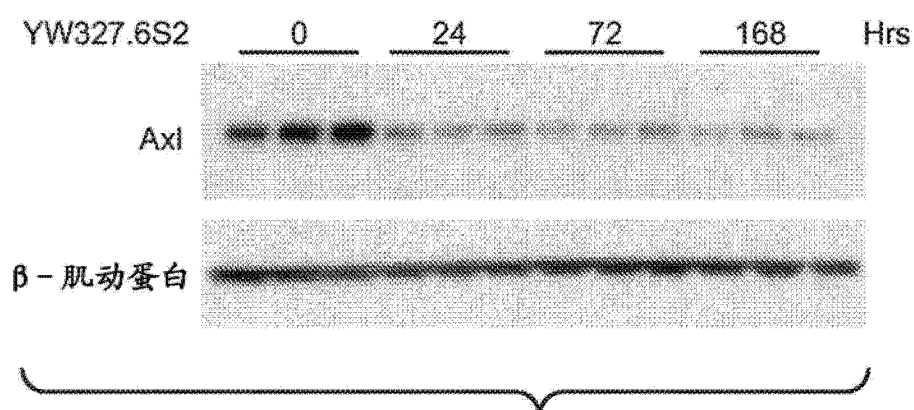


图 8D

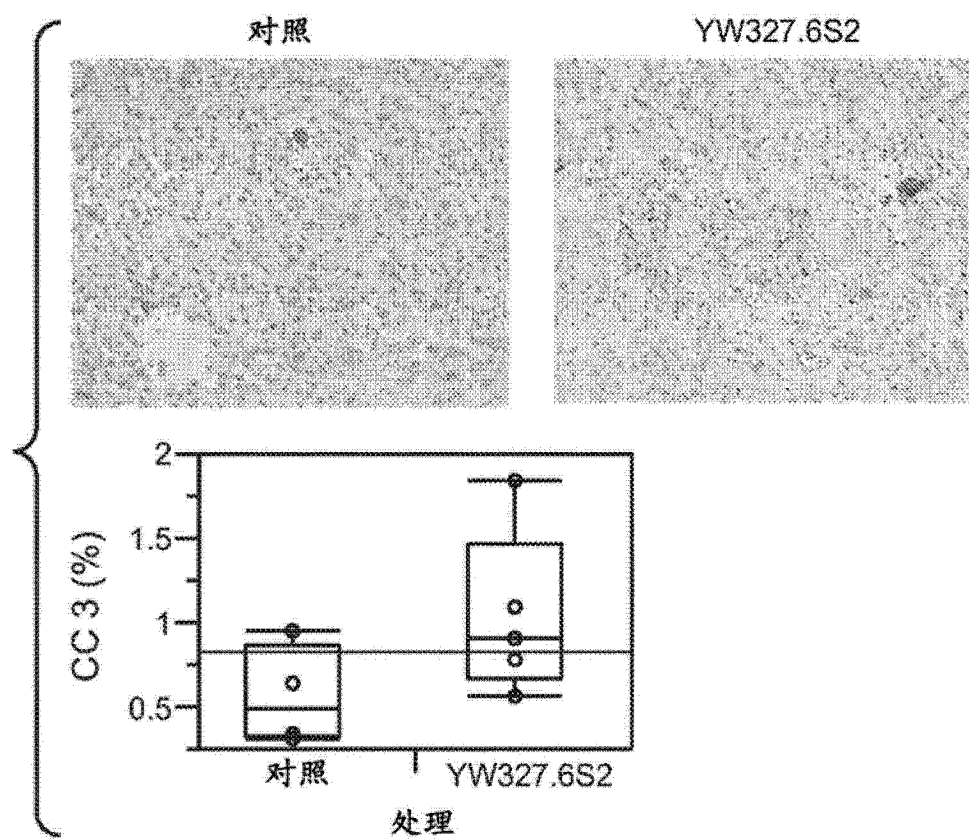


图 8E

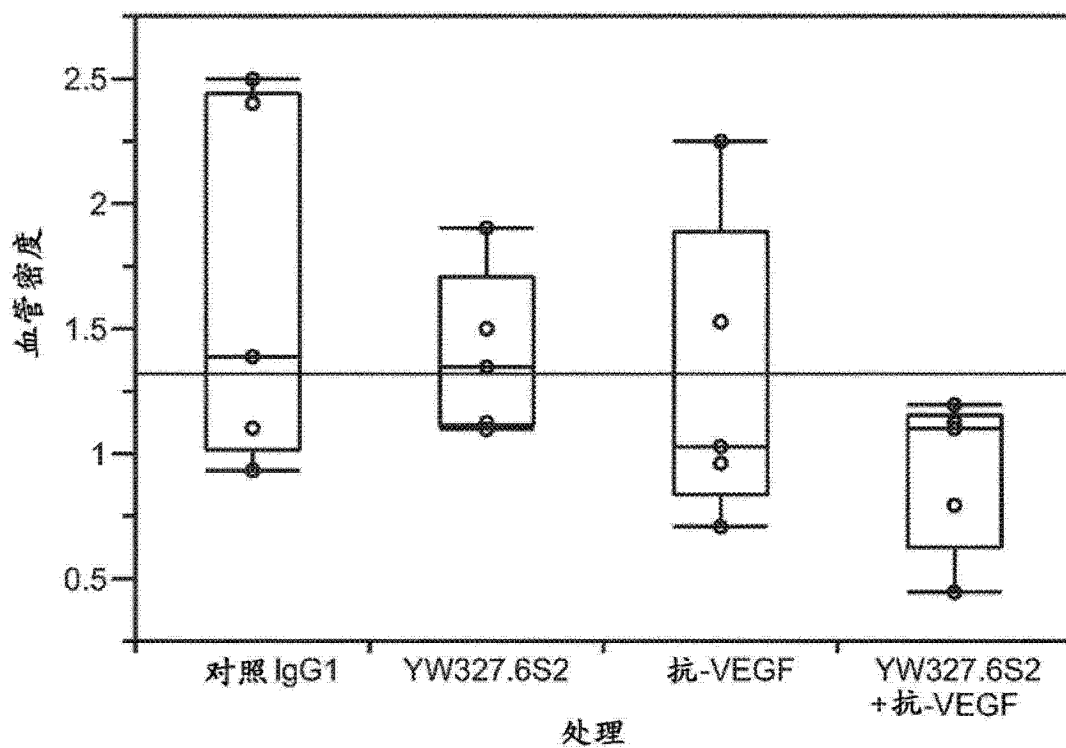


图 8F

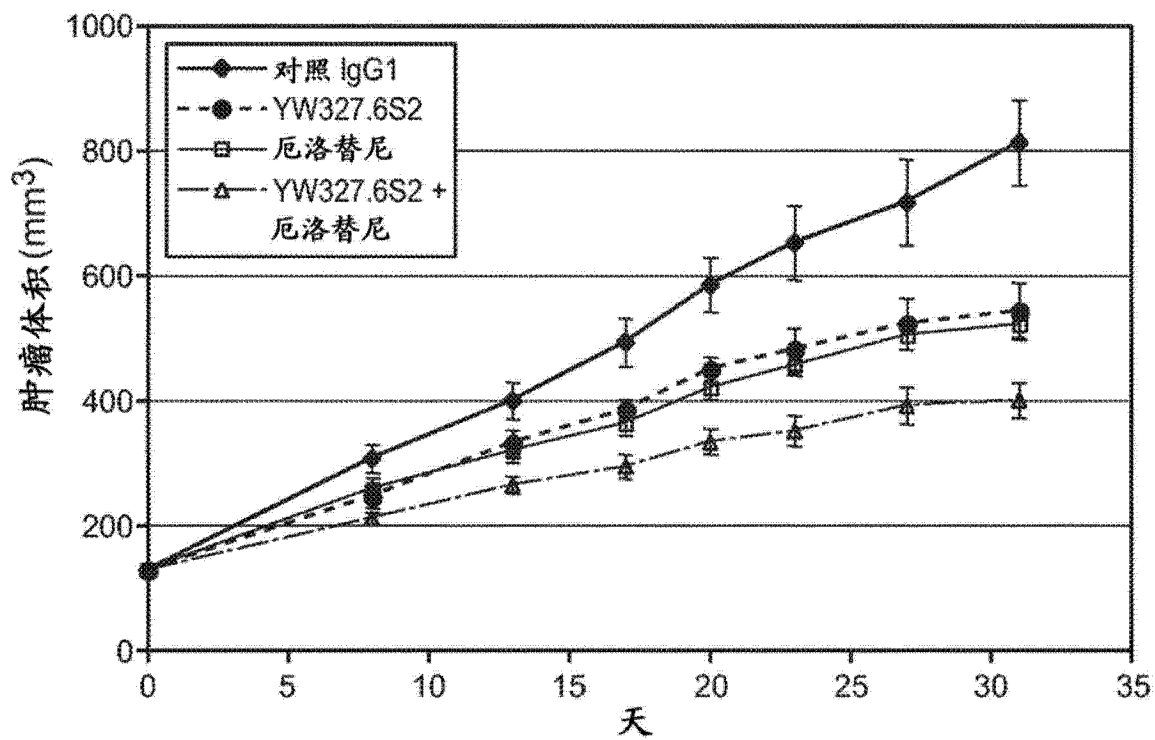


图 9A

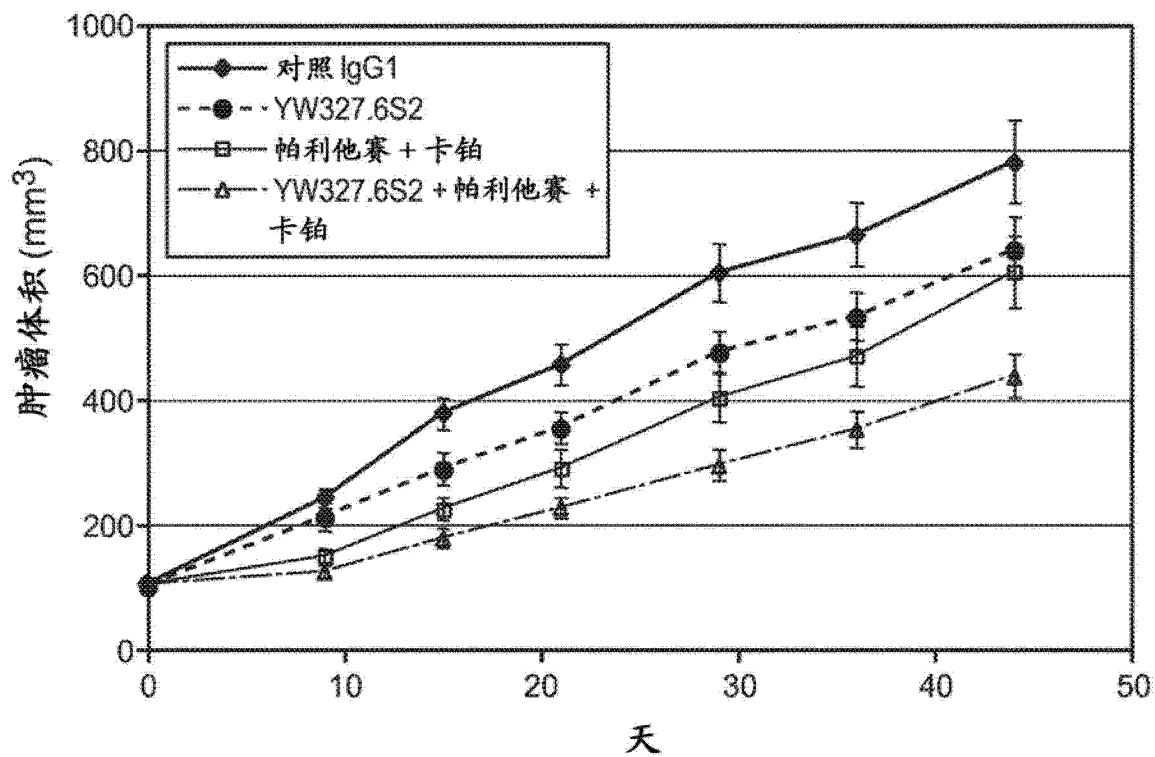


