



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118772278 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 15

(21) 申请号 202410785323.X

(22) 申请日 2018.05.31

(30) 优先权数据

62/514574 2017.06.02 US

62/660908 2018.04.20 US

(62) 分案原申请数据

201880049293.9 2018.05.31

(83) 生物保藏信息

PTA-124227 2017.06.01

PTA-124228 2017.06.01

PTA-124229 2017.06.01

PTA-124230 2017.06.01

(71) 申请人 辉瑞公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 D·E·德特林

V·克里什纳穆尔菲

K·T·波尔森 C·A·索默 杨翊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 权陆军 彭昶

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

权利要求书7页 说明书60页

序列表(电子公布) 附图6页

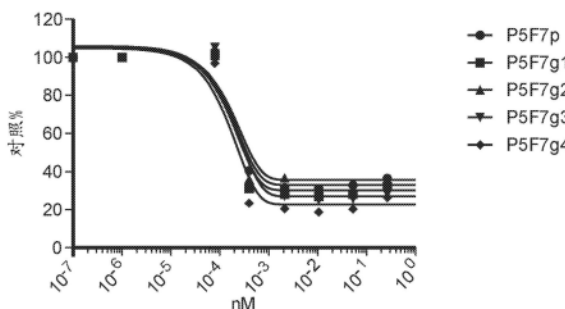
(54) 发明名称

FLT3的特异性抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及FLT3的特异性抗体及其用途。本发明提供了与FLT3 (Fms样酪氨酸激酶3) 特异性结合的抗体。本发明进一步提供了与FLT3和另一种抗原(例如CD3) 结合的双特异性抗体。本发明进一步涉及编码抗体的核酸,以及获得此类抗体(单特异性和双特异性)的方法。本发明进一步涉及关于使用这些抗体用于治疗FLT3介导的病理学,包括癌症例如急性髓样白血病(AML)的治疗方法。

Eo11 细胞杀死



1. 一种分离的抗体,其与Fms样酪氨酸激酶3 (FLT3) 特异性结合,其中所述抗体包含:

(a) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:49、44或50中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:51或52中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:53中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:150中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:151中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:152中所示的序列的VL CDR3;或

(b) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:43、44或45中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:46或47中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:48中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:147中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:148中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:149中所示的序列的VL CDR3;或

(c) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:54、55或56中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:57或58中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:59中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:153中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:154中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:155中所示的序列的VL CDR3;或

(d) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:60、61或62中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:63或64中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:65中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:156中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:157中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:158中所示的序列的VL CDR3;或

(e) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:66、67或68中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:69或70中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:71中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:159中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:160中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:161中所示的序列的VL CDR3;或

(f) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:72、73或74中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:75或76中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:77中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:162中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:163中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:164中所示的序列的VLC DR3;或

(g) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:78、79或80中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:81或82中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:83中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:165中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:166中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:167中所示的序列的VLC DR3;或

(h) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:84、85或86中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:87或88中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:89中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:168

中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:169中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:170中所示的序列的VLC DR3; 或

(i) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:37、38或39中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:40或41中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:42中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:144中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:145中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:146中所示的序列的VLC DR3; 或

(j) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:96、97或98中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:99或100中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:101中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:174中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:175中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:176中所示的序列的VLC DR3; 或

(k) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:177中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:178中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:179中所示的序列的VL CDR3; 或

(l) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:108、109或110中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:111或112中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:113中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:180中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:181中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:182中所示的序列的VL CDR3; 或

(m) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:114、115或116中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:117或118中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:119中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:183中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:184中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:185中所示的序列的VL CDR3; 或

(n) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:120、121或122中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:123或124中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:125中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:186中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:187中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:188中所示的序列的VL CDR3; 或

(o) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:126、127或128中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:129或130中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:131中所示的序列的VH CDR3; 和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:189中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:190中所示的序列的VL CDR2; 以及 (iii) 包含SEQ ID NO:191中所示的序列的VL CDR3; 或

(p) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:132、133或134中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:135或136中所示的序列的VH CDR2; 以及 (iii) 包

含SEQ ID NO:137中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:192中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:193中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:194中所示的序列的VL CDR3;或

(q)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:138、139或140中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:141或142中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:143中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:195中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:196中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:197中所示的序列的VL CDR3;或

(r)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:126、127或128中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:129或130中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:245中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:189中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:190中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:256中所示的序列的VL CDR3;或

(s)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:247、127或246中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:248或249中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:250中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:257中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:190中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:258中所示的序列的VL CDR3;或

(t)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:72、73或74中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:100或251中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:77中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:174中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:175中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:176中所示的序列的VL CDR3;或

(u)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:49、44或50中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:253或252中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:254中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:177中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:259中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:260中所示的序列的VL CDR3;或

(v)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:177中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:178中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:179中所示的序列的VL CDR3;或

(w)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:261中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:259中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:262中所示的序列的VL CDR3;或

(x)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH

互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:263中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:259中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:264中所示的序列的VL CDR3;或

(y) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH 互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:265中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:266中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:267中所示的序列的VL CDR3;或

(z) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH 互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:268中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:266中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:269中所示的序列的VL CDR3;或

(aa) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:270中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:271中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:272中所示的序列的VL CDR3;或

(bb) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:105或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:273中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:266中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:274中所示的序列的VL CDR3;或

(cc) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:255或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:177中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:178中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:179中所示的序列的VL CDR3;或

(dd) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:255或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:275中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:259中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:264中所示的序列的VL CDR3;或

(ee) 包含以下的重链可变 (VH) 区: (i) 包含SEQ ID NO:138、139或140中所示的序列的VH互补决定区1 (CDR1); (ii) 包含SEQ ID NO:255或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii) 包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变 (VL) 区: (i) 包含SEQ ID NO:275中所示的序列的VL CDR1; (ii) 包含SEQ ID NO:259中所示的序列的VL CDR2;以及 (iii) 包含SEQ ID NO:264中所示的序列的VL CDR3。

2. 一种分离的抗体,其与Fms样酪氨酸激酶3(FLT3)特异性结合,其中所述抗体包含:
- (a) VH区,其包含SEQ ID NO:6中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:5中所示的VL序列;或
 - (b) VH区,其包含SEQ ID NO:4中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:3中所示的VL序列;或
 - (c) VH区,其包含SEQ ID NO:8中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:7中所示的VL序列;或
 - (d) VH区,其包含SEQ ID NO:10中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:9中所示的VL序列;或
 - (e) VH区,其包含SEQ ID NO:12中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:11中所示的VL序列;或
 - (f) VH区,其包含SEQ ID NO:14中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:13中所示的VL序列;或
 - (g) VH区,其包含SEQ ID NO:16中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:15中所示的VL序列;或
 - (h) VH区,其包含SEQ ID NO:18中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:17中所示的VL序列;或
 - (i) VH区,其包含SEQ ID NO:2中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:1中所示的VL序列;或
 - (j) VH区,其包含SEQ ID NO:22中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:21中所示的VL序列;或
 - (k) VH区,其包含SEQ ID NO:24中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:23中所示的VL序列;或
 - (l) VH区,其包含SEQ ID NO:26中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:25中所示的VL序列;或
 - (m) VH区,其包含SEQ ID NO:28中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:27中所示的VL序列;或
 - (n) VH区,其包含SEQ ID NO:30中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:29中所示的VL序列;或
 - (o) VH区,其包含SEQ ID NO:32中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:31中所示的VL序列;或
 - (p) VH区,其包含SEQ ID NO:34中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:33中所示的VL序列;或
 - (q) VH区,其包含SEQ ID NO:36中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:35中所示的VL序列;或
 - (r) VH区,其包含SEQ ID NO:205中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:204中所示的VL序列;或
 - (s) VH区,其包含SEQ ID NO:207中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:206中所示的VL序列;或

(t) VH区,其包含SEQ ID NO:209中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:208中所示的VL序列;或

(u) VH区,其包含SEQ ID NO:211中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:210中所示的VL序列;或

(v) VH区,其包含SEQ ID NO:213中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:212中所示的VL序列;或

(w) VH区,其包含SEQ ID NO:215中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:214中所示的VL序列;或

(x) VH区,其包含SEQ ID NO:217中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:216中所示的VL序列;或

(y) VH区,其包含SEQ ID NO:219中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:218中所示的VL序列;或

(z) VH区,其包含SEQ ID NO:221中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:220中所示的VL序列;或

(aa) VH区,其包含SEQ ID NO:223中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:222中所示的VL序列;或

(bb) VH区,其包含SEQ ID NO:225中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:224中所示的VL序列;或

(cc) VH区,其包含SEQ ID NO:227中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:226中所示的VL序列;或

(dd) VH区,其包含SEQ ID NO:229中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:228中所示的VL序列;或

(ee) VH区,其包含SEQ ID NO:231中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:230中所示的VL序列;或

(ff) VH区,其包含SEQ ID NO:233中所示的VH序列;和VL区,其包含SEQ ID NO:232中所示的VL序列。

3. 一种分离的抗体,其与FLT3特异性结合并且与权利要求1的抗体竞争。

4. 权利要求1的分离的抗体,其中所述抗体包含:包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:49、44或50中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:51或52中所示的序列的VH CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:53中所示的序列的VH CDR3;和包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:150中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:151中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:152中所示的序列的VL CDR3。

5. 权利要求1的分离的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:6中所示的VH序列和包含SEQ ID NO:5中所示的VL序列的VL区。

6. 一种核酸,其编码权利要求1-5中任一项的抗体。

7. 一种载体,其包含权利要求6的核酸。

8. 一种宿主细胞,其包含权利要求6的核酸或权利要求7的载体。

9. 权利要求1-5中任一项的抗体,其用作药物。

10. 权利要求9的抗体,其中所述药物用于治疗选自以下的FLT3相关的癌症:多发性骨

髓瘤、恶性浆细胞瘤、霍奇金氏淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主型霍奇金氏淋巴瘤、卡勒氏病和骨髓瘤病、浆细胞白血病、浆细胞瘤、B幼淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL)、急性髓样白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性髓样白血病 (CML)、滤泡性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞性淋巴瘤、髓样白血病、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、原发纵隔 (胸腺) 大B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、富含T细胞/组织细胞大B细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性皮肤弥漫性大B细胞淋巴瘤 (腿型)、老年人EBV阳性弥漫性大B细胞淋巴瘤、与炎症相关的弥散性大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、源于HHV-8相关多中心卡斯特曼病的大B细胞淋巴瘤、特征介于弥散性大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤之间的未分类的B细胞淋巴瘤、特征介于弥漫性大B细胞淋巴瘤和典型霍奇金淋巴瘤之间的未分类的B细胞淋巴瘤、以及其它造血细胞相关的癌症。

FLT3的特异性抗体及其用途

[0001] 本申请是国际申请日为2018年5月31日的国际申请PCT/IB2018/053908进入中国、申请号为201880049293.9的题为“FLT3的特异性抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及与Fms样酪氨酸激酶3 (FLT3) 特异性结合的抗体,例如全长抗体或其抗原结合片段。本发明进一步涉及在一个臂上包含FLT3抗体的异多聚抗体(例如,双特异性抗体)。还提供了包含FLT3抗体的组合物,用于产生和纯化此类抗体的方法,及其在诊断和治疗中的用途。

背景技术

F1t3(也称为CD135、FLK3、STK1),急性髓样白血病(AML)的充分表征的靶抗原,与健康细胞相比,其在AML患者胚细胞上过表达,并且在大多数患者细胞上表达(参见例如,Carow等人,Blood:87(3)(1996年2月);以及Birg等人,Blood:80(10)(1992年11月))。进一步地,F1t3是AML患者中最频繁突变的基因,并且导致受体组成型活化的突变与不良预后相关(参见例如Abu-Duhier等人Br J Haematol.,111(1):190-5(2000年10月),Yamamoto等人,Blood:97(8)(2001年4月))。

[0004] 白血病胚细胞表面上的致癌驱动因子的存在对于靶向疗法的发展提供了机会。小分子F1t3抑制剂已在临床试验中显示活性;然而,由于抗性的获得,应答通常是短暂的。另外,激酶抑制剂仅治疗一定百分比的表达突变形式F1t3的患者,突出显示了对于改善疗法的迫切需要。

[0005] 由于与其它肿瘤抗原相比,F1t3在肿瘤细胞上具有相对低的表达,最近还已开发了以T细胞接合双特异性方法形式的F1t3双特异性抗体。然而,许多双特异性形式的局限性在于它们具有小分子量和短半衰期,因此需要连续输注。相应地,仍然需要具有改善的功效和安全性概况,并且适用于人患者的治疗癌症例如AML的抗体(例如,单特异性或双特异性的)。

发明内容

本文公开的发明涉及与Fms样酪氨酸激酶3 (FLT3) 特异性结合的抗体(例如,单特异性或双特异性抗体)。特别地,本发明的发明人已发现,如本文所述的以全长双特异性形式的FLT3抗体具有更长的半衰期、最小化的Fc相互作用、以及最小化的经由与免疫细胞的相互作用的体内非特异性细胞因子释放。进一步地,发现与其它结构域(包括双特异性形式中注意到的结构域1、2、3和5)相比,如本文所述的以全长双特异性形式的靶向FLT3蛋白的结构域4的FLT3抗体在AML细胞耗尽方面更有效。

[0007] 相应地,在一个方面,本发明提供了与FLT3特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含(a)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:37、38、39、43、44、45、49、50、

54、55、56、60、61、62、66、67、68、72、73、74、78、79、80、84、85、86、90、91、92、96、97、98、102、103、104、108、109、110、114、115、116、120、121、122、126、127、128、132、133、134、138、139、140、246或247中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1)；(ii)包含SEQ ID NO:40、41、46、47、51、52、57、58、63、64、69、70、75、76、81、82、87、88、93、94、99、100、105、106、111、112、117、118、123、124、129、130、135、136、141、142、248、249、251、252、253或255中所示的序列的VH CDR2；以及iii)包含SEQ ID NO:42、48、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、137、143、245、250或254中所示的序列的VH CDR3；和/或包含以下的轻链可变区(VL)：(i)包含SEQ ID NO:144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、257、261、263、265、268、270、273或275中所示的序列的VL CDR1；(ii)包含SEQ ID NO:145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、259、266或271中所示的序列的VL CDR2；以及(iii)包含SEQ ID NO:146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、256、258、260、262、264、267、269、272或274中所示的序列的VL CDR3。

[0008] 在另一个方面，提供的是与FLT3特异性结合的分离的抗体，其中所述抗体包含：VH区，其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231或233中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3；和/或VL区，其包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230或232中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施方案中，抗体包含：VH区，其包含SEQ ID NO:229中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3；和/或VL区，其包含SEQ ID NO:228中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施方案中，如本文所述的VH区包含在残基中的一个或几个保守氨基酸取代的变体，所述残基不在CDR内，和/或如本文所述的VL区包含在氨基酸中的一个或几个氨基酸取代的变体，所述氨基酸不在CDR内。例如，在一些实施方案中，VH或VL区可以包含上述氨基酸序列，或者其具有在残基中的不超过10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个保守取代的变体，所述残基不在CDR内。

[0009] 在一些实施方案中，提供的是与FLT3特异性结合的分离的抗体，其中所述抗体包含：包含SEQ ID NO:215、229或231中所示的序列的VH区；和/或包含SEQ ID NO:214、228或230中所示的序列的VL区。在一些实施方案中，提供的是与FLT3特异性结合的分离的抗体，其中所述抗体包含：包含SEQ ID NO:229中所示的序列的VH区；和/或包含SEQ ID NO:228中所示的序列的VL区。

[0010] 在一些实施方案中，提供的是与FLT3特异性结合，并且与本文提供的与FLT3特异性结合的分离的抗体竞争的抗体。

[0011] 在另一个方面，提供的是双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是全长抗体，其包含与靶抗原特异性结合的双特异性抗体的第一抗体可变结构域，并且包含通过与位于人免疫效应细胞上的效应抗原特异性结合，能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域，其中所述第一抗体可变结构域与包含SEQ ID NO:279的FLT3的结构域4或包含SEQ ID NO:280的FLT3的结构域5结合。

[0012] 在另一个方面，提供的是双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是全长抗体，其包含与靶抗原(例如FLT3)特异性结合的双特异性抗体的第一抗体可变结构域，并且包含通过

与位于人免疫效应细胞上的效应抗原(例如分化簇3(CD3))特异性结合,能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域。在一些实施方案中,第一抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231或233中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变(VL)区,其包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230或232中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施方案中,第一抗体可变结构域包含(a)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:37、38、39、43、44、45、49、50、54、55、56、60、61、62、66、67、68、72、73、74、78、79、80、84、85、86、90、91、92、96、97、98、102、103、104、108、109、110、114、115、116、120、121、122、126、127、128、132、133、134、138、139、140、246或247中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:40、41、46、47、51、52、57、58、63、64、69、70、75、76、81、82、87、88、93、94、99、100、105、106、111、112、117、118、123、124、129、130、135、136、141、142、248、249、251、252、253或255中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:42、48、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、137、143、245、250或254中所示的序列的VH CDR3;和/或(b)包含以下的轻链可变区(VL):(i)包含SEQ ID NO:144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、257、261、263、265、268、270、273或275中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、259、266或271中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、256、258、260、262、264、267、269、272或274中所示的序列的VLC DR3。

[0013] 在一些实施方案中,第二抗体可变结构域包含特异性针对CD3的VH和/或VL区。例如,第二抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:282中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:281中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0014] 在一些实施方案中,第一抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:229中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:228中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;并且第二抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:282中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:281中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0015] 在一些实施方案中,第二抗体可变结构域包含(a)包含以下的VH区:(i)包含SEQ ID NO:285、286或287中所示的序列的VH CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:288或289中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:290中所示的序列的VH CDR3;和/或包含以下的VL区:(i)包含SEQ ID NO:291中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:292中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:234中所示的序列的VL CDR3。

[0016] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包含恒定区。在一些实施方案中,本文所述的抗体具有人IgG1、IgG2或IgG2 Δ a、IgG3或IgG4亚类。在一些实施方案中,本文所述的抗体包

含糖基化恒定区。在一些实施方案中,本文所述的抗体包含对一个或多个Fc γ 受体具有降低的结合亲和力的恒定区。

[0017] 在一些实施方案中,双特异性抗体的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域均包含在人IgG2(SEQ ID NO:290)的铰链区中的位置223、225和228(例如(C223E或C223R)、(E225R)和(P228E或P228R))处,以及在CH3区中的位置409或368处(例如K409R或L368E(EU编号方案))的氨基酸修饰。

[0018] 在一些实施方案中,双特异性抗体的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域均包含在人IgG2的位置265(例如D265A)处的氨基酸修饰。

[0019] 在一些实施方案中,双特异性抗体的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域均包含在人IgG2的位置265(例如D265A)、330(例如A330S)和331(例如P331S)的一个或多个处的氨基酸修饰。在一些实施方案中,双特异性抗体的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域均包含在人IgG2的位置265(例如D265A)、330(例如A330S)和331(例如P331S)的每个处的氨基酸修饰。

[0020] 在其它实施方案中,本发明提供了包含本文所述的任何抗体的药物组合物。

[0021] 本发明还提供了重组产生本文所述的任何抗体的细胞系。

[0022] 本发明还提供了编码本文所述的任何抗体的核酸。本发明还提供了编码本文所述任何抗体的重链可变区和/或轻链可变区的核酸。

[0023] 本发明还提供了包含本文提供的核酸或载体的宿主细胞。还提供的是产生本文提供的抗体(例如,单特异性或双特异性)的方法,其包括在导致抗体产生的条件下培养本文提供的宿主细胞,并且从宿主细胞或培养物中分离抗体。

[0024] 本发明还提供了试剂盒,其包含有效量的本文所述的任何抗体或抗体缀合物。

[0025] 还提供的是本文提供的抗体或双特异性抗体,其用作药物。

[0026] 本发明还提供了治疗有此需要的受试者的方法,其包括提供本文所述的分离的抗体或双特异性抗体,并且向所述受试者施用所述抗体。

[0027] 还提供的是治疗受试者中与表达FLT3的恶性细胞相关的状况的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含如本文所述的抗体的药物组合物。在一些实施方案中,所述状况是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是选自以下的FLT3相关的癌症(例如,具有FLT3表达的任何癌症):多发性骨髓瘤、恶性浆细胞瘤、霍奇金氏淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主型霍奇金氏淋巴瘤、卡勒氏病和骨髓瘤病、浆细胞白血病、浆细胞瘤、B幼淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、急性髓样白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性髓样白血病(CML)、滤泡性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞性淋巴瘤、髓样白血病、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、原发纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、富含T细胞/组织细胞大B细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性皮肤弥漫性大B细胞淋巴瘤(腿型)、老年人EBV阳性弥漫性大B细胞淋巴瘤、与炎症相关的弥散性大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、源于HHV-8相关多中心卡

斯特曼病的大B细胞淋巴瘤、特征介于弥散性大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤之间的未分类的B细胞淋巴瘤、特征介于弥漫性大B细胞淋巴瘤和典型霍奇金淋巴瘤之间的未分类的B细胞淋巴瘤、以及其它造血细胞相关的癌症。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了抑制具有表达FLT3的恶性细胞的受试者中的肿瘤生长或进展的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含分离的抗体或双特异性抗体的药物组合物,如本文所述的。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了抑制受试者中的表达FLT3的恶性细胞转移的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含分离的抗体或双特异性抗体的药物组合物,如本文所述的。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了诱导具有表达FLT3的恶性细胞的受试者中的肿瘤消退的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含分离的抗体或双特异性抗体的药物组合物的药物组合物,如本文所述的。

[0031] 在一些实施方案中,如本文所述的方法进一步包括施用有效量的第二治疗剂。在一些实施方案中,第二治疗剂是生物治疗剂,例如抗体。

[0032] 在一些实施方案中,第二治疗剂是细胞因子,TNF- α (肿瘤坏死因子 α)、PAP (磷脂酸磷酸酶) 抑制剂、溶瘤病毒、激酶抑制剂、IDO (吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶) 抑制剂、谷氨酰胺酶GLS1抑制剂、CAR (嵌合抗原受体) -T细胞或T细胞疗法、TLR (Toll样受体) 激动剂(例如TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR9) 或肿瘤疫苗。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15 (白介素-15)。

附图说明

图1显示了FLT3/CD3双特异性 (FLT3臂为P5F7g、P5F7g1、P5F7g2、P5F7g3或P5F7g4) 在AML细胞系Eo11中诱导细胞毒性。

[0034] 图2显示了具有FLT3结构域4结合表位的FLT3/CD3双特异性 (FLT3臂为P1F1、P4A4、P4E5或P5F7) 在Eo11原位模型中诱导细胞毒性方面高度有效。

[0035] 图3显示了在人T细胞的存在下,针对FLT3蛋白的结构域4的FLT3/CD3双特异性 (FLT3臂为6B7或P8B6) 在原位异种移植物中具有改善的肿瘤功效。

[0036] 图4A和图4B分别证实了在IL15的不存在或存在下,FLT3/CD3双特异性抗体 (P5F7) 降低的EC₅₀值。

[0037] 图5A、5B、5C、5D、5E和5F证实在自体T细胞的存在下,通过增加浓度的FLT3/CD3双特异性 (P5F7) 诱导的离体骨髓抽吸物中的两个主要AML样品的杀死。描绘了如通过CD25+细胞百分比测定的,总T细胞和活化T细胞中的浓度依赖性增加。

具体实施方式

本文公开的本发明提供了与FLT3 (例如人FLT3) 特异性结合的抗体 (例如,单特异性或双特异性)。本发明还提供了编码这些抗体的多核苷酸,包含这些抗体的组合物,以及制备和使用这些抗体的方法。本发明还提供了用于治疗受试者中与FLT3介导的病理学相关的状况,例如癌症的方法。特别地,本发明的发明人已发现,如本文所述的以全长双特异性形式的FLT3抗体具有更长的半衰期、最小化的Fc相互作用、以及最小化的经由与免疫细胞

的相互作用的体内非特异性细胞因子释放。进一步地,发现与其它结构域包括双特异性形式中的结构域1、2、3和5相比,如本文所述的以全长双特异性形式的靶向FLT3蛋白的结构域4的FLT3抗体在AML细胞耗尽方面更有效。

[0039] 一般技术

除非另有说明,否则本发明的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学、免疫学、病毒学、单克隆抗体生成和改造的常规技术,其在本领域的技术内。此类技术在文献中充分解释,所述文献例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:ALaboratory Notebook(J.E.Cellis,编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney,编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell,编辑,1993-1998)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook ofExperimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos,编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人,编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人,编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人,编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach(D.Catty.,编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean,编辑,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,编辑,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0040] 定义

“抗体”是免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点,与靶标例如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等特异性结合。如本文使用的,该术语不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体,还涵盖其抗原结合片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)和结构域抗体(包括例如鲨鱼和骆驼科的抗体)、以及包含抗体的融合蛋白、以及包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。抗体包括任何类别的抗体,例如IgG、IgA或IgM(或其亚类),并且该抗体无需是任何特定类别。取决于其重链恒定区的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同类别。存在免疫球蛋白的五个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0041] 如本文使用的,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”指完整抗体的一个或多个片段,其保留与给定抗原(例如FLT3)特异性结合的能力。抗体的抗原结合功能可以通过完整抗体的片段来执行。术语抗体的“抗原结合片段”内涵盖的结合片段的实例包括

Fab; Fab' ; F(ab')₂; 由VH和CH1结构域组成的Fd片段; 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段; 单结构域抗体 (dAb) 片段 (Ward等人, Nature 341:544-546, 1989) 和分离的互补决定区 (CDR)。

