



(21)申請案號：112134213

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 29 日

(51)Int. Cl. :

C07K16/28 (2006.01)A61K39/395 (2006.01)

A61K47/68 (2017.01)A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/06/29美國62/186,161

2016/05/18美國62/338,203

2016/06/07美國62/346,730

(71)申請人：美商免疫原公司 (美國) IMMUNOGEN, INC. (US)

美國

(72)發明人：柯伏唐葉蕾那 KOVTUN, YELENA (US)；塔法瑞丹尼爾 TAVARES, DANIEL (US)；路林元 RUI, LINGYUN (CN)；契坦頓湯瑪士 CHITTENDEN, THOMAS (US)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：有申請專利範圍項數：145 項圖式數：33共 508 頁

(54)名稱

抗 CD123 抗體以及其結合物及衍生物

(57)摘要

本發明大體上係關於結合 CD123 抗原(介白素-3 受體之  $\alpha$  鏈或 IL-3R $\alpha$ )之抗體、其抗原結合片段、多肽及免疫結合物。本發明亦係關於使用此種 CD123 結合分子來診斷及治療諸如 B 細胞惡性病之疾病的方法。

The present invention generally relates to antibodies, antigen-binding fragments thereof, polypeptides, and immunoconjugates that bind to CD123 antigen (the  $\alpha$  chain of the interleukine 3 receptor, or IL-3R $\alpha$ ). The present invention also relates to methods of using such CD123-binding molecules for diagnosing and treating diseases, such as B-cell malignancies.

指定代表圖：

對 TF-1 細胞之IL3 依賴性增殖抑制

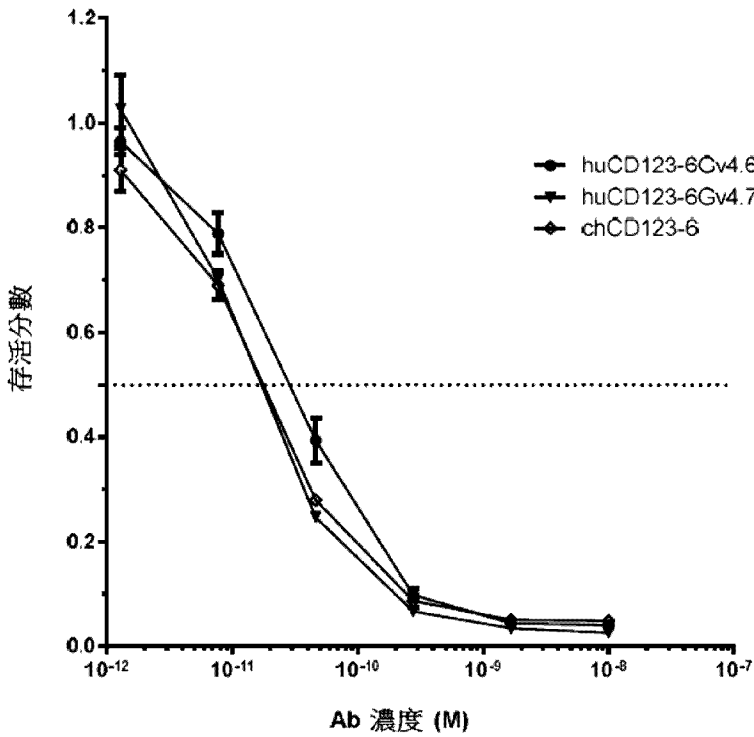


圖 1



## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗CD123抗體以及其結合物及衍生物

【英文發明名稱】 ANTI-CD123 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND  
DERIVATIVES THEREOF

### 【中文】

本發明大體上係關於結合CD123抗原(介白素-3受體之 $\alpha$ 鏈或IL-3R $\alpha$ )之抗體、其抗原結合片段、多肽及免疫結合物。本發明亦係關於使用此種CD123結合分子來診斷及治療諸如B細胞惡性病之疾病的方法。

### 【英文】

The present invention generally relates to antibodies, antigen-binding fragments thereof, polypeptides, and immunoconjugates that bind to CD123 antigen (the  $\alpha$  chain of the interleukine 3 receptor, or IL-3R $\alpha$ ). The present invention also relates to methods of using such CD123-binding molecules for diagnosing and treating diseases, such as B-cell malignancies.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗CD123抗體以及其結合物及衍生物

【英文發明名稱】 ANTI-CD123 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND  
DERIVATIVES THEREOF

### 【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於結合CD123抗原(介白素-3受體之 $\alpha$ 鏈或IL-3R $\alpha$ )之抗體、其抗原結合片段、多肽及免疫結合物。本發明亦係關於使用此種CD123結合分子來診斷及治療諸如B細胞惡性病之疾病的方法。

### 相關申請案之引用

【0002】 本申請案根據35 U.S.C.§119 (e)主張2015年6月29日申請之美國臨時申請案第62/186,161號、2016年5月18日申請之美國臨時申請案第62/338,203號及2016年6月7日申請之美國臨時申請案第62/346,730號之申請日期的權益。以上參考之申請案中之每一者的全部內容係以引用之方式併入本文中。

### 【先前技術】

【0003】 CD123 (介白素3受體 $\alpha$ ，IL-3R $\alpha$ )為作為介白素3受體(IL-3R)複合物之一部分的40 kDa分子。細胞因子介白素3 (IL-3)驅動多能幹細胞早期分化成紅細胞、骨髓細胞及淋巴祖細胞。CD123表現於CD34<sup>+</sup>定向祖細胞上，而非由CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>正常造血幹細胞(HSC)表現。CD123由嗜鹼性球、肥大細胞、漿細胞樣樹突狀細胞表現，一些表現由單核細胞、巨噬細胞及嗜酸性球進行，且低或無表現由嗜中性球及巨核細胞進行。一些非造血組織，諸如胎盤、睪丸萊氏細胞、某些腦細胞元件及一些內皮細胞，亦表現CD123。然而，表現主要為細胞

質表現。

【0004】 據報導CD123由白血病母細胞(「白血病原始細胞」)及白血病幹細胞(LSC)表現(Jordan等人, *Leukemia* 14:1777-1784, 2000 ; Jin等人, *Blood* 113:6603-6610, 2009)。在人類正常前驅群體中, CD123由造血祖細胞(HPC)之一個子集而非由正常HSC表現。據報導CD123亦由漿細胞樣樹突狀細胞(pDC)及嗜鹼性球表現, 且在次要程度上由單核細胞及嗜酸性球表現。

【0005】 已報導CD123在多種血液學惡性病, 包括急性骨髓性白血病(AML)及骨髓發育不良症候群(MDS)中過度表現於惡性細胞上(Muñoz等人, *Haematologica* 86(12):1261-1269, 2001)。CD123之過度表現在AML中與不良預後相關(Tettamanti等人, *Br. J. Haematol.* 161:389-401, 2013)。認為AML及MDS出現在一般呈休眠狀態(即, 非快速分裂之細胞)之白血病幹細胞(LSC)小群體中並由其不朽化, 且因此抵抗細胞死亡(細胞凋亡)及習知化學治療劑。LSC之特徵在於CD123之過度表現, 而CD123不存在於正常人類骨髓中的相應正常造血幹細胞群體中(Jin等人, *Blood* 113:6603-6610, 2009 ; Jordan等人, *Leukemia* 14:1777-1784, 2000)。CD123表現亦與多種其他惡性病/惡性病前期相關: 慢性骨髓性白血病(CML)祖細胞(包括原始細胞危象CML); 霍奇金氏裡-斯二氏細胞(RS)細胞; 轉型非霍奇金氏淋巴瘤(NHL); 一些慢性淋巴細胞性白血病(CLL) (CD11c<sup>+</sup>); 急性T淋巴母細胞白血病(T-ALL)之子集(16%, 最不成熟, 主要是成人)、漿細胞樣樹突狀細胞(pDC) (DC2)惡性病及CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>骨髓發育不良症候群(MDS)骨髓細胞惡性病。

【0006】 AML為以轉型骨髓祖細胞在骨髓中增殖及積聚為特徵之純系疾病, 其最終導致造血衰竭。AML發病率隨年齡而增加, 且年長患者與年輕患者相比典型地具有較差治療結果(Robak等人, *Clin. Ther.* 2:2349-2370, 2009)。令人遺憾的是, 在當前, 大部分患有AML之成人死於其疾病。

【0007】 針對AML之治療最初聚焦於誘導緩解(誘導療法)。在達成緩解後，治療轉而聚焦於鞏固此種緩解(緩解後或鞏固療法)且在一些情況下維持療法。針對AML之標準緩解誘導范式為利用蒽環類/阿糖胞苷組合之化學療法，繼之以通常利用較高劑量之與誘導期期間所使用者相同之藥物的鞏固化學療法或人類幹細胞移植，視患者耐受強化治療之能力及單獨化學療法之治癒可能性而定(參見Roboz, *Curr. Opin. Oncol.* 24:711-719, 2012)。

【0008】 頻繁用於誘導療法之藥劑包括阿糖胞苷及蒽環類。阿糖胞苷亦稱為AraC，其藉由干擾DNA合成來殺死癌細胞及其他快速分裂之正常細胞。與AraC治療相關之副作用包括因白細胞產生減少而造成對感染之抗性降低；因血小板產生減少而造成流血；及由於紅血細胞可能減少而造成貧血。其他副作用包括噁心及嘔吐。蒽環類(例如，道諾黴素、多柔比星及伊達比星)具有若干種作用模式，包括抑制DNA及RNA合成、破壞DNA之高級結構及產生細胞破壞性游離氧自由基。蒽環類之最重要不利作用為心臟毒性，其限制投與終生劑量且在一定程度上限制其適用性。

【0009】 因此，令人遺憾的是，儘管在新診斷之AML之治療方面取得實質性進展，但20%至40%之患者在利用標準誘導化學療法之情況下未達成緩解，且預計進入第一完全緩解之患者中有50%至70%會在3年內復發。在復發時或對於患有抗性疾病之患者的最優策略仍不確定。在處於第一次或後續緩解中之AML患者中，已確定幹細胞移植為抗白血病療法之最有效形式(Roboz, 2012)。

【0010】 抗體-藥物結合物(ADC)及其他細胞結合劑-藥物結合物正作為對多種癌症具有效力之一類強力抗腫瘤劑而出現。細胞結合劑-藥物結合物(諸如ADC)通常由三個獨特元件構成：細胞結合劑(例如，抗體)；連接子；及細胞毒性部分。照例，細胞毒性藥物部分共價連接於抗體上之離胺酸殘基或藉由還原鏈間二硫鍵而獲得之半胱胺酸殘基，從而產生ADC，該等ADC為攜帶連接在抗

體分子上之不同位置上的不同數目之藥物的非均質混合物。

**【發明內容】**

**【0011】** 本發明係基於令人驚訝之發現，即本發明之結合物對多種表現CD123之癌細胞，尤其是具有至少一個消極預後因素之白血病非常有效。

**【0012】** 本發明之一個態樣提供一種抗體或其抗原結合片段，其：(a)結合人類CD123/IL3-R $\alpha$ 抗原之胺基酸101至346內的抗原決定基，且(b)抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖。

**【0013】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段結合人類CD123抗原之胺基酸101至204內的抗原決定基。在另一實施例中，該抗體或其抗原結合片段結合人類CD123抗原之胺基酸205至346內的抗原決定基。

**【0014】** 本發明之一相關態樣提供一種抗體或其抗原結合片段，其：(a)結合人類CD123抗原之胺基酸1至100內的抗原決定基，且(b)抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖，其中IC<sub>50</sub>值為0.1 nM或更小(例如，0.08 nM、0.05 nM、0.03 nM)。

**【0015】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段抑制白血病幹細胞或白血病原始細胞但不抑制造血幹細胞之增殖。

**【0016】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段在0.3 nM或更低，諸如介於0.01 nM與0.3 nM之間、介於0.01 nM與0.2 nM之間、介於0.01 nM與0.19 nM之間、介於0.01 nM與0.18 nM之間、介於0.01 nM與0.15 nM之間或介於0.01 nM與0.1 nM之間的解離常數(K<sub>d</sub>)下結合人類CD123抗原陽性細胞。

**【0017】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段結合石蟹獼猴CD123。舉例而言，該抗體或其抗原結合片段可在介於0.05與0.3 nM之間、介於0.05與0.2 nM之間、介於0.05 nM與0.19 nM之間、介於0.05 nM與0.18 nM之間、

介於0.05 nM與0.15 nM之間或介於0.05與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合石蟹獼猴CD123。在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段以實質上類似之結合親和力結合人類及石蟹獼猴CD123。舉例而言，該抗體或其抗原結合片段可在介於0.05與0.3 nM之間、介於0.05與0.2 nM之間或介於0.05與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合人類及石蟹獼猴CD123。 $K_d$ 可藉由流式細胞術、表面電漿子共振或放射免疫檢定來量測。

**【0018】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段在0.5 nM或更低之濃度下抑制抗原陽性TF-1細胞中至少50%之IL3依賴性增殖。

**【0019】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)至少一個重鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 1、5及12；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 2、3、6-10、13及14；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 4、11、15及70；及b)至少一個輕鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 16、19、20、23及72；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 17、21、24及71；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 18、22及25。

**【0020】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)至少一個重鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 1、5及12；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 2、3、6-10、13及14；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 4、11及15；及b)至少一個輕鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區

(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 16、19、20及23；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 17、21及24；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 18、22及25。

【0021】 在某些實施例中，該等保守胺基酸取代包括CDR中之至少一Lys由Arg取代。

【0022】 在某些實施例中，該抗體為包含小鼠CDR區之CDR移植人類化抗體，且其中該抗體之一或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)個重鏈及/或輕鏈構架區維尼爾區(vernier zone)殘基具有小鼠起源。

【0023】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0024】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，來自SEQ ID NO: 34之N末端的第二個殘基Xaa為Phe。在其他實施例中，Xaa為Val。

【0025】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0026】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘

基為Ser。

【0027】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser，且除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys (亦即，EU/OU編號位置442上之Cys)；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0028】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser。

【0029】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【0030】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。

【0031】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 56中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【0032】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。

【0033】 在某些實施例中，來自SEQ ID NO: 38、34、56及54之N末端的第二個殘基Xaa為Phe。在其他實施例中，Xaa為Val。



【0034】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0035】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【0036】 在某些實施例中，來自SEQ ID NO: 54或56之N末端的第二個殘基Xaa為Phe。在其他實施例中，Xaa為Val。

【0037】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 2或3中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 16中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列的CDR3。

【0038】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 5中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 6、7、8、9或10中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 19或20中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 22中所闡述之胺基酸序列的CDR3。

【0039】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 13或14中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 15中所

闡述之胺基酸序列的CDR3；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 23中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 24中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 25中所闡述之胺基酸序列的CDR3。

**【0040】** 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a) V<sub>H</sub>序列，其與選自由以下各項組成之群的參考V<sub>H</sub>序列具有至少95%一致性：SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳26、28、30、32、34及38)；及/或b) V<sub>L</sub>序列，其與選自由以下各項組成之群的參考V<sub>L</sub>序列具有至少95%一致性：SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (較佳27、29、31、35及37)。在某些實施例中，該V<sub>H</sub>序列與SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳26、28、30、32、34及38)中之一者具有至少99%一致性，及/或其中該V<sub>L</sub>序列與SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (較佳27、29、31、35及37)中之一者具有至少99%一致性。在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含：a) V<sub>H</sub>序列，其係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳26、28、30、32、34及38)；及/或b) V<sub>L</sub>序列，其係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (較佳27、29、31、35及37)。在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段可包含SEQ ID NO: 26之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 27之V<sub>L</sub>序列，或SEQ ID NO: 28之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 29之V<sub>L</sub>序列，或SEQ ID NO: 30之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 31之V<sub>L</sub>序列，或SEQ ID NO: 34之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 35之V<sub>L</sub>序列。

**【0041】** 在某些實施例中，該抗體為鼠類抗體、非人類哺乳動物抗體、嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。舉例而言，該人類化抗體可為CDR移植抗體或表面重整抗體。在某些實施例中，該抗體為全長抗體。在某些實施例中，該其抗原結合片段為Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F<sub>d</sub>、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F<sub>v</sub>、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、IgGΔCH<sub>2</sub>、微小抗體、F(ab')<sub>3</sub>、四鏈抗體、三鏈抗體、

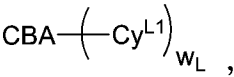
雙鏈抗體、單域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub>或scFv-Fc。

【0042】 本發明之另一態樣提供一種多肽，其包含標的抗體或其抗原結合片段中任一者之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列。該多肽可為與並非假單胞菌毒素之蛋白質的融合物。

【0043】 本發明之另一態樣提供一種細胞，其產生本發明之抗體或其抗原結合片段或本發明之多肽。

【0044】 本發明之另一態樣提供一種產生本發明之抗體或其抗原結合片段或本發明之多肽的方法，其包括：(a)培養本發明之細胞；及(b)自所培養之細胞分離出該抗體、其抗原結合片段或多肽。在某些實施例中，該細胞為真核細胞。

【0045】 本發明之另一態樣提供一種免疫結合物，其具有下式：

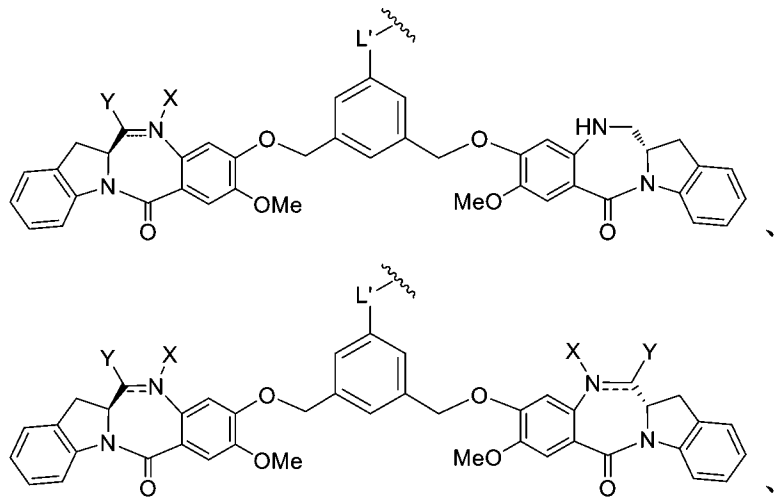


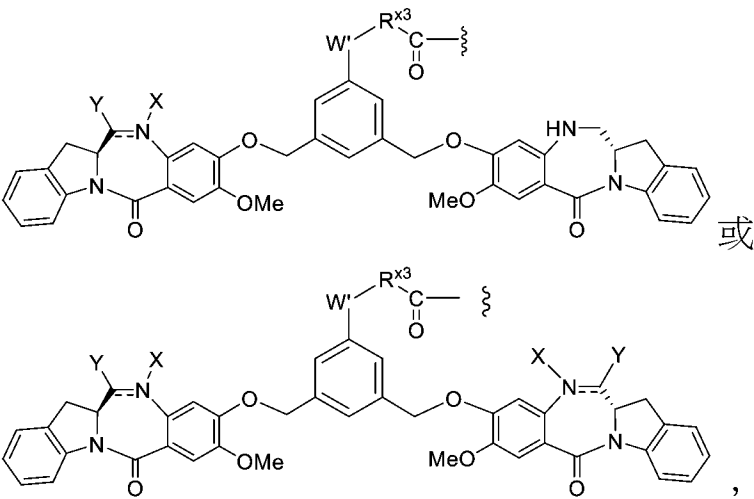
其中：

CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之其多肽，其係經由離胺酸殘基共價連接於CyL1；

WL為1至20之整數；且

CyL1由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C1-C4)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

W'為-NRe'；

Re'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-Rk；

n為2至6之整數；

Rk為-H或-Me；

R<sub>x3</sub>為(C1-C6)烷基；

L'由以下各式表示：

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)- (B1')；或

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-S-Zs1- (B3')；

R<sub>5</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時各自獨立地為-H、(C1-C3)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

m為1至6之整數；且

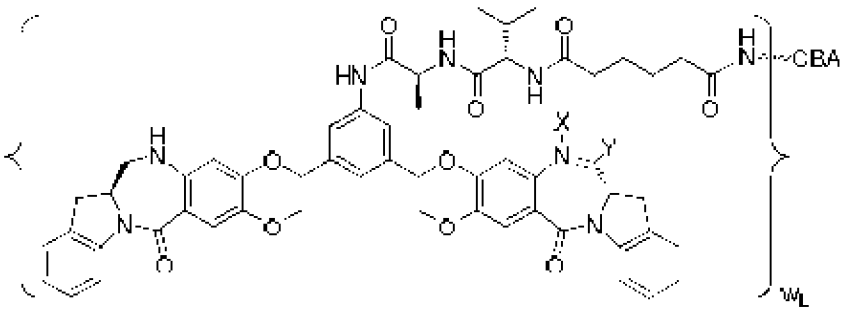
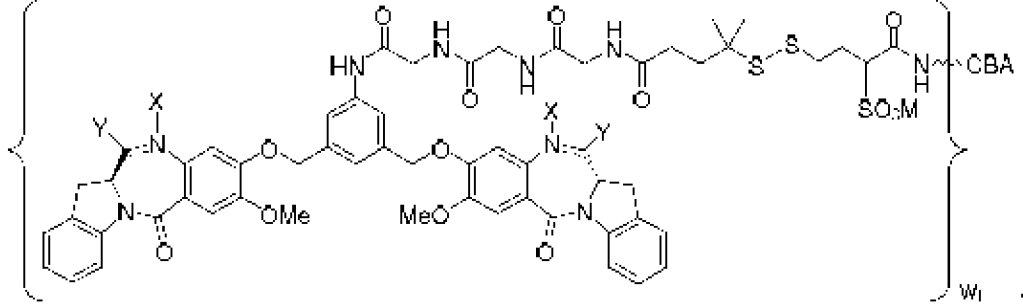
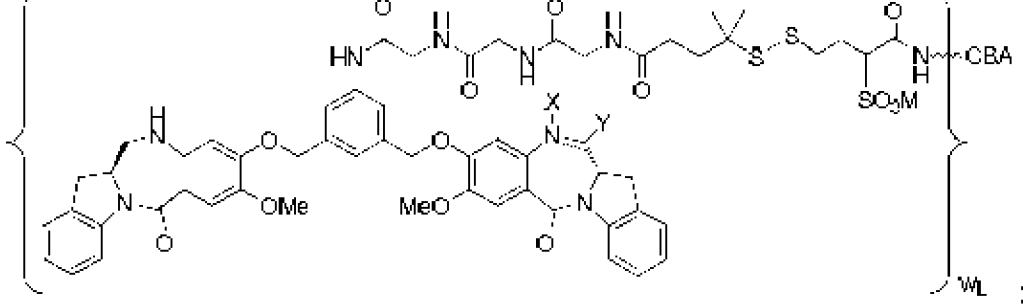
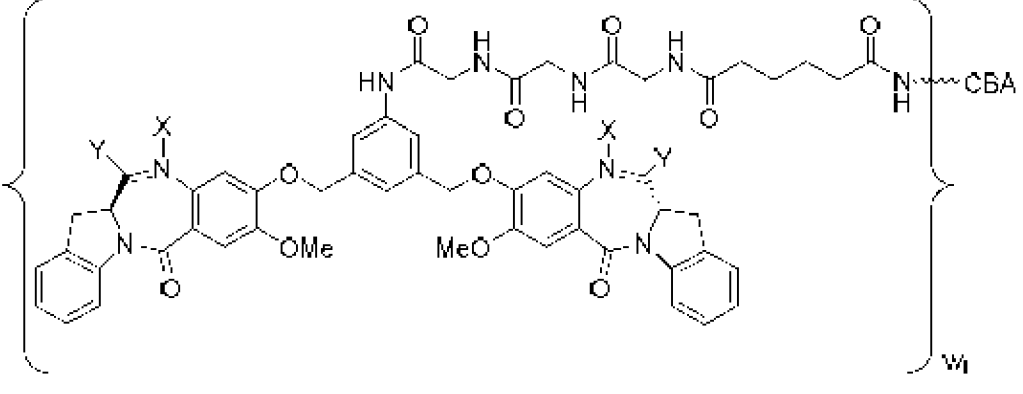
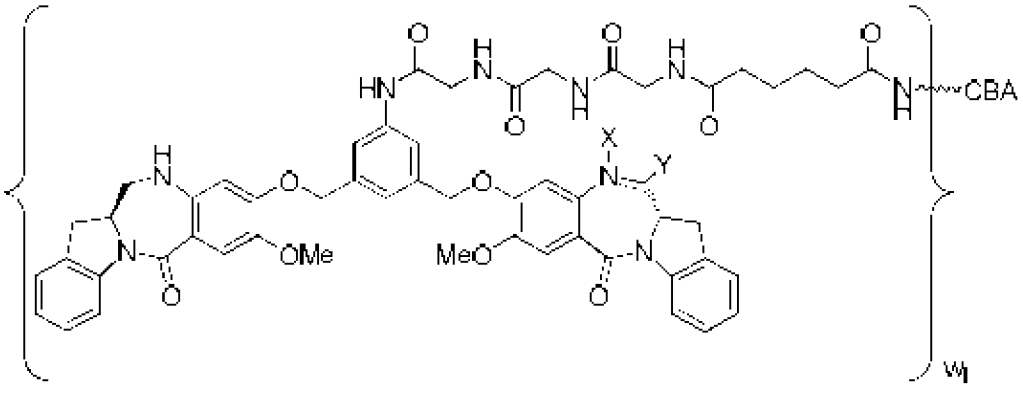
Zs1係選自以下各式中之任一者：

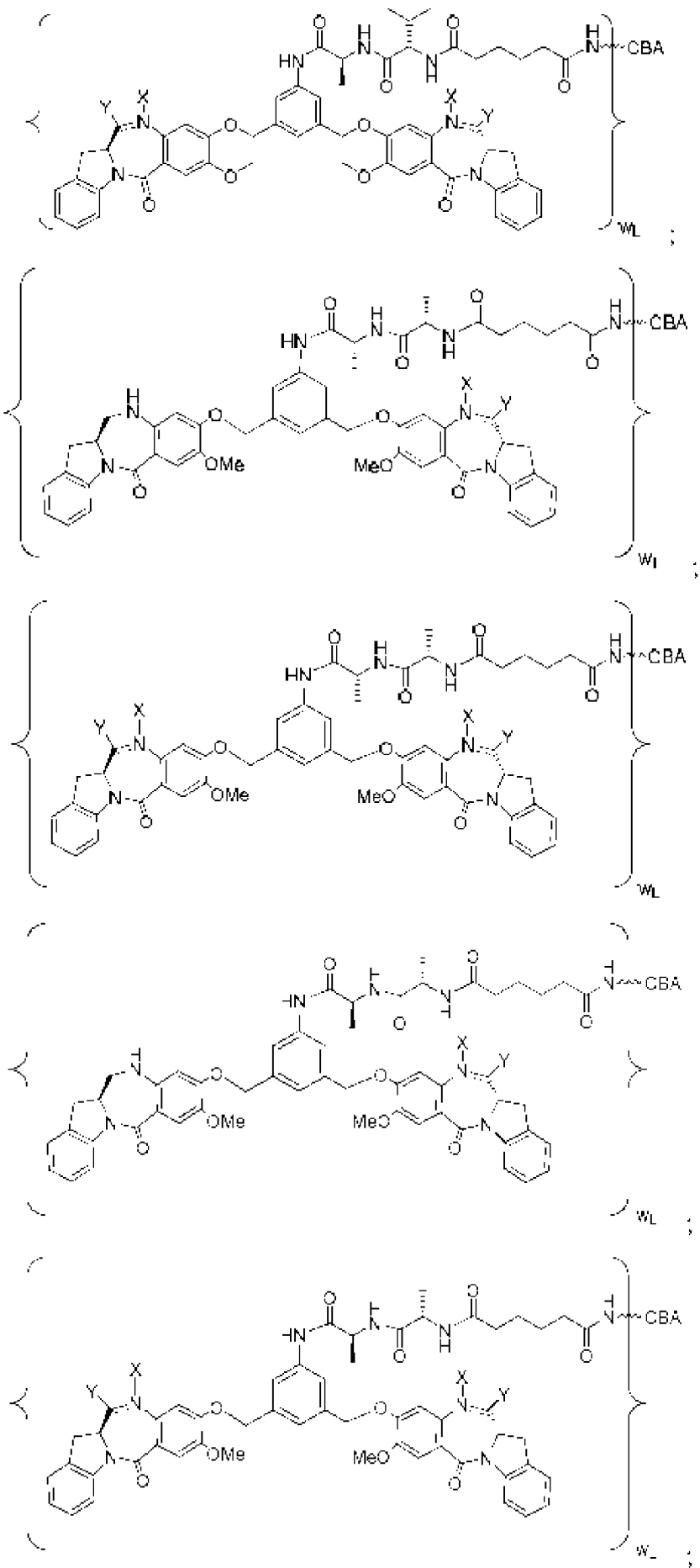


D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在某些實施例中，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

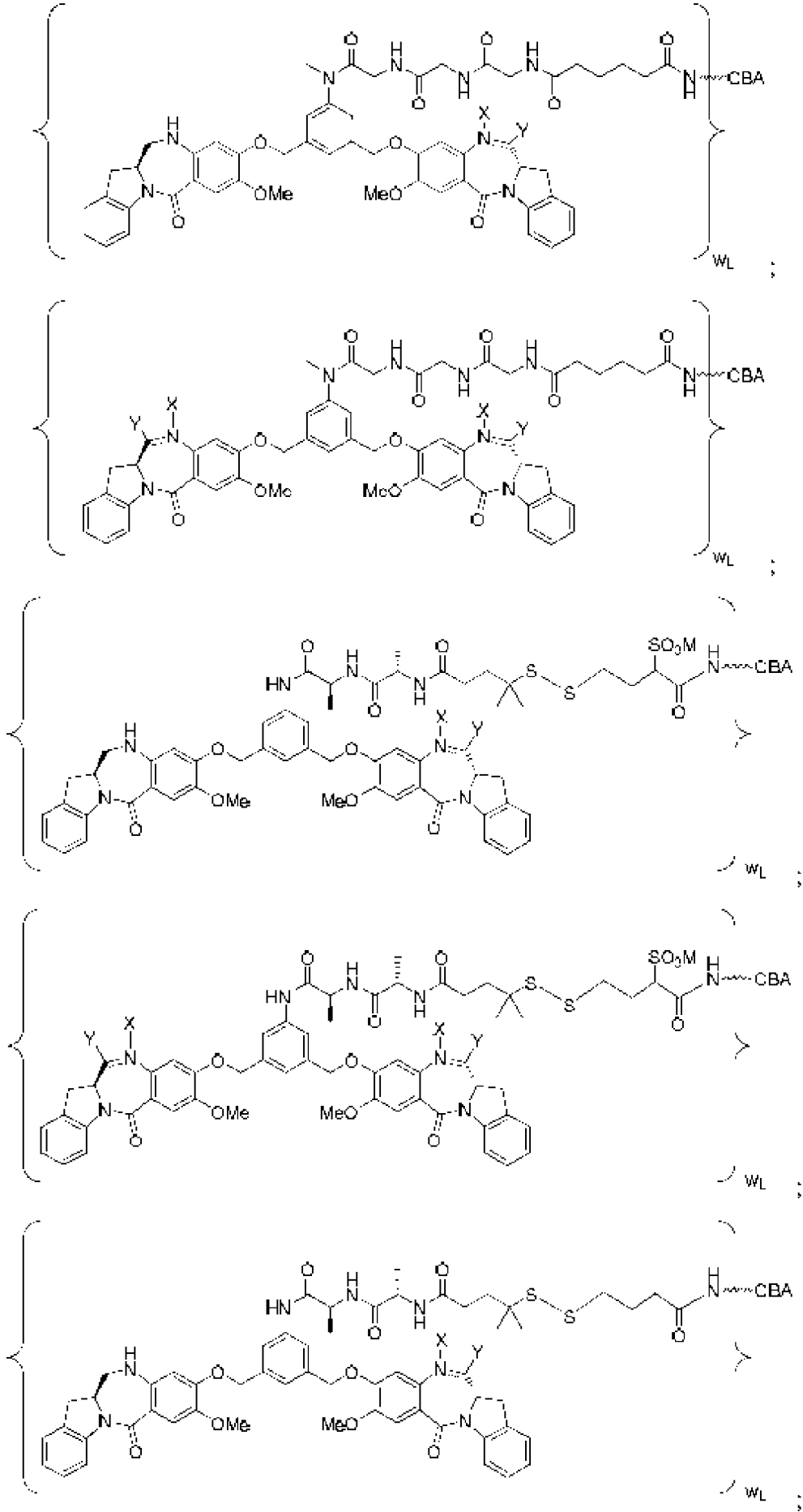
【0048】 在某些實施例中，Q為-SO<sub>3</sub>M。

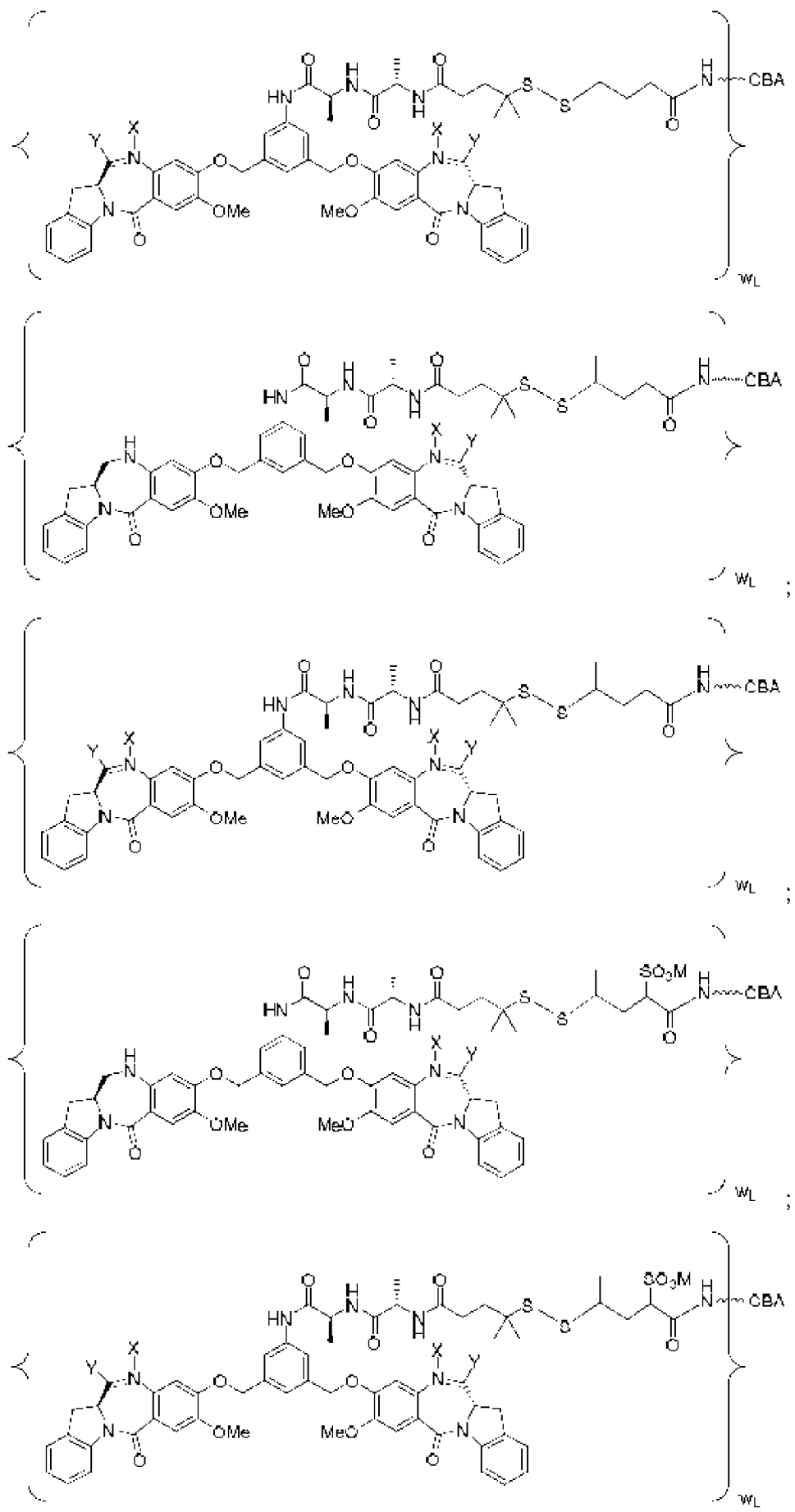
【0049】 在某些實施例中，該免疫結合物由以下各式表示：

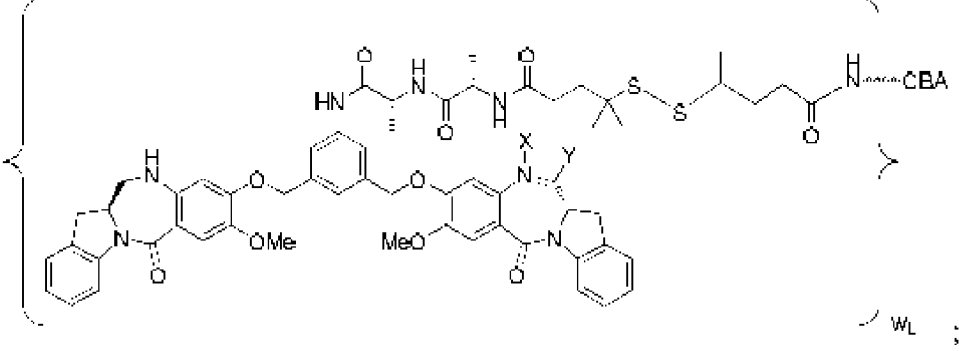
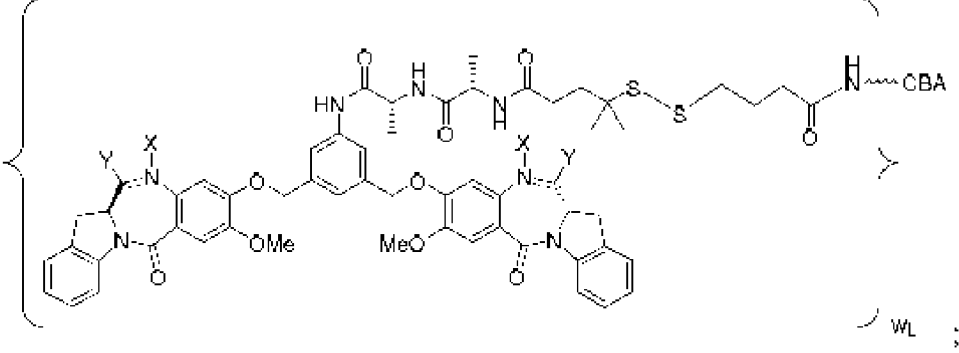
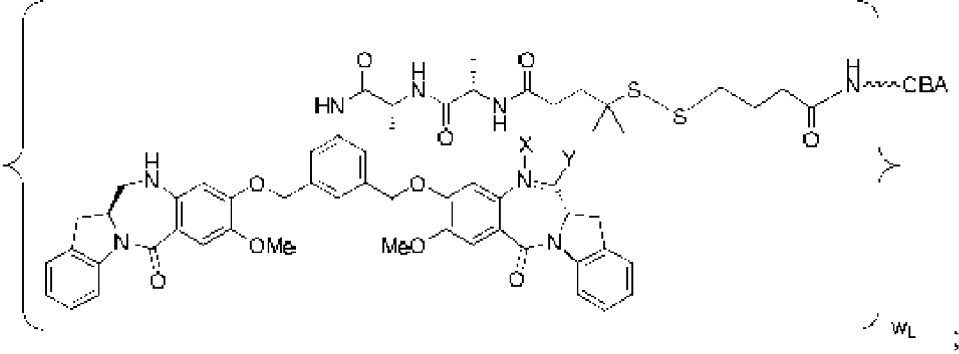
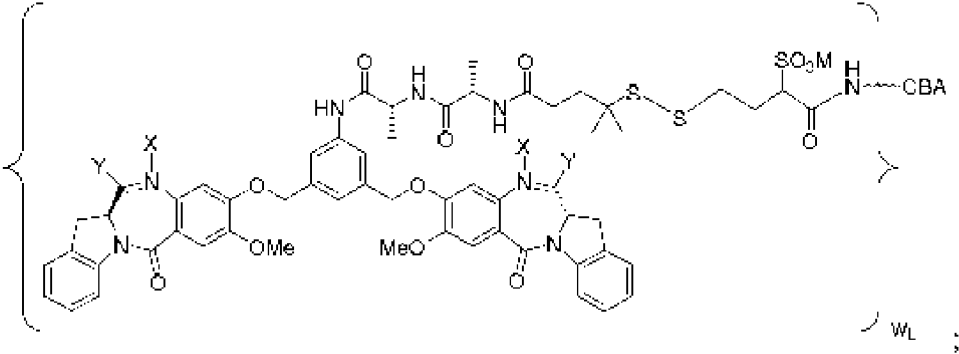
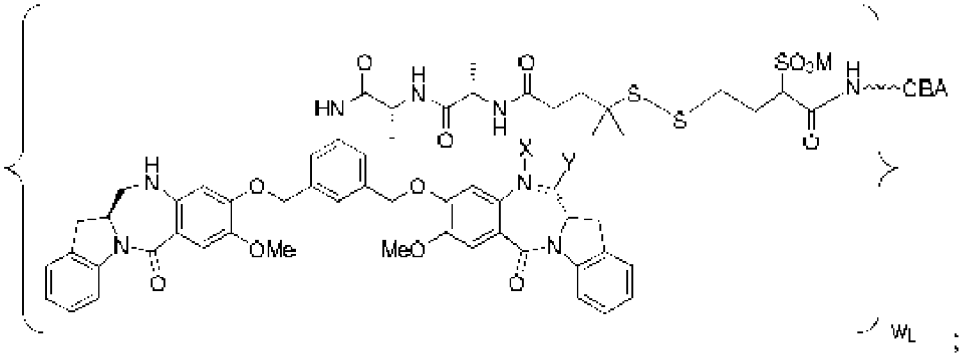


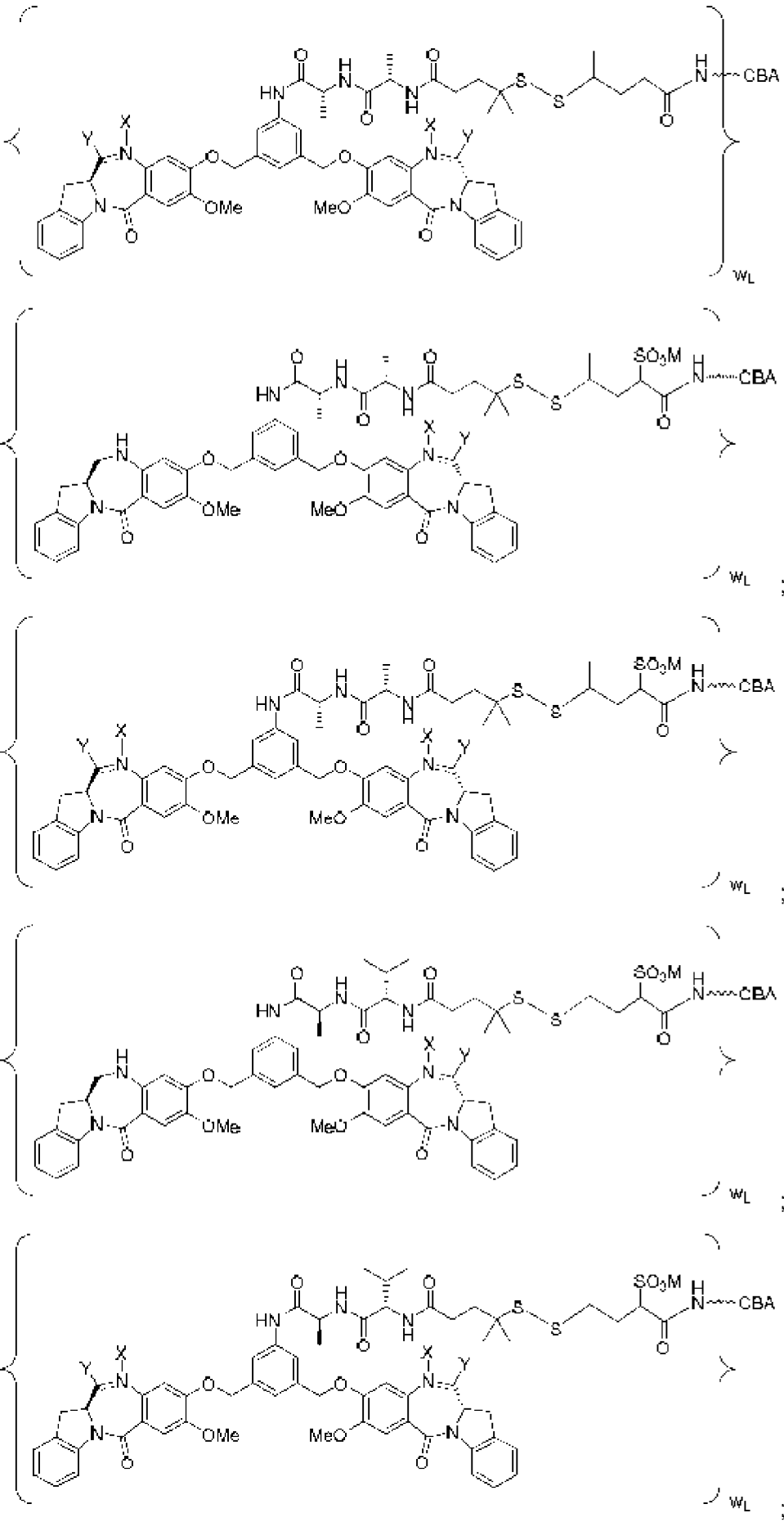




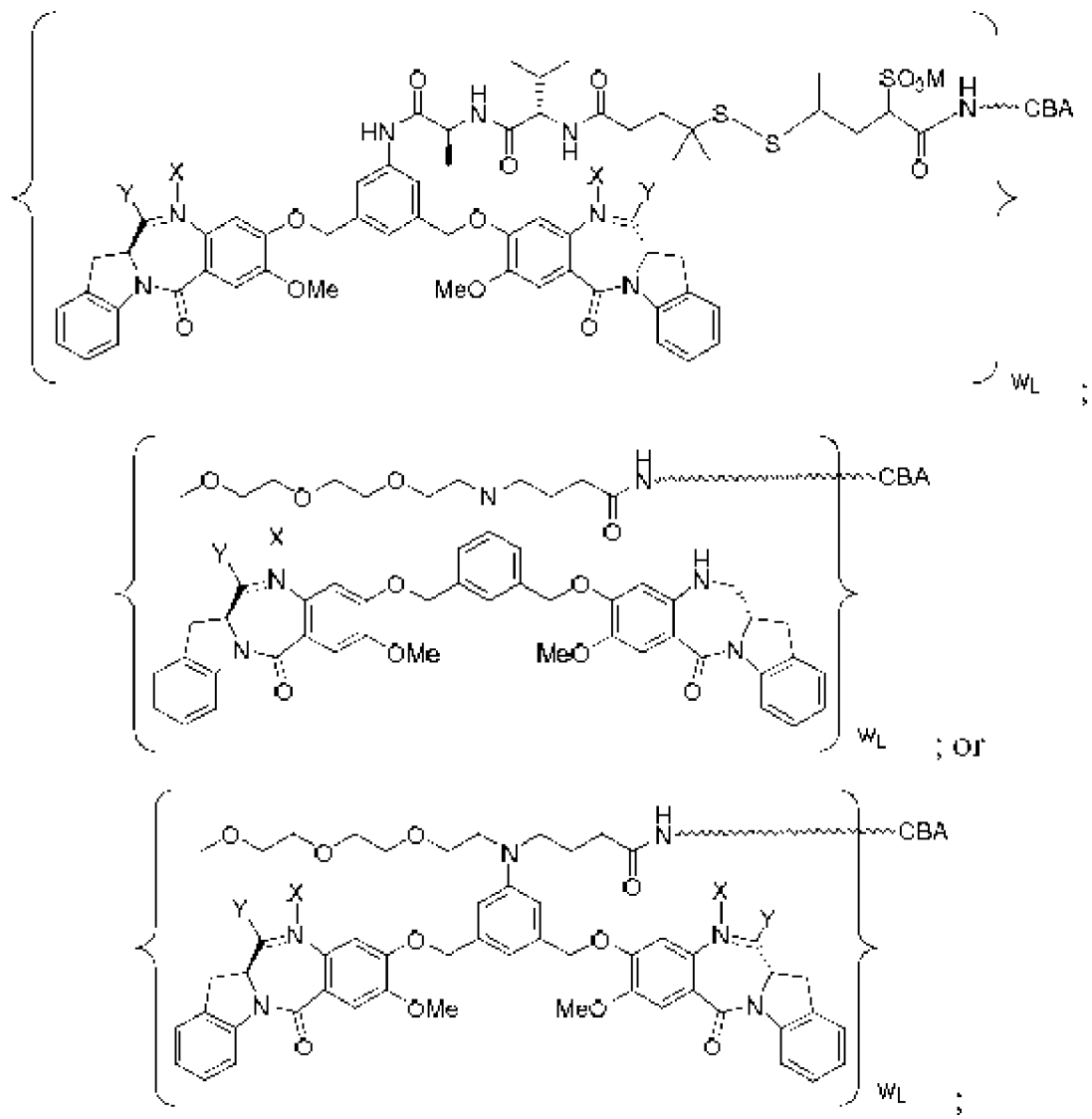






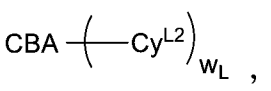






或其醫藥學上可接受之鹽，其中WL為1至10之整數；介於N與C之間的雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO3M。

【0050】 一相關態樣提供一種免疫結合物，其具有下式：



其中：

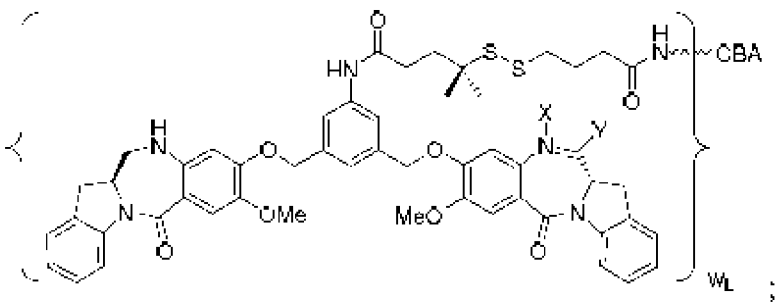
CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之其多肽，其係經由離胺酸殘基共價連接於CyL2；

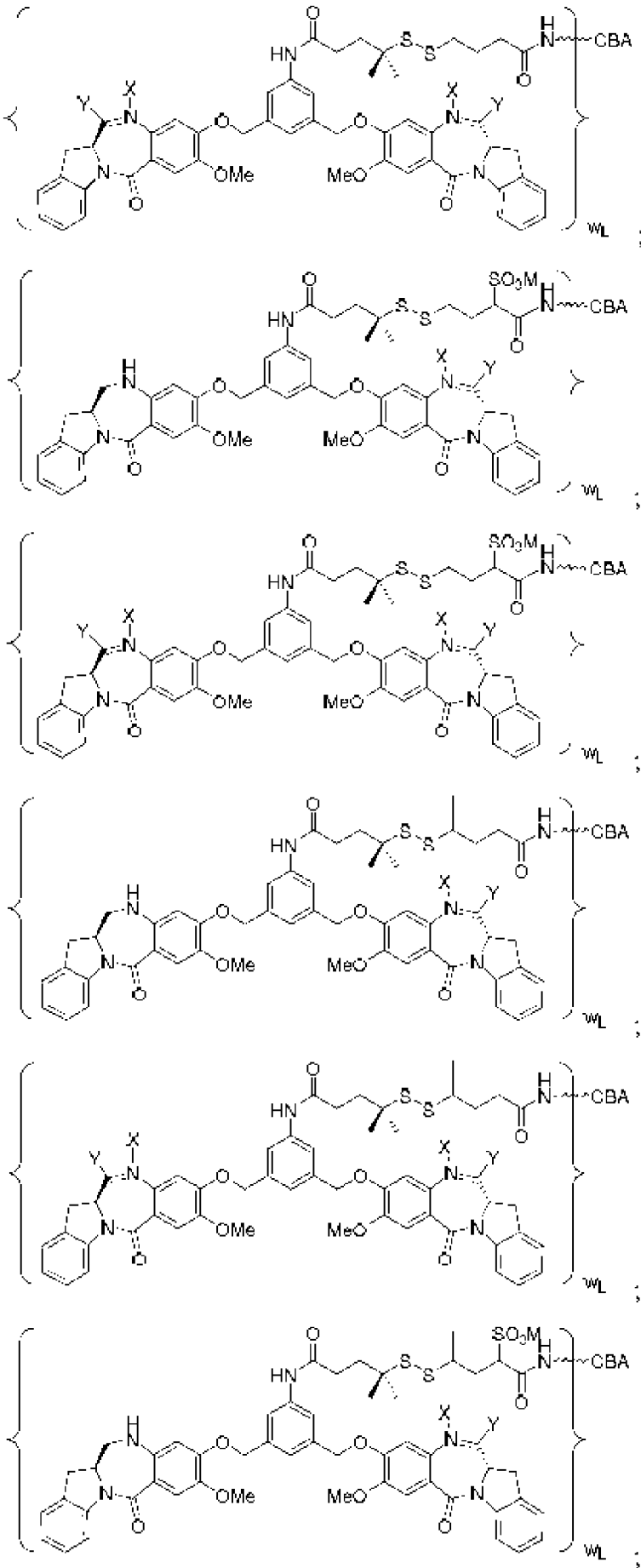
WL為1至20之整數；且









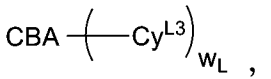




表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【0054】 在某些實施例中，介於N與C之間的雙線=表示雙鍵，X不存在且Y為-H。在某些實施例中，介於N與C之間的雙線=表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。在某些實施例中，M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

【0055】 本發明之另一相關態樣提供一種免疫結合物，其具有下式：

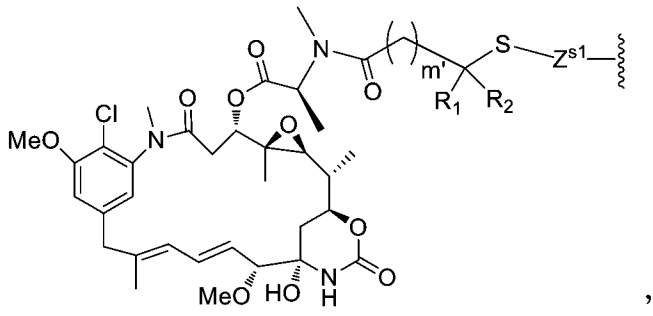


其中：

CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之多肽，其係經由Lys殘基共價連接於CyL3；

WL為1至20之整數；

CyL3由下式表示：



m'為1或2；

R1及R2各自獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

Zs1係選自以下各式中之任一者：











Re'為 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R_k$ ；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x3</sub>為(C1-C6)烷基；

L為-NR<sub>9</sub>-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sup>r"</sup>或不存在；且

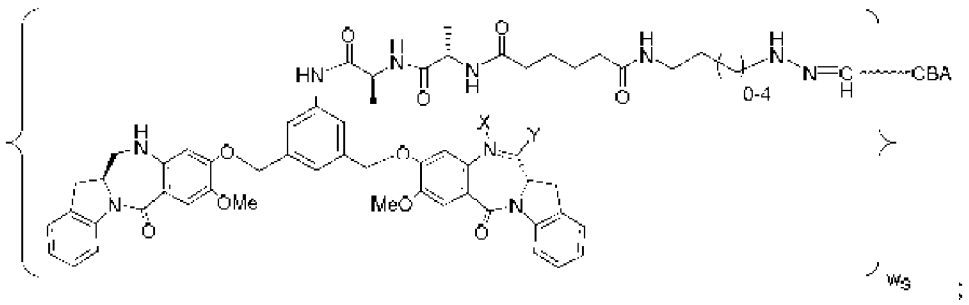
r"為0至6之整數。

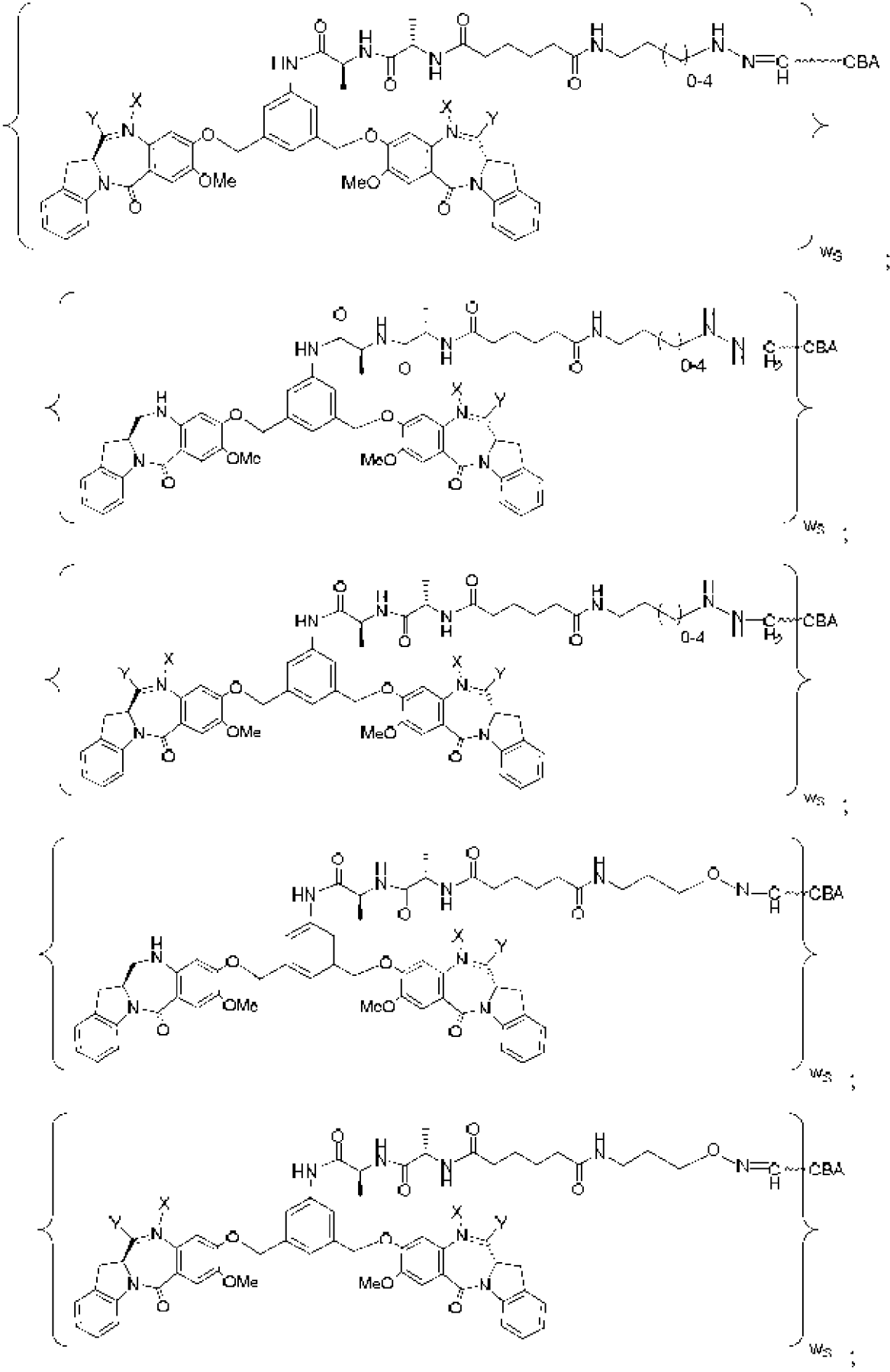
【0060】 出於簡單起見，在將Ser敘述為N末端殘基之以下各情況下，應理解，在適用之情況下，尤其就Thr而言，涵蓋其他2-羥基乙胺部分作為絲胺酸、酰胺酸、羥基離胺酸、4-羥基鳥胺酸或2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分。

【0061】 在某些實施例中，R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>均為H，且R<sub>5</sub>及R<sub>9</sub>均為H或Me。

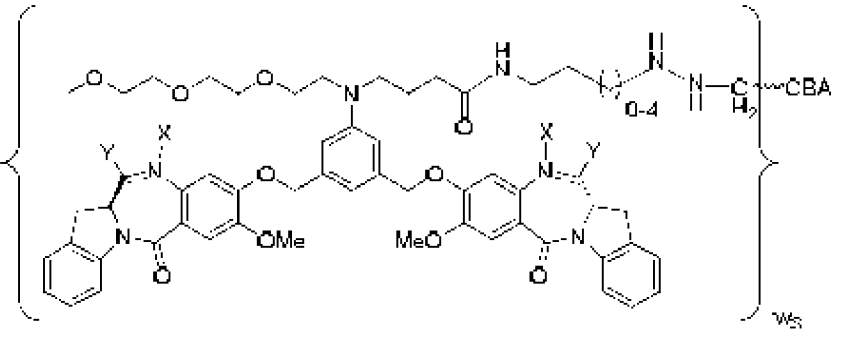
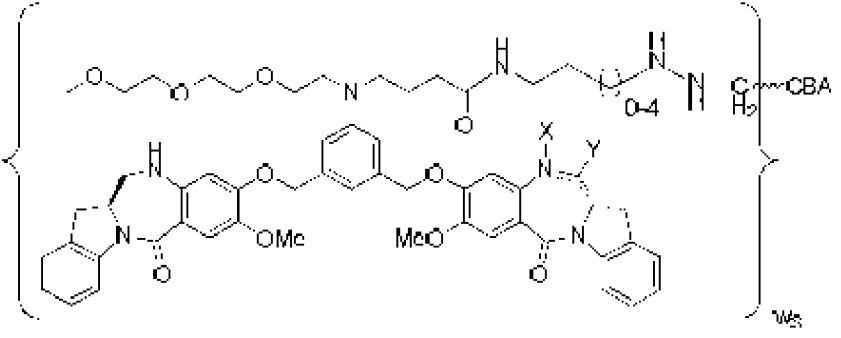
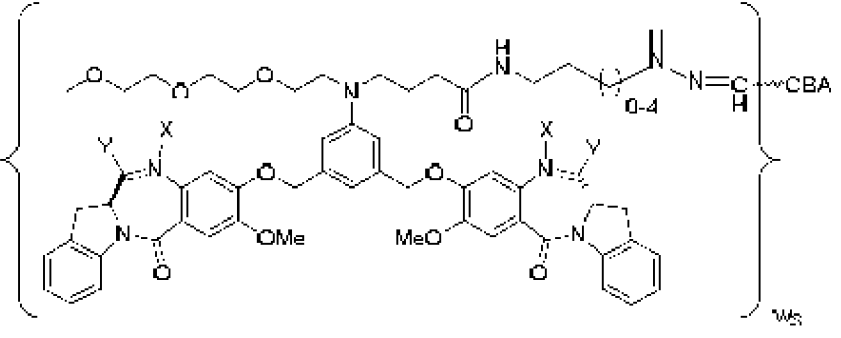
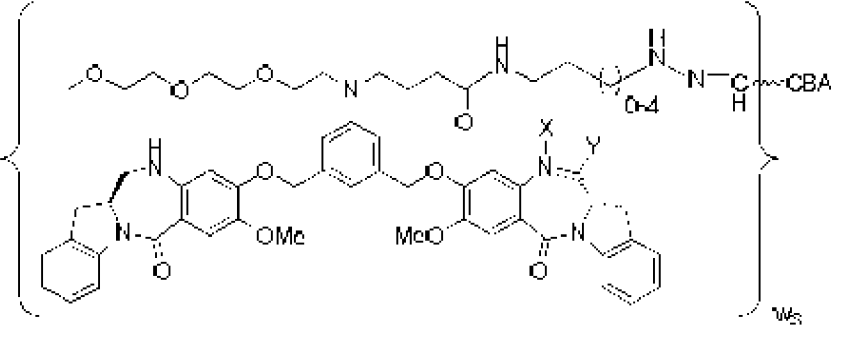
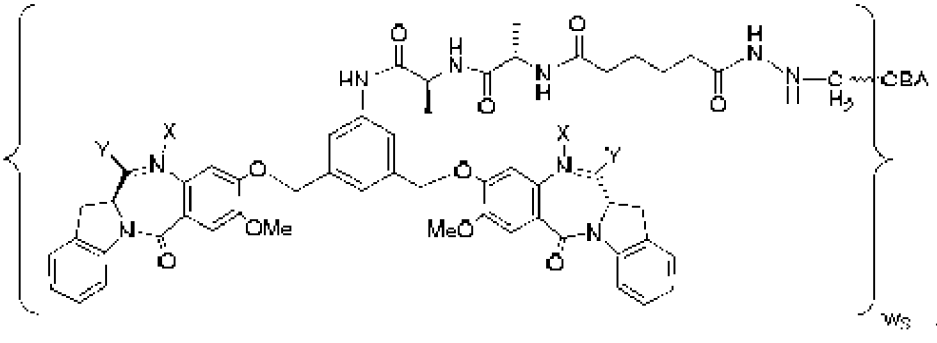
【0062】 在某些實施例中，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽。舉例而言，P可選自由以下各項組成之群：Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在某些實施例中，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。在某些實施例中，Q為-SO<sub>3</sub>M。

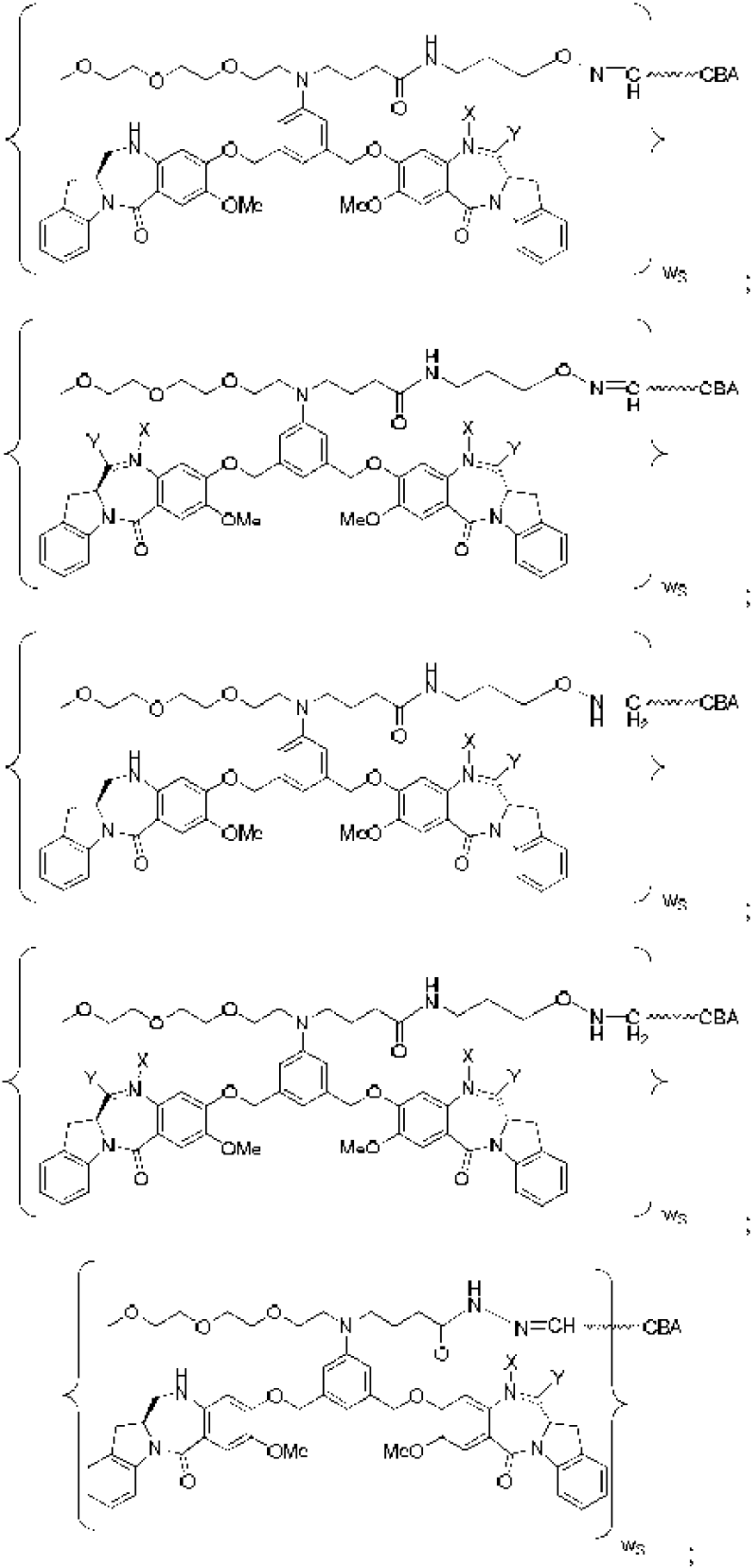
【0063】 在某些實施例中，該免疫結合物由以下各式表示：

















或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線  $\equiv$  表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C1-C4)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>x1</sub>為(C1-C6)烷基；

Re為-H或(C1-C6)烷基；

W'為-NRe'；

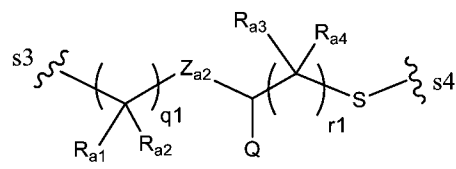
Re'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sub>k</sub>；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x2</sub>為(C1-C6)烷基；

L1由下式表示：



其中：

s<sub>3</sub>為與基團JCB'共價連接之位點；

s<sub>4</sub>為與Cys2上之-S-基團共價連接之位點；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

R<sub>9</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

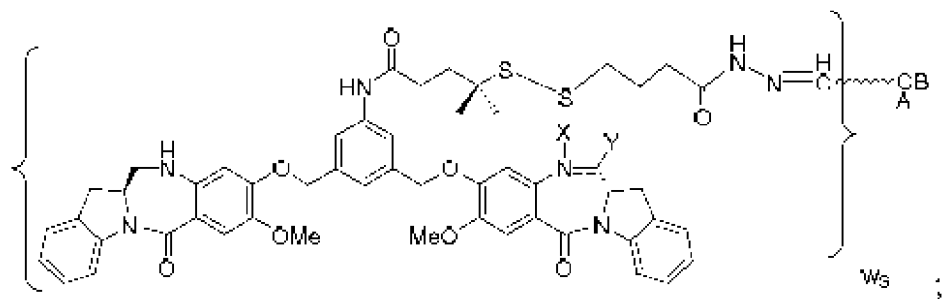
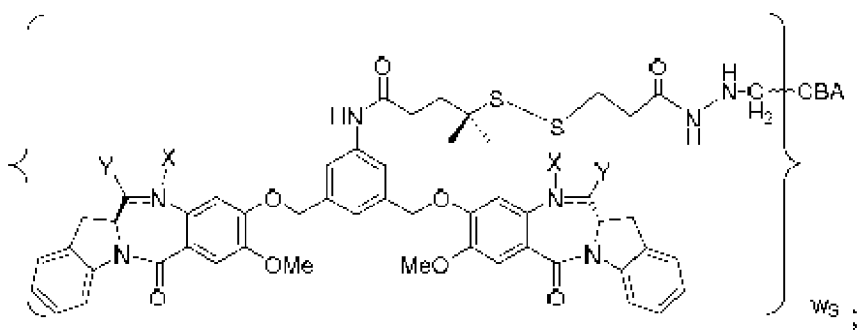
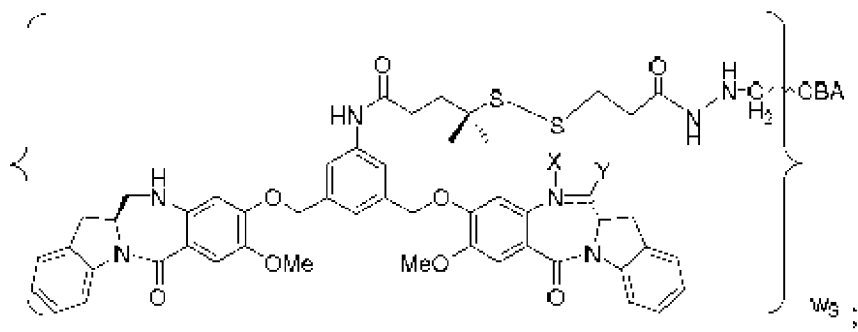
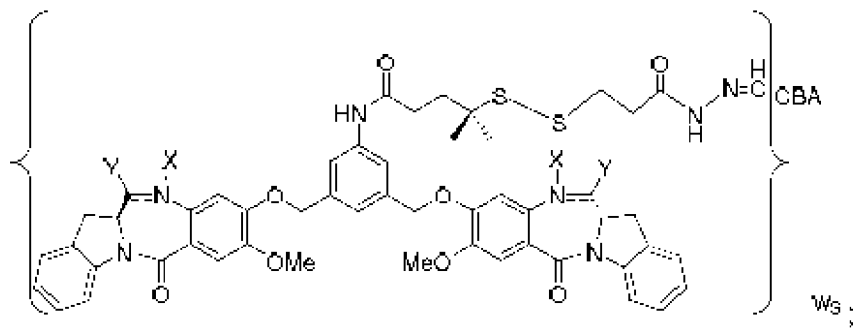
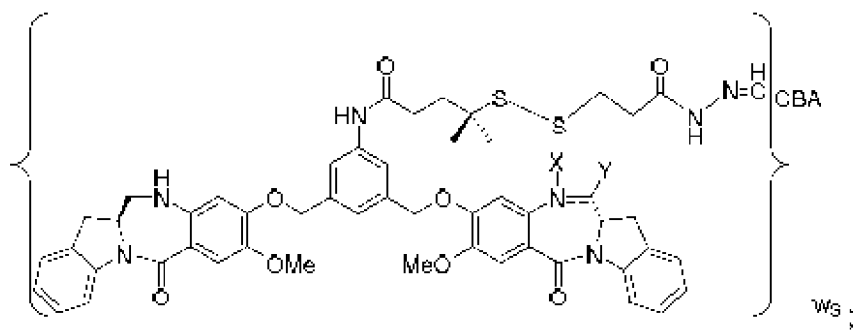
Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

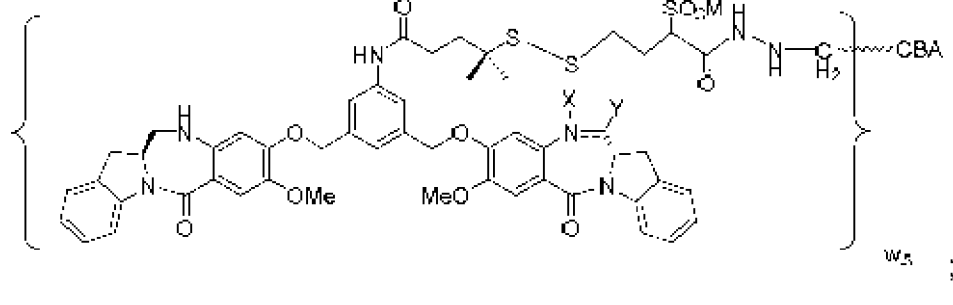
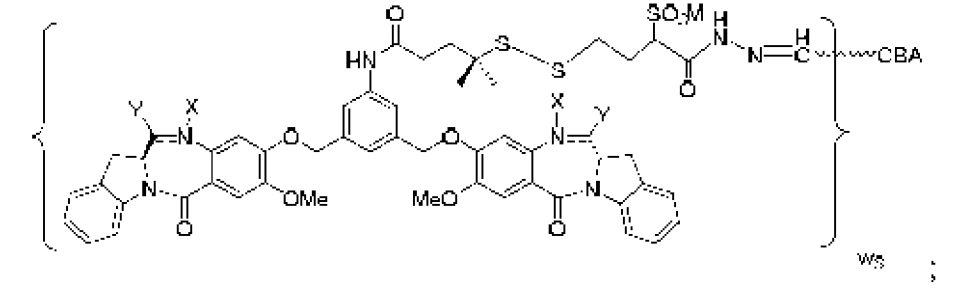
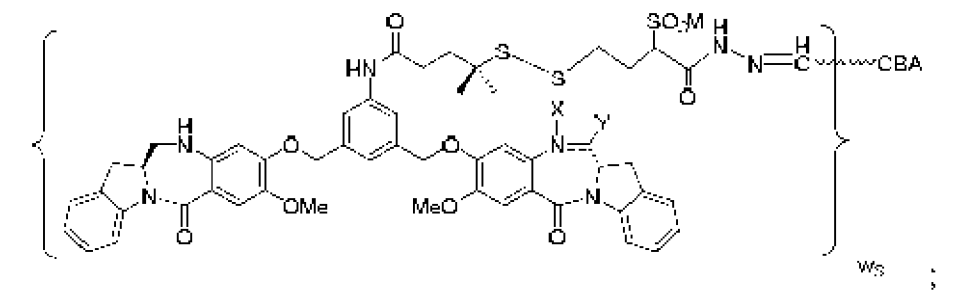
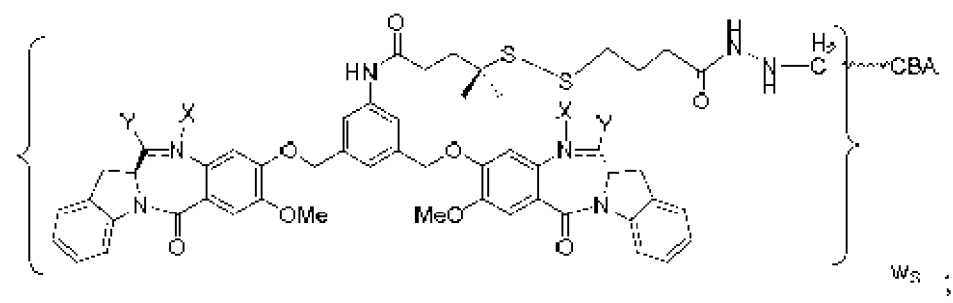
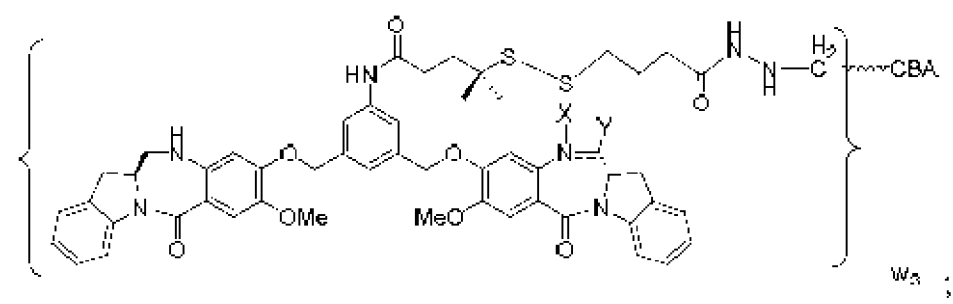
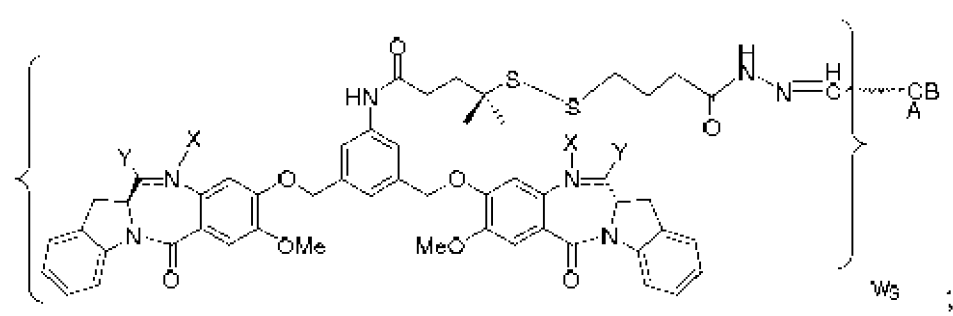
R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>不均為0。

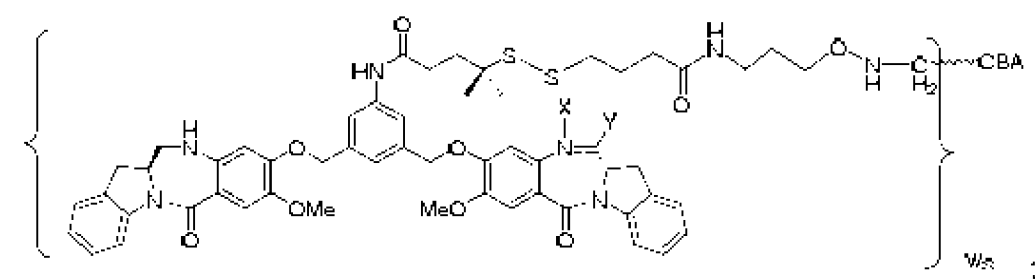
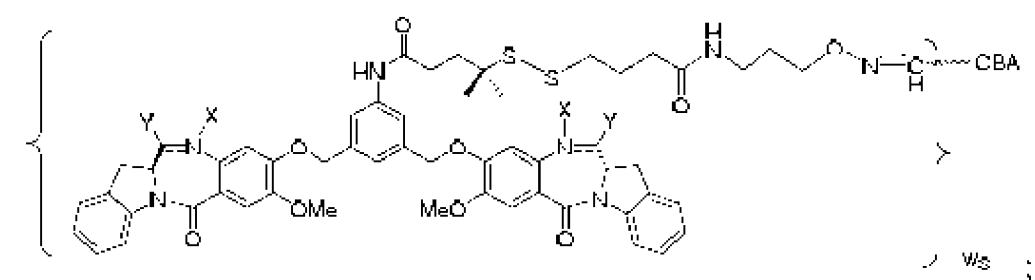
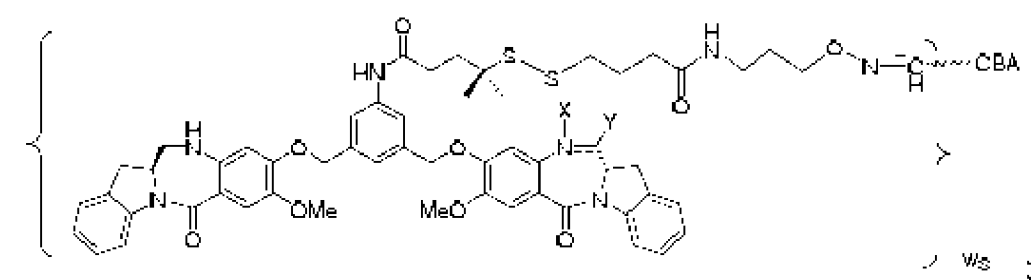
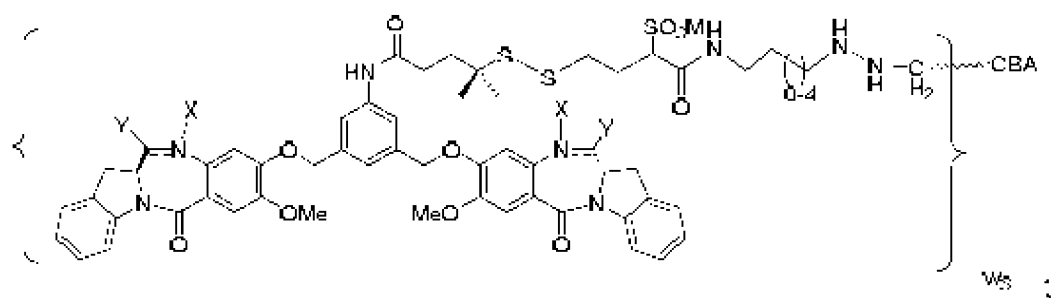
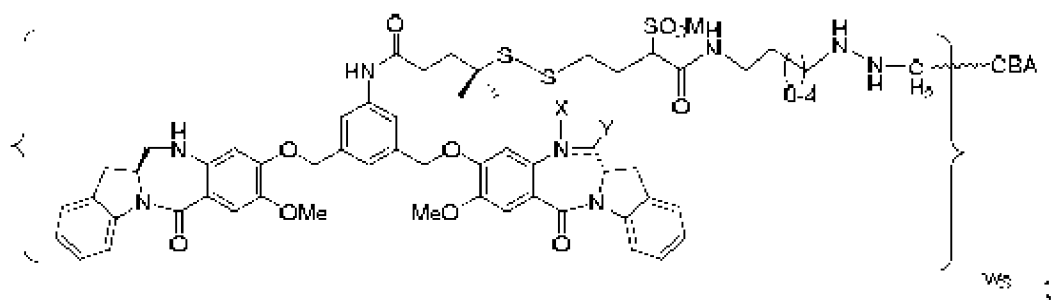
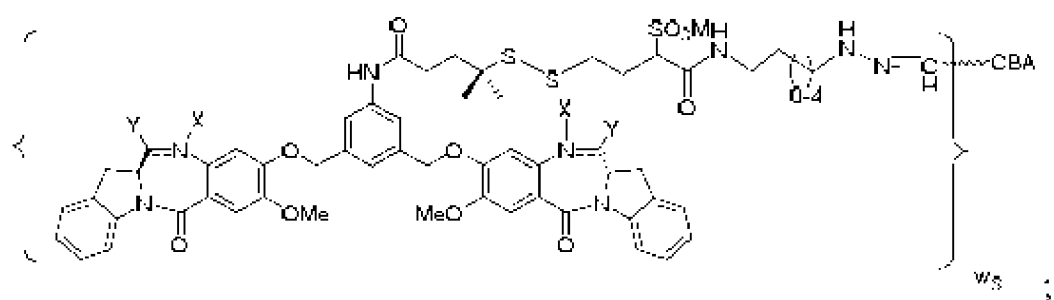
【0065】 在某些實施例中，-L<sub>i</sub>-由以下各式表示：

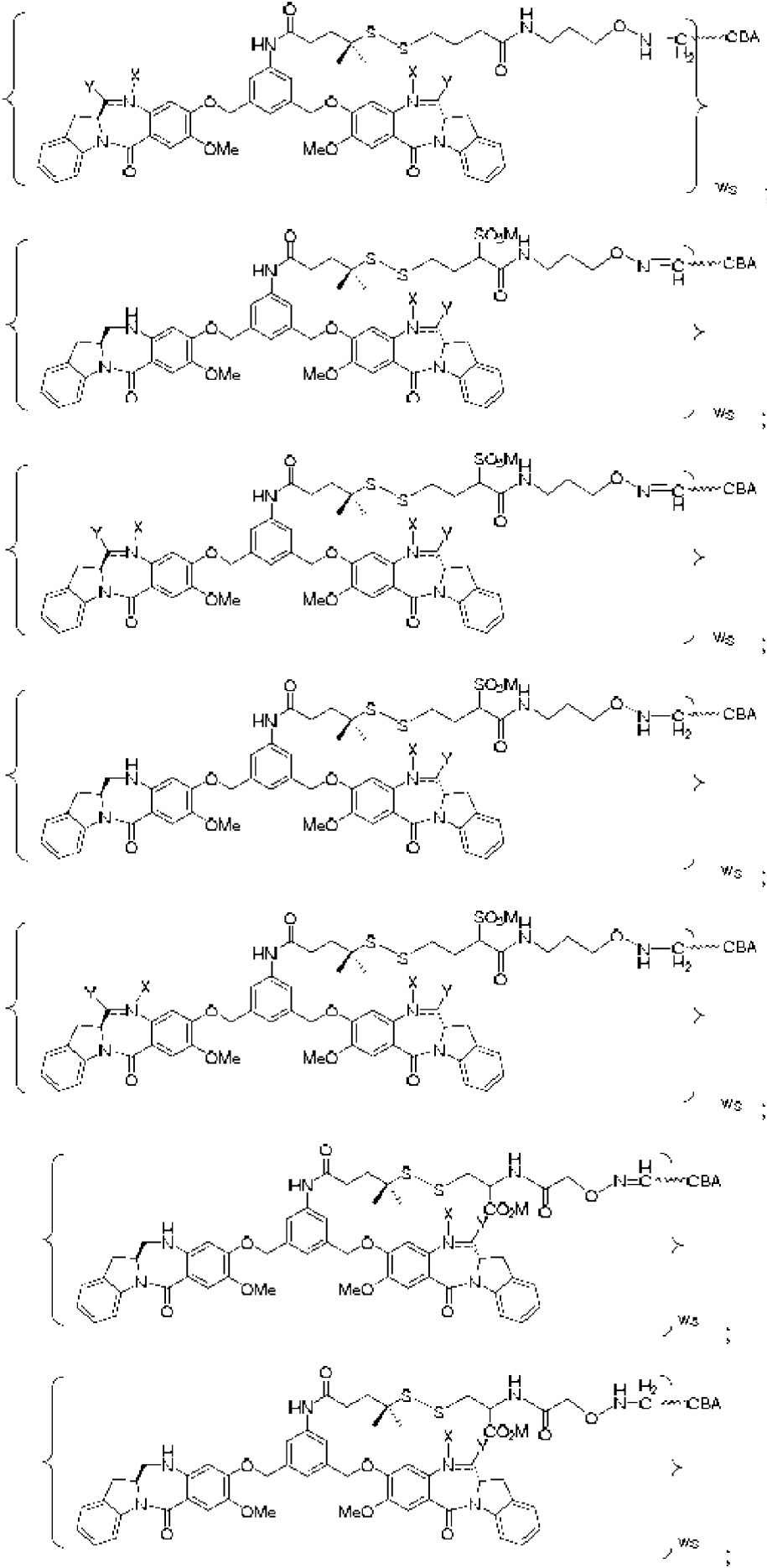


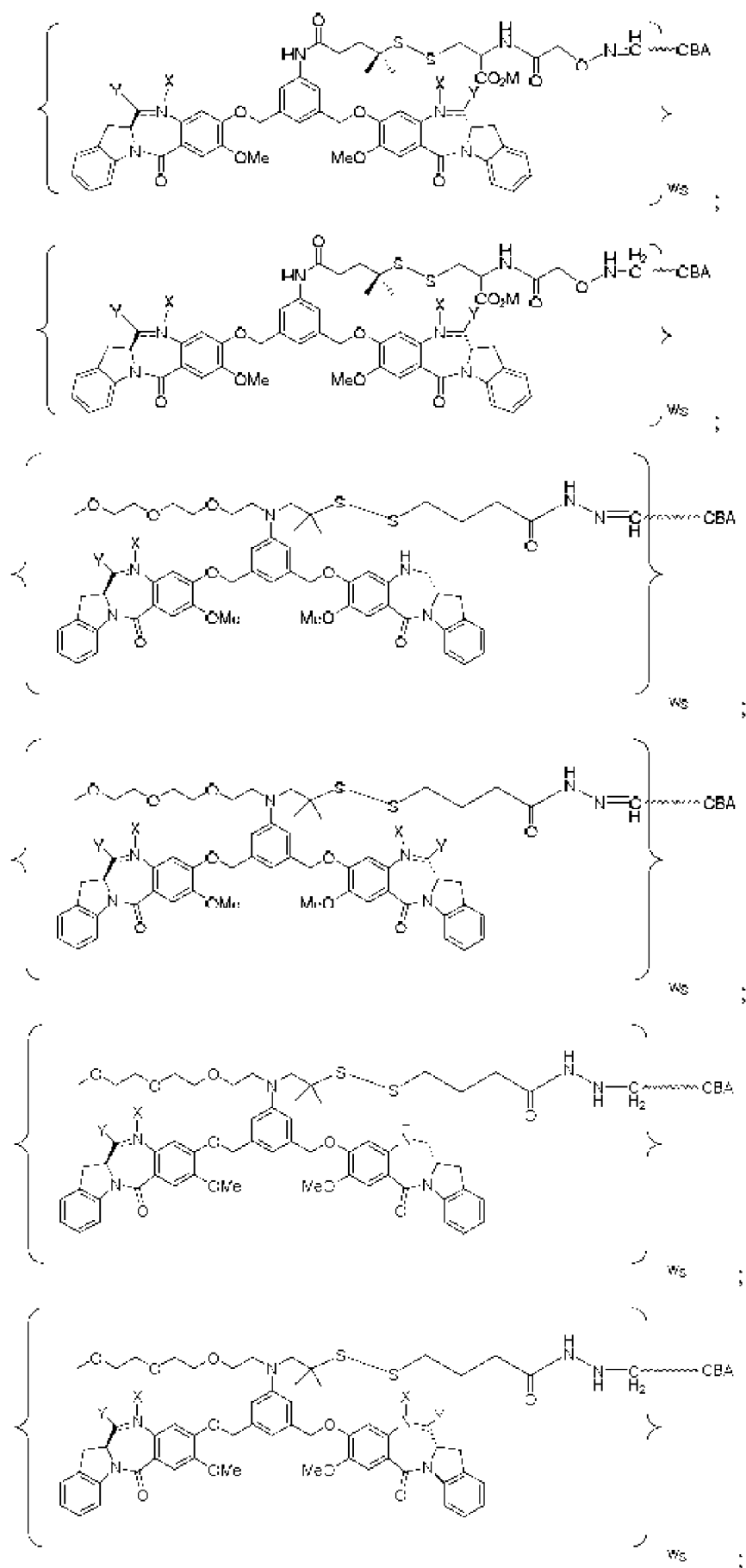






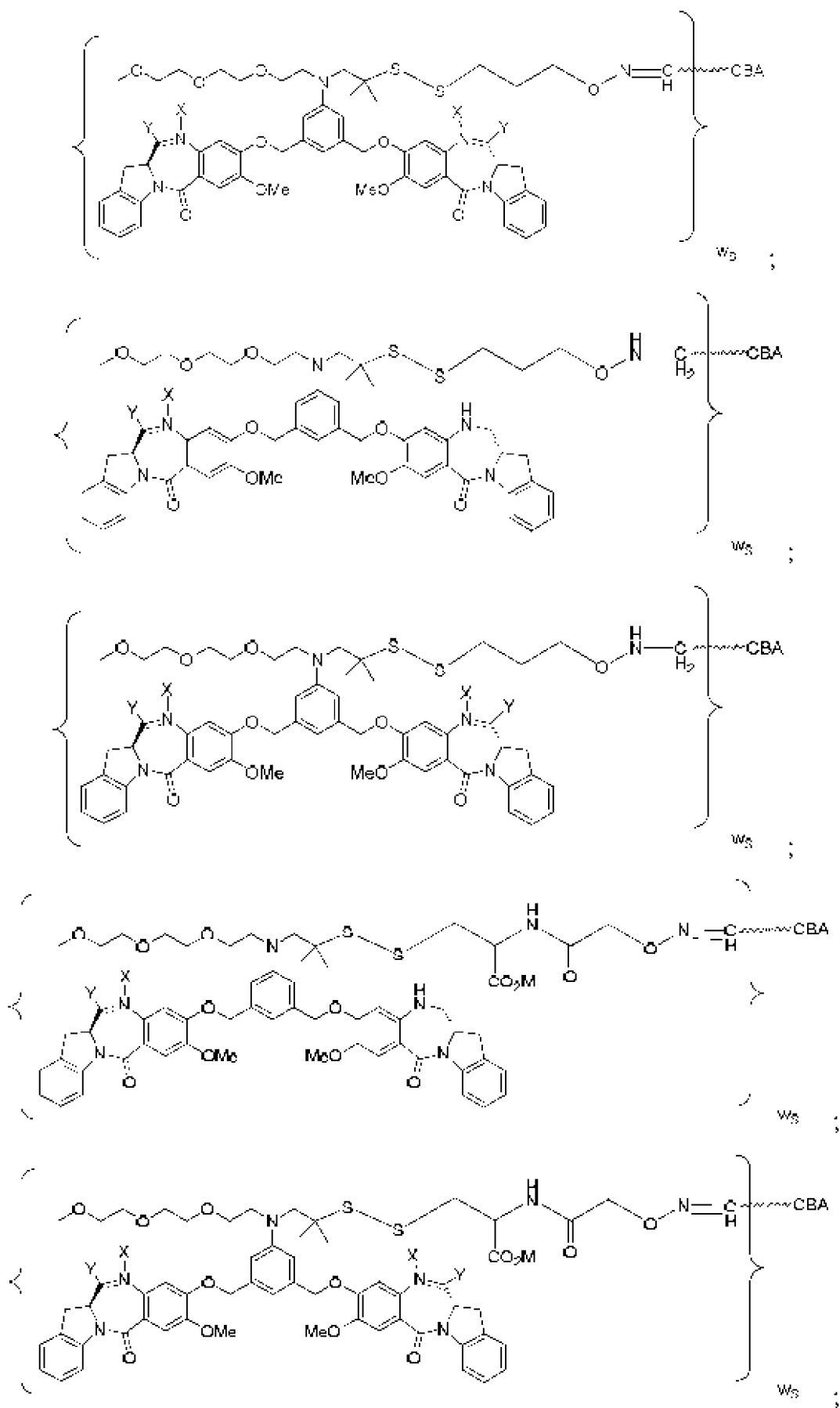




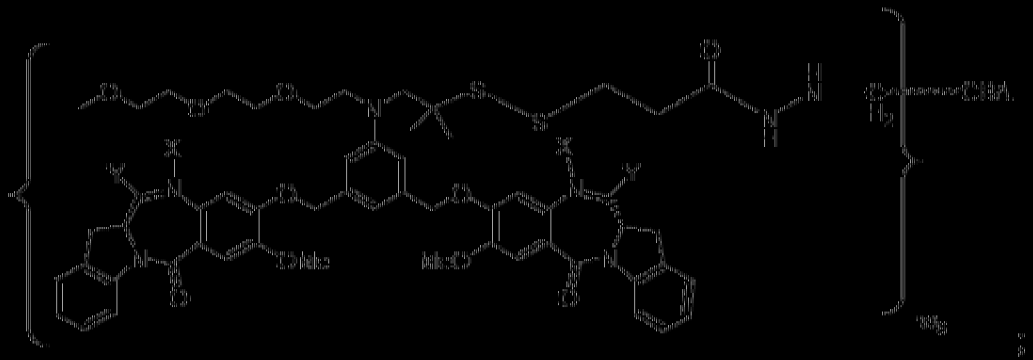










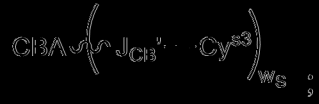


或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線—表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

[0068] 在某些實施例中，介於N與C之間的雙線—表示雙鍵，X不存在且Y為-H。

[0069] 在某些實施例中，介於N與C之間的雙線—表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。在某些實施例中，M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

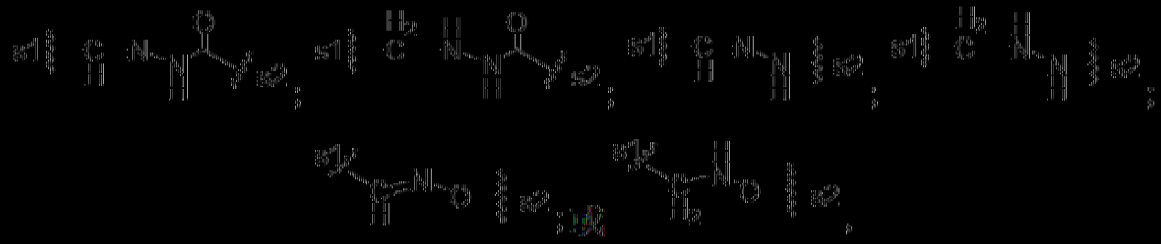
[0070] 本發明之另一態樣提供一種免疫結合物，其具有下式：



其中：

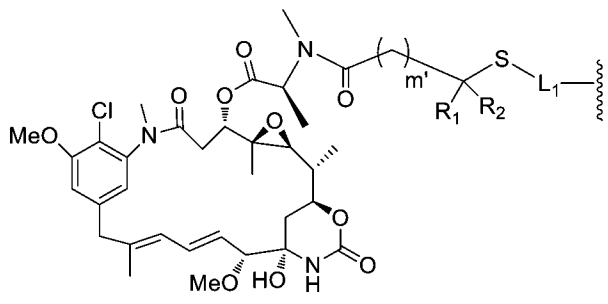
CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段或本發明之其多肽，其共價連接於JCB'基團；

JCB'為藉由使來源於本發明之該抗體或其抗原結合片段或本發明之其多肽之N末端上之2-經基乙胺部分之氧化的醛基與Cys3上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：



其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cys3共價連接之位點；

Cys3由下式表示：

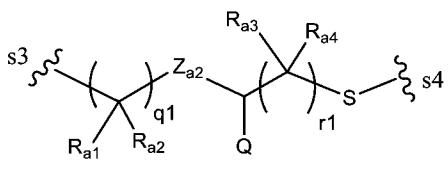


其中：

m'為1或2；

R1及R2各自獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

L1由下式表示：



其中：

s3為與基團JCB'共價連接之位點；

s4為與Cys3上之-S-基團共價連接之位點；

Za2為不存在、-C(=O)-NR9-或-NR9-C(=O)-；

R9為-H或(C1-C3)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

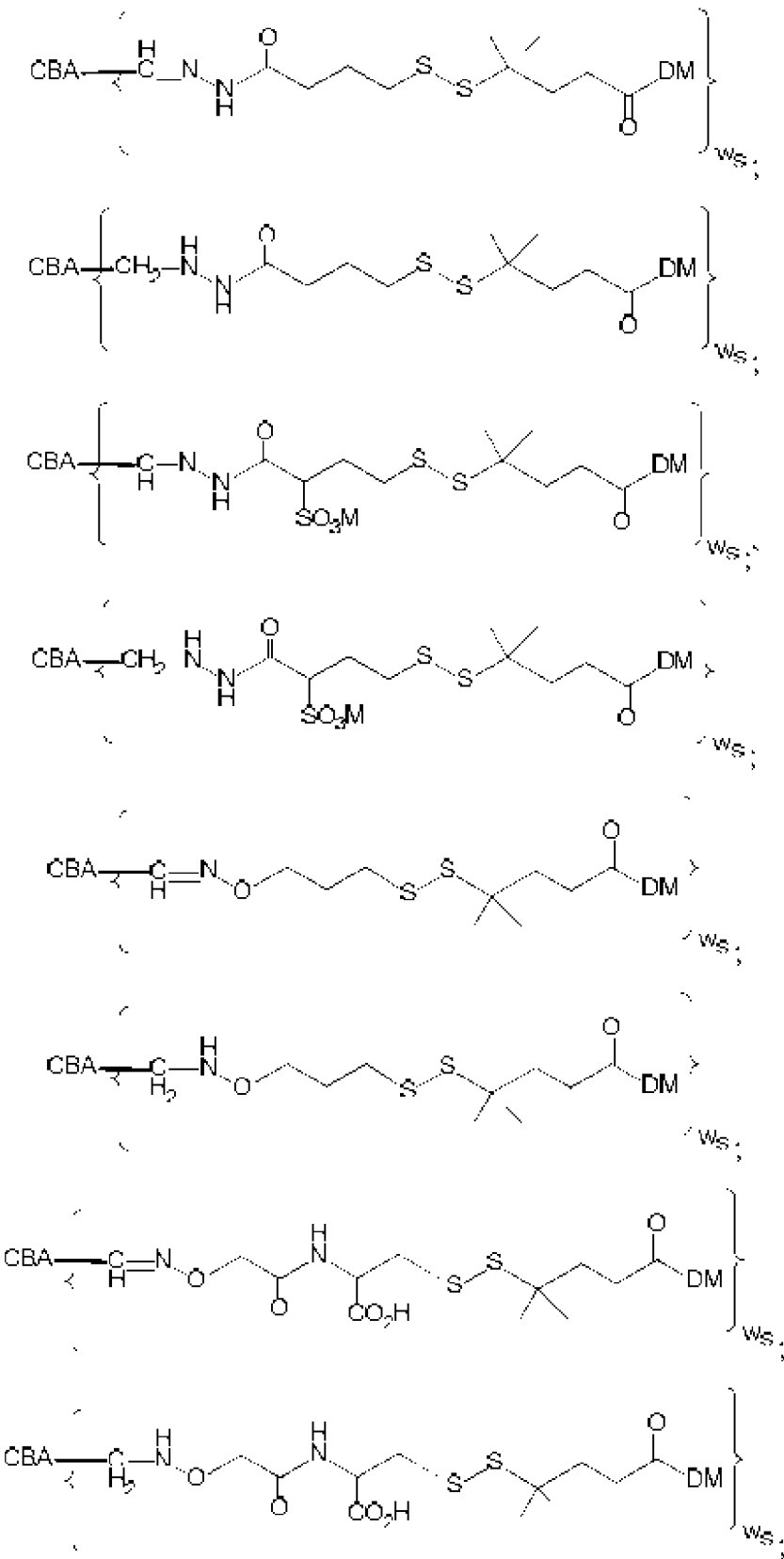
Ra1、Ra2、Ra3、Ra4在每次出現時獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

q1及r1各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q1及r1不均為0。

【0071】 在某些實施例中，m'為1，且R1及R2均為H。在某些實施例中，m'為2，且R1及R2均為Me。

【0072】 在某些實施例中，-L1-由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽；其中DM由下式表示：

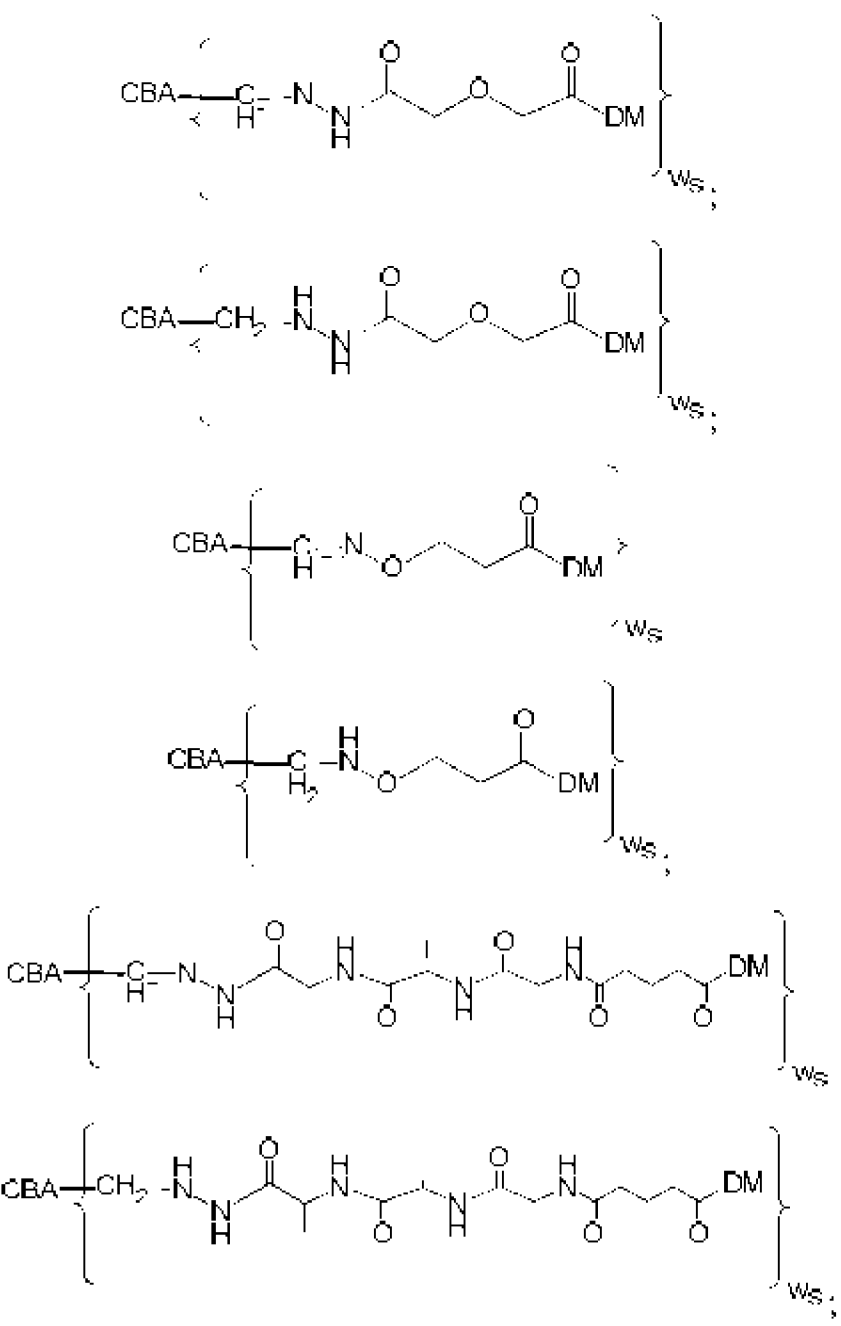


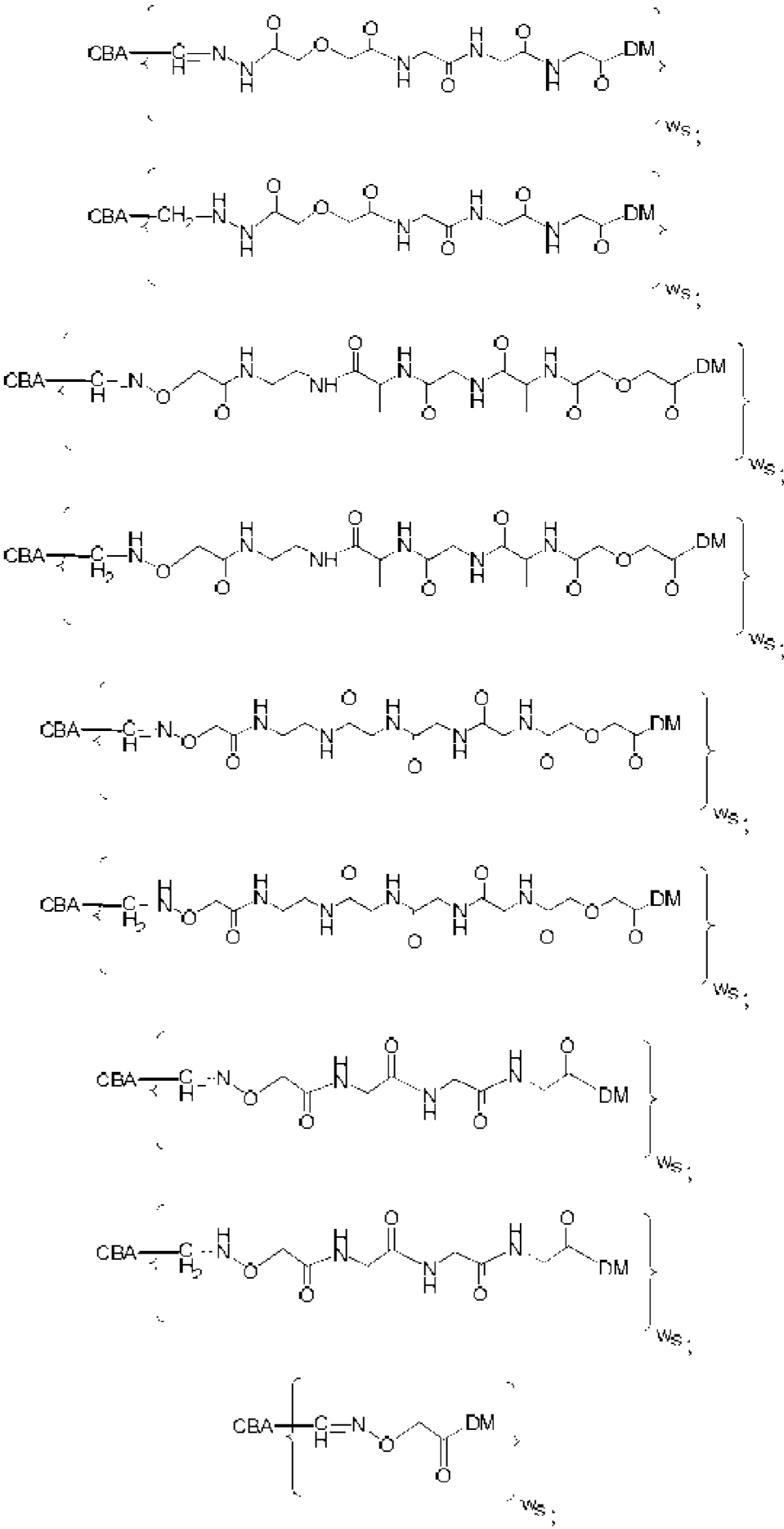


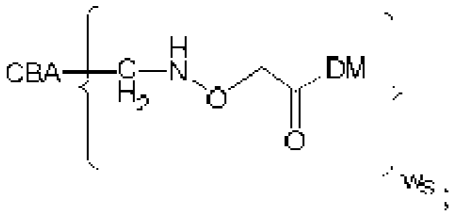


Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在某些實施例中，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala及D-Ala-D-Ala。

