



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108430516 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680077481.3

C.弗兰克林 R.A.斯塔尔 D.刘

(22)申请日 2016.11.18

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30)优先权数据

代理人 彭昶 罗文锋

62/257606 2015.11.19 US

62/420319 2016.11.10 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.02

A61K 47/68(2017.01)

C07K 16/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/062770 2016.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/087800 EN 2017.05.26

(71)申请人 艾伯维施特姆森特克斯有限责任公司

地址 美国伊利诺伊州

权利要求书3页 说明书95页

(72)发明人 H.卡森基 H.费尔南多

序列表70页 附图45页

(54)发明名称

新颖抗EMR2抗体和使用方法

(57)摘要

本发明提供新颖抗EMR2抗体和抗体药物缀合物,和使用此类抗EMR2抗体及抗体药物偶联物治疗癌症的方法。

1. 一种经分离的抗体,其结合至表达EMR2的肿瘤起始细胞。
2. 一种经分离的抗体,其结合至包含SEQ ID NO:1的人类EMR2。
3. 一种经分离的抗体,其结合至EMR2且与包含以下的抗体竞争结合:
SEQ ID NO:21的轻链可变区 (VL) 和SEQ ID NO:23的重链可变区 (VH);或
SEQ ID NO:25的VL和SEQ ID NO:27的VH;或
SEQ ID NO:29的VL和SEQ ID NO:31的VH;或
SEQ ID NO:33的VL和SEQ ID NO:35的VH;或
SEQ ID NO:37的VL和SEQ ID NO:39的VH;或
SEQ ID NO:41的VL和SEQ ID NO:43的VH;或
SEQ ID NO:45的VL和SEQ ID NO:47的VH;或
SEQ ID NO:49的VL和SEQ ID NO:51的VH;或
SEQ ID NO:53的VL和SEQ ID NO:55的VH;或
SEQ ID NO:57的VL和SEQ ID NO:59的VH;或
SEQ ID NO:61的VL和SEQ ID NO:63的VH;或
SEQ ID NO:65的VL和SEQ ID NO:67的VH;或
SEQ ID NO:69的VL和SEQ ID NO:71的VH;或
SEQ ID NO:73的VL和SEQ ID NO:75的VH;或
SEQ ID NO:77的VL和SEQ ID NO:79的VH;或
SEQ ID NO:21的VL和SEQ ID NO:81的VH;或
SEQ ID NO:83的VL和SEQ ID NO:75的VH。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的经分离的抗体,其为内化抗体。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的经分离的抗体,其为嵌合的、CDR接枝、人源化或人类抗体,或其免疫反应性片段。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的经分离的抗体,其中该抗体结合至hEMR2同种型a的氨基酸261-478的茎域内的表位。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的经分离的抗体,其中该抗体不能免疫特异性地结合至CD97。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的经分离的抗体,其中该抗体包含SEQ ID NO:101的轻链可变区 (VL) 和SEQ ID NO:103的重链可变区 (VH);或SEQ ID NO:105的VL和SEQ ID NO:107的VH。
9. 如权利要求1-7中任一项所述的经分离的抗体,其中该抗体包含SEQ ID NO:110的轻链和SEQ ID NO:111的重链;或SEQ ID NO:110的轻链和SEQ ID NO:113的重链;或SEQ ID NO:114的轻链和SEQ ID NO:115的重链;或SEQ ID NO:114的轻链和SEQ ID NO:117的重链。
10. 如权利要求1-7中任一项所述的经分离的抗体,其中该抗体包含位点特异性抗体。
11. 如权利要求1-10中任一项所述的抗体,其中该抗体缀合至有效载荷。
12. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-10中任一项所述的抗体。
13. 一种核酸,其编码如权利要求1-10中任一项所述的抗体的全部或一部分。
14. 一种载体,其包含如权利要求13所述的核酸。
15. 一种宿主细胞,其包含如权利要求13所述的核酸或如权利要求14所述的载体。

16. 一种具有式Ab-[L-D]_n的ADC或其医药学上可接受的盐,其中:
 - a) Ab包含抗EMR2抗体;
 - b) L包含可选的连接体;
 - c) D包含药物;和
 - d) n为从约1至约20的整数。
17. 如权利要求16所述的ADC,其中该抗EMR2抗体包含嵌合的、CDR接枝、人源化或人类抗体或其免疫反应性片段。
18. 如权利要求16所述的ADC,其中Ab为如权利要求1-10中任一项所述的抗EMR2抗体。
19. 如权利要求16所述的ADC,其中n包含从约2至约8的整数。
20. 如权利要求16所述的ADC,其中D包含选自由以下组成的组的化合物:奥瑞斯他汀(auristatin)、类美登素(maytansinoid)、吡咯并苯并二氮呋(pyrrrolobenzodiazepine, PBD)、卡奇霉素(calicheamicin)和瓢菌素(amanitin)。
21. 一种药物组合物,其包含如权利要求16至20中任一项所述的ADC。
22. 一种治疗癌症的方法,其包括向对其有需要的受试者给予如权利要求12或21所述的药物组合物。
 23. 如权利要求22所述的方法,其中该癌症包含恶性血液病。
 24. 如权利要求23所述的方法,其中该恶性血液病包含白血病或淋巴瘤。
 25. 如权利要求24所述的方法,其中该恶性血液病包含急性骨髓性白血病。
 26. 如权利要求22所述的方法,其中该恶性血液病包含非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)。
 27. 如权利要求26所述的方法,其中该非霍奇金氏淋巴瘤包含弥漫性大B细胞淋巴瘤。
 28. 如权利要求22所述的方法,其中该癌症包含实体瘤。
 29. 如权利要求28所述的方法,其中该癌症选自由以下组成的组:肾上腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫癌、食道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌(小细胞与非小细胞)、甲状腺癌和胶质母细胞瘤。
 30. 如权利要求28所述的方法,其中该癌症包含肺腺癌。
 31. 如权利要求28所述的方法,其中该癌症包含鳞状细胞癌。
 32. 如权利要求22所述的方法,其进一步包括向该受试者给予至少一种另外治疗部分。
 33. 一种减少肿瘤细胞群体中的肿瘤起始细胞的方法,其中该方法包括使包含肿瘤起始细胞和除肿瘤起始细胞之外的肿瘤细胞的肿瘤细胞群体与如权利要求16-20所述的ADC接触,借此降低肿瘤起始细胞频率。
 34. 如权利要求33所述的方法,其中该接触是在体内进行。
 35. 如权利要求33所述的方法,其中该接触是在体外进行。
 36. 一种递送细胞毒素至细胞的方法,其包括使该细胞与如权利要求16至20中任一项所述的ADC接触。
 37. 一种检测、诊断或监测受试者中的癌症的方法,该方法包括以下步骤:(a)使肿瘤细胞与如权利要求1-10中任一项所述的抗体接触;和(b)检测此类肿瘤细胞上的该抗体。
 38. 如权利要求37所述的方法,其中该接触是在体外进行。
 39. 如权利要求37所述的方法,其中该接触是在体内进行。

40. 一种产生如权利要求16所述的ADC的方法,其包括使抗EMR2抗体 (Ab) 与药物 (D) 偶联的步骤。

41. 如权利要求40所述的方法,其中该抗体包含位点特异性抗体。

42. 一种试剂盒,其包含:

(a) 含有如权利要求21所述的药物组合物的一个或多个容器;和

(b) 与该一个或多个容器相关联的标签或药品说明书,其指明该组合物用于治疗患有癌症的受试者。

43. 一种试剂盒,其包含:

(a) 含有如权利要求21所述的药物组合物的一个或多个容器;和

(b) 与一个或多个容器相关联的标签或药品说明书,其指明用于患有癌症的受试者的给药方案。

44. 如权利要求42或43所述的试剂盒,其中该癌症为AML。

新颖抗EMR2抗体和使用方法

[0001] 交叉参考的申请

[0002] 本申请要求2015年11月19日所提交的美国临时申请号62/257,606的权益,和2016年11月10日所提交的美国临时申请号62/420,319的权益,两个临时申请均以全文引用的方式并入在此中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,该序列表已以ASCII格式、经由EFS-Web提交且以全文引用的方式并入本文中。该ASCII复本创建于2016年11月15日,名称为S69697_1320W0_sc9301W001_ST25.txt且大小为101KB(104035个字节)。

技术领域

[0005] 本申请大体上涉和新颖的抗EMR2抗体或其免疫反应性片段和包含它们的组合物(包括抗体药物缀合物),用于治疗、诊断或预防癌症及其任何癌症复发或转移。本发明所实施例提供此类抗EMR2抗体或抗体药物缀合物用于治疗癌症的用途,包含降低致瘤细胞频率。

背景技术

[0006] 干细胞和祖细胞的分化和增殖为正常进行的过程,其协同作用以支持器官形成期间的组织生长、细胞修复和细胞置换。系统经紧密调节以确保仅根据生物体的需要而产生适当信号。细胞增殖和分化通常仅在损伤或死亡细胞置换需要时或生长需要时发生。然而,多种因素会触发这些过程发生中断,包括各种信号传导化学物质含量过少或过多、微环境发生变化、基因突变或其组合。正常细胞增殖和/或分化发生中断会导致各种病症,包括增生性疾病,诸如癌症。

[0007] 癌症的常规治疗性疗法包括化学疗法、放射疗法和免疫疗法。这些疗法往往是无效的且手术切除不能提供可行的临床替代方案。当前护理标准的局限特别明显地存在于患者经历第一线疗法且随后复发的情况中。在这些情况下,频繁产生难治性肿瘤,这些肿瘤往往具有侵袭性和不可治愈性。许多肿瘤的总生存率多年保持基本上不变,这至少部分地归因于现有疗法预防复发、肿瘤复发和转移的失败。因此仍非常需要针对增生性疾病开发更具靶向性且更强效的疗法。本发明解决了此需要。

发明内容

[0008] 在广泛方面,本发明提供特异性结合至人类EMR2决定子的分离抗体,和相应抗体药物或诊断缀合物(ADC),或其组合物。在某些实施例中,EMR2决定子为表达在肿瘤细胞上的EMR2蛋白质,而在其他实施例中,EMR2决定子表达在肿瘤起始细胞上。在其他实施例中,本发明抗体结合至EMR2蛋白质且与结合至人类EMR2蛋白质上的表位的抗体竞争结合。

[0009] 在某些实施例中,本发明包含EMR2抗体或ADC,其中抗体或ADC结合域特异性地结合至人类EMR2(SEQ ID NO:1),且包含以下或与包含以下的抗体竞争结合:(1) SEQ ID NO:

21的轻链可变区(VL)和SEQ ID NO:23的重链可变区(VH);或(2)SEQ ID NO:25的VL和SEQ ID NO:27的VH;或(3)SEQ ID NO:29的VL和SEQ ID NO:31的VH;或(4)SEQ ID NO:33的VL和SEQ ID NO:35的VH;或(5)SEQ ID NO:37的VL和SEQ ID NO:39的VH;或(6)SEQ ID NO:41的VL和SEQ ID NO:43的VH;或(7)SEQ ID NO:45的VL和SEQ ID NO:47的VH;或(8)SEQ ID NO:49的VL和SEQ ID NO:51的VH;或(9)SEQ ID NO:53的VL和SEQ ID NO:55的VH;或(10)SEQ ID NO:57的VL和SEQ ID NO:59的VH;或(11)SEQ ID NO:61的VL和SEQ ID NO:63的VH;或(12)SEQ ID NO:65的VL和SEQ ID NO:67的VH;或(13)SEQ ID NO:69的VL和SEQ ID NO:71的VH;或(14)SEQ ID NO:73的VL和SEQ ID NO:75的VH;或(15)SEQ ID NO:77的VL和SEQ ID NO:79的VH;或(16)SEQ ID NO:21的VL和SEQ ID NO:81的VH或(17)SEQ ID NO:83的VL和SEQ ID NO:75的VH。

[0010] 在另一方面,本发明包含一种结合至EMR2的抗体,该抗体包含轻链可变区和重链可变区,其中该轻链可变区具有如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:83所述的轻链可变区的三个CDR;且该重链可变区具有如SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:79或SEQ ID NO:81所述的重链可变区的三个CDR。

[0011] 在其他方面,本发明包含人源化抗体,其具有(1)包含SEQ ID NO:101的VL和包含SEQ ID NO:103的VH或(2)包含SEQ ID NO:105的VL和包含SEQ ID NO:107的VH。在某些实施例中,人源化抗体将包含位点特异性抗体。在所选实施例中,位点特异性人源化抗体将包含(1)包含SEQ ID NO:101的VL和包含SEQ ID NO:103的VH或(2)包含SEQ ID NO:105的VL和包含SEQ ID NO:107的VH。

[0012] 在其他所选实施例中,本发明将包含选自由以下组成的组的人源化抗体:hSC93.253(包含SEQ ID NO:110和111)、hSC93.253ss1(包含SEQ ID NO:110和113)、hSC93.256(包含SEQ ID NO:114和115)、hSC93.256ss1(包含SEQ ID NO:114和117)。

[0013] 在本发明的一些方面,抗体包含嵌合的CDR接枝人源化或人类抗体或其免疫反应性片段。在本发明的其他方面,优选包含前述序列的全部或一部分的抗体为内化抗体。在又其他实施例中,抗体将包含位点特异性抗体。在其他所选实施例中,本发明包含并入任一种前述抗体的抗体药物缀合物。

[0014] 在某些方面,本发明包含编码本发明抗EMR2抗体或其片段的核酸。在其他实施例中,本发明包含含有一种或多种上述核酸的载体或包含该载体的宿主细胞。

[0015] 如以上暗指的,本发明进一步提供了抗EMR2抗体药物缀合物,其中如本文所披露的抗体与有效载荷进行缀合。在某些方面,本发明包含免疫上优先缔合或结合至hEMR2的ADC。本发明的相容抗EMR2抗体药物缀合物(ADC)通常可包含下式:

[0016] $Ab-[L-D]_n$,或其医药学上可接受的盐,其中

[0017] a) Ab包含抗EMR2抗体;

[0018] b) L包含可选的连接体;

[0019] c) D包含药物;和

[0020] d) n为从约1至约20的整数。

[0021] 在一方面,本发明的ADC包含抗EMR2抗体,诸如上述那些物,或其免疫反应性片段。在其他实施例中,本发明的ADC包含细胞毒性化合物,其选自放射性同位素、卡奇霉素(calicheamicin)、吡咯并苯并二氮吡(pyrrolobenzodiazepine)、苯并二氮吡衍生物、奥瑞斯他汀(auristatin)、倍癌霉素(duocarmycin)、类美登素(maytansinoid)或在此所述的另外的治疗部分。

[0022] 进一步提供包含如在此所披露的抗EMR2 ADC的药物组合物。

[0023] 本发明的另一方面为一种治疗癌症的方法,其包括向对其有需要的受试者给予药物组合物,诸如在此所述的那些物。在某些方面,癌症包含恶性血液病,诸如急性骨髓性白血病或弥漫性大B细胞淋巴瘤。在其他方面,受试者患有实体瘤。就此类实施例而言,癌症优选自由以下组成的组:肾上腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、乳癌、胃癌、卵巢癌、子宫颈癌、子宫癌、食道癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肺癌(小细胞与非小细胞)、甲状腺癌和胶质母细胞瘤。在某些实施例中,受试者患有肺腺癌或鳞状细胞癌。另外,在所选实施例中,治疗上述癌症的方法包括向该受试者给予除本发明的抗EMR2 ADC之外的至少一种另外治疗部分。

[0024] 在再另一个实施例中,本发明包含一种减少肿瘤细胞群体中的肿瘤起始细胞的方法,其中该方法包括使肿瘤起始细胞群体与如在此所述的ADC或抗体接触(例如,体外或体内接触),借此降低肿瘤起始细胞频率。

[0025] 在一方面,本发明包含一种递送细胞毒素至细胞的方法,其包括使该细胞与任一种上述ADC接触。

[0026] 在另一方面,本发明包含一种检测、诊断或监测受试者中的癌症(例如肺癌或血液科恶性疾病)的方法,该方法包括使肿瘤细胞与EMR2检测剂接触(例如体外或体内)和检测与肿瘤细胞结合的EMR2药剂的步骤。在所选实施例中,检测剂应包含抗EMR2抗体或与EMR2基因型决定子结合的核酸探针。在相关实施例中,诊断方法将包含免疫组织化学(IHC)或原位杂交(ISH)。本领域普通技术人员将了解,此类药剂任选地可经如下文所披露的效应子、标记物或报导子标记或与其结合且利用多种标准技术(例如MRI、CAT扫描、PET扫描等)中的任一者进行检测。

[0027] 类似地,本发明还提供适用于诊断、监测或治疗EMR2相关病症(诸如癌症)的试剂盒或装置和相关方法。为此目的,本发明优选提供一种有用于检测、诊断或治疗EMR2相关病症的制品,该制品包含含有EMR2 ADC和使用该EMR2 ADC治疗、监测或诊断EMR2相关病症的说明材料的容器,或提供针对其的给药方案。在所选实施例中,装置和相关方法将包含接触至少一个循环肿瘤细胞的步骤。在其他实施例中,所披露的试剂盒将包含说明书、标签、插页、阅读器或其类似物,其指示试剂盒或装置是用于诊断、监测或治疗EMR2相关癌症或针对其提供给药方案。

[0028] 前文是发明内容且因此必然含有细节的简化、概括和省略;因此,本领域普通技术人员将了解,此发明内容仅具描述性且不希望以任何方式进行限制。在此所述方法、组合物和/或装置和/或其他主题的其他方面、特征和优势将显而易见在在此所阐述的传授内容中。提供发明内容是为了以简化形式引入构思的选择,这些构思进一步描述在下文具体实施方式中。

附图说明

[0029] 图1A-1E分别提供EMR2同种型a的氨基酸序列注释(图1A),及其示意性图示(图1B)、EMR2域清单(图1C),和EMR2同种型推定表(图1D)和观测表(图1E);

[0030] 图2显示EMR2的表达量,如对来源于患者源异种移植(PDX)癌症干细胞(CSC)和非致瘤(NTG)细胞以及正常组织的RNA使用全转录组(Illumina)测序所量测;

[0031] 图3描绘自正常组织分离和自多种PDX肿瘤分离的RNA样品中的EMR2转录物的相对表达量,如借由qRT-PCR所量测;

[0032] 图4显示借由微阵列杂交法所量测的正常组织和多种PDX细胞系中的EMR2转录物表达的标准化强度值;

[0033] 图5显示正常组织和原发性肿瘤中的EMR2转录物的表达,得自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA),一种公开可获得的数据集;

[0034] 图6描绘基于原发肺腺癌肿瘤中的EMR2转录物的高表达和低表达的卡普兰-迈耶存活率曲线(Kaplan-Meier survival curves),其得自TCGA数据集,其中门限指标值是使用RPKM值的算术平均值确定;

[0035] 图7以表格形式提供例示性抗EMR2抗体的染色、同种型、细胞杀死和食蟹猕猴交叉反应性特征;

[0036] 图8A-8E提供鼠类抗EMR2抗体的氨基酸和核酸序列注释,其中图8A和8B显示例示性鼠类抗EMR2抗体的轻链(图8A)和重链(图8B)可变区(SEQ ID NO:21-83,奇数)的连续氨基酸序列,图8C显示编码前述轻链和重链可变区(SEQ ID NO:20-82,偶数)的核酸序列,图8D和8E分别描绘抗EMR2抗体的人源化VL和VH域的氨基酸序列和核酸序列,图8F显示全长重链和轻链构建体的氨基酸序列,且图8G-8I描绘SC93.253、SC93.256和SC93.267鼠类抗体的轻链和重链可变区的CDR,如使用Kabat、Chothia、ABM和接触方法所测量;

[0037] 图9表明发现在分组C的例示性抗EMR2抗体识别EMR2的茎域;

[0038] 图10A-10C显示正常细胞和肿瘤细胞表面上的EMR2蛋白质表达,如借由对各种AML患者样品或PDX细胞系(图10A)、各种肺癌PDX细胞系(图10B)和正常造血细胞和AML细胞(图10C)进行流式细胞术所测量,其中对本发明的例示性抗体(黑线)与同种型对照染色群体(灰色实心)进行比较;

[0039] 图11A和11B表明本发明的EMR2 ADC体外有效地介导细胞毒性剂向EMR+细胞的递送和内化(图11A),但对在EMR2-对照细胞则不然(图11B);

[0040] 图12表明根据在此中的传授内容,例示性EMR2 ADC能够抑制肺PDX肿瘤生长;

[0041] 图13A和13B证明EMR2决定子与某些AML PDX细胞系中的肿瘤起始细胞结合,如借由使用FACS分离的EMR2+细胞(图13A)再现异源肿瘤(当植入免疫缺乏小鼠(图13B)中时)所示;和

[0042] 图14A和14B描述本发明的例示性人源化位点特异性ADC能够体内减少AML PDX肿瘤细胞系的白血病负荷。

具体实施方式

[0043] 本发明可以许多不同形式实施。在此中披露本发明的非限制性、描述性实施例,此

类实施例举例描述本发明原理。在此所用的任何章节标题仅出在组织目的且不应理解为限制所述主题。出在本发明的目的,所有鉴定的序列登录号可发现在NCBI参考序列(RefSeq)数据库和/或NCBI GenBank®归档序列数据库中,除非另外描述。

[0044] 已惊人地发现,EMR2表型决定子在临床上与各种增生性病症(包括瘤形成)相关,且EMR2蛋白质及其变体或同种型提供可用于治疗相关疾病的有用肿瘤标记物。就这一点而言,本发明提供了抗体药物缀合物,其包含工程化抗EMR2抗体靶向剂和细胞毒性有效载荷。如下文更详细地论述和所附实例中所阐述,所披露的抗EMR2 ADC特别有效地消除致瘤细胞,且因此有用于治疗与预防某些增生性病症或其进展或复发。另外,所披露的ADC组合物可展现相对较高的DAR=2%和出人意料的稳定性,与包含相同组分的常规ADC组合物相比,其可提供改善的治疗指数。

[0045] 此外,已发现,EMR2标记物或决定子(诸如细胞表面EMR2蛋白质)在治疗上与癌症干细胞(又称为肿瘤永生化细胞)结合且可有效地用于使癌症干细胞消除或沉默。经由使用如本文所披露的抗EMR2缀合物选择性地减少或消除癌症干细胞的能力是惊人的,因为此类细胞已知对在许多常规疗法通常具有抗性。即,传统的和最新的靶向治疗方法的有效性往往因抗性癌症干细胞的存在和/或出现而受到限制,这些抗性癌症干细胞能够使肿瘤生长永生化,即使面对这些多种治疗方法。此外,与癌症干细胞结合的决定子往往使得治疗标靶不良,此是归因于表达较低或不一致,未能保持与致瘤细胞结合或未能在细胞表面上呈现。与先前技术的传授形成鲜明对比,本发明所披露的ADC和方法可有效地克服此固有抗性且特异性地消除、耗竭、沉默或促进此类癌症干细胞的分化,从而抵消其维持或再诱导潜在肿瘤生长的能力。

[0046] 因此,尤其值得注意的是,EMR2缀合物(诸如本文中所披露的那些物)可有利地用于治疗 and/或预防所选增生性(例如赘生性)病症或其进展或复发。应了解,虽然本发明的优选实施例将在下文展开广泛论述,尤其在特定的域或区或表位方面或在包含神经内分泌特征的癌症干细胞或肿瘤及其与所披露的抗体药物缀合物相互作用的背景下展开广泛论述,但本领域普通技术人员应了解,本发明的范畴不受此类例示性实施例限制。相反地,本发明的最广阔实施例和所附权利要求广泛地且明确地关于抗EMR2抗体和缀合物,包括本文披露的那些物,及其用于治疗 and/或预防多种EMR2相关或介导性病症(包括赘生性或细胞增殖性病症)的用途,不论任何特定的作用机制或特异性靶向的肿瘤、细胞或分子组分。

[0047] I. EMR2生理学

[0048] EGF样模块受体2(EMR2;又称为含有EGF样模块的黏蛋白样激素受体样2、CD312和黏附性G蛋白偶联受体E2或ADGRE2)为黏附型类别(ADGR、aGPCR或B类)中的G蛋白偶联受体(GPCR)。对在所有GPCR而言典型的是,EMR2含有七跨膜域(7TM),该七跨膜域使该蛋白质定位在质膜中,其中N末端暴露在细胞外空间中且C末端取向细胞内(Monk等人;PMID:25956432)。GPCR分类成不同家族,其中ADGR为在人类中33个成员的第二大家族(Hamann等人;PMID:25713288)。ADGR的特征为N'末端往往相当大和近膜GPCR蛋白分解位点(GPS)位在更大的高保守性GPCR自身蛋白分解诱导序列(GAIN)内。对在EMR2及其他家族成员而言,已经表明蛋白质在GPS以自身蛋白分解方式裂解,而在内质网(eR)中,产生含有大部分胞外域(ECD)的N末端亚基(又称为 α 亚基)和含有7TM的C末端亚基、细胞质域和极小ECD(β 亚基)(Huang等人;PMID:22310662)。蛋白分解裂解之后,两个片段非共价结合且一起表达在表面

上。ADGR家族成员进一步分类成九个亚家族,其中EMR2连同EMR1 (ADGRE1)、EMR3 (ADGRE3)、EMR4 (ADGRE4) 和CD97 (ADGRE5) 一起属于II类(又称为E级或EGF-TM7) 亚家族。此亚家族的所有成员共同之处在于,在其N'末端ECD内含有2-6种表皮生长因子样域(EGF)。

[0049] 编码EMR2的基因首先基于其与CD97的高度同源性加以描述且发现定位在人类染色体19p13.1上(Lin等人;PMID:10903844)。人类EMR2(hEMR2) 基因是由21个跨越约50kbp的外显子组成。人类EMR2基因的转录产生至少六种已知mRNA转录物,包括6.5kbp的典型同种型(NM_013447)(其翻译成823个氨基酸的蛋白质的全长蛋白质(NP_038475,SEQ ID NO:1,图1A)),称为同种型a,其示意性地描绘在图1B中。应注意在图1A中,前导序列呈粗体,胞外域加有下划线且GPS域的裂解位点加框。hEMR2同种型a的各种域(如借由其氨基酸残基所定义)阐述在图1C中。人类EMR2蛋白质的直系同源物包括(但不限于)黑猩猩(XP_512446)、恒河猕猴(NP_001033751)和狗(NP_001033756),但值得注意的是,不存在鼠类直系同源物(Kwakkenbos等人;PMID:17068111)。

[0050] EMR2的至少六种另外较短同种型已描述在公共域中,该公共域跨越一或两个翻译外显子,包括翻译成765个氨基酸的蛋白质(NP_001257981)的6kbp转录物(NM_001271052)及其他。这些同种型和另外同种型的证据(如图1D和1E中所阐述)来源于如所附实例中所述产生的下一代测序(NGS)数据集。大部分剪接变体与较短转录物有关,此类转录物跨越一个或多个翻译外显子,从而产生缺乏一个且最多三个EGF域或茎区减小的蛋白质同种型。这些较短同种型的生物结果当前未知,但可推测出各种转录物展现差异的配体结合(特异性和/或亲和力)、下游信号传导、局域化和内化。由在这些变体展现不同ECD,因此应了解,根据本发明,可开发或选择对所选同种型具有特异性或结合所有潜在同种型的hEMR2抗体。如下文实例10中更详细地所述,可根据这些较短同种型的存在来解释与正常和肿瘤样品有关的各种EMR2抗体染色模式。

[0051] EMR2的正常组织表达据信局限于骨髓细胞,包括嗜中性白血球、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞的亚群,包括其在骨髓中的祖细胞(Kwakkenbos等人;PMID:11994511和Chang等人;PMID:17174274)。EMR2的表面表达已显示在嗜中性白血球和巨噬细胞的活化和成熟期间上调,具体而言,在发炎组织中,包括在患有全身性发炎反应症候群的患者中。其还已与乳癌(Davies等人;PMID:21174063)、较小的结肠直肠癌亚群(Aust等人;PMID:12761622)和神经胶质瘤(Ivan等人;PMID:25200831)有关。有趣的是,已显示多种人类肿瘤中的许多ADGR频繁地发生突变(O'Hayre等人;PMID:24508914),然而对在这些突变中的大部分而言,不明确其是否具有直接的生物结果和是否改变ADGR的信号传导或局域化。

[0052] 唯一已知的EMR2配体为硫酸软骨素葡糖胺聚糖(Stacey等人;PMID:12829604),表明在细胞黏附/迁移期间具有潜在的作用。这符合如下观察结果:抗EMR2 Ab可体外诱导嗜中性白血球的黏附和趋化激素CXCL12依赖性迁移(Yona等人;PMID:17928360)。通常据信配体对 α -亚基的结合可使细胞内信号经由7TM亚基和G蛋白活化来传输。对在EMR2及其他AGRE而言,还已推测出配体结合可使 α 亚基自受体复合物移除,从而可活化GPCR的 β 亚基部分。对在紧密相关的家族成员CD97而言,已显示配体接合可引起CD97表面表达下调(Karpus等人;PMID:23447688),然而不明确这是否归因于 α/β 复合物内化和/或 α 亚基排出。最近,已显示EMR2不仅以 α/β 杂二聚体形式表达,而且各亚基可定位在质膜上且独立地传递信号,从而开启各亚基结合不同配体的可能性(Huang等人;PMID:22310662)。另外,已推测出ADGR可为混

杂的,从而允许来自不同ADGR基因产物的 α 和 β 亚基结合。

[0053] 应了解,关于EMR2的表达和生物功能的一些先前观察结果可能因使用结合至高保守性EGF域区域且与EMR2和CD97均反应的抗体试剂而混淆。

[0054] II. 癌症干细胞

[0055] 根据本发明模型,肿瘤包含非致瘤细胞和致瘤细胞。非致瘤细胞不具有自更新的能力且不能可再现地形成肿瘤,即使以过量的细胞数目移植至免疫功能不全小鼠中也如此。致瘤细胞(在此中又称为“肿瘤起始细胞”(TIC),典型地构成肿瘤细胞群体中0.01-10%的分数)具有形成肿瘤的能力。对在造血系统恶性疾病而言,TIC尤其在急性骨髓恶性病(AML)中可具有非常罕见的范围 $1:10^4$ 至 $1:10^7$ 或非常充裕存在于例如B细胞系的淋巴瘤中。致瘤细胞涵盖肿瘤永生化细胞(TPC)(可互换地称为癌症干细胞(CSC))与肿瘤祖细胞(TProg)。

[0056] CSC,如支持正常组织中的细胞层次的正常干细胞,能够无限地自复制,同时维持多谱系分化的能力。就此而言,CSC能够产生致瘤后代与非致瘤后代且能够完整地再现亲代肿瘤的非均质细胞组成,如根据少数的经分离CSC连续分离和移植至免疫功能不全小鼠中所证明。证据表明除非这些“种子细胞”被消除,否则肿瘤转移或复发的可能性大得多,导致疾病复发和最终进展。

[0057] TProgs(如CSC)具有促进初始移植体中的肿瘤生长的能力。然而,不同于CSC,其不能够再现亲代肿瘤的细胞非均质性且在随后移植体中再起始肿瘤发生时不太有效,因为TProgs典型地仅能够发生有限次数的细胞分裂,如少数的高度纯化TProg连续移植至免疫功能不全小鼠中所证明。TProgs可进一步分成早期TProgs和晚期TProgs,这可根据表型(例如细胞表面标记物)及其再现肿瘤细胞架构的不同能力来区分。虽然都不能使肿瘤再现至与CSC相同的程度,但早期TProgs再现亲代肿瘤特征的能力大于晚期TProgs。尽管存在前述不同,但已显示,一些TProg群体可在罕见的情形下获得通常归因于CSC的自更新能力且自身可变成CSC。

[0058] CSC展现较高致瘤性且相对而言,往往比以下相对更不活动:(i) TProgs(早期TProgs与晚期TProgs);和(ii) 非致瘤细胞,诸如终末分化肿瘤细胞和肿瘤浸润性细胞,例如纤维母细胞/基质、内皮和造血细胞,其可来源于CSC且典型地包含肿瘤块。由在常规疗法和方案大部分设计成使肿瘤块消退和攻击快速增殖性细胞,因此CSC对常规疗法和方案的耐药性大于更快速增殖的TProgs及其他块体肿瘤细胞群体,诸如非致瘤细胞。可使CSC对常规疗法产生相对耐化学性的其他特征为耐多药性转运蛋白的表达增强、DNA修复机制和抗细胞凋亡基因表达的增强。此类CSC特性已牵涉旨在使患有晚期瘤形成的患者中产生持续反应的标准治疗方案的失败,原因在于标准化学疗法不能有效地靶向实际上促进持续肿瘤生长和复发的CSC。

[0059] 已惊人地发现,EMR2表达与各种致瘤细胞亚群相关,此方式使得其治疗敏感,如在此所阐述。本发明提供抗EMR2抗体,其可特别有用于靶向致瘤细胞且可用于沉默、致敏、中和、降低频率、阻断、消除、干扰、减少、阻碍、限制、控制、耗竭、缓和、介导、减轻、再程序化、消除、杀死或以其他方式抑制(统称为“抑制”)致瘤细胞,借此促进增生性病征(例如癌症)的治疗、管理和/或预防。有利地,本发明的抗EMR2抗体可经选择以使得其在给予受试者后优选降低致瘤细胞频率或致瘤性,不论EMR2决定子的形式(例如表型或基因型)。致瘤细

胞频率的降低可作为以下结果而发生：(i) 抑制或根除致瘤细胞；(ii) 控制致瘤细胞的生长、扩增或复发；(iii) 中断致瘤细胞的起始、繁殖、维持或增殖；或(iv) 以其他方式阻碍致瘤细胞的存活、再生和/或转移。在一些实施例中，致瘤细胞的抑制可作为一种或多种生理学路径变化的结果而发生。路径的变化，不论致瘤细胞的抑制或消除、其潜在性的修改（例如诱导性分化或小生境中断）或以其他方式干扰致瘤细胞影响肿瘤环境或其他细胞的能力，均允许借由抑制肿瘤发生、肿瘤维持和/或转移和复发而使EMR2相关病症获得更有效的治疗。此外应了解，所披露的抗体的相同特征使得其在治疗已证明对标准治疗方案具耐药性或难治性的复发性肿瘤时特别有效。

[0060] 可用于评估致瘤细胞频率降低的方法包括（但不限于）细胞学或免疫组织化学分析，优选为体外或体内限制稀释法分析（Dylla等人，2008，PMID：PMC2413402和Hoey等人，2009，PMID：19664991）。

[0061] 体外限制稀释法分析可借由在促进群落形成的固体培养基上培养经分级或未经分级的肿瘤细胞（例如分别来自经处理的肿瘤和未处理的肿瘤）且对生长的群落计数和表征来进行。可替代地，肿瘤细胞可在含有液体培养基的孔盘上连续稀释且各孔可在接种之后的任何时间、但优选为接种之后超过10天，根据对群落形成呈阳性或阴性来评分。

[0062] 体内限制稀释法如下进行：将来自未处理对照物或来自暴露在所选治疗剂的肿瘤的肿瘤细胞经连续稀释而移植在免疫功能不全小鼠中且随后根据对肿瘤形成呈阳性或阴性来对各小鼠评分。评分可在所植入肿瘤可检测的任何时间进行，但优选在移植之后的60天或超过60天进行。测量致瘤细胞频率的限制稀释法实验的结果分析优选使用泊松分布统计学（Poisson distribution statistics）进行或评估预定义的决定性事件的频率，诸如体内产生或不产生肿瘤的能力（Fazekas等人，1982，PMID：7040548）。

[0063] 还可利用流式细胞术和免疫组织化学测量致瘤细胞频率。两种技术均使用一种或多种抗体或试剂结合本领域中所识别的已知可富集致瘤细胞的细胞表面蛋白质或标记物（参见WO 2012/031280）。如本领域中所知，还可利用流式细胞术（例如荧光活化细胞分选（FACS））表征、分离、纯化、富集或分选各种细胞群体，包括致瘤细胞。流式细胞术是借由传递其中悬浮有混合细胞群体的液流通过能够每秒量测多达数千粒子的物理学和/或化学特征的设备来量测致瘤细胞含量。免疫组织化学提供的另外信息，其借由用结合至致瘤细胞标记物的经标记抗体或试剂将组织样品染色而实现原位（例如组织切片中）致瘤细胞的可视化。

[0064] 因而，本发明抗体可经由诸如流式细胞术、磁性活化细胞分选（MACS）、雷射介导性切片或FACS的方法而有用于鉴定、表征、监测、分离、切片或富集致瘤细胞群体或亚群。FACS为用于根据特定细胞表面标记物、以超过99.5%纯度分离细胞亚群的可靠方法。用于表征和操纵致瘤细胞（包括CSC）的其他相容技术可见在例如U.S.P.N.s 12/686,359、12/669,136和12/757,649中。

[0065] 已与CSC群相关且已用于分离或表征CSC的标记物列举如下：ABCA1、ABCA3、ABCB5、ABCG2、ADAM9、ADCY9、ADORA2A、ALDH、AFP、AXIN1、B7H3、BCL9、Bmi-1、BMP-4、C20orf52、C4.4A、羧肽酶M、CAV1、CAV2、CD105、CD117、CD123、CD133、CD14、CD16、CD166、CD16a、CD16b、CD2、CD20、CD24、CD29、CD3、CD31、CD324、CD325、CD33、CD34、CD38、CD44、CD45、CD46、CD49b、CD49f、CD56、CD64、CD74、CD9、CD90、CD96、CEACAM6、CELSR1、CLEC12A、CPD、CRIM1、CX3CL1、

CXCR4、DAF、核心蛋白聚糖 (decorin)、easyh1、easyh2、EDG3、EGFR、ENPP1、EPCAM、EPHA1、EPHA2、FLJ10052、FLVCR、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、GD2、GJA1、GLI1、GLI2、GPNMB、GPR54、GPRC5B、HAVCR2、IL1R1、IL1RAP、JAM3、Lgr5、Lgr6、LRP3、LY6E、MCP、mf2、mllt3、MPZL1、MUC1、MUC16、MYC、N33、NANOG、NB84、NES、NID2、NMA、NPC1、OSM、OCT4、OPN3、PCDH7、PCDHA10、PCDHB2、PPAP2C、PTPN3、PTS、RARRES1、SEMA4B、SLC19A2、SLC1A1、SLC39A1、SLC4A11、SLC6A14、SLC7A8、SMARCA3、SMARCD3、SMARCE1、SMARCA5、SOX1、STAT3、STEAP、TCF4、TEM8、TGFB3、TMEM16A、TMEM16B、TMEM16C、TMEM16D、TMEM16E、TMEM16F、TMEM16G、TMEM16H、TMEM16I、TMEM16J、TMEM16K、TMEM16L、TMEM16M、TMEM16N、TMEM16O、TMEM16P、TMEM16Q、TMEM16R、TMEM16S、TMEM16T、TMEM16U、TMEM16V、TMEM16W、TMEM16X、TMEM16Y、TMEM16Z、TMEM16AA、TMEM16AB、TMEM16AC、TMEM16AD、TMEM16AE、TMEM16AF、TMEM16AG、TMEM16AH、TMEM16AI、TMEM16AJ、TMEM16AK、TMEM16AL、TMEM16AM、TMEM16AN、TMEM16AO、TMEM16AP、TMEM16AQ、TMEM16AR、TMEM16AS、TMEM16AT、TMEM16AU、TMEM16AV、TMEM16AW、TMEM16AX、TMEM16AY、TMEM16AZ、TMEM16BA、TMEM16BB、TMEM16BC、TMEM16BD、TMEM16BE、TMEM16BF、TMEM16BG、TMEM16BH、TMEM16BI、TMEM16BJ、TMEM16BK、TMEM16BL、TMEM16BM、TMEM16BN、TMEM16BO、TMEM16BP、TMEM16BQ、TMEM16BR、TMEM16BS、TMEM16BT、TMEM16BU、TMEM16BV、TMEM16BW、TMEM16BX、TMEM16BY、TMEM16BZ、TMEM16CA、TMEM16CB、TMEM16CC、TMEM16CD、TMEM16CE、TMEM16CF、TMEM16CG、TMEM16CH、TMEM16CI、TMEM16CJ、TMEM16CK、TMEM16CL、TMEM16CM、TMEM16CN、TMEM16CO、TMEM16CP、TMEM16CQ、TMEM16CR、TMEM16CS、TMEM16CT、TMEM16CU、TMEM16CV、TMEM16CW、TMEM16CX、TMEM16CY、TMEM16CZ、TMEM16DA、TMEM16DB、TMEM16DC、TMEM16DD、TMEM16DE、TMEM16DF、TMEM16DG、TMEM16DH、TMEM16DI、TMEM16DJ、TMEM16DK、TMEM16DL、TMEM16DM、TMEM16DN、TMEM16DO、TMEM16DP、TMEM16DQ、TMEM16DR、TMEM16DS、TMEM16DT、TMEM16DU、TMEM16DV、TMEM16DW、TMEM16DX、TMEM16DY、TMEM16DZ、TMEM16EA、TMEM16EB、TMEM16EC、TMEM16ED、TMEM16EE、TMEM16EF、TMEM16EG、TMEM16EH、TMEM16EI、TMEM16EJ、TMEM16EK、TMEM16EL、TMEM16EM、TMEM16EN、TMEM16EO、TMEM16EP、TMEM16EQ、TMEM16ER、TMEM16ES、TMEM16ET、TMEM16EU、TMEM16EV、TMEM16EW、TMEM16EX、TMEM16EY、TMEM16EZ、TMEM16FA、TMEM16FB、TMEM16FC、TMEM16FD、TMEM16FE、TMEM16FF、TMEM16FG、TMEM16FH、TMEM16FI、TMEM16FJ、TMEM16FK、TMEM16FL、TMEM16FM、TMEM16FN、TMEM16FO、TMEM16FP、TMEM16FQ、TMEM16FR、TMEM16FS、TMEM16FT、TMEM16FU、TMEM16FV、TMEM16FW、TMEM16FX、TMEM16FY、TMEM16FZ、TMEM16GA、TMEM16GB、TMEM16GC、TMEM16GD、TMEM16GE、TMEM16GF、TMEM16GG、TMEM16GH、TMEM16GI、TMEM16GJ、TMEM16GK、TMEM16GL、TMEM16GM、TMEM16GN、TMEM16GO、TMEM16GP、TMEM16GQ、TMEM16GR、TMEM16GS、TMEM16GT、TMEM16GU、TMEM16GV、TMEM16GW、TMEM16GX、TMEM16GY、TMEM16GZ、TMEM16HA、TMEM16HB、TMEM16HC、TMEM16HD、TMEM16HE、TMEM16HF、TMEM16HG、TMEM16HH、TMEM16HI、TMEM16HJ、TMEM16HK、TMEM16HL、TMEM16HM、TMEM16HN、TMEM16HO、TMEM16HP、TMEM16HQ、TMEM16HR、TMEM16HS、TMEM16HT、TMEM16HU、TMEM16HV、TMEM16HW、TMEM16HX、TMEM16HY、TMEM16HZ、TMEM16IA、TMEM16IB、TMEM16IC、TMEM16ID、TMEM16IE、TMEM16IF、TMEM16IG、TMEM16IH、TMEM16II、TMEM16IJ、TMEM16IK、TMEM16IL、TMEM16IM、TMEM16IN、TMEM16IO、TMEM16IP、TMEM16IQ、TMEM16IR、TMEM16IS、TMEM16IT、TMEM16IU、TMEM16IV、TMEM16IW、TMEM16IX、TMEM16IY、TMEM16IZ、TMEM16JA、TMEM16JB、TMEM16JC、TMEM16JD、TMEM16JE、TMEM16JF、TMEM16JG、TMEM16JH、TMEM16JI、TMEM16JJ、TMEM16JK、TMEM16JL、TMEM16JM、TMEM16JN、TMEM16JO、TMEM16JP、TMEM16JQ、TMEM16JR、TMEM16JS、TMEM16JT、TMEM16JU、TMEM16JV、TMEM16JW、TMEM16JX、TMEM16JY、TMEM16JZ、TMEM16KA、TMEM16KB、TMEM16KC、TMEM16KD、TMEM16KE、TMEM16KF、TMEM16KG、TMEM16KH、TMEM16KI、TMEM16KJ、TMEM16KK、TMEM16KL、TMEM16KM、TMEM16KN、TMEM16KO、TMEM16KP、TMEM16KQ、TMEM16KR、TMEM16KS、TMEM16KT、TMEM16KU、TMEM16KV、TMEM16KW、TMEM16KX、TMEM16KY、TMEM16KZ、TMEM16LA、TMEM16LB、TMEM16LC、TMEM16LD、TMEM16LE、TMEM16LF、TMEM16LG、TMEM16LH、TMEM16LI、TMEM16LJ、TMEM16LK、TMEM16LL、TMEM16LM、TMEM16LN、TMEM16LO、TMEM16LP、TMEM16LQ、TMEM16LR、TMEM16LS、TMEM16LT、TMEM16LU、TMEM16LV、TMEM16LW、TMEM16LX、TMEM16LY、TMEM16LZ、TMEM16MA、TMEM16MB、TMEM16MC、TMEM16MD、TMEM16ME、TMEM16MF、TMEM16MG、TMEM16MH、TMEM16MI、TMEM16MJ、TMEM16MK、TMEM16ML、TMEM16MN、TMEM16MO、TMEM16MP、TMEM16MQ、TMEM16MR、TMEM16MS、TMEM16MT、TMEM16MU、TMEM16MV、TMEM16MW、TMEM16MX、TMEM16MY、TMEM16MZ、TMEM16NA、TMEM16NB、TMEM16NC、TMEM16ND、TMEM16NE、TMEM16NF、TMEM16NG、TMEM16NH、TMEM16NI、TMEM16NJ、TMEM16NK、TMEM16NL、TMEM16NM、TMEM16NO、TMEM16NP、TMEM16NQ、TMEM16NR、TMEM16NS、TMEM16NT、TMEM16NU、TMEM16NV、TMEM16NW、TMEM16NX、TMEM16NY、TMEM16NZ、TMEM16OA、TMEM16OB、TMEM16OC、TMEM16OD、TMEM16OE、TMEM16OF、TMEM16OG、TMEM16OH、TMEM16OI、TMEM16OJ、TMEM16OK、TMEM16OL、TMEM16OM、TMEM16ON、TMEM16OO、TMEM16OP、TMEM16OQ、TMEM16OR、TMEM16OS、TMEM16OT、TMEM16OU、TMEM16OV、TMEM16OW、TMEM16OX、TMEM16OY、TMEM16OZ、TMEM16PA、TMEM16PB、TMEM16PC、TMEM16PD、TMEM16PE、TMEM16PF、TMEM16PG、TMEM16PH、TMEM16PI、TMEM16PJ、TMEM16PK、TMEM16PL、TMEM16PM、TMEM16PN、TMEM16PO、TMEM16PP、TMEM16PQ、TMEM16PR、TMEM16PS、TMEM16PT、TMEM16PU、TMEM16PV、TMEM16PW、TMEM16PX、TMEM16PY、TMEM16PZ、TMEM16QA、TMEM16QB、TMEM16QC、TMEM16QD、TMEM16QE、TMEM16QF、TMEM16QG、TMEM16QH、TMEM16QI、TMEM16QJ、TMEM16QK、TMEM16QL、TMEM16QM、TMEM16QN、TMEM16QO、TMEM16QP、TMEM16QQ、TMEM16QR、TMEM16QS、TMEM16QT、TMEM16QU、TMEM16QV、TMEM16QW、TMEM16QX、TMEM16QY、TMEM16QZ、TMEM16RA、TMEM16RB、TMEM16RC、TMEM16RD、TMEM16RE、TMEM16RF、TMEM16RG、TMEM16RH、TMEM16RI、TMEM16RJ、TMEM16RK、TMEM16RL、TMEM16RM、TMEM16RN、TMEM16RO、TMEM16RP、TMEM16RQ、TMEM16RR、TMEM16RS、TMEM16RT、TMEM16RU、TMEM16RV、TMEM16RW、TMEM16RX、TMEM16RY、TMEM16RZ、TMEM16SA、TMEM16SB、TMEM16SC、TMEM16SD、TMEM16SE、TMEM16SF、TMEM16SG、TMEM16SH、TMEM16SI、TMEM16SJ、TMEM16SK、TMEM16SL、TMEM16SM、TMEM16SN、TMEM16SO、TMEM16SP、TMEM16SQ、TMEM16SR、TMEM16SS、TMEM16ST、TMEM16SU、TMEM16SV、TMEM16SW、TMEM16SX、TMEM16SY、TMEM16SZ、TMEM16TA、TMEM16TB、TMEM16TC、TMEM16TD、TMEM16TE、TMEM16TF、TMEM16TG、TMEM16TH、TMEM16TI、TMEM16TJ、TMEM16TK、TMEM16TL、TMEM16TM、TMEM16TN、TMEM16TO、TMEM16TP、TMEM16TQ、TMEM16TR、TMEM16TS、TMEM16TT、TMEM16TU、TMEM16TV、TMEM16TW、TMEM16TX、TMEM16TY、TMEM16TZ、TMEM16UA、TMEM16UB、TMEM16UC、TMEM16UD、TMEM16UE、TMEM16UF、TMEM16UG、TMEM16UH、TMEM16UI、TMEM16UJ、TMEM16UK、TMEM16UL、TMEM16UM、TMEM16UN、TMEM16UO、TMEM16UP、TMEM16UQ、TMEM16UR、TMEM16US、TMEM16UT、TMEM16UU、TMEM16UV、TMEM16UW、TMEM16UX、TMEM16UY、TMEM16UZ、TMEM16VA、TMEM16VB、TMEM16VC、TMEM16VD、TMEM16VE、TMEM16VF、TMEM16VG、TMEM16VH、TMEM16VI、TMEM16VJ、TMEM16VK、TMEM16VL、TMEM16VM、TMEM16VN、TMEM16VO、TMEM16VP、TMEM16VQ、TMEM16VR、TMEM16VS、TMEM16VT、TMEM16VU、TMEM16VV、TMEM16VW、TMEM16VX、TMEM16VY、TMEM16VZ、TMEM16WA、TMEM16WB、TMEM16WC、TMEM16WD、TMEM16WE、TMEM16WF、TMEM16WG、TMEM16WH、TMEM16WI、TMEM16WJ、TMEM16WK、TMEM16WL、TMEM16WM、TMEM16WN、TMEM16WO、TMEM16WP、TMEM16WQ、TMEM16WR、TMEM16WS、TMEM16WT、TMEM16WU、TMEM16WV、TMEM16WW、TMEM16WX、TMEM16WY、TMEM16WZ、TMEM16XA、TMEM16XB、TMEM16XC、TMEM16XD、TMEM16XE、TMEM16XF、TMEM16XG、TMEM16XH、TMEM16XI、TMEM16XJ、TMEM16XK、TMEM16XL、TMEM16XM、TMEM16XN、TMEM16XO、TMEM16XP、TMEM16XQ、TMEM16XR、TMEM16XS、TMEM16XT、TMEM16XU、TMEM16XV、TMEM16XW、TMEM16XX、TMEM16XY、TMEM16XZ、TMEM16YA、TMEM16YB、TMEM16YC、TMEM16YD、TMEM16YE、TMEM16YF、TMEM16YG、TMEM16YH、TMEM16YI、TMEM16YJ、TMEM16YK、TMEM16YL、TMEM16YM、TMEM16YN、TMEM16YO、TMEM16YP、TMEM16YQ、TMEM16YR、TMEM16YS、TMEM16YT、TMEM16YU、TMEM16YV、TMEM16YW、TMEM16YX、TMEM16YY、TMEM16YZ、TMEM16ZA、TMEM16ZB、TMEM16ZC、TMEM16ZD、TMEM16ZE、TMEM16ZF、TMEM16ZG、TMEM16ZH、TMEM16ZI、TMEM16ZJ、TMEM16ZK、TMEM16ZL、TMEM16ZM、TMEM16ZN、TMEM16ZO、TMEM16ZP、TMEM16ZQ、TMEM16ZR、TMEM16ZS、TMEM16ZT、TMEM16ZU、TMEM16ZV、TMEM16ZW、TMEM16ZX、TMEM16ZY、TMEM16ZZ。

[0066] 类似地,与某些肿瘤类型的CSC相关的细胞表面表型的非限制性实例包括CD44^高CD24^低、ALDH⁺、CD133⁺、CD123⁺、CD34⁺CD38⁻、CD44⁺CD24⁻、CD46^高CD324⁺CD66c⁻、CD133⁺CD34⁺CD10⁻CD19⁻、CD138⁻CD34⁻CD19⁺、CD133⁺RC2⁺、CD44⁺α₂β₁^高CD133⁺、CD44⁺CD24⁺ESA⁺、CD271⁺、ABCB5⁺和本领域中已知的其他CSC表面表型。参见例如Schulenburg等人,2010,同上; Visvader等人,2008,PMID:18784658;和U.S.P.N.2008/0138313。就本发明而言,包含实体瘤中的CD46^高CD324⁺表型和白血病中的CD34⁺CD38⁻的CSC制剂备受关注。

[0067] “阳性”、“低”和“阴性”表达量当其应用于标记物或标记物表型时定义如下。具有阴性表达(即“-”)的细胞在在此中定义为表达小在或等在同种型对照抗体在完整抗体染色混合物存在下、在荧光通道中所观测到的表达的95%的那些细胞,从而标记存在于另外荧光发射通道中的感兴趣的其他蛋白质。本领域普通技术人员将了解,用于定义阴性事件的此程序称为“荧光-1 (fluorescence minus one)”或“FMO”染色。表达大于使用同种型对照抗体、使用上述FMO染色程序所观测到的表达的95%的细胞在在此中定义为“阳性”(即“+”)。如在此所定义,存在广泛定义为“阳性”的各种细胞群体。若抗原表达平均观测值大于如上文所述使用同种型对照抗体、使用FMO染色所测量的95%,则细胞定义为呈阳性。若平均表达观测值大于借由FMO染色所测量的95%且在95%的一个标准偏差内,则此类阳性细胞可称为表达低的细胞(即“lo”)。可替代地,若平均表达观测值大于借由FMO染色所测量的95%且比95%高一个标准偏差以上,则此类阳性细胞可称为表达高的细胞(即“hi”)。在其他实施例中,优选可使用99%作为阴性FMO染色与阳性FMO染色之间的分界点且在一些实施例中,百分位可大于99%。

[0068] CD46^高CD324⁺或CD34⁺CD38⁻标记物表型和上文刚刚举例描述的那些物可联合标准流式细胞学分析和细胞分选技术使用以表征、分离、纯化或富集TIC和/或TPC细胞或细胞群体用于进一步分析。

[0069] 本发明抗体降低致瘤细胞频率的能力因此可使用上述技术和标记物测量。在一些情况下,抗EMR2抗体可使致瘤细胞频率降低10%、15%、20%、25%、30%或甚至35%。在其他实施例中,致瘤细胞频率降低可为约40%、45%、50%、55%、60%或65%。在某些实施例中,所披露的化合物可使致瘤细胞频率降低70%、75%、80%、85%、90%或甚至95%。应了解,致瘤细胞频率的任何降低可能引起瘤形成的致瘤性、持久性、复发性和侵袭性的相应降低。

[0070] III. 抗体

[0071] A. 抗体结构

[0072] 抗体及其变体和衍生物(包括接受的命名和编号系统)在例如Abbas等人(2010), *Cellular and Molecular Immunology* [细胞和分子免疫学] (第6版), W.B. 桑德斯公司(W.B. Saunders Company); 或Murphey等人(2011), *Janeway's Immunobiology* [简氏免疫生物学] (第8版), 加兰德科学出版社(Garland Science)中已有广泛描述。

[0073] “抗体”或“完整抗体”典型地是指Y形四聚蛋白质,其包含借由共价二硫键和非共价相互作用结合在一起的两条重链(H)和两条轻链(L)多肽链。各轻链由一个可变域(VL)和一个恒定域(CL)组成。各重链包含一个可变域(VH)和恒定区,在IgG、IgA和IgD抗体的情况下,恒定区包含三个域,称为CH1、CH2和CH3(IgM和IgE具有第四域CH4)。在IgG、IgA和IgD类别中,CH1和CH2域借由灵活性铰链区分离,该铰链区为长度可变的富含脯氨酸和半胱氨酸的区段(在各种IgG子类中为约10至约60个氨基酸)。轻链与重链中的可变域由约12或超过12个氨基酸的“J”区域与恒定域连接且重链还具有约10个额外氨基酸的“D”区域。各类抗体进一步包含由成对半胱氨酸残基形成的链间和链内二硫键。

[0074] 如在此所使用,术语“抗体”包括多克隆抗体(polyclonal antibodies)、多克隆抗体(multiclonal antibodies)、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化和灵长类化抗体、CDR接枝抗体、人类抗体(包括重组产生的人类抗体)、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、抗受试者基因型抗体;合成抗体,包括突变蛋白质及其变体;免疫特异性抗体片段,诸如Fd、Fab、F(ab')₂、F(ab')片段、单链片段(例如ScFv和ScFvFc);及其衍生物,包括Fc融合物及其他修饰,和任何其他免疫反应性分子,只要其展现与决定子的优先缔合或结合。此外,除非上下文限制条件另有指示,否则该术语进一步包含抗体的所有类别(即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)和所有子类(即IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。对应于抗体的不同类别的重链恒定域典型地分别借由相应小写希腊字母 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 指示。来自任何脊椎动物物种的抗体的轻链可基于其恒定域的氨基酸序列而归为两种明显不同类型中的一种,这两种明显不同类型称为 κ 和 λ 。

[0075] 抗体可变域在氨基酸组成方面在不同抗体中显示出相当大的差异且主要负责抗原识别和结合。各轻链/重链对的可变区形成抗体结合位点,使得完整IgG抗体具有两个结合位点(即其为二价的)。VH和VL域包含三个极端可变区,其称为高变区,或更通常称为互补决定区(CDR),此类可变区由四个不大变化的区域(称为构架区(FR))框架化和分离。VH与VL区之间的非共价结合形成Fv片段(可变片段),其含有抗体的两个抗原结合位点之一。

[0076] 除非另外指出,否则如在此所使用,可以根据以下所提供的方案之一将氨基酸分配至各域、构架区和CDR:Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* [具有免疫学兴趣的蛋白的序列] (第5版),美国健康和人类服务部(US Dept. of Health and Human Services), PHS, NIH, NIH出版号91-3242; Chothia等人,1987, PMID: 3681981; Chothia等人,1989, PMID: 2687698; MacCallum等人,1996, PMID: 8876650; 或Dubel编(2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies* [治疗性抗体手册], 第3版,德国威利出版公司(Wiley-VCH Verlag GmbH and Co); 或AbM(牛津大学分子/MSI药典)。包含如根据Kabat、Chothia、MacCallum(又称为接触)所定义的CDR和如自Abysis网站数据库(见下文)获得的AbM的氨基酸残基陈述在下文表1中。应注意MacCallum使用Chothia编号系统。

[0077] 表1

[0078]

	Kabat	Chothia	MacCallum	AbM
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	52-56	47-58	50-58
VH CDR3	95-102	95-102	93-101	95-102
VL CDR1	24-34	24-34	30-36	24-34
VL CDR2	50-56	50-56	46-55	50-56
VL CDR3	89-97	89-97	89-96	89-97

[0079] 抗体序列中的可变区和CDR可根据本领域中已开发的通用规则(如上文所述,诸如Kabat编号系统)或借由将序列针对已知可变区的数据库比对来鉴定。用于鉴定这些区域的方法描述在Kontermann和Dubel编, *Antibody Engineering* [抗体工程], 施普林格, 纽约, 纽约州, 2001和Dinarello等人, *Current Protocols in Immunology* [当前免疫学方案], 约翰·威利父子出版公司(John Wiley and Sons Inc.), 霍博肯市, 新泽西州, 2000中。抗体序列的例示性数据库描述在“Abysis”网站www.bioinf.org.uk/abs(由伦敦大学生物化学和分子生物学院(Department of Biochemistry&Molecular Biology University College London, London, England)的A.C.Martin维护)和VBASE2网站www.vbase2.org, 如Retter等人, *Nucl. Acids Res.* [核酸研究], 33(数据库期刊): D671-D674 (2005) 中所述, 且可经由这些网站存取。

[0080] 优选使用Abysis数据库分析序列, 该数据库整合了来自Kabat、IMGT和蛋白质数据库(PDB)的序列数据和来自PDB的结构数据。参见Dr. Andrew C.R.Martin的书中的章节: *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains* [蛋白质序列和抗体可变域的结构分析]。在: *Antibody Engineering Lab Manual* [抗体工程实验室手册] (编者: Duebel, S. 和Kontermann, R., 施普林格出版社(Springer-Verlag), 海德堡, ISBN-13: 978-3540413547, 还可在网站bioinfor.org.uk/abs上获得)。Abysis数据库网站进一步包括已开发的通用规则以便鉴定可根据在此中的传授内容使用的CDR。所附的图8G至8I在SC93.253、SC93.256和SC93.267抗体的例示性重链和轻链可变区的注释中显示该分析的结果。除非另外指明, 否则本文所阐述的所有CDR均根据Abysis数据库网站、根据Kabat等人获得。

