



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I872065 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：109114175

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 28 日

(51)Int. Cl. : *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
C12N15/13 (2006.01) *C12N15/63 (2006.01)*
A61K47/22 (2006.01) *A61K47/20 (2006.01)*
A61K47/16 (2006.01) *A61K47/08 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/04/29 美國 62/840,297
 2019/07/29 美國 62/879,864

(71)申請人：美商免疫遺傳股份有限公司 (美國) IMMUNOGEN, INC. (US)
 美國

(72)發明人：艾伯 歐格 AB, OLGA (RU)；寇立 尼拉 KOHLI, NEERAJ (US)；奇滕登 湯瑪士 CHITTENDEN, THOMAS (US)；塞蒂亞迪 朱利安托 SETIADY, JULIANTO (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 201838657A

US 2013/0295119A1

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：59 項 圖式數：19 共 301 頁

(54)名稱

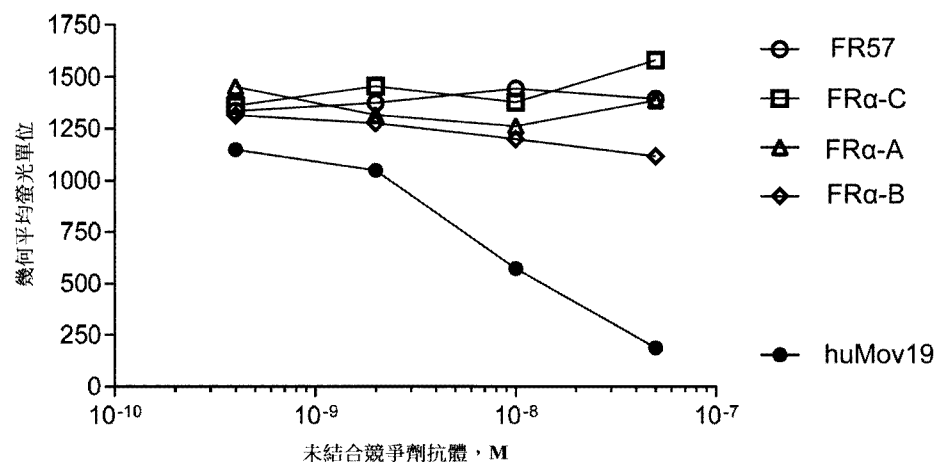
雙互補位 F R- α 抗體及免疫結合物

(57)摘要

本揭示案提供包含結合於葉酸鹽受體 α (FR α) 之多肽的雙互補位抗體，包含該等雙互補位抗體之組合物。在一特定態樣中，該等雙互補位抗體結合於 FR α 且調節 FR α 活性。本揭示案亦提供藉由投與特異性地結合於 FR α 且調節 FR α 活性之雙互補位抗體來治療諸如癌症之病症的方法。

The present disclosure provides biparatopic antibodies comprising polypeptides that bind to folate receptor alpha (FR α) compositions comprising such biparatopic antibodies. In a specific aspect, the biparatopic antibodies bind to FR α and modulate FR α activity. The present disclosure also provides methods for treating disorders, such as cancer, by administering a biparatopic antibody that specifically binds to FR α and modulates FR α activity.

指定代表圖：



【圖 1】



I872065

公告本

【發明摘要】

【中文發明名稱】

雙互補位 F R - α 抗體及免疫結合物

【英文發明名稱】

BIPARATOPIC FR-ALPHA ANTIBODIES AND
IMMUNOCONJUGATES

【中文】

本揭示案提供包含結合於葉酸鹽受體 α (FR α) 之多肽的雙互補位抗體，包含該等雙互補位抗體之組合物。在一特定態樣中，該等雙互補位抗體結合於 FR α 且調節 FR α 活性。本揭示案亦提供藉由投與特異性地結合於 FR α 且調節 FR α 活性之雙互補位抗體來治療諸如癌症之病症的方法。

【英文】

The present disclosure provides biparatopic antibodies comprising polypeptides that bind to folate receptor alpha (FR α) compositions comprising such biparatopic antibodies. In a specific aspect, the biparatopic antibodies bind to FR α and modulate FR α activity. The present disclosure also provides methods for treating disorders, such as cancer, by administering a biparatopic antibody that specifically binds to FR α and modulates FR α activity.

【指定代表圖】第(1)圖。

【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】

雙互補位 F R - α 抗體及免疫結合物

【英文發明名稱】

BIPARATOPIC FR-ALPHA ANTIBODIES AND
IMMUNOCONJUGATES

【技術領域】

【0001】本揭示案之領域一般而言係關於結合於人類葉酸鹽受體 1 (FR α)之雙互補位抗體及免疫結合物。

【先前技術】

【0002】癌症係發達國家死亡之主要原因之一，僅在美國，每年就有超過一百萬人經診斷患有癌症及 500,000 例死亡。總之，據估計超過三分之一的人將在其生命期間發展某一形式之癌症。

【0003】由結合於與腫瘤相關抗原結合之抗體之高度細胞毒性劑組成的抗體-藥物結合物(ADC)代表一種增強腫瘤靶向抗體之效能之有希望的治療策略。ADC提供組合抗體之有利藥物動力學、生物分佈及腫瘤靶向特性與由連接之小分子或有效載荷提供的有效細胞殺死機制之潛力。

【0004】葉酸鹽受體 - α (FR α 或FOLR1)係糖基磷脂醯肌醇連接之細胞表面醣蛋白，其對葉酸鹽具有高親和力。

其在正常及癌組織中之生理學作用尚未得到充分闡明。大多數正常組織不表現 $FR\alpha$ ，且大多數細胞中生理葉酸鹽之轉運被認為由數種其他蛋白質、尤其經還原葉酸鹽載體介導。高水準之 $FR\alpha$ 已發現於漿液性及子宮內膜樣上皮卵巢癌、子宮內膜腺癌以及腺癌亞型之非小細胞肺癌中。重要的是， $FR\alpha$ 表現在卵巢癌患者之轉移性病灶及復發性癌中經維持，且在上皮卵巢及子宮內膜癌中在化學療法之後經維持。此等特性連同正常組織上 $FR\alpha$ 之高度受限表現使得 $FR\alpha$ 成為諸如 ADC 之靶向療法之高度有希望的標靶。

【 0005 】 米維妥昔單抗索拉文辛 (Mirvetuximab soravtansine，IMGN853) 係包含結合於有效微管蛋白作用性類美登素 DM4 之 $FR\alpha$ 靶向抗體的葉酸鹽靶向 ADC，其最近在臨床中在展現中等及高 $FR\alpha$ 水準之鉑抗性卵巢癌患者中經評估。FORWARD I 3 期試驗 2:1 隨機化 366 名患者以接受米維妥昔單抗索拉文辛或醫師選擇之單一劑化學療法 (聚乙二醇化脂質體多柔比星 (doxorubicin)、拓撲替康 (topotecan) 或每週一次紫杉醇 (paclitaxel))。雖然該試驗未達到其改良無進展存活 (PFS) 之主要終點 (在總群體中，風險比 (HR)= 0.98， $p=0.897$)，但預規定之高 $FR\alpha$ 子群體 (218/366) 使用 IMGN853 治療顯示 24% 之總體反應率，相比之下，標準照護化學療法之總體反應率為 10%。另外，在預規定之高 $FR\alpha$ 子群體中，與化學療法相比接受 IMGN853 之患者的 PFS 較長 (HR=0.69， p 值=0.049)，且與化學療法相比接受 IMGN853 之患者的總體存活較長 (HR=0.62， p 值

=0.033)。雖然此等結果對於表現高水準之FR α 之患者為振奮人心的，但該等結果亦證明了IMGN853在改良更廣泛患者群體之無進展存活方面的侷限性。

【0006】因此，仍需要鑑別可達成甚至更有效治療及更高ADC遞送之額外葉酸鹽靶向ADC。

【發明內容】

【0007】本文提供一種特異性地結合人類葉酸鹽受體1 (FR α)之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含(a)第一FR α 結合域，其包含第一可變重鏈(VH)及第一可變輕鏈(VL)且結合於FR α 之第一抗原決定基；及(b)第二FR α 結合域，其包含第二VH及第二VL且結合於FR α 之第二抗原決定基。

【0008】在一些實施例中，該第一FR α 結合域特異性地結合於與包含選自由SEQ ID NO:24、25及26組成之群的VH胺基酸序列及選自由SEQ ID NO:19、20及21組成之群的VL胺基酸序列之抗體相同之FR α 抗原決定基。在一些實施例中，該第一FR α 結合域特異性地結合於與包含選自由SEQ ID NO:24、57及26組成之群的VH胺基酸序列及選自由SEQ ID NO:19、20及21組成之群的VL胺基酸序列之抗體相同之FR α 抗原決定基。在一些實施例中，該第一FR α 結合域競爭性地抑制結合於與包含選自由SEQ ID NO:24、25及26組成之群的VH胺基酸序列及選自由SEQ ID NO:19、20及21組成之群的VL胺基酸序列之抗體相同之

FR α 抗原決定基。在一些實施例中，該第一FR α 結合域競爭性地抑制結合於與包含選自由SEQ ID NO:24、57及26組成之群的VH胺基酸序列及選自由SEQ ID NO:19、20及21組成之群的VL胺基酸序列之抗體相同之FR α 抗原決定基。在一些實施例中，該第二FR α 結合域特異性地結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:22或23及VL胺基酸序列SEQ ID NO:17或18之抗體相同之FR α 抗原決定基。在一些實施例中，該第二FR α 結合域競爭性地抑制結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:22或23及VL胺基酸序列SEQ ID NO:17或18之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0009】在一些實施例中，該第一VH包含VH CDR1-3，其分別包含胺基酸序列(a) SEQ ID NO: 10-12或(b) SEQ ID NO: 15、16及12，且該第一VL包含VL CDR1-3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4-6。在一些實施例中，該第一VH包含選自由SEQ ID NO:24、25及26組成之群的胺基酸序列，及/或該第一VL包含選自由SEQ ID NO:19、20及21組成之群的胺基酸序列。在一些實施例中，該第一FR α 結合域競爭性地抑制結合於與包含選自由SEQ ID NO:24、57及26組成之群的VH胺基酸序列及選自由SEQ ID NO:19、20及21組成之群的VL胺基酸序列之抗體相同之FR α 抗原決定基。在一些實施例中，該第二VH包含VH CDR1-3，其分別包含胺基酸序列(a) SEQ ID NO: 7-9或(b) SEQ ID NO: 13、14及9，且該第二VL包含VL CDR1-3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 1-3。在一些實施例中，

該第二 VH 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:22 或 23，及 / 或該第二 VL 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17 或 18。

【0010】在一些實施例中，該第一 VH 及 VL 對及 / 或該第二 VH 及 VL 對為鼠科動物、非人類、人類化、嵌合、表面重塑或人類的。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段結合於人類 FR α ，而非 FOLR2 或 FOLR3。在一些實施例中，該第一 FR α 結合域為單鏈可變片段 (scFv)。在一些實施例中，該第一 FR α 結合域之 scFv 具有 VH-連接體-VL 之肽取向。在一些實施例中，該第一 FR α 結合域之 scFv 具有 VL-連接體-VH 之肽取向。在一些實施例中，該第二 FR α 結合域為單鏈可變片段 (scFv)。在一些實施例中，該第二 FR α 結合域之 scFv 具有 VH-連接體-VL 之肽取向。在一些實施例中，該第二 FR α 結合域之 scFv 具有 VL-連接體-VH 之肽取向。在一些實施例中，該連接體為甘胺酸-絲胺酸連接體。

【0011】在一些實施例中，該第二 FR α 結合域包含選自 SEQ ID NO: 27-29 之胺基酸序列。在一些實施例中，該第一 FR α 結合域包含選自 SEQ ID NO: 30-32 之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所揭示之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含胺基酸序列 (i) SEQ ID NO:33 及 34，(ii) SEQ ID NO: 35 及 36，(iii) SEQ ID NO: 37 及 38，或 (iv) SEQ ID NO: 39 及 40。

【0012】在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 41-43。

【0013】在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含胺基酸序列 SEQ ID NO: 44-46。

【0014】在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段為四價雙互補位抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段為二價雙互補位抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含選自由串聯 scFv、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體及杵臼結構組成之群之 FR α 結合域。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段具有杵臼 (KIH) 結構。

【0015】在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR α 結合域，其中包含 SEQ ID NO: 1-3 及 7-9 之 FR α 結合域係在該 KIH 結構之杵側上。在一些實施例中，包含 SEQ ID NO: 1-3 及 7-9 之 FR α 結合域係在該 KIH 結構之臼側上。在一些實施例中，包含 SEQ ID NO: 4-6 及 10-12 之 FR α 結合域係在該 KIH 結構之杵側上。在一些實施例中，包含 SEQ ID NO: 4-6 及 10-12 之 FR α 結合域係在該 KIH 結構之臼側上。

【0016】在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含全長抗體。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含第一 FR α 結合域，其中該第一 FR α 結合域為全長抗體。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含第二 FR α 結合域，其中該第二 FR α 結合域為全長抗體。在一些實施例中，該雙互補位抗

體或其抗原結合片段包含抗原結合片段。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含第一FR α 結合域，其中該第一FR α 結合域為抗原結合片段。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含第二FR α 結合域，其中該第二FR α 結合域為抗原結合片段。在一些實施例中，該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41-43。

【0017】在一些實施例中，本文提供編碼本文所揭示之雙互補位抗體或其抗原結合片段之經分離核酸分子的組合。

【0018】在一些實施例中，本文提供一種經分離載體，其包含本文所揭示之核酸分子之一。

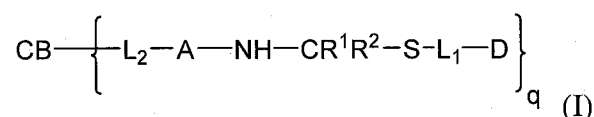
【0019】在一些實施例中，本文提供一種宿主細胞，其包含如本文所揭示之經分離核酸分子的組合或如本文所揭示之經分離載體。在一些實施例中，該宿主細胞係選自由組織培養物中之大腸桿菌 (*E. coli*)、假單胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢桿菌 (*Bacillus*)、鏈黴菌 (*Streptomyces*)、酵母、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10細胞、植物細胞、昆蟲細胞及人類細胞組成之群。

【0020】在一些實施例中，本文提供一種醫藥組合物，其包含如本文所揭示之雙互補位抗體或抗原、如本文所揭示之核酸分子的組合、如本文所揭示之載體或如本文

所揭示之宿主細胞及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。在一些實施例中，如本文所提供之醫藥組合物包含如本文所揭示之雙互補位抗體及醫藥學載劑或賦形劑。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個抗體或其抗原結合片段平均 1 至 10 個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個抗體或其抗原結合片段平均 2 至 5 個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個抗體或其抗原結合片段平均 3 至 4 個藥物。

【0021】在一些實施例中，本文提供一種製備如本文所揭示之雙互補位抗體之方法，其包含 (a) 培養表現該抗體之細胞；及 (b) 自經培養細胞分離該抗體。在一些實施例中，該經培養細胞為真核細胞。

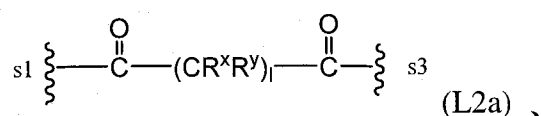
【0022】在一些實施例中，本文提供一種免疫結合物，其由下式表示：

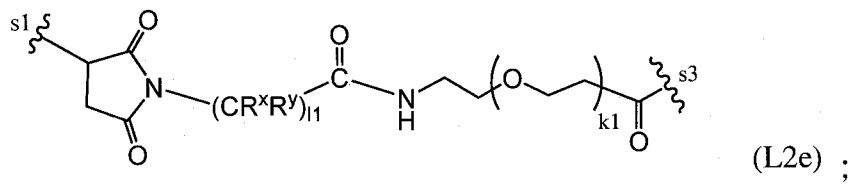
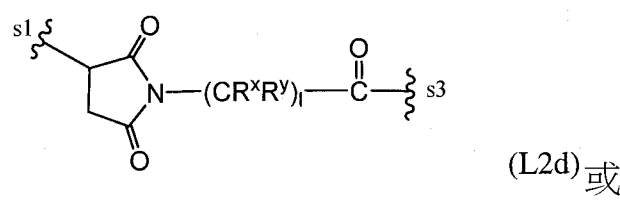
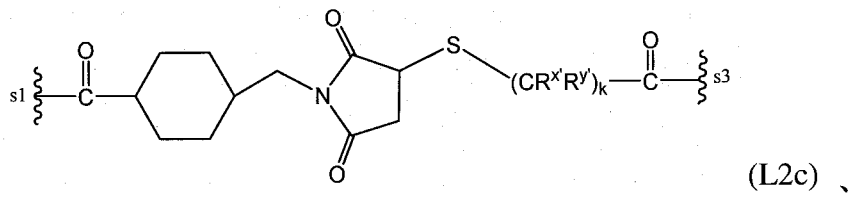
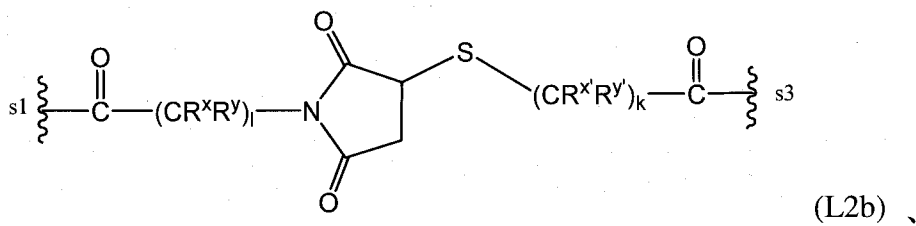


或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CB 係本文所提供之任何雙互補位抗體或其抗原結合片段；

L_2 係由下式之一表示：





其中：

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 及 $R^{y'}$ 在每次出現時獨立地為H、-OH、鹵素、-O-(C₁₋₄烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺或視情況經-OH、鹵素、SO₃H或NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代之C₁₋₄烷基，其中R₄₀、R₄₁及R₄₂各自獨立地為H或C₁₋₄烷基；

l及k各自獨立地為整數1至10；

l1為整數2至5；

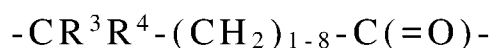
k1為整數1至5；且

s1指示連接至細胞結合劑CB之位點且s3指示連接至A基團之位點；

A為胺基酸殘基或包含2至20個胺基酸殘基之肽；

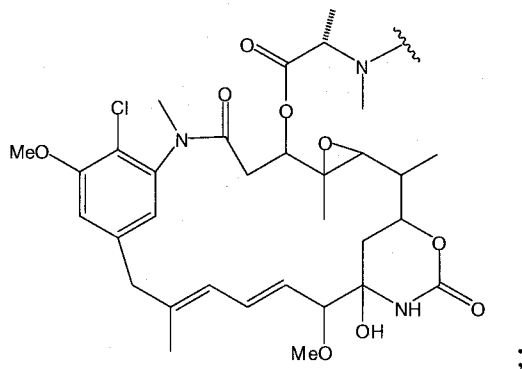
R¹及R²各自獨立地為H或C₁₋₃烷基；

L_1 係由下式表示：



其中 R^3 及 R^4 各自獨立地為 H 或 Me，且 L_1 中之 $-\text{C}(=\text{O})-$ 部分連接至 D；

D係由下式表示：



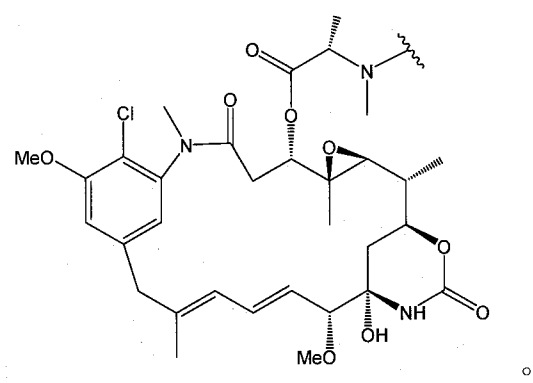
q 為整數 1 至 20。在一些實施例中， q 為整數 1 至 10。在一些實施例中， q 為整數 2 至 5。在一些實施例中， q 為整數 3 至 4。

【0023】 在一些實施例中，該免疫結合物之 R^x 、 R^y 、 $\text{R}^{x'}$ 及 $\text{R}^{y'}$ 均為 H；且 l 及 k 各自獨立地為整數 2 至 6。在一些實施例中，該免疫結合物之 A 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽。

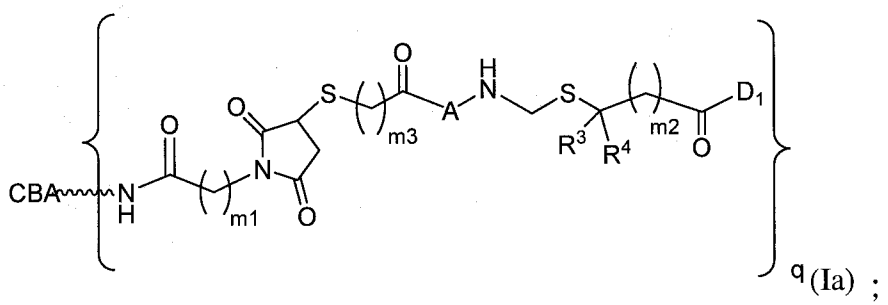
【0024】 在一些實施例中，該免疫結合物之 A 係選自由 Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲 苯 磺 醯 基 -Arg、Phe- N^9 -硝 基 -Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-

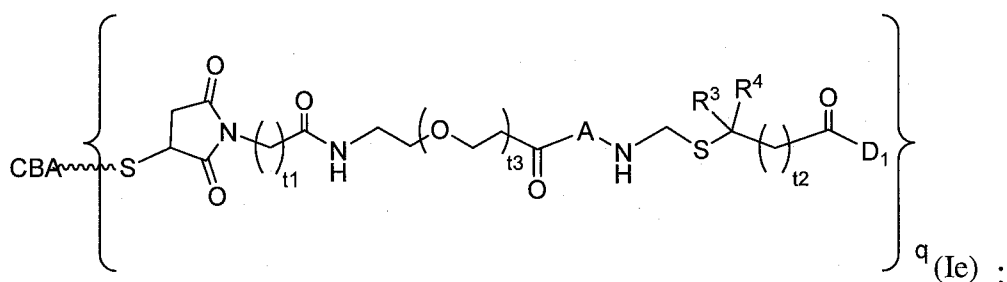
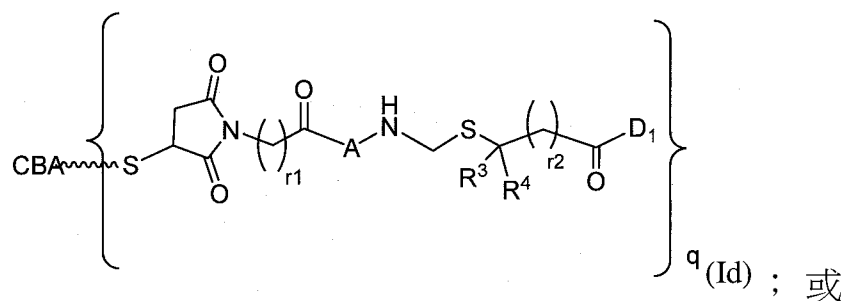
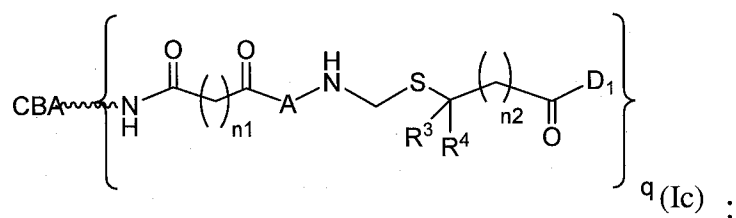
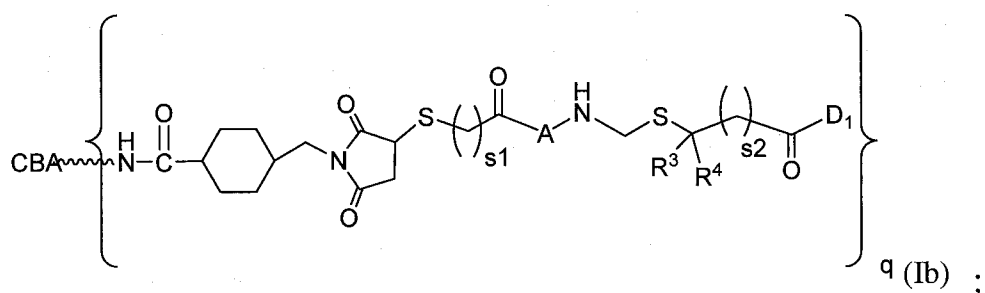
Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:54)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:56)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro及D-Ala-tBu-Gly組成之群，其中各肽中之第一胺基酸連接至L₂基團且各肽中之最後一個胺基酸連接至-NH-CR¹R²-S-L₁-D。在一些實施例中，該免疫結合物之R¹及R²均為H。在一些實施例中，該免疫結合物之L₁為-(CH₂)₄₋₆-C(=O)-。

【0025】 在一些實施例中，該免疫結合物之D係由下式表示：



【0026】 在一些實施例中，該免疫結合物係由下式表示：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$\text{CBA} \sim \text{NH}$ —係經由 Lys 胺基連接至 L_2 基團的本文所提供之任何雙互補位抗體或其抗原結合片段；

$\text{CBA} \sim \text{S}$ —係經由 Cys 硫醇基連接至 L_2 基團的本文所提供之任何雙互補位抗體或其抗原結合片段；

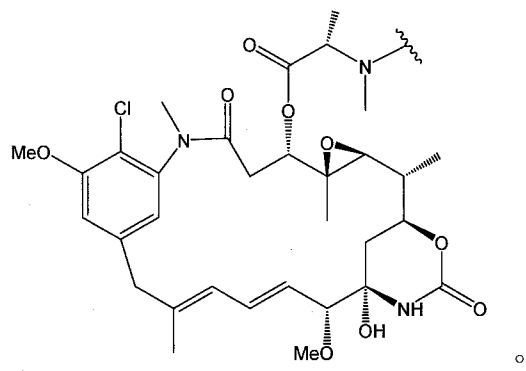
R^3 及 R^4 各自獨立地為 H 或 Me；

$m1$ 、 $m3$ 、 $n1$ 、 $r1$ 、 $s1$ 及 $t1$ 各自獨立地為整數 1 至 6；

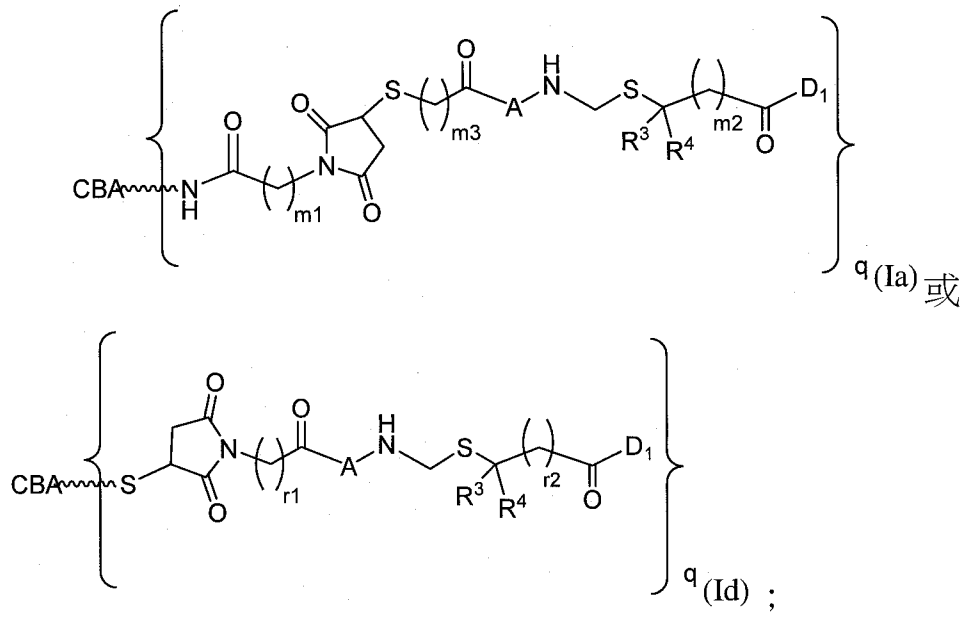
$m2$ 、 $n2$ 、 $r2$ 、 $s2$ 及 $t2$ 各自獨立地為整數 1 至 7；

$t3$ 為整數 1 至 12；

D₁係由下式表示：



【0027】 在一些實施例中，該免疫結合物係由下式表示：

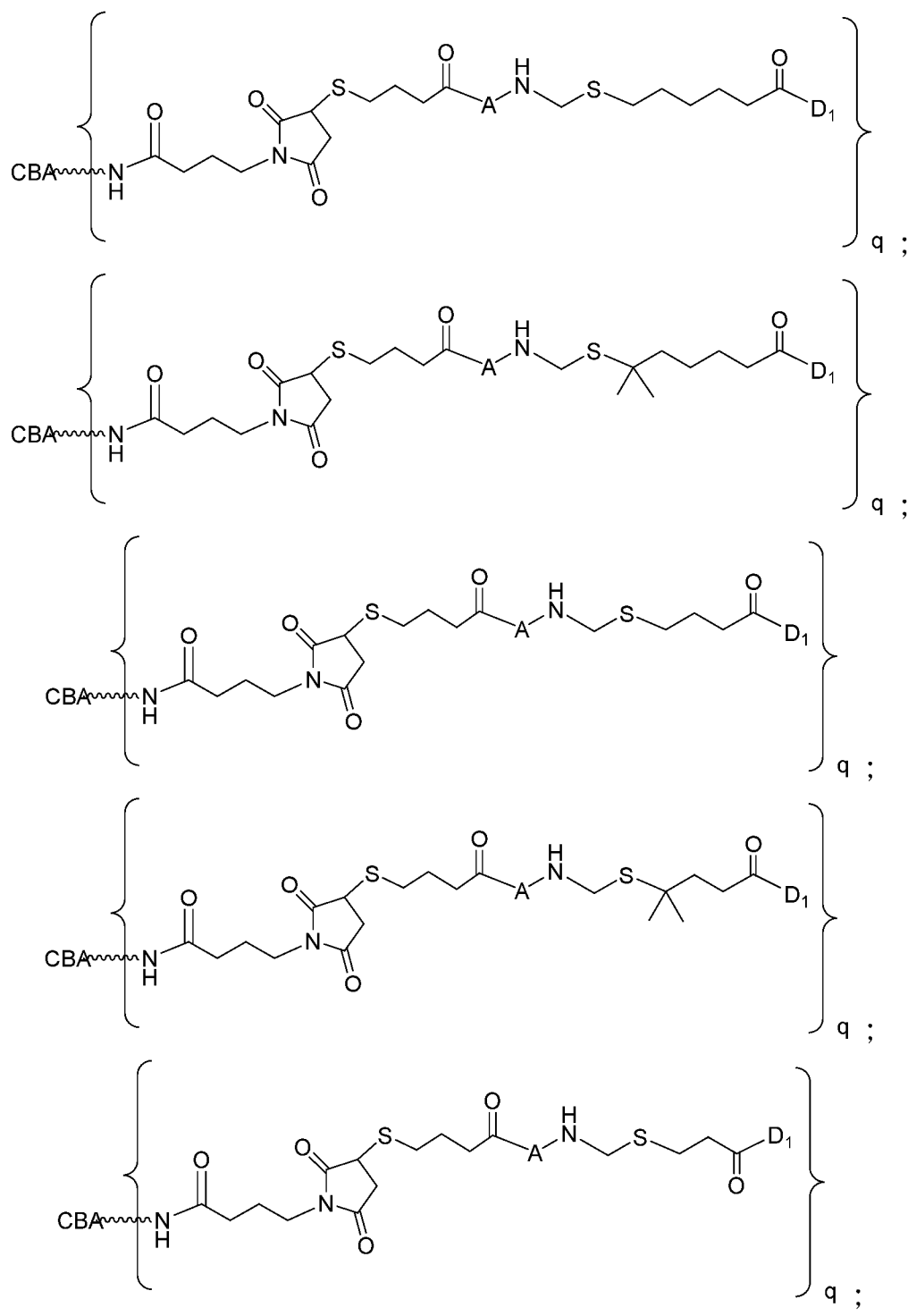


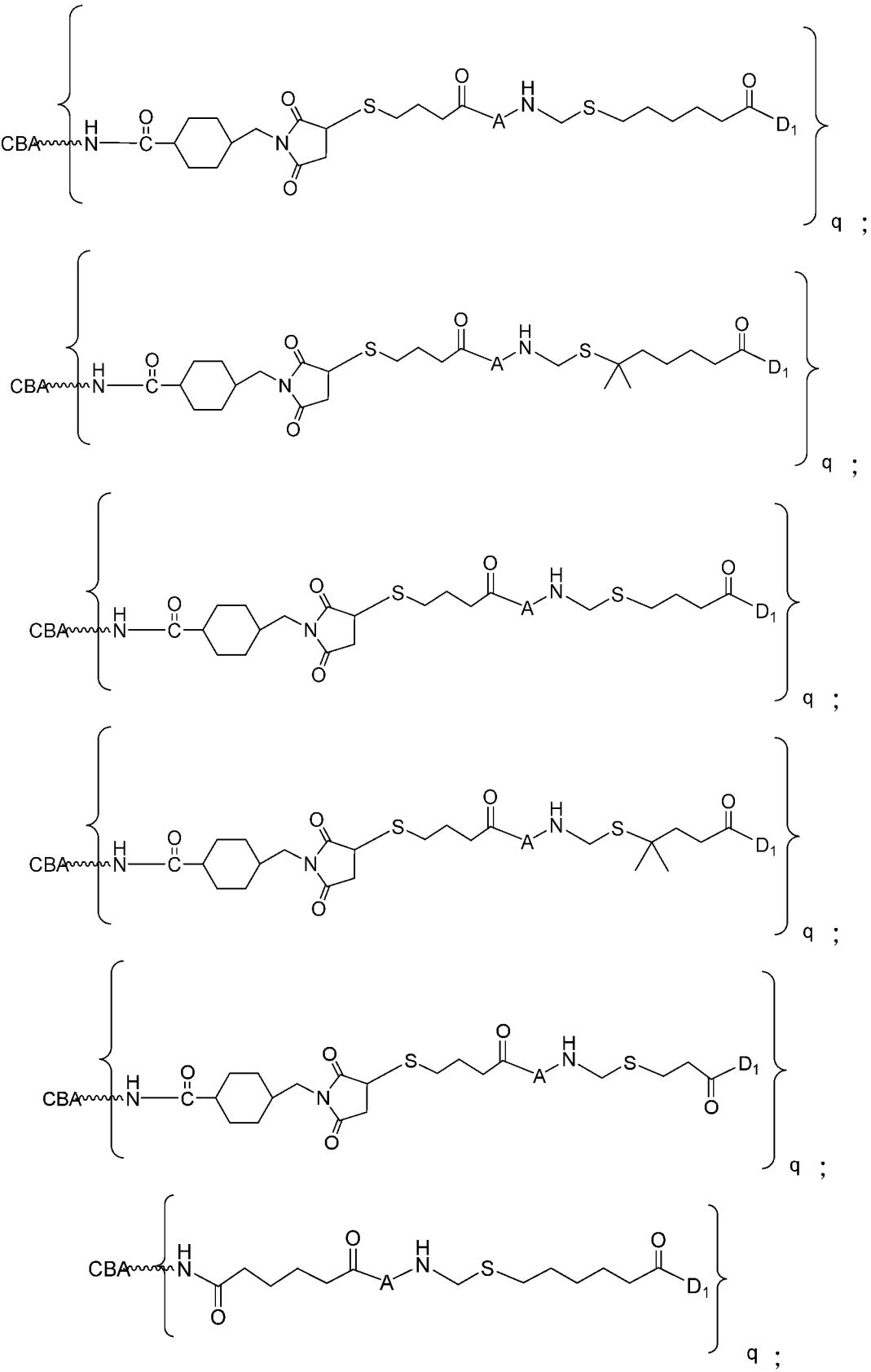
其中：

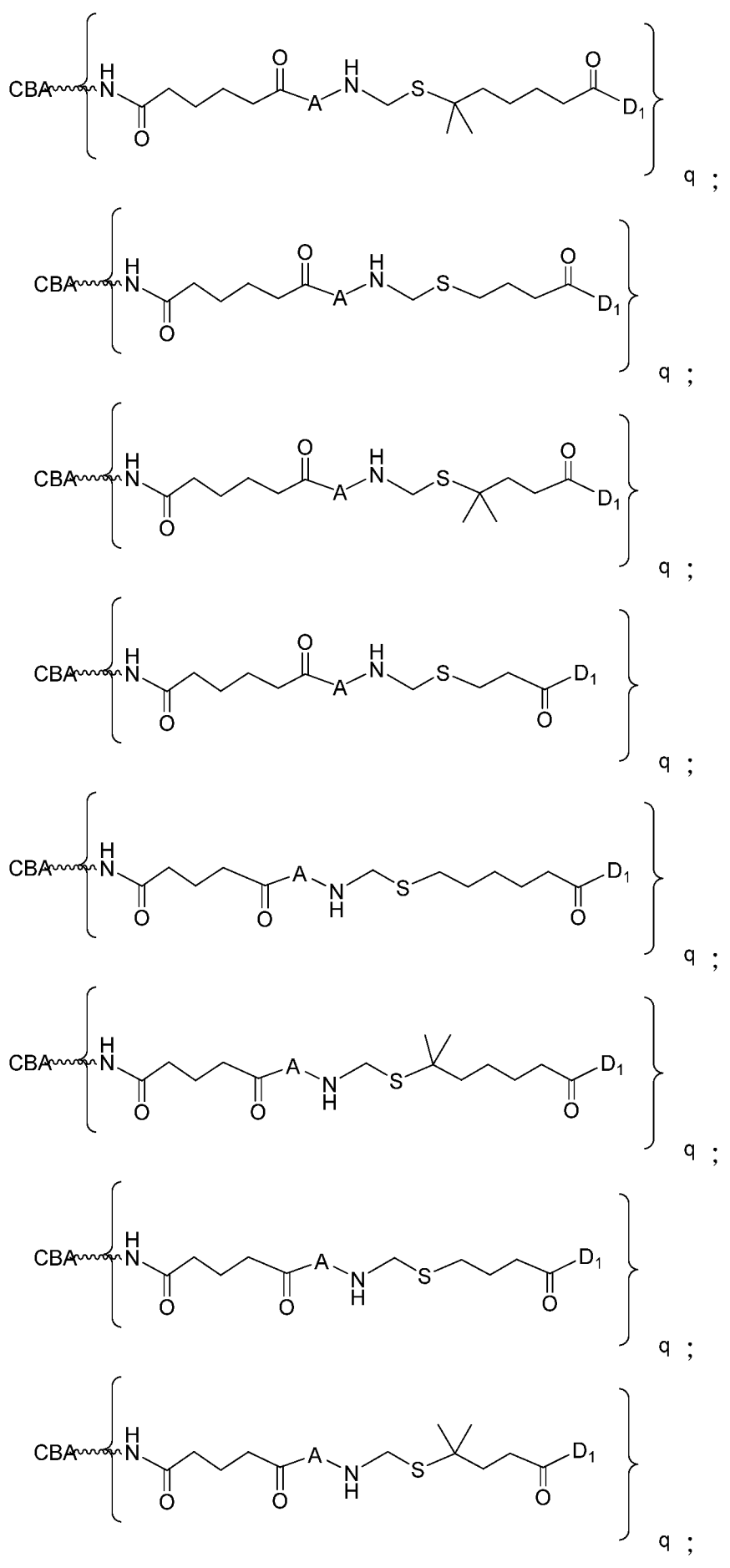
- m₁及 m₃各自獨立地為整數2至4；
- m₂為整數2至5；
- r₁為整數2至6；且
- r₂為整數2至5。

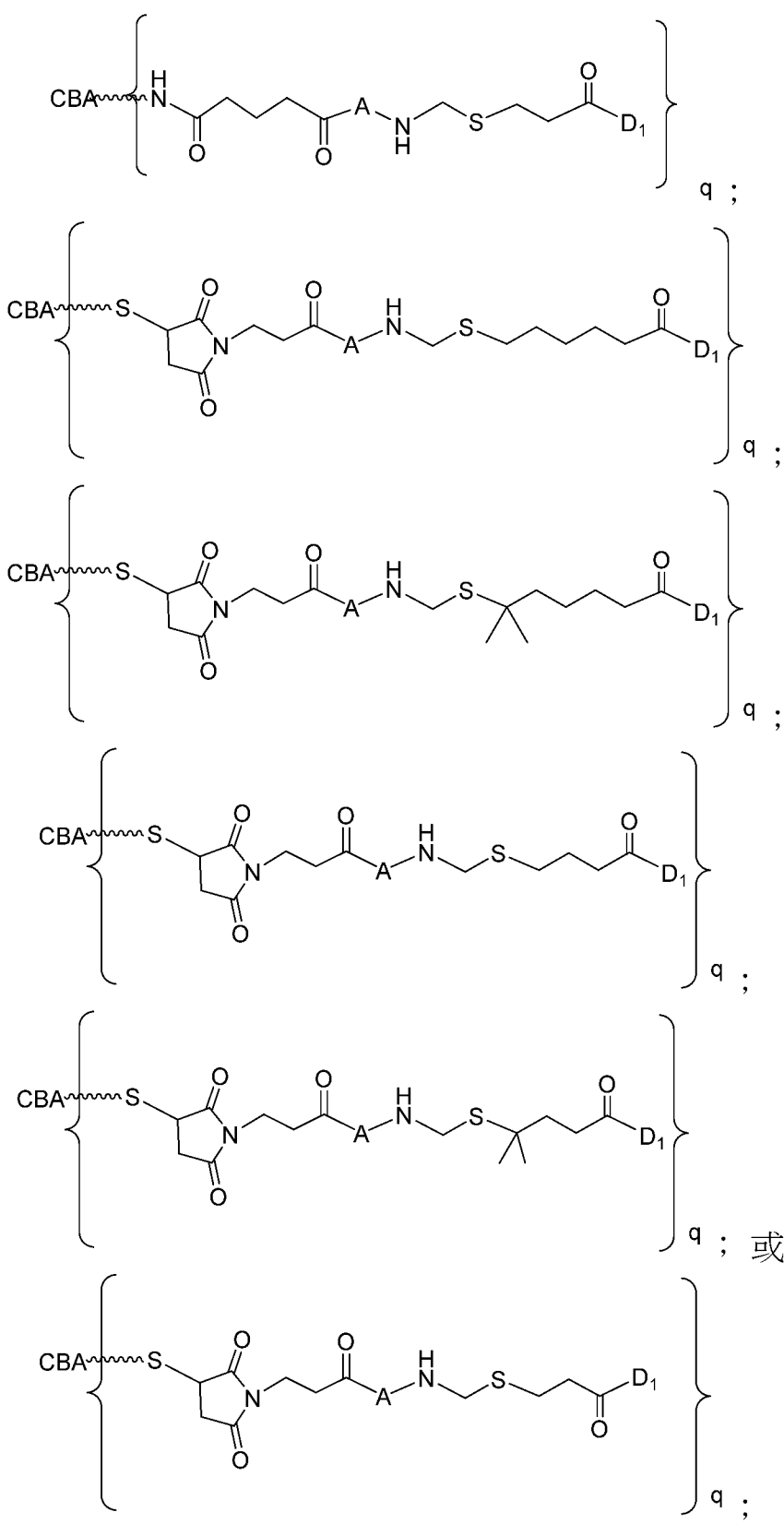
【0028】 在一些實施例中，該免疫結合物之A為Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。

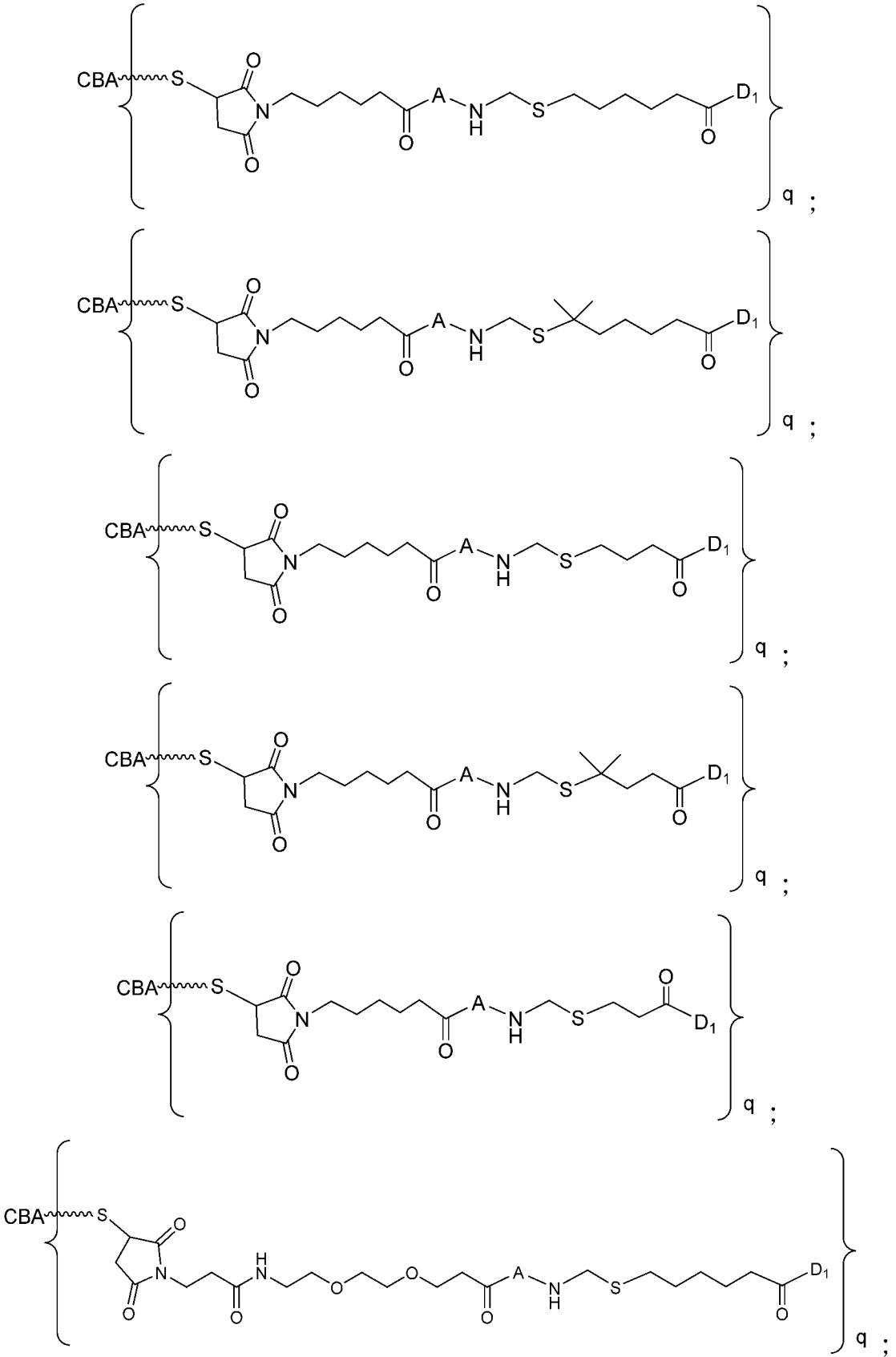
【0029】 在一些實施例中，該免疫結合物係由下式表示：

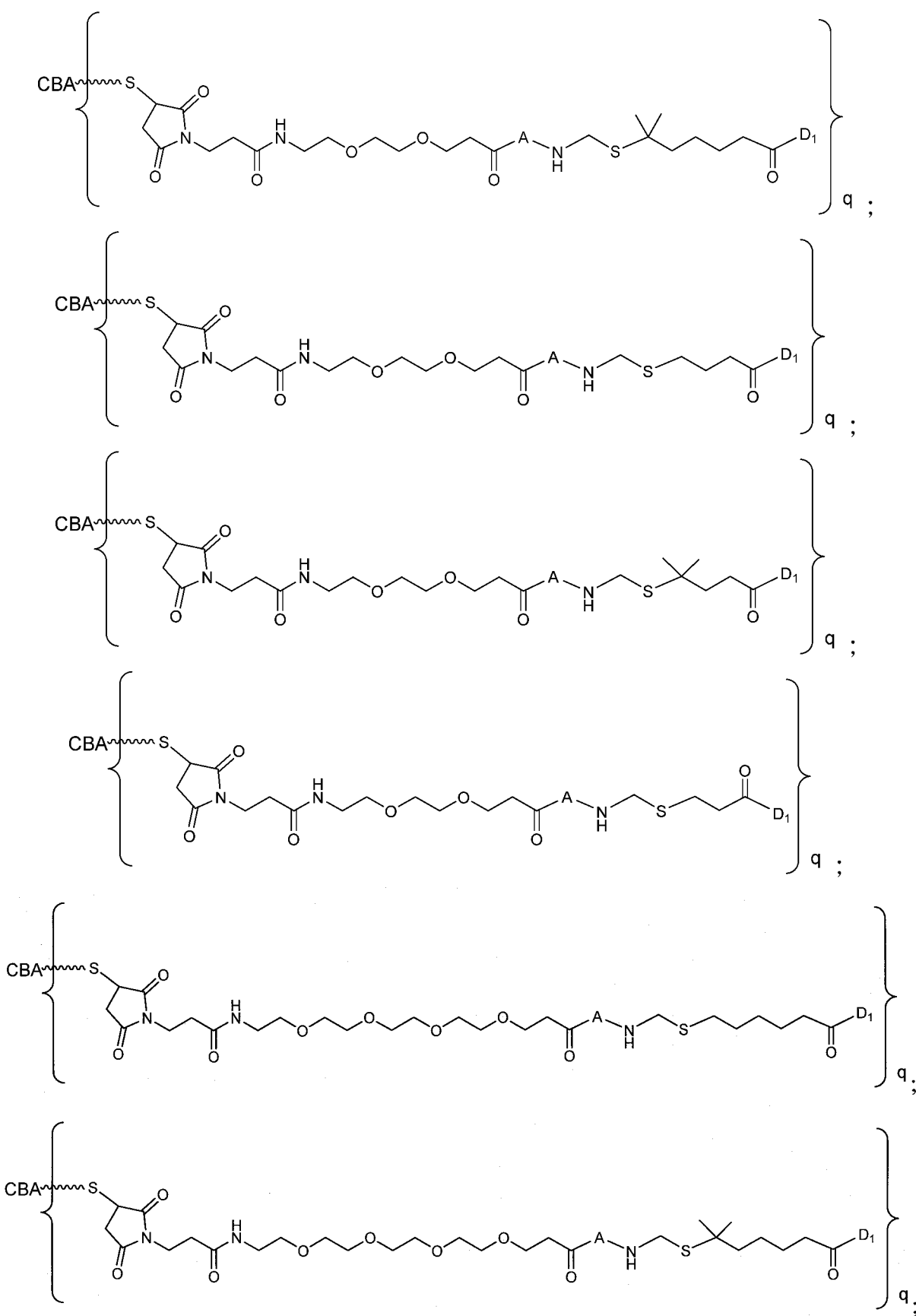


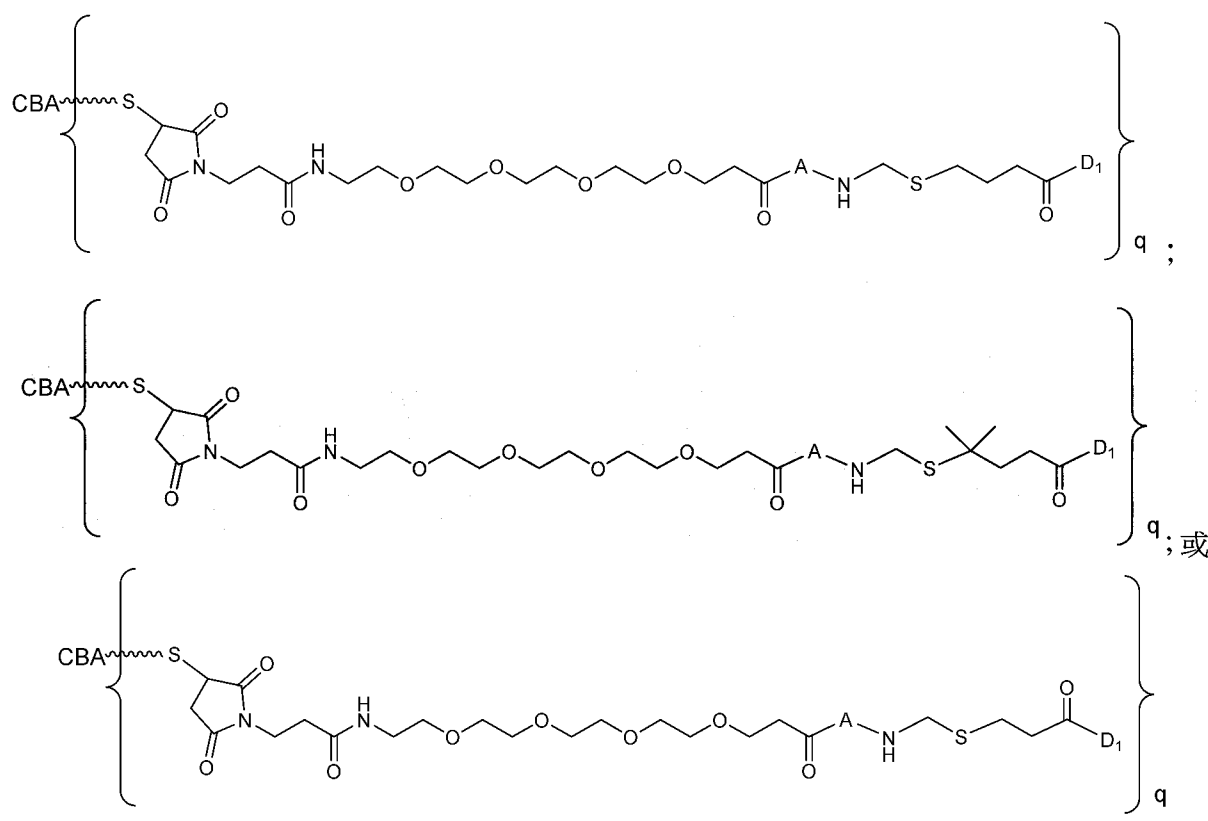








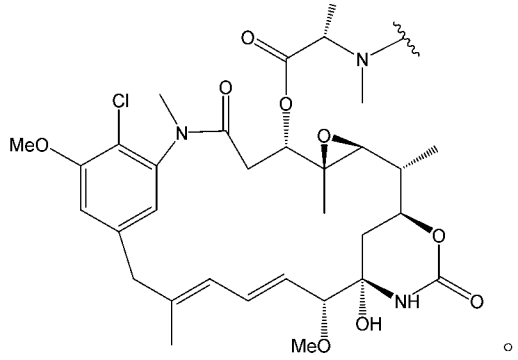




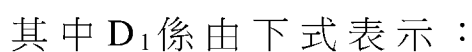
或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

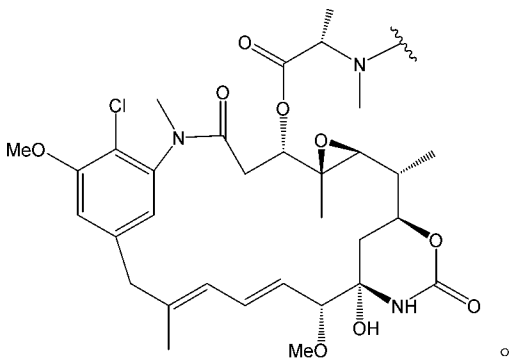
A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly，
且