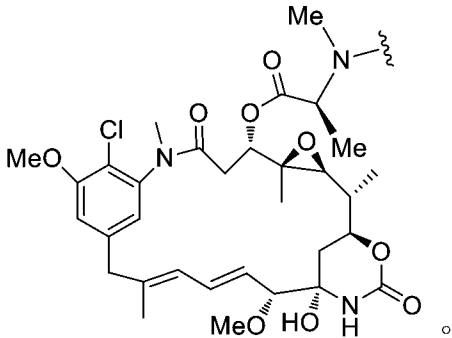
【0078】 在某些實施例中，免疫結合物由以下各式表示：



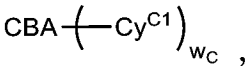




或其醫藥學上可接受之鹽，其中DM由以下結構式表示：



【0079】 本發明之另一態樣提供一種免疫結合物，其由下式表示：

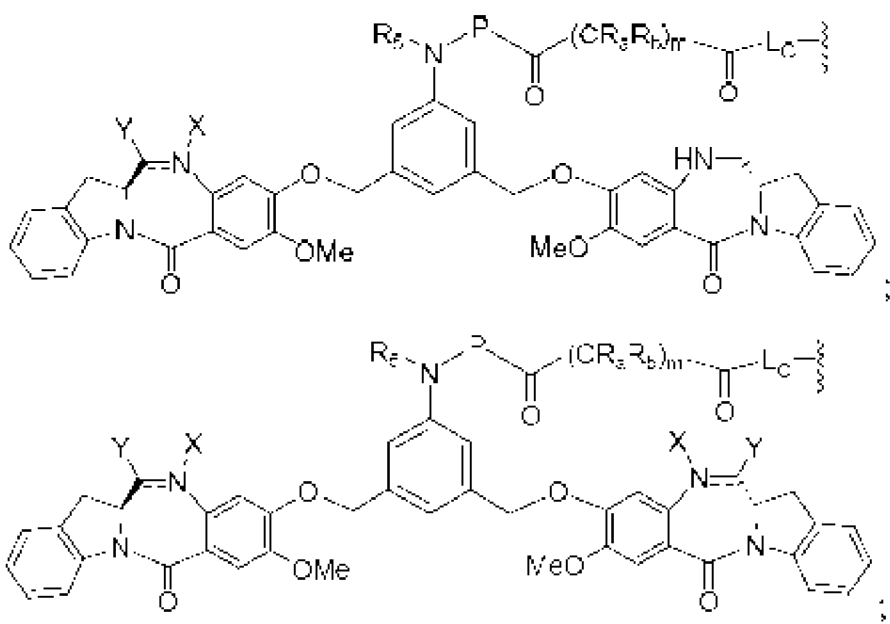


其中：

CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於CyC1；

WC為1或2；

CyC1由以下各式表示：





R19及R20在每次出現時獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

m"為介於1與10之間的整數；且

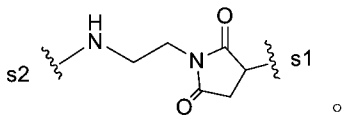
Rh為-H或(C1-C3)烷基。

【0080】 在某些實施例中，Ra及Rb均為H；且R5為H或Me。

【0081】 在某些實施例中，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽。舉例而言，P可選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在某些實施例中，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。在某些實施例中，Q為-SO<sub>3</sub>M。

【0082】 在某些實施例中，R19及R20均為H；且m"為1至6之整數。

【0083】 在某些實施例中，-Lc-由下式表示：



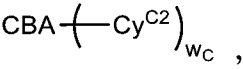
【0084】 在某些實施例中，該免疫結合物由以下各式表示：





為-OH或-SO3M。

【0085】 本發明之另一態樣提供一種免疫結合物，其由下式表示：

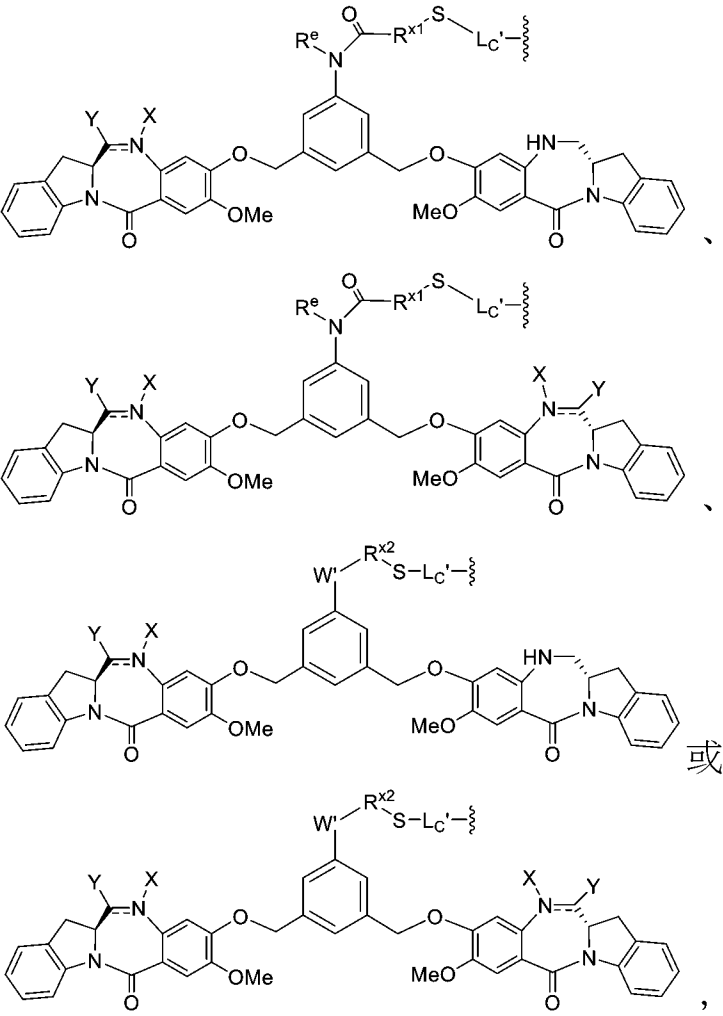


其中：

CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於CyC2；

WC為1或2；

CyC2由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C1-C4)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH

或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>x1</sub>為(C1-C6)烷基；

Re為-H或(C1-C6)烷基；

W'為-NRe'；

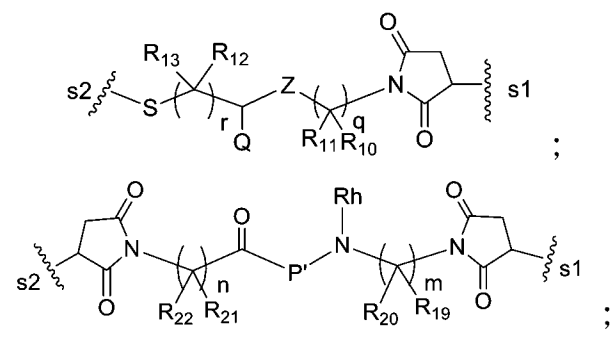
Re'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sub>k</sub>；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x2</sub>為(C1-C6)烷基；

LC'由以下各式表示：



其中：

s<sub>1</sub>為與該CBA共價連接之位點且s<sub>2</sub>為與CyC<sub>2</sub>上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

Q為-H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub>及R<sub>22</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

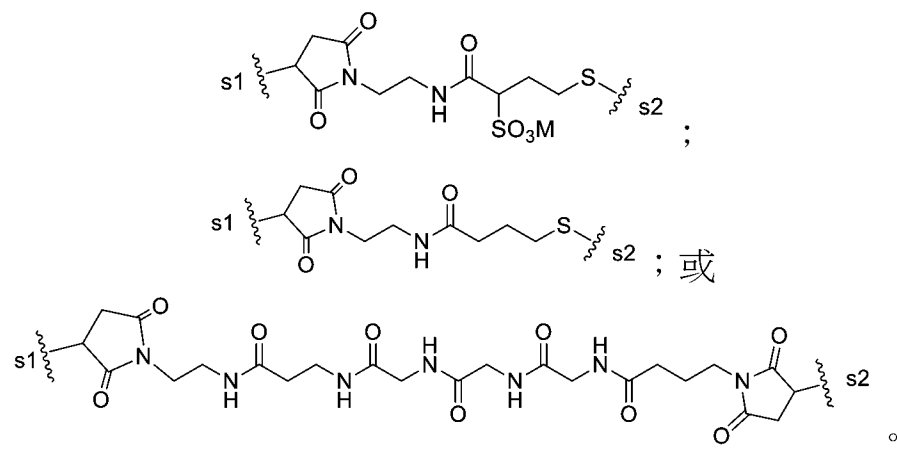
R<sub>h</sub>為-H或(C1-C3)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

【0086】 在某些實施例中，P'為含有2至5個胺基酸殘基之肽。舉例而言，

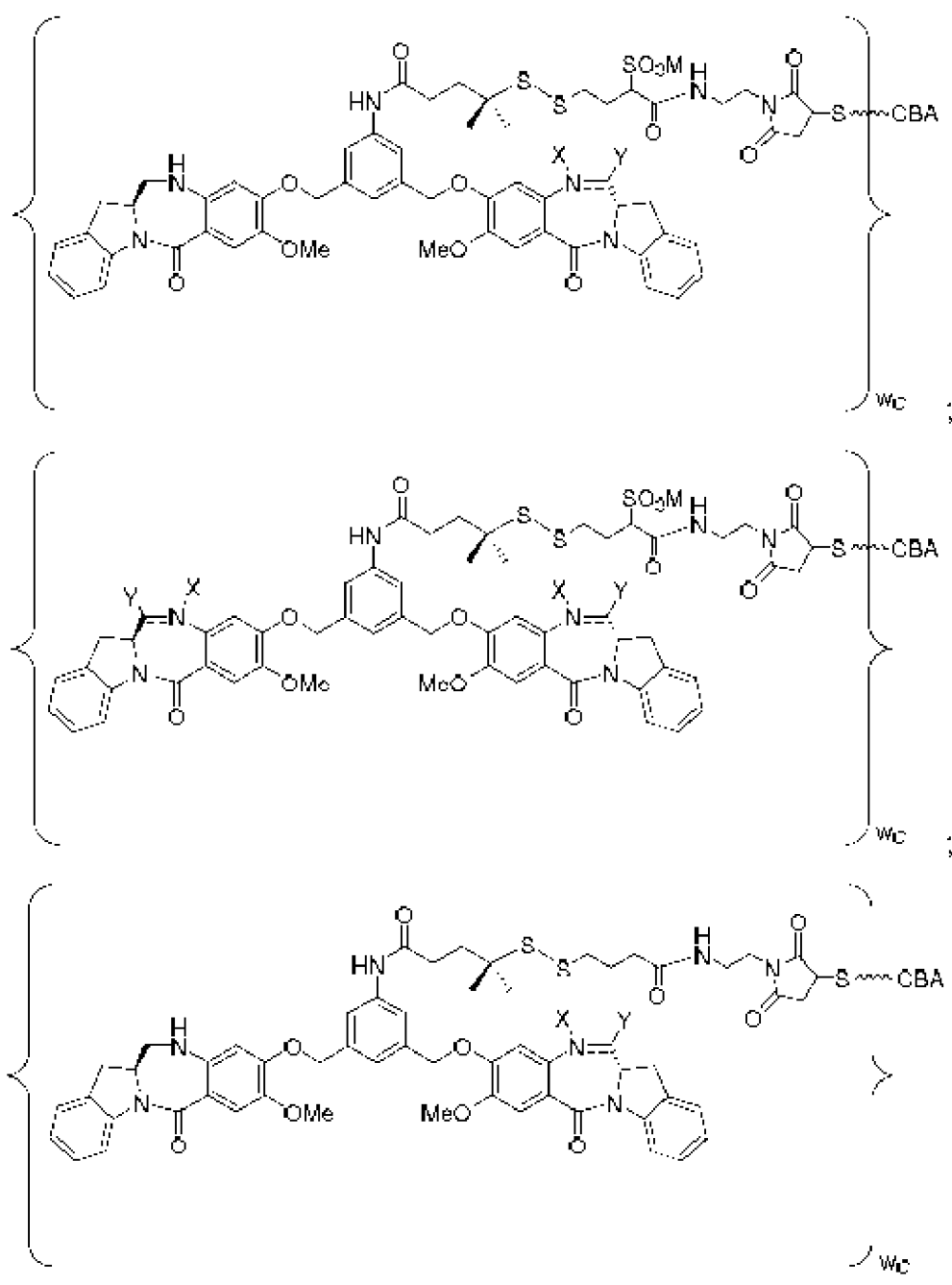
P'可選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在某些實施例中，P'為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【0087】 在某些實施例中，在該免疫結合物中，-Lc'-由以下各式表示：



【0088】 在某些實施例中，R<sup>e</sup>為H或Me；R<sup>x1</sup>為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，且R<sup>x2</sup>為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，其中R<sup>f</sup>及R<sup>g</sup>各自獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且p為0、1、2或3。在某些實施例中，R<sup>f</sup>與R<sup>g</sup>相同或不同且係選自-H及-Me。

【0089】 在某些實施例中，該免疫結合物由以下各式表示：



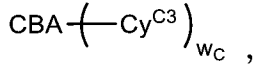


或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【0090】 在某些實施例中，介於N與C之間的雙線=表示雙鍵，X不存在且Y為-H。

【0091】 在某些實施例中，介於N與C之間的雙線=表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。在某些實施例中，M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

【0092】 本發明之另一態樣提供一種免疫結合物，其具有下式：

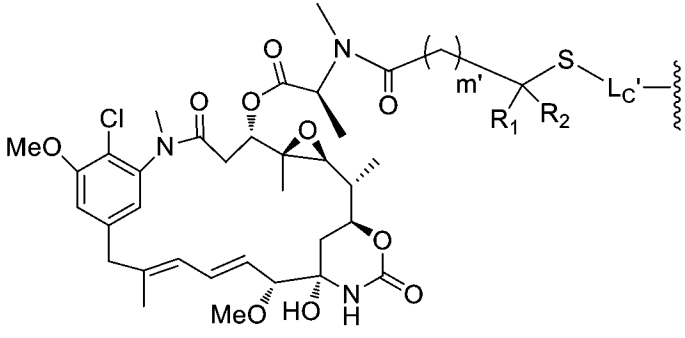


其中：

CBA為本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於CyC3；

WC為1或2；

CyC3由下式表示：

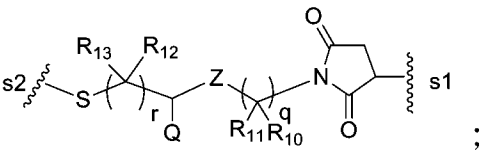


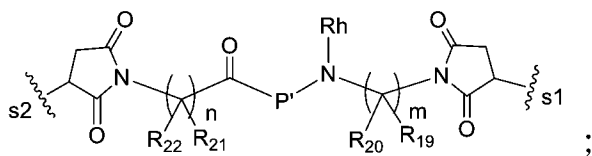
其中：

m'為1或2；

R1及R2各自獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

LC'由以下各式表示：





其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與CyC3上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR9-或-NR9-C(=O)-；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R9、R10、R11、R12、R13、R19、R20、R21及R22在每次出現時獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

Rh為-H或(C1-C3)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

【0093】 在某些實施例中，P'為含有2至5個胺基酸殘基之肽。舉例而言，P'係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在某些實施例中，P'為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【0094】 在某些實施例中，-Lc'-由以下各式表示：





【0097】 本發明之另一態樣提供一種醫藥組合物，其包含本發明之抗體或其抗原結合片段，或本發明之多肽，或本發明之免疫結合物，及醫藥學上可接受之載劑。

【0098】 本發明之另一態樣提供一種抑制表現CD123之細胞生長的方法，其包括使該細胞與本發明之抗體或其抗原結合片段、或本發明之多肽、或本發明之免疫結合物、或本發明之醫藥組合物接觸。

【0099】 在某些實施例中，該細胞為腫瘤細胞。在某些實施例中，該細胞為白血病細胞或淋巴瘤細胞。

【0100】 本發明之另一態樣提供一種治療患有癌症之個體的方法，其中該癌症之細胞表現CD123，該方法包括向該個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段、或本發明之多肽、或本發明之免疫結合物、或本發明之醫藥組合物。

【0101】 在某些實施例中，該癌症或細胞增殖病症為白血病或淋巴瘤。在某些實施例中，該癌症或細胞增殖性病症係選自由以下各項組成之群：急性骨髓性白血病(AML)；慢性骨髓性白血病(CML)；急性淋巴母細胞性白血病(ALL)，包括B細胞系急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)；毛細胞白血病(HCL)；骨髓發育不良症候群；母細胞性漿細胞樣DC贅瘤(BPDCN)白血病；非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)，包括套細胞淋巴瘤；及霍奇金氏白血病(HL)。在某些實施例中，該癌症為急性骨髓性白血病(AML)。在某些實施例中，該癌症為B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)。

【0102】 本發明之另一態樣提供一種在個體中治療細胞增殖性病症之方法，其中該細胞增殖性病症之細胞表現CD123，該方法包括以足以治療該細胞增殖性病症之量向該個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段、或本發明之多肽、或本發明之免疫結合物、或本發明之醫藥組合物。

【0103】 預期除非明確否認或不適用，否則本文中所描述之任一實施例，包括僅在本發明之一個態樣中描述(而在其他態樣中未描述或在其他態樣中未重複)之彼等實施例以及僅在實例中描述之彼等實施例，均可與本發明之任何一或多個其他實施例組合。

#### 【圖式簡單說明】

【0104】 [圖 1] 顯示嵌合 CD123-6 抗體 (chCD123-6) 及其 CDR 移植 huCD123-6 抗體 (huCD123-6Gv4.6 及 huCD123-6Gv4.7) 對 TF-1 細胞之 IL-3 依賴性增殖的抑制。

【0105】 [圖 2A 及圖 2B] 顯示三種鼠類抗 CD123 抗體 (muCD123-3、muCD123-6 及 muCD123-14) 抑制 TF-1 細胞之 IL-3 依賴性增殖，程度至少與 7G3 同樣高。圖 2A 顯示多種抗 CD123 抗體，包括結合 CD123 之對照抗體 7G3、6H6 及 9F5 對在 IL-3 (1 ng/mL) 存在下培養之 TF-1 細胞的抑制。圖 2B 顯示相同抗 CD123 抗體對在 GM-CSF (2 ng/mL) 存在下培養之 TF-1 細胞的抑制。

【0106】 [圖 3] 顯示鼠類抗 CD123 抗體 muCD123-3、muCD123-6 及 muCD123-14 以劑量依賴性方式抑制 TF-1 細胞之 IL-3 (1 ng/mL) 依賴性增殖且程度高於 7G3 抗體。muCD123-16 為結合 CD123 但不抑制 TF-1 細胞之 IL-3 依賴性增殖的陰性對照抗 CD123 抗體。

【0107】 [圖 4A 及圖 4B] 顯示在表現 CD123 之 TF-1 (圖 4A) 及 HNT-34 (圖 4B) 細胞中鼠類 muCD123-3、muCD123-6 及 muCD123-14 抗體與 7G3 抗體相比對 CD123 陽性 AML 細胞具有較高結合親和力。

【0108】 [圖 5A 及圖 5B] 顯示嵌合抗 CD-123 抗體 chCD123-3、chCD123-6 及 chCD123-14 保留其鼠類對應物之高結合親和力，使用 HNT-34 細胞 (圖 5A) 或 CD123 陽性急性骨髓性白血病 (AML) 細胞系 MOLM-13 (圖 5B)。不結合 CD123 之

嵌合抗體chKTI作為陰性對照包括在內。

【0109】 [圖6]顯示嵌合chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14抗CD-123抗體保留其鼠類對應物之功能活性，如其能夠抑制TF-1細胞之IL-3依賴性增殖所證明。結合CD123但不抑制TF-1細胞之IL-3依賴性增殖的非功能嵌合抗CD123抗體(chCD123-18)作為陰性對照包括在內。

【0110】 [圖7A]顯示鼠類(muCD123-6)、嵌合(chCD123-6)及CDR移植huCD123-6抗體(huCD123-6Gv4.7S2及huCD123-6Gv4.7S3)與7G3相比均對表現CD123之HNT-34細胞具有較高親和力。不結合CD123之嵌合抗體chKTI作為陰性對照包括在內。圖7B及圖7C顯示huCD123-6Gv4.7S3或-Gv4.7抗體經由Lys、Ser或Cys鍵聯與D1或D2化合物結合僅適中地影響此等ADC結合物之結合親和力，亦即，Ser連接之huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-sD1（參見圖17中之結構）及huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8，以及圖7B中之Lys連接之huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1及huCD123-6Gv4.7S3-D2；以及圖7C中之Cys連接之huCD123-6Gv4.7-CysMab-D4及huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5。在圖7C中，未結合之huCD123-6Gv4.7抗體具有SEQ ID NO: 54之重鏈序列，其中Xaa為Val。具有「S3-SeriMab」之結合物具有經由輕鏈上之氧化N末端Ser而達成之細胞毒素(在此情況下，吡啶并苯并二氮呋或下文中之「IGN」化合物)鍵聯。具有「CysMab」之結合物具有經由重鏈中經工程改造之Cys（亦即，對應於SEQ ID NO: 54中第5個至最後一個Cys之Cys）而達成之細胞毒素(在此情況下，IGN化合物)鍵聯。

【0111】 [圖8A]顯示嵌合(chCD123-6)及CDR移植(huCD123-6Gv4.7S2及huCD123-6Gv4.7S3) huCD123-6抗體抑制TF-1細胞之IL-3依賴性增殖，程度大於7G3抗體。該抑制具有IL-3依賴性，因為當在GM-CSF存在下使細胞生長時此等抗體不具有抑制效應(圖8B)。

【0112】 [圖9A]顯示IL-3R $\alpha$  (CD123)細胞外域之表現構建體以及包含

IL-3R $\alpha$  (灰色)及GMR $\alpha$ 結構域(白色)之嵌合受體蛋白。圖9B顯示CD123-6抗體主要結合IL-3R $\alpha$ 之CRM結構域(殘基101-306)。圖9C顯示CD123-3抗體主要結合IL-3R $\alpha$ 之CRM結構域(殘基101-306)。圖9D顯示CD123-14抗體排他性地結合IL-3R $\alpha$ 之N末端結構域(殘基1-100)。圖9E顯示7G3抗體排他性地結合IL-3R $\alpha$ 之N末端結構域(殘基1-100)。圖9F顯示6H6抗體排他性地結合IL-3R $\alpha$ 之N末端結構域(殘基1-100)。圖9G顯示9F5抗體排他性地結合IL-3R $\alpha$ 之N末端結構域(殘基1-100)。

【0113】 [圖10]顯示表面重整huCD123-6Rv1.1抗體之類美登素DM1結合物huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1對與生長因子無關之表現CD123之AML細胞系OCI-AML4展現劑量依賴性細胞毒性。該細胞毒性具有CD123依賴性，如過量未結合huCD123-6抗體(500 nM)能夠阻斷該細胞毒性所證明。

【0114】 [圖11A]顯示多種表面重整離胺酸連接之huCD123-6Rv1.1-IGN結合物對不同來源之多種CD123陽性惡性細胞系的活體外細胞毒性。

【0115】 [圖11B]顯示多種離胺酸或半胱胺酸連接之huCD123-6-IGN結合物對多種CD123陽性B-ALL細胞系之活體外細胞毒性。基於未結合KTI抗體之結合物作為陰性對照包括在內。

【0116】 [圖11C]顯示多種Lys或Cys連接之IGN化合物對P-gp (P-糖蛋白)陽性AML細胞系Kasumi-3及MOLM-1具有高活性。在過量未結合匹配huCD123抗體存在下產生具有空心數據點之對照曲線。

【0117】 [圖11D]顯示本發明之多種Lys或Cys連接之CD123-IGN結合物幾乎均可在nM或亞nM濃度下殺死90%之來自9個AML患者樣品之AML祖細胞。

【0118】 [圖11E]顯示Cys連接之huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物在比殺死AML祖細胞所需之濃度高出>100倍之濃度下殺死正常血細胞。相較之下，Mylotarg未展現此種優先殺死效應。

【0119】 [圖12A及圖12B]顯示多種離胺酸連接之huCD123-6Rv1.1-IGN結合物對來自AML患者之原代細胞的活體外細胞毒性。來自對一個原發性患者樣品進行典型CFU檢定的結果提供於圖12A中。圖12B顯示經該等結合物處理之所有AML患者樣品的IC<sub>90</sub>值。

【0120】 [圖 13A 至 圖 13C] 顯示 huCD123-6 之 CysMab 之 IGN 結合物 (huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5，實心黑色圓形)與相同抗體之離胺酸連接之結合物(huCD123-6Gv4.6-D2，實心黑色正方形)對AML細胞系EOL-1 (圖13A)、B-ALL細胞系KOPN-8 (圖13B)及CML細胞系MOLM-1 (圖13C)之活性至少相同。連接各圖中之空心數據點的點曲線表示個別結合物(亦即，空心圓形用於huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5，且空心正方形用於huCD123-6Gv4.6-D2)在阻斷濃度(500 nM)之未結合chCD123-6抗體存在下的活性。

【0121】 [圖 14A 至 圖 14C] 顯示 huCD123-6 之 SeriMab (huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8，實心黑色圓形)與相同抗體之離胺酸連接之結合物(huCD123-6Rv1.1-D2，實心黑色倒三角形)在AML細胞系SHI-1 (圖14A)及HNT-34 (圖14B)以及CML細胞系MOLM-1 (圖14C)中之活性至少相同。連接各圖中之空心數據點的點曲線表示個別結合物(亦即，空心圓形用於huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8，且空心倒三角形用於huCD123-6Rv1.1-D2)在阻斷濃度(500 nM)之未結合huCD123-6抗體存在下的活性。

【0122】 [圖15]顯示示意圖，該圖顯示可用於合成本發明之Ser鍵聯結合物的一般步驟。

【0123】 [圖16]顯示示意圖，該圖顯示可用於合成本發明之Ser鍵聯結合物的一般步驟。

【0124】 [圖17]顯示示意圖，該圖顯示可用於合成本發明之Ser鍵聯結合物的一般步驟。

【0125】 [圖18]顯示Cys連接之huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物與吉妥珠單抗奧佐米星(GO) (亦稱為Mylotarg)相比在未選擇之AML患者樣品中具有較高活性。

【0126】 [圖19]顯示Cys連接之huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物在比殺死AML祖細胞所需之濃度高出>100倍之濃度下殺死正常祖細胞。相比之下，Mylotarg及huCD123-6G4.7-CysMab-D5' (DNA交聯劑D5'之ADC)不展現此種優先殺死效應。

【0127】 [圖20]顯示CD123-IGN結合物在MV4-11 AML皮下小鼠模型中之活體內效力。

【0128】 [圖21]顯示Cys連接之huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物對具有不良預後因素之多種CD123陽性AML細胞系具有高活性。

【0129】 [圖22]顯示經huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物治療之小鼠與經媒劑處理之小鼠及對照相比在第26天的活體內生物發光成像。用結合物處理顯著減少小鼠中的腫瘤負擔。

【0130】 [圖23]顯示用huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物處理與經媒劑處理之小鼠及對照相比在6/6小鼠中延長存活時間。

【0131】 [圖24]顯示MV4-11細胞與huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5結合物一起培育導致DNA損傷、停滯在細胞週期之S期及細胞凋亡介導之細胞死亡。

【0132】 [圖25]顯示CD123-IGN結合物在Molm-13 AML彌散性模型中之活體內效力。

【0133】 [圖26]顯示CD123-IGN結合物在EOL-1皮下模型中之活體內效力。

【0134】 [圖27]顯示huCD123-CysMab-D5結合物在多種劑量下在EOL-1皮下模型中之活體內效力。

【0135】 [圖28]顯示huCD123-CysMab-D5結合物與有效負載之相應游離藥物形式(FGN849或D5)、裸抗體、對照、阿糖胞苷及阿紮胞苷相比在EOL-1皮下模型中之活體內效力。

【0136】 [圖29]顯示CD123-IGN結合物在MV4-11 AML播散性模型中之活體內效力。

【0137】 [圖30]顯示CD123-IGN結合物在MV4-11 AML皮下模型中之活體內效力。

【0138】 [圖31]顯示用huCD123-CysMab-D5結合物治療與用媒劑治療之小鼠及對照相比在小鼠中延長存活時間。

【0139】 [圖32]顯示huCD123-CysMab-D5及huCD123-SeriMab-sD1結合物在小鼠中之活體內耐受性。

【0140】 [圖33]顯示huCD123-離胺酸連接-D2結合物在小鼠中之活體內耐受性。

## 【實施方式】

### 1. 定義

【0141】 為了促進理解本發明，以下定義許多術語及片語。

【0142】 除非另外指示，否則如本文中可互換使用之術語「(人類)IL-3R $\alpha$ 」、「介白素-3受體 $\alpha$ 」或「CD123」係指任何天然(人類)IL-3R $\alpha$ 或CD123。CD123蛋白為異源二聚細胞因子受體(IL-3受體，或IL-3R)之介白素3特異性亞單元。IL-3R由配位體特異性 $\alpha$ 亞單元及由介白素3 (IL3)、群落刺激因子2 (CSF2/GM-CSF)及介白素5 (IL5)之受體共用之信號轉導共同 $\beta$ 亞單元(亦稱為CD131)構成。CD123/IL-3R $\alpha$ 與IL3之結合視 $\beta$ 亞單元而定。 $\beta$ 亞單元係由配位體結合活化，且對於IL3之生物學活性為需要的。

【0143】 針對CD123之此等以上術語均可指如本文中所指示之蛋白質或核酸序列。術語「CD123/IL-3R $\alpha$ 」涵蓋「全長」未處理CD123/IL-3R $\alpha$ 以及由在細胞內進行處理而獲得之CD123/IL-3R $\alpha$ 之任何形式。該術語亦涵蓋CD123/IL-3R $\alpha$ 蛋白或核酸之天然存在之變異體，例如剪接變異體、等位基因變異體及同功型。本文中所描述之CD123/IL-3R $\alpha$ 多肽及多核苷酸可自多種來源，諸如自諸多人類組織類型或自另一來源分離，或藉由重組或合成方法來製備。CD123/IL-3R $\alpha$ 序列之實例包括但不限於NCBI參考號NP\_002174及NM\_002183 (人類CD123變異體1之蛋白質及核酸序列)以及NP\_001254642及NM\_001267713 (人類CD123變異體2之蛋白質及核酸序列)。

【0144】 術語「抗體」意謂免疫球蛋白分子，其可經由該免疫球蛋白分子之可變區內的至少一個抗原識別位點識別且特異性結合標靶，諸如蛋白質、多肽、肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂質或上述之組合。如本文中所使用，術語「抗體」涵蓋完整多株抗體、完整單株抗體、抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及Fv片段)、單鏈Fv (scFv)突變體、諸如雙特異性抗體之多特異性抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、包含抗體之抗原決定部分的融合蛋白質，及包含抗原識別位點之任何其他經修飾免疫球蛋白分子，只要該等抗體展現所要生物活性即可。抗體基於其重鏈恆定域(分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ )之一致性可屬於五個主要免疫球蛋白類別中之任一個：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，或其亞類(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。不同類別之免疫球蛋白具有不同且熟知之亞單元結構及三維構形。抗體可為裸抗體或與諸如毒素、放射性同位素等其他分子結合。

【0145】 在一些實施方案中，抗體為非天然存在之抗體。在一些實施例中，抗體係自天然組分中純化而來。在一些實施例中，抗體為重組產生。在一些實施例中，抗體由雜交瘤產生。



【0146】 「阻斷」抗體或「拮抗性」抗體為抑制或降低其所結合之諸如CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗原的生物學活性的抗體。在某一實施例中，阻斷抗體或拮抗性抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。理想地，該生物活性降低10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

【0147】 術語「抗CD123抗體」、「抗IL-3R $\alpha$ 抗體」或「(特異性)結合CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗體」係指能夠以充分親和力結合CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗體，使得該抗體適用作診斷及/或治療劑用於靶向CD123/IL-3R $\alpha$ 。除非另外規定，否則抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體與無關非CD123/IL-3R $\alpha$ 蛋白之結合程度小於該抗體與CD123/IL-3R $\alpha$ 結合之約10%，如例如藉由放射性免疫檢定(RIA)所量測。在某些實施例中，結合CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗體具有 $\leq 0.5$  nM、 $\leq 0.3$  nM、 $\leq 0.1$  nM、 $\leq 0.05$  nM或 $\leq 0.01$  nM之解離常數( $K_d$ )。在一個實施例中，抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體不結合共同 $\beta$ 鏈CD131。在一個實施例中，抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體不結合CD123中由諸如7G3 (小鼠IgG<sub>2a</sub>)、6H6 (小鼠IgG<sub>1</sub>)及9F5 (小鼠IgG<sub>1</sub>)之已知及市售CD123抗體結合之相同抗原決定基(Sun等人, *Blood* 87(1): 83-92, 1996)。

【0148】 本發明之抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段之序列提供於以下表1至表6中。以下單獨提供用於本發明之多種抗體及免疫結合物的命名法。

【0149】 術語「抗體片段」係指完整抗體之一部分且係指完整抗體之抗原決定可變區。抗體片段之實例包括但不限於Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及F<sub>v</sub>片段、線性抗體、單鏈抗體及由抗體片段形成之多特異性抗體。術語抗體之「抗原結合片段」包括抗體中保留特異性結合抗原之能力的一或多個片段。已顯示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之某些片段來執行。術語抗體之「抗原結合片段」內所涵蓋之結合片段的實例包括(但不限於)：(i)Fab片段，即由V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>及C<sub>H1</sub>結構域組成之單價片段(例如，由木瓜蛋白酶消化之抗體產生三個片段：兩個抗原結合Fab片段及一個不結合抗原之Fc片段)；(ii)F(ab')<sub>2</sub>片段，即包含在鉸鏈區由二硫

橋連接之兩個Fab片段的二價片段(例如，由胃蛋白酶消化之抗體產生兩個片段：二價抗原結合F(ab')<sub>2</sub>片段，以及不結合抗原之pFc'片段及其相關F(ab')單價單元；(iii)由V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>結構域組成的F<sub>d</sub>片段(亦即，包括在Fab中之重鏈部分)；(iv)由抗體之單一臂之V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>結構域組成的F<sub>v</sub>片段，及相關二硫鍵連接之F<sub>v</sub>；(v)dAb (域抗體)或sdAb (單域抗體)片段(Ward等人, *Nature* 341:544-546, 1989)，其由V<sub>H</sub>結構域組成；及(vi)分離之互補性決定區(CDR)。

**【0150】** 「單株抗體」係指涉及單一抗原決定子或抗原決定基之高度特異性識別及結合的均質抗體群體。此與典型地包括針對不同抗原決定子之不同抗體的多株抗體相反。術語「單株抗體」涵蓋完整及全長單株抗體以及抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F<sub>v</sub>)、單鏈(scFv)突變體、包含抗體部分之融合蛋白質及包含抗原識別位點之任何其他經修飾免疫球蛋白分子。此外，「單株抗體」係指以許多方式製造之此種抗體，包括但不限於藉由雜交瘤、噬菌體選擇、重組表現及轉殖基因動物。

**【0151】** 術語「人類化抗體」係指非人類(例如鼠類)抗體之形式，其為含有最小非人類(例如鼠類)序列之特定免疫球蛋白鏈、嵌合免疫球蛋白或其片段。典型地，人類化抗體為人類免疫球蛋白，其中互補決定區(CDR)之殘基經非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔、倉鼠)之CDR中具有所要特異性、親和力及容量之殘基置換(Jones等人, *Nature* 321:522-525, 1986；Riechmann等人, *Nature* 332:323-327, 1988；Verhoeyen等人, *Science* 239:1534-1536, 1988)。

**【0152】** 在一些情況下，人類免疫球蛋白之F<sub>v</sub>構架區(FR)殘基經來自非人類物種之具有所要特異性、親和力及容量之抗體中的相應殘基置換。人類化抗體可藉由取代F<sub>v</sub>構架區中及/或經置換之非人類殘基內之其他殘基來進行進一步修飾，以改進並優化抗體特異性、親和力及/或容量。一般而言，人類化抗體將包括實質上所有至少一個且典型地兩或三個含有所有或實質上所有對應於非人

類免疫球蛋白之CDR區的可變域，而所有或實質上所有FR區為人類免疫球蛋白一致序列之FR區。人類化抗體亦可包含免疫球蛋白恆定區或域(Fc)，典型地人類免疫球蛋白恆定區或域之至少一部分。用於產生人類化抗體之方法的實例描述於以下文獻中：美國專利5,225,539及5,639,641；Roguska等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(3):969-973, 1994；及Roguska等人, *Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996 (均以引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，「人類化抗體」為表面重整抗體。在一些實施例中，「人類化抗體」為CDR移植抗體。

【0153】 抗體之「可變區」係指單獨或組合之抗體輕鏈可變區或抗體重鏈可變區。重鏈及輕鏈之可變區各自自由以三個互補性決定區(CDR，亦稱為高變區)連接之四個構架區(FR)組成。FR維持各鏈中之CDR與另一鏈之CDR緊密鄰近一起，有助於形成抗體之抗原結合位點。存在至少兩種對於測定CDR之技術：(1)基於物種間序列變異性之方法(亦即，Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)；及(2)基於抗原-抗體複合物之結晶學研究的方法(Al-lazikani等人, *J. Molec. Biol.* 273:927-948, 1997)。另外，此項技術中有時使用此兩種方法之組合來測定CDR。

【0154】 當提及可變域(約輕鏈中之殘基1至107及重鏈中之殘基1至113)中之殘基時一般使用Kabat編號系統(例如Kabat等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

【0155】 如Kabat中之胺基酸位置編號係指用於Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)(以引用之方式併入本文中)中之抗體編集之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有對應於可變域FR或CDR之縮短或插入的更少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈



或減少在該物種(例如人類)中引發免疫反應之機會。在某些實施例中，嵌合抗體可包括包含至少一個人類重鏈及/或輕鏈多肽之抗體或其抗原結合片段，諸如，例如包含鼠類輕鏈及人類重鏈多肽之抗體。

**【0158】** 術語「抗原決定基」或「抗原決定子」在本文中可互換用於指抗原中能夠由特定抗體識別且特異性結合之部分。當抗原為多肽時，抗原決定基可由連續胺基酸及藉由蛋白質之三級摺疊而毗鄰之非連續胺基酸形成。由連續胺基酸形成之抗原決定基典型地在蛋白質變性後得以保留，而由三級摺疊形成之抗原決定基典型地在蛋白質變性後喪失。在獨特空間構形下，抗原決定基典型地包括至少3個且更通常至少5或8至10個胺基酸。

**【0159】** 「結合親和力」一般係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的總非共價相互作用總和的強度。除非另外指示，否則如本文中所使用，「結合親和力」係指體現結合對之成員(例如抗體和抗原)之間的1:1相互作用的內在結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數( $K_d$ )或半最大有效濃度( $EC_{50}$ )表示。親和力可藉由此項技術中已知的常用方法，包括本文中所描述之方法來量測。低親和力抗體一般緩慢結合抗原且傾向於容易解離，而高親和力抗體一般更快結合抗原且傾向於保持結合較久。量測結合親和力之多種方法在此項技術中為已知的，出於本發明之目的可使用其中之任一種。本文中描述特定說明性實施例。

**【0160】** 「或更佳」當在本文中用於指結合親和力時係指分子與其結合搭配物之間的更強結合。「或更佳」當在本文中用於指更強結合時由較小數值 $K_d$ 值表示。舉例而言，對抗原具有「0.3 nM或更佳」親和力之抗體係指抗體對抗原之親和力 $\leq 0.3$  nM，例如，0.29 nM、0.28 nM、0.27 nM等，或者等於或小於0.3 nM之任何值。在一個實施例中，如由 $K_d$ 決定之抗體親和力將介於約 $10^{-3}$ 至約 $10^{-12}$  M之間、介於約 $10^{-6}$ 至約 $10^{-11}$  M之間、介於約 $10^{-6}$ 至約 $10^{-10}$  M之間、介於約 $10^{-6}$ 至約

$10^{-9}$  M之間、介於約 $10^{-6}$ 至約 $10^{-8}$  M之間或介於約 $10^{-6}$ 至約 $10^{-7}$  M之間。

【0161】 「特異性結合」一般意謂抗體經由其抗原結合域來結合抗原決定基且該結合需要抗原結合域與抗原決定基之間存在一定互補性。根據此定義，與抗體將結合隨機無關抗原決定基相比，據稱當其經由其抗原結合域結合抗原決定基時，抗體更容易「特異性結合該抗原決定基」。術語「特異性」在本文中用於考核某一抗體結合某一抗原決定基之相對親和力。舉例而言，可認為抗體「A」與抗體「B」相比對指定抗原決定基具有較高特異性，或可稱抗體「A」以比其對相關抗原決定基「D」所具有的特異性高的特異性結合抗原決定基「C」。

【0162】 在某些實施例中，本發明之抗體或抗原結合片段「特異性結合」CD123抗原，因為其對CD123抗原(來自任何物種)比對非CD123抗原具有更高結合特異性。在某些實施例中，本發明之抗體或抗原結合片段「特異性結合」人類CD123抗原，因為其對人類CD123抗原比對非人類CD123抗原(例如小鼠或大鼠CD123)具有更高結合特異性。

【0163】 「優先結合」意謂抗體特異性結合抗原決定基比其結合相關相似同源或類似抗原決定基更容易。因此，與相關抗原決定基相比，「優先結合」指定抗原決定基之抗體將更可能結合該抗原決定基，縱使此種抗體可與該相關抗原決定基交叉反應。舉例而言，在某些實施例中，相對於小鼠CD123，本發明之抗體或抗原結合片段「優先結合」人類CD123抗原。

【0164】 若抗體優先結合抗原決定基達到其可在某種程度上阻斷參考抗體與該抗原決定基結合之程度，則稱其「競爭性抑制」參考抗體與指定抗原決定基之結合。競爭性抑制可藉由此項技術中已知的任何方法來測定，例如競爭ELISA檢定。可稱抗體競爭性抑制參考抗體與指定抗原決定基之結合至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

【0165】 如本文中所使用之片語「實質上相似」或「實質上相同」表示兩

個數值(一般而言，一個與本發明之抗體相關而另一個與參考/比較抗體相關)之間的相似性程度之高足以使得熟習此項技術者將認為該兩個值之間的差異在藉由該等值(例如， $K_d$ 值)量度生物學特徵之情形下具有極小或不具有生物學及/或統計顯著性。作為隨參考/比較抗體之值而變化的函數，該兩個值之間的差異小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%及/或小於約10%。

**【0166】** 經分離之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為呈自然界中未發現之形式的多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物。經分離之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物包括已純化至其不再呈在自然界中發現其時之形式的程度的彼等多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物。在一些實施例中，經分離之抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為實質上純的。

**【0167】** 如本文中所使用，「實質上純」係指至少50%純(亦即，無污染物)、至少90%純、至少95%純、至少98%純或至少99%純的物質。

**【0168】** 如本文中所使用之術語「免疫結合物」、「結合物」或「ADC」係指連接至細胞結合劑(亦即，抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體或其片段)之化合物或其衍生物且由以下通式定義：A-L-C，其中C=細胞毒素，L=連接子，且A=細胞結合劑(CBA)，諸如抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體抗體或抗體片段。免疫結合物亦可由該通式之倒序形式定義：C-L-A。

**【0169】** 「連接子」為能夠以穩定共價方式將諸如本文中所描述之細胞毒性劑之化合物(通常為藥物)(例如類美登素或IGN (吡啶并苯并二氮呋)化合物)連接至諸如抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體或其片段之細胞結合劑的任何化學部分。連接子可在化合物或抗體保持活性之條件下對酸誘導之裂解、光誘導之裂解、肽酶誘導之裂解、酯酶誘導之裂解及二硫鍵裂解敏感或具有實質性抗性。適合之連接子在此項技術中為熟知的且包括例如二硫基、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。連接子亦包括如本文中所描述且如此項技術中已知的帶電連接子及其親水性形式。

【0170】術語「升高之」CD123/IL-3R $\alpha$ 、CD123/IL-3R $\alpha$ 之「增加之表現」及CD123/IL-3R $\alpha$ 之「過度表現」係指含有升高水準之CD123表現的樣品。CD123與對照值(例如在來自未患癌症之個體的生物樣品、組織或細胞、已知不表現或表現低CD123/IL-3R $\alpha$ 之樣品或癌症、正常樣品或不具有升高CD123/IL-3R $\alpha$ 值之癌症中的表現水準)相比可能升高、增加或過度表現。舉例而言，具有增加之表現的樣品(例如，來自諸如白血病及淋巴瘤之血液學癌症的樣品)可含有相對於對照/正常值增加至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍或至少50倍。

【0171】「參考樣品」可用於關聯及比較本發明方法中獲自測試樣品之結果。參考樣品可為細胞(例如細胞系、細胞球粒)或組織。「參考樣品」中之CD123/IL-3R $\alpha$ 水準可為CD123/IL-3R $\alpha$ 之絕對或相對量、量之範圍、最小及/或最大量、平均量及/或中值量。「參考樣品」亦可充當與測試樣品相比較之CD123/IL-3R $\alpha$ 表現基線。「參考樣品」可包括來自相同患者之先前樣品或基線樣品、具有已知CD123/IL-3R $\alpha$ 表現水準之正常參考或來自相關患者群體之具有已知CD123/IL-3R $\alpha$ 表現水準之參考。CD123/IL-3R $\alpha$ 水準亦可表述為標準曲線中之值。標準曲線為用於確定樣品中CD123/IL-3R $\alpha$ 濃度之繪圖檢定資料之定量方法。在一個實施例中，參考樣品為包含經純化CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗原標準物。本發明之診斷方法可涉及測試樣品中之CD123/IL-3R $\alpha$ 表現水準與「參考值」之間的比較。在一些實施例中，參考值為參考樣品中之CD123/IL-3R $\alpha$ 表現水準。參考值可為預定值且亦可由與測試樣品並行測試之參考樣品(例如，對照生物樣品或參考樣品)測定。參考值可為單一截止值，諸如中值或平均值或值範圍，諸如信賴區間。可確定不同的個體亞組的參考值。



【0172】 術語「一級抗體」在本文中係指特異性結合樣品中之靶蛋白抗原的抗體。一級抗體一般為ELISA檢定或IHC程序中所使用之第一抗體。在一個實施例中，一級抗體為IHC程序中所使用之惟一抗體。

【0173】 術語「二級抗體」在本文中係指特異性結合一級抗體，從而在一級抗體與後續試劑(若存在)之間形成橋接或連接之抗體。二級抗體一般為免疫組織化學程序中所使用之二級抗體。

【0174】 本發明之「樣品」或「生物樣品」具有生物學來源，在特定實施例中，諸如來自真核生物。在一些實施例中，該樣品為人類樣品，但亦可使用動物樣品。用於本發明之樣品之非限制性來源包括例如實體組織、活組織檢查吸出物、腹水、液體提取物、血液、血漿、血清、脊髓液、淋巴液、皮膚、呼吸系統、腸及泌尿生殖道之外部切片、淚液、唾液、乳汁、腫瘤、器官、細胞培養物及/或細胞培養物組分。「癌樣品」為含有癌細胞之樣品。該方法可用於研究CD123/IL-3R $\alpha$ 表現態樣或樣品狀態，包括但不限於比較不同類型之細胞或組織、比較不同的發育階段及偵測或測定疾病或異常之存在及/或類型。

【0175】 如本文中所使用，術語「俘獲試劑」係指能夠結合並俘獲樣品中之靶分子，使得在適合之條件下可分離俘獲試劑-靶分子複合物與樣品之其餘部分的試劑。在一個實施例中，該俘獲試劑經固定。在一個實施例中，夾心免疫檢定中之俘獲試劑為針對靶抗原之抗體或不同抗體之混合物。

【0176】 如本文中所使用，術語「可偵測抗體」係指能夠藉由以偵測手段擴增之標記直接地或藉由例如經標記之另一抗體間接地加以偵測的抗體。對於直接標記，典型地使抗體與可藉由一些手段偵測之部分結合。在一個實施例中，該可偵測抗體為生物素化抗體。

【0177】 如本文中所使用，術語「偵測手段」係指用於偵測可偵測抗體之存在的部分或技術，且包括可擴增固定標記(諸如俘獲至微量滴定板上之標記)

之偵測劑。在一個實施例中，檢測手段為螢光偵測劑，諸如親和素或鏈黴親和素。

**【0178】** 通常，「夾心ELISA」使用以下步驟：(1)用俘獲抗體塗佈微量滴定板；(2)添加樣品，且所存在之任何抗原結合俘獲抗體；(3)添加偵測抗體且結合抗原；(4)添加酶聯二級抗體且結合偵測抗體；及(5)添加受質且藉由酶轉化至可偵測形式。

**【0179】** 字組「標記」當在本文中使用时係指直接地或間接地與抗體結合以便產生「經標記」抗體之可偵測化合物或組合物。標記可為自身可偵測的(例如放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶標記之情況下可催化可偵測受質化合物或組合物之化學變化。

**【0180】** 「關聯」意謂以任何方式比較第一分析之效能及/或結果與第二分析之效能及/或結果。舉例而言，可使用第一分析之結果來進行第二分析，及/或可使用第一分析之結果來確定是否應進行第二分析，及/或可比較第一分析之結果與第二分析之結果。在一個實施例中，將CD123/IL-3R $\alpha$ 之增加表現與CD123/IL-3R $\alpha$ 靶向療法有效性之增加可能性相關聯。

**【0181】** 術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中之生理狀況，其中細胞群體以不受調節之細胞生長為特徵。「腫瘤」及「贅瘤」係指由過度細胞生長或增殖引起且為良性(非癌性)或惡性(癌性)之一或多個細胞，包括癌前病變。

**【0182】** 癌症之實例包括淋巴瘤及白血病。可藉由本發明之方法及試劑(例如抗CD123抗體、其抗原結合片段或其免疫結合物)加以治療及/或預防之癌症或腫瘤生成疾病的實例包括AML、CML、ALL (例如，B-ALL)、CLL、骨髓發育不良症候群、母細胞性漿細胞樣DC贅瘤(BPDCN)白血病、B細胞淋巴瘤包括非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、前驅B細胞淋巴母細胞性白血病/淋巴瘤及成熟B細胞贅瘤，諸如B細胞慢性淋巴細胞性白血病(B-CLL)/小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、B

細胞前淋巴細胞性白血病、淋巴漿細胞性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤(MCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)包括低等級、中等級及高等級FL、皮膚濾泡中心淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤(MALT型、結節及脾臟型)、毛細胞白血病(HCL)、彌漫性大B細胞淋巴瘤、伯特基氏淋巴瘤、漿細胞瘤、漿細胞骨髓瘤、移植後淋巴組織增生性病變、瓦爾登斯托姆氏巨球蛋白血症、退行性大細胞淋巴瘤(ALCL)及霍奇金氏白血病(HL)。

【0183】 癌症亦涵蓋含有具有升高之CD123/IL-3R $\alpha$ 表現水準之細胞的癌症。此種CD123/IL-3R $\alpha$ 升高癌症包括但不限於AML、CML、ALL (例如B-ALL) 及CLL。

【0184】 術語「癌細胞」、「腫瘤細胞」及語法等物係指來源於腫瘤或癌前病變之細胞的總群體，包括構成腫瘤細胞群體之大部分的非腫瘤生成細胞及腫瘤生成幹細胞(癌症幹細胞)。如本文中所使用，當僅提及缺乏更新及分化能力之彼等腫瘤細胞時，術語「腫瘤細胞」將由術語「非腫瘤生成」加以修飾，以區分來自癌症幹細胞之彼等腫瘤細胞。

【0185】 術語「個體」係指任何動物(例如哺乳動物)，包括但不限於人類、非人類靈長類、齧齒動物及其類似物，其將為特定治療之受體。典型地，術語「個體」及「患者」在本文中在提及人類個體時可互換使用。

【0186】 與一或多種其他治療劑「組合」投與包括同時(並行)及以任何順序連續投與。

【0187】 術語「醫藥調配物」係指呈允許活性成分之生物活性有效且不含對將投與該調配物之個體具有不可接受之毒性的額外組分的形式的製劑。此種調配物可為無菌的。

【0188】 如本文中所揭示之抗體或免疫結合物之「有效量」為足以進行特定陳述之目的量。「有效量」可相對於所陳述之目的憑經驗且以常規方式確定。

【0189】 術語「治療有效量」係指可在個體或哺乳動物中有效「治療」疾病或病症之抗體或其他藥物用量。在癌症之情況下，藥物之治療有效量可減少癌細胞數目；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即，在一定程度上減緩且在某一實施例中終止)癌細胞浸潤至周圍器官中；抑制(亦即，在一定程度上減緩且在某一實施例中終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；在一定程度上減輕一或多種與癌症相關之症狀；及/或產生良好反應，諸如增加之無進展存活時間(PFS)、無疾病存活時間(DFS)或總體存活時間(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)或在一些情況下穩定疾病(SD)、進行性疾病(PD)之減輕、減少之進展時間(TTP)或其任何組合。參見「治療」在本文中之定義。在藥物可預防現存癌細胞生長及/或殺死現存癌細胞之程度上，其可具有細胞抑制性及/或細胞毒性。

【0190】 「預防有效量」係指在為了達成所要預防結果而必需之劑量及時段下有效的量。典型地但非必要地，因為預防劑量在疾病早期階段之前用於個體，故預防有效量將小於治療有效量。

【0191】 術語「良好反應」一般係指在個體中引起有益狀態。關於癌症治療，該術語係指對個體提供治療效應。在癌症中之正面治療效應可用許多方式加以量測(參見W.A. Weber, *J. Nucl. Med.* 50: 1S-10S (2009))。舉例而言，腫瘤生長抑制、分子標記物表現、血清標記物表現及分子成像技術均可用於評估抗癌治療劑之治療效力。關於腫瘤生長抑制，根據NCI標準， $T/C < 42\%$ 為抗腫瘤活性之最低水準。 $T/C < 10\%$ 被視為高抗腫瘤活性水準，其中 $T/C (\%) = \text{處理組之中值腫瘤體積} / \text{對照組之中值腫瘤體積} \times 100$ 。可例如藉由增加之無進展存活時間(PFS)、無疾病存活時間(DFS)或總體存活時間(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)或在一些情況下穩定疾病(SD)、進行性疾病(PD)之減輕、減少之進展時間(TTP)或其任何組合來評估良好反應。

【0192】 PFS、DFS及OS可藉由國立癌症學會及美國食品與藥物管理局針

對批准新藥物所設定之標準加以量度。參見Johnson等人, (2003) *J. Clin. Oncol.* 21(7): 1404-1411。

**【0193】** 「無進展存活時間」(PFS)係指自登入至疾病進展或死亡之時間。PFS一般使用卡普蘭邁耶法及實體腫瘤反應評估準則(RECIST) 1.1標準來量度。一般而言，無進展存活時間係指患者在癌症不惡化之情況下保持活著的情形。

**【0194】** 「完全反應」或「完全緩解」或「CR」指示腫瘤或癌症之所有徵象均響應於治療而消失。此並非始終意謂癌症已治癒。

**【0195】** 「部分反應」或「PR」係指一或多個腫瘤或病變之尺寸或體積或者體內癌症程度響應於治療而減小。

**【0196】** 「穩定疾病」係指無進展或復發之疾病。在穩定疾病中，既無足以具有部分反應之資格的腫瘤收縮，又無足以取得作為進行性疾病之資格的腫瘤增加。

**【0197】** 「進行性疾病」係指再一個新病變之出現或腫瘤及/或現存非靶病變之明確進展。進行性疾病亦可指自治療開始起由於腫瘤質量或擴散增加導致腫瘤生長超過20%。

**【0198】** 「無疾病存活時間」(DFS)係指在治療期間及之後患者保持無疾病之時間長度。

**【0199】** 「總體存活時間」(OS)係指自患者登入至死亡或設限在知悉活著之最後日期的時間。OS包括壽命預期相較於天然或未處理個體或患者之延長。總體存活係指患者在諸如例如距診斷或治療之時間一年、五年等限定時段內保持活著的情形。

**【0200】** 「化學治療劑」為適用於治療癌症之化學化合物，不考慮作用機制。諸如「治療」或「緩解」之術語係指所診斷之病理學病狀或病症之治癒、

減緩、減輕症狀及/或停止進展之治療量度。因此，需要治療者包括已診斷患有該病症者，且亦可包括具有最輕殘餘疾病或抗性疾病或復發疾病者。在某些實施例中，若患者顯示以下各項中之一或多項，則該個體得以根據本發明之方法成功地「治療」癌症：癌細胞數目減少或完全不存在；腫瘤尺寸減小；抑制或不存在癌細胞浸潤至周圍器官中，包括例如癌症擴散至軟組織及骨骼中；抑制或不存在腫瘤轉移；抑制或不存在腫瘤生長；減輕與特定癌症相關之一或多種症狀；降低發病率及死亡率；生活品質之改良；腫瘤之腫瘤生成性、腫瘤生成頻率或腫瘤生成能力降低；癌症幹細胞之數目或頻率減少；腫瘤生成細胞分化至非腫瘤生成狀態；增加之無進展存活時間(PFS)、無疾病存活時間(DFS)或總體存活時間(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)、穩定疾病(SD)、進行性疾病(PD)之減輕、減少之進展時間(TTP)或其任何組合。

**【0201】** 預防性措施係指可預防及/或減緩靶病理學病狀或病症之發展的措施。因此，需要預防性措施者包括傾向於患有該病症者及欲預防該病症者。

**【0202】** 預防性措施係指可預防及/或減緩靶病理學病狀或病症之發展的治疗性措施。因此，需要預防性措施者包括傾向於患有該病症者及欲預防該病症者。

**【0203】** 如本文中所使用，術語「照護提供者」係指直接與活個體(例如，人類患者)相互作用且向其投與之個體或機構。照護提供者之非限制性實例包括醫生、看護、技師、治療學家、藥劑師、顧問、替代醫學從業者、醫療機構、醫生辦公室、醫院、急診室、診所、緊急照護中心、替代醫學診所/機構及提供以下各項之任何其他實體：一般及/或特殊治療、評估、維護、治療、藥物治療及/或涉及所有或任何部分之患者健康狀態的建議，包括但不限於一般醫學、特殊醫學、手術及/或任何其他類型之治療、評估、維護、治療、藥物治療及/或建議。

【0204】 在一些態樣中，照護提供者可投與或指導另一照護提供者以便投與療法以治療癌症。如本文中所使用，「投與」療法包括對個體開具療法以及向個體遞送、應用或給與療法。照護提供者可實施或指導另一照護提供者或患者進行以下活動：獲得樣品；處理樣品；遞交樣品；接收樣品；轉移樣品；分析或量測樣品；定量樣品；提供分析/量測/定量樣品後所獲得之結果；接收分析/量測/定量樣品後所獲得之結果；對分析/量測/定量一或多個樣品後所獲得之結果進行比較/評分；提供來自一或多個樣品之比較/得分；獲得來自一或多個樣品之比較/得分；投與療法或治療劑(例如，CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑)；開始投與療法；停止投與療法；繼續投與療法；暫時中斷投與療法；增加所投與之治療劑的量；減少所投與之治療劑的量；繼續投與一定量之治療劑；增加投與治療劑之頻率；減少投與治療劑之頻率；維持治療劑之相同給藥頻率；將一種療法或治療劑替換為至少另一療法或治療劑；將一種療法或治療劑與至少另一療法或附加治療劑組合。此等活動可由照護提供者使用電腦實施之方法(例如經由網路服務或獨立式電腦系統)自動進行。

【0205】 如本文中可互換使用之「多肽」或「核酸」係指任何長度核苷酸之聚合物且包括DNA及RNA。核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物，或可由DNA或RNA聚合酶併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包括經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，則可在組裝聚合物前後賦予核苷酸結構以修飾。核苷酸序列可間雜非核苷酸組分。聚核苷酸可在聚合後經進一步修飾，諸如藉由與標記組分結合。其他類型之修飾包括例如「蓋帽」；用類似物取代一或多個天然存在之核苷酸；核苷酸間修飾，諸如，例如具有不帶電鍵聯者(例如膦酸甲酯、膦酸三酯、胺基膦酸酯、胺基甲酸酯等)及具有帶電鍵聯者(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)；含有懸垂部分者，諸如，例如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚-L-

離胺酸等)、具有插入劑者(例如吡啶、補骨脂內酯等)、含有螯合劑者(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)、含有烷基化劑者、具有經修飾之鍵聯者(例如 $\alpha$ -變旋異構核酸等)以及聚核苷酸之未修飾形式。此外,一般存在於糖中之任何羥基均可置換為例如磷酸酯基、磷酸酯基、藉由標準保護基加以保護、或活化以製備與額外核苷酸之額外鍵聯、或可與固體載體結合。5'及3'末端OH可經磷酸化或經1至20個碳原子之胺或有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生化至標準保護基。聚核苷酸亦可含有此項技術中一般已知的類似形式之核糖或脫氧核糖,包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-疊氨基-核糖、碳環狀糖類似物、 $\alpha$ -變旋異構糖、諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖之差向異構糖、呋喃糖、呋喃糖、景天糖、脂族類似物及無鹼基核苷類似物,諸如甲基核糖核苷。一或多個磷酸二酯鍵聯可替換為替代連接基團。此等替代連接基團包括但不限於其中磷酸根置換為P(O)S(「硫代磷醯根」)、P(S)S(「二硫代磷醯根」)、(O)NR<sub>2</sub>(「醯胺根」)、P(O)R、P(O)OR\*、CO或CH<sub>2</sub>(「甲乙縮醛」)之實施例,其中各R或R獨立地為H或者視情況含有醚(-O-)鍵聯、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基之經取代或未經取代之烷基(1-20 C)。並非聚核苷酸中之所有鍵聯均需要一致。先前描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸,包括RNA及DNA。

**【0206】** 術語「載體」意謂構建體,其能夠在宿主細胞中遞送並表現一或多個相關基因或序列。載體之實例包括但不限於病毒載體、裸DNA或RNA表現載體、質體、黏質體或噬菌體載體、與陽離子凝聚劑締合之DNA或RNA表現載體、囊封於脂質體中之DNA或RNA表現載體及某些真核細胞,諸如生產細胞。

**【0207】** 術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換用於指任何長度胺基酸之聚合物。該聚合物可為線性或分枝,其可包含經修飾之胺基酸,且其可間雜非胺基酸。該術語亦涵蓋經天然或藉由插入加以修飾之胺基酸聚合物;例如二硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他處理或修



飾，諸如與標記組分結合。該定義內亦包括例如含有一或多種胺基酸類似物(包括例如非天然胺基酸等)以及此項技術中已知的其他修飾的多肽。應理解，由於本發明之多肽係基於抗體，故在某些實施例中，該等多肽可呈單鏈或締合鏈形式存在。在一些實施例中，多肽、肽或蛋白質為非天然存在的。在一些實施例中，多肽、肽或蛋白質為自其他天然存在之組分中純化而來。在該些實施例中，多肽、肽或蛋白質為重組產生的。

【0208】術語「一致」或「一致性」百分比在兩個或更多個核酸或多肽之上下文中係指當比較並比對(必要時引入間隙)最大對應性時相同或具有規定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基的兩個或更多個序列或子序列，從而任何保守胺基酸取代均不被視為序列一致性之一部分。一致性百分比可使用序列比較軟體或算法或藉由肉眼觀察來量測。此項技術中已知各種算法及軟體可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之比對。序列比對算法之一個此種非限制性實例為Karlin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2264-2268, 1990中所描述、如Karlin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5873-5877, 1993中加以改進且併入NBLAST及XBLAST程式中(Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1991)之算法。在某些實施例中，可使用如Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997中所描述之Gapped BLAST；BLAST-2、WU-BLAST-2 (Altschul等人, *Methods in Enzymology* 266:460-480, 1996)、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California)或Megalign (DNASTAR)為可用於比對序列之其他公開可利用軟體程式。在某些實施例中，使用GCG軟體中之GAP程式測定兩個核苷酸序列之間的一致性百分比(例如，使用NWSgapdna.CMP矩陣以及40、50、60、70或90之間隙權重及1、2、3、4、5或6之長度權重)。在某些替代實施例中，併入Needleman及Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453, 1970)之算法的GCG套裝軟體中之GAP程序可用於測定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比(例如，使用Blossum 62矩陣或

PAM250矩陣，以及16、14、12、10、8、6或4之間隙權重及1、2、3、4、5之長度權重)。或者，在某些實施例中，使用Myers及Miller (CABIOS, 4: 11-17, 1989)之算法測定核苷酸或胺基酸序列之間的一致性百分比。舉例而言，可使用ALIGN程式(版本2.0)且使用具有殘基表之PAM120、間隙長度罰分12及間隙罰分4來測定一致性百分比。適用於藉由特定比對軟體進行最大比對之參數可由熟習此項技術者確定。在某些實施例中，使用比對軟體之缺省參數。在某些實施例中，第一胺基酸序列與第二序列胺基酸之一致性百分比「X」計算為 $100 \times (Y/Z)$ ，其中Y為比對第一序列與第二序列(如藉由肉眼觀察或特定序列比對程式所比對)時評分為一致匹配之胺基酸殘基數目且Z為第二序列中之殘基總數目。若第一序列之長度比第二序列長，則第一序列與第二序列之一致性百分比將大於第二序列與第一序列之一致性百分比。

【0209】 作為一非限制性實例，在某些實施例中，任何特定聚核苷酸是否與參考序列具有某一百分比序列一致性(例如，至少80%一致、至少85%一致、至少90%一致及在一些實施例中至少95%、96%、97%、98%或99%一致)可使用Bestfit程式(Wisconsin Sequence Analysis Package, 用於Unix之版本8, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)來測定。Bestfit使用Smith及Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489, 1981之局部同源性算法來發現兩個序列之間的最佳同源性節段。當根據本發明使用Bestfit或任何其他序列比對程式以確定特定序列是否例如與參考序列具有95%一致性時，設定參數以便在參考核苷酸序列之全長上計算一致性百分比且允許佔參考序列中核苷總酸數目之至多5%的同源性間隙。

【0210】 在一些實施例中，當比較並比對最大對應性時，如使用序列比較算法或藉由肉眼觀察所量測，本發明之兩個核酸或多肽實質上一致，意謂其具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%及在一些實施例中至少

95%、96%、97%、98%、99%核苷酸或胺基酸殘基一致性。在某些實施例中，在至少約10、約20、約40-60個殘基長度或介於其之間的任何整數值之序列區域上或在比60-80個殘基長、至少約90-100個殘基之區域上存在一致性，或序列在所比較之序列的全長上實質上一致，舉例而言，諸如核苷酸序列之編碼區。

【0211】 「保守胺基酸取代」為一個胺基酸殘基置換為具有類似側鏈之另一胺基酸殘基的取代。此項技術中已限定具有類似側鏈之胺基酸殘基家族，包括鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如天冬醯胺、麩胺醯胺、絲胺酸、酥胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 $\beta$ 分枝側鏈(例如酥胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。舉例而言，苯基丙胺酸取代酪胺酸為保守取代。在某些實施例中，本發明多肽及抗體序列中之保守取代不消除含有該胺基酸序列之多肽或抗體與抗原之結合，亦即，該多肽或抗體所結合之CD123/IL-3R $\alpha$ 。鑑別不消除抗原結合之核苷酸及胺基酸保守取代之方法在此項技術中為眾所周知的(參見例如Brummell等人, *Biochem.* 32:1180-1187, 1993; Kobayashi等人, *Protein Eng.* 12(10):879-884, 1999; 及Burks等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417, 1997)。

【0212】 如本文中所使用，「P-糖蛋白1」亦稱為「滲透性糖蛋白」、「P-gp或Pgp」、「多藥物抗性蛋白1 (MDR1)」、「ATP結合卡匣子家族B成員1 (ABCB1)」或「分化簇243 (CD243)」，其為可轉運多種受質越過細胞外及細胞內膜之MDR/TAP亞家族的ABC轉運子。其為具有廣泛受質特異性之ATP依賴性射流泵。P-gp廣泛分佈且表現在以下各項中：腸上皮，其中，其將異生物質(諸如毒素或藥物)泵吸回腸腔中；肝細胞，其中，其將其泵吸回膽管中；腎近端小管細胞，其中，其將其泵吸至尿液傳導導管中；及構成血腦屏障及血睪屏障之毛細

血管內皮細胞，其中，其將其泵吸回毛細血管中。一些癌細胞亦表現大量P-gp，由此致使此等癌症具有多藥物抗性。

**【0213】** 如本文中所使用之「烷基」係指具有一至二十個碳原子之飽和直鏈或分支鏈單價烴基。烷基之實例包括但不限於甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基)、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基及其類似基團。烷基較佳具有一至十個碳原子。烷基更佳具有一至四個碳原子。

**【0214】** 基團中之碳原子數目在本文中可藉由字首「 $\text{C}_{x-xx}$ 」指定，其中x及xx為整數。舉例而言，「 $\text{C}_{1-4}$ 烷基」為具有1至4個碳原子之烷基。

**【0215】** 術語「化合物」或「細胞毒性化合物」可互換使用。其意欲包括其結構或化學式或任何衍生物已揭示於本發明中或其結構或化學式或任何衍生物已以引用之方式併入的化合物。該術語亦包括本發明中所揭示之所有化學式之化合物的立體異構體、幾何異構體、互變異構體、溶劑合物、代謝物及鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)。該術語亦包括上述任一者之任何溶劑合物、水合物及多晶型物。本申請案中所描述之某些本發明態樣中之「立體異構體」、「幾何異構體」、「互變異構體」、「溶劑合物」、「代謝物」、「鹽」、「結合物」、「結合物鹽」、「溶劑合物」、「水合物」或「多晶型物」之特定敘述不應解釋為在其他本發明態樣中在未敘述此等其他形式之情況下意欲省略此等形式。

**【0216】** 術語「手性」係指具有鏡像搭配物之不可疊加性的分子，而術語「非手性」係指可疊加於其鏡像搭配物上之分子。

**【0217】** 術語「立體異構體」係指具有一致化學組成及連接性但其原子在

空間中之取向不同，從而不能藉由繞單一鍵旋轉來相互轉化的化合物。

【0218】 「非對映異構體」係指具有兩個或更多個手性中心且其分子彼此不為鏡像的立體異構體。非對映異構體具有不同的物理性質，例如熔點、沸點、光譜性質及反應性。非對映異構體之混合物可在諸如結晶、電泳及層析之高解析度分析程序下分離。

【0219】 「對映異構體」係指彼此為不可疊加之鏡像的兩種化合物立體異構體。

【0220】 本文中所使用之立體化學定義及規定大體上遵循S. P. Parker編, McGraw-Hill, *Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；以及Eliel, E.及Wilens, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本發明化合物可含有不對稱或手性中心，且因此以不同的立體異構形式存在。意欲本發明化合物之所有立體異構形式，包括但不限於非對映異構體、對映異構體及阻轉異構體以及其混合物，諸如外消旋混合物，形成本發明之一部分。許多有機化合物以光學活性形式存在，亦即其能夠使平面偏振光之平面旋轉。在描述光學活性化合物時，字首D及L或R及S用於表示分子關於其手性中心之絕對構型。字首d及l或(+)及(-)用於指定由化合物所致之平面偏振光旋轉標識，其中(-)或l意謂該化合物左旋。以(+)或d為字首之化合物右旋。對於指定化學結構，此等立體異構體為相同的，但其彼此為鏡像。特定立體異構體亦可稱為對映異構體，且此類異構體之混合物通常稱為對映異構混合物。對映異構體之50:50混合物稱為外消旋混合物或外消旋物，其可在化學反應或過程中無立體選擇或立體特異性之情況下存在。術語「外消旋混合物」及「外消旋物」係指缺乏光學活性之兩種對映異構體類的等莫耳混合物。

【0221】 術語「互變異構體」或「互變異構形式」係指具有不同能量之結構異構體，其可經由低能量屏障相互轉化。舉例而言，質子互變異構體(亦稱為

質子移變互變異構體)包括經由質子遷移而相互轉化，諸如酮-烯醇及亞胺-烯胺異構化。原子價互變異構體包括藉由一些鍵結電子之重組而相互轉化。

【0222】 術語「亞胺反應性試劑」係指能夠與亞胺基團反應之試劑。亞胺反應性試劑之實例包括但不限於亞硫酸鹽( $\text{H}_2\text{SO}_3$ 、 $\text{H}_2\text{SO}_2$ 或者 $\text{HSO}_3^-$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 或 $\text{HSO}_2^-$ 與陽離子形成之鹽)、偏亞硫酸氫鹽( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 或 $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)、單硫代磷酸鹽、二硫代磷酸鹽、三硫代磷酸鹽及四硫代磷酸鹽( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ 、 $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ 、 $\text{POS}_3\text{H}_3$ 、 $\text{PS}_4\text{H}_3$ 或者 $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ 、 $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ 、 $\text{POS}_3^{3-}$ 或 $\text{PS}_4^{3-}$ 與陽離子形成之鹽)、硫代磷酸酯( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ 、 $\text{R}^i\text{SH}$ 、 $\text{R}^i\text{SOH}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ 、 $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$ )、各種胺(羥基胺(例如 $\text{NH}_2\text{OH}$ )、肼(例如 $\text{NH}_2\text{NH}_2$ )、 $\text{NH}_2\text{O}-\text{R}^i$ 、 $\text{R}^i\text{NH}-\text{R}^i$ 、 $\text{NH}_2-\text{R}^i$ )、 $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ 、硫代硫酸鹽( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 或 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)、二亞硫酸鹽( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 或 $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ 與陽離子形成之鹽)、二硫代磷酸鹽( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ 或其與陽離子形成之鹽)、異羥肟酸( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ 或與陽離子形成之鹽)、醯肼( $\text{R}^k\text{CONHNH}_2$ )、甲醛次硫酸鹽( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ 或 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ 與陽離子形成之鹽，諸如 $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-\text{Na}^+$ )、糖基化核苷酸(諸如GDP-甘露糖)、氟達拉濱或其混合物，其中 $\text{R}^i$ 及 $\text{R}^j$ 各自獨立地為具有1至10個碳原子之直鏈或分支鏈烷基且經至少一個選自 $-\text{N}(\text{R}^j)_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 及 $-\text{PO}_3\text{H}$ 之取代基取代； $\text{R}^i$ 及 $\text{R}^j$ 可進一步視情況經本文中所描述之針對烷基之取代基取代； $\text{R}^j$ 為具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基；且 $\text{R}^k$ 為具有1至10個碳原子之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜環基或雜芳基( $\text{R}^k$ 較佳為具有1至4個碳原子之直鏈或分支鏈烷基； $\text{R}^k$ 更佳為甲基、乙基或丙基)。陽離子較佳為單價陽離子，諸如 $\text{Na}^+$ 或 $\text{K}^+$ 。亞胺反應性試劑較佳係選自亞硫酸鹽、羥基胺、脲及肼。該亞胺反應性試劑更佳為 $\text{NaHSO}_3$ 或 $\text{KHSO}_3$ 。

【0223】 如本文中所使用之片語「醫藥學上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥學上可接受之有機或無機鹽。例示性鹽包括但不限於硫酸鹽、檸檬酸

鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、富馬酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、糖酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽「甲磺酸鹽」、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(亦即，1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸鹽))鹽、鹼金屬(例如鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如鎂)鹽及銨鹽。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子，諸如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。相對離子可為使母體化合物上之電荷穩定的任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽可在其結構中具有多於一個帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽的一部分的情形下可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

**【0224】** 若本發明化合物為鹼，則所要醫藥學上可接受之鹽可藉由本領域中可利用之任何適合方法來製備，例如用以下各物處理游離鹼：無機酸，諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸及其類似酸；或有機酸，諸如乙酸、馬來酸、琥珀酸、杏仁酸、富馬酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、哌喃糖基酸(諸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 $\alpha$ 醇酸(諸如檸檬酸或酒石酸)、胺基酸(諸如天冬胺酸或麩胺酸)、芳族酸(諸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(諸如對甲苯磺酸或乙磺酸)或其類似物。

**【0225】** 若本發明化合物為酸，則所要醫藥學上可接受之鹽可藉由任何適合方法來製備，例如用以下各物處理游離酸：無機或有機鹼，諸如胺(一級胺、二級胺或三級胺)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物或其類似物。適合鹽之說明性實例包括但不限於來源於諸如甘胺酸及精胺酸之胺基酸、氨、一級胺、二級胺及三級胺以及諸如哌啶、嗎啉及哌吡之環胺的有機鹽，及來源於鈉、鈣、

鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰之無機鹽。

【0226】 如本文中所使用，術語「溶劑合物」意謂進一步包括藉由非共價分子間力結合之化學計算量或非化學計算量之諸如水、異丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇或其類似物之溶劑的化合物。藉由向化合物中添加至少一莫耳當量之諸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水之羥基溶劑以溶解或水合該亞胺部分而容易地製備化合物之溶劑合物或水合物。

【0227】 「代謝物」或「分解代謝物」為藉由在體內代謝或分解代謝指定化合物、其衍生物或其結合物或其鹽而產生的產物。可使用此項技術中已知的常規技術來鑑別化合物、其衍生物或其結合物之代謝物且使用諸如本文中所描述之彼等測試來測定其活性。此種產物可例如由所投與化合物之氧化、羥基化、還原、水解、醯胺化、脫醯胺化、酯化、脫酯化、酶促裂解及類似過程產生。因此，本發明包括本發明之化合物、其衍生物或其結合物之代謝物，包括由包括使本發明之化合物、其衍生物或其結合物與哺乳動物接觸足以產生其代謝產物之時段的方法產生的化合物、其衍生物或其結合物。

【0228】 片語「醫藥學上可接受」指示物質或組合物必須在化學上及/或在毒理學上與構成調配物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物相容。

【0229】 術語「保護基」或「保護部分」係指常用於封閉或保護特定官能度，而同時使該化合物、其衍生物或其結合物上之其他官能基反應的取代基。舉例而言，「胺保護基」或「胺基保護部分」為與胺基附接由此封閉或保護化合物中之胺基官能度的取代基。此種基團在此項技術中為熟知的(參見例如P. Wuts及T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第7章, J. Wiley & Sons, NJ)且例示為胺基甲酸酯，諸如胺基甲酸甲酯及胺基甲酸乙酯、Fmoc、經取代之胺基甲酸乙酯、藉由1,6-β-消除(亦稱為「自犧牲」)而裂解之胺基甲酸酯、脲、



醯胺、肽、烷基及芳基衍生物。適合之胺基保護基包括乙醯基、三氟乙醯基、第三丁氧基羰基(BOC)、苯甲氧基羰基(CBZ)及9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)。關於保護基及其用途之一般描述，參見P. G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007。

【0230】 術語「胺基酸」係指天然存在之胺基酸或非天然存在之胺基酸。在一個實施例中，胺基酸由 $\text{NH}_2\text{-C(R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa'}}\text{)-C(=O)OH}$ 表示，其中 $\text{R}^{\text{aa}}$ 及 $\text{R}^{\text{aa'}}$ 各自獨立地為H、具有1至10個碳原子之視情況經取代之直鏈、分支鏈或環狀烷基、烯基或炔基、芳基、雜芳基或雜環基，或 $\text{R}^{\text{aa}}$ 與N末端氮原子可共同形成雜環狀環(例如，如在脯胺酸中)。術語「胺基酸殘基」係指當自胺基酸之胺及/或羧基端移除一個氫原子時的相應殘基，諸如 $\text{-NH-C(R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa'}}\text{)-C(=O)O-}$ 。

【0231】 術語「陽離子」係指具有正電荷之離子。陽離子可為單價(例如 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 等)、二價(例如 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 等)或多價(例如 $\text{Al}^{3+}$ 等)。陽離子較佳為單價。

【0232】 術語「反應性酯基」係指可容易地與胺基反應以形成醯胺鍵之基團酯基。例示性反應性酯基包括但不限於N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基酞醯亞胺酯、N-羥基-磺基-琥珀醯亞胺酯、對硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯及其衍生物，其中該等衍生物促進醯胺鍵形成。在某些實施例中，反應性酯基為N-羥基琥珀醯亞胺酯或N-羥基-磺基-琥珀醯亞胺酯。

【0233】 術語「胺反應性基團」係指可與胺基反應以形成共價鍵之基團。例示性胺反應性基團包括但不限於反應性酯基、醯基鹵化物、磺醯基鹵化物、醯亞胺酯或反應性硫酯基。在某些實施例中，胺反應性基團為反應性酯基。在一個實施例中，胺反應性基團為N-羥基琥珀醯亞胺酯或N-羥基-磺基-琥珀醯亞胺酯。

【0234】 術語「硫醇反應性基團」係指可與硫醇(-SH)基團反應以形成共

價鍵之基團。例示性硫醇反應性基團包括但不限於馬來醯亞胺、鹵代乙醯基、鹵代乙醯胺、乙烯磺、乙基磺醯胺或乙基吡啶。在一個實施例中，硫醇反應性基團為馬來醯亞胺。

【0235】 除非上下文另外清楚指示，否則如本發明及申請專利範圍中所使用，單數形式「一(個)」、「一(種)」及「該」包括複數形式。

【0236】 應理解，在本文中措辭「包含」描述實施例之情況下，亦提供以「由...組成」及/或「基本上由...組成」加以描述之在其他方面類似之實施例。

【0237】 如本文中在諸如「A及/或B」之片語中所使用之術語「及/或」意欲包括「A及B」、「A或B」、「A」及「B」。同樣，如本文中在諸如「A、B及/或C」之片語中所使用之術語「及/或」意欲涵蓋以下實施例中之每一者：A、B及C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A及C；A及B；B及C；A(單獨)；B(單獨)；及C(單獨)。

*抗體、化合物及免疫結合物命名法*

【0238】 如本文中所使用，用於抗CD123抗體、細胞毒性化合物及其免疫結合物之命名法一般採用以下含義。

【0239】 CD123-3、CD123-6及CD123-14 (或CD123 Mu-3、CD123 Mu-6及CD123 Mu-14；或muCD123-3、muCD123-6及muCD123-14)為三種鼠類抗CD123單株抗體。重鏈及輕鏈之CDR1-3序列(VH-CDR1-3及VL-CDR1-3)與相關SEQ ID NO: 1-25一起提供於表1及表2中。重鏈可變區(HCVR)序列與相關SEQ ID NO: 26、28及30一起提供於表3A中。其輕鏈可變區(LCVR)序列與相關SEQ ID NO: 27、29及31一起提供於表4A中。鼠類抗體之全長重鏈(HC)序列提供於表5中(SEQ ID NO: 42、44及46)，且鼠類抗體之全長輕鏈(LC)序列提供於表6中(SEQ ID NO: 43、45及47)。

【0240】 chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14為具有鼠類重鏈及輕鏈可

變區以及人類恆定區序列之相應鼠類-人類嵌合抗體。舉例而言，嵌合抗體 chCD123-6由分別具有SEQ ID NO: 28及29之小鼠HCVR及LCVR連同分別用於重鏈及輕鏈之人類IgG1及κ恆定序列構成。參見實例3。

【0241】 huCD123-3、huCD123-6及huCD123-14為相應人類化抗體。當藉由6個相應鼠類CDR區(HC及LC CDR1-3)之CDR移植來進行人類化時，字母「G」緊隨純系名稱之後，其後又繼之以指定人類輕鏈及重鏈可變區序列之起點的型式編號。因此，huCD123-6Gv4.6係指基於將來自相應muCDR123-6抗體之6個CDR區移植(「G」)至人類輕鏈可變區Gv4及重鏈可變區Gv6上的人類化CD123抗體。類似地，-Gv4.7包含人類輕鏈可變區Gv4及重鏈可變區Gv7；且-Gv1.1包含人類輕鏈可變區Gv1及重鏈可變區Gv1。

【0242】 三個HCVR序列huCD123-6Gv1、-Gv6及-Gv7提供於表3A中(SEQ ID NO: 32及34，其中SEQ ID NO: 34表示-Gv6及-Gv7，因為其僅在第2個殘基Xaa上有所不同)，且其DNA編碼序列提供於表3B中(SEQ ID NO: 62、64及66)。三個全長HC序列huCD123-6Gv1、-Gv6及-Gv7提供於表5中(SEQ ID NO: 48及50，其中SEQ ID NO: 50表示全長-Gv6及-Gv7，因為其僅在第2個殘基Xaa上有所不同)。

【0243】 兩個LCVR序列huCD123-6Gv1及-Gv4提供於表4A中(SEQ ID NO: 33及35)，且其DNA編碼序列提供於表4B中(SEQ ID NO: 63及65)。兩個全長LC序列huCD123-6Gv1及-Gv4提供於表6中(SEQ ID NO: 49及51)。

【0244】 當藉由表面重整進行人類化時，表面重整重鏈序列命名為「rh」緊隨鼠類CD123抗體純系編號之後，且進一步命名為表面重整序列之兩個型式v1.0或v1.1之一。因此，huCD123-6rhv1.0及-rhv1.1為具有對應於muCD123-6抗體之CDR區的表面重整重鏈序列，其中型式名稱分別為1.0及1.1。參見表3A中之HCVR SEQ ID NO: 39及40及表3B中之SEQ ID NO: 68及69。亦參見表5中之全長HC SEQ ID NO: 59及60。

【0245】 同樣，表面重整輕鏈序列之惟一型式huCD123-6rlv1.0具有表4A中之LCVR SEQ ID NO: 41及表6中之全長LC SEQ ID NO: 61。

【0246】 具有 huCD123-6rhv1.0 及 huCD123-6rlv1.0 之表面重整抗體為 huCD123-6Rv1.0；且具有huCD123-6rhv1.1及huCD123-6rlv1.0之表面重整抗體為 huCD123-6Rv1.1。

【0247】 NTS2或簡稱「S2」係指在重鏈N末端上具有經工程改造Ser之抗體。huCD123-6Gv6/7之S2變異體具有表3A中之HCVR序列SEQ ID NO: 38及表5中之全長HC蛋白序列SEQ ID NO: 53。

【0248】 同樣，NTS3或簡稱「S3」係指在輕鏈N末端上具有經工程改造Ser之抗體。huCD123-6Gv4之S3變異體具有表4A中之LCVR序列SEQ ID NO: 37及表6中之全長LC蛋白序列SEQ ID NO: 58。

【0249】 包含經工程改造N末端Ser之抗體(S2或S3)可經由氧化之N末端Ser或經由「習知」Lys鍵聯與細胞毒性藥物/劑結合。若藥物鍵聯係經由氧化之N末端Ser，則結合物名稱含有「SeriMab」名稱。若藥物鍵聯係經由Lys，則結合物名稱不含有SeriMab（但存在S2或S3名稱以指示N末端存在經工程改造之Ser）。基於細胞毒素反應性基團，特定鍵聯類型亦將為顯而易見的。舉例而言，huCD123-6Gv4.7S3-SeriMab-D8係指D8與人類化CD123抗體huCD123-6Gv4.7S3之間經由輕鏈上之氧化N末端Ser而形成的結合物。人類化CD123抗體具有移植鼠類CD123-6 CDR區、人類LC Gv4及重鏈Gv7，且輕鏈N末端具有經工程改造之Ser (S3)。相比之下，huCD123-6Gv4.7S3-sSPDB-D1係指D1與相同人類化CD123抗體huCD123-6Gv4.7S3之間藉由Lys鍵聯經由磺化SPDB連接子而形成的結合物。

【0250】 在某些實施例中，若輕鏈及重鏈N末端均含有經工程改造之Ser，則「S2S3」或「S2S3-SeriMab」可出現在抗體名稱中。

【0251】 本發明之某些抗體在重鏈CH3結構域中在對應於SEQ ID NO: 54中第5個至最後一個Cys之相同Kabat位置上具有經工程改造之Cys。此種HC或包含此種HC之抗體含有名稱CysMab。因此huCD123-6Gv4.6-CysMab為人類化CD123抗體，其具有移植muCD123-6 CDR區，基於人類輕鏈Gv4及重鏈Gv6序列，其中經工程改造之Cys位於HC CH3區中對應於SEQ ID NO: 54中第5個至最後一個Cys之位置上。類似地，其重鏈序列為huCD123-6Gv6-CysMab。另外，huCD123-6Gv4.6S2-CysMab否則將為一致的，但在重鏈N末端具有經工程改造之Ser，且其重鏈序列為huCD123-6Gv6S2-CysMab。

【0252】 以上所描述之表面重整抗體可經進一步工程改造以在輕鏈(表面重整抗體之S3變異體)或重鏈(表面重整抗體之S2變異體)或兩者上含有N末端Ser(參見下文)。或者或另外，表面重整抗體可在重鏈CH3結構域中在對應於SEQ ID NO: 54中第5個至最後一個Cys之相同Kabat位置上具有經工程改造之Cys(表面重整抗體之CysMab型式)。表面重整抗體可兼具經工程改造之Cys及N末端Ser。

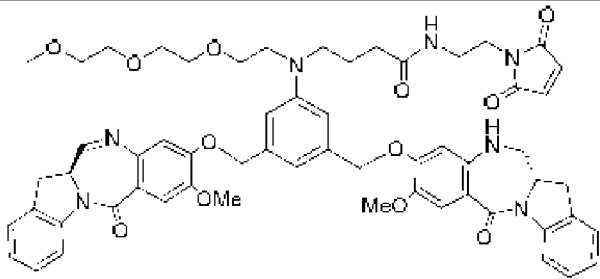
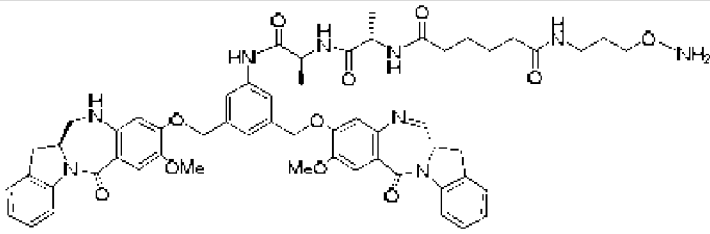
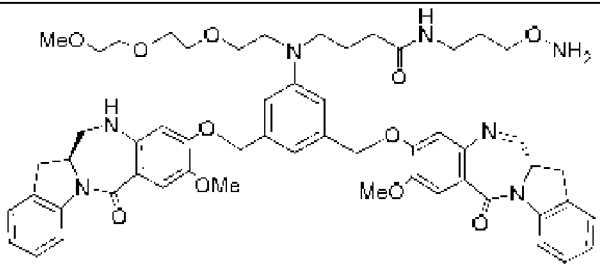
【0253】 然而，在此種CysMab與細胞毒素之間所形成之結合物中，至少在理論上，細胞毒素可經由Cys或經由習知Lys連接至CysMab。然而，如本文中所使用而不存在特定指示，具有CysMab名稱之結合物係指CysMab與細胞毒素之間經由Cys鍵聯(而非Lys鍵聯)形成的結合物。基於細胞毒素反應性基團，特定鍵聯類型亦將為顯而易見的。

【0254】 亦涵蓋以上一般命名法之其他變化形式或組合且對熟習此項技術者將容易顯而易見。舉例而言，huCD123-6Rv1.1-CysMab為huCD123-6之表面重整型式(v1.1)，其具有位於HC CH3區域中對應於SEQ ID NO: 54中第5個至最後一個Cys之位上的經工程改造之Cys。

【0255】 本發明之抗體或其抗原結合片段可經由具有Lys側鏈胺基、Cys側鏈硫醇基或氧化N末端Ser/Thr之鍵聯與某些細胞毒性劑結合。以下出於說明之



|     |  |
|-----|--|
| D3  |  |
| D4  |  |
| D5  |  |
| D5' |  |
| D6  |  |

|    |                                                                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------|
| D7 |  |
| D8 |  |
| D9 |  |

【0256】 注意，若干試劑僅由於連接細胞毒素與不同的抗體側鏈需要不同的鍵聯化學性質(亦即，Lys鍵聯、Cys鍵聯、氧化N末端Ser鍵聯)而稍有不同。儘管如此，仍給予此等相關細胞毒素以不同的「D」名稱。參見D1及D4，以後D2、D5及D8。

【0257】 標的抗體及細胞毒性劑之結合物一般遵循如以上所描述之抗體及細胞毒性劑之命名法。

【0258】 舉例而言，huCD123-6Gv4.6-磺基-SPDB-D1為huCD123-6Gv4.6抗體在該抗體之一或多個Lys殘基上經由磺化SPDB連接子與化合物D1結合之結合物。huCD123-6-CX1-1-DM1為huCD123-6抗體在該抗體之一或多個Lys殘基上經由名為「CX1-1連接子」之三甘胺醯基連接子與細胞毒性劑DM1結合之結合物。參見實例9e。

【0259】 一個值得注意之例外情況為結合物圖7B及圖17中所示之huCD123-6-SeriMab-sD1，其中介於huCD123-6-SeriMab與sD1細胞毒素之間的短



連接子序列未以結合物名稱明確敘述。類似地，圖 15 中之結合物 huCD123-6-SeriMab-sDGN462 亦為以上一般原則之例外情況。

2. CD123結合劑

【0260】 在第一態樣中，本發明提供特異性結合CD123/IL-3R $\alpha$ ，諸如人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之試劑。此等試劑在本文中一般稱為「CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑」。在某些實施例中，CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑為抗體或其抗原結合片段(或出於簡單性目的，「抗體」)、其免疫結合物或其多肽。

【0261】 對於人類及其他物種，CD123/IL-3R $\alpha$ 之胺基酸及核苷酸序列在此項技術中為已知的。舉例而言，以下再現如NCBI RefSeq NP\_002174中所描述之人類CD123/IL-3R $\alpha$ 剪接變異體1蛋白質序列：

```
1  MVLWLTLTLL IALPCLLQTK EDPNPPITNL RMKAKAQQLT WDLNRNVTDI ECVKDADYSM
61  PAVNNSYCQF GAISLCEVTN YTVRVANPPF STWILFPENS GKPWAGAENL TCWIHCVDFL
121 SCSSWAVGPGA PADVQYDLYL NVANRRQQYE CLHYKTDAQG TRIGCRFDDI SRLSSGSQSS
181 HILVRGRSAA FGIPCTDKEV VFSQIEILTP PNMTAKCNKT HSEFMHWKMRS HFNRKFRYEL
241 QIQKRMQPV I TEQVRDRISF QLLNPGTYTV QIRARERVYE FLSAWSTPQR FECDQEEGAN
301 TRAWRTSLLI ALGTLLALVC VFVICRRYL V MQRLEFPRI PH MKDFIGDSFQ NDKLVVWEAG
361 KAGLEECLVT EVQVVQKT (SEQ ID NO: 36)
```

【0262】 以上序列顯示CD123/IL-3R $\alpha$ 前驅鏈蛋白，其由378個胺基酸構成，含有細胞外域(殘基1-306，包括18殘基N末端信號肽)、20胺基酸跨膜域及具有52個胺基酸之胞質尾部。

【0263】 以下再現如NCBI RefSeq NM\_002183中所描繪之人類CD123/IL-3R $\alpha$ 剪接變異體1核酸序列：

```

1  GTCAGSTTCA TGGTTACGAA GCTGCTGACC CCAGGATCCC AGCCCGTGGG AGAGAAGGGG
61  GTCTCTGACA GCCCCCAGCC CTCCCCACTG CCAGATCCTT ATTGGGTCTG AGTTTCAGGG
121 GTGGGSCCCC AGCTGGAGGT TATAAAACAG CTCAATCGGG GAGTACAAAC TTCGSTTTCT
181 CTTGSGGGAA AGCTGCTTTC AGCGCACACG GGAAGATATC AGAAACATCC TAGGATCAGG
241 ACACCCACGA TCTTCTCAAC TGGAACCACG AAGGCTGTTT CTTCCACACA GTACTTTGAT
301 CTCCATTTAA GCAGGCACCT CTGTCCTGCG TTCCGGAGCT GCGTTCCCGA TGGTCTCTCT
361 TTGGCTCACG CTGCTCTGTA TCGCCCTGCC CTGTCTCCTG CAAACGAAGG AAGATCCAAA
421 CCCACCAATC ACGAACCTAA GGATGAAAGC AAAGGCTCAG CAGTTGACCT GGGACCTTAA
481 CAGAAATGTG ACCGATATCG AGTGTGTTAA AGACGCCGAC TATTCTATGC CGGCAGTGAA
541 CAATAGCTAT TGCCAGTTTG GAGCAATTTC CTTATGTGAA GTGACCAACT ACACCGTCCG
601 AGTGGCCAAC CCACCATTCT CCACGTGGAT CCTCTTCCCT GAGAACAGTG GGAAAGCCTG
661 GGCAGSTGCG GAGAATCTGA CCTGCTGGAT TCATGACGTG GATTTCTTGA GCTGCAGCTG
721 GCGGCTAGGC CCGGGGSCCC CCGCGGAGCT CCAGTACGAC CTGTACTTGA ACGTTGCCAA
781 CAGGCGSTCA CAGTACGAGT GTCTTACACI CAAAACGGAT GCTCAGGGAA CAGTATCGG
841 GTGTGTTTTG GATGACATCT CTCGACTCTC CAGCGGTTCT CAAAGTTCCC ACATCCTGGT
901 GCGGSGCAGG AGCGCAGCCT TCGGTATCCC CTGCACAGAT AAGTTTGTGG TCTTTTCACA
961 GATTGAGATA TTAAGTCCAC CCAACATGAC TGCAAAGTGT AATAAGACAC ATTCTTTTAT
1021 GCACTGGAAG ATGAGAAGTC ATTTCAATCG CAAATTTGCG TATGAGCTTC AGATACAAA
1081 GAGAAATGCAG CCTGTAATCA CAGAACAGGT CAGAGACAGA ACCTCCTTCC AGCTACTCAA
1141 TCCTGGAACG TACACAGTAC AAATAAGAGC CCGGGAAAGA GTGTATGAAT TCTTGAGCGC
1201 CTGGAGCACC CCCCAGCGCT TCGAGTGGCA CCAGGAGGAG GCGGCAACA CACGTGCCCTG
1261 GCGGACGTGG CTGCTGATCG CGCTGGGGAC GCTGCTGGCC CTGGTCTGTG TCTTCGTGAT
1321 CTGCAAGAGG TATCTGCTGA TGCAGAGACT CTTTCCCGGC ATCCCTCACA TGAAAGACCC
1381 CATCGSTGAC AGCTTCCAAA ACGACAAGCT GGTGGTCTGG GAGGCGGGCA AAGCCGGCCT
1441 GGAGGAGTGT CTGGTGAAGT AAGTACAGGT CGTGCAGAAA ACTTGAGACT GGGGTTCAAG
1501 GCTTGTGGGG GTCTGCCTCA ATCTCCCTGG CCGGGCCAGG CGCTGCACA GACTGGCTGC
1561 TGGACCTGCG CACGCAGCCC AGGAATGGAC ATTCTTAACG GGTGGTGGGC ATGGGAGATG
1621 CCTGTGTAAT TTCGTCCGAA GCTGCCAGGA AGAAGAACAG AACTTGTGTG GTTTATTTCA
1681 TGATAAAGTG ATTTTTTTTT TTTTAAACCA AAA (SEQ ID NO: 52)
```

【0264】 來自其他非人類物種之CD123/IL-3R $\alpha$ 之蛋白質及核酸序列可使用此項技術中已知的序列搜尋工具(諸如NCBI BLASTp或BLASTn)且分別使用以上蛋白質及核酸序列作為查詢序列而自諸如GenBank之公共資料庫中容易地檢索。

【0265】 可使用許多業內認可之序列對比工具，諸如本文中及以上所描述者中的任一種對來自非人類物種之此種序列與人類序列進行比對，使得可容易地獲得「對應於」任何指定人類序列或序列區域之任何胺基酸殘基或核苷酸。

【0266】 因此，本發明之一個態樣提供一種抗體或其抗原結合片段，其：  
(a)結合人類CD123抗原之胺基酸101至346內的抗原決定基；且(b)在抗原陽性TF-1細胞中抑制IL3依賴性增殖。

【0267】 在一些實施例中，抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段可特異性結合SEQ ID NO: 36之抗原決定基。在某些實施例中，該抗原決定基在對應

於人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之殘基101 -346的區域內。在某些實施例中，該抗原決定基在對應於SEQ ID NO: 36之殘基101-204之區域內。在某些其他實施例中，該抗原決定基在對應於SEQ ID NO: 36之殘基205-346之區域內。在某些實施例中，該抗原決定基不在對應於人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之殘基1-100之區域內。

**【0268】** 在某些實施例中，CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如抗體)抑制IL3依賴性信號傳導，諸如CD123陽性TF-1細胞之IL-3依賴性增殖。儘管不希望受任何特定理論束縛，但本發明之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如抗體)結合CD123，諸如在對應於人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之殘基101-346 (例如殘基101-204或205-346)的CD123區域內，且防止、減少、削弱或以其他方式抑制CD123與 IL-3配位體之間的生產性結合及/或 CD123與共同 $\beta$ 鏈CD131之間的生產性結合，從而減少或消除IL-3依賴性信號傳導。

**【0269】** 在一相關態樣中，本發明提供一種抗體或其抗原結合片段，其：  
(a)結合人類CD123抗原之胺基酸1至100內的抗原決定基，且(b)抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖，其中IC<sub>50</sub>值為0.1 nM或更小(例如，0.08 nM、0.05 nM、0.03 nM)。

**【0270】** 在某些實施例中，由本發明之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如抗體)結合可抑制(例如優先抑制)白血病幹細胞(LSC)、白血病祖細胞(LP)或白血病母細胞之增殖，但實質上不抑制正常造血幹細胞(HSC)之增殖。

**【0271】** 抑制細胞增殖可使用此項技術中已知的任何標準檢定來進行，包括但不限於流式細胞術。舉例而言，可使用流式細胞術基於細胞表面標記物之表現來分離正常HSC、LSC、LP及白血病母細胞，且在與測試劑一起培育之後，可定量量測存活或剩餘細胞之相對數目並比較。

**【0272】** 亦可使用活體外效力檢定在原代癌細胞，諸如原代AML細胞上檢定與正常HSC相比對LSC、LP或白血病原始細胞之細胞增殖的抑制。舉例而

言，可將AML細胞(或含有正常HSC之正常人類骨髓樣品)暴露於不同濃度之標的抗CD123抗體、其抗原結合片段、其免疫結合物或包含該等抗體或抗原結合片段之多肽，持續24小時。非靶向(同型匹配)抗體或免疫結合物(ADC)對照亦可用於該檢定中。可將樣品分至短期液體培養(STLC)檢定以量測對LSC、LP或白血病原始細胞之細胞毒性；及長期液體培養(LTLC)檢定以量測對LSC及正常HSC之效應。STLC可用於在細胞中量測群落形成單位，例如，在接種於半固體MethoCult H4230培養基(Stemcell technologies)中後10至14天。可在添加生長因子以便長期培養5至7週之情況下用類似方式進行LTLC檢定。在兩種檢定中，可對群落進行計數以測定群落形成單位/最初接種之細胞數。可使用PCR或FISH或兩者進一步分析LTLC群落中癌症(例如AML)分子標記物之存在。

【0273】 在某些實施例中，該等抗體或其抗原結合片段在0.3 nM或更低之解離常數( $K_d$ )下結合人類CD123抗原陽性細胞。在某些實施例中，該等抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.3 nM之間、介於0.05與0.2 nM之間或介於0.05與0.1 nM之間、或介於0.01 nM與0.3 nM之間、或介於0.01 nM與0.2 nM之間、或介於0.01 nM與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合人類CD123。

【0274】 在某些實施例中，該等抗體或其抗原結合片段結合石蟹獼猴CD123。在某些實施例中，該等抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.3 nM之間、或介於0.05與0.2 nM之間或介於0.05與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合石蟹獼猴CD123。

【0275】 在某些實施例中，該等抗體或其抗原結合片段在實質上類似之結合親和力下結合人類及石蟹獼猴CD123。在某些實施例中，該等抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.3 nM之間、或介於0.05與0.2 nM之間或介於0.05與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合人類及石蟹獼猴CD123。

【0276】 在某些實施例中，該 $K_d$ 值係基於基於細胞之結合檢定。在某些實

施例中，該K<sub>d</sub>值係藉由流式細胞術加以量測。在某些實施例中，該K<sub>d</sub>值係藉由表面電漿子共振(諸如藉由使用BIOCORE™表面電漿子共振系統)加以量測。在某些實施例中，該K<sub>d</sub>值係藉由放射免疫檢定(RIA)加以量測。在某些實施例中，該K<sub>d</sub>係藉由任何其他業內認可之方法加以量測。

【0277】 在某些實施例中，該抗體或其抗原結合片段在0.5 nM或更低之濃度下抑制抗原陽性TF-1細胞中至少50%之IL3依賴性增殖。

【0278】 在某些實施例中，該CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑為CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)，各可變區包含三個CDR區(例如，HCVR之CDR1至CDR3及LCVR之CDR1至CDR3)，其中HCVR及LCVR之複合CDR為以下表1及表2中所提供之序列中之任一者。

表1 重鏈可變區CDR胺基酸序列

| 抗體        | Alt 名稱      | VH-CDR 1             | VH-CDR2                                              | VH-CDR3                                                         |
|-----------|-------------|----------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| CD123-3   | CD123 Mu-3  | SYVMH (SEQ ID NO:1)  | YIKPYKDGTK (SEQ ID NO:2)                             | EGENGYDAMD Y (SEQ ID NO:4)                                      |
|           |             |                      | YIKPYKDGTKYN EKFKG (Kabat) (SEQ ID NO:3)             |                                                                 |
| CD123-6   | CD123 Mu-6  | SSIMH (SEQ ID NO:5)  | YIKPYNDGTK 鼠類+移植 (SEQ ID NO:6)                       | EGGNDYYDTMD Y (SEQ ID NO:11)                                    |
|           |             |                      | YIRPYNDGTR (表面重整型式 1.0) (SEQ ID NO:7)                |                                                                 |
|           |             |                      | YIKPYNDGTKYN EKFKG (Kabat 鼠類+移植) (SEQ ID NO:8)       |                                                                 |
|           |             |                      | YIRPYNDGTRYN QKFQG (Kabat –表面重整 v1.0) (SEQ ID NO:9)  |                                                                 |
|           |             |                      | YIKPYNDGTKYN QKFQG (Kabat –表面重整 v1.1) (SEQ ID NO:10) |                                                                 |
| CD123-1 4 | CD123 Mu-14 | NYAMS (SEQ ID NO:12) | TINSGGSFTY (SEQ ID NO:13)                            | QSEAYYGYDKRT (SEQ ID NO:15)<br>QSEAYYGYDKRT WFAY (SEQ ID NO:70) |
|           |             |                      | TINSGGSFTYYPD SVKG (Kabat) (SEQ ID NO:14)            |                                                                 |

表2 輕鏈可變區CDR胺基酸序列

| 抗體       | Alt 名稱     | VL-CDR1                                                               | VL-CDR2                   | VL-CDR3                     |
|----------|------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| CD123-3  | CD123Mu-3  | KASQDINKYIA<br>(SEQ ID NO:16)                                         | YTSTLQP<br>(SEQ ID NO:17) | LQYDNLLYT<br>(SEQ ID NO:18) |
| CD123-6  | CD123Mu-6  | KASQDINSYLS<br>(SEQ ID NO:19)                                         | RVNRLVD<br>(SEQ ID NO:21) | LQYDAFPYT<br>(SEQ ID NO:22) |
|          |            | RASQDINSYLS<br>人類化<br>(SEQ ID NO:20)<br>RASQDINSYLA<br>(SEQ ID NO:72) | RVNRLVS<br>(SEQ ID NO:71) |                             |
| CD123-14 | CD123Mu-14 | RASQSVGTSIH<br>(SEQ ID NO:23)                                         | YASESIS<br>(SEQ ID NO:24) | QQSKSWPLT<br>(SEQ ID NO:25) |

【0279】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)至少一個重鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 1、5及12；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 2-3、6-10及13-14，且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 4、11、15及70；及b)至少一個輕鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 16、19至20、23及72；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 17、21、24及71；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 18、22及25。

**【0280】** 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)至少一個重鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 1、5及12；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 2-3、6-10及13-14，且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 4、11及15；及b)至少一個輕鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 16、19至20及23；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 17、21及24；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 18、22及25。

**【0281】** 在某些實施例中，保守胺基酸取代包括由Arg取代CDR中之Lys(諸如SEQ ID NO: 6及7、8及9以及19及20中之Lys對Arg取代)。在某些實施例中，該抗體為包含小鼠CDR區之CDR移植人類化抗體，且其中該抗體之一或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)個重鏈及/或輕鏈構架區維尼爾區殘基具有小鼠起源。

**【0282】** 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 2或3中所闡述之胺基酸序列的CDR2，及視情況地，具有SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及2) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 16中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列的CDR2，及視情況地，具有SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列的CDR3。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 2。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 3。

**【0283】** 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 5中所闡述之胺基酸序列



的CDR1、具有SEQ ID NO: 6、7、8、9或10中所闡述之胺基酸序列的CDR2，及視情況地，具有SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及2)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 19或20中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列的CDR2，及視情況地，具有SEQ ID NO: 22中所闡述之胺基酸序列的CDR3。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 6，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 19。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 7，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 19。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 8，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 19。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 9，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 19。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 10，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 19。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 6，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 20。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 7，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 20。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 8，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 20。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 9，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 20。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 10，且輕鏈可變區之CDR1為SEQ ID NO: 20。對於以上重鏈可變區CDR2與輕鏈可變區CDR1之各成對組合，重鏈可變區CDR1及CDR3分別為SEQ ID NO: 5及11，且輕鏈可變區CDR2及CDR3分別為SEQ ID NO: 21及22。

【0284】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 13或14中所闡述之胺基酸序列的CDR2，及視情況地，具有SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及2)免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 23中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID

NO: 24中所闡述之胺基酸序列的CDR2，及視情況地，具有SEQ ID NO: 25中所闡述之胺基酸序列的CDR3。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 13。在某些實施例中，重鏈可變區之CDR2為SEQ ID NO: 14。

