202346354

(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 202346354 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：112108802 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 03 月 09 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K47/68 (2017.01) *A61P35/00 (2006.01)*
G01N33/574 (2006.01)

(30)優先權：2022/03/09 歐洲專利局 22161191.6

(71)申請人：德商馬克專利公司 (德國) MERCK PATENT GMBH (DE)
德國

(72)發明人：安德爾 簡 ANDERL, JAN (DE)；哈曲特 史蒂芬 HECHT, STEFAN (DE)；瑞斯可 尼可拉斯 RASCHE, NICOLAS (DE)；迪克吉瑟 史蒂芬 DICKGIESSER, STEPHAN (DE)；單 旻 SHAN, MIN (DE)；戴茲奇 卡爾 DEUTSCH, CARL (DE)；沙鹿特 威廉 SLOOT, WILLEM (NL)；瑞伯 魏斯特菲爾 薩賓 RAAB-WESTPHAL, SABINE (DE)；哈特 菲立克斯 HART, FELIX (DE)；多立克斯 拉斯 TOLEIKIS, LARS (DE)；伯格 尼爾 BERGER, NIR (IL)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；許文亭

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：45 項 圖式數：47 共 287 頁

(54)名稱

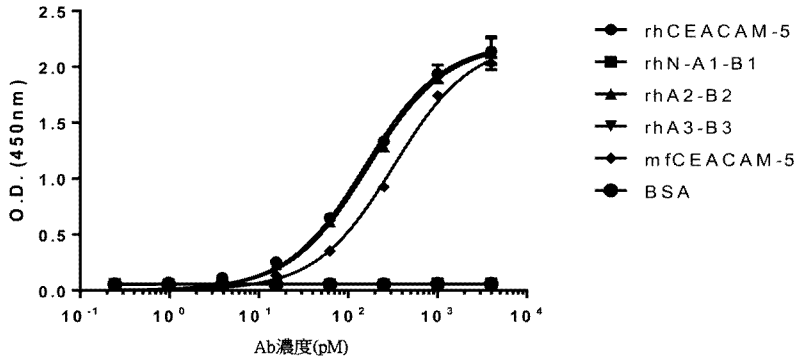
抗 CEACAM5 抗體及其結合物及用途

(57)摘要

本發明提供結合人類 CEACAM5 蛋白之抗體，以及包含編碼該等抗體之序列之經分離之核酸及宿主細胞。本發明亦提供包含該等抗體連接至生長抑制劑之免疫結合物，及包含本發明之抗體或免疫結合物之醫藥組合物。本發明亦提供本發明之抗體、免疫結合物及醫藥組合物於治療癌症或於診斷目的之用途。

The invention provides antibodies which bind human CEACAM5 protein, as well as isolated nucleic acids and host cells comprising a sequence encoding said antibodies. The invention also provides immunoconjugates comprising said antibodies linked to a growth-inhibitory agent, and pharmaceutical compositions comprising antibodies or immunoconjugates of the invention. The invention also provides use of the antibodies, immunoconjugates and pharmaceutical compositions of the invention for the treatment of cancer or for diagnostic purposes.

指定代表圖：


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
O.D. (450nm)
10 -1
10 0
10 1
10 2
10 3
10 4
Ab濃度(pM)
rhCEACAM-5
rhN-A1-B1
rhA2-B2
rhA3-B3
mfCEACAM-5
BSA

【圖1】

202346594
專利案號：112108802

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗CEACAM5抗體及其結合物及用途

【英文發明名稱】

ANTI-CEACAM5 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供結合人類CEACAM5蛋白之抗體，以及包含編碼該等抗體之序列之經分離之核酸及宿主細胞。本發明亦提供包含該等抗體連接至生長抑制劑之免疫結合物，及包含本發明之抗體或免疫結合物之醫藥組合物。本發明亦提供本發明之抗體、免疫結合物及醫藥組合物於治療癌症或於診斷目的之用途。

【英文】

The invention provides antibodies which bind human CEACAM5 protein, as well as isolated nucleic acids and host cells comprising a sequence encoding said antibodies. The invention also provides immunoconjugates comprising said antibodies linked to a growth-inhibitory agent, and pharmaceutical compositions comprising antibodies or immunoconjugates of the invention. The invention also provides use of the antibodies, immunoconjugates and pharmaceutical compositions of the invention for the treatment of cancer or for diagnostic purposes.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗CEACAM5抗體及其結合物及用途

【英文發明名稱】

ANTI-CEACAM5 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於結合人類CEACAM5蛋白之抗體，及係關於包含編碼該等抗體之序列之經分離核酸及宿主細胞。本發明亦係關於包含連接至生長抑制劑之該等抗體之免疫結合物，及係關於包含本發明之抗體或免疫結合物之醫藥組合物。本發明亦係關於本發明之抗體、免疫結合物及醫藥組合物於治療癌症或於診斷目的之用途。

【先前技術】

【0002】 癌胚抗原(CEA)係參與細胞黏著之醣蛋白。1965年(Gold及Freedman, J Exp Med, 121, 439, 1965)將CEA首次鑑別為在妊娠前六個月期間由胎兒腸道正常表現及許多癌症(諸如結腸直腸癌或胰臟癌)中發現之蛋白質。CEA家族屬於免疫球蛋白超家族。由18個基因構成之CEA家族細分為兩個蛋白質子組：癌胚抗原相關細胞黏著分子(CEACAM)子組及妊娠特異性醣蛋白子組(Kammerer及Zimmermann, BMC Biology 2010, 8:12)。

【0003】 在人類中，CEACAM子組由7個成員構成：CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7及CEACAM8。據報導，與初始鑑別之CEA相同之CEACAM5高度表現於癌

細胞(諸如，舉例而言，結直腸、胃、肺及胰臟腫瘤細胞)表面上，且於正常組織中之表現僅限於少數正常上皮細胞(諸如結腸及食管上皮細胞)。因此，CEACAM5可構成適用於腫瘤特異性靶向方法之治療標靶，諸如免疫結合物。

【0004】 CEACAM家族成員之細胞外域由重複之免疫球蛋白樣(Ig樣)域構成，根據序列同源性將該等域分為3種類型，A、B及N。CEACAM5含有七個此等域，即N、A1、B1、A2、B2、A3及B3。一方面CEACAM5 A1、A2及A3域，及另一方面B1、B2及B3域，顯示高序列同源性，人類CEACAM5之A域呈現84至87%成對序列相似性，及B域呈現69至80%成對序列相似性。此外，結構中呈現A及/或B域之其他人類CEACAM成員(即CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7及CEACAM8)顯示與人類CEACAM5之同源性。特別地，人類CEACAM6蛋白之A及B域分別顯示與人類CEACAM5之A1及A3域及B1至B3域中之任一者之序列同源性，甚至高於彼等在人類CEACAM5之A域及B域中觀察到者。

【0005】 已產生抗CEA抗體用於CEA靶向診斷或治療目的。對相關抗原之特異性始終作為此領域中之一關注點提及，例如Sharkey等人(1990, Cancer Research 50, 2823)。由於上文提及之同源性，先前描述之抗體中之一些可證實結合(例如)至不同免疫球蛋白域中存在之CEACAM5之重複性抗原決定基並顯示對其他CEACAM家族成員(諸如CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7或CEACAM8)之交叉反應性，因此缺乏對CEACAM5之特異性。然而，CEA靶向療法需抗CEACAM5抗體之特異性，使得該抗體結合至表現人類CEACAM5之腫瘤細胞但不結合至表現其他CEACAM家族成員之某些正常組織。值得注意的是，已將

CEACAM1、CEACAM6及CEACAM8描述為由人類及非人類靈長類動物之嗜中性球表現(Ebrahimmnejad等人，2000, Exp Cell Res, 260, 365；Zhao等人，2004, J Immunol Methods 293, 207；Strickland等人，2009 J Pathol, 218, 380)，其中其等已顯示調節顆粒球生成並在免疫反應中發揮作用。出於治療目的，抗CEACAM5抗體與CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7或CEACAM8之交叉反應性可因此由於正常組織中毒性增加而降低該化合物之治療指數。因此，需要特異性針對CEACAM5之不與CEACAM家族之其他分子交叉反應的抗體，例如用作抗體藥物結合物(ADC)之部分或用於導致殺死靶細胞之任何其他方法中。

【0006】 此外，由於將CEACAM5描述為表現於一些正常細胞組織中，因此需開發可結合至人類CEACAM5及食蟹獼猴(Macaca fascicularis) CEACAM5之抗CEACAM5抗體，因為可在臨床前毒物學研究中在食蟹獼猴中容易測試此等抗體以評估其等安全性概況。

【0007】 a)物種交叉反應性與b)對人類及食蟹獼猴CEACAM5之特異性(即與其他食蟹獼猴及人類CEACAM家族成員無交叉反應性)之需求之組合進一步增加開發新抗CEACAM5抗體之複雜性，尤其考慮到人類與食蟹獼猴CEACAM蛋白之間的整體序列同源性。

【0008】 此外，文獻中將CEACAM5描述為差內化性表面蛋白(回顧Schmidt等人，2008, Cancer Immunol. Immunother. 57, 1879)，其為針對此靶蛋白之抗體藥物結合物提出另一挑戰。

【0009】 已知抗CEACAM5抗體包括Immunomedics之拉貝珠單抗(labetuzumab) (亦稱為hMN14；Sharkey等人，1995, Cancer Research 55, 5935)。已顯示此抗體不結合至相關抗原，且亦不與來自食蟹獼猴之

CEACAM5交叉反應。拉貝珠單抗亦已用作抗體-藥物結合物(ADC)(即拉貝珠單抗哥維坦(labetuzumab govitecan))之部分。拉貝珠單抗哥維坦係由經由包含pH敏感性碳酸酯及短聚乙二醇(PEG)鏈之連接子(稱為CL2A)結合至抗CEACAM5抗體拉貝珠單抗之細胞毒性藥物SN38構成之ADC。拉貝珠單抗哥維坦之特徵在於所用連接子結構之顯著不穩定性，導致非經腸施用後細胞毒性有效載荷之早期系統性損失。此降解過程可限制抗腫瘤活性並增加副作用之風險。另一已知抗CEACAM5 ADC係賽諾菲之SAR408701 (妥沙米單抗拉夫坦辛(tusamitamab ravtansine))，其包含經由N-琥珀醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基丁酸酯(SPDB)連接子共價連接至細胞毒性劑DM4(一種有效微管去穩定化類美登素)之抗CEACAM5抗體SAR408377 (妥沙米單抗；亦稱為huMab2-3)。SAR408701與包括眼角膜之數個器官及組織之毒副作用(包括角膜炎及角膜病變)相關聯。此外，基於微管抑制劑之ADC於某些癌症適應症(諸如結腸直腸癌)中之有效性可受限制。迄今為止，尚無抗CEACAM5抗體或ADC已批准用於臨床中之任何治療用途；一般而言，很少ADC已批准用於治療實性瘤。

【0010】 由於細胞分解代謝釋放之有效載荷之副作用，導致骨髓及循環血細胞中之毒性(例如嗜中性球減少症、網狀細胞減少症、淋巴球減少症)，因此一些ADC於病患中可受劑量限制。

【0011】 由於藥物與抗體偶合，因此ADC於人類中通常具有於循環中僅數天之次最佳半衰期，其相較於相應之未結合抗體之半衰期顯著更低。此等ADC之相對高清除率係與標靶獨立性攝取後之細胞降解相關，且導致毒性藥物有效載荷之大量釋放，其可觸發副作用。因此，本文揭示之ADC之目的係改善其等半衰期以減少非所需之副作用。

【0012】 鑑於上文，仍需新穎且經改善之治療劑用於治療癌症，例如用於不同之實性瘤適應症，包括(例如) CRC、胰臟癌、胃癌、NSCLC、食道癌及前列腺癌。

【發明內容】

【0013】 本發明尤其藉由提供針對CEACAM5之單株抗體(可與人類及食蟹獼猴蛋白兩者反應)及藉由提供包含該等抗體之免疫結合物(本文中亦稱為抗體-藥物結合物(ADC))解決此需求及此項技術中之其他需求；此等免疫結合物具有細胞毒性效應、活體外殺死腫瘤細胞及活體內抑制腫瘤生長。本發明係關於隨附申請專利範圍中及本文下文進一步描述中描述之實施例。

【0014】 為出於治療目的嘗試產生針對CEACAM5具有最佳特性之新抗體，特別以免疫結合物之形式，發明人已進行廣泛研究及開發，以選擇具有有利概況之抗體並以此為基礎開發免疫結合物。

【0015】 發明人可選擇並產生意外包含數種所需特徵之最佳化IgG。此等抗體以高親和力結合至人類CEACAM5之A2-B2域且不識別人類CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7及CEACAM8蛋白。在細胞情境下，此等抗體對表現CEACAM5之腫瘤細胞顯示高親和力且經內化。此外，此等抗體亦結合至食蟹獼猴CEACAM5蛋白，以對食蟹獼猴及人類蛋白於彼此10倍內之親和力。本發明之抗體結合至食蟹獼猴CEACAM5之A2-B2域，但其等不識別另一食蟹獼猴CEACAM蛋白(CEACAM6)。

【0016】 發明人亦已顯示，其等已產生之抗體當與免疫結合物中之細胞毒性藥物組合時可活體外誘導對腫瘤細胞之細胞毒性效應。結合至細胞毒性藥物之抗體(即本發明之免疫結合物)亦可在攜載表現CEACAM5之

腫瘤之小鼠中顯著抑制腫瘤生長。連接藥物及抗體之連接子係經設計以在非經腸施用後最大化全身穩定性。於靶細胞內自本發明之免疫結合物釋放依喜替康(exatecan)導致極高效力及顯著旁觀者效應。有效旁觀者效應可有利於治療具有異質靶向表現之病患。

【0017】 一般而言，需高全身曝露。ADC藥物之高全身曝露於腫瘤組織及細胞中導致更有效之腫瘤靶向及經改善之細胞毒性有效載荷處置，且相較於具有較低全身曝露之化合物，最終導致增強之腫瘤細胞殺死。

【0018】 此外，本發明抗體-藥物-結合物係藉由包括分子修飾來改善，以減少標靶獨立性細胞降解，導致分子具有較低清除率、較高全身曝露及減少之有效載荷釋放。

【0019】 本發明係關於抗體修飾及有效載荷結合策略，其顯著減少此等ADC之脫靶細胞分解代謝，藉此降低釋放之有效載荷之水準，同時改善由較高ADC曝露驅動之效用。因此，此等修飾將藉由減少副作用及增加抗腫瘤活性，提供具有經改善之治療視窗之藥物。

【0020】 如本文描述，根據本發明之ADC之曝露及半衰期將藉由以下改善，例如

(1)藉由包括YTE突變並使用鏈間半胱胺酸結合將其連接至藥物修飾抗體重鏈或

(2)用YTE突變修飾該抗體重鏈並使用創新之酶結合方法，其使用微生物轉麩醯胺酸酶(本文中亦稱為「TGase」及「mTG」)酶以將該藥物結合至該抗體。

【0021】 令人驚訝地，已藉由上文方法(2)獲得於人類預測動物模型中導致低清除率值之高曝露。以此等修飾，相較於未包含此等修飾之變

體，ADC之曝露已改善約因子10x，因此其導致釋放之有效載荷水準之顯著降低及循環中抗腫瘤活性ADC濃度之顯著增加。經改善之ADC類似於未包含藥物連接子之原始YTE抗體之PK概況且證實相較於先前技術ADC經改善之半衰期。

【0022】 相較於先前技術分子，此等結果將減少毒性並改善臨床癌症療法之效力。

【圖式簡單說明】

【0023】 圖1：ELISA分析中mAb1對重組人類(rh) CEACAM5 ECD或其域N-A1-B1、A2-B2、A3-B3或對重組食蟹獼猴(mf) CEACAM5 ECD之結合。

【0024】 圖2：結合至MKN-45細胞之抗CEACAM5抗體之EC50：mAb1相較於抗體huMab2-3及hmn-14對表現CEACAM5之MKN45細胞系之細胞結合。

【0025】 圖3：經pHrodo標記之抗體內化至細胞之晚期內體及溶體內(每個細胞之總螢光強度，三次重複之平均值)。

【0026】 圖4：每個細胞自700分鐘至1200分鐘之螢光強度，其係曲線之線性部分。在樣本之間量測並比較線性斜率(參見實例1.6.5)。

【0027】 圖5：抗體rb8G4於FFPE癌細胞系之IHC染色。

【0028】 圖6：104種癌細胞系之CEACAM5 mRNA表現及IHC染色之相關性。

【0029】 圖7：抗體rb8G4於正常人類組織之IHC染色。

【0030】 圖8：正常人類組織中之CEACAM5 mRNA表現。

【0031】 圖9：抗體rb8G4於人類結腸直腸癌組織之IHC染色。

【0032】 圖10：抗體rb8G4於人類胃癌組織之IHC染色。

【0033】 圖11：抗體rb8G4於人類食道癌組織之IHC染色。

【0034】 圖12：抗體rb8G4於人類非小細胞肺癌組織之IHC染色。

【0035】 圖13：藉由西方墨點法研究mAb1 (圖13A)及rb8G4 (圖13B)對癌細胞系溶胞產物中之CEACAM5之結合。

【0036】 圖14：顯示儲備mAb、UF後結合物及最終原料藥(BDS)之純度之典型SEC層析圖。

【0037】 圖15：顯示輕鏈及重鏈之分離之典型RP-HPLC層析圖。該層析圖顯示儲備mAb、粗ADC及最終BDS之重疊。

【0038】 圖16：顯示NAC標準及最終BDS之游離藥物濃度之典型層析圖。

【0039】 圖17：顯示儲備mAb及最終BDS之純度之典型SEC層析圖。

【0040】 圖18：顯示輕鏈及重鏈之分離之典型RP-HPLC層析圖。該層析圖顯示儲備mAb及最終BDS之重疊。

【0041】 圖19：顯示NAC標準及最終BDS之游離藥物濃度之典型層析圖。

【0042】 圖20：人類、小鼠及食蟹獼猴血清之ADC穩定性。使用游離依喜替康(標準化資料)計算經結合之依喜替康濃度(初始劑量~10 μM)。

【0043】 圖21：小鼠血清及緩衝液之ADC3對照穩定性。使用游離SN38 (未標準化)計算經結合之SN38濃度(初始劑量50 μg/mL ADC蛋白濃度)。

【0044】 圖22：人類肝溶體中ADC1及ADC2之有效載荷釋放曲線

(pH 5.0)。使用(例如)游離依喜替康(初始濃度~10 μM依喜替康)標準化資料計算經結合之藥物濃度。

【0045】 圖23：ADC分解代謝產物圖譜分析證實游離依喜替康係溶體釋放產物。

【0046】 圖24：ADC1、ADC2及游離有效載荷針對抗原陽性SK-CO-1 (圖24A)及SNU-16 (圖24B)細胞系相較於抗原陰性MDA-MB-231 (圖24C)細胞系之活體外效力。顯示一項代表性實驗，三次重複之平均值±SD。如圖24C中顯示，將三個不同系列之資料點分別分配至ADC1、ADC2及有效載荷之圖例亦適用於圖24A及圖24B。

【0047】 圖25：ADC1及ADC2與各別同型對照對SK-CO-1細胞系之比較。顯示一項代表性實驗，三次重複之平均值±SD。

【0048】 圖26：ADC1、ADC2、ADC SAR DM4、ADC mAb1 DM4及游離有效載荷針對抗原陽性SK-CO-1 (圖26A)相較於抗原陰性MDA-MB-231 (圖26B)細胞系之活體外效力。顯示一項代表性實驗，三次重複之平均值±SD；圖26B中顯示之圖例亦適用於圖26A。

【0049】 圖27：ADC1及ADC2對與抗原陽性SK-CO-1細胞共培養之抗原陰性MDA-MB-231細胞之有效旁觀者效應(圖27A)。ADC1或ADC2對單獨MDA-MB-231細胞無非特異性效應(圖27B)。顯示一項代表性實驗，重複之平均值±SD。

【0050】 圖28：ADC1及ADC2對與抗原陽性SK-CO-1細胞共培養之抗原陰性MDA-MB-231細胞之旁觀者效應比ADC SAR DM4更有效(圖28A及圖28B)。測試ADC對單獨MDA-MB-231細胞無非特異性效應(圖28C)。顯示一項代表性實驗，重複之平均值±SD。

【0051】圖29：單次處理後ADC1及ADC2在CRC PDX模型(COPF217)中之效用。

【0052】圖30：單次處理後ADC1在NSCLC PDX模型(LUPF160151)中之效用。

【0053】圖31：單次處理後ADC1在胃癌PDX模型(GAX066)中之效用。

【0054】圖32：胰臟異種移植模型(HPAF-II)中ADC1相較於ADC3之效用。

【0055】圖33：CRC PDX模型(COPF230)中ADC1相較於ADC SAR DM4之效用。

【0056】圖34：CRC PDX模型(REPF210)中ADC1相較於ADC SAR DM4之效用。

【0057】圖35：胃PDX模型GAPF313 (進行中之實驗之期中分析)中ADC1相較於ADC SAR DM4之效用。

【0058】圖36：顯示mAb1-M / ADC1-M之輸入mAb (input mAb)及最終BDS之純度的典型SEC層析圖。

【0059】圖37：繪示mAb1-M / ADC1-M之最終BDS之DAR測定之典型RP-HPLC層析圖。

【0060】圖38：顯示ADC7-M、ADC2-M及ADC5-M之輸入mAb及最終BDS之純度之典型SEC層析圖。

【0061】圖39：繪示ADC7-M、ADC2-M及ADC5-M之最終BDS之DAR測定之典型RP-HPLC層析圖。

【0062】圖40：ADC1-M、ADC4-M及游離有效載荷針對抗原陽性

SK-CO-1 (圖40a)、SNU-16 (圖40b)、MKN-45 (圖40c)及LS174T (圖40d)細胞系相較於抗原陰性MDA-MB-231 (圖40e)細胞系之活體外效力。顯示一項代表性實驗，重複之平均值±SD。

圖41：ADC2-M、ADC5-M及游離有效載荷針對抗原陽性SK-CO-1 (圖41a)、SNU-16 (圖41b)、MKN-45 (圖41c)及LS174T (圖41d)細胞系相較於抗原陰性MDA-MB-231 (圖41e)細胞系之活體外效力。顯示一項代表性實驗，重複之平均值±SD。

【0063】 圖42：ADC1、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M於huFcRn Tg276小鼠中之藥動性概況(總抗體)。

【0064】 圖43：在用ADC1-M及ADC2-M相比於媒介物對照治療後之腫瘤體積變化。

【0065】 圖44：ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M相較於ADC SAR DM4對與抗原陽性SK-CO-1細胞共培養之抗原陰性MDA-MB-231細胞之更有效旁觀者效應。顯示一項代表性實驗，重複之平均值±SD。

【0066】 圖45：HPAF-II異種移植模型中ADC1-M及ADC3-M相較於ADC8之效用。

【0067】 圖46：單次處理後CRC PDX模型(COPF230)中ADC1-M、ADC3-M相較於ADC SAR DM4之效用。

【0068】 圖47：多次處理後GC PDX模型(GAPF313)中ADC1-M、ADC3-M相較於ADC SAR DM4之效用。

【實施方式】

定義

【0069】 如本文使用，「CEACAM5」命名為「癌胚抗原相關細胞黏著分子5」，亦稱為「CD66e」 (分化簇66e)。CEACAM5係參與細胞黏著之醣蛋白。CEACAM5尤其高度表現於(例如)結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、食道癌、前列腺癌及其他實性瘤之表面上。全長人類CEACAM5之參考序列(包括訊息肽(位置1至34)及原肽(位置686至702))可以寄存編號AAA51967.1獲自基因庫資料庫；此胺基酸序列如下讀取：MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEG KEVLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAY SGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPEL PKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRL QLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPD APTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFI PNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNP VEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLL SVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRP GVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTC QANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEP EAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVC GIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASN PSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSI VKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI (SEQ ID NO: 1)。已在高加索人群體中以高於2%之頻率鑒別五個非同義SNP，其中之四者位於人類CEACAM5之N域中(於位置80、83、112、113處)，最後一者位於

人類CEACAM5之A2域中(於位置398處)。基因庫AAA51967.1含有主要單倍型(I80、V83、I112、I113及E398)。

【0070】「域」或「區域」可為蛋白質之任何區域，一般基於序列同源性定義且通常與特定結構或功能實體相關。已知CEACAM家族成員由Ig樣域構成。本檔案中使用之術語域用以指定個別Ig樣域(諸如「N域」)或用於連續域組(諸如「A2-B2域」)。

【0071】人類CEACAM5之域組織如下(基於基因庫AAA51967.1序列；SEQ ID NO: 1)：

人類CEACAM5域	**SEQ ID NO: 1中之位置**
N	35-142
A1	143-237
B1	238-320
A2	321-415
B2	416-498
A3	499-593
B3	594-685

因此，人類CEACAM5之A2-B2域由SEQ ID NO: 1之胺基酸321至498構成。

【0072】可獲得食蟹獼猴CEACAM5蛋白之參考序列(NCBI參考序列XP_005589491.1)，且此胺基酸序列如下讀取：*mgspsaplhrwcipwqtlllt aslltfwnppttaq*ltiesrpfnvaegkevlllahnvsqnlfgyiwykgervdasrrigscvirtqqitp gpahsgretidfnasllihnvtqsdtgsytiqvikedlvneeatgqfrvypelpkpyissnnsnpvedk davaltcepetqdttylwwvnnqslpvsprlelssdnrtltvfniprndttsykcetqnpvsvrrsdpv tlnvlygpdaptisplntpyragenlnlschaasnptaqyfwfvngtfqqstqelfipnitvnnsgsy mcqahnsatglnrttvtaitvya**elpkpyitsnnsnpiedkdavtltcepetqdttylwwvnnqsl svssrlelsndnrtltvfniprndttfyecetqnpvsvrrsdpvtlnvlygpdaptisplntpyra genlnlschaasnpaaqyswfvngtfqqstqelfipnitvnnsgsymcqahnsatglnrttvta**

itvyvelpkpyissnnsnpiedkdavtltcepvaenttylwwvnnqslsvsprlqlsngnriltllsvtr ndtgpyecgiqnsesakrsdpvtlnvtygpdtpiisppdlsyrsganlnlschsdsnpspqyswling tlrqhtqvlfiskitsnnngayacfvsnlatgrnnsivknisvssgdsapgssglsaratvgiiigmlvg valm (SEQ ID NO: 2) (訊息肽以*斜體*表示；A2-B2域**加粗**；GPI錨加下劃線；在訊息肽與A2-B2域之間之N-A1-B1域以常規字體表示；在A2-B2域與GPI錨之間之A3-B3域以常規字體表示)。

【0073】「編碼序列」或「編碼」表現產物(諸如多肽、蛋白質或酶)之序列係核苷酸序列，其在表現時導致該多肽、蛋白質或酶之產生，即，該核苷酸序列編碼該多肽、蛋白質或酶之胺基酸序列。蛋白質之編碼序列可包括起始密碼子(通常ATG)及終止密碼子。

【0074】如本文使用，特異性蛋白質(例如抗體)之提及可包括具有天然胺基酸序列之多肽，以及無關來源或製備方式之變體及修飾形式。具有天然胺基酸序列之蛋白質係具有與自然獲得相同之胺基酸序列之蛋白質。此等天然序列蛋白質可自自然分離或可使用標準重組及/或合成方法製備。天然序列蛋白質特別包含天然生成之截短或可溶形式、天然生成之變體形式(例如選擇性剪接形式)、天然生成之對偶基因變體及形式(包括轉譯後修飾)。天然序列蛋白質包括攜載轉譯後修飾(諸如醣化或磷酸化)，或一些胺基酸殘基之其他修飾之蛋白質。

【0075】術語「基因」意謂編碼或對應於包含一或多種蛋白質或酶中之所有或部分之胺基酸之特定序列之DNA序列，且可包括或可不包括調節DNA序列，諸如啟動子序列，其等決定(例如)表現該基因之條件。一些基因(其等非結構基因)可自DNA轉錄為RNA，但未轉譯為胺基酸序列。其他基因可用作結構基因之調節子或DNA轉錄之調節子。特別地，

術語基因可預期用於編碼蛋白質之基因體序列，即包含調節子、啟動子、內含子及外顯子序列之序列。

【0076】本文中，與參考序列「具有至少85%一致性」之序列係在其整個長度上與該參考序列之整個長度具有85%或更大，例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之序列。因此，可藉由全域成對比對使用尼德曼(Needleman)及翁施(Wunsch)演算法(J. Mol. Biol. 48：443 (1970))，例如使用程式尼德爾(Needle) (EMBOSS)以BLOSUM62矩陣及下列參數於整個長度上比較兩個此等序列確定「序列一致性」之百分比：缺口開放=10，空位延伸=0.5，末端缺口罰分=假，末端缺口開放=10，末端空位延伸=0.5 (其等係標準設定)。

【0077】「保守胺基酸取代」係其中胺基酸殘基經具有相似化學性質(例如，電荷、大小或疏水性)之側鏈之另一胺基酸殘基取代者。一般而言，保守胺基酸取代將不大體上改變蛋白質之功能性質。具有相似化學性質之側鏈之胺基酸組之實例包括1)脂族側鏈：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸；2)脂族羥基側鏈：絲胺酸及蘇胺酸；3) 含醯胺側鏈：天冬醯胺酸及麩醯胺酸；4)芳族側鏈：苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸；5)鹼性側鏈：離胺酸、精胺酸及組胺酸；6)酸性側鏈：天冬胺酸及麩胺酸；及7)含硫側鏈：半胱胺酸及甲硫胺酸。亦可基於胺基酸大小定義保守胺基酸取代基。

【0078】「抗體」 (亦稱為「免疫球蛋白」)可為(例如)其中兩個重鏈由二硫鍵彼此連接及各重鏈由二硫鍵連接至輕鏈之天然或習知類型之抗體。存在兩種類型之輕鏈，λ (I)及κ (k)。存在五種決定抗體分子之功能活

性之態樣之主要重鏈類別(或同型)：IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。各抗體鏈含有不同序列域(或區域)。典型IgG抗體之輕鏈包括兩個區域，可變區(VL)及恆定區(CL)。典型IgG抗體之重鏈包括四個區域，即可變區(VH)及恆定區(CH)，後者由三個恆定域(CH1、CH2及CH3)組成。輕鏈及重鏈兩者之可變區決定對抗原之結合及特異性。該輕鏈及重鏈之恆定區可賦予重要生物性質，諸如抗體鏈結合、分泌、跨胎盤遷移、補體結合及對Fc受體(FcR)之結合。Fv片段係抗體Fab片段之N端部分且由一個輕鏈及一個重鏈之可變部分構成。

【0079】 抗體特異性在於抗體結合位點與抗原決定位之間的結構互補性。抗體結合位點由主要來自所謂之高變或互補決定區(CDR)之殘基組成。因此，互補決定區(CDR)係指共同定義抗體Fv區之結合親和力及特異性之胺基酸序列。抗體之輕(L)鏈及重(H)鏈各具有三個CDR，分別命名為CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L及CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。因此，習知抗體之抗原結合位點包括六個CDR，其等包含來自重鏈及輕鏈可變區中之各者之CDR組。

【0080】 「框架區」 (FR)係指插入CDR之間的胺基酸序列，即係指在單一物種之不同免疫球蛋白之間相對保守之免疫球蛋白輕鏈及重鏈可變區之彼等部分。免疫球蛋白之輕鏈及重鏈各具有四個FR，分別命名為FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L，及FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。如本文使用，「人類框架區」係與天然生成之人類抗體之框架區大體上一致(約85%或以上，例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之框架區。

【0081】 在本發明之內文中，免疫球蛋白輕鏈或重鏈中之CDR/FR

定義係基於IMGT定義(Lefranc等人，Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1): 55-77；www.imgt.org)確定。

【0082】 如本文使用，術語「抗體」包括習知抗體及其片段，及單域抗體及其片段，諸如單域抗體之可變重鏈；如本文使用之術語「抗體」亦包括嵌合、人類化、雙特異性或多特異性抗體，及其他類型之工程化抗體。術語「抗體」包括單株抗體。

【0083】 如本文使用之術語「單株抗體」或「mAb」係指單一胺基酸序列之抗體分子，其針對特異性抗原且不應視為需藉由任何特定方法產生。單株抗體可例如藉由B細胞或融合瘤之單一純系產生，但亦可為例如藉由涉及遺傳或蛋白質工程化之方法重組產生。

【0084】 術語「嵌合抗體」係指在最廣泛之意義上含有來自一種抗體之一或多個區域及來自一或多種其他抗體之一或多個區域之工程化抗體。在一實施例中，嵌合抗體包含來源於非人類動物之抗體之VH及VL與另一抗體(在一些實施例中，其係人類抗體)之CH及CL之締合。作為該非人類動物，可使用任何動物(諸如小鼠、大鼠、倉鼠、兔或類似物。嵌合抗體亦可表示對至少兩種不同抗原具有特異性之多特異性抗體。

【0085】 術語「人類化抗體」係指非人類來源之全部或部分且已經修飾以置換(例如)VH及VL之框架區中之某些胺基酸以避免或最小化人類中之免疫反應之抗體。人類化抗體之恆定區通常為人類CH及CL區。

【0086】 抗體(例如習知抗體)之「片段」包含完整抗體(諸如IgG)之一部分，特別地該完整抗體之抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、雙功能抗體，及由抗體片段形成之雙特異性及多特異性抗體。習知抗體之片段亦可

為單域抗體，諸如重鏈抗體或VHH。

【0087】 術語「Fab」表示具有約50,000 Da分子量及抗原結合活性之抗體片段，其中重鏈N端側約一半及整個輕鏈通過二硫鍵結合在一起。其通常在藉由用蛋白酶(木瓜蛋白酶)處理IgG之片段中獲得。

【0088】 術語「F(ab')2」係指具有約100,000 Da分子量及抗原結合活性之抗體片段，其略大於經由鉸鏈區之二硫鍵結合之2個相同Fab片段。其通常在藉由用蛋白酶(胃蛋白酶)處理IgG之片段中獲得。

【0089】 術語「Fab'」係指具有約50,000 Da分子量及抗原結合活性之抗體片段，其係藉由切割該F(ab')2之鉸鏈區之二硫鍵獲得。

【0090】 單鏈Fv (「scFv」)係共價連接之VH::VL異二聚體，其通常由包括由肽編碼連接子連接之VH及VL編碼基因之基因融合表現。本發明之人類scFv片段包括保持適當構型之CDR，例如藉由使用基因重組技術。二價及多價抗體片段可藉由單價scFv之締合自發形成，或可藉由以肽連接子偶合單價scFv產生，諸如二價sc(Fv)2。「dsFv」係由二硫鍵穩定之VH::VL異二聚體。「(dsFv)2」表示由肽連接子偶合之兩個dsFv。

【0091】 術語「雙特異性抗體」或「BsAb」表示包含兩個不同抗原結合位點之抗體。因此，BsAb可(例如)同時結合兩種不同抗原。已愈加頻繁地使用基因工程化以設計、修飾及產生具有如(例如) EP 2 050 764 A1中描述之結合性質及效應功能之所需組之抗體或抗體衍生物。

【0092】 術語「多特異性抗體」表示包含兩個或更多個不同抗原結合位點之抗體。

【0093】 術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，其片段包含在相同多肽鏈(VH-VL)中連接至輕鏈可變域(VL)之重鏈

可變域(VH)。藉由使用過短以致於不容許在相同鏈之兩個域之間配對之連接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對並產生兩個抗原結合位點。

【0094】 術語「融合瘤」表示藉由令用抗原使非人類哺乳動物免疫製備之B細胞經受使用來源於小鼠或類似物之產生具有抗原特異性之所需單株抗體之骨髓瘤細胞進行細胞融合獲得之細胞。

【0095】 「經純化」或「經分離」意謂當提及多肽(例如抗體)或核苷酸序列時，指示分子存在於大量缺乏相同類型之其他生物大分子之情況下。如本文使用之術語「經純化」意謂存在至少75重量%、85重量%、95重量%、96重量%、97重量%或98重量%相同類型之生物大分子。編碼特定多肽之「經分離」核酸分子係指大體上不含不編碼標的多肽之其他核酸分子之核酸分子；然而，該分子可包括不有害影響組合物之基本特性之一些另外鹼基或部分。

【0096】 如本文使用，術語「個體」表示哺乳動物，諸如倉鼠、貓、犬、靈長類動物或人類。在本發明之實施例中，該個體(或病患)係人類。

【0097】

本發明之抗體

發明人已成功產生、篩選及選擇特異性抗CEACAM5抗體，該等抗體意外顯示使得其等理想地適用於癌症療法中(特別地作為免疫結合物(抗體-藥物結合物)之部分)之數種特性之組合。例如，本發明之抗體對人類及食蟹獼猴CEACAM5蛋白兩者均顯示高親和力，且其等不與人類CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7及CEACAM8蛋白，或不與食蟹獼猴CEACAM6蛋白顯著交叉反應。發明人已確定根據本發明之此等單株抗

體之胺基酸序列。

【0098】本發明提供一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白；

且其中該經分離抗體包含

(i)至少一個輕鏈恆定區(CL)，其包含選自由以下組成之群之序列：GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP及TLQSA (較佳GGTLQSPP)且較佳於該輕鏈恆定區之C端包含此序列；

及/或

(ii)至少一個重鏈恆定區(CH)，其包含下列胺基酸取代中之一或多者：

(a) L234A及L235A (LALA突變)；

(b) L234A及L235A及P329G (LALA-PG突變)；

(c) L235A及G237A (LAGA突變)；

(d) M252Y及S254T及T256E (YTE突變)；

(e) K222R；

且其中歐盟(EU)編號係用於該等胺基酸取代；

且其中該經分離抗體包含由SEQ ID NO: 3之胺基酸序列構成之CDR1-H、由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列構成之CDR2-H、由SEQ ID NO: 5之胺基酸序列構成之CDR3-H、由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列構成之CDR1-L、由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列構成之CDR2-L及由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列構成之CDR3-L。

【0099】本發明進一步提供一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白；且其中該經分離抗體包含

(i)至少一個輕鏈恆定區(CL)，其包含選自由以下組成之群之序列：GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP及TLQSA (較佳GGTLQSPP)且較佳於該輕鏈恆定區之C端包含此序列；

及

(ii)至少一個重鏈恆定區(CH)，其包含下列胺基酸取代中之一或多者：

(a) L234A及L235A (LALA突變)；

(b) L234A及L235A及P329G (LALA-PG突變)；

(c) L235A及G237A (LAGA突變)；

(d) M252Y及S254T及T256E (YTE突變)；

(e) K222R；

且其中歐盟(EU)編號係用於該等胺基酸取代；

且其中該經分離抗體包含由SEQ ID NO: 3之胺基酸序列構成之CDR1-H、由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列構成之CDR2-H、由SEQ ID NO: 5之胺基酸序列構成之CDR3-H、由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列構成之CDR1-L、由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列構成之CDR2-L及由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列構成之CDR3-L。

【0100】 較佳地，本發明之經分離抗體包含框架區FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7及FR8，具有結構FR1 - CDR1-H - FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4及FR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8；其中FR1由SEQ ID NO: 54構成，FR2由SEQ ID NO: 55構成，FR3由SEQ ID NO: 56構成，FR4由SEQ ID NO: 57構成，FR5由SEQ ID NO: 58構成，FR6由SEQ ID NO: 59構成，FR7由SEQ ID NO:

60構成及FR8由SEQ ID NO: 61構成。

【0101】本發明進一步提供一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白，

其中該經分離抗體較佳包含由SEQ ID NO: 3之胺基酸序列構成之CDR1-H、由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列構成之CDR2-H、由SEQ ID NO: 5之胺基酸序列構成之CDR3-H、由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列構成之CDR1-L、由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列構成之CDR2-L及由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列構成之CDR3-L；

且其中該經分離抗體包含框架區FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7及FR8，具有結構FR1 - CDR1-H - FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4及FR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8；其中FR1由SEQ ID NO: 54 (EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS)構成，FR2由SEQ ID NO: 55 (LTWIRQHPGKGLEWIGY)構成，FR3由SEQ ID NO: 56 (YFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC)構成，FR4由SEQ ID NO: 57 (WGQGTLVTVSS)構成，FR5由SEQ ID NO: 58 (EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS)構成，FR6由SEQ ID NO: 59 (LAWYQQKPGQAPRLLIY)構成，FR7由SEQ ID NO: 60 (TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC)構成及FR8由SEQ ID NO: 61 (FGPGTKVDIK)構成。

【0102】本發明亦提供一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白，其中該經分離抗體包含

(i)至少一個輕鏈恆定區(CL)，其包含選自由以下組成之群之序列：GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP及TLQSA且最

佳該序列GGTLQSPP，且較佳於該輕鏈恆定區之C端包含此序列；

及/或

(ii)至少一個重鏈恆定區(CH)，其包含下列胺基酸取代中之一或多者：

(a) L234A及L235A (LALA突變)；

(b) L234A及L235A及P329G (LALA-PG突變)；

(c) L235A及G237A (LAGA突變)；

(d) M252Y及S254T及T256E (YTE突變)；

(e) K222R；

且其中歐盟(EU)編號係用於該等胺基酸取代；

且其中較佳該經分離抗體包含由SEQ ID NO: 3之胺基酸序列構成之CDR1-H、由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列構成之CDR2-H、由SEQ ID NO: 5之胺基酸序列構成之CDR3-H、由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列構成之CDR1-L、由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列構成之CDR2-L及由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列構成之CDR3-L；

且其中較佳該經分離抗體包含框架區FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7及FR8，具有結構FR1 - CDR1-H - FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4及FR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8；其中FR1由SEQ ID NO: 54構成，FR2由SEQ ID NO: 55構成，FR3由SEQ ID NO: 56構成，FR4由SEQ ID NO: 57構成，FR5由SEQ ID NO: 58構成，FR6由SEQ ID NO: 59構成，FR7由SEQ ID NO: 60構成及FR8由SEQ ID NO: 61構成。

【0103】 本發明亦提供一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5

蛋白且包含由胺基酸序列DGSVSRGGYY (SEQ ID NO: 3)構成之CDR1-H、由胺基酸序列IYYSGST (SEQ ID NO: 4)構成之CDR2-H、由胺基酸序列ARGIAVAPFDY (SEQ ID NO: 5)構成之CDR3-H、由胺基酸序列QSVRSN (SEQ ID NO: 6)構成之CDR1-L、由胺基酸序列AAS (SEQ ID NO: 7)構成之CDR2-L及由胺基酸序列QQYTNWPFT (SEQ ID NO: 8)構成之CDR3-L；且其中該經分離抗體包含

(i)至少一個重鏈恆定區(CH)，其包含下列胺基酸取代中之一或多者：

(a) L234A及L235A (LALA突變)；

(b) L234A及L235A及P329G (LALA-PG突變)；

(c) L235A及G237A (LAGA突變)；

(d) M252Y及S254T及T256E (YTE突變)；

(e) K222R；

及/或

(ii)至少一個輕鏈恆定區(CL)，其包含序列GGTLQSPP，且較佳於該輕鏈恆定區之C端包含此序列；

且其中歐盟(EU)編號係用於該等胺基酸取代。該EU編號系統係熟知的(參考Edelman等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1969, 63, 78-85及Kabat, E.A.等人，National Institutes of Health (U.S.) Office of the Director. Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版；DIANE Publishing: Collingdale, PA, USA, 1991)及本文指示之胺基酸取代之位置遵循此編號系統。使用單字母胺基酸編碼指定該等胺基酸取代。GGTLQSPP亦可數次包含於該輕鏈恆定區(CL)中且可或者或另外亦包含

於該重鏈恆定區(CH)中。較佳地，該GGTLQSPP係於本發明之抗體之兩個輕鏈恆定區(CL)中每個輕鏈恆定區(CL)包含一次。

【0104】 本發明之抗體較佳亦可結合至食蟹獼猴CEACAM5蛋白。

【0105】 在本發明之經分離抗體之一實施例中，兩個重鏈恆定區(CH)均包含該等胺基酸取代(a)至(e)中之一或多者及/或其中兩個輕鏈恆定區均包含該序列GGTLQSPP。下表4中概述CL及CH鏈之修飾之較佳組合，其指示抗體mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M及mAb7-M之修飾組合。較佳地，本發明之抗體包含下列重鏈恆定區(CH)及輕鏈恆定區(CL)修飾中之任一者：

(a)該CH包含胺基酸取代L234A、L235A (LALA突變)及M252Y、S254T及T256E (YTE突變)；或

(b)該CH包含胺基酸取代L234A、L235A (LALA突變)及M252Y、S254T及T256E (YTE突變)；及該輕鏈恆定區(CL)包含序列GGTLQSPP (較佳於C端)；或

(c)該CH包含胺基酸取代L234A、L235A (LALA突變)及M252Y、S254T及T256E (YTE突變)及K222R；及該輕鏈恆定區(CL)包含序列GGTLQSPP (較佳於C端)；或

(d)該CH包含胺基酸取代L234A、L235A (LALA突變)；或

(e)該CH包含胺基酸取代L234A、L235A (LALA突變)；及該輕鏈恆定區(CL)包含序列GGTLQSPP (較佳於C端)。

【0106】 較佳地，本發明之抗體之兩個CL及兩個CH均包含如上文(a)至(e)中概述之修飾。

【0107】 在本發明之經分離抗體之另一實施例中，至少一個重鏈恆

定區(CH)包含胺基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLF PPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 31)或ASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD**R**THTCPPCP APE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 32)及/或該等輕鏈恆定區(CL)中之至少一者包含胺基酸序列RTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGT LQSPP** (SEQ ID NO: 33)。

【0108】在本發明之經分離抗體之又另一實施例中，該等重鏈恆定區(CH)及輕鏈恆定區(CL)具有下列序列組合中之任一者：

(1)兩個CH均包含SEQ ID NO: 31之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(2)兩個CH均包含SEQ ID NO: 31之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(3)兩個CH均包含SEQ ID NO: 32之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(4)兩個CH均包含ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 50)之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(5)兩個CH均包含SEQ ID NO: 50之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(6)至少一個CH包含SEQ ID NO: 31之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(7)至少一個CH包含SEQ ID NO: 31之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(8)至少一個CH包含SEQ ID NO: 32之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(9)至少一個CH包含SEQ ID NO: 50之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(10)至少一個CH包含SEQ ID NO: 50之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 33之序列。

【0109】 在本發明之實施例中，具有上述六個CDR序列之抗體包括包含與胺基酸序列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**DGSVSRGGYY**LTWIRQHPGKGLEWIGY**IYYSGST**YFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGIAVAPFD**YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9) (以粗體字顯示CDR)具有至少85%一致性之胺基酸序列之重鏈可變區(VH)及包含與胺基酸序列EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS**QSVRS**NLAWYQQKPGQAPRLLIY**AAS**TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC**QQYTNWPFT**FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 10) (以粗體字顯示CDR)具有至少85%一致性之胺基酸序列之輕鏈可變區(VL)。

【0110】 在本發明之實施例中，具有上述六個CDR序列之抗體包括包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可變區(VH)及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變區(VL)。

【0111】 在本發明之實施例中，抗體進一步包括包含與胺基酸序列ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 11)具有至少85%一致性之胺基酸序列之重鏈恆定區(CH)及

包含與胺基酸序列RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)具有至少85%一致性之胺基酸序列之輕鏈恆定區(CL)。

【0112】 在本發明之實施例中，抗體包括包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之重鏈恆定區(CH)及包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之輕鏈恆定區(CL)。

【0113】 已知抗體之重鏈恆定區(CH)可包含C端離胺酸(K)而不損失任何結合功能。因此，於本文針對本發明抗體描述之序列中，該等重鏈恆定區(CH)可視需要於C端包含另外離胺酸(K)。就本文揭示之抗體-藥物結合物而言，無離胺酸之重鏈恆定區(CH)係較佳的。

【0114】 在更特定實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且包括包含與胺基酸序列EVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY FNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFD YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 13)具有至少85%一致性之胺基酸序列

之重鏈(HC)及包含與胺基酸序列EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 14)具有至少85%一致性之胺基酸序列之輕鏈(LC)。在本發明之甚至更特定實施例中，該抗體包括：(i)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之輕鏈(LC)；或(ii)包含胺基酸序列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 34)之重鏈(HC)及包含胺基酸序列(SEQ ID NO: 36)之輕鏈(LC)；

或(iii)包含胺基酸序列EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCD**R**THTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO: 35)之重鏈(HC)及包含胺基酸序列EIVLTQSPATLSVSPGERATL
SCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSGSGSG
TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC**GGTLQSPP** (SEQ ID NO: 36)之輕鏈(LC)；

或

(iv)包含EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWI
RQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSS
VTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT
CPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 51)

之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之輕鏈(LC)；或

(v)包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之輕鏈(LC)。

【0115】 在本發明之又更特定實施例中，抗體由以下構成：(i)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之兩個相同重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之兩個相同輕鏈(LC)；或(ii)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之兩個相同重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之兩個相同輕鏈(LC)；或(iii)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之兩個相同重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之兩個相同輕鏈(LC)；或(iv)包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之兩個相同重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之兩個相同輕鏈(LC)；或(v)包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之兩個相同重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之兩個相同輕鏈(LC)。在一些實施例中，本發明抗體之一或多個個別胺基酸可在上文提及序列(包括CDR序列)之一或多者中藉由取代(特別地藉由保守取代)加以改變。此改變可旨在(例如)移除醣化位點或脫醯胺位點，例如與該抗體之人類化有關。

【0116】 在一些實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且由兩個相同重鏈(HC)及兩個相同輕鏈(LC)構成，重鏈(HC)由SEQ ID NO: 13之胺基酸序列構成，輕鏈(LC)由SEQ ID NO: 14之胺基酸序列構成；此特定抗體在本文中亦稱為「mAb1」。

【0117】 在一些實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且由兩個相同重鏈(HC)及兩個相同輕鏈(LC)構

成，重鏈(HC)由SEQ ID NO: 34之胺基酸序列構成及輕鏈(LC)由SEQ ID NO: 14之胺基酸序列構成；此特定抗體在本文中亦稱為「mAb1-M」。

【0118】在一些實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且其由兩個相同重鏈(HC)及兩個相同輕鏈(LC)構成，重鏈(HC)由SEQ ID NO: 34之胺基酸序列構成及輕鏈(LC)由SEQ ID NO: 36之胺基酸序列構成；此特定抗體在本文中亦稱為「mAb2-M」。

【0119】在一些實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且其由兩個相同重鏈(HC)及兩個相同輕鏈(LC)構成，重鏈(HC)由SEQ ID NO: 35之胺基酸序列構成及輕鏈(LC)由SEQ ID NO: 36之胺基酸序列構成；此特定抗體在本文中亦稱為「mAb3-M」。

【0120】在一些實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且其由兩個相同重鏈(HC)及兩個相同輕鏈(LC)構成，重鏈(HC)由SEQ ID NO: 51之胺基酸序列構成及輕鏈(LC)由SEQ ID NO: 14之胺基酸序列構成；此特定抗體在本文中亦稱為「mAb6-M」。

【0121】在一些實施例中，本發明之抗體係一種經分離抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且其由兩個相同重鏈(HC)及兩個相同輕鏈(LC)構成，重鏈(HC)由SEQ ID NO: 51之胺基酸序列構成及輕鏈(LC)由SEQ ID NO: 36之胺基酸序列構成；此特定抗體在本文中亦稱為「mAb7-M」。

【0122】在一些實施例中，本發明之抗體結合至人類及食蟹獼猴

CEACAM5之A2-B2域。本發明亦提供與包含mAb1之重鏈及輕鏈可變區(即分別對應於SEQ ID NO: 9及10之VH及VL)及來自mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M中任一者之重鏈恆定區(CH)及輕鏈恆定區(CL)之抗體競爭結合至人類及/或食蟹獼猴CEACAM5蛋白之A2-B2域之抗體。

【0123】候選抗體與包含mAb1之VH及VL之抗體(此後，在與候選抗體競爭之內文，稱為「參考」抗體)競爭結合至人類及/或食蟹獼猴CEACAM5蛋白之A2-B2域之能力可(例如)藉由競爭性ELISA容易分析，其中該抗原(即人類或食蟹獼猴CEACAM5之A2-B2域，或包含包括該A2-B2域之人類或食蟹獼猴CEACAM5之片段或由其構成之多肽，特別地人類或食蟹獼猴CEACAM5之細胞外域)分別結合至撐體並添加分別含有該候選抗體及該參考抗體之兩種溶液，且容許該等抗體競爭結合至該抗原。然後可量測結合至該抗原之參考抗體之量，並與當針對陰性對照(例如不含抗體之溶液)量測時結合至該抗原之參考抗體之量進行比較。在候選抗體之存在下經結合之參考抗體之量相較於在陰性對照之存在下經結合之參考抗體之量減少指示該候選抗體已與該參考抗體競爭。便利地，可標記(例如螢光)該參考抗體以促進偵測經結合之參考抗體。可用連續稀釋之候選及/或參考抗體進行重複量測。

【0124】在一些實施例中，本發明之抗體不與人類CEACAM1、人類CEACAM6、人類CEACAM7、人類CEACAM8及食蟹獼猴CEACAM6蛋白結合或顯著交叉反應。在一些實施例中，該抗體不與上述人類及食蟹獼猴CEACAM蛋白(除CEACAM5外)之細胞外域結合或顯著交叉反應。

【0125】「親和力」在理論上由全抗體與抗原之間的平衡締合定

義。親和力可藉由多種已知方法進行實驗評估，諸如用表面電漿子共振量測結合率及解離率或在免疫化學分析(ELISA、FACS)中量測EC_{50} (或視K_D)。在此等分析中，該EC_{50}係在對指定濃度之抗原(藉由ELISA (酶聯免疫吸附分析))或表現該抗原之細胞(藉由FACS (螢光活化之細胞分選))曝露指定時間後誘導介於基線與最大值之間的一半之反應之抗體濃度。

【0126】 當兩種抗原之EC_{50}在相似範圍內時，結合至抗原1 (Ag1)之單株抗體對抗原2 (Ag2)具有「交叉反應性」。在本申請案中，當結合至Ag1之單株抗體對Ag2之親和力係其對Ag1之親和力的10倍或以下(例如5倍內)時，結合至Ag1之單株抗體對Ag2具有交叉反應性，對兩種抗原的親和力係以相同方法量測。

【0127】 當對兩種抗原之親和力非常不同時，結合至Ag1之單株抗體不與Ag2 「顯著交叉反應」。若結合反應過低，則對Ag2之親和力可無法量測。在本申請案中，當在相同實驗設定及相同抗體濃度下，該單株抗體對Ag2之結合反應小於相同單株抗體對Ag1之結合反應之5%時，結合至Ag1之單株抗體不與Ag2的顯著交叉反應。實際上，所用抗體濃度可為EC_{50}或達成用Ag1獲得之飽和平線區所需之濃度。當單株抗體不與Ag2顯著交叉反應時，該單株抗體「特異性結合」至Ag1 (或對Ag1「具有特異性」)。

【0128】 在一些實施例中，根據本發明之抗體對食蟹獼猴CEACAM5之親和力係在其對人類CEACAM5之親和力之10倍或更小內(例如於5倍內)。因此，根據本發明之抗體可用於在食蟹獼猴中進行之毒物學研究中，因為食蟹獼猴中觀察到之毒性概況將與人類中之預期潛在副作用相關。

【0129】 在一些實施例中，本發明之抗體對人類CEACAM5或食蟹獼猴CEACAM5，或兩者具有親和力，其係≤ 10 nM；例如，本發明之抗體可對人類CEACAM5具有親和力，其介於1與10 nM之間，諸如對人類CEACAM5之親和力係約6 nM。

【0130】 在使用可溶性重組CEACAM5作為捕獲抗原之ELISA中，對人類CEACAM5或對食蟹獼猴CEACAM5之親和力可確定為(例如)EC50值。

【0131】 或者，對於本發明之抗體，可藉由FACS分析(例如)對腫瘤細胞系MKN45 (DSMZ、ACC 409)測定視解離常數(視KD)。

【0132】 另外，已顯示根據本發明之抗體可藉由免疫組織化學，例如以冷凍及福爾馬林固定及石蠟包埋之(FFPE)組織切片偵測CEACAM5表現。

【0133】 本文中上文及下文描述之實施例之任何組合形成本發明之部分。

【0134】 在一些實施例中，根據本發明之抗體係習知抗體，諸如習知單株抗體，或抗體片段、雙特異性或多特異性抗體。

【0135】 在一些實施例中，根據本發明之抗體包含IgG或其片段或由其構成。

【0136】 在一些實施例中，本發明之抗體可為(例如)鼠抗體、嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。用於抗體序列之人類化之許多方法為此項技術中已知；參見例如回顧Almagro及Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633。一種常用方法係CDR移植，或抗體重塑，其涉及將供體抗體(一般小鼠抗體)之CDR序列植入具有不同特異性之人類抗體之框架支架

內。由於CDR移植可減小CDR移植之非人類抗體之結合特異性及親和力，並因此減小其生物活性，因此可於CDR移植之抗體之所選位置引入回復突變以保留親代抗體之結合特異性及親和力。可使用文獻及抗體資料庫中可用之資訊進行可能回復突變之位置之鑑別。作為回復突變候選者之胺基酸殘基通常為彼等位於抗體分子表面處者，而通常將不改變經掩埋或低表面曝露程度之殘基。CDR移植及回復突變之替代人類化技術係表面重整，其中保留非人類來源之非表面曝露之殘基，而將表面殘基改變為人類殘基。另一替代技術稱為「引導選擇」 (Jespers等人，(1994) Biotechnology 12, 899)且可用以自鼠抗體衍生保留親代抗體之抗原決定基及結合特性之全人類抗體。

【0137】 對於嵌合抗體，人類化通常涉及可變區序列之框架區之修飾。

【0138】 作為CDR之部分之胺基酸殘基將通常不因為人類化而改變，儘管在某些情況下，可需改變個別CDR胺基酸殘基，例如以移除醣化位點、脫醯胺位點或非所需之半胱胺酸殘基。藉由在三肽序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr中將寡醣鏈結合至天冬醯胺酸殘基發生N連接之醣化，其中X可為除Pro外之任何胺基酸。藉由使Asn或Ser/Thr殘基突變為不同殘基，例如藉助於保守取代可達成N-醣化位點之移除。天冬醯胺酸及麩醯胺酸殘基之脫醯胺可取決於諸如pH及表面曝露之因素發生。天冬醯胺酸殘基特別易受脫醯胺影響，主要當存在於序列Asn-Gly中，且在較小程度上存在於其他二肽序列(諸如Asn-Ala)中時。當此脫醯胺位點(例如Asn-Gly)存在於CDR序列中時，因此可需移除位點，通常藉由保守取代以移除所涉及殘基中之一者。用以移除所涉及殘基中之一者之CDR序列中之取代亦旨

在包含於本發明中。

【0139】 在人類化抗體或其片段中，重鏈及輕鏈之可變域可包含人類受體框架區。若存在，則人類化抗體可進一步包含人類恆定重鏈及輕鏈域。

【0140】 在一些實施例中，根據本發明之抗體可為選自由以下組成之群之抗體片段(例如人類化抗體片段)：Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2及雙功能抗體。

【0141】 在一些實施例中，根據本發明之抗體可為由抗體片段(至少一個抗體片段係根據本發明之抗體之片段)形成之雙特異性或多特異性抗體。多特異性抗體係如(例如) EP 2 050 764 A1或US 2005/0003403 A1中描述之多價蛋白質複合物。

【0142】 根據本發明之雙特異性或多特異性抗體可對(a)人類及食蟹獼猴CEACAM5蛋白及(b)至少一種其他抗原具有特異性。在一些實施例中，該至少一種其他抗原不為人類或食蟹獼猴CEACAM家族成員。在其他實施例中，該至少一種其他抗原可為人類或食蟹獼猴CEACAM5上之除mAb1靶向之抗原決定基外之抗原決定基。

【0143】 可藉由此項技術中已知的任何技術產生本發明之抗體。根據本發明之抗體可(例如)以分離(例如純化)形式使用或包含於載體(諸如膜或脂質囊泡(例如脂質體))中。

【0144】

本發明之核酸及宿主細胞

本發明之另一態樣係關於包含編碼如上文定義之本發明之抗體之核酸序列或由其構成之經分離核酸。

【0145】 通常，該核酸係DNA或RNA分子，其可包括於任何合適之載體(諸如質體、黏接質體、游離基因體、人工染色體、噬菌體或病毒載體)中。

【0146】 術語「載體」、「選殖載體」及「表現載體」意謂可將DNA或RNA序列(例如外源基因)引入宿主細胞內以轉形宿主並促進引入序列之表現(例如轉錄及轉譯)之媒介物。

【0147】 因此，本發明之另一態樣係關於包含如上文定義之本發明核酸之載體。

【0148】 此等載體可包含調節元件(諸如啟動子、強化子、終止子及類似物)，以一經對個體投與即引起或引導該多肽之表現。用於動物細胞之表現載體中之啟動子及強化子之實例包括SV40之早期啟動子及強化子(Mizukami T等人，1987)、莫洛尼小鼠白血病病毒之LTR啟動子及強化子(Kuwana Y等人，1987)、免疫球蛋白H鏈之啟動子(Mason JO等人，1985)及強化子(Gillies SD等人，1983)及類似物。

【0149】 可使用動物細胞之任何表現載體，只要可插入並表現編碼人類抗體C區之基因即可。合適載體之實例包括pAGE107 (Miyaji H等人，1990)、pAGE103 (Mizukami T等人，1987)、pHSG274 (Brady G等人，1984)、pKCR (O'Hare K等人，1981)、pSG1 β d2-4-(Miyaji H等人，1990)及類似物。