D₁係由下式表示：

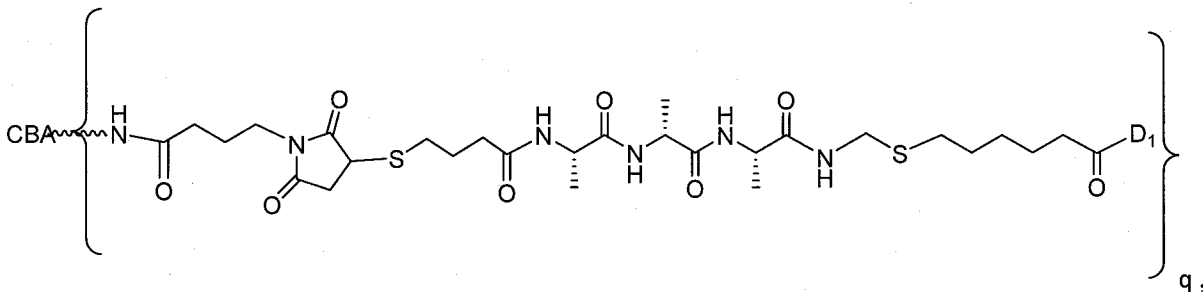


【0030】 在一些實施例中，該免疫結合物係由下式表示：





【0031】 在一些實施例中，該免疫結合物係由下式表示：

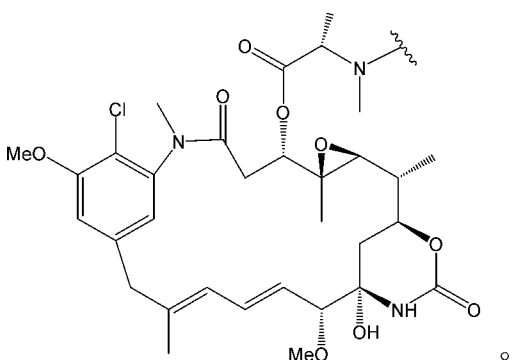


其中：

CBA係本文所提供之任何雙互補位抗體或其抗原結合片段；

q為整數1至10，例如1或10；

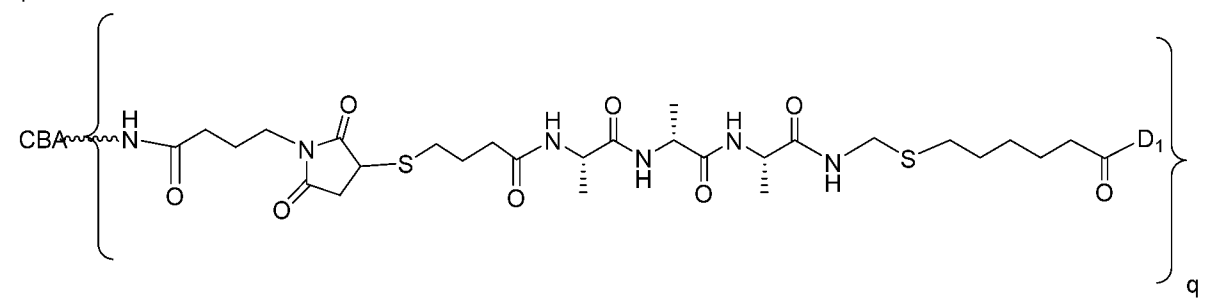
D₁係由下式表示：



【0032】 在一些實施例中，q為整數2至5。在一些實施例中，q為整數3至4。

【0033】 在一些實施例中，該免疫結合物係由下式表

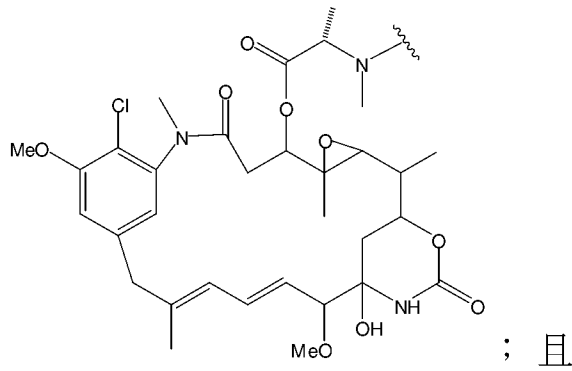
示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CBA係包含胺基酸序列SEQ ID NO: 41-43之雙互補位抗體或抗原結合片段；

D₁係由下式表示：



q為整數1至10。在一些實施例中，q為整數2至5。在一些實施例中，q為整數3至4。

【0034】 在一些實施例中，本文揭示具有式(A) - (L) - (C)之免疫結合物，其中：

(A) 係本文所提供之任何雙互補位抗體或抗原結合片段；

(L) 為連接體；且

(C) 為細胞毒性劑，其中連接體(L)連接(A)至(C)。

【0035】 在一些實施例中，本文所揭示之免疫結合物的連接體係選自由可裂解連接體、不可裂解連接體、親水

性連接體及基於二羧酸之連接體組成之群。在一些實施例中，該連接體係選自由以下組成之群：N-(γ 順丁烯二醯亞胺基丁醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)、 γ 順丁烯二醯亞胺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(GMBS)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)；N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)或N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基戊酸酯(磺基-SPP)；N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(SMCC)；N-磺基丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(磺基SMCC)；N-丁二醯亞胺基-4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)；及N-丁二醯亞胺基-[(N-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)-四乙二醇]酯(NHS-PEG4-順丁烯二醯亞胺)。

【0036】 在一些實施例中，該連接體為磺基-GMBS。

【0037】 在一些實施例中，該連接體為GMBS。

【0038】 在一些實施例中，該連接體為磺基-SPDB。

【0039】 在一些實施例中，本文所揭示之免疫結合物的細胞毒性劑係選自由類美登素、類美登素類似物、苯二氮平、類紫杉醇、CC-1065、CC-1065類似物、倍癌黴素(duocarmycin)、倍癌黴素類似物、卡奇黴素(calicheamicin)、尾海兔素(dolastatin)、尾海兔素類似物、澳瑞他汀(auristatin)、茅層黴素(tomaymycin)衍生物及來普黴素(leptomycin)衍生物或該劑之前藥組成之群。在

一些實施例中，該細胞毒性劑為類美登素。

【0040】在一些實施例中，該免疫結合物進一步包含第二(C)。在一些實施例中，該免疫結合物進一步包含第三(C)。在一些實施例中，該免疫結合物進一步包含第四(C)。

【0041】在一些實施例中，本文提供一種包含至少一種如本文所揭示之免疫結合物之組合物，其中該免疫結合物包含每個A平均3-4個C。

【0042】在一些實施例中，本文提供一種醫藥組合物，其包含如本文所揭示之免疫結合物及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個抗體或其抗原結合片段平均1至10個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個抗體或其抗原結合片段平均2至5個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個抗體或其抗原結合片段平均3至4個藥物。

【0043】在一些實施例中，本文提供一種治療個體之癌症之方法，其包含向該個體投與治療有效量的如本文所揭示之抗體或其抗原結合片段、如本文所揭示之免疫結合物或如本文所揭示之醫藥組合物。

【0044】在一些實施例中，本文提供一種治療癌症之方法。在一些實施例中，該癌症為卵巢癌、子宮癌、腹膜癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、肺癌或腦癌。在一些實施例中，該癌症為卵巢癌。在一些實施例中，該卵巢癌為鉑抗性上皮卵巢癌。在一些實施例中，該卵巢癌為復發性上皮

卵巢癌。在一些實施例中，該卵巢癌為鉑難治性上皮卵巢癌。在一些實施例中，該癌症為子宮癌。在一些實施例中，該癌症為腹膜癌。在一些實施例中，該癌症為輸卵管癌。在一些實施例中，該癌症為子宮內膜癌。在一些實施例中，該癌症為肺癌。在一些實施例中，該癌症為腦癌。在一些實施例中，該癌症為IMGN853抗性的。

【0045】在一些實施例中，該方法進一步包含投與類固醇。

【圖式簡單說明】

【0046】[圖1]藉由FACS顯示huMov19-生物素與葉酸鹽受體抗體FR57；FR α 抗體A（「FR α -A」）；FR α 抗體B（「FR α -B」）；FR α 抗體C（「FR α -C」）；及非生物素化huMov19（「huMov19」）之結合競爭。（參見實例1。）

【0047】[圖2]顯示習知單特異性抗體（諸如huMov19及FR57）、二價雙互補位杵臼(KIH)抗體及四價雙互補位(Morrison)抗體之例示性分子、特徵及示意圖。（參見實例1。）

【0048】[圖3]顯示用於產生基於不對稱-Fc之分子之數種重鏈及輕鏈質體轉染比率之凝膠。L1：僅用FR57scFv-杵轉染；L2：Mov19LC: Mov19HC-臼：FR57scFv-杵以4:4:1轉染；L3：Mov19LC: Mov19HC-臼：FR57scFv-杵以6:2:1轉染；L4：Mov19LC: Mov19HC-臼：FR57scFv-杵以6:6:1轉染；L5：Mov19LC: Mov19HC-臼：

FR57scFv-杵以 9:3:1 轉染；L6：Mov19LC: Mov19HC-臼：
FR57scFv-杵以 2:3:1 轉染；L7：Mov19LC: Mov19HC-臼：
FR57scFv-杵以 1:1:1 轉染；L8：Mov19 LC: Mov19-臼以 3:1
轉染；L9：同型人類 IgG1 轉染。(參見實例 1。)

【0049】[圖 4A-4H]藉由競爭 FACS 顯示 Morrison 之抗體或其片段之結合活性。(參見實例 2。)。詳言之，圖 4A 顯示 Mov19-G1-FR57scFv1 (M9346A-FR57scFv) 之結合活性；圖 4B 顯示 FR57-G1-Mov19scFv1 (FR57-M9346AscFv) 之結合活性；圖 4C 顯示 Mov19-G1-FR α -抗體-A-scFv1 (M9346A-FR- α -A:scFv) 之結合活性；圖 4D 顯示 FR α -抗體-A-G1-Mov19scFv1 (FR- α -A: M9346AscFv) 之結合活性；圖 4E 顯示 FR α -抗體-A-scFv2-G1-Mov19 (FR- α -A:scFv-M9346A) 之結合活性；圖 4F 顯示 FR α -抗體-B-scFv2-G1-Mov19 (FR- α -B:scFv-M9346A) 之結合活性；圖 4G 顯示 FR α -抗體-C-scFv2-G1-Mov19 (FR- α -C:scFv-M9346A) 之結合活性；且圖 4H 顯示 FR57scFv2-G1-Mov19 (FR57scFv-M9346A) 之結合活性。

【0050】[圖 5]顯示 FR57scFv2-杵-Mov19-臼抗體之三種經純化製劑(P1、P2及P3)在非還原及還原條件下之 SDS PAGE 凝膠。該 FR57scFv2-杵-Mov19-臼抗體係呈杵臼(KIH)形式之雙互補位抗體，其中 FR57 scFv 在該抗體之杵側且 huMov19 抗體序列在該抗體之臼側。(參見實例 2。)

【0051】[圖 6]顯示自 FR57scFv2-杵-Mov19-臼抗體之第 0 天及第 14 天樣品獲得的尺寸排阻層析結果之覆蓋圖。

mAU：毫吸光度單位。(參見實例2。)

【0052】[圖7A-7F]顯示與huMov19(「親本」)抗體相比，杵臼(KIH)雙互補位抗體(圖7A、7C及7E)或四價雙互補位抗體(圖7B、7D及7F)之結合(圖7A及7B)、內化及處理(圖7C及7D)及降解(圖7E及7F)。(參見實例2。)

【0053】[圖8]顯示在投與媒劑、含四價雙互補位抗體之免疫結合物(「四價-s-SPDB-DM4」)或含huMov19抗體之免疫結合物(「M-s-SPDB-DM4」)之後，OV-90異種移植模型中之中值腫瘤體積。(參見實例4。)

【0054】[圖9]顯示在投與媒劑、四價-s-SPDB-DM4或M-s-SPDB-DM4之後，Igrov-1異種移植模型中之中值腫瘤體積。(參見實例4。)

【0055】[圖10]顯示在投與媒劑、含杵臼雙互補位抗體之免疫結合物(「KIH-s-SPDB-DM4」)或M-s-SPDB-DM4之後，OV-90異種移植模型中之中值腫瘤體積。(參見實例4。)

【0056】[圖11]顯示含FR57抗體之免疫結合物(FR57-L-DM21)或含huMov19抗體之免疫結合物(M-L-DM21)針對KB細胞之細胞毒性活性。(參見實例5。)

【0057】[圖12A-12E]顯示雙互補位KIH-DM21免疫結合物、huMov19免疫結合物M-DM21及huMov19免疫結合物M-s-SPDB-DM4針對包括KB細胞(圖12A)、Igrov-1細胞(圖12B)、JEG-3細胞(圖12C)、T47D細胞(圖12D)及JHOS-4細胞(圖12E)在內之FR α 陽性細胞株之組的細胞毒性活性。

(參見實例 5。)

【0058】[圖 13A-13D]顯示雙互補位 KIH-L-DM21 免疫結合物、huMov19 免疫結合物 M-L-DM21 及 huMov19 免疫結合物 M-s-SPDB-DM4 在與 KB 細胞(圖 13A)、Igrov-1 細胞(圖 13B)、JEG-3 細胞(圖 13C)及 T47D 細胞(圖 13D)混合之標靶陰性細胞 Namalwa/*luc* 中的活體外旁觀者殺死活性。(參見實例 5。)

【0059】[圖 14A 及 14B]顯示在向 OV-90 異種移植物模型投與雙互補位免疫結合物 KIH-L-DM21 及 huMov19 免疫結合物 M-L-DM21 (圖 14A)或雙互補位免疫結合物 KIH-s-SPDB-DM4 及 huMov19 免疫結合物 M-s-SPDB-DM4 (圖 14B)之後的中值腫瘤體積。(參見實例 6。)

【0060】[圖 15]顯示與媒劑、huMov19 免疫結合物 M-L-DM21 或 huMov19 免疫結合物 M-s-SPDB-DM4 (「IMGN853」)相比，在向 Ishikawa 異種移植物模型投與雙互補位 KIH-L-DM21 免疫結合物之後的中值腫瘤體積。(參見實例 6。)

【0061】[圖 16]顯示與媒劑、huMov19 免疫結合物 M-L-DM21 或 huMov19 免疫結合物 IMGN853 相比，在向 Igrv-1 異種移植物模型投與雙互補位 KIH-L-DM21 免疫結合物之後的中值腫瘤體積。(參見實例 6。)

【0062】[圖 17]顯示與媒劑、huMov19 免疫結合物 M-L-DM21 或 huMov19 免疫結合物 M-s-SPDB-DM4 相比，在向 KB 異種移植物模型投與雙互補位 KIH-L-DM21 免疫結合物

之後的中值腫瘤體積。(參見實例7。)

【0063】[圖 18A 及 18B]顯示與總抗體(TAb：總抗體；結合及未結合)相比，雙互補位 KIH-sSPDB-DM21 免疫結合物(圖 18A)及 huMov19 免疫結合物 M-s-SPDB-DM4 (「IMGN853」)(圖 18B)之毒性。(參見實例7。)

【0064】[圖 19]顯示與媒劑、huMov19 免疫結合物 M9346A-DM21-L 或 huMov19 免疫結合物 IMGN853 相比，在向 IMGN853 抗性 KB 人類子宮頸癌異種移植物模型投與雙互補位 KIH-L-DM21 免疫結合物之後的中值腫瘤體積。(參見實例6。)

【實施方式】

I. 定義

【0065】為了促進理解本發明，下文定義多個術語及片語。

【0066】除非另外指示，否則如本文所用，術語「人類葉酸鹽受體 1」、「FR α 」、「葉酸鹽受體 α (FR- α)」或「FOLR1」係指任何原生人類 FR α 多肽。術語「FR α 」涵蓋「全長」未處理 FR α 多肽以及由細胞內之處理產生的任何形式之 FR α 多肽。該術語亦涵蓋 FR α 之天然存在之變異體，例如由剪接變異體及等位基因變異體編碼之彼等。本文所述之 FR α 多肽可自多種來源，諸如自人類組織類型或自另一來源分離，或藉由重組或合成方法製備。在特定經指示之情況下，「FR α 」可用於指編碼 FR α 多肽之核酸。

人類 $\text{FR}\alpha$ 序列為已知的且包括例如在 UniProtKB 登錄號 P15328 處公開可得之序列(包括同功異型物)。如本文所用，術語「人類 $\text{FR}\alpha$ 」係指包含序列 SEQ ID NO:53 之 $\text{FR}\alpha$ 。

MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKEKPGPEDKLH
EQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCGEMAPACKRHFQDTCLEYEC
SPNLGPWIQQVDQSWRKERVNLNPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWT
SGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQG
NPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS (SEQ ID NO:53)。

【0067】術語「抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體」或「結合於 $\text{FR}\alpha$ 之抗體」係指能夠以充足親和力結合 $\text{FR}\alpha$ 的抗體，以致該抗體適用作靶向 $\text{FR}\alpha$ 之診斷及/或治療劑。如本文所用，該等抗體包括例如雙特異性(例如雙互補位)抗體。除非另外規定，否則抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體與無關、非 $\text{FR}\alpha$ 蛋白之結合程度小於該抗體與 $\text{FR}\alpha$ 之結合的約 10%，如例如藉由放射性免疫分析(RIA)所量測。 $\text{FR}\alpha$ 抗體之實例為此項技術中已知的且揭示於美國公開申請案第 2012/0009181 號及第 2012/0282175 號及美國專利第 9,200,073 B2 號及 PCT 公開案 WO 2011/106528 A1 中，該等文獻中之每一者均以引用之方式整體併入本文中。例示性抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體及其抗原結合片段之序列提供於表 1-8 中。

【0068】術語「**IMGN853**」(亦稱作「米維妥昔單抗索拉文辛」)係指本文所述之免疫結合物，其含有 huMov19 (或 M9346A) 抗體、磺基 SPDB 連接體及 DM4 類美登素。

「**huMov19**」(或「**M9346A**」)抗體係包含全長重鏈 SEQ

ID NO:47 (包含可變重鏈序列 SEQ ID NO:24, 其在下文 SEQ ID NO:47 之背景中加下劃線)及全長輕鏈 SEQ ID NO:48 (包含可變輕鏈序列 SEQ ID NO:19, 其在下文 SEQ ID NO:48 之背景中加下劃線)之抗 FR α 抗體。

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDG
DTFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:47)

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQOPRLLIYRASNL
EAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGG TKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:48)

【0069】 huMov19 (M9346A) 抗體係由質體編碼，該等質體在 2010 年 4 月 7 日根據布達佩斯條約之條款寄存於位於 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 處之 American Type Culture Collection (ATCC) 且具有 ATCC 寄存編號 PTA-10772 及 PTA-10773 或 10774。DM4 係指 N2'-去乙醯基-N2'-(4-巰基-4-甲基-1-側氧基戊基)類美登素。「磺基 SPDB」係指 N-丁二醯亞胺基 4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸酯)連接體。

【0070】術語特定腫瘤、組織或細胞樣品中「升高之」FR α 、FR α 的「增加之表現」或 FR α 的「過表現」係指 FR α (FR α 多肽或編碼該種多肽之核酸)以高於存在於相同

類型或起源之健康或非患病(原生、野生型)組織或細胞中的水準之水準存在。該增加之表現或過表現可例如由突變、基因擴增、增加之轉錄、增加之轉譯或增加之蛋白質穩定性引起。

【0071】FR α 表現可藉由免疫組織化學量測且藉由與展現規定分數之經校準對照物比較來給出「染色強度分數」或「染色均一性分數」(例如，若強度與水準3經校準對照物可相當，則對測試樣品給予強度分數3，或若強度與水準2經校準對照物可相當，則對測試樣品給予強度分數2)。例如，藉由免疫組織化學量測之分數1、2或3或較佳地分數2或3指示FR α 的增加之表現。呈異質或均質之染色均一性亦指示FR α 表現。染色強度及染色均一性分數可單獨或組合(例如2均質、2異質、3均質、3異質等)使用。染色均一性亦可表述為以某一強度染色之細胞之百分比(%) (例如，25%細胞以強度1、2或3染色；50%細胞以強度1、2或3染色；70%細胞以強度1、2或3染色)。在另一實例中，FR α 表現之增加可藉由偵測相對於對照值(例如，來自未患癌症或患有未具有升高之FR α 值的癌症之個體之組織或細胞中的表現水準)至少2倍、至少3倍或至少5倍之增加來測定。FR α 表現可藉由免疫組織化學量測且給出視覺分數，其中FR α 陽性可指大於或等於50%之腫瘤細胞具有在小於或等於10X顯微鏡物鏡下可見之FR α 膜染色。

【0072】術語「抗體」意謂免疫球蛋白分子，其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

別且特異性地結合於標靶，諸如蛋白質、多肽、肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂質或前述各物之組合。如本文所用，術語「抗體」涵蓋完整多株抗體、完整單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、包含抗體之融合蛋白及任何其他經修飾免疫球蛋白分子，只要該等抗體展現所需生物活性即可。如本文所用，該等抗體包括例如雙特異性(例如雙互補位)抗體。抗體基於其重鏈恆定域之屬性(分別稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ)可為免疫球蛋白之五種主要類別中的任一者：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次單元結構及三維組態。抗體可為裸的或結合於其他分子，諸如毒素、放射性同位素等。

【0073】術語「抗體片段」或「其抗體片段」係指完整抗體之一部分。「抗原結合片段」係指完整抗體中結合於抗原之一部分。抗原結合片段可含有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')₂及Fv片段、線性抗體及單鏈抗體。抗體片段可為裸的或結合於其他分子，諸如毒素、放射性同位素等。

【0074】「單株」抗體或其抗原結合片段係指牽涉於單一抗原決定子或抗原決定基之高度特異性識別及結合中的均質抗體或抗原結合片段群體。此與多株抗體形成對照，多株抗體典型地包括針對不同抗原決定子之不同抗體。術語「單株」抗體或其抗原結合片段涵蓋完整及全長

單株抗體，以及抗體片段(諸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、單鏈(scFv)突變體、包含抗體部分之融合蛋白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」抗體或其抗原結合片段係指以多種方式製得之該等抗體及其抗原結合片段，該等方式包括但不限於藉由融合瘤、噬菌體選擇、重組表現及基因轉殖動物。

【0075】術語「人類化」抗體或其抗原結合片段係指非人類(例如鼠科動物)抗體或抗原結合片段之形式，該等形式為特異性免疫球蛋白鏈、嵌合免疫球蛋白或其含有最小非人類(例如鼠科動物)序列之片段。典型地，人類化抗體或其抗原結合片段係其中來自互補決定區(CDR)之殘基由來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔、倉鼠)之 CDR 的殘基置換之具有所需特異性、親和力及能力之人類免疫球蛋白(「CDR 經移植」)(Jones 等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，Nature 332:323-327 (1988)；Verhoeyen 等人，Science 239:1534-1536 (1988))。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 Fv 構架區(FR)殘基經來自非人類物種之具有所需特異性、親和力及能力之抗體或片段中的相應殘基置換。該人類化抗體或其抗原結合片段可藉由 Fv 構架區中及/或經置換非人類殘基內額外殘基之取代進一步經修飾以細化及最佳化抗體或其抗原結合片段之特異性、親和力及/或能力。一般而言，該人類化抗體或其抗原結合片段將包含實質上全部的至少一個且典型地兩個或三個可變域，該等可變域含有全部或實質上全部的對應於

非人類免疫球蛋白之 CDR 區，而全部或實質上全部 FR 區為人類免疫球蛋白共有序列之彼等。該人類化抗體或其抗原結合片段亦可包含免疫球蛋白恆定區或域 (Fc) (典型地，人類免疫球蛋白之恆定區或域) 的至少一部分。用於產生人類化抗體之方法之實例描述於美國專利 5,225,539；Roguska 等人，Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91(3):969-973 (1994)，及 Roguska 等人，Protein Eng. 9(10):895-904 (1996) 中。在一些實施例中，「人類化抗體」為表面重塑抗體。

【0076】抗體之「可變區」係指抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區，單獨或組合。重鏈及輕鏈之可變區各自由四個藉由三個互補決定區 (CDR) (亦稱作高變區) 連接之構架區 (FR) 組成。各鏈中之 CDR 藉由 FR 緊密地保持在一起且與來自另一鏈之 CDR 一起促進形成抗體之抗原結合位點。存在至少兩種用於測定 CDR 之技術：(1) 基於交叉物種序列變異性之方法 (亦即，Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, (第 5 版，1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)，「Kabat」)；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))。此外，此兩種方法之組合有時在此項技術中用於測定 CDR。

【0077】抗體之「恆定」區未直接牽涉於抗體與抗原之結合中，但展現多種效應物功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性。

【0078】當提及可變域中之殘基 (大約為輕鏈之殘基

1-107及重鏈之殘基1-113)時，一般使用 **Kabat**編號系統(例如 Kabat 等人, Sequences of Immunological Interest. 第5版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (「Kabat」)。

【0079】如 Kabat 中之胺基酸位置編號係指在 Kabat 等人 (Sequences of Immunological Interest. 第5版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (「Kabat」) 中用於抗體之彙編的重鏈可變域或輕鏈可變域之編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有較少或額外胺基酸，其對應於可變域之FR或CDR的縮短或插入其中。例如，重鏈可變域可包括在H2之殘基52後面的單一胺基酸插入(根據 Kabat 之殘基52a)及在重鏈FR殘基82後面插入之殘基(例如，根據 Kabat 的殘基82a、82b及82c等)。殘基之 Kabat 編號可針對既定抗體藉由在該抗體之序列的同源區處與「標準」Kabat 編號序列比對來測定。而 Chothia 指出結構環之位置(Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。當使用 Kabat 編號慣例編號時 Chothia CDR-H1 環之末端在H32與H34之間變化，視該環之長度而定(此係因為 Kabat 編號方案將插入置於H35A及H35B處；若35A及35B均不存在，則該環在32處結束；若僅35A存在，則該環在33處結束；若35A及35B均存在，則該環在34處結束)。AbM高變區表示在 Kabat CDR 與 Chothia 結構環之間的折衷，且藉由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體模型化軟體使用。

環	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(Kabat 編號)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Chothia 編號)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

【0080】術語「人類」抗體或其抗原結合片段意謂由人類產生之抗體或其抗原結合片段，或使用此項技術中已知之任何技術製得的具有對應於由人類產生之抗體或其抗原結合片段之胺基酸序列的抗體或其抗原結合片段。人類抗體或其抗原結合片段之此定義包括完整或全長抗體及其片段。

【0081】術語「嵌合」抗體或其抗原結合片段係指其中胺基酸序列係源於兩種或更多種物種之抗體或其抗原結合片段。典型地，輕鏈及重鏈之可變區對應於源於一種哺乳動物物種(例如小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特異性、親和力及能力之抗體或其抗原結合片段之可變區，而恆定區與源於另一物種(通常為人類)之抗體或其抗原結合片段中的序列同源以避免在彼物種中引發免疫反應。

【0082】術語「抗原決定基」或「抗原決定子」在本文中可互換使用且係指抗原中能夠由特定抗體識別且特異性地結合之彼部分。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重摺疊並置之非連續胺基酸形

成。由連續胺基酸形成之抗原決定基在蛋白質變性時典型地經保持，而藉由三重摺疊形成之抗原決定基在蛋白質變性時典型地喪失。抗原決定基典型地包括呈獨特空間構形之至少3個且更通常地至少5個或8-10個胺基酸。

【0083】「結合親和力」一般係指在分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之合計強度。除非另外指示，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對之成員(例如，抗體及抗原)之間的1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。親和力可藉由此項技術中已知之常見方法，包括本文所述之彼等來量測。低親和力抗體一般緩慢地結合抗原且傾向於快速地解離，而高親和力抗體一般更快結合抗原且傾向於保持更久結合。此項技術中已知多種量測結合親和力之方法，其中任一者均可用於本發明之目的。

【0084】當在本文中用於指結合親和力時，「或更佳」係指分子與其結合搭配物之間的較強結合。當在本文中使用時，「或更佳」係指由較小Kd數值表示之較強結合。例如對抗原具有「0.6 nM或更佳」之親和力之抗體，該抗體對該抗原之親和力係<0.6 nM，亦即0.59 nM、0.58 nM、0.57 nM等，或小於0.6 nM之任何值。

【0085】「特異性地結合」一般意謂抗體經由其抗原結合域結合於抗原決定基，且該結合使得該抗原結合域與該抗原決定基之間需要一些互補性。根據此定義，與抗體

將結合於隨機、無關抗原決定基相比，當抗體更快速地經由其抗原結合域結合於一抗原決定基時，據說該抗體「特異性地結合」於彼抗原決定基。術語「特異性」在本文中用於限定特定抗體結合於特定抗原決定基時之相關親和力。例如，抗體「A」可被認為與抗體「B」相比對既定抗原決定基具有較高特異性，或據說與抗體「A」對相關抗原決定基「D」之特異性相比，抗體「A」可以較高特異性結合於抗原決定基「C」。

【0086】「優先地結合」意謂與該抗體將結合於相關、相似、同源或類似抗原決定基相比，該抗體更容易特異性地結合於抗原決定基。因此，「優先地結合」於既定抗原決定基之抗體與結合於相關抗原決定基相比將更有可能結合於彼抗原決定基，即使該種抗體可與該相關抗原決定基交叉反應。

【0087】若抗體優先地結合於既定抗原決定基或重疊抗原決定基，達到使其在某種程度上阻斷參考抗體與該抗原決定基之結合的程度，則據說該抗體「競爭性地抑制」該參考抗體與彼抗原決定基之結合。競爭性抑制可藉由此項技術中已知之任何方法，例如競爭ELISA分析來測定。據說抗體可競爭性地抑制參考抗體與既定抗原決定基之結合達至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

【0088】如本文所用，片語「實質上相似」或「實質上相同」表示兩個數值(一般而言，一數值與本揭示案之

抗體相關且另一數值與參考/比較物抗體相關)之間足夠高程度之相似性，以致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)量度之生物特徵之背景內不重要或不具有生物及/或統計學顯著性。該兩個值之間的差異可小於約 50%、小於約 40%、小於約 30%、小於約 20% 或小於約 10%，隨針對參考/比較物抗體之值而變。

【0089】術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用以指任何長度之胺基酸的聚合物。該聚合物可為線性或分支鏈的，其可包含經修飾胺基酸，且其可由非胺基酸中斷。該等術語亦涵蓋已天然地或藉由干預經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、磷酸化或任何其他操縱或修飾，諸如與標記組分結合。該定義內亦包括例如含有胺基酸(包括例如非天然胺基酸等)之一或多種類似物以及此項技術中已知之其他修飾的多肽。應理解，因為本揭示案之多肽係基於抗體，故在某些實施例中，該等多肽可作為單鏈或締合鏈存在。

【0090】如本文中可互換使用之術語「聚核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸的聚合物，且包括 DNA 及 RNA。該等核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基及/或其類似物，或可藉由 DNA 或 RNA 聚合酶併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包含經修飾核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。若存在核苷酸結構之修飾，則其可在聚合物之組裝之前或之後經賦予。核苷酸之序列可由非核苷酸組分中斷。聚核苷酸可在聚合之

後進一步經修飾，諸如藉由與標記組分結合。其他類型之修飾包括例如一或多種天然存在之核苷酸用類似物進行的「帽」取代；核苷酸間修飾，諸如具有不帶電之鍵(例如，磷酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等)及具有帶電之鍵(例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的彼等、含有諸如蛋白質(例如，核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚 L-離胺酸等)之懸垂部分的彼等、具有嵌入劑(例如，吡啶、補骨脂素等)之彼等、含有螯合劑(例如，金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)之彼等、含有烷基化劑的彼等、具有經修飾之鍵(例如， α 異頭核酸等)之彼等，以及聚核苷酸的未經修飾形式。此外，通常存在於糖中之任何羥基均可例如由磷酸酯基、磷酸酯基置換，由標準保護基保護，或經活化以製備與額外核苷酸之額外鍵，或可結合於固體支撐物。5'及3'端OH可經磷酸化或經胺或1至20個碳原子之有機加帽基團部分取代。其他羥基亦可經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之核糖或去氧核糖的類似形式，包括例如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、 α -異頭糖、差向異構體糖(諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖)、呋喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、無環類似物及非鹼性核苷酸類似物(諸如甲基核糖苷)。一或多種磷酸二酯鍵可由替代連接基團置換。此等替代連接基團包括但不限於如下實施例，其中磷酸酯由P(O)S(「硫代酯」)、P(S)S(「二硫代酯」)、「(O)NR₂(「鹽胺化物」)、「

$P(O)R$ 、 $P(O)OR'$ 、 CO 或 CH_2 (「甲縮醛」)置換，其中各 R 或 R' 獨立地為 H 或視情況含有醚(--O--)鍵、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基之經取代或未經取代烷基(1-20 C)。並非聚核苷酸中之所有鍵均需要一致。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。

【0091】術語「**載體**」意謂構築體，其能夠在宿主細胞中遞送且視情況表現一或多種所關注之基因或序列。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、黏接質體或噬菌體載體、與陽離子縮合劑締合之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)。

【0092】「**經分離**」多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物係呈自然界中未發現之形式之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物。經分離多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物包括已經純化至其不再呈其在自然界中發現之形式之程度的彼等。在一些實施例中，經分離抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為實質上純的。

【0093】如本文所用，「**實質上純的**」係指至少50%純(亦即，不含污染物)、至少90%純、至少95%純、至少98%純或至少99%純的材料。

【0094】術語「**一致**」或「**一致性百分比**」在兩種或更多種核酸或多肽之背景中係指兩個或更多個序列或子序列，當針對最大對應進行比較及比對(必要時引入間隙)，

而不考慮作為序列一致性之一部分的任何保守胺基酸取代時，該等序列或子序列為相同的或具有規定百分比之相同核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可使用序列比較軟體或算法或藉由視覺檢查經量測。此項技術中已知可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之比對之多種算法及軟體。序列比對算法之一種該非限制性實例係描述於 Karlin 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268 (1990)中之算法，如 Karlin 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877 (1993)中加以修改，且併入至 NBLAST 及 XBLAST 程式中 (Altschul 等人，*Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991))。在某些實施例中，可使用如 Altschul 等人，*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)所述之間隙 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)係可用於比對序列之額外公開可得軟體程式。在某些實施例中，兩個核苷酸序列之間的一致性百分比使用 GCG 軟體中之 GAP 程式來測定 (例如，使用 NWSgapdna.CMP 矩陣及間隙權重 40、50、60、70 或 90 及長度權重 1、2、3、4、5 或 6)。在某些替代實施例中，GCG 套裝軟體中之 GAP 程式併入 Needleman 及 Wunsch 算法 (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970))，其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，及間隙權重 16、14、12、10、8、6 或 4 及長度權重 1、2、3、4、

5)。或者，在某些實施例中，核苷酸或胺基酸序列之間的一致性百分比使用 Myers 及 Miller 算法 (CABIOS, 4:11-17 (1989)) 來測定。例如，一致性百分比可使用 ALIGN 程式 (2.0 版) 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。針對藉由特定比對軟體實現之最大比對之適當參數可由熟習此項技術者確定。在某些實施例中，使用比對軟體之預設參數。在某些實施例中，第一胺基酸序列與第二胺基酸序列之一致性百分比「X」經計算為 $100 \times (Y/Z)$ ，其中 Y 為在該等第一及第二序列之比對中經評分為一致匹配 (如藉由視覺檢查或特定序列比對程式所比對) 之胺基酸殘基的數目且 Z 為該第二序列中之殘基總數。若第一序列之長度長於第二序列，則第一序列與第二序列之一致性百分比將高於第二序列與第一序列之一致性百分比。

【0095】作為非限制性實例，與參考序列具有特定百分比「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) 之無論任何特定聚核苷酸均可在某些實施例中使用 Bestfit 程式 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix 8 版, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) 來測定。Bestfit 使用 Smith 及 Waterman 之局部同源性算法 (Advances in Applied Mathematics 2: 482 489 (1981)) 來發現兩個序列之間的最佳同源區段。當根據本揭示案使用

Bestfit或任何其他序列比對程式來測定特定序列是否與參考序列例如95%一致時，設定參數以致一致性百分比係在參考核苷酸序列之全長內經計算且允許參考序列中之核苷酸總數的多達5%之同源間隙。

【0096】「保守胺基酸取代」係其中一個胺基酸殘基經具有相似側鏈之另一胺基酸殘基置換之取代。具有相似側鏈之胺基酸殘基的家族已在此項技術中經定義，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，甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如，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)、 β -分支鏈側鏈(例如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳香族側鏈(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。例如，苯丙胺酸取代酪胺酸為保守取代。在一些實施例中，本揭示案之多肽及抗體之序列中的保守取代並未廢除含有該胺基酸序列之多肽或抗體與抗原(亦即，該多肽或抗體所結合之FR α)之結合。鑑別未消除抗原結合之核苷酸及胺基酸保守取代之方法為此項技術中熟知的(參見例如 Brummell 等人，Biochem. 32: 1180-1 187 (1993)；Kobayashi 等人 Protein Eng. 12(10):879-884 (1999)；及 Burks 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:.412-417 (1997))。

【0097】「雙特異性抗體」係指結合於兩個不同抗原決定基之抗體。該等抗原決定基可在同一標靶抗原上或可

在不同標靶抗原上。

【0098】「**雙互補位抗體**」係結合於同一標靶抗原(例如 $\text{FR}\alpha$)上之兩個不同非重疊抗原決定基之雙特異性抗體。

【0099】在一些實施例中，本文所揭示之 $\text{FR}\alpha$ 抗體或其抗原結合片段為多價分子。如本申請案內所用之術語「**價態**」表示抗體分子中存在規定數目之結合位點。根據本發明之例如天然抗體或全長抗體具有兩個結合位點且為「**二價**」。術語「**四價**」表示抗原結合蛋白中存在四個結合位點。術語「**三價**」表示抗體分子中存在三個結合位點。如本文所用，術語「**雙特異性、四價**」表示根據本發明之抗原結合蛋白具有四個抗原結合位點，其中至少一者結合於第一抗原且至少一者結合於第二抗原或該抗原之另一抗原決定基。

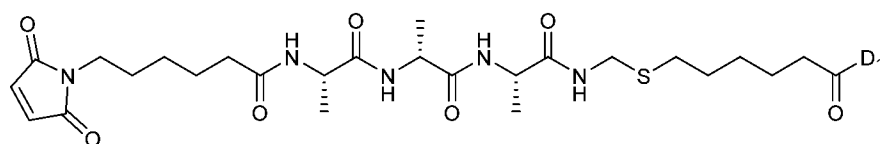
【0100】如本文所用，術語「**免疫結合物**」或「**結合物**」係指連接至細胞結合劑之化合物或其衍生物且由以下通式定義： C-L-A ，其中 C = 細胞毒素， L = 連接體，且 A = 抗體或其抗原結合片段(例如抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體或抗體片段)。免疫結合物亦可以逆序由以下通式定義： A-L-C 。

【0101】「**連接體**」係能夠以穩定、共價方式連接化合物(通常為藥物，諸如類美登素)至諸如抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體或其抗原結合片段之細胞結合劑的任何化學部分。連接體在使該化合物或該抗體保持活性之條件下可易經受或實質上抵抗裂解(例如酸誘導性裂解、光誘導性裂解、肽酶誘導性

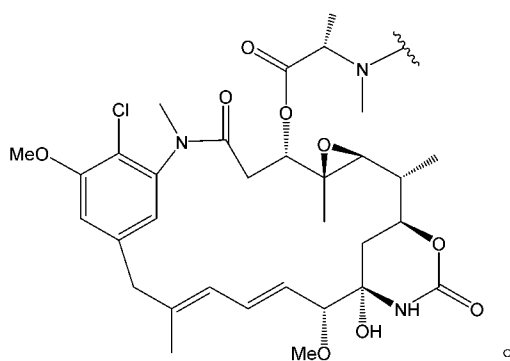
裂解、酯酶誘導性裂解或二硫鍵裂解)。合適連接體為此項技術中熟知的且包括例如二硫基及硫醚基。

【0102】如本文所用，術語「細胞毒性劑」係指抑制或預防一或多種細胞功能及/或引起細胞死亡之物質。在一些實施例中，該細胞毒性劑為類美登素，例如DM21。包含DM21之免疫結合物揭示於WO 2018/160539 A1中，該案以引用之方式整體併入本文中。

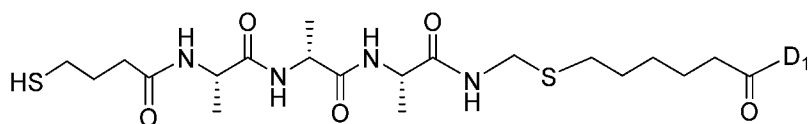
【0103】免疫結合物可包含由以下結構式表示之「DM21C」之位點特異性DM21連接：



，其中D₁為：



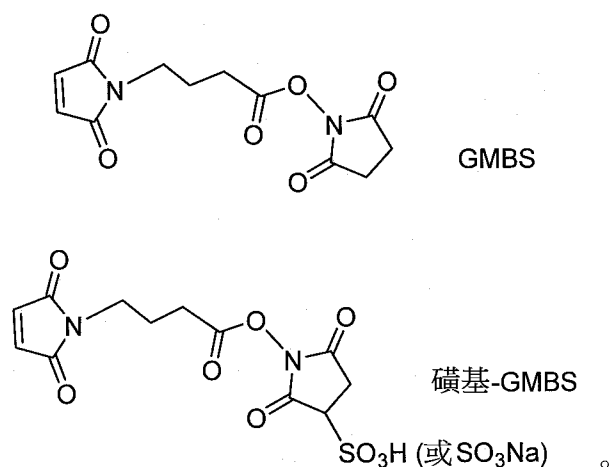
【0104】免疫結合物亦可包含離胺酸連接之DM21「L-DM21」、「DM21-L」或「DM21L」，其由以下結構式表示：



，其中D₁顯示於上

文，藉由例如γ-順丁烯二醯亞胺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(GMBS)或N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)連接體之連接體偶合至抗

體。GMBS 及磺基-GMBS (或 sGMBS) 連接體為此項技術中已知的且可由以下結構式表示：



【0105】「視情況選用之」或「視情況」意謂隨後描述之情形可或可不發生，使得該申請案包括其中該情形發生之情況及其中該情形不發生之情況。例如，片語「視情況經取代」意謂非氫取代基可或可不存在於既定原子上，且因此該申請案包括其中存在非氫取代基之結構及其中不存在非氫取代基之結構。

【0106】術語「癌症」及「癌的」係指或描述哺乳動物中之生理學疾患，其中細胞群體之特徵在於不受調節之細胞生長。癌症之實例包括但不限於癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括輸卵管癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌及多種類型之頭頸部癌。該癌症可為表現 FR α 之癌症

(「FR α 表現性癌」)。

【0107】術語「癌細胞」、「腫瘤細胞」及語法相等形式係指源於腫瘤或癌前病變之細胞的總群體，包括非腫瘤發生細胞(其佔腫瘤細胞群體之大部分)及腫瘤發生幹細胞(癌症幹細胞)。如本文所用，當術語「腫瘤細胞」僅指缺乏復原及分化能力之彼等腫瘤細胞時，其將由術語「非腫瘤發生」修飾以區別彼等腫瘤細胞與癌症幹細胞。

【0108】「晚期」癌症係已藉由局部侵襲或轉移擴散至起源位點或器官外部之癌症。術語「晚期」癌症包括局部晚期及轉移性疾病兩者。

【0109】「轉移性」癌症係指已自身體之一部分擴散至身體之另一部分的癌症。

【0110】「難治性」癌症係即使向癌症患者投與諸如化學療法之抗腫瘤治療仍進展之癌症。

【0111】「復發性」癌症係在對初始療法之回應之後在初始位點處或在遠端位點處已再生長之癌症。

【0112】「復發型」患者係在緩解之後具有癌症之病徵或症狀之患者。視情況，該患者在輔助或新輔助療法之後已復發。

【0113】術語「維持療法」係指給予以幫助阻止癌症在其於初始療法後消失之後復發之療法。

【0114】術語「個體」係指欲為特定治療之接受者的任何動物(例如哺乳動物)，包括但不限於人類、非人類靈長類動物、嚙齒動物及其類似動物。典型地，術語「個

體」及「患者」在本文中關於人類個體可互換使用。

【0115】術語「**醫藥調配物**」係指呈允許活性成分的生物活性有效之形式，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之製劑。該調配物可為無菌的。

【0116】如本文所揭示之抗體、免疫結合物或其他藥物之「**有效量**」係足以進行特定陳述的目的之量。

【0117】術語「**治療有效量**」係指有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症的抗體、免疫結合物或其他藥物之量。在癌症之情況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞數目；減少腫瘤大小或負荷；抑制(亦即，在某種程度上減慢且在特定實施例中停止)癌細胞浸潤至周圍器官中；抑制(亦即，在某種程度上減慢且在特定實施例中停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；在某種程度上減輕與該癌症相關之一或多種症狀；及/或引起有利反應，諸如增加的無進展存活(PFS)、無疾病存活(DFS)或總體存活(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)，或在一些情況下引起穩定疾病(SD)、進行性疾病(PD)減弱、縮短之進展時間(TTP)或其任何組合。參見本文中「治療」之定義。就該藥物可預防生長及/或殺死現有癌細胞而言，其可為細胞抑制性及/或細胞毒性的。

【0118】諸如「**治療 (treating)**」或「**治療 (treatment)**」或「**以治療 (to treat)**」或「**緩解 (alleviating)**」或「**以緩解 (to alleviate)**」之術語係指治

癒、減慢經診斷病理疾患或病症、減輕其症狀及/或停止其進展之治療措施。因此，需要治療之彼等包括已經診斷患有該病症或疑似患有該病症之彼等。在某些實施例中，若患者顯示以下一或多者，則個體成功地根據本揭示案之方法「經治療」癌症：癌細胞之數目減少或完全不存在；腫瘤大小減小；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中)之抑制或不存在；腫瘤轉移之抑制或不存在；腫瘤生長之抑制或不存在；與特定癌症相關之一或多種症狀的減輕；降低之發病率及死亡率；生活品質改良；腫瘤之腫瘤發生、腫瘤發生頻率或腫瘤發生能力的減少；腫瘤中之癌症幹細胞之數目或頻率的減少；腫瘤發生細胞分化成非腫瘤發生狀態；增加的無進展存活(PFS)、無疾病存活(DFS)或總體存活(OS)、完全反應(CR)、部分反應(PR)、穩定疾病(SD)、進行性疾病(PD)減弱、縮短之進展時間(TTP)或其任何組合。

【0119】如本文所用，術語「投與(administer)」、「投與(administering)」、「投與(administration)」及其類似術語係指可用於使得能夠將免疫結合物遞送至所需生物作用位點之方法。可使用本文所述之劑及方法之投與技術見例如 Goodman 及 Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 現行版；Pergamon；及 Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (現行版), Mack Publishing Co., Easton, Pa。在一個態樣中，免疫結合物經靜脈內投與。

【0120】術語「指導(instructing)」意謂藉助於任何

方式(例如書面，諸如呈包裝插頁或其他書面宣傳材料之形式)提供關於適用療法、藥劑、治療、治療方案及其類似物之說明書。

【0121】術語「預治療(pre-treat)」及「預治療(pre-treatment)」係指在治療抗體、其抗原結合片段或免疫結合物之投與之前存在的治療措施。例如，如本文更詳細描述，類固醇(例如皮質類固醇)可在免疫結合物之投與之前約一週、約五天、約三天、約兩天或約一天或24小時內作為預防藥經投與。該類固醇亦可與該免疫結合物同一天在該免疫結合物之前經投與。

【0122】除非本文特定地規定或顯而易見，否則如本文所用，術語「約」應理解為在此項技術中之正常容限範圍內，例如在平均值之2個標準偏差內。「約」可理解為在陳述值之10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%內。除非本文另有說明，否則本文所提供之所有數值均由術語約修飾。

【0123】本文中變數之任何定義內的化學基團之清單之陳述包括作為任何單一基團或所列出的基團之組合之彼變數的定義。本文中關於變數或態樣之實施例之陳述包括作為任何單一實施例或與任何其他實施例或其部分組合之彼實施例。

【0124】除非本文另外清楚指示，否則如本揭示案及申請專利範圍中所用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該(the)」包括複數形式。

【 0125 】應理解，在本文中用語言「包含 (comprising)」描述實施例之任何情況下，亦提供根據「由.....組成」及/或「基本上由.....組成」描述之其他類似實施例。在本揭示案中，「包含 (comprises)」、「包含 (comprising)」、「含有 (containing)」及「具有 (having)」及其類似術語可具有美國專利法中賦予其之含義且可意謂「包括 (includes)」、「包括 (including)」及其類似術語；「基本上由.....組成」或「基本上組成」同樣具有美國專利法中所賦予之含義且該術語為開放式的，允許超出所陳述者之存在，只要所陳述者之基礎或新穎特徵未由於超出所陳述者之存在發生改變，但排除先前技術實施例。

【 0126 】除非本文特定地規定或顯而易見，否則如本文所用，術語「或」應理解為包括性的。如本文中諸如「A及/或B」之片語中所用的術語「及/或」意欲包括「A及B」、「A或B」、「A」及「B」。同樣，如諸如「A、B及/或C」之片語中所用的術語「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）。

【 0127 】本文所提供之任何組合物或方法均可與本文所提供之任何其他組合物及方法中之一或多者組合。

II. 雙互補位抗體

【 0128 】本文提供雙互補位抗FR α 抗體及其抗原結合

片段。此等雙互補位抗體及其抗原結合片段可包含結合於 $\text{FR}\alpha$ 之第一抗原決定基的第一 $\text{FR}\alpha$ 結合域及結合於 $\text{FR}\alpha$ 之第二抗原決定基的第二 $\text{FR}\alpha$ 結合域。 $\text{FR}\alpha$ 之第一及第二抗原決定基係非重疊抗原決定基。此等雙互補位抗體及抗原結合片段可含有額外 $\text{FR}\alpha$ 結合域。例如，四價雙互補位抗體或抗原結合片段可具有結合於第一抗原決定基之兩個 $\text{FR}\alpha$ 結合域及結合於第二抗原決定基之兩個 $\text{FR}\alpha$ 結合域。例示性雙互補位抗體及其抗原結合片段顯示於圖 1 中。

A. $\text{FR}\alpha$ 結合域

【0129】本文揭示可用於組裝雙互補位抗體或其抗原結合片段之 $\text{FR}\alpha$ 結合域。 $\text{FR}\alpha$ 結合域可包含六個互補決定區 (CDR)，亦即可變重鏈 (VH) CDR1、VH CDR2、VH CDR3、可變輕鏈 (VL) CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3。 $\text{FR}\alpha$ 結合域可包含可變重鏈 (VH) 及可變輕鏈 (VL)。VH 及 VL 可為獨立多肽或可為同一多肽之部分 (例如，在 scFv 中)。

【0130】 $\text{FR}\alpha$ 抗體及其抗原結合片段為此項技術中已知的且已揭示於例如 PCT 申請公開案第 WO 2011/106528 A1 號；第 WO 2012/135675 A3 號；第 WO 2012/138749 A1 號；第 WO 2014/036495 A3 號；及第 WO 2015/031815 A2 號中；其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。額外 $\text{FR}\alpha$ 抗體已揭示於美國專利第 8,557,966 B2 號；第 8,709,432 B2 號；第 9,702,881 B2 號；及第 9,637,547 B2 號；及美國專利申請公開案第 US-2012-0282282 A1 號中，

其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。另外，FR α 抗體 huMov19 (M9346A)係由質體編碼，該等質體在2010年4月7日根據布達佩斯條約之條款寄存於位於10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110處之 American Type Culture Collection (ATCC)且具有ATCC寄存編號PTA-10772及PTA-10774。如本文所提供，FR α 結合域可為此等抗體或其抗原結合片段中之任一者之FR α 結合域(例如六個CDR或VH及VL)。

【0131】舉例而言，FR α 結合域可包含huMov19抗體及/或FR57抗體之CDR序列、VH序列及/或VL序列。huMov19及FR57抗體之CDR序列提供於下表1及2中。

【0132】在一些實施例中，本文所揭示之FR α 結合域包含一或多種包含一或多個本文所述之CDR序列之多肽。例如，FR α 結合域可包含下表1及2中所示之一或多個輕鏈CDR序列(亦即，LC CDR1、LC CDR2及LC CDR3)及/或一或多個重鏈CDR序列(亦即，HC CDR1、HC CDR2及HC CDR3)。

表 1：輕鏈 CDR 序列(根據 Kabat 定義)

抗體	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
FR57	RASQNINNLH (SEQ ID NO:1)	YVSQSVS (SEQ ID NO:2)	QQSNSWPHYT (SEQ ID NO:3)
huMov19	KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO:4)	RASNLEA (SEQ ID NO:5)	QQSREYPYT (SEQ ID NO:6)

表 2：重鏈 CDR 序列

抗體	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
FR57	SFGMH (SEQ ID NO:7) AbM 定義： GFTFSSFGMH (SEQ ID NO:13)	Kabat 定義： YISSGSSTISYADSVKG (SEQ ID NO:8) AbM 定義： YISSGSSTIS (SEQ ID NO:14)	Kabat 或 AbM 定義： EAYGSSMEY (SEQ ID NO:9)
huMov19	Kabat 定義： GYFMN (SEQ ID NO:10) AbM 定義： GYTFTGYFMN (SEQ ID NO:15)	Kabat 定義： RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO:11) AbM 定義： RIHPYDGDTF (SEQ ID NO:16)	Kabat 或 AbM 定義： YDGSRAMDY (SEQ ID NO:12)

【 0133 】 在一些實施例中，FR α 結合域包含 (a) VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 1-3；及 (b) VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7-9。在一些實施例中，FR α 結合域包含 (a) VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 1-3；及 (b) VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 13、14及9。在一些實施例中，FR α 結合域包含 (a) VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4-6，及 (b) VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 10-12。在一些實施例中，FR α 結合域包含 (a) VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4-6，及 (b) VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3，其分別包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15、16及12。

【0134】舉例而言，FR α 結合域可包含 huMov19 抗體及 / 或 FR57 抗體之 CDR 序列、VH 序列及 / 或 VL 序列。huMov19 及 FR57 之 CDR 序列提供於下表 1 及 2 中。

【0135】在一些實施例中，本文所揭示之 FR α 結合域包含一或多種包含一或多個本文所述之 CDR 序列之多肽。例如，FR α 結合域可包含下表 1 及 2 中所示之一或多個輕鏈 CDR 序列(亦即，LC CDR1、LC CDR2 及 LC CDR3)及 / 或一或多個重鏈 CDR 序列(亦即，HC CDR1、HC CDR2 及 HC CDR3)。

【0136】在一些實施例中，FR α 結合域包含 huMov19 抗體及 / 或 FR57 抗體之輕鏈及 / 或重鏈可變序列。huMov19 及 FR57 之輕鏈可變序列及重鏈可變序列提供於下表 3 及 4 中。

表 3. 輕鏈可變序列

抗體	序列
FR57	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQS PRLLIKYSVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFC QQSNSWPHYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:17)
FR57 F83E ; Q101C	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQS PRLLIKYSVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDEGMYFC QQSNSWPHYTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:18)
huMov19	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQP GQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAA TYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:19)
huMov19 G104C	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQP GQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAA TYYCQQSREYPYTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:20)
huMov19 A87E ; G104C	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQP GQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDEA TYYCQQSREYPYTFGCGTKLEIK (SEQ ID NO:21)

表 4. 重鏈可變序列

抗體	序列
FR57	EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPG KGLEWVAYISSGSSTISYADSVKGRFTISRDN SKKTLL LQMTSL RAEDTAMYYCAREAYGSSMEYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:22)
FR57 E6Q ; G44C	EVQLVQSGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPG K <u>C</u> LEWVAYISSGSSTISYADSVKGRFTISRDN SKKTLL LQMTSL RAEDTAMYYCAREAYGSSMEYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:23)
huMov1 9	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPG QSLEWIGRIHPYDGD TFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELLS LTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:24)
huMov1 9 S44C	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPG Q <u>C</u> LEWIGRIHPYDGD TFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDY (SEQ ID NO:25)
huMov1 9 S44C	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPG Q <u>C</u> LEWIGRIHPYDGD TFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:57)
huMov1 9 A16E ; S44C	QVQLVQSGAEVVKPG <u>E</u> SVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPG Q <u>C</u> LEWIGRIHPYDGD TFYNQKFQ GKATLTVDKSSNTAHMELL SLTSEDFAVYYCTRYDGS RAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:26)

【 0137】 在一些實施例中，FR α 結合域包含與SEQ ID NO:17具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性之VL，視情況其中該VL包含分別為SEQ ID NO: 1-3之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列。在一些實施例中，FR α 結合域包含與SEQ ID NO:19具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性之VL，視情況其中該VL包含分別為SEQ ID NO: 4-

6之 VL CDR1、VL CDR2及 VL CDR3序列。

【0138】在一些實施例中，FR α 結合域包含與SEQ ID NO:22具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性之VH，視情況其中該VH包含分別為SEQ ID NO: 7-9或分別為SEQ ID NO: 13、14及9之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列。在一些實施例中，FR α 結合域包含與SEQ ID NO:24具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性之VH，視情況其中該VH包含分別為SEQ ID NO: 10-12或分別為SEQ ID NO: 15、16及12之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列。

