



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111330017 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 26

(21) 申请号 201911321333.3

(22) 申请日 2013.08.23

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111330017 A

(43) 申请公布日 2020.06.26

(30) 优先权数据  
61/692,448 2012.08.23 US

(62) 分案原申请数据  
201380055601.6 2013.08.23

(83) 生物保藏信息  
PTA-13102 2012.07.25

(73) 专利权人 艾更斯司股份有限公司  
地址 美国加利福尼亚州  
专利权人 思进公司

(72) 发明人 R·K·莫里森 Z·安

K·J·M·莫里森 J·斯尼德  
X·贾

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262

专利代理师 武晶晶

(51) Int.Cl.  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61K 38/07 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 101272802 A, 2008.09.24  
CN 101395182 A, 2009.03.25

审查员 于秀培

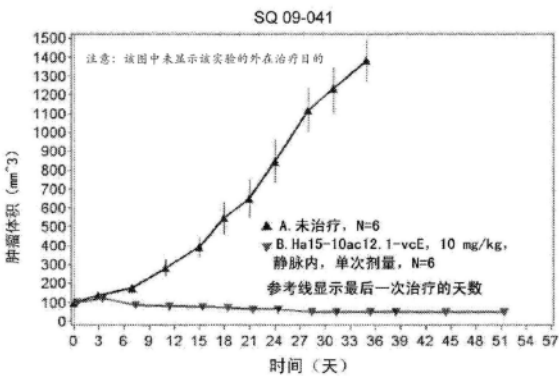
权利要求书4页 说明书70页  
序列表19页 附图20页

(54) 发明名称

结合158P1D7蛋白的抗体药物偶联物(ADC)

(57) 摘要

本文描述了结合158P1D7蛋白及其变体的抗体药物偶联物(ADC)。158P1D7在正常成人组织中显示组织特异性表达,并在表1所列癌中异常表达。因此,本发明的ADC提供一种治疗癌症的治疗组合。



1. 一种抗体药物偶联物,其包含与单甲基澳瑞他汀E (MMAE) 偶联的抗-158P1D7抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7所示重链可变区氨基酸序列具有至少80%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8所示轻链可变区氨基酸序列具有至少80%同源性的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述CDR按Kabat、Chothia或Contact编号方案确定,且其中所述抗体药物偶联物与158P1D7结合并具有细胞毒性。

2. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:7所示重链可变区氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:8所示轻链可变区氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:7的第31-35位范围中的氨基酸序列组成的CDR-H1、由SEQ ID NO:7的第50-66位范围中的氨基酸序列组成的CDR-H2以及由SEQ ID NO:7的第99-109位范围中的氨基酸序列组成的CDR-H3,所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:8的第24-39位范围中的氨基酸序列组成的CDR-L1、由SEQ ID NO:8的第55-61位范围中的氨基酸序列组成的CDR-L2以及由SEQ ID NO:8的第94-102位范围中的氨基酸序列组成的CDR-L3。

4. 一种抗体药物偶联物,其包含与1-20单元的单甲基澳瑞他汀E (MMAE) 偶联的抗-158P1D7抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与以美国典型培养物保藏中心(ATCC) 登录号PTA-13102保藏的中华仓鼠卵巢(CHO) 所生产抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少80%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与以ATCC登录号PTA-13102保藏的中华仓鼠卵巢(CHO) 所生产抗体的轻链可变区氨基酸序列具有至少80%同源性的氨基酸序列,所述重链可变区包含SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3,其中所述CDR按Kabat、Chothia或Contact编号方案确定,且其中所述抗体药物偶联物与158P1D7结合并具有细胞毒性。

5. 如权利要求4所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与以美国典型培养物保藏中心(ATCC) 登录号PTA-13102保藏的中华仓鼠卵巢(CHO) 所生产抗体的重链可变区氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与以ATCC登录号PTA-13102保藏的中华仓鼠卵巢(CHO) 所生产抗体的轻链可变区的氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列。

6. 如权利要求4所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含由SEQ ID NO:7的第31-35位范围中的氨基酸序列

组成的CDR-H1、由SEQ ID NO:7的第50-66位范围中的氨基酸序列组成的CDR-H2以及由SEQ ID NO:7的第99-109位范围中的氨基酸序列组成的CDR-H3,所述轻链可变区包含由SEQ ID NO:8的第24-39位范围中的氨基酸序列组成的CDR-L1、由SEQ ID NO:8的第55-61位范围中的氨基酸序列组成的CDR-L2以及由SEQ ID NO:8的第94-102位范围中的氨基酸序列组成的CDR-L3。

7.如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体还包含人类IgG2恒定区和人类Ig kappa恒定区。

8.如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体是:

(i) 全人抗体;或

(ii) 重组生产的抗体。

9.如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗原结合片段是Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或scFv。

10.如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体或其抗原结合片段通过接头单元与MMAE偶联。

11.如权利要求10所述的抗体药物偶联物,其中所述接头单元是酶-切割的肽酰接头。

12.如权利要求11所述的抗体药物偶联物,其中所述接头单元与所述抗体或其抗原结合片段的硫原子成键。

13.如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体药物偶联物具有下式:

$L-(LU-D)_p$ ,

其中:

L是权利要求1-6任一项所述的抗-158P1D7抗体或其抗原结合片段,

(LU-D)是接头单元-药物单元部分,其中:

LU是接头单元,且

D是MMAE;且

p是1-20的整数。

14.如权利要求13所述的抗体药物偶联物,其中p在1-10范围内。

15.如权利要求13所述的抗体药物偶联物,其中p在2-5范围内。

16.如权利要求10所述的抗体药物偶联物,其中所述接头单元具有式:

-Aa-Ww-Yy-,

其中:

-A-是延伸单元,

a是0或1;

-W-是氨基酸单元,

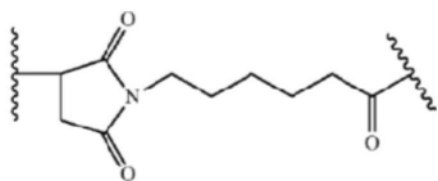
w是0-12的整数;

-Y-是自分解型间隔单元,且

y是0、1或2。

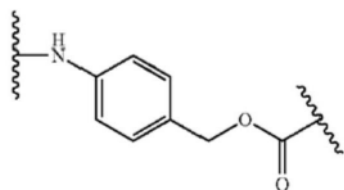
17.如权利要求16所述的抗体药物偶联物,其中所述氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)。

18. 如权利要求16所述的抗体药物偶联物,其中:  
所述延伸单元具有式IIIa的结构:



式 IIIa,

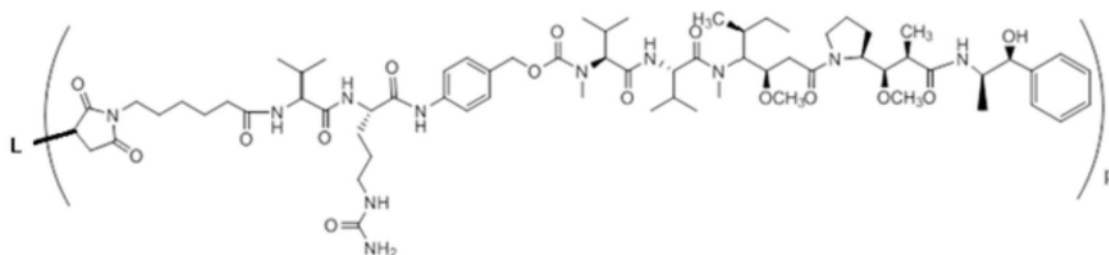
所述氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit); 且  
所述间隔单元具有式Xa的结构:



式 Xa。

19. 如权利要求16所述的抗体药物偶联物,其中所述延伸单元与所述抗体或其抗原结合片段的硫原子成键;其中所述间隔单元是对-氨基苯甲醇 (PAB) 单元,且其中所述间隔单元通过氨基甲酸酯基团与MMAE连接。

20. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体药物偶联物具有如下结构:



其中L是所述抗-158P1D7抗体或其抗原结合片段,p在1-10范围内。

21. 如权利要求20所述的抗体药物偶联物,p在2-5范围内。

22. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物和药学上可接受的赋形剂。

23. 如权利要求22所述的抗体药物偶联物,其中所述药物组合物还包含化疗剂。

24. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物在制备用于治疗对象的癌症的药物中用途,所述癌症是成胶质细胞瘤、肺癌、膀胱癌或乳腺癌。

25. 如权利要求24所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体药物偶联物与化疗剂联用。

26. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体药物偶联物在制备用于治疗对象的癌症的药物中用途,所述癌症是成胶质细胞瘤、肺癌、膀胱癌或乳腺癌,且其中所述对象还接受放疗。

27. 如权利要求24所述的用途,其中所述对象是人类对象。

28. 如权利要求26所述的用途,其中所述对象是人类对象。

29. 如权利要求24所述的用途,其中所述抗体药物偶联物被配制为以1、2、3、4、5或6mg/kg体重的量向对象给予。

30. 如权利要求26所述的用途,其中所述抗体药物偶联物被配制为以1、2、3、4、5或6mg/kg



kg体重的量向对象给予。

31. 如权利要求24所述的用途,其中所述抗体药物偶联物被配制为以1-5mg/kg体重的量向对象给予。

32. 如权利要求26所述的用途,其中所述抗体药物偶联物被配制为以1-5mg/kg体重的量向对象给予。

## 结合158P1D7蛋白的抗体药物偶联物(ADC)

[0001] 本申请是申请日为2013年08月23日、申请号为201380055601.6、名称为“结合158P1D7蛋白的抗体药物偶联物(ADC)”的发明申请的分案。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2012年8月23日提交的美国临时专利申请号61/692,448的优先权。其内容通过引用全文纳入本文。

[0004] 联邦资助研究下完成的发明的权利声明

[0005] 无。

[0006] 以ASCII文本文件提交序列列表

[0007] 下述以ASCII文本文件提交的内容通过引入全文纳入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:511582005088SeqList.txt,记录日期:2013年8月21日,大小:40,154字节)。

### 技术领域

[0008] 本发明涉及结合158P1D7蛋白的抗体、结合片段及其抗体药物偶联物(ADC)。本发明进一步涉及用于治疗表达158P1D7的癌症的预后、预防和治疗的方法以及组合物。

### 技术背景

[0009] 癌症是仅次于冠状动脉疾病的导致人类死亡的第二主要病因。全球每年有上百万人死于癌症。根据美国癌症协会(American Cancer Society)所报道,仅在美国,癌症引起的死亡每年超过五十万人,并且每年新增确诊病例超过一百二十万。虽然由心脏病引起的死亡已显著下降,但由癌症引起的死亡总体呈上升趋势。预计到下个世纪早期,癌症将成为主要死因。

[0010] 全球有数种癌症明显成为主要杀手。特别是肺癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、卵巢癌和膀胱癌代表了癌症死亡的主要原因。这些癌症以及几乎所有其它癌症共有一个常见致死特性。癌的转移性疾病是致命的,很少有例外。此外,即使那些患者最初在原发性癌中存活下来,但一般经验表明他们的生活发生极大改变。许多癌症患者经历由于顾虑到可能会复发或治疗失败导致的严重焦虑。许多患者在治疗后经历身体虚弱。此外,许多癌症患者会经历复发。

[0011] 前列腺癌在全球男性最常见癌症中位居第四。在北美和北欧,前列腺癌无疑是男性中最常见的癌症并且是男性癌症死亡的第二主要原因。仅在美国,每年超过30,000男性死于该疾病,仅次于肺癌。虽然这些数据惊人,但仍没有对转移性前列腺癌的有效治疗。前列腺手术切除、放疗治疗、激素去除治疗、手术阉割和化疗仍为主要治疗方法。不幸的是,这些治疗对许多人没有功效并且经常与不良后果相关联。

[0012] 在诊断前沿,缺乏可确切检测早期局部肿瘤的前列腺癌标记物仍然极大限制该疾病的诊断和处理。虽然血清前列腺特异性抗原(PSA)试验已经是很好的工具,但广泛认为其在几个重要方面上缺乏特异性和总体实用性。

[0013] 通过小鼠中产生可再现不同疾病分期的前列腺癌异种移植,改善了在前列腺癌其它特异性标记物鉴定方面的进展。LAPC (洛杉矶前列腺癌) 异种移植植物是一种已在重症联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中存活传代的前列腺癌异种移植植物,并显示模拟从雄激素依赖性转为雄激素非依赖性的能力 (Klein等,1997,Nat.Med.3:402)。近来鉴定的前列癌标记物包括 PCTA-1 (Su等,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7252)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA) (Pinto等,Clin Cancer Res 1996年9月2日 (9):1445-51)、STEAP (Hubert,等,Proc Natl Acad Sci U S A.1999年12月7日;96 (25):14523-8) 和前列腺干细胞抗原 (PSCA) (Reiter等,1998,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:1735)。

[0014] 虽然先前所鉴定的标记物 (例如PSA) 促进了对诊断和治疗前列腺癌的努力,但仍需要鉴定其它的前列腺癌和相关癌症的标记物和治疗靶标来进一步改善诊断和治疗。美国在2000年出现了估计130,200例结直肠癌,其中包括93,800例结肠癌和36,400例直肠癌。

[0015] 结直肠癌是男性和女性中第三大常见癌症。发生率在1992年至1996年期间显著下降 (每年-2.1%)。研究显示,这些下降是由于增加筛查和息肉切除,其防止息肉发展为浸润性癌。2000年估计出现56,300例死亡 (47,700例结肠癌,8,600例直肠癌), 占有所有美国癌症死亡人数的约11%。

[0016] 目前,外科手术是最常见的结直肠癌治疗形式,而且对尚未扩散的癌症经常是治愈性的。癌已使肠壁严重穿孔或已经扩散至淋巴结的患者大多数在术前或术后接受化疗或化疗加放疗。结肠造口术 (做腹部开口来清除机体排泄物) 有时为结肠癌所需,但直肠癌很少有此需要。仍然需要针对结直肠癌的有效的诊断和治疗方法。

[0017] 在美国所有新增癌症病例中,膀胱癌在男性中约为5% (第五大最常见肿瘤) 且在女性中约为3% (第八大最常见肿瘤)。发病率正缓慢上升,与年长人群的增长相一致。1998年估计有54,500例,其中包括男性39,500例和女性15,000例。在美国按年龄调整的发病率就男性而言为每100,000人中32例,女性为每100,000人中8例。历史上的男性/女性3:1比例可能发生下降,该下降与女性吸烟行为有关。1998年估计有11,000例膀胱癌引起的死亡 (男性7,800例和女性3,900例)。膀胱癌的发生率和死亡率随年龄大幅上升,而且随着人口老龄化该问题将日益严重。

[0018] 大多数膀胱癌在膀胱中复发。控制膀胱癌的方法是联用经尿道切除膀胱 (TUR) 和膀胱内化疗或免疫治疗。膀胱癌的多病灶和复发特性表明TUR的局限。大多数肌肉浸润性癌症不能仅通过TUR治愈。根治性膀胱切除术和尿流改道术是去除癌的最有效方法但对泌尿和性功能具有不可否认的影响。仍然非常需要有益于膀胱癌患者的治疗方法。

[0019] 2000年估计有164,100例新增肺癌和支气管癌,占有所有美国癌症诊断的14%。肺癌和支气管癌的发病率在男性中显著下降,从1984年的每100,000人中86.5例的高点下降之1996年的70.0例。二十世纪90年代,女性中的上升率开始变慢。1996年,女性中的发生率是每100,000人中42.3例。

[0020] 2000年肺癌和支气管癌导致估计156,900人死亡,在所有癌症死亡中占28%。1992年至1996年期间,肺癌在男性中的死亡率显著下降 (每年-1.7%) 而在女性中的死亡率仍然显著上升 (每年0.9%)。1987年以来,每年死于肺癌的女性多于死于乳腺癌的女性,而乳腺癌是40年来女性癌症死亡的主要原因。肺癌发生率和死亡率下降最可能的原因是过去30年里吸烟率下降;然而女性中吸烟行为的减少滞后于男性。重要的是,虽然成人烟草使用下降

已减慢,但年轻人的烟草使用再次上升。

[0021] 通过癌症的类型和分期来决定对肺癌和支气管癌的治疗选择,该治疗选择包括外科手术、放疗和化疗。对于许多局部癌,通常将外科手术作为治疗选择。因为该疾病常在发现时已有扩散,经常需要将放疗和化疗与外科手术联用。小细胞肺癌的治疗选择是单独使用化疗或联用化疗和放疗;该方案中,较大比例的患者得到缓解,其在一些情况下会长时间持续。然而持续需要肺癌和支气管癌的有效治疗以及诊断方法。

[0022] 2000年期间美国女性中预期发生估计182,800例乳腺癌新增浸润性病例。另外,2000年预期诊断大约1,400例男性乳腺癌新增病例。在二十世纪80年代每年约4%的上升之后,女性的乳腺癌发生率在二十世纪90年代稳定至每100,000人中约110.6例。

[0023] 仅在美国,2000年估计有41,200例由乳腺癌引起的死亡(40,800例女性,400例男性)。在女性癌症死亡中乳腺癌排在第二位。根据最新数据,1992年至1996年期间死亡率显著下降,其中在年轻女性(包括白人和黑人)中下降最多。这些下降的发生很可能是由于较早检测和改善的治疗。

[0024] 考虑到医疗环境和患者偏好,乳腺癌的治疗可包括病灶切除术(肿瘤的局部切除)和手臂下方淋巴结切除、乳房切除术(乳腺外科切除)和手臂下方淋巴结切除、放疗、化疗或激素治疗。经常将两种或多种方法联用。许多研究显示,对于早期疾病,病灶切除术加放疗之后的长期存活率与改良型乳房全切术后的存活率相似。再造技术的显著进步提供了乳房切除后乳房再造的数种选择。近来,该再造已与乳房切除同时完成。

[0025] 局部切除原位导管肿瘤(DCIS)和适量周围正常乳腺组织可防止DCIS局部复发。对乳腺的放疗和/或他莫昔芬可降低剩余乳腺组织中DCIS的发生几率。这点很重要,因为DCIS若放任不理,就会发展为浸润性乳腺癌。然而,这些治疗有严重的副作用或后遗症。因此,需要有效的乳腺癌治疗。

[0026] 2000年美国估计有23,100例卵巢癌新增病例。其占有女性癌症的4%并在妇科癌症中排第二。1992年至1996年期间,卵巢癌发生率显著下降。2000年估计有14,000例卵巢癌引起的死亡。卵巢癌导致的死亡比其它任何的女性生殖系统癌症都多。

[0027] 卵巢癌的治疗选择是外科手术、放疗和化疗。外科手术通常包括切除一侧或两侧卵巢、输卵管(输卵管-卵巢切除术)和子宫(子宫切除术)。在一些极早期肿瘤中只切除涉及的卵巢,希望生孩子的年轻女性中尤其如此。在晚期疾病中,尝试切除所有腹内疾病以提高化疗效果。仍然极需卵巢癌的有效治疗选择。

[0028] 2000年美国估计有28,300例胰腺癌新增病例。在过去的20年中,男性中的胰腺癌率已下降。女性中的疾病率保持大致恒定但可能开始下降。2000年胰腺癌在美国导致估计28,200例死亡。在过去的20年里,致死率在男性中出现微小但显著的下降(每年约-0.9%),而在女性中略有上升。

[0029] 胰腺癌的治疗选择是外科手术、放疗和化疗。这些治疗选择在许多患者中可延长存活率和/或缓解症状但对大部分人未必能使其痊愈。极需针对癌症的其它治疗和诊断选择。其包括使用抗体、疫苗和小分子作为治疗方法。此外,也需要使用这些方法作为研究工具来诊断、检测、监控,以及推动所有癌症治疗和研究领域技术水平。

[0030] 单克隆抗体(mAb)(G.Kohler和C.Milstein,Nature 256:495-497(1975))的治疗实用性正在实现。单克隆抗体现已获批作为移植、癌症、传染病、心血管疾病和炎症的疗法。

不同同种型具有不同的效应功能。该功能差异反映在各种免疫球蛋白同种型的不同三维结构中(P.M.Alzari等,Annual Rev.Immunol.,6:555-580(1988))。

[0031] 因为小鼠便于免疫并且识别大部分人抗原为外来物,有治疗潜力的抗人靶标mAb一般具有鼠来源。然而,鼠mAb作为人用疗法具有固有缺点。由于mAb在人中的循环半衰期比人抗体短,它们需要更高频率的给药。更严重的是,向人免疫系统重复给予鼠抗体会引起人免疫系统应答,该应答是通过识别小鼠蛋白为外来物并产生人抗小鼠抗体(HAMA)应答而造成。这类HAMA应答可导致变态反应并从系统中快速清除鼠抗体,从而使鼠抗体治疗无效。为避免该影响,已尝试在小鼠中建立人免疫系统。

[0032] 最初的尝试是希望建立转基因小鼠,该小鼠能以具有人序列的抗体对抗原产生应答(参见Bruggemann等,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 86:6709-6713(1989)),但这受限于通过可由克隆载体稳定维持的DNA量。利用酵母人造染色体(YAC)克隆载体能够将人Ig基因座的大种系片段(germline fragment)导入转基因哺乳动物。使用YAC将基本上大部分人V、D和J区基因以人基因组中所见的相同间隔排列来和人恒定区导入到小鼠中。一种这类转基因小鼠系称为XenoMouse®小鼠并可从安进福利蒙特公司(Amgen Fremont, Inc.) (加利福尼亚州福利蒙特)市售获得。

## 发明内容

[0033] 本发明提供能结合158P1D7蛋白和158P1D7蛋白多肽片段的抗体、结合片段及其抗体药物偶联物(ADC)。在一些实施方式中,本发明包括与治疗剂偶联的全人抗体。在某些实施方式中,前提是不编码图3中完整的核酸序列和/或不制备图2中完整的氨基酸序列。在某些实施方式中,编码图3中完整的核酸序列和/或制备图2中完整的氨基酸酸序列,两者中的任一种都采用相应的人用单位剂型。

[0034] 本发明还提供各种免疫原性或治疗组合物(例如抗体药物偶联物)和表达158P1D7的癌症(例如表I所列组织的癌症,特别是膀胱癌)的治疗策略。

## 附图简要说明

[0035] 图1.158P1D7的cDNA和氨基酸序列示于图1。起始甲硫氨酸用下划线表示。开放阅读框从核酸23-2548开始延伸包含终止密码子。

[0036] 图2.158P1D7抗体的核酸和氨基酸序列。图2(A)显示了Ha15-10ac12重链的cDNA和氨基酸序列。双下划线表示重链可变区,下划线表示重链人IgG2恒定区。图2(B)显示了Ha15-10ac12轻链的cDNA和氨基酸序列。双下划线表示轻链可变区,下划线表示人κ恒定区。

[0037] 图3.158P1D7抗体的氨基酸序列。图3(A)显示了Ha15-10ac12重链的氨基酸序列。双下划线表示重链可变区,且下划线表示人IgG2恒定区。图3(B)显示了Ha15-10ac12轻链的氨基酸序列。双下划线表示轻链可变区,且下划线表示人κ恒定区。

[0038] 图4.Ha15-10ac12抗体与人Ig种系的比对。图4(A) Ha15-10ac12重链(SEQ ID NO:3,位置1-360;SEQ ID NO:4,位置1-120)与人Ig种系的比对。图4(B) Ha15-10ac12轻链(SEQ ID NO:5,位置1-240;SEQ ID NO:6,位置1-80)与人Ig种系IGKV2D-28\*01(SEQ ID NO:10)的比对。

[0039] 图5.在SCID小鼠中皮下建立的人膀胱癌AG-B7异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的

功效。

[0040] 图6.在SCID小鼠中植入的皮下建立的人膀胱癌RT-4-XCL中Ha15-10ac12vcMMAE的功效。

[0041] 图7.在SCID小鼠中植入的皮下建立的人肺癌NCI-H322M-XCL中Ha15-10ac12vcMMAE的功效。

[0042] 图8.在SCID小鼠中皮下建立的人膀胱癌AG-B7异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的功效。

[0043] 图9.通过IHC检测癌症患者试样中的158P1D7蛋白。图9(A)和9(B)显示膀胱癌试样。图9(C)和9(D)显示乳腺癌试样。图9(E)和9(F)显示肺癌试样。图9(G)和9(H)显示成胶质细胞瘤试样。

[0044] 图10.在SCID小鼠中皮下建立的人膀胱癌SW780异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的功效。

[0045] 图11.与M15-68(2)18(也称68(18)1.1)Mab相比Ha15-10ac12vcMMAE在CHP-212细胞毒性试验中的体外功效。

[0046] 图12.在SCID小鼠中皮下建立的患者来源的人膀胱癌AG-B8异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的功效。

[0047] 图13.Ha15-10ac12vcMMAE的饱和曲线。

[0048] 图14.显示Ha15-10ac12vcMMAE的平均荧光强度(MFI)的柱状图。

[0049] 图15.图15(A) CHP-212细胞和图15(B) IGR0V-1细胞上

[0050] Ha15-10ac12vcMMAE的体外细胞毒性的评价。

## 发明详述

[0051] 章节概述

[0052] I.) 定义

[0053] II.) 158P1D7抗体

[0054] III.) 抗体-药物偶联物总述

[0055] III(A).美登木素(Maytansinoid)

[0056] III(B).澳瑞他汀(Auristatin)和尾海兔素(dolostatin)

[0057] III(C).卡奇霉素

[0058] III(D).其他细胞毒剂

[0059] IV.) 结合158P1D7的抗体药物偶联物

[0060] V.) 接头单元

[0061] VI.) 延伸单元

[0062] VII.) 氨基酸单元

[0063] VIII.) 间隔单元

[0064] IX.) 药物单元

[0065] X.) 药物加载

[0066] XI.) 测定ADC细胞毒性作用的方法

[0067] XII.) 对表达158P1D7的癌症的治疗

[0068] XIII.) 将158P1D7作为靶标用于基于抗体的治疗

[0069] XIV.) 158P1D7 ADC混合物

[0070] XV.) 联合治疗

[0071] XVI.) 试剂盒/制品

[0072] I.) 定义:

[0073] 除非另外定义,本文使用的所有专业术语、符号和其它科学术语或专有词汇旨在具有本发明所属领域技术人员通常所理解的含义。在一些情况中,本文出于阐明和/或便于引用目的对具有常规理解含义的术语加以限定,本文中包括此类限定不必定理解为表示与本领域常规理解的显著差异。许多本文所述或所引用的技术和方法已由本领域技术人员充分了解并通常通过常规方法采用,例如,Sambrook等在Molecular Cloning:A Laboratory Manual (《分子克隆:实验室手册》) 第二版(1989),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press)(纽约州冷泉港)中描述的广泛应用的分子克隆方法。适当时,除非另有说明,涉及使用市售可得试剂盒和试剂的过程通常按生产商给出的方案和/或参数进行。

[0074] 本文使用商标名时,除非另有说明,引用该商标名也指该商标名产品的产品制剂、通用名药和活性药物成分。

[0075] 术语“晚期癌症”、“局部晚期癌症”、“晚期疾病”和“局部晚期疾病”是指已通过相关组织囊扩展的癌症,并且包括美国泌尿协会(American Urological Association)(AUA)系统下的C期疾病、Whitmore-Jewett系统下的C1-C2期疾病和TNM(肿瘤、淋巴结、转移)系统下的T3-T4期和N+疾病。总体而言,不推荐局部晚期疾病患者接受外科手术,而且与患有临床局部(器官限定的)癌症的患者相比,这些患者的结果明显较为不利。

[0076] 缩写“AFP”指二甲基缬氨酸-缬氨酸-海兔异亮氨酸(dolaisoleuine)-海兔脯氨酸(dolaproine)-苯丙氨酸-对苯二胺(参见下文式XVI)。

[0077] 缩写“MMAE”指单甲基澳瑞他汀E(参见下文式XI)。

[0078] 缩写“AEB”指澳瑞他汀E与对乙酰基苯甲酸反应生成的酯(参见下文式XX)。

[0079] 缩写“AEVB”指澳瑞他汀E与苯甲酰戊酸反应生成的酯(参见下文式XXI)。

[0080] 缩写“MMAF”指甲基缬氨酸-缬氨酸-海兔异亮氨酸-海兔脯氨酸-苯丙氨酸(doalaine-valine-dolaisoleuine-dolaproine-phenylalanine)(参见下文式XIV)。

[0081] 除非另有说明,术语“烷基”指具有约1-20个碳原子(以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合),优选约1-8个碳原子的饱和直链或支链烃。烷基的示例是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基和3,3-二甲基-2-丁基。

[0082] 单独或作为另一基团一部分的烷基可选被一个或多个基团,优选1-3个基团(以及选自卤素的任何额外取代基)取代,这些基团包括但不限于:-卤素、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>和-CN,其中R'各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基,其中

所述-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、和-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基可任选进一步被一个或多个基团取代,这些基团包括但不限于:-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-卤素、-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R”、-OC(O)R”、-C(O)OR”、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR”、-C(O)N(R”)<sub>2</sub>、-NHC(O)R”、-SR”、-SO<sub>3</sub>R”、-S(O)<sub>2</sub>R”、-S(O)R”、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R”)、-N(R”)<sub>2</sub>和-CN,其中R”各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基。

[0083] 除非另有说明,术语“烯基”和“炔基”指具有约2-20个碳原子(以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合),优选约2-8个碳原子的直链和支链碳链。烯基链的链中具有至少一个双键,炔基链的链中具有至少一个三键。烯基的示例包括但不限于:乙烯或乙烯基、烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基和-2,3-二甲基-2-丁烯基。炔基的示例包括但不限于:炔属、炔丙基、乙炔基、丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基、和-3-甲基-1-丁炔基。

[0084] 单独出现或作为另一基团一部分的烯基和炔基可选被一个或多个基团,优选1-3个基团(以及选自卤素的任何额外取代基)取代,这些基团包括但不限于:-卤素、-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)<sub>2</sub>、-NHC(O)R’、-SR’、-SO<sub>3</sub>R’、-S(O)<sub>2</sub>R’、-S(O)R’、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R’)、-N(R’)<sub>2</sub>和-CN,其中R’各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基,其中所述-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基和-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基可以进一步被一个或多个取代基任选取代,这些取代基包括但不限于:-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-卤素、-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R”、-OC(O)R”、-C(O)OR”、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR”、-C(O)N(R”)<sub>2</sub>、-NHC(O)R”、-SR”、-SO<sub>3</sub>R”、-S(O)<sub>2</sub>R”、-S(O)R”、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R”)、-N(R”)<sub>2</sub>和-CN,其中R”各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基。

[0085] 除非另有说明,术语“亚烷基”指某一饱和支链或直链烃基,所述饱和支链或直链烃基具有约1-20个碳原子(以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合),优选约1-8个碳原子,并具有通过除去母体烷的同一个或两个不同碳原子上两个氢原子而产生的两个单价游离基中心。典型的亚烷基包括但不限于:亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基、亚癸基、1,4-亚环己基等。单独出现或作为另一基团一部分的亚烷基可选被一个或多个基团,优选1-3个基团(以及选自卤素的任何额外取代基)取代,这些基团包括但不限于:-卤素、-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)<sub>2</sub>、-NHC(O)R’、-SR’、-SO<sub>3</sub>R’、-S(O)<sub>2</sub>R’、-S(O)R’、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R’)、-N(R’)<sub>2</sub>和-CN,其中R’各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基,其中所述-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、和-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基可以进一步被一个或多个取代基任选取代,这些取代基包括但不限于:-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-卤素、-0-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-0-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R”、-OC(O)R”、-C(O)OR”、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR”、-C(O)N(R”)<sub>2</sub>、-NHC(O)R”、-SR”、-SO<sub>3</sub>R”、-S(O)<sub>2</sub>R”、-S(O)R”、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R”)、-N(R”)<sub>2</sub>和-CN,其中R”各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-



C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基。

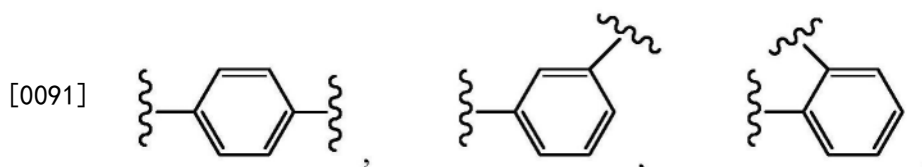
[0086] 除非另有说明,术语“亚烯基”指含有至少一个碳-碳双键的可选取代的亚烷基。示例性亚烯基包括例如,亚乙烯基(-CH=CH-)和亚丙烯基(-CH=CHCH<sub>2</sub>-)。

[0087] 除非另有说明,术语“亚炔基”指含有至少一个碳-碳三键的可选取代的亚烷基。示例性亚炔基包括例如,亚乙炔基(-C≡C-)、炔丙基(-CH<sub>2</sub>C≡C-)和4-戊炔基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH-)。

[0088] 除非另有说明,术语“芳基”指通过除去母体芳环系统中一个碳原子上的一个氢原子而获得的6-20个碳原子(及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合)的单价芳族烃基。示例性结构中,某些芳基用“Ar”表示。典型的芳基包括但不限于:衍生自苯、取代的苯、苯基、萘、蒽、联苯基等的基团。

[0089] 单独出现或作为另一基团一部分的芳基可选被一个或多个基团,优选1-5个基团,或甚至是1-2个基团取代,这些基团包括但不限于:-卤素、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、-NO<sub>2</sub>、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>和-CN,其中R'各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基,其中所述-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、和-芳基可以进一步被一个或多个基团任选取代,这些基团包括但不限于:-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-卤素、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')<sub>2</sub>、-NHC(O)R''、-SR''、-SO<sub>3</sub>R''、-S(O)<sub>2</sub>R''、-S(O)R''、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R'')、-N(R'')<sub>2</sub>和-CN,其中R''各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基。

[0090] 除非另有说明,术语“亚芳基”指可取代的二价芳基(即通过除去母体芳环系统的同一个或两个不同碳原子上的两个氢原子获得),它可以是邻位、间位或对位构型,如下结构所示(以苯基作为示范性芳基):



[0092] 典型的“-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基)芳基”、“-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>亚烯基)芳基”和“-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>亚炔基)芳基”包括但不限于:苄基、2-苄基乙-1-基、2-苄基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苄基、2-萘并苄基乙-1-基等。

[0093] 基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苄基、2-萘并苄基乙-1-基等。

[0094] 除非另有说明,术语“杂环”指具有3-14个环原子(也称为环成员)的单环、双环或多环系统,其中至少一个环中的至少一个环原子是选自N、O、P或S的杂原子(包括其间的碳原子和杂原子的范围和具体数目的所有组合和再组合)。杂环可具有独立地选自N、O、P或S的1-4个环杂原子。杂环中的一个或多个N、C或S原子可以被氧化。单环杂环优选具有3-7个环原子(如2-6个碳原子和1-3个独立选自N、O、P或S的杂原子),双环杂环优选具有5-10个环成员(如4-9个碳原子和1-3个独立选自N、O、P或S的杂原子)。包含杂原子的环可以是芳环或非芳环。除非另有说明,杂环在可产生稳定结构的任何杂原子或碳原子处连接于其侧基。

[0095] 杂环的描述参见Paquette, “Principles of Modern Heterocyclic Chemistr”

(《现代杂环化学原理》)(W.A.Benjamin, 纽约, 1968), 特别是第1、3、4、6、7和9章; The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs (《杂环化合物的化学: 专题论文集》)(约翰韦利森公司(John Wiley & Sons), 纽约, 1950年至今), 具体是第13、14、16、19和28卷; 和J. Am. Chem. Soc. 82: 5566 (1960)。

[0096] “杂环”基团的示例包括例如但不限于, 吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基)、噻唑基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫萘基、吲哚基、假吲哚基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双四氢呋喃基、四氢吡喃基、双四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、吡辛因基、三嗪基、6H-1, 2, 5-噻二嗪基、2H, 6H-1, 5, 2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒎基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、二苯并氧硫杂环己二烯基(phenoxathinyl)、2H-吡咯基、异噻唑基、异噁唑基、吡嗪基、哒嗪基、中氮茛基、异吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹啉基、噌啉基、蝶啶基、4H-卟啉基、卟啉基、 $\beta$ -卟啉基、菲啶基、吡啶基、嘧啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、呋喃基、吩噁基、异色满基、色满基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、奎宁环基、吗啉基、噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、羟吲哚基、苯并噁唑啉基和靛红酰基(isatinoyl)。优选的“杂环”基团包括但不限于: 苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基(coumarinyl)、异喹啉基、吡咯基、噻吩基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基和四唑基。

[0097] 单独或作为另一基团一部分的杂环基团可选被一个或多个基团, 优选1-2个基团取代, 这些基团包括但不限于:  $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、-卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和-CN, 其中 $R'$ 各自独立地选自-H、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基, 其中所述 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基和-芳基可进一步被一个或多个基团任选取代, 这些基团包括但不限于:  $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、-卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和-CN, 其中 $R''$ 各自独立地选自-H、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或芳基。

[0098] 示例但非限定地, 碳-键合杂环可以在以下位置发生键合: 吡啶的2、3、4、5或6位; 哒嗪的3、4、5或6位; 嘧啶的2、4、5或6位; 吡嗪的2、3、5或6位; 呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃(thiofuran)、噻吩(thiophene)、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位; 噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位; 异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4或5位; 吡丙啶的2或3位; 氮杂环丁烷的2、3或4位; 喹啉的2、3、4、5、6、7或8位; 或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。更典型地, 碳键合杂环包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、5-哒嗪基、6-哒嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪基、3-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基或5-噻唑基。

[0099] 示例但非限定地, 氮键合杂环可以在吡丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯

啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吡啶、二氢吡啶或1H-吡啶的1位；异吡啶或异二氢吡啶的2位；吗啉的4位；和呋唑或 $\beta$ -呋啉的9位键合。更典型地，氮键合杂环包括1-吡啶基、1-吡啶基(1-azetedy1)、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡唑基和1-哌啶基。

[0100] 除非另有说明，术语“碳环”指具有3-14个环原子(以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合)且所有环原子都是碳原子的饱和或不饱和的非芳族单环、双环或多环系统。单环碳环优选具有3-6个环原子，更优选具有5或6个环原子。双环碳环优选具有7-12个环原子，如排列为双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统，或具有9或10环原子，排列为双环[5,6]或[6,6]系统。术语“碳环”包括例如，融合于芳环的单环碳环(如，融合于苯环的单环碳环)。碳环优选具有3-8个碳环原子。

[0101] 单独出现或作为另一基团一部分的碳环基团可选被一个或多个基团，优选1-2个基团(以及选自卤素的任何额外取代基)取代，这些基团包括但不限于：-卤素、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-NHC(O)R'、-SR'、-SO<sub>3</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R')、-N(R')<sub>2</sub>和-CN，其中R'各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基，其中所述-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)和-芳基可以进一步被一个或多个取代基任选取代，这些取代基包括但不限于：-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-卤素、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')<sub>2</sub>、-NHC(O)R''、-SR''、-SO<sub>3</sub>R''、-S(O)<sub>2</sub>R''、-S(O)R''、-OH、-N<sub>3</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH(R'')、-N(R'')<sub>2</sub>和-CN，其中R''各自独立地选自-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基或-芳基。

[0102] 单环碳环取代基的例子包括-环丙基、-环丁基、-环戊基、-1-环戊-1-烯基、-1-环戊-2-烯基、-1-环戊-3-烯基、-环己基、-1-环己-1-烯基、-1-环己-2-烯基、-1-环己-3-烯基、-环庚基、-环辛基、-1,3-环己二烯基、-1,4-环己二烯基、-1,3-环庚二烯基、-1,3,5-环庚三烯基和-环辛二烯基。

[0103] 单独使用或作为另一基团一部分的术语“碳环(carbocyclo)”指可选取代的上述二价碳环基团”(即通过除去母体碳环系统的同一个或两个不同碳原子上的两个氢原子获得)。

[0104] 除非文中另有说明，连字号(-)指侧链分子的连接点。因此，术语“- (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基)芳基”或“-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基(芳基)”指本文定义的C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基，其中亚烷基在该亚烷基的任何碳原子上连接于侧链分子且连接于该亚烷基碳原子的一个氢原子被本文定义的芳基取代。

[0105] 当某特定基团被“取代”时，该基团可具有一个或多个取代基，优选1-5个取代基，更优选1-3个取代基，最优选1-2个取代基，所述取代基独立地选自取代基列表。然而，该基团通常可具有任何数量的选自卤素的取代基。如此表示被取代的基团。

[0106] 根据发明人意图，特定分子位置上的任何取代基或变量的定义应独立于它在该分子其他位置上的定义。应理解，本领域普通技术人员可选择本发明化合物上的取代基和取代模式，以提供化学性质稳定并容易用本领域已知技术和本文所述方法合成的化合物。

[0107] 本文所用的保护基指选择性阻断(暂时或永久)多官能化合物中一个反应性位点

的基团。本发明所用的合适羟基保护基是药学上可接受的,在给予对象后可能需要或不需要从母体化合物上切除而使该化合物具有活性。在体内,切割通过正常代谢过程进行。羟基保护基是本领域众所周知的,参见Protective Groups in Organic Synthesis(《有机合成中的保护基》),T.W.Greene和P.G.M.Wuts(约翰韦利森出版社(John Wiley&Sons),第3版),通过引用全文纳入本文用于所有目的,这类保护基包括例如醚(如,烷基醚和甲硅烷基醚,包括例如,二烷基甲硅烷基醚、三烷基甲硅烷基醚、二烷基烷氧基甲硅烷基醚)、酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、磺酸酯和磷酸酯保护基。羟基保护基的例子包括但不限于:甲醚;甲氧基甲醚、甲硫基甲醚、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲醚、苄氧基甲醚、对-甲氧基苄氧基甲醚、对-硝基苄氧基甲醚、邻-硝基苄氧基甲醚、(4-甲氧基苯氧基)甲醚、愈创木酚甲醚、叔丁氧基甲醚、4-戊烯氧基甲醚、甲硅烷氧基甲醚、2-甲氧基乙氧基甲醚、2,2,2-三氯乙氧基甲醚、双(2-氯乙氧基)甲醚、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲醚、薄荷氧基甲醚(menthoxy methyl ether)、四氢吡喃基醚、1-甲氧基环己醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氢呋喃基醚、四氢噻吩基醚;取代的乙醚如1-乙氧基乙醚、1-(2-氯乙氧基)乙醚、1-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]乙醚、1-甲基-1-甲氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙醚、1-甲基-1-苯氧基乙醚、2-三甲基甲硅烷基醚、叔丁醚、烯丙醚、炔丙醚、对-氯苯基醚、对-甲氧基苯基醚、苄基醚、对-甲氧基苄基醚、3,4-二甲氧基苄基醚、三甲基甲硅烷基醚、三乙基甲硅烷基醚、三丙基甲硅烷基醚、二甲基异丙基甲硅烷基醚、二乙基异丙基甲硅烷基醚、二甲基己基甲硅烷基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、二苯基甲基甲硅烷基醚、苯甲酰甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯基乙酸酯、苯甲酸酯、甲基碳酸烷基酯、9-苄基甲基碳酸烷基酯、乙基碳酸烷基酯、2,2,2-三氯乙基碳酸烷基酯、1,1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基碳酸酯、烷基磺酸酯、甲磺酸酯、苄磺酸酯、甲苯磺酸酯、亚甲基缩醛(methylene acetal)、亚乙基缩醛(ethylidene acetal)和叔丁基亚甲基缩酮(*t*-butylmethylidene ketal)。优选的保护基由下式代表: $-R^a$ 、 $-\text{Si}(R^a)(R^a)(R^a)$ 、 $-\text{C}(\text{O})R^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(R^a)$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2R^a$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ 和 $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^a$ ,式中 $R^a$ 是 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$ 烷基、 $\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 烯基、 $\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 炔基、 $-\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$ 亚烷基(碳环)、 $-\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 亚烯基(碳环)、 $-\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 亚炔基(碳环)、 $-\text{C}_6$ - $\text{C}_{10}$ 芳基、 $-\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$ 亚烷基(芳基)、 $-\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 亚烯基(芳基)、 $-\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 亚炔基(芳基)、 $-\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-\text{C}_2$ - $\text{C}_{20}$ 亚炔基(杂环),其中单独或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团可选被取代。