【0150】 質體之其他實例包括包含複製起始序列之複製質體，或整合質體，諸如，舉例而言，pUC、pcDNA、pBR，及類似物。

【0151】 病毒載體之其他實例包括腺病毒、逆轉錄病毒、皰疹病毒及AAV載體。此等重組病毒可藉由此項技術中已知的技術，諸如藉由轉

染包裝細胞或藉由用輔助質體或病毒瞬時轉染產生。包裝病毒之細胞之典型實例包括PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞等。用於產生此等複製缺陷重組病毒之詳細方案可參見(例如)WO 95/14785、WO 96/22378、US 5,882,877、US 6,013,516、US 4,861,719、US 5,278,056及WO 94/19478。

【0152】 本發明之另一目的係關於已藉由根據本發明之核酸及/或載體轉染、感染或轉形之宿主細胞。

【0153】 術語「轉形」意謂將「外源」 (即外來)基因、DNA或RNA序列引入宿主細胞內，使得該宿主細胞將表現引入之基因或序列以產生所需物質，通常由該引入之基因或序列編碼之蛋白質或酶。接受並表現該引入之DNA或RNA之宿主細胞已經「轉形」。

【0154】 本發明之核酸可用以在合適之表現系統中產生本發明之抗體。術語「表現系統」意謂在合適條件下(例如)用於表現由載體攜載並引入宿主細胞內之外源DNA編碼之蛋白質之宿主細胞及可相容載體。

【0155】 常見表現系統包括大腸桿菌宿主細胞及質體載體、昆蟲宿主細胞及桿狀病毒載體，及哺乳動物宿主細胞及載體。宿主細胞之其他實例包括(但不限於)原核細胞(諸如細菌)及真核細胞(諸如酵母細胞、哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞等)。特定實例包括大腸桿菌、克魯維酵母(Kluyveromyces)或啤酒酵母(Saccharomyces yeasts)、哺乳動物細胞系(例如，Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞等)及原代或既定哺乳動物細胞培養物(例如，由淋巴母細胞、纖維母細胞、胚胎細胞、上皮細胞、神經細胞、脂肪細胞等產生)。實例亦包括小鼠SP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、具有二

氫葉酸還原酶基因(下文中稱為「DHFR基因」)缺陷之CHO細胞(Urlaub G等人；1980)、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662，下文中稱為「YB2/0細胞」)，及類似物。在一些實施例中，使用YB2/0細胞，因為當表現於此細胞中時，嵌合或人類化抗體之ADCC活性增強。

【0156】 對於人類化抗體之表現，表現載體可為其中編碼抗體重鏈之基因及編碼抗體輕鏈之基因存在於不同載體上之類型或其中兩種基因均存在於相同載體上之類型(串聯型)。從構築人類化抗體表現載體之容易性、引入動物細胞內之容易性及動物細胞中抗體H與L鏈之表現程度間之平衡的方面考慮，人類化抗體表現載體為串聯型，Shitara K等人，J Immunol Methods. 1994 Jan. 3；167(1-2):271-8)。串聯型人類化抗體表現載體之實例包括pKANTEX93 (WO 97/10354)、pEE18及類似物。

【0157】 本發明亦係關於一種產生表現根據本發明之抗體之重組宿主細胞之方法，該方法包括由以下構成之步驟：(i)將如上文描述之重組核酸或載體活體外或離體引入健全之宿主細胞內，(ii)活體外或離體培養獲得之重組宿主細胞，及(iii)視需要，選擇表現及/或分泌該抗體之細胞。

【0158】 此等重組宿主細胞可用於產生本發明之抗體。

【0159】

產生本發明之抗體之方法

本發明之抗體可藉由此項技術中已知的任何技術諸如(但不限於)任何化學、生物、遺傳或酶技術單獨或組合產生。

【0160】 已知所需抗體之胺基酸序列，熟習此項技術者可容易使用用於產生多肽之標準技術產生該等抗體或免疫球蛋白鏈。例如，該等抗體或免疫球蛋白鏈可使用眾所周知的固相方法使用市售肽合成裝置(諸如由

Applied Biosystems, Foster City, California製造)並遵循製造商之說明書合成。或者，本發明之抗體及免疫球蛋白鏈可藉由如此項技術中熟知的重組DNA技術產生。例如，在將編碼所需多肽之DNA序列引入表現載體內並將此等載體引入將適用於表現所需多肽之真核或原核宿主內後作為DNA表現產物獲得此等多肽(例如抗體)，隨後可使用熟知技術自真核或原核宿主分離該等多肽。

【0161】 例如，本發明提供編碼抗體mAb1之下列DNA序列：

mAb1重鏈核苷酸序列

其中mVk訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VH區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*GAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG

GTGCCCGGGTCGACCGGT**GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCC**

CAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCAC

TGTCTCTGATGGCTCCGTCAGCAGGGGTGGTTACTACTTGACC

TGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGG

TACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTTCAACCCGTCCCTCA

GGAGTCGGGTTACCATGTCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTT

CTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGT

GTATTACTGTGCGAGAGGGATAGCAGTGGCTCCCTTTGACTAC

TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCAGCTAGCACCA

AGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAA

GCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC

CCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG

GCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACA

GCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAGCAGCAGCCTGGGAACCC

AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG

TGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCATACC

TGTCCACCCTGCCCAGCCCCCCCAGTGGCCGGACCCTCCGTGTTCC

TGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC

CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAG

AGGTGAAGTTCAATTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG

CCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGG

GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC

AAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCTCCAGC

ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCC

CCAGGTGTACACACTGCCCCCATCTCGGGAAGAAATGACCAAGAA

CCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCCAGCGA

CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACT

ACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC

TGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGC

AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCAC

TACACACAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGC*TGA*

(SEQ ID NO: 15)

mAb1輕鏈核苷酸序列

其中uPA訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VL區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*AGGGCCCTGCTGGCTAGACTGCTGCTGTGCGTGCTGGTC
GTGTCCGACAGCAAGGGC**GAAATCGTACTCACGCAGTCTCCAG**
CCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGACCAGTCAGAGTGTTCGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAG
CAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCAT
CCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTC
TGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATACTAACTGG
CCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGACATCAAACGTA
CGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA
GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAA
GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGC
AGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA
GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T*TGATAG*

(SEQ ID NO: 16)

本發明亦提供編碼抗體mAb1-M、mAb2-M及mAb3-M、mAb6-M、

mAb7-M之下列DNA序列：

SEQ ID NO 37：HC mAb1-M及mAb2-M (HC-LALA-YTE) (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VH區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCC**GAGGTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTGGATCAGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCCACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCT**GCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC

TGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGA

GTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGT

CCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTC

CAAAGCCTAAGGACACCCTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGA

CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGT

TCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCA

AGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCC

GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC

AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAG

ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTAC

ACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCC

CTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGG

AATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAACC

CCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGC

TGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT

GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGA

GTCTGTCCCTGTCTCCTGGC*TGATGA*

SEQ ID NO 38：HC mAb3-M (HC-K222R-LALA-YTE) (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VH區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTC

CCGCCTCTCTGTCC**GAGGTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGA**

CTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGCACCGTGT

CTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTGGAT

CAGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATT

CTACTACTCCGGCTCCACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCC

AGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCC

TGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACTA

CTGCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGC

CAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACC

CAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGA

ACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTG

TGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACA

CCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAG

CGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC

TGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGA

GTGGAACCCAAGTCCTGCGACAGAACCCACACCTGTCCTCCATGT

CCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTC

CAAAGCCTAAGGACACCCTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGA

CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGT

TCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCA

AGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCC

GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC

AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAG
ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTAC
ACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCC
CTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGG
AATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACA
CCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGC
TGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT
GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGA
GTCTGTCCCTGTCTCCTGGC*TGATGA*

SEQ ID NO 39：LC mAb2-M、mAb3-M及mAb7-M (LC-Tag) (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VL區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTC
CCGCCAGCCTGTCC**GAGATCGTGCTGACTCAATCTCCCGCCACA**
CTGTCTGTGTCTCCCGGCGAAAGAGCTACCCTGTCTTGCCGGA
CATCTCAGTCCGTGCGGTCTAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAA
GCCTGGACAGGCTCCTCGGCTGCTGATCTACGCTGCTTCTACC
AGAGCCACAGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCTCTGGATCTG
GCACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGTCCGAGGA

TTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTATACCAACTGGCCCTTC

ACCTTCGGACCCGGCACAAAGGTGGACATCAAGAGAACCGTGG

CCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAA

GTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCT

CGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTGCAGAG

CGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAG

CACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGTCCAAGGCCGACTA

CGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCT

GTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACAGAGGCGAGTGCGGCGG

CACCTTGCAGTCTCCACCT*TGATAA*

SEQ ID NO 52：HC mAb6-M及HC mAb7-M (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VL區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTC

CCGCCTCTCTGTCC**GAGGTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGA**

CTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGCACCGTGT

CTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTGGAT

CAGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATT

CTACTACTCCGGCTCCACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCC

AGAGTGACCATGTCCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCC

TGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCCGTGTACTA

CTGCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGC

CAGGGCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACC

CAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGA

ACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTG

TGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACA

CCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAG

CGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC

TGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGA

GTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGT

CCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTC

CAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGA

CCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGT

TCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCA

AGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCC

GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC

AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAG

ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTAC

ACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCC

CTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGG

AATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAACC

CCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGC

TGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT

GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGA

GTCTGTCCCTGTCTCCTGGC*TGATGA*

SEQ ID NO 53：LC mAb1-M及LC mAb6-M (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

VL區序列呈**黑體字**，及

CDR以雙下劃線指示：

*ATG*GAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGG

GTGCCCGGGTCGACCGGT**GAAATCGTACTCACGCAGTCTCCAGC**

CACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC

AGGACCAGTCAGAGTGTTCGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGC

AGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCATC

CACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGG

GTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCT

GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATACTAACTGGC

CATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGACATCAAACGTAC

GGTGGCAGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG

TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT

ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC

AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG

GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA

GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG

GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

TGATAG

CD20同型對照

SEQ ID NO 40：HC mAb5-M (抗CD20-HC)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG

RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE

DSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPS

SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT

CPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE

YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV

DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 41：LC mAb5-M (抗CD20-LC)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP

WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTS

NPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP

REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE

KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGTLQSPP**

SEQ ID NO 42：HC mAb5-M (抗CD20-HC) (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTC
CCGCCAGCCTGTCTCAGGTCCAGTTGCAACAACCTGGCGCCGAGC
TTGTGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCG
GCTACACCTTCACCAGCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGACCC
CTGGCAGAGGCCTGGAATGGATCGGCGCTATCTATCCTGGCAACG
GCGACACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCTACCCTGA
CCGCCGACAAGTCCTCTTCCACCGCTTACATGCAGCTGTCCAGCCT
GACCTCTGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCTACCTAT
TATGGCGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGGGGCGCTGGCACCACC
GTGACAGTTTCTGCCGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTC
TGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTG
GAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTG
CTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTCGTGACCGTGC
CTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACC
ACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAG
TCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAA
GCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGG
ACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGG
TGGATGTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACG
TGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAG

GAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG
CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT
GTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAA
GGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACCCTGCCTCC
AAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCT
CGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG
CAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCT
GGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGA
CAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT
GCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCT
GTCCCCTGGCAAG*TGATGA*

SEQ ID NO 43：LC mAb5-M (抗CD20-LC) (核苷酸)

訊息肽加下劃線，

起始及終止密碼子呈*斜體*，

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTC
CCGCCTCTCTGTCCCAGATCGTGCTGTCTCAGTCTCCCGCCATCCT
GAGTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCAGAGCCTC
CTCCTCCGTGTCCTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCTGGCAGC
TCCCCTAAGCCTTGGATCTACGCCACCTCCAATCTGGCCTCTGGCG
TGCCAGTCAGATTCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCTCCTACAGCCT
GACCATCTCTAGAGTGGAAGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTG
TCAGCAGTGGACCAGCAATCCTCCTACCTTTGGCGGAGGCACCAA

GCTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTC
CCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTG
TGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGG
AAGGTGGACAACGCTCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTG
ACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCTCTGAGCAGCACC
CTGACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCC
TGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCT
TTCAACAGAGGCGAGTGTGGCGGCACCCTGCAGTCTCCACCT*TGAT*
AA

SEQ ID NO 64：利妥昔單抗(rituximab) HC

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG
RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE
DSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 65：利妥昔單抗LC

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP
WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTS

NPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0162】 本發明進一步係關於一種產生本發明之抗體之方法，該方法包括由以下構成之步驟：(i)培養根據本發明之經轉形宿主細胞；(ii)表現該抗體；及(iii)回收經表現之抗體。

【0163】 可藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如，舉例而言，蛋白A-瓊脂糖、羥基磷灰石層析術、凝膠電泳、透析或親和力層析術)自培養基適當地分離本發明之抗體。

【0164】 在一些實施例中，藉由獲得編碼如先前描述之人類化VL及VH區之核酸序列，藉由將其等插入具有編碼人類抗體CH及人類抗體CL之基因之動物細胞之表現載體內構築人類嵌合抗體表現載體，及藉由將該表現載體引入動物細胞內表現編碼序列，可產生本發明之人類化嵌合抗體。

【0165】 至於人類嵌合抗體之CH域，可使用屬於人類免疫球蛋白重鏈之任何區域，例如IgG類之彼等係合適的，且可使用屬於IgG類之子類中之任一者，諸如lgG1、lgG2、lgG3及lgG4。此外，至於人類嵌合抗體之CL，可使用屬於人類免疫球蛋白輕鏈之任何區域，且可使用κ類或λ類之彼等。

【0166】 用於產生人類化或嵌合抗體之方法可涉及習知重組DNA且基因轉染技術為此項技術中熟知(參見例如Morrison SL等人，(1984)及專利檔案US 5,202,238；及US 5,204,244)。

【0167】 用於基於習知重組DNA及基因轉染技術產生人類化抗體之

方法為此項技術中熟知(參見例如Riechmann L等人，1988；Neuberger MS等人，1985)。抗體可使用此項技術中已知的多種技術人類化，包括(例如)申請案WO 2009/032661中揭示之技術、CDR移植(EP 239,400；PCT公開案WO 91/09967；美國專利第5,225,539；5,530,101；及5,585,089號)、面飾法或表面重整(EP 592,106；EP 519,596；Padlan EA (1991)；Studnicka GM等人，(1994)；Roguska MA等人，(1994))及鏈混排(美國專利第5,565,332號)。亦已知用於製備此等抗體之一般重組DNA技術(參見歐洲專利申請案EP 125023及國際專利申請案WO 96/02576)。

【0168】 本發明之Fab可藉由用蛋白酶(諸如木瓜蛋白酶)處理本發明之抗體(例如IgG)獲得。此外，Fab可藉由將編碼該抗體之Fab之兩個鏈的DNA序列插入用於原核表現或用於真核表現之載體內，及將該載體引入原核或真核細胞(視需要)內以表現該Fab產生。

【0169】 本發明之F(ab')2可藉由用蛋白酶(胃蛋白酶)處理本發明之抗體(例如IgG)獲得。此外，該F(ab')2可藉由經由硫醚鍵或二硫鍵結合下文描述之Fab'產生。

【0170】 本發明之Fab'可藉由用還原劑(諸如二硫蘇糖醇)處理本發明之F(ab')2獲得。此外，該Fab'可藉由將編碼抗體之Fab'鏈之DNA序列插入用於原核表現之載體內或用於真核表現之載體內，及將該載體引入原核或真核細胞(視需要)內以進行其表現產生。

【0171】 本發明之scFv可藉由獲取如先前針對本發明之抗體描述之CDR或VH及VL域之序列，然後構築編碼scFv片段之DNA，將該DNA插入原核或真核表現載體內，及然後將該表現載體引入原核或真核細胞(視需要)內以表現該scFv產生。為產生人類化scFv片段，可使用稱為CDR移

植之熟知技術，其涉及選擇根據本發明之互補決定區(CDR)，並將其等移植至具有已知三維結構之人類scFv片段框架上(參見例如WO 98/45322；WO 87/02671；US 5,859,205；US 5,585,089；US 4,816,567；EP 0173494)。

【0172】

本發明之抗體之修飾

審慎考慮本文描述抗體之胺基酸序列修飾。例如，可需改善該抗體之結合親和力及/或其他生物性質。

【0173】 可在本發明抗體之結構及編碼其等之DNA序列中作出修飾及改變，且仍導致具有所需特性之功能抗體或多肽。

【0174】 當在多肽之胺基序列中作出改變時，可考慮胺基酸之親水指數。親水胺基酸指數對蛋白質之相互作用生物功能的重要性為此項技術中普遍知曉。公認該胺基酸之相對親水特性有助於所得蛋白質之二級結構，其進一步定義該蛋白質與其他分子(例如，酶、受質、受體、DNA、抗體、抗原，及類似物)之相互作用。各胺基酸已基於其等疏水性及電荷特性分配親水指數，此等為：異白胺酸(+4.5)；纈胺酸(+4.2)；白胺酸(+3.8)；苯丙胺酸(+2.8)；半胱胺酸(+2.5)；甲硫胺酸(+1.9)；丙胺酸(+1.8)；甘胺酸(-0.4)；蘇胺酸(-0.7)；絲胺酸(-0.8)；色胺酸(-0.9)；酪胺酸(-1.3)；脯胺酸(-1.6)；組胺酸(-3.2)；麩胺酸(-3.5)；麩醯胺酸(-3.5)；天冬胺酸(-3.5)；天冬醯胺酸(-3.5)；離胺酸(-3.9)；及精胺酸(-4.5)。

【0175】 本發明之另一態樣亦包含本發明多肽之功能保守變體。

【0176】 例如，某些胺基酸可於蛋白質結構中經其他胺基酸取代而不明顯損失活性。由於蛋白質之相互作用能力及性質定義其生物功能活

性，因此可在蛋白質序列及當然於其編碼DNA序列中作出某些胺基酸取代，同時仍獲得具有類似性質之蛋白質。因此審慎考慮，可在本發明之抗體序列，或編碼該等多肽之相應DNA序列中作出各種改變，而不明顯損失其等生物活性。

【0177】 此項技術中已知，某些胺基酸可經具有相似親水指數或分數之其他胺基酸取代且仍導致具有相似生物活性之蛋白質，即仍獲得生物功能等效之蛋白質。亦可能使用完全建立之技術(諸如丙胺酸掃描方法)，以在本發明之抗體或多肽中鑑別可經取代而不顯著損失結合至抗原之所有胺基酸。此等殘基可認定為中性，因為其等不參與抗原結合或維持該抗體之結構。此等中性位置中之一或多者可經丙胺酸或經另一胺基酸取代而不改變本發明之抗體或多肽之主要特性。

【0178】 中性位置可視為其中可併入任何胺基酸取代之位置。實際上，在丙胺酸掃描之原理中，選擇丙胺酸，因為此殘基不攜載特定結構或化學特徵。通常公認，若丙胺酸可替代特定特定胺基酸而不改變蛋白質之性質，則許多其他(若非所有)胺基酸取代亦可為中性的。在丙胺酸係野生型胺基酸之相反情況下，若特定取代可顯示為中性，則其他取代很可能亦為中性。

【0179】 如上文概述，胺基酸取代一般基於胺基酸側鏈取代基之相對相似性，例如，其等疏水性、親水性、電荷、大小，及類似物。考慮前述特性中之任一者之例示性取代為熟習此項技術者熟知且包括：精胺酸及離胺酸；麩胺酸及天冬胺酸；絲胺酸及蘇胺酸；麩醯胺酸及天冬醯胺酸；及纈胺酸、白胺酸及異白胺酸。

【0180】 亦可需關於效應功能修飾本發明之抗體，(例如)以便於增

強抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，或(例如)改變Fc受體之結合。此可藉由將一或多個胺基酸取代引入該抗體之Fc區中達成。或者或另外，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，藉此容許在此區域中形成鏈間二硫鍵。因此產生之同源二聚體抗體可具有經改善之內化能力及/或經增加之補體介導之細胞殺死及/或抗體依賴性細胞毒性(ADCC) (Caron PC等人，1992；及Shopes B. 1992)。在一些實施例中，本發明之抗體可為胺基酸序列經修飾以導致對大多數Fcγ受體之結合減少或消除之抗體，其可在表現此等受體(例如巨噬細胞、肝竇細胞等)之正常細胞及組織中減少攝取及毒性。此抗體之一實例係於位置234及235處包括兩個白胺酸(L)殘基取代為丙胺酸(A)者(即LALA)；此雙重取代已證實減少Fc對FcγR之結合並因此減少ADCC及減少補體結合/活化。此抗體之另一實例係除LALA雙重取代外包括取代P329G者(即PG-LALA；參見例如Schlothauer等人，Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions, Protein Engineering, Design and Selection，第29卷，第10期，2016年10月，第457至466頁)。在一些實施例中，本發明之抗體可因此為具有(i)含有(例如)取代之LALA或PG-LALA組，及(ii)與本文中上文參考各別SEQ ID NO描述之本發明抗體中之一者之胺基酸序列另外一致之胺基酸序列的抗體。

【0181】 本發明抗體之另一類型之胺基酸修飾可適用於改變該抗體之原始醣化模式，即藉由刪除該抗體中發現之一或多個碳水化合物部分，及/或添加該抗體中不存在之一或多個醣化位點。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸中之任一者(其中X係除脯胺酸外之任何胺

基酸)之存在產生潛在醣化位點。對該抗體添加或刪除醣化位點可便利地藉由改變胺基酸序列使得其含有上文描述之三肽序列中之一或多者(對於N連接之醣化位點)進行。

【0182】 另一類型之修飾涉及去除電腦模擬或實驗上鑑別之序列，因為可能在抗體製劑中導致降解產物或異質性。作為實例，天冬醯胺酸及麩醯胺酸殘基之脫醯胺可取決於諸如pH及表面曝露之因素發生。天冬醯胺酸殘基特別易受脫醯胺影響，主要當存在於序列Asn-Gly中，且在較小程度上存在於其他二肽序列(諸如Asn-Ala)中時。當此脫醯胺位點(特別地Asn-Gly)存在於抗體或多肽中時，因此可考慮移除該位點，通常藉由保守取代以移除所涉及殘基中之一者。序列中用以移除所涉及殘基中之一或多者之此等取代亦旨在包含於本發明中。

【0183】 另一類型之共價修飾涉及將醣苷化學或酶促偶合至抗體。此等程序之優勢在於其等無需在針對N或O連接之醣化具有醣化能力之宿主細胞中產生該抗體。取決於所用偶合模式，糖可結合至(a)精胺酸及組胺酸，(b)游離羧基，(c)游離巰基，諸如半胱胺酸之游離巰基，(d)游離羥基，諸如絲胺酸、蘇胺酸或羥基脯胺酸之游離羥基，(e)芳族殘基，諸如苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸之芳族殘基，或(f)麩醯胺酸之醯胺基。例如，此等方法描述於WO 87/05330中。

【0184】 移除抗體上存在之碳水化合物部分可化學或酶促進行。化學脫醣化需將該抗體曝露於化合物三氟甲磺酸或等效化合物。此處理導致除連接糖(N-乙醯葡萄胺糖或N-乙醯半乳胺糖)外之大多數或所有糖裂解，同時保持該抗體完整。化學脫醣化係由Sojahr H等人，(1987)及Edge, AS等人，(1981)描述。抗體上碳水化合物部分之酶促裂解可藉由使用如

Thotakura, NR等人(1987)描述之多種內切及外切醣苷酶達成。

【0185】 抗體之另一類型共價修飾包括(例如)以美國專利第4,640,835；4,496,689；4,301,144；4,670,417；4,791,192或4,179,337號中闡述之方式將該抗體連接至多種非蛋白質聚合物(例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚環氧烷)中之一者。

【0186】 此項技術中已知的其他胺基酸序列修飾亦可應用於本發明之抗體。

【0187】

本發明之免疫結合物

本發明提供免疫結合物，本文中亦稱為抗體-藥物結合物，或更簡稱為結合物。如本文使用，所有此等術語具有相同含義且可互換。適用於製備免疫結合物之方法為此項技術中已知。本發明之免疫結合物可藉由活體外方法(例如本文描述之方法)製備。

【0188】 本發明提供一種免疫結合物，其包含本發明之抗體(諸如mAb1，或具有與mAb1相同之六個CDR之抗體)經由連接子共價連接至至少一種生長抑制劑。

【0189】 術語「生長抑制劑」 (亦稱為「抗增生劑」)係指抑制細胞(諸如腫瘤細胞)活體外及/或活體內生長之分子或化合物或組合物。

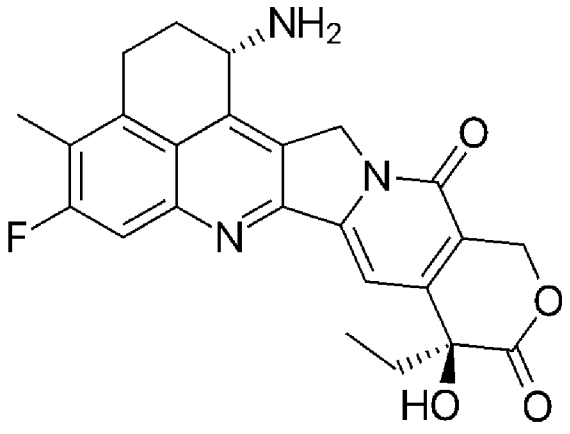
【0190】 在一些實施例中，生長抑制劑係細胞毒性藥物(亦稱為細胞毒性劑)。在一些實施例中，該生長抑制劑係放射性部分。

【0191】 本文使用之術語「細胞毒性藥物」係指直接或間接抑制或防止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。術語「細胞毒性藥物」包括例如化學治療劑、酶、抗生素、毒素(諸如小分子毒素或酶活性毒素)、類毒

素、長春花、紫杉烷、類美登素或類美登素類似物、托馬黴素(tomaymycin)或吡咯苯并二氮呼衍生物、念珠藻素衍生物、來普黴素衍生物、奧瑞他汀(auristatin)或尾海兔素(dolastatin)類似物、前藥、拓撲異構酶I抑制劑、拓撲異構酶II抑制劑、DNA烷化劑、抗微管蛋白劑、CC-1065及CC-1065類似物。

【0192】 拓撲異構酶I抑制劑係抑制人類酶拓撲異構酶I之分子或化合物，其涉及藉由催化DNA單股之瞬時斷裂及重新連接而改變DNA拓撲結構。拓撲異構酶I抑制劑對分裂細胞(例如哺乳動物之分裂細胞)具有高度毒性。合適之拓撲異構酶I抑制劑之實例包括喜樹鹼(CPT)及其類似物，諸如拓撲替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、斯拉替康(silatecan)、考司替康(cositecan)、依喜替康、勒托替康(lurtotecan)、吉馬替康(gimatecan)、貝洛替康(belotecan)及魯比替康(rubitecan)。

【0193】 在一些實施例中，本發明之免疫結合物包含細胞毒性藥物依喜替康作為生長抑制劑。依喜替康具有化學名稱(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氫-9-羥基-4-甲基-10H,13H-苯并(de)哌喃并(3',4':6,7)吲嗪并(1,2-b)喹啉-10,13-二酮。依喜替康由以下結構式(I)表示：



(I)

在本發明之其他實施例中，可使用其他CPT類似物及其他細胞毒性藥物(例如如上文列舉)。申請案WO 2008/010101中進一步給定一些細胞毒性藥物及結合方法之實例，該申請案以引用之方式併入本文中。

【0194】 術語「放射性部分」係指包含適用於治療癌症之放射性同位素(諸如At^{211}、Bi^{212}、Er^{169}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、In^{111}、P^{32}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Sr^{89}，或Lu之放射性同位素)或由其構成之化學實體(諸如分子、化合物或組合物)。此等放射性同位素一般主要發射β-輻射。在一些實施例中，該放射性同位素係α-發射體同位素，例如發射α輻射之鈰227。可例如如申請案WO 2004/091668中描述製備免疫結合物。

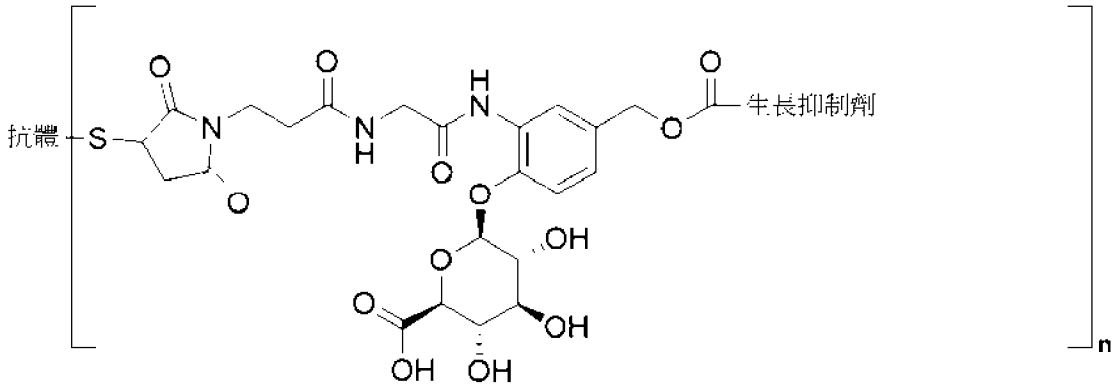
【0195】 在本發明之免疫結合物中，本發明之抗體係經由連接子共價連接至至少一種生長抑制劑。如本文使用，「連接子」意謂包含將該生長抑制劑共價結合至該抗體之共價鍵及/或任何原子鏈之化學部分。連接子為此項技術中熟知且包括(例如)二硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團及酯酶不穩定基團。可(例如)使用多種雙功能蛋白質偶合劑進行本發明之抗體與細胞毒性藥物或其他生長抑制劑之結合，該等偶合劑包括(但不限於) N-琥珀醯亞胺吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)、丁酸4-[(5-硝基-2-吡啶基)二硫基]-2,5-二側氧基-1-吡咯啶基酯(硝基-SPDB)、4-(吡啶-2-基二氫硫基)-2-磺酸基-丁酸(磺酸基-SPDB)、(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(SPDP)、(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸琥珀醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酸酯之雙官能衍生物(諸如己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮苯甲醯基)-己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸

如甲苯2,6-二異氰酸酯)，及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人(1987)中描述製備。碳標記之1-異硫氰酸根合苯甲基甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)係用於將放射性核苷酸結合至抗體之例示性螯合劑(WO 94/11026)。

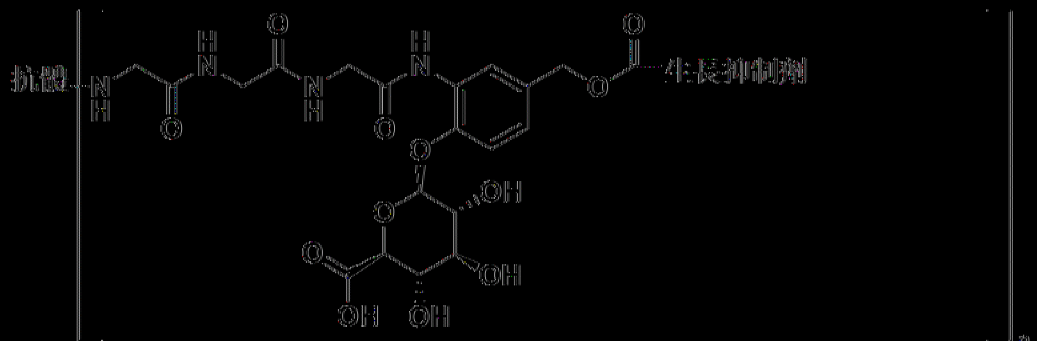
【0196】 在本發明之實施例中，連接子可為「可裂解連接子」，其可在細胞(例如腫瘤細胞)內部或附近促進細胞毒性藥物或其他生長抑制劑之釋放。在一些實施例中，該連接子係可在哺乳動物細胞之內體中可裂解之連接子。例如，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、酯酶不穩定連接子、光不穩定連接子或含二硫鍵連接子(參見例如美國專利第5,208,020號)。

【0197】 當提及表示免疫結合物之結構式時，本文亦使用下列命名法：生長抑制劑及連接子結合在一起亦稱為[(連接子)-(生長抑制劑)]部分；例如，依喜替康分子及連接子結合在一起亦稱為[(連接子)-(依喜替康)]部分。

【0198】 在本發明之一些特定實施例中，連接子係可由人類酶葡萄醣醛酸酶裂解之連接子。例如，本發明之免疫結合物可因此具有下**式(II)**或**式(IIA)**，其包括可由葡萄醣醛酸酶裂解之連接子：



(II)，



(IIIA)，

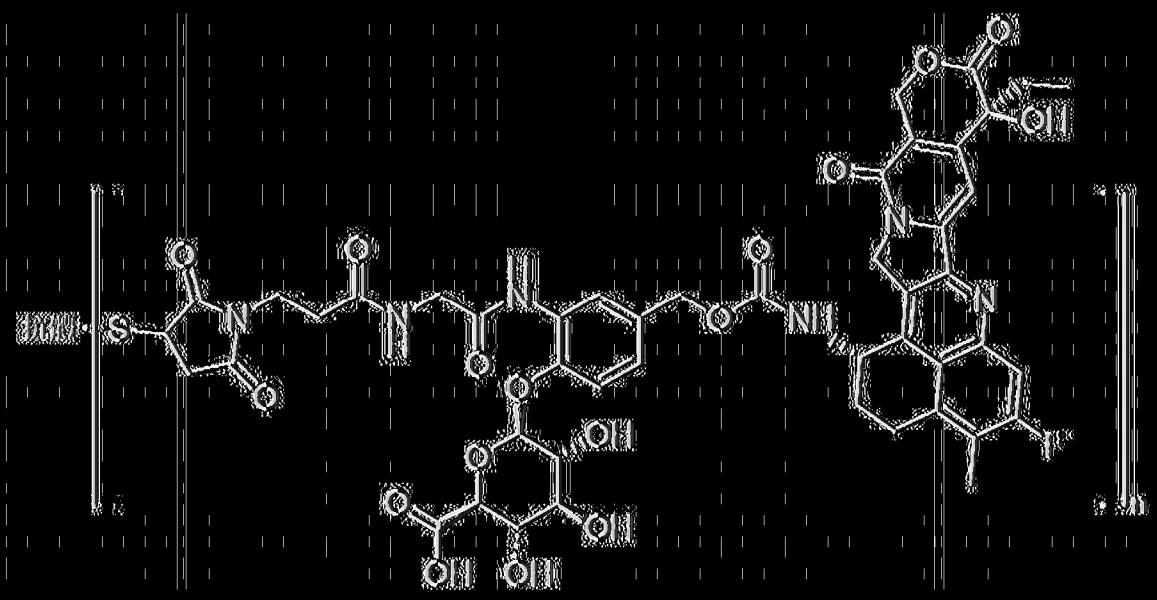
其中該抗體係本發明之抗體，其中S係該抗體之硫原子，且其中n係共價連接至該抗體之[(連接子)-(生長抑制劑)]部分之數量。數字n可(例如)介於1與10之間；在包含上式(III)之更特定實施例中，n係介於7與8之間；在使用上式(III)之又更特定實施例中，n係介於7.5與8.0之間(即約8)。在使用上式IIIA之實施例中，n係較佳介於3與4之間且最佳介於3.5與4.0之間(即約4)。在一典實施例中，S係該抗體之半胱胺酸之硫原子。在一典實施例中，該抗體係mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M。

[0199] 數字n亦稱為「藥物與抗體比」(或「DAR」)；此數字n應始終瞭解為任何給定免疫結合物(之製劑)之平均數。

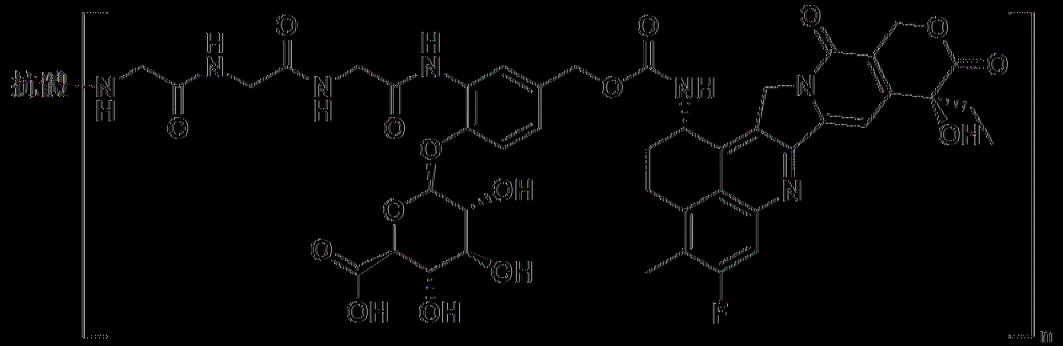
[0200] 在上式(III)中，抗體之硫原子與生長抑制劑之間的化學結構係連接子。此等連接子中之一者亦包含於下文進一步描述之式(IV)至(VIIIA)之各者中。

[0201] 在用可由葡萄醣醛酸酶裂解之連接子之實施例之任一者中，如上文描述，例如，生長抑制劑可為依喜替康。

[0202] 因此，在一典實施例中，本發明提供包含經由連接子共價連接至依喜替康之根據本發明之抗體之免疫結合物，其中該結合物具有下式(IV)或式(IVA)：



(IV)，



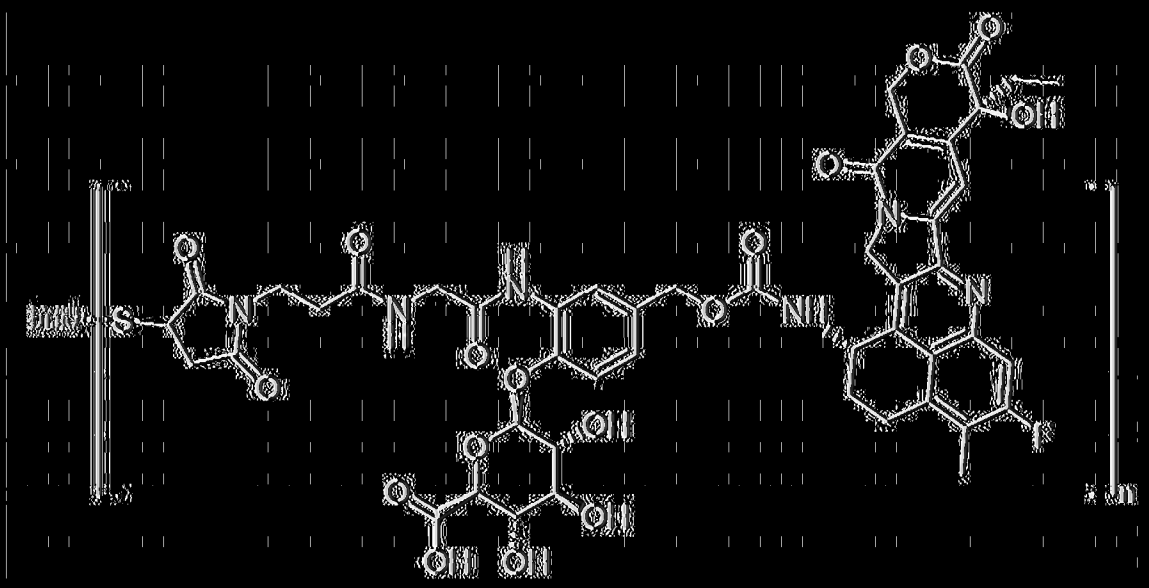
(IVA)，

其中S係該抗體之硫原子，且其中n係共價連接至該抗體之[(連接子)-(依喜替康)]部分之數量。數字n (亦稱為DAR)可(例如)介於1與10之間；在包含式IV之更特定實施例中，n係介於7與8之間；在某於式IV之又更特定實施例中，n係介於7.5與8.0之間(即約8)。在使用上式IVA之實施例中，n係較佳介於3與4之間且最佳介於3.5與4.0之間(即約4)。在一典實施例中，該抗體係mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M。

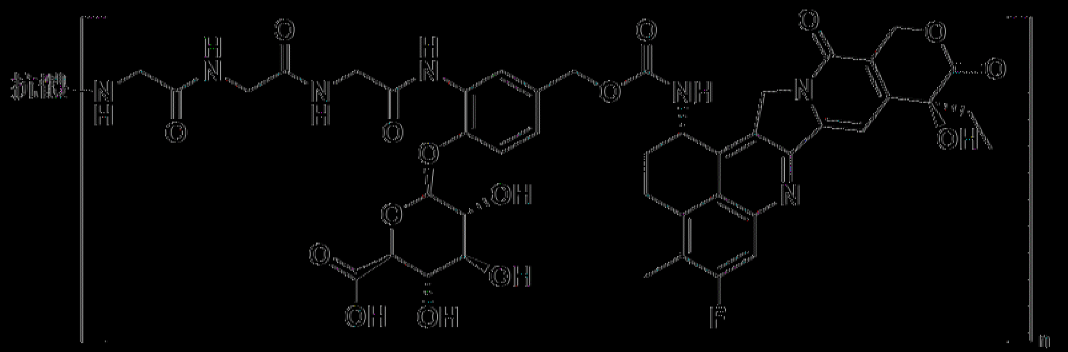
[0203] 在一典實施例中，在本發明之免疫結合物中，諸如如上文描述之與葡萄醣醛酸酶可裂解之連接子結合之依喜替康結合物，該連接子可於該抗體之半胱胺酸殘基之硫原子處共價結合至該抗體。例如，該抗體

之此半胱胺酸殘基可為能夠形成鏈間二硫鍵(本文中亦稱為鏈間二硫橋)之半胱胺酸殘基。因為IgG1抗體中存在四個鏈間二硫鍵，涉及總計八個半胱胺酸殘基，所以該連接子與該抗體之此等半胱胺酸殘基之硫原子處之結合提供DAR可多達8，且在此等情況下，該DAR通常介於7至8之間，諸如介於7.5至8.0之間(即約8)，前提條件為該抗體係IgG1或具有與IgG1相同數量之鏈間二硫鍵。

[0204] 因此，在一典實施例中，本發明提供包含經由連接子共價連接至依喜替康之根據本發明之抗體之免疫結合物，其中該結合物具有下式(VI)或式(VIA)：



(VI)，

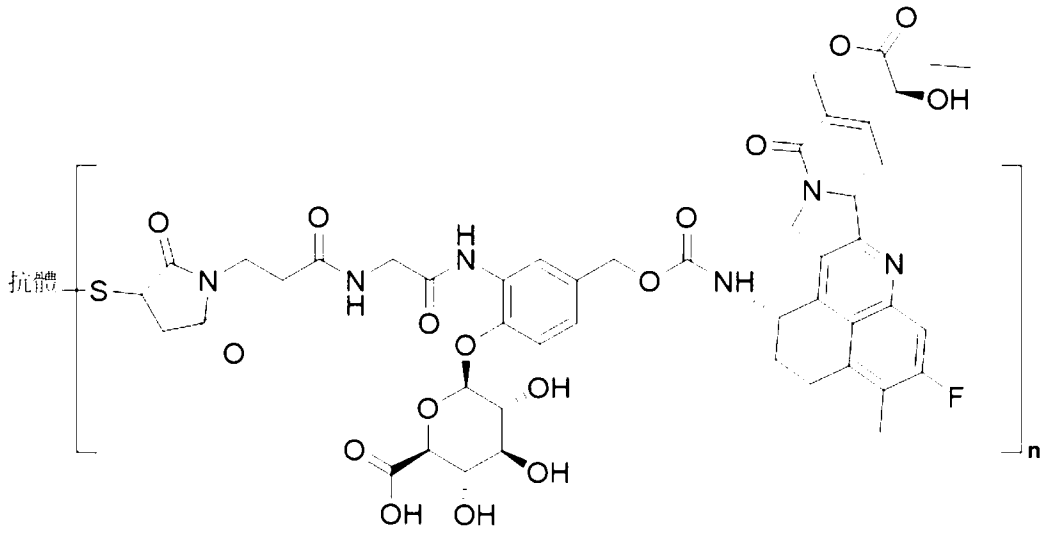


(VIA)，

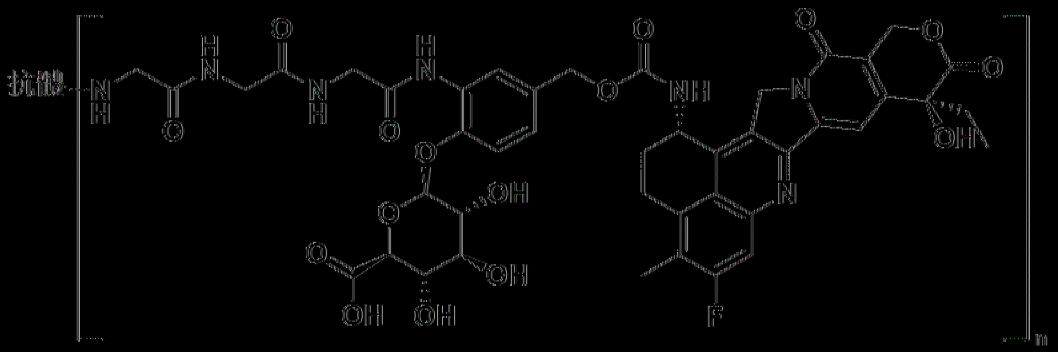
其中S係該抗體之半胱胺酸之硫原子，且其中n係共價連接至該抗體之[(連接子)-(依喜替康)]部分之數量。數字n (亦稱為DAR)可(例如)介於1與10之間；在基於上式VI之更特定實施例中，n係介於7與8之間；在使用式VI之又更特定實施例中，n係介於7.5與8.5之間(較佳8)。在使用上式VIA之實施例中，n係較佳介於3與5之間且更佳介於3.5與4.5之間且最佳4。

【0205】 在上文描述之免疫結合物之任一者中，可使用本發明之任何抗體(如本文中上下文描述)。在一些實施例中，本發明之免疫結合物包含作為抗體之mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M。

【0206】 因此，在一些實施例中，本發明提供一種包含經由連接子共價連接至依喜替康之根據本發明之抗體(較佳選自由以下組成之群：mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M及mAb7-M)之免疫結合物，其中該結合物具有下**式(VIII)或式(VIIIA)**：



(VIII)，



(VIIIA)，

其中S係該抗體(較佳mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M)之半胱胺酸之硫原子，且其中n係共價連接至該抗體(較佳mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M)之[(連接子)-(依喜替康)]部分之數目。數字n (亦稱為DAR)可(例如)介於1與10之間；在更特定實施例中，n係介於7與8之間；在又更特定實施例中，n係介於7.5與8.0之間(即約8)。在一典實施例中，S係能夠形成鏈間二硫橋之抗體(較佳mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M)之半胱胺酸之硫原子且該DAR係約8。實例中進一步描述此免疫結合物(即「ADC1」)之一實例。下文列舉本發明之較佳免疫結合物：

免疫結合物名稱	結合物具有下式	結合物中之抗體	DAR
A1	VIII	抗CEACAM5 mAb LALA突變 YTE突變	介於7.5與8.0之間
A2	VIIIA	抗CEACAM5 mAb LALA突變 YTE突變 MTG Tag	介於3.5與4.5之間
A3	VIIIA	抗CEACAM5 mAb LALA突變 YTE突變 K222R突變 (MTG較佳) MTG Tag	介於3.5與4.5之間
A4	VIII	抗CEACAM5 mAb LALA突變	介於7.5與8.0之間

A5	VIIIA	抗CEACAM5 mAb LALA突變 MTG Tag	介於3.5與4.5之間
A6	VIII	mAb1-M	8
A7	VIIIA	mAb2-M	4
A8	VIIIA	mAb3-M	4
A9	VIII	mAb6-M	8
A10	VIIIA	mAb7-M	4

【0207】 在另一較佳實施例中，本發明提供一種抗體-藥物結合物，其中該藥物係依喜替康且其中該抗體-藥物結合物包含下列(i)至(v)中之任一者：

(i)抗CEACAM5單株抗體，其包括包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之輕鏈及包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列之重鏈且其中依喜替康係經由表4中針對ADC1-M顯示之連接子類型及結合類型連接至該抗體；或

(ii)抗CEACAM5單株抗體，其包括包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列之輕鏈及包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列之重鏈且其中依喜替康係經由表4中針對ADC2-M顯示之連接子類型及結合類型連接至該抗體；或

(iii)抗CEACAM5單株抗體，其包括包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列之輕鏈及包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列之重鏈且其中依喜替康係經由表4中針對ADC3-M顯示之連接子類型及結合類型連接至該抗體；或

(iv)抗CEACAM5單株抗體，其包括包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之輕鏈及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列之重鏈且其中依喜替康係經由表4中針對ADC6-M顯示之連接子類型及結合類型連接至該抗體；或

(v)抗CEACAM5單株抗體，其包括包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列之輕鏈及包含SEQ ID NO:51之胺基酸序列之重鏈且其中依喜替康係經由表4中針對ADC7-M顯示之連接子類型及結合類型連接至該抗體。

【0208】 在另一較佳實施例中，本發明提供一種選自ADC1-M、

ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M及ADC7-M之抗體-藥物結合物，其具有如表4中概述之各別ADC之所有特性，包括如表4中顯示之各別DAR。

【0209】 在本發明之其他實施例中，連接子可為「不可裂解之連接子」(例如SMCC連接子)。該抗體一經溶體降解，即可發生自該抗體釋放生長抑制劑。

【0210】 在本發明之其他實施例中，免疫結合物可為包含本發明之抗體及細胞毒性或生長抑制多肽(作為生長抑制劑)之融合蛋白；此等融合蛋白可藉由重組技術或藉由肽合成(即此項技術中熟知的方法)製得。編碼DNA之分子可包含編碼該結合物之兩個部分(分別為抗體及細胞毒性或生長抑制多肽)之各別區域，彼此相鄰或由編碼連接子肽之區域隔開。

【0211】 本發明之抗體亦可用於定向酶前藥療法中，諸如抗體定向酶前藥療法，藉由將該抗體結合至將前藥(例如肽基化學治療劑，參見WO 81/01145)轉化為活性細胞毒性藥物之前藥活化酶(參見例如WO 88/07378及美國專利第4,975,278號)。適用於ADEPT之免疫結合物之酶組分可包括能夠以使得前藥轉化為其更活性細胞毒性形式之方式來作用於前藥的任何酶。適用於此情境中之酶包括(但不限於)適用於將含磷酸鹽前藥轉化為游離藥物之鹼性磷酸酶；適用於將含硫酸鹽前藥轉化為游離藥物之芳基硫酸酯酶；適用於將無毒氟胞嘧啶轉化為抗癌藥物5-氟尿嘧啶之胞嘧啶脫胺酶；蛋白酶，諸如鋸桿菌蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、枯草菌蛋白酶、羧肽酶及組織蛋白酶(諸如組織蛋白酶B及L)，其等適用於將含肽前藥轉化為游離藥物；D-丙胺醯基羧肽酶，適用於轉化含有D-胺基酸取代基之前藥；碳水化合物裂解酶，諸如適用於將醣化前藥轉化為游離藥物之O-半乳糖苷酶及神經胺糖酸酶；適用於將經P-內醯胺衍生之藥物轉化為游離藥物之P-內

醯胺酶；及青黴素醯胺酶，諸如青黴素V醯胺酶或青黴素G醯胺酶，適用於將於其等胺氮處經苯氧乙醯基或苯乙醯基衍生之藥物分別轉化為游離藥物。藉由此項技術中熟知的技術，諸如使用上文討論之連接子，可將該等酶共價結合至本發明之抗體。

【0212】 適用於製備本發明之免疫結合物之方法為此項技術中熟知(參見例如Hermanson G. T., Bioconjugate Techniques，第三版，2013, Academic Press)。例如，熟知經由共價結合至該抗體之鏈間二硫橋之半胱胺酸殘基之連接子將細胞毒性藥物結合至抗體之方法。

【0213】 一般而言，本發明之免疫結合物可(例如)藉由包括以下步驟之方法獲得：

(i)製備包含連接子及生長抑制劑(例如細胞毒性藥物)之化合物，本文中亦稱為「藥物-連接子化合物」；

(ii)使根據本發明之抗體之任選緩衝水溶液與藥物-連接子化合物之溶液接觸；

(iii)然後自未反應之抗體及/或藥物-連接子化合物任選分離(ii)中形成之結合物。

【0214】 抗體之水溶液可用緩衝液(諸如，舉例而言，組胺酸、磷酸鉀、乙酸鹽、檸檬酸鹽或N-2-羥基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes緩衝液))緩衝。該緩衝液可根據該抗體之性質選擇。可將該藥物-連接子化合物溶解於(例如)有機極性溶劑，諸如二甲亞碸(DMSO)或二甲基乙醯胺(DMA)中。

【0215】 關於對抗體之半胱胺酸殘基之結合，該抗體在步驟(ii)前經受還原(例如使用TCEP)。適用於僅還原鏈間二硫鍵之還原條件為此項技

術中已知。

【0216】 用於結合之還原溫度通常介於20至40℃之間。反應時間可變化且通常為1至24小時。可藉由粒徑排阻層析術(SEC)以折射及/或UV偵測器監測抗體與藥物-連接子化合物之間的反應。若該結合物產率過低，則該反應時間可延長。

【0217】 熟習此項技術者可使用許多不同之層析法以進行步驟(iii)之分離：該結合物可(例如)藉由SEC、吸附層析術(諸如離子交換層析術，IEC)、疏水性交互作用層析術(HIC)、親和力層析術、混合支持層析術(諸如羥基磷灰石層析術)、或高效液相層析術(HPLC) (諸如逆相HPLC純化結合物)純化。亦可使用藉由透析或過濾或滲濾之純化。

【0218】 在步驟(ii)及/或(iii)後，含結合物溶液可經受另外之純化步驟(iv)，例如藉由層析術、超濾及/或滲濾。此另外之純化步驟(例如藉由層析術、超濾及/或滲濾)亦可在還原反應後用含抗體溶液進行，在其中在結合前進行還原的情況下。

【0219】 在此過程結束時於水溶液中回收結合物。藥物與抗體比(DAR)係可隨連同用於結合之實驗條件一起使用之抗體及藥物-連接子化合物之性質(諸如比率 (藥物-連接子化合物)/(抗體)、反應時間、溶劑及共溶劑(若存在)之性質)變化之數字。因此，該抗體與該藥物-連接子化合物之間的接觸可導致包含具有不同藥物與抗體比之彼此不同之數種結合物之混合物。因此測定之DAR為平均值。

【0220】 使用具有四個鏈間二硫橋之抗體(例如mAb1或任何IgG1抗體)於鏈間二硫橋之半胱胺酸殘基處進行結合係此項技術中熟知的方法且提供以下優勢：約8之相對均質之DAR可藉由選擇容許結合繼續進行至完

成(或至少接近完成)之反應條件達成。

【0221】 可用以確定DAR之一例示性方法由以下構成：分光光度法量測純化結合物溶液於λ_D及280 nM處之吸光度比。280 nM係常用於量測蛋白質濃度(諸如抗體濃度)之波長。選擇該波長λ_D以便於容許區分藥物與該抗體，即如熟習此項技術者容易認知，λ_D係該藥物具有高吸光度且λ_D距離280 nM足夠遠之波長以避免該藥物及抗體之吸光度峰值大量重疊。例如，針對依喜替康(或針對喜樹鹼或其他喜樹鹼類似物)，λ_D可選擇為370 nM，或針對類美登素分子，λ_D可選擇為252 nM。

【0222】 可(例如)自 Antony S. Dimitrov (編), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols，第525、445卷，Springer Science: The absorbances for the conjugate at λ_D ($A_{\lambda D}$) and at 280 nM (A_{280}) are measured either on the monomeric peak of the size exclusion chromatography(SEC) analysis (容許計算「DAR(SEC)」參數)或使用經典分光光度計裝置(容許計算「DAR(UV)」參數)推導DAR計算方法。吸光度可如下表示：

$$A_{\lambda D} = (C_D \times \varepsilon_{D\lambda D}) + (C_A \times \varepsilon_{A\lambda D})$$

$$A_{280} = (C_D \times \varepsilon_{D280}) + (C_A \times \varepsilon_{A280})$$

其中：

- C_D及C_A分別為該藥物及該抗體溶液中之濃度
- $\varepsilon_{D\lambda D}$及ε_{D280}分別為該藥物於λ_D及280 nM處之莫耳消光係數
- $\varepsilon_{A\lambda D}$及ε_{A280}分別為該抗體於λ_D及280 nM處之莫耳消光係數。

【0223】 以兩個未知數對此等兩個方程進行求解導致下列等式：

$$C_D = [(\varepsilon_{A280} \times A_{\lambda D}) - (\varepsilon_{A\lambda D} \times A_{280})] / [(\varepsilon_{D\lambda D} \times \varepsilon_{A280}) - (\varepsilon_{A\lambda D} \times$$

$\varepsilon_{D280})]$

$C_A = [A_{280} - (C_D \times \varepsilon_{D280})] / \varepsilon_{A280}$

然後根據該藥物濃度與該抗體濃度之比率計算平均DAR：$DAR = C_D / C_A$。

【0224】 下文中描述用於製備本發明之免疫結合物之替代方法。此方法可特定言之用於在其輕鏈恆定區(CL)中之至少一者中及/或在其重鏈恆定區(CH)中之至少一者中包含選自由以下組成之群之胺基酸序列的抗體：GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP及TLQSA。因此，本發明之另一態樣係關於一種用於產生抗體-連接子-結合物之方法，其包括以下步驟：

(1) 提供一種於其輕鏈恆定區(CL)中之至少一者且較佳兩者中及/或於其重鏈恆定區(CH)中之至少一者且較佳兩者中包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之抗體：GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP及TLQSA且更佳胺基酸序列TLQSPP或GGTLQSPP(最佳序列GGTLQSPP)；

(2) 於反應緩衝液中將至少下列組分混合在一起：

(a) 步驟(1)中提供之該抗體；

(b) 微生物轉麩醯胺酸酶，較佳包含以下胺基酸序列之轉麩醯胺酸酶：**MGSGSGSGTGEEKRSYAETHRLTADDVDDINALNESAPAASS AGPS**FRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQ QVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAF FDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVA SVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALR

NTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPE
AFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADAD
KTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVV
TFVPKSWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID NO: 44)；或FRAPDSDERVTPP
AEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEE
QREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPR
SGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGA
YLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPS
KMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRD
RNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNG
SLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQ
GWPLE (SEQ ID NO: 47)；或FRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPS
YGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVT
WVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAK
DSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGND
ALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSG
QDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFV
NFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFR
NWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID NO: 4
5)；或

DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYS
HRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDED
KYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMN

KALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSF
KDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPD
RGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVW
THGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPK
SWNTAPDKVTQGWPLE (SEQ ID NO: 48)；或

DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYS
HRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDED
KYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMN
KALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSF
KDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPD
RGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVW
THGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPK
SWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID NO: 49)；及

(c) 一種連接子，其包含能夠與來自步驟(1)之抗體在該轉麩醯胺酸酶之存在下反應之H_2N部分且其中該連接子較佳為藥物-連接子，其中該連接子係共價連接至藥物；

(3) 較佳藉由使來自步驟(2)之該混合物經受粒徑排阻層析術自未反應之連接子及自該轉麩醯胺酸酶分離步驟(2)中所產生之抗體-連接子-結合物。

【0225】在一項實施例中，轉麩醯胺酸酶係由多核苷酸

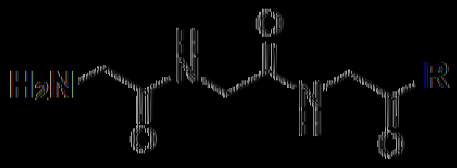
***ATG*GGTAGCGGTAGCGGTTCAGGCACCGGTGAAGAAAAACGT**
AGCTATGCAGAAACCCATCGTCTGACCGCAGATGATGTTGATG
ATATTAATGCACTGAATGAAAGCGCACCGGCAGCAAGCAGCGC

AGGTCCGAGCTTTCGTGCACCGGATAGTGATGAACGTGTTACCCC
TCCGGCAGAACCGCTGGATCGTATGCCGGATCCGTATCGTCCGAG
CTATGGTCGTGCCGAAACCATTGTTAATAACTATATTCGTAAGTGG
CAGCAGGTTTATAGCCATCGTGATGGTCGTAAACAGCAGATGACC
GAAGAACAGCGTGAATGGCTGAGTTATGGTTGTGTTGGTGTTACC
TGGGTTAATAGCGGTCAGTATCCGACCAATCGTCTGGCATTTGCAT
TTTTCGATGAGGACAAATACAAGAACGAGCTGAAAAATGGTCGTC
CGCGTAGCGGTGAAACCCGTGCAGAATTTGAAGGTCGTGTTGCAA
AAGATAGCTTTGATGAAGCAAAAGGTTTTCAGCGTGCACGTGATG
TTGCAAGCGTTATGAATAAAGCACTGGAAAATGCACATGATGAAG
GTGCCTATCTGGACAACCTGAAAAAAGAACTGGCAAATGGTAATG
ATGCCCTGCGTAATGAAGATGCACGTAGCCCGTTTTATAGCGCAC
TGCGTAATACCCCGAGCTTTAAAGATCGTAATGGTGGTAATCATG
ACCCGAGCAAAATGAAAGCAGTGATCTATAGCAAACACTTTTGGA
GCGGTCAGGATCGTAGTGGTAGCAGCGATAAACGTAAATATGGTG
ATCCGGAAGCATTTCGTCCGGATCGTGGCACCGGTCTGGTTGATA
TGAGCCGTGATCGTAATATTCCGCGTAGTCCGACCAGTCCGGGTG
AAAGCTTTGTTAATTTTGATTATGGTTGGTTTGGCGCACAGACCGA
AGCAGATGCAGATAAAACCGTTTGGACCCATGGCAATCATTATCA
TGCACCGAATGGTAGCCTGGGTGCAATGCATGTTTATGAAAGCAA
ATTTCGCAATTGGAGCGACGGCTATAGCGATTTTGATCGTGGTGC
CTATGTTGTTACCTTTGTTCCGAAAAGCTGGAATACCGCTCCGGAT
AAAGTTACCCAAGGTTGGCCG*TAA* (SEQ ID NO: 46)編碼。