[0081] 就本发明中所论述的重链恒定区氨基酸位置而言, 编号是根据首次描述在Edelman等人, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 63(1): 78-85中的Eu索引进行, 该索引描述骨髓瘤蛋白质Eu(据报导为第一种经测序的人类IgG1)的氨基酸序列。Edelman的Eu索引还阐述在Kabat等人, 1991(同上)。因此, 术语“如Kabat中所阐述的Eu索引”或“Kabat的Eu索引”或“Eu索引”或“Eu编号”在重链的情形中是指基于Edelman等人的人类IgG1 Eu抗体的残基编号系统, 如Kabat等人, 1991(同上)中所阐述。轻链恒定区氨基酸序列所用的编号系统类似地阐述在Kabat等人, (同上)中。下文紧接着阐述与本发明相容的例示性 κ (SEQ ID NO:5) 和 λ (SEQ ID NO:8) 轻链恒定区氨基酸序列:

[0082]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:5)。

[0083]

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:8)。

[0084] 类似地,下文紧接着阐述与本发明相容的例示性IgG1重链恒定区氨基酸序列:

[0085]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:2)。

[0086] 本领域普通技术人员将了解,野生型(例如参见SEQ ID NO:2、5或8)或为了提供不成对半胱氨酸(例如参见SEQ ID NO:3、4、6、7、9或10)或者如本文所披露经工程化的此类重链和轻链恒定区序列可使用标准分子生物学技术可操作地与所披露的重链和轻链可变区结合,以提供可并入本发明的EMR2抗体药物缀合物中的全长抗体。构成本发明的所选抗体(hSC93.253、hSC93.253ss1、hSC93.256和hSC93.256ss1)的全长重链和轻链的序列阐述在所附的图8E中。

[0087] 免疫球蛋白分子中存在两种类型的二硫桥或二硫键:链间二硫键和链内二硫键。如本领域中所熟知,链间二硫键的位置和数目根据免疫球蛋白类别和物种而变化。虽然本发明不限于抗体的任何特定类别或子类,但通篇本发明中应使用IgG1免疫球蛋白以用于描述的目的。在野生型IgG1分子中,存在十二个链内二硫键(四个位在各重链上且两个位在各轻链上)和四个链间二硫键。链内二硫键一般受到某种程度的保护且与链间键相比相对不易发生还原。相反地,链间二硫键位在免疫球蛋白表面上,可供溶剂接近且通常相对容易发生还原。重链之间存在两个链间二硫键且各重链与其相应轻链存在一个链间二硫键。已经证明,链间二硫键对于链缔合不是必需的。IgG1铰链区在重链中含有半胱氨酸,其形成链间二硫键,从而提供结构支撑和促进Fab移动的灵活性。重链/重链IgG1链间二硫键位在残基C226和C229(Eu编号),而IgG1的轻链与重链(重链/轻链)之间的IgG1链间双硫键是在κ或λ轻链的C214与重链的上部铰链区中的C220之间形成。

[0088] B. 抗体产生和制造

[0089] 本发明抗体可使用本领域中已知的多种方法制得。

[0090] 1. 宿主动物中产生多克隆抗体

[0091] 在各种宿主动物中产生多克隆抗体在本领域中为熟知的(参见例如Harlow和Lane(编)(1988)Antibodies:A Laboratory Manual[抗体:实验室手册],CSH出版社(CSH Press);和Harlow等人(1989)Antibodies[抗体],纽约州,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press))。为产生多克隆抗体,用抗原性蛋白质或包含抗原性蛋白质的细胞或制剂对具有免疫能力的动物(例如小鼠、大鼠、兔、山羊、非人类灵长类动物等)进行免疫。一段时间之后,借由将动物放血或处死来获得含有多克隆抗体的血清。该血清可以按自动物获得的形式使用或可使抗体部分或完全纯化以提供免疫球蛋白部分或经分离抗体制剂。

[0092] 就此而言,本发明抗体可由诱导具有免疫能力的动物中产生免疫反应的任何EMR2决定子产生。如在此所使用,“决定子”或“标靶”意谓与特定细胞、细胞群体或组织可鉴定地

关联或特异性地发现在特定细胞、细胞群体或组织中或上的任何可检测性状、特性、标记物或因子。决定子或标靶可具有形态、功能或生物化学性质且优选具有表型。在优选实施例中，决定子为特定细胞类型或细胞在某些条件下（例如在细胞周期的特定点期间或特定小生境下的细胞）差异表达（过度表达或表达不足）的蛋白质。出在本发明的目的，决定子优选差异表达在异常癌细胞上且可以包含EMR2蛋白质，或其剪接变体、同种型、同源物或家族成员、或其特定域、区域或表位中的任一者。“抗原”、“免疫原性决定子”、“抗原决定子”或“免疫原”意谓当引入具有免疫能力的动物中时可刺激免疫反应且由免疫反应产生的抗体识别的任何EMR2蛋白质或其任何片段、区域或域。在此中所涵盖的EMR2决定子的存在或不在于可用于鉴定细胞、细胞亚群或组织（例如肿瘤、致瘤细胞或CSC）。

[0093] 任何形式的抗原或含有抗原的细胞或制剂可用于产生特异性针对EMR2决定子的抗体。如在此所阐述，术语“抗原”是在宽泛的意义上使用且可以包含所选靶目标任何免疫原性片段或决定子，包括单个表位、多个表位、单个域或多个域，或完整胞外域（ECD）或蛋白质。抗原可为经分离的全长蛋白质、细胞表面蛋白质（例如经由在表面上表达抗原的至少一部分的细胞免疫），或可溶蛋白质（例如仅经由蛋白质的ECD部分免疫）或蛋白质构建体（例如Fc-抗原）。可在经基因修饰的细胞中产生抗原。任一种前述抗原可单独或与本领域中已知的一种或多种免疫原性增强佐剂组合使用。编码抗原的DNA可为基因组DNA或非基因组DNA（例如cDNA）且可编码足以引起免疫原性反应的ECD的至少一部分。可使用将表达抗原的细胞转型的任何载体，包括（但不限于）腺病毒载体、慢病毒载体、质体和非病毒载体，诸如阳离子脂质。

[0094] 2. 单克隆抗体

[0095] 在所选实施例中，本发明涵盖单克隆抗体的使用。如本领域中所知，术语“单克隆抗体”或“mAb”是指一种自基本上均质抗体群体获得的抗体，即构成该群体的个别抗体除可以少量存在的可能突变（例如天然存在的突变）之外相同。

[0096] 单克隆抗体可使用本领域中已知的多种多样的技术制备，包括杂交瘤技术、重组技术、噬菌体呈现技术、转基因动物（例如XenoMouse[®]）或其某种组合。例如，可以使用杂交瘤以及生物化学和遗传工程技术来产生单克隆抗体，如以下中更详细地描述：An, Zhigiang (编辑) Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic [治疗性单克隆抗体：从工作台到诊所]，约翰威立公司 (John Wiley and Sons)，第1版，2009；Shire等人 (编辑) Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing [当前单克隆抗体开发和制造的趋势]，施普林格科学+商业媒体有限责任公司 (Springer Science+Business Media LLC)，第1版，2010；Harlow等人, Antibodies: A Laboratory Manual [抗体：实验手册]，冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)，第2版，1988；Hammerling等人, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas [单克隆抗体及T细胞杂交瘤] 563-681 (纽约爱思唯尔公司 (Elsevier, N.Y.)，1981)。特异性结合至决定子的多种单克隆抗体产生之后，可经由各种筛选方法、基于例如其对决定子的亲和力或内化速率来选择特别有效的抗体。如在此所述制备的抗体可用作“源”抗体且进一步经修饰以例如改良针对标靶的亲和力、改良其在细胞培养物中的产生、降低体内免疫原性、产生多特异性构建体等。单克隆抗体生产和筛选的更详细描述示于以下以及所附实例中。

[0097] 3. 人类抗体

[0098] 在另一个实施例中,抗体可包含完全人类抗体。术语“人类抗体”是指一种抗体,其具有与人类所产生的抗体对应的氨基酸序列且/或已使用用于制备下述人类抗体的任一种技术制备。

[0099] 可使用本领域中已知的各种技术来产生人类抗体。一种技术为噬菌体呈现,其中在噬菌体上合成(优选人类)抗体文库,利用感兴趣的抗原或其抗体结合部分筛选文库,且分离出结合抗原的噬菌体,利用其可获得免疫反应性片段。制备和筛选此类文库的方法在本领域中已熟知且用于产生噬菌体呈现文库的试剂盒可市购(例如Pharmacia重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;和Stratagene SurfZAP™噬菌体呈现试剂盒,目录号240612)。也存在可用于产生和筛选抗体呈现文库的其他方法和试剂(参见例如U.S.P.N.5,223,409;PCT公开号WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690;和Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]88:7978-7982(1991))。

[0100] 在一个实施例中,重组人类抗体可借由筛选如上所制备的重组组合抗体文库来分离。在一个实施例中,文库为scFv噬菌体呈现文库,该文库是使用自B细胞分离的mRNA所制备的人类VL和VH cDNA产生。

[0101] 借由初始文库(天然或合成)所产生的抗体可以具有中等亲和力(约 10^6 至 $10^7 M^{-1}$ 的 K^a),但还可借由构建第二文库和自第二文库再选择来体外模拟亲和力成熟,如本领域中所所述。例如,可借由使用易错聚合酶(Leung等人,Technique,1:11-15(1989)中所报导)体外随机引入突变。另外,亲和力成熟可如下进行:使所选个别Fv克隆中的一个或多个CDR发生随机突变(例如使用PCR、使用携有跨越感兴趣的CDR的随机序列的引物)且筛选较高亲和力克隆。WO 9607754描述一种诱导免疫球蛋白轻链的CDR发生突变以产生轻链基因文库的方法。另一种有效方法为将借由噬菌体呈现所选的VH或VL域与获自未免疫供者的天然存在的V域变体的谱系重组且在数轮链改组中根据较高亲和力来筛选,如Marks等人,Biotechnol.[生物技术],10:779-783(1992)中所述。这一技术允许产生具有约 $10^{-9} M$ 或更低的解离常数 K_D ($k_{解离}/k_{结合}$)的抗体和抗体片段。

[0102] 在其他实施例中,可以采用类似的程序,使用包含在其表面上表达结合对的真核细胞(例如酵母)的文库。参见例如,U.S.P.N.7,700,302和U.S.S.N.12/404,059。在一个实施例中,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[自然-生物技术]14:309-314(1996);Sheets等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]95:6157-6162(1998))。在其他实施例中,人类结合对可以从在如酵母等真核细胞中产生的组合抗体文库分离。参见例如,U.S.P.N.7,700,302。这些技术有利地允许进行大量候选调节剂的筛选并且提供对候选序列的相对容易的操作(例如,通过亲和力成熟或重组改组)。

[0103] 还可以通过将人类免疫球蛋白基因座引入转基因动物中来制备人抗体,这些转基因动物例如为已经使内源免疫球蛋白基因部分地或完全地失活并且引入了人类免疫球蛋白基因的小鼠。在激发之后,观察到人抗体的产生,这在所有方面都紧密地类似于在人类中所见,包括基因重排、组装及抗体谱系。这一方法描述于例如U.S.P.N.5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016;及关于XenoMouse技术的U.S.P.N.6,

075,181和6,150,584;以及Lonberg和Huszar, Intern. Rev. Immunol. [国际免疫学评述]13: 65-93 (1995) 中。可替代地,可以经由产生针对靶抗原的抗体的人类B淋巴细胞(这些B淋巴细胞可以从罹患赘生性病征的个体回收或可以是已经在体外进行免疫接种的)的永生化来制备人抗体。参见例如,Cole等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy [单克隆抗体和癌症疗法], Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boerner等人, J. Immunol [免疫学杂志], 147 (1): 86-95 (1991); 以及U.S.P.N. 5,750,373。

[0104] 无论来源,应理解的是,人抗体序列可以使用领域已知的分子工程技术来制造并引入如本文所述的表达系统和宿主细胞中。这样的非天然的重组产生的人抗体(和受试者组合物)是与本披露的传授内容完全相容的并明确地保持在本发明的范围内。在某些选择方面,本发明的EMR2 ADC将包含重组产生的人类抗体充当细胞结合剂。

[0105] 4. 衍生抗体:

[0106] 一旦源抗体已如上文所述产生、选择且分离,则其可进一步改变以提供具有改进的医药特征的抗EMR2抗体。优选地,使用已知的分子工程技术来修饰或改变所述源抗体以提供具有所希望的治疗特性的衍生抗体。

[0107] 4.1. 嵌合和人源化抗体

[0108] 本发明的所选实施例包含免疫特异性结合至EMR2且可视为“源”抗体的鼠类单克隆抗体。在所选实施例中,本发明的抗体可以通过对源抗体的恒定区和/或表位结合氨基酸序列的任选修饰从这样的“源”抗体衍生。在某些实施例中,如果源抗体中所选择的氨基酸通过缺失、突变、取代、整合或组合而改变,则抗体是从源抗体“衍生的”。在另一个实施例中,“衍生”抗体是其中源抗体(例如,一个或多个CDR或域或整个重链和轻链可变区)的片段与受体抗体序列组合或并入其中以提供衍生抗体(例如嵌合、CDR接枝或人源化抗体)的一种抗体。这些“衍生”抗体可使用来自抗体产生细胞的遗传物质和如下文所述的标准分子生物技术(诸如改良决定子的亲和力;改良抗体稳定性;改良细胞培养物中的产生和产量;减少体内免疫原性;减少毒性;促进活性部分结合;或产生多特异性抗体)产生。此类抗体也可以通过化学手段或翻译后修饰来修饰成熟分子(例如糖基化模式或聚乙二醇化)而衍生自源抗体。

[0109] 在一个实施例中,本发明的抗体包含嵌合抗体,这些嵌合抗体衍生自来自已经共价接合的至少两种不同物种或类别的抗体的蛋白质区段。术语“嵌合”抗体是针对这样的构建体,其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种的或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而这个或这些链的剩余部分与来自另一物种的或属于另一个抗体类别或亚类的抗体、以及这类抗体的片段中的相应序列相同或同源(U.S.P.N. 4,816,567)。在一些实施例中,本发明的嵌合抗体可以包含与人轻链和重链恒定区可操作地连接的全部或大多数的所选鼠类重链和轻链可变区。在其他所选实施例中,抗EMR2抗体可“衍生”自本文披露的小鼠抗体且包含小在完整的重链和轻链可变区。

[0110] 在其他实施例中,本发明的嵌合抗体是“CDR-接枝”抗体,其中所述CDR(如使用Kabat、Chothia、McCallum等所定义的)衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类,同时抗体的剩余部分大部分衍生自来自另一物种的或属于另一抗体类别或亚类的抗体。对于用于人类中,一种或多种所选啮齿动物CDR(例如小鼠CDR)可以接枝到人类受体抗体中,替代该人抗体的一个或多个天然存在的CDR。这些构建体一般具有以下益处:提供全强度的人抗

体功能(例如,补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)),同时减少了受试者对该抗体的不想要的免疫应答。在一个实施例中,所述CDR接枝抗体将包含从掺入人框架序列的小鼠获得的一种或多种CDR。

[0111] 与该CDR接枝抗体类似的是“人源化”抗体。如在此所使用,“人源化”抗体是包含衍生自一种或多种非人抗体(供体抗体或源抗体)的一种或多种氨基酸序列(例如CDR序列)的人抗体(受体抗体)。在某些实施例中,“回复突变”可以引入到人源化抗体中,其中受体人抗体的可变区的一个或多个FR中的残基被来自非人物种供体抗体的相应残基替换。这样的回复突变可以有助于保持一种或多种接枝CDR的适当三维构型并因此改进亲和性和抗体稳定性。可以使用来自各种供体物种的抗体,这些供体物种包括但不限于小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物。另外,人源化抗体可以包含在受体抗体中或在供体抗体中未发现的新残基,以例如进一步改善抗体性能。可以如以下实例中所陈述提供与本发明相容的CDR接枝和人源化抗体,所述抗体包含来自源抗体的鼠类组分和来自受体抗体的人类组分。

[0112] 可以使用各种领域认可的技术来检测哪些人类序列用作受体抗体,以提供根据本发明的人源化构建体。相容人类种系序列的合集和检测它们作为受体序列的适合性的方法例如披露于Dubel和Reichert(编辑)(2014)Handbook of Therapeutic Antibodies[治疗性抗体手册],第2版,威利-布莱克威尔股份有限公司(Wiley-Blackwell GmbH);Tomlinson,I.A.等人(1992)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]227:776-798;Cook,G.P.等人(1995)Immunol.Today[今日免疫学]16:237-242;Chothia,D.等人(1992)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]227:799-817;以及Tomlinson等人(1995)EMBO J[欧洲分子生物学学会杂志]14:4628-4638中。V-BASE名录(VBASE2-Retter等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]33:671-674,2005),其提供了人类免疫球蛋白可变区序列的一个全面名录(由Tomlinson,I.A.等人汇编,MRC Centre for Protein Engineering[MRC蛋白质工程中心],剑桥,英国),可以用来鉴定相容受体序列。因此,描述于例如U.S.P.N.6,300,064中的共有人框架序列还可以被证明是相容的受体序列并且可以根据本传授内容而使用。一般而言,根据与鼠类来源框架序列的同源性以及对来源抗体和受体抗体的CDR标准结构的分析来选择人框架受体序列。然后可以使用领域认可的技术来合成衍生抗体的重链和轻链可变区的衍生序列。

[0113] 举例来说,CDR接枝和人源化抗体以及相关方法描述于US.P.N.6,180,370和5,693,762中。有关进一步细节,参见例如,Jones等人,1986(PMID:3713831);以及U.S.P.N.6,982,321和7,087,409。

[0114] CDR接枝或人源化抗体可变区与人类受体可变区的序列同一性或同源性可以如本文所论述的进行测定,并且当这样测量时,将优选地共享至少60%或65%的序列同一性,更优选至少70%、75%、80%、85%或90%的序列同一性,甚至更优选至少93%、95%、98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守性氨基酸置换而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有类似化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。一般而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情形中,序列同一性百分比或相似性程度可以向上调整以校正该取代的保守性质。

[0115] 应理解的是,如附图8A和8B中提供的带注释的CDR和框架序列是根据Kabat等人,使用专有Abysis数据库所定义的。然而,如本文所论述的和图8G-8I中所示的,本领域技术

人员根据由Chothia等人、ABM或MacCallum等人以及Kabat等人所提供的定义容易鉴定CDR。因此,包含根据任何上述系统衍生的一种或多种CDR的抗EMR2人源化抗体明确地保持在本发明的范围内。

[0116] 4.2. 位点特异性抗体

[0117] 本发明的抗体可以被工程化以促进与细胞毒素或其他抗癌剂(如以下更详细地论述的)的缀合。根据抗体上细胞毒素的位置以及药物与抗体比(DAR),抗体药物缀合物(ADC)制剂包含ADC分子的均质群体是有利的。基于本披露,本领域技术人员可以容易地制造如在此所述的位点特异性工程化构建体。如在此所使用,“位点特异性抗体”或“位点特异性构建体”意指如下抗体或其免疫反应性片段,其中重链或轻链中的至少一个氨基酸被缺失、改变或取代(优选被另一个氨基酸)以提供至少一个游离半胱氨酸。类似地,“位点特异性缀合物”应保持为意指以下ADC,其包含位点特异性抗体以及与成对或游离半胱氨酸缀合的至少一种细胞毒素或其他化合物(例如,报道分子)。在某些实施例中,未配对半胱氨酸残基将包含未配对的链内半胱氨酸残基。在其他实施例中,游离半胱氨酸残基将包含未配对的链间半胱氨酸残基。在仍其他实施例中,游离半胱氨酸可以被工程化到抗体的氨基酸序列中(例如,在CH3域中)。在任何情况下,位点特异性抗体可以具有不同同种型,例如,IgG、IgE、IgA或IgD;并且在那些类别内,抗体可以具有不同亚类,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。对于IgG构建体,抗体的轻链可以包含各自掺入C214的 κ 或 λ 同种型,在所选实施例中,C214可能由于IgG1重链中缺少C220残基而未配对。

[0118] 因此,如在此所用,术语“游离半胱氨酸”或“未配对半胱氨酸”可以互换使用,除非上下文另有规定,并且应意指抗体的任何半胱氨酸(或含硫醇的)成分(例如,半胱氨酸残基),无论是天然存在还是使用分子工程技术特异性地掺入所选残基位置的,其在生理条件下不是天然存在的(或“天然的”)二硫键的一部分。在某些优选实施例中,游离半胱氨酸可以包含天然存在的半胱氨酸,其天然链间或链内二硫桥配偶体已经被取代、消除或以其他方式改变以在生理条件下破坏天然存在的二硫桥,从而使未配对半胱氨酸适合于位点特异性缀合。在其他优选实施例中,游离或未配对半胱氨酸将包含选择性地位于抗体重链或轻链氨基酸序列内的预定位点的半胱氨酸残基。应当理解,在缀合之前,游离或未配对半胱氨酸可以作为硫醇(经还原的半胱氨酸)、作为封端半胱氨酸(capped cysteine)(经氧化的)或作为与相同或不同分子上的另一半胱氨酸或硫醇基团一起的非天然分子内或分子间二硫键(经氧化的)的一部分存在,这取决于该系统的氧化态。如以下更详细论述的,该适当工程化的抗体构建体的温和还原将提供可用于位点特异性缀合的硫醇。因此,在特别优选的实施例中,游离或未配对半胱氨酸(无论是天然存在的或并入的)将经受选择性还原和随后的缀合以提供均质DAR组合物。

[0119] 应当理解,所披露的工程化缀合物制剂展现的有利特性至少部分地基于特异性引导缀合的能力,并且在缀合位置和组合物的绝对DAR值方面上大大限制所制造的缀合物。与大多数常规ADC制剂不同,本发明不需要完全依赖于抗体的部分或全部还原以提供随机缀合位点和相对不受控制的DAR种类的产生。相反,在某些方面,本发明优选地通过工程化靶向抗体来破坏一个或多个天然存在的(即,“天然”)链间或链内二硫桥或者通过在任何位置引入半胱氨酸残基来提供一个或多个预定的未配对(或游离)半胱氨酸位点。为此,应当理解,在所选实施例中,可以使用标准分子工程技术将半胱氨酸残基沿着抗体(或其免疫反应

性片段)重链或轻链掺入任何位置或附加到其上。在其他优选实施例中,天然二硫键的破坏可以与引入非天然半胱氨酸(其然后将包含游离半胱氨酸)组合实现,然后可以将其用作缀合位点。

[0120] 在某些实施例中,工程化抗体包含链内或链间半胱氨酸残基的至少一个氨基酸缺失或取代。如在此所使用的“链间半胱氨酸残基”意指参与抗体的轻链和重链之间或抗体的两条重链之间的天然二硫键的半胱氨酸残基,而“链内半胱氨酸残基”是在相同重链或轻链中与另一个半胱氨酸天然配对的半胱氨酸残基。在一个实施例中,缺失或取代的链间半胱氨酸残基参与轻链和重链之间的二硫键的形成。在另一个实施例中,缺失或取代的半胱氨酸残基参与两条重链之间的二硫键。在典型的实施例中,由于抗体的互补结构,其中轻链与重链的VH和CH1域配对,并且其中一条重链的CH2和CH3域与互补重链的CH2和CH3域配对,轻链或重链中单个半胱氨酸的突变或缺失将在工程化抗体中产生两个未配对半胱氨酸残基。

[0121] 在一些实施例中,链间半胱氨酸残基缺失。在其他实施例中,链间半胱氨酸取代另一个氨基酸(例如,天然存在的氨基酸)。例如,氨基酸取代可导致链间半胱氨酸被中性(例如丝氨酸、苏氨酸或甘氨酸)或亲水性(例如甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸)残基替换。在所选实施例中,链间半胱氨酸被丝氨酸替换。

[0122] 在本发明涵盖的一些实施例中,缺失或取代的半胱氨酸残基在轻链(κ 或 λ)上,从而在重链上留下游离半胱氨酸。在其他实施例中,缺失或取代的半胱氨酸残基位于重链上,在轻链恒定区上留下游离半胱氨酸。组装时,应理解的是,完整抗体的轻链或重链中的单个半胱氨酸的缺失或取代产生具有两个未配对半胱氨酸残基的位点特异性抗体。

[0123] 在一个实施例中,IgG轻链(κ 或 λ)的位置214处的半胱氨酸(C214)被缺失或取代。在另一个实施例中,IgG重链上的位置220处的半胱氨酸(C220)被缺失或取代。在另外的实施例中,重链上位置226或位置229处的半胱氨酸被缺失或取代。在一个实施例中,重链上的C220被丝氨酸取代(C220S),以在轻链中提供所希望的游离半胱氨酸。在另一个实施例中,轻链中的C214被丝氨酸取代(C214S),以在重链中提供所希望的游离半胱氨酸。这样的位点特异性构建体更详细描述于以下实例中。相容性位点特异性构建体的总结紧接着示于以下表2中,其中通常根据如Kabat中所陈述的Eu索引进行编号,WT代表“野生型”或没有改变的天然恒定区序列并且(Δ)表示氨基酸残基的缺失(例如,C214 Δ 表明位置214处的半胱氨酸残基已经被缺失)。

[0124] 表2

[0125]

名称	抗体组分	改变	SEQ ID NO:
ss1	重链	C220S	SEQ ID NO: 3
	轻链	WT	SEQ ID NO: 5、8
ss2	重链	C220Δ	SEQ ID NO: 4
	轻链	WT	SEQ ID NO: 5、8
ss3	重链	WT	SEQ ID NO: 2
	轻链	C214Δ	SEQ ID NO: 7、10
ss4	重链	WT	SEQ ID NO: 2
	轻链	C214S	SEQ ID NO: 6、9

[0126] 与本发明的位点特异性构建体相容的经工程化的例示性轻链和重链恒定区紧接着阐述在下文中,其中SEQ ID NO:3和4分别包含C220S IgG1和C220Δ IgG1重链恒定区,SEQ ID NO:6和7分别包含C214Δ和C214S κ轻链恒定区且SEQ ID NO:9和10分别包含例示性C214Δ和C214Sλ轻链恒定区。在每种情况下,改变或缺失的氨基酸位点(连同侧翼残基)都加了下划线。

[0127]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:3)

[0128]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEOYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:4)

[0129]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES (SEQ ID NO:6)

[0130]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE (SEQ ID NO:7)

[0131]

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTESS (SEQ ID NO:9)

[0132]

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTES (SEQ ID NO:10)

[0133] 如上文所论述,重链和轻链变体中的每一者可操作地与所披露的重链和轻链可变区(或其衍生物,诸如人源化或CDR接枝构建体)结合,以提供如本文所披露的位点特异性抗EMR2抗体。这样的工程化抗体对于在所披露的ADC中的使用而言,特别相容。

[0134] 关于引入或添加一个或多个半胱氨酸残基以提供游离半胱氨酸(与破坏天然二硫键相反),本领域技术人员可以容易地辨别抗体或抗体片段上的一个或多个相容位置。因此,在所选实施例中,可以将一个或多个半胱氨酸引入CH1域、CH2域或CH3域或其任何组合,这取决于希望的DAR、抗体构建体、所选有效载荷以及抗体靶标。在其他优选的实施例中,半胱氨酸可以被引入到 κ 或 λ CL域中,并且在特别优选的实施例中可以引入CL域的c-末端区域。在每个情形中,邻近半胱氨酸插入位点的其他氨基酸残基可以被改变、去除或取代,以促进分子稳定性、缀合效率或为有效载荷(一旦附接)提供保护环境。在具体实施例中,取代的残基出现在抗体的任何可及位点处。通过用半胱氨酸取代这些表面残基,从而反应性硫醇基团被定位在抗体上的易及位点处,并且可以如在此进一步描述的那样被选择性地还原。在具体实施例中,取代的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸取代这些残基,从而反应性硫醇基团被定位在抗体的可及位点处,并且可以用于选择性缀合抗体。在某些实施例中,以下残基中的任一个或多个可经半胱氨酸取代:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(Eu编号);和重链Fc区的S400(Eu编号)。另外的取代位置和制造相容性位点特异性抗体的方法陈述于U.S.P.N.7,521,541中,将其以其整体结合在此。

[0135] 如在此所披露的,以所定义的位点和化学计量的药物荷载产生抗体药物缀合物的策略广泛地适用于全部抗EMR2抗体,因为其主要涉及抗体的保守恒定域的工程化。由于抗体的每个类别和亚类的氨基酸序列和天然二硫桥均已得到充分证明,本领域技术人员可以容易地制造不同抗体的工程化构建体,而无需过多的实验,因此,这些构建体被明确地涵盖在本发明的范围内。对在包含如本发明中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的全部或一部分的位点特异性构建体而言,这尤为真实。

[0136] 4.3. 恒定区修饰和改变的糖基化

[0137] 本发明的所选实施例还可以包括恒定区(即,Fc区)的取代或修饰,包括但不限于氨基酸残基取代、突变和/或修饰,它们产生具有以下特征的化合物,这些特征包括但不限于:改变的 药物代谢动力学 、增加的血清半衰期、增加的结合亲和力、降低的免疫原性、增加的产量、与Fc受体(FcR)的改变的Fc配体结合、增强或减弱的ADCC或CDC、改变的糖基化和/或二硫键以及修饰的结合特异性。

[0138] 具有改进的效应功能的化合物可经由例如Fc域与Fc受体(例如Fc γ RI、Fc γ RIIA和B、Fc γ RIII和FcRn)之间相互作用所涉和的氨基酸残基的改变来产生,从而可增强细胞毒性和/或改变 药物动力学 ,诸如延长的血清半衰期(参见例如,Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol[免疫学年鉴]9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods[免疫方法]4:25-34(1994);及de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.[实验与临床医学杂志]126:330-41(1995))。

[0139] 在所选实施例中,具有增加的体内半衰期的抗体可以通过对鉴定为涉及Fc域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基进行修饰(例如,取代、缺失或添加)来产生(参见例如,国际公开号W0 97/34631;W0 04/029207;U.S.P.N.6,737,056和U.S.P.N.2003/0190311)。就这些实施例来说,Fc变体可以在哺乳动物,优选人类中提供超过5天、超过10

天、超过15天、优选超过20天、超过25天、超过30天、超过35天、超过40天、超过45天、超过2个月、超过3个月、超过4个月或超过5个月的半衰期。半衰期的增加引起更高的血清滴度,由此使抗体给予的频率降低和/或使有待给予的抗体的浓度降低。可以例如在表达人类FcRn的转基因小鼠或转染的人类细胞系中,或在给予了具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中,对人类FcRn高亲和力结合多肽在体内与人类FcRn的结合及血清半衰期进行检验。WO 2000/42072描述了使与FcRn的结合改善或减少的抗体变体。还参见例如,Shields等人, J. Biol. Chem. [生物化学杂志]9 (2):6591-6604 (2001)。

[0140] 在其他实施例中,Fc改变可以引起ADCC或CDC活性的增强或减弱。如本领域中所知,CDC是指在补体存在下靶细胞的溶解,并且ADCC是指一种细胞毒性形式,其中结合到存在于某些细胞毒性细胞(例如,自然杀手细胞、中性粒细胞及巨噬细胞)上的FcR的分泌型Ig使这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合到带有抗原的靶细胞并且随后用细胞毒素杀灭靶细胞。在本发明的上下文中,提供了具有“改变的”FcR结合亲和力的抗体变体,如与亲本或未修饰抗体或与包含天然序列FcR的抗体相比较,它具有增强或减少的结合。呈现出减少的结合的这些变体可以具有极少或没有可感知的结合,例如与天然序列相比较,0%-20%结合到FcR,例如,如通过本领域中众所周知的技术所测定。在其他实施例中,如与天然免疫球蛋白Fc域相比较,该变体将展现增强的结合。应理解的是,这些类型的Fc变体可以有利地用于增强所披露的抗体的有效抗赘生特性。在又其他实施例中,这些改变引起结合亲和力的增加、免疫原性的降低、产量增加、糖基化和/或二硫键(例如,对于缀合位点)改变、结合特异性修饰、胞噬作用增加,和/或细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)下调等。

[0141] 再其他实施例包含一种或多种工程化糖形,例如,位点特异性抗体,其包含改变的糖基化模式或共价附接到该蛋白质(例如,在Fc域中)的改变的碳水化合物的组成。参见例如Shields,R.L.等人,(2002) J. Biol. Chem. [生物化学杂志]277:26733-26740。工程化糖形可以用于多种目的,包括但不限于,增强或减弱效应子功能、增加抗体对靶标的亲和力或促进抗体的产生。在希望降低效应子功能的某些实施例中,该分子可以被工程化以表达去糖基化的形式。可以引起一个或多个可变区框架糖基化位点的消除以借此消除该位点处的糖基化的取代是众所周知的(参见例如,U.S.P.N.5,714,350和6,350,861)。相反地,可以通过在一个或多个另外的糖基化位点中进行工程化来赋予含Fc分子增强的效应子功能或改善的结合。

[0142] 其他实施例包括具有改变的糖基化组成的Fc变体,如具有减少的岩藻糖基残基量的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分G1cNAc结构的抗体。已证明这些改变的糖基化模式可增加抗体的ADCC能力。工程化的糖形可以通过本领域的普通技术人员已知的任何方法产生,例如,通过使用工程化或变体表达株、通过与一种或多种酶(例如,N-乙酰葡萄糖胺转移酶III (GnTIII))共表达、通过在不同生物体或来自不同生物体的细胞系中表达包含Fc区的分子、或通过表达了包含Fc区的分子之后对一种或多种碳水化合物进行修饰(参见例如,WO 2012/117002)。

[0143] 4.4. 片段

[0144] 无论选择何种形式的抗体(例如,嵌合、人源化等形式)来实行本发明,应理解的是,其免疫反应性片段(其自身或作为抗体药物缀合物的部分)都可以根据在此的传授内容使用。“抗体片段”包含完整抗体的至少一部分。如在此所使用,术语抗体分子的“片段”包括

抗体的抗原结合片段,并且术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体中与所选抗原或其免疫原性决定子免疫特异性结合或反应,或与衍生这些片段的完整抗体竞争特异性抗原结合的多肽片段。

[0145] 示例性免疫反应性片段包括:可变轻链片段(VL)、可变重链片段(VH)、scFv、F(ab')₂片段、Fab片段、Fd片段、Fv片段、单域抗体片段、双抗体、线性抗体、单链抗体分子及由抗体片段形成的多特异性抗体。此外,活性位点特异性片段包含该抗体中保持它与抗原/底物或受体相互作用的能力并且以类似于完整抗体的方式(不过可能具有略微降低的效率)对其进行修饰的一部分。这样的抗体片段可以进一步被工程化以包含一个或多个如本文所述的游离半胱氨酸。

[0146] 在特别优选的实施例中,该EMR2结合域将包含scFv构建体。如在此所使用,“单链可变片段(scFv)”意指从保留结合抗原的能力的抗体衍生的单链多肽。scFv的实例包括利用重组DNA技术形成的抗体多肽,并且其中免疫球蛋白重链和轻链片段的Fv区经由间隔序列连接。用于制备scFv的各种方法是已知的,并且包括描述于U.S.P.N.4,694,778中的方法。

[0147] 在其他实施例中,抗体片段是包含Fc区并且保持当存在于完整抗体中时通常与Fc区相关的至少一种生物功能(如FcRn结合、抗体半衰期调节、ADCC功能及补体结合)的抗体片段。在一个实施例中,抗体片段是具有基本上类似于完整抗体的体内半衰期的单价抗体。例如,此类抗体片段可以包含连接到能够赋予该片段体内稳定性的Fc序列(包含至少一个游离半胱氨酸)的抗原结合臂。

[0148] 如本领域的普通技术人员将充分认识到的,片段可以通过分子工程或经由化学或酶处理(如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶)完整或完全抗体或抗体链,或者通过重组手段获得。有关抗体片段的更详细说明,参见例如,Fundamental Immunology [基础免疫学],W.E.Paul编辑,瑞文出版社(Raven Press),纽约州(1999)。

[0149] 在所选实施例中,本发明的抗体片段将包含可以不同构型使用的ScFv构建体。例如,此类抗EMR2 ScFv构建体可用于治疗肿瘤的授受性免疫基因疗法中。在某些实施例中,本发明抗体(例如ScFv片段)可用于产生免疫选择性地与EMR2反应的嵌合抗原受体(CAR)。根据本发明,抗EMR2 CAR为包含本发明抗EMR2抗体或其免疫反应性片段(例如ScFv片段)、跨膜域和至少一个胞内域的融合蛋白。在某些实施例中,可将已经基因工程化以表达抗EMR2 CAR的T细胞、天然杀手细胞或树突状细胞引入患有癌症的受试者中,以便刺激该受试者的免疫系统特异性地靶向表达EMR2的肿瘤细胞。在一些实施例中,本发明的CAR将包含起始初级细胞质信号传导序列(即,经由T细胞受体复合物起始抗原依赖性初始活化的序列)的胞内域,例如来源于CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的胞内域。在其他实施例中,本发明的CAR将包含起始二次或共刺激信号的胞内域,例如来源于CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134、CD137、ICOS、CD154、4-1BB和糖皮质激素诱导性肿瘤坏死因子受体的胞内域(参见U.S.P.N.US/2014/0242701)。

[0150] 4.5. 多价构建体

[0151] 在其他实施例中,本发明的抗体和缀合物可以是单价或多价(例如二价、三价等)的。如在此所使用,术语“价态”是指与抗体缔合的潜在靶结合位点的数目。每一靶结合位点特异性结合一个靶分子或靶分子上的特定位置或基因座。当抗体是单价时,该分子的每个

结合位点将特异性结合到单一抗原位置或表位。当一种抗体包含超过一个靶结合位点(多价)时,每个靶结合位点可以特异性结合相同或不同的分子(例如,可以结合到不同的配体或不同的抗原,或在同一抗原上的不同表位或位置)。参见例如,U.S.P.N.2009/0130105。

[0152] 在一个实施例中,所述抗体是双特异性抗体,其中两条链具有不同的特异性,如 Millstein 等人,1983,Nature [自然],305:537-539 中所描述的。其他实施例包括具有另外的特异性的抗体,如三特异性抗体。其他更复杂的相容性多特异性构建体及其制造方法陈述于 U.S.P.N.2009/0155255,以及 WO 94/04690;Suresh 等人,1986,Methods in Enzymology [酶学方法],121:210;及 WO 96/27011 中。

[0153] 多价抗体可以免疫特异性结合到所希望的靶分子的不同表位或可以免疫特异性结合到靶分子以及异源表位,如异源多肽或固体支撑材料。尽管所选实施例仅结合两种抗原(即,双特异性抗体),但本发明也涵盖具有另外的特异性的抗体,如三特异性抗体。双特异性抗体还包括交联或“异种缀合”抗体。举例来说,在该异种缀合物中的一种抗体可以偶合到抗生物素蛋白,另一种偶联到生物素。已经例如提出这些抗体使免疫系统细胞靶向不想要的细胞(U.S.P.N.4,676,980),并且用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373 及 EP 03089)。异种缀合抗体可以使用任何常规的连接方法制备。适合的连接剂以及多种连接技术是本领域中众所周知的,并且披露于 U.S.P.N.4,676,980 中。

[0154] 5. 抗体的重组产生

[0155] 可以使用从抗体产生细胞和重组技术获得的遗传物质来产生或修饰抗体及其片段(参见例如;Dubel 和 Reichert (编辑) (2014) Handbook of Therapeutic Antibodies [治疗性抗体手册],第 2 版,威利-布莱克威尔股份有限公司(Wiley-Blackwell GmbH); Sambrook 和 Russell (编辑) (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [分子克隆:实验室手册] (第 3 版),纽约州,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press); Ausubel 等人 (2002) Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology [精编分子生物学方案:当代分子生物学方案的方法概要],约翰威利父子公司(Wiley, John & Sons, Inc.); 以及 U.S.P.N.7,709,611)。

[0156] 本发明的另一个方面涉及编码本发明的抗体的核酸分子。核酸可以存在于全细胞、细胞裂解物或者部分纯化或基本上纯的形式中。当通过标准技术(包括碱/SDS 处理、CsCl 成带(CsCl banding)、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其他技术)从其他细胞成分或其他污染物(例如其他细胞核酸或蛋白质)分离时,核酸是“分离的”或“呈现为基本上纯的”。本发明的核酸可以例如是 DNA (例如基因组 DNA、cDNA)、RNA 及其人工变体(例如,肽核酸),无论单链或双链或 RNA, RNA 并且可以包含或不包含内含子。在所选实施例中,核酸是 cDNA 分子。

[0157] 可以使用标准分子生物学技术得到本发明的核酸。对于由杂交瘤(例如,如以下实施例所述制备的杂交瘤)表达的抗体,编码抗体的轻链和重链的 cDNA 可通过标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体展示技术)获得的抗体,可以从文库中回收编码该抗体的核酸分子。

[0158] 可以通过标准重组 DNA 技术进一步操纵编码 VH 和 VL 区段的 DNA 片段,例如来将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操纵中,编码 VL 或 VH 的 DNA

片段可操作地连接至编码另一蛋白质(诸如抗体恒定区或灵活性连接体)的另一DNA片段。如本上下文中使用的术语“可操作地连接”意指连接两个DNA片段,使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保留在框架内。

[0159] 通过将编码VH的DNA可操作地与编码重链恒定区(在IgG1的情况下,为CH1、CH2和CH3)的另一DNA分子连接,而将所分离的编码VH区域的DNA转化成长重链基因。人类重链恒定区基因的序列在本领域中是已知的(参见例如Kabat等人(1991)(同上)),并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。该重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,但最优选地是IgG1或IgG4恒定区。示例性IgG1恒定区示于SEQ ID NO:2中。对于Fab片段重链基因,编码VH的DNA可以可操作地连接到仅编码重链CH1恒定区的另一DNA分子。

[0160] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区(CL)的另一DNA分子可操作地连接,可以将编码VL区的分离的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人类轻链恒定区基因的序列在本领域中是已知的(参见例如Kabat等人(1991)(同上)),并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区,但最优选地是 κ 恒定区。示例性的相容性 κ 轻链恒定区示于SEQ ID NO:5中,而示例性的相容性 λ 轻链恒定区示于SEQ ID NO:8中。

[0161] 在每种情况下,VH或VL域可以与它们各自的恒定区(CH或CL)可操作地连接,其中所述恒定区是位点特异性恒定区并且提供位点特异性抗体。在所选实施例中,所得位点特异性抗体将包含重链上的两个未配对的半胱氨酸;而在其他实施例中,所述位点特异性抗体将包含CL域中的两个未配对半胱氨酸。

[0162] 本文预期的是与本发明的多肽表现出“序列同一性”、“序列相似性”或“序列同源性”的某些多肽(例如抗原或抗体)。例如,衍生的人源化抗体VH或VL域可以表现出与来源(例如,鼠类)或受体(例如,人类)VH或VL域的序列相似性。“同源性”多肽可以表现出65%、70%、75%、80%、85%或90%序列同一性。在其他实施例中,“同源性”多肽可以表现出93%、95%或98%序列同一性。如在此所使用的,两个氨基酸序列之间的百分比同源性与此两个序列之间的百分比同一性是等同的。这两个序列之间的百分比同一性是这些序列共有的相同位置的数目的函数(即, $\%同源性 = \text{相同位置的数目} / \text{位置的总数目} \times 100$),并考虑到为这两个序列的最优比对而需引入的空位数和每个空位的长度。可以使用如下面的非限制性实例中所述的数学算法完成序列的比较和两个序列之间百分比同一性的确定。

[0163] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使用已经合并到ALIGN程序(版本2.0)中的E.Meyers和W.Miller的算法(Comput.Appl.Biosci.[计算机应用生物科学],4:11-17(1988))来确定,使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12且空位罚分为4。此外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使用已经合并到GCG软件包(可在www.gcg.com获得)中的GAP程序里的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:444-453(1970))算法来确定,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,且空位权重为16、14、12、10、8、6或4和长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0164] 另外地或可替代地,本发明的蛋白序列可以被进一步用作“查询序列”以进行针对公共数据库的检索,以例如鉴定相关序列。这类检索可以使用Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-10的XBLAST程序(2.0版)来进行。可以用XBLAST程

序,得分=50,字长=3进行BLAST蛋白质检索来获得与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的空位比对,可利用如Altschul等人,(1997) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 25 (17) :3389-3402中所述的缺口BLAST。当利用BLAST和缺口BLAST程序时,可以使用各程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0165] 不相同的残基位置可以因保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是一个氨基酸残基被具有类似化学特性(例如,电荷或疏水性)的侧链的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。一般而言,保守氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情形中,序列同一性百分比或相似性程度可以向上调整以校正该取代的保守性质。在存在非保守氨基酸取代的情形中,在实施例中,表现出序列同一性的多肽将保持本发明的多肽(例如,抗体)的所希望的功能或活性。

[0166] 本文还预期了与本发明的核酸表现出“序列同一性”、“序列相似性”或“序列同源性”的核酸。“同源序列”是指表现出至少约65%、70%、75%、80%、85%或90%序列同一性的核酸分子的序列。在其他实施例中,核酸的“同源序列”可以与参比核酸序列表现出93%、95%或98%序列同一性。

[0167] 本发明还提供了包含可以可操作地连接到启动子的上述核酸(参见例如WO 86/05807;WO 89/01036;和U.S.P.N.5,122,464)以及真核分泌途径的其他转录调节和加工控制元件的载体。本发明还提供了携带那些载体和宿主表达系统的宿主细胞。

[0168] 如在此所使用,术语“宿主表达系统”包括可被工程化以产生本发明的核酸或多肽和抗体的任何种类的细胞系统。这种宿主表达系统包括但不限于用重组噬菌体DNA或质粒DNA转化或转染的微生物(例如大肠杆菌或枯草芽孢杆菌);用重组酵母表达载体转染的酵母(例如酵母属);或具有重组表达构建体的哺乳动物细胞(例如,COS、CHO-S、HEK293T、3T3细胞),所述构建体含有来源于哺乳动物细胞或病毒基因组的启动子(例如,腺病毒晚期启动子)。宿主细胞可用两个表达载体共转染,例如编码重链衍生的多肽的第一载体和编码轻链衍生的多肽的第二载体。

[0169] 转化哺乳动物细胞的方法是本领域中众所周知的。参见例如,U.S.P.N.4,399,216、4,912,040、4,740,461及4,959,455。宿主细胞也可以被工程化以允许产生具有不同特征的抗原结合分子(例如经修饰的糖形或具有GnTIII活性的蛋白质)。

[0170] 对于长期高产率产生重组蛋白来说,稳定表达是优选的。因此,稳定地表达所选抗体的细胞系可以使用标准的本领域认可的技术进行工程化,并形成本发明的一部分。除使用含有病毒复制起点的表达载体外,可以用通过适当表达控制元件(例如启动子或增强子序列、转录终止子、聚腺苷酸位点等)和可选择标记物控制的DNA来转化宿主细胞。可以使用本领域中众所周知的任何选择系统,包括谷氨酰胺合成酶基因表达系统(GS系统),该系统提供了用于在所选条件下增强表达的有效方法。以其全部或部分,结合EP 0 216 846、EP 0 256 055、EP 0 323 997和EP 0 338 841、以及U.S.P.N.5,591,639和5,879,936对该GS系统进行论述。用于开发稳定细胞系的另一相容性表达系统是FreedomTMCHO-S Kit(生命技术公司(Life Technologies))。

[0171] 一旦本发明的抗体通过重组表达或所披露的任何其他技术产生,则可以通过本领域已知的方法进行纯化或分离,由此其被鉴定并从其天然环境中分离和/或回收并与会干

扰抗体或相关ADC的诊断或治疗用途的污染物分离。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。

[0172] 可以使用不同的本领域认可的技术,例如像离子交换和尺寸排阻色谱、透析、渗滤和亲和色谱,特别是蛋白A或蛋白G亲和色谱,来纯化这些分离的制剂。以下实例中更充分地论述了相容的方法。

[0173] 6. 生产后选择

[0174] 不管如何获得,都可以针对所希望的特征(包括例如稳健生长、高抗体产量以及所希望的抗体特征如感兴趣的抗原的高亲和性)对抗体产生细胞(例如,杂交瘤、酵母集落等)进行选择、克隆并且进一步筛选。杂交瘤可以在体外细胞培养中或在体内同基因免疫功能不全动物中扩增。选择、克隆及扩增杂交瘤和/或集落的方法是本领域普通技术人员所熟知的。一旦所希望的抗体被鉴定,则可以使用常见的本领域认可的分子生物和生物化学技术来分离、操纵并表达相关遗传物质。

[0175] 由天然文库产生的抗体(天然的或合成的)可以具有适度的亲和性(K_a 为约 $10^6 M^{-1}$ 至 $10^7 M^{-1}$)。为了增强亲和性,可以通过构建抗体文库(例如,通过使用易错聚合酶而引入体外随机突变)并重新选择对来自那些第二文库的抗原具有高亲和力的抗体(例如,通过使用噬菌体或酵母展示)而在体外模仿亲和力成熟。WO 9607754描述了用于在免疫球蛋白轻链的CDR中诱导诱变以建立轻链基因文库的方法。

[0176] 可以使用各种技术来选择抗体,包括但不限于噬菌体或酵母展示,其中在噬菌体或酵母上合成人类组合抗体或scFv片段的文库,用感兴趣的抗原或其结合抗体的部分筛选该文库,并且分离结合该抗原的噬菌体或酵母,从该噬菌体或酵母可以获得抗体或免疫反应性片段(Vaughan等人,1996,PMID:9630891;Sheets等人,1998,PMID:9600934;Boder等人,1997,PMID:9181578;Pepper等人,2008,PMID:18336206)。用于产生噬菌体或酵母展示文库的试剂盒可商业获得。还存在可以用于产生并筛选抗体展示文库的其他方法和试剂(参见U.S.P.N.5,223,409;WO 92/18619,WO 91/17271,WO 92/20791,WO 92/15679,WO 93/01288,WO 92/01047,WO 92/09690;以及Barbas等人,1991,PMID:1896445)。这样的技术有利地允许进行大量候选抗体的筛选并且提供对序列的相对容易的操作(例如,通过重组改组)。

[0177] IV. 抗体的表征

[0178] 在某些实施例中,可以针对有利的特性,包括例如稳健生长、高抗体产量及如以下更详细地论述的所希望的位点特异性抗体特征,对抗体产生细胞(例如,杂交瘤或酵母集落)进行选择、克隆并且进一步筛选。在其他情形中,可以通过选择用于接种动物的特定抗原(例如,特定EMR2同种型)或靶抗原的免疫反应性片段来实现该抗体的表征。在再其他实施例中,所选抗体可以如以上所描述进行工程化以增强或改善免疫化学特征,如亲和力或药物代谢动力学。

[0179] A. 中和抗体

[0180] 在所选实施例中,本发明的抗体可以是“拮抗剂”或“中和”抗体,这意味着抗体可以与决定子缔合并直接或者通过阻止决定子与结合配偶体(如配体或受体)的缔合而阻断或抑制所述决定子的活性,从而中断否则将由分子的相互作用引起的生物反应。如例如通过靶分子活性或体外竞争性结合测定中所测量的,当过量的抗体将与决定子结合的结合配

偶体的量降低至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多时,中和抗体或拮抗剂抗体将实质上抑制决定子与其配体或底物的结合。应理解的是,改良的活性可以使用本领域认可的技术直接地测量,或可以通过变化的活性的下游影响(例如,肿瘤发生或细胞存活)来测量。

[0181] B. 内化抗体

[0182] 在某些实施例中,所述抗体可以包括内化抗体,使得该抗体将结合决定子并且将被内化(连同任何缀合的药学活性部分一起)到所选靶细胞(包括肿瘤发生细胞)中。内化的抗体分子的数量可足以杀灭抗原表达细胞,尤其是抗原表达肿瘤发生细胞。取决于抗体或在一些情况下抗体药物缀合物的效力,将单个抗体分子吸收到细胞中可足以杀灭该抗体所结合的靶细胞。关于本发明,有证据证明,相当大部分的所表达的EMR2蛋白保持与肿瘤发生细胞表面的缔合,从而允许所披露的抗体或ADC的定位和内化。在所选实施例中,这样的抗体将在内化后与杀灭细胞的一种或多种药物缔合或缀合。在一些实施例中,本发明的ADC将包含内化的位点特异性ADC。

[0183] 如在此所使用,“内化”的抗体是在与相关的决定子结合后被靶细胞吸收(与任何缀合的细胞毒素一起)的抗体。这样的内化的ADC的数量将优选地足以杀灭决定子表达细胞,尤其是表达决定子的癌症干细胞。取决于细胞毒素或作为一个整体的ADC的效力,在一些情况下,将若干抗体分子吸收到细胞中足以杀灭该抗体所结合的靶细胞。例如,某些药物(如PBD或卡奇霉素)足以有效以致缀合到抗体的若干分子毒素的内化就足以杀灭靶细胞。可以通过包括以下实例中所描述的那些的各种本领域认可的测定(例如皂草毒蛋白测定,如Mab-Zap和Fab-Zap;先进的靶向系统)来确定抗体在与哺乳动物细胞结合后是否内化。检测抗体是否内化到细胞中的方法也描述于U.S.P.N.7,619,068中。

[0184] C. 耗竭抗体

[0185] 在其他实施例中,本发明的抗体是耗竭抗体。术语“耗竭”抗体是指优选地与在细胞表面之上或附近的抗原结合并且诱导、促进或引起该细胞的死亡(例如,通过CDC、ADCC或引入细胞毒性剂)的一种抗体。在实施例中,所选耗竭抗体将与细胞毒素缀合。

[0186] 优选地,耗竭性抗体将能杀死所定义细胞群体中的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%或99%的EMR2表达细胞。在一些实施例中,该细胞群可以包含富集的、分割的、纯化的或分离的肿瘤发生细胞(包括癌症干细胞)。在其他实施例中,该细胞群可以包含完整肿瘤样品或包含癌症干细胞的异种肿瘤提取物。可以使用标准生物化学技术,根据在此的传授内容对肿瘤发生细胞的耗竭进行监测并定量。

[0187] D. 结合亲和力

[0188] 本文中披露对特定决定子(例如EMR2)具有高结合亲和力的抗体。术语“ K_D ”是指特定的抗体-抗原相互作用的解离常数或表观亲和力。当解离常数 K_D ($k_{解离}/k_{结合}$)为 $\leq 10^{-7}M$ 时,本发明抗体可免疫特异性地结合其靶抗原。当 $K_D \leq 5 \times 10^{-9}M$ 时,该抗体以高亲和力特异性结合抗原,并且当 $K_D \leq 5 \times 10^{-10}M$ 时以极高亲和力特异性结合抗原。在本发明的一个实施例中,该抗体具有 $\leq 10^{-9}M$ 的 K_D 及约 $1 \times 10^{-4}/sec$ 的解离速率。在本发明的一个实施例中,解离速率为 $< 1 \times 10^{-5}/sec$ 。在本发明的其他实施例中,所述抗体将以在约 $10^{-7}M$ 与 $10^{-10}M$ 之间的 K_D 与决定子结合,并且在另一实施例中,它将以 $K_D \leq 2 \times 10^{-10}M$ 结合。本发明的仍其他所选的实施例包含以下抗体,这些抗体具有小于 $10^{-6}M$ 、小于 $5 \times 10^{-6}M$ 、小于 $10^{-7}M$ 、小于 $5 \times 10^{-7}M$ 、小于 $10^{-8}M$ 、

小于 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、小于 10^{-9}M 、小于 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、小于 10^{-10}M 、小于 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、小于 10^{-11}M 、小于 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、小于 10^{-12}M 、小于 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、小于 10^{-13}M 、小于 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、小于 10^{-14}M 、小于 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、小于 10^{-15}M 或小于 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 的 K_D ($k_{\text{解离}}/k_{\text{结合}}$)。

[0189] 在某些实施例中,免疫特异性结合至决定子(例如EMR2)的本发明抗体可具有至少 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $2 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 或至少 $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 的结合速率常数或 $k_{\text{结合}}$ (或 k_a)速率(抗体+抗原(Ag) $k_{\text{结合}} \leftarrow$ 抗体-Ag)。

[0190] 在另一实施例中,免疫特异性地结合至决定子(例如EMR2)的本发明抗体可具有的解离速率常数或 $k_{\text{解离}}$ (或 k_d)速率(抗体+抗原(Ag) $k_{\text{解离}} \leftarrow$ 抗体-Ag)小在 10^{-1}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-2}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-3}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-4}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-5}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-6}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-7}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-8}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ 、小在 10^{-9}s^{-1} 、小在 $5 \times 10^{-9} \text{s}^{-1}$ 或小在 10^{-10}s^{-1} 。

[0191] 可以使用本领域已知的各种技术来确定结合亲和力,例如表面等离子体共振、生物层干涉法、双极化干涉法、静态光散射、动态光散射、等温滴定量热法、ELISA、分析超速离心和流式细胞术。

[0192] E. 分仓和表位作图

[0193] 本文中披露的抗体可根据其所结合的离散表位加以表征。“表位”是抗体或免疫反应性片段特异性结合的决定子的一个或多个部分。免疫特异性结合可以基于如上所述的结合亲和力,或者通过抗体对蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原的优先识别(例如在竞争性测定中)来确认和定义。“线性表位”由允许抗体的免疫特异性结合的抗原中的连续氨基酸形成。即使当抗原变性时,也典型地保持了优先结合线性表位的能力。相反地,“构象表位”通常包含抗原氨基酸序列中的非连续氨基酸,但在抗原的二级、三级或四级结构的情况下,这些非连续氨基酸足够接近以被单一抗体同时结合。当具有构象表位的抗原变性时,抗体通常将不再识别该抗原。表位(连续或非连续)一般包括处于独特空间构象的至少3个、并且更通常至少5个或8至10个或12至20个氨基酸。

[0194] 根据抗体所属的组或“仓”来表征本发明的抗体也是可能的。“分仓”是指使用竞争性抗体结合测定来鉴定不能同时结合免疫原性决定子的抗体对,从而鉴定“竞争”结合的抗体。可以通过以下测定来确定竞争性抗体,在该测定中被测试的抗体或免疫学功能片段防止或抑制参比抗体与共同抗原的特异性结合。典型地,该种分析涉和使用结合至固体表面或细胞、未标记测试抗体和经标记参考抗体的纯化抗原(例如EMR2或其域或片段)。在测试抗体存在下,通过确定结合于固体表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。有关用于确定竞争性结合的方法的其他细节提供于本文的实例中。通常,当竞争性抗体过量存在时,它将使参比抗体与共同抗原的特异性结合抑制至少30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情况下,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、或97%或更多。相反地,当结合参考抗体时,其优选将随后添加的测试抗体(即EMR2抗体)的结合抑制至少30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情况下,测试抗体的结合被抑制至少80%、85%、90%、95%或97%或更多。

[0195] 通常可以使用各种本领域认可的技术来确定分仓或竞争性结合,例如像免疫测定如蛋白质印迹、放射免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测

定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定以及蛋白A免疫测定。此类免疫测定是本领域常规且熟知的(参见, Ausubel等人编辑,(1994) Current Protocols in Molecular Biology[当前分子生物学方案],第1卷, John Wiley&Sons, Inc., New York[约翰威立父子公司, 纽约])。另外, 可以使用交叉阻断测定(参见例如, WO 2003/48731; 以及Harlow等人(1988) Antibodies, A Laboratory Manual[抗体, 实验室手册], 冷泉港实验室, Ed Harlow和David Lane)。

[0196] 用于确定竞争性抑制(以及由此产生的“仓”)的其他技术包括: 使用例如BIAcore™ 2000系统(GE医疗集团)的表面等离子体共振; 使用例如ForteBio® Octet RED(福特生物公司(ForteBio))的生物层干涉法; 或使用例如FACSCanto II(BD生物科学公司(BD Biosciences))的流式细胞术珠粒阵列; 或多重LUMINEX™检测测定(路明克斯公司(Luminex))。