[0108] “改变天然糖基化模式”就本文目的而言意在指缺失一种或多种天然序列158P1D7中发现的碳水化合物部分(通过移除潜在的糖基化位点或通过用化学和/或酶方法去除糖基化),和/或添加一种或多种天然序列158P1D7中不存在的糖基化位点。另外,该短语包括天然蛋白糖基化中的数量改变,涉及各种存在的碳水化合物部分的性质和比例的改变。

[0109] 术语“类似物”指与另一分子结构相似或具有相似或相应特质的分子(例如158P1D7相关蛋白)。例如,158P1D7蛋白类似物可由特异性结合158P1D7的抗体或T细胞特异性结合。

[0110] 除非另有说明,术语“抗体”以最广义使用。因此,“抗体”可以是天然产生或人造

的,例如由常规杂交瘤技术产生的单克隆抗体。158P1D7抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体以及含有这些抗体中抗原结合域和/或一个或多个互补决定区的片段。本文所用术语“抗体”指任何形式的抗体或其片段,该抗体或其片段特异性结合158P1D7和/或显示所需的生物活性并具体包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,前体是其能特异性结合158P1D7和/或显示所需生物活性。本文提供的方法和组合物可使用任何特异性抗体。因此,在一个实施方式中,术语“抗体”包括一种分子,该分子包含至少一个来自轻链免疫球蛋白分子的可变区和至少一个来自重链分子的可变区,其组合形成靶抗原的特异性结合位点。在一个实施方式中,该抗体是IgG抗体。例如,该抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。用于本方法和组合物的抗体可以产生于细胞培养物、噬菌体或各种动物,所述动物包括但不限于牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、绵羊、狗、猫、猴、黑猩猩和猿。因此,在一个实施方式中,本发明的抗体是哺乳动物抗体。噬菌体技术可用于分离起始抗体或产生具有改变的特定性或亲合力特征的变体。这类技术是本领域中常规和熟知的。在一个实施方式中,该抗体通过本领域已知的方法重组生产。例如,重组抗体可通过使用包含编码抗体的DNA序列的载体转染宿主细胞来生产。可使用一种或多种载体来将表达至少一个VL区和一个VH区的DNA序列转染入宿主细胞。抗体产生和生产的重组方法的示例性说明包括Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (《抗体生产:关键技术》)(威利出版社(Wiley), 1997); Shephard等, MONOCLONAL ANTIBODIES (《单克隆抗体》)(牛津大学出版社(Oxford University Press), 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (《单克隆抗体:原理和实践》)(学术出版社(Academic Press), 1993); 和CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (新编免疫学实验指南)(约翰韦利森公司(John Wiley &

[0111] Sons), 最新版)。可通过重组方法对本发明的抗体进行修饰以提高抗体在介导所需功能中的功效。因此,在本发明范围涵盖可使用重组方法通过取代修饰的抗体。通常,该取代是保守性取代。例如,可用不同的残基取代至少一个抗体恒定区中的氨基酸。参见例如,美国专利号5,624,821、美国专利号6,194,551、申请号W0 9958572和Angal等, Mol. Immunol. 30:105-08 (1993)。氨基酸修饰包括氨基酸的缺失、添加和取代。在一些情况中,进行该变化以降低不需要的活性,例如补体依赖性细胞毒性。该抗体经常通过共价或非共价地结合一种物质来标记,该物质提供检测信号。已知各种标记和偶联技术且在科学和专利文献中广泛报道。这些抗体可根据与正常或缺陷的158P1D7的结合来筛选。参见例如, ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (《抗体工程:实践方法》)(剑桥大学出版社(Oxford University Press), 1996)。可通过以下体外和体内试验鉴定具有所需生物活性的合适抗体,所述体外试验包括但不限于:增殖、迁移、粘着、软琼脂生长、血管生成、细胞-细胞通讯、细胞凋亡、转运、信号转导,所述体内试验如肿瘤生长的抑制。本文提供的抗体也可用于诊断应用。作为捕获或非中和抗体,可根据结合特定抗原但不抑制该抗原的受体结合或生物活性的能力来筛选所述抗体。作为中和抗体,该抗体可用于竞争性结合试验。它们也可用于定量分析158P1D7或其受体。

[0112] 本文所用术语抗体的“抗原结合部分”或“抗体片段”(或是简称为“抗体部分”)指保留特异性结合抗原(如158P1D7和变体;图1)能力的158P1D7抗体的一个或多个片段。已证明,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段行使。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的

结合片段的示例包括：(i) Fab片段，由 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_H1$ 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段，包含在铰链区由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)  $V_H$ 和 $C_H1$ 组成的Fd；(iv) 由抗体单臂 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的Fv片段；(v) 由 $V_H$ 结构域组成的dAb片段(Ward等，(1989) Nature

[0113] 341:544-546)；和(vi)分离的互补决定区(CDR)。而且，尽管Fv片段的两个结构域 $V_L$ 和 $V_H$ 分别由不同基因编码，但可通过重组方法利用合成接头使其连接成为一条蛋白链，其中 $V_L$ 和 $V_H$ 区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv)；参见例如Bird等(1988) Science 242: 423-426和Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

[0114] 85:5879-5883)。此类单链抗体也应该为术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖。这些抗体片段通过本领域熟练技术人员已知的常规方法获取，并且筛选这些片段以与完整抗体相同的方式应用。

[0115] 如本文所用，可使用任何形式的“抗原”来生成特异性针对158P1D7的抗体。因此，引发抗原可以是单表位、多表位或者完整蛋白单独或联同一种或多种本领域已知的免疫原性促进剂。引发抗原可以是分离的全长蛋白、细胞表面蛋白(例如用转染有至少部分抗原的细胞免疫)或可溶性蛋白(例如仅用蛋白的胞外结构域部分免疫)。该抗原可在遗传修饰的细胞中生产。编码抗原的DNA可以是基因组或非基因组的(例如cDNA)并编码至少一部分胞外结构域。本文所用术语“部分”指最小数目的氨基酸或核酸，适当时，构成感兴趣抗原的免疫原性表位。可采用适合转化感兴趣细胞的任何遗传载体，包括但不限于腺病毒载体、质粒，和非病毒载体(如阳离子脂质)。在一个实施方式中，本发明方法和组合物中的抗体特异性结合感兴趣的158P1D7的至少一部分胞外结构域。

[0116] 本文提供的抗体或其抗原结合片段可与“生物活性剂”偶联。本文所用术语“生物活性剂”指任何合成或天然产生的化合物，该化合物结合抗原和/或增强或调节所需的生物作用以增强细胞杀死毒素。在一个实施方式中，本发明中使用的结合片段是生物活性片段。本文所用术语“生物活性”指能结合所需抗原表位并直接或间接发挥生物作用的抗体或抗体片段。直接作用包括但不限于：调节、刺激和/或抑制生长信号；调节、刺激和/或抑制抗凋亡信号；调节、刺激和/或抑制凋亡或坏死信号；调节、刺激和/或抑制ADCC级联反应；和调节、刺激和/或抑制CDC级联反应。

[0117] “双特异性”抗体也用于本方法和组合物。本文所用术语“双特异性抗体”指某一抗体，一般是单克隆抗体，对至少两个不同抗原性表位具有结合特异性。在一个实施方式中，这些表位来自相同抗原。在另一个实施方式中，这些表位来自两个不同抗原。制备双特异性抗体的方法为本领域已知。例如，双特异性抗体可通过共同表达两种免疫球蛋白重/轻链对来重组生产。参见例如，Milstein等，Nature 305:537-39(1983)。或者，可使用化学连接制备双特异性抗体。参见例如，Brennan等，Science 229:81(1985)。双特异性抗体包括双特异性抗体片段。参见例如，Hollinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48(1993)，Gruber等，J. Immunol. 152:5368(1994)。

[0118] 本文所述的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体以及此类抗体的片段，嵌合抗体中部分重链和/轻链与来源于特定物种或属于特定抗体类型或亚类抗体的对应序列相同或同源，而该(些)链的剩余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类型或亚类抗体的对应序列相同或同源，前提是其特异性结合靶抗原和/或显示所需的生物活性(美国专利号4,816,

567,和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA

[0119] 81:6851-6855(1984))。

[0120] 术语“化疗剂”指所有有效抑制肿瘤生长的化学化合物。化疗剂的非限制性示例包括烷化剂,例如氮芥、乙烯甲胺化合物和烷基硫磺酯;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;有丝分裂抑制剂,例如抗微管蛋白试剂(例如长春花生物碱、澳瑞他汀和鬼臼毒素衍生物);细胞毒性抗生素;破坏或干扰DNA表达或复制的化合物,例如,DNA小沟结合物;生长因子受体拮抗剂。另外,化疗剂包括细胞毒剂(如本文所定义)、抗体、生物分子和小分子。

[0121] 无论有无明确说明,术语“化合物”涉及并涵盖化学化合物本身以及其各种形式(除非文中明确排除以下情况):化合物的无定形和结晶形式,包括多晶型,其中这些形式可以是混合物的一部分或者是分离状态;化合物的游离酸和游离碱形式,它们通常是本文提供的结构所示的形式;化合物的异构体,指光学异构体和互变异构体,其中光学异构体包括对映异构体和非对映异构体,手性异构体和非手性异构体,光学异构体包括分离的光学异构体以及光学异构体混合物,包括外消旋和非外消旋混合物;其中异构体可以是分离形式或与一种或多种其它异构体的混合物形式;同位素化合物,包括含氘和含氚化合物,并包括含放射性同位素的化合物,所述放射性同位素包括治疗和诊断上有效的放射性同位素;化合物多聚体形式,包括二聚体、三聚体等形式;化合物的盐,优选药学上可接受的盐,包括酸加成盐和碱加成盐,包括具有有机抗衡离子和无机抗衡离子的盐,包括两性离子形式,如果化合物与两种或多种抗衡离子相关联,那么这两种或多种抗衡离子可以相同或不同;以及化合物溶剂合物,包括半溶剂合物、单溶剂合物、二溶剂合物等,包括有机溶剂合物和无机溶剂合物,所述无机溶剂合物包括水合物;如果化合物与两种或多种溶剂分子相关联,那么这两种或多种溶剂分子可以相同或不同。在一些情况下,本文提到本发明化合物时包括明确提及一种或多种上述形式,如盐和/或溶剂合物,然而,这种提法只是为了强调,而不作为排除上文鉴定的其它形式。

[0122] 术语“互补决定区”和“CDR”是本领域已知的,指抗体可变区内非连续的氨基酸序列,其赋予抗体特异性和结合亲和性。通常,在各重链可变区中存在三种(3)CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)且在各轻链可变区中存在三种(3)CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。

[0123] 可以使用多种熟知的方案中的任一种容易地确定给定CDR的精确氨基酸序列边界,包括以下文献:Kabat等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest(《免疫学感兴趣蛋白的序列》),第5版,马里兰州贝塞斯达的国立卫生研究院公共卫生服务部(Public Health Service) (“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等(1997)JMB 273,927-948 (“Chothia”编号方案),MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography(抗体-抗原相互作用:接触分析和结合位点拓扑学)”,J.Mol.Biol.262,732-745 (“接触”编号方案),Lefranc MP等,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains(免疫球蛋白和T细胞受体可变结构域和Ig超家族V样结构域的IMGT独特编号)”,Dev Comp Immunol,2003年1月;27(1):55-77 (“IMGT”编码方案)以及Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool(免疫球蛋白可变结构域的另一种编号方案:自动建模和分析工具)”,J Mol Biol,

2001年6月8

[0124] 日;309(3):657-70(AHo编号方案)。

[0125] 给定CDR的边界可能随鉴定所用方案而变化。例如,Kabat方案基于结构比对,而Chothia方案基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号都基于最常见的抗体区序列长度,其中通过插入字母表示插入,例如“30a”,并且在一些抗体中出现缺失。这两种方案在不同位点放置某些插入和缺失(“插入缺失标记(indel)”),导致不同的编号。接触方案基于复杂晶体结构的分析且在许多方面与Chothia编号方案类似。下文中的表V列举了分别由Kabat、Chothia和接触方案鉴定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3和CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的位置。对于CDR-H1,给出使用Kabat和Chothia编号方案的残基编号。

[0126] 因此,除非另有说明,给定抗体或其区域(如可变区)的术语“CDR”和“互补决定区”以及抗体或其区域的单个CDR(如CDR-H1、CDR-H2)应理解为包括上文所述已知方案中任一种所定义的互补决定区。在一些情况下,指明用于鉴定某一或某些具体CDR的方案,如CDR按Kabat、Chothia或接触方法限定。在其他情况下,给出了CDR的具体氨基酸序列。

[0127] 本文所用术语“保守性取代”指本领域技术人员已知的氨基酸取代且通常不改变所得分子的生物学活性。本领域技术人员认识到,多肽非必需区域的单一氨基酸取代通常不显著改变生物学活性(参见例如Watson等,MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE(《基因分子生物学》),本杰明/卡明斯出版公司(The Benjamin/Cummings Pub.Co.),第224页(第4版1987))。这类示例性取代优选是根据表II和表III中所示进行的取代。例如,这类变化包括用任何异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)和亮氨酸(L)取代这些疏水性氨基酸中的任何其它氨基酸;天冬氨酸(D)取代谷氨酸(E)且反之亦然;谷氨酰胺(Q)取代天冬酰胺(N)且反之亦然;以及丝氨酸(S)取代苏氨酸(T)且反之亦然。其它取代也可视为保守性取代,这取决于特定氨基酸的环境和其在蛋白质三维结构中的作用。例如,甘氨酸(G)和丙氨酸(A)经常可互换,丙氨酸(A)和甘氨酸(G)也可如此。甲硫氨酸(M)相对疏水,可经常与亮氨酸和异亮氨酸互换且有时可与缬氨酸互换。赖氨酸(K)和精氨酸(R)经常在氨基酸残基的显著特性是其电荷而这两种氨基酸残基间的pK差异不重要的位置处可互换。在特定环境中其它变化也可视为“保守性”(参见,例如本文中表III,“Biochemistry(《生物化学》)”第二版第13-15页,Lubert Stryer编(斯坦福大学);Henikoff等,PNAS1992卷89

[0128] 10915-10919;Lei等,J Biol Chem 1995年5月19日;270(20):11882-6)。其它取代也是可允许的并可凭经验或根据已知的保守性取代来确定。

[0129] 术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞的表达活性、细胞功能,和/或导致细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素、化疗剂和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。细胞毒剂的示例包括但不限于:澳瑞他汀(例如澳瑞他汀E、澳瑞他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、美登木素(maytansinoid)、蓖麻毒蛋白、蓖麻毒蛋白A链、考布他汀(combrestatin)、多卡米星、尾海兔素、多柔比星、柔红霉素、紫杉酚、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒蛋白、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ 八叠球菌、白树毒素、迈托毒素、限曲菌素、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白、抗巴豆毒素、卡其霉素、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂和糖皮质激素以及其它的化疗剂和放射性同位素例如At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>



或 $\text{Bi}^{213}$ 、 $\text{P}^{32}$ 和包括 $\text{Lu}^{177}$ 在内的放射性同位素Lu。抗体也可与抗癌前药的活化酶偶联,该酶能将前药转变成其活性形式。

[0130] 本文所用术语“双抗体”指具有两个抗原-结合位点的小抗体片段,该片段包含同一多肽链( $V_H$ - $V_L$ )中连接轻链可变区( $V_L$ )的重链可变区( $V_H$ )。使用长度过短以至于无法在同一条链的两个结构域之间形成配对的接头时,迫使各结构域与另一条链的互补结构域配对,产生两个抗原-结合位点。双抗体更详细描述于例如,EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-48(1993)。

[0131] 在关于158P1D7结合剂对158P1D7表达型细胞作用的上下文中,术语“消耗”指158P1D7表达型细胞的数目减少或消除。

[0132] 本文所用术语“基因产物”指肽/蛋白或mRNA。例如,“本发明的基因产物”有时在本文中指“癌氨基酸序列”、“癌蛋白”、“表I所列的癌蛋白”、“癌mRNA”、“表I所列的癌mRNA”等。在一个实施方式中,癌蛋白由图1的核酸编码。癌蛋白可以是图1中核酸所编码的片段或者全长蛋白。在一个实施方式中,癌氨基酸序列用于确定序列相同性和相似性。在另一实施方式中,该序列是图1中核酸所编码蛋白的天然产生的等位基因变体。在另一种实施方式中,该序列是本文中进一步描述的序列变体。

[0133] “异源偶联物”抗体可用于本发明的方法和组合物。本文所用术语“异源偶联物抗体”指两种共价连接的抗体。这类抗体可通过合成蛋白化学的已知方法来制备,包括使用交联剂。参见例如,美国专利号4,676,980。

[0134] 术语“同源物”指某一分子,该分子通过例如在相应位点具有相同或相似的化学残基序列而展现出与另一分子的同源性。

[0135] 在一个实施方式中,本文中提供的抗体是“人抗体”。本文所用术语“人抗体”指某一抗体,其中包含互补决定区(CDR)在内的轻链和重链序列的完整序列基本上来自人基因。在一个实施方式中,人单克隆抗体通过三源杂交瘤技术、人B细胞技术(参见例如Kozbor等,Immunol.Today 4:72(1983))、EBV转化技术(参见例如Cole等,MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96(1985))或使用噬菌体展示(参见例如Marks等,J.Mol.Biol.222:581(1991))制备。在具体的实施方式中,该人抗体在转基因小鼠中生成。本领域已知制备部分至全人抗体的技术并可使用任何这类技术。根据一种特别优选的实施方式,在工程改造成表达人重链和轻链抗体基因的转基因小鼠中制备全人抗体序列。制备生产人抗体的转基因小鼠的示例性描述参见申请号WO 02/43478和美国专利6,657,103(阿布吉尼公司(Abgenix))及其同族专利。来自生产所需抗体的小鼠的B细胞随后可融合以制备用于连续生产抗体的杂交瘤细胞系。例如,参见美国专利号5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016和5,545,806;以及Jakobovits,Adv.Drug Del.Rev.31:33-42(1998);Green等,J.Exp.Med.188:483-95(1998)。

[0136] 本文所用术语“人源化抗体”指含有来自非人(例如鼠)抗体以及人抗体序列的抗体形式。此类抗体是嵌合抗体,其中含有衍生自非人免疫球蛋白极少序列。通常,所述人源化抗体包含至少一个且通常两个可变区的几乎全部,其中全部或基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的FR区。人源化抗体还任选包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的Fc。参见例如,Cabilly美国专利号4,816,567;Queen等(1989)Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-

10033;和ANTIBODY ENGINEERING:A PRACTICAL APPROACH(《抗体工程:实践方法》)(牛津大学出版社(Oxford University Press)1996)。

[0137] 本文所用术语“抑制了”或“抑制”指以可检测的量降低,或完全阻止。

[0138] 短语“分离的”或“生物学纯化的”指一种物质,该物质基本上或本质上不含在天然状态下通常伴随该材料的成分。因此,本发明所述的分离肽优选不含在其原位环境中通常与该肽相关的物质。例如,当基本上与污染多核苷酸分离时,核苷酸可称为“分离的”,这些污染多核苷酸对应于或互补于非158P1D7基因或编码非158P1D7基因产物或其片段的多肽。本领域技术人员可容易地采用核酸分离方法来获得分离的158P1D7多核苷酸。例如,当采用物理、机械或化学方法将158P1D7蛋白从通常与该蛋白相关的细胞组分中移出时,称之为“分离的”蛋白。本领域技术人员可容易地使用标准纯化方法来获得分离的158P1D7蛋白。或者,可用化学方法制备分离的蛋白。

[0139] 合适的“标记”包括放射性核素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光部分、化学发光部分、磁性颗粒等。教导使用这类标记的专利包括美国专利号3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149和4,366,241。另外,本文提供的抗体可用作荧光体(fluorobodies)的抗原结合组分。参见例如,Zeytun等,Nat.Biotechnol.21:1473-79(2003)。

[0140] 术语“哺乳动物”指归类为哺乳动物的任何生物体,包括小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、马和人。在本发明的一个实施方式中,该哺乳动物是小鼠。在本发明的另一个实施方式中,该哺乳动物是人。

[0141] 术语“转移性癌”和“转移性疾病”指扩散至局部淋巴结或远端部位的癌,并旨在包括AUA系统中的D期疾病和TNM系统中的TxNxM+期。

[0142] 本文所用术语“调节剂”或“测试化合物”或“药物候选物”或其语法上等同形式描述了待测试的某些分子,例如蛋白、寡肽、有机小分子、多糖、多核苷酸等,所述测试是测试其直接或间接改变癌症表型或表达癌序列(例如核酸或蛋白序列)的能力以及对癌序列的作用(例如,信号转导、基因表达、蛋白相互作用等)。一方面,调节剂会中和本发明癌蛋白的作用。“中和”指蛋白活性和对细胞的结果性作用被抑制或阻断。另一方面,调节剂通过中和所述蛋白水平来中和本发明基因和其相应蛋白的作用。在优选的实施方式中,调节剂改变表达概况,或本文提供的核酸或蛋白的表达概况,或下游效应通路。在一个实施方式中,调节剂抑制癌表型,例如,抑制成正常组织指纹图谱(tissue fingerprint)。在另一个实施方式中,调节剂诱导癌表型。通常,用不同的物质浓度平行运行多种试验混合物,以获得对不同浓度的差异反应。通常,这些浓度之一用作阴性对照,即零浓度或低于检测水平的浓度。

[0143] 调节剂、药物候选物或测试化合物包括大量化学种类,但它们一般为有机分子,优选分子量大于100且小于约2500道尔顿的小有机化合物。优选的小分子小于2000或小于1500或小于1000或小于500道尔顿。候选物质包含对与蛋白质发生结构相互作用,特别是形成氢键,所必须的官能团,且通常至少包含胺、羰基、羟基或羧基,优选包含至少两个化学官能团。候选物质常包含环状碳或杂环结构和/或用一个或多个上述官能团取代的芳族或多芳族结构。调节剂也包含生物分子,例如肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶,其衍生物、结构类似物或组合。特别优选肽。一类调节剂是肽,例如含有约5-约35个氨基酸的肽,优选含有约5-约20个氨基酸的肽,特别优选含有约7-约15个氨基酸的肽。优选地,癌调节蛋白是可溶

蛋白,包含非跨膜区和/或具有N末端Cys以协助溶解。在一个实施方式中,该片段的C末端保持为游离酸且N末端是游离胺以协助偶联,即偶联半胱氨酸。在一个实施方式中,本发明的癌蛋白与本文所述的免疫原性试剂偶联。在一个实施方式中,该癌蛋白与BSA偶联。本发明的肽(例如具有优选长度的肽)可互相连接或与其它氨基酸连接以形成较长的肽/蛋白。该调节肽可以是上述天然产生的蛋白的消化物,随机肽或“偏向性”随机肽。在一个优选实施方式中,基于肽/蛋白的调节剂是如本文所定义的抗体及其片段。

[0144] 本文所用术语“单克隆抗体”指获自基本均一抗体群的抗体,即除了可少量存在的可能天然发生的突变以外,群体包含的单独抗体是相同的。单克隆抗体具有针对单一抗原性表位的高度特异性。相反,常规(多克隆)抗体制剂一般包含大量针对(或特异于)不同表位的抗体。在一个实施方式中,多克隆抗体含有多种单克隆抗体,在含多个抗原性表位的单一抗原内具有不同表位特异性、亲和性或亲和力。定语“单克隆”表明抗体的特征在于获自基本均一的抗体群,而不应解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如,根据本发明所用的单克隆抗体可通过首先由Kohler等,Nature 256:495(1975)所述的杂交瘤方法,或通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制备。也可通过例如Clackson等,Nature 352:624-628(1991)和Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1991)所述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。这些单克隆抗体通常以下列Kd结合:至少约1 $\mu$ M,更通常至少约300nM,一般至少约30nM,优选至少约10nM,更优选至少约3nM或更佳,该值通常由ELISA测定。

[0145] “药物赋形剂”包括以下材料,例如佐剂、载剂、pH调节和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、防腐剂等。

[0146] “药学上可接受的”指非毒性、惰性和/或生理上可与人或其它哺乳动物相容的组合物。

[0147] 术语“多核苷酸”指至少10个碱基或碱基对长度的核苷酸多聚体形式,可以是核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任何核苷酸类型的改性形式,并旨在包括单链和双链形式的DNA和/或RNA。本领域中,该术语经常与“寡核苷酸”互换使用。多核苷酸可包括本文公开的核苷酸序列,其中图1所示胸苷(T)也可以是尿嘧啶(U);该定义涉及DNA和RNA化学结构之间的差异,特别是观察到RNA的四种主要碱基之一是尿嘧啶(U)而不是腺苷(T)。

[0148] 术语“多肽”指含至少约4、5、6、7或8个氨基酸的聚合物。说明书通篇使用了氨基酸的标准三字母(参见表II)或单字母名称。本领域中,该术语经常与“肽”或“蛋白”互换使用。

[0149] “重组”DNA或RNA分子是经体外分子操作的DNA或RNA分子

[0150] 本文所用的术语“单链Fv”或“scFv”或“单链”抗体指含抗体V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域的抗体片段,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区之间还包含多肽接头,这使sFv形成所需结构用于抗原结合。有关sFv的综述参见Pluckthun,THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES(《单克隆抗体的药理学》),第113卷,Rosenburg和Moore编,纽约施普林格出版社(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994)。

[0151] 本文所用的术语“特异性”、“特异性结合”和“特异结合”指抗体选择性结合靶抗原表位。可通过在一组指定条件下比较与合适抗原结合以及与非相关抗原或抗原混合物结合的方式来检测抗体的结合特异性。如果该抗体与合适抗原的结合比非相关抗原或抗原混合物高至少2、5、7和优选10倍,则该抗体视为特异性抗体。在一个实施方式中,特异性抗体是

一种仅与158P1D7抗原结合但不与非相关抗原结合的抗体。在另一实施方式中,特异性抗体是结合人158P1D7抗原但不结合非人158P1D7抗原的抗体,该非人158P1D7抗原相对158P1D7抗原具有70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸同源性。在另一实施方式中,特异性抗体是结合人158P1D7抗原和结合鼠158P1D7抗原的抗体,但与人抗原的结合度更高。在另一实施方式中,特异性抗体是结合人158P1D7抗原和结合灵长类动物158P1D7抗原的抗体,但与人抗原的结合度更高。在另一实施方式中,特异性抗体结合人158P1D7抗原以及任何非人158P1D7抗原,但与人抗原或其任何组合的结合度更高。

[0152] 本文所用的“治疗”或“治疗的”和其语法上相关术语,指对任何疾病结果的任何改善,例如延长存活、较低的发病率和/或减少副作用(替代性治疗方式的副产结果);正如本领域技术人员容易理解的那样,优选完全根治疾病,即使这并非是对治疗作用的要求。

[0153] 术语“变体”指某一分子,该分子具有不同于所述类型或标准的变化,例如在具体所述蛋白(例如示于图1的158P1D7蛋白)相应位点上具有一个或多个不同氨基酸残基的蛋白。类似物是变体蛋白的一个示例。剪接同种型和单核苷酸多态性(SNP)是变体的其它示例。

[0154] 本发明所述的“158P1D7蛋白”和/或“158P1D7相关蛋白”包括本文具体鉴定的那些蛋白(参见图1),以及可根据本文所概述的方法或本领域容易获得的方法无需过度实验而分离/产生并鉴定的等位基因变体、保守性取代变体、类似物和同源物。也包括组合不同158P1D7蛋白或其片段的多个部分的融合蛋白,以及158P1D7蛋白与异源多肽的融合蛋白。这类158P1D7蛋白总称为158P1D7相关蛋白、本发明所述的蛋白或158P1D7。术语“158P1D7相关蛋白”指具有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25个或更多于25个氨基酸的多肽片段或158P1D7蛋白序列;或具有至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、330、335、345、355、365、375、385、395、405、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、700、725、750、775、800、825、830、835、840、841个或更多个氨基酸的多肽片段或158P1D7蛋白序列。

[0155] II.) 158P1D7抗体

[0156] 本发明的另一方面提供结合158P1D7相关蛋白的抗体(参见图1)。在一个实施方式中,与158P1D7相关蛋白结合的抗体是特异性结合包含氨基酸序列SEQ ID NO.:2的158P1D7蛋白的抗体。该特异性结合包含氨基酸序列SEQ ID NO.:2的158P1D7蛋白的抗体包括可结合其它158P1D7相关蛋白的抗体。例如,结合包含氨基酸序列SEQ ID NO.:2的158P1D7蛋白的抗体可结合158P1D7相关蛋白,例如158P1D7变体及其同源物或类似物。

[0157] 本发明的158P1D7抗体具体用于癌症(参见例如表I)预后试验、成像、诊断和治疗方案。相似地,这类抗体可用于膀胱癌和其它癌症的治疗和/或预后,158P1D7在一定程度上也在这些其它癌症中表达或过度表达。此外,当抗体与本文所述单甲基澳瑞他汀E(MMAE)偶联时,本发明的158P1D7抗体可治疗性用于治疗涉及158P1D7表达的癌症(特别是膀胱癌,例如晚期或转移性膀胱癌)。

[0158] 抗体、特别是单克隆抗体的各种制备方法为本领域所熟知。例如,可通过使用经分离或免疫偶联形式的158P1D7相关蛋白、肽或片段免疫合适哺乳动物宿主来制备抗体

(Antibodies: A Laboratory Manual (《抗体: 实验室手册》), CSH出版社 (CSH Press), Harlow和Lane编(1988); Harlow, Antibodies (《抗体》), 纽约的冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press) (1989))。另外, 也可使用158P1D7融合蛋白, 例如158P1D7 GST-融合蛋白。在一个具体实施方式中, 生产包含图1中所有或大部分氨基酸序列的GST融合蛋白, 然后用作免疫原以生产合适的抗体。在另一实施方式中, 合成158P1D7相关蛋白并用作免疫原。

[0159] 另外, 使用本领域已知的裸DNA免疫技术(用或不用纯化的158P1D7相关蛋白或158P1D7表达型细胞)产生对所编码免疫原的免疫应答(关于综述, 参见Donnelly等, 1997, Ann.Rev.Immunol.15:617-648)。

[0160] 可分析如图1所示的158P1D7蛋白氨基酸序列来选择158P1D7蛋白特异性区域以生成抗体。例如, 使用158P1D7氨基酸序列的疏水性和亲水性分析来鉴定158P1D7结构的亲水性区域。可使用各种本领域已知的其它方法鉴定显示免疫原性结构以及其它区域和结构域的158P1D7蛋白区域, 这些方法例如Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-Schultz或Jameson-Wolf分析。可使用Hopp, T.P.和Woods, K.R., 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:3824-3828的方法生成亲水性概况。可使用Kyte, J.和Doolittle, R.F., 1982, J.Mol.Biol.

[0161] 157:105-132的方法生成亲水(Hydrophaticity)概况。可使用Janin J., 1979, Nature277:491-492方法生成可及(accessible)残基百分比(%)概况。可使用Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int.J.Pept.Protein Res.32:242-255的方法产生平均挠性(Average Flexibility)概况。可使用Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering1:289-294的方法生成 $\beta$ 转角(Beta-turn)概况。因此, 通过任意这些方案或方法鉴定的每个区域都在本发明的范围内。生产158P1D7抗体的优选方法通过本文所提供的实施例做进一步说明。用作免疫原的蛋白或多肽的制备方法为本领域熟知。制备蛋白带有载体(例如BSA、KLH或其它载体蛋白)的免疫原性偶联物的方法也是本领域熟知的。在一些情况下, 使用例如碳二亚胺试剂直接偶联; 在其它情况下连接试剂(例如伊利诺斯州罗克福德的皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.)提供的试剂)也有效。如本领域所理解的那样, 经常通过在合适时期内注射并使用合适佐剂来给予158P1D7免疫原。免疫方案期间, 可采取抗体效价测定抗体形成的充分性。

[0162] 可通过本领域熟知的各种方法生产158P1D7单克隆抗体。例如, 使用通常已知的Kohler和Milstein的标准杂交瘤技术或使生成抗体的B细胞永生化的修饰方法来制备分泌所需单克隆抗体的永生细胞系。通过免疫试验筛选分泌所需抗体的永生细胞系, 该试验中的抗原是158P1D7相关蛋白。鉴定出合适的永生细胞培养物时, 可从体外培养物或腹水中扩增细胞并生产抗体。

[0163] 本发明的抗体或片段也可通过重组方法生产。也可在多物种来源的嵌合或互补决定区(CDR)移植抗体(grafted antibodies)背景中生产特异性结合158P1D7蛋白所需区域的区域。也可生产人源化或人158P1D7抗体, 并优选用于治疗情况。已熟知通过用一种或多种非人抗体CDR取代对应人抗体序列来人源化鼠和其它非人抗体的方法(参见例如Jones等, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann等, 1988, Nature 332:323-327; Verhoeyen等, 1988, Science 239:1534-1536)。也可参见Carter等, 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285和Sims等, 1993, J.Immunol.151:2296。

[0164] 在优选的实施方式中,本发明的抗体包括全人158P1D7抗体(158P1D7 MAb)。本领域的各种方法中提供了全人158P1D7 MAb的生产方法。例如,一个优选实施方式提供了使用转基因小鼠、灭活供抗体生产、用人重链和轻链基因座进行工程改造的技术,也称为Xenomouse(安进福利蒙特公司(Amgen Fremont, Inc.))。制备生产人抗体的转基因小鼠的示例性说明可参见美国专利6,657,103。也可参见美国专利号5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016;和5,545,806;以及Mendez等,Nature Genetics,15:146-156(1998);Kellerman,S.A.和Green,L.L.,Curr.Opin.Biotechnol 13,593-597(2002)。

[0165] 另外,本发明的人抗体可通过HuMAb小鼠(麦得莱克斯公司(Medarex, Inc.))产生,该小鼠含有人免疫球蛋白基因中编码未重排人重链( $\mu$ 和 $\gamma$ )和 $\kappa$ 轻链免疫球蛋白序列的小基因座,以及灭活内源性 $\mu$ 链和 $\kappa$ 链基因座的靶向突变(参见例如Lonberg等,(1994)Nature 368(6474):856-859)。

[0166] 在另一实施方式中,可使用携带转基因和转染色体上人免疫球蛋白序列的小鼠(例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)生产本发明的全人抗体。这类小鼠在本文中称为“KM小鼠”,该小鼠描述于Tomizuka等,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727和Tomizuka等的PCT WO 02/43478。

[0167] 本发明的人单克隆抗体也可使用噬菌体展示方法制备以筛选人免疫球蛋白基因文库。这类用于分离人抗体的噬菌体展示方法已在本领域中建立。参见例如:Ladner等,5,223,409;美国专利号5,403,484;和5,571,698;Dower等,美国专利号5,427,908和5,580,717;McCafferty等,美国专利号5,969,108和6,172,197;以及Griffiths等,美国专利号5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0168] 也可使用SCID小鼠制备本发明的人单克隆抗体,该小鼠中人免疫细胞已经重建从而可在免疫后产生人抗体应答。这类小鼠描述于例如Wilson等的美国专利号5,476,996和5,698,767。

[0169] 本发明的人单克隆抗体还可使用特定小鼠制备,该小鼠中使用携带人免疫球蛋白重链(VH、DH和JH)和/或 $\kappa$ 轻链(VK和JK)基因座的未重排种系可变区段的人基因组序列完整或部分地代替了免疫球蛋白重链(VH、DH和JH区段)和/或 $\kappa$ 轻链(VK和JK)携带内源性小鼠可变区段的基因组序列(纽约州塔利镇的再生元公司(Regeneron))。参见例如,美国专利号6,586,251、6,596,541、7,105,348、6,528,313、6,638,768和6,528,314。

[0170] 在一个实施方式中,本发明的158P1D7 MAb包含称为Ha15-10ac12抗体的重链和轻链可变区,该抗体由美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)登录号:PTA-13102保藏的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞生产(参见图3),或其重链和轻链可变区含有与Ha15-10ac12的重链和轻链可变区氨基酸序列(如其功能性片段)同源的氨基酸序列,且这些抗体保留本发明158P1D7MAb的所需功能特性。Ha15-10ac12的重链可变区具有SEQ ID NO:7的第1个Q残基至第120个S残基区域的氨基酸序列,且Ha15-10ac12的轻链可变区具有SEQ ID NO:8的第1个D残基至第113个R残基区域的氨基酸序列。

[0171] 在一个实施方式中,该158P1D7抗体含有HA15-10ac12的重链可变区的重链CDR,如HA15-10ac12的重链可变区的重链CDR 1、2和/或3,例如SEQ ID NO:7所列氨基酸序列的CDR1、CDR2和/或CDR3,其通过任意已知的用于鉴定CDR的编号方案确定,例如如本文所述的那些方法。在一个实施方式中,该158P1D7抗体含有HA15-10ac12的轻链可变区的轻链CDR,

如HA15-10ac12的轻链可变区的轻链CDR 1、2和/或3,例如SEQ ID NO:8所列氨基酸序列的CDR1、CDR2和/或CDR3,其通过任意已知的用于鉴定CDR的编号方案确定,例如如本文所述的那些方法。在一个方面,Ha15-10ac12的重链可变区的CDR 1-3分别含有SEQ ID NO:7的残基31-35、残基50-66和残基99-109的氨基酸序列。在一个方面,Ha15-10ac12的轻链可变区的CDR 1-3分别含有SEQ ID NO:8的残基24-39、残基55-61和残基94-102的氨基酸序列。因此,在一些方面,该158P1D7抗体含有具有SEQ ID NO:7的残基31-35的重链CDR1、具有SEQ ID NO:7的残基50-66的重链CDR2和/或具有SEQ ID NO:7的残基99-109的重链CDR3,和/或具有SEQ ID NO:8的残基24-39的轻链CDR1、具有SEQ ID NO:8的残基55-61的轻链CDR2和/或具有SEQ ID NO:8的残基94-102的轻链CDR3。提供的实施方式中还包括与具有这类可变区和/或CDR序列的抗体竞争结合抗原的抗体。在一些实施方式中,提供的抗体包含恒定区。该恒定区可以是任何恒定区亚类。在一个实施方式中,可以使用人IgG2恒定区作为重链恒定区和人Igk恒定区作为轻链恒定区。

[0172] 例如,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0173] (a) 重链可变区包含与图3所示重链可变区氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列;且

[0174] (b) 轻链可变区包含与图3所示轻链可变区氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

[0175] 在其他实施方式中, $V_H$ 和/或 $V_L$ 氨基酸序列可与图3所示 $V_H$ 和 $V_L$ 序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源。

[0176] 在另一个实施方式中,本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中:

[0177] (a) 该重链可变区包含具有图3所示重链可变区的重链可变区CDR 1、2和/或3的氨基酸序列的一个、两个或三个互补决定区(CDR),其通过任意已知的编号方案确定,例如本文所述的任意方法;

[0178] (b) 该轻链可变区包含具有图3所示轻链可变区的轻链可变区CDR 1、2和/或3的氨基酸序列的一个、两个或三个CDR,其通过任意已知的编号方案确定,例如本文所述的任意方法。

[0179] 在另一实施方式中,抗体或其抗原结合部分与具有这类重链和/或轻链CDR的抗体竞争结合。

[0180] 本发明经工程改造的抗体包括对 $V_H$ 和/或 $V_L$ 中框架残基进行修饰(例如以改善抗体特性)的那些抗体。一般进行这种框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是“回复突变(backmutate)”一个或多个相应种系序列的框架残基。更具体地是,经过体突变的抗体可含有不同于该抗体衍生来源的种系序列的框架残基。可通过比较抗体框架序列与该抗体衍生来源的种系序列来鉴定该残基。为将框架区序列转变回其种系构型,可通过例如定点诱变或PCR介导诱变(例如,亮氨酸“回复突变”为甲硫氨酸)将体突变“回复突变”为种系序列。本发明也旨在涵盖这些“回复突变”抗体。

[0181] 另一类型的框架修饰涉及突变框架区中的一个或多个残基,或甚至是一个或多个CDR区中的残基,以去除T细胞表位从而降低该抗体潜在的免疫原性。该方法也称为“去免疫

化”,并进一步详细描述于Carr等的美国专利公开号2003/0153043。

[0182] 除了或替代框架或CDR区中的修饰以外,本发明的抗体可经工程改造以含有Fc区的修饰,一般是改变该抗体一种或多种功能特性,例如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。另外,可对本发明158P1D7 MAbs进行化学修饰(例如可将一个或多个化学部分连接于该抗体)或修饰以改变其糖基化,再次改变MAb的一种或多种官能特性。这些实施方式中的各种在下文中详细描述。

[0183] 在一个实施方式中,修饰CH1的铰链区从而使该铰链区的半胱氨酸残基数目发生改变,例如增加或减少。该方法进一步描述于Bodmer等的美国专利5,677,425。改变CH1铰链区中半胱氨酸残基数目以(例如)促进轻链和重链组装或者提高或降低158P1D7 MAbs的稳定性。

[0184] 在另一实施方式中,对抗体的Fc铰链区进行突变以降低158P1D7 MAbs的生物半衰期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变导入Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区从而使该抗体相对于天然Fc铰链结构域SpA结合具有受损的葡萄球菌蛋白A (SpA) 结合。该方法进一步描述于Ward等的美国专利号6,165,745。

[0185] 在另一实施方式中,对158P1D7 MAbs进行修饰以提高其生物半衰期。可采用各种方法。例如,可如Ward的美国专利号6,277,375所述引入突变。或者,为提高该生物半衰期,可改变抗体CH1或CL区以含有取自IgG Fc区CH2结构域中两个环的救援受体结合表位,如Presta等的美国专利号5,869,046和6,121,022所述。

[0186] 在另一个实施方式中,通过使用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,由此改变158P1D7 MAbs的效应功能。例如,选自氨基酸特异性残基的一个或多个氨基酸可被不同的氨基酸残基取代从而该抗体对效应配体的亲和性改变但保留母体抗体的抗原结合力。亲和性发生改变的效应配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。该方法进一步描述于Winter等的美国专利号5,624,821和5,648,260。

[0187] 158P1D7抗体与158P1D7相关蛋白的反应性可以通过许多熟知方法建立,包括蛋白质印迹、免疫沉淀、ELISA和FACS分析,使用适当的158P1D7相关蛋白、158P1D7表达型细胞或其提取物。158P1D7抗体或其片段可标记有检测标记物或偶联至第二分子。合适的检测标记物包括但不限于放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合物或酶。另外,使用本领域通常已知的方法产生对两种或更多158P1D7表位特异的双特异性抗体。也可通过本领域已知的交联技术(例如Wolff等,Cancer Res.53:2560-2565)生产均二聚抗体。

[0188] 在另一优选实施方式中,本发明的158P1D7 MAbs是含有称为Ha15-10ac12抗体的重链和轻链的抗体。Ha15-10ac12的重链由SEQ ID NO:7的第1个Q残基至第466个K残基范围内的氨基酸序列组成,且Ha15-10ac12的轻链由SEQ ID NO:8的第1个D残基至第219个C残基组成。其序列列于图2和图3。在优选的实施方式种,Ha15-10ac12与细胞毒剂偶联。

