(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201446806 A
(43)公開日： 中華民國 103 (2014) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：103109292 (22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 03 月 14 日
(51)Int. Cl.： *C07K16/40 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K31/5365 (2006.01) *A61K47/48 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
(30)優先權：2013/03/15 美國 61/793,641
(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)
瑞士
艾姆公司 (美國) IRM LLC (US)
百慕達
(72)發明人：亞布拉姆斯 坦亞 ABRAMS, TINYA (US)；可汗 史蒂芬 COHEN, STEVEN (US)；芬頓 克利斯提P FANTON, CHRISTIE P. (US)；乎伯 湯瑪士 HUBER, THOMAS (CH)；米勒 凱西 MILLER, KATHY (US)；許萊爾 希優 何 SCHLEYER, SIEW HO (US)；迪索 達格提 凱薩琳 瑜爾萊克 TISSOT-DAGUETTE, KATHRIN ULRIKE (DE)；菲能爾 凱特林 FINNER, CATRIN (DE)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：48 項 圖式數：53 共 329 頁

(54)名稱

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明係關於抗 cKIT 抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其等用於治療癌症之用途。

c-Kit ADC對GIST T1細胞之活性

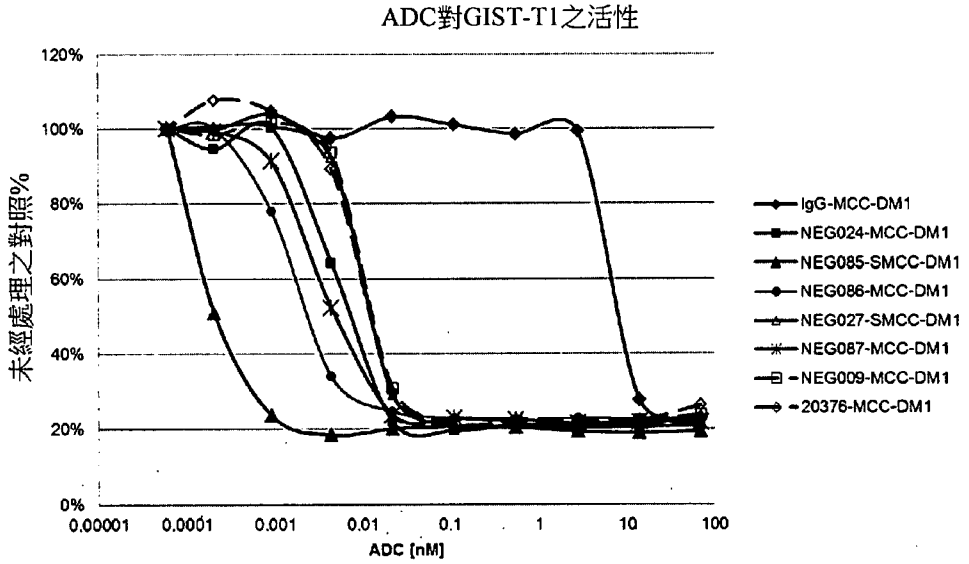


圖4

(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201446806 A
(43)公開日： 中華民國 103 (2014) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：103109292 (22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 03 月 14 日
(51)Int. Cl.： *C07K16/40 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K31/5365 (2006.01) *A61K47/48 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
(30)優先權：2013/03/15 美國 61/793,641
(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)
瑞士
艾姆公司 (美國) IRM LLC (US)
百慕達
(72)發明人：亞布拉姆斯 坦亞 ABRAMS, TINYA (US)；可汗 史蒂芬 COHEN, STEVEN (US)；芬頓 克利斯提P FANTON, CHRISTIE P. (US)；乎伯 湯瑪士 HUBER, THOMAS (CH)；米勒 凱西 MILLER, KATHY (US)；許萊爾 希優 何 SCHLEYER, SIEW HO (US)；迪索 達格提 凱薩琳 瑜爾萊克 TISSOT-DAGUETTE, KATHRIN ULRIKE (DE)；菲能爾 凱特林 FINNER, CATRIN (DE)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：48 項 圖式數：53 共 329 頁

(54)名稱

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明係關於抗 cKIT 抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其等用於治療癌症之用途。

c-Kit ADC對GIST T1細胞之活性

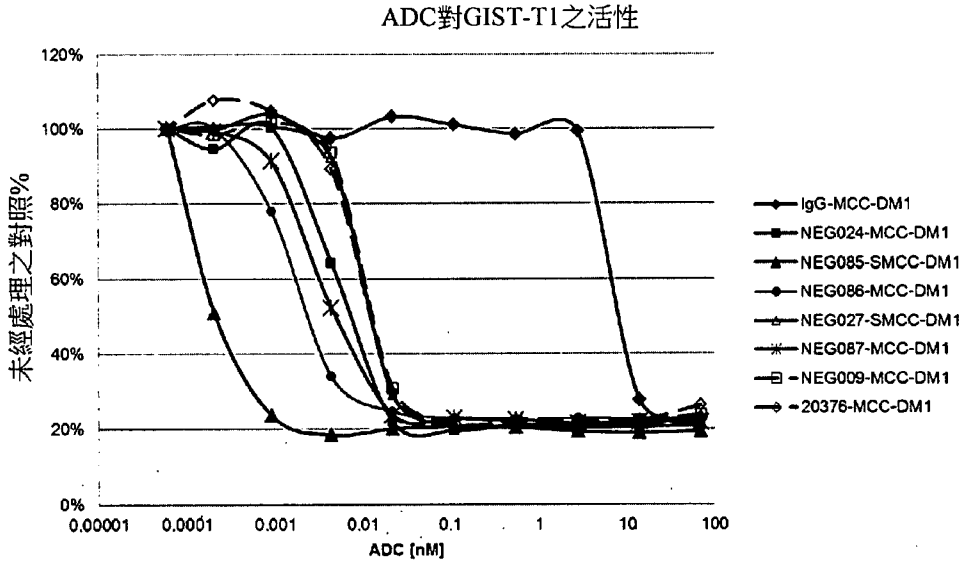


圖4

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【技術領域】

本發明係有關抗cKIT抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其等用於治療癌症之用途。

【先前技術】

cKIT為結合配位體幹細胞因子(SCF)之單一跨膜受體酪胺酸激酶。SCF誘導cKIT之均二聚，此活化cKIT之酪胺酸激酶活性且經PI3-AKT與MAPK路徑傳導信號(Kindblom等人, Am J. Path. 1998 152(5):1259)。cKIT最初作為由貓反轉錄病毒表現之截短形式的致癌基因而發現(Besmer等人, J Virol. 1986; 60(1): 194-203)。相應人類基因之選殖展示cKIT為第III型類別之受體酪胺酸激酶之成員，將其視作家族成員FLT3、CSF-1受體及PDGF受體之一。

作為cKIT突變體之小鼠已顯示，cKIT為造血細胞、生殖細胞、肥大細胞及黑素細胞之發育所需。在人類中，cKIT功能損失可導致耳聾及皮膚與毛髮之色素脫失。cKIT之許多功能獲得型突變已描述於多種癌症中。該等癌症包括胃腸基質腫瘤(GIST)、急性骨髓性白血病(AML)、小細胞肺癌(SCLC)、肥大細胞白血病(MCL)及胰臟癌(Hirota等人, Science 1998 (279):577；Esposito等人, Lab. Invets. 2002 82(11):1481)。

由於cKIT為致癌基因之此等初步指征，產生鑑別cKIT作為AML之標記物的抗體(Gadd等人, Leuk. Res. 1985 (9):1329)。此鼠類單株抗

體(稱為YB5.8B)係藉由使用來自人類患者之白血病母細胞產生且結合大量表現於AML細胞表面上之cKIT，但不偵測正常血液或骨髓細胞上之cKIT (Gadd等人，同上)。產生第二cKIT抗體(SR-1)，其阻斷SCF結合至cKIT且由此阻斷cKIT信號傳導(Broudy等人, Blood 1992 79(2):338)。SR-1抗體之生物作用為抑制BFU-E及CFU-GM生長，且基於此證據，提議使用其用於對造血或腫瘤細胞生長進行進一步研究(Broudy等人，同上)。

在進一步癌症研究中，研究者發現，用cKIT之小分子抑制劑伊馬替尼(Imatinib)處理將顯著減少GIST細胞株之增殖。然而，經伊馬替尼處理之細胞因cKIT中之繼發突變而隨時間變得具抗性(Edris等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Early On-line Edition 2013)。然而，若用SR-1抗體作為第二治療劑處理GIST細胞，則細胞增殖顯著減少，且細胞表面上之cKIT表現減少(Edris等人，同上)。因此，裸SR-1抗體有效解決人類GIST株中伊馬替尼抗性之問題，表明伊馬替尼/抗cKIT抗體組合可為適用的。

抗體藥物結合物

抗體藥物結合物(「ADC」)已在癌症治療中用於細胞毒性劑之局部傳遞(參見例如Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543-549, 2005)。ADC允許藥物部分之靶向傳遞，其中可在最小毒性下達成最大功效。隨著更多ADC顯示出具前景之臨床結果，對開發用於癌症療法之新治療劑的需要增加。

【發明內容】

本發明係有關式$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$之抗體藥物結合物或其醫藥學上可接受之鹽；其中Ab為特異性地結合至人類cKIT之抗原決定基之抗體或其抗原結合片段；L為連接子；D為藥物部分；m為1至8之整數；且n為1至10之整數。

該抗體藥物結合物，其中該n為3或4。

該抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段特異性地結合cKIT之胞外域(SEQ ID NO.160)。

該抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段在結構域1-3(SEQ ID NO.155)處特異性地結合至人類cKIT之抗原決定基。

該抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段在SEQ ID NO. 161或SEQ ID NO. 162處特異性地結合人類cKIT。

該抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：(i)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 76之HCDR1 (CDR互補決定區)，(b) SEQ ID NO: 77之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 78之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 85之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 86之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 87之LCDR3；

(ii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 22之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 23之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 24之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 31之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 32之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 33之LCDR3；

(iii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 130之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 131之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 132之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 139之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 140之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 141之LCDR3；

(iv)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 58之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 59之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 60之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 67之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 68之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 69之LCDR3；

(v)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 40之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 41之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 42之HCDR3；及包含以下

之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 49之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 50之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 51之LCDR3；

(vi)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 94之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 95之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 96之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 103之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 104之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 105之LCDR3；

(vii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 112之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 113之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 114之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 121之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 122之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 123之LCDR3；或

(viii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 3之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 4之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 5之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 12之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 13之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 14之LCDR3。

該抗體藥物結合物，其中CDR內之至少一個胺基酸經另一抗cKIT抗體之相應CDR之相應殘基取代。

該抗體藥物結合物，其中CDR內之一個或兩個胺基酸已經修飾、缺失或取代。

該抗體藥物結合物，其在該可變輕鏈區或該可變重鏈區上保留至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

該抗體藥物結合物，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類工程改造抗體、人類抗體、單鏈抗體(scFv)或抗體片段。

該抗體藥物結合物，其中該連接子(L)係選自由以下組成之群：可裂解連接子、不可裂解連接子、親水性連接子、預帶電荷連接子及

基於二羧酸之連接子。

該抗體藥物結合物，其中該連接子係來源於選自由以下組成之群的交聯試劑：3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)、4-(2-吡啶基二硫基)2-磺酸基-丁酸N-丁二醯亞胺酯(磺酸基-SPDB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(CX1-1)。

該抗體藥物結合物，其中該連接子係來源於該交聯試劑4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)。

該抗體藥物結合物，其中該藥物部分(D)係選自由以下組成之群：V-ATPase抑制劑、促凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧里斯他汀(auristatin)、海兔毒素(dolastatin)、類美登素(maytansinoid)、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白CRM1之抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑(kinesin inhibitor)、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷基化劑、DNA嵌入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。

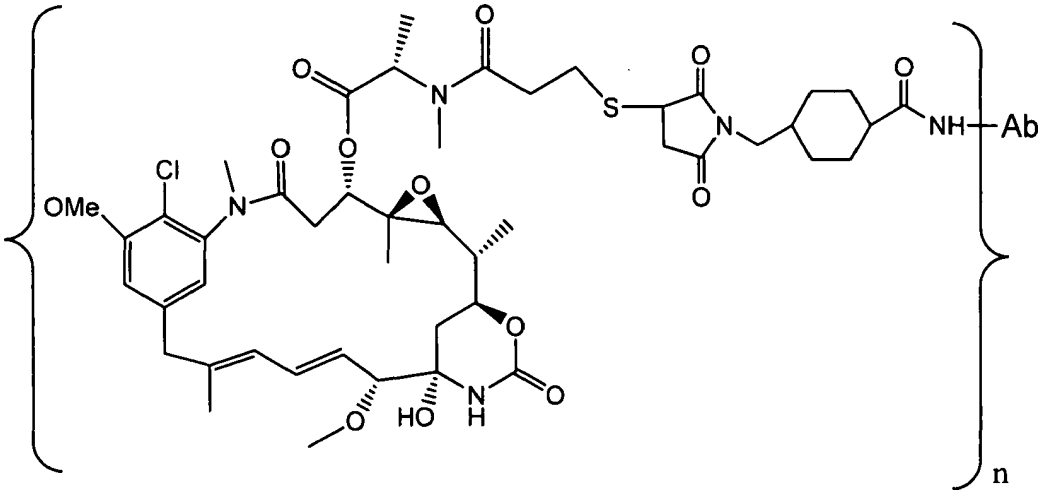
該抗體藥物結合物，其中該藥物部分為類美登素。

該抗體藥物結合物，其中該類美登素為N(2')-脫乙醯基-N(2')-(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素(DM1)或N(2')-脫乙醯基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)。

該抗體藥物結合物，其係與另一治療劑組合。

該抗體藥物結合物，其係與表16中所列之治療劑組合。

一種下式之抗體藥物結合物



或其醫藥學上可接受之鹽；其中Ab為特異性地結合至人類cKIT之抗體或其抗原結合片段，且包含至少一個n。

該抗體藥物結合物，其中該Ab為包含以下之抗體或其抗原結合片段：(i)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 76之HCDR1 (CDR互補決定區)，(b) SEQ ID NO: 77之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 78之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 85之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 86之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 87之LCDR3；

(ii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 22之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 23之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 24之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 31之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 32之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 33之LCDR3；

(iii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 130之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 131之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 132之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 139之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 140之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 141之LCDR3；

(iv)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 58之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 59之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 60之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 67之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 68之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 69之LCDR3；

(v)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 40之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 41之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 42之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 49之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 50之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 51之LCDR3；

(vi)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 94之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 95之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 96之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 103之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 104之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 105之LCDR3；

(vii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 112之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 113之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 114之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 121之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 122之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 123之LCDR3；或

(viii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 3之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 4之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 5之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 12之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 13之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 14之LCDR3。

該抗體藥物結合物，其中CDR內之至少一個胺基酸經另一抗cKIT抗體之相應CDR之相應殘基取代。

該抗體藥物結合物，其中CDR內之一個或兩個胺基酸已經修飾、缺失或取代。

該抗體藥物結合物，其在該可變輕鏈區或可變重鏈區上保留至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致

性。

該抗體藥物結合物，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類工程改造抗體、人類抗體、單鏈抗體(scFv)或抗體片段。

該抗體藥物結合物，其中該n為1至10之整數。

該抗體藥物結合物，其中該n為3至4之整數。

該抗體藥物結合物，其係與另一治療劑組合。

該抗體藥物結合物，其係與表16中所列之治療劑組合。

一種醫藥組合物，其包含該抗體藥物結合物及醫藥學上可接受之載劑。

該醫藥組合物，其中該組合物係以凍乾物形式製備。

該醫藥組合物，其中該凍乾物包含該抗體藥物結合物、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20。

一種治療有需要之患者之cKIT陽性癌症之方法，其包含向該患者投與該抗體藥物結合物或該醫藥組合物。

該治療方法，其中該癌症係選自由以下組成之群：胃腸基質腫瘤(GIST)、小細胞肺癌(SCLC)、急性骨髓性白血病(AML)、黑素瘤、肥大細胞白血病(MCL)、肥大細胞增多症、神經纖維瘤、乳癌、非小細胞肺癌(NSCLC)及胰臟癌。

該方法，其中該抗體藥物結合物或該醫藥組合物係與另一治療劑組合投與。

該方法，其中該抗體藥物結合物或該醫藥組合物係與表16中所列之治療劑組合投與。

該抗體藥物結合物，其係用作藥劑。

該抗體藥物結合物或該醫藥組合物，其係用於治療cKIT陽性癌症。

該抗體藥物結合物，其係與另一治療劑組合投與。

該抗體藥物結合物，其係與表16中所列之治療劑組合投與。

一種核酸，其編碼該抗體或抗原結合片段。

一種載體，其包含該核酸。

一種宿主細胞，其包含該載體。

一種產生抗體或抗原結合片段之方法，其包含培養該宿主細胞及自該培養物回收該抗體。

一種產生抗cKIT抗體藥物結合物之方法，該方法包含：(a)使SMCC化學連接至藥物部分DM-1；(b)使該連接子-藥物結合至自該細胞培養物回收之該抗體；及(c)純化該抗體藥物結合物。

該抗體藥物結合物，以UV分光光度計量測，其具有約3.5之平均類美登素與抗體比(MAR)。

一種診斷試劑，其包含經標記之該抗體或其抗原結合片段。

該診斷試劑，其中該標記係選自由放射性標記、螢光團、發色團、成像劑及金屬離子組成之群。

定義

除非另有規定，否則如本文所用之以下術語及片語欲具有以下含義：

術語「烷基」係指具有指定數目之碳原子的單價飽和烴鏈。舉例而言，C_{1-6}烷基係指具有1至6個碳原子之烷基。烷基可為直鏈或分支鏈。代表性分支鏈烷基具有一個、兩個或三個支鏈。烷基之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基(正丙基及異丙基)、丁基(正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基)、戊基(正戊基、異戊基及新戊基)及己基。

如本文所用之術語「抗體」係指免疫球蛋白家族之多肽，其能夠非共價地、可逆地且以特異性方式結合相應抗原。舉例而言，天然

存在之IgG抗體為四聚體，其包含由二硫鍵互連之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域：CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域CL。VH及VL區可進一步細分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，穿插有更保守之區域，稱為構架區(FR)。各VH及VL由自胺基端至羧基端按以下次序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與包括免疫系統之多種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)的宿主組織或因子結合。

術語「抗體」包括(但不限於)單株抗體、人類抗體、人類化抗體、駱駝抗體、嵌合抗體及抗個體基因型(抗Id)抗體(包括例如針對本發明抗體之抗Id抗體)。該等抗體可屬於任何同型/類別(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)或子類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

「互補決定域」或「互補決定區(「CDR」)可互換地係指VL及VH之高變區。CDR為抗體鏈之靶蛋白結合位點，其對該靶蛋白具有特異性。在各人類VL或VH中存在三個CDR (CDR1-3，自N端依序編號)，其佔可變域之約15-20%。CDR可由其區域及次序而提及。舉例而言，「VHCDR1」或「HCDR1」均係指重鏈可變區之第一CDR。CDR在結構上與靶蛋白之抗原決定基互補，且因此直接負責結合特異性。VL或VH之剩餘延伸段，所謂的構架區，展現較少胺基酸序列變化(Kuby, Immunology, 第4版, 第4章 W.H. Freeman & Co., New York, 2000)。

CDR及構架區之位置可使用此項技術中之各種熟知定義來確定，

例如Kabat、Chothia及AbM（參見例如Johnson等人，Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001)；Chothia及Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)；Chothia等人，Nature, 342:877-883 (1989)；Chothia等人，J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992)；Al-Lazikani等人，J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997))。抗原組合位點之定義亦描述於以下文獻中：Ruiz等人，Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000)；及Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001)；MacCallum等人，J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)；及Martin等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989)；Martin等人，Methods Enzymol., 203:121-153 (1991)；及Rees等人，Sternberg M.J.E.（編），Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

輕鏈與重鏈均分成具有結構及功能同源性之區域。在功能上使用術語「恆定」及「可變」。就此而言，應瞭解，輕鏈(VL)與重鏈(VH)部分之可變域決定抗原識別及特異性。相反地，輕鏈(CL)及重鏈(CH1、CH2或CH3)之恆定域賦予重要的生物特性，諸如分泌、經胎盤活動性、Fc受體結合、補體結合及其類似特徵。按照慣例，恆定區結構域之編號隨著其漸漸遠離抗體之抗原結合位點或胺基端而增大。N端為可變區且在C端為恆定區；CH3及CL結構域實際上分別包含重鏈及輕鏈之羧基端結構域。

如本文所用之術語「抗原結合片段」係指抗體之一或多個部分，其保留與抗原之抗原決定基發生特異性相互作用(例如藉由結合、位阻、穩定化/去穩定化、空間分佈)的能力。結合片段之實例包括(但不限於)單鏈Fv (scFv)、二硫化物連接之Fv (sdFv)、Fab片段、F(ab')片段、由VL、VH、CL及CH1結構域組成之單價片段；F(ab)2片段、包含在鉸鏈區由二硫橋鍵連接之兩個Fab片段之二價片段；由VH及CH1結構域組成之Fd片段；由抗體單臂之VL及VH結構域組成之Fv

片段；由VH結構域組成之dAb片段(Ward等人, Nature 341:544-546, 1989)；及經分離之互補決定區(CDR)，或抗體之其他抗原決定基結合片段。

此外，儘管Fv片段之兩個結構域VL及VH由各別基因編碼，但其可使用重組方法由合成連接子接合，該合成連接子能夠使其製造成其中VL及VH區配對形成單價分子之單一蛋白質鏈(稱為單鏈Fv(「scFv」)；參見例如Bird等人, Science 242:423-426, 1988；及Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988)。該等單鏈抗體亦欲涵蓋於術語「抗原結合片段」內。此等抗原結合片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術來獲得，且以與完整抗體相同之方式針對效用對該等片段進行篩選。

抗原結合片段亦可併入單域抗體、最大抗體、微型抗體、奈米抗體、胞內抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、v-NAR及雙scFv中(參見例如Hollinger及Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005)。抗原結合片段可移植至基於諸如III型纖維結合蛋白(Fn3)之多肽的架構中(參見美國專利第6,703,199號，其描述纖維結合蛋白多肽單功能抗體)。

抗原結合片段可併入包含一對串聯Fv區段(VH-CH1-VH-CH1)之單鏈分子中，該對串聯Fv區段與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區(Zapata等人, Protein Eng. 8:1057-1062, 1995；及美國專利第5,641,870號)。

如本文所用之術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指多肽，包括具有實質上一致之胺基酸序列或來源於相同遺傳來源之抗體及抗原結合片段。此術語亦包括單一分子組合物之抗體分子之製劑。單株抗體組合物顯示對特定抗原決定基之單一結合特異性及親和力。

如本文所用之術語「人類抗體」包括具有可變區之抗體，在該

等可變區中構架區與CDR區均來源於人類起源之序列。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦來源於該等人類序列，例如人類生殖系序列或人類生殖系序列之突變型式，或含有來源於人類構架序列分析之共同構架序列之抗體，如Knappik等人, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000中所述。

本發明之人類抗體可包括不由人類序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變而引入之突變，或保守性取代以促進穩定性或製造)。

如本文所用之術語「識別」係指發現其抗原決定基且與其抗原決定基相互作用(例如結合)之抗體或其抗原結合片段，無論彼抗原決定基為線性或構形的。術語「抗原決定基」係指抗原上與本發明之抗體或抗原結合片段特異性結合之位點。抗原決定基可由相連胺基酸或因蛋白質之三級摺疊而併接之非相連胺基酸形成。由相連胺基酸形成之抗原決定基通常在暴露於變性溶劑時保留，而由三級摺疊形成之抗原決定基通常在用變性溶劑處理時損失。抗原決定基通常包括呈獨特空間構形之至少3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個或15個胺基酸。確定抗原決定基之空間構形之方法包括此項技術中之技術，例如x射線結晶法及二維核磁共振(參見例如Epitope定位 Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷, G. E. Morris編 (1996))。

片語「特異性地結合」或「選擇性地結合」當在描述抗原(例如蛋白質)與抗體、抗體片段或源自抗體之結合劑之間的相互作用之情形下使用時，係指確定蛋白質及其他生物劑之異質群體中，例如生物樣品(例如血液、血清、血漿或組織樣品)中抗原之存在的結合反應。因此，在某些指定免疫分析條件下，具有特定結合特異性之抗體或結合劑與特定抗原之結合為背景之至少兩倍，且實質上不會大量結合至

樣品中所存在之其他抗原。在一個態樣中，在指定免疫分析條件下，具有特定結合特異性之抗體或結合劑與特定抗原之結合為背景之至少十(10)倍，且實質上不會大量結合至樣品中所存在之其他抗原。在該等條件下與抗體或結合劑之特異性結合可能需要將抗體或試劑針對其對特定蛋白質之特異性進行選擇。必要時或適當時，此選擇可藉由扣除與來自其他物種(例如小鼠或大鼠)或其他亞型之分子交叉反應之抗體來達成。或者，在一些態樣中，選擇與某些所要分子交叉反應之抗體或抗體片段。

如本文所用之術語「親和力」係指在單一抗原位點處抗體與抗原之間相互作用的強度。在各抗原位點內，抗體「臂」之可變區經弱的非共價力與抗原在多個位點處相互作用；相互作用愈大，親和力愈強。

術語「經分離抗體」係指實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體。然而，特異性地結合至一個抗原之經分離抗體可與其他抗原具有交叉反應性。此外，經分離抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學物質。

術語「相應人類生殖系序列」係指編碼人類可變區胺基酸序列或子序列之核酸序列，該人類可變區胺基酸序列或子序列與由人類生殖系免疫球蛋白可變區序列編碼之所有其他已知可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或子序列共有最高經確定胺基酸序列一致性。相應人類生殖系序列亦可指與所有其他經評估可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高胺基酸序列一致性的人類可變區胺基酸序列或子序列。相應人類生殖系序列可為僅構架區、僅互補決定區、構架區與互補決定區、可變區段(如上文所定義)，或包含可變區之序列或子序列之其他組合。序列一致性可使用本文所述之方法來確定，例如，使用BLAST、ALIGN或此項技術中已

知之另一比對算法比對兩個序列。相應人類生殖系核酸或胺基酸序列可與參考可變區核酸或胺基酸序列具有至少約90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

可使用多種免疫分析格局來選擇對特定蛋白質具有特異性免疫反應性之抗體。舉例而言，常規使用固相ELISA免疫分析來選擇對蛋白質具有特異性免疫反應性之抗體(關於可用於確定特異性免疫反應性之免疫分析格局及條件的描述，參見例如Harlow及Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998))。特異性或選擇性結合反應通常將產生超過背景信號至少兩倍及更通常超過背景至少10倍至100倍之信號。

術語「平衡解離常數(KD，M)」係指解離速率常數(kd，時間-1)除以締合速率常數(ka，時間-1，M-1)。平衡解離常數可使用此項技術中之任何已知方法來量測。本發明之抗體一般將具有小於約10^{-7}或10^{-8} M，例如小於約10^{-9} M或10^{-10} M，在一些態樣中小於約10^{-11} M、10^{-12} M或10^{-13} M之平衡解離常數。

術語「生物可用性」係指向患者投與之既定量之藥物的全身可用性(亦即血液/血漿含量)。生物可用性為指示藥物自所投與之劑型到達體循環之時間(速率)及總量(程度)之量度的絕對項。

如本文所用之片語「基本上由……組成」係指包括於方法或組合物中之活性醫藥劑之屬或種類，以及對方法或組合物之預期目的無活性之任何賦形劑。在一些態樣中，片語「基本上由……組成」明確地排除除本發明之抗體藥物結合物以外之一或多種其他活性劑的包括情況。在一些態樣中，片語「基本上由……組成」明確地排除除本發明之抗體藥物結合物及共同投與之第二藥劑以外之一或多種其他活性劑的包括情況。

術語「胺基酸」係指天然存在、合成及非天然之胺基酸，以及

以類似於天然存在之胺基酸之方式發揮功能的胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然存在之胺基酸為由遺傳密碼編碼之彼等胺基酸，以及隨後經修飾之彼等胺基酸，例如羥脯胺酸、γ-羧基麩胺酸及O-磷絲胺酸。胺基酸類似物係指具有與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構(亦即結合至氫、羧基、胺基及R基團之α碳)的化合物，例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砜、甲硫胺酸甲基銻。該等類似物具有經修飾之R基團(例如正白胺酸)或經修飾之肽骨架，但保留與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構。胺基酸模擬物係指具有不同於胺基酸之一般化學結構之結構，但以類似於天然存在之胺基酸之方式發揮功能的化合物。

術語「經保守修飾之變異體」適用於胺基酸與核酸序列。關於特定核酸序列，經保守修飾之變異體係指編碼一致或基本上一致之胺基酸序列的彼等核酸，或其中核酸並不將胺基酸序列編碼成基本上一致之序列。由於遺傳密碼之簡併，大量功能上相同之核酸編碼任何既定蛋白質。舉例而言，密碼子GCA、GCC、GCG及GCU均編碼胺基酸丙胺酸。因此，在丙胺酸由密碼子指定之每個位置處，密碼子可在不改變經編碼之多肽的情況下變成所描述之相應密碼子中之任一者。該等核酸變化為「靜默變化」，其為經保守修飾之變化的一個種類。本文中編碼多肽之每個核酸序列亦描述核酸之每種可能靜默變化。熟習此項技術者應認識到，核酸中之各密碼子(通常為甲硫胺酸之唯一密碼子之AUG及通常為色胺酸之唯一密碼子之TGG除外)可經修飾以得到功能上相同之分子。因此，編碼多肽之核酸之各靜默變化隱含於各所述序列中。

對於多肽序列，「經保守修飾之變異體」包括對多肽序列之個別取代、缺失或添加，從而用化學上類似之胺基酸取代胺基酸。提供功能上類似之胺基酸的保守性取代表在此項技術中為熟知的。該等經保

守修飾之變異體除多形變異體、種間同源物及對偶基因之外且不排除多形變異體、種間同源物及對偶基因。以下八組含有彼此保守性取代之胺基酸：1)丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；2)天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；3)天冬醯胺(N)、麩醯胺酸(Q)；4)精胺酸(R)、離胺酸(K)；5)異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；6)苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；7)絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及8)半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M) (參見例如Creighton, Proteins (1984))。在一些態樣中，術語「保守性序列修飾」用於指不會顯著影響或改變含有胺基酸序列之抗體之結合特徵的胺基酸修飾。

如本文所用之術語「最佳化」係指已經改變以使用在生產細胞或生物體中較佳之密碼子編碼胺基酸序列的核苷酸序列，該生產細胞或生物體一般為真核細胞，例如酵母細胞、畢赤酵母(Pichia)細胞、真菌細胞、木黴細胞、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)或人類細胞。最佳化之核苷酸序列經工程改造以完全或儘可能多地保留最初由起始核苷酸序列編碼之胺基酸序列，其亦稱為「親本」序列。

在兩個或兩個以上核酸或多肽序列之情形下，術語「一致百分比」或「一致性百分比」係指兩個或兩個以上序列或子序列相同之程度。若兩個序列在所比較之區域上具有胺基酸或核苷酸之相同序列，則該兩個序列為「一致」的。當如使用以下序列比較算法之一或藉由手動比對及目視檢查所量測，在比較窗或指定區域上比較且比對最大對應性時，若兩個序列具有相同的胺基酸殘基或核苷酸之指定百分比(亦即，在指定區域上，或若未指定，則在整個序列上具有60%一致性，視情況65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致性)，則兩個序列為「實質上一致」的。一致性視情況存在於長度為至少約30個核苷酸(或10個胺基酸)之區域上，或更佳存在於長度為100個至500個或1000個或1000個以上之核苷酸(或20個、50個、200個

或200個以上之胺基酸)之區域上。

為進行序列比較，通常一個序列充當與測試序列相比較之參考序列。當使用序列比較算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列座標，且指定序列算法程式參數。可使用預設程式參數，或可指定替代性參數。接著，序列比較算法基於程式參數計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

如本文所用之「比較窗」包括參考具有選自由20至600、通常約50至約200、更通常約100至約150組成之群的鄰近位置數目中之任一者的區段，其中在最佳比對兩個序列之後序列可與具有相同鄰近位置數目之參考序列相比較。比對用於比較之序列的方法在此項技術中為熟知的。用於比較之序列的最佳比對可如下進行：例如藉由Smith及Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970)之局部同源性算法，藉由Needleman及Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)之同源性比對算法，藉由Pearson及Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)之相似性搜尋方法，藉由此等算法之電腦化實施(Wisconsin Genetics套裝軟體, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中之GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)，或藉由手動比對及目視檢查(參見例如Brent等人, Current Protocols in Molecular Biology, 2003)。

適合於確定序列一致性百分比及序列相似性之算法之兩個實例為BLAST及BLAST 2.0算法，其分別描述於Altschul等人, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977；及Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990中。用於執行BLAST分析之軟體可經國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology資訊)公開可用。此算法涉及首先藉由鑑別查詢序列中長度W之短字組來鑑別高得分序列對(HSP)，其在與資料庫序列中相同長度之字組比對時匹配或滿足某一正值閾值得分T。T稱作鄰域字組得分閾值(Altschul等人，同上)。此等初始鄰域字

組命中充當起始搜尋之種子以發現含有其之較長HSP。該等字組命中沿各序列雙向延伸直至累積比對得分可增加。對於核苷酸序列，使用參數M (一對匹配殘基之獎勵得分；始終> 0)及N (失配殘基之處罰得分；始終< 0)計算累積得分。對於胺基酸序列，使用計分矩陣來計算累積得分。各方向上之字組命中之延伸可在下列情況下中止：累積比對得分自其所達成之最大值減少量X；歸因於一或多個負得分殘基比對之累積，累積得分變成零或小於零；或達到任一序列之末端。BLAST算法參數W、T及X決定比對之敏感性及速度。BLASTN程式(對於核苷酸序列)使用字組長度(W)為11、期望值(E)為10、M = 5、N = -4及兩股之比較作為預設值。對於胺基酸序列，BLASTP程式使用字組長度為3及期望值(E)為10，且BLOSUM62計分矩陣(參見Henikoff及Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915)比對(B)為50、期望值(E)為10、M = 5、N = -4及兩股之比較作為預設值。

BLAST算法亦執行兩個序列之間相似性的統計分析(參見例如Karlin及Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993)。BLAST算法所提供之一個相似性量度為最小和概率(P(N))，其提供兩個核苷酸或胺基酸序列之間會偶然發生匹配的概率指標。舉例而言，若測試核酸與參考核酸之比較中最小和概率小於約0.2，更佳小於約0.01，且最佳小於約0.001，則認為核酸與參考序列相似。

兩個胺基酸序列之間的一致性百分比亦可使用E. Meyers及W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988之算法(其已併入ALIGN程式(2.0版)中)，使用PAM120加權殘基表、空隙長度處罰12及空隙處罰4來確定。另外，兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用Needleman及Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970之算法(其已併入GCG套裝軟體(在www.gcg.com上可得)中之GAP程式中)，使用Blossom 62矩陣及PAM250矩陣以及空隙加權值16、14、12、10、8、

6或4及長度加權值1、2、3、4、5或6來確定。

除上文所指示之序列一致性百分比以外，兩個核酸序列或多肽實質上一致之另一指征為如下文所述由第一核酸編碼之多肽與針對由第二核酸編碼之多肽產生之抗體具有免疫交叉反應性。因此，舉例而言，若一個多肽與第二多肽之不同之處僅在於保守性取代，則該兩個肽通常實質上一致。兩個核酸序列實質上一致之另一指征為如下文所述兩個分子或其補體在嚴格條件下彼此雜交。兩個核酸序列實質上一致之另一指征為可使用相同引子來擴增序列。

術語「核酸」在本文中可與術語「聚核苷酸」互換使用且係指呈單股或雙股形式之脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。該術語涵蓋含有已知核苷酸類似物或經修飾之骨架殘基或鍵的核酸，該等核酸為合成、天然存在及非天然存在的，其具有與參考核酸類似之結合特性，且其以類似於參考核苷酸之方式代謝。該等類似物之實例包括(但不限於)硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、對掌性膦酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。

除非另有指示，否則特定核酸序列亦隱含地涵蓋其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)及互補序列以及經明確指示之序列。特定言之，如下文所詳述，簡併密碼子取代可藉由產生其中一或多個所選(或所有)密碼子之第三位置經混合型鹼基及/或脫氧肌苷殘基取代之序列來達成(Batzer等人, (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081；Ohtsuka等人, (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608；及Rossolini等人, (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

術語「可操作地連接」在核酸情形下係指兩個或兩個以上聚核苷酸(例如DNA)區段之間的功能關係。其通常係指轉錄調控序列與經轉錄之序列的功能關係。舉例而言，若啟動子或增強子序列在適當宿主細胞或其他表現系統中刺激或調節編碼序列之轉錄，則該啟動子或

增強子序列可操作地連接至該編碼序列。一般而言，可操作地連接至經轉錄之序列的啟動子轉錄調控序列實體鄰接經轉錄之序列，亦即，其為順式作用。然而，某些轉錄調控序列(諸如增強子)不需要實體鄰接或緊密接近編碼序列，其增強該等編碼序列之轉錄。

術語「多肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用以指代胺基酸殘基之聚合物。該等術語適用於其中一或多個胺基酸殘基為相應天然存在之胺基酸之人工化學模擬物的胺基酸聚合物，以及天然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。除非另有指示，否則特定多肽序列亦隱含地涵蓋其經保守修飾之變異體。

如本文所用之術語「免疫結合物」或「抗體藥物結合物」係指抗體或其抗原結合片段與另一藥劑之鍵聯，該另一藥劑為諸如化學治療劑、毒素、免疫治療劑、成像探針及其類似物。鍵聯可為共價鍵，或非共價相互作用，諸如經靜電力。可採用此項技術中已知之多種連接子以形成免疫結合物。另外，免疫結合物可依融合蛋白質之形式提供，該融合蛋白質可自編碼免疫結合物之聚核苷酸表現。如本文所用之「融合蛋白質」係指經由連接兩個或兩個以上基因或基因片段而產生之蛋白質，該等基因或基因片段最初編碼各別蛋白質(包括肽及多肽)。融合基因之轉譯產生具有來源於原始蛋白質中之每一者之功能特性的單一蛋白質。

術語「個體」包括人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、狗、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除有所指示，術語「患者」或「個體」在本文中可互換使用。

如本文所用之術語「毒素」、「細胞毒素」或「細胞毒性劑」係指對細胞之生長及增殖有害且可起作用以減少、抑制或破壞細胞或惡性疾病之任何藥劑。

如本文所用之術語「抗癌劑」係指可用於治療諸如癌症之細胞增殖性病症之任何藥劑，包括(但不限於)細胞毒性劑、化學治療劑、放射線療法及放射線治療劑、靶向抗癌劑及免疫治療劑。

如本文所用之術語「藥物部分」或「有效負載」係指結合至抗體或抗原結合片段之化學部分，且可包括任何治療劑或診斷劑，例如抗癌劑、消炎劑、抗感染劑(例如抗真菌劑、抗細菌劑、抗寄生蟲劑、抗病毒劑)或麻醉劑。在某些態樣中，藥物部分係選自V-ATPase抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧里斯他汀、海兔毒素、類美登素、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白CRM1之抑制劑、DPPIV抑制劑、粒線體中磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、蛋白酶體抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷基化劑、DNA嵌入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。使此等藥劑中之每一者連接至與本發明之抗體及方法相容之連接子的方法在此項技術中為已知的。參見例如Singh等人, (2009) Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols, 第525卷, 445-457。另外，有效負載可為生物物理探針、螢光團、自旋標記、紅外探針、親和探針、螯合劑、光譜探針、放射性探針、脂質分子、聚乙二醇、聚合物、自旋標記、DNA、RNA、蛋白質、肽、表面、抗體、抗體片段、奈米粒子、量子點、脂質體、PLGA粒子、醣或多醣。

術語「類美登素藥物部分」意謂具有類美登素化合物之結構之抗體藥物結合物的子結構。美登素最先自東非灌木齒葉美登木(Maytenus serrata)分離(美國專利第3,896,111號)。隨後，發現某些微生物亦產生類美登素，諸如美登醇(maytansinol)及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。已報導合成美登醇及美登醇類似物。參見美國專利第4,137,230號、第4,248,870號、第4,256,746號、第4,260,608

號、第4,265,814號、第4,294,757號、第4,307,016號、第4,308,268號、第4,308,269號、第4,309,428號、第4,313,946號、第4,315,929號、第4,317,821號、第4,322,348號、第4,331,598號、第4,361,650號、第4,364,866號、第4,424,219號、第4,450,254號、第4,362,663號及第4,371,533號，及Kawai等人 (1984) Chem. Pharm. Bull. 3441-3451，各文獻以引用的方式明確併入。適用於結合之類美登素之特定實例包括DM1、DM3及DM4。

「腫瘤」係指瘤性細胞生長及增殖，無論惡性或良性，以及所有癌前及癌性細胞及組織。

術語「抗腫瘤活性」意謂腫瘤細胞增殖速率、存活力或轉移活性降低。顯示抗腫瘤活性之一種可能方式為顯示腫瘤細胞生長速率下降、腫瘤尺寸停滯或腫瘤尺寸減小。該活性可使用公認之活體外或活體內腫瘤模型來評估，該等腫瘤模型包括(但不限於)異種移植模型、同種異體移植模型、MMTV模型，及此項技術中已知用以研究抗腫瘤活性之其他已知模型。

術語「惡性疾病」係指非良性腫瘤或癌症。如本文所用之術語「癌症」包括特徵為細胞生長失調或不受控制之惡性疾病。例示性癌症包括：癌瘤、肉瘤、白血病及淋巴瘤。

術語「癌症」包括原發性惡性腫瘤(例如細胞尚未遷移至個體體內除原始腫瘤部位以外之部位的腫瘤)及繼發性惡性腫瘤(例如由轉移引起之腫瘤，腫瘤細胞遷移至不同於原始腫瘤部位之繼發部位)。

術語「cKIT」係指酪胺酸激酶受體，其為受體酪胺酸激酶III家族之成員。cKIT之核酸及胺基酸序列為已知的，且已於GenBank寄存編號X06182.1、EU826594.1、GU983671.1、HM015525.1、HM015526.1、AK304031.1及BC071593.1中公開。亦參見人類cKIT cDNA序列之SEQ ID NO:1及人類cKIT蛋白質序列之SEQ ID NO.2。在

結構上，cKIT受體為I型跨膜蛋白且含有信號肽，在胞外域中具有5個Ig樣C2結構域且在其胞內域中具有蛋白激酶域，且在其完整長度上與SEQ ID NO.2之胺基酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在結構上，cKIT核酸序列在其完整長度上與SEQ ID NO 1之核酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

術語「cKIT表現癌症」或「cKIT陽性癌症」係指在癌細胞之表面上表現cKIT及/或突變形式之cKIT的癌症。

如本文所用之術語「治療(treat/treatment)」任何疾病或病症在一個態樣中係指改善疾病或病症(亦即，減緩或遏止或減輕疾病或其至少一種臨床症狀的發展)。在另一態樣中，「治療」係指緩和或改善至少一個物理參數，包括患者可能無法辨別之物理參數。在另一態樣中，「治療」係指在身體上(例如穩定可辨別之症狀)、在生理上(例如穩定物理參數)或在兩個方面調節疾病或病症。在另一態樣中，「治療」係指預防或延遲疾病或病症之發作或發展或進展。

術語「治療學上可接受之量」或「治療有效劑量」可互換地係指足以實現所要結果(亦即，減小腫瘤尺寸、抑制腫瘤生長、預防轉移、抑制或預防病毒、細菌、真菌或寄生蟲感染)之量。在一些態樣中，治療學上可接受之量不會誘導或引起不合需要之副作用。治療學上可接受之量可藉由首先投與低劑量，接著遞增地增加彼劑量直至達成所要作用來確定。本發明分子之「預防有效劑量」及「治療有效劑量」可分別預防疾病症狀之發作或使疾病症狀之嚴重程度降低，該等疾病症狀包括與癌症相關之症狀。

術語「共同投與」係指在個體之血液中同時存在兩種活性劑。共同投與之活性劑可並行或依序傳遞。

【圖式簡單說明】

圖1展示在癌細胞株之子組中cKIT-MCC-DM1 ADC之活性。

圖2描繪在癌細胞株之子組中9P3-MCC-DM1、9P3-SPDB-DM4及9P3-CX1-1-DM1之活性。

圖3展示在一組具有不同水準之cKIT表面受體表現之AML、GIST、黑素瘤及SCLC細胞株中9P3-MCC-DM1之活性。

圖4展示cKIT-MCC-DM1 ADC抑制GIST-T1 (伊馬替尼敏感性)細胞之增殖的能力。

圖5展示cKIT-MCC-DM1 ADC抑制GIST430 (伊馬替尼抗性)細胞之增殖的能力。

圖6展示cKIT-MCC-DM1 ADC抑制NCI-H526 (較高cKIT表現SCLC)細胞之增殖的能力。

圖7展示cKIT-MCC-DM1 ADC抑制NCI-H1048 (較低cKIT表現SCLC)細胞之增殖的能力。

圖8展示cKIT-MCC-DM1 ADC抑制CMK11-5 (高cKIT表現AML)細胞之增殖的能力。

圖9展示cKIT-MCC-DM1 ADC抑制Uke-1 (較低cKIT表現AML)細胞之增殖的能力。

圖10為以經校正之差異對於量測中之標準誤差繪製的HDx-MS原始資料。較大負值指示在9P3結合至cKIT抗原後來自氘交換之保護較大。兩個最顯著之保護區域標示為區域1及區域2。

圖11展示使用表面填充定位HDx-MS保護之區域：區域1 (黑色)及區域2 (深灰色)。SCF結合位點標示為位點I (淺灰色球體)、位點II (中灰色球體)及位點III (較深灰色球體)。

圖12為展示15分鐘後在野生型cKIT細胞株Mo7e 圖12(A)或突變型cKIT細胞株GIST-T1 圖12(B)中SCF、NEG085-MCC-DM1、

NEG024-MCC-DM1及20376-MCC-DM1調節cKIT磷酸化之能力的西方墨點。

圖13展示NEG085及20376 Ab介導GIST-T1細胞(A)上及人類骨髓細胞(B)上之表面cKIT的快速內化。

圖14為展示SCF或NEG085-MCC-DM1加速突變型cKIT細胞株GIST-T1 (圖14A)及野生型cKIT細胞株NCI-H526 (圖14B)中之cKIT經一定時程降解之能力的西方墨點。

圖15展示NEG085、NEG024、20376、NEG085-MCC-DM1抑制Mo7e細胞之SCF依賴性增殖的能力。

圖16展示NEG085及NEG085-MCC-DM1抑制Mo7e細胞之SCF非依賴性增殖的能力。

圖17展示Campath (抗CD52 Ab)、NEG085或20376抗體在Uke-1細胞中不誘導活體外ADCC之能力的評估。

圖18展示NEG085及20376不介導初級人類肥大細胞凋亡。

圖19展示NEG085及20376不介導初級人類肥大細胞脫粒。

圖20展示GIST T1異種移植模型中IgG1及NEG027-MCC-DM1之有絲分裂停滯之共定位。

圖21展示在cKIT ADC之單次給藥之後有絲分裂停滯(p-組蛋白H3)及細胞凋亡(卡斯蛋白酶3)之組織切片。

圖22以圖形表示在cKIT ADC之單次給藥之後8天的有絲分裂停滯及細胞凋亡誘導。

圖23展示(A) GIST T1小鼠異種移植物中之劑量反應功效，及(B)經處理過程之體重變化。

圖24以圖形描繪(A)在GIST T1異種移植模型中給藥之後的抗DM1 ELISA，及(B)在GIST T1異種移植模型中給藥之後的抗人IgG1 ELISA。

圖25為GIST T1異種移植小鼠模型中之NEG027-MCC-DM1劑量反應之表格。

圖26為GIST T1中之NEG027-MCC-DM1劑量反應功效之組織學切片。(A)為第4組彙集腫瘤，(B)為第5組彙集腫瘤。

圖27描繪(A)在GIST T1異種移植小鼠模型中0.625 mg/kg之功效，(B)腫瘤體積相對於對照之變化(% T/C)，及(C)經處理過程之體重變化。

圖28展示在將單次劑量之抗cKIT ADC投與GIST T1異種移植小鼠之後第41天之叢集。

圖29為在GIST T1異種移植模型中低有效劑量下之cKIT ADC功效之表格。

圖30展示(A) GIST T1異種移植小鼠模型中之抗cKIT PK (左圖為抗DM1 ELISA)，(B)右圖為抗人IgG1 ELISA。

圖31 A-C展示(A)在SCLC模型中之NEG085-MCC-DM1、NEG024MCC-DM1及NEG086-MCC-DM1活性，(B)經處理過程之體重變化，(C)腫瘤樣品上cKIT之表現。

圖32為在NCI-H1048 SCLC中之抗cKIT-ADC功效研究之表格。

圖33 A-B展示(A)在NCI-H1048 (SCLC)異種移植模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應，(B)經處理過程之體重變化。

圖34為展示在NCI-1048 (SCLC)異種移植小鼠模型中之NEG085-MCC-DM1功效研究之表格。

圖35 A-C展示(A)在NCI-H526 (SCLC)異種移植小鼠模型中20376及NEG024之功效，(B)給藥後之抗體血清濃度，及(C) cKIT之IHC展示在H526腫瘤上之cKIT表現量。

圖36展示在小細胞肺癌(SCLC)異種移植模型中之抗cKIT ADC。

圖37展示在AML異種移植模型(Kasumi-1)中之抗cKIT ADC功

效。

圖38展示在HMC-1肥大細胞增多症異種移植小鼠模型中之抗cKIT ADC功效。

圖39 A/B展示在GIST T1異種移植小鼠模型中之小鼠交叉反應性20376-MCC-DM1之功效，(A)劑量及腫瘤體積，及(B)經處理過程之體重變化。

圖40 A/B展示(A)在GIST T1異種移植小鼠模型中之小鼠交叉反應性20376-MCC-DM1之功效-PK，及(B)給藥後之抗體血清濃度。

圖41展示在GIST T1 SCID灰棕色小鼠中之劑量反應功效研究。

圖42 A/B展示(A)在GIST T1異種移植小鼠模型中之功效(在非結合情況下無功效)，及(B)經處理過程之體重變化。

圖43為在GIST T1小鼠異種移植模型中功效之比較(未經標記/MCC-DM1/SPDB-DM4)。

圖44 A/B展示(A)在比較SPDB-DM4與MCC-DM1之GIST 430異種移植模型中之功效，及(B)經處理過程之體重變化。

圖45展示在GIST 430 SCID灰棕色小鼠模型中之功效。

圖46為在用NEG085-MCC-DM1處理之後p-組蛋白H3免疫染色之照片。

圖47為在投與NEG085-MCC-DM1之後由p-組蛋白H3染色所示之有絲分裂停滯之圖。

圖48A展示GIST T1腫瘤之cKIT染色，圖48B展示在GIST T1異種移植模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應，圖48C展示經NEG085-MCC-DM1處理之小鼠之體重變化。

圖49A展示GIST 430腫瘤之cKIT染色，圖49B展示在GIST 430異種移植模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應，圖49C展示經NEG085-MCC-DM1處理之小鼠之體重變化。

圖50A展示NCI-H526腫瘤(小細胞肺癌(SCLC))之cKIT染色，圖50B展示在NCI-H526異種移植模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應，圖50C展示經NEG085-MCC-DM1處理之小鼠之體重變化。

圖51A展示在NCI-H526異種移植模型中NEG085-MCC-DM1給藥之後IgG1之量，圖51B為在用NEG085-MCC-DM1給藥之後NCI-H526異種移植模型中之抗DM1 ELISA之圖。

圖52A為展示在AML異種移植小鼠模型中NEG085-MCC-DM1之功效之圖，圖52B展示經NEG085-MCC-DM1處理之小鼠之體重變化。

圖53為與cKIT結構域1及2複合之NEG085 Fab之晶體結構之圖示。Fab重鏈呈深灰色，Fab輕鏈呈白色，且cKIT結構域呈淺灰色。抗原決定基及互補位呈黑色。

【實施方式】

本發明提供結合至cKIT之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物。詳言之，本發明係有關結合至cKIT且在該結合之後即內化之抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)。本發明之抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)可用於產生抗體藥物結合物。此外，本發明提供抗體藥物結合物，其具有所需藥物動力學特徵及其他所需屬性，且由此可用於治療表現cKIT之癌症，例如(但不限於)：胃腸基質腫瘤(GIST)、小細胞肺癌(SCLC)、急性骨髓性白血病(AML)、黑素瘤、肥大細胞白血病(MCL)、肥大細胞增多症、神經纖維瘤、乳癌、非小細胞肺癌(NSCLC)及胰臟癌。本發明另外提供包含抗體藥物結合物之醫藥組合物，及製造及使用該等醫藥組合物用於治療癌症之方法。