图 9B

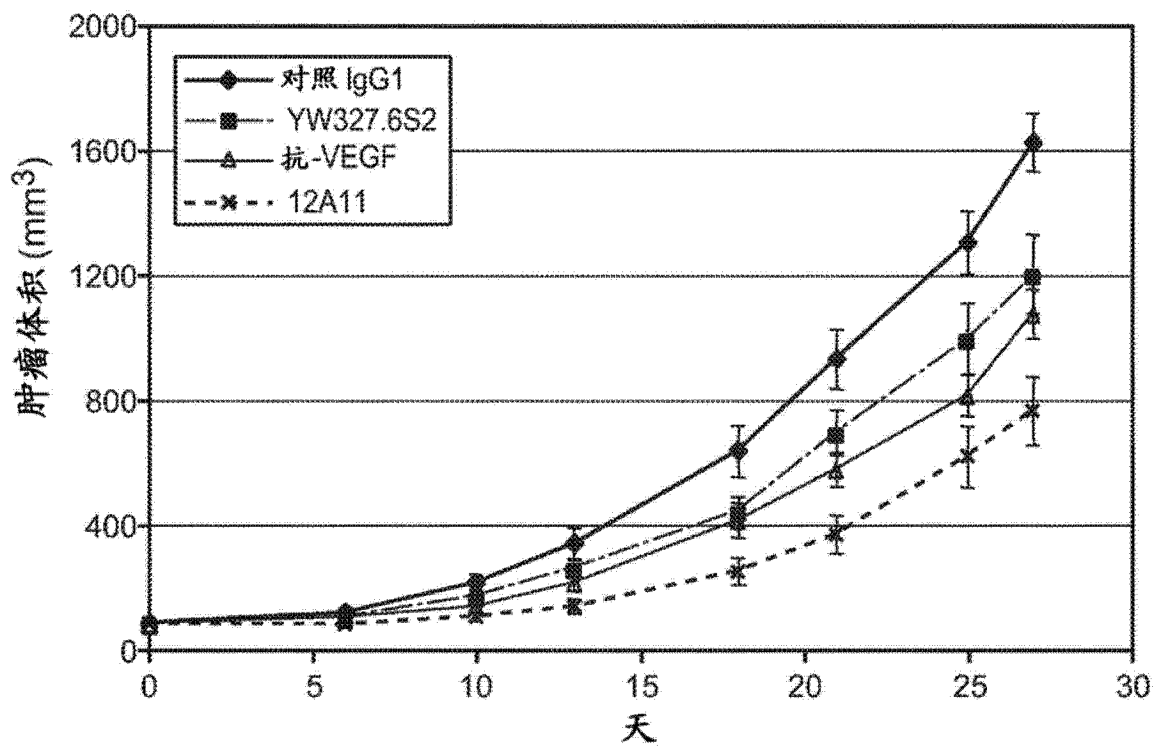


图 10A

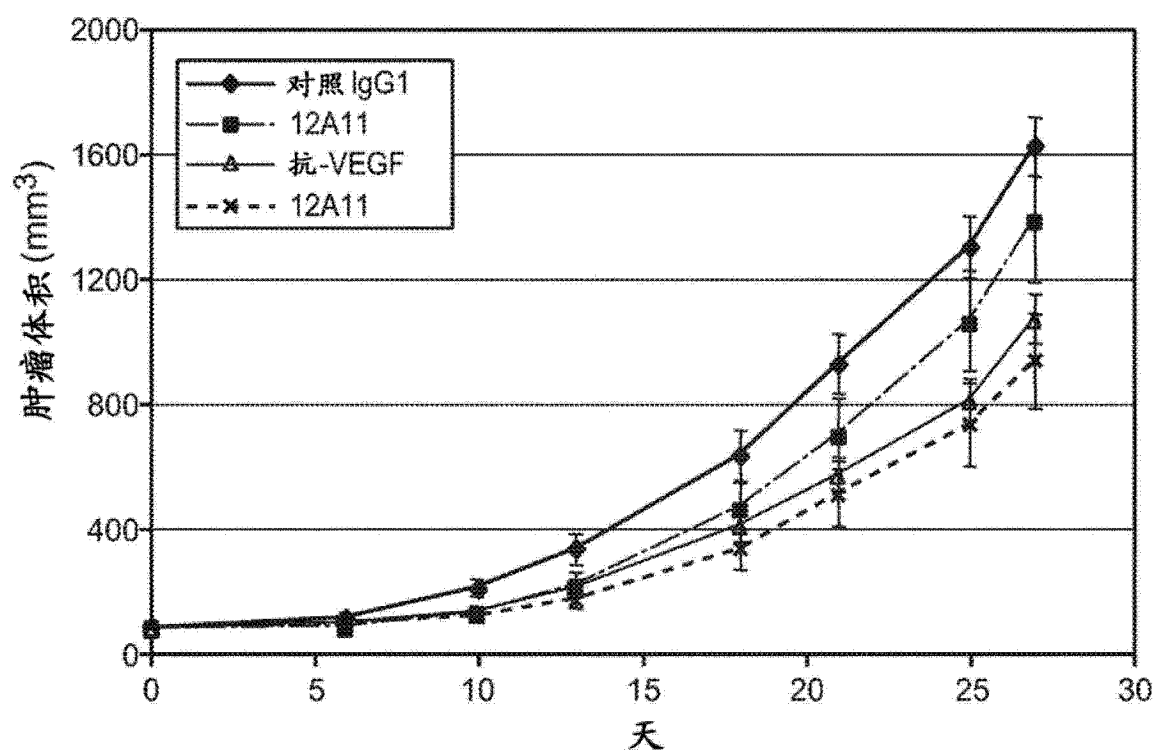


图 10B



图 10C

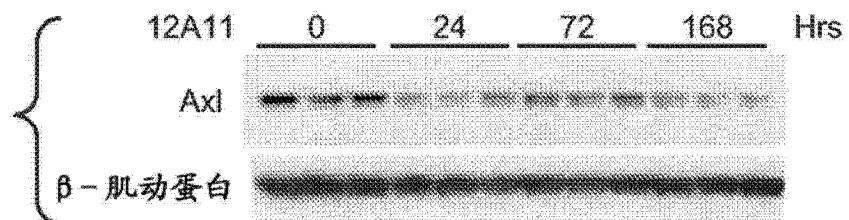


图 10D

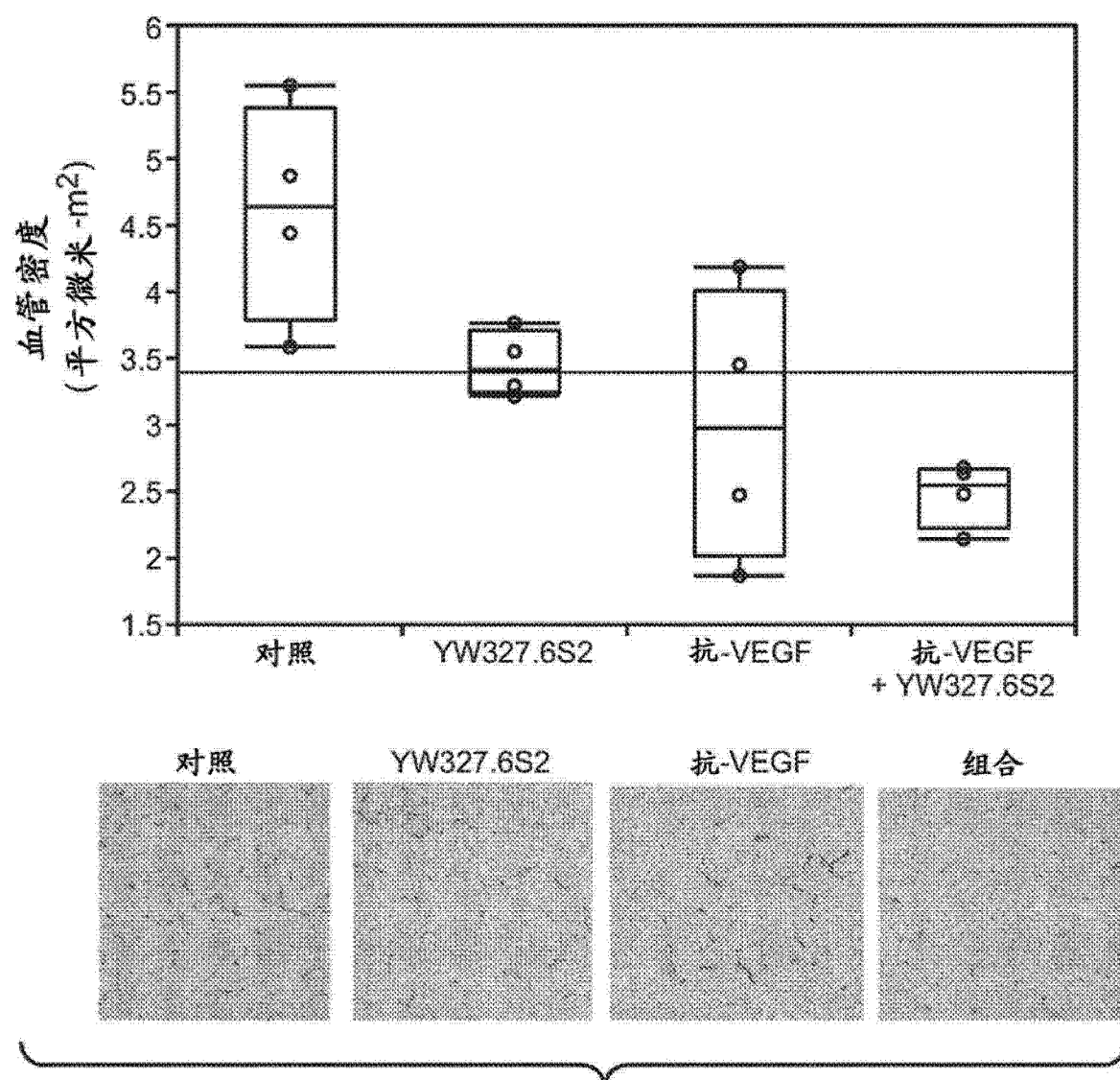


图 10E