[0189] 生产称为Ha15-10ac12的抗体的中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞在2012年7月25日(通过联邦快递)送至美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC),弗吉尼亚州马那萨斯,邮政信箱1549,20108并指定登录号:PTA-13102。

[0190] III.) 抗体-药物偶联物总述

[0191] 另一方面,本发明提供抗体药物偶联物(ADC),该抗体药物偶联物包括偶联细胞毒



剂(如化疗剂,药物、生长抑制剂、毒素(如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性偶联物))的抗体。另一方面,本发明还提供使用ADC的方法。一方面,ADC包括上文中任何158P1D7 MAbs与细胞毒剂或检测试剂共价连接。

[0192] 应用抗体-药物偶联物来局部递送细胞毒剂或细胞生长抑制剂,即在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞的药物的(Syrigos和Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz和Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; 美国专利号4,975,278)使得药物部分靶向递送到肿瘤,并在其中胞内累积,而全身性给予这些非偶联药物试剂可能产生正常细胞以及寻求消除的肿瘤细胞所不可接受的毒性水平(Baldwin等, (1986) *Lancet* (1986年3月15日)第603-05页; Thorpe, (1985) “综述:癌症治疗中的细胞毒剂抗体载体(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)”收录于《单克隆抗体’84:生物和临床应用》(in *Monoclonal Antibodies’84: Biological And Clinical Applications*), A. Pinchera等编,第475-506页)。因此寻求毒性最小的最大功效。已报道多克隆抗体和单克隆抗体都可用于这些策略(Rowland等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。用于这些方法的药物包括道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等, (1986) 同上)。用于抗体毒素偶联物的毒素包括细菌毒素(例如白喉类毒素)、植物毒素(例如蓖麻毒蛋白)、小分子毒素(例如格尔德霉素)(Mandler等(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler等(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler等(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、美登木素(maytansinoid) (EP 1391213; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)和卡其霉素(Lode等(1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman等(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。该毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制的机理实现其细胞毒性和细胞生长抑制作用。一些细胞毒性药物往往在与大抗体或蛋白受体配体偶联时失活或降低活性。

[0193] 抗体药物偶联物的示例是ZEVALIN®(替伊莫单抗(ibrutinomab tiuxetan), 百健艾迪(Biogen/Idec)), ZEVALIN®是一种抗体同位素偶联物,其包含针对正常和恶性B淋巴细胞表面发现的CD20抗原的鼠IgG1κ单克隆抗体以及由硫脲接头-螯合剂连接的<sup>111</sup>In或<sup>90</sup>Y放射性同位素(Wiseman等(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman等(2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig等(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig等(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。

[0194] 另外,MYLOTARG™(吉姆单抗奥佐米星,惠氏制药公司(Wyeth Pharmaceutical))是一种包含与卡其霉素连接的人CD33抗体的抗体药物偶联物,在2000年被批准用于注射治疗急性骨髓型白血病(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; 美国专利号4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。

[0195] 另外,莫坎妥珠单抗(Cantuzumab mertansine) (IMGN公司(Immunogen, Inc.))是一种包含通过二硫键接头SPP连接于美登木素药物部分DM1的huC242抗体的抗体药物偶联物,其正进入II期试验用于治疗表达CanAg的癌症(如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌症)。

[0196] 另外,MLN-2704(千年制药公司(Millennium Pharm.)), BZL生物公司(BZL Biologics), IMGN公司(Immunogen Inc.)是一种包含连接于美登木素药物部分DM1的抗前列腺特异性膜抗原(PSMA)单克隆抗体的抗体药物偶联物,其正开发用于潜在治疗前列腺肿

瘤。

[0197] 最后,将澳瑞他汀肽(如单甲基澳瑞他汀(MMAE)、尾海兔素的合成类似物)偶联嵌合单克隆抗体cBR96(对癌的Lewis Y有特异性)和cAC10(对血液恶性肿瘤的CD30有特异性)(Doronina等(2003)Nature Biotechnology

[0198] 21(7):778-784)。cAC10正在治疗开发中。

[0199] 另外,本文描述了用于生成ADC的化疗剂。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ -帚曲菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、分裂毒素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)。参见例如,1993年10月28日公开的W0 93/21232。多种放射性核素可用于放射性偶联抗体的产生。示例包括 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 和 $^{186}\text{Re}$ 。所述抗体与细胞毒剂的偶联可利用多种双功能蛋白偶联剂完成,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)丙酸盐(SPDP)、亚氨基四氢噻吩(IT)、亚胺酸酯的双功能衍生物(如己二酸亚氨酸二甲酯HCl)、活性酯(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(p-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双-(p-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒蛋白免疫毒素可按Vitetta等(1987)Science, 238:1098所述制备。碳-14-标记的1-异硫氰苄基-3-亚甲二氧基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于偶联放射性核素与抗体的示例性螯合剂(W094/11026)。

[0200] 本文也考虑了抗体与一个或多个小分子毒素及具有毒素活性的所述毒素衍生物的偶联物,该小分子毒素例如卡其霉素、美登木素、尾海兔素、澳瑞他汀、新月毒素和CC1065。

[0201] III(A).美登木素

[0202] 适用作美登木素药物部分的美登素(Maytansine)化合物为本领域技术人员熟知并可根据已知方法从天然来源中分离、通过遗传工程技术(参见Yu等(2002)PNAS 99:7968-7973)生产或者根据已知方法合成制备美登醇和美登醇类似物。

[0203] 美登木素药物部分包括具有修饰芳环的那些药物部分,例如:C-19-去氯(US 4256746)(通过安沙菌素(ansamycin)P2的氢化铝锂还原制备);C-20-羟基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美国专利号4,361,650和4,307,016)(使用链霉菌或放线菌通过去甲基化制备或使用LAH通过脱氯制备);和C-20-去甲氧基、C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-去氯(美国专利号4,294,757)(使用酰氯通过酰化作用制备)以及在其它位点具有修饰的那些。

[0204] 示例性美登木素药物部分也包括具有修饰的那些药物部分,例如:C-9-SH(US 4,424,219)(通过美登醇与 $\text{H}_2\text{S}$ 或 $\text{P}_2\text{S}_5$ 反应制备);C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/ $\text{CH}_2\text{OR}$ )(US 4331598);C-14-羟甲基或酰氧基甲基( $\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $\text{CH}_2\text{Oac}$ )(US

[0205] 4450254)(通过诺尔卡菌属制备);C-15-羟基/酰氧基(US 4,364,866)(通过链霉菌属转化美登醇制备);C-15-甲氧基(美国专利号4,313,946和4,315,929)(分离自滑桃树(*Trewia nudiflora*));C-18-N-去甲基(美国专利号4,362,663和4,322,348)(通过链霉菌

属将美登醇去甲基化制备);和4,5-脱氧(US 4,371,533)(通过用三氯化钛/LAH还原美登醇制备)。

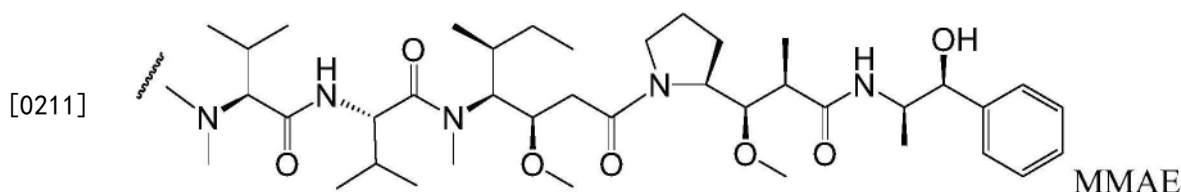
[0206] 含有美登木素的ADC、其制备方法以及其治疗应用公开于例如美国专利号5,208,020、5,416,064、6,441,163和欧洲专利号EP 0 425 235 B1,其公开内容通过引用明确纳入本文。Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623(1996)描述了包含美登木素的ADC,该美登木素称为DM1并与针对人结直肠癌的单克隆抗体C242连接。发现该偶联物对培养的结肠癌细胞有高度的细胞毒性,并在体内肿瘤生长试验中表现出抗肿瘤活性。Chari等,Cancer Research 52:127-131(1992)描述了ADC,其中美登木素通过二硫键接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体A7,或与另一种结合HER-2/neu癌基因的鼠单克隆抗体TA.1偶联。该TA.1-美登木素偶联物的细胞毒性在人乳腺癌细胞系SK-BR-3中体外测试,该细胞系中每个细胞表达 $3 \times 10^5$ 个HER-2表面抗原。该药物偶联物所达到的细胞毒性水平与游离美登木素药物相似,该水平可通过增加每抗体分子的美登木素分子数目来提高。A7美登木素偶联物在小鼠中表现出较低的全身细胞毒性。

[0207] III(B).澳瑞他汀和尾海兔素

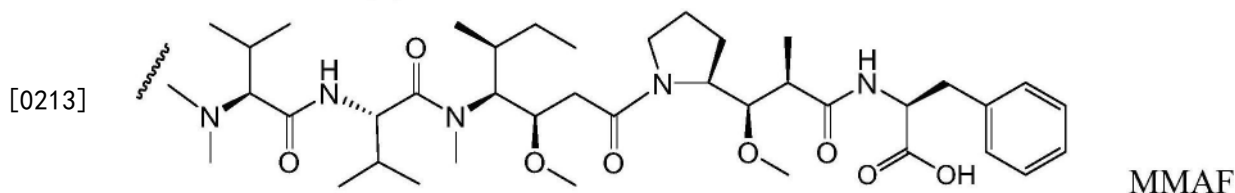
[0208] 在一些实施方式中,ADC包含与多罗他汀或尾海兔素肽类似物和衍生物、澳瑞他汀(美国专利号5,635,483;5,780,588)偶联的本发明所述抗体。尾海兔素和澳瑞他汀已显示干扰微管动力学、GTP水解以及细胞核和细胞分裂(Woyke等(2001)Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584)并具有抗癌(US 5,663,149)和抗真菌活性(Pettit等(1998)Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965)。尾海兔素和澳瑞他汀药物部分可通过肽药物部分的N(氨基)末端或C(羧基)末端连接抗体(WO 02/088172)。

[0209] 示例性的澳瑞他汀实施方式包括N末端连接的单甲基澳瑞他汀药物部分DE和DF,公开于Senter等,美国癌症研究协会会议录(Proceedings of the American Association for Cancer Research),卷45,摘要号623,2004年3月28日发表,以及描述于美国专利公开号2005/0238649,其公开内容通过引用全文明确纳入本文。

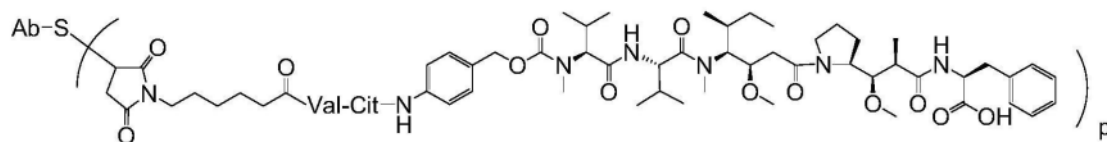
[0210] 示例性的澳瑞他汀实施方式是MMAE(其中波浪线表示共价连接至抗体药物偶联物的接头(L))。



[0212] 另一个示例性的澳瑞他汀实施方式是MMAF,其中波浪线表示共价连接至抗体药物偶联物的接头(L)(US2005/0238649):

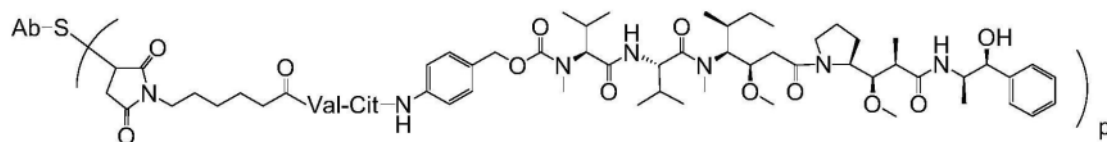


[0214] 其他包含MMAE或MMAF以及各种接头组分(本文进一步描述)的示例性实施方式具有以下结构和缩写(其中Ab表示抗体且p是1至约8):



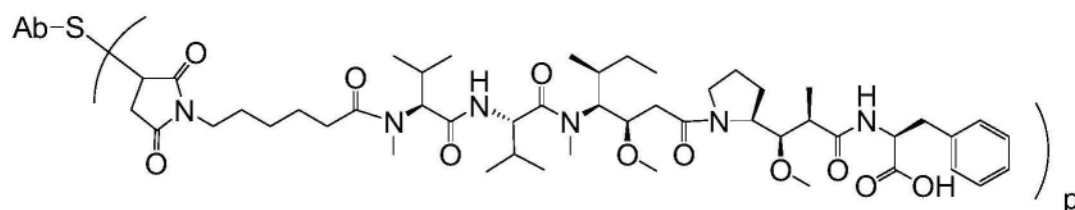
Ab-MC-vc-PAB-MMAF

[0215]



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

[0216]



Ab-MC-MMAF

[0217] 一般基于肽的药物部分可通过形成两个或多个氨基酸和/或肽片段之间的肽键来制备。例如,这类肽键可根据液相合成方法(参见E. **Schröder**和K. **Lübke**, “The Peptides (《肽》)”, 卷1, 第76-136页, 1965, 学术出版社)来制备, 该方法为肽化学技术领域熟知。澳瑞他汀/尾海兔毒素药物部分可根据以下方法制备: US 5635483; US 5780588; Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G. R.等 Synthesis, 1996, 719-725; Pettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; 和 Doronina(2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784。

[0218] III(C). 卡奇霉素

[0219] 在其他实施方式中, ADC包含与一个或多个卡其霉素分子偶联的本发明所述抗体。抗生素的卡奇霉素家族能够以亚皮摩尔浓度产生双链DNA断裂。对于制备卡其霉素家族偶联物, 参见美国专利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(都属于美国氰氨公司

[0220] (American Cyanamid Company))。可以使用的卡奇霉素结构类似物包括但不限于:  $\gamma_1^I$ 、 $\alpha_2^I$ 、 $\alpha_3^I$ 、N-乙酰基- $\gamma_1^I$ 、PSAG和 $\theta_1^I$  (Hinman等, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode等, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 以及前述美国氰氨公司的专利)。另一种可与抗体偶联的抗肿瘤药物是QFA, 该药物是一种抗叶酸剂。卡其霉素和QFA均有胞内作用位点且不易穿过质膜。因此, 通过抗体介导的内化使得细胞摄取这些试剂, 这显著增强了其细胞毒性作用。

[0221] III(D). 其它细胞毒剂

[0222] 可与本发明所述抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括BCNU、链脲霉素、长春新碱和5-氟尿嘧啶、描述于美国专利5,053,394和5,770,710中统称为LL-E33288复合物的一类试剂, 以及埃斯波霉素(美国专利5,877,296)。

[0223] 可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素

A链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 $\delta$ -帚曲菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、白树毒素、分裂毒素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯族毒素(tricothecenes)。参见例如,1993年10月28日公开的WO 93/21232。

[0224] 本发明还包括抗体与具有溶核活性的化合物(例如,核糖核酸酶或DNA内切核酸酶,如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)之间形成的ADC。

[0225] 为了选择性破坏肿瘤,该抗体可包含高放射性原子。各种放射性同位素可用于生成放射性偶联抗体。示例包括 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$ 和Lu的放射性同位素。当将该偶联物用于检测时,其可包含用于闪烁扫描研究的放射性原子,例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 $\text{I}^{123}$ ,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,mri)的自旋标记,例如碘-123、碘-131、钆-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0226] 可用已知的方法将放射性或其它标记引入该偶联物。例如,可生物合成或使用合适的氨基酸前体通过化学氨基酸合成法合成该肽,所述氨基酸前体包含例如氟-19以替代氢。可通过肽的半胱氨酸残基来连接标记如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 $\text{I}^{123}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 和 $\text{In}^{111}$ 。钆-90可通过赖氨酸残基连接。可使用IODOGEN方法(Fraker等(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57引入碘-123。“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (免疫闪烁法中的单克隆抗体)” (Chatal, CRC出版社 (CRC Press) 1989) 详细描述了其它方法。

[0227] IV.) 结合158P1D7的抗体药物偶联化合物

[0228] 本发明提供用于药物靶向递送的抗体药物偶联化合物。发明人已发现抗体药物偶联化合物具有针对表达158P1D7的细胞的强效细胞毒性和/或细胞生长抑制活性。该抗体药物偶联化合物包含共价连接至少一个药物单元的抗体单元。药物单元可直接连接或通过接头单元(-LU-)连接。

[0229] 在一些实施方式中,抗体药物偶联化合物是下式的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物:

[0230]  $\text{L}-(\text{LU}-\text{D})_p(\text{I})$

[0231] 其中:

[0232] L是抗体单元,例如本发明的158P1D7 Mab,且

[0233] (LU-D)是接头单元-药物单元部分,其中:

[0234] LU-是接头单元,且

[0235] -D是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒活性的药物单元;且

[0236] p是1-20的整数。

[0237] 在一些实施方式中,p的范围是1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3或1-2。在一些实施方式中,p的范围是2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4或2-3。在其它实施方式中,p是1、2、3、4、5或6。在一些实施方式中,p是2或4。

[0238] 在一些实施方式中,抗体药物偶联化合物是下式的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物:

[0239]  $\text{L}-(\text{A}_a-\text{W}_w-\text{Y}_y-\text{D})_p(\text{II})$

[0240] 其中:

[0241] L是抗体单元,例如158P1D7 MAb;且

[0242]  $-A_a-W_w-Y_y-$ 是接头单元(LU),其中:

[0243]  $-A-$ 是延伸单元,

[0244] a是0或1,

[0245]  $-W-$ 各自独立地是氨基酸单元,

[0246] w是0-12的整数,

[0247]  $-Y-$ 是自分解型间隔单元,

[0248] y是0、1或2;

[0249]  $-D-$ 是对靶细胞具有细胞抑制或细胞毒活性的药物单元;且

[0250] p是1-20的整数。

[0251] 在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,y是0、1或2。在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,且y是0或1。在一些实施方式中,p的范围是1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3或1-2。在一些实施方式中,p的范围是2-8、2-7、2-6、2-5、2-4或2-3。在其它实施方式中,p是1、2、3、4、5或6。在一些实施方式中,p是2或4。在一些实施方式中,如果w不是0,则y是1或2。在一些实施方式中,如果w是1-12,则y是1或2。在一些实施方式中,w是2-12且y是1或2。在一些实施方式中,a是1,w和y是0。

[0252] 对于包含多个抗体的组合物,p代表药物载量,即每个抗体的平均药物分子数量。药物载量的范围可以是每个抗体1-20个药物(D)。可通过常规方法如质谱、ELISA实验和HPLC鉴定偶联反应制备中每个抗体的平均药物数量。也可以p的形式确定抗体-药物偶联物的定量分布。在某些情况下,可通过诸如反相HPLC或电泳等方式将具有某一确定p值的均一抗体-药物偶联物与其它药物载量的抗体-药物偶联物分离、纯化,并鉴定。在示例性实施方式中,p是2-8。

[0253] 可通过任何本领域技术人员已知的技术生成抗体药物偶联化合物。简而言之,抗体药物偶联化合物包含作为抗体单元的158P1D7 MAb、药物和可选的连接药物与结合剂的接头。在优选实施方式中,抗体是158P1D7 MAb,其含有上文所述称为Ha15-10ac12抗体的重链和轻链可变区。在更优选实施方式中,抗体是158P1D7MAb,其含有上文所述称为Ha15-10ac12抗体的重链和轻链。多种不同的反应可用于药物和/或接头与结合剂的共价连接。其经常通过结合剂(例如抗体分子)的氨基酸残基的反应来实现,所述氨基酸残基包括赖氨酸的氨基、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧基、半胱氨酸的巯基以及芳族氨基酸的不同部分。一种最常用的非特异性共价结合方法是连接化合物的羧基(或氨基)基团与抗体的氨基(或羧基)基团的碳二亚胺反应。此外,已将双功能试剂(例如二醛或亚氨酸酯)用于连接化合物的氨基与抗体分子的氨基。也可将席夫碱(Schiff base)反应用于药物与结合剂的连接。该方法涉及含有乙二醇或羟基的药物的高碘酸盐氧化,从而形成之后与结合剂反应的醛基。通过用结合剂的氨基基团形成席夫碱来发生连接。还可采用异硫氰酸盐作为偶联剂来共价连接药物和结合剂。其它技术为本领域技术人员已知并在本发明范围内。

[0254] 在某些实施方式中,作为接头前体的中间体在合适条件下与药物反应。在某些实施方式中,活性基团用于药物和/或中间体上。药物和中间体之间的反应产物(或衍生药物)继而在合适条件下与158P1D7 MAb反应。

[0255] 抗体药物偶联化合物的各具体单元均会在本文中进一步详细说明。示例性的接头单元、延伸单元、氨基酸单元、自分解型间隔单元和药物单元的合成和结构也描述于美国专利公开号2003-0083263、2005-0238649和2005-0009751,其各通过引用全文纳入本文以用于所有目的。

[0256] V.) 接头单元

[0257] 通常,抗体-药物偶联化合物在药物单元和抗体单元之间包含接头单元。在一些实施方式中,接头在胞内条件下可切割,在胞内条件下切割接头后从抗体释放药物单元。在其它实施方式中,接头单元不可切割且药物被释放,例如通过抗体降解来释放。

[0258] 在一些实施方式中,接头可由胞内环境中(如,溶酶体或内体或胞膜窖(caveolea)内)存在的切割剂切割。接头可以是例如被胞内肽酶或蛋白酶切割的肽酰接头,所述酶包括但不限于溶酶体或内体的蛋白酶。在一些实施方式中,肽酰接头的长度为至少两个氨基酸或至少三个氨基酸。切割剂可包括组织蛋白酶B和D以及纤溶酶,已知它们均可水解二肽药物衍生物,导致在靶细胞内释放活性药物(参见例如,Dubowchik和Walker,1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123)。最常见的是可由158P1D7表达型细胞内存在的酶切割的肽酰接头。例如,可使用由硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽酰接头(如Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:9)接头),所述蛋白酶在癌组织中高表达。这类接头的其他示例描述于例如美国专利号6,214,345,其通过应用全文纳入本文并用于全部目的。在特定实施方式中,可由胞内蛋白酶切割的肽酰接头是Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见例如美国专利6,214,345,其描述了具有val-cit接头的多柔比星的合成)。使用胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优点是该试剂偶联时通常减弱且偶联物的血清稳定性通常较高。

[0259] 在其它实施方式中,可切割接头具有pH敏感性,即某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感型接头可在酸性条件下水解。例如,能使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(如脞、缩氨基脞、缩氨基硫脞、顺式-乌头酰胺(cis-aconitic amide)、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如美国专利号5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123;Neville等,1989, Biol. Chem. 264:14653-14661。)这类接头在中性pH条件下(例如在血液中)相对稳定,但在5.5或5.0的低pH条件(接近溶酶体的pH)下不稳定。在某些实施方式中,可水解接头是硫醚接头(如通过酰脞键连接治疗剂的硫醚(参见例如,美国专利号5,622,929)。

[0260] 在其它实施方式中,该接头在还原条件下可切割(如二硫键接头)。本领域已知多种二硫化物接头,包括例如,可用SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶基-二硫)甲苯)、SPDB和SMPT形成的接头。(参见例如Thorpe等,1987, Cancer Res. 47:5924-5931;Wawrzynczak等,刊于Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer(《免疫偶联物:放射成像和癌症治疗中的抗体偶联物》)(C.W.Vogel编,牛津大学出版社(Oxford U.Press),1987。也参见美国专利号4,880,935。)

[0261] 在其它具体实施方式中,接头是丙二酸接头(Johnson等,1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰接头(Lau等,1995, Bioorg-Med-Chem.

[0262] 3(10):1299-1304)或3'-N-酰胺类似物(Lau等,1995, Bioorg-Med-Chem.

[0263] 3(10):1305-12)。

[0264] 在其它实施方式中,接头单元不可切割并通过降解抗体来释放药物。(参见美国公开号2005/0238649,其通过引用全文纳入本文并用于全部目的)。

[0265] 通常,接头对胞外环境基本不敏感。对于接头,本文所用术语“对胞外环境基本不敏感”指抗体-药物偶联化合物出现在胞外环境中(如血浆中)时,抗体-药物偶联化合物样品中不超过约20%,通常不超过约15%,更通常不超过约10%,甚至更通常不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%的接头被切割。可通过例如以下方法测定接头是否对胞外环境基本不敏感:将抗体-药物偶联化合物与血浆一起培育一段时间(如2、4、8、16或24小时),然后定量测定血浆中出现的游离药物量。

[0266] 在其它非互斥实施方式中,接头促进细胞内化。在某些实施方式中,接头在与治疗剂偶联时促进细胞内化(即,在本文所述的抗体-药物偶联化合物的接头-治疗剂部分的情况下)。在其它实施方式中,接头与澳瑞他汀化合物和158P1D7 Mab偶联时促进细胞内化。

[0267] 可用于本组合物和方法的各种示例性接头描述于W0 2004-010957、美国公开号2006/0074008、美国公开号20050238649和美国公开号2006/0024317(其各通过引用全文纳入本文以用于所有目的)。

[0268] “接头单元”(LU)是可用于连接药物单元和抗体单元以形成抗体-药物偶联化合物的双功能化合物。在一些实施方式中,接头单元具有下式:

[0269]  $-A_a-W_w-Y_y-$

[0270] 其中:-A-是延伸单元,

[0271] a是0或1,

[0272] -W-各自独立地是氨基酸单元,

[0273] w是0-12的整数,

[0274] -Y-是自分解型间隔单元,且

[0275] y是0、1或2。

[0276] 在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,y是0、1或2。在一些实施方式中,a是0或1,w是0或1,且y是0或1。在一些实施方式中,如果w是1-12,则y是1或2。在一些实施方式中,w是2-12且y是1或2。在一些实施方式中,a是1,w和y是0。

[0277] VI.) 延伸单元

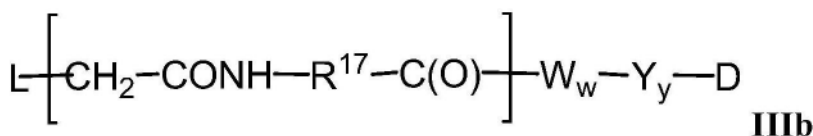
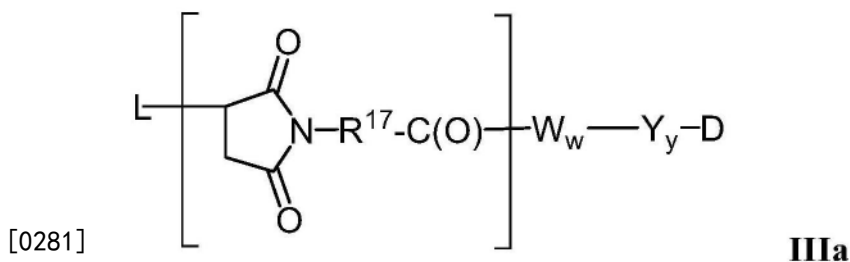
[0278] 延伸单元(A)存在时,能够将抗体单元连接于氨基酸单元(-W-) (如果存在)、间隔单元(-Y-) (如果存在);或连接于药物单元(-D)。158P1D7 Mab(例如Ha15-10ac12)上可存在的有用官能团(天然存在或通过化学操作加入)包括但不限于:巯基、氨基、羟基、糖的异头羟基和羧基。合适的官能团是巯基和氨基。在一个示例中,巯基基团可通过还原158P1D7 Mab的分子内二硫键来产生。在另一实施方式中,可通过158P1D7 MAbs赖氨酸部分的氨基与2-亚氨基四氢噻吩(兆特试剂(Traut's reagent))或其它巯基生成试剂的反应产生巯基。在某些实施方式中,该158P1D7MAbs是重组抗体,经工程改造携带一个或多个赖氨酸。在某些其它实施方式中,重组158P1D7 MAbs经工程改造携带额外的巯基,如额外的半胱氨酸。

[0279] 在一个实施方式中,延伸单元与抗体单元的硫原子成键。该硫原子可衍生自抗体的巯基。式IIIa和IIIb方括号内表示该实施方式的代表性延伸单元,其中L-、-W-、-Y-、-D-、w和y的定义如上所述,R<sub>17</sub>选自-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-、碳环基-、-O-

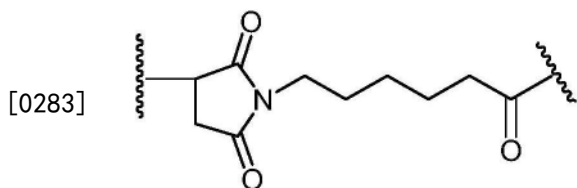


(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基)-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烯基)-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚炔基)-、-亚芳基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-亚芳基-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-亚芳基-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-亚芳基-、-亚芳基-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-亚芳基-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-、-亚芳基-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-(亚碳环基)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-(亚碳环基)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-(亚碳环基)-、-(亚碳环基)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-(亚碳环基)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-、-(亚碳环基)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-、-亚杂环基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-(亚杂环基)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-(亚杂环基)-、-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-(亚杂环基)-、-(亚杂环基)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-(亚杂环基)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>亚烯基-、-(亚杂环基)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚炔基-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-，r是1-10的整数，其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环、亚碳环基、亚杂环基和亚芳基基团是可选取代的。在一些实施方式中，其中单独或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环、碳环基、杂环和亚芳基是未取代的。在一些实施方式中，R<sup>17</sup>选自-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-亚碳环基-、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基)-、-亚芳基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-亚芳基-、-亚芳基-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-(亚碳环基)-、-(亚碳环基)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>亚杂环基-、-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-(亚杂环基)-、-(亚杂环基)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-、-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>和-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-，r是1-10的整数，其中所述亚烷基是未取代的且剩余基团是可选取代的。

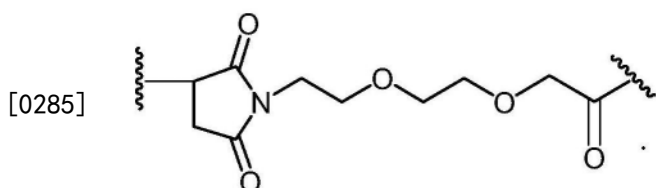
[0280] 从所有示范性实施方式中应该理解，即使没有明确说明，也可将1-20个药物部分连接于抗体(p=1-20)。



[0282] 说明性延伸单元是式IIIa的延伸单元，其中R<sup>17</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-：



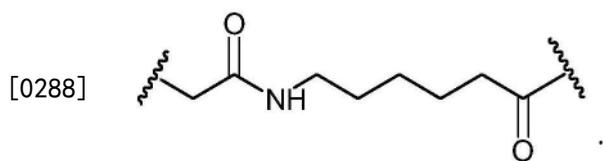
[0284] 另一种说明性延伸单元是式IIIa的延伸单元，其中R<sup>17</sup>是-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-；r是2：



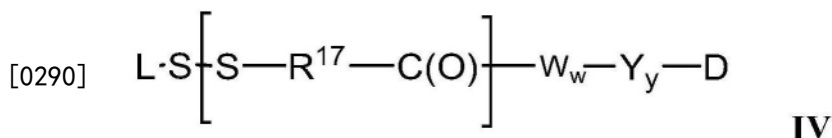
[0286] 说明性延伸单元是式IIIa的延伸单元，其中R<sup>17</sup>是-亚芳基-或亚芳基-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷

基-。在一些实施方式中,芳基是未取代的苯基。

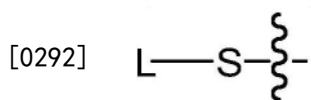
[0287] 另一说明性延伸单元是式IIIb的延伸单元,其中 $R^{17}$ 是 $-(CH_2)_5-$ :



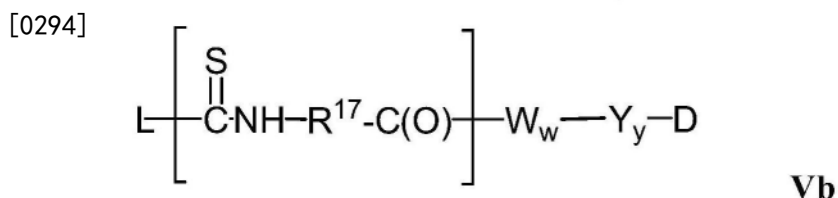
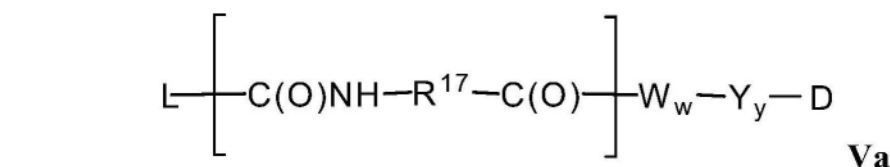
[0289] 在某些实施方式中,通过抗体单元的硫原子和延伸单元的硫原子之间的二硫键,使延伸单元与抗体单元连接。式IV的方括号内表示此实施方式的代表性延伸单元,其中 $R^{17}$ 、L-、-W-、-Y-、-D、w和y如上所定义。



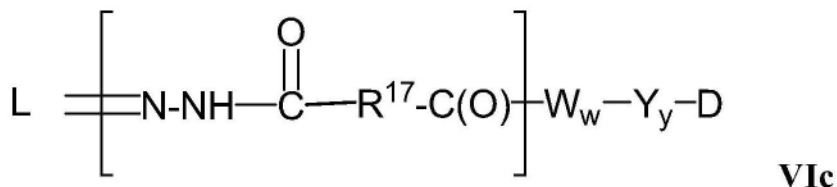
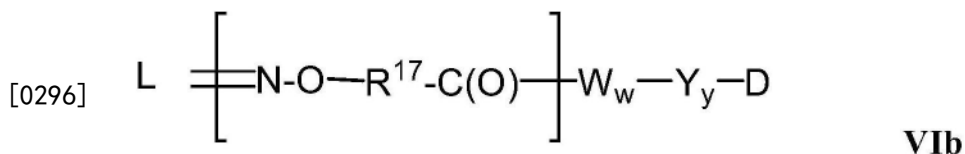
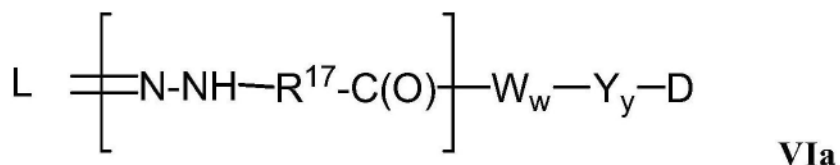
[0291] 在本申请中应注意,除非文中另有说明,下式的S部分指抗体单元的硫原子。



[0293] 在其它实施方式中,延伸单元含有可与抗体的伯或仲氨基成键的活性位点。这些活性位点的例子包括但不限于:活性酯如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酰基氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。式Va和Vb的方括号内表示该实施方式的代表性延伸单元,其中 $R^{17}$ 、L-、-W-、-Y-、-D、w和y如上所定义;



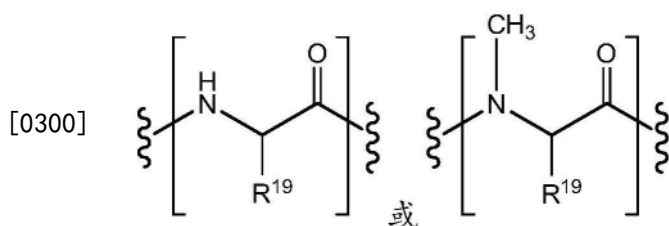
[0295] 在一些实施方式中,延伸单元含有可与抗体上可能出现的修饰糖的(-CHO)基团发生反应的活性位点。例如,可利用诸如高碘酸钠等试剂温和氧化糖,所得的氧化糖的(-CHO)单元可与含有官能团如酰肼、肟、伯或仲胺、肼、缩氨基硫脲、羧酸肼和芳基酰肼的延伸单元缩合,如Kaneko等,1991,Bioconjugate Chem.2:133-41所述。2:133-41.式VIa、VIb和VIc的方括号内表示该实施方式的代表性延伸单元,其中 $R^{17}$ 、L-、-W-、-Y-、-D、w和y的定义如上所述。



[0297] VII.) 氨基酸单元

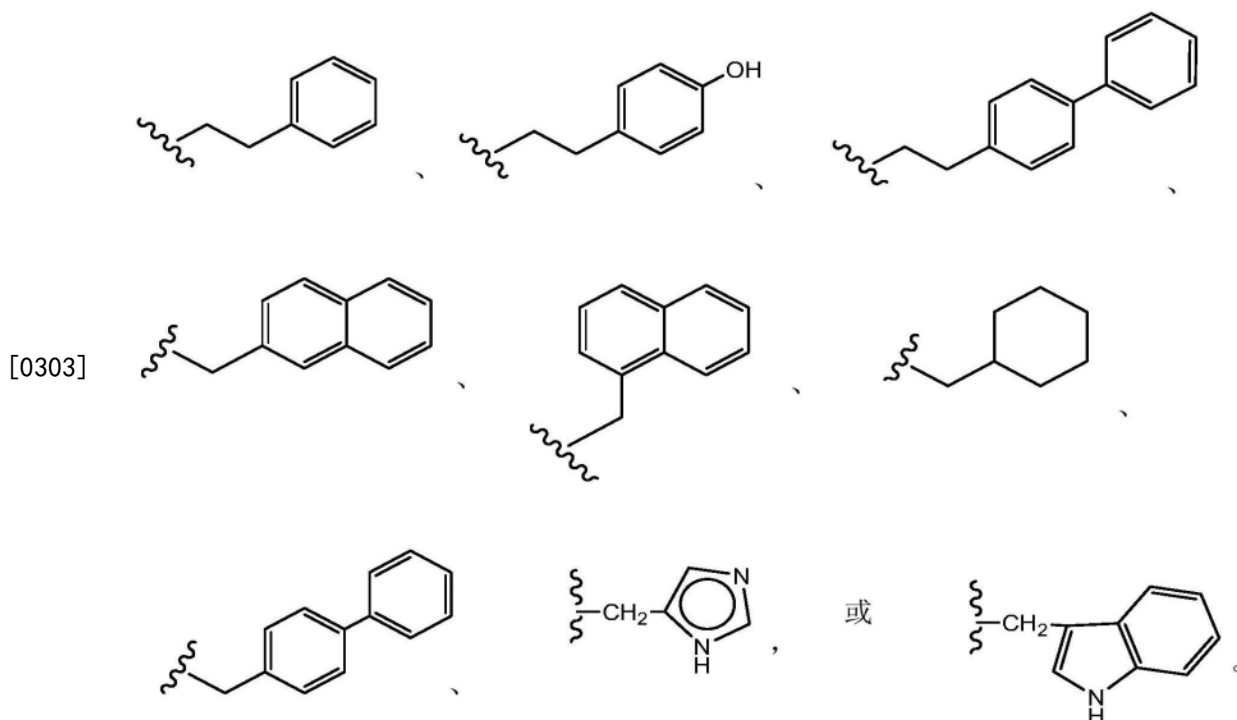
[0298] 存在时,氨基酸单元(-W-)连接延伸单元与间隔单元(如果存在间隔单元),连接延伸单元与药物部分(如果不存在间隔单元),连接抗体单元与药物单元(如果不存在延伸单元和间隔单元)。

[0299]  $\text{W}_w$ -可以是,例如,单肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。-W-单元各自独立地具有下面方括号中所示通式,w是0-12的整数:



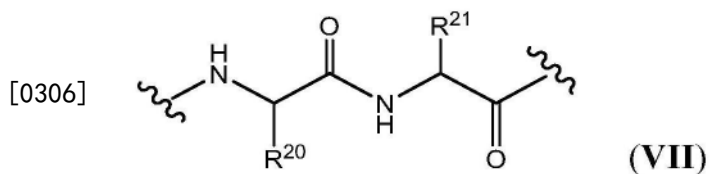
[0301] 其中 $\text{R}^{19}$ 是氢、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对-羟基苄基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、

[0302]  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基、



[0304] 在一些实施方式中,可利用包括癌症或肿瘤相关蛋白酶在内的一种或多种酶对氨基酸单元进行酶促切割,以释放药物单元(-D),其在一个实施方式中于释放后体内质子化以提供药物(D)。

[0305] 在某些实施方式中,氨基酸单元可包含天然氨基酸。在其他实施方式中,氨基酸单元可包含非天然氨基酸。式(VII)-(IX)代表说明性Ww单元:



[0307] 其中 $R^{20}$ 和 $R^{21}$ 如下:

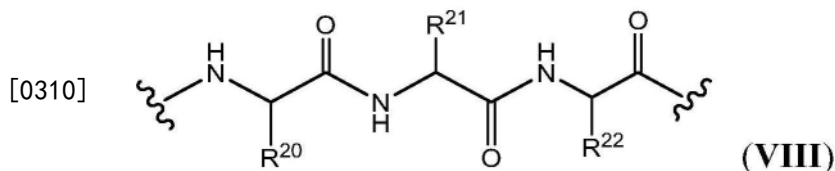
$R^{20}$	$R^{21}$
苄基	$(CH_2)_4NH_2$ ;
甲基	$(CH_2)_4NH_2$ ;
异丙基	$(CH_2)_4NH_2$ ;
[0308] 异丙基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
苄基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
异丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
仲丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;



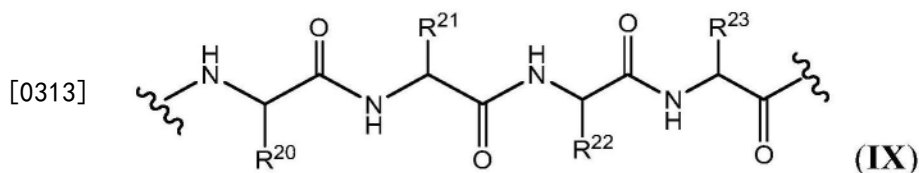
苄基

甲基;

苄基

(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>;[0311] 其中R<sup>20</sup>、R<sup>21</sup>和R<sup>22</sup>如下:

<u>R<sup>20</sup></u>	<u>R<sup>21</sup></u>	<u>R<sup>22</sup></u>
苄基	苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
异丙基	苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ; 且
H	苄基	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;

[0314] 其中R<sup>20</sup>、R<sup>21</sup>、R<sup>22</sup>和R<sup>23</sup>如下:

<u>R<sup>20</sup></u>	<u>R<sup>21</sup></u>	<u>R<sup>22</sup></u>	<u>R<sup>23</sup></u>
H	苄基	异丁基	H; 和
甲基	异丁基	甲基	异丁基。

[0316] 示例性氨基酸单元包括但不限于式VII的单元,其中:R<sup>20</sup>是苄基且R<sup>21</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>;R<sup>20</sup>是异丙基且R<sup>21</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>;或者R<sup>20</sup>是异丙基且R<sup>21</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>。另一示例性氨基酸单元是式VIII的单元,其中R<sup>20</sup>是苄基,R<sup>21</sup>是苄基且R<sup>22</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>。

[0317] 有用的-W<sub>w</sub>-单元可作设计并优化其对特定酶如肿瘤相关蛋白酶的酶切选择性。在一个实施方式中,-W<sub>w</sub>-单元是组织蛋白酶B、C和D,或纤溶酶蛋白酶催化切割的单元。

[0318] 在一个实施方式中,-W<sub>w</sub>-是二肽、三肽、四肽或五肽。当R<sup>19</sup>、R<sup>20</sup>、R<sup>21</sup>、R<sup>22</sup>或R<sup>23</sup>不是氢时,与R<sup>19</sup>、R<sup>20</sup>、R<sup>21</sup>、R<sup>22</sup>或R<sup>23</sup>连接的碳原子是手性碳。

