



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107056945 A

(43)申请公布日 2017. 08. 18

(21)申请号 201710094360.6

(22)申请日 2012.02.17

(30)优先权数据

61/444,614 2011.02.18 US

PCT/US2011/050451 2011.09.02 US

(62)分案原申请数据

201280019016.6 2012.02.17

(71)申请人 艾伯维施特姆森特克斯有限责任公司
司

地址 美国伊利诺斯

(72)发明人 O·富尔德 S·J·戴拉
R·A·司徒 A·班克维奇
A·L·L·拉泽迪克 J·伯恩斯坦

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

C07K 16/30(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

权利要求书1页 说明书80页
序列表79页 附图32页

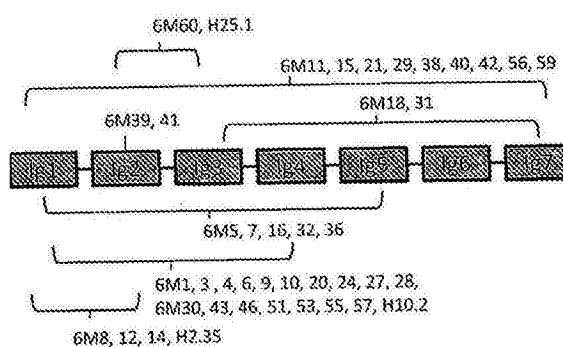
(54)发明名称

新型调节剂及使用方法

(57)摘要

提供了新型调节剂,包括抗体及其衍生物,
及使用此类调节剂来治疗过度增殖性病症的方
法。

阐明调节剂合并的PTK7蛋白质的图示



1. 分离的PTK7调节剂。
2. 权利要求1的经分离的PTK7调节剂,其中所述PTK7调节剂包括PTK7拮抗剂。
3. 权利要求1的经分离的PTK7调节剂,其中所述PTK7调节剂包括抗体或其免疫反应性片段。
4. 权利要求3的经分离的PTK7调节剂,其中所述抗体或其免疫反应性片段包括单克隆抗体。
5. 权利要求4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体选自由嵌合抗体、人源化抗体及人抗体组成的组。
6. 权利要求4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括中和抗体。
7. 权利要求4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括内化抗体。
8. 权利要求4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括与选自由以下组成的组的PTK7同种型缔合的抗体:同种型a、同种型b、同种型c及同种型d。
9. 权利要求8的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括与同种型a缔合的抗体。
10. 权利要求9的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括具有三个互补决定区的轻链可变区及具有三个互补决定区的重链可变区,其中所述重链及轻链互补决定区包含如图6A和图6B中所示的互补决定区。

新型调节剂及使用方法

[0001] 本申请2012年2月17日提交的同名发明专利申请201280019016.6的分案申请。

[0002] 交叉引用的申请

[0003] 本申请要求2011年2月18日递交的美国临时申请系列号61/444,614及2011年9月2日递交的专利合作条约(PCT)第PCT/US2011/050451号的优先权,其中的每一篇均在此以其全部通过引用而并入。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表,其以ASCII格式通过EFS-Web被递交并在此以其全部通过引用而并入。2012年1月26日产生的所述ASCII副本被命名为112304PCT.txt并且大小为163,049字节。

发明领域

[0006] 本申请一般性地涉及新型组合物及其在预防、治疗或改善过度增殖性病症及其任何扩增、重现、复发或转移中的使用方法。在广泛的方面,本发明涉及包括抗PTK7抗体及融合构筑体的蛋白质酪氨酸激酶7(PTK7)调节剂的用途,其用于治疗、诊断或预防赘生性病症。本发明的特别优选的实施方案提供了此种PTK7调节剂,其用于恶性疾病的免疫治疗性治疗,包含降低肿瘤起始细胞频率。

背景技术

[0007] 干细胞及祖细胞分化及细胞增殖为正常进行的过程,此过程协同作用以支持器官形成期间的组织生长及所有活生物体一生中大部分组织的细胞置换及修复。分化及增殖决定通常由经平衡以维持细胞命运决定及组织构架的许多因子及信号控制。正常组织构架主要由对调节细胞分裂及组织成熟的微环境提示作出反应的细胞维持。因此,细胞增殖及分化通常仅在置换受损或垂死细胞或生长需要时发生。不幸的是,细胞增殖和/或分化的破坏可由大量因素导致,所述因素包括例如各种信号传导化学品过少或过多、存在微环境改变、遗传突变或其一些组合。当正常细胞增殖和/或分化受到干扰或以某种方式被破坏时,其可导致各种疾病或病症,包括过度增殖性病症,例如癌症。

[0008] 癌症的惯常治疗包括化学疗法、放射疗法、手术、免疫疗法(例如或生物应答调节剂、疫苗或靶向治疗剂)或其组合。悲哀的是,太多癌症对所述惯常治疗无反应或反应程度微弱,致使患者的选择很少。例如,尽管所选疗法通常有效,但在一些患者中,某些癌症呈现使其无反应的基因突变。此外,视癌症类型而定,一些可用的治疗(例如手术)可能并非可行的替代方案。当试图护理已经历先前治疗且随后复发的患者时,当前标准护理治疗剂所固有限制尤其明显。在所述情况下,失败的治疗方案及所导致的患者恶化可能促成难治性肿瘤,其通常本身表现为最终证明不可治愈的相对侵略性的疾病。尽管近几年来癌症的诊断及治疗有很大改进,但由于现有疗法无法预防复发、肿瘤重现及转移,因此许多实体肿瘤的总生存率仍保持基本上不变。因此,研发更有靶向性且强效的疗法仍为一个挑战。

[0009] 一个有前景的研究领域涉及使用靶向治疗剂来指向似乎为许多癌症的基础的致

肿瘤“种子”细胞。为此,目前已知大多数实体组织含有产生构成大部分该组织的分化细胞类型的成体组织驻留性干细胞群。这些组织中产生的肿瘤类似地由亦由干细胞产生的异质细胞群组成,但明显不同之处在于其总体增殖及组织。尽管日益认识到大部分肿瘤细胞的增殖能力有限,但一小群癌症细胞(通常已知为癌症干细胞或CSC)具有独有的广泛自我更新能力,从而使得能够有固有的肿瘤重新起始能力。更具体地,癌症干细胞假说提出在每种肿瘤内存在独特的细胞亚组(亦即CSC)(约0.1%至10%),其由于分化成肿瘤祖细胞且随后分化成终末分化肿瘤细胞而能够无限自我更新且产生复制能力逐渐受限的肿瘤细胞。

[0010] 近年来愈加明了,这些CSC(亦已知为肿瘤永存细胞或TPC)对传统化学治疗剂或辐射可能更具抗性且因此在标准护理临床疗法之后仍持续而之后刺激难治性肿瘤、继发性肿瘤的生长且促进转移。在这方面,癌症干细胞被暗示促进各种肿瘤形成的迁移和浸润潜能。此外,愈来愈多的证据表明在CSC中调节器官形成和/或正常组织驻留性干细胞的自我更新的路径失调或被改变,从而导致自我更新癌细胞及肿瘤形成持续扩增。一般性地参见A1-Hajj等人,2004,PMID:15378087;及Dalerba等人,2007,PMID:17548814;其中的每一篇均在此以其全部通过引用而并入。因此,传统以及较新靶向治疗方法的有效性显然因抗性癌细胞的存在和/或出现而受到限制,所述抗性癌细胞甚至面对这些不同治疗方法时仍能够使癌症永续。Huff等人,European Journal of Cancer 42:1293-1297(2006)及Zhou等人,Nature Reviews Drug Discovery 8:806-823(2009),各文献均在此以其全部通过引用而并入。所述观察结果介由当患者患有实体肿瘤时传统减瘤剂一致不能实质上增加患者存活率且经由对肿瘤如何生长、复发及转移产生的日益详尽的理解而得到证实。因此,治疗赘生性病症的最近策略认识到消除、耗竭、沉默或促进肿瘤永存细胞的分化,以便减弱导致患者复发的肿瘤重现或转移的可能性的的重要性。

[0011] 开发所述策略的努力包含了最近涉及非传统异种移植(NTX)模型的工作,其中仅在免疫功能不全小鼠中植入了原发性人实体肿瘤样本且进行传代。在许多癌症中,所述技术证实具有产生异质肿瘤且刺激其无限生长的独特能力的细胞亚群的存在。如先前所假设,NTX模型中的工作已证实了所鉴别的肿瘤细胞CSC亚群似乎对例如化学疗法及辐射的减瘤方案更具抗性,潜在地解释了临床应答率与总体存活率之间的差异。此外,在CSC研究中采用NTX模型已引起药物发现及对可导致对肿瘤重现及转移产生重大影响由此改良患者存活率的CSC靶向疗法的药物候选者的临床前评估的根本性改变。尽管已取得进展,但与处理原发性和/或异种移植肿瘤组织相关的固有技术困难以及缺乏用于表征CSC身分及分化潜能的实验平台提出主要的挑战。如此,仍对选择性靶向癌症干细胞及开发可用于治疗、预防和/或管理过度增殖性病症的诊断性、预防性或治疗性化合物或方法存在实质性需要。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明提供的这些及其他目标,在广义上针对可用于治疗PTK7相关性病症(例如过度增殖性病症或赘生性病症)的方法、化合物、组合物及制品。为此,本发明提供有效靶向肿瘤细胞和/或癌症干细胞且可用以治疗患有多种恶性疾病的患者的新型蛋白质酪氨酸激酶7(或PTK7)调节剂。如本文将更详细论述的,目前存在若干已知PTK7同种型且所公开的调节剂优选包含一或多种所述PTK7同种型或与一或多种所述PTK7同种型缔合。此外,在某些实施方案中,所公开的PTK7调节剂可包含识别、激动、拮抗PTK7多肽或基因(或其片段)、与其竞争、相互作用、结合或缔合及调节、调整、更改、改变或修饰PTK7蛋白质对一或多种生理

路径的影响的任何化合物。因此,在广义上,本发明一般性地针对经分离的PTK7调节剂及其用途。在优选的实施方案中,本发明更具体地针对包含抗体(即与PTK7的至少一种同种型免疫优先结合、反应或缔合的抗体)的经分离的PTK7调节剂。此外,如下文所详尽讨论的,所述调节剂可用以提供适用于预防、诊断或治疗增殖性病症的药物组合物。

[0014] 在本发明的所选实施方案中,PTK7调节剂可包含呈分离形式或与其他部分融合或缔合的PTK7多肽或其片段(例如Fc-PTK7、PEG-PTK7或与靶向部分缔合的PTK7)。在其他所选实施方案中,PTK7调节剂可包含PTK7拮抗剂,出于本申请的目的,应认为所述PTK7拮抗剂意指识别PTK7、与其竞争、相互作用、结合或缔合及中和、消除、降低、敏化、再程序化、抑制或控制包括肿瘤起始细胞的赘生性细胞的生长的任何构建体或化合物。在优选的实施方案中,本发明的PTK7调节剂包含抗PTK7抗体或其片段或衍生物,出人意料地发现所述抗PTK7抗体或其片段或衍生物沉默、中和、降低、减少、耗竭、缓和、减弱、再程序化、消除或以其他方式抑制肿瘤起始细胞传播、维持、扩增、增殖或以其他方式促进赘生性细胞存活、重现、再生和/或转移的能力。在特别优选的实施方案中,抗体或免疫反应性片段可与一或多种抗癌剂(例如细胞毒性剂)缔合或缀合。

[0015] 在所选实施方案中,相容的PTK7调节剂可包括具有轻链可变区及重链可变区的抗体,其中该轻链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:60,且其中该重链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59及SEQ ID NO:61。

[0016] 当然,鉴于本发明,本领域技术人员可在不进行过度实验的情况下容易地鉴别与各前述重链及轻链可变区相关的CDR且使用那些CDR工程化或制造嵌合、人源化或CDR移植抗体。如此,在所选实施方案中,本发明针对包含来自图6A或图6B中所示的可变区序列的一个或多个CDR的抗PTK7抗体。在优选的实施方案中,所述抗体将包含单克隆抗体,且在甚至更优选的实施方案中,将包含嵌合、CDR移植或人源化抗体。如下文所更详细论述的,其他实施方案将包含与一或多种细胞毒性剂结合或缔合的所述抗体。

[0017] 因此,在其他实施方案中,本发明将包含选自由hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41及hSC6.58组成的组的PTK7调节剂。其他实施方案针对包含人源化抗体的PTK7调节剂,其中该人源化抗体包含轻链可变区及重链可变区,其中该轻链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:68,且其中该重链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67及SEQ ID NO:69。

[0018] 如先前所示,本发明的一个方面包含PTK7多肽与癌症干细胞的意外缔合。因此,在

某些其他实施方案中,本发明将包含向受试者施用后降低肿瘤起始细胞的频率的PTK7调节剂。优选地,使用体外或体内有限稀释分析来测定频率降低。在特别优选的实施方案中,所述分析可使用包括将活人肿瘤细胞移植至免疫功能不全小鼠中的体内有限稀释分析进行。或者,所述有限稀释分析可使用包括将活人肿瘤细胞限制稀释沉积于体外集落支持条件中的体外有限稀释分析进行。在任一情况下,频率降低的分析、计算或定量优选包括使用泊松分布统计(Poisson distribution statistic)来提供精确计算。应了解,尽管优选所述定量方法,但亦可使用其他劳动强度较低的方法(例如流式细胞计数或免疫组织化学)来提供所需值,且因此明确涵盖在本发明的范畴内。在所述情况下,可使用对于肿瘤起始细胞而言已知富集的肿瘤细胞表面标记的流式细胞计数分析或免疫组织化学检测来测定频率降低。

[0019] 如此,在本发明的另一优选的实施方案中,包括治疗PTK7相关病症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的PTK7调节剂,从而使肿瘤起始细胞的频率降低。优选地,PTK7相关病症包含赘生性病症。此外,优选使用体外或体内有限稀释分析来测定肿瘤起始细胞频率的降低。

[0020] 在这方面,应了解,本发明至少部分基于PTK7免疫原与在各种瘤形成的病源学中涉及的肿瘤永存细胞(即癌症干细胞)相关的发现。更具体地,本申请意外地表明施用各种示例性PTK7调节剂可介由肿瘤起始细胞介导、降低、耗竭、抑制或消除致肿瘤信号传导(即降低肿瘤起始细胞的频率)。此通过耗竭、中和、降低、消除、再程序化或沉默肿瘤起始细胞或通过修饰肿瘤细胞形态(例如诱导的分化、小生境破坏)降低的信号传导转而允许通过抑制肿瘤形成、肿瘤维持、扩增和/或转移及重现而更有效地治疗PTK7相关病症。

[0021] 除与癌症干细胞的前述关联外,亦有证据表明PTK7同种型可参与血管生成、内皮细胞迁移及与肿瘤发生相关联的特定发育信号级联(即Wnt信号传导路径)。使用本文所述的新型PTK7调节剂干预所述细胞相互作用可从而通过超过一种机制(即肿瘤起始细胞降低及破坏致癌路径信号传导)来改善或治疗病症以提供加成效应或协同效应。其他优选的实施方案可利用细胞表面PTK7的细胞内化来递送调节剂介导的抗癌剂。在这方面,应了解,本发明不受任何特定作用机制限制,而是涵盖广泛使用所公开的调节剂来治疗PTK7相关病症(包括各种瘤形成)。

[0022] 因此,本发明的其他方面利用所公开的调节剂可能破坏致癌存活路径同时沉默肿瘤起始细胞的能力。可证明所述多活性PTK7调节剂(例如PTK7拮抗剂)当与标准护理抗癌剂或减瘤剂组合使用时尤其有效。因此,本发明的优选的实施方案包括使用所公开的调节剂作为抗转移剂用于初始治疗后的维持疗法。另外,根据本发明的教导可组合使用两种或更多种PTK7拮抗剂(例如特异性结合PTK7上的两个离散表位的抗体)。此外,如下文详细论述的,本发明的PTK7调节剂可以缀合或非缀合状态使用,且任选地与多种化学或生物抗癌剂组合用作敏化剂。

[0023] 因此,本发明的另一优选的实施方案包括敏化受试者的肿瘤以用抗癌剂治疗的方法,其包括向该受试者施用PTK7调节剂的步骤。其他实施方案包含减少治疗后的转移的方法,其包括向有需要的受试者施用PTK7调节剂。在本发明的特别优选的方面中,PTK7调节剂特异性引起肿瘤起始细胞频率降低,如使用体外或体内有限稀释分析所测定的。

[0024] 本发明的更通常优选的实施方案包含治疗有需要受试者的PTK7相关病症的方法,其包括向受试者施用PTK7调节剂的步骤。在特别优选的实施方案中,PTK7调节剂将与抗癌

剂缔合(例如缀合)。在其他实施方案中,PTK7调节剂将在与细胞表面上或附近的PTK7缔合或结合的后内化。此外,不论与正常邻近组织相比目标肿瘤组织展现PTK7水平的升高还是PTK7水平降低或下抑,均可达成本发明的有益方面,包括信号传导路径的任何破坏及附带益处。

[0025] 在另一方面中,本发明将包括治疗患有赘生性病症的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的至少一种内化PTK7调节剂的步骤。优选的实施方案将包括施用内化抗体调节剂,其中在其他所选实施方案中,内化抗体调节剂与细胞毒性剂缀合或缔合。

[0026] 其他实施方案针对治疗患有PTK7相关病症的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的至少一种耗竭性PTK7调节剂的步骤。

[0027] 在又一实施方案中,本发明提供维持疗法的方法,其中在经设计以移除至少一部分肿瘤物质的初始程序(例如化学治疗剂、辐射或手术)之后的一段时间施用所公开的效应子或调节剂。所述治疗方案可被施用持续数周的时间、数月的时间或甚至数年的时间,其中PTK7调节剂可以预防方式起作用以抑制转移和/或肿瘤重现。在其他实施方案中,所公开的调节剂可与已知减瘤方案协同施用以防或延缓转移、肿瘤维持或重现。

[0028] 应进一步了解,可制造及选择本发明的PTK7调节剂以与PTK7的单一同种型或所选数种蛋白质同种型(即由剪接变体提供)反应,或相反可包含与一些或所有PTK7同种型(当前鉴别出五种)反应或缔合的泛PTK7调节剂(pan-PTK7modulator)。更具体地,如本文所公开的,可产生及选择优选的调节剂(例如抗体)以使其与单一剪接变体所呈现的结构域(例如在特定外显子接合点处)或与在多种或所有PTK7同种型中保守的Ig结构域反应。此情形对于本发明为重要的,因为某些同种型可优选地在TIC上表达且因此可充当治疗靶标以提供选择性降低致肿瘤细胞频率和/或耗竭癌症干细胞群。

[0029] 因此,在所选实施方案中,本发明包括泛PTK7调节剂。在其他所选实施方案中,本发明包括与一或多种剪接变体或同种型免疫特异性缔合的PTK7调节剂。优选地,所述剪接变体可选自由同种型a、同种型b、同种型c及同种型d组成的组。在其他实施方案中,本发明包括治疗有需要受试者的方法,其包括施用治疗有效量的泛PTK7调节剂。其他实施方案包括治疗有需要受试者的方法,其包括施用治疗有效量的与一或多种同种型免疫特异性缔合的PTK7调节剂。

[0030] 除上文所述的治疗用途以外,亦应了解,本发明的调节剂可用以诊断PTK7相关性病症,特别是过度增殖性病症。在一些实施方案中,可向受试者施用调节剂且进行体内检测或监测。本领域技术人员应了解,所述调节剂可用如下文所公开的被标记物或报告子标记或与如下文所公开的标记物或报告子缔合,且使用多种标准技术(例如MRI、CAT扫描、PET扫描等)中的任一种进行检测。

[0031] 因此,在一些实施方案中,本发明将包括体内诊断、检测或监测有需要受试者的PTK7相关病症的方法,其包括施用PTK7调节剂的步骤。

[0032] 在其他情况下,可使用本领域内认可的程序在体外诊断设置中使用所述调节剂。如此,优选的实施方案包括诊断有需要受试者的过度增殖性病症的方法,其包括以下步骤:

[0033] a. 自该受试者获得组织样品;

[0034] b. 使组织样品与至少一种PTK7调节剂接触;及

[0035] c. 检测或定量与样品缔合的PTK7调节剂。

[0036] 所述方法可结合本申请容易地被理解且可使用例如自动读板器、专用报告子系统 etc 通常可获得的商业技术容易地进行。在所选实施方案中,PTK7调节剂将与样品中存在的肿瘤永存细胞缔合。在其他优选的实施方案中,检测或定量步骤将包括肿瘤起始细胞频率的降低及其检测。此外,有限稀释分析可如先前上文所提及地进行,且优选将使用泊松分布统计以提供关于频率降低的精确计算。

[0037] 在类似情境中,本发明亦提供可用于诊断及监测PTK7相关病症(例如癌症)的试剂盒。为此,本发明优选提供可用于诊断或治疗PTK7相关病症的制品,其包含含有PTK7调节剂的容器及使用该PTK7调节剂来治疗或诊断PTK7相关病症的说明材料。

[0038] 本发明的其他优选的实施方案亦利用所公开的调节剂的性质作为可用于通过例如流式细胞计数分析、荧光活化细胞分选(FACS)或激光介导的切片的方法来鉴别、分离、切片或富集肿瘤起始细胞群或亚群的工具。

[0039] 如此,本发明的另一优选的实施方案针对鉴别、分离、切片或富集肿瘤起始细胞群的方法,其包括使所述肿瘤起始细胞与PTK7调节剂接触的步骤。

[0040] 前述内容为概述,且因此必然含有细节的简化、一般化及省略;因此,本领域技术人员应了解,概述仅为说明性的,且不欲以任何方式构成限制。本文所述的方法、组合物和/或装置和/或其他标的物的其他方面、特征及优势将在本文所述的教导中变得显而易见。提供该概述来以简化形式介绍下文在发明详述中进一步描述的所选概念。此概述不意在鉴别要求保护的主题的关键特征或基本特征,其亦不欲在确定要求保护的主题的范畴中用作辅助。

附图说明

[0041] 图1A至图1C分别描绘编码人PTK7的核酸序列(SEQ ID NO:1)、示例性人PTK7变体的氨基酸序列(SEQ ID NO:2),且图1C描绘PTK7的四种代表性同种型的比对及标记序列(SEQ ID NO:3至6),其中图1A中的加下划线部分表示PTK7-1开放阅读框架,图1B中加下划线部分表示如本文所定义PTK7的细胞外结构域且图1C显示如NCBI的基因数据库(Gene database)中所报导人PTK7蛋白质的四种已知示例性同种型的蛋白质比对(蛋白质登录号:同种型a=NP_002812,同种型b=NP_690619;同种型c=NP_690620;同种型d=NP_690621)。图1C分别进一步公开基序肽“GxGxFGxV”、“HRDLxxxN”及“SDVWSxG”为SEQ ID NO:11至13。

[0042] 图2为描绘如使用获自全结肠直肠癌肿瘤样本亚组的高度富集肿瘤祖细胞(TProg)、肿瘤永存细胞(TPC)及非致肿瘤细胞(NTG)群体的全转录组测序所测量的未处理(-)及经伊立替康(irinotecan)处理(+)的小鼠中PTK7的基因表达水平的图示;

[0043] 图3为显示如使用定量RT-PCR所测量的,获自带有三种不同非传统异种移植(NTX)结肠直肠或胰腺肿瘤细胞系之一的小鼠且针对非致肿瘤(NTG)富集细胞群归一化的高度富集肿瘤祖细胞(TProg)及肿瘤永存细胞(TPC)群体中人PTK7的相对基因表达水平的图示;

[0044] 图4A及图4B为显示如针对正常结肠及直肠组织中的表达平均值归一化的(图4A)或与正常邻近组织(图4B)相匹配的,在来自患有I至IV期疾病的患者的全结肠直肠癌样本中如使用RT-PCR所测量的人PTK7的相对基因表达水平的图示;

[0045] 图5A及图5B为分别显示如通过RT-PCR在全肿瘤样本(灰色点)中所测量的或使患者的NAT(白色点)与18种不同实体肿瘤类型之一相匹配的人PTK7基因的相对或绝对基因表

达水平的图示；

[0046] 图6A及图6B以表格形式提供如本文实施例中所述经分离、克隆及工程化的多种鼠类及人源化示例性PTK7调节剂的重链及轻链可变区的邻接氨基酸序列；

[0047] 图7A至图7E以图解及表格表示提供示例性PTK7调节剂的生理化学特征，其中图7A描绘某些调节剂关于鼠类及人PTK7的结合特征，图7B提供所选调节剂的亲和力、合并及交叉反应性数据，图7C及图7D显示所选鼠类调节剂及其人源化对应物的比较结合特征且图7E提供所选调节剂关于人PTK7及其鼠类直系同源物的结合亲和力；

[0048] 图8A至图8G描绘本发明的各种PTK7构建体，其中图8A至图8F提供呈Ig-PTK7-ECD构建体形式的6种PTK7调节剂变体的氨基酸序列，其中各构建体的细胞外结构域部分不同，且图8G以图解方式说明PTK7的细胞外部分的7个Ig结构域以及如括号所示由ELISA得出的若干PTK7调节剂的结合区；

[0049] 图9A至图9E说明不同肿瘤裂解物及NTX样品中PTK7蛋白质的表达水平，其中图9A至图9D描绘与正常邻近组织对照相比各种肿瘤及疾病病期的肿瘤裂解物水平，且图9E提供说明用所选调节剂对人非传统异种移植物的染色的直方图，其中将对照染色(灰色)与非致肿瘤(虚线)及推定癌症干细胞群(实线)上的染色相比较；

[0050] 图10A至图10E以图解方式说明本发明的所选调节剂在与细胞表面上的PTK7结合时内化的能力，其中图10C显示与示例性调节剂(即SC6.10.2,图10C中称为H10)相关的荧光位移，且图10A及图10B表示对照，图10D表明来自杂交瘤上清液的示例性调节剂可与纯化对照(SC6.2.35、SC6.10.2及SC6.25.1,分别称为H2.35、H10.2及H25.1)相比较就内化而言进行筛选，且图10E说明各种调节剂的内化程度(各数据点表示分立的调节剂)，其中虚线表示背景截止值且响应于结合事件由细胞内化的PTK7分子数被绘示于y轴上；

[0051] 图11A至图11D以图解方式说明所公开的调节剂免疫特异性介导细胞毒性剂递送及促进细胞杀死的能力，其中图11A描绘使用三种示例性调节剂(SC6.2.35、SC6.10.2及SC6.25.3,分别称为H2.35、H10.2及H25.3)作为靶向部分将细胞毒性有效负荷引导至表达PTK7的细胞，且其中图11B至图11D说明4种其他示例性调节剂消除三种分立的细胞系的能力，其中在各图中，向下倾斜曲线指示通过内化毒素的细胞杀死；

[0052] 图12显示三种示例性PTK7调节剂免疫特异性介导细胞毒性剂递送且由此降低多种NTX肿瘤细胞系中肿瘤细胞活力的能力；

[0053] 图13A至图13C指示所公开的调节剂降低肿瘤永存细胞频率且抑制其致肿瘤潜能的能力，其中图13A及图13B显示调节剂(即标记了SC6.H2的SC6.2.35)介导的细胞毒性剂递送影响两种分立的NTX乳房肿瘤细胞群的活力，且图13C描绘植入免疫功能不全小鼠中后经处理细胞系的致肿瘤性降低；及

[0054] 图14显示本发明的示例性人源化PTK7调节剂有效介导细胞毒性剂免疫特异性递送及内化至PTK7表达细胞的能力。

[0055] 发明详述

[0056] I. 引言

[0057] 尽管本发明可以许多不同形式实施，但本文所公开为例示本发明原理的其特定示例性实施方案。应强调，本发明不限于所示特定实施方案。此外，任何本文所用的章节标题仅出于组织性目的且不应被解释为限制所描述的主题。

[0058] 如先前所提及的,令人惊奇地发现了PTK7(包括各种同种型)的表达与赘生性生长及过度增殖性病症有关,且所述配体提供可用于治疗相关疾病的有用肿瘤标记物。更具体地,已发现PTK7调节剂,例如本文所公开的PTK7调节剂可有利地用于诊断、诊断治疗、治疗或预防有需要受试者的赘生性病症。因此,尽管下文将详尽讨论本发明的优选的实施方案,尤其在癌症干细胞及其与所公开调节剂相互作用的情形下进行讨论,但本领域技术人员应了解,本发明的范畴并不受所述示例性实施方案限制。相反,本发明及随附权利要求广泛且明确针对PTK7调节剂及其在诊断、诊断治疗、治疗或预防多种PTK7相关或介导病症(包括赘生性或过度增殖性病症)中的用途,而与任何特定作用机制或所特异性靶向的肿瘤组分无关。

[0059] 应进一步了解,与各种现有技术公开的内容相反,本发明主要针对PTK7的各种同种型的免疫特异性调节剂,而非一般性的蛋白质酪氨酸激酶调节剂。即,尽管该类蛋白质酪氨酸激酶受体已在若干类型的病症中广泛涉及且通常被靶向用于治疗性干预,但PTK7特异性调节剂迄今为止吸引较少的关注。一部分,此情形可能起因于相信在治疗立场看来干扰通用PTK活性(尤其用与保守激酶结构域相互作用的小分子)更有效,因为激酶冗余可能补偿该类别特定成员的任何特异性拮抗作用。此外,PTK7据报导包含可阻止其用作治疗性靶标的非活性激酶结构域(或假性激酶结构域)。

[0060] 相反,本发明包括使用优先与PTK7的一或多种同种型反应以提供治疗效益的免疫特异性调节剂。如上文所简要讨论的,在某些实施方案中,可产生及选择本发明的调节剂以与单一PTK7同种型缔合,而在其他实施方案中所选调节剂可与PTK7的一种以上同种型或所有经识别的同种型反应。在这些后者实施方案中,本发明可包括与一种以上PTK7同种型缔合或反应从而提供出乎意料的加成效应或协同效应、以可允许一种以上PTK7介导的路径沉默的调节剂。

[0061] 更一般而言,如本申请中所证明,所公开的免疫特异性PTK7调节剂可有效用以靶向及消除或以其他方式使致肿瘤细胞失能且治疗PTK7相关病症(例如瘤形成)。如本文所用,应认为PTK7相关病症意指在疾病或病症的过程或病源学中被PTK7表达的表型异常标记、诊断或鉴别的任何病症或疾病(包括增殖性病症)。在这方面,表型异常可例如包含PTK7表达水平升高或下抑、某些可定义的细胞群上的异常PTK7表达或细胞生命周期的不当时期或阶段的异常PTK7表达。

[0062] 除上文方才所讨论的一般性关联外,发明者进一步发现所选肿瘤起始细胞(TIC)与PTK7之间迄今为止未知的表型相关性。在这方面,已发现当与一起构成实体肿瘤的大部分的正常组织及非致肿瘤细胞(NTG)比较时,所选TIC表达升高水平的PTK7。因此,PTK7同种型包含肿瘤相关标记物(或抗原或免疫原),且已发现其由于细胞表面上或肿瘤微环境中蛋白质的水平改变而为检测及抑止TIC及相关瘤形成提供有效药剂。更具体地,进一步发现PTK7调节剂,包括与蛋白质缔合、结合或反应的免疫应答性拮抗剂及抗体,有效地降低肿瘤起始细胞的频率,且因此可用于消除、耗竭这些肿瘤起始细胞、使这些肿瘤起始细胞失能、减少这些肿瘤起始细胞、促进这些肿瘤起始细胞的分化或以其他方式阻止或限制这些肿瘤起始细胞休眠和/或继续刺激患者中肿瘤生长、转移或重现的能力。如下文所更详细论述的,TIC肿瘤细胞亚群由肿瘤永存细胞(TPC)与高度增殖性肿瘤祖细胞(TProg)构成。

[0063] 鉴于这些发现,本领域技术人员应了解,本发明进一步提供PTK7调节剂及其在降

低肿瘤起始细胞频率中的用途。如下文所详尽讨论的,本发明的PTK7调节剂广泛地包含识别PTK7或PTK7或其基因、与其反应、竞争、拮抗、相互作用、结合、激动PTK7或PTK7或其基因或与其缔合的任何化合物。通过这些相互作用,PTK7调节剂由此降低或缓和肿瘤起始细胞的频率。本文所公开的示例性调节剂包括核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、肽或多肽。在某些优选的实施方案中,所选调节剂将包含PTK7的抗体或其免疫反应性片段或衍生物。所述抗体性质上可以是拮抗或激动性的且可任选地与细胞毒性剂缀合或缔合。在其他实施方案中,本发明中的调节剂将包含含有PTK7同种型或其反应性片段的PTK7构建体。应了解,所述构建体可包含融合蛋白且可包括来自其他多肽(例如免疫球蛋白或生物应答调节剂)的反应性结构域。在其他方面中,PTK7调节剂将包含在基因组水平发挥所需作用的核酸装配。下文将详细论述与本发明教导相容的其他调节剂。

[0064] 不论最终选择调节剂的何种形式,在引入受试者中之前其优选将呈分离且纯化状态。在这方面,经分离的PTK7调节剂在广义上且根据标准医药实践应被解释为意指呈实质上不含不当污染物(生物或其他污染物)的状态的包含所述调节剂的任何制备物或组合物。如下文详细讨论的,可使用各种本领域内认可的技术按需要纯化和配制这些制备物。当然,应了解,所述“经分离”的制备物可视需要被有意地用惰性或活性成分配制或与惰性或活性成分组合以改进成品的商业、制造或治疗方面且提供药物组合物。

[0065] II. PTK7生理学

[0066] 蛋白质酪氨酸激酶(PTK7)(也已知为结肠癌激酶4(CCK4))为最初自正常人黑色素细胞(Lee等人,Oncogene 8(12),1993)及另外自结肠癌组织(Mossie等人,Oncogene 11(10),1995)克隆的受体酪氨酸激酶。PTK7基因位于6p21.1-p12.2处。已自睾丸cDNA克隆了人PTK7的5种剪接同种型(Jung, Ji等人,Biochim Biophys Acta 1579,2002)。在睾丸与肝癌或结肠癌细胞系之间同种型彼此之间相对丰度不同,但这些同种型的功能意义(若存在)未知。生物信息学分析已表明小鼠可自选择性剪接的mRNA表达可溶性Ptk7同种型(Forrest, Taylor等人,Genome Biol 7,2006)。为了本申请的目的,应了解,除非上下文约束条件另外规定,否则术语“PTK7”及“CCK4”可互换使用且包括人PTK7的剪接变体、同种型、物种直系同源物及同源物。应进一步了解,所述术语亦可指PTK7的天然或变体形式的任何衍生物或片段,其含有PTK7蛋白调节剂(例如抗体或免疫反应性片段)可特异性结合的表位。

[0067] 全长PTK7蛋白为具有674个氨基酸的细胞外结构域(ECD)、继而为短TM跨膜部分及345个氨基酸的细胞质结构域的I型跨膜蛋白。人PTK7的示例性同种型(即转录物变体PTK7-1)的完全核酸序列具有Genbank登录号NM_002821且示于图1A中(SEQ ID NO:1)。类似地,PTK7-1蛋白的全长示例性氨基酸序列示于图1B中(SEQ ID NO:2)。应注意,SEQ ID NO:2中的PTK7蛋白与SEQ ID NO:1的加下划线核酸序列的翻译产物(即如SEQ ID NO:3中所示的同种型)的不同的处在于在图1B中的位置93处存在点突变(L→P)。关于同种型,图1C显示如Genbank中所报导的PTK7的四种示例性同种型的氨基酸序列的批注比对(蛋白质登录号:同种型a=NP_002812,SEQ ID NO:3;同种型b=NP_690619,SEQ ID NO:5;同种型c=NP_690620,SEQ ID NO:6;同种型d=NP_690621,SEQ ID NO:4)。如先前所提及的,同种型a中所示的序列对应于图1A中所示PTK7变体1的开放阅读框架的翻译产物且为最长同种型。如所示,其他剪接同种型编码相对于同种型a缺乏各种Igcam结构域的细胞外结构域。所有同种

型编码同一细胞内结构域。在PTK7比对之下显示蛋白质丝氨酸/酪氨酸激酶的催化结构域中的保守子基序以及认为使得其激酶结构域失活的PTK7蛋白质变化的批注(例如子结构域I及VII中的变化)。

[0068] 在任何情况下,成熟全长PTK7 ECD均包含7个免疫球蛋白样结构域,而如图1C中所示,各种剪接变体编码ECD结构不同的PTK7同种型。所有同种型均含有与通用类别酪氨酸激酶中所发现的结构域实质上同源的细胞质结构域。然而,PTK7缺乏可检测的酪氨酸激酶活性,且因而属于假激酶亚家族,其中各保守激酶子结构域中的若干氨基酸变化使ATP的结合受损(Kroiher等人,Bioessays 23(1),2001)。特别的,PTK7中的子结构域I及子结构域VII中关键残基改变,使得与ATP的不可转移磷酸的直接相互作用以及桥连这些磷酸的 Mg^{2+} 辅因子的整合受损(Hanks等人,Methods Enzymol 200,1991)。

[0069] 应进一步了解,与本发明相容的PTK7多肽可呈“成熟”蛋白质形式或可为更大的蛋白质(例如融合蛋白)的一部分。包括其它氨基酸序列通常是有利的,所述其它氨基酸序列含有分泌序列或前导序列、前蛋白、原蛋白或前原蛋白序列或辅助纯化的序列,例如亲和力标签,例如(但不限于)多个组氨酸残基、FLAG标签、HA标签或myc标签。亦可使用在重组体产生过程中可提供稳定性的其他序列。所述序列可任选地通过并入可裂解序列作为另外的序列或其部分而根据需要来移除。因此,如本文所定义的,PTK7多肽可包含与包括其他多肽的辅助部分融合的构建体。所述其他序列及亲和力标签在本领域中为熟知的且可使用标准生物化学技术产生。

[0070] 尽管PTK7的激酶结构域为非活性的,但PTK7功能的生物重要性可由水螅(Hydra)至果蝇(Drosophila)至鸡及人的保守直系同源物的存在来推断,通过序列分析预测其中的每一种均缺乏激酶活性(Kroiher等人,2001)。基于与螺旋-螺旋缔合倾向相关的特定TM结构域基序的高度保守性及RTK通常响应于配体接合而二聚化的事实,提出TM结构域可介导PTK7二聚化(Kroiher等人,2001)。之后的研究表明PTK7 TM结构域并不促进自身优先缔合(Kobus等人,Biochemistry 44(5),2005),但亦不排除与其他RTK或信号传导复合物的成员的TM结构域的异聚相互作用。因此,不预期PTK7假激酶结构域本身直接传输信号,但其可作为信号传导路径中其他分子的骨架相互作用或可募集其他酪氨酸激酶(Kroiher等人,2001)。

[0071] 人PTK7不在成人结肠中表达,但其表达于胎儿结肠及多种结肠癌衍生的细胞系中(Mossie等人,同上文,1995)以及转移性结肠直肠癌中(Saha等人,Science 294(5545)2001)。被报导表达PTK7的其他正常组织及细胞包括肺、甲状腺及卵巢(Mossie,Jallal等人,1995)、CD4+新近胸腺迁出T细胞(Haines等人,J Exp Med 206(2)2009)及正常骨髓祖细胞及CD34+CD38-骨髓细胞(Prebet等人,Blood 116(13),2010)。关于癌组织,亦已在结肠癌细胞(Mossie等人,1995);AML样品(Muller-Tidow等人,Clin Cancer Res 10(4),2004);CD34-前TALL细胞(Shangguan等人,J Proteome Res 7(5)2008)及胃癌(Gorringe等人,Genes Chromosomes Cancer 42(3),2005)中发现了PTK7表达。有趣的是,尽管PTK7最初是从正常黑色素细胞克隆的,但已报导PTK7在转移性黑色素瘤中丢失(Easty等人,Int J Cancer 71(6),1997)。在含有染色体6p21的缺失的某些乳腺癌中PTK7亦可能丢失(Piao等人,Genes Chromosomes Cancer 30(2),2001),但在乳腺癌细胞系中的表达可变(Su等人,J Cancer 1 2010)。肺腺癌亦表达PTK7,其中更强的表达水平与这些肿瘤中更有利的预后有关。

关 (Endoh等人, *J Clin Oncol* 22 (5), 2004)。如通过qRT-PCR所测定的,骨肉瘤中6p12-p21区的扩增的精细定位已显示基因拷贝数增加未必会引起PTK7过表达 (Lu等人, *Mol Cancer Res* 6 (6), 2008)。

[0072] PTK7的一或多种配体尚未知,但PTK7与多种生物信号传导路径及发育过程有关。蛋白质的免疫球蛋白样ECD结构域结构表明其可能为细胞-细胞接触及黏附的参与者或传感器。已将PTK7的果蝇直系同源物OTK与神经丛蛋白 (plexin) 相关联,作为轴突导向期间臂板蛋白 (semaphorin) 信号传导的潜在辅助受体 (Winberg等人, *Neuron* 32 (1), 2001)。近来,已证明非洲爪蟾 (*Xenopus*) 中神经丛蛋白A1与PTK7之间的相互作用 (Wagner等人, *Biochem Biophys Res Commun* 402 (2) 2010), 同时已显示了PTK7的鸡直系同源物KLG与对于鸡心脏器官形成重要的复合物中的神经丛蛋白A1及Sema6D相互作用 (Toyofuku等人, *Genes Dev* 18 (4), 2004)。使用可溶性PTK7 (sPTK7) 显示PTK7在VEGF诱导的血管生成以及人内皮细胞的体外管形成、迁移及侵入中的作用 (Shin等人, *Biochem Biophys Res Commun* 371 (4), 2008)。小鼠PTK7亦与需要肌动蛋白细胞骨架重组及细胞迁移的表皮伤口愈合过程有关 (Caddy等人, *Dev Cell* 19 (1), 2010)。

[0073] 关于特定的信号级联,PTK7似乎为对于发育重要的各种Wnt信号传导路径的组分 (Puppo等人, *EMBO Rep* 12 (1), 2010)。表达Ptk7中的无效突变或严重亚效突变的小鼠在围产期死亡,显示与PTK7在平面细胞极性 (PCP) 路径中的作用一致的表型 (Lu等人, *Nature* 430 (6995), 2004)。类似地,含有在ECD中具有三个氨基酸插入的突变体PTK7蛋白的chuzhoi小鼠显示PCP缺陷表型 (Paudyal, Damrau等人, 2010)。鼠类PTK7已显示在遗传上与其它PCP基因相互作用,包括Vangl2 (Lu等人, 2004)、Celsr1 (Paudyal, Damrau等人, 2010)、Scrb1及Grhl3 (Caddy等人, 2010)。1型膜基质金属蛋白酶 (MT1-MMP) 使PTK7裂解以释放可溶性PTK7 (即sPTK7), 且MT1-MMP活性与sPTK7产生的平衡的失调导致斑马鱼 (zebrafish) 中的会聚延伸缺陷,这也与PTK7在PCP路径中的作用一致 (Golubkov等人, *J Biol Chem* 285 (46), 2010)。在非洲爪蟾中,在非典型Wnt信号传导路径中与dsh及Wnt受体fz7的复合物中发现PTK7 (Shnitsar等人, *Development* 135 (24), 2008), 而可显示PTK7与 β -连环蛋白之间的相互作用受小鼠细胞中的典型Wnt信号传导动态影响 (Puppo等人, 2010)。另外,PTK7启动子中的保守TCF/LEF-转录因子结合位点表明其为Wnt反应基因且可解释某些结肠直肠癌中的PTK7上调,因为对于Wnt路径信号传导而言这些肿瘤通常失调 (Katoh, *Int J Mol Med* 20 (3), 2007)。

[0074] 在癌组织内,除上文所述其调节Wnt路径的潜能外,PTK似乎在HCT116结肠癌细胞系中输送促增殖及抗细胞凋亡信号,所述表型可通过RNAi介导的PTK7敲低 (knock-down) 被逆转 (Meng等人, *PLoS One* 5 (11), 2010)。PTK7抗细胞凋亡信号在AML胚中输送对蒽环霉素介导的细胞杀死的抗性,其可使用可溶性PTK7-Fc蛋白逆转 (Prebet等人, 2010)。在策略中已采用由特定癌细胞过表达PTK7以便使用结合PTK7且随后被内化的适配体使道诺霉素 (daunorubicin) 被靶向递送至培养物中的T-ALL细胞 (Xiao等人, *Chemistry* 14 (6), 2008)。

[0075] 除前述特征外,本公开表明PTK7的表达在各种肿瘤起始细胞群中升高。连同大块肿瘤中至少一些非致肿瘤细胞中的PTK7的伴随上调,这提出了下述可能性:PTK7介导的配体受体相互作用可触发与肿瘤增殖、血管新生和/或肿瘤转移有关的细胞信号级联。尽管不希望受任何特定理论束缚,相信本发明的PTK7调节剂 (特别是拮抗或中和实施方案) 至少部

分地通过降低或消除肿瘤起始细胞频率从而以与传统标准护理治疗方案(例如伊立替康)不同的方式干扰肿瘤传播或存活、或经由免疫治疗信号传导或递送能杀死PTK7表达细胞的有效负荷来起作用。例如,通过拮抗PTK7降低癌症干细胞活性可包括在面对消除增殖细胞的化学治疗方案时简单地促进细胞增殖,或诱导肿瘤起始细胞分化,以使其失去自我更新能力(即无限增殖及维持多能性)。或者,在优选的实施方案中,将细胞毒性T细胞募集至PTK7表达细胞或递送与能够内化的抗PTK7抗体相缀合的强效毒素可选择性地杀死TPC。

[0076] III. 肿瘤永存细胞

[0077] 与现有技术的教导相反,本发明提供特别适用于靶向肿瘤起始细胞,特别是肿瘤永存细胞的PTK7调节剂,由此促进赘生性病症的治疗、管理或预防。更具体地,如先前所示,已令人惊奇地发现,特定的肿瘤细胞亚群表达PTK7且可修饰对于癌症干细胞自我更新及细胞存活重要的成形素(morphogen)信号传导的局部协调。因此,在优选的实施方案中,根据本发明教导可使用PTK7的调节剂来降低肿瘤起始细胞频率且由此促进治疗或管理过度增殖性疾病。

[0078] 如本文所用,术语肿瘤起始细胞(TIC)涵盖肿瘤永存细胞(TPC;即癌症干细胞或CSC)及高度增殖性肿瘤祖细胞(称为TProg),其一起通常构成大块肿瘤或肿块的独特亚群(即0.1%至40%)。为了本发明的目的,术语肿瘤永存细胞及癌症干细胞或赘生性干细胞等同且在本文中可互换使用。相反,TPC与TProg的不同之处在于其可完全概括肿瘤内存在的肿瘤细胞的组成且具有无限自我更新能力,如少数经分离的细胞的系列移植(通过小鼠的两次或更多次传代)所表明的。如下文所更详细论述的,使用适当细胞表面标记物的荧光活化细胞分选(FACS)为分离高度富集细胞亚群(纯度>99.5%)的可靠方法,这至少部分地是由于其区分单细胞与细胞块(即二倍体等)的能力。使用所述技术已显示,当将低细胞数量的高度纯化TProg细胞移植至免疫功能不全小鼠中时,其可刺激原发性移植物中的肿瘤生长。然而,不同于经纯化的TPC亚群,Tprog产生的肿瘤在表型细胞异质性方面不完全反映亲本肿瘤,且明确在后续移植物中、在再起始肿瘤形成方面无效。相反,TPC亚群完全重构亲本肿瘤的细胞异质性且当系列分离且移植时可有效起始肿瘤。因此,本领域技术人员将认识到尽管TPC与TProg在原发性移植物中皆可产生肿瘤,但TPC与TProg之间的确定差异为以低细胞数量系列移植时TPC持续刺激异质肿瘤生长的独特能力。表征TPC的其他常见方法涉及细胞表面标记物的形态及检验、转录特征谱及药物反应,虽然标记物表达可随培养条件及体外细胞系传代而变化。

[0079] 因此,为了本发明的目的,肿瘤永存细胞,如支持正常组织中的细胞层级的正常干细胞,优选通过其无限自我更新同时维持多向分化能力的能力来定义。肿瘤永存细胞因此能够产生致肿瘤子代(即肿瘤起始细胞:TPC及TProg)与非致肿瘤(NTG)子代。如本文所用,非致肿瘤细胞(NTG)是指自肿瘤起始细胞产生但本身不具有自我更新或产生构成肿瘤的肿瘤细胞的异质谱系的能力的肿瘤细胞。实验上,甚至当以过量细胞数量移植时,NTG细胞不能在小鼠中可再现地形成肿瘤。

[0080] 如所示,TProg由于其有限的在小鼠中产生肿瘤的能力亦被归类为肿瘤起始细胞(或TIC)。TProg为TPC的子代且通常能够进行有限次数的非自我更新细胞分裂。此外,TProg细胞可进一步被分成早期肿瘤祖细胞(ETP)及晚期肿瘤祖细胞(LTP),其各自可通过表型(例如细胞表面标记物)及重构肿瘤细胞构架的不同能力进行区分。尽管存在所述技术差

异,但ETP与LTP两者与TPC在功能上的不同之处在于其以低细胞数量移植时系列重构肿瘤的能力通常较差,且通常不反映亲本肿瘤的异质性。尽管存在上述区别,也显示了各种TProg群体偶尔可获得通常归于干细胞的自我更新能力且本身变为TPC(或CSC)。在任何情况下,两种类型的肿瘤起始细胞皆可能在单一患者的典型肿瘤块中出现且经受如本文所公开的调节剂的治疗。即,所公开的组合物在降低频率或改变所述PTK7阳性肿瘤起始细胞的化学敏感性中通常有效,而与肿瘤中所呈现的特定实施方案或混合物无关。

[0081] 在本发明的上下文中,与TProg(ETP与LTP)、NTG细胞及构成肿瘤块的肿瘤浸润性非TPC来源细胞(例如纤维母细胞/基质、内皮及造血细胞)相比,TPC更具致肿瘤性、相对更沉默且通常更具化学抗性。鉴于惯常疗法及方案大部分被设计成减瘤肿瘤以及攻击快速增殖的细胞,因此与更快增殖的TProg及其他大块肿瘤细胞群相比,TPC可能对惯常疗法及方案更具抗性。此外,TPC通常表达使其对惯常疗法相对更具化学抗性的其他特征,例如多药抗性转运体的表达增加、DNA修复机制及抗细胞凋亡蛋白质增强。其中的每一项均促成通过TPC的耐药性的这些性质构成确保大多数患有晚期瘤形成的患者的长远利益的标准肿瘤学治疗方案失败的关键原因;即不能充分靶向及根除刺激持续肿瘤生长及重现的那些细胞(即TPC或CSC)。

[0082] 不同于许多前述现有技术治疗,本发明的新型组合物优选在向受试者施用后降低肿瘤起始细胞的频率,而与所选调节剂的形式或特定靶标无关(例如遗传物质、PTK7抗体或配体融合构建体)。如上文所述,肿瘤起始细胞频率的降低可能由于以下原因出现:a)消除、耗竭、敏化、沉默或抑制肿瘤起始细胞;b)控制肿瘤起始细胞的生长、扩增或重现;c)中断肿瘤起始细胞的起始、传播、维持或增殖;或d)以其他方式阻碍致肿瘤细胞的存活、再生和/或转移。在一些实施方案中,肿瘤起始细胞的频率降低由于一或多种生理路径的变化而出现。通过降低或消除肿瘤起始细胞或修饰其潜能(例如诱导分化、小生境破坏)或以其他方式干扰其对肿瘤环境或其他细胞施加影响的能力产生的路径变化转而允许通过抑制肿瘤形成、肿瘤维持和/或转移及重现更有效地治疗PTK7相关病症。

[0083] 在可用以评估该种肿瘤起始细胞频率降低的方法中,有体外或体内有限稀释分析,优选继以使用泊松分布统计的计数或评估预定确定事件的频率,例如体内产生或不产生肿瘤的能力。尽管所述限制稀释法分析为计算肿瘤起始细胞频率降低的优选方法,但也可使用其他要求较低的方法来有效地测定所需值,但精确性略差,且与本文的教导完全相容。因此,如本领域技术人员所了解的,也可能通过熟知的流式细胞计数或免疫组织化学方法测定频率值的降低。关于所有前述方法,参见例如Dylla等人,2008,PMCID:PMC2413402及Hoey等人,2009,PMID:19664991;各文献均在此以其全部通过引用而并入。

[0084] 关于有限稀释分析,肿瘤起始细胞频率的体外计数可通过将分级分离或未分级分离的人肿瘤细胞(例如分别来自经处理或未处理的肿瘤)沉积于促进集落形成的体外生长条件中来完成。以此方式,集落形成细胞可通过简单计数及表征集落或通过由以下组成的分析来计数:例如将人肿瘤细胞在系列稀释物中沉积于平板中且在涂铺后至少10天将各孔的集落形成评分为阳性或阴性。测定肿瘤起始细胞频率的能力通常更精确的体内限制稀释实验或分析涵盖将来自未处理的对照或经处理条件的人肿瘤细胞在连续稀释物中移植至例如免疫功能不全小鼠中,且随后在移植后至少60天将各小鼠的肿瘤形成评分为阳性或阴性。通过体外或体内有限稀释分析得出细胞频率值优选通过对已知阳性及阴性事件的频率

应用泊松分布统计从而提供满足阳性事件的定义(在此情况下分别为集落或肿瘤形成)的事件的频率来进行。

[0085] 关于可用以计算肿瘤起始细胞频率的与本发明相容的其他方法,最常见的方法包括可定量流式细胞计数技术及免疫组织化学染色程序。尽管不如上文方才所述的有限稀释分析技术精确,但这些程序劳动强度小得多且在相对短的时限内提供合理值。因此,应了解,熟练技工可使用利用结合对于肿瘤起始细胞而言已知富集的本领域认可的细胞表面蛋白(例如如下文实施例1中所述的潜在相容的标记物)的一或多种抗体或试剂的流式细胞计数细胞表面标记物特征谱测定,且由此测量各种样品的TIC水平。在另一相容的方法中,本领域技术人员可通过免疫组织化学方法,使用能够结合认为可区别这些细胞的细胞表面蛋白的一或多种抗体或试剂原位计数TIC频率(例如在组织切片中)。

[0086] 使用上文所提及的任何方法,接着有可能定量由根据本文的教导所公开的PTK7调节剂(包括与细胞毒性剂相缀合的那些)提供的TIC(或其中的TPC)频率降低。在一些情况下,本发明化合物可以10%、15%、20%、25%、30%或甚至35%降低TIC的频率(通过上文所示的多种机制,包括消除、诱导分化、小生境破坏、沉默等)。在其他实施方案中,TIC频率的降低可为约40%、45%、50%、55%、60%或65%。在某些实施方案中,所公开化合物可以70%、75%、80%、85%、90%或甚至95%降低TIC频率。当然应了解,TIC频率的任何降低均可能引起瘤形成的致肿瘤性、持续、重现及侵略性的相应降低。

[0087] IV.PTK7调节剂

[0088] 在任何情况下,本发明针对PTK7调节剂(包括PTK7拮抗剂)的用途,其用于诊断、诊断治疗、治疗和/或预防各种病症,包括许多PTK7相关恶性疾病中的任一种。所公开的调节剂可被单独使用或与多种抗癌化合物联合使用,例如化学治疗剂或免疫治疗剂(例如治疗性抗体)或生物应答调节剂。在其他所选实施方案中,两种或更多种分立的PTK7调节剂可被组合使用以提供增强的抗增生性作用或可用以制造多特异性构建体。