抗體藥物結合物

本發明提供抗體藥物結合物，其中特異性地結合至cKIT之抗體、抗原結合片段或其功能等效物連接至藥物部分。在一個態樣中，抗體、抗原結合片段或其功能等效物係經由連接子共價連接而連接至

作為抗癌劑之藥物部分。抗體藥物結合物可選擇性地傳遞有效劑量之抗癌劑(例如細胞毒性劑)至表現cKIT之腫瘤組織，藉此可達成較高選擇性(及較低有效劑量)。

在一個態樣中，本發明提供式(I)之免疫結合物：

$$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$$

其中Ab表示本文所述之cKIT結合抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)；

L為連接子；

D為藥物部分；

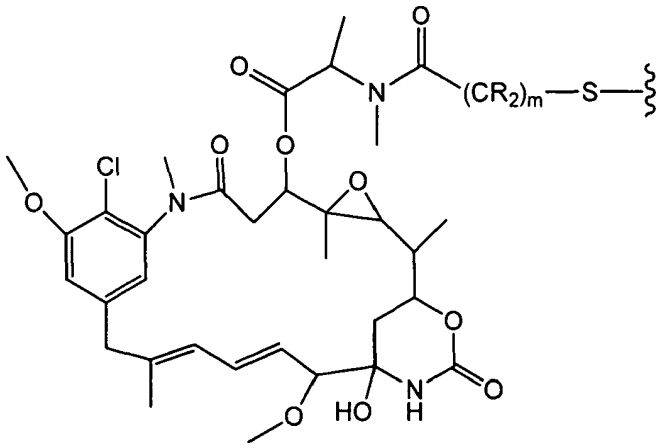
m為1至8之整數；且

n為1至20之整數。在一個態樣中，n為1至10、2至8或2至5之整數。在一特定態樣中，n為3至4。在一些態樣中，m為1。在一些態樣中，m為2、3或4。

儘管藥物與抗體比對於特定結合物分子具有準確值(例如式(I)中之n乘以m)，但應瞭解，該值當用於描述含有許多分子之樣品時將通常為平均值，此係歸因於一定程度之非均質性，其通常與結合步驟相關。免疫結合物之樣品之平均負載在本文中稱作藥物與抗體比或「DAR」。在類美登素之態樣中，此可稱作類美登素與抗體比或「MAR」。在一些態樣中，DAR介於約1與約5之間，且通常為約3、3.5、4、4.5或5。在一些態樣中，至少50重量%之樣品為具有平均DAR加上或減去2之化合物，且較佳至少50%之樣品為含有平均DAR加上或減去1之結合物。其他態樣包括DAR為約3.5之免疫結合物。在一些態樣中，『約n』之DAR意謂DAR之量測值在n之20%以內。

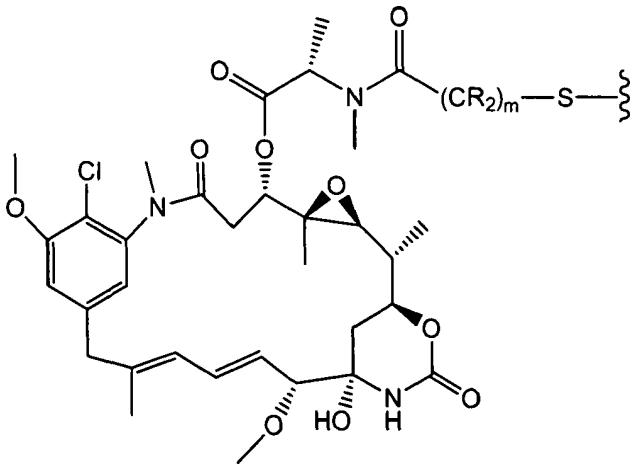
本發明提供免疫結合物，其包含連接或結合至藥物部分的如本文所揭示之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及其功能等效物。在一個態樣中，藥物部分D為類美登素藥物部分，包括具有以下結構之

藥物部分：

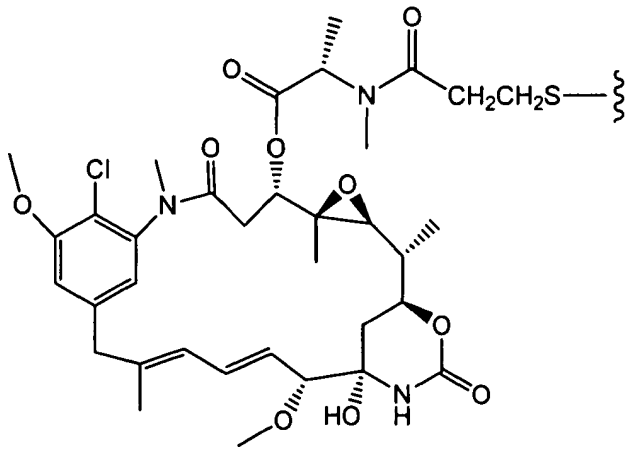


其中波形線指示類美登素之硫原子與抗體藥物結合物之連接子的共價連接。R在每次出現時獨立地為H或C_1-C_6烷基。使醯胺基連接至硫原子之伸烷基鏈可為甲烷基、乙烷基或丙烷基，亦即，m為1、2或3。(美國專利第633,410號，美國專利第5,208,020號，Chari等人(1992) Cancer Res. 52;127-131，Lui等人 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623)。

對於所揭示之免疫結合物預期存在類美登素藥物部分之所有立體異構體，亦即，在類美登素之對掌性碳上R及S組態之任何組合。在一個態樣中，類美登素藥物部分具有以下立體化學。

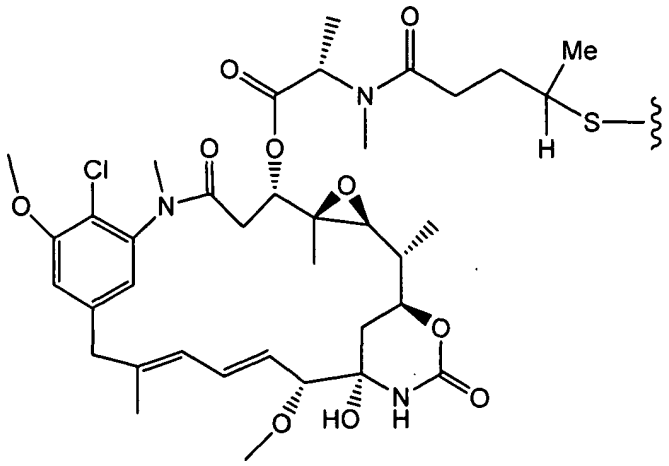


在一個態樣中，類美登素藥物部分為$N^{2'}$-脫乙醯基-$N^{2'}$-(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素(亦稱為DM1)。DM1係由以下結構式表示。



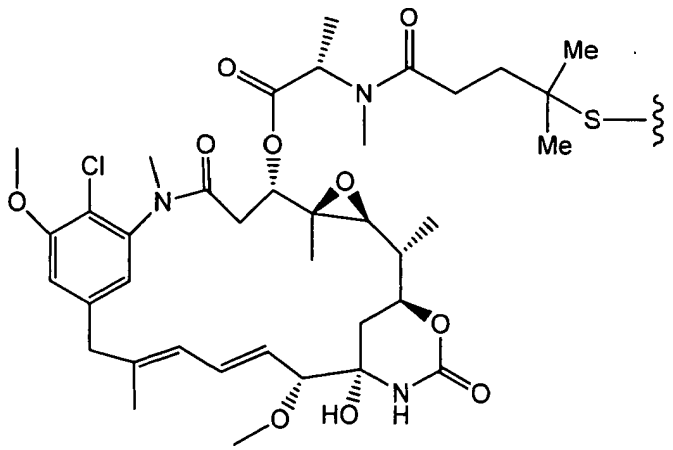
DM1

在另一態樣中，類美登素藥物部分為$N^{2'}$-脫乙醯基-$N^{2'}$-(4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素(亦稱為DM3)。DM3係由以下結構式表示。



DM3

在另一態樣中，類美登素藥物部分為$N^{2'}$-脫乙醯基-$N^{2'}$-(4-甲基-4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素(亦稱為DM4)。DM4係由以下結構式表示。



DM4

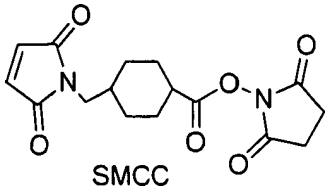
藥物部分D可經連接子L連接至抗體。L為能夠使抗體Ab連接至藥物部分D之任何化學部分。連接子L使抗體Ab經共價鍵連接至藥物D。連接子試劑為雙官能或多官能部分，其可用於連接藥物部分D與抗體Ab以形成抗體藥物結合物。抗體藥物結合物可使用具有反應性官能基用於結合至藥物部分D及結合至抗體Ab之連接子來製備。半胱胺酸、硫醇或胺，例如抗體之胺基酸側鏈(諸如離胺酸)之N端可與連接子試劑之官能基形成一鍵。

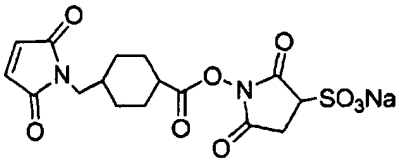
在一個態樣中，L為可裂解連接子。在另一態樣中，L為不可裂解連接子。在一些態樣中，L為酸不穩定連接子、光不穩定連接子、肽酶可裂解連接子、酯酶可裂解連接子、二硫鍵可還原連接子、親水性連接子、預帶電荷連接子或基於二羧酸之連接子。

在藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間形成不可裂解連接子之適合交聯試劑在此項技術中為熟知的，且可形成包含硫原子之不可裂解連接子(諸如SMCC)或不含硫原子之不可裂解連接子。在藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間形成不可裂解連接子之較佳交聯試劑包含基於順丁烯二醯亞胺基或基於鹵乙醯基之部分。根據本發明，該等不可裂解連接子據稱來源於基於順丁烯二醯亞胺基或基於鹵乙醯基之部分。

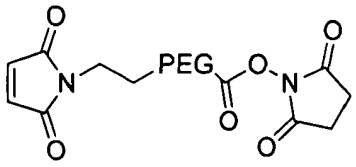
包含基於順丁烯二醯亞胺基之部分的交聯試劑包括(但不限於) 4-

(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸*N*-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸) *N*-丁二醯亞胺酯(其為SMCC之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、κ-順丁烯二醯亞胺基十一烷酸*N*-丁二醯亞胺酯(KMUA)、γ-順丁烯二醯亞胺基丁酸*N*-丁二醯亞胺酯(GMBS)、ε-順丁烯二醯亞胺基己酸*N*-丁二醯亞胺酯(EMCS)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯(MBS)、N-(α-順丁烯二醯亞胺基乙醯氧基)-丁二醯亞胺酯(AMSA)、6-(β-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸丁二醯亞胺酯(SMPH)、4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸*N*-丁二醯亞胺酯(SMPB)、N-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)異氰酸酯(PMIP)，及含有聚乙二醇間隔子的基於順丁烯二醯亞胺基之交聯試劑，諸如MAL-PEG-NHS。此等交聯試劑形成來源於基於順丁烯二醯亞胺基之部分的不可裂解連接子。基於順丁烯二醯亞胺基之交聯試劑之代表性結構展示如下。





磺酸基-SMCC

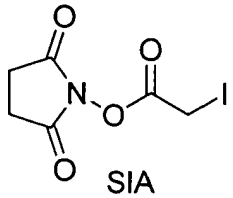


MAL-PEG-NHS

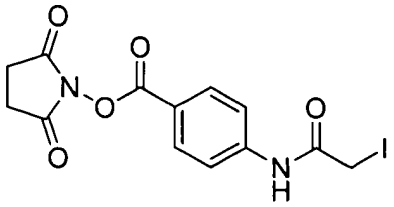
在另一態樣中，連接子L係來源於4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸*N*-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)或MAL-PEG-NHS。

包含基於鹵乙醯基之部分的交聯試劑包括碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、溴乙酸N-

丁二醯亞胺酯(SBA)及3-(溴乙醯胺基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SBAP)。此等交聯試劑形成來源於基於鹵乙醯基之部分的不可裂解連接子。基於鹵乙醯基之交聯試劑之代表性結構展示如下。



SIA

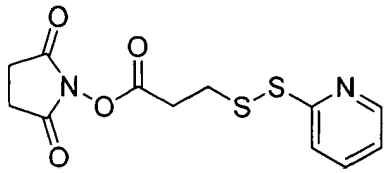


SIAB

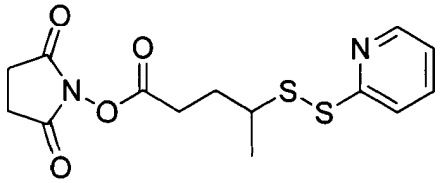
或

在一個態樣中，連接子L係來源於碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)或(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)。

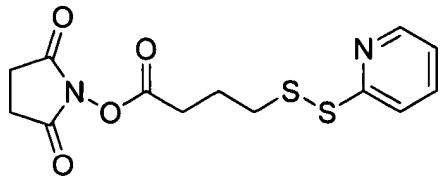
在藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間形成可裂解連接子之適合交聯試劑在此項技術中為熟知的。含二硫化物之連接子為可經二硫化物交換而裂解之連接子，該二硫化物交換可在生理條件下發生。根據本發明，該等可裂解連接子據稱來源於基於二硫化物之部分。適合之二硫化物交聯試劑包括3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)及4-(2-吡啶基二硫基)2-磺酸基-丁酸*N*-丁二醯亞胺酯(磺酸基-SPDB)，其結構展示如下。此等二硫化物交聯試劑形成來源於基於二硫化物之部分的可裂解連接子。



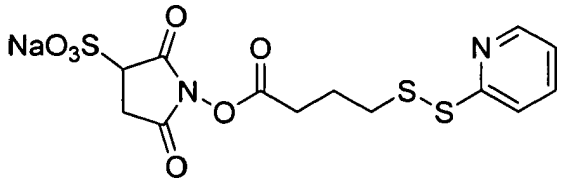
3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)，



4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)，



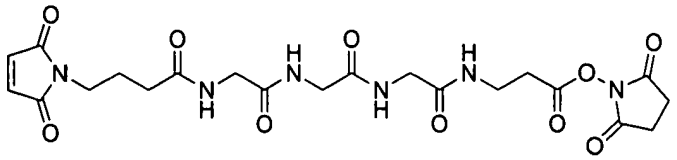
4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)，及



4-(2-吡啶基二硫基)2-磺酸基-丁酸N-丁二醯亞胺酯(磺酸基-SPDB)。

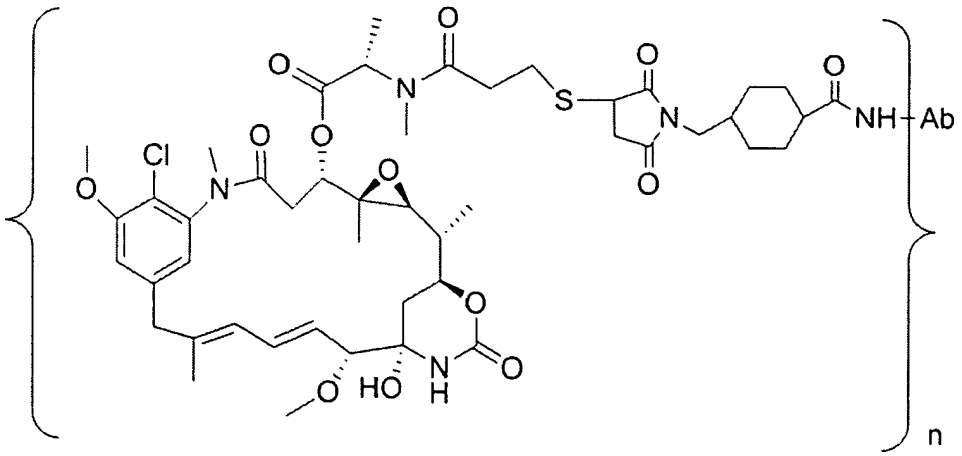
在一個態樣中，連接子L係來源於4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)。

在藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間形成帶電荷連接子之適合交聯試劑稱為預帶電荷交聯試劑。在一個態樣中，連接子L係來源於預帶電荷交聯試劑CX1-1。CX1-1之結構如下。

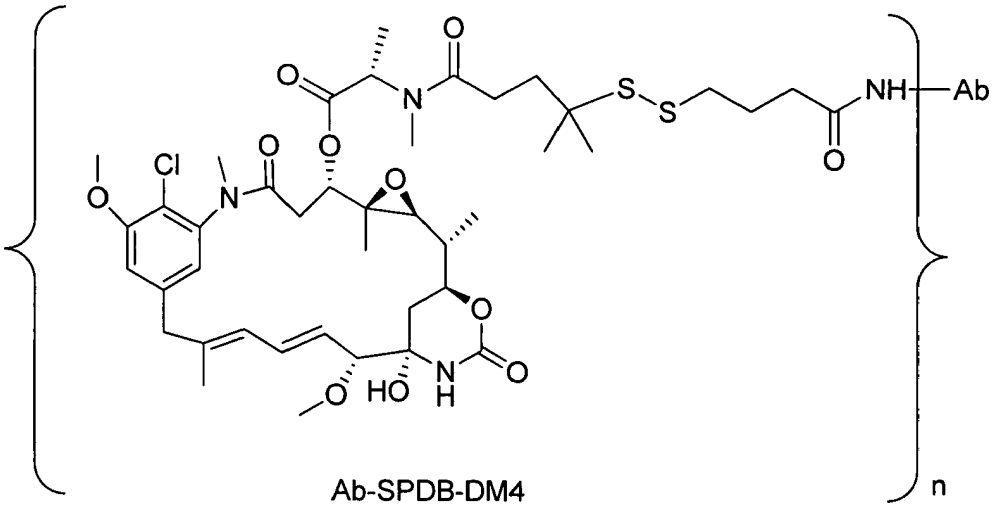


17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(CX1-1)

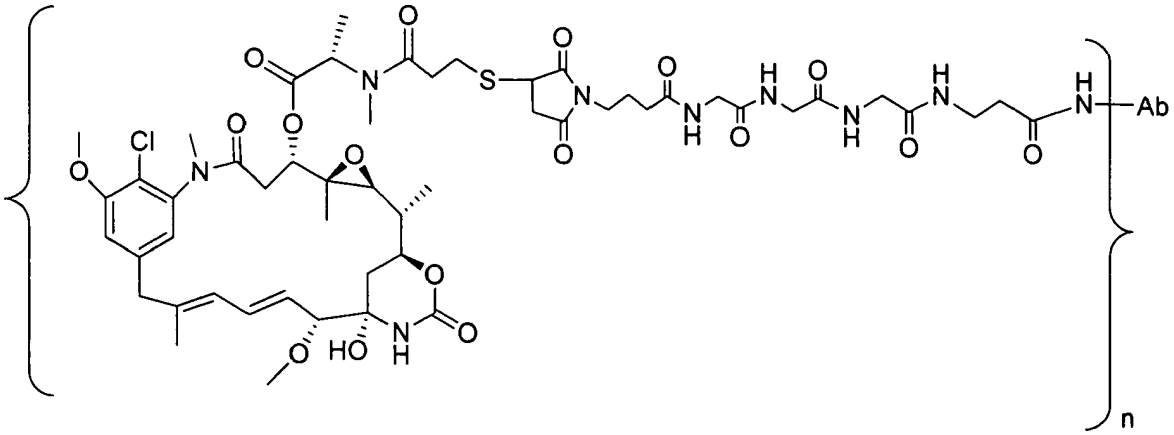
在本發明所提供之一個態樣中，結合物係由以下結構式中之任一者表示：



Ab-MCC-DM1



Ab-SPDB-DM4



Ab-CX1-1-DM1

其中：

Ab為特異性地結合至人類cKIT之抗體或其抗原結合片段；

n，其指示經由與Ab之一級胺形成醯胺鍵而連接Ab之D-L基團的

數目，為1至20之整數。在一個態樣中，n為1至10、2至8或2至5之整數。在一特定態樣中，n為3或4。

在一個態樣中，結合物中藥物(例如DM1或DM4)與抗體之平均莫耳比(亦即平均w值，亦稱為類美登素抗體比(MAR))為約1至約10、約2至約8 (例如1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0或8.1)、約2.5至約7、約3至約5、約2.5至約4.5 (例如約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5)、約3.0至約4.0、約3.2至約4.2或約4.5至5.5 (例如約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4或約5.5)。

在本發明所提供之一個態樣中，結合物具有實質上高純度且具有以下特徵中之一或多者：(a)大於約90% (例如大於或等於約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)、較佳大於約95%之結合物物質為單體，(b)結合物製劑中之非結合連接子含量小於約10% (例如小於或等於約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%) (相對於總連接子)，(c)小於10%之結合物物質經交聯(例如小於或等於約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)，(d)結合物製劑中之游離藥物(例如DM1或DM4)含量小於約2% (例如小於或等於約1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%) (mol/mol，相對於總細胞毒性劑)。

如本文所用之術語「非結合連接子」係指與來源於交聯試劑(例

如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)之連接子共價連接之抗體，其中該抗體並不經連接子共價偶合至藥物(例如DM1或DM4) (亦即，「非結合連接子」可由Ab-SMCC、Ab-SPDB或Ab-CX1-1表示)。

1. 藥物部分

本發明提供特異性地結合至cKIT之免疫結合物。本發明之免疫結合物包含結合至藥物部分之抗cKIT抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物，該藥物部分為例如抗癌劑、抗血液病劑、自體免疫治療劑、消炎劑、抗真菌劑、抗細菌劑、抗寄生蟲劑、抗病毒劑或麻醉劑。可使用此項技術中已知之任何方法使抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物結合至若干相同或不同之藥物部分。

在某些態樣中，本發明之免疫結合物之藥物部分係選自由以下組成之群：V-ATPase抑制劑、促凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧里斯他汀、海兔毒素、類美登素、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白CRM1之抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷基化劑、DNA嵌入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。

在一個態樣中，本發明之免疫結合物之藥物部分為類美登素藥物部分，諸如(但不限於) DM1、DM3或DM4。

此外，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可結合至調節既定生物反應之藥物部分。藥物部分不應視為限於傳統化學治療劑。舉例而言，藥物部分可為具有所要生物活性之蛋白質、肽或多肽。該等蛋白質可包括例如毒素，諸如相思子毒素

(abrin)、蓖麻毒素A (ricin A)、綠膿桿菌外毒素(pseudomonas exotoxin)、霍亂毒素(cholera toxin)或白喉毒素(diphtheria toxin)；蛋白質，諸如腫瘤壞死因子、α-干擾素、β-干擾素、神經生長因子、血小板源性生長因子、組織纖維蛋白溶酶原活化因子、細胞激素、凋亡劑、抗血管生成劑；或生物反應調節劑，諸如淋巴激素。

在一個態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物結合至藥物部分，諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素。細胞毒素之實例包括(但不限於)紫杉烷(taxane) (參見例如國際(PCT)專利申請案第WO 01/38318號及第PCT/US03/02675號)、DNA烷基化劑(例如CC-1065類似物)、蒽環黴素(anthracycline)、微管溶素(tubulysin)類似物、倍癌黴素(duocarmycin)類似物、奧里斯他汀E、奧里斯他汀F、類美登素，及包含反應性聚乙二醇部分之細胞毒性劑(參見例如Sasse等人, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000)；Suzawa等人, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000)；Ichimura等人, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)；Francisco等人, Blood 2003 15;102(4):1458-65)；美國專利第5,475,092號、第6,340,701號、第6,372,738號及第6,436,931號；美國專利申請公開案第2001/0036923 A1號；申請中之美國專利申請案第10/024,290號及第10/116,053號；及國際(PCT)專利申請案第WO 01/49698號)、紫杉酚(taxon)、細胞遲緩素B (cytochalasin B)、短桿菌素D (gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙素(t. colchicin)、小紅莓(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D (actinomycin D)、1-去氫睪酮(1-dehydrotestosterone)、糖

皮質激素(glucocorticoid)、普魯卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)及其類似物或同源物。治療劑亦包括(例如)抗代謝物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶、達卡巴嗪(dacarbazine))、消融劑(例如二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、噻替哌(thiotepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法侖(meiphalan)、卡莫司汀(carmustine) (BSNU)及洛莫司汀(lomustine) (CCNU)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露糖醇(dibromomannitol)、鏈脲佐菌素(streptozotocin)、絲裂黴素C及順二氯二胺鉑(II) (cis-dichlorodiamine platinum(II)) (DDP)順鉑(cisplatin))、蒽環黴素(例如道諾黴素(原稱為柔紅黴素(daunomycin))及小紅莓)、抗生素(例如放線菌素D (dactinomycin)，原稱為放線菌素)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素及胺茴黴素(anthramycin) (AMC))及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。(參見例如Seattle Genetics US20090304721)。

可結合至本發明之抗體、抗體片段(抗原結合片段)或功能等效物之細胞毒素的其他實例包括倍癌黴素、卡里奇黴素(calicheamicin)、美登素及奧里斯他汀及其衍生物。

多種類型之細胞毒素、連接子及使治療劑結合至抗體之方法在此項技術中為已知的，參見例如Saito等人, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215；Trail等人, (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337；Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212；Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763；Pastan及Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091；Senter及Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可

結合至放射性同位素以產生細胞毒性放射性藥物，稱作放射性免疫結合物。可結合至抗體以供診斷或治療用之放射性同位素之實例包括(但不限於)碘-131、銦-111、釔-90及鑥-177。在此項技術中確立製備放射性免疫結合物之方法。放射性免疫結合物之實例可購得，包括Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) 及 Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals)，且類似方法可用於使用本文所揭示之抗體製備放射性免疫結合物。在某些態樣中，巨環螯合劑為1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)，其可經由連接子分子連接至抗體。該等連接子分子在此項技術中通常為已知的且描述於Denardo等人, (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90；Peterson等人, (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7；及Zimmerman等人, (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50中，各文獻以全文引用的方式併入。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可結合至異源蛋白質或多肽(或其片段，較佳結合至至少10個、至少20個、至少30個、至少40個、至少50個、至少60個、至少70個、至少80個、至少90個或至少100個胺基酸之多肽)以產生融合蛋白質。詳言之，本發明提供融合蛋白質，其包含本文所述之抗體片段(例如抗原結合片段) (例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)2片段、VH結構域、VH CDR、VL結構域或VL CDR)，及異源蛋白質、多肽或肽。

其他融合蛋白質可經由基因改組、基元改組、外顯子改組及/或密碼子改組(統稱作「DNA改組」)之技術來產生。可採用DNA改組來改變本發明抗體或其片段(例如具有較高親和力及較低解離速率之抗體或其片段)之活性。一般參見美國專利第5,605,793號、第5,811,238號、第5,830,721號、第5,834,252號及第5,837,458號；Patten等人, (1997) Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33；Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82；Hansson等人, (1999) J. Mol. Biol. 287:265-

76；及Lorenzo與Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308-313 (此等專利及公開案中之每一者藉此以全文引用的方式併入)。抗體或其片段或經編碼之抗體或其片段可藉由在重組之前由易錯PCR、隨機核苷酸插入或其他方法對其進行隨機突變誘發來改變。編碼特異性地結合至抗原之抗體或其片段之聚核苷酸可與一或多個異源分子之一或多個組分、基元、區、部分、結構域、片段等重組。

此外，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可結合至標記物序列，諸如肽，以促進純化。在較佳態樣中，標記物胺基酸序列為六組胺酸肽，尤其諸如pQE載體(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)中所提供之標籤，其中許多可購得。如Gentz等人, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824中所述，舉例而言，六組胺酸提供融合蛋白質之適宜純化。適用於純化之其他肽標籤包括(但不限於)血球凝集素(「HA」)標籤，其對應於來源於流感血球凝集素蛋白之抗原決定基(Wilson等人, (1984) Cell 37:767)，及「FLAG」標籤(A. Einhauer等人, J. Biochem. Biophys. Methods 49: 455-465, 2001)。如本發明所述，抗體或抗原結合片段亦可結合至腫瘤穿透肽以增強其功效。

在其他態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物結合至診斷劑或可偵測劑。該等免疫結合物可適用於監測或預後疾病或病症之發作、發展、進展及/或嚴重程度作為臨床測試程序之一部分，諸如確定特定療法之功效。該診斷及偵測可藉由使抗體偶合至可偵測物質來實現，該等可偵測物質包括(但不限於)多種酶，諸如(但不限於)辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；輔基，諸如(但不限於)抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生蛋白/生物素；螢光物質，諸如(但不限於) Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa

Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、繖酮(umbelliferone)、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯(dansyl chloride)或藻紅素(phycoerythrin)；發光物質，諸如(但不限於)魯米諾(luminol)；生物發光物質，諸如(但不限於)螢光素酶、蟲螢光素及水母素(aequorin)；放射性物質，諸如(但不限於)碘(^{131}I、^{125}I、^{123}I及^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、銦(^{115}In、^{113}In、^{112}In及^{111}In)、鎝(^{99}Tc)、鉈(^{201}Ti)、鎵(^{68}Ga、^{67}Ga)、鈀(^{103}Pd)、鉬(^{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、^{64}Cu、^{113}Sn及^{117}Sn；及使用多種正電子發射斷層攝影術之正電子發射金屬，及非放射性順磁性金屬離子。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可連接至固體支撐物，該等固體支撐物尤其適用於免疫分析或靶抗原之純化。該等固體支撐物包括(但不限於)玻璃、纖維素、聚丙烯醯胺、耐綸(nylon)、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

2. 連接子

如本文所用之「連接子」為能夠使抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物連接至另一部分(諸如藥物部分)之任何化學部分。在化合物或抗體保留活性之條件下，連接子可易發生裂解(可裂解連接子)，諸如酸誘導之裂解、光誘導之裂解、肽酶誘導之裂解、酯酶誘導之裂解及二硫鍵裂解。或者，連接子可實質上對裂解具抗性(例如穩定連接子或不可裂解連接子)。在一些態樣中，連接子為預帶

電荷連接子、親水性連接子或基於二羧酸之連接子。

在一個態樣中，所用連接子係來源於交聯試劑，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)、4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺酸基-丁酸*N*-丁二醯亞胺酯(磺酸基-SPDB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(CX1-1)。在另一態樣中，所用連接子係來源於交聯劑，諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)、4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺酸基-丁酸*N*-丁二醯亞胺酯(磺酸基-SPDB)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(CX1-1)。

不可裂解連接子為能夠使藥物(諸如類美登素)以穩定、共價方式連接至抗體且不屬於上文針對可裂解連接子所列之種類的任何化學部分。因此，不可裂解連接子實質上對酸誘導之裂解、光誘導之裂解、肽酶誘導之裂解、酯酶誘導之裂解及二硫鍵裂解具抗性。此外，不可裂解係指在藥物(諸如類美登素)或抗體不損失其活性之條件下，連接子中或鄰接連接子之化學鍵抵抗由酸、光不穩定裂解劑、肽酶、酯酶或使二硫鍵裂解之化學或生理化合物誘導之裂解的能力。

酸不穩定連接子為可在酸性pH值下裂解之連接子。舉例而言，

某些細胞內區室(諸如核內體及溶酶體)具有酸性pH值(pH 4-5)，且提供適合於使酸不穩定連接子裂解之條件。

光不穩定連接子為在體表面處及光可達之許多體腔中適用之連接子。此外，紅外光可穿透組織。

一些連接子可由肽酶裂解，亦即肽酶可裂解連接子。僅某些肽易於在細胞內部或外部裂解，參見例如Trout等人, 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982)及Umemoto等人 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989)。此外，肽由α-胺基酸及肽鍵構成，該等肽鍵在化學上為一個胺基酸之羧酸酯基與第二胺基酸之胺基之間的醯胺鍵。其他醯胺鍵，諸如羧酸酯基與離胺酸之ε-胺基之間的鍵，不應理解為肽鍵且應視為不可裂解的。

一些連接子可由酯酶裂解，亦即酯酶可裂解連接子。此外，僅某些酯可由存在於細胞內部或外部之酯酶裂解。酯係藉由羧酸與醇縮合形成。簡單酯為由簡單醇產生之酯，該等簡單醇為諸如脂族醇，及小環狀及小芳族醇。

預帶電荷連接子係來源於帶電荷交聯試劑，該等帶電荷交聯試劑在併入抗體藥物結合物中之後保留其電荷。預帶電荷連接子之實例可見於US 2009/0274713中。

3. ADC之結合及製備

本發明之結合物可藉由此項技術中已知之任何方法來製備，諸如美國專利第7,811,572號、第6,411,163號、第7,368,565號及第8,163,888號以及美國申請公開案第2011/0003969號、第2011/0166319號、第2012/0253021號及第2012/0259100號中所述之方法。此等專利及專利申請公開案之完整教示內容以引用的方式併入本文中。

一步製程

在一個態樣中，本發明之結合物可藉由一步製程製備。該製程

包含在適合之pH值下，於視情況含有一或多種共溶劑之實質上水性介質中組合抗體、藥物及交聯劑。在一個態樣中，該製程包含以下步驟：使本發明抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸以形成包含抗體及藥物之第一混合物，接著使包含抗體及藥物之第一混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)在pH值為約4至約9之溶液中接觸以提供包含以下之混合物：(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)，(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)，及(iii)反應副產物。

在一個態樣中，一步製程包含使抗體依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)在pH值為約6或大於6 (例如約6至約9、約6至約7、約7至約9、約7至約8.5、約7.5至約8.5、約7.5至約8.0、約8.0至約9.0或約8.5至約9.0)之溶液中接觸。舉例而言，該製程包含使細胞結合劑依序與藥物(DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)在pH值為約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.8、約7.9、約8.0、約8.1、約8.2、約8.3、約8.4、約8.5、約8.6、約8.7、約8.8、約8.9或約9.0之溶液中接觸。在另一態樣中，該製程包含使細胞結合劑依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)在pH值為約7.8 (例如pH值為7.6至8.0或pH值為7.7至7.9)之溶液中接觸。

一步製程(亦即，使抗體依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸)可在此項技術中已知之任何適合溫度下進行。舉例而言，一步製程可在約20℃或低於20℃ (例如約-10℃ (其限制條件為防止溶液結冰，例如

藉由存在用於溶解細胞毒性劑及雙官能交聯試劑之有機溶劑)至約20℃、約0℃至約18℃、約4℃至約16℃)下、在室溫(例如約20℃至約30℃或約20℃至約25℃)下或在高溫(例如約30℃至約37℃)下進行。在一個態樣中，一步製程在約16℃至約24℃ (例如約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃或約25℃)之溫度下進行。在另一態樣中，一步製程在約15℃或低於15℃ (例如約-10℃至約15℃或約0℃至約15℃)之溫度下進行。舉例而言，該製程包含在約15℃、約14℃、約13℃、約12℃、約11℃、約10℃、約9℃、約8℃、約7℃、約6℃、約5℃、約4℃、約3℃、約2℃、約1℃、約0℃、約-1℃、約-2℃、約-3℃、約-4℃、約-5℃、約-6℃、約-7℃、約-8℃、約-9℃或約-10℃之溫度下，使抗體依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸，其限制條件為防止溶液結冰，例如藉由存在用於溶解交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、磺酸基-SPDB、SPDB或CX1-1)之有機溶劑。在一個態樣中，該製程包含在約-10℃至約15℃、約0℃至約15℃、約0℃至約10℃、約0℃至約5℃、約5℃至約15℃、約10℃至約15℃或約5℃至約10℃之溫度下，使抗體依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸。在另一態樣中，該製程包含在約10℃之溫度(例如8℃至12℃之溫度或9℃至11℃之溫度)下，使抗體依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸。

在一個態樣中，上文所述之接觸係由以下方式實現：提供抗體，接著使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸以形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之第一混合物，接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之第一混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、

磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸。舉例而言，在一個態樣中，抗體提供於反應容器中，將藥物(例如DM1或DM4)添加至反應容器中(藉此接觸抗體)，接著將交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)添加至包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物中(藉此接觸包含抗體及藥物之混合物)。在一個態樣中，抗體提供於反應容器中，且在向容器提供抗體後即刻將藥物(例如DM1或DM4)添加至反應容器中。在另一態樣中，抗體提供於反應容器中，且在向容器提供抗體後的一段時間間隔之後(例如在向空間提供細胞結合劑之後約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約40分鐘、約50分鐘、約1小時、約1天或1天以上)將藥物(例如DM1或DM4)添加至反應容器中。可快速地(亦即在短時間間隔內，諸如約5分鐘、約10分鐘)或緩慢地(諸如藉由使用泵)添加藥物(例如DM1或DM4)。

在使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後即刻或在使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後的某個稍後點(例如約5分鐘至約8小時或8小時以上)，包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物可接著與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸。舉例而言，在一個態樣中，在將藥物(例如DM1或DM4)添加至包含抗體之反應容器中之後即刻將交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)添加至包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物中。或者，在抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時或8小時以上，包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物可與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸。

在包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸之後，使

反應進行約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或24小時以上(例如約30小時、約35小時、約40小時、約45小時或約48小時)。

在一個態樣中，一步製程另外包含淬滅步驟以淬滅任何未反應之藥物(例如DM1或DM4)及/或未反應之交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)。淬滅步驟通常在純化結合物之前進行。在一個態樣中，藉由使混合物與淬滅試劑接觸來淬滅混合物。如本文所用之「淬滅試劑」係指與游離藥物(例如DM1或DM4)及/或交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)反應之試劑。在一個態樣中，順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯胺淬滅試劑，諸如4-順丁烯二醯亞胺基丁酸、3-順丁烯二醯亞胺基丙酸、N-乙基順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺或碘乙醯胺基丙酸，可用於確保藥物(例如DM1或DM4)中之任何未反應基團(諸如硫醇)均淬滅。淬滅步驟可有助於防止藥物(例如DM1)二聚。經二聚之DM1可難以移除。在用極性、帶電荷硫醇淬滅試劑(諸如4-順丁烯二醯亞胺基丁酸或3-順丁烯二醯亞胺基丙酸)淬滅後，過量未反應之DM1轉化成極性、帶電荷、水溶性加合物，該加合物在純化步驟期間可容易地與經共價連接之結合物分離。亦可使用非極性且中性之硫醇淬滅試劑進行淬滅。在一個態樣中，藉由使混合物與淬滅試劑接觸來淬滅混合物，該淬滅試劑與未反應之交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)反應。舉例而言，可將親核試劑添加至混合物中以淬滅任何未反應之SMCC。親核試劑較佳為含胺基之親核試劑，諸如離胺酸、牛磺酸及羥胺。

在另一態樣中，使反應(亦即，使抗體依序與藥物(例如DM1或DM4)及交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸)進行至完成，隨後使混合物與淬滅試劑接觸。就此而言，在包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸之後約1小時至約48小時(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或約25小時至約48小時)，將淬滅試劑添加至混合物中。

或者，藉由將混合物之pH值降至約5.0 (例如4.8、4.9、5.0、5.1或5.2)來淬滅混合物。在另一態樣中，藉由將pH值降至小於6.0、小於5.5、小於5.0、小於4.8、小於4.6、小於4.4、小於4.2、小於4.0來淬滅混合物。或者，將pH值降至約4.0 (例如3.8、3.9、4.0、4.1或4.2)至約6.0 (例如5.8、5.9、6.0、6.1或6.2)、約4.0至約5.0、約4.5 (例如4.3、4.4、4.5、4.6或4.7)至約5.0。在一個態樣中，藉由將混合物之pH值降至4.8來淬滅混合物。在另一態樣中，藉由將混合物之pH值降至5.5來淬滅混合物。

在一個態樣中，一步製程另外包含保持步驟以自抗體釋放不穩定結合之連接子。保持步驟包含在純化結合物之前(例如在反應步驟之後，在反應步驟與淬滅步驟之間，或在淬滅步驟之後)保持混合物。舉例而言，該製程包含(a)使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸以形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物；接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)在pH值為約4至約9之溶液中接觸以提供包含以下之混合物：(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-

SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)，(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)，及(iii)反應副產物；(b)保持步驟(a)中所製備之混合物以自細胞結合劑釋放不穩定結合之連接子；及(c)純化混合物以提供經純化之結合物。

在另一態樣中，該製程包含(a)使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸以形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物；接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)在pH值為約4至約9之溶液中接觸以提供包含以下之混合物：(i)結合物，(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)，及(iii)反應副產物；(b)淬滅步驟(a)中所製備之混合物以淬滅任何未反應之藥物(例如DM1或DM4)及/或未反應之交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)；(c)保持步驟(b)中所製備之混合物以自細胞結合劑釋放不穩定結合之連接子；及(d)純化混合物以提供經純化之結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)。

或者，保持步驟可在純化結合物之後進行，繼之以另一純化步驟。

在另一態樣中，使反應進行至完成，隨後進行保持步驟。就此而言，在包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)之混合物與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸之後約1小時至約48小時(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時，或約24小時至約48小時)，可進行保持步驟。

保持步驟包含將溶液在適合溫度(例如約0℃至約37℃)下維持適合之時段(例如約1小時至約1週、約1小時至約24小時、約1小時至約8

小時或約1小時至約4小時)以自抗體釋放不穩定結合之連接子，同時不會自抗體實質上釋放穩定結合之連接子。在一個態樣中，保持步驟包含將溶液維持於約20℃或20℃以下(例如約0℃至約18℃、約4℃至約16℃)、室溫(例如約20℃至約30℃或約20℃至約25℃)下或高溫(例如約30℃至約37℃)下。在一個態樣中，保持步驟包含將溶液維持於約16℃至約24℃(例如約15℃、約16℃、約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃或約25℃)之溫度下。在另一態樣中，保持步驟包含將溶液維持於約2℃至約8℃ (例如約0℃、約1℃、約2℃、約3℃、約4℃、約5℃、約6℃、約7℃、約8℃、約9℃或約10℃)之溫度下。在另一態樣中，保持步驟包含將溶液維持於約37℃ (例如約34℃、約35℃、約36℃、約37℃、約38℃、約39℃或約40℃)之溫度下。

保持步驟之持續時間視進行保持步驟之溫度及pH值而定。舉例而言，保持步驟之持續時間可藉由在高溫下進行保持步驟而實質上縮短，其中最大溫度受細胞結合劑-細胞毒性劑結合物之穩定性限制。保持步驟可包含將溶液維持約1小時至約1天(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約12小時、約14小時、約16小時、約18小時、約20小時、約22小時或約24小時)、約10小時至約24小時、約12小時至約24小時、約14小時至約24小時、約16小時至約24小時、約18小時至約24小時、約20小時至約24小時、約5小時至約1週、約20小時至約1週、約12小時至約1週(例如約12小時、約16小時、約20小時、約24小時、約2天、約3天、約4天、約5天、約6天或約7天)或約1天至約1週。

在一個態樣中，保持步驟包含將溶液在約2℃至約8℃之溫度下維持至少約12小時至1週之時段。在另一態樣中，保持步驟包含將溶液

在約2℃至約8℃之溫度下維持隔夜(例如約12至約24小時，較佳約20小時)。

保持步驟之pH值較佳為約4至約10。在一個態樣中，保持步驟之pH值為約4或大於4，但小於約6 (例如4至5.9)，或約5或大於5，但小於約6 (例如5至5.9)。在另一態樣中，保持步驟之pH值在約6至約10(例如約6.5至約9、約6至約8)之範圍內。舉例而言，保持步驟之pH值可為約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5或約10。

在其他態樣中，保持步驟包含將混合物在25℃下於約6-7.5之pH值下培育約12小時至約1週，將混合物在4℃下於約4.5-5.9之pH值下培育約5小時至約5天，或將混合物在25℃下於約4.5-5.9之pH值下培育約5小時至約1天。

一步製程可視情況包括將蔗糖添加至反應步驟中以增加結合物之溶解度及回收率。理想地，蔗糖以約0.1% (w/v)至約20% (w/v) (例如約0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)或20% (w/v))之濃度添加。較佳地，蔗糖以約1% (w/v)至約10% (w/v) (例如約0.5% (w/v)、約1% (w/v)、約1.5% (w/v)、約2% (w/v)、約3% (w/v)、約4% (w/v)、約5% (w/v)、約6% (w/v)、約7% (w/v)、約8% (w/v)、約9% (w/v)、約10% (w/v)或約11% (w/v))之濃度添加。另外，反應步驟亦可包含添加緩衝劑。可使用此項技術中已知之任何適合緩衝劑。適合之緩衝劑包括例如檸檬酸鹽緩衝劑、乙酸鹽緩衝劑、丁二酸鹽緩衝劑及磷酸鹽緩衝劑。在一個態樣中，緩衝劑係選自由以下組成之群：HEPPSO (N-(2-羥乙基)哌嗪-N'-(2-羥基丙烷磺酸))、POPSO (哌嗪-1,4-雙(2-羥基-丙烷-磺酸)脫水物)、HEPES (4-(2-羥乙基)哌嗪-1-乙烷磺酸)、HEPPS (EPPS) (4-(2-羥乙基)哌嗪-1-丙烷磺酸)、TES (N-[參(羥甲基)甲基]-2-胺基乙烷磺酸)及其組合。

一步製程可另外包含純化混合物以提供經純化之結合物(例如Ab-

MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)之步驟。可使用此項技術中已知之任何純化方法來純化本發明之結合物。在一個態樣中，本發明之結合物使用切向流過濾(TFF)、非吸附層析、吸附層析、吸附過濾、選擇沈澱，或任何其他適合純化製程，以及其組合。在另一態樣中，在對結合物進行上文所述之純化製程之前，首先經一或多個PVDF膜過濾結合物。或者，在對結合物進行上文所述之純化製程之後，經一或多個PVDF膜過濾結合物。舉例而言，在一個態樣中，經一或多個PVDF膜過濾結合物，接著使用切向流過濾來純化。或者，使用切向流過濾純化結合物，接著經一或多個PVDF膜過濾。

可利用任何適合TFF系統進行純化，包括Pellicon®型系統(Millipore, Billerica, MA)、Sartocon®卡匣系統(Sartorius AG, Edgewood, NY)及Centrasette®型系統(Pall Corp., East Hills, NY)。

可利用任何適合吸附層析樹脂進行純化。較佳吸附層析樹脂包括羥磷灰石層析、疏水電荷誘導層析(HCIC)、疏水相互作用層析(HIC)、離子交換層析、混合模式離子交換層析、固定金屬親和層析(IMAC)、染料配位體層析、親和層析、逆相層析及其組合。適合羥磷灰石樹脂之實例包括陶瓷羥磷灰石(I型及II型CHT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogel®羥磷灰石(Pall Corp., East Hills, NY)及陶瓷氟磷灰石(I型及II型CFT, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合HCIC樹脂之一個實例為MEP Hypercel®樹脂(Pall Corp., East Hills, NY)。適合HIC樹脂之實例包括丁基-瓊脂糖、己基-瓊脂糖、苯基-瓊脂糖及辛基瓊脂糖樹脂(全部來自GE Healthcare, Piscataway, NJ)，以及Macro-prep®甲基樹脂及Macro-Prep®第三丁基樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, CA)。適合離子交換樹脂之實例包括SP-Sepharose®、CM-Sepharose®及Q-Sepharose®樹脂(全部來自GE Healthcare, Piscataway, NJ)，及Unosphere® S樹脂(Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA)。適合混合模式離子交換劑之實例包括Bakerbond® ABx樹脂(JT Baker, Phillipsburg NJ)。適合IMAC樹脂之實例包括Chelating Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)及Profinity® IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合染料配位體樹脂之實例包括藍色瓊脂糖樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)及Affi-gel藍色樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合親和樹脂之實例包括蛋白質A瓊脂糖樹脂(例如MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ)，及凝集素親和樹脂，例如Lentil Lectin Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)，其中抗體帶有適當凝集素結合位點。適合逆相樹脂之實例包括C4、C8及C18樹脂(Grace Vydac, Hesperia, CA)。

可利用任何適合非吸附層析樹脂進行純化。適合非吸附層析樹脂之實例包括(但不限於) SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™樹脂(例如S-200及S-300)、SUPERDEX™樹脂(例如SUPERDEX™ 75及SUPERDEX™ 200)、BIO-GEL®樹脂(例如P-6、P-10、P-30、P-60及P-100)，及一般技術者已知之其他樹脂。

兩步製程及一鍋製程

在一個態樣中，本發明之結合物可如美國專利7,811,572及美國專利申請公開案第2006/0182750號中所述來製備。該製程包含以下步驟：(a)使本發明抗體與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)接觸以使連接子(亦即Ab-SMCC、Ab-SPDB或Ab-CX1-1)共價連接至抗體且藉此製備包含結合有連接子之抗體之第一混合物；(b)視情況對第一混合物進行純化製程以製備經純化之結合有連接子之抗體之第一混合物；(c)藉由使結合有連接子之抗體與藥物(例如DM1或DM4)在pH值為約4至約9之溶液中反應而使藥物(例如DM1或DM4)結合至第一混合物中結合有連接子之抗體以製備包含

以下之第二混合物：(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)，(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)，及(iii)反應副產物；及(d)對第二混合物進行純化製程以自第二混合物之其他組分純化結合物。或者，可略去純化步驟(b)。本文所述之任何純化方法可用於步驟(b)及(d)。在一個實施例中，TFF用於步驟(b)與(d)。在另一實施例中，TFF用於步驟(b)且吸附層析(例如CHT)用於步驟(d)。

一步試劑及原位製程

在一個態樣中，本發明之結合物可藉由使預先形成之藥物-連接子化合物(例如SMCC-DM1、磺酸基-SMCC-DM1、SPDB-DM4或CX1-1-DM1)結合至本發明之抗體來製備，如美國專利6,441,163及美國專利申請公開案第2011/0003969號及第2008/0145374號中所述，繼之以純化步驟。可使用本文所述之任何純化方法。藥物-連接子化合物係藉由使藥物(例如DM1或DM4)與交聯劑(例如SMCC、磺酸基-SMCC、SPDB、磺酸基-SPDB或CX1-1)反應來製備。視情況對藥物-連接子化合物(例如SMCC-DM1、磺酸基-SMCC-DM1、SPDB-DM4或CX1-1-DM1)進行純化，隨後使其結合至抗體。

4. 所需抗體及抗體藥物結合物之表徵及選擇

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物可藉由此項技術中已知之多種分析針對其物理/化學特性及/或生物活性進行表徵及選擇。

舉例而言，本發明之抗體可藉由諸如ELISA、FACS、Biacore或西方墨點之已知方法針對其抗原結合活性進行測試。

轉殖基因動物及細胞株尤其適用於篩選抗體藥物結合物(ADC)，該等抗體藥物結合物具有作為腫瘤相關抗原及細胞表面受體之癌症過度表現之預防性或治療性處理的潛力。篩選適用之ADC可涉及將一定劑量範圍之候選ADC投與轉殖基因動物，及在多個時間點分析ADC對

所評估之疾病或病症之影響。替代地或另外，若適用，則可在暴露於疾病誘發劑之前或同時投與藥物。可連續及個別地篩選候選ADC，或在中等或高產量篩選格局中平行篩選候選ADC。

一個態樣為一種篩選方法，其包含(a)將細胞自表現cKIT之穩定癌細胞株或人類患者腫瘤(例如GIST細胞株或腫瘤片段、黑素瘤細胞株或腫瘤片段)移植至非人類動物中，(b)將ADC藥物候選物投與非人類動物，及(c)確定候選物抑制來自經移植之細胞株之腫瘤生長的能力。本發明亦涵蓋一種篩選用於治療特徵為cKIT過度表現之疾病或病症之ADC候選物的方法，其包含(a)使來自表現cKIT之穩定癌細胞株之細胞與藥物候選物接觸，及(b)評估ADC候選物抑制穩定細胞株生長的能力。

另一態樣為一種篩選方法，其包含(a)使來自表現cKIT之穩定癌細胞株之細胞與ADC藥物候選物接觸，及(b)評估ADC候選物阻斷cKIT之配位體活化的能力。在另一態樣中，評估ADC候選物阻斷配位體刺激之酪胺酸磷酸化的能力。

另一態樣為一種篩選方法，其包含(a)使來自表現cKIT之穩定癌細胞株之細胞與ADC藥物候選物接觸，及(b)評估ADC候選物誘導細胞死亡的能力。在一個態樣中，評估ADC候選物誘導細胞凋亡的能力。

候選ADC可藉由以一定劑量範圍投與轉殖基因動物及評估動物隨時間對化合物之生理反應來篩選。在一些狀況下，可適當地將化合物與將增強化合物功效之輔因子聯合投與。若來源於個體轉殖基因動物之細胞株用於篩選適用於治療與cKIT過度表現相關之多種病症的ADC，則在適當時間將測試ADC添加至細胞培養基中，且使用適當生物化學及/或組織學分析來評估隨時間對ADC之細胞反應。

因此，本發明提供用於鑑別特異性地靶向及結合至cKIT之ADC

及腫瘤細胞上之cKIT過度表現的分析。

cKIT抗體

本發明提供特異性地結合至人類cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)。本發明之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包括(但不限於)人類單株抗體或其片段，如下文實例中所述加以分離。

在某些態樣中，本發明提供特異性地結合cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 9、28、46、64、82、100、118或136(表1)之VH結構域。本發明亦提供特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有表1中所列之VH CDR中之任一者之胺基酸序列的VH CDR。在特定態樣中，本發明提供特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體包含一個、兩個、三個、四個、五個或五個以上具有下表1中所列之VH CDR中之任一者之胺基酸序列的VH CDR (或者，由其組成)。