[0319] 与R<sup>19</sup>、R<sup>20</sup>、R<sup>21</sup>、R<sup>22</sup>或R<sup>23</sup>连接的碳原子各自独立地是(S)或(R)构型。

[0320] 在氨基酸单元的一个方面,该氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)。在另一方面,该氨基酸单元是苯丙氨酸-赖氨酸(即fk)。在氨基酸单元的另一方面,该氨基酸单元是N-甲基缬氨酸-瓜氨酸。另一方面,该氨基酸单元是5-氨基戊酸、高苯丙氨酸赖氨酸、四异喹啉羧酸赖氨酸、环己基丙氨酸赖氨酸、异哌啶酸(isonepepotic acid)赖氨酸、β-丙氨酸赖氨酸、甘氨酸丝氨酸缬氨酸谷胺酰胺和异哌啶酸。

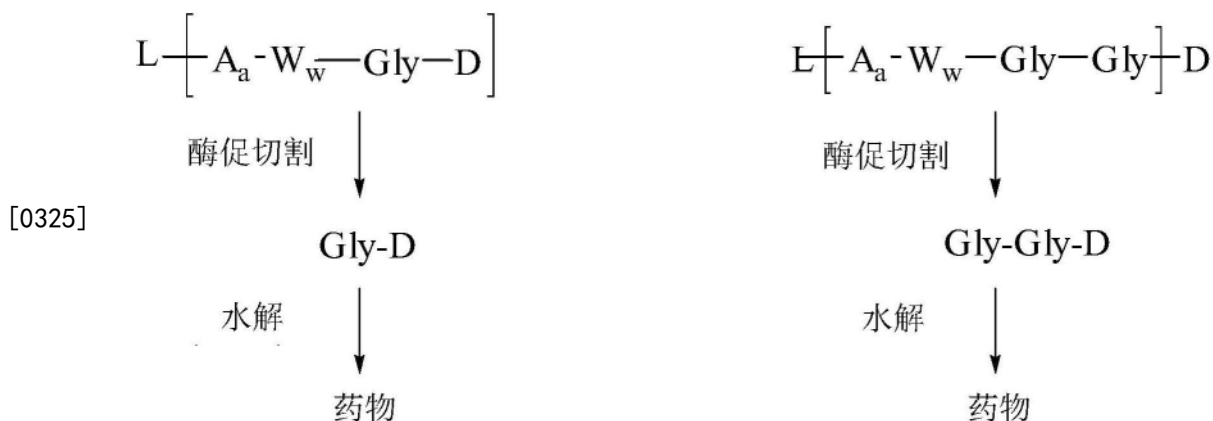
[0321] VIII.) 间隔单元

[0322] 间隔单元(-Y-)存在时,连接氨基酸单元与药物单元(氨基酸单元存在时)。或者,

不存在氨基酸单元时,间隔单元连接延伸单元与药物单元。不存在氨基酸单元和延伸单元时,间隔单元也连接药物单元与抗体单元。

[0323] 间隔单元有两种主要类型:非自分解型或自分解型。非自分解型间隔单元是对抗体药物偶联物的氨基酸单元进行切割特别是酶切后,一部分或全部间隔单元保持结合于药物部分的间隔单元。非自分解型间隔单元示例包括但不限于(甘氨酸-甘氨酸)间隔单元和甘氨酸间隔单元(均示于方案1)(见下)。通过酶(如肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶)对含有甘氨酸-甘氨酸间隔单元或甘氨酸间隔单元的偶联物进行酶切时,从L-Aa-Ww-中切割甘氨酸-甘氨酸-药物部分或甘氨酸-药物部分。在一个实施方式中,在靶细胞内发生独立的水解反应,切割甘氨酸-药物部分键并释放药物。

[0324] 方案1



[0326] 在一些实施方式中,非自分解型间隔单元(-Y-)是-Gly-。在一些实施方式中,非自分解型间隔单元(-Y-)是-Gly-Gly-。

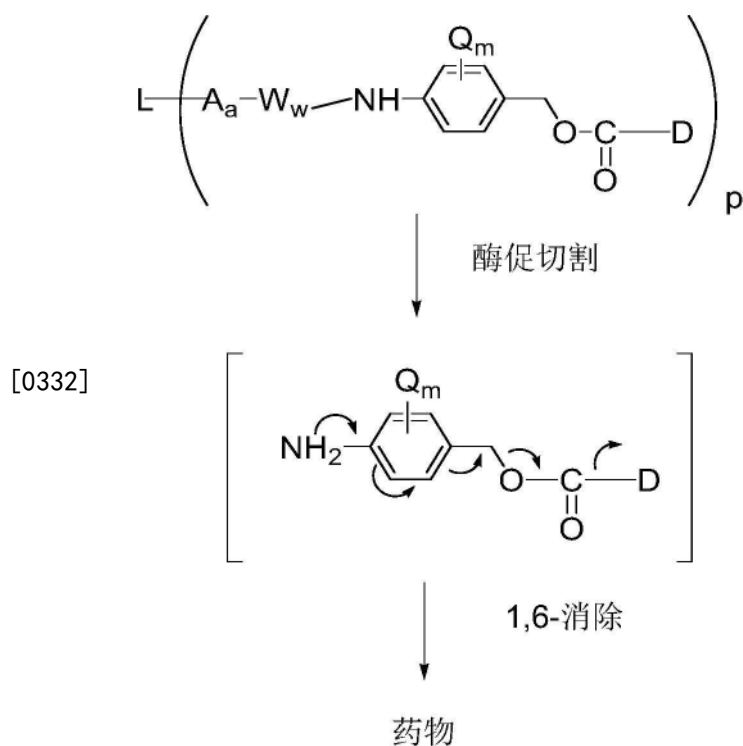
[0327] 在一个实施方式中,提供不存在间隔单元的药物-接头偶联物(y=0),或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0328] 或者,含有自分解型间隔单元的偶联物可释放-D。本文所用术语“自分解型间隔物”指能够将两个间隔的化学部分共价连接成稳定三联分子的双官能化学部分。如果与第一部分的键被切割,则自发与第二化学部分分离。

[0329] 在一些实施方式中,-Y<sub>y</sub>-是对-氨基苯甲醇(PAB)单元(参见方案2和3),它的亚苯基部分被Q<sub>m</sub>取代,其中Q是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数。

[0330] 无论单独存在或作为另一基团的一部分,所述烷基、烯基和炔基均可任选被取代。在一些实施方式中,-Y-是通过PAB基团的氨基氮原子连接于-W<sub>w</sub>-的PAB基团,并通过碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基团直接连接于-D。不希望受任何具体理论或机理的限制,方案2描述了通过氨基甲酸酯或碳酸酯基团直接连接于-D的PAB基团的药物释放的可能机理,如Toki等,2002,J.Org.Chem.67:1866-1872所述。

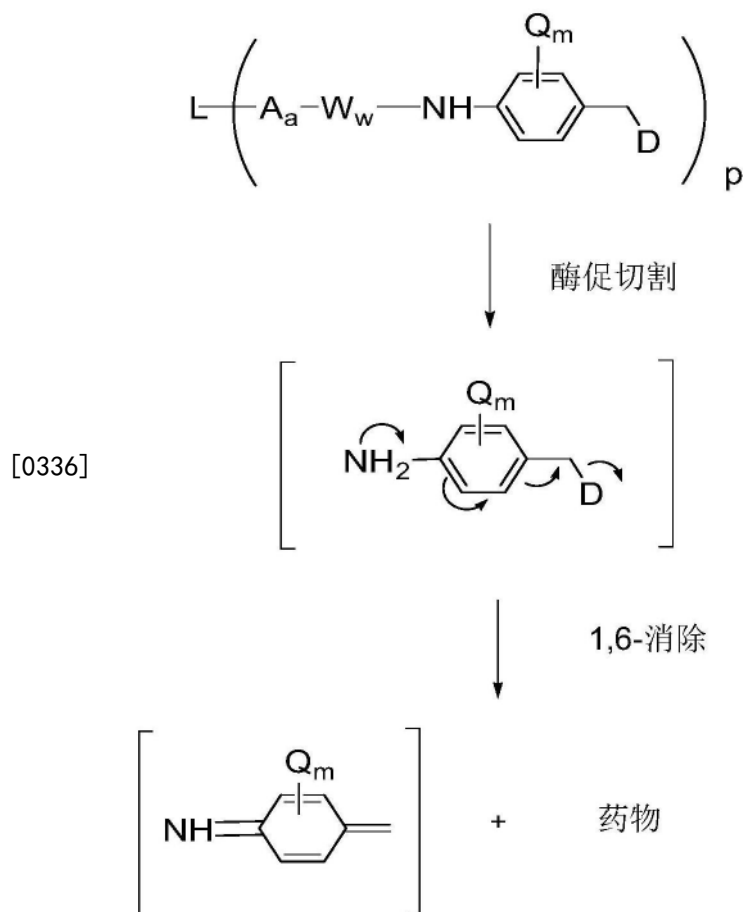
[0331] 方案2



[0333] 在方案2中,Q是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数;p的范围是1-约20。无论单独存在或作为另一基团的一部分,所述烷基、烯基和炔基均可任选被取代。

[0334] 不希望受任何具体理论或机理的限制,方案3描述了通过醚或胺连接直接连接于-D的PAB基团的药物释放的可能机理,其中D包含构成药物单元的一部分的氧或氮基团。

[0335] 方案3



[0337] 在方案3中,Q是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数;p的范围是1至约20。无论单独存在或作为另一基团的一部分,所述烷基、烯基和炔基均可任选被取代。

[0338] 自分解型间隔物的其它示例包括但不限于:电学性质类似于PAB基团的芳族化合物,如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等,1999,Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)和邻或对-氨基苄基缩醛。可以使用在酰胺键水解时发生环化的间隔物,例如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等,1995,Chemistry Biology 2:223)、合适取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等,1972,J.Amer.Chem.Soc.

[0339] 94:5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等,1990,J.Org.Chem.55:5867)。甘氨酸α-位上取代的含胺药物的消除(Kingsbury等,1984,J.Med.Chem.27:1447)也是自分解间隔物的示例。

[0340] 在一个实施方式中,间隔单元是支链双(羟甲基)-苯乙烯(BHMS)单元,如方案4所示,其可用于掺入和释放多种药物。

[0341] 方案4

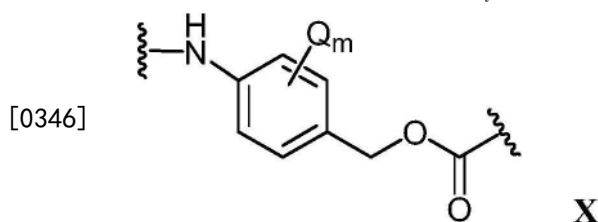




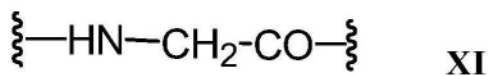
[0343] 在方案4中, Q是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-卤素、-硝基或-氰基; m是0-4的整数; n是0或1; p的范围是1-约20。无论单独存在或作为另一基团的一部分, 所述烷基、烯基和炔基均可任选被取代。

[0344] 在一些实施方式中, -D部分相同。在另一实施方式中, -D部分不同。

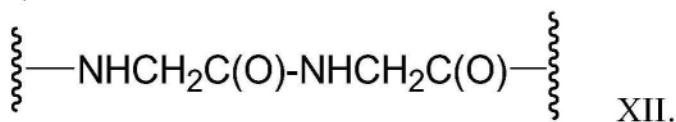
[0345] 在一个方面, 间隔单元(-Y<sub>y</sub>-)由式(X)-(XII)表示:



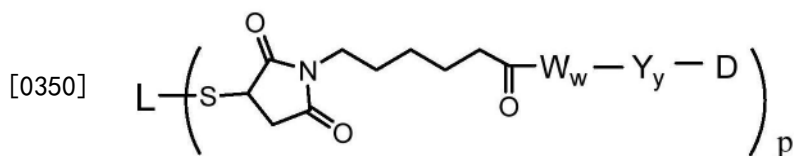
[0347] 其中Q是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烯基)、-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>炔基)、-卤素、-硝基或-氰基; m是0-4的整数。无论单独存在或作为另一基团的一部分, 所述烷基、烯基和炔基均可任选被取代。



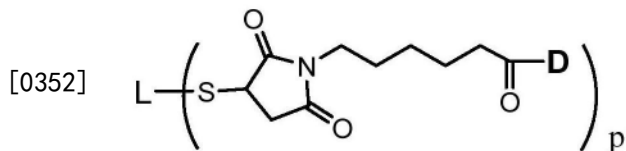
[0348] 和



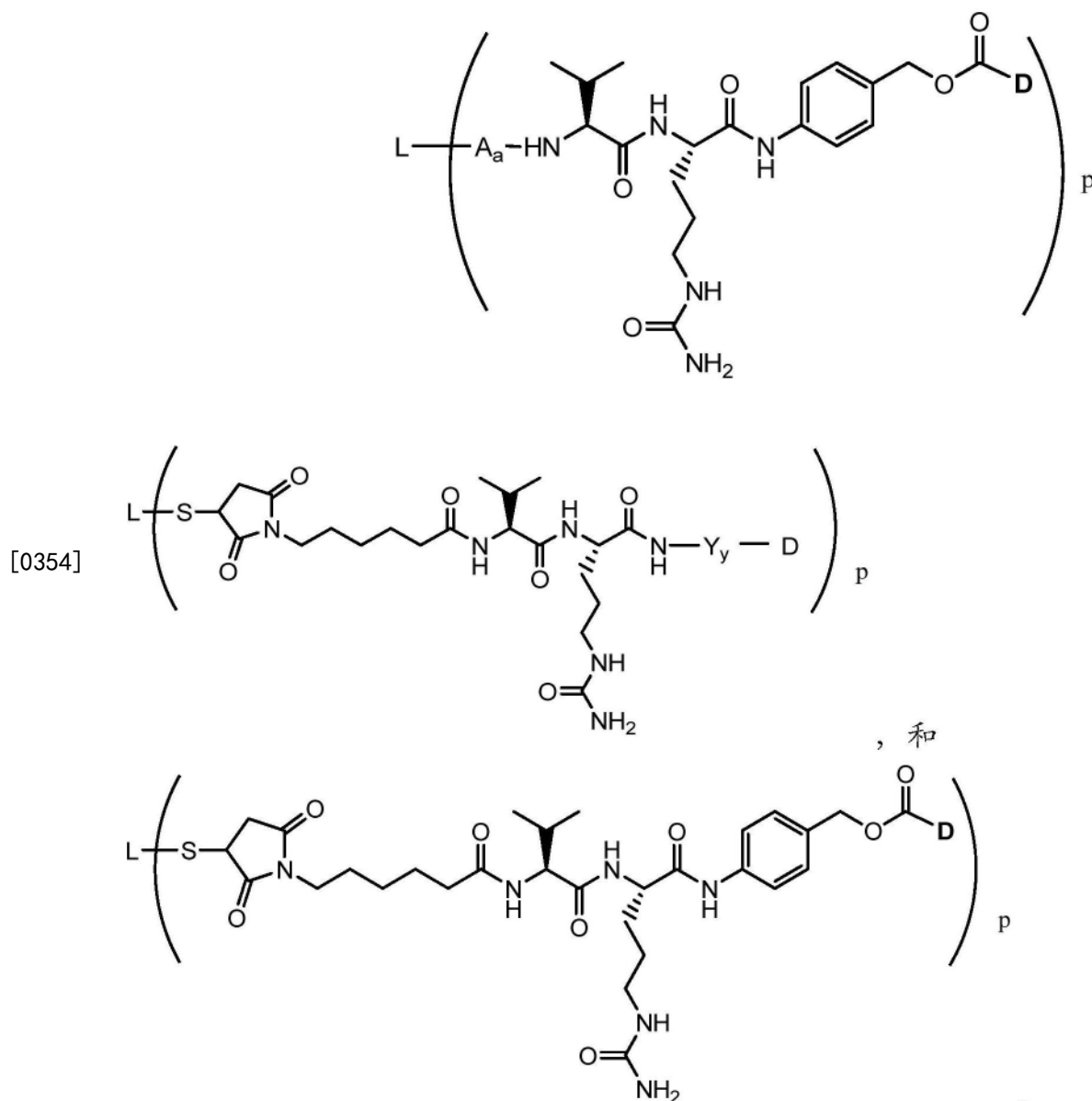
[0349] 包含抗体-药物偶联化合物的式I和II的实施方式可包括:



[0351] 其中w和y各自是0、1或2, 且



[0353] 其中w和y各自是0,



[0355] IX.) 药物单元

[0356] 该药物部分 (D) 可以是任何细胞毒性、细胞生长抑制或免疫调节 (例如免疫抑制) 药物。D 是具有可与间隔单元、氨基酸单元、延伸单元或抗体单元成键的原子的药物单元 (部分)。在一些实施方式中, 药物单元 D 具有氮原子, 其可与间隔单元成键。本文所用术语“药物单元”和“药物部分”含义相同且可互换使用。

[0357] 有用的细胞毒性或免疫调节剂种类包括例如微管蛋白抑制剂、DNA小沟结合物、DNA复制抑制剂和烷化剂。

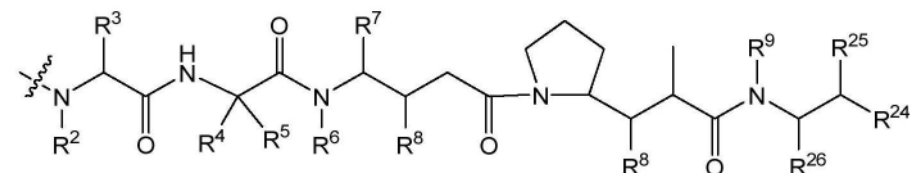
[0358] 在一些实施方式中,所述药物是澳瑞他汀,例如澳瑞他汀E(本领域也称为尾海兔素-10的衍生物)或其衍生物。例如,所述澳瑞他汀可以是澳瑞他汀E和酮酸间形成的酯。例如,澳瑞他汀E可与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其它典型的澳瑞他汀包括AFP、MMAF和MMAE。示例性澳瑞他汀的合成和结构参见美国专利申请号2003-0083263、2005-0238649和2005-0009751;国际专利公开号WO 04/010957、国际专利公开号WO 02/088172和美国专利号6,323,315;6,239,104;6,034,065;5,780,588;5,665,860;5,

663,149;5,635,483;5,599,902;5,554,725;5,530,097;5,521,284;5,504,191;5,410,024;5,138,036;5,076,973;4,986,988;4,978,744;4,879,278;4,816,444;和4,486,414,上述文献各自通过引用全文纳入本文并用于所有目的。

[0359] 已证明澳瑞他汀干扰微管动力学以及细胞核和细胞分裂并具有抗癌活性。澳瑞他汀结合微管蛋白并可对158P1D7表达型细胞产生细胞毒性或细胞生长抑制作用。有许多本领域已知的不同实验可用来确定澳瑞他汀或是所得的抗体-药物偶联物对所需细胞系产生细胞生长抑制或细胞毒性作用。

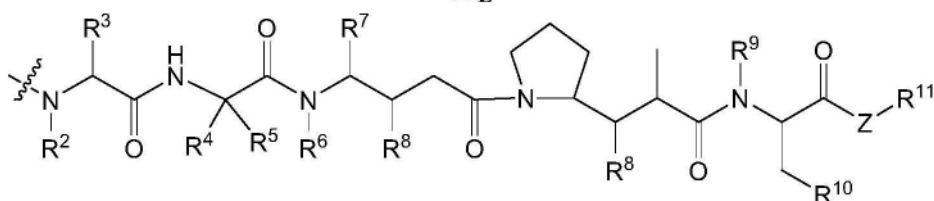
[0360] 用于测定化合物是否结合微管蛋白的方法是本领域已知的。参见例如Muller等, Anal.Chem 2006,78,4390-4397;Hamel等, Molecular Pharmacology,1995 47:965-976;和Hamel等, The Journal of Biological Chemistry,1990 265:28,17141-17149。出于本发明目的,可测定化合物对微管蛋白的相对亲和性。本发明的一些优选澳瑞他汀结合微管蛋白的亲和性范围从比MMAE与微管蛋白的结合亲和性低10倍(较弱亲和力),到比MMAE与微管蛋白结合亲和性高10倍、20倍或100倍(较强亲和力)。

[0361] 在一些实施方式中,-D是式D<sub>E</sub>或D<sub>F</sub>的澳瑞他汀或其药学上可接受的盐或溶剂合物:



**D<sub>E</sub>**

[0362]



**D<sub>F</sub>**

[0363] 其中,在每个位置上独立地给出以下说明:

[0364] 波浪线表示键;

[0365] R<sup>2</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>烯基或-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>炔基;

[0366] R<sup>3</sup>是-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>炔基、-碳环、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基(碳环)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基(碳环)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基(碳环)、-芳基、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基(芳基)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基(芳基)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基(芳基)、-杂环、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基(杂环)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基(杂环)或-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基(杂环);

[0367] R<sup>4</sup>是-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>炔基、-碳环、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基(碳环)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基(碳环)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基(碳环)、-芳基、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基(芳基)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基(芳基)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基(芳基)、-杂环、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基(杂环)、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基(杂环)或-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基(杂环);

[0368] R<sup>5</sup>是-H或-C<sub>1</sub>C<sub>8</sub>烷基;

[0369] 或者R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>一起形成碳环且具有式-(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>s</sub>-,其中R<sup>a</sup>和R<sup>b</sup>独立地是-H、-C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>炔基或碳环,且s是2、3、4、5或6,

- [0370]  $R^6$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0371]  $R^7$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(碳环)、-芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(芳基)、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环)；
- [0372]  $R^8$ 各自独立地是-H、-OH、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-O- ( $C_1-C_{20}$ 烷基)、-O- ( $C_2-C_{20}$ 烯基)、-O- ( $C_1-C_{20}$ 炔基)或-碳环；
- [0373]  $R^9$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0374]  $R^{24}$ 是-芳基、-杂环或-碳环；
- [0375]  $R^{25}$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-碳环、-O- ( $C_1-C_{20}$ 烷基)、-O- ( $C_2-C_{20}$ 烯基)、-O- ( $C_2-C_{20}$ 炔基)或 $OR^{18}$ ，其中 $R^{18}$ 是-H、羟基保护基或在 $OR^{18}$ 代表=O时为直接键；
- [0376]  $R^{26}$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-杂环或-碳环；
- [0377]  $R^{10}$ 是-芳基或-杂环；
- [0378] Z是-O-、-S-、-NH-或 $-NR^{12}$ ，其中 $R^{12}$ 是 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0379]  $R^{11}$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-杂环、 $-(R^{13}O)_m$ 、 $-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ；
- [0380] m是1-1000的整数；
- [0381]  $R^{13}$ 是 $-C_2-C_{20}$ 亚烷基、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基；
- [0382]  $R^{14}$ 是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0383] 每次出现时， $R^{15}$ 独立地是-H、-COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、
- [0384]  $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基；
- [0385] 每次出现时， $R^{16}$ 独立地是-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ；且
- [0386] n是0-6的整数；
- [0387] 其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基是可选取代的。
- [0388] 式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀包括其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团未发生取代的那些。
- [0389] 式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀包括其中 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 基团未被取代且 $R^{19}$ 、 $R^{20}$ 和 $R^{21}$ 基团是如本文所述可选取代的那些。
- [0390] 式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物形式：
- [0391]  $R^2$ 是 $-C_1-C_8$ 烷基；
- [0392]  $R^3$ 、 $R^4$ 和 $R^7$ 独立地选自-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、单环 $C_3-C_6$ 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(单环 $C_3-C_6$ 碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(单环 $C_3-C_6$ 碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(单环 $C_3-C_6$ 碳环)、 $C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基( $C_6-C_{10}$ 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基( $C_6-C_{10}$ 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基( $C_6-C_{10}$ 芳基)、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环)；其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环、芳基和杂环基团是可选取代的；

- [0393]  $R^5$ 是-H;
- [0394]  $R^6$ 是- $C_1$ - $C_8$ 烷基;
- [0395]  $R^8$ 各自独立地选自-OH、-O- ( $C_1$ - $C_{20}$ 烷基)、-O- ( $C_2$ - $C_{20}$ 烯基)或-O- ( $C_2$ - $C_{20}$ 炔基),其中所述烷基、烯基和炔基基团是可取代的;
- [0396]  $R^9$ 是-H或- $C_1$ - $C_8$ 烷基;
- [0397]  $R^{24}$ 是可取代的苯基;
- [0398]  $R^{25}$ 是-OR<sup>18</sup>,其中R<sup>18</sup>是H、羟基保护基或在OR<sup>18</sup>代表=O时是直接键;
- [0399]  $R^{26}$ 选自-H、- $C_1$ - $C_{20}$ 烷基、- $C_2$ - $C_{20}$ 烯基、- $C_2$ - $C_{20}$ 炔基或碳环,其中所述烷基、烯基、炔基和碳环基团是可取代的。
- [0400] 式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐形式:
- [0401]  $R^2$ 是甲基;
- [0402]  $R^3$ 是-H、- $C_1$ - $C_8$ 烷基、- $C_2$ - $C_8$ 烯基或- $C_2$ - $C_8$ 炔基,其中所述烷基、烯基和炔基是可取代的;
- [0403]  $R^4$ 是-H、- $C_1$ - $C_8$ 烷基、- $C_2$ - $C_8$ 烯基、- $C_2$ - $C_8$ 炔基、单环 $C_3$ - $C_6$ 碳环、- $C_6$ - $C_{10}$ 芳基、- $C_1$ - $C_8$ 亚烷基( $C_6$ - $C_{10}$ 芳基)、- $C_2$ - $C_8$ 亚烯基( $C_6$ - $C_{10}$ 芳基)、- $C_2$ - $C_8$ 亚炔基( $C_6$ - $C_{10}$ 芳基)、- $C_1$ - $C_8$ 亚烷基(单环 $C_3$ - $C_6$ 碳环)、- $C_2$ - $C_8$ 亚烯基(单环 $C_3$ - $C_6$ 碳环)、- $C_2$ - $C_8$ 亚炔基(单环 $C_3$ - $C_6$ 碳环);其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基和碳环基团是可取代的;
- [0404]  $R^5$ 是-H;
- [0405]  $R^6$ 是甲基;
- [0406]  $R^7$ 是- $C_1$ - $C_8$ 烷基、- $C_2$ - $C_8$ 烯基或- $C_2$ - $C_8$ 炔基;
- [0407]  $R^8$ 各自是甲氧基;
- [0408]  $R^9$ 是-H或- $C_1$ - $C_8$ 烷基;
- [0409]  $R^{24}$ 是苯基;
- [0410]  $R^{25}$ 是-OR<sup>18</sup>,其中R<sup>18</sup>是H、羟基保护基或在OR<sup>18</sup>代表=O时是直接键;
- [0411]  $R^{26}$ 是甲基。
- [0412] 式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐:
- [0413]  $R^2$ 是甲基; $R^3$ 是-H或- $C_1$ - $C_3$ 烷基; $R^4$ 是- $C_1$ - $C_5$ 烷基; $R^5$ 是-H; $R^6$ 是甲基; $R^7$ 是异丙基或仲丁基; $R^8$ 是甲氧基; $R^9$ 是-H或- $C_1$ - $C_8$ 烷基; $R^{24}$ 是苯基; $R^{25}$ 是-OR<sup>18</sup>;其中R<sup>18</sup>是-H、羟基保护基团或在OR<sup>18</sup>代表=O时是直接键;且 $R^{26}$ 是甲基。
- [0414] 式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物形式:
- [0415]  $R^2$ 是甲基或 $C_1$ - $C_3$ 烷基,
- [0416]  $R^3$ 是-H或- $C_1$ - $C_3$ 烷基;
- [0417]  $R^4$ 是- $C_1$ - $C_5$ 烷基;
- [0418]  $R^5$ 是H;
- [0419]  $R^6$ 是- $C_1$ - $C_3$ 烷基;
- [0420]  $R^7$ 是- $C_1$ - $C_5$ 烷基;
- [0421]  $R^8$ 是- $C_1$ - $C_3$ 烷氧基;

- [0422]  $R^9$ 是-H或- $C_1-C_8$ 烷基;
- [0423]  $R^{24}$ 是苯基;
- [0424]  $R^{25}$ 是- $OR^{18}$ ,其中 $R^{18}$ 是H、羟基保护基或在 $OR^{18}$ 代表=O时是直接键;且
- [0425]  $R^{26}$ 是- $C_1-C_3$ 烷基。
- [0426] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐:
- [0427]  $R^2$ 是甲基;
- [0428]  $R^3$ 、 $R^4$ 和 $R^7$ 独立地选自-H、- $C_1-C_{20}$ 烷基、- $C_2-C_{20}$ 烯基、- $C_2-C_{20}$ 炔基、单环 $C_3-C_6$ 碳环、- $C_1-C_{20}$ 亚烷基(单环 $C_3-C_6$ 碳环)、- $C_2-C_{20}$ 亚烯基(单环 $C_3-C_6$ 碳环)、- $C_2-C_{20}$ 亚炔基(单环 $C_3-C_6$ 碳环)、 $C_6-C_{10}$ 芳基、- $C_1-C_{20}$ 亚烷基( $C_6-C_{10}$ 芳基)、- $C_2-C_{20}$ 亚烯基( $C_6-C_{10}$ 芳基)、- $C_2-C_{20}$ 亚炔基( $C_6-C_{10}$ 芳基)、杂环基、- $C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环基)、- $C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环基)或- $C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环基);其中无论单独存在或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环、芳基和杂环基团是可选取代的;
- [0429]  $R^5$ 是-H;
- [0430]  $R^6$ 是甲基;
- [0431]  $R^8$ 各自是甲氧基;
- [0432]  $R^9$ 是-H、- $C_1-C_{20}$ 烷基、- $C_2-C_{20}$ 烯基或- $C_2-C_{20}$ 炔基;其中所述烷基、烯基和炔基是可选取代的;
- [0433]  $R^{10}$ 是可选取代的芳基或可选取代的杂环基;
- [0434] Z是-O-、-S-、-NH-或-NR<sup>12</sup>-,其中 $R^{12}$ 是- $C_1-C_{20}$ 烷基、- $C_2-C_{20}$ 烯基或- $C_2-C_{20}$ 炔基,各自是可选取代的;
- [0435]  $R^{11}$ 是-H、- $C_1-C_{20}$ 烷基、- $C_2-C_{20}$ 烯基、- $C_2-C_{20}$ 炔基、芳基、杂环基、-( $R^{13}O$ )<sub>m</sub>- $R^{14}$ 或-( $R^{13}O$ )<sub>m</sub>-CH( $R^{15}$ )<sub>2</sub>,其中所述烷基、烯基、炔基、芳基和杂环基团是可选取代的;
- [0436] m是1-1000的整数或m=0;
- [0437]  $R^{13}$ 是- $C_2-C_{20}$ 亚烷基、- $C_2-C_{20}$ 亚烯基或- $C_2-C_{20}$ 亚炔基,各自是可选取代的;
- [0438]  $R^{14}$ 是-H、- $C_1-C_{20}$ 烷基、- $C_2-C_{20}$ 烯基或- $C_2-C_{20}$ 炔基,其中所述烷基、烯基和炔基是可选取代的;
- [0439] 每次出现时, $R^{15}$ 独立地是-H、-COOH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N( $R^{16}$ )<sub>2</sub>、
- [0440] -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>- $C_1-C_{20}$ 烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>- $C_2-C_{20}$ 烯基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>- $C_2-C_{20}$ 炔基,其中所述烷基、烯基和炔基是可选取代的;
- [0441] 每次出现时, $R^{16}$ 独立地是-H、- $C_1-C_{20}$ 烷基、- $C_2-C_{20}$ 烯基、- $C_2-C_{20}$ 炔基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH,其中所述烷基、烯基和炔基是可选取代的;
- [0442] n是0-6的整数。
- [0443] 在某些实施方式中, $R^{10}$ 是可选取代的苯基。
- [0444] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 基团未被取代且 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 基团如本文所述的那些化合物。
- [0445] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团未被取代的那些化合物。
- [0446] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐:
- [0447]  $R^2$ 是- $C_1-C_3$ 烷基; $R^3$ 是-H或- $C_1-C_3$ 烷基; $R^4$ 是- $C_1-C_5$ 烷基; $R^5$ 是-H; $R^6$ 是- $C_1-C_3$ 烷基; $R^7$

是-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基;R<sup>8</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基;R<sup>9</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基;R<sup>10</sup>是可选取代的苯基;Z是-O-、-S-或-NH-;R<sup>11</sup>如上所定义。

[0448] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐:

[0449] R<sup>2</sup>是甲基;R<sup>3</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;R<sup>4</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基;R<sup>5</sup>是-H;R<sup>6</sup>是甲基;R<sup>7</sup>是异丙基或仲丁基;R<sup>8</sup>是甲氧基;R<sup>9</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基;R<sup>10</sup>是可选取代的苯基;Z是-O-、-S-或-NH-;R<sup>11</sup>如上所定义。

[0450] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐形式:

[0451] R<sup>2</sup>是甲基;R<sup>3</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;R<sup>4</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基;R<sup>5</sup>是-H;R<sup>6</sup>是甲基;R<sup>7</sup>是异丙基或仲丁基;R<sup>8</sup>是甲氧基;R<sup>9</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基;R<sup>10</sup>是苯基;Z是-O-或-NH-;R<sup>11</sup>如上所定义,优选氢。

[0452] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括符合以下定义的那些化合物或其药学上可接受的盐形式:

[0453] R<sup>2</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;R<sup>3</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;R<sup>4</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基;R<sup>5</sup>是-H;R<sup>6</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;R<sup>7</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基;R<sup>8</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基;R<sup>9</sup>是-H或-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基;R<sup>10</sup>是苯基;Z是-O-或-NH-;R<sup>11</sup>如上所定义,优选氢。

[0454] 式D<sub>E</sub>或D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>和R<sup>7</sup>独立地是异丙基或仲丁基且R<sup>5</sup>是-H的化合物。在一个示例性实施方式中,R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>各自是异丙基,R<sup>5</sup>是H,R<sup>7</sup>是仲丁基。剩余取代基如本文所定义。

[0455] 式D<sub>E</sub>或D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中R<sup>2</sup>和R<sup>6</sup>各自是甲基且R<sup>9</sup>是H的那些化合物。剩余取代基如本文所定义。

[0456] 式D<sub>E</sub>或D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括R<sup>8</sup>每次出现时均为-OCH<sub>3</sub>的那些化合物。剩余取代基如本文所定义。

[0457] 式D<sub>E</sub>或D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>各自是异丙基、R<sup>2</sup>和R<sup>6</sup>各自是甲基、R<sup>5</sup>是H、R<sup>7</sup>是仲丁基、R<sup>8</sup>每次出现时是-OCH<sub>3</sub>且R<sup>9</sup>是H的那些化合物。剩余取代基如本文所定义。

[0458] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中Z是-O-或-NH-的那些化合物。剩余取代基如本文所定义。

[0459] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中R<sup>10</sup>是芳基的化合物。剩余取代基如本文所定义。

[0460] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中R<sup>10</sup>是苯基的化合物。剩余取代基如本文所定义。

[0461] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括其中Z是-O-且R<sup>11</sup>是氢、甲基或叔丁基的那些化合物。剩余取代基如本文所定义。

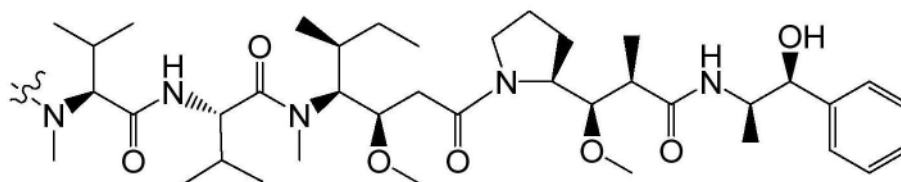
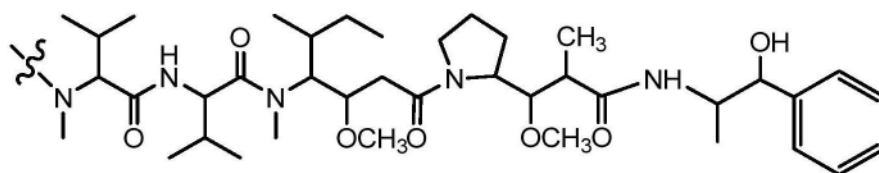
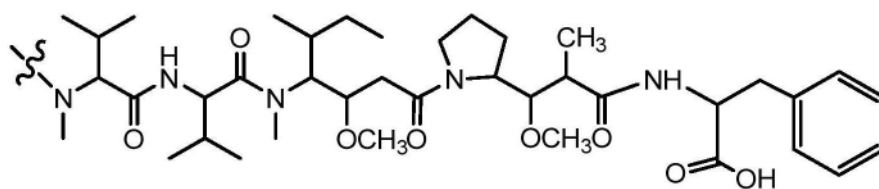
[0462] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括当Z是-NH时,R<sup>11</sup>是-(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>的那些化合物,其中R<sup>15</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>且R<sup>16</sup>是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH。剩余取代基如本文所定义。

[0463] 式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀包括当Z是-NH时,R<sup>11</sup>是-(R<sup>13</sup>O)<sub>m</sub>-CH(R<sup>15</sup>)<sub>2</sub>的那些化合物,其中R<sup>15</sup>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub>H。剩余取代基如本文所定义。

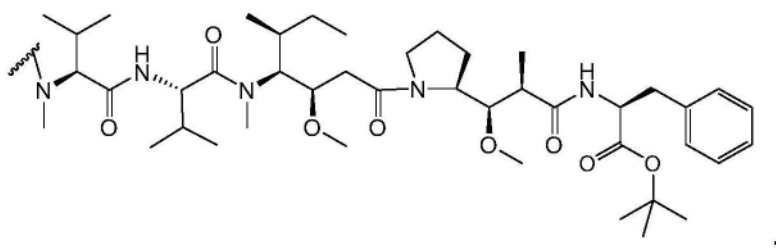
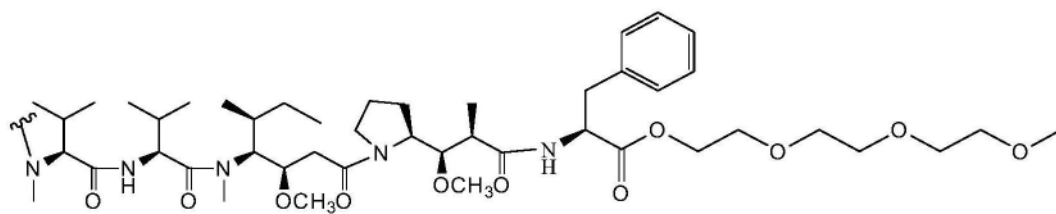
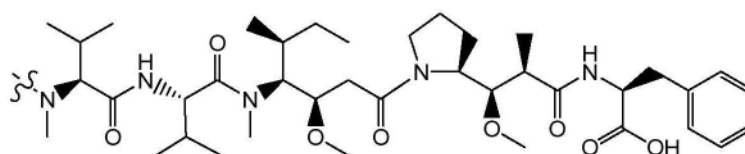
[0464] 在优选实施方式中,当D是式D<sub>E</sub>的澳瑞他汀时,w是1-12,优选2-12的整数,y是1或2,且a优选为1。

[0465] 在一些实施方式中,当D是式D<sub>F</sub>的澳瑞他汀时,a是1且w和y是0。

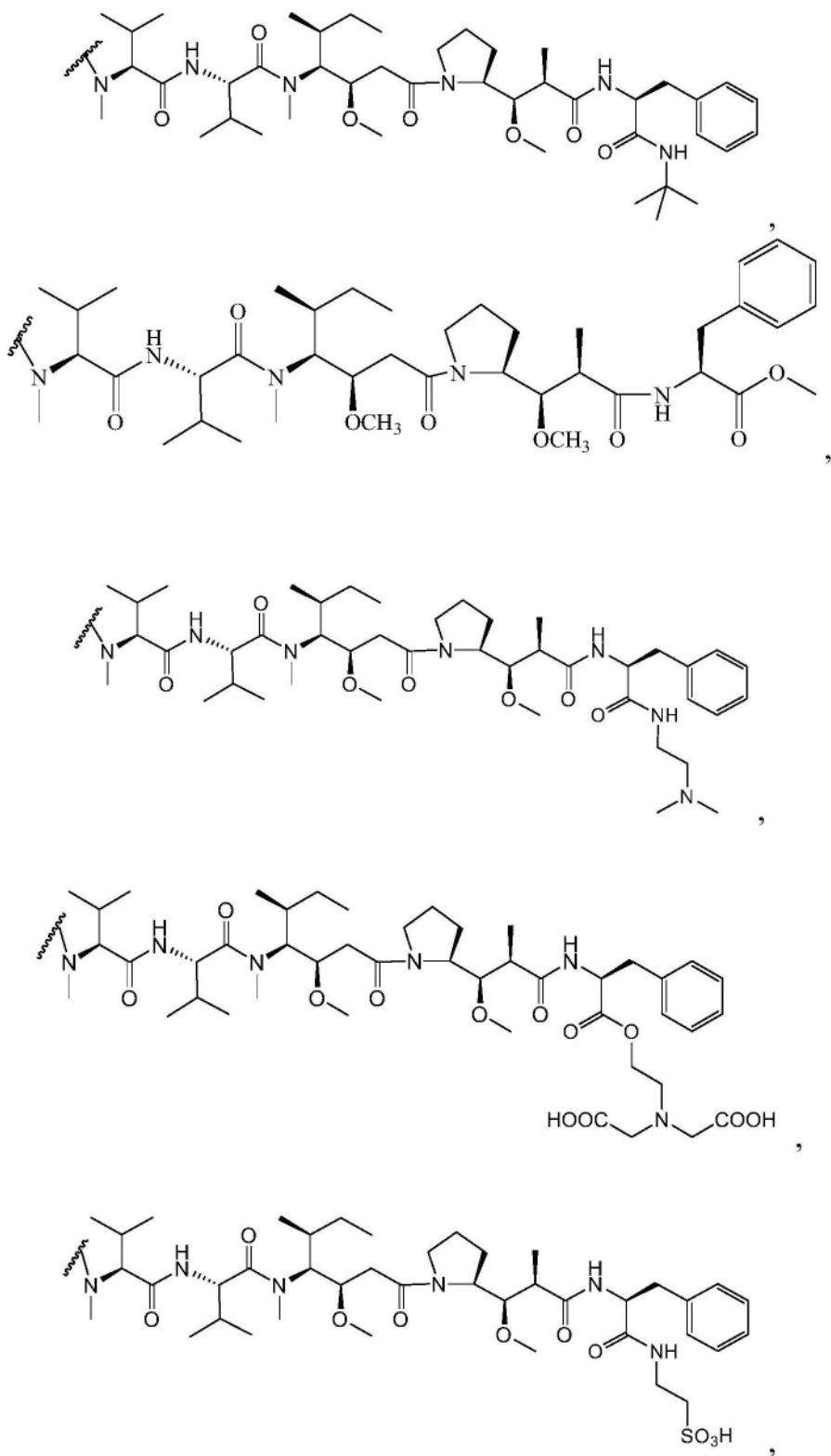
[0466] 说明性药物单元(-D)包括具有以下结构的药物单元其药学上可接受的盐或溶剂合物:

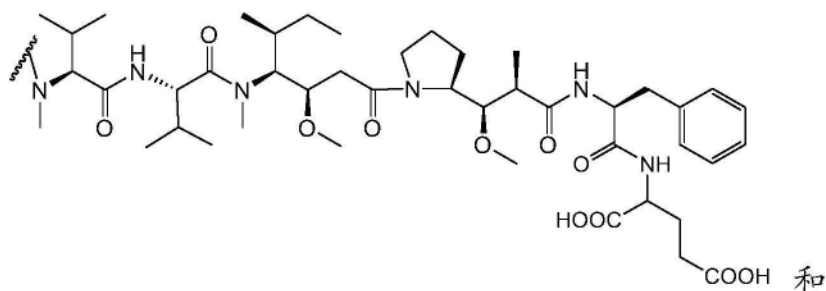


[0467]