[0089] 在某些实施方案中,本发明的PTK7调节剂将包含核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、肽或多肽。甚至更优选地,调节剂将包含可溶性PTK7(sPTK7)或其形式、变体、衍生物或片段,包括例如PTK7融合构建体(例如PTK7-Fc、PTK7-靶向部分等)或PTK7缀合物(例如PTK7-PEG、PTK7-细胞毒性剂、PTK7-brm等)。还应了解,在其他实施方案中,PTK7调节剂包含抗体或其免疫反应性片段或衍生物。在特别优选的实施方案中,本发明的调节剂将包含中和抗体或其衍生物或片段。在其他实施方案中,PTK7调节剂可包含内化抗体或其片段。在其他实施方案中,PTK7调节剂可包含耗竭抗体或其片段。此外,正如前述融合构建体,这些抗体调节剂可与所选细胞毒性剂、聚合物、生物应答调节剂(BRM)等缀合、连接或以其他方式缔合以提供具有各种(且任选地多种)作用机制的定向免疫疗法。如上文所提及的,所述抗体可为泛PTK7抗体且与两种或更多种PTK7同种型或与单一同种型选择性反应的免疫特异性抗体缔合。在其他实施方案中,所述调节剂可在基因水平起作用且可包含作为反义构建体、siRNA、微小RNA等的化合物。

[0090] 应进一步了解,所公开的PTK7调节剂可通过多种机制耗竭、沉默、中和、消除或抑制肿瘤细胞,特别是TPC的生长、传播或存活和/或相关的瘤形成,所述机制包括激动或拮抗所选路径或消除特定细胞,这取决于例如PTK7调节剂的形式、任何相关有效负荷或剂量及递送方法。因此,尽管本文所公开的优选的实施方案针对耗竭、抑制或沉默特定肿瘤细胞亚

群,例如肿瘤永存细胞,但必须强调所述实施方案仅为说明性的且在任何意义上均不具限制性。相反,如随附权利要求中所示,本发明广泛地针对PTK7调节剂及其在治疗、管理或预防各种PTK7相关过度增殖性病症中的用途,而与任何特定机制或靶肿瘤细胞群无关。

[0091] 在相同意义上,所公开的本发明实施方案可包含与PTK7缔合的一或多种PTK7拮抗剂。为此,应了解,本发明的PTK7拮抗剂可包含任何配体、多肽、肽、融合蛋白、抗体或其免疫活性片段或衍生物,其识别PTK7蛋白质或其片段、与PTK7蛋白质或其片段反应、结合、组合、竞争、缔合或与PTK7蛋白质或其片段以其他方式相互作用且消除、沉默、降低、抑制、阻碍、约束或控制肿瘤起始细胞或其他赘生性细胞(包括大块肿瘤或NTG细胞)的生长。在所选实施方案中,PTK7调节剂包括PTK7拮抗剂。

[0092] 如本文所用,拮抗剂是指能够中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰特定或指定蛋白质的活性的分子,包括受体与配体的结合或酶与底物的相互作用。更一般而言,本发明的拮抗剂可包含抗体及抗原结合片段或其衍生物、蛋白质、肽、糖蛋白、糖肽、糖脂、多糖、寡糖、核酸、反义构建体、siRNA、miRNA、生物有机分子、肽模拟物、药学试剂及其代谢物、转录及翻译控制序列等。拮抗剂亦可包括小分子抑制剂、融合蛋白、受体分子及特异性结合蛋白质从而阻隔其与其底物靶标的结合的衍生物、蛋白质的拮抗剂变体、针对蛋白质的反义分子、RNA适配体及抗蛋白质的核糖核酸酶。

[0093] 如本文所用及对两种或更多种分子或化合物所应用的,应认为术语识别或缔合意指分子的共价或非共价反应、结合、特异性结合、组合、相互作用、连接、连结、联合、聚结、合并或接合,从而使一种分子对另一种分子施加影响。

[0094] 此外,如本文实施例中所证明的,在某些情况下,一些人PTK7的调节剂可与来自除人以外的物种(例如鼠类)的PTK7交叉反应。在其他情况下,示例性调节剂可对人PTK7的一或多种同种型具特异性且不显示与来自其他物种的PTK7直系同源物的交叉反应性。当然,结合本文的教导,所述实施方案可包含与来自单一物种的两种或更多种同种型缔合的泛PTK7抗体或仅与单一同种型缔合的抗体。

[0095] 在任何情况下且如下文所更详细讨论的,本领域技术人员应了解,所公开的调节剂可以缀合或非缀合形式被使用。即,调节剂可与药学活性化合物、生物应答调节剂、抗癌剂、细胞毒性剂或细胞生长抑制剂、诊断部分或生物相容性调节剂缔合或缀合(例如共价或非共价地)。在此方面,应了解所述缀合物可包含肽、多肽、蛋白质、融合蛋白、核酸分子、小分子、模拟剂、合成药物、无机分子、有机分子及放射性同位素。此外,如本文所示,所选缀合物可以各种摩尔比共价或非共价地连接至PTK7调节剂,这至少部分地取决于用以实现缀合的方法。

[0096] V. 抗体

[0097] a. 概述

[0098] 如先前所提及的,本发明的特别优选的实施方案包含优先与PTK7的一或多种同种型缔合的呈抗体形式的PTK7调节剂。术语抗体以最广泛的意义被使用且特别涵盖合成抗体、单克隆抗体、寡克隆或多克隆(polyclonal)抗体、多克隆(multiclonal)抗体、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、灵长类化抗体、Fab片段、F(ab')片段、单链FvFc(scFvFc)、单链Fv(scFv)、抗独特型(抗Id)抗体及任何其他免疫活性抗体片段,只要其展现所需的生物活

性(即免疫特异性或免疫优先PTK7缔合或结合)即可。在更广泛的意义上,本发明的抗体包括免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有抗原结合位点的分子,其中这些片段可能融合或可能不融合至另一免疫球蛋白结构域,包括(但不限于)Fc区或其片段。此外,如本文所更详细概述的,术语抗体特别包括如下文所述的Fc变体,包括全长抗体及变体Fc-融合物,其包含Fc区或其片段,任选地包含至少一个氨基酸残基修饰且融合至免疫球蛋白的免疫活性片段。

[0099] 如下文所更详细论述的,通用术语抗体或免疫球蛋白包含可被生物化学地区别的5种不同抗体类别,并且取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可容易地将其归为适当类别。由于历史原因,完整抗体的主要类别称为IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。在人中,可取决于结构及某些生物化学性质而将IgG及IgA类别进一步分成认可的亚类(同型),即IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。应了解,人中的IgG同型按其血清中的丰度次序命名,其中IgG1的丰度最高。

[0100] 尽管所有5种类别的抗体(即IgA、IgD、IgE、IgG及IgM)及所有同型(即IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)以及其变化均在本发明的范畴内,但包含IgG类别免疫球蛋白的优选的实施方案仅为说明的目的而将在一定程度上被详细讨论。然而应了解,该公开内容仅指示示例性组合物及实施本发明的方法且不得以任何方式限制本发明或其随附权利要求的范畴。

[0101] 在这方面,根据同型,人IgG免疫球蛋白包含分子量为约23,000道尔顿(Dalton)的两条相同的轻多肽链及分子量为53,000至70,000的两条相同的重链。与不同抗体类别对应的重链恒定结构域分别由相应小写希腊字母 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 表示。可基于其恒定结构域的氨基酸序列将任何脊椎动物物种的抗体轻链归为两种明显不同的类型(称为 κ 及 λ)之一。本领域技术人员应了解,不同类别免疫球蛋白的亚基结构及三维构型为熟知的。

[0102] 四条链由二硫键以Y构型接合,其中轻链括住自Y的开口起始且经由可变区持续至Y的双末端的重链。各轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而铰链区中的两个二硫键接合重链。各重链及轻链亦具有规则间隔的链内二硫桥,其数目可基于IgG的同型而变化。

[0103] 各重链在一端具有可变结构域(V_H),之后为多个恒定结构域。各轻链在一端具有可变结构域(V_L)且在另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对准且轻链可变结构域与重链的可变结构域对准。在这方面,应了解,轻链(V_L)与重链(V_H)部分两者的可变结构域决定抗原识别及特异性。相反,轻链(C_L)及重链(C_H1 、 C_H2 或 C_H3)的恒定结构域赋予且调节重要生物性质,例如分泌、经胎盘迁移性、循环半衰期、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随其变得更远离抗体的抗原结合位点或氨基端而增加。因此,抗体的氨基端或N端包含可变区且羧基端或C端包含恒定区。因此, C_H3 及 C_L 结构域实际上分别包含重链及轻链的羧基端。

[0104] 术语可变是指如下事实:在免疫球蛋白之间可变结构域的某些部分在序列上广泛不同且这些热点(hot spot)基本上界定特定抗体的结合及特异性特征。在轻链与重链可变结构域中这些高变位点将自身分别显现在三个区段中,称为互补决定区(CDR)。CDR侧翼的可变结构域的更高度保守的部分被称为框架区(FR)。更具体地,在天然存在的单体IgG抗体中,抗体各臂上存在的6个CDR为短的、非邻接氨基酸序列,其被特别安置以当抗体在水相环境中呈三维构型时形成抗原结合位点。

[0105] 包含其余重链及轻链可变结构域的框架区在氨基酸序列中显示较低分子间可变性。相反,框架区主要采取 β 折叠构象,且CDR形成连接 β 折叠结构且在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分的环。因此,这些框架区用以形成通过链间非共价相互作用以正确方向安置6个CDR的骨架。由所安置的CDR形成的抗原结合位点界定与免疫应答性抗原上的表位互补的表面。此互补表面促进抗体与免疫应答性表位的非共价结合。应了解,普通技术人员可使用本文提供的定义容易地鉴别CDR的位置及组成。

[0106] 如下文所更详细论述的,可使用标准重组及表达技术重组或工程化全部或部分重链及轻链可变区以提供有效的抗体。即,可将来自第一抗体(或其任何部分)的重链或轻链可变区与来自第二抗体的重链或轻链可变区的任何所选部分混合及匹配。例如,在一个实施方案中,包含第一抗体的三个轻链CDR的整个轻链可变区可与包含第二抗体的三个重链CDR的整个重链可变区配对以提供可操作的抗体。此外,在其他实施方案中,可混合及匹配源于各种抗体的单个重链及轻链CDR以提供具有优化特征的所需抗体。因此,示例性的抗体可包含来自第一抗体的三个轻链CDR、源于第二抗体的两个重链CDR及来自第三抗体的第三重链CDR。

[0107] 更具体地,在本发明的上下文中,应了解,源于图6A或图6B中所示的鼠类可变区氨基酸序列的任何所公开的重链及轻链CDR可以这种方式被重排以提供根据本发明教导的优化的抗PTK7(例如抗hPTK7)抗体。即,可将源于图6A中所示的邻接轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:20至60,偶数)或图6B中所示的邻接重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:21至61,奇数)的一个或多个CDR并入PTK7调节剂中,且在特别优选的实施方案中,并入与一或多种PTK7同种型免疫特异性缔合的CDR移植或人源化抗体中。所述人源化调节剂的轻链(SEQ ID NO:62至68,偶数)和重链(SEQ ID NO:63至69,奇数)可变区氨基酸序列的实施例亦示于图6A及图6B中。总之,这些新型氨基酸序列描绘本发明的21种鼠类及4种人源化示例性调节剂。此外,图6A及图6B中所示的21种示例性鼠类调节剂及4种人源化调节剂各自的相应核酸序列被包括在本申请随附的序列列表内(SEQ ID NO:120至169)。

[0108] 在任何情况下,互补决定区残基编号可根据Kabat等人的编号定义(1991,NIH Publication 91-3242,National Technical Information Service,Springfield,Va.),具体地,轻链可变结构域中的残基24至34(CDR1)、50至56(CDR2)及89至97(CDR3)及重链可变结构域中的31至35(CDR1)、50至65(CDR2)及95至102(CDR3)。应注意,CDR在抗体与抗体之间显著不同(且根据定义与Kabat共有序列间将不显示同源性)。框架残基的最大比对通常需要在用于Fv区的编号系统中插入间隔残基。另外,由于种间或等位基因差异,任何给定Kabat位点编号处的某些个别残基的身份可能在抗体链与抗体链之间不同。亦参见Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);Chothia等人,Nature 342,第877-883页(1989),MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),及S.Dubel所编Handbook of Therapeutic antibodies,第三版,WILEY-VCH Verlag GmbH and Co.(2007),其中定义包括彼此比较时氨基酸残基的重迭或亚组。各前述参考文献均在此以其全部通过引用而并入且包含如上文所引用的各参考文献所定义的结合区或CDR的氨基酸残基如下所示用于比较。

[0109] CDR定义

[0110]

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	58-50	47-58
V _H CDR3	95-102	95-102	93-101
V _L CDR1	24-34	23-34	30-36
V _L CDR2	50-56	50-56	46-55
V _L CDR3	89-97	89-97	89-96

[0111] ¹残基编号遵循Kabat等人,同上的命名法

[0112] ²残基编号遵循Chothia等人,同上的命名法

[0113] ³残基编号遵循MacCallum等人,同上的命名法

[0114] 如本文中所讨论的,本领域技术人员对于图6A或图6B中所示每一重链及轻链序列可容易地定义、鉴别、推导和/或计数如Kabat等人、Chothia等人或MacCallum等人所定义的CDR。因此,所有所述命名法所定义的目标CDR及包含CDR的抗体被明确地包括在本发明的范畴内。更广泛而言,术语可变区CDR氨基酸残基包括如使用如上所述任何基于序列或结构的方法所鉴别的CDR中的氨基酸。

[0115] 如本文所用,术语可变区框架(FR)氨基酸残基是指Ig链的框架区中的那些氨基酸。如本文所用,术语框架区或FR区包括作为可变区的部分但非CDR的部分(例如使用CDR的Kabat定义)的氨基酸残基。因此,可变区框架为长度在约100至120个氨基酸之间的非邻接序列,但仅包括CDR以外的那些氨基酸。

[0116] 对于重链可变区的特定实例及对于如Kabat等人所定义的CDR,框架区1对应于涵盖氨基酸1至30的可变区的结构域;框架区2对应于涵盖氨基酸36至49的可变区的结构域;框架区3对应于涵盖氨基酸66至94的可变区的结构域;且框架区4对应于自氨基酸103至可变区末端的可变区的结构域。轻链的框架区类似地由各轻链可变区CDR分隔。类似地,使用Chothia等人(例如,CDR-L1 23-24,CDR-L2 50-56,CDR-L3 89-97;CDR-H1 26-32,CDR-H2 50-58,CDR-H3 95-102)或MacCallum等人的CDR的定义,框架区边界由如上所述的各CDR末端分隔。

[0117] 考虑前述结构因素,本领域技术人员应了解,本发明抗体可包含多种功能实施方案中的任一种。在这方面,相容的抗体可包含在受试者中提供所需生理反应的任何免疫应答性抗体(如该术语在本文中所定义的)。尽管任何所公开的抗体均可联合本发明的教导使用,但本发明的某些实施方案将包含嵌合、人源化或人单克隆抗体或其免疫反应性片段。其他实施方案可例如包含均质或异质多聚构建体、Fc变体及经缀合或糖基化改变的抗体。此外,应了解所述构型不互相排斥且相容的个体抗体可包含一个或多个本文所公开的功能方面。例如,相容的抗体可包含具有人源化可变区的单链双抗体或具有改变糖基化模式以调节血清半衰期的Fc修饰的全人全长IgG3抗体。其他示例性实施方案对本领域技术人员而言显而易见,且可容易地被辨别为在本发明的范畴内。

[0118] b. 抗体产生

[0119] 众所周知且如本文实施例中所示,可对包括兔子、小鼠、大鼠等的各种宿主动物进行接种且用以提供根据本文教导的抗体。根据所接种的物种,可用以增强免疫应答的本领

域内已知的佐剂包括(但不限于)弗氏佐剂(Freund's)(完全及不完全)、矿物凝胶(例如氢氧化铝)、表面活性物质(例如溶血卵磷脂、复合多元醇(pluronic polyols)、聚阴离子、肽、油乳液、匙孔戚血蓝蛋白、二硝基苯酚)及可能适用的人佐剂(例如BCG(卡介苗(bacille Calmette-Guerin))及短棒状杆菌(*corynebacterium parvum*))。所述佐剂可通过将抗原螯合于局部沉积物中来保护该抗原免于快速分散,或其可含有刺激宿主分泌对巨噬细胞及免疫系统的其他组分具有趋化性的因子的物质。优选地,若施用多肽,则免疫计划将涉及分散在数周中的两次或更多次施用多肽。

[0120] 在用可包含所选同种型和/或肽或表达所需蛋白质的活细胞或细胞制备物的PTK7免疫原(例如可溶性PTK7或sPTK7)免疫接种动物后,可使用本领域内认可的技术自动物获得抗体和/或产生抗体的细胞。在一些实施方案中,含有多克隆抗PTK7抗体的血清是通过放血或处死动物获得的。该血清可以从动物获得的形式被用于研究目的,或备选地,可将抗PTK7抗体部分或完全纯化以提供免疫球蛋白级分或均质抗体制备物。

[0121] c. 单克隆抗体

[0122] 尽管多克隆抗体可与本发明的某些方面结合使用,但优选的实施方案包括使用PTK7反应性单克隆抗体。如本文所用,术语单克隆抗体或mAb是指获自实质上均质的抗体群体的抗体,即构成该群体的个体抗体除可以少量存在的可能突变(例如天然存在的突变)以外均相同。因此,调节剂单克隆指该抗体的特征并非分立抗体的混合物且可与任何类型的抗体结合使用。在某些实施方案中,该种单克隆抗体包括包含结合或缔合PTK7的多肽序列的抗体,其中PTK7结合多肽序列是通过包括从多个多肽序列中选择单个靶结合多肽序列的方法获得的。

[0123] 在优选的实施方案中,由从经免疫接种的动物分离的细胞制备产生抗体的细胞系。在免疫接种之后,处死动物且通过如随附实施例中所示的本领域中熟知的方式使淋巴结和/或脾B细胞永生化。使细胞永生化的方法包括(但不限于)用致癌基因转染它们、使其感染致癌病毒及在针对永生化细胞选择的条件下对其进行培养、使其经受致癌或诱变化合物、使其与永生化细胞(例如骨髓瘤细胞)融合及使肿瘤抑制基因失活。若利用与骨髓瘤细胞融合,则所述骨髓瘤细胞优选不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性细胞系)。如下文的实施例中所示,可使用PTK7(包括所选同种型)或其免疫反应性部分筛选永生化细胞。在一优选的实施方案中,使用酶联免疫测定(ELISA)或放射免疫测定法来进行初始筛选。

[0124] 更一般地,与本发明一致的分立的单克隆抗体可使用本领域中已知的多种技术来制备,所述技术包括杂交瘤、重组技术、噬菌体展示技术、酵母文库、转基因动物(例如**XenoMouse**[®]或HuMAb **Mouse**[®])或其一些组合。例如,单克隆抗体可使用例如上文广泛描述且在Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988); Hammerling等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中更详细教导的技术产生,各文献以引用的方式并入本文中。使用所公开的方案,优选通过多次皮下或腹膜内注射相关抗原及佐剂在哺乳动物中产生抗体。如先前所讨论的,此免疫接种通常引发免疫应答,其包括从活化的脾细胞或淋巴细胞产生抗原反应性抗体(若经免疫接种的动物为转基因动物,则其可为全人抗体)。尽管可自动物血清收集所得抗体以提供多克隆制备物,但通常更希望自脾脏、淋巴结或外周血液分离单个淋巴细胞以提供单克隆抗体的均质制备物。淋巴细胞最通常是从脾脏

获得且经永生生化以提供杂交瘤。

[0125] 例如,如上文所述,选择过程可为从多个克隆(例如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的库)选择独特克隆。应了解,可进一步改变所选的PTK7结合序列例如以改进对靶标的亲和力、使靶标结合序列人源化、改良其在细胞培养物中的产生、降低其体内免疫原性、产生多特异性抗体等,且包含经改变的靶标结合序列的抗体亦为本发明的单克隆抗体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的分立抗体的多克隆抗体制备物相反,单克隆抗体制备物的各单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除其特异性外,单克隆抗体制备物的有利之处在于其通常未受可能交叉反应的其他免疫球蛋白污染。

[0126] d. 嵌合抗体

[0127] 在另一实施方案中,本发明抗体可包含源于至少两个不同物种或类型的抗体的共价接合蛋白质区段的嵌合抗体。应了解,如本文所用,术语嵌合抗体是针对其中一部分重链和/或轻链与源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列一致或同源,而链的其余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列一致或同源的构建体,以及所述抗体的片段,只要其展现所需的生物活性即可(美国专利第4,816,567号;Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。在一个示例性实施方案中,根据本文教导的嵌合抗体可包含鼠类V_H及V_L氨基酸序列及源于人来源的恒定区。在其他相容的实施方案中,本发明的嵌合抗体可包含如本文所述的CDR移植或人源化抗体。

[0128] 一般而言,制造嵌合抗体的目的是产生嵌合体,其中来自预定目标物种的氨基酸数目被最大化。一个实例为CDR移植抗体,其中该抗体包含一个或多个来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的互补决定区(CDR),而抗体链的其余部分与源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列同一或同源。对于在人中使用,通常将来自啮齿动物抗体的可变区或所选CDR移植于人抗体中,置换天然存在的人抗体可变区或CDR。这些构建体通常具有提供全强度调节剂功能(例如CDC、ADCC等)同时降低标的物对抗体的不当免疫应答的优势。

[0129] e. 人源化抗体

[0130] 与CDR移植抗体类似的为人源化抗体。人源化抗体一般自最初在非人动物中产生的单克隆抗体产生。如本文所用,非人(例如鼠类)抗体的人源化形式为含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体为人免疫球蛋白(接受者或接受体抗体),其中接受者抗体CDR的残基被来自具有所要特异性、亲和力和/或能力的非人物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、兔子或非人灵长类动物)的CDR残基置换。

[0131] 抗体的人源化通常包括分析供体与接受者抗体的序列同源性及典型结构。在所选实施方案中,接受者抗体可包含共有序列。为产生共有人框架,可对比来自若干人重链或轻链氨基酸序列的框架以鉴别共有氨基酸序列。此外,在许多情况下,人免疫球蛋白的可变结构域中的一个或多个框架残基被来自供体抗体的相应非人残基置换。这些框架取代通过本领域中熟知的方法鉴别,例如通过对CDR与框架残基的相互作用建模以鉴别对抗原结合重要的框架残基以及进行序列比较以鉴别特定位置的不常见框架残基。所述取代有助于维持所移植CDR的适当三维构型,且通常相对于无框架取代的类似构建体改善无穷性。此外,人源化抗体可包含接受者抗体或供体抗体中未发现的残基。可使用熟知技术进行这些修饰以进一步改进抗体性能。

[0132] CDR移植及人源化抗体被描述于例如美国专利第6,180,370号、第5,693,762号、第5,693,761号、第5,585,089号及第5,530,101号中。一般而言,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变结构域的实质上全部,其中全部或实质上全部CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,且全部或实质上全部框架区为人免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体任选地还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区。关于更多详情,参见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见例如Vaswani及Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle及Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);及美国专利第6,982,321号及第7,087,409号。另一种方法被称为人工程化(humaneering)且被描述于例如U.S.2005/0008625中。为了本申请的目的,认为术语人源化抗体明确包括无框架取代或有最小框架取代的CDR移植抗体(即包含一个或多个移植非人CDR的人抗体)。

[0133] 另外,非人抗PTK7抗体也可通过人T细胞表位的特异性缺失或以WO 98/52976及WO 00/34317中所公开的方法通过去免疫化而修饰。简言之,可针对结合II类MHC的肽分析抗体的重链及轻链可变区;这些肽代表潜在的T细胞表位(如WO 98/52976及WO 00/34317中所定义的)。为检测潜在T细胞表位,可应用被称为肽穿线(peptide threading)的计算机建模方法,且另外,可搜寻人II类MHC结合肽的数据库中V_H及V_L序列中所存在的基序,如WO 98/52976及WO 00/34317中所描述的。这些基序结合18种主要II类MHC DR异型中的任一种,且因此构成潜在T细胞表位。所检测到的潜在T细胞表位可通过取代可变区中的少数氨基酸残基或通过单一氨基酸取代基而消除。尽可能进行保守性取代。通常但并非唯独地,可使用人生殖系抗体序列中的位置上常见的氨基酸。在鉴别出去免疫变化后,可通过诱变或其他合成方法(例如重新合成、盒置换等)来构建编码V_H及V_L的核酸。经诱变的可变序列可任选地融合至人恒定区。

[0134] 在所选实施方案中,至少60%、65%、70%、75%或80%的人源化抗体可变区残基与亲本框架区(FR)及CDR序列的残基相对应。在其他实施方案中,至少85%或90%的人源化抗体残基与亲本框架区(FR)及CDR序列的残基相对应。在另一优选的实施方案中,95%以上人源化抗体残基将与亲本框架区(FR)及CDR序列的残基相对应。

[0135] 可使用如本文所述的常用分子生物学及生物分子工程化技术来制造人源化抗体。这些方法包括分离、操纵及表达编码来自重链或轻链中至少一个的全部或一部分免疫球蛋白Fv可变区的核酸序列。该核酸的来源为本领域技术人员所熟知的,且例如可从如上文所述产生针对预定靶标的抗体或免疫反应性片段的杂交瘤、真核细胞或噬菌体,从生殖系免疫球蛋白基因或从合成的构建体获得。接着可将编码人源化抗体的重组DNA克隆至适当的表达载体中。

[0136] 人生殖系序列例如公开于Tomlinson,I.A.等人,(1992)J.Mol.Biol.227:776-798;Cook,G.P.等人,(1995)Immunol.Today 16:237-242;Chothia,D.等人,(1992)J.Mol.Bio.227:799-817;及Tomlinson等人,(1995)EMBO J 14:4628-4638中。V BASE目录提供人免疫球蛋白可变区序列的详尽目录(参见Retter等人,(2005)Nuc Acid Res 33:671-674)。这些序列可被用作人序列的来源,例如用于框架区及CDR。如本文所述,也可使用共有人框架区,例如,如美国专利第6,300,064号所描述的。

[0137] f. 人抗体

[0138] 除前述抗体外,本领域技术人员应了解本发明抗体也可包含全人抗体。为了本申请的目的,术语人抗体包含具有与人所产生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或已使用制造如本文所公开的人抗体的任何技术制得的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0139] 人抗体可使用本领域中已知的各种技术产生。如上文所提及,可根据本发明教导使用噬菌体展示技术提供免疫活性结合区。因此,本发明的某些实施方案提供产生抗PTK7抗体或其抗原结合部分的方法,其包含以下步骤:在噬菌体上合成(优选人)抗体的文库、用所选PTK7或其抗体结合部分筛选文库、分离结合PTK7的噬菌体及自噬菌体获得免疫反应性片段。例如,一种制备用于噬菌体展示技术的抗体文库的方法包含以下步骤:用所选PTK7或其抗原部分免疫接种包含人或非人免疫球蛋白基因座的非人动物以产生免疫应答、从经免疫的动物提取产生抗体的细胞;从所提取的细胞分离编码本发明抗体的重链及轻链的RNA、反转录RNA以产生cDNA、使用引物扩增cDNA及将cDNA插入噬菌体展示载体中使得抗体表达于噬菌体上。更具体地,通过PCR使编码 V_H 及 V_L 结构域的DNA与scFv连接子重组在一起且克隆至噬菌粒载体中(例如p CANTAB 6或pComb 3HSS)。接着可使所述载体电穿孔至大肠杆菌中,然后用辅助噬菌体感染大肠杆菌。这些方法中所用的噬菌体通常为包括fd及M13的丝状噬菌体,且 V_H 及 V_L 结构域通常重组融合于噬菌体基因III或基因VIII。

[0140] 本发明的重组人抗PTK7抗体可通过筛选如上文所制备的重组组合抗体文库进行分离。在优选的实施方案中,所述文库为使用由从B细胞分离的mRNA制备的人 V_L 及 V_H cDNA产生的scFv噬菌体展示文库。制备及筛选所述文库的方法在本领域中为熟知的且用于产生噬菌体展示文库的试剂盒是商业上可获得的(例如Pharmacia Recombinant Phage Antibody System,目录号 27-9400-01;及Stratagene SurfZAPTM噬菌体展示试剂盒,目录号240612)。也存在可用于产生及筛选抗体展示文库的其他方法及试剂(参见例如美国专利第5,223,409号;PCT公开第W0 92/18619号、第W0 91/17271号、第W0 92/20791号、第W0 92/15679号、第W0 93/01288号、第W0 92/01047号、第W0 92/09690号;Fuchs等人,Bio/Technology9:1370-1372(1991);Hay等人,Hum.Antibod.Hybridomas 3:81-85(1992);Huse等人,Science 246:1275-1281(1989);McCafferty等人,Nature 348:552-554(1990);Griffiths等人,EMBO J.12:725-734(1993);Hawkins等人,J.Mol.Biol.226:889-896(1992);Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:3576-3580(1992);Garrad等人,Bio/Technology 9:1373-1377(1991);Hoogenboom等人,Nuc.Acid Res.19:4133-4137(1991);及Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982(1991))。

[0141] 幼稚(**naïve**)文库(天然或合成的)所产生的抗体可具有中等亲和力(K_a 为约 10^6 至 $10^7 M^{-1}$),但也可如本领域中所描述的,通过从第二文库构建及再选择来体外模拟亲和力成熟。例如,在Hawkins等人,J.Mol.Biol.,226:889-896(1992)的方法中或Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:3576-3580(1992)的方法中,可通过使用易错聚合酶(Leung等人,Technique,1:11-15(1989)中所报导)在体外随机引入突变。另外,可通过例如用带有涵盖所关注CDR的随机序列的引物使用PCR在所选个别Fv克隆中使一个或多个CDR随机突变并筛选更高亲和力克隆来进行亲和力成熟。W0 9607754描述在免疫球蛋白轻链的互补决定

区中诱导诱变以产生轻链基因文库的方法。另一有效方法为将通过噬菌体展示所选择的V_H或V_L结构域与获自未免疫供体的天然存在V结构域变体集合重组并在数轮链改组中针对更高亲和力进行筛选,如Marks等人,Biotechnol.,10:779-783(1992)中所述。此技术允许制造解离常数K_d(k_{off}/k_{on})为约10⁻⁹M或10⁻⁹M以下的抗体及抗体片段。

[0142] 应进一步了解,可使用包含在细胞表面表达结合对的真核细胞(例如酵母)的文库来利用类似程序。正如噬菌体展示技术,针对所关注的抗原(即PTK7)筛选真核文库并分离及克隆表达候选结合对的细胞。可采取步骤来优化文库内容及使反应性结合对亲和力成熟。参见例如美国专利第7,700,302号及U.S.S.N.12/404,059。在一个实施方案中,人抗体系选自噬菌体文库,其中所述噬菌体文库表达人抗体(Vaughan等人,Nature Biotechnology 14:309-314(1996);Sheets等人,Proc.Natl.Acad.Sci.95:6157-6162(1998);Hoogenboom及Winter,J.Mol.Biol,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol,222:581(1991))。在其他实施方案中,人结合对可从在真核细胞(例如酵母)中产生的组合抗体文库分离。参见例如美国专利第7,700,302号。所述技术有利地允许筛选大量候选调节剂且提供相对容易的对候选序列的操纵(例如通过亲和力成熟或重组改组)。

[0143] 也可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物中来制备人抗体,该转基因动物例如为内源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活的小鼠。攻击时,观察人抗体产生,其在各方面均密切类似于人所见,包括基因重排、组装及抗体集合。此方法被描述于例如美国专利第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号及关于**XenoMouse**®技术的美国专利第6,075,181号及第6,150,584号,以及以下科学出版物中: Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-13(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnology 14:845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14:826(1996);Lonberg及Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。或者,人抗体可经由使产生针对靶标抗原的抗体的人B-淋巴细胞永生化的制备(所述B-淋巴细胞可从患有赘生性病症的个体回收或可在体外被免疫接种)。参见例如Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,J.Immunol,147(1):86-95(1991);及美国专利第5,750,373号。

[0144] VI. 抗体特征

[0145] 无论如何获得或抗体调节剂呈何种前述形式(例如人源化、人等),所公开调节剂的优选的实施方案均可展现各种特征。在这方面,可针对所需特征选择、克隆及进一步筛选产生抗PTK7抗体的细胞(例如杂交瘤或酵母集落),所述特征包括例如稳固生长、高抗体产量及如下文所更详细论述的所需抗体特征。杂交瘤可在同基因动物、缺乏免疫系统的动物(例如裸小鼠)中体内扩增或在细胞培养物中体外扩增。普通技术人员熟知选择、克隆及扩增各自产生分立抗体种类的杂交瘤和/或集落的方法。

[0146] a. 中和抗体

[0147] 在特别优选的实施方案中,本发明的调节剂将包含中和抗体或其衍生物或片段。术语中和抗体或中和拮抗剂是指结合PTK7分子或与PTK7分子相互作用且阻止配体与任何结合伴侣结合或缔合由此中断否则会由分子相互作用引起的生物应答(例如磷酸化或VEGF诱导的血管生成)的抗体或拮抗剂。在评估抗体或其免疫功能片段或衍生物的结合及特异

性时,当如通过例如磷酸化或所选底物(Shin等人,Biochem and Biophys Res Com,第371:4卷)或在体外竞争性结合测定中所测量的,过量抗体使与靶标分子结合的结合伴侣的量降低至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多时,抗体或片段实质上抑制配体与其结合伴侣或底物的结合。在例如针对PTK7的抗体的情形中,中和抗体或拮抗剂优选将使PTK7对于特定底物的磷酸化能力减弱至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。应了解,此减弱的活性可使用本领域内认可的技术直接测量或可由该降低将对例如血管生成的次级活性的影响来测量。

[0148] b. 内化抗体

[0149] 尽管证据表明PTK7或其所选同种型可以可溶性形式存在,但至少一些PTK7可能仍保持与细胞表面缔合,由此允许所公开的调节剂内化。因此,本发明的抗PTK7抗体至少在在一定程度上可由表达PTK7的细胞内化。例如,结合肿瘤起始细胞表面上的PTK7的抗PTK7抗体可由肿瘤起始细胞内化。在特别优选的实施方案中,所述抗PTK7抗体可与在内化时杀死细胞的抗癌剂(例如细胞毒性部分)缔合或缀合。

[0150] 如本文所用,内化的抗PTK7抗体为在结合与哺乳动物细胞缔合的PTK7时由细胞摄取的抗体。内化抗体包括抗体片段、人或人源化抗体及抗体缀合物。内化可在体外或体内发生。对于治疗性应用而言,内化可在体内发生。内化的抗体分子的数目可足以或足够杀死表达PTK7的细胞,尤其表达PTK7的肿瘤起始细胞。取决于抗体或抗体缀合物的效能,在一些情况下,单一抗体分子摄入细胞中足以杀死抗体所结合的靶细胞。例如,某些毒素在杀死方面极其有效,使得内化与抗体缀合的一个毒素分子即足以杀死该肿瘤细胞。在结合哺乳动物细胞上的PTK7后抗PTK7抗体是否内化可通过包括下文实施例(例如实施例12及实施例13)中所述的测定的各种测定来确定。检测抗体是否内化至细胞中的方法也被描述于美国专利第7,619,068号中,其在此以其全部通过引用而并入。

[0151] c. 耗竭抗体

[0152] 在其他优选的实施方案中,本发明的调节剂将包含耗竭抗体或其衍生物或片段。术语耗竭抗体是指与细胞表面上或附近的PTK7结合或缔合且诱导、促进或导致细胞死亡、失能或消除(例如通过补体依赖性细胞毒性或抗体依赖性细胞毒性)的抗体或片段。在下文更充分论述的一些实施方案中,所选耗竭抗体将与细胞毒性剂缔合或缀合。优选地,耗竭抗体将能够移除、失能、消除或杀死至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%或99%规定细胞群中的肿瘤永存细胞。在一些实施方案中,该细胞群可包含经富集、切片、纯化或分离的肿瘤永存细胞。在其他实施方案中,细胞群可包含含有肿瘤永存细胞的全肿瘤样品或异质肿瘤提取物。本领域技术人员应了解,可使用如下文实施例(例如实施例13及实施例14)中所述的标准生物化学技术来监测及定量根据本文教导的致肿瘤细胞或肿瘤永存细胞的耗竭。

[0153] d. 表位结合

[0154] 应进一步了解,所公开的抗PTK7抗体将与由所选靶标呈递的分立表位或决定簇缔合或结合。如本文所用,术语表位是指靶抗原中能够由特定抗体识别及特异性结合的部分。当抗原为多肽(例如PTK7)时,表位可由邻接氨基酸与被蛋白质的三级折叠并置的非邻接氨基酸形成。由邻接氨基酸形成的表位在蛋白质变性后通常被保留,而由三级折叠形成的表

位在蛋白质变性后通常失去。表位通常包括至少3个且更通常至少5个或8至10个呈独特空间构象的氨基酸。更具体地,熟练技工应了解,术语表位包括能够特异性结合免疫球蛋白或T细胞受体或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面分组(例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链)组成且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。另外,表位可为线性或构象表位。在线性表位中,在蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点沿着该蛋白质的一级氨基酸序列呈线性存在。在构象表位中,所述相互作用点存在于蛋白质上彼此线性隔开的氨基酸残基中。

[0155] 一旦确定了抗原上的所需的表位,则可产生针对该表位的抗体,例如通过使用本发明中所述的技术用包含该表位的肽免疫接种。或者,在发现过程中,抗体的产生及表征可阐明关于所需表位的信息。根据此信息,则有可能竞争性筛选结合相同表位的抗体。达成此目的的方法为进行竞争性研究,以发现彼此竞争结合的抗体,即竞争结合抗原的抗体。基于抗体的交叉竞争的合并(bin)抗体的高通量方法描述于WO 03/48731中。

[0156] 如本文所用,术语合并是指基于抗体的抗原结合特征将抗体分组的方法。取决于所观察到的测试抗体的结合模式如何不同,合并箱(bin)的分配在某种程度上为任意的。因此,尽管该技术为分类本发明抗体的适用手段,但合并箱不总是与表位直接相关,且表位结合的所述初始测定应进一步通过如本文所述的其他本领域内认可的方法证实。

[0157] 根据此警告,可通过使用本领域中已知和在本文实施例中所示的方法确定所选一抗(或其片段)是否结合相同表位或交叉竞争与第二抗体的结合。在一个实施方案中,允许本发明的一抗在饱和条件下结合PTK7,然后测量二抗结合PTK7的能力。若测试抗体能够与第一抗PTK7抗体同时结合PTK7,则二抗结合不同于一抗的表位。然而,若二抗不能同时结合PTK7,则二抗结合相同表位、重迭表位或紧接一抗所结合表位的表位。如本领域中所已知且在下文实施例中所述,所需数据可使用固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定、Biacore™系统(即表面等离子共振-GE Healthcare)、**ForteBio**®分析器(即生物层干涉测量法-ForteBio, Inc.)或流式细胞计数方法来获得。如本文所用,术语表面等离子共振是指允许通过检测生物传感器基质内蛋白质浓度的改变分析实时特异性相互作用的光学现象。在特别优选的实施方案中,所述分析是使用如下文实施例中所示的Biacore或ForteBio装置进行的。

[0158] 当用于抗体的情境中时,术语竞争意指如测定所确定的抗体之间的竞争,其中所测试的抗体或免疫功能片段阻止或抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合。通常,该种测定涉及使用与固体表面结合的纯化抗原或带有这些抗原的细胞、未标记的测试免疫球蛋白及经标记的参考免疫球蛋白。竞争性抑制是通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记的量来测量的。测试免疫球蛋白通常以过量存在。由竞争测定鉴别的抗体(竞争抗体)包括与参考抗体结合相同表位的抗体及结合足够接近参考抗体所结合的表位的邻近表位而导致发生位阻的抗体。关于测定竞争性结合的方法的其他详情提供于本文的实施例中。通常,当竞争性抗体以过量存在时,其将以至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合。在一些情况下,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、或97%或更多。

[0159] 除表位特异性外,所公开的抗体也可使用多种不同物理特征进行表征,这包括例如结合亲和力、熔融温度(T_m)及等电点。

[0160] e. 结合亲和力

[0161] 在这方面,本发明进一步涵盖使用对所选PTK7,或在泛抗体(pan-antibody)的情况下,对一种以上类型的PTK7具有高结合亲和力的抗体。当解离常数 K_d (k_{off}/k_{on}) 为 $\leq 10^{-8}M$ 时,称本发明的抗体特异性结合其靶抗原。当 $K_d \leq 5 \times 10^{-9}M$ 时抗体以高亲和力特异性结合抗原,且当 $K_d \leq 5 \times 10^{-10}M$ 时以极高亲和力特异性结合抗原。在本发明的一个实施方案中,抗体的 $K_d \leq 10^{-9}M$ 且解离速率为约 $1 \times 10^{-4}/\text{秒}$ 。在本发明的一个实施方案中,解离速率 $< 1 \times 10^{-5}/\text{秒}$ 。在本发明的其他实施方案中,抗体将以约 $10^{-8}M$ 至约 $10^{-10}M$ 的 K_d 结合PTK7,且在又一实施方案中,其结合的 $K_d \leq 2 \times 10^{-10}M$ 。本发明的其他所选实施方案包含离解常数或 K_d (k_{off}/k_{on}) 小于 $10^{-2}M$ 、小于 $5 \times 10^{-2}M$ 、小于 $10^{-3}M$ 、小于 $5 \times 10^{-3}M$ 、小于 $10^{-4}M$ 、小于 $5 \times 10^{-4}M$ 、小于 $10^{-5}M$ 、小于 $5 \times 10^{-5}M$ 、小于 $10^{-6}M$ 、小于 $5 \times 10^{-6}M$ 、小于 $10^{-7}M$ 、小于 $5 \times 10^{-7}M$ 、小于 $10^{-8}M$ 、小于 $5 \times 10^{-8}M$ 、小于 $10^{-9}M$ 、小于 $5 \times 10^{-9}M$ 、小于 $10^{-10}M$ 、小于 $5 \times 10^{-10}M$ 、小于 $10^{-11}M$ 、小于 $5 \times 10^{-11}M$ 、小于 $10^{-12}M$ 、小于 $5 \times 10^{-12}M$ 、小于 $10^{-13}M$ 、小于 $5 \times 10^{-13}M$ 、小于 $10^{-14}M$ 、小于 $5 \times 10^{-14}M$ 、小于 $10^{-15}M$ 或小于 $5 \times 10^{-15}M$ 的抗体。

[0162] 在特定实施方案中,免疫特异性结合PTK7的本发明抗体的缔合速率常数或 k_{on} 速率($PTK7(Ab) + \text{抗原}(Ag) \xrightarrow{k_{on}} Ab-Ag$) 为至少 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、或至少 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 。

[0163] 在另一实施方案中,免疫特异性结合PTK7的本发明抗体的离解速率常数或 k_{off} 速率($PTK7(Ab) + \text{抗原}(Ag) \xrightarrow{k_{off}} Ab-Ag$) 小于 $10^{-1}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-1}s^{-1}$ 、小于 $10^{-2}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-2}s^{-1}$ 、小于 $10^{-3}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-3}s^{-1}$ 、小于 $10^{-4}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-4}s^{-1}$ 、小于 $10^{-5}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-5}s^{-1}$ 、小于 $10^{-6}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-6}s^{-1}$ 、小于 $10^{-7}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-7}s^{-1}$ 、小于 $10^{-8}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-8}s^{-1}$ 、小于 $10^{-9}s^{-1}$ 、小于 $5 \times 10^{-9}s^{-1}$ 或小于 $10^{-10}s^{-1}$ 。

[0164] 在本发明的其他所选实施方案中,抗PTK7抗体的亲和常数或 K_a (k_{on}/k_{off}) 为至少 $10^2 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^2 M^{-1}$ 、至少 $10^3 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^3 M^{-1}$ 、至少 $10^4 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、至少 $10^5 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、至少 $10^6 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{12} M^{-1}$ 、至少 $10^{13} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{13} M^{-1}$ 、至少 $10^{14} M^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^{14} M^{-1}$ 、至少 $10^{15} M^{-1}$ 或至少 $5 \times 10^{15} M^{-1}$ 。

[0165] f. 等电点

[0166] 除前述结合性质外,抗PTK7抗体及其片段,像所有的多肽一样,具有等电点(pI),其通常被定义为多肽不带净电荷时的pH值。在本领域中已知当溶液的pH值等于蛋白质的等电点(pI)时,蛋白质溶解性通常最低。因此,有可能通过改变抗体中可电离残基的数量及位置以调节pI来优化溶解性。例如,多肽的pI可通过进行适当氨基酸取代(例如通过用带电氨基酸(例如赖氨酸)取代不带电残基(例如丙氨酸))来操纵。不希望受任何特定理论束缚,抗体中引起该抗体的pI变化的氨基酸取代可改良抗体的溶解性和/或稳定性。本领域技术人员将了解何种氨基酸取代最适于特定抗体以实现所需pI。

[0167] 蛋白质的pI可通过多种方法来测定,所述方法包括(但不限于)等电聚焦及各种计算机算法(参见例如Bjellqvist等人,1993,Electrophoresis 14:1023)。在一个实施方案中,本发明抗PTK7抗体的pI高于约6.5、约7.0、约7.5、约8.0、约8.5或约9.0。在另一实施方案中,本发明抗PTK7抗体的pI高于6.5、7.0、7.5、8.0、8.5或9.0。在又一实施方案中,引起本

发明抗体的pI改变的取代不显著减弱其对PTK7的结合亲和力。如下文所更详细论述的,明确预期引起与Fc γ R的结合改变的Fc区的取代也可引起pI变化。在优选的实施方案中,Fc区的取代经特别选择以实现Fc γ R结合的所需改变及pI的任何所需变化。如本文所用,pI值被定义为主要电荷形式的pI。

[0168] g. 热稳定性

[0169] 应进一步了解,抗体Fab结构域的T_m可为抗体热稳定性的良好指标且可进一步提供关于存架期的指示。T_m仅为给定结构域或序列50%解折叠的温度。较低T_m指示较多聚集/较低稳定性,而较高T_m指示较少聚集/较高稳定性。因此,具有较高T_m的抗体或片段或衍生物是优选的。此外,使用本领域内认可的技术,有可能改变抗PTK7抗体或其结构域的组成以增加或优化分子稳定性。参见例如美国专利第7,960,142号。因此,在一个实施方案中,所选抗体的Fab结构域的T_m值高于至少50°C、55°C、60°C、65°C、70°C、75°C、80°C、85°C、90°C、95°C、100°C、105°C、110°C、115°C或120°C。在另一实施方案中,抗体的Fab结构域的T_m值高于至少约50°C、约55°C、约60°C、约65°C、约70°C、约75°C、约80°C、约85°C、约90°C、约95°C、约100°C、约105°C、约110°C、约115°C或约120°C。蛋白质结构域(例如Fab结构域)的热熔融温度(T_m)可使用本领域中已知的任何标准方法,例如通过差示扫描热测量定来测量(参见例如Vermeer等人,2000,Biophys.J.78:394-404;Vermeer等人,2000,Biophys.J.79:2150-2154,两篇文献皆以引用的方式并入本文中)。

[0170] VII. PTK7调节剂片段及衍生物

[0171] 不论本发明的试剂是否包含完整融合构建体、抗体、片段或衍生物,所选调节剂均将与PTK7反应、结合、组合、复合、连接、附接、接合、相互作用或以其他方式缔合且由此提供所需抗赘生性作用。本领域技术人员应了解,调节剂包含经由抗体上表达的一个或多个结合位点与PTK7相互作用或缔合的抗PTK7抗体。更具体地,如本文所用,术语结合位点包含多肽中负责选择性结合所关注靶分子(例如酶、抗原、配体、受体、底物或抑制剂)的区域。结合结构域包含至少一个结合位点(例如完整IgG抗体将具有两个结合结构域及两个结合位点)。示例性结合结构域包括抗体可变结构域、配体的受体结合结构域、受体的配体结合结构域或酶结构域。为了本发明的目的,PTK7的典型活性区域(例如作为Fc-PTK7融合构建体的一部分)可包含底物的结合位点或促进磷酸化。

[0172] a. 片段

[0173] 与选择何种形式的调节剂(例如嵌合、人源化等)实施本发明无关,应了解,该调节剂的免疫反应性片段可根据本文的教导被使用。在最广泛的意义上,术语抗体片段包含完整抗体的至少一部分(例如天然存在的免疫球蛋白)。更具体地,术语片段是指抗体或抗体链(或在Fc融合的情况下为PTK7分子)中与完整或完全抗体或抗体链相比包含较少氨基酸残基的部分。术语抗原结合片段是指结合抗原或与完整抗体(即其所来源的完整抗体)竞争结合(即特异性结合)抗原的免疫球蛋白或抗体的多肽片段。如本文所用,术语抗体分子的片段包括抗体的抗原结合片段,例如抗体轻链(V_L)、抗体重链(V_H)、单链抗体(scFv)、F(ab')₂片段、Fab片段、Fd片段、Fv片段、单结构域抗体片段、双抗体、线性抗体、单链抗体分子及由抗体片段形成的多特异性抗体。类似地,PTK7的活性片段包含PTK7分子中保留其与PTK7底物或受体相互作用及以类似于完整PTK7的方式对其进行修饰(例如磷酸化-但可能效率稍低)的能力的部分。

[0174] 本领域技术人员应了解片段可经由完整或完全调节剂(例如抗体或抗体链)的化学或酶促处理或通过重组方式获得。在这方面,尽管各种抗体片段均根据消化完整抗体来定义,但本领域技术人员应了解,所述片段可以化学方式或通过使用重组DNA方法重新合成。因此,如本文所用,术语抗体明确包括通过修饰完整抗体产生或使用重组DNA方法重新合成的抗体或其片段或衍生物。

[0175] 更具体地,抗体的木瓜蛋白酶消化产生各自具有单一抗原结合位点的称为Fab片段的两个相同抗原结合片段,及残余Fc片段,其名称反映其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点且仍能交联抗原。Fab片段也含有轻链恒定结构域及重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的区别之处在于在重链CH1结构域的羧基端添加有少数残基,包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH在本文中为对于恒定结构域的半胱氨酸残基带有至少一个游离硫醇基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段起初作为其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生。也已知抗体片段的其他化学偶合。关于其他抗体片段的更详细描述,参见例如Fundamental Immunology, W.E. Paul, 编, Raven Press, N.Y. (1999)。

[0176] 应进一步了解,Fv片段为含有完全抗原识别及结合位点的抗体片段。此区域由紧密缔合(其性质可为共价的,例如在scFv中)的一个重链及一个轻链可变结构域的二聚体构成。在此构型中,各可变结构域的三个CDR相互作用以界定V_H-V_L二聚体表面上的抗原结合位点。六个CDR或其亚组共同对抗体赋予抗原结合特异性。然而,甚至单一可变结构域(或仅包含三个抗原特异性CDR的一半Fv)也具有识别且结合抗原的能力,但其亲和力通常低于整个结合位点。

[0177] 在其他实施方案中,抗体片段(例如包含Fc区者)保留当存在于完整抗体中时通常与Fc区相关的至少一种生物学功能,例如FcRn结合、抗体半衰期调节、ADCC功能及补体结合。在一个实施方案中,抗体片段为具有实质上类似于完整抗体的体内半衰期的单价抗体。例如,该种抗体片段可包含连接至能够对该片段赋予体内稳定性的Fc序列的抗原结合臂。

[0178] b. 衍生物

[0179] 在另一实施方案中,应进一步了解,本发明调节剂可为单价或多价(例如二价、三价等)调节剂。如本文所用,术语化合价是指与抗体相关的潜在靶标(即PTK7)结合位点的数目。每个靶标结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的特定位置或基因座。当本发明抗体包含一个以上靶标结合位点(多价)时,各靶标结合位点可特异性结合相同或不同分子(例如可结合不同配体或不同抗原,或相同抗原上的不同表位或位置)。为了本发明的目的,目标抗体优选具有至少一个人PTK7特异性结合位点。在一个实施方案中,本发明的抗体将为单价抗体,其中分子的各结合位点将特异性结合单一PTK7位置或表位。在其他实施方案中,抗体将为多价抗体,其中其包含一个以上结合位点且不同结合位点与一个以上位置或表位特异性缔合。在所述情况下,多个表位可存在于所选PTK7多肽或剪接变体上,或单一表位可存在于PTK7上,而第二个不同的表位可存在于另一分子或表面上。参见例如美国专利第2009/0130105号。

[0180] 如上文所提及,多价抗体可免疫特异性结合所需靶分子的不同表位,或可免疫特异性结合靶分子以及异源表位,例如异源多肽或固体载体材料。尽管抗PTK7抗体的优选的实施方案仅结合两个抗原(即双特异性抗体),但本发明也涵盖具有其它特异性的抗体(例

如三特异性抗体)。双特异性抗体的实施例包括(但不限于)一个臂针对PTK7且另一臂针对任何其他抗原(例如调节剂细胞标记物)的抗体。本领域中已知制造双特异性抗体的方法。全长双特异性抗体的传统产生是基于共同表达两个免疫球蛋白重链-轻链对,其中两条链具有不同特异性(Millstein等人,1983,Nature,305:537-539)。其他更复杂的相容的多特异性构建体及其制造方法显示在美国专利第2009/0155255号中。

[0181] 在其他实施方案中,使具所需结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。融合优选是与包含至少部分铰链区、 C_H2 及 C_H3 区的免疫球蛋白重链恒定结构域的融合。在一个实施例中,含有轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(C_H1)存在于至少一种融合体中。将编码免疫球蛋白重链融合体及任选地免疫球蛋白轻链的DNA插入分别的表达载体中,且共转染至适合宿主生物体中。此在构建中所使用的三个多肽链的不等比率提供最佳产率时提供在实施方案中调整三个多肽片段的相互比例的极大灵活性。然而,当等比率的至少两个多肽链的表达产生高产率或当比率没有特别的意义时,可将两个或所有三个多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0182] 在此方法的一个实施方案中,双特异性抗体由一个臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链(例如PTK7)与另一个臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现此不对称结构有助于使所需双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合分离,因为免疫球蛋白轻链仅存在于一半双特异性分子中提供一种便捷的分离方式。此方法公开于W0 94/04690中。关于产生双特异性抗体的更多详情,参见例如Suresh等人,1986,Methods in Enzymology,121:210。根据W0 96/27011中所述的另一方法,可对抗体分子对进行工程化以使从重组细胞培养物回收的杂二聚体的百分比达到最大。优选的界面包含抗体恒定结构域的 C_H3 结构域的至少一部分。以此方法,使来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链被更大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。通过将大氨基酸侧链置换为更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)而在第二抗体分子的界面上制造出尺寸与大侧链相同或类似的互补空腔。此举提供使异源二聚体的产率增加超过其他不需要的终产物(例如同源二聚体)的机制。

[0183] 双特异性抗体也包括交联或异缀合抗体。例如,异缀合物中的抗体之一可与抗生物素蛋白偶合,另一个与生物素偶合。提出所述抗体例如可使免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利第4,676,980号)且可用于治疗HIV感染(W0 91/00360、W0 92/200373及EP 03089)。可使用任何方便的交联方法制异缀合抗体备。合适的交联剂以及多种交联技术在本领域中为熟知的,且被公开于美国专利第4,676,980号中。

[0184] VIII. PTK7调节剂-恒定区修饰

[0185] a. Fc区及Fc受体

[0186] 除上文所述的所公开调节剂(例如Fc-PTK7或抗PTK7抗体)的可变区或结合区的各种修饰、取代、添加或缺失以外,本领域技术人员应了解,本发明的所选实施方案也可包含恒定区(即Fc区)的取代或修饰。更具体地,预期本发明的PTK7调节剂可尤其含有一个或多个其他氨基酸残基取代、突变和/或修饰,由此产生具有优选特征的化合物,所述优选特征包括(但不限于):药物动力学改变、血清半衰期增加、结合亲和力增加、免疫原性降低、产量增加、Fc配体结合改变、ADCC或CDC活性提高或降低、糖基化和/或二硫键改变及经修饰的结合特异性。在这方面,应了解这些Fc变体可有利地被用于增强所公开调节剂的有效抗赘生