[0197] Luminex是一种能够进行大规模的多重抗体配对的基于珠粒的免疫测定平台。该测定比较了抗体对与靶抗原的同时结合模式。该对中的一种抗体(捕获mAb)与Luminex珠结合, 其中每个捕获mAb与不同颜色的珠结合。另一种抗体(检测器mAb)与荧光信号(例如藻红蛋白(PE))结合。该测定分析了抗体与抗原的同时结合(配对), 并将具有类似配对谱的抗体组合在一起。检测器mAb和捕获mAb的相似谱表明这两种抗体结合相同或紧密相关的表位。在一个实施例中, 可以使用皮尔森(Pearson)相关系数来确定配对谱以鉴定与被测试的抗体组中的任何特定抗体最密切相关的抗体。在实施例中, 如果抗体对的皮尔森相关系数为至少0.9, 则确定测试/检测器mAb处于与参考/捕获mAb相同的仓内。在其他实施例中, 皮尔森相关系数为至少0.8、0.85、0.87或0.89。在另外的实施例中, 皮尔森相关系数为至少0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99或1。分析从Luminex测定获得的数据的其他方法描述于U.S.P.N.8,568,992中。Luminex同时分析100种不同类型的珠(或更多)的能力提供了几乎无限的抗原和/或抗体表面, 这导致与生物传感器测定相比抗体表位谱分析中改善的通量和分辨率(Miller等人, 2011, PMID:21223970)。

[0198] 类似地, 包含表面等离子体共振的分仓技术是与本发明相容的。如在此所使用, “表面等离子体共振”是指如下光学现象, 它允许通过检测生物传感器矩阵内蛋白浓度的变化来分析实时特异性相互作用。使用市售设备如BIAcore™ 2000系统, 可以容易地确定选择的抗体是否与确定的抗原彼此竞争结合。

[0199] 在其他实施例中, 可用于确定测试抗体是否与参比抗体“竞争”结合的技术是“生物层干涉法”, 这是一种光学分析技术, 其分析从两个表面: 生物传感器尖端(tip)上的一层固定化蛋白质和内部参比层反射的白光的干涉图案。结合到生物传感器尖端的分子数量的任何改变都引起可以实时测量的干涉图案的转变。可以使用如下的ForteBio® Octet RED机器来进行这样的生物层干涉测定。将参比抗体(Ab1)捕获到抗小鼠捕获芯片上, 然后使用高浓度非结合抗体来阻断该芯片并且收集基线。然后, 通过特异性抗体(Ab1)捕获重组靶蛋白并且将尖端浸入与具有相同抗体(Ab1)的孔(作为对照)中或浸入具有不同测试抗体(Ab2)的孔中。如通过将结合水平与对照Ab1相比较所测定的, 如果未发生另外的结合, 那么确定Ab1和Ab2为“竞争性”抗体。如果针对Ab2观察到另外的结合, 则确定Ab1和Ab2不相互竞争。这一方法可以扩大到使用代表独特仓的96孔板中的一整行抗体来筛选较大的独特抗体文库。在实施例中, 如果参比抗体使测试抗体与共同抗原的特异性结合抑制至少40%、

45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%，则测试抗体将与参比抗体竞争。在其他实施例中，结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、或97%或更多。

[0200] 一旦包含一组竞争性抗体的仓已被定义，则可以进一步表征以确定该组抗体所结合的抗原上的特定域或表位。使用由Cochran等人，2004，PMID:15099763所描述的方案进行修改来进行域水平表位作图。精细表位作图是在包含抗体所结合决定子的表位的抗原上，确定特异性氨基酸的过程。

[0201] 在某些实施例中，可以使用噬菌体或酵母展示来进行精细表位作图。其他相容的表位作图技术包括丙氨酸扫描突变体、肽印迹(Reineke, 2004, PMID:14970513)或肽切割分析。另外，可以利用诸如表位切除、表位提取和抗原的化学修饰等的方法(Tomer, 2000, PMID:10752610)，使用酶如蛋白水解酶(例如，胰蛋白酶、内蛋白酶Glu-C、内蛋白酶Asp-N、胰凝乳蛋白酶等)；化学试剂如琥珀酰亚胺酯及其衍生物，含伯胺的化合物，胍和碳水化合物，游离氨基酸等。在另一个实施例中，修饰辅助的谱分析，又称为基于抗原结构的抗体谱分析(ASAP)可以用于根据每一抗体与化学或酶促修饰的抗原表面的结合谱的相似性针对相同抗原的大量单克隆抗体进行分类(U.S.P.N.2004/0101920)。

[0202] 一旦在抗原上确定了所希望的表位，就有可能例如通过使用本文所述的技术，用包含所选表位的肽进行免疫接种来产生针对该表位的另外的抗体。

[0203] V. 抗体缀合物

[0204] 在一些实施例中，本发明的抗体可以与药学活性部分或诊断部分缀合以形成“抗体药物缀合物”(ADC)或“抗体缀合物”。术语“缀合”被广泛地使用并且意指任何药学活性部分或诊断部分与本发明的抗体的共价或非共价缔合，而不管缔合方法如何。在某些实施例中，该缔合通过抗体的赖氨酸或半胱氨酸残基来实现。在一些实施例中，药物活性部分或诊断部分可以经由一个或多个位点特异性游离半胱氨酸与抗体缀合。所披露的ADC可以用于治疗和诊断目的。

[0205] 本发明的ADC可以用于将细胞毒素或其他有效载荷递送到靶位置(例如，肿瘤发生细胞和/或表达EMR2的细胞)。如本文所阐述，术语“药物”或“弹头”可以互换使用，并且将意指生物活性或可检测分子或药物，包括如下所述的抗癌剂或细胞毒素。“有效载荷”包含“药物”或“弹头”，可与可选的连接体化合物的组合。缀合物上的弹头可以包含肽、蛋白质或在体内代谢为活性剂的前药、聚合物、核酸分子、小分子、结合剂、模拟剂、合成药物、无机分子、有机分子及放射性同位素。在一个优选实施例中，所披露的ADC将在释放并激活弹头(例如，如本文所披露的PBDS 1-5)之前将结合的有效载荷以相对不反应的无毒状态引导到靶位点。弹头的这种靶向释放优选地通过有效载荷和ADC制剂的相对均质的组合物的稳定缀合(例如，经由抗体上的一个或多个半胱氨酸)来实现，其使过度缀合的(over-conjugated)毒性ADC种类最少化。与药物相偶联的接头被设计为一旦被递送到肿瘤部位时大量释放弹头，本发明的缀合物可以显著减少不希望的非特异性毒性。这有利地在肿瘤部位提供相对高水平的活性细胞毒素，同时使非靶向细胞和组织的暴露最小化，从而提供增强的治疗指数。

[0206] 将理解的是，虽然本发明的一些实施例包含掺入治疗性部分(例如细胞毒素)的有效载荷，但是掺入诊断剂和生物相容性修饰剂的有效载荷可从所披露的缀合物提供的靶向释放中受益。因此，针对示例性治疗有效载荷的任何披露也适用于含有如在此所论述的诊

断剂或生物相容性修饰物的有效载荷,除非上下文另有规定。所选有效载荷可以与该抗体共价或非共价连接,并且至少部分取决于用于实现该缀合的方法而展现不同的化学计量的摩尔比。

[0207] 本发明的缀合物通常可以由下式表示:

[0208] $Ab-[L-D]_n$ 或其药学上可接受的盐,其中:

[0209] a) Ab包含抗EMR2抗体;

[0210] b) L包括任意的接头;

[0211] c) D包括药物;和

[0212] d) n为从约1至约20的整数。

[0213] 本领域技术人员将理解,根据上述式的缀合物可以使用许多不同的接头和药物制造,并且缀合方法将根据组分的选择而变化。因此,与所披露的抗体的反应性残基(例如,半胱氨酸或赖氨酸)缔合的任何药物或药物接头化合物是与本文的传授内容相容的。类似地,允许所选择的药物与抗体的缀合(包括位点特异性缀合)的任何反应条件都在本发明的范围内。尽管如此,本发明的一些优选实施例包含使用稳定剂与如在此所述的温和还原剂的组合进行的药物或药物接头与游离半胱氨酸的选择性缀合。这种反应条件倾向于提供更均质的制剂,该制剂具有较少的非特异性缀合和污染物以及相应较少的毒性。

[0214] A. 弹头

[0215] 1. 治疗剂

[0216] 本发明的抗体可以与作为治疗性部分的药学活性部分或药物缀合、连接或融合或以其他方式缔合,所述药物如抗癌剂,包括但不限于细胞毒性剂(或细胞毒素)、细胞生长抑制剂、抗血管生成剂、减瘤剂、化学治疗剂、放射性治疗剂、靶向性抗癌剂、生物反应修饰剂、癌症疫苗、细胞因子、激素疗法、抗转移剂和免疫治疗剂。

[0217] 示例性抗癌剂或细胞毒素(包括同系物及其衍生物)包含1-脱氢睾酮、安曲霉素、放线菌素D、博来霉素、卡奇霉素(包括n-乙酰基卡奇霉素)、秋水仙素、环磷酰胺、细胞松弛素B、更生霉素(以前称为放线菌素)、二羟基炭疽菌、二酮、多卡米新、埃米汀、表柔比星、溴化乙锭、依托泊苷、糖皮质激素、短杆菌肽D、利多卡因、美登木素生物碱如DM-1和DM-4(Immunogen公司)、苯并二氮杂卓衍生物(Immunogen公司)、光辉霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、紫杉醇、普罗卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、替尼泊苷(tenoposide)、丁卡因及以上任一项的药学上可接受的盐或溶剂合物、酸或其衍生物。

[0218] 另外的相容性细胞毒素包含多拉司他汀和澳瑞他汀(auristatin),包括单甲基澳瑞他汀E(MMAE)和单甲基澳瑞他汀F(MMAF)(赛特基因公司(Seattle Genetics));鹅膏菌素,如 α -鹅膏菌素、 β -鹅膏菌素、 γ -鹅膏菌素或 ϵ -鹅膏菌素(海德伯格制药公司(Heidelberg Pharma));DNA小沟结合剂,如倍癌霉素(duocarmycin)衍生物(信达加公司(Syntarga));烷化剂,如经修饰的或二聚的吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)、氮芥、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C以及顺二氯二氨合铂(II)(DDP)顺铂;剪接抑制剂,如米亚霉素(meayamycin)类似物或衍生物(例如FR901464,如U.S.P.N.7,825,267中所陈述);管结合剂(tubular binding agent),如埃博霉素类似物和微管蛋白抑制剂(tubulysin);紫杉醇;及DNA损伤剂,如卡奇霉素和埃斯波霉素(esperamicin);抗代谢物,如甲氨蝶呤、6-巯

基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷及5-氟尿嘧啶氨烯咪胺；抗有丝分裂剂，如长春花碱和长春新碱；以及蒽环类，如柔红霉素（以前称为道诺霉素）和多柔比星；以及以上任一项的药学上可接受的盐或溶剂化物、酸或衍生物。

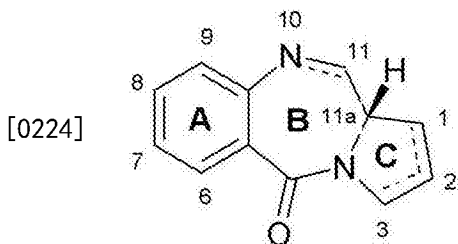
[0219] 在所选实施例中，本发明的抗体可以与抗CD3结合分子缔合以募集细胞毒性T细胞并且使其靶向肿瘤发生细胞（百特技术公司（BiTE technology）；参见例如，Fuhrmann等人（2010）Annual Meeting of AACR Abstract [美国癌症研究学会年会摘要]，第5625期）。

[0220] 在另外的实施例中，本发明的ADC可以包含使用适当接头缀合的治疗性放射性同位素的细胞毒素。可以与这样的实施例可相容的示例性放射性同位素包括但不限于，碘（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、碳（ ^{14}C ）、铜（ ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu ）、硫（ ^{35}S ）、镭（ ^{223}Ra ）、氚（ ^3H ）、铟（ ^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、铋（ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi ）、锝（ ^{99}Tc ）、钛（ ^{201}Ti ）、镓（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、钯（ ^{103}Pd ）、钼（ ^{99}Mo ）、氙（ ^{133}Xe ）、氟（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、 ^{117}Sn 、 ^{76}Br 、 ^{211}At 以及 ^{225}Ac 。其他放射性核素也可用作诊断和治疗剂，尤其是在60到4,000keV能量范围内的那些。

[0221] 在其他所选实施例中，本发明的ADC将与细胞毒性苯并二氮杂卓衍生物弹头进行缀合。可以与披露的抗体缀合的相容性苯并二氮杂卓衍生物（和任选的接头）描述于例如U.S.P.N.8,426,402和PCT申请WO 2012/128868和WO 2014/031566中。与PBD一样，相容性苯并二氮杂卓衍生物被认为在DNA的小沟中结合并抑制核酸合成。据报道，这些化合物具有有效的抗肿瘤特性，并且因此特别适用于本发明的ADC。

[0222] 在一些实施例中，本发明的ADC可包含PBD及其药学上可接受的盐或溶剂化物、酸或衍生物，作为弹头。PBD是烷化剂，烷化剂通过共价结合到小沟中的DNA并抑制核酸合成来发挥抗肿瘤活性。已经显示PBD具有有效的抗肿瘤特性，同时展现出最少的骨髓抑制。与本发明相容的PBD可以使用若干类型接头（例如包含马来酰亚胺部分并带有游离巯基的肽基接头）连接到抗体，并且在某些实施例中呈二聚物形式（即，PBD二聚物）。可以缀合到所披露的抗体的相容性PBD（和任选的接头）描述于例如U.S.P.N.6,362,331、7,049,311、7,189,710、7,429,658、7,407,951、7,741,319、7,557,099、8,034,808、8,163,736、2011/0256157以及PCT文件WO 2011/130613、WO 2011/128650、WO 2011/130616、WO 2014/057073和WO 2014/057074中。下面紧接着详细地论述了与本发明相容的PBD化合物的实例。

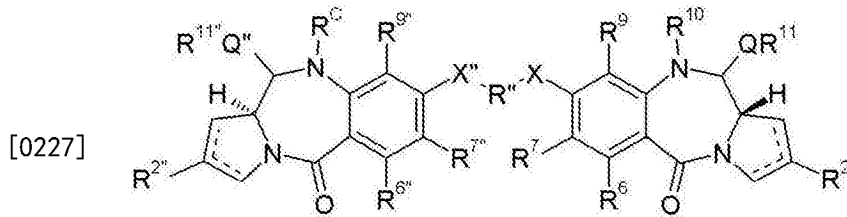
[0223] 关于本发明，已经显示PBD具有有效的抗肿瘤特性，同时表现出最小的骨髓抑制。与本发明相容的PBD可以使用若干类型接头中的任一种（例如包含马来酰亚胺部分并带有游离巯基的肽基接头）与EMR2靶向剂连接，并且在某些实施例中呈二聚体形式（即，PBD二聚体）。PBD具有以下通用结构：



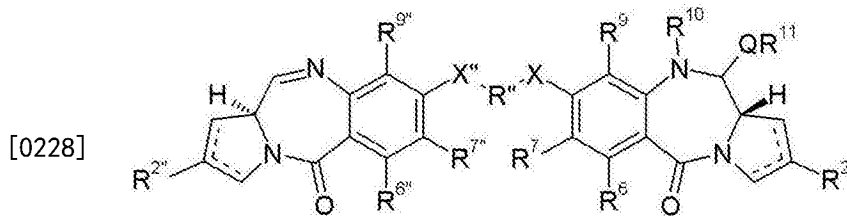
[0225] 它们在其芳族A环和吡咯C环中的取代基的数量、类型和位置以及C环的饱和度方面都不同。在B环中，在N10-C11位置上存在亚胺（N=C）、甲醇胺（NH-CH(OH)）或甲醇胺甲基醚（NH-CH(OMe)），该位置是负责烷化DNA的亲电子中心。所有已知的天然产物在手性C11a位

置处具有(S)-构型,当从C环向A环看时,该(S)-构型提供了右旋扭曲。这给予它们针对与B型DNA的小沟的同螺旋性的适当三维形状,导致在结合位点处的紧密贴合(Kohn,在Antibiotics III.[抗生素III]施普林格出版社(Springer-Verlag),纽约,第3-11页(1975)中;Hurley和Needham-VanDevanter,Acc.Chem.Res.[化学研究评述],19,230-237(1986))。它们在小沟中形成加合物的能力使其能够干扰DNA加工并充当细胞毒性剂。如上暗指的,为了增加其效能,PBD通常以可与本文所述的抗EMR2抗体缀合的二聚体形式使用。

[0226] 在特别优选的实施例中,可以与所披露的调节剂缀合的相容性PBD描述于U.S.P.N.2011/0256157中。在本披露中,PBD二聚物,即,包含两个PBD部分的那些,可以是优选的。因此,本发明的优选的缀合物是具有式(AB)或(AC)的那些:



AB



AC

[0229] 其中:

[0230] 虚线指示在C1与C2或C2与C3之间任选的存在双键;

[0231] R^2 独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R以及COR,并且任选地进一步选自卤基或二卤基;

[0232] 其中R^D独立地选自R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H及卤基;

[0233] R^6 和 R^9 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn及卤基;

[0234] R^7 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn及卤基;

[0235] R^{10} 为连接到如本文所描述的EMR2抗体或其片段或衍生物的接头;

[0236] Q独立地选自O、S及NH;

[0237] R^{11} 为H或R,或其中Q为O、SO₃M,其中M是金属阳离子;

[0238] X选自O、S或N(H),并且在所选实施例中,包括O;

[0239] R'' 是C₃₋₁₂亚烷基,其链可以间杂有一个或多个杂原子(例如O、S、N(H)、NMe和/或芳香族环,例如苯或吡啶,这些环任选地被取代);

[0240] R和R'各自独立地选自任选地取代的C₁₋₁₂烷基、C₃₋₂₀杂环基及C₅₋₂₀芳基基团,并且任选地与基团NRR'有关,R和R'连同它们所附接的氮原子一起形成任选地取代的4-、5-、6-或7-元杂环状环;和

[0241] 其中 $R^{2''}$ 、 $R^{6''}$ 、 $R^{7''}$ 、 $R^{9''}$ 、 X'' 、Q''以及 $R^{11''}$ (如果存在)分别如根据 R^2 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、X、Q以及 R^{11}

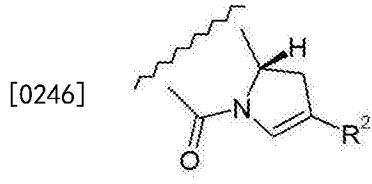
所定义,并且 R^C 为封端基团。

[0242] 下面紧接着更详细地描述包括上述结构的所选实施例。

[0243] 双键

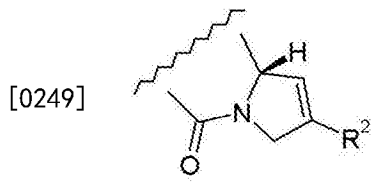
[0244] 在一个实施例中,在C1与C2和C2与C3之间不存在双键。

[0245] 在一个实施例中,这些虚线指示了在C2与C3之间任选地存在双键,如以下所示:



[0247] 在一个实施例中,当 R^2 为 C_{5-20} 芳基或 C_{1-12} 烷基时,双键存在于C2与C3之间。在一个优选的实施例中, R^2 包括甲基基团。

[0248] 在一个实施例中,这些虚线指示了在C1与C2之间任选地存在双键,如以下所示:



[0250] 在一个实施例中,当 R^2 为 C_{5-20} 芳基或 C_{1-12} 烷基时,双键存在于C1与C2之间。在一个优选的实施例中, R^2 包括甲基基团。

[0251] R^2

[0252] 在一个实施例中, R^2 独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R以及COR,并且任选地进一步选自卤基或二卤基。

[0253] 在一个实施例中, R^2 独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R以及COR。

[0254] 在一个实施例中, R^2 独立地选自H、=O、=CH₂、R、=CH-R^D以及=C(R^D)₂。

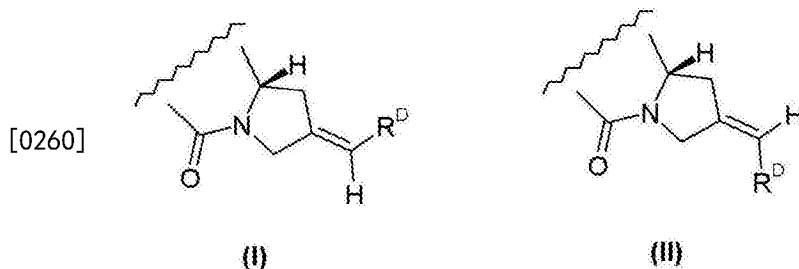
[0255] 在一个实施例中, R^2 独立地为H。

[0256] 在一个实施例中, R^2 独立地为R,其中R包括CH₃。

[0257] 在一个实施例中, R^2 独立地为=O。

[0258] 在一个实施例中, R^2 独立地为=CH₂。

[0259] 在一个实施例中, R^2 独立地为=CH-R^D。在该PBD化合物内,基团=CH-R^D可以具有以下所示的任一构型:



[0261] 在一个实施例中,该构型为构型(I)。

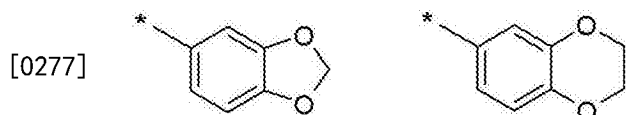
[0262] 在一个实施例中, R^2 独立地为=C(R^D)₂。

[0263] 在一个实施例中, R^2 独立地为=CF₂。

- [0264] 在一个实施例中, R^2 独立地为R。
- [0265] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地取代的 C_{5-20} 芳基。
- [0266] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地取代的 C_{1-12} 烷基。
- [0267] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地取代的 C_{5-20} 芳基。
- [0268] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地取代的 C_{5-7} 芳基。
- [0269] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地取代的 C_{8-10} 芳基。
- [0270] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地取代的苯基。
- [0271] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地经取代的萘基。
- [0272] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地经取代的吡啶基。
- [0273] 在一个实施例中, R^2 独立地为任选地经取代的喹啉基或异喹啉基。
- [0274] 在一个实施例中, R^2 具有1至3个取代基, 其中1个和2个更佳, 且经单取代的基团最优选地。这些取代可以处于任何位置。

[0275] 在 R^2 为 C_{5-7} 芳基的情况下, 单一取代基优选地处于不与到该化合物的其余部分的键相邻的环原子上, 即, 优选地在相对于到该化合物的其余部分的键的 β 或 γ 位。因此, 在 C_{5-7} 芳基为苯基的情况下, 该取代基优选地在间位或对位, 并且更优选地在对位中。

[0276] 在一个实施例中, R^2 选自:



[0278] 其中星号指示附接点。

[0279] 在 R^2 为 C_{8-10} 芳基, 例如喹啉基或异喹啉基的情况下, 它可以在这些喹啉或异喹啉环的任何位置处带有任何数量的取代基。在一些实施例中, 它带有一个、两个或三个取代基, 并且这些取代基可以位于近端或远端环或两者(如果有超过一个取代基)上。

[0280] 在一个实施例中, 在 R^2 任选地被取代的情况下, 这些取代基选自以下取代基部分中所给的那些取代基。

[0281] 在R任选地被取代的情况下, 这些取代基优选地选自:

[0282] 卤基、羟基、醚、甲酰基、酰基、羧基、酯、酰氧基、氨基、酰氨基、酰基酰氨基、氨基羰氧基、脲基、硝基、氰基及硫醚。

[0283] 在一个实施例中, 在R或 R^2 任选地被取代的情况下, 这些取代基选自下组, 该组由以下组成: R、OR、SR、NRR'、 NO_2 、卤基、 CO_2R 、COR、 $CONH_2$ 、CONHR以及CONRR'。

[0284] 在 R^2 为 C_{1-12} 烷基的情况下, 任选的取代基可以另外地包括 C_{3-20} 杂环基和 C_{5-20} 芳基。

[0285] 在 R^2 为 C_{3-20} 杂环基的情况下, 任选的取代基可以另外地包括 C_{1-12} 烷基和 C_{5-20} 芳基。

[0286] 在 R^2 为 C_{5-20} 芳基的情况下, 任选的取代基可以另外地包括 C_{3-20} 杂环基和 C_{1-12} 烷基。

[0287] 应了解的是, 术语“烷基”涵盖烯基和炔基以及环烷基亚类。因此, 在 R^2 为任选地取代的 C_{1-12} 烷基的情况下, 应了解的是, 该烷基任选地含有一个或多个碳-碳双键或三键, 这些键可以形成共轭系统的一部分。在一个实施例中, 该任选地取代的 C_{1-12} 烷基含有至少一个碳-碳双键或三键, 并且该键与出现在C1与C2或C2与C3之间的双键共轭。在一个实施例中, C_{1-12} 烷基为选自饱和 C_{1-12} 烷基、 C_{2-12} 烯基、 C_{2-12} 炔基和 C_{3-12} 环烷基的基团。

[0288] 如果在 R^2 上的取代基为卤基, 那么它优选地为F或Cl, 更优选地为Cl。

[0289] 如果在 R^2 上的取代基为醚,那么在一些实施例中,它可以是烷氧基,例如 C_{1-7} 烷氧基(例如甲氧基、乙氧基),或在一些实施例中,它可以是 C_{5-7} 芳氧基(例如苯氧基、吡啶氧基、呋喃氧基)。

[0290] 如果在 R^2 上的取代基为 C_{1-7} 烷基,那么它可以优选地为 C_{1-4} 烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基)。

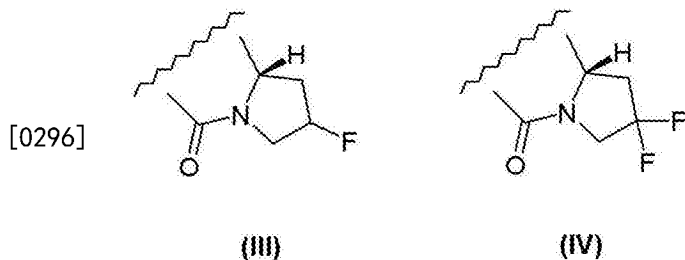
[0291] 如果在 R^2 上的取代基为 C_{3-7} 杂环基,那么在一些实施例中,它可以是含 C_6 氮的杂环基,例如吗啉基、硫吗啉基、哌啶基、哌嗪基。这些基团可以经由氮原子结合到PBD部分的其余部分。这些基团可以进一步被例如 C_{1-4} 烷基取代。

[0292] 如果在 R^2 上的取代基为双-氧基- C_{1-3} 亚烷基,那么这优选地为双-氧基-亚甲基或双-氧基-亚乙基。

[0293] R^2 的特别优选的取代基包括甲氧基、乙氧基、氟代、氯代、氰基、双-氧基-亚甲基、甲基-哌嗪基、吗啉基及甲基-噻吩基。

[0294] 特别优选的取代的 R^2 基团包括但不限于,4-甲氧基-苯基、3-甲氧基苯基、4-乙氧基-苯基、3-乙氧基-苯基、4-氟代-苯基、4-氯代-苯基、3,4-双氧基亚甲基-苯基、4-甲基噻吩基、4-氰基苯基、4-苯氧基苯基、喹啉-3-基及喹啉-6-基、异喹啉-3-基及异喹啉-6-基、2-噻吩基、2-呋喃基、甲氧基萘基及萘基。

[0295] 在一个实施例中, R^2 为卤基或二卤基。在一个实施例中, R^2 为-F或-F₂,这些取代基在以下分别地以(III)和(IV)说明:



[0297] R^D

[0298] 在一个实施例中, R^D 独立地选自R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H及卤基。

[0299] 在一个实施例中, R^D 独立地为R。

[0300] 在一个实施例中, R^D 独立地为卤基。

[0301] R^6

[0302] 在一个实施例中, R^6 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn-及卤基。

[0303] 在一个实施例中, R^6 独立地选自H、OH、OR、SH、NH₂、NO₂及卤基。

[0304] 在一个实施例中, R^6 独立地选自H和卤基。

[0305] 在一个实施例中, R^6 独立地为H。

[0306] 在一个实施例中, R^6 和 R^7 一起形成基团-O-(CH₂)_p-O-,其中p为1或2。

[0307] R^7

[0308] R^7 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn及卤基。

[0309] 在一个实施例中, R^7 独立地为OR。

[0310] 在一个实施例中, R^7 独立地为OR^{7A},其中 R^{7A} 独立地为任选地取代的 C_{1-6} 烷基。

- [0311] 在一个实施例中, R^{7A} 独立地为任选地取代的饱和 C_{1-6} 烷基。
- [0312] 在一个实施例中, R^{7A} 独立地为任选地取代的 C_{2-4} 烯基。
- [0313] 在一个实施例中, R^{7A} 独立地为 Me。
- [0314] 在一个实施例中, R^{7A} 独立地为 CH_2Ph 。
- [0315] 在一个实施例中, R^{7A} 独立地为烯丙基。
- [0316] 在一个实施例中, 化合物为二聚体, 其中各单体的 R^7 基团一起形成连接单体的二聚体桥, 其具有式 $X-R''-X$ 。
- [0317] R^9
- [0318] 在一个实施例中, R^9 独立地选自 H、R、OH、OR、SH、SR、 NH_2 、NHR、 NRR' 、 NO_2 、 Me_3Sn- 及卤基。
- [0319] 在一个实施例中, R^9 独立地为 H。
- [0320] 在一个实施例中, R^9 独立地为 R 或 OR。
- [0321] R^{10}
- [0322] 优选地, 相容连接体 (诸如本文所述的那些物) 在 R^{10} 位置 (即 N10) 使 EMR2 抗体经由共价键连接至 PBD 药物部分。
- [0323] Q
- [0324] 在某些实施例中, Q 独立地选自 O、S 和 NH。
- [0325] 在一个实施例中, Q 独立地为 O。
- [0326] 在一个实施例中, Q 独立地为 S。
- [0327] 在一个实施例中, Q 独立地为 NH。
- [0328] R^{11}
- [0329] 在所选实施例中, R^{11} 为 H 或 R, 或其中 Q 为 O, 可以为 SO_3M , 其中 M 为金属阳离子。该阳离子可以是 Na^+ 。
- [0330] 在某些实施例中, R^{11} 为 H。
- [0331] 在某些实施例中, R^{11} 为 R。
- [0332] 在某些实施例中, 其中 Q 为 O, R^{11} 为 SO_3M , 其中 M 为金属阳离子。该阳离子可以是 Na^+ 。
- [0333] 在某些实施例中, 其中 Q 为 O, R^{11} 为 H。
- [0334] 在某些实施例中, 其中 Q 为 O, R^{11} 为 R。
- [0335] X
- [0336] 在一个实施例, X 选自 O、S 或 N (H)。
- [0337] 优选地, X 为 O。
- [0338] R''
- [0339] R'' 是 C_{3-12} 亚烷基, 其链可以间杂有一个或多个杂原子, 例如 O、S、N (H)、NMe 和/或芳香族环, 例如苯或吡啶, 这些环任选地被取代。
- [0340] 在一个实施例中, R'' 为 C_{3-12} 亚烷基, 其链可以间杂有一个或多个杂原子和/或芳香族环, 例如苯或吡啶。
- [0341] 在一个实施例中, 该亚烷基任选地间杂有一个或多个选自 O、S 及 NMe 的杂原子和/或芳香族环, 这些环任选地被取代。
- [0342] 在一个实施例中, 该芳香族环为 C_{5-20} 亚芳基, 其中亚芳基属于通过从芳香族化合

物的两个芳香族环原子去除两个氢原子获得的二价部分,该部分具有从5到20个环原子。

[0343] 在一个实施例中,R”为C₃₋₁₂亚烷基,其链可以间杂有一个或多个杂原子,例如O、S、N(H)、NMe和/或芳香族环,例如苯或吡啶,这些环任选地被NH₂取代。

[0344] 在一个实施例中,R”为C₃₋₁₂亚烷基。

[0345] 在一个实施例中,R”选自C₃、C₅、C₇、C₉以及C₁₁亚烷基。

[0346] 在一个实施例中,R”选自C₃、C₅以及C₇亚烷基。

[0347] 在一个实施例中,R”选自C₃和C₅亚烷基。

[0348] 在一个实施例中,R”为C₃亚烷基。

[0349] 在一个实施例中,R”为C₅亚烷基。

[0350] 以上所列的亚烷基可以任选地间杂有一个或多个杂原子和/或芳香族环,例如苯或吡啶,这些环任选地被取代。

[0351] 以上所列的亚烷基可以任选地间杂有一个或多个杂原子和/或芳香族环,例如苯或吡啶。

[0352] 以上所列的亚烷基可以为未取代的线性脂肪族亚烷基。

[0353] R和R'

[0354] 在一个实施例中,R独立地选自任选地取代的C₁₋₁₂烷基、C₃₋₂₀杂环基及C₅₋₂₀芳基。

[0355] 在一个实施例中,R独立地为任选地取代的C₁₋₁₂烷基。

[0356] 在一个实施例中,R独立地为任选地取代的C₃₋₂₀杂环基。

[0357] 在一个实施例中,R独立地为任选地取代的C₅₋₂₀芳基。

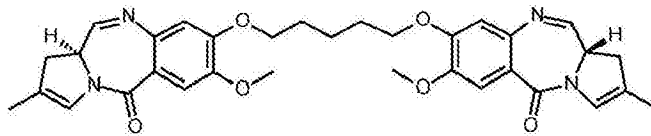
[0358] 以上关于R²的描述是与优选的烷基和芳基以及任选的取代基的身份和数目有关的不同实施例。适当时,由于R²适用于R,故关于其所陈述的优先选择适用于所有其他R,例如,其中R⁶、R⁷、R⁸或R⁹为R。

[0359] 关于R的优先选择也适用于R'。

[0360] 在本发明的一些实施例中,提供了一种具有取代基-NRR'的化合物。在一个实施例中,R和R'连同它们所附接的氮原子形成任选地取代的4-、5-、6-或7-元杂环状环。该环可以含有另外的杂原子,例如N、O或S。

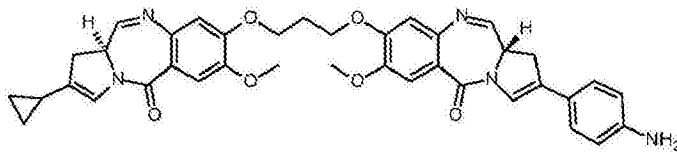
[0361] 在一个实施例中,该杂环状环本身被基团R取代。在另外的N杂原子存在的情况下,该取代基可以位于该N杂原子上。

[0362] 除了上述PBD之外,某些二聚体PBD已经显示出特别有活性并且可以与本发明结合使用。为此,本发明的抗体药物缀合物(即如本文所披露的ADC 1-6)可以包含下文紧接着作为PBD 1-5列出的PBD化合物。请注意,下面的PBD 1-5包含分离接头后释放的细胞毒性弹头,如本文更详细描述的那些。作为药物-接头化合物的组分的PBD1-5各自的合成极详细地呈现于WO 2014/130879中,将其关于这样的合成通过引用结合在此。鉴于WO 2014/130879,可包含本发明的ADC的所选弹头的细胞毒性化合物可以如本文所陈述地容易地生成和使用。因此,在从接头分离时可以从所披露的ADC中释放的所选PBD化合物紧接着示于以下:

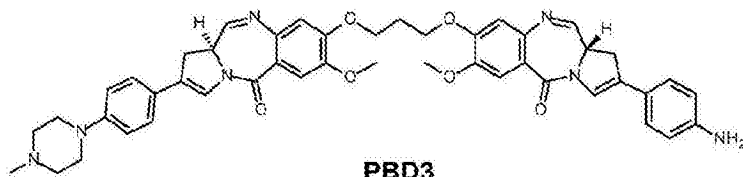


PBD1

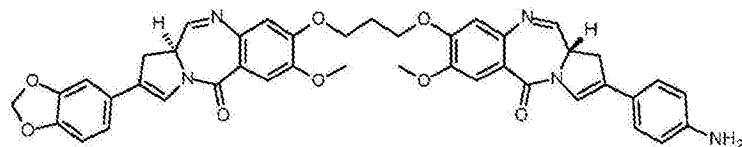
[0363]



PBD2

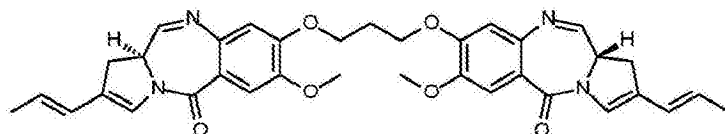


PBD3



PBD4

[0364] 和



PBD5

[0365] 应理解的是,上述每个二聚体PBD弹头将优选在靶细胞内化和接头破坏时释放。如下面更详细描述,某些接头将包含可切割的接头,其可以掺入允许活性PBD弹头释放而不保留接头的任何部分的自灭部分。释放后,PBD弹头将与靶细胞的DNA结合并交联。据报道,这种结合阻断了靶癌细胞的分裂而不扭曲其DNA螺旋,从而潜在地避免了出现耐药性的普遍现象。在其他优选实施例中,弹头可经由不包含自分解部分的可裂解连接体连接至EMR2靶向部分。

[0366] 根据本披露,这样的化合物在一个或多个肿瘤部位的递送和释放可以证明在治疗或管理增生性病征方面是临床上有效的。关于所述化合物,应理解的是,每个披露的PBD在每个C-环中具有两个 sp^2 中心,这可以允许比在每个C-环中仅具有一个 sp^2 中心的化合物的在DNA的小沟中具有更强的结合(以及由此产生的更大的毒性)。因此,当用于如本文所陈述的EMR2 ADC时,所披露的PBD可以证明对于增生性病征的治疗特别有效。

[0367] 上文提供了与本发明相容的示例性PBD化合物,并且决不意味着限制根据本文的

传授内容可以成功掺入抗EMR2缀合物中的其他PBD。而是,可以与如本文所述和下文实例中所陈述的抗体缀合的任何PBD是与所披露的缀合物相容的,并且明确地在本发明的界限和范围内。

[0368] 除了上述试剂之外,本发明的抗体还可以与生物反应修饰剂缀合。在某些实施例中,该生物反应修饰剂将包括白细胞介素2、干扰素或各种类型的集落刺激因子(例如,CSF、GM-CSF、G-CSF)。

[0369] 更一般地,相关药物部分可以是具有所希望的生物活性的多肽。这样的蛋白质可以包括例如毒素,如相思豆毒素、蓖麻毒素A、豹蛙酶(或另一种细胞毒性RNA酶)、绿脓杆菌外毒素、霍乱毒素、白喉毒素;凋亡剂,如肿瘤坏死因子(例如TNF- α 或TNF- β)、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生的生长因子、组织纤溶酶原活化物、AIM I(WO 97/33899)、AIM II(WO 97/34911)、Fas配体(Takahashi等人,1994,PMID:7826947)及VEGI(WO 99/23105)、血栓剂、抗血管生成剂(例如,血管抑素或内皮抑素)、淋巴因子(例如,白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及粒细胞集落刺激因子(G-CSF))或生长因子(例如,生长激素(GH))。

[0370] 2. 诊断剂或检测剂

[0371] 在其他实施例中,将本发明的抗体或其片段或衍生物缀合到一种诊断或可检测试剂、标记物或报道子(它可以例如为生物分子(例如肽或核苷酸)、小分子、荧光团或放射性同位素)。标记的抗体可以用于监测过度增生性病症的进展或进程,或作为一种临床测试程序的一部分,以确定包括所披露的抗体的特定疗法(即,治疗诊断剂)的功效或确定治疗的未来过程。这些标记物或报道子也可以用于纯化所选抗体、用于抗体分析学(例如表位结合或抗体分仓)、分开或分离肿瘤发生细胞、或用于临床前程序或毒理学研究中。

[0372] 可通过将抗体与可检测物质偶联完成这种诊断、分析和/或检测,所述可检测物质包括但不限于各种酶,包括例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于,链酶亲和素/生物素和亲和素/生物素;荧光物质,例如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质,例如但不限于,鲁米诺;生物荧光物质,例如但不限于,萤光素酶、萤光素和水母蛋白;放射性物质,例如但不限于,碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、锝(^{99}Tc)、铊(^{201}Tl)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{89}Zr 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 以及 ^{117}Tl ;使用不同正电子发射断层扫描的正电子发射金属、非放射性顺磁性金属离子、以及放射性标记的或与缀合到特定放射性同位素的分子。在这样的实施例中,适当的检测方法是本领域熟知的并且可容易地从众多商业来源获得。

[0373] 在其他实施例中,可以将抗体或其片段与标记物序列或化合物(如肽或荧光团)融合或偶联以促进纯化或诊断或分析程序,如免疫组织化学、生物层干涉法、表面等离子体共振、流式细胞术、竞争性ELISA、FAC等。在一些实施例中,该标记物包含组氨酸标签,如由pQE载体(凯杰公司(Qiagen))等提供的那些,其中有许多是可商购的。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于,血细胞凝集素“HA”标签,该标签对应于衍生自流感血细胞凝集素蛋白的表位(Wilson等人,1984,Cell[细胞]37:767);及“flag”标签(U.S.P.N.4,703,004)。

[0374] 3. 生物相容性修饰剂

[0375] 在所选实施例中,必要时,本发明的抗体可以与生物相容性修饰剂缀合,这些修饰剂可以用于调整、改变、改善或缓和抗体表征。例如,可以通过附接相对较高分子量的聚合物分子(如可商购的聚乙二醇(PEG)或类似的生物相容性聚合物)来产生具有增加的体内半衰期的抗体或融合构建体。本领域的普通技术人员应理解,获得的PEG可以呈许多不同的分子量和分子构象,可以对这些进行选择以赋予该抗体特定特性(例如,可以裁剪半衰期)。PEG可以在存在或不存在多官能接头的情况下,通过PEG与所述抗体或抗体片段的N-末端或C-末端缀合或经由赖氨酸残基上存在的 ϵ -氨基而附接到抗体或抗体片段或衍生物。可以使用使生物活性的损失最少的线性或分支聚合物衍生化。缀合程度可以通过SDS-PAGE和质谱法密切监测,以确保PEG分子与抗体的最佳缀合。可以通过例如尺寸排除或离子交换色谱来从抗体PEG缀合物中分离未反应的PEG。以类似的方式,可以将所披露的抗体缀合到白蛋白,以使该抗体或抗体片段在体内更稳定或具有更长的体内半衰期。这些技术是本领域中众所周知的,参见例如,WO 93/15199、WO 93/15200及WO 01/77137;及EP 0 413,622。其他生物相容性缀合物对于普通技术人员是显而易见的并且可以容易地根据在此的传授内容鉴定。

[0376] B. 接头化合物

[0377] 如上所指示,与本发明相容的有效载荷包括一个或多个弹头以及任选地将弹头与抗体靶向剂缔合的接头。许多接头化合物可用于将本发明的抗体缀合到相关的弹头上。所述接头仅需要与抗体上的反应性残基(优选半胱氨酸或赖氨酸)和所选的药物化合物共价结合。因此,与所选抗体残基反应并可用于提供本发明的相对稳定的缀合物(位点特异性或其他)的任何接头都与本文的传授内容相容。

[0378] 相容的接头可以有利地与亲核的经还原的半胱氨酸和赖氨酸进行结合。涉及经还原的半胱氨酸和赖氨酸的缀合反应包括但不限于,硫醇-马来酰亚胺、硫醇-卤(酰卤)、硫醇-烯、硫醇-炔、硫醇-乙烯基砜、硫醇-双砜、硫醇-硫代磺酸酯、硫醇-吡啶基二硫化物和硫醇-对氟反应。如在此进一步所论述的,硫醇-马来酰亚胺生物缀合是最广泛使用的方法之一,归因于其快速反应速率和温和的缀合条件。该方法的一个问题是反-迈克尔反应以及来自抗体的马来酰亚胺连接的有效载荷损失或转移到等离子体中的其他蛋白质(例如像人类血清白蛋白)的可能性。然而,在一些实施例中,使用如在本文以下实例中所陈述的选择性还原和位点特异性抗体可用于稳定缀合物并减少这种不希望的转移。硫醇-酰卤反应提供了不能进行反-迈克尔反应并因此更稳定的生物缀合物。然而,与基于马来酰亚胺的缀合相比,硫醇-卤化物反应通常具有较慢的反应速率,并且因此在提供不希望的药物与抗体比方面效率不高。硫醇-吡啶基二硫化物反应是另一种流行的生物缀合途径。吡啶基二硫化物与游离硫醇进行快速交换,得到混合二硫化物和吡啶-2-硫酮的释放。混合二硫化物可以在释放有效载荷的还原性细胞环境中被裂解。在生物缀合中获得更多关注的其他方法是硫醇-乙烯基砜和硫醇-双砜反应,其中每一种都与此处的传授内容相容并且明确地包括在本发明的范围内。

[0379] 在所选实施例中,相容性接头将赋予ADC在细胞外环境中的稳定性,防止ADC分子的聚集并保持ADC自由地溶解于水性介质中并处于单体状态。在运输或递送到细胞中之前,ADC优选地为可溶的并且保持完整,即,该抗体保持连接到药物部分。虽然所述接头在靶细胞外是稳定的,但它们可以被设计成在细胞内部以某一有效速率裂解或降解。因此,有效的

接头将：(i) 维持该抗体的特异性结合特性；(ii) 允许该缀合物或药物部分的细胞内递送；(iii) 保持稳定和完整，即，未裂解或降解，直到该缀合物已经被递送或运输到其靶位点；并且(iv) 维持药物部分的细胞毒性、杀细胞作用或细胞生长抑制作用(在某些情况下，包括任何旁观者效应)。ADC的稳定性可以通过标准分析技术如HPLC/UPLC、质谱、HPLC以及分离/分析技术LC/MS和LC/MS/MS来测量。如上所陈述，抗体与药物部分的共价附接需要该接头具有两个反应性官能团，即，在反应性的意义上为二价的。可用于附接两个或更多个功能性或生物活性部分(如MMAE和抗体)的二价接头试剂是已知的，并且已经描述了提供与本文的传授内容相容的所得缀合物的方法。

[0380] 与本发明相容的接头可以广泛地分类为可裂解和不可裂解的接头。可以包括酸不稳定接头(例如肟和脞)、蛋白酶可裂解接头和二硫键接头的可裂解接头被内化到靶细胞中，并在细胞内部的内体-溶酶体途径中被裂解。细胞毒素的释放和活化依赖于促进酸不稳定化学键(如脞或肟)裂解的内体/溶酶体酸性区室。如果将溶酶体特异性蛋白酶裂解位点工程化成接头，则细胞毒素将在其细胞内靶标附近释放。可替代地，含有混合二硫化物的接头提供了细胞毒性有效载荷在细胞内释放的方法，因为它们在细胞的还原环境(而不是血流中的富氧环境)中被选择性地裂解。相比之下，含有酰胺连接的聚乙二醇或烷基间隔物的相容性不可裂解的接头在靶细胞内的ADC的溶酶体降解期间释放有毒的有效载荷。在一些方面，接头的选择将取决于在缀合物、特定适应症和抗体靶标中使用的具体药物。

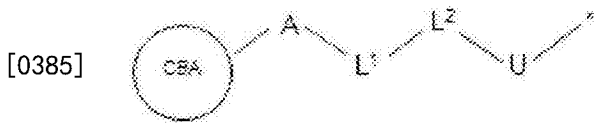
[0381] 因此，本发明的某些实施例包含通过裂解剂可裂解的接头，该接头存在于细胞内环境中(例如，在溶酶体或核内体或细胞凹陷内)。该接头可以例如为一种肽基接头，它被细胞内的肽酶或蛋白酶(包括但不限于，溶酶体或核内体蛋白酶)裂解。在一些实施例中，该肽基接头为至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。裂解剂可以包括组织蛋白酶B和D及纤溶酶，已知它们各自水解二肽药物衍生物，引起靶细胞内部活性药物的释放。通过硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B可裂解的示例性肽基接头是包含Phe-Leu的肽，因为已经发现组织蛋白酶-B在癌组织中高度表达。这样的接头的其他实例例如描述于U.S.P.N.6,214,345中。在特定实施例中，由细胞内的蛋白酶可裂解的肽基接头为Val-Cit接头、Val-Ala接头或Phe-Lys接头。使用该治疗剂的细胞内蛋白水解释放的一个优势是当缀合时该药剂典型地衰减，并且该缀合物的血清稳定性相对较高。

[0382] 在其他实施例中，该可裂解接头是pH敏感的。典型地，该pH敏感性接头将在酸性条件下可水解。例如，可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(例如，脞、肟、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺-乌头酰胺、原酸酯、乙缩醛、缩酮等)(参见例如，U.S.P.N.5,122,368;5,824,805;5,622,929)。这样的接头在中性pH条件(如在血液中的那些)下相对稳定，但低于pH 5.5或5.0(其与溶酶体的pH值近似)不稳定(例如，可裂解)。

[0383] 在又其他实施例中，该接头在还原条件下为可裂解的(例如，二硫化物接头)。本领域中已知多种二硫化物接头，包括例如，可以使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)及SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)形成的那些。在又其他特定实施例中，该接头是丙二酸酯接头(Johnson等人,1995, *Anticancer Res.* [抗癌研究] 15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰基接头(Lau等人,1995, *Bioorg-Med-Chem.* [生物有机化学与医药化学] 3(10):1299-1304)、或3'-N-酰胺类似物

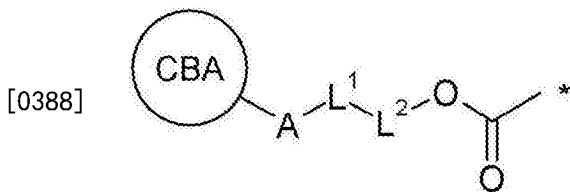
(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem.[生物有机化学与医药化学]3(10):1305-12)。

[0384] 在本发明的某些方面,所选接头将包含具有下式的化合物:



[0386] 其中星号表示与药物的自消附接点,CBA(即细胞结合剂)包含抗EMR2抗体, L^1 包含接头单元和任选地可裂解的接头单元,A是将 L^1 连接到抗体上的反应性残基的连接基团(任选地包含间隔子), L^2 优选地是共价键,并且可能存在或可能不存在的U可以包括全部或部分自消单元,其有利于在肿瘤部位完全分离接头与弹头。

[0387] 在一些实施例(例如在U.S.P.N.2011/0256157中所陈述的那些)中,相容性接头可以包括:



[0389] 其中星号表示与药物的附接点,CBA(即细胞结合剂)包含抗EMR2抗体, L^1 包含接头和任选地可裂解的接头,A是将 L^1 连接到抗体上的反应性残基的连接基团(任选地包含间隔子),并且 L^2 是共价键或与 $-OC(=O)-$ 一起形成自消部分。

[0390] 应理解的是,在存在的情况下, L^1 和 L^2 的性质可以变化极大。这些基团是基于其裂解特征而选择,这些特征可以通过该缀合物将被递送到其的位点处的条件规定。在酶作用下裂解的那些接头是优选的,不过也可以使用通过pH值(例如,酸或碱不稳定的)、温度改变或在照射时(例如,光不稳定的)而可裂解的接头。在还原或氧化条件下可裂解的接头也可以用于本发明中。

[0391] 在某些实施例中, L^1 可以包含连续的氨基酸序列。该氨基酸序列可以是酶裂解的靶底物,借此允许该药物释放。

[0392] 在一个实施例中, L^1 是通过酶作用可裂解的。在一个实施例中,该酶是酯酶或肽酶。

[0393] 在另一个实施例中, L^1 是组织蛋白酶不稳定性接头。

[0394] 在一个实施例中, L^1 包含二肽。该二肽可以表示为 $-NH-X_1-X_2-CO-$,其中 $-NH-$ 和 $-CO-$ 分别表示氨基酸基团 X_1 和 X_2 的N-末端和C-末端。该二肽中的氨基酸可以是天然氨基酸的任何组合。在该接头为一种组织蛋白酶不稳定性接头的情况下,该二肽可以是组织蛋白酶介导的裂解的作用位点。

[0395] 另外,对于具有羧基或氨基侧链官能团的那些氨基酸(分别例如Glu和Lys),CO和NH可以表示该侧链的官能团。

[0396] 在一个实施例中,二肽 $-NH-X_1-X_2-CO-$ 中的基团 $-X_1-X_2-$ 选自: $-Phe-Lys-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Val-Lys-$ 、 $-Ala-Lys-$ 、 $-Val-Cit-$ 、 $-Phe-Cit-$ 、 $-Leu-Cit-$ 、 $-Ile-Cit-$ 、 $-Phe-Arg-$ 以及 $-Trp-Cit-$,其中Cit是瓜氨酸。

[0397] 优选地,二肽 $-NH-X_1-X_2-CO-$ 中的基团 $-X_1-X_2-$ 选自: $-Phe-Lys-$ 、 $-Val-Ala-$ 、 $-Val-Lys-$ 、 $-Ala-Lys-$ 以及 $-Val-Cit-$ 。

[0398] 最优选地,二肽NH-X₁-X₂-CO-中的基团-X₁-X₂-为-Phe-Lys-或-Val-Ala-或Val-Cit。在某些所选实施例中,该二肽将包含-Val-Ala-。

[0399] 在一个实施例中,L²以共价键的形式存在。

[0400] 在一个实施例中,L²是存在的并且与-C(=O)O-一起形成自消接头。在一个实施例中,L²为酶活性的底物,借此允许该弹头释放。

[0401] 在一个实施例中,在L¹在酶作用下可裂解并且L²存在的情况下,该酶将L¹与L²之间的键裂解。

[0402] L¹和L²,在存在的情况下,可以通过选自以下的键而连接:-C(=O)NH-、-C(=O)O-、-NHC(=O)-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NHC(=O)O-、-OC(=O)NH-以及-NHC(=O)NH-。

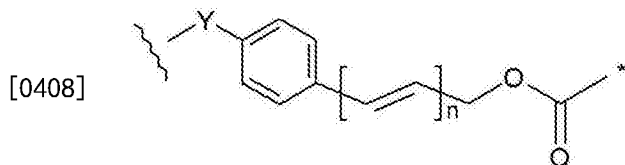
[0403] L¹中连接到L²的氨基可以是氨基酸的N-末端,或可以衍生自氨基酸侧链的氨基,例如赖氨酸氨基酸侧链。

[0404] L¹中连接到L²的羧基可以是氨基酸的C-末端,或可以衍生自氨基酸侧链的羧基,例如谷氨酸氨基酸侧链。

[0405] L¹中连接到L²的羟基可以衍生自氨基酸侧链的羟基,例如丝氨酸氨基酸侧链。

[0406] 术语“氨基酸侧链”包括见于以下中的那些基团:(i)天然存在的氨基酸,如丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸及缬氨酸;(ii)微量氨基酸,如鸟氨酸和瓜氨酸;(iii)非天然氨基酸、β-氨基酸、天然存在的氨基酸的合成类似物和衍生物;及(iv)其所有对映异构体、非对映异构体、同分异构富集的、同位素标记的(例如,²H、³H、¹⁴C、¹⁵N)、受保护的形式及外消旋混合物。

[0407] 在一个实施例中,-C(=O)O-和L²一起形成以下基团:



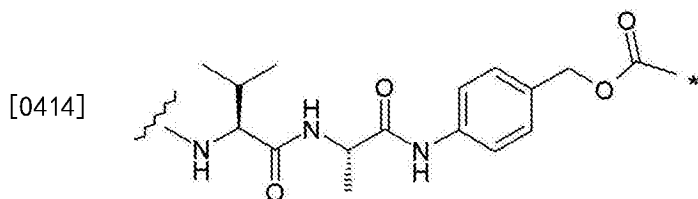
[0409] 其中星号指示与药物或细胞毒性剂位置的附接点,波浪线指示与接头L¹的附接点,Y为-N(H)-、-O-、-C(=O)N(H)-或-C(=O)O-,并且n为0到3。该亚苯基环任选地被一个、两个或三个取代基取代。在一个实施例中,该亚苯基任选地被卤基、NO₂、烷基或羟基烷基取代。

[0410] 在一个实施例中,Y是NH。

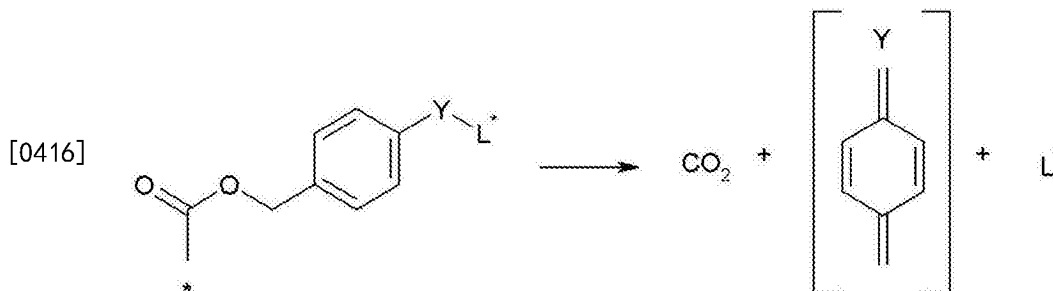
[0411] 在一个实施例中,n是0或1。优选地,n为0。

[0412] 在Y为NH并且n为0时,自消接头可以称为对-氨基苄基羰基接头(PABC)。

[0413] 在其他实施例中,该接头可以包括自消接头并且与二肽一起形成基团-NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-。在其他所选实施例中,该接头可以包括基团-NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-,其示于以下:



[0415] 其中星号指示与所选细胞毒性部分的附接点,并且波浪线指示与可缀合到该抗体的接头(例如间隔子-抗体结合区段)的其余部分的附接点。在酶促裂解该二肽之后,当远端位点活化时,该自消接头将允许完全释放受保护的化合物(即,细胞毒素),沿以下所示的路线进行:



[0417] 其中星号指示与所选细胞毒性部分的附接点,并且L*是包含现在切割的肽基单元的接头的其余部分的活化形式。弹头的完全释放确保它将保持所希望的毒性活性。

[0418] 在一个实施例中,A是共价键。因此,L¹和抗体是直接连接的。例如,在L¹包含连续氨基酸序列的情况下,该序列的N-末端可以直接地连接到抗体残基。

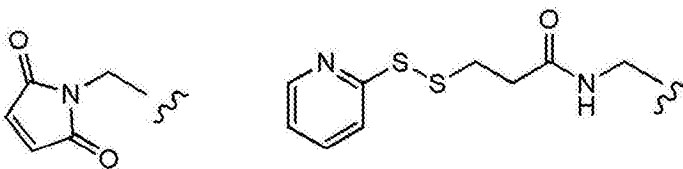
[0419] 在另一个实施例中,A是间隔基。因此,L¹和抗体是间接地连接的。

[0420] 在某些实施例中,L¹和A可以通过选自以下的键连接:-C(=O)NH-、-C(=O)O-、-NHC(=O)-、-OC(=O)-、-OC(=O)O-、-NHC(=O)O-、-OC(=O)NH-以及-NHC(=O)NH-。

[0421] 如将在以下更详细论述的,本发明的药物接头将优选地与半胱氨酸(包括游离半胱氨酸)上的活性硫醇亲核试剂连接。为此,抗体的半胱氨酸可以通过用不同还原剂如DTT或TCEP或如在此所陈述的温和还原剂进行处理而与接头试剂缀合反应来制造。在其他实施例中,本发明的药物接头将优选地与赖氨酸连接。

[0422] 优选地,该接头含有亲电子官能团,用于与该抗体上的亲核官能团反应。在抗体上的亲核基团包括但不限于:(i) N-末端氨基;(ii) 侧链氨基,例如赖氨酸;(iii) 侧链硫醇基,例如半胱氨酸;及(iv) 糖羟基或氨基,其中该抗体为糖基化的。胺、硫醇及羟基是亲核性的并且能够与接头部分和接头试剂上的亲电子基团反应形成共价键,这些接头部分和接头试剂包括:(i) 马来酰亚胺基;(ii) 活化的二硫化物;(iii) 活性酯,如NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)酯、HOBt(N-羟基苯并三唑)酯、卤代甲酸酯及酰基卤;(iv) 烷基和苯甲基卤化物,如卤代乙酰胺;以及(v) 醛、酮和羧基。

[0423] 与本发明相容的示例性官能团紧接着示于以下:

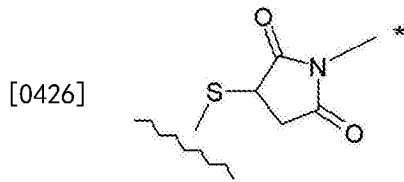


[0424]