[0226] 在本方法之一較佳實施例中，該反應緩衝液係7% DMSO，24 mM HEPES，pH 7.0。

[0227] 較佳地，本發明之方法中所使用之抗體於其輕鏈恆定區(CL)中之至少一者中及/或於其重鏈恆定區(CH)中之至少一者中包含LLQGA及/或GGLLQGPP序列。

[0228] 在本發明之方法中，該連接子係具有下式之連接子：



；

其中R係該連接子之剩餘部分且可視需要亦包含藥物，其中該藥物較佳為依喜替康。在本發明之方法之更佳實施例中，該連接子係NH2-GGG-β-葡萄糖醛酸。

[0229] 在本發明之方法之一較佳實施例中，於步驟(2)中，混合物包含下列藥物-連接子：



在本發明之方法之另一實施例中，步驟(2)中之混合物每個結合位點

分別包含5莫耳當量之連接子或藥物-連接子，其中結合位點係該抗體之輕鏈恆定區(CL)及/或重鏈恆定區(CH)中所包含之序列LLQGA、GGLLQGPP、GGTLQSPP、TLQSG、TLQSPP或TLQSA。

【0230】 在本發明之方法之另一實施例中，抗體係如本文描述之本發明之抗CEACAM5抗體及/或藥物係如本文定義之生長抑制劑。

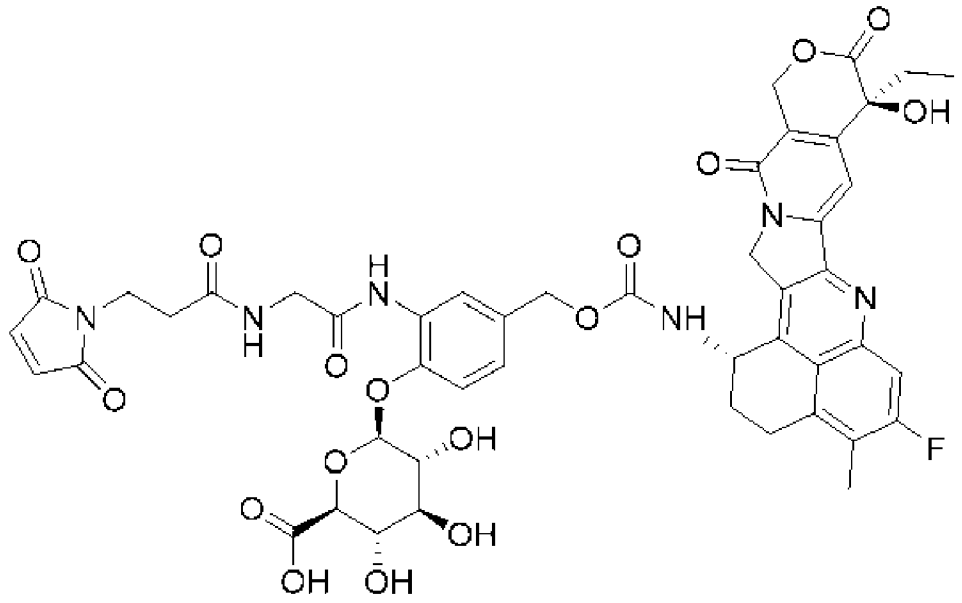
【0231】 本發明之另一態樣係關於一種可根據本發明之方法產生之抗體-連接子結合物，其中該連接子較佳為如本文在本發明ADC之內文中描述之連接子或藥物連接子。

【0232】 實例中描述用於製備本發明之免疫結合物之例示性方法。

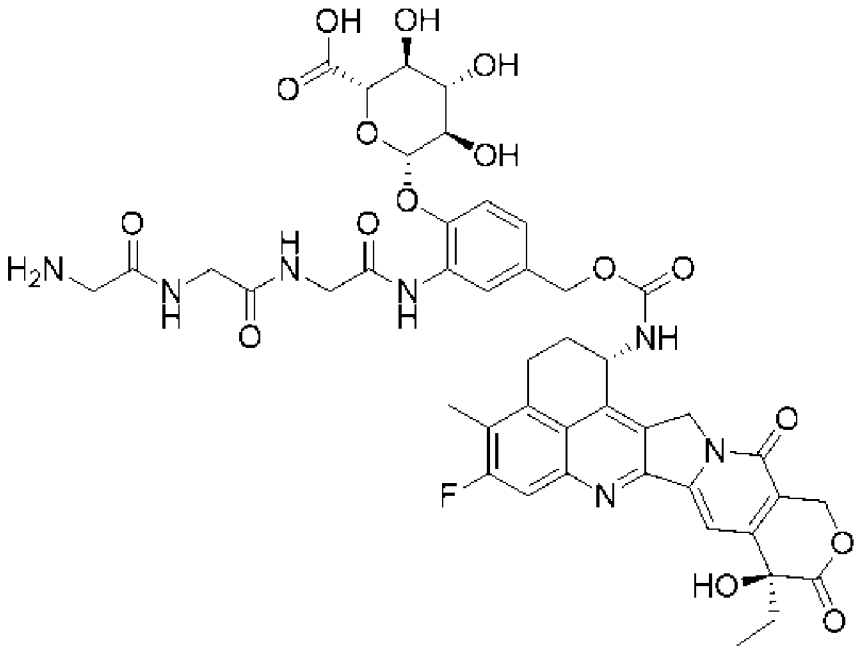
【0233】

藥物-連接子化合物

本發明亦提供包含連接子及生長抑制劑(例如細胞毒性藥物)之化合物，本文中亦稱為「藥物-連接子化合物」。例如，本發明提供下**式(X)或式(XA)化合物**：



(X)，



(XA)，

或其生理上可接受之鹽；根據式X之化合物在本文中亦稱為「藥物-連接子化合物1」、「化合物DL1」或「DL1」及根據式XA之化合物在本文中亦稱為「藥物-連接子化合物1-M」、「化合物DL1-M」或「DL1-M」。

【0234】 此等藥物-連接子化合物可用以製備如本文中上下文描述之本發明之免疫結合物。

【0235】 本發明之藥物-連接子化合物(例如彼等上文繪示之**式(X)或(XA)**者)可藉由化學合成製備，例如如下文實例中進一步描述。

【0236】

醫藥組合物

本發明之抗體或免疫結合物可與醫藥上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑組合，及任選與緩釋基質組合以形成醫藥組合物，該等緩釋基質包括(但不限於)可生物降解聚合物、不可生物降解聚合物、脂質或糖之類別。

【0237】 因此，本發明之另一態樣係關於包含本發明之抗體或免疫結合物及醫藥上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑之醫藥組合物。

【0238】 「醫藥」或「醫藥上可接受」係指分子實體及組合物在視需要對哺乳動物(尤其人類)投與時不產生不利、過敏或其他非所需反應。醫藥上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑係指任何類型之無毒固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、囊封材料或調配助劑。

【0239】 如本文使用，「醫藥上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑，及生理上可相容之類似物。合適載劑、稀釋劑及/或賦形劑之實例包括(但不限於)以下中之一或多者：水、胺基酸、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、緩衝磷酸鹽、乙酸鹽、檸檬酸鹽、琥珀酸鹽；胺基酸及衍生物，諸如組胺酸、精胺酸、甘胺酸、脯胺酸、甘胺醯甘胺酸；無機鹽，諸如NaCl或氯化鈣；糖或多元醇，諸如右旋糖、甘油、乙醇、蔗糖、海藻糖、甘露醇；表面活性劑，諸如聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆188；及類似物，及其組合。在許多情況下，醫藥組合物中包括等滲劑，諸如糖、多元醇或氯化鈉將係有用的，及調配物亦可含有抗氧化劑(諸如色胺)及/或穩定劑(諸如吐溫20)。

【0240】 醫藥組合物之形式、投與途徑、劑量及方案自然取決於待治療之病症、疾病之嚴重程度、病患之年齡、重量及性別等。

【0241】 本發明之醫藥組合物可經調配用於局部、經口、非經腸、鼻內、靜脈內、肌內、皮下或眼內投與及類似物。

【0242】 在一實施例中，醫藥組合物含有用於注射用調配物之醫藥上可接受之媒介物。此等可為等滲、無菌、鹽水溶液(磷酸一鈉或磷酸二鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣或氯化鎂及類似物或此等鹽之混合物)，或

乾燥(尤其凍乾)組合物，其根據情況在添加無菌水或生理鹽水時，允許構成可注射溶液。

【0243】 醫藥組合物可通過藥物組合裝置投與。

【0244】 用於投與之劑量可隨各種參數變化，及例如隨所用投與模式、相關病理學，或者所需治療持續時間變化進行調整。

【0245】 為製備醫藥組合物，可將有效量之本發明之抗體或免疫結合物溶解或分散於醫藥上可接受之載劑或水性介質中。

【0246】 適用於可注射用途之醫藥形式包括無菌水溶液或分散液；包括芝麻油、花生油或丙二醇水溶液之調配物；及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末；在所有此等情況下，該形式必須無菌且可用適用於遞送而不降解之裝置或系統注射，且其在製造及儲存條件下必須穩定及必須防止微生物(諸如細菌及真菌)之污染作用。

【0247】 呈游離鹼或醫藥上可接受之鹽之活性化合物之溶液可製備於與表面活性劑適當混合之水中。分散液亦可製備於甘油、液體聚乙二醇，及其混合物及於油中。在儲存及使用之一般條件下，此等製劑可含有防腐劑以防止微生物生長。

【0248】 本發明之抗體或免疫結合物可以中性或鹽形式調配成醫藥組合物。醫藥上可接受之鹽包括酸加成鹽(與蛋白質之游離胺基形成)，其等與無機酸(諸如，舉例而言，鹽酸或磷酸)或有機酸(諸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸，及類似物)形成。與游離羧基形成之鹽亦可來源於無機鹼(諸如，舉例而言，氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵)及有機鹼(諸如異丙胺、三甲胺、甘胺酸、組胺酸、普魯卡因及類似物)。

【0249】 載劑亦可為溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液體聚乙二醇，及類似物)、其合適混合物及植物油。可(例如)藉由使用包衣(諸如卵磷脂)、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用表面活性劑維持適當之流動性。可由各種抗細菌劑及抗真菌劑(例如，對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、乙汞硫柳酸鈉，及類似物)防止微生物作用。在某些情況下，其可需包括等滲劑(例如，糖或氯化鈉)。可藉由在組合物中使用延遲吸收之藥劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)引起可注射組合物之延遲吸收。

【0250】 無菌可注射溶液可藉由將所需量的活性化合物視需要與上文枚舉之其他成分中之任一者一起併入適當溶劑內，接著過濾滅菌製備。一般而言，分散液可藉由將各種滅菌活性成分併入含有鹼性分散介質及來自彼等上文枚舉者之所需其他成分之無菌媒介物內製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末之情況下，製備方法包括真空乾燥及凍乾技術，該等方法自其先前無菌過濾之溶液產生活性成分加任何另外所需成分之粉末。

【0251】 亦審慎考慮製備用於直接注射之更濃縮或高度濃縮之溶液，其中設想使用DMSO作為溶劑以導致極快滲透，將高濃度活性劑遞送至小腫瘤區域。

【0252】 一經調配，即可以與劑量調配物相容之方式及以治療有效之量投與溶液。可以多種劑量形式(諸如上文描述之可注射溶液之類型)容易地投與該等調配物，但亦可採用藥物釋放膠囊及類似物。

【0253】 對於水溶液中之非經腸投與，例如，該溶液可視需要經適當緩衝，且液體稀釋劑首先與與足夠之鹽水或葡萄糖等滲。此等水溶液尤

其適用於靜脈內、肌內、皮下及腹膜內投與。在此關聯中，鑒於本發明，熟習此項技術者已知可採用之無菌水性介質。例如，可將一個劑量溶解於1 ml等滲NaCl溶液中並添加至1000 ml皮下溶解液或於建議輸注位點處注射(參見例如，「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版，第1035至1038及1570至1580頁)。根據治療中之個體之狀況，劑量中將必然出現一些變化。在任何情況下，負責投與者均將決定適用於個別個體之劑量。

【0254】 本發明之抗體或免疫結合物可調配於治療混合物內以包含(例如)每劑量約0.01至100毫克左右。

【0255】 除經調配用於非經腸投與(諸如靜脈內或肌內注射)之抗體或免疫結合物外，其他醫藥上可接受之形式包括(例如)用於經口投與之錠劑或其他固體、釋放膠囊，及當前使用之任何其他形式。

【0256】 在一些實施例中，審慎考慮使用脂質體及/或奈米顆粒以將多肽引入宿主細胞內。熟習此項技術者已知脂質體及/或奈米顆粒之形成及用途。

【0257】 奈米膠囊可一般以穩定及可重複方式捕獲化合物。為避免由於細胞內聚合物過載引起之副作用，此等超細顆粒(尺寸約0.1 μm) 一般使用可活體內降解之聚合物設計。審慎考慮將滿足此等要求之可生物降解聚烷基-氰基丙烯酸酯奈米顆粒、或可生物降解聚乳酸或聚乳酸共乙交酯奈米顆粒用於本發明中，且此等顆粒可由熟習此項技術者容易製得。

【0258】 脂質體可由磷脂分散於水性介質中並自發形成多層同心雙層囊泡(亦稱為多層囊泡(MLV))而形成。MLV一般具有25 nM至4 μm之直徑。MLV之音波處理導致形成直徑在200至500 A之範圍內，核心中含有水溶液之小單層囊泡(SUV)。脂質體之物理特性取決於pH、離子強度及二

價陽離子之存在。

【0259】 除上述實例外，亦審慎考慮其他醫藥形式，諸如奈米顆粒、微粒及膠囊、植入物(例如脂質植入物)，或自固化或乳化系統。

【0260】

治療方法及用途

發明人已發現本發明之抗體(例如mAb1)可在結合後作為CEACAM5-抗體複合物之部分內化。此外，其等已顯示結合至細胞毒性藥物(依喜替康)之此抗體活體外介導對腫瘤細胞之細胞毒性效應。發明人亦已顯示例如在來源於病患之人類結腸直腸癌之鼠異種移植模型中，當以10 mg/kg之劑量以單次注射使用時，本發明之此等免疫結合物活體內誘導顯著之抗腫瘤活性。事實上，本發明之免疫結合物在大量活體外及活體內模型中顯示廣泛活性。細胞毒性效力與標靶(CEACAM5)表現密切相關且在靶標陰性細胞中低得多。在不同癌症類型之數種來源於細胞系之異種移植(CDX)及來源於病患之異種移植(PDX)模型中證實非常好的抗腫瘤活性。在非人類靈長類動物劑量範圍發現研究中，免疫結合物具有良好耐受性，及其副作用概況係拓撲異構酶-I抑制劑化學療法之典型特徵。臨床前資料為後期臨床測試指示良好之治療窗口。因此本發明之抗體、免疫結合物及醫藥組合物可適用於治療癌症。

【0261】 因此，本發明提供本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物，其用作藥劑。例如，本發明提供本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物，其用以治療癌症。本發明進一步提供一種治療癌症之方法，其包括對有需要個體投與本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物。

【0262】 如相較於相同組織來源之正常(即非腫瘤)細胞，待用本發

明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物治療之癌症係較佳表現CEACAM5之癌症，更佳過表現CEACAM5之癌症。可(例如)藉由使用根據本發明之抗體(或市售抗CEACAM5抗體)，例如如以下部分「診斷用途」中描述，及(例如)藉由免疫組織化學方法容易地分析由細胞表現CEACAM5。

【0263】 在一些實施例中，待用本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物治療之癌症係結腸直腸癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、胃癌、宮頸癌、食道癌(例如食管腺癌)、膽管癌、乳癌、前列腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌、膀胱癌，或胃、子宮、子宮內膜、甲狀腺或皮膚之癌症。在一些特定實施例中，待用本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物治療之癌症係結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、食道癌或前列腺癌。

【0264】 本發明之抗體或免疫結合物可單獨或與任何合適之生長抑制劑組合用於癌症療法中。

【0265】 如上文描述，本發明之抗體可結合(連接)至生長抑制劑。因此本發明之抗體可適用於將該生長抑制劑靶向於表面上表現或過表現之CEACAM5癌細胞。

【0266】 亦熟知治療性單株抗體可導致消耗攜載該抗體特異性識別之抗原之細胞。此消耗可通過至少三種機制介導：抗體介導之細胞毒性(ADCC)、補體依賴性裂解，及通過由該抗體靶向抗原介導之訊息直接抑制腫瘤生長。

【0267】 「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中抗體結合至某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性球及巨噬細胞)上存在之Fc受體(FcR)使得此等細胞毒性效應細胞特異性結合至攜載抗原之靶細胞及後續殺死靶細胞。為評估受關注分

子之ADCC活性，可進行活體外ADCC分析，諸如美國專利第5,500,362或5,821,337號中描述之分析。

【0268】「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指靶細胞在補體存在下之裂解。經典補體途徑之活化係藉由將補體系統之第一組分結合至與其等同源抗原結合之抗體啟動。為評估補體活化，可進行CDC分析，例如如Gazzano-Santoro等人，(Journal of Immunological Methods. 1997 Mar；202(2):163-171)中描述之分析。

【0269】在一些實施例中，本發明之抗體可為具有經修飾之胺基酸序列以導致減少或消除結合至大多數Fcγ受體之抗體，其可減少表現此等受體之正常細胞及組織(例如巨噬細胞、肝竇細胞等)中之攝取及毒性。

【0270】本發明之一態樣係關於一種治療癌症之方法，其包括對有需要個體投與治療有效量之本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物。

【0271】在本發明之內文中，如本文使用，術語「治療(treating)」或「治療(treatment)」意謂逆轉、緩解此術語適用之疾患或病症或此疾患或病症之一或多種症狀、抑制此術語適用之疾患或病症或此疾患或病症之一或多種症狀之進展或預防抑制此術語適用之疾患或病症或此疾患或病症之一或多種症狀。如本文使用之術語「治療癌症」意謂抑制腫瘤惡性細胞之生長及/或自該腫瘤轉移之進展。此治療亦可導致腫瘤生長之消退，即，可量測腫瘤之尺寸減少。例如，此治療可導致該腫瘤或轉移之完全消退。

【0272】在本發明之治療應用之內文中，術語「個體」或「病患」或「有需要個體」或「有需要病患」係指受或可能受腫瘤影響之個體(例如人類或非人類哺乳動物)。例如，該病患可為已例如根據如本文中下文

描述之方法確定對靶向CEACAM5之治療劑，特別地對根據本發明之抗體或免疫結合物敏感之病患。

【0273】「治療有效量」意謂以適用於任何醫學治療之合理收益/風險比治療該癌症疾病之足夠量。然而，將瞭解本發明之抗體、免疫結合物及醫藥組合物(統稱為「治療劑」)之總日用量將由主治醫師於合理醫學判斷之範圍內決定。用於任何特定病患之特定治療有效劑量將取決於多種因素，包括治療中之疾患及該疾患之嚴重程度；採用之特定治療劑之活性；該病患之年齡、體重、一般健康、性別及飲食；採用之特定治療劑之投與時間、投與途徑及排泄率；該治療之持續時間；與採用之特定治療劑組合或同時使用之藥物；及醫學領域中熟知的類似因素。例如，本技術領域中眾所周知，以低於彼等達成所需治療效應者之水準開始化合物之劑量並逐漸增加該劑量直至達成該所需效應。

【0274】本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物亦可用於抑制癌症轉移之進展。

【0275】本發明之抗體、免疫結合物或醫藥組合物亦可與任何其他治療干預組合用於治療癌症(例如輔助療法)及/或用於減少轉移性癌症之生長。例如，用於此組合之其他治療干預可為用於待治療癌症之護理標準(SOC)治療劑。

【0276】使用根據本發明之抗體或免疫結合物或醫藥組合物之治療之效用可活體內(例如在癌症之小鼠模型中)及藉由量測(例如)治療組與對照組之間之腫瘤體積之變化、腫瘤消退%、部分消退或完全消退容易地分析。

【0277】

診斷用途

已報告CEACAM5高度表現於癌細胞(諸如，舉例而言，結直腸、胃、肺及胰臟腫瘤細胞)表面上，且正常組織中之表現僅限於少數正常上皮細胞(諸如結腸及食管上皮細胞)。

【0278】 因此，CEACAM5構成癌症標誌物且有可能用以(例如)指示抗癌症療法之有效性或偵測疾病之復發。

【0279】 在一實施例中，本發明之抗體在靶向表現CEACAM5之腫瘤之療法之內文中可用作分析之組分，以確定病患對治療劑之敏感性、監測抗癌症療法之有效性或偵測治療後該疾病之復發。在一些實施例中，本發明之相同抗體可用作該治療劑之組分及用作該診斷分析之組分。

【0280】 因此，本發明之另一態樣係關於使用根據本發明之抗體在來自個體之生物樣本中離體偵測CEACAM5表現。本發明之另一態樣係關於使用本發明之抗體活體內偵測個體中之CEACAM5表現。當用於偵測CEACAM5時，該抗體可用可偵測分子(諸如，舉例而言，螢光團或酶)標記。

【0281】 CEACAM5之偵測可預期用於(例如)：

a)診斷個體中癌症之存在，或

b)確定患有癌症之病患對靶向CEACAM5之治療劑(特別地根據本發明之抗體或免疫結合物)之敏感性，或

c)監測抗CEACAM5癌症療法之有效性或偵測抗CEACAM5癌症療法後之癌症復發，特別地其中該療法係使用根據本發明之抗體或免疫結合物之療法；

藉由偵測腫瘤細胞上表面蛋白CEACAM5之表現。

【0282】在實施例中，抗體預期用於活體外或離體診斷用途。例如，可使用本發明之抗體在獲自個體之生物樣本中活體外或離體偵測CEACAM5。根據本發明之用途亦可為活體內用途。例如，可對個體投與根據本發明之抗體並可偵測及/或定量抗體-細胞複合物，藉此該等複合物之偵測指示癌症。

【0283】本發明進一步係關於一種在個體中偵測癌症存在之活體外或離體方法，其包括以下步驟：

(a)使來自個體之生物樣本與根據本發明之抗體接觸，特別地在適用於該抗體與該生物樣本形成複合物之條件下接觸；

(b)量測結合至該生物樣本之抗體之濃度；及

(c)藉由比較結合抗體與對照之量測濃度偵測癌症之存在，結合抗體之濃度相較於對照增加指示癌症。

【0284】本發明亦係關於一種測定患有癌症之病患對靶向CEACAM5之治療劑(特別地根據本發明之抗體或免疫結合物)之敏感性之活體外或離體方法，該方法包括以下步驟：

(a)使來自患有癌症之病患之生物樣本與根據本發明之抗體接觸，特別地在適用於該抗體與該生物樣本形成複合物之條件下接觸；

(b)量測結合至該生物樣本之抗體之濃度；及

(c)將結合至該生物樣本之抗體之量測濃度與結合至對照之抗體之濃度進行比較；

其中結合至該生物樣本之抗體之濃度相較於對照增加指示病患對靶向CEACAM5之治療劑之敏感性。

【0285】在上文方法中，該對照可為相同類型之正常、非癌性生物

樣本，或確定為表示相同類型之正常生物樣本中之抗體結合濃度的參考值。

【0286】 在一實施例中，本發明之抗體適用於診斷表現CEACAM5之癌症，諸如結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、食道癌、前列腺癌或表現CEACAM5之其他實性瘤。

【0287】 本發明進一步係關於一種監測抗CEACAM5癌症療法之有效性之活體外或離體方法，其包括以下步驟：

(a)使來自經受抗CEACAM5癌症療法之個體的生物樣本與根據本發明之抗體接觸，特別地在適用於該抗體與該生物樣本形成複合物之條件下接觸；

(b)量測結合至該生物樣本之抗體之濃度；及

(c)將結合抗體之量測濃度與結合至對照之抗體之濃度進行比較；

其中結合至該生物樣本之抗體之濃度相較於對照下降指示該抗CEACAM5癌症療法之有效性。在該方法中，結合至該生物樣本之抗體之濃度相較於對照增加將指示該抗CEACAM5癌症療法無效。在監測有效性之此方法之一實施例中，該對照係與遞交分析之生物樣本相同類型之生物樣本，但其係在抗CEACAM5癌症療法過程中在較早時間點下自該個體獲得。

【0288】 本發明進一步係關於一種偵測抗CEACAM5癌症療法後癌症復發之活體外或離體方法，其包括以下步驟：

(a)使來自個體(已完成抗CEACAM5癌症療法之個體)之生物樣本與根據本發明之抗體接觸，特別地在適用於該抗體與該生物樣本形成複合物之條件下接觸；

(b)量測結合至該生物樣本之抗體之濃度；及

(c)將結合抗體之量測濃度與結合至對照之抗體之濃度進行比較；

其中結合至該生物樣本之抗體之濃度相較於對照增加指示抗CEACAM5癌症療法後之癌症復發。特別地，該對照可為與遞交分析之生物樣本相同類型之生物樣本，但其係先前(即在該抗CEACAM5癌症療法一經完成或完成後)自該個體獲得。

【0289】 該抗CEACAM5癌症療法係(例如)使用根據本發明之抗體或免疫結合物之療法。該抗CEACAM5癌症療法靶向表現CEACAM5之癌症，諸如結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、食道癌、前列腺癌或表現CEACAM5之其他實性瘤。

【0290】 在一些實施例中，本發明之抗體可用可偵測分子或物質，諸如螢光分子或螢光團、放射性分子、酶或此項技術中已知提供(直接或間接)訊息之任何其他標記進行標記。

【0291】 如本文使用，關於根據本發明之抗體，術語「標記」意欲包含藉由將可偵測物質諸如放射性劑或螢光團(例如螢光異硫氰酸鹽(FITC)或藻紅素(PE)或靛青(Cy5))偶合(即，物理連接)至多肽直接標記該抗體，及藉由與可偵測物質之反應性間接標記該多肽。

【0292】 本發明之抗體可用放射性分子藉由此項技術中已知的任何方法標記。例如，放射性分子包括(但不限於)閃爍研究之放射性原子，諸如I^{123}、I^{124}、In^{111}、Re^{186}、Re^{188}、Tc^{99}。本發明之抗體亦可用核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁振造影，MRI)之自旋標記，諸如碘-123、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釓、錳或鐵進行標記。

【0293】 「生物樣本」包含獲自個體的可用於診斷或監測分析中之

各種樣本類型。生物樣本包括(但不限於)血液及生物來源之其他液體樣本、固體組織樣本(諸如生檢樣本或組織培養物或來源於其之細胞，及其後代。因此，生物樣本包含臨床樣本、培養物中之細胞、細胞上清液、細胞溶胞產物、血清、血漿、生物體液及組織樣本(諸如腫瘤樣本)。

【0294】 在一些實施例中，生物樣本可為福爾馬林固定及石蠟包埋(FFPE)之組織樣本。

【0295】 本發明亦係關於一種偵測個體中癌症之存在之活體內方法，其包括以下步驟：

a)對病患投與根據本發明之抗體，其中該抗體係經可偵測分子標記；

b)藉由成像，例如藉由偵測可偵測分子，偵測該抗體於該病患中之定位。

【0296】 在該方法中，癌症可為表現CEACAM5之癌症，諸如結腸直腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、食道癌、前列腺癌或表現CEACAM5之其他實性瘤。

【0297】 本發明之抗體亦可適用於癌症分期(例如，在放射成像中)。本發明之抗體可單獨或與其他癌症標誌物組合使用。

【0298】 如本文使用之術語「偵測」或「經偵測」包括參考或不參考對照之定性及/或定量偵測(即量測濃度)。

【0299】 在本發明之內文中，如本文使用，術語「診斷」意謂基於許多收集之資料，確定醫療狀況之性質，旨在識別影響該個體之病理學。

【0300】

套組

最後，本發明亦提供包含至少一種本發明之抗體或免疫結合物之套

組。發現含有本發明之抗體之套組可用於偵測表面蛋白CEACAM5，或用於治療或診斷分析中。本發明之套組可含有偶合至撐體(例如，組織培養盤或珠(例如，瓊脂糖珠))之抗體。可提供含有用於活體外偵測及定量表面蛋白CEACAM5 (例如在ELISA或西方墨點法中)之抗體之套組。適用於偵測之此抗體可具有標記(諸如螢光或放射性標記)。

【0301】

序列之簡述

胺基酸序列：

SEQ ID NO: 1 根據基因庫寄存編號AAA51967.1之人類CEACAM5蛋白序列

SEQ ID NO: 2 食蟹獼猴CEACAM5蛋白序列(NCBI參考序列XP_005589491.1)

SEQ ID NO: 3 mAb1之CDR1-H

SEQ ID NO: 4 mAb1之CDR2-H

SEQ ID NO: 5 mAb1之CDR3-H

SEQ ID NO: 6 mAb1之CDR1-L

SEQ ID NO: 7 mAb1之CDR2-L

SEQ ID NO: 8 mAb1之CDR3-L

SEQ ID NO: 9 mAb1之VH

SEQ ID NO: 10 mAb1之VL

SEQ ID NO: 11 mAb1之CH

SEQ ID NO: 12 mAb1、mAb1-M及mAb6-M之CL

SEQ ID NO: 13 mAb1之HC

SEQ ID NO: 14 mAb1、mAb1-M及mAb6-M之LC

核酸序列：

SEQ ID NO: 15 編碼mAb1之HC之DNA序列

SEQ ID NO: 16 編碼mAb1之LC之DNA序列

胺基酸序列：

SEQ ID NO: 17 抗體hu8G4之HC

SEQ ID NO: 18 抗體hu8G4之LC

SEQ ID NO: 19 最佳化抗體變體1之HC

SEQ ID NO: 20 最佳化抗體變體1之LC

SEQ ID NO: 21 最佳化抗體變體2之LC

SEQ ID NO: 22 最佳化抗體變體4之LC

SEQ ID NO: 23 最佳化抗體變體5之LC

SEQ ID NO: 24 最佳化抗體變體6之HC

SEQ ID NO: 25 huMab2-3之HC (異型)

SEQ ID NO: 26 huMab2-3之LC

SEQ ID NO: 27 hmn-14之HC

SEQ ID NO: 28 hmn-14之LC

SEQ ID NO: 29 rb8G4之HC

SEQ ID NO: 30 rb8G4之LC

SEQ ID NO: 31 mAb1-M及mAb2-M之CH (CH-LALA-YTE)

SEQ ID NO: 32 mAb3-M之CH (CH-K222R-LALA-YTE)

SEQ ID NO: 33 mAb2-M、mAb3-M及mAb7-M之CL (CL-Tag)

SEQ ID NO: 34 mAb1-M及mAb2-M之HC (HC-LALA-YTE)

SEQ ID NO: 35 mAb3-M之HC (HC-K222R-LALA-YTE)

SEQ ID NO: 36 mAb2-M、mAb3-M及mAb7-M之LC (LC-Tag)

SEQ ID NO: 40 mAb5-M之HC (抗CD20-HC)

SEQ ID NO: 41 mAb5-M之LC (抗CD20-LC)

SEQ ID NO: 44 轉麩醯胺酸酶

SEQ ID NO: 45 轉麩醯胺酸酶(經活化，形式1)

SEQ ID NO: 47 轉麩醯胺酸酶(經活化，形式2)

SEQ ID NO: 48 轉麩醯胺酸酶(經活化，形式3)

SEQ ID NO: 49 轉麩醯胺酸酶(經活化，形式4)

SEQ ID NO: 50 mAb6-M及mAb7-M之CH (CH-LALA)

SEQ ID NO: 51 mAb6-M及mAb7-M之HC (HC-LALA)

SEQ ID NO: 54 框架區FR1

SEQ ID NO: 55 框架區FR2

SEQ ID NO: 56 框架區FR3

SEQ ID NO: 57 框架區FR4

SEQ ID NO: 58 框架區FR5

SEQ ID NO: 59 框架區FR6

SEQ ID NO: 60 框架區FR7

SEQ ID NO: 61 框架區FR8

核酸序列：

SEQ ID NO: 37 編碼mAb1-M及mAb2-M之HC之DNA序列(HC-LALA-YTE)

SEQ ID NO: 38 編碼mAb3-M之HC之DNA序列(LC-K222R-LALA-

YTE)

SEQ ID NO: 39 編碼mAb2-M、mAb3-M及mAb7-M之LC之DNA序列(LC-Tag)

SEQ ID NO: 42 編碼mAb5-M之HC之DNA序列(抗CD20-HC)

SEQ ID NO: 43 編碼mAb5-M之LC之DNA序列(抗CD20-LC)

SEQ ID NO: 46 編碼轉麩醯胺酸酶之DNA序列

SEQ ID NO: 52 編碼mAb6-M及mAb7-M之HC之DNA序列(HC-LALA)

SEQ ID NO: 53 編碼mAb1-M及mAb6-M之LC之DNA序列

胺基酸序列：

SEQ ID NO: 62 拉貝珠單抗重鏈

SEQ ID NO: 63 拉貝珠單抗輕鏈

SEQ ID NO: 64 利妥昔單抗HC

SEQ ID NO: 65 利妥昔單抗LC

【0302】

實例

實例1：抗CEACAM5抗體

1.1轉基因大鼠之免疫作用及融合瘤之分離

為產生對人類CEACAM5蛋白(癌胚抗原相關細胞黏著分子5；CD66e)之單株抗體，自CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC. (WILMINGTON, MA)獲得人類免疫球蛋白基因轉基因大鼠(OmniRat™)。5隻動物用選殖至Aldevron專有免疫作用載體(pB8-CEA-hum-MC)內之CEACAM5 cDNA (編碼具有UniProt ID編號

P06731之人類CEACAM5蛋白序列之胺基酸35至675；除SEQ ID NO: 1之E398經K398取代外，P06731之序列與SEQ ID NO: 1相同)免疫4次，並使用基因槍瞬時轉染至OMT大鼠細胞內。

【0303】 藉由基於細胞之ELISA (CELISA)分析使用細胞膜上表現CEACAM5之細胞評估抗CEACAM5效價(下文呈現效價結果)。在免疫作用方案之第31天，在4輪遺傳物質免疫作用(IS31d-4)後採集經免疫之動物血清。藉由流式細胞分析技術對經選殖至Aldevron專有表現載體(pB1-CEA-hum-MC)內之CEACAM5 cDNA瞬時轉染之哺乳動物細胞測試稀釋於PBS + 3% FBS中之血清。使用10 μg/ml的山羊抗大鼠IgG R-藻紅素結合物(Southern Biotech, #3030-09)作為二級抗體。

【0304】 處死所有動物並將來自淋巴結之淋巴球合併且冷凍保存以備將來使用。使細胞與Ag8小鼠骨髓瘤細胞系融合以產生活融合瘤。然後將來自此融合之融合瘤細胞轉移至十個96孔盤。

【0305】

1.2 CEACAM5特異性

使用基於細胞之ELISA (CELISA)分析篩選融合瘤上清液用於偵測不結合CEACAM1 (BGP)、CEACAM3 (CGM1a)、CEACAM4 (CGM7)、CEACAM6 (NCA)及CEACAM8 (NCA-95)之抗CEACAM5抗體。使用10 μg/ml的山羊抗大鼠IgG R-藻紅素結合物(Southern Biotech, #3030-09)作為二級抗體。

【0306】 將對人類CEACAM5顯示特異性及不對其相關蛋白質顯示特異性之純系轉移至一個96孔盤並在ELISA分析中評估融合瘤上清液的特異性及交叉反應性。在此分析中，8G4融合瘤純系及其子純系顯示對人類

CEACAM5的特異性及對食蟹獼猴CEACAM5的交叉反應性。

【0307】

1.3 偵測抗體序列及選殖

自各融合瘤純系根據RNeasy 96方案，Qiagen製備總RNA。隨後使用無規六聚體及SuperScript©III將總RNA轉錄成cDNA。

【0308】 藉由qPCR品質控制所得cDNA並藉由PCR擴增VH及Vk。使用AMpure XP PCR淨化套組與KingFisher儀器之組合純化PCR產物。

【0309】 使用同源重組程序(所謂之「Lucigen選殖」)將8G4子純系之VH及Vk基因分別選殖至目的載體hi00_pTT5_VH_ccdB及hh00_pTT5_Vk_ccdB內。在One Shot® Mach1™-T1R化學活性大腸桿菌中轉形反應混合物。藉由Sanger定序證實正確重組之純系。

【0310】

1.4命中之人類化及生物化學表徵及候選物選擇

8G4及其他純系係經重新格式化並表現為人類IgG1分子。其等藉由SDS-PAGE、粒徑排阻層析術(SEC)、選擇性、親和力、細胞結合及效力評估。基於結果，選擇一種人類化候選抗體(命名為hu8G4)用於胺基酸序列最佳化以改善可製造性及親和力。

【0311】

人類化候選抗體hu8G4之胺基酸序列如下：

重鏈：

EVQLVESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPG
KGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT
AVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

輕鏈：

ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAP
RLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTN
WPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 18)

【0312】

1.5 hu8G4 (尤其導致mAb1)之生物物理改善策略

hu8G4之可變區序列之評估鑑別輕鏈框架中之六個非生殖系列胺基酸殘基及重鏈框架中之兩個非生殖系列胺基酸殘基。可能易於轉譯後修飾之胺基酸及序列基序(諸如脫醯胺基序、表面可及之甲硫胺酸及游離半胱胺酸)之評估未鑑別傾向增加之任何胺基酸殘基。產生數種經設計之抗體序列，其中某些胺基酸於該位置處經生殖系列相關胺基酸置換。然後使不同之VH及VL最佳化設計以Fab及完整IgG1分子的形式共表現於HEK 293 6E細胞中，進行純化並測試(參見例如下文最佳化變體1至10)。

【0313】

以完整IgG1形式之10種最佳化抗體變體之胺基酸序列如下：

變體1 (VH1.00/VL1.00)

HC：

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPG
KGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADT
AVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

LC：

ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAP
RLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTN
WPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

變體2 (VH1.00/VL1.01)

HC：SEQ ID NO: 19

LC：

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAP

RLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTN
WPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 21)

變體3 (VH1.00/VL1.02)

HC：SEQ ID NO: 19

LC：SEQ ID NO: 14

變體4 (VH1.00/VL1.03)

HC：SEQ ID NO: 19

LC：

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAP
RLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTN
WPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

變體5 (VH1.00/VL1.04)

HC：SEQ ID NO: 19

LC：

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAP
RLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTN
WPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)

變體6 (VH1.02/VL1.00)

HC：

EVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCTVSDGSVS RGGYYLTWIR QHPGKGLEWI GYIYYSGSTY FNPSLRSRVT MSVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCARG IAVAPFDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

LC：SEQ ID NO: 20

變體7 (VH1.02/VL1.01)

HC：SEQ ID NO: 24

LC：SEQ ID NO: 21

變體8 (VH1.02/VL1.02)

HC：SEQ ID NO: 24

LC：SEQ ID NO: 14

變體9 (VH1.02/VL1.03)

HC：SEQ ID NO: 24

LC：SEQ ID NO: 22

變體10 (VH1.02/VL1.04)

HC：SEQ ID NO: 24

LC：SEQ ID NO: 23

所有最佳化變體1至10在維持品質方面均表現相似，如藉由粒徑排阻層析術測定之聚集百分比，基於螢光監測熱解折疊(FMTU)維持穩定性，保持與MKN-45癌細胞系之結合並維持對標靶之選擇性。變體8 (即包括VH1.02及VL1.02之變體)經選為用於進一步開發作為最佳化變體，其序列與生殖系列特別相似。

【0314】 對然後所選變體8進行進一步序列最佳化(尤其)以減少IgG Fc效應功能。相較於親代純系，所得最終序列最佳化(so)純系(命名為so8G4 (本文中亦稱為mAb1))顯示經改善之親和力及經改善之可製造性，且亦顯示減少或不結合至FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIIa、FcγRIIIa/複合物、C1q、FcγRIIb及FcγRIIIb，同時維持對CEACAM5及FcRn之親和力。此最終序列最佳化抗體so8G4 (本文中亦稱為mAb1)之胺基酸序列如下：

重鏈(HC)：SEQ ID NO: 13 (如本文中上文定義)

輕鏈(LC)：SEQ ID NO: 14 (如本文中上文定義)

【0315】

1.6 mAb1之活體外表徵

以活體外分析表徵抗體mAb1之數種性質，包括：結合親和力、選擇性及內化。

【0316】

1.6.1 結合親和力

- 為測定可溶性抗體分析物對捕獲之靶蛋白CEACAM5 (人類或食蟹獼猴Macaca fascicularis)之結合親和力。在Octet Red儀器上使用下列實驗條件：

- 塗覆鏈黴親和素之生物感測器。

- 生物素化靶蛋白濃度(其中ECD表示細胞外域)：

  - 在1000 rpm下以2.5 μg/ml將人類_CEACAM5_ECD-his-生物素R&D系統(使用例行性方法生物素化)捕獲900秒。

  - 在1000 rpm下以5 μg/ml將獲自Syngene之重組食蟹獼猴CEACAM5_ECD-His-生物素(使用例行性方法生物素化)捕獲900秒。

- 分析物抗體濃度：200、100、50、25、12.5、6.25、0 nM。

- 用Octet評估軟體自量測之結合動力學結合(ka)及解離(kd)速率常數測定結合親和力KD (平衡解離常數)值，其中KD = kd/ka

- 以Fab形式使用抗體

由mAb1產生之Fab之結果：

人類CEACAM5之結合親和力KD係6.3 ± 1.98 nM。

食蟹獼猴-CEACAM5之結合親和力KD係14.1 ± 2.53 nM。

【0317】

1.6.2.選擇性

a)物種及域

在ELISA分析中，藉由將抗體自4 nM滴定至0.25 pM，並將其施用至1 μg/ml經結合之重組人類(rh) CEACAM5 ECD或其域N-A1-B1、A2-B2、A3-B3或經結合之重組食蟹獼猴(mf) CEACAM5 ECD(均獲自Syngene)進行mAb1之選擇性測定。結果顯示於圖1中並如下總結：

rhCEACAM5之結合EC50係153.4pM。

rhA2-B2域之結合EC50係166.9pM。

mfCEACAM5之結合EC50係324.3pM。

未偵測到對rhN-A1-B1或rhA3-B3或BSA (牛血清白蛋白，充當陰性對照)之結合。

b)不同CEACAM蛋白

在ELISA分析中進行mAb1之Fab對人類CEACAM5及其他人類CEACAM家族成員之選擇性測定。在96孔分析盤上塗覆蛋白質：huCEACAM5-His6 (R&D系統 # 4128-CM)、huCEACAM6-His6 (3934-CM R&D系統及獲自Syngene之重組蛋白)、huCEACAM1-His6 (2244-CM R&D系統)、huCEACAM3-His6 (C449 Novoprotein)、huCEACAM7-His6 (C926 Novoprotein)、huCEACAM8-His6 (C583 Novoprotein)、huPSG1-His6 (CC66 Novoprotein)，各蛋白質以12 nM濃度塗覆該盤。

【0318】

結果：

在ELISA分析中mAb1之Fab結合人類CEACAM5 (EC50為3.04 nM)，但不結合其他人類CEACAM家族成員，甚至在使用1000 nM mAb1之Fab時，其係比結合至人類CEACAM5之EC50高超過300倍之濃度。

在ELISA分析中，在所有測試濃度下，mAb1之Fab亦不結合至無關蛋白(BSA)。

【0319】

1.6.3 mAb1之細胞結合

藉由在表現標靶(例如人類CEACAM5)之細胞上滴定抗體並量測該等細胞之螢光MFI測定該抗體結合細胞上之其靶蛋白之能力。用於抗體結合比較之模型細胞係表現人類CEACAM5之MKN45細胞系及表現mfCEACAM5之CHO細胞系。用10點x4稀釋，曲線起始濃度2000 nM在分析緩衝液(含有1% BSA之PBSx1)中進行滴定。

【0320】

例示性資料：

mAb1結合至表現人類CEACAM5之MKN-45細胞系且EC50 = 10.62 ± 1.6 nM。

mAb1結合至表現mfCEACAM5之CHO細胞系且EC50 = 4.8 ± 0.6 nM。

【0321】

1.6.4對已知抗體之細胞結合比較

比較吾人主要抗體mAb1與ADC相關已知抗體huMab2-3 (如於已知ADC SAR408701中)及hMN14 (本文中亦稱為hmn-14) (如於已知ADC拉貝珠單抗哥維坦或IMMU-130中)對表現CEACAM5之MKN45細胞系之細胞結合。

【0322】 在本文中下文描述之實驗中，下列胺基酸序列用於上述已知抗體：

huMab2-3：

HC (異型)：

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPER GLEWVAYISSGGGITYAPSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED

TAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

LC：

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSP
KLLVYNTRTLAEGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHY
GTPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)

hmn-14：

HC :

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLE
WIGEIHPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVY
FCASLYFGFPWFAYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)

LC：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAP
KLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSL
YRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 28)

利妥昔單抗(Rituximab)作為對照包括於比較中。結合至細胞之抗體之結果顯示於圖2中並如下總結：

mAb1 (so8G4) = 8.3 nM

huMab2-3 = 6 nM

hmn-14 = 11.8 nM

數個實驗之平均值(EC50)：

mAb1 (so8G4) = 10.4 nM ± 1.6 nM (n=12)

huMab2-3 = 4.9 nM ± 1.6 nM (n=3)

hmn-14 = 16 nM (n=2)

抗CEACAM5抗體對MKN45細胞系之細胞結合顯示mAb1及已知抗體之結合係相似。

【0323】

1.6.5使用Cell Discoverer之內化分析

ADC之相關特性係其內化至表現標靶之細胞及溶體內，且因此內化

係待用作ADC之部分之抗體之相關性質。藉由用pH敏感性染料(pHrodo)直接標記該等抗體可監測抗體內化至晚期內體及溶體(低pH囊泡)內之速率，pH敏感性染料一經激發即在低於6.0之pH下發射強螢光。此螢光可於Cell-Discoverer7 (Zeiss)中成像並可計算內化速率。

【0324】 為分析數種抗體之內化速率，以25,000個細胞/孔將MKN45細胞接種於96孔、暗色、平坦透明底板(Cellvis)中。用100 µL/孔RMPI-1640 + 10% FBS (Thermo)將細胞培養整夜。移除細胞培養基，並在室溫(RT)下在黑暗中，用100 µL稀釋於PBS x 1中之10 µg/ml 赫斯特(Hoechst)染料將細胞染色15 min。然後用PBS x 1將細胞清洗兩次。

【0325】 抗CEACAM5人類IgG抗體(so8G4 (即mAb1)、humab2-3、hmn-14)，及抗MerTK抗體(Merck)用pHrodo直接標記，在無酚紅之溫RPMI1640 + 10% FBS中稀釋至100 nM之濃度，並添加至其等各別孔。如下文進一步描述，將盤在Cell Discoverer中在37℃，5% CO_2下培養20小時，且每20分鐘獲取影像。

【0326】 藉由Cell-Discoverer7 (Zeiss)在567 nM之激發及592/25 nM之發射偵測器下使用螢光對經pHrodo標記之抗體內化至細胞之晚期內體及溶體內進行成像。用赫斯特標記細胞核並在385 nM之激發及425/30 nM之發射偵測器下成像。

【0327】 每20 min記錄各孔之螢光，歷時20 h。藉由Zen軟體(ZEN3.1)及線性回歸之Excel分析計算每個細胞之總螢光強度(SFI)之分析。

【0328】 結果顯示於圖3及圖4中且曲線之線性部分之斜率(參見圖4)亦總結於下表中：

樣本	曲線斜率	R^2
so8G4	28519	99.41
so8G4	29844	99.66
so8G4	28513	99.92
humab2-3	19154	99.42
humab2-3	17398	99.19
humab2-3	20201	99.68
hmn-14	24350	98.61
hmn-14	18754	99.56
hmn-14	23701	99.58

結論：

1.so8G4 (mAb1)具有高於humab2-3 (18917±1416)及hmn-14 (22268±3060)之平均結合速率(28958±766)。

2.so8G4 (mAb1)亦具有高於humab2-3及hmn-14之內化強度。

3.預期mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M及mAb7-M顯示對應於mAb1之內化性質。

【0329】

1.7 產生例如用於結合藥物-連接子化合物一起使用之mAb1之例示性方法

在重組CHO-K1Sv細胞系中產生抗CEACAM5抗體mAb1。在200 l一次性生物反應器中以分批模式進行細胞培養。細胞在用葡萄糖補充之專有CHO分批補料生長培養基中在37℃下生長。在接種後第3、5、7及10天用專有進料組分之混合物進料培養物。

【0330】使用3x1.1 m^2 Millistak+ Pod DOHC (Millipore MD0HC10FS1)及1.1 m^2 Millistak+ Pod XOHC (Millipore #MX0HC01FS1)過濾器淨化來自生物反應器運行之粗條件培養基，接著用Millipore Opticap XL3 0.5 / 0.2 μm過濾器(Millipore #KHGES03HH3)進行終端過濾。

【0331】 淨化後，使用由蛋白A捕獲步驟及離子交換層析步驟構成之標準抗體純化過程純化抗體mAb1。抗CEACAM5抗體mAb1充當用於產生ADC分子之中間體。

【0332】

1.8 mAb1之人類/兔嵌合變體之表現及純化及其於甲醛固定及石蠟包埋之細胞系及人類腫瘤組織上之免疫組織化學(IHC)中之用途

藉由例行性重組方法產生mAb1之人類/兔嵌合變體。mAb1之人類/兔嵌合變體(本文中亦稱為「rb8G4」)具有下列胺基酸序列：

重鏈

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPG
KGLEWIGYIYYSGSTYFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAD
TAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSQPKAPSVFPLAPCCGDTPS
STVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSS
VVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPS
VFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTA
RPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKT
ISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEK
NGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMH
EALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 29)

輕鏈

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAP
RLLIYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTN
WPFTFGPGTKVDIKRDPVAPSVLLFPPSKEELTTGTATIVCVANKFYP

SDITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQSPEDNTYSLSSTLSLTSAQYNSH SVYTCEVVQGSASPIVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 30)

抗體rb8G4藉由瞬時轉染表現於HEK細胞(Expi 293懸浮細胞)中並使用MabSelect SuRe及檸檬酸鹽緩衝液純化。然後將rb8G4用於甲醛固定及石蠟包埋之細胞系及人類腫瘤組織上之IHC：

【0333】

材料及方法

細胞系及組織

【0334】 自Merck細胞庫培養人類癌細胞系，固定於4%緩衝甲醛中，並包埋於石蠟(FFPE)中。將石蠟包埋之細胞系排列成細胞系微陣列(CMA) (Zytomed)。具有人類器官之組織微陣列(TMA)之FFPE組織切片來自amsbio (FDA標準組織陣列，T8234701)。FFPE人類腫瘤樣本由BioIVT及Indivumed GmbH提供。

【0335】

方法

對於使用抗CEACAM-5抗體rb8G4之IHC染色，將經甲醛固定石蠟包埋(FFPE)之癌細胞系微陣列(CMA)及人類腫瘤組織之4 μm切片載於帶電載玻片(SuperFrost Ultra Plus，Thermo Fisher Scientific或TOMO, Matsunami)上。使用Discovery XT (Roche Diagnostics)染色平臺進行染色程序。去石蠟後，將該等切片在Tris-EDTA緩衝液pH 8 (CC1，Roche Diagnostics)中加熱以修復抗原決定基。該等切片與在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)或抗體稀釋劑緩衝液(DCS)中稀釋至0.5或0.7 μg/ml之初級單株抗體rb8G4培育。純系DA1E (兔單株IgG，NEB)用作同型對照抗體。該等初

級抗體後為HQ抗兔IgG偵測套組(Roche Diagnostics)。載玻片用蘇木精複染，在自來水中清洗，脫水，並於Entellan Neu (VWR)永久封固劑中蓋上玻璃蓋玻片。

【0336】將CMA及具有人類器官組織之TMA染色並使用NanoZoomer (Hamamatsu)以0.46 μm/像素之解析度掃描。將人類腫瘤切片染色並使用AxioScan.Z1 (Zeiss)儀器以0.44 μm/像素之解析度掃描。用影像分析軟體HALO (Indica Labs, USA)分析該等CMA之掃描。為測定存在之抗原量，將陽性棕色染色面積計算為活組織面積之面積百分比。將染色(任意單位)計算為：抗體染色(AU) =陽性組織面積%*棕色之平均光密度(OD範圍係0至1)。抗體染色之最大值係100 = 100%之組織區域為黑色(灰度OD值係1)。

【0337】癌細胞系之CEACAM-5 mRNA資料獲自癌細胞系百科全書(CCLE；Broad Institute of MIT & Harvard)。

【0338】

結果

對癌細胞系及人類正常組織之驗證

【0339】抗體rb8G4在FFPE癌細胞系上顯示在細胞質及質膜中之訊號(圖5)。

【0340】藉由將104個癌細胞系上之染色訊號與此等細胞系之mRNA表現(CCLE資料集)進行比較顯示抗體rb8G4對FFPE組織/細胞之特異性。所得r=0.88之皮爾森相關係數支持抗體rb8G4 (亦稱為SO8G4AB323)偵測FFPE組織/細胞中之CEACAM-5抗原決定基之結論(圖6)。此癌細胞系微陣列及經個別選擇之陽性及陰性細胞系在人類正常及腫瘤組織之

染色操作中用作對照基質。

【0341】 在正常人類組織中用抗體rb8G4染色(圖7)與CEACAM-5 mRNA表現(圖8) (來源：http://www.proteinatlas.org/ENSG00000105388-CEACAM5/tissue)一致，進一步支持該抗體對CEACAM-5之特異性。

【0342】

人類腫瘤組織

如結腸直腸癌(圖9)、胃癌(圖10)、食道癌(圖11)及非小細胞肺癌(圖12)中顯示，抗體rb8G4在數種人類腫瘤適應症中染色呈陽性。訊息位於細胞質中及於質膜處。

【0343】

1.9使用mAb1及rb8G4之流式細胞分析技術及西方墨點法

比較mAb1、rb8G4及市售抗CEACAM5抗體對CEACAM5陽性及陰性細胞系之結合。

【0344】 所用方法：在5 mL聚苯乙烯管中將5E5至1E6個細胞用於使用BD FACSCanto II (BD Biosciences)之流式細胞術分析。在50 μL 1% PBS/BSA中在4℃下用10 μg/mL初級抗體(mAb1、rb8G4、小鼠單株Agilent Dako #M7072純系#IL7)及各別螢光標記之二級抗體(驢抗人類IgG Jackson-Dianova #709-116-149；驢抗小鼠IgG Jackson ImmunoResearch #715-116-150、驢抗兔IgG Jackson-Dianova #711-116-152)進行染色20至30 min。在染色步驟之間及之後，使用1% PBS/BSA將細胞清洗三次並重新懸浮於500 μL 1% PBS/BSA (包括0.2 μg/mL DAPI用於活細胞門控)中用於流式細胞術分析。為評估資料，使用FlowJo軟體(BD Biosciences)。

【0345】 結果：mAb1及rb8G4顯示結合僅對應於CEACAM5陽性細胞系之mRNA表現程度資料(下表1；MKN-45、NCI-H441)。相比之下，對於商業抗體，結合較弱且僅限於CEACAM5高細胞系(下表1；MKN-45)。總之，mAb1及rb8G4特異性偵測CEACAM5陽性癌細胞且可用作偵測劑。

細胞系	MAB1	RB8G4	AGILENT/DAKO M7072純系IL7
MKN-45	23.2	36.2	3.8
NCI-H441	2.2	3.2	1.1
A549	1.1	1.1	1.0
MDA-MB-468	1.1	1.0	1.0

表1：不同抗體對CEACAM5陽性及CEACAM5陰性細胞系之結合。對每個細胞系列舉各別抗體之中值螢光強度(MFI)除以二級抗體僅對照之MFI的商。

【0346】 亦藉由西方墨點法研究人類mAb1及rb8G4對CEACAM5陽性及陰性細胞系溶胞產物之結合。

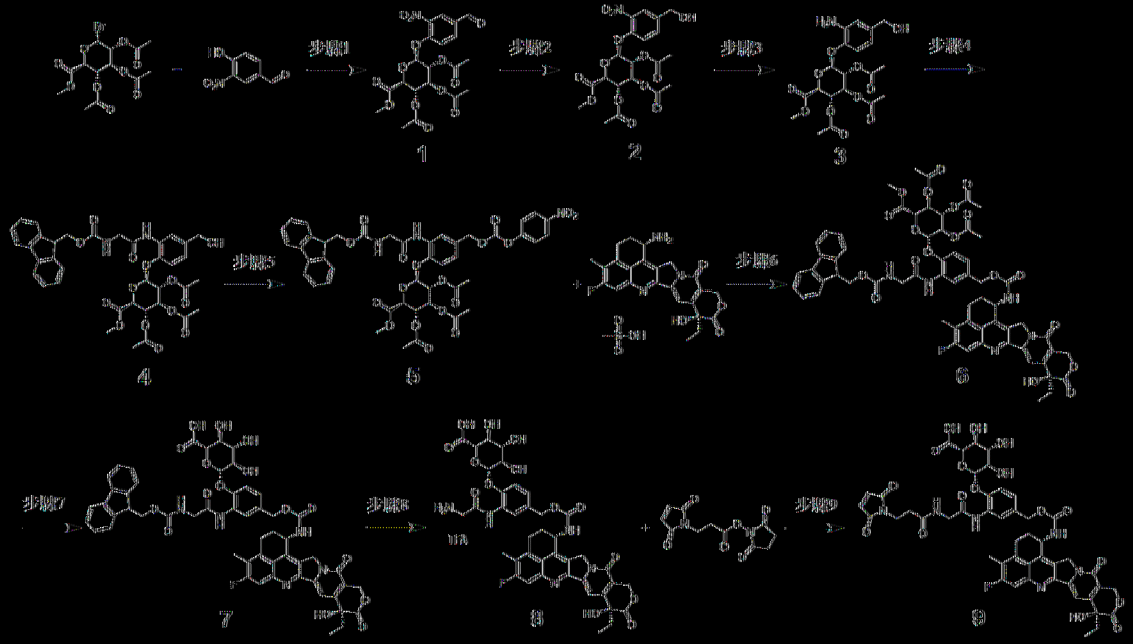
【0347】 所用方法：根據標準方案(Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第1卷，CSHL Press)進行西方墨點法。針對SDS-PAGE，接著膜濕印跡，每條泳道上樣藉由BCA套組(Thermo Scientific, #23227)定量之RIPA細胞溶胞產物之15 μg總蛋白。使用MOPS電泳緩衝液(Bio-Rad #1610788)之Criterion XT 4至12%凝膠(Bio-Rad, #3450125)用於Criterion電泳細胞(Bio-Rad, #1656001)中。藉由麗春紅染色證實蛋白質之轉移。在用0.5 μg/mL至1 μg/mL初級(mAb1或rb8G4)及二級抗體(抗人類IgG，Jackson ImmunoResearch #109-035-098或抗兔IgG，CellSignaling #7074)進行染

色之前及之間進行膜清洗。由ECL偵測試劑使用FUSion FX成像系統(Vilber)將經染色之膜可視化。

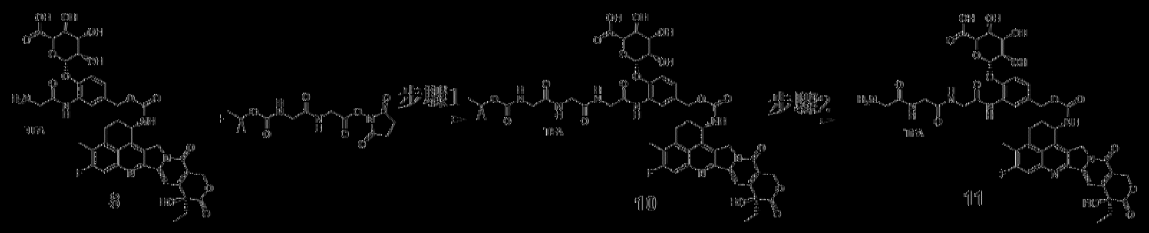
[0348] 結果顯示於圖13A及圖13B中：兩種抗體均以對應於高度離化CEACAM5之預期遷移速度之可比較模式結合。mAb1 (圖13A)及rb8G4 (圖13B)之CEACAM5偵測對CEACAM5陽性細胞系特異，且強度與mRNA表現程度相關。以較低強度觀察到之第二條帶對應於先前描述之潛在第二同功型(Hatakeyama等人：Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. BMC Research Notes 2013 6:381)。

[0349]

實例2：具有基於葡萄糖醛酸之連接子之藥物-連接子化合物:藥物-連接子化合物1 (DL1)及藥物-連接子化合物1-M (DL1-M)之合成



化合物9 (本文中亦稱為藥物-連接子化合物1 (DL1))之合成途徑。

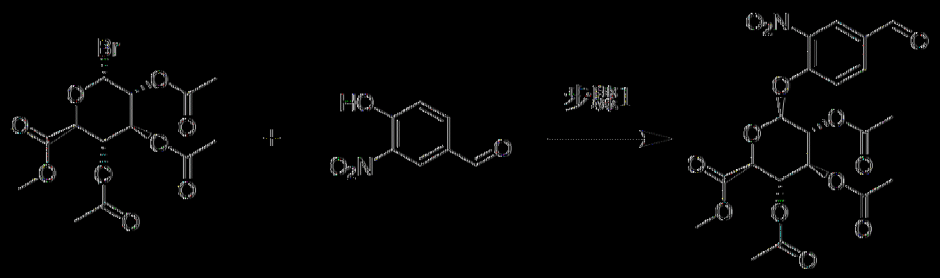


化合物11（本文中亦稱為藥物-連接子化合物1-M（DL1-M)之合成途徑

[0350]