性质。

[0187] 本文中的术语Fc区用于定义免疫球蛋白重链的C端区,包括天然序列Fc区及变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可变化,但人IgG重链Fc区通常被界定为从位置Cys226或从Pro230的氨基酸残基伸展至其羧基端。Fc区的C端赖氨酸(残基447,根据EU编号系统)可被去除,例如在抗体产生或纯化的过程中,或通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程化来去除。因此,完整抗体的组成可包含移除了所有K447残基的抗体群体、未移除K447残基的抗体群体及具有有或无K447残基的抗体的混合物的抗体群体。功能性Fc区具有天然序列Fc区的效应子功能。示例性效应子功能包括C1q结合;CDC;Fc受体结合;ADCC;吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)下调等。所述效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合且可使用如例如本文定义中所公开的各种测定进行评定。

[0188] Fc受体或FcR描述结合抗体的Fc区的受体。在一些实施方案中,FcR为天然人FcR。在一些实施方案中,FcR为结合IgG抗体(γ 受体)的FcR且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亚类的受体,包括那些受体的等位基因变体及替代剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(活化受体)及Fc γ RIIB(抑制受体),其具有主要在其细胞质结构域中不同的相似氨基酸序列。活化受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见例如Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR回顾于例如Ravetch及Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods4:25-34(1994);及de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中。其他FcR,包括将来待鉴别的FcR在本文中由术语FcR涵盖。术语Fc受体或FcR也包括新生儿受体FcRn,其在某些情况下负责将母体的IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)及Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))及调节免疫球蛋白的体内平衡。测量与FcRn的结合的方法为已知的(参见例如Ghetie及Ward.,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie等人,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton等人,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等人))。

[0189] b.Fc功能

[0190] 如本文所用,补体依赖性细胞毒性及CDC是指靶细胞在补体存在下溶解。补体活化路径是通过补体系统的第一组分(C1q)结合至分子(例如与同源抗原复合的抗体)来起始的。为评估补体活化,可进行CDC测定,例如Gazzano-Santoro等人,1996,J.Immunol.Methods,202:163中所述。

[0191] 此外,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC是指一种细胞毒性形式,其中结合于某些细胞毒性细胞(例如自然杀手(NK)细胞、嗜中性白血球及巨噬细胞)上所存在的Fc受体(FcR)的分泌型Ig使得这些细胞毒性效应子细胞能够特异性结合带有抗原的靶细胞且随后用细胞毒素杀死该靶细胞。针对靶标臂细胞毒性细胞的特异性高亲和力IgG抗体为所述杀死所必需的。靶细胞的溶解为细胞外的,需要直接的细胞与细胞接触且不涉及补体。

[0192] FcR结合亲和力或ADCC活性改变的PTK7调节剂变体为与亲本或未修饰抗体或包含天然序列Fc区的调节剂相比FcR结合活性和/或ADCC活性增强或降低的调节剂。与亲本或未修饰抗体或包含天然序列Fc区的调节剂相比,显示增加的FcR结合的调节剂变体以更好的亲和力与至少一种FcR结合。与亲本或未修饰抗体或包含天然序列Fc区的调节剂相比,显示

减少的FcR结合的变体以更差的亲和力与至少一种FcR结合。显示减少的FcR结合的所述变体可具有极少或无可感知的与FcR的结合,例如,如本领域中熟知的技术所测定的,与天然序列IgG Fc区相比,具有0至20%的与FcR的结合。

[0193] 关于FcRn,本发明抗体也包含或涵盖恒定区经修饰的Fc变体,其提供在哺乳动物,优选在人中大于5天、大于10天、大于15天、优选大于20天、大于25天、大于30天、大于35天、大于40天、大于45天、大于2个月、大于3个月、大于4个月或大于5个月的半衰期(例如血清半衰期)。在哺乳动物,优选在人中,本发明抗体(或含有Fc的分子)的半衰期增加在哺乳动物中产生所述抗体或抗体片段的更高的血清效价,且因此降低施用所述抗体或抗体片段的频率和/或降低待施用的所述抗体或抗体片段的浓度。体内半衰期增加的抗体可通过本领域技术人员已知的技术产生。例如,体内半衰期增加的抗体可通过修饰(例如取代、缺失或添加)被鉴别为参与Fc结构域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基产生(参见例如国际公开第W0 97/34631号;第W0 04/029207号;美国专利第6,737,056号及美国专利第2003/0190311号)。可测定体内人FcRn结合及人FcRn高亲和力结合多肽的血清半衰期,例如在表达人FcRn的转基因小鼠或经转染的人细胞系或施用了具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中。W0 2000/42072描述FcRn结合改良或减弱的抗体变体。也参见例如Shields等人J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001)。

[0194] c.糖基化修饰

[0195] 在其他实施方案中,修饰本发明抗体的糖基化模式或组成。更具体地,本发明的优选的实施方案可包含一或多种工程化的糖型,即改变的糖基化模式或改变的共价连接至包含Fc区的分子的碳水化合物组成。工程化的糖型可适用于多种目的,包括(但不限于)增强或降低效应子功能、增加抗体对靶标抗原的亲和力或促进抗体产生。在需要效应子功能降低的情况下,应了解分子可经工程化以表达为去糖基化形式。所述碳水化合物修饰可通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖化位点实现。即,可进行一个或多个氨基酸取代,使得一个或多个可变区框架糖基化位点被消除,由此消除该位点的糖基化(参见例如美国专利第5,714,350号及第6,350,861号)。相反,可通过一个或多个其他糖基化位点的工程化赋予含有Fc的分子增强的效应子功能或改良的结合。

[0196] 此外或备选地,可制造具有改变的糖基化组成的Fc变体,例如:岩藻糖基残基的量降低的低岩藻糖基化抗体或二等分GlcNAc结构增加的抗体。已证明这些及类似改变的糖基化模式增强抗体的ADCC能力。工程化的糖型可通过本领域技术人员已知的任何方法,例如通过使用工程化或变体表达菌株、通过与一或多种酶(例如N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII))共同表达、通过在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达包含Fc区的分子或通过表达包含Fc区的分子之后修饰碳水化合物而产生。参见例如Shields,R.L.等人,(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740;Umana等人,(1999)Nat.Biotech.17:176-1以及欧洲专利第EP 1,176,195号;PCT公开W0 03/035835;W0 99/54342,Umana等人,1999,Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies等人,2001Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等人,2002,J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa等人,2003,J Biol Chem 278:3466-3473;美国专利第6,602,684号;U.S.S.N.10/277,370;U.S.S.N.10/113,929;PCT W0 00/61739A1;PCT W0 01/292246A1;PCT W0 02/311140A1;PCT W0 02/30954A1;PottliagentTM技术(Biowa,Inc.);GlycoMAbTM糖基化工程化技术(GLYCART biotechnology

AG);WO 00061739;EA01229125;美国专利第2003/0115614号;Okazaki等人,2004,JMB,336:1239-49。

[0197] IX.调节剂表达

[0198] a.概述

[0199] 编码所需PTK7调节剂的DNA可容易地使用惯常程序(例如通过使用能够特异性结合编码抗体重链及轻链的基因的寡核苷酸探针)分离及测序。若调节剂为抗体,则经分离及亚克隆的杂交瘤细胞(或噬菌体或酵母来源的集落)可充当该DNA的优选来源。任选地,可如本文所述进一步操纵核酸以产生包括融合蛋白或嵌合、人源化或全人抗体的试剂。更具体地,可使用分离的DNA(其可被修饰)来克隆用于制造抗体的恒定区及可变区序列,如美国专利第7,709,611号所述。

[0200] 此示例性方法需要从所选细胞提取RNA、转化成cDNA及使用抗体特异性引物通过PCR扩增。适合的引物在本领域中已熟知,且如本文所例示容易从许多商业来源获得。应了解,为表达通过筛选组合文库所分离的重组人或非人抗体,将编码抗体的DNA克隆至重组表达载体中且引入包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母及细菌的宿主细胞中。在其他实施方案中,将调节剂引入不以其他方式产生所需构建体的猿COS细胞、NS0细胞、中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary,CHO)细胞或骨髓瘤细胞中且由所述细胞表达。如下文所更详细论述的,表达所需调节剂的经转化的细胞可以相当大的量生长以提供融合构建体或免疫球蛋白的临床及商业供应。

[0201] 不论编码PTK7调节剂的所需部分的核酸是否获自或源于噬菌体展示技术、酵母文库、基于杂交瘤的技术、合成或商业来源,均应理解本发明明确涵盖编码包括融合蛋白及抗PTK7抗体或其抗原结合片段或衍生物的PTK7调节剂的核酸分子及序列。本发明进一步涵盖在高严谨性下或者在中等或较低严谨杂交条件下(例如如下文所定义的)与具有编码本发明调节剂或其片段或变体的多核苷酸序列的核酸互补的多核苷酸杂交的核酸或核酸分子(例如多核苷酸)。如本文所用,术语核酸分子或经分离的核酸分子意欲至少包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可为单链或双链,但优选为双链DNA。此外,本发明包含并入了所述调节剂编码多核苷酸的任何载体或构建体,包括(但不限于)载体、质体、宿主细胞、黏粒或病毒构建体。

[0202] 术语经分离的核酸意指核酸(i)在体外扩增,例如通过聚合酶链反应(PCR),(ii)通过克隆重组产生,(iii)被纯化,例如通过裂解及凝胶电泳分级分离(gel-electrophoretic fractionation),或(iv)被合成,例如通过化学合成法。经分离的核酸为可用于通过重组DNA技术操纵的核酸。

[0203] 更具体地,也提供编码调节剂的核酸,该调节剂包括本发明抗体的一或两条链或其片段、衍生物、突变型蛋白或变体,足以用作杂交探针的多核苷酸、用于鉴别、分析、诱变或扩增编码多肽的多核苷酸的PCR引物或测序引物、用于抑制多核苷酸表达的反义核酸及上述序列的互补序列。核酸可为任何长度。其长度可为例如5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1000、1500、3000、5000个或更多个核苷酸,和/或可包含一个或多个其他序列(例如调节序列)和/或为更大核酸(例如载体)的一部分。这些核酸可为单链或双链的且可包含RNA和/或DNA核苷酸及其人工变体(例如肽核酸)。编码本发明调节剂(包括抗体或其免疫反应性片段或衍生物)的核酸优选如

上文所述被分离。

[0204] b. 杂交及同一性

[0205] 如所指示的,本发明进一步提供在特定杂交条件下与其他核酸杂交的核酸。杂交核酸的方法在本领域中已熟知。参见例如Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6。为了本申请的目的,中等严谨杂交条件使用含有 $5\times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0)的预洗涤溶液,约50%甲酰胺、 $6\times$ SSC的杂交缓冲液,及55℃的杂交温度(或其他类似杂交溶液,例如含有约50%甲酰胺的杂交溶液,42℃的杂交温度)及60℃下于 $0.5\times$ SSC、0.1% SDS中的洗涤条件。严谨杂交条件在 $6\times$ SSC中在45℃下杂交,之后在68℃下用 $0.1\times$ SSC、0.2% SDS洗涤一或多次。此外,本领域技术人员可操纵杂交和/或洗涤条件以增加或降低杂交严谨性,以使得包含彼此间至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的核苷酸序列的核酸通常保持彼此杂交。更一般而言,为了本发明的目的,关于核酸序列的术语实质上同一可解释为与参考核酸序列显示至少约85%、或90%、或95%、或97%序列同一性的核苷酸序列。

[0206] 影响杂交条件的选择的基本参数及设计适合条件的指南由例如Sambrook, Fritsch及Maniatis(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 第9及11章;及Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel等人编, John Wiley&Sons, Inc., 第2.10及6.3-6.4节)所示,且可由普通技术人员基于例如核酸的长度和/或碱基组成容易地确定。

[0207] 应进一步了解,根据本发明,核酸可单独或与可以为同源或异源的其他核酸组合存在。在优选的实施方案中,核酸功能性连接至与该核酸可为同源或异源的表达控制序列。在此情形中,术语同源意指核酸在天然情况下也功能性连接至该表达控制序列,且术语异源意指核酸在天然情况下并不功能性连接至该表达控制序列。

[0208] c. 表达

[0209] 若核酸(例如表达RNA和/或蛋白质或肽的核酸)及表达控制序列以使得该核酸的表达或转录受所述表达控制序列控制或影响的方式彼此共价连接,则该核酸与该表达控制序列彼此功能性连接。若核酸待被翻译成功能性蛋白质,则在存在功能性连接至编码序列的表达控制序列的情况下,诱导该表达控制序列引起该核酸转录,而不在编码序列中产生框移或使该编码序列不能翻译成所需蛋白质或肽。

[0210] 根据本发明,术语表达控制序列包含启动子、核糖体结合位点、增强子及调节基因转录或mRNA翻译的其他控制元件。在本发明的特定实施方案中,表达控制序列可被调节。表达控制序列的确切结构可根据物种或细胞类型而改变,但通常包含分别与转录及翻译的起始有关的5'-非转录及5'-非翻译及3'-非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。更具体地,5'-非转录表达控制序列包含包括用于功能性连接的核酸的转录控制的启动子序列的启动子区。表达控制序列也可包含增强子序列或上游活化因子序列。

[0211] 根据本发明,术语启动子或启动子区涉及位于所表达核酸序列上游(5')且通过提供RNA聚合酶的识别及结合位点控制序列表达的核酸序列。启动子区可包括参与调节基因转录的其他因子的其他识别及结合位点。启动子可控制原核或真核基因的转录。此外,启动子可为诱导性启动子且可响应于诱导剂而起始转录,或在转录不受诱导剂控制的情况下可为组成性启动子。若诱导剂不存在,则受诱导性启动子控制的基因不表达或仅少量表达。在

诱导剂存在下,基因被启动或转录量增加。其一般由特定转录因子的结合介导。

[0212] 根据本发明优选的启动子包括用于SP6、T3及T7聚合酶的启动子、人U6RNA启动子、CMV启动子及其人工杂合启动子(例如CMV),其中一部分或多个部分融合至其他细胞蛋白质(例如人GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶))的基因的启动子的一部分或多个部分,且包括或不包括其他内含子。

[0213] 根据本发明,术语表达以其最普通的含义被使用且包括产生RNA或RNA及蛋白质/肽。其也包括核酸的部分表达。此外,可进行瞬时或稳定表达。

[0214] 在优选的实施方案中,根据本发明,核酸分子存在于载体中,适当时与控制核酸的表达的启动子一起。术语载体在本文中以其最普通的含义被使用且包括用于能使该核酸例如被引入原核和/或真核细胞中,且适当时整合至基因组中的核酸的任何中间媒介物。此类载体优选在细胞中被复制和/或表达。载体可包含质粒、噬菌粒、噬菌体或病毒基因组。如本文所用,术语质粒通常涉及染色体外遗传物质的构建体,通常为环状DNA双链体,其可独立于染色体DNA而复制。

[0215] 在实施本发明时,应了解,任选地使用分子生物学、微生物学及重组DNA技术中的许多惯常技术。所述惯常技术涉及如本文所定义的载体、宿主细胞及重组方法。这些技术已熟知且在以下文献中被解释:例如Berger及Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology volume 152 Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.;Sambrook等人,Molecular Cloning-A Laboratory Manual(第3版),第1-3卷,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,2000及Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等人编,同上。例如用于细胞分离及培养(例如用于后续核酸或蛋白质分离)的其他适用参考文献包括Freshney(1994)Culture of Animal Cells,a Manual of Basic Technique,第3版,Wiley-Liss,New York及其中所引用的参考文献;Payne等人,(1992)Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley& Sons,Inc.New York,N.Y.;Gamborg及Phillips(编)(1995)Plant Cell,Tissue and Organ Culture;Fundamental Methods Springer Lab Manual,Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York)及Atlas及Parks(编)The Handbook of Microbiological Media(1993)CRC Press,Boca Raton,Fla.制备核酸的方法(例如通过体外扩增、从细胞纯化或化学合成)、操纵核酸的方法(例如定点诱变、通过限制酶消化、连接等)及适用于操纵及制备核酸的各种载体、细胞系等被描述于以上参考文献中。另外,基本上任何多核苷酸(包括例如经标记或生物素化的多核苷酸)均可从多种商业来源中的任一种定制或标准定购的。

[0216] 因此,在一个方面中,本发明提供允许重组表达本发明抗体或其部分的重组宿主细胞。通过在所述重组宿主细胞中表达产生的抗体在本文中称为重组抗体。本发明也提供所述宿主细胞的子代细胞及由其产生的抗体。

[0217] 如本文所用,术语重组宿主细胞(或简称为宿主细胞)意指引入了重组表达载体的细胞。应了解重组宿主细胞及宿主细胞不仅意指特定目标细胞,而且也意指该种细胞的子代。因为某些修饰可能因突变或环境影响而存在于后代中,所以该子代实际上可能与亲本细胞相同,但其仍包括在如本文中所用的术语宿主细胞的范畴内。所述细胞可包含如上文所述的本发明载体。

[0218] 在另一方面中,本发明提供一种制备如本文所述的抗体或其部分的方法。根据一

个实施方案,该方法包括培养经如上所述的载体转染或转化的细胞及回收抗体或其部分。

[0219] 如上文所示,本发明抗体(或其片段或变体)的表达优选包括含有编码所需抗PTK7抗体的多核苷酸的表达载体。可使用本领域技术人员熟知的方法来构建包含抗体编码序列及适当转录及翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术及体内遗传重组。因此,本发明的实施方案提供包含可操作地连接至启动子的编码本发明抗PTK7抗体(例如完整抗体、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变结构域或其部分、或重链或轻链CDR、单链Fv或其片段或变体)的核苷酸序列的可复制载体。在优选的实施方案中,所述载体可包括编码抗体分子(或其片段)的重链的核苷酸序列、编码抗体(或其片段)的轻链的核苷酸序列或编码该重链与轻链两者的核苷酸序列。

[0220] 一旦本发明的核苷酸已根据本文的教导被分离及修饰,则其可用以产生所选的调节剂,包括抗PTK7抗体或其片段。

[0221] X. 调节剂产生及纯化

[0222] 使用本领域内认可的分子生物学技术及当前蛋白质表达方法,可产生大量所需调节剂。更具体地,可将编码调节剂(例如如上文所述获得及工程化的抗体)的核酸分子整合至包含各种类型宿主细胞的熟知且可购得的蛋白质生产系统中以提供临床前、临床或商业量的所需药物产品。应了解,在优选的实施方案中,将编码调节剂的核酸分子工程化至提供有效整合至所选宿主细胞中及所需PTK7调节剂随后的高表达水平的载体或表达载体中。

[0223] 优选地,编码PTK7调节剂的核酸分子及包含这些核酸分子的载体可用于转染适合的哺乳动物、植物、细菌或酵母宿主细胞,但应了解,原核系统可用于调节剂制备。可通过用于将多核苷酸引入宿主细胞中的任何已知方法进行转染。用于将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞中的方法在本领域中已熟知,且包括聚葡萄糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸囊封于脂质体中及将DNA直接显微注射至细胞核中。此外,核酸分子可通过病毒载体被引入哺乳动物细胞中。哺乳动物细胞的转化方法在本领域中已熟知。参见例如美国专利第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号及第4,959,455号。此外,植物细胞的转化方法在本领域中已熟知,包括例如农杆菌介导的转化、生物弹射转化、直接注射、电穿孔及病毒转化。细菌及酵母细胞的转化方法在本领域中也熟知。

[0224] 此外,宿主细胞可用两种本发明的表达载体共同转染,例如编码重链来源多肽的第一载体及编码轻链来源多肽的第二载体。两种载体可含有使重链及轻链多肽的表达实质上相等的相同可选择标记物。或者,可使用编码且能够表达重链与轻链多肽两者的单个载体。在所述情形下,轻链优选位于重链之前以避免毒性游离重链过多。重链及轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。

[0225] a. 宿主表达系统

[0226] 多种宿主表达载体系统(许多可购得)与本文的教导相容,且可用以表达本发明的调节剂。所述宿主表达系统代表可由其表达且随后纯化所关注编码序列的媒介物,但也代表用适当核苷酸编码序列转化或转染时可原位表达本发明分子的细胞。所述系统包括(但不限于)微生物,例如经含有调节剂编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或黏粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌(*E. coli*)、枯草杆菌(*B. subtilis*)、链霉菌(*streptomyces*));经含有调节剂编码序列的重组酵母表达载体转染的酵母(例如酵母菌(*Saccharomyces*)、毕

赤酵母(*Pichia*));经含有调节剂编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;经重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒(cauliflower mosaic virus), CaMV;烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus), TMV)感染或经含有调节剂编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转染的植物细胞系统(例如烟草(*Nicotiana*)、拟南芥(*Arabidopsis*)、浮萍(*duckweed*)、玉蜀黍、小麦、马铃薯等);或具有含有源于哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如COS、CHO、BHK、293、3T3细胞)。

[0227] 在细菌系统中,取决于所表达的分子的预期用途,可有利地选择许多表达载体。例如,当要产生大量该种蛋白质时,为了产生调节剂的药物组合物,可能需要引导表达高水平易于纯化的融合蛋白产物的载体。所述载体包括(但不限于)大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,EMBO 1.2:1791(1983)),其中编码序列可单独地连接至载体中与lac Z编码区同框以便产生融合蛋白;pIN载体(Inouye及Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke及Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989))等。pGEX载体也可用于将外源多肽表达为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。一般而言,所述融合蛋白可溶且可通过吸附及结合至基质谷胱甘肽琼脂糖珠粒、随后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从溶解的细胞中被纯化。pGEX载体经设计以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点,以便所克隆的靶标基因产物可从GST部分被释放。

[0228] 在昆虫系统中,可使用苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)(AcNPV)作为载体来表达外源基因。所述病毒在草地黏虫(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。可将编码序列单独地克隆至病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中且置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)控制下。

[0229] 在哺乳动物宿主细胞中,可使用许多基于病毒的表达系统来引入所需核苷酸序列。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,所关注的编码序列可连接至腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子及三联前导序列。接着可通过体外或体内重组将此嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区(例如E1区或E3区)中将产生有活力且能够在受感染宿主中表达分子的重组病毒(例如参见Logan及Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359(1984))。特定起始信号也可作为所插入编码序列的有效翻译所需。这些信号包括ATG起始密码子及邻近序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相以确保整个插入物的翻译。这些外源性翻译控制信号及起始密码子可具有多种天然与合成的来源。表达效率可通过包括适当的转录增强子元件、转录终止子等提高(参见例如Bittner等人,Methods in Enzymol.153:51-544(1987))。因此,可作为表达宿主获得的相容的哺乳动物细胞系在本领域中已熟知且包括可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection;ATCC)获得的许多永生化细胞系。这些细胞系尤其包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0细胞、SP2细胞、HEK-293T细胞、293Freestyle细胞(Life Technologies)、NIH-3T3细胞、海拉细胞(HeLa cell)、幼仓鼠肾(BHK)细胞、非洲绿猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2)、A549细胞及许多其他细胞系。

[0230] 为了长期高产率产生重组蛋白质,稳定的表达为优选的。因此,可使用本领域内认可的标准技术对稳定表达所选调节剂的细胞系进行工程化。宿主细胞可用受适当表达控制

元件(例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的DNA及可选择标记物转化,而非使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外源DNA的后,可使工程化的细胞于富集培养基中生长1至2天,然后转换为选择性培养基。重组质粒中的可选择标记物赋予选择抗性且允许细胞将质粒稳定整合至其染色体中且生长以形成灶点,其可转而克隆且扩增成细胞系。此方法可有利地用以工程化表达分子的细胞系。所述工程化的细胞系尤其可适用于筛选及评估与分子直接或间接相互作用的组合物。

[0231] 许多选择系统在本领域中已熟知且可使用,其包括(但不限于)可分别用于tk-细胞、hgprt-细胞或aprt-细胞中的单纯性疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11:223 (1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska及Szybalski, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202 (1992))及腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy等人,Cell 22:8 17 (1980))基因。此外,可使用抗代谢物抗性作为以下基因的选择基础:dhfr,其赋予对甲氨喋呤的抗性(Wigler等人,Natl.Acad.Sci.USA 77:357 (1980); O'Hare等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527 (1981)); gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan及Berg, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072 (1981)); neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu及Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); 及Morgan及Anderson, Ann.Rev.Biochem.62:191-217 (1993); TIB TECH 11 (5): 155-2 15 (May, 1993)); 及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人, Gene 30:147 (1984))。可常规地应用重组DNA技术中通常已知的方法来选择所需重组克隆,且所述方法被描述于例如Ausubel等人(编), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 及第12及13章, Dracopoli等人(编), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY (1994); Colberre-Garapin等人, J.Mol.Biol.150:1 (1981)中。应了解,一种建立稳定高产率细胞系的特别优选方法包含谷氨酸合成酶基因表达系统(GS系统),其提供在某些条件下增强表达的有效方法。与EP专利0 216 846、0 256 055、0 323 997及0 338 841相关全部或部分地讨论了GS系统,所述专利各自以引用的方式并入本文中。

[0232] 另外,可选择调节插入序列的表达或以所需特定方式修饰及加工基因产物的宿主细胞系。蛋白质产物的所述修饰(例如糖基化)及加工(例如裂解)对于蛋白质的功能和/或纯化可以是重要的。不同宿主细胞具有蛋白质及基因产物的翻译后加工及修饰的特征性及特定机制。如本领域中所已知,可选择适当细胞系或宿主系统以确保所表达多肽的所需修饰及加工。为此,对于在本发明中使用而言,具有用于初级转录物的适当加工、糖基化及基因产物的磷酸化的细胞设备的真核宿主细胞尤其有效。因此,特别优选哺乳动物宿主细胞包括(但不限于)CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、NS0、MDCK、293、3T3、W138以及乳腺癌细胞系(例如BT483、Hs578T、HTB2、BT20及T47D)及正常乳腺细胞系(例如CRL7030及HsS78Bst)。取决于调节剂及所选生产系统,本领域技术人员可容易地选择及优化有效表达调节剂的适当宿主细胞。

[0233] b. 化学合成

[0234] 除前述宿主细胞系统外,应了解,本发明的调节剂也可使用本领域中已知的技术

化学合成(例如参见Creighton,1983,Proteins:Structures and Molecular Principles,W.H.Freeman&Co.,N.Y.,及Hunkapiller,M.,等人,1984,Nature 310:105-111)。例如,可使用肽合成器合成对应于本发明的多肽片段的肽。此外,任选地,可引入非经典氨基酸或化学氨基酸类似物作为多肽序列中的取代或添加。非经典氨基酸一般包括(但不限于)常见氨基酸的D异构体、2,4-二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、g-Abu、e-Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、氧化半胱氨酸(cysteic acid)、t-丁基甘氨酸、t-丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、b-丙氨酸、氟-氨基酸、设计者氨基酸(例如b-甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸)及氨基酸类似物。此外,氨基酸可为D(右旋)或L(左旋)。

[0235] c. 转基因系统

[0236] 本发明的PTK7调节剂也可以转基因方式经由产生对于所关注的免疫球蛋白重链及轻链序列(或其片段或衍生物或变体)为转基因的哺乳动物或植物及产生呈可收回形式的所需化合物而产生。关于哺乳动物中的转基因产生,抗PTK7抗体例如可在山羊、母牛或其他哺乳动物的乳汁中产生及自其中回收。参见例如美国专利第5,827,690号、第5,756,687号、第5,750,172号及第5,741,957号。在一些实施方案中,如上文所述,用PTK7或其免疫原性部分免疫接种包含人免疫球蛋白基因座的非人转基因动物。在植物中制备抗体的方法被描述于例如美国专利第6,046,037号及第5,959,177号中。

[0237] 根据本文的教导,非人转基因动物或植物可通过标准转基因技术将一个或多个编码本发明的PTK7调节剂核酸分子引入动物或植物中而产生。参见Hogan及美国专利第6,417,429号。用以制造转基因动物的转基因细胞可为胚胎干细胞或体细胞或受精卵。转基因非人生物体可为嵌合、非嵌合杂合体及非嵌合纯合体。参见例如Hogan等人,Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manual第2版,Cold Spring Harbor Press(1999); Jackson等人,Mouse Genetics and Transgenics:A Practical Approach,Oxford University Press(2000);及Pinkert,Transgenic Animal Technology:A Laboratory Handbook,Academic Press(1999)。在一些实施方案中,转基因非人动物具有通过编码例如所关注的重链和/或轻链的靶向构建体进行的靶向破坏及置换。在一个实施方案中,转基因动物包含且表达编码特异性结合PTK7的重链及轻链的核酸分子。尽管抗PTK7抗体可在任何转基因动物中制备,但在特别优选的实施方案中,非人动物为小鼠、大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马。在其他实施方案中,非人转基因动物将所需的药物产品表达在血液、乳汁、尿、唾液、眼泪、黏液及其他体液中,使用本领域内认可的纯化技术可容易地从中获得所需药物产品。

[0238] 由不同细胞系或在转基因动物中表达的调节剂(包括抗体)可能具有彼此不同的糖基化模式。然而,与分子的糖基化状态无关,且更一般而言与存在或不存在翻译后修饰无关,由本文提供的核酸分子编码或包含本文提供的氨基酸序列的所有调节剂为本发明的一部分。另外本发明涵盖在翻译期间或之后被差异修饰的调节剂,例如通过糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、与抗体分子或其他细胞配体连接等。许多化学修饰中的任一种可通过已知技术进行,所述已知技术包括(但不限于)通过溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8蛋白酶、NaBH₄特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、氧化、还原、在衣霉素(tunicamycin)存在下代谢合成等。各种翻译后修饰也由本发明涵盖,包括例如N-连接或O-连接的碳水化合物链、N端或C端的加工、化学部分与氨基

酸主链连接、N-连接或O-连接的碳水化合物链的化学修饰及由于原核宿主细胞表达产生的N端甲硫氨酸残基添加或缺失。此外,如本文及下文实施例中所述,多肽也可用可检测的标记物(例如酶促、荧光、放射性同位素或亲和力标记)修饰以允许检测及分离所述调节剂。

[0239] d. 纯化

[0240] 一旦本发明调节剂通过重组表达或任一种本文所公开的其他技术产生,则其可通过本领域中已知纯化免疫球蛋白的任何方法或更一般而言通过纯化蛋白质的任何其他标准技术纯化。在这方面,调节剂可为分离的。如本文所用,经分离的PTK7调节剂为已经鉴别且从其天然环境的组分分离和/或回收的PTK7调节剂。其天然环境的污染物组分为会干扰多肽的诊断或治疗用途的物质,且可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质溶质。因为多肽天然环境的至少一种组分将不存在,所以经分离的调节剂包括位于重组细胞内原位的调节剂。

[0241] 当使用重组技术时,PTK7调节剂(例如抗PTK7抗体或其衍生物或片段)可细胞内产生、产生于周质空间或被直接分泌至培养基中。若所需分子于细胞内产生,则作为第一步骤,可通过例如离心或超滤移除微粒碎片(宿主细胞或溶解片段)。例如,Carter等人,Bio/Technology 10:163 (1992) 描述分离分泌至大肠杆菌的周质空间的抗体的程序。简言之,在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA及苯甲基磺酰氟(PMSF)存在下经约30分钟解冻细胞糊。细胞碎片可通过离心移除。在抗体分泌至培养基中的情况下,通常首先使用市售蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤装置)浓缩所述表达系统的上清液。在任何先前步骤中可包括蛋白酶抑制剂(例如PMSF)以抑制蛋白水解,且可包括抗生素以防止外来污染物生长。

[0242] 由细胞制备的调节剂(例如Fc-PTK7或抗PTK7抗体)组合物可使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析及亲和层析纯化,其中亲和层析法为优选纯化技术。蛋白质A作为亲和配体的适用性取决于存在于所选构建体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类及同型。蛋白质A可用于纯化基于人IgG1、IgG2或IgG4重链的抗体(Lindmark等人,J Immunol Meth 62:1 (1983))。对于所有小鼠同型及人IgG3推荐使用蛋白质G(Guss等人,EMBO J 5:1567 (1986))。虽然亲和配体所连接的基质最常为琼脂糖,但可利用其他基质。与用琼脂糖可达成的流动速率及处理时间相比,机械稳定性基质(例如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)允许更快的流动速率及更短的处理时间。当抗体包含C_H3结构域时,Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker;Phillipsburg,N.J.)适用于纯化。取决于欲回收的抗体,也可利用其他用于蛋白质纯化的技术,例如离子交换柱分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅层析、肝素层析、琼脂糖阴离子或阳离子交换树脂(例如聚天冬氨酸柱)层析、层析聚焦、SDS-PAGE及硫酸铵沉淀。在特别优选的实施方案中,本发明的调节剂将至少部分使用蛋白质A或蛋白质G亲和层析加以纯化。

[0243] XI. 缀合的PTK7调节剂

[0244] 一旦本发明调节剂已根据本文的教导纯化,则其即可与药学活性或诊断性部分或生物相容性修饰剂连接、融合、缀合(例如共价或非共价)或以其他方式缔合。如本文所用,术语缀合物将被广义地泛使用且认为意指与所公开调节剂缔合的任何分子,而与缔合方法无关。在这方面,应了解所述缀合物可包含肽、多肽、蛋白质、聚合物、核酸分子、小分子、模拟剂、合成药物、无机分子、有机分子及放射性同位素。此外,如上文所示,至少部分地取决

于用以实现缀合的方法,所选缀合物可共价或非共价连接至调节剂且显示各种摩尔比。

[0245] 在优选的实施方案中,本发明的调节剂显然可与赋予所选特征的蛋白质、多肽或肽(例如生物毒素、生物标记物、纯化标签等)缀合或缔合。更一般而言,在所选实施方案中,本发明涵盖使用重组融合或化学缀合(包括共价与非共价缀合)至异源蛋白质或多肽的调节剂或其片段,其中多肽包含至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸。构建体不一定需要直接连接,而是可经由连接子序列进行。例如,可使用抗体以通过使本发明的调节剂融合或缀合至特定细胞表面受体特异性抗体而使异源多肽在体外或体内靶向表达PTK7的特定细胞类型。此外,融合或缀合至异源多肽的调节剂也可用于体外免疫测定且可与本领域中已知的纯化方法相容。参见例如国际公开第W0 93/21232号;欧洲专利第EP 439,095号;Naramura等人,1994,Immunol.Lett.39:91-99;美国专利第5,474,981号;Gillies等人,1992,PNAS 89:1428-1432;及Fell等人,1991,J.Immunol.146:2446-2452。

[0246] a. 生物相容性调节剂

[0247] 在优选的实施方案中,本发明的调节剂可与任选地用以调节、改变、改良或缓和调节剂特征的生物相容性调节剂缀合或以其他方式缔合。例如,体内半衰期增加的抗体或融合构建体可通过连接相对高分子量聚合物分子(例如市售聚乙二醇(PEG))或类似生物相容性聚合物而产生。本领域技术人员应了解,可获得呈可经选择以赋予抗体特定性质(例如半衰期可被定制)的许多不同分子量及分子构型的PEG。PEG可在存在或不存在多官能连接子情况下经由PEG与所述抗体或抗体片段的N端或C端的位点特异性缀合或经由赖氨酸残基上存在的ε氨基连接至调节剂或抗体片段或衍生物。可使用引起生物活性损失最小的线性或分支聚合物衍生化。缀合程度可通过SDS-PAGE及质谱分析密切监测以确保PEG分子与抗体分子的最佳缀合。未反应的PEG可通过例如尺寸排阻或离子交换层析与抗体-PEG缀合物分离。所公开的调节剂可以类似方式缀合至白蛋白以制造在体内更稳定或具有更长体内半衰期的抗体或抗体片段。所述技术在本领域中已熟知,参见例如国际公开第W0 93/15199号、第W0 93/15200号及第W0 01/77137号;及欧洲专利第0 413,622号。其他生物相容性缀合物对于普通技术人员显而易见且可根据本文的教导容易地鉴别。

[0248] b. 诊断剂或检测剂

[0249] 在其他优选的实施方案中,本发明的调节剂或其片段或衍生物缀合至可为生物分子(例如肽或核苷酸)、小分子、荧光团或放射性同位素的诊断剂或可检测试剂、标记物或报告子。经标记的调节剂可适用于监测过度增殖性病症的发展或进展或作为临床测试程序的一部分以确定包括所公开调节剂(即诊断治疗剂)的特定疗法的功效,或确定治疗的未来过程。所述标记物或报告子也可适用于纯化所选调节剂、分隔或分离TIC或用于临床前程序或毒物学研究。

[0250] 所述诊断及检测可通过使调节剂与可检测物质偶合来实现,所述可检测物质包括(但不限于):各种酶,包含例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如(但不限于)抗生蛋白链菌素生物素及抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,例如(但不限于)伞酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素;发光物质,例如(但不限于)鲁米诺(luminol);生物发光物质,例如(但不限于)荧光素酶、虫荧光素及水母发光蛋白;放射性物质,例如(但不限于)碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I

、 ^{121}I ）、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)及锝(^{99}Tc)、钛(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 及 ^{117}Tm ；使用各种正电子发射断层摄影术的正电子发射金属、非放射性顺磁性金属离子及经放射性标记或结合至特定放射性同位素的分子。在所述实施方案中，适当的检测方法在本领域中已熟知且可容易地从许多商业来源获得。

[0251] 如上文所示，在其他实施方案中，调节剂或其片段可融合至标记物序列（例如肽或荧光团）以有助于纯化或诊断程序（例如免疫组织化学或FAC）。在优选的实施方案中，标记物氨基酸序列例如六聚组氨酸肽（SEQ ID NO:7），例如pQE载体（Qiagen Inc.）中所提供的标签，其中许多可购得。如Gentz等人，1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824中所述，例如六聚组氨酸（SEQ ID NO:7）提供融合蛋白的便利纯化。适用于纯化的其他肽标签包括（但不限于）与源于流感血球凝集素蛋白质的表位对应的血球凝集素“HA”标签（Wilson等人，1984, Cell 37:767）及“flag”标签（美国专利第4,703,004号）。

[0252] c. 治疗部分

[0253] 如先前所提及的，调节剂或其片段或衍生物也可与例如以下的治疗部分缀合、连接或融合或以其他方式缔合：抗癌剂、细胞毒素或细胞毒性剂（例如细胞生长抑制剂或杀细胞剂）、治疗剂或放射性金属离子（例如 α 或 β -发射体）。如本文所用，细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害且可抑制细胞生长或存活的任何试剂或治疗部分。实例包括紫杉醇（paclitaxel）、细胞松弛素B（cytochalasin B）、短杆菌肽D（gramicidin D）、溴化乙锭、吐根素（emetine）、丝裂霉素（mitomycin）、依托泊苷（etoposide）、特诺波赛（tenoposide）、长春新碱（vincristine）、长春碱（vinblastine）、秋水仙碱（colchicin）、阿霉素（doxorubicin）、道诺霉素（daunorubicin）、二羟基蒽蒽菌素（dihydroxy anthracin）、类美登素（例如DM-1及DM-4（Immunogen, Inc.））、二酮、米托蒽醌（mitoxantrone）、米拉霉素（mithramycin）、放线菌素D（actinomycin D）、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因（procaine）、四卡因（tetracaine）、利多卡因（lidocaine）、普萘洛尔（propranolol）、嘌呤霉素（puromycin）、表柔比星（epirubicin）及环磷酰胺（cyclophosphamide）及其类似物或同源物。其他细胞毒素包含阿瑞他汀（auristatin），包括单甲基阿瑞他汀E（MMAE）及单甲基阿瑞他汀F（MMAF）（Seattle Genetics, Inc.）；鹅膏蕈碱（amanitins），例如 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱或 ϵ -鹅膏蕈碱（Heidelberg Pharma AG）；DNA小沟结合剂，例如多卡米新衍生物（duocarmycin derivative）（Syntarga, B.V.）；及经修饰的吡咯并苯并二氮草二聚体（PBDs, Spirogen, Ltd）。此外，在一个实施方案中，本发明的PTK7调节剂可与抗CD3结合分子缔合以募集细胞毒性T细胞且使其靶向肿瘤起始细胞（BiTE技术；参见例如Fuhrmann, S.等人，AACR年会摘要第5625号（2010），该文献以引用的方式并入本文中）。

[0254] 其他相容的治疗部分包含细胞毒性剂，包括（但不限于）抗代谢物（例如甲氨喋呤（methotrexate）、6-巯嘌呤（6-mercaptopurine）、6-硫鸟嘌呤（6-thioguanine）、阿糖胞苷（cytarabine）、5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil）、达卡巴嗪（decabazine）、烷基化剂（例如氮芥（mechlorethamine）、噻替哌（thioepa）、苯丁酸氮芥（chlorambucil）、美法仑（melphalan）、卡莫司汀（carmustine）（BCNU）及洛莫司汀（lomustine）（CCNU）、环磷酰胺（cyclophosphamide）、白消安（busulfan）、二溴甘露醇（dibromomannitol）、链脲佐菌素

(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycin C)及顺二氯二胺铂(II) (DDP)、顺铂)、蒽环霉素(例如道诺霉素(先前称为道诺霉素(daunomycin))及阿霉素)、抗生素(例如更生霉素(dactinomycin)(先前称为放线菌素)、博莱霉素(bleomycin)、米拉霉素(mithramycin)及安曲霉素(anthracycline)(AMC))及抗有丝分裂剂(例如长春新碱(vincristine)及长春碱(vinblastine))。治疗部分的更广泛清单可见于PCT公开W0 03/075957及美国专利第2009/0155255号中,各文献以引用的方式并入本文中。

[0255] 所选调节剂也可缀合至治疗部分,例如适用于缀合放射性金属离子(参见上文放射性物质的实例)的放射性物质或大环螯合剂。在某些实施方案中,大环螯合剂为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可经由连接子分子连接至抗体。所述连接子分子通常在本领域中已知且描述于Denardo等人,1998,Clin Cancer Res.4:2483; Peterson等人,1999,Bioconjug.Chem.10:553;及Zimmerman等人,1999,Nucl.Med.Biol.26:943中。

[0256] 可与本发明的此方面相容的示例性放射性同位素包括(但不限于)碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、铜(^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、铋(^{212}Bi 、 ^{213}Bi)、锝(^{99}Tc)、钛(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、 ^{117}Te 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 及 ^{211}At 。也可利用其他放射性核素作为诊断剂及治疗剂,特别是能量范围为60keV至4,000keV的那些放射性核素。取决于待治疗的病状及所需治疗特征谱,本领域技术人员可容易地选择适当的放射性同位素以与所公开的调节剂一起使用。

[0257] 本发明的PTK7调节剂也可缀合至修饰给定生物应答的治疗部分或药物(例如生物应答调节剂或BRM)。即,与本发明相容的治疗剂或部分不应解释为限于经典化学治疗剂。例如,在特别优选的实施方案中,药物部分可为具有所需生物活性的蛋白质或多肽或其片段。所述蛋白质可包括例如毒素,例如相思子毒素(abrin)、蓖麻毒素A(ricin A)、Onconase(或另一细胞毒性RNA酶)、绿脓杆菌外毒素(pseudomonas exotoxin)、霍乱菌毒素(cholera toxin)或白喉毒素(diphtheria toxin);蛋白质,例如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤维蛋白溶酶原活化因子、细胞凋亡剂(例如TNF- α 、TNF- β 、AIM I(参见国际公开第W0 97/33899号)、AIM II(参见国际公开第W0 97/34911号)、Fas配体(Takahashi等人,1994,J. Immunol.,6:1567)及VEGI(参见国际公开第W0 99/23105号))、血栓形成剂或抗血管生成剂(例如血管生长抑素或内皮生长抑素);或生物应答修饰剂,例如淋巴因子(例如白介素-1("IL-1")、白介素-2("IL-2")、白介素-6("IL-6")、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF")及粒细胞集落刺激因子("G-CSF"))或生长因子(例如生长激素("GH"))。如上文所述,使调节剂融合或缀合至多肽部分的方法在本领域中已知。除先前所公开的目标参考文献外,也参见例如美国专利第5,336,603号;第5,622,929号;第5,359,046号;第5,349,053号;第5,447,851号及第5,112,946号;EP 307,434;EP 367,166;PCT公开W0 96/04388及W0 91/06570;Ashkenazi等人,1991,PNAS USA 88:10535;Zheng等人,1995,J Immunol 154:5590;及Vil等人,1992,PNAS USA 89:11337,各文献以引用的方式并入本文中。调节剂与部分不一定需要直接缔合,而是可经由连接子序列进行。所述连接子分子通常在本领域中已知且描述于Denardo等人,1998,Clin Cancer

Res 4:2483;Peterson等人,1999,Bioconjug Chem 10:553;Zimmerman等人,1999,Nucl Med Biol 26:943;Garnett,2002,Adv Drug Deliv Rev 53:171中,各文献均以引用的方式并入本文中。

[0258] 更一般而言,已熟知使治疗部分或细胞毒性剂与调节剂缀合的技术。部分可通过本领域内认可的任何方法缀合至调节剂,所述方法包括(但不限于)醛/席夫(Schiff)键联、巯基键联、酸不稳定键联、顺式乌头酰基键联、胺键联、酶可降解键联(一般性地参见Garnett,2002,Adv Drug Deliv Rev 53:171)。也参见例如Amon等人,「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」,Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人,(编),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等人,「Antibodies For Drug Delivery」,Controlled Drug Delivery (第2版),Robinson等人,(编),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe,「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review」,Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人,(编),第475-506页(1985);「Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」,Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人,(编),第303-16页(Academic Press 1985);及Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.62:119。在优选的实施方案中,结合至治疗部分或细胞毒性剂的PTK7调节剂在结合与细胞表面缔合的PTK7分子后可由细胞内化,从而递送治疗性有效负荷。

[0259] XII. 诊断学及筛选

[0260] a. 诊断学

[0261] 如所示的,本发明提供检测、诊断或监测过度增殖性病症的体外或体内方法及从患者筛选细胞以鉴别包括TPC的致癌细胞的方法。所述方法包括鉴别患有癌症的受试者用于治疗或监测癌症进展,包含使患者或从患者获得的样品与如本文所述的所选PTK7调节剂接触及检测调节剂与样品中的结合或游离PTK7的缔合的存在或不存在或缔合水平。当调节剂包含抗体或其免疫活性片段时,与样品中的特定PTK7的缔合可能表示样品可含有肿瘤永存细胞(例如癌症干细胞),从而指示患有癌症的受试者可用如本文所述的PTK7调节剂有效治疗。所述方法可还包括比较与对照物的结合水平的步骤。相反,当所选调节剂为Fc-PTK7时,在与样品接触时可利用及监测所选PTK7的结合性质(直接或间接,体内或体外)以提供所需信息。与本文教导相容的其他诊断或诊断治疗方法在本领域中已熟知且可使用商业材料实施,例如专用报导系统。

[0262] 在特别优选的实施方案中,可使用本发明的调节剂来检测及定量患者样品(例如血浆或血液)中的PTK7水平,其转而可用以检测、诊断或监测PTK7相关病症,包括过度增殖性病症。在相关的实施方案中,本发明的调节剂可被用于体内或体外检测、监测和/或定量循环肿瘤细胞(见,例如W02012/0128801,其在此通过引用并入)。在其它优选的实施方案中,所述循环肿瘤细胞可包含癌症干细胞。

[0263] 示例性相容测定方法包括放射免疫测定、酶免疫测定、竞争性结合测定、荧光免疫测定、免疫印迹测定、蛋白质印迹分析(Western Blot analysis)、流式细胞计数测定及ELISA测定。更一般而言,生物样品中PTK7的检测或PTK7酶活性的测量(或其抑制)可使用任

何本领域中已知的测定来实现。相容的体内诊断治疗或诊断可包含本领域内认可的成像或监测技术,例如磁共振成像(MRI)、计算机化断层摄影术(例如CAT扫描)、正电子断层摄影术(例如PET扫描)、射线照相术、超声波等。本领域技术人员将能够基于病症的病源学、病理表现或临床进展容易地识别及实施适当的检测、监测或成像技术(通常包含市售来源)。

[0264] 在另一实施方案中,本发明提供体内分析癌症进展和/或发病机理的方法。在另一实施方案中,体内分析癌症进展和/或发病机理包含确定肿瘤进展的程度。在另一实施方案中,分析包含鉴别肿瘤。在另一实施方案中,对原发性肿瘤进行肿瘤进展分析。在另一实施方案中,根据本领域技术人员已知的癌症类型,随时间进行分析。在另一实施方案中,体内分析起源于原发性肿瘤的转移细胞的继发性肿瘤的进一步分析。在另一实施方案中,分析继发性肿瘤的大小及形状。在一些实施方案中,进行进一步离体分析。

[0265] 在另一实施方案中,本发明提供一种体内分析癌症进展和/或发病机理的方法,包括确定细胞转移或检测和定量循环肿瘤细胞的水平。在又一实施方案中,细胞转移的分析包含确定与原发性肿瘤不连续的位点的细胞的进行性生长。在另一实施方案中,细胞转移分析的位点包含赘生性扩散的途径。在一些实施方案中,细胞可经由血液血管结构、淋巴、在体腔内或其组合来分散。在另一实施方案中,细胞转移分析是鉴于细胞迁移、散布、外渗、增殖或其组合来进行的。

[0266] 在某些实施例中,在疗法或方案之前可使用所公开的调节剂评估或表征受试者或来自受试者的样品中的致肿瘤细胞以建立基线。在其他实施例中,样品源于所治疗的受试者。在一些实施方案中,样品是在受试者开始或终止治疗后至少约1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90天、6个月、9个月、12个月或大于12个月从所述受试者获取的。在某些实施例中,在一定数目的剂量后(例如在疗法的2、5、10、20,30或30更多剂量后)评估或表征致肿瘤细胞。在其他实施例中,在接受一或多种疗法的后1周、2周、1个月、2个月、1年、2年、3年、4年或更长之后表征或评估致肿瘤细胞。

[0267] 在另一方面中且如下文所更详细论述的,本发明提供用于检测、监测或诊断过度增殖性病症、鉴别患有该种病症的受试者用于可能的治疗或监测患者的病症进展(或退化)的试剂盒,其中该试剂盒包含如本文所述的调节剂及用于检测调节剂对样品的影响的试剂。

[0268] b. 筛选

[0269] PTK7调节剂及包含其的细胞、培养物、群体及组合物(包括其子代)也可用以筛选或鉴别通过与PTK7(例如多肽或其遗传组分)相互作用影响肿瘤起始细胞或其子代的功能或活性的化合物或试剂(例如药物)。因此,本发明进一步提供用于评估或鉴别可通过与PTK7或其底物缔合影响肿瘤起始细胞或其子代的功能或活性的化合物或试剂的系统及方法。所述化合物及试剂可为针对治疗例如过度增殖性病症所筛选的药物候选物。在一个实施方案中,系统或方法包括显示PTK7的肿瘤起始细胞及化合物或试剂(例如药物),其中所述细胞及化合物或试剂(例如药物)彼此接触。

[0270] 本发明进一步提供筛选及鉴别用于改变肿瘤起始细胞或子代细胞的活性或功能的PTK7调节剂或试剂及化合物的方法。在一个实施方案中,方法包括使肿瘤起始细胞或其子代与测试试剂或化合物接触;及确定测试试剂或化合物是否调节PTK7相关肿瘤起始细胞的活性或功能。

[0271] 调节群体内所述肿瘤起始细胞或其子代的PTK7相关活性或功能的测试试剂或化合物将该测试试剂或化合物鉴别为活性试剂。可被调节的示例性活性或功能包括细胞形态、标记物表达、分化或去分化、成熟、增殖、活力、细胞凋亡或细胞死亡神经元祖细胞或其子代的变化。

[0272] 当关于细胞或细胞培养物或方法步骤或治疗使用时,接触意指组合物(例如PTK7相关细胞或细胞培养物)与另一参考实体之间的直接或间接相互作用。直接相互作用的特别实例为物理相互作用。间接相互作用的特别实例为组合物作用于中间分子,该中间分子转而又作用于参考实体(例如细胞或细胞培养物)。

[0273] 在本发明的此方面中,调节指示以与检测对已确定与本发明的肿瘤起始细胞或子代细胞的特定方面(例如转移或增殖)有关的细胞活性或功能的作用相容的方式影响肿瘤起始细胞或子代细胞的活性或功能。示例性活性及功能包括(但不限于)测量形态、发育标记物、分化、增殖、活力、细胞呼吸、粒线体活性、膜完整性或与某些病况相关的标记物的表达。因此,化合物或试剂(例如药物候选物)对肿瘤起始细胞或子代细胞的影响可通过使所述细胞或子代细胞与该化合物或试剂接触并测量如本文所公开的肿瘤起始细胞或子代细胞的活性或功能的任何调节而进行评估或将为熟练技工所已知。

[0274] 筛选及鉴别试剂及化合物的方法包括适用于高通量筛选的方法,其包括任选地定位于或安置于预定位置或地址的细胞阵列(例如微阵列)。高通量机器人或人工处理方法可探查化学相互作用且在短时期内确定许多基因的表达水平。已开发了利用分子信号(例如荧光团)及以极快速率处理信息的自动分析的技术(参见例如Pinhasov等人,Comb.Chem.High Throughput Screen.7:133(2004))。例如,微阵列技术已广泛用以同时探查数千个基因的相互作用,同时提供关于特定基因的信息(参见例如Mocellin及Rossi,Adv.Exp.Med.Biol.593:19(2007))。

[0275] 所述筛选方法(例如高通量)可快速且有效地鉴别活性剂及化合物。例如,可将细胞定位于或安置于(预先接种于)培养皿、管、烧瓶、转瓶或平板(例如单一多孔平板或培养皿,例如8、16、32、64、96、384及1536多孔平板或培养皿)上,任选地在确定的位置,用于鉴别潜在的治疗分子。可筛选的文库包括例如小分子文库、噬菌体展示文库、全人抗体酵母展示库(Adimab,LLC)、siRNA文库及腺病毒转染载体。

[0276] VIII. 药学制备物及治疗用途

[0277] a. 制剂及施用途径

[0278] 取决于调节剂的形式以及任何任选的缀合物、所欲递送模式、所治疗或监测的疾病及许多其他变量,可使用本领域内认可的技术视需要配制本发明的组合物。即,在本发明的各种实施方案中,包含PTK7调节剂的组合物是用多种药学上可接受的载体配制的(参见例如Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus,第20版(2003);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippencott Williams and Wilkins(2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Pharmaceutical Press(2000))。包括媒介物、佐剂及稀释剂的各种药学上可接受的载体可容易地从许多商业来源获得。此外,也可获得各种药学上可接受的佐剂物质,例如pH值调节及缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等。某些非限制性示例性载体包括生理食盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其

组合。

[0279] 更具体地,应了解,在一些实施方案中,本发明的治疗组合物可被净施用或与最少量的其他组分一起施用。相反,本发明的PTK7调节剂可任选地被配制成含有包含赋形剂及佐剂的合适的药学上可接受的载体,所述载体在本领域中熟知且为促进施用调节剂或有助于将活性化合物加工成在药学上对于递送至作用部位最佳的制备物的相对惰性的物质。例如,赋形剂可给予形式或稠度或作为改良调节剂的药物动力学的稀释剂。适合的赋形剂包括(但不限于)稳定剂、湿润剂及乳化剂、用于改变容积摩尔渗透浓度的盐、囊封剂、缓冲剂及皮肤穿透增强剂。

[0280] 用于全身性施用的所公开调节剂可被配制用于经肠、肠胃外或局部施用。的确,可同时使用所有三种类型的配制物以达成活性成分的全身性施用。用于肠胃外及非肠胃外药物递送的赋形剂以及制剂被显示于Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版Mack Publishing (2000) 中。适用于肠胃外施用的制剂包括呈水溶性形式(例如水溶性盐)的活性化合物的水性溶液。另外,可施用活性化合物的悬浮液,适当时为油性注射悬浮液。适合的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油,例如芝麻油;或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯或三酸甘油酯。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液黏度的物质且包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或聚葡萄糖。任选地,悬浮物也可含有稳定剂。也可使用脂质体以封装用于递送至细胞中的试剂。