本發明提供特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 18、37、55、73、91、109、127或145 (表1)之VL結構域。本發明亦提供特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有下表1中所列之VL CDR中之任一者之胺基酸序列的VL CDR。詳言之，本發明提供特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含一個、兩個、三個或三個以上具有表1中所列之VL CDR中之任一者之胺基酸序列的VL CDR (或者，由其組成)。

本發明之其他抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包括已經突

變，但CDR區與表1中所述之序列中所描繪之CDR區仍具有至少60、70、80、90或95一致性百分比的胺基酸。在一些態樣中，其包括突變型胺基酸序列，其中CDR區與表1中所述之序列中所描繪之CDR區相比不超過1個、2個、3個、4個或5個胺基酸已突變。

本發明亦提供編碼特異性地結合至cKIT之抗體之VH、VL、全長重鏈及全長輕鏈的核酸序列。該等核酸序列可針對於哺乳動物細胞中之表現最佳化。

表1. 抗cKIT抗體之實例

9P3		
SEQ ID NO 3: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 4: (Kabat)	HCDR2	NINYDGSSTYYLDSLKS
SEQ ID NO 5: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 6: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 7: (Chothia)	HCDR2	NYDGSS
SEQ ID NO 8: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 9:	VH	EVRLVESEGGLVQPRSSMKLSCTASGFTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFIISRDNAKNILYLQMSSLKSEDTATYYCARGDYYGTTYWYFDVWGTGTTVTVSS
SEQ ID NO 10	恆定重鏈	VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 11:	重鏈 人類化	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVANINYDGSSTYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 12: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 13: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 14: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS

SEQ ID NO 15: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 16: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 17: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 18:	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG KKLWSFGGGTKLEIKR
SEQ ID NO:19	恆定輕鏈	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 20:	輕鏈(人類化VK1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQG KKLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 21:	DNA輕鏈(人類化VK3 NEG009)	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGK KLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
NEG024		
SEQ ID NO 22: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 23: (Kabat)	HCDR2	NINQIAGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 24: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 25: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 26: (Chothia)	HCDR2	NQIAGS
SEQ ID NO 27: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 28:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVANINQIAGSTYYLDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 29:	重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVANINQIAGSTYYLDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO 30:	DNA重鏈	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCGACTACTACATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGGTGGCCAATATCAACCAAATCGCCGGCAGC ACCTACTACCTGGACAGCGTGAGAGGCCGGTTCACCATCAGCC GGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGCG ATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCA GGGCACCACCGTGACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTG GGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAA GACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 31: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 32: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 33: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 34: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 35: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 36: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 37:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGK KLWSFGGGTKVEIK
SEQ ID NO 38:	輕鏈	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGK KLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO 39:	DNA輕鏈	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGC CCTGGCGAAAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCAGCCAGGAC ATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGG CCCCCAGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGG CATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTAC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGT ACTACTGCCAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NEG026		
SEQ ID NO 40: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 41: (Kabat)	HCDR2	NINQNTGSTYYVDSVQG
SEQ ID NO 42: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 43: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 44: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 45: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 46:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVANINQNTGSTYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 47:	重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVANINQNTGSTYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO 48:	DNA重鏈	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCGACTACTACATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGGTGGCCAATATCAACCAAAACACCGGCAG CACCTACTACGTGGACAGCGTGCAAGGCCGGTTCACCATCAGC CGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCC AGGGCACCACCGTGACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAA AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCT TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
SEQ ID NO 49: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 50: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 51: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 52: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 53: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 54: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 55:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGK KLWSFGGGTKVEIK
SEQ ID NO 56:	輕鏈	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGK KLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO 57:	DNA輕鏈	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGC CCTGGCGAAAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCAGCCAGGAC ATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGG CCCCCAGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGG CATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTAC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGT ACTACTGCCAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NEG027		
SEQ ID NO 58: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 59: (Kabat)	HCDR2	SINQNTGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 60: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 61: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 62: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 63: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 64:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVASINQNTGSTYYLDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 65:	重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVASINQNTGSTYYLDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO 66:	DNA重鏈	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCGACTACTACATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGGTGGCCAGTATCAACCAAAACACCGGCAG CACCTACTACCTGGACAGCGTGCGAGGCCGGTTCACCATCAGC CGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCC AGGGCACCACCGTGACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAA AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCT TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
SEQ ID NO 67: (Kabat)	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO 68: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 69: (Kabat)	LCDR3	QQGKKLWS
SEQ ID NO 70: (Chothia)	LCDR1	SQDISNY
SEQ ID NO 71: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 72: (Chothia)	LCDR3	GKKLW
SEQ ID NO 73:	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQGK KLWSFGGGTKVEIK
SEQ ID NO 74:	輕鏈	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAPR LLIYYTSRLQSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEP EDFAVYYCQQGKKLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO 75:	DNA輕鏈	GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGC CCTGGCGAAAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCAGCCAGGAC ATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGG CCCCCAGACTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGG CATCCCCGCCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTAC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTGT ACTACTGCCAGCAGGGCAAGAAGCTGTGGTCCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NEG085		
SEQ ID NO 76: (Kabat)	HCDR1	GYYMA
SEQ ID NO 77: (Kabat)	HCDR2	NINYPGSSTYYLDSVKG
SEQ ID NO 78: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 79: (Chothia)	HCDR1	GFAFSGY
SEQ ID NO 80: (Chothia)	HCDR2	NYPGSS
SEQ ID NO 81: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 82:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGYYMAWVRQAPGK GLEWVANINYPGSSTYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 83:	重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSGYYMAWVRQAPGK GLEWVANINYPGSSTYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO 84:	DNA重鏈	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCGCCT TCAGCGGCTACTACATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGGTGGCCAACATCAACTACCCCGGCAGCAG CACCTACTACCTGGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGC CGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCC AGGGCACCACCGTGACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAA AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCT TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
SEQ ID NO 85: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 86: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 87: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 88: (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO 89: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 90: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 91:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGR RLWSFGGGTKVEIK
SEQ ID NO 92:	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGR RLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO 93:	DNA輕鏈	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCG TGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGAGCA TCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGG CCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGG CGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGGGCCGCCGCCTGTGGTCCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NEG086		
SEQ ID NO 94: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 95: (Kabat)	HCDR2	NINQIAGSTYYVDSVQG
SEQ ID NO 96: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 97: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 98: (Chothia)	HCDR2	NQIAGS
SEQ ID NO 99: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 100:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVANINQIAGSTYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 101:	重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVANINQIAGSTYYVDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO 102:	DNA重鏈	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCGACTACTACATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGGTGGCCAATATCAACCAAATCGCCGGCAGC ACCTACTACGTGGACAGCGTGCAAGGCCGGTTCACCATCAGCC GGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGCG ATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCA GGGCACCACCGTGACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC GAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCC GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTG GGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACA CCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAA GACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTC TTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC AAG
SEQ ID NO 103: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 104: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 105: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 106: (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO 107: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 108: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 109:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGR RLWSFGGGTKVEIK

SEQ ID NO 110:	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGR RLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 111:	DNA輕鏈	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCG TGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGAGCA TCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGG CCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGG CGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGGGCCGCCGCCTGTGGTCCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NEG087		
SEQ ID NO 112: (Kabat)	HCDR1	DYYMA
SEQ ID NO 113: (Kabat)	HCDR2	SINQNTGSTYYLDSVRG
SEQ ID NO 114: (Kabat)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 115: (Chothia)	HCDR1	GFTFSDY
SEQ ID NO 116: (Chothia)	HCDR2	NQNTGS
SEQ ID NO 117: (Chothia)	HCDR3	GDYYGTTYWYFDV
SEQ ID NO 118:	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVASINQNTGSTYYLDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO 119:	重鏈	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGK GLEWVASINQNTGSTYYLDSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARGDYYGTTYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO 120:	DNA重鏈	GAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCT TCAGCGACTACTACATGGCCTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAA GGGCCTGGAATGGGTGGCCAGTATCAACCAAAACACCGGCAG CACCTACTACCTGGACAGCGTGCGAGGCCGGTTCACCATCAGC CGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC GATTACTACGGCACCACCTACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCC AGGGCACCACCGTGACCGTCAGCTCAGCTAGCACCAAGGGCC CCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTC CGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGC TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCC AGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAA AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAG GTGTACACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCT TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCA GCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG
SEQ ID NO 121: (Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
SEQ ID NO 122: (Kabat)	LCDR2	YTSRLQS
SEQ ID NO 123: (Kabat)	LCDR3	QQGRRLWS
SEQ ID NO 124: (Chothia)	LCDR1	SQSISSY
SEQ ID NO 125: (Chothia)	LCDR2	YTS
SEQ ID NO 126: (Chothia)	LCDR3	GRRLW
SEQ ID NO 127:	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGR RLWSFGGGTKVEIK

SEQ ID NO 128:	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGR RLWSFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 129:	DNA輕鏈	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCG TGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGAGCA TCAGCAGCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGG CCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCAGCCGGCTGCAGAGCGG CGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGGGCCGCCGCCTGTGGTCCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCG TGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAG GCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTC CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
20376		
SEQ ID NO 130: (Kabat)	HCDR1	SYAIS
SEQ ID NO 131: (Kabat)	HCDR2	GIIPMSGRTTYAQKFQG
SEQ ID NO 132: (Kabat)	HCDR3	DYGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDP
SEQ ID NO 133: (Chothia)	HCDR1	GGTFSSY
SEQ ID NO 134: (Chothia)	HCDR2	IPMSGR
SEQ ID NO 135: (Chothia)	HCDR3	DYGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDP
SEQ ID NO 136:	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPMSGRTTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDYGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDPWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO 137:	重鏈	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPMSGRTTYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDYGPEAPDYGQSTSYFWYYAFDPWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 138:	DNA重鏈	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAACCC GGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGCTAGTGGGGGCACCT TCTCTAGCTACGCTATTAGCTGGGTCAGACAGGCCCCAGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGGCGGAATTATCCCTATGAGCGGTAGA ACTACCTACGCTCAGAAATTTCAGGGTAGAGTGACTATCACCG CCGACGAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAACTGAGTTCTCTG AGGTCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGACTACG GCCCCGAGGCCCCCGACTACGGTCAATCAACTAGCTACTTCTG GTACTACGCCTTCGACCCTTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCACC GTGTCTTCAGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGG CCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTGGG TTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCC TGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCG CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGG TGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTG CAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCC CCTGCCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCT GTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACC CCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGAC CCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAG CACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCAGC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTG GTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGAC CGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTG CAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO 139: (Kabat)	LCDR1	SGDNIPSYFVH
SEQ ID NO 140: (Kabat)	LCDR2	DDNDRPS
SEQ ID NO 141: (Kabat)	LCDR3	SSWDQDTVV
SEQ ID NO 142: (Chothia)	LCDR1	DNIPSYF
SEQ ID NO 143: (Chothia)	LCDR2	DDN
SEQ ID NO 144: (Chothia)	LCDR3	WDQDTV
SEQ ID NO 145:	VL	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIPSYFVHWYQQKPGQAPVLV IYDDNDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDQ DTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO 146:	輕鏈	DIELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIPSYFVHWYQQKPGQAPVLV IYDDNDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSSWDQ DTVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO 147:	DNA輕鏈	GATATCGAGCTGACTCAGCCCCCTAGCGTCAGCGTCAGCCCTG GTCAAACCGCCTCTATCACCTGTAGCGGCGATAATATCCCTAGC TACTTCGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAGCCCCCG TGCTGGTGATCTACGACGATAACGATAGACCTAGCGGAATCCC CGAGCGGTTTAGCGGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTG ACTATTAGCGGCACTCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACT GCTCTAGCTGGGATCAGGACACCGTGGTGTTCGGCGGAGGCA CTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGCTGCCCCCAGCGT GACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAGGCCAACAA GGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCC GTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCC GGCGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAA GTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTG GAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGG CAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC

本發明之其他抗體包括胺基酸或編碼胺基酸之核酸已經突變，但與表1中所述之序列仍具有至少60、70、80、90或95一致性百分比的抗體。在一些態樣中，其包括突變型胺基酸序列，其中可變區與表1中所述之序列中所描繪之可變區相比不超過1個、2個、3個、4個或5個胺基酸已突變，同時保留實質上相同之治療活性。

由於此等抗體中之每一者可結合至cKIT，因此VH、VL、全長輕鏈及全長重鏈序列(胺基酸序列及編碼胺基酸序列之核苷酸序列)可「混合及匹配」以產生其他cKIT結合抗體。該等「混合及匹配」之cKIT結合抗體可使用此項技術中已知之結合分析(例如ELISA及實例部分所述之其他分析)來測試。當此等鏈經混合及匹配時，來自特定VH/VL對之VH序列應以結構上類似之VH序列置換。同樣地，來自特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長重鏈序列應以結構上類似之全長重鏈序列置換。同樣地，來自特定VH/VL對之VL序列應以結構上類似之VL序列置換。同樣地，來自特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長輕鏈序列應以結構上類似之全長輕鏈序列置換。因此，在一個態樣中，本發明提供經分離之單株抗體或其抗原結合區，其具有：包含選自由SEQ

ID NO: 9、28、46、64、82、100、118或136 (表1)組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區；及包含選自由SEQ ID NO: 18、37、55、73、91、109、127或145 (表1)組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區；其中該抗體特異性地結合至cKIT。

在另一態樣中，本發明提供(i)經分離之單株抗體，其具有：包含已針對於哺乳動物細胞中之表現最佳化且選自由SEQ ID NO: 11、29、47、65、83、101、119或137組成之群之胺基酸序列的全長重鏈；及包含已針對於哺乳動物細胞中之表現最佳化且選自由SEQ ID NO: 20、21、38、56、74、92、110、128或146組成之群之胺基酸序列的全長輕鏈；或(ii)包含其抗原結合部分之功能蛋白質。

在另一態樣中，本發明提供cKIT結合抗體，其包含如表1中所述之重鏈及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3，或其組合。抗體之VH CDR1之胺基酸序列示於SEQ ID NO: 3、22、40、58、76、94、112及130中。抗體之VH CDR2之胺基酸序列示於SEQ ID NO: 4、23、41、59、77、95、113及131中。抗體之VH CDR3之胺基酸序列示於SEQ ID NO: 5、24、42、60、78、96、114及132中。抗體之VL CDR1之胺基酸序列示於SEQ ID NO: 12、31、49、67、85、103、121及139中。抗體之VL CDR2之胺基酸序列示於SEQ ID NO 13、32、50、68、86、104、122及140中。抗體之VL CDR3之胺基酸序列示於SEQ ID NO:14、33、51、69、87、105、123及141中。

鑒於此等抗體中之每一者可結合至cKIT且抗原結合特異性主要由CDR1、CDR2及CDR3區提供，VH CDR1、CDR2及CDR3序列與VL CDR1、CDR2及CDR3序列可「混合及匹配」(亦即，來自不同抗體之CDR可混合及匹配，不過各抗體必須含有VH CDR1、CDR2及CDR3與VL CDR1、CDR2及CDR3以產生其他C5結合分子)。該等「混合及匹配」之cKIT結合抗體可使用此項技術中已知之結合分析及實例中所述

之分析(例如ELISA)來測試。當VH CDR序列經混合及匹配時，來自特定VH序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應以結構上類似之CDR序列置換。同樣地，當VL CDR序列經混合及匹配時，來自特定VL序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應以結構上類似之CDR序列置換。一般技術者應顯而易知，新穎VH及VL序列可藉由以與本文中針對本發明之單株抗體所示之CDR序列結構上類似之序列取代一或多個VH及/或VL CDR區序列而產生。

因此，本發明提供經分離之單株抗體或其抗原結合區，其包含：包含選自由SEQ ID NO: 3、22、40、58、76、94、112及130組成之群之胺基酸序列的重鏈CDR1；包含選自由SEQ ID NO: 4、23、41、59、77、95、113及131組成之群之胺基酸序列的重鏈CDR2；包含選自由SEQ ID NO: 5、24、42、60、78、96、114及132組成之群之胺基酸序列的重鏈CDR3；包含選自由SEQ ID NO: 12、31、49、67、85、103、121及139組成之群之胺基酸序列的輕鏈CDR1；包含選自由SEQ ID NO: 13、32、50、68、86、104、122及140組成之群之胺基酸序列的輕鏈CDR2；及包含選自由SEQ ID NO: 14、33、51、69、87、105、123及141組成之群之胺基酸序列的輕鏈CDR3；其中該抗體特異性地結合cKIT。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:3之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 4之重鏈CDR2；SEQ ID NO:5之重鏈CDR3；SEQ ID NO:12之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 13之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 14之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:22之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 23之重鏈CDR2；SEQ ID NO:24之重鏈CDR3；SEQ ID NO:31之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 32之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 33之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:40之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 41之重鏈CDR2；SEQ ID NO:42之重鏈CDR3；SEQ ID NO:49之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 50之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 51之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:58之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 59之重鏈CDR2；SEQ ID NO:60之重鏈CDR3；SEQ ID NO:67之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 68之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 69之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:76之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 77之重鏈CDR2；SEQ ID NO:78之重鏈CDR3；SEQ ID NO:85之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 86之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 87之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:94之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 95之重鏈CDR2；SEQ ID NO:96之重鏈CDR3；SEQ ID NO:103之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 104之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 105之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:112之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 113之重鏈CDR2；SEQ ID NO:114之重鏈CDR3；SEQ ID NO:121之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 122之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 123之輕鏈CDR3。

在一特定態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含SEQ ID NO:130之重鏈CDR1；SEQ ID NO: 131之重鏈CDR2；SEQ ID NO:132之重鏈CDR3；SEQ ID NO:139之輕鏈CDR1；SEQ ID NO: 140之輕鏈CDR2；及SEQ ID NO: 141之輕鏈

CDR3。

在某些態樣中，特異性地結合至cKIT之抗體為表1中所述之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)。

1. 鑑別抗原決定基及結合至相同抗原決定基之抗體

本發明提供結合至cKIT受體之胞外域內之抗原決定基的抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)。在某些態樣中，抗體及抗體片段可結合至cKIT胞外域之結構域1-3內之抗原決定基。

本發明亦提供結合至與表1中所述之抗cKIT抗體所結合相同之抗原決定基的抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)。其他抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)可因此在cKIT結合分析中基於其與其他抗體交叉競爭(例如以統計上顯著之方式競爭性地抑制其他抗體之結合)的能力來鑑別。測試抗體抑制本發明之抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)與cKIT蛋白質(例如人類cKIT)之結合的能力展示測試抗體可與彼抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)競爭結合至cKIT；根據非限制性理論，此種抗體可與其相競爭之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)結合至cKIT蛋白質上之相同或相關(例如結構上類似或空間上接近)之抗原決定基。在某一態樣中，與本發明之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)結合至cKIT上之相同抗原決定基的抗體為人類或人類化單株抗體。該等人類或人類化單株抗體可如本文所述製備及分離。

2. 進一步改變Fc區之構架

本發明提供位點特異性標記之免疫結合物。此等免疫結合物可包含經修飾之抗體或其抗原結合片段，其另外包含對VH及/或VL內之構架殘基的修飾，例如以改良抗體之特性。通常進行該等構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「回復突變」至相應生殖系序列。更特定言之，已經歷體細胞突變之抗體可含有與抗體所來源之生殖系序列不同之構架殘基。該等殘基可

藉由將抗體構架序列與抗體所來源之生殖系序列相比較來鑑別。為使構架區序列恢復至其生殖系組態，可藉由例如定點突變誘發將體細胞突變「回復突變」至生殖系序列。亦欲涵蓋該等「回復突變」之抗體。

另一類型之構架修飾涉及使構架區內或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變以移除T細胞抗原決定基，藉此降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱作「去免疫化」，且進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第2003/0153043號中。

除在構架或CDR區內進行之修飾以外或替代在構架或CDR區內進行之修飾，抗體可經工程改造以在Fc區內包括修飾，通常用以改變抗體之一或多個功能特性，諸如血清半衰期、補體固定、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。此外，抗體可經化學修飾(例如一或多個化學部分可連接至抗體)或經修飾以改變其糖基化，再次改變抗體之一或多個功能特性。此等態樣中之每一者在下文進一步詳細描述。

在一個態樣中，CH1之鉸鏈區經修飾以使得鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1之鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數經改變以例如有助於輕鏈及重鏈之組裝或增加或降低抗體之穩定性。

在另一態樣中，抗體之Fc鉸鏈區經突變以縮短抗體之生物半衰期。更特定言之，將一或多種胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區中以使得抗體所具有之葡萄球菌蛋白A (SpA)結合相對於原生Fc鉸鏈域SpA結合削弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在其他態樣中，藉由以不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基來改變Fc區以改變抗體之效應功能。舉例而言，一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換以使得抗體所具有的對效應配位體之親和力改

變，但保留親本抗體之抗原結合能力。對其親和力改變之效應配位體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法描述於例如Winter等人之美國專利第5,624,821號及第5,648,260號中。

在另一態樣中，可用不同胺基酸殘基置換一或多個選自胺基酸殘基之胺基酸，以使得抗體具有經改變之Clq結合及/或降低或消除之補體依賴性細胞毒性(CDC)。此方法描述於例如Idusogie等人之美國專利第6,194,551號中。

在另一態樣中，可改變一或多個胺基酸殘基，藉此改變抗體固定補體之能力。此方法描述於例如Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351中。在一特定態樣中，本發明之抗體或其抗原結合片段之一或多個胺基酸經IgG1子類及κ同型之一或多個異型胺基酸殘基置換。異型胺基酸殘基亦包括(但不限於) IgG1、IgG2及IgG3子類之重鏈之恆定區以及κ同型之輕鏈之恆定區，如Jefferis等人, MAbs. 1:332-338 (2009)所述。

在另一態樣中，Fc區經修飾以增加抗體介導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力及/或藉由修飾一或多個胺基酸來增加抗體對Fcγ受體之親和力。此方法描述於例如Presta之PCT公開案WO 00/42072中。此外，已定位人類IgG1上對FcγRl、FcγRII、FcγRIII及FcRn之結合位點，且已描述具有改良之結合的變異體(參見Shields等人, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001)。

在另一態樣中，修飾抗體之糖基化。舉例而言，可製得去糖基化抗體(亦即，抗體缺乏糖基化)。可改變糖基化以例如增加抗體對「抗原」之親和力。可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來實現該等碳水化合物修飾。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，其消除一或多個可變區構架糖基化位點，藉此消除彼位點處之糖基化。該去糖基化可增加抗體對抗原之親和力。此種方法描述於例如

Co等人之美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中。

另外或替代地，可製得糖基化類型改變之抗體，諸如岩藻糖基殘基量減少之低岩藻糖基化抗體或二分GlcNac結構增加之抗體。已展示該等經改變之糖基化模式增加抗體之ADCC能力。可藉由例如於糖基化機構改變之宿主細胞中表現抗體來實現該等碳水化合物修飾。糖基化機構改變之細胞已描述於此項技術中，且可用作用以表現重組抗體，藉此產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，Hang等人之EP 1,176,195描述具有功能上破壞之FUT8基因的細胞株，該基因編碼岩藻糖基轉移酶，以使得於此種細胞株中表現之抗體展現低岩藻糖基化。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述變異型CHO細胞株Lec13細胞，其使岩藻糖連接至經Asn(297)連接之碳水化合物的能力降低，亦使得於彼宿主細胞中表現之抗體低岩藻糖基化(亦參見Shields等人, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述如下細胞株：該等細胞株經工程改造以表現糖蛋白修飾糖基轉移酶(例如β(1,4)-N乙醯基葡糖胺基轉移酶III (GnTIII))，以使得於經工程改造之細胞株中表現之抗體展現增加之二分GlcNac結構，其使得抗體之ADCC活性增加(亦參見Umana等人, Nat. Biotech. 17:176-180, 1999)。

在另一態樣中，抗體經修飾以增加其生物半衰期。多種方法為可行的。舉例而言，可引入以下突變中之一或多者：T252L、T254S、T256F，如Ward之美國專利第6,277,375號中所述。或者，為增加生物半衰期，抗體可在CH1或CL區內經改變以含有自IgG之Fc區之CH2結構域之兩個環獲取的救助受體結合抗原決定基，如Presta等人之美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

3. 產生cKIT抗體

抗cKIT抗體及其抗體片段(例如抗原結合片段)可藉由此項技術中

已知之任何方式產生，包括(但不限於)重組表現、化學合成及抗體四聚體之酶消化，而全長單株抗體可藉由例如融合瘤或重組產生而獲得。重組表現可自此項技術中已知之任何適當宿主細胞，例如哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆蟲宿主細胞等。

本發明另外提供編碼本文所述之抗體之聚核苷酸，例如編碼如本文所述包含互補決定區之重鏈或輕鏈可變區或區段之聚核苷酸。在一些態樣中，編碼重鏈可變區之聚核苷酸與選自由SEQ ID NO: 30、48、66、84、102、120及137組成之群的聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。在一些態樣中，編碼輕鏈可變區之聚核苷酸與選自由SEQ ID NO:39、57、75、93、111、129及147組成之群的聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。

在一些態樣中，編碼重鏈之聚核苷酸與SEQ ID NO: 30、48、66、84、102、120之聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。在一些態樣中，編碼輕鏈之聚核苷酸與SEQ ID NO: 39、57、75、93、111、129及147之聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。

本發明之聚核苷酸可僅編碼抗cKIT抗體之可變區序列。其亦可編碼抗體之可變區與恆定區。一些聚核苷酸序列編碼包含所例示之抗cKIT抗體之一之重鏈與輕鏈之可變區的多肽。一些其他聚核苷酸編碼分別與小鼠抗體之一之重鏈及輕鏈之可變區實質上相同的兩個多肽區段。

聚核苷酸序列可藉由重新固相DNA合成或藉由編碼抗cKIT抗體

或其結合片段之現有序列(例如，如下文實例中所述之序列)之PCR突變誘發產生。核酸之直接化學合成可藉由此項技術中已知之方法來實現，諸如Narang等人, Meth. Enzymol. 68:90, 1979之磷酸三酯方法；Brown等人, Meth. Enzymol. 68:109, 1979之磷酸二酯方法；Beaucage等人, Tetra. Lett., 22:1859, 1981之二乙基胺基磷酸酯方法；及美國專利第4,458,066號之固體支撐物方法。藉由PCR將突變引入聚核苷酸序列中可如以下文獻中所述來進行：例如PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (編), Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis等人 (編), Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila等人, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991；及Eckert等人, PCR Methods and Applications 1:17, 1991。

本發明亦提供用於產生上文所述之抗cKIT抗體之表現載體及宿主細胞。可採用多種表現載體來表現編碼抗cKIT抗體鏈或結合片段之聚核苷酸。基於病毒之表現載體與非病毒表現載體均可用於在哺乳動物宿主細胞中產生抗體。非病毒載體及系統包括質體、通常具有用於表現蛋白質或RNA之表現卡匣的游離型載體，及人類人工染色體(參見例如Harrington等人, Nat Genet 15:345, 1997)。舉例而言，適用於在哺乳動物(例如人類)細胞中表現抗cKIT聚核苷酸及多肽之非病毒載體包括pThioHis A、pThioHis B及pThioHis C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、pEBVHis B及pEBVHis C (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV載體，及此項技術中已知用於表現其他蛋白質之眾多其他載體。適用之病毒載體包括基於反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒之載體；基於SV40、乳頭狀瘤病毒、HBP愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein Barr virus)之載體；痘瘡病毒載體；及勝利基森林病毒(Semliki Forest virus，SFV)。參見Brent等人，同上；Smith, Annu.

Rev. Microbiol. 49:807, 1995；及Rosenfeld等人, Cell 68:143, 1992。

表現載體之選擇視載體欲表現於其中之預期宿主細胞而定。表現載體通常含有可操作地連接至編碼抗cKIT抗體鏈或片段之聚核苷酸之啟動子及其他調控序列(例如增強子)。在一些態樣中，採用誘導性啟動子以防止經插入之序列在除誘導條件以外之條件下表現。誘導性啟動子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金屬硫蛋白(metallothionein)啟動子或熱休克啟動子。在不偏向編碼序列之群體的情況下在非誘導條件下擴增經轉化之生物體的培養物，該等編碼序列之表現產物由宿主細胞更好地耐受。除啟動子以外，亦可要求或需要其他調控元件以有效地表現抗cKIT抗體鏈或片段。此等元件通常包括ATG起始密碼子及鄰近核糖體結合位點或其他序列。另外，表現之效率可藉由包括適於使用中之細胞系統之增強子來增強(參見例如Scharf等人, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994；及Bittner等人, Meth. Enzymol., 153:516, 1987)。舉例而言，SV40增強子或CMV增強子可用於增加在哺乳動物宿主細胞中之表現。

表現載體亦可提供分泌信號序列位置以形成具有由經插入之抗cKIT抗體序列編碼之多肽的融合蛋白質。更通常而言，在包括於載體中之前，經插入之抗cKIT抗體序列連接至信號序列。欲用於接收編碼抗cKIT抗體輕鏈及重鏈可變域之序列的載體有時亦編碼恆定區或其部分。該等載體使可變區表現為具有恆定區之融合蛋白質，藉此產生完整抗體或其片段。該等恆定區通常為人類恆定區。

具有及表現抗cKIT抗體鏈之宿主細胞可為原核或真核細胞。大腸桿菌為適用於選殖及表現本發明之聚核苷酸之一種原核宿主。其他適用之微生物宿主包括桿菌，諸如枯草桿菌(Bacillus subtilis)；及其他腸內菌科，諸如沙門氏菌(Salmonella)、沙雷氏菌(Serratia)；及多種假單胞菌屬。在此等原核宿主中，吾人亦可製得表現載體，其通常

含有與宿主細胞相容之表現控制序列(例如複製起點)。另外，將存在許多種熟知啟動子，諸如乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統、β-內醯胺酶啟動子系統或來自噬菌體λ之啟動子系統。啟動子通常視情況與操縱序列一起控制表現，且具有用於起始並完成轉錄及轉譯之核糖體結合位點序列及其類似序列。亦可採用諸如酵母之其他微生物來表現抗cKIT多肽。亦可使用與桿狀病毒載體組合之昆蟲細胞。

在其他態樣中，哺乳動物宿主細胞用於表現及產生本發明之抗cKIT多肽。舉例而言，其可為表現內源免疫球蛋白基因之融合瘤細胞株(例如，如實例中所述之骨髓瘤融合瘤純系)或具有外源表現載體之哺乳動物細胞株(例如，下文所例示之SP2/0骨髓瘤細胞)。此等細胞包括任何正常致死或正常或異常永生動物或人類細胞。舉例而言，已開發許多能夠分泌完整免疫球蛋白之適合宿主細胞株，包括CHO細胞株、多種COS細胞株、海拉細胞(HeLa cell)、骨髓瘤細胞株、經轉化之B細胞及融合瘤。哺乳動物組織細胞培養物用以表現多肽之用途一般論述於例如Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中。哺乳動物宿主細胞之表現載體可包括表現控制序列，諸如複製起點、啟動子及增強子(參見例如Queen等人, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986)，及必需之加工資訊位點，諸如核糖體結合位點、RNA剪接位點、聚腺苷酸化位點及轉錄終止序列。此等表現載體通常含有來源於哺乳動物基因或哺乳動物病毒之啟動子。適合之啟動子可為組成性啟動子、細胞類型特異性啟動子、階段特異性啟動子及/或可調節或可調控啟動子。適用之啟動子包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、組成性腺病毒主要晚期啟動子、地塞米松(dexamethasone)誘導性MMTV啟動子、SV40啟動子、MRP polIII啟動子、組成性MPSV啟動子、四環素誘導性CMV啟動子(諸如人類即刻早期CMV啟動子)、組成性CMV啟動子及此項技術中已知之啟動子-增強子組合。

引入含有相關聚核苷酸序列之表現載體之方法視細胞宿主之類型而變化。舉例而言，氯化鈣轉染通常用於原核細胞，而磷酸鈣處理或電穿孔可用於其他細胞宿主(一般參見Sambrook等人，同上)。其他方法包括例如電穿孔、磷酸鈣處理、脂質體介導之轉化、注射及顯微注射、衝擊法、病毒顆粒、免疫脂質體、多價陽離子:核酸結合物、裸DNA、人工病毒粒子、融合疱疹病毒結構蛋白VP22 (Elliot及O'Hare, Cell 88:223, 1997)、藥劑增強之DNA吸收，及離體轉導。對於長期、高產率產生重組蛋白質，通常將需要穩定表現。舉例而言，穩定表現抗cKIT抗體鏈或結合片段之細胞株可使用含有病毒複製起點或內源表現元件及選擇性標記物基因之表現載體來製備。在引入載體之後，可使細胞於強化培養基中生長1-2天，隨後將其轉入選擇性培養基中。選擇性標記物之用途為對選擇賦予抗性且其存在使得於選擇性培養基中成功表現經引入之序列的細胞生長。具抗性、經穩定轉染之細胞可使用適於該細胞類型之組織培養技術來增殖。

治療及診斷用途

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物適用於多種應用，包括(但不限於)治療癌症，諸如實體癌。在某些態樣中，抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物適用於抑制腫瘤生長、誘導分化、減小腫瘤體積及/或降低腫瘤之致腫瘤性。使用方法可為活體外、離體或活體內方法。

在一個態樣中，抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物適用於偵測生物樣品中cKIT之存在。如本文所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些態樣中，生物樣品包含細胞或組織。在某些態樣中，該等組織包括相對於其他組織表現較高量之cKIT的正常及/或癌性組織。

在一個態樣中，本發明提供一種偵測生物樣品中cKIT之存在的

方法。在某些態樣中，該方法包含使生物樣品與抗cKIT抗體在允許抗體結合至抗原之條件下接觸，及偵測在抗體與抗原之間是否形成複合物。

亦包括一種診斷與cKIT之表現增加相關之病症的方法。在某些態樣中，該方法包含使測試細胞與抗cKIT抗體接觸；藉由偵測抗cKIT抗體與cKIT抗原之結合來確定測試細胞上cKIT之表現量(定量或定性)；及比較測試細胞中cKIT之表現量與對照細胞中cKIT之表現量(例如源於相同組織之正常細胞作為測試細胞或以與此種正常細胞相當之量表現cKIT之細胞)，其中與對照細胞相比測試細胞上cKIT之較高表現量指示與cKIT之表現增加相關之病症存在。在某些態樣中，測試細胞獲自疑似患有與cKIT之表現增加相關之病症的個體。在某些態樣中，該病症為細胞增殖性病症，諸如癌症或腫瘤。

在某些態樣中，診斷或偵測方法(諸如上文所述之方法)包含偵測抗cKIT抗體與表現於細胞表面上或獲自於表面上表現cKIT之細胞之膜製劑中之cKIT的結合。偵測抗cKIT抗體與表現於細胞表面上之cKIT之結合的例示性分析為「FACS」分析。

某些其他方法可用於偵測抗cKIT抗體與cKIT之結合。該等方法包括(但不限於)此項技術中熟知之抗原結合分析，諸如西方墨點、放射免疫分析、ELISA (酶聯免疫吸附分析)、「夾層」免疫分析、免疫沈澱分析、螢光免疫分析、蛋白質A免疫分析及免疫組織化學(IHC)。

在某些態樣中，抗cKIT抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光標記、發色標記、電子緻密標記、化學發光標記及放射性標記)，以及例如經由酶促反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配位體)。

在某些態樣中，抗cKIT抗體經固定於不溶性基質上。固定需要將抗cKIT抗體與在溶液中保持游離之任何cKIT蛋白質分離。此常規

上如下實現：藉由在分析程序之前使抗cKIT抗體不溶，如藉由吸附至水不溶性基質或表面(Bennich等人，美國專利第3,720,760號)；或藉由共價偶合(例如使用戊二醛交聯)；或藉由在抗cKIT抗體與cKIT蛋白質之間形成複合物之後使抗cKIT抗體不溶，例如藉由免疫沈澱。

診斷或偵測之上述態樣中之任一者可使用本發明之免疫結合物替代抗cKIT抗體或加上抗cKIT抗體來進行。

在一個態樣中，本發明提供一種治療、預防或改善疾病之方法，其包含將抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物投與患者，藉此治療該疾病。在某些態樣中，經抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物治療之疾病為癌症。可治療及/或預防之疾病之實例包括(但不限於)胃腸基質腫瘤(GIST)、小細胞肺癌(SCLC)、急性骨髓性白血病(AML)、黑素瘤、肥大細胞白血病(MCL)、肥大細胞增多症、神經纖維瘤、乳癌、非小細胞肺癌(NSCLC)及胰臟癌。在某些態樣中，癌症之特徵為抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥物結合物可特異性地結合之cKIT表現細胞。

本發明提供治療癌症之方法，其包含投與治療有效量之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物。在某些態樣中，癌症為實體癌。在某些態樣中，個體為人類。

在某些態樣中，抑制腫瘤生長之方法包含向個體投與治療有效量之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物。在某些態樣中，個體為人類。在某些態樣中，個體患有腫瘤或已移除腫瘤。

在某些態樣中，腫瘤表現抗cKIT抗體所結合之cKIT。在某些態樣中，腫瘤過度表現人類cKIT。

對於疾病治療，抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物之適當劑量視多種因素而定，諸如欲治療疾病之類型、疾病之

嚴重程度及過程、疾病之反應性、先前療法、患者之臨床病史等。抗體或藥劑可一次性投與或經持續數天至數月之一系列治療投與，或直至實現治癒或達成疾病病況減輕(例如腫瘤尺寸減小)。最佳給藥時程可藉由量測患者體內之藥物積聚來計算且將視個別抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物之相對效能而變化。在某些態樣中，劑量為每公斤體重0.01 mg至10 mg (例如0.01 mg、0.05 mg、0.1 mg、0.5 mg、1 mg、2 mg、3 mg、4 mg、5 mg、7 mg、8 mg、9 mg或10 mg)，且可每天、每週、每月或每年給與一或多次。在某些態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物每兩週給與一次或每三週給與一次。治療醫師可基於所量測之藥物於體液或組織中之滯留時間及濃度來估計給藥之重複率。

組合療法

在某些情況下，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物與其他治療劑組合，諸如其他抗癌劑、抗過敏劑、抗噁心劑(或抗嘔吐劑)、疼痛舒解劑、細胞保護劑及其組合。

經考慮用於組合療法中之一般化學治療劑包括阿那曲唑(anastrozole，Arimidex®)、比卡魯胺(bicalutamide，Casodex®)、硫酸博萊黴素(bleomycin sulfate，Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射液(Busulfex®)、卡培他濱(capecitabine，Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脫氧-5-氟胞苷、卡鉑(carboplatin，Paraplatin®)、卡莫司汀(BiCNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、順鉑(Platinol®)、克拉屈濱(cladribine，Leustatin®)、環磷醯胺(Cytoxan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂質體注射液(DepoCyt®)、達卡巴嗪(DTIC-Dome®)、放線菌素D (Actinomycin D，Cosmegan)、鹽酸道諾黴素(daunorubicin hydrochloride，Cerubidine®)、檸檬酸道諾黴素脂質體注射液(daunorubicin citrate

liposome injection，DaunoXome®)、地塞米松、多烯紫杉醇(docetaxel，Taxotere®)、鹽酸小紅莓(doxorubicin hydrochloride，Adriamycin®，Rubex®)、依託泊苷(Vepesid®)、磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate，Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®，Efudex®)、氟他胺(flutamide，Eulexin®)、替紮他濱(tezacitibine)、吉西他濱(Gemcitabine，二氟脫氧胞苷)、羥基脲(Hydrea®)、艾達黴素(Idarubicin，Idamycin®)、異環磷醯胺(ifosfamide，IFEX®)、伊立替康(irinotecan，Camptosar®)、L-天冬醯胺酶(ELSPAR®)、甲醯四氫葉酸鈣(leucovorin calcium)、美法侖(melphalan，Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲胺喋呤(Folex®)、米托蒽醌(Novantrone®)、麥羅塔(mylotarg)、太平洋紫杉醇(paclitaxel，Taxol®)、菲尼克斯(phoenix，釔90/MX-DTPA)、噴司他丁(pentostatin)、聚苯丙生20與卡莫司汀植入物(polifeprosan 20 with carmustine implant，Gliadel®)、檸檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate，Nolvadex®)、替尼泊苷(teniposide，Vumon®)、6-硫鳥嘌呤、噻替哌、替拉紮明(tirapazamine，Tirazone®)、注射用鹽酸拓朴替康(topotecan hydrochloride for injection，Hycamptin®)、長春鹼(Velban®)、長春新鹼(Oncovin®)及長春瑞濱(vinorelbine，Navelbine®)。

在一個態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物與具有抗癌特性之第二化合物組合成醫藥組合調配物或作為組合療法之給藥方案。醫藥組合調配物或給藥方案之第二化合物可具有與組合之抗體或免疫結合物互補之活性，以使得其彼此不會造成不利影響。舉例而言，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥物結合物可與(但不限於)化學治療劑、酪胺酸激酶抑制劑(例如伊馬替尼)及其他cKIT路徑抑制劑組合投與。

如本文所用之術語「醫藥組合」係指呈一個單位劑型之固定組

合，或用於組合投藥之非固定組合或分裝部分之套組，其中兩種或兩種以上治療劑可同時獨立地投與或在時間間隔內各別地投與，尤其在此等時間間隔允許組合搭配物顯示協作效應(例如協同效應)之情況下。

術語「組合療法」係指投與兩種或兩種以上治療劑以治療本發明中所述之治療性病狀或病症。該投藥涵蓋以實質上同時之方式共同投與此等治療劑，諸如在具有固定比率之活性成分之單一膠囊中。或者，該投藥涵蓋在用於各活性成分之多個或各別容器中共同投藥(例如膠囊、粉末及液體)。粉末及/或液體可在投藥之前經復原或稀釋至所要劑量。另外，該投藥亦涵蓋在大致相同時間或在不同時間以依序方式使用各類型之治療劑。在任一種狀況下，治療方案將提供藥物組合治療本文所述之病狀或病症之有益作用。

組合療法可提供「協同作用」且證實為「協同的」，亦即，當一起使用活性成分時所達成之效應大於各別使用該等化合物所產生之效應的總和。當活性成分：(1)共同調配成組合之單位劑量調配物且同時投與或傳遞；(2)以各別調配物形式交替或平行傳遞；或(3)藉由某種其他方案傳遞時，可獲得協同效應。當以交替療法傳遞時，在依序投與或傳遞化合物(例如，藉由以各別注射器不同注射)時可達成協同效應。一般而言，在交替療法期間，依序(亦即連續)投與有效劑量之各活性成分，而在組合療法中，一起投與有效劑量之兩種或兩種以上活性成分。

在一個態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其係藉由向有需要之個體投與抗體藥物結合物與一或多種酪胺酸激酶抑制劑之組合來達成，酪胺酸激酶抑制劑包括(但不限於) EGFR抑制劑、Her2抑制劑、Her3抑制劑、IGFR抑制劑及Met抑制劑。

舉例而言，酪胺酸激酶抑制劑包括(但不限於)鹽酸埃羅替尼

(Erlotinib hydrochloride，Tarceva®)；利尼伐尼(Linifanib，N-[4-(3-胺基-1H-吲唑-4-基)苯基]-N'-(2-氟-5-甲基苯基)脲，亦稱為ABT 869，可獲自Genentech)；蘋果酸舒尼替尼(Sunitinib malate，Sutent®)；博舒替尼(Bosutinib，4-[(2,4-二氯-5-甲氧基苯基)胺基]-6-甲氧基-7-[3-(4-甲基哌嗪-1-基)丙氧基]喹啉-3-甲腈，亦稱為SKI-606，且描述於美國專利第6,780,996號中)；達沙替尼(Dasatinib，Sprycel®)；帕唑帕尼(Pazopanib，Votrient®)；索拉非尼(Sorafenib，Nexavar®)；凡德他尼(Zactima，ZD6474)；尼羅替尼(nilotinib，Tasigna®)；瑞格非尼(Regorafenib，Stivarga®)；及伊馬替尼或甲磺酸伊馬替尼(Imatinib mesylate，Gilvec®及Gleevec®)。

表皮生長因子受體(EGFR)抑制劑包括(但不限於)鹽酸埃羅替尼(Tarceva®)；吉非替尼(Gefitnib，Iressa®)；N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[[(3"S")-四氫-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基胺基)-2-丁烯醯胺(Tovok®)；凡德他尼(Vandetanib，Caprelsa®)；拉帕替尼(Lapatinib，Tykerb®)；(3R,4R)-4-胺基-1-((4-((3-甲氧基苯基)胺基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514)；二鹽酸卡奈替尼(Canertinib dihydrochloride，CI-1033)；6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788，CAS 497839-62-0)；木利替尼(Mubritinib，TAK165)；培利替尼(Pelitinib，EKB569)；阿法替尼(Afatinib，BIBW2992)；來那替尼(Neratinib，HKI-272)；N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吲唑-5-基]胺基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-胺基甲酸(3S)-3-嗎啉基甲酯(BMS599626)；N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aα,5β,6aα)-八氫-2-甲基環戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647，CAS 781613-23-8)；及4-[4-[[(1R)-1-苯基乙基]胺基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166，CAS 187724-61-4)。

EGFR抗體包括(但不限於)西妥昔單抗(Cetuximab，Erbitux®)；帕尼單抗(Panitumumab，Vectibix®)；馬妥珠單抗(Matuzumab，EMD-72000)；曲妥珠單抗(Trastuzumab，Herceptin®)；尼妥珠單抗(Nimotuzumab，hR3)；紮魯木單抗(Zalutumumab)；TheraCIM h-R3；MDX0447 (CAS 339151-96-1)；及ch806 (mAb-806，CAS 946414-09-1)。

人類表皮生長因子受體2 (HER2受體) (亦稱為Neu、ErbB-2、CD340或p185)抑制劑包括(但不限於)曲妥珠單抗(Herceptin®)；帕妥珠單抗(Pertuzumab，Omnitarg®)；來那替尼(HKI-272，(2E)-N-[4-[[3-氯-4-[(吡啶-2-基)甲氧基]苯基]胺基]-3-氰基-7-乙氧基喹啉-6-基]-4-(二甲基胺基)丁-2-烯醯胺，且描述於PCT公開案第WO 05/028443號中)；拉帕替尼或二甲苯磺酸拉帕替尼(Lapatinib ditosylate，Tykerb®)；(3R,4R)-4-胺基-1-((4-((3-甲氧基苯基)胺基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS690514)；(2E)-N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)胺基]-7-[[(3S)-四氫-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4-(二甲基胺基)-2-丁烯醯胺(BIBW-2992，CAS 850140-72-6)；N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吲唑-5-基]胺基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-胺基甲酸(3S)-3-嗎啉基甲酯(BMS 599626，CAS 714971-09-2)；二鹽酸卡奈替尼(PD183805或CI-1033)；及N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[(3aα,5β,6aα)-八氫-2-甲基環戊并[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-喹唑啉胺(XL647，CAS 781613-23-8)。

HER3抑制劑包括(但不限於) LJM716、MM-121、AMG-888、RG7116、REGN-1400、AV-203、MP-RM-1、MM-111及MEHD-7945A。

MET抑制劑包括(但不限於)卡博替尼(Cabozantinib，XL184，CAS 849217-68-1)；氟瑞替尼(Foretinib，GSK1363089，原稱為

XL880，CAS 849217-64-7)；替凡替尼(Tivantinib，ARQ197，CAS 1000873-98-2)；1-(2-羥基-2-甲基丙基)-*N*-(5-(7-甲氧基喹啉-4-基氧基)吡啶-2-基)-5-甲基-3-側氧基-2-苯基-2,3-二氫-1*H*-吡唑-4-甲醯胺(AMG 458)；克唑替尼(Cryzotinib，Xalkori®，PF-02341066)；(3Z)-5-(2,3-二氫-1H-吲哚-1-基磺醯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亞甲基)-1,3-二氫-2H-吲哚-2-酮(SU11271)；(3Z)-N-(3-氯苯基)-3-({3,5-二甲基-4-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]-1H-吡咯-2-基}亞甲基)-N-甲基-2-側氧基吲哚啉-5-磺醯胺(SU11274)；(3Z)-N-(3-氯苯基)-3-{[3,5-二甲基-4-(3-嗎啉-4-基丙基)-1H-吡咯-2-基]亞甲基}-N-甲基-2-側氧基吲哚啉-5-磺醯胺(SU11606)；6-[二氟[6-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-b]噠嗪-3-基]甲基]-喹啉(JNJ38877605，CAS 943540-75-8)；2-[4-[1-(喹啉-6-基甲基)-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡嗪-6-基]-1H-吡唑-1-基]乙醇(PF04217903，CAS 956905-27-4)；N-((2R)-1,4-二噁烷-2-基甲基)-N-甲基-N'-[3-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-5-側氧基-5H-苯并[4,5]環庚并[1,2-b]吡啶-7-基]磺醯胺(MK2461，CAS 917879-39-1)；6-[[6-(1-甲基-1*H*-吡唑-4-基)-1,2,4-三唑并[4,3-*b*]噠嗪-3-基]硫基]-喹啉(SGX523，CAS 1022150-57-7)；及(3*Z*)-5-[[(2,6-二氯苯基)甲基]磺醯基]-3-[[3,5-二甲基-4-[[(2*R*)-2-(1-吡咯啶基甲基)-1-吡咯啶基]羰基]-1*H*-吡咯-2-基]亞甲基]-1,3-二氫-2*H*-吲哚-2-酮(PHA665752，CAS 477575-56-7)。

IGF1R抑制劑包括(但不限於) BMS-754807、XL-228、OSI-906、GSK0904529A、A-928605、AXL1717、KW-2450、MK0646、AMG479、IMCA12、MEDI-573及BI836845。關於綜述，參見例如Yee, JNCI, 104; 975 (2012)。

在另一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其係藉由向有需要之個體投與抗體藥物結合物與一或多種FGF下游信號傳導路徑

抑制劑之組合來達成，FGF下游信號傳導路徑抑制劑包括(但不限於) MEK抑制劑、Braf抑制劑、PI3K/Akt抑制劑、SHP2抑制劑以及mTor。

舉例而言，有絲分裂原活化蛋白激酶(MEK)抑制劑包括(但不限於) XL-518 (亦稱為GDC-0973，Cas編號1029872-29-4，可獲自ACC Corp.)；2-[(2-氯-4-碘苯基)胺基]-N-(環丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲醯胺(亦稱為CI-1040或PD184352，且描述於PCT公開案第WO2000035436號中)；N-[(2R)-2,3-二羥基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)胺基]-苯甲醯胺(亦稱為PD0325901，且描述於PCT公開案第WO2002006213號中)；2,3-雙[胺基[(2-胺基苯基)硫基]亞甲基]-丁二腈(亦稱為U0126，且描述於美國專利第2,779,780號中)；N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)胺基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2R)-2,3-二羥基丙基]-環丙烷磺醯胺(亦稱為RDEA119或BAY869766，且描述於PCT公開案第WO2007014011號中)；(3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙基胺基)-8,9,16-三羥基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氫-1H-2-苯并氧雜環十四因(benzoxacyclotetradecine)-1,7(8H)-二酮] (亦稱為E6201，且描述於PCT公開案第WO2003076424號中)；2'-胺基-3'-甲氧基黃酮(亦稱為PD98059，可獲自Biaffin GmbH & Co., KG, Germany)；威羅菲尼(Vemurafenib，PLX-4032，CAS 918504-65-1)；(R)-3-(2,3-二羥基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基胺基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮(TAK-733，CAS 1035555-63-5)；匹瑪色替(Pimasertib，AS-703026，CAS 1204531-26-9)；及曲美替尼二甲亞碸(Trametinib dimethyl sulfoxide，GSK-1120212，CAS 1204531-25-80)。

磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制劑包括(但不限於) 4-[2-(1H-吲唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺醯基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]嗎啉(亦稱為GDC 0941，且描述於PCT公開案第WO 09/036082號及第WO