【0139】在一些實施例中，FR α 結合域包含VL及VH，其中(i)該VL與SEQ ID NO:17具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性，視情況其中該VL包含分別為SEQ ID NO: 1-3之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列，及(ii)該VH與SEQ ID NO:22具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性，視情況其中該VH包含分別為SEQ ID NO: 7-9或分別為SEQ ID NO: 13、14及9之VH CDR1、VH CDR2及VH

CDR3序列。

【0140】在一些實施例中，FR α 結合域包含VL及VH，其中(i)該VL與SEQ ID NO:19具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性，視情況其中該VL包含分別為SEQ ID NO: 4-6之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3序列，及(ii)該VH與SEQ ID NO:24具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性，視情況其中該VH包含分別為SEQ ID NO: 10-12或分別為SEQ ID NO: 15、16及12之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3序列。

【0141】在一些實施例中，FR α 結合域包含VL及VH。VL及VH可為獨立多肽。VL及VH亦可為同一多肽之部分，例如包含VL、連接體及VH之多肽。包含VL、連接體及VH之多肽可呈取向VL-連接體-VH或取向VH-連接體-VL。

【0142】因此，在一些實施例中，FR α 結合域(例如scFv)自N端至C端包含：包含胺基酸序列SEQ ID NO:17之VL、連接體(例如甘胺酸-絲胺酸連接體)及包含胺基酸序列SEQ ID NO:22之VH。在一些實施例中，FR α 結合域自N端至C端包含：包含胺基酸序列SEQ ID NO:22之VH、連接體(例如甘胺酸-絲胺酸連接體)及包含胺基酸序列SEQ ID

NO:17之 VL。

【0143】 在一些實施例中，FR α 結合域(例如 scFv)自 N 端至 C 端包含：包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19 之 VL、連接體(例如甘胺酸-絲胺酸連接體)及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之 VH。在一些實施例中，FR α 結合域自 N 端至 C 端包含：包含胺基酸序列 SEQ ID NO:24 之 VH、連接體(例如甘胺酸-絲胺酸連接體)及包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19 之 VL。

【0144】 可用於連接 VH 及 VL 之連接體為此項技術中已知的。例如，連接體可為甘胺酸-絲胺酸連接體。在一些實施例中，該連接體可具有任何長度且可包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50 或 60 個或更多胺基酸。在其他實施例中，可用於本揭示案之連接體具有至少一個胺基酸及少於 100 個胺基酸、少於 90 個胺基酸、少於 80 個胺基酸、少於 70 個胺基酸、少於 60 個胺基酸、少於 50 個胺基酸、少於 40 個胺基酸、少於 30 個胺基酸、少於 20 個胺基酸、少於 19 個胺基酸、少於 18 個胺基酸、少於 17 個胺基酸、少於 16 個胺基酸、少於 15 個胺基酸、少於 14 個胺基酸、少於 13 個胺基酸或少於 12 個胺基酸。在一個實施例中，連接體序列包含甘胺酸胺基酸殘基。在其他情況下，連接體序列包含甘胺酸及絲胺酸胺基酸殘基之組合。

【0145】 在一些實施例中，FR α 結合域包含在 VH 與

VL之間同框融合之連接體。在一些實施例中，該等甘胺酸/絲胺酸連接體包含胺基酸殘基之任何組合，包括但不限於肽GGGS (SEQ ID NO:49)或GGGGS (SEQ ID NO:50)或其重複序列，包括此等既定肽之1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多重複序列。本文所揭示之甘胺酸/絲胺酸連接體包含胺基酸序列 $(GS)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGGGS)_n$ 或 $(GGGGGS)_n$ ，其中n為整數1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一個實施例中，該連接體序列為GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:51) (亦註明為 $(Gly_4Ser)_3$)。在另一實施例中，該連接體序列為GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:52) (亦註明為 $(Gly_4Ser)_4$)。

【0146】在一些實施例中，FR α 結合域為scFv。例示性scFv FR α 結合域提供於下表5中。

表 5. scFv 融合蛋白

名稱	scFv 序列
FR57scFv1 呈 VH-(G ₄ S) ₄ - VL 取向之 scFv	EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMHWVR QAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADSVKGRFTISRDNSSK TLLQMTSLRAEDTAMYYCAREAYGSSMEYWGQGT LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSV TPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIK YVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQ QNSWPHYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:27)
FR57scFv2 呈 VL (F83E ; Q101C)-(G ₄ S) ₄ - VH (E6Q ; G44C)取向之 scFv	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQ KPGQSPRLLIK Y VVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVE PEDEGMYFCQ Q NSWPHYTFGCGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVQSGGGLVQPGGSRRLSCAAS GFTFSSFGMHWVRQAPGKCLEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKTLLQMTSLRAEDTAMYYCARE AYGSSMEYWGQGT L TVSS (SEQ ID NO:28)
FR57scFv3wt 呈 VL-(G ₄ S) ₄ - VH 取向之 scFv	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNLHWYQQ KPGQSPRLLIK Y VVSQSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISVE PEDFGMYFCQ Q NSWPHYTFGQGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAAS GFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKTLLQMTSLRAEDTAMYYCARE AYGSSMEYWGQGT L TVSS (SEQ ID NO:29)
Mov19scFv1 呈 VH-(G ₄ S) ₄ - VL 取向之 scFv	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWV KQSPGQSLEWIGRIHPYDGD T FYNQKFQGKATLTVDKS SNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPLSLA VSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQPRL LIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAAT YYCQQSREYPYTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)
Mov19scFv2 呈 VL (G104C)- (G ₄ S) ₄ -VH (S44C)取向之 scFv	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMH WHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLT ISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGCGTKLEIKGGGG SGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVVKPGASVKISC KASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIGRIHPYDGD T FYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYC TRYDGSRAMDYWGQGT T TVSS (SEQ ID NO:31)
Mov19scFv3 呈 VL (A87E ; G104C)-(G ₄ S) ₄ - VH (A16E ; S44C)取向之 scFv	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMH WHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLT ISPVEAED E ATYYCQQSREYPYTFGCGTKLEIKGGGG SGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVVKPG E SVKISC KASGYTFTGYFMNWVKQSPGQCLEWIGRIHPYDGD T FYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYC TRYDGSRAMDYWGQGT T TVSS (SEQ ID NO:32)

【0147】在一些實施例中，FR α 結合域包含包括與 SEQ ID NO:27、28或29具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性之胺基酸序列的 scFv，視情況其中該 scFv包含分別為 SEQ ID NO:1-3之 VL CDR1、VL CDR2及 VL CDR3序列及分別為 SEQ ID NO: 7-9或分別為 SEQ ID NO: 13、14及9之 VH CDR1、VH CDR2及 VH CDR3序列。

【0148】在一些實施例中，FR α 結合域包含包括與 SEQ ID NO:30、31或32具有至少約70%、至少約75%、至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或100%序列一致性之胺基酸序列的 scFv，視情況其中該 scFv包含分別為 SEQ ID NO:4-6之 VL CDR1、VL CDR2及 VL CDR3序列及分別為 SEQ ID NO: 10-12或分別為 SEQ ID NO: 15、16及12之 VH CDR1、VH CDR2及 VH CDR3序列。

【0149】在某些實施例中，FR α 結合域與包含胺基酸序列 SEQ ID NO:17及 SEQ ID NO:22之抗體結合於FR α 之同一抗原決定基。

【0150】在某些實施例中，FR α 結合域與包含胺基酸序列 SEQ ID NO:19及 SEQ ID NO:24之抗體結合於FR α 之同一抗原決定基。

【0151】在某些實施例中，FR α 結合域為鼠科動物、嵌合或人類化FR α 結合域。如本文所用，人類化FR α 結合

域可為表面重塑FR α 結合域。

【0152】在某些實施例中，FR α 結合域結合於人類FR α ，而非FOLR2或FOLR3。

B. 雙互補位抗體形式

【0153】該等雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段可包含上文所論述之FR α 結合域之組合，其中該等FR α 結合域結合於FR α 之非重疊抗原決定基。

【0154】多種不同類型之雙特異性構築體為此項技術中已知的且可用於本文所提供之雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段。

【0155】對於雙特異性抗體建構之早期嘗試使用化學交聯或雜交融合瘤或四源融合瘤將兩種不同抗體之兩半接合在一起。儘管此等技術致力於製備雙特異性抗體，其亦會導致產生問題，諸如產生含有抗原結合位點之不同組合的混合群體、難以蛋白質表現、需要純化所關注之雙特異性抗體、低產率、產生費用等。

【0156】最近方法已使用經遺傳工程改造之構築體，該等構築體能夠產生單一雙特異性抗體之均質產物，而無需廣泛純化來移除不需要之副產物。該等構築體已包括串聯scFv、雙功能抗體、串聯雙功能抗體、雙重可變域抗體及使用諸如Ch1/Ck域或DNL[®]之基序之雜二聚化(Chames及Baty, 2009, Curr Opin Drug Discov Devel 12:276-83; Chames及Baty, mAbs 1:539-47)。BITE[®]係指藉由短肽連接

體接合之串聯 scFv (Chames及 Baty, mAbs 1:539-47)。雙特異性抗體產生之其他方法已包括四價 IgG-scFv 融合物 (Dong等人, 2011, MAbs 3:273-88)；雙重作用 Fab (DAF) 抗體 (Bostrom等人, 2009, Science 323:1610-14)；IgG 樣雙重可變域抗體 (DVD-Ig) (Wu 等人, 2007, Nat Biotechnol 25:1290-97)；及在 IgG4 分子之間使用動態交換 (van der Neut Kolfschoten 等人, 2007, Science 317:1554-57)。

【0157】DOCK-AND-LOCK[®] (DNL[®]) 複合物 (參見例如美國專利第 7,521,056 號；第 7,527,787 號；第 7,534,866 號；第 7,550,143 號；第 7,666,400 號；第 7,901,680 號；第 7,906,118 號；第 7,981,398 號；第 8,003,111 號) 表示另一雙特異性抗體形式。儘管標準 DNL[®] 複合物包含具有連接至一個 AD 連接分子之兩個 DDD 連接分子的三聚體，但複合物結構之變化允許形成二聚體、三聚體、四聚體、五聚體、六聚體及其他多聚體。

【0158】在一些實施例中，本文揭示具有不對稱 -Fc 分子之雙互補位構築體，包括呈「杵臼」結構。參見 Kontermann, *MAbs.*, 4(2):182-97 (2012)。杵臼 (KIH) 技術涉及工程改造 C_H3 域以在各重鏈中產生「杵」或「臼」，從而促進雜二聚化。KIH 技術描述於例如 Ridgway 等人, *Protein Engineering* 9(7):617-721 (1996)；US 5,731,168；US 5,807,706；US 5,821,333 中，其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。「CrossMab」技術進一步涉及在雙特異性抗體之一半的 Fab 內交換重鏈及輕鏈域，使得兩個臂

如此不同以致於無法發生輕-重鏈錯配(Schaefer等人, 2011, *Proc Natl. Acad Sci USA* 108:11187-92)。該杵臼方法將具有龐大側鏈之胺基酸引入至一重鏈之CH3域中，該等胺基酸符合另一重鏈之CH3域中的經適當設計之空腔。方法之組合防止重鏈與重鏈及重鏈與輕鏈相互作用之錯配，從而主要產生單一產物。

【0159】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段為二價(參見例如圖2中所示之「杵臼」實例)。二價雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段可包含例如兩個包含scFv之FR α 結合域，兩個包含獨立多肽鏈上之VH及VL的FR α 結合域，或一個包含scFv之FR α 結合域及一個包含獨立多肽鏈上之VH及VL的FR α 結合域。

【0160】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段為三價。

【0161】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段為四價(參見例如圖2中所示之「Morrison」實例)。四價抗體描述於例如M.J. Coloma, S.L. Morrison, *Nat. Biotechnol.*, 15(2):159-63 (1997)中，其以引用之方式整體併入本文中。

【0162】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含作為scFv之FR α 結合域。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含包括獨立多肽上之VH及VL之FR α 結合域。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含作為scFv之FR α 結

合域及包含獨立多肽上之 VH 及 VL 之 FR α 結合域。

【0163】在一些實施例中，二價雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含作為 scFv 之單一 FR α 結合域及包含獨立多肽上之 VH 及 VL 之單一 FR α 結合域。在該等實施例中，該 scFv 可融合至重鏈恆定區且該 VH 可融合至重鏈恆定區。在一些實施例中，該等恆定區具有「杵及臼」序列。「杵」序列可在融合至 scFv 之重鏈恆定區中，且「臼」序列可與融合至 VH 之恆定區融合。或者，「臼」突變可在融合至 scFv 之重鏈恆定區中，且「杵」序列可與融合至 VH 之恆定區融合。該等形式之例示性雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段之序列見表 7。

【0164】在一些實施例中，四價雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含兩個作為 scFv 之 FR α 結合域及兩個包含獨立多肽上之 VH 及 VL 之 FR α 結合域。在該等實施例中，該等 scFv 可融合至包含該 VH 之多肽之 N 端或 C 端。該等 scFv 亦可融合至包含該 VL 之多肽之 N 端或 C 端。

【0165】四價雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段可包含兩種多肽，其中第一多肽包含重鏈恆定區、VH 及 scFv 且第二多肽包含輕鏈恆定區及 VL。四價雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段亦可包含兩種多肽，其中第一多肽包含重鏈恆定區及 VH 且第二多肽包含輕鏈恆定區、VL 及 scFv。該等形式之例示性雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段之序列見表 6。

【0166】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其

抗原結合片段為雙特異性雜二聚雙功能抗體，例如四聚雙特異性雜二聚雙功能抗體。如本文所用，術語「雙特異性雜二聚雙功能抗體」係指兩種或更多種多肽鏈或蛋白質之複合物，且各自可包含至少一個抗體 VL 及一個抗體 VH 域，且其中各多肽鏈中之 VL 及 VH 域係來自不同抗體。

【0167】在一些實施例中，本文所揭示之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含一或多個表面重塑 FR α 結合域。在一些實施例中，雙互補位抗體或其抗原結合片段中之所有 FR α 結合域均經表面重塑。

【0168】在一些實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段係其中來自互補決定區 (CDR) 之殘基由來自非人類物種 (例如小鼠、大鼠、兔、倉鼠) 之 CDR 的殘基置換之具有所需特異性、親和力及能力之人類免疫球蛋白 (「CDR 移植」) (Jones 等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann 等人, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen 等人, *Science* 239:1534-1536 (1988))。

【0169】在進一步實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段係包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之 CDR 移植或表面重塑抗體，其中該重鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:7-9 表示之胺基酸序列的互補決定區，且其中該輕鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:1-3 表示之胺基酸序列的互補決定區。

【0170】在進一步實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段係包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈

可變區之 CDR 移植或表面重塑抗體，其中該重鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:13、14 及 9 表示之胺基酸序列的互補決定區，且其中該輕鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:1-3 表示之胺基酸序列的互補決定區。

【0171】在進一步實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段係包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之 CDR 移植或表面重塑抗體，其中該重鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:10-12 表示之胺基酸序列的互補決定區，且其中該輕鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:4-6 表示之胺基酸序列的互補決定區。

【0172】在進一步實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段係包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之 CDR 移植或表面重塑抗體，其中該重鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:15、16 及 12 表示之胺基酸序列的互補決定區，且其中該輕鏈可變區包含三個分別具有由 SEQ ID NO:4-6 表示之胺基酸序列的互補決定區。

【0173】在進一步實施例中，提供具有人類化(例如，表面重塑、CDR 移植)重鏈可變區之抗體或抗原結合片段，該重鏈可變區與對應於 SEQ ID NO:22-26 之胺基酸序列共享至少 90% 序列一致性，更佳地與 SEQ ID NO:22-26 共享 95% 序列一致性，最佳地與 SEQ ID NO:22-26 共享 100% 序列一致性。在特定實施例中，該抗體包括在 CDR 外部之構架區中之保守突變。

【0174】同樣，提供具有人類化(例如，表面重塑、

CDR移植)輕鏈可變區之抗體，該輕鏈可變區與對應於SEQ ID NO:17-21之胺基酸序列共享至少90%序列一致性，更佳地與SEQ ID NO:17-21共享95%序列一致性，最佳地與SEQ ID NO:17-21共享100%序列一致性。在特定實施例中，該抗體包括在CDR外部之構架區中之保守突變。

【0175】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含重鏈恆定區，諸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。在一些實施例中，該重鏈恆定區為IgG1重鏈恆定區或IgG4重鏈恆定區。此外，在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段可包含輕鏈恆定區(κ 輕鏈恆定區或 λ 輕鏈恆定區)。在一些實施例中，該輕鏈恆定區為 κ 輕鏈恆定區。

【0176】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含第一FR α 結合域，其包含分別選自由SEQ ID NO:19及24；20及25；及21及26組成之群的VL及VH序列；及第二FR α 結合域，其不與huMov19競爭結合於FR α 。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含第一FR α 結合域，其包含分別為SEQ ID NO:20及57之VL及VH序列；及第二FR α 結合域，其不與huMov19競爭結合於FR α 。

【0177】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含第一FR α 結合域，其包含分別選自由SEQ ID NO:17及22；及18及23組成之群的VL及VH序列；及第二FR α 結合域，其不與FR57競爭結合於FR α 。

【0178】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含FR α 結合域，該FR α 結合域競爭性地抑制結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:22及VL胺基酸序列SEQ ID NO:17之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0179】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含FR α 結合域，該FR α 結合域競爭性地抑制結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:24及VL胺基酸序列SEQ ID NO:19之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0180】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含(i)第一FR α 結合域，其競爭性地抑制結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:22及VL胺基酸序列SEQ ID NO:17之抗體相同之FR α 抗原決定基及(ii)第二FR α 結合域，其競爭性地抑制結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:24及VL胺基酸序列SEQ ID NO:19之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0181】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含FR α 結合域，該FR α 結合域結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:22及VL胺基酸序列SEQ ID NO:17之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0182】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含FR α 結合域，該FR α 結合域結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:24及VL胺基酸序列SEQ ID NO:19之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0183】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其

抗原結合片段包含(i)第一FR α 結合域，其結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:22及VL胺基酸序列SEQ ID NO:17之抗體相同之FR α 抗原決定基及(ii)第二FR α 結合域，其結合於與包含VH胺基酸序列SEQ ID NO:24及VL胺基酸序列SEQ ID NO:19之抗體相同之FR α 抗原決定基。

【0184】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或24)。

【0185】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或57)。

【0186】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或26)。

【0187】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈

及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或24)。

【0188】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或57)。

【0189】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或26)。

【0190】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或24)。

【0191】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈

(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或57)。

【0192】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或26)。

【0193】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或24)。

【0194】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或57)。

【0195】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或26)。

【0196】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈

及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或24)。

【0197】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或57)。

【0198】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或26)。

【0199】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或24)。

【0200】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈

(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或57)。

【0201】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或26)。

【0202】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或24)。

【0203】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 17及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或57)。

【0204】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 19及/或26)。

【0205】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈

及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或24)。

【0206】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或57)。

【0207】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或26)。

【0208】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或24)。

【0209】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或22)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈

(例如，分別為 SEQ ID NO: 21 及 / 或 57)。

【0210】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 22)及 huMOV19 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 21 及 / 或 26)。

【0211】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 23)及 huMOV19 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 19 及 / 或 24)。

【0212】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 23)及 huMOV19 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 19 及 / 或 25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 22)及 huMOV19 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 21 及 / 或 57)。

【0213】在一些實施例中，本發明之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 23)及 huMOV19 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 19 及 / 或 26)。

【0214】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 23)及 huMOV19 之可變輕鏈

及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或24)。

【0215】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或57)。

【0216】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 20及/或26)。

【0217】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或24)。

【0218】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 21及/或25)。在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含FR57之可變輕鏈及/或可變重鏈(例如，分別為SEQ ID NO: 18及/或23)及huMOV19之可變輕鏈及/或可變重鏈

(例如，分別為 SEQ ID NO: 21 及 / 或 57)。

【0219】在一些實施例中，本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 FR57 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 18 及 / 或 23)及 huMOV19 之可變輕鏈及 / 或可變重鏈(例如，分別為 SEQ ID NO: 21 及 / 或 26)。

【0220】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 (i) 與 FR57 結合於同一抗原決定基之 scFv 及 (ii) 與 huMov19 結合於同一抗原決定基之 scFv。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:27 及 SEQ ID NO:30。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:27 及 SEQ ID NO:31。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:27 及 SEQ ID NO:32。

【0221】在一些實施例中，抗 FR α 雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28 及 SEQ ID NO:30。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28 及 SEQ ID NO:31。在一些實施例中，抗 FR α 雙互補位抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28 及 SEQ ID NO:32。

【0222】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29 及 SEQ ID NO:30。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29 及 SEQ ID NO:31。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29 及 SEQ

ID NO:32。

【0223】應理解，SEQ ID NO: 27-32之VH及VL序列可以以不同次序排列。例如，如SEQ ID NO:27中所陳述之N端至C端取向為VH-(G4S)₄-VL。然而，本文揭示呈如下取向之scFv多肽序列，其中VH及VL序列圍繞甘胺酸-絲胺酸連接體經交換(例如VL-(G4S)₄-VH)。

【0224】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:26。

【0225】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:26。

【0226】 在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含(i)與FR57結合於同一抗原決定基之scFv及(ii)與huMov19結合於同一抗原決定基之FR α 結合域，其包含在獨立多肽上之VH及VL。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:26。

【0227】 在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:26。

【0228】 在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原

結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:20 及 SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:20 及 SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:20 及 SEQ ID NO:26。

【0229】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:26。

【0230】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:19 及 SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:19 及 SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:19 及 SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:19 及 SEQ ID NO:26。

【0231】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:20及SEQ ID NO:26。

【0232】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:24。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:25。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:57。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:26。

【0233】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含(i)與huMov19結合於同一抗原決定基之scFv及(ii)與FR57結合於同一抗原決定基之FR α 結合域，其包含在獨立多肽上之VH及VL。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:17及SEQ ID NO:22。在一些實施例中，雙互補位抗

FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:17及 SEQ ID NO:23。

【0234】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:18及 SEQ ID NO:22。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:18及 SEQ ID NO:23。

【0235】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 (i)與 huMov19結合於同一抗原決定基之 scFv及 (ii)與 FR57結合於同一抗原決定基之 FR α 結合域，其包含在獨立多肽上之 VH及 VL。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:18及 SEQ ID NO:22。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:18及 SEQ ID NO:23。

【0236】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:17及 SEQ ID NO:22。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:17及 SEQ ID NO:23。

【0237】在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:17及 SEQ ID NO:22。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:17及 SEQ ID

NO:23。

【0238】在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:22。在一些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:23。

【0239】在一些實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段包含揭示於下表6中之多肽序列。

表 6 Morrison 形式(C 端 scFv)融合蛋白

	名稱	scFv 序列
分子-1： mov19-IgG1- FR57scFv1	mov19-IgG1-FR57scFv-HC	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTG YFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQ KFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAV YYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSFGMH WVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADSVKG RFTISRDNSSKKTLLQMTSLRAEDTAMYCA REAYGSSMEYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSVTPGDRVSL SCRASQNINNNLHWYQQKPGQSPRLLIKYS QSVSGIPDRFSGSGSGTDFTLSSISSEPEDFGM YFCQQSNSWPHYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:33)
	huMov19 LC	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAG TSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLGAVPD RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSR EYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:34)
分子 2:FR57-IgG1-mov19scFv1	FR57-IgG1-mov19scFv1-HC	EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKKTLLQMTSLRAEDTAMY YCAREAYGSSMEYWGQGTLLTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

		VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLV QSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNW VKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDFTFYNQKFQGK ATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR YDGSRAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIVLTQSPSLAVSLGQPAISC KASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGQPRLLIYR ASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAED AATYYCQSQSREYPYTFGGGTKLEIKRT (SEQ ID NO:35)
	FR57LC	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNL HWYQQKPGQSPRLLIKYSQSVSGIPDRFSGS GSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQQSNSWPHY TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:36)
分子 3 : FR57scFv2- mov19-IgG1	FR57scFv 2-mov19- IgG1-HC	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNL HWYQQKPGQSPRLLIKYSQSVSGIPDRFSGS GSGTDFTLSSISVEPEDEGMYFCQQSNSWPHY TFGCGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVQSGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGKCLEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKTLTLQMTSLRAEDTAMY YCAREAYGSSMEYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSGGGGSGVQLVQSGAEVVKPGASVKISC KASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHP YDGDFTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMEL LSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

分 子 4 : FR57scFv3wt- mov19-IgG1		VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:37)
	huMov19 LCv1-6	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAG TSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPD RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSR EYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:38)
	FR57scFv 3wt- mov19- IgG1-HC	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNL HWYQQKPGQSPRLLIKYSQSVSGIPDRFSGS GSGTDFTLSSISVEPEDFGMYFCQQSNSWPHY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKKTLLQMTSLRAEDTAMY YCAREAYGSSMEYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSGGGGSQVQLVQSGAEVVKPGASVKISC KASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHP YDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMEL LSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:39)
	huMov19 LCv1-6	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAG TSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPD RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSR EYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:40)

【 0240 】 在 一 些 實 施 例 中 ， 雙 互 補 位 抗 FR α 抗 體 或 其

抗原結合片段包含多肽序列 SEQ ID NO:33 及 SEQ ID NO:34。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含選自 SEQ ID NO:35 及 SEQ ID NO:36 之多肽序列。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含選自 SEQ ID NO:37 及 SEQ ID NO:38 之多肽序列。在一些實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含選自 SEQ ID NO:39 及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【0241】 在一些實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段包含揭示於下表 7 中之多肽序列。

表 7. 不對稱-Fc 分子(杵臼)

	名稱	序列
分子 5： FR57scFv2- 杵 -Mov19- 臼	FR57scFv2- Fc-杵 (C220S、 T366W)	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNL HWYQQKPGQSPRLLIKYSVSQSVSGIPDRFSGS GSGTDFTLSSISVEPEDE <u>EG</u> MYFCQQSNSWPHY TFG <u>C</u> GTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLV <u>Q</u> SGGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGK <u>C</u> LEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKKTLLQLMTSLRAEDTAMY YCAREAYGSSMEYWGQGTLLTVSSGSEPK <u>S</u> DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSL <u>W</u> CLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO:41)
	Mov19-Fc-臼 (T366S、 L368A、 Y407V)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTG YFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDIFYNQ KFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAV YYCTRYDGSRAMDYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL <u>S</u> CAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FL <u>V</u> SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:42)
	Mov19-LC	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAG TSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNL EAGVPD RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSR EYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)

分子 6 : FR57scFv3 wt- 杵 - Mov19-白	FR57scFv3wt -Fc- 杵 (C220S 、 T366W)	EIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQNINNNL HWYQQKPGQSPRLLIKYSQSVSGIPDRFSGS GSGTDFTLSSISSEPEDFGMFYCQQSNSWPHY TFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSF GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTISYADS VKGRFTISRDNSSKKTLLQMTSLRAEDTAMY YCAREAYGSSMEYWGQGLVTVSSGSEPKSS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO:44)
	Mov19-Fc-白 (T366S 、 L368A 、 Y407V)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTG YFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQ KFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSTSEDFAV YYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:45)
	Mov19-LC	DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAG TSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLGAVPD RFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSR EYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:46)

【 0242 】 在一個實施例中，雙互補位抗 FR α 抗體或其
抗原結合片段包含多肽 SEQ ID NO: 41-43。在一個實施例

中，雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段包含多肽 SEQ ID NO: 44-46。

【0243】本揭示案之雙互補位抗體或其抗原結合片段可進一步包含連接體。在一些實施例中，該連接體可自 N 端至 C 端連接第一抗體或其抗原結合片段至第二抗體或其抗原結合片段。在其他實施例中，該連接體可自 N 端至 C 端連接第二多肽至第一多肽。

【0244】在一個實施例中，該等雙互補位抗體或其抗原結合片段包含位於第一肽、抗體或其抗原結合片段與第二肽、抗體或其抗原結合片段之間之連接體序列。該連接體可具有任何長度且可包含至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50 或 60 個或更多胺基酸。在其他實施例中，可用於本揭示案之連接體具有至少一個胺基酸及少於 100 個胺基酸、少於 90 個胺基酸、少於 80 個胺基酸、少於 70 個胺基酸、少於 60 個胺基酸、少於 50 個胺基酸、少於 40 個胺基酸、少於 30 個胺基酸、少於 20 個胺基酸、少於 19 個胺基酸、少於 18 個胺基酸、少於 17 個胺基酸、少於 16 個胺基酸、少於 15 個胺基酸、少於 14 個胺基酸、少於 13 個胺基酸或少於 12 個胺基酸。在一個實施例中，連接體序列包含甘胺酸胺基酸殘基。在其他情況下，連接體序列包含甘胺酸及絲胺酸胺基酸殘基之組合。

【0245】在一些實施例中，該等甘胺酸/絲胺酸連接

體可包含胺基酸殘基之任何組合，包括但不限於肽 GGGGGS (SEQ ID NO:49)或 GGGGGS (SEQ ID NO:50)或其重複序列，包括此等既定肽之 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或更多重複序列。本文所揭示之甘胺酸/絲胺酸連接體包含胺基酸序列 $(GS)_n$ 、 $(GGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 、 $(GGGGGS)_n$ 或 $(GGGGGS)_n$ ，其中 n 為整數 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一個實施例中，該連接體序列為 GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:51) (亦註明為 $(Gly_4Ser)_3$)。在另一實施例中，該連接體序列為 GGGGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:52) (亦註明為 $(Gly_4Ser)_4$)。

【0246】在一些實施例中，該雙互補位抗 $FR\alpha$ 抗體包含改變之(例如突變或經工程改造) Fc 區。例如，在一些態樣中，該 Fc 區已發生改變以減少或增強該抗體之效應物功能、改變該抗體之血清半衰期或其他功能特性。效應物功能之減少或消除在某些情況下為所需的，例如在如下抗體之情況下，其作用機制涉及阻斷或拮抗，而非攜帶標靶抗原之細胞之殺死。當有關其中 $Fc\gamma R$ 以低水準表現之非所需細胞(諸如腫瘤及外源細胞)時，增加之效應物功能一般為所需的，例如具有低水準之 $Fc\gamma RIIB$ 之腫瘤特異性 B 細胞(例如非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、CLL 及伯奇氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma))。本發明之具有該經賦予或改變之效應物功能活性之免疫結合物可用於治療及/或預防其中需要效應物功能活性之增強功效之疾病、

病症或感染。在一些態樣中，Fc區係選自IgM、IgA、IgG、IgE或其他同型之同型。

【0247】儘管雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段之Fc區可具有結合於一或多種Fc受體(例如一或多種Fc γ R)之能力，但在某些實施例中，該抗體或抗體片段包含與Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIIB (CD16b)之結合改變(相對於由野生型Fc區展現之結合)的變異型Fc區，例如與活化受體之結合增強及/或與抑制受體之結合實質上減少或不能與抑制受體結合。因此，雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段之Fc區可包括完全Fc區之一些或全部CH2域及/或一些或全部CH3域，或可包含變異型CH2及/或變異型CH3序列(相對於完全Fc區之CH2或CH3域，其可包括例如一或多種插入及/或一或多種缺失)。該等Fc區可包含非Fc多肽部分，或可包含非天然完全Fc區之部分，或可包含非天然存在取向之CH2及/或CH3域(諸如兩個CH2域或兩個CH3域或依N端至C端方向，CH3域連接至CH2域等)。

【0248】此項技術中已知經鑑別為改變效應物功能之Fc區修飾，包括增加與活化受體(例如Fc γ RIIA (CD16A))之結合及減少與抑制受體(例如Fc γ RIIB (CD32B))之結合的修飾(參見例如Stavenhagen等人，Cancer Res. 57(18):8882-8890 (2007))。表8列出增加與活化受體之結合及/或減少與抑制受體之結合的例示性修飾之例示性單一、雙重、三重、四重及五重取代(編號係如Kabat中之EU索引編號，且

取代係相對於 SEQ ID NO:59之胺基酸序列)。

表 8. 較佳活化 Fc 區之變異

單一位點變異			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
雙重位點變異			
F243L 及 R292P	F243L 及 Y300L	F243L 及 P396L	R292P 及 Y300L
D270E 及 P396L	R292P 及 V305I	P396L 及 Q419H	P247L 及 N421K
R292P 及 P396L	Y300L 及 P396L	R255L 及 P396L	R292P 及 P305I
K392T 及 P396L			
三重位點變異			
F243L、P247L 及 N421K		P247L、D270E 及 N421K	
F243L、R292P 及 Y300L		R255L、D270E 及 P396L	
F243L、R292P 及 V305I		D270E、G316D 及 R416G	
F243L、R292P 及 P396L		D270E、K392T 及 P396L	
F243L、Y300L 及 P396L		D270E、P396L 及 Q419H	
V284M、R292L 及 K370N		R292P、Y300L 及 P396L	
四重位點變異			
L234F、F243L、R292P 及 Y300L		F243L、P247L、D270E 及 N421K	
L234F、F243L、R292P 及 Y300L		F243L、R255L、D270E 及 P396L	
L235I、F243L、R292P 及 Y300L		F243L、D270E、G316D 及 R416G	
L235Q、F243L、R292P 及 Y300L		F243L、D270E、K392T 及 P396L	
P247L、D270E、Y300L 及 N421K		F243L、R292P、Y300L 及 P396L	
R255L、D270E、R292G 及 P396L		F243L、R292P、V305I 及 P396L	
R255L、D270E、Y300L 及 P396L		F243L、D270E、P396L 及 Q419H	
D270E、G316D、P396L 及 R416G			
五重位點變異			
L235V、F243L、R292P、Y300L 及 P396L		F243L、R292P、V305I、Y300L 及 P396L	
L235P、F243L、R292P、Y300L 及 P396L			

【0249】具有減少之與 CD32B 之結合及/或增加之與 CD16A 之結合的人類 IgG1 Fc 區之例示性變異體含有 F243L、R292P、Y300L、V305I 或 P396L 取代，其中編號係如 Kabat 中之 EU 索引編號。此等胺基酸取代可以任何組合存在於人類 IgG1 Fc 區中。在一個實施例中，變異型人

類 IgG1 Fc 區含有 F243L、R292P 及 Y300L 取代。在另一實施例中，變異型人類 IgG1 Fc 區含有 F243L、R292P、Y300L、V305I 及 P396L 取代。

【0250】在一些實施例中，該雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段包含含有降低效應物功能之修飾之免疫球蛋白重鏈恆定區（參見例如 Idusogie 等人，*J. Immunol.* 166:2571-2575 (2001)；Sazinsky 等人，*PNAS USA* 105:20167-20172 (2008)；Davis 等人，*J. Rheumatol.* 34:2204-2210 (2007)；Bolt 等人，*Eur. J. Immunol.* 23:403-411 (1993)；Alegre 等人，*Transplantation* 57:1537-1543 (1994)；Xu 等人，*Cell Immunol.* 200:16-26 (2000)；Cole 等人，*Transplantation* 68:563-571 (1999)；Hutchins 等人，*PNAS USA* 92:11980-11984 (1995)；Reddy 等人，*J. Immunol.* 164:1925-1933 (2000)；WO97/11971 及 WO07/106585；美國申請公開案 2007/0148167A1；McEarchern 等人，*Blood* 109:1185-1192 (2007)；Strohl，*Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009)；及 Kumagai 等人，*J. Clin. Pharmacol.* 47:1489-1497 (2007)，其中每一者之內容均以引用之方式整體併入本文中)。

【0251】在一些實施例中，相對於由野生型 IgG Fc 區 (SEQ ID NO:59) 展現之結合，該雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段之 Fc 區較佳展現降低的 (或實質上不展現) 與選自由以下組成之群之效應物受體的結合：Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A) (同種異型 R131 及 H131)、

Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a) (同種異型 V158及 F158)及 Fc γ RIIIB (CD16b)(同種異型 Fc γ IIIb-NA1及 Fc γ IIIb-NA2)。在一些實施例中，與包含相應免疫球蛋白之野生型 Fc 區之相應抗體或抗原結合片段之結合親和力相比，該雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段之 Fc 區變異型效應物受體結合親和力已減少至 1/10 或更低、1/50 或更低或 1/100 或更低。

【0252】在一特定實施例中，該雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段包含展現減少之效應物功能(例如減少之 ADCC)的 IgG Fc 區且包含在選自由 233、234、235、236、237、238、239、265、266、267、269、270、271、295、296、297、298、300、324、325、327、328、329、331 及 332 組成之群之一或多個胺基酸位置處的修飾，其中胺基酸位置編號係根據如 Kabat 中所陳述之 EU 索引。在一個實施例中，EpCAM 抗體之 CH2-CH3 域包括以下取代中之任何 1、2、3 或 4 者：L234A、L235A、D265A、N297Q、N297A 及 N297G，其中編號係如 Kabat 中之 EU 索引編號。在另一實施例中，CH2-CH3 域含有 N297Q 取代、N297A 取代或 L234A 及 L235A 取代，因為此等突變消除 FcR 結合。或者，該雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段包含天然存在之 Fc 區之 CH2-CH3 域，該天然存在之 Fc 區固有地展現降低的(或實質上不展現)與 Fc γ RIIIA (CD16a) 之結合及/或降低的效應物功能(相對於由野生型 IgG1 Fc 區(SEQ ID NO:59)展現之結合及效應物功能)。在一特定實施例中，該雙互補

位抗FR α 抗體之Fc恆定區包含IgG2 Fc區(SEQ ID NO:60)或IgG4 Fc 區 (SEQ ID NO:61)。由於 N297A、N297G、N297Q、L234A、L235A及D265A取代消除效應物功能，故在其中需要效應物功能之情況下，將較佳地不使用此等取代。

【0253】含具有減少或消除之效應物功能的Fc區之雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段之CH2及CH3域之較佳IgG1序列包含取代L234A/L235A（加下劃線顯示）(SEQ ID NO:62)：

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG
```

【0254】含具有減少或消除之效應物功能的Fc區之雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段之CH2及CH3域之較佳IgG1序列包含取代N297A（加下劃線顯示）(SEQ ID NO:63)：