[0281] 适用于经肠施用的制剂包括硬或软明胶胶囊、丸剂、锭剂(包括包衣锭剂)、酏剂、悬剂、糖浆或吸入剂及其控制释放形式。

[0282] 一般而言,可通过各种途径将包含PTK7调节剂的本发明的化合物及组合物体内施用给有需要的受试者,所述途径包括(但不限于)经口、静脉内、动脉内、皮下、肠胃外、鼻内、肌肉内、心内、心室内、气管内、颊、直肠、腹膜内、皮内、表面、经皮及鞘内或通过植入或吸入。可将目标组合物配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂;包括(但不限于)锭剂、胶囊、散剂、颗粒剂、软膏、溶液、栓剂、灌肠剂、注射剂、吸入剂及气雾剂。可根据所欲应用及治疗方案选择适当的制剂及施用途径。

[0283] b. 剂量

[0284] 类似地,特定给药方案,即剂量、时机及重复,将取决于特定个体及那个个体的医疗史。经验性考虑(例如药物动力学(例如半衰期、清除速率等)将促成剂量的确定。施用的频率可在治疗过程中确定及调整,且基于降低过度增殖性或赘生性细胞(包括肿瘤起始细胞)的数目、维持所述赘生性细胞的降低、降低赘生性细胞的增殖或延迟转移发生。或者,目标治疗组合物的持续缓释制剂可以是适当的。如上文所提及,用于实现缓释的各种制剂设备在本领域中已知。

[0285] 从治疗立场看来,施用有效治疗或预防特定适应症的量的药物组合物。治疗有效量通常取决于所治疗受试者的体重、其身体或健康状况、待治疗病状的程度或所治疗受试者的年龄。一般而言,本发明PTK7调节剂的施用量可在每剂每公斤体重约10 μ g至每公斤体重约100mg的范围内。在某些实施方案中,本发明PTK7调节剂的施用量可在每剂每公斤体重约50 μ g至每公斤体重约5mg的范围内。在某些实施方案中,本发明PTK7调节剂的施用量可在每剂每公斤体重约100 μ g至每公斤体重约10mg的范围内。任选地,本发明PTK7调节剂的施用量可在每剂每公斤体重约100 μ g至每公斤体重约20mg的范围内。还任选地,本发明PTK7调节

剂的施用量可在每剂每公斤体重约0.5mg至每公斤体重约20mg的范围内。在某些实施方案中,提供本发明的化合物,以每公斤体重至少约100 μ g、每公斤体重至少约250 μ g、每公斤体重至少约750 μ g、每公斤体重至少约3mg、每公斤体重至少约5mg、每公斤体重至少约10mg的剂量施用。

[0286] 其他给药方案可如美国专利第7,744,877号中所公开的、根据体表面积(BSA)计算来预测,该文献在此以其全部通过引用而并入。如本领域中所熟知,BSA是使用患者的身高及体重来计算的且提供如由其身体表面积所表示的受试者尺寸的量度。在使用BSA的本发明的所选实施方案中,可施用剂量为10mg/m²至800mg/m²的调节剂。在其他优选的实施方案中,施用剂量为50mg/m²至500mg/m²,且甚至更优选的剂量为100mg/m²、150mg/m²、200mg/m²、250mg/m²、300mg/m²、350mg/m²、400mg/m²或450mg/m²的调节剂。当然,应了解,与剂量如何计算无关,在所选时间段可施用多个剂量以提供实质上高于单次施用的绝对剂量。

[0287] 在任何情况下,PTK7调节剂优选视有需要的受试者的需要施用。施用频率的确定可由本领域技术人员,例如主治医师基于所治疗病状、所治疗受试者的年龄、所治疗病状的严重程度、所治疗受试者的一般健康状况等考虑因素进行。一般而言,向受试者施用有效剂量的PTK7调节剂一或多次。更具体地,向受试者施用有效剂量的调节剂一月一次、一月一次以上或少于一月一次。在某些实施方案中,可施用有效剂量的PTK7调节剂多次,包括在至少1个月、至少6个月或至少1年的时期中。在其他实施方案中,施用所公开调节剂之间可间隔若干天(2、3、4、5、6或7)、若干周(1、2、3、4、5、6、7或8)或若干个月(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0288] 也可凭经验确定已给予一或多次施用的受试者中所公开治疗组合物的剂量及方案。例如,可给予受试者递增剂量的如本文所述制备的治疗组合物。为评估所选组合物的功效,可如先前所述跟踪特定疾病、病症或病状的标记物。在受试者患有癌症的实施方案中,这些跟踪包括经由触诊或目测直接测量肿瘤尺寸、通过x射线或其他成像技术间接测量肿瘤尺寸;如直接肿瘤活检及肿瘤样品的显微镜检验所评估的改良;测量根据本文所述方法鉴别的间接肿瘤标记物(例如用于前列腺癌的PSA)或抗原、疼痛或麻痹减少;语言、视力、呼吸或与肿瘤相关的其他失能改良;食欲增加;或由接受的测试所测量的生活质量增加或存活延长。本领域技术人员将显而易见,剂量将取决于受试者、赘生性病状的类型、赘生性病状的病期、赘生性病状是否开始转移至受试者中的其他位置及所用的过往及当前治疗而改变。

[0289] c. 组合疗法

[0290] 本发明涵盖的组合疗法尤其可适用于降低或抑制不当赘生性细胞增殖(例如内皮细胞)、降低癌症发生、减少或预防癌症重现或减少或预防癌症扩散或转移。在所述情况下,本发明化合物可通过移除支持及使瘤体(例如NTG细胞)永存的TPC而作为敏化剂或化学敏化剂,并允许更有效使用当前标准护理减瘤或抗癌剂。即,包含PTK7调节剂及一或多种抗癌剂的组合疗法可用以减轻已确立的癌症,例如降低所存在的癌细胞数和/或降低肿瘤负荷或改善癌症的至少一种表现或副作用。因而,组合疗法是指施用PTK7调节剂及一或多种抗癌剂,该抗癌剂包括(但不限于)细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、化学治疗剂、靶向抗癌剂、生物应答调节剂、免疫治疗剂、癌症疫苗、抗血管生成剂、细胞因子、激素疗法、辐射疗法及抗转移剂。

[0291] 根据本发明的方法,不存在对各治疗(例如抗PTK7抗体及抗癌剂)分别进行时所观

察到的效应为加成的组合结果的要求。尽管一般需要至少有加成的效应,高于单一疗法之一的任何增加的抗肿瘤效应均有益。此外,本发明不要求组合治疗显示协同效应。然而,本领域技术人员应了解,在包含优选的实施方案的某些所选组合下,可观察到协同作用。

[0292] 为实施本发明的组合疗法,可将PTK7调节剂(例如抗PTK7抗体)与一或多种抗癌剂的组合以在受试者中有效产生抗癌活性的方式向有需要的受试者施用。根据需要,以在肿瘤环境中有效引起其组合存在及其组合作用的量和时间段提供PTK7调节剂及抗癌剂。为达到此目标,可在单一组合物中或作为使用相同或不同施用途径的两种或更多种不同组合物向受试者同时施用PTK7调节剂及抗癌剂。

[0293] 或者,调节剂可以例如数分钟至数周范围内的时间间隔在抗癌剂治疗之前或之后。在分别向受试者应用抗癌剂及抗体的某些实施方案中,各自递送时间之间的时间段为使得抗癌剂及调节剂能够对肿瘤发挥组合效应。在特定的实施方案中,预期抗癌剂与PTK7调节剂两者在彼此间隔约5分钟至约两周内被施用。

[0294] 在其他实施方案中,施用调节剂及抗癌剂之间可间隔若干天(2、3、4、5、6或7)、若干周(1、2、3、4、5、6、7或8)或若干个月(1、2、3、4、5、6、7或8)。可施用PTK7调节剂及一或多种抗癌剂(组合疗法)一次、两次或至少一段时间,直至病状得到治疗、缓解或治愈。优选施用组合疗法多次。可以每天三次至每6个月一次施用组合疗法。施用可按以下计划,例如:每天三次、每天两次、每天一次、每两天一次、每三天一次、每周一次、每两周一次、每月一次、每两个月一次、每三个月一次、每6个月一次或可通过迷你泵连续施用。如先前所示,组合疗法可通过经口、黏膜、颊、鼻内、可吸入、静脉内、皮下、肌肉内、肠胃外、肿瘤内或局部途径施用。可在远离肿瘤位点的位点施用组合疗法。一般只要肿瘤存在即施用组合疗法,其条件是组合疗法使肿瘤或癌症停止生长或使重量或体积减少。

[0295] 在一个实施方案中,向有需要的受试者短治疗循环地组合施用PTK7调节剂与一或多种抗癌剂。用抗体治疗的持续时间可根据所使用的特定抗癌剂而改变。本发明也涵盖不连续施用或分成若干部分施用的每日剂量。熟练技工应了解特定抗癌剂的适当治疗时间,且本发明涵盖持续评估每种抗癌剂的最佳治疗计划。

[0296] 本发明涵盖至少一个周期,优选超过一个周期,期间施用组合疗法。熟练技工应了解一个周期的适当时间,也应了解周期总数及周期之间的时间间隔。本发明涵盖每种调节剂及抗癌剂的最佳治疗计划的持续评估。此外,本发明也提供超过一次施用抗PTK7抗体或抗癌剂。调节剂及抗癌剂可隔天或隔周互换施用;或可给予一系列抗体治疗,之后给予一或多次抗癌剂疗法治疗。在任何情况下,如普通技术人员所了解的,化学治疗剂的适当剂量一般在已用于所述化学疗法单独或与其他化学疗法组合施用的临床疗法的那些剂量左右。

[0297] 在另一优选的实施方案中,本发明的PTK7调节剂可用于维持疗法中以降低或消除疾病初始呈现后肿瘤重现的机率。优选地,病症已被治疗且初始瘤块被消除、减少或以其他方式被改善,因此患者无症状或症状缓解。此时,尽管使用标准诊断程序有极少或不存在疾病适应症,但仍可向受试者施用药学有效量的所公开调节剂一或多次。在一些实施方案中,按常规计划在一段时间中施用效应子。例如,PTK7调节剂可每周、每两周、每月、每6周、每两个月、每三个月、每6个月或每年施用。鉴于本文的教导,本领域技术人员可容易地确定有利剂量及给药方案以降低疾病重现的潜在可能性。此外,取决于患者反应及临床及诊断参数,所述治疗可持续数周、数月、数年或甚至无限期的时间。

[0298] 在另一优选的实施方案中,本发明的调节剂可被用以在减瘤程序之后防治性预防或降低肿瘤转移的可能性。如本公开所用,减瘤过程在广义上被定义且应意指消除、降低、治疗或改善肿瘤或肿瘤增殖的任何程序、技术或方法。示例性的减瘤程序包括(但不限于)手术、辐射治疗(即射线束辐射)、化学疗法或切除。在本领域技术人员鉴于本公开容易地确定的适当次数下,可如临床及诊断或诊断治疗程序所表明地施用PTK7调节剂以减少肿瘤转移。可如使用标准技术所确定的药学有效剂量一或多次施用所述调节剂。优选地,给药方案将伴随允许其视需被修饰的适当诊断或监测技术。

[0299] d. 抗癌剂

[0300] 如本文所用,术语抗癌剂意指可用以治疗细胞增殖性病症(例如癌症)的任何试剂,包括细胞毒性试剂、细胞生长抑制剂、抗血管生成剂、减瘤剂、化学治疗剂、放射疗法及放射线治疗剂、靶向抗癌剂、生物应答调节剂、抗体及免疫治疗剂。应了解,在如上文所讨论的所选实施方案中,抗癌剂可包含缀合物且可在施用之前与调节剂缔合。

[0301] 术语细胞毒性剂意指降低或抑制细胞功能和/或引起细胞破坏的物质,即该物质对细胞有毒。通常,该物质为源于活生物体的天然存在的分子。细胞毒性剂的实例包括(但不限于)下述的小分子毒素或酶促活性毒素:细菌(例如白喉毒素(Diphtheria toxin)、绿脓杆菌(*Pseudomonas*)内毒素及外毒素、葡萄球菌肠毒素A(*Staphylococcal enterotoxin A*))、真菌(例如 α -帚曲菌素(α -sarcin)、局限曲菌素(restrictocin))、植物(例如相思豆毒素(abrin)、蓖麻毒素(ricin)、莫迪素(modeccin)、槲寄生素(viscumin)、商陆抗病毒蛋白质(pokeweed anti-viral protein)、皂草素(saporin)、白树素(gelonin)、苦瓜毒素(momoridin)、天花粉蛋白(trichosanthin)、大麦毒素、油桐蛋白质(*Aleurites fordii* protein)、香石竹毒蛋白(dianthin protein)、洋商陆蛋白质(*Phytolacca mericana* protein)(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制剂(*Momordica charantia* inhibitor)、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(croton)、皂草抑制剂(*saponaria officinalis* inhibitor)、白树素(gelonin)、米特菌素(mitegellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、新霉素(neomycin)及霉菌毒素(tricothecenes))或动物,例如细胞毒性RNA酶,例如细胞外胰腺RNA酶;DNA酶I,包括它们的片段和/或变体。

[0302] 化学治疗剂意指非特异性降低或抑制癌细胞的生长、增殖和/或存活的化合物(例如细胞毒性剂或细胞生长抑制剂)。所述化学剂通常针对细胞生长或分裂所必需的细胞内过程,且因此对抗一般快速生长及分裂的癌细胞尤其有效。例如,长春新碱使微管解聚,且因此抑制细胞进入有丝分裂。一般而言,化学治疗剂可包括抑制或被设计为抑制癌细胞或可能癌变或产生致肿瘤子代的细胞(例如TIC)的任何化学剂。通常施用所述试剂,且所述试剂通常呈组合(例如制剂CHOP)时最有效。

[0303] 可与本发明调节剂组合使用(或缀合)的抗癌剂的实例包括(但不限于)烷基化剂、烷基磺酸酯、氮丙啶、乙烯亚胺及甲基三聚氰胺、多聚乙酰、喜树碱(camptothecin)、苔藓抑素(bryostatin)、卡利他汀(callystatin)、CC-1065、念珠藻环肽(cryptophycins)、尾海兔素(dolastatin)、多卡米新(duocarmycin)、艾榴塞洛素(eleutherobin)、水鬼蕉碱(pancratistatin)、沙考地汀(sarcodictyin)、海绵抑素(spongistatin)、氮芥、抗生素、烯二炔类抗生素、达内霉素(dynemicin)、双膦酸酯、埃斯培拉霉素(esperamicin)、色蛋白烯二炔类抗生素发色团、克拉斯米辛(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、奥斯拉菌

素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博莱霉素、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、更生霉素、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-侧氧基-L-正白氨酸、**Adriamycin[®]**阿霉素、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链脲佐菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin);抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、雄激素、抗肾上腺素、叶酸补充剂(例如夫罗林酸(frolic acid)、醋葡醛内酯(aceglatone)、醛磷酰胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶(eniluracil)、安吡啶(amsacrine)、倍思塔布(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、埃达曲克(edatraxate)、得弗伐胺(defofamine)、秋水仙胺(demecolcine)、地吡酮(diaziquone)、依氟鸟氨酸(elformithine)、依利醋铵(elliptinium acetate)、埃博霉素(epothilone)、依托格鲁(etoglucid)、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖(lentinan)、氯尼达明(lonidainine)、类美登素(maytansinoids)、丙脒脒(mitoguanine)、米托蒽醌、莫哌达醇(mopidanmol)、硝拉维林(nitraerine)、喷司他汀(pentostatin)、凡那明(phenamet)、吡柔比星(pirarubicin)、洛索蒽醌(losoxantrone)、足叶草酸(podophyllinic acid)、2-乙酰肼、丙卡巴肼(procarbazine)、**PSK[®]**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR)、雷佐生(razoxane);根瘤菌素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三氮唑酮(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)(尤其T-2毒素、弗纳库林A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);双溴丙基哌嗪(pipobroman);甲托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷(arabinoside)(「Ara-C」);环磷酰胺(cyclophosphamide);噻替派(thiotepa);紫杉烷(taxoids)、苯丁酸氮芥(chlorambucil);**Gemzar[®]**吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物、长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);米托蒽醌;长春新碱;**NAVELBINE[®]**长春瑞滨(vinorelbine);诺凡特龙(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(Camptosar,CPT-11)、拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);类视黄素(retinoids);卡西他滨(capecitabine);康柏斯达汀(combretastatin);甲酰四氢叶酸(leucovorin)(LV);奥沙利铂(oxaliplatin);降低细胞增殖的PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR及VEGF-A的抑制剂,及以上任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。此定义内也包括用以调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,例如抗雌激素及选择性雌激素受体调节剂(SERM)、抑制芳香酶的芳香酶抑制剂(其调节肾上腺中的雌激素产生)及抗雄激素;以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧杂环戊烷核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸;核糖核酸酶,例如VEGF表达抑制剂及HER2表达抑制剂;疫苗、

PROLEUKIN[®] rIL-2; LURTOTECAN[®] 拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX[®]** rmRH; 长春瑞滨及埃斯培拉霉素及以上任一种的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。其他实施方案包含使用已被批准用于癌症疗法的免疫治疗剂, 例如抗体, 包括 (但不限于) 利妥昔单抗 (rituximab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、吉妥珠单抗 (gemtuzumab ozogamcin)、阿仑单抗 (alemtuzumab)、替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan)、托西莫单抗 (tositumomab)、贝伐单抗 (bevacizumab)、西妥昔单抗 (cetuximab)、帕尼单抗 (patitumumab)、奥伐组单抗 (ofatumumab)、伊匹单抗 (ipilimumab) 及布妥昔单抗 (brentuximab vedotin)。本领域技术人员将能容易地鉴别与本文教导相容的其他抗癌剂。

[0304] e. 放射疗法

[0305] 本发明也提供 PTK7 调节剂与放射疗法 (即在肿瘤细胞内局部诱导 DNA 损伤的任何机制, 例如 γ -辐射、X-射线、UV-辐射、微波、电子发射等) 的组合。也涵盖使用向肿瘤细胞定向递送放射性同位素的组合疗法, 且可与靶向抗癌剂或其他靶向手段结合使用。放射疗法通常以脉冲形式在约 1 周至约 2 周的时间段中施用。可将辐射疗法施用于患有头颈癌的受试者约 6 周至 7 周。任选地, 辐射疗法可作为单一剂量或多次、顺次剂量施用。

[0306] f. 赘生性病状

[0307] 不论单独地还是与抗癌剂或放射疗法组合施用, 本发明的 PTK7 调节剂均尤其适用于一般性治疗患者或受试者中的赘生性病状, 所述赘生性病状可包括良性或恶性肿瘤 (例如肾癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌、甲状腺癌、肝癌; 肉瘤; 神经胶质瘤; 及各种头颈肿瘤); 白血病及淋巴恶性疾病; 其他病症, 例如神经元病症、神经胶质病症、星形胶质细胞病症、下丘脑病症及其他腺体病症、巨噬细胞病症、上皮病症、基质病症及囊胚腔病症; 及炎症病症、血管生成病症、免疫学病症及由病原体引起的病症。用于用本发明的治疗组合物及方法治疗的特别优选靶标为包括实体肿瘤的赘生性病状。在其他优选的实施方案中, 本发明的调节剂可用于诊断、预防或治疗血液学恶性疾病。所治疗的受试者或患者优选为人, 虽然如本文所用, 所述术语被明确认为包含任何哺乳动物物种。

[0308] 更具体地, 根据本发明进行治疗的赘生性病状目标可选自包括 (但不限于) 以下的组: 肾上腺肿瘤、AIDS 相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星形细胞瘤、膀胱癌 (鳞状细胞癌及移行细胞癌)、骨癌 (釉质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑及脊髓癌、转移性脑肿瘤、乳腺癌、颈动脉体瘤、宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、难染肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、室管膜瘤、尤因氏瘤 (Ewing's tumor)、骨外黏液软骨肉瘤、骨纤维发育不全、骨纤维性结构不良、胆囊及胆管癌、妊娠滋养细胞疾病、生殖细胞肿瘤、头颈癌、胰岛细胞瘤、卡波西氏肉瘤 (Kaposi's Sarcoma)、肾癌 (肾母细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、白血病、脂肪瘤/良性脂肪肿瘤、脂肉瘤/恶性脂肪肿瘤、肝癌 (肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、肺癌 (小细胞癌、腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌等)、髓母细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育不良症候群、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺肿瘤、儿科癌症、外周神经鞘肿瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、罕见血液学病症、肾转移性癌症、横纹肌肿瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症及子宫癌 (宫颈癌、子宫内膜癌

及平滑肌瘤)。在某些优选的实施方案中,癌细胞系选自包括(但不限于)以下的实体肿瘤的组:乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌、胰腺癌、结肠癌、前列腺癌、肉瘤、肾转移性癌症、甲状腺转移性癌症及透明细胞癌。

[0309] 关于血液学恶性疾病,应进一步了解,本发明的化合物及方法可尤其有效治疗多种B细胞淋巴瘤,包括低级/NHL滤泡性细胞淋巴瘤(FCC)、套细胞淋巴瘤(MCL)、弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、小淋巴球性(SL) NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级免疫母细胞NHL、高级淋巴母细胞NHL、高级小非裂解细胞NHL、巨大肿瘤疾病NHL、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)(BL)、AIDS相关淋巴瘤、单核细胞B细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴结病、小淋巴球性滤泡性弥漫性大细胞、弥漫性小裂解细胞、大细胞免疫母细胞淋巴母细胞瘤、小非裂解伯基特氏及非伯基特氏滤泡性主要大细胞;滤泡性主要小裂解细胞;及滤泡性混合小裂解及大细胞淋巴瘤。参见Gaidono等人,「Lymphomas」,IN CANCER:PRINCIPLES&PRACTICE OF ONCOLOGY,第2卷:2131-2145(DeVita等人编,第5版1997)。本领域技术人员应明了,由于分类系统的改变,故这些淋巴瘤通常具有不同名称,且患有归类为不同名称的淋巴瘤的患者也可受益于本发明的组合治疗方案。

[0310] 在其他优选的实施方案中,PTK7调节剂可用以有效治疗某些骨髓及血液学恶性疾病,包括白血病,例如慢性淋巴球性白血病(CLL或B-CLL)或急性骨髓白血病AML。所述白血病主要为老年疾病,在五十岁后发病率开始增加且在快70岁时达到峰值。CLL一般涉及赘生性外周血液淋巴细胞增殖。CLL的临床发现涉及淋巴细胞增多、淋巴腺病变、脾肿大、贫血及血小板减少症。AML也称为急性骨髓性白血病、急性髓母细胞性白血病、急性粒细胞性白血病及急性非淋巴细胞性白血病。AML中的潜在病理生理学包含最早期发生阶段的骨髓细胞成熟停滞。在任一病症的情况下,治疗方案可由本领域技术人员鉴于本公开使用临床上接受的程序容易地得出。

[0311] 本发明也提供呈现良性或癌症前期肿瘤的受试者的预防或防治性治疗。不相信应将任何特定类型的肿瘤或赘生性病症排除在使用本发明的治疗以外。然而,肿瘤细胞的类型可能与本发明与第二治疗剂,特别是化学治疗剂及靶向抗癌剂的组合使用有关。

[0312] 本发明的其他优选的实施方案包括使用PTK7调节剂来治疗患有实体肿瘤的受试者。在所述受试者中,许多这些实体肿瘤包括显示可使其特别易受用所公开效应子治疗的影响的各种遗传突变的组织。例如,在患有结肠直肠癌的患者中KRAS、APC及CTNNB1及CDH1突变相对常见。此外,患有具有这些突变的肿瘤的患者通常最难由当前疗法治疗;特别是具有KRAS突变的那些患者。通常引起单一氨基酸取代的KRAS活化突变也涉及其他难以治疗的恶性疾病,包括肺腺癌、黏液腺瘤及胰腺的腺管癌。

[0313] 目前,结肠直肠癌患者是否对EGFR抑制药物或VEGF抑制药物有反应的最可靠预测例如为测试某些KRAS“活化”突变。35%至45%结肠直肠癌中发生KRAS突变,且肿瘤表达突变型KRAS的患者不对这些药物有良好响应。例如,KRAS突变预示结肠直肠癌对帕尼单抗(panitumumab)及西妥昔单抗疗法缺乏反应(Lievre等人,Cancer Res 66:3992-5; Karapetis等人,NEJM 359:1757-1765)。约85%患有结肠直肠癌的患者具有APC基因的突变(Markowitz及Bertagnolli.NEJM 361:2449-60),且在患有家族性腺瘤息肉病及结肠直肠

癌的患者中已表征出800个以上APC突变。这些突变的大部分产生介导 β -连环蛋白破坏的功能能力降低的截短的APC蛋白。 β -连环蛋白基因CTNNB1中的突变也可使蛋白质稳定性增加,从而引起核输入并随后活化若干致癌转录程序,此也为由突变型APC未能适当介导 β -连环蛋白破坏所产生的肿瘤发生机制,该破坏为正常细胞增殖及分化程序保持受控所需。

[0314] CDH1 (E-钙黏附蛋白) 表达减少为结肠直肠癌中的另一常见现象,通常在疾病更晚期被观察到。E-钙黏附蛋白为连接及组织上皮层中的细胞的黏附蛋白接合的中心成员。E-钙黏附蛋白通常在质膜上以物理方式整合 β -连环蛋白 (CTNNB1); 在结肠直肠癌中E-钙黏附蛋白表达丧失导致 β -连环蛋白定位于细胞核且转录活化 β -连环蛋白/WNT路径。异常 β -连环蛋白/WNT信号传导对肿瘤发生是关键的,且核 β -连环蛋白涉及癌症干细胞性 (Schmalhofer 等人, 2009PMID 19153669)。E-钙黏附蛋白为EphA2 (上皮细胞中PTK7配体的一种已知结合伴侣) 的表达及功能所需 (Dodge Zantek等人, 1999PMID 10511313; Orsulic S及Kemler R, 2000PMID 10769210)。使用结合PTK7配体且激动或拮抗受体结合的调节剂可修饰、中断或逆转促致癌过程。或者, PTK7调节剂可基于PTK7调节剂的结合偏好优先结合具有异常PTK7相互作用的肿瘤细胞。因此, 患有带有上述遗传性状的癌症的患者可受益于用前述PTK7调节剂治疗。

[0315] XIV. 制品

[0316] 也提供包含一个或多个包含一个或多个剂量的PTK7调节剂的容器的制药包装及试剂盒。在某些实施方案中, 提供单位剂量, 其中该单位剂量含有预定量组合物, 其包含例如抗PTK7抗体且有或无一种或多种其他试剂。对于其他实施方案, 该单位剂量在单次使用的预填充注射器中被提供用于注射。在其他实施方案中, 单位剂量中所含的组合物可包含生理盐水、蔗糖等; 缓冲剂, 例如磷酸盐等; 和/或在稳定且有效的pH值范围内被配制。或者, 在某些实施方案中, 组合物可以在添加适当液体 (例如无菌水) 时可重构的冻干粉末形式被提供。在某些优选的实施方案中, 该组合物包含一或多种抑制蛋白质聚集的物质, 包括 (但不限于) 蔗糖及精氨酸。容器上或与容器相关的任何标签指示所封装的组合物用于诊断或治疗所选疾病病状。

[0317] 本发明也提供用于产生PTK7调节剂及任选地一或多种抗癌剂的单次剂量或多次剂量施用单位的试剂盒。该试剂盒包含容器及在该容器上或与该容器相关的标签或药品说明书。适合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由各种材料形成, 例如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗病状的组合物, 且可具有无菌接入口 (例如容器可为具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。所述试剂盒一般将在适合的容器中含有药学上可接受的PTK7调节剂的制剂及任选地在同一或不同容器中含有一或多种抗癌剂。所述试剂盒也可含有用于诊断或组合疗法的其他药学上可接受的制剂。例如, 除本发明的PTK7调节剂外, 所述试剂盒也可含有例如以下的多种抗癌剂中的任何一种或多种: 化学治疗或放射线治疗药物; 抗血管生成剂; 抗转移剂; 靶向抗癌剂; 细胞毒性剂; 和/或其他抗癌剂。所述试剂盒也可提供用于将PTK7调节剂与抗癌剂或诊断剂相缀合的适当试剂 (例如参见美国专利第7,422,739号, 其在此以其全部通过引用而并入)。

[0318] 更具体地, 所述试剂盒可具有含有PTK7调节剂且有或无其他组分的单一容器, 或其可具有用于每一种所需试剂的不同容器。在提供组合治疗剂用于缀合的情况下, 可将单一溶液以等摩尔当量组合或以一种组分多于另一种预先混合。或者, 试剂盒的PTK7调节剂

及任何任选的抗癌剂在向患者施用之前可分别被保存在不同的容器内。所述试剂盒也可包含用于容纳药学上可接受的无菌缓冲剂或其他稀释剂(例如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液)的第二/第三容器工具。

[0319] 当试剂盒的组分以一或多种液体溶液被提供时,液体溶液优选为水性溶液,其中特别优选无菌水性溶液。然而,试剂盒组分可以干粉形式提供。当试剂或组分以干粉形式提供时,该粉末可通过添加适合的溶剂来重构。预想该溶剂也可在另一容器中被提供。

[0320] 如上文所简要说明的,该试剂盒也可含有用于将抗体及任何任选的组分施用于动物或患者的工具,例如一个或多个针头或注射器,或甚至眼滴管、移液管或其他此类类似装置,制剂可由该工具注射或引入动物体内或被施用于身体的患病区域。本发明的试剂盒通常也包括用于容纳小瓶的工具及密闭用于商业销售的其他组件,例如其中置放及保留所需小瓶及其他装置的注射或吹模塑料容器。任何标签或药品说明书均指示PTK7调节剂组合物用于治疗癌症,例如结肠直肠癌。

[0321] 在其它优选的实施方案中,本发明的调节剂可与可用于诊断或治疗增生性病症的诊断或治疗装置结合使用,或可包含所述诊断或治疗装置。例如,在优选的实施方案中,本发明的化合物和组合物可与某些可用于检测、监测、定量或描述参与增生性病症的病因学或显现的细胞或标记物化合物的诊断设备或装置组合。在特别优选的实施方案中,所述设备可被用于体内或体外检测、监测和/或定量循环肿瘤细胞(见,例如,WO 2012/0128801,其在此通过引用而并入)。在其它优选的实施方案中,如上文所讨论的,所述循环肿瘤细胞可包含癌症干细胞。

[0322] XV. 研究试剂。

[0323] 本发明的其他优选的实施方案也利用所公开调节剂的性质作为适用于经由例如流式细胞计数、荧光活化细胞分选(FACS)、磁性活化细胞分选(MACS)或激光介导切片的方法鉴别、分离、切片或富集肿瘤起始细胞群或亚群的手段。本领域技术人员应了解,调节剂可用于表征及操纵包括癌症干细胞的TIC的若干相容的技术中(例如参见U.S.S.N.12/686,359、12/669,136及12/757,649,各文献均在此以其全部通过引用而并入)。

[0324] XVI. 杂项

[0325] 除非本文另外定义,否则与本发明相关使用的科学及技术术语应具有普通技术人员所通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。更具体地,除非本文另外明确规定,否则如本说明书及随附权利要求中所用,单数形式“一(a/an)”及“该(the)”包括复数个指代物。因此,例如,提及“蛋白质”包括复数个蛋白质;提及“细胞”包括细胞的混合物,等等。另外,说明书及随附权利要求中所提供的范围包括两个端点及端点之间的所有点。因此,2.0至3.0的范围包括2.0、3.0及2.0与3.0之间的所有点。

[0326] 一般而言,与本文所述的细胞及组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学及蛋白质及核酸化学及杂交有关的命名法及其技术在本领域中熟知且常用。除非另外指出,本发明的方法及技术一般根据本领域中熟知的惯常方法且如各种一般性及更特定的参考文献中所述地进行,所述文献贯穿本专利说明书引用并讨论。例如参见Sambrook J.及Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel等人, Short Protocols in

Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow 及 Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); 及 Coligan 等人, Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)。酶促反应及纯化技术是根据制造商的说明书如本领域中通常所实现或如本文中所述进行的。与本文所述的分析化学、合成有机化学及医学及药物化学相关使用的术语及所述化学的实验室程序及技术为本领域中所熟知且常用的。

[0327] 本说明书中所公开或引用的所有参考文献或文件不加限制地均在此以其全部通过引用而并入。此外,任何本文所用的分节标题仅出于组织目的且不应被解释为限制所描述的主题

实施例

[0328] 参考以下实施例将更容易了解上文一般性描述的本发明,所述实施例是以说明的方式提供且不意在限制本发明。所述实施例不欲表示以下实验为所有实验或所进行的仅有实验。除非另外指示,否则份为重量份,分子量为重量平均分子量,温度以℃计且压力为大气压或接近大气压。

[0329] 实施例1

[0330] 富集肿瘤起始细胞群

[0331] 为表征实体肿瘤存在于癌症患者中时所述实体肿瘤细胞的异质性、使用特定表型标记阐明肿瘤永存细胞 (TPC; 即癌症干细胞: CSC) 的特性及鉴别临床上相关的治疗靶标,使用本领域内认可的技术开发和维持大的非传统异种移植 (NTX) 肿瘤库。包含大量分立的肿瘤细胞系的 NTX 肿瘤库经由最初获自许多患有多种实体肿瘤恶性疾病的癌症患者的异质肿瘤细胞的多次传代在免疫功能不全小鼠中增殖。具有明确定义的谱系的大量分立的早期传代 NTX 肿瘤细胞系的持续可获得性极大促进了鉴别及分离 TPC, 因为其允许对从细胞系纯化的细胞进行可再现及重复的表征。更具体地,分离或纯化的 TPC 根据其在小鼠中产生表型及形态异质肿瘤的能力被回溯性地最准确地定义,所述肿瘤重演所述细胞所来自的患者肿瘤样品。因此,使用小群的分离的细胞在小鼠中产生完全异质肿瘤的能力强烈指示所分离的细胞包含 TPC 的事实。在该工作中,使用最少传代的 NTX 细胞系会大大简化体内实验且提供容易证实的结果。此外,早期传代 NTX 肿瘤也对治疗剂,例如伊立替康 (即 **Camptosar®**) 有反应,这提供了关于驱动肿瘤生长、对当前疗法的抗性及肿瘤重现的潜在机制的临床上的洞察。

[0332] 当建立 NTX 肿瘤细胞系时,使用流式细胞计数分析组成性肿瘤细胞表型以鉴别可用以表征、分离、纯化或富集肿瘤起始细胞 (TIC) 和分离或分析所述群体内的 TPC 及 TProg 细胞的分立标记物。在这方面,本发明者采用基于专有蛋白质组的平台 (即 PhenoPrint™ 阵列),其提供基于蛋白质表达的快速细胞表征及伴随的鉴别潜在可用的标记物。PhenoPrint 阵列为包含数百个分立的结合分子的专有蛋白质组平台,许多所述结合分子获自商业来源,排列于 96 孔板中,其中各孔含有藻红素荧光通道中的不同抗体及排列于板上每一孔中的不同荧光染料中的多种其他抗体。这允许通过快速包括相关细胞或经由非藻红素通道消除不相关细胞来测定所选肿瘤细胞的亚群中所关注抗原的表达水平。当 PhenoPrint 阵列与

本领域中熟知的组织解离、移植及干细胞技术组合使用时 (Al-Hajj 等人, 2004, Dalerba 等人, 2007 及 Dylla 等人, 2008, 均同上, 各文献均均在此以其全部通过引用而并入), 有可能以极高效率有效鉴别相关标记且随后分离及移植特定人肿瘤细胞亚群。

[0333] 因此, 当如同在严重免疫功能不全小鼠中对于人肿瘤所通常进行地建立了各种 NTX 肿瘤细胞系时, 肿瘤在达到 800mm^3 至 2000mm^3 时从小鼠切除且使用本领域内认可的酶消化技术将所述细胞解离成单细胞悬浮液 (参见例如美国专利第 2007/0292414 号, 其以引用的方式并入本文中)。使用 PhenoPrint 阵列从这些悬浮液获得的数据在逐个细胞的基础上提供绝对 (每细胞) 与相对 (相对于群体中的其他细胞) 表面蛋白质表达, 产生细胞群的更复杂表征及分层。更具体地, 使用 PhenoPrint 阵列允许快速鉴别下述蛋白或标记物, 其预期区分 TIC 或 TPC 与 NTG 大块肿瘤细胞及肿瘤基质, 且当从 NTX 肿瘤模型分离时其提供相对快速表征表达不同水平的特定细胞表面蛋白的肿瘤细胞亚群。特别地, 在肿瘤细胞群中具有异质表达的蛋白质允许分离表达高及低水平的特定蛋白质或标记物的不同、且高度纯化的肿瘤细胞亚群并将其移植至免疫功能不全小鼠中, 从而有助于评估 TPC 是否在一个亚群或另一个亚群中富集。

[0334] 术语富集与分离细胞同义地使用, 且意指与起始或初始细胞群相比, 一种类型细胞的产率 (级分) 相对于其他类型细胞的级分被增加。优选地, 富集是指与起始细胞群相比, 细胞群中一种类型细胞的百分比增加约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50% 或大于 50%。

[0335] 如本文所用, 在细胞或组织的情境中, 标记物意指呈化学或生物实体形式的任何特征, 该化学或生物实体与特定细胞、细胞群或组织在鉴别上相关或被特定地发现于特定细胞、细胞群或组织之中或之上, 包括在受疾病或病症影响的组织或细胞群之中或之上所鉴别出的那些。如所显示的, 标记物在性质上可为形态、功能或生物化学的。在优选的实施方案中, 标记物为由特定细胞类型 (例如 TPC) 或由某些条件下的细胞 (例如在细胞生命周期的特定点或特定小生境中的细胞) 差别或优先表达的细胞表面抗原。所述标记物优选为蛋白质, 且更优选地具有如本领域中已知用于抗体、适配体或其他结合分子的表位。然而, 标记物可由表面上或细胞内所发现的任何分子组成, 包括 (但不限于) 蛋白质 (肽及多肽)、脂质、多醣、核酸及类固醇。形态标记物特征或性状的实例包括 (但不限于) 形状、尺寸及核质比。功能标记物特征或性状的实例包括 (但不限于) 黏附于特定基质的能力、掺入或排出特定染料的能力 (例如 (但不限于) 排出亲脂性染料)、在特定条件下迁移的能力及沿特定谱系分化的能力。标记物也可由从报告子基因表达的蛋白质, 例如由于将编码报告子基因的核酸序列引入细胞中而由细胞表达的报告子基因, 且其转录使得产生可用作标记物的报告子蛋白质。可用作标记物的所述报告子基因为例如 (但不限于) 荧光蛋白酶、染色粒蛋白、抗性基因等。

[0336] 在相关意义中, 在组织、细胞或细胞群的情境中, 术语标记物表型 (例如稳定 TPC 表型) 意指可用以表征、鉴别、分隔、分离或富集特定细胞或细胞群 (例如通过 FACS) 的任何标记物或标记物的组合。在特定实施方案中, 标记物表型为可通过检测或鉴别细胞表面标记物的组合表达而测定的细胞表面表型。

[0337] 本领域技术人员将认识到, 已将许多标记物 (或其不存在) 与各种癌症干细胞群相关联并用于分离或表征肿瘤细胞亚群。在这方面, 示例性癌症干细胞标记物包括 OCT4、Nanog、STAT3、EPCAM、CD24、CD34、NB84、TrkA、GD2、CD133、CD20、CD56、CD29、B7H3、CD46、转铁

蛋白受体、JAM3、羧肽酶M、ADAM9、制瘤素M、Lgr5、Lgr6、CD324、CD325、巢蛋白、Sox1、Bmi-1、eed、easyh1、easyh2、mf2、yy1、smarckA3、smarckA5、smarckD3、smarckE1、mllt3、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT5A、WNT10B、WNT16、AXIN1、BCL9、MYC、(TCF4) SLC7A8、IL1RAP、TEM8、TMPRSS4、MUC16、GPRC5B、SLC6A14、SLC4A11、PPAP2C、CAV1、CAV2、PTPN3、EPHA1、EPHA2、SLC1A1、CX3CL1、ADORA2A、MPZL1、FLJ10052、C4.4A、EDG3、RARRES1、TMEPAI、PTS、CEACAM6、NID2、STEAP、ABCA3、CRIM1、IL1R1、OPN3、DAF、MUC1、MCP、CPD、NMA、ADAM9、GJA1、SLC19A2、ABCA1、PCDH7、ADCY9、SLC39A1、NPC1、ENPP1、N33、GPNMB、LY6E、CELSR1、LRP3、C20orf52、TMEPAI、FLVCR、PCDHA10、GPR54、TGFB3、SEMA4B、PCDHB2、ABCG2、CD166、AFP、BMP-4、 β -连环蛋白、CD2、CD3、CD9、CD14、CD31、CD38、CD44、CD45、CD74、CD90、CXCR4、核心蛋白聚糖、EGFR、CD105、CD64、CD16、CD16a、CD16b、GLI1、GLI2、CD49b及CD49f。参见例如Schulenburg等人,2010,PMID:20185329,美国专利第7,632,678号及美国专利第2007/0292414号、第2008/0175870号、第2010/0275280号、第2010/0162416号及第2011/0020221号,各文献以引用的方式并入本文中。应了解,许多这些标记物均包括在上文所述的PhenoPrint阵列内。

[0338] 类似地,与某些肿瘤类型的癌症干细胞相关的细胞表面表型的非限制性实例包括CD44^{hi}CD24^{low}、ALDH⁺、CD133⁺、CD123⁺、CD34⁺CD38⁻、CD44⁺CD24⁻、CD46^{hi}CD324⁺CD66c⁻、CD133⁺CD34⁺CD10⁻CD19⁻、CD138⁻CD34⁻CD19⁺、CD133⁺RC2⁺、CD44⁺ $\alpha_2\beta_1$ ^{hi}CD133⁺、CD44⁺CD24⁺ESA⁺、CD271⁺、ABCB5⁺以及本领域中已知的其他癌症干细胞表面表型。参见例如Schulenburg等人,2010,同上,Visvader等人,2008,PMID:18784658及美国专利第2008/0138313号,各文献均在此以其全部通过引用而并入。本领域技术人员应了解,标记物表型,例如上文方才例示的标记物表型可联合标准流式细胞计数分析及细胞分选技术被使用以表征、分离、纯化或富集TIC和/或TPC细胞或细胞群用于进一步分析。关于本发明所关注的是,CD46、CD324及任选的CD66c高度或异质地表达在许多人结肠直肠癌(“CR”)、乳腺癌(“BR”)、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、胰腺癌(“PA”)、前列腺癌(“PR”)、肾癌(“KDY”)、黑色素瘤(“Me1”)、卵巢癌(“OV”)及头颈癌(“HN”)肿瘤细胞的表面上,而与所分析的肿瘤样本是否为原发性患者肿瘤样本或患者来源的NTX肿瘤无关。

[0339] 本文将具有阴性表达(即“-”)的细胞定义为表达少于或等于在标记其他荧光发射信道中所关注的其他蛋白质的完全抗体染色混合物存在下利用荧光通道中的同型对照抗体所观察到的表达的95%的那些细胞。本领域技术人员应了解,此定义阴性事件的程序称为“荧光减一(fluorescence minus one)”或“FMO”染色。表达多于使用上文所述FMO染色程序利用同型对照抗体所观察到的表达的95%的细胞在本文定义为“阳性”(即“+”)。如本文所定义的,存在被广泛定义为“阳性”的各种细胞群。首先,表达低的细胞(即“lo”)一般被定义为所观察到的表达高于使用FMO染色利用同型对照抗体所测定的95%且在利用同型对照抗体使用上文所述FMO染色程序所观察到的表达的95%的一个标准偏差以内的那些细胞。具有“高”表达的细胞(即“hi”)可被定义为观察到的表达高于使用FMO染色利用同型对照抗体所测定的95%且高于利用同型对照抗体使用上文所述FMO染色程序所观察到的表达的95%一个标准偏差以上的那些细胞。在其他实施方案中,99%优选可用作阴性及阳性FMO染色之间的分界点,且在特别优选的实施方案中,所述百分比可大于99%。

[0340] 使用例如上文所述的那些技术,基于来自结肠直肠癌患者的若干NTX肿瘤间的表

达强度及异质性来快速鉴别及分级结肠直肠肿瘤抗原,通过比较肿瘤与正常邻近组织进一步评估候选TPC抗原,且接着至少部分地基于恶性细胞中特定抗原的上调或下调进行选择。此外,就其富集将完全异质的肿瘤移植至小鼠中的能力(即致肿瘤能力)的能力而言对多种细胞表面标记物进行系统性分析且随后对这些标记物的组合实质上改良了该方法的分辨率且改良了调整荧光活化细胞分选(FACS)技术以鉴别及表征移植后唯独地含有所有肿瘤产生能力的不同的、高度富集肿瘤细胞亚群(即肿瘤起始细胞)的能力。

[0341] 为了重申,术语肿瘤起始细胞(TIC)或致肿瘤(TG)细胞涵盖肿瘤永存细胞(TPC;即癌症干细胞)和高度增殖性肿瘤祖细胞(TProg),一般而言,其一起构成大块肿瘤或物质的独特亚群(即0.1%至25%);其特征如上文所定义。大部分以此方式表征的肿瘤细胞缺乏此肿瘤形成能力,且因此可表征为非致肿瘤性的(NTG)。令人惊讶的是,观察到使用专有PhenoPrint阵列鉴别的大多数不同标记物在使用标准FACS方案时并不显示富集结肠直肠肿瘤中的肿瘤起始细胞群的能力,但可使用不同标记物组合来鉴别肿瘤起始细胞的两个亚群:TPC及TProg。本领域技术人员将认识到尽管TPC与TProg在原发性移植中皆为肿瘤起始性的,但TPC与TProg之间的决定性差异为以低细胞数量系列移植后TPC永久刺激肿瘤生长的能力。此外,尽管其他人已定义了可类似地用以富集致肿瘤细胞的细胞表面标记物或酶活性(Dylla等人,2008,同上),但在本发明的发明者发现之前尚不知道组合使用以富集TPC及TProg的标记物/蛋白质与任何组织或赘瘤中含有所述活性的细胞有关。如下文所述,接着使用全转录组下一代测序法分析使用上文所提及的细胞表面标记物组合分离的特定肿瘤细胞亚群以鉴别及表征差异表达的基因。

[0342] 实施例2

[0343] 分离和分析来自富集肿瘤起始细胞群的RNA样品

[0344] 如实施例1所述使所建立的结肠直肠NTX肿瘤细胞系SCRX-CR4传代并用于在免疫功能不全的小鼠中起始肿瘤。一旦平均肿瘤负荷达到约300mm³,则将小鼠随机化且用15mg/kg伊立替康、25mg/kg吉西他滨或媒介物对照物(PBS)每周处理两次历时至少20天的时间,之后实施安乐死。接着移除肿瘤,且一般使用实施例1中所示的技术自新鲜切除的结肠直肠NTX肿瘤分别分离TPC、TProg及NTG细胞,类似地自胰腺NTX肿瘤分离TG及NTG细胞。更具体地,通过FACS分离细胞群,且即刻进行粒状沉淀且于Qiagen RLTplus RNA裂解缓冲液(Qiagen, Inc.)中裂解。接着将裂解物储存于-80℃下直至使用。解冻后,使用Qiagen RNeasy分离试剂盒(Qiagen, Inc.)遵循供货商的说明提取总RNA且在Nanodrop (Thermo Scientific)及Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)上、再次使用供货商的方案及推荐仪器设定进行定量。所得总RNA制剂适用于遗传测序及分析。

[0345] 制备从如上文所述从经媒介物或化学治疗剂处理的小鼠所分离的各细胞群获得的总RNA样品用于使用Applied Biosystems SOLiD 3.0(通过寡核苷酸连接/检测测序)下一代测序平台(Life Technologies)进行的全转录组测序,以每份样品5ng总RNA开始。在若干样品中,由SOLiD平台产生的数据定位于人基因组的34,609个基因且能够检测PTK7。

[0346] 一般而言,SOLiD3下一代测序平台能够对连接至珠粒的克隆扩增RNA/DNA片段进行平行测序。接着使用通过与染料标记的寡核苷酸连接进行的测序产生样品中存在的每个片段的50个碱基读取,其中总计多于5千万个读取产生基因组中蛋白质的mRNA转录物水平表达的更加精确的代表。SOLiD3平台不仅能够捕捉表达,而且能够捕捉SNP、已知及未知的

可变剪接事件及仅基于读取覆盖(独特定位于基因组位置的读取)的潜在的新外显子发现。因此,使用此下一代平台允许测定转录物水平表达中的差异以及那些所表达的mRNA转录物的特定剪接变体的差异或偏好。此外,用SOLiD3平台、使用经修饰的Applied Biosystems的全转录组方案进行的分析仅需要约5ng起始物质预先扩增。这在从经分选的细胞群提取总RNA时十分重要,其中与NTG或大块肿瘤相比,TPC亚组的细胞数量例如小得多,且因产生极少量可用的起始物质。

[0347] 归一化来自SOLiD3平台的两轮测序数据并如标准工业实践一样进行转换和倍率计算。如图2中所见,测量各SCRx-CR4肿瘤细胞亚群中的PTK7基因表达水平(表示为每百万定位于外显子的读取中的读取;RPM_外显子)。数据分析显示在媒介物或伊立替康处理的小鼠中,PTK7在转录物水平分别被上调2至4倍(相对于NTG群体)和50%至200%(相对于TProg群)。

[0348] 上文详述的观察结果显示,在TPC群体中PTK7的表达一般升高且表明PTK7在肿瘤形成及肿瘤维持中可能起重要作用,因此构成免疫治疗方法的感兴趣的靶标。

[0349] 实施例3

[0350] 对富集的肿瘤起始细胞群中PTK7的实时PCR分析

[0351] 为验证结肠直肠癌中TPC群体相对于TProg及NTG细胞以及胰腺癌中TG相对于NTG细胞中由全转录组测序观察到的差异性PTK7表达,使用**TaqMan**[®]定量实时PCR测量如上文所述自各种NTX细胞系分离的各细胞群中的基因表达水平。应了解,该实时PCR分析允许使用对所关注的特定基因具有特异性的引物及探针组更直接且快速地测量分立靶标的基因表达水平。**TaqMan**[®]实时定量PCR在Applied Biosystems 7900HT机器(Life Technologies)上进行,其用来测量多个患者来源NTX细胞系细胞群及相应对照物中的PTK7及PTK7基因表达。此外,如TaqMan System所提供的说明书所示且使用市售PTK7及PTK7引物/探针组(Life Technologies)进行该分析。

[0352] 如图3中所见,使用从2种不同结肠直肠NTX肿瘤细胞系(SCRX-CR4及SCRX-CR5)及胰腺肿瘤细胞系(SCRX-PA3)分离的NTG及TPC群体进行基因表达的定量实时PCR询问(interrogation)。也分离了TProg细胞群且分析其SCRx-CR4。图3中所示的数据集显示结肠直肠TPC中PTK7基因表达相比于来自同一肿瘤的NTG细胞升高超过2倍。在经历伊立替康处理的小鼠的TPC中及在胰腺肿瘤的TIC细胞群(例如SCRx-PA3)中PTK7也升高2倍以上。使用广泛认可的实时定量PCR方法,与来自结肠直肠及胰腺患者来源NTX肿瘤的NTG细胞对照物相比较,NTX TPC制剂中PTK7表达升高的观察结果证实了先前实施例的更为敏感的SOLiD3全转录组测序数据。所述发现进一步支持所观察到的PTK7表达水平与肿瘤生成、对抗治疗的抗性并重现所基于的细胞的联系。

[0353] 实施例4

[0354] PTK7在未分级的结肠直肠肿瘤样本中的表达

[0355] 鉴于与来自同一肿瘤的TProg及NTG细胞相比,发现来自结肠直肠肿瘤的TPC群体中PTK7基因表达升高的事实,进行实验以确定相对于正常邻近组织(NAT),未分级的结肠直肠肿瘤样品中是否也可检测到PTK7表达升高。也进行了测量以确定肿瘤中PTK7的表达与正常组织样本(NL)中的表达水平相比如何。

[0356] 更具体地,使用本领域中已知的技术设计及制造含有110个不同病期的结肠直肠癌患者肿瘤样本、正常邻近组织及48个正常组织的定制TumorScan qPCR(Origene Technologies) 384孔阵列。使用实施例3中详述的程序及相同的PTK7特异性引物/探针组,在定制板的各孔中进行**TaqMan**[®]实时定量PCR。

[0357] 图4A及图4B显示针对正常结肠及直肠组织中的平均表达归一化的呈图形格式的表达数据的结果。更具体地,图4A总结了使用自110位各种疾病病期(I至IV)的结肠直肠癌患者获得的168个组织样本(其中35个组织样本为来自结肠直肠癌患者的正常邻近(NAT)组织)及48个来自其他位置的正常组织(NL组织)产生的数据。在曲线图中,来自各组织样本/患者的数据由点表示,其中X轴上划分的各群体的几何平均值表示为线。类似地,图4B含有来自24个自各种疾病病期(I至IV)的肿瘤(T)或正常邻近组织(N)获得的匹配结肠直肠癌患者样本的数据。在此处,所绘制的数据基于逐个样品被呈现,其中来自个体患者的各别肿瘤与正常邻近组织之间有关联。相对于正常邻近组织,在大部分匹配肿瘤中PTK7的表达明显更高,其中第3期与第4期的差异表达达到统计显著性($n \geq 4, P \leq 0.037$)。

[0358] 图4A与图4B指示在所呈现的所有4个病期中,相对于正常邻近组织,在大部分结肠直肠癌肿瘤中及在匹配肿瘤样本中,PTK7基因的表达水平升高。此外,相对于进行评估的大多数正常组织,结肠直肠癌任何病期的平均PTK7基因表达似乎升高(图4A)。这些结果表明在结肠直肠癌中PTK7表达增加,且当与在结肠直肠癌TPC及胰腺TIC中PTK7表达最大的上文观察结合时,表明对表达PTK7的癌症干细胞的治疗性靶向可为癌症患者提供治疗益处。

[0359] 实施例5

[0360] 示例性肿瘤样品中PTK7的差异表达

[0361] 为进一步评估其他结肠直肠癌患者肿瘤样品及来自被诊断患有18种不同实体肿瘤类型之一的患者的肿瘤样本中的PTK7基因表达,使用TissueScan qPCR(Origene Technologies) 384孔阵列进行**Taqman**[®] qRT-PCR,所述阵列是如实施例4所述定制的,但包括来自18种不同肿瘤类型的实体肿瘤样品而非仅结肠直肠样品。测量的结果呈现于图5A及图5B中,且显示在许多实体肿瘤类型中PTK7的基因表达显著升高。

[0362] 在这方面,图5A及图5B分别显示来自患有18种不同实体肿瘤类型之一的患者的全肿瘤样本(灰色点)或匹配正常邻近组织(NAT;白色点)中人PTK7基因的相对及绝对基因表达水平。在图5A中,针对所分析的各肿瘤类型的NAT中的平均基因表达归一化数据。在图5B中,评估各种组织/肿瘤中PTK7的绝对表达,其中数据被绘制为通过定量实时PCR达到指数扩增所需的循环数(Ct)。未扩增的样本被分配的Ct值为45,其表示实验方案中的最后扩增循环。各点表示个体组织样本,其中平均值表示为黑线。