化學製備化合物9之方案

步驟1：化合物1



1

[0351] 向(2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-三乙醯氧基-6-溴-四氫-哌喃-2-羧酸甲酯(8.30 g；20.90 mmol；1.00當量)及4-羥基-3-硝基-苯甲醛(5.24 g；31.35 mmol；1.50當量)於乙腈(83.00 ml；10.00 V)中之經攪拌溶液添加氧化銀(I) (9.69 g；41.80 mmol；2.00當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌16 h。使該反應混合物濾過矽藻土。在真空下濃縮濾液以產生固體。將該固體溶解於EtOAc中並用10% $NaHCO_3$水溶液清洗以移除過量4-羥基-3-硝基-苯甲醛。在真空下濃縮有機料以產生呈沙色固體之化合物1。

產量：9.0 g

產量百分率：89.1%

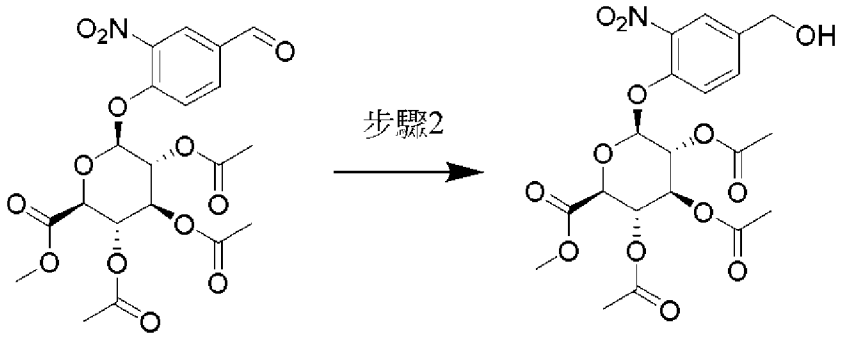
分析資料：

NMR：^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6)： 9.98 (s,1H), 8.46 (s,

1H),8.25-8.21 (m, 1H),7.64 (d, J = 11.60Hz, 1H), 5.94 (d, J= 10.00 Hz,1H),5.51-5.44 (m, 1H),5.20-5.09 (m, 2H),4.80 (d, J = 13.20 Hz, 1H), 3.64 (s,3H), 2.09 (s, 9H)。

【0352】

步驟2：化合物**2**



1 **2**

【0353】向化合物**1** (9.00 g；18.62 mmol；1.00當量)於丙-2-醇(33.00 ml；3.67 V)及$CHCl_3$ (167.00 ml；18.56 V)中之經攪拌溶液添加矽膠60-120 (3.60 g；112.09 mmol；6.02當量)，接著添加硼氫化鈉(1.80 g；46.55 mmol；2.50當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌1 h。完成後，用冷H_2O淬滅該反應混合物並濾過矽藻土。用二氯甲烷萃取濾液並經Na_2SO_4乾燥。濃縮溶劑以產生呈灰白色粉末之化合物**2**。

產量：8.70 g

產量百分率：92.4%

【0354】

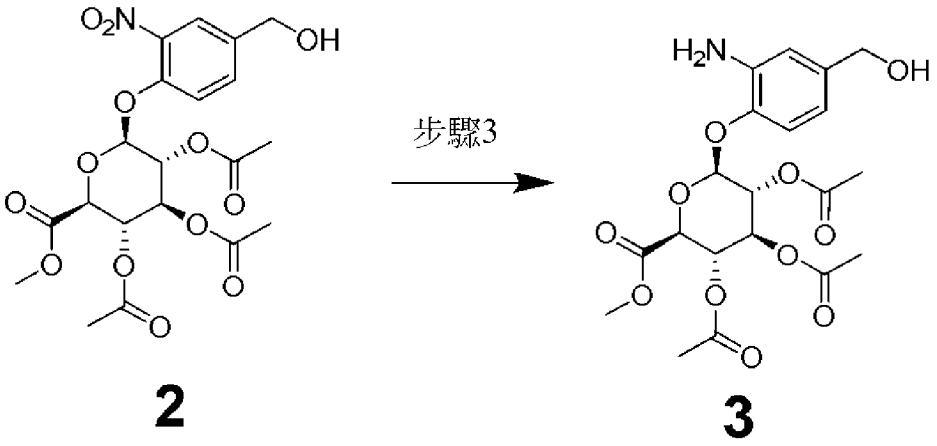
分析資料

LCMS：管柱：ATLANTIS dC18 (50x4.6 mm) 5 µm；移動相A：0.1% HCOOH於H2O: ACN (95:5)中；B：ACN

RT (min)：2.05；M+H：503.2，純度：96.6%

【0355】

步驟3：化合物**3**



2 **3**

【0356】向化合物**2** (8.70 g；17.21 mmol；1.00當量)於乙酸乙酯(100.00 ml；11.49 V)及THF (100.00 ml；11.49 V)中之經攪拌溶液添加碳載鈀(10% w/w) (2.50 g；2.35 mmol；0.14當量)。在室溫下在氫氣氛下將該反應混合物攪拌3 h。完成後，通過矽藻土濾除該反應混合物。在真空下濃縮溶劑以產生呈灰白色固體之化合物**3**。

產量：8.5 g

產量百分率：100%

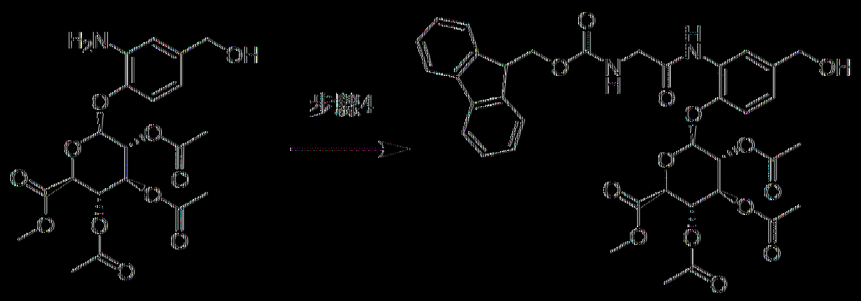
【0357】

分析資料：

LCMS：管柱：ATLANTIS dC18 (50x4.6 mm) 5 μm；移動相A：0.1% HCOOH於H2O:ACN (95:5)中；B：ACN

RT (min)：1.73；M+H：456.10，純度：95.1%

步驟4：化合物**4**



3　　4

[0358] 在0℃下向化合物3 (10.00 g；20.89 mmol；1.00當量)及(9H-芴-9-基甲氧基羰基)-乙酸(7.60 g；25.06 mmol；1.20當量)於DCM (250.00 ml；25.00 V)中之經攪拌溶液添加2-乙氧基-2H-喹啉-1-羧酸乙酯(15.65 g；62.66 mmol；3.00當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌16 h。完成後，在減壓下移除溶劑以產生粗產物。該粗產物藉由管柱層析術(56% EtOAc:石油醚)純化以產生純度80%之化合物。該化合物由具有30% EtOAc及石油醚之洗滌液進一步純化以產生呈白色固體之化合物4。

產量：8.5 g

產量百分率：50.7%

[0359]

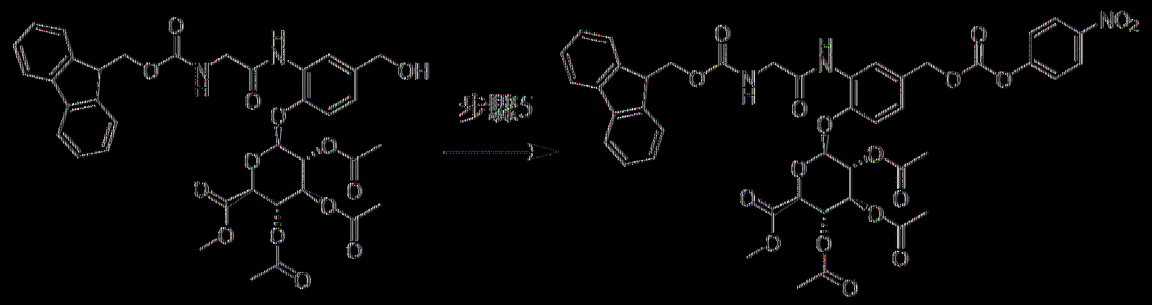
分析資料：

LCMS：管柱：ATLANTIS dC18 (50x4.6 mm) 5 μm；移動相A：0.1% HCOOH於H_2O:ACN (95:5)中；B：ACN

RT (min)：3.03；M+H：735.2，純度：81.9%

[0360]

步驟5：化合物5



4 5

[0361] 在0℃下向化合物4 (2.00 g；2.49 mmol；1.00當量)於THF (40.00 ml；20.00 V)中之經攪拌溶液添加碳酸雙(4-硝基苯基)酯(3.06 g；9.97 mmol；4.00當量)及DIPEA (4.40 ml；24.92 mmol；10.00當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌12 h。該反應完成後，在真空下濃縮反應混合物。粗產物藉由管柱層析術使用矽膠(230-400)及石油醚/乙酸乙酯作為溶析液純化以提供呈淡黃色固體之化合物5。

產量：2.0 g

產品百分率：84.6%

[0362]

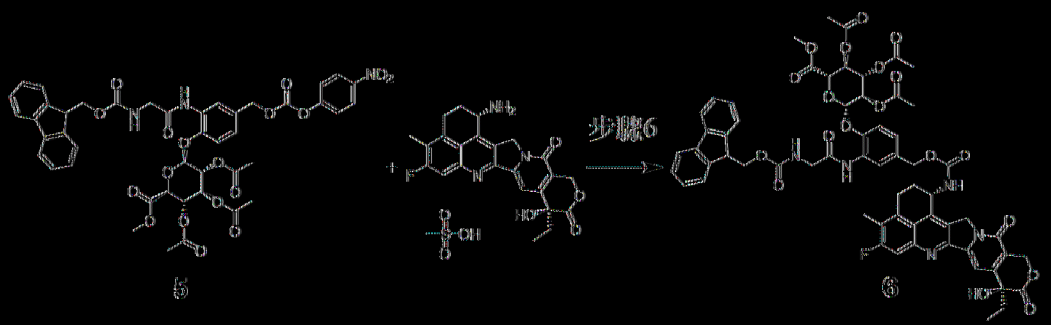
分析資料：

LCMS：管柱：X-Bridge C8(50X4.6) mm，3.5 μm；移動相：A：0.1% TFA於MilliQ水中；B：ACN

RT (min)：3.24；M+H：900.20，純度：94.9%

[0363]

步驟6：化合物6



5 6

|0364| 將化合物5 (1.369 g；1.00當量)溶解於N,N-二甲基甲醯胺(15.00 ml)、甲磺酸依喜替康(679.7 mg；1.00當量)中，添加合成用4-甲基嗎啉(0.422 ml；3.00當量)及1-羥基苯并三唑(172.8 mg；1.00當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌整夜。在攪拌時間後，該反應懸浮物變為棕色溶液。藉由LC-MS監測該反應，其顯示初始材料之完全轉化。該反應混合物經由RP急速層析術純化。將含有產物之溶離份組合，在真空中濃縮並凍乾整夜以提供呈黃色固體之化合物6。

產量：1.59 g

產量百分率：87.5%

|0365|

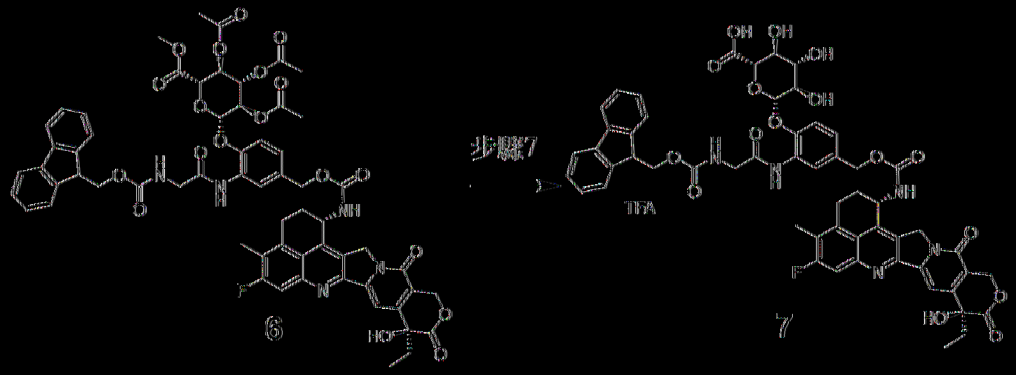
分析資料：

LCMS：管柱：Chromolith HR RP-18e (50-4.6 mm)；移動相A：0.05% HCOOH於H_2O中；B：0.04% HCOOH及1% H_2O於ACN中；T：40℃；流動：3.3 ml/min；MS：100-2000，amu陽性；1% ->100% B：0->2.0 min；100% B：2.0->2.5 min

RT (min)：1.95；M+H：1196.40，純度：84.4%。

|0366|

步驟7：化合物7



|0367| 在0℃下將化合物6 (1.586 g；1.00當量)溶解於四氫呋喃

(50.00 ml)中並滴加LiOH (含有氫氧化鋰水合物(281.77 mg；6.00當量)於水(67.100 ml))中之溶液(0.1 M)。在該添加期間檢查pH值。該pH應不超過10。LiOH溶液之添加在1.5小時後完成。藉由LC-MS監測該反應，LC-MS顯示初始材料之完全轉化。用檸檬酸溶液(pH調整至5)淬滅該反應物。在減壓下濃縮該反應混合物。藉由製備型HPLC純化該粗產物。將含有產物之溶離份組合並凍乾以提供呈深黃色固體之化合物7。

產量：728 mg

產量百分率：54.8%

|(0368)|

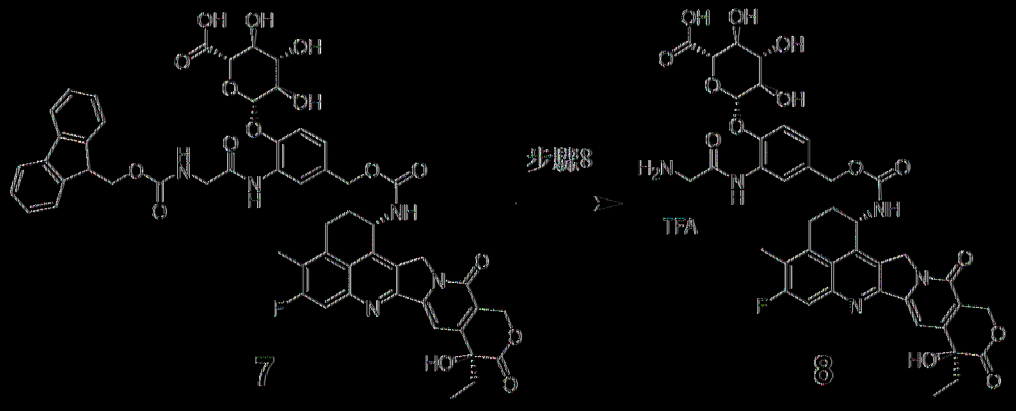
分析資料：

LCMS：管柱：Chromolith HR RP-18e (50-4.6 mm)；移動相A：0.05% HCOOH於H_2O中；B：0.04% HCOOH及1% H_2O於ACN中；T：40℃；流動：3.3 ml/min；MS：100-2000，amu陽性；1% ->100% B：0->2.0 min；100% B：2.0->2.5 min

RT (min)：1.68；M+H：1056.30，純度：98.5%。

|(0369)|

步驟8：化合物8



7 8

|(0370)| 將化合物7 (728.000 mg；1.00當量)溶解於N,N-二甲[illegible]中[illegible]

醯胺(20.00 ml)中。添加哌啶(136.513 µl；2.00當量)並在室溫下將該溶液攪拌總計4小時。藉由LC-MS監測該反應，LC-MS顯示初始材料之完全轉化。在減壓下濃縮該反應混合物並藉由RP急速層析術純化粗產物。將含有產物之溶離份組合，部分移除溶劑並將其凍乾整夜以提供呈黃色固體之化合物8。

產量：706 mg

產量百分率：100%

|(03'71)|

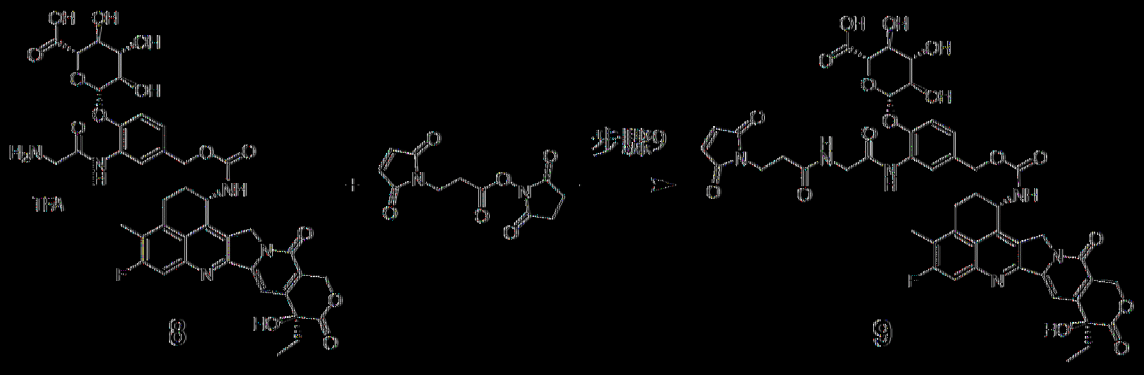
分析資料：

LCMS：管柱：Chromolith HR RP-18e (50-4.6 mm)；移動相A：0.05% HCOOH於H_2O中；B：0.04% HCOOH及1% H_2O於ACN中；T：40℃；流動：3.3 ml/min；MS：100-2000，amu陽性；1% ->100% B：0->2.0 min；100% B：2.0->2.5 min

RT (min)：1.22；M+H：834.30，純度：97.6%。

|(03'72)|

步驟9：化合物9



|(03'73)| 向化合物8 (854 mg；1.00當量)於二甲基甲醯胺(30.00 ml)中之溶液添加N-乙基二異丙胺(149.234 µl；1.00當量)及3-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-吡咯-1-基)-丙酸2,5-二側氧基-吡咯啶-1-基酯(233.61 mg；1.00

當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌3小時。藉由LC-MS監測該反應，LC-MS顯示初始材料之完全轉化。在減壓下濃縮該反應混合物並藉由RP急速層析術純化粗產物。將含有產物之溶離份組合，濃縮並凍乾以產生91%純度之所需產物。藉由RP層析術再次純化此材料以產生呈黃色固體之化合物**9**。

產量：580 mg

產量百分率：60.1%

分析資料：

LCMS：管柱：Chromolith HR RP-18e (50-4.6 mm)；移動相A：0.05% HCOOH於H_2O中；B：0.04% HCOOH及1% H_2O於ACN中；T：40℃；流動：3.3 ml/min；MS：100-2000，amu陽性；1% ->100% B：0 ->2.0 min；100% B：2.0 ->2.5 min

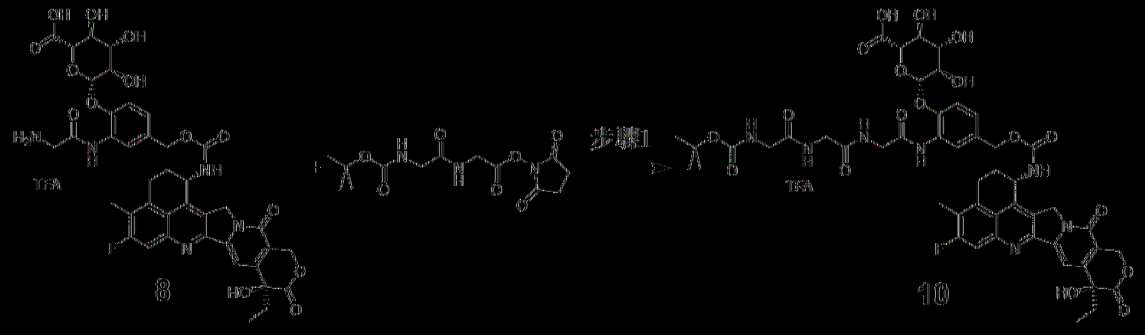
RT (min)：1.38；M+H：985.30，純度：90% (其他10%異構體可藉由HPLC去除)

^{1}HNMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 13.10 - 12.44 (m, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.32 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.02 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 10.9 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.15 - 7.09 (m, 2H), 6.98 (s, 2H), 5.48 - 5.38 (m, 2H), 5.32 - 5.22 (m, 3H), 5.11 - 5.01 (m, 2H), 4.87 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.92 - 3.88 (m, 1H), 3.89 - 3.84 (m, 2H), 3.65 - 3.61 (m, 2H), 3.46 - 3.41 (m, 1H), 3.42 - 3.37 (m, 1H), 3.38 - 3.31 (m, 1H), 3.28 - 3.20 (m, 1H), 3.15 - 3.07 (m, 1H), 2.48 - 2.44 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.24 - 2.13 (m, 2H), 1.94 - 1.80 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

【0374】

化學製備化合物11之方案

步驟1：化合物10



[0375] 向化合物8 (289.00 mg；1.00當量)於二甲基甲醯胺(10.00 ml)中之溶液添加N-乙基二異丙胺(0.104 ml，2.00當量)及(第三丁氧基羰基)甘胺醯甘胺酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(105.70 mg；1.00當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌1小時並藉由LC-MS監測該反應。完成後，在真空中移除溶劑並藉由製備型HPLC於Sunfire管柱上純化粗產物。將含有產物之溶離份組合並凍乾以提供呈黃色固體之化合物10三氟乙酸鹽。

產量：162.00 mg，0.14 mmol。

產量百分率：44.8%

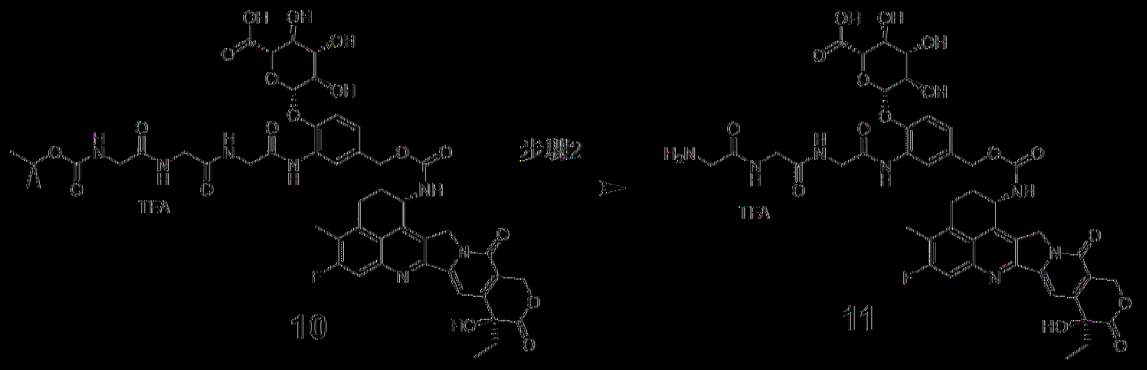
分析資料：

LCMS：管柱：Chromolith HR RP-18e (50-4.6 mm)；移動相A：0.05% HCOOH於H2O中；B：0.04% HCOOH及1% H2O於ACN中；T：40℃；流動：3.3 ml/min；MS：100-2000，amu陽性；1% ->100% B：0->2.0 min；100% B：2.0->2.5 min

RT (min)：1.41；M+H：1048.1，純度：97.9%

[0376]

步驟2：化合物11



[0377] 向化合物10 (162.00 mg；1.00當量)於二氯甲烷(5.00 ml)中之懸浮液添加於1,4-二噁烷(682.43 µl；20.00當量)中之4.0 M氯化氫溶液並在室溫下將其攪拌3.5小時並藉由LC-MS監測該反應。完成後，在真空中濃縮該反應混合物並藉由製備型HPLC純化粗產物。將含有產物之溶離份組合並凍乾以提供呈黃色固體之化合物11三氟乙酸鹽。

產量：113 mg；0.11 mmol。

產量百分比：77.0%

分析資料：

LCMS：管柱：Chromolith HR RP-18e (50-4.6 mm)；移動相A：0.05% HCOOH於H2O中；B：0.04% HCOOH及1% H2O於ACN中；T：40℃；流動：3.3 ml/min；MS：100-2000，amu陽性；1% ->100% B：0->2.0 min；100% B：2.0->2.5 min

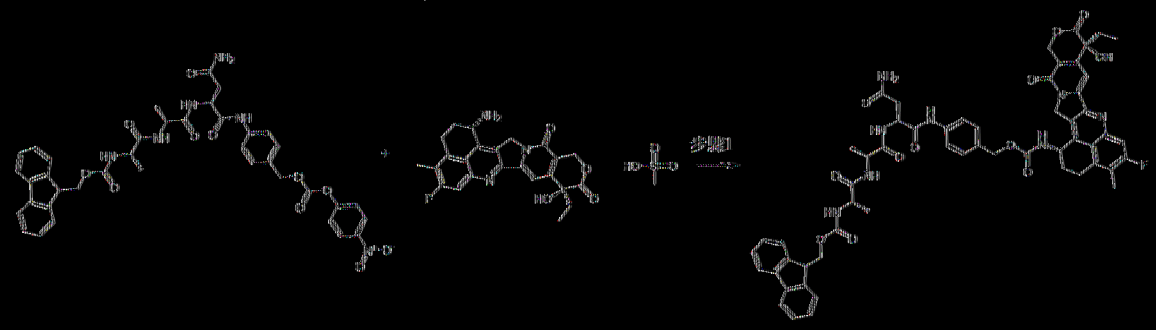
RT (min)：1.22；M+H：948.0，M+2H：474.8；純度：98.8%

^{1}H NMR (700 MHz, DMSO-d6) δ 12.93 - 12.79 (m, 1H), 9.14 (s, 1H), 8.61 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.41 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.05 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.03 - 7.93 (m, 3H), 7.79 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.13 (s, 2H), 6.58 - 6.47 (m, 1H), 5.80 - 5.61 (m, 1H), 5.48 - 5.40 (m, 2H), 5.31 - 5.24 (m, 3H), 5.08 (d, J = 12.2 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 4.91 (d, J = 17.7 Hz, 1H), 3.96 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 3.95 -

3.86 (m, 3H), 3.62 (q, J = 5.8 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.41 (t, J = 8.5 Hz, 1H), 3.35 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.27 – 3.20 (m, 1H), 3.15 – 3.09 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.23 – 2.13 (m, 2H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。

[0378]

實例3：具有抗葉酸受體α可裂解連接子之藥物-連接子化合物：藥物-連接子化合物2 (DL2)之合成



步驟1

[0379] 將4-硝基苯基碳酸4-[(2S)-3-胺甲醯基-2-[(2S)-2-[(2S)-2-({[(9H-茀-9-基)甲氧基]羰基}胺基)內醯胺基]內醯胺基]內醯胺基]苯基}甲酯(400 mg；0.52 mmol；1.00當量) [市售自Levena Biopharma US]溶解於N,N-二甲基甲醯胺(5.00 ml)中。添加甲磺酸依喜替康(277.30 mg；0.52 mmol；1.00當量)、N-乙基二異丙胺(0.27 ml；1.57 mmol；3.00當量)及1-羥基苯并三唑(HOBT) (3.52 mg；0.03 mmol；0.05當量)。在室溫下將該反應混合物攪拌整夜。LC/MS指示完全轉化。

[0380] 經由製備型HPLC純化粗反應混合物並凍乾產生365 mg (0.343 mmol) ((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-胺基-1-((4-(((((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-

1,4-二側氧基丁烷-2-基)胺基)-1-側氧基丙烷-2-基)胺基)-1-側氧基丙烷-2-基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯

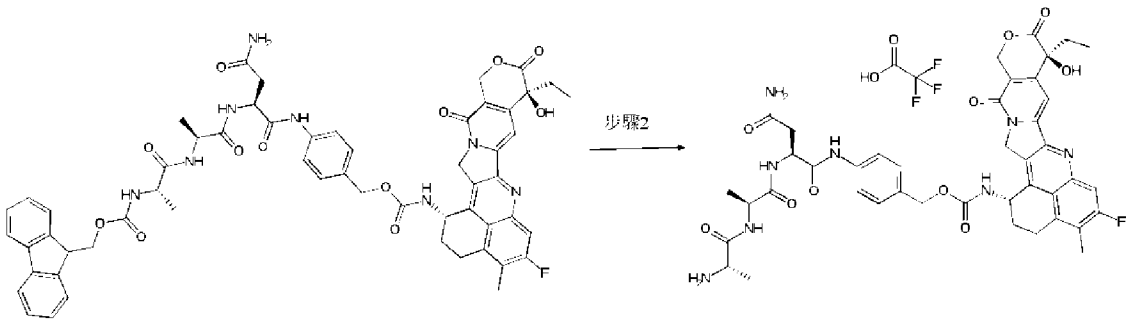
LC/MS：[M+H] = 1064.2

製備型HPLC：

管柱：sunfire製備型c18 obd - 75.0 g (250 bar)

溶劑A：Wasser 0.1%TFA 溶劑C：

溶劑B：乙腈0.1%TFA



步驟2

【0381】將((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-胺基-1-((4-(((((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)胺甲醯基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1,4-二側氧基丁烷-2-基)胺基)-1-側氧基丙烷-2-基)胺基)-1-側氧基丙烷-2-基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(365 mg；0.34 mmol；1.00當量)溶解於N,N- (4.00 ml)中。添加合成用哌啶(0.07 ml；0.69 mmol；2.00當量)並在室溫下將該反應溶液攪拌1 h。

【0382】經由製備型HPLC純化反應混合物產生300 mg (0.314 mmol) ((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)胺基甲酸4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-胺基丙醯胺基)丙醯胺基)-4-

側氧基丁醯胺基)苯甲酯。

LC/MS：[M+H]: 841.3

用於純化之製備型HPLC：

RediSEP Säulc：C18 130 g

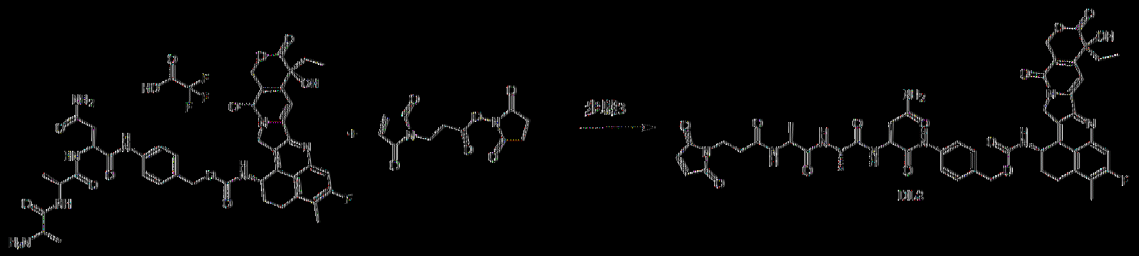
SN：E0410A0D24BE1 批號: 262118923W

流動速率：75 ml/min

條件-體積：390.0 ml

溶析液：A1水0.1%TFA

溶析液：B1乙腈0.1%TFA



步驟3

[0383] 向((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]哌喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)胺基甲酸4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-胺基丙醯胺基)丙醯胺基)-4-側氧基丁醯胺基)苯甲酯(571 mg；0.60 mmol；1.00 äq.)於N,N-二甲基甲醯胺(20ml)中之溶液添加N-乙基二異丙胺(203 µL；1.20 mmol；2.00當量)及3-馬來醯亞胺基丙酸N-琥珀醯亞胺酯(162 mg；0.60 mmol；1.00當量)。然後將該反應混合物攪拌10 min並經由LC/MS監測。

[0384] 經由製備型HPLC純化反應混合物產生378 mg (0.35 mmol) DL2。

LC/MS：[M+H]: 992.4

用於純化之製備型HPLC：

RediSEP管柱：C18 86 g

SN：E0410A8B46130 批號: 281729189W

流動速率：60 ml/min

條件-體積：264.0 ml

溶析液1：A1水0.1%TFA

溶析液2：B1乙腈0.1%TFA

【0385】

序列分析：

方法資訊：A：H_2O + 0.05% HCOOH | B：MeCN + 0.04% HCOOH + 1% H2O

T：40℃ |流動：3.3 ml/min | MS：100-2000 amu陽性

管柱：Chromolith HR RP-18e 50-4.6 mm

0% -> 100% B：0 -> 2.0 min | 100% B：2.0 -> 2.5 min

實例4：免疫結合物之製備：mAb1之基於葡萄糖醛酸之結合物(稱為ADC1)及mAb1-M (所得免疫結合物稱為ADC1-M)、mAb4-M (所得免疫結合物稱為ADC4-M)及mAb6-M (所得免疫結合物稱為ADC6-M)

儘管在mAb1 (所得免疫結合物稱為ADC1)之內文中描述下列方法，但相同方法亦可用於mAb1-M (所得免疫結合物稱為ADC1-M)、mAb4-M (所得免疫結合物稱為ADC4-M)及mAb6-M (所得免疫結合物稱為ADC6-M)。

【0386】

4.1結合過程

抗體製備

【0387】 在2至8℃將抗體mAb1 (如本文中上文定義)解凍長達3天，然後結合並儲存在2至8℃直至使用。在結合當天在使用前在室溫平衡mAb (> 10 g)。將該mAb (9.6 mg/mL)等分(10.0 g，1041.7 mL)並使用結合緩衝液(200 mM組胺酸，pH 6.5)稀釋至5.59 mg/mL。將該mAb溶液添加至3 L Chemglass夾套反應器內並設定至25 ± 2℃，同時在50 rpm攪拌。

【0388】

抗體之還原

將7.0 mol當量(9.7 mL)之50 mM TCEP溶液(50 mM TCEP於結合緩衝液中)添加至mAb溶液小瓶內並容許該反應在25 ± 2℃進行3小時。

【0389】

結合

將式(**X**)之藥物-連接子化合物1 (DL1)稱重並溶解於DMSO中以製備20 mM溶液。將90% (148.6 mL)所需DMSO添加至反應器中。在添加DMSO後，立即將10.0 mol當量(38.2 mL)之20 mM藥物-連接子溶液添加至該反應器中。然後，使用10% (18.2 mL)剩餘之所需DMSO沖洗藥物-連接子小瓶以確保完全轉移。在最終添加後，容許該反應在25 ± 2℃進行1小時。結合期間之總體積係1997.0 mL。

【0390】 注意：反應之總DMSO濃度係10% (v/v) (DMSO +藥物連接子溶液)。

【0391】

淬滅

將35 mol當量(48.5 mL)之50 mM NAC添加至反應器中並容許該反應在25 ± 2℃進行30分鐘。

【0392】

過濾

自反應器轉移經過濾之粗結合物溶液及然後使用Millipak Gamma Gold 60 (MPGL06GH2)過濾產生1993.6 mL (過濾器負載：324.7 g/m2 [蛋白質]，66.5 L/m2 [溶液])經過濾之粗結合物。

【0393】

滲濾

經過濾之粗結合物溶液用Pellicon 3 (30 kDa) Biomax膜(1 x 0.11 m2，300 LMH (550 mL/min)，16 psi TMP，實際負載88.5 g/m2)進行緩衝液交換(DV= 1993.6 mL)。使用滲濾緩衝液(10 mm組胺酸，pH 5.5)以緩衝液交換16滲濾體積(diavolumes)之粗結合物。在緩衝液交換後，將該溶液濃縮至≥ 25 mg/mL，轉移至瓶子內，並用滲濾緩衝液沖洗該膜。自UF/DF回收之總體積係361.5 mL。

【0394】

調配

用112.1 mL滲濾緩衝液(10 mm組胺酸，pH 5.5)將濃ADC (即ADC1)稀釋至20.0 mg/mL。用157.6 mL 4X調配緩衝液(10 mm組胺酸、12% (w/v)海藻糖二水合物、400 mm NaCl，pH 5.5)將所得溶液稀釋至15.0 mg/mL，以獲得濃度15.0 mg/mL之最終標靶原料藥(BDS)。

【0395】

過濾

使用0.2 μm Millipak Gamma Gold 40 (MPGL04GH2)過濾器過濾經最終調配之ADC以產生619.6 mL (過濾器負載：464.6 g/m2 [蛋白質]，31.0 L/m2 [溶液]) ADC1 BDS。將材料包裝於HDPE瓶內並儲存在≤ -65℃下。

【0396】

4.2方法：原料藥表徵：ADC1

粒徑排阻層析術(SEC)方法

SEC方法參數

波長 280 nm

管柱 Tosoh TSKgel 7.8 mm x 300 mm，5 μm (P/N 0008541)

移動相 0.14 M磷酸二氫鉀

50 mm磷酸二氫鈉

0.06 M磷酸二氫鉀

0.25 M氯化鉀

5% IPA

注射體積 20 μL

溫度 25℃

流動速率 0.5 mL/min

運行時間 30 min

典型SEC層析圖顯示儲備mAb、UF後之結合物及最終BDS之純度：圖14。

【0397】針對上文顯示之BDS材料，已報告1.7% HMWS及96.9%之單體純度。

【0398】

逆相HPLC (RP HPLC)方法

RP HPLC方法參數

波長 280 nM

管柱 PLRP-S 1000 Å (50 x 2.1 mm，8 μm)管柱，Agilent (P/N PL1912-1802)

移動相A 0.1%甲酸於具有0.01% TFA之水中

移動相B 0.1%甲酸於具有0.01% TFA之ACN中

梯度

時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	80	20
3.00	80	20
20.00	0	100
22.00	80	20
26.00	0	100
4 min平衡至80% A及20% B		

注射體積 10 μL

管柱溫度 80℃

流動速率 1.0 mL/min

運行時間 30 min

【0399】 **樣本製備** 將樣本稀釋至2 mg/mL並將40 μL添加至微量離心管。添加60 μL ~8 M鹽酸胍、~130 mm Tris、~1 mm EDTA，pH 7.6緩衝液。添加2 μL 500 mm DTT並渦旋混合。在37 ± 2℃下將樣本培養30 ± 2 min。

【0400】 典型RP-HPLC層析圖顯示輕鏈及重鏈之分離：圖15。該層析圖顯示儲備mAb、粗ADC及最終BDS之重疊。

【0401】 針對上文ADC1 BDS材料，報告7.9之DAR。

【0402】

游離藥物法

游離藥物法參數

波長 254 nM

管柱 Phenomenex Gemini，C18，2 x 150 mm，3 μm (P/N 00F-4439-B0)

移動相A 0.1%甲酸於水中

移動相B 0.1%甲酸於乙腈中

梯度

時間 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射體積 10.00 μL

管柱溫度 50℃

流動速率 0.75 mL/min

樣本製備 蛋白質滴：100 μL原料藥+ 250 μL冷MeOH + 50 μL 3 M $MgCl_2$。在20,000 rpm下旋轉10 min。

【0403】 **標準品製備** 將20 μL 20 mm DL1 (藥物-連接子化合物1於DMSO中) + 20 μL DMSO + 40 μL MeOH + 20 μL 200 mM NAC混

合於滲濾緩衝液中。培養整夜以提供4 mM DL-NAC。將4 mM DL-NAC稀釋於MeOH中以提供4 μM DL-NAC標準品。

【0404】 典型層析圖顯示NAC標準及最終BDS之游離藥物濃度：圖16。

【0405】 針對上文顯示之ADC1 BDS材料，已報告低於2.4% (以莫耳比計)之殘餘游離藥物濃度。

【0406】

實例5：免疫結合物：mAb1之基於肽之結合物(稱為ADC2)之製備

5.1結合過程

【0407】

抗體製備

在2至8℃下將抗體mAb1 (如本文中上文定義)解凍長達3天，然後結合並儲存在2至8℃下直至使用。在室溫下在結合當天在使用前平衡mAb (> 9.5 g)。將該mAb (9.6 mg/mL)等分(9.5 g，989.6 mL)並使用結合緩衝液(200 mM組胺酸，pH 6.5)稀釋至5.59 mg/mL。將該mAb溶液添加至3 L Chemglass夾套反應器內並設定至25 ± 2℃，同時在50 rpm下攪拌。

【0408】

抗體之還原

將8.0 mol當量(10.5 mL) 50 mM TCEP溶液(50 mM TCEP於結合緩衝液中)添加至mAb溶液小瓶內並容許該反應在25 ± 2℃下進行3小時。

【0409】

滲濾

經還原之mAb溶液針對6個DV (DV= 1706.9 mL)使用Pellicon 3 (30

kDa) Biomax膜(1 x 0.11 m2，300 LMH (550 mL/min)，16 psi TMP，實際負載86.3 g/m2進行緩衝液交換。使用結合緩衝液(200 mM組胺酸，pH 6.5)對該經還原之抗體進行緩衝液交換。在緩衝液交換後，將該經還原之mAb溶液回收至反應器內並用結合緩衝液膜沖洗。

【0410】

結合

將藥物-連接子化合物2 (DL2)稱重並溶解於DMSO中以製備20 mM藥物-連接子溶液。將90% (142.6 mL)所需DMSO添加至反應器。在添加DMSO後，立即將9.5 mol當量(31.2 mL) 20 mM藥物-連接子溶液添加至該反應器。然後，使用10% (15.8 mL)剩餘之所需DMSO以沖洗藥物-連接子小瓶以確保完全轉移。最終添加後，容許該反應在25 ± 2℃下進行2小時。結合反應期間之總體積係1894.5 mL。

【0411】

淬滅

將35 mol當量(46 mL) 50 mM NAC添加至反應器並容許該反應在25 ± 2℃下進行45分鐘。

【0412】

過濾

自反應器轉移粗結合物溶液並使用Millipak Gamma Gold 60 (MPGL06GH2)過濾以產生1897.3 mL (過濾器負載：308.9 g/m2 [蛋白質]，63.2 L/m2 [溶液])經過濾之粗結合物。

【0413】

滲濾

經過濾之粗結合物溶液用Pellicon 3 (30 kDa) Biomax膜(1 x 0.11 m2，300 LMH (550 mL/min)，16 psi TMP，實際負載84.2 g/m2)進行緩衝液交換(DV = 1897.3 mL)。使用結合緩衝液(200 mM組胺酸，pH 6.5)進行初始12個DV，及然後針對8個另外DV切換至標準滲濾緩衝液(10 mM組胺酸，pH 5.5)。在緩衝液完成該緩衝液交換後，然後將該溶液濃縮至≥25 mg/mL，轉移至瓶子內且該膜用滲濾緩衝液沖洗。自UF/DF回收之總合併體積係335.7 mL。

【0414】

調配

用84.7 mL滲濾緩衝液(10 mM組胺酸，pH 5.5)將濃ADC (即ADC2)稀釋至20.0 mg/mL。用138.6 mL 4X調配緩衝液(10 mM組胺酸、12% (w/v)海藻糖二水合物、400 mm NaCl，pH 5.5)將所得溶液稀釋至15.0 mg/mL之最終標靶BDS濃度。

【0415】

過濾

使用Millipak Gamma Gold 60 (MPGL06GH2)無菌過濾經最終調配之ADC以產生549.3 mL (過濾器負載：411.4 g/m2 [蛋白質]，27.5 L/m2 [溶液]) ADC2 BDS。將材料包裝於HDPE瓶內並儲存在≤ -65℃下。

【0416】

5.2方法：原料藥表徵：ADC2

粒徑排阻層析術(SEC)方法

SEC方法參數

波長　　280 nm

管柱 Tosoh TSKgel 7.8 mm x 300 mm，5 μm (P/N 0008541)

移動相 50 mM磷酸二氫鈉

0.4 M過氯酸鈉

pH 6.3

注射體積 1 μL

管柱溫度 25℃

流動速率 0.5 mL/min

運行時間 30 min

典型SEC層析圖顯示儲備mAb及最終BDS之純度：圖17。

【0417】 針對上文顯示之ADC2 BDS材料，已報告4.2% HMWS及95.8%之單體純度。

【0418】

逆相HPLC (RP HPLC)方法

RP HPLC方法參數

波長 280 nm

管柱 PLRP-S 1000 Å (50 x 2.1 mm，8 μm)管柱，Agilent (P/N PL1912-1802)

移動相A 0.1%甲酸於具有0.01% TFA之水中

移動相B 0.1%甲酸於具有0.01% TFA之ACN中

梯度

時間(min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	80	20
3.00	80	20
20.00	0	100
22.00	80	20
26.00	0	100
4 min平衡至80% A及20% B		

注射體積10 μL

管柱溫度80℃

流動速率　1.0 mL/min

運行時間　30 min

樣本製備　將樣本稀釋至2 mg/mL並將40 μL添加至微量離心管。添加60 μL ~8 M鹽酸胍、~130 mM Tris、~1 mM EDTA，pH 7.6緩衝液。添加2 μL 500 mM DTT並渦旋混合。在37 ± 2℃下將樣本培養30 ± 2 min。

【0419】 典型RP-HPLC層析圖顯示輕鏈及重鏈之分離：圖18。該層析圖顯示儲備mAb及最終BDS之重疊。

【0420】 針對上文之ADC2 BDS材料，報告7.6之DAR。

【0421】

游離藥物法

游離藥物法參數

波長　254 nm

管柱　Phenomenex Gemini，C18，2 x 150 mm，3 μm (P/N 00F-4439-B0)

移動相A 0.1%甲酸於水中

移動相B 0.1%甲酸於乙腈中

梯度

時間(min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射體積 10.00 µL

管柱溫度 50℃

流動速率 0.75 mL/min

樣本製備 蛋白質滴：100 µL原料藥+ 250 µL冷MeOH + 50 µL 3 M $MgCl_2$。在20,000 rpm下旋轉10 min。

【0422】 **標準品製備** 將20 µL 20 mM DL2 (藥物-連接子化合物2於DMSO中) + 20 µL DMSO + 40 µL MeOH + 20 µL 200 mM NAC混合於滲濾緩衝液中。培養整夜以提供4 mM DL-NAC。將4 mM DL-NAC稀釋於MeOH中以提供4 µM DL-NAC標準品。

【0423】 典型層析圖顯示NAC標準及最終BDS之游離藥物濃度：圖19。

【0424】 針對上文顯示之ADC2 BDS材料，已報告低於1.9% (以莫耳比計)之殘餘游離藥物濃度。

【0425】

實例6：ADC SAR408701之類似物

6.1抗體

【0426】 出於其他比較實驗之目的，基於具有下列序列之單株抗體

製備賽諾菲之抗CEACAM5 ADC SAR408701之類似物：

重鏈：SEQ ID NO: 25

輕鏈：SEQ ID NO: 26

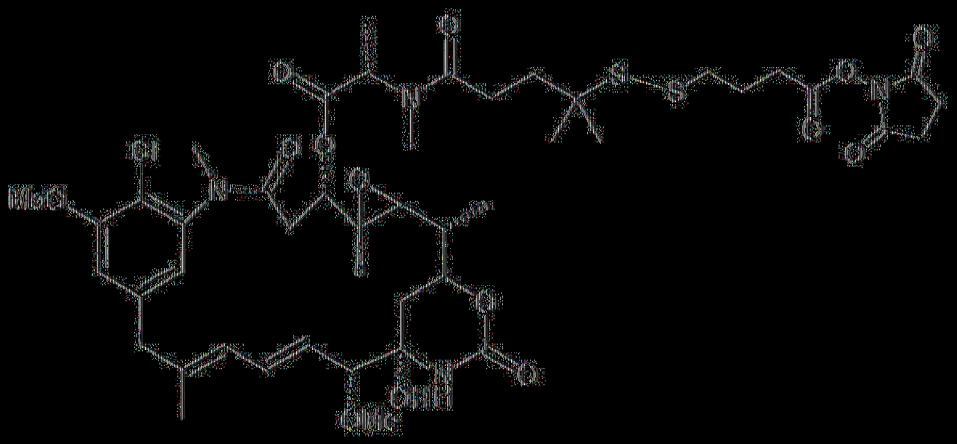
|(0427)|

6.2藥物-連接子化合物

使用SPDB-DM4 (獲自Levena Biopharma)作為待結合至上文提及之抗體之藥物-連接子分子：

產品名稱：SPDB-DM4

結構：



預期質量：994.35

觀察到之平均質量：995.5 (Ms+H+)

質譜分析：一致，顯示正確之MW

HPLC分析：純度> 95%

外觀：白色粉末

|(0428)|

6.3結合

在2至8℃下將抗體解凍長達3天，然後結合並儲存在2至8℃下直至使用。在室溫下在結合當天在使用前平衡抗體(175 mg)。使用結合緩衝液

(PBS pH 7.4)及SPDB-DM4 (Levena Biopharma)之5 mM DMSO溶液(相對於該抗體為8 mol當量)將該抗體(7.9 mg/mL)稀釋至5 mg/mL。將該反應溶液混合並在25℃下培養4 h。

【0429】

6.4製備型粒徑排阻層析術、脫鹽及過濾

使用製備型粒徑排阻層析術純化反應混合物。將Superdex 200 pg (50/60)管柱連接至Äkta Avant 25系統(GE Healthcare)並用PBS pH 7.4根據製造商之說明書平衡。接著，注射該反應混合物並通過管柱以10 ml/min之流動速率及PBS pH 7.4作為電泳緩衝液運行。經由280 nM下之紫外光吸收測定含有ADC之溶離份，合併並濃縮。使用15 ml Amicon Ultra 50 kDa截止離心裝置(Merck Millipore)根據製造商之說明書濃縮ADC材料。使用HiPrep 26/10脫鹽管柱(GE Healthcare)以10 ml/min之流動速率在Äkta Avant 25系統(GE Healthcare)上根據製造商之說明書將經濃縮之ADC材料轉移至調配緩衝液(10 mM組胺酸、130 mM甘胺酸、5%蔗糖，pH 5.5)內。使用0.2 μm過濾器(Merck Millipore)過濾所得ADC材料，等分並隨後在液氮中急速冷凍。該ADC材料之最終濃度係5.82 mg/ml並將該材料保持在-80℃下直至進一步使用。由此工作產生之ADC在本文中亦稱為「ADC SAR DM4」，或簡稱為「ADC SAR」；此ADC係SAR408701之類似物。

【0430】

實例7：基於mAb1及SPDB-DM4之ADC

基於抗體mAb1 (如本文中上文描述)及藥物-連接子化合物SPDB-DM4，即與上文描述之ADC SAR DM4中相同之藥物-連接子化合物製備

另一ADC。由此工作產生之ADC在本文中稱為「ADC mAb1 DM4」並如下製備：

【0431】

7.1所用材料：

•抗體：mAb1，1 mg/mL於10 mM HEPES (pH 5.8)中

•結合緩衝液：10 mM HEPES，pH 5.8

•藥物-連接子化合物：SPDB-DM4，2 mg/mL於DMF中

【0432】

7.2方法：

•結合：使用約30倍莫耳過量之藥物-連接子分子進行結合(75 mL抗體+ 7.1 mL SPDB-DM4藥物-連接子)，在室溫下培養5 h並緩慢搖動

•純化：將ADC的緩衝液交換成20 mM組胺酸、150 mM NaCl，pH 6.0以移除游離藥物

•調配緩衝液：20 mM組胺酸、150 mM NaCl，pH 6.0

【0433】

7.3經純化之ADC分析細節：

•最終產量：40 mg

•濃度：2.2 mg/mL

• DAR：4.4

【0434】

實例8：由ADC1及ADC2釋放之藥物之表徵

8.1材料及方法

8.1.1測試製品

ADC 編號	ADC之簡述
ADC1	mAb1-葡萄糖醛酸-依喜替康(亦參見上文實例4)
ADC2	mAb1-AAN-依喜替康(亦參見上文實例5)
ADC3	抗CEACAM5-CL2A-SN-38 ADC (Creative Biolabs, CAT#：ADC-091LCT，人類化IgG1單株抗CEACAM5抗體，諸如經由CL2A連接子結合至SN38之拉貝珠單抗)

【0435】

8.1.2材料

根據製造商之說明書儲存所有試劑及緩衝液並在批次有效期前使用。

縮寫名稱	來源及內容物
人類肝溶體	Sekisui Xenotech, H0610.L
豆莢蛋白分析緩衝液	50 mM MES、250 mM NaCl
10 x分解代謝緩衝液	Sekisui Xenotech
人類血清	Biowest, S4200-100, 批號# S15594 S4200
小鼠血清	Biowest, S2160-100, 批號# S18169 S2160
食蟹獼猴血清	Abcam, caT：ab155109, 批號: GR316568-1
HEP ES	Sigma, caT：H3784-100g 批號: SLBR6536V
PIC III	Calbiochem，蛋白酶抑制劑混合物III組，不含EDTA，#539134
甲醇	Merck, caT：1060092500

【0436】 8.1.3儀器

儀器	供應商
CO2培養器	Heraeus
緊湊型熱混合器	Eppendorf
HTC PAL自動進樣器	CTC Analytics
1200 HPLC	Agilent Technologies
API4000三重四極桿	Sciex

【0437】

8.1.4程序

8.1.4.1血清樣本製備

【0438】 2 M HEPES溶液：將52.1 g HEPES溶解於75 mL MiliQ水

及15 mL HCl 25%中，調整至pH 7.55並添加高達100 mL。此溶液以15%v/v與血清混合以獲得pH 7.3至7.4之穩定血清。將來自Biowest (批號S15594S4200)之人類血清解凍。100 mL血清與15 mL 2 M HEPES緩衝液混合。將來自Biowest (批號S18169S2160)之小鼠血清解凍。100 mL血清與15 mL 2 M HEPES緩衝液混合。將食蟹獼猴血清解凍且8.5 mL血清與1.5 mL 2 M HEPES緩衝液混合。量測pH (7.37)並將血清無菌過濾。在-20℃下冷凍2 mL等分試樣。

【0439】在室溫下解凍製得之血清。所需ADC蛋白濃度以180 μg/mL一式三份製備，用於後續經由LC-MS進行游離有效載荷分析。在將該等ADC添加至該血清後，混合個別批次並分成20 μL等分試樣。另外，對於各ADC，吸移一個20 μL 96 h樣本，並用於總後處理分析以量測回收率。在-80℃下直接冷凍0 h樣本，在37℃及5% CO2下培養殘餘樣本並使反應於經由在-80℃下儲存培養2/ 4/ 6/ 24/ 48/ 72，96小時停止。

【0440】

8.1.4.2人類肝溶體樣本製備

使用分析緩衝液將pH調整至pH 5.0或pH 4.0。溶體穩定性製劑：製備80 μL人類肝溶體用於一式三份量測，如針對ADC1 (n=3)例示性顯示：2.76 μL ADC1 + 6 μL人類肝溶體+ 71.2 μL豆莢蛋白分析緩衝液。MeOH + PIC (1:200)之製備：10 μL PIC III + 1990 μL MeOH。將Eppendorf管一經轉移至預熱至37℃之熱混合器即開始反應。接著，在0、1、2、4、24及48小時後抽取10 μL等分試樣並與40 μL PIC III (1:200)混合。

【0441】

8.2結果

人類、小鼠及食蟹獼猴血清之ADC穩定性(圖20)。使用游離依喜替康(標準化資料)計算經結合之依喜替康濃度(初始劑量~10 μM)。針對人類、食蟹獼猴及小鼠血清獲得相似概況。僅觀察到少量彈頭釋放，小鼠血清中的ADC2 (於96 h，初始結合之有效載荷之5.9%游離)及ADC1 (1.4%)最為明顯。

【0442】 小鼠血清及緩衝液之ADC3對照穩定性(圖21)。使用游離之SN38 (未標準化)計算經結合之SN38濃度(初始劑量50 μg/mL ADC蛋白濃度)。針對兩種基質，觀察到明顯之SN-38釋放。

【0443】 ADC1及ADC2於人類肝溶體(pH 5.0)中之有效載荷釋放曲線(圖22)。使用(例如)游離依喜替康(初始濃度~10 μM依喜替康)標準化資料計算經結合之藥物濃度。針對ADC1及ADC2裂解介導之有效載荷釋放觀察到中間體濃度之有效載荷釋放(均為初始總結合之有效載荷之~40%)。

【0444】 ADC分解代謝產物圖譜分析證實游離依喜替康為溶體釋放產物(圖23)。為證實依喜替康為主要釋放產物，在人類溶體提取物中進行ADC1分解代謝產物圖譜分析研究。此時，不同時間點之TIC-MS及提取離子層析圖之比較顯示，預期之依喜替康分解代謝產物後續在培養期間(0 h、4 h、24 h)自ADC1釋放。滯留時間9.33 min，偵測質量m/z 436.1671 ($[M+H]^+$，$C_{24}H_{23}O_4N_4F$)及偵測之分解代謝產物之MS/MS譜與依喜替康之彼等一致。

【0445】

實例9：ADC1及ADC2以高效力活體外特異性殺死癌細胞

使用人類癌細胞系以評估ADC1及ADC2殺死癌細胞之潛力。ADC1

及ADC2顯示針對不同CEACAM5陽性細胞系之亞奈莫耳活體外效力及對CEACAM5陰性細胞系之較小影響(下表2)。如例示性劑量反應曲線(圖24A/B)中顯示，ADC1及ADC2針對CEACAM5陽性細胞系SK-CO-1及SNU-16非常有效。相比之下，ADC1及ADC2對抗原陰性MDA-MB-231之影響僅限於測試之最高濃度(圖24C)。

【0446】 利用各別連接子及有效載荷作為用於ADC1及ADC2之利妥昔單抗同型對照ADC對SK-CO-1細胞系顯示低得多的影響(圖25)。

【0447】 總之，ADC1及ADC2以高效力活體外特異性殺死表現CEACAM5之人類癌細胞系。

	MKN-45 IC50 [M]； N≥3	**SNU-16 IC50 [M]； N≥3**	**SK-CO-1 IC50 [M]； N≥4**	**LS174T IC50 [M]； N≥3**	**MDA-MB-468 IC50 [M]； N≥2**	**MDA-MB-231 IC50 [M]； N≥3**
ADC1	6.2E-10 (-78%)	3.2E-10 (-91%)	8.5E-11 (-97%)	3.8E-10 (-72%)	>1E-08 (-85%)	>1E-08 (-67%)
ADC2	4.7E-10 (-90%)	2.8E-10 (-96%)	6.9E-11 (-98%)	2.8E-10 (-81%)	6.7E-09 (-97%)	1.5E-08 (-84%)
有效載荷	8.9E-10 (-96%)	4.4E-10 (-99%)	2.5E-10 (-99%)	5.3E-10 (-88%)	2.1E-10 (-99%)	9.3E-10 (-92%)
CEACAM5	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性

表2：ADC1、ADC2及游離有效載荷針對多種人類細胞系之效力。在最高測試化合物濃度下相較於未處理之對照之最大效應指示於括號中。針對各細胞系，指示CEACAM5表現。

【0448】

方法-存活率分析：

藉由細胞存活率分析量測ADC對癌細胞系之細胞毒性效應。在處理前一天以90 μL體積將細胞接種於96孔盤中。測試化合物(ADC或游離有效載荷)以10倍起始濃度調配於細胞培養基中。將測試化合物連續稀釋

(1:4)並將10 μL各稀釋液一式三份添加至該等細胞。在37℃下於CO2培養器中將盤培養六天。對於細胞存活率量測，將細胞Titer-Glo®試劑(Promega™ Corp, Madison, WI)添加至各孔，並根據製造商之說明書處理盤。使用Varioskan讀盤器(Thermo Fisher)量測發光訊息。將發光讀數轉化為相對於未處理之細胞之存活率%。用非線性回歸分析、使用對數(抑制劑)相比於反應、可變斜率、使用GraphPad Prism之4參數擬合方程擬合資料。資料顯示為相對細胞存活率%相比於莫耳化合物濃度，誤差槓指示一式三份之標準偏差(SD)。計算來源於多個實驗之IC50之幾何平均值。

【0449】 使用與上文相同之方法，亦將ADC1及ADC2與ADC SAR DM4在其等對抗原陽性SK-CO-1及抗原陰性MDA-MB-231細胞系之細胞毒性效應方面進行比較。ADC1及ADC2顯示比ADC SAR DM4針對SK-CO-1癌細胞分別高2.9及2.7倍之效力(圖26A)。相較於ADC1及ADC2，ADC SAR DM4針對抗原陰性MDA-MB-231之非特異性效應略高(圖26B)。ADC SAR DM4及ADC mAb1 DM4針對SK-CO-1顯示可比較之效力，及ADC mAb1 DM4略微傾向於較高效力(圖26A)。

【0450】

實例10：ADC1及ADC2介導針對與抗原陽性細胞共培養之抗原陰性細胞之有效旁觀者效應

在旁觀者分析中評估ADC1及ADC2介導針對抗原陽性細胞附近之抗原陰性細胞之旁觀者效應之潛力。ADC1及ADC2在CEACAM5陽性SK-CO-1之存在下顯示針對CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞之有效旁觀者效應(圖27A)。共培養實驗係在1 nM之ADC濃度下進行，該濃度對於

ADC1而言引起CEACAM5陽性SK-CO-1細胞存活率之最大抑制(圖26A)但對CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞無影響(圖26B)。與此等發現一致，在僅MDA-MB-231對照之旁觀者分析設定中未觀察到ADC1或ADC2之非特異性效應(圖27B)。

【0451】 總之，ADC1及ADC2介導針對與抗原陽性細胞共培養之抗原陰性癌細胞之有效旁觀者效應。此等發現指示有效靶向具有異質標靶表現之腫瘤之潛力。

【0452】 鑑於利用相同之藥物-連接子及Fv區，預期與ADC1及ADC2一樣，ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M及ADC6-M及ADC7-M介導類似有效旁觀者效應。