[0425] 在一些实施例中,半胱氨酸(包括位点特异性抗体的游离半胱氨酸)与药物-接头

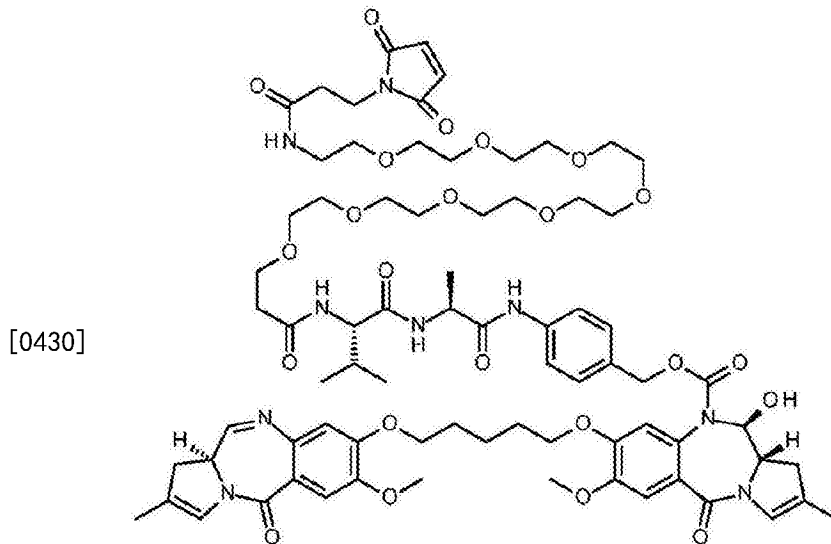
部分之间的连接是通过存在于接头上的硫醇残基和末端马来酰亚胺基团进行的。在这样的实施例中，抗体与药物-接头之间的连接可以如下：



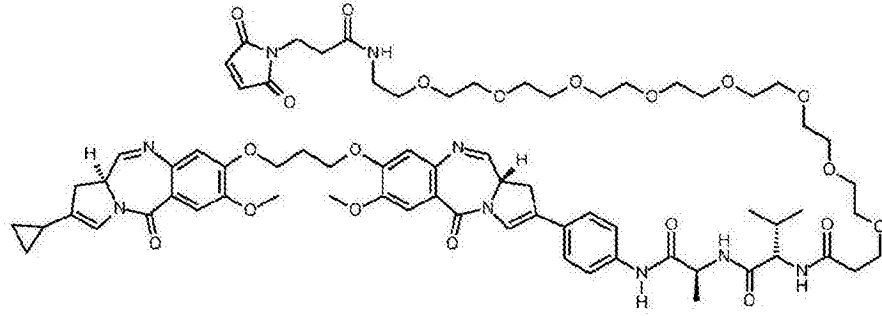
[0427] 其中星号指示与药物-接头的其余部分的附接点，并且波浪线指示与抗体的其余部分的附接点。在该实施例中，S原子优选衍生自位点特异性游离半胱氨酸。

[0428] 关于其他相容性接头，结合部分可以包含可与抗体上的活化的残基反应以提供所希望的缀合物的末端溴乙酰胺或碘乙酰胺。在任何情况下，鉴于本披露，本领域技术人员可以容易地将所披露的每一药物-接头化合物与相容性抗EMR2抗体(包括位点特异性抗体)缀合。

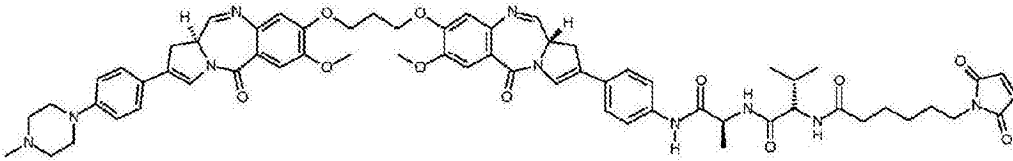
[0429] 根据本披露，本发明提供了制备相容性抗体药物缀合物的方法，该方法包括将抗EMR2抗体与选自下组的药物-接头化合物缀合，该组由以下组成：



DL1

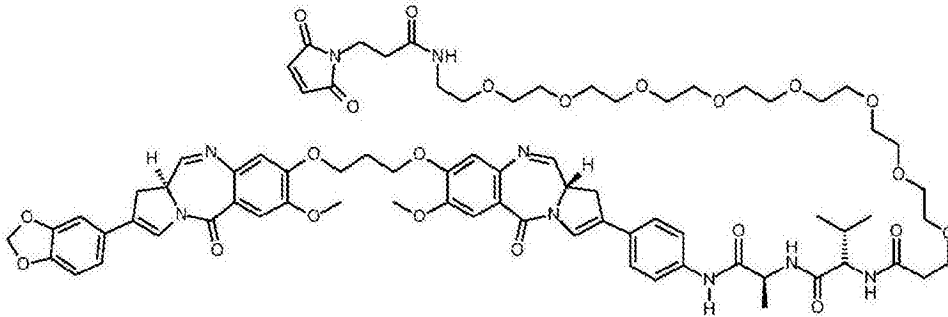


DL2

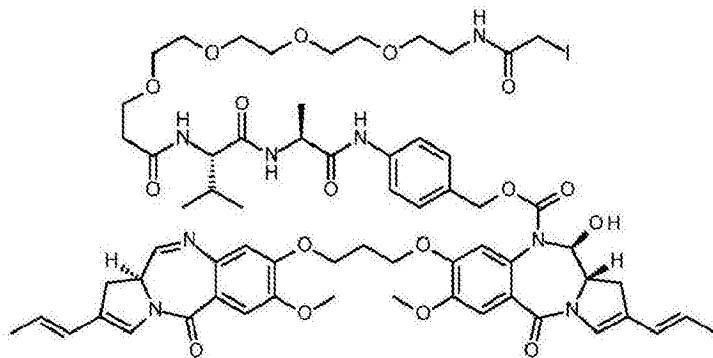


DL3

[0431]



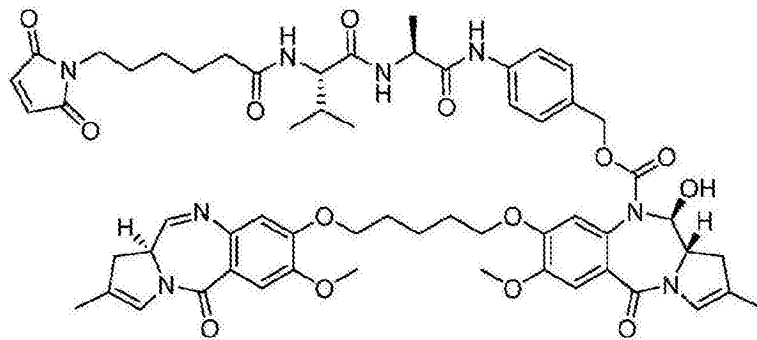
DL4



DL5

和

[0432]

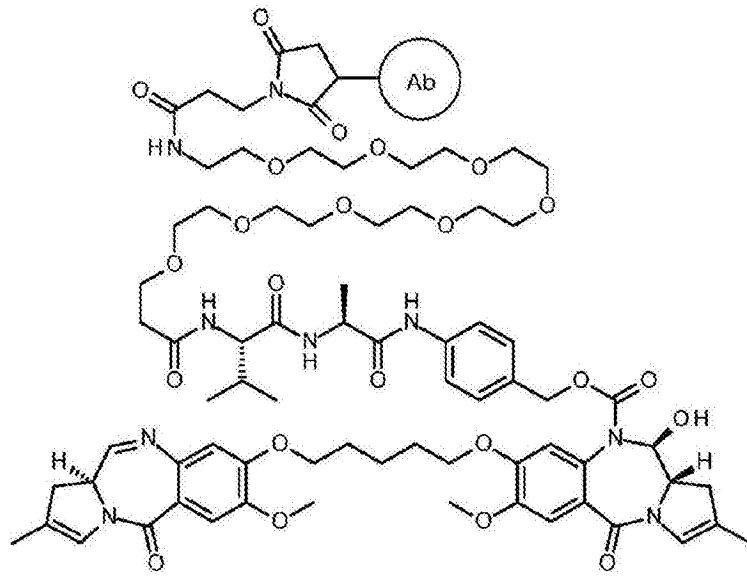


DL6

[0433] 出于即时应用的目的,将DL用作“药物-接头”的缩写并且将包含如以上所示的药物接头1-6(即DL1、DL2、DL3、DL4、DL5和DL6)。请注意,DL1和DL6包含相同的弹头和相同的二肽亚基,但连接基团间隔子不同。因此,切割接头后,DL1和DL6都释放PBD1。

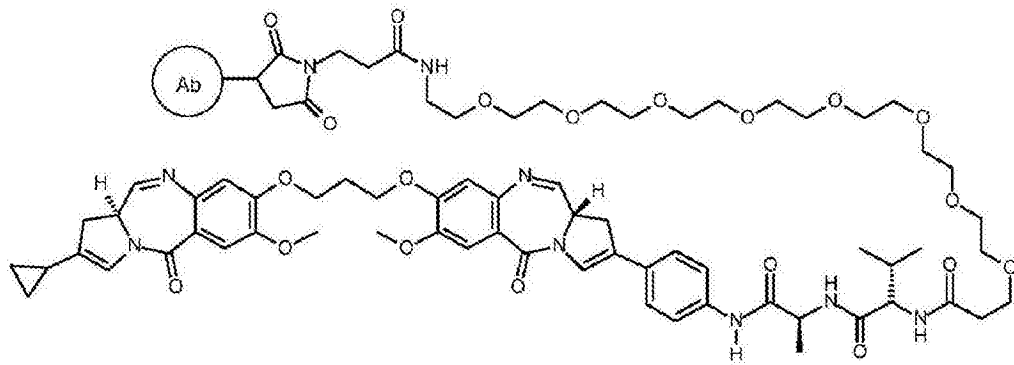
[0434] 应理解的是,使用本领域认可的技术,附有末端马来酰亚胺部分(DL1-DL4和DL6)或碘乙酰胺部分(DL5)的接头可以与所选EMR2抗体上的一个或多个游离巯基缀合。前述化合物的合成途径陈述于W02014/130879中,其明确地通过引用结合在此,用于合成上述DL化合物,而在下面的实例中陈述了缀合这些PBD接头组合的具体方法。

[0435] 因此,在所选方面,本发明涉及与所披露的DL部分缀合的EMR2抗体,以提供紧接着在下面的ADC 1-6中大体上示出的EMR2免疫缀合物。因此,在某些方面,本发明涉及选自下组的抗体药物缀合物,该组由以下组成:

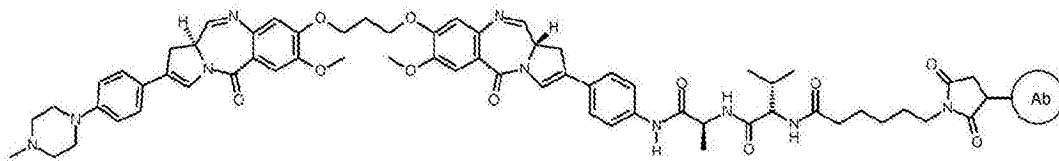


ADC 1

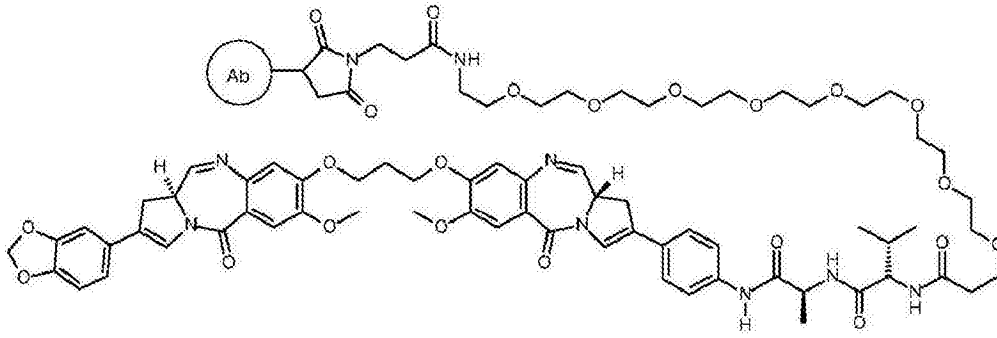
[0436]



ADC 2



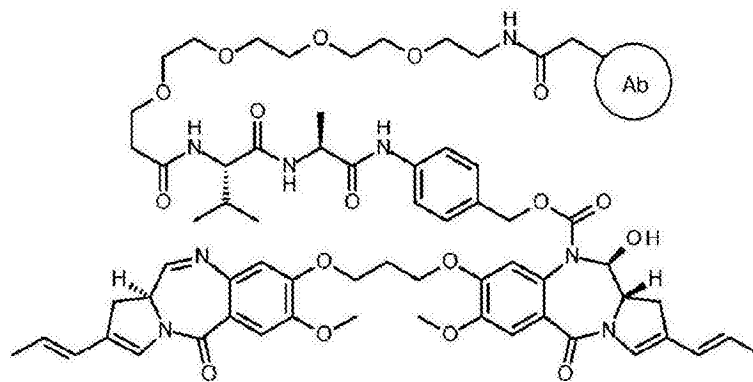
ADC 3



ADC 4

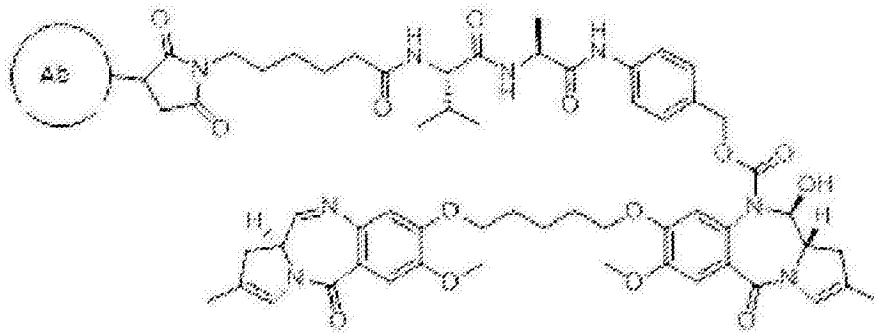
和

[0437]



ADC 5

和



ADC 6

[0438] 其中Ab包含抗EMR2抗体或其免疫反应性片段。

[0439] 在某些方面,本发明的EMR2 PBD ADC将包含如所附实例中所陈述的抗EMR2抗体或其免疫反应性片段。在一个具体的实施例中,ADC3将包含hSC93.253ss1(例如,hSC93.253ss1 PBD3)。在其他方面,本发明的EMR2 PBD ADC将包含hSC93.256ss1(例如,hSC93.256ss1 PBD3)。

[0440] C. 缀合

[0441] 应理解的是,可以使用许多熟知的反应来将药物部分和/或接头附接到所选抗体

上。例如,利用半胱氨酸的巯基的各种反应可用于缀合所希望的部分。一些实施例将包含如下详细论述的抗体的缀合物,该抗体的缀合物包含一个或多个游离半胱氨酸。在其他实施例中,本发明的ADC可以通过将药物与存在于所选抗体中的赖氨酸残基的溶剂暴露的氨基基团进行缀合而产生。仍其他实施例包括N-末端苏氨酸和丝氨酸残基的活化,它们然后可用于将所披露的有效载荷与抗体衔接。将优选地裁剪所选缀合方法以优化与抗体衔接的药物的数量并提供相对较高的治疗指数。

[0442] 用于将治疗性化合物与半胱氨酸残基缀合的各种方法是本领域已知的,并且对于本领域技术人员而言是显而易见的。在碱性条件下,半胱氨酸残基将被去质子化以产生硫醇盐亲核试剂,其可以与软亲电子试剂如马来酰亚胺和碘乙酰胺进行反应。通常用于这种缀合的试剂可以直接与半胱氨酸硫醇进行反应以形成缀合蛋白或与接头-药物进行反应以形成接头-药物中间体。在接头的情况下,利用有机化学反应、条件和试剂的若干路径是本领域技术人员已知的,这些路径包括:(1)本发明的蛋白的半胱氨酸基团与接头试剂的反应,以经由共价键形成蛋白质-接头中间体,之后与活化的化合物反应;和(2)化合物的亲核基团与接头试剂的反应,以经由共价键形成药物-接头中间体,之后与本发明的蛋白的半胱氨酸基团反应。从前述对于本领域技术人员来说显而易见的是,双功能(或二价)接头可用于本发明。例如,双功能接头可以包含用于与一个或多个半胱氨酸残基共价连接的硫醇修饰基团以及用于与该化合物共价或非共价连接的至少一个衔接部分(例如第二硫醇修饰部分)。

[0443] 在缀合之前,可以通过用还原剂如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP))处理来使抗体对于与接头试剂缀合具有反应性。在其他实施例中,可以通过赖氨酸与试剂(包括但不限于2-亚氨基硫杂环戊烷(Ttaut's试剂)、SATA、SATP或SAT(PEG)4)进行反应导致胺转化为硫醇而将另外的亲核基团引入抗体中。

[0444] 关于这样的缀合,半胱氨酸硫醇或赖氨酸氨基基团是亲核的并能与接头试剂和化合物-接头中间体或药物上的亲电子基团进行反应以形成共价键,所述接头试剂和化合物-接头中间体或药物包括:(i)活性酯如NHS酯、HOBT酯、卤代甲酸盐(haloformate)和酰基卤;(ii)烷基和苄基卤化物,如卤代乙酰胺;(iii)醛、酮、羧基和马来酰亚胺基团;和(iv)经由硫化物交换的二硫化物,包括吡啶基二硫化物。化合物或接头上的亲核基团包括,但不限于:能与接头部分和接头试剂上的亲电子基团反应以形成共价键的胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、氨硫脲、肼羧化物和芳酰肼基团。

[0445] 缀合试剂通常包括:马来酰亚胺、卤代乙酰基、碘乙酰胺琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸酯、磺酰氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯酯和亚磷酰胺,尽管也可利用其他的官能团。在某些实施例中,方法包括例如使用马来酰亚胺、碘乙酰胺或卤代乙酰基/烷基卤化物、氮丙啶、丙烯酰基衍生物与半胱氨酸的硫醇进行反应以产生与化合物具有反应性的硫醚。游离硫醇与活化的吡啶基二硫化物的二硫化物交换也可用于生产缀合物(例如,使用5-硫代-2-硝基苯甲酸(TNB))。优选地使用马来酰亚胺。

[0446] 如上所指示,赖氨酸也可以用作反应性残基以实现如本文所陈述的缀合。亲核赖氨酸残基通常通过胺反应性琥珀酰亚胺酯来靶向。为了获得最佳数目的去质子化赖氨酸残基,水性溶液的pH必须低于赖氨酸铵基的pKa,该赖氨酸铵基的pKa为10.5,所以该反应的典型pH为约8和9。偶联反应的常用试剂是NHS-酯,它通过赖氨酸酰化机制与亲核赖氨酸反应。

其他经历类似反应的相容性试剂包括异氰酸酯和异硫氰酸酯,其也可以与本文的传授内容结合使用以提供ADC。一旦赖氨酸已被激活,许多上述连接基团可用于将弹头共价结合到抗体上。

[0447] 用于将化合物与苏氨酸或丝氨酸残基(优选N-末端残基)进行缀合的方法也是本领域已知的。例如,已经描述了其中羰基前体衍生自丝氨酸或苏氨酸的1,2-氨基醇的方法,所述羰基前体可以通过高碘酸盐氧化选择性且快速地转化为醛形式。醛和与本发明的蛋白质附接的化合物中的半胱氨酸的1,2-氨基硫醇的反应形成稳定的噻唑烷产物。该方法对于在N-末端丝氨酸或苏氨酸残基处标记蛋白质特别有用。

[0448] 在一些实施例中,反应性硫醇基团可以通过引入一个、两个、三个、四个或更多个游离半胱氨酸残基而引入所选抗体(或其片段)中(例如,制备包含一个或多个游离非天然半胱氨酸氨基酸残基的抗体)。这样的位点特异性抗体或工程化抗体允许缀合物制剂展现增强的稳定性和基本均质性,这至少部分地归因于提供了一个或多个工程化游离半胱氨酸位点和/或在此所陈述的新型缀合程序。不同于完全或部分地还原每个链内或链间抗体二硫键以提供缀合位点的常规缀合方法(并且其与本发明完全相容),本发明另外提供了某些制备的游离半胱氨酸位点的选择性还原和药物接头与其的附接。

[0449] 就这一点而言,应理解的是,由工程化位点促进的缀合特异性和选择性还原允许在所希望的位置处的高百分比的定点缀合。值得注意的是,这些缀合位点中的一些(例如存在于轻链恒定区的末端区域中的那些)典型地难以在它们倾向与其他游离半胱氨酸交叉反应时有效缀合。然而,通过所得的游离半胱氨酸的分子工程化和选择性还原,可以获得有效的缀合速率,其显著减少不必要的高DAR污染物和非特异性毒性。更一般而言,工程化构建体和披露的包含选择性还原的新型缀合方法提供了具有改善的药物代谢动力学和/或药效动力学和潜在地改善的治疗指数的ADC制剂。

[0450] 在某些实施例中,位点特异性构建体提供一个或多个游离半胱氨酸,该一个或多个游离半胱氨酸在还原时包含亲核的且能够与接头部分(例如以上所披露的那些)上的亲电子基团反应以形成共价键的硫醇基团。如以上所述,本发明的抗体可以具有可还原的未配对的链间或链内半胱氨酸或引入的非天然半胱氨酸,即提供这种亲核基团的半胱氨酸。因此,在某些实施例中,经还原的游离半胱氨酸的游离巯基与所披露的药物-接头的末端马来酰亚胺或卤代乙酰胺基团的反应将提供所希望的缀合。在这样的情形中,可以通过用还原剂如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)进行处理来使抗体的游离半胱氨酸对于与接头试剂缀合具有反应性。因此,每个游离半胱氨酸理论上将呈现活性硫醇亲核试剂。虽然这样的试剂是与本发明特别相容的,但是应当理解,可以使用本领域技术人员通常已知的不同反应、条件和试剂来实现位点特异性抗体的缀合。

[0451] 此外,已经发现,可以选择性地还原工程化抗体的游离半胱氨酸以提供增强的定点缀合和不想要的潜在毒性污染物的减少。更具体地,已经发现“稳定剂”如精氨酸可以调节蛋白质中分子内和分子间相互作用,并且可以与所选择的还原剂(优选相对温和的)联合使用来选择性地还原游离半胱氨酸并促进如此处所陈述的位点特异性缀合。如在此所使用,术语“选择性还原”或“选择性地还原”可以互换使用,并且意指还原一个或多个游离半胱氨酸,而不实质性破坏工程化抗体中存在的天然二硫键。在所选实施例中,这种选择性还原可以通过使用某些还原剂或某些还原剂浓度来实现。在其他实施例中,工程化构建体的

选择性还原将包含与还原剂(包括温和还原剂)组合使用稳定剂。应当理解,术语“选择性缀合”意指在本文所述的细胞毒素存在下,已经选择性地还原的工程化抗体的缀合。在这方面,这样的稳定剂(例如精氨酸)与所选还原剂的组合使用可以显著改善位点特异性缀合的效率,如通过抗体重链和轻链上缀合的程度和该制剂的DAR分布所测定的。WO 2015/031698中广泛披露了相容的抗体构建体和选择性缀合技术以及试剂,将其关于这样的方法和结构特别结合在此。

[0452] 虽然不希望受任何特定理论的束缚,但是这种稳定剂可以调节静电微环境和/或调节所希望的缀合位点处的构象变化,从而允许相对温和的还原剂(其不会实质上还原完整的天然二硫键)促进所希望的一个或多个游离半胱氨酸位点处的缀合。已知此类试剂(例如某些氨基酸)形成盐桥(通过氢键和静电相互作用),并且能以此方式调节蛋白质-蛋白质的相互作用,以赋予稳定效果,这可能导致有利的构象变化和/或减少不利的蛋白质-蛋白质相互作用。此外,这些试剂可以用于抑制还原后不希望的分子内(和分子间)半胱氨酸-半胱氨酸键的形成,从而促进所希望的缀合反应,其中工程化位点特异性半胱氨酸与药物结合(优选经由接头)。由于选择性还原条件不能显著还原完整的天然二硫键,所以随后的缀合反应自然地被驱动到游离半胱氨酸上的相对较少的反应性硫醇(例如,优选2个游离硫醇/抗体)。如先前所暗指,这样的技术可以用于显著降低根据本披露制造的缀合物制剂中的非特异性缀合和相应的不想要的DAR物质的水平。

[0453] 在所选实施例中,与本发明相容的稳定剂通常将包含具有碱性pKa的至少一个部分的化合物。在某些实施例中,该部分将包含伯胺,而在其他实施例中,该胺部分将包含仲胺。在仍其他实施例中,胺部分将包含叔胺或胍基。在其他所选实施例中,胺部分将包含氨基酸,而在其他相容的实施例中,胺部分将包含氨基酸侧链。在又其他实施例中,胺部分将包含蛋白原氨基酸。在仍其他实施例中,胺部分包含非蛋白原氨基酸。在一些实施例中,相容性稳定剂可以包含精氨酸、赖氨酸、脯氨酸和半胱氨酸。在某些优选的实施例中,稳定剂将包含精氨酸。此外,相容性稳定剂可以包括胍和具有碱性pKa的含氮杂环。

[0454] 在某些实施例中,相容性稳定剂包含具有至少一个pKa大于约7.5的胺部分的化合物,在其他实施例中,主题胺部分将具有大于约8.0的pKa,在又其他实施例中,胺部分将具有大于约8.5的pKa,并且在再其他实施例中,稳定剂将包含具有大于约9.0的pKa的胺部分。其他实施例将包含稳定剂,其中胺部分将具有大于约9.5的pKa,而某些其他实施例将包含展现至少一个pKa大于约10.0的胺部分的稳定剂。在仍其他实施例中,稳定剂将包含具有pKa大于约10.5的胺部分的化合物,在其他实施例中,稳定剂将包含具有pKa大于约11.0的胺部分的化合物,而在仍其他实施例中,稳定剂将包含pKa大于约11.5的胺部分。在又其他实施例中,稳定剂将包含具有pKa大于约12.0的胺部分的化合物,而在再其他实施例中,稳定剂将包含pKa大于约12.5的胺部分。本领域技术人员将理解,可以使用标准技术容易地计算或确定相关的pKa,并用于确定使用所选化合物作为稳定剂的适用性。

[0455] 显示在与某些还原剂组合时,所披露的稳定剂在靶向缀合到游离位点特异性半胱氨酸上是特别有效的。出于本发明的目的,相容性还原剂可以包括任何化合物,其产生用于缀合的还原的游离位点特异性半胱氨酸,而不显著地破坏工程化抗体的天然二硫键。在优选地由选择的稳定剂和还原剂的组合提供的这样的条件下,活化的药物接头在很大程度上受限于结合所希望的一个或多个游离位点特异性半胱氨酸位点。特别优选相对温和的还原

剂或以相对低浓度使用的还原剂,以提供温和的条件。如在此所使用,术语“温和还原剂”或“温和还原条件”应保持为意指在一个或多个游离半胱氨酸位点提供硫醇而不实质性破坏工程化抗体中存在的天然二硫键的还原剂(任选在稳定剂存在下)引起的任何试剂或状态。也就是说,温和还原剂或条件(优选与稳定剂组合)能够有效还原一个或多个游离半胱氨酸(提供硫醇),而不会显著破坏蛋白质的天然二硫键。所希望的还原条件可以由许多基于巯基的化合物提供,这些化合物建立了用于选择性缀合的适当环境。在实施例中,温和还原剂可以包含具有一个或多个游离硫醇的化合物,而在一些实施例中,温和还原剂将包含具有单个游离硫醇的化合物。与本发明的选择性还原技术相容的还原剂的非限制性实例包括谷胱甘肽、正乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、2-氨基乙烷-1-硫醇和2-羟基乙烷-1-硫醇。

[0456] 应当理解,上面陈述的选择性还原方法在与游离半胱氨酸的靶向缀合方面特别有效。在这方面,可以通过本领域接受的不同的技术来确定缀合到位点特异性抗体中的希望靶位点的程度(在此定义为“缀合效率”)。可以通过评估在一个或多个靶缀合位点(例如,在每条轻链的c-末端上的游离半胱氨酸)上相对于所有其他缀合位点的缀合百分比,来确定药物与抗体的位点特异性缀合的效率。在某些实施例中,本文的方法提供了将药物有效缀合至包含游离半胱氨酸的抗体。在一些实施例中,缀合效率是至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或更高,如通过相对于所有其他缀合位点的靶缀合百分比所测量的。

[0457] 还应当理解,能够缀合的工程化抗体可以含有游离的半胱氨酸残基,该游离的半胱氨酸残基含有当产生或储存该抗体时被封闭或封端的巯基基团。这种帽包括与巯基基团相互作用并防止或抑制缀合形成的小分子、蛋白质、肽、离子和其他物质。在一些情况下,未缀合的工程化抗体可以包含结合相同或不同抗体上的其他游离半胱氨酸的游离半胱氨酸。如本文所论述,这种交叉反应性在制造程序中可导致不同污染物。在一些实施例中,工程化抗体可能在缀合反应之前需要脱封端。在特定实施例中,本文的抗体是未封端的并且展示出能够缀合的游离巯基。在特定实施例中,本文的抗体经历不干扰或重排天然存在的二硫键的脱封端反应。应当理解,在大多数情况下,在正常还原反应(还原或选择性还原)期间将发生脱封端反应。

[0458] D. DAR分布和纯化

[0459] 在所选实施例中,与本发明相容的缀合和纯化方法有利地提供了产生包含窄DAR分布的相对均质的ADC制剂的能力。就这一点而言,所披露的构建体(例如位点特异性构建体)和/或选择性缀合就药物和工程化抗体之间的化学计量比以及关于毒素位置提供了样品内的ADC物质的均质性。如上所简单论述,术语“药物与抗体比”或“DAR”是指药物与抗体的摩尔比。在某些实施例中,缀合物制剂相对于其DAR分布基本上可以是均匀的,这意味着在该ADC制剂内是具有相对于荷载位点(即游离半胱氨酸)也一致的特定DAR(例如,2或4的DAR)的位点特异性ADC的主要种类。在本发明的其他某些实施例中,可能的是,通过使用位点特异性抗体和/或选择性还原以及缀合来实现所希望的均质性。在其他实施例中,可以通过使用与选择性还原组合的位点特异性构建体来实现所希望的均质性。在又其他实施例中,可以使用分析型或制备型色谱技术来纯化相容性制剂以提供所希望的均质性。在这些实施例的每一个中,可以使用本领域已知的不同技术来分析ADC样品的均质性,包括但不限

于质谱法、HPLC(例如尺寸排阻HPLC、RP-HPLC、HIC-HPLC等)或毛细管电泳。

[0460] 关于ADC制剂的纯化,应当理解,可以使用标准药物制备方法来获得所希望的纯度。如本文所论述,液相色谱法如反相(RP)和疏水相互作用色谱(HIC)可以通过药物荷载值分离混合物中的化合物。在一些情形中,离子交换色谱(IEC)或混合模式色谱(MMC)也可用于分离具有特定载药量的物质。

[0461] 所披露的ADC及其制剂可以包含不同化学计量摩尔比的药物和抗体部分,这取决于抗体的构型,并且至少部分地取决于用于实现缀合的方法。在某些实施例中,每个ADC的载药量可以包括1至20个弹头(即, n 是1-20)。其他所选的实施例可以包括具有从1到15个弹头的载药量的ADC。在仍其他实施例中,ADC可以包含1-12个弹头,或更优选地1-10个弹头。在一些实施例中,ADC将包含从1到8个弹头。

[0462] 虽然理论载药量可能相对较高,但实际限制(如游离半胱氨酸交叉反应性和弹头疏水性)倾向于限制包含由于聚集体和其他污染物而造成的此类DAR的均质制剂的产生。也就是说,较高的载药量,例如 >8 或 10 ,可能导致某些抗体-药物缀合物的聚集、不溶性、毒性或丧失细胞渗透性,这取决于有效载荷。鉴于这些问题,本发明提供的载药量优选地在每个缀合物1至8个药物的范围内,即其中1、2、3、4、5、6、7或8个药物共价附接到每一抗体上(例如,对于IgG1,其他抗体可以具有取决于二硫键数量的不同荷载能力)。优选地,本发明的组合物的DAR将为约2、4或6,并且在一些实施例中,DAR将包含约2。

[0463] 尽管本发明提供相对高水平的均质性,但所披露的组合物实际上包含具有一系列药物化合物(在IgG1的情形中,潜在地从1至8)的缀合物的混合物。因此,所披露的ADC组合物包括缀合物的混合物,其中大部分构成抗体与一个或多个药物部分共价连接,并且(尽管工程化构建体提供了相对缀合特异性以及选择性还原),其中药物部分可以通过不同硫醇基团附接到抗体上。也就是说,在缀合之后,本发明的ADC组合物将包含在不同浓度下具有不同载药量(例如,每个IgG1抗体1至8个药物)的缀合物的混合物(连同主要由游离半胱氨酸交叉反应性引起的某些反应污染物)。然而,使用选择性还原和制造后纯化,缀合组合物可以被驱动到其中它们大部分含有单个主要的希望的ADC种类(例如,2的载药量)和相对低水平的其他ADC种类(例如,1、4、6等的载药量)的点上。平均DAR值表示关于组合物作为整体(即,所有ADC种类一起)的药物荷载的加权平均值。由于所采用的量化方法的固有不确定性和在商业环境中完全去除非主要的ADC种类的难度,可接受的DAR值或规格通常表示为平均值、范围或分布(即, 2 ± 0.5 的平均DAR)。优选地,在药物环境中使用包含在该范围(即1.5至2.5)内的测量平均DAR的组合物。

[0464] 因此,在一些实施例中,本发明将包含平均DAR为1、2、3、4、5、6、7或8各自 ± 0.5 的组合物。在其他实施例中,本发明将包含2、4、6或8 ± 0.5 的平均DAR。最后,在所选实施例中,本发明将包含 2 ± 0.5 或 4 ± 0.5 的平均DAR。应当理解,在一些实施例中,范围或偏差可以小于0.4。因此,在其他实施例中,这些组合物将包含1、2、3、4、5、6、7或8各自 ± 0.3 的平均DAR,2、4、6或8 ± 0.3 的平均DAR,甚至更优选2或4 ± 0.3 的平均DAR,或甚至 2 ± 0.3 的平均DAR。在其他实施例中,IgG1缀合物组合物优选包含1、2、3、4、5、6、7或8各自 ± 0.4 的平均DAR和相对较低水平(即,小于30%)的非主要的ADC种类。在其他实施例中,ADC组合物将包含2、4、6或8各自 ± 0.4 的平均DAR与相对较低水平($<30\%$)的非主要的ADC种类。在一些实施例中,ADC组合物将包含 2 ± 0.4 的平均DAR与相对较低水平($<30\%$)的非主要的ADC种

类。在又其他实施例中,当针对存在于组合物中的所有其他DAR种类而测量时,主要ADC种类(例如,DAR为2或DAR为4)将以大于50%的浓度、以大于55%的浓度、以大于60%的浓度、以大于65%的浓度、以大于70%的浓度、以大于75%的浓度、以大于80%的浓度、以大于85%的浓度、以大于90%的浓度、以大于93%的浓度、以大于95%的浓度或甚至以大于97%的浓度存在。

[0465] 如以下实例中详述的,可以通过常规手段如UV-Vis分光光度法、反相HPLC、HIC、质谱、ELISA和电泳,来表征来自缀合反应的ADC的制剂中的药物/抗体分布。也可以确定依据药物/抗体的ADC定量分布。通过ELISA,可以确定ADC的特定制剂中药物/抗体的平均值。然而,通过抗体-抗原结合和ELISA检测限制不能辨别药物/抗体分布。此外,用于检测抗体-药物缀合物的ELISA测定不能确定药物部分附接到抗体的位置,例如重链或轻链片段或特定氨基酸残基。

[0466] VI. 诊断和筛选

[0467] A. 诊断

[0468] 本发明提供了用于检测、诊断或监测增生性病症的体外和体内方法以及筛选来自患者的细胞以鉴定肿瘤细胞(包括肿瘤发生细胞)的方法。这样的方法包括鉴定患有癌症需治疗或监测癌症进展的个体,包括将患者或从患者获得的样品(体内或体外)与能够特异性识别并缔合EMR2决定子的检测剂(例如抗体或核酸探针)进行接触并检测与样品中检测剂的缔合的存在与否或水平。在所选实施例中,该检测剂将包含与如本文所述的可检测标记或报道分子缔合的抗体。在某些其他实施例中,EMR2抗体将被施用并使用二次标记的抗体(例如,抗鼠抗体)进行检测。在又其他实施例(例如,原位杂交或ISH)中,与基因组EMR2决定子反应的核酸探针将用于增生性病症的检测、诊断或监测。

[0469] 更一般而言,EMR2决定子的存在和/或水平可以使用本领域普通技术人员可用于蛋白质或核酸分析的许多技术中的任一种来测量,例如,直接物理测量(例如质谱)、结合测定(例如免疫测定、凝集测定和免疫色谱测定)、聚合酶链式反应(PCR、RT-PCR、RT-qPCR)技术、分支寡核苷酸技术、RNA印迹技术、寡核苷酸杂交技术以及原位杂交技术。该方法还可以包括测量由化学反应引起的信号,例如光吸收的变化,荧光的变化,化学发光或电化学发光的产生,反射率、折射率或光散射的变化,可检测标记从表面的积聚或释放,氧化或还原或氧化还原物质,电流或电势,磁场变化等。通过测量经标记的结合试剂的参与,通过测量标记的光致发光(例如,通过测量荧光、时间分辨荧光、隐失波荧光、上转换磷光体、多光子荧光等)、化学发光、电化学发光、光散射、光吸收、放射性、磁场、酶活性(例如,通过引起光吸收或荧光变化或引起化学发光的发射的酶促反应来测量酶活性),合适的检测技术可以检测结合事件。可替代地,可以使用不需要使用标记的检测技术,例如基于测量质量(例如表面声波测量)、折射率(例如,表面等离子体共振测量)或者分析物的固有发光的技术。

[0470] 在一些实施例中,该检测剂与样品中特定细胞或细胞组分的缔合表示该样品可以含有肿瘤发生细胞,借此指示该患有癌症的个体可以用如本文所述的抗体或ADC有效地治疗。

[0471] 在某些优选的实施例中,测定可以包括免疫组织化学(IHC)测定或其变体(例如,荧光、显色、标准ABC、标准LSAB等)、免疫细胞化学或其变体(例如,直接、间接荧光、显色等)或原位杂交(ISH)或其变体(例如显色原位杂交(CISH)或荧光原位杂交(DNA-FISH或RNA-

FISH)。

[0472] 就这一点而言,本发明的某些方面包括使用标记的EMR2进行免疫组织化学(IHC)。更具体地,EMR2 IHC可以被用作一种诊断工具以帮助诊断各种增生性疾病并监测对于包括EMR2抗体疗法的治疗的潜在响应。在某些实施例中,EMR2将与一个或多个报道分子缀合。在其他实施例中,该EMR2抗体将是未标记的,并将用与一种或多种报道分子缔合的单独的试剂(例如抗鼠抗体)进行检测。如在此所论述并在下面实例中所示的,相容性诊断测定可以对已经化学地固定(包括但不限于:甲醛、戊二醛、四氧化锇、重铬酸钾、乙酸、醇类、锌盐类、氯化汞、四氧化铬及苦味酸)并包埋(包括但不限于:甲基丙烯酸乙二醇酯、石蜡及树脂)或经由冷冻保存的组织进行。这样的测定可以用于指导治疗决定并且确定给药方案及时程。

[0473] 本发明的其他特别相容的方面涉及使用原位杂交来检测或监测EMR2决定子。原位杂交技术或ISH是本领域技术人员所熟知的。简而言之,将细胞固定,并将含有特定核苷酸序列的可检测探针加入到固定的细胞中。如果细胞含有互补的核苷酸序列,则可以被检测到的探针会与它们杂交。使用本文所陈述的序列信息,可以设计探针来鉴定表达基因型EMR2决定子的细胞。探针优选地与对应于这样的决定子的核苷酸序列杂交。可以对杂交条件进行常规优化,以通过非完全互补杂交使背景信号最小化,尽管优选地探针优选与所选EMR2决定子完全互补。在所选实施例中,用附接于探针的荧光染料标记探针,通过标准荧光方法可容易地检测荧光染料。

[0474] 如本领域技术人员所知,相容性体内治疗剂或诊断测定可以包括本领域认可的成像或监测技术,如磁共振成像、计算机断层扫描(例如CAT扫描)、正电子断层扫描(例如PET扫描)、放射线照相术、超声波等。

[0475] 在某些实施例中,本发明的抗体可用于检测和定量患者样品(例如血浆或血液)中特定决定子(例如,EMR2蛋白)的水平,其转而可以用于检测、诊断或监测与相关决定子相关的增生性疾病。例如,血液和骨髓样品可以与流式细胞术结合使用以检测和测量EMR2表达(或另一种共表达的标记物),并监测疾病和/或治疗响应的进展。在相关实施例中,本发明的抗体可以用于在体内或体外对循环肿瘤细胞进行检测、监测和/或定量(WO 2012/0128801)。在仍其他实施例中,循环肿瘤细胞可以包含肿瘤发生细胞。

[0476] 在本发明的某些实施例中,可以在疗法或方案之前,使用所披露的抗体对受试者或来自受试者的样品中肿瘤发生细胞进行评估或表征,以确立一个基线。在其他实例中,可从衍生自经过治疗的受试者的样品评估肿瘤发生细胞。

[0477] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在体内分析癌症进展和/或发病机理的方法。在另一个实施例中,体内癌症进展和/或发病机理的分析包括确定肿瘤进展的程度。在另一个实施例中,分析包括肿瘤的鉴定。在另一个实施例中,肿瘤进展的分析是针对原发肿瘤进行的。在另一个实施例中,如本领域的普通技术人员所知,取决于癌症的类型,分析是随时间而进行的。在另一个实施例中,起源于原发肿瘤的转移性细胞的继发肿瘤的进一步分析是在体内进行的。在另一个实施例中,分析了继发肿瘤的尺寸和形状。在一些实施例中,进行了进一步离体分析。

[0478] 在另一个实施例中,本发明提供了一种在体内分析癌症进展和/或发病机理的方法,该方法包括确定细胞转移或对循环肿瘤细胞的水平进行检测并定量。在又一个实施例中,细胞转移的分析包括在与原发肿瘤不连续的部位处细胞的进行性生长的测定。在一

些实施例中,可以进行程序来检测经由血管系统、淋巴腺、体腔内或其组合分散的肿瘤细胞。在另一个实施例中,就细胞迁移、播散、外渗、增生或其组合进行了细胞转移分析。

[0479] 在某些实例中,可以在治疗之前,使用所披露的抗体对受试者或来自受试者的样品中的肿瘤发生细胞进行评估或表征,以确立一个基线。在其他实例中,样品源自受治疗的受试者。在一些实例中,在受试者开始或终止治疗之后至少约1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90天、6个月、9个月、12个月或>12个月,从该受试者取得样品。在某些实例中,在一定数量的剂量(例如,在2、5、10、20、30或更多剂量的疗法之后)之后对肿瘤发生细胞进行评估或表征。在其他实例中,在接受了一次或多次疗法之后的1周、2周、1个月、2个月、1年、2年、3年、4年或更多年之后对肿瘤发生细胞进行表征或评估。

[0480] B. 筛选

[0481] 在某些实施例中,本发明的抗体可用于筛选样品,以鉴定通过与决定子相互作用而改变肿瘤细胞的功能或活性的化合物或试剂(例如,抗体或ADC)。在一个实施例中,使肿瘤细胞与抗体或ADC接触,并且可以使用抗体或ADC来筛选表达某一靶标(例如EMR2)的细胞的肿瘤以鉴定这样的细胞用于包括但不限于诊断目的的目的,以监测这些细胞以确定治疗功效或以富集这种靶表达细胞的细胞群。

[0482] 在又一个实施例中,方法包括直接或间接地使肿瘤细胞与检测试剂或化合物接触,并确定该测试试剂或化合物是否调节与决定子相关的肿瘤细胞的活性或功能,例如,细胞形态或生活力的变化、标记物的表达、分化或去分化、细胞呼吸、线粒体活性、膜完整性、成熟、增生、生活力、凋亡或细胞死亡。直接相互作用的一个实例是物理相互作用,而间接相互作用包括例如组合物对中间分子的作用,而这又作用于参比实体(例如,细胞或细胞培养物)。

[0483] 筛选方法包括高通量筛选,其可以包括例如在培养皿、管、烧瓶、转瓶或板上定位或放置(任选地在预定位置)细胞阵列(例如微阵列)。高通量机械或人工处理方法可以在较短时间段内探查化学相互作用并且确定许多基因的表达水平。已经开发了以下技术,这些技术利用分子信号,例如经由荧光团或微阵列(Mocellin和Rossi,2007,PMID:17265713)以及以非常快的速度处理信息的自动化分析(参见,例如,Pinhasov等人,2004,PMID:15032660)。可以筛选的文库包括例如,小分子文库、噬菌体展示文库、完全人抗体酵母展示文库(艾迪玛公司(Adimab))、siRNA文库及腺病毒转染载体。

[0484] VII. 药物制剂和治疗应用

[0485] A. 配制品和给药途径

[0486] 本发明的抗体或ADC可以使用本领域认可的技术以各种方式配制。在一些实施例中,本发明的治疗性组合物能以纯形式或与最少量的另外组分一起给予,而其他组分可以任选地被配制以含有合适的药学上可接受的载体。如在此所使用,“药学上可接受的载体”包含本领域熟知的赋形剂、媒介物、佐剂和稀释剂,并且可以从商业来源获得,用于药物配制(参见,例如,Gennaro(2003)Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus[雷明顿:制药科学与实践及药物事实与比较:药物事实],第20版,默克出版公司(Mack Publishing);Ansel等人(2004)Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems[药物剂型与药物递送系统],第7版,Lippencott Williams和Wilkins;Kibbe等人,(2000)Handbook of Pharmaceutical

Excipients[药物赋形剂手册],第3版,医药出版社(Pharmaceutical Press))。

[0487] 合适的药学上可接受的载体包含相对呈惰性的物质并且可以促进抗体或ADC的施用,或者可以帮助将活性化合物加工成被药学上优化用于递送至作用部位的制剂。

[0488] 这样的药学上可接受的载体包括可以改变配制品的形式、稠度、粘度、pH、张力、稳定性、渗透压、药物代谢动力学、蛋白质聚集或溶解度的试剂,并且包括缓冲剂、润湿剂、乳化剂、稀释剂、成胶囊剂和皮肤渗透促进剂。载体的某些非限制性实例包括盐水、缓冲盐水、右旋糖、精氨酸、蔗糖、水、甘油、乙醇、山梨糖醇、葡聚糖、羧甲基纤维素钠及其组合。用于全身给药的抗体可以被配制用于肠、肠胃外或局部给药。事实上,可以同时使用全部三种类型的配制品来实现活性成分的全身给药。赋形剂以及供肠胃外和非肠胃外药物递送的配制品陈述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:制药科学与实践](2000),第20版,默克出版公司(Mack Publishing)中。

[0489] 用于肠给药的适合配制品包括硬或软明胶胶囊、丸剂、片剂(包括包衣片剂)、酞剂、悬浮液、糖浆或吸入剂及其控制释放形式。

[0490] 适用于胃肠外给药(例如通过注射)的配制品包括水性或非水性、等渗、无热原的无菌液体(例如溶液、悬浮液),其中活性成分溶解、悬浮或以其他方式提供(例如,在脂质体或其他微粒中)。这些液体可以另外含有其他药学上可接受的载体,例如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂和使配制品与预期的受体的血液(或其他相关的体液)等渗的溶质。赋形剂的实例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。用于这种配制品的合适的等渗的药学上可接受的载体的实例包括氯化钠注射液、林格氏溶液或乳酸林格氏注射液。

[0491] 在特别优选的实施例中,可以将本发明的经配制的组合物冻干以提供可在给予前重建的抗体或ADC的粉末形式。用于制备可注射溶液的无菌粉末可以通过冻干包含所披露的抗体或ADC的溶液来产生,以产生包含活性成分以及任何可选的共溶解的生物相容性成分的粉末。一般而言,通过将活性化合物掺入含有基本分散介质或溶剂(例如,稀释剂)以及任选地其他生物相容成分的无菌媒介物中来制备分散液或溶液。相容性稀释剂是药学上可接受的(对人给予是安全无毒的)稀释剂,并且可用于制备液体配制品,如冻干后重溶的配制品。示例性稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。在一个替代性实施例中,稀释剂可以包括盐和/或缓冲剂的水性溶液。

[0492] 在某些优选的实施例中,抗EMR2抗体或ADC将与药学上可接受的糖组合一起冻干。“药学上可接受的糖”是当与感兴趣的蛋白质结合时显著防止或减少蛋白质在储存时的化学和/或物理不稳定性的分子。当旨在冻干配制品,然后重组。如在此所使用,药学上可接受的糖也可以被称为“冻干保护剂”。示例性糖及其相应的糖醇包括:氨基酸,如谷氨酸一钠或组氨酸;甲胺,如甜菜碱;易溶盐,如硫酸镁;多元醇如三元或更高分子量的糖醇,例如甘油、葡聚糖、赤藓糖醇、丙三醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇;丙二醇;聚乙二醇;PLURONICS®;及其组合。另外的示例性冻干保护剂包括甘油和明胶以及糖,即蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖和水苏糖。还原糖的实例包括葡萄糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖和乳果糖。非还原糖的实例包括选自糖醇和其他直链多元醇的多羟基化合物的非还原糖苷。优选的糖醇是单糖苷,尤其是通过还原二糖(如乳糖、麦芽糖、乳果糖和麦芽酮

糖)而获得的那些化合物。糖苷侧基可以是糖苷的或半乳糖苷的。糖醇的另外的实例是葡萄糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇和异麦芽酮糖。优选的药学上可接受的糖是非还原糖,如海藻糖或蔗糖。药学上可接受的糖以“保护量”加入到配制品中(例如冻干前),这意味着蛋白质在储存期间(例如在重溶和储存之后)基本上保持其物理和化学稳定性和完整性。

[0493] 本领域技术人员将理解的是,可将相容性冻干保护剂添加到液体或冻干配制品中,添加浓度范围为从约1mM至约1000mM、从约25mM至约750mM、从约50mM至约500mM、从约100mM至约300mM、从约125mM至约250mM、从约150mM至约200mM或从约165mM至约185mM。在某些实施例中,可添加一种或多种冻干保护剂以提供如下浓度:约10mM、约25mM、约50mM、约75mM、约100mM、约125mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约165mM、约170mM、约175mM、约180mM、约185mM、约190mM、约200mM、约225mM、约250mM、约300mM、约400mM、约500mM、约600mM、约700mM、约800mM、约900mM、或约1000mM。在某些优选的实施例中,该一种或多种冻干保护剂可以包含药学上可接受的糖。在特别优选的方面,药学上可接受的糖将包含海藻糖或蔗糖。

[0494] 在其他选定的实施例中,本发明的液体和冻干配制品可以包含某些化合物(包括氨基酸或其药学上可接受的盐),以用作稳定剂或缓冲剂。可以添加这类化合物,添加浓度范围为从约1mM至约100mM、从约5mM至约75mM、从约5mM至约50mM、从约10mM至约30mM或从约15mM至约25mM。在某些实施例中,可添加一种或多种缓冲剂以提供如下浓度:约1mM、约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约50mM、约60mM、约70mM、约80mM、约90mM、或约100mM。在其他选定的实施例中,可添加缓冲剂以提供如下浓度:约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约50mM、约60mM、约70mM、约80mM、约90mM、或约100mM。在某些优选实施例中,缓冲剂将包含组氨酸盐酸盐。

[0495] 在又其他选定的实施例中,本发明的液体和冻干配制品可以包含作为稳定剂的非离子表面活性剂,例如聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60或聚山梨酯80。可以添加这类化合物,添加浓度范围为从约0.1mg/ml至约2.0mg/ml、从约0.1mg/ml至约1.0mg/ml、从约0.2mg/ml至约0.8mg/ml、从约0.2mg/ml到约0.6mg/ml或从约0.3mg/ml到约0.5mg/ml。在某些实施例中,可以添加表面活性剂以提供如下浓度:约0.1mg/ml、约0.2mg/ml、约0.3mg/ml、约0.4mg/ml、约0.5mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml或约1.0mg/ml。在其他选定的实施例中,可以添加表面活性剂以提供如下浓度:约1.1mg/ml、约1.2mg/ml、约1.3mg/ml、约1.4mg/ml、约1.5mg/ml、约1.6mg/ml、约1.7mg/ml、约1.8mg/ml、约1.9mg/ml或约2.0mg/ml。在某些优选的实施例中,该表面活性剂将包含聚山梨酯20或聚山梨酯40。

[0496] 无论是从冻干粉或天然溶液中重溶,用于肠胃外给药(例如静脉内注射)的所披露的抗体或ADC的相容性配制品可以包含从约10 μ g/mL至约100mg/mL的ADC或抗体浓度。在某些选定的实施例中,抗体或ADC浓度将包含20 μ g/mL、40 μ g/mL、60 μ g/mL、80 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、300 μ g/mL、400 μ g/mL、500 μ g/mL、600 μ g/mL、700 μ g/mL、800 μ g/mL、900 μ g/mL或1mg/mL。在其他实施例中,ADC浓度将包含2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL、5mg/mL、6mg/mL、8mg/mL、10mg/mL、12mg/mL、14mg/mL、16mg/mL、18mg/mL、20mg/mL、25mg/mL、30mg/mL、35mg/mL、40mg/mL、45mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL或100mg/mL。

[0497] 在某些优选方面,本发明的组合物将包含如下液体配制品,该配制品包含10mg/ml EMR2 ADC、20mM组氨酸盐酸盐、0.175M蔗糖、0.4mg/ml聚山梨酯20(pH 6.0)。在一方面,本发

明的组合物包含10mg/ml EMR2 ADC、20mM组氨酸盐酸盐、0.175M蔗糖、0.4mg/mL聚山梨酯20 (pH 6.0)。在另一方面,本发明的组合物包含10mg/ml EMR2 ADC、20mM组氨酸盐酸盐、0.175M蔗糖、0.4mg/mL聚山梨酯20 (pH 6.0)。如本文所论述,可将这种液体配制品冻干以提供可在使用前用药学上相容的(例如,水性)载体进行重溶的粉末状组合物。当在液体溶液中时,此类组合物应优选储存在-70℃并避光。当冻干时,该EMR2 ADC粉末状配制品应优选储存在2℃-8℃并避光。前述溶液或粉末中的每一者优选包含在与指示适当储存条件的标记相关联的无菌玻璃瓶(例如USP I型10ml)中且可经构型以始终提供一定体积(例如3mL或5mL)的10mg/mL EMR2 ADC(在天然或重溶溶液中)。

[0498] 无论是否从冻干粉末重溶,液体EMR2 ADC配制品(例如,如上所陈述)可以在给予之前进一步被稀释(优选在水性载体中)。例如,上述液体配制品可以进一步被稀释到含有0.9%氯化钠注射液、USP或等效物(作必要的修正)的输液袋中,以达到用于给药的所需剂量水平。在某些方面,完全稀释的EMR2 ADC溶液将经由静脉内输注使用IV装置进行给予。优选地,所给予的EMR2 ADC药物溶液(无论通过静脉内(IV)输注还是注射)是透明的、无色的并且没有可见颗粒。

[0499] 本发明的化合物和组合物可以通过不同途径在体内给予于对其有需要的受试者,包括但不限于,口服、静脉内、动脉内、皮下、肠胃外、鼻内、肌肉内、心脏内、室内、气管内、口腔、直肠、腹膜内、皮内、局部、透皮及胸内,或以其他方式通过植入或吸入给予。主题组合物可以被配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂;包括但不限于片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、灌肠剂、注射液、吸入剂和气溶胶。适合的配制品和给药途径可以根据预定的应用和治疗方案选择。

[0500] B. 剂量和给药方案

[0501] 特定的剂量方案,即,剂量、时程及重复,将取决于特定的个体以及经验考虑,如药物动力学(例如半衰期、清除率等)。给药频率的确定可以由本领域技术人员(如主治医师)基于以下考虑来作出:所治疗的病症和所治疗的病症的严重程度,所治疗的受试者的年龄和一般健康状态等。可以在治疗过程中基于评估所选组合物和给药方案的疗效来调整给药频率。可以基于特定疾病、障碍或病症的标记进行这种评估。在个体患有癌症的实施例中,这些包括:经由触诊或目测观察直接测量肿瘤大小;通过x射线或其他成像技术间接测量肿瘤大小;如通过直接肿瘤活检和肿瘤样品的显微镜检查所评估的改善;间接肿瘤标记物(例如,对于前列腺癌的PSA)或根据本文描述的方法鉴定的抗原的测量;增生性细胞或肿瘤发生细胞的数量减少;维持这样的增生性细胞的减少;增生性细胞的增生的减少;或延缓转移的发展。

[0502] 本发明的EMR2抗体或ADC可以多种范围给予。这些包括约5μg/kg体重至约100mg/kg体重/剂量;约50μg/kg体重至约5mg/kg体重/剂量;约100μg/kg体重至约10mg/kg体重/剂量。其他范围包括每剂约100μg/kg体重到约20mg/kg体重,和每剂约0.5mg/kg体重到约20mg/kg体重。在某些实施例中,该剂量为至少约100μg/kg体重、至少约250μg/kg体重、至少约750μg/kg体重、至少约3mg/kg体重、至少约5mg/kg体重、至少约10mg/kg体重。

[0503] 在所选实施例中,EMR2抗体或ADC将以每剂约10、20、30、40、50、60、70、80、90或100 μg/kg体重给予(优选静脉内)。其他实施例可以包括以每剂约200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900或2000μg/kg体重给予

抗体或ADC。在其他实施例中,所披露的缀合物将以2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、9或10mg/kg给予。在仍其他实施例中,这些缀合物能以每剂12、14、16、18或20mg/kg体重给予。在又其他实施例中,这些缀合物能以每剂25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、90或100mg/kg体重给予。根据此处的传授内容,本领域技术人员可以基于临床前动物研究、临床观察结果以及标准医疗和生物化学技术及测量容易地确定不同EMR2抗体或ADC的适当剂量。

[0504] 其他给药方案可以根据体表面积(BSA)计算值判定,如U.S.P.N.7,744,877中所披露。如众所周知的,BSA是使用患者的身高和体重进行计算并且提供了如通过他或他的体表面积所表示的受试者的体格的量度。在某些实施例中,这些缀合物能以从1mg/m²到800mg/m²、从50mg/m²到500mg/m²的剂量并且以100mg/m²、150mg/m²、200mg/m²、250mg/m²、300mg/m²、350mg/m²、400mg/m²或450mg/m²的剂量给予。还应理解的是,可以使用本领域认可的并且凭经验的技术来确定适当剂量。

[0505] 可以按特定方案给予抗EMR2抗体或ADC。一般而言,将EMR2缀合物的有效剂量给予受试者一次或多次。更特别地,该ADC的有效剂量是一个月一次、一个月超过一次或一个月不到一次给予受试者。在某些实施例中,EMR2抗体或ADC的有效剂量可以给予多次,包括持续至少一个月、至少六个月、至少一年、至少两年的时间或若干年的时间。在又其他实施例中,所披露的抗体或ADC的给药之间可以间隔若干天(2、3、4、5、6或7)、若干周(1、2、3、4、5、6、7或8)或若干月(1、2、3、4、5、6、7或8),或甚至一年或若干年。

[0506] 在一些实施例中,涉及缀合抗体的治疗过程将包括在数周或数月的时间段内的多剂量的所选药物。更具体地,本发明的抗体或ADC可以每天、每两天、每四天、每周、每十天、每两周、每三周、每个月、每六周、每两个月、每十周或每三个月给予一次。就这一点而言,应理解的是,基于患者响应和临床实践,这些剂量可以改变或该时间间隔可以调整。本发明还涵盖分成若干部分给药的不连续给药或每日剂量。本发明的组合物和抗癌剂可以在隔日或隔周可互换地给予;或可以给出一系列抗体治疗,之后是一次或多次的抗癌剂疗法治疗。在任何情况下,如本领域的普通技术人员所了解,化学治疗剂的适当剂量一般大约为将在临床疗法中已经采用的那些,其中这些化学治疗剂是单独或与其他化学治疗剂组合给与。

[0507] 在另一个实施例中,本发明的EMR2抗体或ADC可以用于维持疗法中以在该疾病最初出现之后降低或消除肿瘤复发的几率。优选地,该病症将经过治疗并且最初的肿块消除、减小或以其他方式改善,由此该患者是无症状的或得到缓和。此时,可以给予该受试者药理学上有效量的所披露的抗体一次或多次,即使是使用标准诊断程序存在极少或无疾病指征。

[0508] 在另一个优选实施例中,本发明的调节剂可以用于预防或作为一种辅助疗法以预防或降低在减瘤程序之后肿瘤转移的可能性。如本披露中所使用,“减瘤程序”意指任何减少肿瘤块或减轻肿瘤负荷或肿瘤增生的程序、技术或方法。示例性减瘤剂包括但不限于,手术、放射治疗(即,射束放射)、化学疗法、免疫疗法或切除。在本领域技术人员根据本披露容易地确定的适当时间,所披露的ADC可以如通过临床、诊断或治疗诊断程序所提出来给予,以减少肿瘤转移。