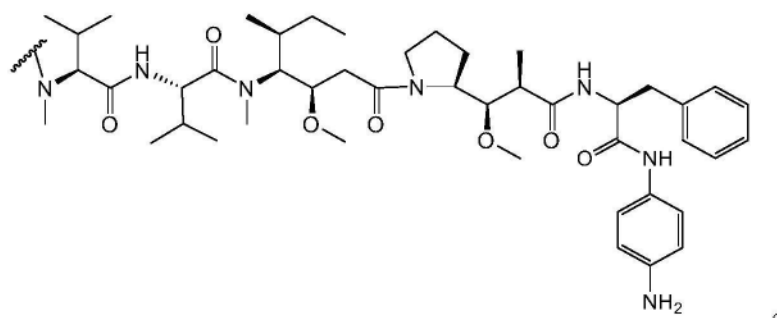








[0469]

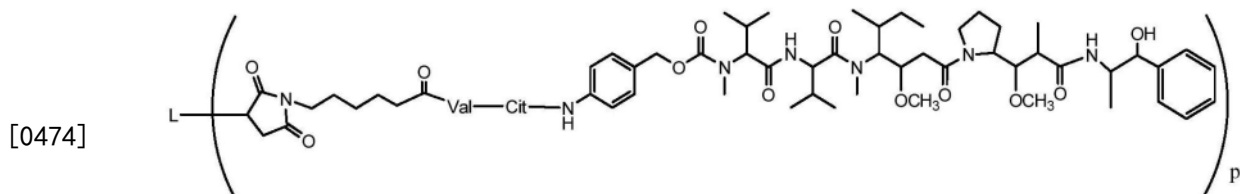


[0470] 在一个方面,可将亲水基团,例如但不限于三乙二醇酯(TEG)通过R<sup>11</sup>连接于药物单元。不受理论限制,亲水基团有助于药物单元的内化和非凝聚。

[0471] 在一些实施方式中,药物单元不是TZT-1027。在一些实施方式中,药物单元不是澳瑞他汀E、尾海兔素10或澳瑞他汀PE。

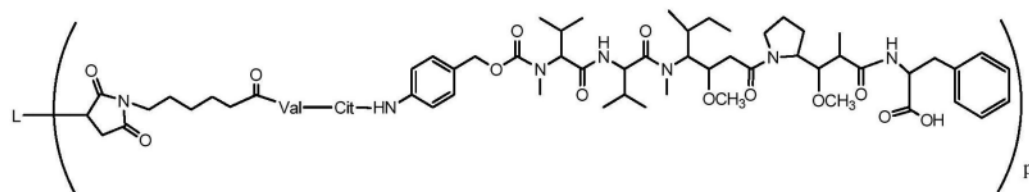
[0472] 示例性抗体药物偶联化合物具有以下结构或其药学上可接受的盐,其中“L”或“mAb-s-”代表本文中称为Ha15-10ac12的158P1D7 Mab:

[0473] L-MC-vc-PAB-MMAE



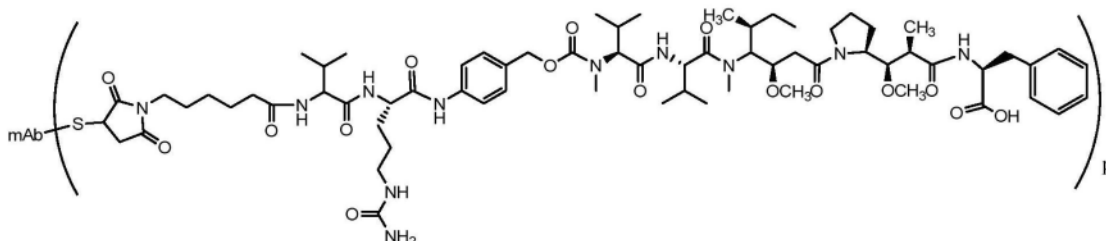
或

[0475] L-MC-vc-PAB-MMAF



[0476]

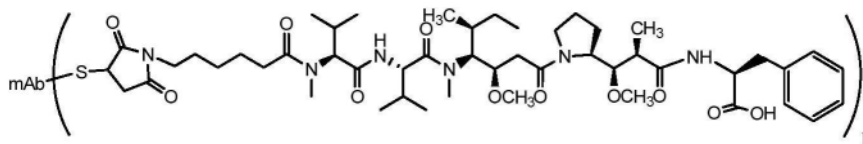
或



[0477] 或

[0478] L-MC-MMAF

[0479]



[0480] 在一些实施方式中,药物单元是卡其霉素、喜树碱、美登木素或蒽环类抗生素。在一些实施方式中,所述药物是紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。

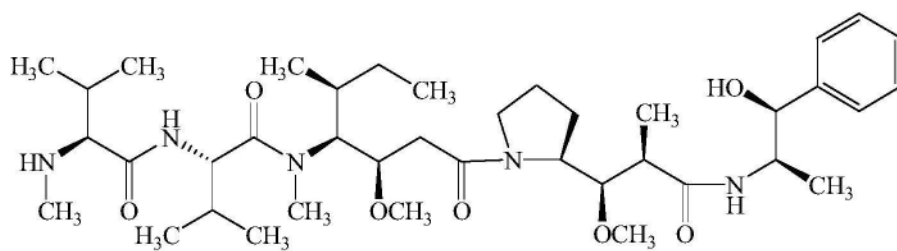
[0481] 在一些典型的实施方式中,合适的细胞毒剂包括例如DNA小沟结合物(例如,烯二炔(enediyne)和脂肪酸释放激素(lexitropsin)、CBI化合物;也可参见美国专利号6,130,237)、多卡米星、紫杉烷(例如紫杉酚和多西紫杉醇)、嘌呤毒素和长春花生物碱。其它细胞毒剂包括例如CC-1065、SN-38、托泊替坎、吗啉代-多柔比星、根霉素、氰基吗啉代-多柔比星、棘霉素、考布他汀、纺锤菌素、埃博霉素(epothilone)A和B、雌氮芥、隐花植物素(cryptophysin)、西马多丁、类美坦西醇、浙皮海绵内酯、艾榴塞洛素和米托蒽醌。

[0482] 在一些实施方式中,该药物是抗微管蛋白剂。抗微管蛋白剂的例子包括:澳瑞他汀、紫杉烷(如Taxol®(紫杉醇)、Taxotere®(多西紫杉醇))、T67(杜拉瑞克(Tularik))和长春花生物碱(如长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)。其他抗微管蛋白药包含,例如浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物(如埃博霉素A和B)、诺考达唑(nocodazole)、秋水仙素和秋水仙胺(colcimid)、雌氮芥、隐花植物素(cryptophycin)、西马多丁、美登木素、考布他汀、浙皮海绵内酯和艾榴塞洛素(eleutherobin)。

[0483] 在某些实施方式中,所述细胞毒剂是美登木素,另一组抗微管蛋白剂。例如,在特定实施方式中,所述美登木素是美登素或DM-1(IMGN公司(ImmunoGen, Inc.));也参见Chari等,1992, Cancer Res 52:127-131)。

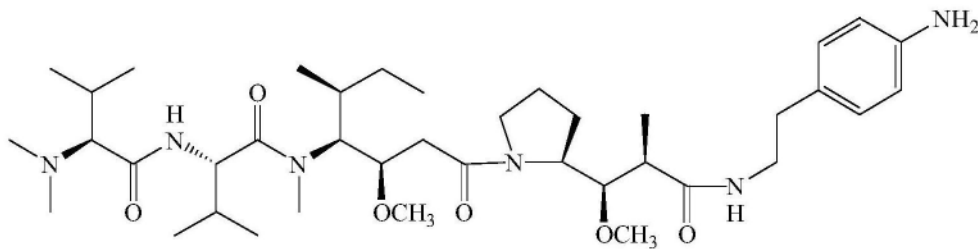
[0484] 在某些实施方式中,细胞毒剂或细胞生长抑制剂是多拉司他汀。在某些实施方式中,细胞毒剂或细胞生长抑制剂是澳瑞他汀类。因此,在具体实施方式中,细胞毒剂或细胞生长抑制剂是MMAE(式XI)。在另一具体实施方式中,细胞毒剂或细胞生长抑制剂是AFP(式XVI)。

[0485]



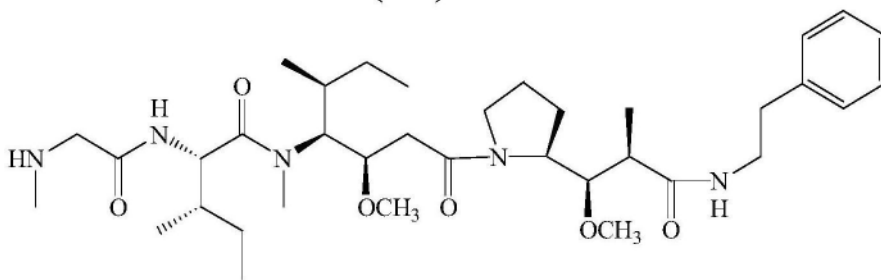
(XI)

[0486] 在某些实施方式中,细胞毒剂或细胞生长抑制剂是式XII-XXI的化合物或其药学上可接受的盐:

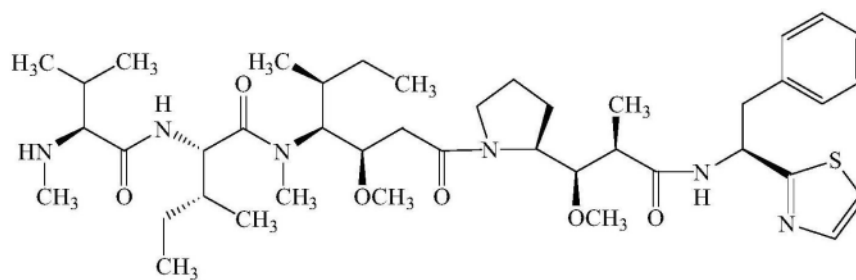


(XII)

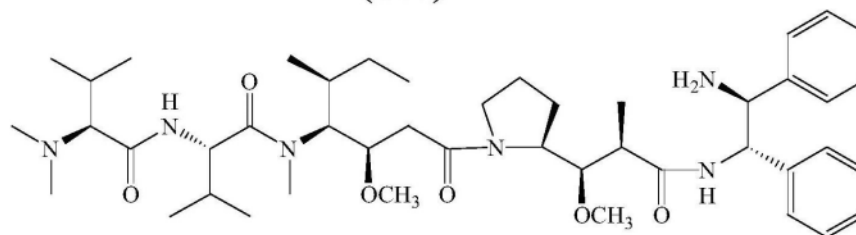
[0487]



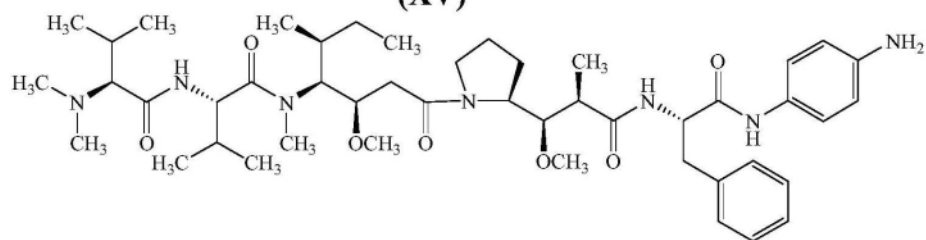
(XIII)



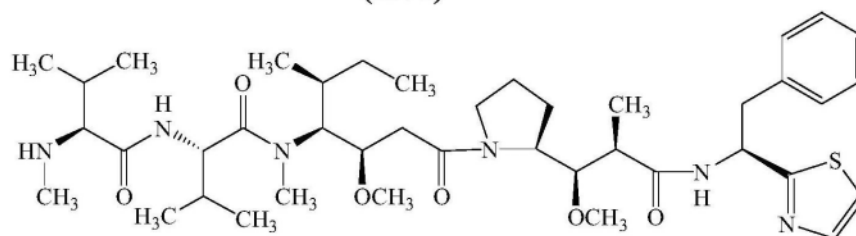
(XIV)



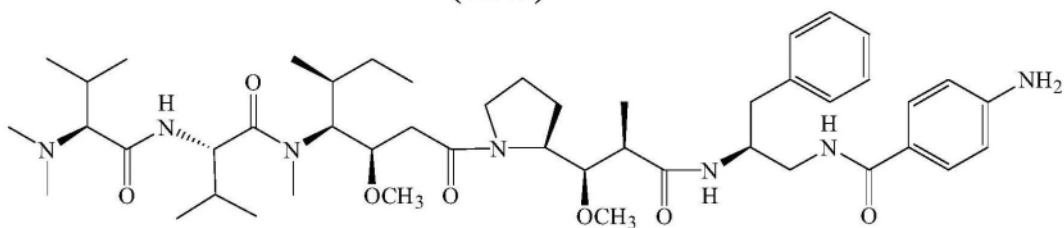
(XV)



(XVI)

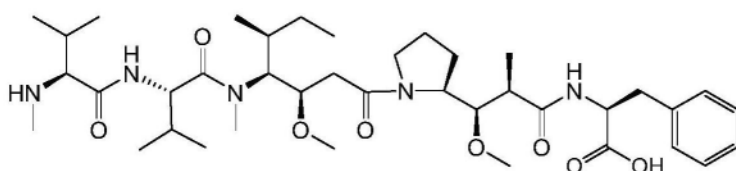


(XVII)



(XVIII)

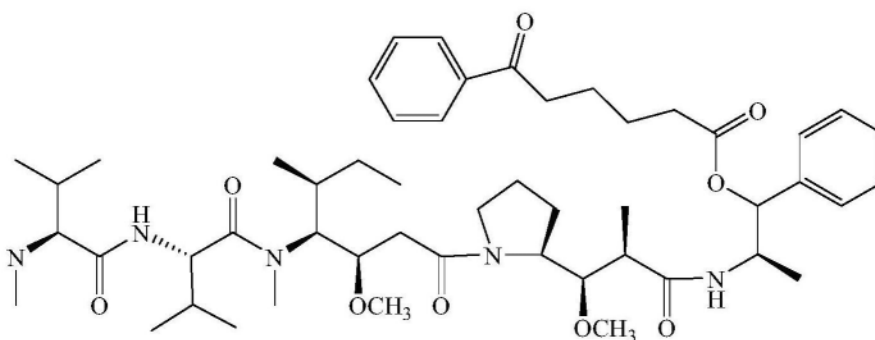
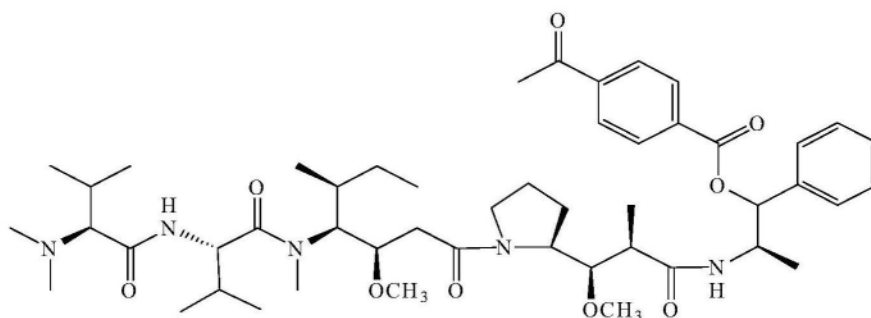
[0488]



(XVIV)

(XX)

[0489]



(XXI)

[0490] X.) 药物载量

[0491] p代表药物载量,即分子中每个抗体的药物部分的平均数量。药物载量的范围可以是每个抗体1-20个药物部分(D)。本发明的ADC包括与1-20范围的药物部分偶联的抗体集合。可通过常规方法如质谱和ELISA实验鉴定来自偶联反应的ADC制品中每个抗体的平均药物部分数量。也可以p的形式确定ADC的定量分布。在一些情况下,可通过诸如电泳的方式将具有某一确定p值的均一ADC与其它药物载量的ADC分离、纯化,并进行鉴定。

[0492] 对于一些抗体药物偶联物,p可能受到抗体结合位点数目的限制。例如,当所述连接是上文示例性实施方式中的半胱氨酸巯基时,抗体可只具有一个或多个半胱氨酸巯基基团,或可只具有一个或多个可经其连接于接头的充足反应性巯基基团。在一些实施方式中,较高的药物载量(例如 $p > 5$ )可能导致一些药物抗体偶联物聚集、不溶性、毒性或失去细胞通透性。在一些实施方式中,本发明ADC的药物加载范围是1-约8、约2-约6、约3-约5、约3-约4、约3.1-约3.9、约3.2-约3.8、约3.2-约3.7、约3.2-约3.6、约3.3-约3.8或约3.3-约3.7。实际上,已证明对于某些ADC,每个抗体药物部分的最佳比例可少于8并可为约2-约5。参见US

[0493] 2005-0238649A1(通过引用全文纳入本文)。

[0494] 在某些实施方式中,在偶联反应中与抗体偶联的药物部分少于理论最大值。例如,抗体可含有不与药物接头中间体或接头试剂发生反应的赖氨酸残基,如下所述。通常,抗体

不含大量可与药物部分连接的游离且反应性的半胱氨酸巯基基团;事实上,抗体中多数半胱氨酸巯基残基以二硫桥的形式存在。在某些实施方式中,抗体可在部分或全还原条件下用还原剂(例如二硫苏糖(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP))还原以产生反应性半胱氨酸巯基基团。在某些实施方式中,抗体经历变性条件以显示反应性亲核基团,例如赖氨酸或半胱氨酸。

[0495] 可通过不同方法控制ADC的载量(药物/抗体比例),例如:(i)限制药物接头中间体或接头试剂相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制偶联反应时间或温度,(iii)部分或限制半胱氨酸巯基修饰还原条件,(iv)通过重组技术工程改造抗体的氨基酸序列,从而修饰半胱氨酸数目和位点以控制接头药物连接的数目和/或位点(例如根据本文及W02006/034488所述制备的巯基MAb或巯基Fab(其通过引用全文纳入本文))。

[0496] 应理解,一个以上亲核基团与药物接头中间体或接头试剂反应再与药物部分试剂反应时,所得产物是ADC化合物的混合物,其中分布了一种或多种与抗体连接的药物部分。每个抗体的平均药物数目可通过双ELISA抗体试验从混合物中计算,该试验对抗体有特异性并对药物有特异性。单独的ADC分子可用质谱法在混合物中鉴定并通过HPLC分离,例如疏水相互作用色谱(参见例如Hamblett,K.J.等,“Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate”(《药物加载对抗CD30抗体药物偶联物的药理学、药代动力学和毒性的作用》)摘要号624,美国癌症研究协会(American Association for Cancer Research),2004年会,2004年3月27-31日,AACR会议记录,卷45,2004年3月;Alley,S.C.等,“Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates”(《抗体药物偶联物中药物连接位置的控制》)摘要号627,美国癌症研究协会,2004年会,2004年3月27-31日,AACR会议记录,卷45,2004年3月)。在某些实施方式中,可通过电泳或色谱法从偶联混合物中分离具有单一加载值的均一ADC。

[0497] XI.) 测定ADC细胞毒性作用的方法

[0498] 测定药物或抗体药物偶联物是否对细胞产生细胞生长抑制和/或细胞毒性作用的方法是已知的。通常,可通过以下方法测定抗体药物偶联物的细胞毒性或细胞生长抑制活性:将表达抗体药物偶联物靶蛋白的哺乳动物细胞暴露在细胞培养基中;将细胞培养一段时间,约6小时至约5天;并测定细胞活力。可采用基于细胞的体外测试来测定抗体药物偶联物的活力(增殖)、细胞毒性和细胞凋亡的诱导(半胱天冬酶活性)。

[0499] 为测定抗体药物偶联物是否产生细胞生长抑制作用,可采用胸苷掺入试验。例如,96孔板上以密度为5,000细胞/孔接种的靶抗原表达癌细胞能培养72小时并在72小时期间的最后8小时中接触0.5 $\mu$ Ci的<sup>3</sup>H-胸苷。在有和没有抗体药物偶联物的情况下测定培养物细胞中<sup>3</sup>H-胸苷的掺入。

[0500] 为了测定细胞毒性,可测定坏死或凋亡(程序性细胞死亡)。坏死通常伴随着质膜通透性增加;细胞溶胀和质膜破裂。凋亡的特征通常是膜出泡、胞质浓缩和内源性核酸内切酶的激活。检测到任意这些对癌细胞的作用表明,抗体药物偶联物可用于癌症治疗。

[0501] 可通过测定细胞摄入的染料(例如中性红、台盼蓝或ALAMAR<sup>TM</sup>蓝)来测量细胞活性(参见例如Page等,1993,Intl.J.Oncology 3:473-476)。在此类试验中,在含有染料的培养基中孵育细胞、洗涤细胞,并用分光光度法测定剩余染料来反映细胞对染料的摄取。也可利

用蛋白质-结合染料磺基罗丹明B (SRB) 测定细胞毒性 (Skehan等, 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12)。

[0502] 或者, 在定量比色测定中使用四唑盐 (例如MTT), 该定量比色测定通过检测存活而非死亡的细胞来测定哺乳动物细胞的存活和增殖 (参见例如Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63)。

[0503] 可通过测量 (例如) DNA片段化来定量分析细胞凋亡。已有市售的体外定量检测DNA片段化的分光光度方法。此类试验的示例包括TUNEL (检测片段化DNA中掺入的带标记核苷酸) 和基于ELISA的实验, 描述于Biochemica, 1999, 2号, 第34-37页 (罗氏分子生化制品公司 (Roche Molecular Biochemicals))。

[0504] 也可通过检测细胞形态学变化来测定细胞凋亡。例如, 关于坏死, 可通过检测某些染料 (例如荧光染料, 如吖啶橙或溴化乙锭) 的摄入来测定质膜完整性的缺失。测定凋亡细胞数目的方法已描述于Duke和Cohen的Current Protocols in Immunology (《新编免疫学实验指南》) (Coligan等编, 1992, 第3.17.1-3.17.16页)。也可用DNA染料标记细胞 (例如吖啶橙、溴化乙锭或碘化丙锭) 并观察细胞的染色质凝聚和沿内核膜的边集 (margination)。可检测以测定细胞凋亡的其他形态学变化包括例如胞质凝聚、膜出泡增加和细胞缩小。

[0505] 可由培养物的附着和“漂浮”的腔室 (compartment) 来测定凋亡细胞是否存在。例如, 可通过去除上清液、胰蛋白酶消化粘附的细胞、离心洗涤步骤 (例如2000rpm离心10分钟) 后混合制备物并检测细胞凋亡 (例如, 通过测定DNA片段化) 来收集两种腔室。(参见例如, Piazza等, 1995, Cancer Research 55:3110-16)。

[0506] 可在合适的动物模型中体内评估158P1D7治疗组合物的作用。例如, 可使用异种瘤模型, 其中将癌外植体或经传代的异种移植组织引入免疫受损动物中, 例如裸小鼠或SCID小鼠 (Klein等, 1997, Nature Medicine 3:402-408)。例如, PCT专利申请W098/16628和美国专利6,107,540描述了各种人前列腺癌异种移植模型, 这些模型能重现原发性肿瘤的发展、微转移和晚期疾病特征性成骨细胞转移的形成。可通过测定肿瘤形成抑制、肿瘤消退或转移等的试验来预测功效。

[0507] 评估促进细胞凋亡的体内试验可用于评估治疗组合物。在一个实施方式中, 检测经治疗组合物处理的荷瘤小鼠的异种移植瘤中细胞凋亡灶的存在, 并与未经处理的对照荷异种移植瘤小鼠作比较。经处理小鼠肿瘤中发现的细胞凋亡灶的程度提供组合物治疗功效的指示。

[0508] 用于实施上述方法的治疗组合物可配制成药物组合物, 该药物组合物包含适用于所需递送方法的载体。合适的载体包括当与治疗组合物组合时保持治疗组合物抗肿瘤功能的任何物质, 并通常与患者免疫系统无反应性。示例包括但不限于任何数量的标准药物载体, 例如无菌磷酸盐缓冲盐水溶液、抑菌水等 (参见, Remington's Pharmaceutical Sciences (《雷明顿药物科学》) 第16版, A.Osal. 编, 1980)。

[0509] 治疗制剂可以是溶解的并可通过任何能向肿瘤位点递送治疗组合物的途径给予。可能有效的给药途径包括但不限于: 静脉内、胃肠外、腹膜内、肌肉、肿瘤内、皮内、器官内、原位等。用于静脉内注射的优选制剂包含: 含防腐剂抑菌水、不含防腐剂的无菌水和/或稀释于含0.9%注射用无菌氯化钠的聚氯乙烯或聚乙烯袋 (USP) 中的治疗组合物溶液。可将治疗蛋白制品以无菌粉末形式冻干并保存, 优选在真空条件下, 然后在注射前于抑菌水 (含有



例如苯甲醇防腐剂)或无菌水中重建。

[0510] 通过上述方法治疗癌症的剂量和给药方案可根据方法和靶标癌而变化,并通常取决于本领域理解的许多其它因素。

[0511] XII.) 治疗表达158P1D7的癌症的

[0512] 158P1D7鉴定为在一组限定组织中正常表达的蛋白,但也在癌(如表I所列那些)中表达,这就拓展了治疗这些癌症的治疗方法。

[0513] 值得注意的是,即使当靶蛋白在正常组织,甚至是重要(vital)正常器官组织上表达时,靶向抗肿瘤治疗也是有用的。重要器官是维持生命的必需器官,例如心脏或结肠。非重要器官是移除后个体仍能存活的器官。非重要器官的示例是卵巢、乳腺和前列腺。

[0514] 正常组织甚至是重要正常组织中的靶蛋白表达,不会破坏该蛋白的靶向试剂治疗某些也过量表达该蛋白的肿瘤的效用。例如,重要器官中的表达不造成损害也不造成自身损害。另外,视为非必需的器官(如前列腺和卵巢)可以移除而不影响死亡率。最后,一些重要器官由于免疫豁免不受正常器官表达的影响。免疫豁免的器官是受到血液-器官屏障保护隔离血液的器官并因此无法进行免疫治疗。免疫豁免器官的示例是大脑和睾丸。

[0515] 因此,抑制158P1D7蛋白活性的治疗方法对患有158P1D7表达型癌症的患者有用。这些治疗方法通常分为三类。第一类调节158P1D7功能(由于该蛋白涉及肿瘤细胞生长)从而抑制或阻滞肿瘤细胞生长或诱导肿瘤细胞死亡。第二类包括抑制158P1D7蛋白与其结合伙伴或其它蛋白的结合或关联的各种方法。第三类包括抑制158P1D7基因转录或158P1D7 mRNA翻译的各种方法。

[0516] 因此,可评估癌症患者是否存在158P1D7表达及其水平,优选使用肿瘤组织的免疫组化评价、定量158P1D7成像或可靠地指示158P1D7表达是否存在或水平的其它技术。为此,优选肿瘤活检或外科手术样本的免疫组化分析。肿瘤组织的免疫组化分析的方法是本领域熟知的。

[0517] XIII.) 将158P1D7作为靶标用于基于抗体的治疗

[0518] 158P1D7是基于抗体治疗策略中具有吸引力的靶标。许多靶向胞外和胞内分子的抗体策略为本领域熟知(参见,例如补体和ADCC介导的杀伤以及胞内抗体的应用)。由于158P1D7由相对于相应正常细胞的各种癌细胞系表达,因此准备全身性给予158P1D7免疫反应性组合物,其展现出极佳的灵敏性但不出现因免疫反应性组合物与非靶标器官和组织结合引起的毒性、非特异性和/或非靶向性作用。与158P1D7结构域特异性反应的抗体可用于全身性治疗表达158P1D7的癌症,优选作为其中偶联物带有毒素或治疗剂的抗体药物偶联物(即ADC)。

[0519] 本领域技术人员应理解,抗体可用于特异性靶向并结合免疫原性分子,例如图1所示158P1D7序列的免疫原性区域。另外,本领域技术人员应理解将抗体与细胞毒剂偶联是常规的(参见,例如Slevers等,Blood 93:11 3678-3684 (1999年6月1日))。在将细胞毒剂和/或治疗剂直接递送至细胞(例如通过将其偶联于对细胞表达分子(如158P1D7)特异的抗体)时,细胞毒剂能对那些细胞产生其已知的生物作用(即细胞毒性)。

[0520] 用抗体细胞毒剂偶联物杀伤细胞的多种组合物和方法是本领域已知的。癌症情况下,一般方法包括向具有肿瘤的哺乳动物给予生物有效量的偶联物,所述偶联物包含与靶向试剂(例如158P1D7 MAbs,优选Ha15-10ac12)连接的所选细胞毒性和/或治疗剂,其与所表

达可供结合或定位于细胞表面的抗原(例如158P1D7)结合。典型的实施方式是向158P1D7表达型细胞递送细胞毒性和/或治疗剂的方法,该方法包括将细胞毒剂与免疫特异性结合158P1D7表位的抗体偶联,并使细胞接触该抗体药物偶联物(ADC)。另一种说明性实施方式是治疗疑似患有转移性癌的个体的方法,该方法包括对所述个体经胃肠外给予药物组合物的步骤,该药物组合物含有治疗有效量的与细胞毒剂和/或治疗剂偶联的抗体。

[0521] 可根据已成功用于治疗其它类型癌症的各种方法用158P1D7抗体进行癌症免疫治疗,所述癌症包括但不限于结肠癌(Arlen等,1998,Crit.Rev.Immunol.18:133-138)、多发性骨髓瘤(Ozak等,1997,Blood 90:3179-3186,Tsunenari等,1997,Blood 90:2437-2444)、胃癌(Kasprzyk等,1992,Cancer Res.52:2771-2776)、B细胞淋巴瘤(Funakoshi等,1996,J.Immunother.Emphasis Tumor Immunol.19:93-101)、白血病(Zhon等,1996,Leuk.Res.20:581-589)、结直肠癌(Moun等,1994,Cancer Res.54:6160-6166;Velders等,1995,Cancer Res.55:4398-4403)和乳腺癌(Shepard等,1991,J.Clin.Immunol.11:117-127)。一些治疗方法包括将裸抗体与毒素或放射性同位素偶联,例如将Y<sup>91</sup>或I<sup>131</sup>分别与抗CD20抗体偶联(例如Zevalin<sup>TM</sup>,IDEC制药公司(IDEC Pharmaceuticals Corp.)或Bexxar<sup>TM</sup>,库尔特制药公司(Coulter Pharmaceuticals)),而其它方法包括共同给予抗体和其它治疗剂,例如Herceptin<sup>TM</sup>(曲妥珠单抗(trastuzu MAb))和紫杉醇(基因泰克公司(Genentech, Inc.))。在优选实施方式中,抗体将偶联有细胞毒剂,同上,优选称为MMAE的澳瑞他汀衍生物(西雅图遗传学公司(Seattle Genetics, Inc.))。

[0522] 虽然158P1D7抗体治疗对所有癌症分期都有用,但抗体治疗特别适用于晚期或转移性癌。本发明所述的抗体治疗对症治疗已接受一轮或多轮化疗的患者。或者,对于尚未接受化疗的患者,将本发明所述抗体治疗与化疗或放疗方案联用。另外,抗体治疗可使伴随的化疗使用减低剂量,尤其对于不能很好耐受化疗剂毒性的患者。Fan等(Cancer Res.53:4637-4642,1993)、Prewett等(International J.of Onco.9:217-224,1996)和Hancock等(Cancer Res.51:4575-4580,1991)描述了各种抗体与化疗剂的共同应用。

[0523] 因此,用于本发明所述治疗方法的优选单克隆抗体是全人抗体且以高亲合性特异性结合靶158P1D7抗原的抗体。虽然本发明的抗体药物偶联物可用于治疗其中表达158P1D7的癌症,但本发明的抗体药物偶联物尤其可治疗性应用于治疗膀胱癌。

[0524] XIV.) 158P1D7 ADC混合物

[0525] 本发明治疗方法包括给予单一158P1D7 ADC以及不同MAb的组合或混合物(即158P1D7 MAb或结合另一蛋白的MAb)。这类MAb混合物可具有某些优势,因为其含有靶向不同表位的MAb,利用不同的效应机理或组合了直接细胞毒性MAb与依赖免疫效应功能的MAb。这类组合MAb可展现协同治疗作用。另外,158P1D7 MAb的给予可伴随其它治疗方法,所述其它治疗方法包括但不限于各种化疗和生物因子、雄激素阻滞剂、免疫调节剂(例如IL-2、GM-CSF)、外科手术或放疗。在一个优选实施方式中,给予偶联形式的158P1D7 MAb。

[0526] 通过能向肿瘤细胞递送抗体的任何途径给予158P1D7 ADC制剂。给药途径包括但不限于:静脉内、腹膜内、肌内、肿瘤内、皮内等。治疗通常包括通过可接受的给药途径(例如静脉内注射(IV))重复给予158P1D7 ADC制剂,且通常剂量范围包括但不限于:0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25mg/kg体重。通常,每周10-1000mg MAb范围的剂量是有效的且耐受良好。

[0527] 基于用 Herceptin® (曲妥珠单抗) 治疗转移性乳腺癌的临床经验, 约4mg/kg患者体重IV的MAb制剂起始加载剂量和之后约2mg/kg IV的每周剂量代表了可接受的给药方案。优选地, 起始加载剂量以90分钟或更长时间的输注给予。如果起始剂量耐受良好, 周期性维持剂量以30分钟或更长时间的输注给予。本领域技术人员应理解, 特定情况下, 各种因素能影响理想剂量方案。这些因素包括例如, 所用MAb的结合亲和性和半衰期、患者的158P1D7表达水平、循环排出158P1D7抗原的程度、所需稳态抗体浓度水平、治疗频率和与本发明治疗方法联用的化疗或其它试剂的影响, 以及特定患者的健康状态。

[0528] 任选地, 应在给定样品中评估患者的158P1D7水平 (例如, 循环的158P1D7抗原和/或158P1D7表达型细胞的水平) 以协助确定最有效给药方案等。这类评估也用于治疗中的监测目的并与其它参数评估 (例如, 膀胱癌治疗中尿细胞学和/或免疫细胞水平, 或通过类比方法评估前列腺癌治疗中的血清PSA水平) 联用以评估治疗成功。

[0529] 本发明的目的是提供158P1D7 ADC, 其抑制或延迟表达158P1D7的肿瘤细胞的生长。本发明进一步的目的是使用这类158P1D7 ADC, 特别是将这类158P1D7ADC与其它药物或免疫学活性治疗联用, 以提供抑制血管发生和其它生物功能的方法并从而降低哺乳动物 (优选人) 中肿瘤的生长。

[0530] XV.) 联合治疗

[0531] 在一个实施方式中, 将158P1D7 ADC与化疗剂或放疗或其组合联用治疗肿瘤 (包括人肿瘤) 时, 有协同作用。换言之, 与化疗剂或放疗或其组合联用时, 158P1D7ADC对肿瘤生长抑制的增强超过预期水平。协同作用可通过例如以下方式显示: 联合治疗对肿瘤生长的抑制大于对单独158P1D7 ADC治疗或158P1D7 ADC和化疗剂或放疗治疗的叠加作用的预期。优选地, 由癌症的缓解证实协同作用, 其中用158P1D7 ADC治疗或用158P1D7 ADC和化疗剂或放疗叠加联合治疗预期不能缓解癌症。

[0532] 使用158P1D7 ADC与化疗或放疗或其两者联合来抑制肿瘤细胞生长的方法包括158P1D7 ADC给予是在着手化疗或放疗之前、期间或之后以及其任何组合 (即着手化疗和/或放疗之前和期间、之前和之后、期间和之后, 或之前、期间和之后)。例如, 一般在着手放疗和/或化疗前1-60天, 优选3-40天, 更优选5-12天内给予158P1D7 ADC。然而, 根据治疗方案和特定患者需求, 以提供最有效治疗和最终延长患者生命的方式实施该方法。

[0533] 可以各种方法实现化疗剂的给药, 包括通过胃肠外和肠内途径的全身性给药。在一个实施方式中, 以单独的分子的形式给予158P1D7 ADC和化疗剂。化疗剂或化疗的具体示例包括: 顺铂、达卡巴嗪 (DTIC)、更生霉素、双氯乙基甲胺 (氮芥)、链脲菌素、环磷酰胺、卡莫司汀 (BCNU)、洛莫司汀 (CCNU)、多柔比星 (阿霉素)、柔红霉素、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊甙、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇 (红豆杉醇)、多西紫杉醇 (多西他赛)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、干扰素 $\alpha$ 、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链脲菌素、他莫昔芬、替尼泊甙、睾内酯、硫鸟嘌呤、噻替哌、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、吉西他滨、苯丁酸氮芥、红豆杉醇和其组合。

[0534] 与158P1D7 ADC联用的放射源可以在待治疗患者的外部或内部。当放射源在患者外部时, 该治疗称为外照射放疗 (external beam radiation therapy) (EBRT)。当放射源在患者内部时, 该治疗称为近程治疗 (BT)。

[0535] 上述治疗方案可进一步与其他癌症治疗剂和/或方案联用,例如额外的化疗、癌症疫苗、信号转导抑制剂、用于治疗异常细胞生长或癌症的试剂、抗体(例如,如W0/2005/092380所述的抗-CTLA-4抗体(辉瑞))或通过结合于IGF-1R抑制肿瘤生长的其它配体,和细胞因子。

[0536] 在哺乳动物经受额外化疗时,可使用上述化疗剂。另外,可使用生长因子抑制剂、生物响应调节剂、抗激素治疗、选择性雌激素受体调节剂(SERM)、血管生成抑制剂和抗雄激素。例如可使用抗激素,例如抗雌激素如诺瓦得士(他莫昔芬),或抗雄激素如康士得(4'-氰基-3-(4-氟苯基磺酰基)-2-羟基-2-甲基-3-'- (三氟甲基)地恩丙胺)。

[0537] 上述治疗方法可与多种外科手术、化疗或放疗方法中的任一种联用。本发明所述治疗方法可使化疗(或其它治疗)使用降低剂量和/或使用较低的频率给予,这对所有患者且特别是不能很好耐受化疗剂毒性的患者来说具有优势。

[0538] XVI.) 试剂盒/制品

[0539] 对于本文所述在实验室、预后、预防、诊断和治疗中的应用,试剂盒在本发明的范围之内。这类试剂盒可包含载体、包装或容器,其经区域化可容纳一个或多个容器例如小瓶、管等,每个容器包含一种用于本方法的单独元件,以及含有使用(例如本文所述的应用)说明的标签或插页。例如,容器可包含带可检测标记或能被可检测标记的抗体。试剂盒可包含含有药物单元的容器。该试剂盒可包括图2或图3中的所有或部分氨基酸序列或其类似物,或编码这些氨基酸序列的核酸分子。

[0540] 本发明试剂盒一般包含上述容器和一个或多个与其相关的容器,该容器包含从商业和使用者立场来看需要的物质,包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器;载体、包装、容器、小瓶和/或管,列出内含物和/或使用说明的标签,有使用说明的包装插页。

[0541] 标签可存在于容器上或和容器一起以指示组合物用于特定治疗或非治疗性应用,例如预后、预防、诊断或实验室应用,并且也可指示体内或体外使用(例如本文所述的应用)指南。指南和/或其它信息也可包括在和试剂盒一起或试剂盒上的说明书或标签中。该标签可在容器上或为该容器所附带。当形成标签的字母、数字或其它字符是模塑或蚀刻到容器本身中时,标签可在容器上;当容器存在容纳该容器的接收容器或载体中时,标签可与该容器附在一起,例如作为包装插页。所述标签可指示该组合物用于诊断、治疗、预防或预后病症,例如表I所示组织的癌症。

[0542] 术语“试剂盒”和“制品”可以同义使用。

[0543] 在本发明的另一个实施方式中,提供包含组合物(例如抗体或抗体药物偶联物(ADC))的制品,例如用于诊断、预后、预防和/或治疗组织癌症(如表I所示的那些)的物质。该制品通常包含至少一个容器和至少一个标签。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。该容器可由各种材料(如玻璃、金属或塑料)制成。该容器可容纳氨基酸序列、小分子、核酸序列、细胞群和/或抗体。在另一实施方式中,容器包含用于评估细胞和组织中158P1D7蛋白表达,或相关实验室、预后、诊断、预防和治疗目的的抗体、其结合片段或特异性结合蛋白;这类应用的指示和/或指南可置于容器上或和容器放在一起,用于该目的的试剂和其它组合物或工具也可如此。

[0544] 或者,该容器可容纳有效用于治疗、诊断、预后或预防病症的组合物并具有无菌进入端口(例如,该容器可以是具有被皮下注射针头刺穿的塞子的静脉输液袋或小瓶)。组合

物中的活性剂可以是能够特异性结合158P1D7的抗体或特异性结合158P1D7的抗体药物偶联物。

[0545] 该制品还可包括含有药学上可接受缓冲剂(如磷酸盐缓冲盐水、林格溶液和/或右旋糖溶液)的第二容器。还可包括从商业和使用者立场来看需要的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、搅拌物、针头、注射器和/或具有指示和/或使用说明的包装插页。

## 实施例

[0546] 通过以下几个实施例对本发明各方面做进一步说明和展示,这些实施例不旨在限制本发明范围。

### [0547] 实施例1

#### [0548] 158P1D7抗原

[0549] 使用本领域已知的抑制消减杂交(SSH)方法发现158P1D7基因序列。从消减正常膀胱cDNA的膀胱癌池中鉴定到223bp的158P1D7 SSH序列。从膀胱癌组织池中分离全长158P1D7 cDNA克隆。该cDNA的长度为2,555bp并编码841个氨基酸的ORF(参见图1)。该158P1D7基因显示与SLITRK6基因同源。对于进一步的参考,参见US 6,863,892(加利福尼亚州圣塔莫尼卡的艾更斯司公司(Agensys, Inc.))、US 7,358,353(加利福尼亚州圣塔莫尼卡的艾更斯司公司)和EP 1,311,675(加利福尼亚州圣塔莫尼卡的艾更斯司公司)。对于158P1D7抗原的示例性实施方式,参见图1。

### [0550] 实施例2

#### [0551] 158P1D7单克隆抗体(MAb)的制备

[0552] 在一个实施方式中,158P1D7和158P1D7变体的治疗性单克隆抗体(“MAb”)包括与每种蛋白特异性表位或变体之间共同序列特异性表位相互作用的那些抗体,该抗体能结合、内化、破坏或调节158P1D7或158P1D7变体的生物功能,例如那些能破坏与配体、底物和结合伴侣相互作用的抗体。用于产生这些MAb的免疫原包括设计成编码或含有胞外结构域或完整158P1D7蛋白序列、预测含有功能基序的区域和通过计算机分析氨基酸序列预测为具有抗原性的158P1D7蛋白变体区域的那些免疫原。免疫原包括肽和重组蛋白例如标签5-158P1D7(tag5-158P1D7),一种纯化的哺乳动物细胞衍生的带组氨酸标签的蛋白。另外,采用工程改造成高水平表达158P1D7的细胞(例如UMUC-158P1D7或3T3-158P1D7)来免疫小鼠。

[0553] 采用XenoMouse **technology**<sup>®</sup>(安进福利蒙特公司)生产抗158P1D7的MAb,其中鼠重链和κ轻链基因座已失活并插入了大部分人重链和κ轻链免疫球蛋白基因座。使用表达158P1D7的重组3T3细胞免疫生产人γ2的异种小鼠(XenoMice),从而生成称为Ha15-10ac12的MAb。