09/055730號中)；2-甲基-2-[4-[3-甲基-2-側氧基-8-(喹啉-3-基)-2,3-二氫咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]苯基]丙腈(亦稱為BEZ 235或NVP-BEZ 235，且描述於PCT公開案第WO 06/122806號中)；4-(三氟甲基)-5-(2,6-二嗎啉并嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(亦稱為BKM120或NVP-BKM120，且描述於PCT公開案第WO2007/084786號中)；陶紮色替(Tozasertib，VX680或MK-0457，CAS 639089-54-6)；(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亞甲基]-2,4-噻唑啶二酮(GSK1059615，CAS 958852-01-2)；(1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(乙醯氧基)-1-[(二-2-丙烯基胺基)亞甲基]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-八氫-11-羥基-4-(甲氧基甲基)-4a,6a-二甲基-環戊并[5,6]萘并[1,2-c]哌喃-2,7,10(1H)-三酮(PX866，CAS 502632-66-8)；及8-苯基-2-(嗎啉-4-基)-吮烯-4-酮(LY294002，CAS 154447-36-6)。

mTor包括(但不限於)西羅莫司脂化物(Temsirolimus，Torisel®)；雷達羅莫司(Ridaforolimus，正式稱為狄弗利斯(deferolimus)，二甲基亞膦酸(1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2-[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*,23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-二羥基-19,30-二甲氧基-15,17,21,23,29,35-六甲基-2,3,10,14,20-五側氧基-11,36-二氧雜-4-氮雜三環[30.3.1.$0^{4,9}$]三十六烷-16,24,26,28-四烯-12-基]丙基]-2-甲氧基環己酯，亦稱為AP23573及MK8669，且描述於PCT公開案第WO 03/064383號中)；依維莫司(Everolimus，Afinitor®或RAD001)；雷帕黴素(Rapamycin，AY22989，Sirolimus®)；塞馬莫德(Simapimod，CAS 164301-51-3)；(5-{2,4-雙[(3S)-3-甲基嗎啉-4-基]吡啶并[2,3-d]嘧啶-7-基}-2-甲氧基苯基)甲醇(AZD8055)；2-胺基-8-[反-4-(2-羥基乙氧基)環己基]-6-(6-甲氧基-3-吡啶基)-4-甲基-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7(8*H*)-酮(PF04691502，CAS 1013101-36-4)；及N^2-[1,4-二側氧基-4-[[4-(4-側氧基-8-苯基-4*H*-1-苯并哌喃-2-基)嗎啉鎓-4-基]甲氧基]丁基]-L-精胺醯基甘胺醯基-L-α-天冬胺醯基L-絲胺酸-內鹽

(SF1126，CAS 936487-67-1)。

在另一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其係藉由向有需要之個體投與抗體藥物結合物與一或多種促凋亡劑之組合來達成，促凋亡劑包括(但不限於) IAP抑制劑、Bcl2抑制劑、MCl1抑制劑、Trail藥劑、Chk抑制劑。

舉例而言，IAP抑制劑包括(但不限於) LCL161、GDC-0917、AEG-35156、AT406及TL32711。IAP抑制劑之其他實例包括(但不限於) WO 04/005284、WO 04/007529、WO 05/097791、WO 05/069894、WO 05/069888、WO 05/094818、US2006/0014700、US2006/0025347、WO 06/069063、WO 06/010118、WO 06/017295及WO 08/134679中所揭示之IAP抑制劑，所有文獻均以引用的方式併入本文中。

BCL-2抑制劑包括(但不限於) 4-[4-[[2-(4-氯苯基)-5,5-二甲基-1-環己烯-1-基]甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[(1R)-3-(4-嗎啉基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]胺基]-3-[(三氟甲基)磺醯基]苯基]磺醯基]苯甲醯胺(亦稱為ABT-263，且描述於PCT公開案第WO 09/155386號中)；四制癌素A (Tetrocarcin A)；抗黴素(Antimycin)；棉子酚(Gossypol，(-)BL-193)；奧巴克拉(Obatoclax)；2-胺基-6-環戊基-4-(1-氰基-2-乙氧基-2-側氧基乙基)-4H色酮-3-甲酸乙酯(HA14-1)；奧利默森(Oblimersen，G3139，Genasense®)；Bak BH3肽；(-)-棉子酚乙酸(AT-101)；4-[4-[(4'-氯[1,1'-聯苯]-2-基)甲基]-1-哌嗪基]-N-[[4-[[(1R)-3-(二甲基胺基)-1-[(苯硫基)甲基]丙基]胺基]-3-硝基苯基]磺醯基]-苯甲醯胺(ABT-737，CAS 852808-04-9)；及納維托卡(Navitoclax，ABT-263，CAS 923564-51-6)。

包括DR4 (TRAILR1)及DR5 (TRAILR2)之促凋亡受體促效劑(PARA)包括(但不限於)杜拉樂明(Dulanermin，AMG-951，

RhApo2L/TRAIL)；馬帕木單抗(Mapatumumab，HRS-ETR1，CAS 658052-09-6)；來沙木單抗(Lexatumumab，HGS-ETR2，CAS 845816-02-6)；阿泊單抗(Apomab，Apomab®)；可那木單抗(Conatumumab，AMG655，CAS 896731-82-1)；及替加珠單抗(Tigatuzumab，CS1008，CAS 946415-34-5，可獲自Daiichi Sankyo)。

檢查點激酶(CHK)抑制劑包括(但不限於) 7-羥基星形孢菌素(7-Hydroxystaurosporine，UCN-01)；6-溴-3-(1-甲基-1*H*-吡唑-4-基)-5-(3*R*)-3-哌啶基-吡唑并[1,5-*a*]嘧啶-7-胺(SCH900776，CAS 891494-63-6)；5-(3-氟苯基)-3-脲基噻吩-2-甲酸N-[(S)-哌啶-3-基]醯胺(AZD7762，CAS 860352-01-8)；4-[((3S)-1-氮雜雙環[2.2.2]辛-3-基)胺基]-3-(1H-苯并咪唑-2-基)-6-氯喹啉-2(1H)-酮(CHIR 124，CAS 405168-58-3)；7-胺基放線菌素D (7-AAD)；異顆粒醯亞胺(Isogranulatimide)；脫溴已炔二醇(debromohymenialdisine)；N-[5-溴-4-甲基-2-[(2S)-2-嗎啉基甲氧基]-苯基]-N'-(5-甲基-2-吡嗪基)脲(LY2603618，CAS 911222-45-2)；蘿蔔硫素(Sulforaphane，CAS 4478-93-7，異硫氰酸4-甲基亞磺醯基丁酯)；9,10,11,12-四氫-9,12-環氧基-1*H*-二吲哚并[1,2,3-*fg*:3',2',1'-*kl*]吡咯并[3,4-*i*][1,6]苯并二氮䓬-1,3(2*H*)-二酮(SB-218078，CAS 135897-06-2)；及TAT-S216A (Sha等人, Mol. Cancer. Ther 2007; 6(1):147-153)；及CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrqrr)。

在一個態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其係藉由向有需要之個體投與抗體藥物結合物與一或多種FGFR抑制劑之組合來達成。舉例而言，FGFR抑制劑包括(但不限於)丙胺酸布立尼布(Brivanib alaninate，BMS-582664，2-胺基丙酸(*S*)-((*R*)-1-(4-(4-氟-2-甲基-1*H*-吲哚-5-基氧基)-5-甲基吡咯并[2,1-*f*][1,2,4]三嗪-6-基氧基)丙-2-基)酯)；瓦加特非(Vargatef，BIBF1120，CAS 928326-83-4)；多韋

替尼二乳酸(Dovitinib dilactic acid，TKI258，CAS 852433-84-2)；3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(BGJ398，CAS 872511-34-7)；達魯舍替(Danusertib，PHA-739358)；及(PD173074，CAS 219580-11-7)。在一特定態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其係藉由向有需要之個體投與抗體藥物結合物與FGFR2抑制劑之組合來達成，FGFR2抑制劑為諸如3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯基)-1-(6((4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基)胺基)嘧啶-4-基)-1-甲基脲(亦稱為BGJ-398)；或4-胺基-5-氟-3-(5-(4-甲基哌嗪1-基)-1*H*-苯并[*d*]咪唑-2-基)喹啉-2(1*H*)-酮(亦稱為多韋替尼(dovitinib)或TKI-258)。AZD4547 (Gavine等人, 2012, Cancer Research 72, 2045-56；N-[5-[2-(3,5-二甲氧基苯基)乙基]-2H-吡唑-3-基]-4-(3R,5S)-二甲基哌嗪-1-基)苯甲醯胺)、普納替尼(Ponatinib，AP24534；Gozgit等人, 2012, Mol Cancer Ther., 11; 690-99；3-[2-(咪唑并[1,2-b]噠嗪-3-基)乙炔基]-4-甲基-N-{4-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]-3-(三氟甲基)苯基}苯甲醯胺，CAS 943319-70-8)。

醫藥組合物

為製備包括免疫結合物之醫藥組合物或無菌組合物，將本發明之免疫結合物與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑混合。組合物可另外含有一或多種其他治療劑，其適用於治療或預防以下癌症：胃腸基質腫瘤(GIST)、小細胞肺癌(SCLC)、急性骨髓性白血病(AML)、黑素瘤、肥大細胞白血病(MCL)、肥大細胞增多症、神經纖維瘤、乳癌、非小細胞肺癌(NSCLC)及胰臟癌。

治療劑及診斷劑之調配物可藉由與生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑以例如凍乾粉末、漿液、水溶液、洗劑或懸浮液之形式混合來製備(參見例如Hardman等人, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.,

2001；Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000；Avis等人(編), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993；Lieberman等人 (編), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990；Lieberman等人 (編) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990；Weiner及Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000)。

在一特定態樣中，本發明之抗體藥物結合物之臨床服務形式(CSF)為於含有ADC、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20之小瓶中之凍乾物。凍乾物可用注射用水復原，該溶液包含ADC、丁二酸鈉、蔗糖及聚山梨醇酯20 (pH值為約5.0)。對於後續靜脈內投藥，所獲得之溶液將通常進一步稀釋至載劑溶液中。

選擇用於治療劑之投藥方案視若干因素而定，包括實體之血清或組織周轉率、症狀程度、實體之免疫原性及生物基質中靶細胞之可達性。在某些態樣中，投藥方案使傳遞至患者之治療劑的量達到最大，與可接受之副作用程度一致。因此，所傳遞之生物劑之量部分地視特定實體及所治療病狀之嚴重程度而定。選擇抗體、細胞激素及小分子之適當劑量之導則為可用的(參見例如Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996；Kresina (編), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991；Bach (編), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993；Baert等人, New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003；Milgrom等人, New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999；Slamon等人, New Engl. J. Med. 344:783-792, 2001；Beniaminovitz等人, New Engl. J. Med.

342:613-619, 2000；Ghosh等人, New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003；Lipsky等人, New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000)。

適當劑量的確定係由臨床醫師進行，例如使用此項技術中已知或疑似影響治療或預測影響治療之參數或因素。一般而言，劑量以稍小於最佳劑量之量開始且以小增量增加，此後直至相對於任何消極副作用達成所要或最佳效果為止。重要診斷量度包括例如發炎之症狀或所產生之發炎性細胞激素之含量。

抗體藥物結合物之醫藥組合物中活性成分之實際劑量可變化，以獲得有效達成特定患者、組合物及投藥模式之所要治療反應，而對患者無毒的活性成分之量。所選劑量將視多種藥物動力學因素而定，包括所採用之本發明特定組合物或其酯、鹽或醯胺之活性；投藥途徑；投藥時間；所採用之特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所採用之特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或物質；所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前醫療病史；及醫學技術中已知之類似因素。

包含抗體或其片段之組合物可藉由連續輸注或藉由以例如一天、一週或每週1-7次之時間間隔給藥而提供。劑量可靜脈內、皮下、局部、經口、經鼻、經直腸、肌肉內、腦內或藉由吸入而提供。特定給藥方案為涉及避免顯著不合需要之副作用的最大劑量或給藥頻率之方案。

對於本發明之免疫結合物，投與患者之劑量可為每公斤患者體重0.0001 mg至100 mg。劑量可為每公斤患者體重0.0001 mg至20 mg、0.0001 mg至10 mg、0.0001 mg至5 mg、0.0001至2 mg、0.0001至1 mg、0.0001 mg至0.75 mg、0.0001 mg至0.5 mg、0.0001 mg至0.25 mg、0.0001至0.15 mg、0.0001至0.10 mg、0.001至0.5 mg、0.01至0.25 mg或0.01至0.10 mg。抗體或其片段之劑量可使用患者體重(公斤，kg)

乘以欲投與之劑量(mg/kg)來計算。

可重複免疫結合物之給藥，且投藥可隔開至少1天、2天、3天、5天、10天、15天、30天、45天、2個月、75天、3個月或至少6個月。在一特定態樣中，每3週重複本發明免疫結合物之給藥。

對特定患者之有效量可視以下因素而變化，諸如所治療之病狀，患者之總體健康狀況，投藥方法、途徑及劑量，及副作用之嚴重程度(參見例如Maynard等人, A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996；Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001)。

投藥途徑可為例如藉由靜脈內、腹膜內、腦內、肌肉內、眼內、動脈內、腦脊髓內、病灶內或藉由持續釋放系統或植入物進行局部或皮膚施用、注射或輸注(參見例如Sidman等人, Biopolymers 22:547-556, 1983；Langer等人, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981；Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982；Epstein等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985；Hwang等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980；美國專利第6,350,466號及第6,316,024號)。必要時，組合物亦可包括增溶劑或用以減輕注射部位之疼痛的局部麻醉劑(諸如利多卡因)，或兩者。另外，亦可例如藉由使用吸入器或噴霧器及具有氣霧劑之調配物來採用經肺投藥。參見例如美國專利第6,019,968號、第5,985,320號、第5,985,309號、第5,934,272號、第5,874,064號、第5,855,913號、第5,290,540號及第4,880,078號；及PCT公開案第WO 92/19244號、第WO 97/32572號、第WO 97/44013號、第WO 98/31346號及第WO 99/66903號，各文獻以全文引用的方式併入本文中。

本發明之組合物亦可經由一或多種投藥途徑，使用此項技術中

已知之多種方法中之一或多者來投與。如熟習此項技術者應瞭解，投藥途徑及/或模式將視所要結果而變化。免疫結合物之所選投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、脊椎或其他非經腸投藥途徑，例如藉由注射或輸注。非經腸投藥代表除經腸及局部投藥以外之投藥模式，通常藉由注射，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。或者，本發明之組合物可經由非-非經腸途徑投與，諸如局部、經表皮或經黏膜投藥途徑，例如鼻內、經口、經陰道、經直腸、舌下或局部。在一個態樣中，本發明之免疫結合物係藉由輸注投與。在另一態樣中，免疫結合物係皮下投與。

若本發明之免疫結合物於控制釋放或持續釋放系統中投與，則可使用泵來達成控制釋放或持續釋放(參見Langer，同上；Sefton, CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20, 1987；Buchwald等人, Surgery 88:507, 1980；Saudek等人, N. Engl. J. Med. 321:574, 1989)。可使用聚合材料來達成免疫結合物之療法的控制釋放或持續釋放(參見例如Medical Applications of Controlled Release, Langer及Wise (編), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen及Ball (編), Wiley, New York, 1984；Ranger及Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1983；亦參見Levy等人, Science 228:190, 1985；During等人, Ann. Neurol. 25:351, 1989；Howard等人, J. Neurosurg. 7 1:105, 1989；美國專利第5,679,377號；美國專利第5,916,597號；美國專利第5,912,015號；美國專利第5,989,463號；美國專利第5,128,326號；PCT公開案第WO 99/15154號；及PCT公開案第WO 99/20253號)。持續釋放調配物中所用之聚合物之實例包括(但不限於)聚(甲基丙烯酸2-

羥乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯吡咯啶酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯) (PLGA)及聚原酸酯。在一個態樣中，持續釋放調配物中所用之聚合物為惰性的，不含可浸出雜質，儲存時穩定，無菌，且生物可降解。控制釋放或持續釋放系統可置放於預防或治療標靶附近，由此僅需要一部分全身劑量(參見例如Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 同上, 第2卷, 第115-138頁, 1984)。

控制釋放系統論述於Langer之綜述(Science 249:1527-1533, 1990)中。熟習此項技術者已知之任何技術可用於產生包含一或多種本發明免疫結合物之持續釋放調配物。參見例如美國專利第4,526,938號；PCT公開案WO 91/05548號；PCT公開案WO 96/20698；Ning等人, Radiotherapy & Oncology 39:179-189, 1996；Song等人, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, 1995；Cleek等人, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, 1997；及Lam等人, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, 1997，各文獻以全文引用的方式併入本文中。

若本發明之免疫結合物係局部投與，則其可調配成軟膏、乳膏、經皮貼片、洗劑、凝膠、洗髮精、噴霧、氣霧劑、溶液、乳液之形式，或熟習此項技術者熟知之其他形式。參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 第19版, Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)。對於不可噴霧之局部劑型，通常採用黏性至半固體或固體形式，其包含載劑或一或多種與局部施用相容之賦形劑且具有在一些情況下大於水之動態黏度。適合之調配物包括(但不限於)溶液、懸浮液、乳液、乳膏、軟膏、粉

末、擦劑、油膏及其類似物，必要時將其滅菌或與影響諸如滲透壓之多種特性之助劑(例如防腐劑、穩定劑、濕潤劑、緩衝劑或鹽)混合。其他適合之局部劑型包括可噴霧之氣霧劑製劑，其中在一些情況下與固體或液體惰性載劑組合之活性成分以與加壓揮發性物質(例如氣體推進劑，諸如氟利昂(freon))之混合物形式封裝或封裝於壓擠瓶中。必要時，亦可向醫藥組合物及劑型中添加增濕劑或保濕劑。該等其他成分之實例在此項技術中為熟知的。

若包含免疫結合物之組合物係鼻內投與，則其可調配成氣霧劑形式、噴霧、細霧或滴劑形式。詳言之，根據本發明使用之預防劑或治療劑宜藉助於適合推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他適合氣體)自加壓包裝或噴霧器以氣霧劑噴霧呈現形式來傳遞。在加壓氣霧劑之狀況下，劑量單位可藉由提供閥門以傳遞計量之量來確定。可調配含有化合物與諸如乳糖或澱粉之適合粉末基劑之粉末混合物的膠囊及藥包(由例如明膠構成)用於吸入器或吹入器。

與例如細胞激素、類固醇、化學治療劑、抗生素或放射線之第二治療劑共同投與或治療之方法在此項技術中為已知的(參見例如Hardman等人, (編) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第10版, McGraw-Hill, New York, N.Y.；Poole及Peterson (編) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.；Chabner及Longo (編) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.)。有效量之治療劑可使症狀減少至少10%；至少20%；至少約30%；至少40%；或至少50%。

可與免疫結合物組合投與之其他療法(例如預防劑或治療劑)可與本發明之免疫結合物相隔小於5分鐘、相隔小於30分鐘、相隔1小時、

相隔約1小時、相隔約1至約2小時、相隔約2小時至約3小時、相隔約3小時至約4小時、相隔約4小時至約5小時、相隔約5小時至約6小時、相隔約6小時至約7小時、相隔約7小時至約8小時、相隔約8小時至約9小時、相隔約9小時至約10小時、相隔約10小時至約11小時、相隔約11小時至約12小時、相隔約12小時至18小時、相隔18小時至24小時、相隔24小時至36小時、相隔36小時至48小時、相隔48小時至52小時、相隔52小時至60小時、相隔60小時至72小時、相隔72小時至84小時、相隔84小時至96小時或相隔96小時至120小時投與。兩種或兩種以上療法可在同一次患者隨訪中投與。

在某些態樣中，免疫結合物可經調配以確保適當活體內分佈。舉例而言，血腦障壁(BBB)排除許多高度親水性化合物。為確保本發明之治療性化合物越過BBB (必要時)，可例如在脂質體中調配該等化合物。關於製造脂質體之方法，參見例如美國專利第4,522,811號；第5,374,548號；及第5,399,331號。脂質體可包含一或多個部分，其選擇性地輸送至特定細胞或器官中，由此增強靶向藥物傳遞(參見例如Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。例示性靶向部分包括葉酸或生物素(參見例如Low等人之美國專利第5,416,016號)；甘露糖苷(Umezawa等人, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗體(Bloeman等人, (1995) FEBS Lett. 357:140；Owais等人, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)；表面活性蛋白質A受體(Briscoe等人, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)；p 120 (Schreier等人, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)；亦參見K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

本發明提供將包含單獨或與其他療法組合之免疫結合物之醫藥組合物投與有需要之個體的方案。組合療法(例如預防劑或治療劑)可

同時或依序投與個體。亦可週期性地投與組合療法之療法(例如預防劑或治療劑)。週期性療法涉及投與第一療法(例如第一預防劑或治療劑)持續一定時段，繼而投與第二療法(例如第二預防劑或治療劑)持續一定時段，且重複此依序投藥，亦即，週期，以降低對一種療法(例如藥劑)之抗性的發展，從而避免或減少一種療法(例如藥劑)之副作用及/或改良療法之功效。

本發明之組合療法之療法(例如預防劑或治療劑)可並行投與個體。

術語「並行」並不限於在準確相同之時間投與療法(例如預防劑或治療劑)，而是意謂包含抗體或其片段之醫藥組合物按一定順序且在一定時間間隔內投與個體，以使得免疫結合物可與其他療法一起起作用以提供與以其他方式投與時相比增加之效益。舉例而言，各療法可同時或在不同時間點按任何次序依序投與個體；然而，若不同時投與，則其應在足夠接近之時間投與以提供所要治療或預防作用。各療法可各別地、以任何適當形式且藉由任何適合途徑投與個體。在多種態樣中，療法(例如預防劑或治療劑)相隔小於15分鐘、小於30分鐘、小於1小時、相隔約1小時、相隔約1小時至約2小時、相隔約2小時至約3小時、相隔約3小時至約4小時、相隔約4小時至約5小時、相隔約5小時至約6小時、相隔約6小時至約7小時、相隔約7小時至約8小時、相隔約8小時至約9小時、相隔約9小時至約10小時、相隔約10小時至約11小時、相隔約11小時至約12小時、相隔24小時、相隔48小時、相隔72小時或相隔1週投與個體。在其他態樣中，兩種或兩種以上療法(例如預防劑或治療劑)在同一患者隨訪中投與。

組合療法之預防劑或治療劑可於同一醫藥組合物中投與個體。或者，組合療法之預防劑或治療劑可於各別醫藥組合物中並行投與個體。預防劑或治療劑可藉由相同或不同投藥途徑投與個體。

實例

實例1：藉由融合瘤技術產生cKIT Ab

抗原及其他蛋白質

藉由轉染293 Freestyle™細胞(Invitrogen, Carlsbad, Ca)來產生分泌人類cKIT蛋白質之短暫表現細胞株。簡言之，使用293Fectin™轉染試劑及含有人類cKIT cDNA之ECD以及序列C端之His6標籤或鼠類Fc之重組質體(pFUSE, Invivogen, San Diego, CA)轉染於Freestyle™培養基(Invitrogen)中培養之細胞。48-72小時後，將培養基離心以移除細胞，無菌過濾，且經澄清之溶解產物用於蛋白質純化。

對於經His6標記之cKIT：將所得濃縮物以0.5 mL/min施加至NiNTA His-Bind Superflow管柱。用PBS進行基線洗滌之後，用PBS以咪唑之分級梯度(10-500 mM)溶離經結合之物質。將所得溶離液針對PBS (pH 7.3)進行透析，無菌過濾且等分。對於Fc-cKit融合，如上文所概述使用蛋白質G fastFlow管柱(替代NiNTA)，且用pH 3甘胺酸緩衝液溶離，該緩衝液用Tris (pH 8)中和。

融合瘤產生

使小鼠免疫及產生融合瘤

用弗氏完全佐劑(Freunds Complete Adjuvant)以1:1稀釋經純化之cKIT，隨後使Bcl-2轉殖基因小鼠(C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 Wehi品系)免疫。使用要求多位點重複免疫(Repetitive Immunization at Multiple Sites，RIMMS) (McIntyre GD., Hybridoma, 1997)之程序使小鼠免疫。簡言之，在接近於周邊淋巴結(PLN)之8個特定位點處用1-3 μg抗原注射小鼠。此程序經12天時段重複8次。第12天，收集測試血液，且藉由ELISA分析血清抗體效價。第15天，自高效價小鼠移出經彙集之PLN。為收集淋巴細胞，用plain DMEM洗滌PLN兩次，接著藉由通過0.22微米篩(Falcon #352350, BD Bioscience, San Jose, CA)使其解離。

將所得淋巴細胞再洗滌2次，隨後進行融合。將F0骨髓瘤細胞與淋巴細胞以2.5個淋巴細胞比1個F0細胞之比率混合。將細胞混合物離心，且隨後向細胞集結粒中逐滴添加1 mL PEG 1500，持續1分鐘。30秒後，緩慢添加1 mL DMEM，且1分鐘後，添加19 mL DMEM，持續5分鐘。集結經融合之細胞，以2 × 10^5個細胞/毫升之密度懸浮於HAT培養基(DMEM + 20% FBS、Pen/Strep/Glu、1× NEAA、1× HAT、0.5× HFCS)中，且置於37℃下一小時。接著將細胞以60微升/孔塗於384孔盤中。

篩選分泌針對cKIT之抗體的融合瘤

融合後十天，針對cKIT特異性抗體之存在來篩選融合瘤盤。對於ELISA篩選，用50 μL cKIT (於PBS中稀釋至15奈克/孔)塗佈Maxisorp 384孔盤(Nunc #464718)，且在4℃下培育隔夜。抽吸剩餘蛋白質，且用含1% BSA之PBS阻斷孔。在室溫下培育30分鐘後，用PBS + 0.05% Tween (PBST)將孔洗滌四次。將15 μL融合瘤上清液轉移至ELISA盤中。於PBS中以1:1000稀釋在移出PLN時獲取之15 μL小鼠血清，且作為陽性對照添加。將50 μL二級抗體(山羊抗小鼠IgG - HRP (Jackson Immuno Research #115-035-071, West Grove, PA)，於PBS中以1:5000稀釋)添加至ELISA盤上之所有孔中。在室溫下培育1小時後，用PBST將盤洗滌八次。添加25 μL TMB (KPL #50-76-05)，且在室溫下培育30分鐘後，在605 nm之吸光度下讀取盤。將來自陽性孔之細胞於HT培養基(DMEM + 20% FBS、Pen/Strep/Glu、1× NEAA、1× HT、0.5× HFCS)中擴增至24孔盤中。

抗體純化

使用蛋白質G (Upstate # 16-266 (Billerica, MA))純化含有cKIT抗體之上清液。在加載上清液之前，用10管柱體積之PBS平衡樹脂。在結合樣品之後，用10管柱體積之PBS洗滌管柱，接著用5管柱體積之

0.1 M甘胺酸(pH 2.0)溶離抗體。即刻用1/10體積之Tris HCl (pH 9.0)中和管柱溶離份。量測溶離份之OD280，且彙集陽性溶離份並針對PBS (pH 7.2)透析隔夜。

實例2：抗cKIT抗體之人類化及親和力成熟

人類化設計

源自融合瘤之抗cKIT抗體9P3之VH及VL序列分別為SEQ ID NO.9及SEQ ID NO.18。用於產生完全IgG1之人類IgG1恆定域之胺基酸序列為對於重鏈之SEQ ID NO.10及對於輕鏈之SEQ ID NO.19。藉由將來自抗cKIT抗體9P3之3個CDR區(GFTFSDYYMA (SEQ ID NO. 148))、(NINYDGSSTYYLDS (SEQ ID NO.149))及(GDYYGTTYWYFDV (SEQ ID NO.150))移植至人類生殖系接受體構架VH3_3-07 (vBASE資料庫)上來實現重鏈之人類化。藉由將來自抗cKIT抗體9P3之3個CDR區(RASQDISNYLN (SEQ ID NO.151))、(YTSRLQS (SEQ ID NO.152))及(QQGKKLWS (SEQ ID NO.153))移植至人類生殖系接受體構架VK3-L25 (vBASE資料庫)上或將2個CDR區(SEQ ID NO.152及SEQ ID NO.153)移植至人類生殖系接受體構架VK1-O12 (vBASE資料庫)上來實現輕鏈之人類化。除CDR區以外，自9P3序列保留可變輕鏈域之一個構架殘基，亦即，VL #71及在VK3-L25之狀況下VL #79 (基於SEQ ID NO.21之殘基編號)。此外，人類J元件JH4及JK4分別用於重鏈及輕鏈。人類化抗體重鏈之所得胺基酸序列為SEQ ID NO. 11，且兩個輕鏈之所得胺基酸序列為SEQ ID NO. 20 (VK1-O12)及SEQ ID NO. 21 (VK3-L6)。

吾人假設，胺基酸基元天冬胺酸繼之以甘胺酸(DG)可易發生轉譯後修飾(異天冬胺酸形成)且CDR內之離胺酸可減少抗體-藥物結合後活性抗體之部分。此外，吾人欲對人類化抗體進行親和力成熟。應用隨機突變誘發(亦即易錯PCR)與定向突變誘發之組合使人類化抗體最

佳化。

產生人類化序列

以GeneArt (Life Technologies Inc. Regensburg, Germany)定序編碼人類化VL及VH結構域之DNA序列，包括智人之密碼子最佳化。藉由剪貼將編碼VL及VH結構域之序列自源自GeneArt之載體次選殖至適合於哺乳動物細胞中分泌之表現載體中。將重鏈及輕鏈選殖至個別表現載體中以允許共轉染。表現載體之元件包括啟動子(細胞巨大病毒(CMV)增強子-啟動子)、用以促進分泌之信號序列、聚腺苷酸化信號及轉錄終止子(牛生長激素(BGH)基因)、允許游離型複製及原核生物中複製之元件(例如SV40起點及ColE1或此項技術中已知之其他元件)及允許選擇之元件(安比西林抗性基因(ampicillin resistance gene)及勻黴素標記物(zeocin marker))。

表現及純化人類化抗體

組成性地表現SV40大T抗原之人類胎腎細胞(HEK293-T ATCC11268)為用於短暫表現人類化及/或最佳化IgG蛋白質之較佳宿主細胞株之一。使用PEI (聚乙烯亞胺，MW 25.000線性，Polysciences，USA目錄號23966)作為轉染試劑進行轉染。藉由在室溫(RT)下將1 g PEI小心地溶解於900 ml細胞培養級水中來製備PEI儲備溶液。為促進PEI溶解，藉由添加HCl將溶液酸化至pH 3-5，繼而用NaOH中和至最終pH值為7.05。最後，將體積調整至1 L，且經0.22 μm過濾器過濾溶液，等分且在-80℃下冷凍直至進一步使用。一旦解凍，即可將等分試樣在-20℃下再冷凍至多3次，但不應在-20℃下長期儲存。使用Novartis專用無血清培養基培養HEK 293T細胞用於細胞轉染及繁殖，且ExCell VPRO無血清培養基(SAFC Biosciences, USA, 目錄號24561C)作為生產/補料培養基。在懸浮培養物中培養經製備用於短暫轉染之細胞。對於小規模(<5 L)轉染，使細胞在5% CO_2之含濕氣

培育箱中於迴轉式震盪器(100-120 rpm)上之Corning搖瓶(Corning, Tewksbury, MA)中生長(種子瓶)。種子培養物中之細胞應維持於指數生長期(細胞密度介於5 × 10^5與3 × 10^6/mL之間)且展現>90%之存活力以供轉染。在此範圍外之細胞密度將在稀釋後導致停滯期或使轉染效率降低。對於小規模(<5 L)轉染，自種子培養物中取出細胞等分試樣，且用Novartis無血清培養基以36%最終體積調整至1.4 × 10^6個細胞/毫升。藉由將DNA以7%最終培養物體積稀釋至1 mg/L (最終體積)，繼而緩緩混合來製備DNA溶液(溶液1：0.5 mg重鏈及0.5 mg輕鏈表現質體用於1 L轉染)。為防止細菌污染，使用0.22 μm過濾器(例如Millipore Stericup)過濾此溶液。接著亦以7%最終培養物體積稀釋3 mg/L (最終體積)之PEI溶液且緩緩混合(溶液2)。在室溫(RT)下培育兩種溶液5-10分鐘。此後在緩緩混合下將溶液2添加至溶液1中，且在室溫下再培育5-15分鐘。接著將轉染混合物添加至細胞中，且持續細胞培養4至6小時。最後，藉由添加ExCell® VPRO無血清培養基來達成剩餘50%之總生產體積。轉染後持續細胞培養十一天。藉由在4℃下以4500 rpm離心20分鐘(Heraeus ®, Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Rockford, IL)來收集培養物。將所回收之細胞上清液經stericup過濾器(0.22 μm)無菌過濾且儲存於4℃下直至進一步加工。

在「ÄKTA 100 explorer Air」層析系統上，在冷卻箱中於4℃下，使用新鮮消毒(0.25 M NaOH)之HiTrap ProtA MabSelect®SuRe 5 ml管柱進行純化。用5 CV PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA)平衡管柱，接著以4.0 ml/min加載經無菌過濾之上清液(2 L)。用8 CV PBS洗滌管柱以溶離未結合之樣品，且用5 CV PBS再次洗滌。用5 CV 50 mM檸檬酸鹽、70 mM NaCl (pH 3.2)溶離抗體。以3 ml溶離份收集溶離液；彙集溶離份且用1 M Tris HCl (pH 10)調整為pH 7。彙集彙集物且無菌過濾(Millipore Steriflip，0.22 μm)，在分光光度計ND-

1000 (NanoDrop)中量測OD 280 nm，且基於序列資料計算蛋白質濃度。測試溶離液之聚集(SEC-MALS)及純度(SDS-PAGE、LAL及MS)。對於第二純化步驟，必要時，將來自第一純化之彙集物加載至新鮮消毒(0.5 M NaOH)之SPX (Hi Load 16/60 Superdex 200級 120 mL (GE-Healthcare))中。用PBS平衡管柱，且用PBS緩衝液以1 ml/min進行操作，以1.2 ml溶離份收集溶離液，且如針對第一純化步驟所述進行分析。

實例3：篩選抗cKIT抗體

HuCAL PLATINUM®淘選

為選擇識別人類cKIT之抗體，採用多個淘選策略。藉由使用可購得之噬菌體呈現文庫Morphosys HuCAL PLATINUM®文庫(Morphosys, Munich DE)作為抗體變異體蛋白質之來源選擇具有高親和結合親和力之純系來產生針對人類cKIT蛋白質之治療性抗體。噬菌粒文庫係基於HuCAL®概念(Knappik等人, (2000) J Mol Biol 296: 57-86)且採用在噬菌體表面上呈現Fab之CysDisplay®技術(Lohning, WO 01/05950)。為分離抗cKIT抗體，使用固相、溶液、全細胞及差異全細胞淘選方法來進行標準淘選策略。

針對cKIT之固相淘選

在4℃下用人類或小鼠cKIT Fc融合蛋白質塗佈96孔Maxisorp™盤隔夜。對於每次淘選，將約4×10^{13}個HuCAL PLATINUM®噬菌體抗體添加至各經塗佈之抗原中，且在室溫下於微量滴定盤震盪器上培育2小時。此後，由數個洗滌步驟洗去非特異性結合之噬菌體，且使用含25 mM DTT之10 mM Tris/HCl (pH 8)溶離特異性結合之噬菌體。

將溶離液轉移至14 ml大腸桿菌細菌中且進行培育以供噬菌體感染。使經感染之細菌再懸浮於2×YT培養基中，塗於LB/Cam瓊脂盤上且培育隔夜。將群落自盤刮下且用於噬菌體營救、所選純系之多純系

擴增及噬菌體產生。以經純化之噬菌體開始下一輪淘選。

根據第一輪之方案進行第二輪及第三輪固相淘選，但其中抗原之量減少及洗滌條件更嚴格。

針對cKIT之捕獲淘選

對於捕獲淘選，經由山羊抗小鼠Fc捕獲抗體將抗原cKIT/鼠類Fc融合蛋白質固定於96孔Maxisorp™盤上。在噬菌體阻斷期間，將人類及小鼠γ球蛋白添加至阻斷緩衝液中以避免針對捕獲抗體及抗原之小鼠Fc部分選擇抗體。如固相淘選方案(參見上文)中所述進行捕獲淘選中之抗原塗佈及噬菌體阻斷程序。

使用經抗生蛋白鏈菌素偶合之磁性珠粒的溶液淘選方案

以兩種不同模式(「傳統」及「替代」)進行溶液淘選。對於每次淘選，用相等體積之2× Chemiblocker/0.1% Tween20阻斷4 × 10^{13}個HuCAL PLATINUM®噬菌體抗體。為移除抗生蛋白鏈菌素結合噬菌體或珠粒結合噬菌體，每次使用1 mg經阻斷之抗生蛋白鏈菌素珠粒進行經阻斷之噬菌體離子的預吸附兩次。

a)「傳統」模式：將經生物素標記之16P23 mAb與人類cKIT ECD-His蛋白質一起培育，且添加至經阻斷之噬菌體粒子中。16P23抗體為內部產生之融合瘤且作為捕獲抗體用於多種篩選方案中以在cKIT之ECD上暴露不同結構域。16P23抗體亦用於抗體歸類(binning)目的。培育後，使用抗生蛋白鏈菌素珠粒捕獲噬菌體-抗原複合物，且用磁分離器收集結合至抗生蛋白鏈菌素珠粒之噬菌體粒子。

b)「替代」模式：將經生物素標記之16P23 mAb添加至抗生蛋白鏈菌素珠粒中，且在室溫下於旋轉器上培育抗體-珠粒混合物30分鐘。洗滌珠粒且再懸浮於含有人類cKIT ECD-His蛋白質之PBS中。隨後，添加噬菌體，且在室溫下於旋轉器上使抗體-珠粒-抗原-噬菌體複合物再旋轉1小時。在此最後培育步驟之後，用磁分離器捕獲珠粒且

棄去上清液。

使用兩種呈現方法，由數個洗滌步驟，使用PBS/0.05% Tween20及PBS洗去非特異性結合之噬菌體。藉由使用含25 mM DTT之10 mM Tris/HCl (pH 8)自抗生蛋白鏈菌素珠粒溶離特異性結合之噬菌體。根據固相淘選方案進行後續噬菌體感染及噬菌體產生。

根據第一輪之方案進行第二輪及第三輪溶液淘選，但其中抗原之量減少及洗滌條件更嚴格。

針對cKIT之全細胞淘選

表現抗原人類、小鼠或大鼠cKIT之靶細胞用作抗原且與HuCAL PLATINUM®噬菌體抗體接觸以供淘選。於PBS/5% FCS中洗滌噬菌體-細胞複合物三次。用0.1 M甘胺酸-HCl/0.5 M NaCl (pH 2.2)自靶細胞溶離特異性結合之噬菌體。根據固相淘選方案進行後續噬菌體感染及噬菌體產生。根據第一輪之方案進行第二輪及第三輪全細胞淘選。

針對cKIT之差異全細胞淘選

在差異全細胞淘選中，對細胞及經純化之蛋白質交替進行選擇。如固相淘選方案中所述進行對經純化之抗原的選擇輪次。關於對細胞之選擇輪次，請參考針對cKIT之全細胞淘選部分中之程序。

成熟淘選

為獲得具有增加之親和力的特異性抗體，進行成熟淘選(Prassler等人, Future Med. Immuno. 2009 1(4):571-583)。出於此目的，將已測試cKIT特異性結合之經定序純系用於LCDR3或HCDR2卡匣交換。此後，如固相淘選方案中所述，用人類及/或小鼠cKIT Fc融合蛋白質進行兩輪固相淘選。

a)對於LCDR3 RapMAT®：酶促消化源自噬菌體之pMORPH30®載體DNA (Morphosys, Munich DE)之Fab編碼片段，且用TRIM™ LCDR3成熟卡匣置換插入物(Virnekaes等人, NAR 1994 22(25):5600-5607)。

隨後，將1.25 μg pMORPH30®呈現載體與帶有多樣化LCDR3之插入物片段接合。

b)對於HCDR2 RapMAT®：在第2輪淘選之後，酶促消化源自噬菌體之pMORPH30®載體DNA之Fab編碼片段，且用TRIM™ HCDR2成熟卡匣置換插入物(Virnekas等人，同上)。隨後，將1.25 μg pMORPH30®呈現載體與帶有多樣化HCDR2之插入物片段接合。

擴增所產生之文庫，且以增加之嚴格度及降低之抗原濃度或人類及小鼠cKIT抗原之交替對其進行兩輪淘選以鑑別親和力改良之純系。

製備含Fab之細菌溶解產物用於ELISA篩選

對於初始篩選及表徵，使用溶菌酶、4 mM EDTA及10 U/μl全能核酸酶(Benzonase)溶解個別Fab表現大腸桿菌純系之隔夜培養物。含Fab之大腸桿菌溶解產物用於ELISA、FACS及SET篩選。

篩選含Fab之粗細菌溶解產物

ELISA篩選

使用ELISA篩選，自淘選輸出結果針對與靶抗原之結合來鑑別單一Fab純系。使用含Fab之粗大腸桿菌溶解產物測試Fab。

Fab表現檢查ELISA

為驗證所製備之大腸桿菌溶解產物中之Fab表現，用於PBS中以1:1000稀釋之Fd片段特異性綿羊抗人IgG塗佈Maxisorp™ 384孔盤(Nunc, Sigma-Aldrich, St.Louis MO)。用於含有0.05% Tween20之PBS中之5%脫脂奶粉阻斷之後，添加含Fab之大腸桿菌溶解產物。隨後，藉由與結合至鹼性磷酸酶之$F(ab)_2$特異性山羊抗人IgG (以1:5000稀釋)一起培育，繼而添加AttoPhos®螢光受質(Roche, #11681982001, Mannheim, DE)來偵測經結合之HuCAL®-Fab片段。記錄535 nm下之螢光發射，其中在430 nm下激發。

對直接塗佈之抗原進行ELISA篩選

用經mFc標記之人類cKIT ECD蛋白質以於PBS中10 μg/ml之濃度塗佈Maxisorp™ 384孔盤。用含5%脫脂奶粉之PBS將盤阻斷之後，添加含Fab之大腸桿菌溶解產物。使用Attophos®螢光受質(Roche, #11681982001, Mannheim, DE)，由結合至鹼性磷酸酶之$F(ab)_2$特異性山羊抗人IgG (以1:5000稀釋)偵測Fab之結合。記錄535 nm下之螢光發射，其中在430 nm下激發。

使用Fab BEL溶解產物進行抗原決定基歸類

為在親和力成熟之前鑑別潛在配位體結合競爭者，使用Fab大腸桿菌溶解產物及16P23抗體(已知配位體結合競爭者)進行競爭ELISA篩選。出於此目的，如上文所述(對直接塗佈之抗原進行ELISA篩選)，用經mFc標記之人類cKIT ECD蛋白質塗佈Maxisorp™ 384孔盤且加以阻斷。

以5 μg/ml之最終濃度添加16P23 mAb，繼而與含Fab之大腸桿菌溶解產物一起培育。最後，使用Attophos ®螢光受質(Roche, #11681982001)，以抗FLAG鹼性磷酸酶結合之抗體(Sigma A-9469，以1:10000稀釋)偵測Fab之結合。記錄535 nm下之螢光發射，其中在430 nm下激發。

FACS篩選

在FACS篩選中，自淘選輸出結果鑑別結合至細胞表面表現之抗原的單一Fab純系。使用含Fab之粗大腸桿菌溶解產物測試Fab。

在96孔或384孔盤格局中進行FACS篩選：

a)在使用BD FACS陣列裝置之96孔盤格局中，將100 μl細胞懸浮液轉移至新的96孔盤中(得到1×10^5個細胞/孔)。將含靶細胞懸浮液之盤離心，且棄去上清液。使剩餘細胞集結粒再懸浮，且將50 μl含Fab之BEL提取物添加至相應孔中。將盤在冰上培育1小時。培育後，將

細胞短暫離心，且用200 μl FACS緩衝液(PBS，3% FCS)洗滌三次。在各洗滌步驟之後，將細胞離心且小心地再懸浮。添加二級偵測抗體(經PE結合之山羊抗人IgG；Dianova, Hamburg, DE)，且在冰上培育樣品，隨後根據Fab培育進行洗滌。最後，使細胞集結粒再懸浮於每孔150 μl FACS緩衝液中，且在BD FACS陣列中分析樣品。

b)在使用BD Calibur ® HTS裝置(BD Biosciences, San Jose, CA)之384孔盤格局中，將20 μl細胞懸浮液轉移至新的圓形384孔盤中(得到4 × 10^4個細胞/孔)。將含靶細胞懸浮液之盤離心，且棄去上清液。使剩餘細胞集結粒再懸浮，且將20 μl含Fab之提取物添加至相應孔中。在4℃下於震盪下將盤培育1小時。培育後，將細胞短暫離心，且用40 μl FACS緩衝液(PBS，3% FCS)洗滌三次。在各洗滌步驟之後，將細胞離心且小心地再懸浮。添加40 μl經PE結合之山羊抗人偵測抗體，且在冰上培育樣品，隨後根據Fab培育進行洗滌。最後，使細胞集結粒再懸浮於每孔35 μl FACS緩衝液中，且用BD FACS Calibur/HTS裝置量測樣品。

親和力測定

對於K_D測定，使用抗體蛋白質之單體部分(藉由分析型SEC分析，至少90%單體含量；分別地，Superdex 75 PC3.2/30 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA)用於Fab，或Tosoh TSKgel G3000 SW_{XL} (7.8 mm / 30.0 cm) (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, DE)用於IgG)。

使用Sector Imager 6000 (MSD)進行KD測定之溶液平衡滴定(SET)方法

基本上如文獻中所述(Friquet等人, J. Immuno. Meth. 1985; 77:305-319)進行溶液中之親和力測定。為改良SET方法之敏感度及精確度，將其自傳統ELISA轉至基於ECL之技術(Haenel等人, 2005 1;339(1):182-4)。根據製造商之說明書，用MSD Sulfo-TAG™ NHS酯

(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA)標記1 mg/ml山羊抗人$(Fab)_2$片段特異性抗體(Dianova)。用抗原塗佈MSD盤且將經平衡之樣品轉移至彼等盤中。洗滌後，將每孔30 μl經MSD-磺酸基標籤標記之偵測抗體(抗人$(Fab)_2$)添加至MSD盤中且在震盪器上培育。洗滌MSD盤且添加30微升/孔含界面活性劑之MSD讀取緩衝液T之後，使用Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA)偵測電化學發光信號。

以應用定製擬合模型之XLfit (IDBS)軟體評估資料。對於Fab分子之K_D測定，使用以下擬合模型(根據(Haenel等人, Anal. Biochem 2005;339(1):182-184)，根據(Abraham等人, J. Mol. Recogn 1996; 9:456-461)加以修改)：

$$y = B_{max} - \left(\frac{B_{max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

$[Fab]_t$：所應用之總Fab濃度

x：所應用之總可溶性抗原濃度(結合位點)

B_{max}：無抗原情況下Fab之最大信號

K_D：親和力

對於IgG分子之K_D測定，使用IgG之以下擬合模式(根據(Piehler等人, 1997)加以修改)：

$$y = \frac{2B_{max}}{[IgG]} \left(\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$

[IgG]：所應用之總IgG濃度

x：所應用之總可溶性抗原濃度(結合位點)

B_{max}：無抗原情況下IgG之最大信號

K_D：親和力

實驗配置：

HuCAL®抗cKIT IgG之K_D測定基本上如下進行：在4℃下於標準MSD盤上於PBS中以0.1 μg/ml塗佈人類cKIT-Fc隔夜/在室溫下於抗生蛋白鏈菌素MSD盤上塗佈分析緩衝液1小時。隨後，在室溫下用含3% BSA之PBS將MSD盤阻斷1小時。在4℃下用含5% BSA之PBS將抗生蛋白鏈菌素盤阻斷隔夜，隨後進行抗原塗佈。對於抗原滴定，應用人類cKIT-His。

隨後，經由使用Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA)進行ECL偵測來定量未結合之Fab的濃度。使用XLfit (IDBS)軟體，應用相應擬合模型來處理結果，以估算親和力且由此鑑別由成熟最為改良之純系。

活體外生物化學分析(交叉反應性及結構域結合分析)

在ELISA中測試經純化之IgG與人類、犬及小鼠cKIT全長ECD蛋白質以及人類cKIT ECD結構域構築體D1-3及D4-5之結合。出於此目的，在4℃下用抗原以於PBS中5 μg/ml之濃度塗佈盤。使用Attophos ®作為受質，由結合至鹼性磷酸酶之抗人或抗小鼠$F(ab)_2$ (於1% MPBS中以1:5000稀釋)偵測IgG之結合。在430 nm激發及535 nm發射下量測螢光發射。

經純化之IgG的抗原決定基歸類

測試經純化之IgG候選物與內部產生之工具抗體的競爭，該等工具抗體先前顯示界定cKIT之胞外域上之個別框(bin)。出於此目的，將IgG以恆定量塗佈於Maxisorp™盤上，且測試與溶液中漸增量之競爭者IgG的競爭。作為陽性對照，分析經塗佈之IgG與溶液中其本身之競爭。所有經測試之IgG均以50×過量與經糖基生物素標記之人類cKIT-Fc融合體在室溫下於溶液中預培育1小時。接著將抗原/抗體複合物添加至經塗佈之抗體中且經由經生物素標記之抗原偵測經結合之複合

物。一般而言，在高IgG濃度下之信號可僅在經塗佈之IgG能夠結合至不同於溶液中之經測試IgG的抗原上之可達抗原決定基時獲得(亦即，非競爭性抗體)。相比之下，對於競爭性抗體、具有部分重疊之抗原決定基之抗體或由位阻阻斷抗原決定基之抗體，在高IgG濃度下之結合信號與對照相比顯著降低。

用20微升/孔之IgG稀釋液以於PBS中1.2 μg/ml之濃度塗佈Maxisorp™盤之各別孔，在4℃下培育隔夜，接著用PBST洗滌3次。在室溫下用90 μl 3% BSA/PBS孔將盤阻斷1小時，且用PBST洗滌3次。

經由FACS對細胞進行EC50測定

在單一濃度下測試經純化之IgG或將其滴定於FACS中以測定結合至細胞表面表現之人類、小鼠或大鼠cKIT的EC50值。出於此目的，用Accutase ® (Life Technologies, Carlsbad, CA)收集Mo7e、P815或RBL-2H3細胞且於FACS緩衝液中稀釋至1 × 10^6/ml。所有後續步驟均在冰上進行以防止受體內化。將細胞懸浮液以100微升/孔填充至96孔U底盤中。在4℃下以210g離心5分鐘後，棄去緩衝液。接著以15 μg/ml之濃度或在滴定實驗中以連續稀釋之抗體濃度(1:3稀釋步驟，起始濃度為15 μg/ml)每孔添加100 μl稀釋於FACS緩衝液中之特異性mAb。在冰上培育1小時後，用150 μl FACS緩衝液洗滌細胞三次。將二級PE結合山羊抗人偵測抗體(於FACS緩衝液中以1:200稀釋)以100微升/孔添加至細胞中，且在冰上培育1小時。用150 μl FACS緩衝液洗滌細胞三次。最後，使細胞集結粒再懸浮於每孔200 μl FACS緩衝液中，且在BD FACS陣列中分析樣品。

活體外生物分析

SCF依賴性增殖分析

對培養於含穩定麩醯胺酸(PAN #P04-18500)、10% FCS及10 ng/ml SCF之RPMI1640 (R&D目錄號255-SC；批號CM2810061, R&D

Corp, Berkeley CA)中之Mo7e細胞株(人類急性巨核母細胞白血病，DSMZ編號：ACC 104)進行增殖分析。

在SCF依賴性增殖分析中，測試經純化之IgG或含IgG之細胞培養物上清液。在兩種實驗配置中，收集細胞，且使其以0.5 × 10^6個細胞/毫升之濃度再懸浮於50 ml饑餓培養基(不含SCF之培養基)中，且在37℃下培育18小時。接著使細胞以1 × 10^6個細胞/毫升之濃度再懸浮於含60 ng/ml SCF (2×濃縮，添加抗體後之最終濃度為30 ng/ml)之饑餓培養基中。將50 μl細胞(5 × 10^4個細胞/孔)及50 μl 2×經濃縮之經純化抗體或未經稀釋之細胞培養物上清液添加至白色96孔透明平底盤之每孔中。對於陰性及陽性對照，包括不含SCF且不含抗體之細胞或含SCF且不含抗體之細胞。將盤在37℃下培育48小時，且最後根據製造商之說明書使用CellTiter-Glo ® (Promega #G7571, Promega, Madison, WI)測定細胞數目。

Fab-ZAP ADC背馱分析(Piggyback Assay)

為測試抗體在受體結合後內化之能力，將Fab-ZAP試劑(皂素偶合之山羊抗hu-mAb；ATS Biotechnology, 目錄號IT-51-250, ATS Bio, San Diego, CA)與經純化之IgG混合或與含IgG之細胞培養物上清液混合來進行ADC分析。對癌細胞株CMK-11-5 (急性巨核母細胞白血病細胞，於RPMI1640 + 10% FCS中培養)測試細胞毒性潛力，因為此等細胞顯示cKIT之高表現。

將培養物中之細胞計數且於培養基中稀釋至1 × 10^5個細胞/毫升之濃度。將50 μl細胞懸浮液(5000個細胞/孔)轉移至96孔盤(經TC處理之透明平底白色盤；Corning目錄號3903, Corning, Tewksbury, MA)中。在各別盤(96孔V底；Nunc, 目錄號249946, Nunc Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中，於培養基中稀釋IgG。將含IgG之細胞培養物上清液以1:125稀釋且將經純化之IgG稀釋至0.4 nM之濃度，得到60微升/孔