【0285】 在某些實施例中，來自一個抗體之輕鏈及重鏈的CDR1序列(諸如SEQ ID NO: 5及19)可與來自另一抗體之輕鏈及重鏈的CDR2序列(諸如SEQ ID NO: 2及17)組合，且視情況可與來自該抗體(例如，SEQ ID NO: 4及18，或11及22)或另一抗體(例如SEQ ID NO: 15及25)之輕鏈及重鏈的CDR3序列組合。本文中涵蓋基於表1中之SEQ ID NO: 1-25之所有可能組合，尤其是關於相同抗體編號(例如來自CD123-3或來自CD123-6或來自CD123-14之所有六個輕鏈及重鏈CDR之彼等組合，而不排他性地枚舉所有特定組合。

【0286】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段在以上任何一或多個CDR序列中之1、2或3個連續殘基上具有保守胺基酸取代。亦即，在一些實施例中，標的抗體及其抗原結合片段可在SEQ ID NO: 1-25中之任何一或多者中之1、2或3個連續殘基上具有保守胺基酸取代。

【0287】 在某些實施例中，該CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑為CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區(HCVR)及輕鏈可變區(LCVR)，其中該HCVR及 LCVR為以下表3A及表4A中所提供之序列中的任一者。編碼HCVR及LCVR之所選相應核酸序列在表3B及表4B中。

表3A 重鏈可變區胺基酸序列

| 抗體                         | Ab名稱                    | VH胺基酸序列 (SEQ ID NO)                                                                                                                                          |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD123-3                    | CD123M <sub>h</sub> -3  | HPQLQQSGSPHVKPGASVKMSCKASGYTFISYVMHWMIKQ<br>KPGQGILHWIGSYIKPTKDCGFKYNHKKKGGKALLSDKPSSTAY<br>MDLSSLISIDSAVYTCARHGNGTYTDAMDYWGQGISTVTV<br>SS (SEQ ID NO:26)    |
| CD123-6                    | CD123M <sub>h</sub> -6  | HPQLQQSGSPHVKPGASVKMSCKASGYTFISSIMHWMIKQK<br>PGQGILHWIGSYIKPTNDCGFKYNHKKKGGKALLSDKSSSTAN<br>MDLNSLISIDSAVYTCARHGNDYTDAMDYWGQGISTVTV<br>VSS (SEQ ID NO:28)    |
| CD123-14                   | CD123M <sub>h</sub> -14 | HWKLVHSGGDILVKPGSSLKLSCAASGFLPSNTAMSWVRQ<br>NSHKRLHWVALINSGGSPFTYFDQSVKGRFISRDNAKNSLY<br>LQMSSLNSIDTAMPTTCARQSEAFTGTDKRLWPAITWGQG<br>ITLVTVSS (SEQ ID NO:30) |
| hCD123-6Gv1                |                         | QVQLVQSGAIVYKKPGASVKEVSCKASGYTFISSIMHWVRQ<br>APGQGILHWIGSYIKPTNDCGFKYNHKKKGRVFMIRDYISISY<br>VYMDLSSLRSIDTAVYTCARHGNDYTDAMDYWGQGILV<br>TVSS (SEQ ID NO:32)    |
| hCD123-6Gv6/1              |                         | QKQLVQSGAIVYKKPGASVKEVSCKASGYTFISSIMHWVRQA<br>PGQGILHWIGSYIKPTNDCGFKYNHKKKGRALLSDRSISSTAY<br>MDLSSLRSIDTAVYTCARHGNDYTDAMDYWGQGILVTV<br>VSS (SEQ ID NO:34)    |
| hCD123-6<br>Gv6/1-NIS2     |                         | SKQLVQSGAIVYKKPGASVKEVSCKASGYTFISSIMHWVRQA<br>PGQGILHWIGSYIKPTNDCGFKYNHKKKGRALLSDRSISSTAY<br>MDLSSLRSIDTAVYTCARHGNDYTDAMDYWGQGILVTV<br>VSS (SEQ ID NO:38)    |
| hCD123-6h <sub>v</sub> 1.0 |                         | QVQLVQSGAIVYKPGASVEMSCKASGYTFISSIMHWMIKQ<br>KPGQGILHWIGSYIKPTNDCGFKYNQKQGGKALLSDRSSSTAY<br>NMDLNSLISIDSAVYTCARHGNDYTDAMDYWGQGISTV<br>TVSS (SEQ ID NO:39)     |
| hCD123-6h <sub>v</sub> 1.1 |                         | QVQLVQSGAIVYKPGASVKMSCKASGYTFISSIMHWMIKQ<br>KPGQGILHWIGSYIKPTNDCGFKYNQKQGGKALLSDKSSSTAY<br>NMDLNSLISIDSAVYTCARHGNDYTDAMDYWGQGISTV<br>TVSS (SEQ ID NO:40)     |

\*在以上所有序列中，其中N末端之第2個殘基為X (或Xaa)，例如SEQ ID NO:

34及38，對於Gv6)序列，X為R；而對於Gv1)序列，X為V。









列具有至少96%一致性；及/或(b)V<sub>L</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO: 27、29、31、35及37)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>L</sub>序列具有至少96%一致性。

【0290】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：(a)V<sub>H</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39及40 (或SEQ ID NO: 26、28、30、32、34及38)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>H</sub>序列具有至少97%一致性；及/或(b)V<sub>L</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO: 27、29、31、35及37)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>L</sub>序列具有至少97%一致性。

【0291】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：(a)V<sub>H</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39及40 (或SEQ ID NO: 26、28、30、32、34及38)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>H</sub>序列具有至少98%一致性；及/或(b)V<sub>L</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO: 27、29、31、35及37)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>L</sub>序列具有至少98%一致性。

【0292】 在某些實施例中，該抗CD123抗體及其抗原結合片段包含：(a)V<sub>H</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39及40 (或SEQ ID NO: 26、28、30、32、34及38)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>H</sub>序列具有至少99%一致性；及/或(b)V<sub>L</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO: 27、29、31、35及37)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>L</sub>序列具有至少99%一致性。

【0293】 在某些實施例中，與SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳SEQ ID NO: 26、28、30、32、34及38)及/或27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO: 27、29、31、35及37)具有某一百分比之序列一致性的

CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體/其抗原結合片段與SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (或SEQ ID NO: 26、28、30、32、34及38)及/或27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO:27、29、31、35及37)之不同之處僅在於保守胺基酸取代，諸如1、2或3個保守胺基酸取代。在某些實施例中，該等保守胺基酸取代為重鏈及/或輕鏈之一或多個CDR區中的1、2或3個連續胺基酸之取代。

【0294】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：(a)V<sub>H</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO:26、28、30、32、34、38、39及40 (或SEQ ID NO: 26、28、30、32、34及38)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>H</sub>序列一致；及/或(b)V<sub>L</sub>序列，其與選自具有由SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (或SEQ ID NO: 27、29、31、35及37)表示之胺基酸序列的群組的參考V<sub>L</sub>序列一致。

【0295】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：如SEQ ID NO: 26中所闡述之V<sub>H</sub>序列及/或如SEQ ID NO: 27中所闡述之V<sub>L</sub>序列。

【0296】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：如SEQ ID NO: 28中所闡述之V<sub>H</sub>序列及/或如SEQ ID NO: 29中所闡述之V<sub>L</sub>序列。

【0297】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：如SEQ ID NO: 30中所闡述之V<sub>H</sub>序列及/或如SEQ ID NO: 31中所闡述之V<sub>L</sub>序列。

【0298】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：如SEQ ID NO: 34中所闡述之V<sub>H</sub>序列及/或如SEQ ID NO: 35中所闡述之V<sub>L</sub>序列。

【0299】 在某些實施例中，該等抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段



包含具有選自由以下各項組成之群的SEQ ID NO.組合的V<sub>H</sub>序列及V<sub>L</sub>序列：  
32/33、34/33、38/33、39/33、40/33、32/35、34/35、38/35、39/35、40/35、32/37、  
34/37、38/37、39/37、40/37、39/33、39/35、39/37、39/41、40/33、40/35、40/37  
及40/41。

【0300】 舉例而言，在一個實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，該V<sub>H</sub>序列闡述於SEQ ID NO: 39中且該V<sub>L</sub>序列闡述於SEQ ID NO: 41中。在某些實施例中，該V<sub>H</sub>序列闡述於SEQ ID NO: 40中且該V<sub>L</sub>序列闡述於SEQ ID NO: 41中。

【0301】 在一相關實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 34中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 34中之Xaa為Val (V)。

【0302】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列，除了第一殘基經Ser (S)置換；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0303】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列，除了第一殘基經Ser (S)置換。

【0304】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包

含：a)免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser，且除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0305】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser。

【0306】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 38中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 38中之Xaa為Val (V)。

【0307】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 34中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 34中之Xaa為Val (V)。

【0308】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 56中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 56中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 56中之Xaa為Val (V)。

【0309】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 54中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 54中之Xaa為Val (V)。

【0310】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a) 免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【0311】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 54中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 54中之Xaa為Val (V)。

【0312】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 56中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 56中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 56中之Xaa為Val (V)。

【0313】 在另一實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段包含：a)免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；及b)免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。在某些實施例中，SEQ ID NO: 54中之Xaa為Phe (F)。在某些實施例中，SEQ ID NO: 54中之Xaa為Val (V)。

(0314) 在某些實施例中，該等抗CD123/ML3R $\alpha$ 抗體及其抗原結合片段  
 特异性結合CD123/ML3R $\alpha$ 。在某些實施例中，該CD123/ML3R $\alpha$ 抗體或其抗原結  
 合片段為特异性結合CD123/ML3R $\alpha$ 之鼠類、嵌合、人類化或人類抗體或其抗原  
 結合片段。在某些實施例中，該人類化抗體或其抗原結合片段為CDR移植或表  
 面重整抗體或其抗原結合片段。

(0315) 在某些實施例中，該等抗CD123/ML3R $\alpha$ 抗體為全長抗體。該等  
 全長抗體可包含以上由1-4個CDR (例如，重鏈之CDR1及CDR2；重鏈及輕鏈之  
 CDR1及CDR2)、1-6個CDR序列(例如，重鏈之CDR1至CDR3；重鏈及輕鏈之CDR1  
 至CDR3)所定義之抗體中的任二者，或以上由HCVR及/或LCVR所定義之抗體中  
 的任二者，或具有表5中之重鏈序列的全長抗體中的任二者，或具有表6中之輕  
 鏈序列的全長抗體中的任二者，或具有表5中之重鏈序列及表6中之輕鏈序列的  
 全長抗體中的任二者。

表5 全長重鏈胺基酸序列

| 抗體      | 全長重鏈胺基酸序列(SBQ ID NO)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD123-3 | HPQLQQSGPIVVKPGASVKMSCKASGYTFSTYVMHWMIKQKPGQGLHWIGY<br>IKPYKDGTEKYNKKKGGKATLISDEKPSSTAYMHLSLTSIDSAVYTCARHGN<br>GTYDAMDYWCQGISVTVSSAKTTPPSVYFLAPSSAAQINSMVHLCCLVKG<br>YHPHPVTVFWNNGSLSSGWLPAPAVLRSDLYFLSSSVTVPSSEFPPSEIVLCNVA<br>HPASSPKVDKKIVPRDEGCKPCCLVPIWSSVNHPPPEPKDVLTLTLPEKVLTV<br>VVDISKDDPIVQPSWTVDDVHVELAQIQPRHQPNSLRSSVSHLPIMHQDWL<br>NKKHKKCRVNSAHPAPBIKESKIKKRPKAPQVYTIPEPKHQMIAKDKVSLTC<br>MLDGRPHDQVWQWQWNGQPAJENYKNLQPMWNNGSYTVYTEKLNVDQESNWH<br>ACNTPLTSVLHGGHGNHPLDLSLSHEPK (SEQ ID NO:42) |
| CD123-6 | HPQLQQSGPIVVKPGASVKMSCKASGYTFSSIMHWMIKQKPGQGLHWIGYTK<br>PYNDGTEKYNKKKGGKATLISDESSSTANMHLSLTSIDSAVYTCARHGN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

|                              |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                              |  | YYDYM DYWGQG I SV I VSSAK I I PPSV Y FLAPGSAAQ INSMV I I GCLV K I Y I P<br>PIPV I V I WNSGSISSGV I I I PAVI I RSDLY I I SSV I V P SSM I P S I I V I C N V A I I<br>PASS I K V D K K I V P E D C G K K P K I C I V P H V S S V I I R P P K P K D V I I I I I I P K V I C V V<br>V D I S K D D P H V Q I S W I V D D V I V I I I A Q I Q P R I H Q I N S I P R S V S I I P I M I H Q D W I N<br>G K I I K K I R V N S A A I P A P H K I S K I K G R P K A Q V Y I I P P P K I Q M A K D K V S I I C M<br>I I D I R P H D I V I W Q W N G Q P A I N Y K N I Q P I M N I N G S Y I V Y S K I N V Q K S N W I A<br>G N I P I C S V I I H G I L I N I I I I K S I S I S P K K (SEQ ID NO:44)                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| CD123-14                     |  | I V K I V H S I G D I V K P G S S I K I S C A A S G I P S N Y A M S W V R I Q N S I K R I I W V A I I<br>N S G G S P I Y Y P D S V K G R I P S R D N A K D S I Y I Q M S S I N S H D I A M Y Y T C A R Q S H A Y<br>Y G Y D K R I W P A Y W C Q G I I V I V S S A K I I P P S V Y F L A P G S A A Q I N S M V I I G C L V<br>K G Y I P I P V I V I W N S G S I S S G V I I I P A V I I R S D I Y I I S S V I V P S S M I P S I I V I C N<br>V A I I P A S S I K V D K K I V P E D C G K K P K I C I V P H V S S V I I R P P K P K D V I I I I I I P K V I<br>C V V V D I S K D D P H V Q I S W I V D D V I V I I I A Q I Q P R I H Q I N S I P R S V S I I P I M I H Q D<br>W I N G K I I K K I R V N S A A I P A P H K I S K I K G R P K A Q V Y I I P P P K I Q M A K D K V S I I<br>I C M I I D I R P H D I V I W Q W N G Q P A I N Y K N I Q P I M N I N G S Y I V Y S K I N V Q K S N<br>W I A G N I P I C S V I I H G I L I N I I I I K S I S I S P K K (SEQ ID NO:46) |
| hCD123-6G4                   |  | QVQLVQSGAIVCKPGASVKVSCKASGYTFSSIMHWVRQAPGQGLHWIGYIK<br>PTNDGFKYTNHKPKGRAFLSDRSISIA YMHSSLRSDIAVYYTCARHGND<br>YYDYM DYWGQG I V I VSSAS I K G P S V I F L A P S S K S I S G I I A A I G C L V K D<br>Y R P I P V I V S W N S G A I I S G V I I I P A V I I Q S S G I Y S I S S V I V P S S S I G I Q I Y I C N<br>V N I K P S N I K V D K K V I P K S C D K I I I I P P C P A P H I I G G P S V I I R P P K P K D I I M S<br>R I P I V I C V V V D V S I I D P H V K R N W Y V D G V I V I N A K I K P R I H Q I N S I P R V V S<br>V I I V I I H Q D W I N G K I Y K K V S N K A I P A P H K I S K A K G Q P R I H Q V Y I I P P S R D<br>H I I K N Q V S I I I I V K G I Y P S D I A V I W I H S N G Q P I N N Y K I I P P V I D S D G S H I Y S K<br>I I V D K S R W Q Q G N V I S C S V M I H A L I N I I Y I Q K S I S I S P G (SEQ ID NO:48)                                                                                                                             |
| hCD123-6G4/                  |  | QXQLVQSGAIVCKPGASVKVSCKASGYTFSSIMHWVRQAPGQGLHWIGYIK<br>PTNDGFKYTNHKPKGRAFLSDRSISIA YMHSSLRSDIAVYYTCARHGND<br>YYDYM DYWGQG I V I VSSAS I K G P S V I F L A P S S K S I S G I I A A I G C L V K D Y R P<br>I P V I V S W N S G A I I S G V I I I P A V I I Q S S G I Y S I S S V I V P S S S I G I Q I Y I C N V N I<br>K P S N I K V D K K V I P K S C D K I I I I P P C P A P H I I G G P S V I I R P P K P K D I I M S R I P I<br>V I C V V V D V S I I D P H V K R N W Y V D G V I V I N A K I K P R I H Q I N S I P R V V S V I I V<br>I I H Q D W I N G K I Y K K V S N K A I P A P H K I S K A K G Q P R I H Q V Y I I P P S R D H I I K<br>N Q V S I I I I V K G I Y P S D I A V I W I H S N G Q P I N N Y K I I P P V I D S D G S H I Y S K I I V<br>D K S R W Q Q G N V I S C S V M I H A L I N I I Y I Q K S I S I S P G (SEQ ID NO:50)                                                                                                                             |
| hCD123-6 G4/1- N1S2 (94 %S2) |  | SXQLVQSGAIVCKPGASVKVSCKASGYTFSSIMHWVRQAPGQGLHWIGYIK<br>PTNDGFKYTNHKPKGRAFLSDRSISIA YMHSSLRSDIAVYYTCARHGND<br>YYDYM DYWGQG I V I VSSAS I K G P S V I F L A P S S K S I S G I I A A I G C L V K D Y R P<br>I P V I V S W N S G A I I S G V I I I P A V I I Q S S G I Y S I S S V I V P S S S I G I Q I Y I C N V N I<br>K P S N I K V D K K V I P K S C D K I I I I P P C P A P H I I G G P S V I I R P P K P K D I I M S R I P I<br>V I C V V V D V S I I D P H V K R N W Y V D G V I V I N A K I K P R I H Q I N S I P R V V S V I I V<br>I I H Q D W I N G K I Y K K V S N K A I P A P H K I S K A K G Q P R I H Q V Y I I P P S R D H I I K<br>N Q V S I I I I V K G I Y P S D I A V I W I H S N G Q P I N N Y K I I P P V I D S D G S H I Y S K I I V<br>D K S R W Q Q G N V I S C S V M I H A L I N I I Y I Q K S I S I S P G (SEQ ID NO:53)                                                                                                                             |
| hCD123-6 G4/1- Cys148        |  | QXQLVQSGAIVCKPGASVKVSCKASGYTFSSIMHWVRQAPGQGLHWIGYIK<br>PTNDGFKYTNHKPKGRAFLSDRSISIA YMHSSLRSDIAVYYTCARHGND<br>YYDYM DYWGQG I V I VSSAS I K G P S V I F L A P S S K S I S G I I A A I G C L V K D Y R P<br>I P V I V S W N S G A I I S G V I I I P A V I I Q S S G I Y S I S S V I V P S S S I G I Q I Y I C N V N I<br>K P S N I K V D K K V I P K S C D K I I I I P P C P A P H I I G G P S V I I R P P K P K D I I M S R I P I<br>V I C V V V D V S I I D P H V K R N W Y V D G V I V I N A K I K P R I H Q I N S I P R V V S V I I V<br>I I H Q D W I N G K I Y K K V S N K A I P A P H K I S K A K G Q P R I H Q V Y I I P P S R D H I I K<br>N Q V S I I I I V K G I Y P S D I A V I W I H S N G Q P I N N Y K I I P P V I D S D G S H I Y S K I I V<br>D K S R W Q Q G N V I S C S V M I H A L I N I I Y I Q K S I S I S P G (SEQ ID NO:54)                                                                                                                             |
| hCD123-6 G4/1S2              |  | SXQLVQSGAIVCKPGASVKVSCKASGYTFSSIMHWVRQAPGQGLHWIGYIK<br>PTNDGFKYTNHKPKGRAFLSDRSISIA YMHSSLRSDIAVYYTCARHGND                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CysMab          | YYDTMDYWGQGT <del>L</del> VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT <del>S</del> WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:56)                                                                                                        |
| huCD123-6rhv1.0 | QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQKPGQGLEWIGYIRPYNDGTRYNQKFQGKATLTSDRSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGT <del>S</del> VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT <del>S</del> WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:59) |
| huCD123-6rhv1.1 | QFQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSSIMHWMKQKPGQGLEWIGYIKPYNDGTYNQKFQGKATLTSDKSSSTANMELNSLTSEDSAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGT <del>S</del> VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT <del>S</del> WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:60)  |

\*在以上所有序列中，其中N末端之第2個殘基為X (或Xaa)，例如SEQ ID NO: 50、53、54及56，對於Gv6序列，X為F；而對於Gv7序列，X為V。在一些實施例中，SEQ ID NO:44中之Met (粗體)為Pro。



表6 全長輕鏈胺基酸序列

| 抗體                                     | 全長輕鏈胺基酸序列(SH) ID NO)                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD123-3                                | DQQLPQSPSSLSASLGGKVLTCKASQDINSYLAWYQPKPKGPKLITRVN<br>ILQPKPSPKSGSGSGGSDYSLSSSLHPIDDAFYTCIQYDNLITPKGGPKLH<br>LKRAAAPLVSRPPSSHQILSGGASVVCILNNIPPKDINVKWKIDGSHRQN<br>GVLNQSWLDQDSEKDSPTSMSSLLILKDDYHRINSTYCHAIEKPSISPVKS<br>KSNRNIC (SH) ID NO:43)      |
| CD123-6                                | DIKMLQSPSSMYASLITRVLTCKASQDINSYLSWYQPKPKGPKLITRVN<br>RLVDGVPSKSGSGSGGSDYSLSSSLHPIDMGITYTCIQYDAHPYTPGGGPK<br>LHKRAAAPLVSRPPSSHQILSGGASVVCILNNIPPKDINVKWKIDGSHR<br>QNKVLNFWLDQDSEKDSPTSMSSLLILKDDYHRINSTYCHAIEKPSISPV<br>KSNRNIC (SH) ID NO:45)        |
| CD123-14                               | DILLRQSPAILSVSPGIRVSPCKRASQSVGFSHWYQQRPNCHPELLEKYASH<br>SSGSPSPKSGSGSGGIDPFLNINSVHSIDADYTCQDQSEKSWFLINGAAPKIL<br>LKRAAAPLVSRPPSSHQILSGGASVVCILNNIPPKDINVKWKIDGSHRQN<br>GVLNQSWLDQDSEKDSPTSMSSLLILKDDYHRINSTYCHAIEKPSISPVKS<br>KSNRNIC (SH) ID NO:47) |
| 1mCD123-<br>6Gv1                       | DQQLPQSPSSLSASVGDREVLTCKRASQDINSYLAWYQPKPKGPKLITRVN<br>RLVSGVPSKSGSGSGGIDPFLSSSLQPHDAFYTCIQYDARPTTPGQGPKV<br>HKRIVAAPSVVIRPPSDHQILKSGIASVVCILNNIPPRHAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQHSVLDQDSEKDSPTSLSSLLILSKADYHKHKVYACHVLDQGLSSPV<br>TKSNRNIC (SH) ID NO:49)   |
| 1mCD123-<br>6Gv4                       | DQQLPQSPSSLSASVGDREVLTCKRASQDINSYLSWYQPKPKGPKLITRVN<br>RLVDCVPSKSGSGSGGENDYTLSSSLQPHDAFYTCIQYDARPTTPGQGPK<br>VHKRIVAAPSVVIRPPSDHQILKSGIASVVCILNNIPPRHAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQHSVLDQDSEKDSPTSLSSLLILSKADYHKHKVYACHVLDQGLSSPV<br>TKSNRNIC (SH) ID NO:51)  |
| 1mCD123-<br>6Gv4-<br>NL83 (pH<br>"53") | SIQMLQSPSSLSASVGDREVLTCKRASQDINSYLSWYQPKPKGPKLITRVN<br>RLVDCVPSKSGSGSGGENDYTLSSSLQPHDAFYTCIQYDARPTTPGQGPK<br>VHKRIVAAPSVVIRPPSDHQILKSGIASVVCILNNIPPRHAKVQWKVDNAL<br>QSGNSQHSVLDQDSEKDSPTSLSSLLILSKADYHKHKVYACHVLDQGLSSPV<br>TKSNRNIC (SH) ID NO:58)  |
| 1mCD123-<br>6v1.0                      | DQQLPQSPSSMSASVCHRVLTCKRASQDINSYLSWYQPKPKGPKLITRVN<br>RLVDCVPSKSGSGSGGQDYSLSSSLHPIDMGITYTCIQYDAHPYTPGQGPKL<br>HKRIVAAPSVVIRPPSDHQILKSGIASVVCILNNIPPRHAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQHSVLDQDSEKDSPTSLSSLLILSKADYHKHKVYACHVLDQGLSSPV<br>KSNRNIC (SH) ID NO:61)   |

[0316] 在某些實施例中，該等抗CD123/ML3Rα抗體為全長抗體，其包含：(a)重鏈，其與以上全長重鏈序列中之任一者，諸如表5中之全長重鏈序列中之任一者具有至少約90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性；及/或(b)輕鏈，其與以上全長輕鏈序列中之任一者，諸如表6中之全長輕鏈序列中之任一者具有至少約90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。在某些實施例中，該等抗CD123/ML3Rα抗體為包含選自由以下各項組成之群的全長重鏈序列與全長輕鏈序列組合的全長抗體：SH) ID NO: 42/43、44/45、46/47、48/49、50/49、

53/49、54/49、56/49、59/49、60/49、48/51、50/51、53/51、54/51、56/51、59/51、60/51、48/58、50/58、53/58、54/58、56/58、59/58、60/58、59/49、59/51、59/58、59/61、60/49、60/51、60/58及60/61，或與其全長重鏈序列及/或輕鏈序列中之任一者具有至少約90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的抗體。

【0317】 在某些實施例中，該等抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體為包含選自由以下各項組成之群的全長重鏈序列與全長輕鏈序列組合的全長抗體：SEQ ID NO: 59/61及60/61，或與其全長重鏈序列及/或輕鏈序列中之任一者具有至少約90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的抗體。此種抗體可進一步在輕鏈、重鏈或兩者中包含經工程改造之N末端Ser/Thr。此種抗體可進一步在重鏈CH3結構域中在對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個Cys之位置上包括經工程改造之Cys。

【0318】 在某些實施例中，該抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體為特異性結合CD123/IL-3R $\alpha$ 之鼠類、嵌合、人類化或人類抗體。在某些實施例中，與全長SEQ ID NO中之任一者具有某一百分比之序列一致性的抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體與此種SEQ ID NO之不同之處僅在於保守胺基酸取代，例如，僅1、2、3、4或5個連續保守胺基酸取代。在某些實施例中，該等保守胺基酸取代在CDR之外。

【0319】 在某些實施例中，該其抗原結合片段為或包含Fab、Fd、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之Fv、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、IgG $\Delta$ CH2、微小抗體、F(ab')<sub>3</sub>、四鏈抗體、三鏈抗體、雙鏈抗體、單域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb2、(scFv)<sub>2</sub>或scFv-Fc。

【0320】 在一相關態樣中，本發明亦提供一種多肽，其包含該等抗體或其抗原結合片段中之任一者、以上V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>序列中之任一者、以上HCVR及/或LCVR中之任一者、或以上HCVR及/或LCVR之CDR序列中之任一者。該多肽可能為例如與非抗體蛋白質或結構域之融合物。在某些實施例中，該融合蛋白質



並非與假單胞菌毒素之融合物。

【0321】 抗體對抗原之親和力或親合力可使用此項技術中所熟知的任何適合方法以實驗測定，例如，流式細胞術、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)或放射免疫檢定(RIA)或動力學(例如BIACORE™分析)。可容易地使用直接結合檢定以及競爭性結合檢定格式。參見例如Berzofsky等人, 「Antibody-Antigen Interactions」, *Fundamental Immunology*, Paul, W. E.編, Raven Press: New York, N.Y. (1984) ; Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992) ; 及其中所描述之方法。

【0322】 若在不同的條件(例如，鹽濃度、pH值、溫度)下量測，則特定抗體-抗原相互作用之量測親和力可變化。因此，親和力及其他抗原結合參數(例如， $K_D$ 或 $K_d$ 、 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ )之量測係用抗體及抗原之標準化溶液及如此項技術中已知且諸如本文中所描述之緩衝液的標準化緩衝液來進行。

【0323】 在一個態樣中，可使用流式細胞術對表面上表現CD123/IL-3R $\alpha$ 抗原之細胞進行結合檢定。舉例而言，可使用 $1 \times 10^5$ 個細胞/樣品在100 $\mu$ L FACS緩衝液(例如，補充有2%正常山羊血清之RPMI-1640培養基)中將CD123/IL-3R $\alpha$ 陽性細胞與不同濃度之抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體一起培育。隨後，可使細胞球粒化，洗滌，且與100  $\mu$ L FITC結合之山羊抗小鼠或山羊抗人類IgG抗體(諸如可獲自例如Jackson Laboratory，6  $\mu$ g/mL，處於FACS緩衝液中)一起培育1 h。隨後再次將細胞球粒化，用FACS緩衝液洗滌且再懸浮於含有1%甲醛之200  $\mu$ L PBS中。樣品可例如使用具有HTS多孔取樣器之FACSCalibur流式細胞儀獲取，且使用CellQuest Pro加以分析(均來自BD Biosciences，San Diego，US)。對於各樣品，可輸出FL1之平均螢光強度(MFI)且針對抗體濃度繪於半對數圖中以產生結合曲線。將蛇形劑量反應曲線針對結合曲線進行擬合，且使用諸如GraphPad Prism v4之程序在缺省參數下計算EC<sub>50</sub>值(GraphPad軟體，San Diego，CA)。EC<sub>50</sub>值可用

作各抗體之表觀解離常數「 $K_d$ 」或「 $K_D$ 」的量度。

【0324】 可使用雜交瘤方法製備單株抗體，諸如由Kohler及Milstein (1975) *Nature* 256:495所描述之彼等方法。使用雜交瘤方法，使小鼠、倉鼠或其他適當宿主動物免疫以引發淋巴細胞產生將特異性結合免疫抗原之抗體。亦可在活體外使淋巴細胞免疫。在免疫後，分離淋巴細胞且使用例如聚乙二醇與適合之骨髓瘤細胞系融合，以形成雜交瘤細胞，隨後可自未融合淋巴細胞及骨髓瘤細胞中選出。如藉由免疫沈澱、免疫印漬或藉由活體外結合檢定(例如，放射免疫檢定(RIA)；酶聯免疫吸附檢定(ELISA))所測定，產生特異性針對所選抗原之單株抗體的雜交瘤可隨後在活體外培養基中使用標準方法(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986)或在活體內作為動物中之腹水腫瘤而增殖。隨後可如針對多株抗體所描述而自培養基或腹水液中純化出單株抗體。

【0325】 或者，亦可如美國專利4,816,567中所描述使用重組DNA方法來製造單株抗體。自成熟B細胞或雜交瘤細胞分離編碼單株抗體之聚核苷酸，諸如藉由使用可特異性擴增編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸引物的RT-PCR，且使用習知程序測定其序列。隨後將編碼重鏈及輕鏈之經分離聚核苷酸選殖至適合之表現載體中，當將其轉染至諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞之否則不會產生免疫球蛋白之宿主細胞中時，由宿主細胞產生單株抗體。此外，可如所描述自表現所要物種之CDR的噬菌體呈現庫中分離所要物種之重組單株抗體或其片段(McCafferty等人, *Nature* 348:552-554, 1990；Clackson等人, *Nature*, 352:624-628, 1991；及Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991)。

【0326】 編碼單株抗體之聚核苷酸可使用重組DNA技術用許多不同的方式進行進一步修飾，以產生替代抗體。在一些實施例中，例如小鼠單株抗體之

輕鏈及重鏈之恆定域可針對以下各項經取代1)例如人類抗體之彼等區域，以產生嵌合抗體，或2)非免疫球蛋白多肽，以產生融合抗體。在一些實施例中，將恆定區截短或移除以產生單株抗體之所要抗體片段。可變區之定點或高密度突變誘發可用於優化單株抗體之特異性、親和力等。

**【0327】** 在一些實施例中，針對人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之單株抗體為人類化抗體。在某些實施例中，此種抗體在治療上用於當投與人類個體時降低抗原性及HAMA (人類抗小鼠抗體)反應。

**【0328】** 用於對非人類或人類抗體進行工程改造、人類化或表面重整之方法亦可使用且在此項技術中為熟知的。人類化、表面重整或類似工程改造抗體可具有一或多個來自非人類來源，例如但不限於小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類或其他哺乳動物之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基經典型地取自已知人類序列之「輸入」可變域、恆定域或其他域且通常稱為「輸入」殘基之殘基置換。

**【0329】** 此種輸入序列可用於降低免疫原性，或者降低、增強或調節結合、親和力、締合速率、解離速率、親合力、特異性、半衰期或如此項技術中已知的任何其他適合之特徵。一般而言，CDR殘基直接且最實質性地涉及影響CD123/IL-3R $\alpha$ 結合。因此，維持部分或所有非人類或人類CDR序列，同時可用人類或其他胺基酸置換可變區及恆定區之非人類序列。

**【0330】** 抗體亦可視情況為經工程改造而保留對抗原CD123/IL-3R $\alpha$ 之高親和力及其他適宜生物學性質的人類化、表面重整、工程改造或人類抗體。為了達成此目標，可視情況藉由使用親本、工程改造及人類化序列之三維模型來分析親本序列及多種設想人類化及工程改造產物之方法來製備人類化(或人類)或工程改造抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體及表面重整抗體。三維免疫球蛋白模型為常用的且為熟習此項技術者所熟知。可利用電腦程式，其顯示且呈現所選候選免疫

球蛋白序列之大概三維構形結構。觀察此等呈現允許分析殘基在候選免疫球蛋白序列發揮功能方面之可能作用，亦即，分析會影響候選免疫球蛋白結合其抗原，諸如CD123/IL-3R $\alpha$ 之能力的殘基。以此方式，可自一致及輸入序列中選擇構架(FR)殘基並組合，從而達成所要抗體特徵，諸如增加對靶抗原之親和力。

【0331】 本發明抗體之人類化、表面重整或工程改造可使用任何已知方法來進行，諸如但不限於以下文獻中所描述之彼等方法：Winter (Jones等人, *Nature* 321:522, 1986；Riechmann等人, *Nature* 332:323, 1988；Verhoeyen等人, *Science* 239:1534, 1988；Sims等人, *J. Immunol.* 151:2296, 1993；Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987；Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285, 1992；Presta等人, *J. Immunol.* 151:2623, 1993；Raguska等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(3):969-973, 1994；美國專利第5,639,641號、第5,723,323號、第5,976,862號、第5,824,514號、第5,817,483號、第5,814,476號、第5,763,192號、第5,723,323號、第5,766,886號、第5,714,352號、第6,204,023號、第6,180,370號、第5,693,762號、第5,530,101號、第5,585,089號、第5,225,539號、第4,816,567號；PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430、EP 229246、7,557,189、7,538,195及7,342,110，各文獻係以全文引用之方式併入本文中，包括其中所引用之參考文獻。

【0332】 在某些替代實施例中，針對CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗體為人類抗體。人類抗體可使用此項技術中已知的各種技術直接製備。可產生活體外免疫或自免疫個體分離之產生針對靶抗原之抗體的不朽化人類B淋巴細胞(參見例如Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁(1985)；Boemer等人, 1991, *J. Immunol.* 147(1):86-95；及美國專利5,750,373)。此外，人類抗體可選自噬菌體庫，其中該噬菌體庫表現人類抗體，如例如以下文獻中所描

述：Vaughan等人, *Nat. Biotech.* 14:309- 314, 1996；Sheets等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 95:6157-6162, 1998；Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381, 1991；及Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581, 1991)。用於產生及使用抗體噬菌體庫之技術亦描述於以下文獻中：美國專利第5,969,108號、第6,172,197號、第5,885,793號、第6,521,404號、第6,544,731號、第6,555,313號、第6,582,915號、第6,593,081號、第6,300,064號、第6,653,068號、第6,706,484號及第7,264,963號；及Rothe等人, *J. Mol. Bio.* doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.018, 2007（各文獻係以全文引用之方式併入）。親和力成熟策略及鏈改組策略(Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783, 1992，以全文引用之方式併入)在此項技術中為已知的且可用於產生高親和力人類抗體。

【0333】 亦可在含有免疫後能夠在不存在內源性免疫球蛋白產生之情況下產生全譜系人類抗體之人類免疫球蛋白基因座的轉殖基因小鼠中製造人類化抗體。這種方法描述於以下美國專利中：5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425及5,661,016。

【0334】 在某些實施例中提供抗體片段以例如增加腫瘤滲透。已知用於產生抗體片段之多種技術。按慣例，此等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化而得到(例如，Morimoto等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117, 1993；Brennan等人, *Science* 229:81, 1985)。在某些實施例中，重組產生抗體片段。Fab、Fv及scFv抗體片段均可表現於且自大腸桿菌或其他宿主細胞中分泌，由此允許產生大量此等片段。亦可自抗體噬菌體庫中分離此種抗體片段。抗體片段亦可為如例如美國專利5,641,870中所描述之線性抗體，且可為單特異性或雙特異性。用於產生抗體片段之其他技術對熟習此項技術者將顯而易見。

【0335】 出於本發明之目的，應瞭解，經修飾抗體可包括任何類型之可變區，由此提供抗體與人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之多肽的締合。就此而言，可變區可包

含或來源於任何類型之可經誘導以建立體液反應且產生針對所要腫瘤相關抗原之免疫球蛋白的哺乳動物。因而，經修飾抗體之可變區可具有例如人類、鼠類、非人類靈長類(例如石蟹獼猴、獼猴等)或狼起源。在一些實施例中，經修飾免疫球蛋白之可變區及恆定區為人類的。在其他實施例中，相容抗體(通常來源於非人類來源)之可變區可經工程改造或特定改適以改良結合性質或降低該分子之免疫原性。就此而言，適用於本發明之可變區可藉由包括輸入胺基酸序列而進行人類化或以其他方式改變。

**【0336】** 在某些實施例中，藉由至少部分置換一或多個CDR且在必要時藉由部分構架區置換及序列變化來改變重鏈及輕鏈中之可變域。儘管CDR可來源於與得到構架區之抗體屬於相同類別或甚至亞類之抗體，但設想CDR將來源於不同類別之抗體且在某些實施例中來自不同物種之抗體。可能未必用來自供體可變區之完整CDR置換所有CDR以便將一個可變域之抗原結合容量轉移至另一個。相反，可能僅需要轉移維持抗原結合位點之活性所必需的彼等殘基。鑑於美國專利第5,585,089號、第5,693,761號及第5,693,762號中所闡述之說明，進行常規實驗或藉由試誤測試以獲得具有較低免疫原性之功能抗體完全在熟習此項技術者之能力範圍內。

**【0337】** 儘管可改變可變區，但熟習此項技術者應瞭解，本發明之經修飾抗體將包括恆定區結構域中一或多個之至少一部分已缺失或以其他方式改變以提供所要生物化學特徵，諸如當與具有大致相同之免疫原性且包含天然或未改變恆定區之抗體相比時腫瘤定位有所增加或血清半衰期有所減少的抗體(例如全長抗體或其免疫活性片段)。在一些實施例中，經修飾抗體之恆定區將包括人類恆定區。與本發明相容之對恆定區之修飾包括一或多個結構域中之一或多個胺基酸的添加、缺失或取代。亦即，本文中所揭示之經修飾抗體可包含對三個重鏈恆定域中之一或多個(CH1、CH2或CH3)及/或對輕鏈恆定域(CL)之變化或修

飾。在一些實施例中，涵蓋一或多個結構域部分或完全缺失之經修飾恆定區。在一些實施例中，經修飾抗體將包含結構域缺失構建體或變異體，其中整個CH2結構域已移除(ACH2構建體)。在一些實施例中，省略之恆定區結構域將由短胺基酸間隔基(例如10個殘基)替換了，從而提供典型地由不存在之恆定區賦予的一定程度的分子可撓性。

【0338】 應注意，在某些實施例中，可對經修飾抗體進行工程改造以使CH3結構域直接與個別經修飾抗體之鉸鏈區融合。在其他構建體中，可能需要在鉸鏈區與經修飾CH2及/或CH3結構域之間提供肽間隔基。舉例而言，可表現相容性構建體，其中CH2結構域已缺失，且剩餘之CH3結構域(經修飾或未經修飾)與具有5-20個胺基酸間隔基之鉸鏈區接合。可添加此種間隔基，例如，以確保恆定域之調控元件保持自由且可及，或確保鉸鏈區保持可撓性。然而，應注意，在一些情況下，可證明胺基酸間隔子具有免疫原性，且引發針對構建體之不需要之免疫反應。因此，在某些實施例中，添加至構建體之任何間隔基將為相對非免疫原性的，或甚至可一起省略，以維持經修飾抗體之所要生物化學品質。

【0339】 除了缺失整個恆定區結構域之外，應瞭解，可藉由數個或甚至單個胺基酸之部分缺失或取代來提供本發明之抗體。舉例而言，CH2結構域之所選區域中單個胺基酸之突變可能足以實質性地減少Fc結合且從而增加腫瘤定位。類似地，可能需要簡單地缺失一或多個控制欲調節之效應因子功能(例如補體C1Q結合)的恆定區結構域的一部分。恆定區之此種部分缺失可改良抗體之所選特徵(血清半衰期)，同時使與標的恆定區結構域有關之其他所需功能保持完整。此外，如以上所提及，可對所揭示之抗體的恆定區進行修飾，例如，藉由對一或多個胺基酸之突變或取代，此舉可增強所得構建體之輪廓。就此而言，有可能破壞由保守結合位點提供之活性(例如Fc結合)，同時實質上維持經修飾抗體之構形及免疫原性輪廓。某些實施例可包括將一或多個胺基酸添加至恆定區，以

增強所需特徵，諸如減少或增加效應因子功能，或提供更多細胞毒素或碳水化合物附接。在此種實施例中，可能需要插入或複製來源於所選恆定區結構域之特定序列。

**【0340】** 本發明進一步涵蓋與本文中所闡述之嵌合抗體、人類化抗體及人類抗體或其抗體片段實質上同源之變異體及等效物。此等可含有例如保守取代突變，亦即，一或多個胺基酸由類似胺基酸取代。舉例而言，保守取代係指胺基酸經相同一般類別內之另一胺基酸取代，諸如，例如，一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸取代、一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸取代或一個中性胺基酸由另一中性胺基酸取代。保守胺基酸取代之含義在此項技術中為熟知的，諸如上文所定義者。

**【0341】** 本發明之多肽可為包含針對人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗體或其片段的重組多肽、天然多肽或合成多肽。此項技術中應認可，本發明之一些胺基酸序列可變化而對蛋白質之結構或功能無顯著效應。因此，本發明進一步包括多肽之變異形式，其顯示實質性活性或包括針對諸如人類CD123之CD123抗原的抗體或其片段之區域。此種突變體包括缺失、插入、倒置、重複及類型取代。

**【0342】** 可進一步修飾多肽及類似物以含有正常情況下並非蛋白質之一部分的額外化學部分。彼等衍生化部分可改良蛋白質之溶解度、生物半衰期或吸收。該等部分亦可減少或消除蛋白質及其類似物之任何不需要之副作用。關於彼等部分之概述可見於REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第20版, Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)中。

**【0343】** 本文中所描述之經分離多肽可藉由此項技術中已知的任何適合之方法來產生。此種方法介於直接蛋白質合成法至構建編碼經分離多肽序列之DNA序列且在適合之經轉型宿主中表現彼等序列的範圍內。在一些實施例中，使用重組技術，藉由分離或合成編碼相關野生型蛋白質之DNA序列來構建DNA



序列。視情況，可藉由位點特異性突變誘發對序列進行突變誘發以提供其功能類似物。參見例如Zoeller等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:5662-5066, 1984及美國專利第4,588,585號。

**【0344】** 在一些實施例中，編碼相關多肽(例如本發明之抗體、抗原結合片段或多肽)之DNA序列將完全或部分藉由化學合成使用寡核苷酸合成器來構建。此種寡核苷酸可基於所要多肽之胺基酸序列且選擇將產生相關重組多肽之宿主細胞中所偏好之彼等密碼子來加以設計。可應用標準方法來合成編碼相關經分離多肽之經分離聚核苷酸序列。舉例而言，可使用完整胺基酸序列來構建反轉譯基因。此外，可合成含有編碼特定經分離多肽之核苷酸序列的DNA寡聚物。舉例而言，可合成若干編碼所要多肽之部分的小寡核苷酸且隨後結紮。個別寡核苷酸典型地含有5'或3'懸垂物以用於互補組裝。

**【0345】** 一經組裝(藉由合成、定點突變誘發或另一方法)後，便將編碼特定經分離相關多肽之聚核苷酸序列插入表現載體中並可操作地連接至適合在所選宿主中表現蛋白質的表現控制序列。可藉由核苷酸定序、限制作圖及在適合宿主中表現生物活性多肽來證實適當組裝。如此項技術中眾所周知，為了在宿主中獲得轉染基因之高表現水準，該基因必須可操作地連接至在所選表現宿主中具有功能之轉錄及轉譯表現控制序列。

**【0346】** 在某些實施例中，使用重組表現載體來擴增並表現編碼針對人類CD123/IL-3R $\alpha$ 之抗體或其片段的DNA。重組表現載體為可複製DNA構建體，其具有編碼抗CD123/IL-3R $\alpha$ 抗體或其片段之多肽鏈且可操作地連接至來源於哺乳動物、微生物、病毒或昆蟲基因之適合轉錄或轉譯調控元件的合成或cDNA來源DNA片段。轉錄單元一般包含以下各項之組裝物：(1)在基因表現中具有調控作用之基因元件，例如，轉錄啟動子或增強子；(2)轉錄至mRNA且轉譯至蛋白質之結構或編碼序列；及(3)適當轉錄及轉譯起始及終止序列。此種調控元件可包

括用於控制轉錄的操作子序列。在宿主中複製之能力通常由複製起點賦予，且可另外併入選擇基因以促進對轉型產物之識別。當DNA區域彼此功能上相關時，將其可操作地連接。舉例而言，若信號肽(分泌前導序列)之DNA表現為參與多肽之分泌的前驅物，則其可操作地連接至多肽之DNA；若啟動子控制序列之轉錄，則其可操作地連接至編碼序列；或若核糖體結合位點經安置以允許轉譯，則其可操作地連接至編碼序列。意欲在酵母表現系統中使用之結構元件包括使宿主細胞能夠在細胞外分泌經轉譯之蛋白質的前導序列。或者，在無前導序列或轉運序列之情況下表現重組蛋白質時，其可包括N末端甲硫胺酸殘基。此殘基可視情況隨後自所表現之重組蛋白質中裂解以提供最終產物。

【0347】 表現控制序列及表現載體之選擇將視宿主之選擇而定。可使用多種表現宿主/載體組合。適用於真核宿主之表現載體包括，例如，包含來自SV40、牛乳頭狀瘤病毒、腺病毒及巨細胞病毒之表現控制序列的載體。適用於細菌宿主之表現載體包括已知細菌質體，諸如來自大腸桿菌之質體，包括pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物，以及更廣泛宿主範圍質體，諸如M13及絲狀單鏈DNA噬菌體。

【0348】 適用於表現CD123/IL-3R $\alpha$ 結合多肽或抗體(或欲用作抗原之CD123/IL-3R $\alpha$ 蛋白)之宿主細胞包括原核生物、酵母、昆蟲或受適當啟動子控制之高級真核細胞。原核生物包括革蘭氏陰性生物體或革蘭氏陽性生物體，例如大腸桿菌或桿菌。高級真核細胞包括哺乳動物來源之確定細胞系，諸如CHO細胞。亦可使用無細胞轉譯系統。適用於與細菌、真菌、酵母及哺乳動物細胞宿主一起使用之選殖及表現載體由Pouwels等人(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985)描述，該文獻之相關揭示內容以引用之方式併入在此。關於蛋白質產生(包括抗體產生)方法之其他資訊可見於例如美國專利公開案第2008/0187954號、美國專利第6,413,746號及第6,660,501號以及國際專利公開案

第WO 04009823號中，各案係以全文引用之方式在此併入本文中。

【0349】 亦適宜使用多種哺乳動物或昆蟲細胞培養系統來表現重組蛋白質。可在哺乳動物細胞中進行重組蛋白質表現，因為此種蛋白質一般經正確摺疊、適當修飾且具有完全功能。適合哺乳動物宿主細胞系之實例包括HEK-293及HEK-293T、由Gluzman (Cell 23: 175, 1981)所描述之猴腎細胞COS-7細胞系及其他細胞系，包括例如L細胞、CI 27、3T3、中國倉鼠卵巢(CHO)、HeLa及BHK細胞系。哺乳動物表現載體可包含非轉錄元件，諸如複製起點、與欲表現之基因連接的適合啟動子及增強子，以及其他5'或3'側接非轉錄序列，以及5'或3'非轉譯序列，諸如必需核糖體結合位點、聚腺苷酸化位點、剪接供體及受體位點以及轉錄終止序列。用於在昆蟲細胞中產生異源蛋白質之桿狀病毒系統由Luckow及Smmers, *Bio/Technology* 6:47 (1988)回顧。

【0350】 因此，本發明之一個態樣亦提供一種細胞，其產生任一種標的抗體或其抗原結合片段或任一種標的多肽。在某些實施例中，該細胞為哺乳動物細胞。在某些實施例中，該細胞為HEK-293或HEK-293T細胞、COS-7細胞、L細胞、CI 27細胞、3T3細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、HeLa細胞或BHK細胞。在某些實施例中，該細胞為CHO細胞。

【0351】 由經轉型宿主產生之蛋白質可根據任何適合之方法加以純化。此種標準方法包括層析法(例如離子交換層析法、親和力層析法及尺寸化管柱層析法)、離心、差異性溶解或藉由用於蛋白質純化之任何其他標準技術。諸如六聚組胺酸、麥芽糖結合結構域、流感病毒被膜序列及谷胱甘肽-S-轉移酶之親和力標籤可附接至蛋白質以允許藉由通過適合親和力管柱而容易地純化。亦可使用諸如蛋白水解、核磁共振及x射線結晶學之技術對經分離蛋白質進行物理表徵。

【0352】 舉例而言，可首先使用市售蛋白質濃縮過濾器，例如Amicon或Millipore Pellicon 超濾單元對來自將重組蛋白質分泌至培養基中之系統的上清

液進行濃縮。在濃縮步驟之後，可將濃縮物應用於適合之純化基質。或者，可使用陰離子交換樹脂，例如具有懸垂二乙基胺基乙基(DEAE)基團之基質或受質。該等基質可為丙烯醯胺、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素或常用於蛋白質純化之其他類型。或者，可使用陽離子交換步驟。適合之陽離子交換劑包括包含磺丙基或羧甲基之多種不溶性基質。最後，使用疏水性RP-HPLC介質，例如具有懸垂甲基或其他脂族基團之矽膠的一或多種逆相高效液相層析(RP-HPLC)步驟可用於進一步純化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑。上述純化步驟一些或全部亦可以各種組合使用，以提供均質重組蛋白質。

【0353】 可例如藉由自細胞球粒中初步提取，隨後進行一或多個濃縮、鹽析、水溶液離子交換或尺寸排阻層析步驟來分離細菌培養物中之重組蛋白質產物。高效液相層析法(HPLC)可用於最終純化步驟。可藉由任何習知方法破壞重組蛋白質表現中所使用之微生物細胞，包括冷凍-解凍循環、超音處理、機械破壞或使用細胞溶解劑。

【0354】 此項技術中用於純化抗體及其他蛋白質之已知方法亦包括例如美國專利公開案第2008/0312425號、第2008/0177048號及第2009/0187005號中所描述之彼等方法，各案係以全文引用之方式在此併入本文中。

【0355】 在某些實施例中，本發明之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑具有N末端絲胺酸，其可用氧化劑氧化以形成具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑。

【0356】 任何適合之氧化劑均可用於以上所描述之方法的步驟(a)中。在某些實施例中，該氧化劑為過碘酸鹽。更特定言之，該氧化劑為過碘酸鈉。

【0357】 可使用相對於CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑過量莫耳當量之氧化劑。在某些實施例中，可使用約2-100、5-80、10-50、1-10或5-10莫耳當量之氧化劑。在某些實施例中，可使用約10或約50當量之氧化劑。當使用大量氧化劑時，使用短反應時間以避免過度氧化。舉例而言，當使用50當量氧化劑時，氧化反應

進行約5至約60分鐘。或者，當使用10當量氧化劑時，氧化反應進行約30分鐘至約24小時。在一個實施例中，使用5-10莫耳當量氧化劑且氧化反應進行約5至約60分鐘(例如約10至約30分鐘、約20至約30分鐘)。

【0358】 在某些實施例中，該氧化反應不導致顯著非靶向氧化。舉例而言，在用於產生具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑之N末端絲胺酸氧化過程期間，無顯著程度(例如小於20%、小於10%、小於5%、小於3%、小於2%或小於1%之甲硫胺酸及/或聚糖得以氧化。

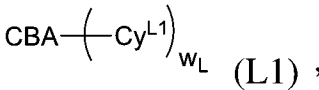
【0359】 在某些實施例中，本發明之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑具有經重組工程改造之Cys殘基，諸如對應於例如SEQ ID NO: 54或56中之第5個至最後一個Cys的Cys殘基(亦即，EU/OU編號位置442上之Cys殘基)。因此，術語「半胱胺酸工程改造抗體」包括具有至少一個正常情況下不存在於抗體輕鏈或重鏈之指定殘基上的Cys的抗體。此種Cys亦可稱為「工程改造Cys」，其可使用任何習知分子生物學重組DNA技術(例如，藉由在靶殘基上用Cys之編碼序列置換非Cys殘基之編碼序列)進行工程改造。舉例而言，若原始殘基為具有編碼序列5'-UCU-3'之Ser，則可使該編碼序列突變(例如，藉由定點突變誘發)至編碼Cys之5'-UGU-3'。在某些實施例中，本發明之Cys工程改造抗體在重鏈中具有工程改造Cys。在某些實施例中，該工程改造Cys在重鏈之CH3結構域中或附近。在某些實施例中，該工程改造Cys對應於例如SEQ ID NO: 54或56中之第5個至最後一個Cys。工程改造抗體重(或輕)鏈序列可插入適合之重組表現載體中，以產生具有工程改造Cys殘基替代原始Ser殘基之工程改造抗體。

### 3. 免疫結合物

【0360】 在一第二態樣中，本發明亦提供免疫結合物，其包含本文中所描述之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑，該等CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑共價連接於一或多分子之本文中所描述之細胞毒性劑。

【0361】 在第一實施例中，本發明之免疫結合物包含本文中所描述之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(包括抗體、其抗原結合片段，或包含該抗體或其抗原結合片段之多肽)，其經由位於該CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑上之一或多個離胺酸殘基之 $\epsilon$ 胺基共價連接於本文中所描述之細胞毒性劑。

【0362】 在第一實施例之第一特定實施例中，本發明之免疫結合物由下式表示：



其中：

CBA為CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如，上文中所描述之標的抗體或其抗原結合片段，或上文所描述之其標的多肽)，其經由離胺酸殘基共價連接於CyL1；

WL為1至20之整數；且

CyL1為由以下各式表示之細胞毒性化合物：



R<sub>x3</sub>為(C1-C6)烷基；

L'由以下各式表示：

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)- (B1')；或

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-S-Zs1- (B2')；

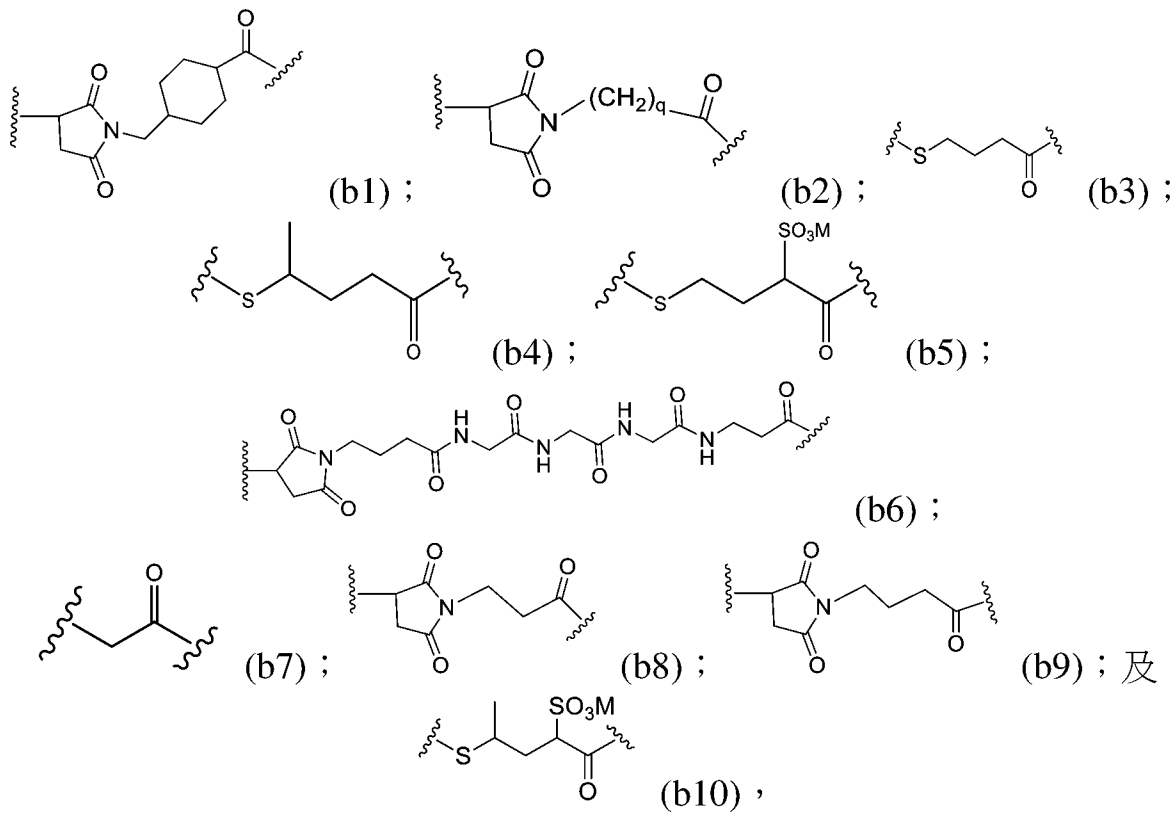
R<sub>5</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時各自獨立地為-H、(C1-C3)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

m為1至6之整數；且

Zs1係選自以下各式中之任一者：



其中：

q為1至5之整數；且

M為H<sup>+</sup>或陽離子。

【0363】 在第二特定實施例中，對於式(L1)之結合物，Cy<sup>L1</sup>由式(L1a)或



(L1a1)表示；且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。

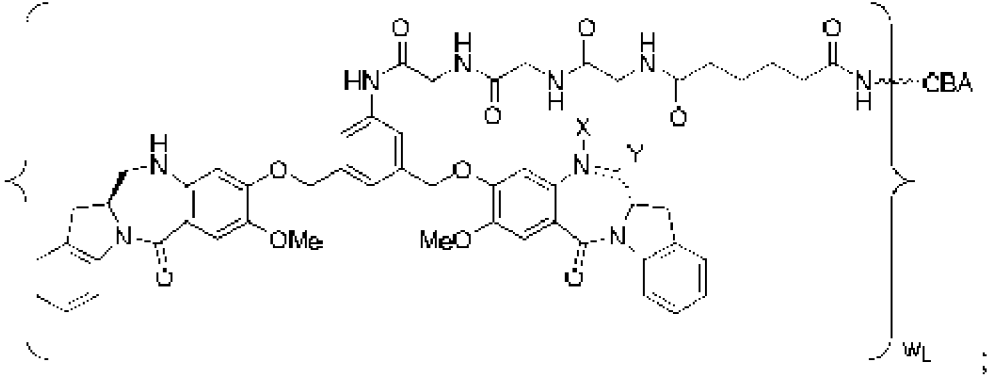
【0364】 在第三特定實施例中，對於式(L1)之結合物， $Cy^{L1}$ 由式(L1b)或(L1b1)表示；且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。更特定言之， $R^{x3}$ 為(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)烷基。

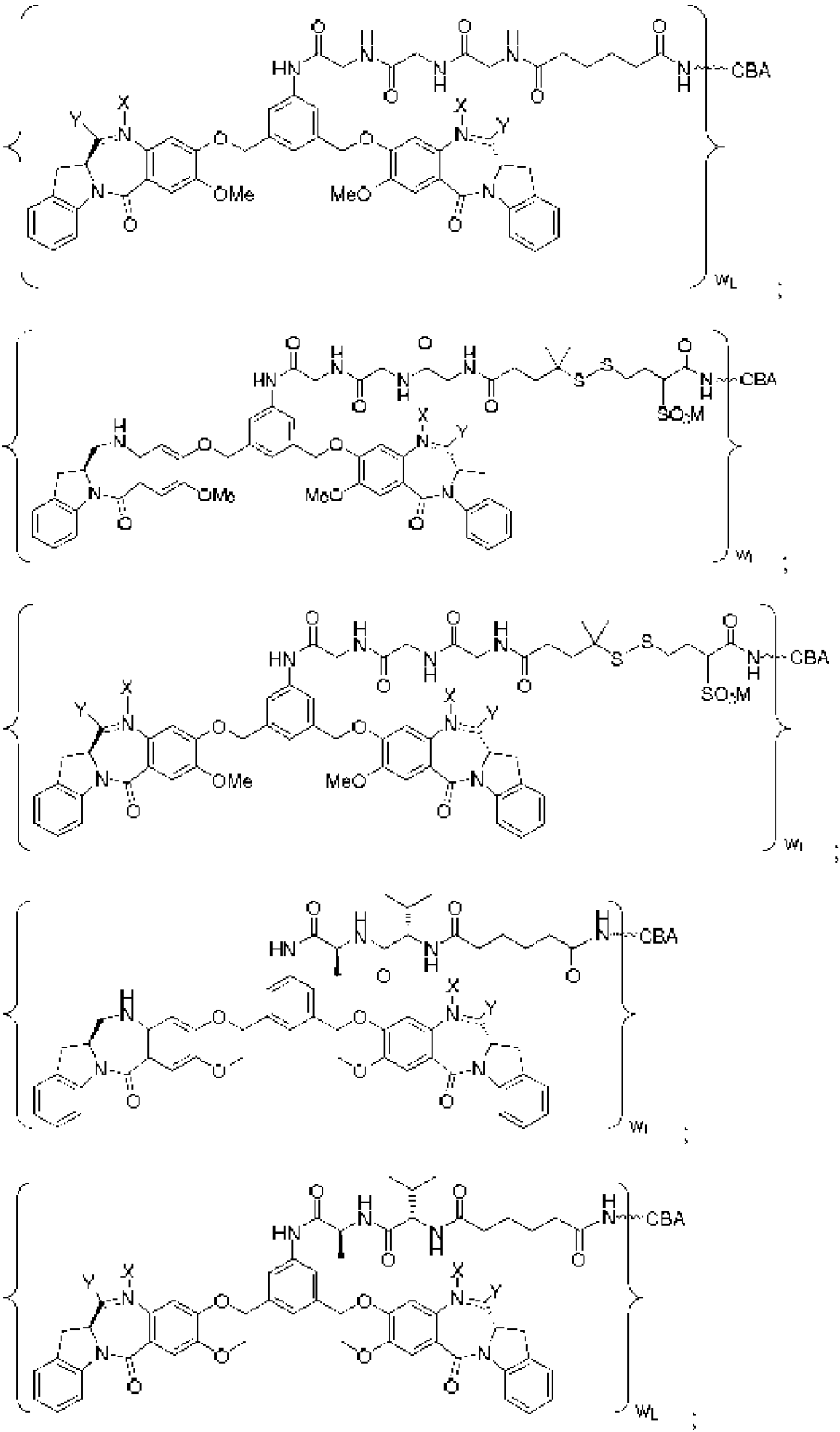
【0365】 在第四特定實施例中，對於式(L1)之結合物， $Cy^{L1}$ 由式(L1a)表示； $R_a$ 及 $R_b$ 均為H； $R_5$ 為H或Me，且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。

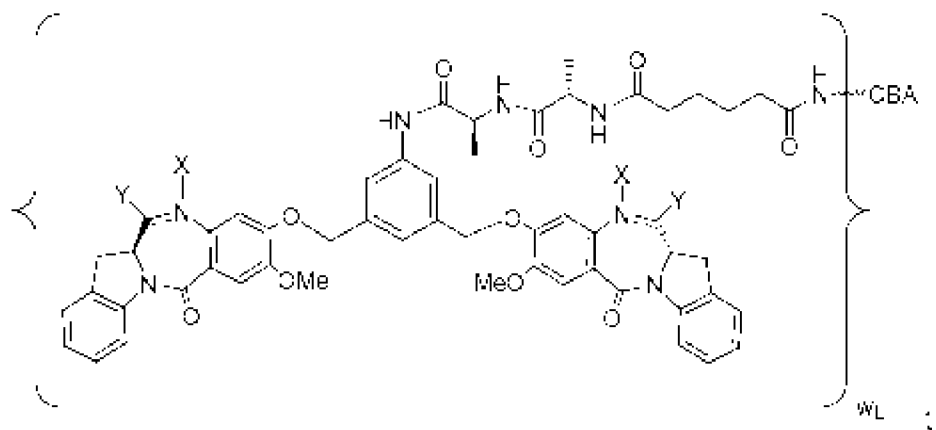
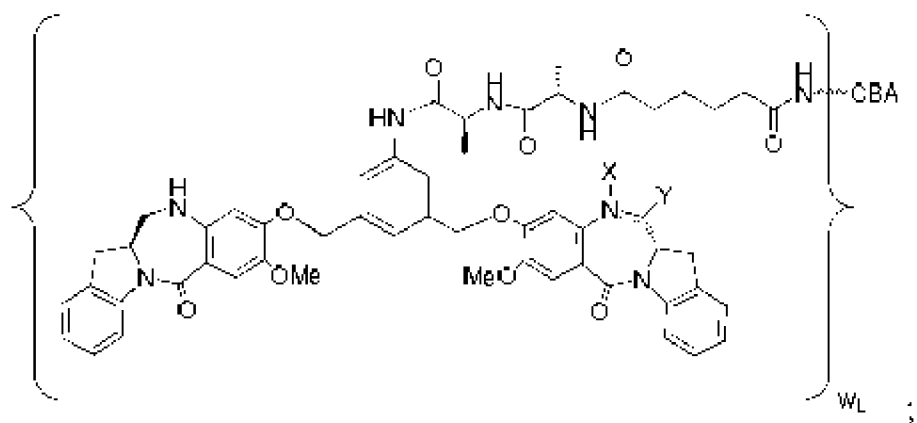
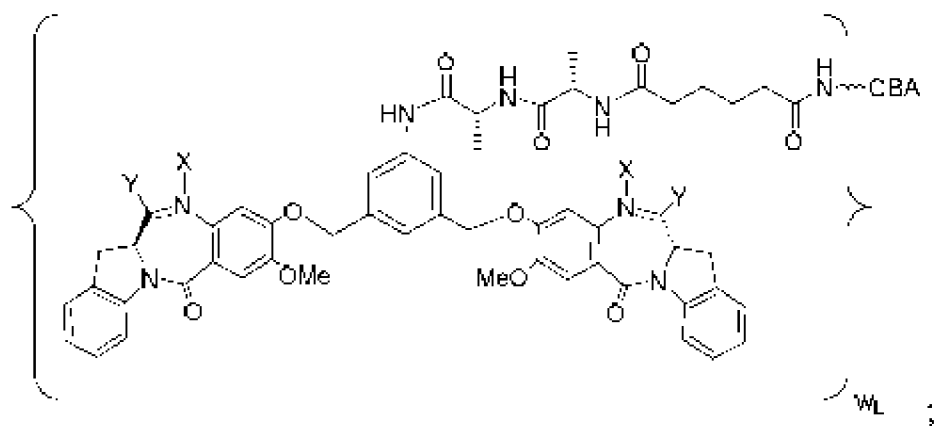
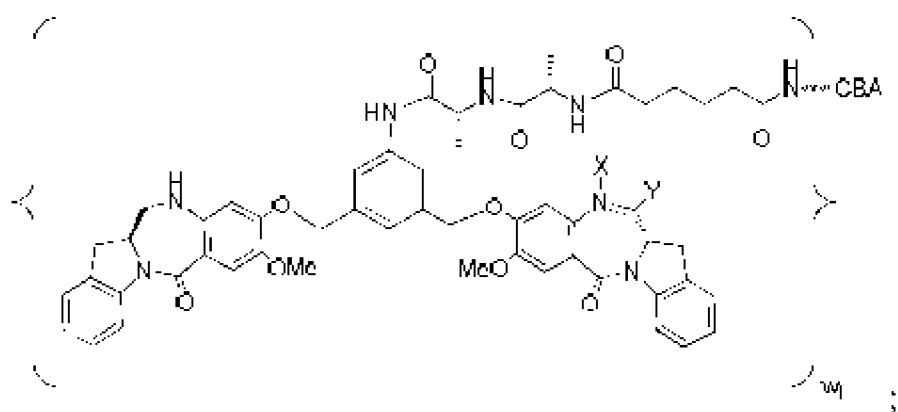
【0366】 在第五特定實施例中，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數如以上在第一、第二或第四特定實施例中所描述。在一更特定實施例中，P係選自由以下各項組成之群：Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。更特定言之，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

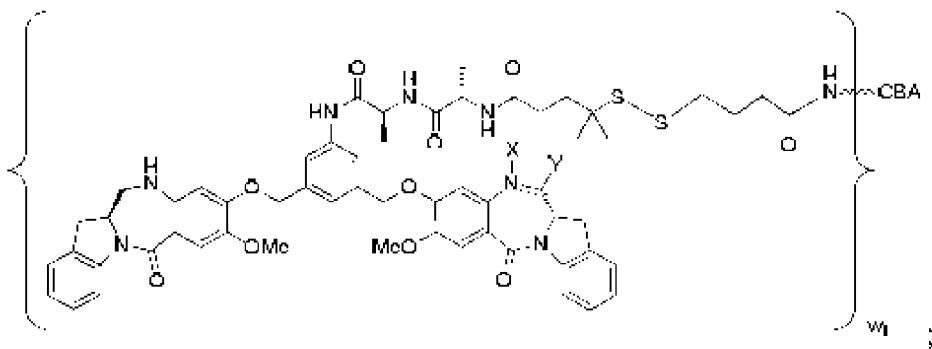
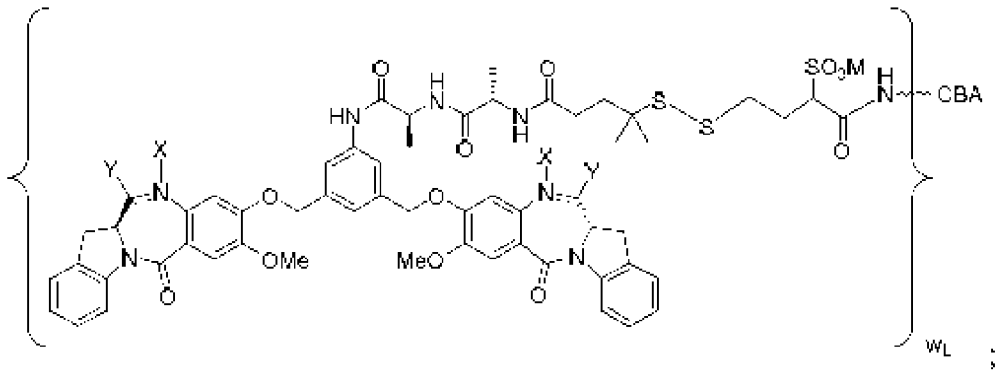
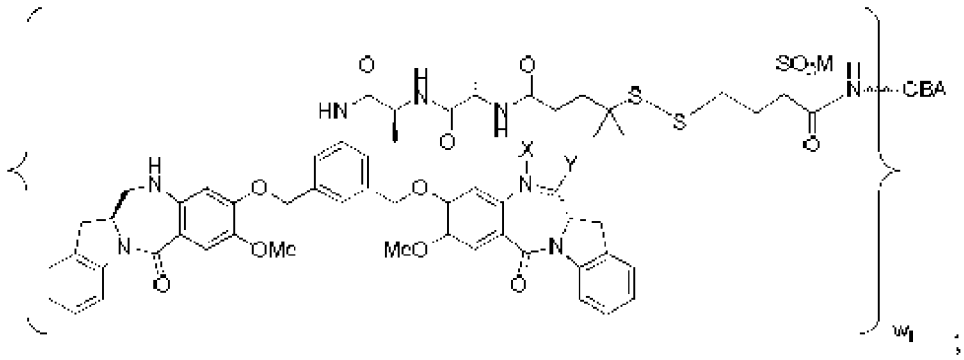
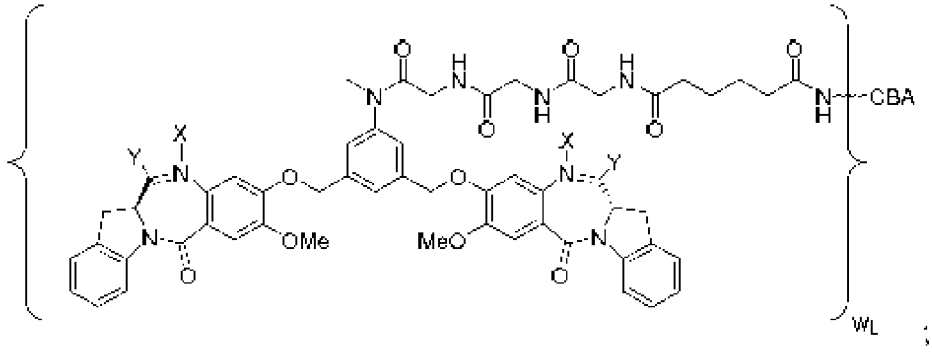
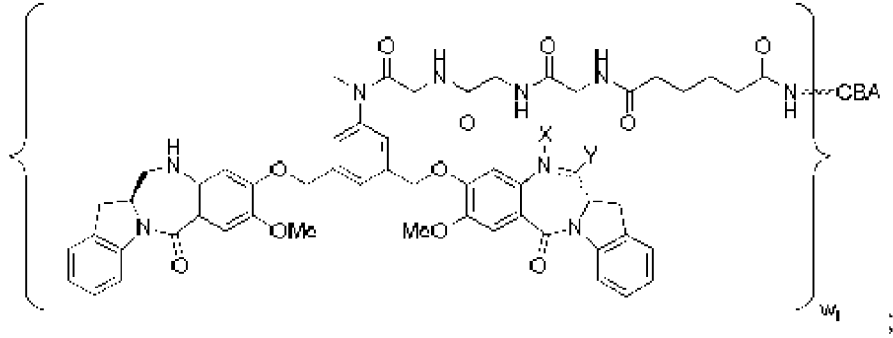
【0367】 在第六特定實施例中，Q為-SO<sub>3</sub>M；且其餘變數如以上在第一、第二、第四或第五特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

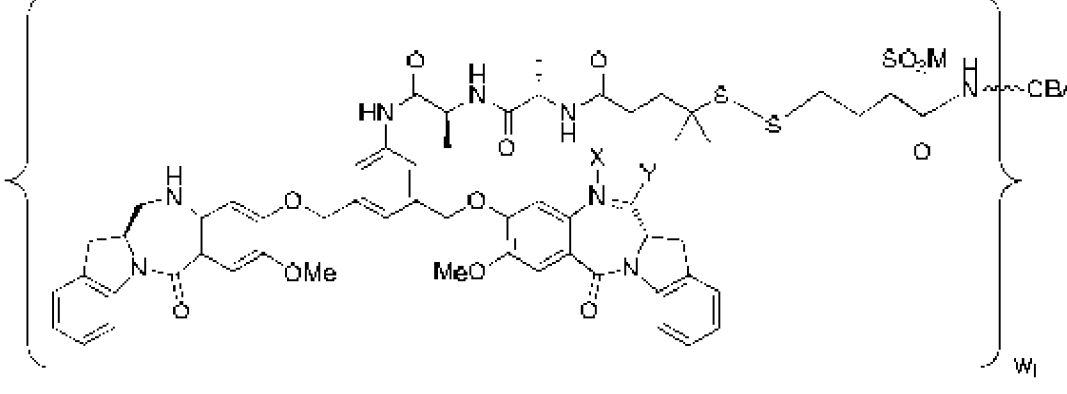
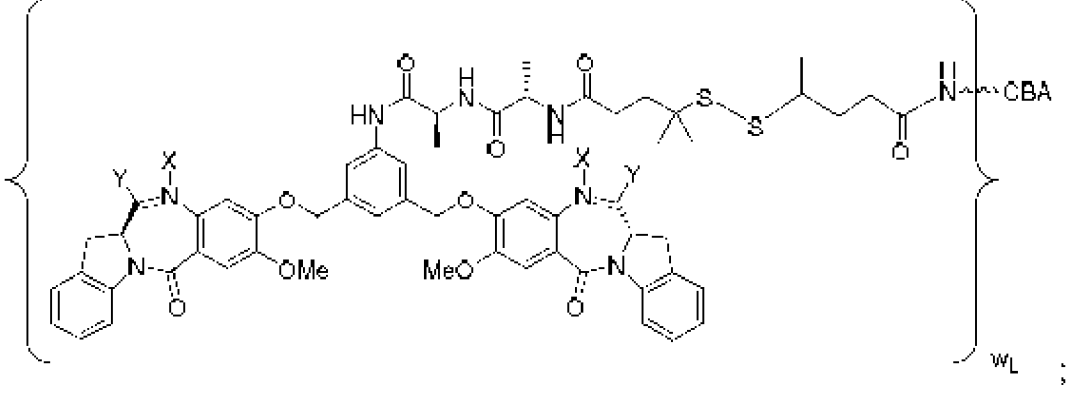
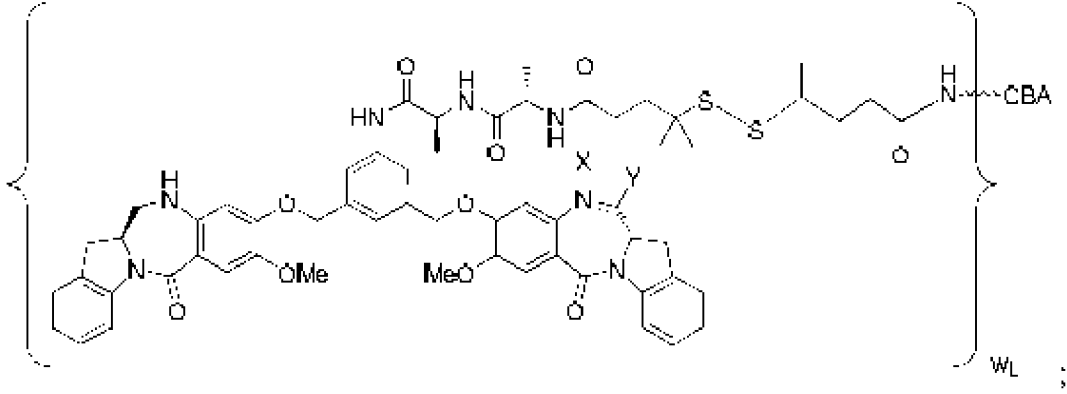
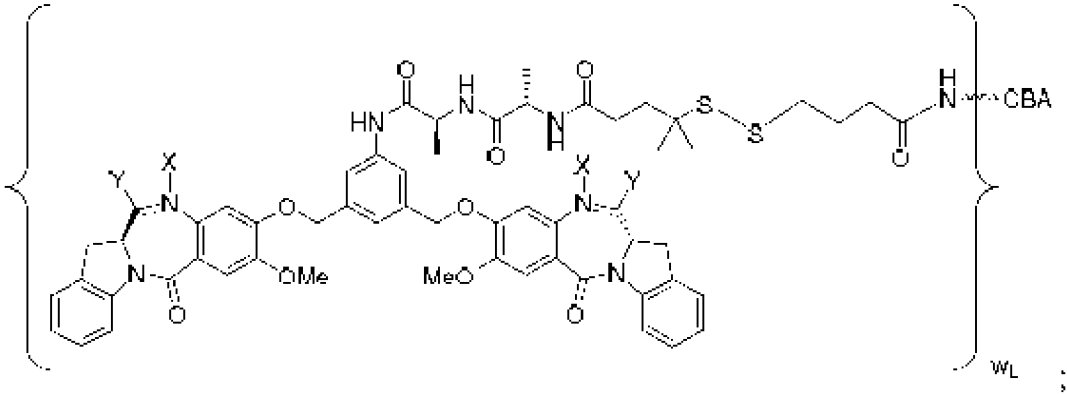
【0368】 在第七特定實施例中，第一實施例之免疫結合物由以下各式表示：

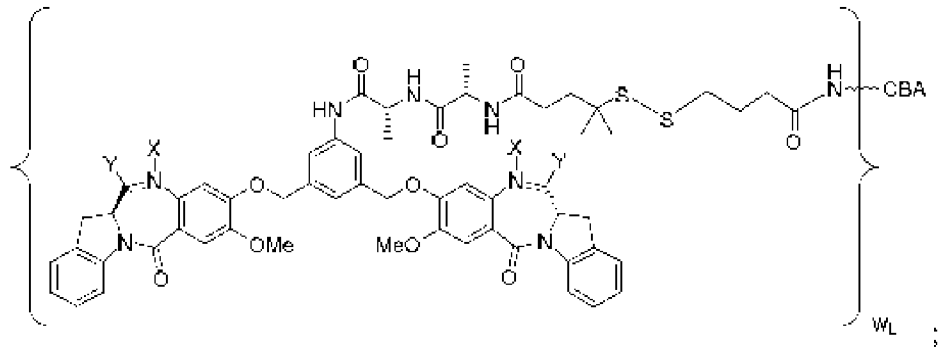
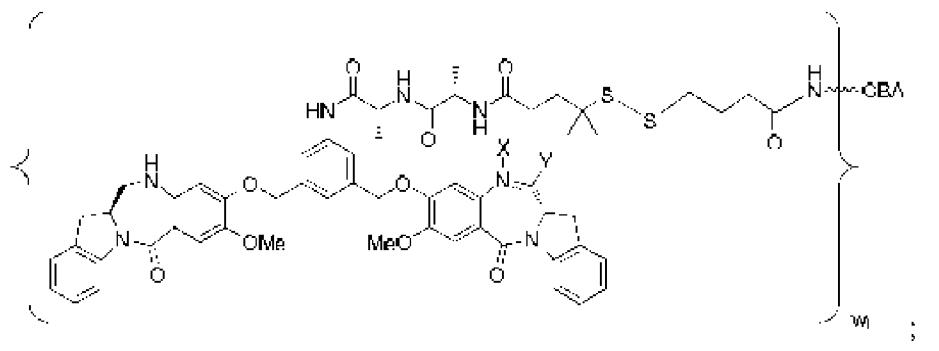
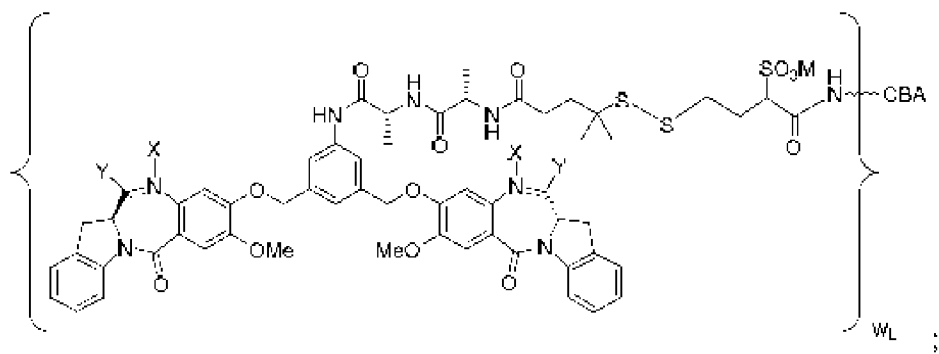
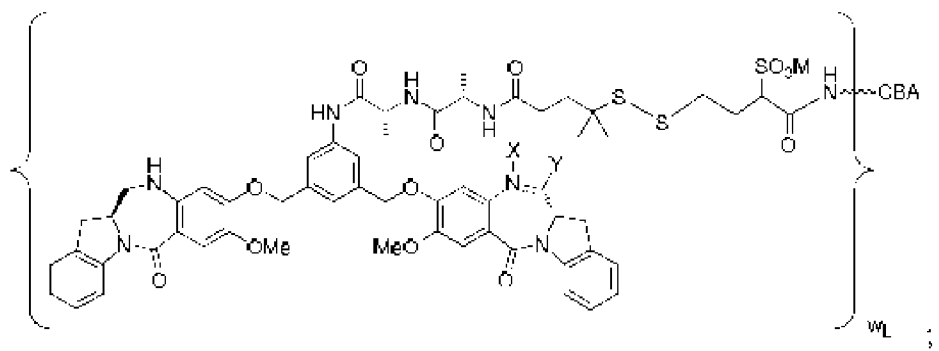
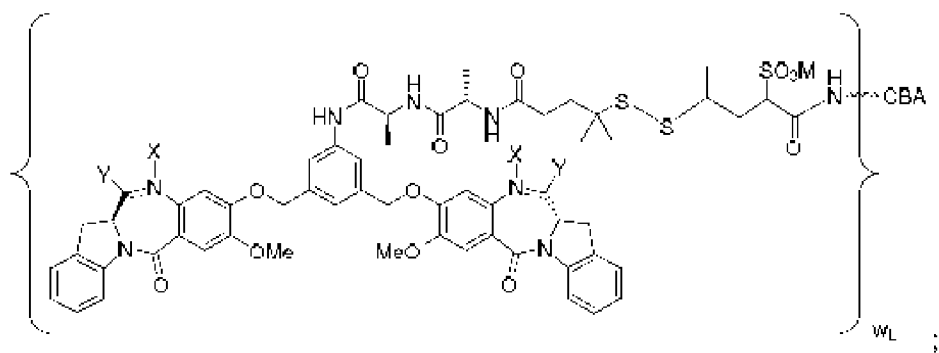


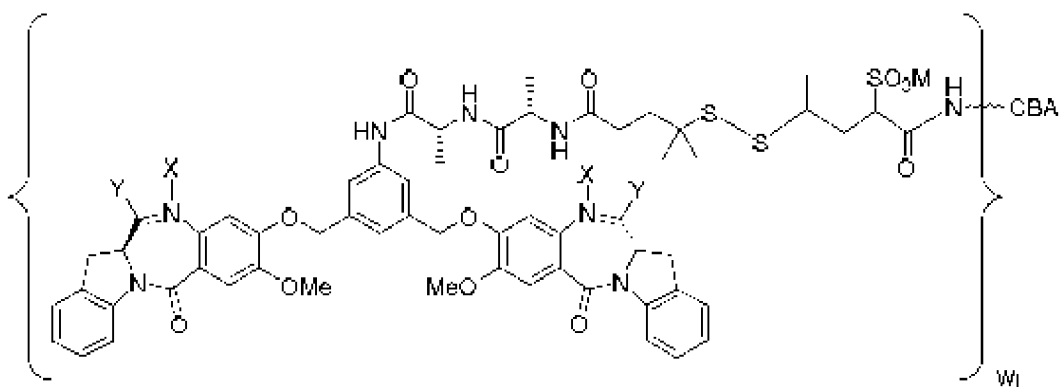
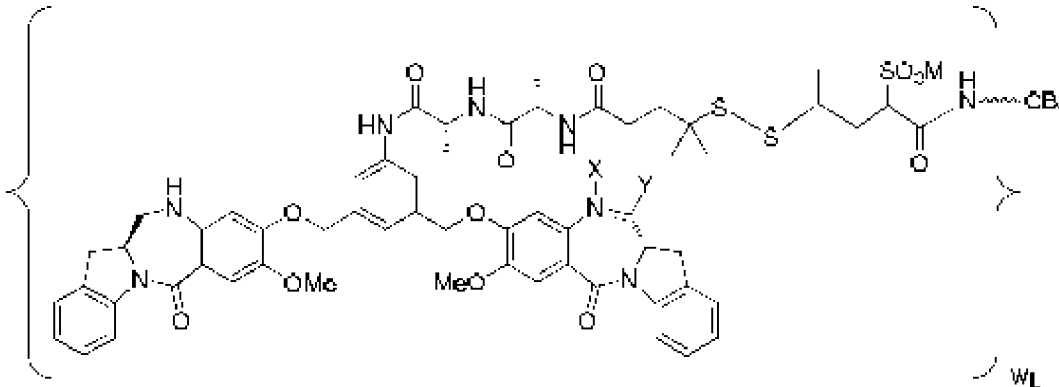
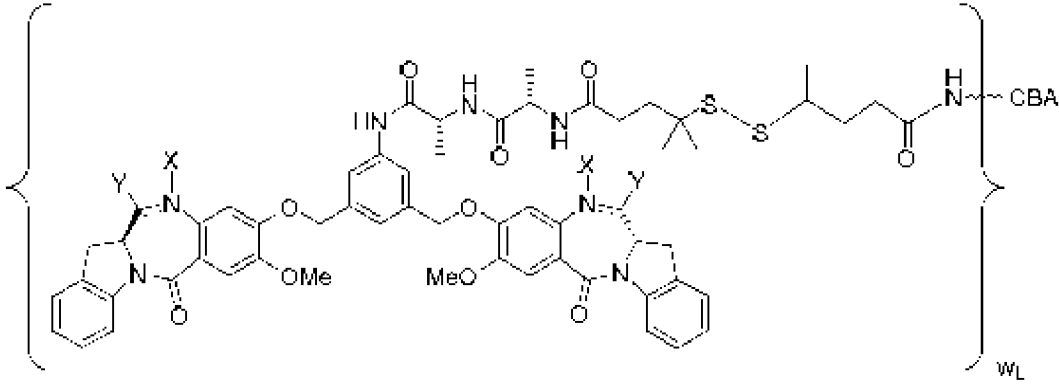
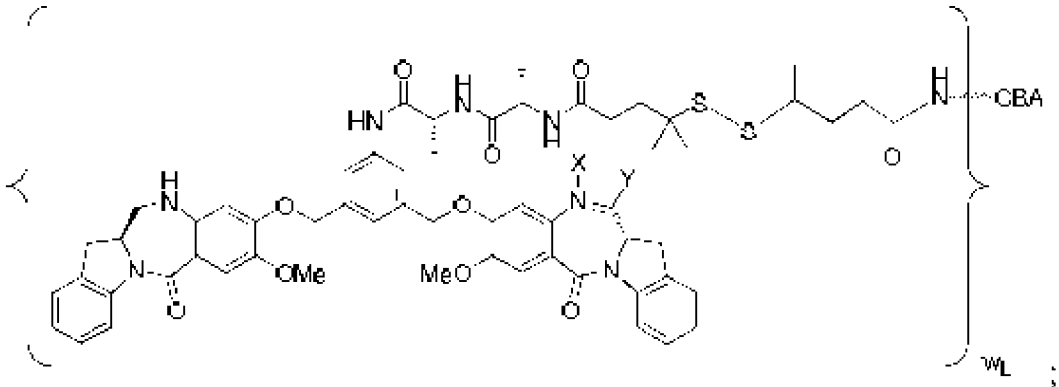




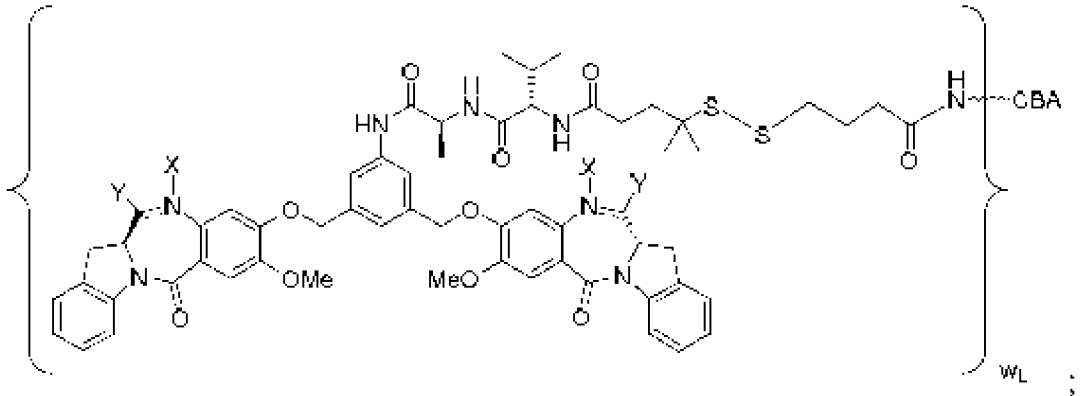
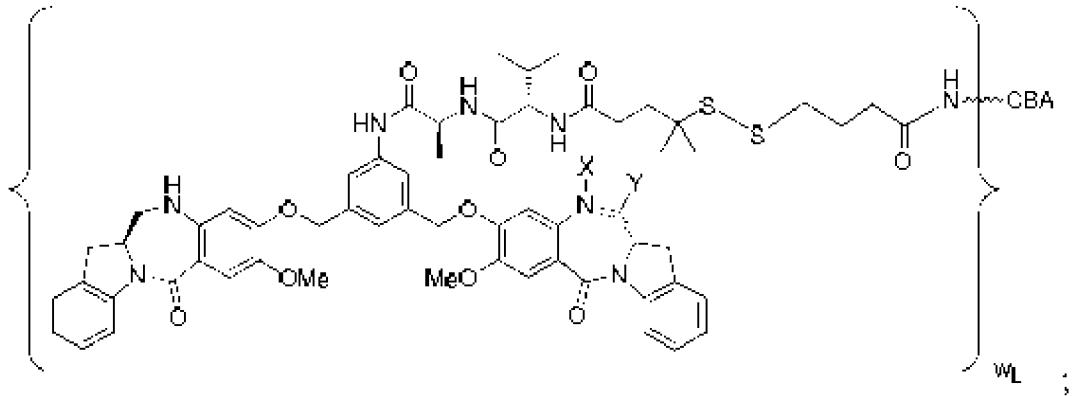
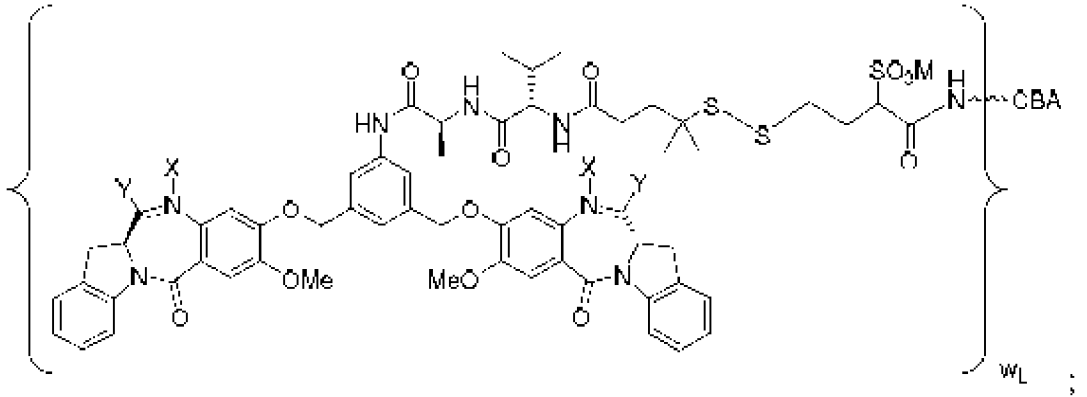
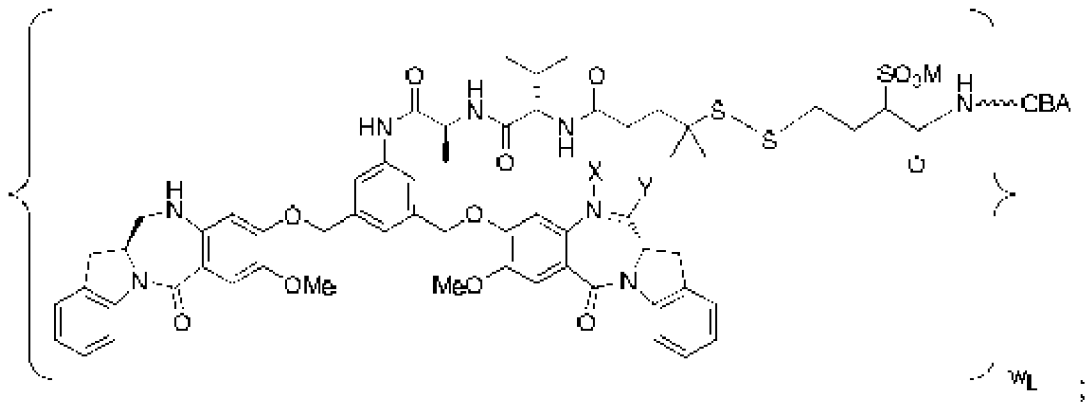












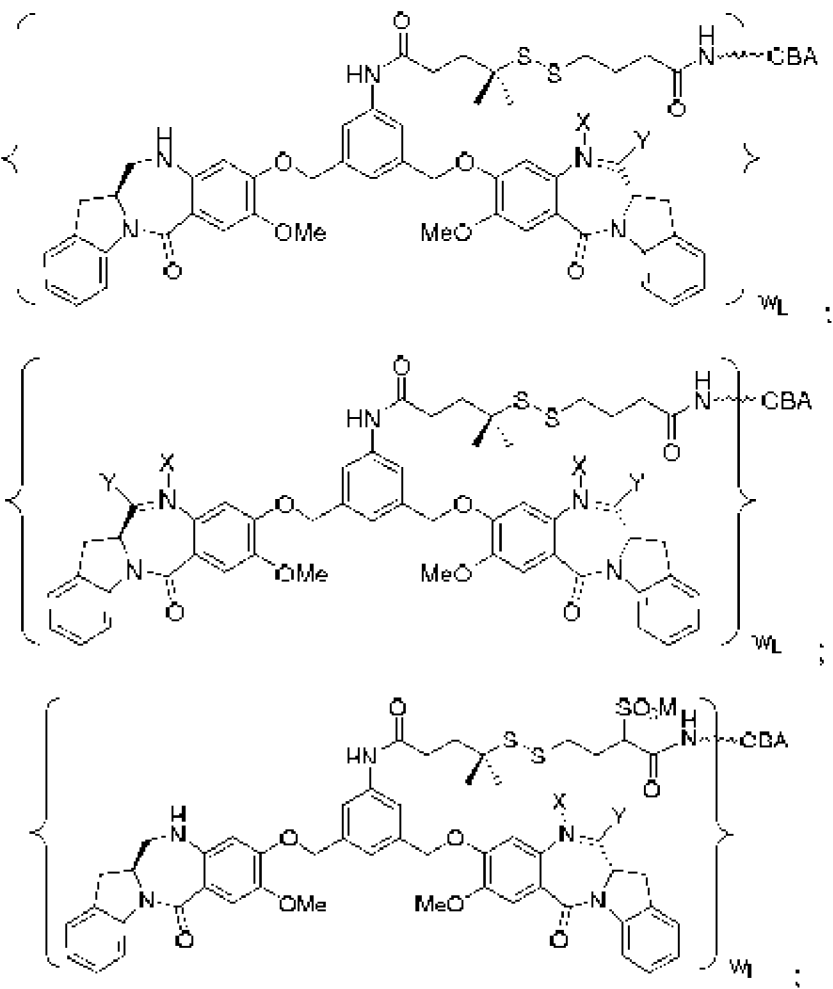


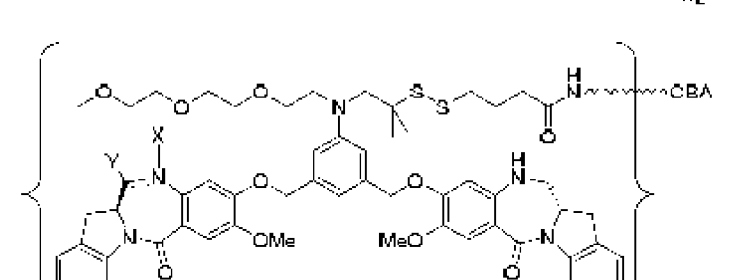
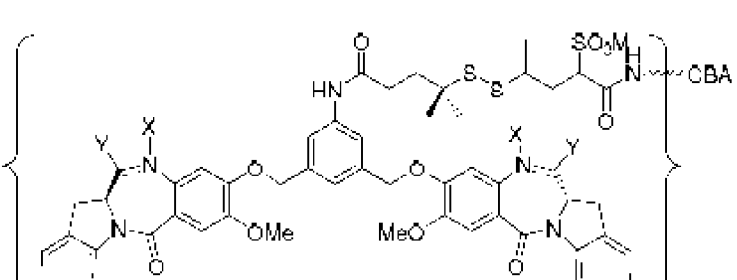
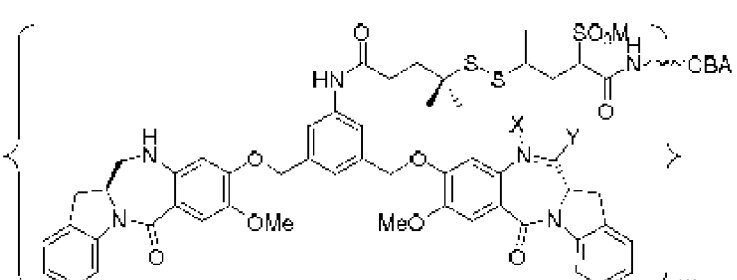
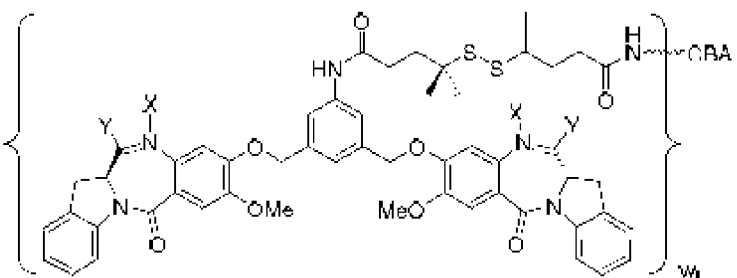
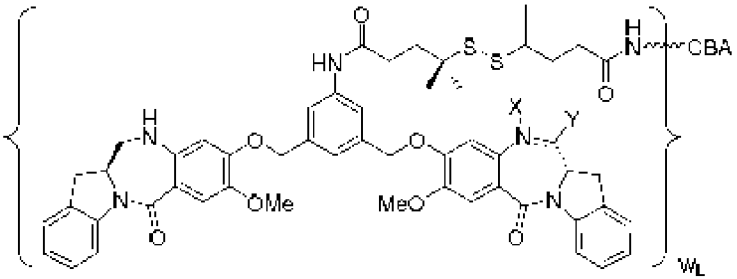
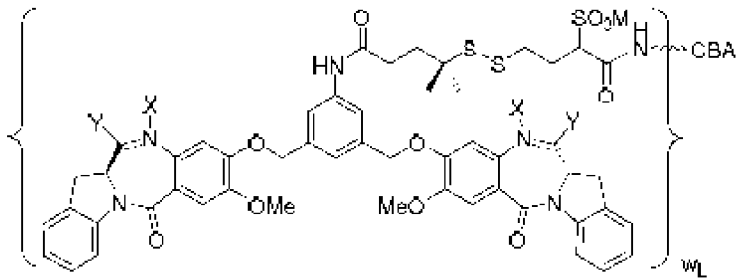






【0373】 在第十二特定實施例中，第一實施例之免疫結合物由以下各式表示：











$R_1$ 及 $R_2$ 均為H；且其餘變數如以上在第十三特定實施例中所描述。

【0376】 在第十五特定實施例中，對於式(L3)之免疫結合物， $m'$ 為2，且 $R_1$ 及 $R_2$ 均為Me；且其餘變數如以上在第十三特定實施例中所描述。

【0377】 在第十六特定實施例中，第一實施例之免疫結合物由以下各式表示：



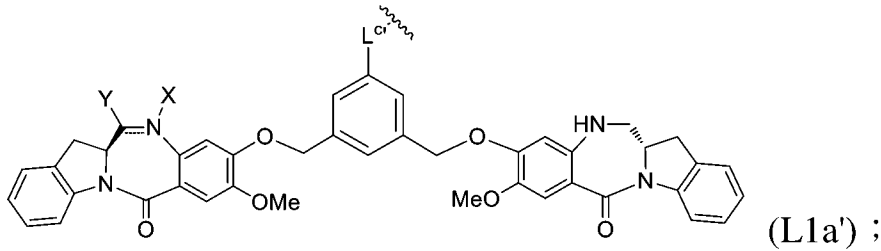
【0379】 在以上第一至第十七特定實施例中之任一者中，標的抗體或其抗原結合片段可允許六個輕鏈及重鏈CDR區中任一者中之一或多個(例如實質上所有或100%) Lys殘基由Arg取代。標的抗體或其抗原結合片段可包含具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列的免疫球蛋白重鏈可變區(HCVR)；及具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列的免疫球蛋白輕鏈可變區(LCVR)。標的抗體或其抗原結合片段亦可包含具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列的Ig HCVR；及具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列的Ig LCVR。標的抗體或其抗原結合片段可進一步包含具有SEQ ID NO: 32、34、38、39或40中所闡述之胺基酸序列的Ig HCVR；及具有SEQ ID NO: 33、35、37或41中所闡述之胺基酸序列的Ig LCVR。在某些實施例中，來自SEQ ID NO: 34之N末端的第二個殘基為Phe，而在某些其他實施例中，來自SEQ ID NO: 34之N末端的第二個殘基為Val。

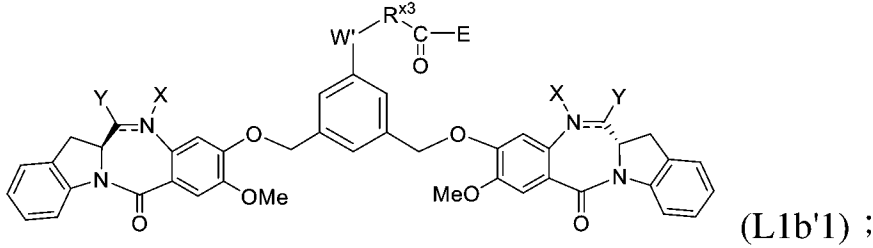
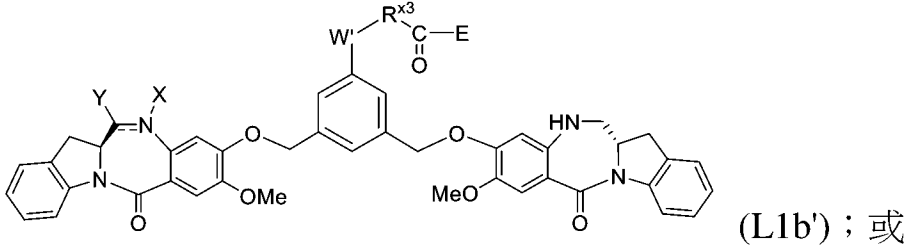
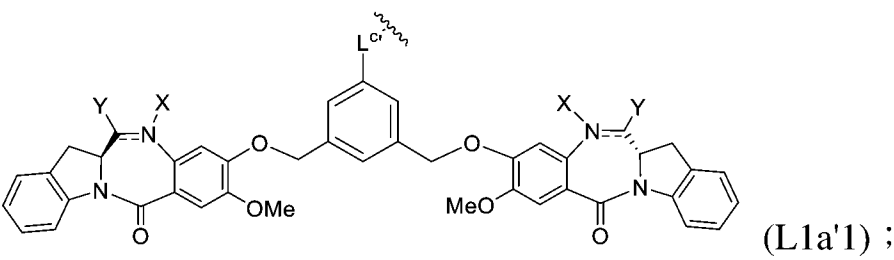
【0380】 第一實施例或其中所描述之任何特定實施例所描述之免疫結合物可根據此項技術中已知的任何方法來製備，參見例如WO 2012/128868及WO2012/112687，各案係以引用之方式併入本文中。

【0381】 在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第一種方法來製備，該方法包括使CBA與具有胺反應性基團之細胞毒性劑反應之步驟。

【0382】 在一個實施例中，對於以上所描述之第一種方法，該反應係在諸如NaHSO<sub>3</sub>之亞胺反應性試劑存在下進行。

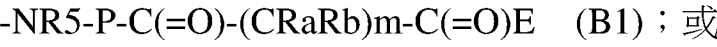
【0383】 在一個實施例中，對於以上所描述之第一種方法，具有胺反應性試劑之細胞毒性劑由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

LC'由以下各式表示：



C(=O)E為反應性酯基，諸如N-羥基琥珀醯亞胺酯、N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯、硝基苯基(例如2-硝基苯基或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(例如，2,4-二硝基苯基)酯、磺基四氟苯基(例如，4-磺基-2,3,5,6-四氟苯基)酯或五氟苯基酯，較佳N-羥基琥珀醯亞胺酯；

Zs由以下各式表示：



其餘變數如第一至第七及第十七特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0384】 在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第二種方法來製備，該方法包括以下步驟：

(a) 使細胞毒性劑與具有胺反應性基團及硫醇反應性基團之連接子化合物反應，以形成具有與其結合之胺反應性基團的細胞毒性劑-連接子化合物；及

(b) 使CBA與細胞毒性劑-連接子化合物反應。

【0385】 在一個實施例中，對於以上所描述之第二種方法，步驟(a)中之反應係在亞胺反應性試劑存在下進行。

【0386】 在一個實施例中，對於以上所描述之第二種方法，在未進行純化之情況下使細胞毒性劑-連接子化合物與CBA反應。或者，在與CBA反應之前首先對細胞毒性劑-連接子化合物進行純化。

【0387】 在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第三種方法來製備，該方法包括以下步驟：

(a) 使CBA與具有胺反應性基團及硫醇反應性基團之連接子化合物反應，以形成具有與其結合之硫醇反應性基團的經修飾之CBA；及

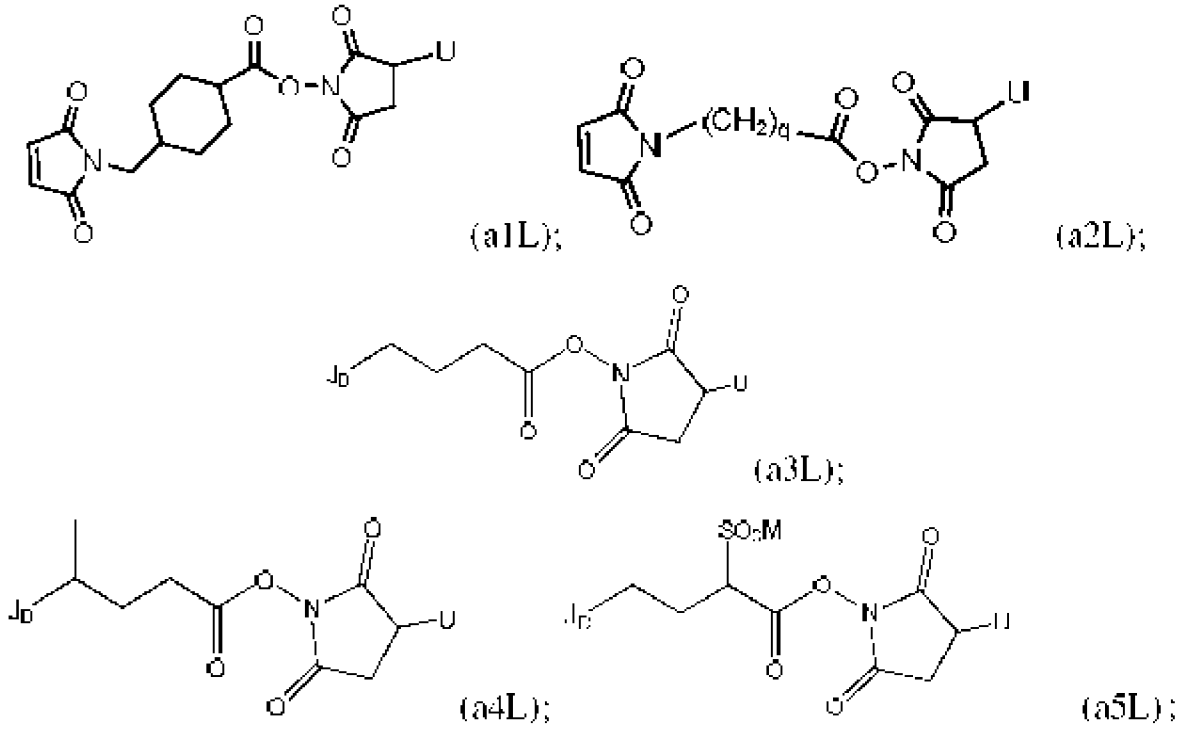
(b) 使該經修飾之CBA與細胞毒性劑反應。

【0388】 在一個實施例中，對於以上所描述之第三種方法，步驟(b)中之反應係在亞胺反應性試劑存在下進行。

【0389】 在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第四種方法來製備，該方法包括使CBA、細胞毒性化合物及具有胺反應性基團及硫醇反應性基團之連接子化合物反應之步驟。