[0042] 与靶 (例如, FLT3蛋白) “优先结合”或“特异性结合” (本文可互换使用) 的抗体或多肽是本领域众所周知的术语, 并且测定此类特异性或优先结合的方法也是本领域众所周知的。如果与分子与替代细胞或物质相比, 它更频繁、更快速地、以更长的持续时间和/或更大的亲和力与特定细胞或物质反应或结合, 则它被说成显示出“特异性结合”或“优先结合”。如果与抗体与其它物质结合相比, 它以更大的亲和力、亲合力、更容易地和/或以更长的持续时间结合, 则它与靶“特异性结合”或“优先结合”。例如, 如果与抗体与其它FLT3表位或非FLT3表位结合相比, 它以更大的亲和力、亲合力、更容易地和/或以更长的持续时间结合FLT3表位, 则它与这个表位特异性或优先结合。还应理解, 通过阅读这个定义, 例如, 与第一靶特异性或优先结合的抗体 (或部分或表位) 可以与第二靶特异性或优先结合或者不特异性或优先结合。像这样, “特异性结合”或“优先结合”不一定要求 (尽管它可以包括) 排他结合。一般地, 但不一定地, 提及结合意指优先结合。

[0043] 抗体的“可变区”指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。如本领域已知的, 重链和轻链的可变区各自由通过三个互补决定区 (CDR) 连接的四个构架区 (FR) 组成, 所述互补决定区也称为高变区。每条链中的CDR通过FR紧密结合在一起, 并且与来自另一条链的CDR一起, 促成抗体的抗原结合位点的形成。存在用于测定CDR的至少两种技术: (1) 基于交叉物种序列变异性的方法 (例如, Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, (第5版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); 以及 (2) 基于抗原-抗体复合物的结晶学研究的方法 (Al-lazikani等人, 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948)。如本文使用的, CDR可以指通过任一种方法或通过两种方法的组合定义的CDR。

[0044] 可变结构域的“CDR”是根据Kabat的定义、Chothia, Kabat和Chothia两者的积累、AbM、接触和/或构象定义、或本领域众所周知的CDR测定的任何方法鉴定的可变区内的氨基酸残基。抗体CDR可以被鉴定为最初由Kabat等人定义的高变区。参见例如Kabat等人, 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, NIH, Washington D.C. CDR的位置也可以被鉴定为最初由Chothia及其它人描述的结构环结构。参见例如Chothia等人, Nature 342:877-883, 1989。CDR鉴定的其它方法包括“AbM定义”, 其是Kabat和Chothia之间的折衷, 并且使用Oxford Molecular的AbM抗体建模软件 (现在的Accelrys®) 衍生, 或基于观察到的抗原接触的CDR的“接触定义”, 在MacCallum等人, J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996中阐述。在本文中称为CDR的“构象定义”的另一种方法中, CDR的位置可以鉴定为对抗原结合做出焓贡献的残基。参见例如, Makabe等人, Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008。另外其它CDR边界定义可能并不严格遵循上述方法之一, 但仍将与Kabat CDR的至少一部分重叠。尽管根据特定的残基或残基组或甚至整个CDR不显著影响抗原结合的预测或实验发现, 它们可以缩短或延长。如本文使用的, CDR可以指通过本领域已知的任何方法, 包括方法的组合定义的CDR。本文使用的方法可以利用根据这些方法中的任一种定义的CDR。对于含有超过一个CDR的任何给定实施方案, 可以根据Kabat、Chothia、延伸、AbM、接触和/或构象定义中的任一种来定义CDR。

[0045] 如本文使用的,“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可以以少量存在的可能天然发生的突变之外,群体包含的各个抗体是相同的。单克隆抗体针对单个抗原位点是高度特异性的。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比,每种单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆的”指示如从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不应解释为要求通过任何特定方法的抗体生产。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler和Milstein, *Nature* 256:495,1975描述的杂交瘤方法来制备,或者可以通过例如美国专利号4,816,567中所述的重组DNA方法来制备。单克隆抗体也可以从噬菌体文库中分离,所述噬菌体文库使用例如McCafferty等人, *Nature* 348:552-554,1990中描述的技术生成。

[0046] 如本文使用的,“人源化”抗体指非人(例如鼠)抗体的形式,其是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合序列),其含有最低限度的衍生自非人免疫球蛋白的序列。优选地,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被替换为具有所需特异性、亲和力和能力,来自非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被替换为相应的非人残基。此外,人源化抗体可以包含这样的残基,其在受体抗体和输入的CDR或构架序列中均未发现,但被包括以进一步完善且优化抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个,且通常为两个可变结构域的基本上全部,其中CDR区的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且FR区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳地还包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的那种。优选的是具有如WO 99/58572中所述修饰的Fc区的抗体。其它形式的人源化抗体具有一个或多个CDR(CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2或CDR H3),其相对于原始抗体有所改变,也被称为“衍生自”来自原始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0047] 如本文使用的,“人抗体”意指这样的抗体,其具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列、和/或已使用本领域技术人员已知或本文公开的用于制备人抗体的任何技术进行制备。人抗体的这个定义包括包含至少一种人重链多肽或至少一种人轻链多肽的抗体。一个此类实例是包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。在一个实施方案中,人抗体选自噬菌体文库,其中该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. (USA)* 95:6157-6162,1998;Hoogenboom和Winter, *J.Mol.Biol.*, 227:381,1991;Marks等人, *J.Mol.Biol.*, 222:581,1991)。人抗体也可以通过动物的免疫来制备,人免疫球蛋白基因座已转基因引入所述动物内代替内源基因座,例如其中内源免疫球蛋白基因已被部分或完全灭活的小鼠。这种方法在美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016中描述。可替代地,可以通过使人B淋巴细胞永生来制备人抗体,所述人B淋巴细胞产生针对靶抗原的抗体(此类B淋巴细胞可以从个体或cDNA的单细胞克隆中回收,或者可以已在体外进行免疫)。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;和美国专利号5,750,373。

[0048] 术语“嵌合抗体”预期指其中可变区序列衍生自一个物种,而恒定区序列衍生自另

一个物种的抗体,例如其中可变区序列衍生自小鼠抗体,而恒定区序列衍生自人抗体的抗体。

[0049] 术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,以指任何长度的氨基酸链。例如,该链可以相对短(例如10-100个氨基酸)或较长。该链可以是线性或分支的,它可以包含修饰的氨基酸,和/或可以被非氨基酸中断。该术语还涵盖已天然地或通过干预修饰的氨基酸链;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、或者任何其它操作或修饰,例如与标记组分缀合。该定义内还包括的是例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸等),以及本领域已知的其它修饰的多肽。应理解,多肽可以作为单链或结合链存在。

[0050] “单价抗体”包含一个抗原结合位点/分子(例如IgG或Fab)。在一些情况下,单价抗体可以具有超过一个抗原结合位点,但结合位点来自不同的抗原。

[0051] “单特异性抗体”包含两个相同的抗原结合位点/分子(例如IgG),使得两个结合位点结合抗原上的相同表位。因此,它们在结合一个抗原分子时彼此竞争。自然界发现的大多数抗体都是单特异性的。在一些情况下,单特异性抗体也可以是单价抗体(例如Fab)

“二价抗体”包含两个抗原结合位点/分子(例如IgG)。在一些情况下,两个结合位点具有相同的抗原特异性。然而,二价抗体可能是双特异性的。

[0052] “双特异性”或“双重特异性”是具有两个不同抗原结合位点的杂交抗体。双特异性抗体的两个抗原结合位点结合两个不同的表位,其可以位于相同或不同的蛋白质靶上。

[0053] “双功能”是在两个臂中具有相同的抗原结合位点(即,相同的氨基酸序列),但每个结合位点可以识别两种不同抗原的抗体。

[0054] “异源多聚体”、“异源多聚体复合物”、或“异源多聚体多肽”是包含至少第一多肽和第二多肽的分子,其中所述第二多肽在氨基酸序列中与第一多肽至少存在一个氨基酸残基的差异。异源多聚体可以包含由第一多肽和第二多肽形成的“异源二聚体”,或者可以形成其中还存在除第一多肽和第二多肽之外的多肽的更高阶的三级结构。

[0055] “异源二聚体”、“异源二聚体蛋白”、“异源二聚体复合物”、或“异多聚体多肽”是包含第一多肽和第二多肽的分子,其中所述第二多肽在氨基酸序列中与第一多肽至少存在一个氨基酸残基的差异。

[0056] 如本文使用的,“铰链区”、“铰链序列”及其变化包括本领域已知的含义,其在例如 Janeway等人,ImmunoBiology:the immune system in health and disease,(Elsevier Science Ltd.,NY)(第4版,1999);Bloom等人,Protein Science(1997),6:407-415;Humphreys等人,J.Immunol.Methods(1997),209:193-202中示出。

[0057] 如本文使用的,“免疫球蛋白样铰链区”、“免疫球蛋白样铰链序列”及其变化,指免疫球蛋白样或抗体样分子(例如,免疫粘附素)的铰链区和铰链序列。在一些实施方案中,免疫球蛋白样铰链区可以来自或衍生自任何IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型,或者IgA、IgE、IgD或IgM,包括其嵌合形式,例如嵌合IgG1/2铰链区。

[0058] 如本文使用的,术语“免疫效应细胞”或“效应细胞”指人免疫系统中天然细胞储库内的细胞,其可以被活化以影响靶细胞的活力。靶细胞的活力可以包括细胞存活、增殖和/或与其它细胞相互作用的能力。

[0059] 本发明的抗体可以使用本领域众所周知的技术来产生,所述技术例如重组技术、

噬菌体展示技术、合成技术或这些技术的组合或本领域中众所周知的其它技术(参见例如, Jayasena, S.D., Clin. Chem., 45:1628-50, 1999, 以及 Fellouse, F.A. 等人, J. Mol. Biol., 373(4):924-40, 2007)。

[0060] 如本领域中已知的, 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”指任何长度的核苷酸链, 并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物、或可以通过DNA或RNA聚合酶掺入链内的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸, 例如甲基化核苷酸及其类似物。如果存在的话, 则可以在链装配之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后例如通过与标记组分缀合进一步修饰。其它类型的修饰包括例如“帽”、用类似物取代一种或多种天然核苷酸、核苷酸间修饰例如具有不荷电键合(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)和具有荷电键合(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、含有侧基部分例如蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚L-赖氨酸等)的那些、具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些、含有烷化剂的那些、具有修饰键合(例如 α 异头核酸等)的那些、以及未修饰形式的多核苷酸。进一步地, 糖中通常存在的任何羟基可以被替换为例如磷酸酯基、磷酸基, 被标准保护基团保护或被活化以制备与另外核苷酸的另外键合, 或者可与固体支持物缀合。5'和3'末端的OH可以被磷酸化或者被胺或1-20个碳原子的有机封端基团部分取代。其它羟基也可以被衍生为标准保护基团。多核苷酸还可以含有本领域一般已知的核糖或脱氧核糖的类似形式, 包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氨基-核糖、碳环糖类类似物、 α -或 β -异头糖、差向异构糖例如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物和无碱基核苷类似物如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键合可以被替换为可替代的连接基团。这些替代的连接基团包括但不限于这样的实施方案, 其中磷酸酯被替换为P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺酯”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”), 其中每个R或R'独立地为H或者取代或未取代的烷基(1-20C), 任选地含有醚(-O-)键合、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。多核苷酸中的并非所有键合都需要是相同的。先前的描述适用于本文提及的所有多核苷酸, 包括RNA和DNA。

[0061] 如本领域中已知的, 抗体的“恒定区”指单独或组合的抗体轻链的恒定区或抗体重链的恒定区。

[0062] 如本文使用的, “基本上纯的”指至少50%纯(即, 不含污染物), 更优选至少90%纯, 更优选至少95%纯, 再更优选至少98%纯, 且最优选至少99%纯的材料。

[0063] “宿主细胞”包括单个细胞或细胞培养物, 其可以是或已是用于掺入多核苷酸插入片段的载体的受体。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代, 并且由于天然、偶然或故意的突变, 后代不一定与原始亲本细胞完全相同(在形态或基因组DNA互补物方面)。宿主细胞包括在体内用本发明的多核苷酸转染的细胞。

[0064] 如本领域已知的, 术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域。“Fc区”可以是天然序列Fc区或变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以改变, 但人IgG重链Fc区通常定义为从在位置Cys226处的氨基酸残基或Pro230到其羧基末端的段。Fc区中的残基编号是如在Kabat中的EU索引的编号。Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of

Health, Bethesda, Md., 1991. 免疫球蛋白的Fc区一般包含两个恒定区CH2和CH3。

[0065] 如本领域使用的,“Fc受体”和“FcR”描述了与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是这样的FcR,其结合IgG抗体(γ 受体),并且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),其具有主要区别在于其胞质结构域的相似的氨基酸序列。FcR在以下综述:Ravetch和Kinet, *Ann. Rev. Immunol.*, 9: 457-92, 1991; Capel等人, *Immunomethods*, 4: 25-34, 1994; 以及de Haas等人, *J. Lab. Clin. M* 编辑, 126: 330-41, 1995。“FcR”还包括新生儿受体FcRn,其负责母体IgG至胎儿的转移(Guyer等人, *J. Immunol.*, 117: 587, 1976; 以及Kim等人, *J. Immunol.*, 24: 249, 1994)。

[0066] 如本文关于抗体的使用的,术语“竞争”意指第一抗体或其抗原结合片段(或部分)与表位结合的方式与第二抗体或其抗原结合部分的结合足够相似,使得与不存在第二抗体下的第一抗体的结合相比,在第二抗体的存在下第一抗体与其同源表位的结合结果可检测地降低。其中在第一抗体的存在下第二抗体与其表位的结合也可检测地降低的替代方案可以但不必是这种情况。即,第一抗体可以抑制第二抗体与其表位的结合,而第二抗体不能抑制第一抗体与其分别表位的结合。然而,当每种抗体可检测地抑制另一种抗体与其同源表位或配体的结合时,无论是相同、更大还是更小程度,这些抗体被说成彼此“交叉竞争”结合其分别的表位。竞争抗体和交叉竞争抗体均由本发明涵盖。不管此类竞争或交叉竞争通过其发生的机制(例如,立体阻碍、构象变化、或者与共同表位或其一部分的结合),基于本文提供的教导,技术人员应了解,此类竞争抗体和/或交叉竞争抗体被涵盖并且可以用于本文公开的方法中。

[0067] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的至少一种效应子功能。示例性的“效应子功能”包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性;吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调等。此类效应子功能一般需要将Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合,并且可以使用本领域已知的用于评估此类抗体效应子功能的各种测定来评价。

[0068] “天然序列Fc区”包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。“变体Fc区”包含这样的氨基酸序列,其由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列Fc区的氨基酸序列,但保留了天然序列Fc区的至少一种效应子功能。在一些实施方案中,与天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有至少一个氨基酸取代,例如,天然序列Fc区或亲本多肽的Fc区中的约1至约10个氨基酸取代,且优选约1至约5个氨基酸取代。本文的变体Fc区优选与天然序列Fc区和/或亲本多肽的Fc区具有至少约80%的序列同一性,且最优选与其具有至少约90%的序列同一性,更优选与其具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、至少约99%的序列同一性。

[0069] 术语“效应子功能”指可归于抗体的Fc区的生物活性。抗体效应子功能的实例包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、Fc受体结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、吞噬作用、C1q结合和细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调。参见例如,美国专利号6,737,056。此类效应子功能一般需要将Fc区与结合结构域(例如抗体可变结构域)组合,并且可以使用本领域已知的用于评估此类抗体效应子功能的各种测定来评价。效应子功能的示例性测量是通过Fc γ 3和/或C1q结合。

[0070] 如本文使用的,“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别在靶细胞上的结合抗体,并且随后引起靶细胞的裂解。可以使用体外ADCC测定,如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述那种,来评价目标分子的ADCC活性。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和NK细胞。可替代地或另外地,可以例如在动物模型如Clynes等人,1998,PNAS(USA),95:652-656中公开的那种中,在体内评价目标分子的ADCC活性。

[0071] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在补体的存在下的靶裂解。补体活化途径通过补体系统的第一组分(C1q)与和同源抗原复合的分子(例如抗体)的结合来起始。为了评价补体活化,可以执行如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods,202:163(1996)中所述的CDC测定。

[0072] 如本文使用的,“治疗”是用于获得有益或所需临床结果的方法。为了本发明的目的,有益或所需临床结果包括但不限于下述中的一种或多种:减少(或破坏)赘生性或癌细胞的增殖、抑制赘生性细胞的转移、缩小或降低表达FLT3的肿瘤大小、缓解FLT3相关疾病(例如癌症)、降低起因于FLT3相关疾病(例如癌症)的症状、增加患有FLT3相关疾病(例如癌症)的人的生活质量、降低治疗FLT3相关疾病(例如癌症)所需的其它药物的剂量、延迟FLT3相关疾病(例如癌症)的进展、治愈FLT3相关疾病(例如癌症)、和/或延长患有FLT3相关疾病(例如癌症)的患者的存活。

[0073] “改善”意指与不施用FLT3抗体(单特异性或双特异性)相比,一种或多种症状的减轻或改善。“改善”还包括症状的持续时间中的缩短或减少。

[0074] 如本文使用的,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以实现任何一种或多种有益或所需结果的量。对于预防用途,有益或所需结果包括消除或减少风险,减轻严重性或延迟疾病的发作,包括疾病、其并发症以及在疾病的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗用途,有益或所需结果包括临床结果,例如减少各种FLT3相关疾病或状况(例如多发性骨髓瘤)的一种或多种症状的发生率或改善、降低治疗疾病所需的其它药物的剂量、增强另一种药物的效应、和/或延迟患者的FLT3相关疾病的进展。有效剂量可以在一次或多次施用中进行施用。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接地实现预防或治疗性处理的量。如在临床上下文中理解的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以与另一种药物、化合物或药物组合物结合或不结合来达到。因此,“有效剂量”可以在施用一种或多种治疗剂的背景下加以考虑,并且如果与一种或多种其它试剂结合,可以达到或达到期望的结果,则单一试剂可以视为以有效量给予。

[0075] “个体”或“受试者”是哺乳动物,更优选人。哺乳动物还包括但不限于灵长类动物、马、犬、猫、小鼠和大鼠。

[0076] 如本文使用的,“载体”意指能够在宿主细胞中递送,并且优选表达一种或多种目标基因或序列的构建体。载体的实例包括但不限于病毒载体,裸露DNA或RNA表达载体,质粒,粘粒或噬菌体载体,与阳离子缩合剂结合的DNA或RNA表达载体,包裹在脂质体中的DNA或RNA表达载体,以及某些真核细胞例如生产细胞。

[0077] 如本文使用的,“表达控制序列”意指指导核酸转录的核酸序列。表达控制序列可

以是启动子,例如组成型或诱导型启动子,或者增强子。表达控制序列与待转录的核酸序列可操作地连接。

[0078] 如本文使用的,“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”包括任何材料,当与活性成分组合时,所述材料允许该成分保留生物活性,并且与受试者的免疫系统不反应。实例包括但不限于任何标准药物载体,例如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液例如油/水乳液和各种类型的润湿剂。用于气溶胶或肠胃外给施用的优选稀释剂是磷酸盐缓冲盐水(PBS)或生理(0.9%)盐水。通过众所周知的常规方法(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.Gennaro编辑,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1990;以及Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第21版,Mack Publishing,2005),来配制包含此类载体的组合物。

[0079] 如本文使用的,术语“含有酰基供体谷氨酰胺的标签”或“谷氨酰胺标签”指含有一个或多个Gln残基的多肽或蛋白质,所述Gln残基充当转谷氨酰胺酶受体。参见例如,W02012059882和W02015015448。

[0080] 如本文使用的,术语“ k_{on} ”或“ k_a ”指关于抗体与抗原结合的速率常数。具体地,使用完整抗体(即二价)和单体FLT3蛋白(例如加上组氨酸标签的FLT3融合蛋白)测量速率常数(k_{on}/k_a 和 k_{off}/k_d)和平衡解离常数。

[0081] 如本文使用的,术语“ k_{off} ”或“ k_d ”指关于抗体从抗体/抗原复合物解离的速率常数。

[0082] 如本文使用的,术语“ K_D ”指抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0083] 在本文中对“约”值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。数目范围包括限定该范围的数目在内。一般而言,术语“约”指变量的指示值,以及在指示值的实验误差内(例如,在关于平均值的95%置信区间内)或指示值的10百分比内(以较大者为准)的所有变量值。当术语“约”在时间段(年、月、周、天等)的上下文中使用时,术语“约”意指该时间段加上或减去下一个从属时间段的一个量(例如,约1年意指11-13个月;约6个月意指6个月加上或减去1周;约1周意指6-8天;等),或在指示值的10百分比内,以较大者为准。

[0084] 应理解,无论何处实施方案在本文中用语言“包括”进行描述,都还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”措辞描述的在其它方面类似的实施方案。

[0085] 当本发明的方面或实施方案根据马库什组或其它替代分组进行描述时,本发明不仅涵盖作为整体列出的整个组,还涵盖个别地该组的每个成员和主要组的所有可能的亚组,以及不存在一个或多个组成员的主要组。本发明还设想了在本发明中的任何一个或多个组成员的明确排除。

[0086] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。在冲突的情况下,以本说明书包括定义为准。在说明书和权利要求自始至终,词语“包括(comprise)”或变化例如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”应理解为暗示包括陈述的整数或整数组,但不排除任何其它整数或整数组。除非上下文另有要求,否则单数术语应该包括复数,且复数术语应该包括单数。

[0087] 尽管在本文中描述了示例性的方法和材料,但与本文描述的那些相似或等价的方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中。材料、方法和实例仅是说明性的,并且不预期

是限制性的。

[0088] FLT3抗体及其制备方法

本发明提供了这样的抗体,其与FLT3[例如,人FLT3(例如,登录号:NP_004110或SEQ ID NO:235)]结合,并且特征在于下述特征中的任何一个或多个:(a)治疗、预防、改善受试者中与表达FLT3的恶性细胞相关的状况(例如癌症,例如AML)的一种或多种症状;(b)抑制受试者(其具有表达FLT3的恶性肿瘤)中的肿瘤生长或进展;(c)抑制受试者(其具有表达FLT3的一种或多种恶性细胞)中的表达FLT3的癌(恶性)细胞转移;(d)诱导表达FLT3的肿瘤消退(例如长期消退);(e)在表达FLT3的恶性细胞中发挥细胞毒活性;(f)阻断FLT3与其它尚未鉴定的因子的相互作用;和/或(g)诱导杀死或抑制附近的非FLT3表达恶性细胞的生长的旁观者效应。

[0089] 在一个方面,提供的是与FLT3特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含(a)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含37、38、39、43、44、45、49、50、54、55、56、60、61、62、66、67、68、72、73、74、78、79、80、84、85、86、90、91、92、96、97、98、102、103、104、108、109、110、114、115、116、120、121、122、126、127、128、132、133、134、138、139、140、246或247中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:40、41、46、47、51、52、57、58、63、64、69、70、75、76、81、82、87、88、93、94、99、100、105、106、111、112、117、118、123、124、129、130、135、136、141、142、248、249、251、252、253或255中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:42、48、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、137、143、245、250或254中所示的序列的VH CDR3;和/或包含以下的轻链可变区(VL):(i)包含SEQ ID NO:144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、257、261、263、265、268、270、273或275中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、259、266或271中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、256、258、260、262、264、267、269、272或274中所示的序列的VL CDR3。

[0090] 在另一个方面,提供的是与FLT3特异性结合的分离的抗体,其中所述抗体包含:VH区,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231或233中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或VL区,其包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230或232中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些实施方案中,抗体包含:VH区,其包含SEQ ID NO.229中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或VL区,其包含SEQ ID NO:228中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0091] 在一些实施方案中,提供的是具有如表1中列出的部分轻链序列中的任何一种和/或如表1中列出的部分重链序列中的任何一种的抗体。在表1中,加下划线的序列是根据Kabat的CDR序列,并且以粗体的序列是根据Chothia的CDR序列,除了关于P4F6、P4C7、P3A1、P5A3、P9B5、P9F1、P1B4、P1B11、P7H3、P3E10、P1A5、P5F7、P4H11、P15F7、P12B6、P8B6、P14G2和P7F9的重链CDR2序列,Chothia CDR序列加下划线,且Kabat CDR序列以粗体。