之總體積。添加濃度為5 nm之相等體積之FabZAP溶液，且將盤在37℃下培育60分鐘。將50 μl抗體/Fab-ZAP結合物轉移至CMK-11-5細胞中(總體積100 μl)。對於對照，製備僅含細胞之孔(=100%存活力對照)及含僅與Fab-ZAP一起培育之細胞之孔(以檢查二級試劑之非特異性殺死)。Fab-ZAP之最終濃度為1.25 nM。將盤在37℃及5% CO_2下培育72小時。根據製造商之說明書使用CellTiter-Glo ® (Promega #G7571)測定細胞數目。將存活力針對僅為對照之細胞進行校正。

概述

在篩選cKIT抗體中，進行2種不同策略：

策略1：

針對高親和力選擇具有人類/犬x-反應性之候選物(217個HCDR3家族)，且在IgG轉化後，在CMK-11-5 FabZAP ADC分析及Mo7e增殖分析中針對功能性篩選純系。針對功能活性及多樣性，選擇候選物用於探索規模之表現。

策略2：

對具有人類/犬/小鼠x-反應性之候選物(5個HCDR3家族)進行親和力成熟，且在IgG轉化後，針對表現選擇候選物。

總之，對來自策略1及2之82個經純化之IgG候選物進行深入表徵。自此82個彙集物中選擇26個IgG候選物用於擴大規模之生產、毒素結合及在活體外及活體內實驗中作為抗體藥物結合物進行後續測試。

在深入表徵後，選擇屬於16個不同HCDR3家族之26個抗體(14個候選物來自策略1及12個候選物來自策略2)用於擴大規模之生產及作為抗體-DM1結合物進行測試。根據以下準則選擇候選物：1)在Fab-DM1背駄分析中野生型及突變型cKIT表現細胞之有效殺死具有在次奈莫耳濃度至低奈莫耳濃度範圍內之EC50，2) 24/26 IgG對犬cKIT之

KD值在對人類cKIT所測定之KD值的3倍範圍內。另外，12/26 IgG與表現於細胞上之小鼠及大鼠cKIT交叉反應。

自此篩選所選之候選物可指派給不同抗原決定基框：

1) 19/26 IgG屬於框1或框6 (結合至cKIT D1-3，配位體結合域)

2) 6/26 IgG屬於框8 (結合至cKIT D4-5，二聚域)

3) 1/26 IgG屬於框2，其對人類cKIT具有高親和力，但對犬cKIT僅具有弱親和力。來自此類型之篩選方案之抗體的一個實例為抗體20376。

實例4：人類、犬、小鼠及大鼠cKIT ECD蛋白質之構築體

基於來自GenBank或Uniprot資料庫之胺基酸序列(參見下表2)對人類、小鼠及大鼠cKIT胞外域進行基因合成。基於使用來自多種犬組織之mRNA產生之胺基酸序列資訊(例如Zyagen Laboratories；下表2)對食蟹獼猴cKIT及1 ECD cDNA模板進行基因合成。將所有經合成之DNA片段選殖至具有C端標籤之適當表現載體，例如基於hEF1-HTLV之載體(pFUSE-mIgG2A-Fc2)中以允許純化。

表2

名稱	描述	寄存編號	SEQ ID NO
人類cKIT D1-5	**人類cKIT tr.變異體2，殘基26-520-TAG** QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVK WTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHG LSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDP EVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAY HRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVS KASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKL QEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYA NNTFGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGEN VDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSEN ESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAF NVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYF CPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSS AFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKEQIHPHTLF TPRSHHHHHH	NM_001093772	(SEQ ID NO.154)

人類 cKIT D1-3	**人類cKIT tr.變異體1，殘基26-311-TAG** QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVK WTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHG LSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDP EVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAY HRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVS KASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKL QEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYA NNTFGSANVTTTLEVVDKGRSHHHHHH	NM_000222	(SEQ ID NO.155)
人類 cKIT D4-5	**人類cKIT tr.變異體1，殘基311-524-TAG** GFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWI YMNRTFTDKWEDYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGTE GGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNG MLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQT LNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGK TSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH	NM_000222	(SEQ ID NO.156)
食蟹獼猴 cKIT D1-5	**食蟹獼猴cKIT，殘基25-520-TAG**	不適用	(參見下文)
小鼠 cKIT D1-5	**小鼠cKIT tr.變異體1，殘基26-527-TAG** SQPSASPGEPSPPSIHPAQSELIVEAGDTLSLTCIDPDFVR WTFKTYFNEMVENKKNEWIQEKAEATRTGTYTCSNSN GLTSSIYVFVRDPAKLFLVGLPLFGKEDSDALVRCPLTD PQVSNYSLIECDGKSLPTDLTFVPNPKAGITIKNVKRAY HRLCVRCAAQRDGTWLHSDKFTLKVRAAIKAIPVVSV PETSHLLKKGDTFTVVCTIKDVSTSVNSMWLKMNPQP QHIAQVKHNSWHRGDFNYERQETLTISSARVDDSGVF MCYANNTFGSANVTTTLKVVEKGFINISPVKNTTVFVT DGENVDLVVEYEAYPKPEHQQWIYMNRTSANKGKDY VKSDNKSNIRYVNQLRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDAS ASVTFNVYVNTKPEILTYDRLINGMLQCVAEGFPEPTID WYFCTGAEQRCTTPVSPVDVQVQNVSVSPFGKLVVQS SIDSSVFRHNGTVECKASNDVGKSSAFFNFAFKEQIQA HTLFTPLEVLFQGPRSPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGP SVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVL PPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYS CSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	NM_001122733	(SEQ ID NO.157)

大鼠 cKIT D1-5	**大鼠cKIT，殘基25-526-TAG** SQPSASPGEPSPPSIQPAQSELIVEAGDTIRLTCTDPAFV KWTFEILDVRIENKQSEWIREKAEATHTGKYTCVSGSG LRSSIYVFVRDPAVLFLVGLPLFGKEDNDALVRCPLTDP QVSNYSLIECDGKSLPTDLKFVPNPKAGITIKNVKRAY HRLCIRCAAQREGKWMRSDKFTLKVRAAIKAIPVVSV PETSHLLKEGDTFTVICTIKDVSTSVDSMWIKLNPQPQS KAQVKRNSWHQGDFNYERQETLTISSARVNDSGVFMC YANNTFGSANVTTTLKVVEKGFINIFPVKNTTVFVTDG ENVDLVVEFEAYPKPEHQQWIYMNRTPTNRGEDYVKS DNQSNIRYVNELRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVSASV TFDVYVNTKPEILTYDRLMNGRLQCVAAGFPEPTIDW YFCTGAEQRCTVPVPPVDVQIQNASVSPFGKLVVQSSI DSSVFRHNGTVECKASNAVGKSSAFFNFAFKGNSKEQI QPHTLFTPRSLEVLFQGPGSPPLKECPPCAAPDLLGGPS VFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAPQVYVL PPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQN YKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSV VHEGLHNHLTTKTISRSLGK	NM_022264	(SEQ ID NO.158)

表3：食蟹獼猴cKIT蛋白質之序列

構築體	單字母代碼之胺基酸序列，信號肽加下劃線	SEQ ID NO
食蟹獼猴 cKIT D1-5	<u>MYRMQLLSCIALSLALVTNS</u>QPSVSPGEPSPPSIHPAKSELIVRVGNEIRLLCI DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSSSIYVF VRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTSYSLKGCQGKPLPKDLR FVPDPKAGITIKSVKRAYHRLCLHCSADQEGKSVLSDKFILKVRPAFKAVP VVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSW HHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTTLEVVDKGFI NIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYP KSENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNASIAFNVYVNTKPEI LTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNAS GPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQI HPHTLFTPRSHHHHHH	(SEQ ID NO.159)

重組cKIT蛋白質之表現

在源自HEK293之細胞株(293FS)中表現所要cKIT重組蛋白質，該等細胞株先前適於懸浮培養且於無血清培養基FreeStyle-293 (Gibco, 目錄號12338018)中生長。小規模與大規模蛋白質生產均經由短暫轉染且在多個搖瓶(Nalgene)中進行，每個搖瓶至多1 L，使用293Fectin (Life Technologies, 目錄號12347019)作為質體載體。以1:1.5 (w:v)之比率使用總DNA與293Fectin。DNA與培養物之比率為1 mg/L。轉染後3-4天收集細胞培養物上清液，離心且無菌過濾，隨後進行純化。

實例5：純化人類、犬、小鼠及大鼠cKIT ECD蛋白質以及cKIT子域1-3及4-5

經標記之蛋白質純化

自細胞培養物上清液中純化重組Fc標記cKIT胞外域蛋白質(例如人類cKIT ECD-Fc、人類cKIT (ECD子域1-3、4-5)-Fc、犬cKIT-mFc、大鼠cKIT-mFc、小鼠cKIT-mFc)。使經澄清之上清液通過已用PBS平衡之蛋白質A瓊脂糖管柱。進行基線洗滌之後，用Pierce Immunopure低pH值溶離緩衝液或100 mM甘胺酸(pH 2.7)溶離經結合之物質，且即刻用1/8溶離體積之1 M Tris (pH 9)中和。必要時，使用Amicon Ultra 15 mL離心濃縮機濃縮經彙集之蛋白質，使用10 kD或30 kD標稱分子量截止。接著藉由SEC使用Superdex 200 26/60管柱純化彙集物以移除聚集體。接著藉由SDS-PAGE及SEC-MALLS (多角度雷射光散射)表徵經純化之蛋白質。藉由280 nm下之吸光度，使用由Vector NTI自序列計算之理論吸收係數來確定濃度。

實例6：cKIT Ab與cKIT ECD子域之結合

為幫助界定cKIT Ab之結合位點，將人類cKIT ECD分成子域1-3(配位體結合域)及子域4-5 (二聚域)。為確定哪些子域經結合，採用夾層ELISA分析。將1 μg/ml稀釋於1X磷酸鹽緩衝鹽水中且對應於cKIT子域1-3、子域4-5或全長cKIT ECD之ECD塗佈於96孔Immulon 4-HBX盤(Thermo Scientific目錄號3855, Rockford, IL)上，且在4℃下培育隔夜。用洗滌緩衝液(含0.01% Tween-20之1X磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) (Bio-Rad 101-0781))將盤洗滌三次。在室溫下用280微升/孔稀釋於1XPBS中之3%牛血清白蛋白將盤阻斷2小時。用洗滌緩衝液將盤洗滌三次。在洗滌緩衝液中以8個點之5倍稀釋製備2 μg/ml抗體，且一式三份以100微升/孔添加至ELISA盤中。在室溫下，在以200 rpm震盪之迴轉式震盪器上將盤培育1小時。用洗滌緩衝液將分析盤洗滌三次。

在洗滌緩衝液中以1:10,000製備二級抗體F(ab')$_2$片段山羊抗人IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch目錄號109-036-088, West Grove, PA)，且以100微升/孔添加至ELISA盤中。在室溫下，在以200 rpm震盪之迴轉式震盪器上將盤與二級抗體一起培育1小時。用洗滌緩衝液將分析盤洗滌三次。使ELISA信號顯色，將100微升/孔之Sure blue ® TMB受質(KPL目錄號52-00-03, Gaithersburg, MD)添加至盤中，且在室溫下培育10分鐘。為終止反應，將50 μl 1 N鹽酸添加至各孔中。使用Molecular Devices SpectraMax M5盤讀取器在450 nM下量測吸光度。為確定各抗體之結合反應，取光學密度量測值之平均值，產生標準偏差值，且使用Excel製圖表。各個別抗cKIT抗體之結合域見於下表5中。

實例7：cKIT Ab之親和力量測

使用SPR技術，使用Biacore® 2000儀器(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)及CM5感測器晶片測定抗體對cKIT種類直系同源物以及對cKIT之親和力。

簡言之，將補充有2% Odyssey®阻斷緩衝液(Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE)之HBS-P (0.01 M HEPES，pH 7.4，0.15 M NaCl，0.005%界面活性劑P20)用作所有實驗之操作緩衝液。由反應單位(RU)量測固定量及反應物相互作用。進行中試實驗以測試及確認抗人Fc抗體(目錄號BR100839, GE Healthcare, Pittsburgh, PA)及固定及測試抗體之捕獲的可行性。

對於動力學量測，進行以下實驗：經由經固定之抗人Fc抗體將抗體捕獲至感測器晶片表面上，且測定cKIT蛋白質於游離溶液中結合之能力。簡言之，經由胺偶合在全部兩個流動細胞上以5 μl/min之流動速率將25 μg/ml抗人Fc抗體(pH 5)固定於CM5感測器晶片上以達到10,500 RU。接著以10 μl/min注射0.1-1 μg/ml測試抗體，持續1分鐘。

抗體之捕獲量一般保持低於200 RU。隨後，2倍連續稀釋3.125-50 nM cKIT受體胞外域(ECD)，且在參考流動細胞與測試流動細胞上以40 μl/min之流動速率注射3分鐘。下文列出經測試之ECD之表格。繼而進行結合之解離，持續10分鐘。在各注射週期之後，用3 M $MgCl_2$以10 μl/min再生晶片表面，持續30秒。在25℃下進行所有實驗，且將反應資料與簡單的1:1相互作用模型(實驗Scrubber 2 ®軟體2.0b版(BioLogic Software))全面擬合以獲得締合速率(k_a)、解離速率(k_d)及親和力(K_D)之估算值。

表4 ECD同型及來源

ECD同型	標籤	來源
人類	C端6× His	NVS
犬	C端6× His	NVS
小鼠	C端6× His	Sino Biological Inc (目錄號：50530-M08H)
大鼠	C端mFc	NVS

表5列出結構域結合及親和力。如表中所示，抗體9p3、NEG024、NEG027、NEG085、NEG086、NEG087及20376均在奈莫耳濃度水準下與人類cKIT反應，且對針對食蟹獼猴ECD所測試者具有類似親和力。然而，僅20376與小鼠交叉反應。所測試之抗體中無一者與大鼠cKIT交叉反應。

表5

Ab	結構域結合	對人類cKIT之親和力(nM)	對犬cKIT之親和力(nM)	對小鼠cKIT之親和力(nM)	對大鼠cKIT之親和力(nM)
9P3	d1-3	20	未測定	無反應	無反應
NEG024	d1-3	1.31	1.15	無反應	無反應
NEG026	d1-3	未測定	未測定	無反應	無反應
NEG027	d1-3	1.34	未測定	無反應	無反應
NEG085	d1-3	8.4	6.14	無反應	無反應
NEG086	d1-3	1.44	1.34	無反應	無反應
NEG087	d1-3	1.13	1.39	無反應	無反應
20376	d1-3	9.1	4.8	2.5	無反應

實例8：製備ADC

藉由一步製程製備DM1結合物

經由切向流過濾(TFF#1)將個別cKIT抗體透濾至反應緩衝液(15 mM磷酸鉀，2 mM EDTA，pH 7.6)中，隨後開始結合反應。隨後，將cKIT抗體(約5.0 mg/mL)依序與DM1 (相對於抗體量5.6倍莫耳濃度過量)及SMCC (相對於抗體量約5.0倍過量)混合。在20℃下於含有2 mM EDTA及10% DMA之15 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.6)中進行反應約16小時。藉由添加1 M乙酸將pH值調整至5.0來淬滅反應。在pH值調整之後，經多層(0.45/0.22 μm) PVDF過濾器過濾反應混合物且純化並使用切向流過濾(TFF#2)透濾至含有8.22%蔗糖之20 mM丁二酸鹽緩衝液(pH 5.0)中。切向流過濾之儀器參數之一個實例列於下表6中。

表6 切向流過濾之儀器參數

TFF參數	TFF#1設定點	TFF#2設定點
體積濃度(Cb - g/L)	20	20
TMP (psi)	12-18	12-18
進流速率(LMH)	324	324
膜負載(g/m^2)	80 - 150	80 - 150
透濾體積	10	14
透濾緩衝液	15 mM磷酸鉀，2 mM EDTA，pH 7.6	20 mM丁二酸鹽，8.22%蔗糖，pH 5.0
溫度(℃)	室溫(20 - 25)	室溫(20 - 25)

自上文所述之製程獲得之結合物係藉由以下方法分析：用於細胞毒性劑負載(類美登素與抗體比，MAR)之UV光譜法；用於測定結合物單體之SEC-HPLC；及用於游離類美登素百分比之逆相HPLC或疏水屏蔽相(Hisep)-HPLC。

藉由原位製程製備DM1結合物

亦可根據以下程序藉由原位製程結合抗cKIT抗體。使用4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)連接子使cKIT抗體結合至DM1。在DMA中製備DM1及磺酸基-SMCC異雙官能連接子之儲備溶液。將磺酸基-SMCC與DM1硫醇混合

在一起以在25℃下於含有40% v/v 50 mM丁二酸鹽緩衝液水溶液、2 mM EDTA (pH 5.0)之DMA中反應10分鐘，DM1與連接子之比率為1.3:1莫耳當量且DM1之最終濃度為1.95 mM。接著使抗體與反應物之等分試樣反應以在含2.5 mg/mL Ab之50 mM EPPS (pH 8.0)及10% DMA (v/v)之最終結合條件下得到約6.5:1之SMCC與Ab莫耳當量比。在25℃下約18小時後，使用經10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)平衡之SEPHADEX™ G25管柱純化結合反應混合物。

任一種方法均適用於抗體結合。下表提供cKIT ADC之一個實例。

表7 經DM1結合之抗體之特性

Ab	MAR	單體(%)	產率(%)	游離藥物(%)
9P3	3.6	99		未偵測
NE6024	4	98	70	0.7
NEG026	4	98	71	1.2
NEG027	4	98	68	1.2
NE6Q85	3.5	99	88	0.7
NEG086	3.5	99	83	1.5
NE6087	3.6	99	90	1.1
20376	3.8	99	84	未偵測

使用SPDB連接子製備ADC

在25℃下於含有50 mM NaCl、2 mM EDTA及5% DMA之50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)中用4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB，分別為5.0、5.5及4.9倍莫耳濃度過量)修飾抗cKIT抗體，例如抗體9P3 (8 mg/ml)，持續120分鐘。隨後在25℃下於含有50 mM NaCl、2 mM EDTA及5% DMA之50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)中使未經純化之經修飾Ab結合至DM4 (相對於未結合之連接子1.7倍莫耳濃度過量)，持續18小時，最終經修飾抗體濃度為4 mg/mL。使用經10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)

平衡且溶離之SEPHADEX™ G25管柱純化結合反應混合物。

使用CX1-1連接子製備ADC

將抗cKIT抗體，例如抗體9P3 (5.0 mg/mL)依序與DM1 (相對於抗體量7.15倍莫耳濃度過量)及CX1-1 (相對於抗體量5.5倍過量)混合。在25℃下於含有2 mM EDTA及5% DMA之60 mM EPPS [4-(2-羥乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸]緩衝液(pH 8.5)中進行反應約16小時。接著使用經10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)平衡且溶離之SEPHADEX™ G25管柱純化反應混合物。

比較抗體-MCC-DM1、抗體-SPDB-DM4及抗體-CX1-1-DM1之活體外功效之一個實例展示於圖2中。

實例9：ADC相對於親本抗體之親和力

使用Biacore技術，使用Biacore® T100儀器(GE Healthcare, Pittsburgh, PA)及CM5感測器晶片，使用與上文實例7中所述之方法類似之方法，測定抗體在結合至SMCC-DM1之後對cKIT之親和力。

對於所評估之抗體，經SMCC-DM1結合之抗體相對於親本非結合抗體對於結合至人類cKIT獲得類似親和力估算值，表明結合並不明顯影響抗體結合(表8)。

表8 非結合抗體及經MCC-DM1結合之抗體的親和力

	人類c-Kit ECD (nM)	
	非結合	-MCC-DM1
NEG024	1.3	1.1
NEG085	4.2	5.2
NEG086	1.4	1.8
20376	9.1	11.2

實例10：9P3-MCC-DM1、9P3-SPDB-DM4及9P3-CX1-1-DM1對一組細胞株之活性

在結合至MCC-DM1連接子-有效負載之後，確定抗體藥物結合物(ADC)抑制AML、SCLC、GIST及黑素瘤細胞株增殖之能力。GIST-T1

細胞株由Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan慷慨提供。GIST430及GIST882細胞株由Dr. Jonathan Fletcher, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA真誠提供。

對於小細胞肺癌(SCLC)，使用NCI-H526及NCI-H1048細胞株。NCI-H526為高cKIT表現者且獲自ATCC (CRL-5811, ATCC Manassas, VA)。NCI-H1048表現較低量之cKIT，且亦獲自ATCC (CRL-5853)。CMK-11-5為表現高量cKIT之AML細胞株((JCRB目錄號IFO50430, Japan)，亦參見Nagano等人, Int. J. Hematol. 1992; 56:67-78)。UKE-1亦為AML細胞株且其表現低量cKIT。UKE-1細胞株由Professor Walter Fiedler, University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany慷慨提供。Kasumi 1獲自ATCC (CRL-2724)。Kasumi-6獲自ATCC (CRL-2775)。MDA-MB-453獲自ATCC (HTB-131)。NCI-H889及NCI-H1930細胞株購自ATCC (分別為CRL-5817及CRL-5906)。Hel92.1.7細胞獲自Sigma-Aldrich (目錄號92111706-1VL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。M-07e及SKNO1細胞購自DSMZ，分別為ACC-104及ACC-690 (DSMZ, Braunschweig, DE)。OCI-M1細胞株亦來自DSMZ (ACC-529)。

簡言之，在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下在由供應商推薦之培養基中培養細胞。在分析當天，用PBS (Cellgro, 目錄號21-031-CV)洗滌細胞兩次，隨後用0.1%胰蛋白酶-EDTA (內部技術服務)處理5分鐘，且再懸浮於推薦培養基中。接著將細胞計數，且以2,000-10,000個細胞/孔之密度於100 μl細胞培養基中接種於96孔盤(Costar目錄號3603, Corning, Tewksbury, MA)中。產生重複盤用於第0天量測，且在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育所有盤隔夜。亦產生僅含培養基之孔以充當陰性對照。在此培育之後，將100微升/孔之Cell titer Glo®試劑(Promega目錄號G7573, Madison, WI)添加至第0天盤中，接著將該等盤緩緩震盪2分鐘，培育10分鐘，且使

用Perkin Elmer Wallac Microbeta Trilux®盤讀取器(Perkin Elmer, Waltham, MA)量測所得發光強度。將測試ADC於適當細胞培養基中連續稀釋成3×儲備溶液，且添加50 μl經3×連續稀釋之ADC (最終分析濃度為0.0002-68 nM DM1當量)，隨後在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育5天。在此培育時段之後，經由添加如上文所述之Cell titer Glo®試劑測定相對細胞存活力。使用一式兩份之平均值如下計算ADC對細胞增殖之影響：(抑制% = (經ADC處理-未經處理)/(未經處理-第0天)×100)。將抑制%資料與4參數邏輯斯諦方程(4-parameter logistic equation)擬合且確定GI_{50}值。

如圖1中所示，在增殖分析中對一組GIST (GIST T-1、GIST882、GIST430)、SCLC (NCI-H526、NCI-H1048)及AML (Kasumi-6、Kasumi-1)細胞株測試cKIT ADC。IC50及最大殺死值列於表中。MDA-MB453 (乳癌細胞株)不表現cKIT。IgG-MCC-DM1為同型對照。如圖1所展示，所有cKIT ADC在所使用之七個細胞株中均具有奈莫耳濃度至次奈莫耳濃度之IC50。此指示cKIT ADC具有廣譜指征，且在腫瘤表現適當量之cKIT的任何情況下均可使用。

亦評估經由SPDB-DM4及CX1-1-DM1連接子-有效負載結合之抗cKIT抗體(9P3)的能力，且展示於圖2中。如上文所述而進行之此等研究揭示，使用SPDB-DM4或CX1-1-DM1所評估之抗cKIT ADC亦為細胞增殖之有效抑制劑，表明其成功地傳遞毒素以殺死細胞之能力並不限於MCC-DM1。圖1與圖2均提供在奈莫耳濃度至次奈莫耳濃度範圍內有效之cKIT ADC。

另外，圖3為抗cKIT ADC GI50相對於cKIT受體量之圖及其適應症(AML、GIST、黑素瘤及SCLC)。如圖3中所示，抗cKIT ADC對所有所列適應症均有效。

實例11：cKIT-MCC-DM1 ADC對GIST、SCLC及AML細胞株之活體外

活性

在結合至MCC-DM1連接子-有效負載之後，確定抗體藥物結合物(ADC)抑制AML、SCLC及GIST細胞株增殖之能力。對於由供應商提供之在此等實驗中所用之細胞的清單，參見上文實例10。

簡言之，在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下在由供應商推薦之培養基中培養細胞。在分析當天，用PBS (Cellgro, 目錄號21-031-CV, Corning Tewksbury, MA)洗滌細胞兩次，隨後用0.1%胰蛋白酶-EDTA (內部技術服務)處理5分鐘，且再懸浮於推薦培養基中。接著將細胞計數，且以5,000個細胞/孔(對於AML及SCLC細胞)及10,000個細胞/孔(對於GIST細胞)之密度於100 μl細胞培養基中接種於96孔盤(Costar目錄號3603, Corning, Tewksbury, MA)中。產生重複盤用於第0天量測，且在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育所有盤隔夜。在此培育之後，將100微升/孔之Cell titer Glo®試劑(Promega目錄號G7573, Promega, Madison, WI)添加至第0天盤中，接著將該等盤緩緩震盪2分鐘，培育10分鐘，且使用Perkin Elmer Wallac Microbeta ® Trilux盤讀取器(Perkin Elmer, Waltham, MA)量測所得發光強度。將測試ADC於適當細胞培養基中連續稀釋成3×儲備溶液，且添加50 μl經3×連續稀釋之ADC (最終分析濃度為0.0002-68 nM DM1當量)，隨後在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育5至8天。在此培育時段之後，經由添加如上文所述之Cell titer Glo ®試劑測定相對細胞存活力。使用一式兩份之平均值如下計算ADC對細胞增殖之影響：(最大影響% (A_{MAX}) = (未經處理-經最高ADC濃度處理)×100)。

將抑制%資料與4參數邏輯斯諦方程擬合且確定GI_{50}值。此資料展示於圖4-9中。如該等圖中所示，IgG-MCC-DM1結合物用作對照。所有經測試之ADC均具有大於對照抗體之活性。如圖4-9中之曲線所展示，抗cKIT ADC，例如NEG085、NEG024及20376抗體極有效地減

少細胞增殖，且由此將有效治療GIST、AML及SCLC。

實例12：藉由FACS (螢光活化細胞分選)定量細胞株上之cKIT表面受體密度

Quantum Simply Cellular珠粒(Bangs Laboratories, Inc. 目錄號815, Fishers, IN)用作標準。珠粒標準之抗體結合能力在0至約310,000之範圍內。將珠粒或五十萬個細胞離心，且用100微升/樣品之FACS緩衝液(PBS、0.2% BSA、0.1% NaAz)洗滌兩次。在各洗滌步驟之後，將珠粒或細胞離心且小心地再懸浮。洗滌後，添加FACS緩衝液，且將10 μg/ml APC-小鼠抗人CD117 (BD Pharmigen目錄號550412, BD Biosciences, San Jose, CA)或10 μg/ml APC-小鼠IgG κ同型對照(BD Pharmigen目錄號554681)添加至相應孔中，最終體積為100微升/樣品。

接著將細胞-抗體懸浮液在冰上培育1小時。培育後，將細胞短暫離心，且用100 μl FACS緩衝液洗滌兩次。在各洗滌步驟之後，將珠粒或細胞離心且小心地再懸浮。

藉由再懸浮於100微升/樣品之含7-AAD (BD Pharmigen目錄號559925)之FACS緩衝液中來排除非活細胞。將樣品在冰上培育10分鐘，且在BD FACS Canto II ® (BD Biosciences, San Jose, CA)中進行分析。使用FlowJo ®軟體確定每個樣品之信號的幾何平均值，且如Quantum Simply Cellular手冊中所述確定抗原密度。在TIBCO Spotfire 4.0中進行活體外細胞株對ADC之敏感度及細胞株受體密度之分析。

此受體密度展示於圖3之Y軸上。在此態樣中，受體密度分析適用作初始生物標記物用於患者分層。舉例而言，在圖3中，高受體密度與X軸上所示之抗cKIT ADC GI50之功效相關聯。受體密度分析適用於在臨床配置中確定哪些患者應接受抗cKIT ADC治療劑。

實例13：藉由氘交換質譜法(HDx-MS)分析cKIT對9P3抗體之抗原決定

基定位

氘交換質譜法(HDx-MS)量測蛋白質之醯胺骨架上之氘吸收。此等量測對醯胺之溶劑可達性及骨架醯胺之氫鍵結網狀物之變化敏感。HDx-MS常常用於比較兩種不同狀態之蛋白質，諸如apo及配位體結合，且與胃蛋白酶快速消化相結合。在該等實驗中，吾人可定位通常具有10至15個胺基酸之區域，其在兩種不同狀態之間顯示差異氘吸收。經保護之區域直接涉及於配位體結合中或受抗體與配位體之結合異位影響。

在此等實驗中，在不存在及存在治療劑mAb 9P3之情況下量測cKIT胞外域(SEQ ID NO:160，參見下文)之氘吸收。cKIT中顯示在抗體結合後氘吸收減少之區域可能涉及於抗原決定基中；然而，歸因於量測之性質，亦可能偵測到直接結合位點遠端之變化(異位效應)。通常，具有最大量之保護的區域涉及於直接結合中，不過可能並非始終如此。為描繪自異位效應產生之直接結合事件，正交量測(例如X射線結晶法、丙胺酸突變誘發)為必要的。

表9. cKIT胞外域構築體

SEQ ID NO: 160 長度：503個胺基酸 類型：蛋白質 生物體：人類
QPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEAT NTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQG KPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVS KASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSA RVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKP EHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFN VYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPF GKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKEQIHPHTLFTPRSHHHHHH

在Waters Synapt ® G2 HDx-MS平台上進行cKIT抗原決定基定位實驗，該平台包括LEAP ®機器人系統、nanoACQUITY® UPLC系統及Synapt ® G2質譜儀。在此方法中，如下進行一式三份對照實驗。將300 pmol (1.4 mg/ml) cKIT抗原稀釋至110 μl 95%氘化PBS緩衝液

(pH 7.4)中，且在室溫下於台式旋轉器(bench rotator)上培育25分鐘(%D = 85.5%)。藉由在冰上用冷淬滅緩衝液(6 M脲及1 M TCEP pH = 2.5)以1:1稀釋來淬滅氘交換，持續5分鐘。淬滅後，將管轉移至LEAP系統(熱箱設定為2℃)上，且由LEAP系統將經淬滅之樣品注射至UPLC系統上以供分析。UPLC系統併有經固定之胃蛋白酶管柱2.1 mm × 30 mm (Life Technologies 2-3131-00)，該管柱維持於12℃下。8分鐘2%至35%乙腈梯度及Waters UPLC CSH C18 1.0 × 100 mm管柱用於分離。接著，使用抗體進行一式三份實驗。使用標準技術將300 pmol 9P3抗體固定於蛋白質G瓊脂糖珠粒(Thermo Scientific目錄號22851)上。簡言之，將抗體離心以移除儲存緩衝液。接著將200 μl PBS緩衝液(pH 7.4)及300 pmol cKIT添加至經固定之Ab中，且在室溫下培育30分鐘。培育後，將複合物離心，且用200 μl PBS緩衝液洗滌，且再次離心。對於氘交換，將200 μl氘化PBS添加至抗原-抗體複合物中以用於在室溫下培育25分鐘(%D = 85.5%)。接著移除氘緩衝液，且即刻添加125 μl冰冷淬滅緩衝液。淬滅5分鐘後，將管柱離心，且將流過液(flow-through)轉移至預冷卻之HPLC小瓶中。使用相同線上胃蛋白酶消化/LC-MS配置作為對照實驗來分析樣品。

此等量測之結果概述於圖10及圖11中。圖10展示對照與經9P3抗體結合之樣品之間的經基線校正之差異除以量測中之標準誤差。在此圖中，較大負值指示在9P3抗體結合至cKIT抗原後在既定區域中較大量之保護。9P3結合至cKIT後，吾人在cKIT之以下兩個區域中觀測到最大量之保護：VFVRDPAKLFL (區域1，109-119 (SEQ ID NO. 161))及HCSVDQEGKSVL (區域2，185-196 (SEQ ID NO.162))。區域1包含殘基109-119且為D1及D2結構域之一部分。區域2包含殘基185-196且為D2結構域之一部分。在圖11中，吾人已將兩個最受保護之區域(參見圖10)定位至cKIT胞外域(PDB ID 2e9w)之晶體結構上。另外，吾人

亦已使用文獻值將cKIT上之SCF結合位點標記為位點I、II及III (Yuzawa等人, Cell 2007;130: 323-334)。圖11中存在兩個關鍵發現。第一，區域1及2在晶體結構中極為接近，即使其在初級序列空間中相隔較遠。此觀測結果表明，兩者可潛在地為抗原決定基之一部分，且若如此，則9P3之抗原決定基為不連續的。第二，區域1及2在文獻中所報導之SCF結合位點遠端。此為重要的觀測結果，因為其表明9P3抗體不會直接干擾配位體結合。替代地，抗體可能空間上干擾配位體結合及/或在配位體結合後干擾受體二聚。在各別競爭分析中，使用ELISA及FACS，吾人觀測到9P3部分阻斷SCF結合至cKIT，因此似乎存在部分空間干擾。總之，HDx-MS資料指示9P3抗體之抗原決定基由SCF結合位點遠端之不連續抗原決定基組成。預期NEG024、NEG085、NEG086、NEG027及NEG087具有相同作用機制。

實例14：使用cKIT野生型細胞株Mo7e及cKIT突變型細胞株GIST T-1評估cKIT ADC充當促效劑之能力

為評估cKIT ADC之潛在促效特性，將2 × 10^6個GIST T-1 (由Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan真誠提供)或Mo7e (DSMZ, ACC-104)細胞在37℃下於5% CO_2下(對於GIST T-1之DMEM及對於Mo7e之RPMI，補充有0.1% FBS)在6孔盤(NUNC目錄號14067)中血清饑餓隔夜。在37℃下，用10 ng/ml rh-SCF (R&D, 目錄號255-SC, R&D, Berkeley, CA)、5 μg/ml NEG085-MCC-DM1、NEG024-MCC-DM1及20376-MCC-DM1處理細胞15分鐘。一個孔指定為未經處理(UT)。將細胞收集於1 ml PBS中。將細胞集結粒在冰上於30 μl溶解緩衝液中溶解60分鐘：該溶解緩衝液為：20 mM Tris-HCl；pH 7.5，137 mM NaCl，1% Triton X-100，15%甘油，蛋白酶及磷酸酶抑制劑。接著在4℃下將溶解產物以12,000 rpm短暫離心40分鐘。在75℃下將20 μg各樣品煮沸10分鐘，且加載於12孔NuPAGE® 4-12% Bis-Tris凝膠(Life

Technologies, NP0322BOX, Carlsbad, CA)上。在蛋白質轉移至膜墨點之後，在室溫下於TBST-5%牛乳中將膜阻斷1小時，接著在4℃下用初級抗體探測隔夜。次日，於TBST中洗滌墨點(4 × 5分鐘)。在室溫下將墨點於二級抗體(山羊抗兔HRP 1:30,000；Santa Cruz)中培育1小時。於TBST中洗滌墨點(4 × 5分鐘)且顯色。

用於西方墨點分析之初級抗體為α-cKIT Tyr703 (Cell Signaling Technology目錄號3073, Beverly, MA)、α-cKIT Tyr721 (NOVUS, 目錄號NBP1-51412, Novus, Littleton, CO)、AKT Ser473 (Cell Signaling Technology目錄號9271)、AKT (Cell Signaling Technology目錄號4691)、ERK Thr202/Tyr204 (Cell Signaling Technology目錄號9101)、ERK (Cell Signaling Technology目錄號9102)及GAPDH (Cell Signaling Technology目錄號3683)。

如圖12中所示，cKIT抗體NEG085、NEG024及20376可在不存在配位體(SCF)之情況下介導cKIT之磷酸化。然而，下游信號傳導路徑不受影響，因為信號不會轉導至磷酸基ERK或磷AKT。

實例15：如藉由流動式細胞測量術測定cKIT Ab介導之GIST-T1細胞上之表面cKIT內化

使用溫度轉變法及流動式細胞測量術讀出，藉由在細胞單層中用抗體處理來評估cKIT抗體介導之內化的動力學。將GIST-T1 (由Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan真誠提供)細胞以2.5 × 10E5個細胞/孔接種於五個12孔組織培養物處理之盤(BD Falcon 353043)中。在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育細胞隔夜。次日，移除培養基且用450 μl新鮮培養基替換。在適當細胞培養基中以10× 10 μg/ml濃度製備cKIT抗體NEG085、20376及同型對照，且每孔添加50 μl測試cKIT抗體或同型，最終濃度為10 μg/ml。在冰上培育所有細胞1小時，繼而用1 mL 1×磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌兩次，且再懸浮於

500 μl細胞培養基中。將2-5號盤轉變至37℃且在37℃下於5% CO_2下在以下時間點收集：30分鐘、2小時、4小時及24小時。將100 μl細胞解離緩衝液(Gibco目錄號13150-016, Life Technologies, Carlsbad, CA)添加至1號盤中(4℃結合對照)，且在37℃下培育直至細胞脫離。用100 μl培養基中和細胞，且將其轉移至96孔V底組織培養物處理之盤(Costar 3894)中。將細胞離心，且用FACS緩衝液(1×磷酸鹽緩衝鹽水、2%胎牛血清、0.1%疊氮化鈉)洗滌兩次。在FACS緩衝液中以1比100之比率製備經藻紅素結合之山羊抗人IgG二級Ab (Invitrogen H10104, Life Technologies, Carlsbad, CA)。將二級抗體以100微升/孔添加至細胞中，且在冰上與細胞一起培育45分鐘。在培育時段結束時，將細胞離心，且用FACS緩衝液洗滌三次。用100微升/孔之1%多聚甲醛固定細胞，且在4℃下於黑暗中儲存。對在37℃下培育多個時間點之細胞重複細胞解離、二級抗體培育及固定步驟。次日，使用BD FACSCanto II ®設備，使用HTS系統(BD Biosciences, San Jose, CA)分析所有樣品。用FlowJo軟體分析樣品以獲得對於藻紅素通道之螢光的幾何平均值。圖13A為初始細胞表面結合%相對於幾何平均值-PE (4℃結合)/幾何平均值-PE (在37℃下之時間點)×100之圖。如圖13A中所展示，兩種抗體NEG085與20376均結合細胞表面上之cKIT，且快速內化至細胞中。此指示所揭示之cKIT ADC將快速內化，由此有效地將毒素傳遞至細胞中。

在另一內化實驗中，對人類骨髓細胞評估NEG085對cKit受體量之影響。將正常人類CD34+骨髓細胞(All Cells, 目錄號ABM022F, Emeryville, CA)解凍，且用10 mL StemPro®-34 SFM培養基(Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA)洗滌。使細胞以4×10^5個細胞/毫升再懸浮於1.25 mL StemPro-34 SFM培養基中且平分至兩個管中。一個管未經處理，且另一個管經10 μg/ml NEG085處理，且兩者均在37℃、

5% CO_2下培育。在各時間點(0、15、30、60、120及240分鐘)自各條件收集100 μL細胞懸浮液，且將其置於冰冷收集管中以停止內化。用3 mL冰冷FBS染色緩衝液洗滌細胞，且再懸浮於100 μL FBS染色緩衝液中。將5 mL 104D2-BV421 (小鼠抗人IgG1 k, Biolegend)添加至各管中，且在冰上培育1小時。用FBS染色緩衝液再洗滌之後，藉由流動式細胞測量術，藉由在FACS Canto II® (BD Biosciences, San Jose, CA)上評估BV421之平均螢光強度來量測總cKit受體。

如圖13B中所示，cKIT在結合NEG085後快速內化，大部分內化快速發生(15分鐘)，接著繼續發生以使表面上之cKIT量穩步下降直至4小時之終點。

實例16：在野生型cKIT細胞株(NCI-H526)或突變型cKIT細胞株(GIST-T1)中評估NEG085-MCC-DM1調節cKIT降解之能力

在37℃下於5% CO_2下，在前一夜將5 × 10^6個GIST-T1 (由Dr. Takahiro Taguchi, Kochi U., Japan真誠提供)或NCI-H526 (ATCC CRL-5811)細胞接種於生長培養基(對於GIST T-1之DMEM、10% FBS，及對於NCI-H526之RPMI、10% FBS)中。接著用含100 mM環己醯亞胺(CHX) (目錄號090M4009, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO)之無甲硫胺酸培養基(GIBCO：DMEM，21013-024；RPMI，A14517-01；Life Technologies, Carlsbad, CA)處理細胞。在37℃下於5% CO_2下，用5 μg/ml ADC (NEG085-MCC-DM1)、10 ng/ml rh-SCF (R&D, 255-SC)或ADC與rh-SCF處理細胞1、4或6小時。在處理後1小時、4小時及6小時將細胞收集於1 ml PBS中。將細胞集結粒在冰上於50 μl溶解緩衝液(20 mM Tris-HCl；pH 7.5，137 mM NaCl，1% Triton X-100，15%甘油，蛋白酶及磷酸酶抑制劑)中溶解60分鐘。接著在4℃下將溶解產物以12,000 rpm短暫離心40分鐘。在75℃下將5 μg各樣品煮沸10分鐘，且加載於15孔NuPAGE® 4-12% Bis-Tris凝膠(NP0323BOX Life

Technologies, Carlsbad, CA)上。在蛋白質轉移至膜墨點之後，在室溫下於TBST-5%牛乳中將膜阻斷1小時，接著在4℃下用抗cKIT抗體(Cell Signaling Technology目錄號3074, Beverly, MA)探測隔夜。次日，於TBST中洗滌墨點(4 × 5分鐘)。在室溫下將墨點於二級抗體(山羊抗兔HRP 1:30,000；Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX)中培育1小時。於TBST中洗滌墨點(4 × 5分鐘)且顯色。用於西方墨點分析之初級抗體為抗cKIT (Cell Signaling Technology目錄號3074)及GAPDH (Cell Signaling Technology目錄號3683)。圖14 A/B展示由NEG085-MCC-DM1介導之cKIT受體降解之時程。降解為快速的，6小時之後量變得極低/不可偵測。應注意，cKIT受體之降解在表現突變型cKIT受體之GIST T1細胞中相比SCF與NEG085-MCC-DM1較快發生(圖14A)。又，NEG085-MCC-DM1不會阻斷cKIT受體結合SCF，因為添加NEG085-MCC-DM1及SCF提供較快降解，如圖14B中所見。若NEG085-MCC-DM1為配位體阻斷劑，則在NEG085-MCC-DM1與NEG085-MCC-DM1及SCF之間將不存在差異。

實例17：非結合NEG085及20376不會抑制SCF依賴性細胞株Mo7e之增殖

為評估裸抗體之潛在拮抗特性及抗體藥物結合物(ADC)抑制cKIT表現細胞株增殖之能力，使MO7e (DSMZ, 目錄號ACC-104, Braunschweig, DE)在存在或不存在cKIT配位體幹細胞因子(SCF)之情況下生長，以供存活。使MO7e細胞於10 ng/ml人類顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子GM-CSF (R&D Systems目錄號215-GM, Minneapolis, MN)或10 ng/ml人類幹細胞因子SCF (R&D Systems目錄號255-SC)中生長，隨後以5000個細胞/孔於100 μl稀釋培養基中接種於96孔盤(Costar目錄號3904, Corning, Tewksbury, MA)中。產生重複盤用於第0天量測，且在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育所有盤隔

夜。在此培育之後，再添加50 μl稀釋培養基，繼而添加90微升/孔之Cell titer Glo ®試劑(Promega目錄號G7573, Madison, WI)至指定「第0天」盤之各孔中。將分析盤緩緩震盪20分鐘，且使用Perkin Elmer 1450 Microbeta TriLux ®盤讀取器(Perkin Elmer, Waltham, MA)量測所得發光強度。以3×濃度製備測試裸Ab及ADC；於適當細胞培養基中30 μg/ml，且進行8個點之5倍連續稀釋。亦產生僅含培養基之孔以充當陰性對照。添加50 μl經3×連續稀釋之抗體或ADC (最終分析濃度為0.0009-68 nM)，隨後在組織培養物培育箱中在37℃下於5% CO_2下培育5天。在此培育時段之後，經由添加如上文所述之Cell titer Glo試劑測定相對細胞存活力。使用一式兩份之平均值如下計算ADC對細胞增殖之影響：(抑制% = (經ADC或Ab處理)/(未經處理)×100)。將抑制%資料與4參數邏輯斯諦方程擬合且確定GI_{50}值。

如圖15及圖16中所示，裸抗cKIT抗體不會抑制細胞增殖。在圖15中，將NEG085-MCC-DM1與非結合NEG085、NEG024及20376相比較。如圖中清楚展示，NEG085-MCC-DM1在低濃度下抑制M07e細胞之細胞增殖，而非結合抗體不具有此作用。IgG-MCC-DM1對照相比非結合NEG085、NEG024或20376具有較大抗增殖作用。

此情況在圖16中亦可見，其中實驗使用GM-CSF而非SCF以消除SCF配位體對cKIT受體所具有之內化作用。圖16中之結果與圖15一致，其中非結合NEG085抗體對細胞增殖並無有害作用，類似於非結合IgG對照。總之，圖15及16所示之結果指示，細胞增殖減少係歸因於抗cKIT抗體與毒素之結合。

實例18：評估活體外ADCC活性

相對於與NK3.3細胞(殺死細胞或效應細胞；由Jacky Kornbluth自Saint Louis University真誠提供)共培育之Uke-1細胞(靶細胞；由Professor Walter Fiedler, University Hospital Eppendorf, Hamburg,

Germany慷慨提供)來測定非結合抗cKIT抗體(NEG085, 20376)介導抗體依賴性細胞毒性之能力。簡言之，將Uke-1細胞用鈣黃綠素(Calcein)乙醯氧基-甲酯(鈣黃綠素-AM；Sigma-Aldrich目錄號17783-5MG, St. Louis, MO)染色，洗滌兩次，以每孔5000個細胞之濃度吸移至96孔微量滴定盤(96孔、U底、透明塑膠；Corning Costar, 目錄號650 160, Tewksbury, MA)中，且與上述抗體及蛋白質之連續稀釋液(自50,000至0.003 μg/ml)一起預培育10分鐘，隨後添加NK3.3效應細胞1小時，效應細胞與靶細胞比為20比1。為計算靶細胞之抗體特異性溶解，平行培育無抗體之僅靶細胞或效應細胞用作基線及陰性對照，而藉由用1% Triton-X 100溶液溶解僅靶細胞來確定陽性對照或最大溶解或100%特異性溶解。作為另一陽性對照，使用MabCampath® (Sanofi, Paris, FR)，其識別Uke-1細胞上之CD52。在共培育靶細胞與效應細胞之後，將微量滴定盤離心，且將上清液流體之等分試樣轉移至另一微量滴定盤(96孔、平底、黑色及透明底；Corning Costar, 目錄號3904, Tewksbury, MA)中，且用螢光計數器(Victor 3 ®多標記計數器, Perkin Elmer, Waltham, MA)測定溶液中游離鈣黃綠素之濃度。

結果呈現於圖17中。抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)為細胞介導之免疫性之機制，藉此效應細胞溶解已由特異性抗體結合之靶細胞。在此實驗中，MabCampath®以及抗cKIT抗體20376及NEG085為非結合人類IgG1抗體。如圖17中所示，僅MabCampath抗體介導靶細胞之ADCC殺死。20376與NEG085甚至在較高濃度下均不能誘導ADCC。因而，當使用ADC之一，例如NEG085-MCC-DM1時所見之任何細胞殺死並非歸因於ADCC作用機制。

實例19：使用初級人類肥大細胞研究NEG085及20376引起肥大細胞凋亡之能力

根據Saito等人, Nature Protocols 2006;1(4):2178-2183所述之方法

培養來自周邊人類血液之初級人類肥大細胞。在37℃下於1.6 nM rhSCF (Genscript, 目錄號Z00400, Piscataway, NJ)存在下將已於液體培養物中維持最少一週之肥大細胞與漸增濃度(0.05 - 100 nM)之抗人cKIT Ab NEG085及20376或同型對照IgG一起培育48小時，隨後添加Caspase-Glo® 3/7試劑(Promega, 目錄號G8093, Madison, WI)以量測細胞凋亡。在室溫下培育30分鐘後，在BioTek® Synergy盤讀取器(BioTek, Winooski, VT)上記錄發光。

由於cKIT表現於肥大細胞上，故任何治療性抗cKIT抗體不應引起肥大細胞耗盡。圖18展示在1.6 nM rhSCF存在下用抗人cKIT Ab或同型對照Ab處理後使用初級人類肥大細胞之細胞凋亡分析。將初級人類肥大細胞與漸增濃度之抗cKIT抗體NEG085及20376或同型對照IgG一起培育。如圖18中所見，NEG085與20376非結合抗體均不引起離體人類初級肥大細胞凋亡。

實例20：使用初級人類肥大細胞確定NEG085及20376介導肥大細胞脫粒之能力

根據Saito等人(同上)所述之方法培養來自周邊人類血液之初級人類肥大細胞。在37℃下將已於液體培養物中維持最少一週之肥大細胞用5% Ag特異性IgE JW8 (內部批次ACE 27283)、95%非特異性單株人類IgE (Abbiotec, 目錄號12030635, San Deigo, CA)及10 ng/mL rhIL-4 (R&D Systems目錄號204-IL, Minneapolis, MN)預處理5天。接著在37℃下於山羊抗人IgG (H+L) Fc特異性Ab (Jackson ImmunoResearch, 目錄號109-005-008-JIR, West Grove, PA)存在下將細胞與漸增濃度(0.05 - 100 nM)之同型對照IgG、抗人cKIT Ab 20376及NEG085、抗IgE Ab LE27或NIP(5)BSA抗原一起培育90分鐘。接著將細胞離心，且將上清液轉移至96孔黑壁盤中，隨後添加β-己醣胺酶受質。在37℃下培育90分鐘後，藉由添加tris鹼(Sigma, 目錄號T1503-500G, pH 12, St.