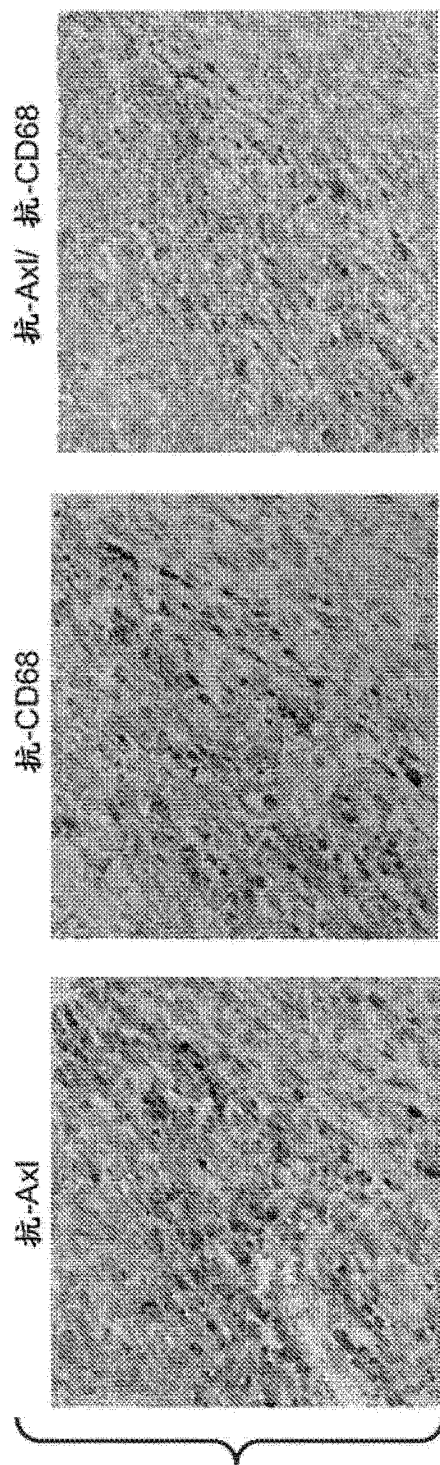


图 10F

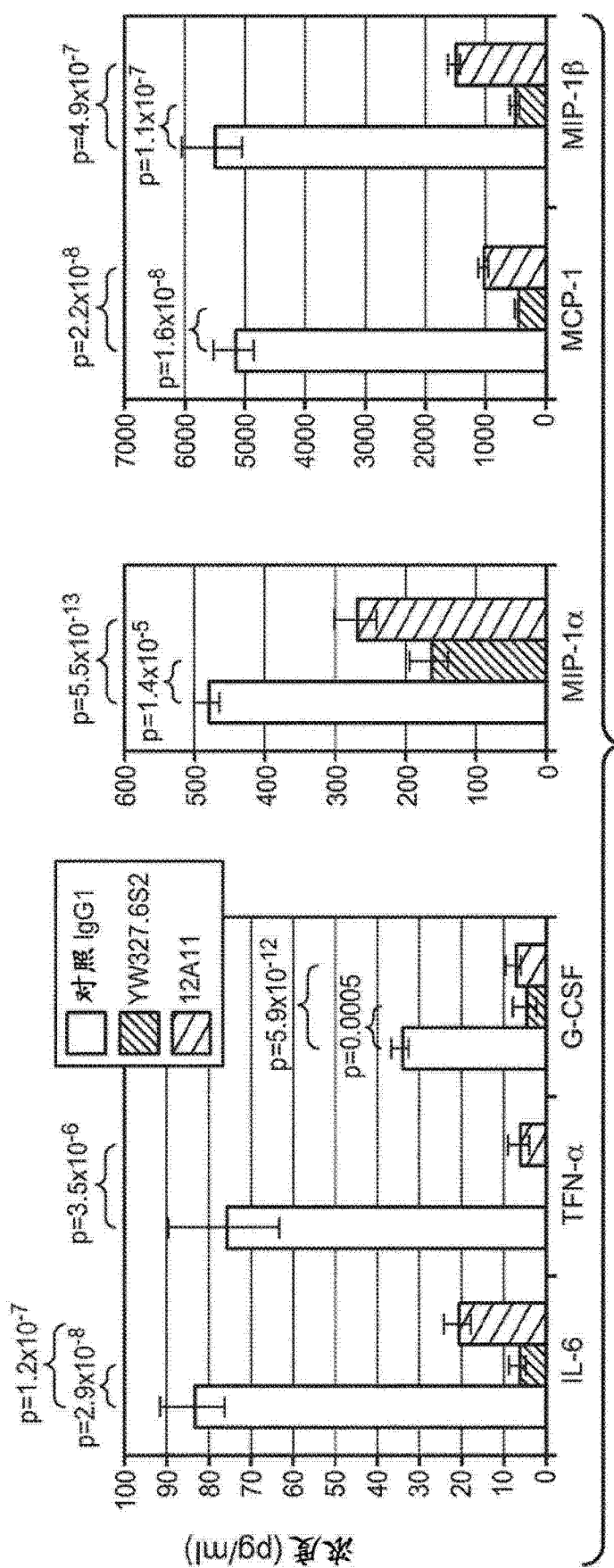


图 10G

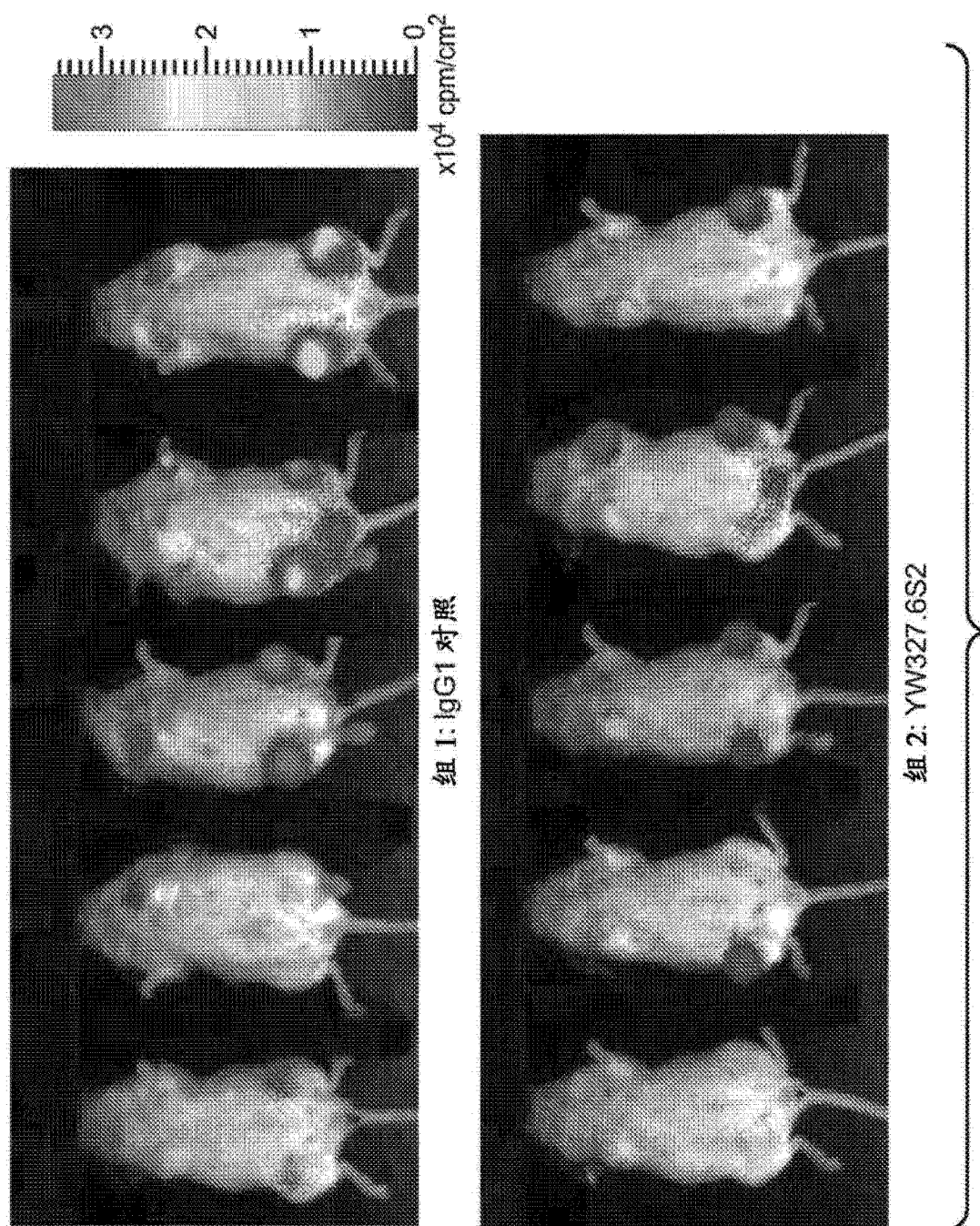


图 11A

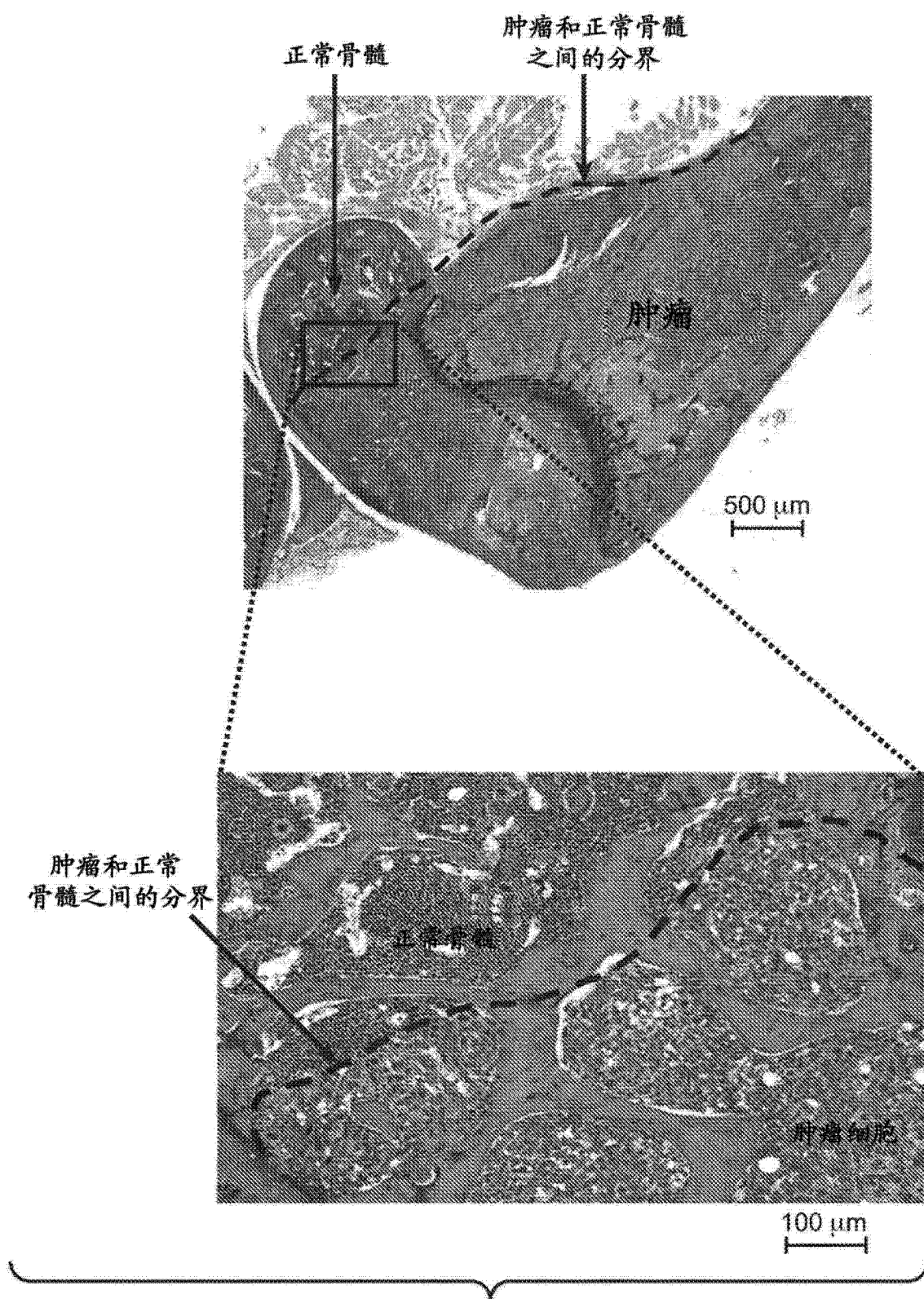


图 11B

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEESEPFVGNPGNI
TGARGLTGTLRCQLQVQGEPPVHWRDGOILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQ
RITSLQLSDTGQYQCLVFLGHQTFVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSC
QAQGPPEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRT
ATITVLPQQPRNLHLVSRQPTTELEVAVTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEP
DPPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPL
GPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTL
LQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLPVPLEAWRPVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVV
AAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTEVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLG
ISEELKEKL RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKVAVKTMKIAICT
RSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSHFL
YSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADF
GLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTP
YPGVENSEIYDYL RQGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTL
KALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGR
YVLCPSSTTPSPAQPADRGSPAAPGQEDGA (SEQ ID NO: 165)

图 12