[0092] 表1

mAb	轻链	重链
P4F6	EIVLTQSPGTL S LSPGERATLSCR <u>ASHSVSSSYLAWYQQKPGQAPR</u> LLIYG <u>GASSRAT</u> GIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQY</u> <u>GSPRRT</u> FGQG T KVEIK (SEQ ID NO: 1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV S CK ASGGTF <u>GSY</u> GISWVRQAPGQGLE WMGGI <u>PIFGTV</u> TYAQKFQGRVTIT ADESTRTAYMELSSLRSEDTAVYY CARD <u>SWSGATGASDT</u> WGQGLV TVSS (SEQ ID NO: 2)
P4C7	EIVLTQSPGTL S LSPGERATLSCR <u>ASQVVSASLLAWYQQKPGQAP</u> RLLIYG <u>ASTRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YARSST</u> FGQG T KVEIK (SEQ ID NO: 3)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV S CK ASGGTF <u>S</u> SYTISWVRQAPGQGLE WMGGI <u>PAFGIAN</u> YAQKFQGRVTI TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAK <u>GGSYS</u> LDYFDI <u>W</u> WGQGLVT VSS (SEQ ID NO: 4)
P3A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASQSISSYLNWYQQKPGKAPK</u> LLIYA <u>AASSLQSGVPSRFSGSGSG</u> TDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>STPLT</u> FGQG T KVEIK (SEQ ID NO: 5)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV S CK ASGGTF <u>S</u> SYDISWVRQAPGQGLE WMGGI <u>PVSGRAN</u> YAQKFQGRVT ITDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAR <u>VRPTYWPLDY</u> WGQGLVTV SS (SEQ ID NO: 6)
P5A3	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV S CK

mAb	轻链	重链
	<p><u>GTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK</u> APKLMY<u>EVSKRPS</u>GVPDRFSGS KSGNTASLTVSGLQAEDADYYC <u>SSYAGSNTVVF</u>GGGTKLTVL (SEQ ID NO: 7)</p>	<p><u>ASGGTFSSYYIGWVRQAPGQGLE</u> WMGGI<u>PWFGTANYA</u>QKFQGRVT ITADKSTNTAYMELSSLRSEDYAV YYCAAD<u>HHDSPSGYTSGGFDVW</u> GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8)</p>
P9B5	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS<u>S</u> <u>GSSSNIGSNYVY</u>WYQQLPGTAP KLLIY<u>RNNQRPS</u>GVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYC<u>AA</u> <u>WDDSLSGVV</u>FGGTKLTVL (SEQ ID NO: 9)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFIFAS<u>YAMS</u>WVRQAPGKGLE WWSEISSGGSTTYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDYAV YYCARD<u>DRV</u>MAGLGYDPFDYWGQ GTLTVTVSS (SEQ ID NO: 10)</p>
P9F1	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS<u>S</u> <u>GSGSNIGSNYVY</u>WYQQLPGTAP KLLIY<u>RNNQRPS</u>GVPDRFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYC<u>AA</u> <u>WDGSLSRPV</u>FGTGTKLTVL (SEQ ID NO: 11)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFIFSSFAMSWVRQAPGKGLE WWSDISGSGASTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDYAV YYCASASGGSGSYWPYMDPWGQ GTLTVTVSS (SEQ ID NO: 12)</p>
P1B4	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLS<u>CR</u> <u>ASQSV</u>PNEQLAWYQQKPGQAP RLLIY<u>DASSRAT</u>GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC<u>QQ</u> <u>YGSPPLT</u>FGQGKVEIK (SEQ ID NO: 13)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCK ASGGVFSRYALSWVRQAPGQGLE WMGGI<u>PMLGFANYA</u>QKFQGRVT ITADESTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCATLDFGALDYWGQGLTVTVS S (SEQ ID NO: 14)</p>
P1B11	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLS<u>CR</u> <u>ASQSV</u>SSSELAWYQQKPGQAP RLLIY<u>DASSRAT</u>GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC<u>QQ</u> <u>YDSSPLT</u>FGQGKVEIK (SEQ ID NO: 15)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCK ASGGTFRSFDISWVRQAPGQGLE WMGRII<u>PILGYANYA</u>QKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDYAVY YCASDLGAPWAGYPFDPWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 16)</p>
P7H3	<p>QSVLTQPPSVSVAPGKTARIT<u>CG</u> <u>GNNIGSKSVH</u>WYQQKPGQAPVL</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE</p>

mAb	轻链	重链
	VIYY <u>DSDRPS</u> GIPERFSGSNSGN TATLTISRVEAGDEADYYC <u>QVWD</u> <u>SSTAWV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 17)	WVSAI <u>SGSGG</u> STYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARG <u>TRWWWGDAFDH</u> WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 18)
P3E10	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>R</u> <u>ASQSVSSQLA</u> WYQQKPGQAP RLLIY <u>DASSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSSPLT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKK ASGGTF <u>SSYAIQWVRQAPGQGLE</u> WMGGI <u>VGSWGL</u> LANYAQKFQGRV TITTDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAT <u>SAF</u> GELASWGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 20)
P1A5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>R</u> <u>ASQAVDSSDLA</u> WYQQKPGQAP RLLIY <u>DAYTRPS</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSSPLT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKK ASGGV <u>FSRYALSWVRQAPGQGLE</u> WMGGI <u>PMLGF</u> FANYAQKFQGRV ITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAT <u>LDFGALDY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 22)
P5F7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>R</u> <u>ASQSVSSNLA</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>DTFTRAT</u> GIPARFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQYGS</u> <u>SPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 23)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCA ASGFT <u>FSSYAMNWVRQAPGKGLE</u> WVSSI <u>SGGGRST</u> YYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>LSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 24)
P4H11	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>R</u> <u>ASQSVSNTYLA</u> WYQQKPGQAP RLLIY <u>DTSSRAT</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSSLT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCA ASGFT <u>FSSYAMNWVRQAPGKGLE</u> WVSSI <u>SGGGRST</u> YYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>LSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 26)
P15F7	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASQSISTYLN</u> WYQQKPGKAPK LLIY <u>AASNLQS</u> GVPSRFSGSGSG	EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCA ASGFT <u>FNNYAMNWVRQAPGKGL</u> EWSVIS <u>SGSGGT</u> YYADSVKGRF

mAb	轻链	重链
	TDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>SIPLT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)	TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAS <u>GIWDLRY</u> WGQGLTVTS S (SEQ ID NO: 28)
P12B6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>ASQIVSSSYLAWY</u> QQKPGQAPR LLIY <u>GASSRAS</u> GIPDRFSGSGS TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQY</u> <u>GGSPY</u> TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 29)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFMSY <u>AI</u> SWWRQAPGQGLE WMGGI <u>PIFGIAN</u> YAQKFQGRVTIT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARE <u>TLIYPIPFEL</u> WGQGLTVTS S (SEQ ID NO: 30)
P8B6	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>ASQSVSHSYLAWY</u> QQKPGQAP RLLIY <u>GASFRAA</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSDPY</u> TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 31)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFSSY <u>AV</u> SWWRQAPGQGLE WMGGI <u>PIFGIAN</u> YAQKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CAI <u>EGIGGDLRYDGYDA</u> WGQGL TVSS (SEQ ID NO: 32)
P14G2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASQSISSYLNWY</u> QQKPGKAPK LLIY <u>DASDLQR</u> GVPSRFSGSGS TDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>NTPWT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFS <u>NYVMN</u> WWRQAPGKGLE WWSAI <u>SGSGATTY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVS <u>GLWAGGI</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 34)
P7F9	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC <u>I</u> <u>RSSGSIASNYVQWY</u> QQKPGQAP VLVVY <u>DDSDRPS</u> GIPERFSGSNS GNTATLTISRVEAGDEADYYC <u>QV</u> <u>WDSSSDHWV</u> FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 35)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSY <u>AMS</u> WWRQAPGKGLE WWSAI <u>GSGGSTY</u> ADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAM YYCARD <u>YYAFSDPAYGGMDV</u> WG QGLTVTVSS (SEQ ID NO: 36)
P08B0 6EE	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>ASQSVSHSYLAWY</u> QQKPGQAP RLLIY <u>GASFRAA</u> GIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSK ASGGTFSSY <u>AV</u> SWWRQAPGQGLE WMGGI <u>PIFGIAN</u> YAQKFQGRVTIT ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY

mAb	轻链	重链
	<u>YGSEPYTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 204)	CA <u>IEGIGGDLRYEGYDAWGQGL</u> VTVSS (SEQ ID NO: 205)
P04A0 4	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>ASQSVTSSQLAWYQQKPGQAP</u> RLLIY <u>DASSRATGIPDRFSGSGS</u> GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSSLLITFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 206)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKK ASGGTFSSYITWVRQAPGQGLE WMGRIMP <u>AFGWTNYAQKFQGRV</u> TITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCAS <u>DEFGAFDVWGQGL</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 207)
P01A0 5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCR <u>ASQAVDSSDLAWYQHKGPGQAP</u> RLLIY <u>DAYTRPSGIPDRFSGSGS</u> GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSSPLTFGGGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 208)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKK ASGGVF <u>SRYALSWVRQAPGQGLE</u> WMGGI <u>PMLGFANYAQKFQGRVTI</u> TADSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAT <u>LDFGALDYWGQGL</u> LVTVSS (SEQ ID NO: 209)
P08B0 3	DIVMTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASQSVSSNLAWYQQKPGQAP</u> RLLIY <u>DAYTRATGIPARFSGSGS</u> GTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQ</u> <u>YGSPYTFGQGTKVEIK</u> (SEQ ID NO: 210)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKK ASGGTFSSYDISWVRQAPGQGLE WMGRI <u>PSFGAANYAQKFQGRVTI</u> TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCAT <u>DDGEGWTPPFGYWGQGL</u> VTVSS (SEQ ID NO: 211)
P5F7	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASQSVSSNLAWYQQKPGQAP</u> RLLIY <u>DTFTRATGIPARFSGSGSGS</u> TDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQY</u> <u>GSSPPTFGQGTRLEIK</u> (SEQ ID NO: 212)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSS ISGGGRSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD LSPSDVGWGYGFDI WG QGLTVTVSS (SEQ ID NO: 213)
P5F7g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL</u> LIY <u>DTFTRATGIPARFSGSGSGTD</u> FTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQYGS</u>	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSS ISGGGRSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV

mAb	轻链	重链
	<u>SPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 214)	YYCARD <u>DLSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 215)
P10A0 2g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASQDVSDLLA</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>DAYTRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QQYA</u> <u>SSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 216)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTF <u>SSYAMN</u> WVRQAPGKGLE WVSS <u>ISGGGRSTYYADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 217)
P10A0 4g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASQKVS</u> DLLAWYQQKPGQAPRL LIY <u>DAYTRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QQYT</u> <u>GSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 218)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTF <u>SSYAMN</u> WVRQAPGKGLE WVSS <u>ISGGGRSTYYADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 219)
P10A0 5g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASLSVSDLLA</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>DAYS</u> RATGIPARFSGSGSGT DFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QQYSS</u> <u>NPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 220)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTF <u>SSYAMN</u> WVRQAPGKGLE WVSS <u>ISGGGRSTYYADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 221)
P10A0 7g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASGSVSDLLA</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>DAYS</u> RATGIPARFSGSGSGT DFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QQYA</u> <u>SYPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 222)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTF <u>SSYAMN</u> WVRQAPGKGLE WVSS <u>ISGGGRSTYYADSVKGRFTI</u> SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDVGWGYGFDI</u> WG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 223)
P10B0	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASQDVSDLLA</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>DAYTRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTSSLEPEDFAVYYC <u>QQYA</u> <u>SSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 216)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA

mAb	轻链	重链
3g	<u>ASQSVSDLLAWYQQKPGQAPRL</u> LIY <u>DAFSRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQYG</u> <u>TPPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 224)	ASGFTFSS <u>YAMN</u> WVRQAPGKGLE WVSSISG <u>GGRSTYY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDV</u> GWGYGFDIWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 225)
P10B0 6g	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u></u> <u>ASEVSDLLAWYQQKPGQAPRL</u> LIY <u>DAYSRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQYS</u> <u>ASPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 226)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSS <u>YAMN</u> WVRQAPGKGLE WVSSISG <u>GGRSTYY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDV</u> GWGYGFDIWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 227)
P5F7g 2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u></u> <u>ASQSVSSNLA</u> WYQQKPGQAPRL LIY <u>DTFTRAT</u> GIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQYGS</u> <u>SPPT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 228)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSS <u>YAMN</u> WVRQAPGKGLE WWSAISG <u>GGRSTYY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDV</u> GWGYGFDIWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 229)
P5F7g 3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u></u> <u>ASQSVSLLAWYQQKPGQAPRL</u> LIY <u>DAYTRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQYT</u> <u>GSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 230)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSS <u>YAMN</u> WVRQAPGKGLE WWSAISG <u>GGRSTYY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDV</u> GWGYGFDIWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 231)
P5F7g 4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u></u> <u>ASQSVSLLAWYQQKPGQAPRL</u> LIY <u>DAYTRAT</u> GIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQYT</u> <u>GSPIT</u> FGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 232)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSS <u>YAMS</u> WVRQAPGKGLE WWSAISG <u>GGRSTYY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARD <u>DLSPSDV</u> GWGYGFDIWG
mAb	轻链	重链
	232)	QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 233)

[0093] 本文还提供的是针对FLT3的抗体的抗原结合结构域的CDR部分(包括Chothia、

Kabat CDR和CDR接触区)。CDR区的测定完全在本领域的技术内。应理解,在一些实施方案中,CDR可以是Kabat和Chothia CDR的组合(也称为“组合的CR”或“延伸的CDR”)。在一些实施方案中,CDR是Kabat CDR。在其它实施方案中,CDR是Chothia CDR。换言之,在具有超过一个CDR的实施方案中,CDR可以是Kabat、Chothia、组合CDR或其组合中的任一种。表2提供了本文提供的CDR序列的实例。

[0094] 表2

重链			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
P4F6	SYGIS (SEQ ID NO: 37) (Kabat); GGTFGSY (SEQ ID NO: 38) (Chothia); GGTFGSYGIS (SEQ ID NO: 39) (延伸的)	GIIPFGTVTYAQK FQG (SEQ ID NO: 40) (Kabat); IPIFGT (SEQ ID NO: 41) (Chothia)	DSWSGATGAS DT (SEQ ID NO: 42)
P4C7	SYTIS (SEQ ID NO: 43) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia) GGTFSSYTIS (延伸的) (SEQ ID NO: 45)	GIIPAFGIANYAQK FQG (SEQ ID NO: 46) (Kabat); IPAFGI (SEQ ID NO: 47) (Chothia)	GGSYSLDYFDI (SEQ ID NO: 48)
P3A1	SYDIS (SEQ ID NO: 49) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia); GGTFSSYDIS (SEQ ID	GIIPVSGRANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 51) (Kabat); IPVSGR (SEQ ID NO: 52) (Chothia)	VRPTYWPLDY (SEQ ID NO: 53)

	NO: 50) (延伸的)		
P5A3	SYIIG (SEQ ID NO: 54) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 55) (Chothia); GGTFSSYIIG (SEQ ID NO: 56) (延伸的)	GIIPWFGTANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 57) (Kabat); IPWFGT (SEQ ID NO: 58) (Chothia)	DHHDSPSGYT SGGFDV (SEQ ID NO: 59)
P9B5	SYAMS (SEQ ID NO: 60) (Kabat); GFIFASY (SEQ ID NO: 61) (Chothia); GFIFASYAMS (SEQ ID NO: 62) (延伸的)	EISSGGSTTYAD SVKG (SEQ ID NO: 63) (Kabat); SSSGGS (SEQ ID NO: 64) (Chothia)	DRVMAGLGYD PFDY (SEQ ID NO: 65)
P9F1	SFAMS (SEQ ID NO: 66) (Kabat); GFIFSSF (SEQ ID NO: 67) (Chothia); GFIFSSFAMS (SEQ ID NO: 68) (延伸的)	DISGSGASTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 69) (Kabat); SGSGAS (SEQ ID NO: 70) (Chothia)	ASGGSGSYWP YMDP (SEQ ID NO: 71)
P1B4	RYALS (SEQ ID NO: 72) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 73) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 74) (延伸的)	GIIPMLGFANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 75) (Kabat); IPMLGF (SEQ ID NO: 76) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 77)
P1B11	SFDIS (SEQ ID NO: 78) (Kabat); GGTFRSF (SEQ ID NO: 79) (Chothia); GGTFRSFDIS (SEQ ID NO: 80) (延伸的)	RIIPILGYANYAQK FQG (SEQ ID NO: 81) (Kabat); IPILGY (SEQ ID NO: 82) (Chothia)	DLGAPWAGYP FDP (SEQ ID NO: 83)
P7H3	SYAMH (SEQ ID NO: 84)	AISGSGGSTYYAD	GTRWWWGDA

	(Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 85) (Chothia); GFTFSSYAMH (SEQ ID NO: 86) (延伸的)	SVKG (SEQ ID NO: 87) (Kabat); SGSGGS (SEQ ID NO: 88) (Chothia)	FDH (SEQ ID NO: 89)
P3E10	SYAIQ (SEQ ID NO: 90) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 91) (Chothia); GGTFSSYAIQ (SEQ ID NO: 92) (延伸的)	GIVGSWGLANYA QKFQG (SEQ ID NO: 93) (Kabat); VGSWGL (SEQ ID NO: 94) (Chothia)	SAFGELAS (SEQ ID NO: 95)
P1A5	RYALS (SEQ ID NO: 96) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 97) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 98) (延伸的)	GIIPMLGFANYAQ KFQG (SEQ ID NO: 99) (Kabat); IPMLGF (SEQ ID NO: 100) (Chothia)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 101)
P5F7	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (延伸的)	SISGGGRSTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 105) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWG YGFDI (SEQ ID NO: 107)
P4H11	SYAMN (SEQ ID NO: 108) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 109) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 110) (延伸的)	SISGGGRSTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 111) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 112) (Chothia)	DLSPSDVGWG YGFDI (SEQ ID NO: 113)
P15F7	NYAMN (SEQ ID NO: 114) (Kabat); GFTFNYY (SEQ ID NO: 117) (Kabat);	VISGSGGTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 117) (Kabat);	GIWDLRY (SEQ ID NO: 119)

	115) (Chothia); GFTFNMYAMN (SEQ ID NO: 116) (延伸的)	SGSGGT (SEQ ID NO: 118) (Chothia)	
P12B6	SYAIS (SEQ ID NO: 120) (Kabat); GGTFMSY (SEQ ID NO: 121) (Chothia); GGTFMSY AIS (SEQ ID NO: 122) (延伸的)	GIPIFGIANYAQKF QG (SEQ ID NO: 123) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 124) (Chothia)	ETLIYPIPFEL (SEQ ID NO: 125)
P8B6	SYAVS (SEQ ID NO: 126) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia); GGTFSSYAVS (SEQ ID NO: 128) (延伸的)	GIPIFGIANYAQKF QG (SEQ ID NO: 129) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 130) (Chothia)	EGIGGDLRYD GYDA (SEQ ID NO: 131)
P14G2	NYVMN (SEQ ID NO: 132) (Kabat); GFTFSNY (SEQ ID NO: 133) (Chothia); GFTFSNYVMN (SEQ ID NO: 134) (延伸的)	AISGSGATYYAD SVKG (SEQ ID NO: 135) (Kabat); SGSGAT (SEQ ID NO: 136) (Chothia)	GLWAGGI (SEQ ID NO: 137)
P7F9	SYAMS (SEQ ID NO: 138) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 139) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 140) (延伸的)	AIGSGSGSTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 141) (Kabat); GGSGGS (SEQ ID NO: 142) (Chothia)	DYYAFSDPAY GGMDV (SEQ ID NO: 143)
P08B06EE	SYAVS (SEQ ID NO: 126) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia); GGTFSSYAVS (SEQ ID	GIPIFGIANYAQKF QG (SEQ ID NO: 129) (Kabat); IPIFGI (SEQ ID NO: 130) (Chothia)	EGIGGDLRYE GYDA (SEQ ID NO: 245)

	NO: 128) (延伸的)		
P04A04	SYIIT (SEQ ID NO: 247) GGTFSSY (SEQ ID NO: 127) (Chothia) GGTFSSYIIT (SEQ ID NO: 246) (延伸的)	RIMPAFGWTNYA QKFQG (SEQ ID NO: 248) (Kabat) MPAFGW (SEQ ID NO: 249) (Chothia)	DEFGAFDV (SEQ ID NO: 250)
P01A05	RYALS (SEQ ID NO: 72) (Kabat); GGVFSRY (SEQ ID NO: 73) (Chothia); GGVFSRYALS (SEQ ID NO: 74) (延伸的)	IPMLGF (SEQ ID NO: 100) (Chothia) GGIIPMLGFANYA QKFQG (SEQ ID NO: 251) (Kabat)	LDFGALDY (SEQ ID NO: 77)
P08B03	SYDIS (SEQ ID NO: 49) (Kabat); GGTFSSY (SEQ ID NO: 44) (Chothia); GGTFSSYDIS (SEQ ID NO: 50) (延伸的)	RIIPSGAANYAQQ FQG (SEQ ID NO: 253) (Kabat) IPSGA (SEQ ID NO: 252) (Chothia)	DDGEGWTPPF GY (SEQ ID NO: 254)
P5F7g; P10A02g; P10A04g; P10A05g; P10A07g; P10B03g; P10B06g	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (延伸的)	SISGGGRSTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 105) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWG YGFDI (SEQ ID NO: 107)
P5F7g2; P5F7g3	SYAMN (SEQ ID NO: 102) (Kabat); GFTFSSY (SEQ ID NO: 103) (Chothia); GFTFSSYAMN (SEQ ID NO: 104) (延伸的)	AISGGGRSTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 255) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	DLSPSDVGWG YGFDI (SEQ ID NO: 107)
P5F7g4	SYAMS (SEQ ID NO: 138) (Kabat);	AISGGGRSTYYAD SVKG (SEQ ID NO:	DLSPSDVGWG YGFDI (SEQ ID

	GFTFSSY (SEQ ID NO: 139) (Chothia); GFTFSSYAMS (SEQ ID NO: 140) (延伸的)	255) (Kabat); SGGGRS (SEQ ID NO: 106) (Chothia)	NO: 107)
轻链			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
P4F6	RASHSVSSSYLA (SEQ ID NO: 144)	GASSRAT (SEQ ID NO: 145)	QQYGSPVRT (SEQ ID NO: 146)
P4C7	RASQYVSASLLA (SEQ ID NO: 147)	GASTRAT (SEQ ID NO: 148)	QQYARSST (SEQ ID NO: 149)
P3A1	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 150)	AASSLQS (SEQ ID NO: 151)	QQSYSTPLT (SEQ ID NO: 152)
P5A3	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 153)	EVSKRPS (SEQ ID NO: 154)	SSYAGSNTVV (SEQ ID NO: 155)
P9B5	SGSSSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 156)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 157)	AAWDDSLSGV V (SEQ ID NO: 158)
P9F1	SGSGSNIGSNYVY (SEQ ID NO: 159)	RNNQRPS (SEQ ID NO: 160)	AAWDGSLSRP V (SEQ ID NO: 161)
P1B4	RASQSVNEQLA (SEQ ID NO: 162)	DASSRAT (SEQ ID NO: 163)	QQYGSPPLT (SEQ ID NO: 164)
P1B11	RASQSVSSSELA (SEQ ID NO: 165)	DASSRAT (SEQ ID NO: 166)	QQYDSSPLT (SEQ ID NO: 167)

P7H3	GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO: 168)	YDSDRPS (SEQ ID NO: 169)	QVWDSSTAWW (SEQ ID NO: 170)
P3E10	RASQSVPSQLA (SEQ ID NO: 171)	DASSRAT (SEQ ID NO: 172)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 173)
P1A5	RASQAVDSSDLA (SEQ ID NO: 174)	DAYTRPS (SEQ ID NO: 175)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 176)
P5F7	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)
P4H11	RASQSVSNTYLA (SEQ ID NO: 180)	DTSSRAT (SEQ ID NO: 181)	QQYGSSLT (SEQ ID NO: 182)
P15F7	RASQSISTYLN (SEQ ID NO: 183)	AASNLQS (SEQ ID NO: 184)	QQSYSIPLT (SEQ ID NO: 185)
P12B6	RASQIVSSSYLA (SEQ ID NO: 186)	GASSRAS (SEQ ID NO: 187)	QQYGGSPYT (SEQ ID NO: 188)
P8B6	RASQSVSHSYLA (SEQ ID NO: 189)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSDPYT (SEQ ID NO: 191)
P14G2	RASQSISSYLN (SEQ ID NO: 192)	DASDLQR (SEQ ID NO: 193)	QQSYNTPWT (SEQ ID NO: 194)
P7F9	TRSSGSIASNYVQ (SEQ ID NO: 195)	DDSDRPS (SEQ ID NO: 196)	QVWDSSSDH WV (SEQ ID NO: 197)
P08B06EE	RASQSVSHSYLA (SEQ ID NO: 189)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSEPYT (SEQ ID NO: 191)

			256)
P04A04	RASQSVTSSQLA (SEQ ID NO: 257)	GASFRAA (SEQ ID NO: 190)	QQYGSSLLIT (SEQ ID NO: 258)
P01A05	RASQAVDSSDLA (SEQ ID NO: 174)	DAYTRPS (SEQ ID NO: 175)	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 176)
P08B03	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYGSPYT (SEQ ID NO: 260)
P5F7g	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)
P10A02g	RASQDVSDLLA (SEQ ID NO: 261)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYASSPIT (SEQ ID NO: 262)
P10A04g	RASQKVSDLLA (SEQ ID NO: 263)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYTGSPIT (SEQ ID NO: 264)
P10A05g	RASLSVSDLLA (SEQ ID NO: 265)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 266)	QQYSSNPIT (SEQ ID NO: 267)
P10A07g	RASGSVSDLLA (SEQ ID NO: 268)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 266)	QQYASYPIT (SEQ ID NO: 269)
P10B03g	RASQSVSDLLA (SEQ ID NO: 270)	DAFSRAT (SEQ ID NO: 271)	QQYGTTPIT (SEQ ID NO: 272)
P10B06g	RASESVSDLLA (SEQ ID NO: 273)	DAYS RAT (SEQ ID NO: 266)	QQYSASPIT (SEQ ID NO: 274)
P5F7g2	RASQSVSSNLA (SEQ ID NO: 177)	DTFTRAT (SEQ ID NO: 178)	QQYGSSPPT (SEQ ID NO: 179)