Louis, MO)終止反應，且在Envision®盤讀取器上記錄螢光強度。

如同實例19中之先前實驗，重要的是評估抗cKIT抗體對肥大細胞之任何有害作用。先前實驗檢查肥大細胞凋亡，此處之實驗係針對肥大細胞脫粒。如圖19中所示，陽性對照NIP(5)及LE27顯示高程度之肥大細胞脫粒。相比之下，抗cKIT抗體NEG085及20376不誘導離體人類初級肥大細胞之肥大細胞脫粒。

實例21：由cKIT ADC活體內調節中靶藥效學標記物

進行研究以評估cKIT ADC NEG027-MCC-DM1活體內調節藥效學標記物之能力，包括檢查NEG027抗體對表現突變型cKIT之GIST T1腫瘤異種移植物中有絲分裂停滯之藥效學(PD)事件的共定位。此等研究之目標在於評估G2/M細胞週期停滯之程度及持續時間。

藉由使用免疫組織化學方法偵測腫瘤中之人類IgG抗體(其在小鼠中為NEG027)間接估計ADC之存在。經親和純化之兔抗人IgG (H+L)獲自Jackson ImmunoResearch Laboratories (目錄號309-005-082, West Grove, PA)。抗體與全分子人類IgG及其他人類免疫球蛋白之輕鏈反應，而與小鼠血清蛋白具有最小交叉反應。簡言之，IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑(Ventana, Tucson, AZ)。將初級抗體稀釋至2 μg/ml之工作濃度，且在室溫下培育32分鐘。隨後，與Ventana UltraMap預稀釋之HRP結合抗兔抗體(目錄號760-4315, Ventana, Tucson, AZ)一起培育32分鐘。

如由免疫組織化學評估之pHH3陽性核積聚用作G2/M停滯之標記物。藉由用對應於圍繞人類組蛋白H3 (pHH3)之Ser10之殘基的合成磷酸肽使動物免疫而產生之兔多株抗體獲自Cell Signaling Technology (Danvers, MA, 目錄號9701)。簡言之，IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑。將初級抗體以1:50稀釋，且在室溫下培育60分鐘。隨後，與Jackson ImmunoResearch

Laboratories山羊抗兔經生物素標記之二級抗體(目錄號111-065-144, West Grove, PA)一起培育32分鐘。

為評估GIST T1皮下腫瘤異種移植模型中抗cKIT ADC誘導之PD標記物變化，將10 × 10^6個細胞於含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液(Hank's balanced salt solution)之懸浮液中皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。將小鼠隨機分配以在腫瘤達到300至500 mm^3時即接受單次靜脈內劑量之NEG027-MCC-DM1 (2.5 mg/kg)、非特異性IgG1-MCC-DM1同型對照(2.5 mg/kg)或tris緩衝鹽水(TBS；5 ml/kg) (n = 3隻/組)。人類IgG之免疫染色顯示NEG027定位之處且此與pHH3免疫染色之較大密度之區域(圖20中所示之代表性影像)相關聯，從而對具有藥效學作用之抗體之共定位提供支持。與類美登素有效負載之預期作用機制一致，NEG027-MCC-DM1使得對pHH3陽性呈陽性之細胞百分比顯著時間依賴性增加，pHH3陽性相對於非特異性同型IgG1-MCC-DM1或經PBS處理之對照在給藥後33及48小時達峰值，在約一週時信號返回至基線(圖21中所示之代表性影像，圖22中所示之圖)。亦評估經裂解之卡斯蛋白酶3之時間依賴性變化。在此等研究中，藉由用對應於人類卡斯蛋白酶-3中與(Asp175)相鄰之胺基端殘基的合成肽使動物免疫而產生之兔多株抗體獲自EMD Millipore (目錄號PC679)。IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑。將初級抗體稀釋至20 μg/ml，且在室溫下培育32分鐘。隨後，與Jackson ImmunoResearch Laboratories山羊抗兔經生物素標記之二級抗體(目錄號111-065-144, West Grove, PA)一起培育32分鐘。

類似於pHH3，亦觀測經裂解之卡斯蛋白酶3之時間依賴性變化(圖21中所示之代表性影像，圖22中所示之圖)。此等資料展示，cKIT ADC NEG027-MCC-DM1能夠引發穩固的活體內細胞PD效應，與類美

登素有效負載之作用機制一致。

展示GIST T1腫瘤上之cKIT免疫染色之代表性照片以觀測此異種移植模型中之染色模式(圖21)。藉由用對應於cKIT之細胞質c端部分之胺基酸963至976的合成肽使動物免疫而產生之兔多株抗體獲自Dako (目錄號A4502)。簡言之，IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑。將初級抗體稀釋至14 μg/ml之工作濃度，且在室溫下培育60分鐘。隨後，與Ventana UltraMap預稀釋之HRP結合抗兔抗體(目錄號760-4315)一起培育16分鐘。

實例22：抗cKIT ADC針對小鼠之胃腸基質腫瘤(GIST)之活體內功效

在若干腫瘤異種移植模型中評估抗cKIT ADC之抗腫瘤活性。在表現突變型cKIT之GIST T1皮下腫瘤異種移植模型中評估非小鼠cKIT交叉反應性抗人cKIT ADC NEG027-MCC-DM1之劑量依賴性抗腫瘤活性及藥物動力學(PK)。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之10 × 10^6個細胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。

在植入後10天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為207 mm^3。在隨機分配至五個組之一(n = 9隻/組)中之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之ADC媒劑TBS (5 ml/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (2.5 mg/kg)或NEG027-MCC-DM1 (0.625、1.25或2.5 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次。對照IgG1-MCC-DM1在2.5 mg/kg下不具顯著活性。NEG027-MCC-DM1在0.625 mg/kg下與經TBS處理之組相比顯示統計上顯著之功效，然而，在1.25及2.5 mg/kg下誘導甚至更高之功效，兩者均誘導類似之腫瘤體積停滯(按照測徑規量測)，不過組織學評估並未顯示腫瘤細胞之存在。替代地，結締組織、脂肪組織及周邊神經與橫紋肌之區段的混合物為此等切片中之主要組織組分。此支持腫瘤之組織學消退(圖23-26)。

自此研究，在給藥後1小時、24小時及4天、7天、11天及21天亦收集血清以分別使用抗人IgG1 ELISA及抗DM ELISA隨時間量測抗體/ADC濃度。為評估PK參數，經由後眼眶放血收集血清且經由ELISA進行分析。總抗體PK分析藉由比色ELISA量測存在/不存在DM1之情況下的總抗體濃度。用抗人IgG (Fc特異性)塗盤，且用抗人IgG-HRP偵測，隨後在適當盤讀取器上讀數。結合物PK分析藉由比色ELISA量測結合至至少一(1)個DM1分子之抗體。在此格局中，用抗美登素抗體塗盤，且用抗人IgG-HRP偵測。PK與七天之近似血清半衰期成劑量比例(圖23-24)。

由於單次0.625 mg/kg劑量之NEG027-MCC-DM1僅引起GIST T1腫瘤生長延遲，由此提供動態範圍以評估不同ADC活性，故選擇此劑量以評估一組密切相關之ADC的功效，該等ADC亦來源於原始鼠類9P3-MCC-DM1 ADC。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA)之漢克氏平衡鹽溶液之10 × 10^6個細胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。在植入後10天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為195 mm^3。在隨機分組(n = 8隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (8 ml/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (10 mg/kg)、NEG085-MCC-DM1 (0.625 mg/kg)、NEG086-MCC-DM1 (0.625 mg/kg)、NEG087-MCC-DM1 (0.625 mg/kg)、NEG024-MCC-DM1 (0.625 mg/kg)或NEG026-MCC-DM1 (0.625 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖27-29)。對照IgG1-MCC-DM1甚至在10 mg/kg之高劑量下仍無活性。以0.625 mg/kg給藥之抗cKIT ADC彼此在統計上並無差異。經NEG085-MCC-DM1及NEG024-MCC-DM1處理之組具有在最狹小範圍內之最小腫瘤體積。

自此研究，在給藥後1小時、24小時及3天、7天、10天、14天及21天亦收集血清以分別使用抗人IgG1 ELISA及抗DM ELISA隨時間量

測抗體/ADC濃度。為評估PK參數，經由後眼眶放血收集血清且經由ELISA進行分析。總抗體PK分析藉由比色ELISA量測存在/不存在DM1之情況下的總抗體濃度。用抗人IgG (Fc特異性)塗盤，且用抗人IgG-HRP偵測，隨後在適當盤讀取器上讀數。結合物PK分析藉由比色ELISA量測結合至至少一(1)個DM1分子之抗體。在此格局中，用抗美登素抗體塗盤，且用抗人IgG-HRP偵測。此等ADC顯示類似之血清暴露(圖30)。

實例23：抗cKIT ADC針對小鼠之小細胞肺癌之活體內功效

在具有適度cKIT免疫染色之NCI-H1048小細胞肺癌異種移植模型中評估一組ADC之抗腫瘤活性，該模型與GIST T1腫瘤異種移植物相比展現較大異質性(圖21-圖30)。將NEG085-MCC-DM1與作為cKIT信號傳導之強拮抗劑的一組cKIT ADC相比較，該等cKIT ADC中無一者結合至小鼠cKIT。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之10 × 10^6個細胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。在植入後15天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約120 mm^3。所有經處理之組均接受2 mg/kg之單次靜脈內劑量。在隨機分組(n = 8隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (5 ml/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (2 mg/kg)、NEG024-MCC-DM1、NEG085-MCC-DM1及NEG086-MCC-DM1。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖31、32)。對照IgG1-MCC-DM1無活性。NEG085-MCC-DM1在9%之低ΔT/ΔC下趨向於具有功效，但在此2 mg/kg劑量下與媒劑在統計上並無差異。NEG024-MCC-DM1及NEG026-MCC-DM1顯著有效。

cKIT ADC之抗腫瘤功效亦為NCI-H1048小細胞肺癌異種移植模型，評估NEG085-MCC-DM1之劑量依賴性抗腫瘤活性。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之10 × 10^6個細

胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。在植入後11天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約150-200 mm^3。在隨機分組(n = 8隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (5 ml/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (10 mg/kg)或NEG085-MCC-DM1 (2.5、5及10 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖33、34)。對照IgG1-MCC-DM1無活性，2.5 mg/kg劑量之NEG085-MCC-DM1亦如此。然而，5及10 mg/kg劑量顯著有效。

在具有較高cKIT含量之第二小細胞肺癌異種移植模型中評估兩種抗cKIT ADC之抗腫瘤活性，該模型類似於GIST T1腫瘤異種移植物(圖21中之代表性照片及圖35中之圖)。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之6 × 10^6個細胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。在植入後6天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約150 mm^3。在隨機分組(n = 9隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (8 ml/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (10 mg/kg)、NEG024-MCC-DM1 (2.5、5及10 mg/kg)及小鼠交叉反應性ADC 20376-MCC-DM1 (10 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖35及圖36)。對照IgG1-MCC-DM1無活性。20376-MCC-DM1在10 mg/kg下使腫瘤初始消退，然而，在初始消退之後，可見腫瘤復發。在NEG024-MCC-DM1之三種劑量下觀測到顯著劑量依賴性功效，在10 mg/kg下持續長期消退，且腫瘤在60天後開始再生，表明20376-MCC-DM1可能需要大於在此研究中投與之單次劑量。20376-MCC-DM1及NEG024-MCC-DM1之10 mg/kg劑量之血清暴露為大約相當的。

實例24：抗cKIT ADC針對小鼠之急性骨髓性白血病之活體內功效

在表現突變型cKIT之急性骨髓性白血病Kasumi-1皮下腫瘤異種移植模型中評估抗cKIT ADC鼠類9P3-MCC-DM1及9P3-SPDB-DM4之

劑量依賴性抗腫瘤活性。用Matrigel™ (BD Biosciences)向雌性SCID灰棕色小鼠之右腋皮下移植2-3片1 mm^3片段化Kasumi-1腫瘤組織。在植入後21天將具有Kasumi-1腫瘤之小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為150 mm^3。在隨機分配至八個組之一(n = 8隻/組)中之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之PBS (200 μl)、非特異性同型對照IgG1-SPDB-DM4 (10 mg/kg)、9P3-MCC-DM1 (10 mg/kg)及9P3-SPDB-DM4 (1或5 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重三次(圖37)。對照IgG1-SPDB-DM4在10 mg/kg下無顯著活性。使用5 mg/kg及10 mg/kg劑量之9P3-SPDB-DM4觀測到腫瘤生長消退。

表10. Kasumi-1功效

藥物	劑量	時程	腫瘤反應	宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(ΔT/ΔC) (%)	體重損失百分比(%)	存活(存活數/總數)
PBS	**0 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**100**	**6.36**	**8/8**
IgG-SPDB-DM4	**10 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**98**	**3.06**	**8/8**
9P3-MCC-DM1	**10 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**11**	**-0.62**	**8/8**
9P3-SPDB-DM4	**1 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**65**	**-0.05**	**8/8**
9P3-SPDB-DM4	**5 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**-83**	**-1.72**	**8/8**

實例25：抗cKIT ADC針對小鼠之肥大細胞增多症之活體內功效

在表現突變型cKIT之HMC-1.2皮下腫瘤異種移植模型中評估抗cKIT ADC鼠類9P3-MCC-DM1及9P3-SPDB-DM4之抗腫瘤活性。HMC-1.2細胞株由Dr. Joseph Butterfield, Mayo Clinic, Rochester, MN真誠提供。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之無FBS DMEM培養基之3、5及10 × 10^6個細胞皮下植入雌性Foxn-1裸小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為100 μl。

在植入後33天將帶有HMC-1.2腫瘤之小鼠錄入此研究中，平均腫瘤體積為100 mm^3。在隨機分配至三個組之一(n = 4隻/組)中之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之PBS (200 μl)、9P3-MCC-DM1 (10 mg/kg)

或9P3-SPDB-DM4 (10 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重三次(圖38)。在10 mg/kg之9P3-SPDB-DM4及9P3-MCC-DM1下觀測到腫瘤消退。

表11. HMC-1研究

藥物	劑量	時程	腫瘤反應	宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(ΔT/ΔC) (%)	體重損失百分比(%)	存活(存活數/總數)
PBS	**0 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**100**	**13.49**	**4/4**
9P3-MCC-DM1	**10 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**6**	**7.71**	**4/4**
9P3-SPDB-DM4	**10 mg/kg**	**單次靜脈內給藥**	**-40**	**3.25**	**4/4**

實例26：小鼠交叉反應性cKIT ADC20376-MCC-DM1之活體內功效

在表現突變型cKIT之GIST T1皮下腫瘤異種移植模型中評估小鼠cKIT交叉反應性抗人cKIT ADC 20376-MCC-DM1之劑量依賴性抗腫瘤活性及藥物動力學(PK)。在植入後10天將雌性SCID灰棕色小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約200 mm^3。在隨機分配至五個組之一(n = 9隻/組)中之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (5 ml/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (10 mg/kg)、NEG085-MCC-DM1 (0.625 mg/kg)或20376-MCC-DM1 (0.625、2.5、5或10 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖39-41)。對照IgG1-MCC-DM1在10 mg/kg下無顯著活性。203786-MCC-DM1亦無效，而NEG085-MCC-DM1在0.625 mg/kg下顯示低功效，不過亦在統計上不顯著。20376-MCC-DM1在2.5、5及10 mg/kg下全部顯著有效。

自此研究，在給藥後1小時、24小時及4天、7天、11天及21天亦收集血清以分別使用抗人IgG1 ELISA及抗DM ELISA隨時間量測抗體/ADC濃度。為評估PK參數，經由後眼眶放血收集血清且經由ELISA進行分析。總抗體PK分析藉由比色ELISA量測存在/不存在DM1之情況下的總抗體濃度。用抗人IgG (Fc特異性)塗盤，且用抗人IgG-HRP

偵測，隨後在適當盤讀取器上讀數。結合物PK分析藉由比色ELISA量測結合至至少1個DM1分子之抗體。在此格局中，用抗美登素抗體塗盤，且用抗人IgG-HRP偵測。使用小鼠cKIT交叉反應性ADC 20376-MCC-DM1，PK由於ADC結合小鼠cKIT在正常組織中影響暴露(組織介導之藥物處置)而不成劑量比例，且因此20376-MCC-DM1與非小鼠cKIT交叉反應性ADC NEG085-MCC-DM1之間的血清濃度存在明顯差異(圖40)。此說明在0.625 mg/kg之低劑量下兩種ADC之間的功效差異。在較高劑量下，組織介導之藥物處置效應較不顯著，且功效在小鼠之GIST T1腫瘤異種移植模型中變得明顯。

實例28：具有SPDB-DM4連接子/有效負載之cKIT ADC針對胃腸基質腫瘤之活體內功效

在表現突變型cKIT之GIST T1皮下腫瘤異種移植模型中比較具有MCC-DM1 (不可裂解)及SPDB-DM4 (可裂解)連接子/有效負載之鼠類9P3 ADC (NEG024及NEG085來源於其)之劑量依賴性抗腫瘤活性。在植入後18天將雌性SCID灰棕色小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約170 mm^3。在隨機分組(n = 8隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (5 ml/kg)、非結合鼠類9P3抗體(10 mg/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (5 mg/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (5 mg/kg)、非特異性同型對照IgG1-SPDB-DM4 (10 mg/kg)、9P3-MCC-DM1 (5及10 mg/kg)或9P3-SPDB-DM4 (2.5及5 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖42、43)。對照非特異性IgG1 ADC與非結合9P3均無效。所有9P3 ADC在測試劑量下均有效；然而，來自經2.5 mg/kg 9P3-SPDB-DM4處理之組的腫瘤與其他組相比似乎效果略差。

在表現突變型cKIT之胃腸基質腫瘤GIST430之第二腫瘤異種移植模型中比較具有MCC-DM1 (不可裂解)及SPDB-DM4 (可裂解)連接子/有效負載之鼠類9P3 ADC (NEG024及NEG085來源於其)之劑量依賴性

抗腫瘤活性。在植入後11天將雌性SCID灰棕色小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約200 mm^3。在隨機分組(n = 9隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之TBS (5 ml/kg)、非結合鼠類9P3抗體(10 mg/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (5 mg/kg)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (10 mg/kg)、非特異性同型對照IgG1-SPDB-DM4 (5 mg/kg)、9P3-MCC-DM1 (10 mg/kg)或9P3-SPDB-DM4 (5 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖44、45)。對照非特異性IgG1 ADC均無效。然而，兩種9P3 ADC在測試劑量下均類似有效。

實例29：調配物

ADC之臨床服務形式(CSF)為於含有50 mg抗cKIT-MCC-DM1、16.2 mg丁二酸鈉、410.8 mg蔗糖及1 mg聚山梨醇酯20 (不考慮10%之裝填過量以允許取出實裝量)之小瓶中之凍乾物。在用5 mL注射用水將凍乾物復原之後，獲得含有10 mg/mL抗cKIT-MCC-DM1、20 mM丁二酸鈉、240 mM蔗糖及0.02%聚山梨醇酯20 (pH 5.0)之溶液。

對於後續靜脈內投藥，所獲得之溶液將通常於載劑溶液進一步稀釋成即用型ADC溶液以供輸注。

對於CSF，基於初步穩定性測試選擇10 mg/mL之ADC濃度。選擇240 mM之蔗糖濃度以產生等張調配物，維持非晶形凍乾物餅狀結構且獲得蛋白質穩定。

用以選擇最穩定調配物之重要的指示穩定性之分析方法尤其涵蓋用以確定聚集度之尺寸排阻層析、顯微鏡下可見微粒物質測試、游離毒素測定及效能測試。

預篩選研究顯示，濃度為0.02%之聚山梨醇酯20對機械應力提供足夠穩定。在即時及加速穩定性條件(25℃及40℃)下之液體及凍乾穩定性研究展示，丁二酸鹽pH 5.0調配物提供總體最佳儲存穩定性。在此調配物中最顯著的是，可滿足所有測試調配物在游離毒素之聚集與

釋放之間的最佳平衡。在40℃下三個月之後，可確定降解產物無顯著增加。

實例30：由cKIT ADC活體內調節中靶藥效學標記物

進行研究以評估cKIT ADC NEG085-MCC-DM1活體內調節藥效學標記物之能力，包括檢查NEG085抗體對表現突變型cKIT之GIST T1腫瘤異種移植物中有絲分裂停滯之藥效學(PD)事件的共定位。此等研究之目標在於評估G2/M細胞週期停滯之程度及持續時間。

如由免疫組織化學評估之磷酸基-組蛋白H3 (pHH3)陽性核積聚用作G2/M停滯之標記物。藉由用對應於圍繞人類組蛋白H3 (pHH3)之Ser10之殘基的合成磷酸肽使動物免疫而產生之兔多株抗體獲自Cell Signaling Technology (Danvers, MA, 目錄號9701)。簡言之，IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑(Ventana, Tucson, AZ)。將初級抗體以1:50稀釋，且在室溫下培育60分鐘。隨後，與Jackson ImmunoResearch Laboratories山羊抗兔經生物素標記之二級抗體(目錄號111-065-144, West Grove, PA)一起培育32分鐘。

為評估GIST T1皮下腫瘤異種移植模型中抗cKIT ADC誘導之PD標記物變化，將10 × 10^6個細胞於含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之懸浮液中皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。將小鼠隨機分配以在腫瘤達到200至300 mm^3時即接受單次靜脈內劑量之NEG085-MCC-DM1 (5 mg/kg)、非特異性IgG1-MCC-DM1同型對照(5 mg/kg)或tris緩衝液(10 mM Tris-HCl、80 mM NaCl、3.5%蔗糖、0.01% Tween 20 pH 7.5) (n = 3隻/組)。

與類美登素有效負載之預期作用機制一致，NEG085-MCC-DM1使得對pHH3陽性呈陽性之細胞百分比顯著時間依賴性增加，且因此

細胞週期停滯。pHH3陽性相對於非特異性同型IgG1-MCC-DM1或經Tris緩衝液處理之對照在給藥後1-2天達峰值，在處理後四天信號下降(圖46中所示之代表性影像，及圖47中所示之圖)。

實例31：抗cKIT ADC針對小鼠之胃腸基質腫瘤(GIST)之活體內功效

在兩個GIST腫瘤異種移植模型中評估抗cKIT ADC NEG085-MCC-DM1之抗腫瘤活性。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之10 × 10^6個細胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。

展示GIST T1及GIST430腫瘤上之cKIT免疫染色之代表性照片以觀測此等異種移植模型中之染色模式(分別為圖48A及49A)。藉由用對應於cKIT之細胞質c端部分之胺基酸963至976的合成肽使動物免疫而產生之兔多株抗體獲自Dako (目錄號A4502)。簡言之，IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑(Ventana, Tucson, AZ)。將初級抗體稀釋至14 μg/ml之工作濃度，且在室溫下培育60分鐘。隨後，與Ventana UltraMap預稀釋之HRP結合抗兔抗體(目錄號760-4315)一起培育16分鐘。

對於GIST T1功效研究，在植入後18天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約118 mm^3 - 234 mm^3。在隨機分配至五個組之一(n = 9隻/組)中之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之Tris緩衝液(ADC媒劑)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (5 mg/kg)或NEG085-MCC-DM1 (1.25、2.5或5 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖48B及圖48C)。對照IgG1-MCC-DM1在5 mg/kg下無顯著活性。經1.25、2.5及5 mg/kg之NEG085-MCC-DM1處理之小鼠所具有之腫瘤顯示腫瘤體積與經tris緩衝液處理之對照相比的平均變化百分比(ΔT/ΔC)分別為63%、11%及12%，且此資料之概述示於表12中。NEG085-MCC-DM1處理在所有劑量下均良好耐受。

表12

第38天GIST T1異種移植小鼠模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應

藥物	劑量	時程	腫瘤反應		宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(ΔT/ΔC) (%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3 ± SEM)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
媒劑	0 mg/kg	單次靜脈內給藥	100	1132 ± 331	4.8 ± 2.3	9/9
IgG-SMCC-DM1同型對照	5 mg/kg	單次靜脈內給藥	75	849 ± 281	5.5 ± 1.6	9/9
NEG085-MCC-DM1	1.25 mg/kg	單次靜脈內給藥	63	712 ± 225	2.1 ± 2.2	9/9
NEG085-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	11	128 ± 85	-0.7 ± 1.0	9/9
NEG085-MCC-DM1	5 mg/kg	單次靜脈內給藥	12	140 ± 63	1.6 ± 1.2	9/9

對於GIST 430功效研究，在植入後12天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為125 mm^3 - 200 mm^3。在隨機分組(n = 8隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之tris緩衝液(ADC媒劑)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (10 mg/kg)、非結合NEG085抗體或NEG085-MCC-DM1 (2.5、5或10 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖49B及圖49C)。對照IgG1-MCC-DM1及非結合NEG085在10 mg/kg下無活性。經2.5及5 mg/kg之NEG085-MCC-DM1處理之小鼠無顯著活性(ΔT/ΔC分別為78%及56%)，比較者伊馬替尼(ΔT/ΔC為47%)亦如此，伊馬替尼初始以100 mg/kg給藥，由於100 mg/kg劑量在SCID灰棕色小鼠中耐受性較差，故劑量降低至80 mg/kg。如圖49B中以圖形展示及表13中所概述，10 mg/kg顯著有效(ΔT/ΔC為19%)。NEG085-MCC-DM1處理在所有劑量下均良好耐受。

表13

第28天GIST430異種移植小鼠模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應

藥物	劑量	時程	腫瘤反應		宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(ΔT/ΔC) (%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3 ± SEM)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
媒劑對照	0 mg/kg	單次靜脈內給藥	100	864 ± 103	-0.3 ± 1.3	8/8
IgG-MCC-DM1同型對照	10 mg/kg	單次靜脈內給藥	124	1070 ± 98	1.9 ± 0.8	8/8
非結合NEG085	10 mg/kg	單次靜脈內給藥	88	760 ± 119	3.9 ± 1.7	8/8
NEG085-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	78	674 ± 83	4.8 ± 0.6	8/8
NEG085-MCC-DM1	5 mg/kg	單次靜脈內給藥	56	485 ± 70	5.5 ± 1.8	8/8
NEG085-MCC-DM1	10 mg/kg	單次靜脈內給藥	19	167 ± 42	1.5 ± 1.8	8/8
伊馬替尼	100 mg/kg	經口每天兩次	47	408 ± 65	1.5 ± 0.7	6/8

實例32：抗cKIT ADC針對小鼠之小細胞肺癌之活體內功效

在NCI-H526小細胞肺癌異種移植模型中評估抗cKIT ADC NEG085-MCC-DM1之抗腫瘤活性。將含有含50% Matrigel™ (BD Biosciences)之漢克氏平衡鹽溶液之10 × 10^6個細胞皮下植入雌性SCID灰棕色小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。

展示NCI-H526腫瘤上之cKIT免疫染色之代表性照片以觀測此異種移植模型中之染色模式(圖50A)。藉由用對應於cKIT之細胞質c端部分之胺基酸963至976的合成肽使動物免疫而產生之兔多株抗體獲自Dako (目錄號A4502)。簡言之，IHC方案包括熱及標準暴露於Ventana Cell Conditioning #1抗原修復試劑(Ventana, Tucson, AZ)。將初級抗體稀釋至14 μg/ml之工作濃度，且在室溫下培育60分鐘。隨後，與Ventana UltraMap預稀釋之HRP結合抗兔抗體(目錄號760-4315)一起培育16分鐘。

在植入後六天將小鼠錄入研究中，平均腫瘤體積為約180 mm^3。在隨機分組(n = 9隻/組)之後，向小鼠投與單次靜脈內劑量之Tris緩衝液(ADC媒劑)、非特異性同型對照IgG1-MCC-DM1 (5 mg/kg)或NEG085-MCC-DM1 (1.25、2.5及5 mg/kg)。每週量測腫瘤體積及體重兩次(圖50B及圖50C)。對照IgG1-MCC-DM1無活性。NEG085-MCC-DM1在1.25 mg/kg下初始誘導腫瘤體積停滯，繼而腫瘤再生。2.5及5 mg/kg之處理顯著有效，從而誘導腫瘤消退(分別消退74%及96%)，且此展示於圖50B中且概述於表14中。在此等劑量下之處理顯示在單次處理後約3週腫瘤再生。所有NEG085-MCC-DM1處理均良好耐受。

表14

第19天NCI-H526異種移植小鼠模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應

藥物	劑量	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C) (%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化 (mm^3 ± SEM)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
TBS	0 mg/kg	單次靜脈內給藥	100	-	1165 ± 159	4.9 ± 0.9	9/9
IgG1-MCC-DM1同型對照	5 mg/kg	單次靜脈內給藥	109	-	1274 ± 282	6.4 ± 1.3	9/9
NEG085-MCC-DM1	1.25 mg/kg	單次靜脈內給藥	8	-	99 ± 57	-0.2 ± 0.8	8/9 (具有大腫瘤之1隻小鼠在第16天自研究中移除)
NEG085-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-73.96	-139 ± 25	-1.6 ± 1.1	9/9
NEG085-MCC-DM1	5 mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-95.76	-174 ± 10	3.8 ± 1.5	9/9

自此研究，在給藥後1小時、24小時及5天、7天、9天、14天、21天及28天亦收集血清以分別使用抗人IgG1 ELISA及抗DM ELISA隨時間量測抗體/ADC濃度。為評估PK參數，經由後眼眶放血收集血清且經由ELISA進行分析。總抗體PK分析藉由比色ELISA量測存在/不存在DM1之情況下的總抗體濃度。用抗人IgG (Fc特異性)塗盤，且用

抗人IgG-HRP偵測，隨後在適當盤讀取器上讀數。結合物PK分析藉由比色ELISA量測結合至至少一(1)個DM1分子之抗體。在此格局中，用抗美登素抗體塗盤，且用抗人IgG-HRP偵測。在此研究中使用NEG085-MCC-DM1之劑量依賴性功效與總抗體及ADC之劑量依賴性血清暴露相關聯，如抗總抗體及抗美登素ELISA所量測(分別為圖51A及圖51B)。

實例33：抗cKIT ADC針對小鼠之急性骨髓性白血病之活體內功效

在Novartis建立之HAMLX5343全身性原發性AML (急性骨髓性白血病)異種移植模型中評估抗cKIT ADC NEG085-MCC-DM1之抗腫瘤活性。將5 × 10^6個細胞於磷酸鹽緩衝鹽水中全身植入(經由尾靜脈注射)雌性NSG小鼠。含有於懸浮液中之細胞之總注射體積為200 μl。

在植入後43天將小鼠錄入研究中，平均白血病負荷為約14.8% CD45陽性周邊血液單核細胞(PBMC)。在隨機分組(n = 6隻/組)之後，使小鼠未經處理或每天腹膜內投與ARA-C (阿糖胞苷)持續6天，或每兩週靜脈內投與NEG085-MCC-DM1 (10 mg/kg)一次。藉由流動式細胞測量術量測白血病負荷。每週經由尾部自所有研究動物收集血液。使紅血球溶解，且用抗hCD45抗體(eBioscience, San Diego CA, 目錄號P/N 17-9459-42)將剩餘PMBC染色。在FACS Canto流式細胞儀(BD Biosciences) (圖52A)上分析經染色之細胞。每週量測體重兩次(圖52B)。ARA-C儘管在三隻動物中有效，但具有高毒性，導致另外三隻動物之體重損失>20%。10 mg/kg之NEG085-MCC-DM1處理使得腫瘤進展延遲，包括在第二次給藥後短暫消退(圖52A)。如圖52及表15中所示，NEG085-MCC-DM1處理與未經處理之對照相比顯著有效。NEG085-MCC-DM1之處理良好耐受(圖52B)。

表15

第71天全身性原發性AML異種移植模型HAMLX5343中之NEG085-

MCC-DM1

藥物	劑量	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C) (%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化(% CD45陽性PBMC ± SEM)	體重之平均變化(自67天，% ± SEM)	存活(存活數/總數)
未經處理	0 mg/kg	N/A	100	-	77.3 ± 1.7	1.7 ± 1.8	6/6
ARA-C (阿糖胞苷)	50 mg/kg	每天 × 6天，腹膜內	-	-52.5%	-6.6 ± 2.1	2.3 ± 2.3	3/6 (3隻小鼠不耐受處理且在給藥6天後自研究中移除)
NEG085-MCC-DM1	10 mg/kg	每2週，靜脈內	48.3	-	37.4 ± 5.4	1.8 ± 1.6	6/6

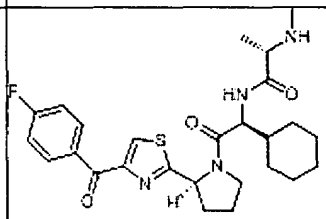
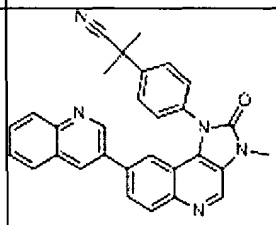
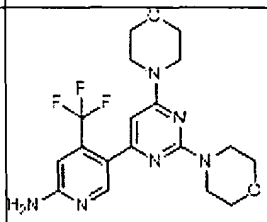
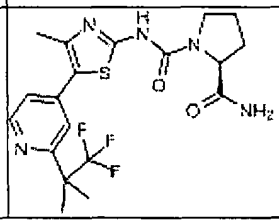
實例34. 呈組合療法形式之NEG085-MCC-DM1

使用不同劑量矩陣與小分子抑制劑組合測試NEG085-MCC-DM1。針對每個劑量組合計算細胞存活力之相對抑制。使用Chalice軟體(Zalicus, Cambridge MA)或ComboExplorer應用(Novartis, Basel CH)，針對廣泛使用之藥物本身劑量加和作用之洛伊模型(Loewe model)，將組合之反應與其單劑相比較(Lehar等人 Nat Biotechnol (2009) 27: 659-666；Zimmermann等人, Drug Discov Today (2007) 12: 34-42)。與加和作用相比之過量抑制可繪製成完全劑量矩陣圖表以觀測發生協同作用之藥物濃度。協同組合在劑量矩陣內產生過量抑制區域。表16展示若干NEG085-MCC-DM1/組合之資料。當組合與使用單劑本身之反應相比產生相同之細胞存活力抑制反應時，發現「加和作用」。當細胞存活力抑制大於相比本身之單劑的反應時，指示「協同作用」。或者，洛伊得分(Loewe score)小於5指示「加和作用」，且洛伊得分大於5指示「協同作用」。

藉由使用CellTiter Glo發光分析(Promega, Madison WI)量測細胞ATP含量來確定細胞存活力。在藥物添加前一天，將來自2種不同細胞株之250-500個GIST細胞於20 μl生長培養基中塗至384孔盤(Greiner,

Monroe, NC)中。GIST430細胞含有cKIT之雙重突變，使得該等細胞對Glivec®具部分抗性。GIST882細胞具有cKIT之單一突變且對Glivec®具抗性。接著將細胞與多種濃度之NEG085-MCC-DM1作為單劑、單劑化合物或NEG085-MCC-DM1/化合物組合一起培育120小時，隨後將CellTiter Glo試劑添加至各孔中，且在Envision盤讀取器(Perkin Elmer, Waltham MA)上記錄發光。使用發光值計算細胞存活力相對於經DMSO處理之細胞(0%抑制)的抑制。

表16

化合物之標靶	組合	結構	細胞株/結果	細胞株/結果
	NEG085-MCC-DM1與以下組合：		**GIST430**	**GIST882**
RTK*i*	**Glivec®**	伊馬替尼	協同作用	加和作用
RTK*i*	**Sutent®**	舒尼替尼	加和作用	加和作用
IAP*i*	**NVP-LCL161**		協同作用	協同作用
PI3K fam.*i*	**NVP-BEZ235**		加和作用	協同作用
pan PI3K*i*	**NVP-BKM120**		加和作用	協同作用
PI3K*i*	**NVP-BYL719**		協同作用	協同作用

mTOR*i* *(cat.)*	**NVP-CCG168**		加和作用	加和作用
mTOR*i* *(allo.)*	**NVP-RAD001**	Everolimus®	協同作用	協同作用
HSP90*i*	**NVP-HSP990**		加和作用	加和作用
JAK2	**NVP-BVB808**		加和作用*	加和作用*

總之，本文所揭示之抗cKIT抗體當與其他分子組合使用時具有協同效應，此產生更多治療選項。舉例而言，NEG085-MCC-DM1可與IAP抑制劑(例如NVP-LCL161)以療法形式共同投與以觀察協同效應。

實例35. NEG085之抗原決定基定位

原位限制性蛋白水解

人類cKIT (Uniprot寄存代碼P10721)結構域1 (D1)-結構域3 (D3)胞外域(ECD)蛋白質係用殘基Q26-G311製得(N130S、N145S-此等變化導致糖基化缺乏，以表現無聚糖形式之蛋白質)。將等莫耳比之人類cKIT D1-D3 ECD與NEG085 Fab混合，且對其進行經20 mM Tris-HCl (pH 7.5)及100 mM NaCl平衡之最終凝膠過濾步驟，且濃縮至20 mg/ml。將胰蛋白酶添加至蛋白質複合物結晶樣品中以產生1:100 w/w稀釋液。將蛋白酶/樣品混合物在室溫下培育30分鐘，隨後設置結晶實驗。

結晶

cKIT ECD/NEG085 Fab複合物之繞射晶體在4℃下直接獲自Protein Complex Suite F5 (0.1 M NaCl、0.1 M Tris pH 8.0、8% PEG 20k；Qiagen)，且在微量最佳化之後，產生內部繞射至5 Å之晶體。藉由沉滴蒸氣擴散法平衡等體積之蛋白質(20 mg/mL)與儲備溶液(0.1 M NaCl、0.1 M Tris pH 8.0、10% PEG 20k)使用於資料收集之晶體在4℃生長。在資料收集之前，將晶體於含有30%甘油之儲備溶液中低溫保護且於液氮中急驟冷卻。

資料收集

使用ADSC QUANTUM 315偵測器(ADSC, Poway CA)及同步加速器輻射(λ=1.0000Å)在Advanced Light Source之光束線5.0.2下收集冷卻至100K之單晶的資料。cKIT ECD/NEG085 Fab之晶體繞射至3.1 Å解析度且屬於空間群C2，其單位晶胞參數為a=213.76 Å，b=117.48 Å，c=171.92 Å，α=90°，β=118.47°，γ=90°。晶體在不對稱單元中含有cKIT ECD/NEG085 Fab複合物之四個複本，其中計算溶劑含量為66%。使用autoPROC (Global Phasing Ltd, Cambridge UK)處理資料。

結構確定及精製

藉由用PHASER (McCoy等人, J. Appl. Crystallogr. 2007; 40(4): 658-74)進行分子置換，使用cKIT ECD (PDB ID代碼：2EC8) (Yuzawa等人, Cell 2007; 130 (2):323-34)及抗α1β1整合素I Fab (PDB ID代碼：1MHP) (Karpusas等人, J. Mol. Biol. 2003; 327 (5):1031-41)之經公開晶體結構作為初始模型，在3.1 Å解析度下解析cKIT ECD/NEG085 Fab複合物之結構。使用在Phenix (Adams等人, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2010; 66(2): 213-21)中實施之模擬黏接複合物省略圖，在COOT (Emsley及Cowtan, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2004; 60 (12): 2126-32)中手動重建NEG085 Fab片段之CDR環。使用

Phenix.refine程式進行後續輪次之模型構建及精製直至會聚。

結果：與NEG085之Fab片段複合之人類cKIT D1-D2之結構

cKIT D1-D3/NEG085 Fab共結構展示，NEG085藉由與結構域1、2內所含之許多殘基及該等結構域之間的連接子殘基發生特異性相互作用來識別並結合至cKIT之胞外膜遠端域。由NEG085識別之cKIT抗原決定基可因此定義為：

cKIT結構域1殘基：R49、V50

cKIT結構域2殘基：Q152、G153、H185及環Q190-E198

結構域1與2之間的連接子：D113-L117

NEG085使用所有CDR (H1-H3及L1-L3)結合cKIT D1-D2 (圖53)。圖53為展示Fab重鏈(深灰色)、Fab輕鏈(白色)及Kit D1-D2 (淺灰色)結構域之Kit D1-D2/NEG085 Fab複合物之3.1 Å晶體結構之圖示。抗原決定基及互補位呈黑色。NEG085/cKIT界面掩藏總共約1890 Å2溶劑可達表面積(分別為來自H鏈及L鏈之1211 Å2及679 Å2)。抗原決定基在cKIT D1-D2連接子區域D113-L117及環Q190-E198上定中心，藉由與R49、V50、Q152、G153及H185發生周邊相互作用而補充(圖53)。使用PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel及Henrick, J. Mol. Biol. 2007, 372(3):774-97)檢查cKIT D1-D2與NEG085 Fab之間的分子間相互作用。此資料示於表17中。

二聚cKIT/SCF信號傳導複合物(Yuzawa等人 Cell 2007; 130 (2);323-34)及cKIT/NEG085複合物中cKIT之重疊顯示NEG085及SCF似乎不與彼此競爭結合至cKIT。NEG085結合至與負責SCF結合之結合抗原決定基不同的抗原決定基。因此，NEG085與cKIT之結合對於SCF之締合將不直接競爭。

表17

NEG085 L鏈		Kit D1-D2		距離(Å)
氫鍵及鹽橋				
Ser31	OG	Arg49	NH2	3.6
Tyr32	OH	Gln190	NE2	2.5
Arg53	NH2	Asp113	OD1	3.2
Gly91	O	Lys193	NZ	2.9
Arg92	NH1	Glu191	OE2	3.0
Arg92	NH1	Glu191	OE1	3.1
Arg92	O	Lys193	NZ	3.1
Leu94	N	Lys193	NZ	3.5
Trp95		Lys193		陽離子-π
凡得瓦爾力(van der Waals)接觸				
Tyr50		Pro114		
Tyr53		Val50、Pro114		
Arg93		Lys193		
NEG085 H鏈		**Kit D1-D2**		**距離(Å)**
氫鍵及鹽橋				
Tyr33	OH	Ser194	N	3.1
Tyr33	OH	Ser194	O	2.4
Asn52	ND2	Ser194	OG	3.2
Tyr59	OH	Gly192	O	3.2
Tyr59	OH	Ser194	N	3.1
Tyr101	OH	Glu198	OE2	2.6
Gly103	O	Leu117	N	3.4
Gly103	N	Leu196	O	3.0
Thr105	N	Pro114	O	2.9
Trp107	NE1	Gln190	OE1	3.1
Trp107	NE1	Lys193		陽離子-π
凡得瓦爾力接觸				
Tyr53		Leu196		
Pro54		Gln152、Gly153		
Ser57		Ser194		
Tyr59		Lys193		
Tyr102		His185、Leu196、Ser197、Lys199		
Thr104		Pro114		
Thr105		Pro114、Gln190		
Tyr106		Pro114、Ala115		
Trp107		Ser194、Val195		

NEG085 Fab VH及VL殘基係基於其線性胺基酸序列而編號。cKIT殘基係基於UniProt ID P10721而編號。使用PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) (Krissinel及Henrick, J. Mol. Biol. 2007, 372(3):774-97)檢查分子間相互作用。

應瞭解，本文所述之實例及態樣僅為達成說明目的，且熟習此項技術者可鑒於其提出各種修改或變化，且該等修改或變化欲包括於本申請案之精神及範圍及隨附申請專利範圍之範疇內。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 亞布拉姆斯，坦亞
可汗，史蒂芬
芬頓，克利斯提
乎伯，湯瑪士
米勒，凱西
許萊爾，希優
迪索-達格提，凱薩琳　瑜爾萊克
菲能爾，凱特林

<120> 抗體藥物結合物

<130> PAT055643-US-PSP

<140> 61/793,641
<141> 2013-03-15

<160> 162

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5084
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1
gatcccatcg cagctaccgc gatgagaggc gctcgcggcg cctgggattt tctctgcgtt 60

ctgctcctac tgcttcgcgt ccagacaggc tcttctcaac catctgtgag tccaggggaa 120

ccgtctccac catccatcca tccaggaaaa tcagacttaa tagtccgcgt gggcgacgag 180

attaggctgt tatgcactga tccgggcttt gtcaaatgga cttttgagat cctggatgaa 240

acgaatgaga ataagcagaa tgaatggatc acggaaaagg cagaagccac caacaccggc 300

aaatacacgt gcaccaacaa acacggctta agcaattcca tttatgtgtt tgttagagat 360

cctgccaagc ttttccttgt tgaccgctcc ttgtatggga aagaagacaa cgacacgctg 420

gtccgctgtc ctctcacaga cccagaagtg accaattatt ccctcaaggg gtgccagggg 480

aagcctcttc ccaaggactt gaggtttatt cctgacccca aggcgggcat catgatcaaa 540

agtgtgaaac gcgcctacca tcggctctgt ctgcattgtt ctgtggacca ggagggcaag 600

tcagtgctgt cggaaaaatt catcctgaaa gtgaggccag ccttcaaagc tgtgcctgtt 660

gtgtctgtgt ccaaagcaag ctatcttctt agggaagggg aagaattcac agtgacgtgc 720

acaataaaag atgtgtctag ttctgtgtac tcaacgtgga aaagagaaaa cagtcagact 780

aaactacagg agaaatataa tagctggcat cacggtgact tcaattatga acgtcaggca 840

acgttgacta tcagttcagc gagagttaat gattctggag tgttcatgtg ttatgccaat 900

aatacttttg gatcagcaaa tgtcacaaca accttggaag tagtagataa aggattcatt 960

aatatcttcc ccatgataaa cactacagta tttgtaaacg atggagaaaa tgtagatttg 1020

attgttgaat atgaagcatt ccccaaacct gaacaccagc agtggatcta tatgaacaga 1080

accttcactg ataaatggga agattatccc aagtctgaga atgaaagtaa tatcagatac 1140
gtaagtgaac ttcatctaac gagattaaaa ggcaccgaag gaggcactta cacattccta 1200
gtgtccaatt ctgacgtcaa tgctgccata gcatttaatg tttatgtgaa tacaaaacca 1260
gaaatcctga cttacgacag gctcgtgaat ggcatgctcc aatgtgtggc agcaggattc 1320
ccagagccca caatagattg gtatttttgt ccaggaactg agcagagatg ctctgcttct 1380
gtactgccag tggatgtgca gacactaaac tcatctgggc caccgtttgg aaagctagtg 1440
gttcagagtt ctatagattc tagtgcattc aagcacaatg gcacggttga atgtaaggct 1500
tacaacgatg tgggcaagac ttctgcctat tttaactttg catttaaagg taacaacaaa 1560
gagcaaatcc atccccacac cctgttcact cctttgctga ttggtttcgt aatcgtagct 1620
ggcatgatgt gcattattgt gatgattctg acctacaaat atttacagaa acccatgtat 1680
gaagtacagt ggaaggttgt tgaggagata aatggaaaca attatgttta catagaccca 1740
acacaacttc cttatgatca caaatgggag tttcccagaa acaggctgag ttttgggaaa 1800
accctgggtg ctggagcttt cgggaaggtt gttgaggcaa ctgcttatgg cttaattaag 1860
tcagatgcgg ccatgactgt cgctgtaaag atgctcaagc cgagtgccca tttgacagaa 1920
cgggaagccc tcatgtctga actcaaagtc ctgagttacc ttggtaatca catgaatatt 1980
gtgaatctac ttggagcctg caccattgga gggcccaccc tggtcattac agaatattgt 2040
tgctatggtg atcttttgaa ttttttgaga agaaaacgtg attcatttat ttgttcaaag 2100
caggaagatc atgcagaagc tgcactttat aagaatcttc tgcattcaaa ggagtcttcc 2160
tgcagcgata gtactaatga gtacatggac atgaaacctg gagtttctta tgttgtccca 2220
accaaggccg acaaaaggag atctgtgaga ataggctcat acatagaaag agatgtgact 2280
cccgccatca tggaggatga cgagttggcc ctagacttag aagacttgct gagcttttct 2340
taccaggtgg caaagggcat ggctttcctc gcctccaaga attgtattca cagagacttg 2400
gcagccagaa atatcctcct tactcatggt cggatcacaa agatttgtga ttttggtcta 2460
gccagagaca tcaagaatga ttctaattat gtggttaaag gaaacgctcg actacctgtg 2520
aagtggatgg cacctgaaag cattttcaac tgtgtataca cgtttgaaag tgacgtctgg 2580
tcctatggga tttttctttg ggagctgttc tctttaggaa gcagccccta tcctggaatg 2640
ccggtcgatt ctaagttcta caagatgatc aaggaaggct tccggatgct cagccctgaa 2700
cacgcacctg ctgaaatgta tgacataatg aagacttgct gggatgcaga tcccctaaaa 2760
agaccaacat tcaagcaaat tgttcagcta attgagaagc agatttcaga gagcaccaat 2820
catatttact ccaacttagc aaactgcagc cccaaccgac agaagcccgt ggtagaccat 2880
tctgtgcgga tcaattctgt cggcagcacc gcttcctcct cccagcctct gcttgtgcac 2940

gacgatgtct gagcagaatc agtgtttggg tcacccctcc aggaatgatc tcttcttttg 3000
gcttccatga tggttatttt cttttctttc aacttgcatc caactccagg atagtgggca 3060
ccccactgca atcctgtctt tctgagcaca ctttagtggc cgatgatttt tgtcatcagc 3120
caccatccta ttgcaaaggt tccaactgta tatattccca atagcaacgt agcttctacc 3180
atgaacagaa aacattctga tttggaaaaa gagagggagg tatggactgg gggccagagt 3240
cctttccaag gcttctccaa ttctgcccaa aaatatggtt gatagtttac ctgaataaat 3300
ggtagtaatc acagttggcc ttcagaacca tccatagtag tatgatgata caagattaga 3360
agctgaaaac ctaagtcctt tatgtggaaa acagaacatc attagaacaa aggacagagt 3420
atgaacacct gggcttaaga aatctagtat ttcatgctgg gaatgagaca taggccatga 3480
aaaaaatgat ccccaagtgt gaacaaaaga tgctcttctg tggaccactg catgagcttt 3540
tatactaccg acctggtttt taaatagagt ttgctattag agcattgaat tggagagaag 3600
gcctccctag ccagcacttg tatatacgca tctataaatt gtccgtgttc atacatttga 3660
ggggaaaaca ccataaggtt tcgtttctgt atacaaccct ggcattatgt ccactgtgta 3720
tagaagtaga ttaagagcca tataagtttg aaggaaacag ttaataccat tttttaagga 3780
aacaatataa ccacaaagca cagtttgaac aaaatctcct cttttagctg atgaacttat 3840
tctgtagatt ctgtggaaca agcctatcag cttcagaatg gcattgtact caatggattt 3900
gatgctgttt gacaaagtta ctgattcact gcatggctcc cacaggagtg ggaaaacact 3960
gccatcttag tttggattct tatgtagcag gaaataaagt ataggtttag cctccttcgc 4020
aggcatgtcc tggacaccgg gccagtatct atatatgtgt atgtacgttt gtatgtgtgt 4080
agacaaatat ttggaggggt atttttgccc tgagtccaag agggtccttt agtacctgaa 4140
aagtaacttg gctttcatta ttagtactgc tcttgtttct tttcacatag ctgtctagag 4200
tagcttacca gaagcttcca tagtggtgca gaggaagtgg aaggcatcag tccctatgta 4260
tttgcagttc acctgcactt aaggcactct gttatttaga ctcatcttac tgtacctgtt 4320
ccttagacct tccataatgc tactgtctca ctgaaacatt taaattttac cctttagact 4380
gtagcctgga tattattctt gtagtttacc tctttaaaaa caaaacaaaa caaaacaaaa 4440
aactcccctt cctcactgcc caatataaaa ggcaaatgtg tacatggcag agtttgtgtg 4500
ttgtcttgaa agattcaggt atgttgcctt tatggtttcc cccttctaca tttcttagac 4560
tacatttaga gaactgtggc cgttatctgg aagtaaccat ttgcactgga gttctatgct 4620
ctcgcacctt tccaaagtta acagattttg gggttgtgtt gtcacccaag agattgttgt 4680
ttgccatact ttgtctgaaa aattcctttg tgtttctatt gacttcaatg atagtaagaa 4740
aagtggttgt tagttataga tgtctaggta cttcaggggc acttcattga gagttttgtc 4800
ttgccatact ttgtctgaaa aattcctttg tgtttctatt gacttcaatg atagtaagaa 4860

aagtggttgt tagttataga tgtctaggta cttcaggggc acttcattga gagttttgtc 4920

aatgtctttt gaatattccc aagcccatga gtccttgaaa atatttttta tatatacagt 4980

aactttatgt gtaaatacat aagcggcgta agtttaaagg atgttggtgt tccacgtgtt 5040

ttattcctgt atgttgtcca attgttgaca gttctgaaga attc 5084

<210> 2
<211> 976
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2
Met Arg Gly Ala Arg Gly Ala Trp Asp Phe Leu Cys Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly
20 25 30

Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val
35 40 45

Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val
50 55 60

Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn
65 70 75 80

Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr
85 90 95

Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg
100 105 110

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

Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr
130 135 140

Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu
145 150 155 160

Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly Ile Met Ile Lys Ser Val Lys
165 170 175

Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Leu His Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly
180 185 190

Lys Ser Val Leu Ser Glu Lys Phe Ile Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe
195 200 205

Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg
210 215 220

Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser
225 230 235 240

Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln
245 250 255

Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln
260 265 270

Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe
275 280 285

Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr
290 295 300

Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn
305 310 315 320

Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu
325 330 335

Tyr Glu Ala Phe Pro Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn
340 345 350

Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu
355 360 365

Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly
370 375 380

Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn
385 390 395 400

Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu
405 410 415

Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly
420 425 430

Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln
435 440 445

Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser
450 455 460

Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser
465 470 475 480

Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp
485 490 495

Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn
500 505 510

Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Ile Gly
515 520 525

Phe Val Ile Val Ala Gly Met Met Cys Ile Ile Val Met Ile Leu Thr
530 535 540

Tyr Lys Tyr Leu Gln Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val
545 550 555 560

Glu Glu Ile Asn Gly Asn Asn Tyr Val Tyr Ile Asp Pro Thr Gln Leu
565 570 575

Pro Tyr Asp His Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Arg Leu Ser Phe Gly
580 585 590

Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala
595 600 605

Tyr Gly Leu Ile Lys Ser Asp Ala Ala Met Thr Val Ala Val Lys Met
610 615 620

Leu Lys Pro Ser Ala His Leu Thr Glu Arg Glu Ala Leu Met Ser Glu
625 630 635 640

Leu Lys Val Leu Ser Tyr Leu Gly Asn His Met Asn Ile Val Asn Leu
645 650 655

Leu Gly Ala Cys Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr
660 665 670

Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser
675 680 685

Phe Ile Cys Ser Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Ala Ala Leu Tyr Lys

690 695 700

Asn Leu Leu His Ser Lys Glu Ser Ser Cys Ser Asp Ser Thr Asn Glu
705 710 715 720

Tyr Met Asp Met Lys Pro Gly Val Ser Tyr Val Val Pro Thr Lys Ala
725 730 735

Asp Lys Arg Arg Ser Val Arg Ile Gly Ser Tyr Ile Glu Arg Asp Val
740 745 750

Thr Pro Ala Ile Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp
755 760 765

Leu Leu Ser Phe Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala
770 775 780

Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu
785 790 795 800

Thr His Gly Arg Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp
805 810 815

Ile Lys Asn Asp Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro
820 825 830

Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe
835 840 845

Glu Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser
850 855 860

Leu Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr
865 870 875 880

Lys Met Ile Lys Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro
885 890 895

Ala Glu Met Tyr Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu
900 905 910

Lys Arg Pro Thr Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile
915 920 925

Ser Glu Ser Thr Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro
930 935 940

Asn Arg Gln Lys Pro Val Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val
945 950 955 960

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Ser Gln Pro Leu Leu Val His Asp Asp Val
965 970 975

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 3
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 4
Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 5
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 6
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 7
Asn Tyr Asp Gly Ser Ser
1 5

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 8
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 9
Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Ser
1 5 10 15