[0363] 使用定制组合的OriGene TissueScan阵列,观察到大部分诊断患有结肠直肠癌的患者及诊断患有肾上腺癌、子宫内膜癌、食道癌、肝癌、甲状腺癌及膀胱癌的大多数患者在其肿瘤中相对于NAT具有明显更多的PTK7基因表达,表明PTK7可能在这些肿瘤的肿瘤形成和/或肿瘤进展中起作用。也有相对于NAT,PTK7表达升高的肺及前列腺癌患者的亚组。从这些研究中也清楚的是,在大多数NAT样品中PTK7基因表达一般处于中等,其中最高表达在乳房、子宫颈、卵巢、胰腺、睾丸及膀胱中观察到。此外,这些数据表明关于呈现所选过度增殖性病症的患者中的肿瘤形成或肿瘤永续,PTK7表达升高具预示性且可能具有决定性。

[0364] 实施例6

[0365] 构建及表达PTK7免疫原

[0366] 为产生及表征某些本发明的PTK7调节剂,构建及表达两种形式的PTK7免疫原。最初商业表达载体pCMV6-XL4-PTK7购自Origene, Inc.。确定了全长ORF的序列(图1A的加下划线部分),接着通过PCR亚克隆至pCDH-EF1-MCS-T2A-GFP慢病毒载体(System Biosciences)的EcoRI及NotI位点中。此慢病毒载体表达融合至T2A核糖体跳跃肽及GFP可选择标记物的全长PTK7蛋白质,从而能够多顺反表达于经转导的细胞中。根据标准方案使用此慢病毒载体转导293T细胞或BALB/c 3T3细胞。另外,在使用聚乙烯亚胺转染细胞后48小时,使用pCMV6-XL4-PTK7在293T细胞的表面上瞬时表达PTK7蛋白质。质膜制剂是使用差速离心从PTK7过表达细胞获得的。

[0367] 在其他情况下,使用插入了一部分编码蛋白质的细胞外结构域(ECD)的PTK7cDNA的pEE12.4表达载体(Lonza AG)制备及表达可溶性PTK7免疫原,该蛋白质的细胞外结构域(ECD)是由图1B中的加下划线氨基酸所表示的序列编码的。在第一种情况下,将ECD片段同框亚克隆在IgK前导序列的下游及8xHis表位标签(SEQ ID NO:8)的上游。可溶性His标记的PTK7 ECD免疫原通过CHO-KSV细胞的瞬时转染产生,且使用Ni-NTA树脂及标准方法(Qiagen Inc.)从细胞上清液纯化所分泌的蛋白质。除前述PTK7-ECD-His构建体、上文所述质膜制剂及经转染的细胞外,也产生及表达了Fc-PTK7-ECD构建体。此过程使用高保真KOD Hot Start DNA聚合酶(EMD Chemicals)通过图1B中所示的ECD片段的PCR扩增起始。此PCR反应中所用的正向引物具有PTK7序列:GCCATTGTCTTCATCAAGCAGCC(SEQ ID NO:9)且也包括5' HindIII限制性位点及用于使产物分泌至培养物上清液中的鼠类IgGκ信号肽/前导序列。用以扩增这些构建体的反向引物具有PTK7序列:CTGGATCATCTTGTAGGGGGGAG(SEQ ID NO:10)且包括允许克隆于人IgG2Fc蛋白质上游的5' DraIII及BglIII限制性位点,其是作为合成基因定购的(DNA 2.0 Inc.)。

[0368] 接着使用HindIII及EcoRI限制性位点将扩增或亚克隆产物移至最终表达载体pEE12.4(Lonza AG)中,且保真度通过DNA测序证实。将质粒瞬时转染至CHO-S或293T悬浮细胞中且通过镍亲和柱(用于His标记的蛋白质)或蛋白质A(用于Fc融合产物)进行纯化。产物通过尺寸排阻层析法使用Superdex200柱(GE Healthcare)在磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH 7.2)中进一步纯化,其中使用Bradford方法(Bradford method)(Bradford, 1976: PMID 942051)定量经纯化的融合蛋白。

[0369] 实施例7

[0370] 使用hPTK7免疫原产生抗PTK7抗体

[0371] 呈鼠类抗体形式的PTK-7调节剂是根据本文的教导经由分别用如先前实施例所述制造的过表达全长hPTK7、hPTK7-His或hPTK7-Fc的BALB/3T3或HEK 293细胞接种产生的。在这方面,用前述PTK7免疫原的制备物免疫接种三个种系的雌性小鼠(每种3只: Balb/c、CD-1、FVB)。小鼠全部经由足垫途径用在各情况下用相等体积**TiterMax**[®]或明矾佐剂乳化的10μg所选PTK7构建体或 1×10^6 个细胞免疫接种。

[0372] 使用FACS或固相ELISA测定筛选小鼠血清中对人PTK7具有特异性的小鼠IgG抗体。对于ELISA而言,将平板用PBS中0.01μg/mL至1μg/mL范围内的不同浓度的PTK7-His涂覆过夜。在用含有0.02% (v/v) Tween 20的PBS洗涤后,在室温下将各孔用每孔200μL 3% (w/v)

BSA (PBS中) 或2%FCS (PBS中) 封闭1小时。在室温下在每孔涂覆了50 μ L PTK7-His的板上孵育小鼠血清稀释物1小时。洗涤板且接着在室温下以每孔50 μ L用3%BSA-PBS或2%FCS-PBS以1:10000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG一起孵育1小时。洗涤板且在室温下每孔添加100 μ L TMB底物溶液 (Thermo Scientific 34028) 历时15分钟。最终, 添加等体积的2M H₂SO₄以停止底物显色并通过分光光度计在OD 450下进行分析。

[0373] 如所示, 也通过FACS针对过表达与GFP共同转导的人PTK7的细胞测试鼠类血清中的抗PTK7抗体。简言之, 将每孔 1×10^5 个用人PTK7及GFP转导的BALB/3T3细胞与100 μ L用PBS/2%FCS以1:100稀释的小鼠血清一起孵育30分钟。用PBS/2%FCS洗涤细胞且接着每样品与50 μ L用PBS/2%FCS以1:200稀释的DyeLight 649标记的山羊抗小鼠IgG Fc片段特异性二抗一起孵育。在孵育15分钟后, 用PBS/2%FCS洗涤细胞2次且重悬于含有DAPI的PBS/2%FCS中且通过FACS进行分析。

[0374] 处死血清阳性免疫接种的小鼠且解剖出引流淋巴结 (腿弯部及腹股沟, 若增大), 且用作抗体产生细胞的来源。通过电融合使B细胞的单细胞悬浮液 (375×10^6 个细胞) 与非分泌性P3x63Ag8.653骨髓瘤细胞 (ATCC编号CRL-1580) 以1:1的比率融合。细胞电融合使用BTX Hybrimmune系统或ECM2001 (皆来自BTX Harvard Apparatus) 根据制造商的说明书进行。之后, 使电融合细胞重悬于补充有偶氮丝氨酸 (Sigma编号A9666) 的杂交瘤选择培养基 (DMEM (Cellgro目录编号15-017-CM) 培养基, 含有15% 胎儿克隆I血清 (Hyclone)、10% BM Condimed (Roche Applied Sciences)、1mM 丙酮酸钠、4mM L-谷氨酸、100IU青霉素-链霉素、50 μ M 2-巯基乙醇及100 μ M次黄嘌呤) 中。在第一次融合中, 将细胞以每孔 2×10^4 个涂铺于平底微量滴定板中, 之后在选择性HAT培养基 (Sigma, CRL P-7185) 中孵育两周。在第二次融合中, 融合后将细胞涂铺于四个T225烧瓶中, 每烧瓶有90ml选择培养基。接着将烧瓶置于含有5% CO₂及95% 空气的湿润37 $^{\circ}$ C孵育箱中6天至7天。

[0375] 在生长之后, 使用FACS Aria I细胞分选仪分选T225中包含来自第二次融合的细胞的文库且以每孔一个细胞涂铺于Falcon 96孔U型底平板 (皆来自BD Biosciences) 中。必要时将任何剩余未用杂交瘤文库细胞冷冻以用于未来测试。接着使所选杂交瘤于200 μ L含有15% 胎儿克隆I血清 (Hyclone)、10% BM-Condimed (Roche Applied Sciences)、1mM 丙酮酸钠、4mM L-谷氨酸、100IU青霉素-链霉素、50 μ M 2-巯基乙醇及100 μ M次黄嘌呤的培养基中生长。在两种融合物于96孔板中生长10天至14天之后, 使用ELISA或FACS测定对于来自各孔的上清液的抗体测定对鼠类PTK7的反应活性。

[0376] 简言之, 在4 $^{\circ}$ C下用碳酸钠缓冲液中1 μ g/mL于的鼠类PTK7-His涂覆96孔板 (VWR, 610744) 过夜。洗涤板且在37 $^{\circ}$ C下用2%FCS-PBS封闭一小时且即刻使用或保持于4 $^{\circ}$ C下。在室温下在板上孵育未稀释的杂交瘤上清液一小时。洗涤板且在室温下用在1%BSA-PBS中以1:10000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG探查一小时。在如上文所述与底物溶液一起孵育之后, 在OD 450下读取板。

[0377] 与上文所述类似地, 也使用FACS测定针对人PTK7特异性筛选分泌小鼠免疫球蛋白的生长阳性杂交瘤孔。简言之, 将每孔 1×10^5 个用人PTK7及GFP转导的BALB/3T3细胞与25 μ L至100 μ L杂交瘤上清液一起孵育30分钟。用PBS/2%FCS洗涤细胞两次且接着每样品与50 μ L用在PBS/2%FCS中以1:200稀释的DyeLight 649标记的山羊抗小鼠IgG Fc片段特异性二抗一起孵育。在孵育15分钟之后, 用PBS/2%FCS洗涤细胞2次且重悬于具有DAPI (Life

Technologies) 的 PBS/2%FCS 中且通过 FACS 进行分析。对于第二次融合,使所得 PTK7 特异性克隆杂交瘤扩增且低温保存于 CS-10 冷冻介质 (Biolife Solutions) 中且储存于液态氮中。

[0378] 对于第一次融合,使用限制稀释涂布对所选抗原阳性孔进行亚克隆。目测检查板中单一集落生长的存在且接着通过如上文所述的抗原特异性 ELISA 及 FACS 证实筛选来自单一集落孔的上清液。使所得克隆群体扩增且低温保存于冷冻介质 (90%FBS、10%DMSO) 中且储存于液态氮中。

[0379] 对于第一次融合,选择来自阳性孔的分泌 PTK7 的杂交瘤 (4 个命中,在 OD405 下 20min>0.75) 进行进一步表征。

[0380] 在 48 个板 (4608 个孔) 上接种的第二次融合以数百个命中产生约 65% 的克隆效率。所选克隆提供几十种对人 PTK7 具有免疫特异性的鼠类抗体,其中一些也与鼠类 PTK7 交叉反应。

[0381] 实施例 8

[0382] PTK7 调节剂的测序及人源化

[0383] 8(a) 测序:

[0384] 基于上述内容,选择结合固定的人的许多示例性不同单克隆抗体及与小鼠 PTK7 以表观高亲和力交叉反应的抗体进行测序及进一步分析。如图 6A 及图 6B 中以表格方式所示,实施例 7 中产生的所选单克隆抗体的轻链可变区 (图 6A) 及重链可变区 (图 6B) 的序列分析证实了许多序列具有新型互补决定区且通常显示新型 VDJ 排列。应注意,图 6A 及图 6B 中所示的互补决定区源自 VBASE2 分析。

[0385] 更具体地,图 6A 描绘来自抗 PTK7 抗体的 21 个新型鼠类轻链可变区的邻接氨基酸序列 (SEQ ID NO:20 至 60,偶数) 及源于代表性鼠类轻链的 4 个人源化轻链可变区 (SEQ ID NO:62 至 68,偶数)。类似地,图 6B 描绘来自相同抗 PTK7 抗体的 21 个新型鼠类重链可变区的邻接氨基酸序列 (SEQ ID NO:21 至 61,奇数) 及来自与提供人源化轻链相同的鼠类抗体的 4 个人源化重链可变区 (SEQ ID NO:63 至 69,奇数)。因此,总的,图 6A 及图 6B 提供 21 个鼠类抗 PTK7 抗体 (称为 SC6.2.35、SC6.10.2、SC6.4.1、SC6.50.1、SC6.3、SC6.4、SC6.6、SC6.7、SC6.13、SC6.14、SC6.15、SC6.19、SC6.20、SC6.21、SC6.23、SC6.24、SC6.26、SC6.29、SC6.41、SC6.58 及 SC6.59) 及 4 个人源化抗体 (称为 hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41 及 hSC6.58) 的批注序列。应注意,命名 SC6.4.1 及 SC6.4 仅反映命名异常而调节剂实际上包含具有新型重链及轻链可变区序列的两种分立的抗体。

[0386] 为了本申请的目的,各特定抗体的 SEQ ID NO 是顺次的。因此,mAb SC6.2.35 分别包含轻链及重链可变区的 SEQ ID NO:20 及 21。在这方面,SC6.10.2 包含 SEQ ID NO:22 及 23,SC6.4.1 包含 SEQ ID NO:24 及 25 等。此外,图 6A 及图 6B 中各抗体氨基酸序列的相应核酸序列包括在本申请内作为其随附序列列表。所包括的核酸序列包含比相应氨基酸序列 (重链或轻链) 大 100 的 SEQ ID NO。因此,编码 mAb SC6.2.35 的重链及轻链可变区氨基酸序列 (即 SEQ ID NO:20 及 21) 的核酸序列包含 SEQ ID NO:120 及 121。其他抗体核酸序列,包括编码人源化构建体的抗体核酸序列类似地编号。

[0387] 作为测序示例性调节剂中的第一步,将所选杂交瘤细胞于 **Trizol**[®] 试剂 (Life Technologies) 中溶解以制备 RNA。在这方面,使 10⁴ 个至 10⁵ 个细胞重悬于 1ml Trizol 中且在添加 200μL 氯仿后剧烈震荡。接着在 4℃ 下离心样品 10 分钟,且将水相转移至新鲜微量离心

管中,其中添加等体积异丙醇。再剧烈震荡管且在室温下孵育10分钟,之后在4℃下离心10分钟。所得RNA粒状沉淀用1ml 70%乙醇洗涤一次且在室温下简短干燥,之后重悬于40μL经DEPC处理的水中。RNA制剂的质量通过于1%琼脂糖凝胶中分级3μL进行确定,之后储存于-80℃下直至使用。

[0388] 各杂交瘤的Ig重链的可变区使用经设计以靶向完全小鼠VH集合的包含32种小鼠特异性前导序列引物的5'引物混合物以及对所有小鼠Ig同型具有特异性的3'小鼠C γ 引物进行扩增。使用相同PCR引物从两端对VH的400bp PCR片段进行测序。类似地,将经设计以扩增各Vk小鼠家族的每一种的32种5'Vk前导序列引物混合物与对小鼠 κ 恒定区具有特异性的单一反向引亚组合用以扩增及测序 κ 轻链。使用反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)由100ng总RNA扩增V_H及V_L转录物。

[0389] 对每个杂交瘤进行总计8个RT-PCR反应:Vk轻链4个及V γ 重链(γ 1)4个。使用QIAGEN一步RT-PCR试剂盒进行扩增(Qiagen, Inc.)。此试剂盒提供Sensiscript及Omniscript反转录酶、HotStarTaq DNA聚合酶、dNTP混合物、缓冲液及Q-溶液,能够有效扩增“困难”(例如富含GC)模板的新型添加剂的掺合物。使用特异性V区引物直接测序所提取的PCR产物。使用IMG_T分析核苷酸序列以鉴别具有最高序列同源性的生殖系V、D及J基因成员。使用V-BASE2(Retter等人,同上)且通过V_H及V_L基因与小鼠生殖系数据库的比对将衍生序列与Ig V-区及J-区的已知生殖系DNA序列进行比较。

[0390] 制备包括3μL RNA、0.5 100μM重链或 κ 轻链引物、5μL5×RT-PCR缓冲液、1μL dNTP、1μL含有反转录酶及DNA聚合酶的酶混合物及0.4μL核糖核酸酶抑制剂RNasin(PromegaBioSystems.)的反应混合物。反应混合物含有反转录与PCR所需的所有试剂。热循环仪程序为RT步骤,50℃30分钟,95℃15分钟,之后30个循环(95℃30秒、48℃30秒、72℃1.0分钟)。然后最终在72℃下孵育10分钟。

[0391] 为制备用于直接DNA测序的PCR产物,使用QIAquick™ PCR纯化试剂盒根据制造商的方案对其进行纯化。使用50μL无菌水从旋转柱上洗脱DNA且接着从两条链直接测序。再次地,使用VBASE2(数据未图标)分析所得DNA序列以提供图6A及图6B中所示的批注序列。更具体地,如上文所述,21种鼠类抗PTK7抗体的重链及轻链可变区的批注氨基酸序列示于图6A及图6B中。

[0392] 8(b)人源化:

[0393] 使用互补决定区(CDR)移植使实施例7中所产生的4种鼠类抗体人源化。基于序列及结构相似性关于功能性人生殖系基因选择重链及轻链的人框架。在这方面,结构相似性是通过比较小鼠典型CDR结构与具有相同典型结构的人候选者进行评估的,如Chothia等人(同上)所述。

[0394] 更具体地,使用计算机辅助CDR移植方法(Abysis Database,UCL Business Plc.)及标准分子工程化技术使鼠类抗体SC6.23、SC6.24、SC6.41及SC6.58人源化以提供hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41及hSC6.58调节剂。可变区的人框架区是基于其与小鼠框架序列及其典型结构的最高序列同源性选择的。出于分析的目的,根据Kabat等人编号将氨基酸分配至各CDR结构域。制造若干人源化抗体变体以产生最佳人源化抗体,其中所述人源化抗体一般保持来自小鼠杂交瘤的抗原结合互补决定区(CDR),其与人框架区缔合。最终发现,人源化SC6.23、SC6.24、SC6.41及SC6.58mAb以与其鼠类对应物类似的亲和力结合人PTK7抗

原,如使用Biacore系统所测量的。

[0395] 使用本领域内认可的技术进行分子工程化程序。为此,根据制造商的方案(**Trizol**[®]Plus RNA Purification System,Life Technologies)从杂交瘤提取总mRNA。使用经设计以扩增各杂交瘤的序列特异性5'前导序列引物与3'人C γ 1引物的组合以扩增及克隆各人源化抗体的可变区。类似地,将经特别设计以扩增各Vk区的5'Vk前导序列与对人 κ 恒定区具有特异性的单一反向引亚组合使用以扩增及克隆 κ 轻链。克隆扩增的片段作为嵌合人 γ 1/ κ 链且作为各人源化mAb的基准。

[0396] 从所述核苷酸序列信息,获得关于SC6.23、SC6.24、SC6.41及SC6.58的重链及轻链的V、D及J基因区段的数据。基于该序列数据,设计对抗体的Ig V_H及V_K链的前导序列具有特异性的新引亚组以克隆重组单克隆抗体。随后,将V-(D)-J序列与小鼠Ig生殖系序列比对。SC6.23的重链基因被鉴别为VH36096(V)、DSP2.3(D)及JH3。SC6.24的重链基因被鉴别为VHJ558(V)、DSP2.7(D)及JH4。SC6.41的重链基因鉴别为IGHV14-4(V)、DFL16.1(D)及JH2。SC6.58的重链基因被鉴别为IGHV4-1(V)、DFL16.1(D)及JH4。所有四个轻链均为K类。SC6.23mAb的轻链基因被鉴别为IGKV14-111及JK5,SC6.24mAb的轻链基因被鉴别为IGKV3-5及JK1,SC6.41mAb的轻链基因被鉴别为IGKV2-137及JK4生殖系序列,且SC6.58 κ 轻链被鉴别为IGKV17-121及JK4生殖系序列。这些结果被总结于下方的表1中。

[0397] 表1

[0398]

克隆	VH	DH	JH	VL	JL
SC6.23	VH3609	DSP2.3	JH3	IGKV14-111	JK5

[0399]

SC6.24	VHJ558	DSP2.7	JH4	IGKV3-5	JK1
SC6.41	IGHV14-4	DFL16.1	JH2	IGKV2-137	JK4
SC6.58	IGHV4-1	DFL16.1	JH4	IGKV17-121	JK4

[0400] 从所有4个克隆获得的重链及轻链序列与功能性人可变区序列比对且对同源性及典型结构进行总结。重链及轻链分析的结果分别示于表2及表3中。

[0401] 表2

[0402]

mAb	人 VH	人 DH	人 JH	与人生殖系序列 的同源性%	与小鼠序列的 同源性%
hSC6.23	VH2-5	IGHD5-5	JH4	91	81
hSC6.24	VH1-3	IGHD4-23	JH6	82	82
hSC6.41	VH1-46	IGHD4-23	JH4	79	88
hSC6.58	VH3-7	IGHD2-8	JH6	86	88

[0403] 表3

[0404]

mAb	人 VK	人 JK	与人生殖系序列的同 源性%	与小鼠序列的同源 性%
hSC6.23	O8	JK5	91	81
hSC6.24	L6	JK1	82	82
hSC6.41	A3/A19	JK1	79	88
hSC6.58	B2	JK4	86	88

[0405] 因为生殖系选择及CDR移植过程提供一般保留其结合特征的抗体,所以显然很少需要在大部分构建体中插入鼠类残基。

[0406] 如上文所提及的,所有4种抗体的人源化可变区重链及人源化κ轻链的氨基酸序列示于图6A及图6B中 (SEQ ID NO:62至69) 且相应核酸序列 (SEQ ID NO:162至169) 显示在随附的序列表中。

[0407] 更具体地,人源化SC6.23轻链 (SEQ ID NO:62及162) 及人源化重链 (SEQ ID NO:63及163) 的氨基酸序列及相应核酸序列示于图6A及图6B及序列表中。类似地,以相同方式显示人源化SC6.24轻链 (SEQ ID NO:64及164) 及人源化重链 (SEQ ID NO:65及165) 的氨基酸序列及相应核酸序列。本发明的另一实施方案通过人源化SC6.41轻链 (SEQ ID NO:66及166) 及人源化重链 (SEQ ID NO:67及167) 的氨基酸序列及相应核酸序列阐明。在又一实施方案中,描述人源化SC6.58轻链 (SEQ ID NO:68及168) 及人源化重链 (SEQ ID NO:69及169) 的氨基酸序列及相应核酸序列。如下文实施例中所表明,各前述人源化抗体作为根据本文教导的有效PTK7调节剂。

[0408] 在任何情况下,使用本领域内认可的技术表达及分离所公开的调节剂。为此,将两种重链的合成人源化可变DNA片段 (Integrated DNA Technologies) 克隆至人IgG1表达载体中。将可变轻链片段克隆至人C-κ表达载体中。抗体通过将重链及轻链共同转染至CHO细胞中被表达。

[0409] 更具体地,对于抗体产生,进行了将鼠类及人源化可变基因PCR产物定向克隆至人免疫球蛋白表达载体中。Ig基因特异性PCR中所用的所有引物均包括限制性位点 (对于IgH为AgeI及XhoI,对于IgK为XmaI及DraIII), 其允许分别直接克隆至含有人IgG1及IGK恒定区的表达载体中。简言之,PCR产物用Qiaquick PCR纯化试剂盒 (Qiagen, Inc.) 纯化,之后分别用AgeI及XhoI (IgH), XmaI及DraIII (IgK) 消化。对经消化的PCR产物进行纯化,随后连接至表达载体中。在具有200U T4-DNA连接酶 (New England Biolabs)、7.5μL经消化及纯化的基因特异性PCR产物及25ng线性化载体DNA的10μL总体积中进行连接反应。将感受态大肠杆菌DH10B细菌 (Life Technologies) 用3μL连接产物经由42℃热休克转化,且涂铺于氨苄青霉素平板 (ampicillin plate) (100μg/mL) 上。接着将V_H区的AgeI-EcoRI片段插入pEE6.4HuIgG1 (Lonza AG) 表达载体的相同位点中,同时将合成XmaI-DraIII V_K插入物克隆至各pEE12.4Hu-κ表达载体的XmaI-DraIII位点中。

[0410] 产生人源化抗体的细胞通过使用293fectin用适当质粒转染HEK293细胞而产生。在这方面,用QIAprep旋转柱 (Qiagen) 纯化质粒DNA。将人胚肾 (HEK) 293T (ATCC编号CRL-11268) 细胞于150mm平板 (Falcon, Becton Dickinson) 中在标准条件下在补充有10%热灭

活FCS、100 μ g/mL链霉素、100U/mL青霉素G(所有均来自Life Technologies)的Dulbecco's 改良伊格氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM) 中培养。

[0411] 对于瞬时转染,使细胞生长至80%汇合。将等量IgH及相应IgL链载体DNA(各载体DNA为12.5 μ g)添加至与1.5mL Opti-MEM中50 μ L HEK 293转染试剂混合的1.5mL Opti-MEM中。在室温下孵育混合物30分钟且均匀分布于培养板。在转染后3天收集上清液,置换为20mL补充有10%FBS的新鲜DMEM且在转染后第6天再进行收集。将培养物上清液通过在800 $\times$ g下离心10分钟清除细胞碎片且储存于4 $^{\circ}$ C下。用蛋白质G珠粒(GE Healthcare)纯化重组嵌合及人源化抗体。

[0412] 实施例9

[0413] PTK7调节剂的特征

[0414] 9(a)一般的调节剂特征

[0415] 使用各种方法分析如上文所述产生的所选PTK7调节剂(鼠类与人源化)的免疫化学特征。特别地,表征了许多这些抗体的亲和力、动力学、合并及关于猕猴及鼠类同源物的交叉反应性(例如通过ForteBio)。调节剂的反应性也由蛋白质印迹法、使用还原及非还原样品测量,以提供关于表位为线性或不为线性的一些指示。除图7A中所示的鼠类及人抗原结合数据外,所选鼠类调节剂的抗体表征的结果也以表格形式示于图7B中。最后,如图7C至图7E中所示,使用生物膜层干涉测量分析在ForteBio RED (ForteBio, Inc.) 上用标准抗原浓度系列测量所选鼠类及人源化调节剂的亲和力。一般而言,所选调节剂显示在纳摩尔浓度范围内的相对高的亲和力。

[0416] 根据本发明,用三种方式测量调节剂亲和力以确保精确度。第一,在ELISA中测量固定量的针对抗原的系列稀释液探查的抗体的结合信号,以确定相对调节剂活性(数据未显示)。第二,然后使用生物膜层干涉测量分析、在ForteBio RED (ForteBio, Inc.) 上用标准抗原浓度系列测量所选效应子的亲和力及动力学常数 k_{on} 及 k_{off} 。最后,通过表面等离子共振(Biacore System, GE Healthcare)测量所选调节剂的亲和力。基于标准抗原浓度系列且使用1:1朗缪尔结合模型(1:1Langmuir binding model),使用本领域中常用的技术确定结合抗原的抗体的 K_d 及动力学常数 k_{on} 及 k_{off} (例如参见图7C及图7E)。一般而言,所选效应子(鼠类或人源化)呈现纳摩尔浓度范围内的相对高的亲和力。在图7B中的表中,上标B表示在Biacore上进行的亲和力测量,而上标F表示利用在ForteBio上进行的测量。

[0417] 还进行了初步工作以确定由PTK7效应子识别的表位是否包含邻接氨基酸或由通过抗原的二级结构并置的非邻接氨基酸形成。在这方面,在还原(例如使用0.5M DTT)及非还原条件下进行蛋白质印迹法。更具体地,使用本领域中熟知的标准电泳技术,将呈两种状态的PTK7抗原在凝胶上进行电泳且产生印记,之后暴露于所选调节剂。如图7B中所示,测试了两种PTK7调节剂,其显然仅与二硫键完整的抗原(NR)反应。未测试剩余PTK7调节剂的蛋白质印迹活性。

[0418] 关于抗体合并,根据制造商的说明书及本领域内认可的夹层法[Analytical Biochemistry 386:172-180 (2009)]使用ForteBio Octet Red96分析器(ForteBio, Inc.)来鉴别结合至相同或不同箱的抗体。简言之,将抗体(Ab1)捕捉于抗小鼠捕捉芯片上,之后使用15 μ g/mL (100nM) 高浓度非结合抗体封闭芯片且建立基线。接着通过特异性抗体(Ab1)捕捉如实施例6中所提供的单体重组hPTK7-His(同种型a) (500nM),且将尖端浸入具有作为

对照的相同抗体 (Ab1) 的孔或具有不同抗体 (Ab2) 的孔中, 其中两种抗体皆为 $4\mu\text{g/mL}$ (25nM)。若用新抗体观察到了其他结合, 则确定 Ab1 及 Ab2 处于不同箱。若不存在其它结合, 与对照 Ab1 类似, 则确定 Ab2 处于同一箱。可将此过程扩展以在 96 孔板中使用一整列表示独特箱的抗体筛选独特抗体的大型文库。人与鼠类 PTK7 抗原的三种代表性调节剂的示例性数据示于图 7A 中。图 7A 说明 SC6.10.2 完全不结合小鼠, SC6.2.35 结合人的约 10% 且 SC6.25.1 以相同亲和力结合小鼠 PTK7-His (注意; 在图 7A 中抗体指定为 H2.35、H10.2 及 H25.1)。进一步确定这些测试抗体中的每一种存在于不同的箱中。以类似方式, 对 9 种其他 PTK7 调节剂进行合并分析, 结果示于图 7B 中。这些数据鉴别出至少 7 个通过测试调节剂识别的不同箱。表中的 ND 表示数据未测定。

[0419] 最后, 用 ForteBio、使用包含重组表达的单体抗原的浓度系列评估关于猕猴及鼠类 PTK7 同源物的交叉反应性。如图 7B 中所列举, 许多示例性调节剂与小鼠 PTK7 反应, 而所有抗体均与高度类似的猕猴 PTK7 交叉反应。

[0420] 9 (b) 人源化调节剂特征

[0421] 使用此实施例中上文所述的技术, 分析人源化构建体 hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41 及 hSC6.58 以确定其结合特征。另外, 对于两种抗体, 都将人源化抗体结合直接与亲本鼠类抗体相比较, 以鉴别由人源化过程所产生的速率常数的任何微小变化。

[0422] 更具体地, 使用表面等离子共振 (SPR) 由 Biacore 测量鼠类 SC6.23 的亲和力以提供图 7C 中所示的结果。基于 25、12.5 及 6.25nM 的浓度系列 (在图 7C 及图 7D 中产生由顶部至底部的曲线) 且使用 1:1 朗缪尔结合模型, 估算抗体结合抗原的 K_d 为 2.3nM。接着对人源化 SC6.23 构建体进行的类似实验显示相等结果 (图 7D), 指示人源化过程对亲和力无不利影响。在这方面, 测量指示人源化构建体具有 3.9nM 的亲和力, 其完全在治疗性抗体的可接受限度内。实施例 8 中描述的各人源化构建体的类似测量示于图 7E 中, 且连同此实施例中所述的其他技术, 显示所公开的人源化 PTK7 调节剂具有治疗性抗体所需要的特性。

[0423] 实施例 10

[0424] 所选 PTK7 调节剂的表位测定

[0425] 为进一步改进合并数据且确定如上文所述产生的所选 PTK7 调节剂所界定的抗原区, 构建并表达了 PTK7 ECD 的若干不同变体。更具体地, 使用扩增各种 PTK7 Ig 结构域且使其融合至作为合成基因 (DNA2.0) 订购的人 IgG2Fc 结构域上游的 BglIII 限制性位点的引物设计了 PTK7 缺失突变体。接着使用 HindIII 及 EcoRI 限制性位点将这些 Fc 融合蛋白克隆至 pEE12.4 表达载体 (Lonza AG) 中。使用 293Fectin (Life Technologies) 使用分离的无内毒素质粒 DNA (Qiagen Inc.) 转染黏附性 293 细胞。转染后 72 小时收集来自 293 转染细胞的上清液。特别地, 设计了以下融合至 Fc 区的缺失构建体:

[0426] 1. PTK7 ECD Ig 结构域 1 至 2 (SEQ ID NO:70) 图 8A

[0427] 2. PTK7 ECD Ig 结构域 3 至 7 (SEQ ID NO:71) 图 8B

[0428] 3. PTK7 ECD Ig 结构域 1 至 5 (SEQ ID NO:72) 图 8C

[0429] 4. PTK7 ECD Ig 结构域 6 至 7 (SEQ ID NO:73) 图 8D

[0430] 5. PTK7 ECD Ig 结构域 2 至 3 (SEQ ID NO:74) 图 8E

[0431] 6. PTK7 ECD Ig 结构域 1 至 4 (SEQ ID NO:75) 图 8F

[0432] 7. PTK7 ECD Ig 结构域 1 至 7 (SEQ ID NO:3) 图 1C-ECD

[0433] 这些构建体的前6种的氨基酸序列示于图8A至图8F中(包含所选PTK7 ECD以及Fc区)。第7种构建体的序列包含融合至Fc结构域的如图1C中所示的同种型a的细胞外结构域(SEQ ID NO:3)。

[0434] 使用这些构建体,测试若干调节剂识别缺失了规定的Ig结构域的PTK7蛋白质的能力。通过包括使用结构域缺失构建体的ELISA测定且在标准条件下运行。在这方面,使PTK7 Ig结构域Fc融合物被捕捉于涂覆有山羊抗人IgG Fc特异性(Jackson ImmunoResearch)抗体的ELISA板上。接着用HRP标记的山羊抗小鼠Fc特异性抗体检测各鼠类抗PTK7抗体结合各种缺失Fc融合蛋白的能力。

[0435] 使用此测定,将示例性调节剂鉴别为针对特定PTK7 Ig结构域。ELISA结果的实例定义检测到的每种代表性表位或结合模式且被包括在下方表4内。

[0436] 表4

[0437]

Ig 结构域	1 至 2	2 至 3	1 至 4	1 至 5	3 至 7	6 至 7	1 至 7	结合结构域
SC6.2.35	+	-	+	+	-	-	+	Ig 结构域 1 至 2
SC6.39	+	+	+	+	-	-	+	Ig 结构域 2
SC6.25.1	-	+	+	+	-	-	+	Ig 结构域 2 至 3
SC6.10.2	-	-	+	+	-	-	+	Ig 结构域 1 至 4
SC6.18	-	-	-	-	+	-	+	Ig 结构域 3 至 7
SC6.11	-	-	-	-	-	-	+	Ig 结构域 1 至 7

[0438] 基于ELISA分析中的不同阳性结合模式,抗PTK7单克隆抗体显然识别若干不同表位(表4及图8G)。应注意,在图8G中,调节剂被列为6M,而SC6及SC6.2.35及SC6.10.2被列为H2.35及H10.2。并无抗体仅结合Ig结构域6至7内的表位,但这两个结构域可促成由SC6.18及SC6.31结合的Ig3至7Fc融合构建体的二级/三级结构(表中未示)。此外,三种抗体(SC6.2.35、SC6.4.1及SC6.10.2)识别前4个Ig结构域中的表位,且并无抗体结合Ig结构域6至7内的表位。在前4个Ig结构域中,SC6.2.35结合至结构域1至2内的表位。SC6.4.1识别Ig结构域2及3的边界内的表位。相反,SC6.10.2似乎对前4个Ig结构域内的任何缺失均敏感,且因此所有4个Ig样结构域可能涉及界定表位SC6.10.2。类似地,一些抗体仅结合全长构建体Ig结构域1至7,表明Ig缺失破坏了这些表位的一些结合位点或二级结构。图8G提供这些结合模式的图标,其包括其他抗体及显示所公开调节剂的结合位置的相当的数据,其中PTK7 ECD的7个Ig结构域以方框形式表示且使用括号指明各抗PTK7抗体的此ECD内所阐明的表位位置。

[0439] 实施例11

[0440] 示例性肿瘤样品中的PTK7蛋白表达

[0441] 在先前实施例中记录升高的基因表达水平且产生抗PTK7的抗体之后,寻求关于所选患者肿瘤群体中相应PTK7蛋白表达的证据。在这方面,提供包含来自11种肿瘤类型或其各自正常邻近组织的432种组织裂解物的4种稀释液的反相癌症蛋白质裂解物阵列(ProteoScan™阵列;OriGene Technologies)以及由没有或有由外源性启动子驱动的TP53过表达的HEK 293细胞组成的对照物。使用如实施例7所述产生的小鼠单克隆PTK7抗体检测此阵列上裂解物中的PTK7蛋白表达,且通过蛋白质印迹法识别PTK7蛋白(例如克隆SC6.2.35)。比色检测试剂及方案由ProteoScan阵列的制造商提供,使用平板扫描仪使用BZScan2Java软件(INSERM-TAGC)将所制造阵列上的斑点转化成数字影像以定量斑点强度。

[0442] 所述测定的所选结果指示在黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLS)、小细胞肺癌(SCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌及卵巢癌患者来源的肿瘤样品亚组中PTK7蛋白的表达上调。对于所选肿瘤的这些测定的示例性数据显示在图9A-9D中。更具体地,图9A显示在结肠直肠肿瘤样本亚组中PTK7蛋白表达似乎明显升高;当与从更早疾病阶段获得的样本的正常邻近组织或肿瘤组织比较时,在患有第IV期疾病的患者中尤其如此。如图9B中所示,在大多数神经内分泌胰腺肿瘤中以及在分别患有乳腺癌(图9C)及卵巢癌(图9D)的患者亚组中PTK7蛋白表达也升高。数据是如上文所述产生的且表示为每斑点的平均像素强度(斑点强度)。各样品中的水平黑色条表示每个各类别中的样本的平均值。

[0443] 这些数据支持以上实施例中的观察结果,PTK7过表达与结肠直肠癌中的TIC和/或TPC有关及可能参与增殖和/或存活。鉴于前述实施例显示:a) PTK7基因表达主要与结肠直肠癌中的TPC细胞亚群及胰腺肿瘤中的TG细胞亚群相关;b) PTK7蛋白表达在TIC细胞亚群上更高;c) 在来自晚期结肠直肠癌的全肿瘤样本中PTK7蛋白表达升高;及d) 通常观察到在晚期肿瘤中TIC更常见,PTK7似乎与支持肿瘤生长、对疗法的抗性及肿瘤重现的细胞有关,因此加强了PTK7可在支持前述肿瘤中的TPC和/或TIC中起主要作用的命题。

[0444] 鉴于这些结果,使用流式细胞计数评估人乳房(BR)、肺(LU)、卵巢(OV)、结肠(CR)及肾(KDY)肿瘤异种移植物的非致肿瘤(NTG)及癌症干细胞(CSC)群体内的PTK7表达。如实施例1中所述,可分别使用表型标记CD46^{-/lo} CD324⁻及CD46^{hi} CD324⁺鉴别、监测及富集NTG及CSC富集群体。因此,收集来自免疫功能不全小鼠的人肿瘤异种移植物、解离且用市售抗CD46、抗CD324及抗PTK7(Miltenyi Biotech)抗体共同染色,之后使用流式细胞计数在CD46^{-/lo} CD324⁻NTG群体及CD46^{hi} CD324⁺CSC群体中评估PTK7表达。更具体地,使用标准技术在BD FACSCanto™ II流动式细胞仪(BD Biosciences)上用进行流式细胞计数分析,其中使用了同型染色及荧光减一(FMO)对照物以证实染色特异性。

[0445] 示例性乳房、肺、卵巢、结肠直肠及肾肿瘤样品的结果示于图9E中,其中同型对照物以实心灰色标记,NTG细胞群由阴影线(hatched line)表示且CSC富集群体由实线显示。应了解,尽管在这些肿瘤的每一种的NTG群体中表面PTK7染色相对较低,但在CSC富集群体中表面PTK7染色明显升高。迄今已使用许多所公开的调节剂证实了这些结果(数据未图标)且代表25种以上所测试的独特NTX细胞系(包含各种实体肿瘤)。

[0446] PTK7与TPC的其它表面标记物的关联表达模式在NSCLC及卵巢癌的致肿瘤性研究中被进一步描绘。从解离的人肿瘤异种移植物(如上文所述通过荧光活化的细胞分选(FACS)染色)分离PTK7⁻和PTK7⁺肿瘤群体,将相等的数目与Matrigel(BD Biosciences)混合

并皮下移植到NOD/SCID受体小鼠中。PTK7⁻细胞在受体小鼠中不能产生肿瘤,而PTK7⁺肿瘤细胞以NSCLC及卵巢癌均一致性地产生快速生长的肿瘤,且提供了关于所公开的调节剂作为诊断和治疗诊断试剂的用途的进一步的证据。

[0447] 实施例12

[0448] 所选PTK7调节剂由K562及G401细胞内化

[0449] 就其在K562及G401细胞中内化的能力筛选来自通过如上文所述免疫接种小鼠所产生的杂交瘤的PTK7调节剂。

[0450] 在这方面,在室温下用人TruStain (Biolegend, Inc., 422302) 封闭起始浓度为 10^6 /mL的K562细胞(单细胞悬浮液) 10分钟。将细胞稀释成每反应 50×10^3 个细胞。在冰上用终体积为50 μ L的抗体上清液染色一式两份的样品30分钟,接着用FACS染色培养基(FSM; 2%胎牛血清/汉克氏(Hank's)缓冲盐水溶液/25mM HEPES[pH 7.4]; Mediatech, Inc.) 洗涤以移除未结合抗体。之后,在冰上用驴抗小鼠Alexa647 (Life Technologies) 进行第二次染色30分钟。接着再洗涤细胞以移除未结合的抗体且使样品重悬于内化培养基(2%胎牛血清/伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium))中且在5% CO₂中在37°C (或对于对照物为4°C) 下孵育1小时以允许内化。通过将样品转移至冰上且添加冰冷FSM停止反应。为移除未内化且保留于细胞表面上的任何抗体,在冰上用低pH值磷酸盐缓冲盐水(PBS[pH 2.0]) 处理样品10分钟。在此“酸脱除(acid-strip)”步骤之后,用FSM广泛洗涤样品,重悬于150 μ L含有2 μ g/ml DAPI (Life Technologies) 的FSM中,且在BD FACS Canto流动式细胞仪上进行分析。高于由此实验中自冰上所孵育的细胞所检测的任何荧光增加均由抗体内化能力产生,其在低pH值磷酸盐缓冲液处理期间保护荧光分子免于脱离细胞表面。除非另外说明,否则所有孵育均在FACS染色培养基中进行。

[0451] 当使用上文所述酸脱除方案筛选含有PTK7抗体的杂交瘤单个克隆的上清液时,若干上清液显示荧光对未染色细胞及IgG阴性对照抗体的正位移(图10A及10B)。如若干抗PTK7抗体保护Alexa647二抗免于酸脱除且产生向右荧光位移所表明的,利用这些抗体可观察到抗体内化。抗体克隆SC6.10.2 (即图10C中的H10) 为能通过具有此活性的抗PTK7抗体进行典型内化的实例。与IgG对照物相比,约15%含PTK7抗体的上清液(4/27) 诱导了内化。使用K562细胞,此数据表明能结合PTK7 ECD的抗体亚组会接合抗原,如同其呈现于细胞上一般,且能够有效内化。

[0452] 在图10D中显示了进一步的证据表明在各种示例性细胞系中,所公开的调节剂可介导内化。更具体地,发现神经胶母细胞瘤细胞系(G401威姆氏肿瘤细胞(Wilm's Tumor cell))表达高水平的PTK7(数据未显示),表明此细胞系在所选测定条件下可能更敏感且因此能更有效地鉴别能诱导内化的调节剂。一般地,使用与前述酸脱除程序一起使用这些细胞,筛选来自实施例7的170个独特杂交瘤上清液以确定其是否含有内化抗体。将上述筛选中所鉴别出的纯化抗体SC6.2.35、SC6.10.2及SC6.25.3 (图10D中表示为H2.35、H10.2及H25.3) 用作阳性对照(图10D)。紧接对照物下方显示6种示例性上清液中存在的调节剂的内化能力(通过良好命名鉴别)。在此更详尽测定下,数据显示以上所讨论的免疫程序所提供的许多调节剂能够结合PTK7且内化(如1A02、1F02、2A03及2F10所证明),虽然并非每一个克隆(2F11及2F09) 均具有此能力。

[0453] 在关于所公开调节剂的性质的另一证明中,发现以显著方式结合G401细胞的所有

所筛选的抗体均以一定程度内化(图10E)。如图10E中的虚线所表示,基于小鼠同型对照抗体将阳性细胞染色设定为4%,所述对照抗体显示非特异性染色为细胞的0%至3%。在酸脱除步骤之后(即内化后)在37℃及4℃下测量用各抗体染色的G401细胞的平均荧光强度,且使用含有已知数量的荧光分子的8峰值Rainbow珠粒(BD SpheroTech编号559123)将其换算成每细胞的相对受体数。内化受体数通过从在37℃下经历内化步骤的样品获得的受体数减去4℃下经历内化步骤的样品获得的受体数来计算。应注意,PTK7特异性抗体在其诱导内化的能力方面是异质性的,鉴于被内化受体数的差异有10倍,而这与细胞结合程度无关(图10E的右上象限)。

[0454] 实施例13

[0455] PTK7调节剂有助于递送细胞毒性剂

[0456] 稳定连接至抗体的细胞毒性药物的靶向代表对患有实体肿瘤的患者可能具有极大治疗益处的强大抗体方法。为确定上文所述内化PTK7特异性抗体是否能够介导细胞毒性剂递送至活细胞,进行了体外细胞杀死测定,其中使与核糖体灭活蛋白皂草素缀合的抗生蛋白链菌素(Advanced Targeting Systems)结合至生物素化的PTK7抗体,且72小时后通过测量细胞活力来测量这些皂草素复合物内化及杀死细胞的能力。

[0457] 特别地,在96孔板的各孔中每孔涂铺 1×10^4 个G401威姆氏肿瘤细胞。自上清液纯化如上文所述呈抗PTK7抗体形式的PTK7调节剂,将其生物素化且接着稀释至20 μ g/mL。将各抗体的等分试样与抗生蛋白链菌素-ZAP(Advanced Targeting Systems)以1:1混合,涡旋震动5秒,且接着在室温下孵育1小时。接着制造另外三种抗体-皂草素复合物的10倍系列稀释液,且分别将50 μ L每种混合物添加至含有G401细胞的孔中。接着在37℃/5%CO₂下孵育细胞/抗体-皂草素混合物24小时。在此孵育之后,使细胞在圆底96孔板中离心,移除上清液且将100 μ L新鲜培养基添加至各孔中。接着再孵育细胞72小时,之后使用CellTiter-Glo(Promega Inc.)根据制造商的方案计数活细胞数。

[0458] 使用上文所述细胞杀死测定,显示包含来自克隆SC6.2.35、SC6.10.2及SC6.25.3(在图11A中表示为H2.35、H10.2且H25.3)的抗体的示例性内化PTK7调节剂介导皂草素毒素内化及细胞杀死。更具体地,图11A明显表明与非特异性同型对照抗体(即MOPC)相反,这些调节剂通过PTK7介导的内化实现细胞杀死的能力。所述数据表明所公开的调节剂对PTK7具有免疫特异性且能通过细胞表面缔合有效介导细胞毒性有效负荷的递送且杀死PTK7阳性细胞。

[0459] 在前述杀死测定的延伸中,使用另外四种示例性调节剂(SC6.23、SC6.41、SC6.51及SC6.58)及用作阳性对照的SC6.10.2显示通过PTK7特异性抗体递送细胞毒性有效负荷。为此,在添加抗体及毒素的前一天将以下细胞类型在其各自培养基中(每孔500个细胞)涂铺于96孔组织培养板中:G401威姆氏肿瘤细胞、使用反转录病毒转导工程化以在其细胞表面上表达PTK7分子的HEK293T(本文表示为293.PTK7细胞)及作为对照物的HEK293T。

[0460] 对于此测定而言,将各浓度的纯化的PTK7调节剂添加至含有涂铺细胞的各孔中。在添加调节剂之后,将固定量的浓度为4nM的共价连接至皂草素的抗小鼠IgG Fab片段(Fab-ZAP,Advanced Targeting Systems,编号IT-48)添加至各孔中且孵育培养物72小时。如上文所述使用CellTiter-Glo测定活细胞数。将使用含有具有皂草素-Fab片段的细胞的培养物(但无调节剂)得到的原始发光计数设定为100%参考值,且据此计算所有其他计数

(称为“归一化RLU”)。

[0461] 使用此测定,表明所有所测试的PTK7抗体(而非同型对照抗体)均能杀死靶细胞(图11B至图11D),其中图11B、图11C及图11D说明调节剂分别对G401细胞、293.PTK7细胞及HEK293T细胞的影响。应了解,调节剂介导的内化及杀死取决于细胞类型(比较图11B-G401细胞及图11D-HEK293T细胞)、靶细胞上PTK7的表达水平(比较图11C-293.PTK7细胞及图11D-HEK293T细胞)及各种调节剂的固有内化能力。该测定进一步表明内化主要是由于PTK7特异性抗体与细胞表面的结合而发生,不需要额外交联。基于用以产生图11B至图11D的剂量反应曲线的数据(及其他调节剂的类似得到的值,未显示),确定各测试调节剂/靶细胞组合的半最大有效浓度(“EC50”)。更具体地,下方表5列举如使用上文方才所述的测定对三种靶细胞中的每种所测定的13种调节剂的EC50(以pM计)。ND表明值未测定。

[0462] 表5

[0463] PTK7调节剂介导的细胞毒性剂递送

[0464]

调节剂	G401细胞	293.PTK7细胞	HEK293T细胞
IgG2b对照物	无杀死	无杀死	无杀死
SC6.2.35	1.1	0.65	0.45
SC6.10.2	4.7	1.1	156
SC6.25.1	223	10.9	97.6
SC6.8	2.8	3.5	ND
SC6.21	约200	30.6	ND
SC6.23	2.6	1.1	3.0
SC6.24	6.7	2.3	11.0
SC6.30	314	19.7	ND
SC6.41	2.6	2.3	5.7
SC6.51	105	12.6	8100
SC6.53	4.5	1.9	14.2
SC6.55	8.8	4.2	ND
SC6.58	35.1	10.4	86.8

[0465] 尽管注意到在个体调节剂间关于杀死的一些变化,但根据表5中的数据明显存在一些一般的趋势。在这方面,与G401细胞或野生型293细胞相比,所述调节剂一般在介导工程化的PTK过表达293细胞的细胞杀死中更有效。值得关注的是,许多测试的调节剂对介导已知在细胞表面上表达PTK7的非工程化G401肿瘤细胞的杀死相对有效。所述可重现结果指示如本文所例示的广泛内化PTK7调节剂的治疗潜能。

[0466] 实施例14

[0467] PTK7调节剂有助于细胞毒性剂递送至致肿瘤细胞中

[0468] 为确证先前实施例的结果且证明PTK7调节剂可介导原发性人肿瘤细胞的毒素内化及细胞杀死,涂铺耗竭小鼠谱系的NTX细胞(即以低传代异种移植物在免疫功能不全小鼠中繁殖的人肿瘤细胞)且随后暴露于抗PTK7抗体及Fab-ZAP。

[0469] 特别地,将源于肺(LU)癌、卵巢(OV)癌及黑色素瘤(SK)患者的NTX肿瘤解离成单细胞悬浮液且使用有利于癌症干细胞增殖的本领域内认可的常用技术于补充有生长因子的无血清培养基中涂铺于Primaria™平板(BD Biosciences)上。在37℃/5%CO₂/5%O₂下培养3至5天之后,使细胞与同型对照(IgG2a)抗体或三种鼠类抗PTK7抗体(0.1nM的SC6.2.35、SC6.10.2或SC6.25.1;标记为SC6.H2、SC6.H10及SC6.H25)之一及Fab-ZAP(40nM)接触,如先前实施例中一般性显示的。接着在5至7天后通过使用CellTiter Glo根据制造商的说明书定量剩余细胞数来评估调节剂介导的皂草素细胞毒性。针对未处理细胞对结果进行归一化。

[0470] 如图12所示,对于所有肿瘤类型而言,暴露于各测试调节剂中的每一种(但非同型对照物)均引起活细胞数减少。在这方面,应了解,杀死细胞的量显然取决于特定的肿瘤细胞系以及特定调节剂。这些数据表明本发明的调节剂可与来自各种肿瘤类型的各种抗原表达细胞免疫特异性缔合、内化且由此介导构成细胞的杀死。此外,所公开调节剂如先前所述相关于在有利于癌症干细胞增殖的条件下培养的NTX肿瘤细胞系这样做的能力强烈指示其选择性消除癌症干细胞的能力。

[0471] 实施例15

[0472] PTK7调节剂降低癌症干细胞致肿瘤性

[0473] 为进一步证实所公开调节剂降低癌症干细胞频率且影响其致肿瘤潜能的能力,将NTX乳房肿瘤细胞用SC6.2.35处理且随后植入免疫功能不全小鼠中。

[0474] 在这方面,解离两种乳腺癌患者来源的NTX肿瘤(BR13及BR64)且在本领域中已知维持致肿瘤细胞的条件下培养人肿瘤细胞,并如先前实施例中所述的用PTK7调节剂(及同型对照物)及Fab-ZAP处理。接着,在处理14天后使用Cell Titer Glo根据制造商的说明书关于细胞活力测量细胞毒性。再次地,针对未处理的细胞对结果进行归一化。

[0475] 分别如图13A及图13B中所见,源于BR13(图13A)及BR64(图13B)的乳房肿瘤细胞通过皂草素细胞毒性剂的PTK7调节剂介导的免疫特异性缔合及内化基本上被消除。更具体地,用0.2nM的PTK7调节剂SC6.2.35(SC6.H2)处理导致消除约70%至80%的细胞,而IgG2a对照物处理的细胞基本上未受影响。所述发现结果与实施例13中所见的结果一致且基于所公开调节剂消除源于多种肿瘤的肿瘤永存细胞的能力进一步证明本发明的广泛适用性。

[0476] 为证实所公开调节剂消除肿瘤起始细胞,将来自两种乳腺癌细胞系的经处理的制备物移植至小鼠中以确定肿瘤起始细胞是否仍存活。更具体地,每种独立地收集来自三个重复孔的细胞,用含有2%BSA的PBS洗涤,重悬于100μl中且接着一般使用实施例1中所述的程序移植至个体免疫功能不全小鼠中。每周监测小鼠的肿瘤生长且测量所出现的任何肿瘤以计算其体积。仅移植了用IgG对照物处理的NTX BR13及BR64细胞的小鼠发生肿瘤,而移植了与PTK7调节剂接触的细胞的那些小鼠并未生长肿瘤。这些结果表明TIC被能够介导毒素递送的PTK7调节剂消除了(图13C)。

[0477] 对数据的回顾显示移植用PTK7调节剂及皂草素处理的任一乳腺癌细胞系之后剩余的活细胞没有导致肿瘤形成。相反,来自两个乳腺癌细胞系(即用同型对照抗体处理的那些)的对照细胞在移植后能够重新起始肿瘤生长。特别地,3只移植了每种对照细胞系(BR22及BR64)的小鼠中的两只发生了可测量的肿瘤,表明移植的细胞包含肿瘤永存细胞。更重要的是,经调节剂处理的细胞不能形成肿瘤强烈暗示所移植的细胞不包含肿瘤永存细胞。即,

根据本发明用PTK7调节剂/皂草素组合处理可选择性靶向及消除肿瘤永存细胞。在任何情况下,这些数据表明用所公开的调节剂处理有效降低肿瘤细胞的致肿瘤潜能。

[0478] 实施例16

[0479] 人源化PTK7调节剂介导细胞毒性剂递送

[0480] 因为本发明的优选的实施方案在治疗性设置中可能采用人源化PTK7调节剂,所以进行了工作以表明人源化抗PTK7抗体(如实施例8中所示制造的)通过递送细胞毒性剂作为细胞杀死的有效介导体。