【0390】 在一個實施例中，對於第四種方法，該反應係在亞胺反應性試劑存在下進行。

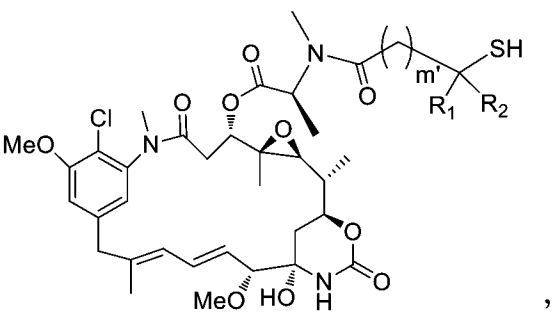
【0391】 在某些實施例中，對於以上所描述之第二、第三或第四實施例，具有胺反應性基團及硫醇反應性基團之連接子化合物由以下各式表示：







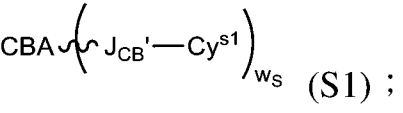




其中變數如以上在第十三至第十七特定實施例及其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0393】 在第二實施例中，本發明之免疫結合物包含本文中所描述之本發明第一態樣中所描述之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(包括抗體、其抗原結合片段，或包含該抗體或其抗原結合片段之多肽)(例如氧化之抗體或其抗原結合片段，或其多肽)，其經由位於氧化CD123結合劑上之一或多個醛基而共價連接於本文中所描述之細胞毒性劑。位於氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑上之醛基可藉由使CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑之一或多個2-羥基乙胺部分氧化而產生，其中該2-羥基乙胺部分為絲胺酸、酰胺酸、羥基離胺酸、4-羥基鳥胺酸或2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基之一部分。在一個實施例中，醛基可藉由使位於CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑上之一或多個N末端絲胺酸殘基(例如，輕鏈及/或重鏈N末端上之1、2、3或至多4個Ser殘基)之2-羥基乙胺部分氧化來產生。

【0394】 在第二實施例之第一特定實施例中，本發明之免疫結合物由下式表示：



其中：

CBA為本發明之第一態樣中所描述之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如上文中所描述之標的氧化抗體或其抗原結合片段，或以上所描述之其標的氧化多肽)；

WS為1、2、3或4；

JCB'為藉由使CBA上之醛基與Cys1上之醛反應性基團反應而形成的部分，



R<sub>5</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

P為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

Zd1為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

R<sub>9</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時獨立地為-H、(C1-C3)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

r及r'獨立地為1至6之整數；

W'為-NRe'；

Re'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sub>k</sub>；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x3</sub>為(C1-C6)烷基；

L為-NR<sub>9</sub>-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>r''</sub>或不存在；且

r''為0至6之整數。

【0395】 在第二特定實施例中，對於式(S1)之免疫結合物，Cy<sup>s1</sup>由式(S1a)或(S1a1)表示；且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。

【0396】 在第三特定實施例中，對於式(S1)之免疫結合物，Cy<sup>s1</sup>由式(S1b)或(S1b1)表示；且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。更特定言之，R<sup>x3</sup>為(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)烷基。

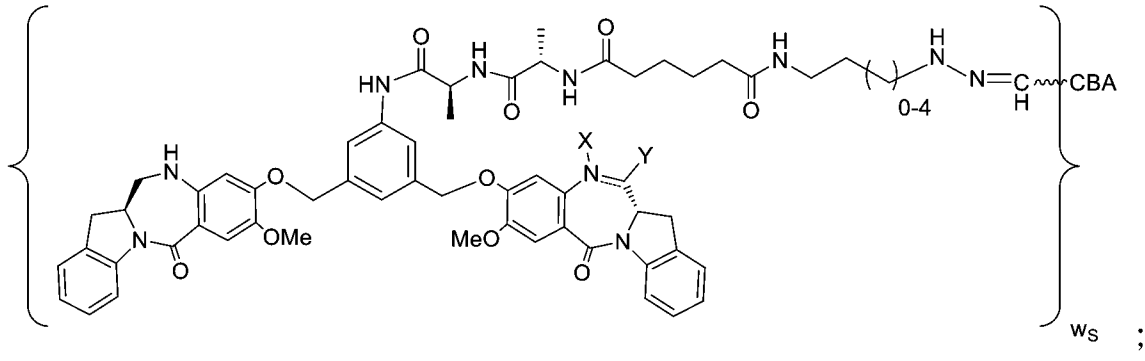
【0397】 在第四特定實施例中，對於式(S1)之免疫結合物，R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>均為H，且R<sub>5</sub>及R<sub>9</sub>均為H或Me；且其餘變數如以上在第一或第二特定實施例中所描述。

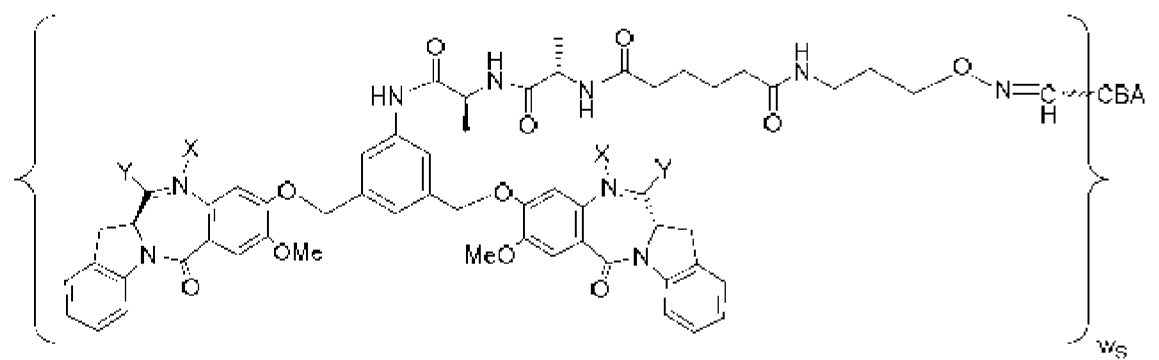
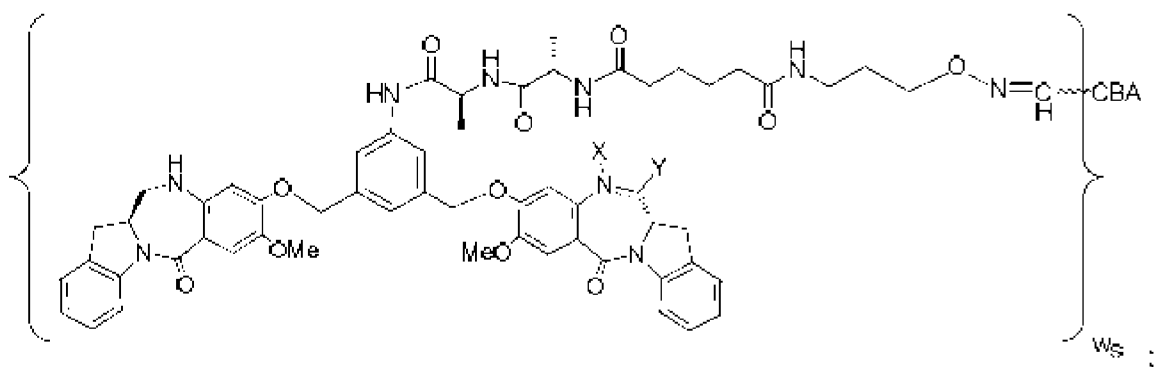
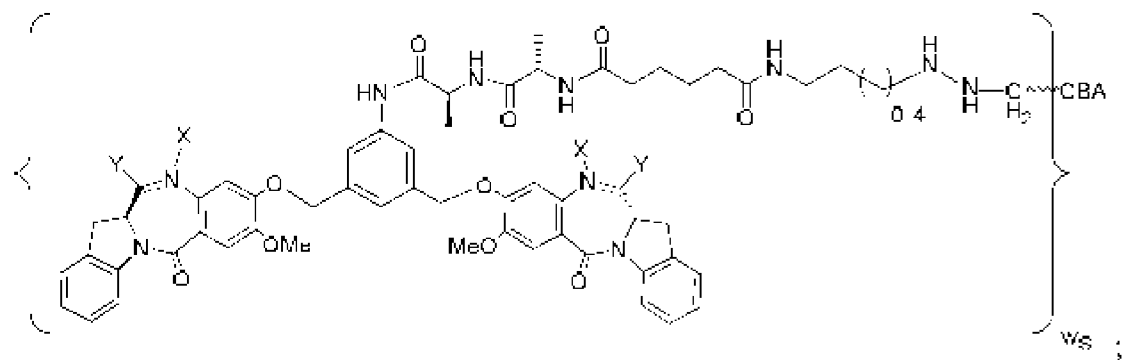
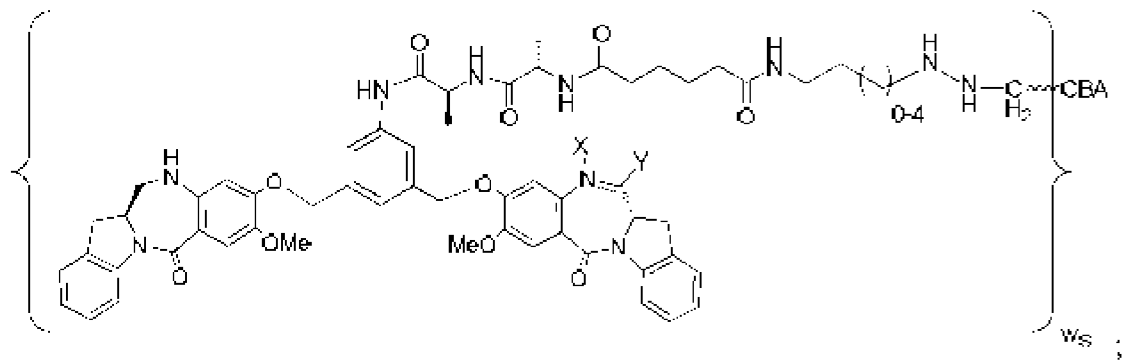
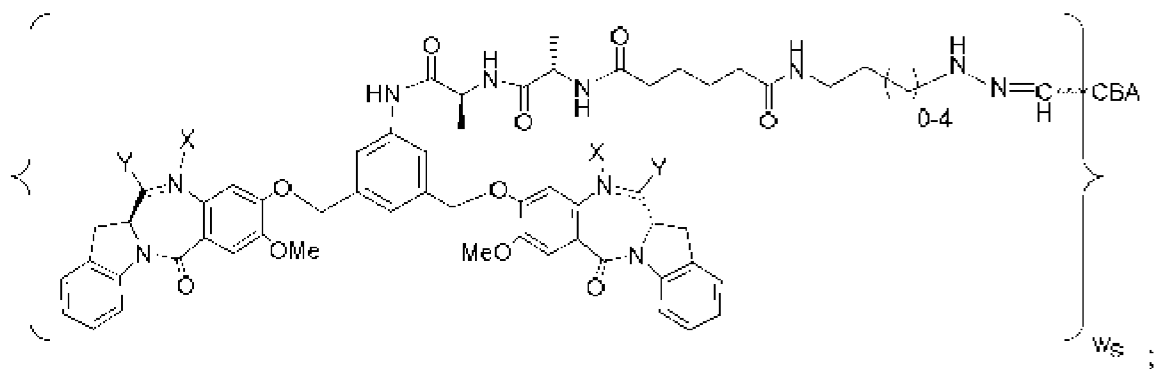
【0398】 在第五特定實施例中，對於式(S1)之免疫結合物，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數如以上在第一、第二或第四特定實施例中所描述。在一更特定實施例中，P係選自由以下各項組成之群：Gly-Gly-Gly、Ala-Val、

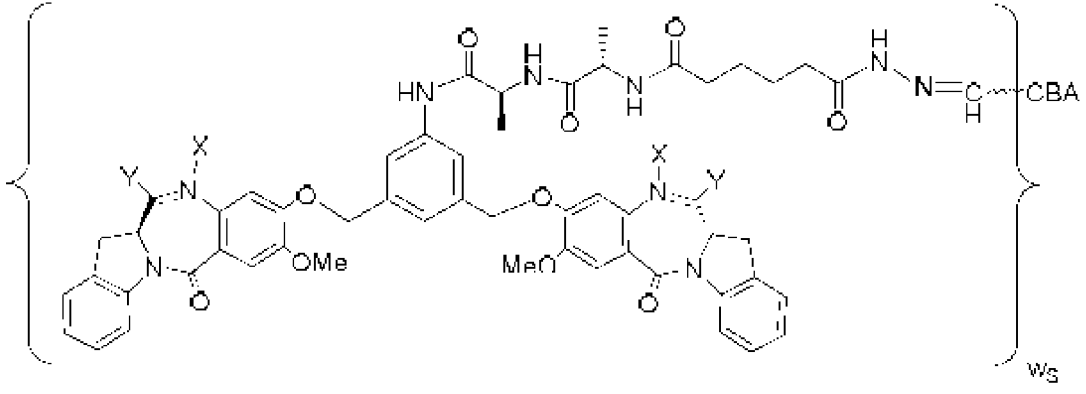
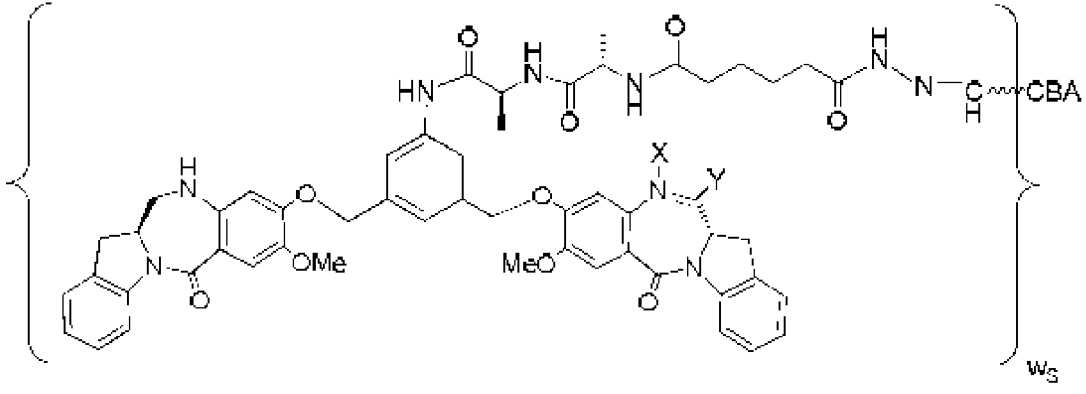
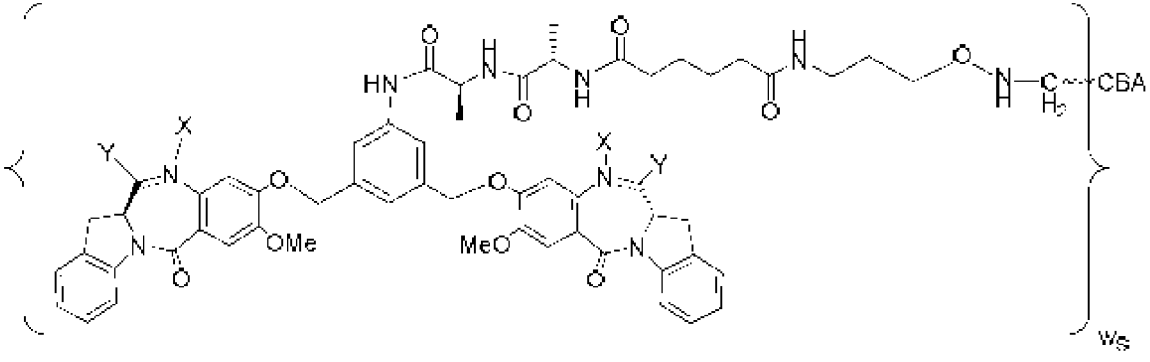
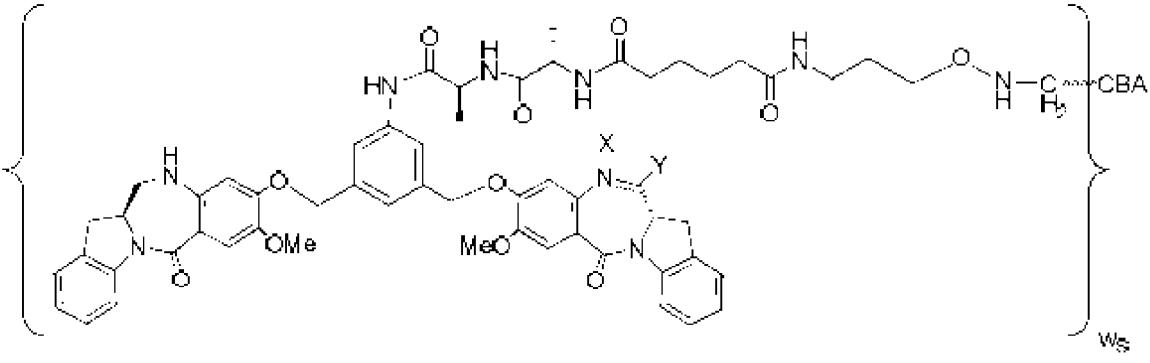
Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。甚至更特定言之，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【0399】 在第六特定實施例中，對於式(S1)之免疫結合物，Q為-SO<sub>3</sub>M；且其餘變數如以上在第一、第二、第四或第五特定實施例中所描述。

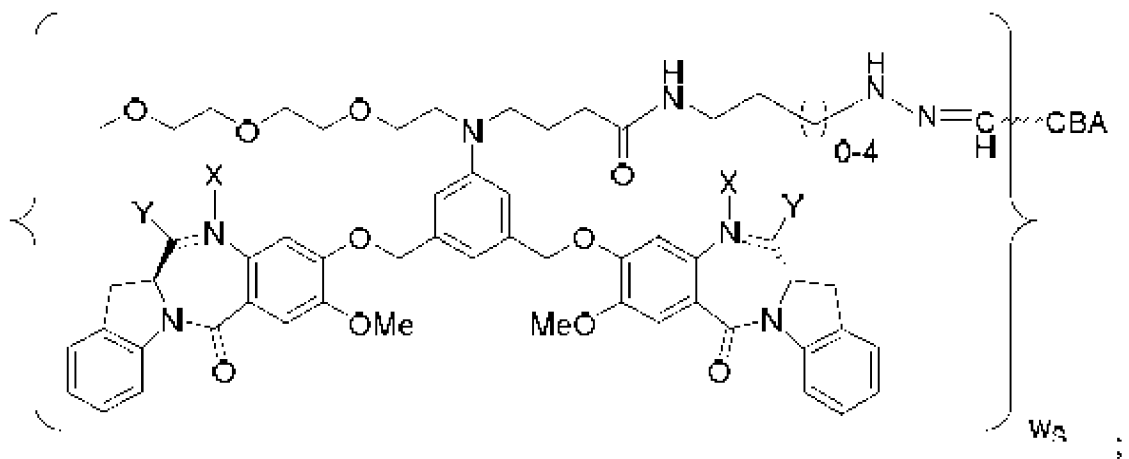
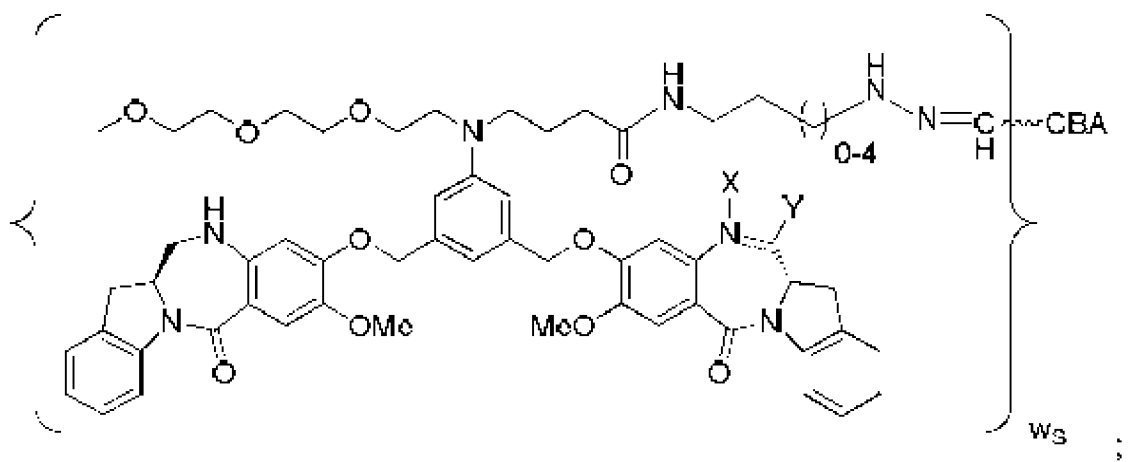
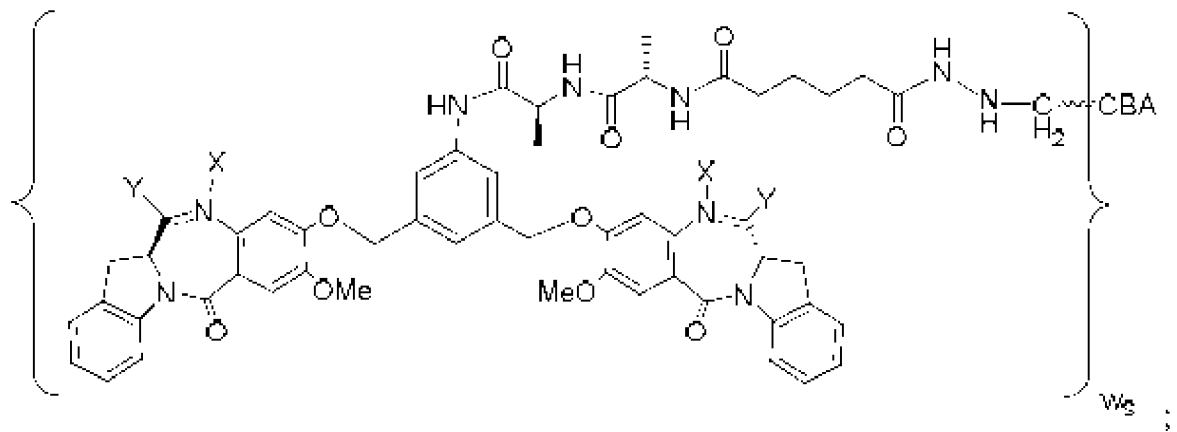
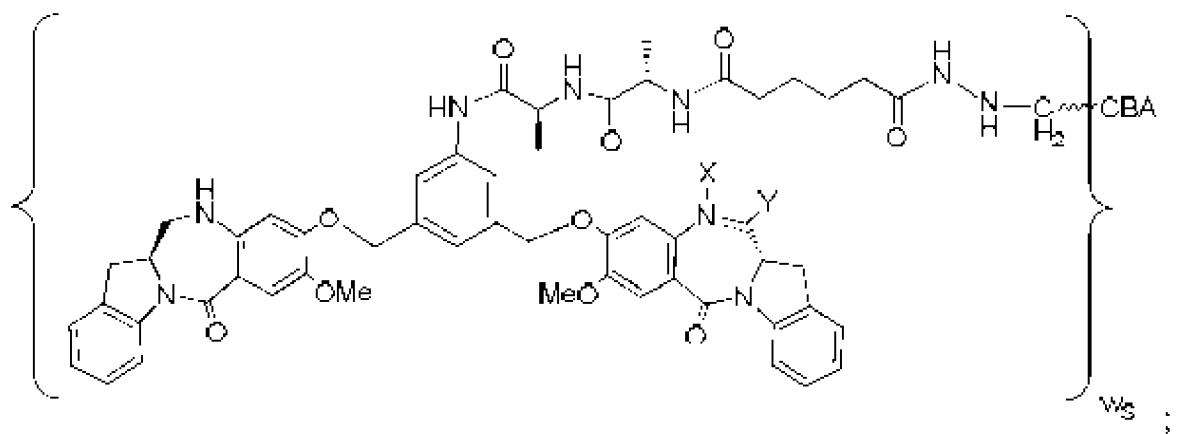
【0400】 在第七特定實施例中，第二實施例之免疫結合物由以下各式表示：

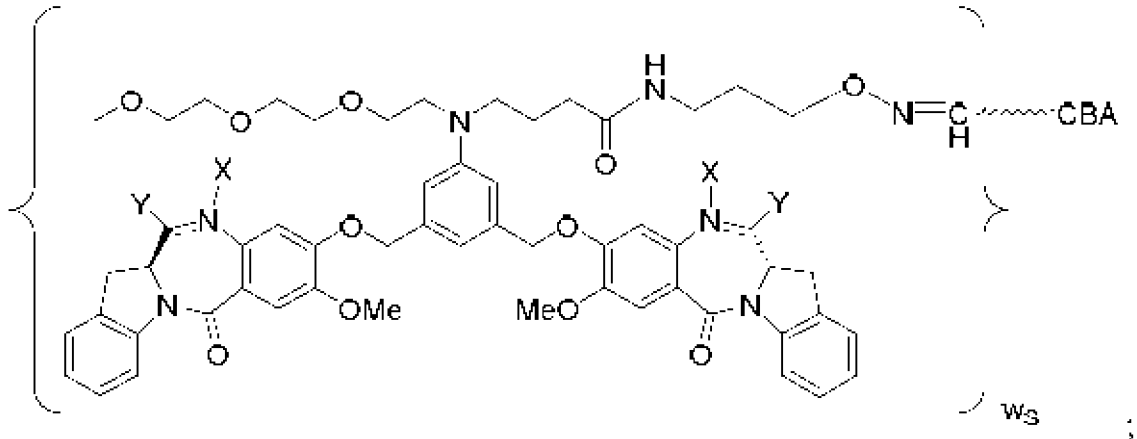
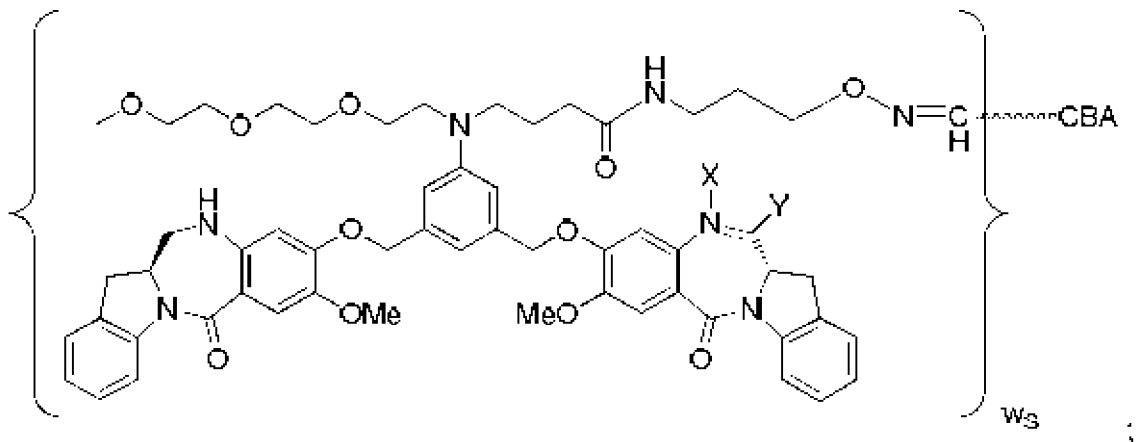
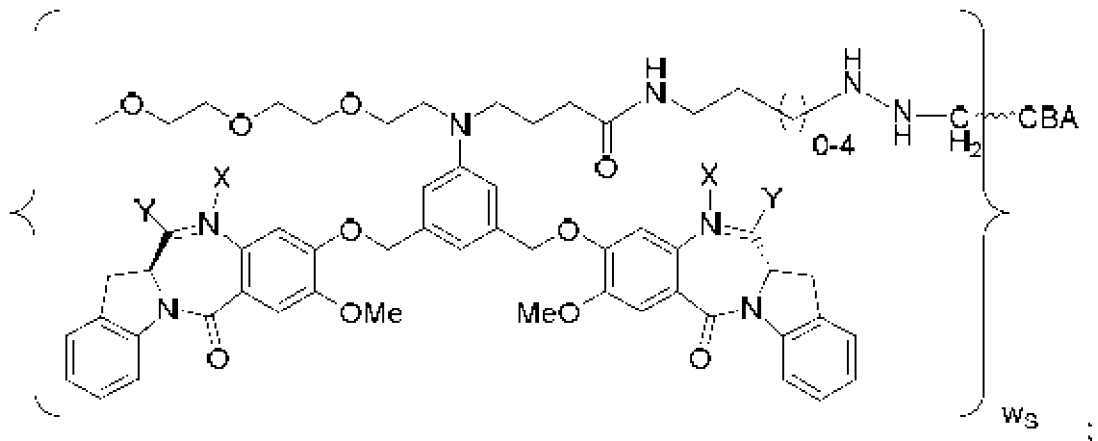
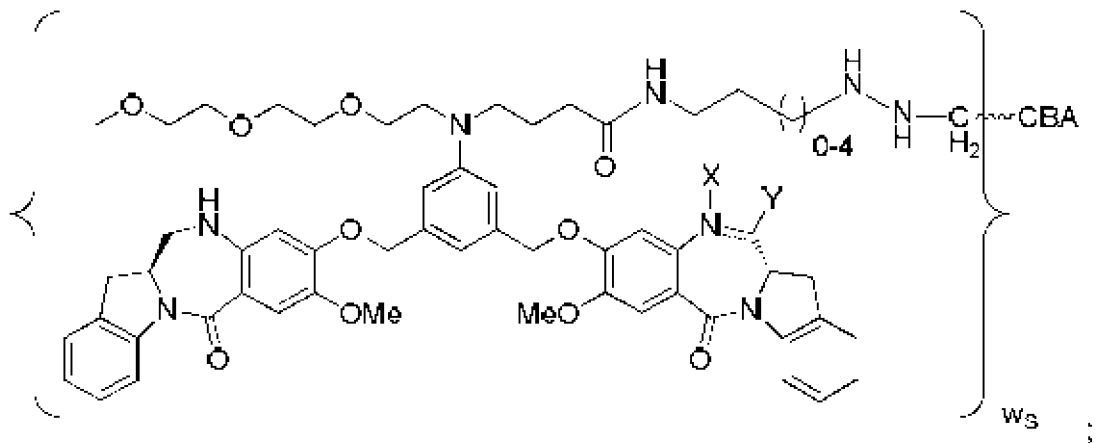


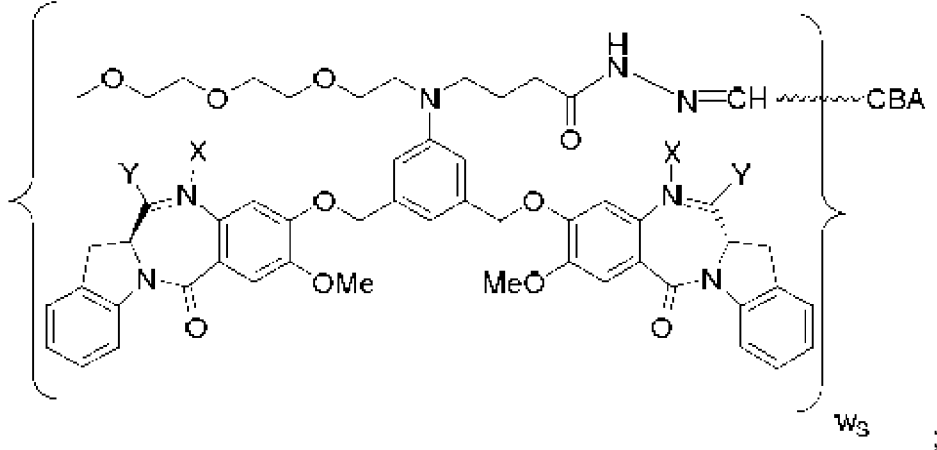
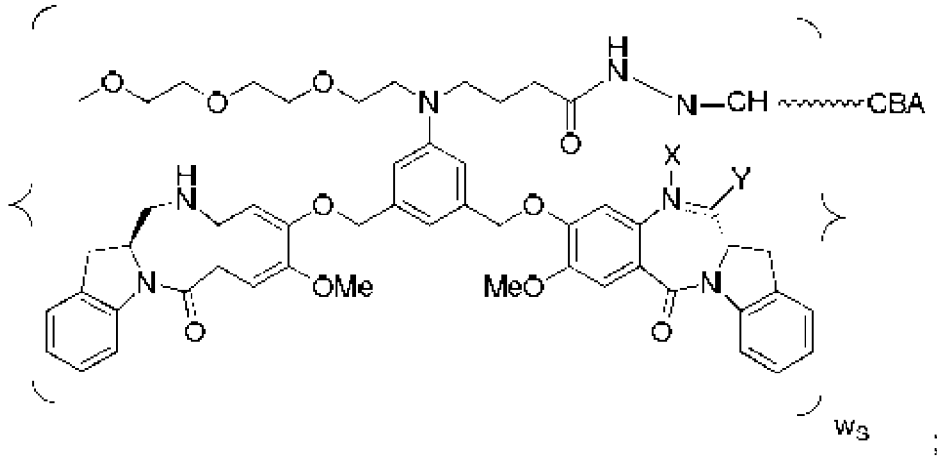
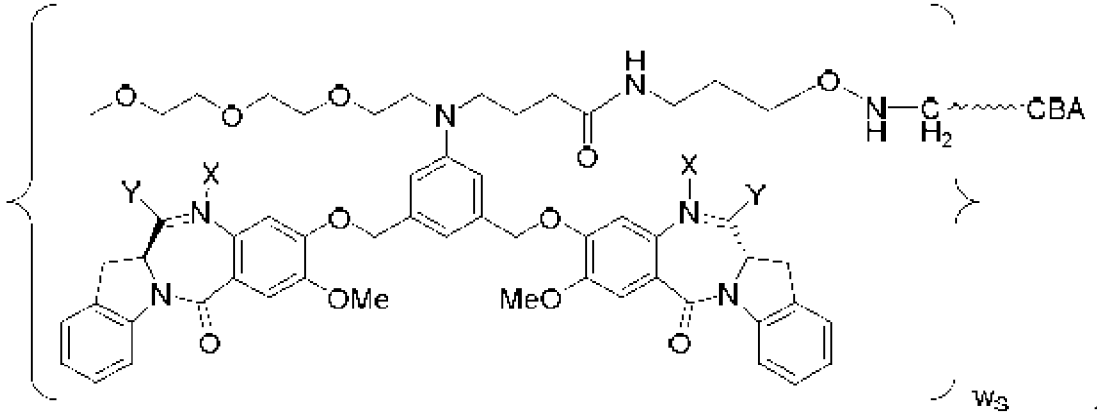
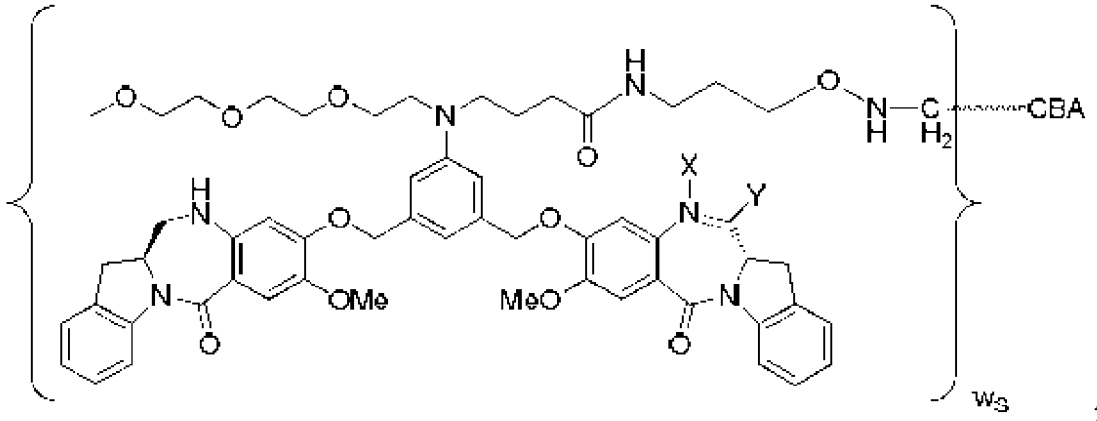






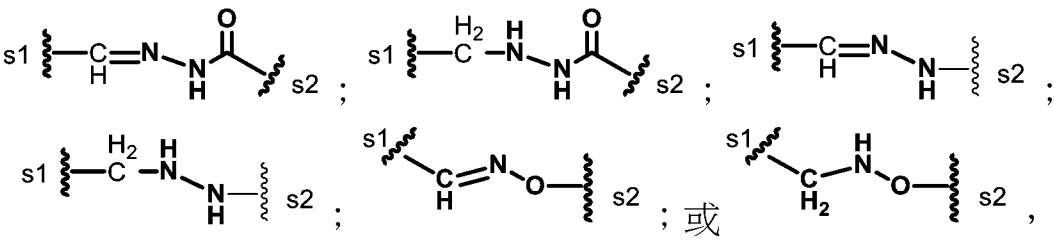






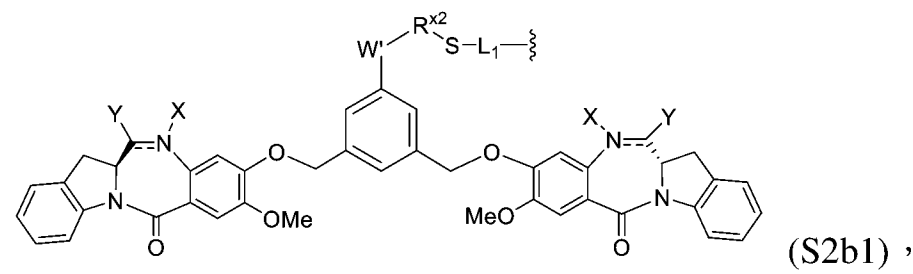
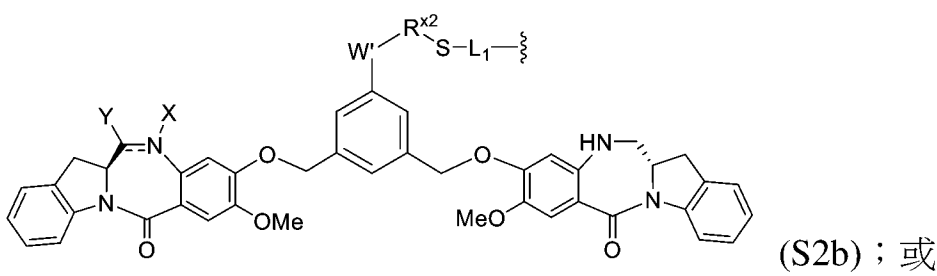
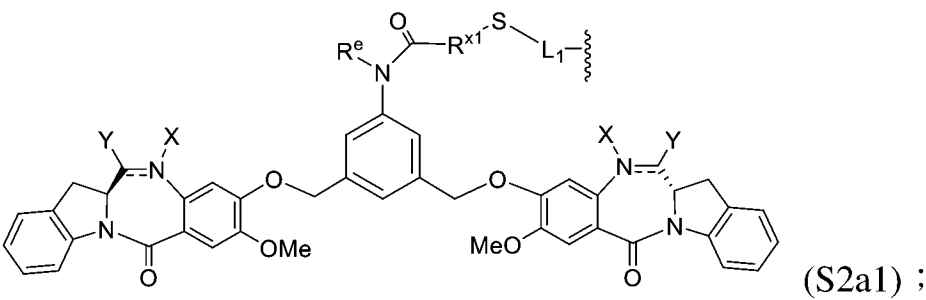
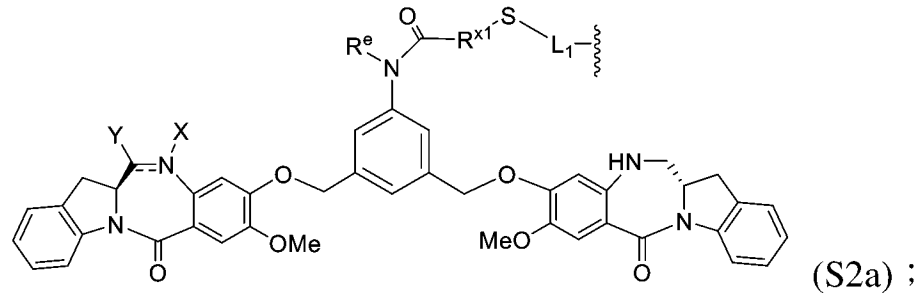


JCB'為藉由使CBA上之醛基與Cys2上之醛反應性基團反應而形成的部分，  
且由以下各式表示：



其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cys2共價連接之位點；

Cys2由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X

不存在且Y為-H或(C1-C4)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>x1</sub>為(C1-C6)烷基；

Re為-H或(C1-C6)烷基；

W'為-NRe'；

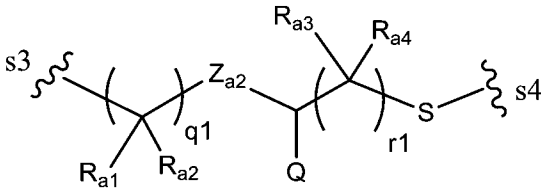
Re'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sub>k</sub>；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x2</sub>為(C1-C6)烷基；

L1由下式表示：



其中：

s<sub>3</sub>為與基團JCB'共價連接之位點；

s<sub>4</sub>為與Cys2上之-S-基團共價連接之位點；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

R<sub>9</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>不均為0。

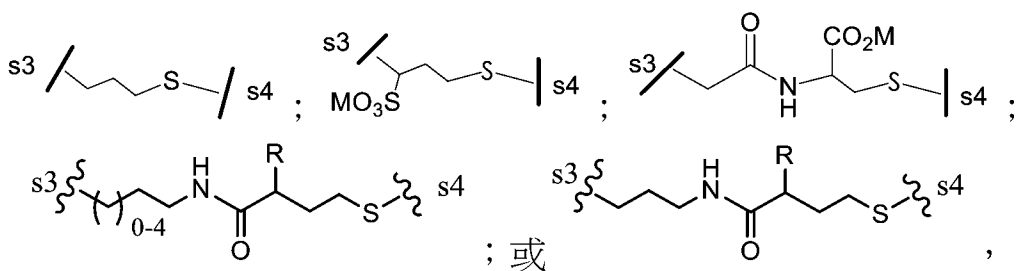
**【0402】** 在一更特定實施例中，Z<sub>a2</sub>不存在；q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>各自獨立地為0至3之整數，其限制條件為q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>不均為0；且其餘變數如以上在第八特定實施例中所描述。甚至更特定言之，R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>均為-H。

【0403】 在另一更特定實施例中， $Z_{a2}$ 為-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-； $q1$ 及 $r1$ 各自獨立地為1至6之整數；且其餘變數如以上在第八特定實施例中所描述。甚至更特定言之， $R_{a1}$ 、 $R_{a2}$ 、 $R_{a3}$ 、 $R_{a4}$ 均為-H。

【0404】 在第九特定實施例中，對於式(S2)之免疫結合物， $Cy^{s2}$ 由式(S2a)或(S2a1)表示；且其餘變數如以上在第八特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

【0405】 在第十特定實施例中，對於式(S2)之免疫結合物， $Cy^{s2}$ 由式(S2b)或(S2b1)表示；且其餘變數如以上在第八特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

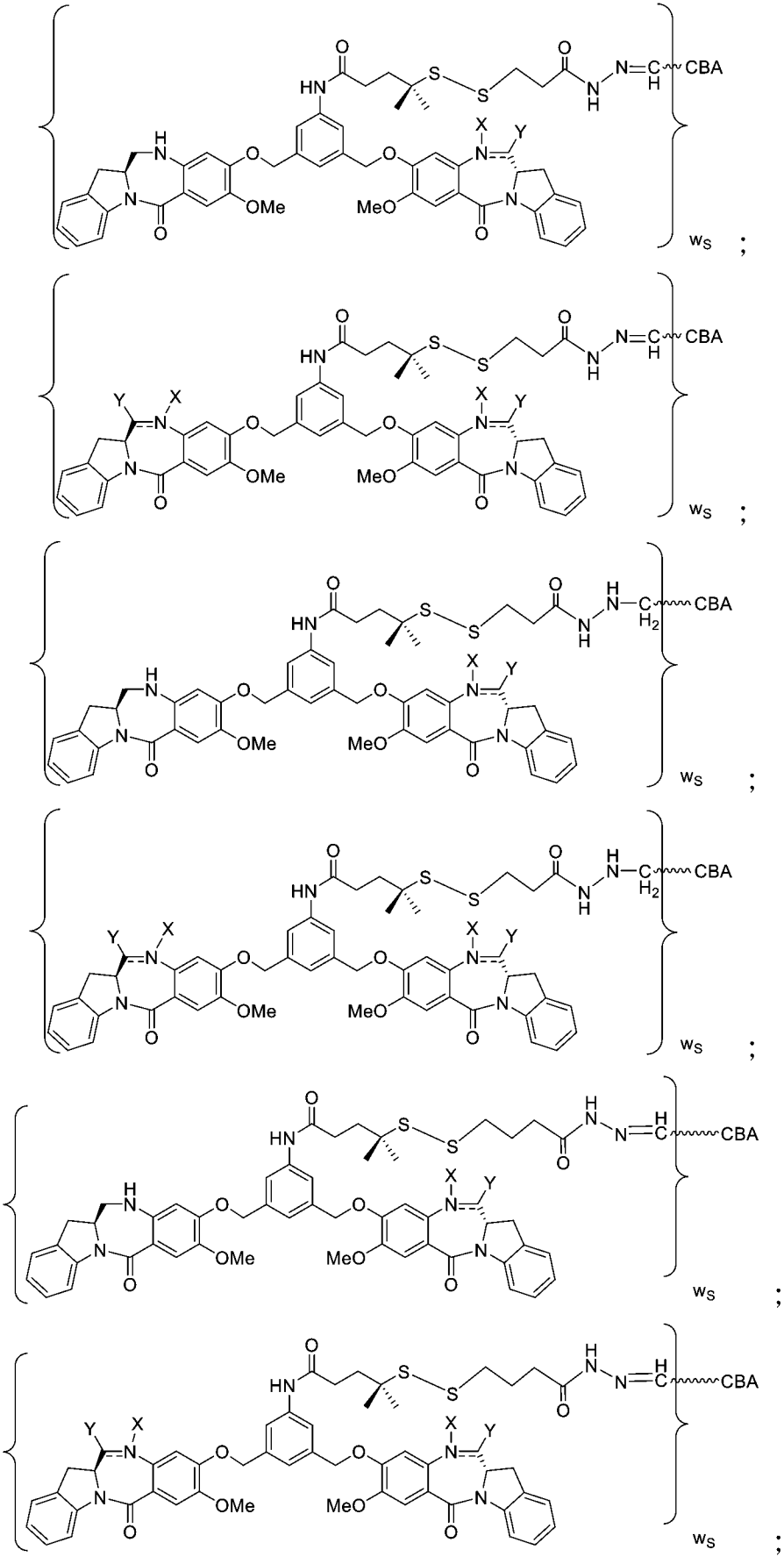
【0406】 在第十一特定實施例中，對於式(S2)之免疫結合物， $-L_1-$ 由以下各式表示：



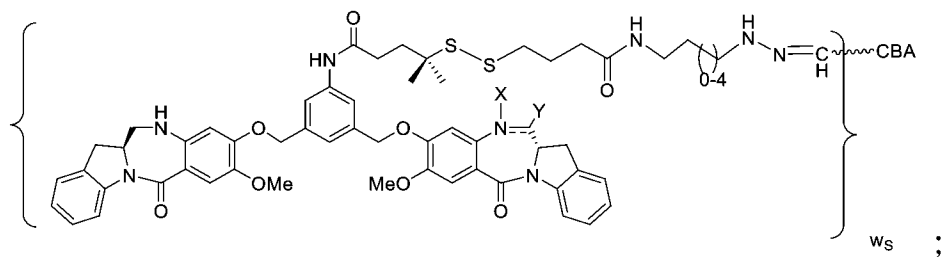
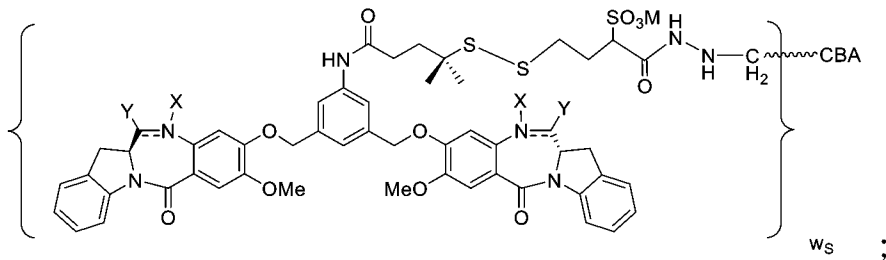
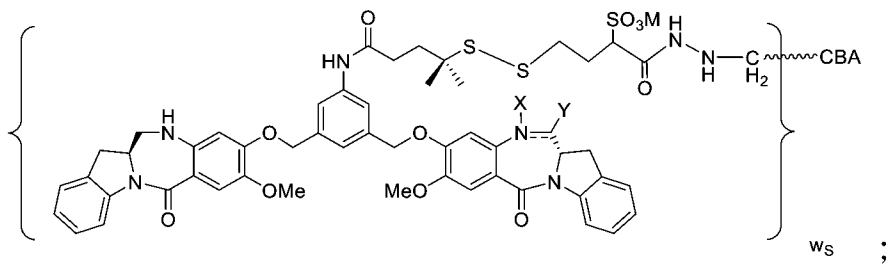
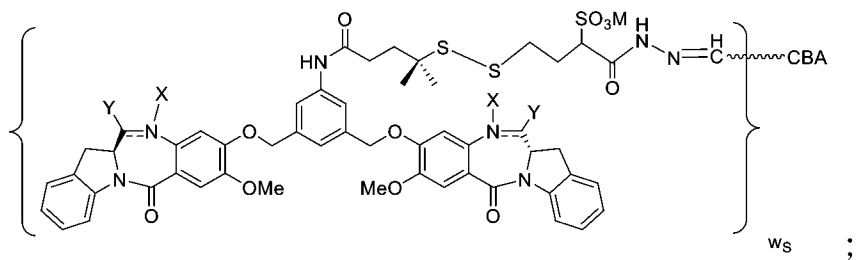
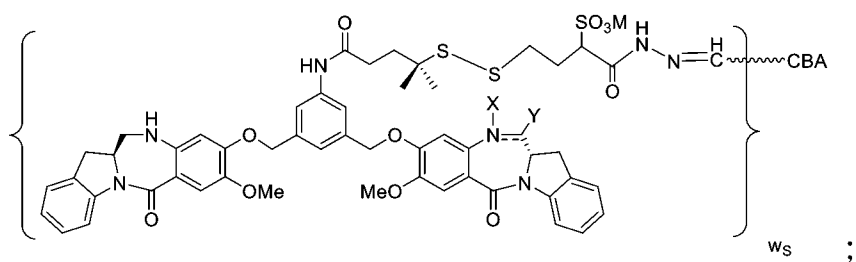
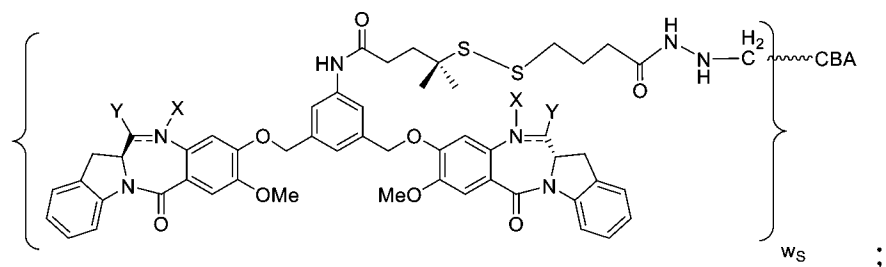
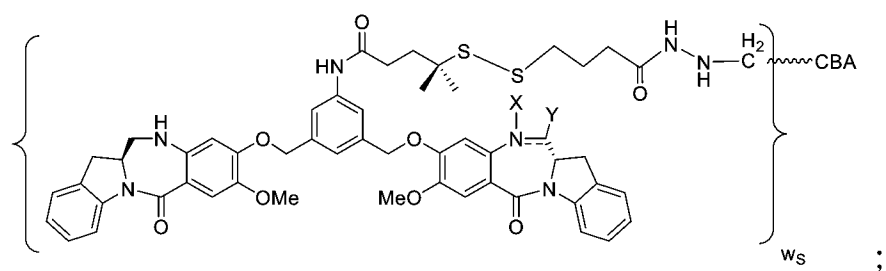
或其醫藥學上可接受之鹽，其中 $R$ 為H或-SO<sub>3</sub>M；且其餘變數如以上在第八、第九或第十特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

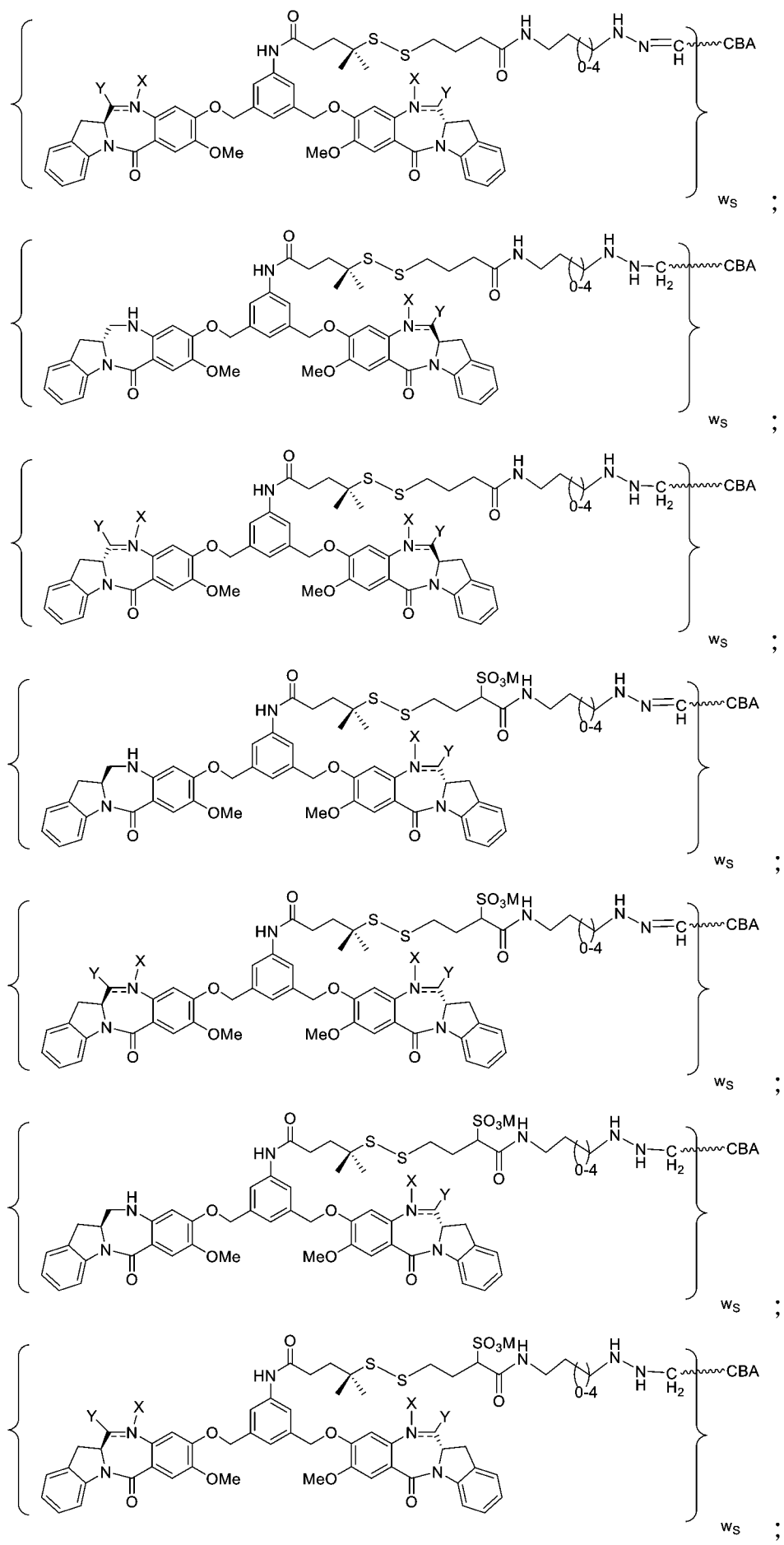
【0407】 在第十二特定實施例中，對於式(S2)之免疫結合物， $R^e$ 為H或Me；且 $R^{x1}$ 為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，且 $R^{x2}$ 為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，其中 $R^f$ 及 $R^g$ 各自獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且 $p$ 為0、1、2或3。更特定言之， $R^f$ 與 $R^g$ 相同或不同且係選自-H及-Me。

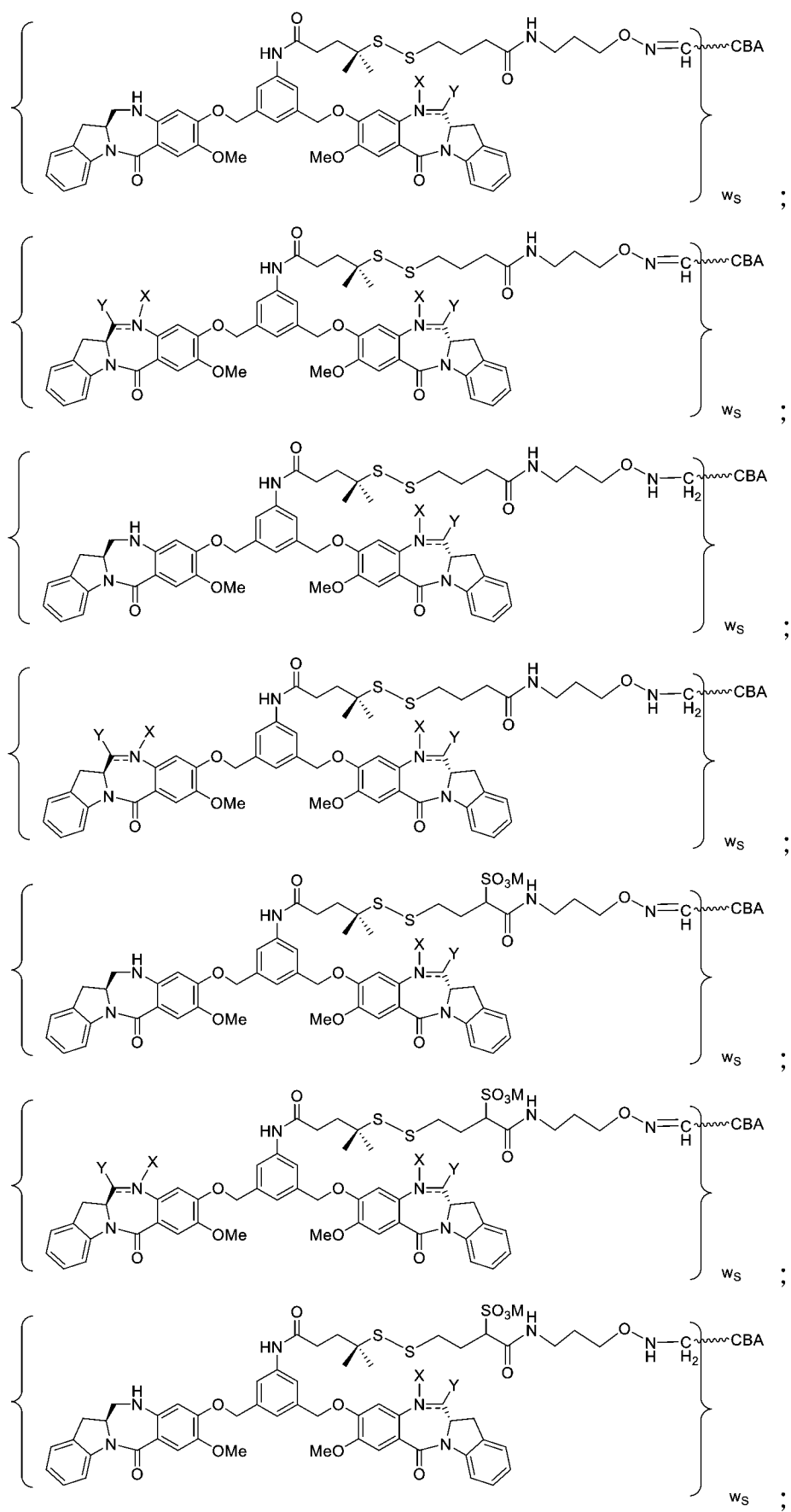
【0408】 在第十三特定實施例中，第二實施例之免疫結合物由以下各式表示：

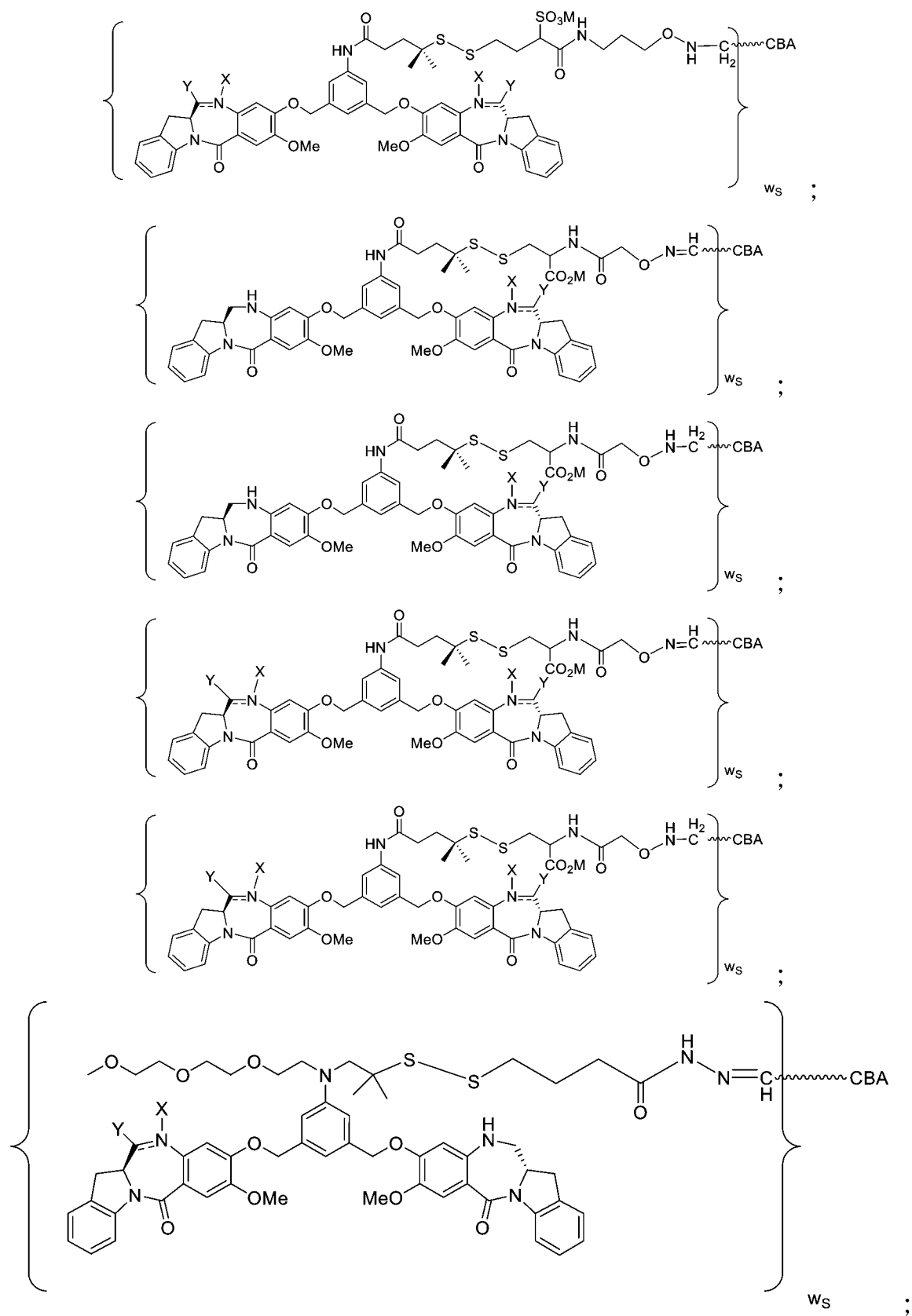


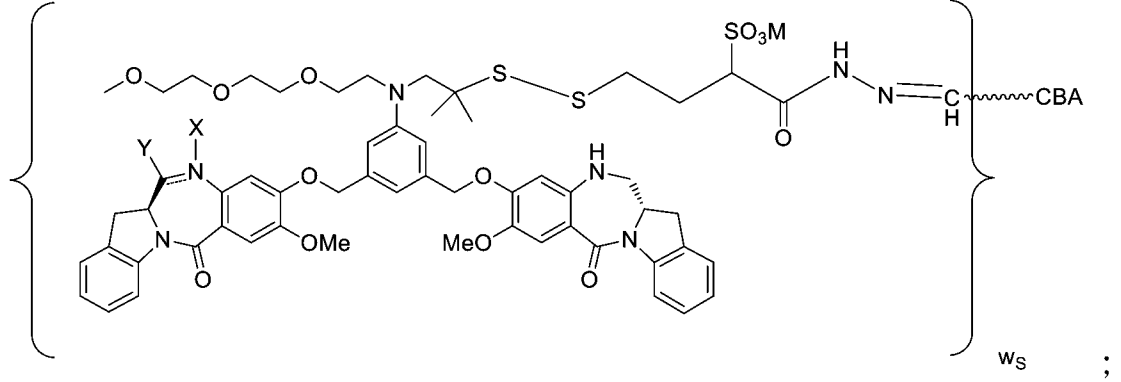
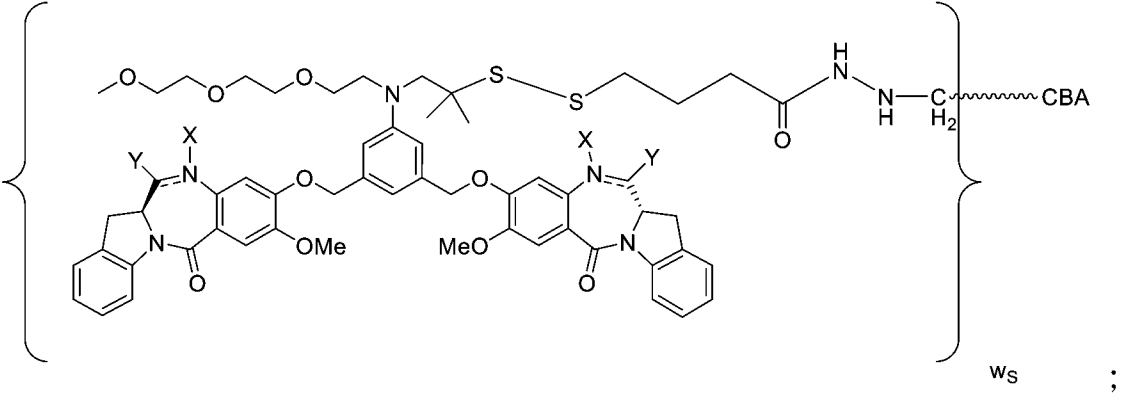
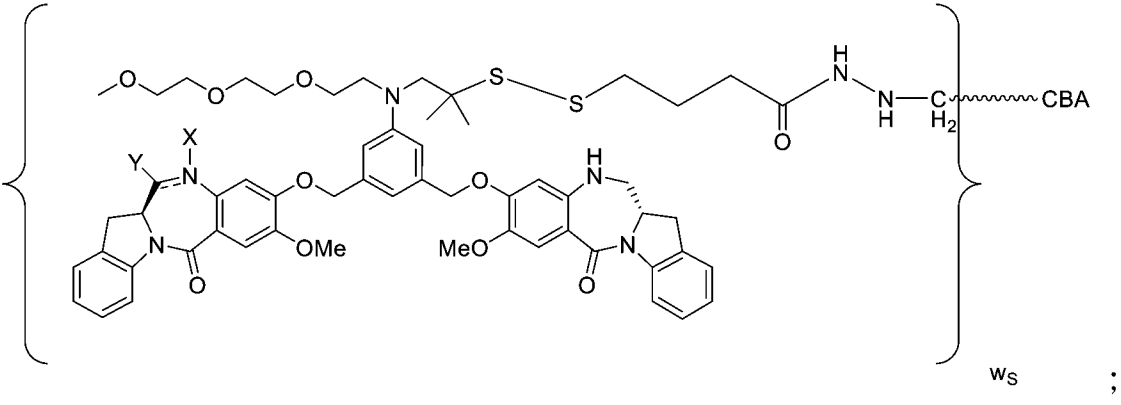
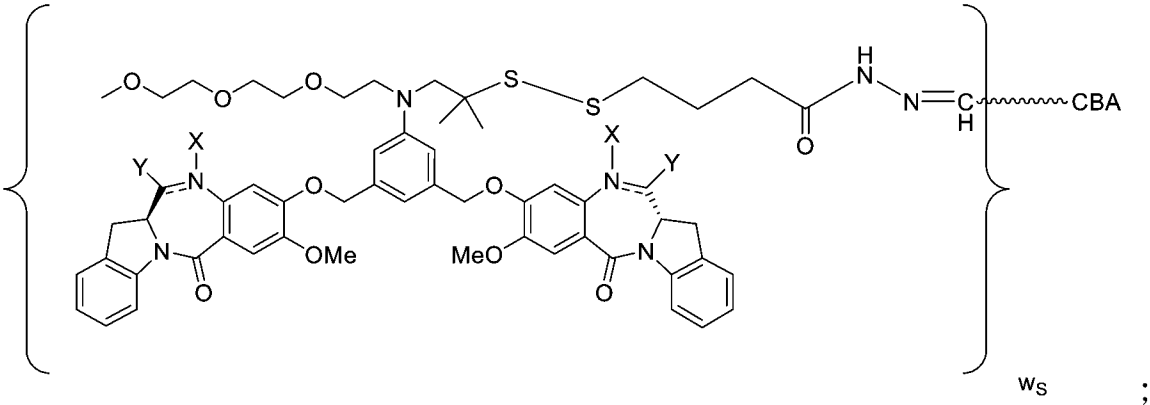


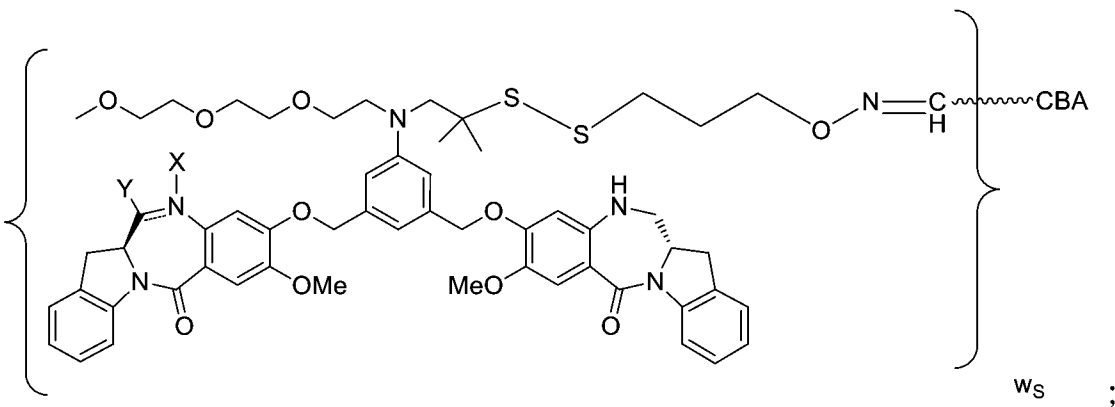
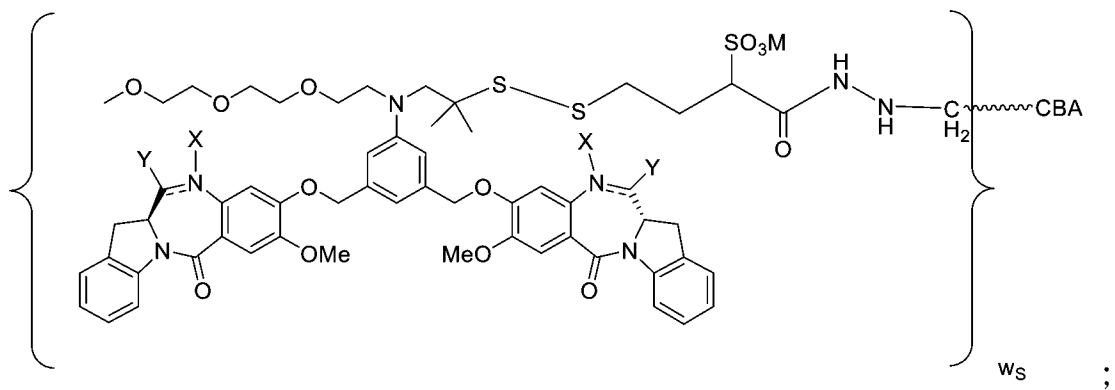
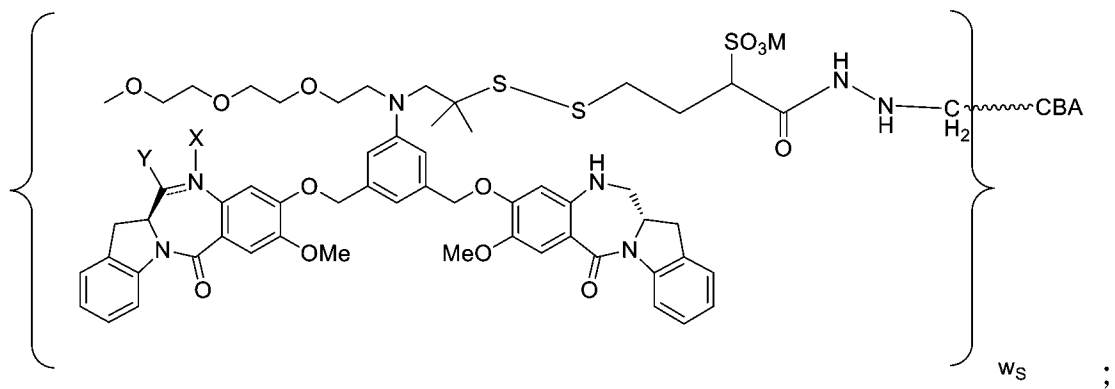
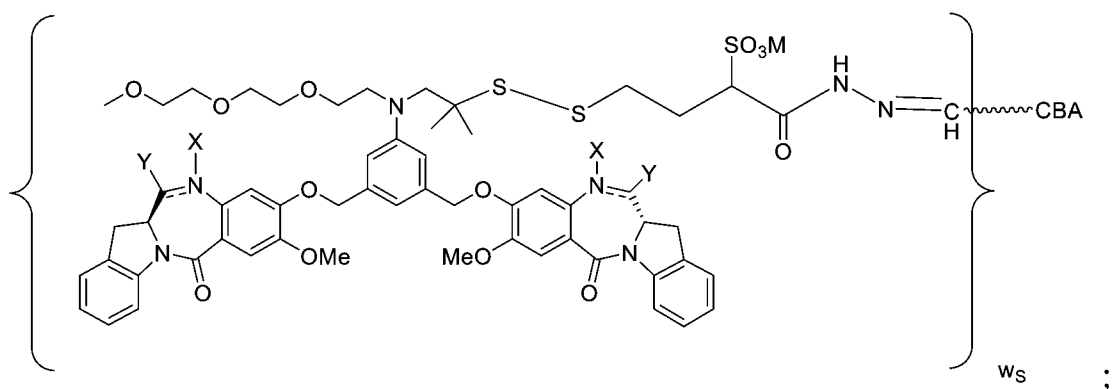


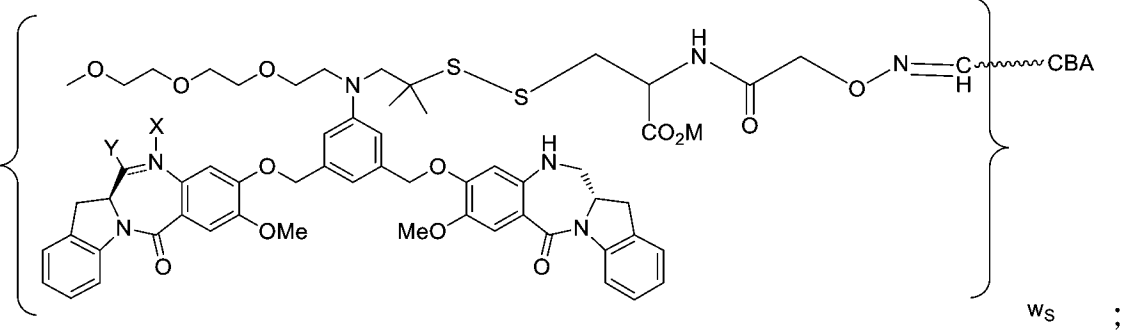
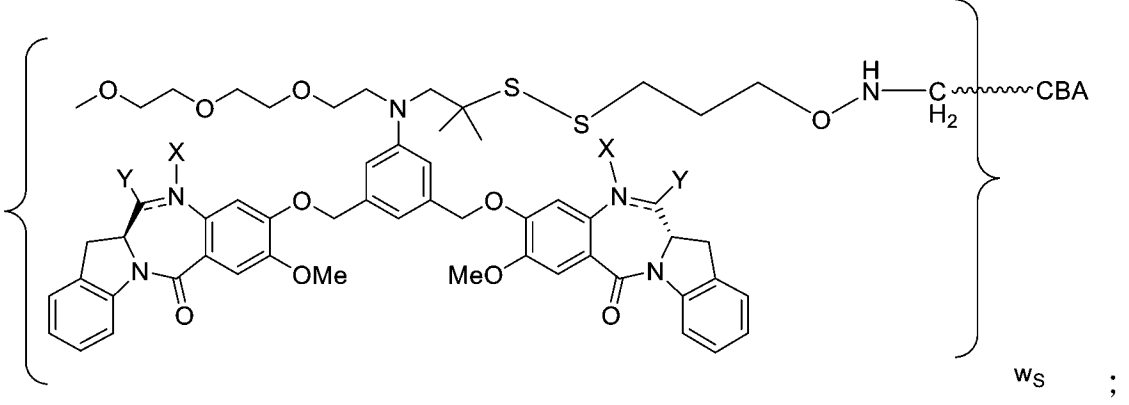
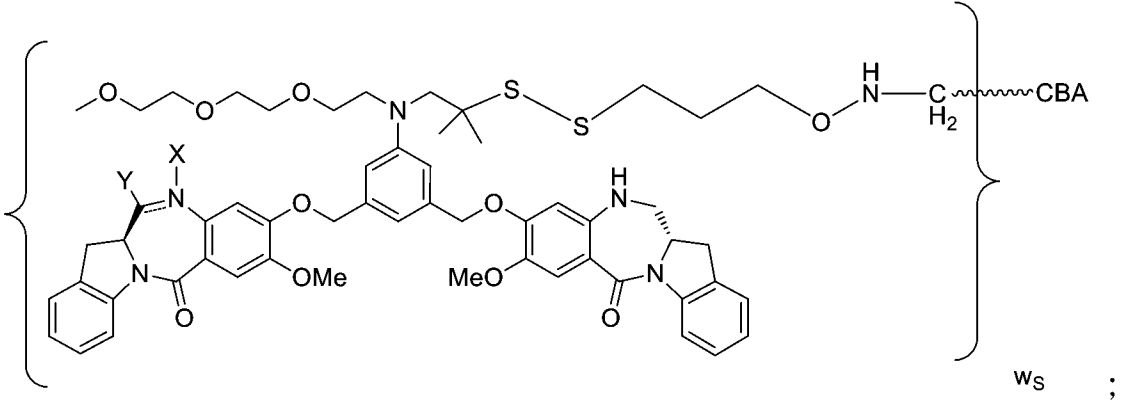
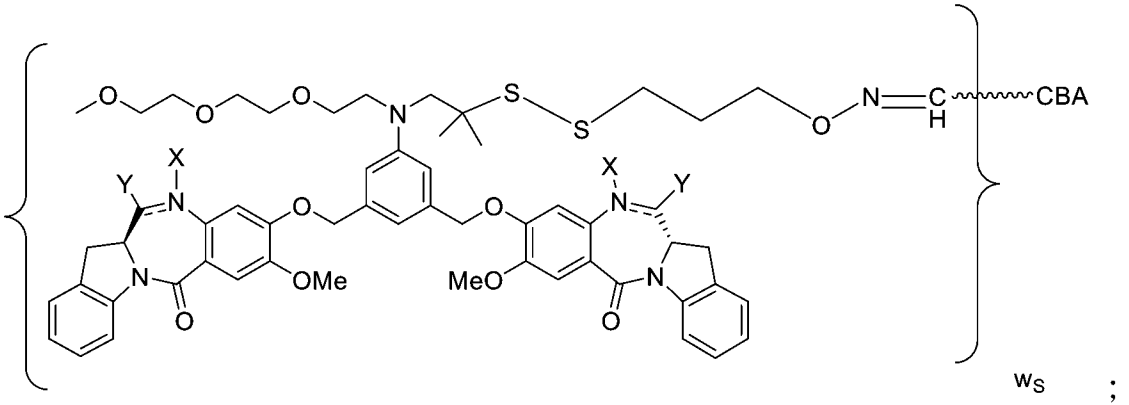


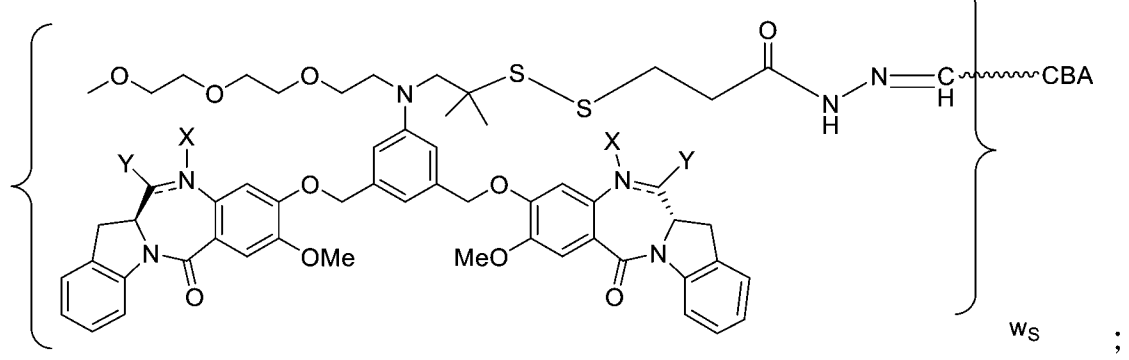
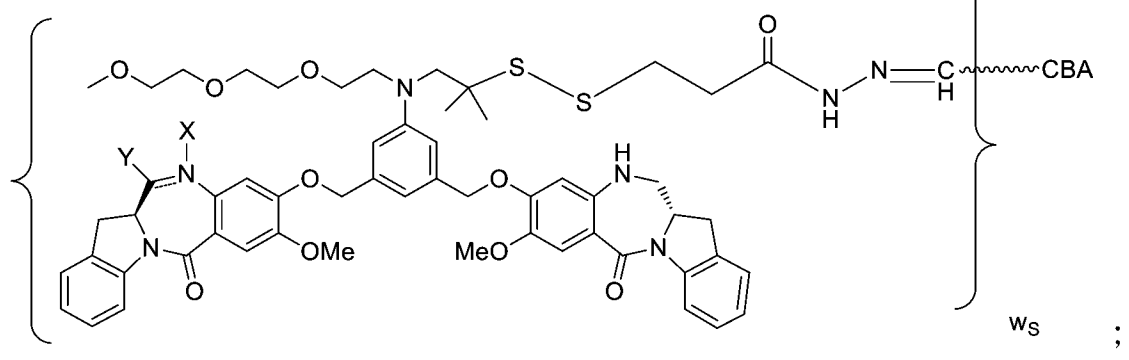
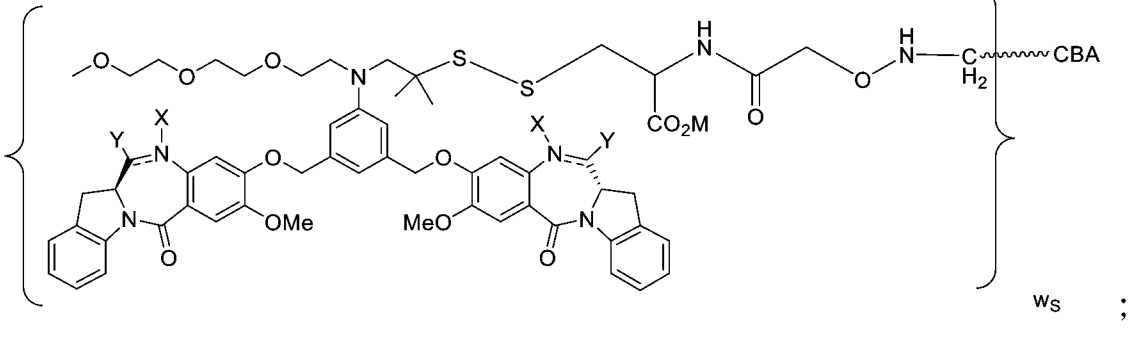
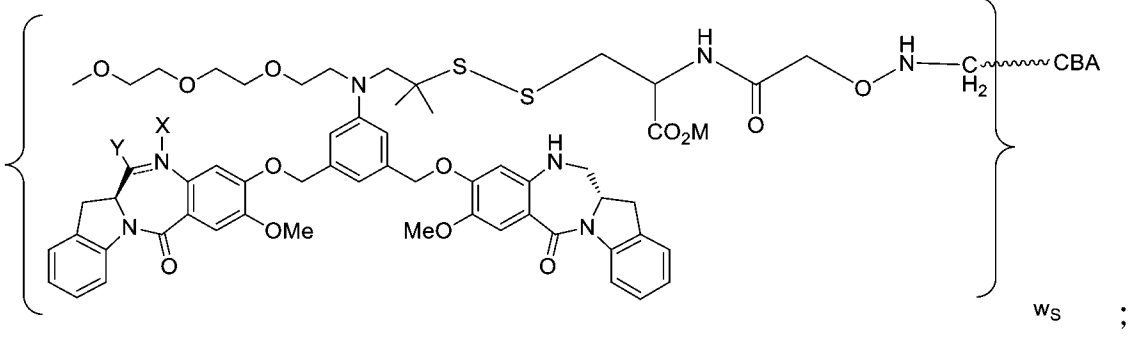
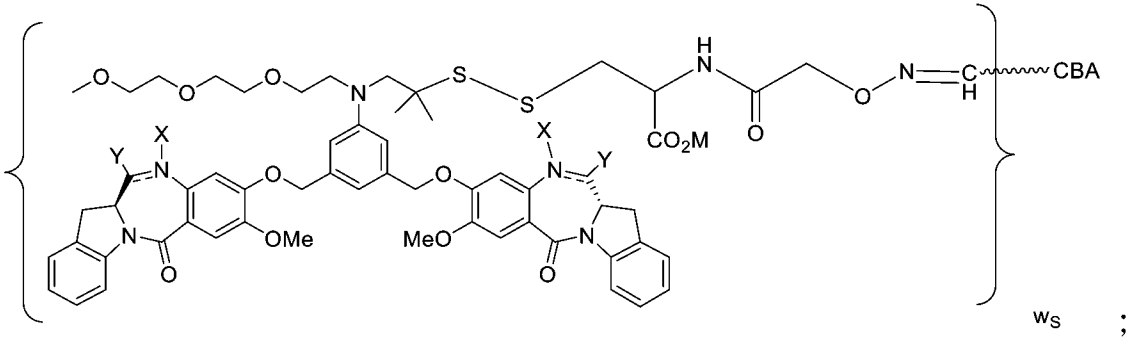




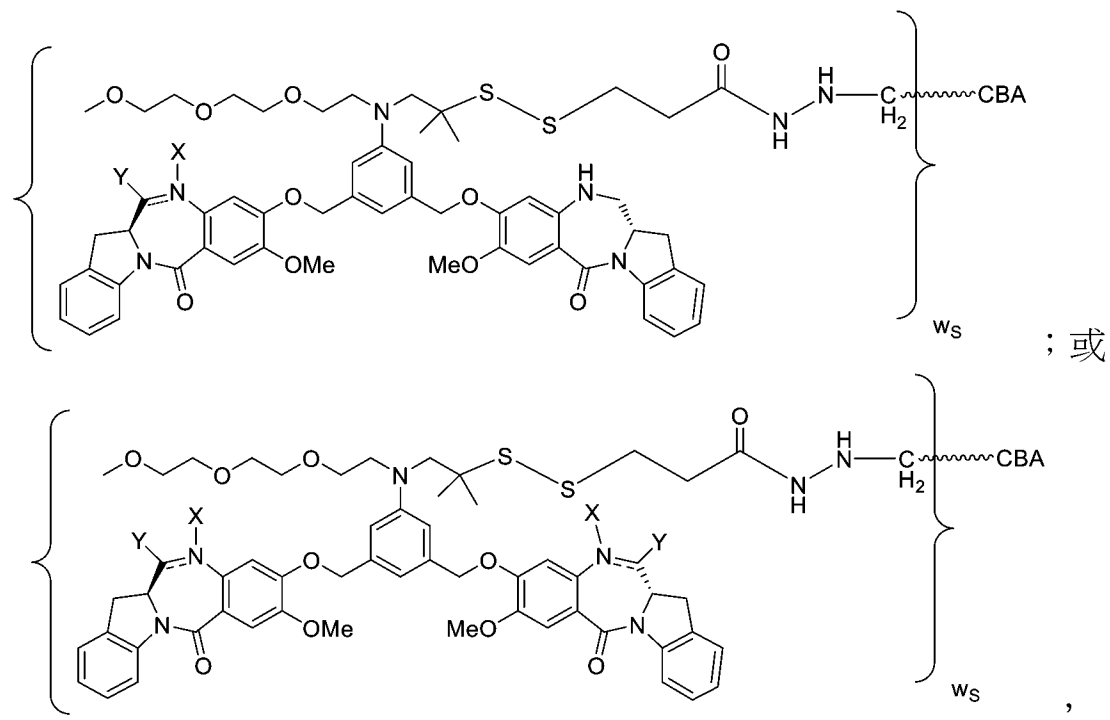






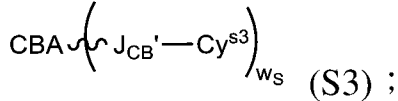






或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H；且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。在一更特定實施例中，介於N與C之間的雙線=表示雙鍵，X不存在且Y為-H。在另一更特定實施例中，介於N與C之間的雙線=表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。

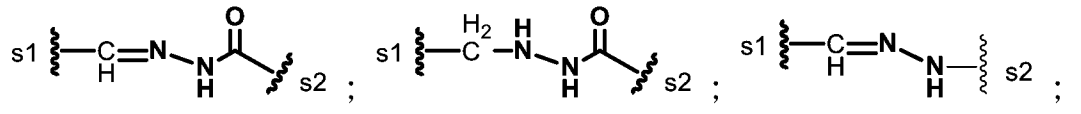
【0409】 在第十四特定實施例中，第二實施例之免疫結合物由下式表示：

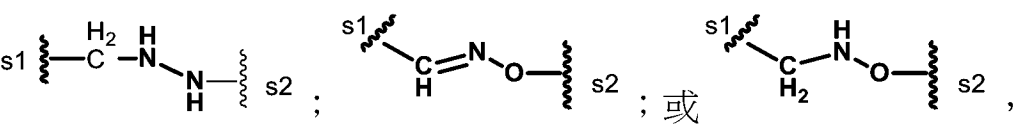


其中：

CBA為本發明之第一態樣中所描述之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如上文中所描述之標的氧化抗體或其抗原結合片段，或以上所描述之其標的氧化多肽)；

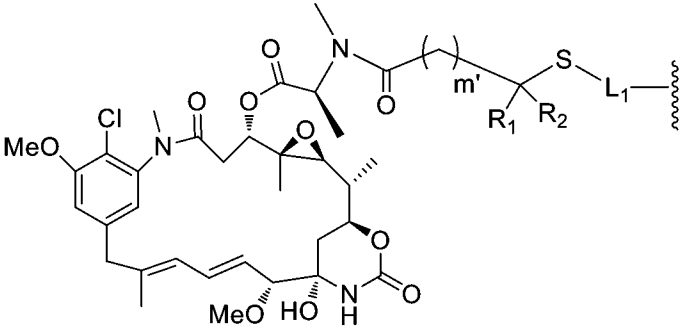
JCB'為藉由使CBA上之醛基與Cys3上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：





其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cys3共價連接之位點；

Cys3由下式表示：

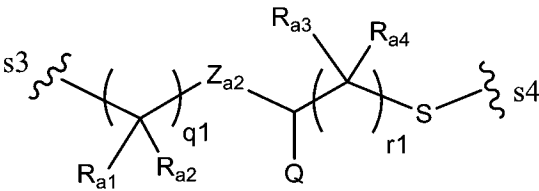


其中：

m'為1或2；

R1及R2各自獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

L1由下式表示：



其中：

s3為與基團JCB'共價連接之位點；

s4為與Cys3上之-S-基團共價連接之位點；

Za2為不存在、-C(=O)-NR9-或-NR9-C(=O)-；

R9為-H或(C1-C3)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

Ra1、Ra2、Ra3、Ra4在每次出現時獨立地為H或(C1-C3)烷基；且

q1及r1各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q1及r1不均為0。

【0410】 在一更特定實施例中，Za2不存在；q1及r1各自獨立地為0至3之整數，其限制條件為q1及r1不均為0；且其餘變數如以上在第十四特定實施例中所

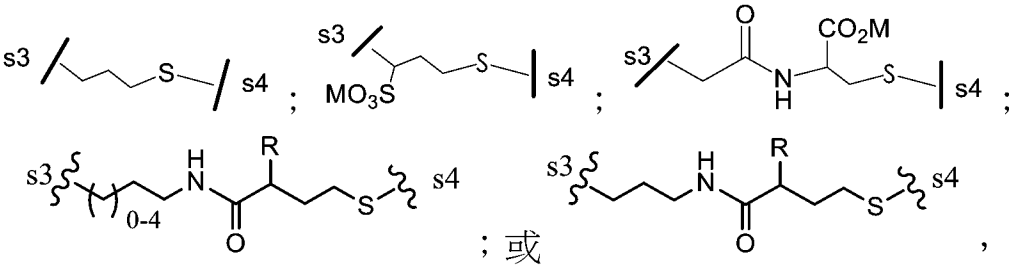
描述。甚至更特定言之， $R_{a1}$ 、 $R_{a2}$ 、 $R_{a3}$ 、 $R_{a4}$ 均為-H。

【0411】 在另一更特定實施例中， $Z_{a2}$ 為-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-； $q1$ 及 $r1$ 各自獨立地為1至6之整數；且其餘變數如以上在第十四特定實施例中所描述。甚至更特定言之， $R_{a1}$ 、 $R_{a2}$ 、 $R_{a3}$ 、 $R_{a4}$ 均為-H。

【0412】 在第十五特定實施例中，對於式(S3)之免疫結合物， $m'$ 為1，且 $R_1$ 及 $R_2$ 均為H；且其餘變數如以上在第十四特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

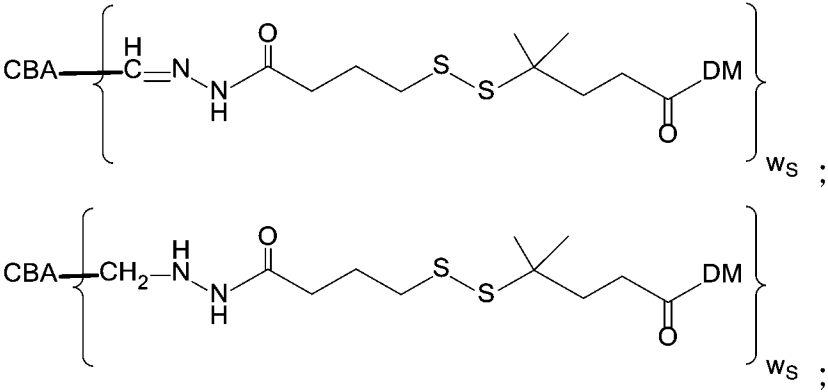
【0413】 在第十六特定實施例中，對於式(S3)之免疫結合物， $m'$ 為2，且 $R_1$ 及 $R_2$ 均為Me；且其餘變數如以上在第十四特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

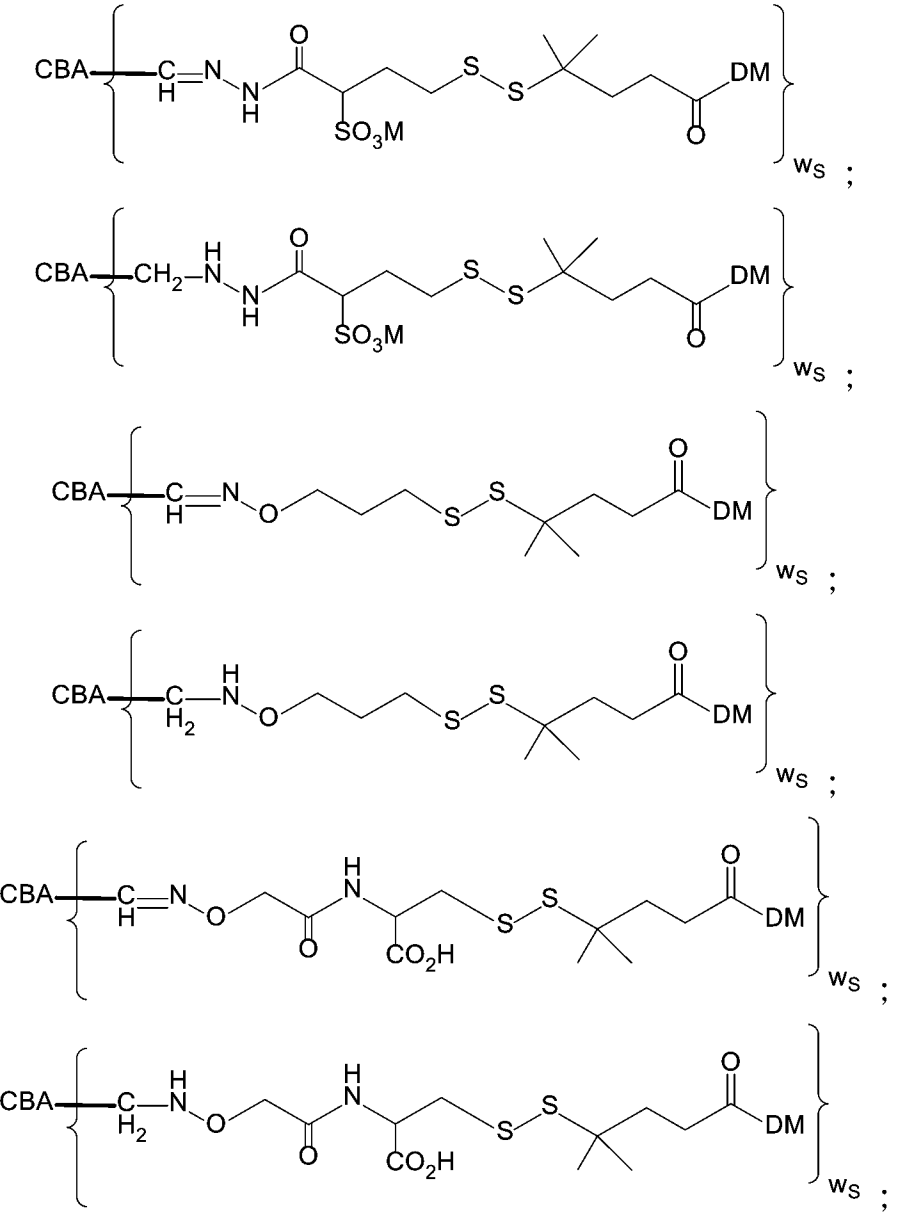
【0414】 在第十七特定實施例中，對於式(S3)之免疫結合物， $-L_1-$ 由以下各式表示：



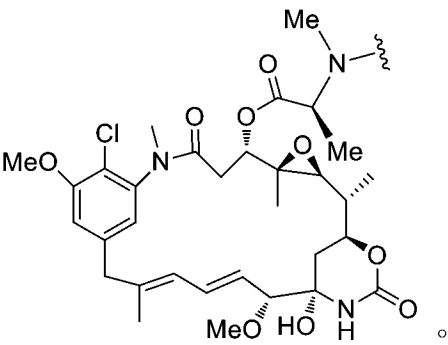
或其醫藥學上可接受之鹽，其中R為H或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子。

【0415】 在第十八特定實施例中，第二實施例之免疫結合物由以下各式表示：

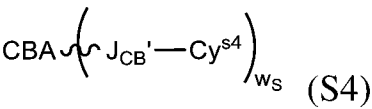




或其醫藥學上可接受之鹽；其中DM由下式表示：



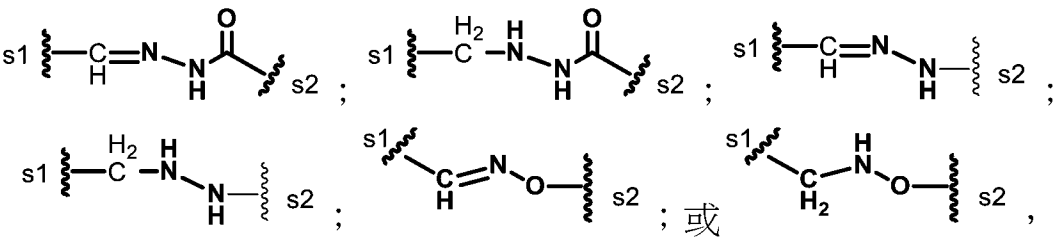
【0416】 在第十九特定實施例中，第二實施例之免疫結合物由下式表示：



其中：

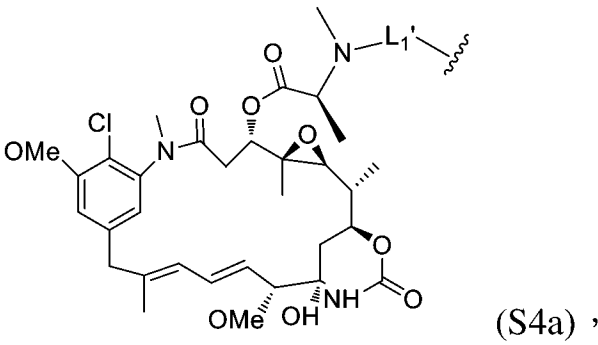
CBA為本發明之第一態樣中所描述之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如上文中所描述之標的氧化抗體或其抗原結合片段，或以上所描述之其標的氧化多肽)；

JCB'為藉由使CBA上之醛基與Cys4上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：

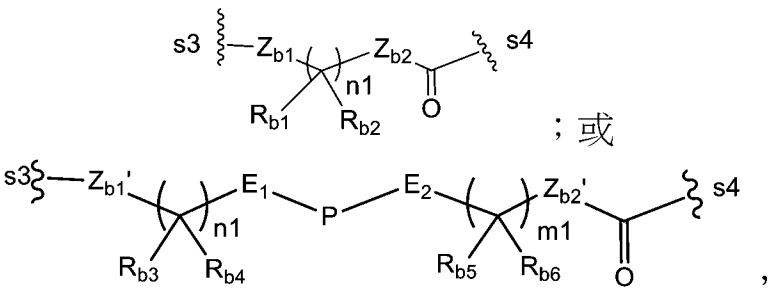


其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cys4共價連接之位點；

Cys4由以下各式表示：



L1'由以下各式表示：



其中：

s3為與基團JCB'基團共價連接之位點；

s4為與Cys4上之-NMe-基團共價連接之位點；

Zb1及Zb2均不存在，或Zb1及Zb2中一者不存在且另一者為-CH2-O-或-O-CH2-；

Zb1'及Zb2'各自獨立地為不存在、-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-、-NR<sub>9</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-或-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9</sub>-；

R<sub>9</sub>為H或(C1-C3)烷基；

n1及m1各自獨立地為1至6之整數；

E1及E2中一者為-C(=O)-且另一者為-NR<sub>9</sub>-；或E1及E2中一者為-C(=O)-或-NR<sub>9</sub>-且另一者為不存在；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；且

Rb1、Rb2、Rb3、Rb4、Rb5及Rb6在每次出現時各自獨立地為H或(C1-C3)烷基。

【0417】 在第二十特定實施例中，對於式(S4)之免疫結合物，R<sub>b1</sub>、R<sub>b2</sub>、R<sub>b3</sub>、R<sub>b4</sub>、R<sub>b5</sub>及R<sub>b6</sub>均為H；且其餘變數如以上在第十九特定實施例中所描述。

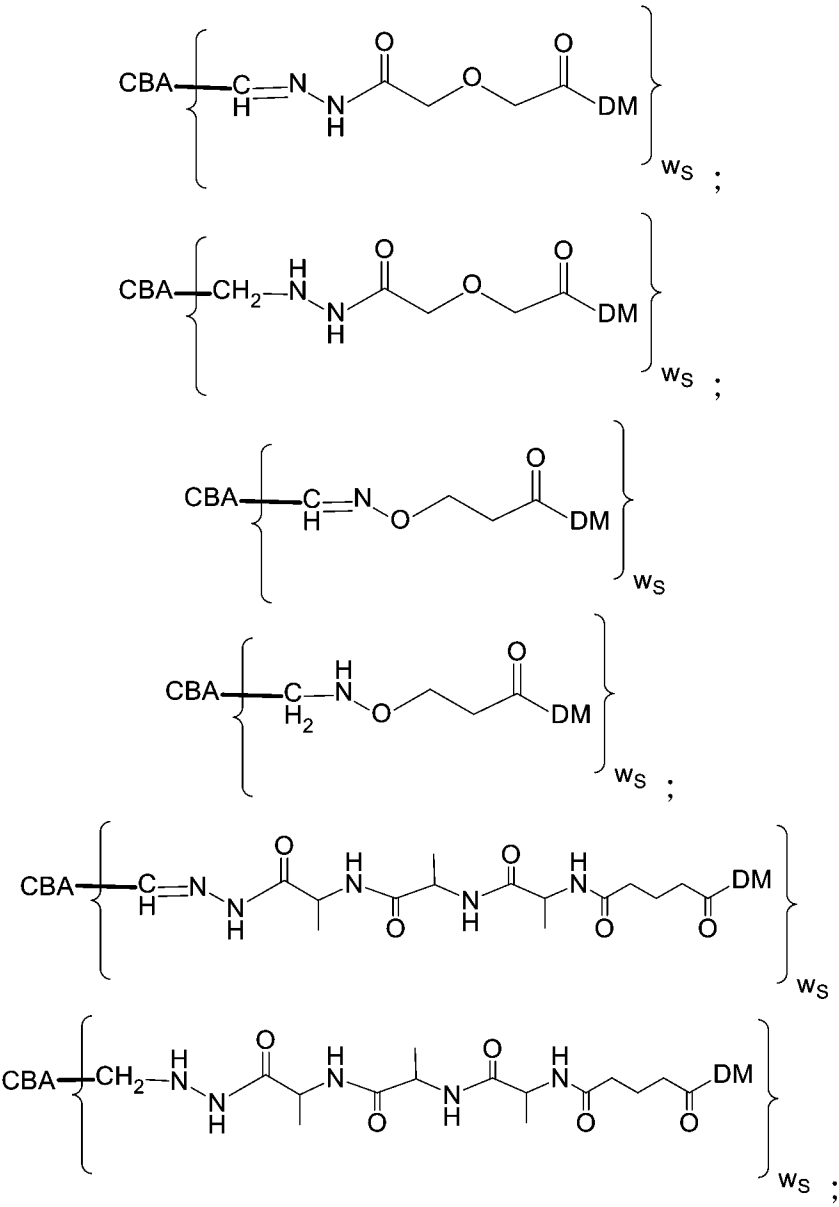
【0418】 在第二十一特定實施例中，對於式(S4)之免疫結合物，R<sub>9</sub>為H；且其餘變數如以上在第十九或第二十特定實施例中所描述。