	NO: 177)	NO: 178)	(SEQ ID NO: 179)
P5F7g3; P5F7g4	RASQSVSSLLA (SEQ ID NO: 275)	DAYTRAT (SEQ ID NO: 259)	QQYTGSPIT (SEQ ID NO: 264)

[0095] 在一些实施方案中,本发明提供了与FLT3结合并且与如本文所述的抗体竞争的抗体,包括P4F6、P4C7、P3A、P5A3、P9B5、P9F1、P1B4、P1B11、P7H3、P3E10、P1A5、P5F7、P4H11、P15F7、P12B6、P8B6、P14G2、P7F9、P08B06EE、P04A04、P01A05、P08B03、P5F7、P5F7g、P10A02g、P10A04g、P10A05g、P10A07g、P10B03g、P10B06g、P5F7g2、P5F7g3或P5F7g4。

[0096] 在一些实施方案中,本发明还提供了基于CDR接触区针对FLT3抗体的抗体的CDR部分。CDR接触区是使抗体具有对于抗原的特异性的抗体区域。一般而言,CDR接触区包括在CDR和游标区(Vernier zone)中的残基位置,其受约束以便维持适当的环结构用于抗体结合特异性抗原。参见例如,Makabe等人,J. Biol. Chem., 283: 1156-1166, 2007。CDR接触区的测定完全在本领域的技术内。

[0097] 如本文所述的FLT3抗体与FLT3(例如人FLT3(例如(SEQ ID NO:201)))的结合亲和力(K_D)可以为约0.001至约5000nM。在一个实施方案中,结合亲和力约为以下中的任意: 5000nM、4500nM、4000nM、3500nM、3000nM、2500nM、2000nM、1789nM、1583nM、1540nM、1500nM、1490nM、1064nM、1000nM、933nM、894nM、750nM、705nM、678nM、532nM、500nM、494nM、400nM、349nM、340nM、353nM、300nM、250nM、244nM、231nM、225nM、207nM、200nM、186nM、172nM、136nM、113nM、104nM、101nM、100nM、90nM、83nM、79nM、74nM、54nM、50nM、45nM、42nM、40nM、35nM、32nM、30nM、25nM、24nM、22nM、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、12nM、10nM、9nM、8nM、7.5nM、7nM、6.5nM、6nM、5.5nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.5nM、0.3nM、0.1nM、0.01nM或0.001nM。在一些实施方案中,结合亲和力小于约5000nM、4000nM、3000nM、2000nM、1000nM、900nM、800nM、250nM、200nM、100nM、50nM、30nM、20nM、10nM、7.5nM、7nM、6.5nM、6nM、5nM、4.5nM、4nM、3.5nM、3nM、2.5nM、2nM、1.5nM、1nM或0.5nM中的任意。

[0098] 可以使用本文公开的抗体制备双特异性抗体,对于至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的(参见例如,Suresh等人,Methods in Enzymology 121:210,1986)。传统上,双特异性抗体的重组生产基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Millstein和Cuello, Nature 305, 537-539, 1983)。相应地,在一个方面,提供的是双特异性抗体,其中所述双特异性抗体是全人抗体,其包含与靶抗原(例如FLT3)特异性结合的双特异性抗体的第一抗体可变结构域,并且包含通过与位于人免疫效应细胞上的效应抗原特异性结合,能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域。

[0099] 人免疫效应细胞可以是本领域已知的各种免疫效应细胞中的任意。例如,免疫效应细胞可以是人淋巴样细胞谱系的成员,包括但不限于T细胞(例如,细胞毒性T细胞)、B细胞和天然杀伤(NK)细胞。免疫效应细胞还可以是例如但不限于人髓样谱系的成员,包括但不限于单核细胞、嗜中性粒细胞和树突状细胞。此类免疫效应细胞可以对靶细胞具有细胞毒性或凋亡作用,或者在通过结合效应抗原而活化时具有其它所需作用。

[0100] 效应抗原是在人免疫效应细胞上表达的抗原(例如蛋白质或多肽)。可以被异源二聚体蛋白(例如,异源二聚体抗体或双特异性抗体)结合的效应抗原的实例包括但不限于人CD3(或CD3(分化簇)复合物)、CD16、NKG2D、NKp46、CD2、CD28、CD25、CD64和CD89。

[0101] 靶细胞可以是对于人天然的或外来的细胞。在天然靶细胞中,该细胞可能已被转化为恶性细胞或经过病理修饰(例如,被病毒、疟原虫或细菌感染的天然靶细胞)。在外来靶细胞中,该细胞是侵入病原体,例如细菌、疟原虫或病毒。

[0102] 靶抗原在处于患病状态(例如炎症性疾病、增殖性疾病(例如癌症)、免疫学病症、神经系统疾病、神经变性疾病、自身免疫疾病、传染病(例如病毒感染或寄生虫感染)、过敏反应、移植物抗宿主病或宿主抗移植物病)的靶细胞上表达。靶抗原不是效应抗原。在一些实施方案中,靶抗原是FLT3。

[0103] 在一些实施方案中,提供的是双特异性抗体,其中所述双特异性抗体是全长抗体,其包含与靶抗原特异性结合的双特异性抗体的第一抗体可变结构域,并且包含通过与位于人免疫效应细胞上的效应抗原特异性结合,能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域,其中所述第一抗体可变结构域与包含SEQ ID NO:279的FLT3的结构域4结合。

[0104] 在一些实施方案中,提供的是双特异性抗体,其中所述双特异性抗体是全长抗体,其包含与靶抗原特异性结合的双特异性抗体的第一抗体可变结构域,并且包含通过与位于人免疫效应细胞上的效应抗原特异性结合,能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域,其中所述第一抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231或233中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变(VL)区,其包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230或232中所示的VL序列的VL CDR1、VLC DR2和VLC DR3。

[0105] 在一些实施方案中,提供的是双特异性抗体,其中所述双特异性抗体是全长抗体,其包含与靶抗原特异性结合的双特异性抗体的第一抗体可变结构域,并且包含通过与位于人免疫效应细胞上的效应抗原特异性结合,能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域,其中所述第一抗体可变结构域包含(a)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:37、38、39、43、44、45、49、50、54、55、56、60、61、62、66、67、68、72、73、74、78、79、80、84、85、86、90、91、92、96、97、98、102、103、104、108、109、110、114、115、116、120、121、122、126、127、128、132、133、134、138、139、140、246或247中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:40、41、46、47、51、52、57、58、63、64、69、70、75、76、81、82、87、88、93、94、99、100、105、106、111、112、117、118、123、124、129、130、135、136、141、142、248、249、251、252、253或255中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:42、48、53、59、65、71、77、83、89、95、101、107、113、119、125、131、137、143、245、250或254中所示的序列的VH CDR3;和/或包含以下的轻链可变区(VL):(i)包含SEQ ID NO:144、147、150、153、156、159、162、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、257、261、263、265、268、270、273或275中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:145、148、151、154、157、160、163、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、259、266或271中所示的

序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:146、149、152、155、158、161、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、256、258、260、262、264、267、269、272或274中所示的序列的VLC DR3。

[0106] 在一些实施方案中,第一抗体可变结构域包含(a)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:102、103或104中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:255或106中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:107中所示的序列的VH CDR3;和/或(b)包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:177中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:178中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:179中所示的序列的VLC DR3。

[0107] 在一些实施方案中,第二抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:282中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:281中所示的VL序列的VLC DR1、VLC DR2和VL CDR3。

[0108] 在一些实施方案中,第一抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:229中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:228中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;并且第二抗体可变结构域包含重链可变(VH)区,其包含SEQ ID NO:282中所示的VH序列的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:281中所示的VL序列的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0109] 在一些实施方案中,第二抗体可变结构域包含(a)包含以下的重链可变(VH)区:(i)包含SEQ ID NO:285、286或287中所示的序列的VH互补决定区1(CDR1);(ii)包含SEQ ID NO:288或289中所示的序列的VH CDR2;以及iii)包含SEQ ID NO:290中所示的序列的VH CDR3;和/或(b)包含以下的轻链可变(VL)区:(i)包含SEQ ID NO:291中所示的序列的VL CDR1;(ii)包含SEQ ID NO:292中所示的序列的VL CDR2;以及(iii)包含SEQ ID NO:234中所示的序列的VLC DR3。

[0110] 表3显示了第二抗体可变结构域的特异性氨基酸和核酸序列,其对于CD3是特异性的。在表3中,加下划线的序列是根据Kabat的CDR序列,并且以粗体的序列是根据Chothia的CDR序列。

[0111] 表3

mAb	轻链	重链
h2B4_HNPS_VL_TK	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLFNVRSRKNYLA WYQQK PGQPPKLLIS WASTRES GVPDFR SGSGSGTDFLTISLQAEDVAV YYCK QSYDLFT FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 281)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDYYMTWVRQAPGKGL E WVAFIRNRARGYTS DHNPSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYC ARDRPSYYVLDY WGQGT TVVSS (SEQ ID NO: 282)
h2B4_HNPS_VL_TK	GACATTGTGATGACTCAATCCC CCGACTCCCTGGCTGTGTCCCT CGGCGAACGCGCAACTATCAAC TGAAAAGCAGCCAGTCCCTGT TCAACGTCCGGTCGAGGAAGAA CTACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAACCTGGGCAGCCGCCGAAG CTTCTGATCTCATGGGCCTCAA CTCGGGAAGCGGAGTGCCAG ATAGATTCTCCGGATCTGGCTC CGGAACCGACTTCACCCTGACG ATTTTCGAGCTTGCAAGCGGAGG ATGTGGCCGTGTACTACTGCAA GCAGTCCTACGACCTCTTACC TTTGGTTCGGGCACCAAGCTGG AGATCAAA (SEQ ID NO: 283)	GAAGTCCAACCTTGTCGAATCGGG AGGAGGCCTTGTGCAACCCGGT GGATCCCTGAGGCTGTTCATGCG CGGCCTCGGGCTTCACCTTTTCC GATTACTACATGACCTGGGTGAG ACAGGCCCTGGAAGGGGTTG GAATGGGTGGCATTTCATCCGGA ATAGAGCCCGCGGATACACTTCC GACCACAACCCAGCGTGAAGG GGCGTTTACCATTAGCCGCGA CAACGCCAAGAAGTCCCTTACC TCAAATGAACAGCCTGCGGGC GGAGGATACCGCTGTGTACTACT GCGCCCGCGACCGGCCGTCTTA CTATGTGCTGGACTACTGGGGC CAGGGTACTACGGTCACCGTCT CCTCA (SEQ ID NO: 284)

[0112] 表4显示了第二抗体可变结构域的CDR序列的实例,其对于CD3是特异性的。

[0113] 表4

重链			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
h2B4_HNPS_VL_TK	SDYYMT (SEQ ID NO: 285) (Kabat); GFTFSDY (SEQ ID NO: 286) (Chothia); GFTFSDYYMT (SEQ ID NO: 287) (延伸的)	RNRARGYT (SEQ ID NO: 288) (Kabat) FIRNRARGYTS DHNPSVKG (SEQ ID NO: 289) (延伸的)	DRPSYYVLDY (SEQ ID NO: 290)
轻链			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
h2B4_HNPS_VL_TK	KSSQSLFNVRSRKN YLA (SEQ ID NO: 291)	WASTRES (SEQ ID NO: 292)	KQSYDLFT (SEQ ID NO: 234)

[0114] 在一些实施方案中,本文提供的双特异性抗体含有CD3特异性可变结构域,其具有如美国公开号20160297885中提供的抗CD3序列,所述专利为了所有目的在此通过引用并

入。

[0115] 根据制备双特异性抗体的一种方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原组合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合物优选具有免疫球蛋白重链恒定区,其包含铰链、CH2和CH3区的至少一部分。优选具有在融合物的至少一个中存在的的第一重链恒定区(CH1),其含有轻链结合所必需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果需要的话)免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体内,并且共转染到合适的宿主生物内。当在构建中使用的不相等比率的三条多肽链提供最佳产率时,这在实施方案中提供了调节三个多肽片段的相互比例的极大灵活性。然而,当至少两条多肽链以相等比率的表达导致高产率时,或当比率没有特别意义时,能够在在一个表达载体中插入关于两条或所有三条多肽链的编码序列。

[0116] 在另一种方法中,双特异性抗体由在一个臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链、以及在另一个臂中具有杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。在双特异性分子的仅一半中具有免疫球蛋白轻链的这种不对称结构,促进所需的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分开。这种方法在PCT公开号W0 94/04690中描述。

[0117] 在另一种方法中,双特异性抗体由一个臂中的第一铰链区中的氨基酸修饰组成,并且第一铰链区中的取代/置换的氨基酸具有与另一个臂中的第二铰链区中的相应氨基酸相反的电荷。这种方法在国际专利申请号PCT/US2011/036419(W02011/143545)中描述。

[0118] 在另一种方法中,通过改变或改造第一免疫球蛋白样Fc区和第二免疫球蛋白样Fc区(例如,铰链区和/或CH3区)之间的界面,增强了所需的异源多聚体或异源二聚体蛋白(例如,双特异性抗体)的形成。在这种方法中,双特异性抗体可以由CH3区组成,其中CH3区包含一起相互作用以形成CH3界面的第一CH3多肽和第二CH3多肽,其中CH3界面内的一个或多个氨基酸使同源二聚体形成失稳,且在静电上不利于同源二聚体形成。这种方法在国际专利申请号PCT/US2011/036419(W02011/143545)中描述。

[0119] 在另一种方法中,在转谷氨酰胺酶的存在下,使用对于在一个臂中针对表位(例如FLT3)的抗体改造的含有谷氨酰胺的肽标签、以及对于在另一个臂中针对第二表位的第二抗体改造的另一种肽标签(例如,含有Lys的肽标签或反应性内源Lys),可以生成双特异性抗体。这种方法在国际专利申请号PCT/IB2011/054899(W02012/059882)中描述。

[0120] 在一些实施方案中,如本文所述的异源二聚体蛋白(例如,双特异性抗体)包含全长人抗体,其中所述双特异性抗体的第一抗体可变结构域与靶抗原(例如,FLT3)特异性结合,并且包含通过与位于人免疫效应细胞上的效应抗原(例如CD3)特异性结合,能够募集人免疫效应细胞的活性的双特异性抗体的第二抗体可变结构域,其中所述异源二聚体蛋白的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域包含在人IgG2(SEQ ID NO:236)的铰链区中的位置223、225和228(例如(C223E或C223R)、(E225E或E225R)和(P228E或P228R))处,以及在CH3区中的位置409或368处(例如K409R或L368E(EU编号方案))的氨基酸修饰。

[0121] 在一些实施方案中,异源二聚体蛋白的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域包含在人IgG1(SEQ ID NO:237)的铰链区中的位置221和228(例如(D221R或D221E)和(P228R或P228E))处,以及在CH3区中的位置409或368(例如K409R或L368E处(EU编号方案))的氨基酸修饰。

[0122] 在一些实施方案中,异源二聚体蛋白的第一抗体可变结构域和第二抗体可变结构域包含在人IgG4(SEQ ID NO:238)的铰链区中的位置228(例如(P228E或P228R))处,以及在CH3区中的位置409或368处(例如R409或L368E(EU编号方案))的氨基酸修饰。

[0123] 可用于本发明中的抗体可以涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等)、嵌合抗体、双特异性抗体、异源缀合物抗体、单链(ScFv)、其突变体、包含抗体部分(例如结构域抗体)的融合蛋白、人源化抗体、以及包含所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型,包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体以及共价修饰的抗体。抗体可以是鼠、大鼠、人或任何其它起源(包括嵌合或人源化抗体)。

[0124] 在一些实施方案中,如本文所述的FLT3单特异性抗体或FLT3双特异性抗体(例如,FLT3-CD3)是单克隆抗体。例如,FLT3单特异性抗体是人单克隆抗体。在另一个实例中,FLT3-CD3双特异性抗体的FLT3臂是人单克隆抗体,并且FLT3-CD3双特异性抗体的CD3臂是人源化单克隆抗体。

[0125] 在一些实施方案中,抗体包含修饰的恒定区,例如但不限于具有用于激发免疫应答的增加潜力的恒定区。例如,恒定区可以修饰为对于Fc γ 受体如Fc γ RI、Fc γ RIIA或Fc γ RIII具有增加的亲和力。

[0126] 在一些实施方案中,抗体包含修饰的恒定区,例如免疫惰性(即,具有激发免疫应答的减少潜力)的恒定区。在一些实施方案中,恒定区如Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999;PCT申请号PCT/GB99/01441;和/或英国专利申请号98099518中所述进行修饰。Fc可以是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。Fc可以是含有突变A330P331至S330S331的人IgG2(IgG2 Δ a),其中氨基酸残基参考野生型IgG2序列进行编号。Eur. J. Immunol., 29:2613-2624, 1999。在一些实施方案中,抗体包括包含下述突变的IgG₄的恒定区(Armour等人, Molecular Immunology 40585-593, 2003):E233F234L235至P233V234A235(IgG4 Δ c),其中编号参考野生型IgG4。在又一个实施方案中,Fc是具有缺失G236(IgG4 Δ b)的人IgG4 E233F234L235至P233V234A235。在另一个实施方案中,Fc是任何人IgG4 Fc(IgG4、IgG4 Δ b或IgG4 Δ c),其含有铰链稳定突变S228至P228(Aalberse等人, Immunology 105, 9-19, 2002)。在另一个实施方案中,Fc可以是无糖基化的Fc。

[0127] 在一些实施方案中,通过突变寡糖附着残基(例如Asn297)和/或侧翼残基(其为恒定区中的糖基化识别序列的部分),使恒定区无糖基化。在一些实施方案中,恒定区被酶促无糖基化用于N联糖基化。恒定区可以被酶促或通过糖基化缺陷的宿主细胞中表达而无糖基化用于N联糖基化。

[0128] 在一些实施方案中,恒定区具有修饰的恒定区,其去除或减少Fc γ 受体结合。例如,Fc可以是含有突变D265的人IgG2,其中氨基酸残基参考野生型IgG2序列(SEQ ID NO:236)进行编号。相应地,在一些实施方案中,恒定区具有修饰的恒定区,其具有SEQ ID NO:239中所示的序列:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCRVRCRCPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK. 而且, 编码SEQ

ID NO:239中所示的序列的核酸显示于SEQ ID NO:240中。

[0129] 在一些实施方案中, 恒定区具有修饰的恒定区, 其具有SEQ ID NO:241中所示的序列:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCEVECPECPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK. 而且, 编码SEQ

ID NO:241中所示的序列的核酸显示于SEQ ID NO:242中。

[0130] 人κ恒定区的氨基酸显示于SEQ ID NO:243中:

GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

而且, 编码SEQ ID NO:243的序列的核酸显示于SEQ ID NO:244中。

[0131] 测定抗体与FLT3的结合亲和力的一种方法是通过测量二价抗体与单体FLT3蛋白的结合亲和力。FLT3抗体的亲和力可以通过表面等离子共振 (Biacore™3000™表面等离子共振 (SPR) 系统, Biacore™, INC, Piscataway NJ) 进行测定, 所述表面等离子共振配备有预固定的抗小鼠Fc或抗人Fc, 使用HBS-EP运行缓冲液 (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15NaCl, 3mM EDTA, 0.005% v/v表面活性剂P20)。单体加上8组氨酸标签的人FLT3细胞外结构域可以稀释到HBS-EP缓冲液内至小于0.5μg/mL的浓度, 并且使用可变的接触时间跨越各个芯片通道注射, 以达到两个范围的抗原密度: 用于详细的动力学研究的50-200个反应单位 (RU)、或用于筛选测定的800-1,000RU。再生研究已显示, 在25% v/v乙醇中的25mM NaOH有效地去除结合的FLT3蛋白, 同时对于超过200次注射保持芯片上的FLT3抗体的活性。通常, 将纯化的加上8组氨酸标签的FLT3样品的系列稀释物 (跨越0.1-10x估计 K_D 的浓度) 以100μL/分钟注射1分钟, 并且允许高达2小时的解离时间。基于加上8组氨酸标签的FLT3蛋白的序列比消光系数, 通过在280nm处的吸光度测定FLT3蛋白的浓度。通过使用BIAevaluation程序, 将数据总体拟合至1:1兰米尔结合模型 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6.99-110), 同时获得动力学结合速率 (k_{on} 或 k_a) 和解离速率 (k_{off} 或 k_d)。平衡解离常数 (K_D) 值计算为 k_{off}/k_{on} 。这个方案适用于测定抗体与任何单体FLT3的结合亲和力, 所述单体FLT3包括人FLT3、另一种哺乳动物的FLT3 (例如小鼠FLT3、大鼠FLT3或灵长类动物FLT3) 以及不同形式的FLT3 (例如糖基化的FLT3)。抗体的结合亲和力一般在25°C下进行测量, 但也可以在37°C下进行测量。

[0132] 如本文所述的抗体可以通过本领域已知的任何方法来制备。对于杂交瘤细胞系的产生,宿主动物的免疫途径和时间表一般与对于抗体刺激和产生建立的和常规的技术一致,如本文进一步所述。用于产生人和小鼠抗体的一般技术是本领域已知的和/或在本文中描述。

[0133] 考虑可以操纵任何哺乳动物受试者包括人或由此的抗体产生细胞,以充当用于产生哺乳动物包括人和杂交瘤细胞系的基础。通常,用一定量的免疫原,对宿主动物进行腹膜内、肌内、经口、皮下、足底内和/或皮内接种,包括如本文所述的。

[0134] 使用Kohler,B.和Milstein,C.,Nature 256:495-497,1975的一般体细胞杂交技术,或如通过Buck,D.W.等人,In Vitro,18:377-381,1982修饰的,可以从淋巴细胞和永生生化骨髓瘤细胞制备杂交瘤。可用的骨髓瘤系,包括但不限于X63-Ag8.653和来自Salk Institute,Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA的那些,可以用于杂交中。一般地,该技术涉及使用融合剂如聚乙二醇、或通过本领域技术人员众所周知的电学手段,使骨髓瘤细胞和淋巴样细胞融合。融合后,将细胞与融合培养基分开,并且在选择性生长培养基(如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基)中生长,以消除未杂交的亲本细胞。本文所述的补充或未补充血清的任何培养基都可以用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一种替代方案,EBV永生生化B细胞可以用于产生本发明的单克隆抗体。需要时,将杂交瘤扩增并亚克隆,并且通过常规免疫测定程序(例如,放射免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫测定)测定上清液的抗免疫原活性。

[0135] 可以用作抗体来源的杂交瘤涵盖产生对于FLT3特异性的单克隆抗体或其一部分的亲本杂交瘤的所有衍生物,后代细胞。

[0136] 产生此类抗体的杂交瘤可以使用已知程序在体外或体内生长。需要时,可以通过常规的免疫球蛋白纯化程序,例如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱和超滤,从培养基或体液中分离单克隆抗体。例如,通过使制剂在由附着至固相的免疫原制成的吸附剂上运行,并且从免疫原中洗脱或释放所需抗体,可以去除不希望有的活性(如果存在的话)。使用双功能试剂或衍生剂,例如,马来酰亚胺基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中R和 R^1 是不同的烷基基团,用表达人FLT3、人FLT3蛋白、或含有与蛋白质(所述蛋白质在待免疫的物种中是免疫原性的,例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合的靶氨基酸序列的片段的细胞免疫宿主动物,可以得到抗体(例如,单克隆抗体)群体。

[0137] 需要时,可以对目标抗体(单克隆或多克隆的)进行测序,然后将多核苷酸序列克隆到载体内用于表达或繁殖。可以将编码目标抗体的序列维持在宿主细胞中的载体中,然后将该宿主细胞扩增且冷冻用于未来使用。细胞培养中的重组单克隆抗体的产生可以通过本领域已知的手段通过从B细胞中克隆抗体基因来进行。参见例如Tiller等人, J. Immunol. Methods 329, 112, 2008; 美国专利号7,314,622。

[0138] 在一个替代方案中,多核苷酸序列可以用于遗传操作,以“人源化”抗体或改善抗体的亲和力或其它特征。例如,如果抗体用于人的临床试验和治疗中,则恒定区可以被改造为更接近地类似人恒定区,以避免免疫应答。可能期望遗传操纵抗体序列,以获得对FLT3的更大亲和力和抑制FLT3中的更大功效。

[0139] 存在使单克隆抗体人源化的四个一般步骤。这些步骤是：(1) 测定起始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列，(2) 设计人源化抗体，即决定在人源化过程期间使用哪个抗体构架区，(3) 实际人源化方法/技术，以及(4) 人源化抗体的转染和表达。参见例如，美国专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;6,331,415;5,530,101;5,693,761;5,693,762;5,585,089;和6,180,370。

[0140] 已描述了包含衍生自非人免疫球蛋白的抗原结合位点的许多“人源化”抗体分子，包括具有啮齿类动物或修饰的啮齿类动物V区及其与人恒定区融合的相关CDR的嵌合抗体。参见例如，Winter等人*Nature* 349:293-299,1991,Lobuglio等人*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224,1989,Shaw等人*J Immunol.*138:4534-4538,1987,以及Brown等人*Cancer Res.*47:3577-3583,1987。其它参考文献描述了在与适当的人抗体恒定区融合之前，将啮齿类动物CDR移植到人支持构架区(FR)内。参见例如，Riechmann等人*Nature*332:323-327,1988,Verhoeyen等人*Science* 239:1534-1536,1988,以及Jones等人*Nature*321:522-525,1986。另一个参考文献描述了由重组改造的啮齿类动物构架区支持的啮齿类动物CDR。参见例如欧洲专利公开号0519596。这些“人源化”分子被设计为使针对啮齿类动物抗人抗体分子的不需要的免疫应答最小化，其限制了那些部分在人受体中的治疗应用的持续时间和有效性。例如，可以对抗体恒定区进行改造，使得它是免疫学惰性的(例如，不触发补体裂解)。参见例如PCT公开号PCT/GB99/01441;英国专利申请号9809951.8。也可以利用的人源化抗体的其它方法通过Daugherty等人,*Nucl. Acids Res.*19:2471-2476,1991,以及在美国专利号6,180,377;6,054,297;5,997,867;5,866,692;6,210,671;和6,350,861;以及PCT公开号WO 01/27160中公开。