[0554] ELISA表明,该158P1D7 MAb Ha15-10ac12特异性结合表达158P1D7的细胞(重组和内源的)以及重组158P1D7蛋白。

[0555] 使用Trizol试剂(生命技术公司吉布可BRL(Life Technologies, Gibco BRL))从各杂交瘤细胞中分离mRNA后,确定158P1D7 MAb Ha15-10ac12的DNA编码序列。

[0556] 采用以下方案对来自杂交瘤细胞的抗158P1D7 Ha15-10ac12重链和轻链可变核酸序列进行测序。用Trizol试剂(生命技术公司吉布可BRL(Life Technologies, Gibco BRL))裂解分泌Ha15-10ac12的杂交瘤细胞。纯化并定量分析总RNA。通过吉布可-BRL

Superscript预扩增系统(Gibco-BRL Preamplification system)用寡(dT)12-18引物从总RNA中得到第一链cDNA。使用人免疫球蛋白可变重链引物和人免疫球蛋白可变轻链引物扩增第一链cDNA。对PCR产物测序并测定可变重链和轻链区。

[0557] 可变重链和轻链区的核酸和氨基酸序列在图2和图3中列出。Ha15-10ac12MAb与人Ig种系的比对示于图4A-4B。

[0558] 实施例3

[0559] 使用重组DNA方法表达Ha15-10ac12

[0560] 为在转染细胞中重组表达Ha15-10ac12 MA b,将Ha15-10ac12 MA b可变重链和轻链序列分别克隆到人重链IgG2和人轻链Ig $\kappa$ 恒定区的上游。将完整的Ha15-10ac12 MA b人重链和轻链盒克隆到克隆载体中CMV启动子/增强子的下游。聚腺苷酸位点包含在MA b编码序列下游。将重组的表达Ha15-10ac12 MA b的构建体转染至CHO-K1SV细胞中。通过流式细胞术评估分泌自重组CHO细胞的Ha15-10ac12相关MA b对细胞表面158P1D7的结合。使用来自杂交瘤或者来自使用Ha15-10ac12重链和轻链载体构建体转染的CHO细胞的Ha15-10ac12 MA b对UMUC-对照和UMUC-158P1D7细胞进行染色。通过流式细胞术检测结合。

[0561] 结果显示,CHO细胞中重组表达的Ha15-10ac12与158P1D7的结合类似于纯化自杂交瘤的Ha15-10ac12。还通过ELISA评估了分泌自重组细胞的Ha15-10ac12MA b对158P1D7重组蛋白的结合。在来源于CHO和来源于杂交瘤细胞的MA b材料之间,Ha15-10ac12与158P1D7蛋白的结合相同。

[0562] 生产称为Ha15-10ac12的抗体的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞在2012年7月25日(通过联邦快递)送至美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),弗吉尼亚州马那萨斯,邮政信箱1549,20108并指定登录号:PTA-13102。

[0563] 实施例4

[0564] Ha15-10ac12 Mab的抗体药物偶联物

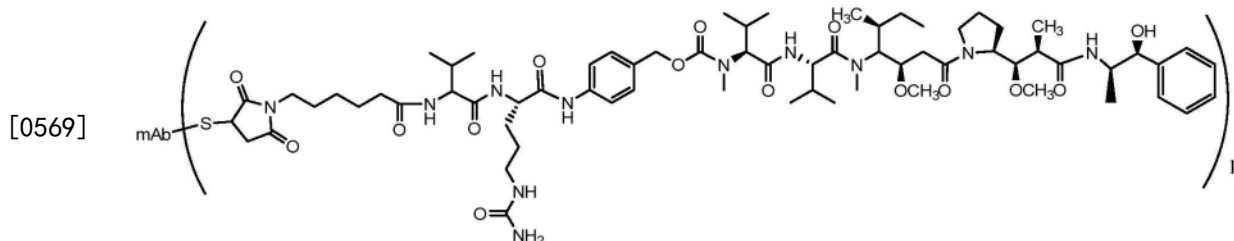
[0565] 使用以下方案,通过本文所述的vc(Val-Cit)接头将Ha15-10ac12 MA b(图2)与称为MMAE(式XI)的澳瑞他汀衍生物偶联,以产生本发明称为Ha15-10ac12vcMMAE的抗体药物偶联物(ADC)。通过使用表IV所示一般方法完成vc(Val-Cit)接头与MMAE(西雅图遗传学公司(Seattle Genetics, Inc.)华盛顿州西雅图)的偶联以产生细胞毒性vcMMAE(参见US/2006/0074008)。

[0566] 然后,使用以下方案制备本发明称为Ha15-10ac12vcMMAE的抗体药物偶联物(ADC)。

[0567] 简言之,制剂缓冲液(具有5%山梨糖醇的10mM乙酸盐pH 5.0)中的Ha15-10ac12 MA b对还原缓冲液(25mM硼酸钠,300mM氯化钠,pH为9.0 $\pm$ 0.1)进行缓冲交换。随后通过添加5mM EDTA和2.65摩尔当量的TCEP(相对于Ha15-10ac12 MA b的摩尔数)部分还原Ha15-10ac12 MA b。随后将该混合物在37 $^{\circ}$ C下搅拌三(3)小时。二硫化物还原后,将该混合物冷却至15-17 $^{\circ}$ C的目标温度并以4%(v/v)DMSO溶液的形式每摩尔添加五(5)药物当量的vcMMAE。60-75分钟后,对偶联开始时添加的每摩尔vcMMAE添加1摩尔量的N-乙酰-L-半胱氨酸,从而淬灭过量的未反应vc。15分钟后,使用浓缩的组氨酸pH 5.2缓冲储液将Ha15-10ac12vcMMAE调节至6.0-6.4的目标pH并通过0.5/0.2 $\mu$ m PES膜过滤以除去聚集的抗体药物偶联物。过滤后,立即进行切向流过滤以除去DMSO和淬灭的药物接头并将抗体药物偶联物交换至缓冲液

(含有5.5%脱水海藻糖(trehalose dehydrate)的20mM组氨酸(pH 6.0±0.1))中。切向过滤后,将Ha15-10ac12vcMMAE稀释至6±1mg/mL的终浓度并添加聚山梨酯20至0.01%的终浓度。

[0568] 所得抗体药物偶联物(ADC)命名为Ha15-10ac12vcMMAE并具有下式:



[0570] 其中,MAb是Ha15-10ac12(图2和图3),p是1-12。该实施例中抗体药物偶联物的优选的p值约为3.5-3.7。

[0571] 实施例5

[0572] Ha15-10ac12vcMMAE的表征

[0573] 使用实施例中题为“Ha15-10ac12 MAb的抗体药物偶联物”的方法来生成结合158P1D7的抗体药物偶联物,并使用本领域已知试验的组合对其进行筛选、鉴定和表征。

[0574] A. 通过FACS测定亲和性

[0575] 测试Ha15-10ac12vcMMAE与SW780细胞表面上表达的158P1D7的结合亲和性。简言之,将Ha15-10ac12vcMMAE的十一(11)种稀释溶液在6.67nM-0.0001nM的终浓度下与SW780细胞4℃孵育过夜(每孔50,000个细胞)。孵育结束时,洗涤细胞并与抗hIgG-PE检测抗体在4℃孵育45分钟。洗涤未结合的检测抗体后,通过FACS分析细胞。获得平均荧光强度(MFI)值并列于(表VI)中。将MFI值输入Graphpad Prism软件并采用一位点结合(双曲线)方程式 $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$ 分析以生成Ha15-10ac12vcMMAE饱和曲线,示于(图13)。B<sub>max</sub>是Ha15-10ac12vcMMAE最大程度结合158P1D7时的MFI值;K<sub>d</sub>表示Ha15-10ac12vcMMAE结合亲和性,其是达到半最大结合所需的Ha15-10ac12vcMMAE浓度。

[0576] Ha15-10ac12vcMMAE与SW780细胞表面上表达的158P1D7的计算出的亲和性(K<sub>d</sub>)是0.005nM。

[0577] B. FACS结合

[0578] 通过FACS测试Ha15-10ac12vcMMAE与UMUC、SW780和CHP-212细胞表面上表达的158P1D7的结合。简言之,收获细胞并以50000个细胞/孔的浓度并接种孔板。将Ha15-10ac12vcMMAE稀释至3μg/mL(用于UMUC和SW780细胞)或10μg/mL(用于CHP-212细胞)并与细胞孵育(4℃下1小时)。在孵育结束时,清洗细胞并将其与抗hIgG-PE检测抗体在4℃下孵育1小时。清洗掉未结合的检测抗体后,通过FACS分析细胞。获得了平均荧光强度(MFI)值(表VII)并显示了直方图(图14)。

[0579] 实施例6

[0580] Ha15-10ac12vcMMAE介导的体外细胞毒性

[0581] 使用人神经母细胞瘤CHP-212细胞系(其内源性表达SLITRK-6)和人卵巢癌细胞系IGROV-1(其不表达SLITRK-6)评估Ha15-10ac12vcMMAE介导SLITRK-6依赖型细胞毒性的能力。

[0582] 简言之,将CHP-212和IGROV-1细胞以1000个细胞/孔的浓度接种至96孔板上的50 $\mu$ l完全培养基中并在37摄氏度、5% CO<sub>2</sub>下置于组织培养箱中。第二天,在完全培养基中制备与vcMMAE偶联的Ha15-10ac12vcMMAE和同种型对照抗体的2x储液并向适当孔中添加50 $\mu$ l的ADC连续稀释物。细胞用与vcMMAE偶联的Ha15-10ac12vcMMAE和同种型对照抗体在37摄氏度、5% CO<sub>2</sub>的组织培养箱中处理六(6)天。在孵育结束时,向各孔中添加12 $\mu$ l的阿尔玛蓝(Alamar Blue)或普雷斯托蓝(Presto Blue)并孵育四(4)小时。使用540激发和590发射波长使用BioTek Synergy H4酶标仪读取平板。

[0583] 这些数据表明,名称为Ha15-10ac12vcMMAE的ADC能够选择性诱导对SLITRK-6表达型CHP-212细胞系的细胞毒性,而其无法诱导对不表达SLITRK-6的IGROV-1细胞系的细胞毒性。因此,这些结果显示,Ha15-10ac12vcMMAE可选择性地将细胞毒性药物递送至表达158P1D7的细胞并将其杀死(图15)。

[0584] 在另一个实验中,将表达SLITRK6 (Ha15-10ac12 MAbs和M15-68(2)18(也称作68(18)1.1,参见WO 2004/072263)MAbs的靶标)的人神经母细胞瘤细胞CHP-212与测试制剂Ha15-10ac12vcMMAE和M15-68(2)18孵育以显示这些物质的任意体外细胞杀伤(细胞毒性)活性。简言之,使用4000个CHP-212细胞/ml接种九十六(96)孔板并以九(9)个点从10,000ng/ml向下六(6)倍稀释至0.006ng/ml的稀释梯度加上0.0ng/ml的最终测试孔来添加测试抗体。对各孔一式三份进行实验。此外,对照抗体和对照细胞(IGROV-1)以相同方式进行实验以与测试物比较。使试验运行四(4)天,随后向各孔中添加普雷斯托蓝(对活细胞染色的颜料)以得到细胞活力的比色读取值。得到细胞活力的比色读取值。随后计算各孔中的细胞存活百分比并使用S形剂量反应的非线性拟合分析数据。使用Prism制图软件计算IC50值并将Ha15-10ac12vcMMAE的细胞毒性作用与M15-68(2)18和实验中使用的其他对照相比较。

[0585] 结果显示,与M15-68(2)18抗体和其他对照相比,Ha15-10ac12vcMMAE具有优良的体外细胞毒性(图11)。Ha15-10ac12vcMMAE的IC50为0.9076而不能计算M15-68(2)18的IC50。

#### [0586] 实施例7

##### [0587] Ha15-10ac12vcMMAE抑制体内肿瘤生长

[0588] 158P1D7在肿瘤组织细胞表面上显著表达而在正常组织中限制性表达,这使158P1D7成为抗体疗法和经由ACD的相似疗法的良好靶标。因此评价Ha15-10ac12vcMMAE在人膀胱癌、肺癌、乳腺癌和成胶质细胞瘤异种移植小鼠模型中的治疗功效。

[0589] 在小鼠癌症异种移植模型(例如皮下和原位)中研究抗体药物偶联物对肿瘤生长和转移形成的功效。

[0590] 将 $5 \times 10^4$ - $10^6$ 癌细胞以1:1稀释度与基质胶(Matrigel)(合作研究公司(Collaborative Research))混合,在雄性SCID小鼠右腋注射以形成皮下(s.c.)肿瘤。为测试ADC对肿瘤形成的功效,即在注射肿瘤细胞同一天开始注射ADC。作为对照,对小鼠注射纯化的人IgG或PBS;或识别人细胞中不表达的非相关抗原的纯化的MAb。在初步研究中,发现对照IgG或PBS对肿瘤生长的作用无差异。通过卡尺测量测定肿瘤尺寸,且以宽度<sup>2</sup>x长度/2计算肿瘤体积,其中宽度是最小尺寸且长度是最大尺寸。皮下肿瘤直径大于1.5cm时处死小鼠。

[0591] 异种移植癌症模型的优点是能研究新血管形成和血管生成。肿瘤生长部分依赖于



新血管发展。虽然毛细血管系统和正发展的血管网络来源于宿主,但新血管形成的引发和结构由异种移植肿瘤调节(Davidoff等,Clin Cancer Res. (2001) 7:2870;Solesvik等,Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20:1295)。根据本领域已知的方法研究抗体和小分子对新血管形成的作用,所述方法是例如对肿瘤组织和其周围微观环境进行IHC分析。

[0592] 158P1D7 ADC:

[0593] 如标题为“158P1D7单克隆抗体 (MAb) 的制备”的实施例所述生产抗158P1D7的单克隆抗体。如标题为“Ha15-10ac12 MAb的抗体药物偶联物”的实施例所述进一步将MAb与毒素偶联以形成Ha15-10ac12vcMMAE。通过FACS表征Ha15-10ac12vcMMAE并用本领域已知的其它方法测定其与158P1D7结合的能力。

[0594] 细胞系和异种移植:

[0595] 如本领域已知的那样,将细胞维持在补充有L-谷氨酰胺和10%FBS的DMEM中。在SCID小鼠中通过连续增殖维持AG-B7、RT-4-XCL和NCI-H322M-XCL异种移植。SW780和RT-4-XCL是细胞来源的膀胱癌细胞系,由A.T.C.C. (弗吉尼亚州玛纳萨斯) 获得。AG-B7和AG-B8是患者来源的异种移植,其来源于人膀胱癌试样。本领域技术人员应理解,对本发明的ADC在体内进行了多个实验。这部分是因为,即使在相同疾病病症中,各体内模型也会表现出本领域技术人员而言的某种水平的不可预测性。因此,本领域技术人员应理解,使用若干类型的体内模型使本领域技术人员能够更好地评估本发明的ADC。

[0596] 在SCID小鼠中皮下建立的人膀胱癌AG-B7异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的评估

[0597] 在该实验中,将人膀胱癌AG-B7细胞(每只小鼠 $5 \times 10^6$ 个细胞)注射至单个SCID小鼠的肋部并允许肿瘤在未治疗的情况下生长至其达到 $250\text{mm}^3$ 的大致体积。此时,使用研究主管软件(Study Director Software) (v.1.7;加利福尼亚州南旧金山的研究日志系统公司(Studylog Systems, Inc.))基于治疗开始时的肿瘤体积将动物分成各组以确保各组中具有类似的平均肿瘤尺寸和方差。所有ADC治疗的组都通过静脉推注注射接受 $10\text{mg/kg}$ 的单次剂量。使用卡尺测量每周两次监测各组中的肿瘤生长直至研究终点。使用针对分级数据的非参数方差分析(ANOVA)在全部各组都可获得数据的最终时间点处进行肿瘤体积的统计学分析。

[0598] 结果显示,与未治疗的对照相比,Ha15-10ac12vcMMAE显示强力的抑制作用( $p < 0.0001$ ) (图5)。

[0599] 在SCID小鼠中植入的皮下建立的人膀胱癌RT-4-XCL中

[0600] Ha15-10ac12vcMMAE的评估

[0601] 在另一个实验中,无菌收集人膀胱癌异种移植AG-B7原肿瘤并将其切碎至小片(约 $1\text{mm}^3$ )。将6个小片经皮下植入单个SCID小鼠肋部。当平均肿瘤体积达到 $100\text{mm}^3$ 的预定尺寸时,使用研究主管软件(v.1.7;加利福尼亚州南旧金山的研究日志系统公司)将动物随机分为ADC治疗组和未治疗对照组(见肿瘤体积图),其中各组具有类似的平均肿瘤尺寸和方差。所有ADC治疗组(包括两个对照ADC)都通过静脉推注注射接受 $5\text{mg/kg}$ 的单次剂量。使用卡尺测量每周两次监测各组中的肿瘤生长直至研究终点。使用针对分级数据的非参数方差分析(ANOVA)在全部各组都可获得数据的最终时间点处进行肿瘤体积的统计学分析。

[0602] 结果显示,与未治疗对照或相应的ADC对照H3-1.4.1.2vcMMAE相比,Ha15-10ac12vcMMAE都显示强力的肿瘤抑制作用(两种情况下都是 $p < 0.0001$ ) (图6)。

[0603] 在SCID小鼠中植入的皮下建立的人肺癌NCI-H322M-XCL中Ha15-10ac12vcMMAE的评估

[0604] 在另一个实验中,将人肺癌NCI-H322M-XCL细胞(每只小鼠 $2.5 \times 10^6$ 个细胞)注射至单个SCID小鼠的胁部并允许肿瘤在未治疗的情况下生长至其达到 $200\text{mm}^3$ 的大致体积。此时,使用研究主管软件(v.1.7;加利福尼亚州南旧金山的研究日志系统公司)基于治疗开始时的肿瘤体积将动物分成各组以确保各组中具有类似的平均肿瘤尺寸和方差。所有ADC组(包括两个对照ADC)都通过静脉推注注射每周两次给予 $3\text{mg/kg}$ 的剂量,共五次剂量。使用卡尺测量每周两次监测各组中的肿瘤生长直至研究终点。使用针对分级数据的非参数方差分析(ANOVA)在全部各组都可获得数据的最终时间点处进行肿瘤体积的统计学分析。

[0605] 结果显示,与载剂对照( $p < 0.0001$ )或相应的ADC对照Ha3-12bc1.1vcMMAE( $p = 0.0041$ )相比,Ha15-10ac12vcMMAE都显示强力的肿瘤抑制作用(图7)。

[0606] 在SCID小鼠中皮下建立的人膀胱癌AG-B7异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的功效

[0607] 在另一个实验中,无菌收集人膀胱癌异种移植植物AG-B7原肿瘤并将其切碎至小片(约 $1\text{mm}^3$ )。将五个小片经皮下植入单个SCID小鼠胁部。使肿瘤在无治疗情况下生长直到其体积达约 $200\text{mm}^3$ 。此时,使用研究主管软件(v.1.7;加利福尼亚州南旧金山的研究日志系统公司)基于治疗开始时的肿瘤体积将动物分成各组以确保各组中具有类似的平均肿瘤尺寸和方差。所有ADC组(包括两个对照ADC)都通过静脉推注注射每周两次给予 $0.5\text{mg/kg}$ 的剂量,共七次剂量。使用卡尺测量每周两次监测各组中的肿瘤生长直至研究终点。使用针对分级数据的非参数方差分析(ANOVA)在全部各组都可获得数据的最终时间点处进行肿瘤体积的统计学分析。

[0608] 结果显示,与载剂对照( $p < 0.0001$ )或相应的ADC对照Ha3-12abc1vcMMAE( $p < 0.0001$ )相比,杂交瘤中生成的Ha15-10ac12vcMMAE

[0609] (Ha15-10ac12.1vcMMAE)和CHO细胞中生成的Ha15-10ac12vcMMAE(Ha15-10ac12vcMMAE)都显示强力的肿瘤抑制作用(图8)。

[0610] 在SCID小鼠中皮下建立的人膀胱癌SW780异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的功效

[0611] 在另一个实验中,将人膀胱癌异种移植植物SW780细胞植入SCID小鼠的胁部并允许肿瘤生长直至其达到约 $200\text{mm}^3$ 的体积。此时,根据治疗起始时治疗体积将动物分成若干治疗组以确保各治疗组具有类似的平均肿瘤尺寸和方差。在研究主管软件(v.1.7;加利福尼亚州南旧金山的研究日志系统公司)的帮助下将小鼠分成治疗组以使尺寸匹配小鼠。在研究开始时,所有ADC组(包括两个对照ADC)都以 $1\text{mg/kg}$ 的剂量通过静脉推注注射进行给药。使用卡尺测量每周两次监测各组中的肿瘤生长直至研究终点。使用针对分级数据的非参数方差分析(ANOVA)在全部各组都可获得数据的最终时间点处进行肿瘤体积的统计学分析。

[0612] 结果显示,Ha15-10ac12vcMMAE的肿瘤抑制活性优于Ha15-10ac12 MAb。此外,可推断Ha15-10ac12 MAb没有肿瘤抑制作用,因为该治疗组中肿瘤的生长动力学遵循同种型对照抗体。此外,在 $1\text{mg/kg}$ 的单次剂量后,与同种型对照ADC相比,Ha15-10ac12vcMMAE显示统计学显著性生长抑制( $p < 0.001$ ) (图10)。

[0613] 在SCID小鼠中皮下建立的患者来源的人膀胱癌AG-B8异种模型中Ha15-10ac12vcMMAE的功效

[0614] 在另一个实验中,将患者来源的人膀胱癌AG-B8肿瘤碎片(tumor pieces)植入

SCID小鼠的肺部并允许肿瘤生长直至其达到约200mm<sup>3</sup>的体积。此时,根据治疗起始时治疗体积将动物分成若干治疗组以确保各治疗组具有类似的平均肿瘤尺寸和方差。在研究主管软件(v.1.7;加利福尼亚州南旧金山的研究日志系统公司)的帮助下将小鼠分成治疗组以使尺寸匹配小鼠。在研究开始(第零(0)天)时,所有ADC组(包括两个对照ADC)都以5mg/kg的剂量通过静脉推注注射进行给药。使用卡尺测量每周两次监测各组中的肿瘤生长直至研究终点。使用针对分级数据的非参数方差分析(ANOVA)在全部各组都可获得数据的最终时间点处进行肿瘤体积的统计学分析。

[0615] 结果显示,与未治疗对照( $p<0.0001$ )或其他相应ADC  $\gamma$ -2对照( $p<0.0001$ )相比,Ha15-10ac12vcMMAE都具有更好的肿瘤抑制活性。此外,与Ha15-10ac12mcMMAF相比,Ha15ac12vcMMAE还显示较好的统计学显著性作用( $p<0.0458$ ) (图12)。

#### [0616] 结论

[0617] 总之,图5-8和12显示,与对照ADC相比,命名为Ha15-10ac12vcMMAE的158P1D7 ADC显著抑制了表达158P1D7的肿瘤细胞的生长。因此,Ha15-10ac12vcMMAE可用于治疗目的以治疗和控制表I所示癌症。具体而言,这些结果显示,Ha15-10ac12vcMMAE对膀胱癌模型的多种类型都具有抑制作用,表明其特别治疗性有益于治疗膀胱癌。

#### [0618] 实施例8

##### [0619] 通过使用158P1D7 ADC治疗和诊断人癌的人临床试验

[0620] 根据本发明使用特异性结合158P1D7的158P1D7 ADC,并用于治疗某些肿瘤,优选示于表I的那些。关于每个所示情况,成功推行了两种临床方法。

[0621] I.) 辅助治疗:辅助治疗中,将158P1D7 ADC与化疗或抗肿瘤试剂和/或放疗或其组合联用来治疗患者。通过向标准一线和二线疗法加入158P1D7 ADC以标准方案治疗原发性癌靶标(例如表I所列的那些)。方案设计根据以下示例评估来解决有效性问题,所述示例包括但不限于:原发性肿瘤质量或转移病灶的减少、无进展存活的增加、总体存活、患者健康状况的改善、疾病稳定以及降低标准化疗和其它生物试剂标准剂量的能力。这些剂量减少能通过减少化疗或生物试剂的剂量有关毒性而允许额外和/或延长的治疗。在数种辅助临床试验中联用158P1D7 ADC与化疗或抗肿瘤试剂。

[0622] II.) 单一治疗:关于158P1D7 ADC在肿瘤单一治疗中的应用,向患者给予158P1D7 ADC而不给予化疗剂或抗肿瘤试剂。在一个实施方式中,在有广泛转移性疾病的末期癌症患者中开展临床单一治疗。方案设计根据以下示例评估来解决有效性问题,所述示例包括但不限于:原发性肿瘤质量或转移病灶的减少、无进展存活的增加、总体存活、患者健康状况的改善、疾病稳定以及降低标准化疗和其它生物试剂常用剂量的能力。

#### [0623] 剂量

[0624] 可调整剂量方案以提供最佳所需响应。例如,可给予单一推注剂量,可随时间给予分成数次的剂量或可如治疗情况的紧急性所示成比例降低或增加剂量。尤其有利的是配制成单位剂型的胃肠道外组合物以便于给药和剂量均一性。本文所用的剂量单位形式指作为单一剂量用于待治疗哺乳动物对象的物理离散单位,每个单位包含预定量的活性化合物,该预定量经计算能够产生与所需药物载体相关的所需治疗效果。本发明剂量单位形式的规格决定于并直接取决于(a)抗体和/或ADC的独特特性和可达到的具体治疗或预防作用,和(b)就治疗个体敏感性而言复合该活性化合物技术中固有的局限性。

[0625] 根据本发明所述联合给予158P1D7 ADC的治疗有效量的非限制性范围示例是约0.5至约10mg/kg、约1至约5mg/kg、至少1mg/kg、至少2mg/kg、至少3mg/kg或至少4mg/kg。其他示例性非限制性范围是例如约0.5至约5mg/kg,或例如约0.8至约5mg/kg,或例如约1至约7.5mg/kg。本发明的高剂量实施方式涉及超过10mg/kg的剂量。需要注意的是,剂量值可根据待缓解的病症类型和严重程度而变化,并可包括单次剂量或多次剂量。需要进一步理解,对于任何具体的对象,应当随着时间根据个体的需求以及给予或监督组合物给予的个人专业判断来调节具体给药方案,本文所列的剂量范围仅仅是示例性的,不意在对所要求权利的组合物的范围或实施方式构成限制。

[0626] 临床开发计划(Clinical Development Plan) (CDP)

[0627] CDP遵循并发展有关辅助治疗或单一治疗的158P1D7 ADC治疗。各试验最初证实重复剂量的安全性并其后确定其有效性。各试验是开放标记,其比较标准化疗与标准疗法加158P1D7 ADC。应理解,可与招募患者相关使用的一个非限制性标准是根据活检所测量的患者肿瘤中158P1D7表达水平。

[0628] 正如任何基于蛋白或抗体输注的治疗,安全性问题主要涉及(i) 细胞因子释放综合征,即高血压、发热、颤抖、寒战;(ii) 对该材料的免疫性应答的发展(即由患者对抗体治疗产生人抗体发展,或产生HAMA应答);和(iii) 对表达158P1D7的正常细胞的毒性。采用标准测试和随访以监控各种这类安全性问题。发现158P1D7 ADC对于人给药是安全的。

[0629] 实施例9

[0630] 通过IHC检测癌症患者试样中的158P1D7蛋白

[0631] 通过免疫组化测试来自(i) 膀胱癌、(ii) 乳腺癌、(iii) 肺癌和(iv) 成胶质细胞瘤患者的患者肿瘤试样中158P1D7蛋白的表达。简言之,将福尔马林固定、石蜡包埋的组织切成四(4)微米切片并装在载玻片上。将该切片脱蜡,再水合并用EZ-Retriever微波(生物基因公司(Biogenex),加利福尼亚州圣拉蒙)中用斯特拉(citra)抗原修复溶液(生物基因公司,加利福尼亚州圣拉蒙)在95℃处理15分钟。然后用3%的过氧化氢溶液处理该切片以灭活内源过氧化物酶活性。采用无血清蛋白封闭物(大科公司(Dako),加利福尼亚州卡朋特里亚)来抑制非特异性结合,然后将其与单克隆小鼠抗158P1D7抗体或同种型对照孵育。接着,采用Super Sensitive™聚合物-辣根过氧化物酶(HRP)检测系统处理该切片,该系统由以下步骤组成:先在Super Enhancer™试剂中孵育,之后用聚合物-HRP二抗偶联物(生物基因公司,加利福尼亚州圣拉蒙)孵育。然后使用DAB试剂盒(生物基因公司,加利福尼亚州圣拉蒙)对切片进行显影。使用苏木精进行核染色,并通过明场显微镜进行分析。使用158P1D7免疫活性抗体检测患者样品中由棕色染色指示的特异性染色。参见图9(A)、9(C)、9(E)和9(G)。相反地,对照抗体不对任何患者样品染色。参见图9(B)、9(D)、9(F)和9(H)。

[0632] 结果显示了患者膀胱癌、乳腺癌、肺癌和成胶质细胞瘤的肿瘤细胞中158P1D7的表达。这些结果显示,158P1D7在人癌中表达,并且针对该抗原的抗体和称为Ha15-10ac12vcMMAE的抗体药物偶联物可用于诊断和治疗目的。(图9)。

[0633] 本申请中通篇引用了各种网站数据内容、各种出版物、专利申请和专利。(网站可通过其统一资源定位符或URL、万维网上的地址来引用。)这些参考文献中每篇的公开内容通过引用全文纳入本文。

[0634] 本发明不局限于本文所述实施方式的范围,这些实施方式仅旨在说明本发明的单

独方面,任何功能等同形式也在本发明范围内。本文所述以外的对发明模型和方法的各种改良通过以上描述和教导对本领域技术人员显而易见,所述改良同样旨在落入本发明的范围内。可以实施此类改良或其它实施方式而不偏离本发明的真实范围和精神。

[0635] 表格

[0636] 表I:恶变时表达158P1D7的组织恶性胶质瘤

[0637] 肺

[0638] 膀胱

[0639] 乳腺表II:氨基酸缩写

[0640]

单字母	三字母	全称
F	Phe	苯丙氨酸
L	Leu	亮氨酸
S	Ser	丝氨酸
Y	Tyr	酪氨酸
C	Cys	半胱氨酸
W	Trp	色氨酸
P	Pro	脯氨酸
H	His	组氨酸
Q	Gln	谷氨酰胺
R	Arg	精氨酸
I	Ile	异亮氨酸
M	Met	甲硫氨酸
T	Thr	苏氨酸
N	Asn	天冬酰胺
K	Lys	亮氨酸
V	Val	缬氨酸
A	Ala	丙氨酸
D	Asp	天冬氨酸
E	Glu	谷氨酸
G	Gly	甘氨酸

[0641] 表III:氨基酸取代矩阵

[0642] 改自GCG软件9.0BLOSUM62氨基酸取代矩阵(模块取代矩阵)。值越高,相关天然蛋白中发现取代的可能性越大。

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
	4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
		9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
			6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
				5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
					6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
						6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
							8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
								4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
									5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
[0643]										4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
											5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
												6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
													7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
														5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
															5	-1	-1	-3	-3	-2	R
																4	1	-2	-3	-2	S
																	5	0	-2	-2	T
																		4	-3	-1	V
																			11	2	W
																				7	Y

[0644] 表IV.合成vcMMAE的一般方法

[0645] 其中:AA1=氨基酸1

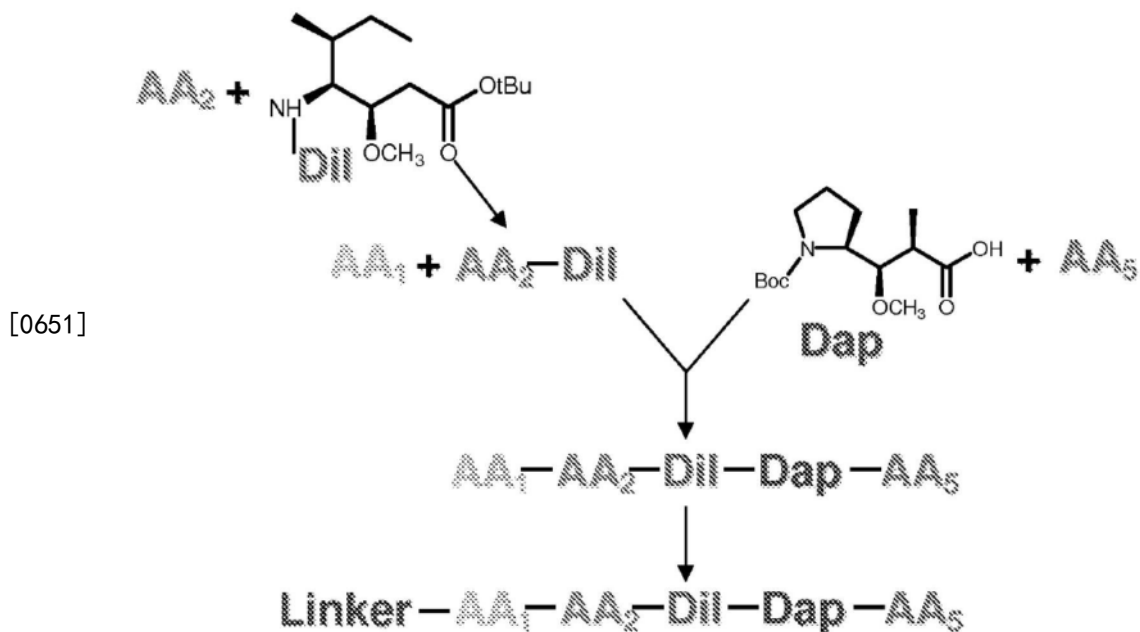
[0646] AA2=氨基酸2

[0647] AA5=氨基酸5

[0648] DIL=海兔异亮氨酸

[0649] DAP=海兔脯氨酸

[0650] 接头=Val-Cit(vc)



[0652] 表V. 分别由Kabat、Chothia和接触方案鉴定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3和CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的位置。对于CDR-H1,使用Kabat和Chothia编号方案列出了残基编号。

	<b>CDR</b>	<b>Kabat</b>	<b>Chothia</b>	<b>接触</b>																								
	CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36																								
	CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55																								
	CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96																								
[0653]	CDR-H1 (Kabat 编号 <sup>1)</sup> )	H31--H35B	H26--H32..34	H30--H35B																								
	CDR-H1 (Chothia 编号 <sup>2)</sup> )	H31--H35	H26--H32	H30--H35																								
	CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58																								
	CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101																								
[0654]	表VI.FACS试验中的平均荧光强度(MFI) 值																											
[0655]	<table><tr><td>nM</td><td>Ha15-10ac12vcMMAE</td></tr><tr><td>6.667</td><td>155.0</td></tr><tr><td>2.222</td><td>149.6</td></tr><tr><td>0.741</td><td>140.9</td></tr><tr><td>0.247</td><td>133.8</td></tr><tr><td>0.082</td><td>124.0</td></tr><tr><td>0.027</td><td>107.6</td></tr><tr><td>0.0091</td><td>87.0</td></tr><tr><td>0.0030</td><td>60.8</td></tr><tr><td>0.0010</td><td>25.7</td></tr><tr><td>0.0003</td><td>14.9</td></tr><tr><td>0.0001</td><td>4.3</td></tr></table>				nM	Ha15-10ac12vcMMAE	6.667	155.0	2.222	149.6	0.741	140.9	0.247	133.8	0.082	124.0	0.027	107.6	0.0091	87.0	0.0030	60.8	0.0010	25.7	0.0003	14.9	0.0001	4.3
nM	Ha15-10ac12vcMMAE																											
6.667	155.0																											
2.222	149.6																											
0.741	140.9																											
0.247	133.8																											
0.082	124.0																											
0.027	107.6																											
0.0091	87.0																											
0.0030	60.8																											
0.0010	25.7																											
0.0003	14.9																											
0.0001	4.3																											
[0656]	表VII.结合试验的Ha15-10ac12vcMMAE FACS MFA值																											
[0657]	<table><tr><td></td><td>UMUC-AGS15</td><td>SW780</td><td>CHP-212</td></tr><tr><td>MFI</td><td>115</td><td>159</td><td>142</td></tr></table>					UMUC-AGS15	SW780	CHP-212	MFI	115	159	142																
	UMUC-AGS15	SW780	CHP-212																									
MFI	115	159	142																									

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110> 艾更斯司股份有限公司	
[0003]	思进公司	
[0004]	<120> 结合158P1D7蛋白的抗体药物偶联物 (ADC)	
[0005]	<130> 14369-071-146	
[0006]	<140> CN 201911321333.3	
[0007]	<141> 2019-12-20	
[0008]	<150> CN 201380055601.6	
[0009]	<151> 2015-04-23	
[0010]	<150> PCT/US2013/056504	
[0011]	<151> 2013-08-23	
[0012]	<150> US 61/692,448	
[0013]	<151> 2012-08-23	
[0014]	<160> 10	
[0015]	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
[0016]	<210> 1	
[0017]	<211> 2555	
[0018]	<212> DNA	
[0019]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0020]	<220>	
[0021]	<221> CDS	
[0022]	<222> (23) ... (2548)	
[0023]	<220>	
[0024]	<221> misc_feature	
[0025]	<222> (1) ... (2555)	
[0026]	<223> 158P1D7	
[0027]	<400> 1	
[0028]	tcggatttca tcacatgaca ac atg aag ctg tgg att cat ctc ttt tat tca	52
[0029]	Met Lys Leu Trp Ile His Leu Phe Tyr Ser	
[0030]	1 5 10	
[0031]	tct ctc ctt gcc tgt ata tct tta cac tcc caa act cca gtg ctc tca	100
[0032]	Ser Leu Leu Ala Cys Ile Ser Leu His Ser Gln Thr Pro Val Leu Ser	
[0033]	15 20 25	
[0034]	tcc aga ggc tct tgt gat tct ctt tgc aat tgt gag gaa aaa gat ggc	148
[0035]	Ser Arg Gly Ser Cys Asp Ser Leu Cys Asn Cys Glu Glu Lys Asp Gly	
[0036]	30 35 40	
[0037]	aca atg cta ata aat tgt gaa gca aaa ggt atc aag atg gta tct gaa	196
[0038]	Thr Met Leu Ile Asn Cys Glu Ala Lys Gly Ile Lys Met Val Ser Glu	



[0039]	45	50	55	
[0040]	ata agt gtg cca cca tca cga cct ttc caa cta agc tta tta aat aac	244		
[0041]	Ile Ser Val Pro Pro Ser Arg Pro Phe Gln Leu Ser Leu Leu Asn Asn			
[0042]	60	65	70	
[0043]	ggc ttg acg atg ctt cac aca aat gac ttt tct ggg ctt acc aat gct	292		
[0044]	Gly Leu Thr Met Leu His Thr Asn Asp Phe Ser Gly Leu Thr Asn Ala			
[0045]	75	80	85	90
[0046]	att tca ata cac ctt gga ttt aac aat att gca gat att gag ata ggt	340		
[0047]	Ile Ser Ile His Leu Gly Phe Asn Asn Ile Ala Asp Ile Glu Ile Gly			
[0048]	95	100	105	
[0049]	gca ttt aat ggc ctt ggc ctc ctg aaa caa ctt cat atc aat cac aat	388		
[0050]	Ala Phe Asn Gly Leu Gly Leu Leu Lys Gln Leu His Ile Asn His Asn			
[0051]	110	115	120	
[0052]	tct tta gaa att ctt aaa gag gat act ttc cat gga ctg gaa aac ctg	436		
[0053]	Ser Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asp Thr Phe His Gly Leu Glu Asn Leu			
[0054]	125	130	135	
[0055]	gaa ttc ctg caa gca gat aac aat ttt atc aca gtg att gaa cca agt	484		
[0056]	Glu Phe Leu Gln Ala Asp Asn Asn Phe Ile Thr Val Ile Glu Pro Ser			
[0057]	140	145	150	
[0058]	gcc ttt agc aag ctc aac aga ctc aaa gtg tta att tta aat gac aat	532		
[0059]	Ala Phe Ser Lys Leu Asn Arg Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Asp Asn			
[0060]	155	160	165	170
[0061]	gct att gag agt ctt cct cca aac atc ttc cga ttt gtt cct tta acc	580		
[0062]	Ala Ile Glu Ser Leu Pro Pro Asn Ile Phe Arg Phe Val Pro Leu Thr			
[0063]	175	180	185	
[0064]	cat cta gat ctt cgt gga aat caa tta caa aca ttg cct tat gtt ggt	628		
[0065]	His Leu Asp Leu Arg Gly Asn Gln Leu Gln Thr Leu Pro Tyr Val Gly			
[0066]	190	195	200	
[0067]	ttt ctc gaa cac att ggc cga ata ttg gat ctt cag ttg gag gac aac	676		
[0068]	Phe Leu Glu His Ile Gly Arg Ile Leu Asp Leu Gln Leu Glu Asp Asn			
[0069]	205	210	215	
[0070]	aaa tgg gcc tgc aat tgt gac tta ttg cag tta aaa act tgg ttg gag	724		
[0071]	Lys Trp Ala Cys Asn Cys Asp Leu Leu Gln Leu Lys Thr Trp Leu Glu			
[0072]	220	225	230	
[0073]	aac atg cct cca cag tct ata att ggt gat gtt gtc tgc aac agc cct	772		
[0074]	Asn Met Pro Pro Gln Ser Ile Ile Gly Asp Val Val Cys Asn Ser Pro			
[0075]	235	240	245	250
[0076]	cca ttt ttt aaa gga agt ata ctc agt aga cta aag aag gaa tct att	820		
[0077]	Pro Phe Phe Lys Gly Ser Ile Leu Ser Arg Leu Lys Lys Glu Ser Ile			