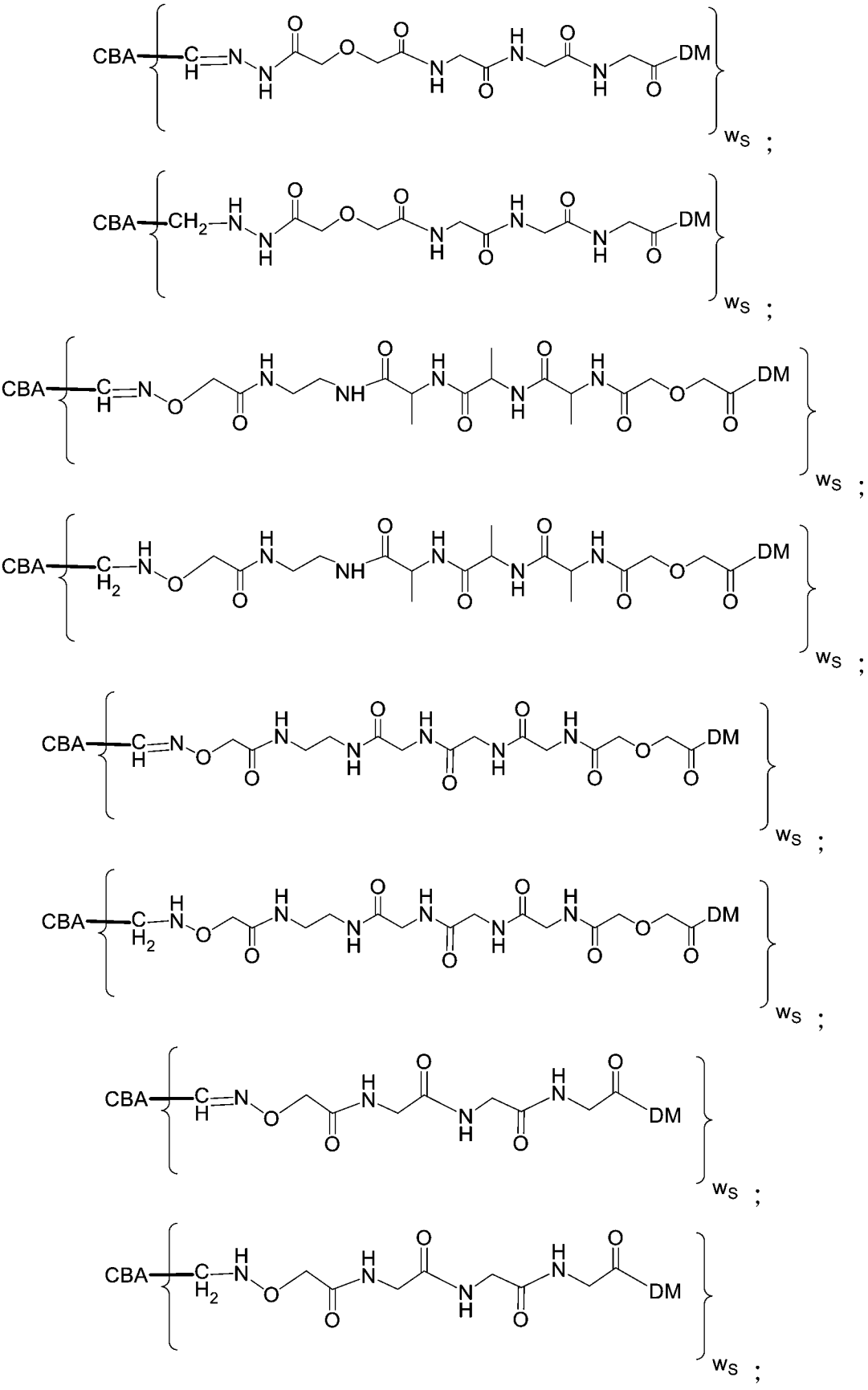
【0419】 在第二十二特定實施例中，對於式(S4)之免疫結合物，Z<sub>b1</sub>'及Z<sub>b2</sub>'均不存在；或Z<sub>b1</sub>'為-CH<sub>2</sub>-O-且Z<sub>b2</sub>'不存在；或Z<sub>b1</sub>'為-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9</sub>-且Z<sub>b2</sub>'為-O-CH<sub>2</sub>-或不存在；且其餘變數如以上在第十九、第二十或第二十一特定實施例中所描述。

【0420】 在第二十三特定實施例中，對於式(S4)之免疫結合物，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數如以上在第十九、第二十、第二十一或第二十二特定實施例中所描述。在一更特定實施例中，P係選自由以下各項組成之群：Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:

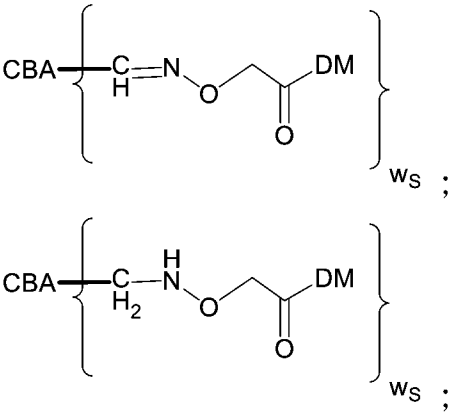
57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala；且其餘變數如以上在第二十三特定實施例中所描述。甚至更特定言之，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【0421】 在第二十四特定實施例中，第二實施例之免疫結合物由以下各式表示：

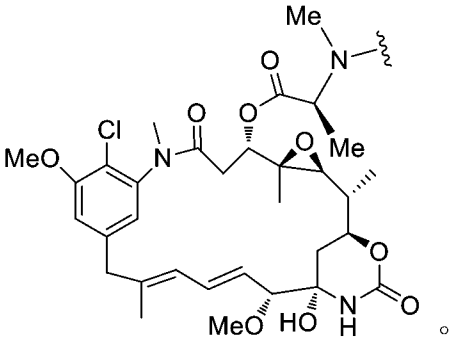








或其醫藥學上可接受之鹽，其中DM由以下結構式表示：



【0422】 在第二十五特定實施例中，對於第二實施例之免疫結合物，M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>；且其餘變數如以上在第一至第二十四特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0423】 在以上第一至第二十五特定實施例中之任一者中，標的氧化抗體或其抗原結合片段可允許1、2、3或至多4個N末端2-羥基乙胺部分氧化成醛基，以便共價連接於本文中所描述之細胞毒性劑。N末端2-羥基乙胺部分可為絲胺酸、酰胺酸、羥基離胺酸、4-羥基鳥胺酸或2,4-二胺基-5-羥基戊酸殘基，較佳為Ser或Thr之一部分。出於簡單起見，以下描述，包括氧化反應及任何隨後與連接子或細胞毒性劑結合，均可指Ser作為此種N末端2-羥基乙胺部分之特定實例，但一般應被視為指所有N末端2-羥基乙胺部分。標的抗體或其抗原結合片段可包含具有SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列的免疫球蛋白重鏈可變區(HCVR)；及具有SEQ ID NO: 33、35、37或41 (較佳SEQ ID NO: 35或37)中所闡述之胺基酸序列的免疫球蛋白輕鏈可變區(LCVR)。標的抗體或其抗原結合片段亦可包含具有

SEQ ID NO: 32、34、38、39或40 (較佳SEQ ID NO: 34)中所闡述之胺基酸序列的Ig HCVR；及具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列的Ig LCVR。標的抗體或其抗原結合片段亦可包含具有SEQ ID NO: 53或56中所闡述之胺基酸序列的Ig重鏈(HC)區；及具有SEQ ID NO: 33、35、37或41 (較佳SEQ ID NO: 35或37)中所闡述之胺基酸序列的Ig LCVR。標的抗體或其抗原結合片段亦可包含具有SEQ ID NO: 48、50、53、54、56、59或60 (較佳SEQ ID NO: 53)中所闡述之胺基酸序列的Ig HC區；及具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列的Ig LCVR。在某些實施例中，來自SEQ ID NO: 34、38、50、53、54或56之N末端的第二個殘基為Phe，而在某些其他實施例中，來自SEQ ID NO: 34、38、50、53、54或56之N末端的第二個殘基為Val。

【0424】 在某些實施例中，第二實施例之免疫結合物可藉由第一種方法來製備，該方法包括使本發明之第一態樣中所描述的具有N末端醛之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ -結合劑與具有醛反應性基團之細胞毒性劑反應。

【0425】 在某些實施例中，第二實施例之免疫結合物可藉由第二種方法來製備，該方法包括使本發明之第一態樣中所描述的具有N末端醛之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與具有醛反應性基團之連接子化合物反應，以形成具有與其結合之連接子的經修飾之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑，隨後使該經修飾之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與細胞毒性劑反應。

【0426】 在某些實施例中，第二實施例之免疫結合物可藉由第三種方法來製備，該方法包括使本發明之第一態樣中所描述的具有N末端醛之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與細胞毒性劑接觸，隨後添加具有醛反應性基團之連接子化合物。

【0427】 在某些實施例中，第二實施例之免疫結合物可藉由第四種方法來製備，該方法包括以下步驟：

- (a) 用氧化劑使具有N末端2-羥基乙胺部分之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如，Ser/Thr)氧化，以形成具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑；及
- (b) 使具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與具有醛反應性基團之細胞毒性劑反應。

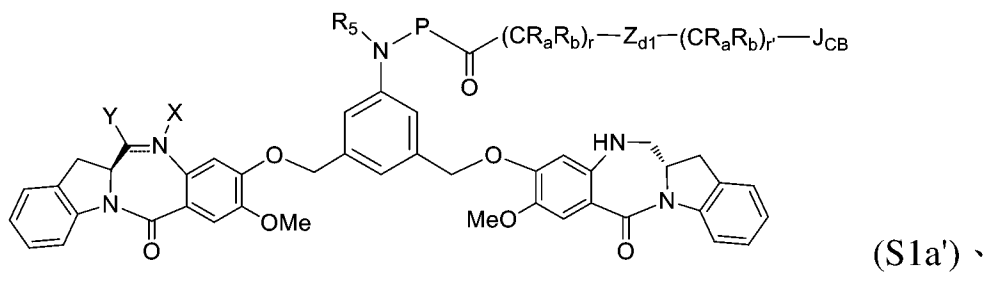
【0428】 在某些實施例中，第二實施例之免疫結合物可藉由第五種方法來製備，該方法包括以下步驟：

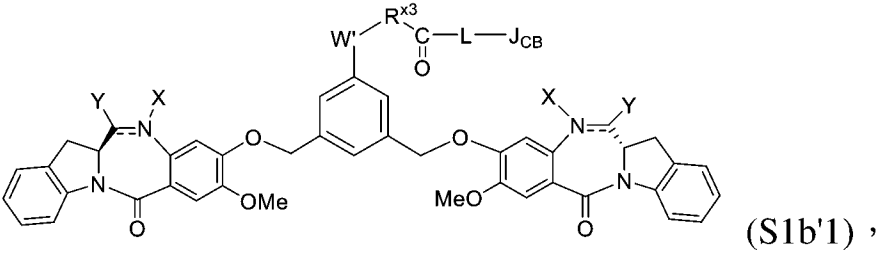
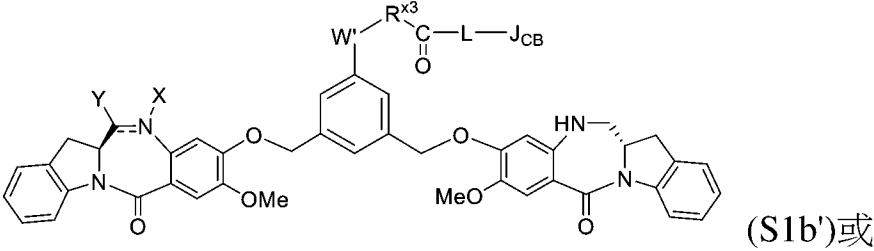
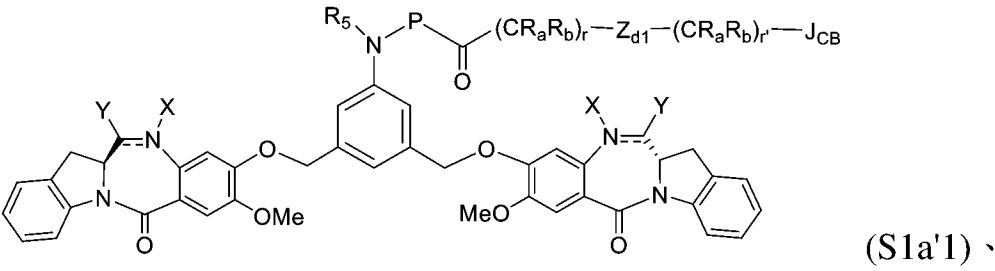
- (a) 用氧化劑使具有N末端2-羥基乙胺部分之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如，Ser/Thr)氧化，以形成具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑；
- (b) 使具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與具有醛反應性基團之連接子化合物反應，以形成具有與其結合之連接子的經修飾之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑，隨後使該經修飾之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與細胞毒性劑反應。

【0429】 在某些實施例中，第二實施例之免疫結合物可藉由第六種方法來製備，該方法包括以下步驟：

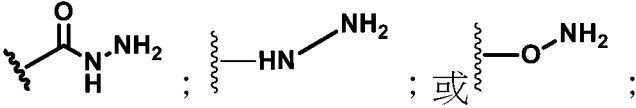
- (a) 用氧化劑使具有N末端2-羥基乙胺部分之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如，Ser/Thr)氧化，以形成具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑；
- (b) 使具有N末端醛基之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑與細胞毒性劑接觸，隨後添加具有醛反應性基團之連接子化合物。

【0430】 在一個實施例中，對於以上所描述之第一種或第四種方法，具有醛反應性基團之細胞毒性劑由以下各式表示：



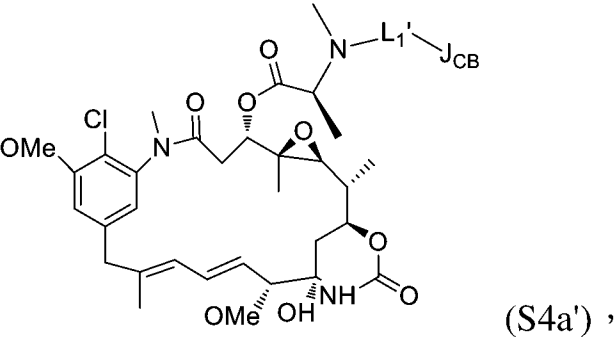


或其醫藥學上可接受之鹽，其中JCB由以下各式表示：



且其餘變數如以上在第一至第七及第二十五特定實施例及其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

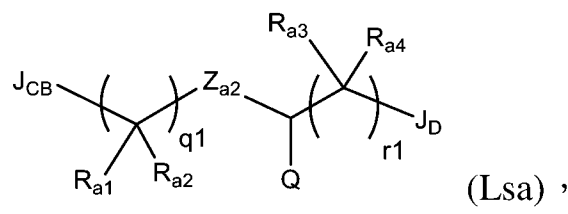
【0431】 在另一實施例中，對於以上所描述之第一種或第四種方法，具有醛反應性基團之細胞毒性劑由下式表示：



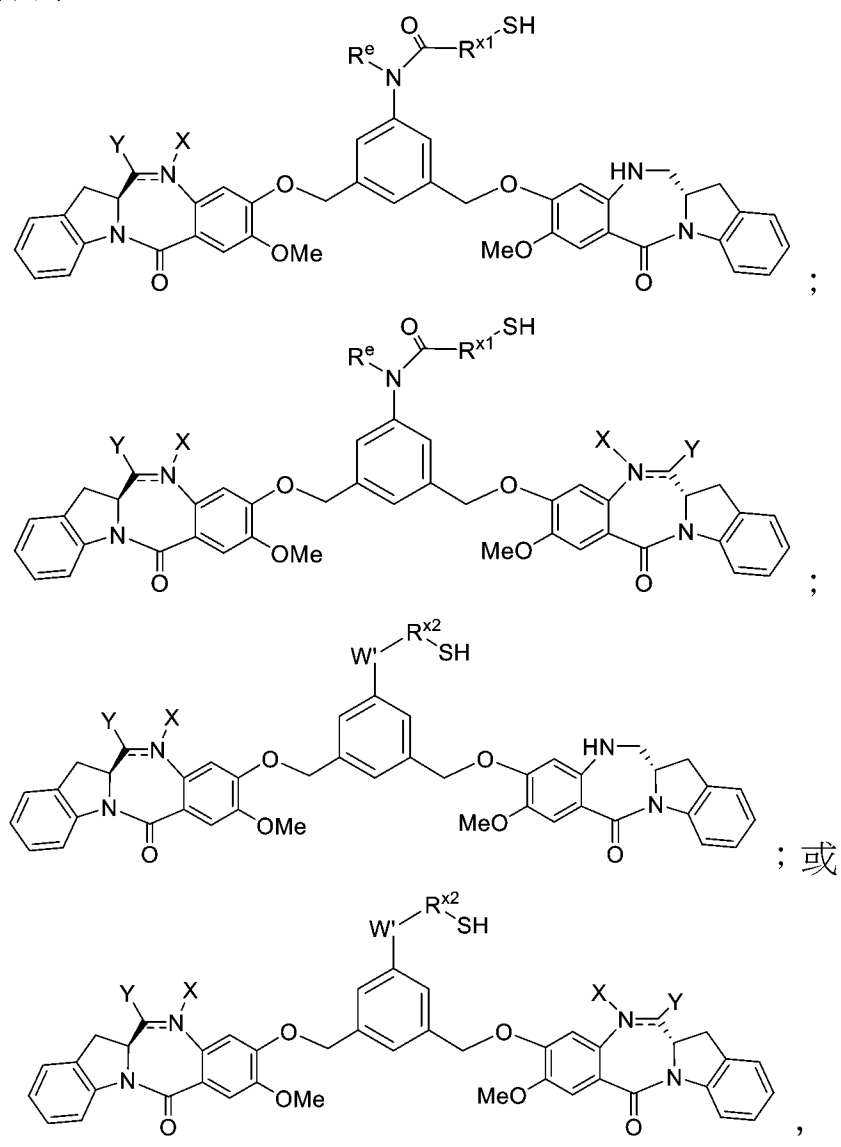
或其醫藥學上可接受之鹽，其中JCB如以上所描述且其餘變數如第十九至第二十五特定實施例及其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0432】 在一個實施例中，對於以上所描述之第二種、第三種、第五種或

第六種方法，連接子化合物由下式表示：



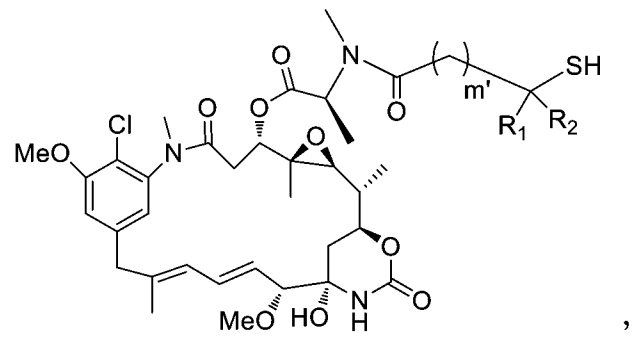
其中JD為-SH、-SSRd或-SC(=O)Rg；Rd為苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；Rg為烷基；JCB如以上所描述；細胞毒性劑由以下各式表示：



且其餘變數如以上在第八至第十三及第二十五特定實施例及其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0433】 在另一實施例中，對於以上所描述之第二種、第三種、第五種或

第六種方法，連接子化合物由以上式(L<sup>s</sup>a)表示；細胞毒性化合物由下式表示：



且其餘變數如第十四至第十八及第二十五特定實施例及其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0434】 在一個實施例中，對於以上所描述之第一種或第四種方法，使細胞毒性劑與諸如NaHSO<sub>3</sub>之亞胺反應性試劑反應，以形成經修飾之細胞毒性劑，隨後與具有N末端醛之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑反應。在一個實施例中，經修飾之細胞毒性劑在與具有N末端醛之氧化CBA反應之前未經純化。或者，經修飾之細胞毒性劑在與具有N末端醛之氧化CBA反應之前經純化。

【0435】 在另一實施例中，對於以上所描述之第二種或第五種方法，使細胞毒性劑與諸如NaHSO<sub>3</sub>之亞胺反應性試劑反應，以形成經修飾之細胞毒性劑，隨後與具有與其結合之連接子的經修飾CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑反應。在一個實施例中，經修飾之細胞毒性劑在與具有與其結合之連接子的經修飾CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑反應之前經純化。或者，經修飾之細胞毒性劑在與具有N末端醛之氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑反應之前未經純化。

【0436】 在又一實施例中，對於以上所描述之第三種或第六種方法，氧化CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑、細胞毒性劑及連接子化合物之反應係在諸如NaHSO<sub>3</sub>之亞胺反應性試劑存在下進行。

【0437】 任何適合之氧化劑均可用於以上所描述之第四種、第五種或第六種方法之步驟(a)中。在某些實施例中，該氧化劑為過碘酸鹽。更特定言之，該氧化劑為過碘酸鈉。

【0438】 可使用相對於CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑過量莫耳當量之氧化劑。在某些實施例中，可使用約2-100、5-80、10-50、1-10或5-10莫耳當量之氧化劑。在某些實施例中，可使用約10或約50當量之氧化劑。當使用大量氧化劑時，使用短反應時間以避免過度氧化。舉例而言，當使用50當量氧化劑時，氧化反應進行約5至約60分鐘。或者，當使用10當量氧化劑時，氧化反應進行約30分鐘至約24小時。在一個實施例中，使用5-10莫耳當量氧化劑且氧化反應進行約5至約60分鐘(例如約10至約30分鐘、約20至約30分鐘)。

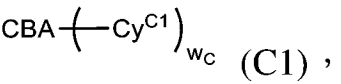
【0439】 在某些實施例中，催化劑存在於以上所描述之第一種、第二種或第三種方法中之反應中或以上所描述之第四種、第五種或第六種方法中之步驟(b)之反應中。可使用此項技術中之任何適合之催化劑。在一個實施例中，催化劑為苯胺或經取代之苯胺。例示性苯胺催化劑包括但不限於苯胺、鄰苯二胺、間苯二胺、3,5-二胺基苯甲酸、對苯二胺、2-甲基-對苯二胺、N-甲基-對苯二胺、鄰胺基苯酚、間胺基苯酚、對胺基苯酚、對甲氧基苯胺、5-甲氧基-胺基苯甲酸、鄰胺基苯甲酸及4-胺基苯乙醇。在一個實施例中，催化劑為4-胺基苯乙醇。在某些實施例中，步驟(b)之反應在約5.0至約6.5之pH值下進行。在某些實施例中，步驟(b)之反應在約5.0之pH值下進行。

【0440】 在某些實施例中，對於以上所描述之第一種、第二種或第三種方法中之反應或以上所描述之第四種、第五種或第六種方法中之步驟(b)之反應，具有醛反應性基團之化合物(例如，本文中所描述之細胞毒性劑或連接子化合物)相對於氧化細胞結合劑(例如，氧化抗體或氧化抗原結合部分)在莫耳過量下使用。在某些實施例中，具有醛反應性基團之化合物與氧化細胞結合劑之比率介於約10:1至約1.1:1之間、介於約5:1至約2:1之間。在一個實施例中，該比率為約4:1。

【0441】 在第三實施例中，本發明之免疫結合物包含本發明之第一態樣中

所描述之CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(包括抗體、其抗原結合片段，或包含該抗體或其抗原結合片段之多肽)，其經由位於CD123結合劑上之一或多個半胱胺酸殘基之硫醇基(-SH)共價連接於本文中所描述之細胞毒性劑。

【0442】 在第一特定實施例中，第三實施例之免疫結合物由下式表示：

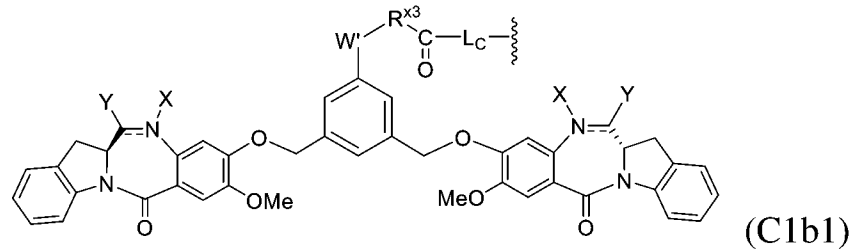
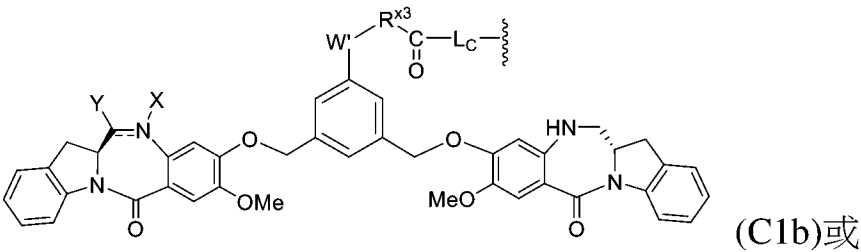
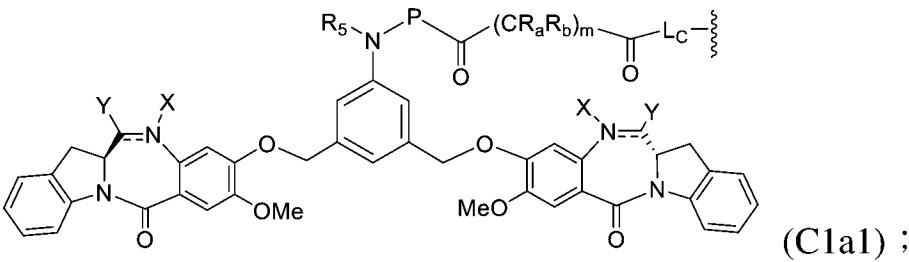
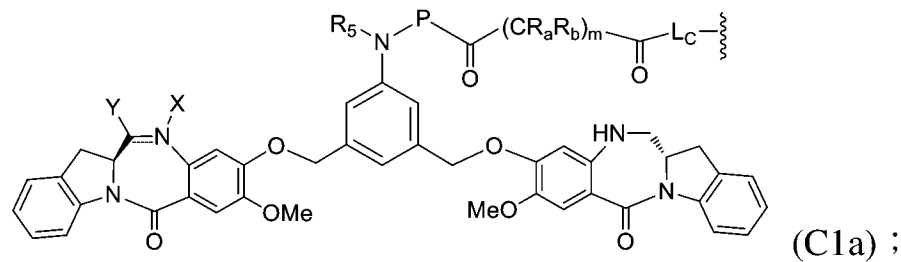


其中：

CBA為本發明之第一態樣中所描述的CD123/IL-3R $\alpha$ 結合劑(例如上文所描述之標的抗體或其抗原結合片段，或以上所描述之其標的多肽)，其經由半胱胺酸殘基共價連接於CyC1；

WC為1或2；

CyC1由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線  $\equiv$  表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C1-C4)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>5</sub>為-H或(C1-C3)烷基；

P為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時獨立地為-H、(C1-C3)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

W'為-NRe'；

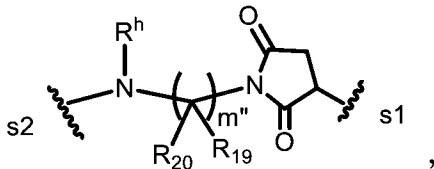
Re'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sub>k</sub>；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x3</sub>為(C1-C6)烷基；且

LC由以下表示：



其中s1為與CBA共價連接之位點，且s2為與CyC1上之-C(=O)-基團共價連接之位點；其中：

R<sub>19</sub>及R<sub>20</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

m''為介於1與10之間的整數；且

R<sub>h</sub>為-H或(C1-C3)烷基。

【0443】 在第二特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物，Cy<sup>C1</sup>由式(C1a)或(C1a1)表示；且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。

【0444】 在第三特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物，Cy<sup>C1</sup>由式(C1b)

或(C1b1)表示；且其餘變數如以上在第一特定實施例中所描述。

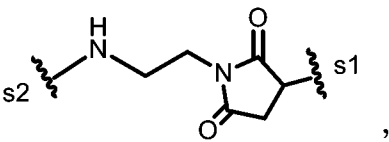
【0445】 在第四特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物， $Cy^{C1}$ 由式(C1a)或(C1a1)表示； $R_a$ 及 $R_b$ 均為H；且 $R_5$ 為H或Me；且其餘變數如以上在第一或第二特定實施例中所描述。

【0446】 在第五特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物，P為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數如以上在第一、第二或第四特定實施例中所描述。在一更特定實施例中，P係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- $N^9$ -甲 苯磺 醯 基 -Arg、Phe- $N^9$ -硝 基 -Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、 $\beta$ -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在另一更特定實施例中，P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【0447】 在第六特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物，Q為 $-SO_3M$ ；且其餘變數如以上在第一、第二、第四或第五特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

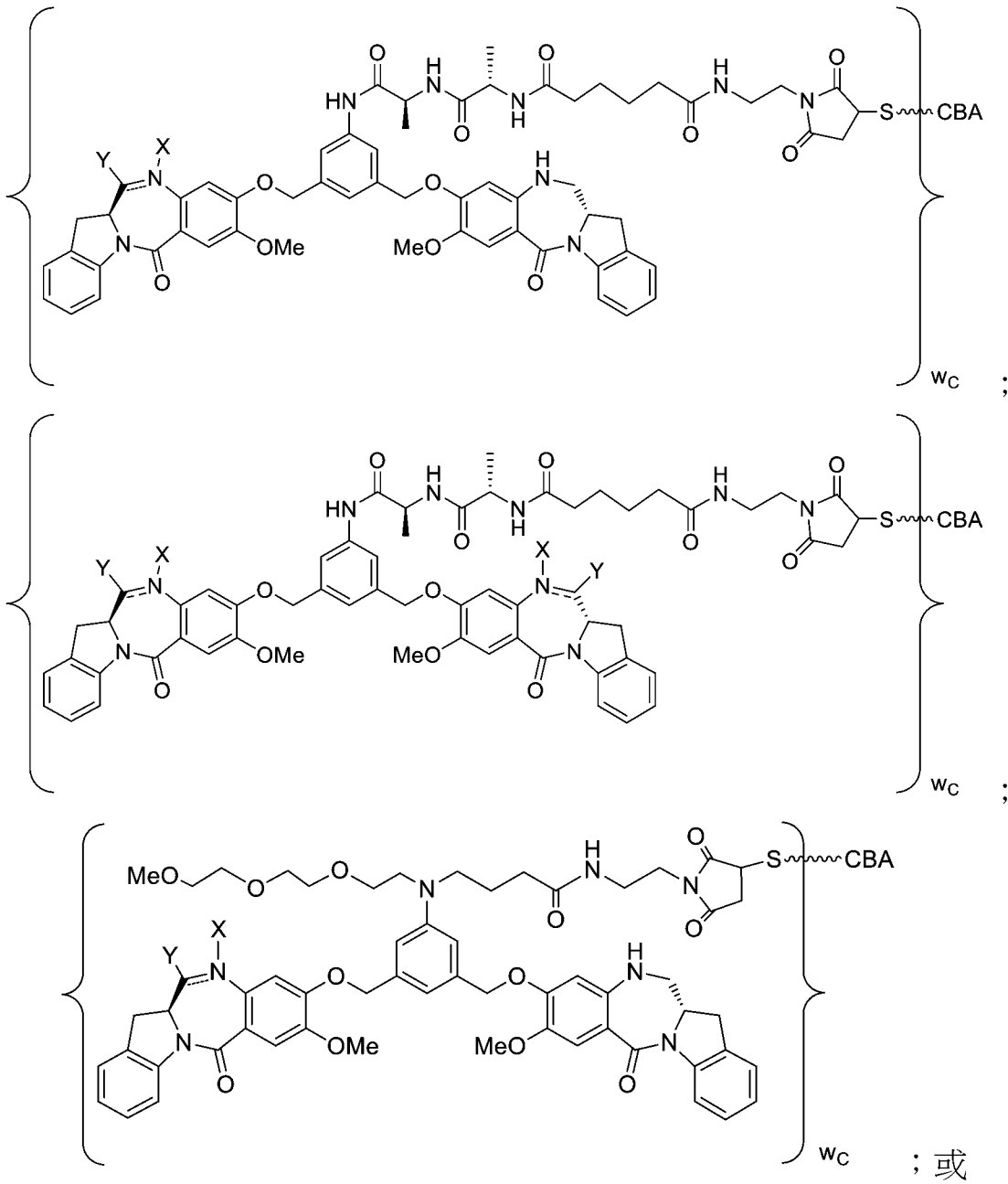
【0448】 在第七特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物， $R_{19}$ 及 $R_{20}$ 均為H；且 $m''$ 為1至6之整數；且其餘變數如以上在第一、第二、第三、第四、第五或第六特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

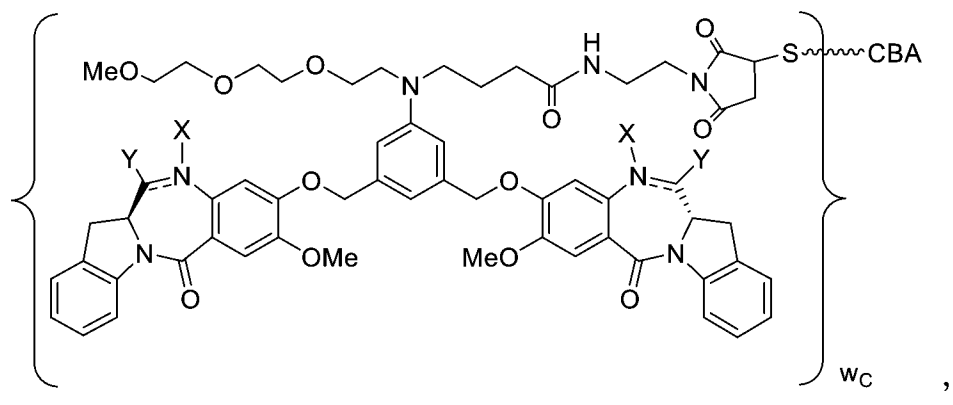
【0449】 在第八特定實施例中，對於式(C1)之免疫結合物，-L-Lc-由下式表示：



且其餘變數如以上在第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

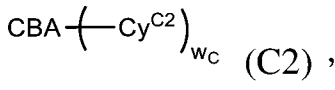
【0450】 在第九特定實施例中，第三實施例之免疫結合物由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO3M。在一更特定實施例中，介於N與C之間的雙線=表示雙鍵，X不存在且Y為-H。在另一更特定實施例中，介於N與C之間的雙線=表示單鍵，X為-H且Y為-SO3M。

【0451】 在第十特定實施例中，第三實施例之免疫結合物由下式表示：

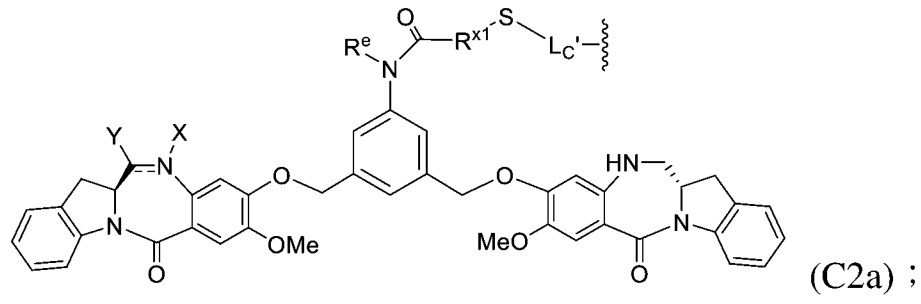


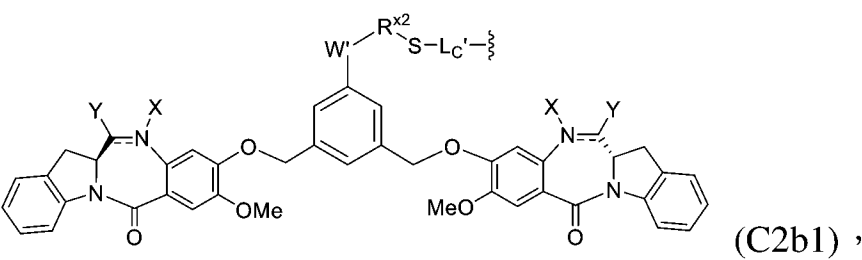
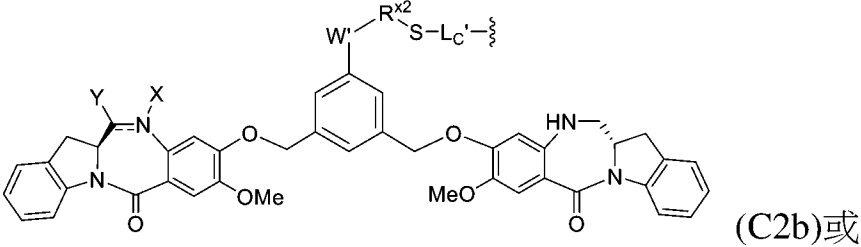
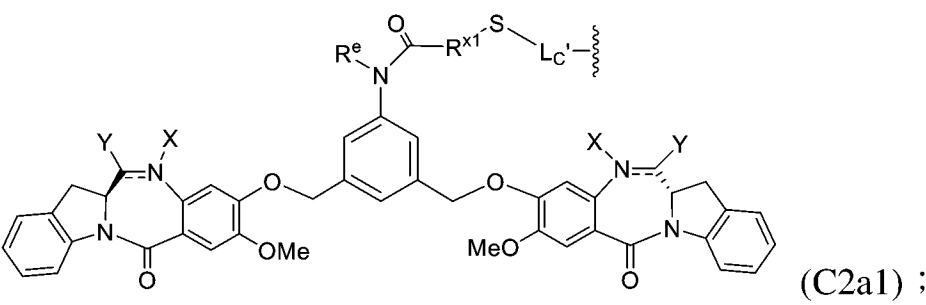
其中：

CBA為本發明之第一態樣中所描述的CD123/IL-3Rα結合劑(例如上文所描述之標的抗體或其抗原結合片段，或以上所描述之其標的多肽)，其經由半胱胺酸殘基共價連接於CyC2；

WC為1或2；

CyC2由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C1-C4)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>x1</sub>為(C1-C6)烷基；

R<sub>e</sub>為-H或(C1-C6)烷基；

W'為-NR<sub>e</sub>'；

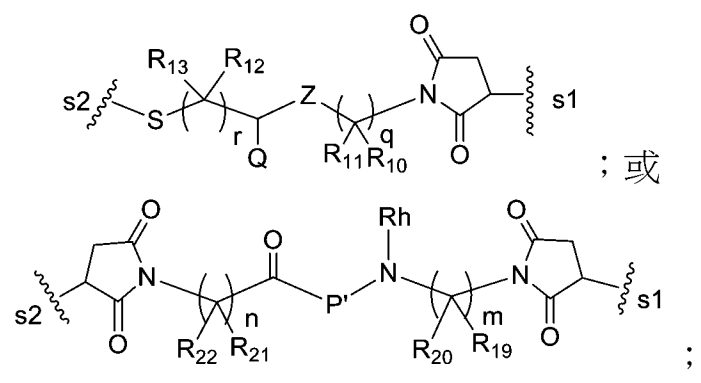
R<sub>e</sub>'為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sub>k</sub>；

n為2至6之整數；

R<sub>k</sub>為-H或-Me；

R<sub>x2</sub>為(C1-C6)烷基；

LC'由以下各式表示：



其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與CyC2上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR9-或-NR9-C(=O)-；

Q為-H、帶電取代基或可離子化基團；

R9、R10、R11、R12、R13、R19、R20、R21及R22在每次出現時獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

Rh為-H或(C1-C3)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

【0452】 在一更特定實施例中，q及r各自獨立地為介於1至6之間的整數，更特定言之，介於1至3之間的整數。甚至更特定言之，R10、R11、R12及R13均為H。

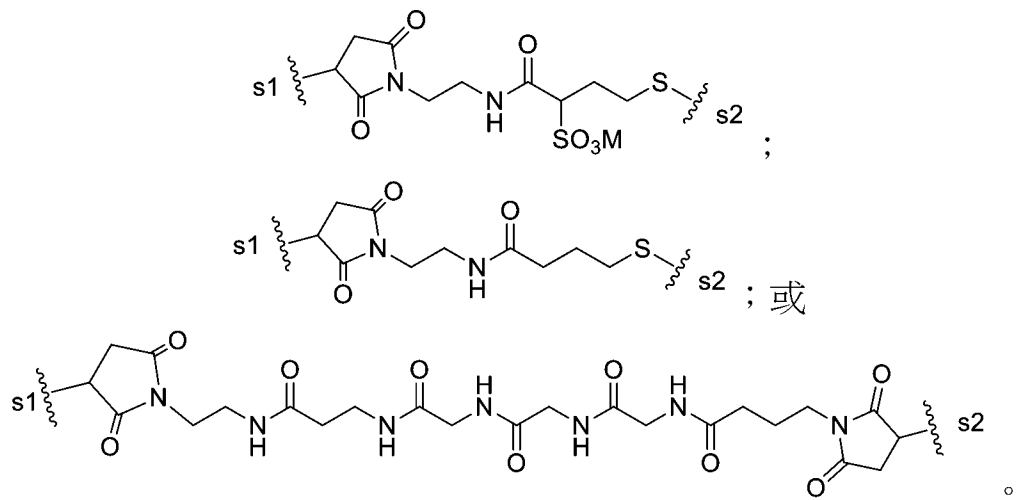
【0453】 在另一更特定實施例中，m及n各自獨立地為介於1與6之間的整數，更特定言之，介於1至3之間的整數。甚至更特定言之，R19、R20、R21及R22均為H。

【0454】 在第十一特定實施例中，對於式(C2)之免疫結合物，Cy<sup>C2</sup>由式(C2a)或(C2a1)表示；且其餘變數如以上在第十特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

【0455】 在第十二特定實施例中，對於式(C2)之免疫結合物，Cy<sup>C2</sup>由式(C2b)或(C2b1)表示；且其餘變數如以上在第十特定實施例中所描述。

【0456】 在第十三特定實施例中，對於式(C2)之免疫結合物，P'為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數如第十、第十一或第十二特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。在一更特定實施例中，P'係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。在另一更特定實施例中，P'為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

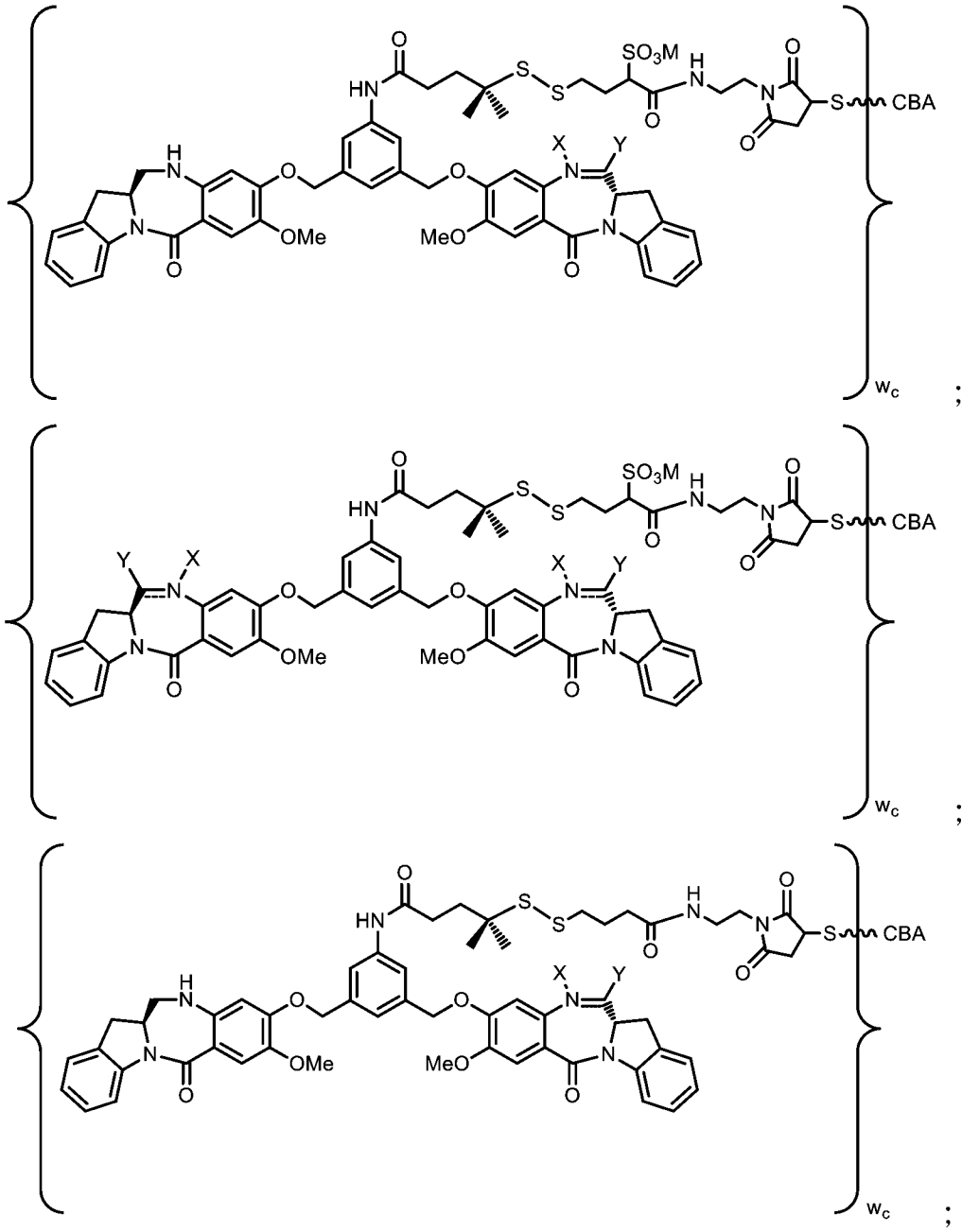
【0457】 在第十四特定實施例中，對於式(C2)之免疫結合物，-L<sub>C</sub>'-由以下各式表示：



【0458】 在第十五特定實施例中，對於式(C2)之免疫結合物，R<sup>e</sup>為H或Me；R<sup>x1</sup>為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，且R<sup>x2</sup>為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，其中R<sup>f</sup>及R<sup>g</sup>各自獨立地為

-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且p為0、1、2或3；且其餘變數如以上在第十、第十一、第十二、第十三或第十四特定實施例中所描述。更特定言之，R<sup>f</sup>與R<sup>g</sup>相同或不同且係選自-H及-Me。

【0459】 在第十六特定實施例中，第三實施例之免疫結合物由以下各式表示：

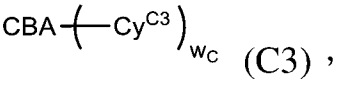






或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO3M。在一更特定實施例中，介於N與C之間的雙線=表示雙鍵，X不存在且Y為-H。在另一特定實施例中，介於N與C之間的雙線=表示單鍵，X為-H且Y為-SO3M。

【0460】 在第十七特定實施例中，第三實施例之免疫結合物由下式表示：

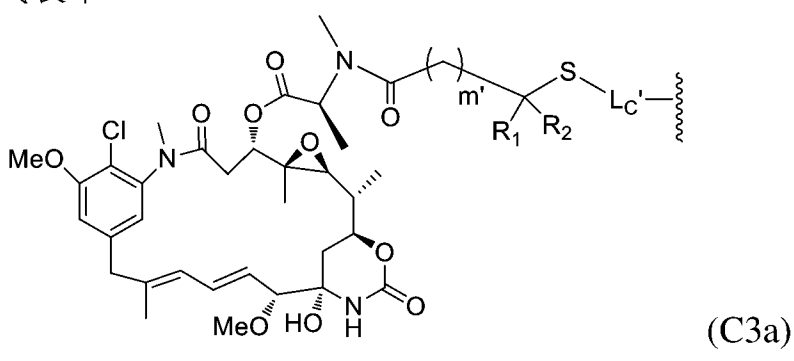


其中：

CBA為本發明之第一態樣中所描述的CD123/IL-3Rα結合劑(例如上文所描述之標的抗體或其抗原結合片段，或以上所描述之其標的多肽)，其經由半胱胺酸殘基共價連接於CyC3；

WC為1或2；

CyC3由下式表示：

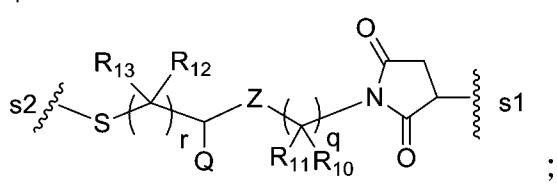


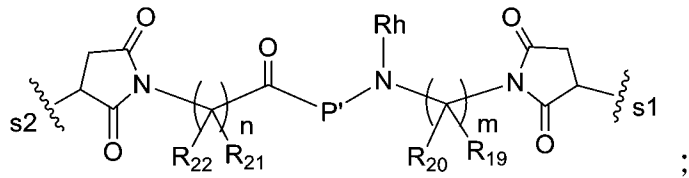
其中：

m'為1或2；

R1及R2各自獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

LC'由以下各式表示：





其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與CyC3上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR9-或-NR9-C(=O)-；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R9、R10、R11、R12、R13、R19、R20、R21及R22在每次出現時獨立地為-H或(C1-C3)烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

Rh為-H或(C1-C3)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

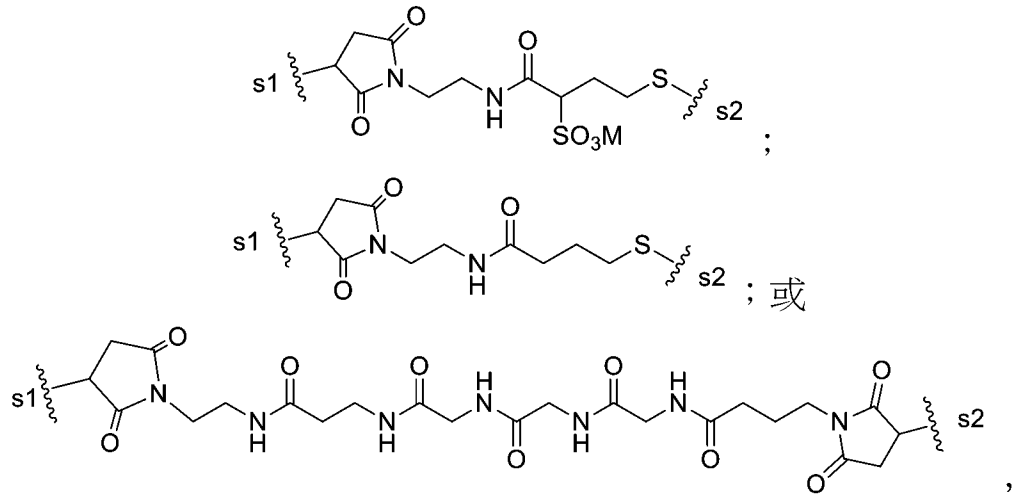
【0461】 在一更特定實施例中，q及r各自獨立地為介於1至6之間的整數，更特定言之，1至3之整數。甚至更特定言之，R10、R11、R12及R13均為H。

【0462】 在另一更特定實施例中，m及n各自獨立地為介於1與6之間的整數，更特定言之，1至3之整數。甚至更特定言之，R19、R20、R21及R22均為H。

【0463】 在第十八特定實施例中，對於式(C3)之免疫結合物，P'為含有2至5個胺基酸殘基之肽；且其餘變數如第十七特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。在一更特定實施例中，P'係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Leu、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、

Val-D-Lys 、 Val-D-Arg 、 D-Val-Cit 、 D-Val-Lys 、 D-Val-Arg 、 D-Val-D-Cit 、 D-Val-D-Lys 、 D-Val-D-Arg 、 D-Arg-D-Arg 、 Ala-Ala 、 Ala-D-Ala 、 D-Ala-Ala 、 D-Ala-D-Ala 、 Ala-Met及Met-Ala 。在另一更特定實施例中，P'為Gly-Gly-Gly 、 Ala-Val 、 Ala-Ala 、 Ala-D-Ala 、 D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala 。

【0464】 在第十九特定實施例中，對於式(C3)之免疫結合物，-Lc'-由以下各式表示：

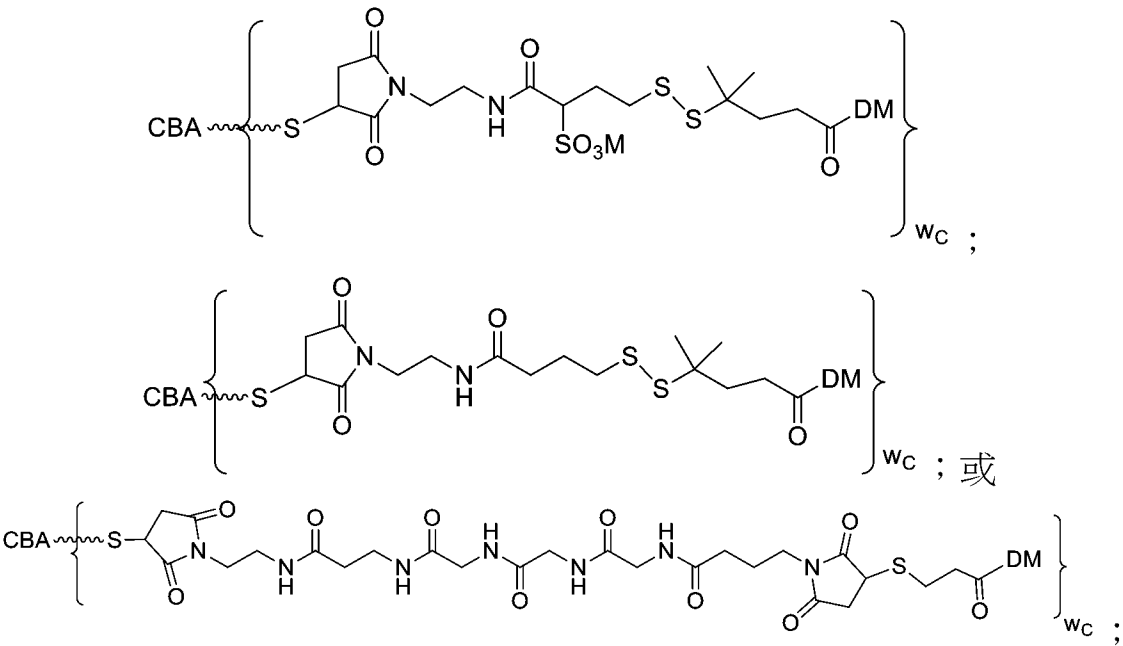


其中M為H<sup>+</sup>或陽離子；且其餘變數如以上在第十七或第十八特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

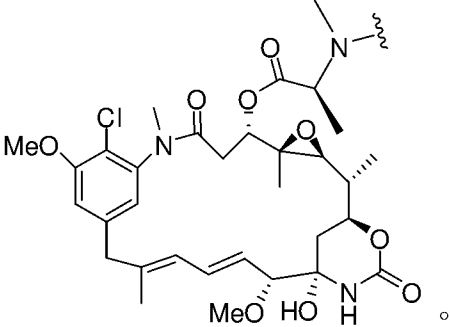
【0465】 在第二十特定實施例中，對於式(C3)之免疫結合物，m'為1，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為H；且其餘變數如以上在第十七、第十八或第十九特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

【0466】 在第二十一特定實施例中，對於式(C3)之免疫結合物，m'為2，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為Me；且其餘變數如以上在第十七、第十八或第十九特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中所描述。

【0467】 在第二十二特定實施例中，第三實施例之免疫結合物由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中DM為由下式表示之藥物部分：



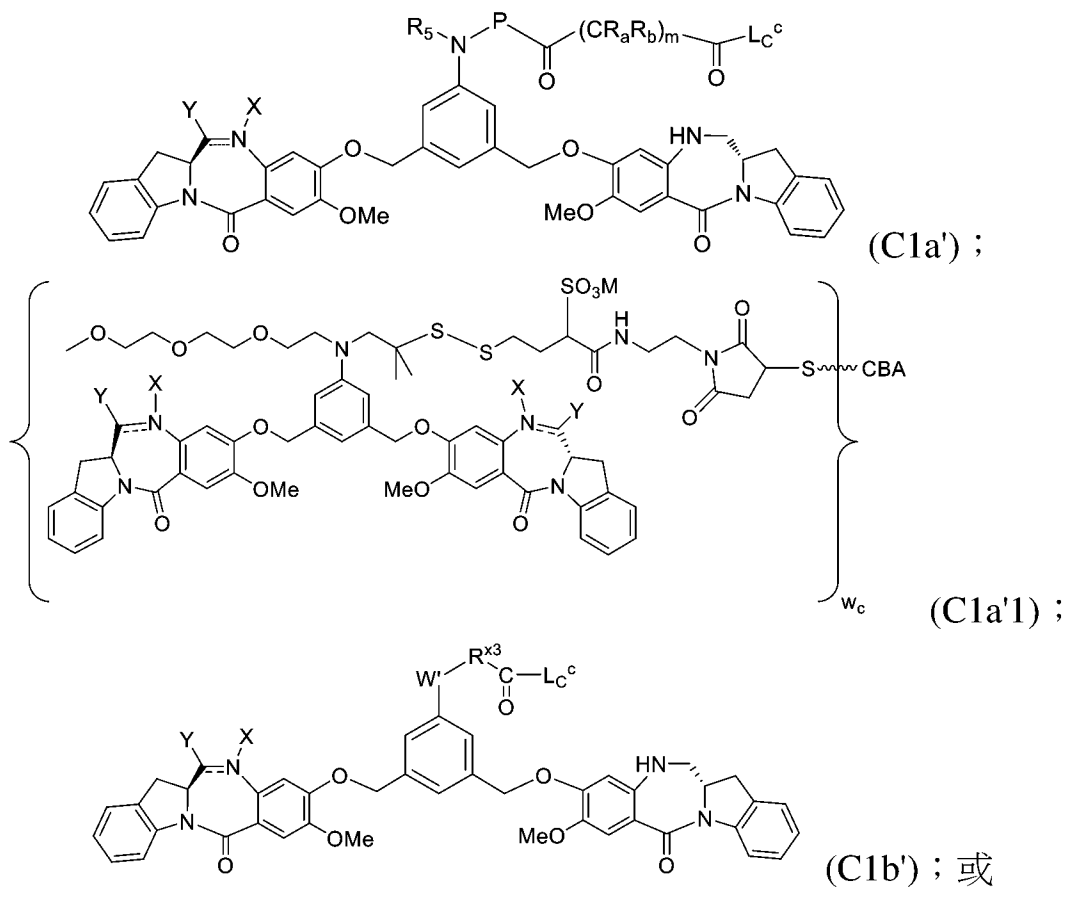
【0468】 在第二十三特定實施例中，對於第三實施例之免疫結合物，M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>；且其餘變數如第一至第二十二特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

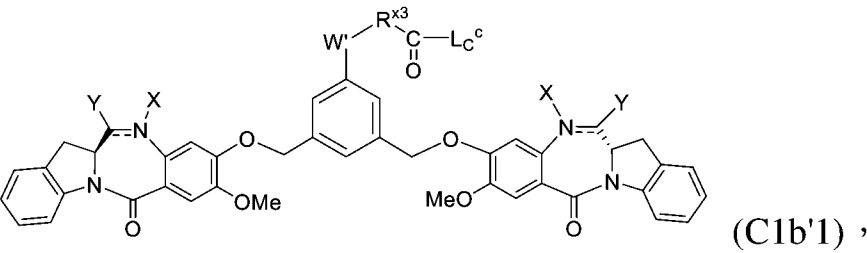
【0469】 在以上第一至第二十三特定實施例中之任一者中，標的抗體或其抗原結合片段或包含該標的抗體或其抗原結合片段之多肽在對應於SEQ ID NO: 54或56之重鏈CH3結構域中經工程改造之Cys (亦即，第5個至最後一個殘基)的位置上具有Cys殘基。標的抗體或其抗原結合片段可包含具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列的免疫球蛋白重鏈區(HC)；及具有SEQ ID NO: 33、35、37或41 (較佳SEQ ID NO: 35或37)中所闡述之胺基酸序列的免疫球蛋白輕鏈可變區(LCVR)。標的抗體或其抗原結合片段亦可包含具有SEQ ID NO: 56中所闡述之胺

基酸序列的Ig重鏈區；及具有SEQ ID NO: 33、35、37或41 (較佳SEQ ID NO: 35或37)中所闡述之胺基酸序列的Ig LCVR。在某些實施例中，來自SEQ ID NO: 54及56之N末端的第二個殘基為Phe，而在某些其他實施例中，來自SEQ ID NO: 54及56之N末端的第二個殘基為Val。

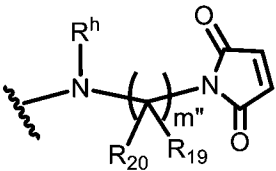
【0470】 以上所描述之第三實施例之免疫結合物(例如，第一至第二十三特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者的免疫結合物)可藉由使具有一或多個游離半胱胺酸之CBA與本文中所描述之具有硫醇反應性基團之細胞毒性劑反應來製備。

【0471】 在一個實施例中，具有硫醇反應性基團之細胞毒性劑由以下各式表示：



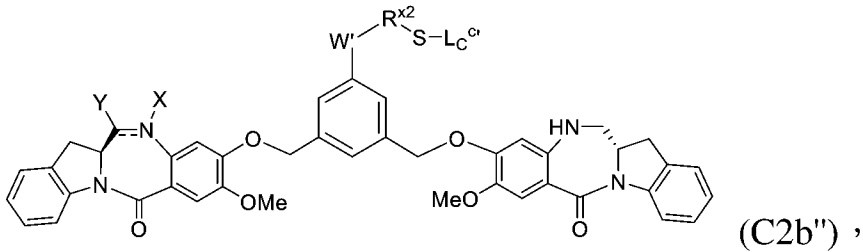
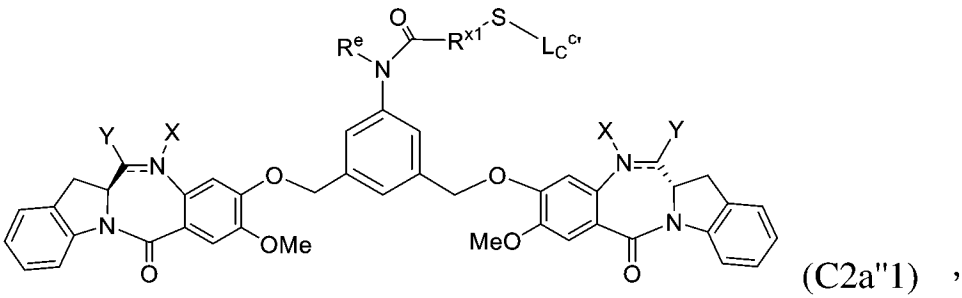
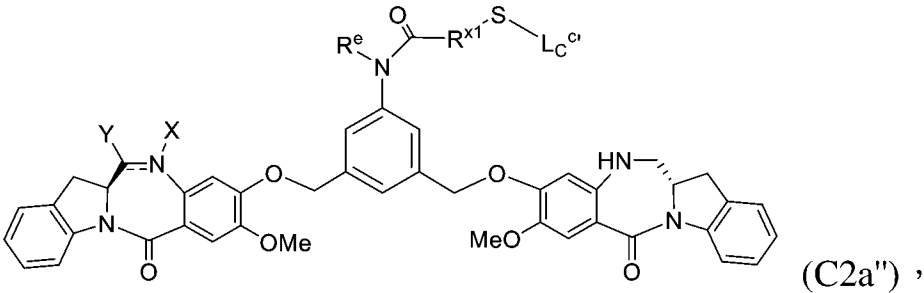


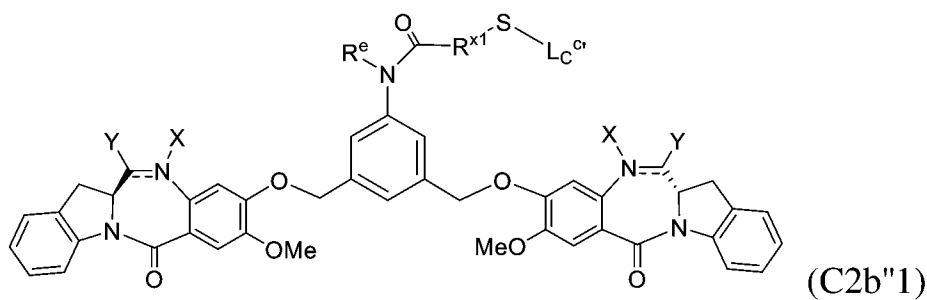
或其醫藥學上可接受之鹽，其中-LCc由以下各式表示：



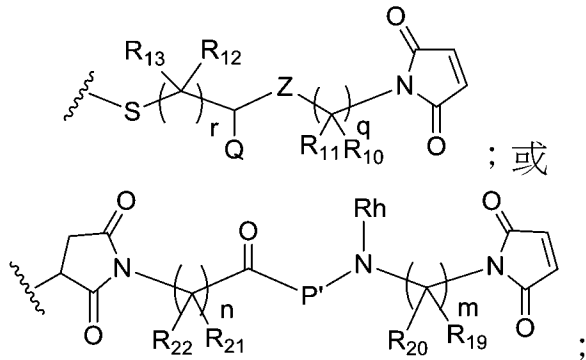
其中變數如以上在第一至第九及第二十三特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0472】 在另一實施例中，具有硫醇反應性基團之細胞毒性劑由以下各式表示：



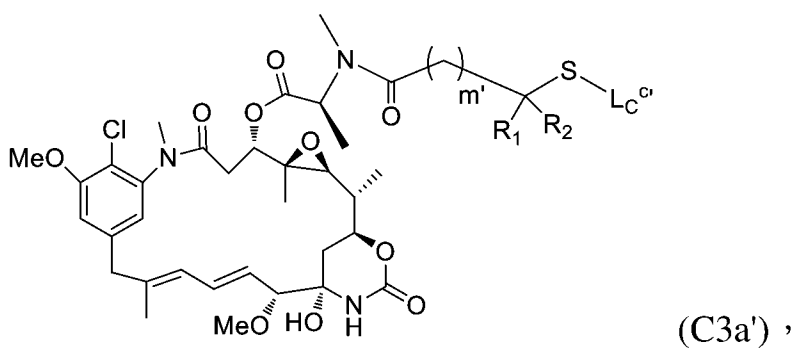


或其醫藥學上可接受之鹽，其中Lcc'由以下各式表示：



其中變數如以上在第十至第十六及第二十三特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0473】 在又一實施例中，具有硫醇反應性基團之細胞毒性劑由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中Lcc'如以上所描述且其餘變數如以上在第十七至第二十三特定實施例或其中所描述之任何更特定實施例中之任一者中所描述。

【0474】 在某些實施例中，有機溶劑用於CBA與細胞毒性劑之反應中以溶解細胞毒性劑。例示性有機溶劑包括但不限於二甲基乙醯胺(DMA)、丙二醇等。在一個實施例中，CBA與細胞毒性劑之反應在DMA及丙二醇存在下進行。



#### 4. 組合物及使用方法

【0475】 本發明包括一種組合物(例如，醫藥組合物)，其包含本文中所描述之標的抗體或其抗原結合片段、或其免疫結合物(例如，式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)及式(C3)之結合物)及載劑(醫藥學上可接受之載劑)。本發明亦包括一種組合物(例如，醫藥組合物)，其包含標的抗體或其抗原結合片段、或式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)及式(C3)之免疫結合物及載劑(醫藥學上可接受之載劑)且進一步包含第二治療劑。本發明組合物適用於在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療增殖性病症，包括血液學癌症、白血病或淋巴瘤。

【0476】 特定言之，本發明提供醫藥組合物，其包含本文中所描述之CD123結合劑或其免疫結合物中的一或多種。在某些實施例中，該等醫藥組合物進一步包括醫藥學上可接受之媒劑。此等醫藥組合物得以用於在人類患者中抑制腫瘤生長及治療癌症，包括血液學癌症、白血病或淋巴瘤。

【0477】 在某些實施例中，藉由組合本發明之經純化抗體或其免疫結合物與醫藥學上可接受之媒劑(例如載劑、賦形劑)來製備調配物以便儲存及使用(Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Edition Mack Publishing, 2000)。適合之醫藥學上可接受之媒劑包括但不限於無毒緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；鹽，諸如氯化鈉；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六甲雙銨；氯化苯銨；氯化苯鈦；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量多肽(例如少於約10個胺基酸殘基)；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；碳水化合物，諸如單糖、二糖、葡萄糖、甘露

糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；鹽形成相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及非離子界面活性劑，諸如TWEEN或聚乙二(PEG)。

**【0478】** 本文中所描述之醫藥組合物可以許多方式投與以用於局部或系統治療。投與可為經局部(諸如至黏膜，包括陰道及直腸遞送)，諸如經皮貼片、軟膏、洗液、乳膏、凝膠、滴劑、栓劑、噴霧、液體及粉劑；經肺(例如，藉由吸入或吹入粉劑或氣霧劑，包括藉由霧化器；氣管內、鼻內、表皮及經皮)；經口；或非經腸，包括靜脈內、動脈內、皮下、腹膜內或肌肉內注射或輸注；或顱內(例如鞘內或心室內)投與。在一些特定實施例中，該投與為靜脈內。本文中所描述之醫藥組合物亦可在活體外或離體使用。

**【0479】** 本發明之抗體或免疫結合物可與諸如已知可有效治療相關疾病或病症之化合物之第二化合物組合於醫藥組合調配物或給藥方案中作為組合療法。在一些實施例中，該第二化合物為抗癌劑。在一些實施例中，該等方法涵蓋投與該第二化合物及本發明之免疫結合物，與投與單獨免疫結合物相比，產生更佳效力。該第二化合物可經由許多方式投與，包括例如局部、經肺、經口、非經腸或顱內投與。在一些實施例中，該投與為經口。在一些實施例中，該投與為靜脈內。在一些實施例中，該投與為經口及經靜脈內。

**【0480】** 抗體或免疫結合物亦可與止痛劑或其他藥物組合於醫藥組合調配物或給藥方案中作為組合療法。

**【0481】** 抗體或免疫結合物亦可與具有抗癌性質之第二化合物組合於醫藥組合調配物或給藥方案中作為組合療法。該醫藥組合調配物或給藥方案之第二化合物可與該組合之ADC具有互補活性，使得其不會對彼此產生不利影響。亦提供包含CD123結合劑及第二抗癌劑之醫藥組合物。

**【0482】** 本發明包括在哺乳動物(例如人類)中抑制異常細胞生長或治療

增殖性病症之方法，其包括向該哺乳動物投與治療有效量之單獨或與第二治療劑組合之本文中所描述之標的抗體或其抗原結合片段或免疫結合物(例如式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)及式(C3)之結合物)或其組合物。

**【0483】** 在某些實施例中，哺乳動物中之異常細胞生長或增殖性病症為與CD123之表現相關或以CD123之表現為特徵的疾病或病狀，諸如癌症，包括血液學癌症、白血病或淋巴瘤。在某些實施例中，該增殖性病症為淋巴器官癌或血液學惡性病。

**【0484】** 舉例而言，癌症可選自由以下各項組成之群：急性骨髓性白血病(AML，包括低CD33 AML、P-糖蛋白陽性AML、復發性AML或難治性AML)；慢性骨髓性白血病(CML)，包括CML原始細胞危象及與CML相關之Abelson致癌基因(Bcr ABL易位)；骨髓發育不良症候群(MDS)；急性B淋巴母細胞白血病或B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)；慢性淋巴細胞性白血病(CLL)，包括李希特氏症候群或李希特氏CLL轉型；毛細胞白血病(HCL)；急性前骨髓細胞性白血病(APL)；B細胞慢性淋巴增生性白血病(B-CLPD)；非典型慢性淋巴細胞性白血病(較佳具有顯著CD11c表現)；原始細胞性漿細胞樣樹突狀細胞贅瘤(BPDCN)；非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)，包括套細胞白血病(MCL)及小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)；霍奇金氏淋巴瘤；系統性肥大細胞病及伯基特氏淋巴瘤。

**【0485】** 在某些實施例中，該B-ALL為CD19陽性B-ALL。在某些其他實施例中，該B-ALL為CD19陰性B-ALL。

**【0486】** 在某些實施例中，該癌症具有至少一個消極預後因子，例如，P-糖蛋白之過度表現、EVI1之過度表現、p53變化、DNMT3A突變、FLT3內部串聯重複。

**【0487】** 在某些實施例中，治療有效量之單獨或與第二治療劑組合之本文

中所描述之標的抗體或其抗原結合片段或免疫結合物(例如式(L1)、式(L2)、式(L3)、式(S1)、式(S2)、式(S3)、式(S4)、式(C1)、式(C2)及式(C3)之結合物)或其組合物優先抑制白血病幹細胞(LSC)、白血病祖細胞(LP)及/或白血病原始細胞相對於正常造血幹細胞(HSC)之增殖。在某些實施例中，以上標的藥劑抑制白血病幹細胞(LSC)、白血病祖細胞(LP)及/或白血病原始細胞之增殖的IC<sub>50</sub>值或半最大濃度比正常造血幹細胞(HSC)低至少10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、300倍、500倍或更多。

【0488】 在某些實施例中，本發明之抗白血病療法不僅靶向並殺死白血病原始細胞，而且較佳亦靶向並殺死白血病祖細胞(LP)及白血病幹細胞(LSC)。在某些實施例中，該療法亦對正常HSC具有較低選擇性。在某些實施例中，LSC、LP及白血病原始細胞上之CD123表現與正常淋巴細胞(其可能接近陰性)相比高得多(例如在LSC、AML祖細胞及AML原始細胞中高出至少20-25倍)。在某些實施例中，LP及LSC上之CD123表現水準至少與白血病原始細胞上同樣高。

【0489】 類似地，本發明提供一種在所選細胞群體中誘導細胞死亡之方法，其包括使靶細胞或含有靶細胞之組織與有效量之本發明之標的抗體或其抗原結合片段或免疫結合物接觸。靶細胞為結合物之細胞結合劑可結合之細胞。

【0490】 若需要，則可隨結合物投與其他活性劑，諸如其他抗腫瘤劑。

【0491】 癌症療法及其劑量、投與途徑及推薦用法在此項技術中為已知的且已描述於諸如Physician's Desk Reference (PDR)之文獻中。PDR揭示治療各種癌症時已使用之藥劑劑量。此等上述化學治療藥物之治療上有效之給藥方案及劑量將視所治療之特定癌症、疾病程度及熟習此項技術之醫師所熟知的其他因素而定，且可由醫師決定。PDR之內容明確以全文引用之方式併入本文中。熟習此項技術者可回顧PDR，使用以下參數中之一或多個來確定可根據本發明之教示加以使用之化學治療劑及結合物之給藥方案及劑量。此等參數包括：綜合指

數；製造商；產品(公司或註冊商標之藥物名稱)；分類索引；一般/化學指標(非商標普通藥物名稱)；藥物之彩色影像；符合FDA標記之產品資訊；化學資訊；功能/作用；適應症及禁忌；試驗研究、副作用、警告。

**【0492】** 活體外用途之實例包括處理自體骨髓隨後將其移植至相同患者中以殺死患病或惡性細胞；處理骨髓隨後對其進行移植以便殺死勝任T細胞且預防移植物對抗宿主疾病(GVHD)；處理細胞培養物以便殺死除不表現靶抗原之所要變異體以外的所有細胞；或殺死表現非所要抗原之變異體。

**【0493】** 非臨床活體外使用之條件由熟習此項技術者容易地確定。

**【0494】** 臨床離體使用之實例為自骨髓中移出腫瘤細胞或淋巴樣細胞隨後進行自體移植用於癌症治療或自體免疫性疾病治療，或自自體或同種異體骨髓或組織中移出T細胞及其他淋巴樣細胞隨後進行移植以便預防GVHD。可如下進行治療。自患者或其他個體收集骨髓，且隨後在含有血清之培養基中培育，向其中添加本發明之細胞毒性劑，濃度範圍為約10  $\mu$ M至1 pM，在約37°C下持續約30分鐘至約48小時。濃度及培育時間之準確條件，亦即，劑量，由熟習此項技術者容易地確定。在培育之後，用含有血清之培養基洗滌骨髓細胞且根據已知方法經靜脈內返至患者。在患者於收集骨髓之時間與再輸注經處理之細胞之間接受諸如摘除化學療法或總體照射過程之其他治療的情形下，使用標準醫學設備將經處理之骨髓細胞冷凍儲存於液氮中。

**【0495】** 對於臨床活體內使用，測試無菌性及內毒素水準之本發明細胞毒性化合物或結合物將作為溶液或凍乾粉末供應。

**【0496】** 適合之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑及賦形劑為熟知的且可在臨床情形允許時由熟習此項技術者決定。適合之載劑、稀釋劑及/或賦形劑之實例包括：(1)杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝生理食鹽水，pH約7.4，含有或不含約1 mg/mL至25 mg/mL人血清白蛋白；(2)0.9%生理食鹽水(0.9% w/v NaCl)；及(3)5% (w/v)

葡萄糖；且亦可含有諸如色胺之抗氧化劑及諸如Tween 20之穩定劑。

【0497】 用於在所選細胞群體中誘導細胞死亡、用於抑制細胞生長及/或用於治療癌症之本發明方法可在活體外、活體內或離體實施。

## 實例

### 實例1 產生針對人類及獼猴CD123抗原之小鼠單株抗體

【0498】 為了產生鼠類抗CD123抗體，將野生型BALB/c雌性小鼠(Charles River Laboratory, Wilmington, MA)每2週五次以 $5 \times 10^6$ 個細胞/小鼠之劑量經皮下注射含表現人類CD123之穩定300-19細胞系的PBS，該細胞系為BALB/c衍生前驅B細胞系(M. G. Reth等人, 1985, *Nature*, 317: 353-355)。處死以用於雜交瘤產生之前三天，使免疫小鼠接受腹膜內注射另一劑量之抗原。根據標準動物方案自小鼠收集脾臟且在兩個無菌霧面載玻片之間研磨以獲得處於RPMI-1640培養基中之單細胞懸浮液。在用ACK溶解緩衝液溶解紅血球之後，隨後將脾臟細胞與鼠類骨髓瘤P3X63Ag8.653細胞(P3細胞) (J. F. Kearney等人, 1979, *J. Immunol*, 123: 1548-1550)以1個P3細胞:3個脾臟細胞之比率混合。對脾臟細胞與P3細胞之混合物進行洗滌且在室溫下在融合培養基(0.3 M甘露醇/D-山梨醇、0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 及1 mg/mL BSA)中用鏈黴蛋白酶處理3 min。藉由添加胎牛血清(FBS, Invitrogen)終止反應；隨後洗滌細胞，再懸浮於2 mL冷融合培養基中且與BTX ECM 2001電融合機器(Harvard Apparatus)融合。將融合之細胞輕緩添加至含有次黃嘌呤-胺基蝶呤-胸苷(HAT)之RPMI-1640選擇培養基(Sigma Aldrich)中，在37°C下培育20 min，且隨後以200  $\mu\text{L}$ /孔接種至平底96孔板中。隨後在5%  $\text{CO}_2$ 培育箱中在37°C下培育各板，直至雜交瘤純系可用於抗體篩選。亦可使用其他免疫及雜交瘤產生技術，包括以下文獻中所描述者：J. Langone及H. Vunakis (編, *Methods in Enzymology*, 第121卷, *Immunochemical Techniques, Part I*, Academic Press, Florida)；以及E. Harlow及D. Lane (*Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY)。

### 雜交瘤篩選及選擇

【0499】 使用流式細胞儀結合檢定，用表現人類CD123之穩定300-19細胞系及野生型300-19細胞進行雜交瘤篩選。簡而言之，首先用CELLTRACE™遠紅外DDAO-SE (Invitrogen)標記野生型300-19細胞，與未經處理之細胞以1:1比率混合，且與雜交瘤上清液一起在冰上培育2小時。隨後洗滌細胞，與經PE標記之抗小鼠IgG (Jackson Immunoresearch)一起培育，洗滌，用福馬林固定且使用FACS陣列(BD Bioscience)加以分析。擴增對人類CD123抗原具有特異性反應性之雜交瘤且藉由流式細胞術結合檢定，使用三個獨立細胞系再篩選上清液：表現人類CD123之穩定300-19細胞系、表現獼猴CD123之300-19細胞系及野生型300-19細胞系。藉由限制稀釋對與人類及獼猴CD123抗原具有陽性結合但在野生型300-19細胞上呈陰性之雜交瘤進行進一步次選殖。自各雜交瘤選擇一個顯示與人類及獼猴CD123抗原之特異性結合的次純系。

【0500】 在此研究過程中進行總計六次融合。篩選大致6,000個雜交瘤，產生對人類及獼猴CD123抗原具有特異性之33個雜交瘤，且次選殖18個雜交瘤。培養穩定次純系且使用市售小鼠IgG同型分析試劑(諸如IsoStrip小鼠單株抗體同型分析套組，Roche Diagnostics GmbH，Germany，產品編號11493027001)鑑別單株抗體之同型。

### 抗體純化

【0501】 使用標準方法，諸如，例如蛋白A或G層析法(HiTrap Protein A或G HP，1 mL，Amersham Biosciences)自雜交瘤次純系上清液中純化抗體。簡而言之，藉由添加1/10體積之1 M Tris/HCl緩衝液pH 8.0來製備上清液以用於層析。使經pH值調節之上清液經由0.22 µm濾膜進行過濾且裝載至經結合緩衝液(PBS，pH 7.3)平衡之管柱上。用結合緩衝液洗滌管柱，直至獲得穩定基線，在

280 nm下無吸收。用含有0.15 M NaCl之0.1 M乙酸緩衝液pH 2.8，使用0.5 mL/min之流速來溶離抗體。收集大致0.25 mL之溶離份且藉由添加1/10體積之1 M Tris/HCl pH 8.0進行中和。使峰溶離份針對1×PBS透析隔夜兩次，且藉由經0.2 µm濾膜過濾進行滅菌。藉由在A280下之吸收率來定量經純化之抗體。

**【0502】** 使用離子交換層析法(IEX)與針對鼠類抗體之四級銨(Q)層析法對經蛋白A純化之溶離份進行進一步拋光。簡而言之，將來自蛋白A純化之樣品緩衝液交換至結合緩衝液(10 mM Tris、10 mM氯化鈉，pH 8.0)中且經由0.22 µm過濾器進行過濾。隨後將所製備之樣品以120 cm/h之流速裝載至經結合緩衝液平衡之Q快速流樹脂(GE Lifesciences)上。選擇管柱尺寸以具有足以結合樣品中之所有MAb的容量。隨後用結合緩衝液洗滌管柱，直至獲得穩定基線，在280 nm下無吸收。藉由在20倍柱體積(CV)下起始10 mM至500 mM氯化鈉之梯度來溶離抗體。基於在280 nm (A280)下之吸收率量測來收集峰溶離份。用尺寸排阻層析法(SEC)在具有SWXL保護管柱6.0×40 mm之TSK凝膠G3000SWXL 7.8×300 mm (Tosoh Bioscience，Montgomeryville，PA)上使用Agilent HPLC 1100系統(Agilent，Santa Clara，CA)評估單體之百分比。彙集單體含量在95%以上之溶離份，使用TFF系統緩衝液交換至PBS (pH 7.4)，且藉由經0.2 µm濾膜過濾進行滅菌。藉由A280，使用消光係數1.47來測定經純化之抗體的IgG濃度。亦使用諸如陶瓷羥基磷灰石(CHO)之替代方法對抗體進行拋光，具有良好選擇性。使用具有40 µm粒度之II型CHO樹脂(Bio-Rad Laboratories)，利用與如針對IEX層析法所描述類似之方案。用於CHO之結合緩衝液對應於20 mM磷酸鈉pH 7.0，且在20 CV下用20-160 mM磷酸鈉之梯度溶離抗體。

**實例2 抗CD123抗體VL及VH區之選殖及測序**

*VL及VH區之選殖*

**【0503】** 使用RNeasy套組(QIAGEN)，根據製造商之方案由5×10<sup>6</sup>個CD123



雜交瘤細胞製備總細胞RNA。使用SuperScript II cDNA合成套組(Invitrogen)由總RNA隨後合成cDNA。

【0504】 用於擴增來源於雜交瘤細胞之抗體可變區cDNA的PCR程序係基於Wang等人 ((2000) *J Immunol Methods*. 233:167-77)及Co等人((1992) *J Immunol*. 148:1149-54)中所描述之方法。藉由5'-端上之簡並引物及分別處於3'-端上之鼠類 $\kappa$ 或IgG<sub>1</sub>恆定區特異性引物來擴增V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub>序列。將經純化之擴增子送至Beckman Coulter Genomics以進行定序。

【0505】 因為用於選殖V<sub>L</sub>及V<sub>H</sub> cDNA序列之簡並引物改變5'-端，因此需要額外定序工作以驗證完整cDNA序列。將初步序列輸入NCBI IgBlast網站之搜尋查詢以鑑別得到抗體序列之鼠類生殖系序列。隨後設計PCR引物以便對鼠類抗體之生殖系連接之前導序列進行退火，使得此新PCR反應將產生完整可變區cDNA序列，不因PCR引物而改變。

用於序列證實之質量測定

【0506】 將針對各抗CD123抗體獲得之可變區cDNA序列與生殖系恆定區序列組合以獲得全長抗體cDNA序列。隨後由cDNA序列之轉譯計算重鏈及輕鏈之分子量，且與藉由對經純化鼠類抗CD123抗體進行LC/MS分析而獲得之分子量相比較。各輕鏈及重鏈之觀測分子量相配期望值。

實例3 抗體人類化

重組抗體表現

【0507】 對鼠類CD123抗體之經證實可變區胺基酸序列進行密碼子優化，合成並且藉由Blue Heron Biotechnology與人類抗體恆定區一起進行同框選殖，以構建CD123抗體之嵌合型式。用於嵌合CD123抗體之載體、恆定區及選殖流程與以下所描述之用於人類化CD123抗體者一致。嵌合抗體chCD123-6由分別具有SEQ ID NO: 28及29之小鼠可變區序列連同分別用於重鏈及輕鏈之人類

IgG1及κ恆定序列構成。將輕鏈可變區選殖至pAbKZeo質體之EcoRI及BsiWI位點中，且將重鏈可變區選殖至pAbG1Neo質體之HindIII及ApaI位點中。在振盪瓶中使用懸浮適應型HEK-293T細胞，使用改進型PEI程序在黏附HEK-293T細胞中瞬時產生此等表現構建體。如先前所描述來進行PEI瞬時轉染(Durocher等人, *Nucleic Acids Res.* 30(2):E9 (2002))，除了使HEK-293T細胞在Freestyle 293 (Invitrogen)中生長且在添加PEI-DNA複合物之後保持培養物體積未加稀釋。將轉染物培育一週，且隨後依序藉由標準蛋白A層析及拋光層析程序來純化澄清上清液。

抗體人類化

【0508】 使用實質上如Jones等人, *Nature* 321: 604-608, 1986、Verhoeyen等人, *Science* 239: 1534-1536, 1988、美國專利第5,225,539號及美國專利第5,585,089號中所描述之互補決定區(CDR)移植程序對鼠類CD123-6抗體進行人類化。CDR移植一般由用人類抗體Fv構架區置換小鼠抗體之Fv構架區(FR)同時保留對親本抗體之特異性抗原結合性質非常重要之小鼠CDR殘基組成。遵循Kabat編號方案及Kabat CDR定義之CD123-6抗體之例示性CDR如以下表A中所指示。

表A

| CD123-6 CDRs (CDR 移植)                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 輕鏈                                                                                                                                                    |
| CDR-L1：<br>鼠類：KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 19)<br>CDR 移植：RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 20)<br>CDR-L2：RVNRLVD (SEQ ID NO: 21)<br>CDR-L3：LQYDAFPYT (SEQ ID NO: 22) |
| 重鏈                                                                                                                                                    |
| CDR-H1：SSIMH (SEQ ID NO: 5)                                                                                                                           |



【0513】 非常確定構架殘基亦可對抗原結合存在結構貢獻，且可作為背部突變再引入，以最大程度地保留抗原結合親和力。Foote及Winter, *J. Mol. Biol.* 224: 487-499 (1992)。直接處於CDR下方之殘基平臺稱為維尼爾區殘基，可能有助於保留指引抗體之特異性及親和力之CDR環的構形。因此，製造含有維尼爾區殘基之一或多個背部突變之變異體，且隨後評估抗原結合以及功能IL3抑制活性。所測試之維尼爾區背部突變包括V<sub>L</sub>中之3個殘基(FW-L2中之位置46及FW-L3中之位置69、71)及V<sub>H</sub>中之8個殘基(FW-H1中之位置2、28，FW-H2中之位置48，及FW-H3中之位置67、69、71、73、78)。具有維尼爾區背部突變之若干CDR移植CD123-6抗體對TF-1細胞展現IL3抑制活性，如型式4.6或在本文中稱為「Gv4.6」(V<sub>L</sub> Gv4及V<sub>H</sub> Gv6)及型式4.7或在本文中稱為「Gv4.7」(V<sub>L</sub> Gv4及V<sub>H</sub> Gv7)所例示(圖1)。

【0514】 所描述之CDR移植CD123-6抗體之特定構架殘基使用提供於以下表B及表C中。

表B CD123-6抗體VL之CDR移植

| CD123-6-V <sub>L</sub> |          |                              |                              |
|------------------------|----------|------------------------------|------------------------------|
| Kabat<br>位置            | 鼠類殘<br>基 | 人類<br>(CDR 移<br>植) v1 殘<br>基 | 人類<br>(CDR 移<br>植) v4 殘<br>基 |
| 3                      | K        | Q                            | Q                            |
| 11                     | M        | L                            | L                            |
| 12                     | Y        | S                            | S                            |
| 15                     | L        | V                            | V                            |
| 17                     | E        | D                            | D                            |
| 43                     | S        | A                            | A                            |
| 46                     | T        | S                            | <u>T</u>                     |
| 69                     | Q        | T                            | <u>N</u>                     |
| 71                     | Y        | F                            | <u>Y</u>                     |
| 72                     | S        | T                            | T                            |
| 79                     | E        | Q                            | Q                            |
| 80                     | Y        | P                            | P                            |
| 83                     | M        | F                            | F                            |
| 84                     | G        | A                            | A                            |
| 85                     | I        | T                            | T                            |
| 100                    | G        | Q                            | Q                            |
| 104                    | L        | V                            | V                            |
| 24                     | K        | R                            | R                            |



|     |   |   |          |          |
|-----|---|---|----------|----------|
| 75  | S | T | T        | T        |
| 78  | A | V | <u>A</u> | <u>A</u> |
| 79  | N | Y | Y        | Y        |
| 82a | N | S | S        | S        |
| 83  | T | R | R        | R        |
| 87  | S | T | T        | T        |
| 108 | S | L | L        | L        |

【0515】 另外，為了最小化關於對屬於CDR中之結合離胺酸之影響的擔心，在CDR移植時將鼠類CD123-6抗體CDR-L1中之離胺酸24置換為精胺酸(參見以上表A)。

【0516】 亦遵循Roguska等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91(3):969-973, 1994及Roguska等人, *Protein Eng.* 9(10):895-904, 1996先前所描述之方法，藉由可變域表面重整對CD123-6抗體進行人類化。表面重整一般涉及鑑別輕鏈及重鏈中之可變區構架表面殘基且用人類等效物對其進行置換。鼠類CDR及埋藏構架殘基保留在表面重整抗體中。CD123-6抗體之例示性CDR如表D中所指示加以定義。

表D

|                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CD123-6 抗體 CDR (表面重整)</b>                                                                                                                                                  |
| <b>輕鏈</b>                                                                                                                                                                     |
| CDR-L1：<br>鼠類：KASQDINSYLS (SEQ ID NO: 19)<br>表面重整：RASQDINSYLS (SEQ ID NO: 20)<br>CDR-L2：RVNRLVD (SEQ ID NO: 21)<br>CDR-L3：LQYDAFPYT (SEQ ID NO: 22)                           |
| <b>重鏈</b>                                                                                                                                                                     |
| CDR-H1：SSIMH (SEQ ID NO: 5)<br>CDR-H2：<br>鼠類表面重整 v1.1：YIKPYNDG <b>TK</b> (SEQ ID NO: 6)<br>表面重整 v1.0：YIRPYNDG <b>TR</b> (SEQ ID NO: 7)<br>CDR-H3：EGGNDYYDTMDY (SEQ ID NO: 11) |
| <b>Kabat CD123-6 CDR-H2</b>                                                                                                                                                   |
| 鼠類 CDR-H2：YIKPYNDG <b>TKYNEKFKG</b> (SEQ ID NO: 8)<br>表面重整 v1.0 CDR-H2：YIRPYNDG <b>TRYNQKFQG</b> (SEQ ID NO: 9)<br>表面重整 v1.1 CDR-H2：YIKPYNDG <b>TKYNQKFQG</b> (SEQ ID NO: 10) |
| *雙下劃線序列標記 Kabat 重鏈 CDR-H2 中不被視為用於表面重整之 CDR 的部分。                                                                                                                               |

【0517】 為了最小化關於對屬於CDR中之結合離胺酸之影響的擔心，將鼠類CD123-6抗體輕鏈CDR-L1之離胺酸24置換為精胺酸。類似地，將鼠類CD123-6抗體重鏈CDR-H2之離胺酸52及59置換為精胺酸以獲得表面重整型式1.0。將AbM重鏈CDR-H2定義用於表面重整，故該表提供用於CD123-6抗體之鼠類及人類型式的彼等以及例示性Kabat定義重鏈CDR-H2序列。

【0518】 表面殘基位置定義為具有30%或更大相對可及性之任何位置



(Pedersen等人, *J. Mol. Biol.* 235: 959-973, 1994)。隨後將計算表面殘基與人類生殖系表面序列比對，以鑑別最同源人類表面序列。用作CD123-6抗體輕鏈可變域之置換表面的人類生殖系序列為IGKV1-16\*01，而IGHV1-69\*10用作重鏈可變域之置換表面。特定構架表面殘基變化提供於以下表E及表F中。

表E CD123-6抗體VL之表面重整

| CD123-6 V <sub>L</sub> |          |                    |
|------------------------|----------|--------------------|
| Kabat<br>位置            | 鼠類<br>殘基 | 人類(表<br>面重整)<br>殘基 |
| 1                      | D        | D                  |
| 3                      | K        | <u>Q</u>           |
| 5                      | T        | T                  |
| 9                      | S        | S                  |
| 12                     | Y        | <u>S</u>           |
| 15                     | L        | <u>V</u>           |
| 18                     | R        | R                  |
| 40                     | P        | P                  |
| 41                     | G        | G                  |
| 57                     | G        | G                  |
| 60                     | S        | S                  |
| 67                     | S        | S                  |
| 80                     | Y        | <u>P</u>           |
| 81                     | E        | E                  |
| 100                    | G        | <u>Q</u>           |
| 103                    | K        | K                  |
| 107                    | K        | K                  |
| 108                    | R        | R                  |
| 24                     | K        | <u>R</u>           |

表F CD123-6抗體VH之表面重整

| CD123-6 V <sub>H</sub> |          |                  |                         |
|------------------------|----------|------------------|-------------------------|
| Kabat<br>位置            | 鼠類<br>殘基 | 人類<br>v1.0<br>殘基 | 人類(表<br>面重整)<br>v1.1 殘基 |
| 1                      | E        | <u>Q</u>         | <u>Q</u>                |
| 2                      | F        | <u>V</u>         | F                       |
| 3                      | Q        | Q                | Q                       |
| 5                      | Q        | <u>V</u>         | <u>V</u>                |
| 9                      | P        | <u>A</u>         | <u>A</u>                |
| 11                     | L        | <u>V</u>         | <u>V</u>                |
| 13                     | K        | K                | K                       |
| 14                     | P        | P                | P                       |
| 19                     | K        | K                | K                       |
| 23                     | K        | K                | K                       |
| 28                     | I        | <u>T</u>         | <u>T</u>                |
| 41                     | P        | P                | P                       |
| 42                     | G        | G                | G                       |
| 43                     | Q        | Q                | Q                       |
| 61                     | E        | <u>Q</u>         | <u>Q</u>                |
| 62                     | K        | K                | K                       |
| 64                     | K        | <u>Q</u>         | <u>Q</u>                |
| 65                     | G        | G                | G                       |
| 73                     | K        | <u>R</u>         | K                       |
| 74                     | S        | S                | S                       |



(2 ng/mL)以起始細胞增殖。在37°C下在濕潤5% CO<sub>2</sub>培育箱中將細胞培育3天。藉由比色WST-8檢定(Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US)測定各孔中之活細胞的相對數目。WST-8在活細胞中由脫氫酶還原成可溶於組織培養基中之橘色甲臘產物。所產生之甲臘之量與活細胞數目成正比。以最終體積之10%向孔中添加WST-8，且在37°C下在濕潤5% CO<sub>2</sub>培育箱中將各板再培育2至6小時。隨後在板讀取光譜儀上以雙波長模式450 nm/650 nm量測吸收率，且將650 nm下之吸收率(細胞所致之非特異性光散射)減去450 nm下之吸收率。藉由首先修正培養基背景吸收率，且隨後將經抗體處理之各樣品之值除以含未處理細胞之孔(對照)的平均值來計算各孔中之相對細胞數目。

【0521】 來自典型檢定之結果提供於圖2A及圖2B中。與先前報導之資料(Sun等人1996)一致，7G3而非6H6或9F5抗體實質上抑制IL-3依賴性增殖。出乎意料地，此研究中所產生之若干抗CD123抗體能夠比7G3甚至更顯著地抑制TF-1細胞之IL-3依賴性增殖(圖2A)。舉例而言，抗體3、6及14將TF-1細胞數目減至小於對照(在不存在抗體之情況下生長的TF-1細胞)中之細胞數目的5%，而7G3抗體將細胞數目減至對照中之細胞數目的15%。相比之下，用其他抗CD123抗體(例如，抗體2、5、7、8、9、12、13、16、18、20、21及22)處理對細胞增殖僅具有最低效應或完全無效應。

【0522】 抗體3、6、14及7G3對TF-1細胞增殖之抑制具有IL-3依賴性，因為當細胞在存在存在另一生長因子GM-CSF之情況下生長時，此等抗體不具有抑制效應(圖2B)。

【0523】 接下來，確定抑制IL3依賴性增殖所需之抗體3、6、14 (分別重命名為muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14)及7G3之濃度。將TF-1細胞以6,000個細胞/孔接種於100 µL培養基中。使用6倍稀釋系列將該等抗體稀釋至培養基中且每孔添加50 µL稀釋物質。隨後將IL3以最終濃度1 ng/mL添加至細胞。最終抗

體濃度典型地介於 $6 \times 10^{-8}$  M至 $8 \times 10^{-12}$  M之範圍內。在37°C下在濕潤5% CO<sub>2</sub>培育箱中將細胞培育3天。如以上所描述藉由WST-8檢定來測定各孔中之相對細胞數目。將相對細胞數目值相對於抗體濃度繪製曲線圖且提供於圖3中。顯而易見，muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14及7G3實質上且以劑量依賴性方式抑制TF-1細胞之IL-3依賴性增殖，而對照無功能抗CD123抗體不具有此種效應。舉例而言，在所測試之最高抗體濃度下，用7G3處理使相對細胞數目減至18%，IC<sub>50</sub>值為0.33 nM。在所測試之最高抗體濃度下，用muCD123-3處理使相對細胞數目減至2%，IC<sub>50</sub>值為0.26 nM。同樣，在所測試之最高抗體濃度下，用muCD123-14或muCD123-6處理使相對細胞數目減至小於1%，IC<sub>50</sub>值分別為0.08 nM或0.05 nM。因此，muCD123-3、muCD123-6及muCD123-14抑制TF-1細胞之IL-3依賴性增殖達與7G3抗體相比顯著更高之程度。

**實例5 鼠類抗CD123抗體之結合親和力**

【0524】 藉由流式細胞術使用經純化之抗體來測試結合親和力。說明muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14及7G3與表現CD123之TF-1及HNT-34細胞之結合的FACS直方圖分別示於圖4A及圖4B中。將TF-1細胞( $5 \times 10^4$ 個細胞/樣品)與不同濃度之鼠類抗體一起在200 μL FACS緩衝液(補充有2%正常山羊血清之DMEM培養基)中培育。隨後使細胞球粒化，洗滌兩次，且與100 μL藻紅素(PE)結合山羊抗小鼠IgG抗體(Jackson Laboratory)一起培育1 h。再次使細胞球粒化，用FACS緩衝液洗滌且再懸浮於200 μL含1%甲醛之PBS中。樣品可使用具有HTS多孔取樣器之FACSCalibur流式細胞儀或FACS陣列流式細胞儀獲取，且使用CellQuest Pro加以分析(均來自BD Biosciences，San Diego，US)。對於各樣品，計算FL2之幾何平均螢光強度且針對抗體濃度繪於半對數圖中。藉由非線性回歸產生劑量反應曲線，且使用GraphPad Prism v4 (GraphPad software，San Diego，CA)計算對應於各抗體之表觀解離常數(K<sub>d</sub>)的各曲線之EC<sub>50</sub>值。對於所有測試抗

體均觀測到強結合，且對於muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14及7G3抗體， $K_d$ 值分別對應於0.3 nM、0.1 nM、0.3 nM及0.9 nM (圖4A)。因此，在此實驗中，標的鼠類CD123抗體之結合比7G3抗體強至少3-9倍。

【0525】 同樣，當另一CD123陽性急性骨髓性白血病細胞系HNT-34用於以上所描述之相同流式細胞術檢定時亦觀測到強結合。對於muCD123-3、muCD123-6、muCD123-14及7G3，如以上所描述而算出之 $K_d$ 值分別為0.2 nM、0.07 nM、0.5 nM及2 nM (圖4B)。因此，在此實驗中，標的鼠類CD123抗體之結合比7G3抗體強至少4-28倍。

【0526】 此等數據說明，muCD123-3、muCD123-6及muCD123-14與7G3抗體相比對CD123陽性AML細胞具有較低 $K_d$  (其表示較高親和力)。

**實例6 嵌合抗CD123抗體之結合親和力**

【0527】 檢定嵌合抗體chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14對HNT-34細胞之結合親和力，與嵌合同型對照IgG (chKTI)相比較。如實例5中所描述使用二級PE結合之山羊抗人類抗體進行流式細胞術結合檢定並分析。圖5A描繪各抗體之劑量反應曲線。使用GraphPad Prism v4 (GraphPad software，San Diego，CA)計算各抗體之表觀解離常數( $K_d$ )之值。資料顯示嵌合化僅適度影響此等抗體之結合親和力。chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14之 $K_d$ 值分別為0.1 nM、0.04 nM及0.2 nM。此等值與實例5中所報導之其鼠類對應物的彼等值相差至多2.5倍。不出所料，chKTI抗體在測試濃度下不結合細胞(圖5A)。

【0528】 使用另一CD123陽性急性骨髓性白血病細胞系MOLM-13來證實chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14對AML細胞之高親和力。如以上所描述進行流式細胞術結合檢定並分析。圖5B描繪各抗體之劑量反應曲線。chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14之表觀解離常數( $K_d$ )值分別為0.2 nM、0.08 nM及0.2 nM。在最高測試濃度(10 nM)下，對於嵌合同型對照IgG (chKTI抗體)，僅觀測到

邊界結合。

【0529】 因此，chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14保留其鼠類對應物之高親和力。

### 嵌合抗體之功能活性

【0530】 檢定chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14及用作陰性對照之無功能抗CD123抗體抑制TF-1細胞之IL3依賴性增殖的能力。如實例4中所描述進行該等檢定並分析。用chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14處理以劑量依賴性方式減少相對細胞數目，IC<sub>50</sub>值分別為0.1 nM、0.03及0.05 nM (圖6)。對照無功能抗體不影響細胞生長。因此，chCD123-3、chCD123-6及chCD123-14保留其鼠類對應物之功能活性。

### 實例7 人類化抗CD123抗體之結合親和力

【0531】 將例示性人類化抗CD123抗體huCD123-6Gv4.7S2及huCD123-6Gv4.7S3對HNT-34細胞之結合親和力分別與其鼠類及嵌合對應物muCD123-6及chCD123-6相比較。並行測試7G3抗體及嵌合同型對照IgG(chKTI)。如實例5中所描述進行流式細胞術結合檢定並分析。圖7A描繪各抗體之劑量反應曲線。此等資料顯示人類化不影響抗體之結合親和力，因為huCD123-6Gv4.7S2、huCD123-6Gv4.7S3、chCD123-6及muCD123-6之K<sub>d</sub>大致為0.06 nM。7G3抗體之表觀K<sub>d</sub>顯著較高，大致為2 nM。chKTI抗體在測試濃度下不結合細胞。因此，兩種huCD123-6Gv4.7純系均保留鼠類及嵌合對應物之高親和力且與7G3抗體相比對表現CD123之細胞具有更高親和力(例如高出至少約30倍)。

【0532】 類似地，使用HNT-34細胞來檢定例示性人類化huCD123-6Gv4.7抗體之ADC結合物的結合親和力，與未結合huCD123-6Gv4.7相比較。如實例5中所描述使用二級PE結合之山羊抗人類抗體進行流式細胞術結合檢定並分析。

圖7B及圖7C描繪各抗體及相應結合物之劑量反應曲線。資料顯示結合僅適度影響此等抗體之結合親和力。

人類化抗CD123抗體之功能活性

【0533】 將例示性人類化抗CD123抗體 huCD123-6Gv4.7S2 及 huCD123-6Gv4.7S3之功能活性(抑制TF-1細胞之IL3依賴性增殖的能力)與其嵌合對應物chCD123-6抗體相比較。並行測試7G3抗體。如實例4中所描述進行該等檢定並分析。

【0534】 用huCD123-6Gv4.7S2、huCD123-6Gv4.7S3及chCD123-6處理類似地抑制IL-3依賴性增殖：該增殖在1 nM下受到完全抑制，IC<sub>50</sub>為0.02 nM (圖8A)。然而，用7G3處理對細胞增殖不具有此種深遠影響：抗體IC<sub>50</sub>為0.2 nM且不能夠完全抑制細胞增殖，而是僅在最高濃度(10 nM)下將細胞數目減至18%。

【0535】 huCD123-6Gv4.7S2、huCD123-6Gv4.7S3、chCD123-6及7G3對TF-1細胞增殖之抑制具有IL-3依賴性，因為當細胞在存在存在另一生長因子GM-CSF之情況下生長時，此等抗體不具有抑制效應(圖8B)。

【0536】 因此，huCD123-6Gv4.7保留其鼠類及嵌合對應物之功能活性，且與7G3抗體相比在抑制IL-3依賴性增殖方面顯著更具活性。

實例8 抗原決定基作圖

【0537】 CD123抗原IL-3受體鏈 $\alpha$  (IL-3R $\alpha$ )由 378個胺基酸構成，其含有涉及IL-3結合之306胺基酸細胞外域、20胺基酸跨膜域及具有52個胺基酸之短胞質尾部。細胞外域可進一步分成N末端結構域(NTD)，其包含自成熟蛋白質之19位酰胺酸(例如信號肽裂解後)至100位絲胺酸的區域；及細胞因子識別基元(CRM)，其由兩個離散摺疊結構域構成：結構域2 (胺基酸101-204)及結構域3 (胺基酸205-306)。藉由利用IL-3R $\alpha$ 細胞外域與保留IL-3R $\alpha$ 拓撲結構且共用對信號傳導必不可少之共同 $\beta$ 亞單元的粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子受體 $\alpha$ 鏈(GMR $\alpha$ )之



組合對嵌合蛋白質進行工程改造本文中所描述之某些抗CD123抗體之抗原決定基進行作圖。

*IL-3Rα變異體選殖及表現*

【0538】 CD123/IL-3Rα細胞外域(殘基1-306)表現為組胺酸標籤化蛋白質。對蛋白質序列進行密碼子優化且藉由Life Technologies來合成，並且利用EcoRI及HindIII限制位點與10組胺酸標籤一起同框選殖於pABLT哺乳動物表現載體中。類似地合成並選殖亦包含自成熟蛋白質之25位絲胺酸至114位絲胺酸之N末端結構域的對照GMRα蛋白質之細胞外域(殘基1-325)及包含115位甘胺酸至325位纈胺酸之CRM結構域。隨後藉由限制消化以GMRα分子之相應序列置換IL-3Rα分子之N末端結構域(殘基1-100)或CRM結構域(殘基101-306)來構建IL3Rα /GMRα嵌合受體蛋白表現載體。IL3Rα (1-100)編碼IL3Rα殘基1-100與GMRα殘基115-325之融合物，且IL3Rα (101-306)編碼GMRα殘基1-114與IL3Rα殘基101-306之融合物，如圖9A中所說明。

【0539】 經由HEK 293T細胞之瞬時轉染來表現IL3-Rα、GMRα及兩種嵌合IL-3Rα His標籤化蛋白質IL3-Rα (1-100)及IL3-Rα (101-306)，且使用Ni瓊脂糖排阻層析法(GE healthcare)按照製造商之說明自轉染細胞之上清液中純化。

*與多種IL3Ra構建體之抗體結合*

【0540】 在酶聯免疫吸附檢定(ELISA)格式中測試嵌合及人類化抗IL3Rα抗體與以上所描述之IL-3Rα蛋白的結合。簡而言之，在50 mM碳酸氫鈉緩衝液pH 9.6中將藉由Ni瓊脂糖排阻層析法加以純化之各His標籤化IL-3Rα蛋白稀釋至1 ng/mL且將100 μL添加至各孔中。在4℃下培育16 h之後，用Tris緩衝生理食鹽水+0.1% Tween-20 (TBST)洗滌各板，隨後用200 μL阻斷緩衝液(TBS+1% BSA)阻斷。接下來，以一式兩份將連續稀釋於阻斷緩衝液中之100 μL一級抗體添加至ELISA孔且在室溫下培育1 h。隨後用TBST將各板洗滌3次，隨後向各孔添加100

μL抗人類IgG (H+L)-HRP (Jackson ImmunoResearch)。再一次在室溫下將各板培育1 h，隨後用TBST進行三次洗滌。最終，100 μL TMB單組分HRP微孔受質 (Surmodics)添加至各孔且培育5 min。藉由添加100 μL終止溶液(Surmodics)終止反應且在450 nm下讀取吸收率。

**【0541】** 評估CD123抗體與嵌合IL-3Rα蛋白之結合，與野生型IL-3Rα相比較。圖9B說明huCD123-6抗體以類似之亞奈莫耳親和力結合IL-3Rα及IL-3Rα (101-306)。相反，huCD123-6抗體不結合GMRα構建體且對於嵌合蛋白IL-3Rα (1-100)構建體，結合幾乎消除。此等結果指示huCD123-6抗體主要結合CRM結構域，僅允許來自IL-3Rα之N末端結構域的最小貢獻。類似地，chCD123-3抗體主要結合IL-3Rα CRM結構域，但結合親和力與野生型IL-3Rα相比有所降低(圖9C)。對嵌合受體蛋白IL-3Rα (101-306)之結合親和力降低表明在CD123-3抗體結合時可能涉及IL-3Rα之N末端結構域。然而，chCD123-14抗體不識別嵌合受體IL-3Rα (101-306) (圖9D)；相反，其以等效親和力結合IL-3Rα及IL-3Rα (1-101)。此等結果說明，chCD123-14抗體排他性地結合IL-3Rα之N末端結構域。相較而言，7G3抗體以及兩種其他市售抗體6H6及9F5亦結合IL-3Rα N末端結構域及野生型IL-3Rα構建體，但不識別IL3Rα之CRM結構域(分別圖9E、圖9F及圖9G)。總之，此等資料說明CD123-6及CD123-3抗體之抗原決定基主要位於IL-3Rα之CRM結構域內，且與限制於IL-3Rα之N末端結構域的7G3抗體抗原決定基不同。CD123-14抗體亦結合限制於IL-3Rα之N末端結構域內的抗原決定基。

**實例9 製備huCD123-6抗體之離胺酸連接之DM1及IGN結合物**

**a. 製備huCD123Gv4.7S3-磺基-SPDB-D1**

**【0542】** 允許含有2.0 mg/mL CD123-6G4.7S3抗體及3.5莫耳當量磺基-SPDB-D1原位混合物之反應物在25°C下在15 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌啶乙磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑中藉由連接

子結合3-4小時。該原位混合物係藉由在25°C下在20 mM N,N-二異丙基乙胺(DIPEA)存在下使3.0 mM磺基-SPDB連接子與3.9 mM磺化化合物D1在DMA中反應5小時而製得。

【0543】 反應後，使用NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級，GE Healthcare)將結合物純化並緩衝液交換至20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液。在室溫下在相同緩衝液中進行透析4小時，且隨後利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)在4°C下隔夜。