```
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYASTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPG
```

【0255】含具有減少或消除之效應物功能的Fc區之雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段之CH2及CH3域之較佳IgG1序列包含取代N297Q（加下劃線顯示）(SEQ ID NO:64)：

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYQSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPG

【0256】 在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段包含選自SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63或SEQ ID NO:64之Fc (免疫球蛋白)序列。在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段包含具有減少或消除之效應物功能之Fc (免疫球蛋白)序列(例如，包含上文在SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63及/或SEQ ID NO:64中示出的取代)且包含如本文所揭示之一或多種杵白突變。在一些實施例中，該Fc序列包含如本文所揭示之杵突變。在一些實施例中，該Fc序列包含如本文所揭示之白突變。

【0257】 在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段包含對應於以下之一或多種修飾：IgG1-C220S、C226S、C229S、P238S；IgG1-C226S、C229S；IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A；IgG1-L234A、L235A；IgG1-L234F、L235E、P331S；IgG1-L234F、L235E、P331S；IgG1-H268Q、A330S、P331S；IgG1-G236R、L328R；IgG1-L235G、G236R、IgG1-N297A；IgG1-N325A、L328R；IgG1-N325L、L328R；IgG1-K326W、E333S；IgG2-V234A、G237A；IgG2-E333S；IgG2 H268Q、V309L、A330S、A331S；IgG4-S228P、L236E；IgG4-F234A、L235A；IgG4-F234A、G237A、E318A；IgG4-L235A、G237A、E318A；IgG4-

L236E；IgG2-EU序列 118-260；及 IgG4-EU序列 261-447；其中位置編號係根據如 Kabat 中之 EU 索引。

【0258】在一些實施例中，該雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段包含具有減少之 CDC 活性之重鏈免疫球蛋白恆定域。在特定態樣中，雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段包含含有降低 CDC 活性之突變之 IgG1 重鏈恆定區(參見例如 WO 1997/11971 及 WO 2007/106585；美國申請公開案 2007/0148167A1；McEarchern 等人，*Blood* 109:1185-1192 (2007)；Hayden-Ledbetter 等人，*Clin. Cancer* 15:2739-2746 (2009)；Lazar 等人，*PNAS USA* 103:4005-4010 (2006)；Bruckheimer 等人，*Neoplasia* 11:509-517 (2009)；Strohl，*Curr. Op. Biotechnol.* 20:685-691 (2009)；及 Sazinsky 等人，*PNAS USA* 105:20167-20172 (2008)；其中每一者均以引用之方式整體併入本文中)。降低 CDC 之重鏈恆定域序列修飾的實例包括對應於以下之一或多種修飾：IgG1-C226S、C229S、E233P、L234V、L235A；IgG1-C226S、P230S；IgG1-L234F、L235E、P331S；IgG1-S239D、A330L、I332E；IgG2 EU 序列 118-260；IgG4-EU 序列 261-447；及 IgG2-H268Q、V309L、A330S、A331S (根據 EU 索引)。

【0259】在一些實施例中，所提供之雙互補位抗 FR α 抗體或抗原結合片段包含含有一或多種半衰期延長胺基酸修飾(例如取代)之重鏈免疫球蛋白恆定域。能夠延長含 Fc 區分子之半衰期之多種突變為此項技術中已知的且作為本

文所提供之雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段的組分經涵蓋。參見例如美國專利第6,277,375號；第7,083,784號；第7,217,797號及第8,088,376號；美國公開案第2002/0147311號；及第2007/0148164號；及PCT公開案第WO 1998/23289號；第WO 2009/058492號；及第WO 2010/033279號，其中每一者之內容均以引用之方式整體併入本文中。

【0260】包含Fc區之蛋白質的血清半衰期可藉由增加該Fc區對FcRn之結合親和力而延長。如本文所用，術語「半衰期」意謂分子之藥物動力學特性，其係分子在其投與之後的平均存在時間之量度。半衰期可表述為自個體(例如人類患者或其他哺乳動物)之身體或其特定隔室消除百分之五十(50%)的已知量之分子所需的時間，例如，如在血清中(亦即，循環半衰期)或在其他組織中所量測。一般而言，半衰期延長導致所投與之分子在循環中之平均滯留時間(MRT)增加。

【0261】在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段包含在選自由以下組成之群之一或多個位置處的半衰期延長胺基酸取代：238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435及436，其中胺基酸位置編號係根據EU索引。在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段含有在位置251-

257、285-290、308-314、385-389及428-436處之胺基酸殘基之一或多種胺基酸取代，其中胺基酸位置編號係根據EU索引。在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段含有以下一或多者：用Tyr、Phe、Trp或Thr取代在Kabat位置252處之胺基酸；用Thr取代在Kabat位置254處之胺基酸；用Ser、Arg、Gln、Glu、Asp或Thr取代在Kabat位置256處之胺基酸；用Leu取代在Kabat位置257處之胺基酸；用Pro取代在Kabat位置309處之胺基酸；用Ser取代在Kabat位置311處之胺基酸；用Thr、Leu、Phe或Ser取代在Kabat位置428處之胺基酸；用Arg、Ser、Iso、Pro或Gln取代在Kabat位置433處之胺基酸；或用Trp、Met、Ser、His、Phe或Tyr取代在Kabat位置434處之胺基酸。更特定言之，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段域可相對於野生型人類IgG恆定域含有胺基酸取代，包括用Tyr取代在Kabat位置252處之胺基酸、用Thr取代在Kabat位置254處之胺基酸及用Glu取代在Kabat位置256處之胺基酸。

【0262】在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段包含選自以下之至少一種取代：T250Q、M252Y、S254T、T256E、K288D、T307Q、V308P、A378V、M428L、N434A、N434S、N434H、N434Y、H435K及Y436I，其中編號係如Kabat中之EU索引編號。在進一步實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段包含選自以下之取代：(a) M252Y、S254T及T256E；(b) M252Y及S254T；(c) M252Y及T256E；(d) T250Q及

M428L ; (e) T307Q 及 N434A ; (f) A378V 及 N434A ; (g) N434A 及 Y436I ; (h) V308P 及 N434A ; 及 (i) K288D 及 H435K 。

【0263】在一較佳實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段含有包含以下取代中之任何1、2或3者之變異型IgG Fc區：M252Y、S254T及T256E。本揭示案進一步提供具有變異型Fc區之雙互補位抗FR α 抗體或抗原結合片段，該等變異型Fc區包含：(a)改變效應物功能及/或Fc γ R之一或多種突變；及(b)延長血清半衰期之一或多種突變。

表 9：免疫球蛋白序列

例示性 IgG1 Fc 區	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:59)
例示性 IgG2 Fc 區	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:60)
例示性 IgG4 Fc 區	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:61)
例示性 L234A/L235A IgG1 Fc區	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:62)
例示性 N297A IgG1 Fc區	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:63)
例示性 N297Q IgG1 Fc區	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:64)

III. 雙互補位抗體產生

【0264】免疫特異性地結合於 $FR\alpha$ 之雙互補位抗體或其抗原結合片段可藉由此項技術中已知用於合成抗體之方法，例如藉由化學合成或藉由重組表現技術產生。除非另外指示，否則本文所述之方法使用在此項技術之技能內的分子生物學、微生物學、遺傳分析、重組 DNA、有機化學、生物化學、PCR、寡核苷酸合成及修飾、核酸雜交及相關領域中之習知技術。此等技術描述於例如本文所引用之參考文獻中且在該文獻中經充分解釋。參見例如 Sambrook J 等人，(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY；Ausubel FM 等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 年及每年更新)；*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 年及每年更新) Gait (編) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press；Eckstein (編) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press；Birren B 等人 (編) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

【0265】如本文所提供之雙互補位抗體或其抗原結合片段可藉由化學連接兩種不同單株抗體或藉由融合兩種融合瘤細胞株以產生雜交-融合瘤來製備。

【0266】在一特定實施例中，所述之雙互補位抗體或

其抗原結合片段藉由涉及產生之任何方式，例如經由DNA序列之合成、遺傳工程改造來製備、表現、產生或分離。在某些實施例中，該種雙互補位抗體或其抗原結合片段包含未天然存在於動物或哺乳動物(例如人類)活體內之抗體生殖系譜系內之序列(例如DNA序列或胺基酸序列)。

【0267】製備雙特異性、二價抗體或其抗原結合片段之方法描述於例如美國專利第5,731,168號、第5,807,706號、第5,821,333號及美國申請公開案第2003/020734號及第2002/0155537號中；其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。雙特異性四價抗體及其製備方法描述於例如國際申請公開案第WO02/096948號及第WO00/44788號中，該兩者之揭示內容均以引用之方式整體併入本文中。一般參見國際申請公開案第WO93/17715號、第WO92/08802號、第WO91/00360號及第WO92/05793號；Tutt等人，J. Immunol. 147:60-69 (1991)；美國專利第4,474,893號；第4,714,681號；第4,925,648號；第5,573,920號；及第5,601,819號；及Kostelny等人，J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)；其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。

【0268】一種用於產生雙特異性抗體之方法已稱作「杵臼」策略(參見例如國際公開案WO2006/028936)。Ig重鏈之錯配在此技術中藉由使形成IgG中之CH3域之界面的所選胺基酸突變而減少。在CH3域內兩條重鏈直接地相互作用所處之位置處，具有小側鏈之胺基酸(臼)經引入至一條重鏈之序列中且具有大側鏈之胺基酸(杵)經引入至另

一重鏈上之配對物相互作用殘基位置中。在一些實施例中，本發明組合物具有免疫球蛋白鏈，其中CH3域已藉由使在兩種多肽之間的界面處相互作用之所選胺基酸突變而經修飾，以便優先地形成雙特異性抗體。該等雙特異性抗體可由同一亞類(例如IgG1或IgG3)或不同亞類(例如IgG1及IgG3，或IgG3及IgG4)之免疫球蛋白鏈構成。

【0269】在一個實施例中，雙互補位抗體或其抗原結合片段包含在「杵鏈」中之T366W突變及在「臼鏈」中之T366S、L368A、Y407V突變，及視情況選用的在CH3域之間之額外鏈內二硫橋，其藉由例如將Y349C突變引入至「杵鏈」中且將E356C突變或S354C突變引入至「臼鏈」中而產生；在「杵鏈」中之R409D、K370E突變及在「臼鏈」中之D399K、E357K突變；在「杵鏈」中之T366W突變及在「臼鏈」中之T366S、L368A、Y407V突變；在「杵鏈」中之R409D、K370E突變及在「臼鏈」中之D399K、E357K突變；在一條鏈中之Y349C、T366W突變及在配對鏈中之E356C、T366S、L368A、Y407V突變；及在一條鏈中之Y349C、T366W突變及在配對鏈中之S354C、T366S、L368A、Y407V突變(根據EU編號系統編號)。

【0270】如本文所述之雙特異性抗體亦可根據DuoBody技術平台(Genmab A/S)產生，如例如國際公開案第WO 2011/131746號、第WO 2011/147986號、第WO 2008/119353號及第WO 2013/060867號中及Labrijn AF等

人, (2013) PNAS 110(13): 5145-5150中所述。該 DuoBody 技術可用於組合含有兩條重鏈及兩條輕鏈之第一 $\text{FR}\alpha$ 結合域的一半與含有兩條重鏈及兩條輕鏈之第二 $\text{FR}\alpha$ 結合域的一半。所得雜二聚體含有來自第一 $\text{FR}\alpha$ 結合域之一條重鏈及一條輕鏈, 及與其配對之來自第二 $\text{FR}\alpha$ 結合域之一條重鏈及一條輕鏈。

【0271】在一些情況下, 雙互補位抗體或其抗原結合片段含有 IgG4 及 IgG1、IgG4 及 IgG2、IgG4 及 IgG2、IgG4 及 IgG3 或 IgG1 及 IgG3 鏈雜二聚體。該等雜二聚重鏈抗體可常規地藉由例如修飾形成人類 IgG4 及 IgG1 或 IgG3 中之 CH3 域之界面的所選胺基酸而經工程改造以便有利於雜二聚重鏈形成。

【0272】在特定實施例中, 雙互補位抗體或其抗原結合片段可包含嵌合 $\text{FR}\alpha$ 結合域或人類化 $\text{FR}\alpha$ 結合域。在某些實施例中, 雙互補位抗體或其抗原結合片段可為 F(ab')_2 片段。 F(ab')_2 片段含有藉由鉸鏈區中之二硫鍵連接的四聚抗體分子之兩個抗原結合臂。

【0273】本文所述之雙互補位抗體或其抗原結合片段可藉由熟習此項技術者已知之任何技術產生。例如, 本文所述之 F(ab')_2 片段可使用諸如胃蛋白酶之酶藉由免疫球蛋白分子之蛋白水解裂解而產生。

【0274】在某一態樣中, 本文提供一種製備雙互補位抗體或其抗原結合片段之方法, 其包含培養本文所述之一或多種細胞。在某一態樣中, 本文提供一種製備雙互補位

抗體或其抗原結合片段之方法，其包含使用本文所述之細胞或宿主細胞(例如包含編碼本文所述之抗體之聚核苷酸的細胞或宿主細胞)來表現(例如重組表現)該抗體或抗原結合片段。在一特定實施例中，該細胞為經分離細胞。在一特定實施例中，外源聚核苷酸已經引入至該細胞中。在一特定實施例中，該方法進一步包含純化獲自該細胞或宿主細胞之抗體或抗原結合片段的步驟。

【0275】FR α 結合域可使用此項技術中已知之多種技術例如由單株抗體製備，該等技術包括使用融合瘤、重組及噬菌體呈現技術或其組合。例如，單株抗體可使用融合瘤技術產生，包括此項技術中已知且教示於例如 Harlow E 及 Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988)；Hammerling GJ 等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981)中之彼等。如本文所用，術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。例如，單株抗體可由外源表現本文所述之抗體之宿主細胞重組產生。本文所述之單株抗體可例如藉由如 Kohler G 及 Milstein C (1975) *Nature* 256: 495 中所述之融合瘤方法製得，或可例如使用例如如本文所述之技術自噬菌體文庫分離。用於製備純系細胞株及由此表現之單株抗體之其他方法係此項技術中熟知的(參見例如 *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 第5版, Ausubel FM 等人, 上述中第11章)。

【0276】此外，本文所述之FR α 結合域亦可使用此項

技術中已知之多種噬菌體呈現方法產生。在噬菌體呈現方法中，蛋白質呈現於攜帶編碼其之聚核苷酸序列的噬菌體粒子之表面上。詳言之，編碼 VH 及 VL 域之 DNA 序列自動物 cDNA 文庫（例如受影響組織之人類或鼠科動物 cDNA 文庫）擴增。編碼 VH 及 VL 域之 DNA 藉由 PCR 與 scFv 連接體一起重組且經選殖至噬菌粒載體中。該載體在大腸桿菌中經電穿孔且該大腸桿菌受輔助噬菌體感染。用於此等方法中之噬菌體典型地為絲狀噬菌體，包括 fd 及 M13，且該等 VH 及 VL 域通常重組融合至噬菌體基因 III 或基因 VIII。表現結合於特定抗原之抗體或片段的噬菌體可用抗原，例如使用經標記抗原或結合於或經捕捉至固體表面或珠粒之抗原進行選擇或鑑別。可用於製備本文所述之抗體之噬菌體呈現方法的實例包括揭示於 Brinkman U 等人，(1995) J Immunol Methods 182: 41-50；Ames RS 等人，(1995) J Immunol Methods 184: 177-186；Kettleborough CA 等人，(1994) Eur J Immunol 24: 952-958；Persic L 等人，(1997) Gene 187: 9-18；Burton DR 及 Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280；PCT 申請案第 PCT/GB91/001134 號；國際公開案第 WO 90/02809 號、第 WO 91/10737 號、第 WO 92/01047 號、第 WO 92/18619 號、第 WO 93/1 1236 號、第 WO 95/15982 號、第 WO 95/20401 號及第 WO 97/13844 號；及美國專利第 5,698,426 號、第 5,223,409 號、第 5,403,484 號、第 5,580,717 號、第 5,427,908 號、第 5,750,753 號、第 5,821,047 號、第 5,571,698 號、第 5,427,908 號、第

5,516,637 號、第 5,780,225 號、第 5,658,727 號、第 5,733,743 號及第 5,969,108 號中之彼等。

【0277】如以上參考文獻中所述，在噬菌體選擇之後，來自噬菌體之抗體編碼區可經分離且用於產生 $FR\alpha$ 結合域，包括人類 $FR\alpha$ 結合域，且表現於包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌在內之任何所需宿主中，例如如下文所述。重組產生諸如 Fab、Fab' 及 $F(ab')_2$ 片段之 $FR\alpha$ 結合域的技術亦可使用此項技術中已知之方法，諸如揭示於 PCT 公開案第 WO 92/22324 號；Mullinax RL 等人，(1992) BioTechniques 12(6): 864-9；Sawai H 等人，(1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34；及 Better M 等人，(1988) Science 240: 1041-1043 中之彼等來使用。

【0278】在一個態樣中，為了產生 $FR\alpha$ 結合域或抗體，可使用包括 VH 或 VL 核苷酸序列、限制位點及保護該限制位點之側接序列之 PCR 引子以自模板(例如 scFv 純系)擴增 VH 或 VL 序列。使用熟習此項技術者已知之選殖技術，經 PCR 擴增之 VH 域可經選殖至表現 VH 恆定區之載體中，且經 PCR 擴增之 VL 域可經選殖至表現 VL 恆定區(例如人類 κ 或 λ 恆定區)之載體中。該等 VH 及 VL 域亦可經選殖至表現必需恆定區之一載體中。重鏈轉化載體及輕鏈轉化載體接著使用熟習此項技術者已知之技術共轉染至細胞株中以產生表現抗體(例如 IgG)之穩定或短暫細胞株。

IV. 編碼雙互補位抗體之聚核苷酸

【0279】在某些實施例中，本揭示案涵蓋包含編碼雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段或該種抗體或片段之域(例如VH、VL、具有VL之VH(例如在scFv中)、重鏈、輕鏈、具有scFv之重鏈、具有scFv之輕鏈、恆定區或具有scFv之恆定區)的核酸之聚核苷酸。

【0280】因此，本文提供編碼SEQ ID NO:17-40之聚核苷酸。本文亦提供包含編碼任何雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段之聚核苷酸之組合的組合物(例如包含編碼SEQ ID NO:17之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:22之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:18之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:23之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:19之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:24之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:20之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:25之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:21之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:26之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:33之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:34之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:35之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:36之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:37之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:38之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:39之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:40之聚核苷酸的組合物、包含編碼SEQ ID NO:41之聚核苷酸、編碼SEQ ID NO:42之聚核苷酸及編碼SEQ ID NO:43之聚核苷酸的組合物或包含編碼SEQ ID NO:44之聚

核苷酸、編碼 SEQ ID NO:45 之聚核苷酸及編碼 SEQ ID NO:46 之聚核苷酸的組合物)。本文亦提供包含編碼任何雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段之聚核苷酸之組合的組合物(例如包含編碼 SEQ ID NO:20 之聚核苷酸及編碼 SEQ ID NO:57 之聚核苷酸的組合物)。

【0281】在某些實施例中，該雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段係由質體編碼，該等質體根據布達佩斯條約之條款寄存於位於 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 處之 American Type Culture Collection (ATCC) 且具有 ATCC 寄存編號 PTA-10774 (2010 年 4 月 7 日寄存)、PTA-125915 (「Mov19-Fc-臼」；2019 年 4 月 29 日寄存至 ATCC 且 2019 年 4 月 30 日由 ATCC 接受) 及 PTA-125916 (「FR57scFv2-Fc-杵」；2019 年 4 月 29 日寄存至 ATCC 且 2019 年 4 月 30 日由 ATCC 接受)。

【0282】本發明之聚核苷酸可呈 RNA 形式或呈 DNA 形式。DNA 包括 cDNA、基因體 DNA 及合成 DNA；且可為雙鏈或單鏈，且若為單鏈，則可為編碼鏈或非編碼(反義)鏈。在一些實施例中，聚核苷酸為 cDNA 或缺乏一或多個內源內含子之 DNA。

【0283】在一些實施例中，聚核苷酸為非天然存在之聚核苷酸。在一些實施例中，聚核苷酸係重組產生的。

【0284】在某些實施例中，該等聚核苷酸為經分離的。在某些實施例中，該等聚核苷酸為實質上純的。在一些實施例中，聚核苷酸自天然組分經純化。

【0285】在一些實施例中，本文所提供之聚核苷酸針對特定宿主中之表現經密碼子最佳化(將人類 mRNA 中之密碼子改變為諸如大腸桿菌之細菌宿主所青睞的彼等)。

V. 細胞及載體

【0286】亦提供包含本文所述之聚核苷酸之載體及細胞。

【0287】在某些態樣中，本文提供表現(例如重組)特異性地結合於 $FR\alpha$ 之本文所述抗體、其抗原結合片段且包含相關聚核苷酸及表現載體之細胞(例如宿主細胞)。本文提供用於在宿主細胞中、較佳地在哺乳動物細胞中重組表現之載體(例如表現載體)，其包括包含編碼抗 $FR\alpha$ 抗體或其片段之核苷酸序列的聚核苷酸。本文亦提供包含用於重組表現本文所述之抗 $FR\alpha$ 抗體或其抗原結合片段之該等載體之宿主細胞。在一特定態樣中，本文提供用於產生本文所述之抗體或其抗原結合片段之方法，其包含在宿主細胞中表現該抗體或其抗原結合片段。

【0288】本文所述之抗體或其抗原結合片段的重組表現涉及表現載體之建構，該表現載體含有編碼該抗體或其片段(例如重鏈或輕鏈、包含重鏈或輕鏈的融合蛋白(例如融合至一或多個可變域(例如 scFv)之重鏈或輕鏈)、可變域、包含 VH 及 VL 之多肽(例如 scFv)、恆定域及/或包含恆定域的融合蛋白(例如融合至一或多個可變域(例如 ScFv)之恆定域))之聚核苷酸。一旦已獲得編碼本文所述之抗體或

其片段之聚核苷酸，即可藉由重組 DNA 技術使用此項技術中熟知的技術來產生用於產生該抗體或其片段之載體。因此，本文描述藉由表現編碼抗體或其片段之核苷酸序列之聚核苷酸來製備蛋白質的方法。可使用熟習此項技術者熟知之方法來建構含有用於抗體或其片段之編碼序列及適當轉錄及轉譯控制信號之表現載體。此等方法包括例如活體外重組 DNA 技術、合成技術及活體內基因重組。亦提供包含編碼抗體或其片段之核苷酸序列之可複製載體，該核苷酸序列可操作性連接至啟動子。該等載體可例如包括編碼抗體分子之恆定區的核苷酸序列(參見例如國際公開案第 WO 86/05807 號及第 WO 89/01036 號；及美國專利第 5,122,464 號)，且該抗體之可變域可經選殖至該種載體中以表現整個重鏈、整個輕鏈或整個重鏈及輕鏈兩者。編碼額外可變域或 FR α 結合域(例如 scFv)之核苷酸序列亦可經選殖至該種載體中以表現包含融合至 FR α 結合域或其片段(例如 VH 或 VL)之重鏈或輕鏈的融合蛋白。

【0289】表現載體可藉由習知技術經轉移至細胞(例如宿主細胞)，且所得細胞可接著藉由習知技術經培養以產生本文所述之抗體或片段(例如重鏈或輕鏈、包含重鏈或輕鏈的融合蛋白(例如融合至一或多個可變域(例如 scFv)之重鏈或輕鏈)、可變域、包含 VH 及 VL 之多肽(例如 scFv)、恆定域及/或包含恆定域的融合蛋白(例如融合至一或多個可變域(例如 ScFv)之恆定域))。因此，本文提供含有編碼本文所述之抗體或其片段之聚核苷酸的宿主細胞，

該聚核苷酸可操作性連接至啟動子以在宿主細胞中表現該等序列。

【0290】在某些實施例中，關於多鏈抗體之表現，編碼所有鏈之載體可個別地在宿主細胞中共表現以表現整個免疫球蛋白分子。

【0291】在某些實施例中，宿主細胞含有包含編碼本文所述之抗體或其抗原結合片段之所有鏈的聚核苷酸之載體。在特定實施例中，宿主細胞含有編碼本文所述之抗體或其抗原結合片段之所有鏈的多種不同載體。

【0292】載體或載體之組合可包含編碼兩種相互作用以形成本文所述之抗體或其抗原結合片段之多肽的聚核苷酸：例如，編碼包含重鏈及 scFv 之融合蛋白的第一聚核苷酸及編碼輕鏈之第二聚核苷酸；編碼包含輕鏈及 scFv 之融合蛋白的第一聚核苷酸及編碼重鏈之第二聚核苷酸；編碼包含重鏈及 VH 之融合蛋白的第一聚核苷酸及編碼包含輕鏈及 VL 之融合蛋白的第二聚核苷酸等。在兩種多肽由兩種單獨載體中之聚核苷酸編碼時，該等載體可以 3 個編碼包含重鏈之融合蛋白的聚核苷酸：1 個編碼包含輕鏈之融合蛋白的聚核苷酸之比率經轉染至宿主細胞中。

【0293】載體或載體之組合可包含編碼三種相互作用以形成本文所述之抗體或其抗原結合片段之多肽的聚核苷酸：例如，編碼重鏈之第一聚核苷酸、編碼輕鏈之第二聚核苷酸及編碼包含重鏈恆定域、VH 及 VL（視情況其中 VH 及 VL 為 scFv）之融合蛋白的第三聚核苷酸。在三種多肽由

三種單獨載體中之聚核苷酸編碼時，該等載體可以6個編碼重鏈之聚核苷酸:3個編碼輕鏈之聚核苷酸:1個編碼融合蛋白之聚核苷酸的比率經轉染至宿主細胞中。

【0294】載體或載體之組合可包含編碼四種相互作用以形成本文所述之抗體或其抗原結合片段之多肽的聚核苷酸：例如，編碼第一重鏈之第一聚核苷酸、編碼第二重鏈之第二聚核苷酸、編碼第一輕鏈之第三聚核苷酸及編碼第二輕鏈之第四聚核苷酸。

【0295】在一些實施例中，宿主細胞包含上文所述之載體或載體之組合。在其他實施例中，兩種宿主細胞、三種宿主細胞或四種宿主細胞包含上文所述之載體或載體之組合。

【0296】多種宿主表現載體系統可用於表現本文所述之抗體分子或其片段(例如重鏈或輕鏈、包含重鏈或輕鏈的融合蛋白(例如融合至一或多個可變域(例如scFv)之重鏈或輕鏈)、可變域、包含VH及VL之多肽(例如scFv)、恆定域及/或包含恆定域的融合蛋白(例如融合至一或多個可變域(例如ScFv)之恆定域))。該等宿主表現系統表示可用於產生所關注之編碼序列且隨後進行純化之媒劑，而且表示當用適當核苷酸編碼序列轉型或轉染時可原位表現本文所述之抗體或其片段之細胞。此等包括但不限於微生物，諸如經含有抗體編碼序列之重組噬菌體DNA、質體DNA或黏接質體DNA表現載體轉型的細菌(例如大腸桿菌及枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*))；經含有抗體編碼序列之重組酵母表

現載體轉型的酵母(例如畢赤酵母(*Saccharomyces Pichia*))；經含有抗體編碼序列之重組病毒表現載體(例如桿狀病毒)感染的昆蟲細胞系統；經重組病毒表現載體(例如花椰菜嵌紋病毒，CaMV；菸草嵌紋病毒，TMV)感染或經含有抗體編碼序列之重組質體表現載體(例如Ti質體)轉型的植物細胞系統(例如綠藻，諸如萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*))；或具有重組表現構築體之哺乳動物細胞系統(例如COS(例如COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa及NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20及BMT10細胞)，該等構築體含有源於哺乳動物細胞的基因體之啟動子(例如金屬硫蛋白啟動子)或源於哺乳動物病毒之啟動子(例如腺病毒晚期啟動子；牛痘病毒7.5K啟動子)。在一特定實施例中，用於表現本文所述抗體或其抗原結合片段之細胞為CHO細胞，例如來自CHO GS System™ (Lonza)之CHO細胞。在一特定實施例中，編碼免疫特異性地結合FR α (例如人類FR α)之本文所述抗體之核苷酸序列的表現係由組成性啟動子、誘導性啟動子或組織特異性啟動子調節。

【0297】一旦本文所述之抗體分子或其片段(例如重鏈或輕鏈、可變域及/或包含VH及VL之多肽(例如scFv))已藉由重組表現產生，其即可藉由此項技術中已知用於純化免疫球蛋白分子之任何方法，例如藉由層析(例如離子交

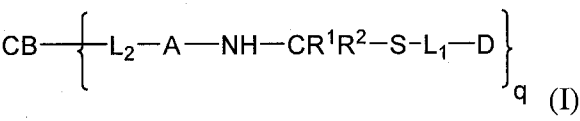
換、親和力(尤其藉由蛋白 A 後對特定抗原之親和力)及分級管柱層析)、離心、差異溶解度或藉由用於純化蛋白質之任何其他標準技術經純化。此外，本文所述抗體可融合至本文所述或以其他方式在此項技術中已知之異源多肽序列以促進純化。

VI. 含有雙互補位抗體之免疫結合物

【0298】在一個態樣中，本揭示案係關於包含本文所述之雙互補位 FR α 結合劑(例如抗體或其抗原結合片段)及細胞毒性劑之免疫結合物。該細胞毒性劑可使用此項技術中已知之技術直接地或間接地經由連接體偶合或結合至該 FR α 結合劑以產生「免疫結合物」、「結合物」或「ADC」。

A. 例示性免疫結合物

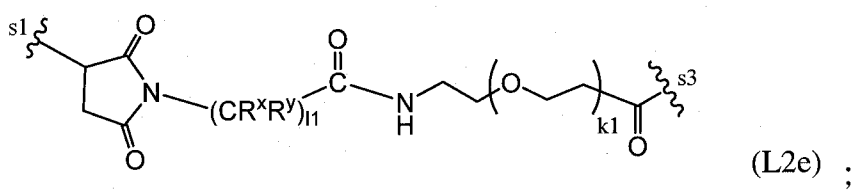
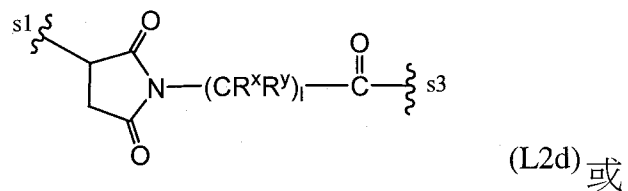
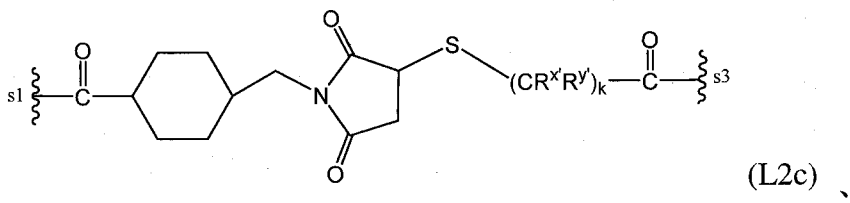
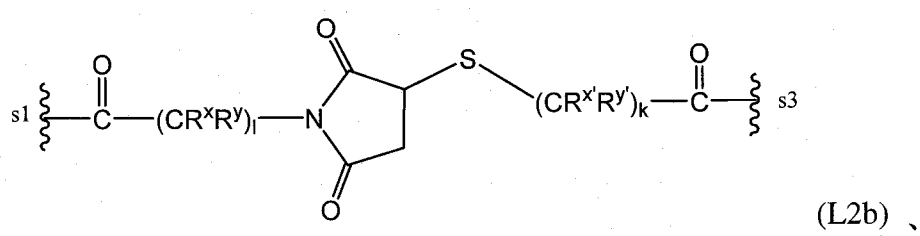
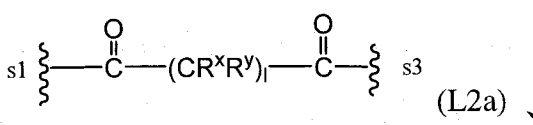
【0299】在第一實施例中，本文所提供之免疫結合物包含本文所述之雙互補位 FR α 抗體或其抗原結合片段，其經由位於該雙互補位 FR α 抗體或其抗原結合片段上之一或多個離胺酸殘基的 ϵ -胺基共價連接至本文所述之類美登素化合物。在一個實施例中，該免疫結合物係由式(I)表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CB係雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段；

L₂係由下式之一表示：



其中：

R^x、R^y、R^{x'}及R^{y'}在每次出現時獨立地為H、-OH、鹵素、-O-(C₁₋₄烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺或視情況經-OH、鹵素、SO₃H或NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代之C₁₋₄烷基，其中R₄₀、R₄₁及R₄₂各自獨立地為H或C₁₋₄烷基；

l及k各自獨立地為整數1至10；

l1為整數2至5；

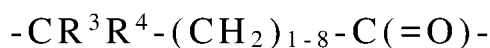
k1為整數1至5；且

s1指示連接至細胞結合劑CB之位點且s3指示連接至A基團之位點；

A 為胺基酸殘基或包含 2 至 20 個胺基酸殘基之肽；

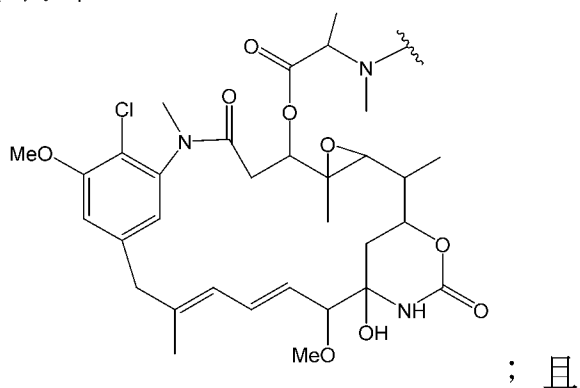
R^1 及 R^2 各自獨立地為 H 或 C_{1-3} 烷基；

L_1 係由下式表示：



其中 R^3 及 R^4 各自獨立地為 H 或 Me，且 L_1 中之 $-C(=O)-$ 部分連接至 D；

D 係由下式表示：



q 為整數 1 至 20。在一些實施例中， q 為整數 1 至 10。在一些實施例中， q 為整數 2 至 5。在一些實施例中， q 為整數 3 至 4。

【0300】在第一實施例之第一特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由上述式 (I) 表示，其中 R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 及 $R^{y'}$ 均為 H；且 l 及 k 各自獨立地為整數 2 至 6；且剩餘變數係如上文關於式 (I) 所述。

【0301】在第一實施例之第二特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由上述式 (I) 表示，其中 A 為含有 2 至 5 個胺基酸殘基之肽；且剩餘變數係如上文在第一實施例或第一特定實施例中關於式 (I) 所述。在一些實施例中，A 為可藉由蛋白酶裂解之肽。在一些實施例中，可藉由在腫瘤

組織中表現之蛋白酶裂解之肽。在一些實施例中，A係具有與 $-\text{NH}-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{S}-\text{L}_1-\text{D}$ 共價連接之胺基酸的肽，該胺基酸選自由Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、硒代-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr及Val組成之群，各自獨立地呈L或D異構體。在一些實施例中，連接至 $-\text{NH}-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{S}-\text{L}_1-\text{D}$ 之胺基酸為L胺基酸。

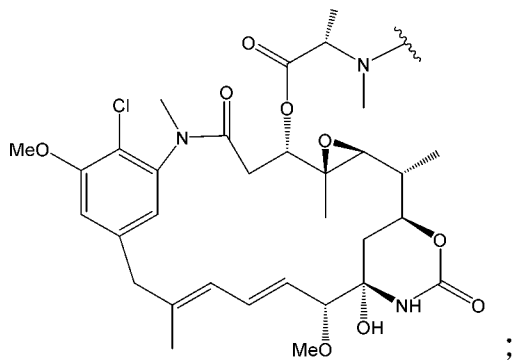
【0302】在第一實施例之第三特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由上述式(I)表示，其中A係選自由Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe-N9-甲苯磺醯基-Arg、Phe-N9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 54)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:55)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:56)、Val-Arg、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、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro及D-Ala-tBu-Gly組成之群，其中各肽中之第一胺基酸連接至 L_2 基團且各肽中之最後一個胺基酸連接至 $-\text{NH}-\text{CR}_1\text{R}_2-\text{S}-\text{L}_1-\text{D}$ ；且剩餘變數係

如在第一實施例或第一特定實施例中關於式(I)所述。

【0303】在第一實施例之第四特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由上述式(I)表示，其中 R^1 及 R^2 均為H；且剩餘變數係如在第一實施例或第一、第二或第三特定實施例中關於式(I)所述。

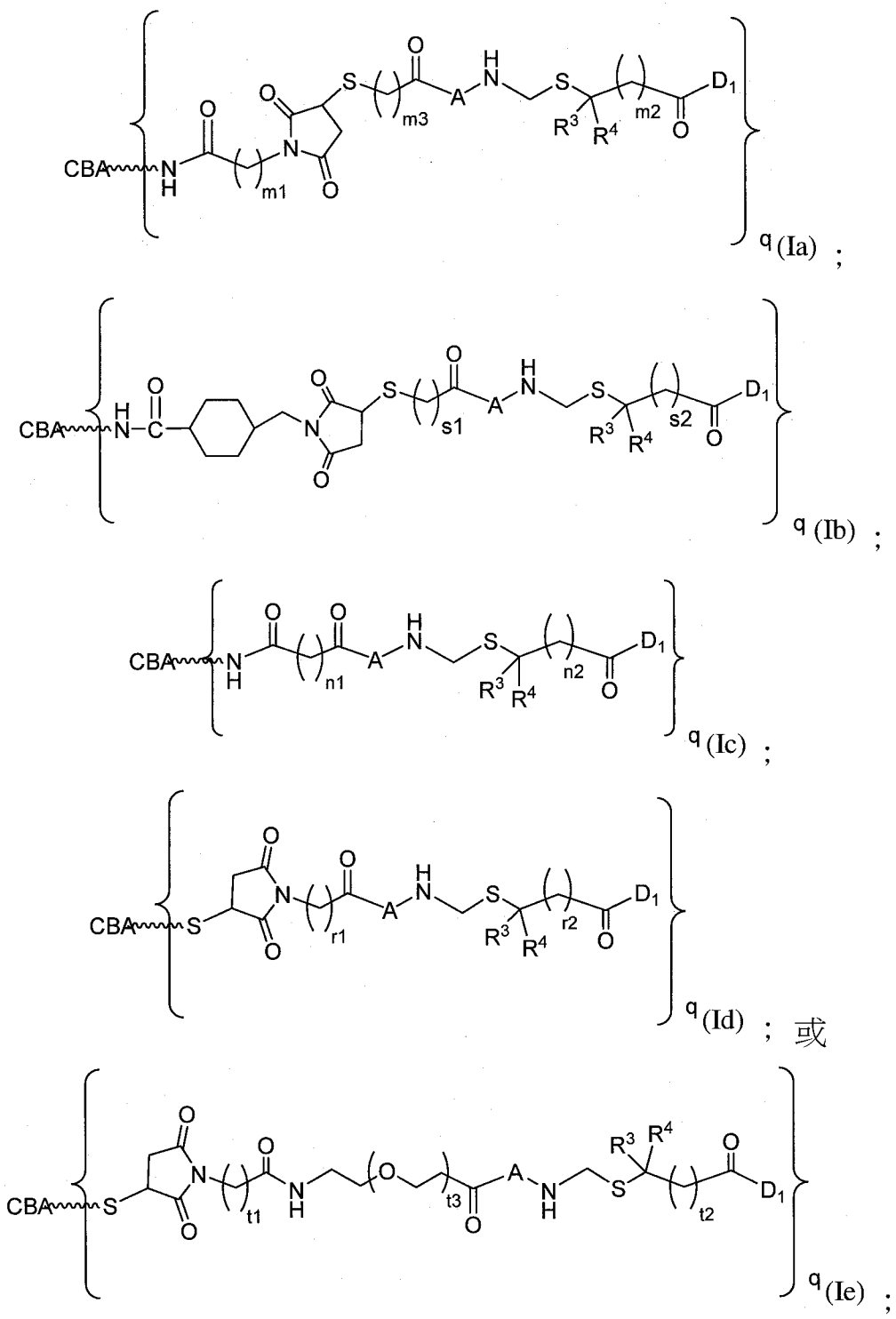
【0304】在第一實施例之第五特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由上述式(I)表示，其中 L_1 為 $-(CH_2)_{4-6}-C(=O)-$ ；且剩餘變數係如在第一實施例或第一、第二、第三或第四特定實施例中關於式(I)所述。

【0305】在第一實施例之第六特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由上述式(I)表示，其中D係由下式表示：



且剩餘變數係如在第一實施例或第一、第二、第三、第四或第五特定實施例中關於式(I)所述。

【0306】在第七特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CBA~NH—係經由 Lys 胺基連接至 L₂ 基團的雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段；

CBA~S—係經由 Cys 硫醇基連接至 L₂ 基團的雙互補位抗 FR α 抗體或其抗原結合片段；

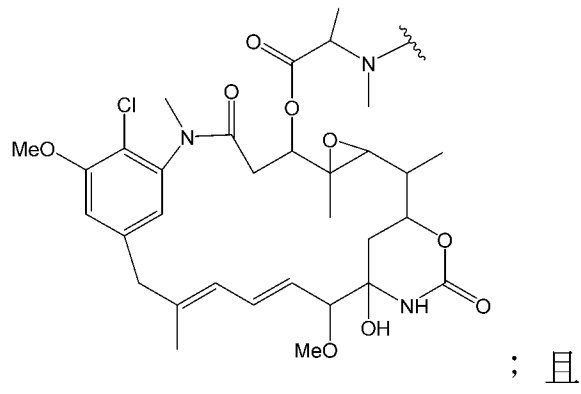
R^3 及 R^4 各自獨立地為H或Me；

$m1$ 、 $m3$ 、 $n1$ 、 $r1$ 、 $s1$ 及 $t1$ 各自獨立地為整數1至6；

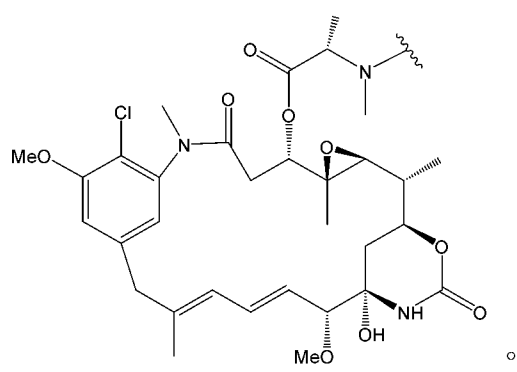
$m2$ 、 $n2$ 、 $r2$ 、 $s2$ 及 $t2$ 各自獨立地為整數1至7；

$t3$ 為整數1至12；

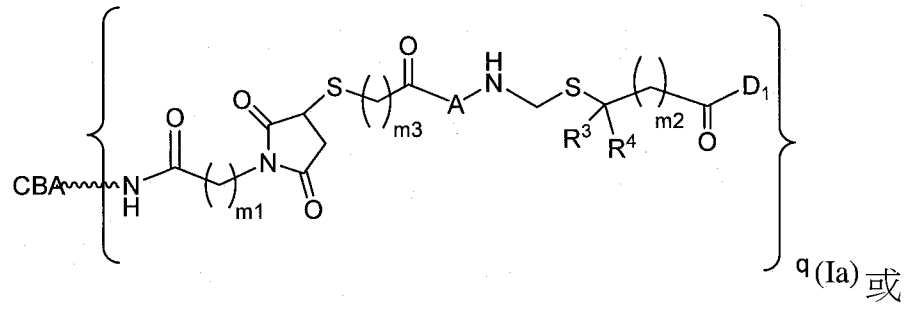
D_1 係由下式表示：

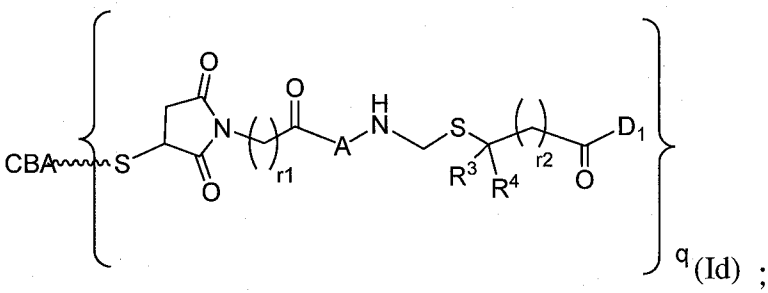


q 為整數1至20。在一些實施例中， q 為整數1至10。在一些實施例中， q 為整數2至5。在一些實施例中， q 為整數3至4。在一更特定實施例中， D_1 係由下式表示：



【0307】 在第八特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由下式表示：





其中：

m1及m3各自獨立地為整數2至4；

m2為整數2至5；

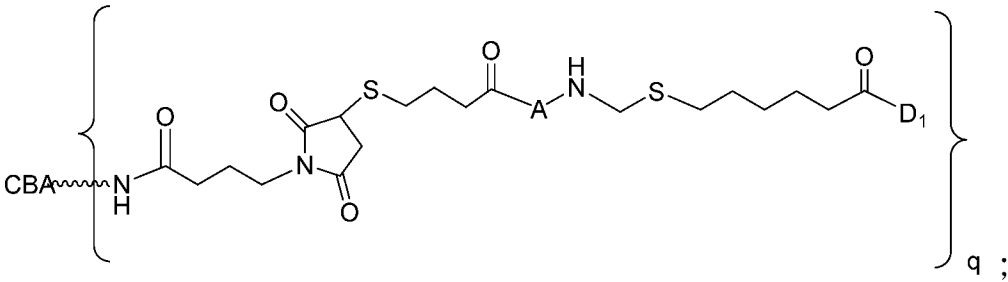
r1為整數2至6；

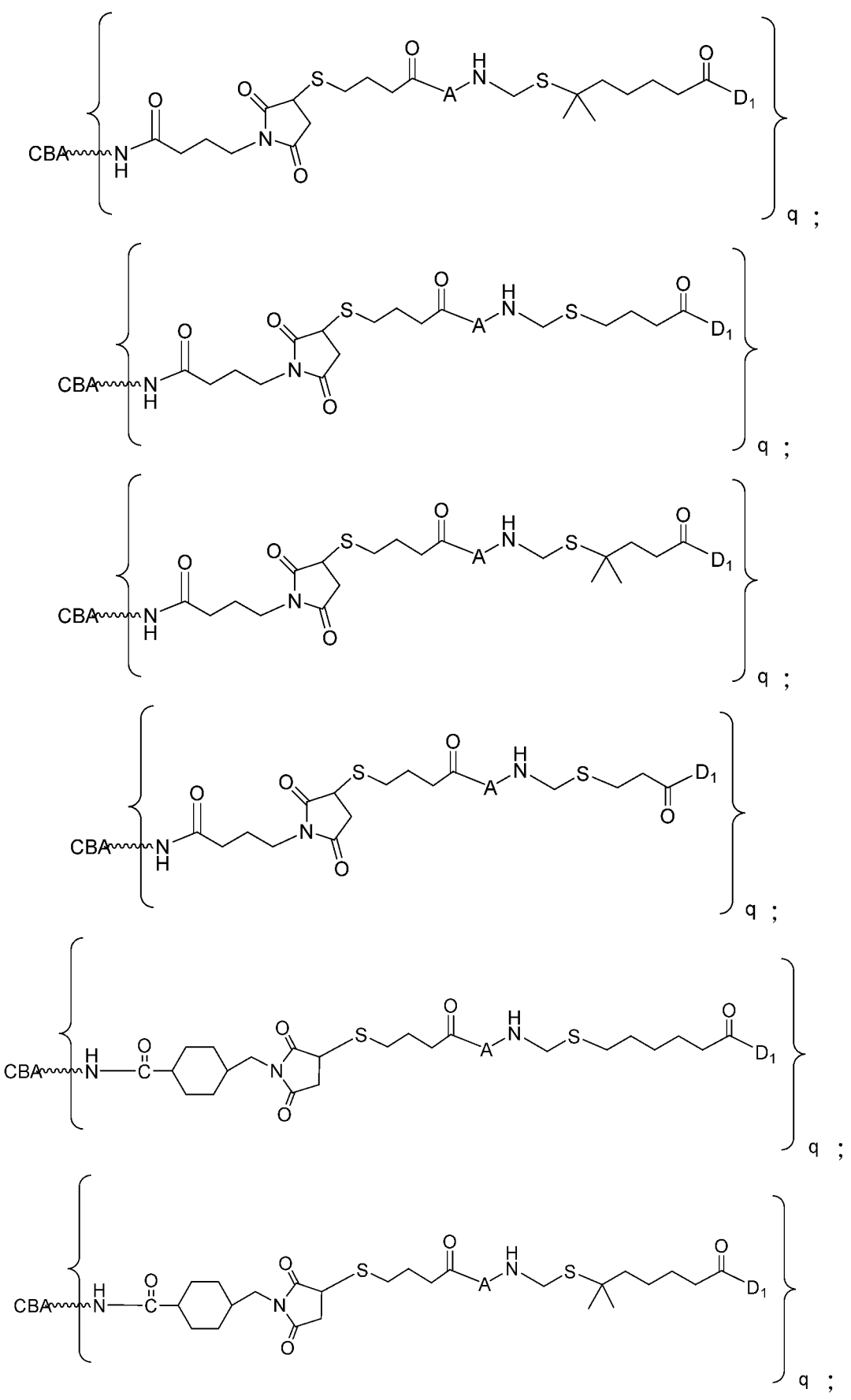
r2為整數2至5；且

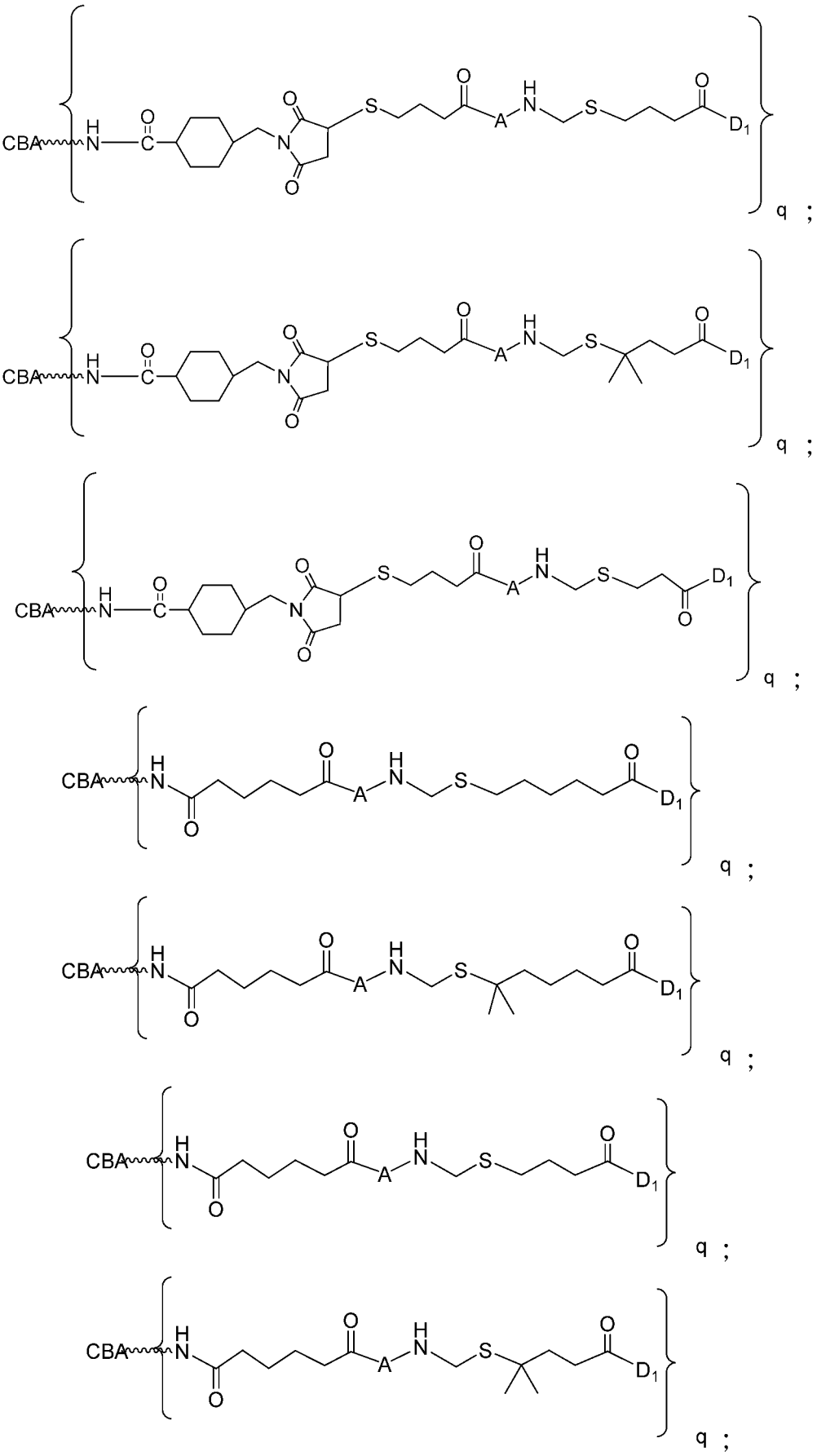
剩餘變數係如第七特定實施例中所述。

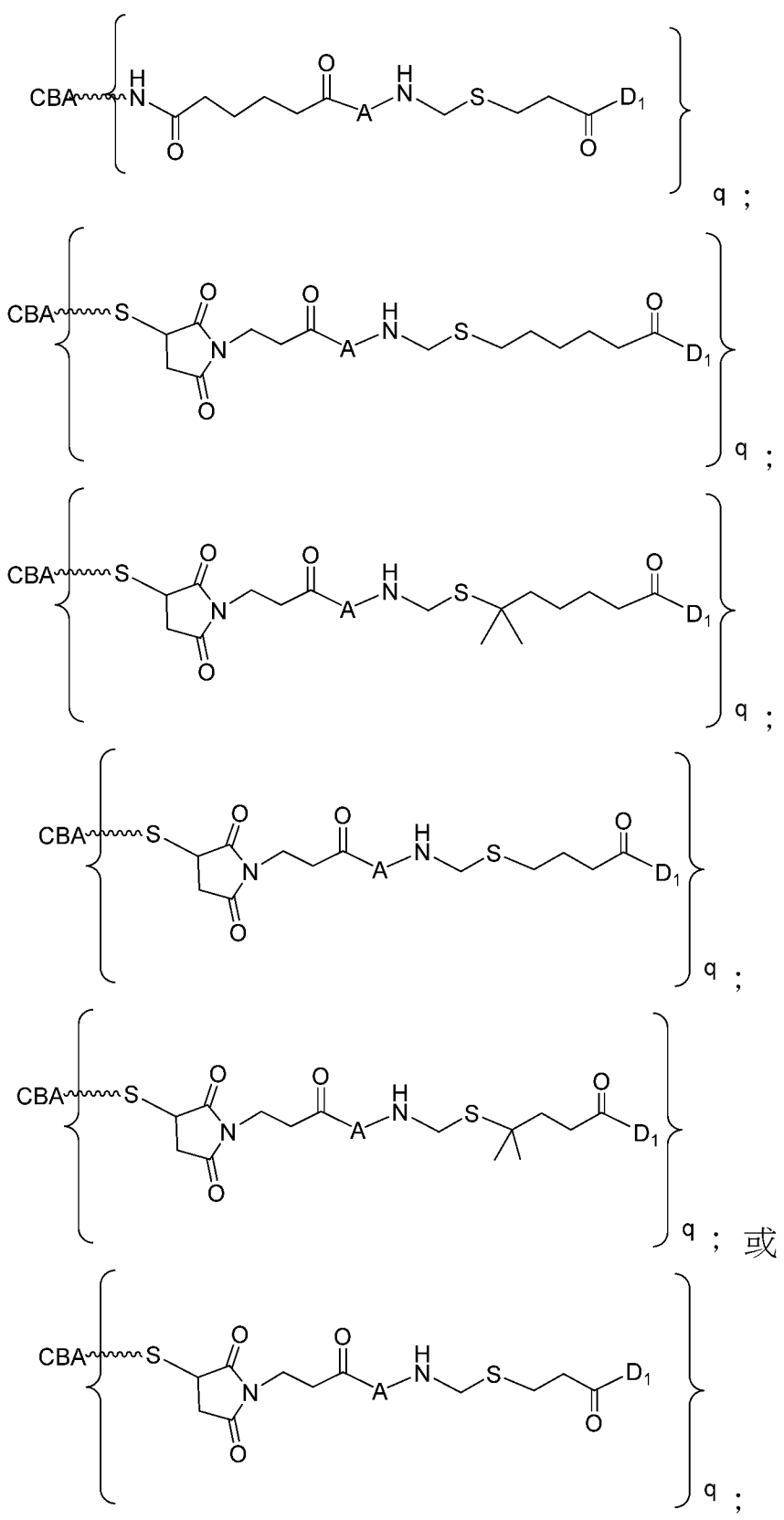
【0308】在第九特定實施例中，關於第七或第八特定實施例中所述之免疫結合物，A為Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。在一更特定實施例中，關於第七或第八特定實施例中所述之免疫結合物，A為L-Ala-D-Ala-L-Ala。

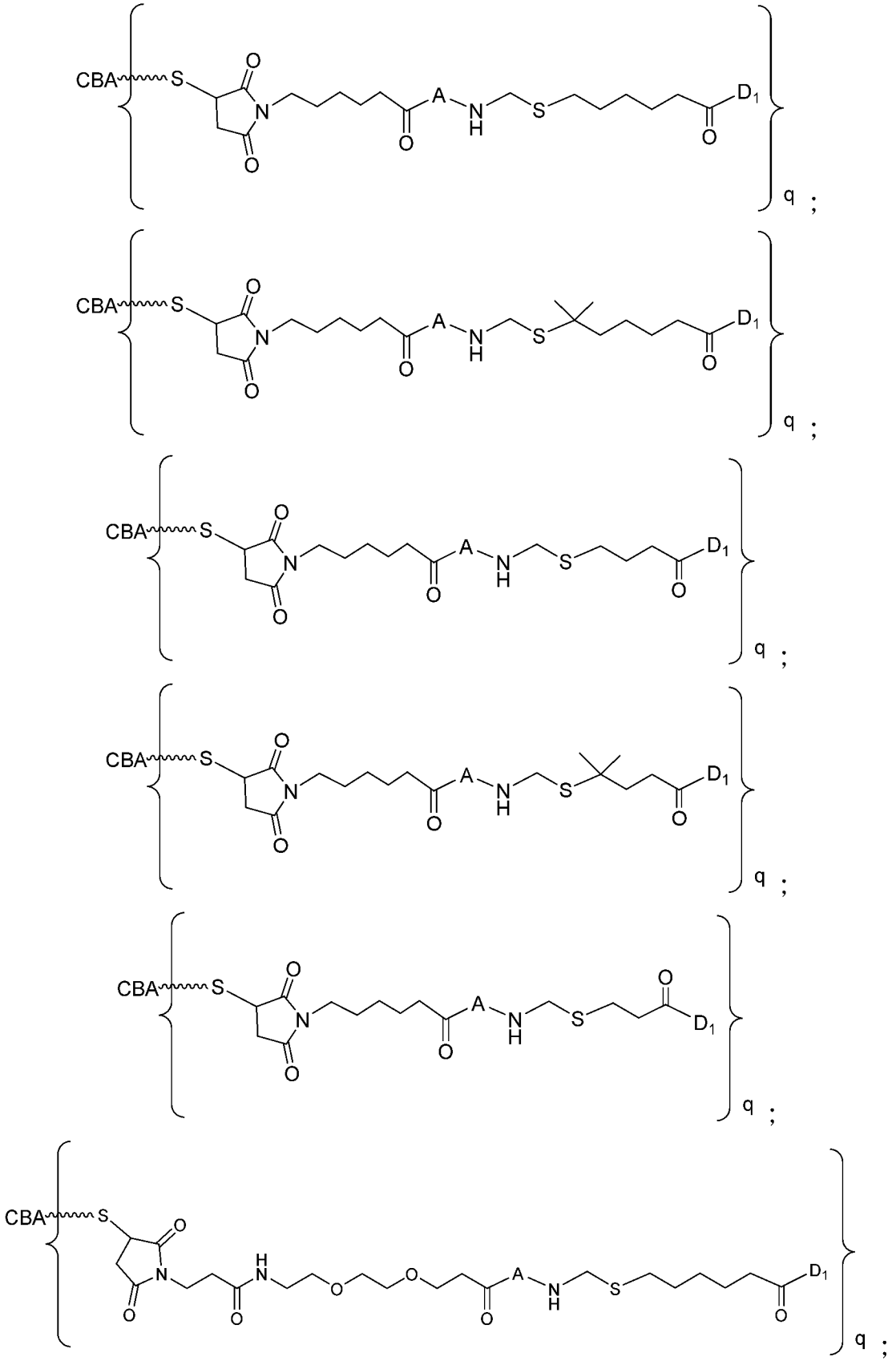
【0309】在第十特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由下式表示：

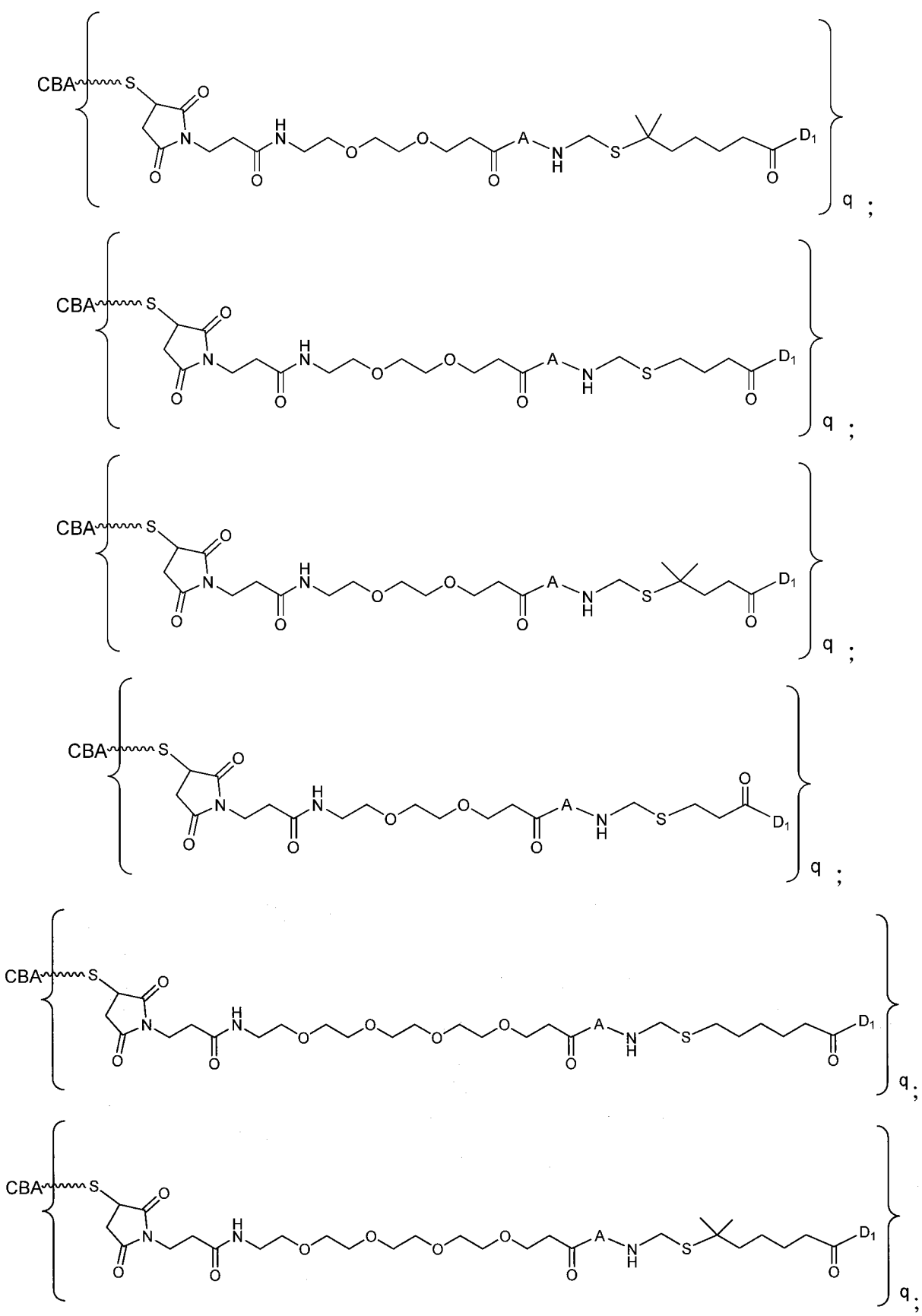


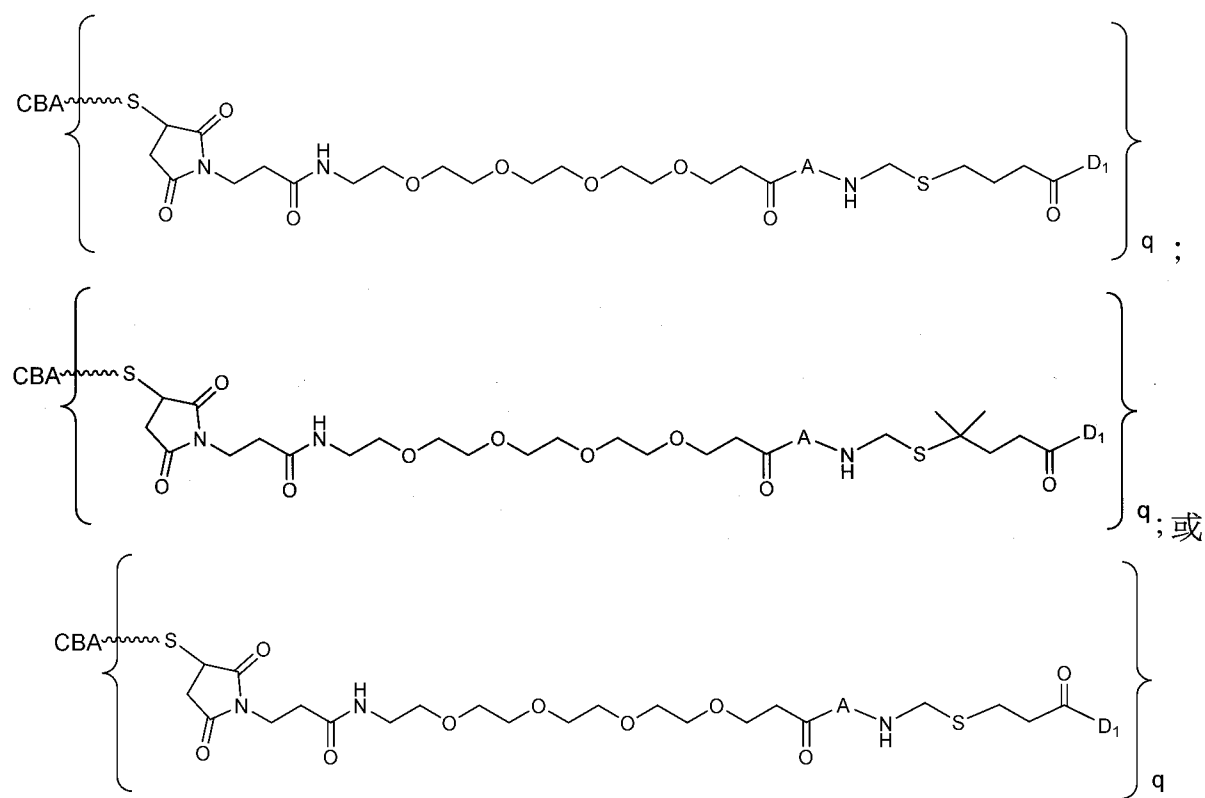










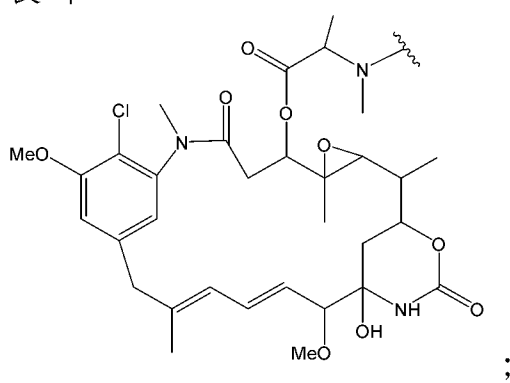


或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

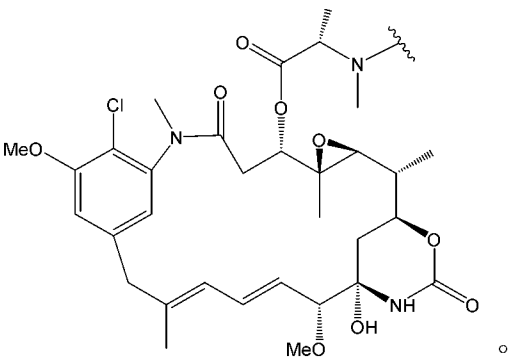
A 為 Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro 或 D-Ala-tBu-Gly，

且

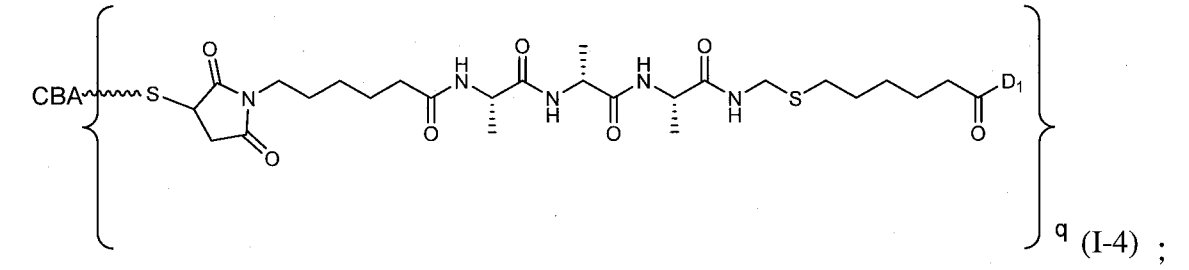
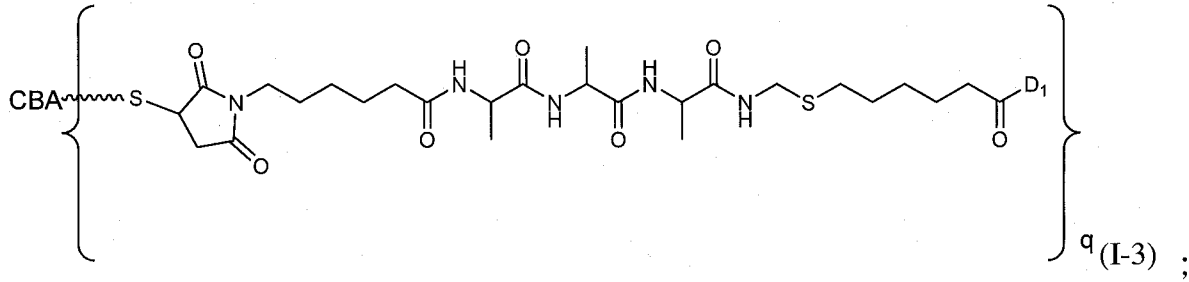
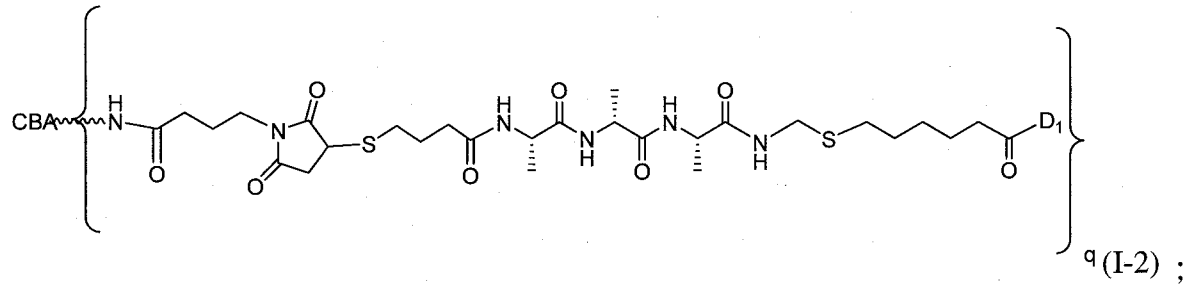
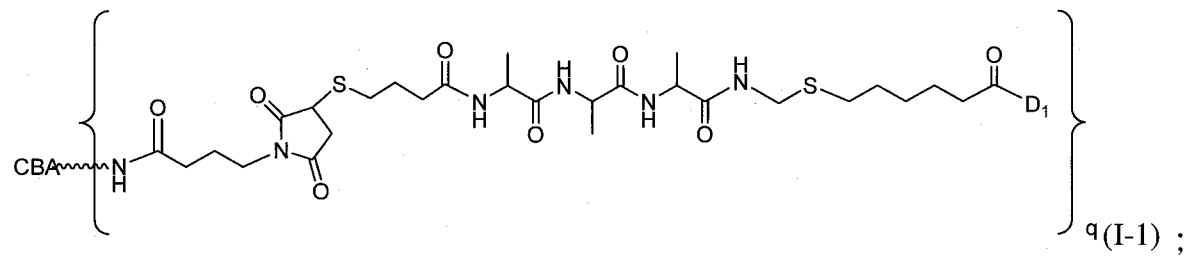
D₁係由下式表示：

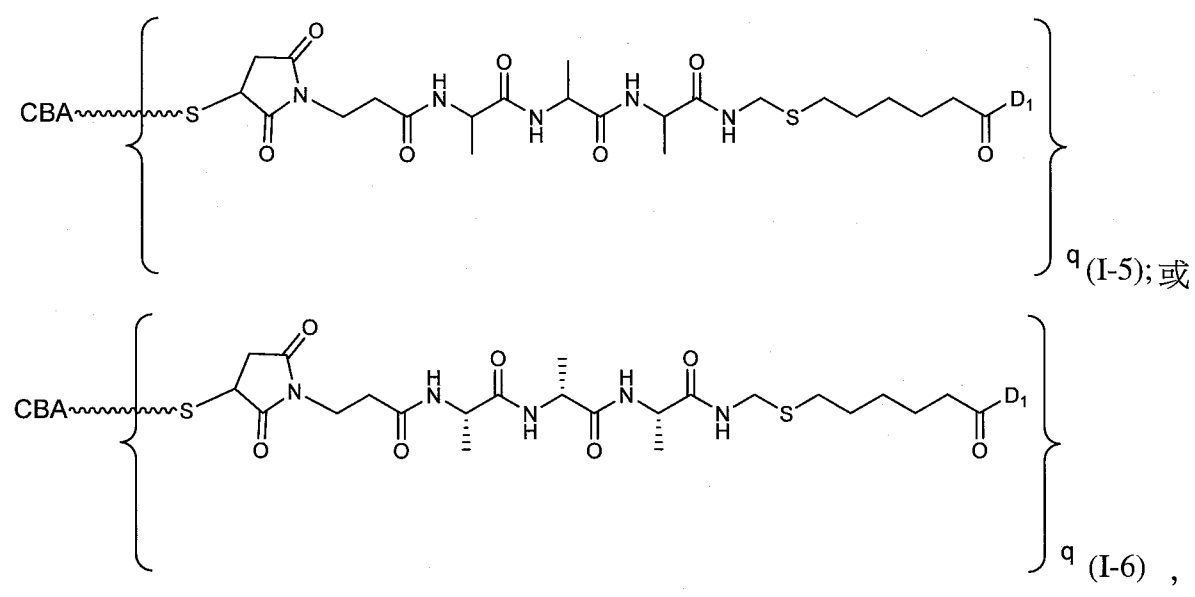


且剩餘變數係如第七、第八或第九特定實施例中所述。在一更特定實施例中，A為L-Ala-D-Ala-L-Ala。在一更特定實施例中，D₁係由下式表示：

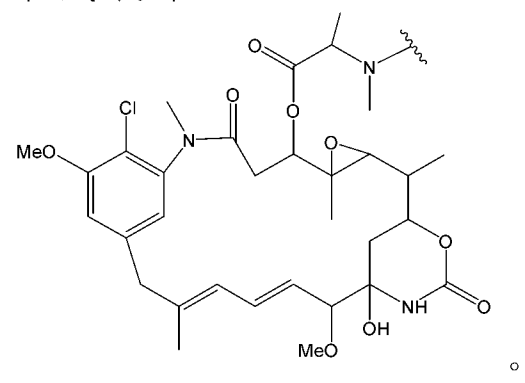


【0310】在第十一特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由下式表示：

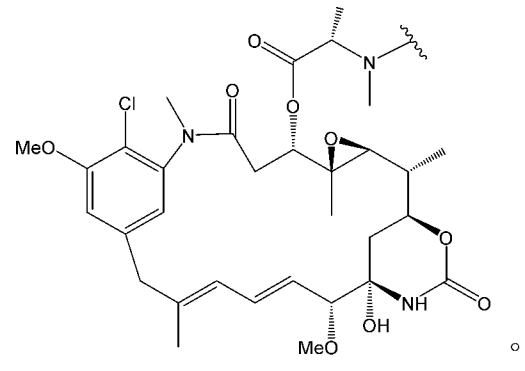




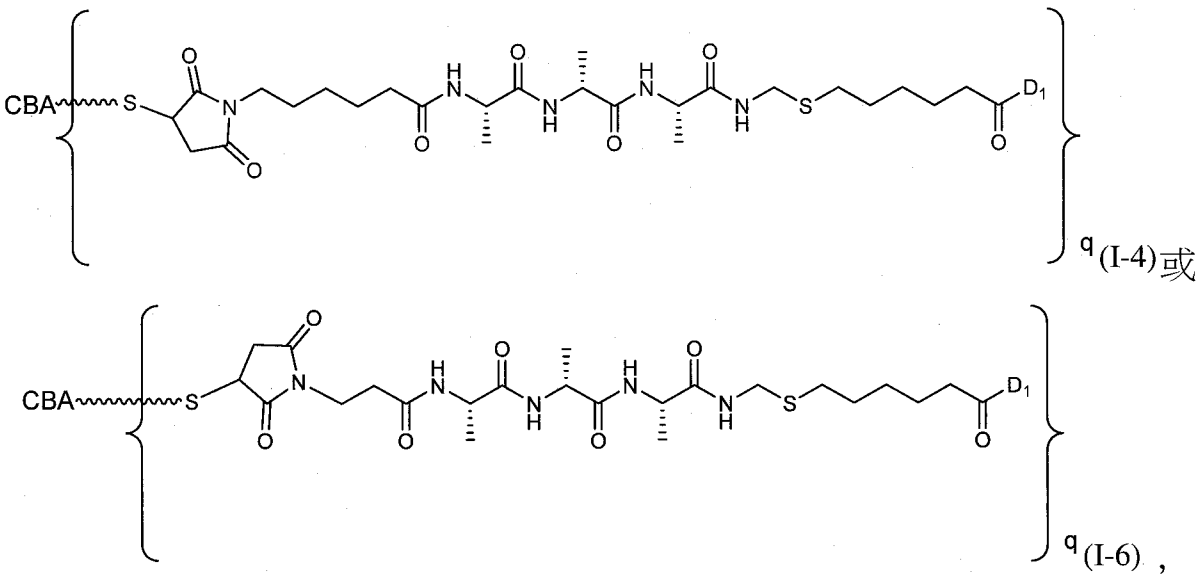
其中 D₁係由下式表示：



【0311】在一更特定實施例中，D₁係由下式表示：



【0312】在第十二特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由下式表示：

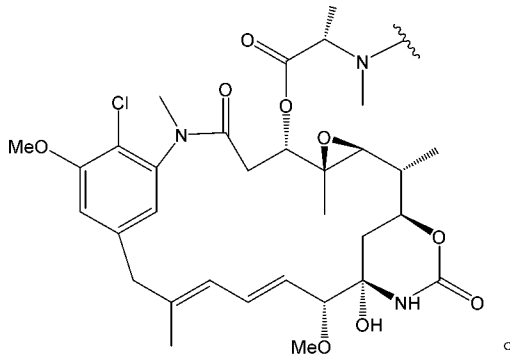


其中：

CBA係雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含(i)分別具有序列SEQ ID NO: 1-3之輕鏈互補決定區L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3及分別具有序列SEQ ID NO:7-9之重鏈互補決定區H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3，及(ii)分別具有序列SEQ ID NO:4-6之輕鏈互補決定區L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3及分別具有序列SEQ ID NO:10-12之重鏈互補決定區H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3；

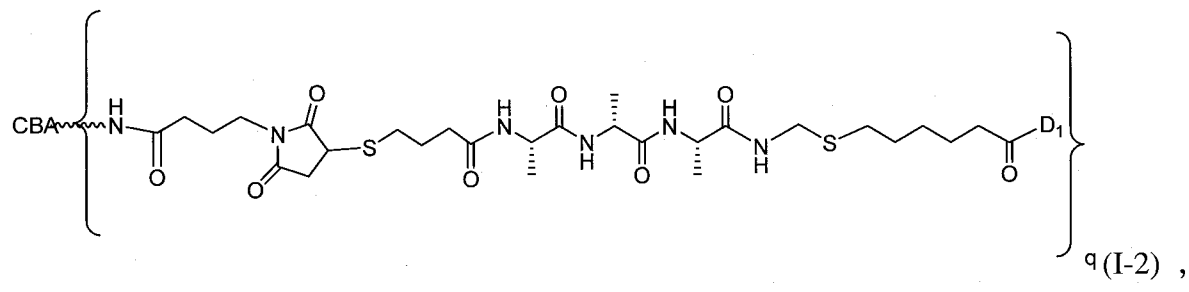
q為1或2；

D₁係由下式表示：



【0313】在某些實施例中，關於式(I-4)或(I-6)之免疫結合物，該雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:18之VL、包含胺基酸序列SEQ ID NO:23之VH、包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VL及包含胺基酸序列SEQ ID NO:24之VH。

【0314】在第十三特定實施例中，本文所提供之免疫結合物係由下式表示：

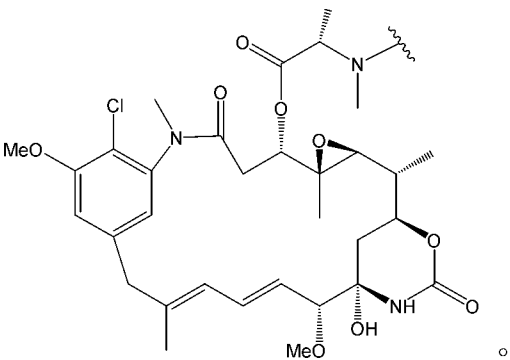


其中：

CBA係雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含(i)分別具有序列SEQ ID NO: 1-3之輕鏈互補決定區L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3及分別具有序列SEQ ID NO:7-9之重鏈互補決定區H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3，及(ii)分別具有序列SEQ ID NO:4-6之輕鏈互補決定區L-CDR1、L-CDR2及L-CDR3及分別具有序列SEQ ID NO:10-12之重鏈互補決定區H-CDR1、H-CDR2及H-CDR3；

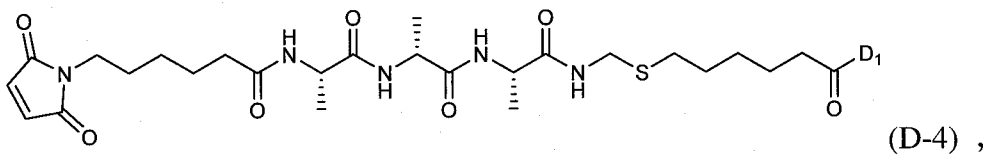
q為整數1至10，例如1或10；且

D₁係由下式表示：



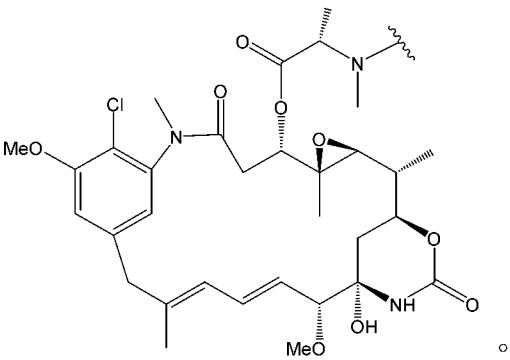
【0315】在某些實施例中，關於式(I-2)之免疫結合物，該雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包括包含胺基酸序列SEQ ID NO:18之VL、包含胺基酸序列SEQ ID NO:23之VH、包含胺基酸序列SEQ ID NO:19之VL及包含胺基酸序列SEQ ID NO:24之VH。在某些實施例中，關於式(I-2)之免疫結合物，該雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 41、42及43之多肽。

【0316】在第十四實施例中，本文所提供之免疫結合物包含偶合至類美登素化合物DM21C（亦稱作Mal-LDL-DM或MalC5-LDL-DM或化合物17a)之雙互補位抗FR α 抗體，該類美登素化合物由以下結構式表示：

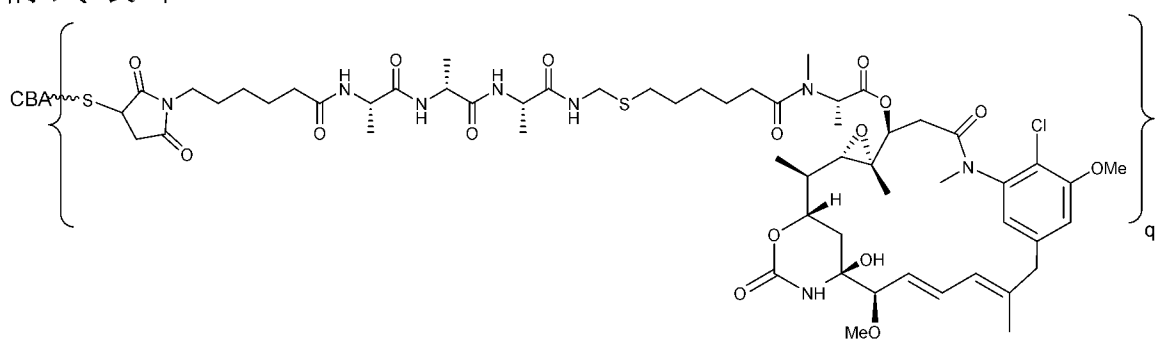


其中該雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含(i)分別具有序列SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:23之輕鏈可變區及重鏈可變區，及(ii)分別具有序列SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:24之輕鏈可變區及重鏈可變區；且D₁係由下式表

示：



【0317】在一個實施例中，該免疫結合物係由以下結構式表示：



其中：

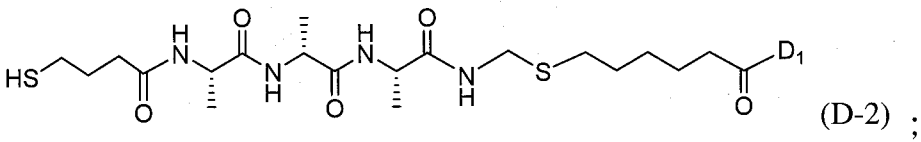
CBA係雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段，包含(i)分別具有序列SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:23之輕鏈可變區及重鏈可變區，及(ii)分別具有序列SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:24之輕鏈可變區及重鏈可變區；且

q為1或2。

【0318】在某些實施例中，關於包含第十四特定實施例之免疫結合物的組合物(例如醫藥組合物)，DAR係在1.5-2.2、1.7-2.2或1.9-2.1範圍內。在一些實施例中，DAR為1.7、1.8、1.9、2.0或2.1。