[0481] 更具体地,根据本文的教导,采用三种示例性人源化PTK7调节剂(hSC6.23、hSC6.58及hSC6.24)以介导细胞毒性有效负荷的引入且消除致肿瘤细胞。一般而言,使用上文实施例13中所述的方案,使工程化以表达PTK7的HEK293细胞(即293.PTK7细胞)暴露于不同浓度的所选调节剂及连接至抗人Fab的皂草素(Fab-ZAP人,Advanced Targeting Systems)。在孵育之后,洗涤细胞且接着在5至7天后通过使用CellTiter Glo根据制造商的说明书定量剩余细胞数来评估调节剂介导的皂草素细胞毒性。针对未处理细胞对结果进行归一化且以图解方式呈现于图14中。

[0482] 图14中所示的曲线的检视显示所有三种测试PTK7调节剂极有效地诱导细胞毒性有效负荷的内化,从而降低细胞活力。在这方面,浓度在1pM与10pM之间的各调节剂提供细胞活力降低50%,且在100pM的浓度下降低细胞活力80%以上。再次地,根据本公开,这些数据指示可免疫特异性介导细胞毒性剂递送至所选细胞群的高度有效的调节剂。

[0483] 本领域技术人员应进一步了解,本发明可在不背离其精神或中心属性的情况下以其他特定形式实施。由于本发明的上述描述仅公开其示例性实施方案,故应了解其他变化也涵盖在本发明的范畴内。因此,本发明不限于本文已详细描述的具体实施方案。相反,应参考随附权利要求作为本发明的范畴及内容的指示。

[0484] 本说明书还包括下列内容:

[0485] 1.分离的PTK7调节剂。

[0486] 2.实施方式1的经分离的PTK7调节剂,其中所述PTK7调节剂包括PTK7拮抗剂。

[0487] 3.实施方式1的经分离的PTK7调节剂,其中所述PTK7调节剂包括抗体或其免疫反应性片段。

[0488] 4.实施方式3的经分离的PTK7调节剂,其中所述抗体或其免疫反应性片段包括单克隆抗体。

[0489] 5.实施方式4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体选自由嵌合抗体、人源化抗体及人抗体组成的组。

[0490] 6.实施方式4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括中和抗体。

[0491] 7.实施方式4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括内化抗体。

[0492] 8.实施方式4的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括与选自由以下组成的组的PTK7同种型缔合的抗体:同种型a、同种型b、同种型c及同种型d。

[0493] 9.实施方式8的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括与同种型a缔合的抗体。

[0494] 10.实施方式9的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包括具有三个互补决定区的轻链可变区及具有三个互补决定区的重链可变区,其中所述重链及轻链互补决定区

包含如图6A和图6B中所示的互补决定区。

[0495] 11.实施方式9的经分离的PTK7调节剂,其中所述单克隆抗体包含轻链可变区及重链可变区,其中所述轻链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:60,且其中所述重链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59及SEQ ID NO:61。

[0496] 12.实施方式10或11的经分离的PTK7调节剂,其还包括细胞毒性剂。

[0497] 13.一种经分离的PTK7调节剂,其包括竞争抗体,其中所述竞争抗体以至少约40%抑制实施方式10或11的经分离的PTK7调节剂与PTK7的结合。

[0498] 14.一种核酸,其编码实施方式11中所定义的氨基酸重链可变区或氨基酸轻链可变区。

[0499] 15.一种载体,其包含实施方式14的核酸。

[0500] 16.实施方式1的经分离的PTK7调节剂,其包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其片段。

[0501] 17.实施方式16的经分离的PTK7调节剂,其中所述PTK7调节剂还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区。

[0502] 18.实施方式1的经分离的PTK7调节剂,其中所述调节剂在向有需要的受试者施用后降低肿瘤起始细胞的频率。

[0503] 19.实施方式18的经分离的PTK7调节剂,其中所述频率降低是使用已知对于肿瘤起始细胞而言富集的肿瘤细胞表面标记的流式细胞计数分析测定的。

[0504] 20.实施方式18的经分离的PTK7调节剂,其中所述频率降低是使用已知对于肿瘤起始细胞而言富集的肿瘤细胞表面标记的免疫组织化学检测来测定的。

[0505] 21.实施方式18的经分离的PTK7调节剂,其中所述肿瘤起始细胞包含肿瘤永存细胞。

[0506] 22.实施方式1的经分离的PTK7调节剂,其还包含细胞毒性剂。

[0507] 23.一种药物组合物,其包含实施方式1的经分离的PTK7调节剂。

[0508] 24.实施方式23的药物组合物,其中所述经分离的PTK7调节剂包括单克隆抗体。

[0509] 25.实施方式24的药物组合物,其中所述单克隆抗体包括人源化抗体。

[0510] 26.实施方式25的药物组合物,其中所述人源化抗体包括选自由hSC6.23、hSC6.24、hSC6.41及hSC6.58组成的组的抗体。

[0511] 27.实施方式1的经分离的PTK7调节剂,其中所述PTK7调节剂包括泛PTK7调节剂。

[0512] 28.一种治疗PTK7相关病症的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的PTK7调节剂。

- [0513] 29.实施方式28的方法,其中所述PTK7调节剂包括PTK7拮抗剂。
- [0514] 30.实施方式28的方法,其中所述PTK7调节剂包括抗体或其免疫反应性片段。
- [0515] 31.实施方式30的方法,其中所述抗体或其免疫反应性片段包括单克隆抗体。
- [0516] 32.实施方式31的方法,其中所述单克隆抗体选自由嵌合抗体、人源化抗体及人抗体组成的组。
- [0517] 33.实施方式32的方法,其中所述单克隆抗体包含轻链可变区及重链可变区,其中所述轻链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:60,且其中所述重链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:59及SEQ ID NO:61。
- [0518] 34.实施方式33的方法,其中所述单克隆抗体为人源化抗体。
- [0519] 35.实施方式31的方法,其中所述单克隆抗体包括中和抗体。
- [0520] 36.实施方式31的方法,其中所述单克隆抗体包括内化抗体。
- [0521] 37.实施方式36的方法,其中所述内化抗体包含细胞毒性剂。
- [0522] 38.实施方式28的方法,其中所述PTK7相关病症包括增殖性病症。
- [0523] 39.实施方式38的方法,其中所述过度增殖性病症包括赘生性病症。
- [0524] 40.实施方式39的方法,其中所述赘生性病症包括实体肿瘤。
- [0525] 41.实施方式40的方法,其中赘生性病症包含肾上腺癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌或乳腺癌。
- [0526] 42.实施方式39的方法,其中所述赘生性病症包括血液学恶性疾病。
- [0527] 43.实施方式42的方法,其中所述血液学恶性疾病包括白血病或淋巴瘤。
- [0528] 44.实施方式39的方法,其中患有所述赘生性病症的所述受试者显示包含肿瘤起始细胞的肿瘤。
- [0529] 45.实施方式44的方法,还包括降低所述受试者中肿瘤起始细胞频率的步骤。
- [0530] 46.实施方式45的方法,其中所述频率的降低是使用已知对于肿瘤起始细胞而言富集的肿瘤细胞表面标记的流式细胞计数分析或已知对于肿瘤起始细胞而言富集的肿瘤细胞表面标记的免疫组织化学检测来测定的。
- [0531] 47.实施方式45的方法,其中所述频率降低是使用体外或体内有限稀释分析来测定的。
- [0532] 48.实施方式47的方法,其中所述频率降低是使用包含将活的人肿瘤细胞移植至免疫功能不全小鼠中的体内有限稀释分析来测定的。
- [0533] 49.实施方式48的方法,其中使用体内有限稀释分析测定的所述频率降低包括使用泊松分布统计定量肿瘤起始细胞频率。

- [0534] 50.实施方式47的方法,其中所述频率降低是使用包括将活的人肿瘤细胞有限稀释沉积于体外集落支持条件中的体外有限稀释分析来测定的。
- [0535] 51.实施方式50的方法,其中使用体外有限稀释分析测定的所述频率降低包括使用泊松分布统计定量肿瘤起始细胞频率。
- [0536] 52.实施方式28的方法,还包括施用抗癌剂的步骤。
- [0537] 53.实施方式28的方法,其中所述PTK7调节剂包含如SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列或其片段。
- [0538] 54.实施方式28的方法,其中所述PTK7调节剂包括泛PTK7调节剂。
- [0539] 55.降低有需要的受试者中肿瘤起始细胞频率的方法,包括向所述受试者施用PTK7调节剂。
- [0540] 56.实施方式55的方法,其中所述肿瘤起始细胞包含肿瘤永存细胞。
- [0541] 57.实施方式56的方法,其中所述肿瘤永存细胞为CD44⁺或CD133⁺细胞。
- [0542] 58.实施方式55的方法,其中所述PTK7调节剂包括抗体。
- [0543] 59.实施方式58的方法,其中所述抗体包括单克隆抗体。
- [0544] 60.实施方式59的方法,其中所述单克隆抗体还包括细胞毒性剂。
- [0545] 61.实施方式55的方法,其中所述受试者患有选自由以下组成的组的赘生性病症:肾上腺癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌及乳腺癌。
- [0546] 62.实施方式55的方法,其中所述肿瘤起始细胞频率以至少10%降低。
- [0547] 63.实施方式55的方法,其中所述频率降低是使用已知对于肿瘤起始细胞而言富集的肿瘤细胞表面标记的流式细胞计数分析或已知对于肿瘤起始细胞而言富集的肿瘤细胞表面标记的免疫组织化学检测来测定的。
- [0548] 64.治疗患有血液学恶性疾病的受试者的方法,包括向所述受试者施用PTK7调节剂。
- [0549] 65.实施方式64的方法,其中所述PTK7调节剂包括单克隆抗体。
- [0550] 66.敏化用于以抗癌剂治疗的受试者中的肿瘤的方法,包括向所述受试者施用PTK7调节剂的步骤。
- [0551] 67.实施方式66的方法,其中所述PTK7调节剂包括抗体。
- [0552] 68.实施方式66的方法,其中所述肿瘤为实体肿瘤。
- [0553] 69.实施方式66的方法,其中所述抗癌剂包括化学治疗剂。
- [0554] 70.实施方式66的方法,其中所述抗癌剂包括免疫治疗剂。
- [0555] 71.一种诊断有需要的受试者的过度增殖性病症的方法,其包含以下步骤:
- [0556] a.自所述受试者获得组织样品;
- [0557] b.使所述组织样品与至少一种PTK7调节剂接触;及
- [0558] c.检测或定量与所述样品缔合的所述PTK7调节剂。
- [0559] 72.实施方式71的方法,其中所述PTK7调节剂包括单克隆抗体。
- [0560] 73.实施方式72的方法,其中所述抗体与报告子可操作地结合。
- [0561] 74.一种可用于诊断或治疗PTK7相关病症的制品,其包含含有PTK7调节剂的容器及使用所述PTK7调节剂来治疗或诊断所述PTK7相关病症的说明材料。

- [0562] 75.实施方式74的制品,其中所述PTK7调节剂为单克隆抗体。
- [0563] 76.实施方式74的制品,其中所述容器包含可读取板。
- [0564] 77.治疗患有赘生性病症的受试者的方法,包括施用治疗有效量的至少一种内化PTK7调节剂。
- [0565] 78.实施方式77的方法,其中所述PTK7调节剂包括抗体。
- [0566] 79.实施方式78的方法,其中所述抗体包括单克隆抗体。
- [0567] 80.实施方式79的方法,其中所述单克隆抗体还包含细胞毒性剂。
- [0568] 81.实施方式80的方法,其还包括施用抗癌剂的步骤。
- [0569] 82.治疗患有赘生性病症的受试者的方法,包括施用治疗有效量的至少一种中和PTK7调节剂的步骤。
- [0570] 83.实施方式82的方法,其中所述PTK7调节剂包括抗体。
- [0571] 84.实施方式83的方法,其中所述抗体包括单克隆抗体。
- [0572] 85.实施方式84的方法,其中所述单克隆抗体包括人源化抗体。
- [0573] 86.实施方式85的方法,其中所述人源化抗体还包含细胞毒性剂。
- [0574] 87.实施方式82的方法,其中所述赘生性病症系选自由以下组成的组:肾上腺癌、膀胱癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌及乳腺癌。
- [0575] 88.一种鉴别、分离、切片或富集肿瘤起始细胞群的方法,其包括使所述肿瘤起始细胞与PTK7调节剂接触的步骤。
- [0576] 89.实施方式88的方法,其中所述PTK7调节剂包括抗体。
- [0577] 90.一种PTK7调节剂,其包括人源化抗体,其中所述人源化抗体包含轻链可变区及重链可变区,其中所述轻链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:68,且其中所述重链可变区包含与选自由如下所示的氨基酸序列组成的组的氨基酸序列具有至少60%同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:67及SEQ ID NO:69。
- [0578] 91.抑制或预防有需要的受试者中的转移的方法,包括施用药学有效量的PTK7调节剂的步骤。
- [0579] 92.实施方式91的方法,其中所述受试者在施用所述PTK7调节剂之前或之后经历减瘤程序。
- [0580] 93.实施方式92的方法,其中所述减瘤程序包括施用至少一种抗癌剂。
- [0581] 94.对有需要的受试者进行维持治疗的方法,包括施用药学有效量的PTK7调节剂的步骤。
- [0582] 95.实施方式94的方法,其中在施用所述PTK7调节剂之前,所述受试者已针对赘生性病症被治疗。
- [0583] 96.耗竭患有过度增殖性病症的受试者中肿瘤起始细胞的方法,包括施用PTK7调节剂的步骤。
- [0584] 97.体内诊断、检测或监测有需要的受试者中PTK7相关病症的方法,包括施用PTK7调节剂的步骤。

[0585] 98. 诊断、检测或监测有需要的受试者中PTK7相关病症的方法,包括使循环肿瘤细胞与PTK7调节剂接触的步骤。

[0586] 99. 实施方式98的方法,其中所述接触步骤在体内发生。

[0587] 100. 实施方式98的方法,其中所述接触步骤在体外发生。

序列表

<110> STEM CENTRX, INC.

<120> 新型调节剂及使用方法

<130> S69697 1030US.PCT

<140>

<141>

<150> PCT/US2011/050451

<151> 2011-09-02

<150> 61/444,614

<151> 2011-02-18

<160> 169

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4249

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

gcggcgcgcg gggactcgga ggtactgggc gcgcgcggct ccggctcggg acgcctcggg 60
acgcctcggg gtcgggctcc ggctgcggct gctgctgcgg cgcgcgcgct ccgggtgcgt 120
ccgcctcctg tgcccgccgc ggagcgcagt ctgcgcgccc gccgtgcgcc ctcagctcct 180
tttctgagc ccgcccgcat gggagctgcg cggggatccc cggccagacc ccgccggttg 240
cctctgctca gcgtcctgct gctgccgctg ctgggcggta cccagacagc cattgtcttc 300
atcaagcagc cgtcctccca ggatgcactg caggggcgcc gggcgctgct tcgctgtgag 360
gttgaggctc cgggcccggg acatgtgtac tggctgctcg atggggcccc tgtccaggac 420
acggagcggc gtttcgcccc gggcagcagc ctgagctttg cagctgtgga ccggctgcag 480
gactctggca ccttccagtg tgtggctcgg gatgatgtca ctggagaaga agcccgagct 540
gccaacgcct ccttcaacat caaatggatt gaggcaggct ctgtggtcct gaagcatcca 600
gcctcggaag ctgagatcca gccacagacc caggtcacac ttcgttgcca cattgatggg 660
caccctcggc ccacctacca atggttccga gatgggaccc ccctttctga tggtcagagc 720
aaccacacag tcagcagcaa ggagcgggaa ctgacgctcc ggccagctgg tcctgagcat 780
agtgggctgt attcctgctg cgcacacagt gcttttgccc aggcttgagc cagccagaac 840
ttcaccttga gcattgctga tgaaagcttt gccagggtgg tgctggcacc ccaggacgtg 900
gtagtagcga ggtatgagga ggccatgttc cattgccagt tctcagccca gccacccccg 960
agcctgcagt ggctctttga ggatgagact cccatcacta accgcagtcg cccccacac 1020
ctccgcagag ccacagtgtt tgccaacggg tctctgctgc tgaccaggt ccggccacgc 1080
aatgcaggga tctaccgctg cattggccag gggcagaggg gccacccat catectggaa 1140
gccacacttc acctagcaga gattgaagac atgccgtat ttgagccacg ggtgtttaca 1200
gctggcagcg aggagcgtgt gacctgcctt cccccaagg gtctgccaga gccagcgtg 1260

```

tggtgggagc	acgcgggagt	ccggctgccc	acccatggca	gggtctacca	gaagggccac	1320
gagctggtgt	tggccaatat	tgctgaaagt	gatgctgggt	tctacacctg	ccacgcggcc	1380
aacctggctg	gtcagcggag	acaggatgtc	aacatcactg	tggccactgt	gccctcctgg	1440
ctgaagaagc	cccaagacag	ccagctggag	gagggcaaac	ccggctactt	ggattgcctg	1500
acccaggcca	cacaaaaacc	tacagttgtc	tggtacagaa	accagatgct	catctcagag	1560
gactcacggt	tcgaggtctt	caagaatggg	accttgcgca	tcaacagcgt	ggaggtgtat	1620
gatgggacat	ggtaccgttg	tatgagcagc	accccagccg	gcagcatcga	ggcgcaagcc	1680
cgtgtccaag	tgctggaaaa	gctcaagttc	acaccaccac	cccagccaca	gcagtgcatt	1740
gagtttgaca	aggaggccac	ggtgccctgt	tcagccacag	gccgagagaa	gccactattt	1800
aagtgggaac	gggcagatgg	gagcagcctc	ccagagtggg	tgacagacaa	cgctgggacc	1860
ctgcattttg	cccgggtgac	tcgagatgac	gctggcaact	acacttgcat	tgccccaac	1920
gggccgcagg	gccagattcg	tgcccatgtc	cagctcactg	tggcagtttt	tatcaccttc	1980
aaagtggaac	cagagcgtac	gactgtgtac	cagggccaca	cagccctact	gcagtgcgag	2040
gcccaggggg	acccaagcc	gctgattcag	tggaaaggca	aggaccgat	cctggacccc	2100
accaagctgg	gaccaggat	gcacatcttc	cagaatggct	ccctggtgat	ccatgacgtg	2160
gcccctgagg	actcaggccg	ctacacctgc	attgcaggca	acagctgcaa	catcaagcac	2220
acggaggccc	ccctctatgt	cgtggacaag	cctgtgccgg	aggagtcgga	gggccctggc	2280
agccctcccc	cctacaagat	gatccagacc	attgggttgt	cggtgggtgc	cgctgtggcc	2340
tacatcattg	ccgtgctggg	cctcatgttc	tactgcaaga	agcgtgcaa	agccaagcgg	2400
ctgcagaagc	agcccagggg	cgaggagcca	gagatggaat	gcctcaacgg	tgggcctttg	2460
cagaacgggc	agccctcagc	agagatccaa	gaagaagtgg	ccttgaccag	cttgggctcc	2520
ggccccgcgg	ccaccaacaa	acgccacagc	acaagtgata	agatgcactt	cccacggtct	2580
agcctgcagc	ccatcaccac	gctggggaag	agtgagtttg	gggaggtgtt	cctggcaaag	2640
gctcagggct	tggaggaggg	agtggcagag	accctggtag	ttgtgaagag	cctgcagagc	2700
aaggatgagc	agcagcagct	ggacttccgg	agggagttag	agatgttttg	gaagctgaac	2760
cacgccaacg	tggtgcggct	cctggggctg	tgccgggagg	ctgagcccca	ctacatgggtg	2820
ctggaatatg	tggatctggg	agacctcaag	cagttcctga	ggatttccaa	gagcaaggat	2880
gaaaaattga	agtcacagcc	cctcagcacc	aagcagaagg	tggccctatg	caccaggtta	2940
gccctgggca	tggagcacct	gtccaacaac	cgctttgtgc	ataaggactt	ggctgcgcgt	3000
aactgcctgg	tcagtgccca	gagacaagtg	aaggtgtctg	ccctgggcct	cagcaaggat	3060
gtgtacaaca	gtgagtacta	ccacttccgc	caggcctggg	tgccgctgcg	ctggatgtcc	3120
cccaggcca	tcctggaggg	tgactttctt	accaagtctg	atgtctgggc	cttcgggtgtg	3180
ctgatgtggg	aagtgtttac	acatggagag	atgccccatg	gtgggcaggc	agatgatgaa	3240
gtactggcag	atttgacagg	tgggaagget	agaattcctc	agcccagggg	ctgcccttcc	3300
aaactctatc	ggctgatgca	gcgtgtctgg	gccctcagcc	ccaaggaccg	gccctccttc	3360
agtgagattg	ccagcgcctt	gggagacagc	accgtggaca	gcaagccgtg	aggaggagac	3420
ccgctcagga	tggcctgggc	aggggaggac	atctctagag	ggaagctcac	agcatgatgg	3480
gcaagatccc	tgctctcctg	ggccctgagg	cccctgcctt	agtgaacag	gcattgtctga	3540
ggtctgagca	gggcctggcc	tttctcctc	ttctcacc	tcctcctttg	ggaggctgac	3600

ttggacccaa actgggcgac tagggctttg agctgggcag ttttcctgc cacctcttcc 3660
 tctatcaggg acagtgtggg tgccacaggt aacccaatt tctggccttc aacttctccc 3720
 cttgaccggg tccaactctg ccactcatct gccaaacttg cctggggagg gctaggcttg 3780
 ggatgagctg ggtttgtggg gagttcctta atattctcaa gttctgggca cacagggtta 3840
 atgagtctct tggcccactg gtcccacttg ggggtctaga ccaggattat agaggacaca 3900
 gcaagtgagt cctccccact ctgggcttgt gcacactgac ccagaccac gtcttcccca 3960
 cccttctctc ctttctcat cctaagtgcc tggcagatga aggagttttc aggagctttt 4020
 gacactatat aaaccgccct tttgtatgc accacgggcg gcttttatat gtaattgcag 4080
 cgtgggggtg gtgggcatgg gaggtagggg tgggccttg agatgaggag ggtgggcat 4140
 ccttacccca cacttttatt gttgtcgttt tttgtttgtt ttgttttttt gtttttgttt 4200
 ttgtttttac actcgtcgtc ctcaataaat aagccttttt tacaacctg 4249

<210> 2

<211> 1070

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

180	185	190
Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys	Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln	
195	200	205
Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe		
210	215	220
Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu		
225	230	235
240		
Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu		
245	250	255
Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro		
260	265	270
Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu		
275	280	285
Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln		
290	295	300
Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala		
305	310	315
320		
Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly		
325	330	335
Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro		
340	345	350
Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg		
355	360	365
Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser		
370	375	380
Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg		
385	390	395
400		
Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys		
405	410	415
Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp		
420	425	430
Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn		
435	440	445
Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly		
450	455	460
Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg		
465	470	475
480		
Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val		
485	490	495

Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln		
500	505	510
Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly		
515	520	525
Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu		
530	535	540
Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val		
545	550	555
Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro		
565	570	575
Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile		
580	585	590
Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr		
595	600	605
Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln		
610	615	620
Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg		
625	630	635
Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro		
645	650	655
Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile		
660	665	670
Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu		
675	680	685
Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr		
690	695	700
Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu		
705	710	715
Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln		
725	730	735
Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly		
740	745	750
Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala		
755	760	765
Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser		
770	775	780
Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr		
785	790	795
Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln		

	805	810	815
Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu			
	820	825	830
Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu			
	835	840	845
Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu			
	850	855	860
Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu			
865	870	875	880
Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys			
	885	890	895
Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr			
	900	905	910
Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His			
	915	920	925
Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val			
	930	935	940
Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr			
945	950	955	960
Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu			
	965	970	975
Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe			
	980	985	990
Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly			
	995	1000	1005
Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys			
	1010	1015	1020
Ala Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg			
	1025	1030	1035
Leu Met Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser			
	1040	1045	1050
Phe Ser Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser Thr Val Asp Ser			
	1055	1060	1065
Lys Pro			
	1070		
<210> 3			
<211> 1070			
<212> PRT			
<213> 智人			

<400> 3

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

Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala			
305	310	315	320
Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly			
	325	330	335
Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro			
	340	345	350
Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg			
	355	360	365
Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser			
	370	375	380
Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg			
385	390	395	400
Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys			
	405	410	415
Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp			
	420	425	430
Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn			
	435	440	445
Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly			
450	455	460	
Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg			
465	470	475	480
Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val			
	485	490	495
Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln			
	500	505	510
Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly			
	515	520	525
Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu			
530	535	540	
Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val			
545	550	555	560
Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro			
	565	570	575
Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile			
	580	585	590
Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr			
	595	600	605
Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln			

610	615	620
Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg		
625	630	635
Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro		640
	645	650
Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile		655
	660	665
Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu		670
	675	680
Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr		685
	690	700
Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu		
705	710	715
Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln		720
	725	730
Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly		735
	740	745
Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala		750
	755	760
Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser		765
	770	775
Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr		780
	785	790
Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln		795
	805	810
Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu		815
	820	825
Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu		830
	835	840
Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu		845
	850	855
Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu		860
	865	870
Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys		875
	885	890
Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr		895
	900	905
Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His		910
	915	920
		925

Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val
 930 935 940
 Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr
 945 950 955 960
 Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu
 965 970 975
 Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe
 980 985 990
 Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly
 995 1000 1005
 Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys
 1010 1015 1020
 Ala Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg
 1025 1030 1035
 Leu Met Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser
 1040 1045 1050
 Phe Ser Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser Thr Val Asp Ser
 1055 1060 1065
 Lys Pro
 1070
 <210> 4
 <211> 1014
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4
 Met Gly Ala Ala Arg Gly Ser Pro Ala Arg Pro Arg Arg Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Gly Thr Gln Thr Ala Ile
 20 25 30
 Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly Arg Arg
 35 40 45
 Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His Val Tyr
 50 55 60
 Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg Phe Ala
 65 70 75 80
 Gln Gly Ser Ser Leu Ser Phe Ala Ala Val Asp Arg Leu Gln Asp Ser
 85 90 95
 Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Ala
 100 105 110

Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala Gly Pro		
115	120	125
Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro Gln Thr		
130	135	140
Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro Thr Tyr		
145	150	155
Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His		
	165	170
Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala Gly Pro		
	180	185
Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln		
	195	200
Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe		
	210	215
Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu		
225	230	235
Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu		
	245	250
Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro		
	260	265
Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu		
	275	280
Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln		
	290	295
Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala		
305	310	315
Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly		
	325	330
Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro		
	340	345
Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg		
	355	360
Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser		
	370	375
Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg		
385	390	395
Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys		
	405	410
Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp		

420	425	430
Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys	Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn	
435	440	445
Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly		
450	455	460
Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg		
465	470	475
Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val		
485	490	495
Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln		
500	505	510
Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly		
515	520	525
Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu		
530	535	540
Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val		
545	550	555
Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro		
565	570	575
Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile		
580	585	590
Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr		
595	600	605
Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln		
610	615	620
Trp Lys Asp Lys Pro Val Pro Glu Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro		
625	630	635
Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala		
645	650	655
Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys		
660	665	670
Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro		
675	680	685
Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser		
690	695	700
Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro		
705	710	715
Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro		
725	730	735

Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly		
740	745	750
Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu		
755	760	765
Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln		
770	775	780
Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala		
785	790	795
Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr		
805	810	815
Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg		
820	825	830
Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr		
835	840	845
Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His		
850	855	860
Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys		
865	870	875
Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser		
885	890	895
Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val		
900	905	910
Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser		
915	920	925
Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe		
930	935	940
Thr His Gly Glu Met Pro His Gly Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu		
945	950	955
Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys Ala Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys		
965	970	975
Pro Ser Lys Leu Tyr Arg Leu Met Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro		
980	985	990
Lys Asp Arg Pro Ser Phe Ser Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser		
995	1000	1005
Thr Val Asp Ser Lys Pro		
1010		
<210> 5		
<211> 1030		
<212> PRT		

<213> 智人

<400> 5

```

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

```

290	295	300
Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala		
305	310	315
Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly		320
	325	330
Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro		335
	340	345
Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg		350
	355	360
Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser		365
	370	380
Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg		
385	390	395
Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys		400
	405	410
Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp		415
	420	425
Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn		430
	435	440
Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly		445
	450	460
Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg		
465	470	475
Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val		480
	485	490
Gln Val Leu Asp Gly Ser Ser Leu Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala		495
	500	505
Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr		510
	515	520
Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val		525
	530	540
Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg		
545	550	555
Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln		560
	565	570
Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu		575
	580	585
Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser		590
	595	600
		605

Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys			
610	615	620	
Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr			
625	630	635	640
Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro			
	645	650	655
Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala			
	660	665	670
Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys			
	675	680	685
Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro			
	690	695	700
Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser			
705	710	715	720
Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro			
	725	730	735
Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro			
	740	745	750
Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly			
	755	760	765
Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu			
	770	775	780
Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln			
785	790	795	800
Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala			
	805	810	815
Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr			
	820	825	830
Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg			
	835	840	845
Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr			
	850	855	860
Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His			
865	870	875	880
Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys			
	885	890	895
Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser			
	900	905	910
Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val			

915	920	925
Pro Leu Arg Trp Met Ser	Pro Glu Ala Ile Leu	Glu Gly Asp Phe Ser
930	935	940
Thr Lys Ser Asp Val Trp	Ala Phe Gly Val Leu	Met Trp Glu Val Phe
945	950	955
Thr His Gly Glu Met Pro	His Gly Gly Gln Ala	Asp Asp Glu Val Leu
965	970	975
Ala Asp Leu Gln Ala Gly	Lys Ala Arg Leu Pro	Gln Pro Glu Gly Cys
980	985	990
Pro Ser Lys Leu Tyr Arg	Leu Met Gln Arg Cys	Trp Ala Leu Ser Pro
995	1000	1005
Lys Asp Arg Pro Ser Phe	Ser Glu Ile Ala Ser	Ala Leu Gly Asp
1010	1015	1020
Ser Thr Val Asp Ser Lys	Pro	
1025	1030	
<210> 6		
<211> 940		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 6		
Met Gly Ala Ala Arg Gly	Ser Pro Ala Arg Pro	Arg Arg Leu Pro Leu
1	5	10
Leu Ser Val Leu Leu Leu	Pro Leu Leu Gly Gly	Thr Gln Thr Ala Ile
20	25	30
Val Phe Ile Lys Gln Pro	Ser Ser Gln Asp Ala	Leu Gln Gly Arg Arg
35	40	45
Ala Leu Leu Arg Cys Glu	Val Glu Ala Pro Gly	Pro Val His Val Tyr
50	55	60
Trp Leu Leu Asp Gly Ala	Pro Val Gln Asp Thr	Glu Arg Arg Phe Ala
65	70	75
Gln Gly Ser Ser Leu Ser	Phe Ala Ala Val Asp	Arg Leu Gln Asp Ser
85	90	95
Gly Thr Phe Gln Cys Val	Ala Arg Asp Asp Val	Thr Gly Glu Glu Ala
100	105	110
Arg Ser Ala Asn Ala Ser	Phe Asn Ile Lys Trp	Ile Glu Ala Gly Pro
115	120	125
Val Val Leu Lys His Pro	Ala Ser Glu Ala Glu	Ile Gln Pro Gln Thr
130	135	140
Gln Val Thr Leu Arg Cys	His Ile Asp Gly His	Pro Arg Pro Thr Tyr

145	150	155	160
Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His			
	165	170	175
Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala Gly Pro			
	180	185	190
Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln			
	195	200	205
Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe			
	210	215	220
Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu			
225	230	235	240
Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu			
	245	250	255
Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro			
	260	265	270
Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu			
	275	280	285
Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln			
	290	295	300
Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala			
305	310	315	320
Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly			
	325	330	335
Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro			
	340	345	350
Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg			
	355	360	365
Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser			
	370	375	380
Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg			
385	390	395	400
Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Pro Glu			
	405	410	415
Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val Thr Arg			
	420	425	430
Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro Gln Gly			
	435	440	445
Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile Thr Phe			
450	455	460	

Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr Ala Leu			
465	470	475	480
Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln Trp Lys			
	485	490	495
Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg Met His			
	500	505	510
Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro Glu Asp			
	515	520	525
Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile Lys His			
	530	535	540
Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu Glu Ser			
545	550	555	560
Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr Ile Gly			
	565	570	575
Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu Gly Leu			
	580	585	590
Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln Lys Gln			
	595	600	605
Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly Pro Leu			
	610	615	620
Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala Leu Thr			
625	630	635	640
Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser Thr Ser			
	645	650	655
Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr Thr Leu			
	660	665	670
Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln Gly Leu			
	675	680	685
Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu Gln Ser			
	690	695	700
Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu Met Phe			
705	710	715	720
Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu Cys Arg			
	725	730	735
Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu Gly Asp			
	740	745	750
Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys Leu Lys			
	755	760	765
Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr Gln Val			

770	775	780
Ala Leu Gly Met Glu His	Leu Ser Asn Asn Arg Phe	Val His Lys Asp
785	790	795
Leu Ala Ala Arg Asn Cys	Leu Val Ser Ala Gln Arg	Gln Val Lys Val
805	810	815
Ser Ala Leu Gly Leu Ser	Lys Asp Val Tyr Asn Ser	Glu Tyr Tyr His
820	825	830
Phe Arg Gln Ala Trp Val	Pro Leu Arg Trp Met Ser	Pro Glu Ala Ile
835	840	845
Leu Glu Gly Asp Phe Ser	Thr Lys Ser Asp Val Trp	Ala Phe Gly Val
850	855	860
Leu Met Trp Glu Val Phe	Thr His Gly Glu Met Pro	His Gly Gly Gln
865	870	875
Ala Asp Asp Glu Val Leu	Ala Asp Leu Gln Ala Gly	Lys Ala Arg Leu
885	890	895
Pro Gln Pro Glu Gly Cys	Pro Ser Lys Leu Tyr Arg	Leu Met Gln Arg
900	905	910
Cys Trp Ala Leu Ser Pro	Lys Asp Arg Pro Ser Phe	Ser Glu Ile Ala
915	920	925
Ser Ala Leu Gly Asp Ser	Thr Val Asp Ser Lys Pro	
930	935	940

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的6xHis标签"

<400> 7

His His His His His His

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的8xHis标签"

<400> 8

His His His His His His His His

1 5

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 9

gccattgtct tcatcaagca gcc 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的引物"

<400> 10

ctggatcatc ttgtaggggg gag 23

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /note="未知的描述：基序肽"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2) .. (2)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> 任何氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7) .. (7)

<223> 任何氨基酸

<400> 11
Gly Xaa Gly Xaa Phe Gly Xaa Val
1 5
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /note="未知的描述：基序肽"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (7)
<223> 任何氨基酸
<400> 12
His Arg Asp Leu Xaa Xaa Xaa Asn
1 5
<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 未知
<220>
<221> 来源
<223> /note="未知的描述：基序肽"
<220>
<221> MOD_RES
<222> (6) .. (6)
<223> 任何氨基酸
<400> 13
Ser Asp Val Trp Ser Xaa Gly
1 5
<210> 14
<400> 14
000
<210> 15
<400> 15
000
<210> 16
<400> 16

000

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<400> 19

000

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gly Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Ser Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35	40	45
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Arg Ser Asn Ser Asn Glu Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Gly Lys Leu Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
100	105	110

Ala

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 22

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

<210> 23

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Pro Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35	40	45
Gly Ile Ile Ser Thr Tyr Tyr	Gly Asp Val Thr Asn Asn Pro Lys Phe	
50	55	60
Arg Gly Lys Ala Thr Met Thr	Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr	
65	70	75
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr	Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	80
85	90	95
Ala Arg Asn Asp Leu Phe Ala Tyr	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
100	105	110
Val Ser Ala		
115		
<210> 24		
<211> 94		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 24		
Leu Gly Gly Arg Val Thr Ile Thr	Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn	
1	5	10
Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln	Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu	
20	25	30
Leu Ile Ser Gly Ala Thr Thr	Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe	
35	40	45
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp	Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu	
50	55	60
Gln Thr Glu Asp Val Ala Thr Tyr	Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Ile	
65	70	75
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr	Lys Leu Glu Ile Lys Arg	80
85	90	
<210> 25		
<211> 123		
<212> PRT		
<213> Mus sp.		
<400> 25		
Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser	Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser	
1	5	10
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr	Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser	
20	25	30
Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg	Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu	
35	40	45

Trp Met Val Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Asp Ala Tyr Asp Val Arg Arg Ser Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 26

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

<210> 27

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 27

Gln Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Gln Pro Gly Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Val Ser Cys Lys Ala Thr Leu Glu Glu Gly Tyr Thr Phe Thr Val
 20 25 30
 Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp

35	40	45
Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys		
50	55	60
Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala		
65	70	75
Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg Gly Lys Leu His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
100	105	110

Ser Ala

<210> 28

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 28

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

Lys Arg

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 29

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Lys Asp		
20	25	30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Arg Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Tyr Asp Gly Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 30

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

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 32

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

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 33

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

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 34

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

<210> 35

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 35

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

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 36

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

<210> 37

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 37

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

Ser

<210> 38

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 38

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

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 39

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

<210> 40

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 40

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

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 41

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

<210> 42

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 42

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

<210> 43

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 43

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 44

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

100										105									
<210> 45																			
<211> 116																			
<212> PRT																			
<213> Mus sp.																			
<400> 45																			
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala				
1				5					10					15					
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Ser	Thr	Ser				
			20						25					30					
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile				
		35					40						45						
Gly	Arg	Ile	Tyr	Leu	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe				
	50					55					60								
Thr	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr				
65					70					75					80				
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Trp	Arg	Gly	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu				
			100					105					110						
Thr	Val	Ser	Ser																
			115																
<210> 46																			
<211> 113																			
<212> PRT																			
<213> Mus sp.																			
<400> 46																			
Asp	Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Val	Gly				
1				5					10					15					
Glu	Lys	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser				
			20						25					30					
Ser	Thr	Gln	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln				
		35					40					45							
Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val				
	50					55				60									
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr				
65					70					75					80				
Ile	Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln				
				85					90					95					

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 47

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 47

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

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 48

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Leu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Tyr
 65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 49

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

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

Asn Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 50

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 50

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn

65	70	75	80
Pro Val Glu Ala Asp	Asp Val Ala Thr Tyr	Tyr Cys Gln Gln Ser	Asn
	85	90	95
Glu Asp Pro Trp Thr	Phe Gly Gly Gly Thr	Lys Leu Glu Ile	Lys
	100	105	110

<210> 51

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 51

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

<210> 52

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 52

Asp Ile Ala Leu Thr	Gln Ser Pro Ala Ser	Leu Ala Val Ser	Leu Gly
1	5	10	15
Gln Arg Ala Thr Ile	Ser Cys Arg Ala Ser	Glu Ser Val Asp	Asn Ser
	20	25	30
Gly Ile Cys Phe Val	Asn Trp Phe Gln	Gln Lys Pro Gly	Gln Pro Pro
	35	40	45
Lys Leu Leu Ile Tyr	Ala Ala Ser Asn	Gln Gly Ser Gly	Val Pro Ala
	50	55	60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Met Glu Lys Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 53

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 53

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

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Thr Phe Asn Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His		
65	70	75
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp		
85	90	95
Glu Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 55

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

<210> 56

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 56

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ala Thr Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly		
1	5	10
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Thr		
20	25	30
Lys Gly Asp Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
35	40	45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 57

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 57

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

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 58

Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Ile Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 59

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 59

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

<210> 60

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 60

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

			20				25				30							
Gly	Asp	Gln	Lys	Asn	Cys	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln			
			35				40				45							
Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val			
			50				55				60							
Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr			
65							70				75				80			
Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn			
			85				90				95							
Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu			
			100				105				110							
Lys																		
<210> 61																		
<211> 120																		
<212> PRT																		
<213> Mus sp.																		
<400> 61																		
Glu	Ile	His	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly			
1			5				10				15							
Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr			
			20				25				30							
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val			
			35				40				45							
Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Leu	Val			
50							55				60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ala	Arg	Thr	Thr	Leu	Tyr			
65							70				75				80			
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys			
			85				90				95							
Ala	Arg	Thr	Ala	Arg	Ala	Ser	Asn	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln			
			100				105				110							
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
			115				120											
<210> 62																		
<211> 107																		
<212> PRT																		
<213> 人工序列																		
<220>																		
<221> 来源																		

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 62

```

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

```

<210> 63

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 63

```

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

```

115	120
<210> 64	
<211> 111	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"	
<400> 64	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr	
20 25 30	
Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	
35 40 45	
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala	
50 55 60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
65 70 75 80	
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn	
85 90 95	
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	
<210> 65	
<211> 119	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"	
<400> 65	
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
Ala Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe	
50 55 60	

<400> 67

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

<210> 68

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 68

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

<210> 69

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 69

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

<210> 70

<211> 434

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 70

Ala	Ile	Val	Phe	Ile	Lys	Gln	Pro	Ser	Ser	Gln	Asp	Ala	Leu	Gln	Gly
1				5						10				15	
Arg	Arg	Ala	Leu	Leu	Arg	Cys	Glu	Val	Glu	Ala	Pro	Gly	Pro	Val	His
			20					25					30		
Val	Tyr	Trp	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Pro	Val	Gln	Asp	Thr	Glu	Arg	Arg
			35				40					45			
Phe	Ala	Gln	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Val	Asp	Arg	Leu	Gln
			50				55					60			

Asp Ser Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu			
65	70	75	80
Glu Ala Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala			
	85	90	95
Gly Pro Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro			
	100	105	110
Gln Thr Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro			
	115	120	125
Thr Tyr Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser			
	130	135	140
Asn His Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala			
145	150	155	160
Gly Pro Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe			
	165	170	175
Gly Gln Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu			
	180	185	190
Ser Phe Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val His Pro			
	195	200	205
Val Arg Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly			
	210	215	220
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
225	230	235	240
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	245	250	255
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	260	265	270
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg			
	275	280	285
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	290	295	300
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
305	310	315	320
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	325	330	335
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	340	345	350
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	355	360	365
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met			

370	375	380
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
385	390	395
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		400
	405	410
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		415
	420	425
		430
Gly Lys		
<210> 71		
<211> 702		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"		
<400> 71		
Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu Glu Ala Met Phe His		
1	5	10
Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu Gln Trp Leu Phe Glu		
	20	25
Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro Pro His Leu Arg Arg		30
	35	40
Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu Thr Gln Val Arg Pro		45
50	55	60
Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln Gly Gln Arg Gly Pro		
65	70	75
Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala Glu Ile Glu Asp Met		
	85	90
Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly Ser Glu Glu Arg Val		95
	100	105
Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro Ser Val Trp Trp Glu		110
	115	120
His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg Val Tyr Gln Lys Gly		125
130	135	140
His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser Asp Ala Gly Val Tyr		
145	150	155
Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg Arg Gln Asp Val Asn		160
	165	170
Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys Lys Pro Gln Asp Ser		175

180	185	190
Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp Cys Leu Thr Gln Ala		
195	200	205
Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn Gln Met Leu Ile Ser		
210	215	220
Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn		
225	230	235
Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg Cys Met Ser Ser Thr		
245	250	255
Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val Gln Val Leu Glu Lys		
260	265	270
Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln Cys Met Glu Phe Asp		
275	280	285
Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly Arg Glu Lys Pro Thr		
290	295	300
Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu Pro Glu Trp Val Thr		
305	310	315
Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val Thr Arg Asp Asp Ala		
325	330	335
Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro Gln Gly Gln Ile Arg		
340	345	350
Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile Thr Phe Lys Val Glu		
355	360	365
Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr Ala Leu Leu Gln Cys		
370	375	380
Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln Trp Lys Gly Lys Asp		
385	390	395
Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg Met His Ile Phe Gln		
405	410	415
Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro Glu Asp Ser Gly Arg		
420	425	430
Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile Lys His Thr Glu Ala		
435	440	445
Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu Glu Ser Glu Gly Pro		
450	455	460
Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln His Pro Val Arg Ser Val		
465	470	475
Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe		
485	490	495

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro		
500	505	510
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val		
515	520	525
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr		
530	535	540
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val		
545	550	555
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		
565	570	575
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		
580	585	590
Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro		
595	600	605
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val		
610	615	620
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
625	630	635
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp		
645	650	655
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
660	665	670
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
675	680	685
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
690	695	700

<210> 72

<211> 708

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 72

Ala Ile Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly		
1	5	10
Arg Arg Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His		
20	25	30
Val Tyr Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg		

35					40					45						
Phe	Ala	Gln	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Val	Asp	Arg	Leu	Gln	
50					55					60						
Asp	Ser	Gly	Thr	Phe	Gln	Cys	Val	Ala	Arg	Asp	Asp	Val	Thr	Gly	Glu	
65					70					75					80	
Glu	Ala	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Ser	Phe	Asn	Ile	Lys	Trp	Ile	Glu	Ala	
85					90					95						
Gly	Pro	Val	Val	Leu	Lys	His	Pro	Ala	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Gln	Pro	
100					105					110						
Gln	Thr	Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	His	Ile	Asp	Gly	His	Pro	Arg	Pro	
115					120					125						
Thr	Tyr	Gln	Trp	Phe	Arg	Asp	Gly	Thr	Pro	Leu	Ser	Asp	Gly	Gln	Ser	
130					135					140						
Asn	His	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	Glu	Arg	Asn	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	Ala	
145					150					155					160	
Gly	Pro	Glu	His	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Cys	Cys	Ala	His	Ser	Ala	Phe	
165					170					175						
Gly	Gln	Ala	Cys	Ser	Ser	Gln	Asn	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ala	Asp	Glu	
180					185					190						
Ser	Phe	Ala	Arg	Val	Val	Leu	Ala	Pro	Gln	Asp	Val	Val	Val	Ala	Arg	
195					200					205						
Tyr	Glu	Glu	Ala	Met	Phe	His	Cys	Gln	Phe	Ser	Ala	Gln	Pro	Pro	Pro	
210					215					220						
Ser	Leu	Gln	Trp	Leu	Phe	Glu	Asp	Glu	Thr	Pro	Ile	Thr	Asn	Arg	Ser	
225					230					235					240	
Arg	Pro	Pro	His	Leu	Arg	Arg	Ala	Thr	Val	Phe	Ala	Asn	Gly	Ser	Leu	
245					250					255						
Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Arg	Pro	Arg	Asn	Ala	Gly	Ile	Tyr	Arg	Cys	Ile	
260					265					270						
Gly	Gln	Gly	Gln	Arg	Gly	Pro	Pro	Ile	Ile	Leu	Glu	Ala	Thr	Leu	His	
275					280					285						
Leu	Ala	Glu	Ile	Glu	Asp	Met	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Arg	Val	Phe	Thr	
290					295					300						
Ala	Gly	Ser	Glu	Glu	Arg	Val	Thr	Cys	Leu	Pro	Pro	Lys	Gly	Leu	Pro	
305					310					315					320	
Glu	Pro	Ser	Val	Trp	Trp	Glu	His	Ala	Gly	Val	Arg	Leu	Pro	Thr	His	
325					330					335						
Gly	Arg	Val	Tyr	Gln	Lys	Gly	His	Glu	Leu	Val	Leu	Ala	Asn	Ile	Ala	
340					345					350						

Glu Ser Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly		
355	360	365
Gln Arg Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp		
370	375	380
Leu Lys Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr		
385	390	395
Leu Asp Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr		
	405	410
Arg Asn Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys		
	420	425
Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp		
	435	440
Tyr Arg Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala		
	450	455
Arg Val Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro		
465	470	475
His Pro Val Arg Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val		
	485	490
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
	500	505
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
	515	520
His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
	530	535
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr		
545	550	555
Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn		
	565	570
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro		
	580	585
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	595	600
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
	610	615
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
625	630	635
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
	645	650
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
		655

660	665	670
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
675	680	685
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
690	695	700
Ser Pro Gly Lys		
705		
<210> 73		
<211> 429		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"		
<400> 73		
Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln Cys Met Glu Phe Asp Lys		
1 5 10 15		
Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly Arg Glu Lys Pro Thr Ile		
20 25 30		
Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu Pro Glu Trp Val Thr Asp		
35 40 45		
Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val Thr Arg Asp Asp Ala Gly		
50 55 60		
Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro Gln Gly Gln Ile Arg Ala		
65 70 75 80		
His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile Thr Phe Lys Val Glu Pro		
85 90 95		
Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr Ala Leu Leu Gln Cys Glu		
100 105 110		
Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln Trp Lys Gly Lys Asp Arg		
115 120 125		
Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg Met His Ile Phe Gln Asn		
130 135 140		
Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro Glu Asp Ser Gly Arg Tyr		
145 150 155 160		
Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile Lys His Thr Glu Ala Pro		
165 170 175		
Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu Glu Ser Glu Gly Pro Gly		
180 185 190		

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

<210> 74

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 74

Glu Glu Ala Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu

1	5	10	15
Ala Gly Pro Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln			
20	25	30	
Pro Gln Thr Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg			
35	40	45	
Pro Thr Tyr Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln			
50	55	60	
Ser Asn His Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro			
65	70	75	80
Ala Gly Pro Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala			
85	90	95	
Phe Gly Gln Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp			
100	105	110	
Glu Ser Phe Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala			
115	120	125	
Arg Tyr Glu Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro			
130	135	140	
Pro Ser Leu Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg			
145	150	155	160
Ser Arg Pro Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser			
165	170	175	
Leu Leu Leu Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys			
180	185	190	
Ile Gly Gln Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu			
195	200	205	
His Leu Ala Glu His Pro Val Arg Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro			
210	215	220	
Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
225	230	235	240
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
245	250	255	
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
260	265	270	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
275	280	285	
Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln			
290	295	300	
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
305	310	315	320

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro		
325	330	335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
340	345	350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
355	360	365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
370	375	380
Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
385	390	395
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
405	410	415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
420	425	430
Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	

<210> 75
 <211> 607
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> 来源
 <223> /note="人工序列的描述：合成的多肽"
 <400> 75

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

115	120	125
Thr Tyr Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser		
130	135	140
Asn His Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala		
145	150	155
Gly Pro Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe		
165	170	175
Gly Gln Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu		
180	185	190
Ser Phe Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg		
195	200	205
Tyr Glu Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro		
210	215	220
Ser Leu Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser		
225	230	235
Arg Pro Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu		
245	250	255
Leu Leu Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile		
260	265	270
Gly Gln Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His		
275	280	285
Leu Ala Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr		
290	295	300
Ala Gly Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro		
305	310	315
Glu Pro Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His		
325	330	335
Gly Arg Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala		
340	345	350
Glu Ser Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly		
355	360	365
Gln Arg Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala His Pro Val Arg Ser		
370	375	380
Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val		
385	390	395
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
405	410	415
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
420	425	430

Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
435							440					445			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser
450						455					460				
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
465					470					475					480
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				485					490					495	
Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			500					505					510		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		515					520					525			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
		530					535				540				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser
545					550					555					560
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				565					570					575	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			580					585					590		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		595					600					605			

<210> 76

<400> 76

000

<210> 77

<400> 77

000

<210> 78

<400> 78

000

<210> 79

<400> 79

000

<210> 80

<400> 80

000

<210> 81

<400> 81

000

<210> 82

<400> 82

000

<210> 83

<400> 83

000

<210> 84

<400> 84

000

<210> 85

<400> 85

000

<210> 86

<400> 86

000

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<400> 92

000

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000
<210> 95
<400> 95
000
<210> 96
<400> 96
000
<210> 97
<400> 97
000
<210> 98
<400> 98
000
<210> 99
<400> 99
000
<210> 100
<400> 100
000
<210> 101
<400> 101
000
<210> 102
<400> 102
000
<210> 103
<400> 103
000
<210> 104
<400> 104
000
<210> 105
<400> 105
000
<210> 106
<400> 106
000
<210> 107
<400> 107

000
<210> 108
<400> 108
000
<210> 109
<400> 109
000
<210> 110
<400> 110
000
<210> 111
<400> 111
000
<210> 112
<400> 112
000
<210> 113
<400> 113
000
<210> 114
<400> 114
000
<210> 115
<400> 115
000
<210> 116
<400> 116
000
<210> 117
<400> 117
000
<210> 118
<400> 118
000
<210> 119
<400> 119
000
<210> 120
<211> 336

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 120

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttttggca atagttttat gcaactgtac 120
cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa cctaggatcc 180
ggggtcacctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctgtggagg aggatgattc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttcctcgg 300
acgttcggtg gaggctccag gctggaaatc aaacgg 336

<210> 121

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 121

cagggtccaaa tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagctt 60
tcttgcaagg ctactggcta cacattcact ggctactgga ttgagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggctg ttctaactcc 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgctgata catcctccaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac aactgaggac tctgccatct attactgtgc aagagggaag 300
ctttcctggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 122

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 122

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcaac 60
gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag tctgggtatca acagaaaaca 120
gggcaatctc ctaaagcact gattcactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactetca ccctcagcaa tgtacagtct 240
gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcac tataacagct ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

<210> 123

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 123

cagggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggtctc agtgaagatt 60
tcttgcaagg gttctggcta cagattcact gattatccta tacactgggt gaagcagagt 120
catgcaaaga gtctagagtg gattggaatt attagtactt actatggtga tgttaccaac 180

aacccgaagt tcaggggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccac cacagcctat 240
 atggaacttg ccagactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aagaaatgat 300
 ctttttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

<210> 124

<211> 282

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 124

ctaggaggca gagtcacat tacttgcaag gcaagtgacc acattaataa ttggttagcc 60
 tggatatcagc agaaaccagg aaatgctcct aggetcttaa tatctggtgc taccactttg 120
 gaaactggggg ttccttcaag attcagtggc agtggatctg gaaaggatta cactctcagc 180
 ataaccagtc ttcagactga agatgttgct acttattact gtcaacagta ttggagtatt 240
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg 282

<210> 125

<211> 375

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 125

tctgatgtgc agcttcagga gtcgggacct ggcctggtga aacettetca gtctctgtcc 60
 ctcacctgca ctgtcactgg ctactcaatc accagtgatt atgcctggaa ctggatccgg 120
 cagtttccag gaaacaaact ggagtggatg ggctacataa gctacagtgg ttacactaac 180
 tacaacccat ctctcaaaag tcgaatctct atcactcgag acacatccaa gaaccagttc 240
 ttctgcagt tgatttctgt gactactgag gacacagcca catattactg tgcaagaggg 300
 gatgcttacg acgtccggag aagtacgtac tactttgact actggggcca aggcaccact 360
 ctcacagtct cctcg 375

<210> 126

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 126

gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtcgggtga ctccaggaga tagcgtcagt 60
 ctttcctgca gggccagcca aagtgttagc aacaacctac actggtatca acaaaaatca 120
 catgcgtctc caaggettct catcaagtat gettcccagt ccattctctgg gateccctcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttactctca gtatcaacag tgtggagact 240
 gaagattttg gaatgtatct ctgtcaacag agttacagct ggcctcggac gttecggtgga 300
 ggcaccaage tggaaatcaa acgg 324

<210> 127

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 127

cagctggagg agtcagggtgc tgagctgatg cagcctgggg cctcagtga ggtttcctgc 60
aaggccactg gctacacatt cactgtctac tggatagagt gggtaaaaca gaggcctgga 120
catggccttg aatggattgg agagatttta cctggaagtg gtagtactga ttacaatgag 180
aagttcaagg gcaaggccac attcactgca gattcactct ccaacacagc ctacatgcaa 240
ctcagcagcc tgacaactga ggactctgcc atctattact gtgcaagagg gaagcttcac 300
tggggccaag ggactctggt cacagtctct gca 333

<210> 128

<211> 341

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 128

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacggtggaa atcaacagaa ctccttgccc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc ttccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cgctcttacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatacttat 300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccgagctg gaaataaaac g 341

<210> 129

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 129

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cgattttagt aaagactgga tgagttgggt ccggcaggct 120
ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagccgtac gataaattat 180
gcaccatctc taaaggataa attcatcatc tccagagaga acgcaaaaaa tacgctgtac 240
ctgcaaatga gtaaagttag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagatgggat 300
tacgacgggtg gtatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcacctctc ctca 354

<210> 130

<211> 323

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 130

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgeat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gaacaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtccacaat gcaaacacct tagcagaagg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga ggatcaacag cctgcagcct 240

gaagatttttg ggagttatta ttgtcagcat cattatggta ttccgttcac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaagtaga acg 323
 <210> 131
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 131
 gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctcaggatt cgattttagt agatactgga tgagttgggt ccggcaggct 120
 ccagggaag ggctagaatg gattggagaa attaatecag atagcagtac gataaactat 180
 acgccatctc taaaggataa attcatcate tccagagaca acgcaaaaa tacgctgtac 240
 ctgcaaatga gcaaagttag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagaccggga 300
 tatggtaact tgtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354
 <210> 132
 <211> 334
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 132
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggaca gagagccact 60
 gtcttctgca gagccagcca gactgtcgat tataatggaa tgagttatat gcaactgttc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaacctc ctcatctatg ctgcatccaa cctagattct 180
 gggatccctg ccaggttcag tggcagtggt tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaagatgc tgcaacctat tactgtcagc aatgtattga ggatccgctc 300
 acgttcggtg ctgggaccat gctggaggtg aaac 334
 <210> 133
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> Mus sp.
 <400> 133
 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tacactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatectt tcagtgatgg tactaagttt 180
 actgagaagt tcaaaggcaa ggccctcactg acttcagaca aatcgtccag cacagcctac 240
 atggagctca acagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagaggt 300
 ccttattatt acggtaccgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
 tca 363
 <210> 134
 <211> 322
 <212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 134

cacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac agtaatttag catggtatca acagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtcaatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgtcatcg 180
aggttccgtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
gaagattttg ggagttatta ttgtcaacat ttttggatta ctccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaaagaaa ac 322

<210> 135

<211> 366

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 135

caggttcagc tccagcagtc aggggctgag ctgggaagac ctggggcttc agtgaaactg 60
tcttgcaagg attctggcta caccattact atctactgga tgcagtgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggggct atttatcctg gagatgggtga tactaggtac 180
cctcagaagt tcaagggcaa gtccacattg tctgcagata aatcctccaa cacagcctcc 240
atgcacctca gcagcttggc atctgatgac tctgcggtct attactgttc aagaggaggg 300
tcaaccaact atgattacga cggatttgct tactggggcc aagggactct ggctactgtc 360
tctgca 366

<210> 136

<211> 334

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 136

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gcactggttc 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa cctaggatcc 180
gggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctctggagg aggctgatac tgcaatgtat ttctgtcage agagtaagga ggttcctcgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac 334

<210> 137

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 137

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgaa ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
tcttgcaagg ctactggcta cacattcagt aactactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaaggggtag tactaactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata cttcctccaa cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagagggaaa 300
 caatactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctca 339

<210> 138

<211> 323

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 138

agtattgtgc tgacccagtc tctcaaattc ctgcttgtgt cagcaggaga cagggttacc 60
 atgacctgca aggccagtca gagtgtgact aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 120
 gggcagtctc ctaaactgct gatatactat gcatccaaac actacactgg agtccctgat 180
 cgcttcaactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa acg 323

<210> 139

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 139

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctagtgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
 tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaatecta gcaacggteg ttctaactac 180
 aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtct atttctgtgc acattactac 300
 gatggtagtt acgggttctt tgactattgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 140

<211> 334

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 140

gacattgtgc tgacacagtc tcttgettec ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctacct ctatttatat gcaactgtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaaetc ctcatcaagt atgcatcaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag aatcacccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatac tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtgg 300
 acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac 334

<210> 141

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 141

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaagtc 60
 tcctgtacag cctcaggatt cgatttttagt agatattgga tgagttgggt ccggcaggct 120
 ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac gataaactat 180
 acgccatctc tgaaggataa attcatcatc tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgtac 240
 ctgcaaatga gcaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagaccggga 300
 tatggtaacc tctttgttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 142

<211> 341

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 142

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggaa atccaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaagccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg 180
 ggatctggggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggaccgattt cactcttacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttactact gtcagaatga tcatactttt 300
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac g 341

<210> 143

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 143

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt aaagactgga tgagttgggt ccggcaggct 120
 ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag acagtagtac gataaactat 180
 gcaccagctc taaaggataa attcatcatc tccagagaga acgcaaaaaa tacgctgtac 240
 ctgcaaatga acaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagatgggtca 300
 actgggcttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 348

<210> 144

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 144

gatatccaga tgacacagac tccatcctcc ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcaattgca gggcaagtca gggcctcagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctactac gcatcaatat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcactg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcac cctggagcaa 240

gaggatattg gcacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtgga 300
ggcaccaaac tggaaatcaa c 321

<210> 145

<211> 348

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 145

caggttcaac tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta tccattcagt acctcctgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggaaagg gtcttgagtg gattggacgg atttatcttg gagatggaga tactaactac 180
aatgggaagt tcacgggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagtttac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct acttctgtgc aagatggagg 300
ggtgactacg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 348

<210> 146

<211> 340

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 146

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
ctgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca ctcaaaacaa ctacttggcc 120
tggtaccagc agacaccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac 340

<210> 147

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 147

tctgatgtgc agcttcagga gtcaggacct ggctctgtga aaccttctca gactctgtct 60
ctcacctgct ctgtccctga ctactccatc accagtgatt atcactggca ctggatcagg 120
cagtttccag gaaacaaaact ggagtggatg ggatacataa gctcaagggg tagtactaac 180
tacaacccat ctctcaaaaa tcgaatctcc atcactcatg acacatctga gaatcagttc 240
ttcctgaaat tgacttctgt gactactgag gactcagcca catattattg tgcaggcttg 300
tcccagttag ctcttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 148

<211> 322

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 148

gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtca ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggacaagat tattctctca ccatcagcag cctggactat 240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gtccggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa ac 322

<210> 149

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 149

caagttactc taaaagagtc tggccctggg atattgaage cctcacagac ctcagtcctg 60
acttgttctt tctctgggtt ttcaactgagc acttctaata tgggtgtagg ctggattcgt 120
cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtat 180
tataacccat ccctgaagag ccagctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggtc 240
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgaa gatactgcc a ttactactg tgttcgaagt 300
aactatgggtt acgcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 150

<211> 334

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 150

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggga gagggccacc 60
atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agctatggca aaagttttat gcactggtac 120
cagcagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcaac aaagtaatga ggatccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac 334

<210> 151

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 151

cagggtccagt tgcagcagtc tgggcctgag gtggtgagge ctggggtctc agtgaagatt 60
tcttgcaagg gtccggcta cacattcact gattatgctg tgcactgggt gaagctgagt 120
catgcaaaga gtctggagtg gattggagtt attagtactt acaatgatta tacatacaac 180
aaccaggatt ttaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctat 240
atggaacttg ccagattgac atctgaggat tctgcatct attactgtgc aagaggtaac 300

tectacttct atgctttgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 152

<211> 334

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 152

gacattgcgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 60
atttcctgca gagccagcga aagtgttgat aattctggca ttgttttgt gaactggttc 120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180
gggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctatggaga aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcage aaagtaagga ggttccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac 334

<210> 153

<211> 363

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 153

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgagcc ctgggacttc agtgaagctg 60
tcttgcaagg cttctggata caccttcaca ttctatggta taagctgggt gaagcagaaa 120
actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatcctg gaagttataa tgcttactac 180
aatgacaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca gatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct atttctgtgc cagagactat 300
ggtgaccctg attactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 154

<211> 334

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 154

gacattgtgc tgacacagtc tctgtcttcc ttaactgtgt ctctggggca gagggccacc 60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctacct ttaattatat gaactggtac 120
caacagaaac taggacagcc acccaaaactc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 180
gggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg agaggatat tgcaacatat tactgtcage acagttggga gattccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaac 334

<210> 155

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 155

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc ccagaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cgatttcagt agatactgga tgagttgggt ccggcaggct 120
ccagggaaag ggctagaatg gattggagaa attaatccag atagcagtac ggtaaactat 180
acgccatctc taaaggataa attcatcatc tccagagaca acgccaacaaa tacgctgtac 240
ctgcaaatga gtaaagttag atctgaggac acagcccttt attactgtgc aagaccggga 300
tatggtaacc tctttgttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 156

<211> 337

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 156

gatatttgtt tgactcagge tacacctctt gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catactaagg gcgacactta cttgtattgg 120
ttctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatata atcggatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgttttcac actgagaatc 240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatcca 300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaaac 337

<210> 157

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 157

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag tctgtgaggt caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcaccg cttctggcct caatatataa gactactata tgcactgggt gaacctgagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatgggtga tactgaatat 180
gccccggagt tccagggcaa ggccactatg actgcagaca catcttccaa cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtaa tgcttgcaac 300
tacggtagtg cctacggcta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 158

<211> 322

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 158

gaaacaactg tgaccagtc tccagcatcc ctgtccatgg ctataggaga aaaagtcacc 60
atcagatgca taaccaaacac tgatattgat gatgatatga actggtacca gcagaagcca 120
ggggaacctc ctaagctcct tatttcagaa ggcaatggtc ttcgtcctgg agtcccatcc 180
cgattctcca gcagtggcta tggcacagat tttgttttta caattgaaaa catgctctca 240
gaagatgttg cagattacta ctgtttgcaa agtgataact tgccctctcac gtccggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa ac 322

<210> 159

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 159

gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt agatactgga tgagttgggt ccggcaggct 120
ccagggaaaag gactagaatg gattggagat cttaatccag atagcagtgc gataaactat 180
acgccatctc taaaggataa attcatcate tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgtac 240
ctgcaaatga gcaaagtgag atctgaggac acagcccttt attactgtac actcattact 300
acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctctca 360

<210> 160

<211> 340

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 160

gacattgtga tgactcagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggagt gaaggtcact 60
atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggag atcaaaagaa ctgcttgact 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagccacct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac 340

<210> 161

<211> 360

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 161

gaaatacatc tgggtggagtc tgggggagge ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaagtc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aggtatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggt gtggtcgtta cacctactat 180
ccagaccttg tgaagggtcg attcaccate tccagagaca ttgccaggac caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaacagct 300
cgggcttcga attatgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctctca 360

<210> 162

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 162

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60
atcacttgca aggcgagtca ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120
gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggaacagat tttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggaaatcaa a 321
```