[0509] 本发明的又其他实施例包括向无症状但有发生癌症的风险的受试者给予所披露的抗体或ADC。也就是说,本发明的抗体或ADC可以在真正预防意义上使用并且提供给经过检查或测试并且具有一个或多个所述风险因素(例如,染色体组指征、家族史、体内或体外

测试结果等)但尚未显现赘瘤的患者。

[0510] 对用于已经提供一次或多次给药的个体中所披露的治疗性组合物的剂量和方案也可以凭经验确定。举例来说,可以给个体递增剂量的如在此所描述制造的治疗性组合物。在所选实施例中,对应地基于凭经验确定或观察的副作用或毒性,可以使该剂量逐渐增加或减少或衰减。为了评估所选组合物的功效,可以如先前所描述,跟踪特定疾病、病症或病状的标记物。对于癌症,这些包括经由触诊或目测观察来直接测量肿瘤大小、通过x射线或其他成像技术来间接测量肿瘤大小;如通过直接肿瘤活检和肿瘤样品的显微镜检查所评估的改善;间接肿瘤标记物(例如,对于前列腺癌的PSA)根据在此描述的方法鉴定的肿瘤发生抗原的测量;疼痛或麻痹的减少;言语、视力、呼吸或与肿瘤相关的其他能力丧失的改善;食欲增加;或如通过公认测试所测量的生活质量增加或存活期延长。本领域技术人员应清楚的是,该剂量将取决于个体、赘生性病状的类型、赘生性病状的阶段、该赘生性病状是否已经开始转移到个体中的其他位置以及过去和当前所使用的治疗而变化。

[0511] C. 组合疗法

[0512] 如上述组合疗法所提及的组合可特别适用于减少或抑制非所需的赘生性细胞增殖、减少癌症发生率、减少或预防癌症复发,或减少或预防癌症扩散或转移。在这些情形中,本发明的抗体或ADC可以通过去除CSC而充当敏化剂或化学敏化剂,这些试剂将以其他方式支持并且维持肿块并借此允许更有效地使用当前的医疗标准的减瘤剂或抗癌剂。也就是说,在某些实施例中,所披露的抗体或ADC可以提供一种增强的作用(例如,加和性或协同性),由此加强了另一种给予的治疗剂的作用模式。在本发明的上下文中,“组合疗法”应当在广义上解释并且仅仅是指抗EMR2抗体或ADC以及一种或多种抗癌剂的给予,这些抗癌剂包括但不限于,细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、抗血管生成剂、减瘤剂、化学治疗剂、放射疗法及放射治疗剂、靶向性抗癌剂(包括单克隆抗体和小分子实体)、BRM、治疗性抗体、癌症疫苗、细胞因子、激素疗法、放射疗法以及抗转移剂和免疫治疗剂,包括特异性和非特异性方法。

[0513] 这些组合的结果无需为当分开地进行每种治疗(例如抗体和抗癌剂)时所观察的作用的加和。尽管至少加和作用一般是所希望的,但超出单一疗法之一的任何增加的抗肿瘤作用都是有益的。另外,本发明不需要组合治疗展现出协同作用。然而,本领域技术人员应理解,在包含优选实施例的某些所选组合情况下,可以观察到协同作用。

[0514] 因此,在某些方面,组合疗法相比于(i)单独使用的抗EMR2抗体或ADC,或(ii)单独使用的治疗性部分,或(iii)在不添加抗EMR2抗体或ADC的情况下使用治疗性部分与另一治疗性部分的组合,具有治疗协同作用或改善了癌症治疗中可测量的治疗效果。如在此所使用的术语“治疗协同作用”是指抗EMR2抗体或ADC以及一种或多种治疗性部分的组合,该组合具有大于抗EMR2抗体或ADC或一种或多种治疗性部分的组合的累加效应的治疗效果。

[0515] 通过与对照或基线测量进行比较来量化所披露的组合的期望结果。如在此所使用,相关术语,如“改善”、“增加”或“减少”指示相对于对照的值,如在本文所述的治疗开始之前在同个体中的测量,或在一个对照个体(或多个对照个体)中不存在本文所述的抗EMR2抗体或ADC的情况下但在其他治疗性部分(如标准护理治疗)存在的情况下的测量。代表性对照个体是与所治疗的个体患有相同类型的癌症的个体,其与所治疗的个体是大约同一年龄的(以确保治疗的个体和对照个体中的疾病阶段是可比较的)。

[0516] 对治疗响应上的改变或改善通常是统计学上显著的。如本文所使用的,术语“显著性”或“显著的”涉及两个或更多个实体之间存在非随机关联的概率的统计分析。为了确定关系是否是“显著的”或具有“显著性”,可以计算“p值”。低于用户定义的截断点的P值被认为是显著的。p值小在或等在0.1、小在0.05、小在0.01、小在0.005或小在0.001可视为显著。

[0517] 协同治疗效果可以是比由单一治疗性部分或抗EMR2抗体或ADC引起的治疗效果,或由抗EMR2抗体或ADC或给定组合的单一治疗性部分引起的治疗效果的总和大至少约两倍、或至少约五倍、或至少约十倍、或至少约二十倍、或至少约五十倍、或至少约一百倍的效果。与由单一治疗性部分或抗EMR2抗体或ADC引起的治疗效果,或由抗EMR2抗体或ADC或给定组合的单一治疗性部分引起的治疗效果的总和相比,协同治疗效果也可以被观察为至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%或更多的治疗效果的增加。协同效应也是一种当组合使用时允许减少治疗剂给药剂量的效果。

[0518] 在实行组合疗法时,可以向受试者以单一组合物形式或以两种或更多种相异的组合物形式使用相同或不同给药途径同时地给予抗EMR2抗体或ADC以及一种或多种治疗性部分。可替代地,使用抗EMR2抗体或ADC的治疗可以在治疗性部分治疗之前或之后以例如从数分钟到数周范围内的时间间隔进行。在一个实施例中,该治疗性部分和抗体或ADC是彼此在约5分钟到约两周内给予。在又其他实施例中,该抗体与治疗性部分的给药之间可以间隔若干天(2、3、4、5、6或7)、若干周(1、2、3、4、5、6、7或8)或若干月(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0519] 该组合疗法可以被给予直至病症以不同安排(如每日一次、两次或三次,每两天一次,每三天一次,每周一次,每两周一次,每个月一次,每两个月一次,每三个月一次,每六个月一次)被治疗、减轻或治愈,或者可以连续地给予。该抗体和一种或多种治疗性部分可以在隔日或隔周给予;或可以给出一系列抗EMR2抗体或ADC治疗,之后是使用另外的治疗性部分的一次或多次治疗。在一个实施例中,将抗EMR2抗体或ADC与一个或多个治疗性部分组合给予用于短的治疗周期。在其他实施例中,给予该组合疗法用于长的治疗周期。可以经由任何途径给予该组合疗法。

[0520] 在所选实施例中,本发明的化合物和组合物可以与检查点抑制剂(如PD-1抑制剂或PD-L1抑制剂)联合使用。PD-1及其配体PD-L1是抗肿瘤T淋巴细胞应答的负调节剂。在一个实施例中,组合疗法可以包括将抗EMR2抗体或ADC与抗PD-1抗体(例如,派姆单抗、纳武单抗、佩蒂单抗(pidilizumab))以及任选地一种或多种其他治疗性部分一起给予。在另一个实施例中,组合疗法可以包括将抗EMR2抗体或ADC与抗PD-L1抗体(例如,艾维单抗(avelumab)、阿特朱单抗(atenzolizumab)、杜维单抗(durvalumab))以及任选地一种或多种其他治疗性部分一起给予。在又另一个实施例中,组合疗法可以包括将抗EMR2抗体或ADC与抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体一起给予于在用检查点抑制剂和/或靶向BRAF组合疗法(例如,威罗菲尼或达拉菲尼)治疗后持续进展的患者。

[0521] 在一些实施例中,抗EMR2抗体或ADC可以与各种一线癌症疗法组合使用。因此,在所选实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和细胞毒性剂(如异环磷酰胺、丝裂霉素C、长春地辛、长春碱、依托泊苷、伊立替康、吉西他滨、紫杉烷、长春瑞滨、甲氨蝶呤和培美曲塞)以及任选地一种或多种其他治疗性部分。在某些赘生性指示物(例如,血液学指示物,如AML或多发性骨髓瘤)中,所披露的ADC可以与细胞毒性剂如阿糖胞苷(AraC)加上葱环霉

素(阿柔比星、安吡啶、阿霉素、柔红霉素、伊达比星等)或米托蒽醌、氟达拉滨、羟基脲、氯法拉滨、cloretazine组合使用。在其他实施例中,本发明的ADC可以与G-CSF或GM-CSF引发、脱甲基化试剂如阿扎胞苷或地西他滨、FLT3选择性酪氨酸激酶抑制剂(例如,米哌妥林、来他替尼和舒尼替尼)、全反式视黄酸(ATRA)和三氧化二砷组合给予(其中后两种组合可以对急性早幼粒细胞白血病(APL)特别有效)。

[0522] 在另一个实施例中,该组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和铂基药物(例如卡铂或顺铂)以及任选地一种或多种其他治疗性部分(例如长春瑞滨;吉西他滨;紫杉烷,例如像多西他赛或紫杉醇;伊立替康;或培美曲塞)。

[0523] 在某些实施例中,例如在BR-ERPR、BR-ER或BR-PR癌症的治疗中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和一种或多种描述为“激素疗法”的治疗性部分。如在此所使用的“激素疗法”是指例如他莫昔芬;促性腺激素或黄体生成释放激素(GnRH或LHRH);依维莫司和依西美坦;托瑞米芬;或芳香酶抑制剂(例如阿那曲唑、来曲唑、依西美坦或氟维司群)。

[0524] 在另一个实施例中,例如在BR-HER2的治疗中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和曲妥珠单抗或阿多-曲妥珠单抗恩他新(Kadcyla)以及任选地一种或多种其他治疗性部分(例如帕妥珠单抗和/或多西他赛)。

[0525] 在一些实施例中,例如在转移性乳腺癌的治疗中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和紫杉烷(例如多西他赛或紫杉醇)以及任选地一种或多种另外的治疗性部分,例如蒽环霉素(例如阿霉素或表柔比星)和/或艾日布林。

[0526] 在另一个实施例中,例如,在转移性或复发性乳腺癌或BRCA突变型乳腺癌的治疗中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和甲地孕酮以及任选地一种或多种另外的治疗性部分。

[0527] 在另外的实施例中,例如,在BR-TNBC的治疗中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和聚ADP核糖聚合酶(PARP)抑制剂(例如BMN-673、奥拉帕尼、rucaparib和维利帕尼(veliparib))以及任选地一种或多种另外的治疗性部分。

[0528] 在另一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和PARP抑制剂以及任选的一种或多种其他治疗性部分。

[0529] 在另一个实施例中,例如在乳腺癌的治疗中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和环磷酰胺以及任选地一种或多种另外的治疗性部分(例如阿霉素、紫杉烷、表柔比星、5-FU和/或氨甲蝶呤)。

[0530] 在另一个实施例中,用于治疗EGFR阳性NSCLC的组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和阿法替尼以及任选地一种或多种其他治疗性部分(例如埃罗替尼和/或贝伐单抗)。

[0531] 在另一个实施例中,用于治疗EGFR阳性NSCLC的组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和埃罗替尼以及任选地一种或多种其他治疗性部分(例如贝伐单抗)。

[0532] 在另一个实施例中,用于治疗ALK阳性NSCLC的组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和色瑞替尼(Zykadia)以及任选地一种或多种其他治疗性部分。

[0533] 在另一个实施例中,用于治疗ALK阳性NSCLC的组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和克唑替尼(Xalcori)以及任选地一种或多种其他治疗性部分。

[0534] 在另一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和贝伐单抗以及任选地一种或多种其他治疗性部分(例如吉西他滨或紫杉烷(例如像多西他赛或紫杉醇));和/或铂

类似物)。

[0535] 在另一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和贝伐单抗以及任选地环磷酰胺。

[0536] 在具体的实施例中,用于治疗铂抗性肿瘤的组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和阿霉素和/或依托泊苷和/或吉西他滨和/或长春瑞滨和/或异环磷酰胺和/或亚叶酸调节的5-氟尿嘧啶和/或贝伐单抗和/或他莫昔芬;以及任选地一种或多种其他治疗性部分。

[0537] 在所选实施例中,所披露的抗体和ADC可以与某些类固醇组合使用,以潜在地使治疗过程更有效并减少副作用,如炎症、恶心和过敏。可以与本发明的ADC组合使用的示例性类固醇包括但不限于氢化可的松、地塞米松、甲基泼尼松龙和泼尼松龙。在特别优选的方面,类固醇将包含地塞米松。

[0538] 在一些实施例中,抗EMR2抗体或ADC可以与各种一线黑素瘤疗法组合使用。在一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和达卡巴嗪以及任选地一种或多种其他治疗性部分。在另外的实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和替莫唑胺以及任选地一种或多种其他治疗性部分。在另一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和铂基治疗性部分(例如卡铂或顺铂)以及任选地一种或多种其他治疗性部分。在一些实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和长春花生物碱治疗性部分(例如,长春碱、长春瑞滨、长春新碱或长春地辛)以及任选地一种或多种其他治疗性部分。在一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和白细胞介素-2以及任选地一种或多种其他治疗性部分。在另一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和干扰素- α 以及任选地一种或多种其他治疗性部分。

[0539] 在其他实施例中,抗EMR2抗体或ADC可以与辅助性黑素瘤治疗和/或外科手术(例如肿瘤切除术)组合使用。在一个实施例中,组合疗法包括使用抗EMR2抗体或ADC和干扰素- α 以及任选地一种或多种其他治疗性部分。

[0540] 本发明还提供了抗EMR2抗体或ADC与放射疗法的组合。如本文所使用的术语“放射疗法”是指用于在肿瘤细胞内诱导局部DNA损伤的任何机制,如 γ 照射、X射线、UV照射、微波、电子发射等。还涵盖了使用放射性同位素向肿瘤细胞的定向传递的组合疗法,并且该疗法可以组合或作为本文所披露的抗EMR2抗体的缀合物使用。典型地,放射疗法是以脉冲方式经一段从约1到约2周的时间给予。任选地,该放射疗法可以按单次剂量或按多次连续剂量给予。

[0541] 在其他实施例中,抗EMR2抗体或ADC可以与下述一种或多种化学治疗剂组合使用。

[0542] D. 抗癌剂

[0543] 如在此所使用的术语“抗癌剂”是“治疗性部分”的一个子集,其又是被描述为“药学活性部分”的药剂的子集。更特别地,“抗癌剂”是指可以用于治疗细胞增生性病征(如癌症)的任何药剂(或其药学上可接受的盐),并且包括但不限于,细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、抗血管生成剂、减瘤剂、化学治疗剂、放射治疗剂、靶向性抗癌剂、生物反应修饰剂、治疗性抗体、癌症疫苗、细胞因子、激素疗法、抗转移剂以及免疫治疗剂。注意,前述抗癌剂的分类并不排除彼此,并且所选药剂可以分为一个或多个类别。例如,相容性抗癌剂可以被分类为细胞毒性剂和化学治疗剂。因此,前述术语中的每一个都应当根据本披露并且然后根据它们在医学领域中的使用来解释。

[0544] 在优选的实施例中,抗癌剂可以包括抑制或消除,或设计成抑制或消除癌细胞或可能变为癌性或产生肿瘤发生子代(例如肿瘤发生细胞)的细胞的任何化学试剂(例如化学治疗剂)。就这一点而言,所选化学试剂(细胞周期依赖性试剂)经常针对细胞生长或分裂必需的细胞内过程,并且因此针对一般迅速生长并且分裂的癌性细胞特别有效。例如,长春新碱使微管蛋白解聚合,并由此抑制迅速分裂的肿瘤细胞进入有丝分裂。在其他情况下,所选化学试剂是不依赖于细胞周期的试剂,其在其生命周期的任何时间点干扰细胞存活,并且可能对定向治疗剂(例如ADC)有效。举例来说,某些吡咯并苯并二氮杂卓与细胞DNA的小沟结合并在递送至细胞核时抑制转录。关于组合疗法或ADC组分的选择,应理解的是,鉴于本披露,本领域技术人员可容易地鉴定相容性细胞周期依赖性试剂和不依赖于细胞周期的试剂。

[0545] 在任何情况下,并且如上所暗指,应理解的是,除了本文所披露的抗EMR2抗体和ADC之外,所选抗癌剂还可以彼此(例如,CHOP疗法)组合给予。此外,应进一步理解的是,在所选实施例中,这样的抗癌剂可以包含缀合物并且可以在给药之前与抗体缔合。在某些实施例中,所披露的抗癌剂将与抗EMR2抗体连接以提供如本文所披露的ADC。

[0546] 如在此所使用,术语“细胞毒性剂”(或细胞毒素)通常是指对细胞有毒的物质,因为其降低或抑制细胞功能和/或引起肿瘤细胞的破坏。在某些实施例中,该物质是源自活生物体或其类似物(从天然来源纯化或合成制备的)的天然存在的分子。细胞毒性剂的实例包括但不限于以下小分子毒素或酶活性毒素:细菌(例如卡奇霉素、白喉毒素、绿脓杆菌内毒素和外毒素、葡萄球菌肠毒素A)、真菌(例如, α -帚曲菌素、局限曲菌素)、植物(例如,相思豆毒素、蓖麻毒素、葫莲根毒蛋白、槲寄生素、美洲商陆抗病毒蛋白、皂草毒素、白树毒素、苦瓜毒素、天花粉毒素、大麦毒素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、垂序商陆蛋白[PAPI、PAPII及PAP-S]、苦瓜抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、米特格林(mitegellin)、局限曲菌素、酚霉素、新霉素及单端孢霉烯族毒素)或动物(例如,细胞毒性RNA酶,如细胞外胰腺RNA酶;DNA酶I,包括其片段和/或变体)。本文陈述了包括某些放射性同位素、美登木素生物碱、澳瑞他汀、多拉司他汀、多卡米新、鹅膏蕈碱和吡咯并苯并二氮杂卓的另外的相容性细胞毒性剂。

[0547] 更一般而言,可以与本发明的抗体组合(或缀合)使用的细胞毒性剂或抗癌剂的实例包括但不限于:烷化剂、烷基磺酸酯、阿那曲唑、鹅膏蕈碱、氮丙啶、乙烯亚胺及甲基三聚氰胺、多聚乙酰、喜树碱、BEZ-235、硼替佐米、苔藓抑素、海绵他汀、CC-1065、色瑞替尼、克唑替尼、念珠藻环肽、多拉斯他汀、多卡米新、伊斯罗宾、埃罗替尼、水鬼蕉碱、萨克丁特(sarcodictyin)、海绵素、氮芥、抗生素、烯二炔达内霉素、双膦酸酯、埃斯波霉素、色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、坎磷酰胺、卡拉比星、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、环磷酰胺、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、依西关坦、氟尿嘧啶、氟维司群、吉非替尼、伊达比星、拉帕替尼、来曲唑、洛那法尼、麻西罗霉素、乙酸甲地孕酮、丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、帕唑帕尼、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、雷帕霉素、罗多比星、索拉非尼、链黑霉素、链脲佐菌素、三苯氧胺、柠檬酸三苯氧胺、替莫唑胺、tepodina、替吡法尼、杀结核菌素、乌苯美司、凡德他尼、伏氯唑、XL-147、净司他汀、佐柔比星;抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、雄激素、抗肾上腺素、叶酸补充剂(如甲酰四氢叶酸)、醋葡醛内酯、醛磷酰胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶、安吡啶、贝斯特布斯

(bestrabucil)、比生群、伊达曲沙、地磷酰胺、秋水仙胺、地吡醌、依氟鸟氨酸、依利醋铵、艾普塞隆、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、罗尼达宁(lonidainine)、类美登醇、米托胍脞、米托蒽醌、莫哌达醇、尼曲瑞林(nitraerine)、喷司他丁、蛋氨酸芥、比柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙胍、丙卡巴胍、多糖复合物、雷佐生;根瘤菌素;SF-1126、西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素(T-2毒素、疣孢菌素A、漆斑菌素A及蛇形菌素);乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;盖克托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷;环磷酰胺;塞替派;紫杉烷、苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲胺蝶呤;铂类似物、长春花碱;铂;依托泊苷;异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞宾;诺消灵;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;西罗达;伊班膦酸盐;伊立替康、拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸;视黄醇;卡培他滨;康普瑞汀;亚叶酸;奥沙利铂;XL518,PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR及VEGF-A的抑制剂,这些抑制剂减少细胞增生;及以上任一项的药学上可接受的盐或溶剂化物、酸或衍生物。这一定义中还包括用于调控或抑制对于肿瘤的激素作用的抗激素剂,如抗雌激素和选择性雌激素受体抗体,抑制酶芳香酶的芳香酶抑制剂,这些抑制剂调控肾上腺中雌激素的产生,及抗雄激素;以及曲沙他滨(1,3-二氧杂环戊烷核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸、核糖酶,如VEGF表达抑制剂和HER2表达抑制剂;疫苗,PROLEUKIN®rIL-2:LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂;ABARELIX®rmRH;长春瑞宾和埃斯波霉素,及以上任一项的药学上可接受的盐或溶剂化物、酸或衍生物。

[0548] 相容性细胞毒性剂或抗癌剂还可以包含商业上或临床上可用的化合物,如埃罗替尼(TARCEVA®),基因技术公司(Genentech)/OSI制药公司(OSI Pharm.)、多西他赛(TAXOTERE®),赛诺菲-安万特公司(Sanofi-Aventis)、5-FU(氟尿嘧啶,5-氟尿嘧啶,CAS号51-21-8)、吉西他滨(GEMZAR®),礼来公司(Lilly)、PD-0325901(CAS号391210-10-9,辉瑞公司)、顺铂(顺式二胺,二氯铂(II)、CAS号15663-27-1)、卡铂(CAS号41575-94-4)、紫杉醇(TAXOL®),百时美施贵宝肿瘤学(Bristol-Myers Squibb Oncology)、新泽西州普林斯顿)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®),基因技术公司)、替莫唑胺(4-甲基-5-氧代-2,3,4,6,8-五氮杂双环[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-甲酰胺,CAS号85622-93-1,TEMODAR®, TEMODAL®,先灵葆雅公司(Schering Plough)、三苯氧胺((Z)-2-[4-(1,2-二苯基丁-1-烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺,NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®)和阿霉素(ADRIAMYCIN®)。另外的商业上或临床上可用的抗癌剂包括依鲁替尼(IMBRUVICA®),艾伯维公司(AbbVie)、奥沙利铂(ELOXATIN®),赛诺菲公司(Sanofi)、硼替佐米(VELCADE®),千禧制药公司(Millennium Pharm.)、索坦(sutent)(SUNITINIB®,SU11248,辉瑞公司)、来曲唑(FEMARA®,诺华公司(Novartis))、甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC®,诺华公司)、XL-518(Mek抑制剂,Exelixis,WO 2007/044515)、ARRY-886(Mek抑制剂,AZD6244,数组生物制药公司(Array BioPharma),阿斯利康公司)、SF-1126(PI3K抑制剂,萨马福尔制药公司(Semafore Pharmaceuticals))、BEZ-235(PI3K抑制剂,诺华公司)、XL-147(PI3K抑制剂,Exelixis)、PTK787/ZK 222584(诺华公司)、氟维司群(FASLODEX®,阿斯利康公司)、亚叶酸(醛叶酸)、雷帕霉素(西罗莫司,

RAPAMUNE®、惠氏公司)、拉帕替尼(TYKERB®,GSK572016,葛兰素史克公司(Glaxo Smith Kline))、洛那法尼(SARASAR™,SCH 66336,先灵葆雅公司)、索拉非尼(NEXAVAR®,BAY43-9006,拜耳实验室)、吉非替尼(IRESSA®,阿斯利康公司)、伊立替康(CAMPTOSAR®,CPT-11,辉瑞公司)、替吡法尼(ZARNESTRA™,强生公司(Johnson& Johnson))、ABRAXANE™(不含克列莫佛)、紫杉醇的白蛋白工程化纳米颗粒配制品(美国制药合作伙伴公司(American Pharmaceutical Partners),伊利诺伊州绍姆堡(Schaumburg, IL))、凡德他尼(rINN,ZD6474,ZACTIMA®,阿斯利康公司)、氯醌、AG1478、AG1571(SU 5271;苏根公司(Sugen))、坦罗莫司(TORISEL®,惠氏公司)、帕唑帕尼(葛兰素史克公司)、坎磷酰胺(TELCYTA®,泰力克公司(Telik))、噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN®, NEOSAR®)、长春瑞滨(NAVELBINE®)、卡培他滨(XELODA®,罗氏公司)、三苯氧胺(包括NOLVADEX®;柠檬酸三苯氧胺)、FARESTON®(柠檬酸托他米芬)、MEGASE®(醋酸甲地孕酮)、AROMASIN®(依西美坦,辉瑞公司)、甲霜灵、法多唑、RIVISOR®(伏氯唑)、FEMARA®(来曲唑;诺华公司)和ARIMIDEX®(阿那曲唑;阿斯利康公司)。

[0549] 术语“药学上可接受的盐”或“盐”是指分子或大分子的有机或无机盐。可以与氨基基团形成酸加成盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐(gentisinate)、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、糖质酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、以及双羟萘酸盐(即1,1'亚甲基双-(2-羟基3-萘甲酸盐))。药学上可接受的盐可以涉及包含另一种分子,如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他平衡离子。该平衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可以有多个带电荷的原子。在多个带电荷的原子是药学上可接受的盐的一部分的情况下,该盐可以有多个平衡离子。因此,药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电荷的原子和/或一个或多个平衡离子。

[0550] 类似地,“药学上可接受的溶剂化物”或“溶剂化物”是指一种或多种溶剂分子与分子或大分子的缔合。形成药学上可接受的溶剂化物的溶剂的实例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0551] 在其他实施例中,本发明的抗体或ADC可以与目前临床试验中或可商购的多种抗体(或免疫治疗剂)中的任一种组合使用。所披露的抗体可以与选自下组的抗体组合使用,该组由以下组成:阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿托珠单抗、阿仑单抗、阿妥莫单抗、阿托昔单抗、anatumomab、阿西莫单抗、阿特朱单抗、艾维单抗、巴维昔单抗、贝妥莫单抗、贝伐单抗、比伐珠单抗、博纳吐单抗、布妥昔单抗、坎妥珠单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、西他珠单抗、西妥木单抗、利伐珠单抗(clivatuzumab)、坎妥木单抗(conatumumab)、达西珠单抗(dacetuzumab)、多妥珠单抗(dalotuzumab)、达妥木单抗(daratumumab)、地莫单抗、曲兹妥单抗(drozitumab)、杜利妥单抗(duligotumab)、杜维单抗、杜昔妥单抗(dusigitumab)、依美昔单抗、艾妥珠单抗(elotuzumab)、恩脱昔单抗(ensituximab)、厄妥索单抗、达珠单抗、法妥珠单抗(farletuzumab)、拉妥珠单抗(ficlatuzumab)、费妥木单抗(figitumumab)、法

伏妥单抗 (flanvotumab)、弗妥昔单抗 (futuximab)、加尼妥单抗 (ganitumab)、吉妥珠单抗、吉瑞昔单抗、来巴妥单抗 (glembatumumab)、替伊莫单抗、伊戈伏单抗、麦妥珠单抗 (imgatuzumab)、印妥昔单抗 (indatuximab)、伊珠单抗、英妥木单抗、伊匹单抗、伊妥木单抗、拉贝珠单抗、lambrolizumab、来沙木单抗、林妥珠单抗、洛伐珠单抗 (lorvotuzumab)、鲁卡木单抗 (lucatumumab)、曼妥木单抗 (mapatumumab)、马妥珠单抗、米妥珠单抗 (milatuzumab)、明瑞莫单抗、米妥莫单抗、莫妥木单抗 (moxetumomab)、那妥单抗 (narnatumab)、那莫单抗、尼妥木单抗 (necitumumab)、尼妥珠单抗、纳武单抗、若莫单抗 (nofetumomab)、obinutuzumab、卡妥珠单抗 (ocaratumab)、奥法木单抗、奥拉妥单抗 (olaratumab)、奥拉帕尼、昂妥珠单抗 (onartuzumab)、奥妥珠单抗 (oportuzumab)、瑞戈伏单抗 (oregovomab)、帕尼单抗、帕图珠单抗 (parsatumab)、帕托单抗 (patritumab)、派姆单抗盘图莫单抗 (pemtumomab)、帕妥珠单抗、pidilizumab、平妥单抗、普立木单抗、拉妥木单抗 (racotumomab)、拉图单抗 (radretumab)、雷莫芦单抗、利妥木单抗 (rilotumumab)、利妥昔单抗、罗妥木单抗、沙妥莫单抗、昔洛珠单抗、sibrotuzumab、司妥昔单抗、司妥佐单抗 (sintuzumab)、索利图单抗 (solitomab)、他妥珠单抗 (tacatumab)、他妥莫单抗 (taplitumomab)、替妥莫单抗 (tenatumomab)、替普莫单抗 (teprotumumab)、加珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、托卡珠单抗 (tucozumab)、乌妥昔单抗 (ublituximab)、维妥珠单抗、沃妥珠单抗 (vorsetuzumab)、伏妥莫单抗、扎鲁木单抗、CC49、3F8、MEDI0680、MDX-1105、及其组合。

[0552] 其他实施例包括被批准用于癌症疗法的抗体的使用,包括但不限于,利妥昔单抗、吉妥珠单抗奥佐米星、阿仑单抗、替伊莫单抗、托西莫单抗、贝伐单抗、西妥昔单抗、帕木单抗、奥法木单抗、伊匹单抗及布妥昔单抗威多廷。本领域的普通技术人员将能够容易地鉴定与在此的传授内容相容的另外的抗癌剂。

[0553] E. 放射疗法

[0554] 本发明还提供了抗体或ADC与放射疗法(即,用于在肿瘤细胞内诱导DNA损伤的任何机制,如 γ 照射、X射线、UV照射、微波、电子发射等)的组合。还涵盖了使用放射性同位素向肿瘤细胞的定向传递的组合疗法,并且所披露的抗体或ADC可以与靶向性抗癌剂或其他靶向手段联合使用。典型地,放射疗法是以脉冲方式经一段从约1到约2周的时间给予。该放射疗法可以给予患有头颈癌的受试者,持续约6到7周。任选地,该放射疗法可以按单次剂量或按多次连续剂量给予。

[0555] VIII. 适应症

[0556] 本发明提供了本发明的抗体和ADC用于诊断、治疗性诊断、治疗和/或预防各种病症(包括赘生性病症、炎症、血管生成性病症和免疫疾病以及由病原体引起的病症)的用途。在某些实施例中,待治疗的疾病包括包含实体瘤的赘生性病症。在其他实施例中,待治疗的疾病包括恶性血液病。在某些实施例中,本发明的抗体或ADC将被用于治疗表达EMR2决定子的肿瘤或肿瘤发生细胞。优选地,有待治疗的“受试者”或“患者”将为人类,不过如在此所使用,这些术语明确地被视作包含任何哺乳动物物种。

[0557] 应理解的是,本发明的化合物和组合物可用于在疾病的不同阶段和其治疗周期的不同时间点治疗受试者。因此,在某些实施例中,本发明的抗体和ADC将被用作一线治疗,并且被给予于之前没有针对癌性病症进行治疗的受试者。在其他实施例中,本发明的抗体和

ADC将被用于治疗二线和三线患者(即,先前针对同一病症分别治疗一次或两次的那些患者)。仍其他实施例将包括已经用所披露的EMR2ADC或用不同治疗剂治疗相同或相关病症三次或更多次的四线或更高线患者(例如胃癌或结肠直肠癌患者)的治疗。在其他实施例中,本发明的化合物和组合物将用于治疗先前已经被治疗(用本发明的抗体或ADC或用其他抗癌剂)并且已经复发或被确定为对先前的治疗难以治疗的受试者。在所选实施例中,本发明的化合物和组合物可用于治疗具有复发性肿瘤的受试者。

[0558] 在某些实施例中,本发明的化合物和组合物将作为单一药剂或以组合形式用作一线或诱导疗法且给予先前尚未针对癌症病状加以治疗的受试者。在其他实施例中,本发明的化合物和组合物将在固结或维持治疗期间作为单一药剂或以组合形式使用。在其他实施例中,本发明的化合物和组合物将用于治疗先前已经被治疗(用本发明的抗体或ADC或用其他抗癌剂)并且已经复发或被确定为对先前的治疗难以治疗的受试者。在所选实施例中,本发明的化合物和组合物可用于治疗具有复发性肿瘤的受试者。在其他实施例中,本发明的化合物和组合物将用作调理疗法的一部分,作好接受自体或同种异体造血干细胞的准备,其中以骨髓、脐带血液或移动的周边血液作为干细胞源。

[0559] 关于恶性血液病,应进一步理解的是,本发明的化合物和方法可以特别有效地治疗多种白血病,包括急性髓性白血病(AML,基于FAB命名法(M0-M7)、WHO分类、分子标记/突变、核型、形态学以及其他特征来识别其各种亚型)、世系急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、多毛细胞白血病(HCL)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)、青少年骨髓单核细胞性白血病(JMML)和大颗粒淋巴细胞性白血病(LGL)以及B细胞淋巴瘤,包括霍奇金淋巴瘤(经典霍奇金淋巴瘤和结节淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤)、非霍奇金淋巴瘤,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、低等级/NHL滤泡细胞淋巴瘤(FCC)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和伯基特淋巴瘤(BL);中等等级/滤泡性NHL、中等等级弥漫性NHL、高等级免疫母细胞性NHL、高等级淋巴母细胞性NHL、高等级小非卵裂细胞NHL、大包块疾病NHL、华氏巨球蛋白血症、淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL)、AIDS相关淋巴瘤、单核细胞性B细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴结病、弥漫性小卵裂细胞淋巴瘤、大细胞免疫母细胞性成淋巴细胞瘤、小非卵裂淋巴瘤、伯基特氏和非伯基特氏淋巴瘤、滤泡性(主要为大细胞)淋巴瘤、滤泡性(主要为小卵裂细胞)淋巴瘤、以及滤泡性混合性小卵裂细胞和大细胞淋巴瘤。参见Gaidono等人,“Lymphomas”,IN CANCER:PRINCIPLES&PRACTICE OF ONCOLOGY[“淋巴瘤”,癌症:肿瘤学原理与实践],第2卷:2131-2145(DeVita等人编辑,第5增版,1997)。本领域技术人员应当清楚的是,这些淋巴瘤由于分类系统的改变而经常会具有不同的名称,并且患有以不同名称分类的淋巴瘤的患者也可以从本发明的组合治疗方案获益。

[0560] 在其他优选实施例中,增生性病征将包含实体瘤,包括(但不限于)肾上腺、肝脏、肾脏、膀胱、乳房、胃、卵巢、子宫颈、子宫、食道、结肠直肠、前列腺、胰腺、肺(小细胞与非小细胞)、甲状腺的癌瘤、肉瘤、胶质母细胞瘤,和各种头颈肿瘤。在某些所选方面,且如下文实例中所示,所披露的ADC尤其有效地治疗肺癌,包括肺腺癌、小肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)(例如鳞状细胞非小细胞肺癌或鳞状细胞小细胞肺癌)。在一个实施例中,肺癌是难治性、复发性或对铂基药剂(例如,卡铂、顺铂、奥沙利铂)和/或紫杉烷(例如多西他赛、紫杉醇、拉洛他赛或卡巴他赛)具有抗性的。在另一个实施例中,待治疗的受试者患有大细胞神

经内分泌癌 (LCNEC)。

[0561] 如所指示,所披露的抗体和ADC尤其有效地治疗肺癌,包括以下亚型:小细胞肺癌和非小细胞肺癌(例如鳞状细胞非小细胞肺癌或鳞状细胞小细胞肺癌)。在其他实施例中,所披露的组合物可以用于治疗肺腺癌。在所选实施例中,抗体和ADC可以被给予于表现出局限性疾病或扩散期疾病的患者。在其他实施例中,所披露的缀合抗体将被给予于难治性患者(即在完成初始治疗过程期间或之后不久疾病复发的患者);敏感患者(即,初次治疗后复发超过2-3个月的患者);或对铂基药剂(例如卡铂、顺铂、奥沙利铂)和/或紫杉烷(例如多西他赛、紫杉醇、拉洛他赛或卡巴他赛)表现出抗性的患者。在某些优选的实施例中,本发明的EMR2 ADC可以给予于一线患者。在其他实施例中,本发明的EMR2 ADC可以给予于二线患者。在仍其他实施例中,本发明的EMR2 ADC可以给予于三线患者。

[0562] 在特别优选的实施例中,所披露的ADC可以用于治疗小细胞肺癌。就这样的实施例来说,可以向表现出局限性疾病的患者给予缀合的调节剂。在其他实施例中,将向表现出扩散期疾病的患者给予所披露的ADC。在其他优选的实施例中,将向难治性患者(即,在完成初始治疗过程期间或之后不久复发的患者)或复发性小细胞肺癌患者给予所披露的ADC。又其他实施例包含将所披露的ADC给予敏感性患者(即初步治疗之后长在2-3个月复发的患者)。在每个情形中,应当理解,取决于所选给药方案和临床症状,可以将相容性ADC与其他抗癌剂组合使用。

[0563] 更一般而言,根据本发明治疗的赘生性病状可为良性或恶性的;实体瘤或血液科恶性疾病;且可选自包括(但不限于)以下的组:肾上腺肿瘤、AIDS相关癌症、肺泡软部分肉瘤、星形胶质细胞肿瘤、自主神经节肿瘤、膀胱癌(鳞状细胞癌和移行细胞癌)、囊胚病症、骨癌(釉质瘤、动脉瘤骨囊肿、骨软骨瘤、骨肉瘤)、脑和脊髓癌症、转移性脑瘤、乳癌、颈动脉体肿瘤、子宫颈癌、软骨肉瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤良性纤维性组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆形细胞肿瘤、室管膜瘤、上皮病症、尤文氏肿瘤(Ewing's tumors)、骨外黏液样软骨肉瘤、骨纤维生成不良、骨纤维性发育不良、胆囊和胆管癌症、胃癌、胃肠、妊娠期滋养层疾病、生殖细胞肿瘤、腺病症、头颈癌、下丘脑、肠癌、胰岛细胞瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's Sarcoma)、肾脏癌症(肾母细胞瘤、乳头状肾细胞癌)、白血病、脂肪瘤/良性脂肪瘤样肿瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤样肿瘤、肝癌(肝母细胞瘤、肝细胞癌)、淋巴瘤、淋巴瘤(霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤)、肺癌(小细胞癌、腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌等)、巨噬细胞病症、神经管胚细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤(包括浆细胞瘤、局域化骨髓瘤和髓外骨髓瘤)、骨髓发育不良症候群、骨髓增生性疾病(包括骨髓纤维化、真性红细胞增多症和原发血小板减少症)、神经母细胞瘤、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状甲状腺癌、副甲状腺肿瘤、儿科癌症、周边神经鞘肿瘤、嗜铬细胞瘤、脑垂体肿瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑色素瘤、罕见血液学病症、肾转移性癌症、横纹肌样肿瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、基质病症、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移性癌症和子宫癌症(子宫颈癌、子宫内膜癌和平滑肌瘤)。

[0564] IX. 制品

[0565] 本发明包括包含一个或多个容器(container)或接受器(receptacle)的药物包装和试剂盒,其中容器可以包含一个或多个剂量的本发明的抗体或ADC。这样的试剂盒或包装

本质上可以是诊断性的或治疗性的。在某些实施例中,该包装或试剂盒包含单位剂量,意指组合物的预定量,该组合物例如包含本发明的抗体或ADC,含或不含一种或多种另外的试剂,以及任选地一种或多种抗癌剂。在某些其他实施例中,该包装或试剂盒含有可检测量的抗EMR2抗体或ADC,具有或不具有相关的报道分子以及任选地一种或多种另外的试剂,用于癌性细胞的检测、定量和/或可视化。

[0566] 在任何情况下,本发明的试剂盒通常将包含在合适的容器或接受器中的本发明的抗体或ADC,药学上可接受的配制品,以及任选地在相同或不同容器中的一种或多种抗癌剂。所述试剂盒还可以含有其他药学上可接受的配制品或装置,用于诊断或组合疗法。诊断装置或仪器的实例包括可用于检测、监测、量化或分析与增生性病症相关的细胞或标记物的那些(关于这样的标记物的完整列表,参见上文)。在一些实施例中,这些装置可以用于在体内或体外对循环肿瘤细胞进行检测、监测和/或定量(参见例如WO 2012/0128801)。在仍其他实施例中,循环肿瘤细胞可以包含肿瘤发生细胞。本发明预期的试剂盒还可以含有合适的试剂以将本发明的抗体或ADC与抗癌剂或诊断剂进行组合(例如,参见U.S.P.N.7,422,739)。

[0567] 当试剂盒的组分被提供在一种或多种液体溶液中时,该液体溶液可以是非水性的,尽管通常优选的是水性溶液,特别优选无菌水性溶液。试剂盒中的配制品还可以作为可以在加入合适的液体时重溶的干燥粉末或以冻干形式提供。用于重溶的液体可以包含在单独的容器中。这样的液体可以包含无菌的药学上可接受的缓冲液或其它稀释剂,如抑菌性注射用水、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液或葡萄糖溶液。在试剂盒包含本发明的抗体或ADC组合另外的治疗剂或试剂的情况下,能以摩尔当量组合或者一种组分超过另一种组分来预先混合该溶液。可替代地,本发明的抗体或ADC以及任何任选的抗癌剂或其他药剂(例如类固醇)可以在给予患者之前分开保持在不同的容器中。

[0568] 在某些优选的实施例中,包含本发明的组合物的上述试剂盒将包含标签、标记物、药品说明书、条形码和/或阅读器,这表明试剂盒内容物可用于治疗、预防和/或诊断癌症。在其他优选的实施例中,试剂盒可以包括标签、标记物、药品说明书、条形码和/或阅读器,这表明试剂盒内容物可以根据某一剂量或给药方案给予以治疗患有癌症的受试者。在特别优选的方面,所述标签、标记物、药品说明书、条形码和/或阅读器表明试剂盒内容物可用于治疗、预防和/或诊断恶性血液病(例如AML)或提供用于治疗肺癌的剂量或给药方案。在其他尤其优选的方面,所述标签、标记物、药品说明书、条形码和/或阅读器表明试剂盒内容物可用于治疗、预防和/或诊断肺癌(例如腺癌),或提供用于治疗肺癌的剂量或给药方案。

[0569] 合适的容器或接受器包括例如瓶、小瓶、注射器、输注袋(即,袋子)等。所述容器可以由多种材料形成,如玻璃或药学上相容的塑料。在某些实施例中,所述一个或多个接受器可以包含无菌存取口。例如,该容器可以是具有可通过皮下注射针刺穿的塞子的静脉输液袋或小瓶。

[0570] 在一些实施例中,该试剂盒可以含有一种通过其将该抗体和任何任选的组分给予患者的构件,例如,一个或多个针或注射器(预装满的或空的)、滴眼管、移液管或其他此类装置,由该装置,可以将配制物注射或引入到受试者中或施用到身体的患病区域。本发明的试剂盒还将典型地包括一种用于容纳小瓶或此类装置及其他组分的紧密封闭的构件以供商业销售,如例如吹塑的塑料容器,在其中放置并且保持所希望的小瓶和其他装置。

[0571] X. 其他

[0572] 除非在此另外定义,否则结合本发明使用的科技术语应当具有本领域的普通技术人员通常所了解的意义。另外,除非上下文另外需要,否则单数形式的术语应当包括复数形式并且复数形式的术语应当包括单数形式。此外,说明书和所附权利要求书中提供的范围包括端点和这些端点之间的所有点。因此,2.0到3.0的范围包括2.0、3.0及2.0与3.0之间的所有点。

[0573] 一般而言,在此所描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及化学的技术是本领域中众所周知并且常用的那些。在此使用的与这样的技术相关联的命名法也是本领域常用的。除非另外指明,否则本发明的方法及技术通常根据本领域中熟知的常规方法且如本说明书通篇所引用的各种参考文献中所描述来进行。

[0574] XI. 参考文献

[0575] 将在此援引的全部专利、专利申请、和出版物、和以电子方式可获得的材料(包括,例如,核苷酸序列提交,例如GenBank和RefSeq;和氨基酸序列提交,例如SwissProt、PIR、PRF、PBD;以及来自GenBank和RefSeq中经注释的编码区的翻译)的完整披露内容通过引用结合,而不管短语“通过引用结合”是否相关于特定参考文献使用。以上的详细说明和后面的实例仅是出于清晰理解的目的而给出的。不应理解为由由此构成任何不必要的限制。本发明不限于所显示和描述的具体细节。由权利要求书限定的本发明包括对于本领域技术人员而言显而易见的变化。在此所用的任何章节标题仅出在组织目的且不应理解为限制所述主题。

[0576] 实例

[0577] 通过参照以下实例将更容易地了解总体如上所述的本发明,这些实例是通过说明方式提供并且并非旨在成为本发明的限制。这些实例不旨在表示以下实验是所进行的全部或唯一实验。除非另外指示,否则份数是重量份,分子量是重量平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是在大气压或接近大气压下。

[0578] 序列表概述

[0579] 表3提供了本文包括的氨基酸和核酸序列的概述。

[0580] 表3

[0581]

SEQ ID NO	描述
1	EMR2 同种型 a 的氨基酸序列
2	IgG1 重链恒定区蛋白
3	C220S IgG1 重链恒定区蛋白
4	C220Δ IgG1 重链恒定区蛋白
5	κ 轻链恒定区蛋白
6	C214S κ 轻链恒定区蛋白
7	C214Δ κ 轻链恒定区蛋白
8	λ 轻链恒定区蛋白
9	C214S λ 轻链恒定区蛋白

[0582]

10	C214Δλ 轻链恒定区蛋白
11-19	保留的
20	SC93.15 VL DNA
21	SC93.15 VL 蛋白
22	SC93.15 VH DNA
23	SC93.15 VH 蛋白
24-79	如 SEQ ID NO: 20-23 中所排序的其他鼠类克隆
80	SC93.15.1 VH DNA
81	SC93.15.1 VH 蛋白
82	SC93.266 VL DNA
83	SC93.266 VL 蛋白
84-99	保留的
100	hSC93.253 VL DNA
101	hSC93.253 VL 蛋白
102	hSC93.253 VH DNA
103	hSC93.253 VH 蛋白
104	hSC93.256 VL DNA
105	hSC93.256 VL 蛋白
106	hSC93.256 VH DNA
107	hSC93.256 VH 蛋白
108-109	保留的
110	hSC93.253 轻链蛋白质
111	hSC93.253 重链蛋白质
112	保留的
113	hSC93.253ss1 重链蛋白质
114	hSC93.256 轻链蛋白质
115	hSC93.256 重链蛋白质
116	保留的
117	hSC93.256ss1 重链蛋白质

[0583] 肿瘤细胞系概述

[0584] PDX肿瘤细胞类型用缩写表示,后面是数字,数字表示特定的肿瘤细胞系。测试样

品的传代次数是由p0-p#外加样品名称指示,其中p0指示直接地从患者肿瘤获得的未传代样品,并且p#指示在测试之前已经通过小鼠对肿瘤进行传代的次数。如在此所使用,肿瘤类型和亚型的缩写显示在如下表4中:

[0585] 表4

[0586]

肿瘤类型	缩写	肿瘤亚型	缩写
急性髓性白血病	AML		
膀胱	BL		
乳腺	BR		
		基底样	BR-基底样
		雌激素受体阳性和/或黄体酮受体阳性	BR-ERPR
		ERBB2/Neu 阳性	BR-ERBB2/Neu
		HER2 阳性	BR-HER2
		三阴性	TNBC
		管腔上皮 A 型	BR-LumA
		管腔上皮 B 型	BR-LumB
		三阴性的密封蛋白亚型	TNBC-CL
		低密封蛋白	BR-CLDN-低
		正常样	BR-NL
宫颈	CER		
结肠直肠	CR		
		直肠腺癌	RE-Ad
子宫内膜	EM		
食管	ES		
胃	GA		
		弥漫性腺癌	GA-Ad-Dif/Muc
		肠腺癌	GA-Ad-Int
		间质瘤	GA-GIST
胶质母细胞瘤	GB		

[0587]

头颈	HN		
肾	KDY		
		透明肾细胞癌	KDY-CC
		乳头状肾细胞癌	KDY-PAP
		移行细胞或尿路上皮癌	KDY-URO
		未知	KDY-UNK
肝	LIV		
		肝细胞癌	LIV-HCC
		胆管癌	LIV-CHOL
淋巴瘤	LYM		
	DLBC	弥漫性大 B 细胞	
肺	LU		
		腺癌	LU-Ad
		类癌	LU-CAR
		大细胞神经内分泌	LU-LCC
		非小细胞	NSCLC
		鳞状细胞	LU-SCC
		小细胞	SCLC
		梭形细胞	LU-SPC
多发性骨髓瘤	MM		
卵巢	OV		
		透明细胞	OV-CC
		子宫内膜样	OV-END
		混合亚型	OV-MIX
		恶性混合中胚层	OV-MMMT
		粘液性	OV-MUC
		神经内分泌	OV-NET
		乳头状浆液性	OV-PS
		浆液性	OV-S
		小细胞	OV-SC
		移行细胞癌	OV-TCC
胰腺	PA		
		腺泡细胞癌	PA-ACC
		十二指肠癌	PA-DC
		粘液腺癌	PA-MAD

[0588]

		神经内分泌	PA-NET
		腺癌	PA-PAC
		腺癌外分泌型	PA-PACe
		导管腺癌	PA-PDAC
		壶腹腺癌	PA-AAC
前列腺	PR		
皮肤	SK		
		黑素瘤	MEL
		鳞状细胞癌	SK-SCC
		葡萄膜黑素瘤	UVM
睾丸	TES		
甲状腺	THY		
		甲状腺髓样癌	MTC

[0589] 实例1

[0590] EMR2表达的鉴定

[0591] 使用全转录组测序

[0592] 为了表征存在于癌症患者中的实体瘤的细胞异质性并鉴定临床相关的治疗靶标，使用本领域认可的技术开发并维持大的PDX肿瘤库。包含大量离散的肿瘤细胞系的PDX肿瘤库在免疫功能低下小鼠中通过肿瘤细胞的多次传代而增生，其中所述肿瘤细胞最初从罹患多种实体瘤恶性肿瘤的癌症患者获得。低传代PDX肿瘤是其天然环境中肿瘤的代表，提供了对驱动肿瘤生长和抵抗目前治疗的潜在机制的临床相关见解。

[0593] 肿瘤细胞可以广泛地分为两种类型的细胞亚群：非肿瘤发生细胞 (NTG) 和肿瘤起始细胞 (TIC)。当被植入进免疫功能低下的小鼠中时，TIC具有形成肿瘤的能力。癌症干细胞 (CSC) 是TIC的一个亚组，其能够无限期地自我复制同时维持多向分化的能力。NTG虽然有时能够在体内生长，但不会形成当植入时重现原始肿瘤的异质性的肿瘤。

[0594] 为了进行全转录组分析，在PDX肿瘤达到800-2000mm³后或在骨髓中建立白血病 (<5%的人源骨髓细胞结构) 后针对AML，从小鼠切除PDX肿瘤。使用本领域认可的酶消化技术将切除的PDX肿瘤解离成单细胞悬浮液 (参见，例如，U.S.P.N. 2007/0292414)。将分离的大量肿瘤细胞与4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 一起孵育以检测死细胞，与抗小鼠CD45和H-2K^d抗体一起孵育以鉴定小鼠细胞，并且与抗人EPCAM抗体一起孵育以鉴定人细胞。另外，肿瘤细胞与鉴定CD46^高CD324⁺CSC或CD46^低CD324⁻NTG细胞的荧光结合抗人类CD46和/或CD324抗体一起孵育且接着使用FACS Aria细胞分选仪 (BD生物科学公司) 分选 (参见U.S.P.N 2013/0260385、2013/0061340和2013/0061342)。对在AML而言，典型地利用PDX系收集股骨和胫骨以提取骨髓。单一细胞悬浮液用低张力铵-氯化物-钾 (ACK) 溶液处理以耗竭红细胞且用针对CD45、CD33、CD34和CD38的抗人类抗体染色以检测人类细胞。在一些情况下，使用直接获自患者的周边血液或骨髓样品而不预先在小鼠中繁殖。

[0595] 通过在补充有1% 2-巯基乙醇的RLT加RNA (RLTplus RNA) 裂解缓冲液 (凯杰公司

(Qiagen)) 中裂解细胞来从肿瘤细胞中提取RNA,在-80℃下冷冻裂解物,并且然后使用RNeasy分离试剂盒(凯杰公司)解冻裂解物用于RNA提取。使用Nanodrop分光光度计(赛默科技公司(Thermo Scientific))和/或生物分析仪2100(Bioanalyzer2100,安捷伦科技公司(Agilent Technologies))来量化RNA。正常组织RNA购自各种来源(生命技术公司(Life Technology)、安捷伦公司(Agilent)、ScienCell公司、生物链公司(BioChain)以及克隆技术公司(Clontech))。通过遗传测序和基因表达分析来评估所得的总RNA制剂。具体而言,使用Illumina HiSeq 2000或2500下一代测序系统(Illumina, Inc.)分析某些急性骨髓性白血病(AML)和肺肿瘤样品。

[0596] 就此而言,使用cDNA进行Illumina全转录组分析,该cDNA是使用5ng自NTG或CSC肿瘤亚群提取的总RNA产生,该肿瘤亚群是如上文在此实例1中所述分离。该文库是使用TruSeq RNA样品制备试剂盒v2(伊鲁米那公司)创建的。所得的cDNA文库被片段化和条形码化。使用映射到基因外显子区域的度量标准FPKM(片段/千碱基/百万),将来自Illumina平台的测序数据名义上表示为片段表达值,使得基本的基因表达分析能够被标准化并列举为FPKM转录物。如图2中所示,AML和LU CSC肿瘤细胞亚群中的EMR2 mRNA表达(黑色条)通常高在正常细胞(灰色条)与NTG细胞群体(白色条)中的表达。

[0597] 鉴定AML与肺肿瘤CSC群体中的升高的EMR2 mRNA表达表明EMR2值得作为潜在的诊断和免疫治疗靶标进一步评价。此外,EMR2在CSC中的表达相较于NTG在AML和LU PDX肿瘤中的表达增加表明EMR2为这些肿瘤类型的致瘤细胞的良好标记物。

[0598] 实例2

[0599] 使用QRT-PCR量测肿瘤中的EMR2 mRNA的表达

[0600] 如图1D和1E中所描绘和如上文所论述,人类EMR2基因潜在地编码多种转录物,包括21个外显子长的6.5kbp典型全长同种型(Genbank登录号:NM_013447)、6.5kbp同种型和各种长度的若干较短同种型,其中一些先前已描述(Genbank登录号:NM_001271052、NM_152916、NM_152916_17、NM_152918);还参见图1D),而其他转录物首次描述在本文中(参见图1E)。EMR2蛋白质的长同种型(“hEMR2”)为328个氨基酸的七跨膜G蛋白偶联受体蛋白质(NP_038475)。大部分所述同种型是借由跳读一个或多个外显子而产生,从而产生缺失一至三个EGF样域的较短ECD或导致茎区缩短。所有同种型中仅有两种具有完整的7TM域和GPS序列,表明膜结合和翻译后自裂解仍然是完整的。外显子16单独或与外显子17组合缺失的两种同种型导致7TM内产生缺失且潜在地导致GPS内产生缺失且不明确这些同种型是否和如何影响EMR2蛋白质同种型的局域化和迁移。还应注意,外显子的各种所述省略可组合存在,从而进一步扩增潜在数目个同种型。由在所有所述同种型直接影响EMR2的ECD,因此这些同种型中任一者的表达可影响我们在此所述抗体所靶向的某些表位。可设想产生结合至所有潜在同种型(例如借由靶向EGF样域1和2)的Ab或产生更限制性地结合一种同种型或同种型亚群(例如借由靶向EGF样域3-5或茎区)的Ab。由在一些较短同种型主要发现在正常细胞中(参见图1E),因此此开启了特异性地靶向AML及其他肿瘤细胞而与正常细胞的结合极小或不结合的机会。

[0601] 为了证实肿瘤细胞中的EMR2 RNA表达,使用Fluidigm BioMark™ HD系统,根据工业标准协议对各种PDX细胞系或初始患者样品执行qRT-PCR。如实例1所述,从大量PDX肿瘤细胞或分选的CSC和NTG亚群中提取RNA。根据制造商的说明,使用大容量cDNA库试剂盒(生

命技术公司)将1.0ng的RNA转化为cDNA。然后将使用EMR2探针特异性Taqman测定法预扩增的cDNA材料用于随后的qRT-PCR实验。

[0602] 对正常组织中的EMR2表达与AML、LU-Ad和LU-SCC PDX肿瘤细胞系中的表达进行比较(图3;各点表示各个别组织或PDX细胞系的平均相对表达,其中小的水平线表示几何平均值)。“正常”表示如下各种正常组织样品:膀胱、周边血液单核细胞(PBMC)、脑、乳房、前列腺、胸腺、肾上腺、结肠、背侧根神经节、内皮细胞(动脉、静脉、血管平滑肌)、食道、心脏、肾脏、肝脏、肺、胰脏、骨骼肌、皮肤(完整和分离的纤维母细胞和角质细胞)、小肠、脾、胃、气管和睪丸。表达最高的两种正常组织为脾和PBMC。图3显示相较于正常组织,AML和LU-Ad和LU-SCC亚群中的平均EMR2表达更高,但LU肿瘤标本的几何平均值总体较低。此数据支持EMR2在AML中和在所选LU PDX中的表达升高(相较于正常组织)的较早发现。

[0603] 实例3

[0604] 使用微阵列分析

[0605] 肿瘤中的EMR2 mRNA表达的确

[0606] 执行微阵列实验以测量EMR2在各种肿瘤PDX细胞系中的表达量且如下分析数据。自AML、LYM、MM LU-Ad、LU-SCC和BL PDX肿瘤中提取1-2 μ g全肿瘤总RNA,基本上如实例1中所述的。使用Agilent SurePrint GE Human 8x 60v2微阵列平台分析样品,该平台含有50,599个生物学探针,其针对人类基因组中的27,958个基因和7,419个lncRNA所设计。标准的行业惯例被用于标准化和转换强度值以量化每个样品的基因表达。各样品中的EMR2表达的标准化强度绘制在图4中且借由水平条指示各肿瘤类型中所得的几何平均值。正常组织包括乳房、结肠、心脏、肾脏、肝脏、肺、卵巢、胰脏、PBMC、皮肤、脾和胃。

[0607] 对图4的更紧密审视显示AML、LYM、MM和BL肿瘤细胞系中的EMR2表达和LU-Ad和LU-SCC的至少一些肿瘤样品中的EMR2表达相较于正常组织而言上调。EMR2表达在前述肿瘤类型中升高的观测结果证实前述实例的结果。具体而言,所有三种平台上所分析的AML肿瘤样品显示EMR2表达实质上升高。更一般而言,这些数据表明EMR2表达在多种肿瘤亚型中,包括AML、LYM、MM、LU-Ad、LU-SCC和BL,且可为开发针对这些适应症的基于抗体的治疗剂的良好靶标。

[0608] 实例4

[0609] 使用癌症基因组图谱,肿瘤中的EMR2表达

[0610] 使用称为癌症基因组图谱(TCGA)的、原发性肿瘤和正常样品的大型公开可用数据集来证实hEMR2 mRNA在各种肿瘤中的超表达。来自IlluminaHiSeq_RNASeqV2平台的hEMR2表达数据自TCGA数据门户(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaDownload.jsp>)下载且解析以聚集来自各基因的个别外显子的读数,以产生单个值读数/千碱基外显子/百万个映射读数(RPKM)。图5显示AML、弥漫性大B细胞(DLBC)和LU-Ad初始患者样品中的EMR2表达相较于正常组织升高。这些数据进一步证实EMR2 mRNA的含量升高可发现在各种肿瘤类型中,表明抗EMR2抗体和ADC可为这些肿瘤的有用疗法。

[0611] 图6显示LU-Ad TCGA肿瘤亚群的卡普兰迈耶存活率曲线(Kaplan Meier survival curves),其中患者存活率数据是可获得的。根据LU-Ad肿瘤中的EMR2 mRNA高表达(即表达高在门限指数值)或EMR2 mRNA的低表达(即表达低在门限指数值)来将患者分层。门限指数值是以RPKM值的75%四分位数计算,其经计算为2.74。