[0141] 上文讨论的与人源化抗体相关的一般原理也适用于定制抗体，例如用于在犬、猫、灵长类动物、马科动物和牛族动物中使用。进一步地，可以组合本文所述的人源化抗体的一个或多个方面，例如CDR移植、构架突变和CDR突变。

[0142] 在一个变化中，可以通过使用商购可得的小鼠获得全人抗体，所述小鼠已改造为表达特异性人免疫球蛋白蛋白。设计为产生更期望的(例如，全人抗体)或更稳固的免疫应答的转基因动物也可以用于生成人源化或人抗体。此类技术的实例是来自Abgenix, Inc. (Fremont, CA)的XenomouseTM以及来自Medarex, Inc. (Princeton, NJ)的HuMAb-Mouse[®]和TC MouseTM。

[0143] 在一个替代方案中，抗体可以使用本领域已知的任何方法来重组制备且表达。在另一个替代方案中，抗体可以通过噬菌体展示技术来重组制备。参见例如，美国专利号5,565,332;5,580,717;5,733,743;和6,265,150;以及Winter等人,*Annu. Rev. Immunol.*12:433-455,1994。可替代地，噬菌体展示技术(McCafferty等人,*Nature* 348:552-553,1990)可以用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库，在体外产生人抗体和抗体片段。根据这种技术，将抗体V结构域基因框内克隆到丝状噬菌体如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因内，并且作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝，所以基于抗体的功能特性的选择还导致选择编码显示出那些特性的抗体的基因。因此，噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以各种形式执行;关于综述，参见例如Johnson, Kevin S.和Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571,1993。V基因区段的几种来源可以用于噬菌体展示。

Clackson等人, *Nature* 352:624-628, 1991, 从衍生自免疫小鼠的脾的V基因的小型随机组合文库中分离了广泛多样的抗噁唑酮抗体。基本上遵循由Mark等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, 或Griffith等人, *EMBO J.* 12:725-734, 1993所述的技术, 可以构建来自未免疫的人供体的V基因储库, 并且可以分离针对广泛多样的抗原(包括自身抗原)的抗体。在天然免疫应答中, 抗体基因以高速率积累突变(体细胞超突变)。引入的一些变化将赋予更高的亲和力, 并且展示高亲和力的表面免疫球蛋白的B细胞在随后的抗原攻击过程中被优先复制且分化。这种天然过程可以通过采用称为“链改组”的技术来模拟。(Marks等人, *Bio/Technol.* 10:779-783, 1992)。在这种方法中, 通过用从未免疫的供体获得的V结构域基因的天然存在变体储库(储库)序贯地替换重链和轻链V区基因, 可以改善通过噬菌体展示获得的“一级”人抗体的亲和力。这种技术允许产生亲和力在pM-nM范围内的抗体和抗体片段。用于制备极大噬菌体抗体储库(也称为“母文库(the mother-of-all libraries)”)的策略已通过Waterhouse等人, *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266, 1993进行描述。基因改组还可以用于从啮齿类动物抗体衍生人抗体, 其中所述人抗体具有与起始啮齿类动物抗体相似的亲和力和特异性。根据也称为“表位印迹”的这种方法, 将通过噬菌体展示技术获得的啮齿类动物抗体的重链或轻链V结构域基因替换为人V结构域基因的储库, 产生啮齿类动物-人嵌合体。在抗原上的选择导致分离能够恢复功能性抗原结合位点的人可变区, 即, 表位支配(标记)配偶体的选择。当重复该过程以便替换剩余的啮齿类动物V结构域时, 获得人抗体(参见PCT公开号W0 93/06213)。与啮齿类动物抗体通过CDR移植的传统人源化不同, 这种技术提供了完全人抗体, 其没有啮齿类动物起源的构架或CDR残基。

[0144] 抗体可以通过以下进行重组制备: 首先从宿主动物中分离抗体和抗体产生细胞, 获得基因序列, 并且使用基因序列以在宿主细胞(例如, CHO细胞)中重组表达抗体。可以采用的另一种方法是在植物(例如烟草)或转基因乳中表达抗体序列。已公开了用于在植物或乳中重组表达抗体的方法。参见例如, Peeters等人 *Vaccine* 19:2756, 2001; Lonberg, N. 和 D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13:65, 1995; 以及Pollock等人, *J Immunol Methods* 231:147, 1999。用于制备抗体的衍生物例如人源化的、单链等的方法是本领域已知的。

[0145] 免疫测定和流式细胞术分选技术, 例如荧光活化细胞分选(FACS), 也可以用于分离对于FLT3或目标肿瘤抗原特异性的抗体。

[0146] 如本文所述的抗体可以与许多不同的载体结合。载体可以是活性的和/或惰性的。众所周知的载体的实例包括聚丙烯、聚苯乙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、玻璃、天然和改性纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。为了本发明的目的, 载体的性质可以是可溶的或不溶的。本领域技术人员将知道用于结合抗体的其它合适的载体, 或将能够使用例行实验来确定这些。在一些实施方案中, 载体包含靶向心肌的部分。

[0147] 编码单克隆抗体的DNA使用常规程序容易地分离且测序(例如, 通过使用能够与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞充当此类DNA的优选来源。一旦分离, 就可以将DNA置于表达载体(例如PCT公开号W0 87/04462中公开的表达载体)内, 然后将所述表达载体转染到否则不产生免疫球蛋白蛋白的宿主细胞内, 所述宿主细胞例如大肠杆菌(*E. coli*)细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞, 以获得在重组宿主细胞中的单克隆抗体合成。参见例如PCT公开号W0 87/04462。还可以例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠序列(Morrison等人,

Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851,1984),或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价连接,来修饰DNA。以这种方式,制备具有本文单克隆抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂交”抗体。

[0148] 可以使用本领域已知的方法来鉴定或表征如本文所述的FLT3抗体,由此检测和/或测量FLT3表达水平的减少。在一些实施方案中,通过使候选试剂与FLT3一起温育,并且监测结合和/或FLT3表达水平的伴随减少,来鉴定FLT3抗体。结合测定可以用纯化的FLT3多肽,或者天然表达或经转染以表达FLT3多肽的细胞执行。在一个实施方案中,结合测定是竞争性结合测定,其中评估候选抗体与已知的FLT3抗体竞争FLT3结合的能力。该测定可以以各种形式,包括ELISA形式执行。

[0149] 在初步鉴定后,候选FLT3抗体的活性可以通过已知用于测试靶向生物活性的生物测定进一步确认且完善。可替代地,生物测定可以用于直接筛选候选物。实施例中详细描述了用于鉴定且表征抗体的一些方法。

[0150] 可以使用本领域众所周知的方法表征FLT3抗体。例如,一种方法是鉴定它与之结合的表位或“表位作图”。本领域中存在已知的许多方法用于作图且表征蛋白质上的表位,包括分辨抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争性测定、基因片段表达测定和基于合成肽的测定,如例如Harlow和Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1999的第11章中所述。在另一个实例中,表位作图可以用于测定抗体与之结合的序列。表位作图从各种来源商购可得,例如,Pepscan Systems (Edelhertweg 15,8219PH Lelystad,荷兰)。该表位可以是线性表位,即包含在单个氨基酸段中,或由氨基酸的三维相互作用形成的构象表位,所述氨基酸可以不一定包含在单个段中。可以分离或合成(例如,重组地)不同长度(例如,至少4-6个氨基酸长)的肽,并且用于与FLT3或其它肿瘤抗原抗体的结合测定。在另一个实例中,通过使用衍生自FLT3序列的重叠肽,并且测定通过FLT3抗体的结合,可以在系统筛选中测定FLT3抗体与之结合的表位。根据基因片段表达测定,编码FLT3的开放读码框被随机地或通过特定的遗传构建片段化,并且测定表达的FLT3片段与待测试抗体的反应性。基因片段可以例如通过PCR产生,然后在放射性氨基酸的存在下,在体外转录并翻译成蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定抗体与放射性标记的FLT3的结合。某些表位也可以通过使用在噬菌体颗粒的表面上展示的随机肽序列的大型文库(噬菌体文库)来鉴定。可替代地,可以在简单的结合测定中测试限定的重叠肽片段文库与测试抗体的结合。在另一个实例中,可以执行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变,以鉴定对于表位结合需要、充分和/或必需的残基。例如,可以使用突变型FLT3执行结构域交换实验,其中FLT3蛋白的各种片段已被替换(交换)为来自另一个物种(例如小鼠)的FLT3的序列、或紧密相关但抗原性不同的蛋白质。通过评价抗体与突变型FLT3的结合,可以评价特定FLT3片段对抗体结合的重要性。在FLT3特异性抗体(即不结合FLT3wt(野生型)或任何其它蛋白质的抗体)的情况下,可以从FLT3与FLT3wt的序列比对来推导表位。

[0151] 可以用于表征FLT3抗体的另外一种方法是使用具有其它抗体的竞争测定,所述其它抗体已知与相同抗原结合,即FLT3上的各种片段,以测定FLT3抗体是否结合与其它抗体相同的表位。竞争测定是本领域技术人员众所周知的。

[0152] 表达载体可以用于指导FLT3抗体的表达。本领域技术人员熟悉表达载体的施用,

以获得外源蛋白在体内的表达。参见例如,美国专利号6,436,908;6,413,942;和6,376,471。表达载体的施用包括局部或全身施用,包括注射、经口施用、粒子枪或插入导管的施用,以及局部施用。在另一个实施方案中,将表达载体直接施用于交感神经干或神经节,或施用到冠状动脉、心房、心室或心包膜内。

[0153] 也可以使用含有表达载体或亚基因组多核苷酸的治疗组合物的靶向递送。受体介导的DNA递送技术在例如以下中描述:Findeis等人,Trends Biotechnol.,1993,11:202;Chiou等人,Gene Therapeutics:Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J.A.Wolff,编辑,1994;Wu等人,J.Biol.Chem.,263:621,1988;Wu等人,J.Biol.Chem.,269:542,1994;Zenke等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:3655,1990;以及Wu等人,J.Biol.Chem.,266:338,1991。含有多核苷酸的治疗组合物以约100ng至约200mg DNA的范围施用,用于基因治疗方案中的局部施用。约500ng至约50mg、约1 μ g至约2mg、约5 μ g至约500 μ g、以及约20 μ g至约100 μ g DNA的浓度范围也可以在基因治疗方案过程中使用。可以使用基因递送媒介物来递送治疗性多核苷酸和多肽。基因递送媒介物可以具有病毒或非病毒起源(一般参见,Jolly,Cancer Gene Therapy,1:51,1994;Kimura,Human Gene Therapy,5:845,1994;Connelly,Human Gene Therapy,1995,1:185;以及Kaplitt,Nature Genetics,6:148,1994)。可以使用内源性哺乳动物启动子或异源启动子来诱导此类编码序列的表达。编码序列的表达可以是组成型的或调控的。

[0154] 用于递送所需多核苷酸和在所需细胞中表达的基于病毒的载体是本领域众所周知的。示例性的基于病毒的媒介物包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如,PCT公开号W0 90/07936;W0 94/03622;W0 93/25698;W0 93/25234;W0 93/11230;W0 93/10218;W0 91/02805;美国专利号5,219,740和4,777,127;GB专利号2,200,651;和EP专利号0345242)、基于甲病毒的载体(例如辛德毕斯病毒载体、塞姆利基森林病毒(ATCC VR-67;ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(ATCC VR-373;ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923;ATCC VR-1250;ATCC VR 1249;ATCC VR-532))、以及腺相关病毒(AAV)载体(参见例如PCT公开号W0 94/12649,W0 93/03769;W0 93/19191;W0 94/28938;W0 95/11984和W0 95/00655)。也可以采用如Curiel,Hum.Gene Ther.,1992,3:147中所述的,与杀死的腺病毒连接的DNA的施用。

[0155] 也可以采用非病毒递送媒介物和方法,包括但不限于与单独的杀死的腺病毒连接或未连接的聚阳离子缩合DNA(参见例如,Curiel,Hum.Gene Ther.,3:147,1992);配体连接的DNA(参见例如,Wu,J.Biol.Chem.,264:16985,1989);真核细胞递送媒介物细胞(参见例如,美国专利号5,814,482;PCT公开号W0 95/07994;W0 96/17072;W0 95/30763;和W0 97/42338)和核酸电荷中和或与细胞膜融合。也可以采用裸露DNA。示例性的裸露DNA引入方法在PCT公开号W0 90/11092和美国专利号5,580,859中描述。可以充当基因传递媒介物的脂质体在美国专利号5,422,120;PCT公开号W0 95/13796;W0 94/23697;W0 91/14445;和EP 0524968中描述。另外的方法在Philip,Mol.Cell Biol.,14:2411,1994以及Woffendin,Proc.Natl.Acad.Sci.,91:1581,1994中描述。

[0156] 在一些实施方案中,本发明涵盖组合物包括药物组合物,所述组合物包含本文所述或通过方法制备的抗体,并且具有本文所述的特征。如本文使用的,组合物包含与FLT3结合的一种或多种抗体,和/或包含编码一种或多种这些抗体的序列的一种或多种多核苷酸。

这些组合物可以进一步包含合适的赋形剂,例如药学上可接受的赋形剂,包括缓冲剂,其是本领域众所周知的。

[0157] 本发明还提供了制备这些抗体中的任意种的方法。本发明的抗体可以通过本领域已知的程序进行制备。可以通过抗体的蛋白酶降解或其它降解,通过如上所述的重组方法(即,单一多肽或融合多肽),或通过化学合成来产生多肽。抗体的多肽,尤其是至多约50个氨基酸的较短多肽,通过化学合成方便地制备。化学合成方法是本领域已知的并且是商购可得的。例如,抗体可以通过采用固相方法的自动化多肽合成仪产生。还参见美国专利号5,807,715;4,816,567;和6,331,415。

[0158] 在另一个替代方案中,可以使用本领域众所周知的程序重组制备抗体。在一个实施方案中,多核苷酸包含编码抗体P4F6、P4C7、P3A¹、P5A3、P9B5、P9F1、P1B4、P1B11、P7H3、P3E10、P1A5、P5F7、P4H11、P15F7、P12B6、P8B6、P14G2、P7F9、P08B06EE、P04A04、P01A05、P08B03、P5F7、P5F7g、P10A02g、P10A04g、P10A05g、P10A07g、P10B03g、P10B06g、P5F7g2、P5F7g3或P5F7g4的重链和/或轻链可变区的序列。可以将编码目标抗体的序列维持在宿主细胞中的载体中,然后将该宿主细胞扩增且冷冻用于未来使用。载体(包括表达载体)和宿主细胞在本文中进一步描述。

[0159] 包含两个共价连接的抗体的异源缀合物抗体也在本发明的范围内。此类抗体已用于将免疫系统细胞靶向不期望的细胞(美国专利号4,676,980),以及用于治疗HIV感染(PCT公开号W0 91/00360和W0 92/200373;EP 03089)。异源缀合物抗体可以使用任何方便的交联方法制备。合适的交联剂和技术是本领域众所周知的,并且在美国专利号4,676,980。

[0160] 嵌合或杂交抗体也可以使用合成蛋白化学的已知方法在体外制备,所述方法包括涉及交联剂的那些。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于这个目的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚胺酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0161] 在重组人源化抗体中,可以修饰Fc γ 部分,以避免与Fc γ 受体以及补体和免疫系统的相互作用。在W0 99/58572中描述了用于制备此类抗体的技术。例如,如果抗体用于人的临床试验和治疗中,则恒定区可以被改造为更类似人恒定区,以避免免疫应答。参见例如,美国专利号5,997,867和5,866,692。

[0162] 本发明涵盖对本发明的抗体和多肽的修饰,包括表5中所示的变体,包括并不显著影响其性质的功能上等价的抗体,以及具有增强或降低的活性和/或亲和力的变体。例如,可以使氨基酸序列突变,以获得对FLT3具有所需结合亲和力的抗体。多肽的修饰是本领域的常规实践,且无需在本文中详细描述。修饰多肽的实例包括具有氨基酸残基的保守取代的多肽,不显著地有害地改变功能活性、或成熟(增强)多肽对于其配体的亲和力的氨基酸的一种或多种缺失或添加,或化学类似物的使用。

[0163] 氨基酸序列插入包括长度范围从一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合物,以及单个或多重氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体或与表位标签融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N末端或C末端与酶或多肽的融合,其增加抗体在血液循环中的半衰期。

[0164] 取代变体具有在抗体分子中去除的至少一个氨基酸残基,并且在原位插入了不同的残基。对于取代诱变最感兴趣的位点包括高变区,但也考虑了FR改变。保守取代显示在

表5的“保守取代”标题下。如果此类取代导致生物活性中的改变,则可以引入在表5中命名为“示例性取代”、或如下文参考氨基酸类别进一步描述的更显著改变,并且筛选产物。在一些实施方案中,与参考亲本抗体相比,本文提供的抗体的取代变体在VH或VL区中具有不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个保守取代。在一些实施方案中,取代不在VH或VL区的CDR内。

[0165] 表5:氨基酸取代

原始残基 (天然存在的氨基酸)	保守取代	示例性取代
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸
Leu (L)	Ile	正亮氨酸 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸

[0166] 抗体的生物特性中的基本修饰通过选择取代来实现,所述取代在其维持以下的作用方面显著不同:(a) 取代区域中的多肽主链结构,例如,作为片层或螺旋构象,(b) 分子在靶部位处的电荷或疏水性,或(c) 侧链的体积。天然存在的氨基酸残基基于共同的侧链特性进行分组:

- (1) 非极性的:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) 极性的,无电荷: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- (3) 酸性的(带负电的):Asp,Glu;
- (4) 碱性的(带正电的):Lys,Arg;
- (5) 影响链取向的残基:Gly,Pro;和
- (6) 芳香族的:Trp,Tyr,Phe,His。

[0167] 通过将这类别之一的成员交换为另一个类别来制备非保守取代。

[0168] 一般还可以用丝氨酸取代不涉及维持抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基,以改善分子的氧化稳定性并防止异常的交联。相反,可以将半胱氨酸键加入抗体中,以改善其稳定性,特别是当抗体是抗体片段如Fv片段时。

[0169] 氨基酸修饰的范围可以从改变或修饰一个或多个氨基酸到区域(例如可变区)的完全重新设计。可变区中的变化可以改变结合亲和力和/或特异性。在一些实施方案中,在CDR结构域内进行不超过一到五个保守氨基酸取代。在其它实施方案中,在CDR结构域内进行不超过一到三个保守氨基酸取代。在另外其它实施方案中,CDR结构域是CDR H3和/或CDR L3。

[0170] 修饰还包括糖基化和非糖基化的多肽,以及具有其它翻译后修饰的多肽,例如,用不同糖的糖基化、乙酰化和磷酸化。抗体在其恒定区中的保守位置处被糖基化(Jefferis和Lund,Chem.Immunol.65:111-128,1997;Wright和Morrison,TibTECH 15:26-32,1997)。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能(Boyd等人,Mol.Immunol.32:1311-1318,1996;Wittwe和Howard,Biochem.29:4175-4180,1990),以及糖蛋白的各部分之间的分子内相互作用,其可以影响糖蛋白的构象并呈现三维表面(Jefferis和Lund,同上;Wyss和Wagner,Current Opin.Biotech.7:409-416,1996)。寡糖还可以作用于基于特定的识别结构,将给定的糖蛋白靶向某些分子。抗体的糖基化还已报道影响抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。特别地,具有四环素调节的 $\beta(1,4)$ -N-乙酰氨基葡萄糖氨基转移酶III(GnTIII)(催化二等分GlcNAc的形成的糖基转移酶)表达的CHO细胞具有改善的ADCC活性(Umana等人,Mature Biotech.17:176-180,1999)。

[0171] 抗体的糖基化通常是N联或O联的。N联指碳水化合物部分附着至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸、天冬酰胺-X-苏氨酸和天冬酰胺-X-半胱氨酸(其中X是除了脯氨酸以外的任何氨基酸),是用于碳水化合物部分酶促附着至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中的这些三肽序列中任一的存在产生潜在的糖基化位点。O联糖基化指糖N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸(最通常为丝氨酸或苏氨酸)的附着,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0172] 通过改变氨基酸序列,使得它含有上述三肽序列中的一个或多个(对于N联糖基化位点),方便地实现糖基化位点对抗体的添加。也可以通过向原始抗体的序列中添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行改变(对于O联糖基化位点)。

[0173] 抗体的糖基化模式也可以改变,而不改变基础核苷酸序列。糖基化在很大程度上取决于用于表达抗体的宿主细胞。由于用于表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白例如抗体的细胞类型很少是天然细胞,因此可以预期抗体的糖基化模式中的变化(参见例如Hse等人,J.Biol.Chem.272:9062-9070,1997)。

[0174] 除宿主细胞的选择之外,在抗体的重组生产过程中影响糖基化的因素还包括生长模式、培养基制剂、培养物密度、氧合、pH、纯化方案等等。已提出了各种方法来改变在特定

宿主生物中实现的糖基化模式,包括引入或过表达涉及寡糖生产的某些酶(美国专利号5,047,335;5,510,261和5,278,299)。例如,使用内切糖苷酶H(Endo H)、N-糖苷酶F、内切糖苷酶F1、内切糖苷酶F2、内切糖苷酶F3,可以从糖蛋白中酶促去除糖基化或某些类型的糖基化。另外,重组宿主细胞可以进行遗传改造,以在加工某些类型的多糖时是缺陷的。这些技术和类似技术是本领域众所周知的。

[0175] 其它修饰方法包括使用本领域已知的偶联技术,包括但不限于酶促手段、氧化取代和螯合。修饰可以用于例如标记物的附着用于免疫测定。修饰多肽使用本领域已建立的程序制备,并且可以使用本领域已知的标准测定进行筛选,其中一些在下文和实施例中进行描述。

[0176] 其它抗体修饰包括已如PCT公开号W0 99/58572中所述进行修饰的抗体。除针对靶分子的结合结构域之外,这些抗体还包含效应子结构域,其具有与人免疫球蛋白重链的恒定区的全部或部分基本上同源的氨基酸序列。这些抗体能够结合靶分子,而不触发明显的补体依赖性裂解或细胞介导的靶破坏。在一些实施方案中,效应子结构域能够特异性结合FcRn和/或Fc γ RI Ib。这些通常基于衍生自两个或更多个人免疫球蛋白重链C_H2结构域的嵌合结构域。以这种方式修饰的抗体特别适用于慢性抗体疗法中,以避免对常规抗体疗法的炎症及其它不良反应。

[0177] 本发明包括亲和力成熟的实施方案。例如,亲和力成熟的抗体可以通过本领域已知的程序产生(Marks等人,Bio/Technology,10:779-783,1992;Barbas等人,Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813,1994;Schier等人,Gene,169:147-155,1995;Yelton等人,J. Immunol.,155:1994-2004,1995;Jackson等人,J. Immunol.,154(7):3310-9,1995,Hawkins等人,J. Mol. Biol.,226:889-896,1992;和PCT公开号W02004/058184)。

[0178] 下述方法可以用于调节抗体的亲和力和CDR的表征。表征抗体的CDR和/或改变(例如改善)多肽(例如抗体)的结合亲和力的一种方式称为“文库扫描诱变”。一般地,文库扫描诱变如下工作。使用本领域公认的方法,用两个或更多个(例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)个氨基酸替换CDR中的一个或多个氨基酸位置。这生成小型克隆文库(在一些实施方案中,对于所分析的每一个氨基酸位置一个克隆),所述克隆各自具有两个或更多个成员的复杂性(如果在每一个位置处取代两个或更多个氨基酸)。一般地,该文库还包括包含天然(未取代)氨基酸的克隆。在来自每个文库的少量克隆,例如约20-80个克隆(取决于文库的复杂性)中筛选与靶多肽(或其它结合靶)的结合亲和力,并且鉴定具有增加的结合、相同的结合、降低的结合或无结合的候选物。用于测定结合亲和力的方法是本领域众所周知的。可以使用Biacore™表面等离子共振分析来测定结合亲和力,所述分析检测结合亲和力中约2倍或更大的差异。当起始抗体已经以相对高的亲和力(例如约10nM或更低的K_D)结合时,Biacore™是特别有用的。在本文的实施例中描述了使用Biacore™表面等离子共振的筛选。

[0179] 结合亲和力可以使用Kinexa Biocensor、闪烁邻近测定、ELISA、ORIGEN免疫测定(IGEN)、荧光猝灭、荧光转移和/或酵母展示来测定。结合亲和力也可以使用合适的生物测定进行筛选。

[0180] 在一些实施方案中,使用本领域公认的诱变方法(其中的一些在本文中描述),用所有20种天然氨基酸替换(在一些实施方案中,一次一个)CDR中的每一个氨基酸位置。这生