【0453】 相較於ADC SAR，ADC1及ADC2介導對與抗原陽性細胞共培養之抗原陰性細胞之有效得多的旁觀者效應(圖28A、圖28B)。利用與ADC1及ADC2中相同之抗體(即mAb1)及ADC SAR DM4中利用之藥物-連接子分子(即SPDB-DM4)之ADC mAb1 DM4亦顯示比ADC SAR DM4更明顯之旁觀者效應(圖28A、圖28B)。此指示相較於利用不同抗體之ADC SAR，mAb1有助於針對ADC1及ADC2觀察到更高旁觀者效應。因此預期ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M及ADC7-M亦比ADC SAR介導更有效之旁觀者效應。

【0454】 針對所有測試之ADC，旁觀者效應之程度隨添加至恆定數量之抗原陰性細胞之抗原陽性細胞之數量增加而增加(比較圖28A及圖28B)。不希望受理論束縛，此可為更多ADC經較高數量之抗原陽性細胞處理以釋放更多游離有效載荷之結果，此造成對抗原陰性細胞之旁觀者效應。

【0455】 未觀察到測試ADC對單獨MDA-MB-231細胞之非特異性效應(圖28C)。

【0456】

方法-旁觀者分析

藉由旁觀者分析量測ADC對與抗原陽性癌細胞系共培養之抗原陰性癌細胞系之細胞毒性效應。將一千個CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞接種於每孔具有750或3000個CEACAM5陽性SK-CO-1細胞之共培養實驗中。作為對照，僅平行接種1000個MDA-MB-231細胞。在處理前一天以90 μL總體積將細胞接種於96孔盤中。以1E-9 M之最終濃度的10倍將測試化合物調配於細胞培養基中並一式兩份將10 μL添加至該等細胞。在37℃下於CO2培養器中將盤培養六天。

【0457】 在免疫螢光染色之前，移除培養基並用100%甲醇(-20℃)將細胞處理30分鐘。在移除甲醇及一個PBS清洗步驟後，在室溫下用2.5%多聚甲醛(PFA)及於PBS中之0.2% Triton X-100將細胞處理15分鐘。在移除溶液及一個PBS清洗步驟後，在室溫下用於PBS中之1% BSA / 0.1%吐溫/ 0.1%疊氮化鈉將細胞處理至少一個小時。藉由用10 μg/mL人類抗CEACAM5 (mAb1)初級抗體及1:2000稀釋之驢抗人類IgG螢光(藻紅素)標記之二級抗體(Jackson ImmunoResearch #709-116-149)進行免疫螢光染色以區分抗原陽性及抗原陰性細胞。藉由細胞核染色使用1 μg/mL赫斯特33342 (Life technologies，目錄號H3570)染料鑑別細胞。在室溫下於1% BSA / 0.1%疊氮化鈉PBS溶液中進行染色30分鐘。二級抗體染色與赫斯特染料染色組合。在染色步驟之間及之後，用PBS將細胞清洗三次。

【0458】 用共聚焦定量影像細胞儀CQ1 (Yokogawa® Electric

Corporation, Tokyo, Japan)將盤成像。自CQ1軟體(Yokogawa)模板「細胞核及偽細胞體」調整分析並使用FlowJo (BD)分析FCS導出檔。基於細胞核周圍經螢光標記之抗體之染色或不染色，區分並定量抗原陽性及抗原陰性細胞。條形圖顯示每種處理條件下鑑別之抗原陽性及抗原陰性細胞之數量。

【0459】

實例11：ADC1及ADC2在來源於結腸直腸癌(CRC)病患之異種移植(PDX)小鼠模型中之效用

已在來源於人類病患之CRC異種移植模型COPF217 (Shanghai LideBiotech CO., LTD)中評估活體內抗腫瘤效用。將COPF217腫瘤片段皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu, Charles River)之右側腹內。當腫瘤達成165 mm^3之平均體積時，6隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)或用ADC1或ADC2靜脈內處理一次(各以10 mg/kg之劑量；第0天)。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用式L×(W^2)/2計算腫瘤體積。

【0460】 使用10 mg/kg之劑量之ADC1或ADC2之單次處理導致顯著之抗腫瘤效應。兩種物質均顯示導致腫瘤停滯之可比較效應(圖29)。用ADC1或ADC2處理對體重無顯著影響(資料未顯示)。

【0461】 使用其他CRC PDX模型之其他實驗：

在對應於上文針對COPF217描述者之另外實驗中，使用ADC1之單次處理亦在12個具有高CEACAM5表現之其他CRC PDX模型中導致腫瘤停滯或腫瘤消退。

【0462】

實例12：ADC1在非小細胞肺癌(NSCLC) PDX小鼠模型中之效用

已在來源於人類病患之NSCLC異種移植模型LUPF160151 (Shanghai LideBiotech CO., LTD)中評估活體內抗腫瘤效用。將LUPF160151腫瘤片段皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu, Charles River)之右側腹內。當腫瘤達成180 mm^3之平均體積時，5隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)或用ADC1 (6 mg/kg；第0天)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用式L×(W^2)/2計算腫瘤體積。

【0463】 使用6 mg/kg之劑量之ADC1之單次處理導致對體重無影響(資料未顯示)之顯著抗腫瘤效應(圖30)。模型LUPF160151顯示異質CEACAM5表現，及CEACAM5陰性腫瘤細胞與CEACAM5陽性腫瘤細胞相鄰。因此，ADC1於此模型中之良好效用指示ADC之有效旁觀者效應。

【0464】

實例13：ADC1於胃癌PDX小鼠模型中之效用

在來源於人類病患之胃癌異種移植模型GAX066 (Shanghai ChemPartner Co., Ltd)中評估活體內抗腫瘤效用。將腫瘤片段皮下植入免疫缺陷雌性小鼠(Nu/Nu小鼠，Beijing Vital River Lab Animal Technology Co. Ltd, 18至22 g)之右側腹內。當腫瘤達成220 mm^3之平均體積時，6隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)或用ADC1 (3或10 mg/kg；第0天)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用式L×(W^2)/2計算腫瘤體積。

【0465】 使用3或10 mg/kg ADC1之單次處理引起對體重無影響(資料未顯示)之顯著抗腫瘤效應(圖31)。在六個腫瘤之五者中，用10 mg/kg處理導致腫瘤完全消退。

【0466】

實例14：ADC1相較於ADC3在來源於胰細胞系之腫瘤模型中之效用

已在來源於人類胰細胞系之異種移植模型HPAF-II (ATCC，CRL-1997)中評估ADC1相較於ADC3之效用。將5x10^{6}個HPAF-II細胞皮下注入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(Hsd:無胸腺裸Foxn1nu, Envigo)之右側腹內。當腫瘤達成150 mm^{3}之平均體積時，10隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)或ADC1 (1 mg/kg或6 mg/kg；第0天)或用ADC3 (1 mg/kg或6 mg/kg；第0天)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用L×(W^2)/2計算腫瘤體積。

【0467】 使用6 mg/kg之劑量之ADC1之單次處理導致顯著之抗腫瘤效應。該效應係劑量依賴性的，因為僅使用1 mg/kg之單次處理導致輕微但顯著、短暫之抗腫瘤效應。相比之下，使用相同劑量之ADC3之單次處理在任一劑量下均未顯示顯著之抗腫瘤效應(圖32)。所有處理對體重均無顯著影響(資料未顯示)。預期在此方面與ADC1一樣，ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M及ADC7-M與ADC3相比同樣有利。

【0468】

實例15：ADC1相較於ADC SAR DM4於兩個CRC PDX小鼠模型中之效用

在來源於人類病患之CRC異種移植模型COPF230及REPF210 (Shanghai LideBiotech CO., LTD)中評估活體內抗腫瘤效用。將腫瘤片段皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu, Charles River)之右側腹內。當腫瘤達成約170 mm^{3}之平均體積時，6隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)、ADC1 (6 mg/kg)或ADC SAR DM4 (6 mg/kg) (第0天)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用式L×(W^2)/2計算腫瘤體

積。

【0469】 使用ADC1之單次處理在兩個PDX模型COPF230 (圖33)及REP F210 (圖34)中均導致顯著之抗腫瘤效應。相比之下，使用相同劑量ADC SAR DM4之單一處理在CRC PDX模型之任一者中均不顯示抗腫瘤效應(圖33、圖34)。在處理組之任一者中未觀察到對體重有顯著影響(資料未顯示)。預期在此方面與ADC1一樣，ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M及ADC7-M與ADC SAR DM4相比同樣有利。

【0470】

實例16：ADC1相較於ADC SAR DM4在胃PDX小鼠模型(GAPF313)中之效用

在來源於人類病患之胃異種移植模型GAPF313 (Shanghai LideBiotech CO., LTD)中評估活體內抗腫瘤效用。將腫瘤片段皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu, Charles River)之右側腹內。當腫瘤達成約180 mm^3之平均體積時，6隻小鼠/組自第0天起每兩週用媒介物(鹽水溶液)、ADC1 (4 mg/kg或7 mg/kg Q2Wx3)或ADC SAR DM4 (4.7 mg/kg Q2Wx3)靜脈內處理3次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用式L×(W^2)/2計算腫瘤體積。

【0471】 進行中之實驗之臨時資料分析證實ADC1在此模型中之明顯抗腫瘤效用且ADC SAR DM4無影響(圖35)。所有處理均耐受良好(資料未顯示)。預期在此方面與ADC1一樣，ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M及ADC7-M與ADC SAR DM4相比同樣有利。

【0472】

實例17：ADC1之安全性概況-食蟹獼猴中之前導性毒性研究

為研究安全性概況，藉由以0、3、10及30 mg/kg之劑量對食蟹獼猴靜脈內輸注30 min投與ADC1，以3週時間間隔輸注三次(在第1、22及43天)，並在第50天處死動物用於大體及組織病理學檢查。因此，發現ADC1具有相對有利之安全性概況，因為ADC1在受已知ADC之毒副作用影響之某些器官中缺乏毒性。

【0473】

實例18：經修飾之抗體及轉麩醯胺酸酶之表現及純化

在下文中，將描述經修飾之抗體之表現及純化。此等經修飾之抗體可用於產生各別抗體-藥物-結合物。下表4中概述經修飾之抗體mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb4-M、mAb5-M、mAb6-M及mAb7-M之特徵：

抗體/抗體-藥物結合物名稱	**抗體特徵**	**抗體-藥物結合物特徵，包括較佳之藥物與抗體比、連接子類型及藥物**	**mAb抗體之重鏈(HC)及輕鏈(LC)之胺基酸序列**
mAb1-M、 ADC1-M	抗CEACAM5 mAb LALA突變 YTE突變	鏈間半胱胺酸結合 DAR=8 馬來醯亞胺基-b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1)	HC = SEQ ID NO: 34 LC = SEQ ID NO: 14
mAb2-M、 ADC2-M	抗CEACAM5 mAb LALA突變 YTE突變 MTG Tag	MTG偶合 DAR=4 NH2-GGG-b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 34 LC = SEQ ID NO: 36
mAb3-M、 ADC3-M	抗CEACAM5 mAb LALA突變 YTE突變 K222R突變(MTG最佳化) MTG Tag	MTG偶合 DAR=4 NH2-GGG-b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 35 LC = SEQ ID NO: 36
mAb4-M、 ADC4-M	基於抗CD20利妥昔單抗之同型對照	鏈間半胱胺酸結合 DAR=8 馬來醯亞胺基-b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1)	HC = SEQ ID NO: 64 LC = SEQ ID NO: 65 (利妥昔單抗mAb)

mAb5-M、 ADC5-M	基於抗CD20利妥昔單抗之同型對照 LALA突變 MTG Tag	MTG偶合 DAR=4 NH2-GGG-b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 40 LC = SEQ ID NO: 41
mAb6-M、 ADC6-M	抗CEACAM5 mAb LALA突變	鏈間半胱胺酸結合 DAR=8 馬來醯亞胺基b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1)	HC = SEQ ID NO: 51 LC = SEQ ID NO: 14
mAb7-M、 ADC7-M	抗CEACAM5 mAb LALA突變 MTG Tag	MTG偶合 DAR=4 NH2-GGG-b-葡萄糖醛酸-依喜替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 51 LC = SEQ ID NO: 36

表4

【0474】合成編碼抗體mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb5-M、mAb6-M及mAb7-M之DNA序列並選殖至pTT5質體上用以於GeneArt (Life Technologies)處進行重組表現。使用ExpiCHO表現系統(GibcoTM, Thermo Fisher Scientific Inc.)於搖瓶中使用所產生之質體瞬時轉染及重組蛋白表現。轉染後七天，收穫上清液並使用標準分步方法純化經表現之抗體，該方法包括蛋白A親和層析術(HiTrap mAbSelect SuRe管柱，Cytiva)及粒徑排阻層析術(HiLoad Superdex 200 pg管柱，Cytiva)。

【0475】以醫藥品級品質購買mAb4-M/利妥昔單抗(F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland)。

【0476】

轉麩醯胺酸酶之表現及純化

合成編碼轉麩醯胺酸酶酶mTG (Seq ID 46)之DNA序列並選殖至pET30a質體上用以於GeneArt (Life Technologies)處重組表現。在28℃及130 rpm (50 mm落差)下在搖瓶中於用5 g/l葡萄糖、10 ml/100 ml 10x磷

酸鹽緩衝鹽水及30 mg/l卡那黴素(kanamycin)補充之溶原性肉湯培養基中將經產生之質體轉形之大腸桿菌(Escherichia coli) BL21 (DE3)菌株培養整夜。使用此培養物以接種含有9.5 l公升生長培養基(50 g/l酵母提取物、10 g/l蛋白腖、0.5 g/l $MgSO_4$ x 7 H_2O及2 ml 50% Desmophen (由Rhein Chemie Rheinau生產之消泡劑)之發酵槽至0.00002之光學密度。該發酵槽係在28℃下以800 U/min轉速，5 Nl/min通氣量及pH 7.0至7.4運行整夜(16 h)。於OD 5，用0.1 mM IPTG誘導該培養物直至達成~30之OD (5至6小時)。在泡沫形成或氧濃度降至低於2 mg/ml之情況下，分別添加更多Desmophen，或將轉速增加至1000 rpm。藉由連續流通離心收穫細胞塊。

【0477】 將50 g細胞集結粒重新懸浮於250 ml 50 mM乙酸Na、1 mM DTT、5 mM $MgCl_2$、25 U/ml Benzonase (Millipore) pH 5.5中並使用法式壓碎機(French Press)破壞。上清液藉由離心及過濾(0.8/0.2 μm孔徑)澄清，pH調整至5.5並裝載於Fractogel® SO3- (M) 85 ml管柱(Millipore)上，接著以20 CV自0至1 M NaCl之線性梯度溶析。具有預期尺寸之經純化之蛋白質之溶離份藉由SDS-PAGE鑑別，混合並在4℃下針對50 mM Tris/HCl、300 mM NaCl，pH 8.0透析整夜。然後使用0.5 U/ml Dispase®I (Sigma Aldrich)及2 mM $CaCl_2$在37℃下以2 mg/ml之最終濃度將轉麩醯胺酸酶蛋白水解處理60 min，接著添加5 mM EDTA。在4℃下針對50 mM磷酸鈉緩衝液pH 6.0將該反應混合物透析整夜，裝載於Fractogel® SO3管柱(Millipore)上並以20 CV自0至1 M NaCl之線性梯度溶析。具有有效裂解及純化之蛋白質之溶離份藉由SDS-PAGE鑑別，混合，濃縮並使用HiLoad Superdex 75pg粒徑排阻管柱(Cytiva)用24

HEPES pH 7，100 mM NaCl作為電泳緩衝液純化。將含有轉麩醯胺酸酶之溶離份混合，濃縮至>20 mg/ml，於液氮中快速冷凍並儲存在-80℃下。使用ZediXclusive微生物轉麩醯胺酸酶分析(Zedira)測定酶活性。

【0478】

實例19：ADC1-M、ADC4-M及ADC6-M之ADC製備、結合及表徵

19.1.抗體製備及結合

【0479】 將調配於50 mM組胺酸、100 mM NaCl，pH 6.5中之單株抗體(mAb)儲存在-80℃下。在結合前，在室溫下解凍mAb並經由用調配物緩衝液稀釋將蛋白質濃度調整至5 mg/ml。隨後，添加10至12莫耳當量過量(相對於該mAb)之TCEP減少mAb並在37℃下培養2至3 h。添加16至24莫耳當量(相對於該mAb)之DL1 (於DMSO中之10 mM儲備溶液中)並在25℃下培養60 min。添加25莫耳當量(相對於該mAb)之N-乙醯基-半胱胺酸(來自25 mM DMSO儲備溶液)淬滅該反應混合物並在25℃下培養30 min。經由粒徑排阻層析術(SEC)自DL1及可能之高分子量物種(HMWS)分離ADC。在SEC純化前，以4000 x g將樣本離心2 min以移除可能之沈澱。使用HiLoad Superdex 200 26/60 Increase管柱與Äkta LC系統(Cytiva)之組合以2.5 ml/min之流動速率及50 mM組胺酸、100 mM NaCl，pH 6.5作為電泳緩衝液進行SEC。將含有ADC材料之分級樣本混合並使用Amicon Ultra 15 50K離心機(Millipore)濃縮至6 mg/ml，接著使用HiTrap脫鹽管柱與Äkta LC系統(Cytiva)之組合將最終緩衝液交換為10 mM組胺酸、40 mM NaCl、6%海藻糖、0.05%吐溫，pH 5.5。使最終原料藥(BDS)濾過0.22 μm無菌過濾裝置(Millipore)並於液氮中休克冷凍直至進一步使用。

【0480】

19.2.品質屬性

ADC1-M

濃度[mg/ml]	6.0
藥物與抗體比	8.16
純度SEC [%]	98.9
游離藥物含量[%]	0.08
內毒素含量[EU/mg]	1.84

ADC6-M

濃度[mg/ml]	7.09
藥物與抗體比	8.14
純度SEC [%]	100
游離藥物含量[%]	0.01
內毒素含量[EU/mg]	0.39

ADC4-M

濃度[mg/ml]	5.82
藥物與抗體比	7.87
純度SEC [%]	97.8
游離藥物含量[%]	0.03
內毒素含量[EU/mg]	0.13

【0481】

9.3原料藥表徵

【0482】 粒徑排阻層析術(SEC)方法

藉由粒徑排阻層析術於Waters Bio Resolve SEC mAb管柱上評估單體含量及純度。

波長　　214 nm

管柱　　Waters Bio Resolve SEC mAb管柱，200 Å，2.5 μm，4.6 x 150 mm

移動相　　50 mM磷酸二氫鈉

0.4 M過氯酸鈉，pH 6.3

注射體積　5 μL

管柱溫度　25℃

流動速率　0.35 mL/min

顯示輸入mAb及最終BDS之純度之典型SEC層析圖係顯示於圖36中。

逆相HPLC (RP HPLC)方法

RP HPLC方法參數

波長　214 nm

管柱　PLRP-S 1000 Å (50 x 2.1 mm，8 μm)管柱，Agilent

移動相A　Lichrosolv H_2O + 0.1% TFA

移動相B　100% AcN + 0.1% TFA

梯度　7.5 min內30至45% B

注射體積10 μL

管柱溫度65℃

流動速率　1.0 mL/min

樣本製備　將40 μl樣本(2.2 mg/ml)與4 μl 0.5 M TCEP混合並在室溫下培養5 min。然後，添加40 μl之0.5 M碘乙醯胺並在37℃下培養15 min。注射10 μl之此反應物。

【0483】 繪示最終BDS之DAR測定之典型RP-HPLC層析圖係顯示於圖37中。

游離藥物方法

波長 254 nm

管柱 Phenomenex Gemini，C18，2 x 150 mm，3 μm (P/N 00F-4439-B0)

移動相A 0.1%甲酸於水中

移動相B 0.1%甲酸於乙腈中

梯度

時間(min)	MPA (%)	MPB (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射體積10.00 μL

管柱溫度50℃

流動速率 0.75 mL/min

樣本製備蛋白質滴：100 μL原料藥 + 250 μL冷MeOH + 50 μL 3 M MgCl2。在20,000 rpm下旋轉10 min。

【0484】標準品製備 將20 μL 20 mM DL (MSC2702209A於DMSO中) + 20 μL DMSO + 40 μL MeOH + 20 μL 200 mM NAC混合於滲濾緩衝液中。培養整夜以提供4 mM DL-NAC。將4 mM DL-NAC稀釋於MeOH中以提供4 μM DL-NAC標準品。

【0485】

內毒素表徵

使用Endosafe PTS內毒素系統(Charles River)藉由動力學顯色LAL分析測定內毒素。將緩衝液及抗體10倍稀釋於LAL試劑水中。將ADC 10倍稀釋於LAL試劑水中。所有樣本均於0.01至1 EU/mL匣上分析。藉由除以ADC [P] mg/mL將EU/mL值轉化為EU/mg。

【0486】

實例20：ADC7-M、ADC2-M、ADC5-M及ADC3-M之ADC製備、結合及表徵

【0487】

20.1.抗體製備及結合

將單株抗體(mAb)儲存在-80℃下。在結合前，在室溫下解凍mAb並使用HiTrap脫鹽管柱與Äkta液相層析術(LC)系統(Cytiva)之組合將緩衝液交換成24 mM HEPES，pH 7.0。為將藥物連接子(DL)偶合至該抗體，使用微生物轉麩醯胺酸酶(mTG)。反應設定如下：5 mg/ml mAb，每個結合位點5莫耳當量之DL1-M，20 U/ml mTG，7% DMSO，24 mM HEPES，pH 7.0。該反應係在37℃下進行18 h。經由粒徑排阻層析術(SEC)自DL及mTG分離ADC。在SEC純化前，使用5 M NaCl儲備溶液將樣本之NaCl濃度調整至100 mM。使用HiLoad Superdex 200 26/60 Increase管柱與Äkta LC系統(Cytiva)之組合以2.5 ml/min之流動速率及10 mM組胺酸、100 mM NaCl，pH 5.5作為電泳緩衝液進行SEC。將含有ADC材料之分級樣本混合並使用Amicon Ultra 15 50K離心機(Millipore)濃縮至8 mg/ml，接著使用HiTrap脫鹽管柱與Äkta LC系統(Cytiva)之組合將最終緩衝液交換為10 mM組胺酸、40 mM NaCl、6%海藻糖、0.05%吐溫，pH 5.5。使最終原料藥(BDS)濾過0.22 μm無菌過濾裝置(Millipore)並於液氮中休克冷凍直至進一步使用。

【0488】

20.2品質屬性

ADC7-M

濃度[mg/ml]	7.11
藥物與抗體比	3.87
純度SEC [%]	99.9
游離藥物含量[%]	0.12
內毒素含量[EU/mg]	0.34

ADC2-M

濃度[mg/ml]	6.9
藥物與抗體比	3.86
純度SEC [%]	99.7
游離藥物含量[%]	0.03
內毒素含量[EU/mg]	0.19

ADC3-M

濃度[mg/ml]	7.98
藥物與抗體比	4.2
純度SEC [%]	100
游離藥物含量[%]	0.13
內毒素含量[EU/mg]	0.14

ADC5-M

濃度[mg/ml]	5.92
藥物與抗體比	3.88
純度SEC [%]	99.8
游離藥物含量[%]	0.15
內毒素含量[EU/mg]	>0.5

【0489】

20.3.方法：原料藥表徵

粒徑排阻層析術(SEC)方法

藉由粒徑排阻層析術於TOSOH TSKgel管柱上評估單體含量及純度。注射體積在1至5 µl之範圍內(高達10 µg蛋白質)。

波長 214 nm

管柱　Tosoh TSKgel 7.8 mm x 300 mm，5 μm

移動相　50 mM磷酸二氫鈉、0.4 M過氯酸鈉，pH 6.3

注射體積1至5 μL

管柱溫度25℃

流動速率　0.5 mL/min

顯示輸入mAb及最終BDS之純度之典型SEC層析圖係顯示於圖38中。

逆相HPLC (RP HPLC)方法

RP HPLC方法參數

波長　214 nm

管柱　PLRP-S 1000 Å (50 x 2.1 mm，8 μm)管柱，Agilent

移動相A Lichrosolv H_2O + 0.1% TFA

移動相B 100% AcN + 0.1% TFA

梯度　7.5 min內30至45% B

注射體積10 μL

管柱溫度65℃

流動速率　1.0 mL/min

樣本製備將40 μl樣本(2.2 mg/ml)與4 μl 0.5 M TCEP混合並在室溫下培養5 min。然後，添加40 μl之0.5 M碘乙醯胺並在37℃下培養15 min。注射10 μl之此反應物。

【0490】 繪示最終BDS之DAR測定典型RP-HPLC層析圖係顯示於圖39中。

【0491】

游離藥物方法

波長 254 nm

管柱 Phenomenex Gemini，C18，2 x 150 mm，3 μm (P/N 00F-4439-B0)

移動相A 0.1%甲酸於水中

移動相B 0.1%甲酸於乙腈中

梯度

時間(min)	MPA (%)	MPB (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射體積10.00 μL

管柱溫度50℃

流動速率 0.75 mL/min

樣本製備蛋白質滴：100 μL原料藥 + 250 μL冷MeOH + 50 μL of 3 M MgCl2。在20,000 rpm下旋轉10 min。

【0492】標準品製備 將20 μL 20 mM DL (MSC2702209A於DMSO中) + 20 μL DMSO + 40 μL MeOH + 20 μL 200 mM NAC混合於滲濾緩衝液中。培養整夜以提供4 mM DL-NAC。將4 mM DL-NAC稀釋於MeOH中以提供4 μM DL-NAC標準品。

【0493】

內毒素表徵

使用Endosafe PTS內毒素系統(Charles River)藉由動力學顯色LAL分析測定內毒素。將緩衝液及抗體10倍稀釋於LAL試劑水中。將ADC 10倍稀釋於LAL試劑水中。所有樣本均於0.01至1 EU/mL匣上分析。藉由除

以ADC [P] mg/mL將EU/mL值轉化為EU/mg。

【0494】

實例21： ADC1-M及ADC2-M以高效力活體外特異性殺死癌細胞

使用人類癌細胞系以評估ADC1-M及ADC2-M殺死癌細胞之潛力。ADC1-M及ADC2-M分別針對不同CEACAM5陽性細胞系顯示亞奈莫耳及亞奈莫耳至個位數奈莫耳活體外效力(**表3**)。相反，ADC1-M及ADC2-M對CEACAM5陰性細胞系MDA-MB-231之影響較小(**表3**)。如例示性劑量反應曲線中顯示，ADC1-M及ADC2-M針對CEACAM5陽性細胞系SK-CO-1、SNU-16、MKN-45及LS174T (**圖40a至d及圖41a至d**)係非常有效的。相反，ADC1-M及ADC2-M對抗原陰性MDA-MB-231細胞存活率僅有較小影響(**圖40e及41e**)。

【0495】 利用相同連接子有效載荷作為ADC1-M及ADC2-M之同型對照ADC對測試之CEACAM5陽性細胞系顯示低得多的影響(**圖40及圖41**)。

【0496】 總之，ADC1-M及ADC2-M以高效力活體外特異性殺死表現CEACAM5之人類癌細胞系。

	SK-CO-1 IC50 [M]； N≥2	**SNU-16 IC50 [M]； N≥2**	**MKN-45 IC50 [M]； N≥2**	**LS174T IC50 [M]； N≥2**	**MDA-MB-231 IC50 [M]； N≥3**
ADC1-M	7.6E-11 (-95%)	3.6E-10 (-97%)	5.2E-10 (-96%)	6.0E-10 (-86%)	>1E-08 (-71%)
ADC2-M	1.1E-10 (-92%)	5.1E-9 (-78%)	1.2E-9 (-80%)	8.5E-10 (-67%)	n/a (-16%)
有效載荷	2.2E-10 (-97%)	2.9E-10 (-99%)	6.6E-10 (-100%)	3.0E-10 (-91%)	6.0E-10 (-91%)
CEACAM5	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性

表3：ADC1-M、ADC2-M及游離有效載荷針對多種人類細胞系之效

力。在最高測試化合物濃度下相較於未處理之對照之最大效應指示於括號中。效力報告之截止值-50%效應，否則說明「n/a」。針對各細胞系，指示CEACAM5表現。

【0497】

方法-存活率分析：

藉由細胞存活率分析量測ADC對癌細胞系之細胞毒性效應。在處理前一天，以90 μL之體積將細胞接種於96孔盤中。測試化合物(ADC或游離有效載荷)係以起始濃度之10倍調配於細胞培養基中。將測試化合物連續稀釋(1:4)並將10 μL各稀釋液一式三份添加至該等細胞。在37℃下於CO2培養器中將盤培養六天。對於細胞存活率量測，將細胞Titer-Glo®試劑(Promega™ Corp, Madison, WI)添加至各孔，並根據製造商之說明書處理盤。使用Varioskan讀盤器(Thermo Fisher)量測發光訊息。將發光讀數轉化為相對於未處理之細胞之存活率%。用非線性回歸分析、使用對數(抑制劑)相比於反應、可變斜率、使用Genedata Screener或GraphPad Prism之4參數擬合方程擬合資料。資料顯示為相對細胞存活率%相比於莫耳化合物濃度，誤差槓指示一式兩份或一式三份之標準偏差(SD)。計算來源於多個實驗之IC50之幾何平均值。

【0498】 ADC1-M及ADC2-M亦與ADC SAR DM4就其等對抗原陽性SK-CO-1及抗原陰性MDA-MB-231細胞系之細胞毒性效應進行比較。ADC1-M及ADC2-M顯示與ADC SAR DM4針對SK-CO-1癌細胞之相似效力(圖40a及圖41a，相較於圖26a)。相較於ADC1-M及ADC2-M，ADC SAR DM4對抗原陰性MDA-MB-231之非特異性效應更高(圖40e及圖41e，相較於圖26b)及ADC2-M之差異比ADC1-M更明顯。

【0499】 ADC1-M及ADC2-M亦係利用缺乏YTE突變之抗體主鏈產生。此等ADC (ADC6-M及ADC7-M)均顯示類似具有YTE突變之各別ADC (ADC1-M及ADC2-M)之可比較結果。

【0500】

實例23：ADC之藥動性研究

在單次靜脈內投與3 mg/kg ADC1、ADC1-M、ADC6-M、ADC7-M、ADC2-M後，於人類FcRn轉基因(276個半合子模型)小鼠中進行藥動性研究。在給藥後1、24、48、72、144、168、240、336及504 h，自ADC1-M、ADC6-M、ADC7-M及ADC2-M之每個治療組6隻動物，及在給藥後0.08 (約5分鐘)、4、24、48、72、168、240、336及504 h針對ADC1自9隻動物採集樣本。匯總資料用於PK分析，參見圖42中每次治療之血漿濃度。對時間0之血漿濃度(C0)反向外推導致略低於ADC1-M、ADC7-M及ADC2-M之理論最大濃度，且接近於ADC6-M及ADC1之理論最大濃度(假定以40 mL/kg血漿體積稀釋)。該血漿濃度以雙相概況下降：於所有分子組中，觀察到血漿濃度之急劇下降長達24 h，接著較緩慢之下降長達最後一次採樣時間(504 h)，除經ADC6-M治療之動物外，其可定量長達336 h。

【0501】 針對ADC2-M (190 h) (DAR=4之Lala-YTE突變體)，接著ADC7-M (122 h) (DAR=4之Lala突變體)，ADC1-M (64.5 h) (DAR=8之Lala-YTE突變體)及ADC6-M (33.8 h) (DAR=8之Lala突變體)及最後ADC1 (29.6 h) (DAR=8之IgG1.4)計算最長終末半衰期(t1/2)值。外推AUCinf之%係低於20%，容許可靠地計算AUC0-inf及推導之參數(Cl、Vz及Vss)。計算ADC2-M (Lala-YTE突變體，DAR=4)，接著ADC7-M、

ADC6-M、ADC1-M及ADC1於轉基因小鼠中的最高AUC0-inf及最低Cl值。該等AUC0-inf及Cl值分別在1360000至10200000 h*ng/mL及0.293至1.16 mL/h/kg之範圍內。針對49.8至113 mL/kg之範圍內之Vss未觀察到分佈體積(Vss)之相關差異。

【0502】 總之，於轉基因小鼠中單次靜脈內投與3 mg/kg後，由ADC2-M顯示最高血漿曝露、最低Cl及最長t1/2的最佳PK概況。PK概況藉由自IgG1.4移動至Lala突變體改善，進一步藉由包括YTE突變體，藉由將DAR自8減小至4觀察到最強效應。

【0503】 表5：3 mg/kg靜脈內投與後Ceacam5備用分子之PK參數。亦指示抗體-藥物-結合物(ADC)及藥物與抗體比(DAR)。

劑量_(mg/kg)	ADC	抗體主鏈	DAR	菌株	t1/2 (h)	C0 (ng/mL)	Tlast (h)	Clast (ng/mL)	AUClast (h*ng/mL)	AUCinf (h*ng/mL)	%_Ext (%)	Vz (mL/kg)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)
3	ADC 1	IgG1.4	8	HuFcRn	29.6	76800	240	74.4	1360000	1360000	0.2	93.9	2.20	65.8
3	ADC 1-M	Lala-YTE突變體	8	HuFcRn	64.5	49900	504	1190	2580000	2590000	0.4	108	1.16	113
3	ADC 2-M	Lala-YTE突變體	4	HuFcRn	190	56100	504	6810	8360000	10200000	18.4	80.2	0.293	87.7
3	ADC 6-M	Lala突變體	8	HuFcRn	33.8	84100	336	52.0	2850000	2850000	0.1	51.3	1.05	49.8
3	ADC 7-M	Lala突變體	4	HuFcRn	122	55800	504	2400	5720000	6140000	6.9	86.0	0.488	93.4

【0504】

實例24：ADC1-M及ADC2-M在來源於胰細胞系之腫瘤模型中之效用

已於來源於人類胰細胞系之異種移植模型BxPC3 (ATCC，CRL-1687)中評估ADC1-M及ADC2-M之效用。將5x106個BxPC3細胞皮下注

入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(Hsd:無胸腺裸Foxn1nu, Envigo)之右側腹內。當腫瘤達成85 mm^3之平均體積時，10隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)或ADC1-M (5 mg/kg；第0天)或用ADC2-M (5 mg/kg或10 mg/kg；第0天)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用L×(W^2)/2計算腫瘤體積。

【0505】 使用5 mg/kg之劑量之ADC1-M及使用5 mg/kg或10mg/kg之劑量之ADC2-M之單次處理導致顯著之抗腫瘤效應。兩種ADC於此模型中均具有可比較之效用(圖43)。該等處理對體重無顯著影響(資料未顯示)。

【0506】

實例25：ADC8 (ADC拉貝珠單抗哥維坦(labetuzumab govitecan)之類似物)之製備

25.1抗體

【0507】 出於其他比較實驗之目的，基於具有下列序列之單株抗體製備ADC拉貝珠單抗哥維坦之另一類似物：

重鏈：DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TSVAWYQQKP GKAPKLLIYW TSTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YSLYRSFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GECEVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCSASGF DFTTYWMSWV RQAPGKGLEW IGEIHPDSST INYAPSLKDR FTISRDNAKN TLFLQMDSLR PEDTGVYFCA

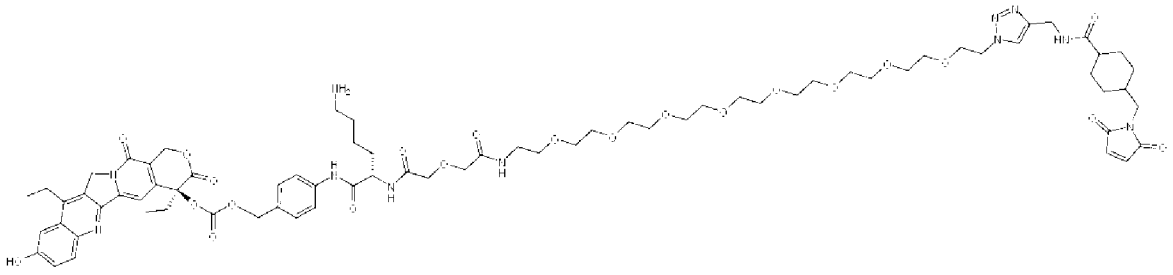
SLYFGFPWFA YWGQGTPVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 62)

輕鏈：DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TSVAWYQQKP GKAPKLLIYW TSTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YSLYRSFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 63)

【0508】

25.2藥物-連接子化合物

作為結合至上文提及之抗體之藥物-連接子分子，使用具有下列結構之分子：



此藥物-連接子分子可自SyntaBio LLC, 10239 Flanders Ct, San

Diego, CA 92121.批號S041070422購買獲得。

【0509】

25.3結合

在結合前在2至8℃下將單株抗體(mAb)解凍長達3天並在2至8℃下儲存於PBS pH 6.8中直至進一步使用。在結合當天，該mAb溶液之pH藉由添加0.5 M Tris、0.025 M EDTA，pH 8.5調整至5% (v/v)之最終濃度。在pH調整後，使用10莫耳當量之TCEP減少該mAb並在20℃下培養120 min。隨後，該mAb溶液用20 mM組胺酸、80 mM NaCl，pH 5.5 1:1稀釋，將DMSO濃度調整至 10% (v/v)並添加16莫耳當量之上文提及之藥物-連接子以開始反應。在20℃下將該反應培養60 min且最後藉由添加100 mM NAC (正乙醯基-半胱胺酸)淬滅。然後，經結合之mAb (即ADC)經由製備型粒徑排阻層析術處理。

【0510】

25.4製備型粒徑排阻層析術、脫鹽及過濾

使用製備型粒徑排阻層析術純化反應混合物。將GE HiLoad 26/60 Superdex S200管柱連接至Äkta Avant 25系統(GE Healthcare)並用20 mM組胺酸、80 mM NaCl，pH 5.5根據製造商之說明書平衡。隨後，注入該反應混合物並以5 ml/min之流動速率使用20 mM組胺酸、80 mM NaCl，pH 5.5作為電泳緩衝液運行通過該管柱。含有ADC之溶離份經由在280 nm下的UV光吸收測定，混合並濃縮。ADC材料係使用Vivaspin VS2022裝置(Sartorius UK Ltd.)根據製造商之說明書濃縮。使用HiPrep 26/10脫鹽管柱(GE Healthcare)以10 ml/min之流動速率於Äkta Avant 25系統(GE Healthcare)上根據製造商之說明書將該經濃縮之ADC材料轉移至調配物

緩衝液(10 mM組胺酸、100 mM NaCl、3%海藻糖、0.05% (w/v) PS20，pH 5.5)內。最終ADC材料係使用0.2 μm過濾器(0.2 μm PES過濾器，Merck Millipore)過濾，等分及後續於液氮中休克冷凍。該ADC材料(原料藥)之最終濃度係7.7 mg/ml。該材料保持在-80℃下直至進一步使用。由此工作產生之ADC於本文中稱為「ADC8」；此ADC係拉貝珠單抗哥維坦之類似物。

【0511】

25.5 ADC8原料藥之進一步表徵

上文獲得之ADC8原料藥藉由(a)粒徑排阻層析術(SEC)進一步分析，顯示99.3%之單體純度，(b)逆相HPLC (RP HPLC)，顯示7.7之DAR，及(c)基於RP HPLC之游離藥物方法，顯示殘餘之游離藥物濃度低於0.02%(以莫耳比計)。

【0512】

實例26：ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M以比ADC SAR DM4及ADC8更高之特異性殺死癌細胞

使用與實例21中描述之方法相同之方法，使用人類癌細胞系來比較ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M，及ADC SAR DM4及ADC8對具有CEACAM5表現之癌細胞之影響相對於對缺乏CEACAM5表現之癌細胞之影響。藉由將針對CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞之IC50除以針對各CEACAM5陽性細胞系之IC50來計算IC50之倍數減少，定義為特異性因子(參見表6)。該特異性因子之值越大，則經測試之ADC之特異性越大。ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M於CEACAM5陽性SK-CO-1、SNU-16及MKN-45細胞比於CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞中

顯示低得多的IC50，此導致於116至874之範圍內之特異性因子。ADC2-M及ADC7-M之特異性因子可經低估，因為於經測試之濃度範圍內缺乏對MDA-MB-231細胞之影響(如表3及圖41e中針對ADC2-M顯示)。出於此原因，僅針對ADC2-M及ADC7-M，將該IC50設定為100 nM之最高測試濃度以計算特異性因子。相反，ADC SAR DM4及ADC8分別於26至73及1.8至4.8之範圍內顯示更低之特異性因子。總之，顯示活體外ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M相較於ADC SAR DM4及ADC8對CEACAM5陽性癌細胞更具選擇性殺死。

	SK-CO-1 N≥2	**SNU-16 N≥2**	**MKN-45 N≥2**	**MDA-MB-231 N≥2**
ADC1-M	874.4	241.9	201.2	1
ADC2-M	>631.9	>207.2	>166.6	1
ADC6-M	710.2	194.9	157.7	1
ADC7-M	>595.8	>178.9	>116.2	1
ADC SAR DM4	46.5	73.2	26.0	1
ADC8	4.8	1.8	2.5	1
CEACAM5	陽性	陽性	陽性	陰性

表6：ADC在CEACAM5陽性細胞系中相較於在CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞系中之相對效力增加(特異性因子)。將MDA-MB-231之IC50除以三種CEACAM5陽性細胞系中之各者之IC50以計算各ADC之各別特異性因子(針對MDA-MB-231報告1之理論因子，僅用於說明)。計算係基於2至4次個別實驗之IC50幾何平均值。

【0513】

實例27：相較於ADC SAR DM4，ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M介導針對與抗原陽性細胞共培養的抗原陰性細胞之更有效之

旁觀者效應

使用與實例10中相同之方法，於旁觀者分析中評估ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M及ADC SAR DM4介導針對靠近抗原陽性細胞之抗原陰性細胞之旁觀者效應之潛力。ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M在CEACAM5陽性SK-CO-1之存在下顯示針對CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞之有效旁觀者效應(圖44)。共培養實驗係在1 nM之ADC濃度下進行，該濃度對於ADC1而言引起CEACAM5陽性SK-CO-1細胞存活率之最大抑制(圖26A)但對單獨CEACAM5陰性MDA-MB-231細胞無影響(圖26B)。與此等發現一致，在僅MDA-MB-231對照之旁觀者分析設定中，未觀察到ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M及ADC SAR DM4之非特異性效應。

【0514】 總之，ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M介導針對與抗原陽性細胞共培養之抗原陰性癌細胞之有效旁觀者效應。此等發現指示有效靶向具有異質性標靶表現之腫瘤之潛力。

【0515】 相較於ADC SAR DM4，ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M及ADC7-M介導對與抗原陽性細胞共培養之抗原陰性細胞之有效得多之旁觀者效應(圖44)。

【0516】 針對所有經測試之ADC，旁觀者效應之程度隨添加至恆定數量之抗原陰性細胞之抗原陽性細胞之數量增加而增加。不希望受理論之束縛，此可為更多ADC經較高數量之抗原陽性細胞處理以釋放更多游離有效載荷之結果，此造成對抗原陰性細胞之旁觀者效應。

【0517】 在旁觀者分析中，在1E-9M測試濃度下，針對所有經測試之ADC，未觀察到經測試之ADC對單獨MDA-MB-231細胞之非特異性效

應。

【0518】

實例28：ADC1-M及ADC3-M相較於ADC8之效用

在來源於人類胰臟腺癌細胞系之異種移植模型HPAF-II (ATCC，CRL-1997)中評估ADC1-M及ADC3-M相較於ADC8之效用。將5x10^{6}個HPAF-II細胞皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(Hsd:無胸腺裸Foxn1nu, Envigo)之右側腹內。當腫瘤達成150 mm^{3}之平均體積時，10隻小鼠/組用ADC1-M (1 mg/kg或6 mg/kg)或用ADC3-M (1 mg/kg或6 mg/kg)或用ADC8 (1 mg/kg或6 mg/kg)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用L×W^2/2計算腫瘤體積。

【0519】 相較於媒介物對照，使用1或6 mg/kg之劑量之ADC1-M或ADC3-M單次處理導致顯著抗腫瘤效應。該效應係劑量依賴性的，因為使用1 mg/kg之單次處理僅導致輕微及暫時性抗腫瘤效應，而6 mg/kg顯示強得多的抗腫瘤效應。相反，使用ADC8之單次處理在任一劑量下均不顯示顯著抗腫瘤效應(圖45)。所有處理對體重均無顯著影響(資料未顯示)。

【0520】

實例29：CRC PDX小鼠模型中ADC1-M及ADC3-M相較於ADC SAR DM4之效用

ADC1-M及ADC3-M相較於ADC SAR DM4之抗腫瘤效用係於人類CRC異種移植模型COPF230中。該研究係於Lide Biotech (Shanghai)進行。將COPF230 腫瘤片段皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(Crl:NU-Foxn1nu)之右側腹內。當腫瘤達成165 mm^{3}之平均體積時，6隻小鼠/組用媒介物(鹽水溶液)或用ADC1-M、ADC3-M或ADC SAR DM4 (各6

mg/kg)靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用L×W^2/2計算腫瘤體積。

【0521】 使用6 mg/kg ADC1-M或ADC3-M之單次處理相較於媒介物對照組導致可比較且顯著之抗腫瘤效應。相反，使用6 mg/kg ADC SAR DM4之單次處理證實僅輕微之抗腫瘤效應(圖46)。所有處理對體重均無顯著影響(資料未顯示)。

【0522】

實例30：GC PDX小鼠模型中ADC1-M及ADC3-M相較於ADC SAR DM4之效用

已於人類GC異種移植模型GAPF313中評估ADC1-M及ADC3-M相較於ADC SAR DM4之抗腫瘤效用。該研究係於Lide Biotech (Shanghai)進行。將GAPF313腫瘤片段皮下植入六至八週齡免疫缺陷雌性小鼠(Crl:NU-Foxn1nu)之右側腹內。當腫瘤達成176 mm^3之平均體積時，6隻小鼠/組每隔一週(3個週期)用媒介物(鹽水溶液)或用4 mg/kg ADC1-M或ADC3-M或4.7 mg/kg ADC SAR DM4靜脈內處理一次。用卡尺量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並使用L×W^2/2計算腫瘤體積。

【0523】 使用ADC1-M或ADC3-M之多次處理相較於媒介物對照導致可比較且顯著之抗腫瘤效應。相較於ADC1-M及ADC3-M，ADC SAR DM4之有效性係顯著更低(圖47)。所有處理對體重均無顯著影響(資料未顯示)。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"  dtdVersion="V1_3"
fileName="C254223SEQA.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2023-06-09">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>WO</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-03-09</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>1193-7 PCT</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>EP</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>22161191.6</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-03-09</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">德商馬克專利公司(MERCK PATENT
GMBH)</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>MERCK PATENT GMBH</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">簡  安德爾(ANDERL, JAN)</InventorName>
 <InventorNameLatin>ANDERL, JAN</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">抗CEACAM5抗體及其結合物及用途
</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>71</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>702</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..702</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q2">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHL
FGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYP
ELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVS
ARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAH
NSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLS
VTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQEL
FISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLP
VSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPS
PQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>705</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..705</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>Macaca fascicularis</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGSPSAPLHRWCIPWQTLLLTASLLTFWNPPTTAQLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQNL
FGYIWYKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETIDFNASLLIHNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYP
ELPKPYISSNNSNPVEDKDAVALTCEPETQDTTYLWWVNNQSLPVSPRLELSSDNRTLTVFNIPRNDTTSYKCETQNPVS
VRRSDPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAH
NSATGLNRTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQDTTYLWWVNNQSLSVSSRLELSNDNRTLTVFN
IPRNDTTFYECETQNPVSVRRSDPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAAQYSWFVNGTFQQSTQEL
FIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPIEDKDAVTLTCEPVAENTTYLWWVNNQSLS
VSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTGPYECGIQNSESAKRSDPVTLNVTYGPDTPIISPPDLSYRSGANLNLSCHSDSNPS
PQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNNGAYACFVSNLATGRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSARATVGIIIGMLVGV
ALM</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DGSVSRGGYY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IYYSGST</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ARGIAVAPFDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QSVRSN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="8">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQYTNWPFT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q18">

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q20">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>328</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..328</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q22">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q24">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>447</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..447</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q26">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1404</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1404</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q30">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagaccgacaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccgggtcgaccggtga
ggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgatggct
ccgtcagcaggggtggttactacttgacctggatccgccagcacccagggaagggcctggagtggattgggtacatctat
tacagtgggagcacctacttcaacccgtccctcaggagtcgggttaccatgtcagtagacacgtctaagaaccagttctc
cctgaagctgagctctgtgactgccgcggacacggccgtgtattactgtgcgagagggatagcagtggctccctttgact
actggggccagggaaccctggtcaccgtctcttcagctagcaccaagggccccagcgtgttccccctggcccccagcagc
aagtccacaagcggaggaacagccgccctgggctgcctggtgaaggactacttccccgagcccgtgaccgtgtcctggaa
cagcggagccctgacctccggcgtgcacaccttccccgccgtgctgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtgg
tgacagtgccaagcagcagcctgggaacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggac
aagagagtggagcccaagagctgcgacaagacccatacctgtccaccctgcccagcccccccagtggccggaccctccgt
gttcctgttcccccccaagcccaaggacaccctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtga
gccacgaggacccagaggtgaagttcaattggtatgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagag
gaacagtacaacagcacctacagggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaggaatacaa
gtgcaaggtctccaacaaggccctgccctccagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccacgggagcccc
aggtgtacacactgcccccatctcgggaagaaatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggcttttac
cccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccctgtgctggacag
cgacggcagcttcttcctgtacagcaagctgaccgtggacaagtccaggtggcagcagggcaacgtgttcagctgcagcg
tgatgcacgaggccctgcacaaccactacacacagaagagcctgagcctgtcccccggctga</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>708</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..708</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q32">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgagggccctgctggctagactgctgctgtgcgtgctggtcgtgtccgacagcaagggcga
aatcgtactcacgcagtctccagccaccctgtctgtgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggaccagtcaga
gtgttcgcagcaacttagcctggtaccagcagaagcctggccaggctcccaggctcctcatctatgctgcatccaccagg
gccactggtatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagtctga
agattttgcagtttattactgtcagcagtatactaactggccattcactttcggccctgggaccaaagtggacatcaaac
gtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccagga
gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgaga
aacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt
tgatag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q34">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seq
uence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q36">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
```

```
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q38">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seq
uence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q40">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q42">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q44">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q46">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="24">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q48">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seq
uence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>450</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..450</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYAPS
TVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
```

YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_se
quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q52">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPSRF
SGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>449</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..449</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q54">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPDSSTINYAP
SLKDRFTISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_seq
uence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="28">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q56">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>441</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..441</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q58">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVT
LGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPT
CPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPI
AHEDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAE
DNYKTTPAVLDSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q60">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRDPVAPSVLLFPPSKEELTTGTATIVCVANKFYPS
DITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQSPEDNTYSLSSTLSLTSAQYNSHSVYTCEVVQGSASPIVQSFNRGDC</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q62">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="32">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q64">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDRTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV
```

TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q66">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGTLQSPP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q68">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="35">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q70">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DRTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="36">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>222</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..222</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q72">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGTLQSPP
</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="37">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1407</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1407</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q74">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaagctgcctgtcagactgctggtgctgatgttctggattcccgcctctctgtccgaggt
ccagctgcaagaatctggccctggactggtcaagccctctcagaccctgtctctgacctgcaccgtgtctgacggctctg
tttctagaggcggctactacctgacctggatcagacagcatcctggcaagggcctcgagtggatcggctacatctactac
tccggctccacctacttcaaccccagcctgagatccagagtgaccatgtccgtggacacctccaagaaccagttctccct
gaagctgtcctccgtgaccgctgctgataccgccgtgtactactgcgccagaggaatcgccgtggctccctttgattatt
ggggccagggcaccctggtcaccgtgtcctctgcttctaccaagggacccagcgtgttccctctggctccttccagcaag
tctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgtgtcttggaactc
tggcgctctgacatccggcgtgcacacctttccagctgtgctgcaatcctccggcctgtactctctgagcagcgtcgtga
ccgtgccttctagctctctgggcacccagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaag
agagtggaacccaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgctccagaagctgctggcggcccttccgt
gtttctgttccctccaaagcctaaggacaccctgtacatcacccgcgagcctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgt
ctcacgaggaccccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagag
gaacagtacaacagcacctacagagtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaa
gtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgctcctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagggaacccc
aggtttacaccctgcctccaagccgggaagagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggcttctac
ccctccgatatcgctgtggaatgggagagcaatggccagccagagaacaactacaagacaacccctcctgtgctggactc
cgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcagcagggcaacgtgttctcctgctccg
tgatgcacgaggccctgcacaatcactacacccagaagagtctgtccctgtctcctggctgatga</INSDSeq_seque
nce>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="38">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1407</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1407</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q76">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaagctgcctgtcagactgctggtgctgatgttctggattcccgcctctctgtccgaggt
ccagctgcaagaatctggccctggactggtcaagccctctcagaccctgtctctgacctgcaccgtgtctgacggctctg
tttctagaggcggctactacctgacctggatcagacagcatcctggcaagggcctcgagtggatcggctacatctactac
tccggctccacctacttcaaccccagcctgagatccagagtgaccatgtccgtggacacctccaagaaccagttctccct
gaagctgtcctccgtgaccgctgctgataccgccgtgtactactgcgccagaggaatcgccgtggctccctttgattatt
ggggccagggcaccctggtcaccgtgtcctctgcttctaccaagggacccagcgtgttccctctggctccttccagcaag
tctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgtgtcttggaactc
tggcgctctgacatccggcgtgcacacctttccagctgtgctgcaatcctccggcctgtactctctgagcagcgtcgtga
ccgtgccttctagctctctgggcacccagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaag
agagtggaacccaagtcctgcgacagaacccacacctgtcctccatgtcctgctccagaagctgctggcggcccttccgt
gtttctgttccctccaaagcctaaggacaccctgtacatcacccgcgagcctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgt
ctcacgaggaccccgaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagag
gaacagtacaacagcacctacagagtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaa
gtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgctcctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagggaacccc
aggtttacaccctgcctccaagccgggaagagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggcttctac
ccctccgatatcgctgtggaatgggagagcaatggccagccagagaacaactacaagaccacacctcctgtgctggactc
cgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcagcagggcaacgtgttctcctgctccg
```

tgatgcacgaggccctgcacaatcactacacccagaagagtctgtccctgtctcctggctgatga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>729</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..729</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q78">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaagctgcctgtcagactgctggtgctgatgttctggattcccgccagcctgtccgagat
cgtgctgactcaatctcccgccacactgtctgtgtctcccggcgaaagagctaccctgtcttgccggacatctcagtccg
tgcggtctaacctggcctggtatcagcagaagcctggacaggctcctcggctgctgatctacgctgcttctaccagagcc
acaggcatccccgccagattttctggctctggatctggcaccgagtttaccctgaccatctccagcctgcagtccgagga
tttcgccgtgtactactgccagcagtataccaactggcccttcaccttcggacccggcacaaaggtggacatcaagagaa
ccgtggccgctccttccgtgttcatcttcccaccttccgacgagcagctgaagtccggcacagcttctgtcgtgtgcctg
ctgaacaacttctaccctcgggaagccaaggtgcagtggaaagtggataacgccctgcagagcggcaactcccaagagtc
tgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgacactgtccaaggccgactacgagaagc
acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccatcagggcctgtctagccctgtgaccaagtctttcaacagaggcgagtgcggc
ggcaccttgcagtctccaccttgataa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
<INSDSeq>

```
    <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q80">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="41">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>221</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..221</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q82">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFS
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGTLQSPP<
/INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="42">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1416</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1416</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q84">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaagctgcctgtcagactgctggtgctgatgttctggattcccgccagcctgtctcaggt
ccagttgcaacaacctggcgccgagcttgtgaagcctggcgcttctgtgaagatgtcctgcaaggcctccggctacacct
tcaccagctacaacatgcactgggtcaagcagacccctggcagaggcctggaatggatcggcgctatctatcctggcaac
```

ggcgacacctcctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgaccgccgacaagtcctcttccaccgcttacatgca
gctgtccagcctgacctctgaggactccgccgtgtactactgcgcccggtctacctattatggcggcgactggtacttca
acgtgtggggcgctggcaccaccgtgacagtttctgccgcttctaccaagggacccagcgtgttccctctggctccttcc
agcaagtctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgtgtcctg
gaactctggcgctctgacatctggcgtgcacacctttccagctgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctctg
tcgtgaccgtgccttccagctctctgggaacccagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtg
gacaagagagtggaacccaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgctccagaagctgctggcggccc
ttccgtgtttctgttccctccaaagcctaaggacaccctgatgatctctcggacccctgaagtgacctgcgtggtggtgg
atgtgtctcacgaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcct
agagaggaacagtacaactccacctacagagtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaaga
gtacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgctcctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctaggg
aaccccaggtttacaccctgcctccaagccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctcgtgaagggc
ttctacccttccgatatcgccgtggaatgggagagcaatggccagcctgagaacaactacaagacaacccctcctgtgct
ggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcagcagggcaacgtgttctcct
gctccgtgatgcacgaggccctgcacaatcactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggcaagtgatga</INSD
Seq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="43">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>726</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..726</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q86">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>atgaagctgcctgtcagactgctggtgctgatgttctggattcccgcctctctgtcccagat
cgtgctgtctcagtctcccgccatcctgagtgctagccctggcgagaaagtgacaatgacctgcagagcctcctcctccg
tgtcctacatccactggttccagcagaagcctggcagctcccctaagccttggatctacgccacctccaatctggcctct
ggcgtgccagtcagattctccggatctggctccggcacctcctacagcctgaccatctctagagtggaagccgaggatgc
cgccacctactactgtcagcagtggaccagcaatcctcctacctttggcggaggcaccaagctggaaatcaagcggacag
tggccgctccttccgtgttcatcttcccaccttccgacgagcagctgaagtctggcacagcctctgtcgtgtgcctgctg
aacaacttctaccctcgggaagccaaggtgcagtggaaggtggacaacgctctgcagtccggcaactcccaagagtctgt
gaccgagcaggactccaaggactctacctactctctgagcagcaccctgacactgtccaaggccgactacgagaagcaca
aggtgtacgcctgcgaagtgacccatcagggcctgtctagccctgtgaccaagtctttcaacagaggcgagtgtggcggc
accctgcagtctccaccttgataa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="44">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>381</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..381</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q88">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGSGSGSGTGEEKRSYAETHRLTADDVDDINALNESAPAASSAGPSFRAPDSDERVTPPAEP
LDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKN
ELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYS
ALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFV
NFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP<
/INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="45">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>335</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..335</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q90">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>FRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQRE
WLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALE
NAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYG
DPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNW
SDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1146</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1146</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q92">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggtagcggtagcggttcaggcaccggtgaagaaaaacgtagctatgcagaaacccatcg
tctgaccgcagatgatgttgatgatattaatgcactgaatgaaagcgcaccggcagcaagcagcgcaggtccgagctttc
gtgcaccggatagtgatgaacgtgttacccctccggcagaaccgctggatcgtatgccggatccgtatcgtccgagctat
ggtcgtgccgaaaccattgttaataactatattcgtaagtggcagcaggtttatagccatcgtgatggtcgtaaacagca
gatgaccgaagaacagcgtgaatggctgagttatggttgtgttggtgttacctgggttaatagcggtcagtatccgacca
atcgtctggcatttgcatttttcgatgaggacaaatacaagaacgagctgaaaaatggtcgtccgcgtagcggtgaaacc
cgtgcagaatttgaaggtcgtgttgcaaaagatagctttgatgaagcaaaaggttttcagcgtgcacgtgatgttgcaag
cgttatgaataaagcactggaaaatgcacatgatgaaggtgcctatctggacaacctgaaaaaagaactggcaaatggta
atgatgccctgcgtaatgaagatgcacgtagcccgttttatagcgcactgcgtaaccccgagctttaaagatcgtaat
ggtggtaatcatgacccgagcaaaatgaaagcagtgatctatagcaaacacttttggagcggtcaggatcgtagtggtag
cagcgataaacgtaaatatggtgatccggaagcatttcgtccggatcgtggcaccggtctggttgatatgagccgtgatc
gtaatattccgcgtagtccgaccagtccgggtgaaagctttgttaattttgattatggttggtttggcgcacagaccgaa
gcagatgcagataaaaccgtttggacccatggcaatcattatcatgcaccgaatggtagcctgggtgcaatgcatgttta
tgaaagcaaatttcgcaattggagcgacggctatagcgattttgatcgtggtgcctatgttgttacctttgttccgaaaa
gctggaataccgctccggataaagttacccaaggttggccgtaa</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="47">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>337</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..337</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q94">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>FRAPDSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQRE
WLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALE
NAHDESAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKERNGGNHDPSRMKAVIYSKHFWSGQDRSSSADKRKYG
DPDAFRPAPGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNW
SEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGWPLE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="48">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>333</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..333</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q96">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY
GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHD
EGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEA
FRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGY
SDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWPLE</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="49">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>331</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..331</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q98">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSY
GCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHD
EGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEA
FRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGY
SDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="50">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>329</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..329</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q100">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="51">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q102">
```