[0612] 图下方所列的“处在风险中的数目”显示各患者首次诊断日(第0天)之后的每2000天,数据集中剩余的存活患者的数目。根据格汉-布雷斯洛-威尔科克森检验(Gehan-Breslow-Wilcoxon test),根据 $p=0.0088$ 的对数秩(Mantel-Cox)检验,两个存活率曲线存在显著差异($p=0.0066$)。这些数据显示患有展现EMR2高表达的LU-Ad肿瘤的患者们的存活时间比患有展现EMR2低表达的LU-Ad肿瘤的患者短得多。这表明抗EMR2疗法适用于治疗LU-Ad且EMR2表达适用作预后生物标记,根据此生物标记可作出治疗决策。

[0613] 实例5

[0614] 重组EMR2蛋白质的克隆和表达

[0615] 和过度表达细胞表面EMR2蛋白质的细胞系的工程化

[0616] 全长人类EMR2 (hEMR2) DNA构建体

[0617] 为了产生过度表达全长hEMR2蛋白质的细胞系,如下构建含有编码成熟hEMR2蛋白质的开放阅读框架的慢病毒载体。首先,利用标准分子克隆技术(System Biosciences)引入编码IgK信号肽的核苷酸序列,随后在pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP的多个克隆位点上游引入天冬氨酸/离氨酸表位,从而产生载体pLMEGPA。该双启动子构建体使用CMV启动子来驱动天冬氨酸/赖氨酸标记的细胞表面蛋白的表达,独立于驱动copGFP T2A Puro报道子和选择性标记的下游EF1启动子。pLMEGPA中的T2A序列促进肽键缩合的核糖体跳过,导致两种独立蛋白的表达:在T2A肽的上游编码的报道子copGFP的高水平表达,与在T2A肽的下游编码的Puro选择性标记蛋白的共表达,这允许在嘌呤霉素存在下进行选择。

[0618] 使用NCBI登录NM_013447作为参比,从GeneArt(赛默飞世尔科技公司)订购编码成熟hEMR2蛋白(残基Q24-N823)的合成DNA片段。将合成基因进行密码子优化,用于在哺乳动物细胞系中表达,并且侧翼有限制性内切核酸酶位点,以使得能够在pLMEGPA中的IgK信号肽-天冬氨酸/赖氨酸表位标签的下游进行框内亚克隆。这产生了pLMEGPA-hEMR2-NF1ag慢病毒载体,其编码具有附着于成熟hEMR2蛋白的N-末端的天冬氨酸/赖氨酸标签的融合蛋白。

[0619] hEMR2胞外域融合蛋白

[0620] 为了产生含有hEMR2蛋白质胞外域的一部分的融合蛋白,自GeneArt订购编码自成熟多肽的起点至GPS域的起点(例如Q24-Q478)的hEMR2蛋白质N末端胞外区的合成DNA片段,或编码蛋白质的ECD茎区(例如D291-Q478)的较小区域。这些DNA分子的序列是根据在哺乳动物细胞中的表达经密码子优化。这些DNA片段用于表达融合或标记蛋白的构建体的所有后续工程,该融合或标记蛋白含有hEMR2 ECD或其片段。具体而言,产生构建体,其中编码hEMR2多肽(残基Q24-Q478)的DNA是使用标准分子技术与编码9x-组氨酸标记(hEMR2-ECD-His)或人类IgG2Fc蛋白质(hEMR2-ECD-Fc)的DNA框内融合。类似地,产生构建体,其中编码hEMR2多肽(残基D291-Q478)的DNA是使用标准分子技术与编码9x-组氨酸标记(hEMR2-ECDstalk-His)或人类IgG2 Fc蛋白质(hEMR2-ECDstalk-Fc)的DNA框内融合。

[0621] 为生产可用于产生针对hEMR2蛋白的ECD的免疫反应性抗体的免疫原,使用标准分子技术将上述嵌合融合基因亚克隆到框内和免疫球蛋白 κ (IgK)信号肽序列下游的CMV驱动的表达载体中。CMV驱动的表达载体允许在HEK293T和/或CHO-S细胞中的高水平瞬时表达。使用聚乙烯亚胺聚合物作为转染试剂,用选自以下之一的表达构建体转染HEK293T细胞悬浮或黏附培养物或悬浮CHO-S细胞:hEMR2-ECD-His、hEMR2-ECD-Fc、hEMR2-ECD茎-His、或

hERM2-ECD茎-Fc。转染后的三至五天,使用适用于标记的镍-EDTA (Qiagen) 或MabSelect SuRe™蛋白质A (GE Healthcare Life Sciences) 柱,自澄清的细胞上清液中纯化hERM2-ECD-His、hERM2-ECD-Fc、hERM2-ECD茎-His或hERM2-ECD茎-Fc蛋白质。

[0622] 全长食蟹猕猴EMR2 (cEMR2) DNA构建体

[0623] 为了产生本发明中关于食蟹猕猴 (*Macaca fascicularis*) EMR2蛋白质 (cEMR2) 所必需的所有分子和细胞材料,首先如下推测cEMR2开放阅读框架序列:对编码hEMR2蛋白质的DNA序列进行BLAST (相对在NCBI的食蟹猕猴全基因组鸟枪邻接序列数据库),观测人类基因与食蟹猕猴基因之间具保守性的外显子/内含子边界,和对编码cEMR2的推定食蟹猕猴开放阅读框架进行组装。结果分析指明hEMR2与cEMR2蛋白质89.3%一致。

[0624] 使用如上衍生的核苷酸序列作为参考,自GeneArt订购编码成熟cEMR2蛋白质(残基Q24-N816)的合成DNA片段。将合成基因进行密码子优化,用于在哺乳动物细胞系中表达,并且侧翼有限制性内切核酸酶位点,以使得能够在pLMEGPA中的IgK信号肽-天冬氨酸/赖氨酸表位标签的下游进行框内亚克隆。这产生了pLMEGPA-cEMR2-NFlag慢病毒载体,其编码具有附着于成熟cEMR2蛋白的N-末端的天冬氨酸/赖氨酸标签的融合蛋白。

[0625] 食蟹猕猴EMR2 (cEMR2) 胞外域融合蛋白。

[0626] 为了产生本发明中关于cEMR2蛋白质的胞外域所需要的所有分子和细胞材料,上述pLMEGPA载体内所含的cEMR2开放阅读框架用作PCR反应的模板,以实现编码自成熟多肽起点至GPS域起点(例如D25-Q471)的cEMR2蛋白质N末端胞外区的DNA片段或编码蛋白质的ECD茎区(例如D288-Q471)的扩增。编码所要残基的DNA侧接适合限制位点以能够在IgK信号肽序列下游且在9x-组氨酸标记或人类IgG2Fc cDNA上游框内次克隆入CMV驱动型表达载体中。如上文针对类似人类融合蛋白所述产生重组cEMR2-ECD-His或cEMR2-ECD-Fc融合蛋白。

[0627] 人类和食蟹猕猴CD97 (hCD97和cCD97构建体)。

[0628] 基本上如上文刚刚针对筛选所披露的抗体所述,产生人类和食蟹猕猴CD97构建体。更具体而言,使用NCBI登录号NM_078481作为参考来设计人类CD97构建体。编码全长成熟人类CD97蛋白质(残基Q21-I845)的合成DNA片段是借由GeneArt制造且以类似在上文针对hEMR2所述的方式次克隆入IgK信号肽-天冬氨酸/离胺氨酸表位标记下游的pLMEGPA载体中,从而产生pLMEGPA-hCD97-NFlag。为了产生编码人类CD97-ECD-His和hCD97-ECD-Fc融合蛋白的构建体,使用PCR扩增编码残基Q21-R552、侧接适当限制位点的DNA片段,以便框内次克隆入IgK信号肽序列下游和9x-组氨酸标记或人类IgG2 Fc cDNA上游的CMV驱动型表达载体中。使用两种所得DNA构建体CMV-hCD97-ECD-His和CMV-hCD97-ECD-Fc转染HEK293T和/或CHO-S细胞,产生hCD97-ECD-His或hCD97-ECD融合蛋白,如上文针对类似hEMR2融合蛋白所述。

[0629] 使用NCBI登录号NM_005588243作为参考来设计编码食蟹猕猴CD97ECD(残基Q23-R554)的合成CD97 DNA片段,借由GeneArt制造,且直接框内次克隆入IgK信号肽序列下游和9x-组氨酸标记上游的CMV驱动型表达载体内。重组cCD97-His蛋白质如上文针对类似hCD97融合蛋白所述制得。

[0630] 细胞系工程化

[0631] 使用本领域普通技术人员熟知的标准慢病毒转导技术,分别使用三种慢病毒载体pLMEGPA-hEMR2-NFlag、pLMEGPA-cEMR2-NFlag或pLMEGPA-hCD97-NFlag产生稳定的过度表

达hEMR2、cEMR2或hCD97蛋白质的基于HEK293T的细胞系。使用嘌呤霉素选择经转导的细胞，随后对高表达HEK293T亚克隆（例如对GFP和FLAG表位呈强阳性的细胞）进行荧光活化细胞分选（FACS）。

[0632] 实例6

[0633] 产生抗EMR2抗体

[0634] 为了产生抗EMR2鼠类抗体，用10 μ g hEMR2-His蛋白质、10 μ g cEMR2-His茎蛋白质或过度表达hEMR2或cEMR2的293T细胞连同适当佐剂一起接种一个Ba1b/c小鼠、一个FVB和一个CD-1。初始接种之后，将10 μ g hEMR2-His蛋白质连同适当佐剂一起注射至小鼠中，每周两次历时4周，其中最后接种是使用10 μ g hEMR2-His蛋白质、10 μ g cEMR2-His茎蛋白质或过度表达hEMR2或cEMR2的293T细胞连同适当佐剂一起执行。

[0635] 将小鼠处死且解剖引流淋巴结（腭、腹链沟和内侧髂）且用作抗体产生细胞的来源。使用BTX Hybrimmune型系统（BTX Harvard Apparatus），借由电促细胞融合将单一细胞悬浮液中的B细胞（430 $\times 10^6$ 个细胞）与非分泌型Sp2/0-Ag14骨髓瘤细胞（ATCC#CRL-1581）以1:1比率融合。将细胞再悬浮在由补充有偶氮丝氨酸、15%胎儿克隆I血清、10%BM条件培养基、1mM非必需氨基酸、1mM HEPES、100IU青霉素-链霉素和50 μ M 2-巯基乙醇的DMEM培养基组成的杂交瘤选择培养基中，且在四个T225烧瓶中、在每个烧瓶100mL选择培养基中培养。将这些烧瓶放入一个含有5%CO₂和95%空气的潮湿的37 $^{\circ}$ C培养箱中，保持六天。

[0636] 融合之后六天，自烧瓶中收集杂交瘤文库细胞且文库在液氮中储存。冷冻小瓶在T75烧瓶中解冻且次日，（使用FACS Aria I细胞分选仪）将杂交瘤细胞在90 μ L补充杂交瘤选择培养基（如上文所述）中以每孔一个细胞铺板在15个Falcon 384孔盘中。

[0637] 将杂交瘤培养10天，并使用如下进行的流式细胞术筛选上清液中对hEMR2具有特异性的抗体。每孔1 $\times 10^5$ 个经hEMR2稳定转导的HEK293T细胞与25 μ L杂交瘤上清液一起孵育30分钟。将细胞用PBS/2%FCS洗涤，并且然后与25 μ L/样品DyeLight 649标记的山羊抗小鼠IgG（以1:300稀释于PBS/2%FCS中的Fc片段，特异性二级）一起孵育15分钟。将细胞用PBS/2%FCS洗涤两次并重悬于含有DAPI的PBS/2%FCS中，并通过流式细胞术分析荧光（其超过用同种型对照抗体染色的细胞的荧光）。将剩余的未使用的杂交瘤文库细胞在液氮中冷冻以用于将来的文库测试和筛选。

[0638] 免疫接种操作产生大量的鼠类抗体，其与表达hEMR2的HEK293T细胞发生免疫特异性反应且与未处理HEK293T细胞不发生免疫特异性反应。

[0639] 实例7

[0640] 抗EMR2抗体的特征

[0641] 使用各种方法，根据同种型、表位分组和染色或杀死表达食蟹猕猴和人类EMR2和人类CD97的能力来表征实例6中所产生的抗EMR2小鼠抗体。图7提供概述大量例示性鼠类抗hEMR2抗体的特征的表。“ND”表示不确定同种型，而“混合”表示检测到超过一种同种型。

[0642] 使用Milliplex小鼠免疫球蛋白同种型分型试剂盒（Millipore），根据制造商方案确定多种代表性抗体的同种型。EMR2特异性抗体的结果可见在图7的最后一栏中。

[0643] 使用多路复用竞争免疫测定（路明克斯公司（Luminex Corp.）），将抗体分组成仓。将100 μ l浓度为10 μ g/mL的每个抗EMR2抗体（捕获mAb）与已经缀合抗小鼠 κ 抗体的磁珠（路明克斯公司）一起孵育1小时（Miller等人，2011，PMID:21223970）。将捕获mAb/缀合的珠复合

物用PBSTA缓冲液(含0.05%吐温20的PBS中的1%BSA)洗涤,并然后合并。去除残留的洗涤缓冲液后,将珠与2 μ g/mL hEMR2-His蛋白一起孵育1小时,洗涤,并然后重悬于PBSTA中。将合并的珠混合物分配到96孔板中,每个孔含有抗EMR2抗体(检测者mAb),并在振荡下孵育1小时。在洗涤步骤之后,将缀合于PE的5 μ g/ml的浓度的抗小鼠 κ 抗体(与上面使用的相同)添加到各孔中并一起孵育1小时。将珠再次洗涤并重悬于PBSTA中。用Luminex MAGPIX仪器测量平均荧光强度(MFI)值。将抗体配对可视化为从抗体对的皮尔森相关系数计算的矩阵的树状图。根据树状图和对抗体对的MFI值的分析来确定分仓。图7显示所筛选的抗EMR2抗体可针对hEMR2蛋白质分成至少三个独特分组(A-C)。

[0644] 还使用流式细胞术测试例示性抗体以测量其与细胞表面上所表达的hEMR2、cEMR2和CD97结合的能力。为此目的,将过度表达hEMR2、cEMR2和hCD97的经工程化的HEK293T细胞(根据实例5制备)连同未处理的对照细胞与指定抗体一起孵育30分钟且使用BD FACS Canto II流式细胞仪、根据制造商说明书,借由流式细胞术分析hEMR2表达。抗原表达是以经工程化的细胞表面上所观测到的几何平均荧光强度变化(Δ MFI)量化,相较于已经同种型对照抗体染色的相同细胞,此类细胞已经抗EMR2抗体染色。经工程化的细胞与尚未经工程化的细胞之间还观测几何平均荧光强度变化(Δ MFI)。根据平均荧光强度的分析结果阐述在图7中标有FC的一栏中。数据审查显示若干种所披露的抗体结合细胞表面上的hEMR2和cEMR2。此外,虽然这些相同抗体中的一些表现上结合hCD97,而其他(诸如SC93.254和SC93.266)未表明其可向EMR2抗原提供增强的特异性。

[0645] 为了确定本发明的抗EMR2抗体是否能够内化以便介导细胞毒性剂递送至活肿瘤细胞,使用例示性抗EMR2抗体和连接至皂草毒蛋白的二级抗小鼠抗体FAB片段进行体外细胞杀死分析。皂草毒蛋白是使核糖体失活的植物毒素,由此抑制蛋白质合成并导致细胞死亡。皂草毒蛋白仅在细胞内部具有细胞毒性,其中其近接核糖体,但不能独立地内化。因此,在这些分析中,皂草毒蛋白介导细胞产生的细胞毒性表明抗小鼠FAB-皂草毒蛋白构建体能够在相关抗EMR2小鼠抗体结合和内化至靶细胞中之后内化。

[0646] 以每孔500个细胞将单一细胞悬浮液中的过度表达hEMR2、cEMR2和hCD97的HEK293T细胞(根据实例5制备)铺板在BD组织培养盘(BD生物科学公司)中。一天后,将图7中所述的各种浓度的纯化抗EMR2抗体与固定浓度的2nM抗小鼠IgG FAB-皂草毒蛋白构建体(先进的靶向系统)一起添加至培养物中。孵育96小时后,根据制造商的说明使用CellTiter-Glo®(普洛麦格公司(Promega))对活细胞进行计数。使用含有仅与第二FAB-皂草素缀合物一起孵育的细胞的培养物的原发光计数被设定为100%参考值,并且所有其他计数被计算为参考值的百分比。结果是以存活细胞的百分比呈现。

[0647] 这些数据表明,250pM浓度的亚组抗EMR2抗体-皂草毒蛋白缀合物以不同功效有效地杀死过度表达hEMR2、cEMR2和/或CD97的HEK293T细胞(图7),而未处理的293T对照物在相同条件下不消除。有趣的是,若干种所测试抗体(例如SC93.239、SC93.253、SC93.255)能够消除表达hEMR2和cEMR2的细胞,但不能消除表达hCD97的细胞。如本文所论述,具有此类特征的抗体可展现降低的细胞毒性且借此提供特别有益的治疗指数。

[0648] 实例8

[0649] EMR2抗体的测序

[0650] 如下所述对实例6中产生的抗EMR2小鼠抗体进行测序。根据制造商的说明使用

RNeasy微型试剂盒(凯杰公司)从所选的杂交瘤细胞中纯化总RNA。每个样品使用 10^4 与 10^5 个之间的细胞。将分离的RNA样品储存在 -80°C 直至使用。

[0651] 使用了包含八十六种被设计成靶向完整小鼠VH谱系的小鼠特异性前导序列引物的两种5'引物混合物,以及对所有小鼠Ig同种型具有特异性的3'小鼠C γ 引物来对每个杂交瘤的Ig重链的可变区进行扩增。类似地,使用包含六十四种被设计成扩增每个V κ 小鼠家族的5'V κ 前导序列的两种引物混合物与对小鼠 κ 恒定区具有特异性的单个反向引物的组合来对 κ 轻链进行扩增并测序。如下使用凯杰一步法(One Step)RT-PCR试剂盒从100ng总RNA扩增VH和VL转录物。对每个杂交瘤执行总计四次RT-PCR反应:两次针对V κ 轻链并且两次针对VH重链。PCR反应混合物包括1.5 μL 的RNA、0.4 μL 的100 μM 的重链或 κ 轻链引物(由整合DNA技术公司(Integrated DNA Technologies)定制合成)、5 μL 的5x RT-PCR缓冲液、1 μL dNTP、以及0.6 μL 的含有逆转录酶和DNA聚合酶的酶混合物。热循环仪程序是RT步骤 50°C 持续60分钟、 95°C 持续15分钟,然后35个循环的(94.5°C 持续30秒、 57°C 持续30秒、 72°C 持续1分钟)。然后在 72°C 下最后孵育10分钟。

[0652] 使用与上述用于扩增可变区相同的特异性可变区引物对提取的PCR产物进行测序。PCR产物被送到外部测序供应商(MCLAB)进行PCR纯化和测序服务。使用IMGT序列分析工具(http://www.imgt.org/IMGTmedical/sequence_analysis.html)分析核苷酸序列,以鉴定具有最高序列同源性的种系V、D和J基因成员。通过使用专有抗体序列数据库将VH和VL基因与小鼠种系数据库进行比对,将这些衍生序列与Ig V-和J-区的已知种系DNA序列进行比较。

[0653] 图8A描绘来自抗EMR2抗体的许多新颖小鼠轻链可变区的连续氨基酸序列,而图8B描绘来自相同抗EMR2抗体的新颖小鼠重链可变区的连续氨基酸序列。小鼠轻链和重链可变区氨基酸序列提供在SEQ ID NO:21-83奇数中。

[0654] 更具体而言,图8A和8B提供多种鼠类抗EMR2抗体的序列注释,称为SC93.15,其具有SEQ ID NO:21的VL和SEQ ID NO:23的VH;SC93.34,其具有SEQ ID NO:25的VL和SEQ ID NO:27的VH;SC93.51,其具有SEQ ID NO:29的VL和SEQ ID NO:31的VH;SC93.160,其具有SEQ ID NO:33的VL和SEQ ID NO:35的VH;SC93.216,其具有SEQ ID NO:37的VL和SEQ ID NO:39的VH;SC93.219,其具有SEQ ID NO:41的VL和SEQ ID NO:43的VH;SC93.221,其具有SEQ ID NO:45的VL和SEQ ID NO:47的VH;SC93.234,其具有SEQ ID NO:49的VL和SEQ ID NO:51的VH;SC93.239,其具有SEQ ID NO:53的VL和SEQ ID NO:55的VH;SC93.243,其具有SEQ ID NO:57的VL和SEQ ID NO:59的VH;SC93.252,其具有SEQ ID NO:61的VL和SEQ ID NO:63的VH;SC93.253,其具有SEQ ID NO:65的VL和SEQ ID NO:67的VH;SC93.255,其具有SEQ ID NO:69的VL和SEQ ID NO:71的VH;SC93.256,其具有SEQ ID NO:73的VL和SEQ ID NO:75的VH;和SC93.267,其具有SEQ ID NO:77的VL和SEQ ID NO:79的VH。另外,图8A和8B显示SC93.15.1和SC93.266的序列注释,该SC93.15.1具有SEQ ID NO:21的VL(与SC93.15的VL一致)和SEQ ID NO:81的VH且该SC93.266具有SEQ ID NO:83的VL和SEQ ID NO:75的VH(与SC93.256的VL一致)。这些数据紧接着概述在下文表5中。

[0655] 表5

克隆	轻链 SEQ ID NO: NA/AA	重链 SEQ ID NO: NA/AA
SC93.15	20/21	22/23
SC93.34	24/25	26/27
SC93.51	28/29	30/31
SC93.160	32/33	34/35
SC93.216	36/37	38/39
SC93.219	40/41	42/43
SC93.221	44/45	46/47
SC93.234	48/49	50/51
SC93.239	52/53	54/55
SC93.243	56/57	58/59
SC93.252	60/61	62/63
SC93.253	64/65	66/67
SC93.255	68/69	70/71
SC93.256	72/73	74/75
SC93.267	76/77	78/79
SC93.15.1	20/21	80/81
SC93.266	82/83	74/75

[0656] 对VL和VH氨基酸序列进行注释以鉴定根据Kabat定义的构架区(即FR1-FR4)和互补决定区(即图8A中的CDRL1-CDRL3或图8B中的CDRH1-CDRH3)。使用专有版本的阿拜斯数据库分析可变区序列以提供CDR和FR名称。尽管CDR是根据Kabat定义,然而本领域普通技术人员将了解CDR和FR名称也可根据Chothia、McCallum或任何其他所接受命名法系统定义。图8C提供编码图8A和8B中所述的氨基酸序列的核酸序列(SEQ ID NO:20-82,偶数)。

[0658] 如图8A和8B中所见,各特定鼠类抗体的重链和轻链可变区氨基酸序列的SEQ ID NO.通常为连续的奇数。因此,单克隆抗EMR2抗体SC93.15的轻链和重链可变区分别包含氨基酸SEQ ID NO:21和23;SC93.34的轻链和重链可变区分别包含SEQ ID NO:25和27;SC93.51的轻链和重链可变区分别包含SEQ ID NO:29和31等。图8A和8B中所述的编号方案例外为SC93.15.1(SEQ ID NO:21和81)和SC93.266(SEQ ID NO:83和75),其中的每一者与其他所测序抗体的一共享可变区(分别为VL和VH)。在任何情况下,编码鼠类抗体氨基酸序列的相应核酸序列包括在图8C中且其SEQ ID NO.紧接着相应氨基酸SEQ ID NO.之前。因此,例如,SC93.15抗体VL和VH核酸序列的SEQ ID NO.分别为SEQ ID NO:20和22。

[0659] 除图8A-8C中的序列注释之外,图8G-8I提供SC93.253、SC93.256和SC93.267的轻链和重链可变区的CDR名称,如利用Kabat、Chothia、ABM和接触方法所确定。图8G-8I中所描绘的CDR名称是利用如上文所论述的Abysis数据库的专有版获得。如后续实例所示,本领域技术人员应理解,所披露的鼠类CDR可以接枝到人类构架序列中以提供根据本发明的CDR接枝或人源化的抗EMR2抗体。此外,鉴于本披露,可以容易地确定根据本文的传授内容制备和测序的任何抗EMR2抗体的CDR,并使用推断的CDR序列提供本发明的CDR接枝或人源化的抗EMR2抗体。对于如图8A和8B所示的具有重链和轻链可变区序列的抗体而言尤其如此。

[0660] 实例9

[0661] 分组C的抗EMR2抗体

[0662] 识别EMR2的茎区

[0663] 进一步研究前述实例的抗EMR2抗体以确定与所观测分组相关的抗体表位的位置。

[0664] 更具体而言,进行ELISA分析,以对所选抗体结合至EMR2蛋白质的位置进行定位。简言之,96孔盘(VWR,610744)在4°C用含有1 μ g/mL hEMR2(Q24-Q478)-ECD-His或hEMR2(Q24-Q478)-ECD-Fc蛋白质的碳酸钠缓冲液涂布过夜。洗涤培养盘且在37°C用2%FCS-PBS阻断一小时且紧接着在4°C使用或保存。未稀释的杂交瘤上清液在培养盘上、在室温下孵育一小时。洗涤培养盘且在室温下用经HRP标记的山羊抗小鼠IgG(在1%BSA-PBS中1:10,000稀释)探测一小时。与底物溶液一起孵育之后,在OD 450读盘。

[0665] 分析结果显示在图9中,其中各数据点代表不同抗体且信号水平指示结合。如图9所证明,发现经确定属于分组C的抗体与EMR2蛋白质的茎区(即残基261-478)有关。

[0666] 实例10

[0667] 利用流式细胞术

[0668] 检测肿瘤上的EMR2表达

[0669] 流式细胞术是用于评估本发明抗EMR2抗体特异性检测初级和PDX AML肿瘤样品和LU PDX肿瘤细胞系表面上的人类EMR2蛋白质的存在的能力。另外,还测量LU CSC表面上的EMR2的表达。

[0670] 借由自小鼠中提取股骨与胫骨来收集AML PDX样品。移除任何附接的肌肉组织后,将骨合并且使用研钵和杵磨碎以使骨髓脱离骨的其余部分。收集细胞悬浮液且红细胞借由暴露在低张力铵-氯化物-钾溶液(ACK)而溶解。在冰上孵育5分钟后,借由添加含有2%胎牛血清的PBS缓冲液(FSM)而中止红细胞溶解,借由离心收集细胞且使用耐纶网滤出任何组织残渣。获得初级人类AML样品,作为Fico1分离的单核细胞冷冻保存,解冻,用FSM洗涤一次且用于分析。将单一细胞悬浮液与可检测死亡细胞的4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、可鉴定人类白血病细胞的抗人类CD45和CD33一起孵育。所得单一细胞悬浮液包含肿瘤和非肿瘤细胞的块状样品,包括NTG细胞和CSC。为了将块状AML白血病群体分成NTG和CSC亚群,进一步将PDX肿瘤细胞与抗人类CD34和CD38或候选AML CSC标记物一起孵育。

[0671] 收集LU PDX肿瘤且使用本领域中公认的酶组织消化技术解离,以获得PDX肿瘤细胞的单一细胞悬浮液(参见例如U.S.P.N.2007/0292414)。将PDX肿瘤单一细胞悬浮液与检测死细胞的4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、抗小鼠CD45和鉴定小鼠细胞的H-2K^d抗体和鉴定人类癌细胞的抗人类EPCAM抗体一起孵育。所得单一细胞悬浮液包含肿瘤细胞块状样品,包括NTG细胞与CSC。为了将块状LU PDX肿瘤细胞群体分成NTG和CSC亚群,将PDX肿瘤细胞与抗人类CD46和/或CD324和ESA抗体一起孵育(U.S.P.N.2013/0260385、2013/0061340和2013/0061342)。

[0672] 在任一情况下,使用BD FACS Canto II流式细胞仪,使用SC93.267(一种展现杀死CD97表达细胞的极小能力的抗EMR2抗体),借由流式细胞术分析块状或经分选的肿瘤细胞中的hEMR2表达。

[0673] 图10A显示,相较于IgG同种型对照抗体(灰色实心),SC93.267抗体检测到所测试的各AML样品中的hEMR2表面表达量较高(黑线)。EMR2特异性染色发现在自患者血液或骨髓

新鲜分离的多个个别原发AML样品和来自所建立人类AML PDX细胞系的白血病细胞中。数据表明EMR2表达在较宽范围的AML细胞上,涵盖此疾病的多种亚型。此类结果进一步表明本发明抗EMR2抗体可有用于诊断和治疗AML。

[0674] 图10B显示,与分选的NTG细胞或同种型对照相比,抗hEMR2抗体SC93.267检测到CSC LU细胞表面上的hEMR2表达升高。更具体而言,相较于IgG同种型对照抗体(灰色实心),PDX肿瘤样品LU123、LU205、LU300 (LU-Ad) 和LU120 (LU-SCC) 显示CSC(实心黑线)和LU和BR PDX肿瘤细胞的NTG亚群(虚线)上的hEMR2表达增加。这表明EMR2表达在多种LU肿瘤亚型(LU-Ad和LU-SCC)中的CSC上。基于MA和/或QPCR数据、根据RNA量度不显示EMR2表达的两种LU PDX株是LU58和LU134明显不显示EMR2抗体的任何染色,此进一步表明EMR2抗体的特异性。

[0675] 在各种情况下,表达可以已经抗EMR2抗体染色的肿瘤细胞表面上所观测的几何平均荧光强度相较于已经同种型对照抗体染色的相同肿瘤的变化(Δ MFI)量化。概述所分析的各种肿瘤细胞系的 Δ MFI的表以插图显示在图10A和10B中。总的,此数据提出EMR2表达在LU和AML肿瘤细胞上,表明此类肿瘤对所披露的抗EMR2抗体或包含其的抗体药物缀合物的治疗敏感。

[0676] 除图10A和10B中所示的结合之外,图10C表明选自不同表位分组的抗hEMR2抗体在其对正常血液和骨髓细胞、自AML PDX株是分离的细胞和来自血液科恶性疾病的各种细胞系的染色方面是不同的。就此而言,经EDTA或肝素处理以防止凝血的正常健康自愿供者血液直接用抗hEMR2抗体SC93.239(分组A)和SC93.262(分组C)染色,孵育,洗涤,借由使用抗小鼠IgG荧光染料标记抗体检测且与DAPI共染色以排除死亡细胞。接着使用FACSCanto(BD生物科学公司),根据制造商说明书,借由流式细胞术分析血细胞。除分级的样品之外,各种血液组分仅基于其正向/侧向分散特性,以电子方式门控。此冷冻保存的正常骨髓购自商业来源(A11Cells),解冻,洗涤且用EMR2特异性抗体染色且与抗人类CD34和CD38抗体和DAPI共染色。针对活CD34+或CD34+CD38-细胞门控之后,分析hEMR2表达。

[0677] 基于这些样品和方法,图10C显示SC93.239和SC93.262抗体所检测的hEMR2在血液粒细胞(Gran)、单核细胞(Mo)和淋巴细胞(LYM)上的表达的直方图。实心粗线描绘EMR2表达,而灰色阴影直方图显示适当同种型对照的信号。正如所预期,此类克隆中无一者将人类淋巴细胞染色,但对两种经染色的单核细胞则不然(虽然强度不同)。相反地,仅克隆SC93.239将粒细胞亚群染色,表明克隆SC93.262识别粒细胞(例如表达不被SC93.262识别的EMR2同种型的粒细胞)上不太丰裕的表位。类似地,分析人类正常骨髓细胞时,使用SC93.239获得更强染色。

[0678] 此外,如直方图所示,克隆SC93.239识别存在于CD34+骨髓细胞上的表位,而克隆SC93.262不将任何CD34+细胞染色。分析来自AML PDX株是的白血病细胞时,还观测hEMR2特异性克隆之间的染色模式差异。即,克隆SC93.239将AML31p2染色,但不能将AML23p2染色,而克隆SC93.262与AML23p2反应,但与AML31p2不反应。图10C进一步显示两种血液细胞系KG1(AML)和DEL(组织细胞增多症)上的EMR2的表面表达差异,根据RNA量度,两种细胞系对在EMR2表达均呈阳性。两种克隆均将DEL细胞染色,但仅克隆SC93.239对KG1显示阳性染色。EMR2阴性、但CD97阳性细胞系JVM2(套细胞淋巴瘤)未被任一种抗体识别,进一步表明其针对EMR2的特异性。

[0679] 总的,这些数据表明产生各种表位特异性抗hEMR2且可用于以不同于正常和恶性细胞的结合概况特异性结合血液样品。更具体而言,应了解可产生和/或选择可与主要由致瘤细胞表达的表位反应的本发明抗体,借此提供有益的治疗指数。

[0680] 实例11

[0681] 嵌合和人源化抗EMR2抗体的产生

[0682] 如下使用本领域认可的技术来产生嵌合抗EMR2抗体。从杂交瘤中提取总RNA并进行PCR扩增。从受试者核酸序列的分析获得关于以下鼠类抗体:SC93.253和SC93.256的VH和VL链的V、D和J基因区段的数据(针对核酸序列参见图8C)。使用以下限制性位点:对于VH片段的AgeI和XhoI、对于VL片段的XmaI和DraIII来设计对抗体的VH和VL链的框架序列特异的引物组。用Qiaquick PCR纯化试剂盒(凯杰公司)纯化PCR产物,随后用限制性内切酶AgeI和XhoI消化VH片段,并用XmaI和DraIII消化VL片段。将VH和VL消化的PCR产物进行纯化并分别连接到IgH或Igκ表达载体中。连接反应是用200U T4-DNA连接酶(新英格兰生物实验室(New England Biolabs))、7.5μL消化并且纯化的基因特异性PCR产物及25ng线性化载体DNA进行,总体积10μL。经由在42℃下热休克,用3μL连接产物对感受态大肠杆菌DH10B细菌(生命技术公司)进行转化,并且将其以100μg/mL的浓度铺板到氨比西林板上。在对扩增的连接产物进行纯化和消化之后,将VH片段克隆到包含HuIgG1的pEE6.4表达载体(龙沙公司(Lonza))的AgeI-XhoI限制性位点中,并将VL片段克隆到包含Hu-κ轻恒定区的pEE12.4表达载体(龙沙公司)的XmaI-DraIII限制性位点中。

[0683] 通过将CHO-S细胞与pEE6.4HuIgG1和pEE12.4Hu-κ表达载体以及PEI作为转染试剂进行共转染,来表达包含完整鼠类重链和轻链可变区以及人恒定区的嵌合抗体。转染后三至六天收获上清液。通过在800×g下离心10分钟从细胞碎片清除含有重组嵌合抗体的培养上清液并保存在4℃。将重组嵌合抗体用蛋白A珠粒进行纯化。

[0684] 也使用专有的计算机辅助CDR接枝方法(阿拜斯数据库,UCL商业公司(UCL Business))和标准分子工程技术,如下对鼠类抗EMR2抗体进行CDR接枝或人源化。基于人类种系抗体序列的框架序列和CDR经典结构与相关小鼠抗体的框架序列和CDR之间的最高同源性,设计可变区的人类框架区。出于分析的目的,将氨基酸分配到每个CDR域是根据Kabat等人的编号进行。就这一点而言,图5H至5J显示了使用鼠类抗体SC93.253和SC93.256的各种分析方案推断的重CDR和轻CDR。一旦设计了包含鼠类Kabat CDR和所选人框架的可变区,就从合成基因区段(整合DNA技术公司)产生它们。然后使用如上文针对嵌合抗体所述的分子方法来克隆和表达人源化抗体。例示性人源化EMR2抗体构建体(包括下文更详细论述的某些位点特异性构建体)的细节紧接着阐述在下文表6中。

[0685] 就此而言,应注意表6显示在人源化方法期间,经由使用氨基酸取代T57N来移除SC93.253的CDR中的有希望糖基化位点,以便增强最终人源化抗体的稳定性和均质性。此取代包括在最终hSC93.253抗体中。

[0686] 表6

[0687]

mAb	同种 型	人 VH	人 JH	VH FR 变化	VH CDR 变化	人 VK	人 JK	VK FR 变化	VK CDR 变化
hSC93. 253	IgG1/ κ	IGH V3-2 1*1	JH6	无	T57N	IGK V1-3 9*01	JK4	无	无
hSC93. 253ss1	IgG1 C220 S/κ	IGH V3-2 1*1	JH6	无	T57N	IGK V1-3 9*01	JK4	无	无
hSC93. 256	IgG1/ κ	IGH V3-7 2*1	JH6	无	无	IGK V1-2 7*01	JK2	无	无
hSC93. 256ss1	IgG1 C220 S/κ	IGH V3-7 2*1	JH6	无	无	IGK V1-2 7*01	JK2	无	无

[0688] 各衍生自相应鼠类抗体(例如SC93.253来源于SC93.256)的VL和VH序列的人源化抗体hSC93.253(SEQ ID NO:101和103)和hSC93.256(SEQ ID NO:105和107)的VL和VH氨基酸序列显示在图8D中。VL和VH的相应核酸序列阐述在图8E中(SEQ ID NO:100-106,偶数)。人源化构建体序列的概述紧接着阐述在下文表7中。

[0689] 表7

克隆	轻链 SEQ ID NO: NA/AA	重链 SEQ ID NO: NA/AA	全长 SEQ ID NO: LC/HC
hSC93.253	100/101	102/103	110/111
hSC93.253ss1	100/101	102/103	110/113
hSC93.256	104/105	106/107	114/115
hSC93.256ss1	104/105	106/107	114/117

[0691] 此实例中所述的例示性人源化抗体表明临床上相容的抗体可如本文所披露产生和衍生。在本发明的某些方面,可以将这样的抗体掺入EMR2 ADC中以提供包含有利的治疗指数的组合物。

[0692] 实例12

[0693] 位点特异性抗EMR2抗体的产生

[0694] 如上文表6和7中所述,例示性位点特异性抗体是根据本文中的传授产生。借由所附在克隆名称的“ss1”后缀指示的这些位点特异性构建体包含hSC93.253和hSC93.256可变区。

[0695] 关于表7中所述的构建体,hSC93.253和hSC93.253ss1包含相同的可变区氨基酸序列(即VL的SEQ ID NO:101和VH的SEQ ID NO:103)。类似地,单克隆抗体hSC93.256和hSC93.256ss1各自包含SEQ ID NO:105中所述的VL氨基酸序列和SEQ ID NO:107中所述的VH氨基酸序列。各种构建体(野生型IgG1与位点特异性)的全长轻链和重链氨基酸序列显示

在图8F中,其中重链C220S突变点和相应的天然半胱氨酸结合搭配物各加下划线。更具体而言,图8F显示例示性抗体hSC93.253 (SEQ ID NO:110和111)、hSC93.253ss1 (SEQ ID NO:110和113)、hSC93.256 (SEQ ID NO:114和115)和hSC93.256ss1 (SEQ ID NO:114和117)的全长重链和轻链氨基酸序列。

[0696] 位点特异性构建体如下制造:

[0697] 构建了包含天然轻链(LC)恒定区和重链(HC)恒定区的工程化人IgG1/ κ 抗EMR2位点特异性抗体,其中与LC中的半胱氨酸214(C214)天然形成链间二硫键的、HC的靠上铰链区中的半胱氨酸220(C220)被丝氨酸(C220S)替换。组装时,HC与LC形成包含两个适合与治疗剂结合的游离半胱氨酸(轻链的位置214)的抗体。除非另有说明,恒定区残基的所有编号均根据Kabat等人所述的编号方案。

[0698] 更具体而言,编码人源化抗EMR2抗体hSC93.253 HC (SEQ ID NO:111)或hSC93.256 HC (SEQ ID NO:115)之一的表达载体用作PCR扩增和定点突变诱发的模板。根据制造商的说明使用Quick-change®系统(安捷伦科技公司(Agilent Technologies))进行定点诱变。

[0699] 将编码hSC93.253 (SEQ ID NO:113)的突变体C220S HC的载体与hSC93.253 (SEQ ID NO:110)的 κ LC共转染至CHO-S细胞中且使用哺乳动物短暂表达系统表达。类似地,编码hSC93.256 (SEQ ID NO:117)的突变体C220S HC的载体与hSC93.256 (SEQ ID NO:114)的 κ LC共转染且使用CHO-S细胞表达。

[0700] 含有C220S突变体的经工程化的抗EMR2位点特异性抗体称为hSC93.253ss1和hSC93.256ss1。hSC93.253ss1 (SEQ ID NO:110和113)和hSC93.256ss1 (SEQ ID NO:114和117)位点特异性抗体的全长LC和HC的氨基酸序列显示在图8F中。通过SDS-PAGE表征工程化的抗EMR2位点特异性抗体,以证实已经产生了正确的突变体。在存在和不存在还原剂如DTT(二硫苏糖醇)的情况下,在来自生命技术公司的预制10%Tris-甘氨酸微型凝胶上进行SDS-PAGE。电泳之后,凝胶用胶态考马斯溶液(colloidal Coomassie solution)染色。在还原条件下,观察到对应于游离LC和游离HC的两个条带。这种图是还原条件下IgG分子的典型图。在非还原条件下,条带图不同于天然IgG分子的条带图,指示在HC与LC之间不存在二硫键。观察到对应于HC-HC二聚体的约98kD的条带。此外,观察到对应于游离LC的模糊条带和对应于LC-LC二聚体的约48kD的主要条带。由于每个LC的C-末端上的游离半胱氨酸,预期形成一定量的LC-LC物质。

[0701] 如本文所论述,与标准先前技术ADC组合物相比,制造位点特异性EMR2抗体的能力允许制备较均质的组合物且可提供改进的治疗指数。

[0702] 实例13

[0703] 抗EMR2抗体的结合

[0704] 具有鼠类可变区和人源化抗EMR2抗体的各种嵌合抗体(包括hSC93.253和hSC93.256的位点特异性构建体)经由具有游离硫氢基的末端顺丁烯二酰亚胺基部分而与吡咯并苯并二氮呋(例如PBD1和PBD3)结合,以产生抗体药物缀合物(ADC),称为SC93.239 PBD1、SC93.253 PBD1、SC93.256 PBD1、SC93.267 PBD1、hSC93.253ss1 PBD1、hSC93.253ss1 PBD3、hSC93.256ss1 PBD1和hSC93.256ss1 PBD3。这些缀合物连同适当的结合和未结合对照物一起用于后续实例中。

[0705] 如下制备天然抗EMR2 ADC。在室温下,在具有5mM EDTA的磷酸盐缓冲盐水(PBS)

中,通过添加预定摩尔的摩尔三(2-羧乙基)-膦(TCEP)/摩尔抗体,对抗EMR2抗体的半胱氨酸键进行部分还原90分钟。所得经部分还原的制剂接着在室温下经由顺丁烯二酰亚胺连接体而与PBD1(PBD1结构提供在本说明书上文中)结合最少30分钟。然后通过添加与接头-药物相比过量的N-乙酰基半胱氨酸(NAC),使用在水中制备的10mM储备溶液来淬灭反应。淬灭最少20分钟时间之后,经由添加0.5M乙酸将pH调节至6.0。ADC制剂借由使用30kDa膜透滤而相对在透滤缓冲液进行缓冲交换。经透滤的抗EMR2ADC接着用蔗糖和聚山梨醇酯-20调配至目标最终浓度。分析所得抗EMR2 ADC的蛋白质浓度(借由量测UV)、聚集(SEC)、药物与抗体比率(DAR)(借由逆相HPLC(RP-HPLC))和活性(体外细胞毒性)。

[0706] 使用经修改的部分还原方法使例示性位点特异性人源化抗EMR2ADC结合。所要产物为一种ADC,其最大程度地在各LC恒定区的不成对半胱氨酸(ss1构建体中的C214)上结合,且使药物与抗体比率(DAR)大于2(DAR>2)的ADC最少化、同时使DAR为2(DAR=2)的ADC最多化。为了进一步提高缀合的特异性,使用包含稳定剂(例如L-精氨酸)和温和还原剂(例如谷胱甘肽)的方法在与接头-药物缀合之前选择性还原抗体,然后是渗滤和配制步骤。

[0707] 各位点特异性抗体的制剂在室温下、在具有预定浓度的还原谷胱甘肽(GSH)、含有1M L-精氨酸/5mM EDTA的缓冲液(pH 8.0)中维持最少两小时而选择性地还原。然后使用30kDa膜(Millipore Amicon Ultra)将所有制剂进行缓冲液交换到20mM Tris/3.2mM EDTA缓冲液(pH 7.0)中以去除还原性缓冲液。所得选择性还原制剂接着在室温下经由顺丁烯二酰亚胺连接体与PBD1或PBD3(PBD结构提供在上文中)结合最少30分钟。然后通过添加与接头-药物相比过量的NAC,使用在水中制备的10mM储备溶液来淬灭反应。淬灭最少20分钟时间之后,经由添加0.5M乙酸将pH调节至6.0。所得位点特异性ADC制剂使用30kDa膜、借由透滤而在透滤缓冲液中缓冲交换。经透滤的抗EMR2 ADC接着用蔗糖和聚山梨醇酯-20调配至目标最终浓度。分析所得位点特异性抗EMR2 ADC的蛋白质浓度(借由量测UV)、聚集(SEC)、药物与抗体比率(DAR)(借由逆相HPLC(RP-HPLC))和活性(体外细胞毒性)。

[0708] 所得缀合物储存至使用。

[0709] 实例14

[0710] 抗EMR2 ADC介导体外杀死

[0711] 为了确定本发明的抗EMR2 ADC是否能够内化以便介导细胞毒性剂递送至活肿瘤细胞,使用例示性抗EMR2 ADC、hSC93.253ss1PBD1、hSC93.253ss1 PBD3、hSC93.256ss1 PBD1和hSC93.256ss1 PBD3(如上文实例中所述产生)进行体外细胞杀死分析。在此情况下,使用DL6递送PBD1以提供ADC 6且使用DL3递送PBD3以提供ADC 3。

[0712] 将过度表达hEMR2的HEK293T细胞的单一细胞悬浮液或未处理HEK293T细胞以每孔500个细胞铺板在BD组织培养盘(BD生物科学公司)中。一天后,将各种浓度的经纯化ADC或人类IgG1对照抗体与PBD1或PBD3缀合物添加至培养物中。细胞在37°C/5%CO₂下孵育96小时。孵育之后,使用CellTiter-Glo[®](普洛麦格公司),根据制造商说明书对活细胞计数。使用含有未处理细胞的培养物所得的原始发光计数设定为100%参考值且所有其他计数均以参考值的百分比计算。

[0713] 图11A(EMR2+细胞)和11B(EMR2-细胞)显示,表达EMR2决定子的细胞对人源化位点特异性抗EMR2 ADC(例如hSC93.253ss1 PBD3和hSC93.256ss1 PBD3)的敏感性比所结合的人类IgG1对照抗体大得多。另外,相较于过度表达EMR2的HEK293T细胞,EMR2 ADC对未过度

表达EMR2的未处理HEK293T细胞的影响非常小,表明ADC对EMR2抗原的特异性(图11B)。

[0714] 上述结果表明抗EMR2 ADC能够特异性地介导细胞毒性有效载荷内化和递送至表达EMR2的细胞。

[0715] 实例15

[0716] EMR2抗体药物缀合物体内抑制实体瘤生长

[0717] 基于前述结果,努力证明本发明的所结合EMR2调节剂体内缩减和抑制表达EMR2的人类肿瘤生长。就此而言,本发明的所选抗体(SC93.253、SC93.256和SC93.267)与PBD细胞毒性剂(PBD1、DL6)共价结合且测试所得ADC以证明其抑制免疫缺乏小鼠中的人类PDX肿瘤生长的能力。

[0718] 为此目的,使用本领域中公认的技术使患者源异种移植(PDX)肺肿瘤(LU187)在雌性NOD/SCID接受者小鼠的侧腹中皮下生长。监测肿瘤体积和小鼠体重,每周两次。当肿瘤体积达到150–250mm³时,将小鼠随机分配至处理组且经由腹膜内注射而注射单次剂量的SC93 ADC(1.6mg/kg)或抗半抗原对照IgG2a PBD1(各基本上如实例13中所述产生)。处理之后,监测肿瘤体积和小鼠体重直至肿瘤超过800mm³或小鼠生病。在所有测试中,经处理的小鼠未展现不利的健康效应,超过了在具有肿瘤的免疫缺乏NOD/SCID小鼠中典型发现的那些效应。

[0719] 图12显示所披露的ADC对具有LU187肿瘤的展现EMR2表达的小鼠中的肿瘤生长的影响。更具体而言,图12显示直接与媒介物(未图示)或对照ADC IgG2a PBD1相比,抗EMR2 ADC的给予引起肿瘤抑制。

[0720] 例示性结合抗体体内抑制肿瘤体积的惊人能力进一步验证了EMR2作为治疗标靶用于治疗增生性病症的用途。

[0721] 实例16

[0722] 使用抗EMR2抗体靶向CSC

[0723] 如上文所论述,肿瘤细胞可大体分成两种类型的细胞亚群:非致瘤细胞(NTG)和肿瘤起始细胞或致瘤细胞(TIC)。致瘤细胞当植入免疫功能不全小鼠中时具有形成肿瘤的能力,而非致瘤细胞则不能。癌症干细胞(CSC)为致瘤细胞亚群且能够无限地自复制,同时维持多谱系分化的能力。为了确定肿瘤中的EMR2表达是否会与增强的致瘤性相关,如下文所述分离和分析某些AML肿瘤细胞。

[0724] 更具体而言,初级人类AML样品用抗人类CD34和抗EMR2抗体(SC93.267)与生物素缀合物染色。进行初始染色后,洗涤样品且用抗生物素蛋白链菌素与APC缀合物再染色以检测SC93.267⁺细胞。接着使用FACS Aria™流式细胞仪(BD生物科学公司)将此样品分选成CD34⁻SC93.267⁺、CD34⁻SC93.267^高和CD34⁺SC93.267⁺亚群。每组五只雌性NSG免疫功能不全小鼠借由275拉德(rad)全身照射来调理且上述三种亚群中的每一者静脉内注射15,000个细胞。将小鼠无痛处死且移植后第10周收集骨髓、周边血液和脾以借由流式细胞术测量白血病负荷。

[0725] 图13A显示使用所披露的EMR2抗体SC93.267的门控条件和细胞群体分离,而图13B表明致瘤细胞亚群当注射至免疫功能不全小鼠中时可再现亲本肿瘤。就此而言,图13A和13B显示此样品中的致瘤细胞存在于CD34⁺EMR2⁺细胞群体中(图13B中的闭合三角形)。因此,靶向CD34⁺EMR2⁺细胞群体的药剂(如本文所述的EMR2特异性ADC)可用于靶向肿瘤相关

细胞的致瘤亚群。该靶向可引起明显的肿瘤消退和预防肿瘤再现或复发。另外,检测患者骨髓或血液样品内的CD34+EMR2+细胞(例如借由流式细胞术或共免疫组织化学)可用于诊断或预后目的。

[0726] 实例17

[0727] 人源化EMR2抗体药物缀合物

[0728] 体内减少AML PDX肿瘤的白血病负荷

[0729] 鉴于前述实例中EMR2 ADC所提供的给人深刻印象的结果和EMR2+致瘤细胞存在于血液科恶性疾病(例如以致瘤细胞形式)中的证明,进行另外实验以证明所披露的化合物治疗各种血液科恶性疾病(诸如急性骨髓性白血病(AML))的能力。

[0730] 更具体而言,表达EMR2的AML PDX株是(例如AML16和AML23)在播散性白血病模型中用于确定所披露的ADC是否可有效地减少免疫功能不全小鼠中的肿瘤负荷。就此而言,使用Multirad 250x射线照射器(Faxitron),使NOD/SCID/共同 γ 链基因敲除小鼠(NSG)接受275亚致死剂量的全身辐射。在照射后的48小时内,小鼠静脉内输注AML细胞的单一细胞悬浮液。为了证实肿瘤移植,将三只随机选择的小鼠在预定时间无痛处死,且收集骨髓、周边血液和脾用于评估白血病负荷。就此而言,利用此类组织制备单一细胞悬浮液,用低渗透压溶液溶解红细胞且细胞用识别CD45和CD33的经荧光染料标记的人类特异性抗体染色。所染色样品使用FACSCanto™流式细胞仪(BD生物科学公司)分析且测量各组织中的人类白血病细胞负荷的相对数目。

[0731] 确认移植之后,小鼠根据体重随机分组且腹膜内注射抗EMR2 ADC或相应对照物。在AML16的情况下,向小鼠注射单次剂量的0.1mg/kg hSC93.253ss1 PBD1(例如ADC 6)、hSC93.256ss1 PBD1、对照HuIgG1.ss1 PBD1或单次剂量的媒介物对照物(图14A)。在AML23的情况下,向小鼠注射单次剂量的0.2mg/kg SC93.239 PBD1、SC93.253 PBD1、SC93.256 PBD1、SC93.267 PBD1、对照小鼠IgG2a PBD1或单次剂量的媒介物对照物(图14B)。常规地监测经处理小鼠的健康状况且当小鼠生病或在预定时间点生病时,将所有小鼠无痛处死且借由流式细胞术分析各小鼠的骨髓、脾和血液中的白血病负荷,如先前所述。图14A和14B展现在抗EMR2 ADC体内治疗之后,白血病负荷降低,这进一步验证了EMR2作为治疗标靶用于治疗AML的用途。

[0732] 抗EMR2 ADC特异性杀死表达EMR2的肿瘤细胞(包括致瘤细胞)且体内显著抑制肿瘤生长延长的时段的能力进一步验证了抗EMR2 ADC用于治疗性治疗癌症且具体而言用于治疗AML的用途。

[0733] 本领域技术人员将进一步理解的是,本发明能以其他特定形式实施而不脱离其精神或中心属性。由于本发明的前述说明仅仅披露了其示例性实施例,所以应当理解的是,其他变化也被考虑为在本发明的范围之内。因此,本发明并不局限于在此已经详细描述的具体实施例。而是,应参考所附的如本发明的范围和内容的权利要求书。

序列表

<110> 艾伯维公司 (AbbVie Stemcentrx LLC)

<120> 新颖抗 EMR2 抗体和使用方法

<130> S69697 1320W0 / sc9301W001

<150> US 62/257,606

<151> 2015-11-19

<150> US 62/420,319

<151> 2016-11-10

<160> 117

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 823

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> EMR2 同种型 a 的氨基酸序列

[0001]

<400> 1

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

Thr Leu Pro Gly Ala Glu Thr Gln Asp Ser Arg Gly Cys Ala Arg Trp
20 25 30

Cys Pro Gln Asp Ser Ser Cys Val Asn Ala Thr Ala Cys Arg Cys Asn
35 40 45

Pro Gly Phe Ser Ser Phe Ser Glu Ile Ile Thr Thr Pro Met Glu Thr
50 55 60

Cys Asp Asp Ile Asn Glu Cys Ala Thr Leu Ser Lys Val Ser Cys Gly
65 70 75 80

Lys Phe Ser Asp Cys Trp Asn Thr Glu Gly Ser Tyr Asp Cys Val Cys
85 90 95

Ser Pro Gly Tyr Glu Pro Val Ser Gly Ala Lys Thr Phe Lys Asn Glu
100 105 110

Ser Glu Asn Thr Cys Gln Asp Val Asp Glu Cys Gln Gln Asn Pro Arg
115 120 125

Leu Cys Lys Ser Tyr Gly Thr Cys Val Asn Thr Leu Gly Ser Tyr Thr
130 135 140

Cys Gln Cys Leu Pro Gly Phe Lys Leu Lys Pro Glu Asp Pro Lys Leu
145 150 155 160

Cys Thr Asp Val Asn Glu Cys Thr Ser Gly Gln Asn Pro Cys His Ser
165 170 175

Ser Thr His Cys Leu Asn Asn Val Gly Ser Tyr Gln Cys Arg Cys Arg
180 185 190

Pro Gly Trp Gln Pro Ile Pro Gly Ser Pro Asn Gly Pro Asn Asn Thr
195 200 205

Val Cys Glu Asp Val Asp Glu Cys Ser Ser Gly Gln His Gln Cys Asp
210 215 220

[0002]

Ser Ser Thr Val Cys Phe Asn Thr Val Gly Ser Tyr Ser Cys Arg Cys
225 230 235 240

Arg Pro Gly Trp Lys Pro Arg His Gly Ile Pro Asn Asn Gln Lys Asp
245 250 255

Thr Val Cys Glu Asp Met Thr Phe Ser Thr Trp Thr Pro Pro Pro Gly
260 265 270

Val His Ser Gln Thr Leu Ser Arg Phe Phe Asp Lys Val Gln Asp Leu
275 280 285

Gly Arg Asp Tyr Lys Pro Gly Leu Ala Asn Asn Thr Ile Gln Ser Ile
290 295 300

Leu Gln Ala Leu Asp Glu Leu Leu Glu Ala Pro Gly Asp Leu Glu Thr
305 310 315 320

Leu Pro Arg Leu Gln Gln His Cys Val Ala Ser His Leu Leu Asp Gly
325 330 335

Leu Glu Asp Val Leu Arg Gly Leu Ser Lys Asn Leu Ser Asn Gly Leu
340 345 350

Leu Asn Phe Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Glu Leu Ser Leu Glu Val Gln
355 360 365

Lys Gln Val Asp Arg Ser Val Thr Leu Arg Gln Asn Gln Ala Val Met
370 375 380

Gln Leu Asp Trp Asn Gln Ala Gln Lys Ser Gly Asp Pro Gly Pro Ser
385 390 395 400

Val Val Gly Leu Val Ser Ile Pro Gly Met Gly Lys Leu Leu Ala Glu
405 410 415

Ala Pro Leu Val Leu Glu Pro Glu Lys Gln Met Leu Leu His Glu Thr
420 425 430

His Gln Gly Leu Leu Gln Asp Gly Ser Pro Ile Leu Leu Ser Asp Val
435 440 445

[0003]

Ile Ser Ala Phe Leu Ser Asn Asn Asp Thr Gln Asn Leu Ser Ser Pro
450 455 460

Val Thr Phe Thr Phe Ser His Arg Ser Val Ile Pro Arg Gln Lys Val
465 470 475 480

Leu Cys Val Phe Trp Glu His Gly Gln Asn Gly Cys Gly His Trp Ala
485 490 495

Thr Thr Gly Cys Ser Thr Ile Gly Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ile Cys
500 505 510

Arg Cys Thr His Leu Ser Ser Phe Ala Val Leu Met Ala His Tyr Asp
515 520 525

Val Gln Glu Glu Asp Pro Val Leu Thr Val Ile Thr Tyr Met Gly Leu
530 535 540

Ser Val Ser Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Leu Thr Phe Leu Leu
545 550 555 560

Cys Lys Ala Ile Gln Asn Thr Ser Thr Ser Leu His Leu Gln Leu Ser
565 570 575

Leu Cys Leu Phe Leu Ala His Leu Leu Phe Leu Val Ala Ile Asp Gln
580 585 590

Thr Gly His Lys Val Leu Cys Ser Ile Ile Ala Gly Thr Leu His Tyr
595 600 605

Leu Tyr Leu Ala Thr Leu Thr Trp Met Leu Leu Glu Ala Leu Tyr Leu
610 615 620

Phe Leu Thr Ala Arg Asn Leu Thr Val Val Asn Tyr Ser Ser Ile Asn
625 630 635 640

Arg Phe Met Lys Lys Leu Met Phe Pro Val Gly Tyr Gly Val Pro Ala
645 650 655

Val Thr Val Ala Ile Ser Ala Ala Ser Arg Pro His Leu Tyr Gly Thr
660 665 670

[0004]

Pro Ser Arg Cys Trp Leu Gln Pro Glu Lys Gly Phe Ile Trp Gly Phe
675 680 685

Leu Gly Pro Val Cys Ala Ile Phe Ser Val Asn Leu Val Leu Phe Leu
690 695 700

Val Thr Leu Trp Ile Leu Lys Asn Arg Leu Ser Ser Leu Asn Ser Glu
705 710 715 720

Val Ser Thr Leu Arg Asn Thr Arg Met Leu Ala Phe Lys Ala Thr Ala
725 730 735

Gln Leu Phe Ile Leu Gly Cys Thr Trp Cys Leu Gly Ile Leu Gln Val
740 745 750

Gly Pro Ala Ala Arg Val Met Ala Tyr Leu Phe Thr Ile Ile Asn Ser
755 760 765

Leu Gln Gly Val Phe Ile Phe Leu Val Tyr Cys Leu Leu Ser Gln Gln
770 775 780

Val Arg Glu Gln Tyr Gly Lys Trp Ser Lys Gly Ile Arg Lys Leu Lys
785 790 795 800

Thr Glu Ser Glu Met His Thr Leu Ser Ser Ser Ala Lys Ala Asp Thr
805 810 815

Ser Lys Pro Ser Thr Val Asn
820

<210> 2

<211> 329

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> IgG1 重链恒定区蛋白

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

[0005]