【0544】 發現經純化之結合物具有1.2 mg/ml之最終蛋白質濃度，且平均每個抗體連接2.9分子之化合物D1 (藉由UV Vis，針對化合物D1使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}}=15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}}=30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且針對huCD123-6G4.7S3抗體使用 $\epsilon_{280\text{ nm}}=207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )；94.3%單體(藉由尺寸排阻層摺法)；及<2%未結合化合物D1 (UPLC Dual管柱，逆相HPLC分析)。

**b. 製備huCD123-6Gv4.7S3-D2**

【0545】 將含有2.0 mg/mL huCD123-6G4.7S3抗體及5.0莫耳當量化合物D2 (在25°C下在90:10 DMA:50 mM琥珀酸鹽pH 5.5中以5倍過量之亞硫酸氫鈉預處理4小時)之反應物在25°C下在15 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌啶乙磺酸) pH 8.5緩衝液及10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑中培育4小時。

【0546】 反應後，使用NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級，GE Healthcare)將結合物純化並緩衝液交換至20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液。在室溫下在相同緩衝液中進行透析4小時，且隨後利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)在4°C下隔夜。

【0547】 發現經純化之結合物具有1.2 mg/ml之最終蛋白質濃度，且平均

每個抗體連接2.9分子之化合物D2 (藉由UV Vis，針對化合物D2使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}}=15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}}=30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且針對huCD123-6Gv4.7S3抗體使用 $\epsilon_{280\text{ nm}}=207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )；99.3%單體(藉由尺寸排阻層摺法)；及<2%未結合化合物D2 (UPLC Dual管柱，逆相HPLC分析)。

**c. 製備huCD123-6Gv1.1-磺基-SPDB-DGN462**

【0548】 藉由在含有10 mM DIPEA (*N,N*-二異丙基乙胺)之DMA中將1.5 mM磺基-SPDB連接子、1.95 mM磺化DGN462 (sDGN462)培育20 min隨後在25°C下添加0.9 mM MPA (3-馬來醯亞胺基丙酸)以淬滅未反應之IGN硫醇持續15 min而在原位形成 NHS-磺基-SPDB-sDGN462。在25°C下將含有2.5 mg/mL huCD123-6Gv1.1抗體及7.5莫耳當量所得NHS-磺基-SPDB-DGN462之反應物在15 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌啶乙磺酸) pH 8.5緩衝液及15% v/v DMA共溶劑中培育隔夜。

【0549】 反應後，使用NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級，GE Healthcare)將結合物純化至20 mM組胺酸、50 mM NaCl、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50  $\mu\text{M}$ 亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液。在4°C下利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)在相同緩衝液中進行透析隔夜。

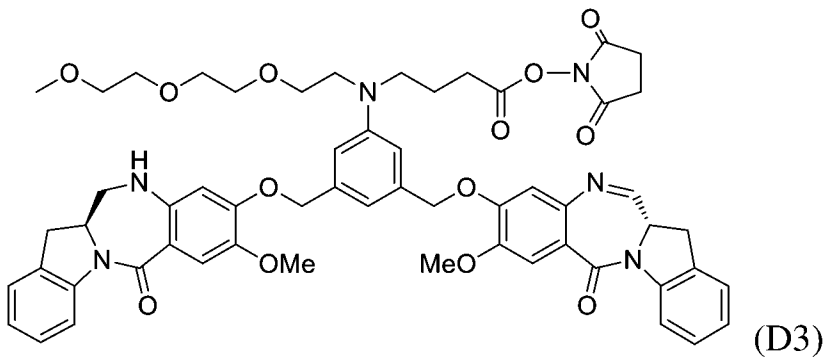
【0550】 發現經純化之結合物具有0.95 mg/ml之最終抗體濃度，且平均每個抗體連接2.8個DGN462分子(藉由UV-Vis，針對DGN462使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}}=15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}}=30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且針對huCD123-6Gv1.1抗體使用 $\epsilon_{280\text{ nm}}=207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )；99.5%單體(藉由尺寸排阻層摺法)；及0.6%未結合DGN462 (藉由丙酮沈澱，逆相HPLC分析)。

**d. 製備huCD123-6Gv1.1-D3**

【0551】 在25°C下將含有2.0 mg/mL huCD123-6Gv1.1抗體及3.5莫耳當量 D3 (在25°C下在90:10 DMA:50 mM琥珀酸鹽pH 5.5中以5倍過量之亞硫酸氫鈉預

處理4小時)之反應物在15 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌啶乙磺酸) pH 8.5緩衝液及10% v/v DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑中培育4小時。反應後，使用NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級，GE Healthcare)將結合物純化並緩衝液交換至20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5% w/v蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液。在室溫下在相同緩衝液中進行透析4小時，且隨後利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)在4°C下隔夜。

【0552】 發現經純化之結合物具有0.9 mg/ml之最終蛋白質濃度，且平均每個抗體連接3.4個D3分子(藉由UV-Vis，針對D3使用莫耳消光係數 $\epsilon_{330\text{ nm}}=15,484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}}=30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，且針對huCD123-6Gv1.1抗體使用 $\epsilon_{280\text{ nm}}=207,360\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ )；96%單體(藉由尺寸排阻層摺法)；及<1%未結合D3 (雙管柱，逆相HPLC分析)。



**e. 製備huCD123-6Rv1.1-CX1-1-類美登素結合物**

【0553】 使人類化抗CD123抗體(表面重整huCD123-6Rv1.1)在離胺酸殘基上經由三甘胺醯基CX1-1連接子與類美登素有效負載結合。在室溫下將含有處於含有20 mM N,N-二異丙基乙胺(DIPEA)之N,N-二甲基乙醯胺(DMA)中之5 mM三甘胺醯基CX1-1異雙官能連接子(攜帶N-羥基琥珀醯亞胺及馬來醯亞胺基團)及6.5 mM DM1類美登素的混合物培育約20 min。在室溫下用2 mM馬來醯亞胺基丙酸(MPA)淬滅未反應之DM1持續約20 min，隨後以約7.6×或15×CX1-1-DM1加合物相對於抗體之過量將反應混合物添加至以4 mg/mL處於含有約8% DMA之140 mM EPPS緩衝液pH 8中的人類化抗CD123抗體(huCD123-6Rv1.1)。在25°C下將結

合反應混合物培育隔夜，此後使用NAP脫鹽管柱(Illustra，Sephadex G-25，GE Healthcare)將結合物純化並緩衝液交換至含有250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20之10 mM琥珀酸鹽緩衝液pH 5.5中。利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)在4°C下在以上所描述之琥珀酸鹽緩衝液中進行透析隔夜。

【0554】 發現經純化之結合物含有平均每個抗體連接4.3及6.7個類美登素分子(藉由UV Vis光譜及尺寸排阻HPLC，針對DM1使用莫耳消光係數 $\epsilon_{252\text{ nm}}=26350\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ 及 $\epsilon_{280\text{ nm}}=5456\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ ，且針對huCD123抗體使用 $\epsilon_{280\text{ nm}}=207076\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ )；98%單體(藉由尺寸排阻層摺法)；以及分別為2.1 mg/mL及1.2 mg/mL之最終蛋白質濃度。藉由HPLC估計經純化結合物中之未結合類美登素之水準較低(<1%)。脫糖基化結合物之質譜指示連接之類美登素物質。

**實例10 活體外細胞毒性檢定**

【0555】 使用活體外細胞毒性檢定來量測huCD123-6之抗體-藥物結合物(ADC)殺死在細胞表面上表現CD123之細胞的能力。在培養基中按照細胞供應商(ATCC或DSMZ)所推薦來培養細胞系。將處於100  $\mu\text{L}$ 培養基中之2,000至10,000個細胞添加至平底96孔板之各孔。為了阻斷細胞表面上之Fc受體，培養基補充有100 nM chKTI抗體(屬於相同同型之抗體)。使用3倍稀釋系列將結合物稀釋至培養基中且每孔添加100  $\mu\text{L}$ 。為了測定CD123無關性細胞毒性之貢獻，在結合物之前向一些孔中添加CD123阻斷劑(例如100 nM chCD123-6抗體)。各檢定板中包括含有細胞及培養基但缺乏結合物之對照孔以及僅含有培養基之孔。對於各資料點，以一式三份進行檢定。在37°C下在濕潤6% CO<sub>2</sub>培育箱中將各板培育4至7天。隨後如實例4中所描述使用基於WST-8之細胞計數套組-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.，Rockville，MD)測定各孔中之活細胞的相對數目。藉由首先修正培養基背景吸收率且隨後將各值除以對照孔(未經處理之細胞)中之值的平

均值來計算各孔中之細胞之表觀存活分數。將細胞之存活分數相對於結合物濃度繪於半對數圖中。

【0556】 來自典型細胞毒性檢定之結果示於圖 10 中。AML細胞系 OCI-AML4可在培養基中無生長因子之情況下增殖。用類美登素結合物 huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1處理細胞。該處理導致劑量依賴性細胞殺死，IC<sub>50</sub> 值為0.07 nM。為了評估該殺死是否起因於CD123表現，藉由過量未結合 chCD123-6抗體(500 nM)阻斷抗原且在細胞上測試結合物之效力。後一種處理在低於3 nM之濃度下不影響細胞之活力且在10 nM (最高測試濃度)下對細胞活力僅具有中等影響。因此，huCD123-6Rv1.1-CX1-1-DM1結合物對OCI-AML4細胞顯示高CD123依賴性細胞毒性。

【0557】 亦在活體外測試huCD123-6抗體經由離胺酸與其他細胞毒性劑 (DGN462、D3、D1及D2)連接之結合物的細胞毒性。該研究中使用十五個不同來源(AML、B-ALL、CML及NHL)之CD123陽性細胞系(下表)。該等細胞系中大多數來源於具有至少一個消極預後因子(例如P-糖蛋白過度表現、EVI1過度表現、p53變化、DNMT3A突變、FLT3內部串聯重複)之攜帶惡性病之患者。該等結合物對此等細胞系顯示高效力，IC<sub>50</sub>值介於亞pM至低nM範圍內(下表、圖11A)。

多種離胺酸連接之huCD123-6-IGN結合物對不同來源之CD123陽性細胞系的活

體外細胞毒性

| 細胞系名稱     | 來源    | 消極預後因子           | IC50, M       |           |           |           |
|-----------|-------|------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|
|           |       |                  | DGN462<br>ADC | D3<br>ADC | D2<br>ADC | D1<br>ADC |
| THP1      | AML   | p53 缺失           | 1.9E-10       | 3.0E-11   | 6.7E-12   | 5.8E-11   |
| SHI-1     | AML   | p53 基因變化         | 1.7E-10       | 2.9E-11   | 1.3E-11   | 3.2E-11   |
| KO52      | AML   | p53 突變、Pgp 過度表現  | 3.9E-10       | 2.4E-10   | 1.4E-11   | 4.1E-10   |
| KASUMI-3  | AML   | EVII 及 Pgp 過度表現  | 2.8E-09       | 2.3E-11   | 9.8E-12   | 1.4E-10   |
| KG-1      | AML   | p53 突變、Pgp 過度表現  | 8.5E-10       | 6.6E-09   | 2.2E-10   | 4.1E-09   |
| OCI-AML2  | AML   | DNMT3A 突變        | 1.4E-10       | 1.0E-10   | 8.8E-11   | 2.1E-10   |
| HNT-34    | AML   | MECOM (EVII)過度表現 | 2.3E-11       | 3.2E-12   | 2.0E-12   | 5.9E-12   |
| MV4-11    | AML   | FLT3 內部串聯重複      | 1.6E-12       | 5.4E-13   | 5.6E-13   | 1.3E-12   |
| MOLM-13   | AML   | FLT3 內部串聯重複      | 2.2E-12       | 4.6E-13   | 4.9E-13   | 1.2E-12   |
| EOL-1     | AML   |                  | 9.0E-12       | 3.3E-12   | 2.5E-12   | 4.7E-12   |
| MOLM-1    | CML   | EVII 及 Pgp 過度表現  | 1.1E-09       | 7.1E-11   | 2.9E-11   | 2.1E-10   |
| KOPN8     | B-ALL |                  | 5.3E-11       | 2.2E-11   | 1.1E-11   | 3.0E-11   |
| JM-1      | B-ALL |                  | 3.2E-10       | 1.7E-10   | 2.4E-11   | 4.1E-10   |
| KCL-22    | CML   |                  | 2.0E-09       | 9.5E-10   | 3.0E-11   | 2.9E-10   |
| Granta519 | NHL   |                  | 1.2E-11       | 2.1E-12   | 1.2E-12   |           |

【0558】 以上資料似乎表明B-ALL細胞系(KOPN8及JM-1)對IGN化合物非常敏感。為了進一步驗證此發現，使用相同B-ALL細胞系KOPN8及JM-1加額外B-ALL細胞系「380細胞」測試huCD123-6Gv4.7抗體經由離胺酸或半胱胺酸與D1或D2連接之結合物的細胞毒性。該等檢定中包括使用具有不結合此等B-ALL細胞系之抗體KTI的結合物的陰性對照。圖11B中之結果證實以上發現。

【0559】 上表亦顯示huCD123-IGN化合物對多種AML細胞系具有高活性。使用Lys及Cys連接之IGN化合物的代表資料示於圖11C中。與圖11C中所示之資料一致，關於Cys連接之結合物(huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5)之細胞毒性的額外資料(示於下表及圖21中)說明該結合物對多種CD123陽性AML細胞系，包括具有不良預後因子者非常有效。



| 細胞系               | 不良預後因子       | huCD123-CysMab-05     |                  | 特异性指數  |                                             |
|-------------------|--------------|-----------------------|------------------|--------|---------------------------------------------|
|                   |              | IC <sub>50</sub> pMol | IC <sub>50</sub> | 對照     | APC / IC <sub>50</sub><br>huCD123-CysMab-05 |
| CD123 陰性細胞系       |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
| Namalwa           |              | 10000                 |                  | 1      |                                             |
| K562              |              | 8000                  |                  | 1      |                                             |
| CD123 陽性 AMOL 細胞系 |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
|                   |              |                       |                  |        |                                             |
| SKM-1             | P53          | 7                     |                  | 57     |                                             |
| K562              |              | 20                    |                  | 100    |                                             |
| HOI-1             |              | 2                     |                  | 1080   |                                             |
| UCSD-AML1         | FM1OX        | 1                     |                  | 400    |                                             |
| KG-1              | P53, MDR1    | 60                    |                  | 95     |                                             |
| THP-1             | P53          | 30                    |                  | 167    |                                             |
| SiH-1             | P53          | 6                     |                  | >3,333 |                                             |
| MOLM-1            | MDR1 和 FM1OX | 120                   |                  | >167   |                                             |
| Molm-13           | FM1OX        | 0.5                   |                  | 2080   |                                             |
| MV4-11            | FM1OX        | 1                     |                  | 2080   |                                             |
| KASUMI-3          | P53 和 MDR1   | 3                     |                  | 100    |                                             |
| HN1-34            | FM1OX        | 1                     |                  | 1100   |                                             |

[(0560)] 令人感興趣的是，初步資料表明，即使當與Lys連接之D2或Lys連接之D1的有效結合物相比時，Cys連接之D5結合物看似對AMOL祖細胞亦尤其有效。參見圖11D，其中使用9個AMOL患者樣品來測試本發明之多種IGN結合物的效力。

[(0561)] 其他活體外細胞毒性研究顯示Cys連接之D5結合物在未經選擇之AMOL患者樣品中具有比Mylotarg高4倍的活性。參見圖18。

[(0562)] 另外，圖11B及圖19顯示Cys連接之huCD123-D5結合物在比殺死AMOL祖細胞所需之濃度高出>100倍之濃度下殺死正常血細胞。相較而言，Mylotarg (吉妥單抗奧佐米星)不展現此種優先殺死效應，細胞毒性在正常祖細胞與AMOL祖細胞之間僅相差10倍。在圖19中，測試額外AMOL患者樣品。另外，亦測試DNA交聯劑D5'-huCD123結合物且其展現細胞毒性在正常祖細胞與AMOL祖細胞之間僅相差6倍(參見圖19)。

實例11 離胺酸連接之IGN結合物對原發性AMOL患者樣品的活體外效力

[(0563)] 使用群落形成單位(CFU)檢定來量測多種離胺酸連接之huCD123-6-IGN結合物殺死原發性AMOL細胞之能力。來自AMOL患者之冷凍周圍

血單核細胞(PBMC)及骨髓單核細胞(BMMC)係購自Conversant Biologics Inc. (Huntsville, AL)及AllCells, LLC (Alameda, CA)。如供應商所推薦將細胞解凍，洗滌且再懸浮於RPMI培養基(RPMI-1640、10%胎牛血清、50 ng/mL SCF及50 ng/mL FLT3L)中。為了阻斷細胞表面上之Fc受體，培養基補充有100 nM chKTI 抗體(屬於相同同型之抗體)。將處於150  $\mu$ L培養基中之200,000個細胞添加至平底96孔板之各孔。使用10倍稀釋系列將結合物稀釋至培養基中且每孔添加50  $\mu$ L。對照孔含有細胞及培養基，但缺乏結合物。在濕潤6% CO<sub>2</sub>培育箱中在37°C下將各板培育18小時。隨後將細胞轉移至含有2.2 mL無EPO之METHOCULT™ H4534 (StemCell Technologies, Vancouver, BC)的管中，混合並且將混合物轉移至6孔板中。在濕潤6% CO<sub>2</sub>培育箱中在37°C下培育各板直至群落形成(通常10至16天)且進行計數。藉由比較經結合物處理之樣品中的計數與未經處理之對照中的計數來測定群落形成之抑制百分比。將群落抑制百分比相對於結合物濃度繪製曲線圖，且由該等曲線確定抑制90%群落形成之結合物濃度(IC<sub>90</sub>)。

【0564】 來自對一個原發性患者樣品進行典型CFU檢定的結果提供於圖12A 中。huCD123-6-IGN 結合物顯示劑量依賴性細胞毒性，對於huCD123-6Gv1.1-sSPDB-DGN462、huCD123-6Gv1.1-D3、huCD123-6Gv1.1-sSPDB-D1及huCD123-6Gv1.1-D2，IC<sub>90</sub>值分別為0.1 nM、0.01 nM、0.03 nM及0.012 nM。圖12B顯示經該等結合物處理之所有AML患者樣品的IC<sub>90</sub> 值。對於 huCD123-6Gv1.1-sSPDB-DGN462、huCD123-6Gv1.1-D3、huCD123-6Gv1.1-sSPDB-D1及huCD123-6Gv1.1-D2，各結合物之中值IC<sub>90</sub>值以實線形式提供且分別等於2 nM、0.1 nM、0.03 nM及0.02 nM。因此，離胺酸連接之huCD123-6-IGN結合物對來自AML患者之樣品顯示高效力。

**實例12 製備huCD123-6抗體之Ser位點特異性結合物**

**a) N末端抗體結合 - 兩步法**

【0565】 用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 當量，25 °C，30 分鐘)處理 huCD123-6Gv4.6/7S3 抗體(具有 huCD123-6Gv4 LCVR (SEQ ID NO: 37，包括工程改造 N 末端 Ser)及 HCVR Gv6/7 (SEQ ID NO: 34)) (如圖 15 中所示之**流程 1**中的 [1]；3 mg/mL，於 PBS 中，pH 7.4)。隨後藉由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA 等級，GE Healthcare)將混合物緩衝液交換至乙酸鈉緩衝液 pH 5.0。

【0566】 用 4-胺基苯乙醇(100 mM，於 DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)將所得溶液處理至 10% v/v 共溶劑。隨後引入異雙官能連接子 1 (**流程 1**中之[3]；5 當量)且密封反應容器並且在 37°C 下培育 24 小時。

【0567】 隨後經由 NAP 脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA 等級，GE Healthcare)將混合物緩衝液交換至 HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌咻乙磺酸) pH 8.5 緩衝液。隨後用 DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調節溶液且在 25°C 下用磺化 DGN462 (sDGN462) ([5]，**流程 1**；游離硫醇；5 當量)處理 6 小時。

【0568】 使用 NAP 過濾管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA 等級，GE Healthcare)將所得結合物緩衝液交換至 250 mM 甘胺酸、10 mM 組胺酸、1% 蔗糖、0.01% Tween-20、50 µM 亞硫酸氫鈉調配緩衝液 pH 6.2。在 25°C 下在相同緩衝液中利用 Slide-a-Lyzer 透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)進行透析 4 小時。

【0569】 發現經純化之結合物([6]，**流程 1**)具有每個抗體平均連接兩個 DGN462 分子(經由 Q-ToF 質譜)、>98% 單體(經由空間排阻層析)、<2% 游離藥物(經由丙酮沈澱逆相 HPLC 分析)及 0.18 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，針對 huCD123-6Gv4.6/7S3 抗體使用莫耳消光係數  $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

***b) N 末端抗體結合 - IGN 直接連接***

【0570】 在 25°C 下用 5 mM 過碘酸鈉水溶液(50 莫耳當量)將經工程改造而在重鏈上具有 N 末端絲胺酸之經工程改造含 N 末端 Ser 之 huCD123-6Gv4.7S2 抗體(huCD123-6Gv4.7S2，其包含重鏈序列 SEQ ID NO: 53，其中 Xaa 為 Val，及輕鏈

序列SEQ ID NO: 51) (流程2中之[1]，圖16；3 mg/mL，處於PBS中，pH 7.4)處理30分鐘。隨後藉由NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級，GE Healthcare)將混合物緩衝液交換至乙酸鈉緩衝液pH 5.0。

【0571】 用對苯二胺(100 mM，於DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)將所得溶液處理至10% v/v共溶劑。隨後，隨後引入原位磺化D8 (或sD8) ([3]，流程2；5莫耳當量)，且密封反應容器並且在37°C下培育24小時。

【0572】 隨後藉由NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級，GE Healthcare)將混合物緩衝液交換至250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖緩衝液pH 6.2。在25°C下在相同緩衝液中利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)進行透析4小時。

【0573】 發現經純化之結合物([4]，流程2)具有每個抗體平均連接兩個D8分子(經由Q-ToF質譜)、>96%單體(經由空間排阻層析)、<3%游離藥物(經由HISEP逆相 HPLC 分析)及 1.4 mg/mL 之最終蛋白質濃度(經由 UV-Vis，針對 huCD123-6Gv4.7S2抗體使用莫耳消光係數 $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

【0574】 根據以下程序製備以上所描述之原位磺化D8 (或sD8)：將呈凍乾白色固體狀之D8試劑溶解於DMA (N,N-二甲基乙醯胺)中，得到10-20 mM儲備濃縮溶液。添加新鮮亞硫酸氫鈉(500 mM水溶液，5莫耳當量)且使所得溶液在25°C下反應4-6小時，隨後在4°C下進行15小時保持步驟。引入新鮮亞硫酸氫鈉之另一等分試樣(500 mM水溶液，2莫耳當量)且允許在25°C下反應4小時，隨後儲存在-80°C下直至進一步使用。

***c) N末端抗體結合 - 用於CD123-6Gv4.7之兩步方案***

【0575】 在25°C下用5 mM過碘酸鈉水溶液(50莫耳當量)將經工程改造而在輕鏈上具有N末端絲胺酸之 huCD123-6Gv4.7S3 抗體 (參見以上) (huCD123-6Gv4.7S3) (流程3中之[1]，圖17；3 mg/mL，處於PBS中，pH 7.4)處理

30分鐘。隨後藉由NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換至乙酸鈉緩衝液pH 5.0。

【0576】 用4-胺基苯乙醇(100 mM, 於DMA [N,N-二甲基乙醯胺]中)將所得溶液處理至10% v/v共溶劑。隨後引入異雙官能連接子1 (流程3中之[3]; 5莫耳當量)且密封反應容器並且在37°C下培育24小時。

【0577】 隨後經由NAP脫鹽管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級, GE Healthcare)將混合物緩衝液交換至HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌咩乙磺酸) pH 8.5緩衝液。隨後用DMA (N,N-二甲基乙醯胺)共溶劑(10% v/v)調節溶液且在25°C下用磺化D1 (或sD1) ([5], 流程3; 游離硫醇; 5莫耳當量)處理6小時。

【0578】 使用NAP過濾管柱(Illustra Sephadex G-25 DNA等級, GE Healthcare)將所得結合物緩衝液交換至250 mM甘胺酸、10 mM組胺酸、1%蔗糖、0.01% Tween-20、50 µM亞硫酸氫鈉調配緩衝液pH 6.2。在25°C下在相同緩衝液中利用Slide-a-Lyzer透析卡匣(ThermoScientific 10,000 MWCO)進行透析4小時。

【0579】 發現經純化之結合物([6], 流程3)具有每個抗體平均連接2.0分子之D1 (經由Q-ToF質譜)、>96%單體(經由空間排阻層析)、<3%游離藥物(經由丙酮沈澱逆相HPLC分析)及0.4 mg/mL之最終蛋白質濃度(經由UV-Vis, 針對huCD123-6Gv4.7S3抗體使用莫耳消光係數 $\epsilon_{280}=213320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

**實例13 huCD123-6抗體之位點特異性結合物的活體外細胞毒性**

【0580】 使用活體外細胞毒性檢定將huCD123-6與多種IGN化合物之位點特異性結合物(huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5及huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8)殺死在細胞表面上表現CD123之細胞的能力與含有匹配抗體及有效負載之離胺酸連接結合物(huCD123-6Gv4.6-D2及huCD123-6Rv1.1-D2)的相比較。如實例10中所描述進行細胞毒性檢定並分析。

【0581】 huCD123-6Gv4.6-CysMab-D5 結 合 物 ( 其 中

huCD123-6Gv4.6-CysMab具有SEQ ID NO: 54之Ig重鏈序列及SEQ ID NO: 51之輕鏈序列)對多個細胞系之活性至少與離胺酸連接之huCD123-6Gv4.6-D2結合物(其中huCD123-6Gv4.6抗體具有SEQ ID NO: 50之Ig重鏈序列及SEQ ID NO: 51之輕鏈序列)相同。使用AML細胞系EOL-1、B-ALL細胞系KOPN-8及CML細胞系MOLM-1之細胞毒性檢定的若干實例分別示於圖13A至圖13C中。兩種結合物均以劑量依賴性方式殺死細胞，對EOL-1細胞、KOPN-8細胞及MOLM-1細胞之IC<sub>50</sub>值分別為大致0.002 nM、0.005 nM及0.02 nM。該殺死具有CD123依賴性，因為當藉由未結合之chCD123-6抗體阻斷CD123抗原時該等結合物對細胞之毒性變弱至少100倍。

**【0582】** huCD123-6Rv1.1S2-SeriMab-D8 結合物(其中表面重整huCD123-6Rv1.1S2抗體具有SEQ ID NO: 60之Ig重鏈序列(除了N末端殘基為Ser)及SEQ ID NO: 61之輕鏈序列)維持標靶(CD123)結合，且對多個細胞系之活性至少與離胺酸連接之huCD123-6Rv1.1-D2結合物(其中表面重整huCD123-6Rv1.1抗體具有SEQ ID NO: 60之Ig重鏈序列及SEQ ID NO: 61之輕鏈序列)相同。使用AML細胞系SHI-1及HNT-34以及CML細胞系MOLM-1之細胞毒性檢定的若干實例分別示於圖14A至圖14C中。兩種結合物均以劑量依賴性方式殺死細胞，對SHI-1細胞、HNT-34細胞及MOLM-1細胞之IC<sub>50</sub>值分別為大致0.01 nM、0.002 nM及0.03 nM。該殺死具有CD123依賴性，因為當藉由未結合之huCD123-6抗體阻斷CD123抗原時該等結合物對細胞之毒性變弱至少100倍。

**【0583】** 在另一實驗中，發現具有huCD123抗體之Ser連接之DGN462化合物與具有較高DAR之離胺酸連接之型式相比具有3倍抗原特異性效力(資料未顯示)。

**實例14 CD123-IGN結合物用於MV4-11 AML皮下小鼠模型中之活體內效力研究**

【0584】 皮下植入腫瘤細胞代表一種在活體內測試新穎潛在抗癌藥物之便利手段。已對來源於實體腫瘤及白血病(涵蓋多種腫瘤基因型及表型)之多種人類及鼠類細胞系進行改適以便在鼠類宿主中生長，且因此允許在適當腫瘤模型中測試標的治療劑。

【0585】 將如以下方案中所概述之皮下急性骨髓性白血病模型(AML)用於測試標的CD123抗體藥物結合物(ADC)在活體內減少腫瘤負擔之能力的效力。特定言之，使雌性SCID小鼠各自在右脅部經皮下接種約 $1 \times 10^7$ 個人類AML細胞系MV4-11細胞。在接種後第14天，基於腫瘤體積將小鼠隨機分組，且用400 mg/kg人類IgG藉由腹膜內注射加以處理以阻斷MV4-11細胞上之Fc受體。在接種後第15天以1或3  $\mu\text{g/kg}$ 之劑量一次性經靜脈內投與標的抗D123 ADC或非靶向抗體對照(chKTI-離胺酸連接-D1、chKTI-離胺酸連接-D2及huKTI-CysMab連接-D2，其中該huKTI抗體在對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之位置上具有經工程改造之Cys)。接種後第20天用100 mg/kg人類IgG再次處理小鼠。每日監測動物，且每週兩次量測腫瘤體積。以下列出處理組及對照組與個別劑量。

| 群組 | 處理                | 劑量( $\mu\text{g/kg}$ )<br>(實際劑量<br>( $\mu\text{g/kg}$ )) | 途徑及方案                    |
|----|-------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1  | 媒劑                | -                                                        | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 2  | huCD123-sSPDB-D1  | 1 (0.78)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 3  | huCD123-離胺酸連接-D2  | 1 (0.89)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 4  | huCD123-CysMab-D5 | 1 (0.91)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 5  | huCD123-sSPDB-D1  | 3 (2.35)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 6  | huCD123-離胺酸連接-D2  | 3 (2.69)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 7  | huCD123-CysMab-D5 | 3 (2.88)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 8  | chKTI-sSPDB-D1    | 3                                                        | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 9  | chKTI-離胺酸連接-D2    | 3                                                        | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 10 | huKTI-CysMab-D5   | 1 (0.91)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |
| 11 | huKTI-CysMab-D5   | 3 (2.88)                                                 | <i>i.v.</i> ， $\times 1$ |

【0586】 該研究中所使用之huCD123抗體為人類化huCD123-6Gv4.7抗體，其經由Lys鍵聯或經由如上文中所描述之經工程改造之Cys鍵聯與D1或D2連接。亦包括Lys連接之基於嵌合K<sub>TI</sub>抗體之IGN結合物及Cys連接之基於人類K<sub>TI</sub>抗體之IGN結合物作為對照。後一種K<sub>TI</sub> CysMab抗體在重鏈CH3結構域中在對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之位置上具有經工程改造之Cys。

【0587】 初步數據顯示Lys及Cys連接之IGN化合物在活體內小鼠模型中對MV4-11異種移植腫瘤具有高活性(參見圖20)。

#### 實例15. 製備huCD123-6抗體之Cys位點特異性結合物

##### *huCD123-6Gv1.1S2-CysMab-D7*

【0588】 huCD123-6Gv1.1S2-CysMab為具有SEQ ID NO: 33之LCVR序列及SEQ ID NO: 48之HC序列(除了第一個殘基為Ser)且包括對應於SEQ ID NO: 54或56之第5個至最後一個殘基之經工程改造Cys的CDR移植人類化抗體。

【0589】 使用標準程序製備此攜帶兩個呈還原狀態之未配對半胱氨酸殘基的huCD123抗體。向此中間物於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)、5 mM *N,N,N',N'*-乙二胺四乙酸(EDTA) pH 6.0中之溶液中添加*N,N*-二甲基乙醯胺(DMA)、丙二醇及10莫耳當量呈處於DMA中之儲備溶液形式的D7，得到反應混合物，該反應混合物具有含2% v/v DMA及38% v/v丙二醇之PBS 5 mM EDTA pH 6.0的最終溶劑組成。允許反應在25°C下進行24小時。

【0590】 使用Sephadex G25脫鹽管柱將該結合物純化至20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液中，藉由經具有10 kDa分子量截止值之膜進行超濾加以濃縮，且經0.22 μm注射過濾器進行過濾。隨後使用具有10 kDa分子量截止值之膜使結合物相對於相同緩衝液進行透析。

【0591】 發現該結合物具有2 mol D7/mol抗體(藉由UV-Vis)；97.2%單體



(藉由SEC)；及1.9%未結合D7(藉由SEC/逆相HPLC)。未顯示脫糖基化結合物之LC-MS。

***huCD123-6Gv4.7-CysMab-D5***

【0592】 huCD123-6Gv4.7-CysMab為具有SEQ ID NO: 34之LCVR序列(其中Xaa為Val)及SEQ ID NO: 35之HCVR序列且包括對應於SEQ ID NO: 54或56之第5個至最後一個殘基之經工程改造Cys的CDR移植人類化抗體。

【0593】 使用標準程序製備此攜帶兩個呈還原狀態之未配對半胱胺酸殘基的huCD123抗體。向此中間物於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)、5 mM *N,N,N',N'*-乙二胺四乙酸(EDTA) pH 6.0中之溶液中添加*N,N*-二甲基乙醯胺(DMA)、丙二醇及10莫耳當量呈處於DMA中之儲備溶液形式的D5，得到反應混合物，該反應混合物具有含2% v/v DMA及38% v/v丙二醇之PBS 5 mM EDTA pH 6.0的最終溶劑組成。允許反應在25°C下進行24小時。

【0594】 使用Sephadex G25脫鹽管柱將該結合物純化至20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50 μM亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液中，藉由經具有10 kDa分子量截止值之膜進行超濾加以濃縮，且經0.22 μm注射過濾器進行過濾。隨後使用具有10 kDa分子量截止值之膜使結合物相對於相同緩衝液進行透析。

【0595】 發現該結合物具有2 mol D5/mol抗體(藉由UV-Vis)及94.8%單體(藉由SEC)。未顯示脫糖基化結合物之LC-MS。

***huCD123-6Gv4.7-CysMab-D4***

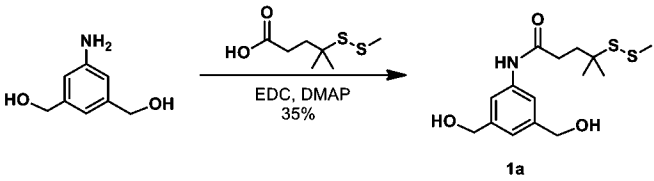
【0596】 使用標準程序製備以上攜帶兩個呈還原狀態之未配對半胱胺酸殘基的huCD123抗體。向此中間物於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)、5 mM *N,N,N',N'*-乙二胺四乙酸(EDTA) pH 6.0中之溶液中添加*N,N*-二甲基乙醯胺(DMA)、丙二醇及5莫耳當量呈處於DMA中之儲備溶液形式的D4，得到反應混

合物，該反應混合物具有含2% v/v DMA及38% v/v丙二醇之PBS 5 mM EDTA pH 6.0的最終溶劑組成。允許反應在25°C下進行6小時。

【0597】 使用Sephadex G25脫鹽管柱將該結合物純化至20 mM組胺酸、50 mM氯化鈉、8.5%蔗糖、0.01% Tween-20、50  $\mu$ M亞硫酸氫鈉pH 6.2調配緩衝液中，藉由經具有10 kDa分子量截止值之膜進行超濾加以濃縮，且經0.22  $\mu$ m注射過濾器進行過濾。隨後使用具有10 kDa分子量截止值之膜使結合物相對於相同緩衝液進行透析。

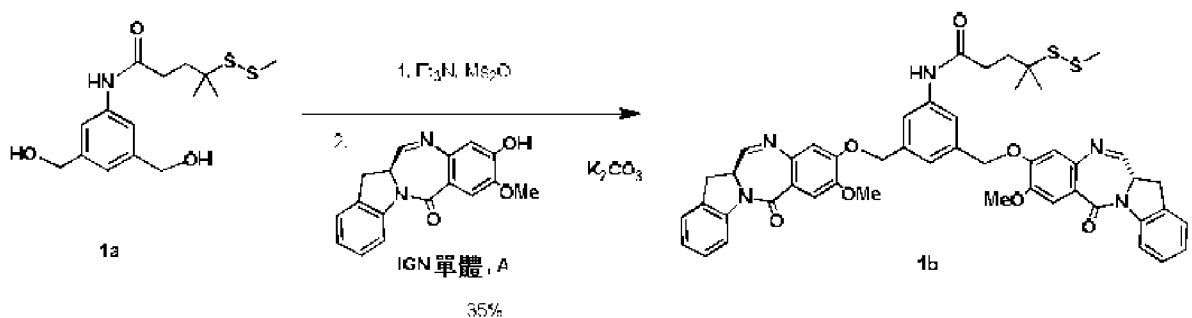
【0598】 發現該結合物具有1.8 mol D4/mol抗體(藉由UV-Vis)及97.4%單體(藉由SEC)。未顯示脫糖基化結合物之LC-MS。

### 實例16. 化合物D1之合成



化合物1a：

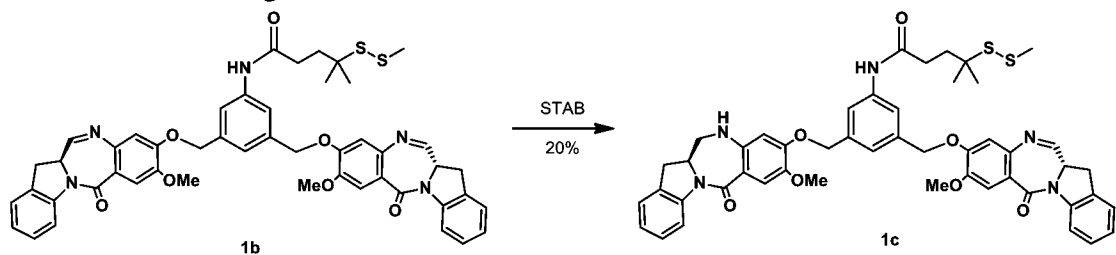
【0599】 向(5-胺基-1,3-伸苯基)二甲醇(1.01 g, 6.59 mmol)於無水二甲基甲醯胺(16.48 mL)及無水四氫呋喃(16.48 mL)中之攪拌溶液中添加4-甲基-4-(甲基二硫烷基)戊酸(1.281 g, 6.59 mmol)、N-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(2.53 g, 13.19 mmol)及4-二甲基胺基吡啶(0.081 g, 0.659 mmol)。在室溫下將所得混合物攪拌18小時。用飽和氯化銨溶液淬滅反應且用乙酸乙酯(3×50 mL)萃取。用水及鹽水洗滌有機萃取物，隨後經無水硫酸鈉乾燥。過濾溶液且在真空中濃縮，並且藉由矽膠層析法(乙酸乙酯/己烷)純化所得殘餘物，獲得呈白色固體狀之化合物1a (0.70 g, 32%產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9.90 (s, 1H), 7.43 (s, 2H), 6.93 (s, 1H), 5.16 (t, 2H, *J* = 5.7 Hz), 4.44 (d, 4H, *J* = 5.7 Hz), 2.43 (s, 3H), 2.41-2.38 (m, 2H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.29 (s, 6H)。MS (*m/z*), 實驗值330.0 (*M* + 1)<sup>+</sup>。



化合物**1b**：

【0600】 向化合物**1a** (219 mg, 0.665 mmol)於無水二氯甲烷(6.65 mL)中之冷卻(-10℃)溶液中添加三乙胺(463  $\mu$ l, 3.32 mmol)，隨後逐滴添加甲磺酸酐(298 mg, 1.662 mmol)。在-10℃下將該混合物攪拌2小時，隨後用冰水淬滅該混合物且用冷乙酸乙酯(2 $\times$ 30 mL)萃取。用冰水洗滌有機萃取物，用無水硫酸鈉乾燥，過濾且在減壓下濃縮，獲得粗二甲磺酸酯。

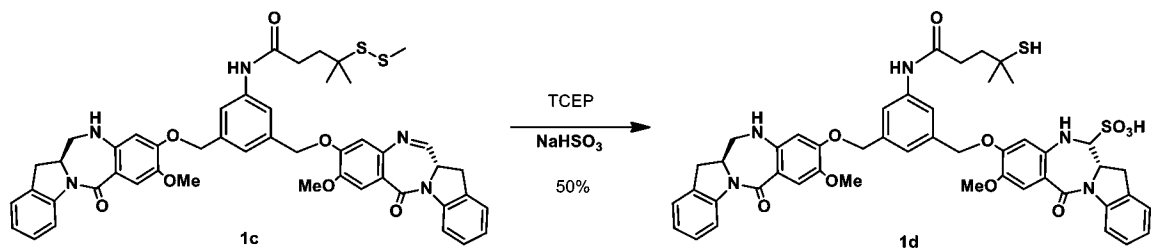
【0601】 將該粗二甲磺酸酯(227 mg, 0.467 mmol)及IGN (或吲哚啉并苯并二氮呋)單體**A** (303 mg, 1.028 mmol)溶解於無水DMF (3.11 mL)中。添加碳酸鉀(161 mg, 1.169 mmol)且在室溫下將混合物攪拌18小時。添加去離子水且過濾所得沈澱物並且用水沖洗。將固體再溶解於二氯甲烷中且用水洗滌。用無水硫酸鎂乾燥有機層，過濾並濃縮。藉由矽膠層析法(甲醇/二氯甲烷)純化粗殘餘物，得到化合物**1b** (227 mg, 36%產率)。MS (m/z), 實驗值882.5 (M + 1)<sup>+</sup>。



化合物**1c**：

【0602】 向化合物**1b** (227 mg, 0.167 mmol)於無水1,2-二氯乙烷(3.346 mL)中之懸浮液中添加三乙醯氧基硼氫化鈉(37.3 mg, 0.167 mmol)。在室溫下將該混合物攪拌一小時，此後用飽和氯化銨溶液將其淬滅。用二氯甲烷萃取該混合物且用鹽水洗滌。用無水硫酸鎂乾燥有機層，過濾並濃縮。藉由RP-HPLC (C18，

水/乙腈)純化粗殘餘物。用二氯甲烷萃取含有所要產物之部分，用無水硫酸鎂乾燥，過濾並濃縮，得到化合物**1c** (35 mg，19%產率)。MS (m/z)，實驗值884.3 (M + 1)<sup>+</sup>。



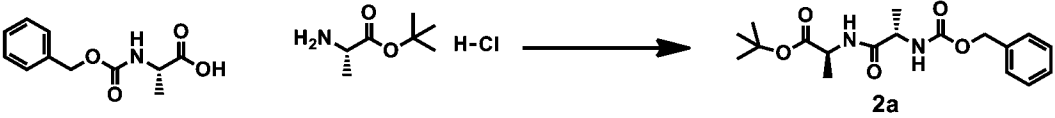
化合物**1d**：

【0603】 向化合物**1c** (18 mg，0.017 mmol)於乙腈(921 μL)及甲醇(658 μL)中之溶液中添加含參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(17.51 mg，0.060 mmol) (用飽和碳酸氫鈉溶液(0.2 mL)中和)之磷酸鈉緩衝液(132 μL，0.75 M，pH 6.5)。在室溫下將混合物攪拌3.5小時，隨後用二氯甲烷及去離子水稀釋。分離有機層，用鹽水洗滌，用無水硫酸鈉乾燥，過濾且在減壓下濃縮，獲得粗硫醇。MS (m/z)，實驗值838.3 (M + 1)<sup>+</sup>。

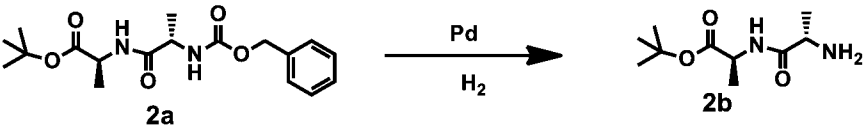
【0604】 將粗硫醇(15.5 mg，0.018 mmol)溶解於2-丙醇(1.23 mL)中。添加去離子水(617 μL)及亞硫酸氫鈉(5.77 mg，0.055 mmol)且在室溫下將混合物攪拌五小時。在丙酮/乾冰浴中冷凍反應物，凍乾，且藉由RP-HPLC (C18，去離子水/乙腈)加以純化。將含有所要產物之部分冷凍並凍乾，得到化合物 (12S,12aS)-9-((3-(4-巯基-4-甲基戊醯胺基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯甲(基)氧基)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-12-磺酸(化合物**磺化D1** (**sD1**)) (6.6 mg，39%產率)。MS (m/z)，實驗值918.2 (M-1)<sup>-</sup>。

**實例17.** 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基

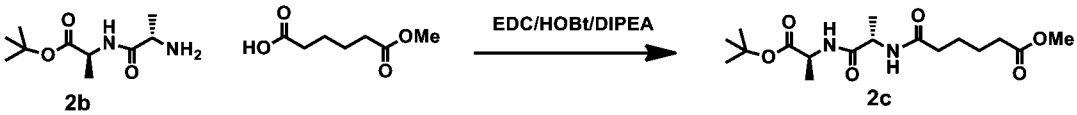
-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-(基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-(基)胺基)-1-側氧基丙-2-(基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物D2之合成



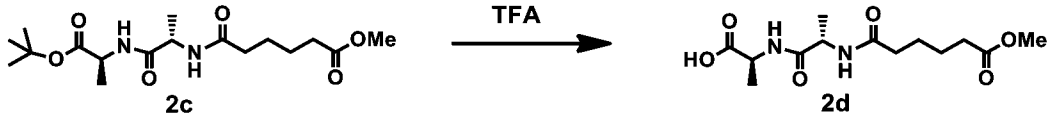
【0605】 步驟1：將(S)-2-(((苯甲氧基)羰基)胺基)丙酸(5 g，22.40 mmol)及(S)-2-胺基丙酸第三丁酯鹽酸鹽(4.48 g，24.64 mmol)溶解於無水DMF (44.8 mL)中。添加EDC·HCl (4.72 g，24.64 mmol)、HOBt (3.43 g，22.40 mmol)及DIPEA (9.75 mL，56.0 mmol)。在氬氣下在室溫下將反應物攪拌隔夜。用二氯甲烷稀釋反應混合物，且隨後用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉、水及鹽水洗滌。使有機層經硫酸鈉乾燥並濃縮。經由矽膠層析法(己烷/乙酸乙酯)純化粗油，產生化合物**2a** (6.7 g，85%產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.38-7.31 (m, 5H), 6.53-6.42 (m, 1H), 5.42-5.33 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.48-4.41 (m, 1H), 4.32-4.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.38 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz)。



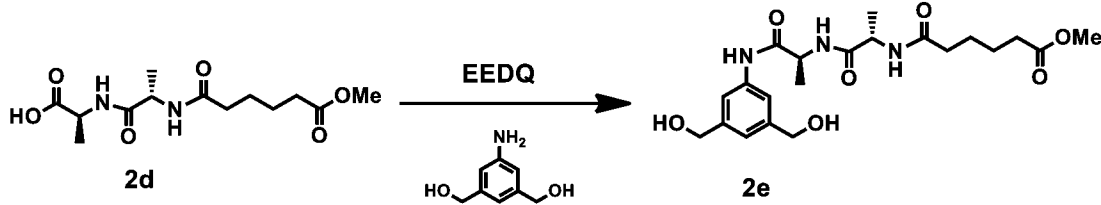
【0606】 步驟2：將化合物**2a** (6.7 g，19.12 mmol)溶解於甲醇(60.7 mL)及水(3.03 mL)。用氬氣將該溶液吹掃五分鐘。緩慢添加鈀/碳(濕，10%) (1.017 g，0.956 mmol)。在氬氣氛圍下將反應物攪拌隔夜。經由矽藻土過濾該溶液，用甲醇沖洗並濃縮。使其與甲醇及乙腈一起共沸，且將所得油直接置於高真空上，得到化合物**2b** (4.02 g，97%產率)，其直接用於下一步驟中。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78-7.63 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.73 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.39 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.36 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz)。



【0607】 步驟3：將化合物**2b** (4.02 g, 18.59 mmol)及己二酸單甲酯(3.03 mL, 20.45 mmol)溶解於無水DMF (62.0 mL)中。添加EDC·HCl (3.92 g, 20.45 mmol)、HOBT (2.85 g, 18.59 mmol)及DIPEA (6.49 mL, 37.2 mmol)。在室溫下將混合物攪拌隔夜。用二氯甲烷/甲醇(150 mL, 5:1)稀釋反應物且用飽和氯化銨、飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。使其經硫酸鈉乾燥，過濾並汽提。使該化合物與乙腈(5×)一起共沸，隨後在高真空上在35°C下泵吸，得到化合物**2c** (6.66 g, 100%產率)。粗物質不經純化即進行下一步驟。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.75 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 6.44 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.43-4.36 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 2.35-2.29 (m, 2H), 2.25-2.18 (m, 2H), 1.71-1.60 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.36 (t, 6H, *J* = 6.0 Hz)。

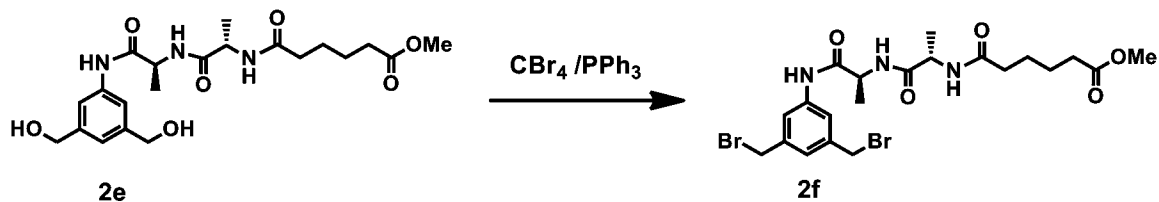


【0608】 步驟4：在室溫下在TFA (28.6 mL, 372 mmol)及去離子水(1.5 mL)中將化合物**2c** (5.91 g, 16.5 mmol)攪拌三小時。將反應混合物與乙腈一起濃縮且置於高真空上，得到呈黏性固體狀之粗化合物**2d** (5.88 g, 100%產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.21 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 4.69-4.60 (m, 1H), 4.59-4.51 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.40-2.33 (m, 2H), 2.31-2.24 (m, 2H), 1.72-1.63 (m, 4H), 1.51-1.45 (m, 3H), 1.42-1.37 (m, 3H)。

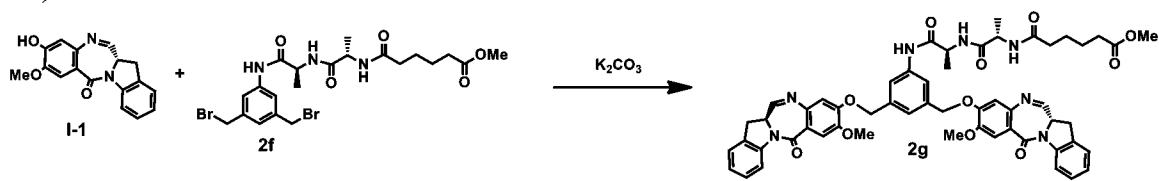


【0609】 步驟5：將化合物**2d** (5.6 g, 18.52 mmol)溶解於無水二氯甲烷(118 mL)及無水甲醇(58.8 mL)中。添加(5-胺基-1,3-仲苯基)二甲醇(2.70 g, 17.64 mmol)及EEDQ (8.72 g, 35.3 mmol)，且在室溫下將反應物攪拌隔夜。汽提溶劑且添加乙酸乙酯。過濾所得漿液，用乙酸乙酯洗滌且在真空/N<sub>2</sub>下乾燥，得到化合物**2e**

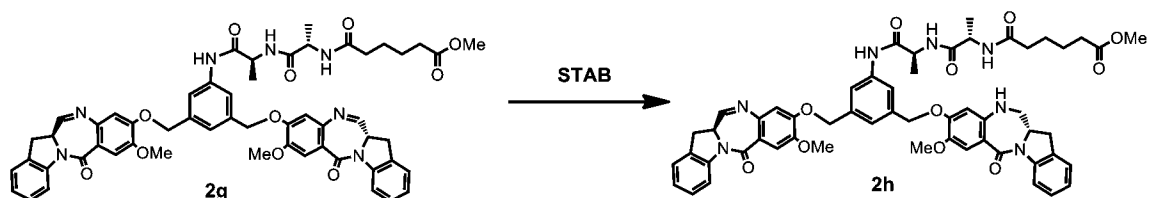
(2.79 g, 36%產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.82 (s, 1H), 8.05, (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 8.01 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.46 (s, 2H), 6.95 (s, 1H), 5.21-5.12 (m, 2H), 4.47-4.42 (m, 4H), 4.40-4.33 (m, 1H), 4.33-4.24 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.33-2.26 (m, 2H), 2.16-2.09 (m, 2H), 1.54-1.46 (m, 4H), 1.30 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.22 (d, 3H, *J* = 4.4 Hz)。



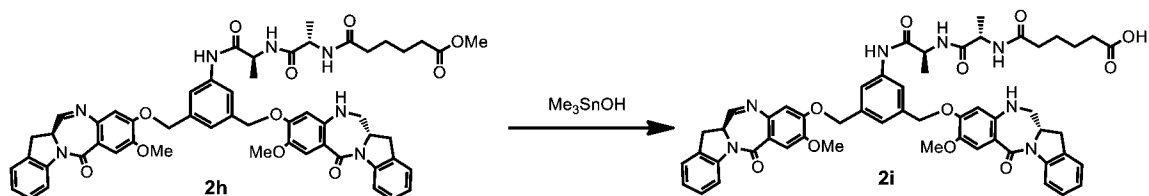
【0610】 步驟6：將化合物**2e** (0.52 g, 1.189 mmol)及四溴化碳(1.183 g, 3.57 mmol)溶解於無水DMF (11.89 mL)中。添加三苯基膦(0.935 g, 3.57 mmol)且在氬氣下將反應物攪拌四小時。用DCM/MeOH (10:1)稀釋反應混合物且用水及鹽水洗滌，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。藉由矽膠層析法(DCM/MeOH)純化粗物質，得到化合物**2f** (262 mg, 39%產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10.01 (s, 1H), 8.11 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 8.03 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 7.67 (s, 2H), 7.21 (s, 1H), 4.70-4.64 (m, 4H), 4.40-4.32 (m, 1H), 4.31-4.23 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.34-2.26 (m, 2H), 2.18-2.10 (m, 2H), 1.55-1.45 (m, 4H), 1.31 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz), 1.21 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz)。



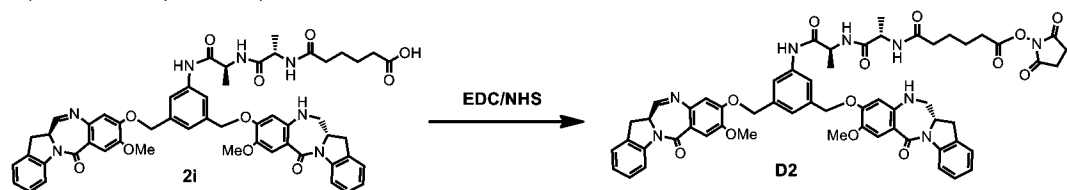
【0611】 步驟7：將二溴化物化合物**2f**及IGN單體化合物**I-1**溶解於DMF中。添加碳酸鉀且在室溫下攪拌隔夜。向反應混合物中添加水以使產物沈澱。在室溫下將漿液攪拌5 min，且隨後過濾並在真空/*N*<sub>2</sub>下乾燥1 h。藉由矽膠層析法(二氯甲烷/甲醇)純化粗物質，得到化合物**2g** (336 mg, 74%產率)。LCMS = 5.91 min (15 min方法)。MS (*m/z*): 990.6 (*M* + 1)<sup>+</sup>。



【0612】 步驟8：將二亞胺化合物**2g**溶解於1,2-二氯乙烷中。向反應混合物中添加 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ 且在室溫下攪拌1 h。用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀釋反應物且用飽和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 水溶液淬滅。進行層分離且用鹽水洗滌，經 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥並濃縮。經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化粗物質，得到化合物**2h** (85.5 mg, 25%產率)。LCMS = 6.64 min (15 min方法)。MS (m/z): 992.6 ( $\text{M} + 1$ )<sup>+</sup>。



【0613】 步驟9：將甲酯化合物**2h**溶解於1,2-二氯乙烷中。向反應混合物中添加三甲基錫醇且在80°C下加熱隔夜。使反應混合物冷卻至室溫且用水稀釋。用1 M HCl將水層酸化至pH ~ 4。用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (10:1, 3×20 mL)萃取混合物。用鹽水洗滌所合併之有機層且經 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥並濃縮。使粗物質通過二氧化矽插塞，得到化合物**2i** (48.8 mg, 80%產率)。LCMS = 5.89 min (15 min方法)。MS (m/z): 978.6 ( $\text{M} + 1$ )<sup>+</sup>。

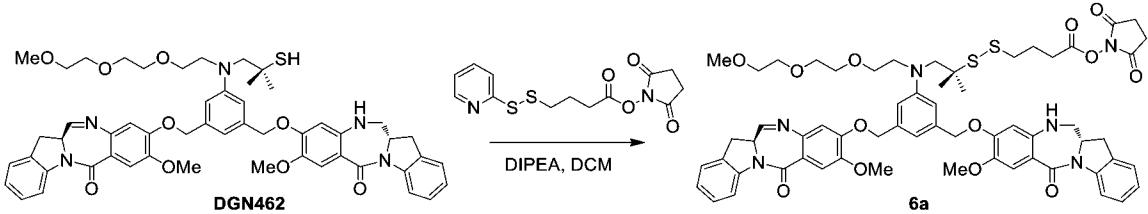


【0614】 步驟10：在室溫下將EDC·HCl添加至酸化化合物**2i**及N-羥基琥珀醯亞胺於 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 中之攪拌溶液中。將反應混合物攪拌2 h。用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 稀釋反應混合物且用水(1×15 mL)及鹽水(1×15 mL)洗滌。使有機層經 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 乾燥，過濾並濃縮。經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化粗物質，得到6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呿并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((R)-8-甲氧基-6-側氧基

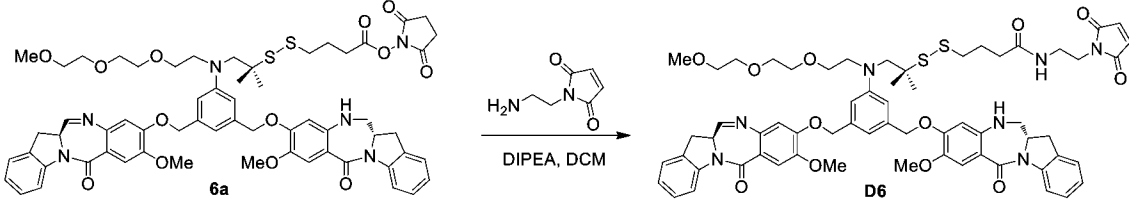


-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-(基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-(基)胺基)-1-側氧基丙-2-(基)胺基)-6-側氧基己酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯，即化合物**D2** (8.2 mg，30%產率)。LCMS = 6.64 min (15 min方法)。MS (m/z): 1075.4 (M + 1)<sup>+</sup>。

**實例18. N-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基)-11-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-(基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮呋并[1,2-a]吡啉-9-(基)氧基)甲基)苯基)-13,13-二甲基-2,5,8-三氧雜-14,15-二硫雜-11-氮雜十九-19-噻胺，即化合物**D6**之合成**



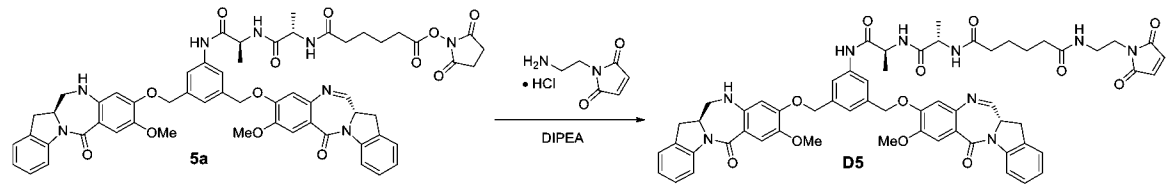
**【0615】 步驟1：**向游離硫醇**DGN462** (40 mg，0.042 mmol)及4-(2-吡啶基二硫)丁酸NHS酯(35 mg，80%純度，0.085 mmol)於無水二氯甲烷(0.5 mL)中之溶液中添加無水二異丙基乙胺(0.015 mL，0.085 mmol)且在室溫下攪拌16小時。用飽和氯化銨溶液淬滅反應混合物且用二氯甲烷稀釋。在分液漏斗中分離所獲得之混合物。用鹽水洗滌有機層，經無水硫酸鈉乾燥，過濾且在減壓下汽提。藉由半製備型逆相HPLC (C18管柱，CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)純化殘餘物。合併含有純產物之部分，冷凍並凍乾，得到所要NHS酯，即化合物**6a** (29.7 mg，60%產率)。LCMS = 9.1 min (15 min方法)。MS (m/z): 1157.3 (M + 1)<sup>+</sup>。



**【0616】 步驟2：**向NHS酯，即化合物**6a** (12.3 mg，0.011 mmol)及N-(2-胺基乙基)馬來噻亞胺鹽酸鹽(2.0 mg，0.011 mmol)於無水二氯甲烷(0.3 mL)中之溶

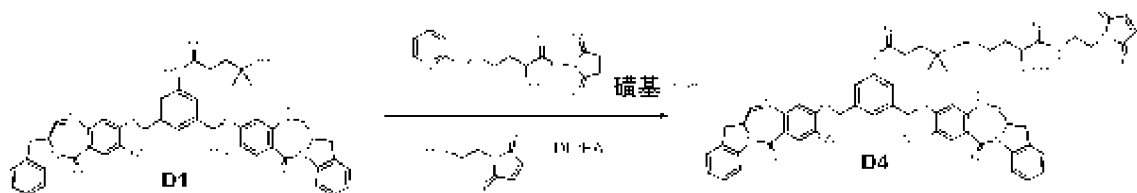
液中添加DIPEA (0.0022 mL, 0.013 mmol)。在室溫下將混合物攪拌3小時，隨後在減壓下對其進行汽提。藉由半製備型逆相HPLC (C18管柱, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)純化殘餘物。合併含有純產物之部分，冷凍並凍乾，得到所要馬來醯亞胺，即化合物**D6** (10 mg, 80%產率)。LCMS = 8.3 min (15 min方法)。MS (m/z): 1181.8 (M + 1)<sup>+</sup>。

**實例 19.** N1-(2-(2,5- 二側氧基 -2,5- 二氫 -1H- 吡咯 -1- 基) 乙基)-N6-((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)己二醯胺，即化合物**D5**之合成



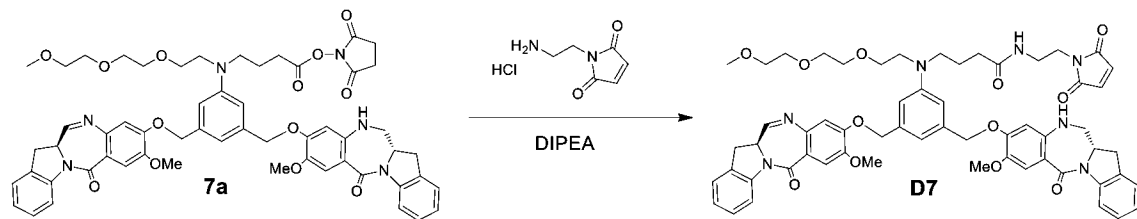
**【0617】** 在室溫下將NHS酯，即化合物**5a** (8.2 mg, 7.6 μmol)及1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮鹽酸鹽(2.2 mg, 0.011 mmol)溶解於無水二氯甲烷(305 μL)中。添加DIPEA(2.66 μL, 0.015 mmol)且將反應物攪拌3.5小時。濃縮反應混合物且藉由RPHPLC (C18管柱, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 梯度35%至55%)加以純化。將所要產物部分冷凍並凍乾，得到呈固體白色粉末狀之馬來醯亞胺，即化合物**D5** (5.3 mg, 58%產率)。LCMS = 5.11 min (8 min方法)。MS (m/z): 1100.6 (M + 1)<sup>+</sup>。

**實例 20.** 1-((2-(2,5- 二側氧基 -2,5- 二氫 -1H- 吡咯 -1- 基) 乙基) 胺基)-4-((5-((3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)胺基)-2-甲基-5-側氧基戊-2-基)二硫烷基)-1-側氧基丁烷-2-磺酸，即化合物**D4**之合成



【0618】 在室溫下，在氮氣下向游離硫醇**D1** (88 mg，0.105 mmol)及1-((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)-1-側氧基-4-(吡啶-2-基二硫烷基)丁烷-2-磺酸(磷基-SPDB) (64.0 mg，0.158 mmol)於無水二氯甲烷(2.10 mL)中之懸浮液中添加DIPEA (55.0  $\mu$ L，0.315 mmol)。將該混合物攪拌16小時，且隨後添加1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮鹽酸鹽(55.6 mg，0.315 mmol)、無水二氯甲烷(1.0 mL)及DIPEA (0.055 mL，0.315 mmol)。在室溫下將該混合物再攪拌5小時，此後在真空中濃縮反應物。藉由RP-HPLC (C18，CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)純化所得殘餘物。將含有所要產物的部分冷凍並凍乾，得到呈白色固體狀之馬來醯亞胺**D4** (20 mg，16%產率)。LCMS = 4.92 min (8 min方法)。MS (m/z): 1158.6 (M + 1)<sup>+</sup>。

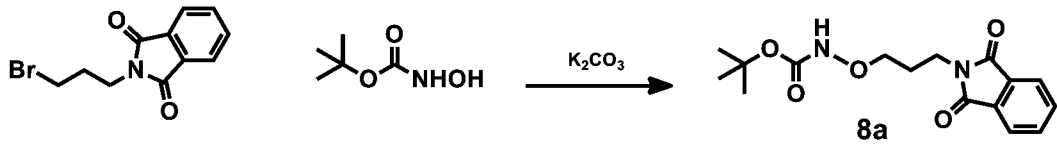
**實例21. N-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基)-11-(3-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-11,12,12a,13-四氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-側氧基-12a,13-二氫-6H-苯并[5,6][1,4]二氮吡并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-2,5,8-三氧雜-11-氮雜十五-15-醯胺，即化合物**D7**之合成**



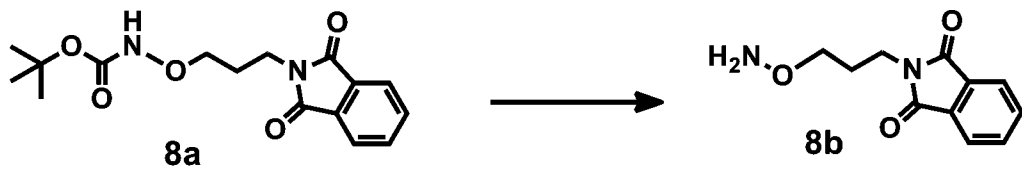
【0619】 在氮氣下向NHS酯**7a** (5 mg，4.82  $\mu$ mol)及1-(2-胺基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮鹽酸鹽(1.7 mg，9.64  $\mu$ mol)於無水二氯甲烷(200  $\mu$ L)中之溶液中添加DIPEA (1.512  $\mu$ L，8.68  $\mu$ mol)。在室溫下將該混合物攪拌4小時，且隨後在真空中濃縮。藉由RP-HPLC (C18，CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O)純化所得殘餘物。將含有所要產物之部分冷凍並凍乾，得到馬來醯亞胺化合物**D7** (3.5 mg，68%產率)。LCMS = 4.61

min (15 min方法)。MS (m/z): 1062.8 (M + 1)<sup>+</sup>。

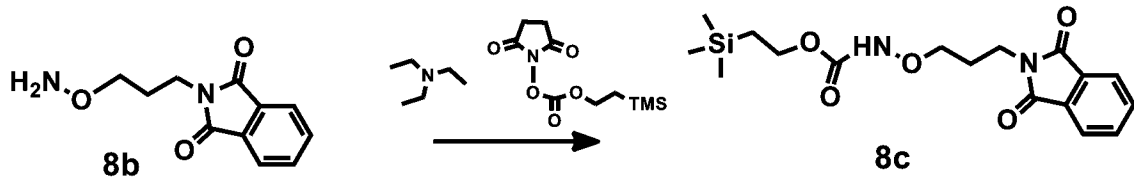
**實例22. 化合物D8之合成**



**【0620】 步驟1：**將羥基胺基甲酸第三丁酯(1.490 g, 11.19 mmol)溶解於無水DMF (22.38 mL)中。添加2-(3-溴丙基)異吲哚啉-1,3-二酮(3 g, 11.19 mmol)及碳酸鉀(3.09 g, 22.38 mmol)且在室溫下將反應物攪拌隔夜。用冷水對其進行稀釋且用EtOAc萃取。用鹽水洗滌有機物，經硫酸鈉乾燥且藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/Hex，梯度0%至45%)純化粗殘餘物，獲得呈黏性固體狀之化合物**8a** (2.41 g, 67%產率)。LCMS = 4.99 min (8 min方法)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.86-7.83 (m, 2H), 7.73-7.77 (m, 2H), 7.28 (bs, 1H), 3.92 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.82 (t, 2H, 6.9Hz), 2.05-1.98 (m, 2H), 1.47 (s, 9H)。

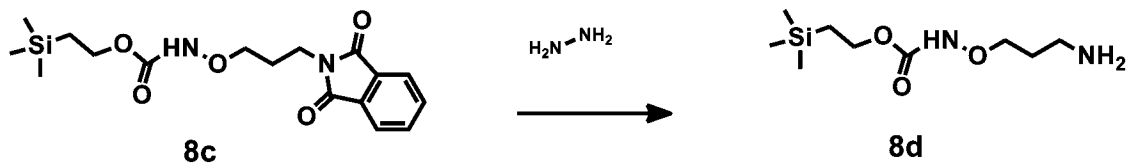


**【0621】 步驟2：**將化合物**8a** (2.41 g, 7.52 mmol)溶解於無水DCM (18.81 mL)中且在冰浴中冷卻至0°C。添加DCM (9.40 mL)與TFA (9.40 mL)之新混合溶液且移除冰浴。在室溫下將反應物攪拌1小時且用DCM稀釋並且用飽和碳酸氫鈉洗滌。用鹽水洗滌有機層，乾燥，過濾並濃縮，得到化合物**8b** (1.32 g, 80%產率)。粗物質不經進一步純化便使用。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.85-7.82 (m, 2H), 7.72-7.69 (m, 2H), 3.78 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.72 (t, 2H, 6.0Hz), 1.99-1.93 (m, 2H)。

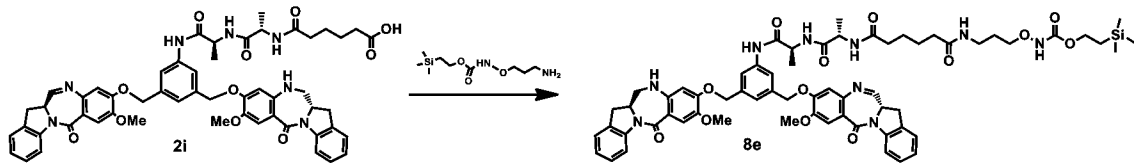


**【0622】 步驟3：**將化合物**8b** (100 mg, 0.454 mmol)溶解於無水DCM (4.5 mL)中，添加TEA (127 μl, 0.908 mmol)及(2-(三甲基矽烷基)乙基)碳酸2,5-二側氧

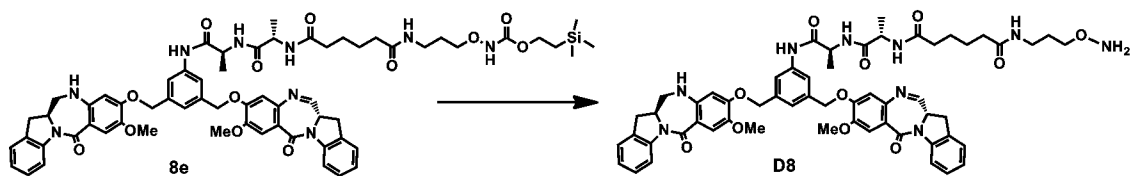
基吡咯啉-1-基酯(177 mg, 0.681 mmol)且在室溫下將反應物攪拌隔夜。用DCM稀釋反應物，用鹽水洗滌，乾燥，過濾並蒸發。藉由矽膠急驟層析法(EtOAc/Hex，梯度0%至40%)純化粗殘餘物，獲得化合物**8c** (148 mg, 89%產率)。LCMS = 5.91 min (8 min方法)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.86-7.83 (m, 2H), 7.73-7.69 (m, 2H), 7.39 (bs, 1H), 4.26-4.20 (m, 2H), 3.94 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.83 (t, 2H, 6.9Hz), 2.06-1.98 (m, 2H), 1.05-0.98 (m, 2H), 0.04 (s, 9H)。



【0623】 步驟4：將化合物**8c** (148 mg, 0.406 mmol)溶解於乙醇(2.7 mL)中並且攪拌，直至完全溶解。添加胍(63.7 μl, 2.030 mmol)且在室溫下攪拌反應物，直至在1小時快速形成白色沈澱物。經由矽藻土過濾反應物且用額外的乙醇沖洗。蒸發濾液且藉由矽膠急驟層析法(A = MeOH, B = EtOAc, 梯度100%至10%)加以純化。藉由質譜偵測產物部分並且蒸發，得到呈黏性固體狀之化合物**8d** (67.5 mg, 71%產率)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.27-4.21 (m, 2H), 3.98 (t, 2H, *J* = 5.9 Hz), 2.92-2.87 (m, 2H), 1.85-1.77 (m, 2H), 1.06-0.99 (m, 2H), 0.04 (s, 9H)。

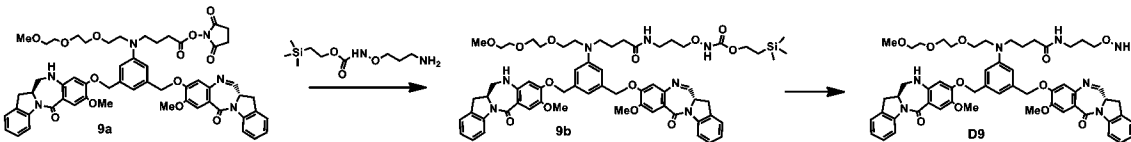


【0624】 步驟5：使以上實例17中所描述之化合物**2i** (30 mg, 0.031 mmol)懸浮於無水DCM (613 μl)中。逐滴添加無水DMF，直至溶液澄清。添加化合物**8d** (21.57 mg, 0.092 mmol)、EDC·HCl (29.4 mg, 0.153 mmol)及DMAP (0.749 mg, 6.13 μmol)且在室溫下將反應物攪拌1小時。用DCM/MeOH 10:1對其進行稀釋，且隨後用水洗滌。用DCM/MeOH 10:1萃取水層，且乾燥所合併之有機物並濃縮，得到化合物**8e** (49 mg)，不進行進一步純化便使用。LCMS = 5.94 min (8 min方法)。MS (*m/z*): 1194.4 (*M* + 1)<sup>+</sup>。



【0625】 **步驟6**：將化合物**8e** (49 mg, 0.041 mmol)溶解於THF (820  $\mu$ l)中，並且在冰浴中將反應物冷卻至0℃。添加TBAF (205  $\mu$ l, 0.205 mmol)且將反應物攪拌15分鐘，隨後移除冰浴。在室溫下對其進行攪拌直至完畢。將反應物冷卻至0℃，用飽和氯化銨淬滅且用DCM/MeOH 10:1萃取。用鹽水洗滌有機物，用硫酸鈉乾燥並蒸發。經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化粗物質，得到化合物**D8** (17.6 mg, 54%產率，經2個步驟)。LCMS =5.1 min (8 min方法)。MS (m/z): 1050.4 (M + 1)<sup>+</sup>。

**實例23. 化合物D9之合成**



【0626】 **步驟1**：將化合物**9a** (17 mg, 0.016 mmol)溶解於DCM (328  $\mu$ l)中。在室溫下添加化合物**8d** (5.76 mg, 0.025 mmol)及DIPEA (5.71  $\mu$ l, 0.033 mmol)並且攪拌反應物直至完畢。用10:1 DCM:MeOH對其進行稀釋且用鹽水洗滌。乾燥有機物並濃縮，得到化合物**9b**，其直接使用。

【0627】 **步驟2**：類似於實例23中之化合物**D8**來製備化合物**D9**。經由RPHPLC (C18管柱，乙腈/水)純化粗物質，得到化合物**D9** (5 mg, 31%產率，經2個步驟)。LCMS = 5.68 min (8 min方法)。MS (m/z): 1012.5 (M + 1)<sup>+</sup>。

**實例24. huCD123-CysMab-D5 在Kasumi-3-Luc-mCh-Puro 播散性模型中之活體內效力**

【0628】 為了測試huCD123-CysMab-D5對降低活體內播散性腫瘤負擔之能力的效力，將表現螢光素酶的播散性腫瘤模型與活動物成像組合使用，如以下方案中所描述。

【0629】 對雌性NSG小鼠(Jackson Labs)各自在尾靜脈中經靜脈內(IV)注射 $5 \times 10^6$ 個Kasumi-3-Luc-mCh-Puro細胞，即經工程改造以表現螢光素酶及mCherry之人類AML細胞系(Molecular Imaging, Ann Arbor, MI)。由Kasumi-3細胞進行螢光素酶表現允許使用活動物成像器對腫瘤負擔進行定量，該活動物成像器偵測由螢光素酶在活體內暴露於所注射之螢光素酶受質D-螢光素後所產生之生物發光信號。在接種後第6天，對小鼠進行成像且基於生物發光成像(BLI)而隨機分至研究組中。在各結合物投與之前24 h，將小鼠經腹膜內(IP)注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷Kasumi-3 AML細胞上之Fc受體，從而防止結合物之非特異性吸收。在Kasumi-3接種後第7天及第41天，使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、10  $\mu$ g/kg (以D5計；以huCD123計0.80 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、3  $\mu$ g/kg (以D5計；以huCD123計0.240 mg/kg) huCD123-CysMab-D5或10  $\mu$ g/kg非靶向KTI-CysMab-D5對照結合物。在結合物投與後第5天及第10天，使小鼠接受腹膜內注射100 mg/kg非靶向chKTI抗體，以確保持續阻斷AML腫瘤細胞上之Fc受體。

【0630】 在Kasumi-3接種後第11天、第13天、第17天、第20天、第24天、第27天、第31天、第38天、第41天、第45天、第52天、第59天、第66天、第73天及第80天對小鼠進行成像。在Molecular Imaging (Ann Arbor, MI)使用IVIS 50光學成像(Xenogen, Alameda, CA)進行活體內生物發光成像。在約1%至2%異氟烷氣體麻醉下對動物進行成像，每次三隻。各小鼠經腹膜內注射150 mg/kg D-螢光素(螢光素酶受質)且在注射之後10分鐘依序在俯臥位及背臥位進行成像。使用CCD晶片之大至小分區，且調節暴露時間(2秒至2分鐘)以便自各小鼠之影像中可觀測之腫瘤獲得至少數百次計數且避免CCD晶片飽和。使用Matlab R2015a分析影像。定製腳本將整體固定體積ROI置於各個別動物之俯臥及仰臥影像上，且基於動物鑑別進行標記。計算總流量(光子/秒)且輸出所有ROI以有助於在群組之

間進行分析。將俯臥及仰臥ROI加和在一起以估計整體腫瘤負擔。

【0631】 %T/C計算如下= [(T, 處理組之中值BLI)/(C, 對照組之中值BLI)]×100%。根據NCI標準，T/C≤42%為抗腫瘤活性之最低水準，而T/C值>42%為無活性，且T/C值<10%被視為高活性。

【0632】 %腫瘤負擔延遲(%TBD)計算如下：%TBD=(T-C)/C×100%，其中T-C，其中T為處理組達成指定BLI信號之之時間(天)且C為對照組達成指定BLI信號之之時間(天)。改適應用於%ILS之相同度量標準，吾等將%TBD>25視為最低活性，將%TBD>40視為活性，且將%TBD>50視為高活性。

【0633】 每週兩次對小鼠進行稱重且在研究持續時間期間監測臨床徵象。對達到安樂死準則之任何小鼠處以安樂死。在發現自發死亡時加以記錄。該研究在腫瘤細胞接種後第115天結束。

【0634】 初步實驗顯示，用任一劑量之huCD123-CysMab-D5進行處理引起腫瘤負擔隨時間初步消退，在第27天達到最低點，而在媒劑及KTI-CysMab-D5處理之群組中，腫瘤負擔在此時間段期間穩定增加。參見例如圖22。針對此等初步實驗計算之腫瘤生長抑制(T/C值)顯示10 µg/kg及3 µg/kg之huCD123-CysMab-D5在第27天具有高活性，分別具有0.20及0.25之%T/C值。亦使用經媒劑處理之群組在第45天之BLI信號作為指定BLI來計算%腫瘤負擔延遲(%TBD)。根據此度量標準，huCD123-CysMab-D5之兩種劑量均具有高活性，產生>75% (10 µg/kg huCD123-CysMab-D5)及>65% (3 µg/kg huCD123-CysMab-D5)之%TBD，相比之下，在10 µg/kg KTI-CysMab-D5對照結合物下可見0% TBD。另外，利用huCD123-CysMab-D5以3 µg/kg及10 µg/kg劑量兩者之治療與對照相比在具有突變P53及多藥物抗性AML之6/6小鼠中延長存活時間(參見圖23)。

【0635】 四個研究組各自在研究結束時之存活時間提供於圖31中且彙總於下表中。經媒劑處理之小鼠具有70天之中值存活時間。相比之下，經10 µg/kg



(以D5計；以huCD123計0.80 mg/kg) huCD123-CysMab-D5處理之小鼠具有115天之中值存活時間，產生64% ILS (高活性)。同樣，經3 µg/kg (以D5計；以huCD123計0.240 mg/kg) huCD123-CysMab-D5處理之小鼠具有105天之中值存活時間，產生50% ILS (高活性)。經10 µg/kg (以D5計) huKTI-CysMab-D5非靶向對照結合物處理之小鼠具有65.5天之中值存活時間，產生0% ILS (無活性)，指示用huCD123-CysMab-D5獲得之高活性具有CD123依賴性。

| 群組 | 處理                    | 劑量<br>(µg/kg<br>D5) | 劑量<br>(mg/kg<br>huCD123) | 中 值<br>存 活<br>時間<br>(天) | T-C | %IL<br>S | 活性       |
|----|-----------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|-----|----------|----------|
| 1  | 媒劑                    | -                   | -                        | 70                      | -   | -        | -        |
| 2  | huCD123-Cys<br>Mab-D5 | 10                  | 0.80                     | 115                     | 45  | 64       | 高 活<br>性 |
| 3  | huCD123-Cys<br>Mab-D5 | 3                   | 0.240                    | 105                     | 35  | 50       | 高 活<br>性 |
| 4  | huKTI-CysMab<br>-D5   | 10                  | 0.80                     | 65.5                    | 0   | 0        | 無 活<br>性 |

【0636】 對於N=6，中值存活時間(天)為第3隻及第4隻小鼠喪命之天數的平均值。使用中值存活時間值，% ILS (壽命增加)計算為： $\%ILS = (T-C)/C \times 100\%$ ，其中T為處理組之中值存活時間(天)且C為對照組之中值存活時間(天)。對於播散性模型之NCI標準為：ILS≥25%為最低活性，ILS>40%為活性，且ILS≥50%為高活性。

**實例25. huCD123-CysMab-D5結合物誘導DNA損傷，從而導致MV4-11細胞之細胞週期停滯在S期及細胞凋亡介導之細胞死亡**

【0637】 為了評估huCD123-CysMab-D5介導之細胞死亡的機制，用10 nM huCD123-CysMab-D5將表現CD123之MV4-11 AML細胞處理一小時，隨後在37 °C下在無結合物培養基中再培育48小時。使用未經處理之MV4-11細胞作為對照。收集細胞，且用多種試劑染色以定量處於細胞週期之不同階段的細胞數目(碘

化丙啶)、具有DNA損傷之細胞(pH2AX)、細胞凋亡(膜聯蛋白-V (Annexin-V)及裂解之凋亡蛋白酶-3)及穿孔質膜(TO-PRO-3)。如圖24中所顯示, MV4-11細胞與huCD123-CysMab-D5一起培育導致DNA損傷、停滯在細胞週期之S期及細胞凋亡介導之細胞死亡。

#### **實例26. huCD123-CysMab-D5在Molm-13播散性模型中之活體內效力**

【0638】 所有播散性模型之資料收集及分析:每週兩次對小鼠進行稱重且在研究持續時間期間監測臨床徵象。量測終點為存活時間。當存在後腿癱瘓、體重減少>處理前體重之20%、出現可見腫瘤或可見任何痛苦跡象時對動物處以安樂死。在發現自發死亡時對其進行記錄。對於播散性模型,腫瘤生長延遲計算為T-C,其中T為處理組之中值存活時間(天)且C為媒劑對照組之中值存活時間(天)。使用下式計算播散性模型之壽命增加百分比(%ILS): $\%ILS=(T-C)/C \times 100\%$ 。根據播散性模型之NCI標準評估抗腫瘤活性:ILS $\geq$ 25%為最低活性,ILS>40%為活性,且ILS $\geq$ 50%為高活性。

【0639】 為了測試huCD123-CysMab-D5對減少活體內腫瘤負擔之能力的效力,使用如以下方案中所描述之播散性腫瘤模型。

【0640】 將雌性無胸腺裸鼠各自在側尾靜脈中經靜脈內注射含 $10 \times 10^6$ 個人類AML細胞系Molm-13細胞之100  $\mu$ l無血清培養基。在接種後第7天,將小鼠隨機分至研究組中。在結合物投與前24 h,將小鼠經腹膜內注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷Molm-13 AML細胞上之Fc受體,從而防止結合物之非特異性吸收。在Molm-13接種後第7天,使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、0.1  $\mu$ g/kg (以D5計;以huCD123計0.008 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、0.3  $\mu$ g/kg (以D5計;以huCD123計0.024 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、1  $\mu$ g/kg (以D5計;以huCD123計0.08 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、1  $\mu$ g/kg (以D5計;以huKTI計0.08 mg/kg) huKTI-CysMab-D5對照結合物、0.1  $\mu$ g/kg (以D2計;以huCD123計

0.0059 mg/kg) huCD123-離胺酸連接-D2、0.3 µg/kg (以D2計；以huCD123計0.018 mg/kg) huCD123-離胺酸連接-D2、1 µg/kg (以D2計；以huCD123計0.059 mg/kg) huCD123-離胺酸連接-D2或1 µg/kg (以D2計；以chKTI計0.059 mg/kg) chKTI-離胺酸連接-D2對照結合物。在結合物投與後第4天及第9天，使小鼠接受腹膜內注射 100 mg/kg非靶向chKTI抗體，以確保持續阻斷AML腫瘤細胞上之Fc受體。結果彙總於下表及圖25中。

【0641】 huCD123-CysMab-D5結合物在所有三個測試劑量下均具有高活性，各自產生>262.5天之%ILS。相比之下，1 µg/kg (以D5計)劑量之非靶向huKTI-CysMab-D5對照結合物無活性，產生0% ILS。此說明huCD123-CysMab-D5之CD123依賴性活性。類似地，huCD123-離胺酸連接-D2在所有三個測試劑量下均具有高活性，各自產生>59之%ILS。然而，1 µg/kg (以D2計)劑量之chKTI-離胺酸連接-D2非靶向對照結合物亦無活性，產生11% ILS，說明huCD123-離胺酸連接-D2之CD123依賴性活性。當比較在各CD123靶向結合物之最低測試劑量0.1 µg/kg劑量下所獲得之%ILS時，可見huCD123-CysMab-D5與huCD123-離胺酸連接-D2之間的一個明顯差異。在0.1 µg/kg huCD123-CysMab-D5下所獲得之% ILS為262.5天，而在0.1 µg/kg劑量之huCD123-離胺酸連接-D2下所獲得之% ILS為59天，表明huCD123-CysMab-D5之優越性。

| 處理組                           | 中值存活時間<br>(天) | 腫瘤生長延遲<br>(T-C，天) | % ILS   | 結果  |
|-------------------------------|---------------|-------------------|---------|-----|
| 媒劑                            | 28            | 0                 | 0       | --- |
| huCD123-CysMab-D5 (0.1 µg/kg) | 101.5         | 73.5              | 262.5   | 高活性 |
| huCD123-CysMab-D5 (0.3 µg/kg) | > 101.5       | > 73.5            | > 262.5 | 高活性 |
| huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)   | > 101.5       | > 73.5            | > 262.5 | 高活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)     | 26.5          | 0                 | 0       | 無活性 |
| huCD123-離胺酸連接-D2 (0.1 µg/kg)  | 44.5          | 16.5              | 59      | 高活性 |
| huCD123-離胺酸連接-D2 (0.3 µg/kg)  | > 101.5       | > 73.5            | > 262.5 | 高活性 |
| huCD123-離胺酸連接-D2 (1 µg/kg)    | > 101.5       | > 73.5            | > 262.5 | 高活性 |
| chKTI-離胺酸連接-D2 (1 µg/kg)      | 31            | 3                 | 11      | 無活性 |

**實例27. huCD123-CysMab-D5在EOL-1皮下模型中之活體內效力**

【0642】 所有皮下模型之資料收集及分析：每週兩次對小鼠進行稱重且在研究持續時間期間監測臨床徵象。當存在後腿癱瘓、體重減少>處理前體重之20%、發生腫瘤潰瘍或可見任何痛苦跡象時對動物處以安樂死。每週一至兩次在三個維度上使用測徑規量測腫瘤體積。使用式 $V = \text{長度} \times \text{寬度} \times \text{高度} \times \frac{1}{2}$ 表示腫瘤體積 (mm<sup>3</sup>) (Tomayko 及 Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol. 24: 148-54 (1989))。如Bissery等人, Cancer Res. 51: 4845-52 (1991)中所描述來評估活性。亦使用下式評估腫瘤生長抑制(T/C值)： $T/C (\%) = (\text{處理組之中值腫瘤體積} / \text{對照組之中值腫瘤體積}) \times 100\%$ 。當媒劑對照之腫瘤體積達到預定尺寸時，同時測定處理組(T)及媒劑對照組(C)之腫瘤體積(Bissery等人, Cancer Res. 51: 4845-52 (1991))。測定各處理組之每日中值腫瘤體積，包括無腫瘤小鼠(0 mm<sup>3</sup>)。根據NCI標準， $T/C \leq 42\%$ 為抗腫瘤活性之最低水準。 $T/C < 10\%$ 被視為高抗腫瘤活性水準。

【0643】 為了測試huCD123-CysMab-D5對減少活體內腫瘤負擔之能力的效力，使用如以下方案中所描述之皮下腫瘤模型進行三個研究。

【0644】 在第一個研究中，對雌性無胸腺裸鼠各自在右脅部經皮下接種含 $10 \times 10^6$ 個人類AML細胞系EOL-1細胞之100  $\mu$ l無血清培養基/基質膠。在EOL-1接種後第6天，將小鼠隨機分至研究組中。在結合物投與前24 h，將小鼠經腹膜內注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷EOL-1 AML細胞上之Fc受體，從而防止結合物之非特異性吸收。在EOL-1接種後第7天，使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、1  $\mu$ g/kg（以D5計；以huCD123計0.08 mg/kg）huCD123-CysMab-D5、3  $\mu$ g/kg（以D5計；以huCD123計0.24 mg/kg）huCD123-CysMab-D5、1  $\mu$ g/kg（以D2計；以huCD123計0.050 mg/kg）huCD123-離胺酸連接-D2、3  $\mu$ g/kg（以D2計；以huCD123計0.151 mg/kg）huCD123-離胺酸連接-D2、1  $\mu$ g/kg（以D5計；以huKTI計0.08 mg/kg）huKTI-CysMab-D5對照結合物、3  $\mu$ g/kg（以D5計；以huKTI計0.24 mg/kg）huKTI-CysMab-D5對照結合物、1  $\mu$ g/kg（以D2計；以chKTI計0.050 mg/kg）chKTI-離胺酸連接-D2或3  $\mu$ g/kg（以D2計；以chKTI計0.151 mg/kg）chKTI-離胺酸連接-D2對照結合物。在結合物投與後第4天及第9天，使小鼠接受腹膜內注射100 mg/kg非靶向chKTI抗體，以確保持續阻斷AML腫瘤細胞上之Fc受體。結果呈現於下表及圖26中。

【0645】 huCD123-CysMab-D5之1  $\mu$ g/kg（以D5計）及3  $\mu$ g/kg劑量分別具有活性及高活性，分別產生13% (3/6 CR)及2% T/C (5/6 CR)。相比之下，huKTI-CysMab-D5非靶向對照結合物之1  $\mu$ g/kg（以D5計）及3  $\mu$ g/kg劑量無活性，具有 $\geq 73$ 之% T/C，說明huCD123-CysMab-D5之活性具有CD123依賴性。huCD123-離胺酸連接-D2之1  $\mu$ g/kg（以D2計）及3  $\mu$ g/kg劑量分別具有活性及高活性，分別產生30% (1/6 CR)及1% (6/6 CR)。相比之下，chKTI-離胺酸連接-D2非靶向對照結合物之1  $\mu$ g/kg（以D2計）及3  $\mu$ g/kg劑量均無活性，分別產生75% T/C

(0/6 CR)及81% T/C (0/6 CR)。此顯示huCD123-離胺酸連接-D2之活性具有CD123 依賴性。當比較1 µg/kg (以D5計) huCD123-CysMab-D5與1 µg/kg (以D2計) huCD123-離胺酸連接-D2時，兩種CD123靶向結合物之間的差異顯而易見，因為前者產生13% T/C 及3/6 CR，而後者產生30% T/C 及僅1/6 CR，說明 huCD123-CysMab-D5在此模型中具有明顯優越性。

| 處理組                              | % T/C<br>(第 15 天) | PR  | CR  | 結果  |
|----------------------------------|-------------------|-----|-----|-----|
| 媒劑                               | ---               | 1/6 | 1/6 | --- |
| huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)      | 13                | 3/6 | 3/6 | 活性  |
| huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)      | 2                 | 5/6 | 5/6 | 高活性 |
| huCD123- 離 胺 酸 連 接 -D2 (1 µg/kg) | 30                | 1/6 | 1/6 | 活性  |
| huCD123- 離 胺 酸 連 接 -D2 (3 µg/kg) | 1                 | 6/6 | 6/6 | 高活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)        | 100               | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)        | 73                | 1/6 | 1/6 | 無活性 |
| chKTI- 離 胺 酸 連 接 -D2 (1 µg/kg)   | 75                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| chKTI- 離 胺 酸 連 接 -D2 (3 µg/kg)   | 81                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |

【0646】 在第二個研究中，對雌性無胸腺裸鼠各自在右脅部經皮下接種含 10×10<sup>6</sup>個人類AML細胞系EOL-1細胞之100 µl無血清培養基/基質膠。在EOL-1接種後第6天，將小鼠隨機分至研究組中。在結合物投與前24 h，將小鼠經腹膜內注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷EOL-1 AML細胞上之Fc受體，從而防止結合物之非特異性吸收。EOL-1接種後第7天，使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、0.5 µg/kg (以D5計；以huCD123計0.04 mg/kg) huCD123-CysMab-D5或1 µg/kg (以D5計；以huCD123計0.08 mg/kg) huCD123-CysMab-D5。在結合物投與後第4天及第9天，使小鼠接受腹膜內注射100 mg/kg非靶向chKTI抗體，以確保持續阻斷AML腫瘤細胞上之Fc受體。結果呈現於下表及圖27中。

【0647】 huCD123-CysMab-D5之0.5 µg/kg (以D5計)劑量具有活性，產生11% T/C及3/6 CR。類似地，huCD123-CysMab-D5之1 µg/kg劑量具有高活性，產生3% T/C及6/6 CR。

| 處理組                           | % T/C<br>(第 16 天) | PR  | CR  | 結果  |
|-------------------------------|-------------------|-----|-----|-----|
| 媒劑                            | ---               | 0/6 | 0/6 | --- |
| huCD123-CysMab-D5 (0.5 µg/kg) | 11                | 3/6 | 3/6 | 活性  |
| huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)   | 3                 | 6/6 | 6/6 | 高活性 |

【0648】 在第三個研究中，對雌性無胸腺裸鼠各自在右脅部經皮下接種含10×10<sup>6</sup>個人類AML細胞系EOL-1細胞之100 µl無血清培養基/基質膠。在EOL-1接種後第6天，將小鼠隨機分至研究組中。在結合物投與前24 h，將小鼠經腹膜內注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷EOL-1 AML細胞上之Fc受體，從而防止結合物之非特異性吸收。在EOL-1接種後第7天，使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、3 µg/kg (以D5計；以huCD123計0.24 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、3 µg/kg (以D5計) FGN849 (有效負載之游離藥物形式)、0.24 mg/kg未結合(裸) huCD123抗體或3 µg/kg (以D5計；以huKTI計0.24 mg/kg) huKTI-CysMab-D5對照結合物。經阿糖胞苷處理之小鼠在EOL-1接種後第7天、第8天、第9天、第10天及第11天接受單次腹膜內注射，而經阿紫胞苷處理之小鼠在EOL-1接種後第7天、第10天、第13天、第16天及第19天接受單次腹膜內注射。在結合物投與後第4天及第9天，使小鼠接受腹膜內注射100 mg/kg非靶向chKTI抗體，以確保持續阻斷AML腫瘤細胞上之Fc受體。結果呈現於下表及圖28中。

【0649】 在所測試之所有製品中，僅3 µg/kg (以D5計)劑量之huCD123-CysMab-D5顯示活性，產生高活性1 %T/C及8/8 CR，相比之下，3 µg/kg (以D5計)劑量之huKTI-CysMab-D5非靶向對照結合物產生69% T/C及0/8 CR。3 µg/kg (以D5計)劑量之未結合游離藥物FGN849亦無活性，具有92 %T/C及0/8

CR。同樣，與huCD123-CysMab-D5之抗體劑量相匹配的0.24 mg/kg劑量之未結合(「裸」) huCD123抗體無活性，具有60% T/C及0/8 CR。以每日75 mg/kg之劑量投與5天之阿糖胞苷無活性，具有84% T/C及0/8 CR。以每三天一次3.75 mg/kg之劑量投與5個劑量之阿紫胞苷無活性，具有59% T/C及0/8 CR。

| 處理組                         | % T/C<br>(第 16 天) | PR  | CR  | 結果  |
|-----------------------------|-------------------|-----|-----|-----|
| 媒劑                          | ---               | 0/8 | 0/8 | --- |
| huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg) | 1                 | 8/8 | 8/8 | 高活性 |
| FGN849 (3 µg/kg)            | 92                | 0/8 | 0/8 | 無活性 |
| 裸抗體(0.24 mg/kg)             | 60                | 0/8 | 0/8 | 無活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)   | 69                | 0/8 | 0/8 | 無活性 |
| 阿糖胞苷； 75 mg/kg， qd x 5      | 84                | 0/8 | 0/8 | 無活性 |
| 阿紫胞苷； 3.75 mg/kg， q3d x 5   | 59                | 0/8 | 0/8 | 無活性 |

**實例28. huCD123-CysMab-D5及huCD123-SeriMab-sD1在MV4-11播散性模型中之活體內效力**

【0650】 為了測試huCD123-CysMab-D5及huCD123-SeriMab-sD1對減少活體內腫瘤負擔之能力的效力，使用如以下方案中所描述之播散性腫瘤模型。

【0651】 用150 mg/kg環磷醯胺對雌性NOD SCID小鼠進行預處理以部分消融骨髓，以便改良MV4-11細胞之植入。用0.9% NaCl還原環磷醯胺(Baxter，批次號4E011，Exp 05.2017)，且在第0天之MV4-11細胞接種前第-3天及第-2天經腹膜內投與小鼠。在如以上所描述之環磷醯胺處理之後，將小鼠各自在側尾靜脈中經靜脈內注射含3×10<sup>6</sup>個人類AML細胞系MV4-11細胞之100 µl無血清培養基。在MV4-11接種後第7天，將小鼠隨機分至研究組中。在結合物投與前24 h，將小鼠經腹膜內注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷MV4-11 AML細胞上之Fc受體，從而防止結合物之非特異性吸收。在MV4-11接種後第7天，使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、1 µg/kg (以D5計；以huCD123計0.08 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、3 µg/kg (以D5計；0.24 mg/kg huCD123) huCD123-CysMab-D5、1 µg/kg (以D1計；以huCD123計0.054 mg/kg)



huCD123-SeriMab-sD1 、 3  $\mu\text{g/kg}$  (以 D1 計 ; 以 huCD123 計 0.163  $\text{mg/kg}$ )  
huCD123-SeriMab-sD1 、 1  $\mu\text{g/kg}$  (以 D5 計 ; 以 huKTI 計 0.08  $\text{mg/kg}$ )  
huKTI-CysMab-D5 對照結合物、 3  $\mu\text{g/kg}$  (以 D5 計 ; 以 huKTI 計 0.24  $\text{mg/kg}$ )  
huKTI-CysMab-D5 對照結合物、 1  $\mu\text{g/kg}$  (以 D1 計 ; 以 chKTI 計 0.07  $\text{mg/kg}$ )  
chKTI-SeriMab-sD1 對照結合物或 3  $\mu\text{g/kg}$  (以 D1 計 ; 以 chKTI 計 0.21  $\text{mg/kg}$ )  
chKTI-SeriMab-sD1 對照結合物。結果彙總於下表及圖29中。

【0652】 huCD123-CysMab-D5之1  $\mu\text{g/kg}$ 及3  $\mu\text{g/kg}$  (以D5計)劑量均具有高活性，各自產生 $\geq 70$ 之%ILS。相比之下，1  $\mu\text{g/kg}$ 劑量(以D5計)之huKTI-CysMab-D5非靶向對照結合物具有最低活性，產生28% ILS。huKTI-CysMab-D5之3  $\mu\text{g/kg}$ 劑量無活性，具有0% ILS，說明huCD123-CysMab-D5具有CD123依賴性活性。huCD123-SeriMab-sD1之1  $\mu\text{g/kg}$ 及3  $\mu\text{g/kg}$  (以sD1計)劑量均具有高活性，各自產生 $\geq 101$ 之%ILS。然而，當研究非靶向chKTI-SeriMab-sD1對照結合物之活性時，3  $\mu\text{g/kg}$ 劑量(以sD1計)顯而易見高度非特異性非CD123靶向活性，其產生65% ILS (高活性)。此指示靶向CD123之huCD123-SeriMab-sD1之3  $\mu\text{g/kg}$  (以sD1計)劑量之高活性在一定程度上可能由於不涉及靶向CD123之非特異性藥物吸收機制。相比之下，chKTI-SeriMab-sD1對照結合物之1  $\mu\text{g/kg}$  (以sD1計)劑量無活性，具有%ILS 15，說明chKTI-SeriMab-sD1之3  $\mu\text{g/kg}$ 劑量之非特異性活性具有劑量依賴性且huCD123-SeriMab-sD1之1  $\mu\text{g/kg}$  (以sD1計)劑量之高活性實際上具有CD123依賴性。

| 處理組                           | 中值存活時間<br>(天) | 腫瘤生長延遲<br>(T-C，天) | % ILS | 結果   |
|-------------------------------|---------------|-------------------|-------|------|
| 媒劑                            | 46            | 0                 | 0     | ---  |
| huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)   | 81            | 35                | 76    | 高活性  |
| huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)   | 78            | 32                | 70    | 高活性  |
| huCD123-SeriMab-sD1 (1 µg/kg) | 92.5          | 46.5              | 101   | 高活性  |
| huCD123-SeriMab-sD1 (3 µg/kg) | >92.5         | > 46.5            | > 101 | 高活性  |
| huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)     | 59            | 13                | 28    | 最低活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)     | 46            | 0                 | 0     | 無活性  |
| chKTI-SeriMab-sD1 (1 µg/kg)   | 53            | 7                 | 15    | 無活性  |
| chKTI-SeriMab-sD1 (3 µg/kg)   | 76            | 30                | 65    | 高活性  |

**實例29. huCD123-CysMab-D5及huCD123-SeriMab-sD1在MV4-11皮下模型中之活體內效力**

【0653】 為了測試huCD123-CysMab-D5及huCD123-SeriMab-sD1對減少活體內腫瘤負擔之能力的效力，使用如以下方案中所描述之皮下腫瘤模型。

【0654】 將雌性CB.17 SCID小鼠各自在右脇部經皮下接種處於100 µl無血清培養基/基質膠中之10×10<sup>6</sup>個MV4-11細胞，即人類AML細胞系。在MV4-11接種後第14天，將小鼠隨機分至研究組中。在結合物投與前24 h，將小鼠經腹膜內注射400 mg/kg非靶向chKTI抗體以阻斷MV4-11 AML細胞上之Fc受體，從而防止結合物之非特異性吸收。在MV4-11接種後第15天，使小鼠在側尾靜脈中接受單次靜脈內注射媒劑、0.3 µg/kg（以D1計；以huCD123計0.016 mg/kg）huCD123-SeriMab-sD1、1 µg/kg（以D1計；以huCD123計0.054 mg/kg）huCD123-SeriMab-sD1、3 µg/kg（以D1計；以huCD123計0.16 mg/kg）huCD123-SeriMab-sD1、0.3 µg/kg（以D5計；以huCD123計0.024 mg/kg）huCD123-CysMab-D5、1 µg/kg（以D5計；以huCD123計0.08 mg/kg）huCD123-CysMab-D5、3 µg/kg（以D5計；以huCD123計0.24 mg/kg）

huCD123-CysMab-D5 、 0.3 µg/kg (以 D1 計 ; 以 chKTI 計 0.021 mg/kg)  
chKTI-SeriMab-sD1對照結合物、 1 µg/kg (以D1計 ; 以chKTI計0.07 mg/kg)  
chKTI-SeriMab-sD1對照結合物、 3 µg/kg (以D1計 ; 以chKTI計0.21 mg/kg)  
chKTI-SeriMab-sD1對照結合物、 0.3 µg/kg (以D5計 ; 以huKTI計0.024 mg/kg)  
huKTI-CysMab-D5對照結合物、 1 µg/kg (以D5計 ; 以huKTI計0.08 mg/kg)  
huKTI-CysMab-D5對照結合物或3 µg/kg (以D5計 ; 以huKTI計0.24 mg/kg)  
huKTI-CysMab-D5對照結合物。在MV4-11接種後第20天，將小鼠經腹膜內注射  
100 mg/kg非靶向chKTI抗體以確保持續阻斷AML腫瘤細胞上之Fc受體。結果呈  
現於下表及圖30中。

**【0655】** huCD123-SeriMab-sD1之1 µg/kg及3 µg/kg (以sD1計)劑量均具有  
高活性，各自產生0及6/6 CR之%T/C。所測試之最低huCD123-SeriMab-sD1劑量  
0.3 µg/kg (以sD1計)無活性，具有43之%T/C及0/6 CR。然而，當研究非靶向  
chKTI-SeriMab-sD1對照結合物之活性時，3 µg/kg劑量(以sD1計)可見高度非特異  
性非CD123靶向活性，其產生6 %T/C (高活性)及3/6 CR。此指示靶向CD123之  
huCD123-SeriMab-sD1之3 µg/kg (以sD1計)劑量之高活性在一定程度上可能由於  
不涉及靶向CD123之非特異性藥物吸收機制。相比之下，chKTI-SeriMab-sD1對  
照結合物之1 µg/kg (以sD1計)及0.3 µg/kg劑量均無活性，分別產生73% T/C及  
83% T/C，顯示chKTI-SeriMab-sD1之3 µg/kg劑量(以sD1計)之高非特異性活性具  
有劑量依賴性且huCD123-SeriMab-sD1之1 µg/kg劑量(以sD1計)之高活性實際上  
具有CD123依賴性。

**【0656】** huCD123-CysMab-D5之1 µg/kg及3 µg/kg (以D5計)劑量均具有高  
活性，各自產生0% T/C，以及分別5/6及6/6 CR。huCD123-CysMab-D5之0.3 µg/kg  
(以D5計)劑量，即所測試之最低劑量無活性，具有69% T/C及0/6CR。相比之下，  
huKTI-CysMab-D5非靶向對照結合物之所有三種劑量(以D5計)無活性，各自產生

≥43% T/C及0/6 CR；顯示huCD123-CysMab-D5之CD123依賴性活性。

| 處理組                             | % T/C<br>(第 49 天) | PR  | CR  | 結果  |
|---------------------------------|-------------------|-----|-----|-----|
| 媒劑                              | ---               | 0/6 | 0/6 | --- |
| huCD123-SeriMab-sD1 (0.3 µg/kg) | 43                | 1/6 | 0/6 | 無活性 |
| huCD123-SeriMab-sD1 (1 µg/kg)   | 0                 | 6/6 | 6/6 | 高活性 |
| huCD123-SeriMab-sD1 (3 µg/kg)   | 0                 | 6/6 | 6/6 | 高活性 |
| huCD123-CysMab-D5 (0.3 µg/kg)   | 69                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| huCD123-CysMab-D5 (1 µg/kg)     | 0                 | 5/6 | 5/6 | 高活性 |
| huCD123-CysMab-D5 (3 µg/kg)     | 0                 | 6/6 | 6/6 | 高活性 |
| chKTI-SeriMab-sD1 (0.3 µg/kg)   | 83                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| chKTI-SeriMab-sD1 (1 µg/kg)     | 73                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| chKTI-SeriMab-sD1 (3 µg/kg)     | 6                 | 5/6 | 3/6 | 高活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (0.3 µg/kg)     | 102               | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (1 µg/kg)       | 79                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |
| huKTI-CysMab-D5 (3 µg/kg)       | 43                | 0/6 | 0/6 | 無活性 |

**實施例30. huCD123-IGN結合物在小鼠中之活體內耐受性**

【0657】 為了測試huCD123-CysMab-D5及其他huCD123-IGN結合物在活體內之耐受性，如以下方案中所描述來使用小鼠模型。

【0658】 使雌性CD-1小鼠接受向側尾靜脈中單次靜脈內注射媒劑、150 µg/kg (以D5計；以huCD123計12 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、125 µg/kg (以D5計；以huCD123計 10 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、100 µg/kg (以D5計；以huCD123計8 mg/kg) huCD123-CysMab-D5、150 µg/kg (以sD1計；以huCD123計14.3 mg/kg) huCD123-SeriMab-sD1或 125 µg/kg (以sD1計；以huCD123計11.9) huCD123-SeriMab-sD1。huCD123抗體不與小鼠CD123交叉反應，由此使得此活體內小鼠模型僅為脫靶毒性之指標。每日觀測小鼠，持續33天，且測定體重。若動物經歷大於20%體重損失或處於瀕死狀態，則對動物處以安樂死。除了體重損失以外，在任何處理中之研究過程中不進行其他臨床觀測。

【0659】 使雌性CD-1小鼠接收向側尾靜脈中單次靜脈內注射媒劑、75 µg/kg (以D2計；以huCD123計4.4 mg/kg) huCD123-離胺酸連接-D2、100 µg/kg (以D2計；以huCD123計5.9 mg/kg) huCD123-離胺酸連接-D2或125 µg/kg (以D2計；以huCD123計7.4 mg/kg) huCD123-離胺酸連接-D2。huCD123抗體不與小鼠CD123交叉反應，由此使得此活體內小鼠模型僅為脫靶毒性之指標。每日觀測小鼠，持續22天，且測定體重。若動物經歷大於20%體重損失或處於瀕死狀態，則對動物處以安樂死。