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequ
ence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1407</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1407</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q104">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgaagctgcctgtcagactgctggtgctgatgttctggattcccgcctctctgtccgaggt
ccagctgcaagaatctggccctggactggtcaagccctctcagaccctgtctctgacctgcaccgtgtctgacggctctg
tttctagaggcggctactacctgacctggatcagacagcatcctggcaagggcctcgagtggatcggctacatctactac
tccggctccacctacttcaaccccagcctgagatccagagtgaccatgtccgtggacacctccaagaaccagttctccct

gaagctgtcctccgtgaccgctgctgataccgccgtgtactactgcgccagaggaatcgccgtggctccctttgattatt
ggggccagggcaccctggtcaccgtgtcctctgcttctaccaagggacccagcgtgttccctctggctccttccagcaag
tctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgtgtcttggaactc
tggcgctctgacatccggcgtgcacacctttccagctgtgctgcaatcctccggcctgtactctctgagcagcgtcgtga
ccgtgccttctagctctctgggcacccagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttccaacaccaaggtggacaag
agagtggaacccaagtcctgcgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgctccagaagctgctggcggcccttccgt
gtttctgttccctccaaagcctaaggacaccctgatgatctctcggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgt
ctcacgaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagag
gaacagtacaacagcacctacagagtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaa
gtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctgctcctatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagcctagggaacccc
aggtttacaccctgcctccaagccgggaagagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgtctcgtgaagggcttctac
ccctccgatatcgctgtggaatgggagagcaatggccagccagagaacaactacaagacaacccctcctgtgctggactc
cgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccagatggcagcagggcaacgtgttctcctgctccg
tgatgcacgaggccctgcacaatcactacacacagaagagtctgtccctgtctcctggctgatga</INSDSeq_seque
nce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="53">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>708</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..708</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q106">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggagaccgacaccctgctgctgtgggtgctgctgctgtgggtgcccgggtcgaccggtga
aatcgtactcacgcagtctccagccaccctgtctgtgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcaggaccagtcaga

gtgttcgcagcaacttagcctggtaccagcagaagcctggccaggctcccaggctcctcatctatgctgcatccaccagg
gccactggtatcccagccaggttcagtggcagtgggtctgggacagagttcactctcaccatcagcagcctgcagtctga
agattttgcagtttattactgtcagcagtatactaactggccattcactttcggccctgggaccaaagtggacatcaaac
gtacggtggcagcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccagga
gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgaga
aacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt
tgatag</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q108">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="55">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q110">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LTWIRQHPGKGLEWIGY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="56">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>38</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..38</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q112">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>YFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q114">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>WGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="58">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q116">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="59">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q118">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LAWYQQKPGQAPRLLIY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="60">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>36</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..36</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q120">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="61">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q122">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>FGPGTKVDIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="62">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>662</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..662</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q124">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECEVQLVESGG
GVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNTLFLQMDSLRPE
DTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="63">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q126">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="64">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier id="q127">
       <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>rituximab HC</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q128">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="65">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q130">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFS
GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq
_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="66">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q132">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGTLQSPP</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q134">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LLQGA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q136">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GGLLQGPP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="69">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q138">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TLQSG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q140">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TLQSPP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q144">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>TLQSA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種經分離之抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白；

且其中該經分離之抗體包含

(i)至少一個輕鏈恆定區(CL)，包含選自由GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP及TLQSA組成之群之序列且較佳包含此序列於該輕鏈恆定區之C端；

及/或

(ii)至少一個重鏈恆定區(CH)，包含下列胺基酸取代中之一或多者：

(a) L234A及L235A (LALA突變)；

(b) L234A及L235A及P329G (LALA-PG突變)；

(c) L235A及G237A (LAGA突變)；

(d) M252Y及S254T及T256E (YTE突變)；

(e) K222R；

且其中歐盟(EU)編號係用於該等胺基酸取代；

且其中該經分離之抗體包含由SEQ ID NO: 3之胺基酸序列構成之CDR1-H、由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列構成之CDR2-H、由SEQ ID NO: 5之胺基酸序列構成之CDR3-H、由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列構成之CDR1-L、由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列構成之CDR2-L及由SEQ ID NO: 8之胺基酸序列構成之CDR3-L。

【請求項2】

如請求項1之經分離之抗體，其中該經分離之抗體包含框架區FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7及FR8，具有結構FR1 - CDR1-H -

FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4及FR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8；其中FR1由SEQ ID NO: 54構成，FR2由SEQ ID NO: 55構成，FR3由SEQ ID NO: 56構成，FR4由SEQ ID NO: 57構成，FR5由SEQ ID NO: 58構成，FR6由SEQ ID NO: 59構成，FR7由SEQ ID NO: 60構成及FR8由SEQ ID NO: 61構成。

【請求項3】

一種經分離之抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白；

且其中該經分離之抗體包含

(i)至少一個輕鏈恆定區(CL)，包含選自由GGTLQSPP、TLQSPP、TLQSA及TLQSG組成之群之序列，且較佳包含此序列於該輕鏈恆定區之C端；

及/或

(ii)至少一個重鏈恆定區(CH)，包含下列胺基酸取代中之一或多者：

(a) L234A及L235A (LALA突變)；

(b) L234A及L235A及P329G (LALA-PG突變)；

(c) L235A及G237A (LAGA突變)；

(d) M252Y及S254T及T256E (YTE突變)；

(e) K222R；

且其中歐盟(EU)編號係用於該等胺基酸取代；

且其中較佳該經分離之抗體包含由SEQ ID NO: 3之胺基酸序列構成之CDR1-H、由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列構成之CDR2-H、由SEQ ID NO: 5之胺基酸序列構成之CDR3-H、由SEQ ID NO: 6之胺基酸序列構成之CDR1-L、由SEQ ID NO: 7之胺基酸序列構成之CDR2-L及由SEQ ID

NO: 8之胺基酸序列構成之CDR3-L；

且其中該經分離之抗體包含框架區FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7及FR8，具有結構FR1 - CDR1-H - FR2 - CDR2-H - FR3 - CDR3-H - FR4及FR5 - CDR1-L - FR6 - CDR2-L - FR7 - CDR3-L - FR8；其中FR1由SEQ ID NO: 54構成，FR2由SEQ ID NO: 55構成，FR3由SEQ ID NO: 56構成，FR4由SEQ ID NO: 57構成，FR5由SEQ ID NO: 58構成，FR6由SEQ ID NO: 59構成，FR7由SEQ ID NO: 60構成及FR8由SEQ ID NO: 61構成。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之經分離之抗體，其中兩個重鏈恆定區(CH)均包含該等胺基酸取代(a)至(e)中之一或多者及/或其中兩個輕鏈恆定區均包含該序列GGTLQSPP。

【請求項5】

如請求項1至3中任一項之經分離之抗體，其中至少一個重鏈恆定區(CH)包含SEQ ID NO: 31或SEQ ID NO: 32之胺基酸序列及/或其中該等輕鏈恆定區(CL)中之至少一者包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列。

【請求項6】

如請求項1至3中任一項之經分離之抗體，其中該等重鏈恆定區(CH)及輕鏈恆定區(CL)具有下列序列組合中之任一者：

(1)兩個CH均包含SEQ ID NO: 31之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(2)兩個CH均包含SEQ ID NO: 31之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(3)兩個CH均包含SEQ ID NO: 32之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(4)兩個CH均包含SEQ ID NO: 50之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(5)兩個CH均包含SEQ ID NO: 50之序列及兩個CL均包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(6)一個CH包含SEQ ID NO: 31之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(7)一個CH包含SEQ ID NO: 31之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(8)一個CH包含SEQ ID NO: 32之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 33之序列；或

(9)一個CH包含SEQ ID NO: 50之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 12之序列；或

(10)一個CH包含SEQ ID NO: 50之序列及一個CL包含SEQ ID NO: 33之序列。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之抗體，其包括包含與SEQ ID NO: 9之胺基酸序列具有至少85%一致性之胺基酸序列之重鏈可變區(VH)及包含與SEQ ID NO: 10之胺基酸序列具有至少85%一致性之胺基酸序列之輕鏈可變區(VL)。

【請求項8】

如請求項7之抗體，其包括包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可

變區(VH)及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變區(VL)。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之抗體，其包括

(i)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之輕鏈(LC)；或

(ii)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之輕鏈(LC)；或

(iii)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之輕鏈(LC)；或

(iv)包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之輕鏈(LC)；或

(v)包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之重鏈(HC)及包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之輕鏈(LC)。

【請求項10】

一種經分離之抗體，其與包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變區(VL)之抗體競爭結合至人類CEACAM5蛋白之A2-B2域且其中該等重鏈恆定區(CH)及輕鏈恆定區(CL)係如請求項1至9中任一項定義。

【請求項11】

如請求項10之抗體，其中該抗體亦與包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可變區(VH)及SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變區(VL)之抗體競爭結合至食蟹獼猴(*Macaca fascicularis*) CEACAM5蛋白之A2-B2域且其中該等重鏈恆定區(CH)及輕鏈恆定區(CL)係如請求項1至9中任

一項定義。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之抗體，其中該抗體不顯著與人類CEACAM1、人類CEACAM6、人類CEACAM7、人類CEACAM8及食蟹獼猴CEACAM6交叉反應。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之抗體，其中該抗體係抗體片段。

【請求項14】

如請求項13之抗體，其中該抗體係選自由以下組成之群之抗體片段：Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2及雙功能抗體(diabodies)。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之抗體，其係雙特異性或多特異性抗體。

【請求項16】

一種經分離之抗體，其結合至人類CEACAM5蛋白且其由兩個包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之相同重鏈(HC)及兩個包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之相同輕鏈(LC)構成；或

其由兩個包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之相同重鏈(HC)及兩個包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之相同輕鏈(LC)構成；或

其由兩個包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之相同重鏈(HC)及兩個包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之相同輕鏈(LC)構成；或

其由兩個包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之相同重鏈(HC)及兩個包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之相同輕鏈(LC)構成；或

其由兩個包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之相同重鏈(HC)及兩個包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之相同輕鏈(LC)構成。

【請求項17】

一種經分離之核酸，其包含編碼如請求項1至16中任一項之抗體之核酸序列。

【請求項18】

一種宿主細胞，其已經如請求項17之核酸轉形。

【請求項19】

一種免疫結合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗體經由連接子共價連接至至少一種生長抑制劑。

【請求項20】

如請求項19之免疫結合物，其中該生長抑制劑係細胞毒性藥物或放射性部分。

【請求項21】

如請求項19或20之免疫結合物，其中該生長抑制劑係選自由以下組成之群：化學治療劑、酶、抗生素、毒素(諸如小分子毒素或酶活性毒素)、類毒素、長春花、紫杉烷、類美登素(maytansinoids)或類美登素類似物、托馬黴素(tomaymycin)或吡咯苯并二氮呯衍生物、念珠藻素(cryptophycin)衍生物、來普黴素(leptomycin)衍生物、奧瑞他汀(auristatin)或尾海兔素(dolastatin)類似物、前藥、拓撲異構酶I抑制劑、拓撲異構酶II抑制劑、DNA烷化劑、抗微管蛋白劑、CC-1065及CC-1065類似物。

【請求項22】

如請求項19至21中任一項之免疫結合物，其中該生長抑制劑係依喜替康(exatecan)。

【請求項23】

如請求項19至22中任一項之免疫結合物，其中連接子係可裂解連接子。

【請求項24】

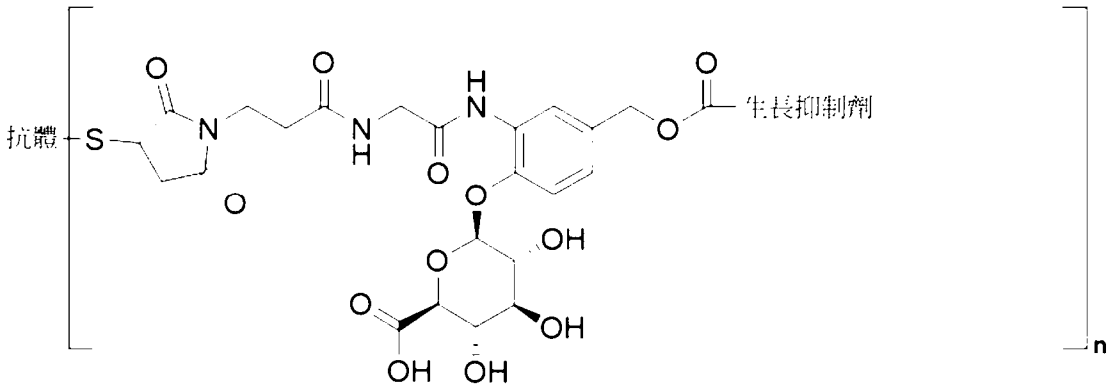
如請求項19至23中任一項之免疫結合物，其中該連接子係可於哺乳動物細胞之內體中裂解之連接子。

【請求項25】

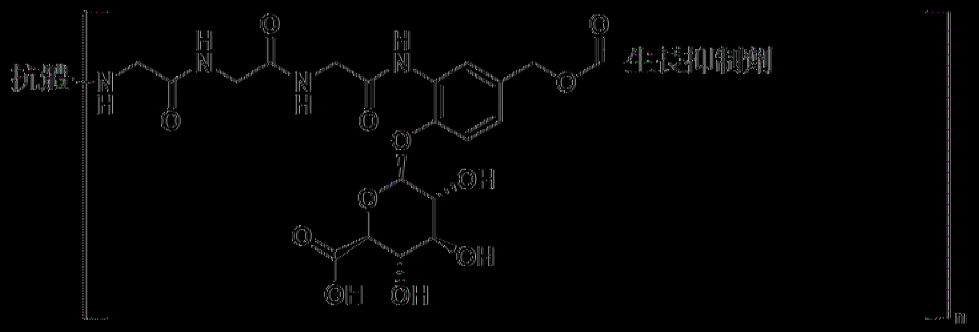
如請求項19至24中任一項之免疫結合物，其中該連接子係可由人類葡萄醣醛酸酶裂解之連接子。

【請求項26】

如請求項19至25中任一項之免疫結合物，其中該免疫結合物具有下式(II)或式(IIA)：



(II)，



(IIA)，

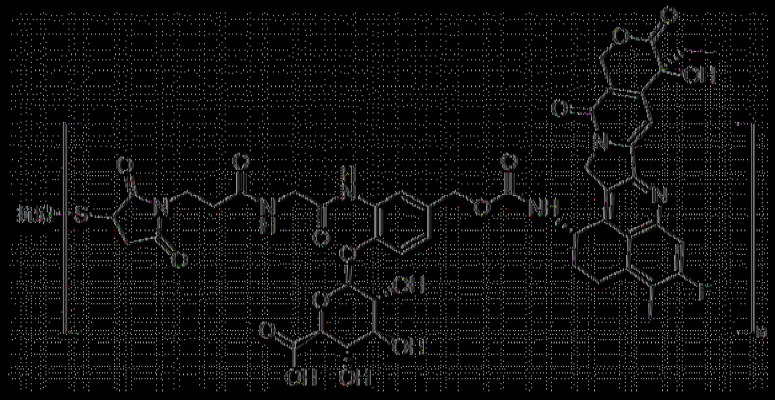
其中S係該抗體之硫原子，且其中n係共價連接至該抗體之[(連接子)-(生長抑制劑)]部分之數量。

[請求項27]

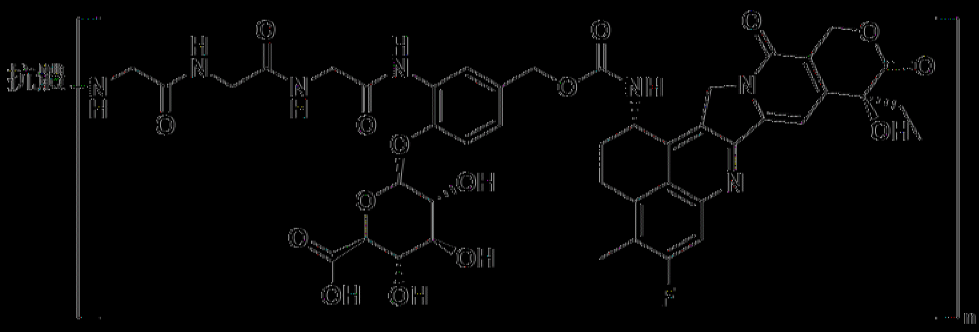
如請求項26之免疫結合物，其中n係介於1與10之間且較佳4。

[請求項28]

如請求項19至26中任一項之免疫結合物，其中該免疫結合物具有下式(IV)或式(IVA)：



(IV)，



(IVA)，

其中S係該抗體之硫原子，且其中n係共價連接至該抗體之[(連接子)-(依喜替康)]部分之數量。

【請求項29】

如請求項28之免疫結合物，其中該免疫結合物具有式(IVA)且n係介於1與10之間且較佳4。

【請求項30】

如請求項19至29中任一項之免疫結合物，其中該S係該抗體之半胱胺酸之硫原子。

【請求項31】

如請求項30之免疫結合物，其中該抗體之半胱胺酸係能夠形成鏈間二硫鍵之半胱胺酸中之一者。

【請求項32】

如請求項26至31中任一項之免疫結合物，其中式(II)及(IV)之n係介於7與8之間；且其中式(IIA)及(IVA)之n係介於3與5之間。

【請求項33】

如請求項26至32中任一項之免疫結合物，其中式(II)及(IV)之n係介於7.5與8.0之間；且其中式(IIA)及(IVA)之n係介於3.5與4.5之間且較佳式(IIA)及(IVA)之n係4。

【請求項34】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗體或如請求項19至33中任一項之免疫結合物，其進一步包含醫藥上可接受之載劑、稀釋劑及/或賦形劑。

【請求項35】

如請求項1至16中任一項之抗體或如請求項19至33中任一項之免疫結合物或如請求項34之醫藥組合物，其用作藥劑。

【請求項36】

如請求項1至16中任一項之抗體或如請求項19至33中任一項之免疫結合物或如請求項34之醫藥組合物，其用以治療癌症。

【請求項37】

如請求項36使用之抗體、免疫結合物或醫藥組合物，其中該癌症係表現CEACAM5之癌症。

【請求項38】

如請求項36或37使用之抗體、免疫結合物或醫藥組合物，其中該癌症係結腸直腸癌、胃癌、肺癌、胰臟癌、食道癌或前列腺癌。

【請求項39】

一種治療癌症之方法，其包括對個體投與如請求項1至16中任一項之抗體或如請求項19至33中任一項之免疫結合物或如請求項34之醫藥組合物。

【請求項40】

如請求項39之方法，其中該癌症係表現CEACAM5之癌症。

【請求項41】

如請求項39或40之方法，其中該癌症係結腸直腸癌、胃癌、肺癌、胰臟癌、食道癌或前列腺癌。

【請求項42】

一種使用如請求項1至16中任一項之抗體離體偵測來自個體之生物樣

本中CEACAM5表現之方法。

【請求項43】

如請求項42之方法，其中該抗體係經可偵測分子標記。

【請求項44】

一種如請求項1至16中任一項之抗體之用途，其用於離體偵測來自個體之生物樣本中CEACAM5表現。

【請求項45】

如請求項44之用途，其中該抗體係經可偵測分子標記。

圖(發明圖式)

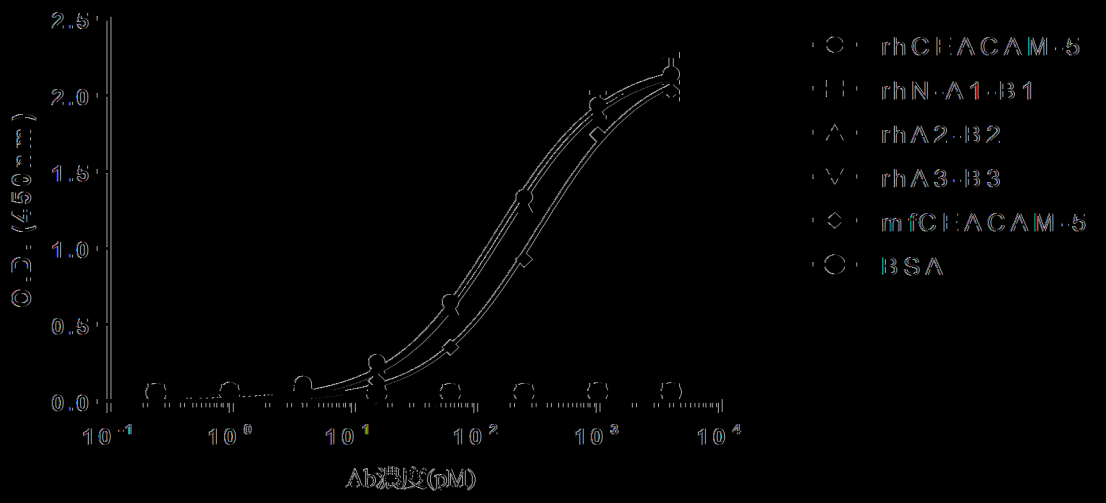

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450(450nm)
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
Ab濃度(pM)
rhCEACAM-5
rhN-A1-B1
rhA2-B2
rhA3-B3
mfCEACAM-5
BSA

圖1)

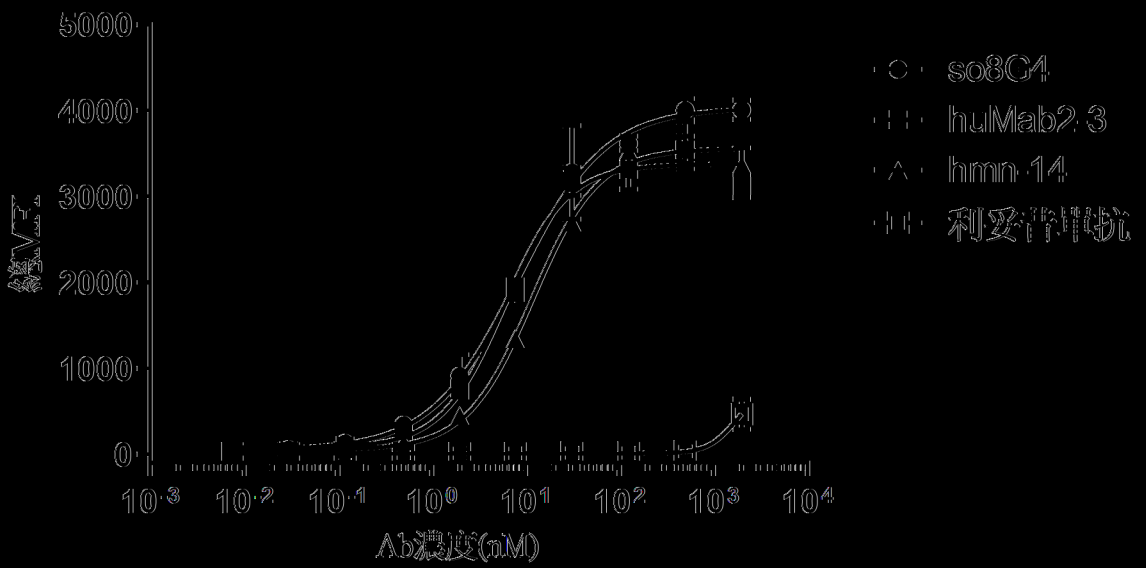
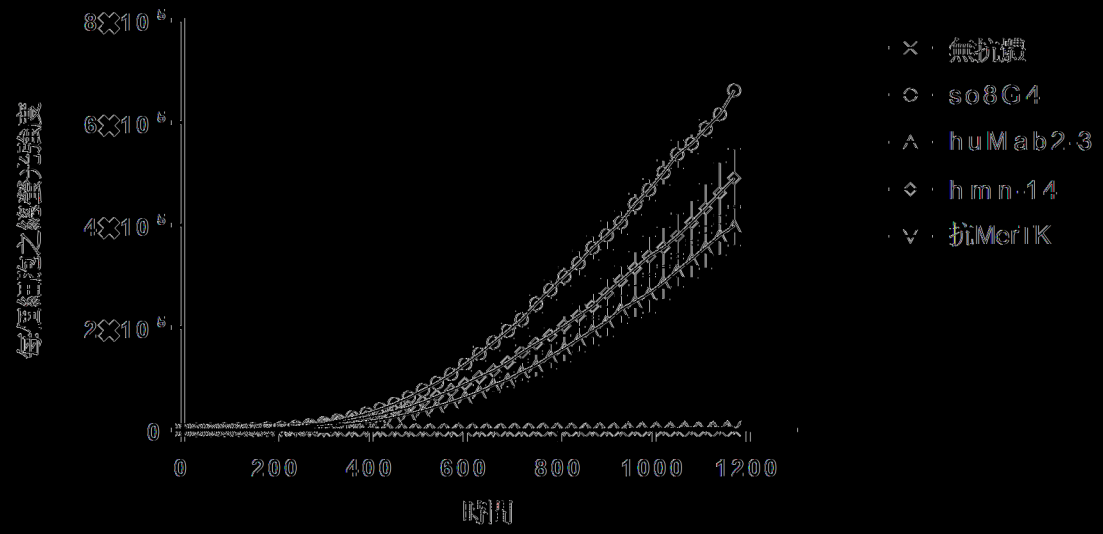
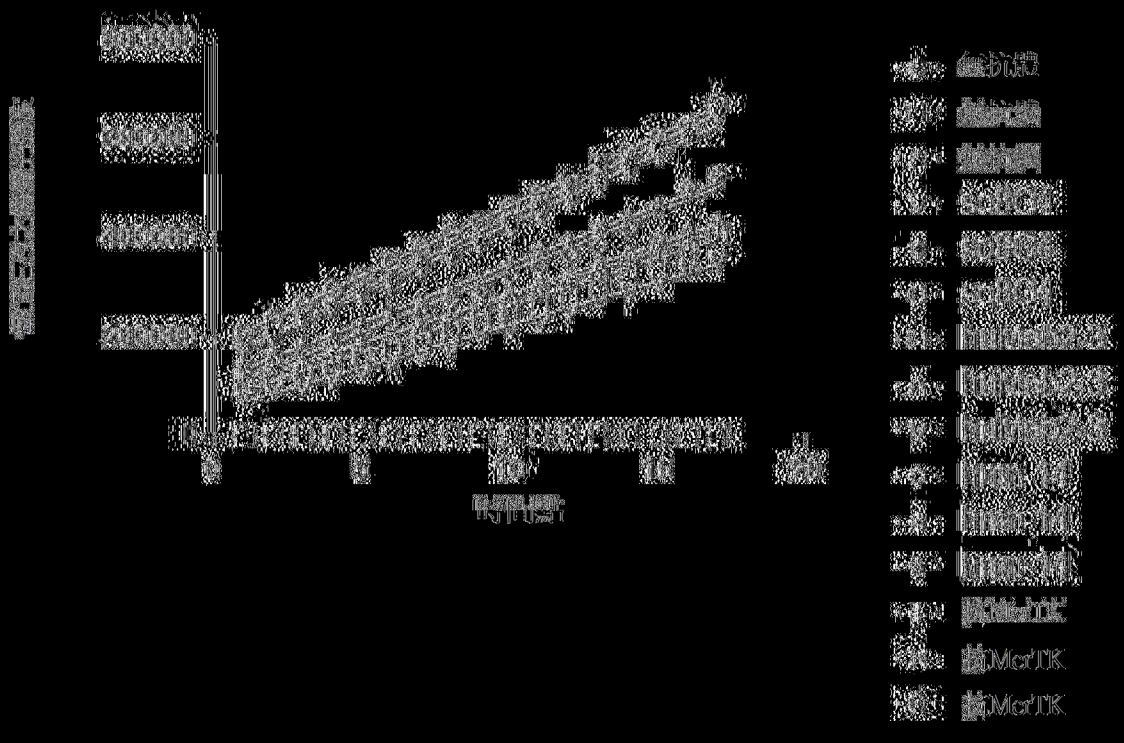

5000
4000
3000
2000
1000
0
MFI
10⁻³
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
Ab濃度(nM)
so8C4
huMab2.3
hmn-14
利妥昔單抗

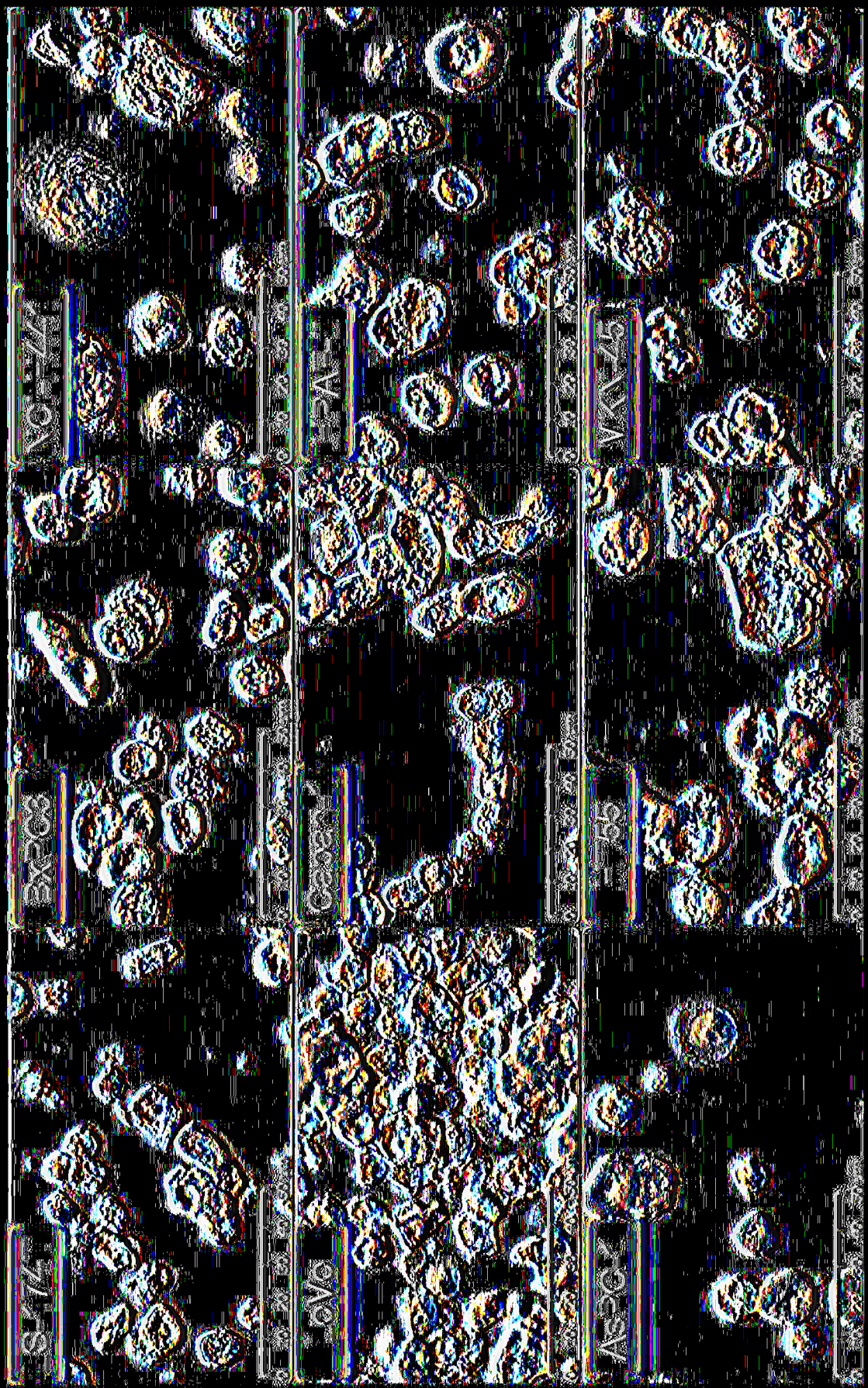
圖2)

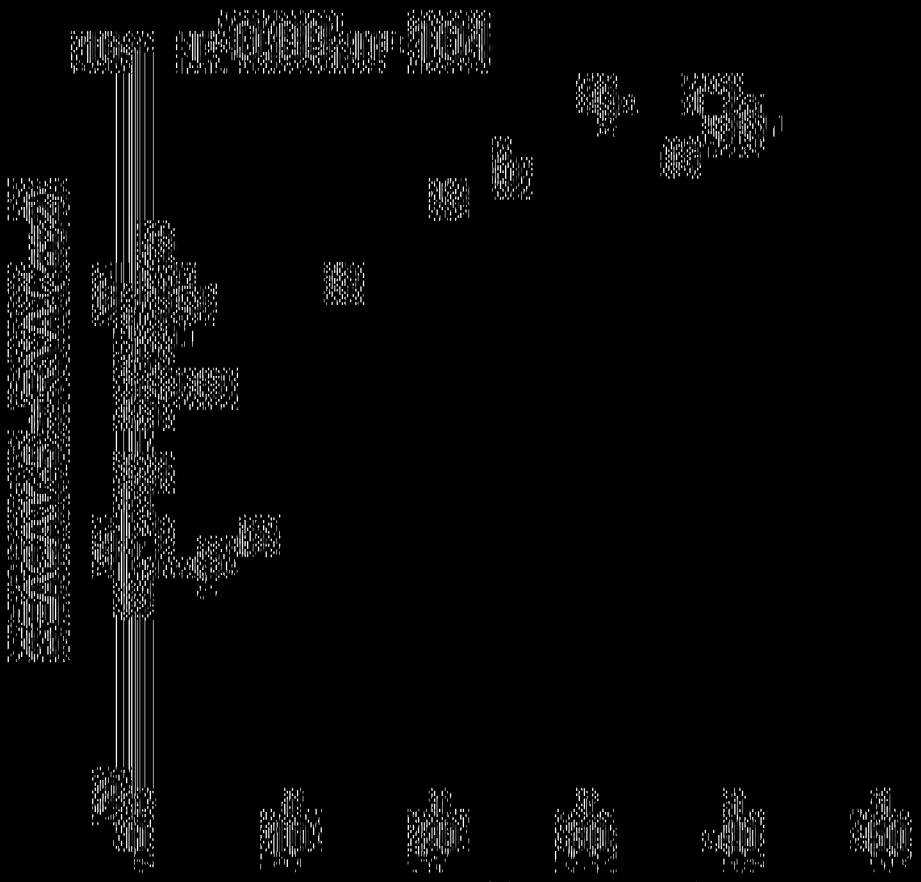

8×10⁵
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
腫瘍体積（mm³）
0
200
400
600
800
1000
1200
時間
無抗體
so8G4
huMab2.3
hmn.14
抗MerTK

圖(圖3)


時間（天）
無抗體
抗MerTK
抗MerTK

圖(圖4)





CEACAM-5 (SO8G4AB 323)
IHC抗體染色(AU)

(圖6)

陽性對照

陰性對照

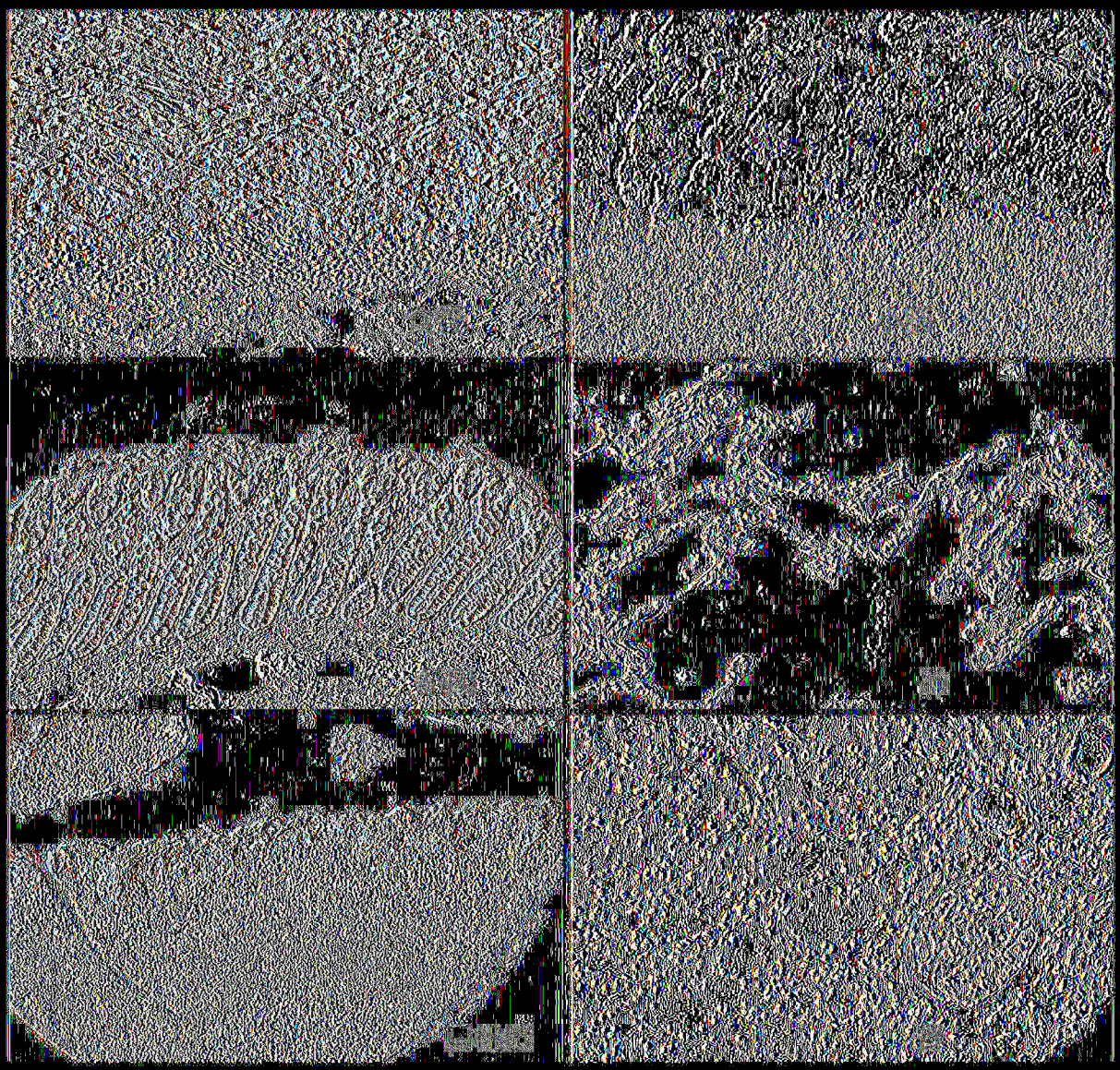
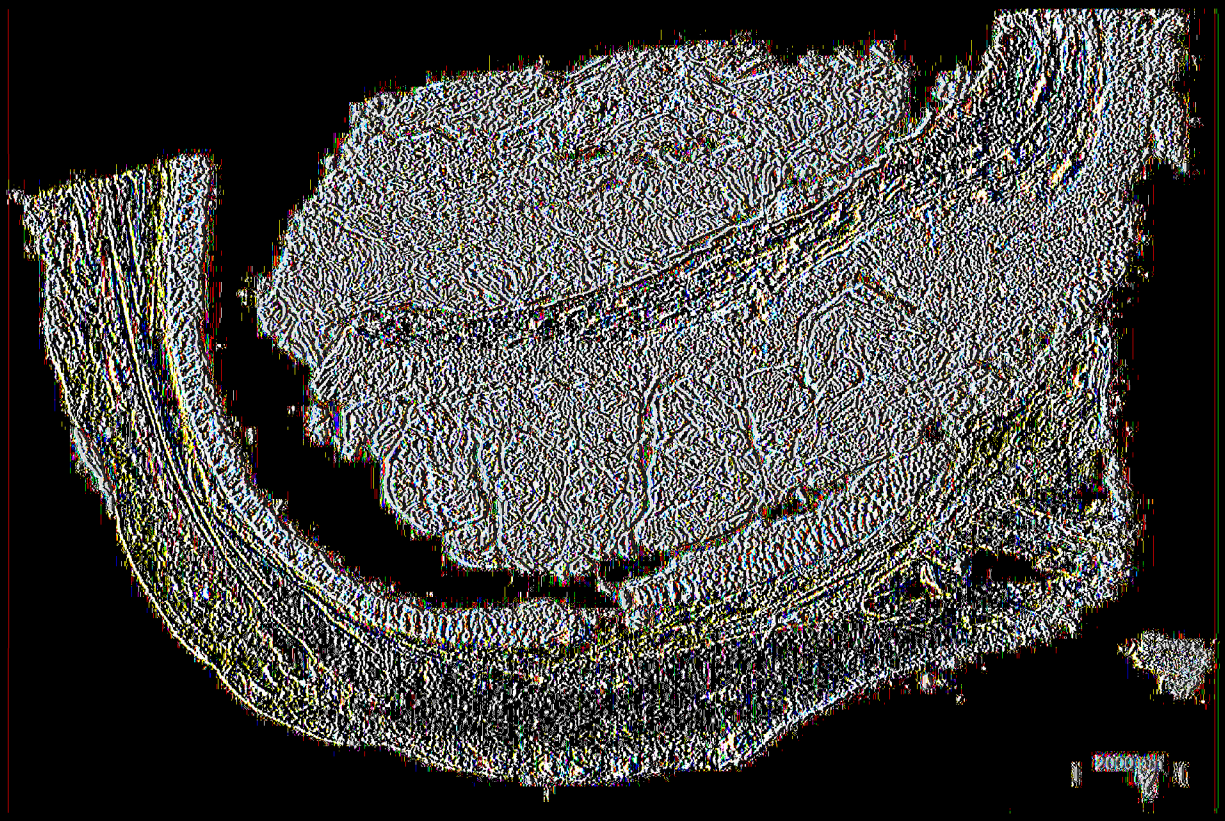
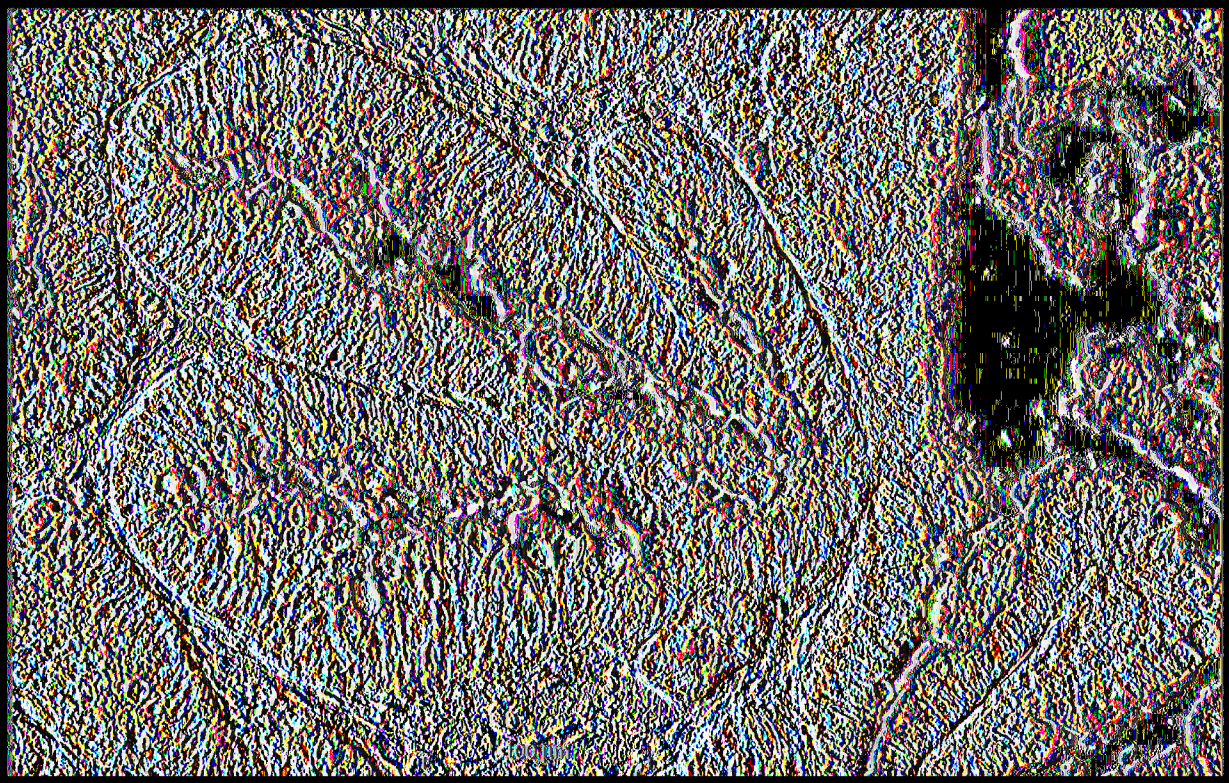


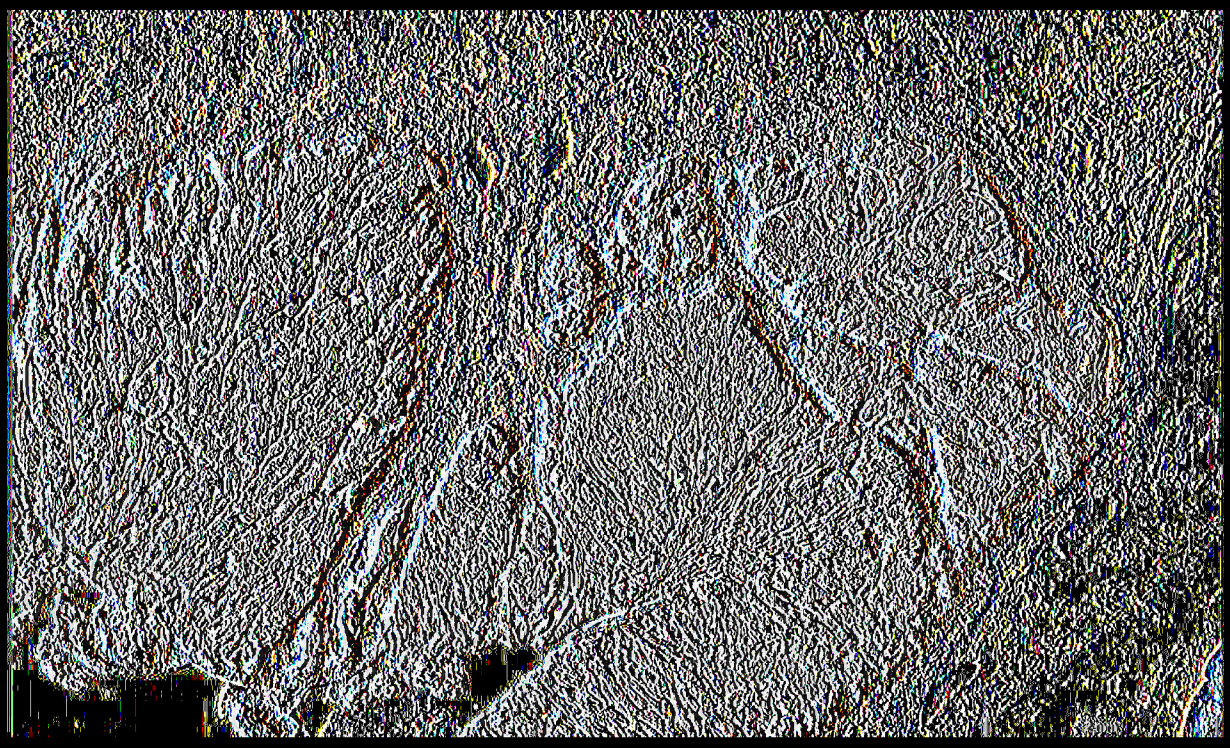
圖7

發明專利說明書
TAIWAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
RNA聚合酶Ⅲ第三次轉錄，會增加細胞的
[圖1]





圖(9)



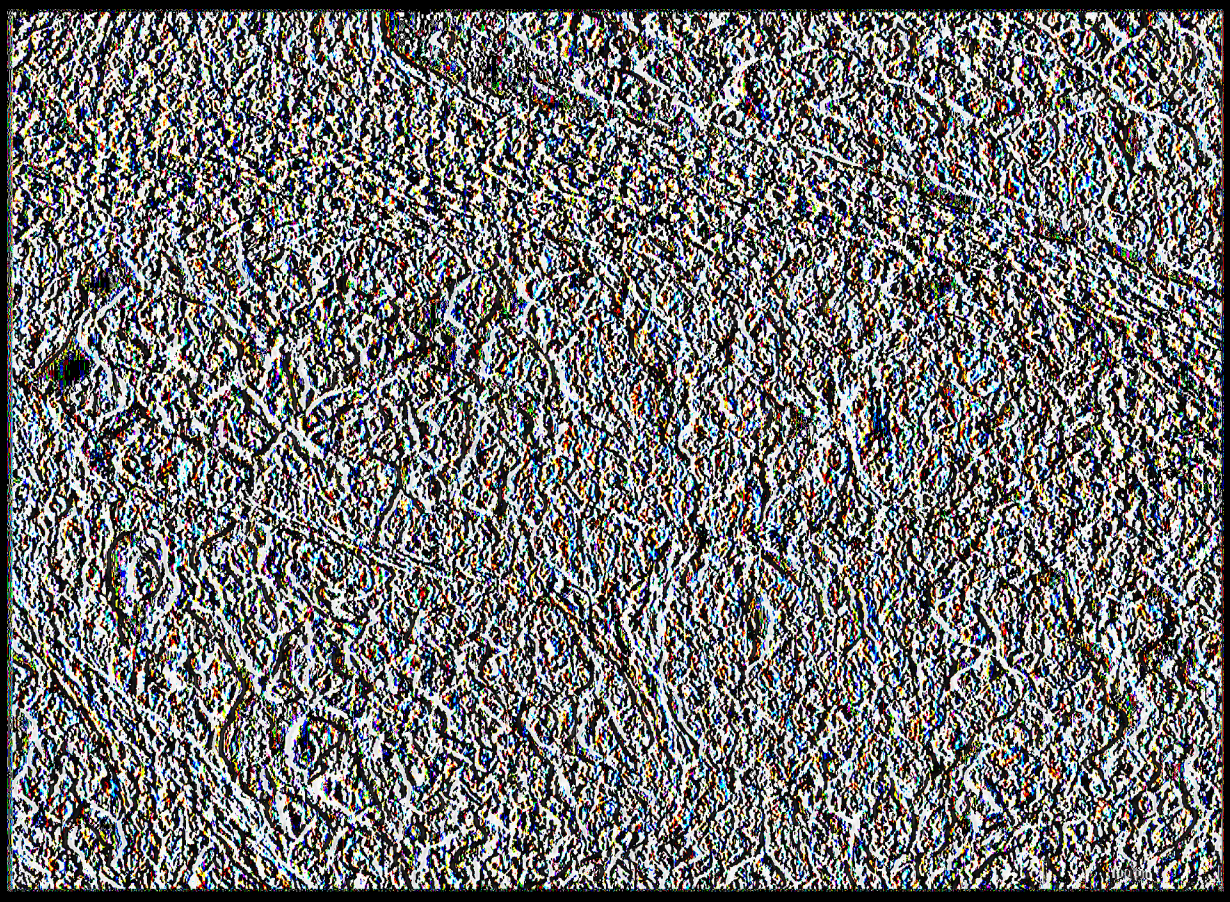
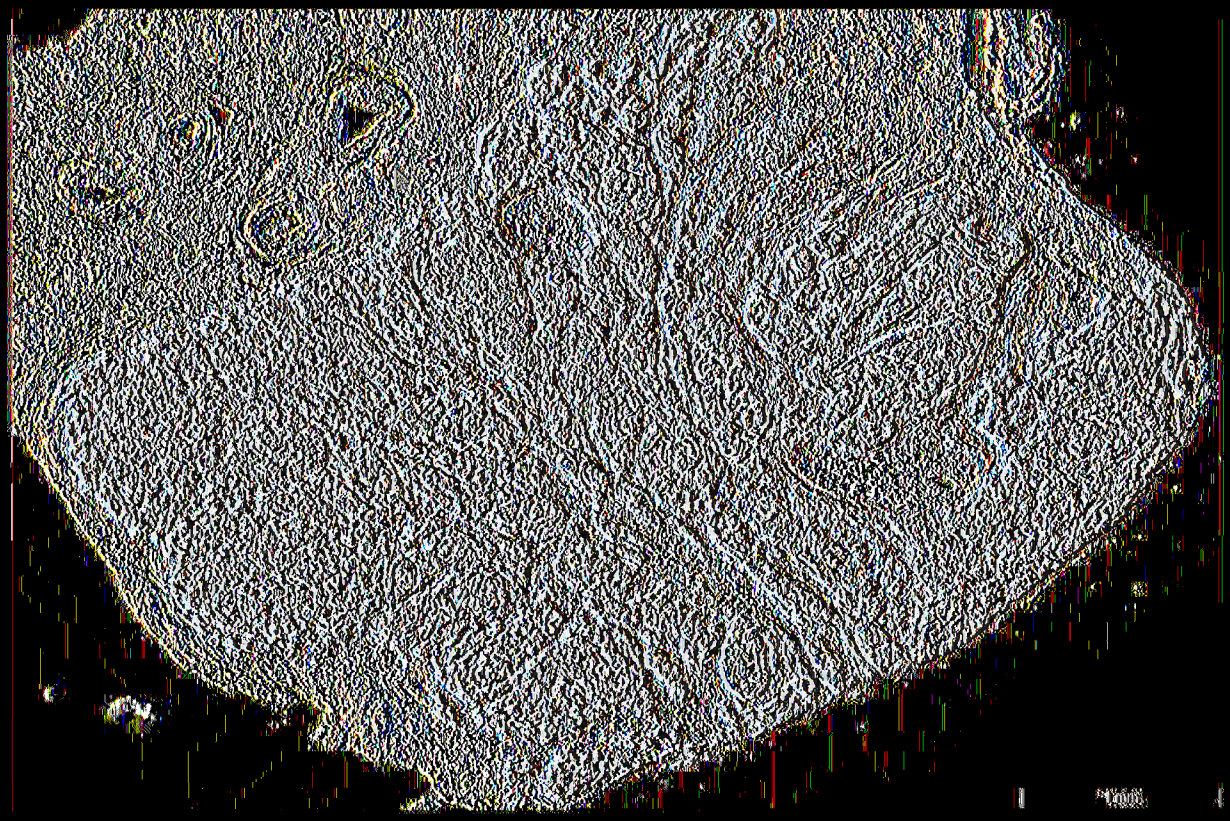
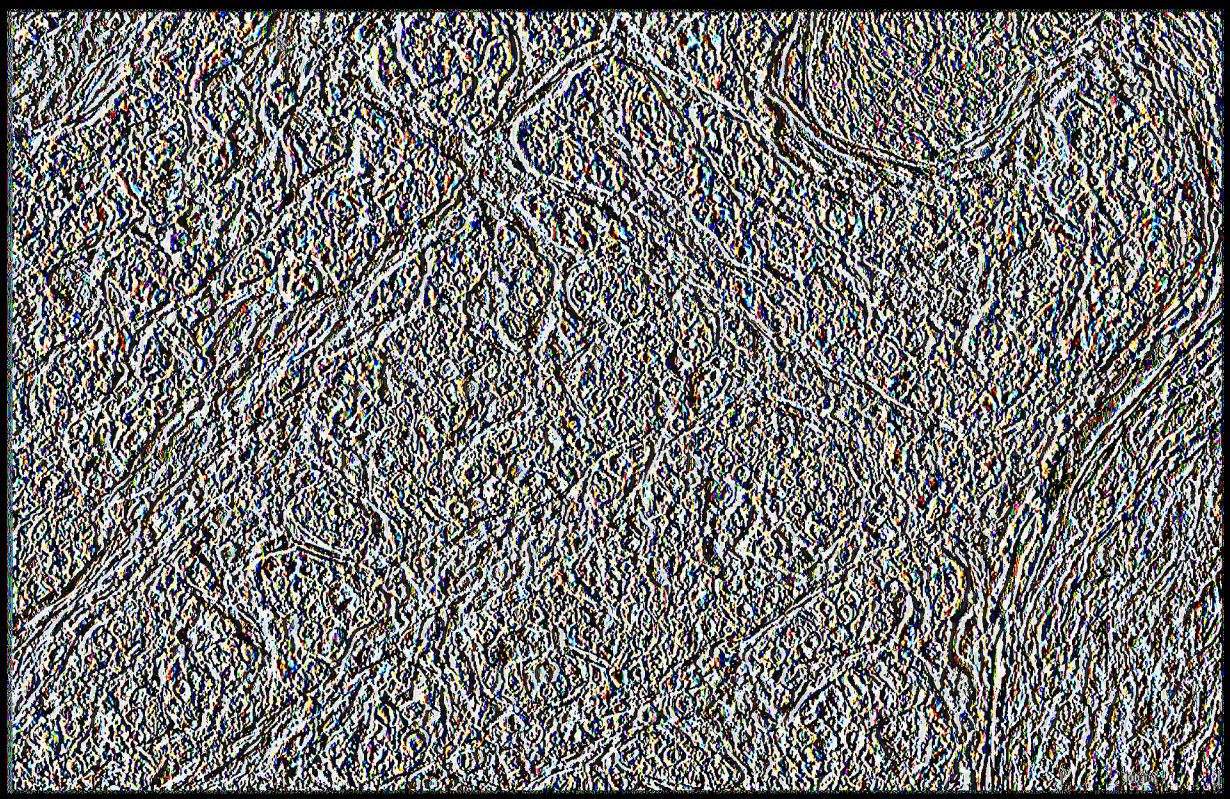
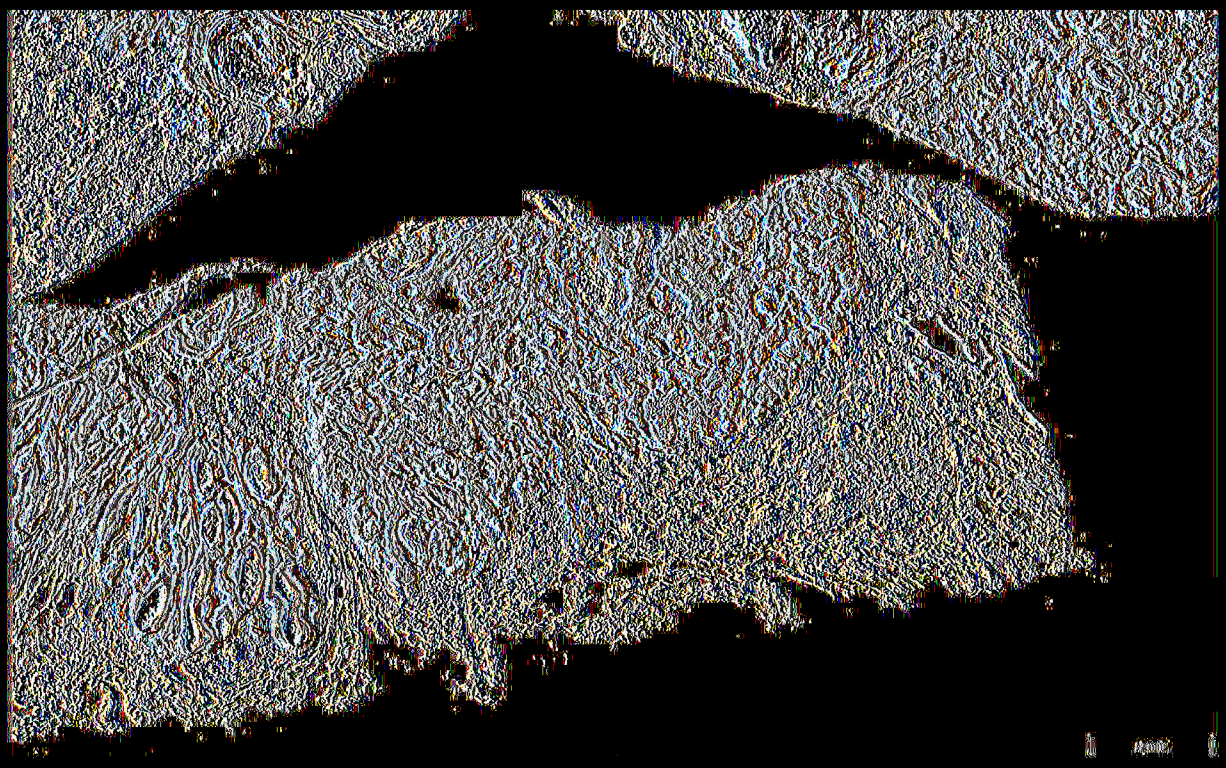


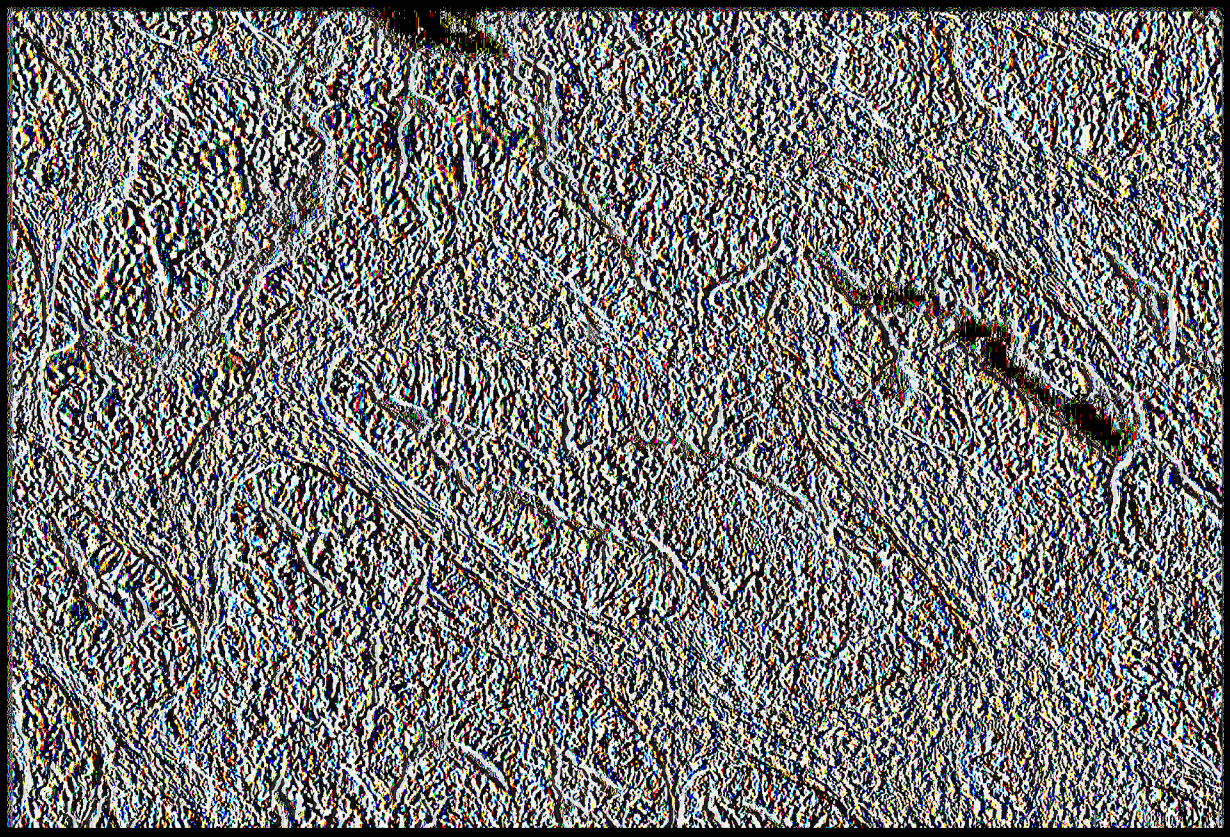
圖10





(圖11)