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

[0006]

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 3

<211> 329

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 尚未归类的特性
<223> C220S IgG1 重恒定区蛋白

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

[0007]

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

[0008]

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 4
<211> 328
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 尚未归类的特性
<223> C220 δ IgG1 重恒定区蛋白

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

[0009]

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

[0010]

<220>
<221> 尚未归类的特性
<223> κ 轻链恒定区蛋白

<400> 5

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> C214S κ 轻链恒定区蛋白

<400> 6

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

[0011]

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser
 100 105

<210> 7
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> C214 δ κ 轻链恒定区蛋白

<400> 7

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
100 105

[0012]

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> λ轻链恒定区蛋白

<400> 8

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 9
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 尚未归类的特性
<223> C214S λ 轻链恒定区蛋白

<400> 9

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

[0013]

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Ser Ser
100 105

<210> 10
<211> 104

<212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> C214 δ λ轻链恒定区蛋白

<400> 10

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
 35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

[0014]

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Ser
 100

<210> 11

<400> 11
 000

<210> 12

<400> 12
 000

<210> 13

<400> 13
 000

<210> 14

<400> 14

000

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<400> 16

000

<210> 17

<400> 17

000

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<400> 19

000

[0015]

<210> 20

<211> 321

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.15 VL

<400> 20

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggccagtca gaatgtgggt acttctgtag cctggatca acagaaacca 120

ggcactctc ctaaactact gatttactgg gcaccacce ggcacactgg agtcctgat 180

cgcttcacag gcagtggtc tggacagat ttctctctca ccattagcag tgtgcagtct 240

gaagaactga cagattattt ctgtcagcaa tatagcagct atctctcac gttcggaggg 300

gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.15 VL

<400> 21

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

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

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

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

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

[0016]

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

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

<210> 22
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.15 VII

<400> 22

gaggteacgc tgcaacaate tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tctgttaagg gttctggata caegtctact gactactica tgaactgggt gaagctgagc 120
 catggaaga gccttgagtg gattggagaa attaatceta ataatggtg tactaactac 180
 aaccagaagt tcaaggcaa ggccacatig actgtagaca agtctctcag catagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagict attactgtgc aagaccggg 300

acgaactact ggggccccagg caccactctc acagtctcct ca

342

<210> 23
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.15 VH

<400> 23

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Leu Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

[0017]

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

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

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

Ala Arg Pro Gly Thr Asn Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

<210> 24
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.34 VL

<400> 24
gacgttttga fgaccocaaag tccactctcc ctgccctgca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgcg galclaglea gagcattgll catagtaatg gaaacacctt tttagattgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag etctgatctt acaaagtctt caagcgattt 180
tciggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggcctgagga tcigggagtt tattactgct tcaaggttc acatggtccg 300
tggacgttcg gggaggcac caagctggaa atcaaaa 336

<210> 25
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 尚未归类的特性
<223> 鼠 SC93.34 VL

<400> 25

[0018]

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Glu Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 26

<211> 348
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.34 VH

<400> 26
 gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ttggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tectgcaagg cttctggeta caccttttcc agctactgga tgcactgggt aaacagagg 120
 cctagacagg gtctggaatg gattggcget atttatectg gaaatagtga tactaactac 180
 aaccagaagt tcaagggeaa ggccaaactg actgcagtca catctgccag cactgectac 240
 atggagctca gcagcctgac aaatgaagac tetgcggtct attactgtgc gaactgggac 300
 ggagactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 348

<210> 27
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0019]

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.34 VH

<400> 27

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
	Ala Asn Trp Asp Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
	100	105	110
	Thr Val Ser Ser		
	115		
	<210> 28		
	<211> 333		
	<212> DNA		
	<213> 小家鼠		
	<220>		
	<221> 尚未归类的特性		
	<223> 鼠 SC93.51 VL		
	<400> 28		
	aacattgtgc tgacceaaate tccagattct ttgctgtgt ctctaggcca gagggccacc		60
	atactctgca gagccagtga aagtgttgat agttatggca ataattttat gcactggta		120
	cagcagaaac caggacagcc acccaaaact ctcactatc ttgcatccaa cctagaatct		180
[0020]	ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcacct caccattgat		240
	ccctgtggagg ctgatgatgc tgcaacctat taetgtcagc aaaattitga ggaacctgg		300
	acgttcggtg gaggcaccaa gctggaatc aaa		333
	<210> 29		
	<211> 111		
	<212> PRT		
	<213> 小家鼠		
	<220>		
	<221> 尚未归类的特性		
	<223> 鼠 SC93.51 VL		
	<400> 29		
	Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
	1 5 10 15		
	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr		
	20 25 30		
	Gly Asn Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		

	35		40		45	
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala
	50		55		60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
	65		70		75	
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala
			85			
Glu	Asp	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly
			100			

<210> 30
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.51 VH

[0021]

<400> 30	
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaggta	60
tcctgcaagg cttctgggta tggattcaact agctacaaca tgtactgggt gaagcagagc	120
catggaaga gccctgagtg gattggatat attgatcctt acaatggtgg tactagctac	180
uaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac	240
atgcattcca acagcctgac atctgaggac tetgcagtct attactgtgc aagaagcgac	300
tacggtagag aggetatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctcca	357

<210> 31
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.51 VH

<400> 31

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

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

[0022] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.160 VL

<400> 32
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggcact 60
 atgagctgca agteccagtc gactctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctactigacc 120
 tggtaaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atceactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacagge agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcagctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
 cccacgttcg gtctctggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 33

<211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.160 VL

<400> 33

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

[0023] Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

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

<210> 34
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.160 VH

<400> 34

cgatcctgt tggcgcagtc tggacctgaa ctgaaaaagc ctggagagac agtcaagate 60

tcttgcgaagg cttctgggta taccttcaaca gactatggaa tacactgggt gaagcagget 120

ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggetgg ataaacacca agactgggtg gccaacatat 180

gcagatgact tcaaggaag gtttgccttc tctttgaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aattgaggac acggetacat atttctgtgc tgggtgggaat 300
 agcctttact acggiagtag gccttactgg ggccaaggga cctctgtcac tgtctctgca 360

<210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93, 160 VH

<400> 35

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

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

[0024] Gly Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Asn Ser Leu Tyr Tyr Gly Ser Arg Pro Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 36
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.216 VL

<400> 36
 gaaatccaga tgaccacagtc tccatccctct atgtctgcat ctctgggaga cagaataacc 60
 atcacttgcc aggcaactca agacattggt aagaatttaa actgggtatca gcagaaacea 120
 gggaaatccc ctccatccct gatciattat gcaactgaac tggcagaagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagigggtc tgggacagac taitctctga caatcagcaa cctggagctc 240
 gaagatttig cagactatta cigtctacag tttiatgagt ttccgctcac gttcgggtgc 300
 gggaccaage tggagctgaa a 321

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0025]

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.216 VL

<400> 37

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

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

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

Tyr Tyr Ala Thr Glu Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 38
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.216 VH

<400> 38
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tctctgtcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgccttgggt tgcgccagact 120
 ceggagaaga ggctggagtg ggtcgcagcc attcatagta atggtgafat cacctactat 180
 ccagacactg tgaagggccg attcaccate tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagctctgac gtctgaggac acagcettgt attactgtgc aazcettgct 300
 tactggggcc aagggactct ggctcactgtc tctgca 336

[0026]

<210> 39
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.216 VH

<400> 39

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

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

<210> 42
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.219 VH

[0028]

<400> 42
 gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaacte 60
 tccgtgtcag cctctggatt cactttcagt agctatggaa tgcactgggt ccgtcaggct 120
 ccagagaagg ggcctggagt ggtcgcatat attagtagta gcggtgttac catctactat 180
 gcagacacag tgaagggecg attcaccatc tccagagaca atgccaaagaa caccctgttc 240
 ttgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac accgccatgt attactgtgc aagacggggg 300
 taigttaact cctttgacta ctggggccaa ggcaccacte tcacagtctc ctca 354

<210> 43
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.219 VH

<400> 43

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

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

[0029] Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

- <210> 44
- <211> 336
- <212> DNA
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.221 VL

<400> 44
gattttttga tgaccCAAAC tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagica gagcattgta catagtaatg gagacaccta tttagaatgg 120
ttctgcaga aaccaggcca gctcCAAAG ctctgatct aCAAAGTTC eaaccgattt 180
tctggggctc cagacaggtt cagtggcagt ggatecagga cagatttcac aotcaagate 240
agcagagtgg aggetgagga tetgggagtt tattactgct ttcaaggTTC acatgttcca 300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttgaa ataaaa 336

<210> 45

<211> 112
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.221 VL

<400> 45

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

[0030] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

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

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 46
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.221 VH

<400> 46
 cagatccagt tggatcagtc tggatcagc ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg ettcctgggia taccctcaca gactattcaa taaactgggt gaagcagget 120
 ccaggaaaag gtttcaagtg gatgggctgg ataacacac acactggtgt gccaacatat 180

gcagatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccac cactgcaat. 240
 ttacagatca acaacctcaa aaatgaggac acggetacgt atttetgtgc gagagcccgc 300
 taigatggtt actaegggag gtttgactat tggggccaag gcaccactct cacagtcicc 360
 tca 363

<210> 47
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.221 VH

<400> 47

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

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

[0031]

Ser Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr Gly Arg Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48
 <211> 321
 <212> DNA

<213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.234 VL

<400> 48
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttat agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
 ggaaaatctc ctcagctect ggictataat gcagaaacct tagcagaagg tgtgiccatca 180
 aggttcagtg ccagtggate eggcacacag ttttetetga agatcaacag cctgcagect 240
 gaagatttig ggagttatta ctgtcaacat catttogggt ctcctgggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

[0032]

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.234 VL

<400> 49

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

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

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

Tyr Asn Ala Glu Thr Leu Ala Glu Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Trp
 85 90 95

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

- <210> 50
- <211> 354
- <212> DNA
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.234 VH

<400> 50
 gatgtacagc ttcaggagtc aggaectggc ctctgaaac ctctcagtc tctgtctctc 60
 acctgctctg teactgaact ctcateaac agtgggttatt actggaactg gatecggcag 120
 ttccaggaa acaaaactgga atggatggcc tacataagct acgatggtag cattacctac 180
 aaccatctc tcaaaaatcg aaictccatc actcgtgaca catcfaagaa ccagtttttc 240
 ctgaagtga attctgtgac taetgaggac acagccaat attactgtgc aagcaactgg 300
 gcagaactgt acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc etca 354

[0033]

- <210> 51
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.234 VH

<400> 51

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

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

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 52
- <211> 324
- <212> DNA
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.239 VL

[0034]

<400> 52
 gaaaatgtgc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60
 atgacctgca gggccagctc aagtgttaagt tccagtgact tgcactggta ccagcagaag 120
 tcaggtgect cccccaaaet ctggatttat agcacatcca acttggett caggatccct 180
 getcettca gtggcagtgg gtcctggggcc tcttgetctc tcacaatcag cagtgtggag 240
 gctgaagaig ctgccactta ttactgecat caatacagtg gttaccctg gacgttcggc 300
 ggaggcacca agetggaaat caag 324

- <210> 53
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.239 VL

<400> 53

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Asp Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ala Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ser Cys Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 54

<211> 354

<212> DNA

[0035] <213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.239 VH

<400> 54

ctggttcagc tgcagcagtc tggagttgag ctggcgagge ctggggcttc agtgaagctg 60

tcttgcaagg cttctggcta cattttcaca agctatggtā taagctgggt gaagcagagā 120

actggacagg gccttgagtg gattggaaac atttatceta gaactggaaa tacttattac 180

aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcgtac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttetgtgc aagagggact 300

cactatgata ccccttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.239 VH

<400> 55

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

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

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

Gly Asn Ile Tyr Pro Arg Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

[0036]

Ala Arg Gly Thr His Tyr Asp Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.243 VL

<400> 56

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggcagtcg ggatgtgggt actgctgtag cctggatca acagaaacca 120

gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccacc ggcacactgg agtcctgat 180

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttaactctca ccattagcaa tgtgcagtet 240

gaagacttgg cagattatit ctgtcagcaa tatagcagct atcacacgft cggagggggg 300

accaagetgg aaataaaa 318

<210> 57

<211> 106

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.243 VL

<400> 57

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

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

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

[0037]

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr His Thr
85 90 95

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

<210> 58

<211> 357

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.243 VH

<400> 58

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc cgggggcctc agtgaagata 60
 tectgcaagg caactggcta cacattcagt agetactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gataggagag attttacctg gaagtggtag aactaactac 180
 aatgagagge tcaagggcaa ggcacattc actgcagata cacctccaa cactgcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tetgcegtct attactgtgc aagacctat 300
 ttctacggtt ccaacttfga cttctggggc caaggeacca ctctcacagt ctectca 357

<210> 59
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.243 VH

<400> 59

[0038]

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Pro Tyr Phe Tyr Gly Ser Asn Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 60
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.252 VL

<400> 60
 gacatccaga tgacacaagc ttcacccctac ttgtctgtat ctctaggagg cagagtcacc 60
 attacttgca aggcaagtga ccacattaat aattggtag cctggtafca gcagaaacca 120
 ggaaatgctc ctaggctctt aatatctcat gcaaccaatt tggaaactgg gtttccttca 180
 agattcagtg gcagtggatc tggaaaggat tacactctca gcattaccag tcttcagaet 240
 gaagatgttg ctacttatta ctgtcaacag fattggaaca ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataga a 321

[0039]

<210> 61
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.252 VL

<400> 61

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Asn Ile Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 62
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.252 VH

<400> 62
 caggttcagc tgcaacagtc tgaogctgag ttggtgaaac ctggagcttc agtgaagata 60
 tcctgcaagg tttctggctt cagcttcaact gaccacacta ttcactggat gaggcagagg 120
 cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttatccta cagatggaaa tactaggtat 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggcctcattg actgcagaca aatcctccac cacagcctac 240
 [0040] atgcagetca gcagcctgae atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aaaaaggggt 300
 tactactggt acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc ctea 354

<210> 63
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.252 VH

<400> 63

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Phe Thr Asp His
 20 25 30

Thr Ile His Trp Met Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Thr Asp Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Arg Gly Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

[0041]

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.253 VL

<400> 64
 gacattgtga tgaccacgac tcaaaaatc atgtccacat cagtaggaga caggatcacc 60
 atcacctgca aggccagica gaatgttctg actacigtag actggatcca acagaaaacca 120
 gggcagtcct ctaaagtacl gatttccctg gcacccaacc ggcacactgg agtccctgat 180
 cgtttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 240
 gaagacctgg cagattatit ctgtctgcaa cataggaatt atcctctgac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 65
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.253 VL

<400> 65

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

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

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

Ser Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

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

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

[0042]

<210> 66
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93. 253 VH

<400> 66

gaagtgaagc tggaggagtc tgggggagc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgtttcagt agttatgaca tgtcttgggt tcgccagact 120

ccggagaaga ggetggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtgtaatta cacctactat 180

ccagacagtg tgaaggccg attcaccctc tccagagaca atgccaggaa caccctgtac 240

ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaetat 300

gattaccctg attacgetat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagteac cgtctctctc 360

<210> 67

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.253 VH

<400> 67

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0043]

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

Ala Arg His Tyr Asp Tyr Pro Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68

<211> 321

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.255 VL

<400> 68

gacatccaga tgacacaatc ttcatcctac ttgtctgtat ctctaggagg cagagtcacc 60

atfactigca aggcaagtga ccacatcaat aattggttag ccttggtatca gcagaaacca 120

ggaaatgcc ctagctctt aatatttgg gcaaccagtt tggaaactgg ggttccttca 180
 agattcagtg gcagtggate tggaaaggat tacactctca gcataaccag tcttcagagt 240
 gaagatgtag gtaactatta ctgtcaacag taitggagia ttccgtatac gttcggaggg 300
 gggaccaage tcgaaataaa a 321

<210> 69
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.255 VL

<400> 69

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

Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp
 20 25 30

[0044]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Ile Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 70
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.255 VH

<400> 70
 caggttcagc tgcaacagtc tgacgcigag ttggigaagc ctggatcttc agtgaagata 60
 tcttgcgaagg tttctggcct caccttcaact gaccatactt ttcactggat gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggaatg gattggatat atttatccta gagatggtaa tactaagtat 180
 aatgagaaat tcacgggcaa ggccacattg actgcagaca gatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca acagcctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagtictaac 300
 tgggcccagt ggtacttcga tatctggggc acagggacca cggtcaccgt ctctctca 357

<210> 71
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.255 VH

[0045]

<400> 71
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp His
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Thr Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Ser Asn Trp Ala Gln Trp Tyr Phe Asp Ile Trp Gly Thr Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 72
- <211> 321
- <212> DNA
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.256 VL

<400> 72
gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gtgcaagtea gggeattaga aattatttaa actggtatea gcagaaacca 120
gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagat tacactcagg agteccatca 180
aggttcagig gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatacgcaa cciggaacct 240
gaagatatig ccacttacta ttgtcagcag taiggttaagc ttccgtacac gttcggaggg 300
gggaccaage tggaaataaa a 321

[0046]

- <210> 73
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.256 VL

<400> 73

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Lys Leu Pro Tyr
85 90 95

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

- <210> 74
- <211> 351
- <212> DNA
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.256 VH

<400> 74
 gaagtgaagc ttgaggagtc tggaggagge ttggtgcaac ctggaggate catgaaactc 60
 tetlgtgctg cctctggatt cacttttagt gaagccctgga tggactgggt ccgccagtct 120
 ccagagaagg ggcttgagtg ggttgcctgaa attagaagca aagttaataa tcatgaaaca 180
 tactatgctg agtctgtgaa agggagggtc accatctcaa gagatgattc caaaagtagt 240
 gctctacctg aatgaacag cttagaget gaagacactg gcatttatta ctgtatcagg 300
 aatgattact ttgattactg ggccaagge accactctca cagtctcttc a 351

[0047]

- <210> 75
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> 小家鼠

- <220>
- <221> 尚未归类的特性
- <223> 鼠 SC93.256 VH

<400> 75

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Val Asn Asn His Glu Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ile Arg Asn Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76

<211> 318

<212> DNA

[0048] <213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性

<223> 鼠 SC93.267 VL

<400> 76

gacatccaga tgacacagtc tccatctcca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60

atcacttgca gggcaagcca agacattaac aagtttatat ctigtaccac acacaggcct 120

ggaaaaggtc ctaggctgct cattcattac gcactacat tacagccagg catcccatca 180

aggttcagtg gauglgggfc tgggagagat tattcttcca gcatacagca ccigggagcct 240

gaagataatg eaacttatta ttgtctacag taigataate tgtggacgtt cggtggagge 300

accaagctgg aatcaga 318

<210> 77

<211> 106

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.267 VI.

<400> 77

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

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

Ile Ser Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
 85 90 95

[0049]

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
 100 105

<210> 78
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.267 VH

<400> 78

gaggtecaac tgeaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggettc agtgaggatg 60
 tcttgcgaagg ettctggata cacattcact gactacaaca tgtactgggt gaagcagagc 120
 ctctggaaga gccttgagtg gattggatat atttacccta acactggtgg tgctacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtgaaca agtctctccag tacagccttc 240
 atggagctcc gcagcctgac atcggaggat tctgcagtct attactgtgg aagaggggga 300
 ctgggccctt ttgcttactg gggecaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

<210> 79
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.267 VH

<400> 79

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

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

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

[0050]

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

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

Gly Arg Gly Gly Leu Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 80
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.15.1 VH

<400> 80

gacgtgaagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ttggagggtc ccigaaattc 60
 teetgtgcag cctctggatt cactttttagt agttattata tgccttgggt tcgccagact 120
 ccagagaaga ggctggagtt ggtcgcagcc attaatatta atggtggtag tacctactat 180
 ccagacactg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagctgaa gctcaggagc acagccttgt attactgtgc aggacatggg 300
 ggctacggc tcccttttga gtactggggc caaggeacca ctctcacagt ctctctca 357

<210> 81
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.15.1 VH

<400> 81

[0051]

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Leu Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ile Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly His Gly Gly Leu Arg Leu Pro Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 82
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.266 VL

<400> 82
 gatatccaga tgacacagac tacatcctec ctgtctgect ctctgggaga cagagtcacc 60
 atcagttgca gtgcaagtca gggcattaga aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
 gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccatcagcaa cctggaacct 240
 gaagatattg ccaattacta ttgtcagcag tatggtaagc ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaatana t 321

[0052]

<210> 83
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<220>
 <221> 尚未归类的特性
 <223> 鼠 SC93.266 VL

<400> 83
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Lys Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 100 105

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87

<400> 87
000

[0053]

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89

<400> 89
000

<210> 90

<400> 90
000

<210> 91

<400> 91
000

<210> 92

<400> 92
000

<210> 93

	<400> 93 000	
	<210> 94	
	<400> 94 000	
	<210> 95	
	<400> 95 000	
	<210> 96	
	<400> 96 000	
	<210> 97	
	<400> 97 000	
	<210> 98	
	<400> 98 000	
[0054]	<210> 99	
	<400> 99 000	
	<210> 100	
	<211> 321	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> hSC93.253 VL DNA	
	<400> 100	
	gacattcaga tgacacagag ccttccagt ctgtccgat ccgtggcga ccgttgaca	60
	atcacatgca aggctagta gaatgtgaga accaccgtg attggtatca gcaaaagcct	120
	ggtaaggcac ctaaactgct gatafacctg gcatccaata gacacaccgg agtcccaage	180
	cggttcagtg gctccggcag tggtaaccgat ttactctga ccatctecag ccttcagcca	240
	gaggactttg ccacctatta ttgccctcag caccggaact acccctgac tttegggtga	300
	ggaacaaaag ttgaaatcaa g	321
	<210> 101	

<211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hSC93.253 VL 蛋白

<400> 101

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

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

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

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

[0055]

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

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

<210> 102
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hSC93.253 VH DNA

<400> 102

gaggtgcaac tegttgagag cggcggaggt ttggtgaaac caggaggaag tctgcgctg 60
 agctgcgctg ccagtggttt caccitctcc agctatgata tgagctgggt geggcagget 120
 cecggtaagg gactggaatg ggttictact atcagtagtg gaggcaacta caactactac 180
 cecgattctg tgaagggtcg gtttactatt agccgtgaca acgctaagaa cagcctctat 240
 ctgcagatga atagtcttcg cgcagaggat accgcegtat actactgegc taggcattat 300

gactatcctg attatgccat ggattactgg gctcagggca caacagtcac tgtgagctct 360

- <210> 103
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> hSC93.253 VH 蛋白

<400> 103

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

[0056]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Tyr Asp Tyr Pro Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

- <210> 104
- <211> 321
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> hSC93.256 VL DNA

<400> 104

gatatccaga tgaccacgac tcctctctcc ctgtccgcac cagtaggaga cagggtgaca 60

atcacatgct cagcctctca agggataaga aactatctca actggtatca gcaaaaacca 120
 ggaaggtcc ccaaactgct gatttattat acctcccagc ttcatcctgg ggtccctagc 180
 cgtttctccg gctctggcag cggcacagac ttcacactga ctatctcttc tctgcaacca 240
 gaggacgtgg ccacttacta ctgccagcaa tacggtaaac ttccctacac cttegggcag 300
 ggtaccaaat tggagatcaa g 321

<210> 105
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hSC93.256 VL 蛋白

<400> 105

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

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

[0057]

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Lys Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 106
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hSC93.256 VH DNA

<400> 106
 gaggtgcagc ttgtcgaaag tggcgggggc ttggtccagc ctgggggaag tctcaggetg 60
 tctgcgcgct ctcccggtt cacttttagt gacgcttga tggactgggt gcgtcaggct 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtcggcgag atcaggagca aggttaataa ccatgaaact 180
 tactacgcc aatccglga aggcglttc accatactc gtagcagacag taagaactcc 240
 ctctacctgc agatgaacag tctgaaaact gaggacactg ctgtgtacta ctgtgcacga 300
 aatgattact tcgactactg ggggcagggc actacagtga cagtgtcttc c 351

<210> 107
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hSC93.256 VH蛋白

<400> 107

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

[0058]

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

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Arg Ser Lys Val Asn Asn His Glu Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108

<400> 108
000

<210> 109

<400> 109
000

<210> 110

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hSC93.253 轻链蛋白

<400> 110

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

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

[0059]

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

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 111

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hSC93.253 重链蛋白

[0060]

<400> 111

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Tyr Asp Tyr Pro Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	115	120	125
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
	130	135	140
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
	145	150	155 160
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	165	170	175
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180	185	190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200	205
[0061]	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215	220
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
	225	230	235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245	250	255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265	270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280	285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295	300
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
	305	310	315 320
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		

		325						330						335		
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
					340				345					350		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
					355				360					365		
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
					370				375					380		
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405						410					415
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
					420						425					430
[0062]	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
					435				440					445		
	Gly															
	<210>	112														
	<400>	112														
		000														
	<210>	113														
	<211>	449														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	hSC93.253ss1	重链蛋白													
	<400>	113														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
	1				5						10				15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
					20					25					30	

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg His Tyr Asp Tyr Pro Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

[0063]

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

[0064]

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hSC93.256 轻链蛋白

<400> 114

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

[0065]

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Lys Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 115

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hSC93, 256 重链蛋白

<400> 115

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

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

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0066]

Gly Glu Ile Arg Ser Lys Val Asn Asn His Glu Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

[0067]

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 116

<400> 116
000

<210> 117

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

[0068]

<220>

<223> hSC93.256ss1 重链蛋白

<400> 117

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

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

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Arg Ser Lys Val Asn Asn His Glu Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

[0069]

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

[0070]

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

hEMR2同种型a的氨基酸序列

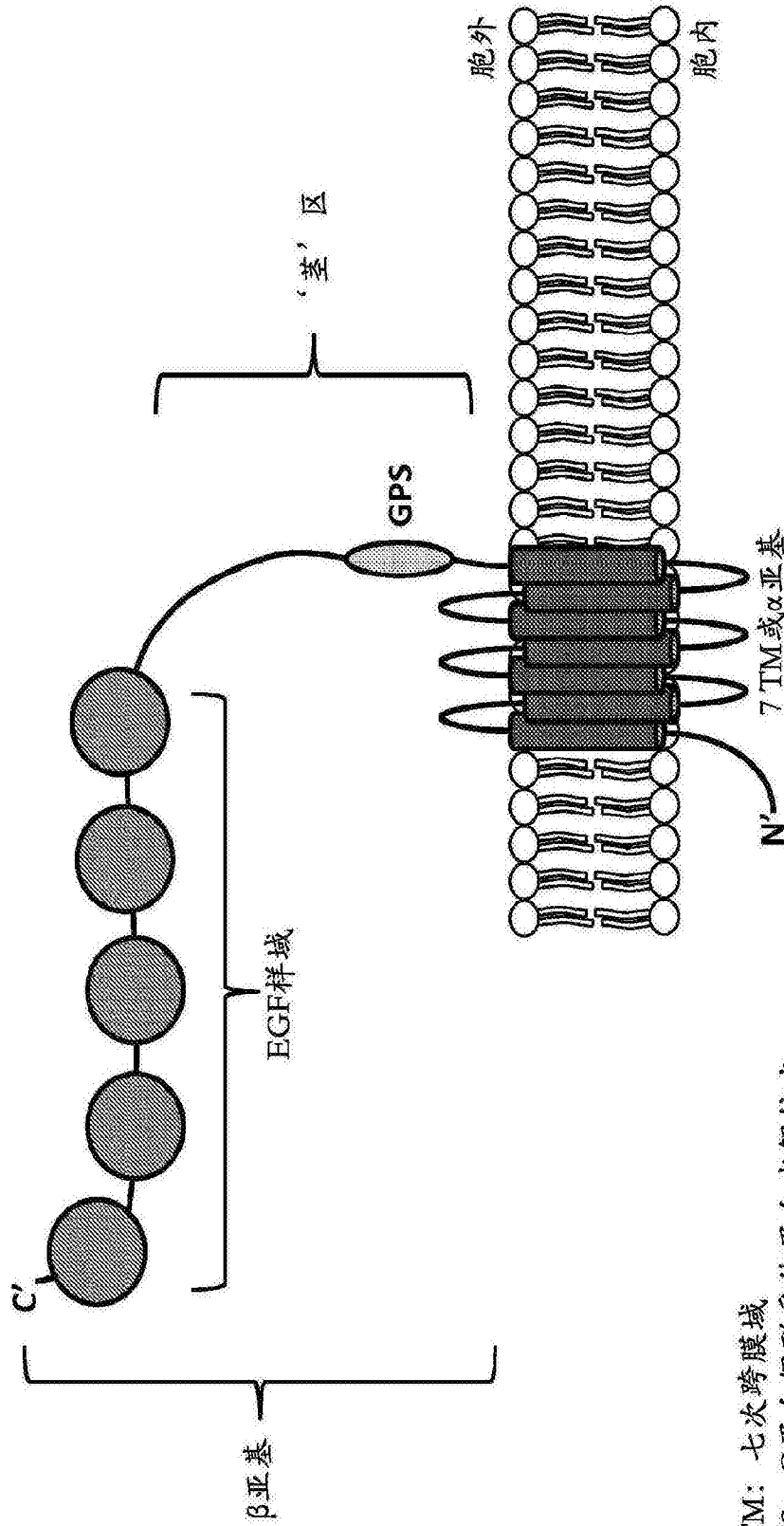
```

>gi|23397681|ref|NP_038475.2| EMR2同种型a前体[智人]
1  mggrvflvfl afcvwltlpg aetqdsrgca rwcpqdsscv natacrnpg fssfseiitt
61  pmetcddine catlskvscg kfscdcwnteg sydcvcspgy epvsgaktfk nesentcqdvdv
121 decggnprlc ksygtcvntl gsytcgclpg fkllkpedpk1 ctdvnectsg qnpchssthc
181 lnnvgsyqcr crpgwqpi spngpnntvc edvdecssgg hqcdsstvcf ntvgsyscrc
241 rpqwkprhgi pnngkdtvce dmtfstwtpp pgvhsqtlsr ffdkvqdlqr dykpglannt
301 iqsilqalde lleapgdlet lprlqghcva shlldgledv lrglsknlsn gllnfsypag
361 te1slevqkq vdrsvtlrqn qavmqldwnq agksgdpgps vvg1vsiipgm gkllaeaplv
421 lepekqml1h ethggl1qdg sp1llsdvis aflsnndtqn lsspvttffs hrsviprqqv
481 lcvfwehgqn gcghwattgc stigttrdtst icrc 1 |sf avlmahydva eedpvltvit
541 ymglsvsl1c l1laaltf1l ckaiqntsts lhlqlslclf lahllflvai dqtghkv1cs
601 iaagtlhyly latltwmlle alylfltarn ltvvnyssin rfmkklmpfv gygvpavtva
661 isaarsrphly gtpsrw1qp ekgfiwfglg pvcaifsvnl v1flvtlwl knrlssl1nse
721 vst1rntrml afkatakifi lgctwclgil qvgpaarvma y1fti1nslq gvfiflvycl
781 lsqqvregyg kwskgirk1k tesemht1ss sakadt1kps tvn SEQ ID NO. 1

```

图1A

hEMMR2同种型a的示意图



7 TM: 七次跨膜域
 GPS: G蛋白偶联受体蛋白水解位点
 EGF: 表皮生长因子

图1B

域	氨基酸
EGF1	25-66
EGF2	67-118
EGF3	119-162
EGF4	163-211
EGF5	212-260
茎	261-478
GPS	479-529
第一TM	541-561
第二TM	570-590
第三TM	606-626
第四TM	645-665
第五TM	684-704
第六TM	736-756
第七TM	761-781
IC	782-823

图1C

EMR2域和同种型

同种型	缺失的氨基酸	域	缺失的外显子
2	531-596	第一TM	14
3	163-212	EGF4	6b
4	120-212	EGF3&4	6a/b
5	120-302	EGF3-5	6a-9
6	675-728	第五TM	16/17a

图1D

样品	缺失的氨基酸	域	缺失的外显子	同种型
正常BM AML23p0 CD34+CD86- AML31p0 CD34+CLEC12A-	473-530	GPS	13	-
正常BM	675-697	第五TM	16	-
正常BM	398-530	茎 + GPS	12/13	-
正常BM	398-472	茎	12	-
AML31p0 CD34+CLEC12A-	120-212	EGF3&4	6	4
AML31p0 CD34+CLEC12A-	531-596	第一和第二 TM	14	2

图1E

通过Illumina全转录组测序确定EMR2 mRNA表达

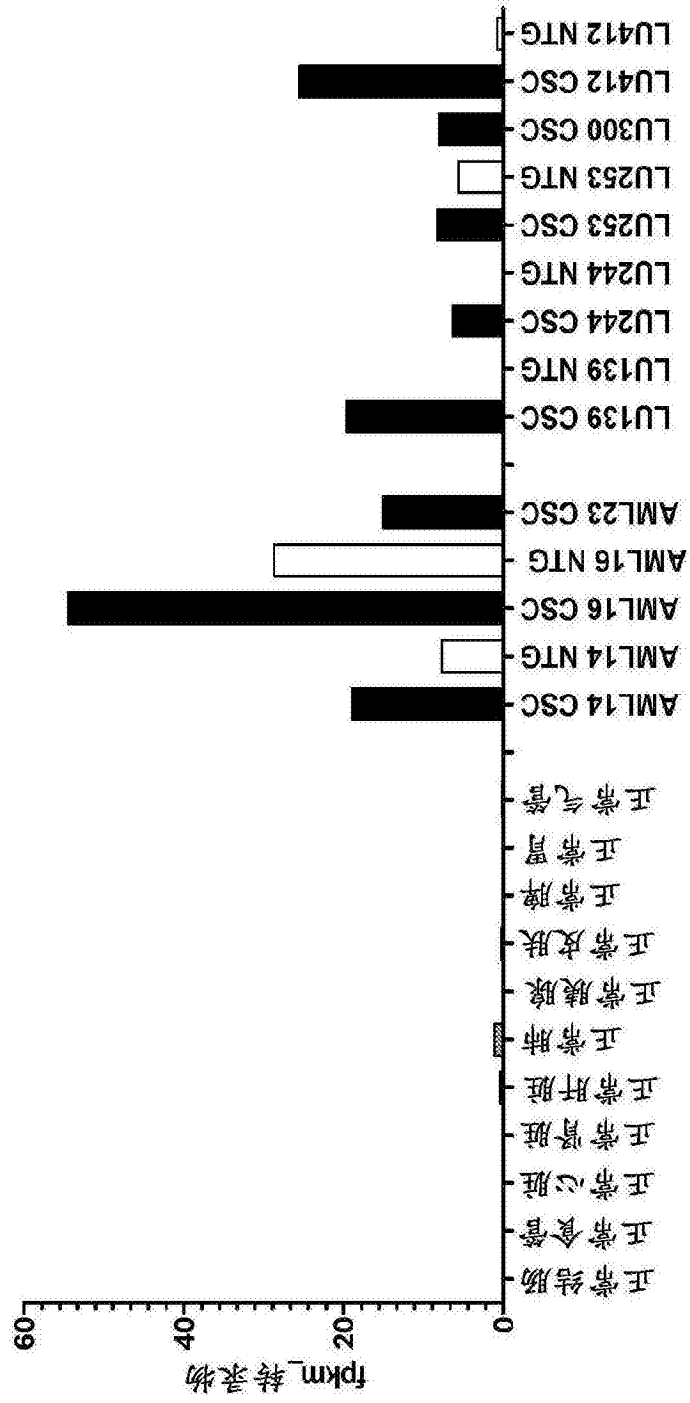


图2

PDX肿瘤细胞中的EMR2 mRNA表达, 如使用qRT-PCR所确定的

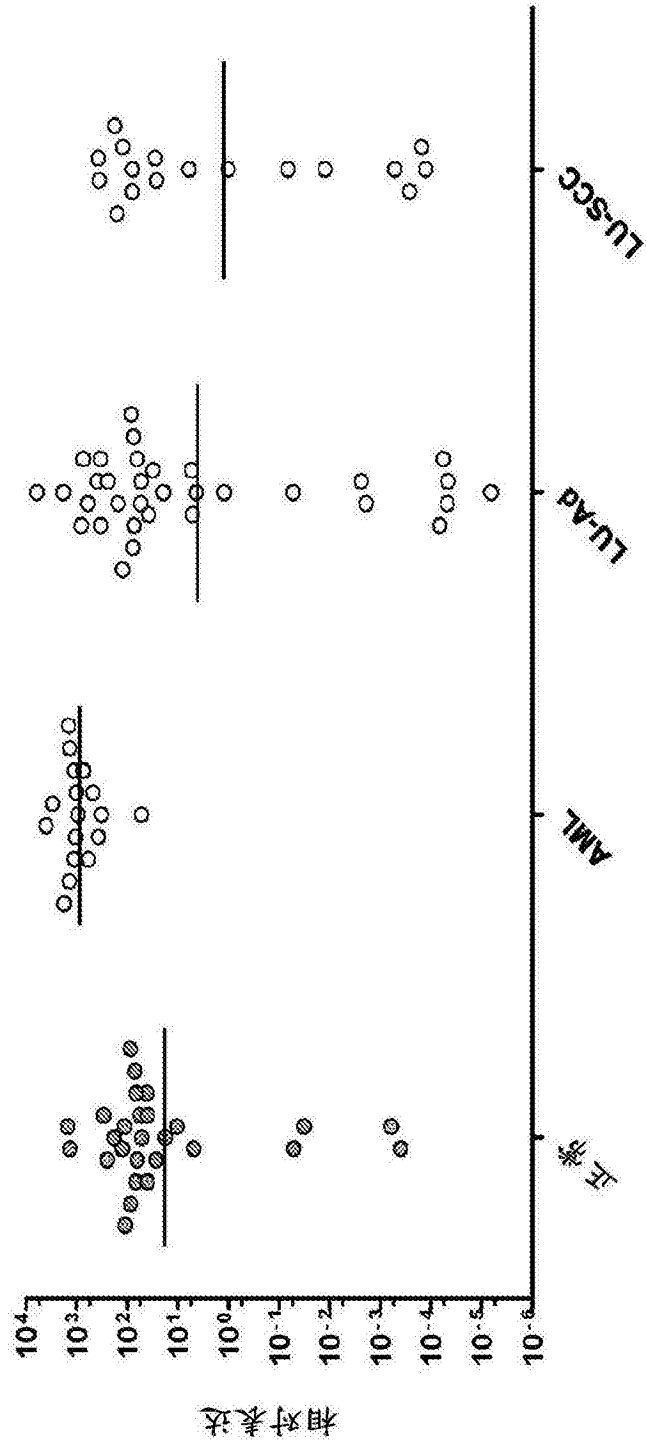


图3

PDX肿瘤细胞系中EMR2 mRNA表达, 如通过微阵列分析所确定的

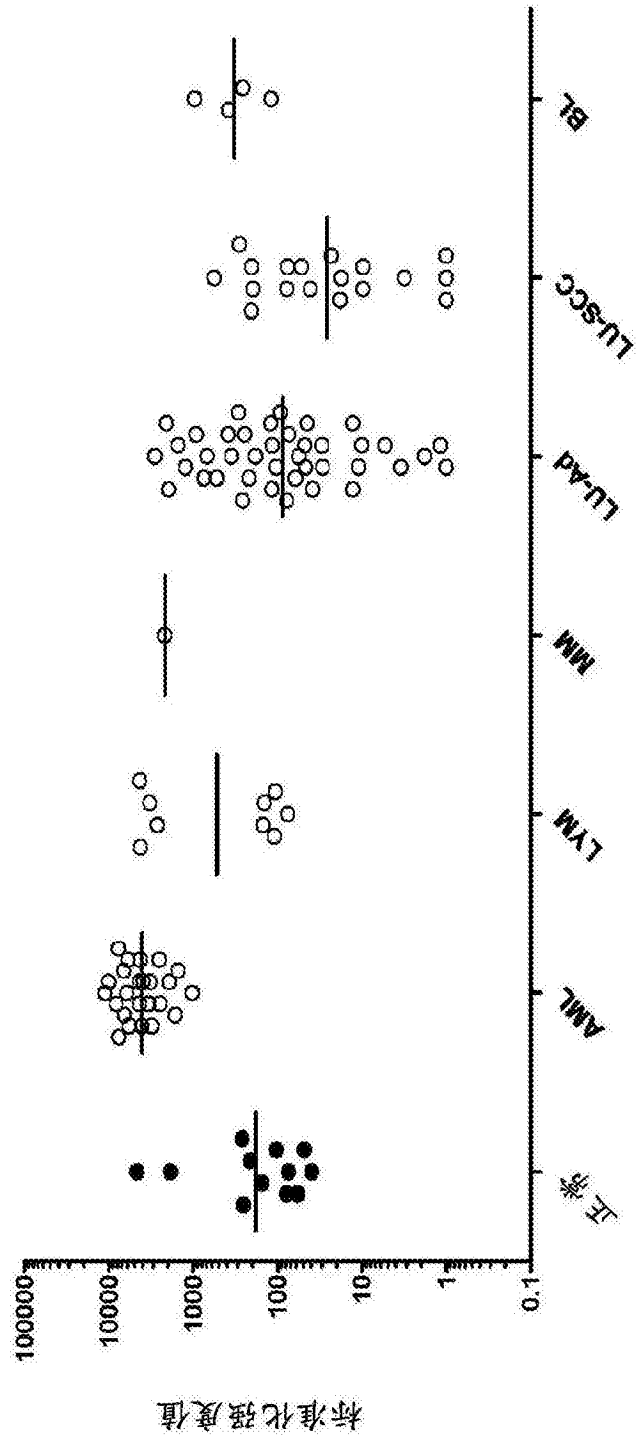


图4

在来自癌症基因组图谱的数据库中的EMR2 mRNA的表达

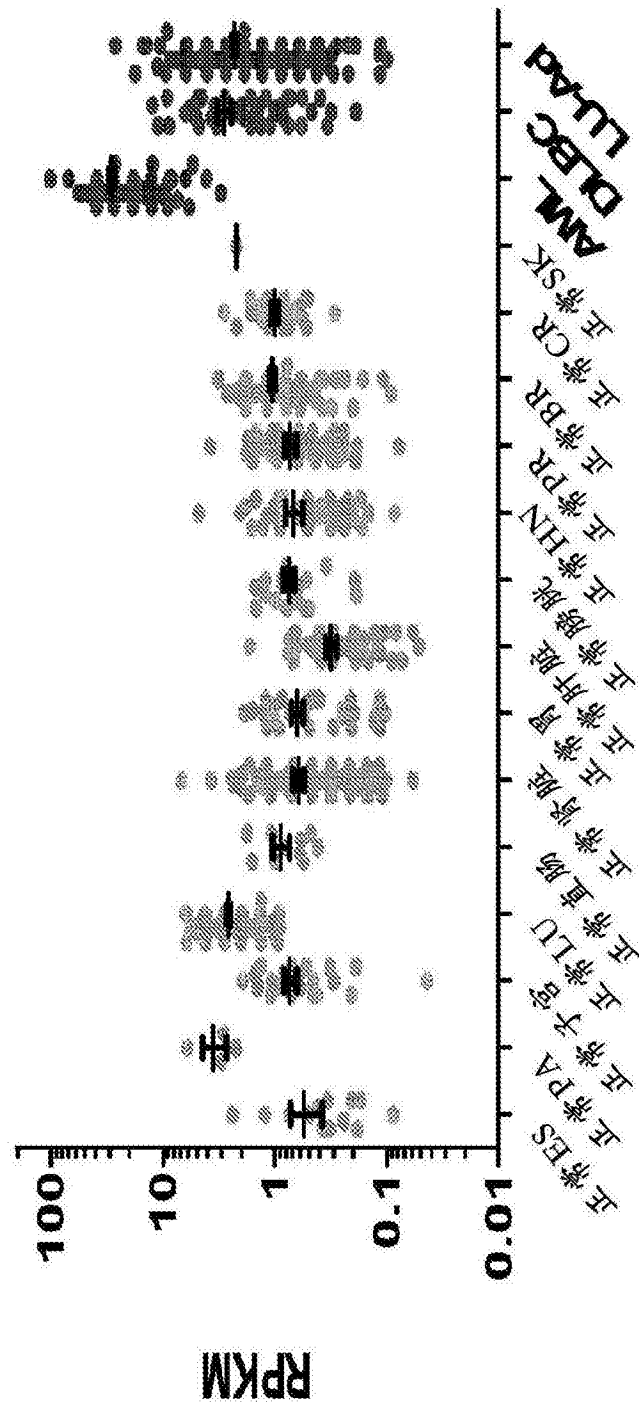


图5

在来自癌症基因组图谱的肺癌肿瘤中低和高EMR2 mRNA表达患者之间的存活差异

EMR2低和高表达患者在LU-Ad中的存活率

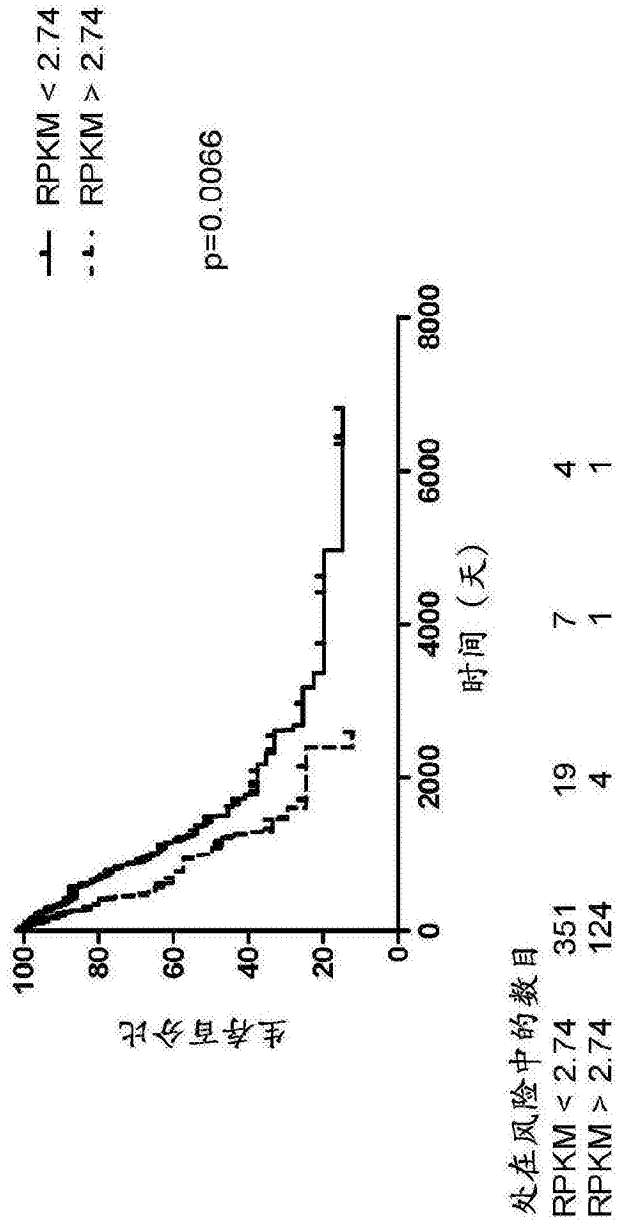


图6

抗EMR2抗体特征

抗体	IVK				FC				Luminex	同种型
	293天然 fz, 生存%	HxEMR2, fz, 生存%	CxEMR2, fz, 生存%	hCD97, fz, 生存%	293天然 FC MFI	HxEMR2 FC MFI	CxEMR2 FC MFI	CD97 FC MFI	分组	
SC93.2	100.9	19.5	102.4	101.2	ND	2615.0	27.2	ND	B	IgG2a
SC93.15	103.1	15.0	100.7	99.5	ND	6412.0	41.2	ND	B	IgG1
SC93.117	103.5	99.8	101.2	92.6	66.4	23421.0	107.0	62.7	C	IgG2a
SC93.160	101.9	96.8	101.2	104.9	67.6	26040.0	62.6	61.8	C	IgG2a
SC93.201	98.03369	99.5302	107.9643	95.98695	96.3	73.4	84.2	83.5	A	IgG2a
SC93.202	101.0044	99.31339	107.3965	105.0523	223	155	168	167	A	IgG2a
SC93.203	107.8553	100.468	107.1722	102.7119	91.3	73.3	79.1	85.8	A	IgG2a
SC93.204	103.1236	93.68396	103.4991	104.619	93.6	80.5	74.2	86.4	A	IgG2b
SC93.205	104.3941	100.5044	97.43651	103.7348	112	158	369	94.9	B	IgG1
SC93.206	101.6783	95.99376	104.806	102.7381	109	142	272	84.5	B	IgG2a
SC93.207	108.4914	96.46273	98.19887	103.3881	96.1	80.8	83.6	84.1	A	IgG1
SC93.208	107.2571	96.10213	98.81602	107.1674	95.5	75.3	82.9	74.2	A	IgG1
SC93.209	103.1497	97.03995	97.72693	105.304	121	101	104	98.1	A	ND
SC93.210	100.3543	105.8964	104.3523	99.13818	213	163	179	164	A	IgG2a
SC93.213	105.4494	101.5151	101.5024	96.26407	93.5	77.5	111	91.1	A	IgG1
SC93.214	102.7612	100.6486	101.3192	102.5993	94.4	83	81.9	74.6	A	IgG1
SC93.215	101.2301	102.9222	104.334	108.4146	94.7	76.3	87.2	77.4	A	IgG2b
SC93.216	106.7317	101.6587	104.5155	107.08	96.8	90.6	220	83.4	A	IgG1
SC93.217	102.5486	100.7932	105.7498	106.5428	95.7	78.3	88.7	76.2	A	IgG2b
SC93.218	100.8617	100.8655	91.48286	102.1744	93.9	127	175	84.2	B	IgG2a
SC93.219	99.14716	99.99935	87.70738	101.5422	95.6	76.2	85.3	87.5	A	IgG2b
SC93.220	102.4148	95.92178	94.35078	101.2734	95.2	3711	85.8	77.9	C	IgG1
SC93.221	103.1773	100.6493	92.20892	99.06336	97.2	5075	72.5	74.2	C	IgG1
SC93.225	92.04523	97.97309	106.0679	102.2058	92.6	76.9	73.4	83.7	A	IgG1
SC93.226	99.45242	100.5371	104.6386	107.0253	101	1621	88.8	86	C	IgG2b
SC93.227	101.0439	96.58189	105.9186	99.95044	94.3	77.2	82.4	85.4	A	IgG2a
SC93.228	103.2243	99.04579	108.017	103.9196	94.4	85.5	84.1	74.9	A	IgG2b
SC93.229	101.6733	100.9464	104.3842	103.5387	117	3337	84.8	95	C	IgG2b
SC93.230	102.5005	102.6534	104.918	102.6563	95.8	75.5	84.4	84.4	A	混合
SC93.231	101.3491	101.1235	100.3672	103.9277	95.9	77.9	83.6	75.5	A	IgG1
SC93.232	100.7792	99.83046	99.50428	98.99995	94.4	84.4	84.7	74.8	A	IgG2a
SC93.233	100.7221	97.24311	92.49453	99.92912	117	229	437	114	B	IgG2b
SC93.237	65.49762	99.18552	103.4413	104.2726	95.2	78.8	74.4	81.2	A	混合

图7

抗EMR2抗体特征

抗体	IVK				FC				Luminex	同种型
	293天然 fz, 生存%	HxEMR2, fz, 生存%	CxEMR2, fz, 生存%	hCD97, fz, 生存%	293天然 FC MFI	HxEMR2 FC MFI	CxEMR2 FC MFI	CD97 FC MFI	分组	
SC93.238	100.1191	100.1548	108.1061	105.3621	96.2	4609	86.6	76.1	C	IgG1
SC93.239	103.1647	16.80835	16.73421	106.1041	97.8	71091	76700	925	A	IgG2b
SC93.240	101.115	17.12026	15.06079	23.53578	222	28654	20677	15835	C	IgG2a
SC93.241	100.3921	11.50593	10.30675	14.08404	823	55320	33003	47837	B	IgG2a
SC93.242	102.857	45.33057	38.94506	68.64213	96.9	25033	24654	10461	A	IgG2a
SC93.243	103.6734	68.65433	20.84169	91.89716	97.1	42735	65775	8144	A	IgG2b
SC93.249	102.9931	96.24316	55.3136	76.51441	107	3609	2245	726	C	ND
SC93.250	103.6462	99.86466	104.0106	86.25856	1572	885	797	813	B	ND
SC93.252	101.9414	10.83034	9.417316	9.090175	326	40497	45165	43835	B	IgG2a
SC93.253	103.2035	13.42689	11.13274	92.17698	99.5	38290	48656	328	A	IgG2a
SC93.254	103.1732	14.62267	11.69288	90.73825	92.9	72889	77018	1627	A	IgG2b
SC93.255	101.1377	12.12862	9.627367	9.090174	269	36415	43830	43288	B	ND
SC93.256	101.5123	12.50444	12.25301	92.40587	109	42580	37616	88.3	A	IgG2a
SC93.257	100.2827	39.49488	33.11815	49.76707	101	20089	22097	10594	A	ND
SC93.261	107.4367	94.43766	83.56555	82.56363	1256	86.9	8112	89.3	A	ND
SC93.262	102.6813	100.8555	104.8653	93.48492	111	25177	92.2	95.1	C	ND
SC93.263	101.8566	45.30295	42.60548	46.43182	101	18812	21656	10269	A	ND
SC93.264	104.1685	15.06682	12.77814	75.76235	109	38477	34975	89	A	IgG2a
SC93.265	103.5573	48.54864	38.08937	54.70454	102	16416	20209	9805	A	ND
SC93.266	104.8383	13.11941	12.67312	99.20715	102	49859	40450	98.3	A	IgG2a
SC93.267	102.7985	15.64763	27.79684	89.03793	143	36649	38739	132	A	IgG2a

图7续

抗EMR2抗体特征

抗体	IVK				FC				Luminex	
	293天然 fz, 生存%	HxEMR2 fz, 生存%	CxEMR2 fz, 生存%	hCD97 fz, 生存%	293天然 FC MFI	HxEMR2 FC MFI	CxEMR2 FC MFI	CD97 FC MFI	分组	同种型
SC93.268	103.0539	11.82113	9.522343	31.39053	100	49084	46158	18622	A	ND
SC93.269	102.9953	96.20899	102.8903	84.75442	113	2956	85.2	104	C	ND
SC93.273	93.02122	101.1052	104.4762	100.0836	101	90	142	104	A	ND
SC93.274	99.31721	103.5137	95.45466	102.562	102	91.3	862	295	A	ND
SC93.275	104.6472	102.6857	104.4504	102.0196	101	86.5	82.5	88	A	ND
SC93.276	101.2843	100.7633	106.7295	101.9776	95.1	147	107	88	A	ND
SC93.277	102.6072	105.777	101.9759	102.8978	100	104	83.7	75.5	A	ND
SC93.278	100.4125	106.2706	103.6861	99.25074	93.5	85.8	86	87.3	A	ND
SC93.279	97.68095	103.9878	104.1245	98.99887	96.2	79.1	78.4	87.5	A	ND
SC93.280	104.368	102.3392	103.3431	103.3193	101	86.6	84.7	88.9	A	ND
SC93.281	101.1854	106.1049	103.5951	101.6788	99.4	88.4	90.9	89.4	A	ND
SC93.285	83.69699	107.4536	102.5835	103.7274	101	90.9	76.4	85.4	A	ND
SC93.286	99.26137	104.3082	12.73771	36.68868	746	2204	77780	49790	A	ND
SC93.287	97.74536	105.2228	108.0146	104.4913	100	91.1	87.6	91.4	A	ND
SC93.288	102.1131	106.3172	107.003	104.493	101	84.2	81.9	89.5	A	ND
SC93.289	103.6593	104.1079	102.197	103.6584	91.7	89.5	74.8	88.7	A	ND
SC93.290	102.9163	104.9014	107.3851	101.8953	99.1	89.1	89.4	77.5	A	ND
SC93.291	95.18127	99.85416	102.5405	101.0894	98.2	75.7	85.9	79.9	A	ND
SC93.292	98.81042	104.0409	102.0494	103.4838	98.4	79.4	77.4	77.7	A	ND
SC93.293	102.8991	104.5029	104.6586	104.1958	98.9	86.7	85.6	78.7	A	ND

图7续

抗EMR2鼠抗体氨基酸可变区轻链序列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
SC93.15	DIVMITQSHKFMSTSVGDRVSTIC	KASQNVGTSVA	WYQQKPGHSPKLLIY	WASTRHT	GVPDRFTGSGSGTDFTSLTISSVQSEDLTDYFC	QQYSSVPLT	FGGGTKLEIK	21
SC93.34	DVLMITQSPISLPVSLGDDQASISC	RSSQSIHSHNGNTYLD	WYLOKPGQSPKLLIY	KVSKRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	FOGSHVPWT	FGGGTKLEIK	25
SC93.51	NIVLTQSPASLAIVSLGQRATISIC	RASEVDSYGNFMFMH	WYQQKPGQPPKLLIY	LASNLES	GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYC	QQNFEDPRT	FGGGTKLEIK	29
SC93.160	DIVMITQSPSSLIVTAGERKVTMTC	KSSQSLINSGNQKNYLT	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRES	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEADLAVYYC	QINDYSYPT	FGSGTKLEIK	33
SC93.216	EIQMTQSPSSMSASISLGRITTC	QATQDIVKINLN	WYQQKPGKSPSSLIY	YATELAE	GVPDRFSGSGSGSDYSLTISNLESEDFADYYC	LQFYEFPLT	FGAGTKLEIK	37
SC93.219	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC	SASSSVSYMY	WYQQKPGSPPRLIY	DTSNLAS	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYC	QQWSSYPP	FGGGTKLEIK	41
SC93.221	DFLMTQTPLISLPVSLGDDQASISC	RSSQSIHSHNGDITYLE	WFLOKPGQSPKLLIY	KYSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	FOGSHVPPFT	FGSGTKLEIK	45
SC93.234	DIQMTQSPASLASVGETVTITC	RASENIYSYLA	WYQQKQKSPQLLIY	NAETLAE	GVSSRFASGSGTQISLQINSLQPEDFGSYWC	QHHFGSNWT	FGGGTKLEIK	49
SC93.239	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTC	RASSVSSSDLIH	WYQQKSGASPKLWIY	STSNLAS	GVPARFSGSGSGASCSLTISVVEAEDAATYYC	HQYSGYPWT	FGGGTKLEIK	53

抗EMR2鼠抗体氨基酸可变区轻链序列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ.ID NO
SC93.243	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	KASQDVGTAVA	WYQQKPGQSPKLLIY	WASTRHT	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNMQSEDLADYFC	QQYSSVHT	FGGGTKLEIK	57
SC93.252	DIQMTQASSYLSVSLGGRVTITC	KASDHINWLA	WYQQKPGNAPRLIIS	HATNLET	GFPDRFTGSGSGGKDYTLISLQTEDVATYYC	QQYWNIPYT	FGGGTKLEIE	61
SC93.253	DIVMTOSQKFMSTSVGDRIIITC	KASQNVRTTVD	WYQQKPGQSPKVLIS	LASNRHT	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNMQSEDLADYFC	LQHRNYPLT	FGGGTKLEIK	65
SC93.255	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITC	KASDHINWLA	WYQQKPGNAPRLIIF	GATSLET	GVPSRFSGSGSGKDYTLISLSQSEEDVGTYYC	QQYWSIPYT	FGGGTKLEIK	69
SC93.256	DIQMTQITSSLSASLGDRVTISC	SASQGIIRNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDVATYYC	QQYVKLPYT	FGGGTKLEIK	73
SC93.267	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITC	RASQDINKFIS	WYQHRPGKGRLLIH	YASTLOP	GIPSRFSGSGGRDYFSISINLEPEDVATYYC	LOYDNLWT	FGGGTKLEIR	77
SC93.15.1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	KASQNVGTSVA	WYQQKPGHSPKLLIY	WASTRHT	GVPDRFTGSGSGTDFSLTISNMQSEDLTDYFC	QQYSSYPLT	FGGGTKLEIK	21
SC93.266	DIQMTQITSSLSASLGDRVTISC	SASQGIIRNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDVATYYC	QQYVKLPYT	FGGGTKLEIN	83

图8A(续)