[0078]		255		260		265	
[0079]	tgc cct act cca cca gtg tat gaa gaa cat gag gat cct tca gga tca						868
[0080]	Cys Pro Thr Pro Pro Val Tyr Glu Glu His Glu Asp Pro Ser Gly Ser						
[0081]		270		275		280	
[0082]	tta cat ctg gca gca aca tct tca ata aat gat agt cgc atg tca act						916
[0083]	Leu His Leu Ala Ala Thr Ser Ser Ile Asn Asp Ser Arg Met Ser Thr						
[0084]		285		290		295	
[0085]	aag acc acg tcc att cta aaa cta ccc acc aaa gca cca ggt ttg ata						964
[0086]	Lys Thr Thr Ser Ile Leu Lys Leu Pro Thr Lys Ala Pro Gly Leu Ile						
[0087]		300		305		310	
[0088]	cct tat att aca aag cca tcc act caa ctt cca gga cct tac tgc cct						1012
[0089]	Pro Tyr Ile Thr Lys Pro Ser Thr Gln Leu Pro Gly Pro Tyr Cys Pro						
[0090]		315		320		325	
[0091]	att cct tgt aac tgc aaa gtc cta tcc cca tca gga ctt cta ata cat						1060
[0092]	Ile Pro Cys Asn Cys Lys Val Leu Ser Pro Ser Gly Leu Leu Ile His						
[0093]		335		340		345	
[0094]	tgt cag gag cgc aac att gaa agc tta tca gat ctg aga cct cct ccg						1108
[0095]	Cys Gln Glu Arg Asn Ile Glu Ser Leu Ser Asp Leu Arg Pro Pro Pro						
[0096]		350		355		360	
[0097]	caa aat cct aga aag ctc att cta gcg gga aat att att cac agt tta						1156
[0098]	Gln Asn Pro Arg Lys Leu Ile Leu Ala Gly Asn Ile Ile His Ser Leu						
[0099]		365		370		375	
[0100]	atg aag tct gat cta gtg gaa tat ttc act ttg gaa atg ctt cac ttg						1204
[0101]	Met Lys Ser Asp Leu Val Glu Tyr Phe Thr Leu Glu Met Leu His Leu						
[0102]		380		385		390	
[0103]	gga aac aat cgt att gaa gtt ctt gaa gaa gga tcg ttt atg aac cta						1252
[0104]	Gly Asn Asn Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Gly Ser Phe Met Asn Leu						
[0105]		395		400		405	
[0106]	acg aga tta caa aaa ctc tat cta aat ggt aac cac ctg acc aaa tta						1300
[0107]	Thr Arg Leu Gln Lys Leu Tyr Leu Asn Gly Asn His Leu Thr Lys Leu						
[0108]		415		420		425	
[0109]	agt aaa ggc atg ttc ctt ggt ctc cat aat ctt gaa tac tta tat ctt						1348
[0110]	Ser Lys Gly Met Phe Leu Gly Leu His Asn Leu Glu Tyr Leu Tyr Leu						
[0111]		430		435		440	
[0112]	gaa tac aat gcc att aag gaa ata ctg cca gga acc ttt aat cca atg						1396
[0113]	Glu Tyr Asn Ala Ile Lys Glu Ile Leu Pro Gly Thr Phe Asn Pro Met						
[0114]		445		450		455	
[0115]	cct aaa ctt aaa gtc ctg tat tta aat aac aac ctc ctc caa gtt tta						1444
[0116]	Pro Lys Leu Lys Val Leu Tyr Leu Asn Asn Asn Leu Leu Gln Val Leu						

[0117]	460	465	470	
[0118]	cca cca cat att ttt tca ggg gtt cct cta act aag gta aat ctt aaa	1492		
[0119]	Pro Pro His Ile Phe Ser Gly Val Pro Leu Thr Lys Val Asn Leu Lys			
[0120]	475	480	485	490
[0121]	aca aac cag ttt acc cat cta cct gta agt aat att ttg gat gat ctt	1540		
[0122]	Thr Asn Gln Phe Thr His Leu Pro Val Ser Asn Ile Leu Asp Asp Leu			
[0123]		495	500	505
[0124]	gat tta cta acc cag att gac ctt gag gat aac ccc tgg gac tgc tcc	1588		
[0125]	Asp Leu Leu Thr Gln Ile Asp Leu Glu Asp Asn Pro Trp Asp Cys Ser			
[0126]		510	515	520
[0127]	tgt gac ctg gtt gga ctg cag caa tgg ata caa aag tta agc aag aac	1636		
[0128]	Cys Asp Leu Val Gly Leu Gln Gln Trp Ile Gln Lys Leu Ser Lys Asn			
[0129]		525	530	535
[0130]	aca gtg aca gat gac atc ctc tgc act tcc ccc ggg cat ctc gac aaa	1684		
[0131]	Thr Val Thr Asp Asp Ile Leu Cys Thr Ser Pro Gly His Leu Asp Lys			
[0132]		540	545	550
[0133]	aag gaa ttg aaa gcc cta aat agt gaa att ctc tgt cca ggt tta gta	1732		
[0134]	Lys Glu Leu Lys Ala Leu Asn Ser Glu Ile Leu Cys Pro Gly Leu Val			
[0135]	555	560	565	570
[0136]	aat aac cca tcc atg cca aca cag act agt tac ctt atg gtc acc act	1780		
[0137]	Asn Asn Pro Ser Met Pro Thr Gln Thr Ser Tyr Leu Met Val Thr Thr			
[0138]		575	580	585
[0139]	cct gca aca aca aca aat acg gct gat act att tta cga tct ctt acg	1828		
[0140]	Pro Ala Thr Thr Thr Asn Thr Ala Asp Thr Ile Leu Arg Ser Leu Thr			
[0141]		590	595	600
[0142]	gac gct gtg cca ctg tct gtt cta ata ttg gga ctt ctg att atg ttc	1876		
[0143]	Asp Ala Val Pro Leu Ser Val Leu Ile Leu Gly Leu Leu Ile Met Phe			
[0144]		605	610	615
[0145]	atc act att gtt ttc tgt gct gca ggg ata gtg gtt ctt gtt ctt cac	1924		
[0146]	Ile Thr Ile Val Phe Cys Ala Ala Gly Ile Val Val Leu Val Leu His			
[0147]		620	625	630
[0148]	cgc agg aga aga tac aaa aag aaa caa gta gat gag caa atg aga gac	1972		
[0149]	Arg Arg Arg Arg Tyr Lys Lys Lys Gln Val Asp Glu Gln Met Arg Asp			
[0150]	635	640	645	650
[0151]	aac agt cct gtg cat ctt cag tac agc atg tat ggc cat aaa acc act	2020		
[0152]	Asn Ser Pro Val His Leu Gln Tyr Ser Met Tyr Gly His Lys Thr Thr			
[0153]		655	660	665
[0154]	cat cac act act gaa aga ccc tct gcc tca ctc tat gaa cag cac atg	2068		
[0155]	His His Thr Thr Glu Arg Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Glu Gln His Met			

[0156]	670	675	680	
[0157]	gtg agc ccc atg gtt cat gtc tat aga agt cca tcc ttt ggt cca aag	2116		
[0158]	Val Ser Pro Met Val His Val Tyr Arg Ser Pro Ser Phe Gly Pro Lys			
[0159]	685	690	695	
[0160]	cat ctg gaa gag gaa gaa gag agg aat gag aaa gaa gga agt gat gca	2164		
[0161]	His Leu Glu Glu Glu Glu Glu Arg Asn Glu Lys Glu Gly Ser Asp Ala			
[0162]	700	705	710	
[0163]	aaa cat ctc caa aga agt ctt ttg gaa cag gaa aat cat tca cca ctc	2212		
[0164]	Lys His Leu Gln Arg Ser Leu Leu Glu Gln Glu Asn His Ser Pro Leu			
[0165]	715	720	725	730
[0166]	aca ggg tca aat atg aaa tac aaa acc acg aac caa tca aca gaa ttt	2260		
[0167]	Thr Gly Ser Asn Met Lys Tyr Lys Thr Thr Asn Gln Ser Thr Glu Phe			
[0168]	735	740	745	
[0169]	tta tcc ttc caa gat gcc agc tca ttg tac aga aac att tta gaa aaa	2308		
[0170]	Leu Ser Phe Gln Asp Ala Ser Ser Leu Tyr Arg Asn Ile Leu Glu Lys			
[0171]	750	755	760	
[0172]	gaa agg gaa ctt cag caa ctg gga atc aca gaa tac cta agg aaa aac	2356		
[0173]	Glu Arg Glu Leu Gln Gln Leu Gly Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Asn			
[0174]	765	770	775	
[0175]	att gct cag ctc cag cct gat atg gag gca cat tat cct gga gcc cac	2404		
[0176]	Ile Ala Gln Leu Gln Pro Asp Met Glu Ala His Tyr Pro Gly Ala His			
[0177]	780	785	790	
[0178]	gaa gag ctg aag tta atg gaa aca tta atg tac tca cgt cca agg aag	2452		
[0179]	Glu Glu Leu Lys Leu Met Glu Thr Leu Met Tyr Ser Arg Pro Arg Lys			
[0180]	795	800	805	810
[0181]	gta tta gtg gaa cag aca aaa aat gag tat ttt gaa ctt aaa gct aat	2500		
[0182]	Val Leu Val Glu Gln Thr Lys Asn Glu Tyr Phe Glu Leu Lys Ala Asn			
[0183]	815	820	825	
[0184]	tta cat gct gaa cct gac tat tta gaa gtc ctg gag cag caa aca tag	2548		
[0185]	Leu His Ala Glu Pro Asp Tyr Leu Glu Val Leu Glu Gln Gln Thr *			
[0186]	830	835	840	
[0187]	atggaga			2555
[0188]	<210> 2			
[0189]	<211> 841			
[0190]	<212> PRT			
[0191]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0192]	<220>			
[0193]	<221> misc_feature			
[0194]	<222> (1) ... (842)			

[0195]	<223>	158P1D7
[0196]	<400>	2
[0197]	Met Lys Leu Trp Ile His Leu Phe Tyr Ser Ser Leu Leu Ala Cys Ile	
[0198]	1 5 10 15	
[0199]	Ser Leu His Ser Gln Thr Pro Val Leu Ser Ser Arg Gly Ser Cys Asp	
[0200]	20 25 30	
[0201]	Ser Leu Cys Asn Cys Glu Glu Lys Asp Gly Thr Met Leu Ile Asn Cys	
[0202]	35 40 45	
[0203]	Glu Ala Lys Gly Ile Lys Met Val Ser Glu Ile Ser Val Pro Pro Ser	
[0204]	50 55 60	
[0205]	Arg Pro Phe Gln Leu Ser Leu Leu Asn Asn Gly Leu Thr Met Leu His	
[0206]	65 70 75 80	
[0207]	Thr Asn Asp Phe Ser Gly Leu Thr Asn Ala Ile Ser Ile His Leu Gly	
[0208]	85 90 95	
[0209]	Phe Asn Asn Ile Ala Asp Ile Glu Ile Gly Ala Phe Asn Gly Leu Gly	
[0210]	100 105 110	
[0211]	Leu Leu Lys Gln Leu His Ile Asn His Asn Ser Leu Glu Ile Leu Lys	
[0212]	115 120 125	
[0213]	Glu Asp Thr Phe His Gly Leu Glu Asn Leu Glu Phe Leu Gln Ala Asp	
[0214]	130 135 140	
[0215]	Asn Asn Phe Ile Thr Val Ile Glu Pro Ser Ala Phe Ser Lys Leu Asn	
[0216]	145 150 155 160	
[0217]	Arg Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Ile Glu Ser Leu Pro	
[0218]	165 170 175	
[0219]	Pro Asn Ile Phe Arg Phe Val Pro Leu Thr His Leu Asp Leu Arg Gly	
[0220]	180 185 190	
[0221]	Asn Gln Leu Gln Thr Leu Pro Tyr Val Gly Phe Leu Glu His Ile Gly	
[0222]	195 200 205	
[0223]	Arg Ile Leu Asp Leu Gln Leu Glu Asp Asn Lys Trp Ala Cys Asn Cys	
[0224]	210 215 220	
[0225]	Asp Leu Leu Gln Leu Lys Thr Trp Leu Glu Asn Met Pro Pro Gln Ser	
[0226]	225 230 235 240	
[0227]	Ile Ile Gly Asp Val Val Cys Asn Ser Pro Pro Phe Phe Lys Gly Ser	
[0228]	245 250 255	
[0229]	Ile Leu Ser Arg Leu Lys Lys Glu Ser Ile Cys Pro Thr Pro Pro Val	
[0230]	260 265 270	
[0231]	Tyr Glu Glu His Glu Asp Pro Ser Gly Ser Leu His Leu Ala Ala Thr	
[0232]	275 280 285	
[0233]	Ser Ser Ile Asn Asp Ser Arg Met Ser Thr Lys Thr Thr Ser Ile Leu	

[0234]	290	295	300
[0235]	Lys Leu Pro Thr Lys Ala Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Ile Thr Lys Pro		
[0236]	305	310	315
[0237]	Ser Thr Gln Leu Pro Gly Pro Tyr Cys Pro Ile Pro Cys Asn Cys Lys		
[0238]	325	330	335
[0239]	Val Leu Ser Pro Ser Gly Leu Leu Ile His Cys Gln Glu Arg Asn Ile		
[0240]	340	345	350
[0241]	Glu Ser Leu Ser Asp Leu Arg Pro Pro Pro Gln Asn Pro Arg Lys Leu		
[0242]	355	360	365
[0243]	Ile Leu Ala Gly Asn Ile Ile His Ser Leu Met Lys Ser Asp Leu Val		
[0244]	370	375	380
[0245]	Glu Tyr Phe Thr Leu Glu Met Leu His Leu Gly Asn Asn Arg Ile Glu		
[0246]	385	390	395
[0247]	Val Leu Glu Glu Gly Ser Phe Met Asn Leu Thr Arg Leu Gln Lys Leu		
[0248]	405	410	415
[0249]	Tyr Leu Asn Gly Asn His Leu Thr Lys Leu Ser Lys Gly Met Phe Leu		
[0250]	420	425	430
[0251]	Gly Leu His Asn Leu Glu Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Asn Ala Ile Lys		
[0252]	435	440	445
[0253]	Glu Ile Leu Pro Gly Thr Phe Asn Pro Met Pro Lys Leu Lys Val Leu		
[0254]	450	455	460
[0255]	Tyr Leu Asn Asn Asn Leu Leu Gln Val Leu Pro Pro His Ile Phe Ser		
[0256]	465	470	475
[0257]	Gly Val Pro Leu Thr Lys Val Asn Leu Lys Thr Asn Gln Phe Thr His		
[0258]	485	490	495
[0259]	Leu Pro Val Ser Asn Ile Leu Asp Asp Leu Asp Leu Leu Thr Gln Ile		
[0260]	500	505	510
[0261]	Asp Leu Glu Asp Asn Pro Trp Asp Cys Ser Cys Asp Leu Val Gly Leu		
[0262]	515	520	525
[0263]	Gln Gln Trp Ile Gln Lys Leu Ser Lys Asn Thr Val Thr Asp Asp Ile		
[0264]	530	535	540
[0265]	Leu Cys Thr Ser Pro Gly His Leu Asp Lys Lys Glu Leu Lys Ala Leu		
[0266]	545	550	555
[0267]	Asn Ser Glu Ile Leu Cys Pro Gly Leu Val Asn Asn Pro Ser Met Pro		
[0268]	565	570	575
[0269]	Thr Gln Thr Ser Tyr Leu Met Val Thr Thr Pro Ala Thr Thr Thr Asn		
[0270]	580	585	590
[0271]	Thr Ala Asp Thr Ile Leu Arg Ser Leu Thr Asp Ala Val Pro Leu Ser		
[0272]	595	600	605

[0273]	Val Leu Ile Leu Gly Leu Leu Ile Met Phe Ile Thr Ile Val Phe Cys
[0274]	610 615 620
[0275]	Ala Ala Gly Ile Val Val Leu Val Leu His Arg Arg Arg Arg Tyr Lys
[0276]	625 630 635 640
[0277]	Lys Lys Gln Val Asp Glu Gln Met Arg Asp Asn Ser Pro Val His Leu
[0278]	645 650 655
[0279]	Gln Tyr Ser Met Tyr Gly His Lys Thr Thr His His Thr Thr Glu Arg
[0280]	660 665 670
[0281]	Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Glu Gln His Met Val Ser Pro Met Val His
[0282]	675 680 685
[0283]	Val Tyr Arg Ser Pro Ser Phe Gly Pro Lys His Leu Glu Glu Glu Glu
[0284]	690 695 700
[0285]	Glu Arg Asn Glu Lys Glu Gly Ser Asp Ala Lys His Leu Gln Arg Ser
[0286]	705 710 715 720
[0287]	Leu Leu Glu Gln Glu Asn His Ser Pro Leu Thr Gly Ser Asn Met Lys
[0288]	725 730 735
[0289]	Tyr Lys Thr Thr Asn Gln Ser Thr Glu Phe Leu Ser Phe Gln Asp Ala
[0290]	740 745 750
[0291]	Ser Ser Leu Tyr Arg Asn Ile Leu Glu Lys Glu Arg Glu Leu Gln Gln
[0292]	755 760 765
[0293]	Leu Gly Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Asn Ile Ala Gln Leu Gln Pro
[0294]	770 775 780
[0295]	Asp Met Glu Ala His Tyr Pro Gly Ala His Glu Glu Leu Lys Leu Met
[0296]	785 790 795 800
[0297]	Glu Thr Leu Met Tyr Ser Arg Pro Arg Lys Val Leu Val Glu Gln Thr
[0298]	805 810 815
[0299]	Lys Asn Glu Tyr Phe Glu Leu Lys Ala Asn Leu His Ala Glu Pro Asp
[0300]	820 825 830
[0301]	Tyr Leu Glu Val Leu Glu Gln Gln Thr
[0302]	835 840
[0303]	<210> 3
[0304]	<211> 1341
[0305]	<212> DNA
[0306]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0307]	<220>
[0308]	<221> CDS
[0309]	<222> (1) ... (1341)
[0310]	<220>
[0311]	<221> misc_feature

[0312]	<222> (1) ... (1341)	
[0313]	<223> Ha15-10ac12重链	
[0314]	<220>	
[0315]	<221> misc_feature	
[0316]	<222> (1) ... (360)	
[0317]	<223> 重链可变区	
[0318]	<220>	
[0319]	<221> misc_feature	
[0320]	<222> (361) ... (1341)	
[0321]	<223> 重链人IgG2恒定区	
[0322]	<400> 3	
[0323]	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
[0324]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
[0325]	1 5 10 15	
[0326]	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat	96
[0327]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0328]	20 25 30	
[0329]	ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gaa tgg gtg	144
[0330]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0331]	35 40 45	
[0332]	gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat caa tat tat gca gac tcc gtg	192
[0333]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0334]	50 55 60	
[0335]	aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt	240
[0336]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe	
[0337]	65 70 75 80	
[0338]	ctg caa atg cac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
[0339]	Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0340]	85 90 95	
[0341]	gcg aga ggt ctg act tct gga cgg tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa	336
[0342]	Ala Arg Gly Leu Thr Ser Gly Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln	
[0343]	100 105 110	
[0344]	ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc	384
[0345]	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
[0346]	115 120 125	
[0347]	ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc acc tcc gag agc aca gcg gcc	432
[0348]	Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala	
[0349]	130 135 140	
[0350]	ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg	480



[0351]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	
[0352]	145 150 155 160	
[0353]	tgg aac tca ggc gct ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc cca gct gtc	528
[0354]	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	
[0355]	165 170 175	
[0356]	cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc	576
[0357]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	
[0358]	180 185 190	
[0359]	tcc agc aac ttc ggc acc cag acc tac acc tgc aac gta gat cac aag	624
[0360]	Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys	
[0361]	195 200 205	
[0362]	ccc agc aac acc aag gtg gac aag aca gtt gag cgc aaa tgt tgt gtc	672
[0363]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val	
[0364]	210 215 220	
[0365]	gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga ccg tca gtc ttc	720
[0366]	Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe	
[0367]	225 230 235 240	
[0368]	ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct	768
[0369]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	
[0370]	245 250 255	
[0371]	gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac ccc gag gtc	816
[0372]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	
[0373]	260 265 270	
[0374]	cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	864
[0375]	Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
[0376]	275 280 285	
[0377]	aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc	912
[0378]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val	
[0379]	290 295 300	
[0380]	ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc	960
[0381]	Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
[0382]	305 310 315 320	
[0383]	aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	1008
[0384]	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
[0385]	325 330 335	
[0386]	aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	1056
[0387]	Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
[0388]	340 345 350	
[0389]	tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc	1104

[0390]	Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
[0391]	355	360 365
[0392]	aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg	1152
[0393]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	
[0394]	370	375 380
[0395]	cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac	1200
[0396]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp	
[0397]	385	390 395 400
[0398]	ggc tcc ttc ttc ctt tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg	1248
[0399]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp	
[0400]	405	410 415
[0401]	cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac	1296
[0402]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	
[0403]	420	425 430
[0404]	aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa	1341
[0405]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *	
[0406]	435	440 445
[0407]	<210> 4	
[0408]	<211> 446	
[0409]	<212> PRT	
[0410]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0411]	<220>	
[0412]	<221> 链	
[0413]	<222> (1) ... (446)	
[0414]	<223> Ha15-10ac12重链	
[0415]	<400> 4	
[0416]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
[0417]	1	5 10 15
[0418]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0419]	20	25 30
[0420]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0421]	35	40 45
[0422]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0423]	50	55 60
[0424]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe	
[0425]	65	70 75 80
[0426]	Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0427]	85	90 95
[0428]	Ala Arg Gly Leu Thr Ser Gly Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln	

[0429]																
				100				105					110			
[0430]	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
[0431]				115				120					125			
[0432]	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
[0433]				130				135					140			
[0434]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
[0435]				145				150					155			160
[0436]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
[0437]					165					170					175	
[0438]	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
[0439]				180					185					190		
[0440]	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
[0441]				195					200					205		
[0442]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val
[0443]				210					215					220		
[0444]	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
[0445]				225					230				235			240
[0446]	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
[0447]					245					250					255	
[0448]	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
[0449]				260						265					270	
[0450]	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
[0451]				275					280					285		
[0452]	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val
[0453]				290					295					300		
[0454]	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
[0455]				305					310				315			320
[0456]	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
[0457]					325					330					335	
[0458]	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
[0459]				340						345					350	
[0460]	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
[0461]				355					360						365	
[0462]	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
[0463]				370					375					380		
[0464]	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp
[0465]				385						390			395			400
[0466]	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
[0467]					405					410					415	

[0468]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	
[0469]	420	425 430
[0470]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
[0471]	435	440 445
[0472]	<210> 5	
[0473]	<211> 660	
[0474]	<212> DNA	
[0475]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0476]	<220>	
[0477]	<221> CDS	
[0478]	<222> (1) ... (660)	
[0479]	<220>	
[0480]	<221> misc_feature	
[0481]	<222> (1) ... (660)	
[0482]	<223> Ha15-10ac12轻链	
[0483]	<220>	
[0484]	<221> misc_feature	
[0485]	<222> (1) ... (339)	
[0486]	<223> 轻链可变区	
[0487]	<220>	
[0488]	<221> misc_feature	
[0489]	<222> (340) ... (660)	
[0490]	<223> 人kappa恒定区	
[0491]	<400> 5	
[0492]	gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga	48
[0493]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[0494]	1 5 10 15	
[0495]	gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg ctt agt	96
[0496]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser	
[0497]	20 25 30	
[0498]	cat gga ttc aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct	144
[0499]	His Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
[0500]	35 40 45	
[0501]	cca caa ctc ctg atc tat ttg ggt tct agt cgg gcc tcc ggg gtc cct	192
[0502]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro	
[0503]	50 55 60	
[0504]	gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc	240
[0505]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
[0506]	65 70 75 80	

[0507]	agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg ctt tat tac tgc atg caa ccc	288
[0508]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Pro	
[0509]	85 90 95	
[0510]	cta caa att ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	336
[0511]	Leu Gln Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[0512]	100 105 110	
[0513]	cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	384
[0514]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
[0515]	115 120 125	
[0516]	cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	432
[0517]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
[0518]	130 135 140	
[0519]	tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	480
[0520]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
[0521]	145 150 155 160	
[0522]	tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	528
[0523]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
[0524]	165 170 175	
[0525]	acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	576
[0526]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
[0527]	180 185 190	
[0528]	aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg	624
[0529]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
[0530]	195 200 205	
[0531]	ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag	660
[0532]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *	
[0533]	210 215	
[0534]	<210> 6	
[0535]	<211> 219	
[0536]	<212> PRT	
[0537]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0538]	<220>	
[0539]	<221> 链	
[0540]	<222> (1) ... (219)	
[0541]	<223> Ha15-10ac12轻链	
[0542]	<400> 6	
[0543]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
[0544]	1 5 10 15	
[0545]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser	

[0546]	20	25	30
[0547]	His Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
[0548]	35	40	45
[0549]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro		
[0550]	50	55	60
[0551]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0552]	65	70	75
[0553]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Pro		
[0554]	85	90	95
[0555]	Leu Gln Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0556]	100	105	110
[0557]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0558]	115	120	125
[0559]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0560]	130	135	140
[0561]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0562]	145	150	155
[0563]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0564]	165	170	175
[0565]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0566]	180	185	190
[0567]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0568]	195	200	205
[0569]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0570]	210	215	
[0571]	<210> 7		
[0572]	<211> 446		
[0573]	<212> PRT		
[0574]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0575]	<220>		
[0576]	<221> CHAIN		
[0577]	<222> (1) ... (446)		
[0578]	<223> Ha15-10ac12重链		
[0579]	<220>		
[0580]	<221> SITE		
[0581]	<222> (1) ... (120)		
[0582]	<223> 重链可变区		
[0583]	<220>		
[0584]	<221> SITE		

[0585]	<222> (121) ... (446)																		
[0586]	<223> 人IgG2恒定区																		
[0587]	<400> 7																		
[0588]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg			
[0589]	1				5					10					15				
[0590]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
[0591]				20					25					30					
[0592]	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
[0593]			35					40					45						
[0594]	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Gln	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
[0595]		50					55				60								
[0596]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe			
[0597]	65					70				75					80				
[0598]	Leu	Gln	Met	His	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[0599]				85					90					95					
[0600]	Ala	Arg	Gly	Leu	Thr	Ser	Gly	Arg	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln			
[0601]				100					105					110					
[0602]	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val			
[0603]			115					120					125						
[0604]	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala			
[0605]		130					135				140								
[0606]	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser			
[0607]	145					150				155				160					
[0608]	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val			
[0609]				165					170					175					
[0610]	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro			
[0611]			180						185					190					
[0612]	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys			
[0613]			195					200					205						
[0614]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val			
[0615]		210					215				220								
[0616]	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe			
[0617]	225					230				235					240				
[0618]	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro			
[0619]				245					250					255					
[0620]	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val			
[0621]			260					265					270						
[0622]	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr			
[0623]			275					280					285						

[0624]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
[0625]	290 295 300
[0626]	Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
[0627]	305 310 315 320
[0628]	Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
[0629]	325 330 335
[0630]	Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
[0631]	340 345 350
[0632]	Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
[0633]	355 360 365
[0634]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
[0635]	370 375 380
[0636]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
[0637]	385 390 395 400
[0638]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
[0639]	405 410 415
[0640]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
[0641]	420 425 430
[0642]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0643]	435 440 445
[0644]	<210> 8
[0645]	<211> 219
[0646]	<212> PRT
[0647]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0648]	<220>
[0649]	<221> 链
[0650]	<222> (1) ... (219)
[0651]	<223> Ha15-10ac12轻链
[0652]	<220>
[0653]	<221> 位点
[0654]	<222> (1) ... (113)
[0655]	<223> 轻链可变区
[0656]	<220>
[0657]	<221> 位点
[0658]	<222> (114) ... (219)
[0659]	<223> 人kappa恒定区
[0660]	<400> 8
[0661]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
[0662]	1 5 10 15



[0663]	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser
[0664]	20 25 30
[0665]	His Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0666]	35 40 45
[0667]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
[0668]	50 55 60
[0669]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0670]	65 70 75 80
[0671]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Pro
[0672]	85 90 95
[0673]	Leu Gln Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0674]	100 105 110
[0675]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0676]	115 120 125
[0677]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0678]	130 135 140
[0679]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0680]	145 150 155 160
[0681]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0682]	165 170 175
[0683]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0684]	180 185 190
[0685]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0686]	195 200 205
[0687]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0688]	210 215
[0689]	<210> 9
[0690]	<211> 4
[0691]	<212> PRT
[0692]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0693]	<220>
[0694]	<223> 合成的构建体
[0695]	<220>
[0696]	<221> misc_feature
[0697]	<222> (1) ... (4)
[0698]	<223> 肽酰接头
[0699]	<400> 9
[0700]	Gly Phe Leu Gly
[0701]	1

[0702] <210> 10  
 [0703] <211> 100  
 [0704] <212> PRT  
 [0705] <213> 智人(Homo sapiens)  
 [0706] <220>  
 [0707] <221> 结构域  
 [0708] <222> (1) ... (100)  
 [0709] <223> IGKV2D-28\*01  
 [0710] <400> 10  
 [0711] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 [0712] 1 5 10 15  
 [0713] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 [0714] 20 25 30  
 [0715] Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 [0716] 35 40 45  
 [0717] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 [0718] 50 55 60  
 [0719] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 [0720] 65 70 75 80  
 [0721] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 [0722] 85 90 95  
 [0723] Leu Gln Thr Pro  
 [0724] 100

1 M K L W I H L E Y S S L L  
1 tgggattttcatcacatgacacacATGAAGCTGTGGATTGATCTCTTTTATTTCATCTCTGCT  
14 A C I S L H S Q T P V L S S R G S C D S  
61 TGCCTGTATATCTTTACACTCCCAAACTCCASTGCTCTCATCCASAGGCTCTTGTGATTC  
34 L C N C E E K D S T M L I N C E A K G I  
121 TCTTTGCAATTGTGAGGAAAAGATGGCACAATGCTAATAAATTGTGAAGCAAAAGGTAT  
54 K M V S E I S V P P S R P P Q L S L L N  
181 CAAGATGGTATCTGAAATAAGTGTGCCACCATCAGACCTTTCCAACTAAGCTTATTAAA  
74 N E L T M L H T N D F S G L T N A I S I  
241 TAACGGCTTGACGATGCTTCACACAAATGACTTTTCTGGGCTTACCAATGCTATTTCAAT  
94 H L G F N N I A D I E I G A F N G L G L  
301 ACACCTTGGATTTAACAATATTGCAGATATTGAGATAGGTGCATTTAATGGCCTTGGCCT  
114 L K Q L H I N H N S L E I L K E D T F H  
361 CCTGAAACAACCTTCATATCAATCACAATTCTTTAGAAATTCTTAAAGAGGATACTTTCCA  
134 G L E N L E F L Q A D N N F I T V I E P  
421 TGGACTGGAAAACCTGGAAATCCTGCAAGCAGATAACAATTTATCACAGTGATTGAACC  
154 S A F S K L N R L K V L I L N D N A I E  
481 AAGTGCTTTTAGCAAGCTCAACAGACTCAAGTGTTAATTTTAAATGACAATGCTATTGA  
174 S L P P N I F R E V P L T H L D L R G N  
541 GAGTCTTCCTCCAAACATCTCCGATTGTGTCCTTTAACCCATCTAGATCTTCGTGGAAA  
194 Q L Q T L P Y V G F L E H I G R I L D L  
601 TCAATTACAAACATTGCCTTATGTTGGTTTTCTCGAACACATTGGCCGAATATTGGATCT  
214 Q L E D N K W A C N C D L L Q L K T W L  
661 TCAGTTGGAGGACAACAATGGGCCTGCAATTGTGACTTATTGCAGTTAAAAACTTGGTT  
234 E N M P P Q S I I G D V V E N S P P F F  
721 GGAGAACATGCCTCCACAGTCTATAAATTGGTGATGTTGTCTGCAACAGCCCTCCATTTT  
254 H G S I L S R L K K E S I C F T P P V Y  
781 TAAAGGAAGTATACTCAGTAGACTAAAGAAGGAATCTATTGCCCCTACTCCACCAGTGTA  
274 E E H E O P S G S L H L A A T S S I N E  
841 TGAAGAACATGAGGATCCTTCAGGATCATTACATCTGGCAGCAACATCTTCAATAAATGA  
294 S R M S T K T T S I L K L P T K A P G L  
901 TAGTCGCATGTCAACTAAGACCACGTCCATTCTAAAACCTACCCACCAAGCACCAGGTTT

图1

314 I P Y I T R P S T Q L P G P Y C P I P C  
961 GATACCTTATATTACAAAGCCATCCACTCAACTTCCAGGACCTTACTGCCCTATTCCTTG  
334 N C K V L S P S G L L I H C Q E R N I E  
1021 TAACTGCAAGTCTTATCCCCATCAGGACTTCTAATACATTGTCAGGAGCGCAACATTGA  
354 S L S D L R P P P Q N P R R L I L A G N  
1081 AAGCTTATCAGATCTGAGACCTCCTCCGCAAAATCCTAGAAAGTTCATTCTAGCGGGA  
374 I I H S L M K S D L V E Y F T L E M L H  
1141 TATTATTCACAGTTTAAATGAAGTCTGATCTACTGGAATATTTCACTTTGGAAATCCTTCA  
394 L G N N R I E V L E E G S F M N L T R L  
1201 CTTGGGAAACAATCGTATTGAAGTTCTTGAAGAAGGATCGTTTATGAACCTAACGAGATT  
414 Q K L Y L N G N H L T K L S R G M F L G  
1261 ACAAAAACCTCTATCTAAATGGTAACCACCTGACCRAATTAAGTAAAGGCATGTTCCCTTGG  
434 L H N L E Y L Y L E Y N A I K E I L P G  
1321 TCTCCATAATCTTGAATACCTATATCTTGAATACAATGCCATTAAGGAAATACTGCCAGG  
454 T F N P M P K L K V L Y L N N N L L Q V  
1381 AACCTTTAATCCAATGCCTAAACTTAAAGTCTGTATTTAAATAACAACCTCCTCCAAGT  
474 L P P H I F S G V P L T K V N L K T N Q  
1441 TTTACCACCACATATTTTTTCAGGGGTTCTCTAACTAAGGTAAATCTTAAACAAACCA  
494 F T H L P V S N I L D D D L L T Q I D  
1501 GTTTACCCATCTACCTGTAAGTAATATTTTGGATGATCTTGATTTACTAACCCAGATTGA  
514 L E D N P W D C S C D L V S L Q Q W I Q  
1561 CCTTGAGGATAACCCCTGGGACTGCTCCTGTGACCTGGTTGGACTGCAGCAATGGATACA  
534 K L S K N T V T D D I L C T S P G H L D  
1621 AAAGTTAAGCAAGAACACAGTGACAGATGACATCCTCTGCACCTTCCCCCGGGCATCTCGA  
554 K K E L K A L N S E I L C P G L V N N P  
1681 CAAAAAGGAATTGAAGCCCTAAATAGTGAAATTCTCTGTCCAGGTTTAGTAAATAACCC  
574 S M P T Q T S Y L M V T T P A T T T N T  
1741 ATCCATGCCAACACAGACTAGTTACCTTATGGTCACCACTCCTGCRACAACAACAAATAC  
594 A D T I L R S L T D A V P L S V L I L G  
1801 GGCTGATACTATTTTACGATCTCTTACGGACGCTGTGCCACTGTCTGTTCTAATATTGGG  
614 L L I M F I T I V F C A A G I V V L V I  
1861 ACTTCTGATTATGTTTCATCACTATTGTTTTCTGTGCTGCAAGGATAGTGGTTCTTGTCT  
634 H R R R R Y K K K Q V D E Q M R D N S P  
1921 TCACCGCAGGAGAAGATACAAAAAGAAACAAGTAGATGAGCAAATGAGAGACAACAGTCC  
654 V H L Q Y S M Y G H K T T H H T T E R P  
1981 TGTGCATCTTCACTACAGCATGTATGGCCATAAAACCACTCATCACACTACTGAAAGACC  
674 S A S L Y E Q H M V S P M V H V Y R S P

图1(续)

2041 CTCTGCCTCACTCTATGAACAGCAGCATGGTGAGCCCCATGGTTTCATGTCTATAGAAGTCC  
694 S F G P K H L E E E E E R N E K E G S D  
2101 ATCCCTTTGGTCCAAAGCATCTGGAAGAGGAAGAAGAGAGGAATGAGAAAGAAGGAAGTGA  
714 A E H L Q R S L L E Q E N H S P L T G S  
2161 TGCAAAACATCTCCAAAGAAGTCTTTTGGAAACAGGAAAATCATTCACCACTCACAGGGTC  
734 N M K Y K T T N Q S T E F L S F Q D A S  
2221 AAATATGAAATACAAAACCCAGCAACCAATCAACAGAATTTTTATCCTTCCAAGATGCCAG  
754 S L Y R N I L E K E R E L Q Q L G I T E  
2281 CTCATTGTACAGAAACATTTTAGAAAAAGAAAGGGAACTTCAGCAACTGGGAATCACAGA  
774 Y L R K N I A Q L Q P D M E A H Y P G A  
2341 ATACCTAAGGAAAAACATTGCTCAGCTCCAGCCTGATATGGAGGCACATTATCCTGGAGC  
794 H E E L K L M E T L M Y S R P R K V L V  
2401 CCACGAAGAGCTGAAGTTAATGGAACATTAAATGTACTCACGTCCAAGGAAGGTATTAGT  
814 E Q T K N E Y F E L K A N L H A E P D Y  
2461 GSAACAGACAAAAAATGAGTATTTTGAACCTTAAAGCTAATTTACATGCTGAACCTGACTA  
834 L E V L E Q Q T \*  
2521 TTAGAAAGTCCTGGAGCAGCAAACATAGatggaga

图1(续)

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L  
1 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  
S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A  
61 TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCCCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGCTCCGCCAGGCT  
P G K G L E W V A V I W Y D G S N Q Y Y  
121 CCAGGCAAGGGGCTGCAATGGCTGGCAGTTATATGCTATCATGGAAGTAATCAATATTAT  
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L F  
181 GCAGACTCCGTGAAGGGCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTIT  
L Q M H S L R A E D T A V Y Y C A R G L  
241 CTGCAATGCACAGCCTGACAGCGGAGGACACGGCTGIGTATTACTGTGGAGAGGCTCTG  
T S G R Y G M D V W G Q G T T V T V S S  
301 ACTTCTGCAGCGTACGGTATGGACGCTCTGGGGCCAGGGACCAAGCTCACCGTCTCTCA  
A S T R G P S V F P L A P C S R S T S E  
361 GCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCTTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACTCCGAG  
S T A A L G C L V K D Y F F E P V T V S  
421 AGCAGAGCGGCCCTCGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCC  
W N S S A L T S G V H T F P A V L Q S S  
481 TGGAACTCAGGCGCTCTGATCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTTACAGTCTCTCA  
G L Y S L S V T V P S S N F G T Q T  
541 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTCCCTCCAGCACTTCCGCACCCAGACC  
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R  
601 TACACCTGCACAGCTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGACAGTTGAGCGC  
K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F  
661 AATGTTGTGTGAGGTGCCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCACTCTTC  
L F E P K F M D T L M I S R T P E V T C  
721 CTCTTCCCCCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAAGTGC  
V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G  
781 GTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCACTGGTACGTGGACGGC  
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T P R  
841 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT  
V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C  
901 GTGGTCAGCGTCCCTCACCGTGTGTGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC  
K V S N K G L P A P I E E T I S R T K G  
961 AAGGTCTCCAACAAAGGCTCCCGCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAACCAAGGG  
Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N  
1021 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCGTGGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAAC  
Q V S L T C L V K G F Y F S D I A V E W  
1081 CAGGTCAAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG  
E S N G Q P E N N Y R T T P P M L D S D  
1141 GAGACCAATGGGCGAGCGGAGAACACTACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGAC  
G S F P L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
1201 GGCTCCTTCTTCTTTACAGCAAGCTCAACGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAC  
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
1261 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC  
S L S P G K \*  
1321 TCCCTGTCTCCGGGTAATAA

图2A

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S  
 1 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGGCTCC  
 I S C R S S Q S L L L S H G F N Y L D W  
 61 ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCCTCCTGCTTACTCATGGATTCAACTATTTGGATTGG  
 Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S S R A  
 121 TACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAGTGGGGCC  
 S G V F D R F S G S G S E T L E T L K I  
 181 TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAATC  
 S R V E A E D V G L Y Y C N Q F L Q I P  
 241 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCTTTTATTACTGCATGCAACCCCTACAAATTCCG  
 W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V  
 301 TGGACGTTCCGGCCAAGGACCAAGGTGGAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTC  
 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L  
 361 TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCGTC  
 L N N F Y F R E A K V Q W K V D N A L Q  
 421 CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTTGGATAACGCCCTCCAA  
 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L  
 481 TCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC  
 S S T L T L S R A D Y E K H K V Y A C E  
 541 AGCAGCAGCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCCTGCGAA  
 V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C \*  
 601 GTCACCCATCAGGGCCCTGAGCTCCCGCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGACAGTGTAG

图2B

1 QVQLVESGGGVVQPGESLRISCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV  
 51 INYDGSNOYYADSVKGRFTISRENSKNTLFLOMHSIRAEDTAVYYCARGL  
 101 TSGRYGMDVMGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK  
 151 DYFFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTOT  
 201 YTCNVLDHKEPSNTKVDKTVERRKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL  
 251 MISRTFEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFE  
 301 VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISRKGGOPREPOVYTL  
 351 PPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD  
 401 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图3A

1 DIVMTQSPFLSLEPVTFGEPAISCRSSQSLLLSHGFFNYLDWYLOKPGQSPQ  
51 LLIYLGSSSFASGVFDRFSGSGGTDETLKISRVEAEDVGLYYCMQPLQIP  
101 WTEGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK  
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
201 VTHOGLSSPVTKSFNRGEC

图3B



ID#	Accession	Position	Sequence	Length
98.3(290/295)	Ha15-10ac12VH	1	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A	70
100(5/5)	IGHV3-33*01	1	CAGGTGACCTGGTGGAGTGGGGAGGGTGTCCAGCCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTCTGCAAG	70
100(48/48)	IGHD4-17*01	1	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A	70
ID#	IGHJ6*02			
98.3(290/295)	Ha15-10ac12VH	71	A S G F T F S S Y G M H N V R Q A P G K G L E W	140
100(5/5)	IGHV3-33*01	71	CGTCT GGATTCACCTCAGTACGTATGGC ATGCACTGTCGCGCAGGTCCAGGCAAGGGCTGGAATG	140
100(48/48)	IGHD4-17*01	71	A S G F T F S S Y G M H N V R Q A P G K G L E W	140
ID#	IGHJ6*02			
98.3(290/295)	Ha15-10ac12VH	141	V A V I N Y D G S N Q Y Y A D S V K G R F T I	210
100(5/5)	IGHV3-33*01	141	GGTGGCAGCTT ATATGATATGATGCAAGTAATCAA TATATSCAGACTCCCTGAGGCGGATTCACCATC	210
100(48/48)	IGHD4-17*01	141	V A V I N Y D G S N Q Y Y A D S V K G R F T I	210
ID#	IGHJ6*02			
98.3(290/295)	Ha15-10ac12VH	211	S R D N S K N T L F L Q M H S L R A E D T A V	280
100(5/5)	IGHV3-33*01	211	TCCAGAGCAATTCAGACACAGCGTGTTCGCAATGCAGCCCTGAGAGCGGAGCACGGTGTGT	280
100(48/48)	IGHD4-17*01	211	S R D N S K N T L F L Q M H S L R A E D T A V	280
ID#	IGHJ6*02			