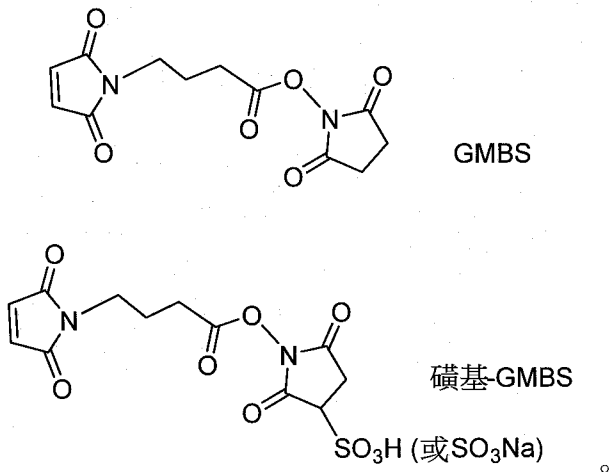
【0319】在第十五特定實施例中，本文所提供之免疫

結合物包含偶合至類美登素化合物DM21 (亦稱作DM21L、LDL-DM或化合物 14c)之雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段，該類美登素化合物由以下結構式表示：

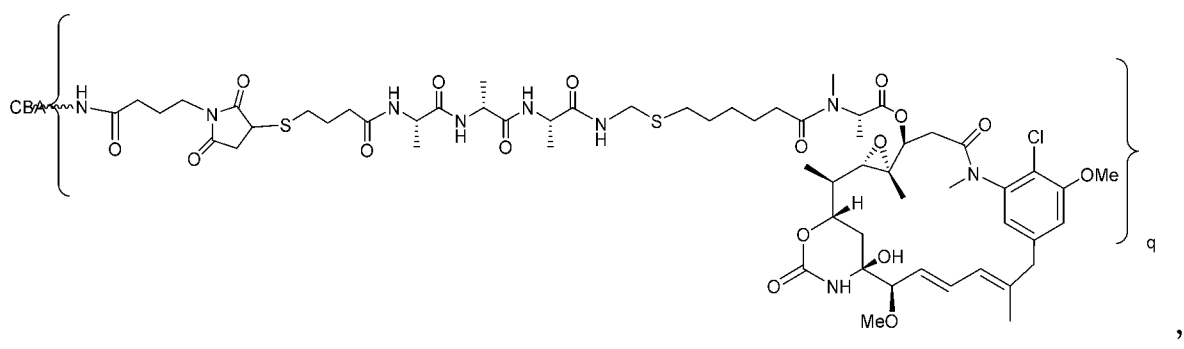


該偶合係經由 γ -順丁烯二醯亞胺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(GMBS)或N-(γ -順丁烯二醯亞胺基丁醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)連接體。該雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含(i)分別具有序列SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:23之輕鏈可變區及重鏈可變區，及(ii)分別具有序列SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:24之輕鏈可變區及重鏈可變區。

【0320】GMBS及磺基-GMBS (或sGMBS)連接體為此項技術中已知的且可由以下結構式表示：



【0321】在一個實施例中，該免疫結合物係由以下結構式表示：



其中：

CBA係雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段，包含(i)分別具有序列SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:23之輕鏈可變區及重鏈可變區，及(ii)分別具有序列SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:24之輕鏈可變區及重鏈可變區；且

q為整數1至10，例如1或10。在一些實施例中，q為整數2至5。在一些實施例中，q為整數3至4。

【0322】在某些實施例中，關於第十五特定實施例之免疫結合物，該雙互補位抗FR α 抗體或其抗原結合片段包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 41、42及43之多肽。

【0323】在某些實施例中，關於包含第十五特定實施例之免疫結合物的組合物(例如醫藥組合物)，DAR係在3.0-4.0、3.2-3.8、3.1-3.7或3.4-3.7範圍內。在一些實施例中，DAR為3.2、3.3、3.4、3.5、3.5、3.7或3.8。在一些實施例中，DAR為3.5。

【0324】在某些實施例中，關於包含離胺酸結合物之組合物，DAR係在1.5-3.1範圍內。在一些實施例中，DAR為約2.0。

【0325】在某些實施例中，關於包含第一實施例或第

一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四或第十五特定實施例之免疫結合物的組合物(例如醫藥組合物)，每個抗體分子之細胞毒性劑之平均數目(亦即， q 平均值)(亦稱作該組合物中之藥物-抗體比率(DAR))係在 1.0-8.0 範圍內。在一些實施例中，DAR 係在 1.0-5.0、1.0-4.0、1.5-4.0、2.0-4.0、2.5-4.0、1.0-3.4、1.0-3.0、3.0-4.0、3.1-3.5、3.1-3.7、3.4-3.6、1.5-2.5、2.0-2.5、1.7-2.3 或 1.8-2.2 範圍內。在一些實施例中，DAR 係小於 4.0、小於 3.8、小於 3.6、小於 3.5、小於 3.0 或 小於 2.5。在一些實施例中，DAR 係在 3.1-3.7 範圍內。在一些實施例中，DAR 係在 3.1-3.4 範圍內。在一些實施例中，DAR 係在 3.3-3.7 範圍內。在一些實施例中，DAR 係在 3.5-3.9 範圍內。在一些實施例中，DAR 為 3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7 或 3.8。在一些實施例中，DAR 為 3.5。在一些實施例中，DAR 係在 1.8-2.0 範圍內。在一些實施例中，DAR 係在 1.7-1.9 範圍內。在一些實施例中，DAR 係在 1.9-2.1 範圍內。在一些實施例中，DAR 為 1.9、2.0 或 2.1。在一些實施例中，關於包含經由一或多個半胱胺酸硫醇基連接至類美登素化合物之雙互補位抗 $FR\alpha$ 抗體或其抗原結合片段的本發明免疫結合物，DAR 係在 1.5-2.5、1.8-2.2、1.1-1.9 或 1.9-2.1 範圍內。在一些實施例中，DAR 為 1.8、1.9、2.0 或 2.1。

B. 連接體

【0326】此項技術中已知之任何合適連接體均可用於製備本揭示案之免疫結合物。在某些實施例中，該等連接體為雙官能連接體。如本文所用，術語「雙官能連接體」係指具有兩個反應性基團之修飾劑；該等反應性基團之一能夠與細胞結合劑反應，而另一者與類美登素化合物反應以使該兩個部分連接在一起。該等雙官能交聯劑為此項技術中熟知的(參見例如 Isalm 及 Dent, *Bioconjugation* 第 5 章, 第 218-363 頁, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999)。例如，使得能夠經由硫醚鍵連接之雙官能交聯劑包括 *N*-丁二醯亞胺基-4-(*N*-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-甲酸酯(SMCC)以引入順丁烯二醯亞胺基，或 *N*-丁二醯亞胺基-4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)以引入碘乙醯基。在細胞結合劑上引入順丁烯二醯亞胺基或鹵基乙醯基之其他雙官能交聯劑為此項技術中熟知的(參見美國專利公開案第 2008/0050310 號、第 20050169933 號，可獲自 Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA)，且包括但不限於雙-順丁烯二醯亞胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、*N*-(β-順丁烯二醯亞胺基丙氧基)丁二醯亞胺酯(BMPS)、γ-順丁烯二醯亞胺基丁酸 *N*-丁二醯亞胺酯(GMBS)、ε-順丁烯二醯亞胺基己酸 *N*-羥基丁二醯亞胺酯(EMCS)、5-順丁烯二醯亞胺基戊酸 NHS、HBVS、*N*-丁二醯亞胺基-4-(*N*-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸酯)(其為 SMCC 之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-

N-羥基丁二醯亞胺酯(MBS)、4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸醯肼或HCl鹽(MPBH)、N-丁二醯亞胺基3-(溴乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)、N-丁二醯亞胺基碘乙酸酯(SIA)、 κ -順丁烯二醯亞胺基十一酸N-丁二醯亞胺酯(KMUA)、N-丁二醯亞胺基4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、丁二醯亞胺基-6-(β -順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸酯(SMPH)、丁二醯亞胺基-(4-乙烯基磺醯基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫雙-順丁烯二醯亞胺基乙烷(DTME)、1,4-雙-順丁烯二醯亞胺基丁烷(BMB)、1,4-雙順丁烯二醯亞胺基-2,3-二羥基丁烷(BMDB)、雙-順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、雙-順丁烯二醯亞胺基乙烷(BMOE)、磺基丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基-甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、磺基丁二醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基丁二醯亞胺酯(磺基-MBS)、N-(γ -順丁烯二醯亞胺基丁醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)、N-(ϵ -順丁烯二醯亞胺基己醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ -順丁烯二醯亞胺基十一醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-KMUS)及磺基丁二醯亞胺基4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB)。

【0327】雜雙官能交聯劑係具有兩個不同反應性基團之雙官能交聯劑。含有胺反應性N-羥基丁二醯亞胺基(NHS基團)及羧基反應性肼基兩者之雜雙官能交聯劑亦可用於使本文所述之細胞毒性化合物與細胞結合劑(例如，

抗體)連接。該等市售雜雙官能交聯劑之實例包括丁二醯亞胺基 6-肼基菸鹼醯胺丙酮脲(SANH)、丁二醯亞胺基 4-肼基對苯二甲酸酯鹽酸鹽(SHTH)及丁二醯亞胺基鉸菸鹼酸酯鹽酸鹽(SHNH)。具有酸不穩定鍵之結合物亦可使用本揭示案之具有肼的苯二氮平衍生物來製備。可使用之雙官能交聯劑之實例包括丁二醯亞胺基-對甲醯基苯甲酸酯(SFB)及丁二醯亞胺基-對甲醯基苯氧基乙酸酯(SFPA)。

【0328】使得能夠經由二硫鍵使細胞結合劑與細胞毒性化合物連接之雙官能交聯劑為此項技術中已知的，且包括 *N*-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、*N*-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、*N*-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、*N*-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB 或 sSPDB)以引入二硫基吡啶基。可用於引入二硫基之其他雙官能交聯劑為此項技術中已知的，且揭示於美國專利 6,913,748、6,716,821 及美國專利公開案 2009/0274713 及 2010/0129314 中，其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。或者，亦可使用引入硫醇基之交聯劑，諸如 2-亞胺基硫雜戊環、高半胱胺酸硫內酯或 *S*-乙醯基丁二酸酐。

C. 細胞毒性劑

【0329】在一些實施例中，本文提供可用於製備本揭示案之免疫結合物之細胞毒性劑。用於本文所提供之免疫結合物的細胞毒性劑可為引起細胞死亡或誘導細胞死亡或

以某一方式降低細胞活力之任何化合物，且包括例如類美登素及類美登素類似物、苯二氮平、類紫杉醇、CC-1065 及 CC-1065 類似物、倍癌黴素及倍癌黴素類似物、烯二炔(諸如卡奇黴素)、尾海兔素及尾海兔素類似物(包括澳瑞他汀)、茅層黴素衍生物、來普黴素衍生物、甲胺喋呤、順鉑、卡鉑、道諾黴素、多柔比星、長春新鹼、長春花鹼、美法侖、絲裂黴素 C、苯丁酸氮芥及嗎啉基多柔比星。在某些實施例中，細胞毒性劑為類美登素及類美登素類似物。

【0330】合適類美登素之實例包括美登醇及美登醇類似物之酯。包括抑制微管形成且對哺乳動物細胞具有高度毒性之任何藥物，美登醇及美登醇類似物亦如此。

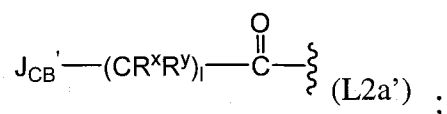
【0331】例示性細胞毒性劑先前描述於 WO 2018/160539 A1 及 WO 2011/106528 中，其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。

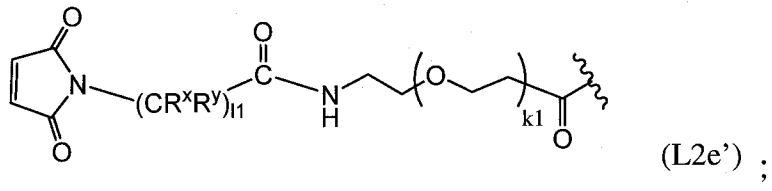
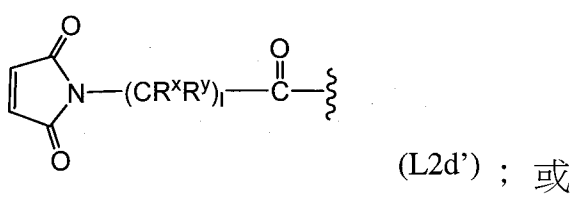
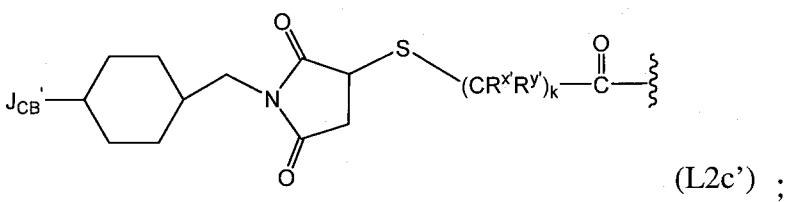
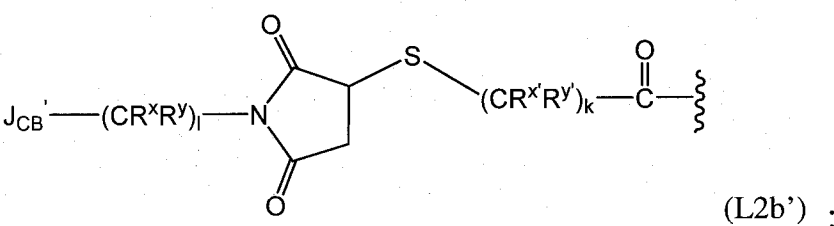
【0332】本文所提供之免疫結合物可包含類美登素化合物，其由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L_2' 係由以下結構式表示：





其中：

R^x 、 R^y 、 $R^{x'}$ 及 $R^{y'}$ 在每次出現時獨立地為H、-OH、鹵素、-O-(C₁₋₄烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺或視情況經-OH、鹵素、-SO₃H或NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代之C₁₋₄烷基，其中R₄₀、R₄₁及R₄₂各自獨立地為H或C₁₋₄烷基；

l及k各自獨立地為整數1至10；

J_{CB}'為-C(=O)OH或-COE，其中-COE為反應性酯；

A為胺基酸或包含2至20個胺基酸之肽；

R¹及R²各自獨立地為H或C₁₋₃烷基；

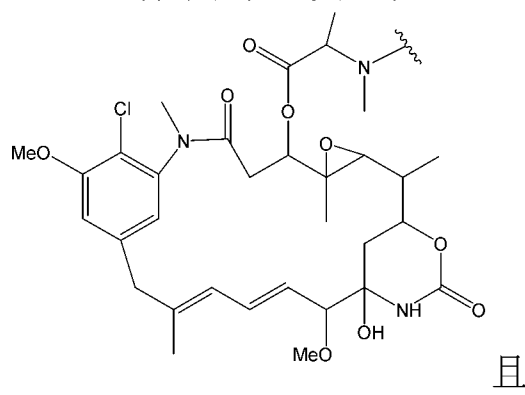
L₁係由下式表示：

-CR³R⁴-(CH₂)₁₋₈-C(=O)-；

其中R³及R⁴各自獨立地為H或Me，且L₁中之-C(=O)-部

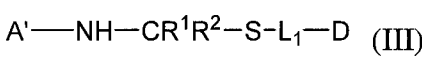
分連接至 D；

D係由下式表示：



q為整數 1 至 20。在一些實施例中，q為整數 1 至 10。在一些實施例中，q為整數 2 至 5。在一些實施例中，q為整數 3 至 4。

【0333】 在一些實施例中，本發明之類美登素係由下式表示：



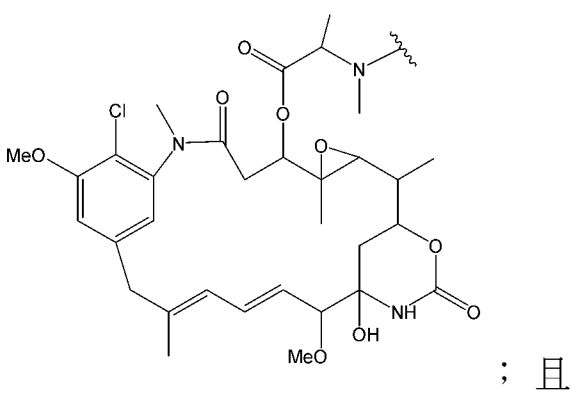
或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

A'為胺基酸或包含 2 至 20 個胺基酸之肽 (亦即，A-NH₂)；

R¹及 R²各自獨立地為 H 或 C₁₋₃ 烷基；

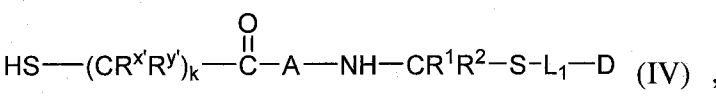
L₁為 -CR³R⁴-(CH₂)₁₋₈-C(=O)-；R³及 R⁴各自獨立地為 H 或 Me；

D係由下式表示：



q 為整數 1 至 20。在一些實施例中，q 為整數 1 至 10。在一些實施例中，q 為整數 2 至 5。在一些實施例中，q 為整數 3 至 4。

【0334】 在一些實施例中，本發明之類美登素係由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

R^x及 R^y在每次出現時獨立地為 H、-OH、鹵素、-O-(C₁₋₄烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺或視情況經 -OH、鹵素、SO₃H或 NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代之 C₁₋₄烷基，其中 R₄₀、R₄₁及 R₄₂各自獨立地為 H或 C₁₋₄烷基；

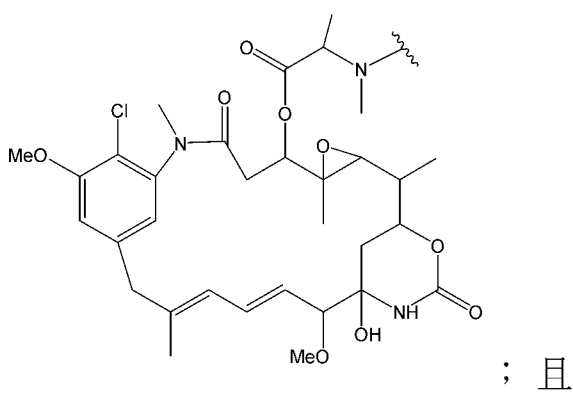
k 為整數 1 至 10；

A 為胺基酸殘基或包含 2 至 20 個胺基酸殘基之肽；

R¹及 R²各自獨立地為 H或 C₁₋₃烷基；

L₁ 為 -CR³R⁴-(CH₂)₁₋₈-C(=O)-；R³及 R⁴各自獨立地為 H或 Me；

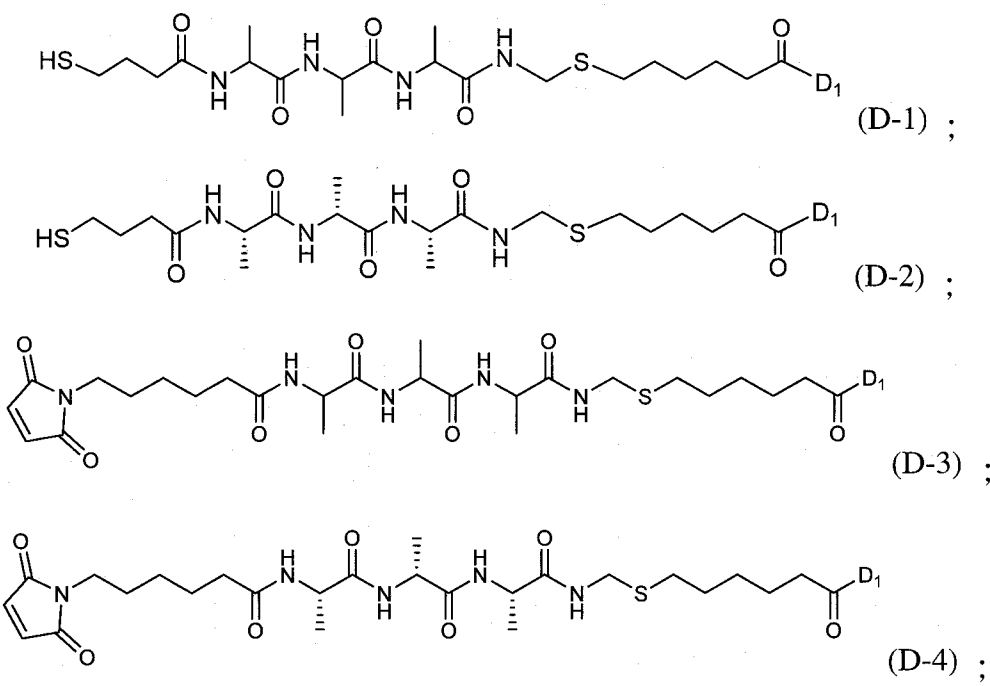
D 係由下式表示：

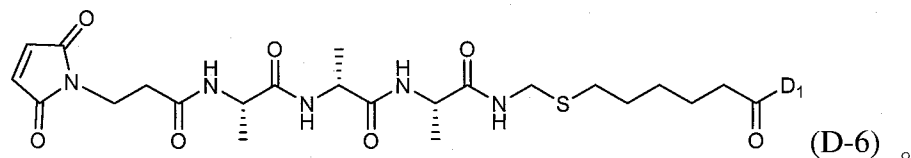
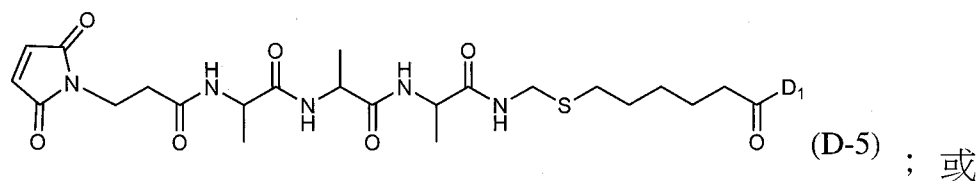


q 為整數 1 至 20。在一些實施例中，q 為整數 1 至 10。在一些實施例中，q 為整數 2 至 5。在一些實施例中，q 為整數 3 至 4。

【0335】 在一些實施例中，關於式 (II)、(III) 或 (IV) 之類美登素化合物，變數係如第一實施例或第一實施例中之第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十或第十一特定實施例中所述。

【0336】 在一特定實施例中，該類美登素化合物係由下式表示：





【0337】合適美登醇酯之額外實例包括具有經修飾芳環之彼等及在其他位置處具有修飾之彼等。該等合適類美登素揭示於美國專利第 4,424,219 號；第 4,256,746 號；第 4,294,757 號；第 4,307,016 號；第 4,313,946 號；第 4,315,929 號；第 4,331,598 號；第 4,361,650 號；第 4,362,663 號；第 4,364,866 號；第 4,450,254 號；第 4,322,348 號；第 4,371,533 號；第 5,208,020 號；第 5,416,064 號；第 5,475,092 號；第 5,585,499 號；第 5,846,545 號；第 6,333,410 號；第 7,276,497 號及第 7,473,796 號中。另外，關於產生該等抗體-類美登素結合物之若干描述提供於美國專利第 6,333,410 號、第 6,441,163 號、第 6,716,821 號及第 7,368,565 號中，其中每一者均以引用之方式整體併入本文中。

【0338】在一些實施例中，該免疫結合物包含 $N^{2'}$ -去乙醯基- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素 (DM1)、 $N^{2'}$ -去乙醯基- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素 (稱作 DM3)、 $N^{2'}$ -去乙醯基- $N^{2'}$ -(4-巯基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素 (DM4)，其中兩者先前描述於 PCT 申請公開案第 WO 2011/106528 A1 號及美國專利第 8,557,966 B2 號中，其中

每一者均以引用之方式整體併入本文中。

D. 藥物結合

【0339】本文所述之包含共價連接至細胞毒性劑(例如類美登素)之雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段的免疫結合物可根據此項技術中已知之任何合適方法製備。

【0340】在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第一方法製備，該第一方法包含使該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段與描述於第二實施例中之式(II)之類美登素化合物反應的步驟。

【0341】在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第二方法製備，該第二方法包含以下步驟：

(a) 使式(III)或(IV)之類美登素化合物與本文所述之連接體化合物反應以形成其上結合有胺反應性基團或硫醇反應性基團之細胞毒性劑-類美登素化合物(例如式(II)化合物)，其可共價連接至該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段；及

(b) 使該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段與該類美登素-連接體化合物反應以形成該免疫結合物。

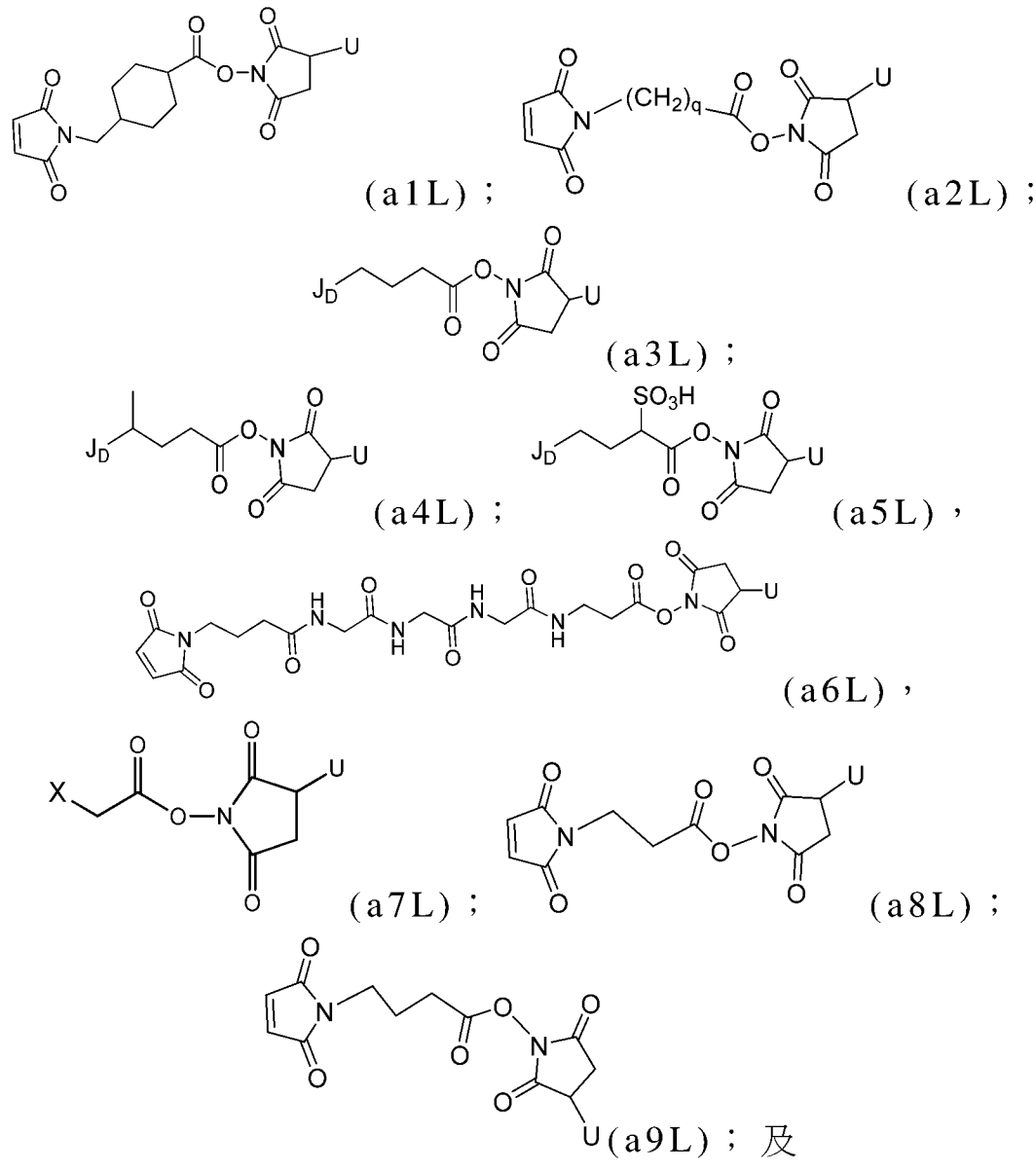
【0342】在某些實施例中，第一實施例之免疫結合物可藉由第三方法製備，該第三方法包含以下步驟：

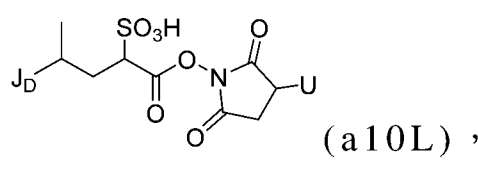
(a) 使該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段與本文所述之連接體化合物反應以形成其上結合有胺反應性基團或硫醇反應性基團之經修飾雙互補位FR α 結合抗體或

其抗原結合片段，其可共價連接至式(III)或(IV)之類美登素化合物；及

(b) 使該經修飾雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段與式(III)或(IV)之類美登素化合物反應以形成該免疫結合物。

【0343】在某些實施例中，關於上述第二、第三或第四方法，該連接體化合物係由式(a1L) - (a10L)中任一者表示：

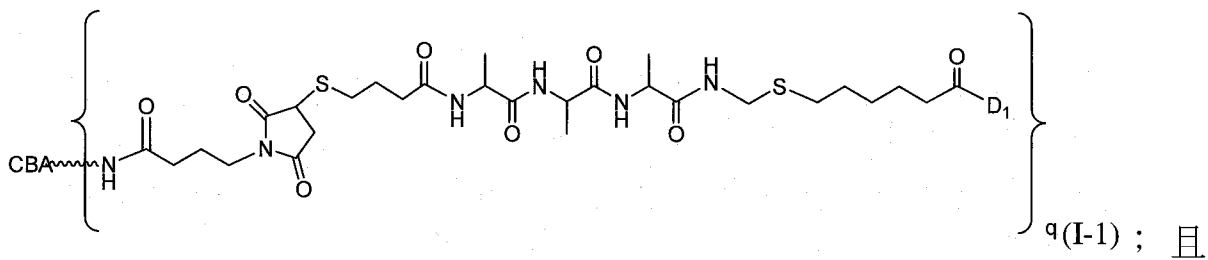




其中 X 為鹵素；J_D 為 -SH 或 -SSR^d；R^d 為苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；R^g 為烷基；且 U 為 -H 或 SO₃H 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0344】在一個實施例中，該連接體化合物係由式 (a9L) 表示之 GMBS 或磺基-GMBS (或 sGMBS)，其中 U 為 -H 或 SO₃H 或其醫藥學上可接受之鹽。

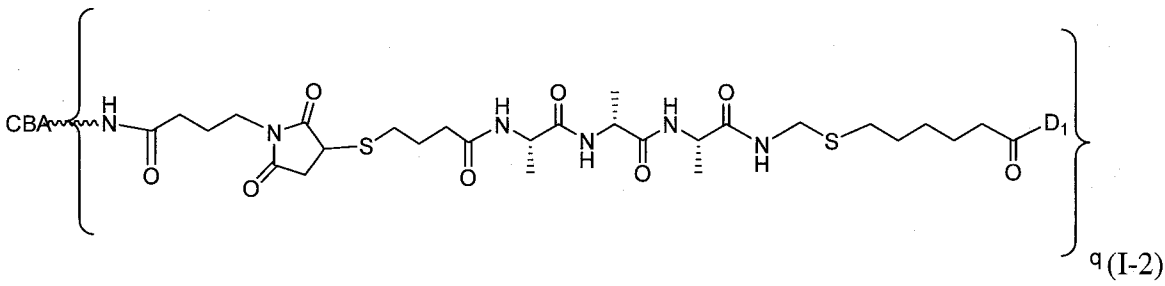
【0345】在一特定實施例中，本發明之免疫結合物係由下式表示：



該免疫結合物可藉由上述第二、第三或第四方法製備，其中該連接體化合物係由式 (a9L) 表示之 GMBS 或磺基-GMBS，其中 U 為 -H 或 SO₃H 或其醫藥學上可接受之鹽；且該類美登素化合物係由上述式 (D-1) 表示。在一更特定實施例中，式 (I-1) 之免疫結合物係藉由使式 (D-1) 之類美登素化合物與連接體化合物 GMBS 或磺基-GMBS 反應以形成類美登素-連接體化合物，隨後使該雙互補位 FR α 結合抗體或其抗原結合片段與該類美登素-連接體化合物反應來製備。在一甚至更特定實施例中，該類美登素連接體化合物在與該雙互補位 FR α 結合抗體或其抗原結合片段反應之前未經純

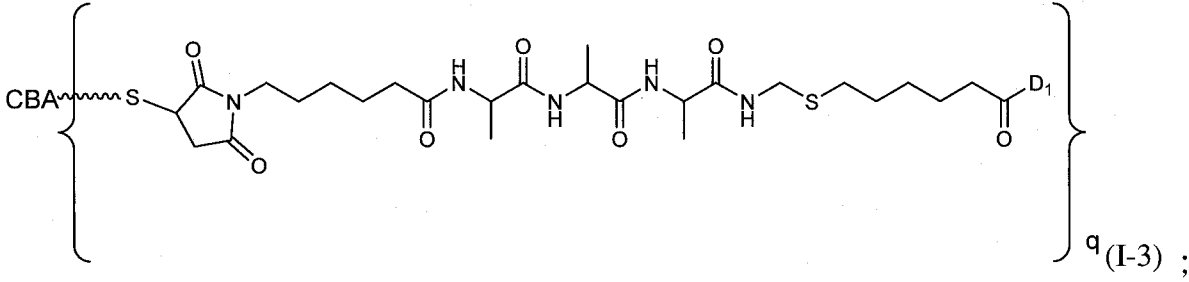
化。

【0346】在另一特定實施例中，該免疫結合物係由下式表示：



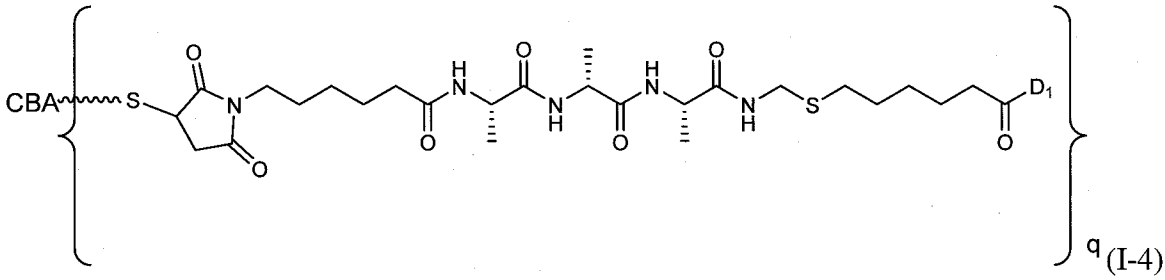
；且該免疫結合物可藉由上述第二、第三或第四方法製備，其中該連接體化合物係由式(a9L)表示之GMBS或磺基-GMBS，其中U為-H或SO₃H或其醫藥學上可接受之鹽；且該類美登素化合物係由上述式(D-2)表示。在一更特定實施例中，式(I-2)之免疫結合物係藉由使式(D-2)之類美登素化合物與連接體化合物GMBS或磺基-GMBS反應以形成類美登素-連接體化合物，隨後使該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段與該類美登素-連接體化合物反應來製備。在一甚至更特定實施例中，該類美登素連接體化合物在與該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段反應之前未經純化。

【0347】[02] 在另一特定實施例中，該免疫結合物係由下式表示：



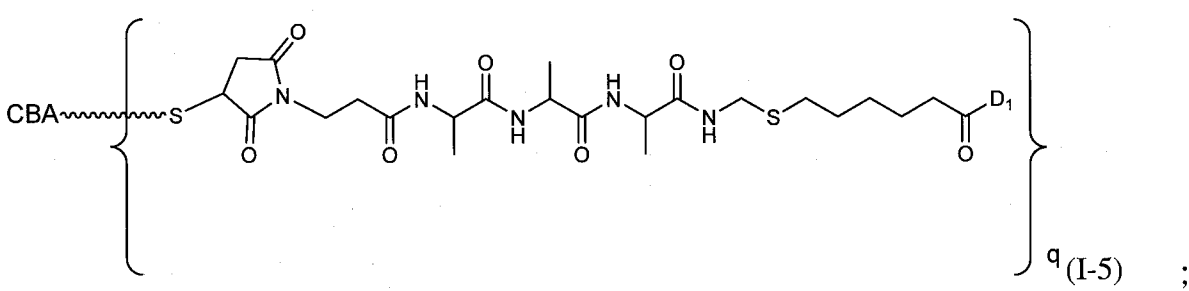
且該免疫結合物係根據上述第一方法藉由使該雙互補位 $\text{FR}\alpha$ 結合抗體或其抗原結合片段與上述式 (D-3) 之類美登素化合物反應來製備。

【0348】在另一特定實施例中，該免疫結合物係由下式表示：



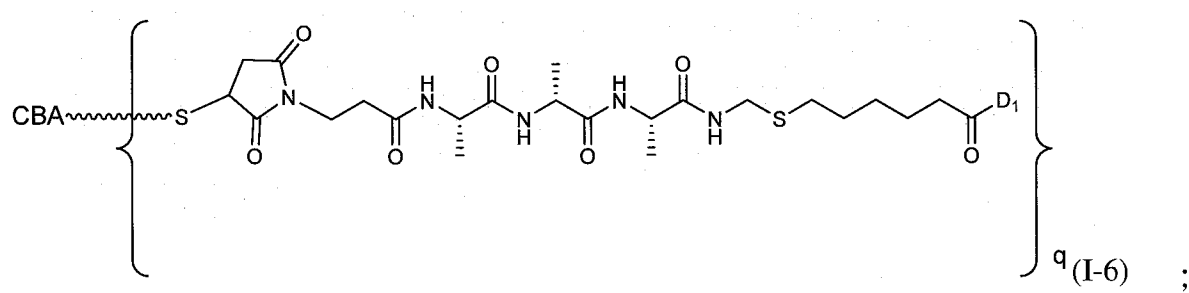
；且該免疫結合物係根據上述第一方法藉由使該雙互補位 $\text{FR}\alpha$ 結合抗體或其抗原結合片段與上述式 (D-4) 之類美登素化合物反應來製備。

【0349】在另一特定實施例中，該免疫結合物係由下式表示：



且該免疫結合物係根據上述第一方法藉由使該抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體或其抗原結合片段與上述式 (D-5) 之類美登素化合物反應來製備。

【0350】在另一特定實施例中，該免疫結合物係由下式表示：



且該免疫結合物係根據上述第一方法藉由使該雙互補位FR α 結合抗體或其抗原結合片段與上述式(D-6)之類美登素化合物反應來製備。

【0351】 在一些實施例中，由上文所揭示之式I-3至I-6表示的免疫結合物係根據2019年3月21日提出申請之美國臨時申請案62/821,707及相關美國申請案第16/825,127號中所述之方法來製備。

【0352】 在一些實施例中，藉由上述任何方法製備之免疫結合物經受純化步驟。就此而言，該免疫結合物可使用切向流過濾(TFF)、非吸附層析、吸附層析、吸附過濾、選擇性沈澱或任何其他合適純化過程以及其組合自該混合物之其他組分經純化。

【0353】 在一些實施例中，該免疫結合物使用單一純化步驟(例如TFF)經純化。較佳地，該結合物使用單一純化步驟(例如TFF)經純化且交換至適當調配物中。在本發明之其他實施例中，該免疫結合物使用兩個連續純化步驟經純化。例如，該免疫結合物可首先藉由選擇性沈澱、吸附過濾、吸附層析或非吸附層析純化，隨後用TFF純化。一般技術者將理解，該免疫結合物之純化使得能夠分離包含化學偶合至細胞毒性劑之細胞結合劑之穩定結合物。

【 0354 】任何合適 TFF 系統均可用於純化，包括 Pellicon 類型系統 (Millipore, Billerica, Mass.)、Sartocon 卡匣系統 (Sartorius AG, Edgewood, N.Y.) 及 Centrasette 類型系統 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)

【 0355 】任何合適吸附層析樹脂均可用於純化。較佳吸附層析樹脂包括羧磷灰石層析、疏水性電荷誘導層析 (HCIC)、疏水性相互作用層析 (HIC)、離子交換層析、混合模式離子交換層析、固定金屬親和力層析 (IMAC)、染料配位體層析、親和力層析、逆相層析及其組合。合適羧磷灰石樹脂之實例包括陶瓷羧磷灰石 (CHT I 型及 II 型，Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)、HA Ultrogel 羧磷灰石 (Pall Corp., East Hills, N.Y.) 及陶瓷氟磷灰石 (CFT I 型及 II 型，Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適 HCIC 樹脂之實例為 MEP Hypercel 樹脂 (Pall Corp., East Hills, N.Y.)。合適 HIC 樹脂之實例包括 Butyl-Sepharose、Hexyl-Sepharose、Phenyl-Sepharose 及 Octyl Sepharose 樹脂 (均來自 GE Healthcare, Piscataway, N.J.)，以及 Macro-prep Methyl 及 Macro-Prep t-Butyl 樹脂 (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適離子交換樹脂之實例包括 SP-Sepharose、CM-Sepharose 及 Q-Sepharose 樹脂 (均來自 GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 及 Unosphere S 樹脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適混合模式離子交換劑之實例包括 Bakerbond ABx 樹脂 (JT Baker, Phillipsburg N.J.)。合適 IMAC 樹脂之實例包括 Chelating Sepharose 樹脂

(GE Healthcare, Piscataway, N.J.)及 Profinity IMAC 樹脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適染料配位體樹脂之實例包括 Blue Sepharose 樹脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.) 及 Affi-gel Blue 樹脂 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.)。合適親和力樹脂之實例包括蛋白 A 瓊脂糖樹脂 (例如 MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, N.J.)，其中細胞結合劑為抗體；及凝集素親和力樹脂，例如小扁豆凝集素瓊脂糖樹脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)，其中細胞結合劑攜帶適當凝集素結合位點。或者，可使用對細胞結合劑具特異性之抗體。該種抗體可經固定至例如 Sepharose 4 Fast Flow 樹脂 (GE Healthcare, Piscataway, N.J.)。合適逆相樹脂之實例包括 C4、C8及C18樹脂 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.)。

【0356】任何合適非吸附層析樹脂均可用於純化。合適非吸附層析樹脂之實例包括但不限於 SEPHADEXTM G-25、G-50、G-100、SEPHACRYLTM 樹脂 (例如 S-200及 S-300)、SUPERDEXTM 樹脂 (例如 SUPERDEXTM 75 及 SUPERDEXTM 200)、BIO-GEL® 樹脂 (例如 P-6、P-10、P-30、P-60及 P-100)，及一般技術者已知之其他樹脂。

VII. 組合物及套組

【0357】本文提供包含在生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑中具有所需程度之純度的本文所述之免疫結合物、抗體或其抗原結合片段之組合物 (Remington's

Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用之劑量及濃度下對接受者無毒。

【0358】醫藥組合物可經調配用於針對個體之特定投與途徑。例如，醫藥組合物可經調配用於非經腸(例如靜脈內)投與。欲用於活體內投與之組合物可為無菌的。此容易藉由經由例如無菌濾膜過濾來實現。

【0359】本文所述之醫藥組合物在一個實施例中係用作藥劑。本文所述之醫藥組合物可適用於治療諸如癌症之疾患。可如本文所述經治療之癌症之實例包括但不限於癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括輸卵管癌、鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌及多種類型之頭頸部癌。該癌症可為FR α 表現性癌。

【0360】本文所提供之醫藥組合物可包含免疫結合物，且該醫藥組合物(該醫藥組合物中之免疫結合物)可具有每個雙互補位抗體或其抗原結合片段平均1至20個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個雙互補位抗體或其抗原結合片段平均1至10個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個雙互補位抗體或其抗原結合片段平均

2至5個藥物。在一些實施例中，醫藥組合物包含每個雙互補位抗體或其抗原結合片段平均3至4個藥物。

VIII. 方法及用途

【0361】本揭示案之雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物可用於多種應用，包括但不限於治療性治療方法，諸如癌症治療。在某些實施例中，該等劑可用於抑制腫瘤生長及/或減少腫瘤體積。該等使用方法可為活體外或活體內方法。

【0362】本揭示案提供治療癌症之方法，其包含向個體(例如需要治療之個體)投與治療有效量的雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段或免疫結合物。在某些實施例中，該癌症係包括但不限於輸卵管癌、癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病之癌症。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC))、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌及多種類型之頭頸部癌。

【0363】該等癌症之更特定實例包括卵巢癌、上皮卵巢癌、卵巢原發性腹膜癌或輸卵管癌。在某些實施例中，該癌症為卵巢癌。在某些實施例中，該卵巢癌為上皮卵巢癌(EOC)。在某些實施例中，該卵巢癌(例如EOC)為鉑抗

性、復發性或難治性的。在某些實施例中，該癌症為腹膜癌。在某些實施例中，該腹膜癌為原發性腹膜癌。在某些實施例中，該癌症為子宮內膜癌。在某些實施例中，該子宮內膜癌為漿液性子宮內膜癌。在某些實施例中，癌症為肺癌。在某些實施例中，該肺癌為非小細胞肺癌(NSCLC)。在某些實施例中，該肺癌為腺癌或細支氣管肺泡癌。在某些實施例中，該癌症為子宮癌。

【0364】在某些實施例中，該癌症為鉑難治性的。在某些實施例中，該癌症為原發性鉑難治性的。在某些實施例中，該癌症為鉑敏感性的。

【0365】在某些實施例中，該癌症為IMGN853抗性的。

【0366】在某些實施例中，該癌症為轉移性或晚期癌症。

【0367】在某些實施例中，該癌症表現與FR α 結合劑或抗體結合之葉酸鹽受體。在某些實施例中，該癌症過表現人類FR α 。

【0368】在一些實施例中，該雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段、免疫結合物或包含其之醫藥組合物經投與至具有增加的FR α 表現水準之患者，例如，如美國公開申請案第2012/0282175號或國際公開申請案第WO 2012/135675號所述，其中兩者均以引用之方式整體併入本文中。例示性抗體、分析及用於偵測FR α 之套組提供於WO 2014/036495及WO 2015/031815中，其中兩者均以引用

之方式整體併入本文中。因此，在一些實施例中，FR α 蛋白表現係藉由免疫組織化學(IHC)量測且藉由與展現規定分數之對照物(例如經校準對照物)比較來給出染色強度分數及/或染色均一性分數(例如，若強度與水準3經校準對照物可相當，則對測試樣品給予強度分數3，或若強度與水準2經校準對照物可相當，則對測試樣品給予強度分數2(中等))。呈「異質」(亦即，至少25%且少於75%細胞經染色)或「均質」(亦即，至少75%細胞經染色)而非「局部」(亦即，大於0%且少於25%細胞經染色)之染色均一性亦指示增加的FR α 表現。染色強度及染色均一性分數可單獨或組合(例如2均質、2異質、3均質、3異質等)使用。在另一實施例中，FR α 表現之增加可藉由偵測相對於對照值(例如，來自未患癌症或患有未具有升高之FR α 值的癌症之個體之組織或細胞中的表現水準)至少2倍、至少3倍或至少5倍)之增加來測定。在一些實施例中，染色均一性分數係基於經染色細胞之百分比。

【0369】在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以1異質或更高水準表現FR α 之癌症。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以2異質或更高水準表現FR α 之癌症。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以3異質或更高水準表現FR α 之癌症。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以2異質或更高水準表現FR α 之肺癌。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以3異質或更高水準表現FR α 之肺癌。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以2異質或更

高水準表現FR α 之卵巢癌。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以3異質或更高水準表現FR α 之卵巢癌。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以2異質或更高水準表現FR α 之子宮內膜癌。在一些實施例中，該癌症係藉由IHC發現以1異質或更高水準表現FR α 之子宮內膜樣癌。

【0370】在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少一種細胞具有至少為1之FR α 分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少一種細胞具有至少為2 (中等)之FR α 分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少一種細胞具有至少為3之FR α 分數。

【0371】在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少25%細胞具有至少為1之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少33%細胞具有至少為1之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少50%細胞具有至少為1之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少66%細胞具有至少為1之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少75%細胞具有至少為1之FR α IHC分數。

【0372】在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少25%細胞具有至少為2 (中等)之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少33%細胞具有至少為2 (中等)之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的25-75%細胞具有至少為2 (中等)之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少50%細胞具

有至少為 2 (中等)之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 66%細胞具有至少為 2 (中等)之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 75%細胞具有至少為 2 (中等)之FR α IHC分數。

【0373】 在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 25%細胞具有至少為 3 之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 33%細胞具有至少為 3 之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 50%細胞具有至少為 3 之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 66%細胞具有至少為 3 之FR α IHC分數。在一些實施例中，自患者獲得之樣品中的至少 75%細胞具有至少為 3 之FR α IHC分數。

【0374】 在一些實施例中，FR α 表現可藉由免疫組織化學量測且給出視覺分數，其中FR α 陽性可指大於或等於 50%之腫瘤細胞具有在小於或等於 10X顯微鏡物鏡下可見之FR α 膜染色。在一些實施例中，FR α 表現可藉由免疫組織化學量測且給出視覺分數，其中FR α 陽性可指大於或等於 66%之腫瘤細胞具有在小於或等於 10X顯微鏡物鏡下可見之FR α 膜染色。在一些實施例中，FR α 表現可藉由免疫組織化學量測且給出視覺分數，其中FR α 陽性可指大於或等於 75%之腫瘤細胞具有在小於或等於 10X顯微鏡物鏡下可見之FR α 膜染色。

【0375】 在某些實施例中，該個體為人類。

【0376】 本揭示案進一步提供使用本文所述之雙互補

位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物來抑制腫瘤生長之方法。在某些實施例中，該抑制腫瘤生長之方法包含活體外使腫瘤與本文所提供之雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物接觸。例如，表現 $\text{FR}\alpha$ 之永生細胞株或癌症細胞株在其中添加有雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物之培養基中經培養以抑制腫瘤生長。在一些實施例中，腫瘤細胞自諸如組織生檢、胸膜積液或血樣之患者樣品分離且在其中添加有雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物之培養基中經培養以抑制腫瘤生長。

【0377】 在一些實施例中，該抑制腫瘤生長之方法包含活體內使腫瘤或腫瘤細胞與雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物接觸。在某些實施例中，使腫瘤或腫瘤細胞與雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物接觸係在動物模型中進行的。例如，雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物可經投與至已在免疫受損小鼠(例如 NOD/SCID 小鼠)中生長之表現一或多種腫瘤之異種移植物以抑制腫瘤生長。在一些實施例中，癌症幹細胞自諸如組織生檢、胸膜積液或血樣之患者樣品分離且經注射至免疫受損小鼠中，該等小鼠接著經投與雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物以抑制腫瘤細胞生長。

【0378】 在某些實施例中，該抑制腫瘤生長之方法包含向個體投與治療有效量之雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原

結合片段及免疫結合物。在某些實施例中，該個體為人類。在某些實施例中，該個體具有腫瘤或已移除腫瘤。

【0379】投與可為非經腸，包括靜脈內投與。

【0380】將有效治療疾患之雙互補位免疫結合物、抗體或其抗原結合片段、或組合物的量將取決於該疾病之性質。欲用於組合物中之精確劑量亦將取決於投與途徑及該疾病之嚴重性。

【0381】在一些實施例中，本文提供用作藥劑之雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段、免疫結合物或包含其之醫藥組合物。在一些態樣中，本文提供用於治療癌症之方法之雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段、免疫結合物或醫藥組合物。在一些態樣中，本文提供用於治療個體之癌症之方法的雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段、免疫結合物或醫藥組合物，該方法包含向該個體投與有效量之本文提供之雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段、免疫結合物或醫藥組合物。

【0382】在一個態樣中，本揭示案之雙互補位抗 $\text{FR}\alpha$ 抗體、其抗原結合片段及免疫結合物可用於偵測 $\text{FR}\alpha$ 例如在生物樣品中之存在。如本文所用，術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織。在某些實施例中，該等組織包括正常組織及/或相對於其他組織以較高水準表現 $\text{FR}\alpha$ 之癌組織。在某些實施例中， $\text{FR}\alpha$ 過表現偵測卵巢癌、肺癌、腦癌、乳癌、子宮癌、腎癌或胰臟癌之存在。

【0383】在某些實施例中，偵測FR α 在生物樣品中之存在之方法包含使該生物樣品與雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段或免疫結合物在可允許雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段或免疫結合物的結合之條件下接觸，及偵測是否在該雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段或免疫結合物與FR α 之間形成複合物。

【0384】在某些實施例中，雙互補位抗FR α 抗體、其抗原結合片段或免疫結合物係經標記。標記包括但不限於直接地偵測之標記或部分(諸如螢光、發色團、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶反應或分子相互作用間接地偵測之部分，諸如酶或配位體。

【0385】本揭示案之實施例可進一步參考以下非限制性實例來定義，該等非限制性實例詳細地描述本揭示案之某些抗體的製備及使用本揭示案之抗體之方法。熟習此項技術者應顯而易知，可對材料及方法實施多種修改而不偏離本揭示案之範圍。

實例

【0386】應理解，本文所述之實例及實施例僅出於說明性目的且根據其之多種修改或改變將被建議給熟習此項技術者且意欲包括於本申請案之精神及範圍內。

實例 1. 產生雙互補位抗體

雙特異性抗體之表現

【0387】如先前所述，藉由標準融合瘤技術產生一組鼠科動物抗FR α 抗體且使用表面重塑方法使其人類化(參見例如WO 2011/106528 A1)。抗體經分類成兩個倉，取決於其與Mov19競爭結合(倉1)或未競爭結合(倉2：FR α 抗體A、FR α 抗體B、FR α 抗體C及FR57)，此係使用FACS競爭分析進行。簡言之， $1.5 \times 10^{-9} \text{M}$ M9346A生物素化抗體與在一般自 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 至 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 之濃度範圍下的FR α 抗體A、FR α 抗體B、FR α 抗體C及FR57混合。使用非生物素化M9346A抗體作為完全結合競爭之對照物。該混合物添加至每孔含有20,000個FR α 陽性KB細胞之96孔板中，且該等板在冰上培育持續一小時。該等細胞接著用冷磷酸鹽緩衝生理食鹽水/1%牛血清白蛋白洗滌，且用抗生蛋白鏈菌素-PE試劑偵測結合之huM9346A-生物素。使用FACSCalibur流式細胞儀分析樣品。如圖1所示，僅對照抗體M9346A與huM9346A-生物素競爭結合；四種經分析FR-抗體均未干擾huM9346A-生物素之結合。

【0388】使用倉1及倉2抗體之可變區(VH及VL)，使用兩種不同形式來建構數種雙互補位分子：Morrison氏形式及不對稱-Fc。簡言之，關於基於Morrison氏形式的分子，對應於倉1或倉2抗體之VH及VL區之序列藉由(G4S)4連接體經連接以產生單鏈片段(scFv)，該單鏈片段(scFv)接著使用(G4S)3連接體融合至倉2或倉1 IgG1之重鏈的C或N端。基於不對稱-Fc之雙互補位分子使用杵臼技術用FR57scFv及Mov19 Fab產生(Protein Eng. 1996年7

月 ;9(7):617-21. 『 Knobs-into-holes 』 engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Ridgway JB, Presta LC, Carter, P)。簡言之，FR1-57scFv融合至含有C220S（使未配對半胱胺酸突變為絲胺酸）及杵突變（T366W）之經工程改造Fc區；且Mov19 Fab區融合至含有臼突變（T366S、L368A及Y407V）之經工程改造Fc。除非另外註明，否則所有編號均係基於EU系統。圖2顯示在後續實驗中評估之多種抗體形式。

【0389】某些經建構分子之序列提供於表6-7中。對應於此等雙特異性抗體之基因使用標準分子生物學技術經密碼子最佳化、合成且經選殖至質體中。用於轉染之輕鏈及重鏈質體的比率針對基於Morrison氏之分子保持1:3；且針對基於不對稱-Fc之分子保持9:3:1（Mov19LC: Mov19 HC-臼:FR57scFv-杵）。如圖3所示，數種重鏈及輕鏈質體轉染比率經研究用於產生基於不對稱-Fc之分子，其中比率9:3:1顯示最少量之均二聚體。

【0390】所有雙特異性抗體分子均在293T中短暫地產生。簡言之，關於293T轉染，在震盪燒瓶中使用PEI作為轉染試劑在懸浮適應性HEK-293T細胞中短暫地產生表現構築體。PEI短暫轉染係如先前所述（Durocher等人，Nucleic Acids Res. 30(2):E9（2002））來執行，除了HEK-293T細胞在Freestyle 293中生長且在添加PEI-DNA複合物之後，培養物體積保持未經稀釋。該等轉染經培育持續一週且經收集。

抗體純化

【0391】經過濾上清液使用基本上由兩個層析步驟組成之流程經純化：蛋白 A 親和力及陶瓷羥磷灰石 (CHT)。簡言之，經過濾上清液裝載於已用 1X PBS (pH 7.3±0.1) 預平衡之蛋白 A 管柱上。該管柱用 1X PBS (pH 7.3±0.1) 洗滌以減少非特異性宿主細胞蛋白質。結合之抗體使用含有 50 mM 氯化鈉之 25 mM 乙酸 (pH 3.2) 溶離且立即用 1 M Tris-鹼中和至 pH 7.0±0.2。經中和之池在 CHT 結合緩衝液 (15 mM 磷酸鈉，pH 7.0±0.1) 中 1:10 稀釋且裝載於用 CHT 結合緩衝液預平衡之 II 型 CHT 管柱 (40 μm 粒徑) 上。結合之蛋白質使用線性梯度 (10 個管柱體積中之 15 mM-160 mM 磷酸鈉) 溶離，且彙集所關注之溶離份 (高百分比單體，藉由尺寸排阻層析 SEC)，針對 1X PBS (pH 7.3±0.1) 透析，且經過濾滅菌。最終抗體濃度藉由量測在 280 nm 下之吸光度及 1.44 mL mg⁻¹ cm⁻¹ 之消光係數來測定。

【0392】所有純化實驗均在配備有在線 UV、電導率及 pH 探針之 AKTA 純化系統上進行。SEC 分析使用 Agilent HPLC 1100 系統藉由在 TSKgel G3000SWXL 管柱 (7.8 × 300 mm) 上注射 40 μg 樣品來執行，該管柱亦具有在線保護管柱 (6.0 × 40 mm) 以延長管柱壽命。移動相含有 50 mM 磷酸鈉緩衝液及 400 mM 高氯酸鈉，流量為 1.0 mL/min，且溶離為等度的。

實例 2. 雙互補位抗體形式對抗體產生、穩定性及功能活性之影響

親本(倉 1 及 倉 2)抗體之結合特徵

【 0393 】 表 10 概述 倉 1 及 倉 2 抗體與重組 FR α 抗原之結合之動力學參數。KD 值經由基本上根據製造商之推薦程序在 Octet96 系統 (ForteBio) 上執行的生物層干涉術獲得。簡言之，抗人類 - 或抗鼠科動物 -Fc 感測器預浸泡於 1X 動力學緩衝液 (ForteBio) 中持續 10 min 且用 5 μ g/mL 倉 1 或 倉 2 IgG 培育持續 5 min。該等感測器接著依序移動至 1X 動力學緩衝液持續 5 min (以測定基線)、用於締合之抗原連續稀釋液 (10 min) 及用於解離之 1X 動力學緩衝液 (10 min)。收集原始數據，加以處理且使用 ForteBio 分析軟體擬合至簡單 1:1 結合模型以測定動力學參數 K 締合及 K 解離。