【0660】 結果彙總於以下各表以及圖32及圖33中。

【0661】 huCD123-CysMab-D5在150 µg/kg (以D5計；以huCD123計12 mg/kg)下未得以耐受。平均體重變化最低點發生在第12天，減少11%。在第12天由於> 20%體重損失而對八隻小鼠中之一隻處以安樂死。huCD123-CysMab-D5在125 µg/kg (以D5計；以huCD123計10 mg/kg)下未得以良好耐受。平均體重變化最低點發生在第10天，減少8.6%。在第9天由於體重損失而對八隻小鼠中之一隻處以安樂死。huCD123-CysMab-D5在100 µg/kg (以D5計；以huCD123計8 mg/kg)下得以耐受。平均體重變化最低點發生在第6天，減少7%。此處理組中之小鼠無一由於體重損失而被處以安樂死。

【0662】 huCD123-SeriMab-sD1在150 µg/kg (以huCD123計14.3 mg/kg)下未得以耐受。平均體重變化最低點發生在第10天，減少17.3%。在第10天，由於體重損失而對八隻小鼠中之兩隻處以安樂死。huCD123-SeriMab-sD1在125 µg/kg (以sD1計；以huCD123計11.9 mg/kg)下未得以良好耐受。平均體重變化最低點發生在第10天，減少6.7%。在第12天，由於體重損失而對八隻小鼠中之一隻處以安樂死。

【0663】 huCD123-離胺酸連接-D2在75 µg/kg (以D2計；以huCD123計4.4 mg/kg)下得以耐受。平均體重變化最低點發生在第5天，減少6%。此處理組中之

小鼠無一由於體重損失而被處以安樂死。huCD133-離胺酸連接-D2在100 µg/kg (以D2計；以huCD123計5.9 mg/kg)下得以耐受。平均體重變化最低點發生在第7天，減少8%。此處理組中之小鼠無一由於體重損失而被處以安樂死。huCD123-離胺酸連接-D2在125 µg/kg (以D2計；以huCD123計7.4 mg/kg)下未得以耐受。平均體重變化最低點發生在第9天(當N=6時)，減少17%。由於> 20%體重損失而在所指示之天數對原始八隻小鼠中以下數目之小鼠處以安樂死：第8天，一隻；第9天，一隻；第10天，兩隻；第11天，一隻；及第13天，一隻。

| 處理                  | µg/kg，<br>以藥物<br>負載計 | mg/kg，以<br>huCD123<br>計 | 因> 20<br>BW 損<br>失而處<br>以安樂<br>死之小<br>鼠數 | 最低<br>體重<br>(天) | 最低<br>點平<br>均體<br>重降<br>低% |
|---------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| 媒劑                  | -----                | -----                   | 0/8                                      | -----           | -----                      |
| huCD123-CysMab-D5   | 150                  | 12                      | 1/8                                      | 12              | 11                         |
| huCD123-CysMab-D5   | 125                  | 10                      | 1/8                                      | 10              | 8.6                        |
| huCD123-CysMab-D5   | 100                  | 8                       | 0/8                                      | 6               | 7                          |
| huCD123-SeriMab-sD1 | 150                  | 14.3                    | 2/8                                      | 10              | 17.3                       |
| huCD123-SeriMab-sD1 | 125                  | 11.9                    | 1/8                                      | 10              | 6.7                        |

| 治療                   | µg/kg，以<br>藥物負<br>載計 | mg/kg，<br>以<br>huCD123<br>計 | 因> 20 BW 損<br>失而處以安<br>樂死之小鼠<br>數 | 最低<br>體重<br>(天) | 最低點<br>平均體<br>重降低<br>% |
|----------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------|
| 媒劑                   | -----                | -----                       | 0/8                               | -----           | -----                  |
| huCD123-離胺<br>酸連接-D2 | 75                   | 4.4                         | 0/8                               | 5               | 6                      |
| huCD123-離胺<br>酸連接-D2 | 100                  | 5.9                         | 0/8                               | 7               | 8                      |
| huCD123-離胺<br>酸連接-D2 | 125                  | 7.4                         | 6/8                               | 9               | 17                     |

BW：體重

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 免疫原公司（ImmunoGen, Inc.）

<120> 抗CD123抗體以及其結合物及衍生物

<150> US 62/346,730  
<151> 2016-06-07

<150> US 62/338,203  
<151> 2016-05-18

<150> US 62/186,161  
<151> 2015-06-29

<160> 97

<170> Patent In版本3.5

<210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 1

Ser Tyr Val Met His  
1 5

<210> 2  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 2

Tyr Ile Lys Pro Tyr Lys Asp Gly Thr Lys  
1 5 10

<210> 3  
<211> 17



<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 3

Tyr Ile Lys Pro Tyr Lys Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 4

Glu Gly Glu Asn Gly Tyr Tyr Asp Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 5

Ser Ser Ile Met His  
1 5

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 6

Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys  
1 5 10

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 7

Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg  
1 5 10

<210> 8  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 8

Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 9  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 9

Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 10  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 10

Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

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

<220>  
<223> 合成肽

<400> 11

Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 12

Asn Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 13

Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr  
1 5 10

<210> 14  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 14

Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 15  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 15

Gln Ser Glu Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asp Lys Arg Thr  
1 5 10

<210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala  
1 5 10

<210> 17  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 17

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro  
1 5

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 18

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr Thr  
1 5

<210> 19  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 19

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser  
1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser  
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 21

Arg Val Asn Arg Leu Val Asp  
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 22

Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser Ile His  
1 5 10

<210> 24  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 24

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 25

Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 26  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 26

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Glu Asn Gly Tyr Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 27  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 27

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

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



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

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

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
65 70 75 80

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

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

<210> 28  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 28

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 29  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 29

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

<210> 30  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 30

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Ser Glu Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asp Lys Arg Thr Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 31  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 31

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

Thr Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser  
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asn Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu  
85 90 95

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

<210> 32

<211> 82

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 32

Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn  
1 5 10 15

Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr  
20 25 30

Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg  
35 40 45

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp  
50 55 60

Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
65 70 75 80

Ser Ser

<210> 33  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 33

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 34  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> Xaa  
<222> (2)..(2)  
<223> Phe或Val

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 35  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 35

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 36  
<211> 378  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 36

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu  
1 5 10 15

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met  
20 25 30

Lys Ala Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr  
35 40 45

Asp Ile Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn  
50 55 60

Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn  
65 70 75 80

Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe  
85 90 95

Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys  
100 105 110

Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro  
115 120 125

Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn  
130 135 140

Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly  
145 150 155 160

Thr Arg Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly  
165 170 175

Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly  
180 185 190

Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu  
195 200 205



Thr Pro Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met  
210 215 220

His Trp Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu  
225 230 235 240

Gln Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp  
245 250 255

Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile  
260 265 270

Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro  
275 280 285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp  
290 295 300

Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Cys  
305 310 315 320

Val Phe Val Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro  
325 330 335

Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp  
340 345 350

Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu  
355 360 365

Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr  
370 375

<210> 37  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 37

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Phe或Val

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 39  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 39

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 40  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 40

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 41  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 41

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

<210> 42  
<211> 445  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Glu Asn Gly Tyr Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val  
130 135 140

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

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

Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro  
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly  
210 215 220

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

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys  
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln  
260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln  
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu  
290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg  
305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro  
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr  
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly  
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu  
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn  
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 43  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 43

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

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

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

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



Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
100 105 110

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

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
130 135 140

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

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210

<210> 44  
<211> 445  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 44

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Phe | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Ser | Val | Lys | Met | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Ile | Phe | Thr | Ser | Ser |
|     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| Ile | Met | His | Trp | Met | Lys | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Gly | Tyr | Ile | Lys | Pro | Tyr | Asn | Asp | Gly | Thr | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe |
|     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Ser | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Asn |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Met | Glu | Leu | Asn | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Ala | Arg | Glu | Gly | Gly | Asn | Asp | Tyr | Tyr | Asp | Thr | Met | Asp | Tyr | Trp | Gly |
|     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Val | Tyr | Pro | Leu | Ala | Pro | Gly | Ser | Ala | Ala | Gln | Thr | Asn | Ser | Met | Val |
|     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |
| Thr | Trp | Asn | Ser | Gly | Ser | Leu | Ser | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Val | Leu | Glu | Ser | Asp | Leu | Tyr | Thr | Leu | Ser | Ser | Ser | Val | Thr | Val | Pro |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Ser | Met | Arg | Pro | Ser | Glu | Thr | Val | Thr | Cys | Asn | Val | Ala | His | Pro |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly  
210 215 220

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

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys  
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln  
260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln  
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu  
290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg  
305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
325 330 335

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro  
340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr  
355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln  
370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly  
385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu  
405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn  
420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440 445

<210> 45  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 45

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
100 105 110

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

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
130 135 140

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

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210

<210> 46  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 46

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Thr | Ile | Asn | Ser | Gly | Gly | Ser | Phe | Thr | Tyr | Tyr | Pro | Asp | Ser | Val |
| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ala | Lys | Asp | Ser | Leu | Tyr |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |     |
| Leu | Gln | Met | Ser | Ser | Leu | Asn | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Met | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Ala | Arg | Gln | Ser | Glu | Ala | Tyr | Tyr | Gly | Tyr | Asp | Lys | Arg | Thr | Trp | Phe |
|     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Lys | Thr |
|     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |
| Thr | Pro | Pro | Ser | Val | Tyr | Pro | Leu | Ala | Pro | Gly | Ser | Ala | Ala | Gln | Thr |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Asn | Ser | Met | Val | Thr | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Tyr | Phe | Pro | Glu |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Pro | Val | Thr | Val | Thr | Trp | Asn | Ser | Gly | Ser | Leu | Ser | Ser | Gly | Val | His |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Glu | Ser | Asp | Leu | Tyr | Thr | Leu | Ser | Ser | Ser |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Pro | Arg | Pro | Ser | Glu | Thr | Val | Thr | Cys | Asn |
|     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| Val | Ala | His | Pro | Ala | Ser | Ser | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Ile | Val | Pro |
|     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Arg | Asp | Cys | Gly | Cys | Lys | Pro | Cys | Ile | Cys | Thr | Val | Pro | Glu | Val | Ser |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |
| Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Val | Leu | Thr | Ile | Thr |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr  
275 280 285

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser  
290 295 300

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

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

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln  
370 375 380

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met  
385 390 395 400

Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys  
405 410 415

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu  
420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 47  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 47

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

Thr Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Ser  
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asn Gly Phe Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Ser Trp Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala  
100 105 110

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

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
130 135 140



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

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210

<210> 48  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 48

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly  
450

<210> 49  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 49

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 50  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> Xaa  
<222> (2)..(2)  
<223> Phe或Val

<400> 50

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly  
450

<210> 51  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 51

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 52  
<211> 1713  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 52

Gly Thr Cys Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala  
1 5 10 15

Cys Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys  
20 25 30

Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly  
35 40 45

Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Thr Cys Thr  
50 55 60

Cys Thr Gly Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Ala Cys Cys Cys  
65 70 75 80

Cys Thr Cys Cys Cys Cys Ala Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Ala Thr  
85 90 95

Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Gly  
100 105 110

Thr Thr Thr Cys Ala Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys  
115 120 125

Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Thr Ala Thr Ala  
130 135 140

Ala Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Gly Gly Gly  
145 150 155 160

Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr  
165 170 175

Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly  
180 185 190

Cys Thr Gly Cys Thr Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Cys Ala Cys Ala  
195 200 205

Cys Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala Ala  
210 215 220

Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Ala Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly  
225 230 235 240

Ala Cys Ala Cys Cys Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys Thr Thr Cys Thr  
245 250 255

Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala  
260 265 270

Gly Gly Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Ala  
275 280 285

Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys  
290 295 300

Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr  
305 310 315 320

Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Gly Gly  
325 330 335

Ala Gly Cys Thr Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Cys Gly Ala Thr Gly  
340 345 350

Gly Thr Cys Cys Thr Cys Cys Thr Thr Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala  
355 360 365

Cys Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Thr Cys Gly Cys  
370 375 380

Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly  
385 390 395 400

Cys Ala Ala Ala Cys Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys  
405 410 415

Cys Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys  
420 425 430

Gly Ala Ala Cys Cys Thr Ala Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala  
435 440 445

Gly Cys Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr  
450 455 460

Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Thr Thr Ala Ala  
465 470 475 480

Cys Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Thr  
485 490 495

Ala Thr Cys Gly Ala Gly Thr Gly Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala Gly  
500 505 510

Ala Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Cys Thr Ala Thr  
515 520 525

Gly Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Cys Ala Ala Thr  
530 535 540

Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Gly Cys Cys Ala Gly Thr Thr Thr Gly  
545 550 555 560

Gly Ala Gly Cys Ala Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr Ala Thr Gly  
565 570 575

Thr Gly Ala Ala Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys  
580 585 590

Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Gly Ala Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala  
595 600 605

Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Cys Ala Cys  
610 615 620

Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Cys Cys Thr  
625 630 635 640

Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Ala Gly Cys  
645 650 655

Cys Thr Thr Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Gly Gly Ala  
660 665 670

Gly Ala Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly  
675 680 685

Ala Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr  
690 695 700

Thr Cys Thr Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly  
705 710 715 720

Gly Gly Cys Gly Gly Thr Ala Gly Gly Cys Cys Cys Gly Gly Gly Gly  
725 730 735

Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Cys Cys  
740 745 750

Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Cys Cys Thr Gly Thr Ala Cys Thr Thr  
755 760 765

Gly Ala Ala Cys Gly Thr Thr Gly Cys Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly  
770 775 780

Cys Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Gly Thr  
785 790 795 800

Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys  
805 810 815

Gly Gly Ala Thr Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Ala  
820 825 830

Cys Gly Thr Ala Thr Cys Gly Gly Gly Thr Gly Thr Cys Gly Thr Thr  
835 840 845

Thr Cys Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly  
850 855 860

Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr Thr Cys Thr  
865 870 875 880

Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys Cys Ala Cys Ala Thr Cys Cys  
885 890 895

Thr Gly Gly Thr Gly Cys Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ala Gly  
900 905 910

Cys Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Ala Thr Cys  
915 920 925

Cys Cys Cys Thr Gly Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Gly Thr  
930 935 940

Thr Thr Gly Thr Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala  
945 950 955 960

Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr  
965 970 975

Cys Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Cys Ala Thr Gly Ala Cys Thr Gly  
980 985 990

Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Ala Cys  
995 1000 1005

Ala Cys Ala Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala  
1010 1015 1020

Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly  
1025 1030 1035

Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Ala Thr Cys Gly Cys Ala Ala  
1040 1045 1050

Ala Thr Thr Thr Cys Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr  
1055 1060 1065

Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly  
1070 1075 1080

Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Thr Ala Ala Thr  
1085 1090 1095

Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Gly  
1100 1105 1110

|         |         |         |      |         |         |      |         |     |
|---------|---------|---------|------|---------|---------|------|---------|-----|
| Ala Gly | Ala Cys | Ala Gly | Ala  | Ala Cys | Cys Thr | Cys  | Cys Thr | Thr |
| 1115    |         |         | 1120 |         |         | 1125 |         |     |
| Cys Cys | Ala Gly | Cys Thr | Ala  | Cys Thr | Cys Ala | Ala  | Thr Cys | Cys |
| 1130    |         |         | 1135 |         |         | 1140 |         |     |
| Thr Gly | Gly Ala | Ala Cys | Gly  | Thr Ala | Cys Ala | Cys  | Ala Gly | Thr |
| 1145    |         |         | 1150 |         |         | 1155 |         |     |
| Ala Cys | Ala Ala | Ala Thr | Ala  | Ala Gly | Ala Gly | Cys  | Cys Cys | Gly |
| 1160    |         |         | 1165 |         |         | 1170 |         |     |
| Gly Gly | Ala Ala | Ala Gly | Ala  | Gly Thr | Gly Thr | Ala  | Thr Gly | Ala |
| 1175    |         |         | 1180 |         |         | 1185 |         |     |
| Ala Thr | Thr Cys | Thr Thr | Gly  | Ala Gly | Cys Gly | Cys  | Cys Thr | Gly |
| 1190    |         |         | 1195 |         |         | 1200 |         |     |
| Gly Ala | Gly Cys | Ala Cys | Cys  | Cys Cys | Cys Cys | Ala  | Gly Cys | Gly |
| 1205    |         |         | 1210 |         |         | 1215 |         |     |
| Cys Thr | Thr Cys | Gly Ala | Gly  | Thr Gly | Cys Gly | Ala  | Cys Cys | Ala |
| 1220    |         |         | 1225 |         |         | 1230 |         |     |
| Gly Gly | Ala Gly | Gly Ala | Gly  | Gly Gly | Cys Gly | Cys  | Ala Ala | Ala |
| 1235    |         |         | 1240 |         |         | 1245 |         |     |
| Cys Ala | Cys Ala | Cys Gly | Thr  | Gly Cys | Cys Thr | Gly  | Gly Cys | Gly |
| 1250    |         |         | 1255 |         |         | 1260 |         |     |
| Gly Ala | Cys Gly | Thr Cys | Gly  | Cys Thr | Gly Cys | Thr  | Gly Ala | Thr |
| 1265    |         |         | 1270 |         |         | 1275 |         |     |
| Cys Gly | Cys Gly | Cys Thr | Gly  | Gly Gly | Gly Ala | Cys  | Gly Cys | Thr |
| 1280    |         |         | 1285 |         |         | 1290 |         |     |
| Gly Cys | Thr Gly | Gly Cys | Cys  | Cys Thr | Gly Gly | Thr  | Cys Thr | Gly |
| 1295    |         |         | 1300 |         |         | 1305 |         |     |

202423981

Thr Gly Thr Cys Thr Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Cys Thr Gly  
1310 1315 1320

Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr  
1325 1330 1335

Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Thr  
1340 1345 1350

Thr Cys Cys Cys Cys Gly Cys Ala Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala  
1355 1360 1365

Cys Ala Thr Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Cys Ala Thr  
1370 1375 1380

Cys Gly Gly Thr Gly Ala Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala  
1385 1390 1395

Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr  
1400 1405 1410

Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
1415 1420 1425

Cys Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala  
1430 1435 1440

Gly Gly Ala Gly Thr Gly Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys  
1445 1450 1455

Thr Gly Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly Gly Thr Cys Gly Thr  
1460 1465 1470

Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Thr Thr Gly Ala Gly Ala  
1475 1480 1485



Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys Thr  
1490 1495 1500

Thr Gly Thr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Cys Cys Thr  
1505 1510 1515

Cys Ala Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Gly  
1520 1525 1530

Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala  
1535 1540 1545

Cys Ala Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly  
1550 1555 1560

Ala Cys Cys Thr Gly Cys Gly Cys Ala Cys Gly Cys Ala Gly Cys  
1565 1570 1575

Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr  
1580 1585 1590

Cys Cys Thr Ala Ala Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly  
1595 1600 1605

Gly Cys Ala Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys Thr  
1610 1615 1620

Gly Thr Gly Thr Ala Ala Thr Thr Thr Cys Gly Thr Cys Cys Gly  
1625 1630 1635

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala  
1640 1645 1650

Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Thr Gly Thr  
1655 1660 1665

Gly Thr Gly Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala  
1670 1675 1680

Thr Ala Ala Ala Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr  
1685 1690 1695

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Cys Cys Cys Ala Ala Ala Ala  
1700 1705 1710

<210> 53  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> Xaa  
<222> (2)..(2)  
<223> Phe或Val

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly  
450

<210> 54  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成肽

<220>

<221> Xaa

<222> (2)..(2)

<223> Phe或Val

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly  
450

<210> 55  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 55

Ala Leu Ala Leu  
1

<210> 56  
<211> 398  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 56

Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala  
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser  
20 25 30

Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly  
35 40 45

Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
50 55 60

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
65 70 75 80

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
85 90 95

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
100 105 110

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
115 120 125

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
130 135 140

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
145 150 155 160

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
165 170 175

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
180 185 190

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
195 200 205



Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
210 215 220

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
225 230 235 240

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
260 265 270

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
290 295 300

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
305 310 315 320

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
340 345 350

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
355 360 365

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
370 375 380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro Gly  
385 390 395

<210> 57  
<211> 4

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<220>  
<221> Xaa  
<222> (1)..(1)  
<223>  $\beta$ -Ala

<400> 57

Xaa Leu Ala Leu  
1

<210> 58  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 58

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 59  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 59

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val |
|     | 275 |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Asp | Glu | Leu | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro |
| 385 |     |     |     | 390 |     |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |

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

Pro Gly  
450

<210> 60  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 60

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

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

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Asn  
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly  
450

<210> 61  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 61

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



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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 62  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 62

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Thr Thr Ala Thr  
20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Thr Gly Thr Ala Gly Cys Ala  
35 40 45

Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys  
50 55 60

Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Thr  
65 70 75 80

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Thr Cys Cys Gly Gly Gly Gly Cys Cys  
85 90 95

Gly Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly  
100 105 110

Gly Cys Gly Cys Ala Thr Cys Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr  
115 120 125

Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Ala Gly Cys  
130 135 140

Gly Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala  
145 150 155 160

Gly Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly  
165 170 175

Gly Gly Thr Cys Ala Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Ala  
180 185 190

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Ala Thr  
195 200 205

Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala  
210 215 220

Gly Cys Cys Thr Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr  
225 230 235 240

Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala  
245 250 255

Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Gly Gly Gly Thr Cys Gly Thr Gly Thr  
260 265 270

Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ala Thr  
275 280 285

Ala Cys Ala Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly  
290 295 300

Thr Cys Thr Ala Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala Gly  
305 310 315 320

Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Gly  
325 330 335

Gly Ala Thr Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Thr Ala Thr Ala Thr Thr  
340 345 350

Ala Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
355 360 365

Ala Gly Gly Cys Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys  
370 375 380

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr  
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Cys Thr  
405 410 415

Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Cys  
420 425 430

Gly Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys  
435 440 445

Cys

<210> 63  
<211> 396  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 63

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Ala Ala Thr  
20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Gly Cys Thr  
35 40 45

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Cys | Gly | Cys | Ala | Ala | Cys | Ala | Gly | Gly | Gly | Gly | Thr | Thr | Cys |
| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Ala | Cys | Thr | Cys | Ala | Gly | Ala | Cys | Ala | Thr | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Thr |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |
| Gly | Ala | Cys | Cys | Cys | Ala | Gly | Ala | Gly | Thr | Cys | Cys | Cys | Thr | Cys | Thr |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | Cys | Thr | Cys | Thr | Gly | Ala | Gly | Cys | Gly | Cys | Thr | Thr | Cys | Thr | Gly |
|     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Thr | Gly | Gly | Gly | Gly | Ala | Cys | Cys | Gly | Gly | Gly | Thr | Gly | Ala | Cys |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Cys | Ala | Thr | Cys | Ala | Cys | Cys | Thr | Gly | Thr | Cys | Gly | Gly | Gly | Cys | Ala |
| 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |
| Thr | Cys | Cys | Cys | Ala | Gly | Gly | Ala | Cys | Ala | Thr | Cys | Ala | Ala | Thr | Thr |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |
| Cys | Thr | Thr | Ala | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Cys | Thr | Thr | Gly | Gly | Thr | Thr |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |
| Cys | Cys | Ala | Gly | Cys | Ala | Gly | Ala | Ala | Gly | Cys | Cys | Cys | Gly | Gly | Ala |
|     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ala | Ala | Ala | Gly | Cys | Cys | Cys | Cys | Thr | Ala | Ala | Ala | Thr | Cys | Thr | Cys |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Thr | Cys | Ala | Thr | Thr | Thr | Ala | Cys | Cys | Gly | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Ala |
| 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Cys | Cys | Gly | Thr | Thr | Thr | Gly | Gly | Thr | Cys | Thr | Cys | Cys | Gly | Gly | Ala |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Thr | Gly | Cys | Cys | Thr | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly | Gly | Thr | Thr | Thr | Ala |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     | 255 |     |

Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Gly  
260 265 270

Thr Ala Cys Ala Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys  
275 280 285

Ala Cys Cys Ala Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys  
290 295 300

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Thr Cys Gly Cys  
305 310 315 320

Ala Ala Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Cys Thr Thr Gly  
325 330 335

Cys Ala Gly Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Cys Thr Thr Cys Cys  
340 345 350

Cys Thr Thr Ala Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Ala  
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Ala Ala  
370 375 380

Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Gly Thr Ala Cys Gly  
385 390 395

<210> 64  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 64

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr  
20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr Thr Gly Cys Ala  
35 40 45

Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys  
50 55 60

Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr  
65 70 75 80

Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys  
85 90 95

Gly Ala Ala Gly Thr Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly  
100 105 110

Gly Cys Gly Cys Thr Ala Gly Thr Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr  
115 120 125

Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala  
130 135 140

Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Ala  
145 150 155 160

Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly  
165 170 175

Gly Gly Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr  
180 185 190

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr  
195 200 205

Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala  
210 215 220

Gly Cys Cys Ala Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly  
225 230 235 240

Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Ala Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Thr Thr Thr Ala Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Cys  
260 265 270

Cys Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr  
275 280 285

Cys Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly  
290 295 300

Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly  
305 310 315 320

Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Ala  
325 330 335

Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr  
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
355 360 365

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Cys  
370 375 380

Gly Ala Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr  
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr  
405 410 415



Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys  
420 425 430

Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys  
435 440 445

Cys

<210> 65  
<211> 396  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 65

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr  
20 25 30

Cys Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala  
35 40 45

Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys  
50 55 60

Ala Thr Ala Gly Cys Gly Ala Cys Ala Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr  
65 70 75 80

Gly Ala Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr  
85 90 95

Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly  
100 105 110

Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Cys Gly Thr Gly Ala Cys  
115 120 125

Thr Ala Thr Cys Ala Cys Ala Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys  
130 135 140

Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Thr  
145 150 155 160

Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Thr  
165 170 175

Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly  
180 185 190

Ala Ala Ala Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Gly Ala Cys Ala Cys  
195 200 205

Thr Gly Ala Thr Ala Thr Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala  
210 215 220

Thr Cys Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Cys Gly Gly Thr  
225 230 235 240

Gly Thr Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Cys Gly Ala Thr Thr Thr Thr  
245 250 255

Cys Cys Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly  
260 265 270

Ala Ala Ala Cys Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys  
275 280 285

Ala Cys Ala Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys  
290 295 300

Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys  
305 310 315 320

Ala Ala Cys Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Gly  
325 330 335

Cys Ala Gly Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys  
340 345 350

Cys Thr Thr Ala Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Cys Ala  
355 360 365

Gly Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala  
370 375 380

Ala Thr Thr Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Cys Gly  
385 390 395

<210> 66  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 66

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr  
20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr Thr Gly Cys Ala  
35 40 45

Ala Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys  
50 55 60

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Ala | Gly | Cys | Cys | Ala | Gly | Gly | Thr | Cys | Cys | Ala | Ala | Cys | Thr |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Thr | Gly | Thr | Gly | Cys | Ala | Gly | Ala | Gly | Thr | Gly | Gly | Cys | Gly | Cys | Cys |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |     |
| Gly | Ala | Ala | Gly | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly | Ala | Ala | Ala | Cys | Cys | Ala | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Cys | Gly | Cys | Thr | Ala | Gly | Thr | Gly | Thr | Cys | Ala | Ala | Gly | Gly | Thr |
|     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |
| Gly | Thr | Cys | Cys | Thr | Gly | Thr | Ala | Ala | Gly | Gly | Cys | Ala | Thr | Cys | Ala |
| 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Cys | Thr | Ala | Cys | Ala | Thr | Cys | Thr | Thr | Thr | Ala | Cys | Cys | Ala |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     | 160 |     |
| Gly | Cys | Thr | Cys | Cys | Ala | Thr | Cys | Ala | Thr | Gly | Cys | Ala | Thr | Thr | Gly |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Gly | Gly | Thr | Cys | Ala | Gly | Ala | Cys | Ala | Gly | Gly | Cys | Thr | Cys | Cys | Thr |
|     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Gly | Gly | Ala | Cys | Ala | Gly | Gly | Gly | Cys | Cys | Thr | Gly | Gly | Ala | Gly | Thr |
|     | 195 |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |
| Gly | Gly | Ala | Thr | Thr | Gly | Gly | Gly | Thr | Ala | Thr | Ala | Thr | Cys | Ala | Ala |
| 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |
| Gly | Cys | Cys | Ala | Thr | Ala | Cys | Ala | Ala | Thr | Gly | Ala | Thr | Gly | Gly | Gly |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |
| Ala | Cys | Ala | Ala | Ala | Ala | Thr | Ala | Cys | Ala | Ala | Thr | Gly | Ala | Ala | Ala |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |
| Ala | Gly | Thr | Thr | Thr | Ala | Ala | Ala | Gly | Gly | Gly | Cys | Gly | Ala | Gly | Cys |
|     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |

Cys Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr  
275 280 285

Cys Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly  
290 295 300

Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly  
305 310 315 320

Cys Thr Cys Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Ala  
325 330 335

Gly Ala Cys Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr  
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
355 360 365

Ala Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Cys  
370 375 380

Gly Ala Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr  
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr  
405 410 415

Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys  
420 425 430

Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys  
435 440 445

Cys

<210> 67  
<211> 396  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 67

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr  
20 25 30

Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys Ala  
35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys  
50 55 60

Ala Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr  
65 70 75 80

Gly Ala Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Thr  
85 90 95

Thr Cys Thr Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly  
100 105 110

Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Cys  
115 120 125

Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Thr Cys Gly Cys Gly Cys Thr  
130 135 140

Thr Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Thr Ala  
145 150 155 160

Gly Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Thr  
165 170 175

Cys Cys Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys  
180 185 190

Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Thr Cys  
195 200 205

Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Thr Cys Gly Gly Gly Thr Thr Ala Ala  
210 215 220

Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr  
225 230 235 240

Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr  
245 250 255

Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gly Gly  
260 265 270

Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Thr Ala Thr Ala Gly Cys Cys Thr Gly  
275 280 285

Ala Cys Ala Ala Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Thr Thr Gly  
290 295 300

Ala Ala Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Gly  
305 310 315 320

Ala Ala Thr Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr Thr Gly Cys Thr Thr Gly  
325 330 335

Cys Ala Gly Thr Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys  
340 345 350

Cys Thr Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Ala  
355 360 365

Gly Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala  
370 375 380

Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr Ala Cys Gly  
385 390 395

<210> 68  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 68

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Thr Ala Thr  
20 25 30

Thr Cys Thr Gly Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Cys Gly Cys Cys  
35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys  
50 55 60

Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr  
65 70 75 80

Cys Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala  
85 90 95

Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly  
100 105 110

Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Thr  
115 120 125



Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys  
130 135 140

Gly Gly Gly Thr Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Cys Ala Cys Ala Thr  
145 150 155 160

Cys Thr Ala Gly Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Thr Thr Gly  
165 170 175

Gly Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr  
180 185 190

Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr  
195 200 205

Gly Gly Ala Thr Ala Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Gly  
210 215 220

Gly Cys Cys Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Cys  
225 230 235 240

Ala Cys Thr Cys Gly Ala Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Ala Gly Cys  
260 265 270

Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys  
275 280 285

Cys Gly Cys Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly  
290 295 300

Cys Ala Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ala  
305 310 315 320

Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly  
325 330 335

Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Gly Thr Thr Thr Ala Cys Thr  
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
355 360 365

Thr Gly Gly Cys Ala Ala Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Thr  
370 375 380

Gly Ala Thr Ala Cys Thr Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr  
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Cys Cys Thr Cys  
405 410 415

Thr Gly Thr Ala Ala Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Ala Ala Gly Cys  
420 425 430

Gly Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Thr Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys  
435 440 445

Cys

<210> 69  
<211> 449  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 69

Ala Ala Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Thr  
20 25 30

Thr Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys  
35 40 45

Ala Cys Cys Gly Cys Ala Ala Cys Ala Gly Gly Cys Gly Thr Thr Cys  
50 55 60

Ala Cys Ala Gly Thr Cys Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr  
65 70 75 80

Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys  
85 90 95

Gly Ala Gly Gly Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly  
100 105 110

Gly Thr Gly Cys Cys Ala Gly Cys Gly Thr Ala Ala Ala Gly Ala Thr  
115 120 125

Gly Thr Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Ala Gly Cys  
130 135 140

Gly Gly Cys Thr Ala Thr Ala Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr  
145 150 155 160

Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly  
165 170 175

Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Cys Cys Thr  
180 185 190

Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr  
195 200 205

Gly Gly Ala Thr Cys Gly Gly Cys Thr Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala  
210 215 220

Ala Cys Cys Thr Thr Ala Thr Ala Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys  
225 230 235 240

Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Gly Ala  
245 250 255

Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Cys  
260 265 270

Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys  
275 280 285

Ala Ala Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Thr Cys Cys Ala Cys Thr Gly  
290 295 300

Cys Cys Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Thr Ala Ala  
305 310 315 320

Thr Ala Gly Thr Cys Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly  
325 330 335

Gly Ala Thr Thr Cys Cys Gly Cys Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr  
340 345 350

Ala Thr Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly  
355 360 365

Gly Gly Gly Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys  
370 375 380

Gly Ala Cys Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr  
385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Gly  
405 410 415

Thr Gly Thr Thr Ala Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys  
420 425 430

Gly Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys  
435 440 445

Cys

<210> 70  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 70

Gln Ser Glu Ala Tyr Tyr Gly Tyr Asp Lys Arg Thr Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10 15

<210> 71  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 71

Arg Val Asn Arg Leu Val Ser  
1 5

<210> 72  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 72

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 73  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 73

Gly Phe Leu Gly  
1

<210> 74  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 74

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg  
50 55 60

<210> 75  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 75

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser  
1 5 10 15

Leu Glu Pro Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala  
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
35 40 45

<210> 76

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 76

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

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

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

Gly Tyr Ile Arg Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Arg Tyr Asn  
50 55 60

<210> 77

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 77

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

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

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

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
50 55 60

<210> 78

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 78

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Ala Asn Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp  
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
50 55 60

<210> 79

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>



<223> 合成肽

<400> 79

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg  
50 55 60

<210> 80

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 80

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Ser Gly Val Pro Ser Arg  
50 55 60

<210> 81

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 81

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile  
35 40 45

Tyr Arg Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg  
50 55 60

<210> 82

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 82

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg  
50 55 60

<210> 83

<211> 47

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 83

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser  
1 5 10 15

Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala  
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
35 40 45

<210> 84  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 84

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala  
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
35 40 45

<210> 85  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 85

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Ala  
20 25 30

Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
35 40 45

<210> 86

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 86

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
1 5 10 15

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser  
20 25 30

Tyr Pro

<210> 87

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 87

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

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

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

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
50 55 60

<210> 88  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 88

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

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

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

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
50 55 60

<210> 89  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 89

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

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

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

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
50 55 60

<210> 90  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 90

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

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

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

Gly Tyr Ile Lys Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
50 55 60

<210> 91  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 91

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

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

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala  
50 55 60

<210> 92  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 92

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Ala Asn Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp  
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
50 55 60

<210> 93  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 93

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser  
1 5 10 15

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp  
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
50 55 60

<210> 94  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成肽

<400> 94

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser  
1 5 10 15

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp  
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
50 55 60

<210> 95  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>



<223> 合成肽

<400> 95

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Arg Ser Thr Ser  
1 5 10 15

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp  
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
50 55 60

<210> 96

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 96

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

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg  
35

<210> 97

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 97

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Thr Ala Asn Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
20 25 30

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Asn Asp Tyr Tyr Asp Thr Met Asp  
35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
50 55 60

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種抗體或其抗原結合片段，其：

- (a) 結合人類CD123/IL3-R $\alpha$ 抗原之胺基酸101至346內的抗原決定基，且
- (b) 抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖。

【請求項2】如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合人類CD123抗原之胺基酸101至204內的抗原決定基。

【請求項3】如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合人類CD123抗原之胺基酸205至346內的抗原決定基。

【請求項4】一種抗體或其抗原結合片段，其：

- (a) 結合人類CD123抗原之胺基酸1至100內的抗原決定基，且
- (b) 抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖，其中IC<sub>50</sub>值為0.1 nM或更小(例如，0.08 nM、0.05 nM、0.03 nM)。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段抑制白血病幹細胞或白血病母細胞之增殖而不抑制造血幹細胞之增殖。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在0.3 nM或更低的解離常數(K<sub>d</sub>)下結合人類CD123抗原陽性細胞。

【請求項7】如請求項6之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.01 nM與0.3 nM之間的K<sub>d</sub>下結合人類CD123抗原陽性細胞。

【請求項8】如請求項7之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.01 nM與0.2 nM之間的K<sub>d</sub>下結合人類CD123抗原陽性細胞。

【請求項9】如請求項8之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.01 nM與0.1 nM之間的K<sub>d</sub>下結合人類CD123抗原陽性細胞。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段結合石蟹獼猴CD123。

【請求項11】如請求項1至9中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.3 nM之間的 $K_d$ 下結合石蟹獼猴CD123。

【請求項12】如請求項1至9中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.2 nM之間的 $K_d$ 下結合石蟹獼猴CD123。

【請求項13】如請求項1至9中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合石蟹獼猴CD123。

【請求項14】如請求項1至13中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在實質上類似之結合親和力下結合人類及石蟹獼猴CD123。

【請求項15】如請求項14之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.3 nM之間的 $K_d$ 下結合人類及石蟹獼猴CD123。

【請求項16】如請求項14之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.2 nM之間的 $K_d$ 下結合人類及石蟹獼猴CD123。

【請求項17】如請求項14之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在介於0.05與0.1 nM之間的 $K_d$ 下結合人類及石蟹獼猴CD123。

【請求項18】如請求項6至17中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中 $K_d$ 係藉由流式細胞術、表面電漿子共振或放射免疫檢定加以量測。

【請求項19】如請求項1至18中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在0.5 nM或更低之濃度下抑制抗原陽性TF-1細胞中至少50%之IL3依賴性增殖。

【請求項20】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 至少一個重鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1

係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 1、5及12；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 2、3、6-10、13及14；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 4、11及15；及

b) 至少一個輕鏈可變區或其片段，其包含三個順序互補性決定區(CDR)，分別為CDR1、CDR2及CDR3，其中，除了1、2或3個保守胺基酸取代以外，CDR1係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 16、19、20及23；CDR2係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 17、21及24；且視情況，CDR3係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 18、22及25。

【請求項21】如請求項20之抗體或其抗原結合片段，其中該等保守胺基酸取代包括藉由Arg取代CDR中之至少一個Lys。

【請求項22】如請求項20或21之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為包含小鼠CDR區之CDR移植人類化抗體，且其中該抗體之一或多(例如1、2、3、4、5、6、7或8)個重鏈及/或輕鏈構架區維尼爾區殘基具有小鼠起源。

【請求項23】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【請求項24】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【請求項25】如請求項24之抗體或其抗原結合片段，其中自SEQ ID NO: 34之N末端起之第二個殘基Xaa為Phe。

【請求項26】如請求項24之抗體或其抗原結合片段，其中自SEQ ID NO: 34

之N末端起之第二個殘基Xaa為Val。

【請求項27】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【請求項28】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser。

【請求項29】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser，且除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【請求項30】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列，除了N末端殘基為Ser。

【請求項31】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【請求項32】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 34中所闡述之胺基酸序列；

及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。

【請求項33】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 56中所闡述之胺基酸序列；

及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【請求項34】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；

及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列。

【請求項35】如請求項31至34中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中自SEQ ID NO: 38、34、56及54之N末端起第二個殘基Xaa為Phe。

【請求項36】如請求項31至34中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中自SEQ ID NO: 38、34、56及54之N末端起第二個殘基Xaa為Val。

【請求項37】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈區，其具有SEQ ID NO: 59或60中所闡述之胺基酸序列，

除了對應於SEQ ID NO: 54之第5個至最後一個殘基之殘基為Cys；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列。

【請求項38】如請求項1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 54中所闡述之胺基酸序列；

及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO: 35中所闡述之胺基酸序列。

【請求項39】如請求項38、33或34之抗體或其抗原結合片段，其中自SEQ ID NO: 54或56之N末端起第二個殘基Xaa為Phe。

【請求項40】如請求項38、33或34之抗體或其抗原結合片段，其中自SEQ ID NO: 54或56之N末端起第二個殘基Xaa為Val。

【請求項41】如請求項1至3及5至20中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 2或3中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 16中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列的CDR3。

【請求項42】如請求項1至3及5至20中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 5中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 6、7、8、9或10中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及

b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 19或20中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 22中所闡述之胺基酸序列的CDR3。

【請求項43】如請求項4至20中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 免疫球蛋白重鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 13或14中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列的CDR3；及



b) 免疫球蛋白輕鏈可變區，其包含具有SEQ ID NO: 23中所闡述之胺基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO: 24中所闡述之胺基酸序列的CDR2及具有SEQ ID NO: 25中所闡述之胺基酸序列的CDR3。

【請求項44】如請求項1至43中任一項之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) V<sub>H</sub>序列，其與選自由以下各項組成之群的參考V<sub>H</sub>序列具有至少95%一致性：SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳26、28、30、32、34及38)；及/或

b) V<sub>L</sub>序列，其與選自由以下各項組成之群的參考V<sub>L</sub>序列具有至少95%一致性：SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (較佳27、29、31、35及37)。

【請求項45】如請求項44之抗體或其抗原結合片段，其中該V<sub>H</sub>序列與SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳26、28、30、32、34及38)之一具有至少99%一致性，及/或其中該V<sub>L</sub>序列與SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (較佳27、29、31、35及37)之一具有至少99%一致性。

【請求項46】如請求項45之抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) V<sub>H</sub>序列，其係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 26、28、30、32、34、38、39及40 (較佳26、28、30、32、34及38)；及/或

b) V<sub>L</sub>序列，其係選自由以下各項組成之群：SEQ ID NO: 27、29、31、33、35、37及41 (較佳27、29、31、35及37)。

【請求項47】如請求項46之抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 26之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 27之V<sub>L</sub>序列。

【請求項48】如請求項46之抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 28之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 29之V<sub>L</sub>序列。

【請求項49】如請求項46之抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 30之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 31之V<sub>L</sub>序列。

【請求項50】如請求項46之抗體或其抗原結合片段，其包含SEQ ID NO: 34之V<sub>H</sub>序列及SEQ ID NO: 35之V<sub>L</sub>序列。

【請求項51】如請求項1至49中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為鼠類抗體、非人類哺乳動物抗體、嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。

【請求項52】如請求項51之抗體或其抗原結合片段，其中該人類化抗體為CDR移植抗體或表面重整抗體。

【請求項53】如請求項1至52中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為全長抗體。

【請求項54】如請求項1至52中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該其抗原結合片段為Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F<sub>d</sub>、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之F<sub>v</sub>、V-NAR結構域、IgNar、內抗體、IgGΔCH<sub>2</sub>、微小抗體、F(ab')<sub>3</sub>、四鏈抗體、三鏈抗體、雙鏈抗體、單域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub>或scFv-Fc。

【請求項55】一種多肽，其包含如請求項1至54中任一項之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列。

【請求項56】如請求項55之多肽，其為與並非假單胞菌毒素之蛋白質的融合物。

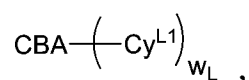
【請求項57】一種細胞，其產生如請求項1至54中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之多肽。

【請求項58】一種方法，其產生如請求項1至54中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之多肽，該方法包括：

- (a) 培養如請求項57之細胞；及
- (b) 自該培養之細胞分離該抗體、其抗原結合片段或多肽。

【請求項59】如請求項58之方法，其中該細胞為真核細胞。

【請求項60】一種免疫結合物，其具有下式：

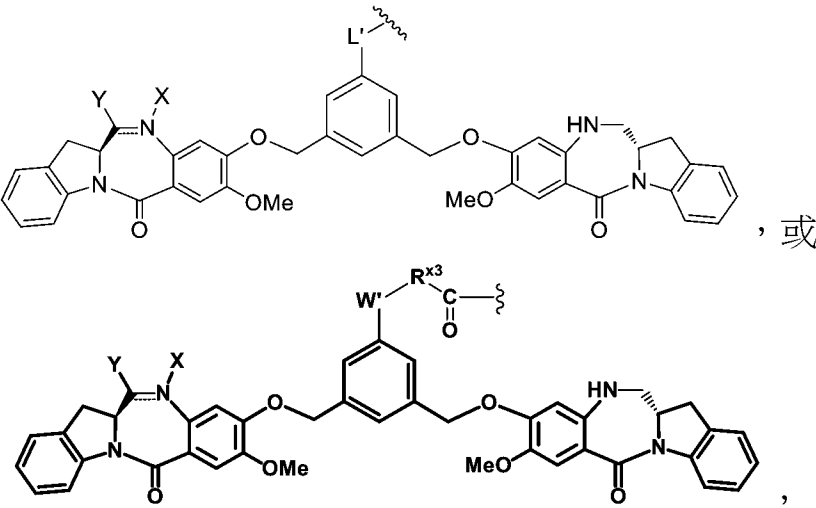


其中：

CBA為如請求項23至26中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之其多肽，其係經由離胺酸殘基共價連接於Cy<sup>L1</sup>；

W<sub>L</sub>為1至20之整數；且

Cy<sup>L1</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線 == 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x3</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

L'由以下各式表示：

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)- (B1')；或

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-S-Z<sup>s1</sup>- (B3')；

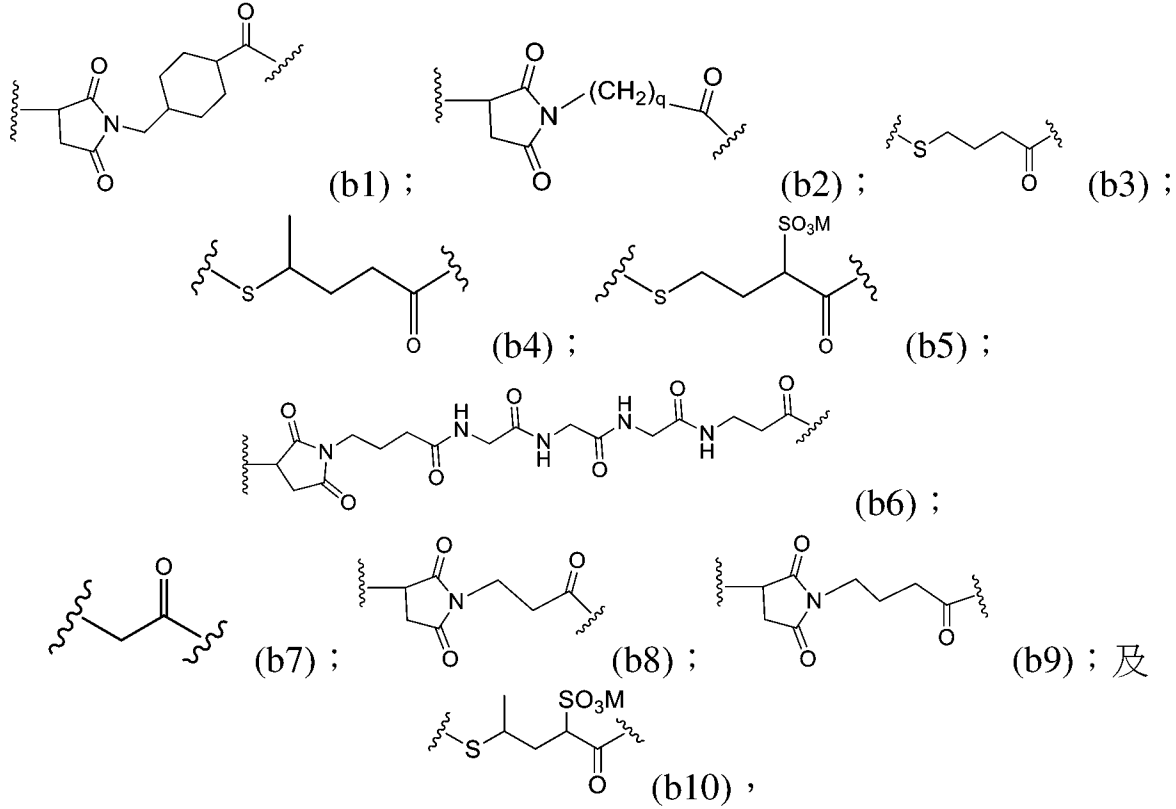
R<sub>5</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時各自獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

m為1至6之整數；且

Z<sup>s1</sup>係選自以下各式中之任一者：



其中：

q為1至5之整數；且

M為H<sup>+</sup>或陽離子。

【請求項61】如請求項60之免疫結合物，其中R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>均為H；且R<sub>5</sub>為H或Me。

【請求項62】如請求項60或61之免疫結合物，其中P為含有2至5個胺基酸殘基之肽。

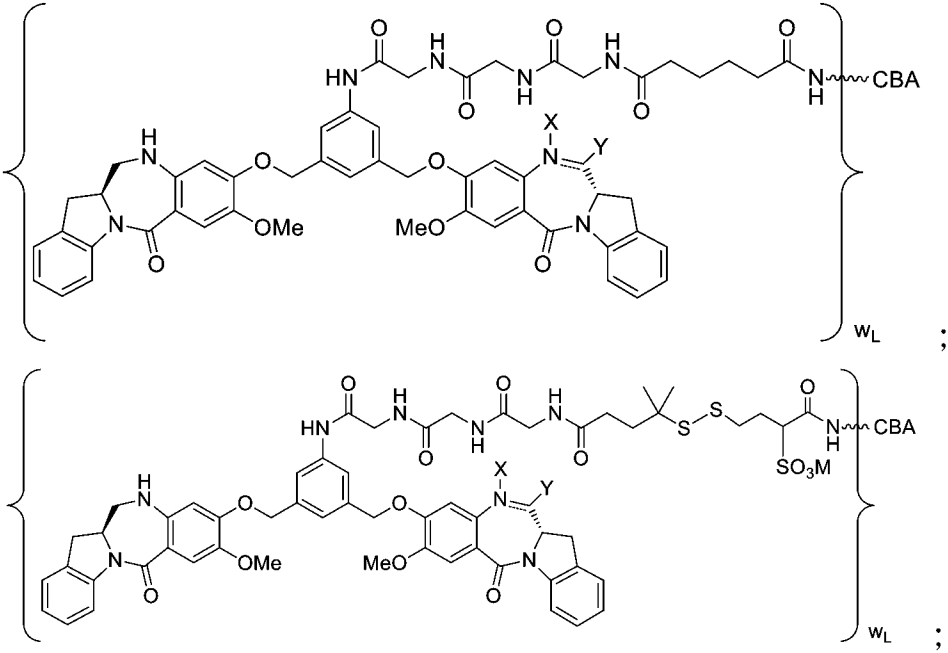
【請求項63】如請求項60至62中任一項之免疫結合物，其中P係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、

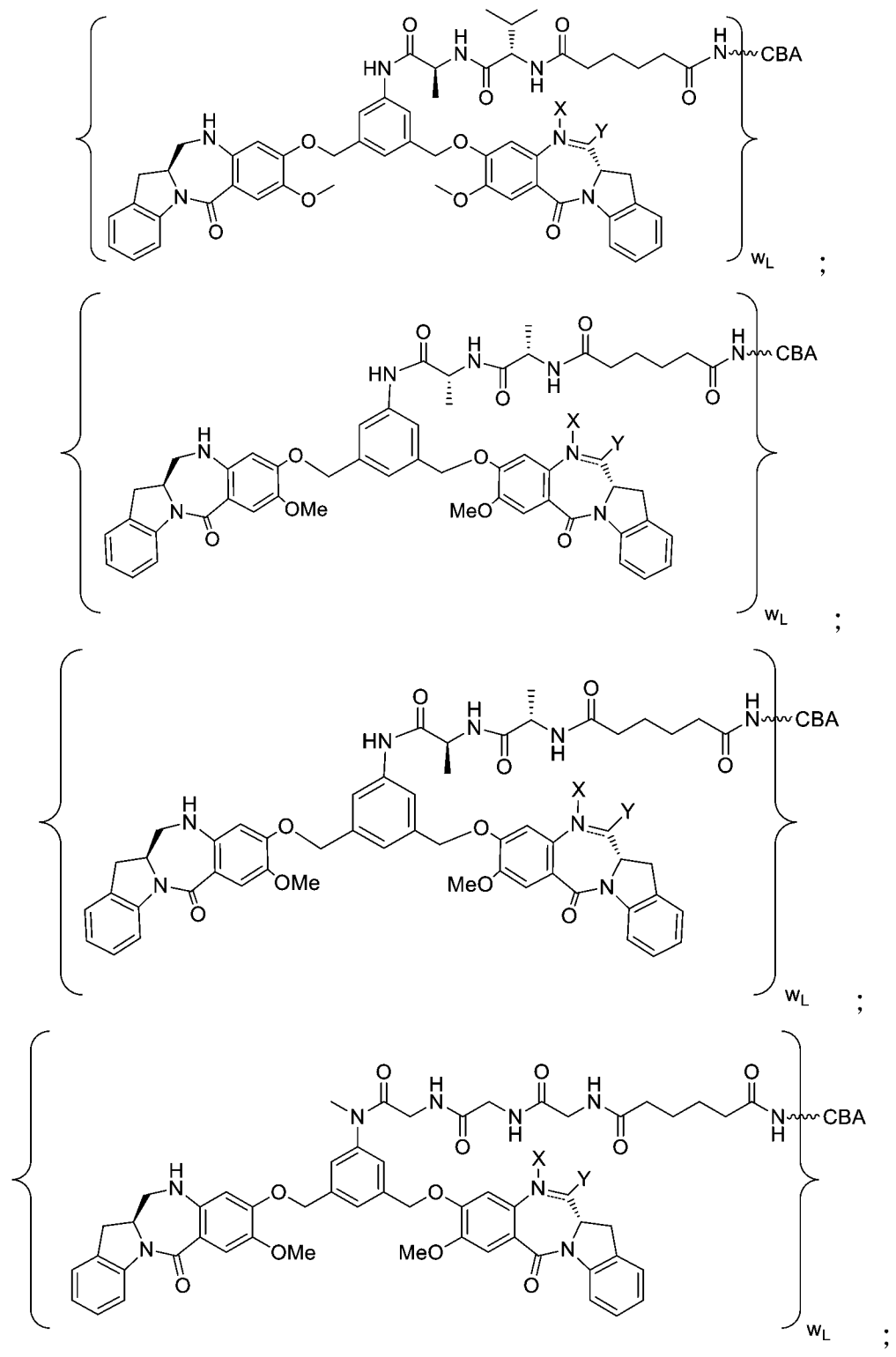
Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。

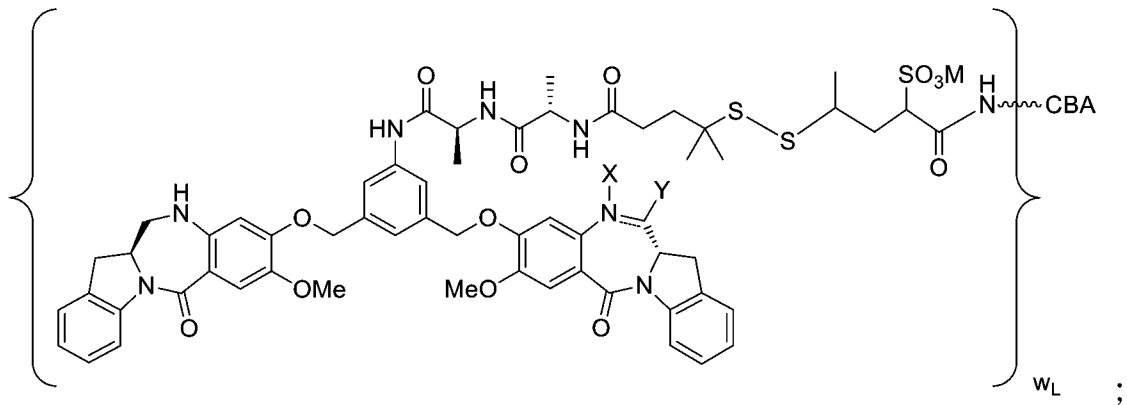
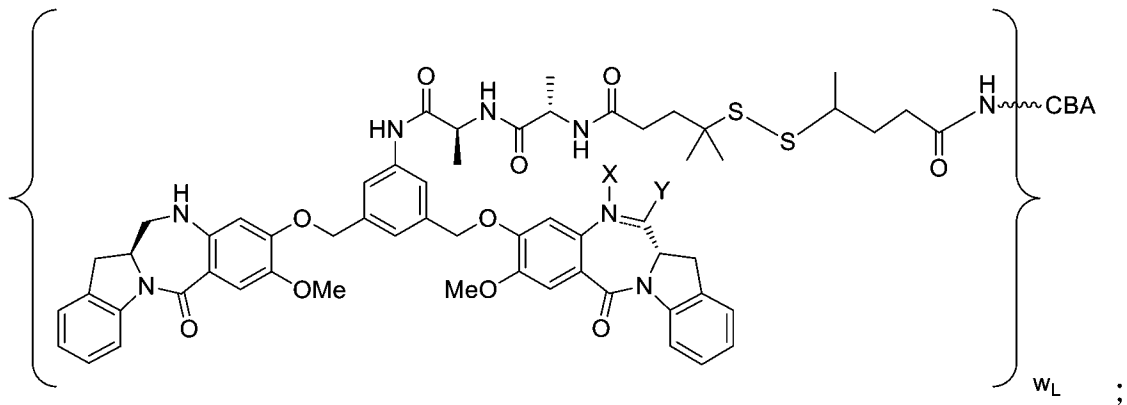
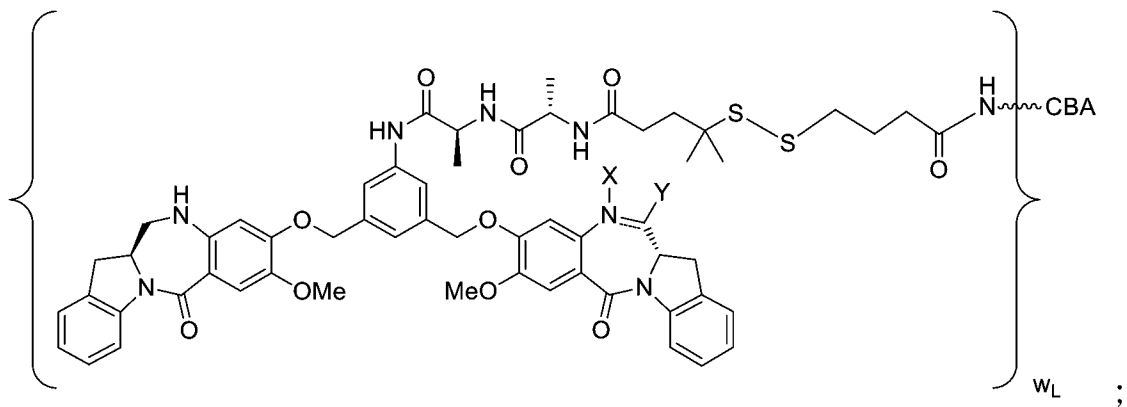
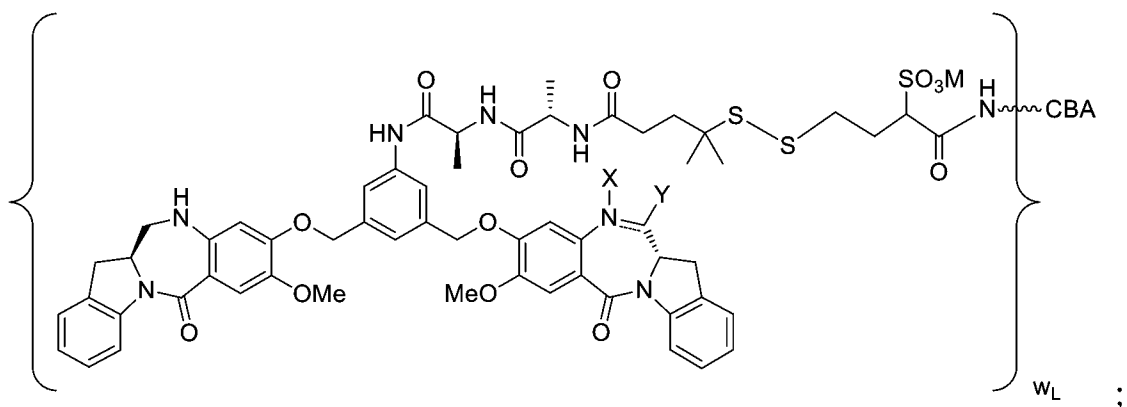
【請求項64】如請求項63之免疫結合物，其中P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

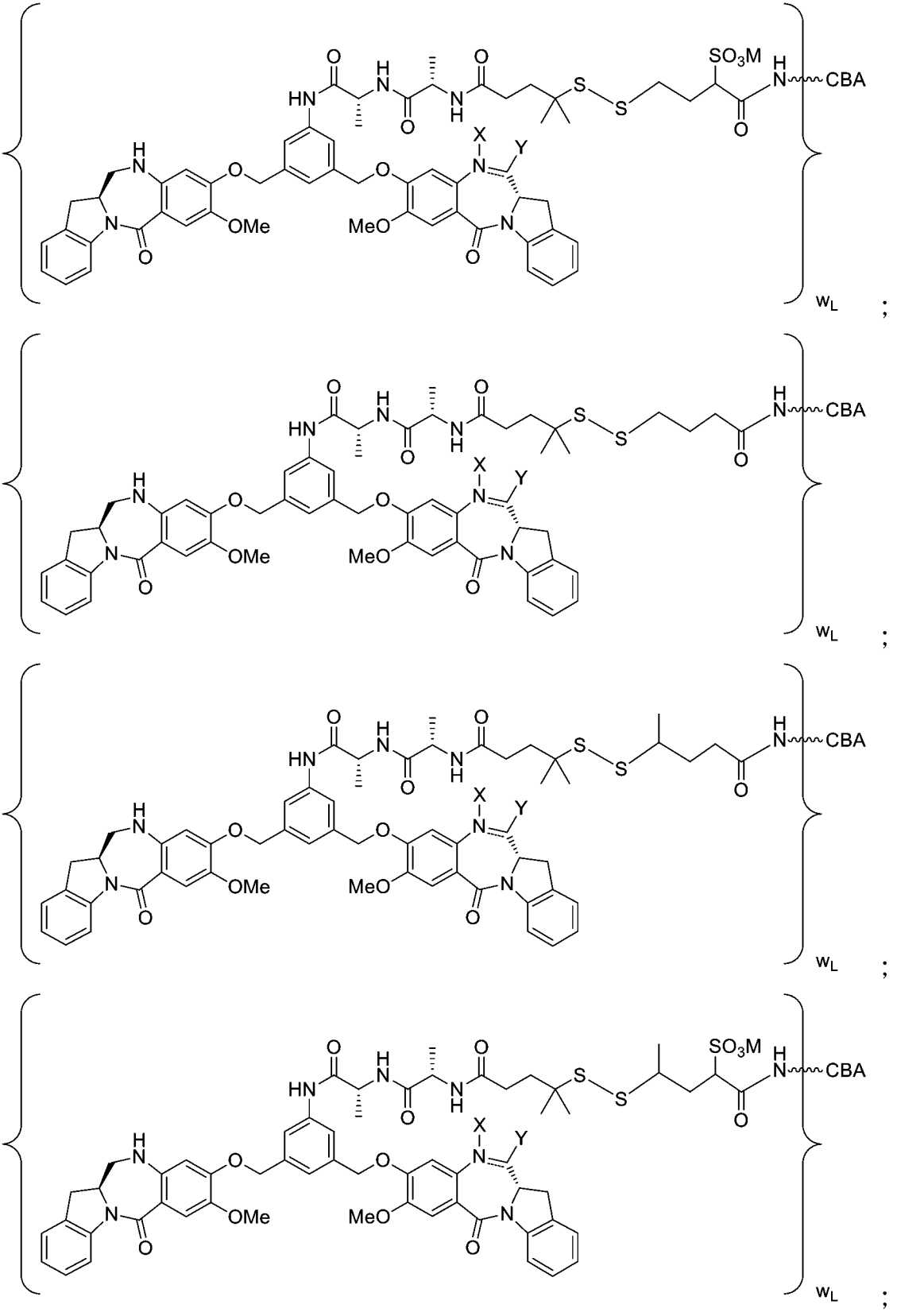
【請求項65】如請求項60至64中任一項之免疫結合物，其中Q為-SO<sub>3</sub>M。

【請求項66】如請求項60之免疫結合物，其中該免疫結合物由以下各式表示：

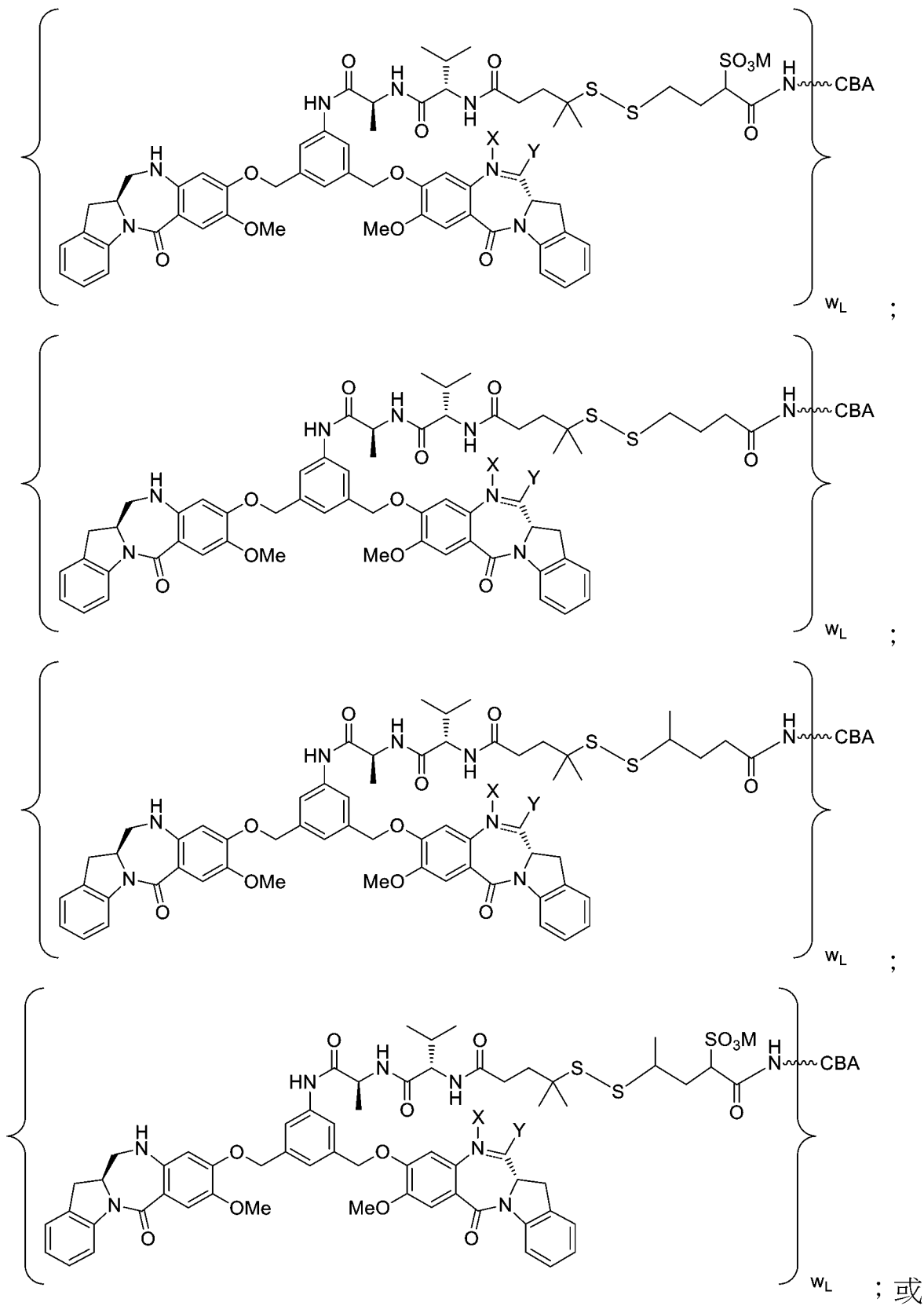


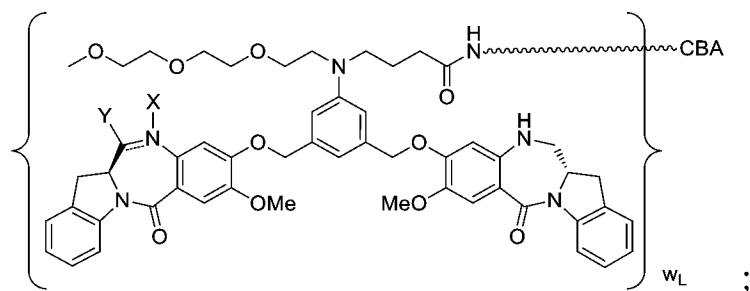






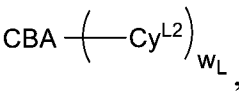






或其醫藥學上可接受之鹽，其中 $W_L$ 為1至10之整數；介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【請求項67】一種免疫結合物，其具有下式：

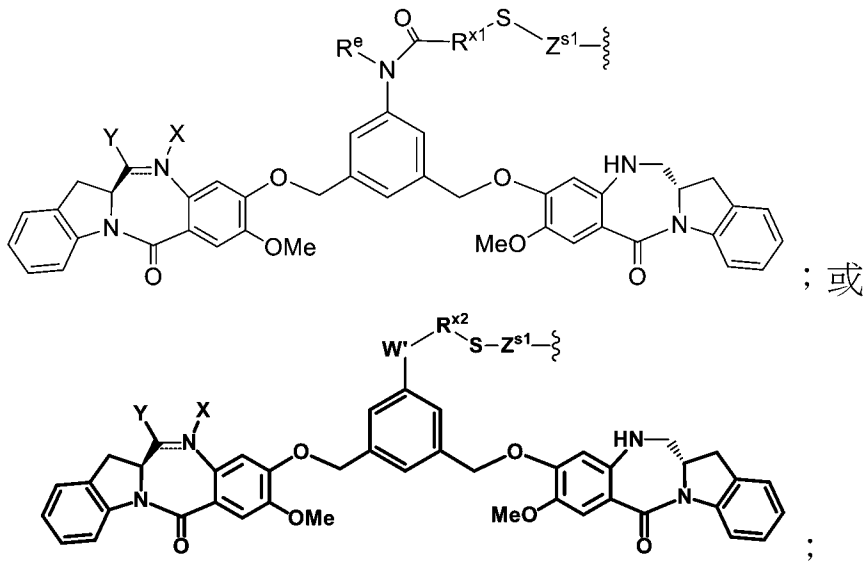


其中：

CBA為如請求項23至26中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之其多肽，其係經由離胺酸殘基共價連接於Cy<sup>L2</sup>；

$W_L$ 為1至20之整數；且

$Cy^{L2}$ 由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為

-OH或-SO<sub>3</sub>M；

R<sup>x1</sup>及R<sup>x2</sup>獨立地為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>e</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

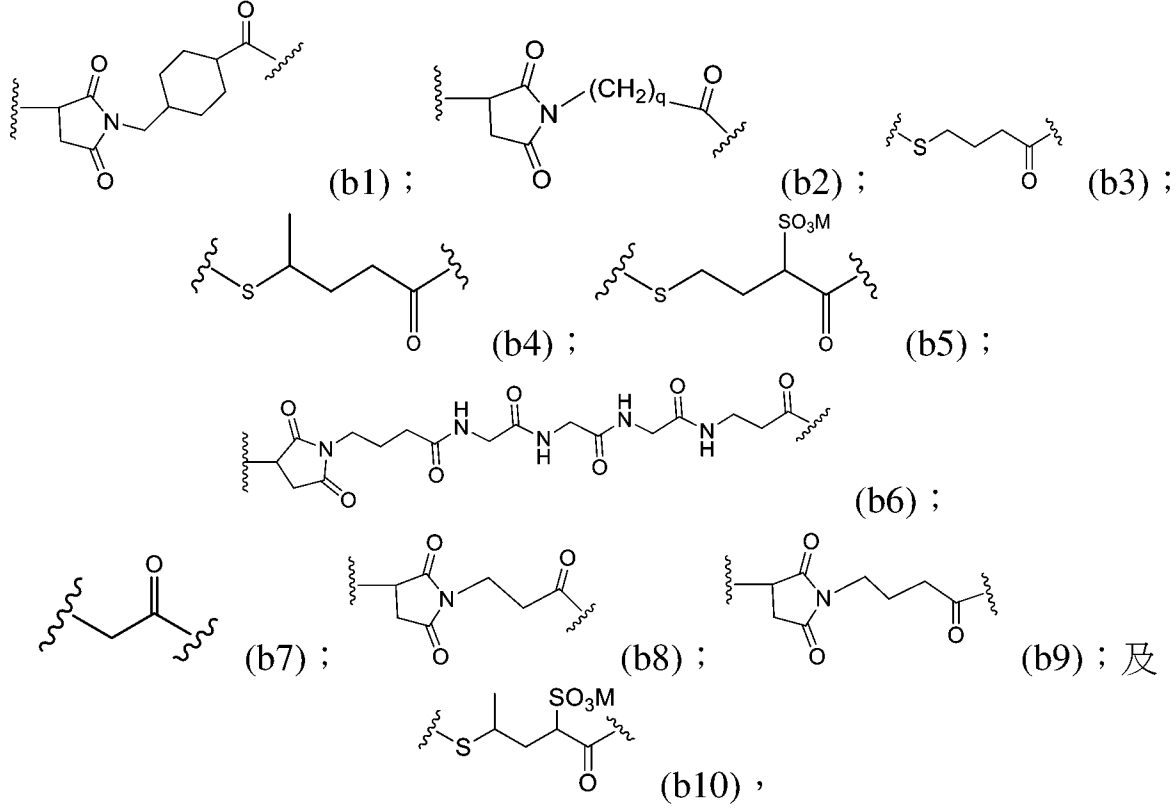
W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

Z<sup>s1</sup>係選自以下各式中之任一者：



其中：

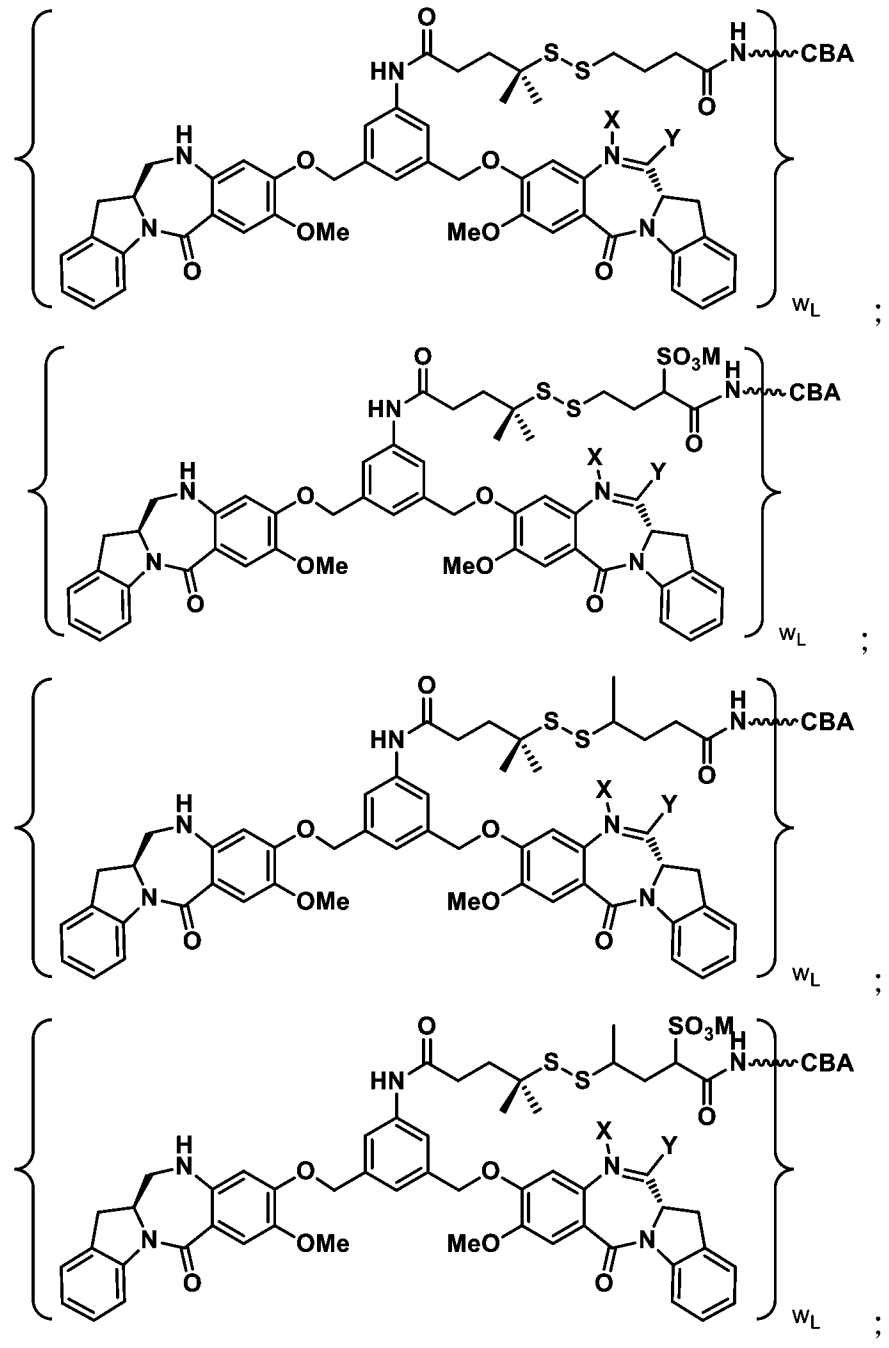
q為1至5之整數；且

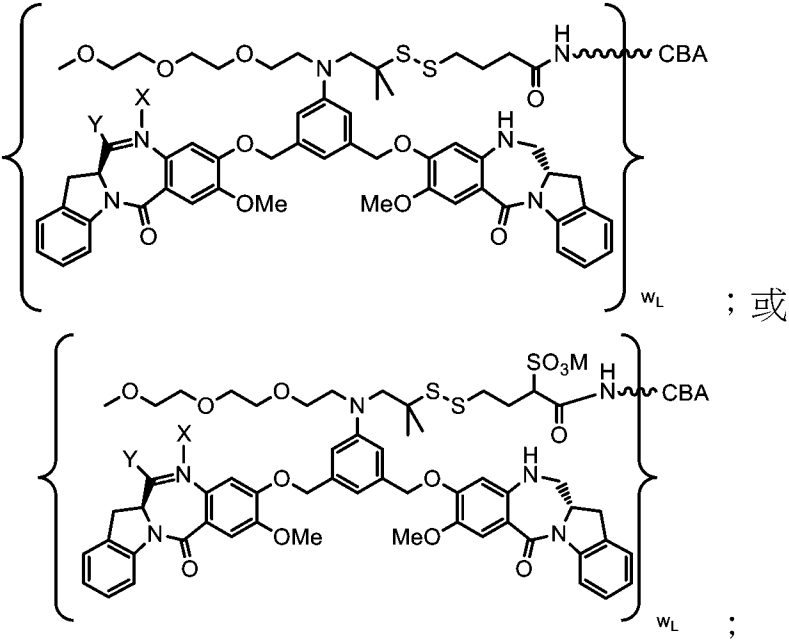
M為-H<sup>+</sup>或陽離子。

【請求項68】如請求項67之免疫結合物，其中R<sup>e</sup>為H或Me；R<sup>x1</sup>及R<sup>x2</sup>獨立地為-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-，其中R<sup>f</sup>及R<sup>g</sup>各自獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且p為0、1、2或3。

【請求項69】如請求項68之免疫結合物，其中R<sup>f</sup>與R<sup>g</sup>相同或不同且係選自-H及-Me。

【請求項70】如請求項67之免疫結合物，其中該免疫結合物由以下各式表示：





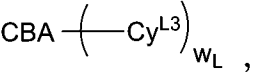
或其醫藥學上可接受之鹽，其中 $W_L$ 為1至10之整數；介於N與C之間的雙線 $\equiv$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【請求項71】如請求項60至70中任一項之免疫結合物，其中該介於N與C之間的雙線 $\equiv$ 表示雙鍵，X不存在且Y為-H。

【請求項72】如請求項60至70中任一項之免疫結合物，其中該介於N與C之間的雙線 $\equiv$ 表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。

【請求項73】如請求項72之免疫結合物，其中M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

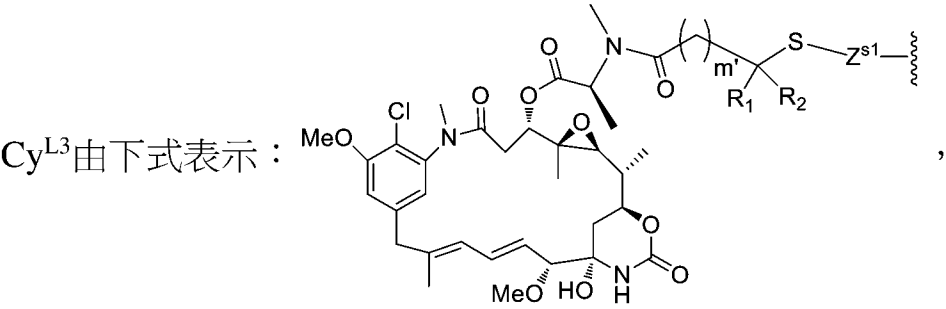
【請求項74】一種免疫結合物，其具有下式：



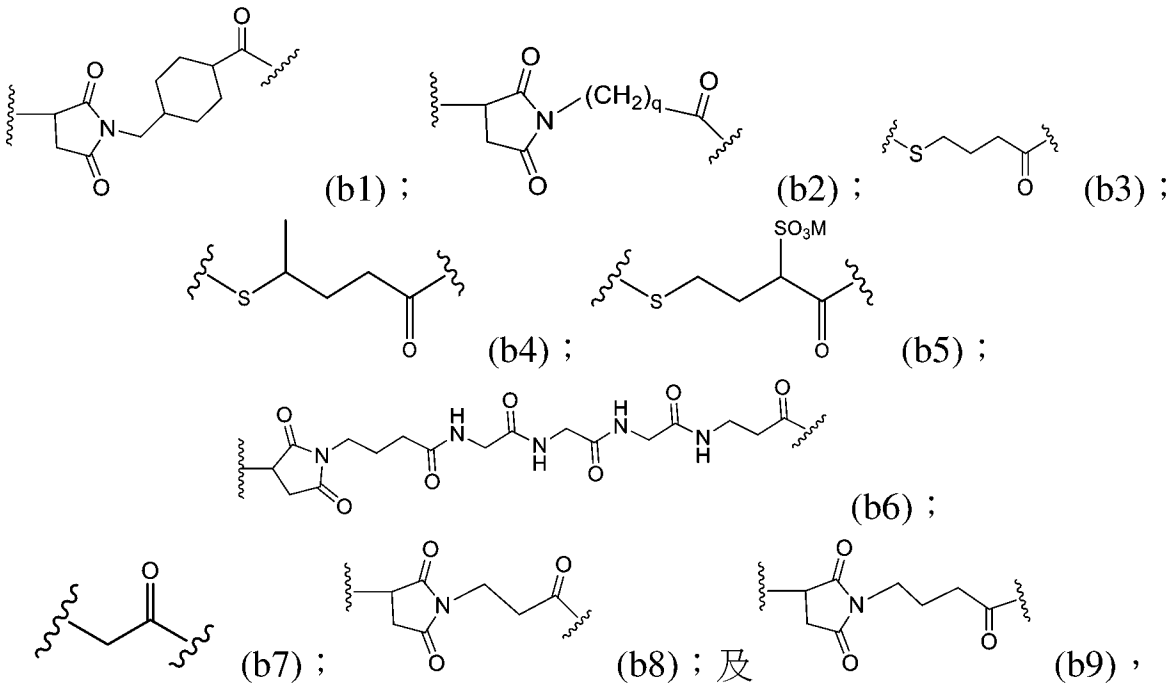
其中：

CBA為如請求項23至26中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之多肽，其係經由Lys殘基共價連接於Cy<sup>L3</sup>；

$W_L$ 為1至20之整數；

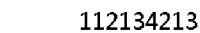


m'為1或2；  
R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>各自獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且  
Z<sup>s1</sup>係選自以下各式中之任一者：



其中：  
q為1至5之整數；且  
M為H<sup>+</sup>或陽離子。

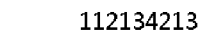
- 【請求項75】如請求項74之免疫結合物，其中m'為1，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為H。
- 【請求項76】如請求項74之免疫結合物，其中m'為2，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為Me。
- 【請求項77】如請求項74之免疫結合物，其中該免疫結合物由以下各式表示：



112134213

112134213

112134213

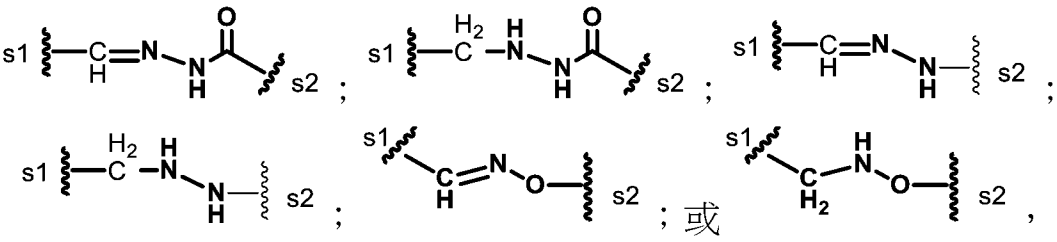


其中：

CBA為如請求項27至36中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之其多肽，其共價連接於J<sub>CB</sub>'基團；

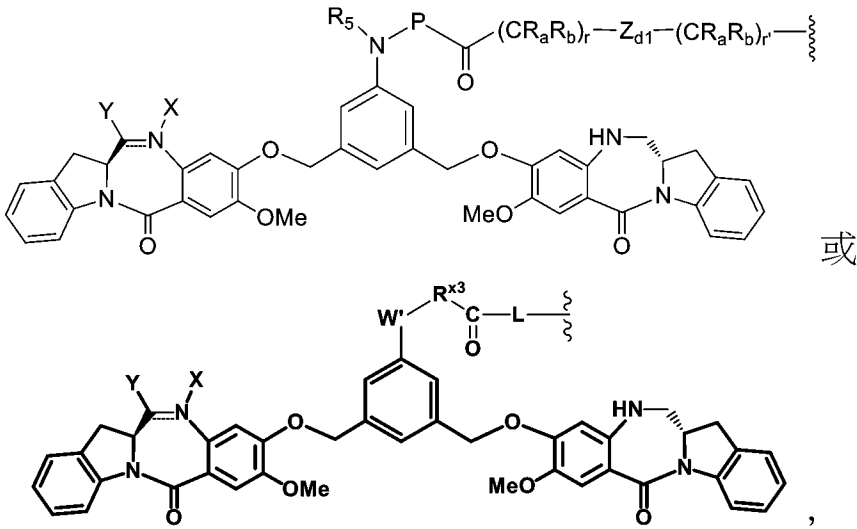
W<sub>S</sub>為1、2、3或4；

J<sub>CB</sub>'為藉由使來源於如請求項27至36中任一項之該抗體或其抗原結合片段或如請求項55或56之其多肽之N末端上之2-羥基乙胺部分之氧化的醛基與Cy<sup>s1</sup>上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：



其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cy<sup>s1</sup>共價連接之位點；

Cy<sup>s1</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>5</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；



P為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

Z<sub>d1</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

R<sub>9</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

r及r'獨立地為1至6之整數；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x3</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

L為-NR<sub>9</sub>-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>r''</sub>或不存在；且

r''為0至6之整數。

【請求項80】如請求項79之免疫結合物，其中R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>均為H，且R<sub>5</sub>及R<sub>9</sub>均為H或Me。

【請求項81】如請求項79或80之免疫結合物，其中P為含有2至5個胺基酸殘基之肽。

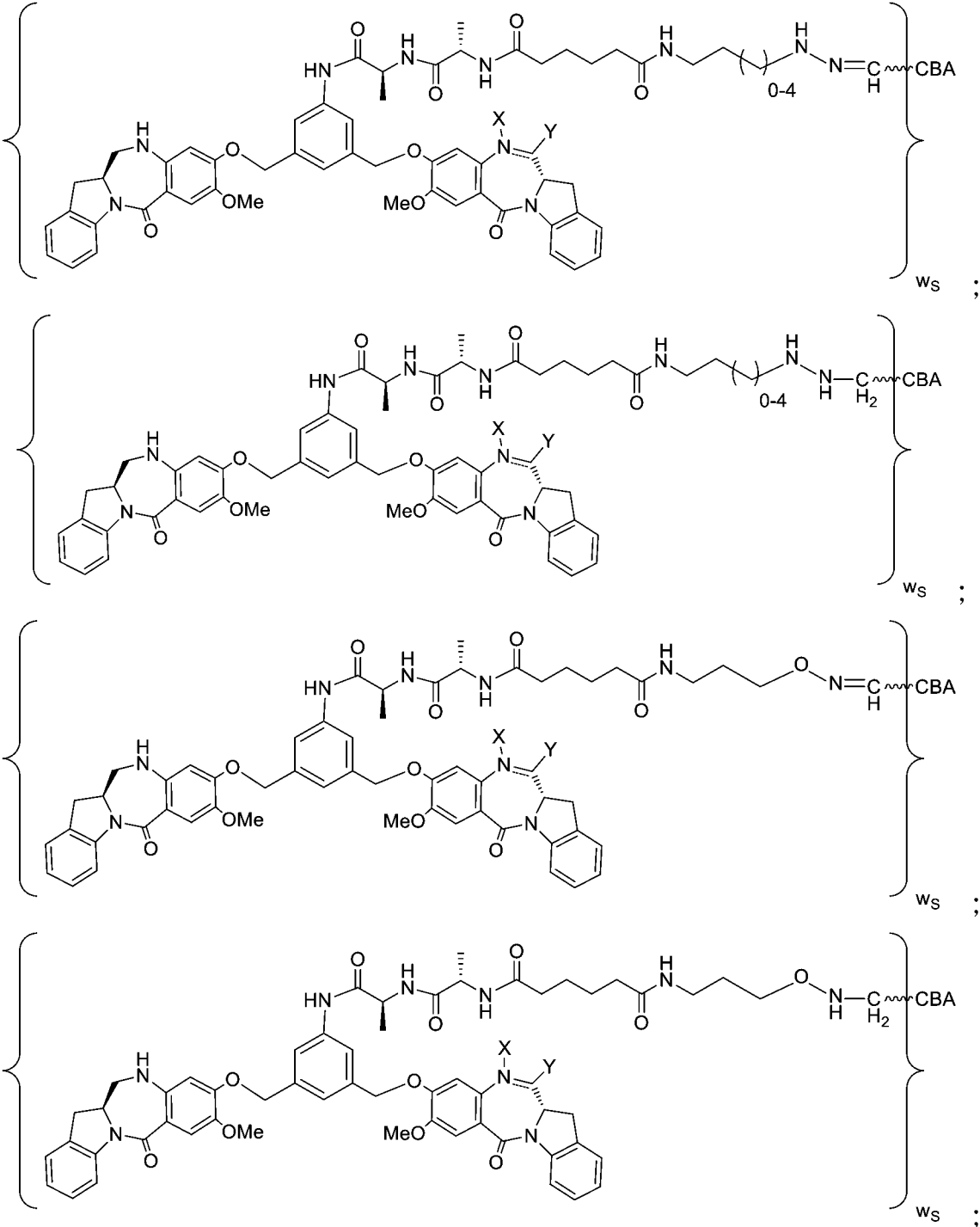
【請求項82】如請求項79至81中任一項之免疫結合物，其中P係選自由以下各項組成之群：Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、

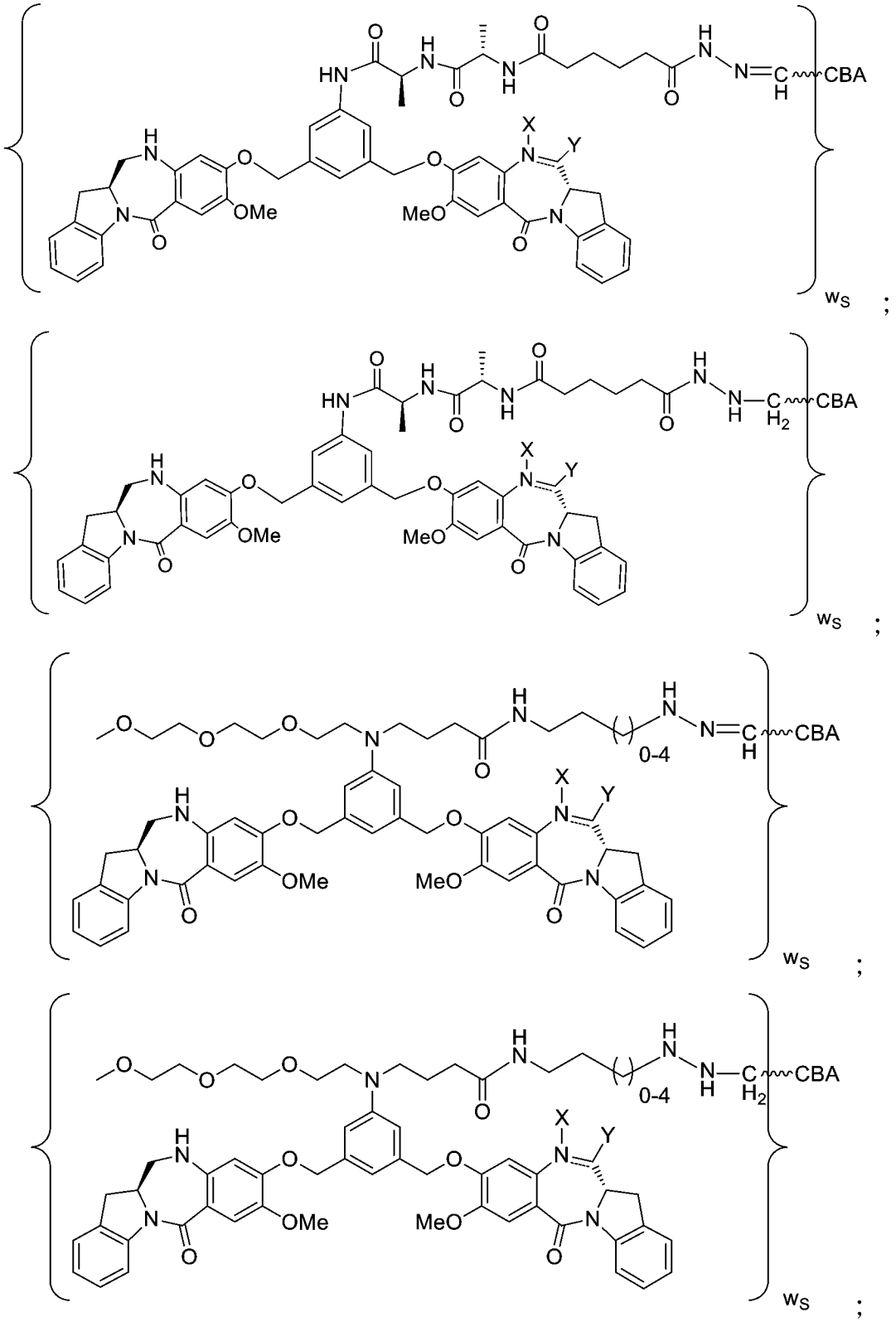
D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。

【請求項83】如請求項82項之免疫結合物，其中P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【請求項84】如請求項79至83中任一項之免疫結合物，其中Q為-SO<sub>3</sub>M。

【請求項85】如請求項80之免疫結合物，其由以下各式表示：

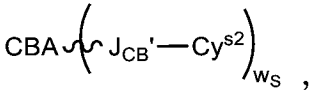






為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

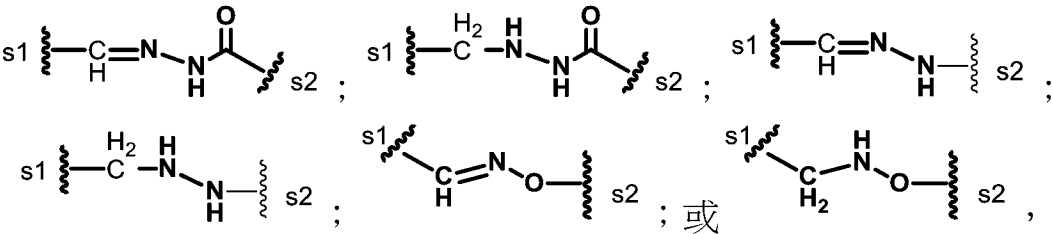
【請求項86】一種免疫結合物，其具有下式：



其中：

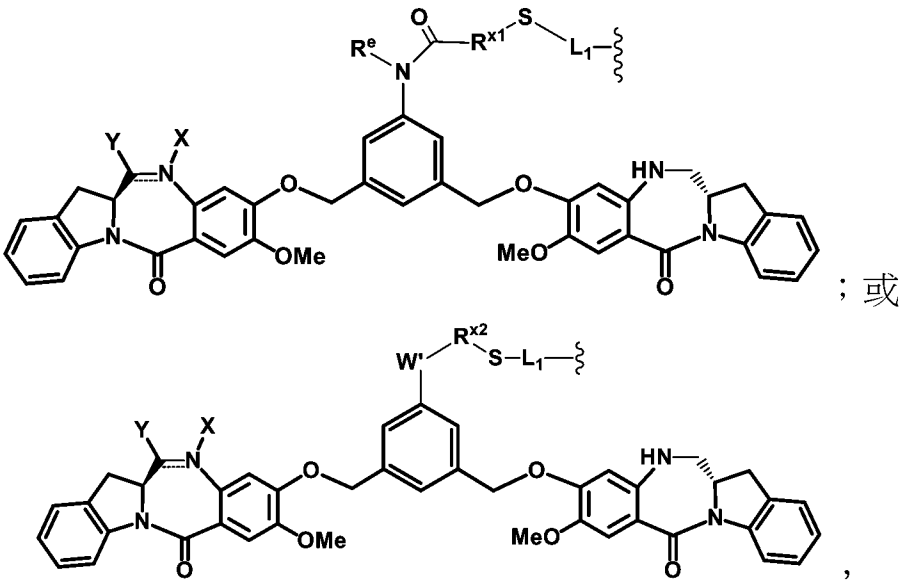
CBA為如請求項27至36中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項55或56中任一項之其多肽，其共價連接於J<sub>CB'</sub>基團。

J<sub>CB'</sub>為藉由使來源於如請求項27至36中任一項之該抗體或其抗原結合片段或如請求項55或56之其多肽之N末端上之2-羥基乙胺部分之氧化的醛基與Cy<sup>s2</sup>上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：



其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cy<sup>s2</sup>共價連接之位點；

Cy<sup>s2</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X

不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sup>x1</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>e</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

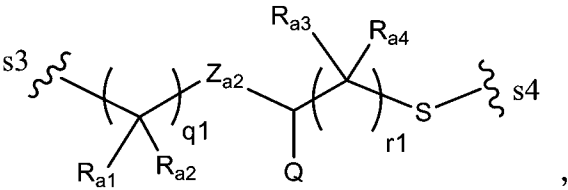
R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x2</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

L<sub>1</sub>由下式表示：



其中：

s3為與基團J<sub>CB</sub>'共價連接之位點；

s4為與Cy<sup>s2</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

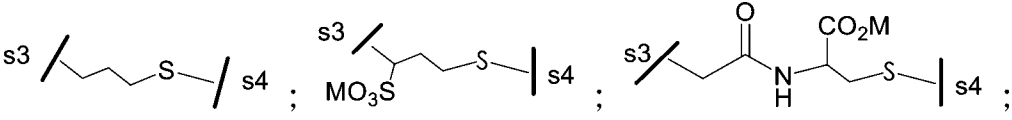
R<sub>9</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

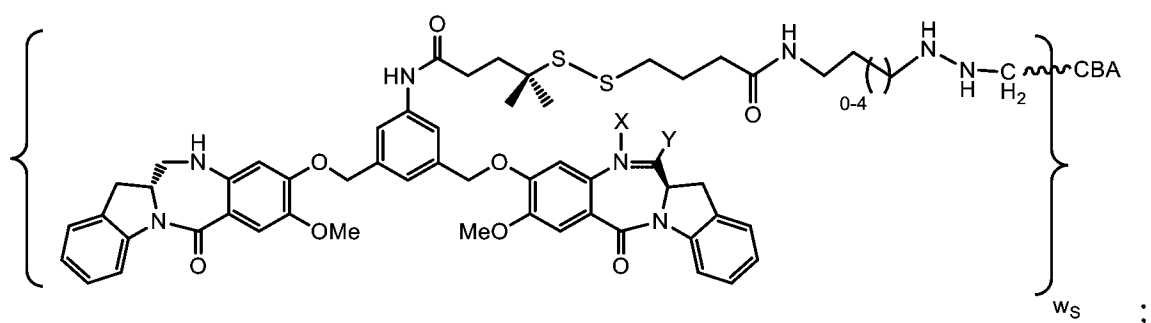
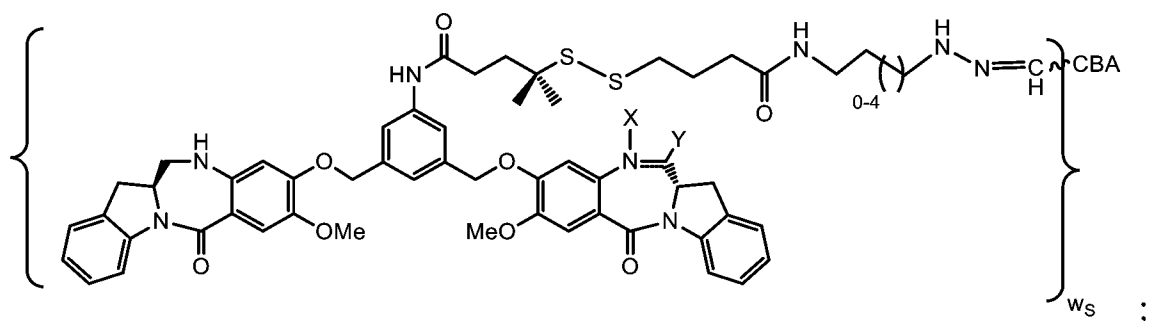
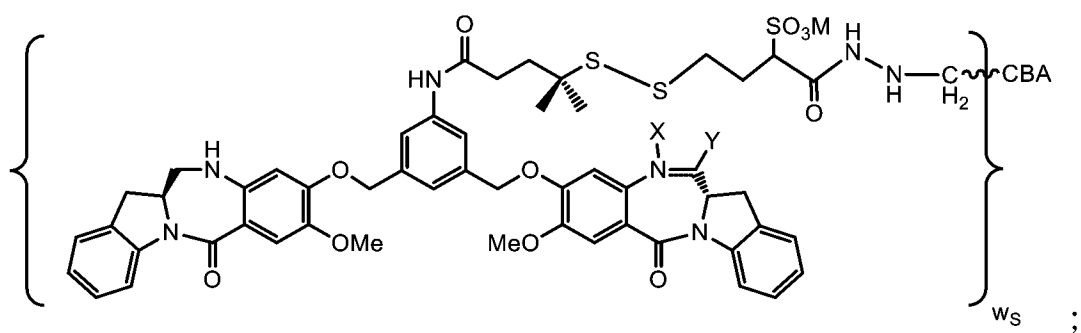
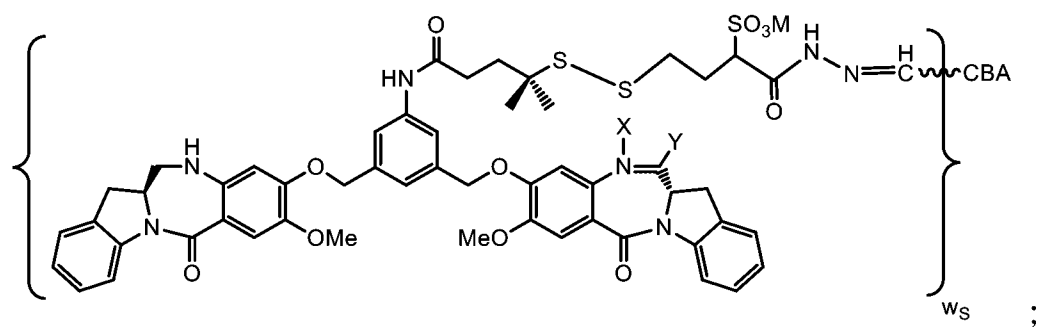
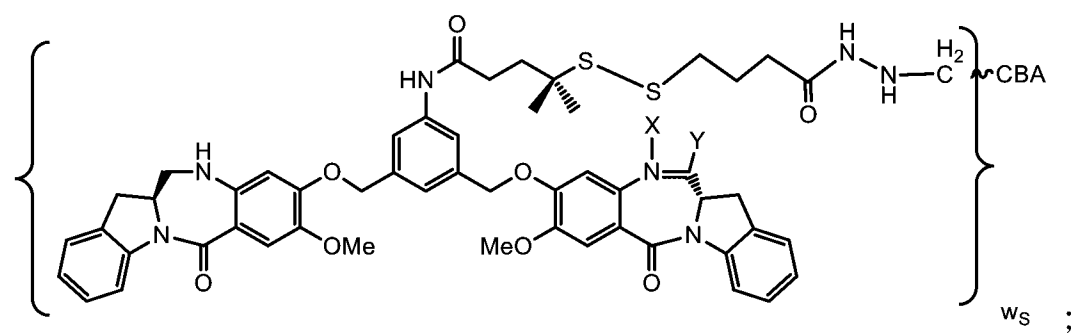
R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

q1及r1各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q1及r1不均為0。

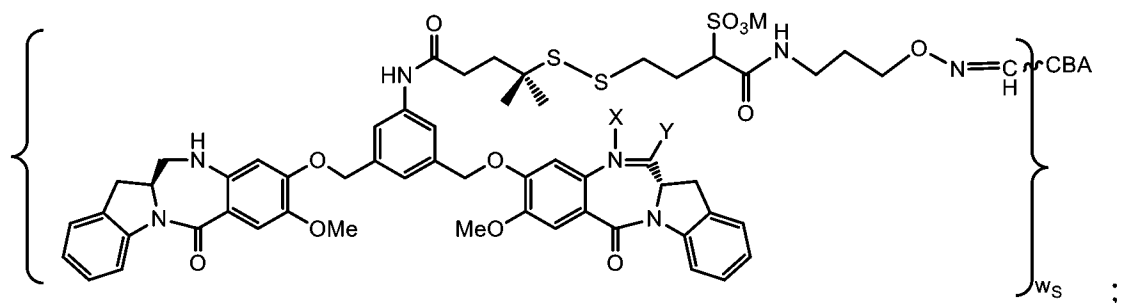
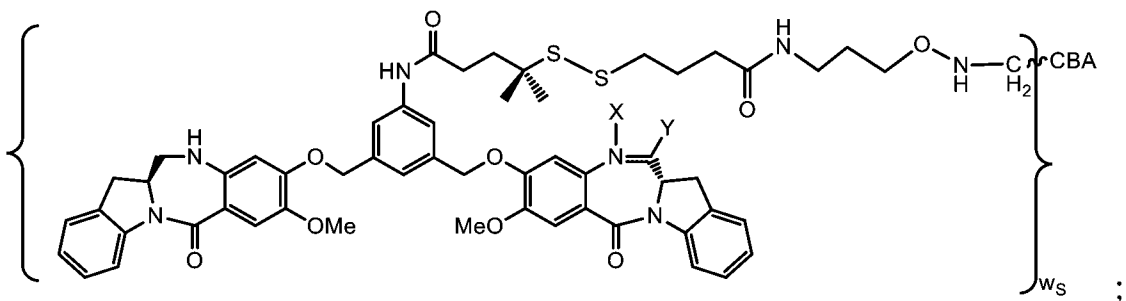
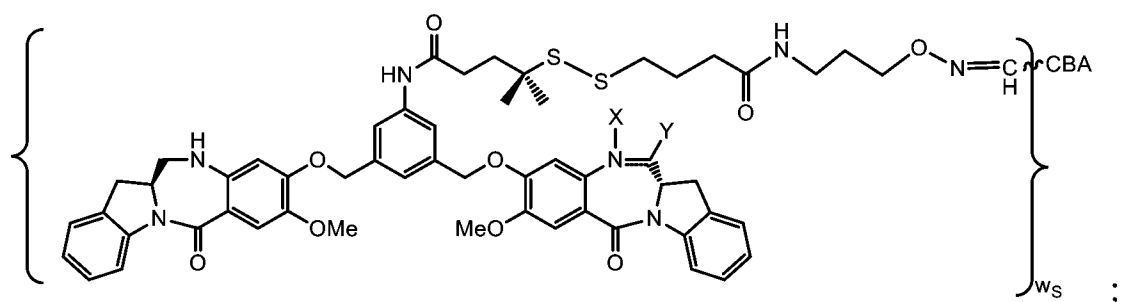
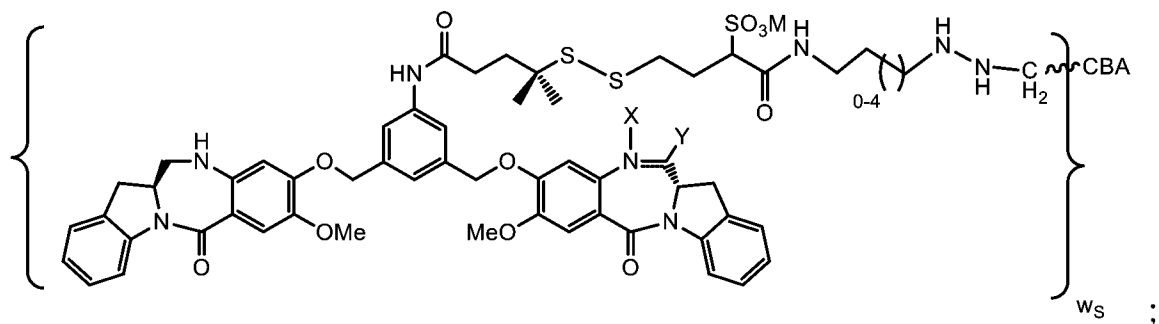
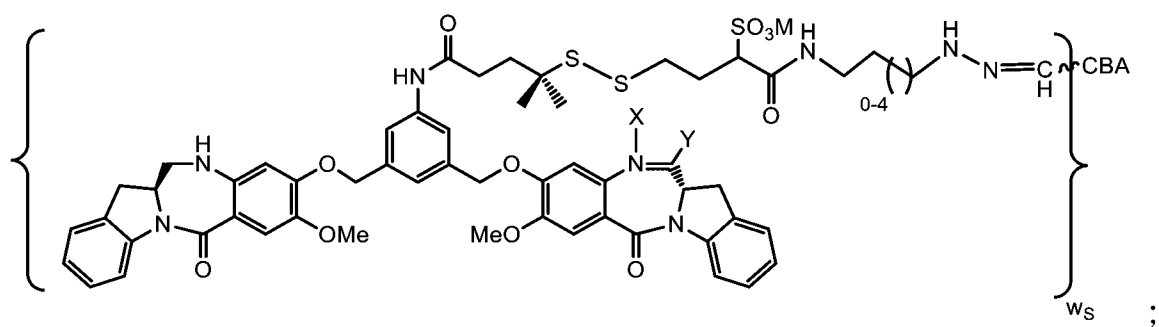
【請求項87】如請求項86之免疫結合物，其中-L<sub>1</sub>-由以下各式表示：