<210> 163

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 163

```
cagatcacct tgaaggagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60
acctgcacct tctctgggtt ctactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt 120
cagccccag gaaaggccct ggagtggctt gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180
tacagcccat ctctgaagag caggtccacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240
gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgttcgaagt 300
aactatgggtt acgcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca 360
```

<210> 164

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 164

```
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtga gagtgttgac agctatggca aaagttttat gcaactgtac 120
caacagaaac ctggccaggc tcccaggtc ctcatctata gggcatcaa cctggaatct 180
ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttactct caccatcagc 240
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333
```

<210> 165

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 165

```
caggctccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcaact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120
cccggaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180
aaccaggact tcaagggcag agtcaccatg accagggaca catccgcgag cacagcctac 240
atggagctga gcagactgag atctgaagac acggtgtgt attactgtgc gagaggtaac 300
tcctacttct atgctttgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357
```

<210> 166

<211> 337

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 166

```
gatattgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagcctcctg catactaaag gagacaccta tttgtattgg 120
ttcctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct atcgatgtc taatcgggcc 180
tccgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgta tgcaacatct agaatatcca 300
ttcacgttcg gccaggggac aaagttggaa atcaaac 337
```

<210> 167

<211> 355

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 167

```
cagggtcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcaaa gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcgacctg aaaatgggtga cacagaatac 180
gcaccggagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtaa tgcttgaac 300
```

tacggtagtg cctacggcta ctggggccaa ggcaccactc tcaccgtctc ctcag 355

<210> 168

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 168

gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60
atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120
ggagaagctg ctattctcct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtctctg aatcccacct 180
cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat ttacctca caattaataa catagaatct 240
gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgcctctcac gtteggctcg 300
gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 169

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /note="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 169

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg gatcggcgac ctaaaccag attcaagtgc gataaactat 180
gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact 300
acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

(SEQ ID NO: 1)

图 1A

(SEQ ID NO: 1) Cont.

ATTGGGTTGTGGGTGGGTGCCGCTGTGGCCTACATCAATGCGCTGCTGGGCCTCATGTTCTACTGCAAGA
AGCGCTGCAAAGCCAAGCGGCTGCAGAAGCAGCCCGAGGCGAGGAGCCAGAGATGGAATGCCTCAACGG
TGGGCCTTTGCAGAACGGGCAGCCCTCAGCAGAGATCCAAGAAGAAGTGGCCTTGACCAGCTTGGGCTCC
GGCCCCGGGGCCACCAACAAACGCCACAGCACAAAGTGATAAGATGCACCTCCACGGTCTAGCCTGCAGC
CCATCACCACGCTGGGAAGAGTGAGTTTGGGGAGGTGTTCCCTGGCAAAGGCTCAGGGCTTGGAGGAGGG
AGTGGCAGAGACCCCTGGTACTTGTGAAGAGCCTGCAGAGCAAGGATGAGCAGCAGCAGCTGGACTTCCGG
AGGGAGTTGGAGATGTTTGGGAAGCTGAACCACGCCAACGTGGTGGCGCTCCTGGGGCTGTGCCGGGAGG
CTGAGCCCCACTACATGGTGTCTGGAATATGTGGATCTGGGAGACCTCAAGCAGTTCCTGAGGATTTCAA
GAGCAAGGATGAAAAATTGAAGTCACAGCCCCCTCAGCACCAAGCAGAAGGTGGCCCTATGCCACCCAGTA
GCCCTGGGCATGGAGCACCTGTCCAACAACCGCTTTGTGCATAAGGACTTGGCTGGCGGTAACTGCCTGG
TCAGTGGCCAGAGACAAGTGAAGGTGTCTGCCCTGGGCCTCAGCAAGGATGTGTACAACAGTGAGTACTA
CCACTTCCGCCAGGCCTGGGTGCCGCTGGCGCTGGATGTCCCCGAGGCCATCCTGGAGGGTGACTTCTCT
ACCAAGTCTGATGTCTGGCCCTTCGGTGTGCTGATGTGGGAAGTGTTTACACATGGAGAGATGCCCCATG
GTGGGCAGGCAGATGATGAAGTACTGGCAGATTTCAGAGCTGGGAAGGCTAGACTTCCTCAGCCCCGAGGG
CTGCCCTTCCAAACTCTATCGGCTGATGCAGCCTGCTGGGCCCTCAGCCCCAAGGACCGGCCCTCCTTC
AGTGAGATTGCCAGCGCCCTGGGAGACAGCACCGTGGACAGCAAGCCGTGAGGAGGGAGCCCGCTCAGGA
TGGCCTGGGCAGGGGAGGACATCTCTAGAGGGAAGCTCACAGCATGATGGGCAAGATCCCTGTCTCTCTG
GGCCCTGAGGCCCCCTGCCCTAGTGCAACAGGCATTGCTGAGGTCTGAGCAGGGCCTGGCCTTTCCTCTCT
TTCCTCACCCCTCATCCTTTGGGAGGCTGACTTGGACCCAACTGGGCGACTAGGGCTTTGAGCTGGGCAG
TTTTCCTGCCACCTCTTCTCTATCAGGGACAGTGTGGGTGCCACAGGTAACCCCAATTTCTGGCCTTC
AACTTCTCCCTTGACCGGGTCCAACCTCTGCCACTCATCTGCCAACTTTGCCTGGGAGGGCTAGGCTTG
GGATGAGCTGGSTTTGTGGGGAGTTCCTTAATATTCTCAAGTTCTGGGCACACAGGCTTAATGAGTCTCT
TGGCCCACTGGTCCCACTTGGGGGTCTAGACCAGGATTATAGAGGACACAGCAAGTGAGTCTTCCCACT
CTGGGCTTGTGCACACTGACCCAGACCCAGTCTTCCCCACCTTCTCTCTCTTCTCTCATCCTAAGTGCC
TGGCAGATGAAGGAGTTTCAGGAGCTTTGACACTATATAAACCGCCCTTTTGTATGCACCACGGGGG
GCTTTTATATGTAATGCAGCGTGGGGTGGGTGGGCATGGGAGGTAGGGCTGGGCCCTGCAGATGAGGAG
GGTGGGCCATCCTTACCCACACTTTTATGTTGTCTCTTTTGTGTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTT
TTGTTTTTACACTCGCTGCTCTCAATAAATAAGCCTTTTACAACTG

图1A (续)

>gi|47938093|gb|AAH71557.1|PIK7 蛋白质磷酸激酶7[智人]

(SEQ ID NO:2)

MGAARGSPARPRRLPLLSVLLPLLLGGTQTAIVFIKQSSODALQGRRALLRCEVEAPGPVHVYWLLDGA
 PVQDTERFAQSSLSFAAVDRPQDSGTFOCVARDDVTGCEARSANASFNKIEWAGPVVLKHPASEAEI
 QPQTQVTLRCHIDGHPPTYQWFRDGTFLSDGOSNHTVSSKERNLTLRPAGPEHSGLYSCCAHSAFGQAC
 SSQFTLSIADESEFARVVLAPODVVVARVEEAMFHCQFSAQPPESLQWLFEDETPTNRSRPPHLRRATV
 FANGSLLLTQVRPNAGIYRCIGQCQGPPIILEATLHLAEIEDMPLEFPRVFTAGSEERVTCLPKGLP
 EPSVWMEHAGVRLPTHGRVYQKGHELVLANIAESDAGVYTCHAAANLAGORQDVNITVATVPESWLKKPQD
 SOLEEGKPGYLDCLTOATPKPTVVWYRNOMLISEDSEEFVKNGTLRINSVEVYDGTWYRCMSSTPAGSI
 EAQARVQVLEKLFPTPPQPOQCMEDKEATVPCSATGREKPTIKWERADGSSLPFWVTDNAGTLHFARV
 TRDDAGNYTCIASNGPQGIIRAHVQLTVAVFITFKVEPERTTVYQCHTALLQCEAQGDPKPLIQWKGKDR
 ILDPTKLGPMMHIFONGSLVIHDVAPEDSGRYTCIAGNSCNIKHTEAPLYVVDKFPVPEESECGSPPPYK
 MIQTIGLSVGAAYYIAVLGLMFYCKKRCIAKRLQKQPEGEPEMECLNGGPLQNGQPSAEIQEEVALT
 SLGSGPAATNKRHSTSDKMHFPRSSLPITTLGKSEFGEVFLAKAQGLEEGVAETLVLVKSLQSKDEQQQ
 LDFRRELEMEGKLNHANVVRLGLCREAEPHYMVLEYVDLGDLLKQFLRISKSKDEKLKSQLSTKQKVAL
 CTQVALGMEHLSNNRFVHKDLAARNCLVSAQRQVKVSALGLSKDVYNSEYHYERQAWVPLRWMSPEAILE
 GDFSTKSDVWAFGLMNEVFTHGEMPHGGQADDEVLDLQAGKARLPQPEGCPSKLYRLMQRWALSFKD
 RPSFSEIASALGDSTVDSKP

图1B

PTK7 同种型

信号肽		IG结构域 (1)	
iso a	MAAGGSPARERPRFLEWVLPFLGSGGTAIVFIKQPSQDALQ	STAGDDEGVTACGKJNIPK	70
iso d	MAAGGSPARERPRFLEWVLPFLGSGGTAIVFIKQPSQDALQ	STAGDDEGVTACGKJNIPK	
iso b	MAAGGSPARERPRFLEWVLPFLGSGGTAIVFIKQPSQDALQ	STAGDDEGVTACGKJNIPK	
iso c	MAAGGSPARERPRFLEWVLPFLGSGGTAIVFIKQPSQDALQ	STAGDDEGVTACGKJNIPK	
iso a	LDDEPRFAQSSGSSAAVVRDQSGGTRDDVTGEERARSANASFNIKWIEAGPVVLKHPASEAEI		140
iso d	LDDEPRFAQSSGSSAAVVRDQSGGTRDDVTGEERARSANASFNIKWIEAGPVVLKHPASEAEI		
iso b	LDDEPRFAQSSGSSAAVVRDQSGGTRDDVTGEERARSANASFNIKWIEAGPVVLKHPASEAEI		
iso c	LDDEPRFAQSSGSSAAVVRDQSGGTRDDVTGEERARSANASFNIKWIEAGPVVLKHPASEAEI		
IGcam结构域 (2)			
iso a	QPOTQVTLRCHIDGHPRTYQWFRDGTFLSDGQSNHTVSSKERNLTLRFAGPEHSGLYSCCAHSAFQGCAC		210
iso d	QPOTQVTLRCHIDGHPRTYQWFRDGTFLSDGQSNHTVSSKERNLTLRFAGPEHSGLYSCCAHSAFQGCAC		
iso b	QPOTQVTLRCHIDGHPRTYQWFRDGTFLSDGQSNHTVSSKERNLTLRFAGPEHSGLYSCCAHSAFQGCAC		
iso c	QPOTQVTLRCHIDGHPRTYQWFRDGTFLSDGQSNHTVSSKERNLTLRFAGPEHSGLYSCCAHSAFQGCAC		
IGcam结构域 (3)			
iso a	SSQNFTLSIADESFAFVVLAPQDVVVARVELAMFHCGFSAQPPPSLQWLFEDETPITNRSRPFHLRRATV		280
iso d	SSQNFTLSIADESFAFVVLAPQDVVVARVELAMFHCGFSAQPPPSLQWLFEDETPITNRSRPFHLRRATV		
iso b	SSQNFTLSIADESFAFVVLAPQDVVVARVELAMFHCGFSAQPPPSLQWLFEDETPITNRSRPFHLRRATV		
iso c	SSQNFTLSIADESFAFVVLAPQDVVVARVELAMFHCGFSAQPPPSLQWLFEDETPITNRSRPFHLRRATV		
IGcam结构域 (4)			
iso a	FANGSLLLTQVRPRNAGIYRCIGQGQGRGPFPIILEATLHLAEIEDMPLFEPFRVVTAGSEERVTCLEPKGLP		350
iso d	FANGSLLLTQVRPRNAGIYRCIGQGQGRGPFPIILEATLHLAEIEDMPLFEPFRVVTAGSEERVTCLEPKGLP		
iso b	FANGSLLLTQVRPRNAGIYRCIGQGQGRGPFPIILEATLHLAEIEDMPLFEPFRVVTAGSEERVTCLEPKGLP		
iso c	FANGSLLLTQVRPRNAGIYRCIGQGQGRGPFPIILEATLHLAEIEDMPLFEPFRVVTAGSEERVTCLEPKGLP		
iso a	EPFVWWEHAGVRLPTHGRVYQKGHELVLANIAESDAGVYTCHAAANLAGORRQDVNITVATVPSWLKFKQD		420
iso d	EPFVWWEHAGVRLPTHGRVYQKGHELVLANIAESDAGVYTCHAAANLAGORRQDVNITVATVPSWLKFKQD		
iso b	EPFVWWEHAGVRLPTHGRVYQKGHELVLANIAESDAGVYTCHAAANLAGORRQDVNITVATVPSWLKFKQD		
iso c	EPFVWWEHAGVRLPTHGRVYQKGHELVLANIAESDAGVYTCHAAANLAGORRQDVNITVATVPSWLKFKQD		
IGcam结构域 (5)			
iso a	SOLECKPGYLDCLTQATPKFTVWYRNQMLISEDGRFEVFNKNTLRINSVEVYDGTWYRCMSSTPAGSI		490
iso d	SOLECKPGYLDCLTQATPKFTVWYRNQMLISEDGRFEVFNKNTLRINSVEVYDGTWYRCMSSTPAGSI		
iso b	SOLECKPGYLDCLTQATPKFTVWYRNQMLISEDGRFEVFNKNTLRINSVEVYDGTWYRCMSSTPAGSI		
iso c	SOLECKPGYLDCLTQATPKFTVWYRNQMLISEDGRFEVFNKNTLRINSVEVYDGTWYRCMSSTPAGSI		
IGcam结构域 (6)			
iso a	EAQARVQVLEKLRFTFPFQFQDKEATVPCSATGREKPTLWERAQDSSLPFWVTDNAGTLNFAFV		560
iso d	EAQARVQVLEKLRFTFPFQFQDKEATVPCSATGREKPTLWERAQDSSLPFWVTDNAGTLNFAFV		
iso b	EAQARVQVL-----DSSLPFWVTDNAGTLNFAFV		
iso c	-----NGSSLPFWVTDNAGTLNFAFV		
IGcam结构域 (7)			
iso a	TRDDAGNYTCIASNGFQGGQIRAHVQLTVAVFITFKVSPERTTVYQGHATLQCEAQGDPKPLIQWKGRD		630
iso d	TRDDAGNYTCIASNGFQGGQIRAHVQLTVAVFITFKVSPERTTVYQGHATLQCEAQGDPKPLIQWK----		
iso b	TRDDAGNYTCIASNGFQGGQIRAHVQLTVAVFITFKVSPERTTVYQGHATLQCEAQGDPKPLIQWKGRD		
iso c	TRDDAGNYTCIASNGFQGGQIRAHVQLTVAVFITFKVSPERTTVYQGHATLQCEAQGDPKPLIQWKGRD		
iso a	ILDPTKLGRMHIFQNGSLVINDVAPEDSGRYTCIAGNSCNIKHTEAPLYVVDKFPVPESEGGPGSFPFYK		700
iso d	-----DKFPVPESEGGPGSFPFYK		
iso b	ILDPTKLGRMHIFQNGSLVINDVAPEDSGRYTCIAGNSCNIKHTEAPLYVVDKFPVPESEGGPGSFPFYK		
iso c	ILDPTKLGRMHIFQNGSLVINDVAPEDSGRYTCIAGNSCNIKHTEAPLYVVDKFPVPESEGGPGSFPFYK		

图1C

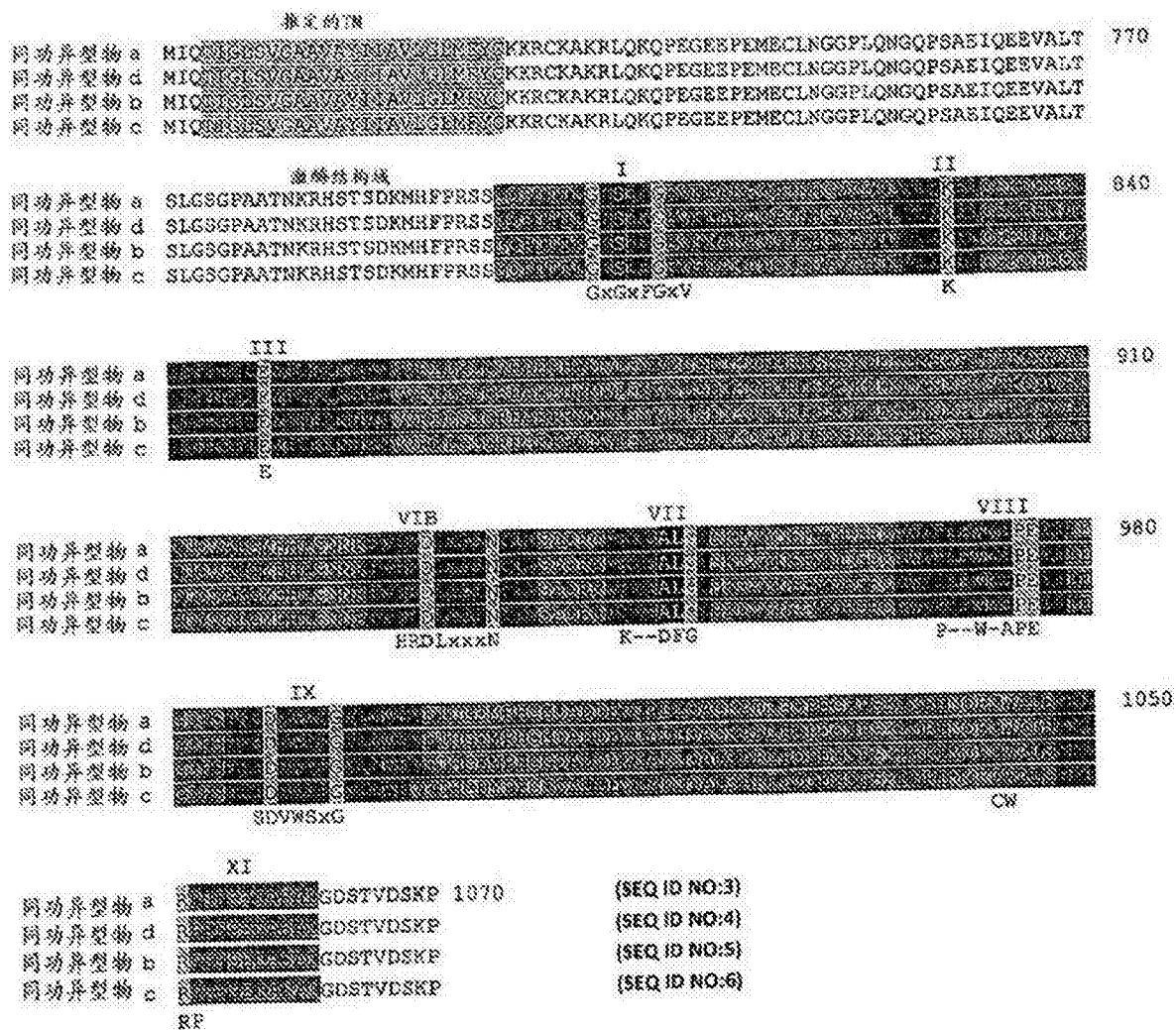


图1C(续)

PTK7基因表达在结肠直肠癌TPC中升高

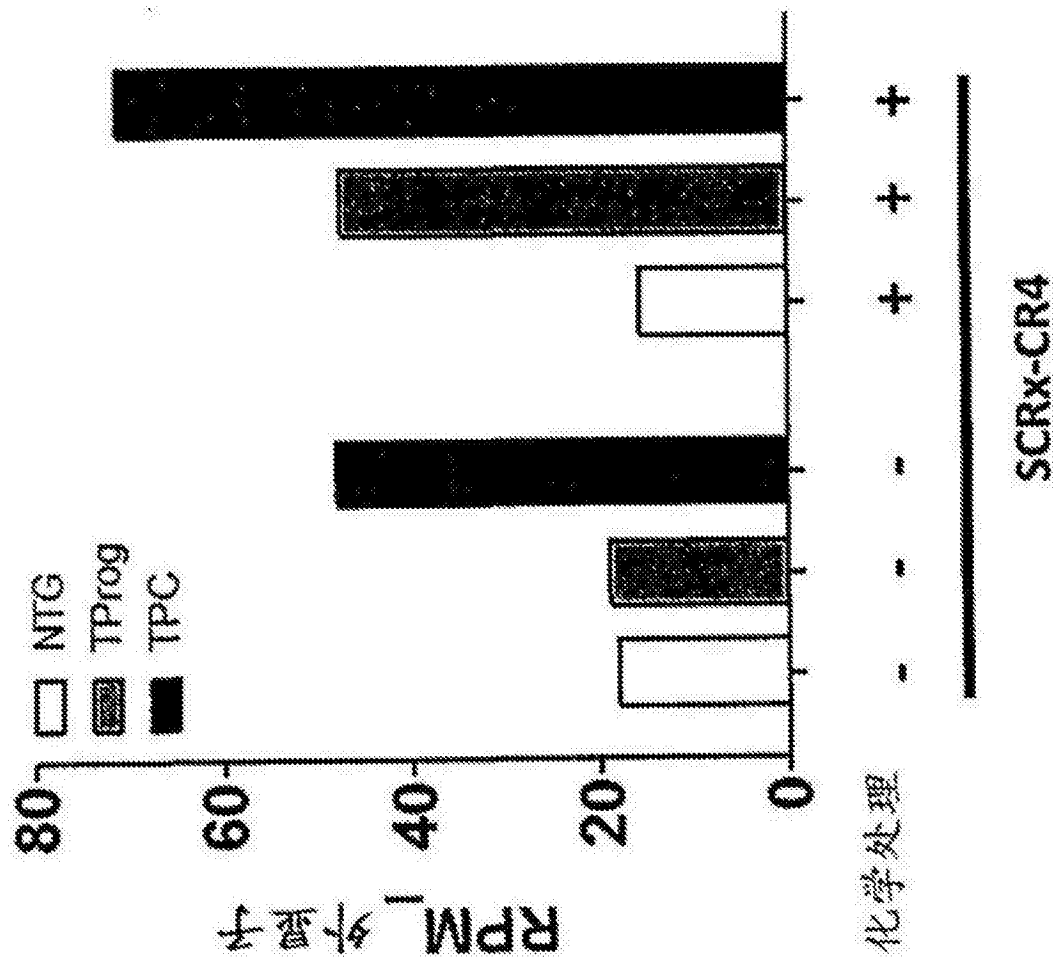


图2

Taqman PCR证实了PTK7在结肠直肠及胰腺TPC中过表达

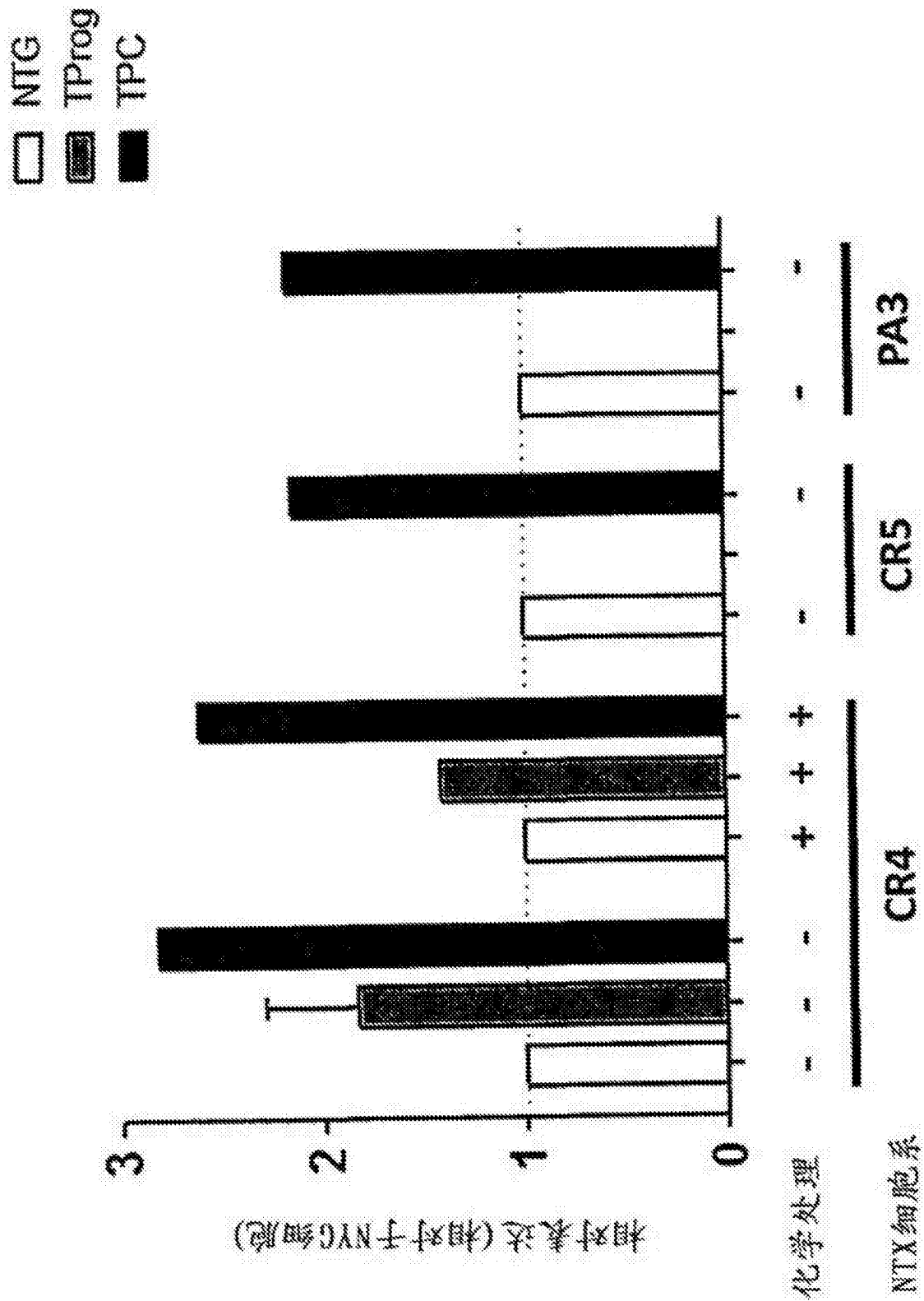


图3

Taqman PCR证实了在疾病的不同阶段,结肠直肠癌样本中升高的PTK7过表达

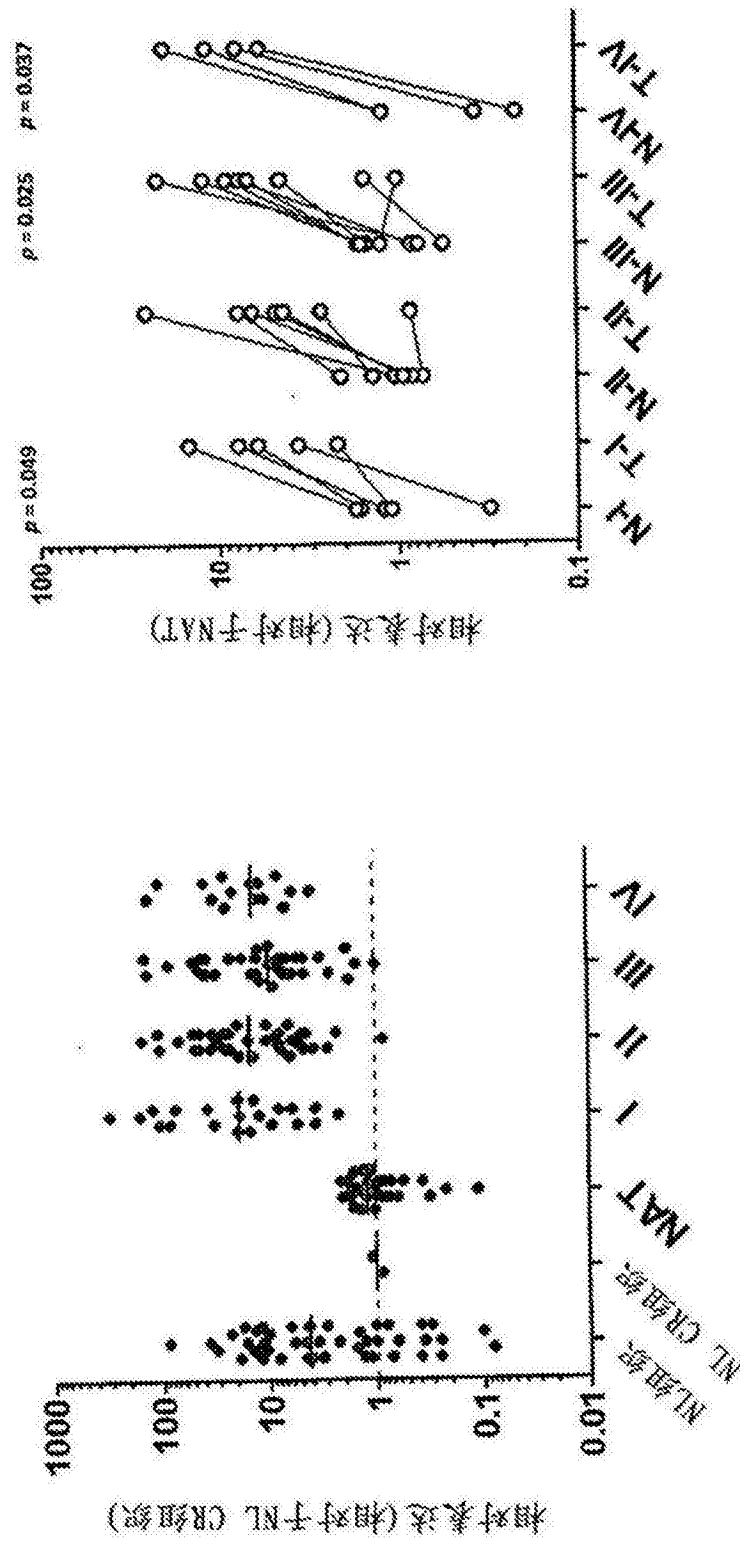


图 4A

图 4B

Taqman PCR表明PTK7在肾上腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肝癌及膀胱癌中过表达

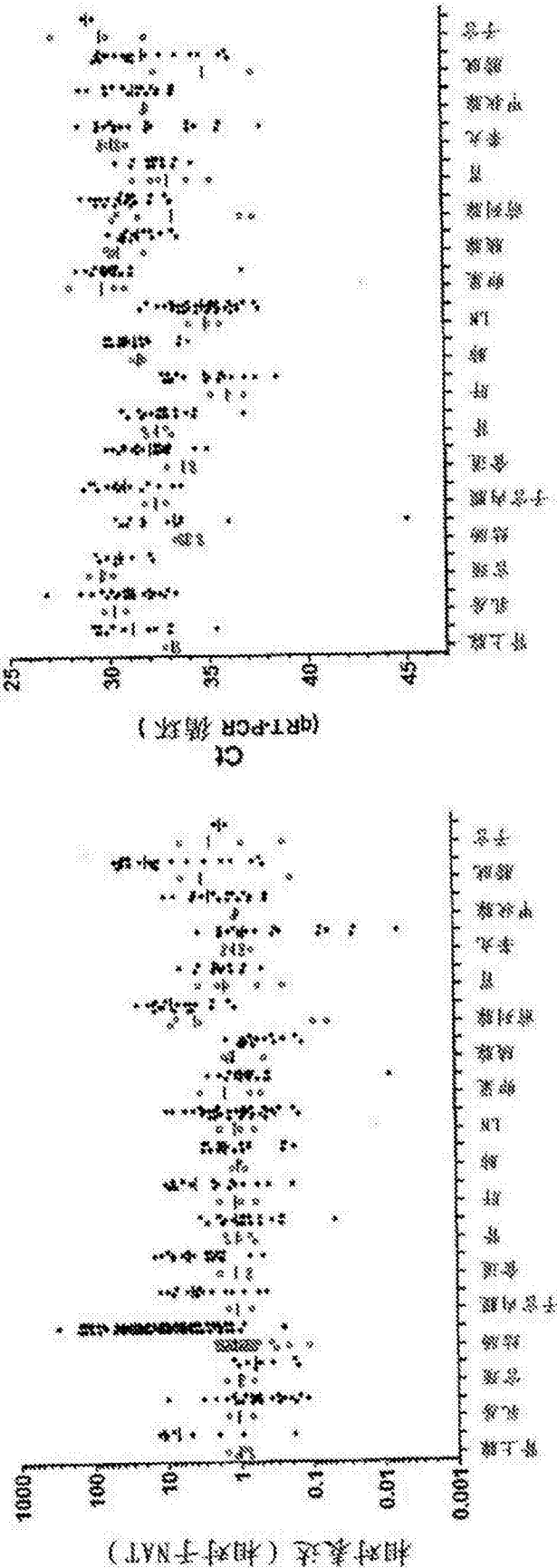


图 5B

图 5A

示例性鼠及人源化PTK7调节剂轻链可变区的蛋白质序列
鼠轻链可变区

mAb	FW1	CDRL1	FW2	CDRL2	FW3	CDRL3	SEQ ID NO
SC6.2.49	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	MHWYQDRFGQPRLLY	AASNLGS	GVPARFSSGSGTDFTLTHSRHPVEEDTAMHYTC	QDSERPRFTGGGSTRLEKR	20
SC6.10.2	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KASQVGVGN	VHWYQDRFGQPRLLY	SASRYVS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QMYNSRPYTFGGGSTRLEKR	22
SC6.4.1	LGGRVTHC	KASQVGVGN	LHWYQDRFGQPRLLY	GATTLFT	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSQTEEDVATTC	QDYWGBRPTFGGSTRLEKR	24
SC6.50.1	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KASQVGVGN	LHWYQDRFGQPRLLY	YASQSS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	26
SC6.3	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KSSQSLNDSGRQDMS	LHWYQDRFGQPRLLY	GASTRES	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QNDHTYPTFGGSTRLEKR	28
SC6.4	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RISNHTSLAWYQDRFGQPRLLY	LHWYQDRFGQPRLLY	NATLAE	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QHWYGPFTFGGSTRLEKR	30
SC6.6	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASQTVGVGN	MHWYQDRFGQPRLLY	AASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDCISDPLTFGGSTRLEKR	32
SC6.7	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	LHWYQDRFGQPRLLY	AATNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QHPWHTPTFGGSTRLEKR	34
SC6.13	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	MHWYQDRFGQPRLLY	AASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	36
SC6.14	SWTQGLFLVSAAGDRVTHC	KASQVGVGN	VHWYQDRFGQPRLLY	YASQSS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	38
SC6.15	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	MHWYQDRFGQPRLLY	YASQSS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	40
SC6.19	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KSSQSLNDSGRQDMS	LHWYQDRFGQPRLLY	GASTRES	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QNDHTYPTFGGSTRLEKR	42
SC6.20	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	LHWYQDRFGQPRLLY	YASQSS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	44
SC6.21	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KSSQSLNDSGRQDMS	LHWYQDRFGQPRLLY	WASTRES	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	46
SC6.23	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KASQVGVGN	LHWYQDRFGQPRLLY	RTHRLD	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	48
SC6.24	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	MHWYQDRFGQPRLLY	RASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	50
SC6.26	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	VHWYQDRFGQPRLLY	AASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	52
SC6.29	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	MHWYQDRFGQPRLLY	YASQSS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	54
SC6.41	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RSSQSLNDSGRQDMS	LHWYQDRFGQPRLLY	RASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	56
SC6.58	ETVITQSPASLSGLGRATSC	HTTQDQDD	MHWYQDRFGQPRLLY	WASTRES	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	58
SC6.59	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KSSQSLNDSGRQDMS	LHWYQDRFGQPRLLY	WASTRES	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	60

人源化的轻链可变区

mAb	FW1	CDRL1	FW2	CDRL2	FW3	CDRL3	SEQ ID NO
SC6.23	DVMTQSPASLSGLGRATSC	KASQVGVGN	LHWYQDRFGQPRLLY	RTNRLD	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	LQDSERPRFTGGGSTRLEKR	62
SC6.24	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RASEVDSYSGMF	MHWYQDRFGQPRLLY	RASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	64
SC6.41	DVMTQSPASLSGLGRATSC	RSSQSLNDSGRQDMS	LHWYQDRFGQPRLLY	RASNLGS	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	QDSYWBRPTFGGSTRLEKR	66
SC6.58	ETVITQSPASLSGLGRATSC	HTTQDQDD	MHWYQDRFGQPRLLY	WASTRES	GVPDRFTGGGSDTFTLTLSWVQSRDAAYTC	LQDSERPRFTGGGSTRLEKR	68

图6A

示例性鼠及人源化PTK7调节剂重链可变区的蛋白质序列
鼠重链可变区

seq ID NO	CDRH1	FR2	CDRH2	FR3	CDRH3	SEQ ID NO
306.2.35	QVQDAQDQDAEIMVQDAQDAVLSKAT	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSLQVQDSTLTQVSA	21
306.10.2	QVQDQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	STYTGSDV	THNPKFQKATNTDQKSTTATMELALTSQSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	23
306.4.1	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	STYTGSDV	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	25
306.10.1	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	STYTGSDV	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	27
306.3	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	29
306.4	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	31
306.8	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	33
306.7	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	35
306.13	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	37
306.14	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	39
306.15	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	41
306.19	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	43
306.20	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	45
306.21	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	47
306.23	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	49
306.24	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	51
306.28	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	53
306.29	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	55
306.41	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	57
306.58	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	59
306.59	EVKLLEGGGELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	61

人源化的重链可变区

seq ID NO	CDRH1	FR2	CDRH2	FR3	CDRH3	SEQ ID NO
306.23	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	63
306.34	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	65
306.41	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	67
306.58	QVQDAQDQDAELVQVQDAVLSKQKGS	IEVYKQDPQDALEWAGE	LPQSGDQD	QNVNDFKGAATFTADTQNTATMQLSSLTEDSAATTC	ARNSQIFAYQGGDTLTQVSA	69

图6B

所选PTK7调节剂的合并及交叉反应性分析

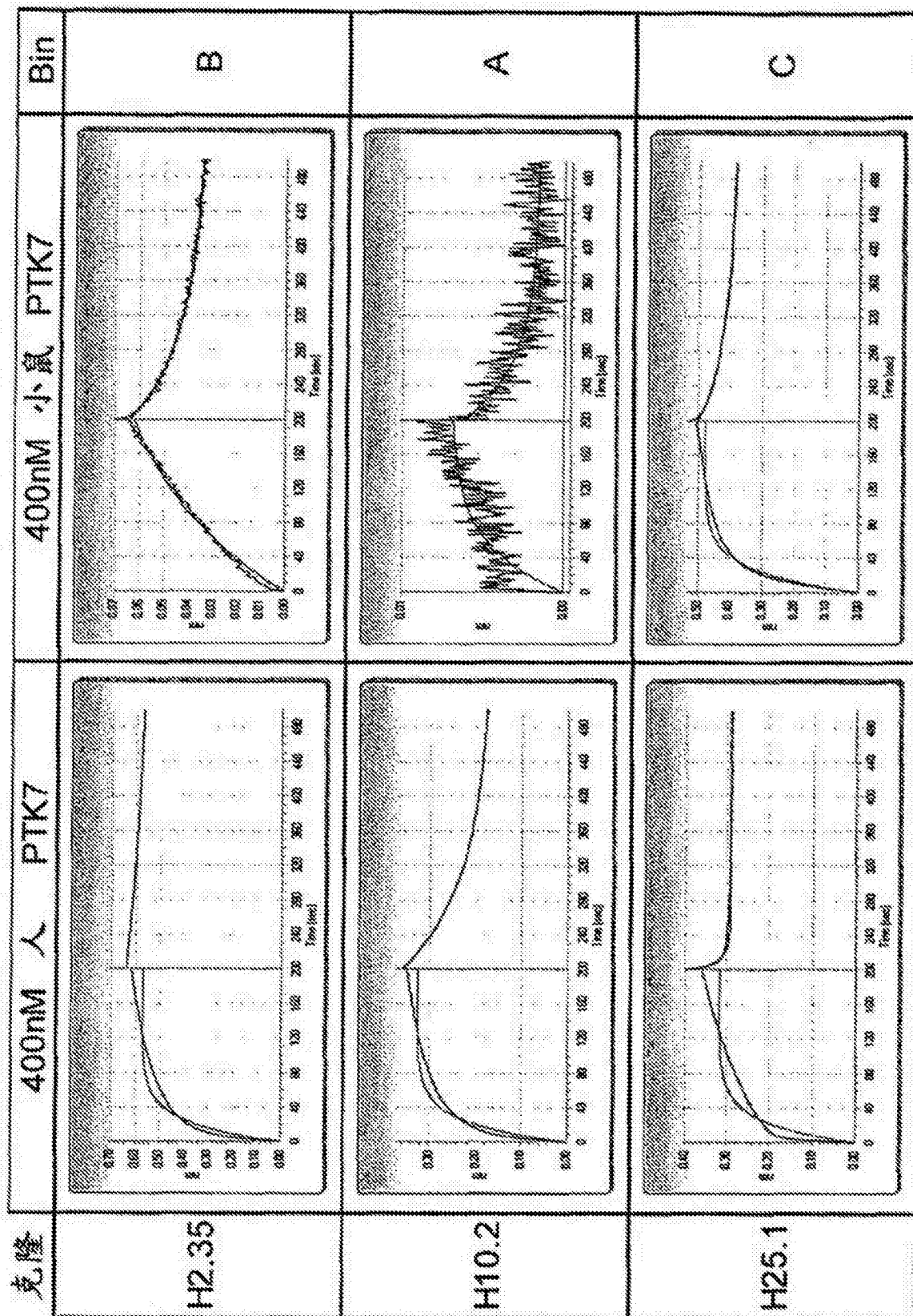


图7A

示例性PTK7调节剂特征

克隆	合并	亲和力 (nM)	Western 反应活性	猕猴 XR	小鼠 XR
SC6.2.35	B	<0.1 ^B	NR	Yes	No
SC6.10.2	A	5.6 ^B	ND	Yes	No
SC6.25.1	C	24 ^B	NR	Yes	Yes
SC6.18	D	2 ^F	ND	Yes	Yes
SC6.21	E	<0.1 ^F	ND	Yes	Yes
SC6.23	F	2.3 ^B	ND	Yes	Yes
SC6.24	A	0.6 ^B	ND	Yes	Yes
SC6.30	A	<0.1 ^F	ND	Yes	No
SC6.41	H	1.0 ^B	ND	Yes	Yes
SC6.55	A	2 ^F	ND	Yes	Yes
SC6.57	ND	0.2 ^F	ND	Yes	Yes
SC6.58	B	0.5 ^B	ND	Yes	Yes

B - Biacore
F - ForteBio

图7B

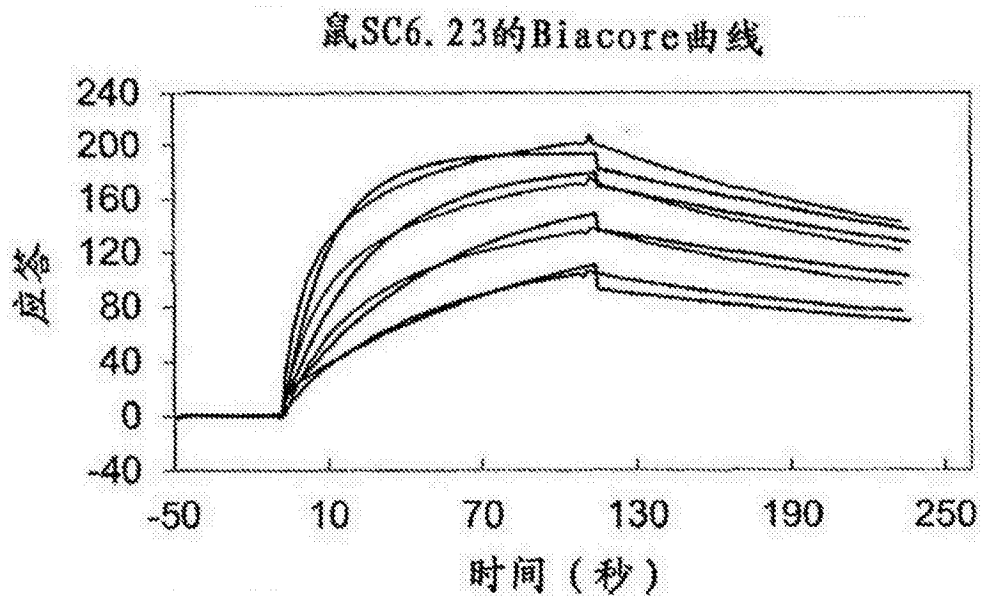


图7C

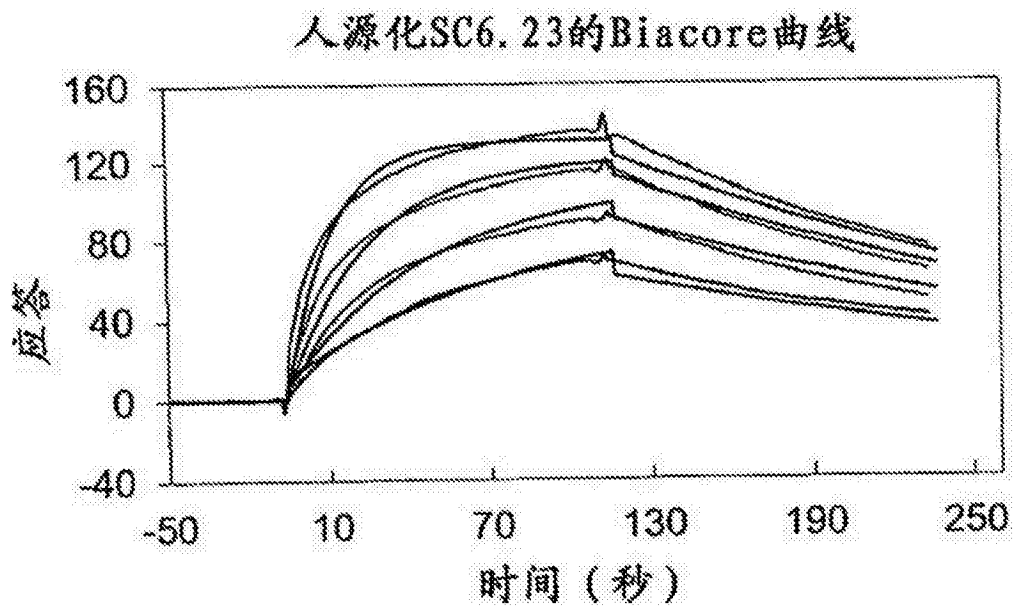


图7D

人克隆	合并	Hu Ag亲和力 (鼠mAb)	Hu Ag亲和力 (人mAb)
SC6.23	F	2.3 nM	3.9 nM
SC6.24	A	0.6 nM	1.2 nM
SC6.41	H	1.0 nM	2.1 nM
SC6.58	B	0.5 nM	1.0 nM