成小型克隆文库(在一些实施方案中,对于所分析的每一个氨基酸位置一个克隆),所述克隆各自具有20个成员的复杂性(如果在每一个位置处取代所有20种氨基酸)。

[0181] 在一些实施方案中,待筛选的文库包含在两个或更多个位置中的取代,所述位置可以在相同的CDR中或者在两个或更多个CDR中。因此,该文库可以包含在一个CDR中的两个或更多个位置处的取代。该文库可以包含在两个或更多个CDR中的两个或更多个位置处的取代。该文库可以包含在3、4、5个或更多个位置中的取代,所述位置在两个、三个、四个、五个或六个CDR中发现。可以使用低冗余密码子来制备取代。参见例如,Balint等人,Gene 137 (1):109-18,1993的表2。

[0182] CDR可以是CDRH3和/或CDRL3。CDR可以是CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2和/或CDRH3中的一个或多个。CDR可以是Kabat CDR、Chothia CDR或延伸的CDR。

[0183] 可以对具有改善结合的候选物进行测序,从而鉴定导致改善的亲合力(也称为“改善的”取代)的CDR取代突变体。还可以对结合的候选物进行测序,从而鉴定保留结合的CDR取代。

[0184] 可以进行多轮筛选。例如,具有改善结合的候选物(所述候选物各自包含在一个或多个CDR的一个或多个位置处的氨基酸取代)也可用于设计第二文库,所述第二文库至少含有在每个改善的CDR位置(即,在其下取代突变体显示改善结合的CDR中的氨基酸位置)处的原始氨基酸和取代的氨基酸。这种文库的制备和筛选或选择在下文进一步讨论。

[0185] 文库扫描诱变还提供了用于表征CDR的手段,只要具有改善的结合、相同的结合、降低的结合或无结合的克隆频率,还提供了与每个氨基酸位置对于抗体-抗原复合物的稳定性的重要性有关的信息。例如,如果CDR的位置在改变为所有20种氨基酸时保留结合,则该位置被鉴定为不太可能是抗原结合所必需的位置。相反,如果CDR的位置仅在很小百分比的取代中保留结合,则该位置被鉴定为对CDR功能重要的位置。因此,文库扫描诱变方法生成关于CDR中可以改变为许多不同氨基酸(包括所有20种氨基酸)的位置的信息,以及CDR中不能改变或只能改变为几个氨基酸的位置的信息。

[0186] 具有改善亲和力的候选物可以在第二文库中组合,所述第二文库包括改善的氨基酸、在该位置处的原始氨基酸,并且可以进一步包括在该位置处的另外取代,取决于所需或者使用所需筛选或选择方法允许的文库的复杂性。另外,需要时,可以将相邻氨基酸位置随机化为至少两个或更多个氨基酸。相邻氨基酸的随机化可以允许突变型CDR中的另外构象灵活性,其依次又可以允许或促进大量改善突变的引入。该文库还可以包含在第一轮筛选中未显示出改善亲和力的位置处的取代。

[0187] 使用本领域已知的任何方法,在第二文库中筛选或选择具有改善的和/或改变的结合亲和力的文库成员,包括使用Biacore™表面等离子共振分析的筛选,以及使用本领域已知的用于选择的任何方法的选择,所述方法包括噬菌体展示、酵母展示和核糖体展示。

[0188] 本发明还涵盖融合蛋白,其包含来自本发明的抗体的一个或多个片段或区域。在一个实施方案中,提供了融合多肽,其包含SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230或232中所示的可变轻链区的至少10个邻接氨基酸,和/或SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231或233中所示的可变重链区的至少10个氨基酸。在其它实施方案中,提供了融

合多肽,其包含可变轻链区的至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个、或至少约30个邻接氨基酸,和/或可变重链区的至少约10个、至少约15个、至少约20个、至少约25个、或至少约30个邻接氨基酸。在另一个实施方案中,融合多肽包含一个或多个CDR。在另外其它实施方案中,融合多肽包含CDR H3 (VH CDR3) 和/或CDR L3 (VL CDR3)。为了本发明的目的,融合蛋白含有一种或多种抗体,以及在天然分子中它与之不附着的另一种氨基酸序列,例如来自另一个区域的异源序列或同源序列。示例性异源序列包括但不限于“标签”,例如FLAG标签或6His标签。标签是本领域众所周知的。

[0189] 融合多肽可以通过本领域已知的方法,例如合成或重组产生。通常,本发明的融合蛋白通过使用本文所述的重组方法制备编码其的表达多核苷酸来制备,尽管它们也可以通过本领域已知的其它方式,包括例如化学合成来制备。

[0190] 本发明还提供了包含缀合(例如连接)至试剂的抗体的组合物,所述试剂促进与固体支持物(例如生物素或抗生物素蛋白)的偶联。为了简单起见,一般伴随这些方法适用于本文所述的任何FLT3抗体实施方案的理解提及抗体。缀合一般指连接如本文所述的这些组分。可以以多种方式来实现连接(其一般将这些组分紧密结合地固定在一起至少用于施用)。例如,当试剂和抗体各自具有能够彼此反应的取代基时,在试剂和抗体之间的直接反应是可能的。例如,在一个上的亲核基团,例如氨基或巯基,可能能够与另一个上的含羰基基团例如酸酐或酰卤,或者与含有良好离去基团(例如,卤化物)的烷基基团反应。

[0191] 本发明还提供了编码本发明的抗体的分离的多核苷酸,以及包含该多核苷酸的载体和宿主细胞。

[0192] 相应地,本发明提供了多核苷酸(或组合物,包括药物组合物),其包含编码下述任意种的多核苷酸:P4F6、P4C7、P3A、P5A3、P9B5、P9F1、P1B4、P1B11、P7H3、P3E10、P1A5、P5F7、P4H11、P15F7、P12B6、P8B6、P14G2、P7F9、P08B06EE、P04A04、P01A05、P08B03、P5F7、P5F7g、P10A02g、P10A04g、P10A05g、P10A07g、P10B03g、P10B06g、P5F7g2、P5F7g3、P5F7g4、或者其具有结合FLT3的能力的任何片段或部分。

[0193] 在另一个方面,本发明提供了编码本文所述的任何抗体(包括抗体片段)和多肽的多核苷酸,例如具有受损的效应子功能的抗体和多肽。可以通过本领域已知的程序制备且表达多核苷酸。

[0194] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的任何多核苷酸的组合物(例如药物组合物)。在一些实施方案中,所述组合物包含表达载体,所述表达载体包含编码本文所述的任何抗体的多核苷酸。

[0195] 表达载体和多核苷酸组合物的施用在本文中进一步描述。

[0196] 在另一个方面,本发明提供了制备本文所述的任何多核苷酸的方法。

[0197] 与任何此类序列互补的多核苷酸也由本发明涵盖。多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,并且可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子包括含有内含子并以一对一方式对应于DNA分子的HnRNA分子,以及不含内含子的mRNA分子。另外的编码序列或非编码序列可以但不必存在于本发明的多核苷酸内,并且多核苷酸可以但不必与其它分子和/或支持材料连接。

[0198] 多核苷酸可以包含天然序列(即,编码抗体或其一部分的内源序列),或可以包含此类序列的变体。多核苷酸变体含有一个或多个取代、添加、缺失和/或插入,使得相对于天

然免疫反应性分子,编码多肽的免疫反应性并不减小。一般可以如本文所述评价对编码多肽的免疫反应性的作用。变体优选显示出与编码天然抗体或其一部分的多核苷酸序列至少约70%的同一性,更优选至少约80%的同一性,再更优选至少约90%的同一性,且最优选至少约95%的同一性。

[0199] 如果当如下所述就最大对应进行比对时,两个序列中的核苷酸或氨基酸序列是相同的,则两个多核苷酸或多肽序列被说成是“等同的”。通常通过在比较窗上比较序列以鉴定且比较序列相似性的局部区域,来执行两个序列之间的比较。如本文使用的,“比较窗”指至少约20个,通常为30至约75个、或40至约50个邻接位置的区段,其中在两个序列进行最佳比对后,可以将序列与具有相同数目的邻接位置的参考序列进行比较。

[0200] 使用缺省参数,使用Lasergene生物信息学软件试剂盒(DNASTAR, Inc., Madison, WI)中的Megalalign程序,可以进行用于比较的序列的最佳比对。这个程序体现了下述参考文献中描述的几种比对方案:Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (编辑) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC第5卷, Suppl. 3, 第345-358页; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis第626-645页 Methods in Enzymology第183卷, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. 和 Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. 和 Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. 和 Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. 和 Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

[0201] 优选地,通过在至少20个位置的比较窗上比较两个最佳比对的序列来确定“序列同一性的百分比”,其中比较窗中的多核苷酸或多肽序列的部分可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比20百分比或更少,通常为5至15百分比,或10至12百分比的添加或缺失(即,缺口),用于两个序列的最佳比对。百分比通过以下进行计算:测定在其处等同的核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中出现的位置数目,以得到匹配位置数目,将匹配位置数目除以参考序列中的位置总数目(即窗口大小),并且将结果乘以100,以得到序列同一性的百分比。

[0202] 变体也可以或可替代地与天然基因或者其一部分或互补体基本上同源。此类多核苷酸变体能够在中等严格条件下与编码天然抗体的天然存在的DNA序列(或互补序列)杂交。

[0203] 合适的“中等严格条件”包括在5X SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0)的溶液中的预洗涤;在50°C-65°C、5X SSC下杂交过夜;随后为在65°C下用含有0.1% SDS的2X、0.5X和0.2X SSC洗涤两次,各20分钟。

[0204] 如本文使用的,“高度严格条件”或“高严格性条件”是这样的条件,其:(1)采用低离子强度和高温用于洗涤,例如在50°C下0.015M氯化钠/0.0015M柠檬酸钠/0.1%十二烷基硫酸钠;(2)在杂交过程中采用变性剂,在42°C下例如甲酰胺,例如具有0.1%牛血清白蛋白的50% (v/v)甲酰胺/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/具有750mM氯化钠、75mM柠檬酸

钠以pH 6.5的50mM磷酸钠缓冲液;或(3)在42℃下采用50%甲酰胺、5x SSC(0.75M NaCl、0.075M柠檬酸钠)、50mM磷酸钠(pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5x Denhardt溶液、超声处理的鲑精DNA(50μg/ml)、0.1%SDS和10%硫酸葡聚糖,伴随在42℃下在0.2x SSC(氯化钠/柠檬酸钠)中和在55℃下50%甲酰胺中的洗涤,随后为在55℃下由含有EDTA的0.1x SSC组成的高严格性洗涤。技术人员将认识到如何根据需要调节温度、离子强度等,以适应诸如探针长度等等因素。

[0205] 本领域普通技术人员将了解,由于遗传密码的简并性,存在编码如本文所述的多肽的许多核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与任何天然基因的核苷酸序列具有最低限度的同源性。然而,本发明特别考虑了由于密码子使用中的差异而变的多核苷酸。进一步地,包含本文提供的多核苷酸序列的基因的等位基因在本发明的范围内。等位基因是由于一种或多种突变(例如核苷酸的缺失、添加和/或取代)而改变的内源基因。所得到的mRNA和蛋白质可以但不必具有改变的结构或功能。可以使用标准技术(例如杂交、扩增和/或数据库序列比较)鉴定等位基因。

[0206] 可以使用化学合成、重组方法或PCR获得本发明的多核苷酸。化学多核苷酸合成的方法是本领域众所周知的,并且无需在本文中详细描述。本领域技术人员可以使用本文提供的序列和商业DNA合成仪,以产生所需的DNA序列。

[0207] 为了使用重组方法制备多核苷酸,可以将包含所需序列的多核苷酸插入合适的载体内,并且依次又可以将该载体引入合适的宿主细胞内用于复制和扩增,如本文进一步讨论的。可以通过本领域已知的任何手段,将多核苷酸插入宿主细胞内。通过直接摄取、内吞、转染、F-交配或电穿孔,通过引入外源多核苷酸来转化细胞。一旦引入,外源多核苷酸就可以作为非整合载体(例如质粒)维持在细胞内、或整合到宿主细胞基因组内。如此扩增的多核苷酸可以通过本领域众所周知的方法从宿主细胞中分离。参见例如,Sambrook等人,1989。

[0208] 可替代地,PCR允许DNA序列的复制。PCR技术是本领域众所周知的,并且在美国专利号4,683,195、4,800,159、4,754,065和4,683,202中,以及PCR:The Polymerase Chain Reaction,Mullis等人编辑,Birkaswer Press,Boston,1994中描述。

[0209] 通过使用在适当载体中的分离的DNA,并且将其插入适当的宿主细胞内,可以获得RNA。当细胞复制并且DNA被转录成RNA时,然后可以使用本领域技术人员众所周知的方法,例如如Sambrook等人,1989,同上中所述分离RNA。

[0210] 合适的克隆载体可以根据标准技术构建,或者可以选自本领域中可获得的大量克隆载体。尽管选择的克隆载体可以根据预期使用的宿主细胞而变,但有用的克隆载体一般具有自我复制的能力,可能具有用于特定限制性核酸内切酶的单一靶,和/或可能携带关于可以用于选择含有该载体的克隆中的标记物的基因。合适的实例包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA以及穿梭载体例如pSA3和pAT28。这些和许多其它克隆载体可从商业供应商例如BioRad、Stratagene和Invitrogen获得。

[0211] 表达载体一般是可复制的多核苷酸构建体,其含有根据本发明的多核苷酸。暗示表达载体必须可作为附加体或作为染色体DNA的整合部分在宿主细胞中复制。合适的表达载体包括但不限于质粒,病毒载体,包括腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒、粘粒和PCT公开

号WO 87/04462中公开的表达载体。载体组分一般可以包括但不限于下述中的一种或多种：信号序列；复制起点；一种或多种标记物基因；合适的转录控制元件（例如启动子、增强子和终止子）。为了表达（即翻译），通常还需要一种或多种翻译控制元件，例如核糖体结合位点、翻译起始位点和终止密码子。

[0212] 含有目标多核苷酸的载体可以通过许多适当手段中的任意种引入宿主细胞内，所述手段包括电穿孔，采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其它物质的转染；微粒轰击；脂转染；以及感染（例如，当载体是传染原，例如牛痘病毒时）。引入载体或多核苷酸的选择经常取决于宿主细胞的特点。

[0213] 本发明还提供了包含本文所述的任何多核苷酸的宿主细胞。能够过表达异源DNA的任何宿主细胞都可以用于分离编码目标抗体、多肽或蛋白质的基因的目的。哺乳动物宿主细胞的非限制性实例包括但不限于COS、HeLa和CHO细胞。还参见PCT公开号WO 87/04462。合适的非哺乳动物宿主细胞包括原核生物（例如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*））和酵母（例如酿酒酵母（*S. cerevisiae*）、粟酒裂殖酵母（*S. pombe*）或乳酸克鲁维酵母（*K. lactis*））。优选地，宿主细胞以比宿主细胞中相应的内源抗体或目标蛋白质（如果存在的话）的表达高约5倍，更优选地高10倍，甚至更优选地高20倍的水平表达cDNA。通过免疫测定或FACS完成在宿主细胞中筛选与FLT3的特异性结合。可以鉴定过表达目标抗体或蛋白质的细胞。

[0214] 使用FLT3抗体的方法

本发明的抗体可用于各种应用中，包括但不限于治疗性处理方法和诊断处理方法。

[0215] 通过上述方法获得的抗体（例如，单特异性和双特异性）可以用作药物。在一些实施方案中，此类药物可以用于治疗癌症。在一些实施方案中，所述癌症是造血起源的癌症，例如淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中，所述癌症是多发性骨髓瘤、恶性浆细胞瘤、霍奇金氏淋巴瘤、结节性淋巴细胞为主型霍奇金氏淋巴瘤、卡勒氏病和骨髓瘤病、浆细胞白血病、B幼淋巴细胞白血病、毛细胞白血病、B细胞非霍奇金氏淋巴瘤（NHL）、急性髓样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、急性淋巴细胞性白血病（ALL）、慢性髓样白血病（CML）、滤泡性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞性淋巴瘤、髓样白血病、华氏巨球蛋白血症、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、原发纵隔（胸腺）大B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、富含T细胞/组织细胞大B细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性皮肤弥漫性大B细胞淋巴瘤（腿型）、老年人EBV阳性弥漫性大B细胞淋巴瘤、与炎症相关的弥散性大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、ALK阳性大B细胞淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、源于HHV-8相关多中心卡斯特曼病的大B细胞淋巴瘤、特征介于弥散性大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤之间的未分类的B细胞淋巴瘤、特征介于弥漫性大B细胞淋巴瘤和典型霍奇金淋巴瘤之间的未分类的B细胞淋巴瘤、或其它造血细胞相关的癌症。在一个优选实施方案中，所述癌症是AML。在一个优选实施方案中，所述癌症是ALL。

[0216] 在一些实施方案中，提供的是抑制具有表达FLT3的恶性细胞的受试者中的肿瘤生

长或进展的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含如本文所述的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)的组合物。在其它实施方案中,提供的是抑制受试者中的表达FLT3的细胞转移的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含如本文所述的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)的组合物。在其它实施方案中,提供的是诱导受试者中的恶性细胞中的肿瘤消退的方法,其包括向有此需要的受试者施用有效量的包含如本文所述的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)的组合物。

[0217] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)可以用于制造用于治疗有此需要的患者中的癌症的药物。

[0218] 在一些实施方案中,所述治疗可以与选自以下的针对癌症的一种或多种疗法组合:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、靶向疗法、疫苗疗法、树突状细胞疗法、基因疗法、激素疗法、手术切除、激光疗法和放射疗法。

[0219] 在一些实施方案中,用于细胞因子疗法中的细胞因子是白介素(IL)-1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17。在一些实施方案中,细胞因子是IL-15、IL-12或IL-2。例如,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)与野生型IL-15(例如,登录号>sp|P40933|49-162或SEQ ID NO:293)结合(例如之前、同时或之后)施用于患者。

[0220] 在一些实施方案中,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)与生物治疗剂结合(例如之前、同时或之后)施用于患者,所述生物治疗剂例如抗体,包括但不限于,抗CTLA-4抗体、抗4-1BB抗体(例如PF-04518600)、抗PD-1抗体(例如纳武单抗、帕博利珠单抗或PF-06801591)、抗-PD-L1抗体(例如阿维单抗、阿特珠单抗或度伐鲁单抗)、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗TIGIT抗体、抗OX40抗体、IL-8抗体、抗HVEM抗体、抗BTLA抗体、抗CD40抗体、抗CD40L抗体、抗CD47抗体、抗CSF1R抗体、抗CSF1抗体、抗MARCO抗体、抗CXCR4抗体、抗VEGFR1抗体、抗VEGFR2抗体、抗TNFR1抗体、抗MCSF抗体(例如PD-0360324)、抗TNFR2抗体、抗CD3双特异性抗体、抗CD19抗体、抗CD20、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗ICOS抗体、抗CD22抗体、抗CD 52抗体、抗CCR4抗体、抗CCR8抗体、抗CD200R抗体、抗VISG4抗体、抗CCR2抗体、抗LILRb2抗体、抗CXCR4抗体、抗CD206抗体、抗CD163抗体、抗KLRG1抗体、抗B7-H4抗体、抗B7-H3抗体或抗GITR抗体。

[0221] 在一些实施方案中,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)与以下结合(例如之前、同时或之后)施用于患者:用CCR2拮抗剂(例如INC-8761)、抗病毒剂、西多福韦和白介素-2的治疗,用于MS患者的阿糖胞苷(也称为ARA-C)或那他珠单抗治疗,或用于牛皮癣患者的依法利珠单抗治疗,或用于PML患者的其它治疗。在一些实施方案中,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)可以与以下组合使用:化学疗法,放射,免疫抑制剂(例如环孢菌素、硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、霉酚酸酯和FK506),或其它免疫消除剂例如CAMPATH、细胞毒素、氟达立滨、环孢菌素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸(mycophenolic acid)、类固醇、FR901228、细胞因子和/或照射。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢素和FK506),或抑制对于生长因子诱导的信号传导重要的p70S6激酶(雷帕霉素)。在进一步的实施方案中,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)可以与激酶抑制剂组合使用,所述激酶抑制剂包括但不限于mTOR抑制剂、米哚妥林、来他替尼、索拉非尼、舒尼替尼、奎扎替尼、普纳替尼、克莱拉尼、帕博西尼和吉列替尼。

[0222] 在一些实施方案中,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)也可以与

以下组合使用:表观遗传调节剂、蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂(例如来那度胺)、Hedgehog抑制剂、TNF α (肿瘤坏死因子 α)、PAP(磷脂酸磷酸酶)抑制剂、溶瘤病毒、IDO(吡啶胺-吡咯2,3-双加氧酶)抑制剂、谷氨酰胺酶GLS1抑制剂、肿瘤疫苗、TLR(Toll样受体)激动剂(例如TLR3、TLR4、TLR5、TLR7或TLR9)、或异柠檬酸脱氢酶(IDH)抑制剂。

[0223] 在一个进一步的实施方案中,本发明的FLT3抗体(例如,FLT3-CD3双特异性抗体)与以下结合(例如之前、同时或之后)施用于患者:骨髓移植、CART(嵌合抗原受体T)细胞、使用任一化学治疗剂例如氟达拉滨的T细胞消融疗法、外部束放射疗法(XRT)、环磷酰胺、或者抗体例如OKT3或阿仑珠单抗。

[0224] 根据本发明的抗体(例如,单特异性或双特异性)的施用可以以任何方便的方式进行,包括通过气溶胶吸入、注射、摄入、输血、植入或移植。本文所述的组合物可以皮下、皮内、瘤内、颅内、结节内、髓内、肌内、通过静脉内或淋巴管内注射、或腹膜内施用于患者。在一个实施方案中,本发明的抗体组合物优选通过静脉内注射施用。

[0225] 在一些实施方案中,抗体(例如,单特异性或双特异性)的施用可以包含例如约0.01至约20mg/kg体重的施用,包括在这些范围内的mg/kg的所有整数值。在一些实施方案中,抗体的施用可以包含约0.1至10mg/kg体重的施用,包括在这些范围内的mg/kg的所有整数值。抗体可以在一个或多个剂量中施用。在一些实施方案中,所述有效量的抗体可以作为单一剂量施用。在一些实施方案中,所述有效量的抗体可以在一段时间内作为超过一个剂量施用。施用的时机在主治医师的判断内,并且取决于患者的临床状况。尽管个体需求变化,但对于特定疾病或状况确定给定抗体(例如,单特异性或双特异性)的有效量的最佳范围在本领域的技术内。有效量意指提供治疗或预防益处的量。施用的剂量取决于受体的年龄、健康和体重,同时治疗的种类(如果存在的话),治疗频率和所需效应的性质。在一些实施方案中,肠胃外施用有效量的异源多聚体抗体或包含那些抗体的组合物。在一些实施方案中,施用可以是静脉内施用。在一些实施方案中,施用可以通过在肿瘤内注射直接完成。

[0226] 在一些实施方案中,本文提供的抗FLT3抗体可以用于诊断目的,例如鉴定样品(例如,免疫组织化学测定)或患者中的FLT3蛋白的测定中。

[0227] 组合物

在一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含在药学上可接受的载体中的如上所述的本发明的抗体(例如,单特异性或双特异性)或其一部分。在某些实施方案中,本发明的多肽可以以中性形式(包括两性离子形式)、或者作为带正电或带负电的种类存在。在一些实施方案中,多肽可以与抗衡离子复合,以形成“药学上可接受的盐”,其指包含一种或多种多肽和一种或多种抗衡离子的复合物,其中所述抗衡离子衍生自药学上可接受的无机和有机酸和碱。

[0228] 抗体(例如,单特异性或双特异性)或其一部分可以单独施用,或者与本发明的一种或多种其它多肽组合、或与一种或多种其它药物(或其任何组合)组合施用。本发明的药物组合物、方法和用途因此还涵盖与其它活性剂组合(共施用)的实施方案,如下文详述的。

[0229] 如本文使用的,提及本发明的抗体和一种或多种其它治疗剂的术语“共施用”、“共施用的”和“与……组合”,预期意指并且确实指的是下述且包括下述:(i)当此类组分一起配制成单一剂型时,所述单一剂型在基本上相同时间将所述组分释放给所述患者,本文公开的抗体和治疗剂的此类组合同时施用于需要治疗的患者;(ii)当此类组分彼此分开配制

成分开的剂型时,所述分开的剂型在基本上相同时间由所述患者服用,本文公开的抗体和治疗剂的此类组合基本上同时施用于需要治疗的患者;(iii)当此类组分彼此分开配制成分开的剂型时,所述分开的剂型在相继时间由所述患者服用,在每次施用之间具有显著的时间间隔,本文公开的抗体和治疗剂的此类组合序贯施用于需要治疗的患者;以及(iv)当此类组分一起配制成单一剂型时,所述单一剂型以受控方式释放所述组分,由此它们在相同时间和/或不同时间同时、相继和/或重叠释放给所述患者,其中每个部分可以通过相同途径或不同途径施用,本文公开的抗体和治疗剂的此类组合序贯施用于需要治疗的患者。

[0230] 一般地,本文公开的抗体(例如,单特异性或双特异性)或其一部分适合作为与一种或多种药学上可接受的赋形剂结合的制剂施用。术语“赋形剂”在本文中用于描述除本发明的化合物外的任何成分。赋形剂的选择在很大程度上取决于诸如特定的施用模式,赋形剂对溶解度和稳定性的作用,以及剂型的性质的因素。如本文使用的,“药学上可接受的赋形剂”包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。药学上可接受的赋形剂的一些实例是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等等及其组合。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。药学上可接受的物质的另外实例是润湿剂或少量辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强抗体的贮存期限或有效性。

[0231] 本发明的药物组合物和关于其制备的方法对于本领域技术人员将是显而易见的。此类组合物和关于其制备的方法可以在例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第19版(MackPublishing Company,1995)中找到。药物组合物优选在GMP条件下制造。