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

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Val Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 10
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1 5 10 15

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
35 40 45

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

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 11
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 11
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 12
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 13
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 14
Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 15
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 16
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 16
Tyr Thr Ser
1

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 17
Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 18
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 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln 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 Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
85 90 95

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

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 19
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

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

Met 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 Lys
325 330

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 21
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 22
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 23
Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 24
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 25
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 26
Asn Gln Ile Ala Gly Ser
1 5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 27
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 28
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 28
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 29
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro

115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 30
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 30
gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaat atcaaccaaa tcgccggcag cacctactac 180

ctggacagcg tgagaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat 300

tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc 360

agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420

agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 480

gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540

agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660

gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgcccccccct gcccagcccc agagctgctg 720

ggcggaccct ccgtgttcct gttcccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg 780

acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacccaga ggtgaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900

tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960

ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc 1020

atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg 1080

gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccccc 1200

ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc 1260

aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320

tacacccaga agagcctgag cctgtccccc ggcaag 1356

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 31
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 32
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 33
Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 34
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 35
Tyr Thr Ser
1

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 36
Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 37
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 38
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 39
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 39
gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga aagagccacc 60

ctgtcctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagactgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg catccccgcc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag ggcaagaagc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt ccccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 40
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 41
Asn Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 42
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 43
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 44
Asn Gln Asn Thr Gly Ser
1 5

<210> 45
<211> 13

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 45
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 46
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 46
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 47
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 48
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 48
gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaat atcaaccaaa acaccggcag cacctactac 180
gtggacagcg tgcaaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat 300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc 360
agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660
gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgcccccct gcccagcccc agagctgctg 720
ggcggaccct ccgtgttcct gttcccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg 780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacccaga ggtgaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900
tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc 1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg 1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccc 1200
ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc 1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320
tacacccaga agagcctgag cctgtccccc ggcaag 1356

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 49
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 50

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 50
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 51
Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 52
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 53
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 53
Tyr Thr Ser
1

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 54
Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 55
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

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

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 56
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 57
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 57
gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga aagagccacc 60

ctgtcctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagactgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg catccccgcc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag ggcaagaagc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 58
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 59
Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 60
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 61
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 62
Asn Gln Asn Thr Gly Ser
1 5

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 63
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 64
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 64
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 65
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 65
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 66
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 66
gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccagt atcaaccaaa acaccggcag cacctactac 180

ctggacagcg tgcgaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat 300

tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc 360

agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420

agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 480

gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540

agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660

gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgcccccct gcccagcccc agagctgctg 720

ggcggaccct ccgtgttcct gttccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg 780

acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacccaga ggtgaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900

tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960

ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc 1020

atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg 1080

gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc 1200

ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc 1260

aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320

tacacccaga agagcctgag cctgtccccc ggcaag 1356

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 67
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 68
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 69
Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 70
Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 71
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 71
Tyr Thr Ser
1

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 72
Gly Lys Lys Leu Trp
1 5

<210> 73
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 73
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

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

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 74
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 75
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 75
gagatcgtga tgacccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga aagagccacc 60

ctgtcctgca gagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggccaggccc ccagactgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg catccccgcc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctggaaccc 240

gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag ggcaagaagc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt ccccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 76
Gly Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 77
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 77
Asn Ile Asn Tyr Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 78
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 79
Gly Phe Ala Phe Ser Gly Tyr
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 80
Asn Tyr Pro Gly Ser Ser
1 5

<210> 81
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 81
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 82
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 82
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 Ala Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 83
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 83
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 Ala Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Pro Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 84
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 84
gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt cgccttcagc ggctactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120
cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaac atcaactacc ccggcagcag cacctactac 180
ctggacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat 300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc 360
agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660
gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgcccccccct gcccagcccc agagctgctg 720
ggcggaccct ccgtgttcct gttcccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg 780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacccaga ggtgaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900
tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc 1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg 1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccccc 1200
ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc 1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320
tacacccaga agagcctgag cctgtccccc ggcaag 1356

<210> 85
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 85
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 86
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 87
Gln Gln Gly Arg Arg Leu Trp Ser
1 5

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 88
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 89
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 89
Tyr Thr Ser
1

<210> 90
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 90
Gly Arg Arg Leu Trp

1 5

<210> 91
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 91
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 93
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 93
gatatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg cgtgcccagc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggccgccgcc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 94
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 95
Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 96
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 96
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 97
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 97
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 98
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 98
Asn Gln Ile Ala Gly Ser
1 5

<210> 99
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 99
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 100
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 100
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 101
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Gln Ile Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Gln 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 102
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 102
gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccaat atcaaccaaa tcgccggcag cacctactac 180

gtggacagcg tgcaaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240

ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat 300

tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc 360

agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420

agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 480

gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540

agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660

gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgcccccccct gcccagcccc agagctgctg 720

ggcggaccct ccgtgttcct gttcccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg 780

acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacccaga ggtgaagttc 840

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900

tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960

ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc 1020

atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg 1080

gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc 1200

ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc 1260

aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320

tacacccaga agagcctgag cctgtccccc ggcaag 1356

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 103
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 104
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 105
Gln Gln Gly Arg Arg Leu Trp Ser
1 5

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 106
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 107
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 107
Tyr Thr Ser
1

<210> 108
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 108
Gly Arg Arg Leu Trp
1 5

<210> 109
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 109
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 110
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 110
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 111
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 111
gatatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg cgtgcccagc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggccgccgcc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 112
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 112
Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 113
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 113
Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 114
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 115
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 116
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 116
Asn Gln Asn Thr Gly Ser
1 5

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 117
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 118
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 Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 119
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 Tyr

20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Gln Asn Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg 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 Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 120
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 120
gaagtgcaat tggtggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggctt caccttcagc gactactaca tggcctgggt ccgacaggcc 120

cctggcaagg gcctggaatg ggtggccagt atcaaccaaa acaccggcag cacctactac 180

ctggacagcg tgcgaggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggcgat 300
tactacggca ccacctactg gtacttcgac gtgtggggcc agggcaccac cgtgaccgtc 360
agctcagcta gcaccaaggg ccccagcgtg ttccccctgg cccccagcag caagagcacc 420
agcggcggca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga gcccgtgacc 480
gtgtcctgga acagcggagc cctgacctcc ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540
agcagcggcc tgtacagcct gtccagcgtg gtgacagtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
cagacctaca tctgcaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg 660
gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc tgcccccccct gcccagcccc agagctgctg 720
ggcggaccct ccgtgttcct gttcccccccc aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg 780
acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac gtgagccacg aggacccaga ggtgaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag 900
tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac 960
ggcaaggaat acaagtgcaa ggtctccaac aaggccctgc cagcccccat cgaaaagacc 1020
atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag ccccaggtgt acaccctgcc cccctcccgg 1080
gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccgaga acaactacaa gaccacccccc 1200
ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc 1260
aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac 1320
tacacccaga agagcctgag cctgtccccc ggcaag 1356

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 121
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 122
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 122
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 123
Gln Gln Gly Arg Arg Leu Trp Ser
1 5

<210> 124
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 124
Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 125
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 125
Tyr Thr Ser
1

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 126
Gly Arg Arg Leu Trp
1 5

<210> 127
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 127
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 128
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 129
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 129
gatatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgtc gggccagcca gagcatcagc agctacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagccggc tgcagagcgg cgtgcccagc 180

agattttctg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag ggccgccgcc tgtggtcctt cggcggaggc 300

accaaggtgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360

gacgagcagc tgaagagcgg caccgccagc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420

cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agagcggcaa cagccaggag 480

agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540

agcaaggccg actacgagaa gcataaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600

tccagccccg tgaccaagag cttcaacagg ggcgagtgc 639

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 130
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 131
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 131
Gly Ile Ile Pro Met Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 132
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 132
Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro
20

<210> 133
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 133
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 134
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 134
Ile Pro Met Ser Gly Arg
1 5

<210> 135
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 135
Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser Tyr Phe
1 5 10 15

Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro
20

<210> 136
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 136
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Met Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser
100 105 110

Tyr Phe Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser
130

<210> 137
<211> 462
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 137
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Ile Ile Pro Met Ser Gly Arg Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Glu Ala Pro Asp Tyr Gly Gln Ser Thr Ser
100 105 110

Tyr Phe Trp Tyr Tyr Ala Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
115 120 125

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
130 135 140

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
275 280 285

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 138
<211> 1386
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 138
caggtgcagc tggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaaac ccggctctag cgtgaaagtc 60

agctgtaaag ctagtggggg caccttctct agctacgcta ttagctgggt cagacaggcc 120

ccaggtcaag gcttggagtg gatgggcgga attatcccta tgagcggtag aactacctac 180

gctcagaaat ttcagggtag agtgactatc accgccgacg agtctactag caccgcctat 240

atggaactga gttctctgag gtcagaggac accgccgtct actactgcgc tagagactac 300

ggccccgagg cccccgacta cggtcaatca actagctact tctggtacta cgccttcgac 360

ccttggggtc aaggcaccct ggtcaccgtg tcttcagcta gcactaaggg cccaagtgtg 420

tttcccctgg cccccagcag caagtctact tccggcggaa ctgctgccct gggttgcctg 480

gtgaaggact acttccccga gcccgtgaca gtgtcctgga actctggggc tctgacttcc 540

ggcgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag agcagcggcc tgtacagcct gagcagcgtg 600

gtgacagtgc cctccagctc tctgggaacc cagacctata tctgcaacgt gaaccacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg gagcccaaga gctgcgacaa gacccacacc 720

tgcccccccct gcccagctcc agaactgctg ggagggcctt ccgtgttcct gttcccccccc 780

aagcccaagg acaccctgat gatcagcagg acccccgagg tgacctgcgt ggtggtggac 840

gtgtcccacg aggacccaga ggtgaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac 900

aacgccaaga ccaagcccag agaggagcag tacaacagca cctacagggt ggtgtccgtg 960

ctgaccgtgc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaagaat acaagtgcaa agtctccaac 1020

aaggccctgc cagccccaat cgaaaagaca atcagcaagg ccaagggcca gccacgggag 1080

ccccaggtgt acaccctgcc ccccagccgg gaggagatga ccaagaacca ggtgtccctg 1140

acctgtctgg tgaagggctt ctaccccagc gatatcgccg tggagtggga gagcaacggc 1200

cagcccgaga acaactacaa gaccaccccc ccagtgctgg acagcgacgg cagcttcttc 1260

ctgtacagca agctgaccgt ggacaagtcc aggtggcagc agggcaacgt gttcagctgc 1320

agcgtgatgc acgaggccct gcacaaccac tacacccaga agtccctgag cctgagcccc 1380

ggcaag 1386

<210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 139
Ser Gly Asp Asn Ile Pro Ser Tyr Phe Val His
1 5 10

<210> 140
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 140
Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 141
Ser Ser Trp Asp Gln Asp Thr Val Val
1 5

<210> 142
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 142
Asp Asn Ile Pro Ser Tyr Phe
1 5

<210> 143
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 143
Asp Asp Asn
1

<210> 144
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 144
Trp Asp Gln Asp Thr Val
1 5

<210> 145
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Gln Asp Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 146
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Asp Asp Asn Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Gln Asp Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 147
<211> 636
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 147
gatatcgagc tgactcagcc ccctagcgtc agcgtcagcc ctggtcaaac cgcctctatc 60

acctgtagcg gcgataatat ccctagctac ttcgtgcact ggtatcagca gaagcccggt 120

caagcccccg tgctggtgat ctacgacgat aacgatagac ctagcggaat ccccgagcgg 180

tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta ttagcggcac tcaggccgag 240

gacgaggccg actactactg ctctagctgg gatcaggaca ccgtggtgtt cggcggaggc 300

actaagctga ccgtgctggg tcaacctaag gctgccccca gcgtgaccct gttccccccc 360

agcagcgagg agctgcaggc caacaaggcc accctggtgt gcctgatcag cgacttctac 420

ccaggcgccg tgaccgtggc ctggaaggcc gacagcagcc ccgtgaaggc cggcgtggag 480

accaccaccc ccagcaagca gagcaacaac aagtacgccg ccagcagcta cctgagcctg 540

acccccgagc agtggaagag ccacaggtcc tacagctgcc aggtgaccca cgagggcagc 600

accgtggaaa agaccgtggc cccaaccgag tgcagc 636

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 148
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5 10

<210> 149
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 149
Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 150
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 150
Gly Asp Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 151
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 151
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 152
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 152
Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 153

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 153
Gln Gln Gly Lys Lys Leu Trp Ser
1 5

<210> 154
<211> 503
<212> PRT
<213> 智人

<400> 154
Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro
1 5 10 15

Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu
20 25 30

Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala
50 55 60

Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn
65 70 75 80

Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp
85 90 95

Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro
100 105 110

Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly
115 120 125

Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly
130 135 140

Ile Met Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Leu His
145 150 155 160

Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu Lys Phe Ile
165 170 175

Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser
180 185 190

Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys
195 200 205

Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu
210 215 220

Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly
225 230 235 240

Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg
245 250 255

Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly
260 265 270

Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile
275 280 285

Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu
290 295 300

Asn Val Asp Leu Ile Val Glu Tyr Glu Ala Phe Pro Lys Pro Glu His
305 310 315 320

Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp
325 330 335

Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu
340 345 350

His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu
355 360 365

Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val
370 375 380

Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met
385 390 395 400

Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr
405 410 415

Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val
420 425 430

Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val
435 440 445

Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val
450 455 460

Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn
465 470 475 480

Phe Ala Phe Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Arg
485 490 495

Ser His His His His His His
500

<210> 155
<211> 294
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155
Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro
1 5 10 15

Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu
20 25 30

Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala
50 55 60

Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn
65 70 75 80

Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp
85 90 95

Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro
100 105 110

Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly
115 120 125

Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly
130 135 140

Ile Met Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Leu His
145 150 155 160

Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu Lys Phe Ile
165 170 175

Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser
180 185 190

Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys
195 200 205

Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu
210 215 220

Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly
225 230 235 240

Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg
245 250 255

Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly
260 265 270

Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Arg Ser
275 280 285

His His His His His His
290

<210> 156
<211> 222
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156
Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn Thr Thr Val Phe Val Asn
1 5 10 15

Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu Tyr Glu Ala Phe Pro Lys
20 25 30

Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Phe Thr Asp Lys
35 40 45

Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile Arg Tyr Val
50 55 60

Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr

65 70 75 80

Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Phe Asn
85 90 95

Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Val
100 105 110

Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile
115 120 125

Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser Val
130 135 140

Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Pro Pro Phe Gly
145 150 155 160

Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His Asn
165 170 175

Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser Ala
180 185 190

Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn Lys Glu Gln Ile His Pro
195 200 205

His Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser His His His His His His
210 215 220

<210> 157
<211> 741
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 157
Ser Gln Pro Ser Ala Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His
1 5 10 15

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

Thr Cys Ile Asp Pro Asp Phe Val Arg Trp Thr Phe Lys Thr Tyr Phe
35 40 45

Asn Glu Met Val Glu Asn Lys Lys Asn Glu Trp Ile Gln Glu Lys Ala
50 55 60

Glu Ala Thr Arg Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Ser Asn Ser Asn Gly Leu
65 70 75 80

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

Val Gly Leu Pro Leu Phe Gly Lys Glu Asp Ser Asp Ala Leu Val Arg
100 105 110

Cys Pro Leu Thr Asp Pro Gln Val Ser Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Cys
115 120 125

Asp Gly Lys Ser Leu Pro Thr Asp Leu Thr Phe Val Pro Asn Pro Lys
130 135 140

Ala Gly Ile Thr Ile Lys Asn Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys
145 150 155 160

Val Arg Cys Ala Ala Gln Arg Asp Gly Thr Trp Leu His Ser Asp Lys
165 170 175

Phe Thr Leu Lys Val Arg Ala Ala Ile Lys Ala Ile Pro Val Val Ser
180 185 190

Val Pro Glu Thr Ser His Leu Leu Lys Lys Gly Asp Thr Phe Thr Val
195 200 205

Val Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Thr Ser Val Asn Ser Met Trp Leu
210 215 220

Lys Met Asn Pro Gln Pro Gln His Ile Ala Gln Val Lys His Asn Ser
225 230 235 240

Trp His Arg Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Glu Thr Leu Thr Ile
245 250 255

Ser Ser Ala Arg Val Asp Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn
260 265 270

Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Lys Val Val Glu
275 280 285

Lys Gly Phe Ile Asn Ile Ser Pro Val Lys Asn Thr Thr Val Phe Val
290 295 300

Thr Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Val Val Glu Tyr Glu Ala Tyr Pro
305 310 315 320

Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Ser Ala Asn

325 330 335

Lys Gly Lys Asp Tyr Val Lys Ser Asp Asn Lys Ser Asn Ile Arg Tyr
340 345 350

Val Asn Gln Leu Arg Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr
355 360 365

Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe
370 375 380

Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu
385 390 395 400

Ile Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Glu Gly Phe Pro Glu Pro Thr
405 410 415

Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Thr Gly Ala Glu Gln Arg Cys Thr Thr Pro
420 425 430

Val Ser Pro Val Asp Val Gln Val Gln Asn Val Ser Val Ser Pro Phe
435 440 445

Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Val Phe Arg His
450 455 460

Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Ser Asn Asp Val Gly Lys Ser Ser
465 470 475 480

Ala Phe Phe Asn Phe Ala Phe Lys Glu Gln Ile Gln Ala His Thr Leu
485 490 495

Phe Thr Pro Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Arg Ser Pro Arg Gly
500 505 510

Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
515 520 525

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
530 535 540

Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
545 550 555 560

Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
565 570 575

5

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
580 585 590

Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
595 600 605

Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala
610 615 620

Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro
625 630 635 640

Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln
645 650 655

Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr
660 665 670

Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr
675 680 685

Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
690 695 700

Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser
705 710 715 720

Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser
725 730 735

Arg Thr Pro Gly Lys
740

<210> 158
<211> 741
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<400> 158
Ser Gln Pro Ser Ala Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile Gln
1 5 10 15

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

Thr Cys Thr Asp Pro Ala Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp
35 40 45

Val Arg Ile Glu Asn Lys Gln Ser Glu Trp Ile Arg Glu Lys Ala Glu

50 55 60

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

Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Val Leu Phe Leu Val
85 90 95

Gly Leu Pro Leu Phe Gly Lys Glu Asp Asn Asp Ala Leu Val Arg Cys
100 105 110

Pro Leu Thr Asp Pro Gln Val Ser Asn Tyr Ser Leu Ile Glu Cys Asp
115 120 125

Gly Lys Ser Leu Pro Thr Asp Leu Lys Phe Val Pro Asn Pro Lys Ala
130 135 140

Gly Ile Thr Ile Lys Asn Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Ile
145 150 155 160

Arg Cys Ala Ala Gln Arg Glu Gly Lys Trp Met Arg Ser Asp Lys Phe
165 170 175

Thr Leu Lys Val Arg Ala Ala Ile Lys Ala Ile Pro Val Val Ser Val
180 185 190

Pro Glu Thr Ser His Leu Leu Lys Glu Gly Asp Thr Phe Thr Val Ile
195 200 205

Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Thr Ser Val Asp Ser Met Trp Ile Lys
210 215 220

Leu Asn Pro Gln Pro Gln Ser Lys Ala Gln Val Lys Arg Asn Ser Trp
225 230 235 240

His Gln Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Glu Thr Leu Thr Ile Ser
245 250 255

Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn Asn
260 265 270

Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Lys Val Val Glu Lys
275 280 285

Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Val Lys Asn Thr Thr Val Phe Val Thr
290 295 300

Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Val Val Glu Phe Glu Ala Tyr Pro Lys
305 310 315 320

Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Pro Thr Asn Arg
325 330 335

Gly Glu Asp Tyr Val Lys Ser Asp Asn Gln Ser Asn Ile Arg Tyr Val
340 345 350

Asn Glu Leu Arg Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr
355 360 365

Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Ser Ala Ser Val Thr Phe Asp
370 375 380

Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Met
385 390 395 400

Asn Gly Arg Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile
405 410 415

Asp Trp Tyr Phe Cys Thr Gly Ala Glu Gln Arg Cys Thr Val Pro Val
420 425 430

Pro Pro Val Asp Val Gln Ile Gln Asn Ala Ser Val Ser Pro Phe Gly
435 440 445

Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Val Phe Arg His Asn
450 455 460

Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Ser Asn Ala Val Gly Lys Ser Ser Ala
465 470 475 480

Phe Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Ser Lys Glu Gln Ile Gln Pro
485 490 495

His Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
500 505 510

Gly Ser Pro Pro Leu Lys Glu Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu
515 520 525

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val
530 535 540

Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
545 550 555 560

Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
565 570 575

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
580 585 590

Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
595 600 605

Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser
610 615 620

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro
625 630 635 640

Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu
645 650 655

Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala
660 665 670

Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr
675 680 685

Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu
690 695 700

Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser
705 710 715 720

Val Val His Glu Gly Leu His Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser
725 730 735

Arg Ser Leu Gly Lys
740

<210> 159
<211> 527
<212> PRT
<213> 食蟹獼猴

<400> 159
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro
20 25 30

Ser Ile His Pro Ala Lys Ser Glu Leu Ile Val Arg Val Gly Asn Glu
35 40 45

Ile Arg Leu Leu Cys Ile Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu
50 55 60

Ile Leu Asp Glu Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu
65 70 75 80

Lys Ala Glu Ala Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His
85 90 95

Gly Leu Ser Ser Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu
100 105 110

Phe Leu Val Asp Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu
115 120 125

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

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

Pro Lys Ala Gly Ile Thr Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg
165 170 175

Leu Cys Leu His Cys Ser Ala Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser
180 185 190

Asp Lys Phe Ile Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val
195 200 205

Val Ser Val Ser Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe
210 215 220

Thr Val Thr Cys Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr
225 230 235 240

Trp Lys Arg Glu Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser
245 250 255

Trp His His Gly Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Ala Thr Leu Thr Ile
260 265 270

Ser Ser Ala Arg Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn
275 280 285

Asn Thr Phe Gly Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp
290 295 300

Lys Gly Phe Ile Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn Thr Thr Val Phe Val
305 310 315 320

Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu Tyr Glu Ala Phe Pro
325 330 335

Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Phe Thr Asp
340 345 350

Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile Arg Tyr
355 360 365

Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr
370 375 380

Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ser Ile Ala Phe
385 390 395 400

Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu
405 410 415

Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr
420 425 430

Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser
435 440 445

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

Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His
465 470 475 480

Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser
485 490 495

Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn Lys Glu Gln Ile His
500 505 510

Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Arg Ser His His His His His His
515 520 525

<210> 160
<211> 503

<212> PRT
<213> 智人

<400> 160
Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro
1 5 10 15

Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu
20 25 30

Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn Glu Trp Ile Thr Glu Lys Ala Glu Ala
50 55 60

Thr Asn Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Thr Asn Lys His Gly Leu Ser Asn
65 70 75 80

Ser Ile Tyr Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu Val Asp
85 90 95

Arg Ser Leu Tyr Gly Lys Glu Asp Asn Asp Thr Leu Val Arg Cys Pro
100 105 110

Leu Thr Asp Pro Glu Val Thr Asn Tyr Ser Leu Lys Gly Cys Gln Gly
115 120 125

Lys Pro Leu Pro Lys Asp Leu Arg Phe Ile Pro Asp Pro Lys Ala Gly
130 135 140

Ile Met Ile Lys Ser Val Lys Arg Ala Tyr His Arg Leu Cys Leu His
145 150 155 160

Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu Ser Glu Lys Phe Ile
165 170 175

Leu Lys Val Arg Pro Ala Phe Lys Ala Val Pro Val Val Ser Val Ser
180 185 190

Lys Ala Ser Tyr Leu Leu Arg Glu Gly Glu Glu Phe Thr Val Thr Cys
195 200 205

Thr Ile Lys Asp Val Ser Ser Ser Val Tyr Ser Thr Trp Lys Arg Glu
210 215 220

Asn Ser Gln Thr Lys Leu Gln Glu Lys Tyr Asn Ser Trp His His Gly
225 230 235 240

Asp Phe Asn Tyr Glu Arg Gln Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Ala Arg
245 250 255

Val Asn Asp Ser Gly Val Phe Met Cys Tyr Ala Asn Asn Thr Phe Gly
260 265 270

Ser Ala Asn Val Thr Thr Thr Leu Glu Val Val Asp Lys Gly Phe Ile
275 280 285

Asn Ile Phe Pro Met Ile Asn Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu
290 295 300

Asn Val Asp Leu Ile Val Glu Tyr Glu Ala Phe Pro Lys Pro Glu His
305 310 315 320

Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp
325 330 335

Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu
340 345 350

His Leu Thr Arg Leu Lys Gly Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu
355 360 365

Val Ser Asn Ser Asp Val Asn Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val
370 375 380

Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met
385 390 395 400

Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr
405 410 415

Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val
420 425 430

Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val
435 440 445

Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val
450 455 460

Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn
465 470 475 480

Phe Ala Phe Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Arg
485 490 495

Ser His His His His His His
500

<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 161
Val Phe Val Arg Asp Pro Ala Lys Leu Phe Leu
1 5 10

<210> 162
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 162
His Cys Ser Val Asp Gln Glu Gly Lys Ser Val Leu
1 5 10

201446806

發明摘要

※ 申請案號：103109292

※ 申請日：103.3.14

※IPC 分類：C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/5365 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗體藥物結合物

ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明係關於抗cKIT抗體、抗體片段、抗體藥物結合物，及其等用於治療癌症之用途。

【英文】

The present invention relates to anti-cKIT antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

申請專利範圍

1. 一種下式之抗體藥物結合物

$$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$$

或其醫藥學上可接受之鹽；其中

Ab為特異性地結合至人類cKIT之抗原決定基之抗體或其抗原結合片段；

L為連接子；

D為藥物部分；

m為1至8之整數；且

n為1至10之整數。

2. 如請求項1之抗體藥物結合物，其中該n為3或4。

3. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段特異性地結合cKIT之胞外域(SEQ ID NO.160)。

4. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段在結構域1-3 (SEQ ID NO.155)處特異性地結合至人類cKIT之抗原決定基。

5. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段在SEQ ID NO. 161或SEQ ID NO. 162處特異性地結合人類cKIT。

6. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

(i)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 76之HCDR1 (CDR互補決定區)，(b) SEQ ID NO: 77之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 78之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 85之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 86之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 87之

LCDR3；

(ii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 22之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 23之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 24之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 31之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 32之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 33之LCDR3；

(iii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 130之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 131之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 132之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 139之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 140之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 141之LCDR3；

(iv)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 58之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 59之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 60之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 67之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 68之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 69之LCDR3；

(v)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 40之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 41之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 42之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 49之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 50之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 51之LCDR3；

(vi)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 94之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 95之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 96之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 103之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 104之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 105之LCDR3；

(vii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 112之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 113之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 114之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 121之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 122之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 123之LCDR3；或

(viii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 3之HCDR1，(b)

SEQ ID NO: 4之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 5之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 12之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 13之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 14之LCDR3。

7. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中CDR內之至少一個胺基酸經另一抗cKIT抗體之相應CDR之相應殘基取代。

8. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中CDR內之一個或兩個胺基酸已經修飾、缺失或取代。

9. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其在可變輕鏈區或可變重鏈區上保留至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

10. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類工程改造抗體、人類抗體、單鏈抗體(scFv)或抗體片段。

11. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該連接子(L)係選自由以下組成之群：可裂解連接子、不可裂解連接子、親水性連接子、預帶電荷連接子及基於二羧酸之連接子。

12. 如請求項11之抗體藥物結合物，其中該連接子係來源於選自由以下組成之群的交聯試劑：3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)、4-(2-吡啶基二硫基)2-磺酸基-丁酸N-丁二醯亞胺酯(磺酸基-SPDB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-磺酸基丁二醯亞胺酯(磺酸基-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-

四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(CX1-1)。

13. 如請求項12之抗體藥物結合物，其中該連接子係來衍生自該交聯試劑4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)。

14. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其中該藥物部分(D)係選自由以下組成之群：V-ATPase抑制劑、促凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧里斯他汀(auristatin)、海兔毒素(dolastatin)、類美登素(maytansinoid)、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白CRM1之抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑(kinesin inhibitor)、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷基化劑、DNA嵌入劑、DNA小溝結合劑及DHFR抑制劑。

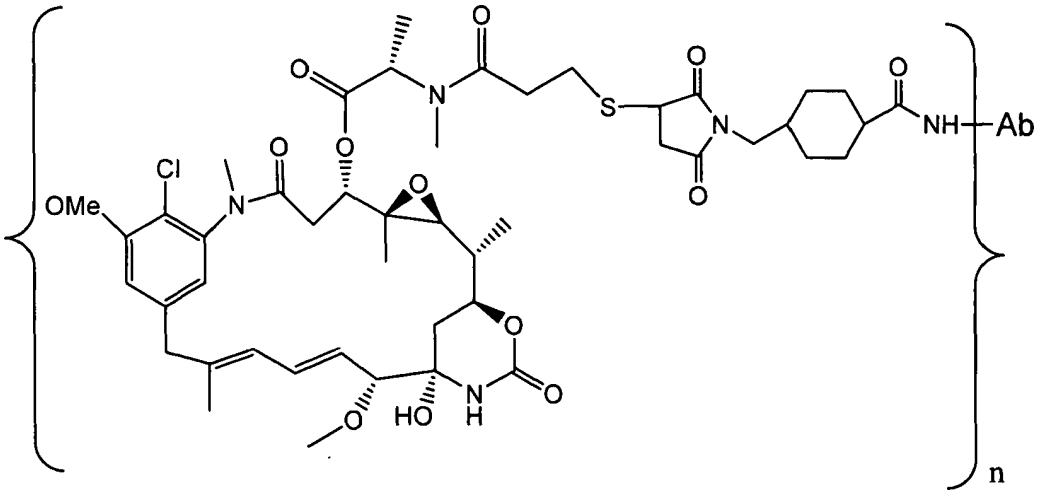
15. 如請求項14之抗體藥物結合物，其中該藥物部分為類美登素。

16. 如請求項15之抗體藥物結合物，其中該類美登素為N(2')-脫乙醯基-N(2')-(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素(DM1)或N(2')-脫乙醯基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)。

17. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其係與另一治療劑組合。

18. 如請求項1或2之抗體藥物結合物，其係與表16中所列之治療劑組合。

19. 一種下式之抗體藥物結合物



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

Ab為特異性地結合至人類cKIT之抗體或其抗原結合片段，且包含至少一個n。

20. 如請求項19之抗體藥物結合物，其中該Ab為包含以下之抗體或其抗原結合片段：

(i)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 76之HCDR1 (CDR互補決定區)，(b) SEQ ID NO: 77之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 78之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 85之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 86之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 87之LCDR3；

(ii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 22之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 23之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 24之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 31之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 32之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 33之LCDR3；

(iii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 130之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 131之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 132之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 139之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 140之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 141之LCDR3；

(iv)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 58之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 59之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 60之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 67之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 68之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 69之LCDR3；

(v)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 40之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 41之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 42之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 49之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 50之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 51之LCDR3；

(vi)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 94之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 95之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 96之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 103之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 104之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 105之LCDR3；

(vii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 112之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 113之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 114之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 121之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 122之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 123之LCDR3；或

(viii)包含以下之重鏈可變區：(a) SEQ ID NO: 3之HCDR1，(b) SEQ ID NO: 4之HCDR2，(c) SEQ ID NO: 5之HCDR3；及包含以下之輕鏈可變區：(d) SEQ ID NO: 12之LCDR1，(e) SEQ ID NO: 13之LCDR2，及(f) SEQ ID NO: 14之LCDR3。

21. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其中CDR內之至少一個胺基酸經另一抗cKIT抗體之相應CDR之相應殘基取代。

22. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其中CDR內之一個或兩個胺基酸已經修飾、缺失或取代。

23. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其在該可變輕鏈區或可變重鏈區上保留至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%或99%一致性。

24. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類工程改造抗體、人類抗體、單鏈抗體(scFv)或抗體片段。

25. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其中該n為1至10之整數。

26. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其中該n為3至4之整數。

27. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其係與另一治療劑組合。

28. 如請求項19或20之抗體藥物結合物，其係與表16中所列之治療劑組合。

29. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至26中任一項之抗體藥物結合物及醫藥學上可接受之載劑。

30. 如請求項29之醫藥組合物，其中該組合物係以凍乾物形式製備。

31. 如請求項30之醫藥組合物，其中該凍乾物包含如請求項1至26中任一項之抗體藥物結合物、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20。

32. 一種如請求項1至26中任一項之抗體藥物結合物或如請求項29至31中任一項之醫藥組合物之用途，其係用於製造用以治療cKIT陽性癌症之藥劑。

33. 如請求項32之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：胃腸基質腫瘤(GIST)、小細胞肺癌(SCLC)、急性骨髓性白血病(AML)、黑素瘤、肥大細胞白血病(MCL)、肥大細胞增多症、神經纖維瘤、乳癌、非小細胞肺癌(NSCLC)及胰臟癌。

34. 如請求項33之用途，其中該藥劑係與另一治療劑組合投與。

35. 如請求項34之用途，其中該藥劑係與表16中所列之治療劑組合投與。

36. 如請求項1、2、19及20中任一項之抗體藥物結合物，其係用作

藥劑。

37. 如請求項1、2、19及20中任一項之抗體藥物結合物，其係用於治療cKIT陽性癌症。

38. 如請求項37之抗體藥物結合物，其係與另一治療劑組合投與。

39. 如請求項38之抗體藥物結合物，其係與表16中所列之治療劑組合投與。

40. 如請求項29至31中任一項之醫藥組合物，其係用於治療cKIT陽性癌症。

41. 一種核酸，其編碼如請求項1至26中任一項之抗體或抗原結合片段。

42. 一種載體，其包含如請求項41之核酸。

43. 一種宿主細胞，其包含如請求項42之載體。

44. 一種產生抗體或抗原結合片段之方法，其包含培養如請求項43之宿主細胞及自該培養物回收該抗體。

45. 一種產生抗cKIT抗體藥物結合物之方法，該方法包含：

(a)使SMCC化學連接至藥物部分DM-1；

(b)使該連接子-藥物結合至如請求項44之自該細胞培養物回收之抗體；及

(c)純化該抗體藥物結合物。

46. 一種如請求項45製得之抗體藥物結合物，以UV分光光度計量測，其具有約3.5之平均類美登素與抗體比(MAR)。

47. 一種診斷試劑，其包含經標記之如請求項1至26中任一項之抗體或其抗原結合片段。

48. 如請求項47之診斷試劑，其中該標記係選自由放射性標記、螢光團、發色團、成像劑及金屬離子組成之群。

c-Kit ADC對一組細胞株之活性

ADC	GIST T-1		GIST882		GIST430		NCI-H526		NCI-H1048		Kasumi-6		Kasumi-1		MDA-MB-453 (c-Kit陰性)	
	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %	IC50 nM	Amax %
IgG-MCC-DM1	13.622	82	**>68**	27	33.121	53	35.738	99	12.141	98	19.200	78	8.300	99	11.383	95
NEG024-MCC-DM1	0.021	72	0.721	66	0.038	53	0.074	99	0.737	98	5.262	78	8.493	99	22.772	92
NEG085-MCC-DM1	0.009	76	0.471	71	0.036	59	0.026	99	0.547	98	0.637	80	4.824	99	46.827	90
NEG086-MCC-DM1	0.013	74	0.430	69	0.056	54			0.828	98	0.522	80	4.223	99	16.922	91
NEG087-MCC-DM1	0.008	78	0.411	70	0.046	57			1.503	98	3.242	80	6.073	99	45.431	90
20376-MCC-DM1	0.051	69	1.000	69	0.038	54	0.074	99	1.340	97	1.505	79	1.329	100	2.690	95

圖1

對多種細胞株進行之不同連接子/毒素之比較

細胞株	適應症	9P3-MCC-DM1 GI50 (nM)	9P3-MCC-DM1 Amax (%)	9P3-SPDB-DM4 GI50 (nM)	9P3-SPDB-DM4 Amax (%)	9P3-CX1-1-DM1 GI50 (nM)	9P3-CX1-1-DM1 Amax (%)	cKit狀態
CMK11-5	AML	0.05	91	0.07	92	nd	nd	WT
Hel92.1.7	AML	0.61	95	1.26	94	7.6	95	WT
Kasumi-1	AML	4	100	0.83	100	0.02	100	N822K/WT
Kasumi-6	AML	1.29	92	0.91	94	nd	nd	WT
M-O7e	AML	0.08	100	0.11	99	nd	nd	WT
OCI-M1	AML	0.11	99	0.13	100	nd	nd	WT
SKNO1	AML	3.6	99	1.6	99	5.2	100	N822K/N822K
UKE-1	AML	1.8	99	5.6	100	nd	nd	WT
GIST T1	GIST	0.02	75	0.045	75	nd	nd	Ex11del
GIST430	GIST	0.08	60	0.17	65	0.04	55	Ex11del, Ex13
NCI-H526	SCLC	0.05	98	0.17	98	nd	nd	WT
NCI-H889	SCLC	0.15	86	1.47	84	nd	nd	Amp
NCI-H1048	SCLC	4.3	99	2.77	100	1.45	100	WT
NCI-H1930	SCLC	0.09	87	0.3	88	nd	nd	Amp

圖2

適應症對c-Kit ADC之敏感度

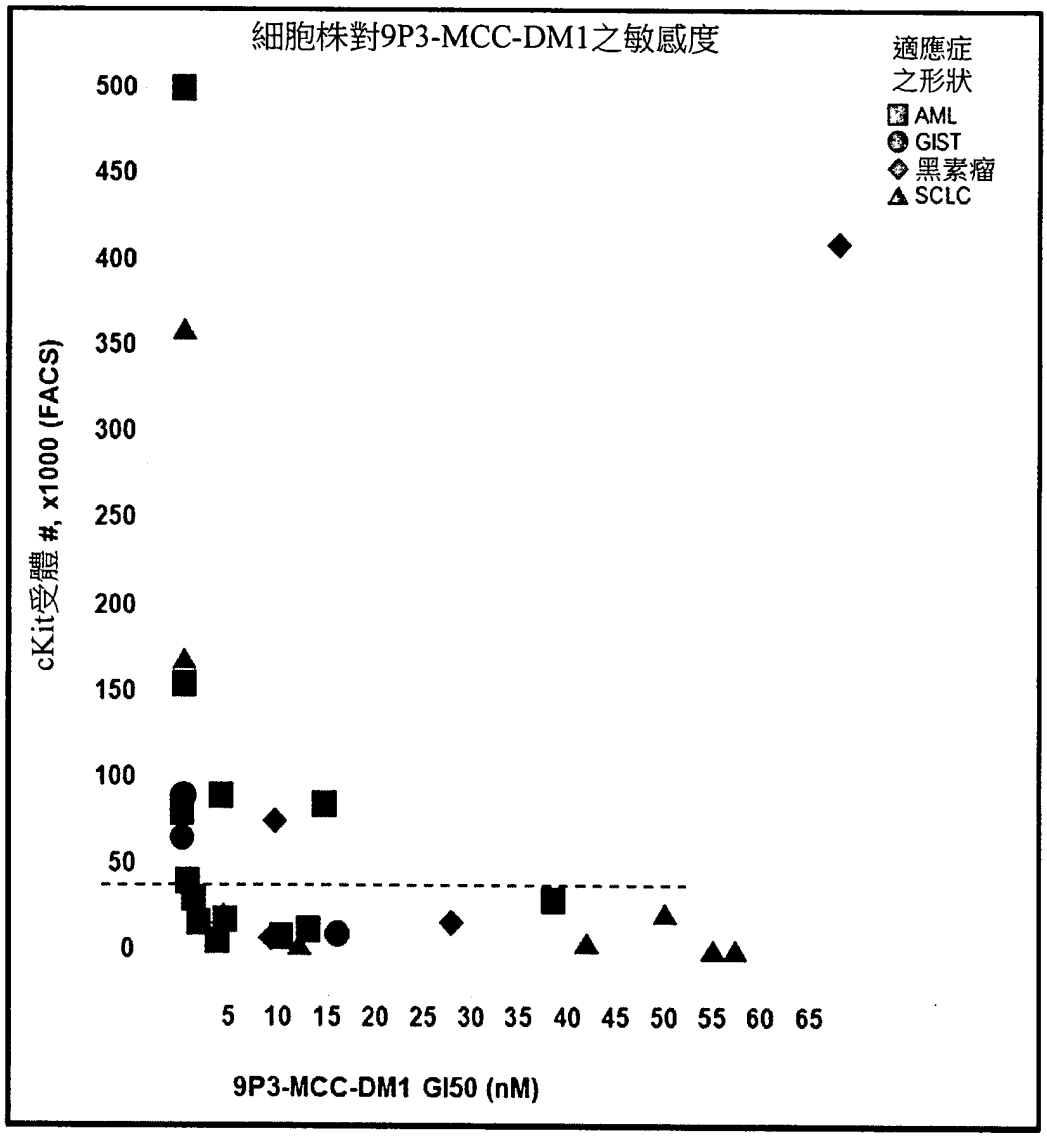


圖3

c-Kit ADC對GIST T1細胞之活性

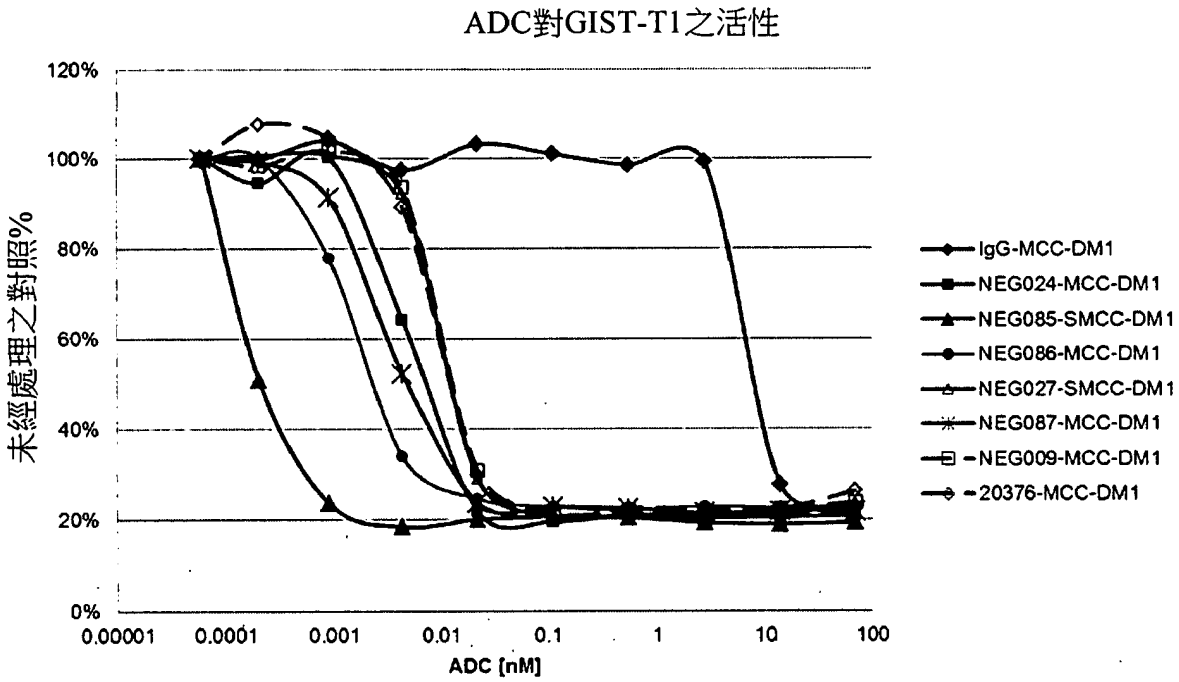


圖4

c-Kit ADC對GIST 430細胞之活性

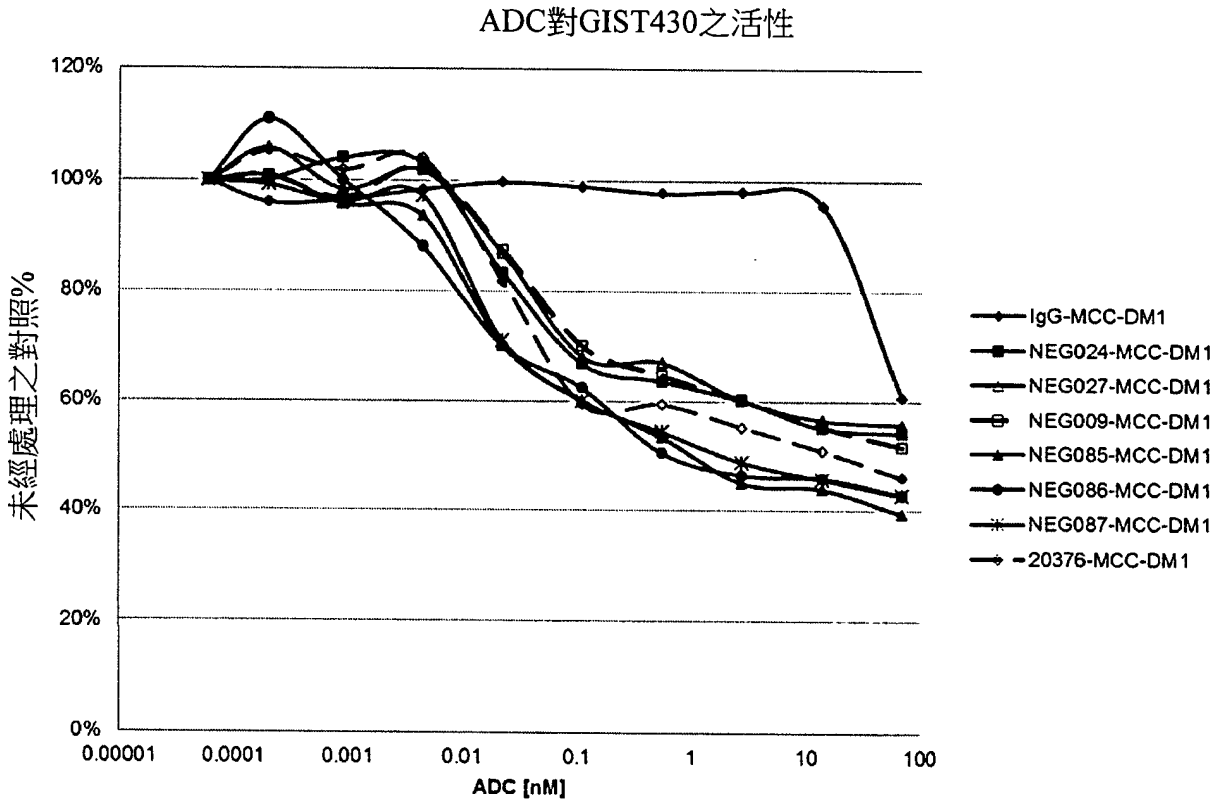


圖5

c-Kit ADC對NCI-H526細胞(小細胞肺癌(SCLC))之活性

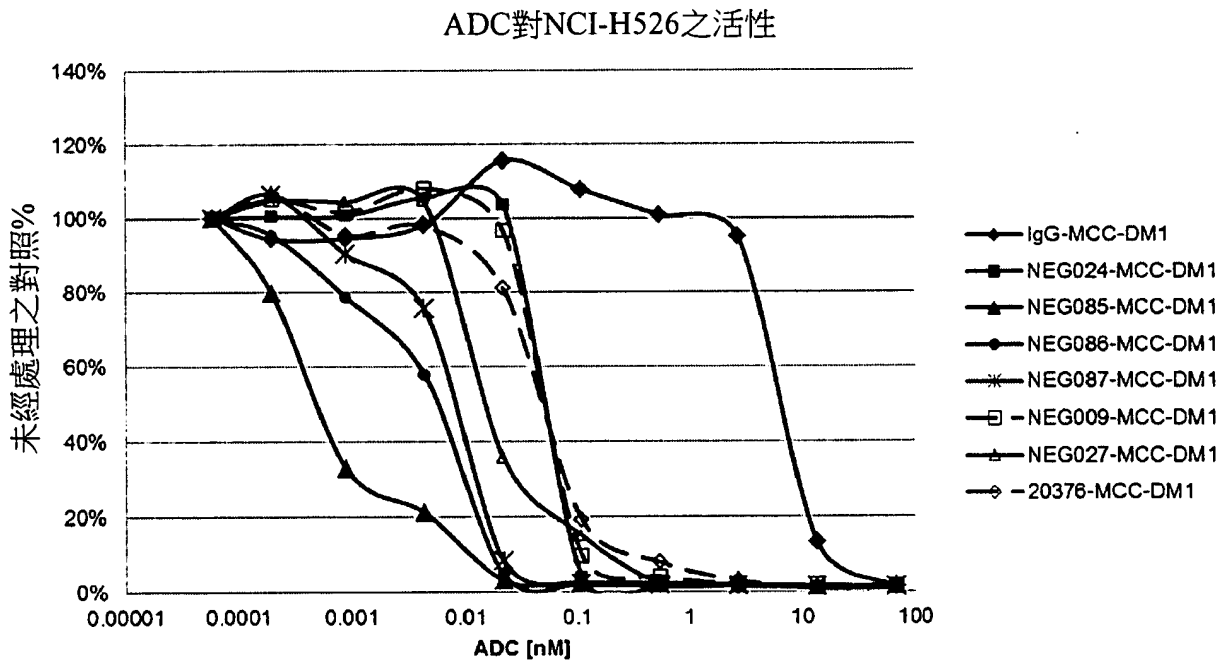


圖6

c-Kit ADC對NCI-H1048細胞之活性

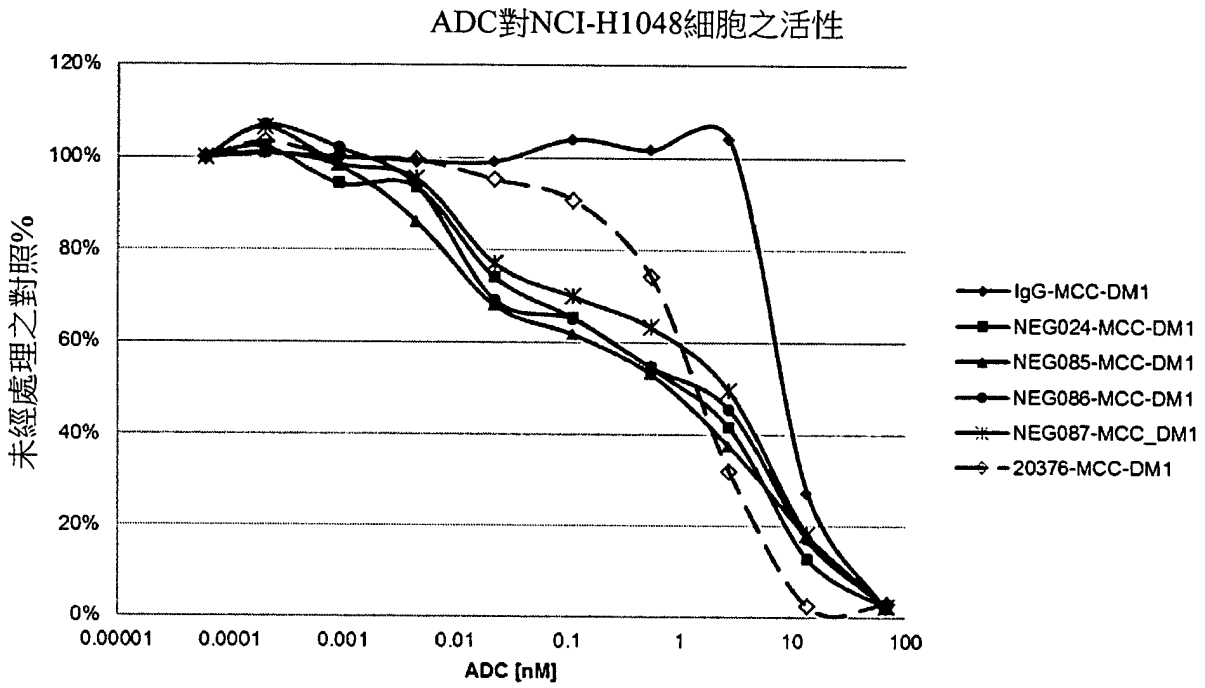


圖7

c-Kit ADC對CMK-11-5細胞之活性

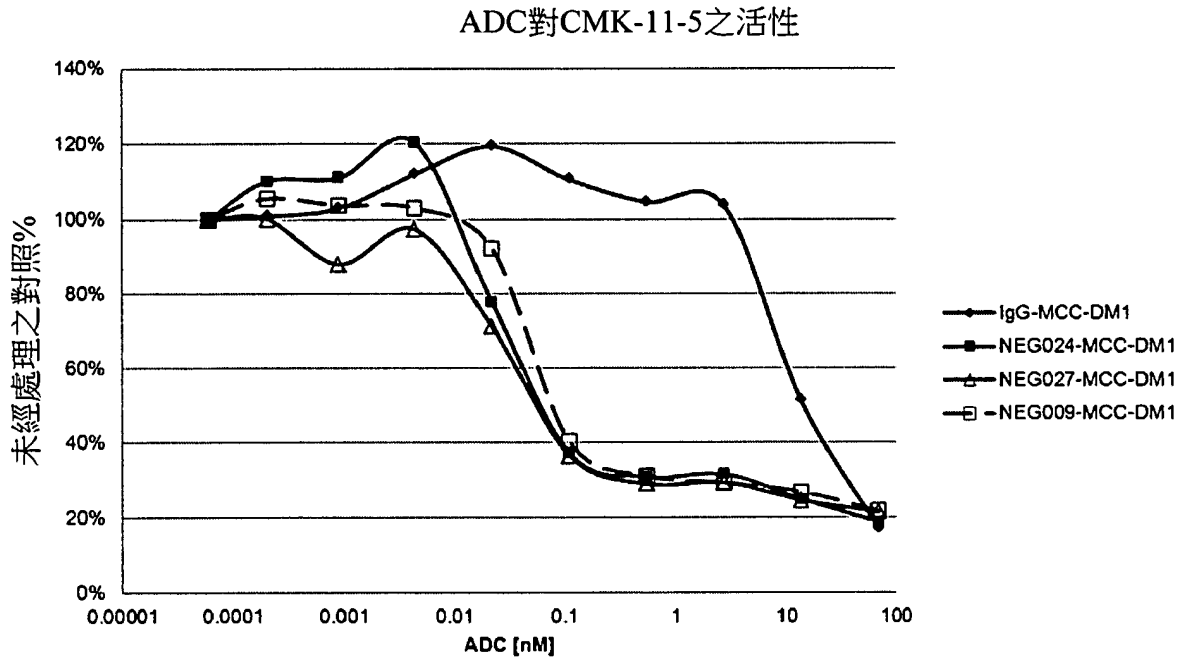


圖8

c-Kit ADC對Uke-1細胞之活性

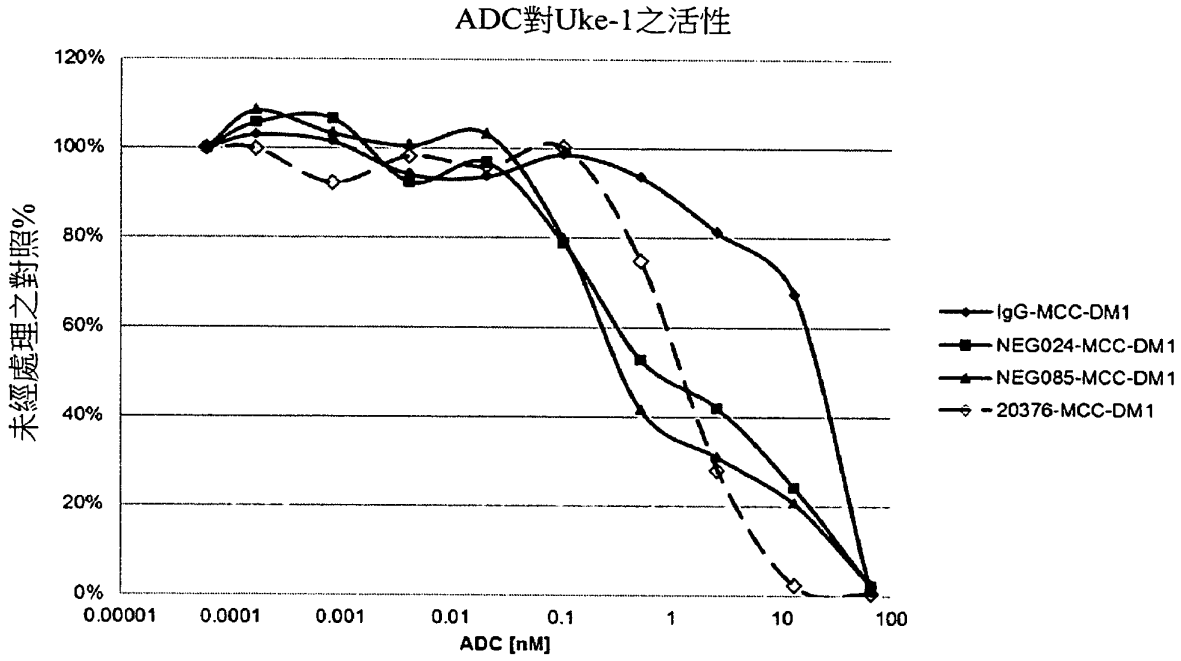
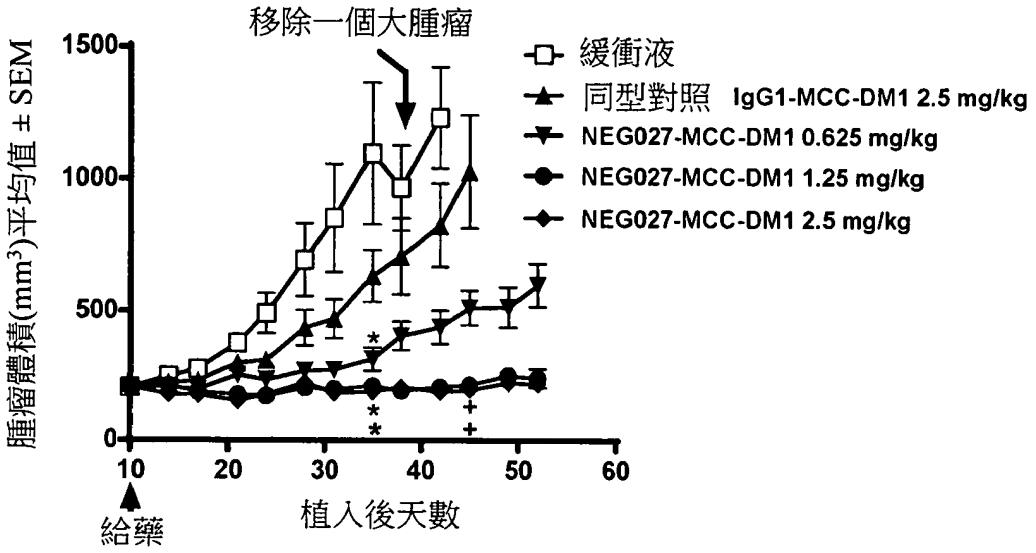