图4A



ID#		<-----FWR1----->	
	D I V M T Q S P L S L F V T P G E P A S I S C		
Ha15-10ac12VL	1	GATATTGGAGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCACCCCTGGAGAGCGGCCCTCAATCTCTGCA	70
	D I V M T Q S P L S L F V T P G E P A S I S C		
IGKV2D-28*01	1		70
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR1----->	<-----FWR2----->
	R S S Q S L L L S H G F N Y L D W Y L Q K F G		
Ha15-10ac12VL	71	GGCTAGT CAGAGCCCTCCTGTAGTCAG---GATCAACTAT TTGATTTGTTACTGCAGAGCCAGG	137
	R S S Q S L L H S N G Y N Y L D W Y L Q K F G		
IGKV2D-28*01	71		137
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR2----->	
	Q S P Q L L I Y L G S S R A S G V P D R F S G		
Ha15-10ac12VL	138	GCAGTCTCACAACTCCGTGATCTAT TTGGGTTCT AGTCGGGCTTCGGGTCCTTGACAGTTTCAGTGGC	207
	Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G		
IGKV2D-28*01	138		207
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR3----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	208	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	277
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	208		277
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR3----->	
	C N Q P L Q I P N T F G Q G T K V E I K		
Ha15-10ac12VL	278	GC ATGCACCCCTACAAATTCTGTGGACGTTGGGCAAGGACCAGGTGGAAATCABAC	337
	C N Q A L Q T P		
IGKV2D-28*01	278		337
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR4----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	338	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	407
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	338		407
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR4----->	
	C N Q P L Q I P N T F G Q G T K V E I K		
Ha15-10ac12VL	408	GC ATGCACCCCTACAAATTCTGTGGACGTTGGGCAAGGACCAGGTGGAAATCABAC	467
	C N Q A L Q T P		
IGKV2D-28*01	408		467
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR5----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	468	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	537
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	468		537
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR5----->	
	C N Q P L Q I P N T F G Q G T K V E I K		
Ha15-10ac12VL	538	GC ATGCACCCCTACAAATTCTGTGGACGTTGGGCAAGGACCAGGTGGAAATCABAC	597
	C N Q A L Q T P		
IGKV2D-28*01	538		597
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR6----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	598	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	667
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	598		667
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR6----->	
	C N Q P L Q I P N T F G Q G T K V E I K		
Ha15-10ac12VL	668	GC ATGCACCCCTACAAATTCTGTGGACGTTGGGCAAGGACCAGGTGGAAATCABAC	727
	C N Q A L Q T P		
IGKV2D-28*01	668		727
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR7----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	728	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	797
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	728		797
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR7----->	
	C N Q P L Q I P N T F G Q G T K V E I K		
Ha15-10ac12VL	798	GC ATGCACCCCTACAAATTCTGTGGACGTTGGGCAAGGACCAGGTGGAAATCABAC	857
	C N Q A L Q T P		
IGKV2D-28*01	798		857
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR8----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	858	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	927
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	858		927
IGKJ1*01			
ID#		<-----CDR8----->	
	C N Q P L Q I P N T F G Q G T K V E I K		
Ha15-10ac12VL	928	GC ATGCACCCCTACAAATTCTGTGGACGTTGGGCAAGGACCAGGTGGAAATCABAC	987
	C N Q A L Q T P		
IGKV2D-28*01	928		987
IGKJ1*01			
ID#		<-----FWR9----->	
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y		
Ha15-10ac12VL	988	AGTGATCAGGCACAGATTTCACCTGAATAACAGACAGATGGAGCTCAGCATGTGGGCTTATTACT	1057
	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y		
IGKV2D-28*01	988		1057
IGKJ1*01			

图4B

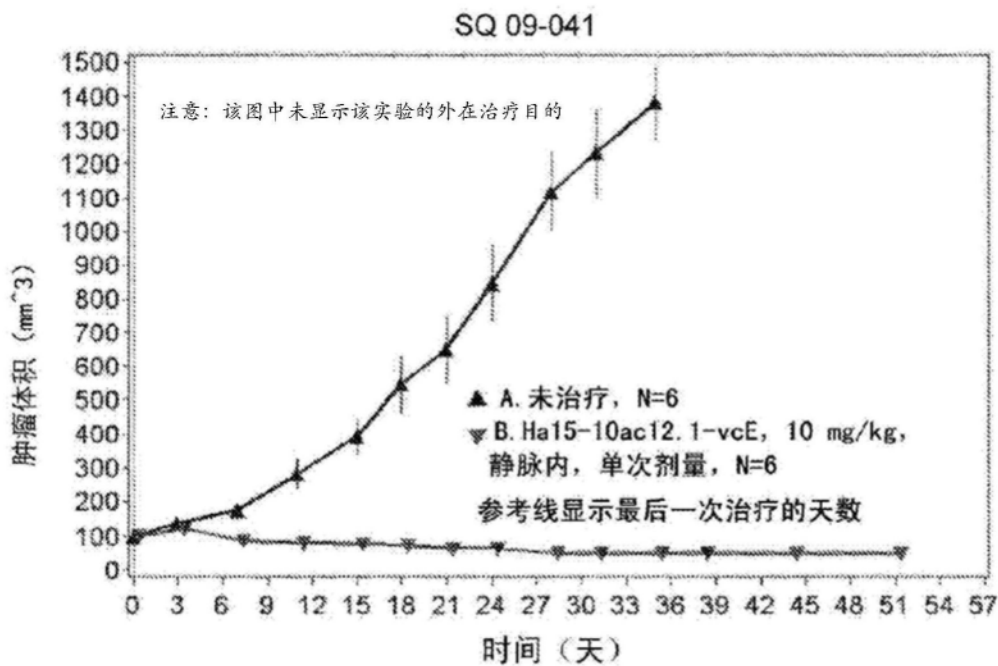


图5

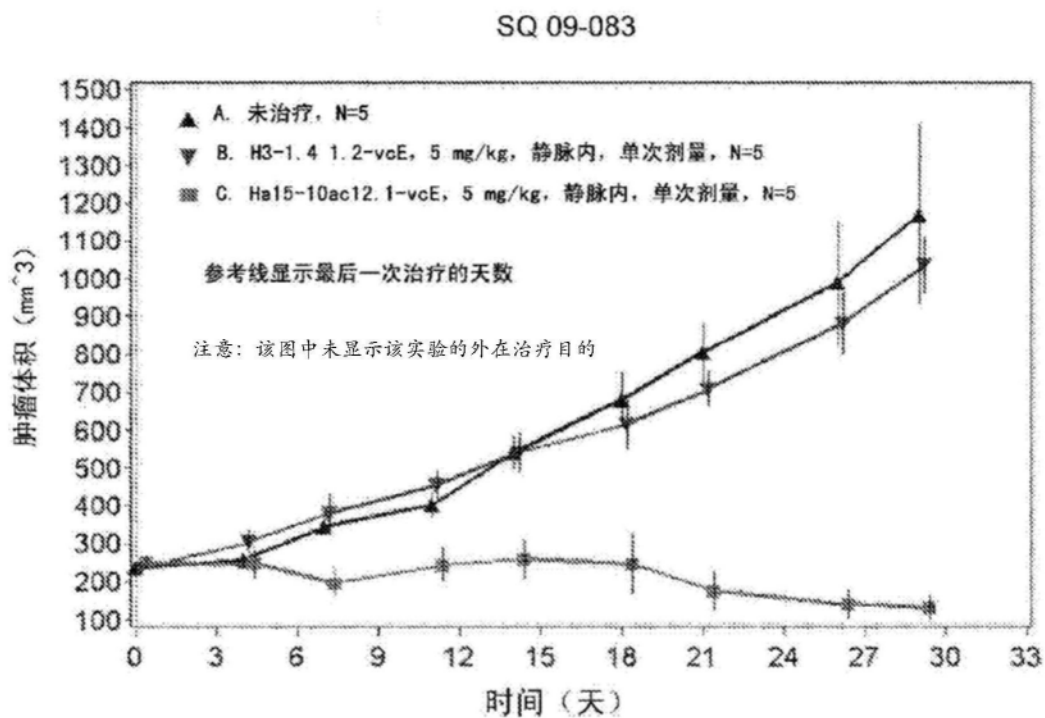


图6

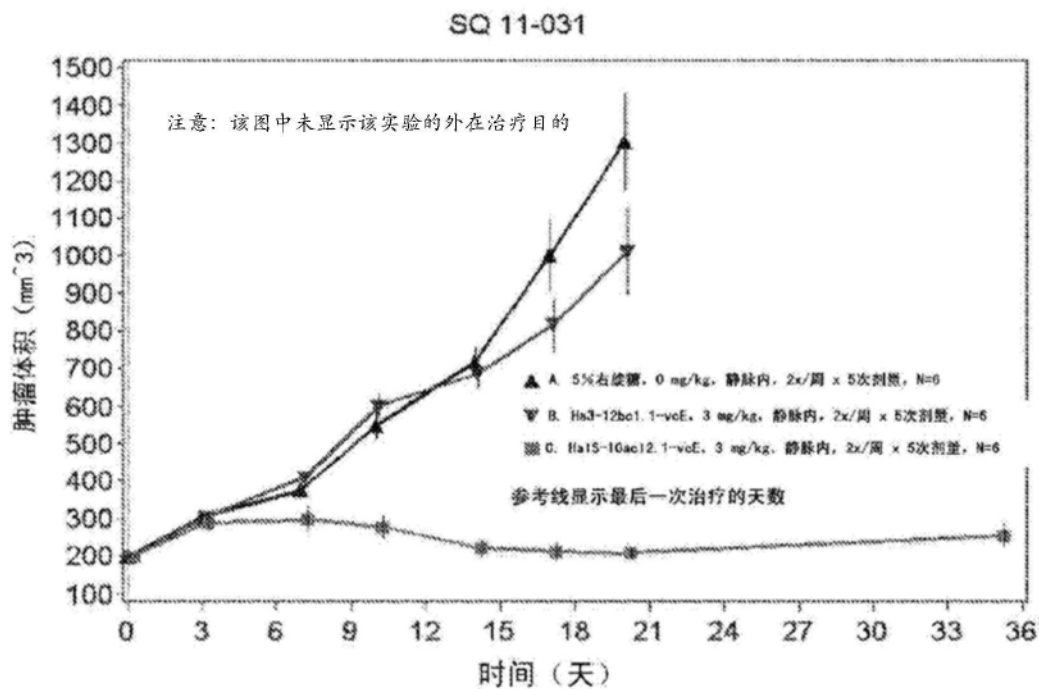


图7

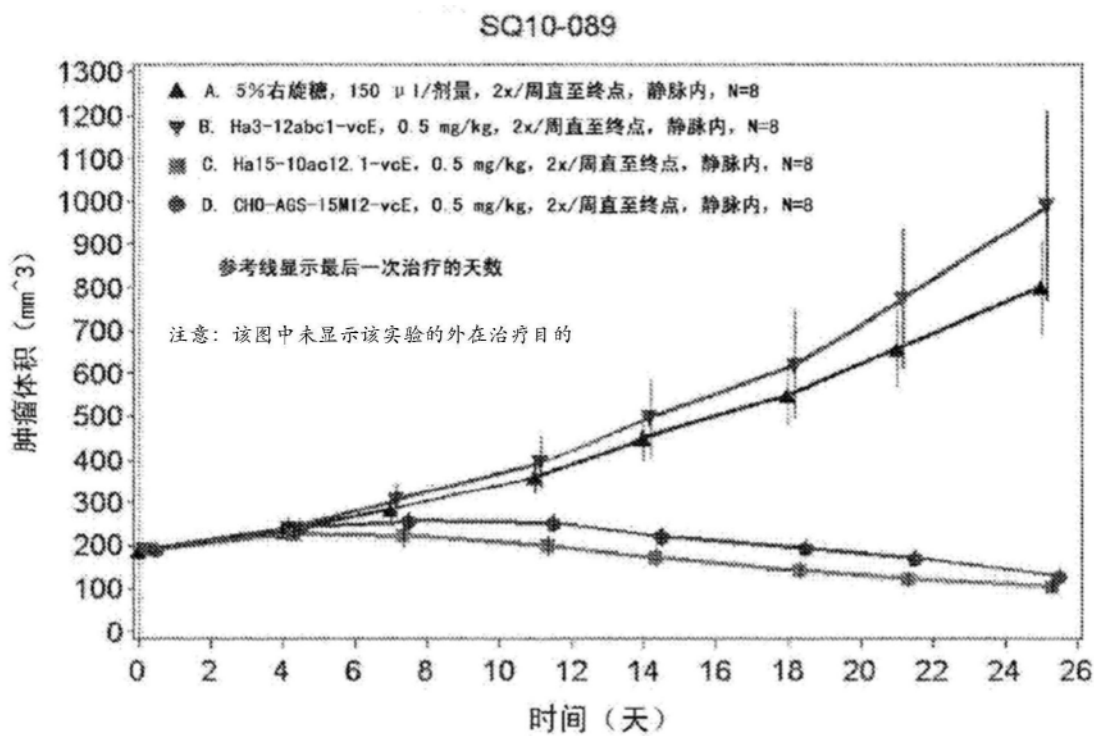


图8

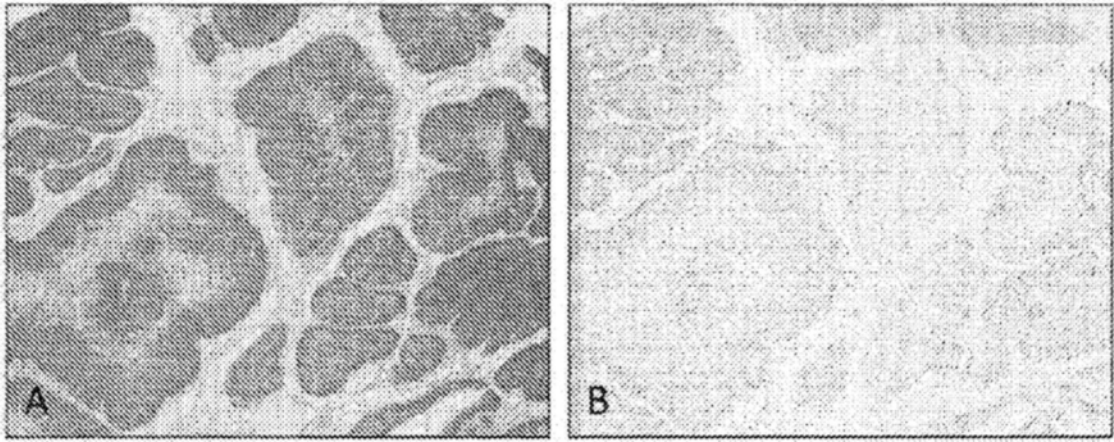


图9A-9B

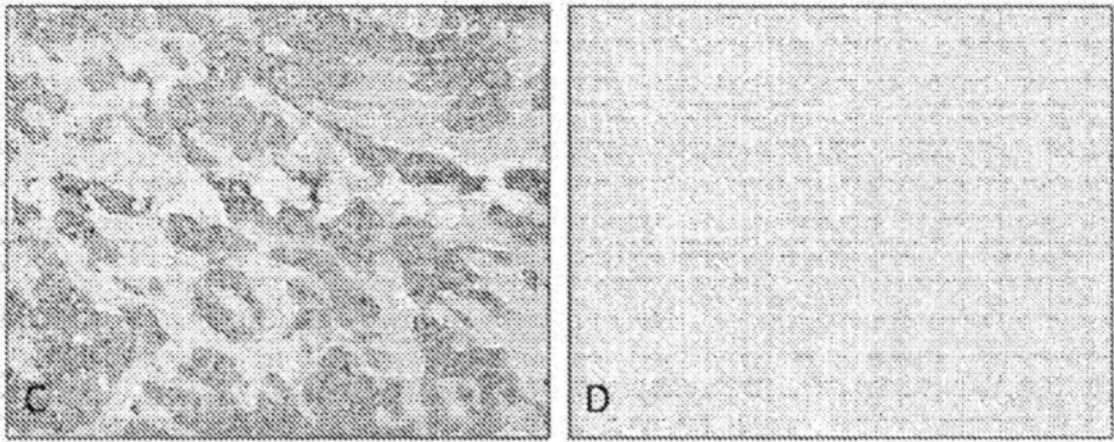


图9C-9D

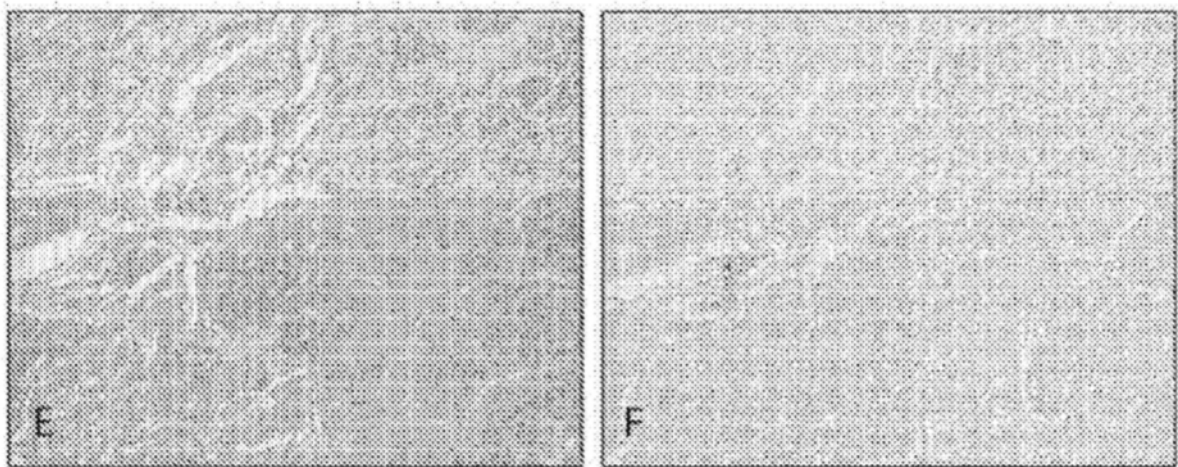


图9E-9F

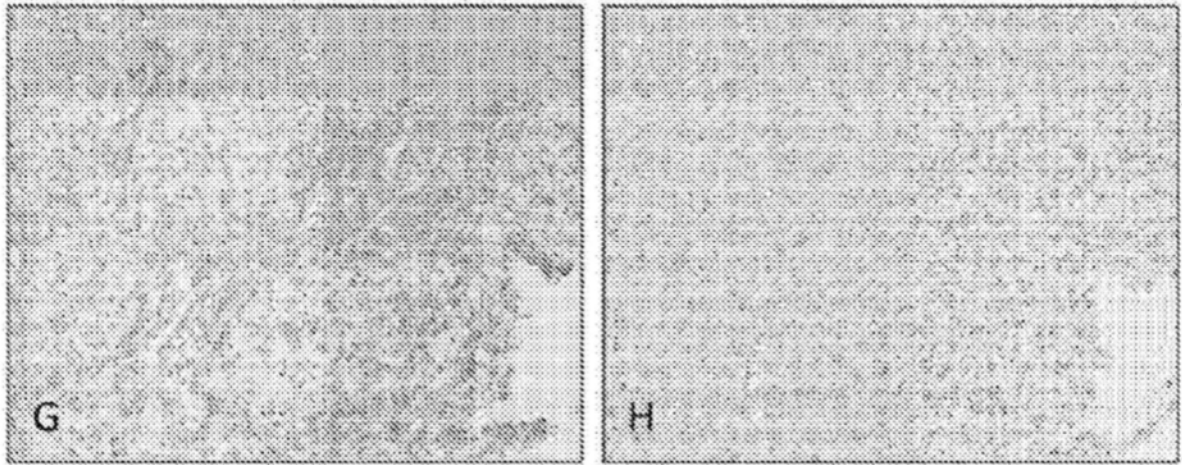


图9G-9H

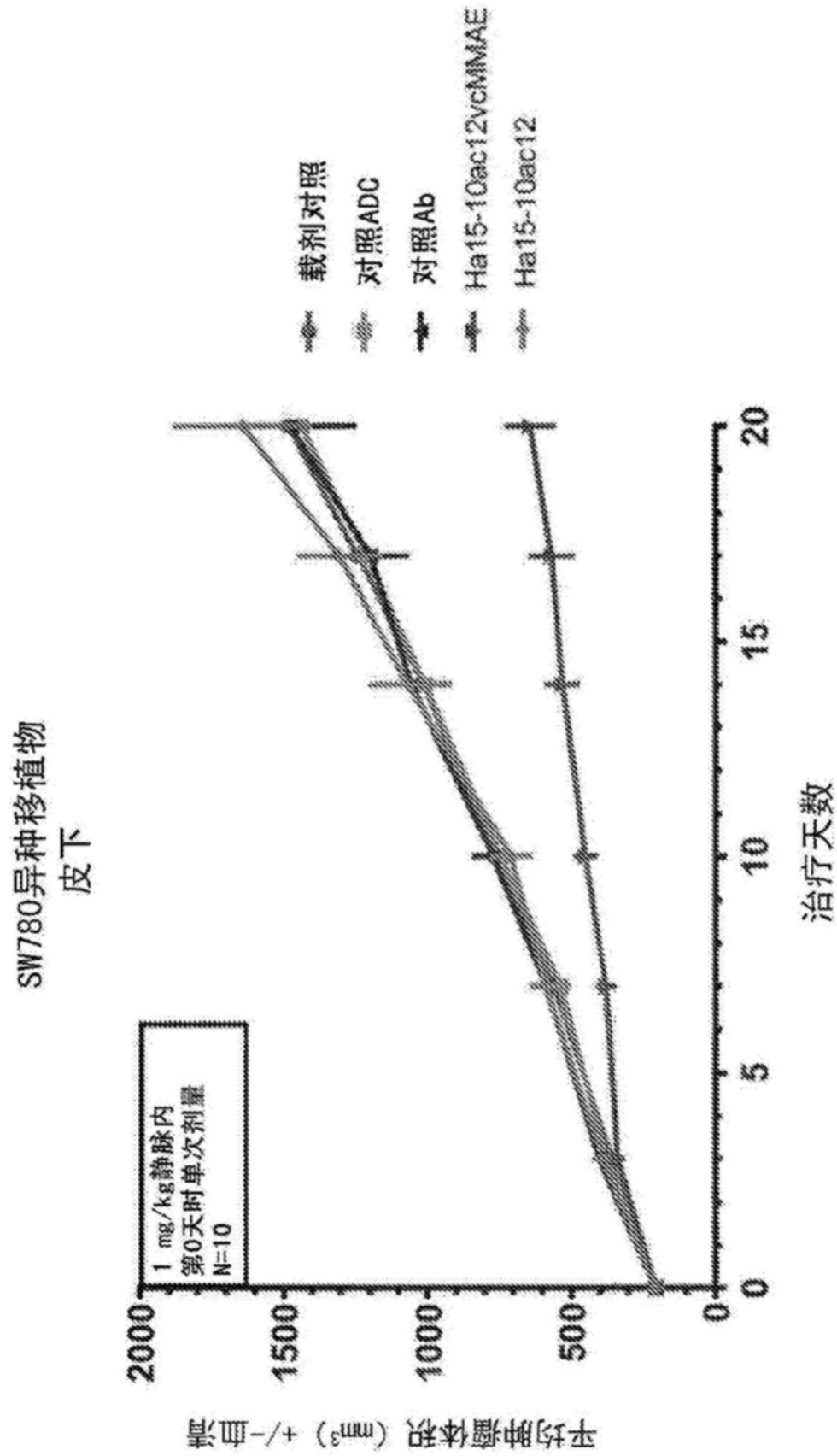


图10



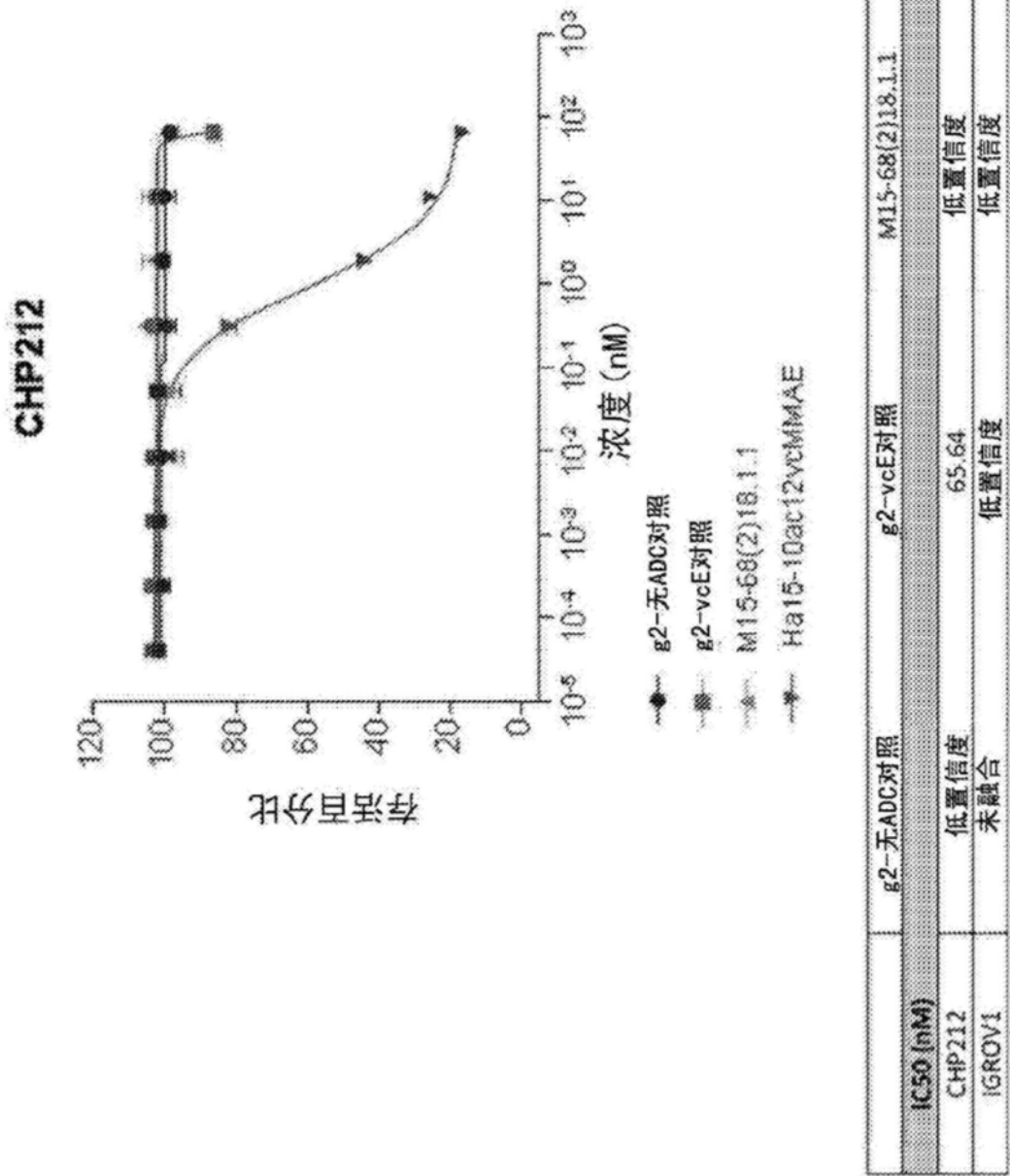


图11

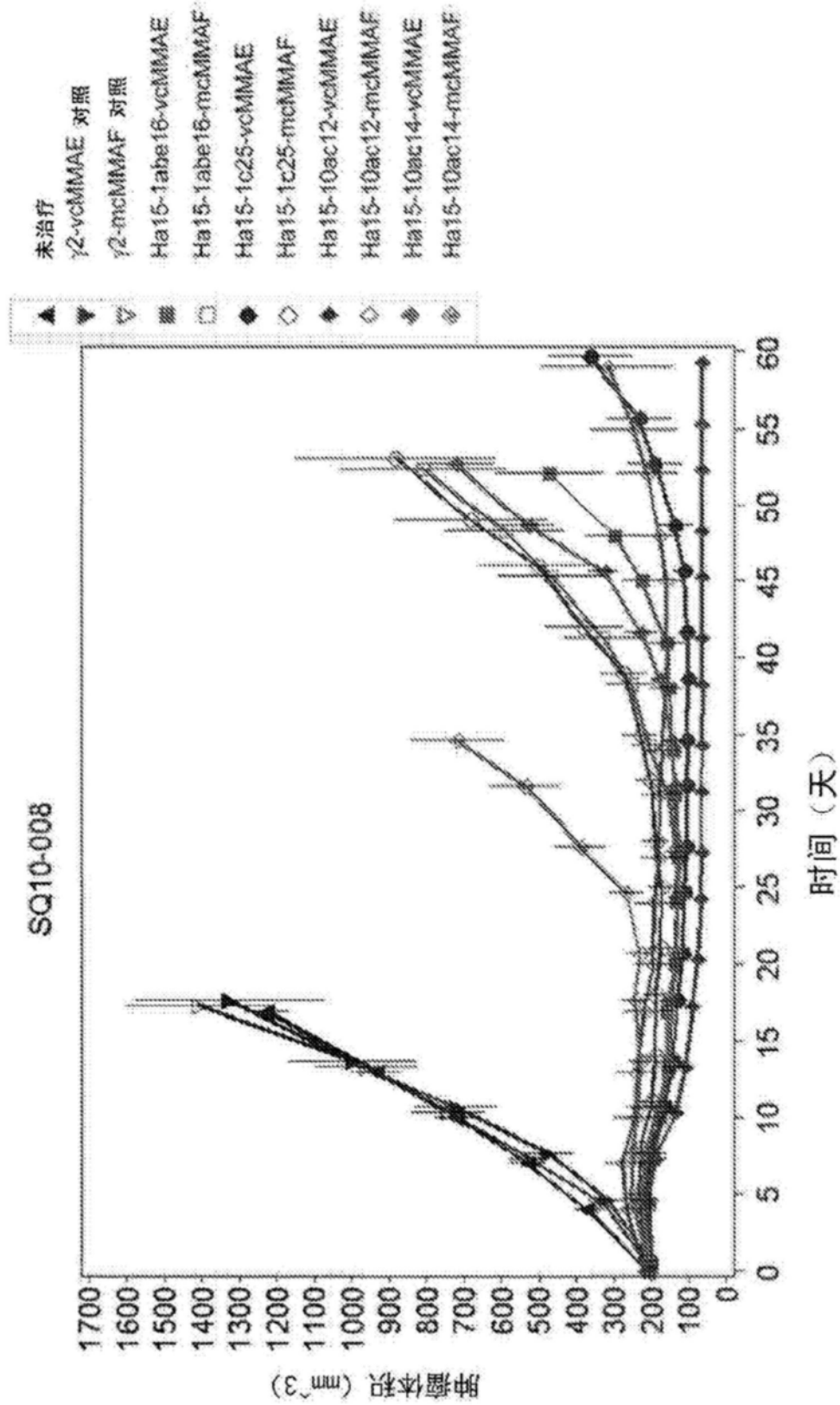


图12

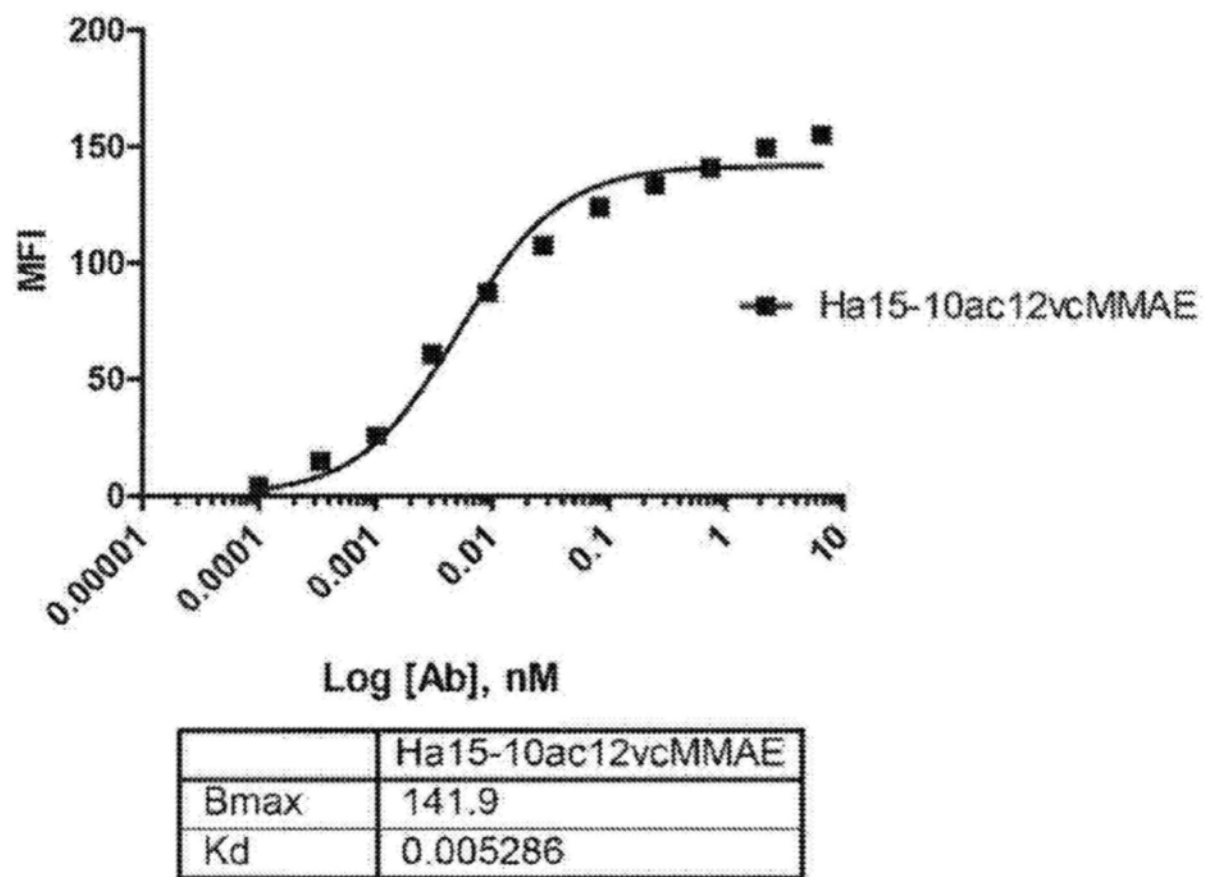


图13

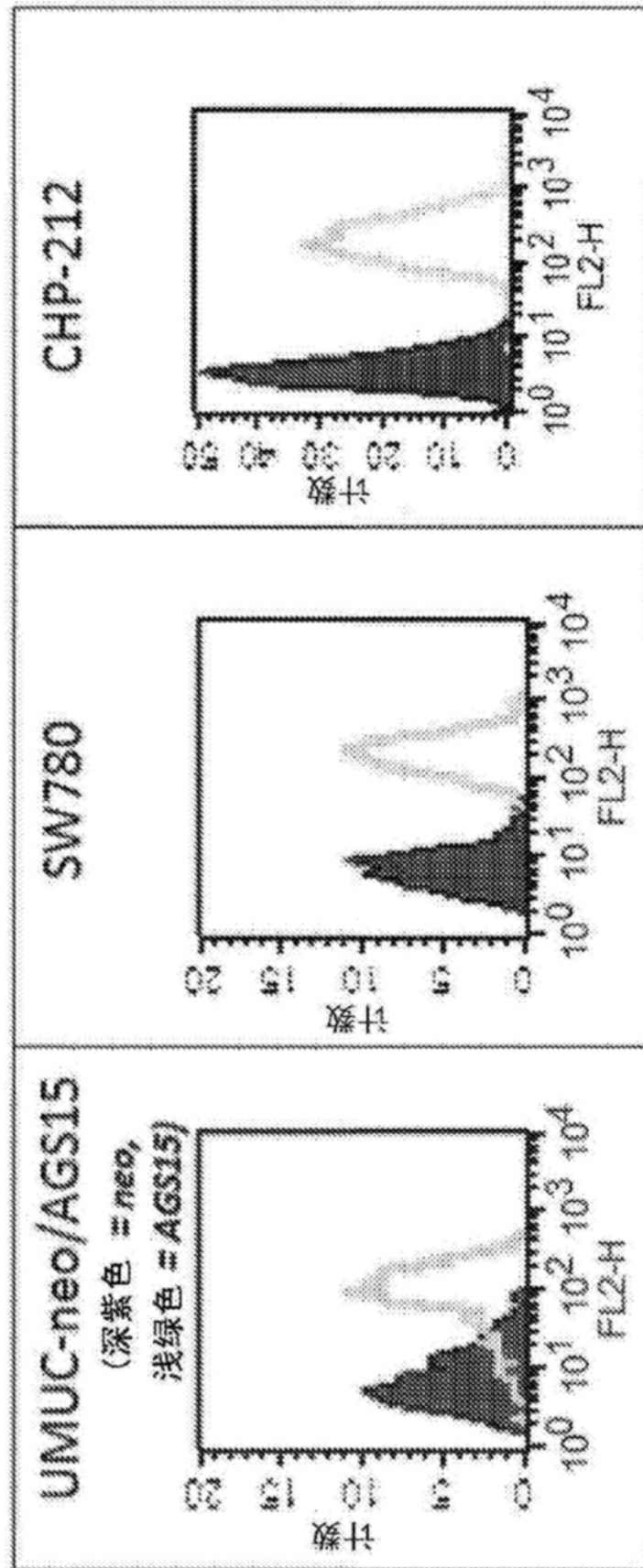


图14

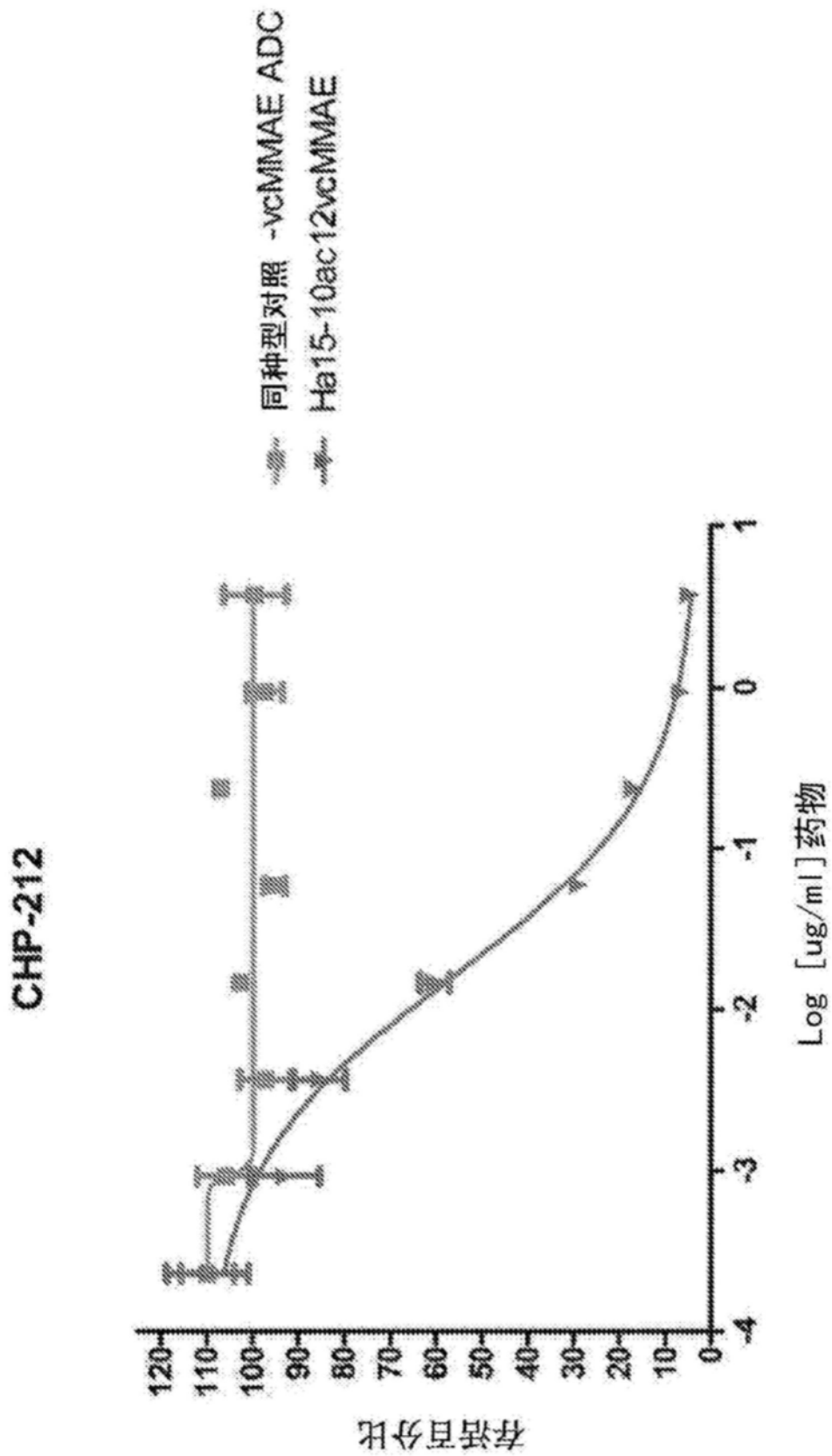


图15A

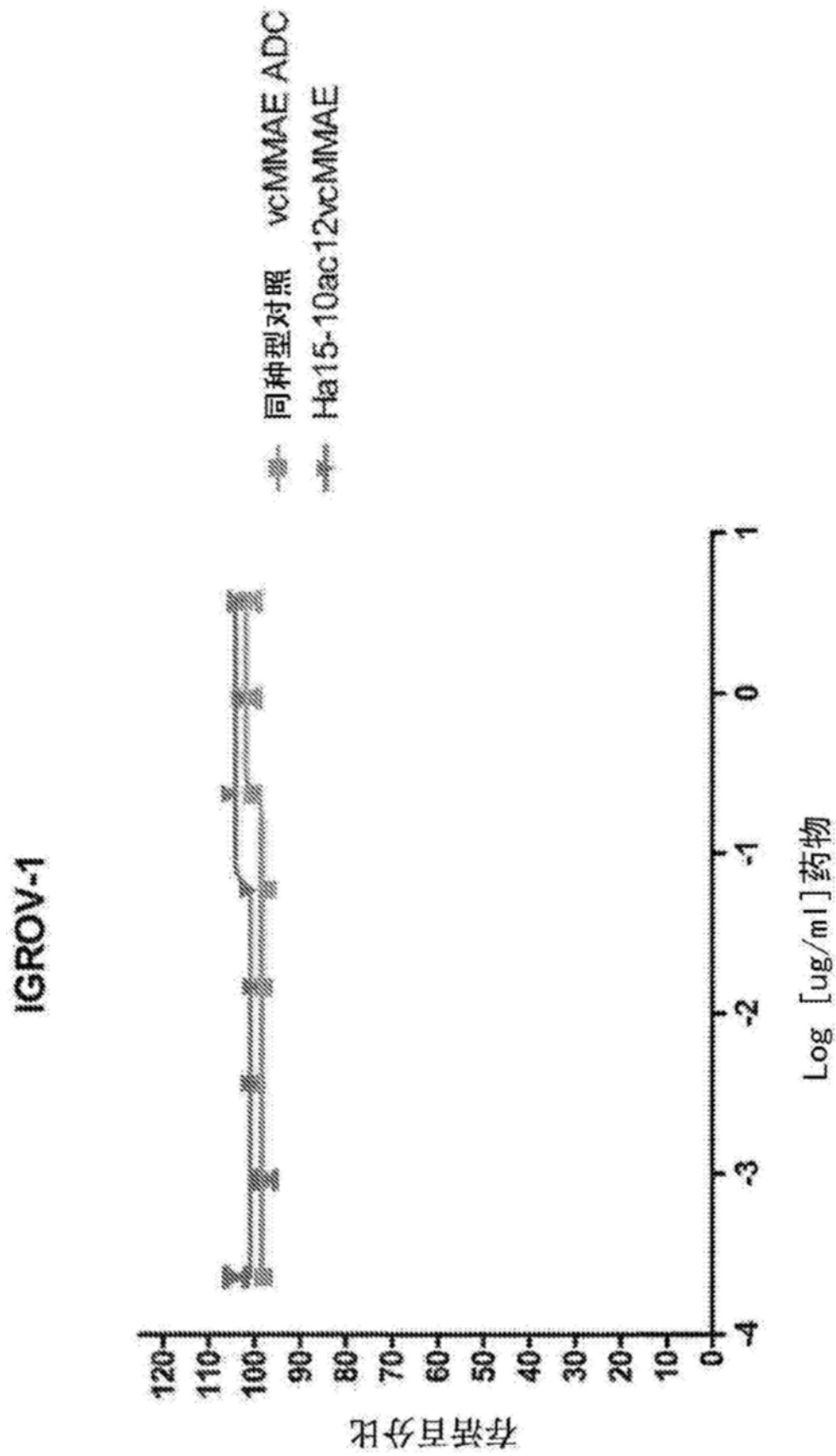


图15B