[0232] 本发明的药物组合物可以以散装、作为单一单位剂量、或作为多个单一单位剂量制备、包装或出售。如本文使用的,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量一般等于将施用于受试者的活性成分的剂量,或此类剂量的方便部分,例如此类剂量的一半或三分之一。本领域接受的用于施用肽、蛋白质或抗体的任何方法都可以适当地用于本文公开的异源二聚体蛋白及其一部分。

[0233] 本发明的药物组合物通常适合于肠胃外施用。如本文使用的,药物组合物的“肠胃外施用”包括特征在于物理破坏受试者的组织、以及通过组织中的缺口施用药物组合物的任何施用途径,因此一般导致直接施用到血液、肌肉或内部器官内。肠胃外施用因此包括但不限于通过注射组合物,通过经由手术切口施加组合物,通过经由穿透组织的非手术伤口施加组合物等等的药物组合物施用。特别地,肠胃外施用考虑包括但不限于皮下、腹膜内、肌内、胸骨内、静脉内、动脉内、鞘内、心室内、尿道内、颅内、滑膜内注射或输注;以及肾脏透析输液技术。优选的实施方案包括静脉内和皮下途径。

[0234] 适合于肠胃外施用的药物组合物的制剂通常一般包含与药学上可接受的载体,例如无菌水或无菌等渗盐水组合的活性成分。此类制剂可以以适合于推注施用或连续施用的形式制备、包装或出售。可注射制剂可以在单位剂型例如安瓿中、或在含有防腐剂的多剂量容器中制备、包装或出售。用于肠胃外施用的制剂包括但不限于悬浮液、溶液、在油性或水性媒介物中的乳液、糊剂等等。此类制剂可以进一步包含一种或多种另外的成分,包括但不限于悬浮剂、稳定剂或分散剂。在用于肠胃外施用的制剂的一个实施方案中,活性成分以干燥(即粉末或颗粒)形式提供,用于在肠胃外施用重构的组合物之前用合适的媒介物(例如无菌无热原水)重构。肠胃外制剂还包括水溶液,其可以含有赋形剂,例如盐、碳水化合物和

缓冲剂(优选至pH 3至9),但对于某些应用,它们可以更合适地配制为无菌非水溶液或干燥形式,以与合适的媒介物例如无菌、无热原水结合使用。示例性的肠胃外施用形式包括在无菌水溶液,例如丙二醇水溶液或右旋糖水溶液中的溶液或悬浮液。需要时,此类剂型可以适当地进行缓冲。其它有用的可肠胃外施用的制剂包括包含以微晶形式或在脂质体制剂中的活性成分的那些制剂。用于肠胃外施用的制剂可以配制为立即释放和/或修饰释放。修饰释放制剂包括控制、延迟、持续、脉冲、靶向和按程序释放制剂。例如,在一个方面,可以通过以下来制备无菌可注射溶液:将以所需量的异源二聚体蛋白例如双特异性抗体与根据需要的上文列举的成分之一或组合掺入适当的溶剂中,随后为过滤灭菌。一般地,通过将活性化合物掺入无菌媒介物内来制备分散体,所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文列举的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其先前的无菌过滤溶液得到活性成分加上任何另外所需成分的粉末。溶液的适当流动性可以例如通过以下得到维持:使用包衣如卵磷脂,在分散体的情况下维持所需的粒径,以及使用表面活性剂。可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,来实现可注射组合物的延长吸收。

[0235] 可以调整剂量方案以提供最佳的所需应答。例如,可以施用单次推注,可以在一段时间内施用几个分份剂量,或可以如由治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制肠胃外组合物是尤其有利的,用于施用的容易和剂量的均匀性。如本文使用的,剂量单位形式指物理上离散的单位,其适合作为用于待治疗的患者/受试者的单位剂量。每个单元含有预定数量的活性化合物,所述数量计算为与所需的药物载体结合产生所需的疗效。关于本发明的剂量单位形式的规范一般由以下决定且直接取决于以下:(a) 化学治疗剂的独特特征和待实现的特定治疗或预防效应,以及(b) 配制此类活性化合物用于治疗个体中的敏感性的领域中固有的局限性。

[0236] 因此,基于本文提供的公开内容,技术人员将了解,根据治疗领域众所周知的方法调节剂量和给药方案。即,可以容易地确定最大可耐受剂量,并且还可以确定向患者提供可检测的治疗益处的有效量,以及关于施用每种试剂以向患者提供可检测的治疗益处的时间要求。相应地,尽管例示了某些剂量和施用方案,但是这些实施例绝不限制在实践本发明时可以提供给患者的剂量和施用方案。

[0237] 应注意,剂量值可以随着待缓解的状况的类型和严重性而变,并且可以包括单一剂量或多重剂量。还应理解,对于任何特定的受试者,应该根据个体需要和施用或监督组合物的施用人员的专业判断,随着时间过去调整具体的剂量方案,并且本文阐述的剂量范围仅是示例性的,并不预期限制请求保护的组合物的范围或实践。进一步地,关于本发明的组合物的剂量方案可以基于各种因素,包括疾病的类型,患者的年龄、重量、性别、医疗状况,状况的严重性,施用途径,以及采用的特定抗体。因此,剂量方案可以广泛变化,但可以使用标准方法常规确定。例如,可以基于药代动力学或药效学参数来调节剂量,所述药代动力学或药效学参数可以包括临床效应,例如毒性效应和/或实验室值。因此,本发明涵盖如由技术人员确定的患者内剂量递增。确定适当的剂量和方案是相关领域众所周知的,并且一旦提供了本文公开的教导,就由技术人员理解为涵盖的。

[0238] 一般地,对于本文所述的抗体(单特异性或双特异性)的施用,候选物剂量可以每天、每周、每隔一周、每三周、每四周、每五周、每六周、每七周、每八周、每十周、每十二周或

超过每十二周施用一次。对于经过几天或更长的重复施用,取决于状况,持续治疗直到出现所需的症状抑制或直到达到足够的治疗水平,例如以减少与癌症相关的症状。通过常规技术和测定容易地监测这种疗法的进展。给药方案(包括使用的抗FLT单特异性或双特异性抗体)可以随着时间过去变化。

[0239] 在一些实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每天施用一次,其剂量范围为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多中的任意种。例如,可以使用约 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.03\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 和约 $25\text{mg}/\text{kg}$ 的日剂量。

[0240] 在一些实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每周施用一次,其剂量范围为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多中的任意种。例如,可以使用约 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.03\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $25\text{mg}/\text{kg}$ 和约 $30\text{mg}/\text{kg}$ 的周剂量。

[0241] 在一些实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每两周施用一次,其剂量范围为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多中的任意种。例如,可以使用约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $25\text{mg}/\text{kg}$ 和约 $30\text{mg}/\text{kg}$ 的两周剂量。

[0242] 在一些实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每三周施用一次,其剂量范围为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多中的任意种。例如,可以使用约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $25\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $35\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $40\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $45\text{mg}/\text{kg}$ 和约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的三周剂量。

[0243] 在一些实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每月或每四周施用一次,其剂量范围为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 、至 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多中的任意种。例如,可以使用约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $25\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $30\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $35\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $40\text{mg}/\text{kg}$ 、约 $45\text{mg}/\text{kg}$ 和约 $50\text{mg}/\text{kg}$ 的月剂量。

[0244] 在其它实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每天施用一次,其剂量范围为约 0.01mg 至约 1200mg 或更多。例如,可以使用约 0.01mg 、约 0.1mg 、约 1mg 、约 10mg 、约 50mg 、约 100mg 、约 200mg 、约 300mg 、约 400mg 、约 500mg 、约 600mg 、约 700mg 、约 800mg 、约 900mg 、约 1000mg 、约 1100mg 或约 1200mg 的日剂量。

[0245] 在其它实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每周施用一次,其剂量范围为约 0.01mg 至约 2000mg 或更多。例如,可以使用约 0.01mg 、约 0.1mg 、约 1mg 、约 10mg 、约 50mg 、约 100mg 、约 200mg 、约 300mg 、约 400mg 、约 500mg 、约 600mg 、约 700mg 、约 800mg 、约 900mg 、约 1000mg 、约 1100mg 、约 1200mg 、约 1300mg 、约 1400mg 、约 1500mg 、约 1600mg 、约 1700mg 、约 1800mg 、约 1900mg 或约 2000mg 的周剂量。

[0246] 在其它实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每两周施用一次,其剂量范围为约 0.01mg 至约 2000mg 或更多。例如,可以使用约 0.01mg 、约 0.1mg 、约 1mg 、约 10mg 、约 50mg 、约 100mg 、约 200mg 、约 300mg 、约 400mg 、约 500mg 、约 600mg 、约 700mg 、约 800mg 、约 900mg 、约

1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg或约2000mg的两周剂量。

[0247] 在其它实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每三周施用一次,其剂量范围约为0.01mg至约2500mg或更多。例如,可以使用约0.01mg、约0.1mg、约1mg、约10mg、约50mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2100mg、约2200mg、约2300mg、约2400mg或约2500mg的三周剂量。

[0248] 在其它实施方案中,取决于上述因素,候选物剂量每四周或每月施用一次,其剂量范围为约0.01mg至约3000mg或更多。例如,可以使用约0.01mg、约0.1mg、约1mg、约10mg、约50mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2100mg、约2200mg、约2300mg、约2400mg、约2500mg、约2600mg、约2700mg、约2800mg、约2900mg或约3000mg的月剂量。

[0249] 试剂盒

本发明还提供了用于本方法中的试剂盒。本发明的试剂盒包括一个或多个容器,其包含如本文所述的抗体(例如,单特异性或双特异性)和根据本文所述的本发明的任何方法的使用说明书。一般地,这些说明书包含用于上述治疗性处理的抗体蛋白质的施用的描述。

[0250] 与如本文所述的抗体(例如,单特异性或双特异性)的使用有关的说明书一般包括关于用于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。本发明的试剂盒中供应的说明书通常是在标签或包装插页(例如,试剂盒中包括的纸张)上的书面说明书,但机器可读的说明书(例如,磁盘或光学存储盘上携带的说明)也是可接受的。

[0251] 本发明的试剂盒在合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶,瓶,广口瓶,软包装(例如密封的聚酯薄膜或塑料袋)等等。还考虑的是用于与特定装置例如吸入器、鼻腔施用装置(例如雾化器)或输注装置例如微型泵组合使用的包装。试剂盒可以具有无菌入口(例如,容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶)。容器也可以具有无菌入口(例如,容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉注射溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是双特异性抗体。容器可以进一步包含第二药物活性剂。

[0252] 试剂盒可以任选地提供另外的组分,例如缓冲液和解释性信息。通常,试剂盒包括容器和在容器上或与容器相关的标签或包装插页。

[0253] 生物保藏

本发明的代表性材料于2017年6月1日保藏于美国典型培养物保藏中心,10801University Boulevard,Manassas,Va.20110-2209,USA。具有ATCC登录号PTA-124230的载体P5F7g2-VL(Plasmids;P5F7g2-VL)是编码P5F7g2轻链可变区的多核苷酸,并且具有ATCC登录号PTA-124229的载体P5F7g2-VH(Plasmids;P5F7g2-VH)是编码P5F7g2重链可变区的多核苷酸。保藏根据国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约及其实施细则

(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations thereunder) (布达佩斯条约)的规定进行。这确保保藏物的活培养物从保藏日起维持30年。保藏根据布达佩斯条约条款通过ATCC可获得,并且遵守Pfizer, Inc.和ATCC之间的协议,所述协议确保在相关的美国专利发布时、或者在向公众公开任何美国或外国专利申请时(以先到者为准),保藏物培养物的后代对公众的永久且不受限制的可用性,并且确保根据35U.S.C. §122和根据其制定的专员规则(包括37C.F.R. §1.14,其中特别提及8860G 638),后代对由美国专利商标局局长授权的人的可用性。

[0254] 本申请的受让人已同意,如果在合适的条件下培养时,所保藏材料的培养物可能死亡、丢失或破坏,则将在通知后迅速将材料替换为相同的另一份。保藏材料的可得性不应解释为违反任何政府当局根据其专利法授予的权利来实践发明的许可。

[0255] 还参考在本文中公开,并且于2017年6月1日保藏于美国典型培养物保藏中心,10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA的材料。具有ATCC登录号PTA-124228的载体PE310-VL (Plasmids; P3E10-VL) 是编码PE310轻链可变区的多核苷酸,并且具有ATCC登录号PTA-124227的载体P3E10-VH (Plasmids; P3E10-VH) 是编码PE310重链可变区的多核苷酸。保藏也根据布达佩斯条约条款,根据如上文概述的条款及其条件进行。

[0256] 下述实施例仅提供用于说明目的,并不预期以任何方式限制本发明的范围。实际上,根据前述说明书,除本文显示且描述的那些之外的本发明的各种修改对于本领域技术人员将变得显而易见,并且落入所附权利要求的范围内。

实施例

[0257] 实施例1:在37°C测定人FLT3/FLT3抗体相互作用的动力学和亲和力本实施例测定各种抗FLT3抗体在37°C下的动力学和亲和力。所有实验都在Biacore T200表面等离子共振生物传感器(GE Lifesciences, Piscataway NJ)上执行。

[0258] 传感器芯片制备在25°C下执行,使用10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4的运行缓冲液。通过使用400mM EDC和100mM NHS的1:1 (v/v) 混合物,以10 μL/分钟的流速,活化Biacore CM4传感器芯片的所有流动池7分钟,制备抗人Fc传感器芯片。抗人Fc试剂(山羊抗人IgG Fc, Southern Biotech目录号#2081-01)在10mM乙酸钠pH 4.5中稀释至30 μg/mL,并且以20 μL/分钟在所有流动池上注射7分钟。所有流动池用在150mM硼酸盐缓冲液pH 8.5中的100mM乙二胺以10 μL/分钟封闭7分钟。

[0259] 实验在37°C下使用10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20, pH 7.4, 1mg/mL BSA的运行缓冲液执行。FLT3抗体以10 μL/分钟的流速从未稀释的上清液捕获到下游的流动池(流动池2、3和4)1分钟。在每个流动池上捕获了不同的抗体。流动池1用作参考表面。在FLT3抗体捕获后,将分析物(缓冲液, hFLT3)以30 μL/分钟注射到所有流动池上2分钟。在分析物注射后,监测离解10分钟,随后用75mM磷酸的三次1分钟注射再生所有流动池。对于每种捕获的FLT3抗体,执行下述分析物注射:缓冲液、11nM hFLT3、33nM hFLT3、100nM hFLT3和300nM hFLT3。对于每种捕获的FLT3抗体收集缓冲液循环用于双重参考目的(如Myszka, D.G. Improving biosensor analysis. J. Mol. Recognit. 12, 279-284 (1999)中所述的双重参考)。双重参考的传感器图总体拟合至简单的伴随质量转运的1:1兰米尔结合模型。

[0260] 表6显示了关于测试的抗FLT3抗体的动力学和亲和力参数。

[0261] 表6

	结构域	IgG 形式					scFv 形式					
		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (分钟)	huFlt3		mFlt3		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	$t_{1/2}$ (分钟)	K_D (nM)
					K_D (nM)	Kd (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)				
P4F6	1	1,40E+05	3,50E-03	3,3	25	36,1	1,32E+05	1,99E-03	5,8	15,1		
P4C7	1	1,60E+05	1,20E-03	9,3	7,7	402,4	1,21E+05	1,64E-03	7	13,6		
P3A1	2	9,50E+04	6,00E-03	1,9	64	-	1,07E+05	1,67E-03	6,9	15,67		
P5A3	3	9,80E+04	1,00E-02	1,2	102	19,3	8,10E+04	1,75E-02	0,7	216		
P9B5	3	4,20E+04	4,70E-04	24,4	11	1,5	3,80E+04	6,87E-04	16,8	18,1		
P9F1	3	1,80E+05	2,30E-02	0,5	127	-	2,26E+05	2,86E-02	0,4	126,5		
P1B4	4	1,80E+05	5,80E-03	2	32	-	1,20E+05	3,27E-03	3,5	27,3		
P1B11	4	1,20E+05	5,50E-03	2,1	45	-	8,47E+04	2,57E-03	4,5	30,3		
P7H3	4	9,90E+05	1,80E-03	6,6	2	0,9	2,05E+05	1,87E-03	6,2	9,1		
P3E10	4	1,80E+05	1,90E-02	0,6	106	-	1,72E+05	1,12E-02	1	65,1		
P1A5	4	1,78E+06	3,47E-04	33	0,19	-	2,59E+05	2,92E-04	40	1,1		
P4A4	4	1,16E+06	4,69E-04	25	0,4	-						
P1G12	4	6,17E+05	2,92E-04	40	0,47	6,5						
P4E5	4	1,20E+06	1,51E-04	77	0,13	18,9						
P5A4	4	5,53E+05	1,01E-04	114	0,18	-						
P5F7	4	6,36E+05	1,52E-04	76	0,24	-	1,89E+05	1,97E-04	59	1		
P4H11	4	6,18E+04	1,44E-02	1	233	-	1,60E+05	9,33E-03	1	58,3		
P15F7	5	1,40E+05	5,50E-03	2,1	38	-						
P12B6	5	1,10E+05	9,00E-03	1,3	84	-						
P7D3	5	7,10E+04	5,20E-03	2,2	72	-						
P7A6	5	3,40E+04	3,70E-04	31	11							
P8B6	5	9,30E+04	2,30E-04	51	2,5	-						
P14G2	5	1,40E+05	1,10E-03	10,7	8	-	9,35E+04	3,05E-04	37,9	3,3		
P7F9	4	1,10E+05	1,30E-03	8,9	12	13,8	8,70E+04	2,41E-03	4,8	27,7		

[0262] 实施例2:在体外使用Flt3-CD3双特异性IgG靶向结构域4的T细胞介导的AML细胞系的杀死本实施例示出了在Flt3阳性细胞中双特异性抗Flt3/CD3 hIgG2 Δ A_D265A的体外细胞毒性。

[0263] 将人抗Flt3 (P5F7p、P5F7g2、P5F7g2、P5F7g3、P5F7g4) 和人抗CD3 (h2B4-VH-hnps VL-TK (“H2B4”)) 抗体表达为在一个臂上具有EEEE且在另一个臂上具有RRRR的改造的人IgG2dA_D265A,用于在人IgG2 (SEQ ID NO:236) 的铰链区中的位置223、225和228 (例如(C223E或C223R)、(E225E或E225R)和(P228E或P228R))处,以及在CH3区中的位置409或368处(例如K409R或L368E(欧盟编号方案))的双特异性交换。FLT3/CD3双特异性抗体也具有在位置265(EU编号方案)处从D到A的突变。

[0264] 使用人Pan T Cell Isolation试剂盒(Miltenyi, San Diego CA),阴性选择来自人PBMC的CD3+T细胞。将表达靶的(Eo11)细胞和CD3+T细胞分别以20000和100000个细胞/孔种植到透明的U形底板上。用8倍连续稀释的双特异性抗体处理细胞。在处理24小时后,通过

流式细胞术分析确定AML细胞耗尽。通过与对照处理的细胞(在这种情况下,图1中仅H2B4)对比,来测量细胞耗尽。通过Prism软件计算EC50。如图1中所示,在这种Eo11细胞系中观察到细胞毒性。

[0265] 实施例3:F1t3-CD3双特异性IgG诱导在AML原位异种移植模型中的肿瘤消融本实施例示出了原位Eo11异种移植模型中的肿瘤消退和抑制。

[0266] F1t3双特异性的体内功效研究用表达荧光素酶和GFP的Eo11原位模型执行。通过尾静脉,将30万个Eo11 LucGFP细胞静脉注射到6-8周龄的雌性Nod/Scid/IL2Rg^{-/-} (NSG) 动物内。D-荧光素 (Regis Technologies, Morton Grove, IL) 的腹腔内注射 (200uL/动物, 以15mg/mL), 随后为用异氟烷麻醉, 并且后续全身生物发光成像 (BLI) 允许肿瘤负荷的监测。由通过肿瘤细胞表达的荧光素酶与荧光素之间的相互作用发出的生物发光信号, 通过使用IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, MA) 的成像进行捕获, 并且使用Living Image 4.4 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA) 定量为总通量 (光子/秒)。当总通量对于所有动物达到15E6的平均值时, 通过推注尾静脉用来自PBMC的2000万个扩增T细胞注射动物。简言之, 用人T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi, San Diego, CA) 活化购自AllCells (Alameda, CA) 的泛T细胞。三天后, 每两天添加20ng/ml IL2 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, 德国), 直到第11天。收获细胞, 磁性去除活化/扩增珠, 并且将细胞洗涤且重悬浮于PBS中。T细胞注射后2天, 如上所述对小鼠进行成像, 并且将动物随机分为七只小鼠的组: P1A510 μ g/kg (ug/kg)、P4A410upk、P4E510upk、P5F710upk、P5F730upk和Stumpy (CD3仅以30 μ g/kg结合双特异性对照)。T细胞植入后三天, 经由推注尾静脉注射, 施用单一剂量的人抗F1t3/CD3 (在一个臂上如上文列出的FLT3抗体, 以及在另一个臂上的CD3抗体 (h2B4-VH-hnps VL-TK) 双特异性和阴性 (NNC) 对照双特异性抗体。当动物显示出后肢麻痹 (关于AML原位模型的终点) 时, 将其处死。图2显示了单一剂量的人抗F1t3/CD3双特异性抗体以剂量依赖性方式导致肿瘤消退。

[0267] 实施例4: 在AML原位异种移植模型中, 与靶向结构域5的双特异性相比, 靶向结构域4的F1t3-CD3双特异性IgG更有效。

[0268] 本实施例示出了与靶向结构域5的抗体相比, 靶向F1t3结构域4的抗体的改善的肿瘤活性。

[0269] 如实施例3中所述执行Eo11原位异种移植模型。在这种情况下, 以10upk的单一剂量给药靶向结构域4的双特异性6B7或靶向结构域5的双特异性P8B6。Stumpy代表仅CD3结合的对照双特异性抗体。在测试的剂量下, P8B6不具有抗肿瘤活性, 而6B7是肿瘤消融的。

[0270] 实施例5: 在长期体外杀死测定中, 在IL15的存在下, 关于F1t3双特异性的EC50值显著减少本实施例示出了与IL-15组合的抗F1t3/CD3 P5F7双特异性抗体在F1t3阳性细胞中的体外细胞毒性。

[0271] 将先前冷冻的人泛T淋巴细胞 (human Pan T lymphocytes) 解冻, 并且在补充有10%血清 (Hyclone)、1%Pen Strep (Corning) 和15单位/mL的人IL-2 (eBioscience) 的RPMI-1640培养基中恢复一天。收集恢复1天的人T淋巴细胞, 并且以 1×10^6 个细胞/mL重悬浮于完全RPMI培养基中。将表达F1t3的EOL1细胞以100uL中的50,000个细胞接种在96孔U形底板中。将五万 (50,000) 个活的人CD3+淋巴细胞加入25 μ L培养基/孔的铺平板的肿瘤细胞中。制备F1t3/CD3 P5F7双特异性抗体的5点5倍系列稀释物 (剂量范围为 1×10^{-11} nM至 8×10

$^{-14}$ nM最终浓度)。通过向板中添加稀释的双特异性抗体,并且在37°C下温育2天、5天或7天,来起始细胞毒性测定。为了测试IL15对Flt3/CD3双特异性抗体重定向T细胞的抗肿瘤功效的作用,细胞培养物接受10ng/ml IL15或媒介物对照。在各个时间点通过荧光素酶分析测定AML细胞耗尽。然后,使用GraphPad Prism 7.0软件(GraphPad Software),通过特异性细胞毒性百分比相对于Flt3/CD3 P5F7双特异性的Log10浓度的非线性回归图测定EC50值。图4A和图4B分别示出了在长期杀死测定中,在IL15的不存在或存在下,Flt3/CD3双特异性的改善的抗肿瘤活性。

[0272] 实施例6:在Flt3/CD3 P5F7双特异性的存在下,存在于来自AML患者的骨髓抽吸物中的自体T细胞有效杀死AML胚细胞。

[0273] 本实施例示出了抗-Flt3/CD3P5F7双特异性抗体有效地重定向自体T细胞,以离体消除AML胚细胞。

[0274] 为了测定使用患者T细胞和AML细胞的细胞毒性活性,新鲜的骨髓抽吸物购自Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, WA)。通过用PerCP-cy5.5抗人CD3 (BioLegend, San Diego, CA)、BV 510抗人CD8抗体 (BioLegend, San Diego, CA)、BUV650抗人CD4 (BioLegend, San Diego, CA)、PE-Texas Red抗人CD33 (BioLegend, San Diego, CA)、APC抗人Flt3 (BD Biosciences, San Jose, CA) 染色每个样品,来测定靶细胞 (AML胚) 和效应细胞 (T细胞) 的数目。将来自每个患者的总共二十五万 (250,000) 个骨髓细胞铺平板在24孔板上的1ml培养基中,并且在37°C下在5%CO₂大气下培养。将P5F7 Flt3/CD3双特异性抗体在完全RPMI培养基中稀释至10nM,并且制备5点10倍系列稀释物 (剂量范围为10nM至0.01nM)。通过向板中添加稀释的双特异性抗体,并且在37°C下温育细胞4天,来起始细胞毒性试验。