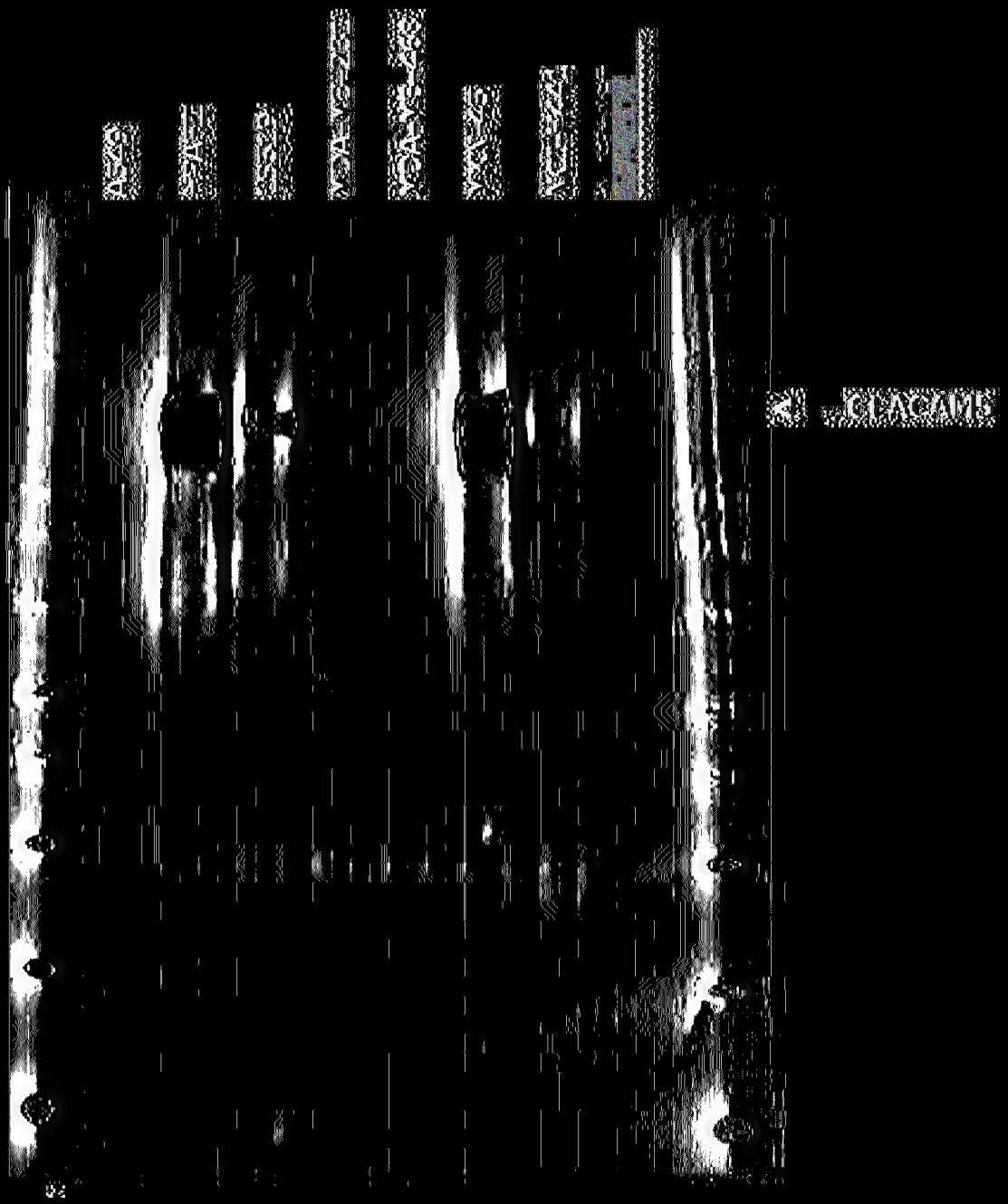




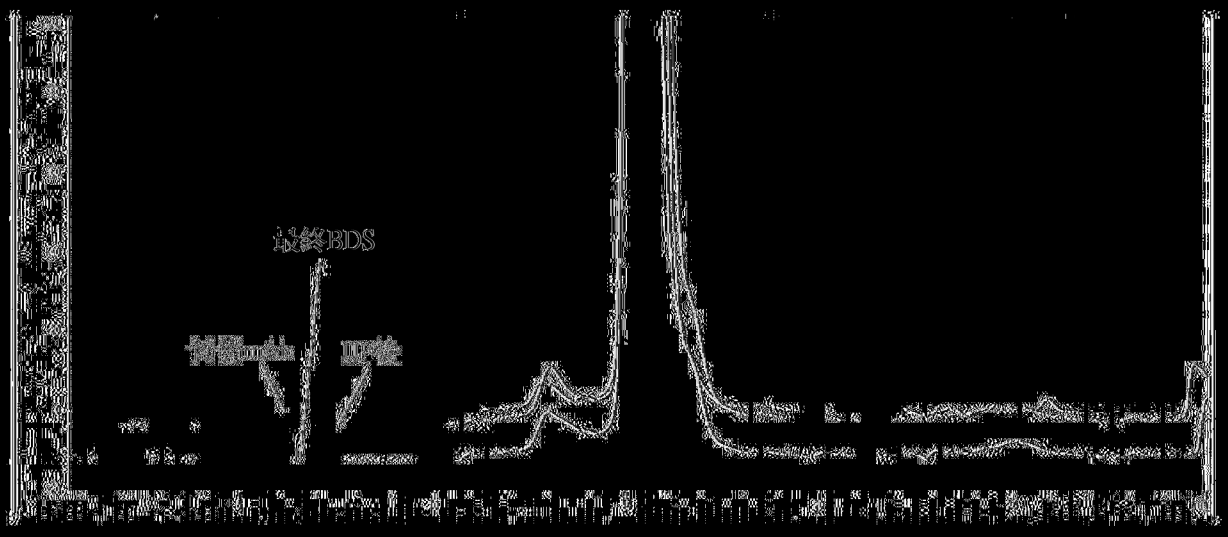
圖(圖12)



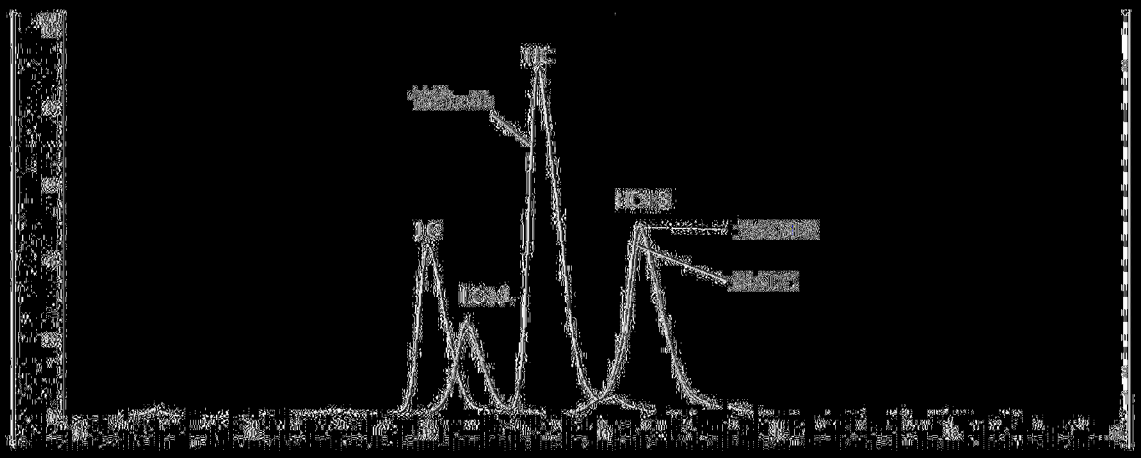
(圖13A)



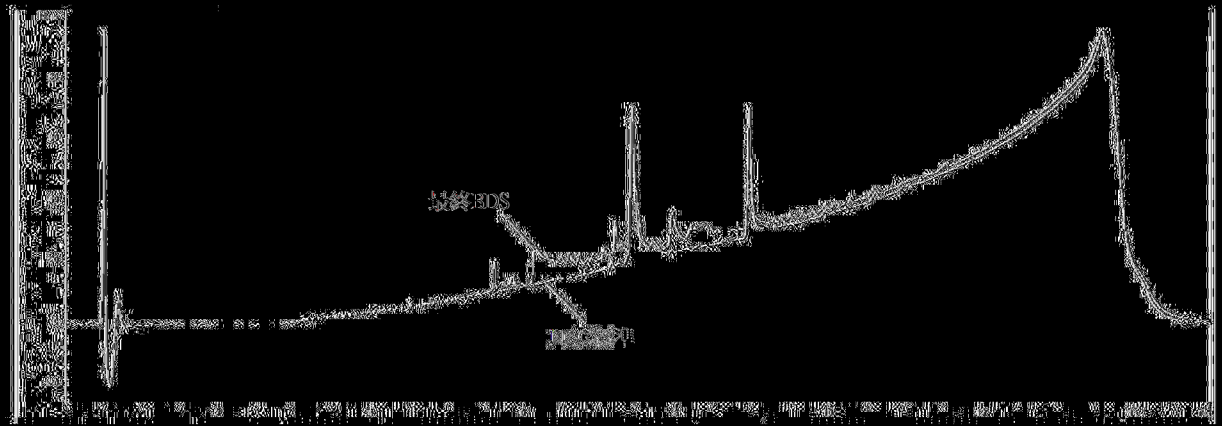
(圖13B)



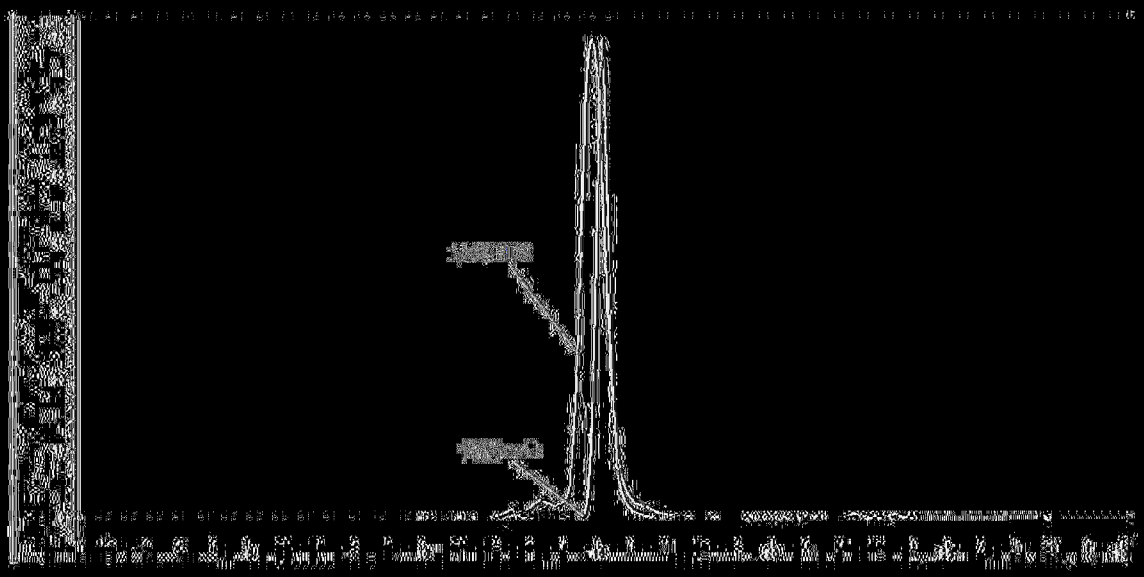
(圖14)



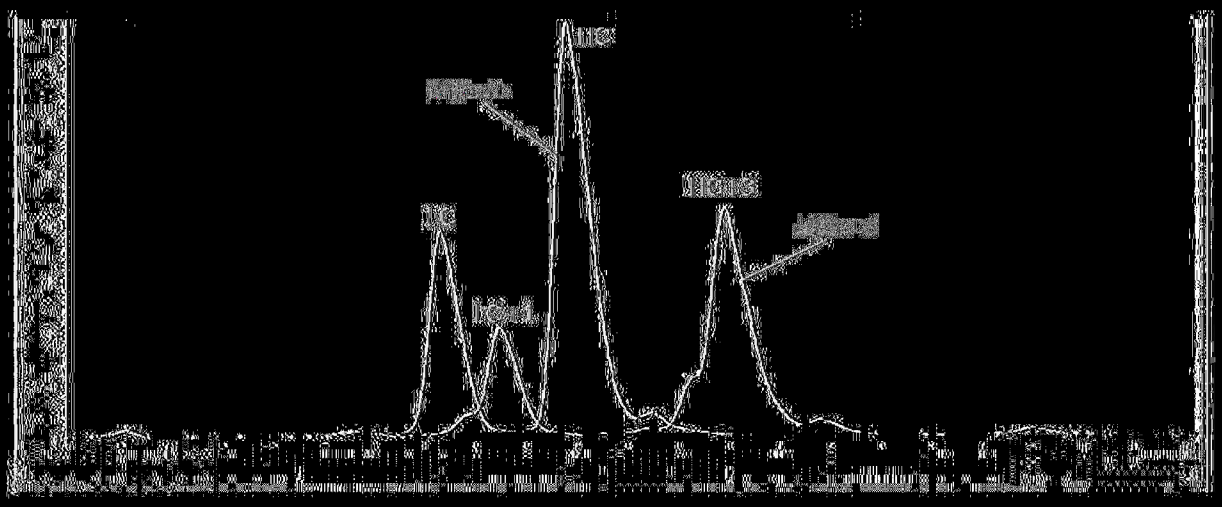
(圖15)



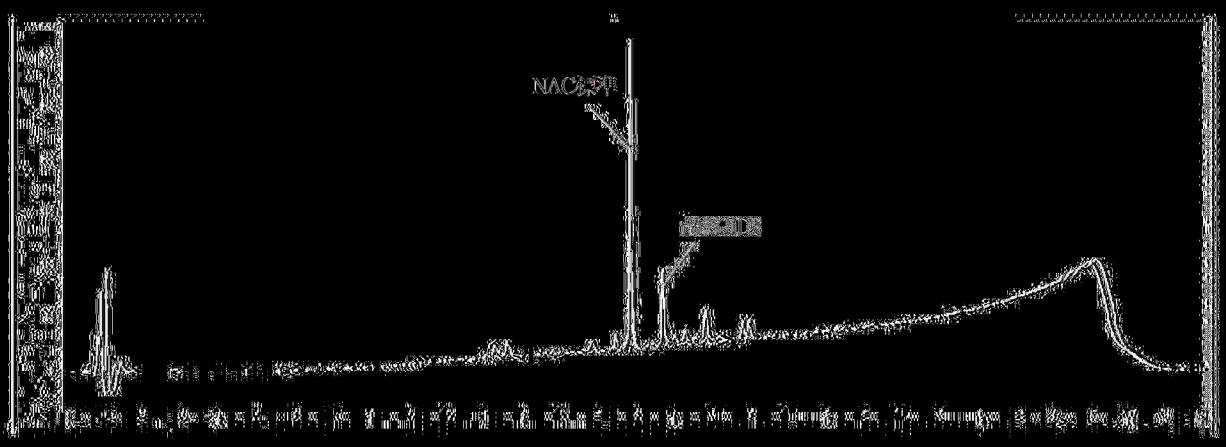
(圖16)



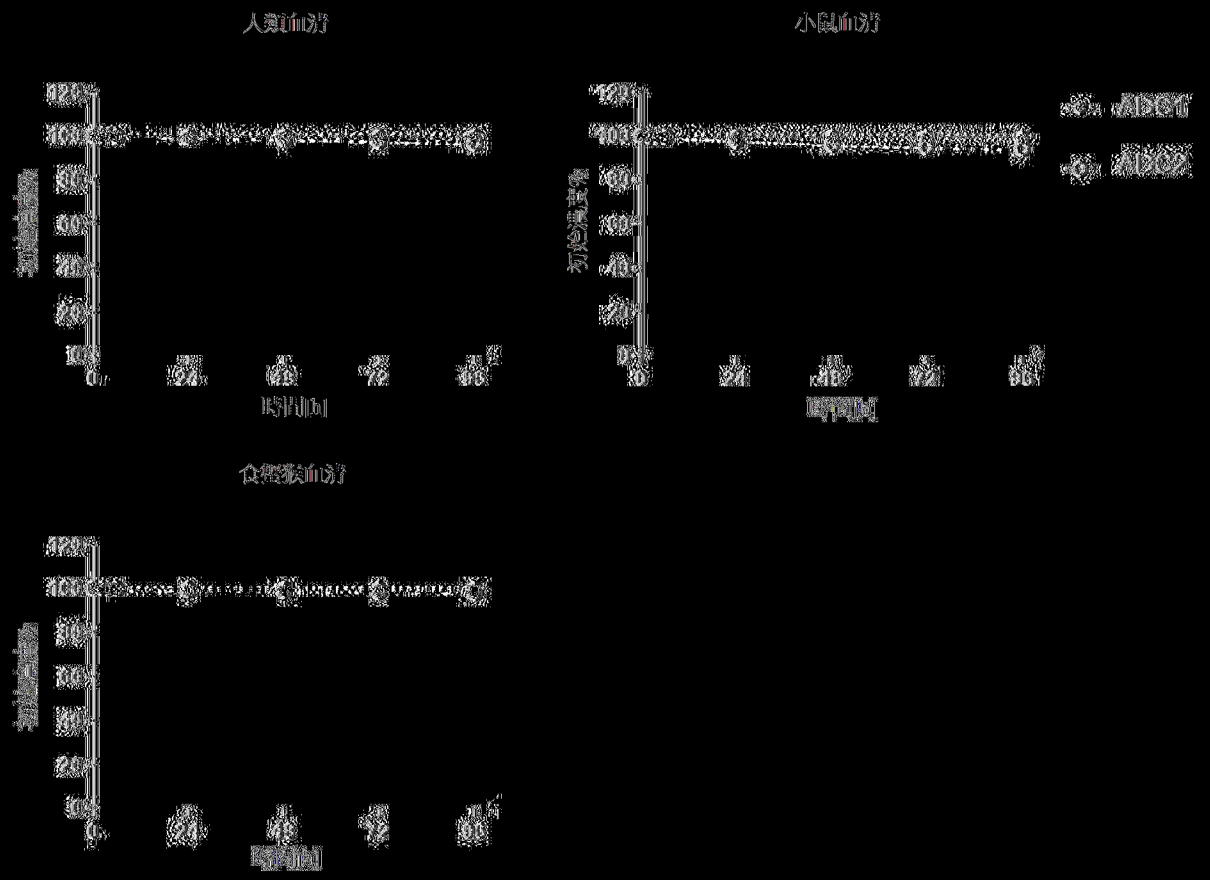
(圖17)



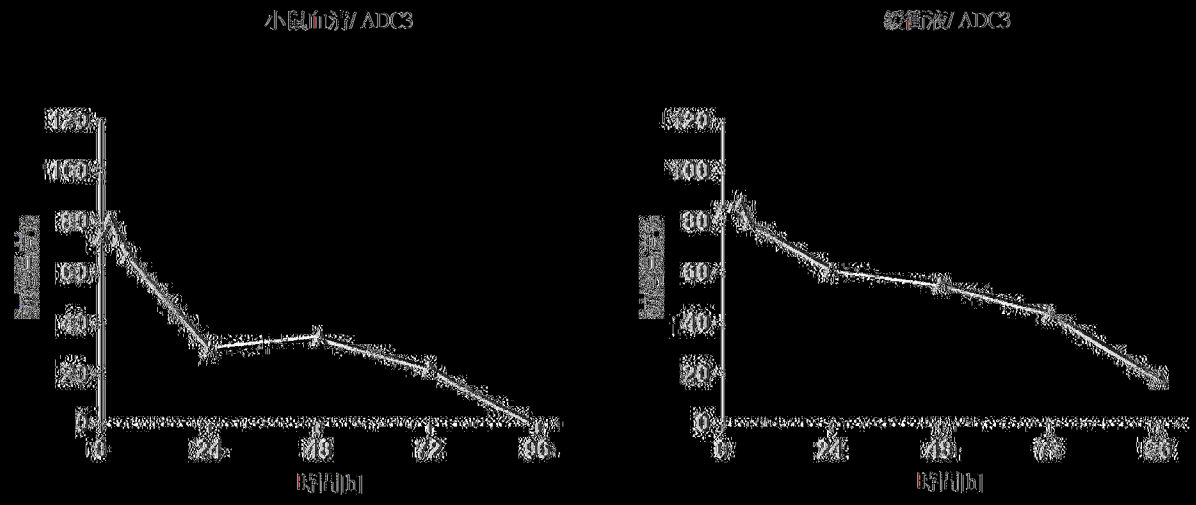
(圖18)



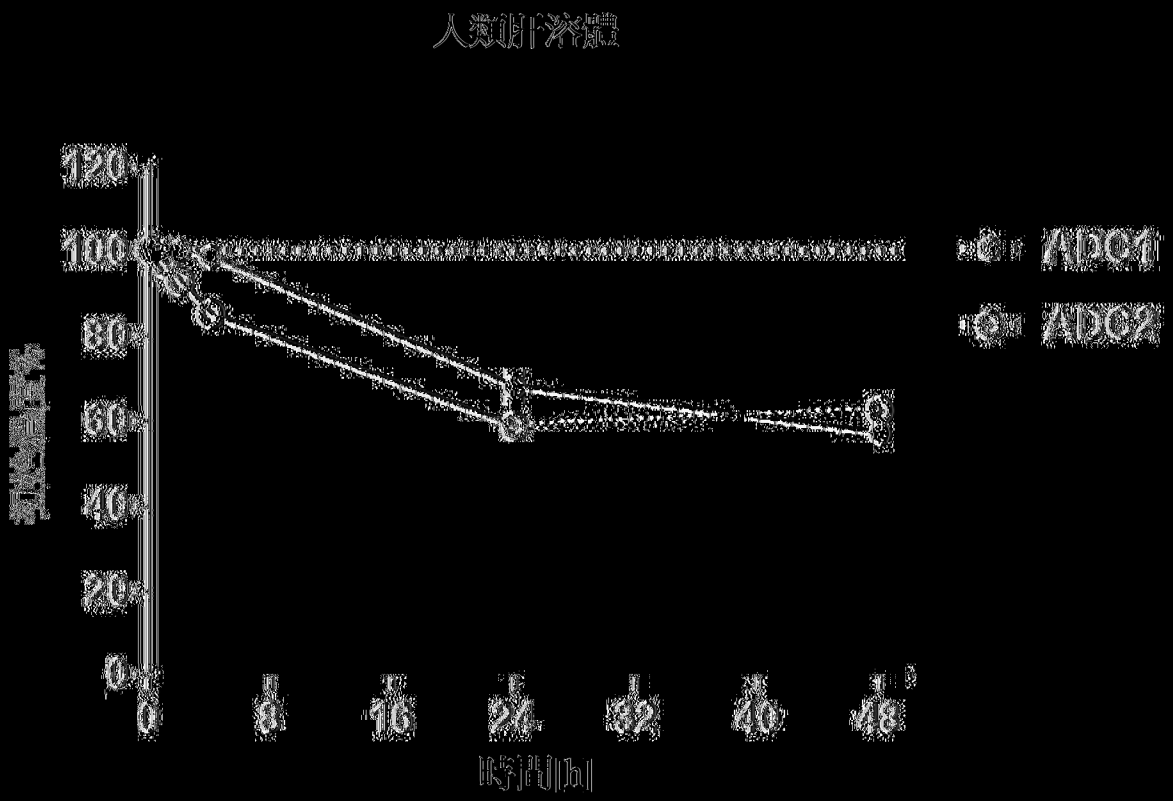
(圖19)



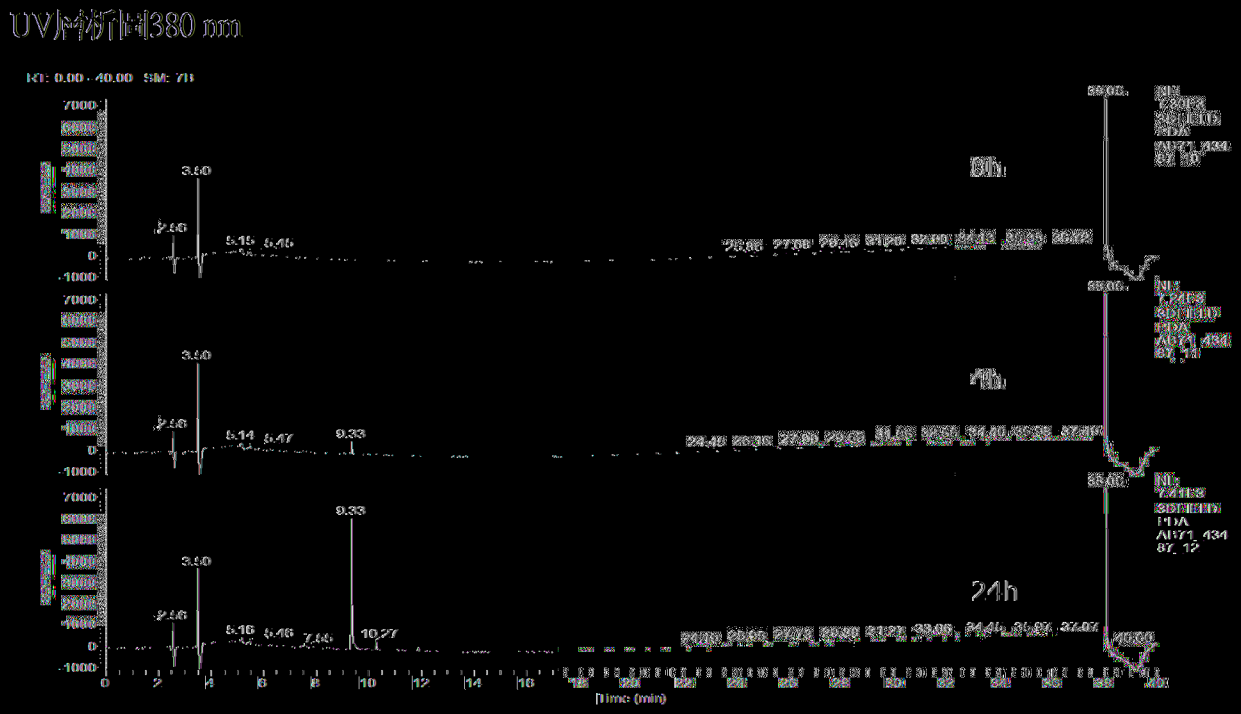
(圖20)

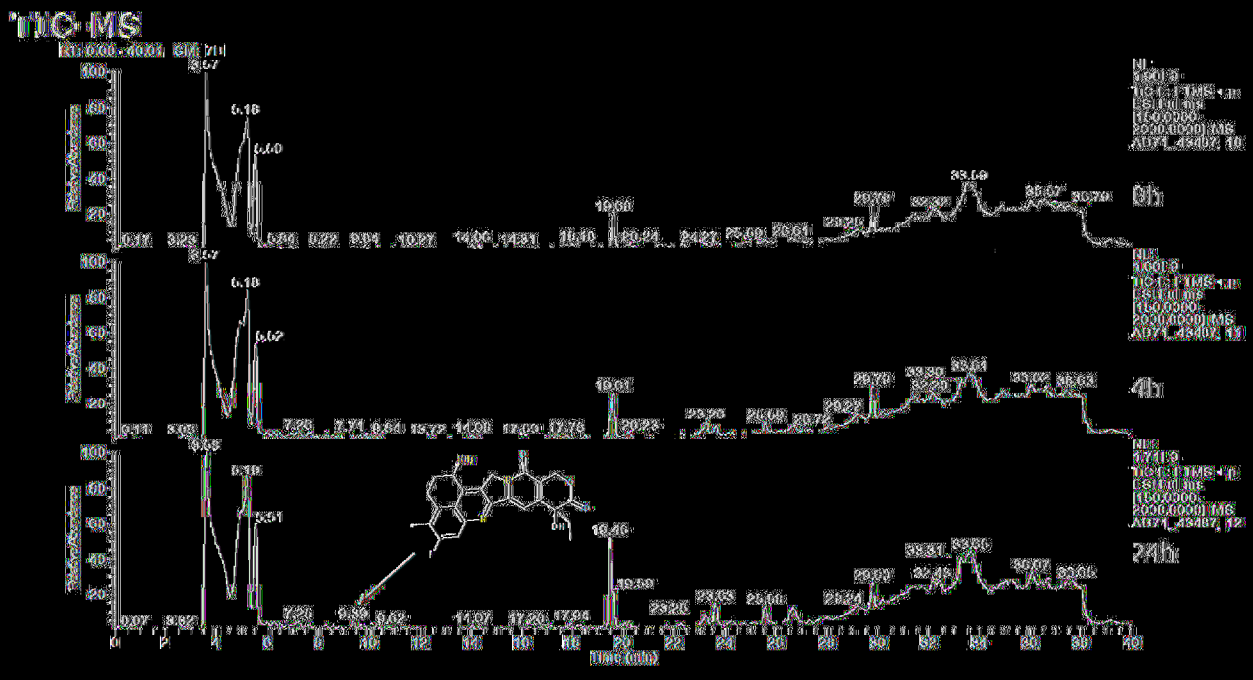


(圖21)



（圖22）





(圖23)

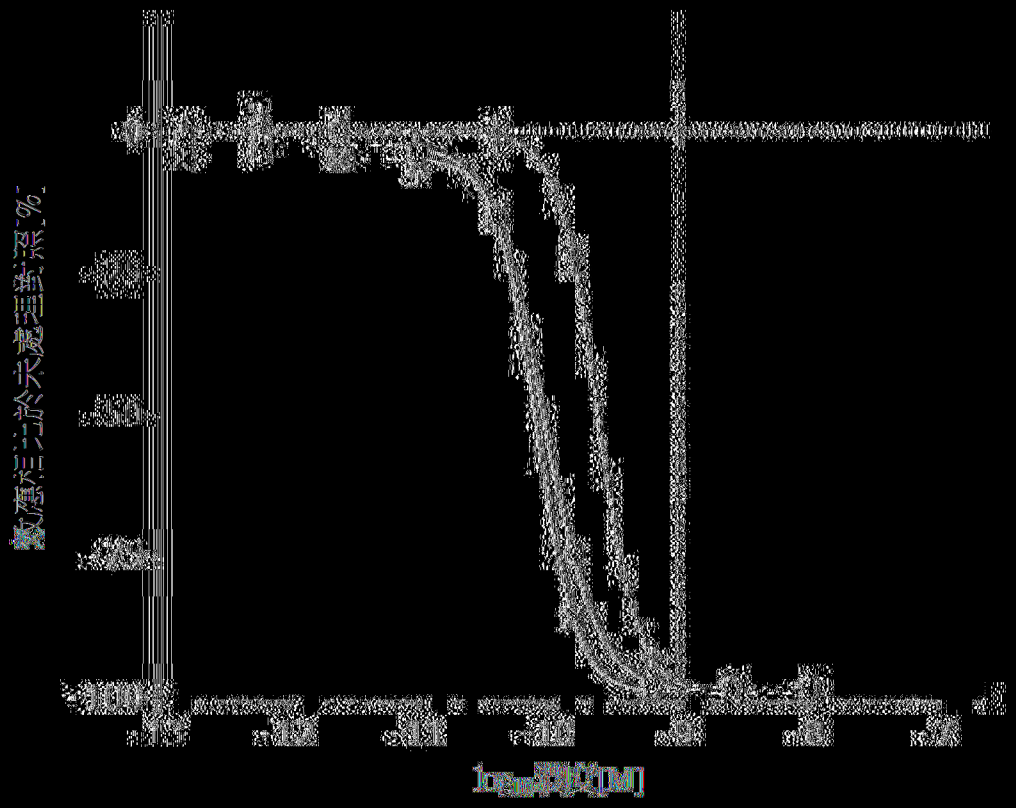


圖24A

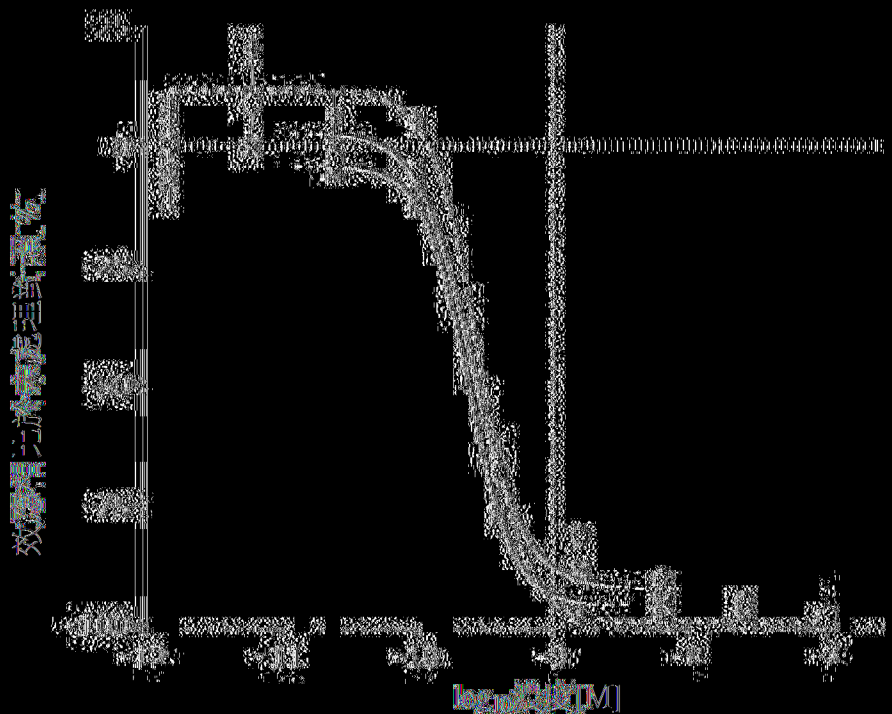
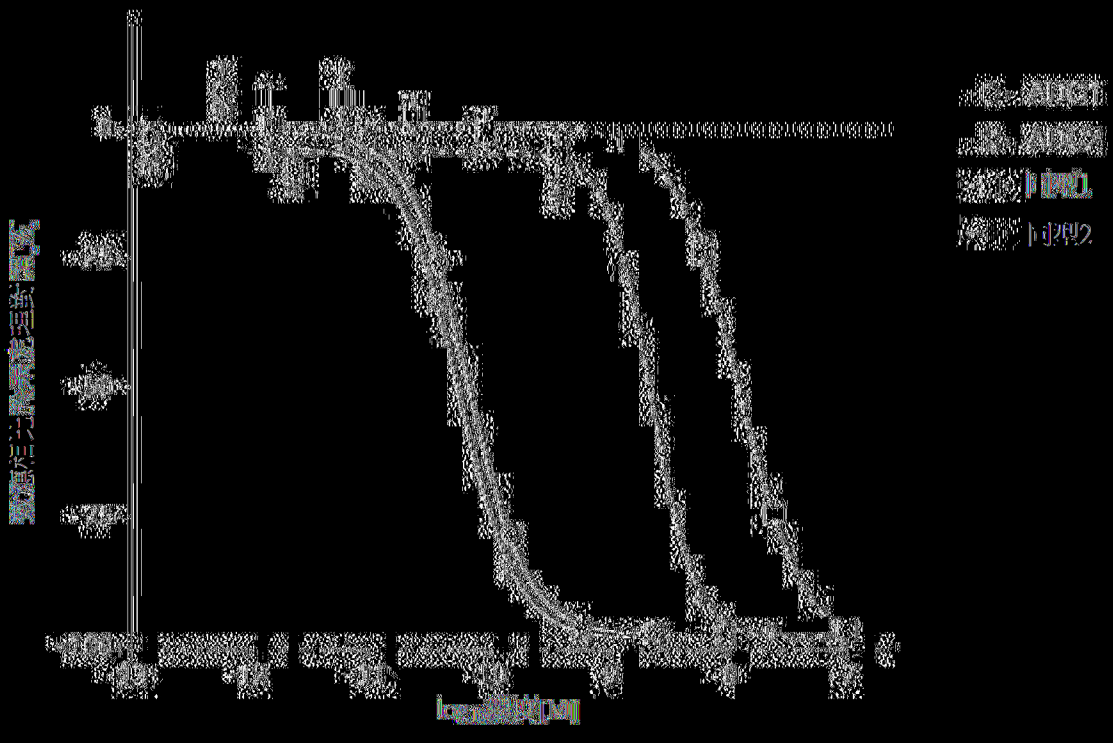


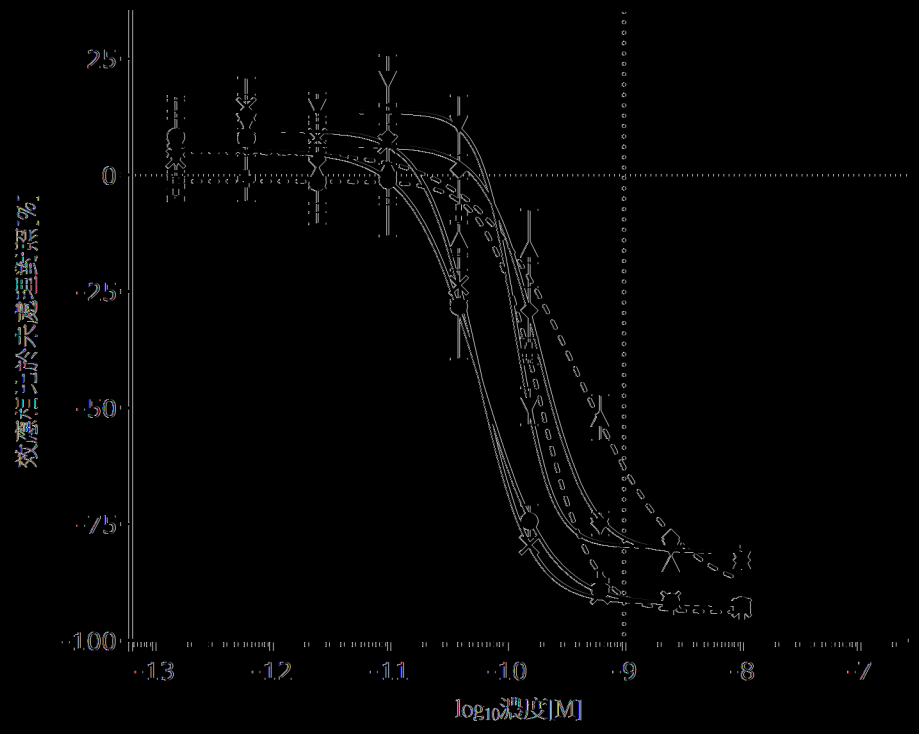
圖24B



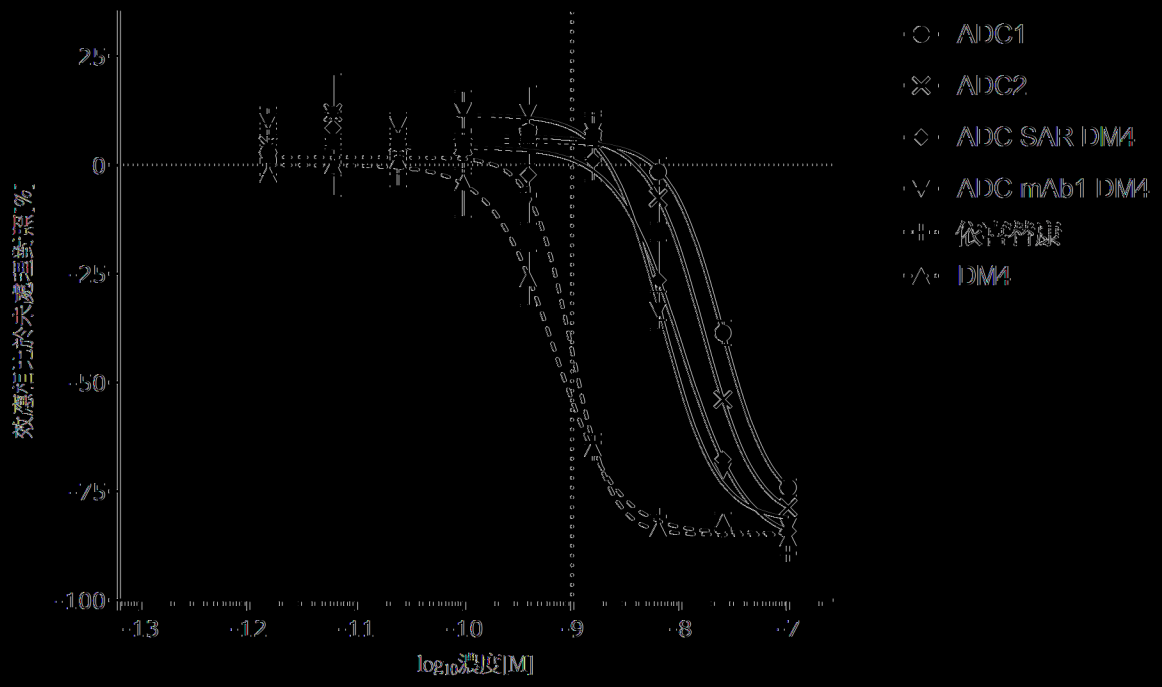
(圖24C)



(圖25)


25
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
效應活細胞未覆蓋面積百分比%

(圖26A)


25
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
效應活細胞未覆蓋面積百分比%
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4
依沙替康
DM4

(圖26B)

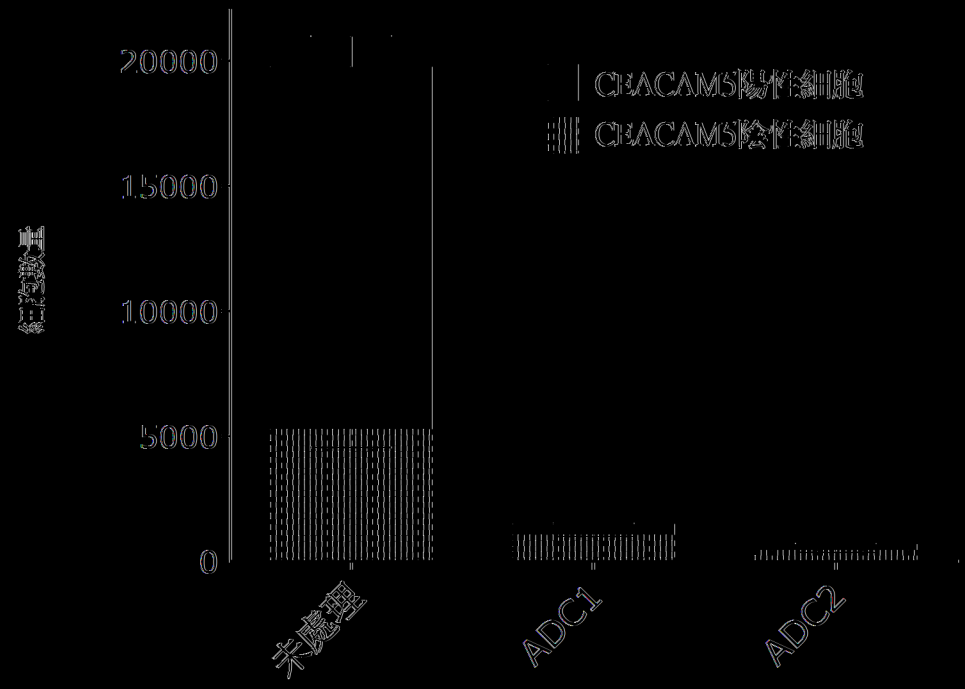

20000
15000
10000
5000
0
CEACAM5陽性細胞
CEACAM5陰性細胞
未處理
ADC1
ADC2

圖2A

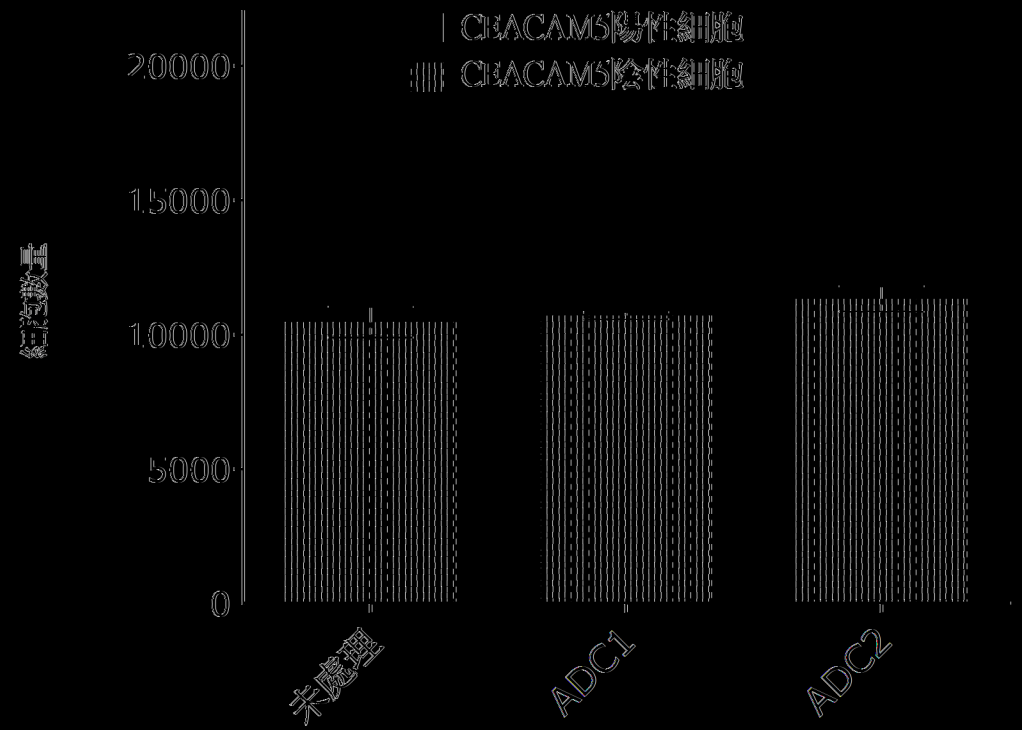
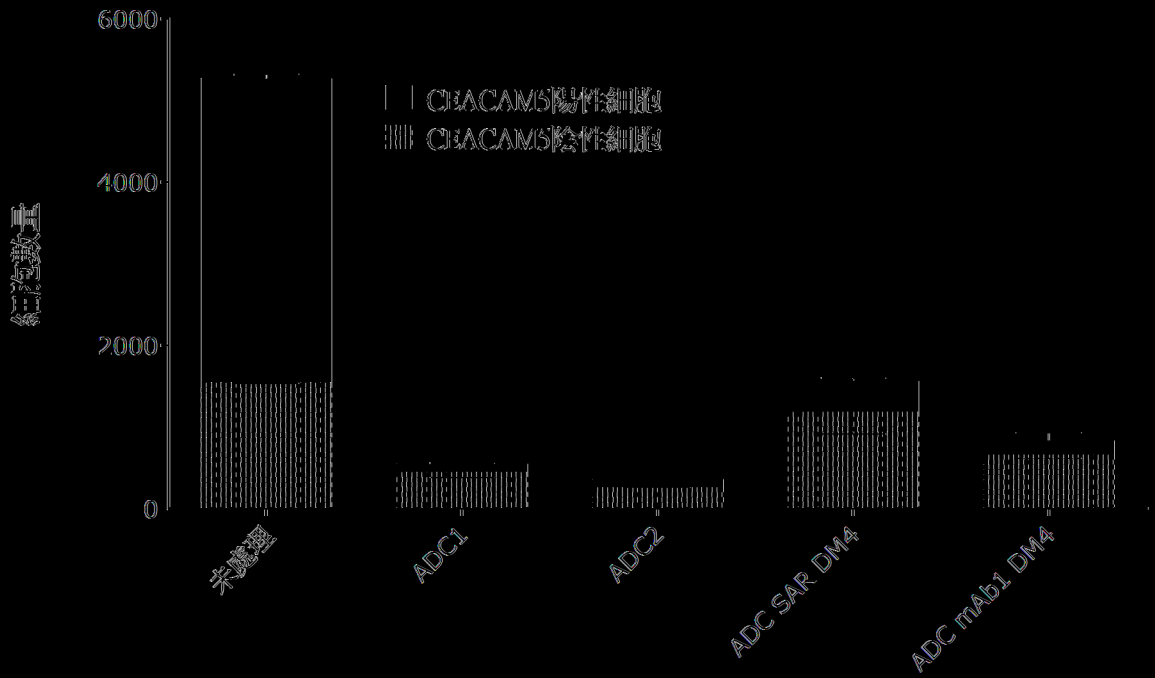
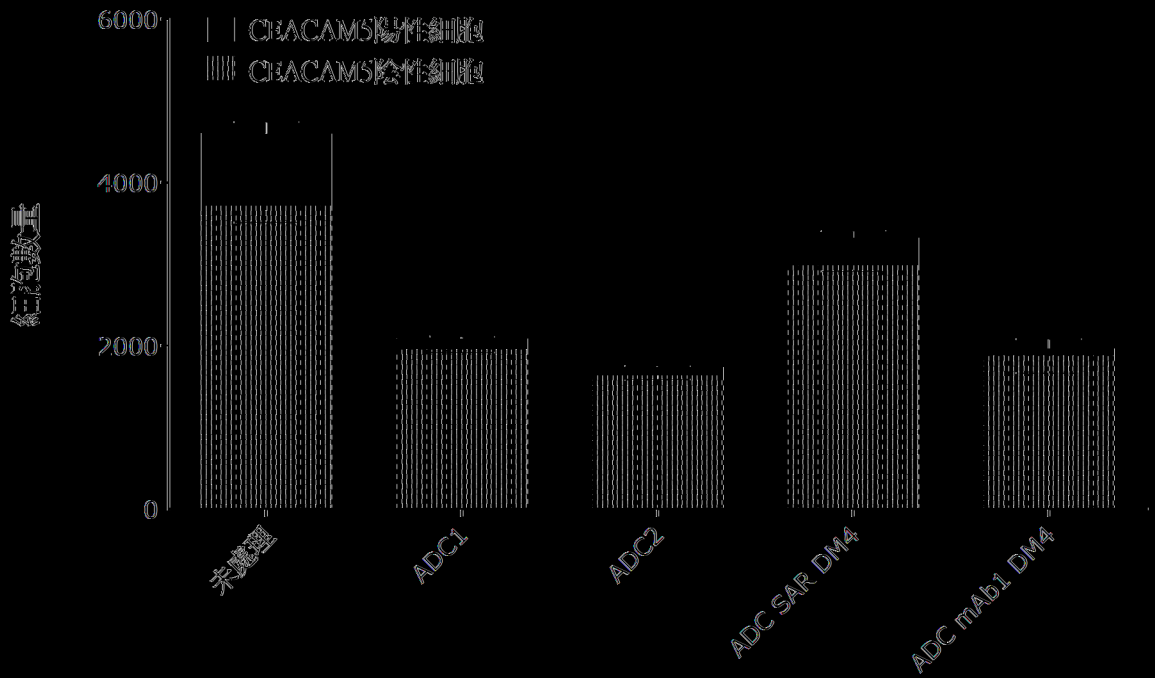

20000
15000
10000
5000
0
CEACAM5陽性細胞
CEACAM5陰性細胞
未處理
ADC1
ADC2

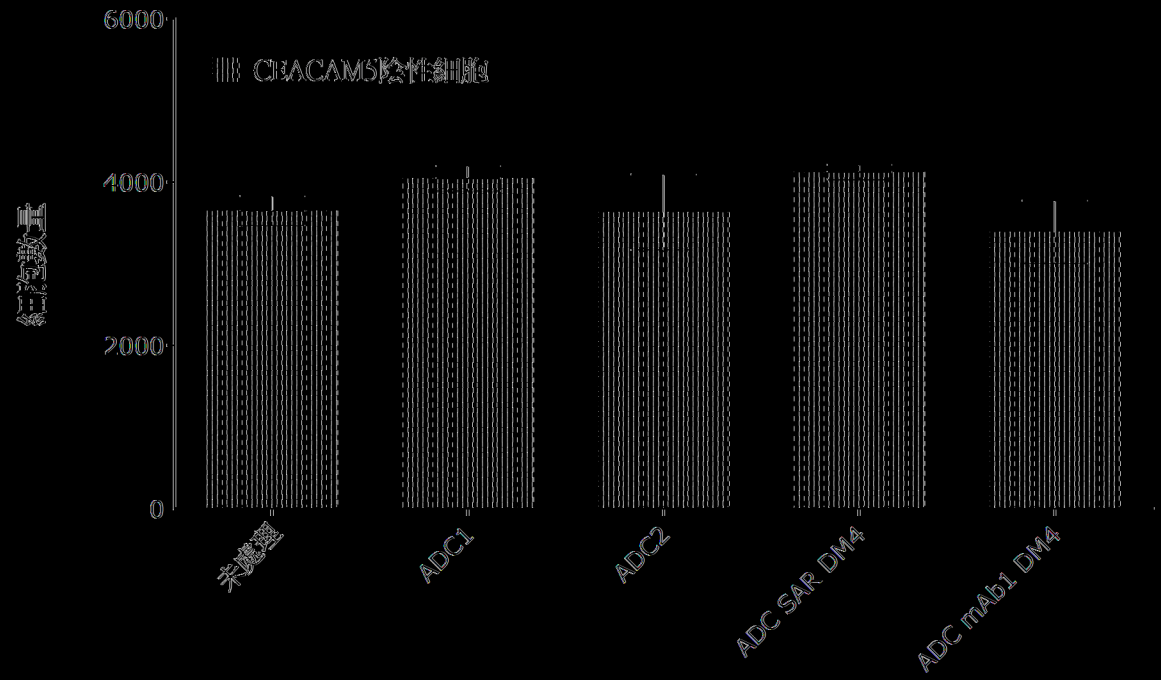
圖2B


6000
4000
2000
0
CEACAM5陽性細胞
CEACAM5陰性細胞
未處理
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4

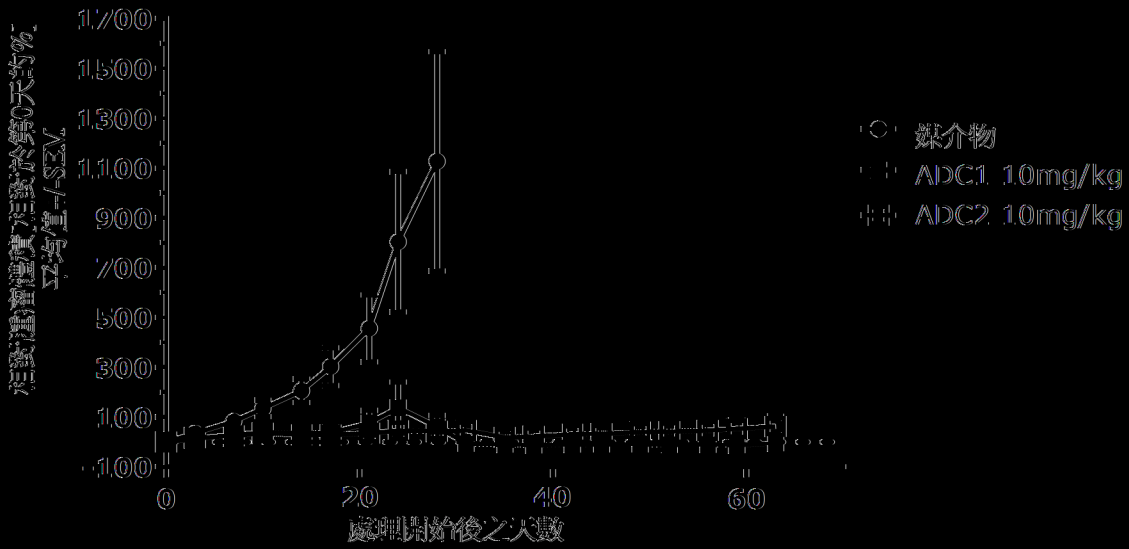
(圖28A)


6000
4000
2000
0
CEACAM5陽性細胞
CEACAM5陰性細胞
未處理
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4

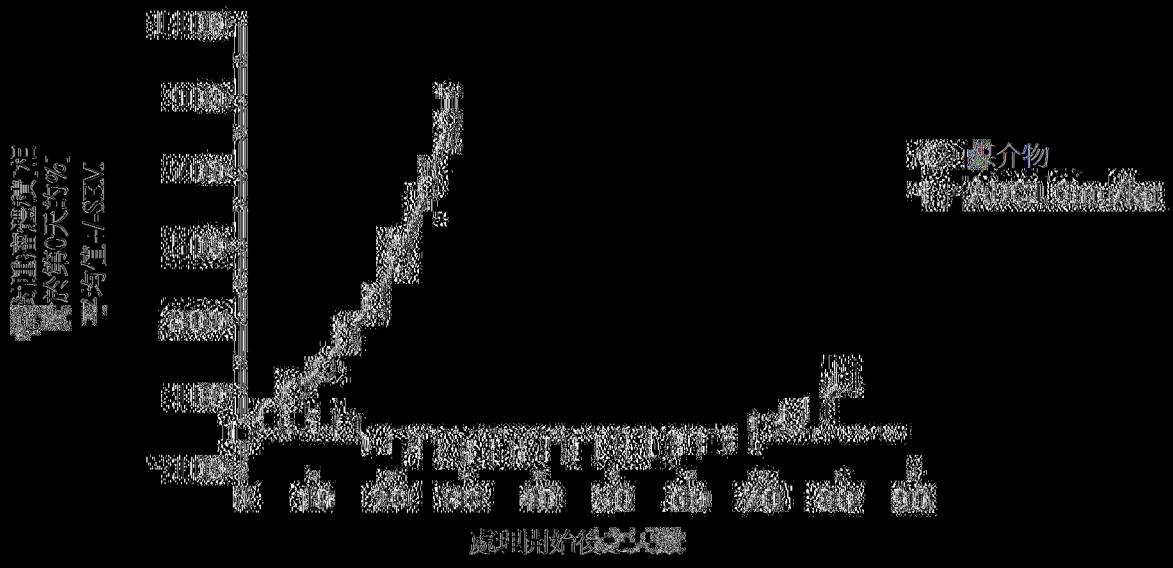
(圖28B)


6000
4000
2000
0
CBACAM5陽性細胞
未處理
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4