表 10.

名稱	KD (M)	K 締合 (1/Ms)	K 解離(1/s)
Mov19 (倉 1)	6×10^{-10}	5×10^5	3×10^{-4}
FR57 (倉 2)	1×10^{-9}	3×10^5	4×10^{-4}
FR α 抗體 A (倉 2)	4×10^{-9}	1×10^5	4×10^{-4}
FR α 抗體 B (倉 2)	1×10^{-8}	3×10^5	4×10^{-3}
FR α 抗體 C (倉 2)	3×10^{-9}	3×10^5	7×10^{-4}

雙互補位抗體之穩定性

【 0394 】 雙互補位抗體藉由組合 Mov19 抗體與識別另一非重疊抗原決定基之抗體而產生。詳言之，基於 Morrison 氏形式之 IgG 係藉由將來自倉 IgG 之一的 scFv 融合至來自另一倉之 IgG 的 C 或 N 端而產生。表 11 列出所研究之

所有組合。融合至 C 端之 scFv 係呈 VH-VL 取向；且融合至 N 端之彼等係呈 VL-VH 取向。Mov19 作為僅在 C 端呈 VH-VL 及 VL-VH 取向兩者之 scFv 加以研究，具有或不具有 Brinkmann 之 VH44-VL100 二硫化物穩定性突變 (PNAS 1993 年 8 月；90 (16): 7538-754. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. U Brinkmann, Y Reiter, S H Jung, B Lee 及 I Pastan)。

表 11.

名稱	效價 (mg/L) : 293T	蛋白 A 後 單體%	歷經 1 週之 單體%改變	scFv 位置
Morrison 氏形式				
Mov19 -G1-FR α 抗體- A-scFv1*	2.35	93	>5%	C 端
Mov19 -G1-FR α -抗體- B-scFv1	2.24	<70		C 端
Mov19 -G1-FR α -抗體- C-scFv1	0.4	<70		C 端
Mov19 -G1- FR57scFv1*	4.43	91	<0.1%	C 端
FR α -抗體-A-G1- Mov19scFv1*	6.37	75		C 端
FR α -抗體-B-G1- Mov19scFv1	9.35	<70		C 端
FR α -抗體-C-G1- Mov19scFv1	10.1	<70		C 端
FR α -抗體-C-G1- Mov19scFv2	1.38	<70		C 端
FR α -抗體-C-G1- Mov19scFv3	2.78	<70		C 端
FR57-G1-Mov19scFv1*	5	73	>5%	C 端
FR α -抗體-A-scFv2-G1- Mov19*	11.2	72	>5%	N 端
FR α -抗體-B-scFv2-G1- Mov19*	12.0	89	>5%	N 端
FR α -抗體-C-scFv2-G1- Mov19*	6.2	83	>5%	N 端
FR57scFv2-G1-Mov19*	13.3	90	<0.1%	N 端
不對稱-Fc				
FR57scFv2-杵/Mov19- 白	26	87		N.A
FR57scFv3wt-杵 /Mov19-白	15	70		N.A

【 0395 】 如表 11 所示，顯著數目之基於 Morrison 氏形式之雙互補位分子在蛋白 A 親和力純化後具有低百分比單體。由於可擴展性或可製造性可能成為具有低百分比單體

之構築體的挑戰，選擇展現較高效價及大於 70 之單體 % 之八種構築體(在表 11 中由星號指示)用於進一步評估。此八種構築體使用陶瓷羥磷灰石層析進一步經研磨至大於 95% 純度且經受進一步表徵。為了說明 scFv 臂之總體分子構形或潛在結構改變對雙互補位臂之結合的影響，藉由競爭 FACS 分析來分析八種 Morrison 氏構築體之各臂的結合效率。簡言之，FR α 陽性 T47D 細胞用與在一般自 50 nM 至 0.2 nM 之濃度範圍下的相應鼠科動物親本抗體混合之 0.8 nM Morrison 氏抗體培育。在冰上培育持續 2 小時之後，細胞自未結合抗體洗出，且結合之 Morrison 氏抗體用第二抗人類 FITC 標記抗體偵測。在增加濃度之親本抗體存在下減少之 Morrison 氏抗體結合指示對臂之第二集合的結合之影響。如圖 4A-4H 及表 12 所示，八種 Morrison 氏抗體中之五種具有完全無活性或部分地受影響之臂。在具有功能性臂之兩個集合的三種 Morrison 氏抗體中，兩種抗體 (FR α -抗體 -A-scFv2-Mov19-IgG1 及 FR α -抗體 -C-scFv2-Mov19-IgG1) 展現穩定性問題。基於此等數據，選擇 FR57scFv2-Mov19-IgG1 (「四價」) 用於進一步評估。

表 12.

四價 Ab	臂結合(根據競爭 FACS)	
	Fab	scFv
Mov19:FRα-抗體-A-scFv	活性	無活性
FRα-抗體-A:Mov19scFv	活性	部分地受影響
Mov19:FR57scFv	活性	部分地受影響
FR57:Mov19scFv	活性	無活性
FRα-抗體-A-scFv: Mov19	活性	活性
FRα-抗體-B-scFv: Mov19	部分地受影響	活性
FRα-抗體-C-scFv: Mov19	活性	活性
FR57scFv:Mov19	活性	活性

【 0396 】 在一獨立實驗中，兩種基於不對稱 -Fc 形式之雙互補位分子 (FR57scFv2- 杵 -Mov19- 臼 及 FR57scFv3wt- 杵 -Mov19- 臼) 亦 經 表 現 。 FR57scFv2- 杵 -Mov19- 臼 (「 KIH 」) 展現較高單體 % 及效價且經選擇用於進一步評估。如圖 5 所示，此分子在凝膠電泳中在非還原條件下作為單一色帶 (對應於約 125 kDa) 跑膠且在還原條件下分解成 3 個色帶 (一個對應於輕鏈 (約 25 kDa) 且兩個對應於相似尺寸 (各自約 50 kDa) 之重鏈 (FR57scFv-Fc- 杵 及 Mov19-HC- 臼)) 。此等結果表明 FR57scFv2- 杵 -Mov19- 臼 在細胞培養物中正確地經組裝且在純化期間未崩潰。

【 0397 】 接著，藉由在 40℃ 下加熱 FR57scFv2- 杵 -Mov19- 臼 分子 (濃度：10 mg/mL 於 1X PBS 中) 持續 2 週且基本上使用實例 1 所述之程序執行 SEC 分析來分析該分子之穩定性。圖 6 顯示第 0 天及第 14 天樣品之 SEC 覆蓋圖。特定言之，未觀察到聚集或裂解，表明該分子之良好穩定性。

抗體結合及處理

【0398】活體外使用 3[H]-抗體來分析抗體形式對抗體結合及處理之影響。簡言之，FR α 陽性 KB 細胞在 37°C 下暴露於飽和濃度之親本、KIH 雙互補位或 Morrison 氏抗體持續 30 min，在 PBS 中洗滌以移除任何未結合抗體，再懸浮於新鮮培養基中，且在 37°C 下在潮濕 6% CO₂ 氛圍中培育持續 22 h。在丙酮萃取及液體閃爍計數之後分析無蛋白質放射性(經處理抗體)及蛋白質相關放射性(未經處理抗體)之量，且數據用於計算每個細胞之抗體結合位點(ABC)、經處理抗體 % 及經處理抗體之量。初步實驗顯示親本抗體 M9346A 及 huFR57 之處理為相似的。因此，僅一種親本抗體(M9346A)用於進一步實驗。

【0399】兩種雙互補位形式(KIH 及四價)均顯示與親本抗體相比增加之量的經處理抗體(圖 7C 及 7D)。有趣的是，兩種雙互補位形式之經改良遞送/處理機制為不同的。KIH 雙互補位抗體具有較高 ABC 及與單特異性親本抗體相似之內化效率(圖 7A-7D)，而 Morrison 氏四價抗體顯示經改良內化效率及可與親本抗體相當之 ABC 值(圖 7C 及 7D)。就兩種雙互補位形式而言經降解之抗體之量為相似的(圖 7E 及 7F)。

實例 3. 製備雙互補位 FR α 靶向免疫結合物

製備 FR57scfv-huMov19-磺基-SPDB-DM4 結合物

【0400】根據比爾定律分別使用在 280、343 及 412 nm

下之 UV/Vis 吸光度值及消光係數計算 FR57scfv-huMov19、磺基-SPDB 及 DM4 之莫耳濃度。藉由使連接體在 50 mM 磷酸鉀緩衝液、50 mM 氯化鈉及 2 mM EDTA (pH 7.5) 中與 25 mM DTT 反應且量測在 343 nm 下之硫吡啶釋放來測定連接體濃度。藉由使 DM4 在 50 mM 磷酸鉀緩衝液、50 mM 氯化鈉及 2 mM EDTA (pH 7.5) 中與 10 mM DTNB [5,5-二硫雙-(2-硝基苯甲酸)] 反應且量測在 412 nm 下之吸光度來測定藥物濃度。

【0401】在抗體結合之前，藉由在 25°C 下在 30% 水溶液 [15 mM 磷酸鉀 (pH 7.6) 及 70% 有機物 [(N-N-二甲基乙醯胺、DMA、SAFC)] 中使 1.5 mM 磺基-SPDB 與 1.95 mM DM4 反應持續 90 min 來製備磺基-SPDB-DM4 原位混合物。在結合反應期間，2.5 mg/mL 抗體溶液在 25°C 下在具有 10% DMA (v/v) 之 15 mM 磷酸鉀 pH 7.6 中與相對抗體 8 至 8.5 倍莫耳過量之磺基-SPDB-DM4 反應持續 15-20 小時。該反應使用 AKTA 上之 Sephadex 25 去鹽管柱經純化至 10 mM 乙酸鹽、9% 蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.0) 調配緩衝液中且經由具有 0.22 μ m PVDF 膜之注射器過濾器過濾。

【0402】結合至抗體之 DM4 的莫耳比率 (DAR) 及未結合之類美登素物質之百分比係如下文所述經測定。藉由 UV-Vis 發現經純化結合物具有 3.4 mol DM4/mol 抗體，藉由 SEC 發現具有 99.8% 單體，且藉由 HPLC Hisep 管柱分析發現具有低於 2% 之游離藥物。

【0403】DAR 係藉由量測在 252 及 280 nm 下之 UV/Vis

吸光度且使用說明各組分之作用的二項方程計算 Ab 濃度及 DM4 濃度來測定。存在於最終 FR57scfv-huMov19-磺基-SPDB-DM4 結合物樣品中之未結合之類美登素的量係自經由 HISEP 管柱 (25 cm × 4.6 mm, 5 μm) 分析之樣品中觀察到的所得峰面積計算。存在於結合物樣品中之游離類美登素百分比 (FM%) 係使用以下方程計算：游離類美登素 % = (歸因於 DM4 之逆相 PA 252) / (歸因於 DM4 之逆相 PA 252 + 歸因於 DM4 之流通 PA 252) × 100%。

製備杵臼 (KIH)-FR57scfv-huMov19-磺基-SPDB-DM4 結合物

【0404】在抗體結合之前，藉由在 25℃ 下在 30% 水溶液 [15 mM 磷酸鉀 (pH 7.6) 及 70% 有機物 [(N-N-二甲基乙醯胺、DMA、SAFC)] 中使 1.5 mM 磺基-SPDB 與 1.95 mM DM4 反應持續 90 min 來製備磺基-SPDB-DM4 原位混合物。在結合反應期間，3.0 mg/mL 抗體溶液在 25℃ 下在具有 11% DMA (v/v) 之 15 mM 磷酸鉀 pH 7.6 中與相對抗體 10 倍莫耳過量之磺基-SPDB-DM4 反應持續 15-20 小時。該反應使用 NAP 去鹽管柱兩次經純化至 10 mM 丁二酸鹽、250 mM 甘胺酸、0.5% 蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5) 調配緩衝液中且經由具有 0.22 μm PVDF 膜之注射器過濾器過濾。藉由 UV-Vis 發現經純化結合物具有 2.9 mol DM4/mol 抗體，藉由 SEC 發現具有 90.6% 單體，且藉由 HPLC Hisep 管柱分析發現具有低於 1% 之游離藥物。

製備 FR57scfv-huMov19-DM21 結合物

【0405】根據比爾定律分別使用在 280、343 及 412 nm 下之 UV/Vis 吸光度值及消光係數計算 FR57scfv-huMov19、磺基-GMBS 及 DM21 之莫耳濃度。藉由使連接體在 50 mM 磷酸鉀緩衝液、50 mM 氯化鈉及 2 mM EDTA (pH 7.5) 中與 25 mM DTT 中之 50 mM DTT 反應且量測在 343 nm 下之硫吡啶釋放來測定連接體濃度。藉由使 DM21 在 50 mM 磷酸鉀緩衝液、50 mM 氯化鈉及 2 mM EDTA (pH 7.5) 中與 10 mM DTNB [5,5-二硫雙-(2-硝基苯甲酸)] 反應且量測在 412 nm 下之吸光度來測定藥物濃度。

【0406】在結合之前，藉由使 1.5 mM 磺基-GMBS 分別在 60/40 (v/v) DMA 及丁二酸鹽緩衝液 pH 5.0 中與 1.95 mM DM21 反應來製備磺基-GMBS-DM21 原位混合物。該結合在具有 10% DMA (v/v) 之 60 mM 4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸 (EPPS) pH 8.0 中用相對 2.5 mg/mL 之抗體 6.5 連接體過量之磺基-GMBS-DM21 進行。在 25℃ 下培育 20-22 小時之後，該反應使用 NAP 去鹽管柱經純化至 10 mM 丁二酸鹽、250 mM 甘胺酸、0.5% 蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5) 中且經由 0.22 μm PVDF 膜過濾器過濾。

【0407】結合至抗體之 DM21 的莫耳比率 (DAR) 及未結合之類美登素物質之百分比係如下文所述經測定。藉由 UV-Vis 發現經純化結合物具有 3.7 mol DM21/mol 抗體，藉由 SEC 發現具有 98% 單體，且藉由 HPLC Hisep 管柱分析發現具有低於 2% 之游離藥物。

【0408】結合至抗體之DM21的莫耳比率(DAR)係藉由量測在252及280 nm下之UV/Vis吸光度且使用說明各組分之作用的二項方程計算Ab濃度及DM21濃度來測定。存在於最終FR57scfv-huMov19-GMBS-DM21L結合物樣品中之未結合之類美登素的量係自經由HISEP管柱(25 cm × 4.6 mm, 5 μm)分析之樣品中觀察到的所得峰面積計算。存在於結合物樣品中之游離類美登素百分比(FM%)係使用以下方程計算：游離類美登素% = (歸因於DM21之逆相PA 252) / (歸因於DM21之逆相PA 252 + 歸因於DM21之流通PA 252) × 100%。

製備-杵臼(KIH)-FR57scfv-huMov19-GMBS-DM21L結合物

【0409】在結合過程期間使用較低濃度之該原位混合物中之藥物及連接體及較低抗體濃度製備初始批次之KIH-FR57scfv-huMov19-GMBS-DM21L。簡言之，在結合之前，藉由使1.5 mM磺基-GMBS分別在60/40 (v/v) DMA及丁二酸鹽緩衝液pH 5.0中與1.95 mM DM21反應來製備磺基-GMBS-DM21原位混合物。該結合在具有10% DMA (v/v)之60 mM 4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸(EPPS) pH 8.0中用相對2.5 mg/mL之抗體7.5連接體過量之磺基-GMBS-DM21進行。在25℃下培育20-22小時之後，該反應使用NAP去鹽管柱兩次經純化至10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)中且經由0.22 μm PVDF膜過濾器過濾。藉由UV-Vis發現經純化結合物具有

3.1 mol DM21/mol抗體，藉由SEC發現具有99.1%單體，且藉由HPLC Hisep管柱分析發現具有低於2%之游離藥物。

【0410】在結合過程期間使用較高濃度之該原位混合物中之藥物及連接體及較高抗體濃度製備稍後批次的用於藥物動力學及功效研究之KIH-FR57scfv-huMov19-GMBS-DM21L。簡言之，在結合之前，藉由使3 mM磺基-GMBS分別在60/40 (v/v) DMA及丁二酸鹽緩衝液pH 5.0中與3.9 mM DM21反應來製備磺基-GMBS-DM21原位混合物。該結合在具有10% DMA (v/v)之60 mM 4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪丙烷磺酸(EPPS) pH 8.0中用相對5.7-6 mg/mL之抗體6.5-7連接體過量之磺基-GMBS-DM21進行。在25℃下培育20-22小時之後，該反應使用AKTA上之Sephadex-25去鹽管柱經純化至10 mM丁二酸鹽、250 mM甘胺酸、0.5%蔗糖、0.01% Tween 20 (pH 5.5)中且經由0.22 μm PVDF膜過濾器過濾。藉由UV-Vis發現經純化結合物具有3.1 mol DM21/mol抗體，藉由SEC發現具有98.7%單體，且藉由HPLC Hisep管柱分析發現具有低於2%之游離藥物。

【0411】包含DAR為3.5之KIH-FR57scfv-huMov19-GMBS-DM21L構築體之組合物係稱作「IMGN151」。

實例4. 雙互補位抗體形式對免疫結合物功效之影響

雙互補位免疫結合物之活體外細胞毒性

【0412】活體外使用KB、Igrov-1及T47D細胞評價雙互補位抗體形式對免疫結合物細胞毒性之影響。根據實例

3 所述之方法製備親本、KIH及Morrison氏抗體之磺基-SPDB-DM4結合物。該等結合物經稀釋於適當培養基中且添加至含有 1×10^3 個細胞/孔之96孔平板的孔中。該等板在37℃、6% CO₂下經培育持續5天。根據製造商之方案藉由WST-8分析測定細胞活力，且使用S型劑量-反應(可變斜率)非線性回歸曲線擬合(GraphPad Software Inc)產生IC₅₀。

表 13.

細胞株	FRα 密度 (X 1000)，抗 FRα 習知 Ab-PE FACS	Ab-磺基-SPDB-DM4，IC50，nM		
		親本 (M9346A)	二價，KIH	四價， Morrison
KB	約 4,000	0.1	0.09	0.07
Igrov-1	500	2.0	0.2	0.2
T47D	100	20.0	0.2	1.0

【0413】與親本抗體結合物相比，該等雙互補位磺基-SPDB-DM4結合物均針對三種所測試之中等至低FRα表現性細胞株中的兩者(Igrov-1及T47D)更具活性。同樣對該三種結合物敏感之唯一細胞株為KB，其具有極高水準之標靶表現。KIH結合物展示大於Morrison氏形式結合物之針對T47D細胞株(亦即，具有最低水準之標靶表現的細胞)之細胞毒性活性。然而，KIH結合物及Morrison氏形式結合物兩者針對所分析之另兩種株具同樣活性。

四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0414】活體內使用OV-90異種移植物模型來分析四

價雙互補位抗體形式對免疫結合物治療功效之影響。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組 $n=6$)且隨後在接種後第7天給藥。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、2.5及5 mg/kg之四價-s-SPDB-DM4以及2.5及5 mg/kg之M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第80天終止。

【0415】每週兩次使用測徑規在三個維度量測腫瘤體積。體積使用式子體積 = $\frac{1}{2}$ (長度 $\times$ 寬度 $\times$ 高度)以 mm^3 表示 (Cancer Chemother. Pharmacol. 1989 (24): 148-154. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. MM Tomayko及CP Reynolds)。每週兩次量測體重，作為測試劑毒性之粗略指數。活性係如Cancer Res. 1991年9月(51): 4845-4852. Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue. M Bissery, D Guenard, F Gueritte-Voegelein等人所述加以評價。

【0416】該研究之結果顯示於圖8及表14中。四價-s-SPDB-DM4結合物在2.5及5 mg/kg劑量下均具活性，分別具有13%及11% T/C。2.5 mg/kg劑量具有32天T-C、LCK 1.25 (活性)、2/6 PR及0/6 CR。5 mg/kg劑量具有47天T-C、LCK 1.84 (活性)、2/6 PR、2/6 CR及1/6 TFS。M-s-SPDB-DM4結合物在2.5 mg/kg劑量下具活性，具有26% T/C，且在5 mg/kg劑量下具高度活性，具有3% T/C。2.5 mg/kg劑量具有25天T-C、LCK 0.98 (無活性)且無衰退。就5 mg/kg

組而言，T-C及LCK歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。然而，該組中存在4/6 PR、3/6 CR及3/6 TFS。在接種後第13天之最低點處，所有研究組中均存在2-5%之最少體重損失。此研究之結果指示，四價ADC形式不提供相對親本結合物之活性改良。

表 14.

組(s-SPDB-DM4)	Ab 劑量(mg/kg)	T/C% (D27)	PR	CR	結果
四價	2.5	13%	2/6	0/6	活性
四價	5	11%	2/6	2/6	活性
M	2.5	26%	0/6	0/6	活性
M	5	3%	4/6	3/6	高度活性

四價雙互補位ADC在攜帶IGROV-1人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0417】活體內使用IGROV-1異種移植物模型來分析四價雙互補位抗體形式對免疫結合物治療功效之影響。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組n=8)且隨後在接種後第11天給藥。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、100 μg/kg之四價-s-SPDB-DM4及100 μg/kg之M-s-SPDB-DM4。為了說明四價結合物歸因於四價抗體與親本抗體之間的分子量差異(亦即，50 kDa差異)而可能用藥不足，劑量在此研究及所有進一步研究中藉由有效載荷標準化。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第81天終止。腫瘤量測及計算係如上文子章節(「四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性」)中所述經測定。

【0418】該研究之結果顯示於圖9及表15中。四價-s-SPDB-DM4及親本 M-s-SPDB-DM4結合物在 100 μg/kg下均具活性，分別具有21%及15% T/C。就任一組而言，T-C及LCK歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。四價結合物具有2/8 PR、1/8 CR及0/8 TFS，而M-s-SPDB-DM4具有3/8 PR、1/8 CR及0/8 TFS。該研究中之大多數組中存在最少重量損失，其中例外為100 μg/kg四價ADC，其在接種後第14天之最低點處具有8%體重損失。又，此研究之結果指示，四價ADC形式不提供相對親本結合物之活性改良。

表 15.

組(s-SPDB-DM4)	DM 劑量(μg/kg)	T/C% (D31)	PR	CR	結果
四價	100	21%	2/8	1/8	活性
M	100	15%	3/8	1/8	活性

KIH雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0419】活體內使用OV-90異種移植物模型來分析KIH雙互補位抗體形式對免疫結合物治療功效之影響。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組n=6)且隨後在接種後第7天給藥。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、40、20及10 μg/kg之KIH-s-SPDB-DM4及20 μg/kg之M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第80天終止。腫瘤量測及計算係如子章節「四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異

種移植物之 SCID 小鼠中之活體內抗腫瘤活性」中所述經測定。

【0420】該研究之結果顯示於圖 10 及表 16 中。KIH-s-SPDB-DM4 結合物在 40 µg/kg 下具高度活性，在 20 µg/kg 下具活性且在 10 µg/kg 下無活性，分別具有 6%、12% 及 83% T/C。40 µg/kg 劑量組具有 29 天 T-C、LCK 1.84 (活性)、3/6 PR、2/6 CR 及 0/6 TFS。20 µg/kg 劑量組具有 38 天 T-C、LCK 1.32 (活性) 且無衰退。10 µg/kg 劑量組具有 2 天 T-C、LCK 0.09 (無活性) 且無衰退。親本 M-s-SPDB-DM4 結合物在 20 µg/kg 下無活性，具有 81% T/C 且無衰退。就此組而言，T-C 及 LCK 歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。此研究中未觀察到體重損失。與用四價結合物執行之研究形成對照，KIH-s-SPDB-DM4 顯示與 M-s-SPDB-DM4 相比明顯更具活性。基於此等研究之結果，相對四價形式選擇 KIH 形式用於進一步評估。

表 16.

組(s-SPDB-DM4)，效應物劑量	T/C%	衰退		結果
		部分	完全	
KIH 40 µg/kg	6%	3/6	2/6	高度活性
KIH 20 µg/kg	12%	0/6	0/6	活性
KIH 10 µg/kg	83%	0/6	0/6	無活性
M 20 µg/kg	81%	0/6	0/6	無活性

實例 5. 結合於 DM21 之杵臼雙互補位抗體的活體外活性
結合於 DM21 之杵臼雙互補位抗體的活體外細胞毒性

【0421】根據實例 4 所述之方案(「雙互補位免疫結合

物之活體外細胞毒性」)，在多種細胞株中分析結合於 DM21 之 KIH 雙互補位抗體的活體外細胞毒性。在早期研究中，兩種親本 DM21 結合物 (M-DM21 及 huFR57-DM21) 之活性顯示極相似 (圖 11)。在所有進一步研究中，KIH-DM21 活性與親本 M 抗體之結合物 (M-s-SPDB-DM4 及 M-DM21) 相比以評價雙互補位形式及 DM21 有效載荷對 KIH-DM21 之總體細胞毒性的作用。

【0422】與兩種親本結合物相比，KIH-DM21 針對所測試之五種細胞株中的三者 (Igrov-1、T47D 及 JHOS-4) 明顯更具活性。(圖 12A-12E。)另外，具有 DM21 連接體/有效載荷之兩種結合物 (KIH-DM21 及 M-DM21) 針對 Jeg-3 細胞具相似活性，而 M-s-SPDB-DM4 結合物證明針對此細胞株具較少活性。展現最高 FR α 表現水準之唯一細胞株 (KB) 對所有三種結合物相似地敏感。因此，此等結果顯示相對於親本抗體之結合物 (M-s-SPDB-DM4 及 M-DM21)，KIH-DM21 針對大多數所測試之細胞株展現增加的活性。

【0423】另外，使用 ^3H -抗體比較 KIH-DM21 及親本單特異性抗體之結合、內化及處理。在具有中等 (JHOS-4) 及高 (KB) FR α 表現之腫瘤細胞中，KIH-DM21 分別加強抗體結合事件及處理達 100% 及 170%。

結合於 DM21 之杵臼雙互補位抗體的旁觀者殺死活性

【0424】活體外使用多種細胞株來分析 KIH-DM21 殺死混合細胞培養物中之 FR α -細胞的能力。與其他活體外細

胞毒性實驗一致，親本抗體結合物 M-DM21 及 M-s-SPDB-DM4 用作對照物。標靶陽性細胞 (KB、Igrov-1、Jeg-3 或 T47D) 及標靶陰性細胞 Namalwa/luc (亦即，表現螢光素酶之 Namalwa 細胞) 之混合培養物暴露於 0.5 nM 該等結合物。當細胞單獨經培育時，此結合物濃度對標靶陰性細胞無毒。接著測試混合培養物中多種百分比之標靶陽性細胞 (9% 至 50%)。在 5 天暴露之後，根據製造商之方案藉由 One Glo (Promega) 測定該混合物中之標靶陰性細胞的細胞增生之抑制。

表 17

FR α +細胞株	FR α 表現(藉由 FACS，使用習知 Ab-PE)	產生足以殺死 90% FR α ⁺ 細胞之代謝物所必需的% FR α ⁺ 細胞		
		IMGN853	M-DM21	KIH-DM21
KB	約 2,000,000	30	30	小於 10
Igov-1	500,000	大於 50	35	10
Jeg-3	150,000	大於 50	40	40
T47D	100,000	大於 70	大於 70	65

【0425】在所測試之所有混合培養物中，KIH-DM21 具有最高旁觀者活性，隨後為 M-DM21。M-s-SPDB-DM4 為最少活性結合物，如圖 13A - 13D 及表 17 所示。

【0426】總之，此等數據指示與結合於 DM21 之親本抗體或 s-SPDB-DM4 相對，與 DM21 連接體 / 有效載荷組合之 KIH 雙互補位形式引起增加的活體外功效。

實例 6. KIH 雙互補位免疫結合物之活體內功效

KIH 雙互補位 ADC 在攜帶 OV-90 人類卵巢癌異種移植物之 SCID 小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0427】在具有低FR α 表現(H-分數為30)之OV-90異種移植物模型中評價 KIH-DM21之活體內功效且與 KIH-s-SPDB-DM4相比。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組 n=6)且隨後在接種後第7天給藥。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、40、20及10 $\mu\text{g/kg}$ 之 KIH-s-SPDB-DM4、40、20及10 $\mu\text{g/kg}$ 之 KIH-DM21、20 $\mu\text{g/kg}$ 之 M-DM21及20 $\mu\text{g/kg}$ 之 M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第80天終止。腫瘤量測及計算係如實例4子章節「四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性」中所述經測定。

【0428】該研究之結果顯示於圖14A-14B及表18中。KIH-s-SPDB-DM4 40 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有29天T-C、LCK 1.84 (活性)、3/6 PR、2/6 CR及0/6 TFS。20 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有38天T-C、LCK 1.32 (活性)且無衰退。10 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有2天T-C、LCK 0.09 (無活性)且無衰退。親本M-s-SPDB-DM4結合物在20 $\mu\text{g/kg}$ 下無活性，具有81% T/C且無衰退。就此組而言，T-C及LCK歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。KIH-DM21結合物在所有劑量下均具高度活性，就40 $\mu\text{g/kg}$ 劑量而言具有1% T/C，就20 $\mu\text{g/kg}$ 劑量而言具有7% T/C且就10 $\mu\text{g/kg}$ 劑量而言具有9% T/C。40 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有53天T-C、LCK 2.49 (活性)、5/6 PR、5/6 CR及3/6 TFS。20 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有42天T-C、LCK 1.98 (活性)、3/6 PR、2/6 CR及1/6 TFS。10 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有2/6 PR及0/6

CR。就此組而言，T-C及LCK歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。M-DM21結合物在20 μg/kg下具活性，具有22% T/C、30天T-C、LCK 1.41 (活性)且無衰退。此研究中未觀察到體重損失。總之，在此研究中，DM21結合物比呈親本及KIH雙互補位形式之s-SPDB-DM4結合物更具活性。另外，在相同連接體/有效載荷形式內之匹配20 μg/kg劑量下，雙互補位KIH結合物比其親本配對物更具活性。基於此等結果，選擇KIH-DM21用於額外異種移植物模型中之評估。

表 18.

組，效應物劑量	T/C%	衰退		結果
		部分	完全	
KIH-DM21 40 μg/kg	1%	5/6	5/6	高度活性
KIH-DM21 20 μg/kg	7%	3/6	2/6	高度活性
KIH-DM21 10 μg/kg	9%	2/6	0/6	高度活性
KIH-s-SPDB-DM4 40 μg/kg	6%	3/6	2/6	高度活性
KIH-s-SPDB-DM4 20 μg/kg	12%	0/6	0/6	活性
KIH-s-SPDB-DM4 10 μg/kg	83%	0/6	0/6	無活性
M-DM21 20 μg/kg	22%	0/6	0/6	活性
M-s-SPDB-DM4 20 μg/kg	81%	0/6	0/6	無活性

KIH雙互補位ADC在攜帶Ishikawa人類子宮內膜腺癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0429】在具有中等FRα表現(H-分數為100)之Ishikawa異種移植物模型中分析結合於DM21之KIH雙互補位抗體的活體內功效。

【0430】小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組n=6)且隨後在接種後第11天給藥。該等組包括給藥調配物

緩衝液之對照組、100、50及25 $\mu\text{g/kg}$ 之 KIH-DM21、100及50 $\mu\text{g/kg}$ 之 M-DM21及100 $\mu\text{g/kg}$ 之 M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第90天終止。腫瘤量測及計算係如實例4子章節「四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性」中所述經測定。

【0431】該研究之結果顯示於圖15及表19中。KIH-DM21結合物在100及50 $\mu\text{g/kg}$ 下具高度活性，但在25 $\mu\text{g/kg}$ 下無活性，分別具有0%、9%及78% T/C。100 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有> 63天之T-C、> 3.33之LCK（高度活性）、6/6 PR、5/6 CR及4/6 TFS。50 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有3/6 PR及0/6 CR。就此組而言，T-C及LCK歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。25 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有2天T-C、LCK 0.11（無活性）且無衰退。M-DM21結合物在130 $\mu\text{g/kg}$ 下具高度活性且在70 $\mu\text{g/kg}$ 下具活性，分別具有0%及11% T/C。130 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有> 63天之T-C、> 3.33之LCK（高度活性）、6/6 PR、6/6 CR及0/6 TFS。50 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有27天T-C、LCK 1.43（活性）、4/6 PR、2/6 CR及0/6 TFS。M-s-SPDB-DM4結合物在100 $\mu\text{g/kg}$ 劑量下具高度活性，具有1% T/C、6/6 PR及3/6 CR。就此組而言，T-C及LCK歸因於低腫瘤體積下之壞死可能無法經測定。在該研究中之所有組中存在1-5%之間的最少體重損失。總之，當以100 $\mu\text{g/kg}$ 給藥時，與親本結合物M-DM21及M-s-SPDB-DM4相比，KIH-DM21明顯更具活性。儘管所有三種結合物均在100 $\mu\text{g/kg}$

下具高度活性，KIH雙互補位ADC之反應持續時間比親本抗體結合物長得多。

表 19.

組，效應物劑量	T/C%	衰退		TFS	結果
		部分	完全		
KIH-DM21 100 µg/kg	0%	6/6	5/6	4/6	高度活性
KIH-DM21 50 µg/kg	9%	3/6	0/6	0/6	高度活性
KIH-DM21 25 µg/kg	78%	0/6	0/6	0/6	無活性
M-DM21 約 130 µg/kg	0%	6/6	6/6	0/6	高度活性
M-DM21 約 70 µg/kg	11%	4/6	2/6	0/6	活性
M-s-SPDB-DM4 100 µg/kg	1%	6/6	0/6	0/6	高度活性

KIH雙互補位ADC在攜帶IGROV-1人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0432】在具有中等FR α 表現(H-分數為140)之IGROV-1異種移植物模型中分析結合於DM21之KIH雙互補位抗體的活體內功效。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組n=8)且隨後在接種後第10天給藥。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、100及50 µg/kg之KIH-DM21、130及70 µg/kg之M-DM21及100及50 µg/kg之M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第120天終止。腫瘤量測及計算係如實例4子章節「四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性」中所述經測定。

【0433】該研究之結果顯示於圖16及表20中。KIH-DM21結合物在100及50 µg/kg下均具活性，分別具有19%

及 12% T/C。100 µg/kg劑量具有> 99天之 T-C、>2.87之 LCK (高度活性)、7/8 PR、6/8 CR及 0/8 TFS。50 µg/kg劑量具有 53天 T-C、LCK 1.53 (活性)、5/8 PR、3/8 CR及 0/8 TFS。M-DM21結合物在 130及 70 µg/kg下均具活性，分別具有 13%及 16% T/C。130 µg/kg劑量具有> 99天之 T-C、> 2.87之 LCK (高度活性)、8/8 PR、7/8 CR及 2/8 TFS。70 µg/kg劑量具有 36天 T-C、LCK 1.04 (活性)、3/8 PR、2/8 CR及 0/8 TFS。M-s-SPDB-DM4結合物在 100及 50 µg/kg劑量下均具活性，分別具有 17%及 34% T/C。100 µg/kg劑量具有 23天 T-C、LCK 0.67 (無活性)、3/8 PR、2/8 CR及 0/8 TFS。50 µg/kg劑量具有 17天 T-C、LCK 0.49 (無活性)且無衰退。在接種後第 16 天之最低點處，大多數組中存在 1-5% 之最少體重損失，其中例外係在 50 µg/kg 下之 M-DM21 (6%)及在 50 µg/kg 下之 M-s-SPDB-DM4 (7%)。總之，與 DM21結合物相比，親本 M-s-SPDB-DM4結合物展現較少活體內功效。另外，在所測試之兩種劑量下，KIH-DM21及親本 M-DM21具相似活性。

表 20.

組	T/C%	衰退		結果
		部分	完全	
KIH-DM21 100 µg/kg	19%	7/8	6/8	活性
KIH-DM21 50 µg/kg	12%	5/8	3/8	活性
M-DM21 100 µg/kg	13%	8/8	7/8	活性
M-DM21 50 µg/kg	16%	3/8	2/8	活性
M-s-SPDB-DM4 100 µg/kg	17%	3/8	2/8	活性
M-s_SPDB-DM4 50 µg/kg	34%	0/8	0/8	活性

KIH雙互補位ADC在攜帶KB人類子宮頸癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0434】在具有高FR α 表現(H-分數為300)之KB異種移植物模型中分析結合於DM21之KIH雙互補位抗體的活體內功效。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組n=6)且隨後在接種後第6天給藥，此時腫瘤達到約100 mm³。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、50及25 μ g/kg之KIH-DM21、50及25 μ g/kg之M-DM21及50及25 μ g/kg之M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第120天終止。腫瘤量測及計算係如實例4子章節「四價雙互補位ADC在攜帶OV-90人類卵巢癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性」中所述經測定。

【0435】該研究之結果顯示於圖17及表21中。KIH-DM21結合物在50及25 μ g/kg下具高度活性，就兩種劑量而言，具有0% T/C、>100天之T-C及> 6.41之LCK（高度活性）。100 μ g/kg劑量具有6/6 PR、6/6 CR及6/6 TFS，而25 μ g/kg劑量具有6/6 PR、5/6 CR及5/6 TFS。M-DM21結合物在50 μ g/kg及25 μ g/kg下均具高度活性，分別具有0%及2% T/C。兩種劑量具有> 100天之T-C及> 6.41之LCK（高度活性）。50 μ g/kg劑量具有6/6 PR、6/6 CR及6/6 TFS，而25 μ g/kg劑量具有5/6 PR、4/6 CR及4/6 TFS。M-s-SPDB-DM4結合物在50及25 μ g/kg下均具高度活性，分別具有0%及8% T/C。50 μ g/kg劑量具有> 100天之T-C、> 6.41之LCK（高度

活性)、6/6 PR、6/6 CR及5/6 TFS。25 µg/kg劑量具有24天 T-C、LCK 1.54 (活性)、3/6 PR、1/6 CR及1/6 TFS。在接種後第8天之最低點處，M-DM21及M-s-SPDB-DM4組中可見2-4%之最少體重損失。總之，25 µg/kg之M-s-SPDB-DM4之反應為短暫的，而50 µg/kg之M-s-SPDB-DM4的投與在大多數小鼠中引起長期持續之完全衰退。在25 µg/kg及50 µg/kg劑量下之M-DM21及KIH-DM21的投與在大多數小鼠中引起長期持續之完全衰退。

【0436】總之，此處所述之活體內功效研究指示KIH-DM21在所測試之大多數異種移植物模型中為最具活性結合物，隨後為M-DM21及M-s-SPDB-DM4。

表 21.

組	T/C%	衰退		TFS	結果
		部分	完全		
KIH-DM21 50 µg/kg	0%	6/6	6/6	6/6	高度活性
KIH-DM21 25 µg/kg	0%	6/6	5/6	5/6	高度活性
M-DM21 50 µg/kg	0%	6/6	6/6	6/6	高度活性
M-DM21 25 µg/kg	2%	5/6	4/6	4/6	高度活性
M-s-SPDB-DM4 50 µg/kg	0%	6/6	6/6	5/6	高度活性
M-s-SPDB-DM4 25 µg/kg	8%	3/6	1/6	1/6	高度活性

KIH雙互補位ADC在攜帶IMGN853抗性KB人類子宮頸癌異種移植物之SCID小鼠中之活體內抗腫瘤活性

【0437】在IMGN853抗性KB異種移植物模型中分析結合於DM21之KIH雙互補位抗體之活體內功效。親本KB細胞在1 nM DM1-Me存在下生長。在建立穩定生長之培養物之後，細胞經次選殖且純系生長，經表徵且經冷凍。選

擇次純系 6A 用於此研究且小鼠經皮下接種。小鼠根據腫瘤體積經隨機化至各組中(每組 $n=6$)且隨後在接種後第 5 天給藥，此時腫瘤達到約 100 mm^3 。該等組包括給藥調配物緩衝液之對照組、40 及 20 $\mu\text{g/kg}$ 之 KIH-L-DM21、40 及 20 $\mu\text{g/kg}$ 之 M-L-DM21 及 40 及 20 $\mu\text{g/kg}$ 之 M-s-SPDB-DM4。所有小鼠均經投與單一靜脈內劑量之以上化合物。該研究在接種後第 78 天終止。腫瘤量測及計算係如以上 OV-90 人類卵巢癌異種移植物實驗中所述經測定。

【0438】該研究之結果顯示於圖 19 及表 22 中。KIH-L-DM21 結合物在 40 及 20 $\mu\text{g/kg}$ 下均具高度活性，具有 0% T/C。40 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有 > 60 天之 T-C、> 3.41 之 LCK (高度活性)、6/6 PR、6/6 CR 及 6/6 TFS。20 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有 46 天 T-C、LCK 2.61 (活性)、6/6 PR、4/6 CR 及 1/6 TFS。M-L-DM21 結合物在 40 $\mu\text{g/kg}$ 及 20 $\mu\text{g/kg}$ 下均具高度活性，分別具有 0% 及 2% T/C。40 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有 > 60 天之 T-C、> 3.41 之 LCK (高度活性)、6/6 PR、6/6 CR 及 6/6 TFS。20 $\mu\text{g/kg}$ 劑量組具有 28 天 T-C、LCK 1.59 (活性)、5/6 PR、2/6 CR 及 2/6 TFS。M-s-SPDB-DM4 結合物在 40 $\mu\text{g/kg}$ 下具高度活性，但在 20 $\mu\text{g/kg}$ 下無活性，分別具有 0% 及 63% T/C。40 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有 41 天 T-C、LCK 2.33 (活性)、6/6 PR、6/6 CR 及 0/6 TFS。20 $\mu\text{g/kg}$ 劑量具有 6 天 T-C、LCK 0.34 (無活性)、0/6 PR、0/6 CR 及 0/6 TFS。KIH-L-DM21 20 $\mu\text{g/kg}$ 組中可見最少體重損失，在接種後第 8 天之最低點處損失 3%。總之，在此模型中，KIH-L-DM21 與 M-L-

DM21可相當地有效且 KIH-L-DM21及 M-L-DM21均比 M-s-SPDB-DM4更有效。

表 22.

組	T/C%	衰退		TFS	結果
		部分	完全		
KIH-L-DM21 40	0%	6/6	6/6	6/6	高度活性
KIH-L-DM21 20	0%	6/6	4/6	1/6	高度活性
M-L-DM21 40	0%	6/6	6/6	6/6	高度活性
M-L-DM21 20	2%	5/6	2/6	2/6	高度活性
M-s-SPDB-DM4 40	0%	6/6	6/6	0/6	高度活性
M-s-SPDB-DM4 20	63%	0/6	0/6	0/6	無活性

實例 7. 雙互補位免疫結合物藥物動力學及耐受性

【0439】在食蟹獼猴中在單一劑量之後分析雙互補位FR α 靶向性免疫結合物之毒性及毒物動力學型態。簡言之，KIH-DM21以10或13 mg/kg之劑量水準以10分鐘緩慢推注形式經投與至兩隻雄性猴/劑量水準。觀察該等動物至給藥後28天以評估任何效應之恢復、持續或進展。評估體重、臨床觀察結果及食物消耗，且針對臨床病理學參數(血液學、血清化學及凝血)及毒物動力學參數收集血樣。

【0440】所有動物均存活直至研究結束。不存在對體重、血液學或血清化學參數之KIH-DM21相關影響。在單一10 Ab mg/kg組動物中注意到之KIH-DM21相關臨床觀察結果係在第8及12天後肢變紅，關於非給藥時期之剩餘部分未注意到臨床發現。在兩個劑量組中，在第4及8天注意到KIH L DM21相關較高纖維蛋白原值。截至非給藥時期結束(第29天)，值與預治療值相似。

【0441】 KIH-DM21 ADC在單一靜脈內投與至猴之後顯示兩相藥物動力學。ADC之平均末期t1/2在10 mg/kg劑量下為156小時。總抗體(TAb)之平均t1/2比關於ADC所觀察到之平均t1/2長(在10 mg/kg劑量下184小時)。ADC及TAbs濃度時間型態之比較指示，KIH-DM21免疫結合物在10 mg/kg劑量下比IMGN853更穩定。在10 mg/kg劑量下，與IMGN853相比，KIH-DM21具有更長末期半衰期及更大暴露度量(AUC_∞值)。

表 23.

PK 參數	FRα 雙互補位 ADC		IMGN853	
劑量組	10 mg/kg (N=2, m)		10 mg/kg (N=10)	
	ADC	Tab	ADC	TAbs
半衰期(h)	156	184	98.2	168.9
AUC _{0-inf} (h*µg/mL)	35,400	42,200	25,583	30,587

【0442】 如圖 18A及 18B所示，FRα雙互補位免疫結合物及IMGN853均在10及mg/kg下經充分耐受，且該雙互補位免疫結合物在13 mg/kg下相似地經充分耐受。另外，如表 23所示，FRα雙互補位免疫結合物在10 mg/kg劑量下比IMGN853更穩定。詳言之，該雙互補位免疫結合物展現比IMGN853長約60小時之末期半衰期及比IMGN853高約40%之總暴露。

【序列表】

<110> 美商免疫遺傳股份有限公司 (ImmunoGen, Inc.)

<120> 雙互補位 FR- α 抗體及免疫結合物

<140> TW 109114175

<141> 2020-04-28

<150> US 62/840, 297

<151> 2019-04-29

<150> US 62/879, 864

<151> 2019-07-29

<160> 64

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> FR57 VL-CDR1

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> FR57 VL-CDR2

<400> 2

Tyr Val Ser Gln Ser Val Ser
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> FR57 VL-CDR3

<400> 3

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His Tyr Thr
1 5 10

- <210> 4
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 VL-CDR1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

- <210> 5