抗EMR2鼠抗体氨基酸可变区重链序列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
SC93.15	EVQLQQSGPELVKPGASVKISKCKGSGYFT	DYFMN	WVKLSHGKSLWIG	EINPNINGGTNPNQKFKG	KATLTVDKSSSIAYMEIRSLTSEDSAVYYCAR	PGTNY	WGPGTTLTVSS	23
SC93.34	EVQLQQSGTYLARPASVKMSCKASGYTFS	SYWMH	WVKQRPROGLEWIG	AIPENSDTNPNQKFKG	KAKLTAVTSASTAYMELSLTSEDSAVYYCAN	WDGDFDY	WVGQGTTLTVSS	27
SC93.51	EIQLLQSGPELVKPGASVKVSKCKASGYGFT	SYNMY	WVKQSHGKSLWIG	YIDPYNNGGTSYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR	SDYGREAMDY	WVGQGTSTVTVSS	31
SC93.160	QILLVQSGPELKRPGETVTKISKCKASGYFT	DYGIH	WVKQAPGKGLKWMWIG	WINTKTGVTYADDFKGG	RFAPSLTASATAYLQINLNKIEDIATYFCAG	GNSLYYGSRPY	WVGQGTTLTVSA	35
SC93.216	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	SYGMS	WVROTPKRLWVA	AIHSNGDITYPDVYKGG	RFTISRDNAKNTLYLQIMSSLTSEDTALYYCAN	LAY	WVGQGTTLTVSA	39
SC93.219	EVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS	SYGMH	WVROAPEKLEWVA	YISSSGGTYVADTVKGG	RFTISRDNAKNTLFIQIMTSLRSEDAMYYCAR	RGYNSFDY	WVGQGTTLTVSS	43
SC93.221	QIQLVQSGSELKRPGETVKISKCKASGYTFT	DYSIN	WVKQAPGKGFKWMWIG	WINTYTGVTYADDFKGG	RFAPSLTASATAYLQINLNKIEDIATYFCAR	ARYDGYVGFEDY	WVGQGTTLTVSS	47
SC93.234	DVQLQESGPELVKPSQSLTCSVTDYSIT	SGYYWIN	WVROFPGNKLEWVA	YISYDGSITYNPSLKN	RISITRDTSKNQFFLKNVSTTIEDTATYYCAS	NWADWYFEDY	WVGQGTTLTVSS	51
SC93.239	LVQLQQSGVELARPASVKLSCKASGYFT	SYGIS	WVKQRTGGGLEWIG	NIVPRTGNTYYNEKFKD	KATLTADKSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYFCAR	GTHYDPLDY	WVGQGTTLTVSS	55

抗EMR2鼠抗体氨基酸可变区重链序列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
SC93.243	QVQLQDSGAEIMKPGASVKISKATGYTFS	SYWIE	WVKQRPGHGLEWIG	EILPGSGRTMYNERLKG	KATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	PYFYGSNFDY	WGQGTTLTVSS	59
SC93.252	QVQLQDSDAELVKPGASVKISKVSGFSFT	DHTIH	WVMRQRPEQGLEWIG	YIYPTDGNTRYNEKFKG	KASLTADIKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYCAK	RGYVWYFDV	WGTGTLTVSS	63
SC93.253	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFATF	SYDMS	WVVRQTPKRLWVA	TISGGNYTYPDSYKQ	RFTFSRDNARNITLYLQMSLSRSEDYALYYCAR	HYDYPDYAMIDY	WGQGTSVTVSS	67
SC93.255	QYQIQQSDDAELVKPGSSVKISKRVSGFIFT	DHIIH	WVKQRPEQGLEWIG	YIYPRDIGNIKYNEKFTG	KALLIADRSSTIAYMQLINSLI SEDSAVYFCAK	SNWAAQWYFDI	WIGIGILVTVSS	71
SC93.256	EVKLEESGGGLVQPGGSMIKLSCAASGFTFS	DAWMD	WVVRQSPKGLEWVA	EIRSKVNHETYYAESYKQ	RFTISRDDSKSSVYLQIMNSLRAEDTGYTCIR	NDYFDY	WGQGTTLTVSS	75
SC93.267	EVQLQDSGFELVKPGASVVRMSCKASGYTFT	DYNMY	WVKOSLIGKLEWIG	YIYPTGTGGATYDQKFKG	KATLTVNKSSTAFMELRSLTSEDSAVYYCGR	GGLGPFAY	WGQGTTLTVSA	79
SC93.15.1	DYKLVESGGGLVKLGGSLKFSCAASGFTFS	SYYMIS	WVVRQTPKRLWVA	AINIINGGSTYYPDTVKQ	RFTISRDNARNITLYLQIMSSLIKSEDYALYYCAG	HGGLRLPFEY	WGQGTTLTVSS	81
SC93.266	EVKLEESGGGLVQPGGSMIKLSCAASGFTFS	DAWMD	WVVRQSPKGLEWVA	EIRSKVNHETYYAESYKQ	RFTISRDDSKSSVYLQIMNSLRAEDTGYTCIR	NDYFDY	WGQGTTLTVSS	75

图8B(续)

抗EMR2鼠抗体核苷酸可变区序列

名称	链	SEQ ID NO
SC93..15	轻链	20
SC93..15	重链	22
SC93..34	轻链	24
SC93..34	重链	26
SC93..51	轻链	28
SC93..51	重链	30
SC93..160	轻链	32
SC93..160	重链	34

核苷酸序列

GACATTGTGATGACCAGCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGCGTCAGCATTCCACCTGCAAGGCCAGTCCAGAAATGTGGGTACTTCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAAACGAGGCCA
CTCTCTTAAACTACTGATTACTGGGCCATCCACC66CAGACTG9AGTCCCTGATCGCTTCAKAGGCCAGTGG6ATCTG66ACAGATTTCTCTCACCATTAGCAGTGTGCAGTCTG9AGACTTGA
CAGATTATTTTC TGTCAGCAATATAGCAGCTATCTCTCAGTTTCGGAGGGGGGAGCCAGACTG6AAATAGAAA

GAGGTECAGCTGCACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCTG6GGCTTCAGTGAAGATATCCCTGTAGGGTTCTGGATACACGTTCTEACTGACTTCTCATG9AATGGGTGAAGCTGAGCCATGG
AAAGAGCTTTAGTGGATGGGAAATTTAATCTTAATAATGGTGTACTAATCTACAAACCAAAAGTTTCAAGGGCCAG65CCACATTTGACTGTGACAAAGTCTCCAGCATAGCCCTACATGG6GCTCC
CCAGCCTGACATCTGGAGACTCTGGAGTCTATTACTGTGCCAAGACCCGGGACCGAATCTCTGG6G6CCAG6SCACCACTCTCAGACGTTCTCTCA

GACGTTTTGATGACCAAAAGTCACTCTCCCTGCTTCAGTCTG6GAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAAGTCAAGGCAATGTCTTCAATAGTAAATGG5AAACACTATTTAGATTTG6TACCT
GCCAGAACCAAG6CCAGTCTCCAAAGCTCTCATAGCTTCACAAGTTTCCAAAGCGATTTCTG6GG6TCCAGAGCAG66TCCAGTGG6CA6TGG6ATCAG666CAGAGATTTCCACACTAAG6ATCAGCAGAG6TGG
AGGCTGAGGATCTGG6AGTTAATTACTGCTTTTCAG6TTTCAATGTTCC6TGGACGTTTGG6TGG6AG65CACCAGCTCAAGCTGG6AAATCAMA

GAGGTTCAAGCTCCAGCAGTCTGG6AGCTGTGTTTTGGCAA66CCTGG6G6CCTCCAGTGAAGATGTCCCTGC6A65GCTTCTGGCTACACCTTTCCAGCTACTGGATGGACTGGGTAAAAACAGAG66CCTAG
ACA956TCTGG6AATGG6ATTTGG6GCTATTTATCTGG6AAATAGTGAATCAACTACAAACCAAAAGTTTCAAGGG6CAAG65CCAAACTGACTGGCAGTCCACATCTCCAG6CACTGCCCTACATGG6AGCTCA
G6AGCCTGACAAATG6A65ACTCTGG6GTTTATTACTGTGTG659AAC TGG6G6ACTTTG6ACTACTGG6G6CCAA666CACCACTCTCAGCAGTCTCTCTCA

AACATTTGTGCTGACCCCAATCTCAGCTTCTTTG6GCTTCTTAG666CAGAG6666CCACCATACTCTGCAGAG6CCAGTGAAGTGTGTTAGTAAATGG5CAATAATTTTATG6CACTGG6TACCAGCA
6AAACAG66ACAGCCACCCAAACTCTCATCTATCTGATCCAACTAGAACTGG6G6TCCCCTG6CAGGTTCCAGTGG6CA6TGG6ATCTAG666CAGAGACTTCCACCTCAGCATTG6AATCTGTGG6AG6
CTGATGATECTGCAACTATACTGTCAG6CAAAATTTG6G6ATCTCTGG6AG66CACCAAGCTGG6AAATCAMA

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGG6AGCTG6AGCTG6G6CCTG6G6CCTCCAGTGAAGTATCTCTGC6A66GCTTCTGGCTACAG6TCTACTAGCTACAAAGTGTACTGGGTGA66CAG6GCTATGG
AAAGAGCCTTGAGTGGATGG6ATATATTAATCTTACAAATGGTGGTACTAGCTACAAACCAAAAGTTTCAAGGG6CAAG65CCAAACTGACTGTGACAAAGTCTCCAG6CACTGCCCTACATGGCATCTCA
ACAGCCTGACATCTGAG6ACTCTG6AGTCTATTACTGTGTCCAAAG6666ACTGACTG6G6TGA6666666ACTG6G6ATCTG6G666TCC66G64AGCTCTCAGTCA6C6TCTCTCTCA

GACATTTGTGATGACACAGTCTCCCTTCCATCTGCCCTG6CAGGAGGAGAGGTCACATGAGCTG6CAAGTCTCAGTCCAGGCTGTGTAAACAGTGG6AAATCAAAAGAATCTATTTG6ACCTGG6TA
CCAG6AG66ACCA666CAG66CCTCTA66CTTCTGACTAGTGG6CATTCCACTGG6G6ATCTCAGTGG6G6TCCCTG6ATCTCCAGG6CAG6ATTTCCACTCTCAGCATCAG6CAG6TGG
TGG6G6CTG6AAG6ACTTGG6CAGTCTTACTGTGTCAGAAATGATTAAGTATCTCCAGCCTG6G6TCTTGG6G6CAAG6CTGG6AAGTGAANA

CAGATCTCTGTTGGTGGCAGTCTGG6AGCTG6AACTG6AA66GCTGG6AG66A66ACTG66G666ACTGG6G6G66TGTGG6TTATACCTCAGAGACTTGG6AATAG6ATCTGG6TGG6A66G66CTCCAG66
AAAGGGTTTAAAGTGGATGG6CTGG6ATAA66CACAAGACTGG6TGG6CAG66G6TGG6CAGACTTGG6G6G6G66G66G6G6TGG6CCTCTCTTTGG6AA66CCTCCAG6CACTGCCCTATTTTGGCAGATCA
ACAACCTCAAAAATGGAGGACAG6GCTACATATTTCTGTGCTGGTGG6AATAG6CTTACTAGG6TAGTGG6G66G6TACTGG6G6C6A66G66G6ACTCTGG6TCACTCTCTCTG6CA



抗EMR2鼠抗体核苷酸可变区序列

名称	链	核酸序列	SEQ ID NO
SC93.255	轻链	GACATCCAGATGACACAACTTCATCCTACTTGTGTATCTCTAGGAGGCGAGAGTCACCATTACTTCCAAAGGCAAGTGCACATCAATAATGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAAACCAGGAAA TGCCCTTAGGCCTTAATATTTGGTGCACACAGTTTGGAAACGGGGTTCCCTTCAAGATTCAGTTGGCAGTGGATCTGGAAAAGGATTAACACTCAGCATAACCAAGTCTTCAGAGTGAAGATGTAG GTACTTATAC TGTCAACAGTA TTTGGAGTATTCGGTATACGTTCCGGAGGGGAGCCAAAGCTCGAAAATAAAA	68
SC93.255	重链	CAGSTTCAGCTGCCAACAGTCTGACGCTGAGTTGGTGAAGCTGGATCTTCAGTGAAGATATCTCGCAAGGTTCCTGGCTTCCACCTTCACCTGACATACTATTCTACTGGATGAAGCAGGGCCCTGA ACAGGGCC TGGAAATGGATTTGGATATATTTATCTTAGAGATGTAATCTAGATATTAATGNSAAATTCACGGGCAGGCTTCATTTGACTGCAAGACAGATCTCCAGCACAGCCTTCAT5CAGCTCA ACAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTCTTGTGCAAGTTCTAACC TG666CCAGTGGTACTTCGATATCTT66666CAGAGGGACACAGGTCAAGCTCTCCCTCA	70
SC93.256	轻链	GATATCCASATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAAGTTGCAGTGCRAAGTGCAGGCAATTAAGAAATTAATTAACCTGGTATCAGCAGAAAAACCAGATGG AACTGTTAAACTCCTCGATCTATACACATCANGATTCACACTCAGAGGTCCCATCAAGGTTCCAGTTGGCAGTGGGTTCCAGTTGGCAGTGGGATTAATCTCTCACCATTAGCAACCTGGGACCTGAGATATTG CCACTTACTTGTGTCAGCAGTA TGGTAAAGCTTCCTGGTACAGGTTCCGGAGGGGAGCCAAAGCTTGGAAAATAAAA	72
SC93.256	重链	GAAATGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGAGGAGGCTTGGTGGCAACCTGGAGGATCTCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTTGGATTCAC TTTTAGTGAAGCCTGGATGGAACTGGGTTCCGGCCAGTCTCCAGA GAAAGGGCTTGGAGTGGGTTGGCTGAAATTTAGAAAGCAAGTTAATAATCATGAACATATACTGCTGGTGGTCTGGTGAAGGGAGGCTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAGTAGTGTCTACCTGC AAATGAAACAGCTTAAGAGCTGAAGACACTGGGCAATTTATTTACTGATATCAGGAAATGATTTACTTTGATTTACTGGG666CAAAGCACCACCTCTCAAGTCTCCCTCA	74
SC93.267	轻链	GACATCCASATGACACAGTCTCATCTCTCAC TGTCTGCATCTCTG666BAGCC AAGGTCACCATCTGTCAGAGG666AAGCC AAG6CATTAAGCAAGTTTATATCTTGGTACC AAGCAG666CTGGAAA AGGTCCTAGGCCTGCTCATTTGATACGGCATCTACATTCAGCCAG66CATCCCATCAAGGTTCCAGTTGGAAAGTGGGTTCTGGGAGGATTAATCTCTCAGCATCAGCAACCTGGAGGCTTGAAGATATTG CAACTTATTTGCTAGCAGTA TGATAATCTGTGGAGCTTTCGGTGGAG666CACCAGCTGGAAAATCAAG	76
SC93.267	重链	GAGGTTCAMCTGCCAACAGTCTGGACCTGAGCCTGGTGAAGCCTTGGGCTTTCAGTGAAGGATGCTCGCAAGGCTTCTGGATACAACTTCTGGCTGAAAGCAGTGTACTGGGTGAAGCAGAGCCTTGG AAAGGCTTGGAGTGGATATATTTAACTAACACTGCTGGTGGTCTACATACAAACCAAGGTTCCAGAGGGCCAGGCTCAATGACTGTGAACAAGTCTCCAGTACAGCCTTTCATGGAGCTCC GCAGCCTGACATCGAGGAAATTC TGCAGTCTATTACTTGTGGAGAGAG666666ACTGGG666CTTGGCTTACTGG666CAAAG666ACTTGGTCACTGCTCTGCA	78
SC93.15.1	轻链	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCACATCAGTGAAGAGAGCAGGGGTCAAGCTCACCTGCAAGG666CAGTCAAGAA TGTGGGTACTTCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAAAACCAG666CA CTCTCTTAAC TACTTGGGCACTCACCC666CACACTGGAGTCCCTGATGGCTTCACAGG666CTGGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTCACCATTAGCAGTGTGGCAGTTGAAGACTTGA CAGATTATTTCTGTCAGCAATA TAGCAGCTATCTCTCACGTTCCGGAGGG666GAGCCAAAGCTGGAAAATAAAA	20
SC93.15.1	重链	GACGTGAAGCTCTGTGGAGTCTGG666GAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGG666CTCGTGAANAATCTCCCTGTCAGGCTCTGGATTCAC TTTTAGTAGTATTAATATGTCTGGGTTCCGGCCAG666ACTCCAGA GAAAGGCTTGGAGTGGTGGAGCTTAAATTAATGGTGGTACTACTATTCAGCAGACTGTGAAGG666GAAATTCACCATCTCCAGAGCAATGGCCAAAGCAACCTCTGTACCCTGGCAATGA CCAGTCTGAAGTCTGAGGAGACAGCCTTGTATTACTTGTGGAGGACATGG666666CTAGGGCTCCCTTTTGGAGTACTGG666CAAAG666CACCCTCTCAAG666CTCCCTCA	80

图8C(续)

抗EMR2鼠抗体核苷酸可变区序列

名称	链	核酸序列	SEQ ID NO
5C93.256	轻链	GATATCCAGATGACAGACTACATCCTCCCTGCTCTCTGGGAGACAGAGTCAGGGCATTAGAAAAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAAACCGATGG AACTGTTAAACTCCTGATCTATTACACATCAGATTACACTCAGGAGTCCCTCAGAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGSSGACAGATTATTCTCTCACCATCAGCAACCTGGAACTGAAAGATATTG CCACTTACTATTGTCAGCAGTATGGTAAAGCTTCGTTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAAAATAAT	82
5C93.256	重链	GAAGTGAAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTSCAACCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTTGTGCTGCCCTCTGGCTTTCACTTTTAGTGAACGCTGGATGGACTGGGTCGGCAGTCTCCAGA GAAGGGCTTTGAGTGGTTGCTGAAATTAGAGCAAGTTAAATAATCATGAAACATATGCTGAGTCTGTGAAAGGGTTTACCATCTCAAGAGATGATTCGAAAGTAGTGTCTACCTGC AAATGACACGCTTAAGAGCTGAGACACTGGGCATTTATTACTGTATCAGGATGATTACTTTGATTACTGGGGCCAAAGGCACCCTCTCACAGTCTCCCTCA	74

图8C(续)

抗EMR2人源化抗体轻链可变区氨基酸序列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
HSC93.253	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	KASQNRVTTVD	WYQQKPKGKAPKLLIY	LASMRHT	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	LQIRRYPLT	FGGGTKEIK	101
HSC93.256	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	SASQGIIRNYLN	WYQQKPKGKVPKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	QQYQKLPYT	FGGQTKLEIK	105

抗EMR2人源化抗体重链可变区氨基酸序列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
HSC93.253	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYDMS	WVRQAPGKGLEWVS	TISSGGNYMYPDSVKG	RFIISRDNANKNSLYLQWNSLRAEDTAVYYCAR	HYDYPDYANDY	WGQGTITVTVSS	103
HSC93.256	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	DAMMD	WVRQAPGKGLEWVG	EIRSKYNNIHETYYVAEYKVG	RFTISRDDSNNKNSLYLQWNSLKTEDTAVYYCAR	NDYFDY	WGQGTITVTVSS	107

图8D

抗EMR2人源化抗体可变区核苷酸序列

名称	链	核酸序列	SEQ. ID. NO.
HSC93.253	轻链	GACATTCAGATGACACAGAGCCCTTCCAGTCTGTCCGATCCCGTGGGGGACGCGTGTGACAAATGTCACATGCAAGGCTAGTCAGAAATGTGAGAAACACCCGTCGATGGTATCAGCAAAAGCCTGGTAAGGCACTAAACTGCTGATATACCTGGCATCCCAATAGACACACCCGAGTCCCAAGCCGGTTCCAGTGGCTCCGGCACTGGTACCGATTTTACTCTGACCATCTCCAGCCTTCAGCCA GAGGACTTGGCCACCTAATATGGCTTCAAGCACCGAACAACCCCTGACCTTGGGAGGAAACAAAAGTGGAAATCAAG	100
HSC93.253	重链	GAGGTGCAACTCGTTGAGAGCGCGGCGGAGGTTTGGTGAATCCAGGAGAAAGTCTGGGCTGAGCTGGCGCTGCTGAGTGGTTTCACTTCTCCAGCTATGATATGAGCTGGGTGGCGAGGCTCCCGTAAGGGACTGGAAATGGGTTCTACTATCAGTAGTAGTGGAGGCAACTACAACTACTACCCGATCTGTGAAAGGTCGGTTACTATTAGCCGTGACAAACGCTAAGAAACAGCCCTATCTGCAGATGAAATAGTCTTCGCGCAGAGGATACCCGCGTACTACTGCGCTAGGCAATTATGACTATCTCTGATTTATGCCATGAGGATTAAGGTTACTGGGTTCAAGGACACACAGCTACTGTGAGCTCT	102
HSC93.256	轻链	GATATCCAGATSAECCAGTCTCCCTTTCCTGTCGCAACAGTAGGAGACAGGGTGGACAACTACATGCTCAGCCTCTCAGGAGATAGAAACATCTCAACTGGTATCAGCAAAACCA GGCAAGGTCCCCAAACTGGCTGATTTATTATACCCTCCGACTTCACTCCGGGTTCCCTAGCCGTTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCAAGACTTCACACTGACTATCTCTCTCTGCAACCA GAGGACGTGGCCACTTACTACTGCGCAGCAATACGGTAAACTTCCCTACACTTCGGGCAAGGGTACCAGATGGAGATCAAG	104
HSC93.256	重链	GAGGTGCAGCTTGTGAAAAGTGGCGGGGCTTGGTCCAGCTGGGGGAAAGTCTCAGGCTGTCCTGGCCGCTTCCGGGTTCACTTTTAGTGACGCTGGACTGGGTGGCTCAGGCTCCCTGGCAAGGGACTGGAAATGGGTTGGCTGGCGAGATCAGGAGCAAGGTTAAATAACCAAGAACTTACTACGGCCGAACTCCGTAAGAGGTCGTTTCCACCAATATCTGGTGAACAGACTAAGAACTCCCTACTCGCAGATGAACAGTCTGAAAACCTGAGGACACTGCTGTGTACTACTGTCACGAAATGATTAATTCGACTACTGGGGCAGGCGCACTACAGTGACAGTGTCTTCC	106

图8E

抗EMR2人源化抗体全长氨基酸序列

名称	链	SEQ. ID NO
h5C93. 253	轻链	110
h5C93. 253	重链	111
h5C93. 253ss1	轻链	110
h5C93. 253ss1	重链	111
h5C93. 256	轻链	114
h5C93. 256	重链	115
h5C93. 256ss1	轻链	114
h5C93. 256ss1	重链	117

全长序列

DIQMTQSPSSLSASVGDVRVITTCASQIWRITVDWYQKPKGKAPKLLIYLASMRITIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQGHIRYPLTIGGGTKVEIKRTVAAPSVEIAPPDSEQLKSGTASVWCLLNIFY
PREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFSSYDMNSWRQAPGKGLIEWSTISSGGNYYYPDSVKGRTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARHYDYPDYAMDYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKKVEPKSCKDTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTRPEVTCVVYVDSHEDPEVKFNW
YYDGVVYHNAKTKPREEQYMSYRQVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSEFFLYSKLTVDKSRW
QQGNIWFSCSVNHEALHMHYITQKSLSPG

DIQMTQSPSSLSASVGDVRVITTCASQIWRITVDWYQKPKGKAPKLLIYLASMRITIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQGHIRYPLTIGGGTKVEIKRTVAAPSVEIAPPDSEQLKSGTASVWCLLNIFY
PREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFSSYDMNSWRQAPGKGLIEWSTISSGGNYYYPDSVKGRTISRDNAKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARHYDYPDYAMDYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKKVEPKSCKDTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTRPEVTCVVYVDSHEDPEVKFNW
YYDGVVYHNAKTKPREEQYMSYRQVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSEFFLYSKLTVDKSRW
QQGNIWFSCSVNHEALHMHYITQKSLSPG

DIQMTQSPSSLSASVGDVRVITTCASQIWRITVDWYQKPKGKAPKLLIYYTSRSHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQYGLPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVEIAPPDSEQLKSGTASVWCLLNIFY
PREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFSSYDMNSWRQAPGKGLIEWGVEIRSKVNHETYYAESVKGRTISRDNKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARNDYFDYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKKVEPKSCKDTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTRPEVTCVVYVDSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYMSYRQVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSEFFLYSKLTVDKSRWQQG
NIWFSCSVNHEALHMHYITQKSLSPG

DIQMTQSPSSLSASVGDVRVITTCASQIWRITVDWYQKPKGKAPKLLIYYTSRSHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQYGLPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVEIAPPDSEQLKSGTASVWCLLNIFY
PREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLISCAASGFTFSSYDMNSWRQAPGKGLIEWGVEIRSKVNHETYYAESVKGRTISRDNKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARNDYFDYWGQGTITVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKKVEPKSCKDTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMSRTRPEVTCVVYVDSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYMSYRQVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSEFFLYSKLTVDKSRWQQG
NIWFSCSVNHEALHMHYITQKSLSPG

SC93.253轻链和重链可变区的CDR

展示107个残基中的1-107:

查询蛋白质序列		D	I	V	M	T	Q	S	Q	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	I	I	
Chothia 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
Chothia+ 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
Kabat 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
区域: CHOTHIA		LFR1																				
ABM		LFR1																				
KABAT		LFR1																				
接触		LFR1																				
		↑																				
I	T	C	K	A	S	Q	N	V	R	T	T	V	D	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
		CDR-L1																				
		LFR2																				
		CDR-L1																				
		LFR2																				
		CDR-L1																				
		LFR2																				
		CDR-L1																				
		LFR2																				
		CDR-L1																				
		LFR2																				
P	K	V	L	I	S	L	A	S	N	R	H	T	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
		CDR-L2																				
		LFR3																				
		CDR-L2																				
		LFR3																				
		CDR-L2																				
		LFR3																				
		CDR-L2																				
		LFR3																				

轻链

图86

SC93.253轻链和重链可变区的CDR

S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	N	V	Q	S	E	D	L	A	D	Y	F	C	L
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
CDR-L3																						
CDR-L3																						
CDR-L3																						
CDR-L3																						

SEQ ID NO 65																						
Q	H	R	N	Y	P	L	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K					
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107					
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107					
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107					
																		LFR4				
																		LFR4				
																		LFR4				
																		LFR4				

个异常残基 (<1%的序列)

轻链

图8G续

展示120个残基中的1-120: SC93.253轻链和重链可变区的CDR

查询蛋白质序列		E	V	K	L	V	E	S	G	G	L	V	K	P	G	S	L	K	L			
Chothia 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
Chothia+ 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
Kabat 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
区域: CHOTHIA		HFR1																				
ABM		HFR1																				
KABAT		HFR1																				
接触		HFR1																				
S	C	A	A	S	G	F	A	F	S	S	Y	D	M	S	W	V	R	Q	T	P	E	K
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
CDR-H1																						
HFR2																						
CDR-H1																						
HFR2																						
CDR-H1																						
HFR2																						
R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	N	Y	T	Y	Y	P	D	S	V	K	G
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
CDR-H2																						
HFR3																						
CDR-H2																						
HFR3																						
CDR-H2																						
HFR3																						
CDR-H2																						
HFR3																						

重链

图8G续

SC93.253 轻链和重链可变区的 CDR

★																						
R	F	T	F	S	R	D	N	A	R	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	R	S	E
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H72A	H72B	H72C	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H83	H84	H85
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
HFR3																						
D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	H	Y	D	Y	P	D	Y	A	M	D	Y	W	G	Q
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H101	H102	H103	H104	H105
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H101	H102	H103	H104	H105
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H101	H102	H103	H104	H105
CDR-H3																						
HFR4																						
CDR-H3																						
HFR4																						
CDR-H3																						
HFR4																						
CDR-H3																						
HFR4																						
G	T	S	V	T	V	S	S	SEQ ID NO. 67														S
H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113															H113
H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113															H113
H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113															H113
插入																						
重链																						

图 8G 续

展示107个残基中的1-107: SC93.256轻链和重链可变区的CDR

查询蛋白质序列

Chotha 编号	D	I	Q	M	T	Q	T	T	S	S	L	S	A	S	L	G	D	R	V	T
Chothia+编号	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
Kabat 编号	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20
区域: CHOThIA	LFR1																			
ABM	LFR1																			
KABAT	LFR1																			
接触	LFR1																			

I	S	C	S	A	S	Q	G	I	R	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	D	G	T
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
CDR-L1																						
LFR2																						
CDR-L1																						
LFR2																						
CDR-L1																						
LFR2																						
CDR-L1																						
LFR2																						
CDR-L1																						
LFR2																						
V	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
CDR-L2																						
LFR3																						
CDR-L2																						
LFR3																						
CDR-L2																						
LFR3																						
CDR-L2																						
LFR3																						
CDR-L2																						
LFR3																						

轻链

图8H

SC93.256轻链和重链可变区的CDR

S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	N	L	E	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	Q
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
CDR-L3																						
CDR-L3																						
CDR-L3																						
CDR-L3																						

Q	Y	G	K	L	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107
L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107
CDR-L3																	
CDR-L3																	
CDR-L3																	
CDR-L3																	

SEQ ID NO. 73

轻链

图8H续

展示1117个残基中的1-117: SC93.256轻链和重链可变区的CDR

查询蛋白质序列		E	V	K	L	E	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	M	K	L			
Chothia 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H20		
Chothiat 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H20		
Kabat 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H20		
区域: CHOTHIA		HER1																				
ABM		HER1																				
KABAT		HER1																				
接触		HER1																				
S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	A	W	M	D	W	V	R	Q	S	P	E	K
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
		CDR-H1																				
		HER2																				
		CDR-H1																				
		HER2																				
		CDR-H1																				
		HER2																				
G	L	E	W	V	A	E	I	R	S	K	V	N	N	N	H	E	T	Y	A	E	S	V
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H52B	H52C	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H52B	H52C	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H52B	H52C	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63
		CDR-H2																				
		HER3																				
		CDR-H2																				
		HER3																				
		CDR-H2																				
		HER3																				

重链 ↑

图8H续

SC93.256轻链和重链可变区的CDR

K	G	R	F	T	I	S	R	D	D	S	K	S	S	V	Y	L	Q	M	N	S	L	R
H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83
H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H72A	H72B	H72C	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H83
H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83
HF3																						
A	E	D	T	G	I	Y	C	I	R	N	D	Y	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	
H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H108	
H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H108	
H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H108	
CDR-H3											HF4											
CDR-H3											HF4											
CDR-H3											HF4											
CDR-H3											HF4											
L	T	V	S	S	SEQ ID NO. 75																	
H109	H110	H111	H112	H113																		
H109	H110	H111	H112	H113																		
H109	H110	H111	H112	H113																		

重链

插入

↑ 异常残基 (<1%的序列)

图8H续

SC93.267轻链和重链可变区的CDR

展示106个残基中的1-106:

查询蛋白质序列		D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	L	G	G	K	V	T	
Chothia 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
Chothia+ 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
Kabat 编号		L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	
区域 CHOTHIA		LFR1																				
ABM		LFR1																				
KABAT		LFR1																				
接触		LFR1																				
I	T	C	R	A	S	Q	D	I	N	K	F	I	S	W	Y	Q	H	R	P	G	K	G
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42	L43
CDR-L1																				LFR2		
CDR-L1																				LFR2		
CDR-L1																				LFR2		
CDR-L1																				LFR2		
CDR-L1																				LFR2		
P	R	L	L	I	H	Y	A	S	T	L	Q	P	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
L44	L45	L46	L47	L48	L49	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56	L57	L58	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L66
CDR-L2																				LFR3		
CDR-L2																				LFR3		
CDR-L2																				LFR3		
CDR-L2																				LFR3		
CDR-L2																				LFR3		

轻链

图 81

SC93.267轻链和重链可变区的CDR

S	G	R	D	Y	S	F	S	I	S	N	L	E	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C	L
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88	L89
																						CDR-L3
																						CDR-L3
																						CDR-L3
																						CDR-L3

																						SEQ ID NO. 77
Q	Y	D	N	L	T	F	G	G	G	G	T	K	L	E	I	R						
L90	L91	L92	L93	L94	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107						
L90	L91	L92	L93	L94	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107						
L90	L91	L92	L93	L94	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L107						
																	LFR4					
																	LFR4					
																	LFR4					
																	LFR4					
异常残基 (<1%的序列)																						
轻链																						

图8I续

展示117个残基中的1-117: SC93.267轻链和重链可变区的CDR

查询蛋白质序列		E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	R	M	
Chothia 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
Chothia+ 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
Kabat 编号		H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	
区域: CHOTHIA		HFR1																				
ABM		HFR1																				
KABAT		HFR1																				
接触		HFR1																				
S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	Y	W	V	K	Q	S	L	G	K
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42	H43
CDR-H1																						
HFR2																						
CDR-H1																						
HFR2																						
CDR-H1																						
HFR2																						
CDR-H1																						
HFR2																						
CDR-H1																						
HFR2																						
S	L	E	W	I	G	Y	I	Y	P	N	T	G	G	A	T	Y	N	Q	K	F	K	G
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62	H63	H64	H65
CDR-H2																						
HFR3																						
CDR-H2																						
HFR3																						
CDR-H2																						
HFR3																						
CDR-H2																						
HFR3																						

重链

图8I续

SC93.267轻链和重链可变区的CDR

K	A	T	L	T	V	N	K	S	S	S	T	A	F	M	E	L	R	S	L	T	S	E
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H72A	H72B	H72C	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H83	H84	H85
H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H83	H84	H85
HF3																						
HF3																						
HF3																						
HF3																						
D	S	A	V	Y	Y	C	G	R	G	G	L	G	P	F	A	Y	M	G	Q	G	T	L
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107	H108
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107	H108
H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H101	H102	H103	H104	H105	H106	H107	H108
HF4																						
HF4																						
HF4																						
HF4																						
HF4																						
V	T	V	S	A																		
H109	H110	H111	H112	H113	SEQ ID NO. 79																	
H109	H110	H111	H112	H113																		
H109	H110	H111	H112	H113																		
HF4																						
HF4																						
HF4																						
HF4																						

重链

图8I续

分組C的抗EMR2抗体识别EMR2的茎区

茎 ELISA

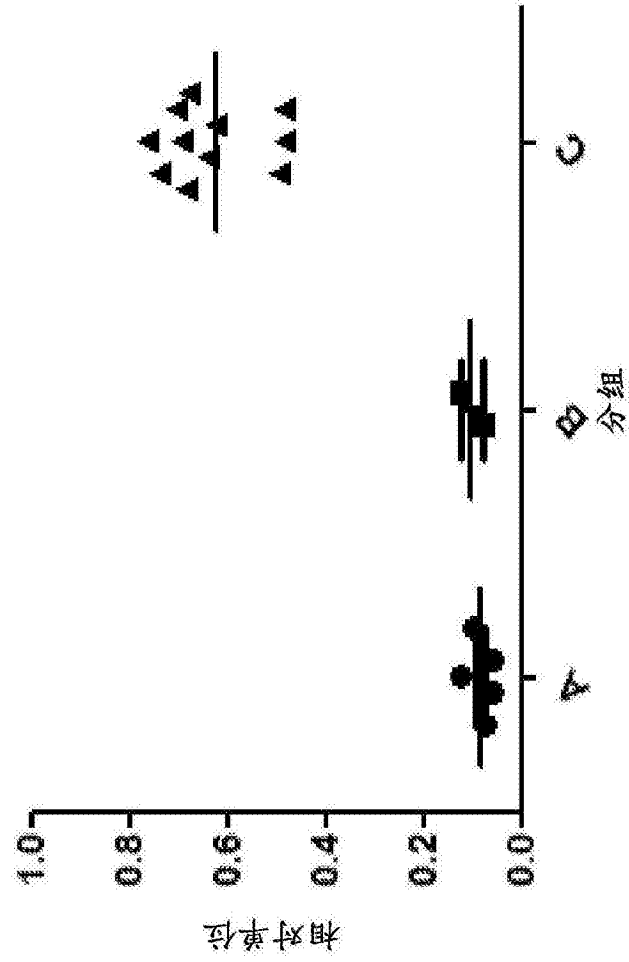


图9

通过流式细胞术抗EMR2抗体检测AML肿瘤细胞上EMR2蛋白的表面表达

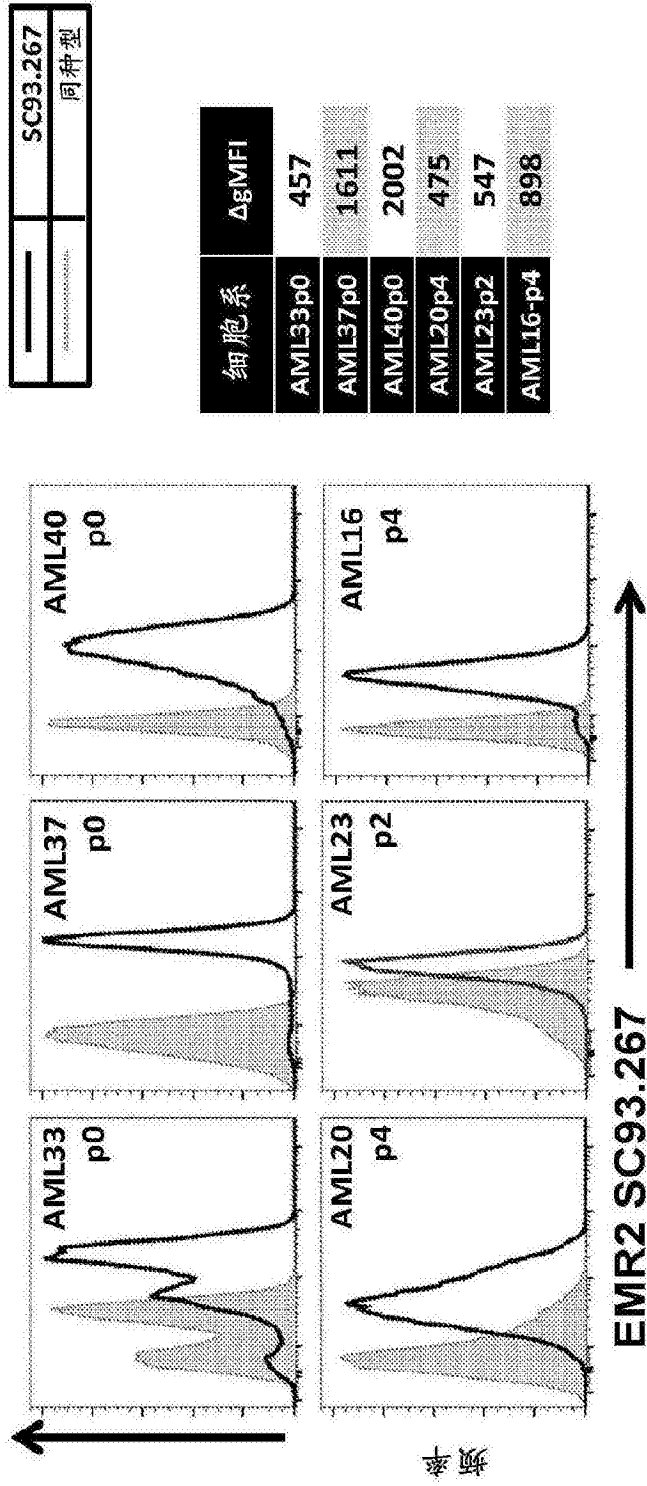


图10A

通过流式细胞术抗EMR2抗体检测肺癌肿瘤细胞上EMR2蛋白的表面表达

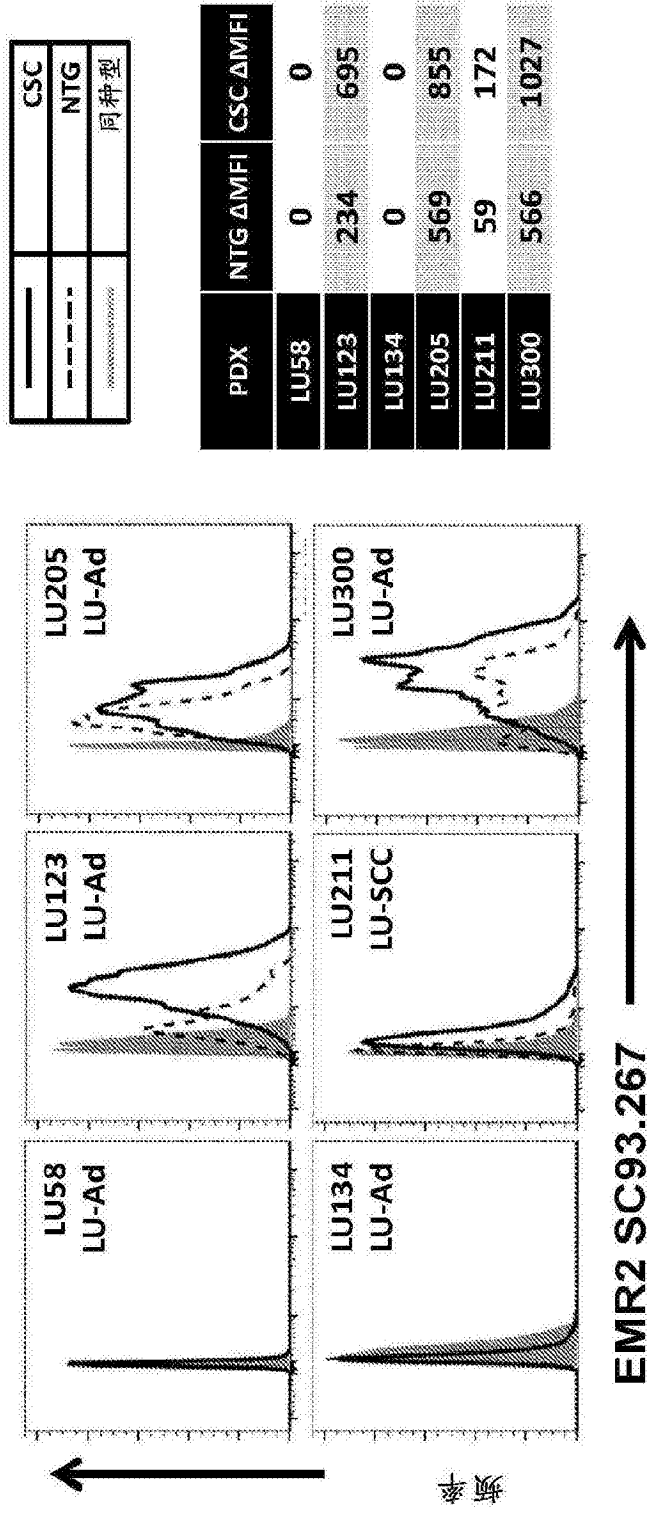


图10B

抗EMR2抗体检测不同细胞群体上各种EMR2表位的表面表达

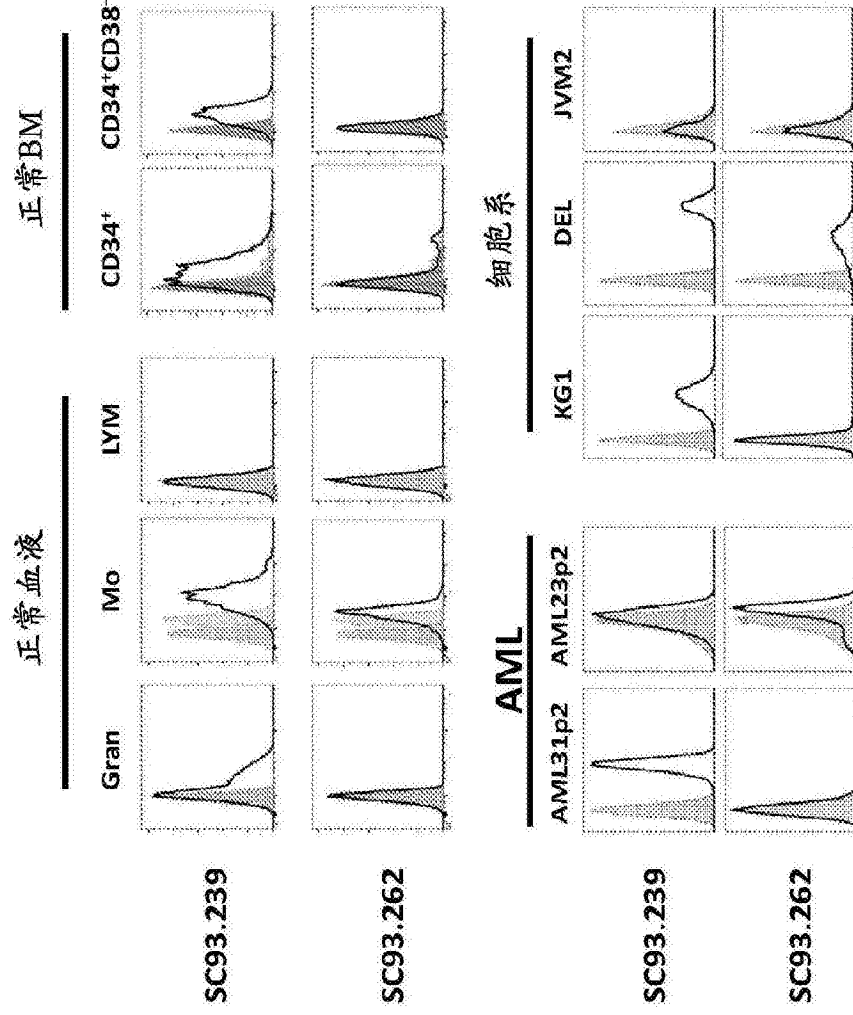


图10C

抗EMR2 ADC介导体外杀死

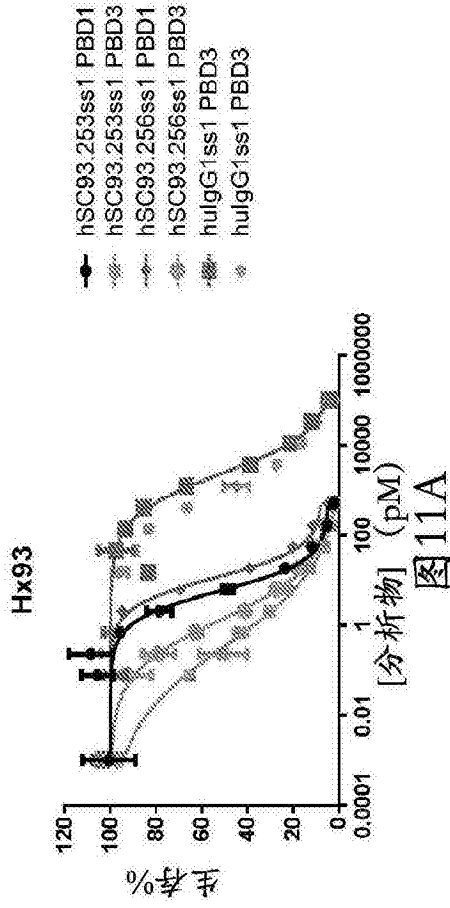


图11A

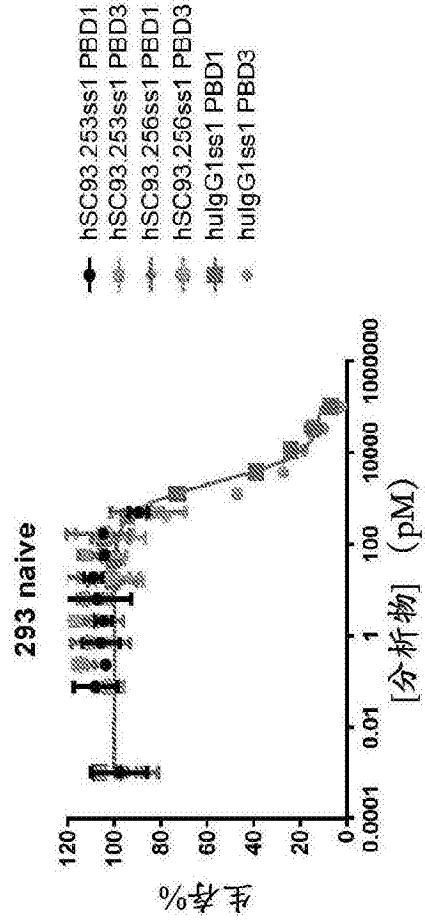


图11B

抗EMR2 ADC体内降低肺癌PDX肿瘤中的肿瘤体积

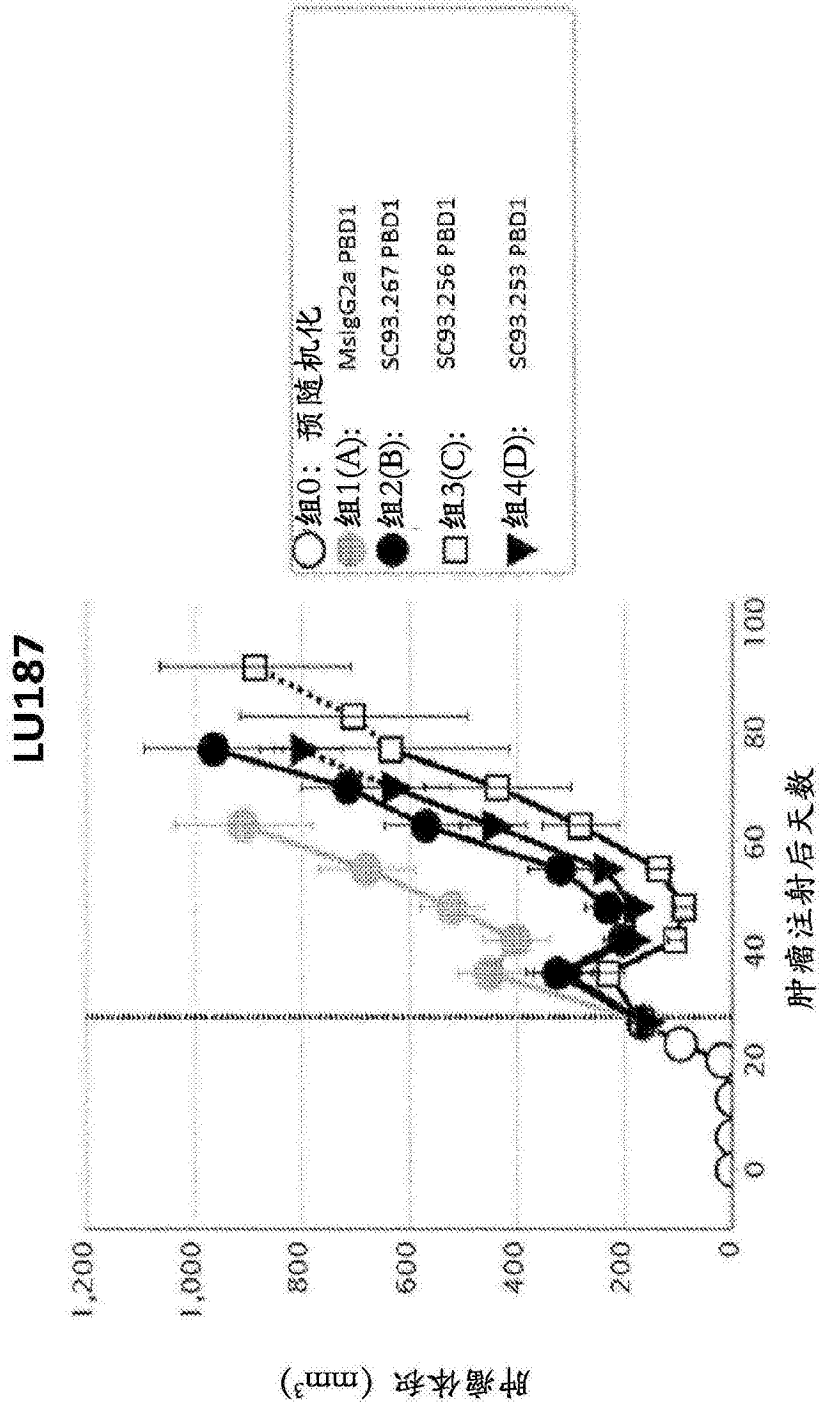
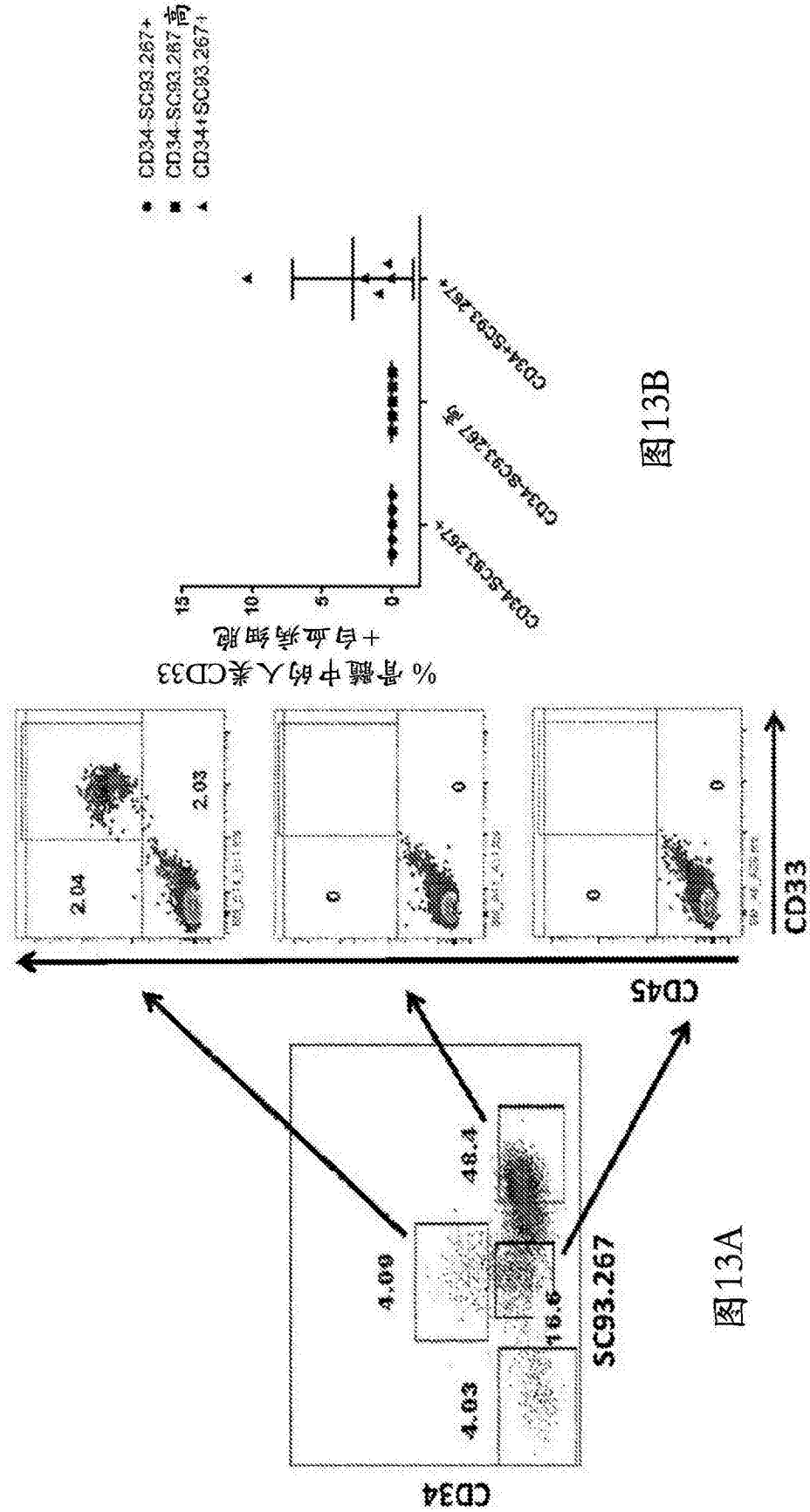


图12

EMR2在AML中的白血病干细胞表面上表达



人源化抗EMR2 ADC体内降低AML PDXX肿瘤中的白血病负荷

AML16

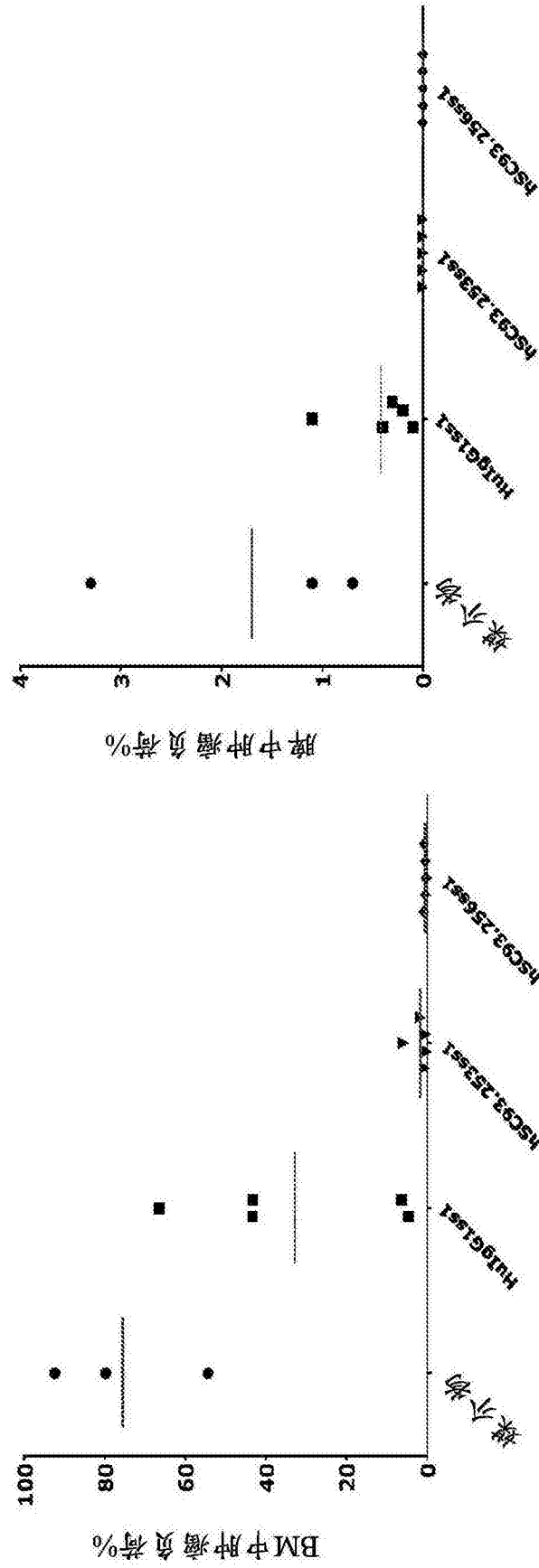


图14A

人源化抗EMR2 ADC体内降低AML PDX肿瘤中的白血病负荷

AML23

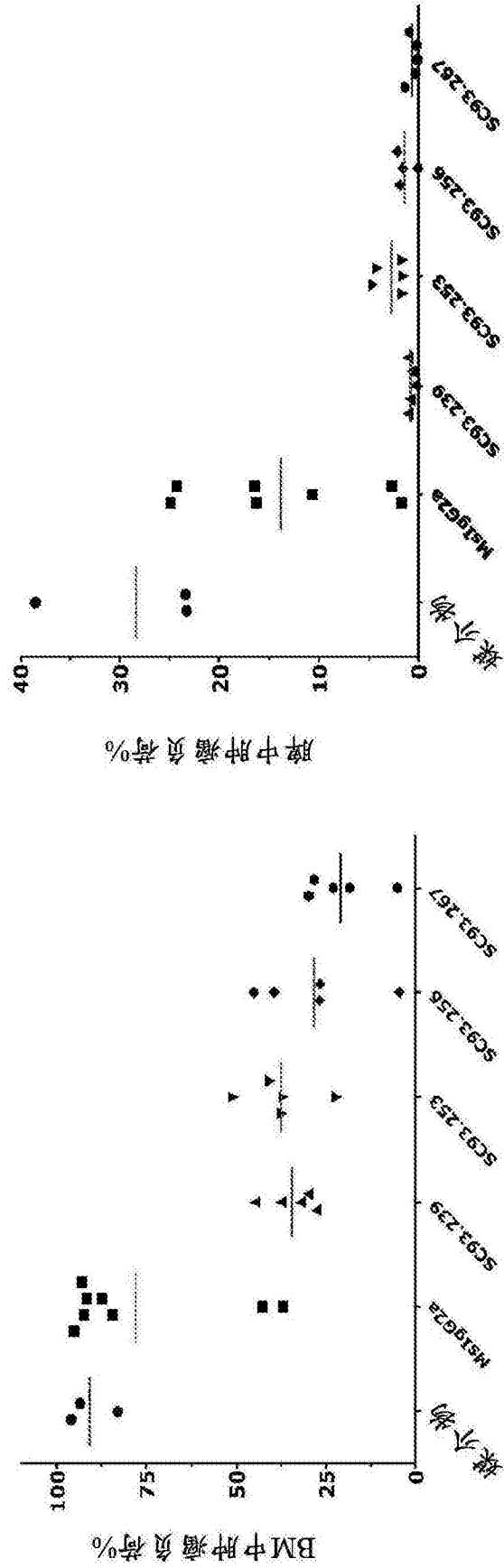


图14B