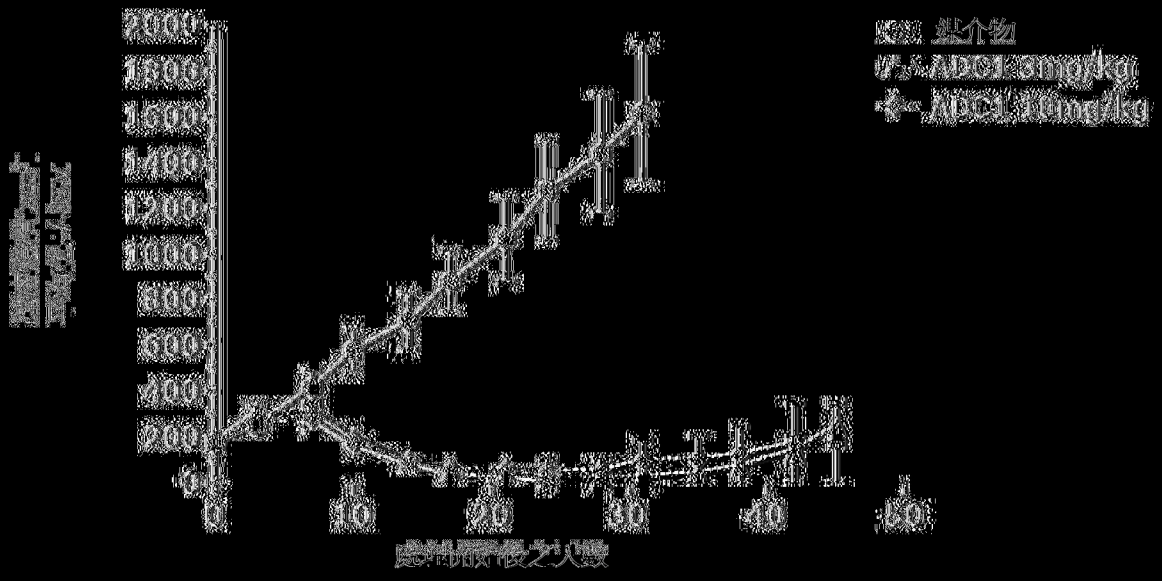
|(圖28C)|


媒介物
ADC1 10mg/kg
ADC2 10mg/kg
0
20
40
60
處理開始後之天數

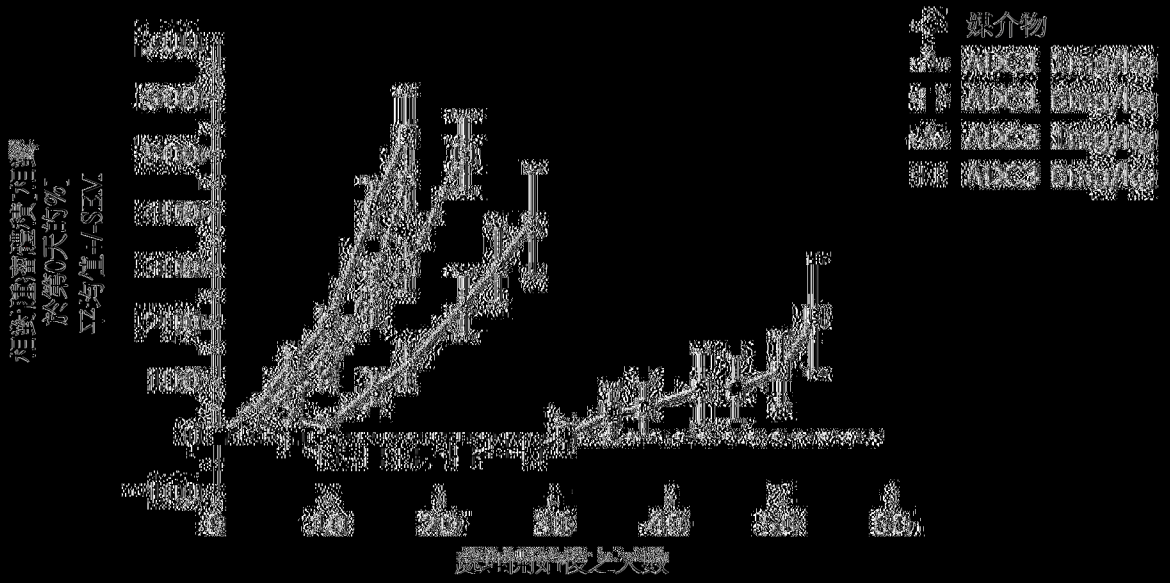
|(圖29)|


處理開始後之天數
試驗介物
A1C1 3mg/kg
A1C1 1mg/kg

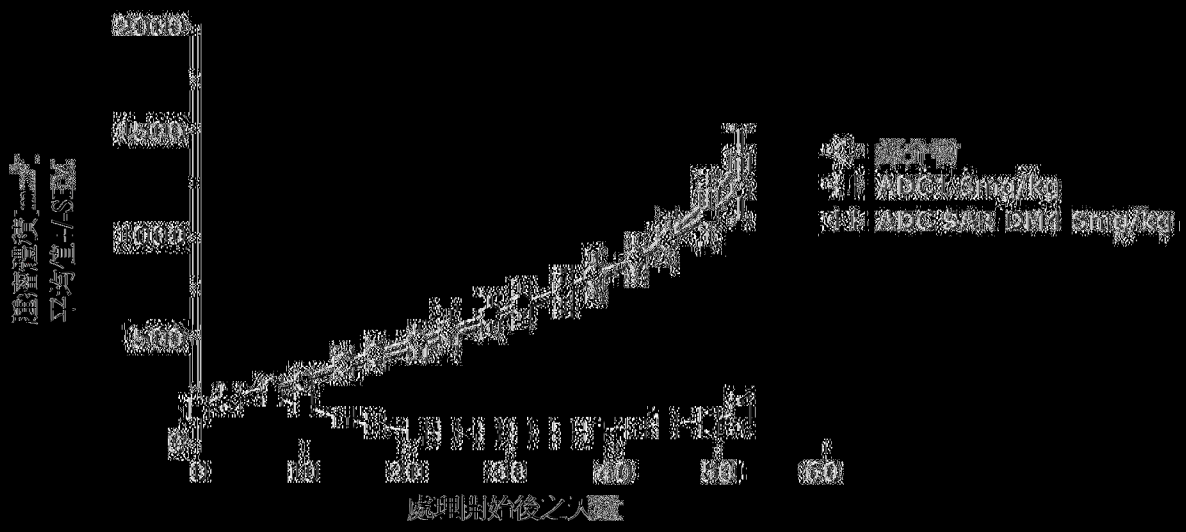
(圖30)


處理開始後之天數
試驗介物
A1C1 3mg/kg
A1C1 1mg/kg

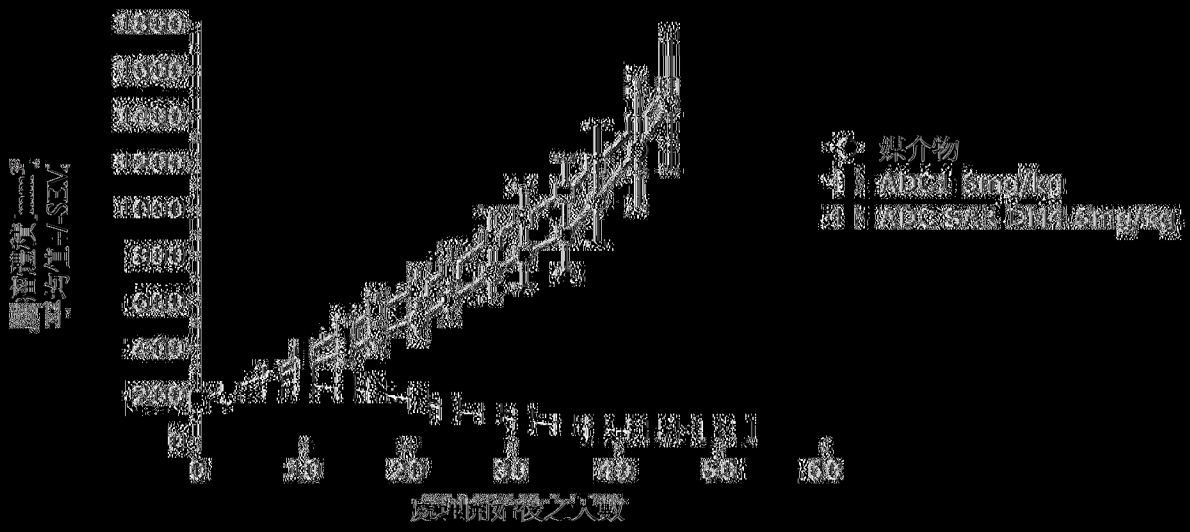
(圖31)



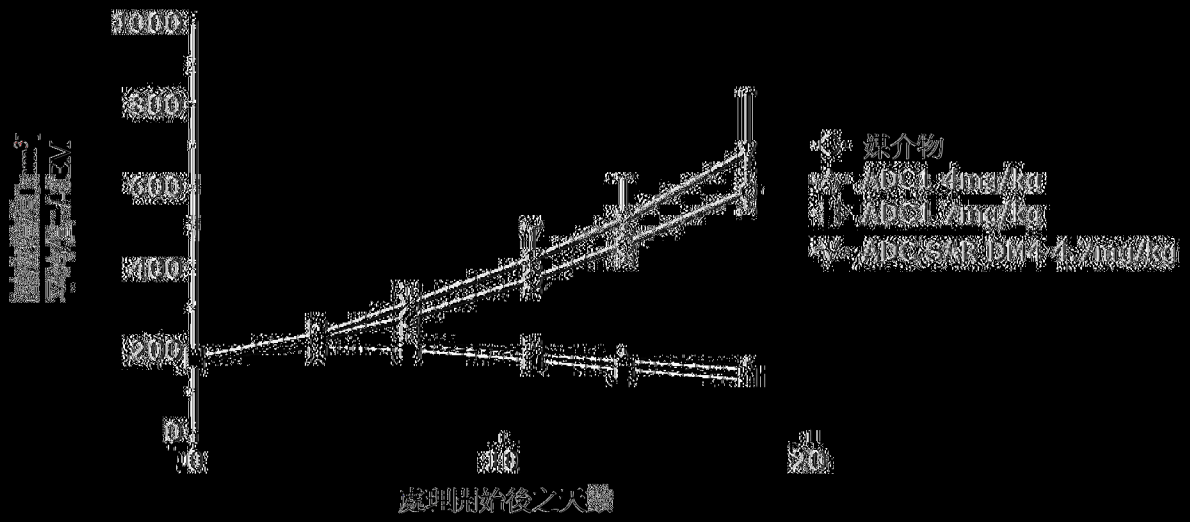
[圖32]



[圖33]


媒介物
ADC1 5mg/kg
ADC5 5mg/kg
遠端開始後之天數

[圖34]

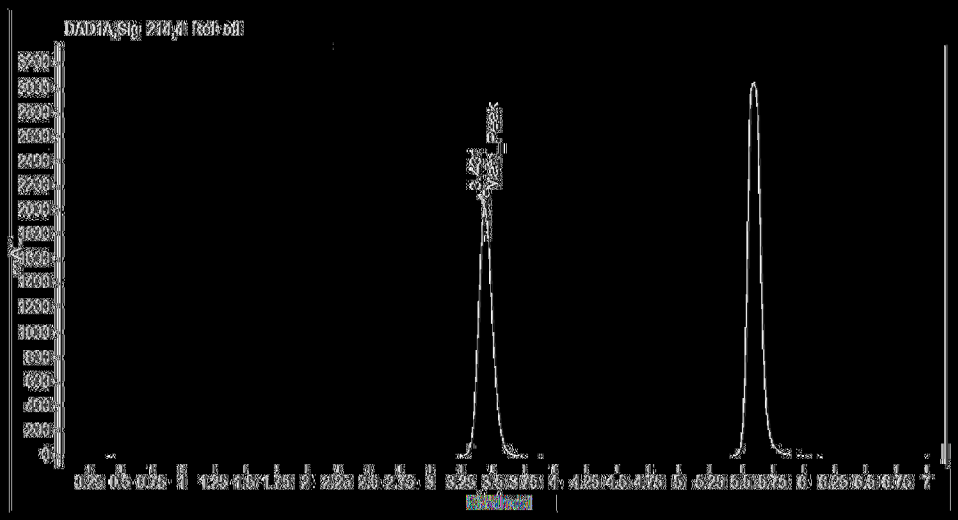

媒介物
ADC1 4mg/kg
ADC1 2mg/kg
ADC5 4mg/kg
遠端開始後之天數

[圖35]

顯示輸入mAb及最終BDS之純度之典型SEC分析圖：

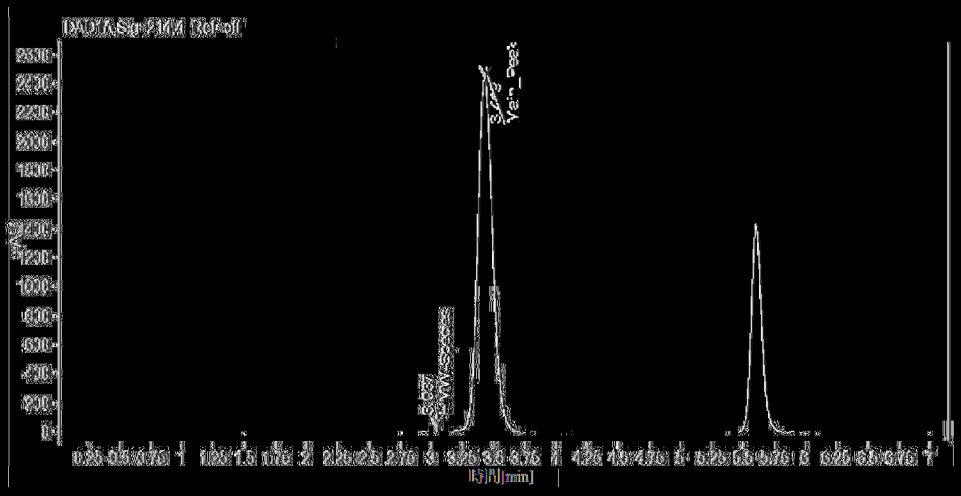
輸入mAb

純度：100%



ADC BDS

純度：98.9%

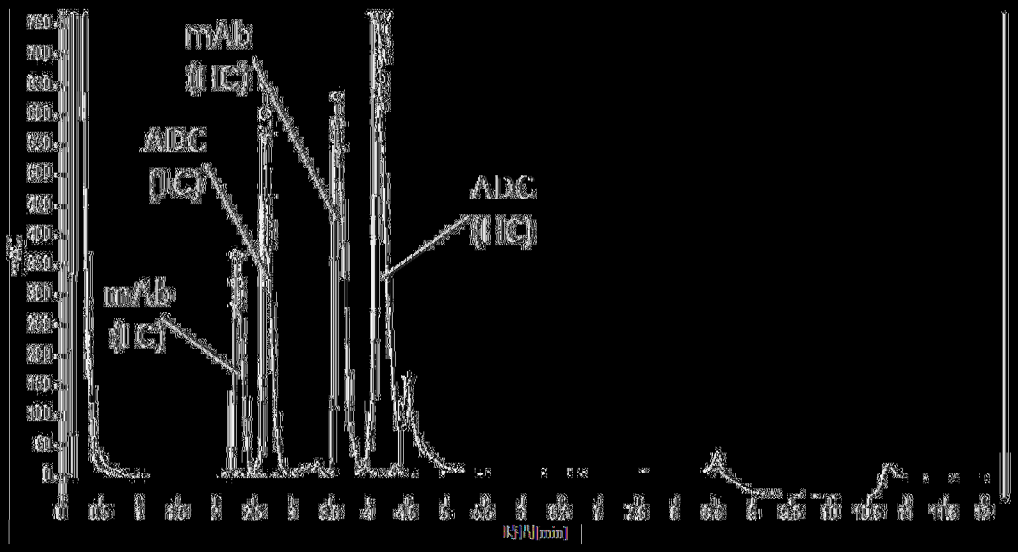


(圖36)

顯示最終BDS之DAR測定之典型RP-HPLC層析圖：

ADC BDS

DAR：8.16

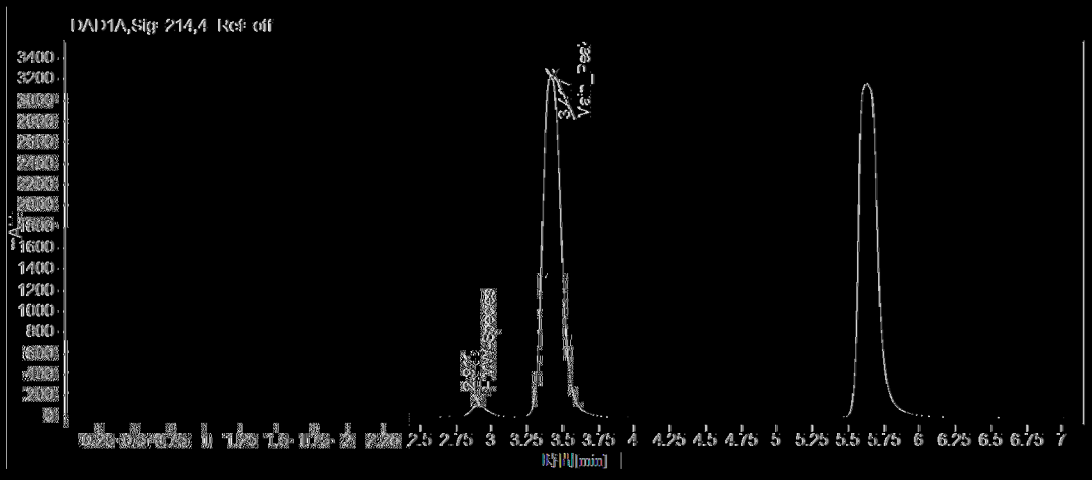


（圖37）

顯示輸入mAb及最終BDS之純度之典型SEC層析圖：

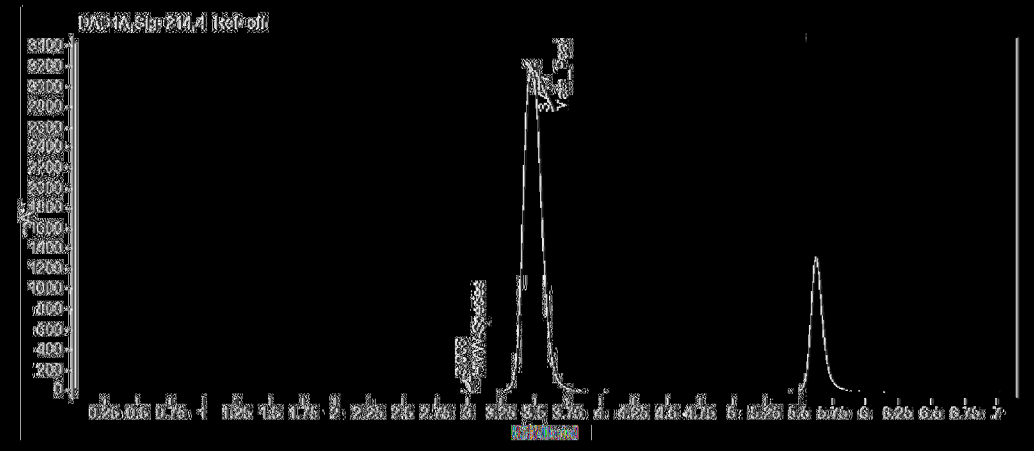
輸入mAb

純度：96.3%



ADC BDS

純度：99.9



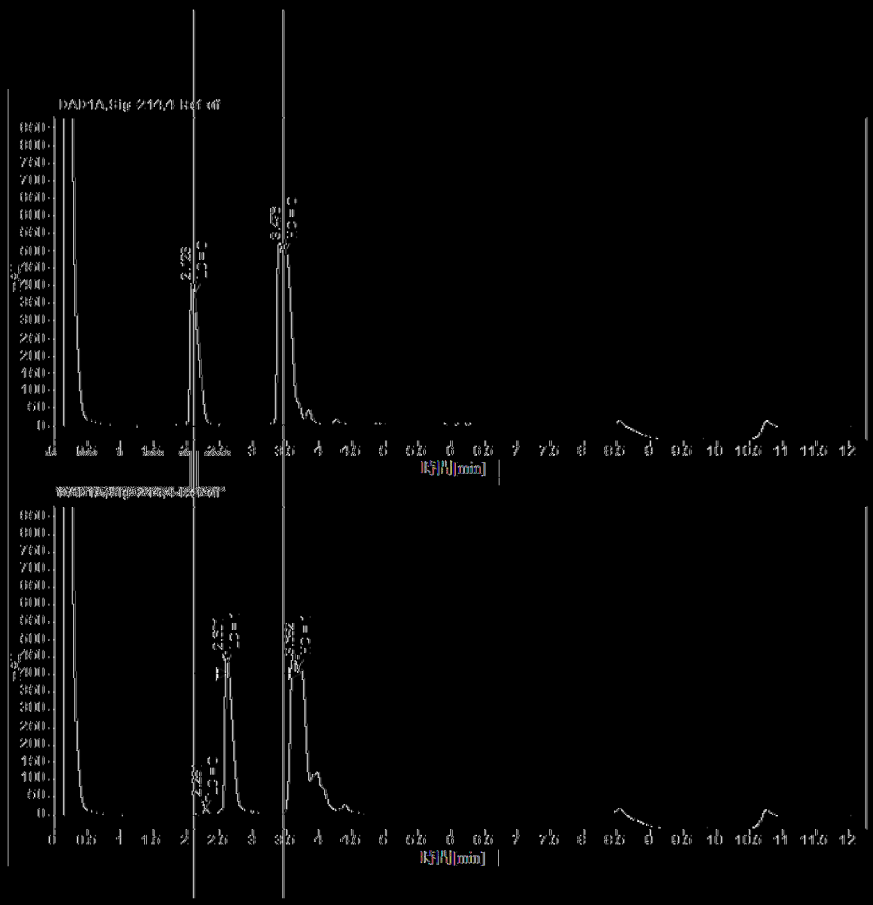
（圖38）

給示最終BDS之DAR測定之典型RP-HPLC解析圖：

輸入mAb

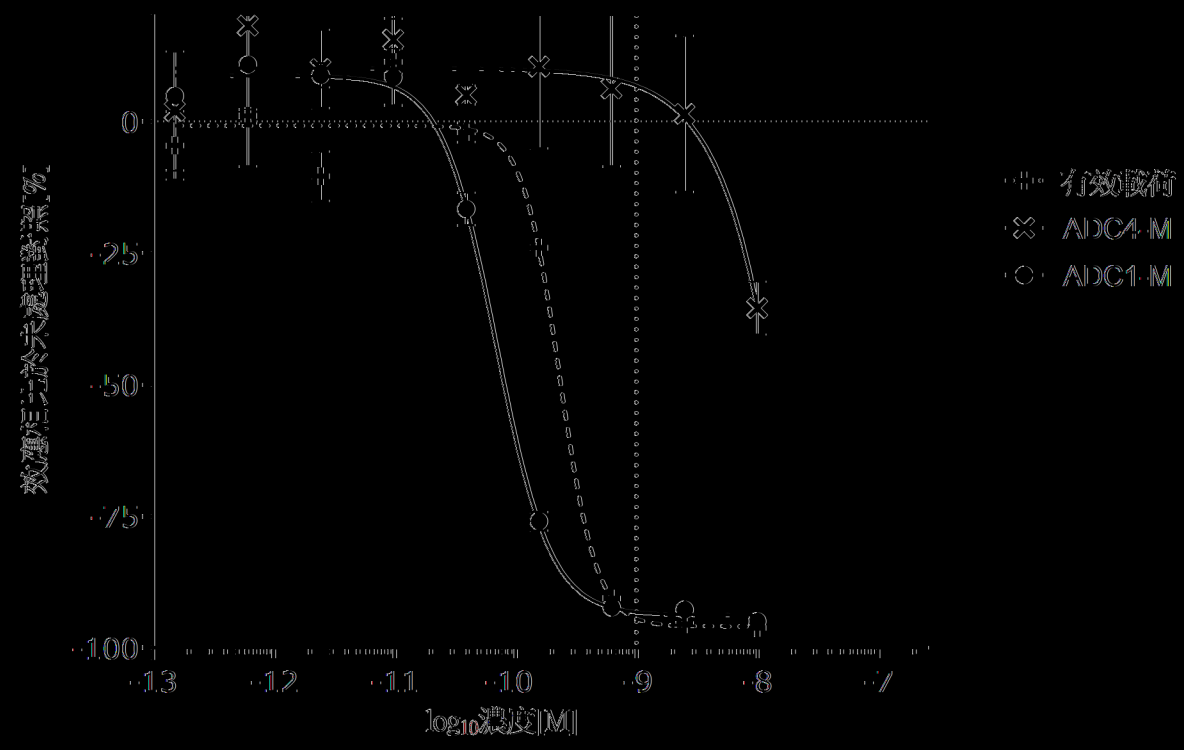
ADC BDS

DAR：3.87

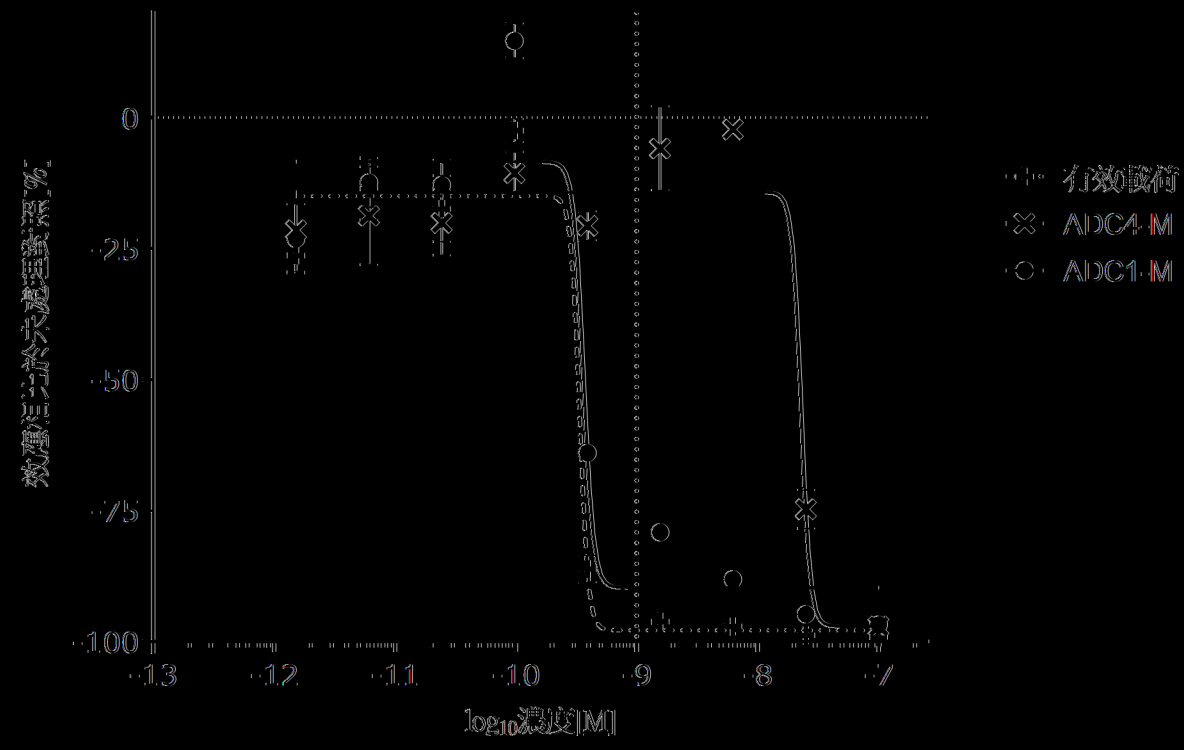


|(圖39)|

(a)

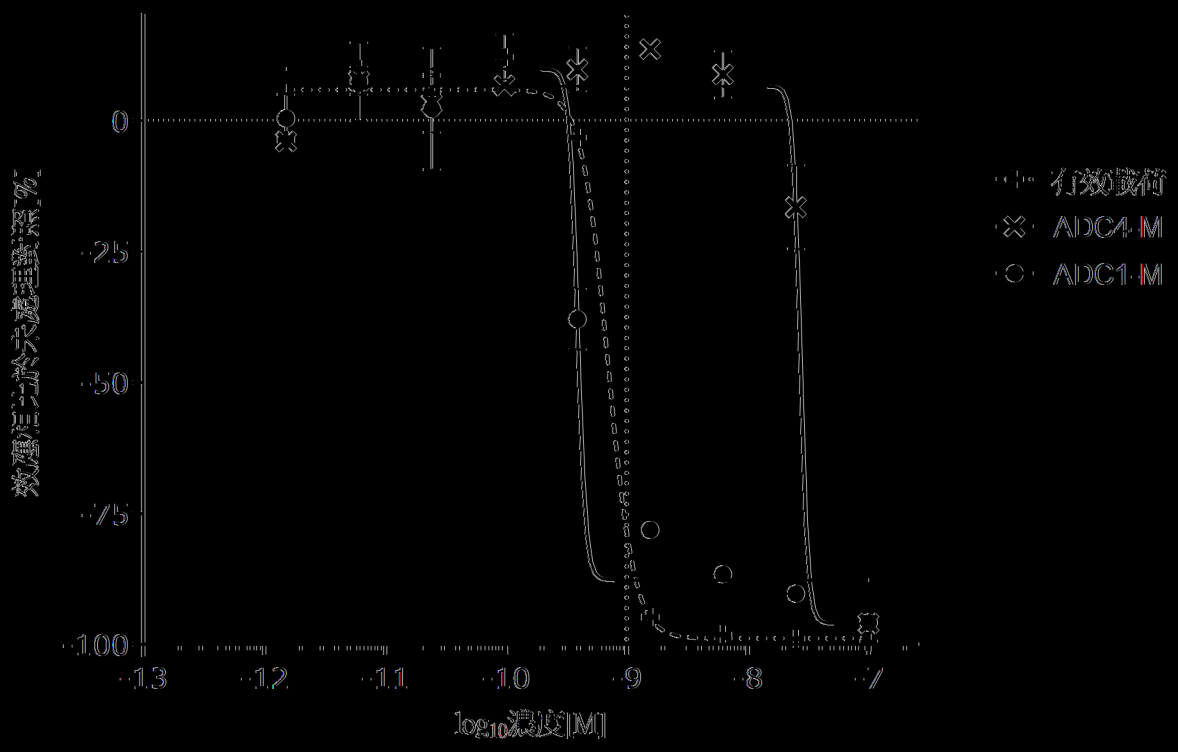

0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有效載荷
ADC4-M
ADC1-M

(b)

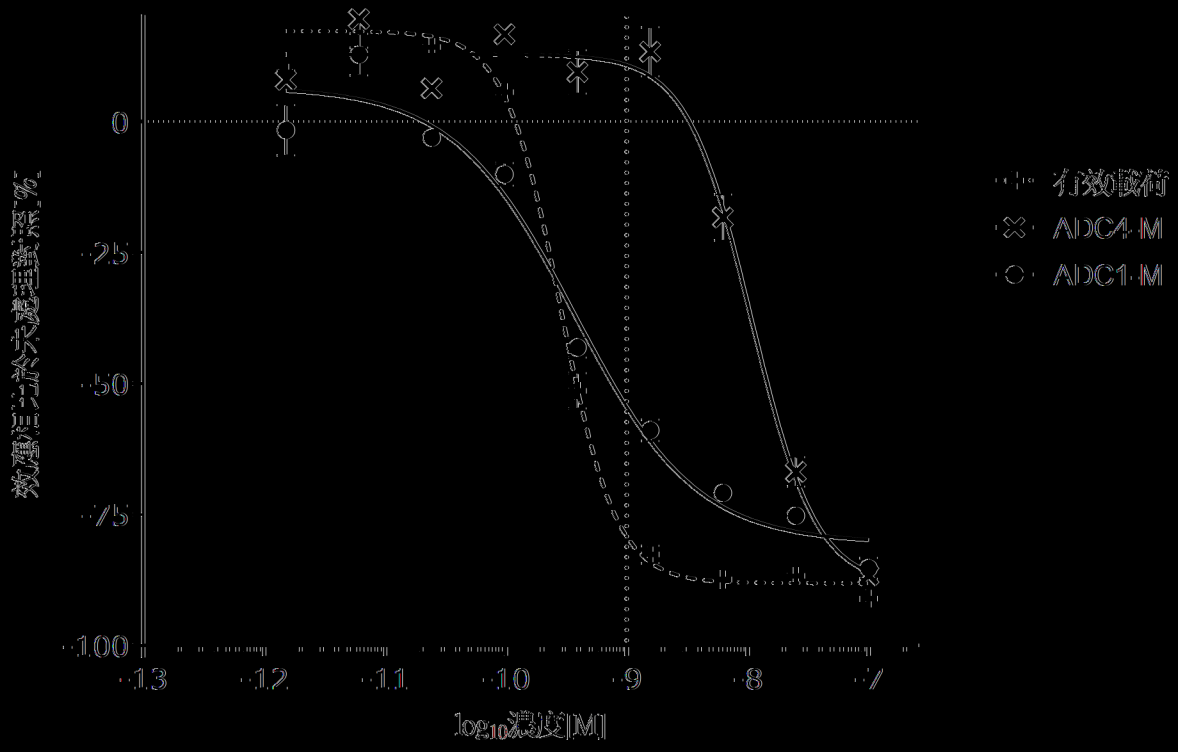

0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有效載荷
ADC4-M
ADC1-M

(圖40)

(c)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有效載荷
ADC4-M
ADC1-M

(d)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有效載荷
ADC4-M
ADC1-M

[圖10]（續）

(e)

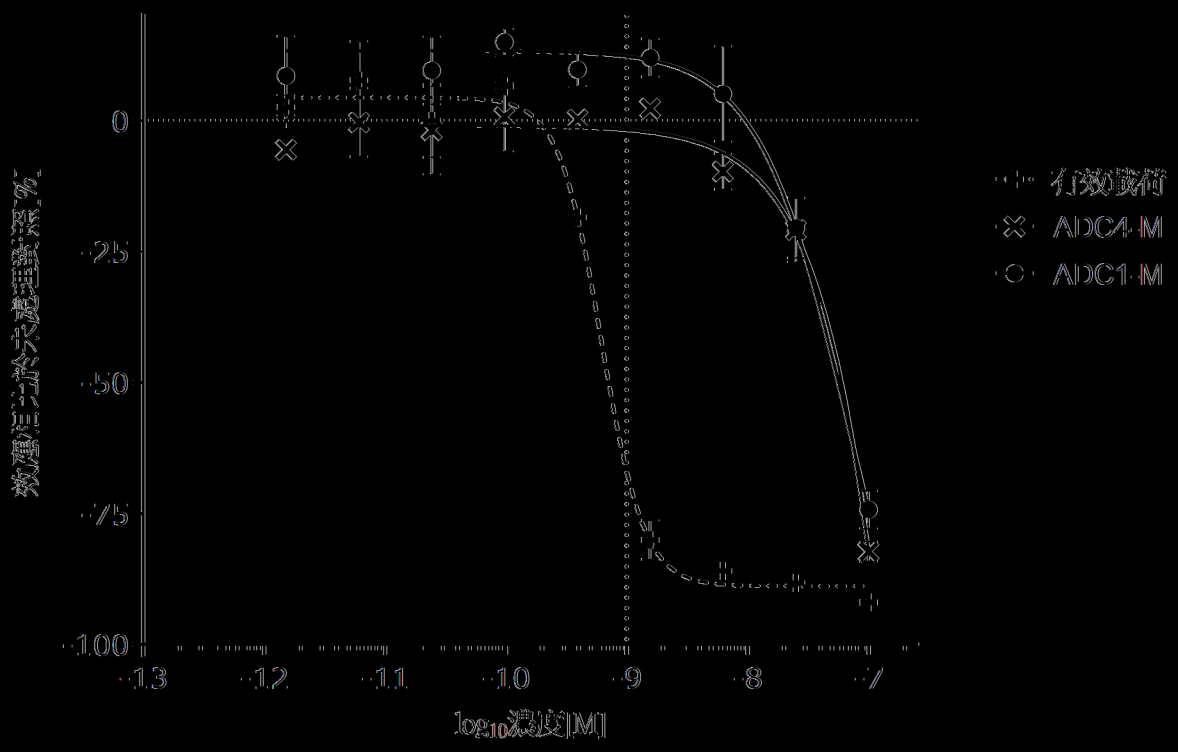
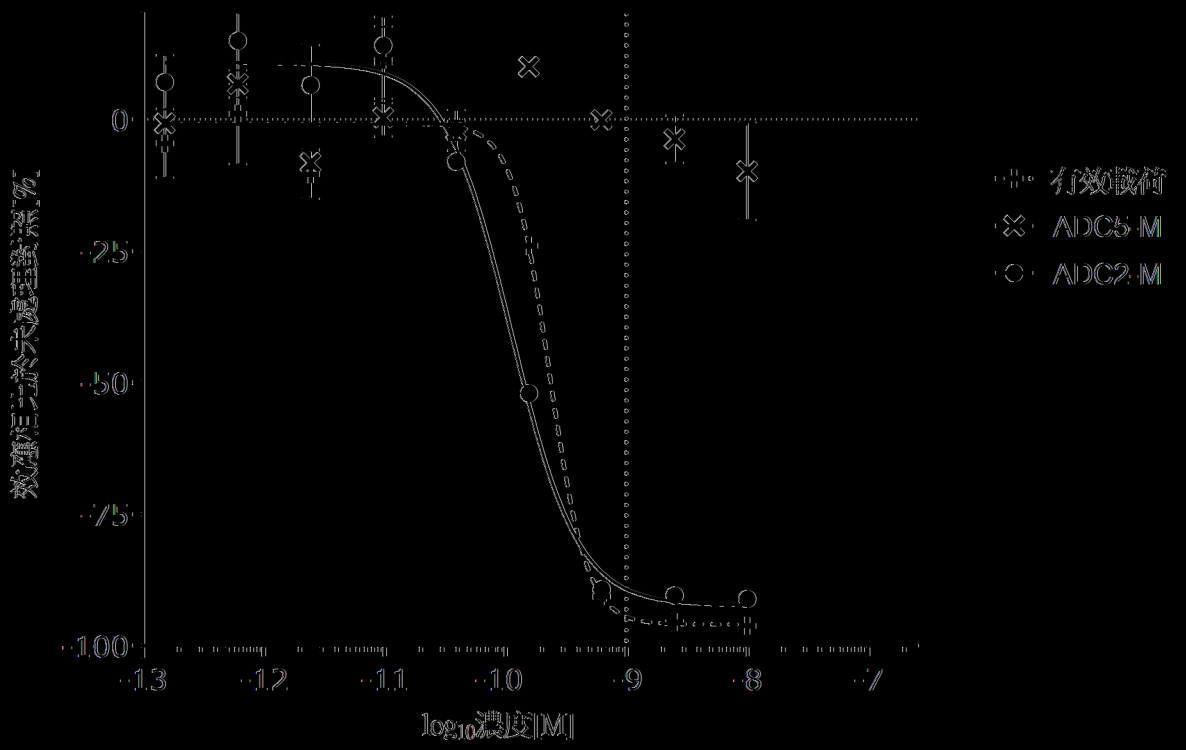
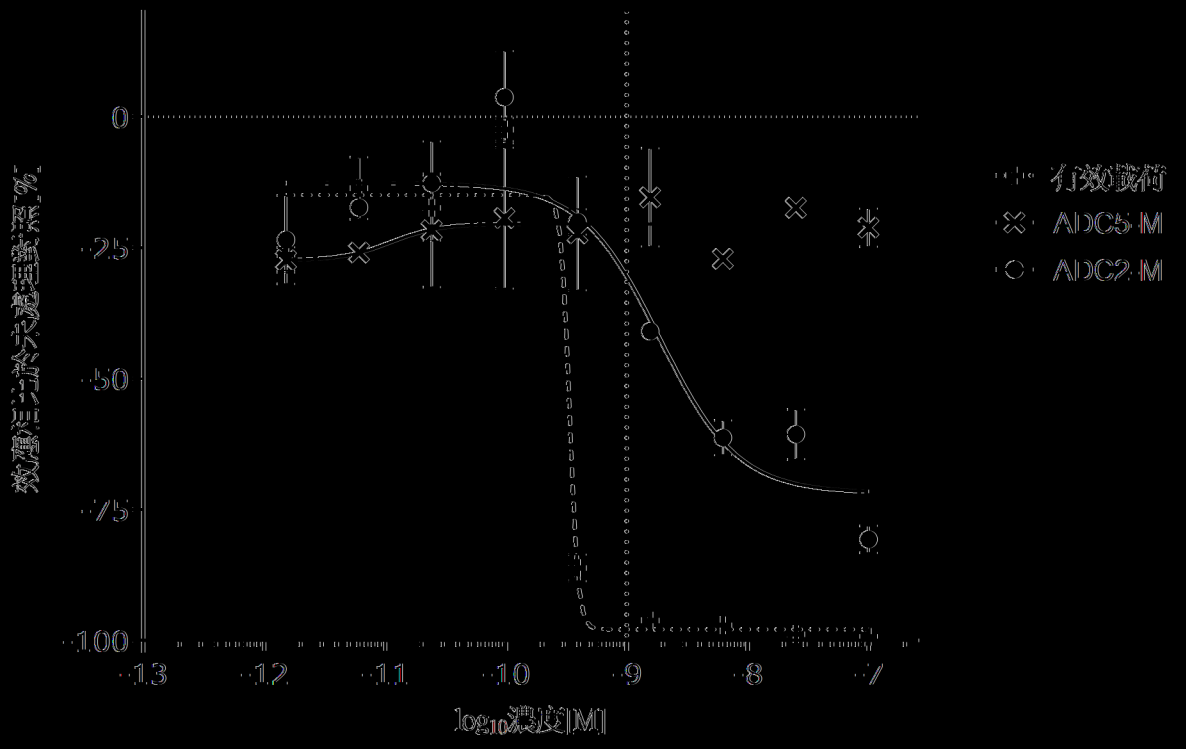


圖4(e)

(a)

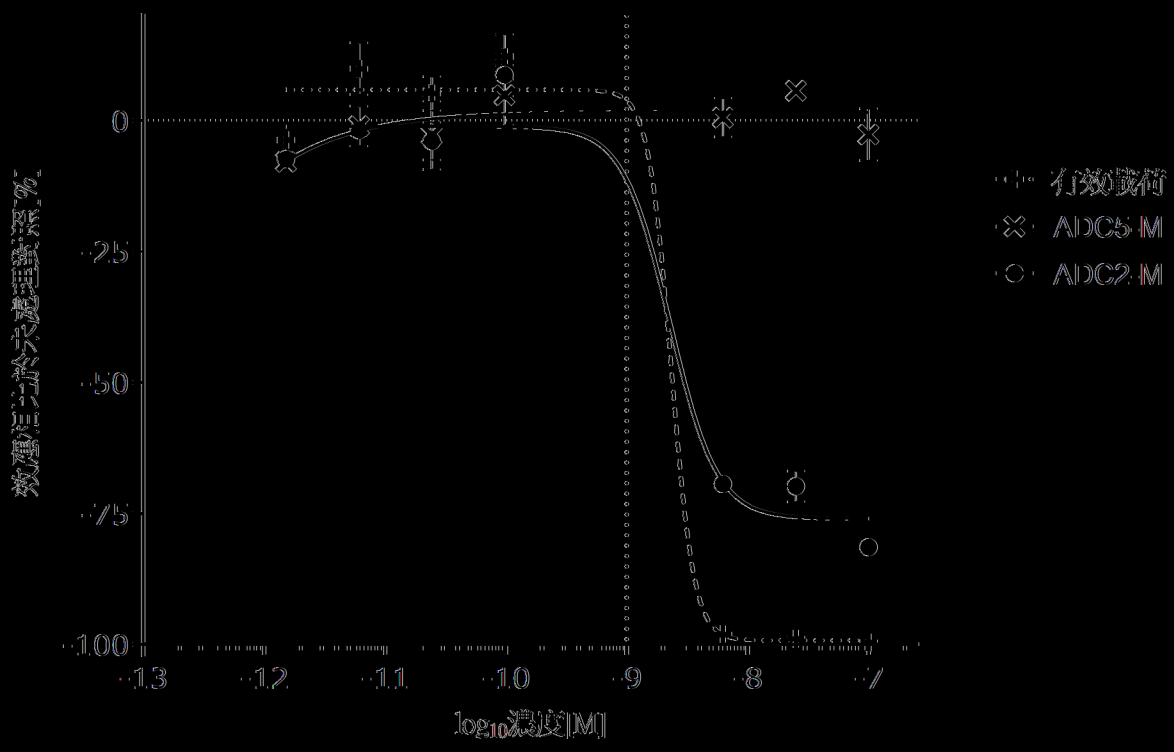

0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有效載荷
ADC5-M
ADC2-M

(b)

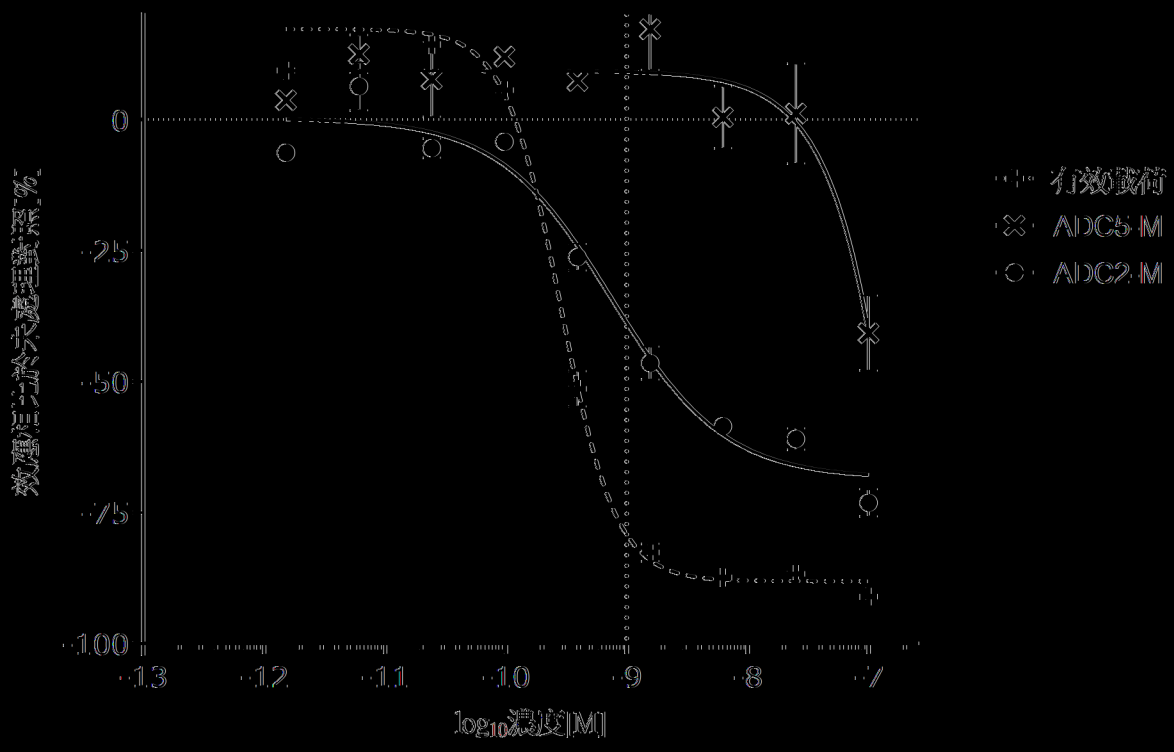

0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有效載荷
ADC5-M
ADC2-M

（圖41）

(c)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有効載荷
ADC5 M
ADC2 M

(d)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10濃度[M]
有効載荷
ADC5 M
ADC2 M

（圖41）(續)

(e)

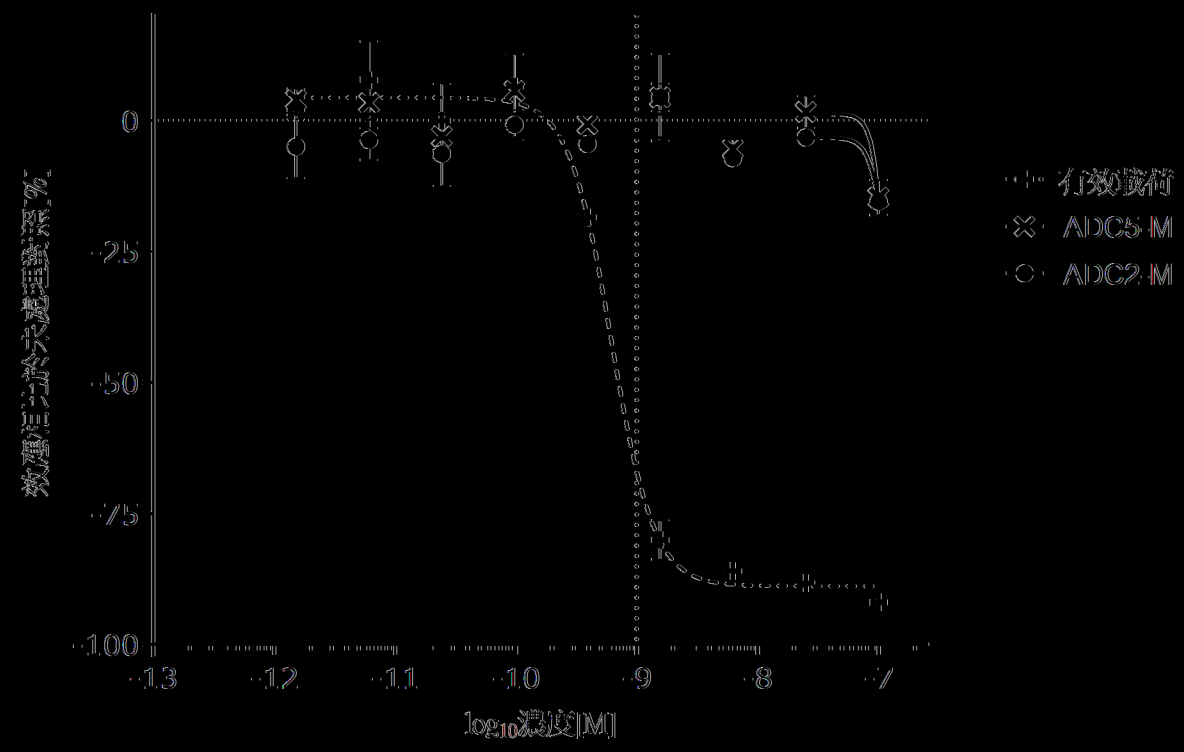
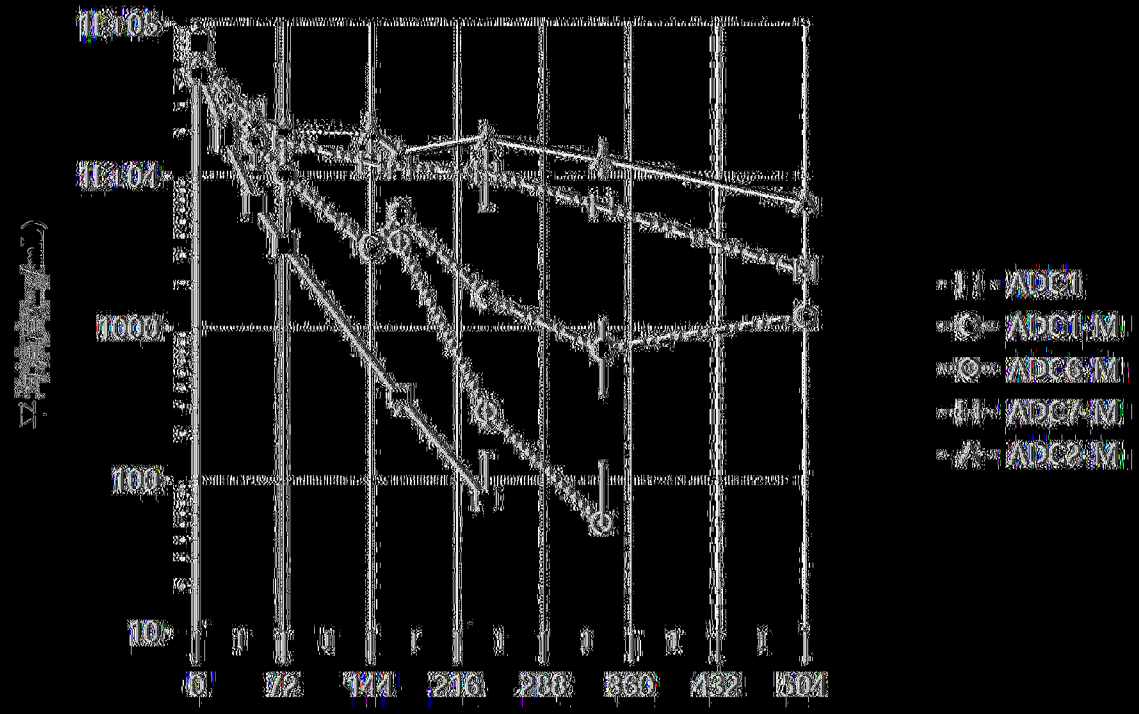
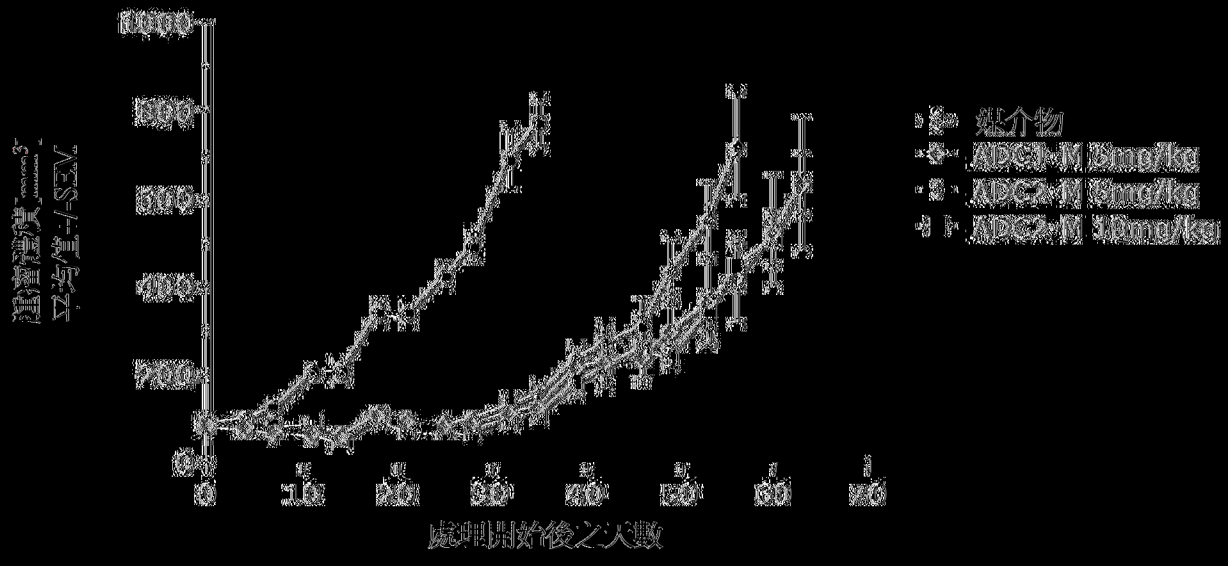


圖4.1 (續)

Hu1cRh (276)



|(圖42)|



|(圖43)|

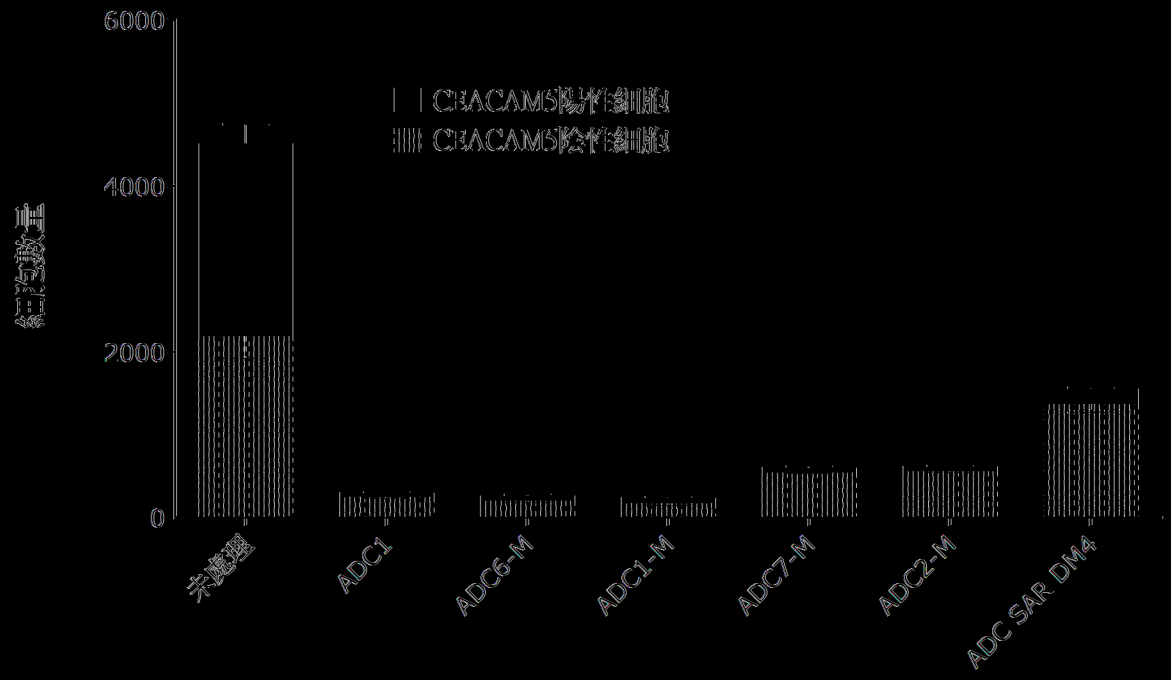

6000
4000
2000
0
CEACAM5陽性細胞
CEACAM5陰性細胞
未處理
ADC1
ADC6-M
ADC1-M
ADC7-M
ADC2-M
ADC SAR DM4

圖44

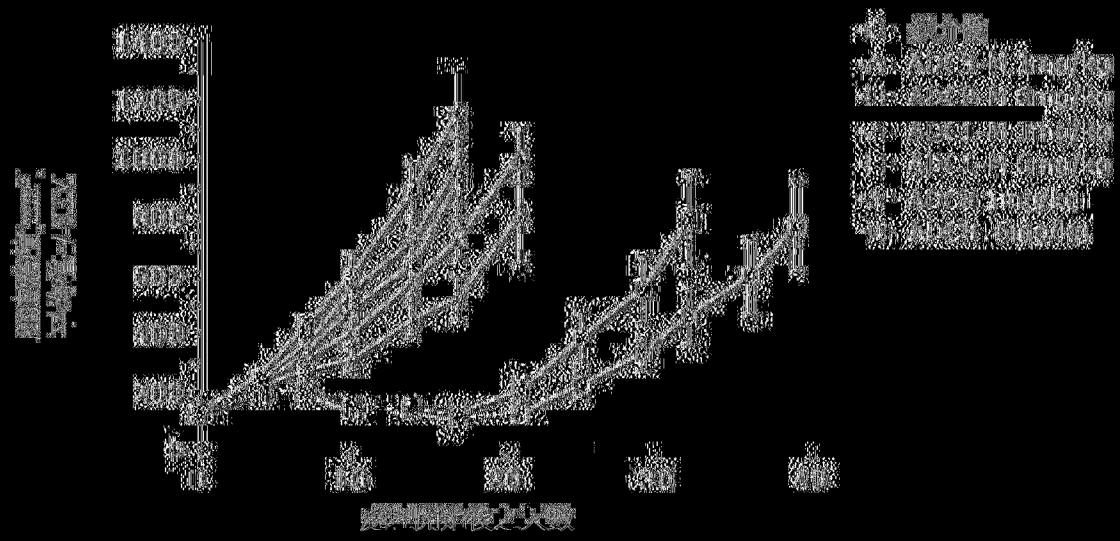


圖45

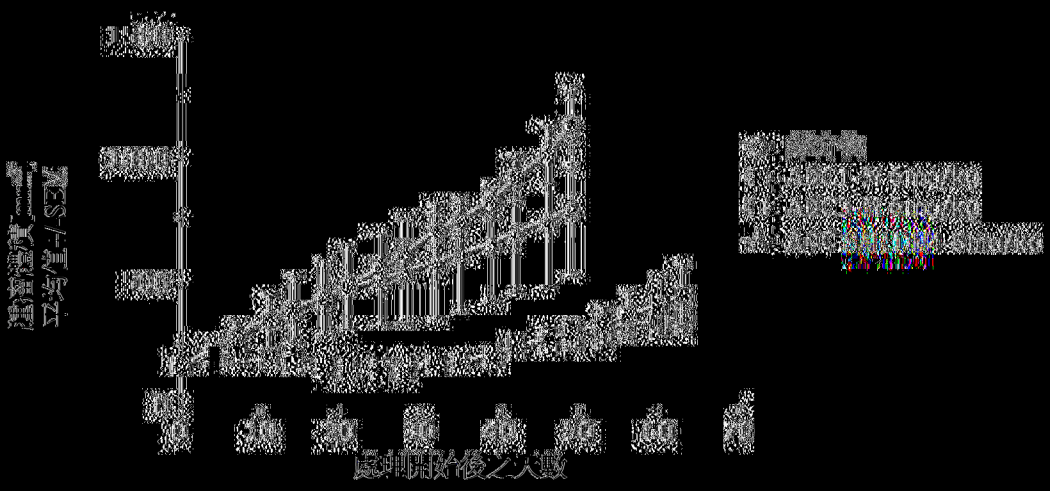

腫瘤體積
0
500
1000
1500
2000
2500
0
10
20
30
40
50
60
70
給藥後之天數
ADC1-M 4mg/kg
ADC3-M 4mg/kg
ADC SAR1DM4 4.2mg/kg

圖46

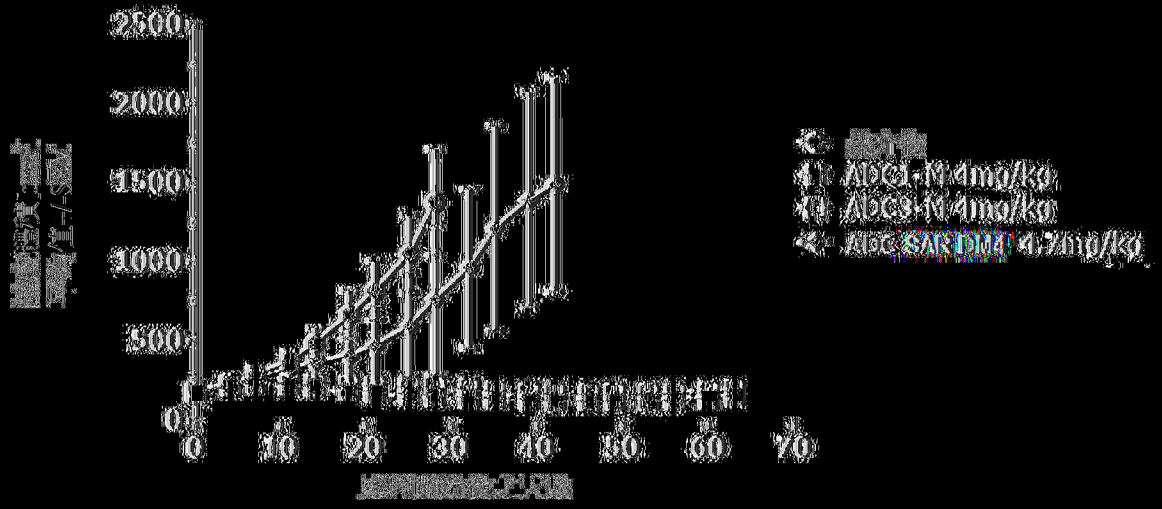

腫瘤體積
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
ADC1-M 4mg/kg
ADC3-M 4mg/kg
ADC SAR1DM4 4.2mg/kg

圖47