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 VL-CDR2

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

- <210> 6
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 VL-CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

- <210> 7
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57 VH-CDR1

<400> 7

Ser Phe Gly Met His
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57 VH-CDR2

<400> 8

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57 VH-CDR3

<400> 9

Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 VH-CDR1

<400> 10

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 11
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> huMov19 VH-CDR2

<400> 11

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> huMov19 VH-CDR3

<400> 12

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> FR57 VH-CDR1

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> FR57 VH-CDR2

<400> 14

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser
1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 VH-CDR1

<400> 15

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 VH-CDR2

<400> 16

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe
1 5 10

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57 輕鏈可變序列

<400> 17

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

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

<210> 18
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57、F83E、Q101C 輕鏈可變序列

<400> 18

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Glu Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

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

<210> 19
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 輕鏈可變序列

<400> 19

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 20
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19G104C 輕鏈可變序列

<400> 20

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19A87E ; G104C 輕鏈可變序列

<400> 21

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57 重鏈可變序列

<400> 22

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57 E6Q ; G44C 重鏈可變序列

<400> 23

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 重鏈可變序列

<400> 24

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

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

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

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 S44C 重鏈可變序列

<400> 25

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
100 105

<210> 26

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 A16E ; S44C 重鏈可變序列

<400> 26

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57scFv1

<400> 27

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

Ser	Arg	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
			50				55				60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu
65							70				75				80
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85							90				95
Ala	Arg	Glu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105							110
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			115				120							125	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln
			130				135				140				
Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser
145							150				155				160
Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asn	Ile	Asn	Asn	Asn	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln
				165							170				175
Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Val	Ser	Gln	Ser
			180					185							190
Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
			195				200							205	
Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Met	Tyr
			210				215				220				
Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Ser	Trp	Pro	His	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly
225							230				235				240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
245

- <210> 28
- <211> 246
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57scFv2

<400> 28

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Glu Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
145 150 155 160

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val
165 170 175

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Leu
195 200 205

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser
245

- <210> 29
- <211> 246
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- <220>
- <223> FR57scFv3wt

<400> 29

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His

[illegible]

$\langle 210 \rangle$	30
$\langle 211 \rangle$	249
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工序列(Artificial Sequence)

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ Mov19scFv1

 $\langle 400 \rangle$ 30

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

Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr		
		20						25					30				
Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile		
		35					40					45					
Gly	Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe		
	50					55					60						
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	His		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Thr	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
		115					120					125					
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln		
	130					135					140						
Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser		
145					150					155					160		
Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His		
				165					170					175			
Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg		
			180					185					190				
Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly		
		195					200					205					
Ser	Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp		
	210						215				220						
Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe		

225	230	235	240
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	245		
<210>	31		
<211>	249		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	Mov19scFv2		
<400>	31		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala			
	20	25	30
Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro			
	35	40	45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp			
	50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg			
	85	90	95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly			
	100	105	110
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
	115	120	125
Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys			
	130	135	140
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
145	150	155	160

Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Cys Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
180 185 190

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
195 200 205

Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 32
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mov19scFv3

<400> 32

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys
130 135 140

Pro Gly Glu Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Cys Leu
165 170 175

Glu Trp Ile Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn
180 185 190

Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
195 200 205

Thr Ala His Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
245

- <210> 33
- <211> 711
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> mov19-IgG1-FR57scFv-HC
- <400> 33

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	His	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90						95	
Thr	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105						110		
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
		115					120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
		195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					

His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260						265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275						280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310						315				320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355						360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370						375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405					410					415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	
		435					440					445				

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
450 455 460

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
465 470 475 480

Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
485 490 495

Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
500 505 510

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
515 520 525

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Leu Leu
530 535 540

Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
545 550 555 560

Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
565 570 575

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
580 585 590

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
595 600 605

Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys
610 615 620

Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys
625 630 635 640

Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Val Ser Gln Ser Val
645 650 655

Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

660						665						670					
Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Met	Tyr	Phe		
675						680						685					
Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Ser	Trp	Pro	His	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr		
690						695						700					
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr											
705						710											
<210>	34																
<211>	218																
<212>	PRT																
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
<220>																	
<223>	huMov19LC																
<400>	34																
Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly		
1	5				10						15						
Gln	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala		
20					25						30						
Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro		
35				40						45							
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp		
50				55						60							
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser		
65				70						75						80	
Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg		
85					90						95						
Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg		
100					105						110						
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln		
115					120						125						

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 35
<211> 714
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57-IgG1-mov19scFv1-HC

<400> 35

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

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Glu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
		115					120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
		195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280					285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
		290				295					300					

Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355					360					365				
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405					410					415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	
		435					440					445				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	
	450					455					460					
Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	
465					470					475					480	
Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Phe	
				485					490					495		
Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	
			500					505					510			
Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln	

515																520																525															
Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	His	Met																																
530					535					540																																					
Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr																																
545					550					555					560																																
Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr																																
					565					570										575																											
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly																																
					580					585										590																											
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser																																
					595					600										605																											
Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Cys																																
610										615										620																											
Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp																																
625					630										635					640																											
Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala																																
					645										650										655																						
Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser																																
					660					665										670																											
Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala																																
					675					680										685																											
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly																																
690										695										700																											
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr																																						
705					710																																										
<210>																36																															
<211>																215																															
<212>																PRT																															
<213>																人工序列(Artificial Sequence)																															

<220>
<223> FR57LC

<400> 36

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Val	
				165					170					175		
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
			180					185					190			
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu	
		195					200					205				
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
	210					215					220					
Ala	Arg	Glu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
225					230					235					240	
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				245					250						255	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	
			260					265					270			
Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	
		275					280					285				
Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	
	290					295					300					
Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	
305					310					315					320	
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				325					330					335		
Ser	Asn	Thr	Ala	His	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe	
			340					345					350			
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	
		355					360					365				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	

370				375				380							
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
385					390					395					400
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
				405					410					415	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
			420						425				430		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
		435					440					445			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	450						455					460			
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
465						470					475				480
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
				485						490					495
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			500						505					510	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
		515						520					525		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
		530					535					540			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
545						550					555				560
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
				565						570					575
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
			580						585					590	

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
595 600 605

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
610 615 620

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
625 630 635 640

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
645 650 655

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
660 665 670

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
675 680 685

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
690 695 700

Leu Ser Pro Gly
705

<210> 38
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19LCv1-6

<400> 38

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp

50					55					60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75					80
Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg
				85					90					95	
Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105					110		
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
		115					120					125			
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	130					135					140				
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145					150					155					160
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
	210					215									
<210> 39															
<211> 708															
<212> PRT															
<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> FR57scFv3wt-mov19-IgG1-HC															
<400> 39															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
130 135 140

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
145 150 155 160

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
165 170 175

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val
180 185 190

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Leu
195 200 205

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

225					230				235				240				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
				245					250				255				
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val		
				260					265				270				
Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr		
				275					280				285				
Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln		
				290					295				300				
Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe		
305				310								315				320	
Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
				325				330								335	
Ser	Asn	Thr	Ala	His	Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe		
				340				345								350	
Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr		
				355				360								365	
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly		
				370				375								380	
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly		
385				390								395				400	
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val		
				405								410				415	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe		
				420								425				430	
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val		
				435				440								445	

Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	
450						455					460					
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	
465					470					475					480	
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
				485					490					495		
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
			500					505					510			
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
		515					520					525				
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
	530					535					540					
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
545					550					555					560	
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
				565					570					575		
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
			580					585					590			
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
		595					600					605				
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
	610					615					620					
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
625					630					635					640	
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
				645					650					655		
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
			660					665					670			

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
675 680 685

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
690 695 700

Leu Ser Pro Gly
705

<210> 40
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19LCv1-6

<400> 40

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 41
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57scFv2-Fc-杵(C220S、T366W)

<400> 41

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Glu Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His

85										90					95				
Tyr	Thr	Phe	Gly	Cys	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly				
			100				105				110								
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
			115				120				125								
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
			130				135				140								
Ser	Arg	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe				
			145				150				155				160				
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Cys	Leu	Glu	Trp	Val				
			165				170				175								
Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
			180				185				190								
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Leu	Leu				
			195				200				205								
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys				
			210				215				220								
Ala	Arg	Glu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
			225				230				235				240				
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr				
			245				250				255								
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser				
			260				265				270								
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
			275				280				285								
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro				
			290				295				300								

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
305 310 315 320

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
325 330 335

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
340 345 350

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
355 360 365

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
370 375 380

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
385 390 395 400

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
405 410 415

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
420 425 430

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
435 440 445

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
450 455 460

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
465 470 475

<210> 42
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mov19-Fc-臼(T366S、L368A、Y407V)

<400> 42

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

1				5						10					15				
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr				
			20					25					30						
Phe	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile				
		35					40					45							
Gly	Arg	Ile	His	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Phe	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe				
	50					55					60								
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	His				
65					70					75					80				
Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Thr	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
			100					105					110						
Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro				
		115					120					125							