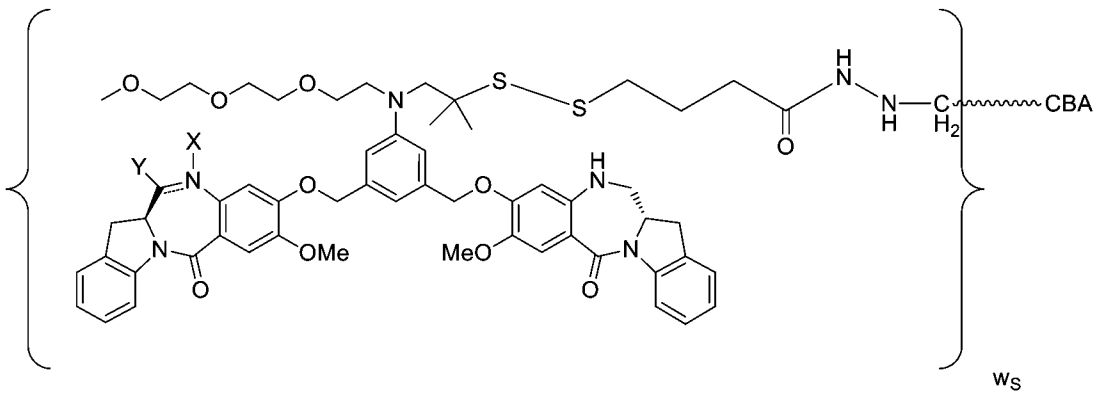
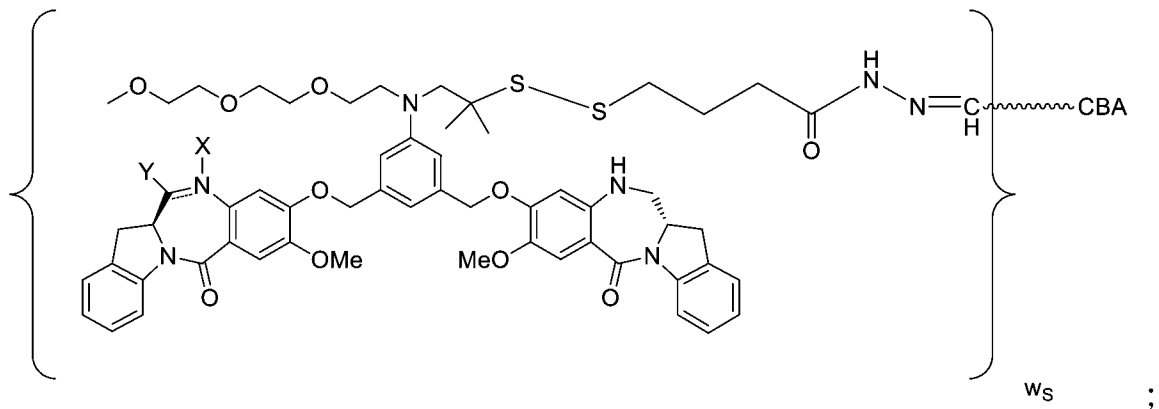
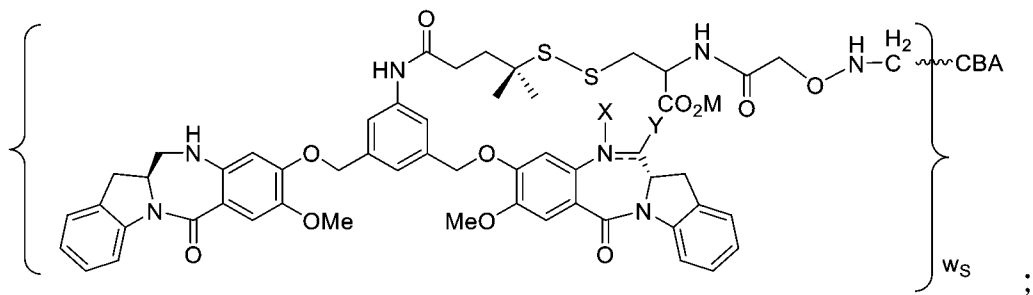
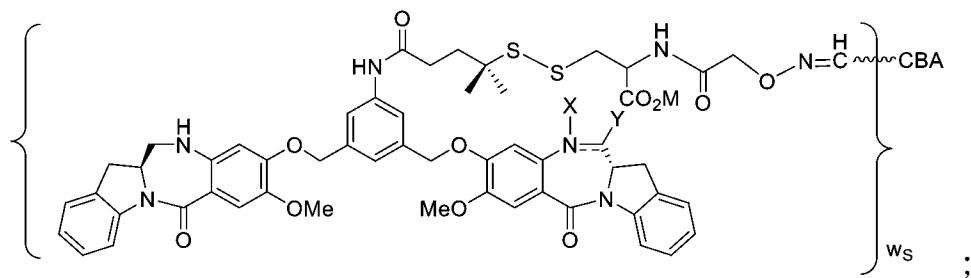
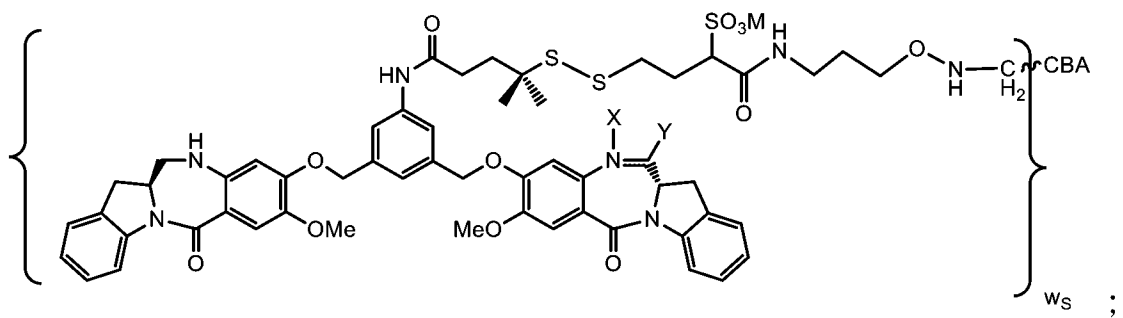


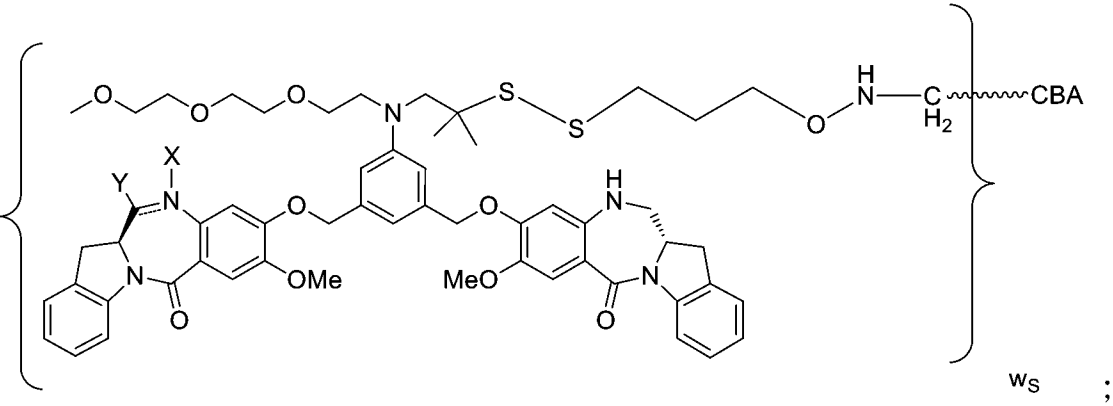
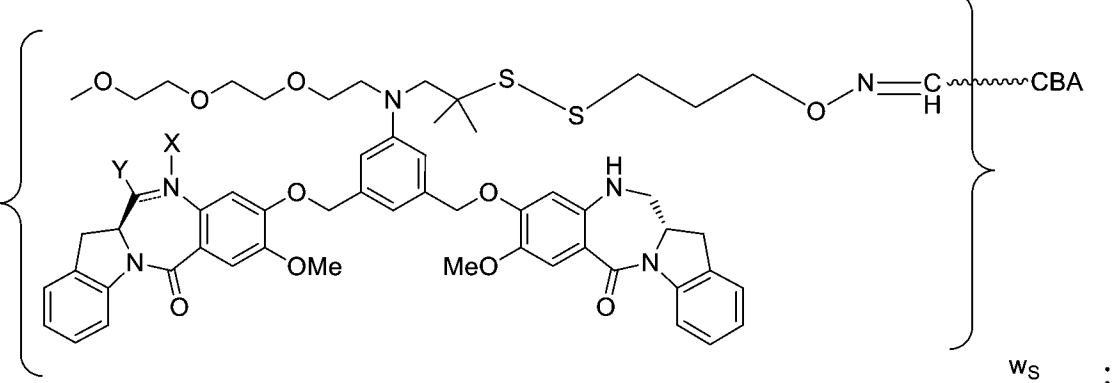
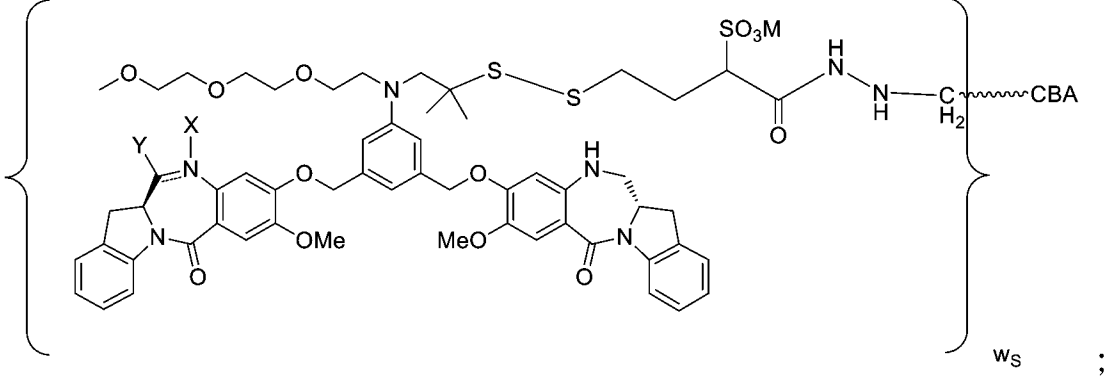
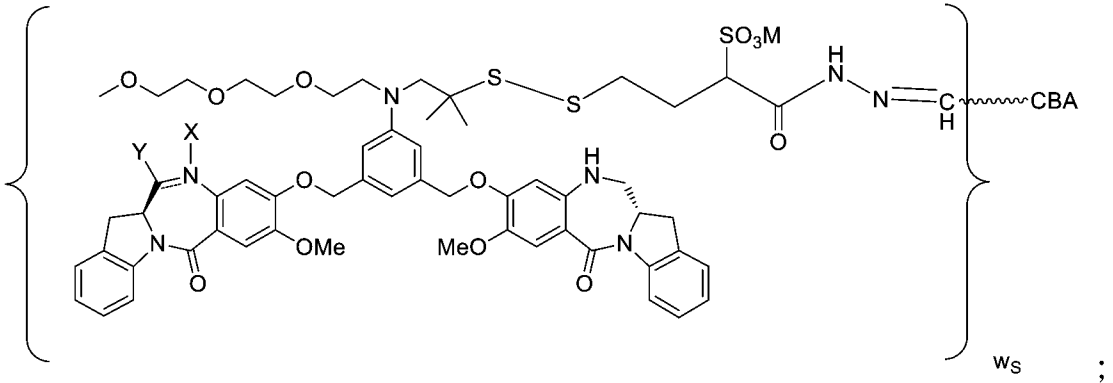


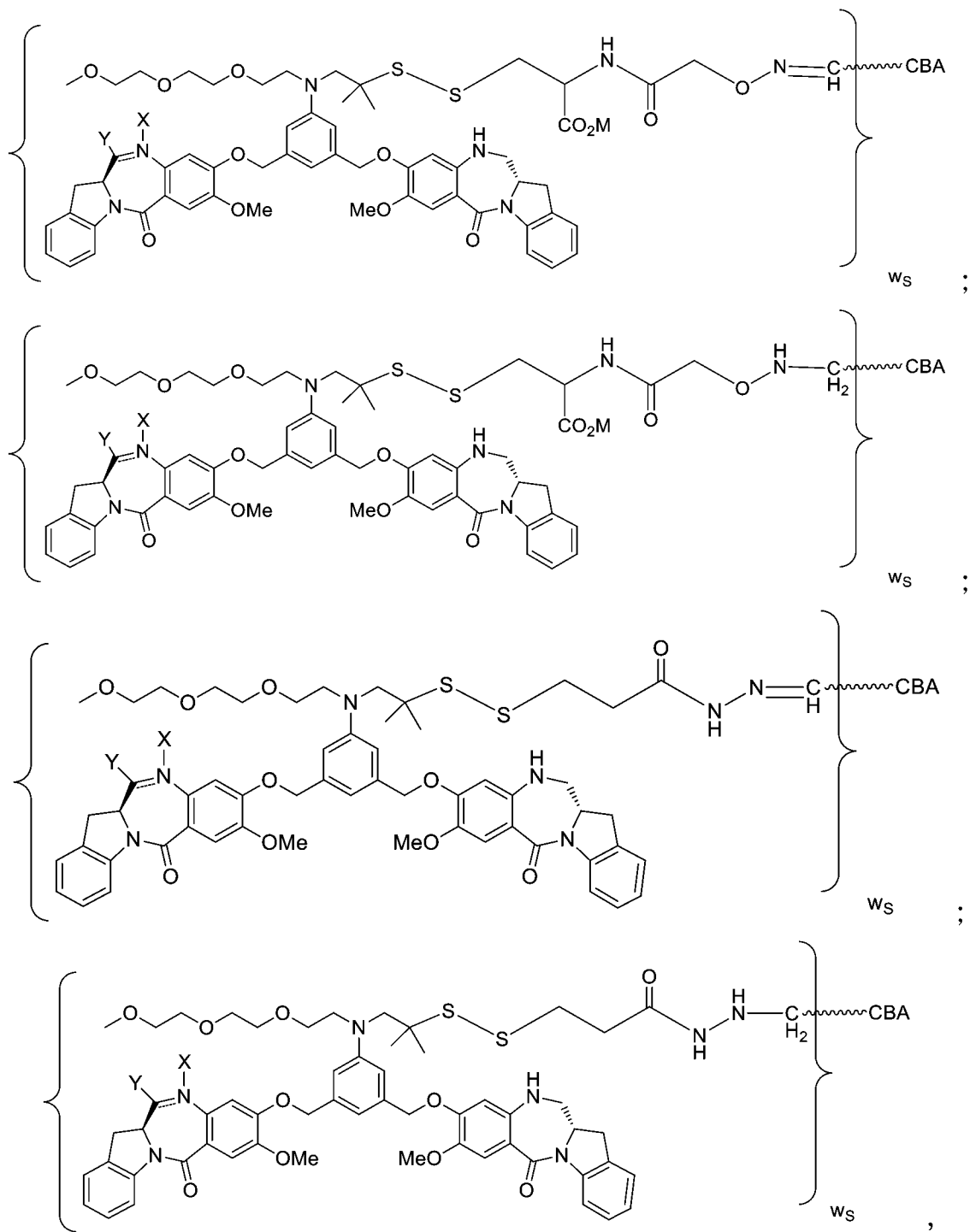












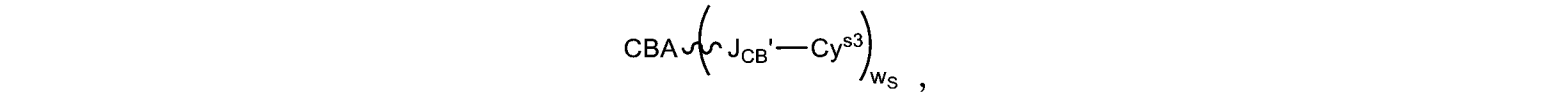
或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H；且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【請求項91】如請求項70至90中任一項之免疫結合物，其中該介於N與C之間的雙線=表示雙鍵，X不存在且Y為-H。

【請求項92】如請求項79至90中任一項之免疫結合物，其中該介於N與C之間的雙線=表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。

【請求項93】如請求項92之免疫結合物，其中M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

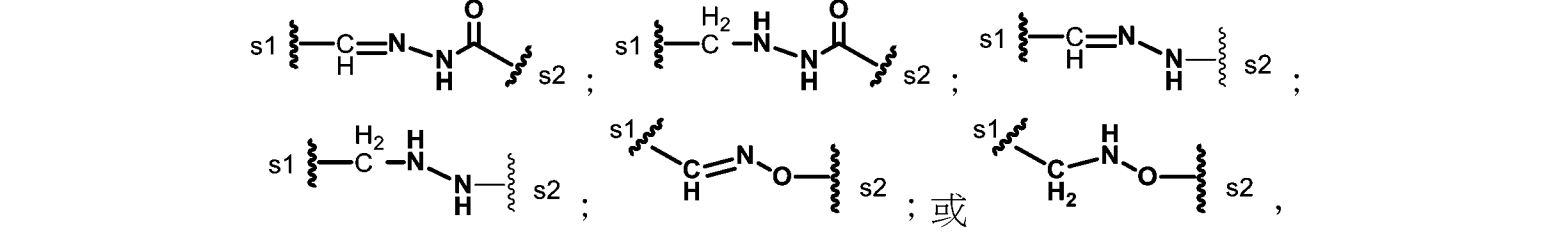
【請求項94】一種免疫結合物，其具有下式：



其中：

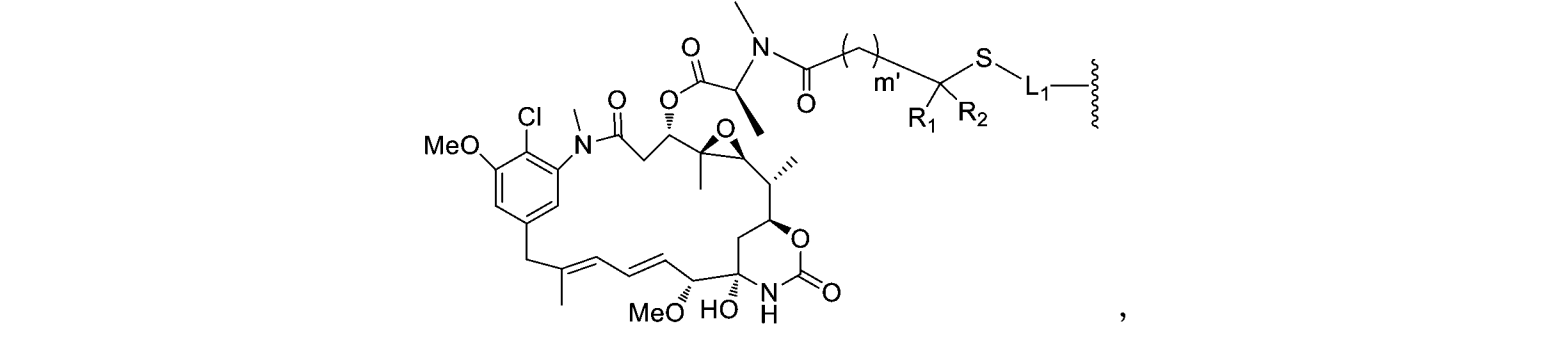
CBA為如請求項27至36中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項55或56之其多肽，其共價連接於該J<sub>CB'</sub>基團；

J<sub>CB'</sub>為藉由使來源於如請求項27至36中任一項之該抗體或其抗原結合片段或如請求項55或56之其多肽之N末端上之2-羥基乙胺部分之氧化的醛基與Cy<sup>s3</sup>上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：



其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cy<sup>s3</sup>共價連接之位點；

Cy<sup>s3</sup>由下式表示：

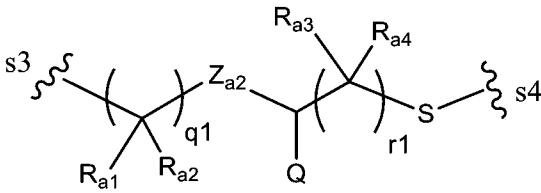


其中：

m'為1或2；

R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>各自獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

L<sub>1</sub>由下式表示：



其中：

s<sub>3</sub>為與基團J<sub>CB</sub>'共價連接之位點；

s<sub>4</sub>為與Cy<sup>s3</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

R<sub>9</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

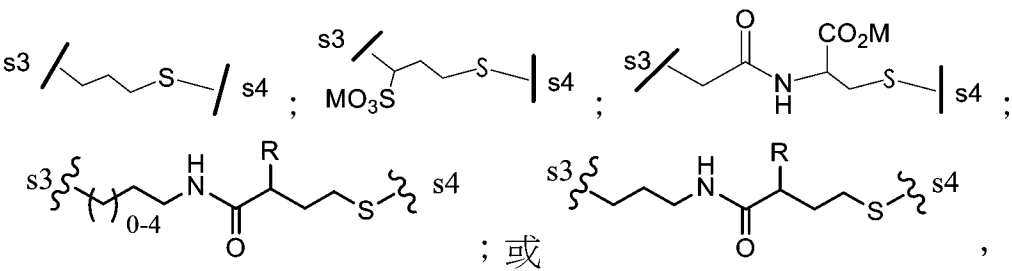
q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>不均為0。

【請求項95】如請求項94之免疫結合物，其中m'為1，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為H。

【請求項96】如請求項94之免疫結合物，其中m'為2，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為Me。

【請求項97】如請求項94至96中任一項之免疫結合物，其中-L<sub>1</sub>-由以下各式

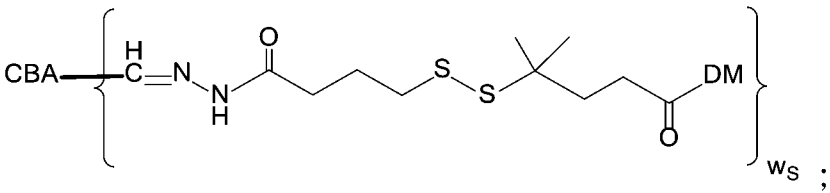
表示：

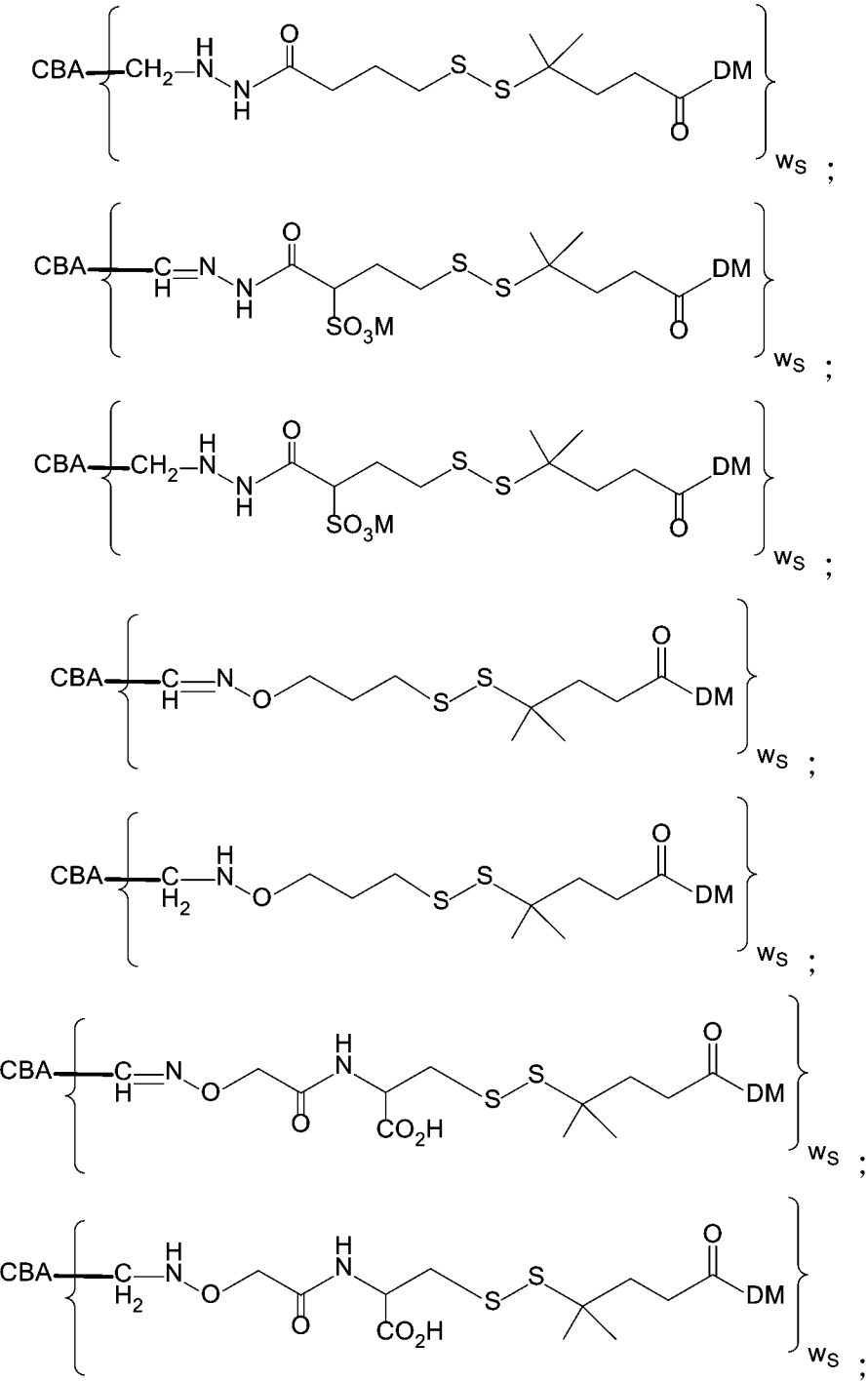


或其醫藥學上可接受之鹽，其中R為H或-SO<sub>3</sub>M且M為H<sup>+</sup>或陽離子。

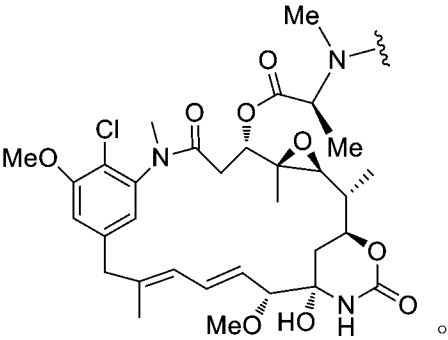
【請求項98】如請求項94之免疫結合物，其中該免疫結合物由以下各式表

示：

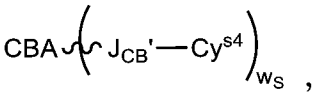




或其醫藥學上可接受之鹽；其中DM由下式表示：



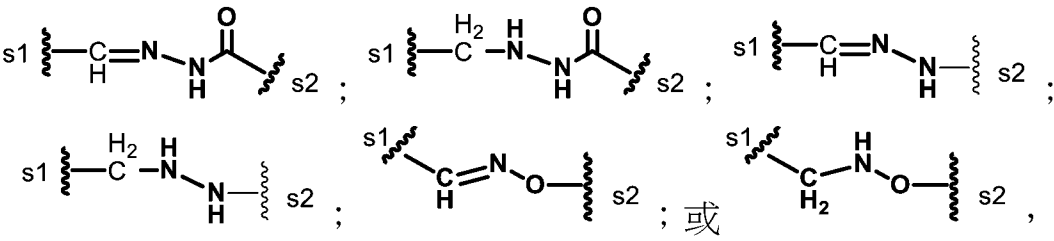
【請求項99】一種免疫結合物，其具有下式：



其中：

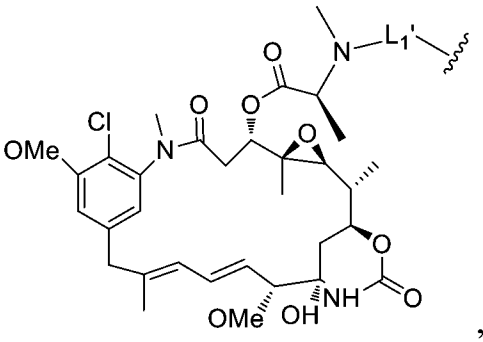
CBA為如請求項27至36中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項66或56中任一項之其多肽，其共價連接於該J<sub>CB'</sub>基團；

J<sub>CB'</sub>為藉由使來源於如請求項27至36中任一項之該抗體或其抗原結合片段或如請求項55或56之其多肽之N末端上之2-羥基乙胺部分之氧化的醛基與Cy<sup>s4</sup>上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：

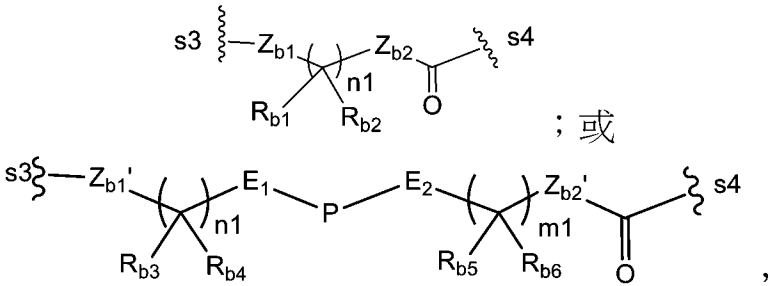


其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cy<sup>s4</sup>共價連接之位點；

Cy<sup>s4</sup>由以下各式表示：



L<sub>1'</sub>由以下各式表示：



其中：



s3為與基團J<sub>CB</sub>'基團共價連接之位點；

s4為與Cy<sup>s4</sup>上之-NMe-基團共價連接之位點；

Z<sub>b1</sub>及Z<sub>b2</sub>均不存在，或Z<sub>b1</sub>及Z<sub>b2</sub>中一者不存在且另一者為-CH<sub>2</sub>-O-或-O-CH<sub>2</sub>-；

Z<sub>b1</sub>'及Z<sub>b2</sub>'各自獨立地為不存在、-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-、-NR<sub>9</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-或-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9</sub>-；

R<sub>9</sub>為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

n1及m1各自獨立地為1至6之整數；

E<sub>1</sub>及E<sub>2</sub>中一者為-C(=O)-且另一者為-NR<sub>9</sub>-；或E<sub>1</sub>及E<sub>2</sub>中一者為-C(=O)-或-NR<sub>9</sub>-且另一者為不存在；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；且

R<sub>b1</sub>、R<sub>b2</sub>、R<sub>b3</sub>、R<sub>b4</sub>、R<sub>b5</sub>及R<sub>b6</sub>在每次出現時各自獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基。

【請求項100】如請求項99之免疫結合物，其中R<sub>b1</sub>、R<sub>b2</sub>、R<sub>b3</sub>、R<sub>b4</sub>、R<sub>b5</sub>及R<sub>b6</sub>均為H。

【請求項101】如請求項100之免疫結合物，其中R<sub>9</sub>為H。

【請求項102】如請求項99至101中任一項之免疫結合物，其中Z<sub>b1</sub>'及Z<sub>b2</sub>'均不存在；或Z<sub>b1</sub>'為-CH<sub>2</sub>-O-且Z<sub>b2</sub>'不存在；或Z<sub>b1</sub>'為-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9</sub>-且Z<sub>b2</sub>'為-O-CH<sub>2</sub>-或不存在。

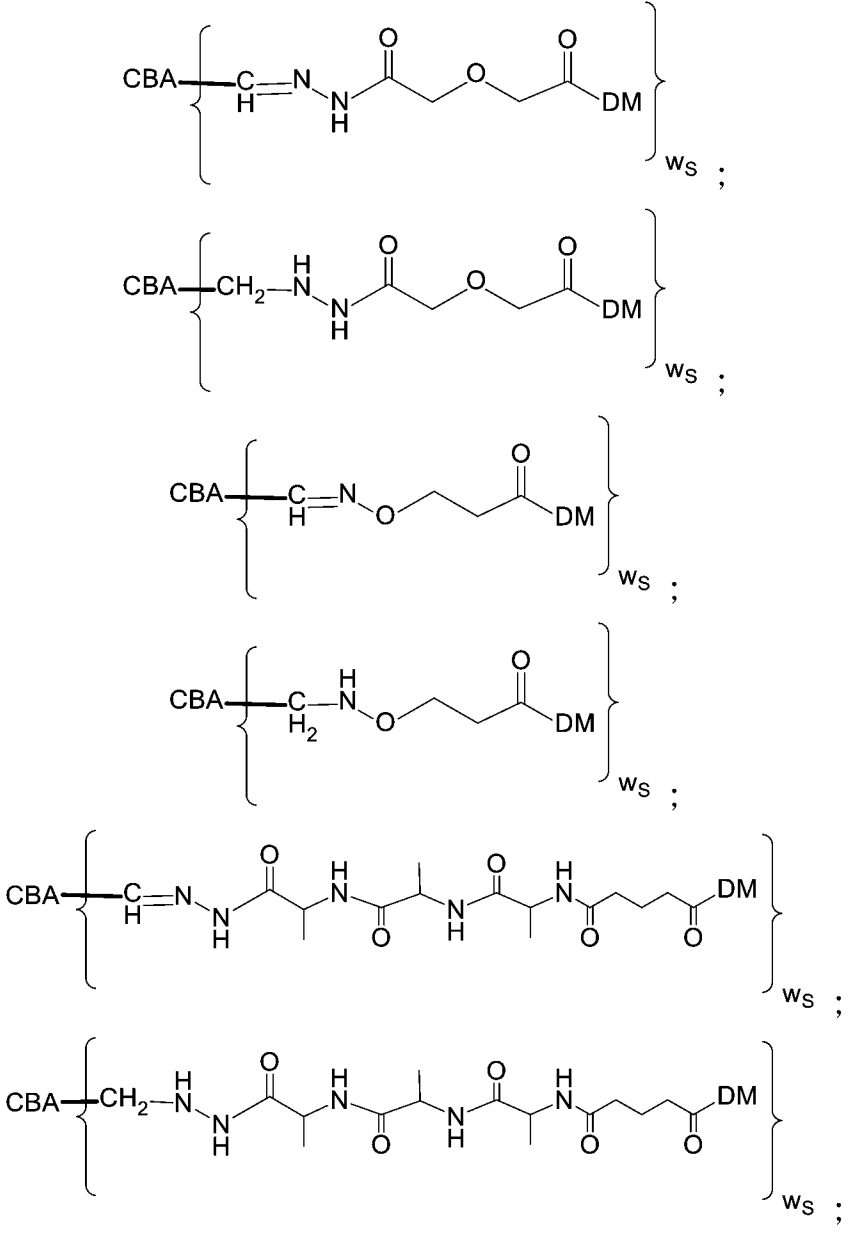
【請求項103】如請求項99至102中任一項之免疫結合物，其中P為含有2至5個胺基酸殘基之肽。

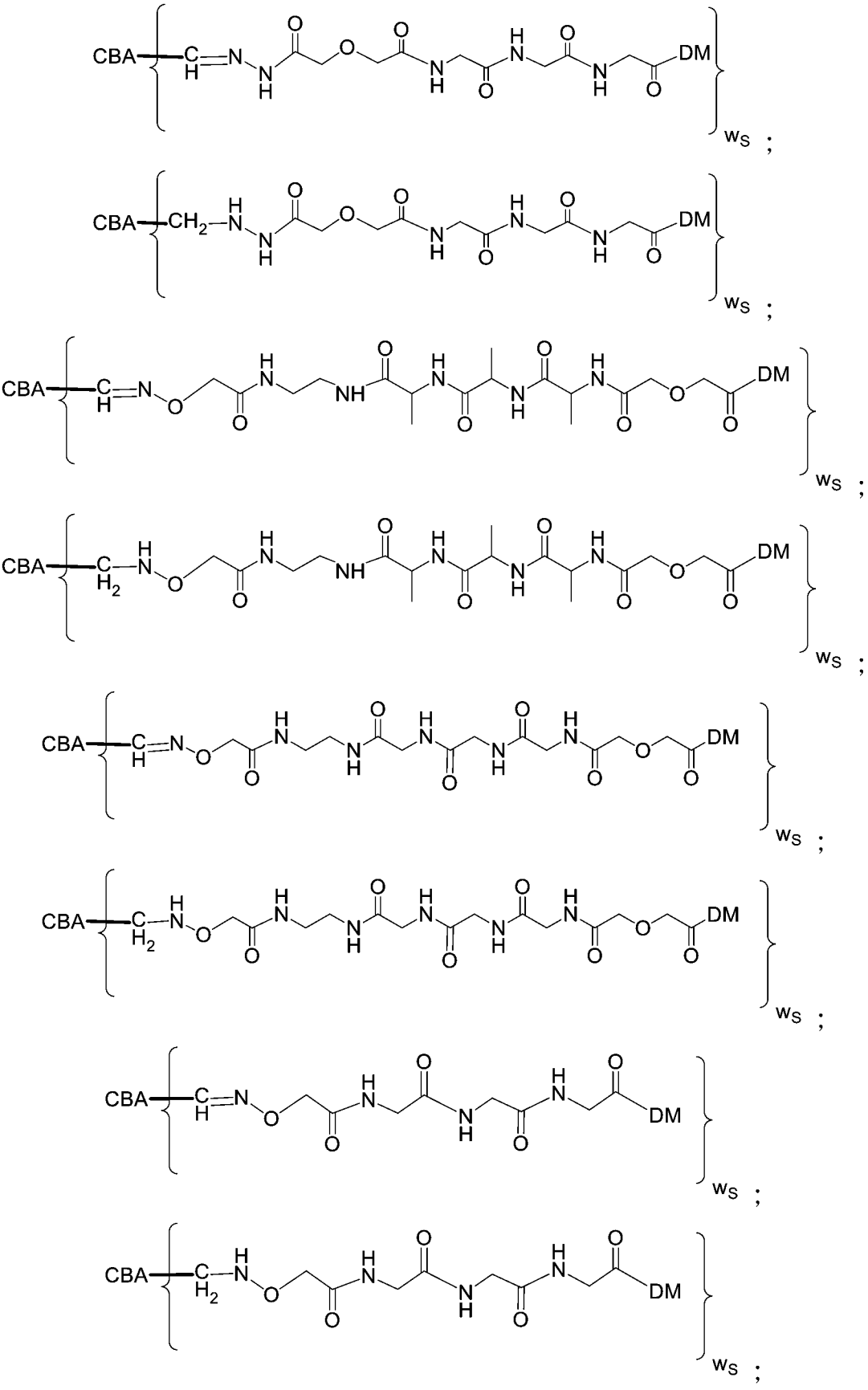
【請求項104】如請求項99至103中任一項之免疫結合物，其中P係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:

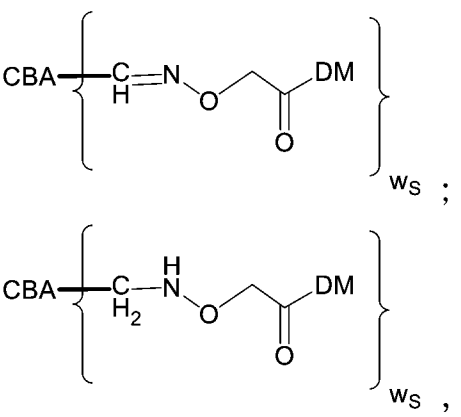
57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。

【請求項105】如請求項104之免疫結合物，其中P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala及D-Ala-D-Ala。

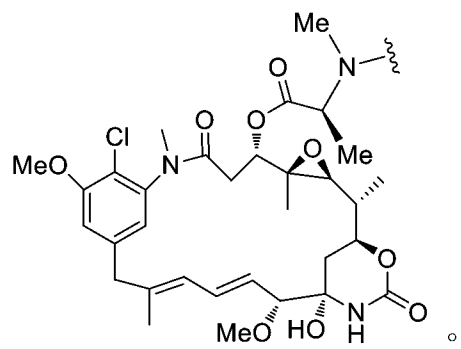
【請求項106】如請求項99之免疫結合物，其中該免疫結合物由以下各式表示：



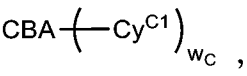




或其醫藥學上可接受之鹽，其中DM由以下結構式表示：



【請求項107】一種免疫結合物，其由下式表示：

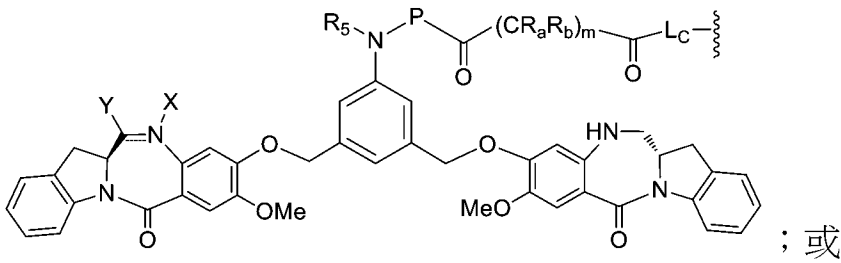


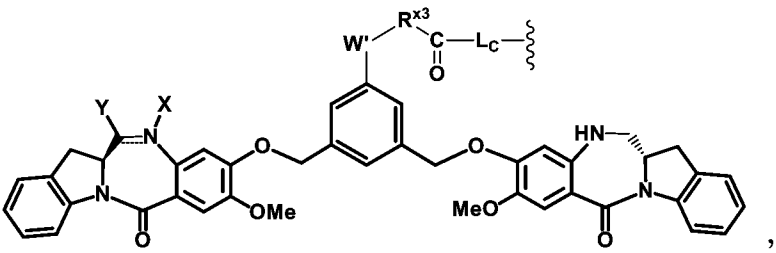
其中：

CBA為如請求項37、29、30、38、33及34中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於Cy<sup>C1</sup>；

W<sub>C</sub>為1或2；

Cy<sup>C1</sup>由以下各式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>5</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

P為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

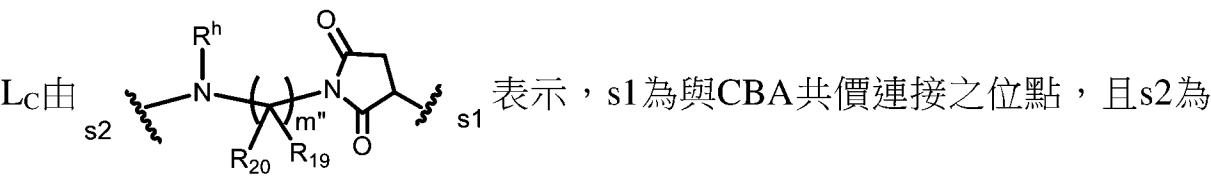
W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x3</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；且



與Cy<sup>C1</sup>上之-C(=O)-基團共價連接之位點；其中：

R<sub>19</sub>及R<sub>20</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

m''為介於1與10之間的整數；且

R<sup>h</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基。

【請求項108】如請求項107之免疫結合物，其中R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>均為H；且R<sub>5</sub>為H或

Me。

【請求項109】如請求項107或108之免疫結合物，其中P為含有2至5個胺基酸殘基之肽。

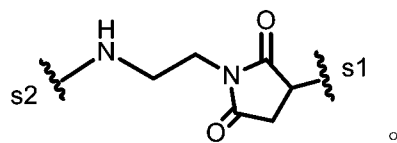
【請求項110】如請求項107至109中任一項之免疫結合物，其中P係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。

【請求項111】如請求項110之免疫結合物，其中P為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

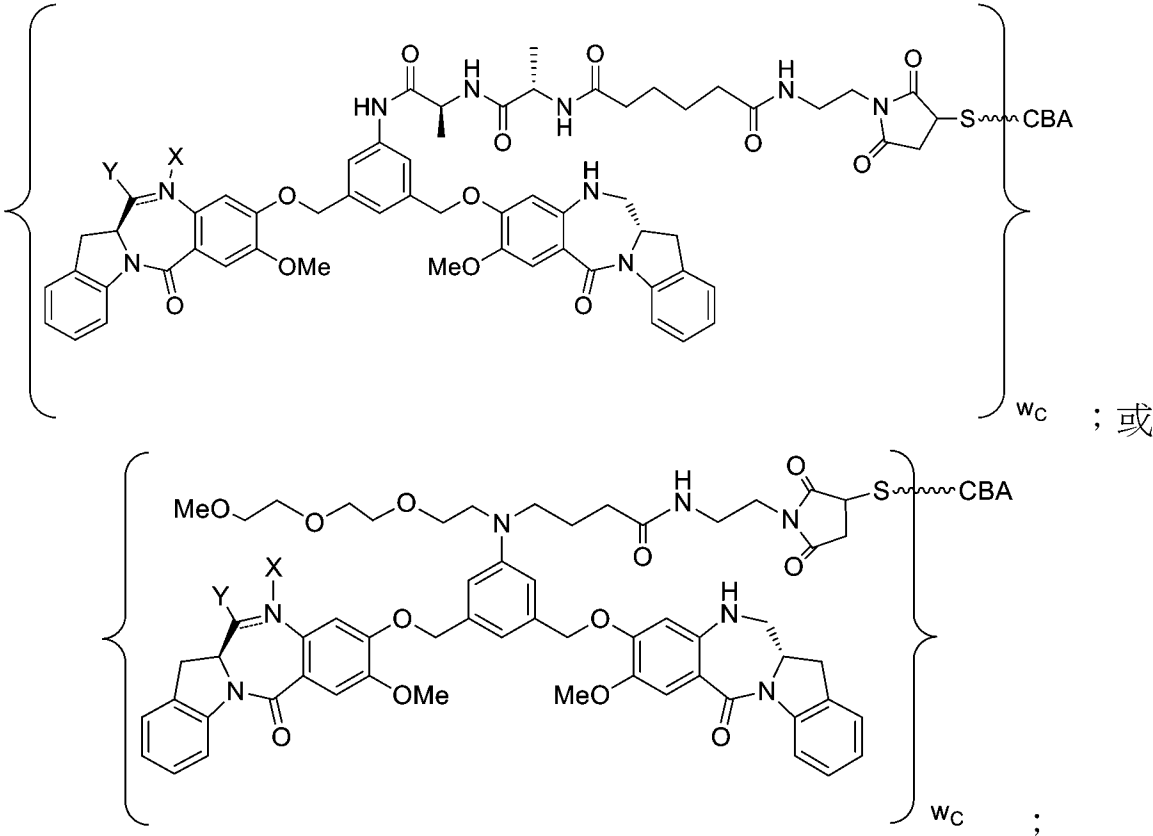
【請求項112】如請求項107至111中任一項之免疫結合物，其中Q為-SO<sub>3</sub>M。

【請求項113】如請求項107至112中任一項之免疫結合物，其中R<sub>19</sub>及R<sub>20</sub>均為H；且m"為1至6之整數。

【請求項114】如請求項113之免疫結合物，其中-Lc-由下式表示：

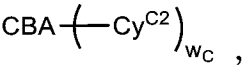


【請求項115】如請求項107之免疫結合物，其由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線＝表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【請求項116】一種免疫結合物，其由下式表示：

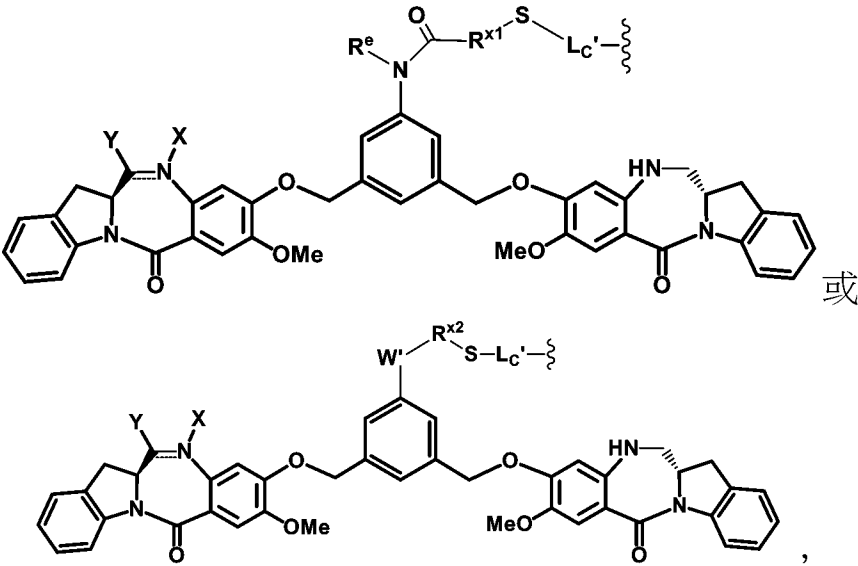


其中：

CBA為如請求項37、29、30、38、33及34中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於Cy<sup>C2</sup>；

W<sub>C</sub>為1或2；

Cy<sup>C2</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線 = 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sup>x1</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>e</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

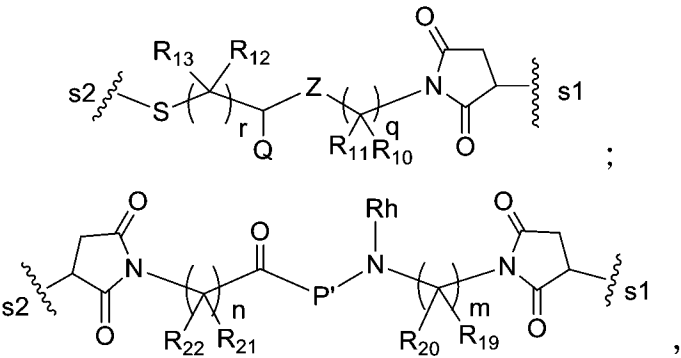
R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x2</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

Lc'由以下各式表示：





其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與Cy<sup>C2</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

Q為-H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub>及R<sub>22</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)

烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

R<sup>h</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

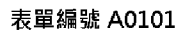
P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

【請求項117】如請求項116之免疫結合物，其中P'為含有2至5個胺基酸殘基之肽。

【請求項118】如請求項116或117之免疫結合物，其中P'係選自Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。

【請求項119】如請求項118之免疫結合物，其中P'為Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

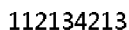
【請求項120】如請求項116之免疫結合物，其中-Lc'-由以下各式表示：

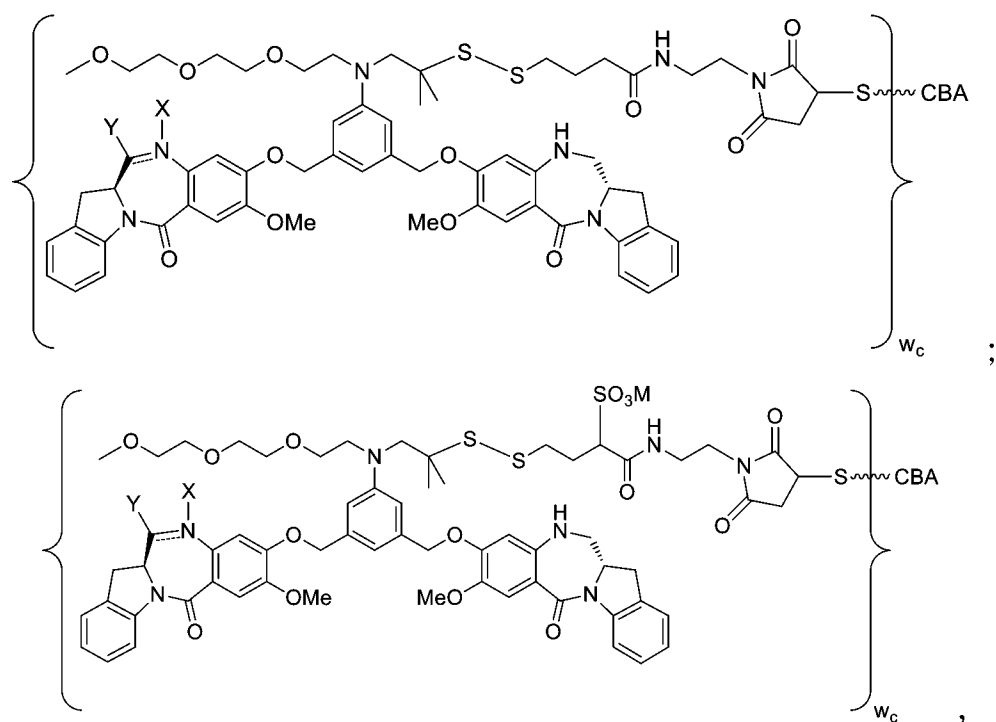


1122049094-0

FCP-070177

第 48 頁，共 53 頁(發明申請專利範圍)





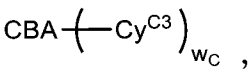
或其醫藥學上可接受之鹽，其中介於N與C之間的雙線 $\equiv$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H；且當其為單鍵時，X為-H且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M。

【請求項124】如請求項116至123中任一項之免疫結合物，其中該介於N與C之間的雙線 $\equiv$ 表示雙鍵，X不存在且Y為-H。

【請求項125】如請求項116至123中任一項之免疫結合物，其中該介於N與C之間的雙線 $\equiv$ 表示單鍵，X為-H且Y為-SO<sub>3</sub>M。

【請求項126】如請求項125之免疫結合物，其中M為H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>或K<sup>+</sup>。

【請求項127】一種免疫結合物，其具有下式：

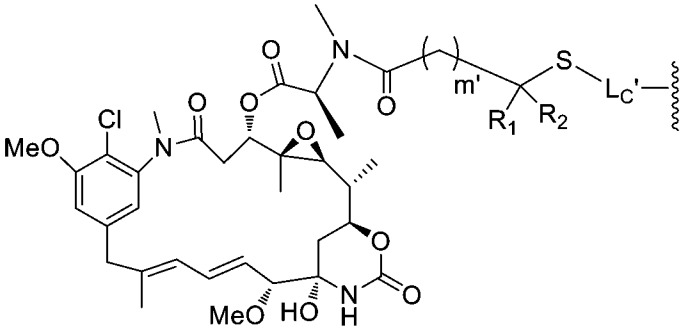


其中：

CBA為如請求項37、29、30、38、33及34中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於Cy<sup>C3</sup>；

W<sub>c</sub>為1或2；

Cy<sup>C3</sup>由下式表示：

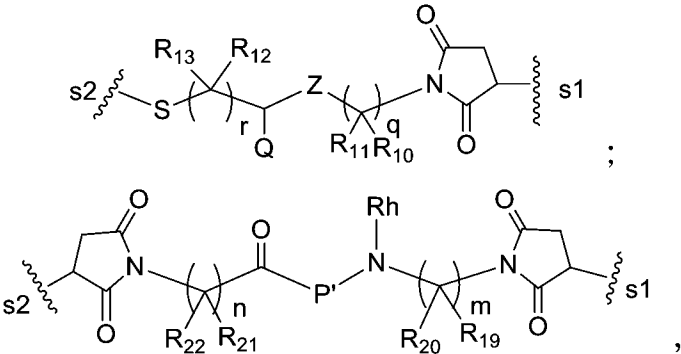


其中：

m'為1或2；

R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>各自獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

Lc'由以下各式表示：



其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與Cy<sup>C3</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub>及R<sub>22</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

R<sup>h</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

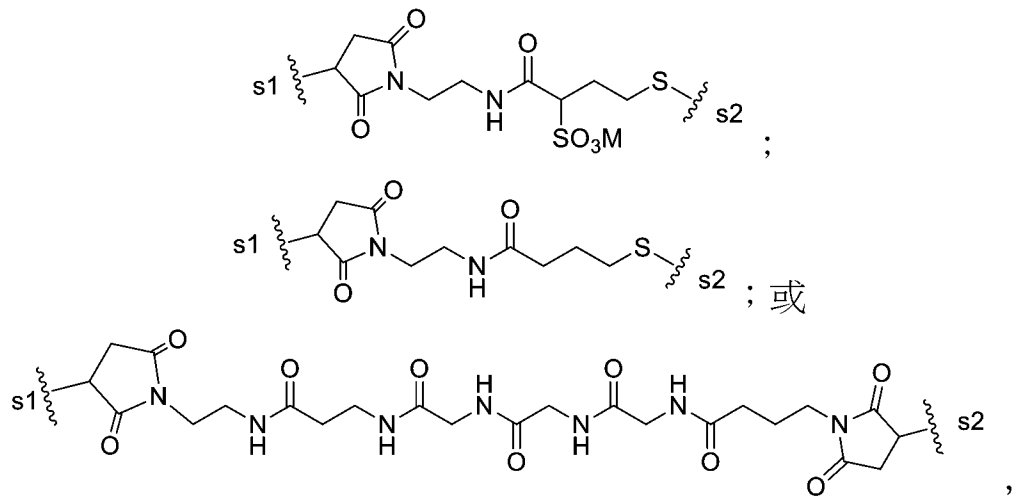
【請求項128】如請求項127之免疫結合物，其中P'為含有2至5個胺基酸殘基

之肽。

【請求項129】如請求項127或128之免疫結合物，其中P'係選自 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Lle-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N<sup>9</sup>-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N<sup>9</sup>-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 57)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 73)、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met及Met-Ala。

【請求項130】如請求項129之免疫結合物，其中P'為ly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

【請求項131】如請求項127之免疫結合物，其中-Lc'-由以下各式表示：



其中M為H<sup>+</sup>或陽離子。

【請求項132】如請求項127至131中任一項之免疫結合物，其中m'為1，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為H。

【請求項133】如請求項127至131中任一項之免疫結合物，其中m'為2，且R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>均為Me。



胞。

【請求項139】一種治療患有癌症之個體的方法，其中該癌症之細胞表現CD123，該方法包括向該個體投與治療有效量之如請求項1至54中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之多肽，或如請求項60至134中任一項之免疫結合物，或如請求項135之醫藥組合物。

【請求項140】如請求項139之方法，其中該癌症為白血病或淋巴瘤。

【請求項141】如請求項139之方法，其中該癌症係選自由以下各項組成之群：急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)及慢性淋巴細胞性白血病(CLL)。

【請求項142】如請求項141之方法，其中該癌症為急性骨髓性白血病(AML)。

【請求項143】如請求項141之方法，其中該癌症為B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)。

【請求項144】一種在個體中治療細胞增殖性病變之方法，其中該細胞增殖性病變之細胞表現CD123，該方法包括以足以治療該細胞增殖性病變之量向該個體投與治療有效量之如請求項1至54中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如請求項55或56之多肽，或如請求項60至134中任一項之免疫結合物，或如請求項135之醫藥組合物。

【請求項145】如請求項144之方法，其中該細胞增殖性病變係選自由以下各項組成之群：急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、B細胞系急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、毛細胞白血病(HCL)、骨髓發育不良症候群、母細胞性漿細胞樣DC贅瘤(BPDCN)白血病、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、套細胞淋巴瘤及霍奇金氏白血病(HL)。





























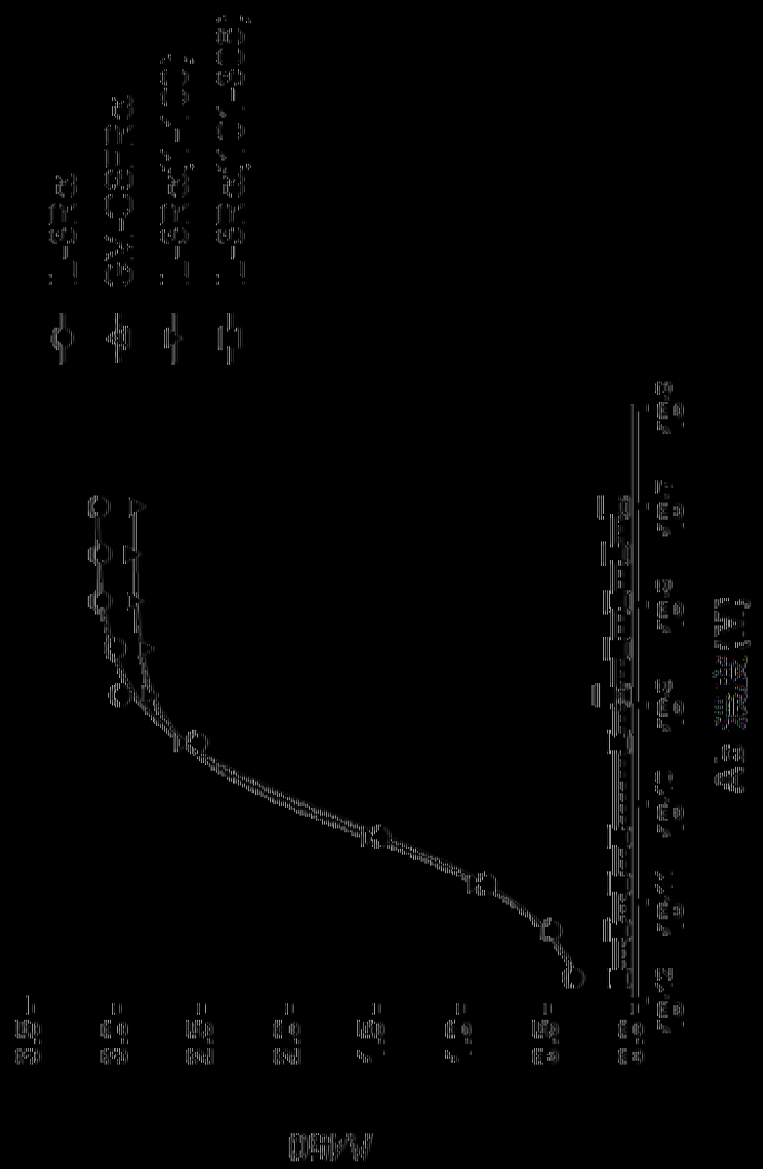








圖 13 例 3 之 Ag 離子濃度



|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Ag <sup>+</sup> 濃度 (M/L) |       |
| 0.001                    | 0.001 |
| 0.002                    | 0.002 |
| 0.003                    | 0.003 |
| 0.004                    | 0.004 |

圖 13





















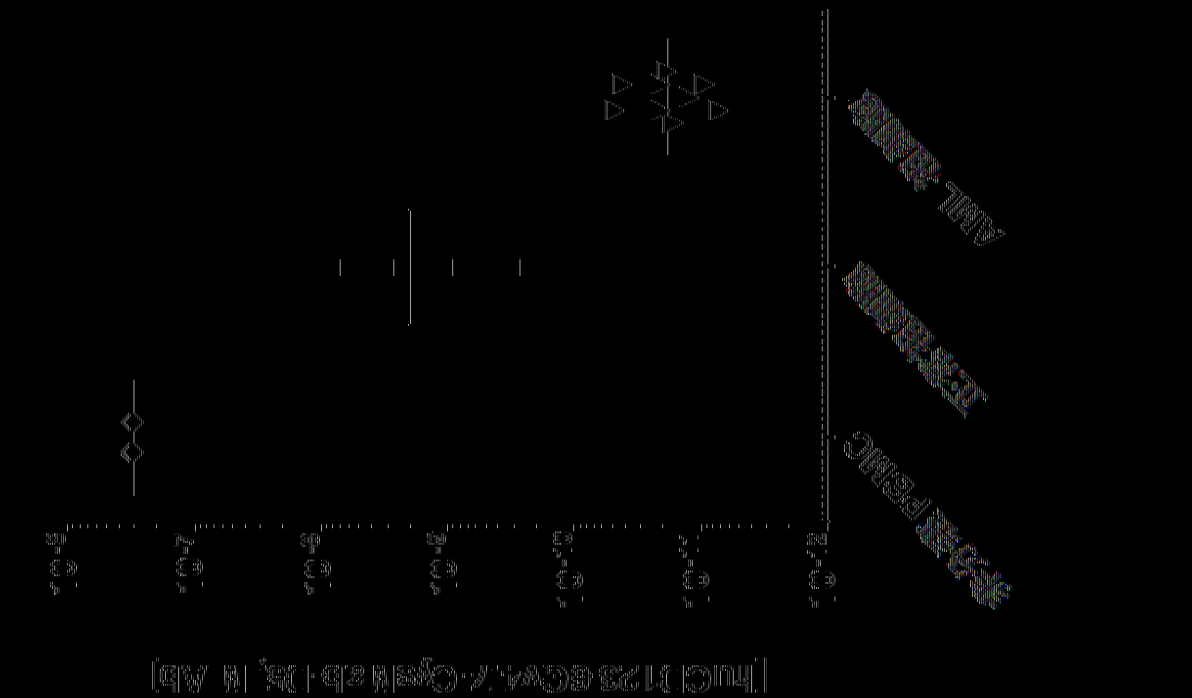
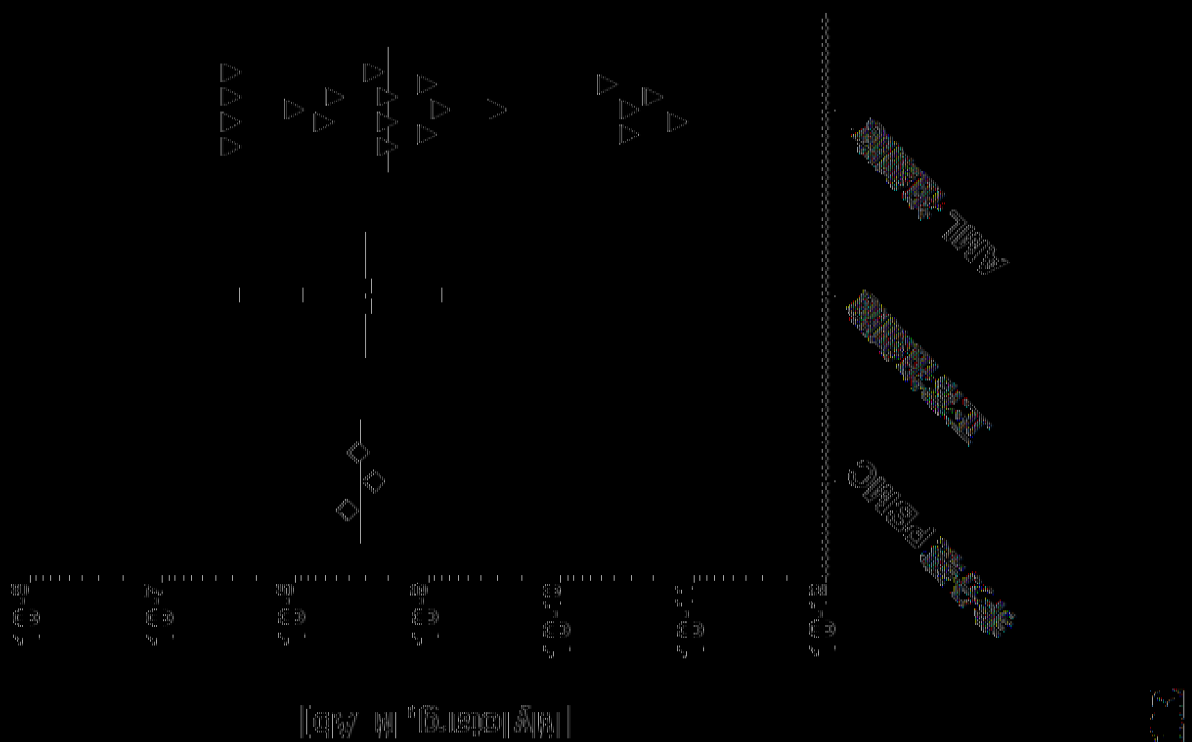




























圖 22 顯示本發明之 A26 實施例之 A26

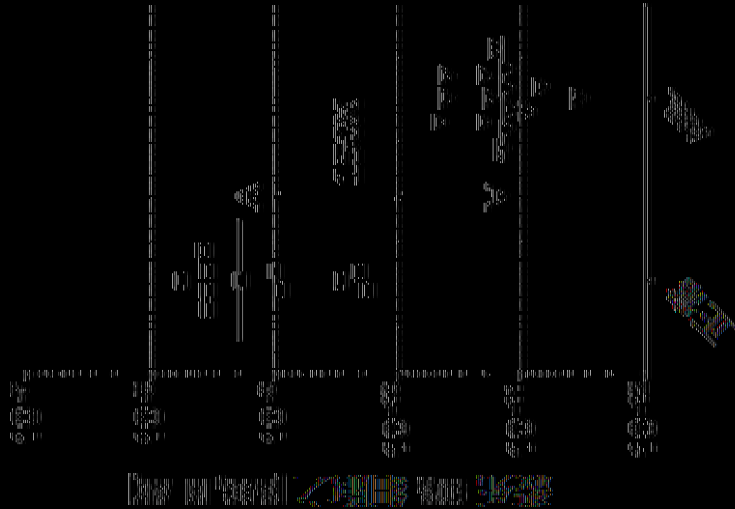


圖 23 顯示本發明之 A27 實施例之 A27

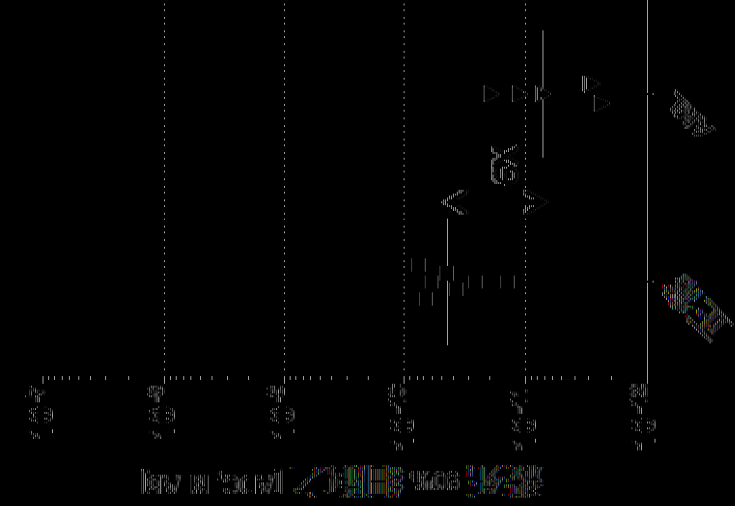


圖 24 顯示本發明之 A28 實施例之 A28

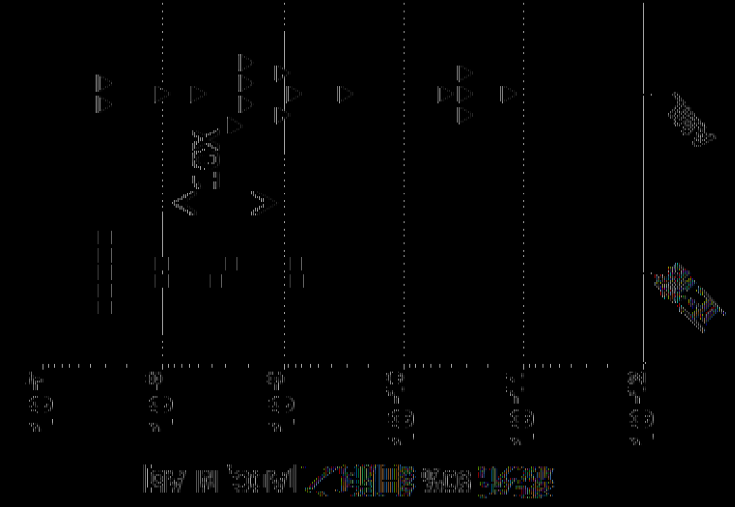
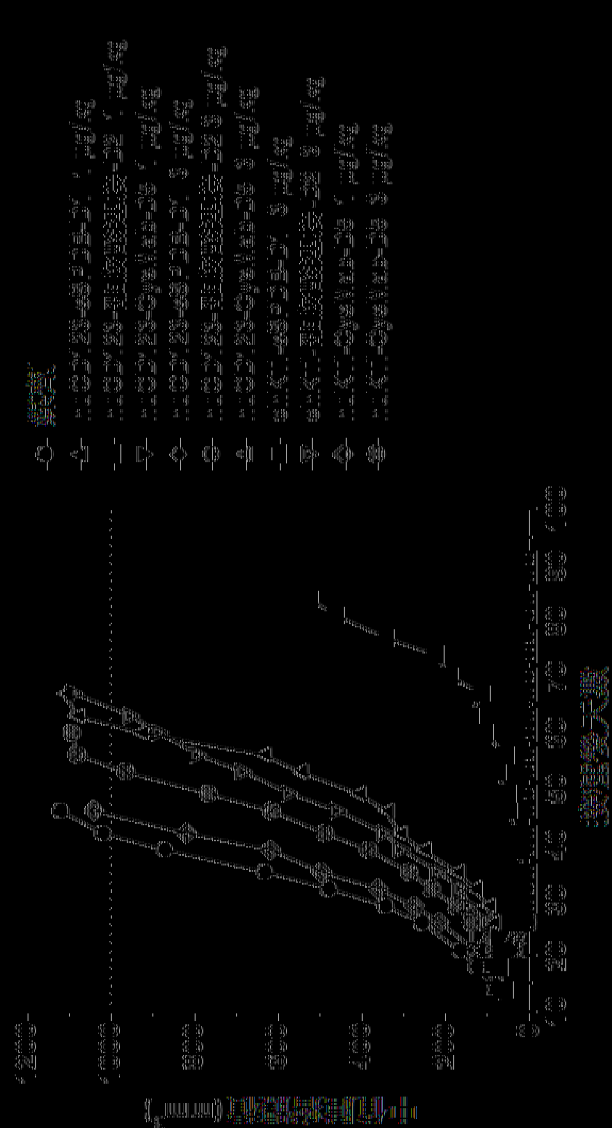


圖 25



|    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |
|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |
| 電圧 | 電流 | 電阻 | 電容 | 電感 | 電導 | 電阻率 | 電容率 | 電感率 | 電導率 |









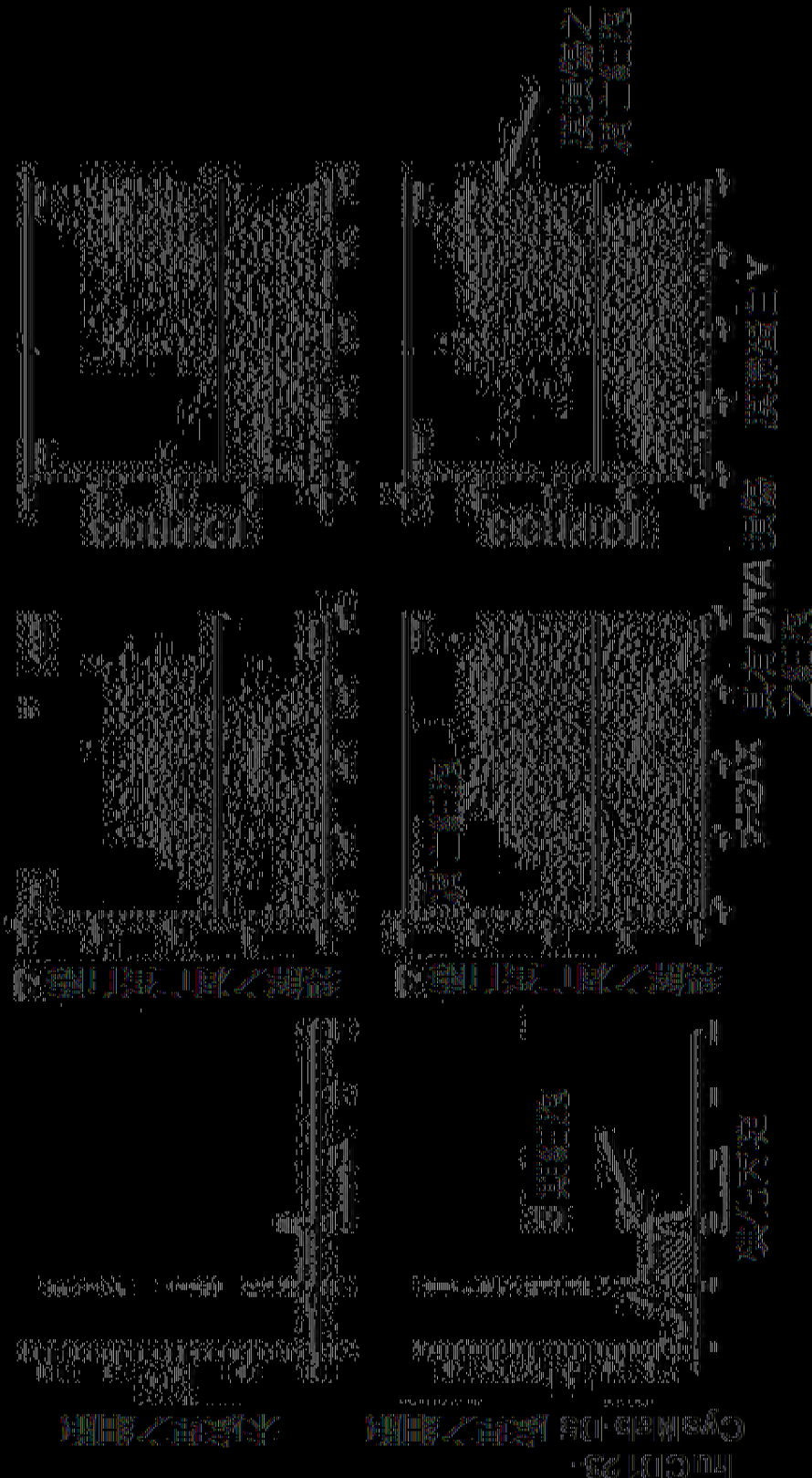


圖 26





















【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種抗體或其抗原結合片段，其：

- (a) 結合人類CD123/IL3-R $\alpha$ 抗原之胺基酸101至346內的抗原決定基，且
- (b) 抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖。

【請求項2】一種抗體或其抗原結合片段，其：

- (a) 結合人類CD123抗原之胺基酸1至100內的抗原決定基，且
- (b) 抑制抗原陽性TF-1細胞中之IL3依賴性增殖，其中IC<sub>50</sub>值為0.1 nM或更小(例如，0.08 nM、0.05 nM、0.03 nM)。

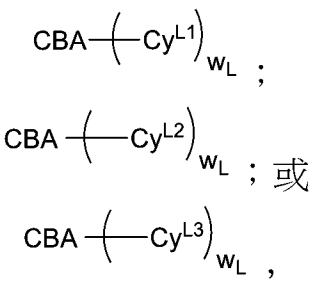
【請求項3】一種包含如請求項1或2之V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列之多肽。

【請求項4】一種產生如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段或如請求項3之多肽的細胞。

【請求項5】一種產生如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段或如請求項3之多肽的方法，該方法包括：

- (a) 培養如請求項4之細胞；及
- (b) 自該培養之細胞分離該抗體、其抗原結合片段或多肽。

【請求項6】一種免疫結合物 (immunoconjugate)，其具有下式：

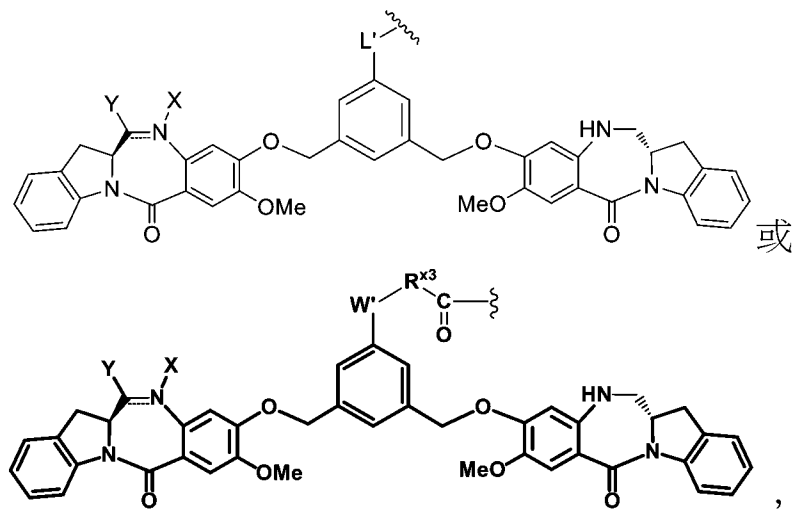


其中：

CBA為如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之其多肽，其係經由離胺酸殘基共價連接於Cy<sup>L1</sup>、Cy<sup>L2</sup>或Cy<sup>L3</sup>；

W<sub>L</sub>為1至20之整數；且

Cy<sup>L1</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x3</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

L'由以下各式表示：

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-C(=O)- (B1')；或

-NR<sub>5</sub>-P-C(=O)-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>m</sub>-S-Z<sup>s1</sup>- (B3')；

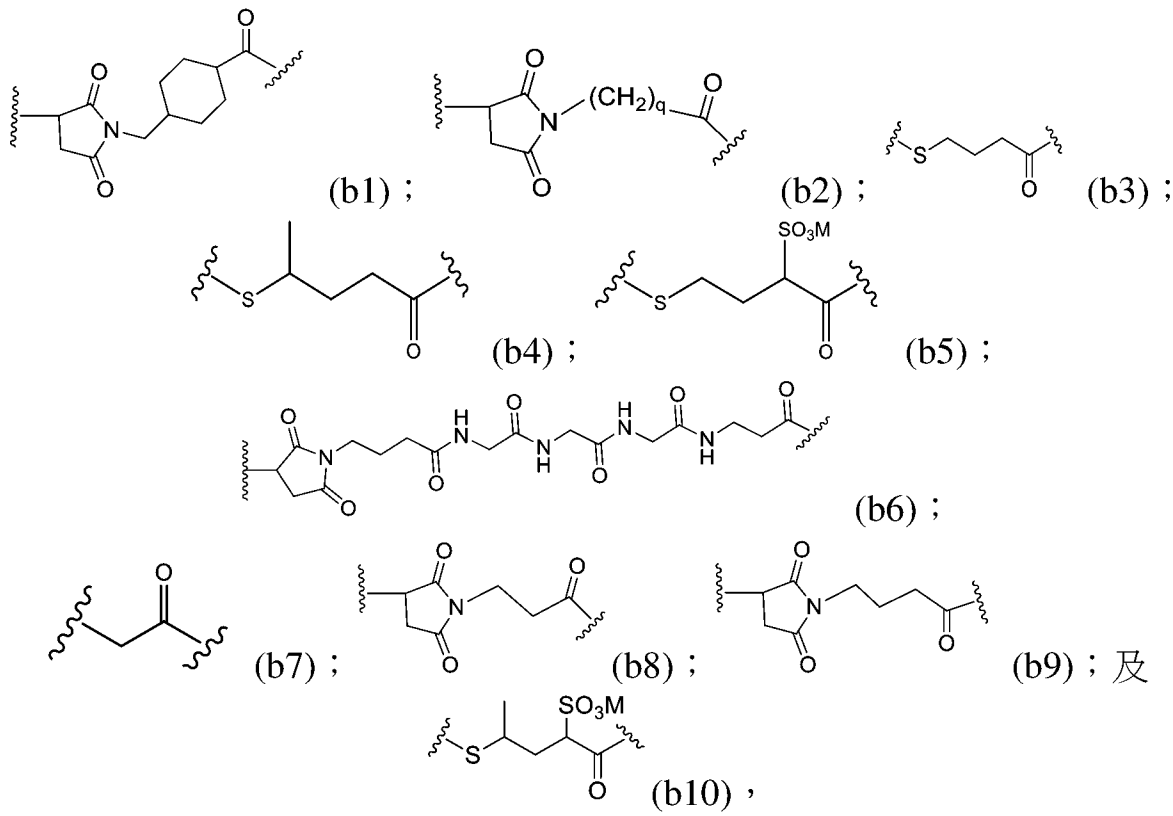
R<sub>5</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時各自獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

m為1至6之整數；且

Z<sup>s1</sup>係選自以下各式中之任一者：

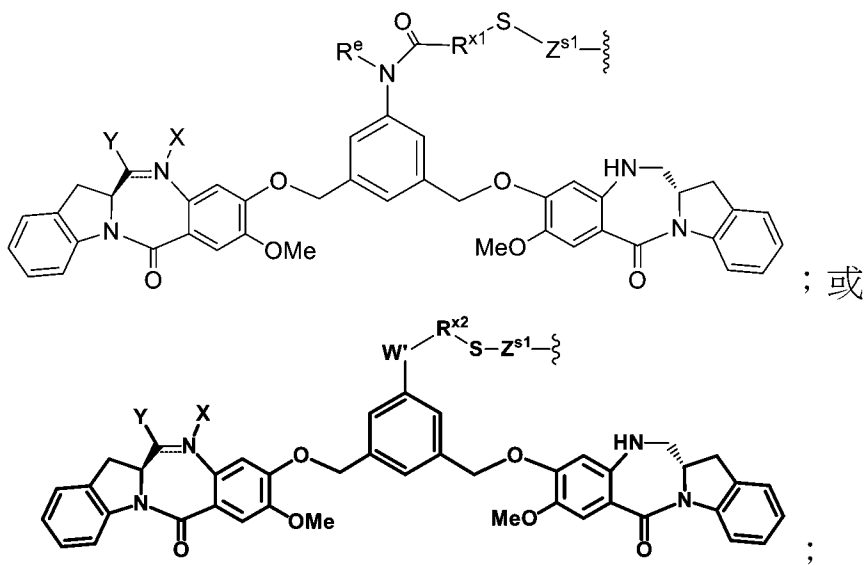


其中：

q為1至5之整數；且

M為H<sup>+</sup>或陽離子；

Cy<sup>L2</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線 == 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

R<sup>x1</sup>及R<sup>x2</sup>獨立地為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>e</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

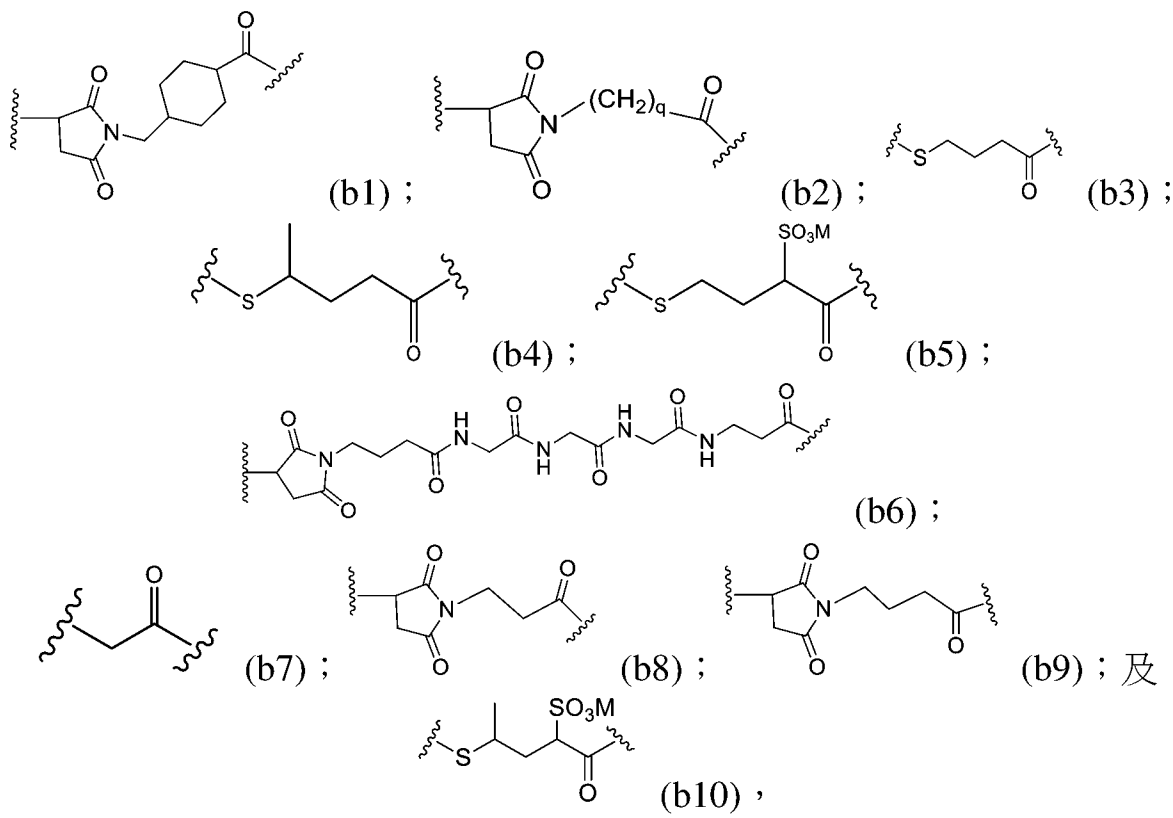
W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

Z<sup>s1</sup>係選自以下各式中之任一者：



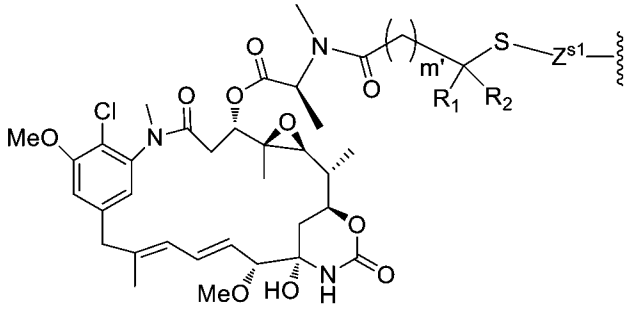
其中：

q為1至5之整數；且

M為-H<sup>+</sup>或陽離子；且



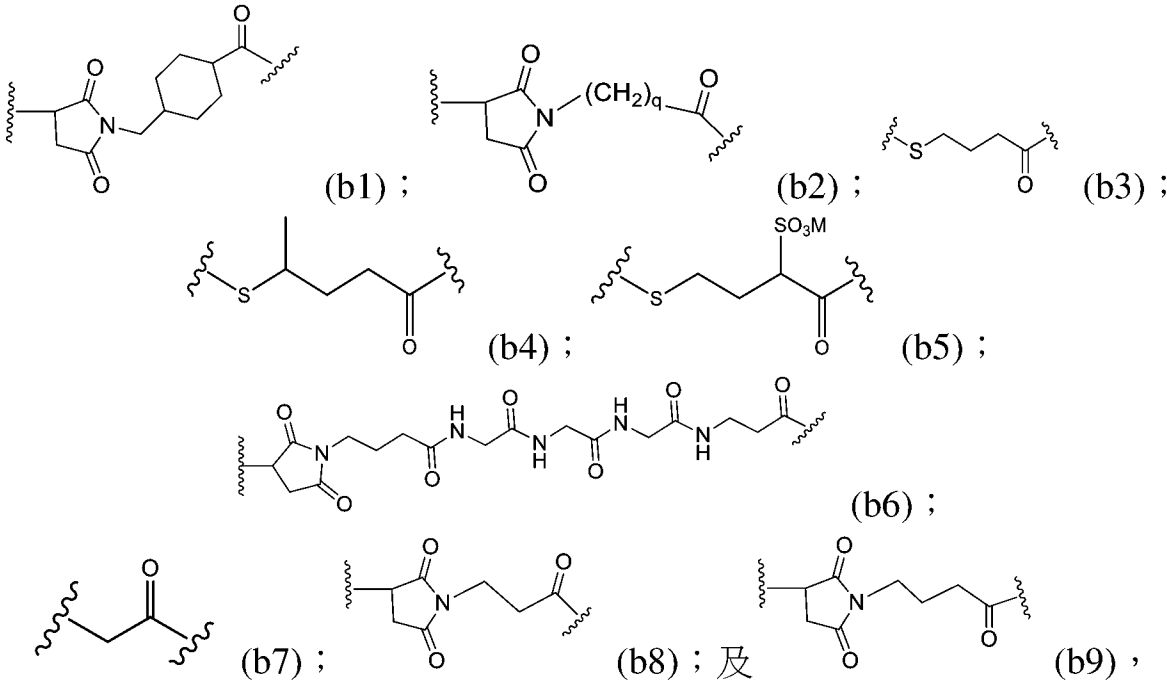
Cy<sup>L3</sup>由下式表示：



m'為1或2；

R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>各自獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

Z<sup>s1</sup>係選自以下各式中之任一者：

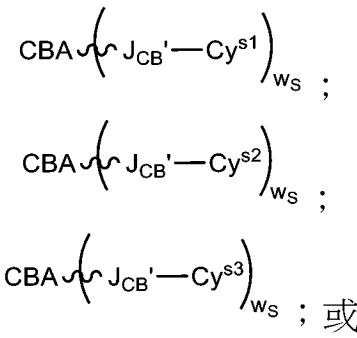


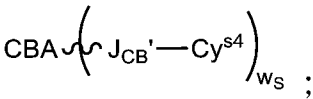
其中：

q為1至5之整數；且

M為H<sup>+</sup>或陽離子。

【請求項7】一種免疫結合物，其具有下式：



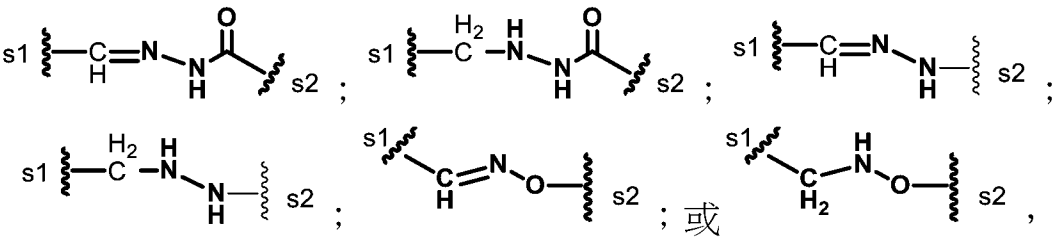


其中：

CBA為如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之其多肽，其共價連接於J<sub>CB'</sub>基團；

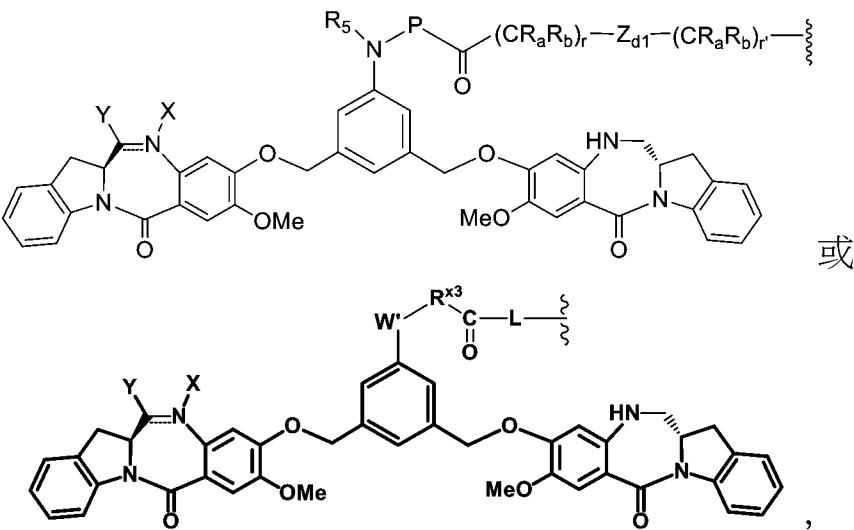
W<sub>s</sub>為1、2、3或4；

J<sub>CB'</sub>為藉由使來源於如請求項1或2之該抗體或其抗原結合片段或如請求項3之其多肽之N末端上之2-羥基乙胺部分之氧化的醛基與Cy<sup>s1</sup>、Cy<sup>s2</sup>、Cy<sup>s3</sup>或Cy<sup>s4</sup>上之醛反應性基團反應而形成的部分，且由以下各式表示：



其中s1為與該CBA共價連接之位點；且s2為與Cy<sup>s1</sup>、Cy<sup>s2</sup>、Cy<sup>s3</sup>或Cy<sup>s4</sup>共價連接之位點；

Cy<sup>s1</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH

或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>5</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

P為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

Z<sub>d1</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

R<sub>9</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

r及r'獨立地為1至6之整數；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

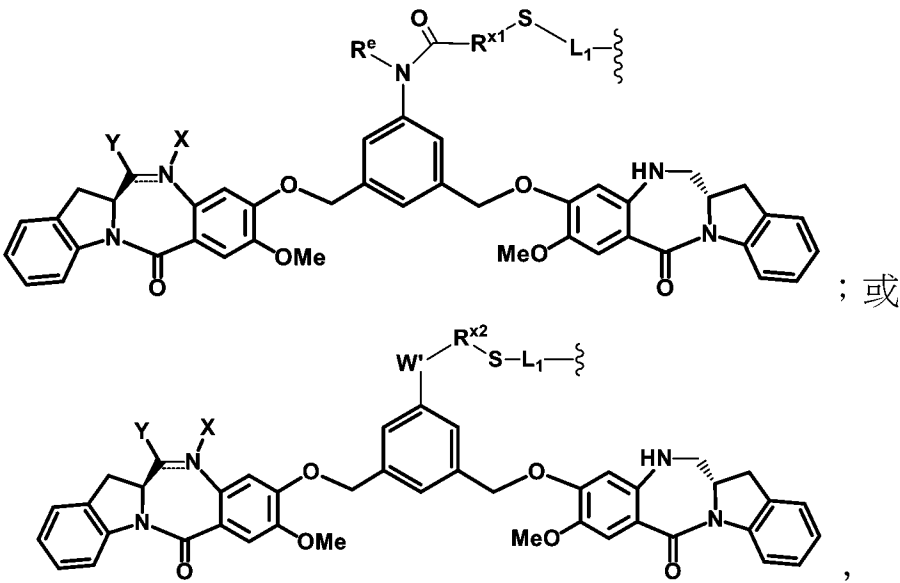
R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x3</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

L為-NR<sub>9</sub>-(CR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)<sub>r</sub>''或不存在；且

r''為0至6之整數；

Cy<sup>s2</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線=表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，且Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M；

M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sup>x1</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

R<sup>e</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

W'為-NR<sup>e'</sup>；

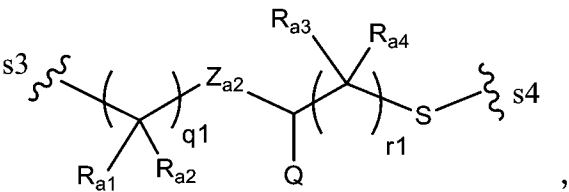
R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x2</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；

L<sub>1</sub>由下式表示：



其中：

s3為與基團J<sub>CB</sub>'共價連接之位點；

s4為與Cy<sup>s2</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

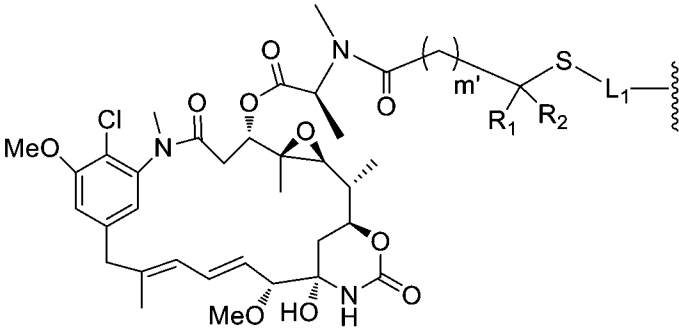
R<sub>9</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

q1及r1各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q1及r1不均為0；

Cy<sup>s3</sup>由下式表示：

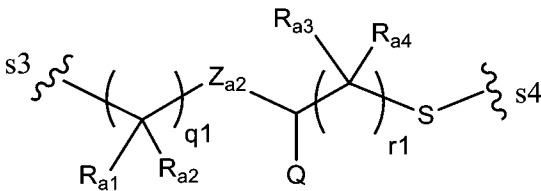


其中：

m'為1或2；

R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>各自獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

L<sub>1</sub>由下式表示：



其中：

s<sub>3</sub>為與基團J<sub>CB</sub>'共價連接之位點；

s<sub>4</sub>為與Cy<sup>s3</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z<sub>a2</sub>為不存在、-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

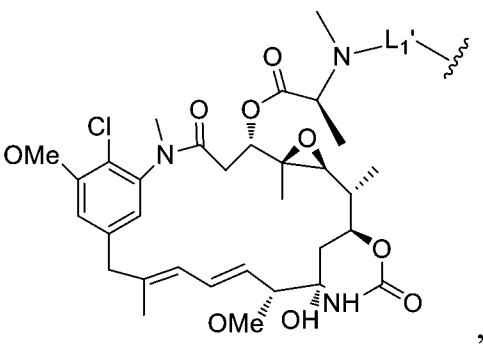
R<sub>9</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

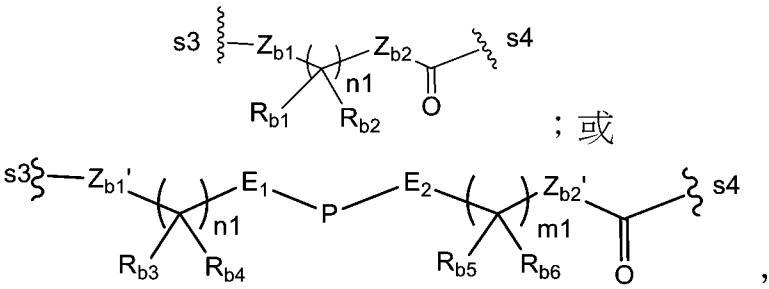
R<sub>a1</sub>、R<sub>a2</sub>、R<sub>a3</sub>、R<sub>a4</sub>在每次出現時獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>各自獨立地為0至10之整數，其限制條件為q<sub>1</sub>及r<sub>1</sub>不均為0；

Cy<sup>s4</sup>由以下各式表示：



L<sub>1</sub>'由以下各式表示：



其中：

s<sub>3</sub>為與基團J<sub>CB</sub>'基團共價連接之位點；

s<sub>4</sub>為與Cy<sup>s4</sup>上之-NMe-基團共價連接之位點；

Z<sub>b1</sub>及Z<sub>b2</sub>均不存在，或Z<sub>b1</sub>及Z<sub>b2</sub>中一者不存在且另一者為-CH<sub>2</sub>-O-或-O-CH<sub>2</sub>-；

Z<sub>b1</sub>'及Z<sub>b2</sub>'各自獨立地為不存在、-CH<sub>2</sub>-O-、-O-CH<sub>2</sub>-、-NR<sub>9</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-或-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NR<sub>9</sub>-；

R<sub>9</sub>為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

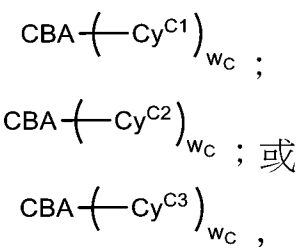
n<sub>1</sub>及m<sub>1</sub>各自獨立地為1至6之整數；

E<sub>1</sub>及E<sub>2</sub>中一者為-C(=O)-且另一者為-NR<sub>9</sub>-；或E<sub>1</sub>及E<sub>2</sub>中一者為-C(=O)-或-NR<sub>9</sub>-且另一者為不存在；

P為胺基酸殘基或含有介於2至20個之間的胺基酸殘基的肽；且

R<sub>b1</sub>、R<sub>b2</sub>、R<sub>b3</sub>、R<sub>b4</sub>、R<sub>b5</sub>及R<sub>b6</sub>在每次出現時各自獨立地為H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基。

【請求項8】一種免疫結合物，其由下式表示：

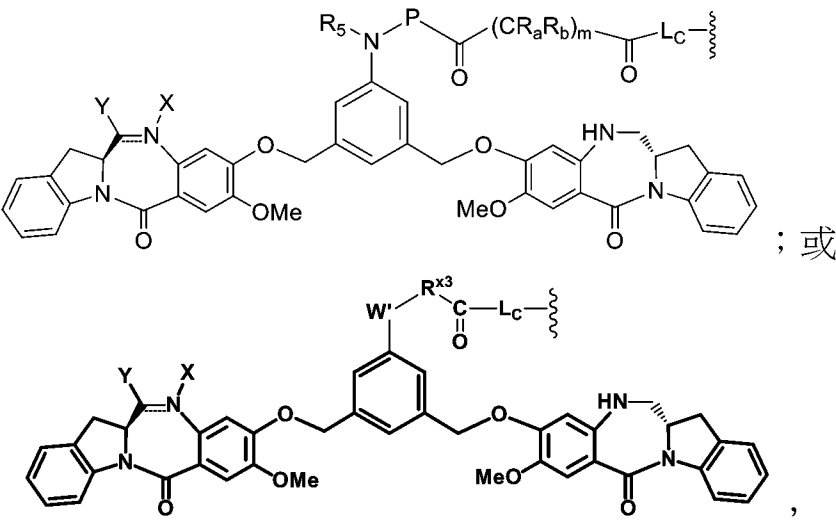


其中：

CBA為如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之其多肽，其係經由半胱胺酸殘基共價連接於Cy<sup>C1</sup>、Cy<sup>C2</sup>或Cy<sup>C3</sup>；

W<sub>C</sub>為1或2；

Cy<sup>C1</sup>由以下各式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

介於N與C之間的雙線==表示單鍵或雙鍵，其限制條件為當其為雙鍵時，X不存在且Y為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基；且當其為單鍵時，X為-H或胺保護部分，Y為-OH或-SO<sub>3</sub>M，且M為H<sup>+</sup>或陽離子；

R<sub>5</sub>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

P為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

R<sub>a</sub>及R<sub>b</sub>在每次出現時獨立地為-H、(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基或帶電取代基或可離子化基團Q；

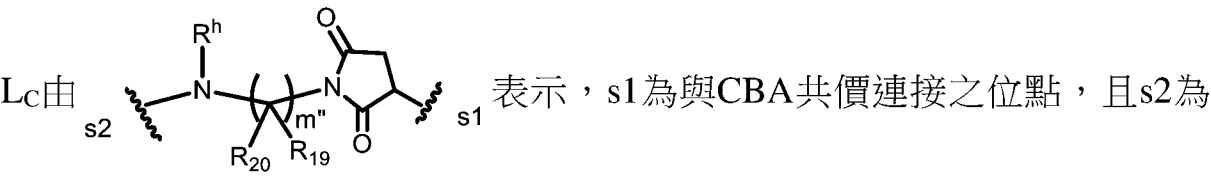
W'為-NR<sup>e'</sup>；

R<sup>e'</sup>為-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>；

n為2至6之整數；

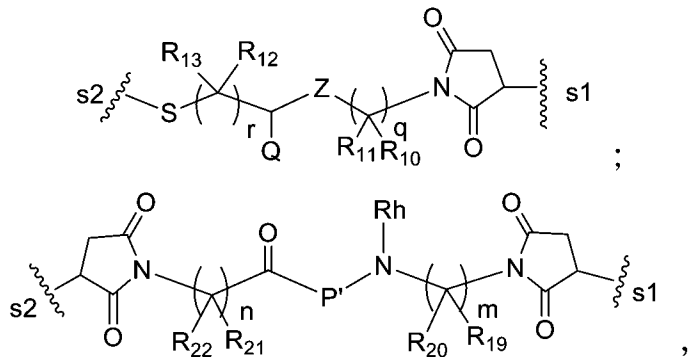
R<sup>k</sup>為-H或-Me；

R<sup>x3</sup>為(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基；且









其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與Cy<sup>C2</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

Q為-H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub>及R<sub>22</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)

烷基；

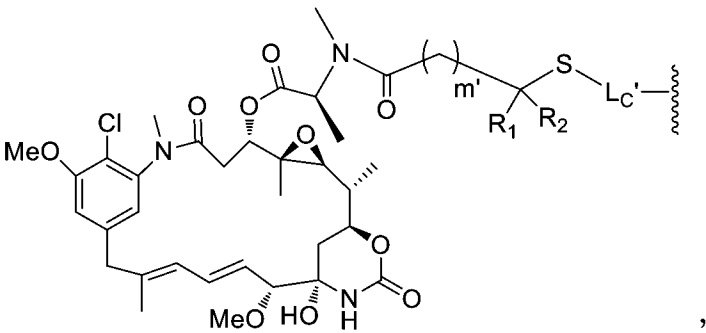
q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

R<sup>h</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽；

Cy<sup>C3</sup>由下式表示：

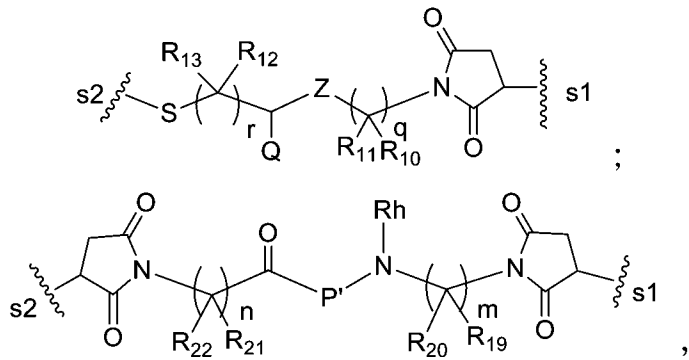


其中：

m'為1或2；

R<sub>1</sub>及R<sub>2</sub>各自獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

Lc'由以下各式表示：



其中：

s1為與該CBA共價連接之位點且s2為與Cy<sup>C3</sup>上之-S-基團共價連接之位點；

Z為-C(=O)-NR<sub>9</sub>-或-NR<sub>9</sub>-C(=O)-；

Q為H、帶電取代基或可離子化基團；

R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>19</sub>、R<sub>20</sub>、R<sub>21</sub>及R<sub>22</sub>在每次出現時獨立地為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；

q及r在每次出現時獨立地為介於0與10之間的整數；

m及n各自獨立地為介於0與10之間的整數；

R<sup>h</sup>為-H或(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)烷基；且

P'為胺基酸殘基或含有2至20個胺基酸殘基之肽。

【請求項9】一種醫藥組合物，其包含如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之多肽、或如請求項6至8中任一項之免疫結合物，及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項10】一種抑制表現CD123之細胞生長的活體外(in vitro)或離體(ex vivo)方法，其包括使該細胞與如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之多肽、或如請求項6至8中任一項之免疫結合物、或如請求項9之醫藥組合物接觸。

【請求項11】如請求項10之方法，其中該細胞為腫瘤細胞。

【請求項12】如請求項11之方法，其中該細胞為白血病細胞或淋巴瘤細胞。

【請求項13】一種如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之多肽、或如請求項6至8中任一項之免疫結合物、或如請求項9之醫藥組合物，其係用於治療患有癌症之個體的方法，其中該癌症之細胞表現CD123。

【請求項14】如請求項13所使用之抗體或其抗原結合片段、或多肽、或免疫結合物或醫藥組合物，其中該癌症為白血病或淋巴瘤。

【請求項15】如請求項13所使用之抗體或其抗原結合片段、或多肽、或免疫結合物或醫藥組合物，其中該癌症係選自由以下各項組成之群：急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)及慢性淋巴細胞性白血病(CLL)。

【請求項16】如請求項15所使用之抗體或其抗原結合片段、或多肽、或免疫結合物或醫藥組合物，其中該癌症為急性骨髓性白血病(AML)。

【請求項17】如請求項15所使用之抗體或其抗原結合片段、或多肽、或免疫結合物或醫藥組合物，其中該癌症為B細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)。

【請求項18】一種如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段、或如請求項3之多肽、或如請求項6至8中任一項之免疫結合物、或如請求項9之醫藥組合物，其係用於在個體中治療細胞增殖性病征的方法，其中該細胞增殖性病征之細胞表現CD123。

【請求項19】如請求項18所使用之抗體或其抗原結合片段、或多肽、或免疫結合物或醫藥組合物，其中該細胞增殖性病征係選自由以下各項組成之群：急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、B細胞系急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、毛細胞白血病(HCL)、骨髓發育不良症候群(myelodysplastic syndrome)、母細胞性漿細胞樣DC贅瘤(basic plasmacytoid DC neoplasm, BPDCN)白血病、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、套細胞淋巴瘤及霍奇金氏白血病(HL)。

【請求項20】如請求項19所使用之抗體或其抗原結合片段、或多肽、或免

疫結合物或醫藥組合物，其中該細胞增殖性病症是母細胞性漿細胞樣DC贅瘤(BPDCN)白血病。