[0275] 在温育4天后,在使用FACSDiva软件 (BD Biosciences) 的LSRII流式细胞术仪器上,通过分别计数CD33+CD45dim AML胚细胞的数目、CD4+CD8+细胞的数目、以及CD25+CD4+或CD25+CD8+细胞的百分比,来评价AML患者细胞的活力、T细胞增殖和活化。结果证实存在自体T细胞的存在下,通过增加浓度的FLT3/CD3双特异性 (P5F7),诱导原代AML细胞的有效杀死 (参见图5A、5B、5C、5D、5E和5F)。

[0276] 尽管所公开的教导已参考各种申请、方法、试剂盒和组合物进行描述,但应了解,可以做出各种改变和修改,而不脱离本文的教导和下文请求保护的发明。提供前述实施例以更好地示出所公开的教导,并不预期限制本文呈现的教导的范围。尽管本教导已根据这些示例性实施方案进行描述,但技术人员将容易理解,这些示例性实施方案的众多变化和修改无需过度实验是可能的。所有此类变化和修改都在当前教导的范围内。

[0277] 本文引用的所有参考文献,包括专利、专利申请、论文、教科书等等,以及其中引用的参考文献,就其尚未被引用的程度而言,在此整体引入作为参考。在一个或多个引入的文献和类似材料与本申请不同或矛盾的情况下,包括但不限于定义的术语、术语用法、所述技术等等,以本申请为准。

[0278] 前述描述和实施例详述了本发明的某些具体实施方案,并且描述了由本发明人考虑的最佳模式。然而,应了解,无论前述可能在文本中出现的如何详细,本发明都可以以许多方式进行实践,并且本发明应当根据所附权利要求及其任何等价物加以解释。

Eo11 细胞杀死

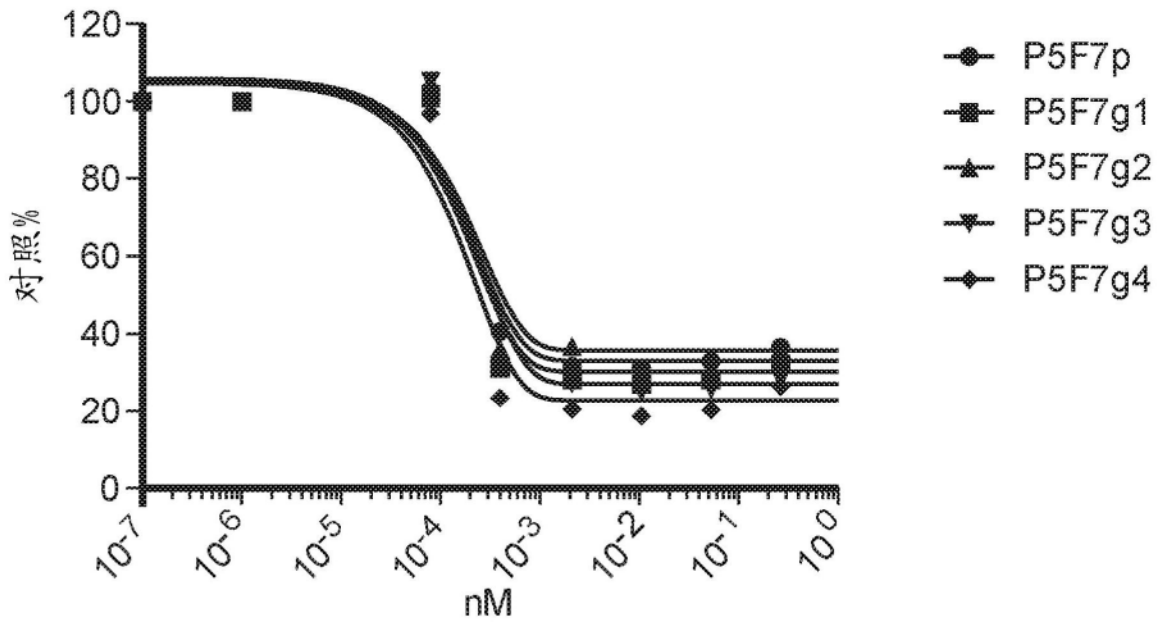


图1

Eo11原位模型： 结构域4候选克隆

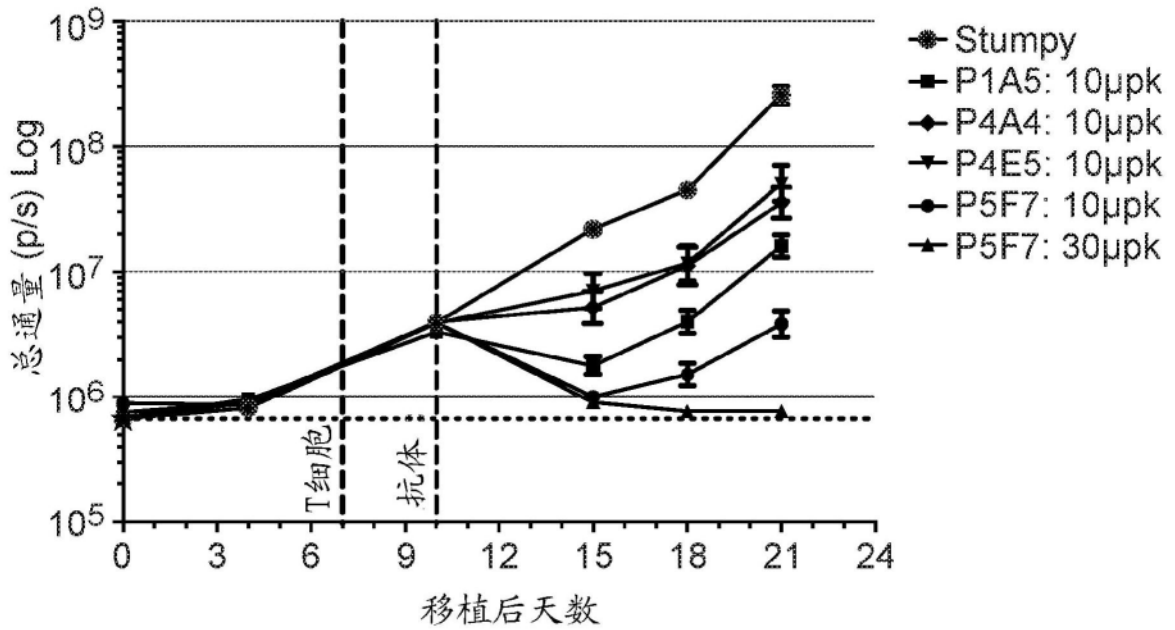


图2

Eo11原位模型：
结构域4相对于结构域5

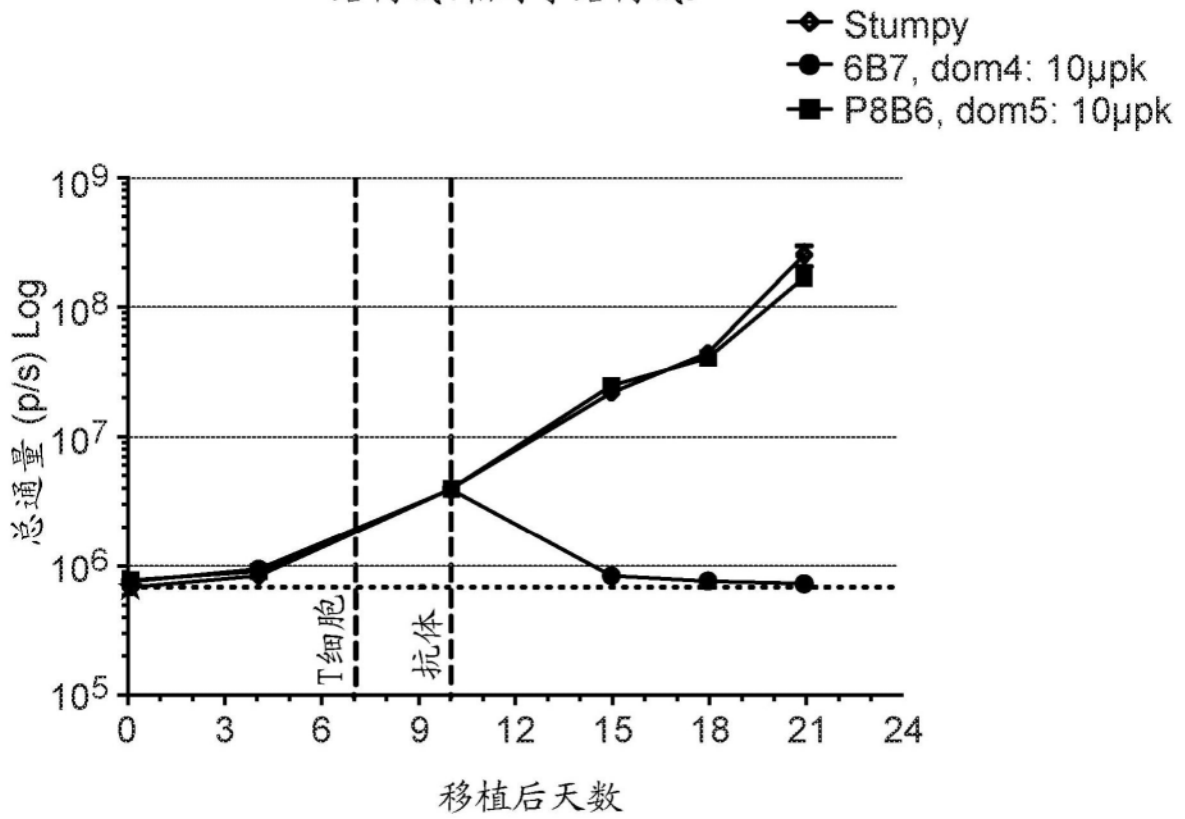


图3

剂量相对于应答: - IL15

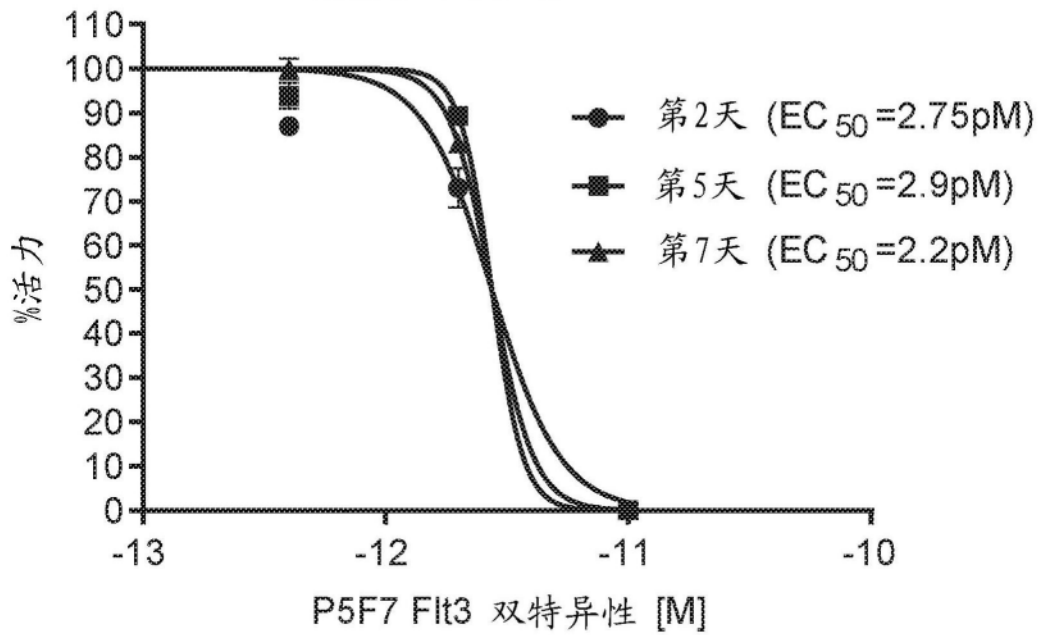


图4A

剂量相对于应答: + IL15

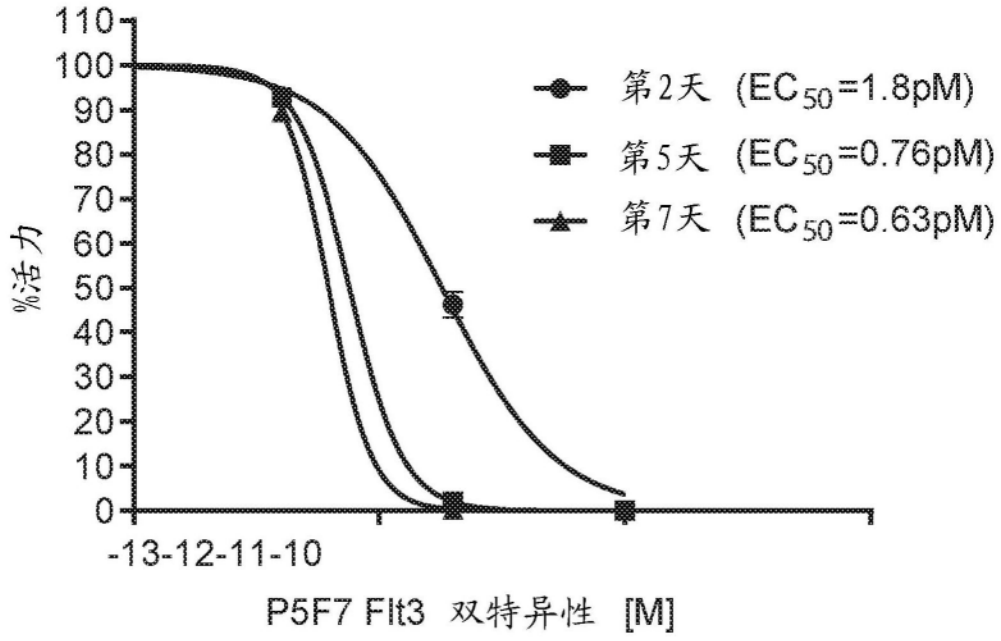


图4B

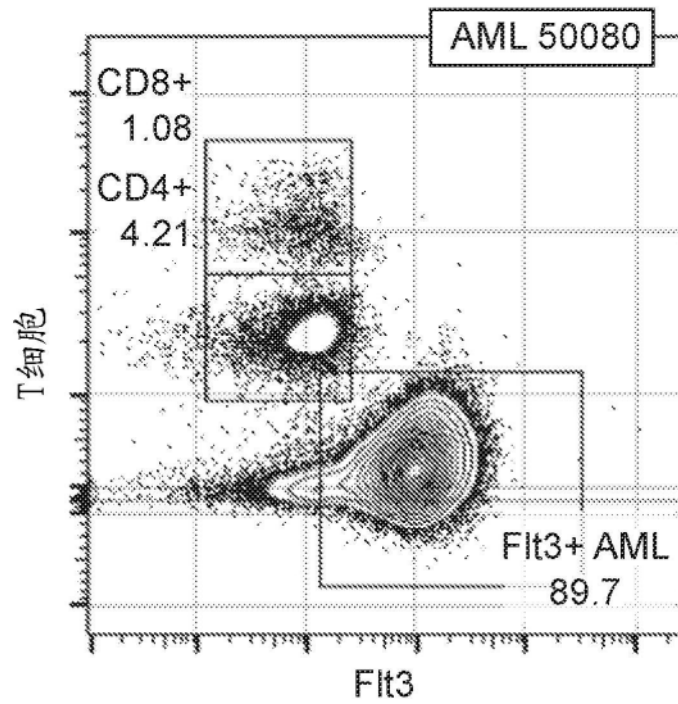


图5A

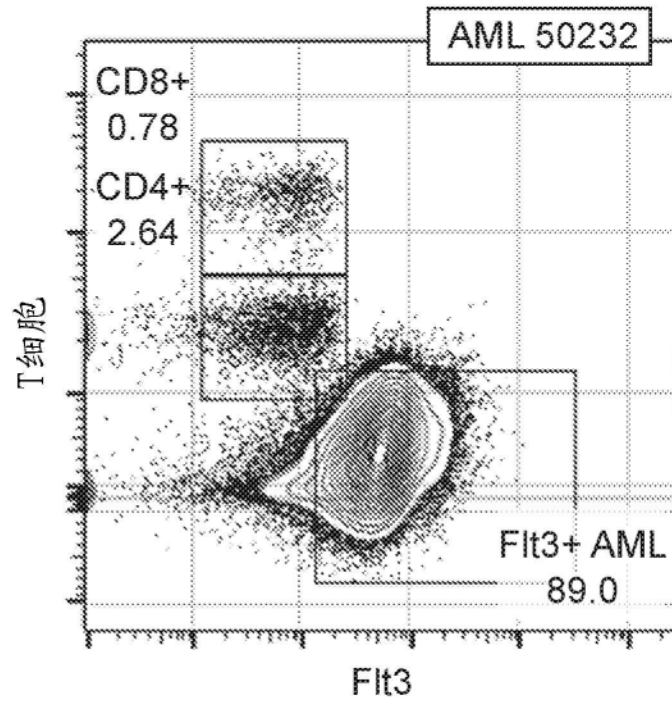


图5B

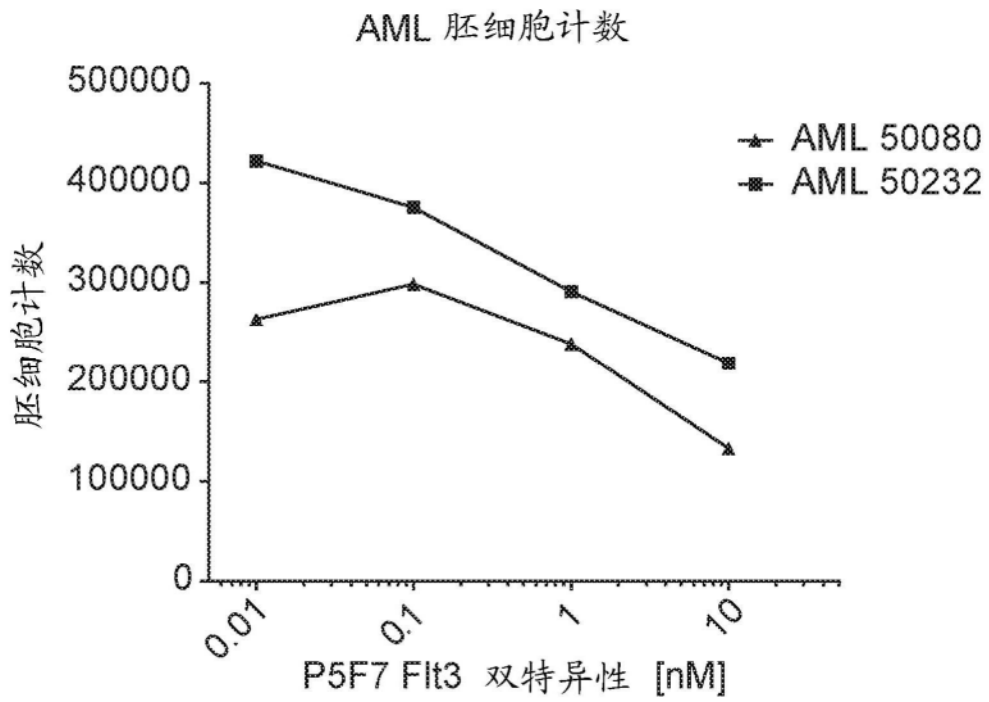


图5C

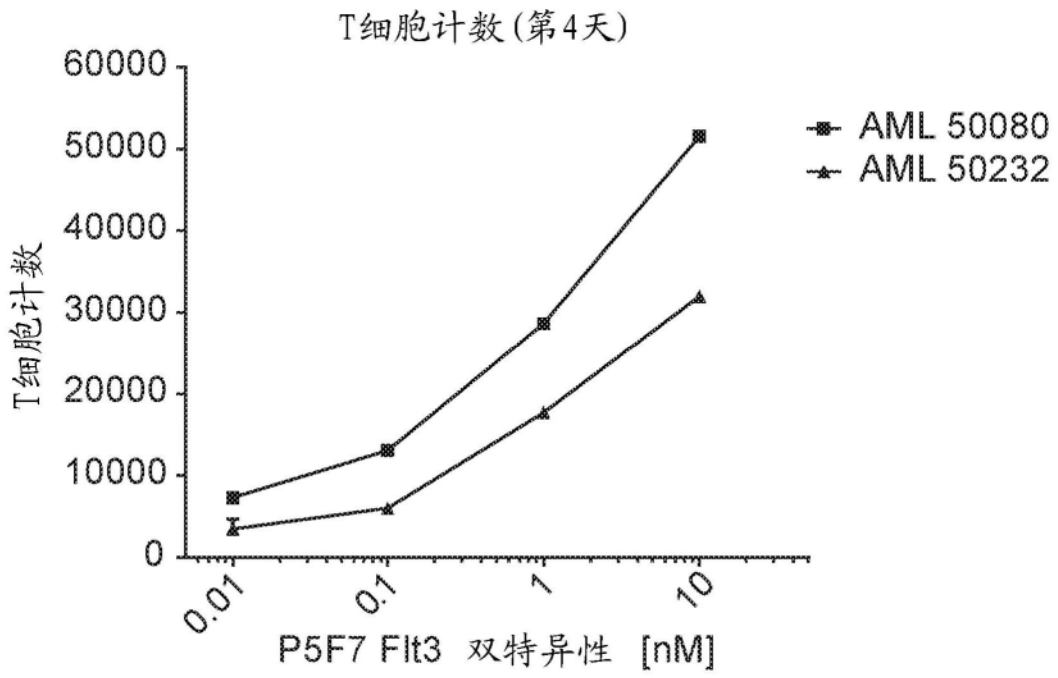


图5D

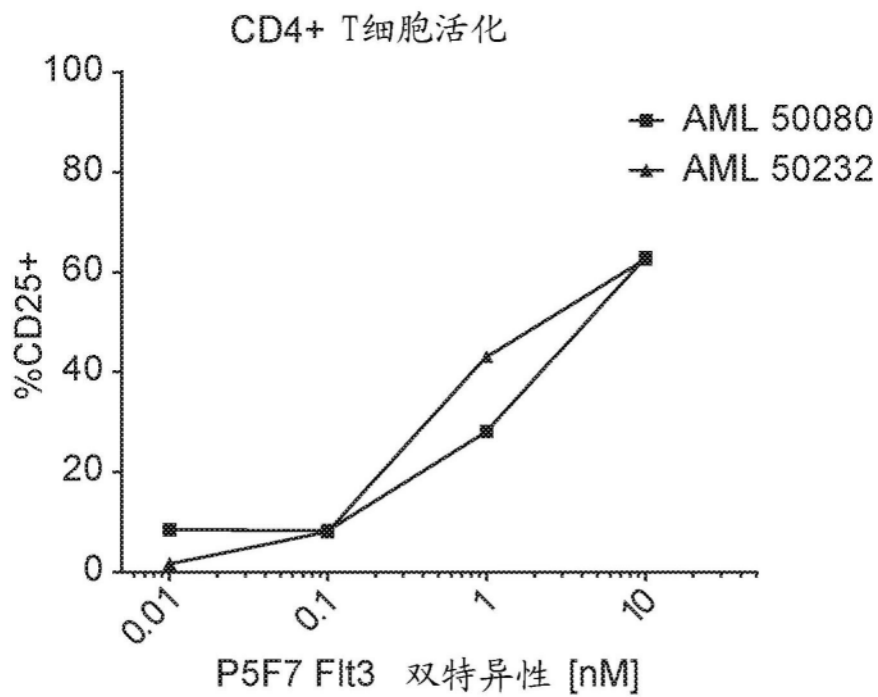


图5E

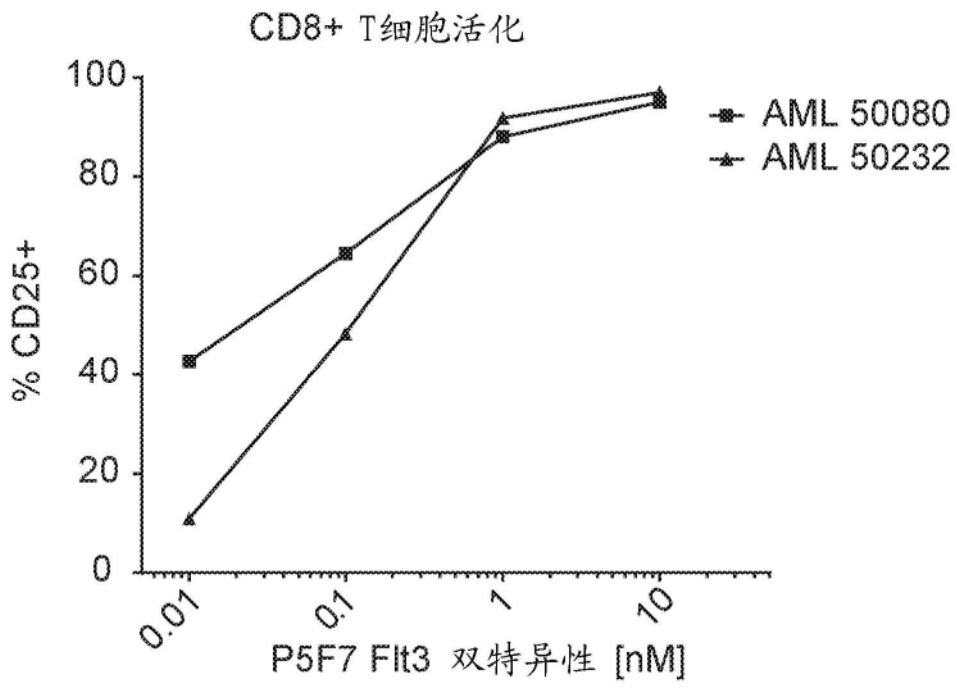


图5F