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly				
	130					135					140								
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn				
145					150					155					160				
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln				
				165					170					175					
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser				
			180					185					190						
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser				
		195					200					205							
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr				
	210					215					220								

His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260						265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280						285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	
		355					360					365				
Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
		370				375					380					
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405					410					415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
			420					425					430			
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
		435					440					445				

<210> 43
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mov19-LC

<400> 43

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 44
<211> 479
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> FR57scFv3wt-Fc-杵(C220S、T366W)

<400> 44

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

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Asn
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

130					135					140					
Ser 145	Arg	Arg	Leu	Ser	Cys 150	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe 155	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe 160
Gly	Met	His	Trp	Val 165	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly 170	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp 175	Val
Ala	Tyr	Ile	Ser 180	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr 185	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp 190	Ser	Val
Lys	Gly	Arg 195	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg 200	Asp	Asn	Ser	Lys	Lys 205	Thr	Leu	Leu
Leu 210	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg 215	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala 220	Met	Tyr	Tyr	Cys
Ala 225	Arg	Glu	Ala	Tyr	Gly 230	Ser	Ser	Met	Glu	Tyr 235	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 240
Leu	Val	Thr	Val	Ser 245	Ser	Gly	Ser	Glu	Pro 250	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys 255	Thr
His	Thr	Cys	Pro 260	Pro	Cys	Pro	Ala 265	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly 270	Gly	Pro	Ser
Val	Phe 275	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro 280	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 285	Ile	Ser	Arg
Thr 290	Pro	Glu	Val	Thr	Cys 295	Val	Val	Val	Asp	Val 300	Ser	His	Glu	Asp	Pro
Glu 305	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 310	Tyr	Val	Asp	Gly	Val 315	Glu	Val	His	Asn	Ala 320
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 325	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn 330	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 335	Val
Ser	Val	Leu	Thr 340	Val	Leu	His	Gln 345	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 350	Lys	Glu	Tyr

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
355 360 365

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
370 375 380

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
385 390 395 400

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
405 410 415

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
420 425 430

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
435 440 445

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
450 455 460

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
465 470 475

<210> 45
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> Mov19-Fc-蛋白(T366S、L368A、Y407V)

<400> 45

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

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

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

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe

50					55					60					
Gln 65	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu 70	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 75	Ser	Asn	Thr	Ala	His 80
Met	Glu	Leu	Leu	Ser 85	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Thr	Arg	Tyr	Asp 100	Gly	Ser	Arg	Ala	Met 105	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln 110	Gly	Thr
Thr	Val	Thr 115	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr 120	Lys	Gly	Pro	Ser 125	Val	Phe	Pro
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr 140	Ala	Ala	Leu	Gly
Cys 145	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr 150	Phe	Pro	Glu	Pro	Val 155	Thr	Val	Ser	Trp	Asn 160
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr 165	Ser	Gly	Val	His	Thr 170	Phe	Pro	Ala	Val	Leu 175	Gln
Ser	Ser	Gly 180	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 185	Val	Val	Thr	Val 190	Pro	Ser	Ser
Ser	Leu	Gly 195	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile 200	Cys	Asn	Val	Asn 205	His	Lys	Pro	Ser
Asn	Thr 210	Lys	Val	Asp	Lys	Lys 215	Val	Glu	Pro	Lys 220	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
His 225	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys 230	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu 235	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser 240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro 245	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 250	Thr	Leu	Met	Ile	Ser 255	Arg
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp 265	Val	Ser	His	Glu 270	Asp	Pro

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

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

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

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

- <210> 46
- <211> 218
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> Mov19-LC
- <400> 46

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1				5						10					15				
Gln	Pro	Ala	Ile	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Phe	Ala				
			20					25					30						
Gly	Thr	Ser	Leu	Met	His	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro				
			35				40					45							
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Asp				
	50					55					60								
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser				
65					70				75					80					
Pro	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg				
				85				90						95					
Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105					110						
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln				
		115					120					125							
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr				
	130					135					140								
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser				
145					150					155				160					
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr				
			165					170					175						
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys				
			180					185					190						
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro				
		195				200						205							
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210					215													

<210> 47
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 全長重鏈

<400> 47

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

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

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

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180										185										190									
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser														
195										200										205									
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr														
210										215										220									
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser														
225										230										235									
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg														
245										250										255									
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro														
260										265										270									
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala														
275										280										285									
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val														
290										295										300									
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr														
305										310										315									
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr														
325										330										335									
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu														
340										345										350									
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys														
355										360										365									
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser														
370										375										380									
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp														
385										390										395									
																				400									

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 48
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 全長輕鏈

<400> 48

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
	165	170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
	180	185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
	195	200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 甘胺酸/絲胺酸連接體

<400> 49

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 甘胺酸/絲胺酸連接體

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 甘胺酸/絲胺酸連接體

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 甘胺酸/絲胺酸連接體

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 53
<211> 257
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 53

Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
20 25 30

Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
35 40 45

Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
50 55 60

Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
85 90 95

Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
100 105 110

Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
115 120 125

Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
130 135 140

Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
145 150 155 160

Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
165 170 175

Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
180 185 190

Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
195 200 205

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
210 215 220

Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
225 230 235 240

Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
245 250 255

Ser

- <210> 54
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 肽

<400> 54

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> β -Ala

<400> 55

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 肽

<400> 56

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 57
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huMov19 S44C 重鏈可變序列

<400> 57

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Cys Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58

<400> 58
000

- <210> 59
- <211> 216
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 野生型 IgG Fc 區

<400> 59

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

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

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

- <210> 60
- <211> 215
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> IgG2 Fc 區
- <400> 60

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1				5						10					15				
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val				
			20					25					30						
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val				
		35					40					45							
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln				
	50					55					60								
Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln				
65					70					75				80					
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly				
				85					90					95					
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro				
			100					105					110						
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr				
		115					120					125							
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser				
	130					135					140								
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr				
145					150					155					160				
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr				
				165					170					175					
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe				
			180					185					190						
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys				
	195						200					205							
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly													
	210					215													

<210> 61
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgG4 Fc 區

<400> 61

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

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

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

			180					185							190		
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln		
		195					200					205					
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly										
		210					215										
<210>	62																
<211>	216																
<212>	PRT																
<213>	人工序列(Artificial Sequence)																
<220>																	
<223>	IgG1 CH2 及 CH3 (L234A/L235A)																
<400>	62																
Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys		
1			5						10						15		
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val		
			20					25					30				
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr		
		35					40					45					
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu		
	50					55					60						
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His		
65					70					75					80		
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys		
			85						90					95			
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln		
		100						105					110				
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu		
		115					120					125					
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro		
	130					135					140						

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 63
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgG1 CH2 及 CH3 (N297A)

<400> 63

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

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

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 64
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> IgG1 CH2 及 CH3 (N297Q)

<400> 64

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
50						55					60					
Gln	Tyr	Gln	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
65					70					75					80	
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				85					90					95		
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
		100						105					110			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
		115					120					125				
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
	130						135				140					
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
145					150					155					160	
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
				165					170						175	
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
			180					185					190			
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
		195					200					205				
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly									
	210					215										

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種特異性地結合人類葉酸鹽受體 1 (FR α)之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含：

(a) 第一 FR α 結合域，其包含第一可變重鏈(VH)及第一可變輕鏈(VL)且結合於 FR α 之第一抗原決定基；及

(b) 第二 FR α 結合域，其包含第二 VH及第二 VL且結合於 FR α 之第二抗原決定基，

其中

該第一 VH包含分別為(a) SEQ ID NO: 10-12或(b) SEQ ID NO: 15、16及12之 VH CDR1-3；

該第一 VL包含分別為 SEQ ID NO: 4-6之 VL CDR1-3；

該第二 VH包含分別為(a) SEQ ID NO: 7-9或(b) SEQ ID NO: 13、14及9之 VH CDR1-3；且

該第二 VL包含分別為 SEQ ID NO: 1-3之 VL CDR1-3。

【請求項 2】如請求項 1 之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中(i)該第一 VH包含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列且該第一 VL包含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列，或(ii)該第二 VH包含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列且該第二 VL包含 SEQ ID NO: 18 之胺基酸序列。

【請求項 3】如請求項 1 之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中(i)該第一 VH包含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列且該第一 VL包含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列，且(ii)該第二 VH包含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列且該第二 VL包含

SEQ ID NO: 18之胺基酸序列。

【請求項4】如請求項3之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中(a)該第一FR α 結合域為單鏈可變片段(scFv)，且該第二FR α 結合域包含VH及VL，該VH及VL位於獨立多肽上，或(b)該第二FR α 結合域為scFv，且該第一FR α 結合域包含VH及VL，該VH及VL位於獨立多肽上。

【請求項5】如請求項4之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該scFv具有VH-連接體-VL或VL-連接體-VH之肽取向。

【請求項6】如請求項5之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該連接體為甘胺酸-絲胺酸連接體。

【請求項7】如請求項4之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該雙互補位抗體或其抗原結合片段包含IgG1重鏈恆定區及輕鏈恆定區。

【請求項8】如請求項7之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其具有杵臼(KIH)結構。

【請求項9】如請求項8之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該第一FR α 結合域係在該KIH結構之臼側上且該第二FR α 結合域係在該KIH結構之杵側上。

【請求項10】如請求項1之雙互補位抗體或其抗原結合片段，其中該雙互補位抗體包含SEQ ID NO: 41-43之胺基酸序列。

【請求項11】一種編碼如請求項1至10中任一項之雙互補位抗體或其抗原結合片段之經分離核酸分子的組合。

【請求項 12】一種經分離載體，其包含如請求項 11 之經分離核酸分子的組合中一者。

【請求項 13】一種宿主細胞，其包含如請求項 11 之經分離核酸分子的組合。

【請求項 14】如請求項 13 之宿主細胞，其係選自由大腸桿菌 (*E. coli*)、假單胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢桿菌 (*Bacillus*)、鏈黴菌 (*Streptomyces*)、酵母、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS 1、COS 7、BSC1、BSC40、BMT10 細胞、植物細胞、昆蟲細胞、及組織培養物中之人類細胞組成之群。

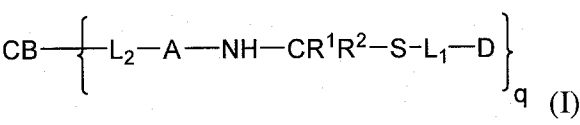
【請求項 15】一種醫藥組合物，其包含如請求項 1 至 10 中任一項之雙互補位抗體或其抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項 16】一種醫藥組合物，其包含如請求項 12 之經分離載體及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項 17】一種製備如請求項 1 至 10 中任一項之雙互補位抗體或其抗原結合片段之方法，其包含 (a) 培養表現該雙互補位抗體或其抗原結合片段之細胞；及 (b) 自該經培養之細胞分離該雙互補位抗體或其抗原結合片段。

【請求項 18】如請求項 17 之方法，其中該細胞為真核細胞。

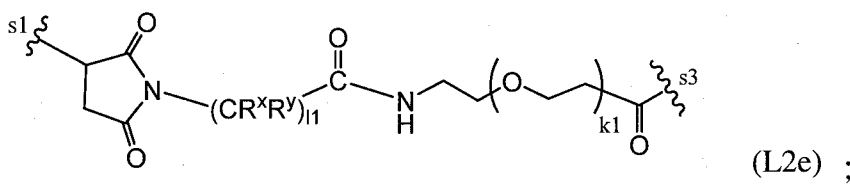
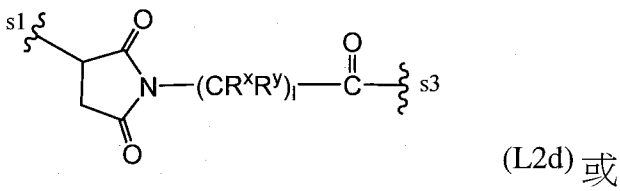
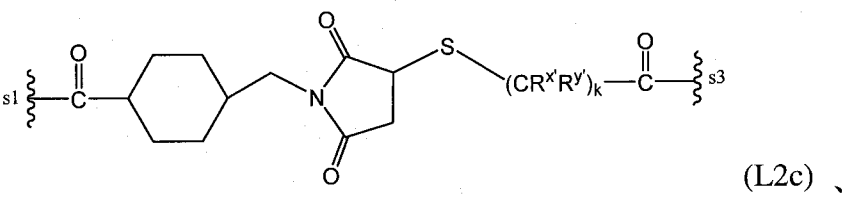
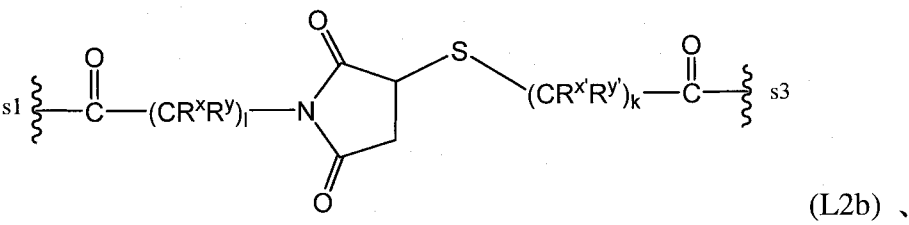
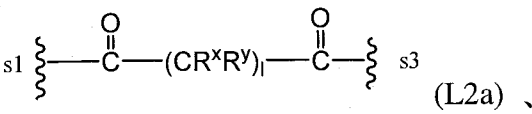
【請求項 19】一種免疫結合物，其由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CB係如請求項1至10中任一項之雙互補位抗體或其抗原結合片段；

L₂係由下式之一表示：



其中：

R^x、R^y、R^{x'}及R^{y'}在每次出現時獨立地為H、-OH、鹵素、-O-(C₁₋₄烷基)、-SO₃H、-NR₄₀R₄₁R₄₂⁺或視情況經-OH、鹵素、SO₃H或NR₄₀R₄₁R₄₂⁺取代之C₁₋₄烷基，其中R₄₀、R₄₁及R₄₂各自獨立地為H或C₁₋₄烷基；

1及k各自獨立地為整數1至10；

11為整數2至5；

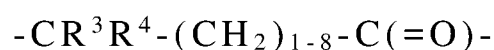
k1為整數1至5；且

s1指示連接至該細胞結合劑CB之位點且s3指示連接至A基團之位點；

A為胺基酸殘基或包含2至20個胺基酸殘基之肽；

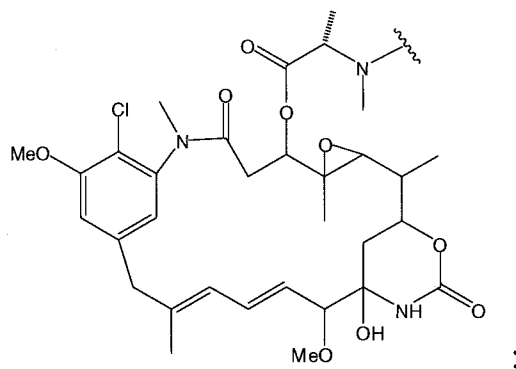
R¹及R²各自獨立地為H或C₁₋₃烷基；

L₁係由下式表示：



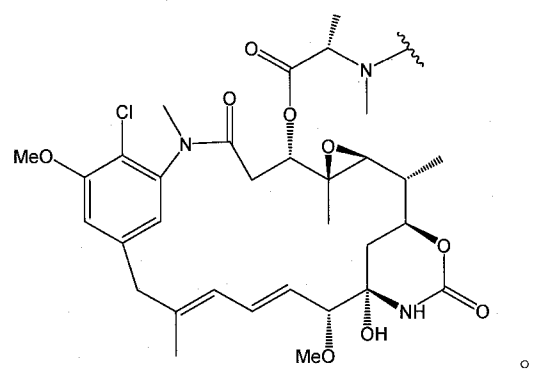
其中R³及R⁴各自獨立地為H或Me，且L₁中之-C(=O)-部分連接至D；

D係由下式表示：

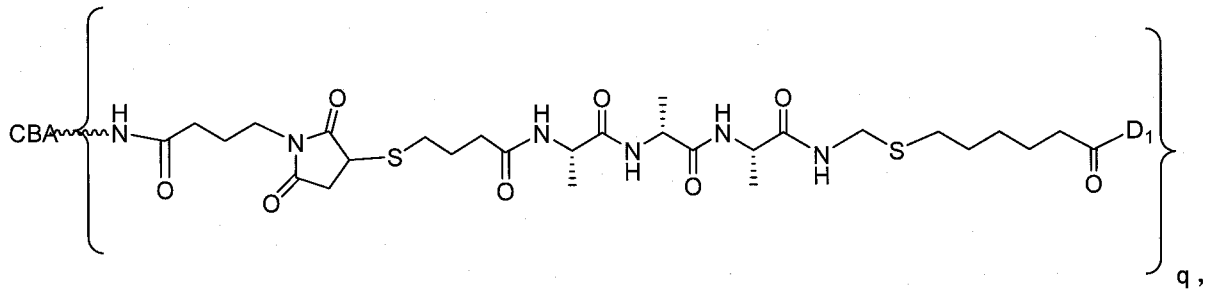


q為整數1至20。

【請求項20】如請求項19之免疫結合物，其中D係由下式表示：



【請求項 21】如請求項 19 之免疫結合物，其中該免疫結合物係由下式表示：

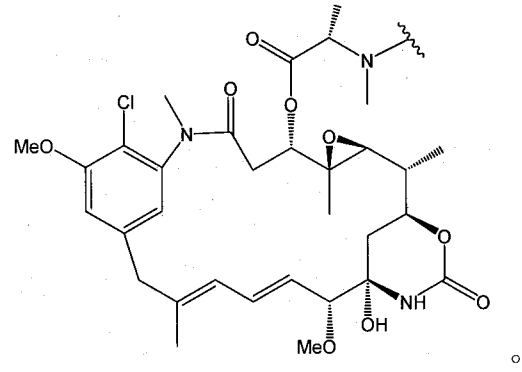


其中：

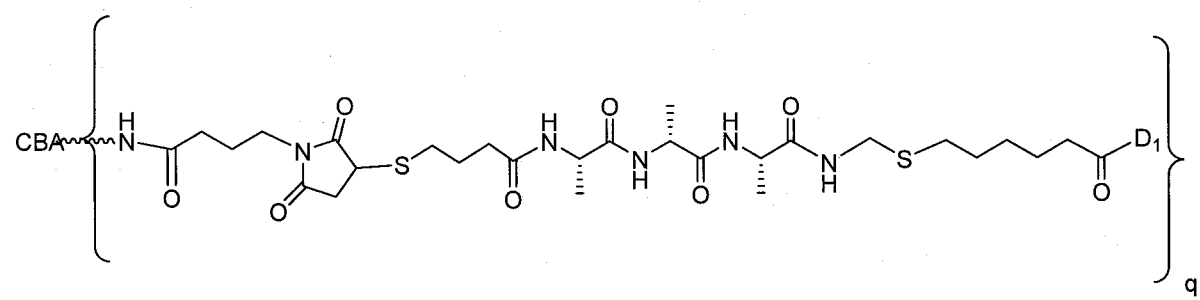
CBA 係該雙互補位抗體或其抗原結合片段；

q 為整數 1 至 10；

D₁ 係由下式表示：



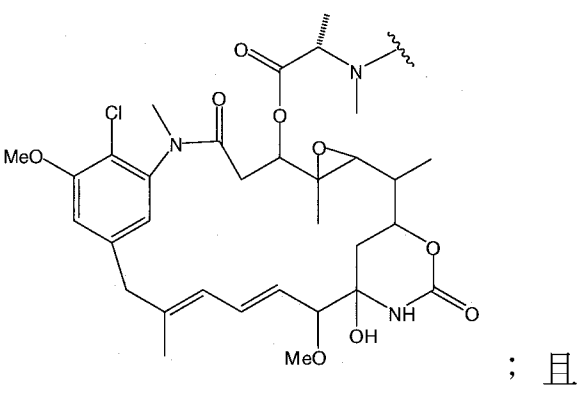
【請求項 22】如請求項 19 之免疫結合物，其中該免疫結合物係由下式表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

CBA係包含 SEQ ID NO: 41-43之胺基酸序列之雙互補位抗體；

D₁係由下式表示：



q為整數1至10。

【請求項23】一種具有式(A) - (L) - (C)之免疫結合物，其中：

(A) 係如請求項1至10中任一項之雙互補位抗體或其抗原結合片段；

(L) 為連接體；且

(C) 為細胞毒性劑，

其中該連接體(L)連接(A)至(C)。

【請求項24】如請求項23之免疫結合物，其中該連接體係選自由可裂解連接體、不可裂解連接體、親水性連接體及基於二羧酸之連接體組成之群。

【請求項25】如請求項24之免疫結合物，其中該連接體係選自由以下組成之群：N-(γ 順丁烯二醯亞胺基丁醯基氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-GMBS或sGMBS)； γ 順丁烯二醯亞胺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(GMBS)；N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)；N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)；N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基戊酸酯(磺基-SPP)；N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)；N-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(SMCC)；N-磺基丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(磺基SMCC)；N-丁二醯亞胺基-4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸酯(SIAB)；及N-丁二醯亞胺基-[(N-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)-四乙二醇]酯(NHS-PEG4-順丁烯二醯亞胺)。

【請求項26】如請求項23之免疫結合物，其中該細胞毒性劑為類美登素。

【請求項27】如請求項26之免疫結合物，其中該類美登素為DM21。

【請求項28】一種組合物，其包含如請求項23之免疫結合物，其中該免疫結合物包含每個A平均3-4個C。

【請求項29】一種醫藥組合物，其包含如請求項19至27中任一項之免疫結合物及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項30】如請求項29之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含每個該雙互補位抗體或其抗原結合片段平均3至4個細胞毒性劑。

【請求項 31】一種如請求項 1 至 10 中任一項之雙互補位抗體或其抗原結合片段於製備藥物之用途，該藥物係用於治療癌症。

【請求項 32】如請求項 31 之用途，其中該癌症為卵巢癌、子宮癌、腹膜癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、肺癌或腦癌。

【請求項 33】如請求項 31 之用途，其中該癌症為卵巢癌。

【請求項 34】如請求項 33 之用途，其中該卵巢癌為鉑抗性上皮卵巢癌。

【請求項 35】如請求項 33 之用途，其中該卵巢癌為復發性上皮卵巢癌。

【請求項 36】如請求項 33 之用途，其中該卵巢癌為鉑難治性上皮卵巢癌。

【請求項 37】如請求項 31 之用途，其中該癌症為子宮癌。

【請求項 38】如請求項 31 之用途，其中該癌症為腹膜癌。

【請求項 39】如請求項 31 之用途，其中該癌症為輸卵管癌。

【請求項 40】如請求項 31 之用途，其中該癌症為子宮內膜癌。

【請求項 41】如請求項 31 之用途，其中該癌症為肺癌。

【請求項 42】如請求項 31 之用途，其中該癌症為腦癌。

【請求項 43】如請求項 31 之用途，其中該癌症為 IMGN853 抗性的。

【請求項 44】如請求項 31 之用途，其中該藥物係與類固醇投與。

【請求項 45】一種如請求項 29 之醫藥組合物於製備藥物之用途，該藥物係用於治療癌症。

【請求項 46】如請求項 45 之用途，其中該癌症為卵巢癌、子宮癌、腹膜癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、肺癌或腦癌。

【請求項 47】如請求項 45 之用途，其中該癌症為卵巢癌。

【請求項 48】如請求項 47 之用途，其中該卵巢癌為鉑抗性上皮卵巢癌。

【請求項 49】如請求項 47 之用途，其中該卵巢癌為復發性上皮卵巢癌。

【請求項 50】如請求項 47 之用途，其中該卵巢癌為鉑難治性上皮卵巢癌。

【請求項 51】如請求項 45 之用途，其中該癌症為子宮癌。

【請求項 52】如請求項 45 之用途，其中該癌症為腹膜癌。

【請求項 53】如請求項 45 之用途，其中該癌症為輸卵

管癌。

【請求項 54】如請求項 45 之用途，其中該癌症為子宮內膜癌。

【請求項 55】如請求項 45 之用途，其中該癌症為肺癌。

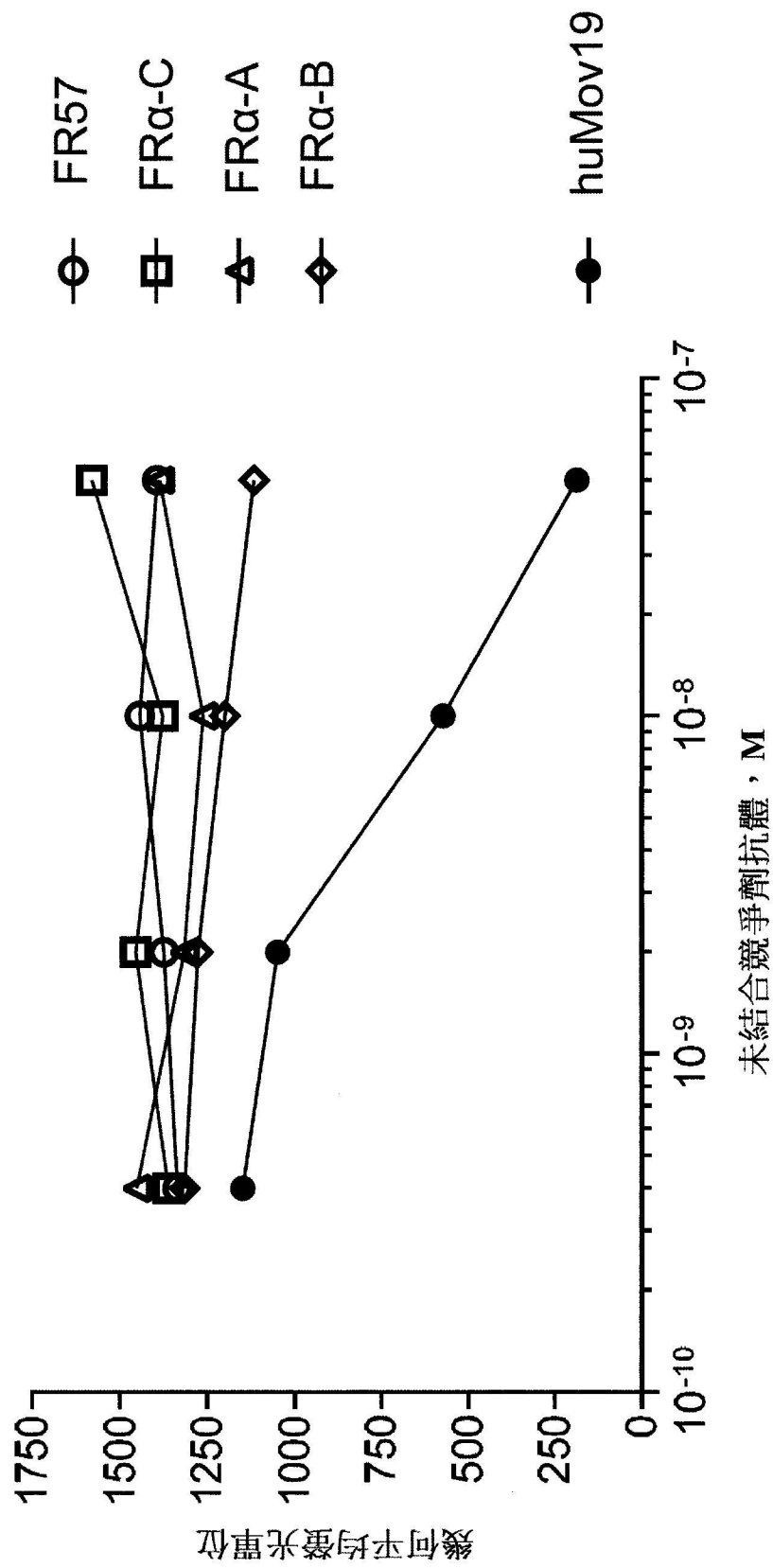
【請求項 56】如請求項 45 之用途，其中該癌症為腦癌。

【請求項 57】如請求項 45 之用途，其中該癌症為 IMGN853 抗性的。

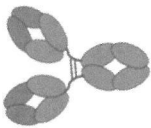
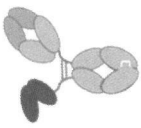
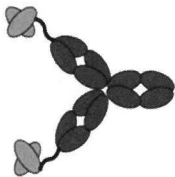
【請求項 58】如請求項 45 之用途，其中該藥物係與類固醇投與。

【請求項 59】如請求項 45 之用途，其中該醫藥組合物包含每個該雙互補位抗體或其抗原結合片段平均 3 至 4 個細胞毒性劑。

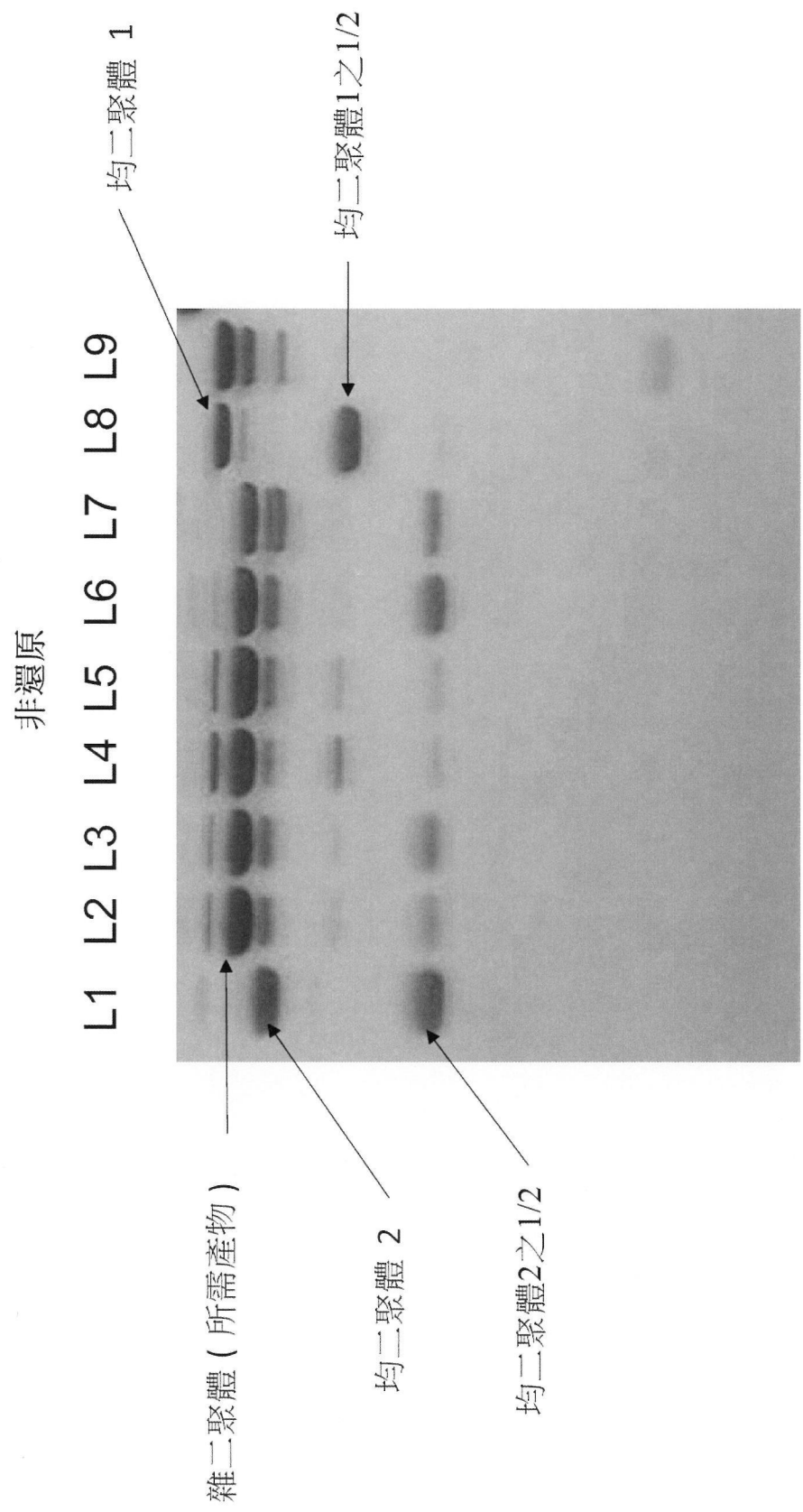
【發明圖式】



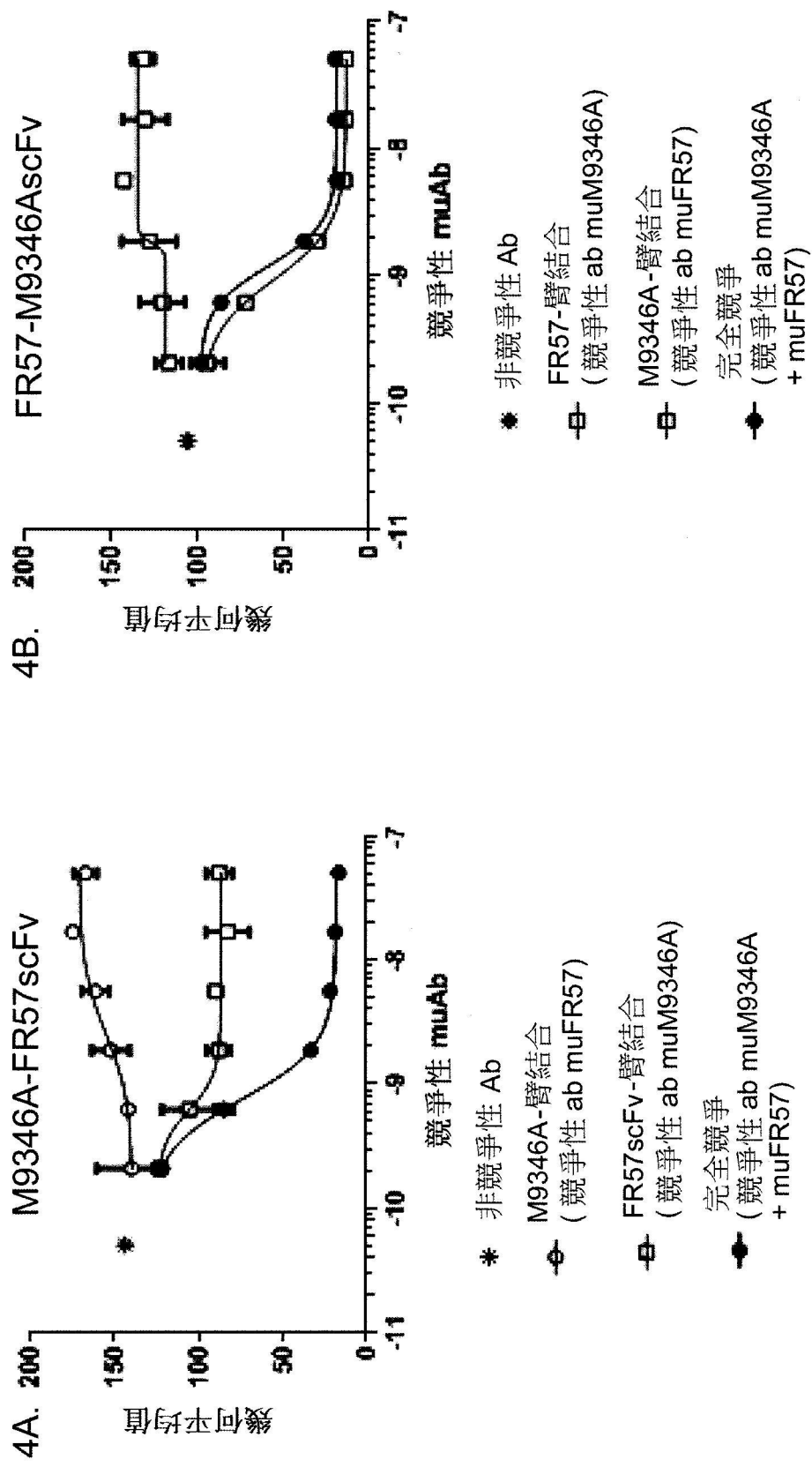
【圖 1】

形式	例示性分子	特徵	圖解
習知抗體	• M9346A (「huMov19」, 「M」) • FR57 • FRα-A • FRα-B • FRα-C	二價單特異性	
杵白 (KIH)	• FR57scFv2- 杵 -Mov19- 白 (「KIH」) • FR57scFv3wt- 杵 -Mov19- 白	二價雙互補位	
Morrison	• Mov19-IgG1-FR13scFv1 • Mov19-IgG1-FR57scFv1 • FRα-A-IgG1-Mov19scFv1 • FR57-IgG1-Mov19scFv1 • FRα-AscFv2-Mov19-IgG1 • FRα-BscFv2-Mov19-IgG1 • FRα-CscFv2-Mov19-IgG1 • FR57scFv2-Mov19-IgG1 (「四價」)	四價雙互補位	

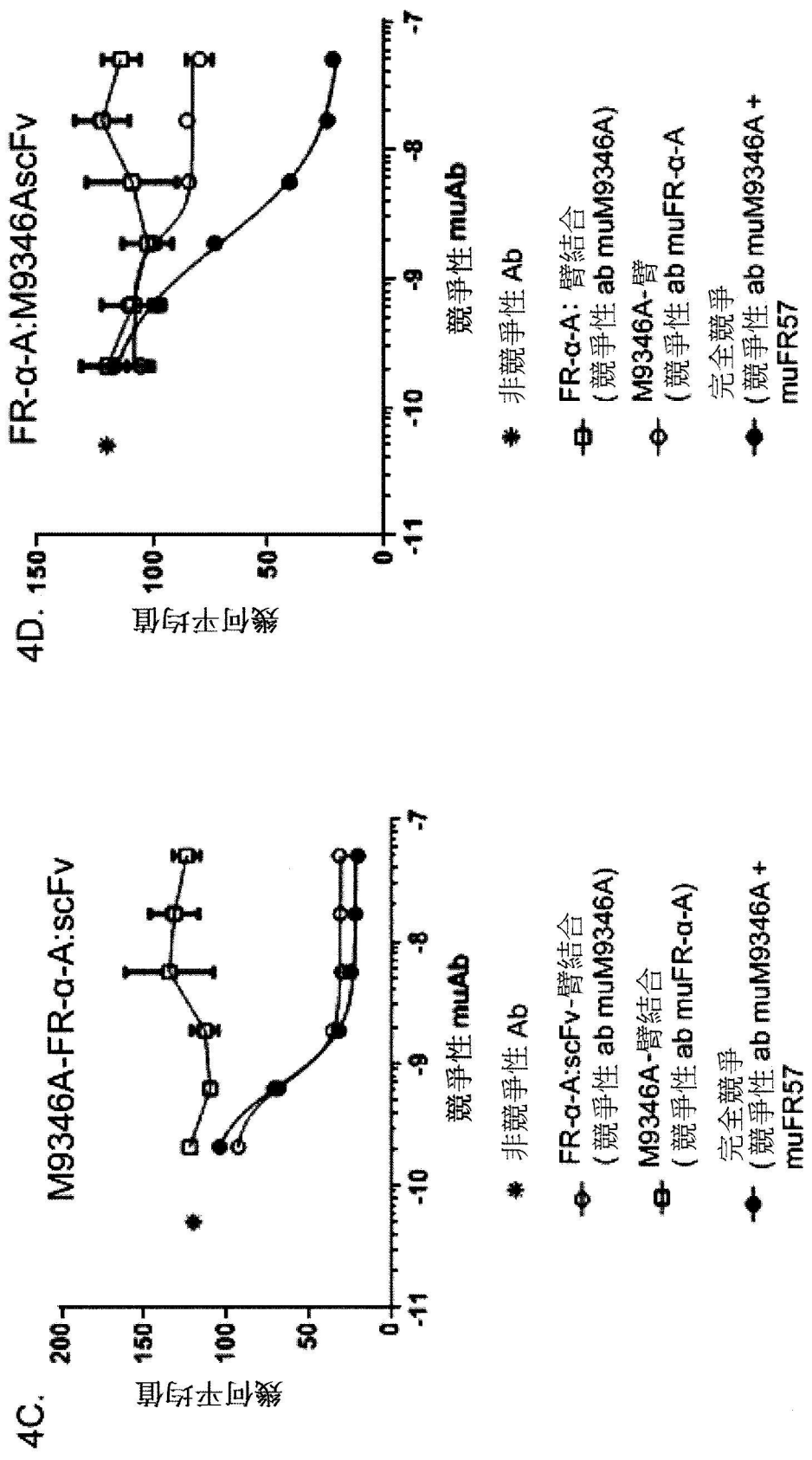
【圖 2】



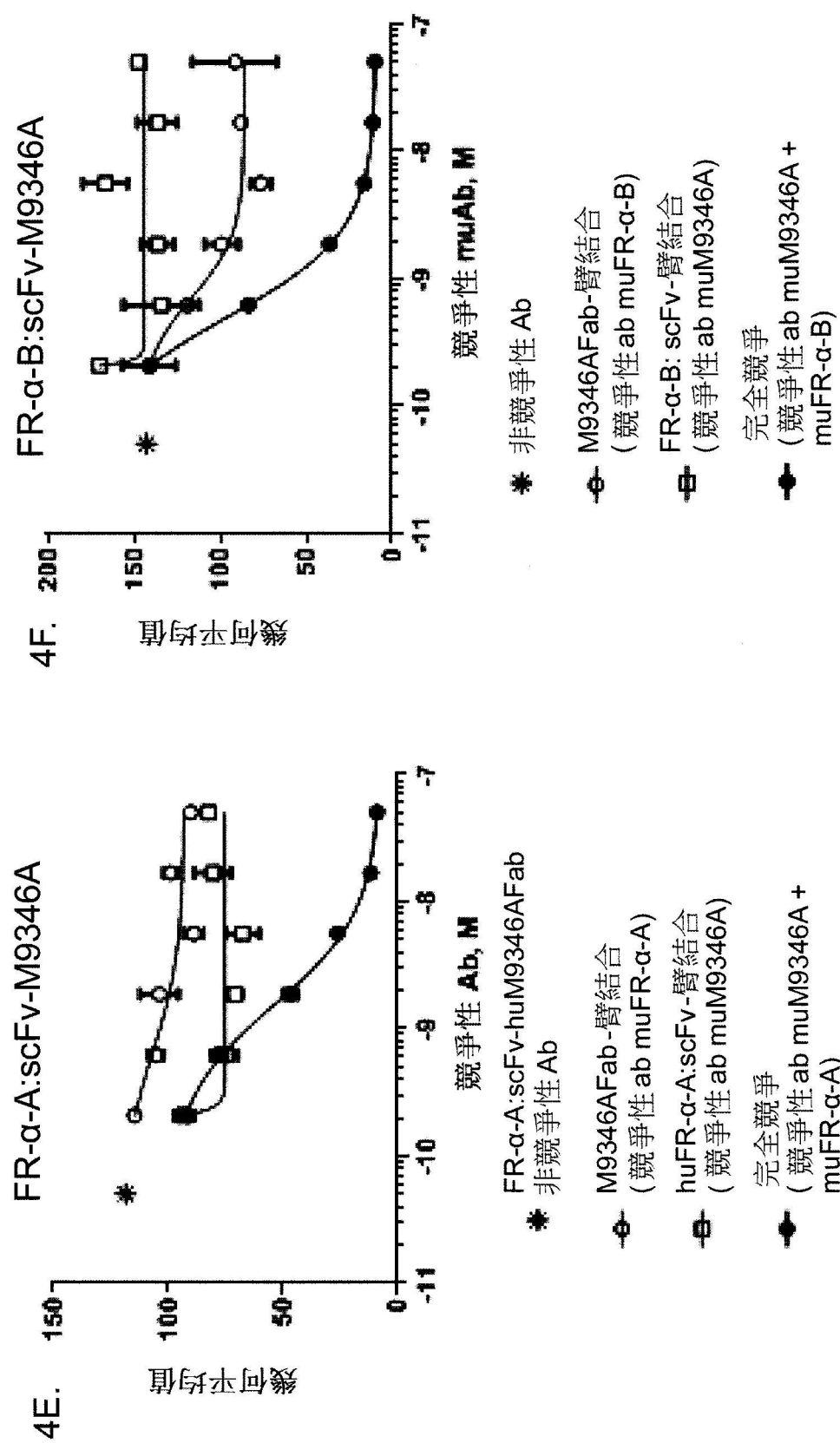
【圖 3】



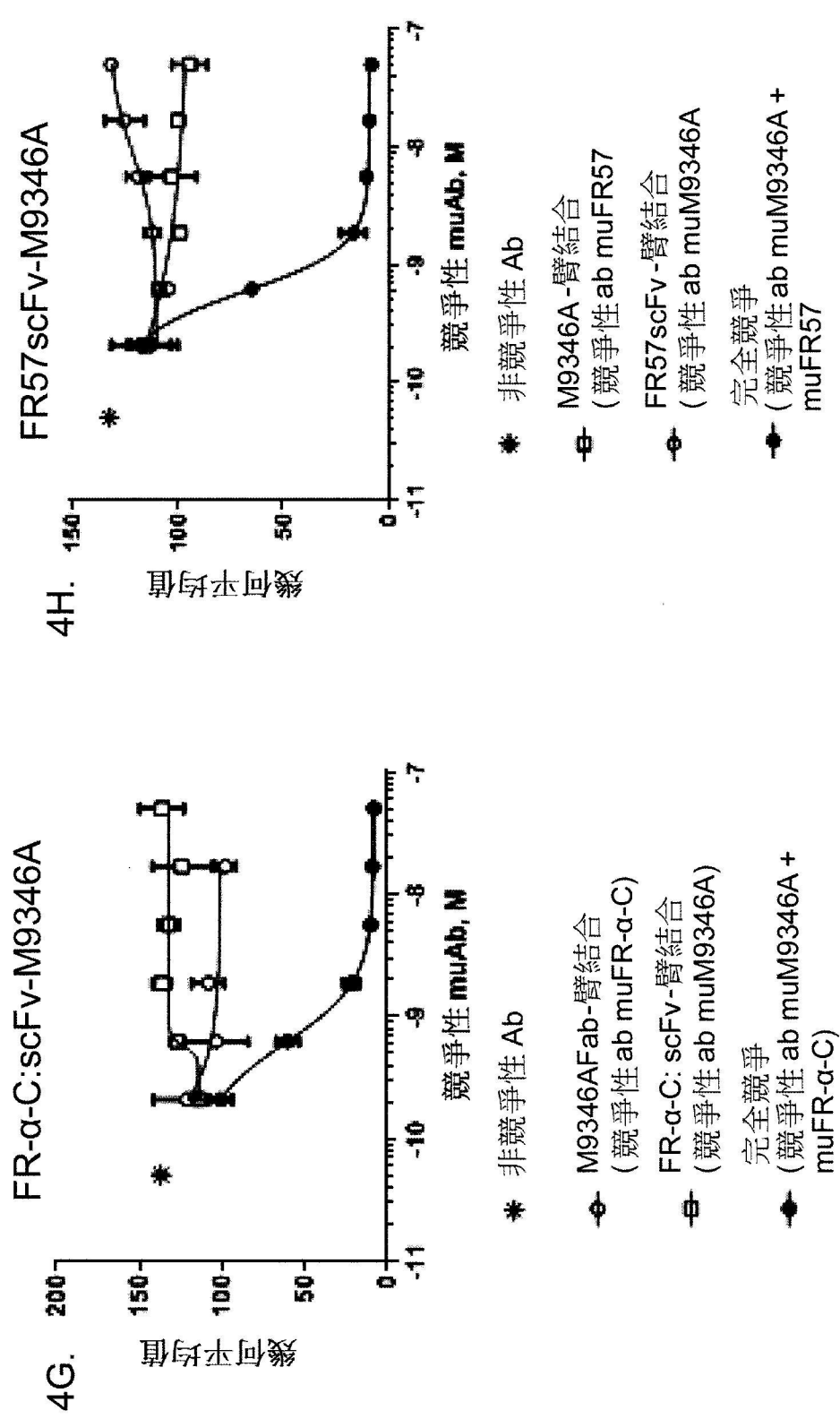
【圖 4A-4B】



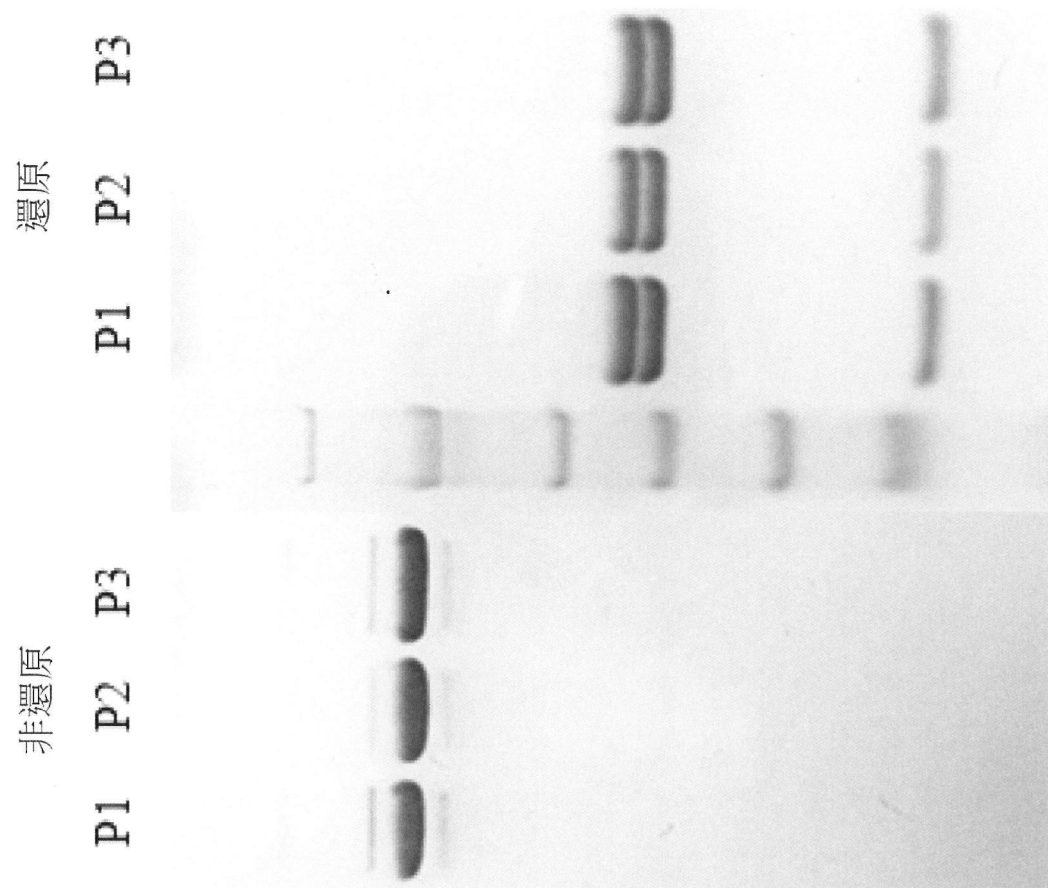
【圖 4C-4D】



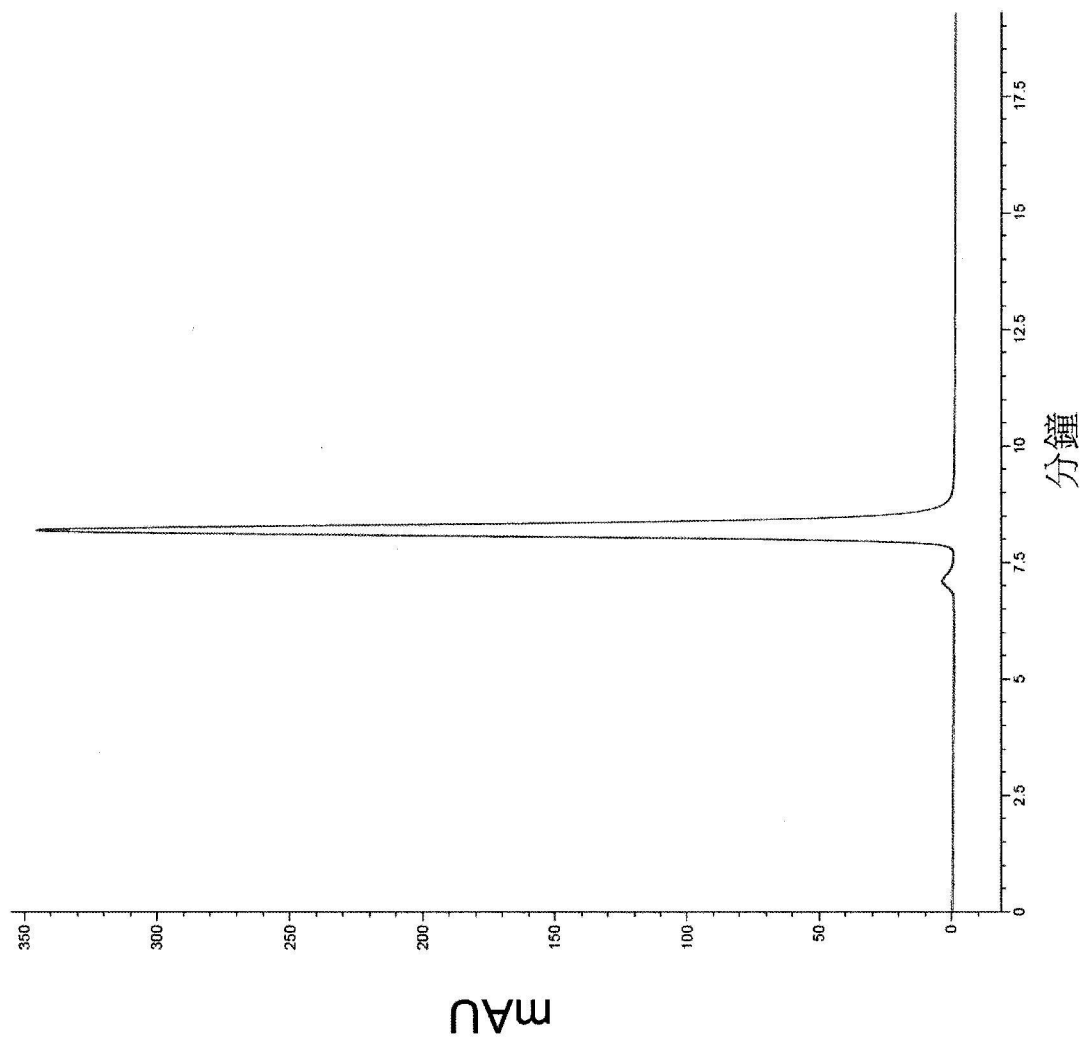
【圖 4E-4F】



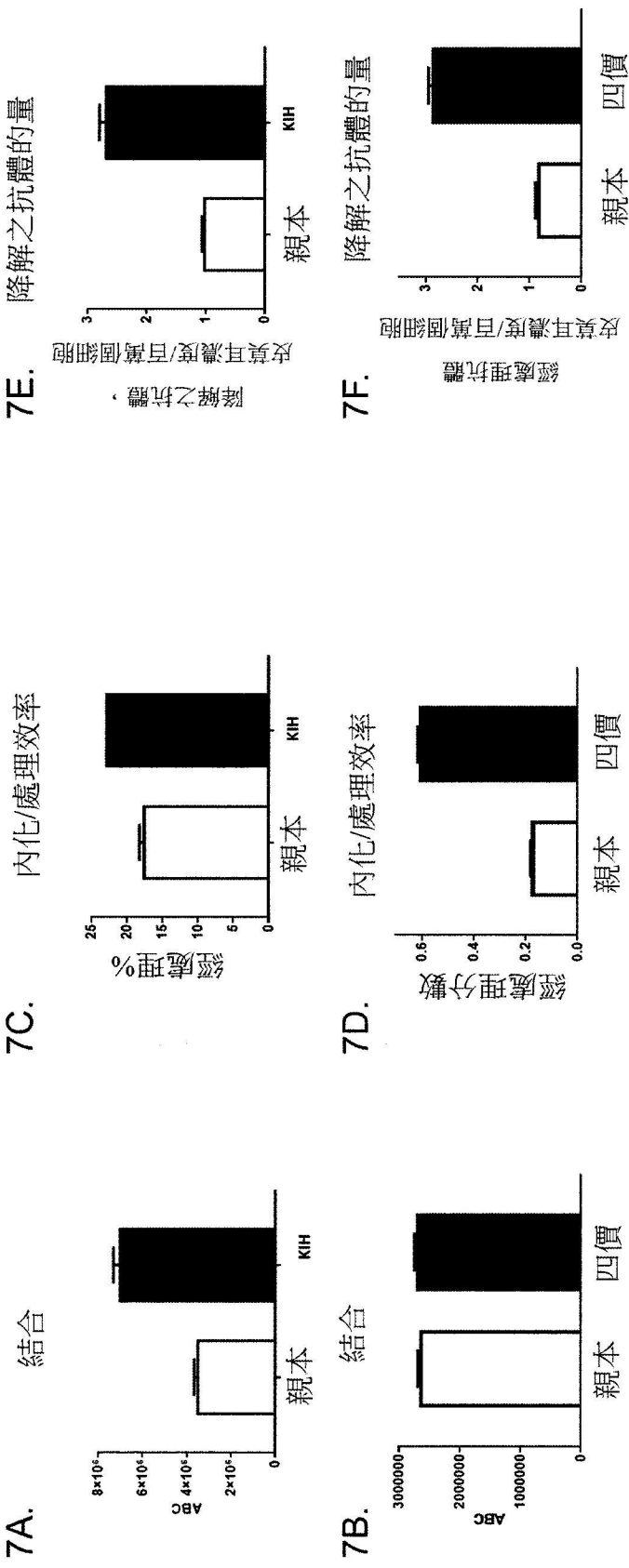
【圖 4G-4H】



【圖 5】

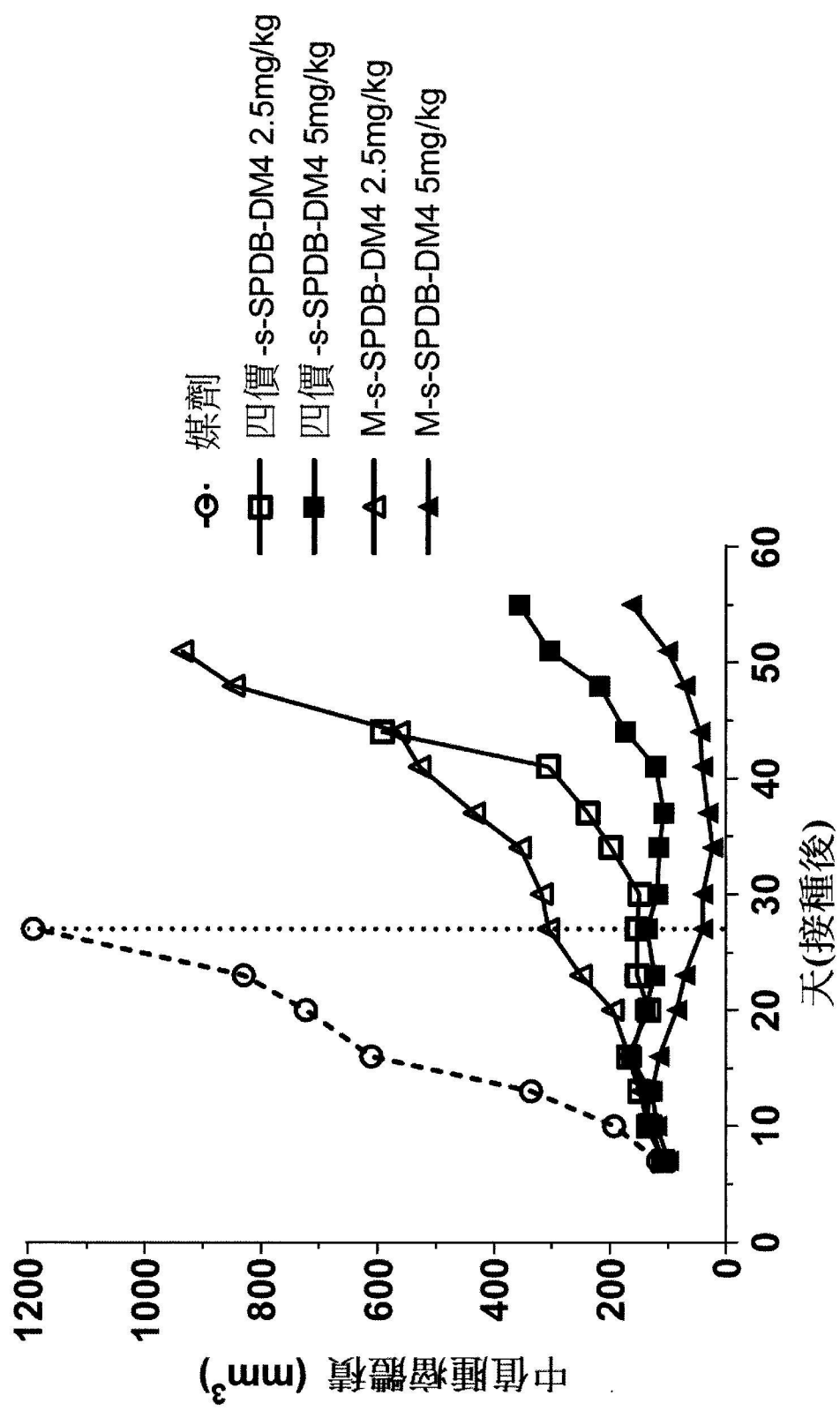


【圖 6】



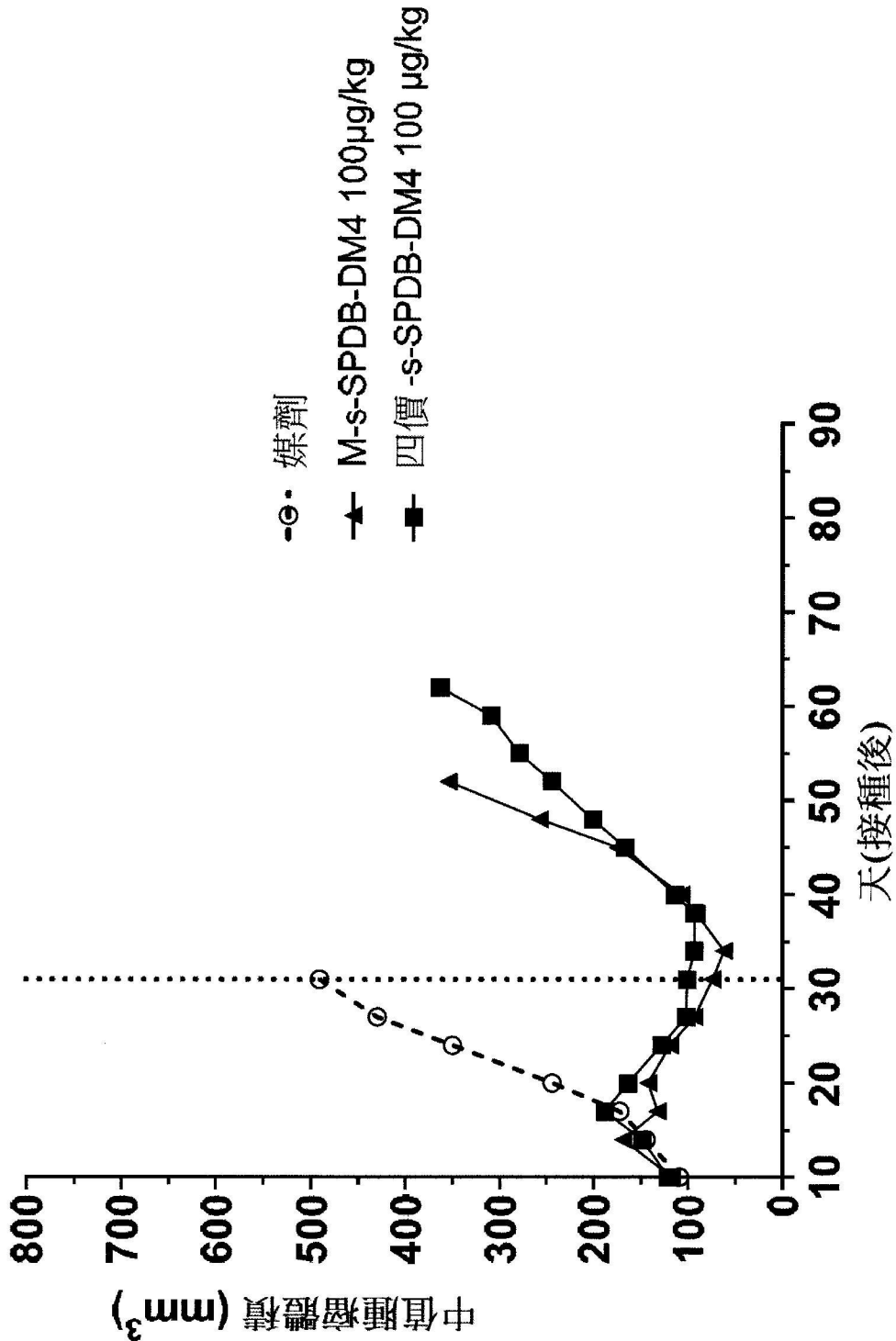
【圖 7A-7F】

OV-90, 中值 TV

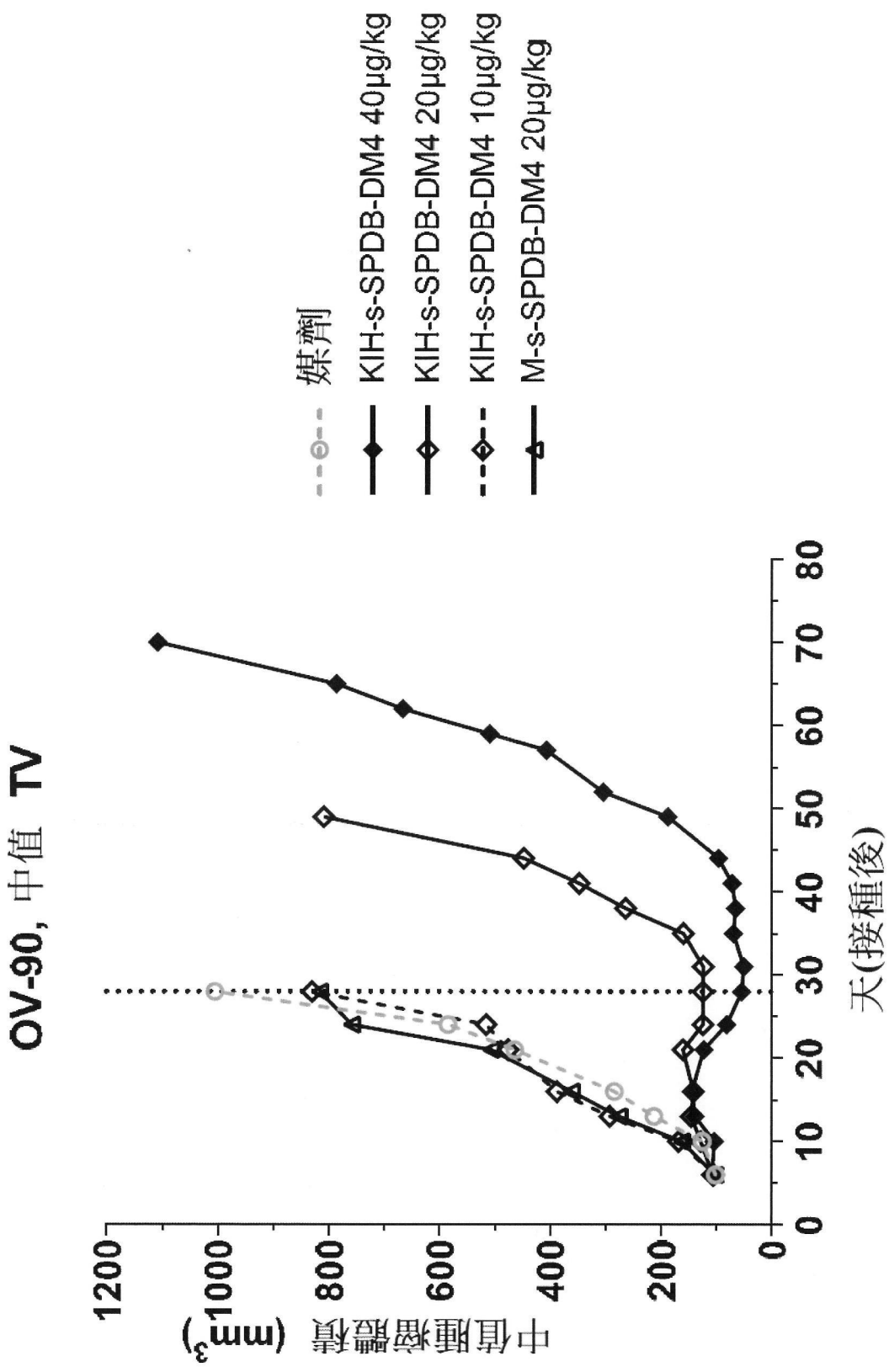


【圖 8】

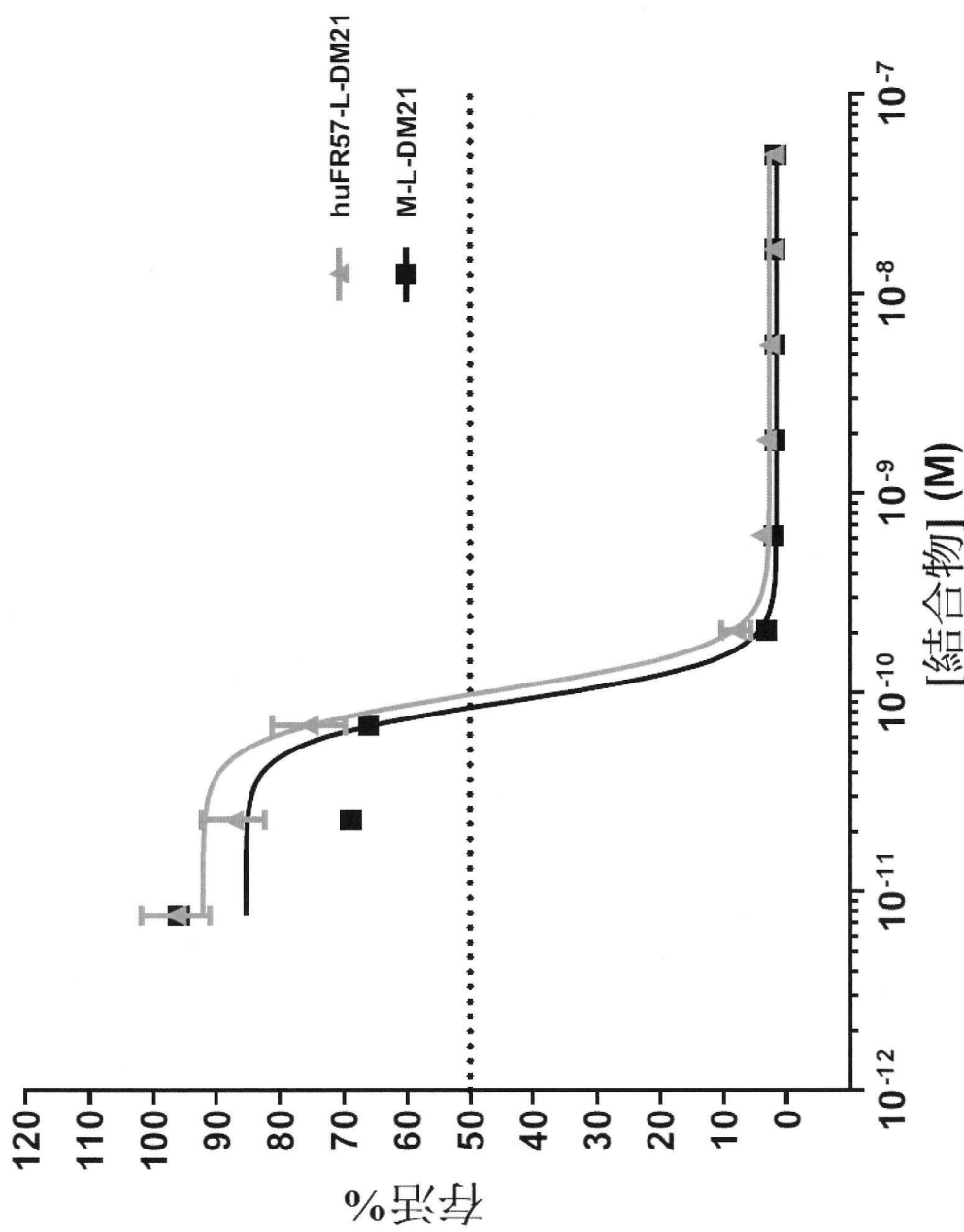
IGROV-1, 中值 TV



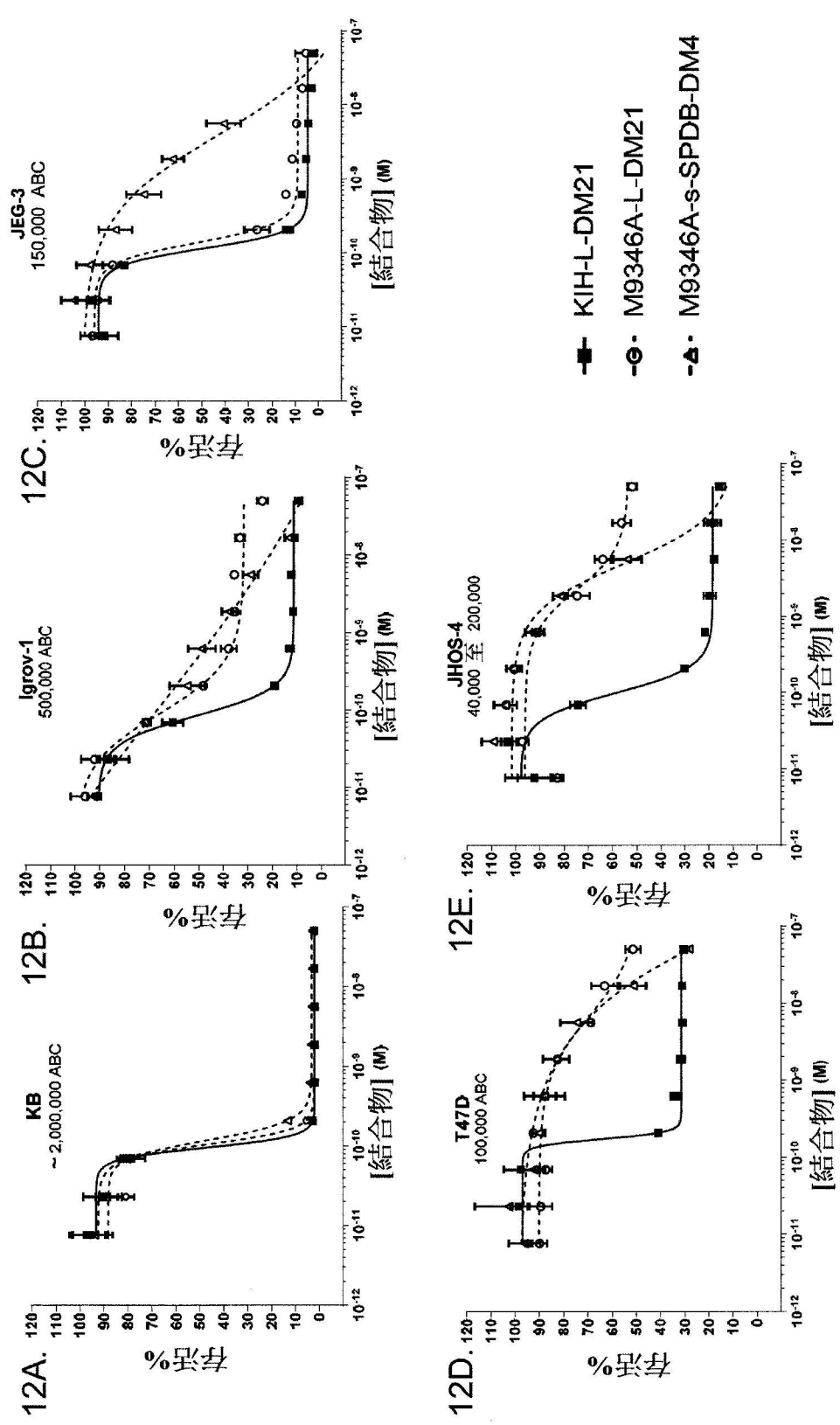
【圖 9】



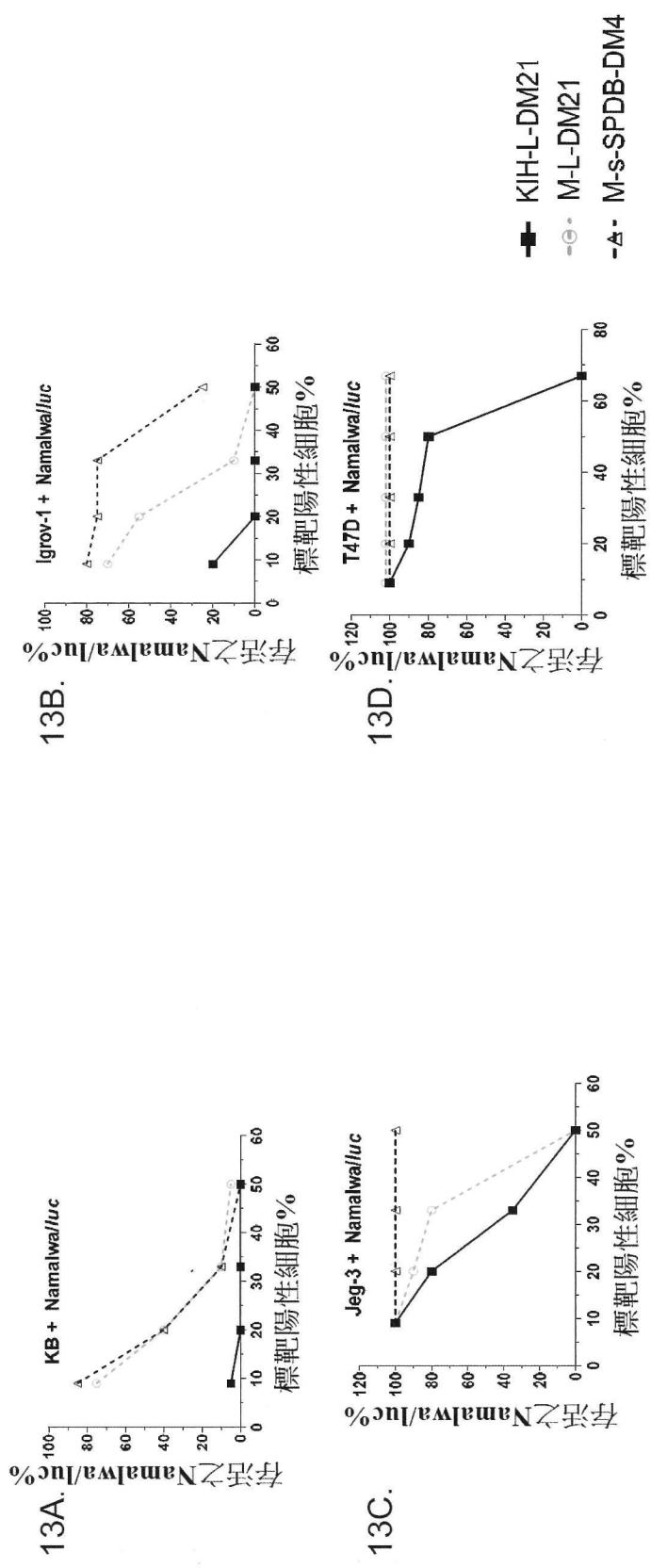
【圖 10】



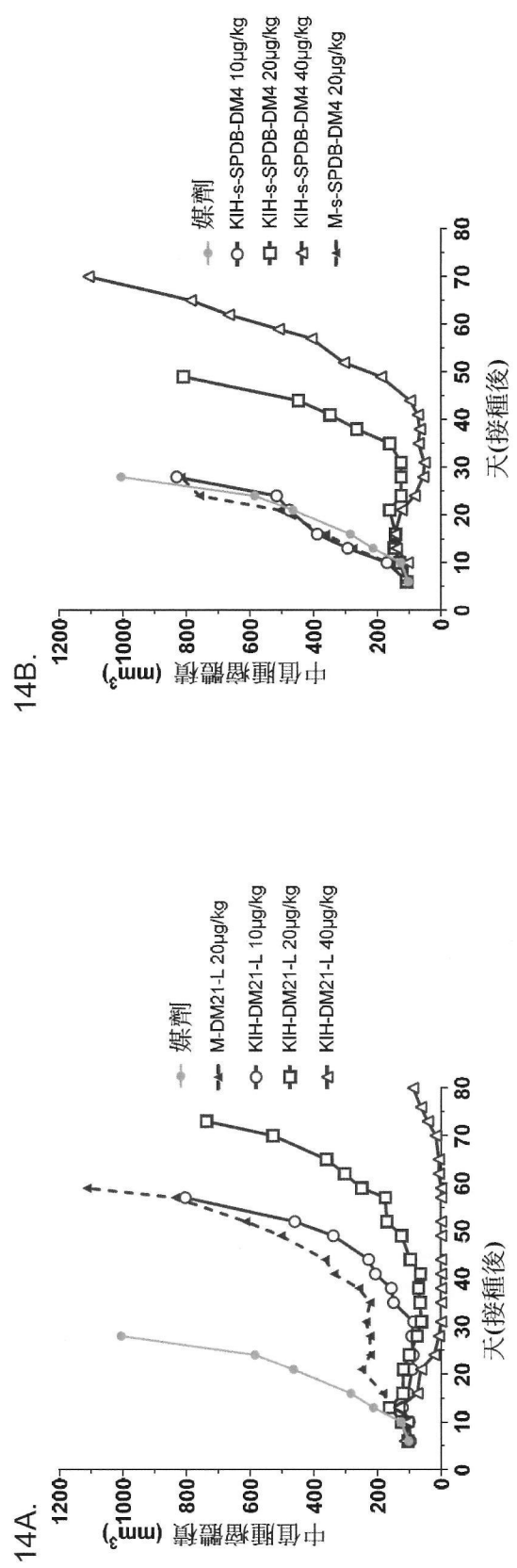
【圖 11】



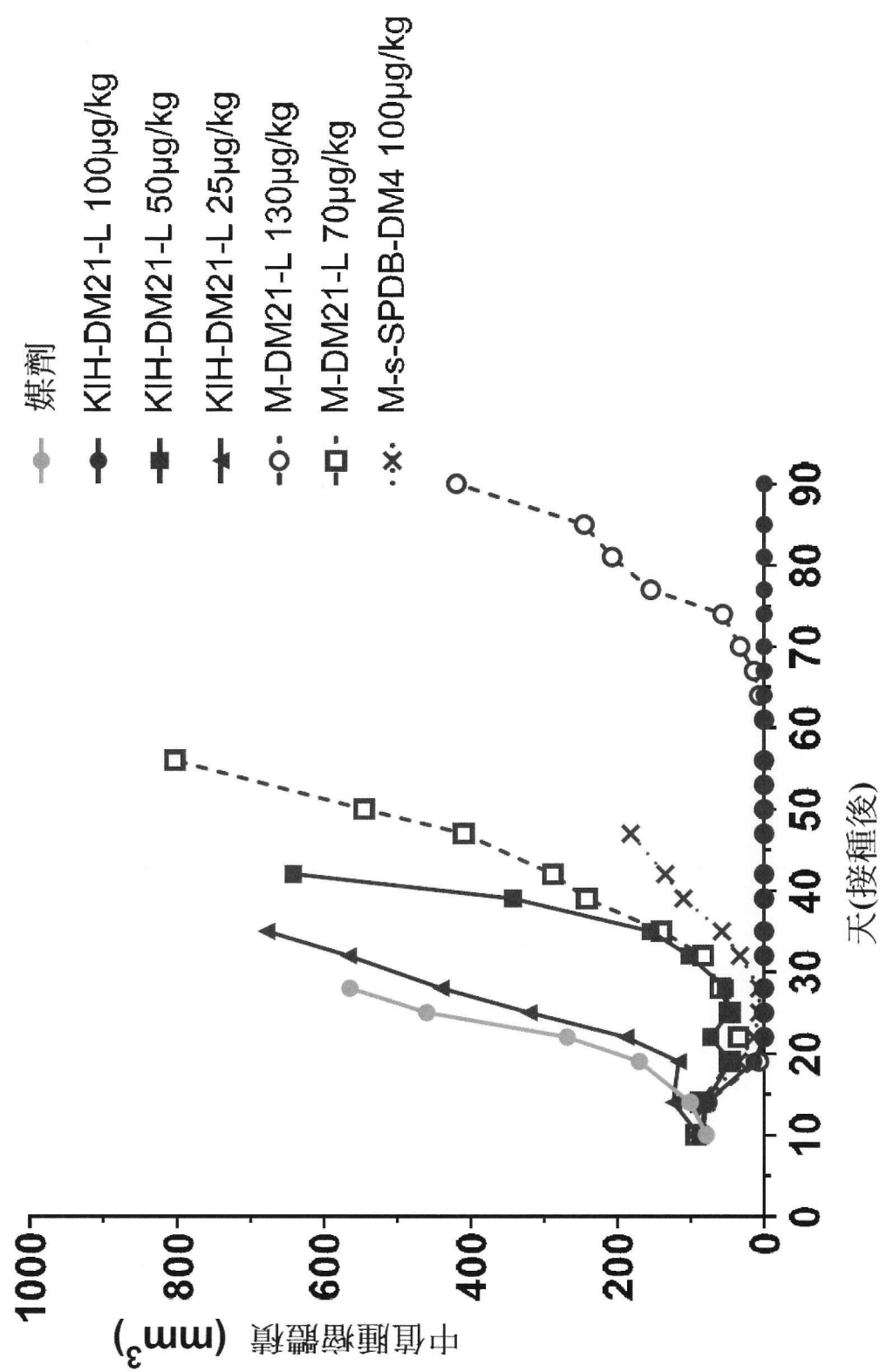
【圖 12A-12E】



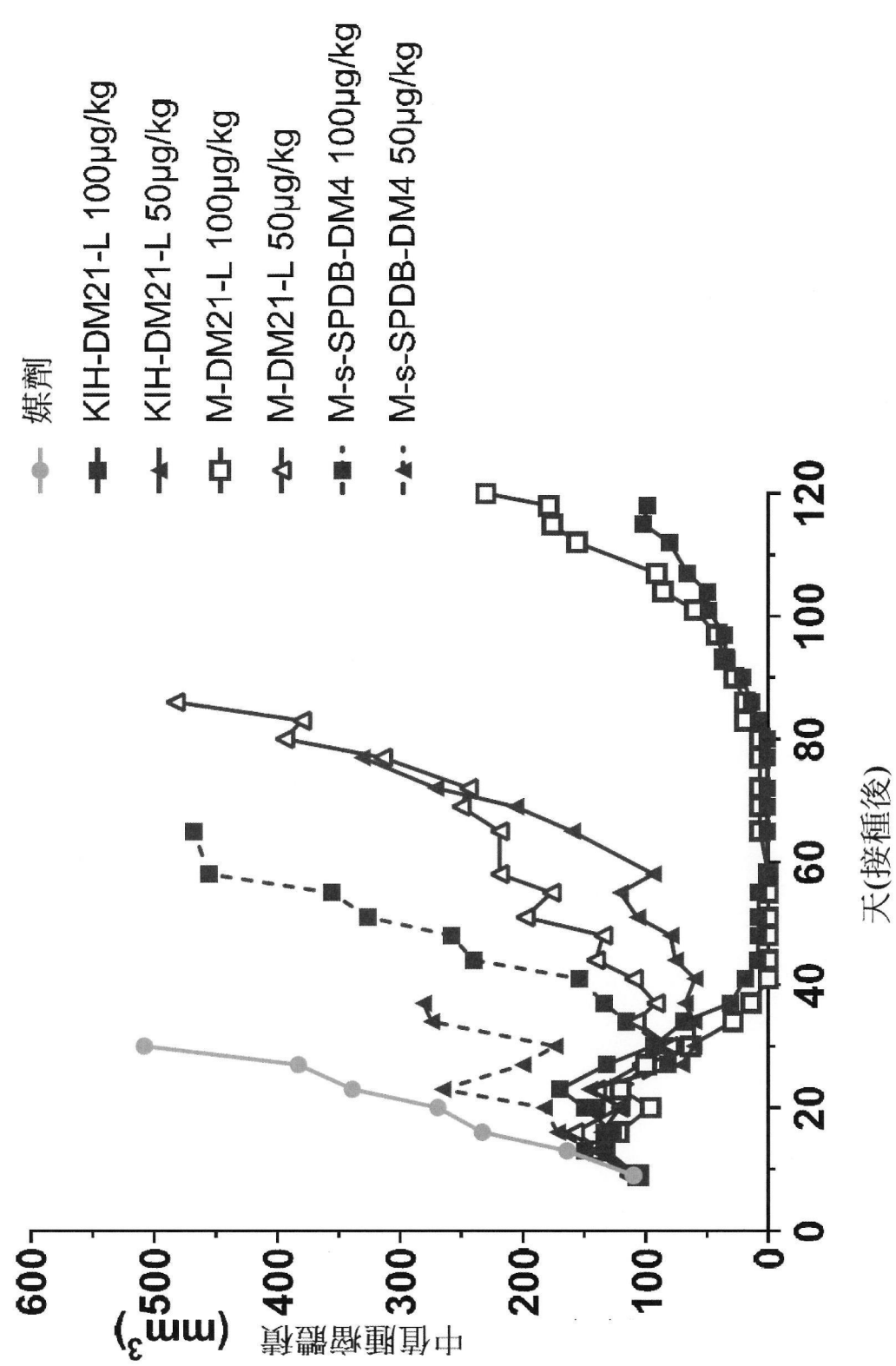
【圖 13A-13D】



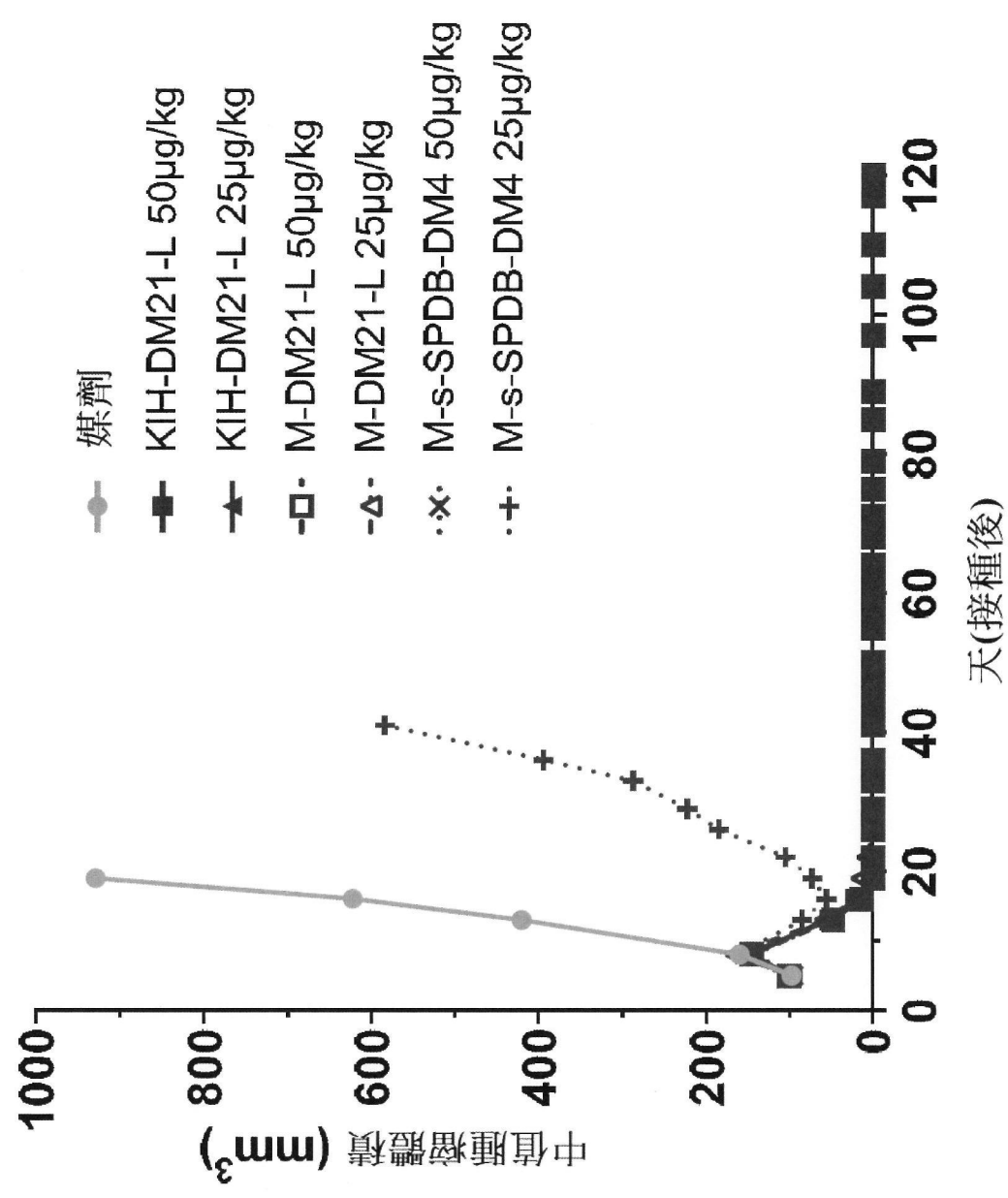
【圖 14A-14B】



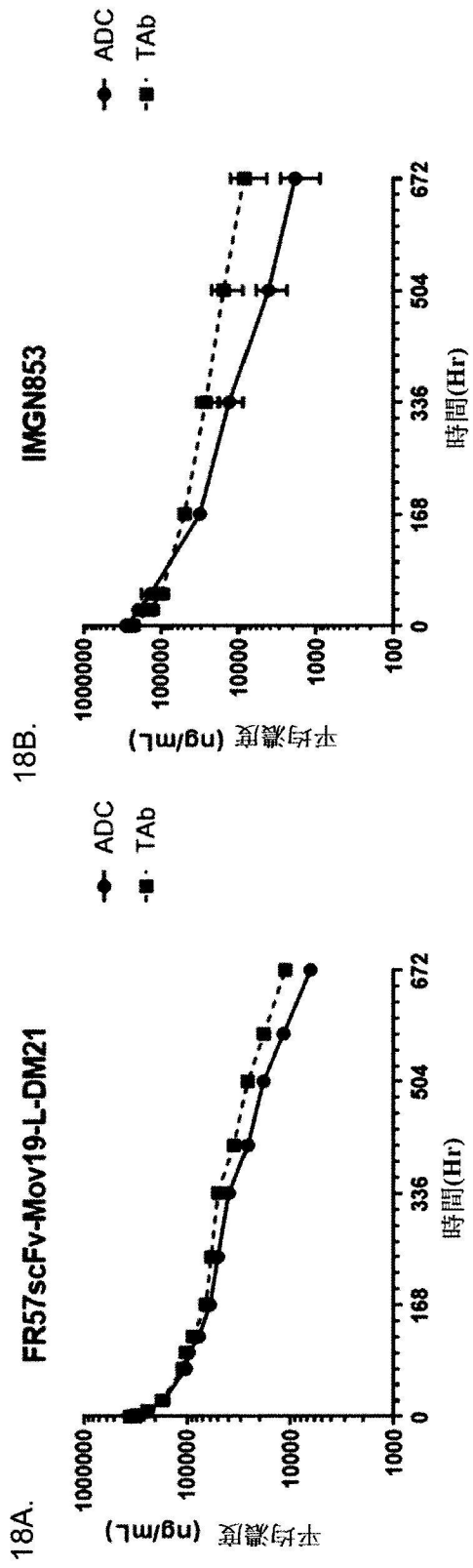
【圖 15】



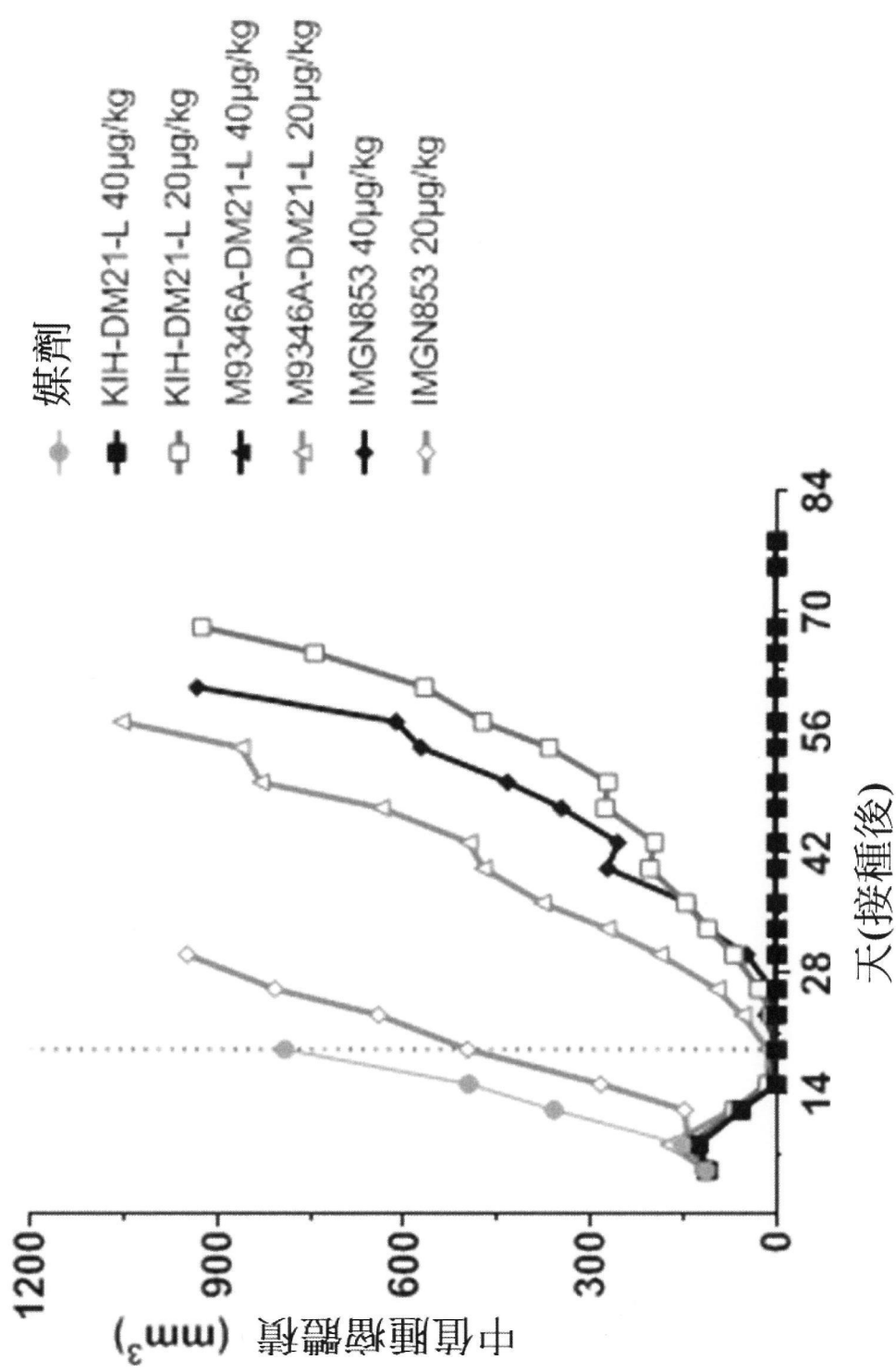
【圖 16】



【圖 17】



【圖 18A-18B】



【圖 19】