图7E

pEE12.4的翻译ScRx6 2个IgG: IgG2Fc (Ig结构域1及2)

(SEQ ID NO: 70)

```

1    AIVFIKQPSS QDALQGRRAL LRCEVEAPGP VHVYWLLDGA FVQDTERREA
51   QGSSLSFAAV DRLQDSGTFO CVARDDVTGE EARSANASFN IKWIEAGPVV
101  LKHPASEAEI QPQTQVTLRC HIDGHPRTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
151  KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNETLSIA DESFARVVLA
201  PQDVVVHPVR SVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
251  VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW
301  LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNOV
351  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPFMLDSGDS FFLYSKLTVD
401  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

```

图8A

pEE12.4的翻译ScRx6 IgG3至7 IgG2Fc(Ig结构域3至7)

(SEQ ID NO: 71)

```

1   APQDVVVARY EEAMFHCQFS AQPPPSLOWL FEDETPITNR SRPPHLRRAT
51  VFANGSLLLT QVRPRNAGIY RCIGQGQRGP PIILEATLHL AEIEDMPLFE
101 PRVFTAGSEE RVTCLPPKGL PEPSVWWEHA GVRLPHTGRV YQKGHELVLVLA
151 NIAESDAGVY TCHAANLAGQ RRQDVNITVA TVPSWLKKPQ DSQLEEGKPG
201 YLDCLTQATP KPTVVWYRNQ MLISEDSEFE VFKNGTLRIN SVEVDGTWY
251 RCMSSTPAGS IEAQARVQVL EKLKFTPPPQ PQQCMFEDKE ATVPCSATGR
301 EKPTIKWERA DGSSLPEWVT DNAGTLHFAR VTRDDAGNYT CIASNGPQGG
351 IRAHVQLTVA VFITFKVEPE RTTVYQGHTA LLQCEAQGDP KPLIQWKGKD
401 RILDPTKLGK RMHIFQNGSL VIHADVAPEDS GRYTICAGNS CNIKHTEAPL
451 YVVDKPVPEE SEGPGSPPPY KMIQHPVRSV ECPFPCAPPV AGPSVFLFPP
501 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
551 FNSTFRVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEXT ISKTGQPRE
601 PQVYTLPPSR EEMTKNOVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP
651 PMLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
701 GK*

```

图8B

pEE12.4 ScRx6 5个IgG: IgG2Fc (Ig结构域1及5)

(SEQ ID NO: 72)

```

1   AIVFIKQPSS QDALQGRRL LRCEVEAPGP VHVVWLLDGA PVQDTERRFA
51  QGSSLSFAAV DRLQDSGTFQ CVARDDVTGE EARSANASFN IKWIEAGPVV
101 LKHPASEAEI QPQTQVTLRC NIDGHFRPTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
151 KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNFTLSIA DESFARVVLA
201 PQDVVVARYE EAMFHCQFSA QPPPSLOWLF EDETPITNRS RPPHLRRATV
251 FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR CIGQGQRGPP IILEATLHLA EIEDMPLFEP
301 RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG VRLPHTGRVY QKGHELVLAN
351 IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDVNITVAT VPSWLKKPQD SQLEEGKPGY
401 LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSEFEV FKNGTLRINS VEVYDGTWYR
451 CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KKLKFTPPPQ HPVRSVECPP CPAPPVAGPS
501 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT
551 KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK
601 KGQPREPQVY TLFPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN
651 NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNNHYTQK
701 SLSLSPGK

```

图8C

pEE12.4的翻译ScRx6 IgG6及7 IgG2Fc(Ig结构域6及7)

(SEQ ID NO: 7)

```

1   KFTPPPQFPQ CMEFDKEATV PCSATGREKP TIKWERADGS SLPEWVTDNA
51  GTLHFARVTR DDAGNYTCIA SNGPQGQIRA HVQLTVAVFI TFKVEPERTT
101 VYQGH TALLO CEAQGDPKPL IQWK GKDRIL DPTKLGPRMH IFQNGSLVIH
151 DVAPEDSGRY TCIAGNSCNI KHTEAPLYVV DKPVPEESEG PGSPFPYKMI
201 QHPVRSVECP PCPAPPVAGP SVFLFPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH
251 EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TFRVVSVLTV VHQDWLNGKE
301 YKCKVSNKGL PAPIEKTISK TKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL
351 VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPML DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ
401 QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

```

图8D

pEE12.4的翻译ScRx6 IgG2及3 IgG2Fc(Ig结构域2及3)

(SEQ ID NO: 7)

```

1   EARSANASF NIKWIEAGPV VLKHPASEAE IQPQTQVTLR CHIDGHPRPT
51  YQWFRDGTPL SDGQSNHTVS SKERNLTLRP AGFEHSGLYS CCAHSAFGQA
101 CSSQNFTLSI ADES FARVVL APQDVVARY EEAMFHCQFS AQPPPSLQWL
151 FEDETPITNR SRPPLRRAT VFANGSLLL T QVRPRNAGIY RCIGQGQGRF
201 PIILEATLHL AEHPVRSVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPKPK KDTLMISRTPE
251 EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLTV
301 VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE
351 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY
401 SKLTVDKSRW QGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

图8E

pEE12.4的翻译ScRx6 4个IgG IgG2Fc(Ig结构域1至4)

(SEQ ID NO: 7)

1	AIVFIKQPSS	QDALQGRRAL	LRCEVEAPGP	VHVIWLLDGA	PVQDTERRFA
51	QGSSLSFAAV	DRLQDSGTFQ	CVARDDVTGE	EARSANASFN	IKWIEAGPVV
101	LKHPASEAEI	QPQTQVTLRC	HIDGHPRPTY	QWFRDGTPLS	DGQSNHTVSS
151	KERNLTLRPA	GPEHSGLYSC	CAHSAFGQAC	SSQNFTLSIA	DESFARVVLA
201	PQDVVVARYE	EAMFHCQFSA	QPPPSLQWLF	EDETPITNRS	RPPHLRRATV
251	FANGSLLLTO	VRPRNAGIYR	CIGQGQRGPP	IILEATLHLA	EIEDMPLFEP
301	RVFTAGSEER	VTCLPPKGLP	EPSVWWEHAG	VRLPTHGRVY	QKGHELVLAN
351	IAESDAGVYT	CHAANLAGQR	RQDVNITVAH	PVRSVECPPC	PAPPVAGPSV
401	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK
451	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	PIEKTISKTK
501	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN
551	YKTTTPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS
601	LSLSFGK				

图8F

阐明调节剂合并的PTK7蛋白质的图示

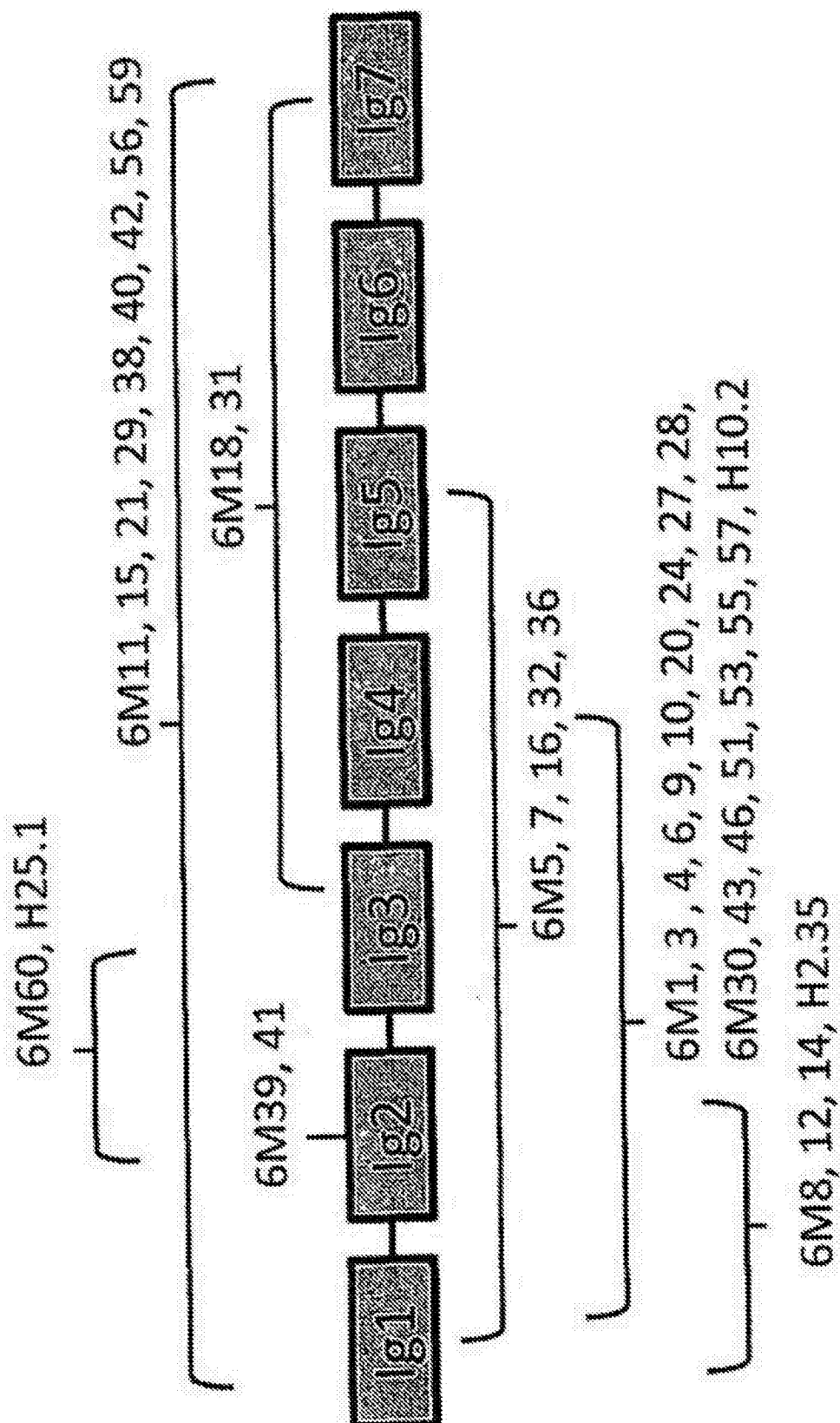


图8G

PTK7蛋白质表达在结肠直肠癌及胰腺肿瘤裂解物的亚组中升高了

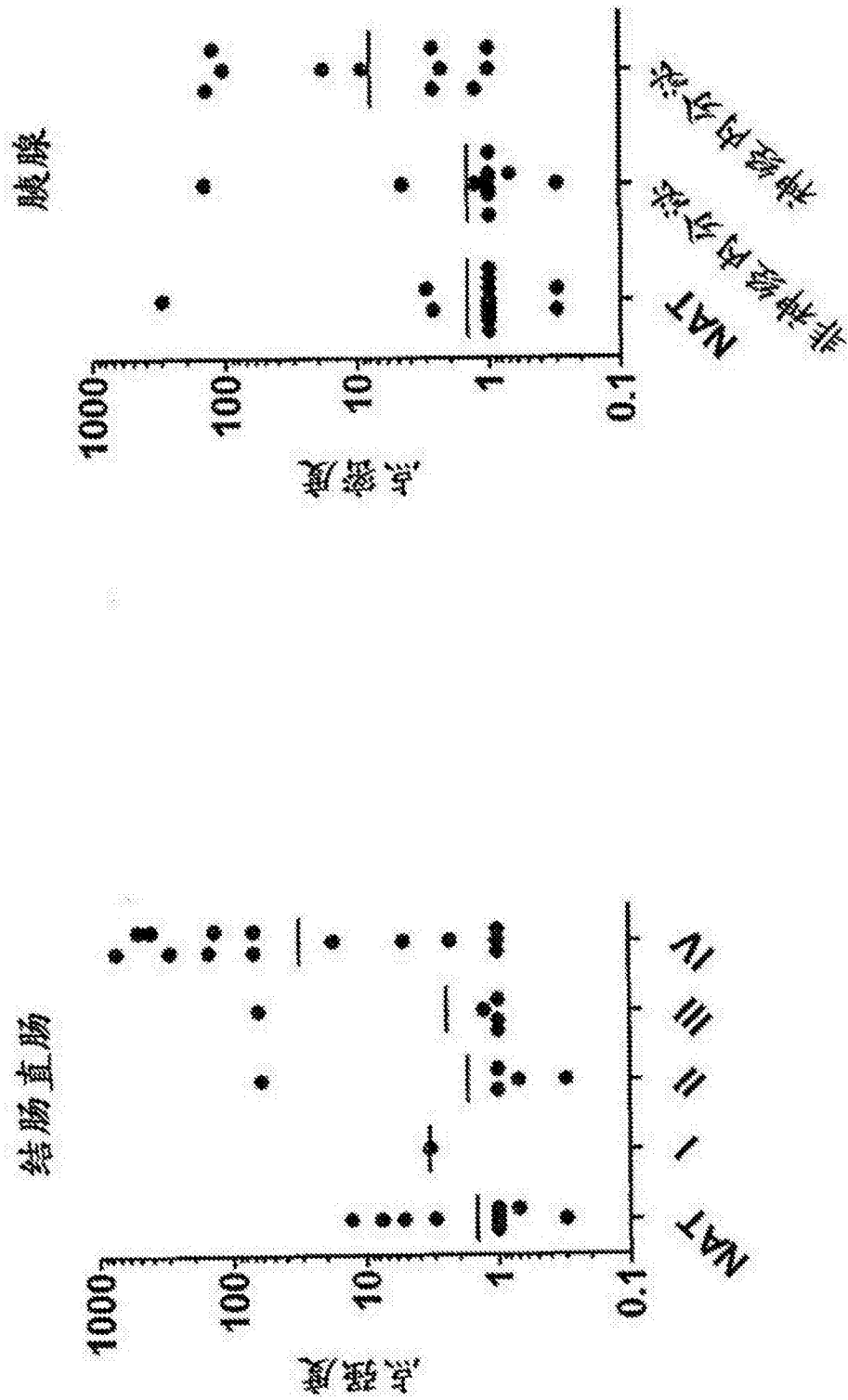


图9A

图9B

PTK7蛋白质表达在乳腺癌及卵巢癌肿瘤裂解物的亚组中升高了

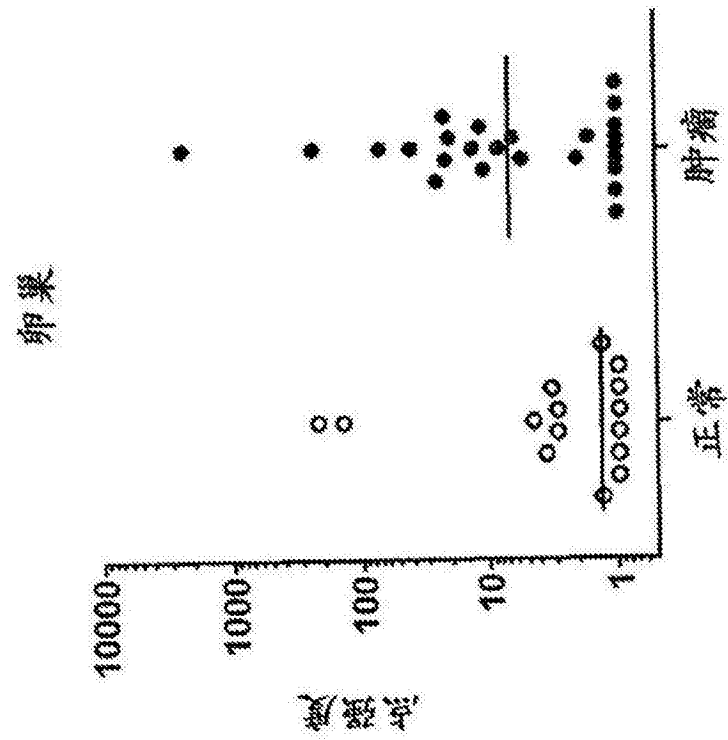


图9D

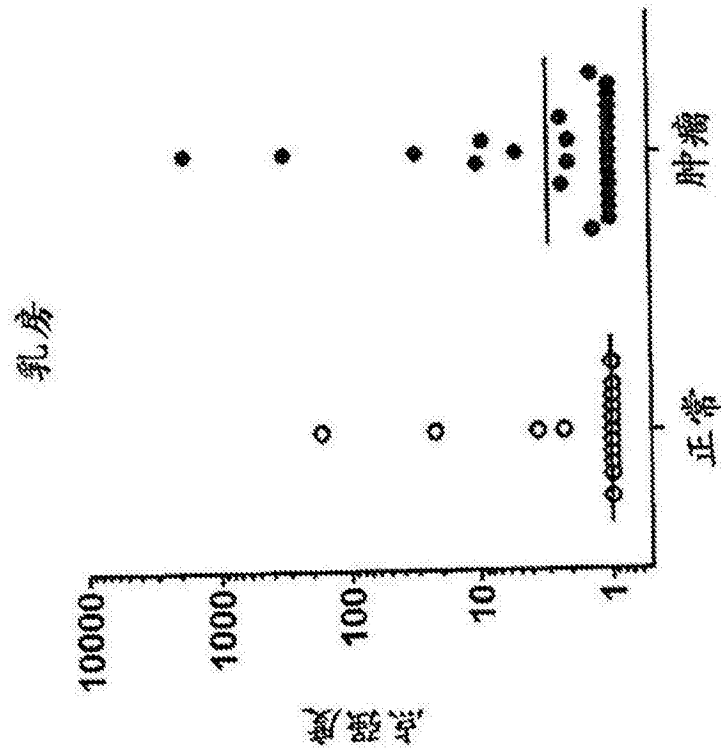


图9C

PTK7蛋白质表达在NTX样品中升高了

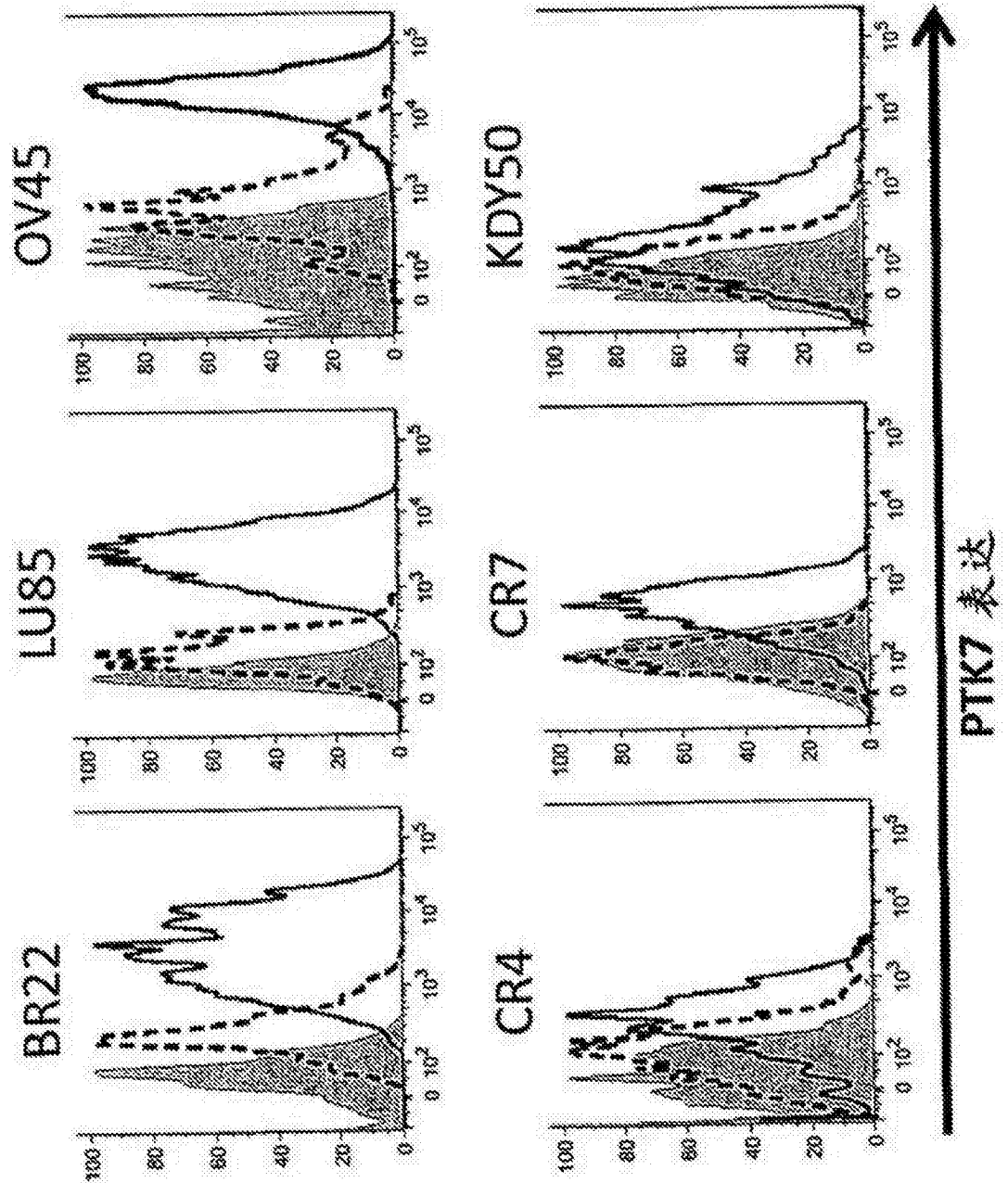


图9E

PTK7调节剂与K562细胞缔合且内化

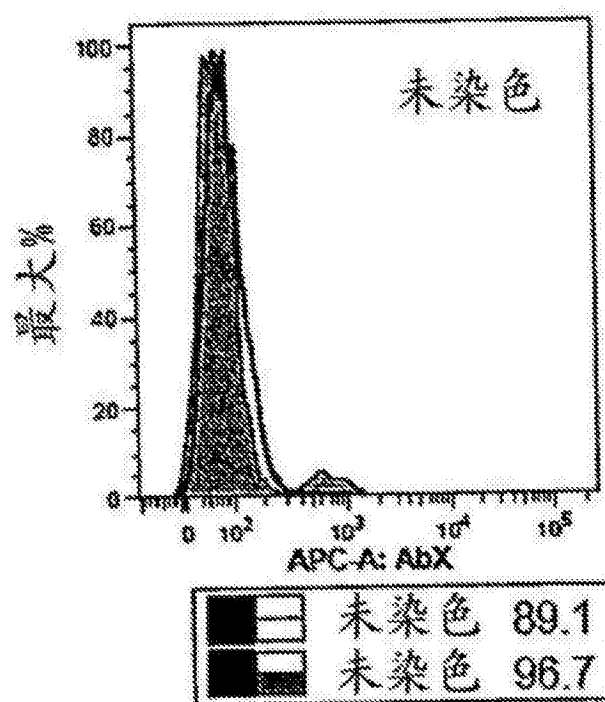


图 10A

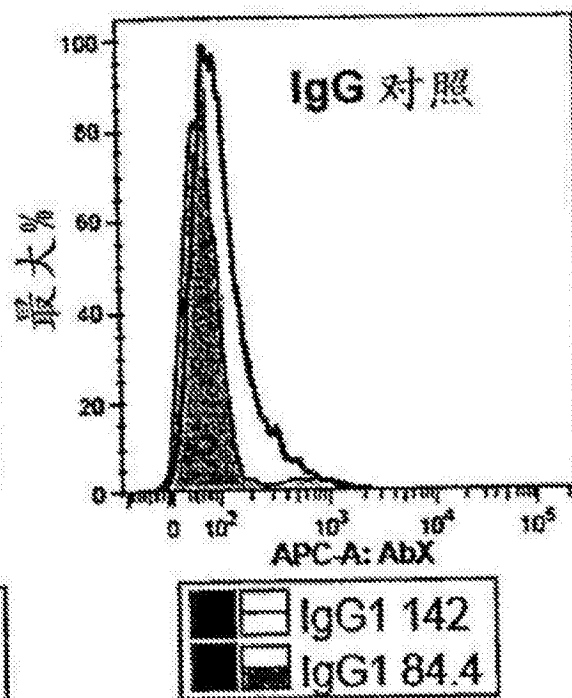


图 10B

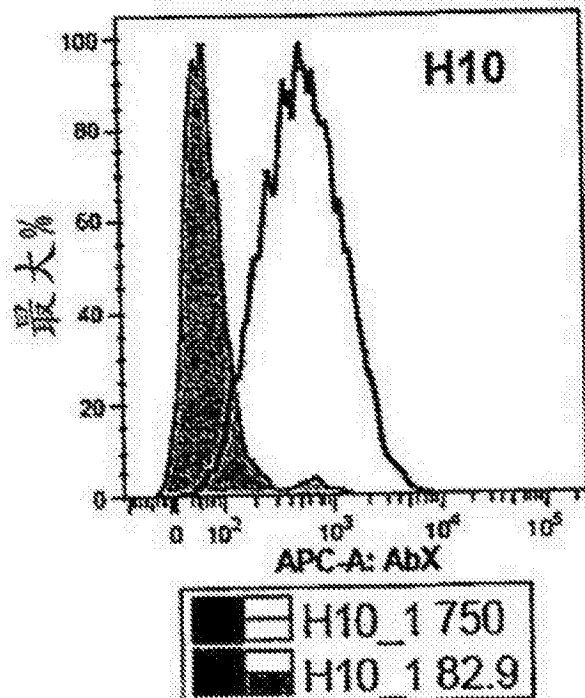


图 10C

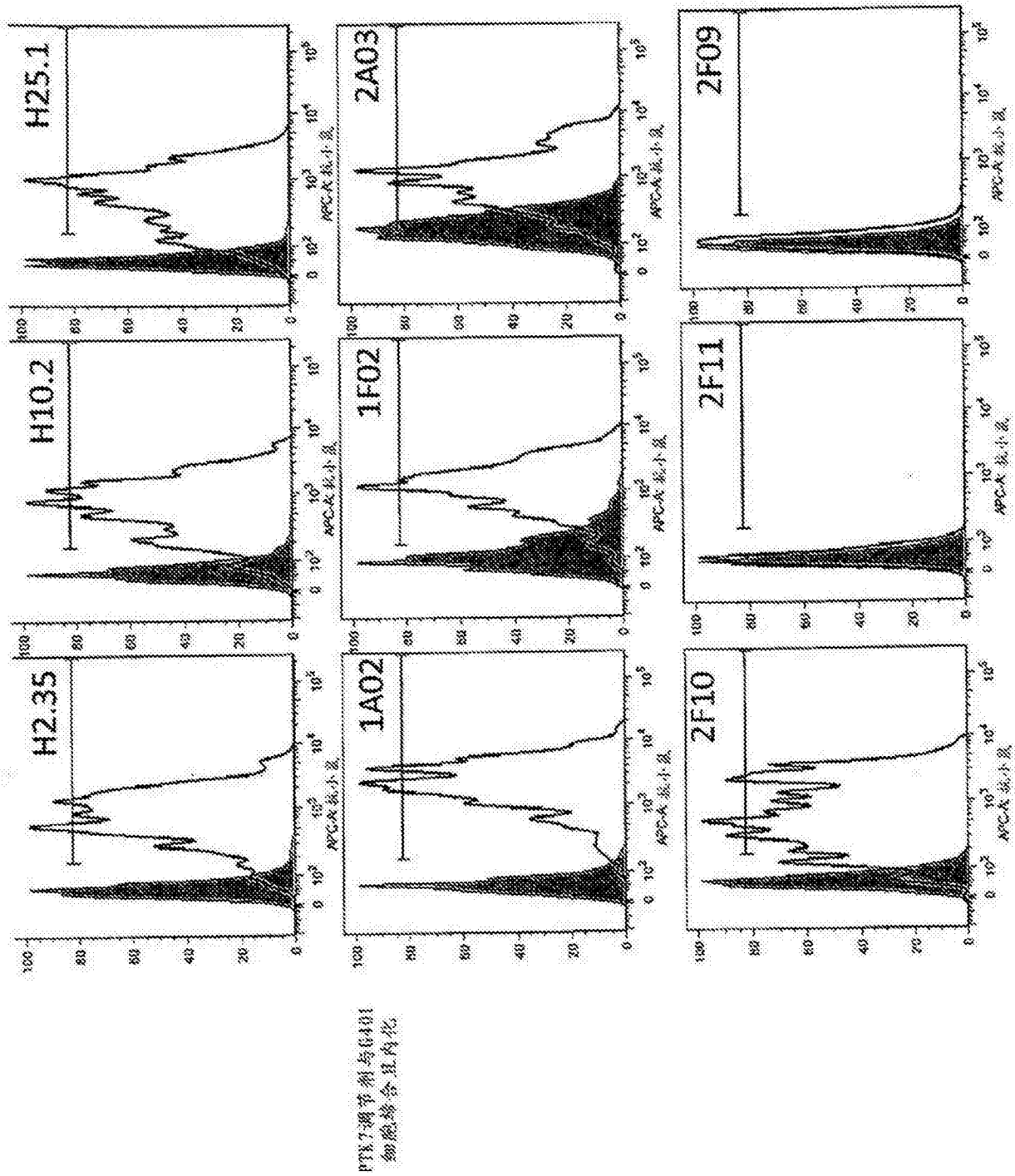


图10D

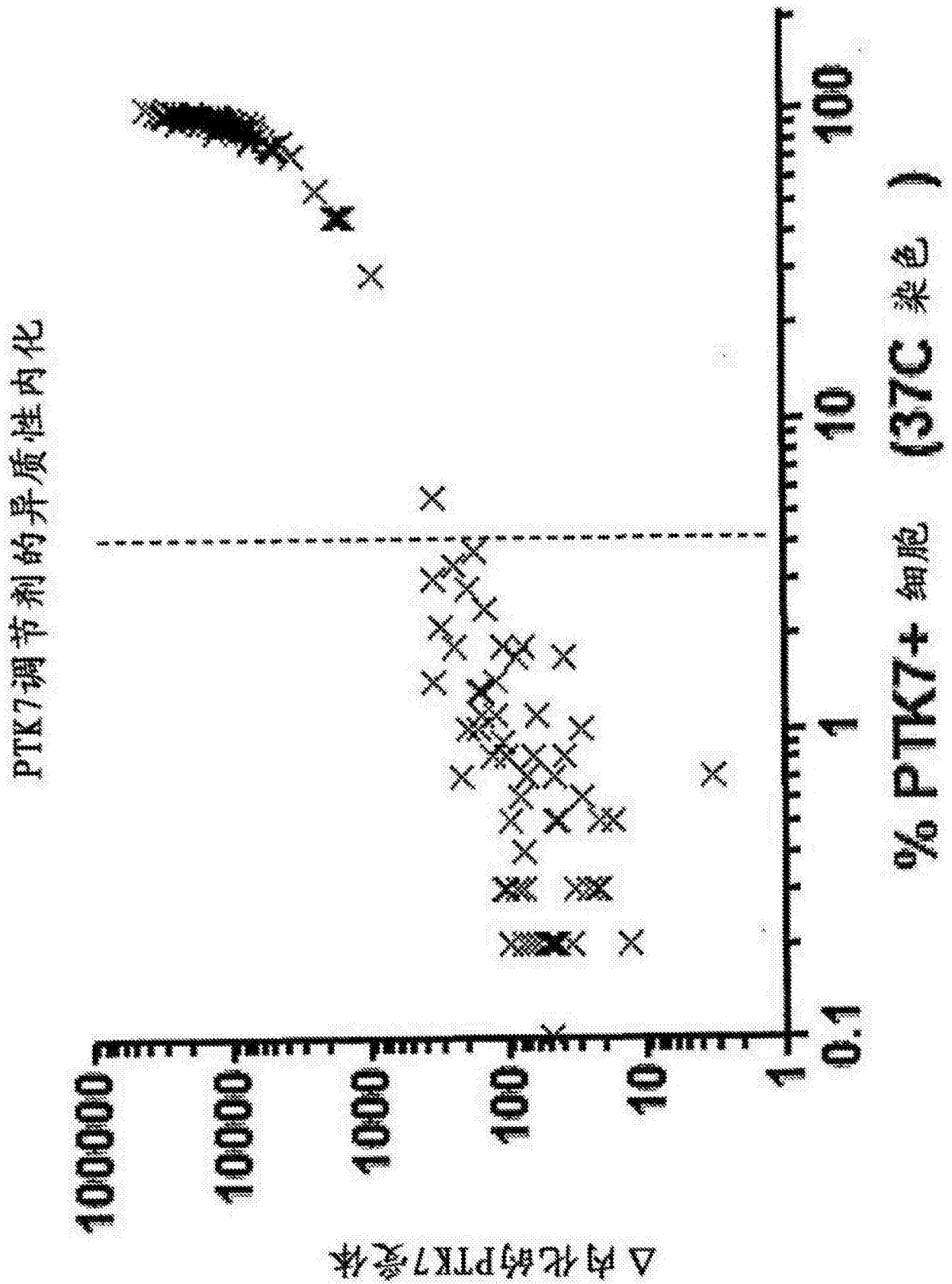


图10E

PTK7调节剂在体外介导毒素递送

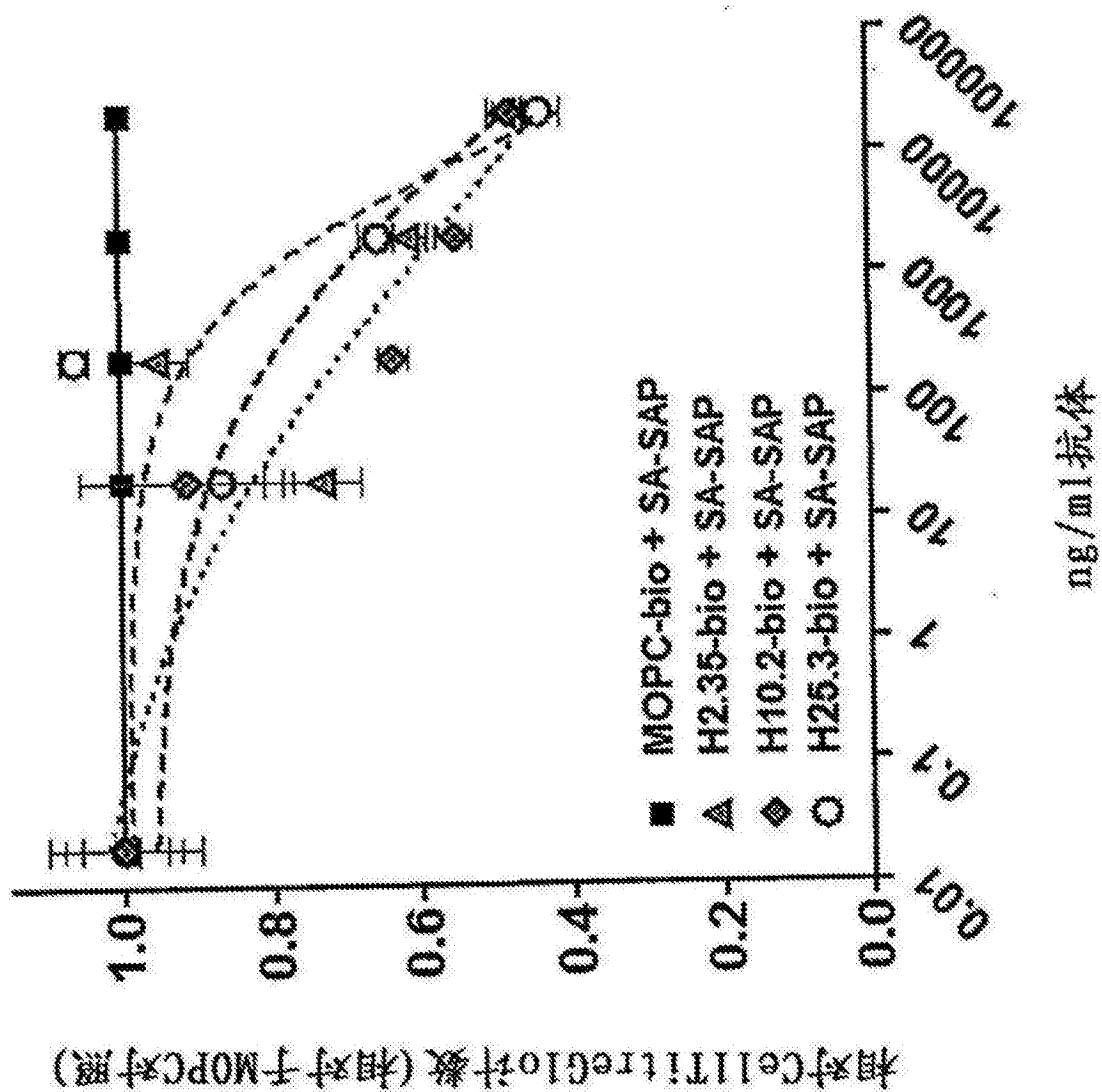


图11A

PTK7调节剂介导细胞杀死

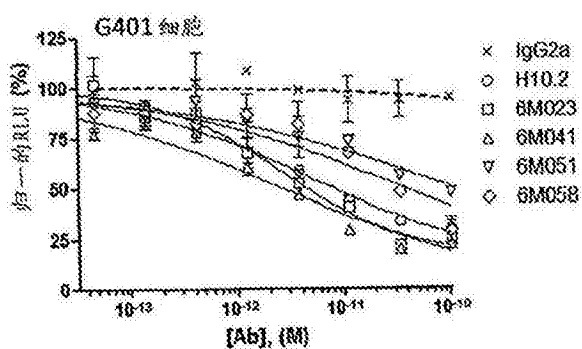


图 11B

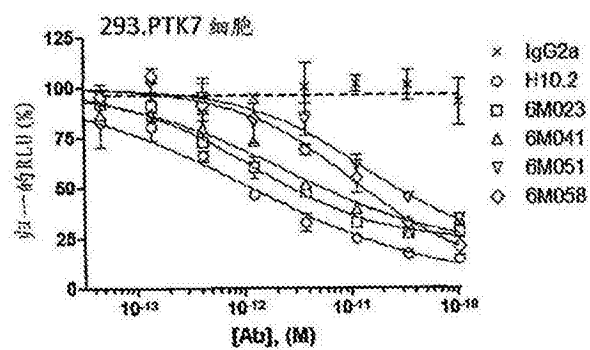


图 11C

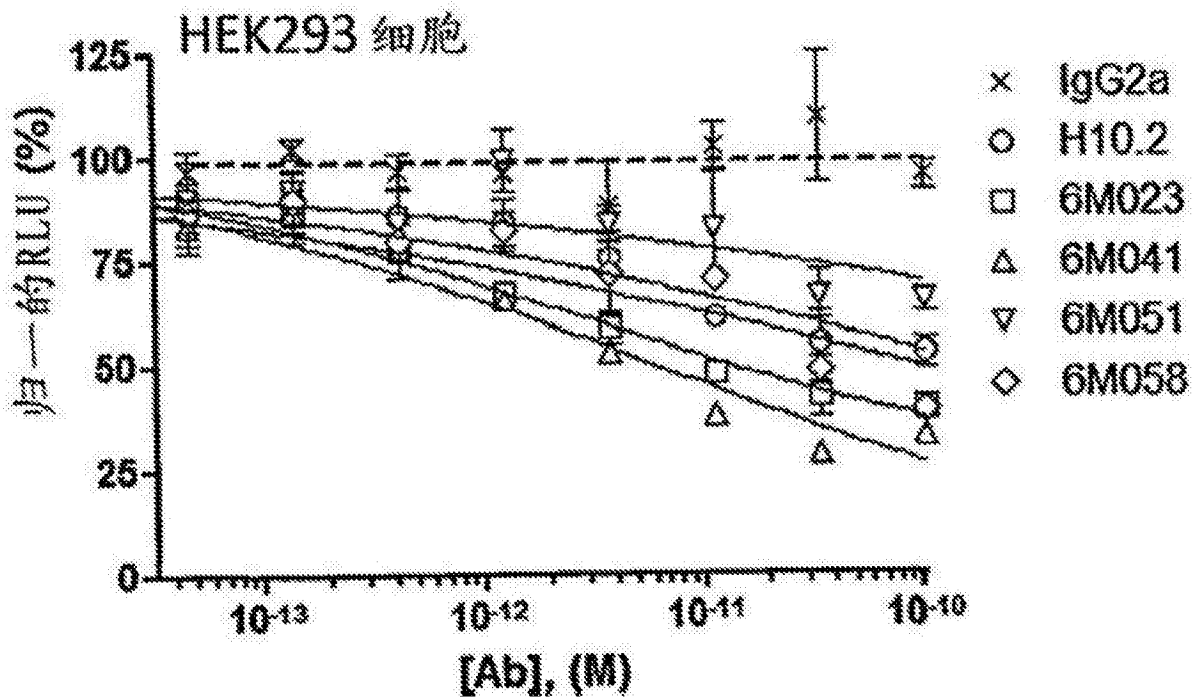


图 11D

PTK7调节剂降低肿瘤细胞成活性

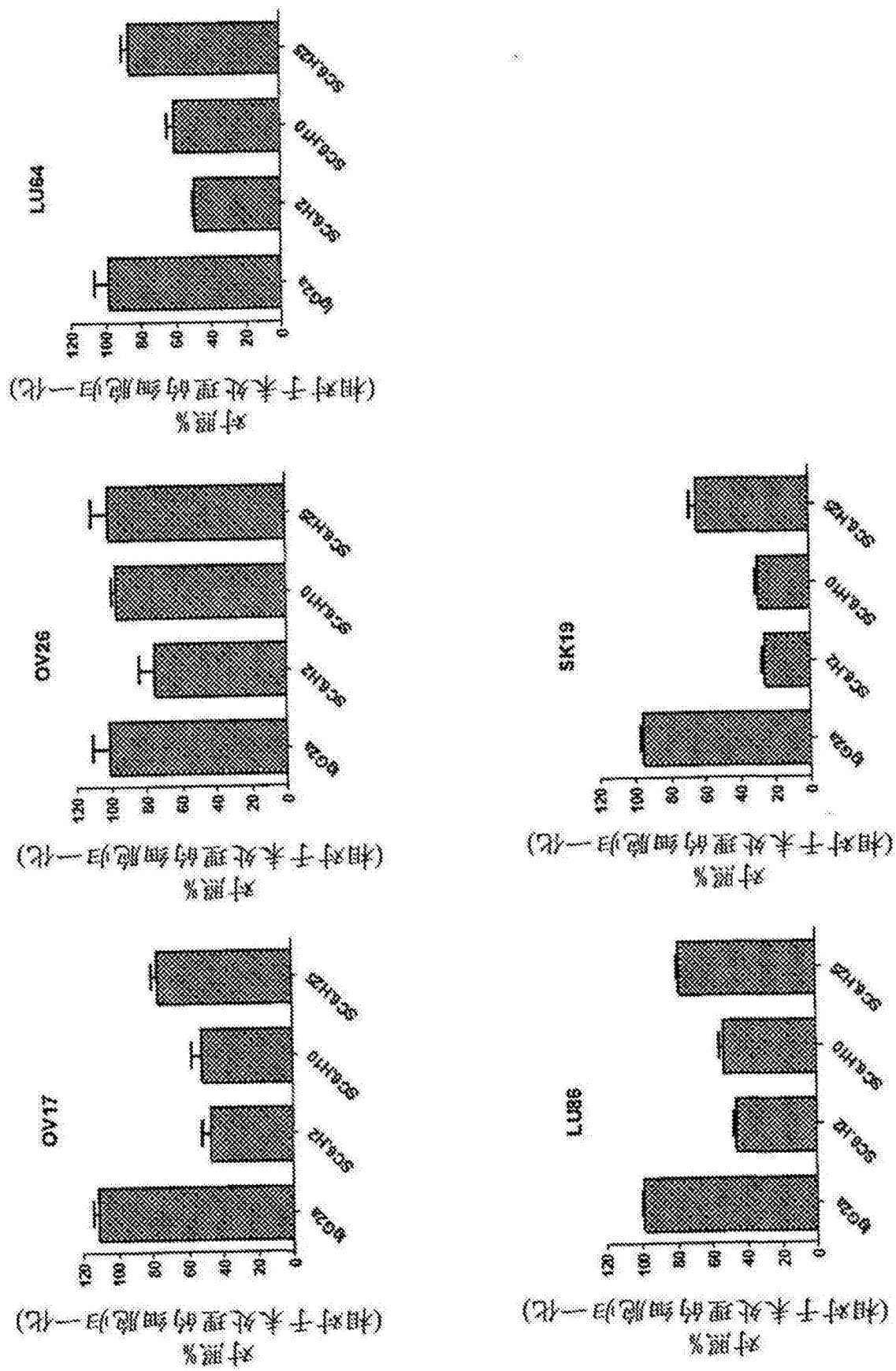


图12

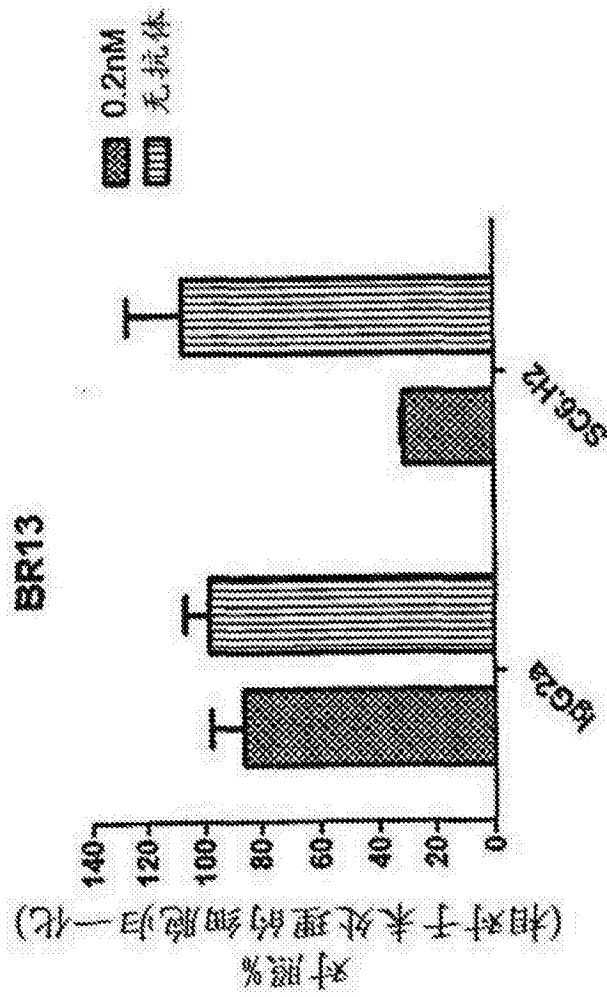


图13A

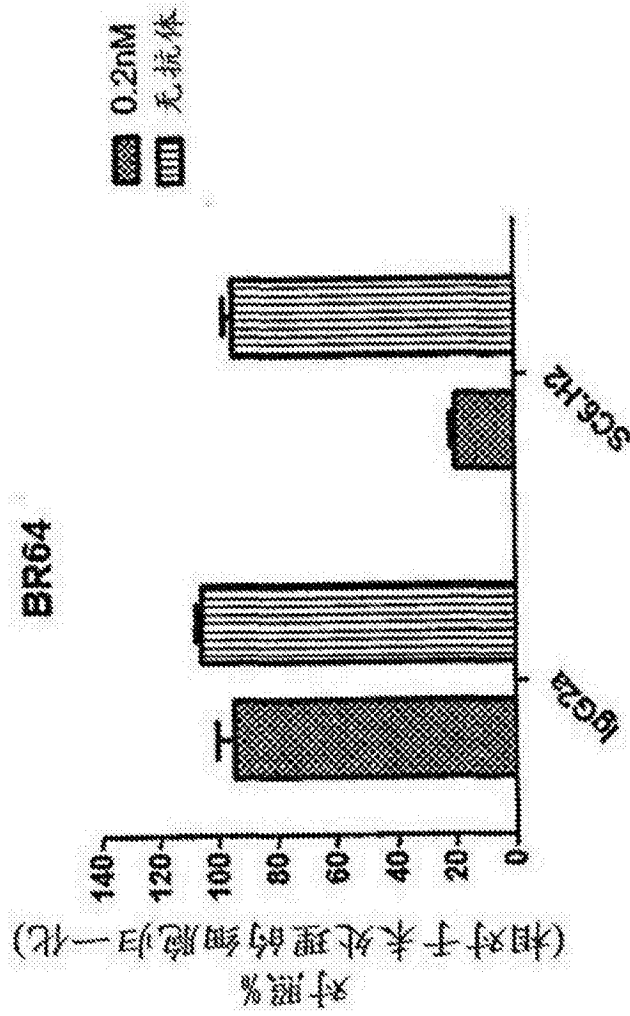


图13B

PTK7调节剂降低细胞致肿瘤性

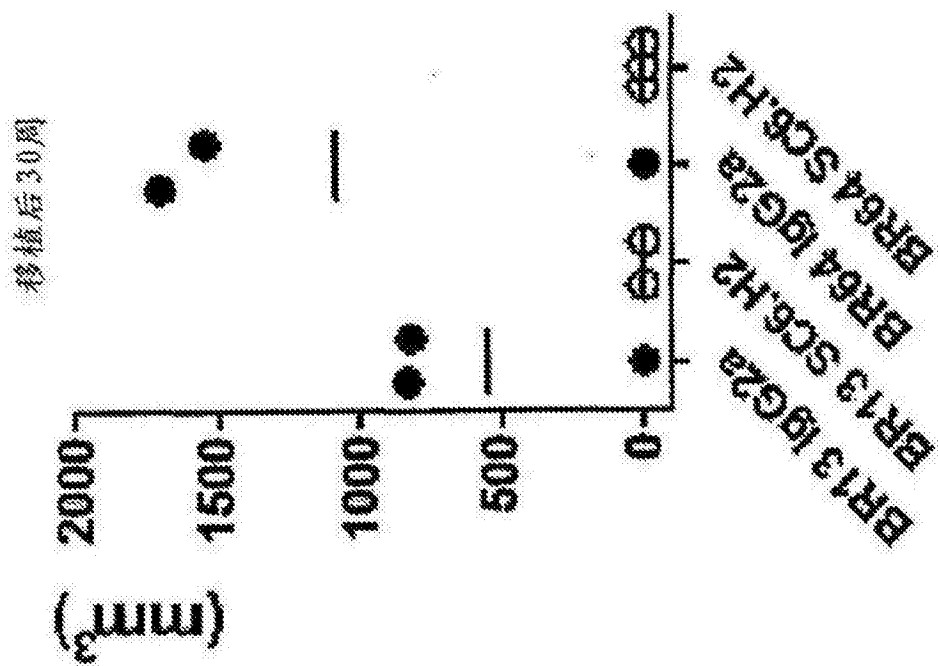


图13C

人源化PTK7调节剂诱导细胞杀死

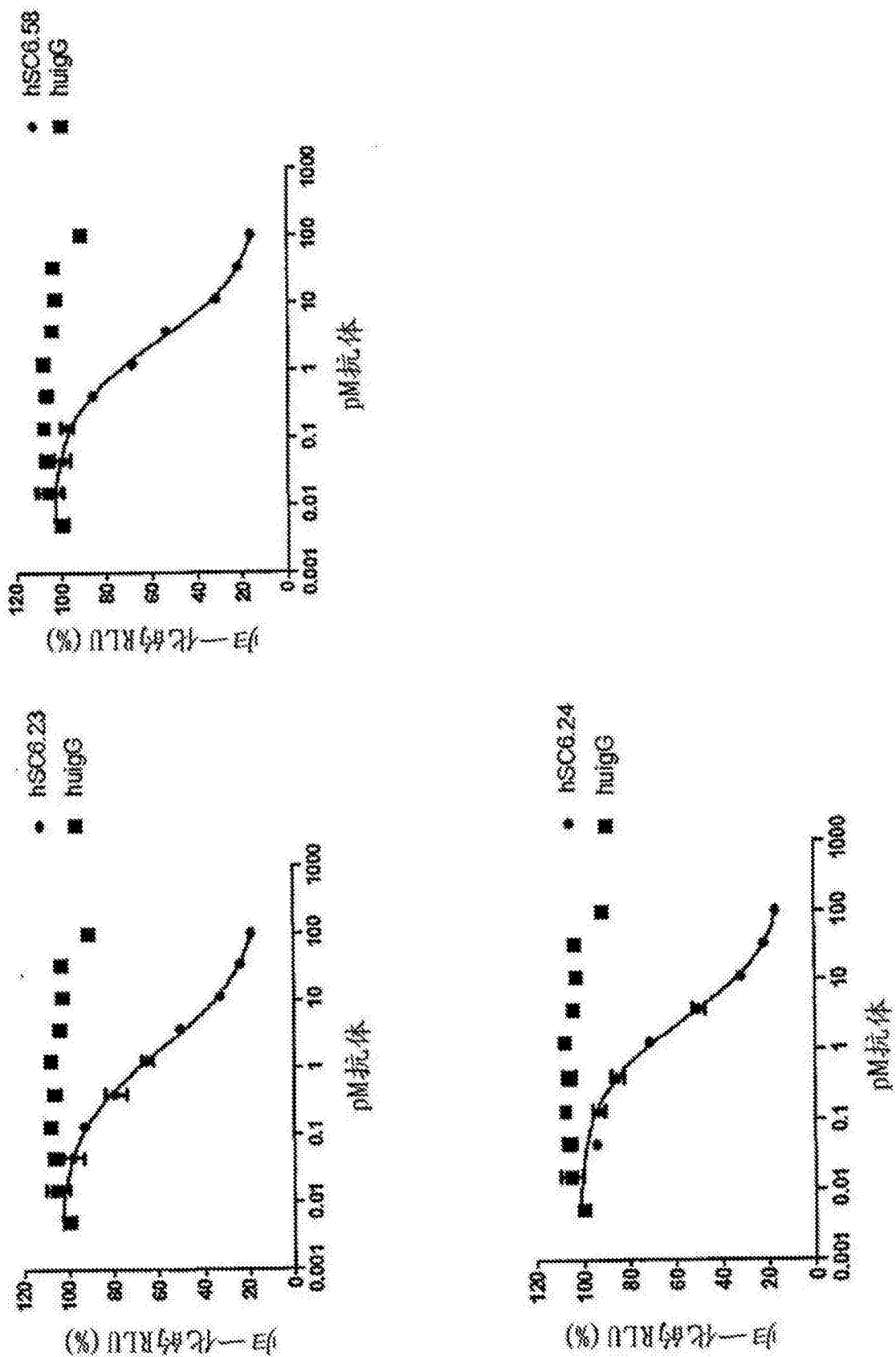


图14