圖9

(A) GIST T1小鼠異種移植物中之劑量反應功效



(B) *((A)中給藥之圖例適用於(B))，經處理過程之體重變化

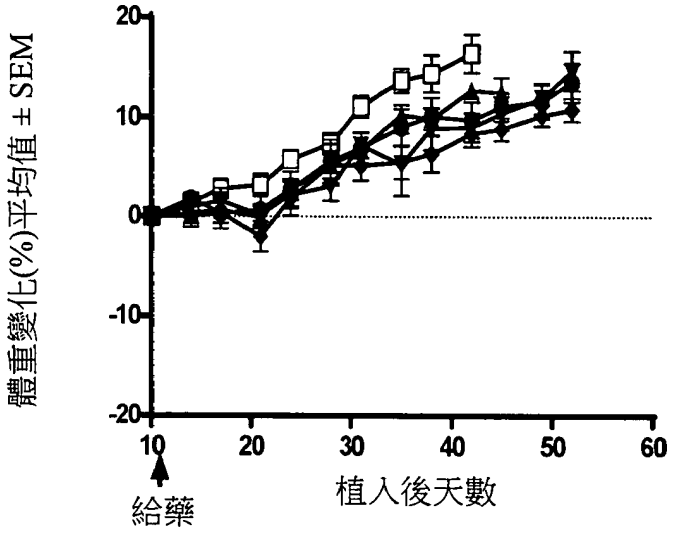
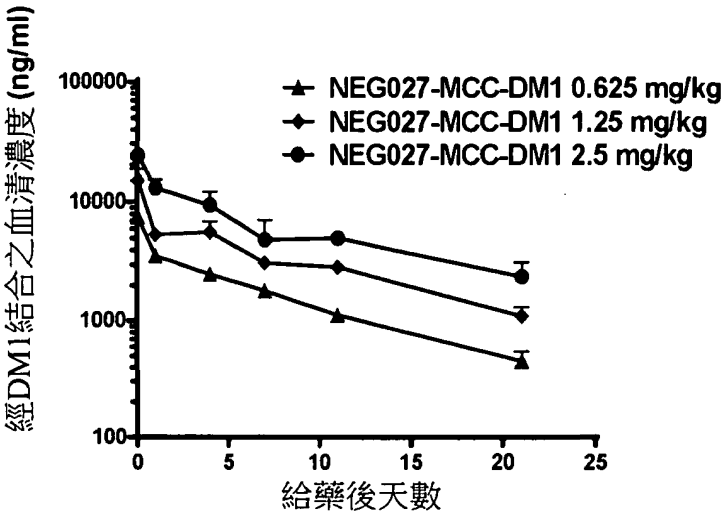


圖23

(A) 在GIST T1異種移植模型中給藥之後的抗DM1 ELISA



(B)在GIST T1異種移植模型中給藥之後的抗人IgG1 ELISA

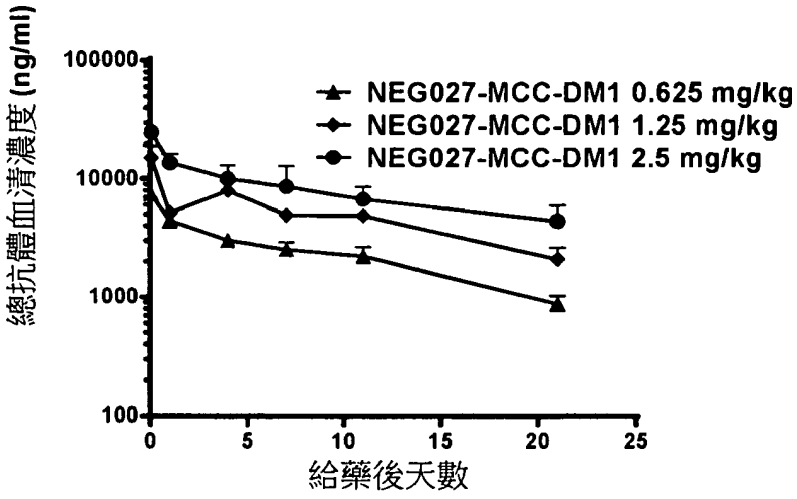


圖24

GIST T1異種移植小鼠模型中之NEG027-MCC-DM1劑量反應

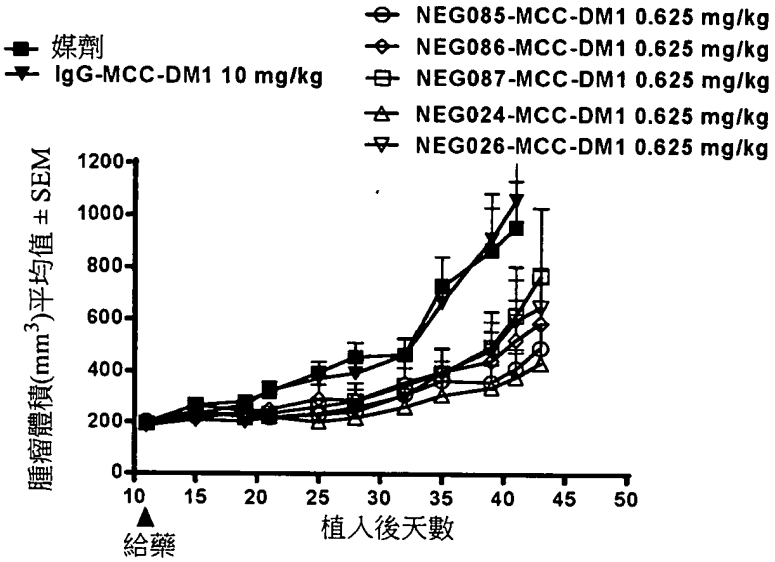
(上圖)第35天資料表($p < 0.05$相對於媒劑，ANOVA/塔基氏檢驗) (下圖)第45天資料表($p < 0.05$相對於Grp 2 (IgG-DM1對照)，ANOVA/鄧恩氏法)

組	藥物	劑量	時程	腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C)(%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化($mm^3 \pm SEM$)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
1	TBS	0 mg/kg	單次靜脈內給藥	100	-	890 ± 270	13.7 ± 1.2	9/9
2	IgG5-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	47	-	417 ± 95	10.2 ± 1.0	9/9
3	NEG027-MCC-DM1	0.625 mg/kg	單次靜脈內給藥	12*	-	109 ± 39	5.3 ± 3.2	9/9
4	NEG027-MCC-DM1	1.25 mg/kg	單次靜脈內給藥	0*	-	4 ± 15	9.0 ± 1.8	9/9
5	NEG027-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	-*	-8.71	-18 ± 21	5.5 ± 1.6	9/9

組	藥物	劑量	時程	腫瘤體積相對於IgG對照之平均變化(T/C)(%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化($mm^3 \pm SEM$)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
1	TBS	0 mg/kg	單次靜脈內給藥	下降	下降	0 ± 0	0.0 ± 0.0	9/9
2	IgG-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-	811 ± 214	12.5 ± 1.5	9/9
3	NEG027-MCC-DM1	0.625 mg/kg	單次靜脈內給藥	50	-	301 ± 62	10.4 ± 1.7	8/9 (第38天自研究中移除一隻)
4	NEG027-MCC-DM1	1.25 mg/kg	單次靜脈內給藥	21*	-	8 ± 19	11.1 ± 1.4	9/9
5	NEG027-MCC-DM1	2.5 mg/kg	單次靜脈內給藥	20*	-	-14 ± 28	8.8 ± 1.1	8/9 (第38天自研究中移除一隻)

圖25

(A) 在GIST T1異種移植小鼠模型中0.625 mg/kg之功效



(B) 腫瘤體積相對於對照之變化(% T/C)

ADC	% ΔT/ΔC (D41)
IgG1-DM1	114
NEG085-DM1	**28**
NEG086-DM1	43
NEG087-DM1	56
NEG024-DM1	**23**
NEG026-DM1	54

(C) 經處理過程之體重變化

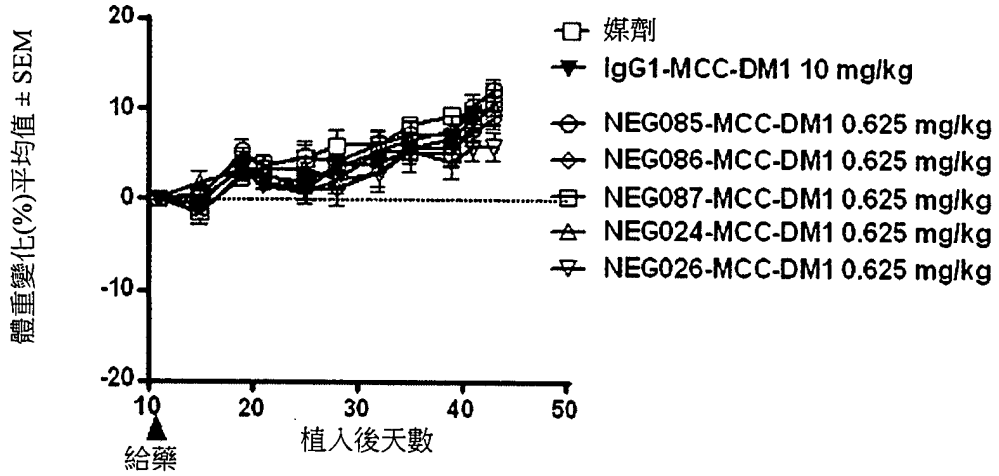


圖27

在將單次劑量之抗cKIT ADC投與GIST T1異種移植小鼠之後第41天

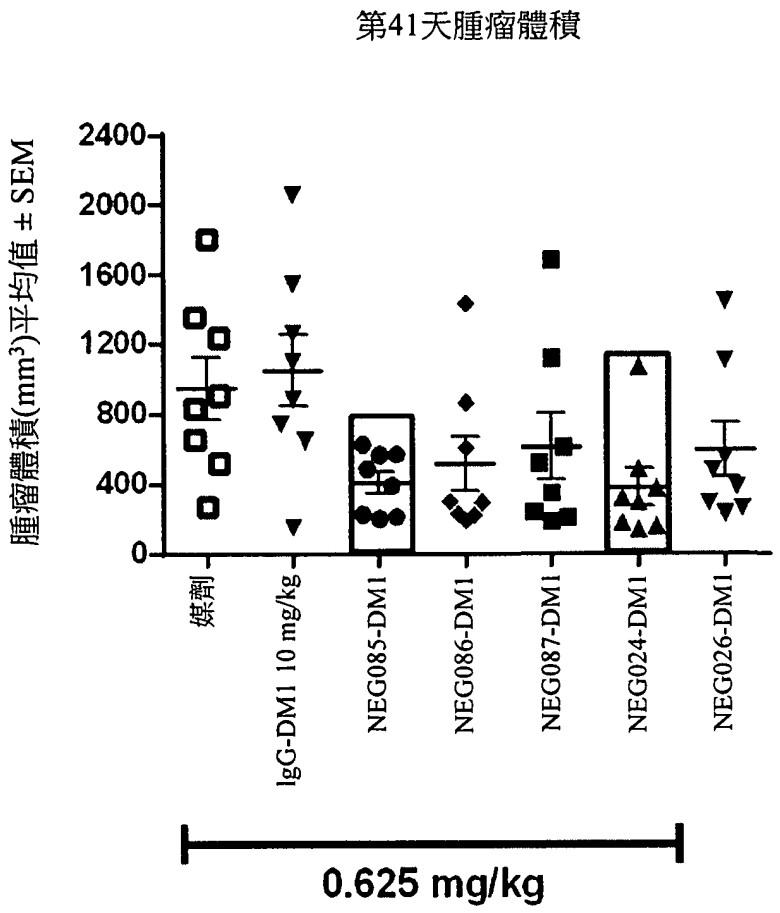


圖28

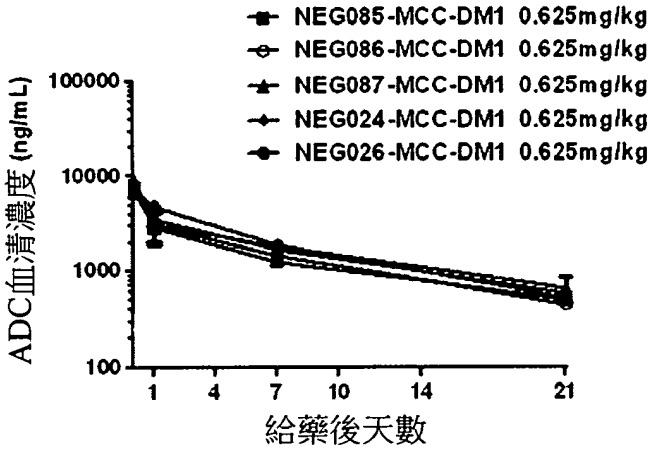
在SCID灰棕色小鼠之GIST T1模型中之抗cKIT ADC功效研究(低劑量)

藥物	劑量	時程	腫瘤反應		宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C)(%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3± SEM)	體重之平均變化(%± SEM)	存活(存活數/總數)
TBS	0mg/kg	單次靜脈內給藥	100	757 ± 175	9.3 ± 1.0	8/8
IgG-SMCC-DM1	10mg/kg	單次靜脈內給藥	114	861 ± 206	9.1 ± 1.0	8/8
NEG085-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	28	210 ± 56	10.3 ± 1.3	8/8
NEG086-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	43	325 ± 146	7.4 ± 1.4	8/8
NEG087-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	56	423 ± 188	8.4 ± 2.1	8/8
NEG024-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	23	176 ± 104	9.6 ± 2.0	8/8
NEG026-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	54	410 ± 166	5.7 ± 1.4	8/8

圖29

(A) GIST T1異種移植小鼠模型中之抗cKIT PK (左圖為抗DM1 ELISA)

(B)右圖為抗人IgG1 ELISA



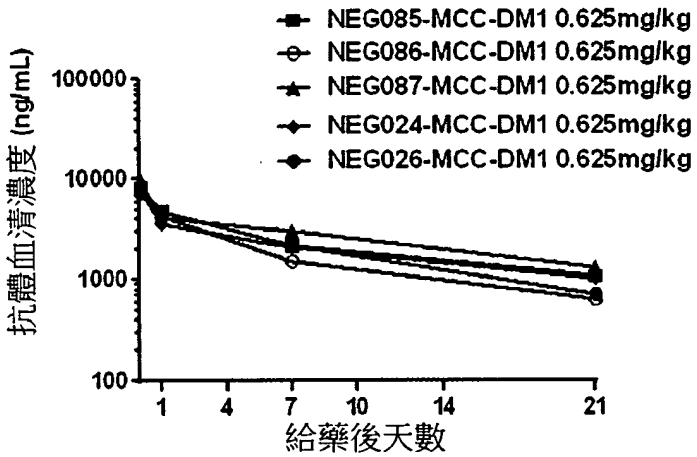


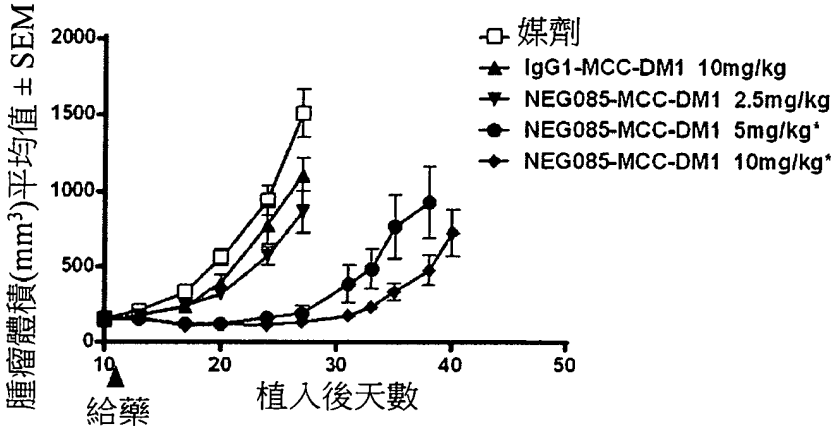
圖30

在NCI-H1048 SCLC中之抗cKIT-ADC功效研究

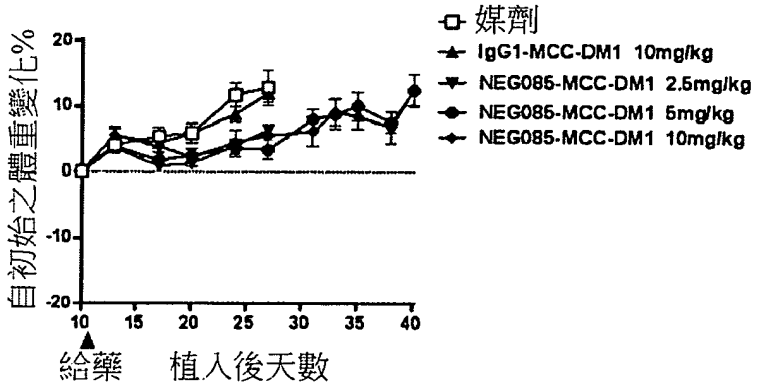
藥物	劑量	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化 (T/C)(%)	消退 (%)	腫瘤體積之平均變化 (mm^3± SEM)	體重之平均變化 (%± SEM)	存活(存活數/總數)
媒劑	0mg/kg	單次靜脈內給藥	100	-	1234 ± 125	8.8 ± 3.7	8/8
IgG1-MCC-DM1	2mg/kg	單次靜脈內給藥	82	-	1013 ± 91	8.8 ± 2.9	8/8
NEG024-MCC-DM1	2mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-2.16*	-3 ± 18	2.5 ± 2.4	8/8
NEG085-MCC-DM1	2mg/kg	單次靜脈內給藥	9	-	114 ± 42	-0.2 ± 2.1	8/8
NEG086-MCC-DM1	2mg/kg	單次靜脈內給藥	4*	-	44 ± 22	1.8 ± 0.7	8/8

圖32

(A) 在NCI-H1048 (SCLC)異種移植模型中之NEG085-MCC-DM1劑量反應



*P < 0.05，ANOVA/塔基



(B) 經處理過程之體重變化

圖33

在NCI-1048 (SCLC)異種移植小鼠模型中之NEG085-MCC-DM1功效研究

第27天資料表

藥物	劑量	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C)(%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3± SEM)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
TBS	0mg/kg	單次靜脈內給藥	100	-	1347 ± 164	12.9 ± 2.6	8/8
IgG1-MCC-DM1	10mg/kg	單次靜脈內給藥	72	-	963 ± 113	12.0 ± 1.3	8/8
NEG085-MCC-DM1	2.5mg/kg	單次靜脈內給藥	53	-	716 ± 141	6.3 ± 1.7	8/8
NEG085-MCC-DM1	5mg/kg	單次靜脈內給藥	3*	-	37 ± 55	6.0 ± 1.8	8/8
NEG085-MCC-DM1	10mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-14.92*	-23 ± 14	5.5 ± 1.7	8/8

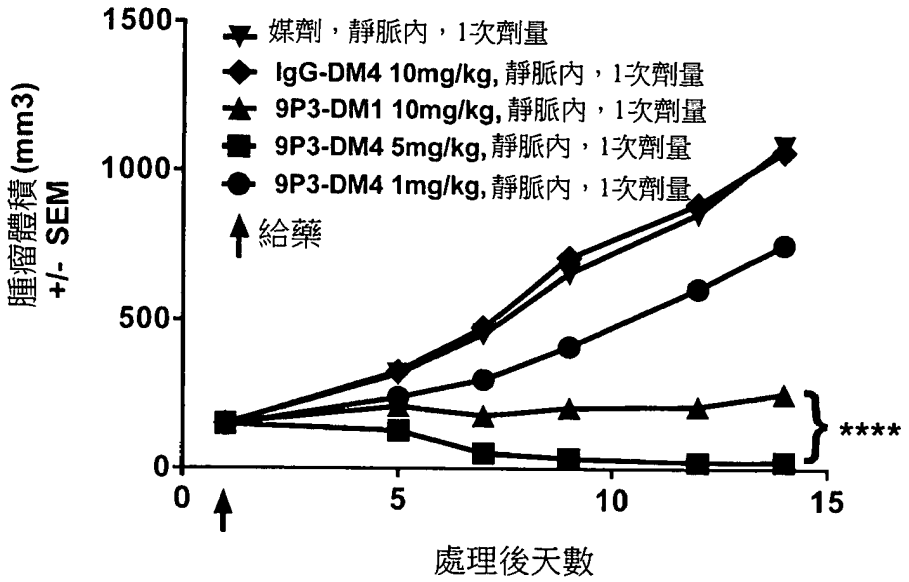
圖34

在小細胞肺癌(SCLC)異種移植模型中之抗cKIT ADC (*p < 0.05，ANOVA/鄧恩氏法)

藥物	劑量	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C)(%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3± SEM)	體重之平均變化(%± SEM)	存活(存活數/總數)
TBS	**0mg/kg**	單次靜脈內給藥	**100**	**-**	**1338 ± 107**	**13.5 ± 3.6**	**9/9**
IgG1-MCC-DM1	**10mg/kg**	單次靜脈內給藥	**57**	**-**	**766 ± 208**	**6.6 ± 0.7**	**9/9**
20376-MCC-DM1	**10mg/kg**	單次靜脈內給藥	**1**	**-**	**18 ± 28**	**4.1 ± 1.9**	**9/9**
NEG024-MCC-DM1	**2.5mg/kg**	單次靜脈內給藥	**-**	**-76.14***	**-148 ± 17**	**3.0 ± 1.1**	**9/9**
NEG024-MCC-DM1	**5mg/kg**	單次靜脈內給藥	**-**	**-52.94***	**-106 ± 15**	**3.3 ± 1.1**	**9/9**
NEG024-MCC-DM1	**10mg/kg**	單次靜脈內給藥	**-**	**-63.04***	**-123 ± 14**	**-0.1 ± 2.2**	**9/9**

圖36

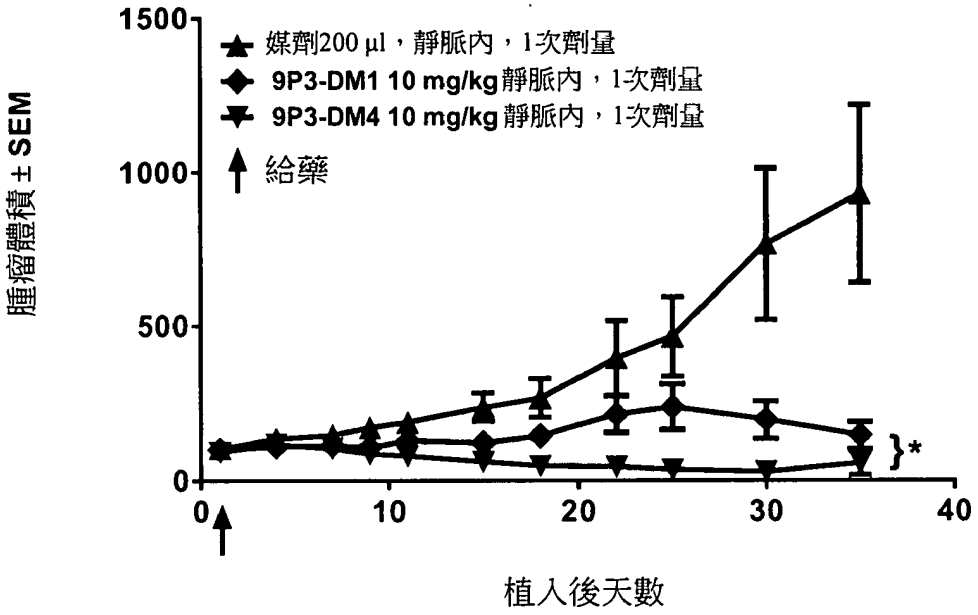
在AML異種移植模型(Kasumi-1)中之功效



對照相對於處理組：使用單因子ANOVA量測顯著差異，事後檢驗塔基多重比較檢驗(***p<0.0001)

圖37

在HMC-1肥大細胞增多症異種移植小鼠模型中之功效

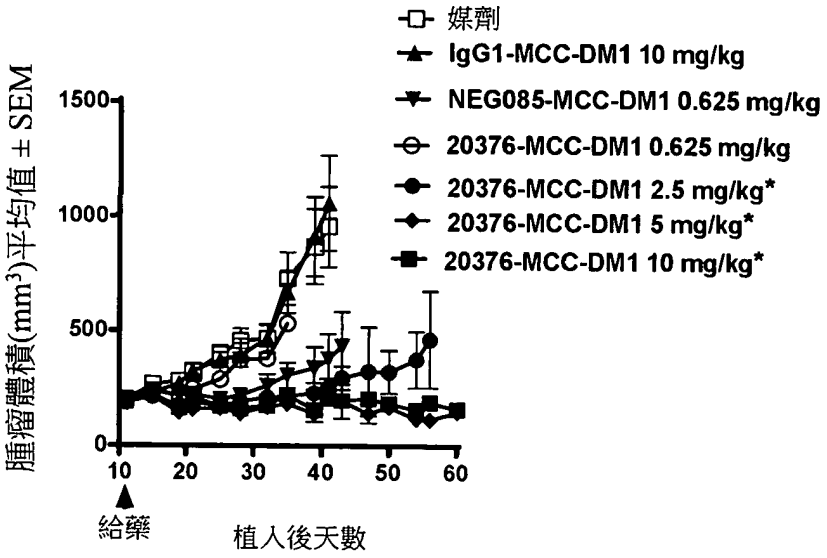


對照相對於處理組：使用單因子ANOVA量測顯著差異，事後檢驗塔基多重比較檢驗(*$p<0.05$)

圖38

在GIST T1異種移植小鼠模型中之小鼠交叉反應性20376-MCC-DM1之功效

A-劑量及腫瘤體積



B-經處理過程之體重變化

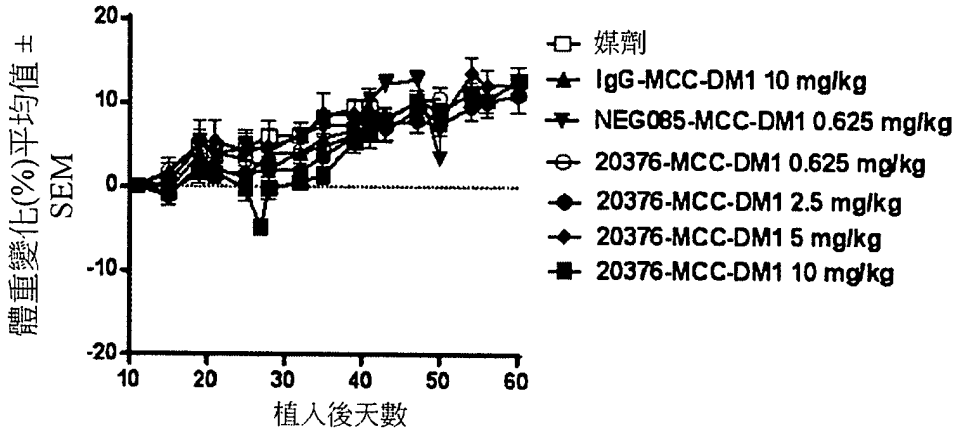
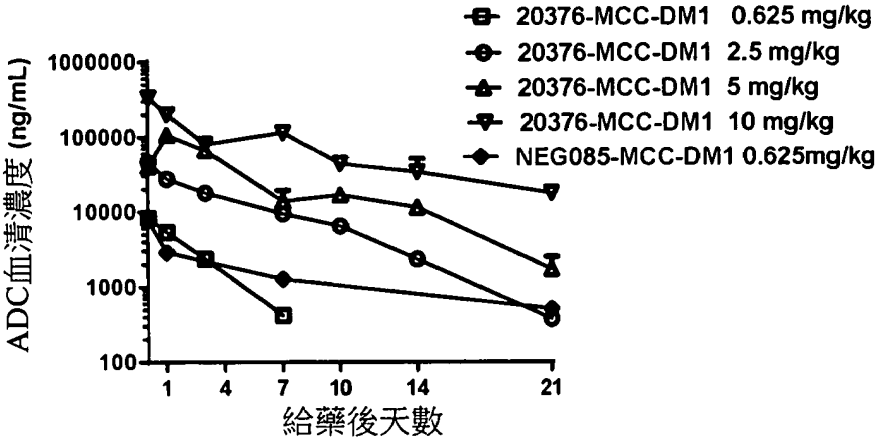


圖39

(A) 在GIST T1異種移植小鼠模型中之小鼠交叉反應性20376-MCC-DM1之功效-PK



(B) 給藥後之抗體血清濃度

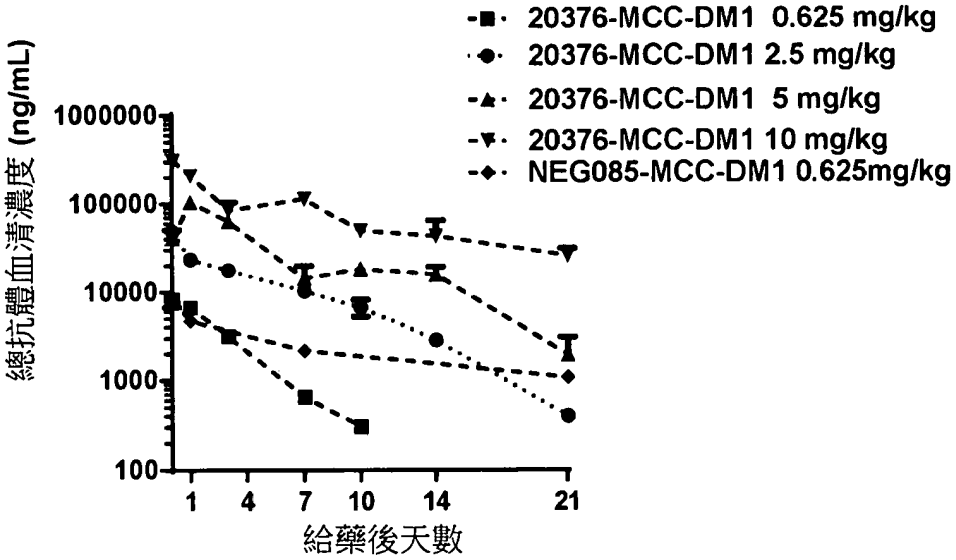


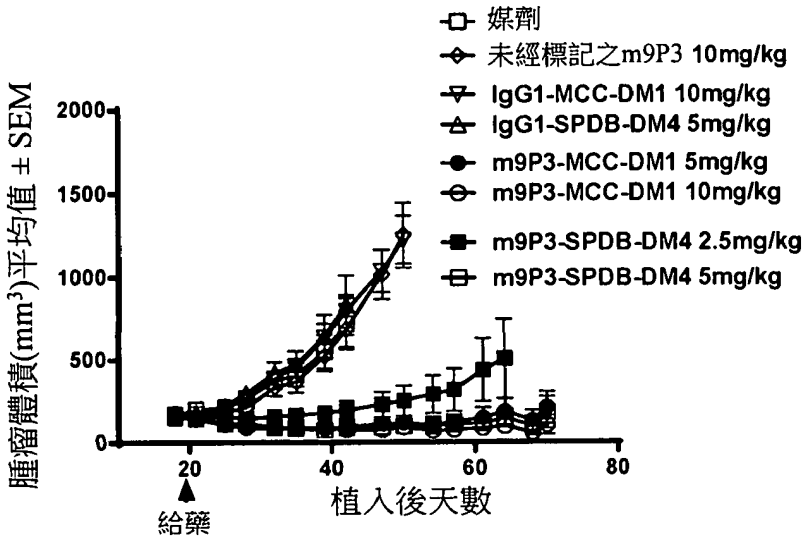
圖40

在GIST T1 SCID灰棕色小鼠中之劑量反應功效研究(資料表41)

藥物	劑量	時程	腫瘤反應		宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C)(%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3± SEM)	體重之平均變化(%± SEM)	存活(存活數/總數)
媒劑	0mg/kg	單次靜脈內給藥	100	757 ± 175	9.3 ± 1.0	8/8
IgG-SMCC-DM1	10mg/kg	單次靜脈內給藥	114	861 ± 206	9.1 ± 1.0	8/8
NEG085-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	28	210 ± 56	10.3 ± 1.3	8/8
20376-SMCC-DM1	0.625mg/kg	單次靜脈內給藥	51	385 ± 106	8.1 ± 1.0	8/9(自研究中移除一隻小鼠)
20376-SMCC-DM1	2.5mg/kg	單次靜脈內給藥	9*	66 ± 41	7.2 ± 1.6	9/9
20376-SMCC-DM1	5mg/kg	單次靜脈內給藥	4*	34 ± 62	7.5 ± 1.2	9/9
20376-SMCC-DM1	10mg/kg	單次靜脈內給藥	3*	22 ± 16	6.1 ± 1.5	8/9(自研究中移除一隻小鼠)

圖41

(A) 在GIST T1異種移植小鼠模型中之功效(在非結合情況下無功效)



(B) 經處理過程之體重變化

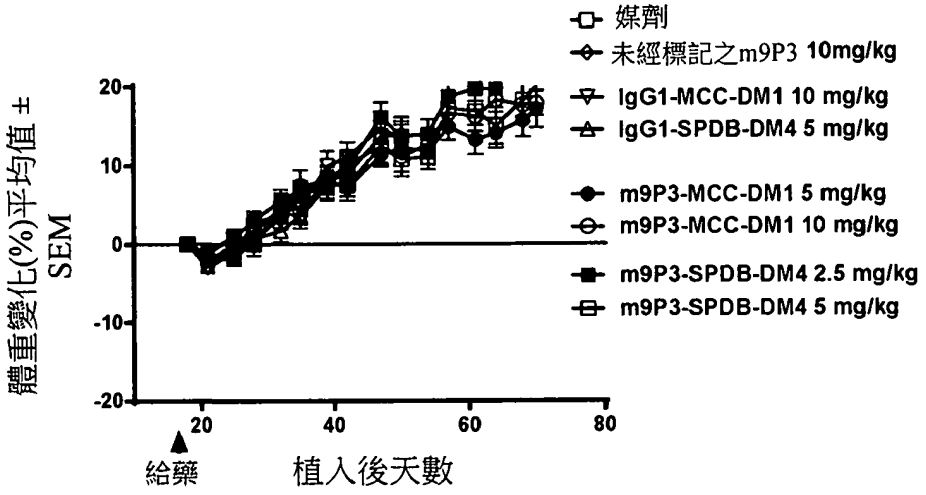


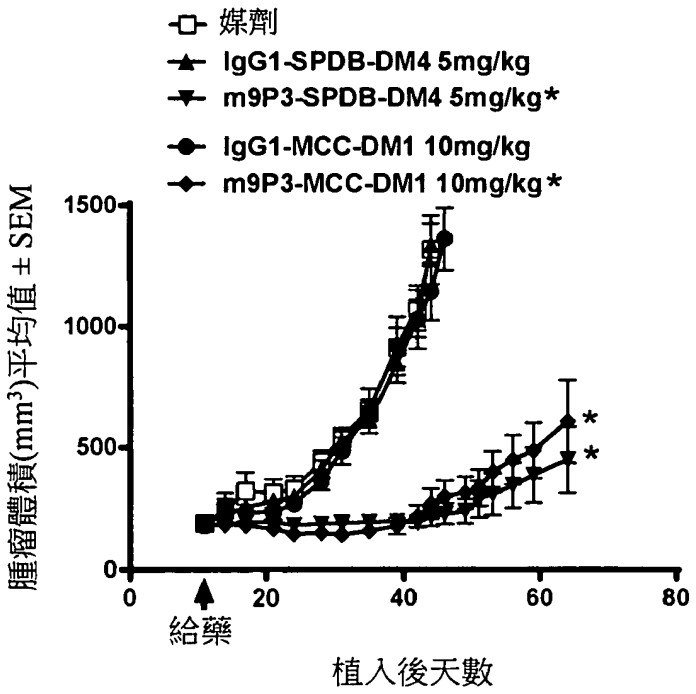
圖42

在GIST T1小鼠異種移植模型中之功效(未經標記/MCC-DM1/SPDB-DM4) (第42天資料表，$p<0.05$，ANOVA/塔基)

藥物	劑量	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化(T/C)(%)	消退(%)	腫瘤體積之平均變化(mm^3± SEM)	體重之平均變化(% ± SEM)	存活(存活數/總數)
媒劑	0mg/kg	單次靜脈內給藥	100	-	554 ± 148	9.5 ± 2.2	8/8
未經標記之9P3	10mg/kg	單次靜脈內給藥	95	-	525 ± 103	9.0 ± 1.9	8/8
IgG1-MCC-DM1	5mg/kg	單次靜脈內給藥	113	-	624 ± 96	11.1 ± 1.9	9/9
IgG1-SPDB-DM4	10mg/kg	單次靜脈內給藥	119	-	657 ± 176	10.0 ± 1.3	9/9
9P3-MCC-DM1	10mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-55.80	-97 ± 23	10.2 ± 1.1	9/9
9P3-MCC-DM1	5mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-43.84	-74 ± 28	7.2 ± 1.1	9/9
9P3-SPDB-DM4	5mg/kg	單次靜脈內給藥	-	-43.24	-67 ± 14	7.6 ± 2.0	9/9
9P3-SPDB-DM4	2.5mg/kg	單次靜脈內給藥	7	-	36 ± 58	9.6 ± 1.6	9/9

圖43

(A) 在比較SPDB-DM4與MCC-DM1之GIST 430異種移植模型中之功效



(B) 經處理過程之體重變化

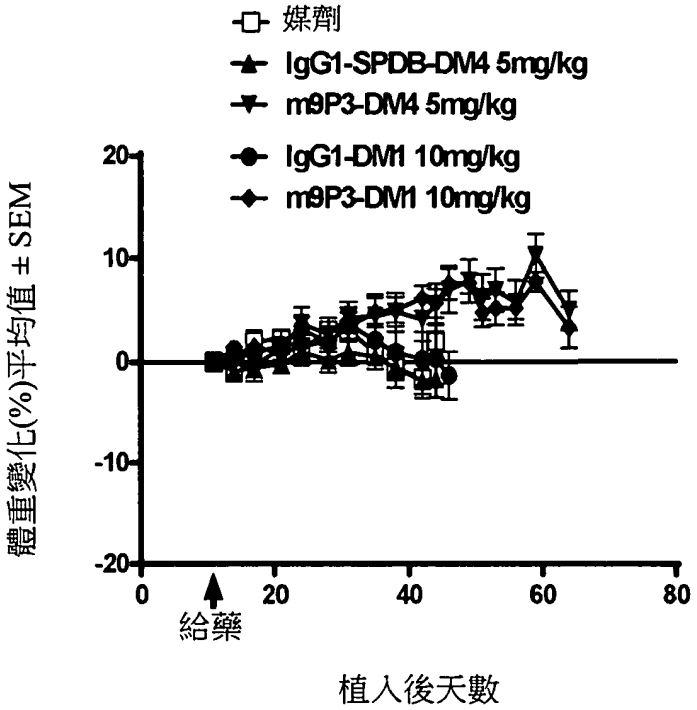


圖44

在GIST 430 SCID灰棕色小鼠模型中之功效

藥物	劑量 (mg/kg)	時程	腫瘤反應			宿主反應	
			腫瘤體積相對於對照之平均變化 (T/C)(%)	消退 (%)	腫瘤體積之平均變化 (mm^3± SEM)	體重之平均變化 (%± SEM)	存活(存活數/總數)
媒劑	0	單次靜脈內給藥	100	-	1127 ± 161	2.1 ± 1.7	8/9 (惡病質伴有較大腫瘤)
IgG1-SPDB-DM4	5	單次靜脈內給藥	101	-	1139 ± 91	-1.6 ± 1.9	9/9
9P3-SPDB-DM4	5	單次靜脈內給藥	3*	-	34 ± 38	5.6 ± 2.0	9/9
IgG1-MCC-DM1	10	單次靜脈內給藥	85	-	959 ± 112	0.3 ± 2.5	9/9
9P3-MCC-DM1	10	單次靜脈內給藥	7*	- (第24天 22%)	80 ± 51	5.7 ± 1.4	9/9

圖45

在c-Kit ADC NEG085-MCC-DM1之單次給藥之後10天的有絲分裂停滯(p-組蛋白H3)

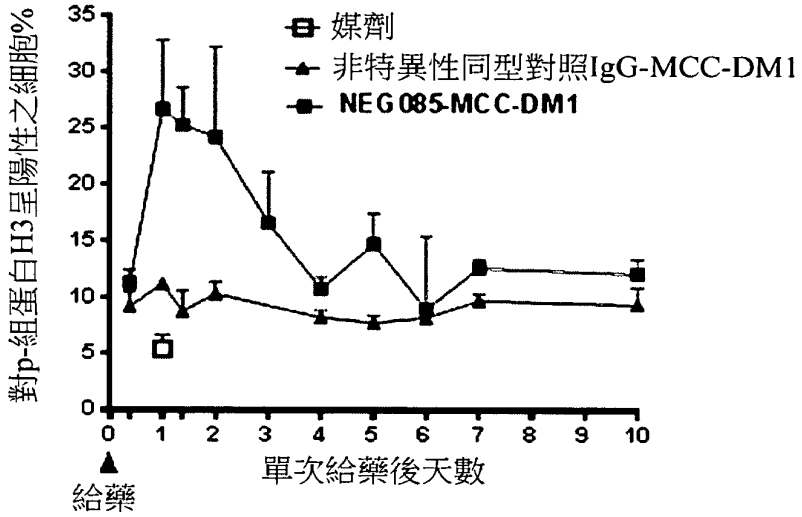
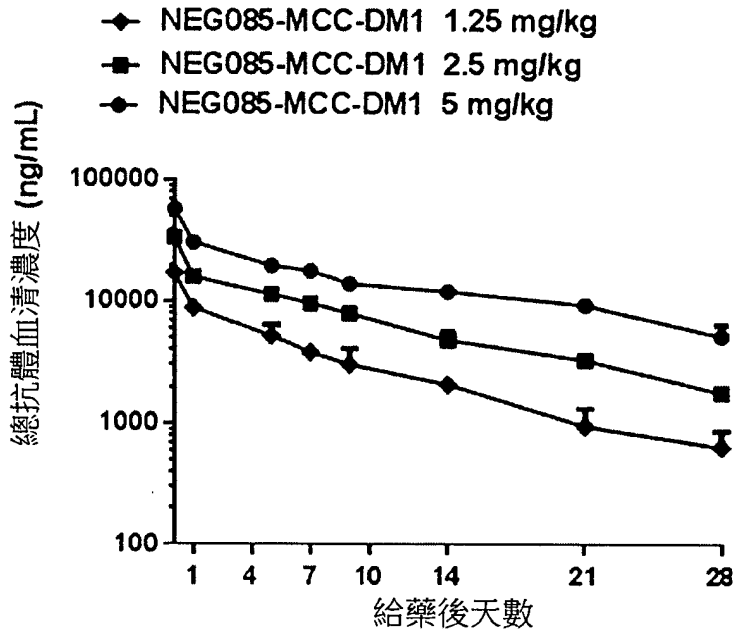


圖47

(A) 在NCI-H526異種移植模型中給藥之後的抗人IgG1 ELISA



(B) 在NCI-H526異種移植模型中給藥之後的抗DM1 ELISA

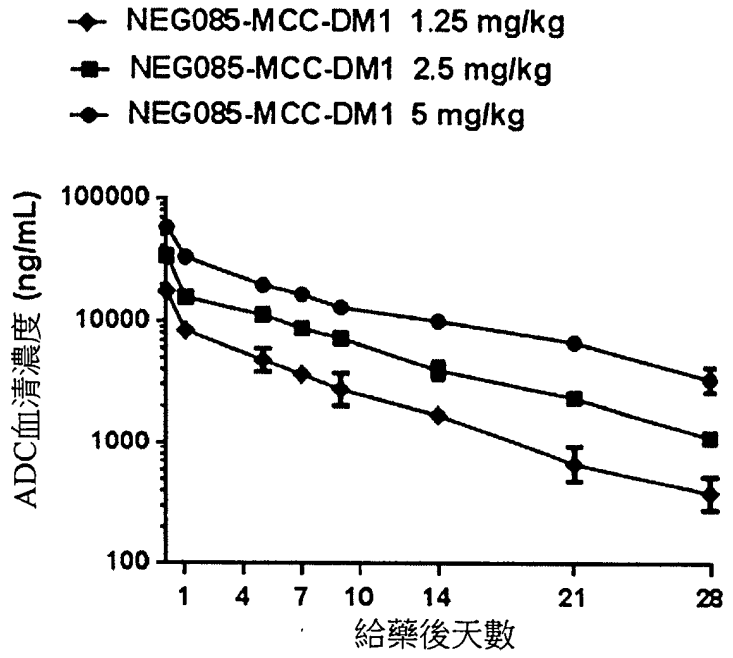
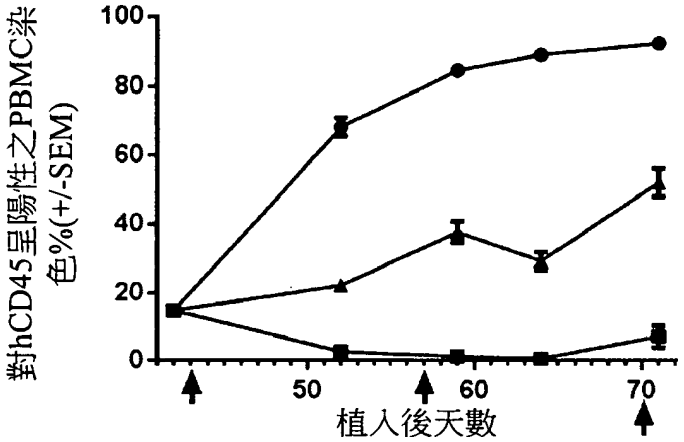


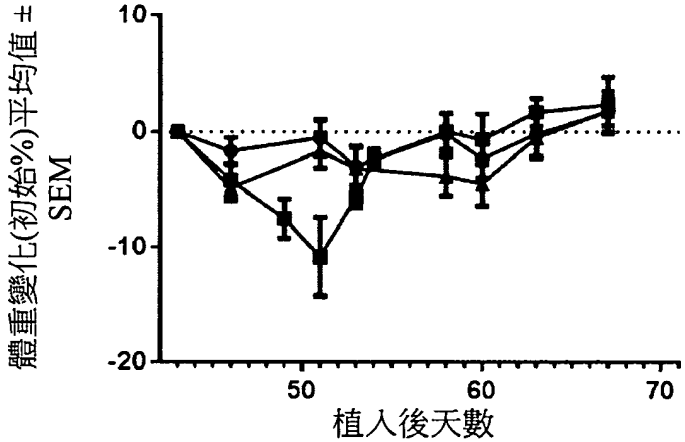
圖51

(A) 在全身性原發性AML異種移植模型HAMLX5343中之NEG085-MCC-DM1反應



未經處理
ARA-C 50 mg/kg，腹膜內，每天一次，6天
NEG085-MCC-DM1 10 mg/kg，靜脈內，每兩週一次
NEG085-MCC-DM1給藥天數

(B) 經處理過程之體重變化



未經處理
ARA-C 50 mg/kg，腹膜內，每天一次，6天
NEG085-MCC-DM1 10 mg/kg，靜脈內，每兩週一次

圖52

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（4）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)