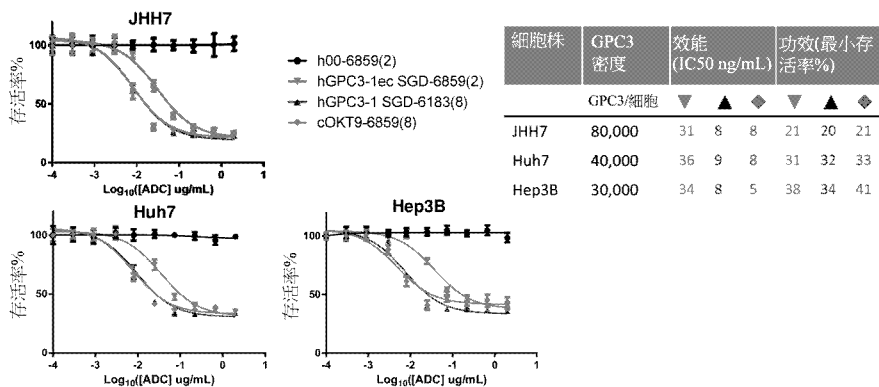




(21)申請案號：108105041 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 15 日
(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K47/68 (2017.01)
(30)優先權：2018/02/15 美國 62/631,353
(71)申請人：美商思進公司 (美國) SEAGEN INC. (US)
美國
(72)發明人：碧琪兒 特拉維斯 BIECHELE, TRAVIS (US)；亞瑟 威廉斯 ARTHUR, WILLIAM (US)；布魯克 派翠克 BURKE, PATRICK (US)；維思登朵芙 蘿莉 WESTENDORF, LORI (US)
(74)代理人：陳長文；張哲倫；張雅雯
(56)參考文獻：
TW 201739472A CN 106414499A
審查人員：張茜毓
申請專利範圍項數：14 項 圖式數：13 共 95 頁

(54)名稱
磷脂醯肌醇蛋白聚醣(GLYPICAN)3 抗體及其結合物
(57)摘要

本發明提供特異性結合於 GPC3 之鼠類、嵌合及人類化抗體及其結合物。
The invention provides murine, chimeric, and humanized antibodies that specifically bind to GPC3 and conjugates thereof.
指定代表圖：



【圖7】



I851552

【發明摘要】

【中文發明名稱】

磷脂醯肌醇蛋白聚醣(GLYPICAN)3抗體及其結合物

【英文發明名稱】

GLYPICAN 3 ANTIBODIES AND CONJUGATES THEREOF

【中文】

本發明提供特異性結合於GPC3之鼠類、嵌合及人類化抗體及其結合物。

【英文】

The invention provides murine, chimeric, and humanized antibodies that specifically bind to GPC3 and conjugates thereof.

【指定代表圖】

圖7

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

磷脂醯肌醇蛋白聚醣(GLYPICAN)3抗體及其結合物

【英文發明名稱】

GLYPICAN 3 ANTIBODIES AND CONJUGATES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 磷脂醯肌醇蛋白聚醣(Glypican) 3 (GPC3)為已知在肝細胞癌細胞上表現且在多種惡性細胞上報導之細胞表面蛋白聚醣。本發明提供GPC3抗體及其結合物。

【發明內容】

【0002】 本文提供抗GPC3抗體及GPC3定向抗體-藥物結合物。特定言之，本文提供GPC3定向特吡萊辛(tubulysin)抗體-藥物結合物及使用此等結合物治療GPC3表現病症之方法。較佳抗的GPC3抗體為嵌合或人類化形式的鼠類GPC3-1抗體。鼠類GPC3-1抗體包含具有在SEQ ID NO:8中所闡述之胺基酸序列之重鏈可變區及在SEQ ID NO:9中所闡述之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【圖式簡單說明】

【0003】 圖1展示人類GPC3之序列。

【0004】 圖2A展示hGPC3-1重鏈變體與人類vH供體序列HV1-18/HJ4之序列比對。

【0005】 圖2B展示hGPC3-1重鏈變體與人類vH供體序列HV1-69-2/HJ4之序列比對。

【0006】 圖3展示hGPC3-1重鏈變體之序列比對。

【0007】 圖4展示hGPC3-1輕鏈變體與人類vL供體序列KV2-30/KJ2之序列比對。

【0008】 圖5展示hGPC3-1輕鏈變體之序列比對。

【0009】 圖6展示hGPC3-1ec之表面電漿子共振結合資料。(左邊)多個感測器圖譜表示與固定hGPC3締合之hGPC3-1ec之若干濃度(400、160、64、25.6、10.2、4.1及1.64 nM)。(右邊) K_D 藉由繪製各濃度之600秒最大反應來測定且由一半最大結合之定義。

【0010】 圖7展示測試人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 SGD-6183抗體-藥物結合物抵抗表現包括JHH7、Huh7及Hep3B之HCC細胞株之一組GPC3的活體外細胞毒性分析之結果。

【0011】 圖8展示測試人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 SGD-6183抗體-藥物結合物抵抗表現包括NCI-H661及NCI-H446之肺癌細胞株之一組GPC3的活體外細胞毒性分析之結果。

【0012】 圖9展示HCC異種移植模型JHH7之結果。

【0013】 圖10展示HCC異種移植模型Huh7之結果。

【0014】 圖11展示HCC異種移植模型Hep3B之結果。

【0015】 圖12展示肺癌異種移植模型NCI-H661之結果。

【0016】 圖13展示在與S239C或天然半胱胺酸結合時活體內評定特吡萊辛M乙酸鹽穩定性及連接子順丁烯二醯亞胺穩定性的結果。

【實施方式】

定義

【0017】 如本文中所使用術語「單株抗體」係指自實質上同種之抗

體群體獲得的抗體，亦即除可以少量存在之可能的天然存在之突變之外，包含該群體之個別抗體係相同的。修飾語「單株」指示抗體之特徵為自實質上同種之抗體群體獲得，且不應理解為需要藉由任何特殊方法產生該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由Kohler等人 (1975) *Nature* 256:495首先描述的融合瘤方法製得，或可藉由重組DNA方法(參見例如，美國專利第4816567號)製得。「單株抗體」亦可使用描述於例如 Clackson等人 (1991) *Nature*, 352:624-628及Marks等人 (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597中之技術自噬菌體抗體庫分離或可由其他方法製得。本文所描述之抗體為單株抗體。

【0018】 抗體通常以分離形式提供。此意謂抗體為通常至少50%w/w純之干擾蛋白及由其生產或純化產生之其他污染物，但不排除抗體與過量醫藥學上可接受之載劑或旨在促進其使用之其他媒劑組合的可能性。有時抗體為至少60%、70%、80%、90%、95%或99% w/w純之干擾蛋白質和由其生產或純化產生的污染物。抗體(包括分離抗體)可與細胞毒性劑結合且作為抗體藥物結合物提供。

【0019】 「分離」聚核苷酸係指自其天然之組分鑑別及分離及/或回收的聚核苷酸。

【0020】 單株抗體與其靶抗原之特異性結合意謂至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} M^{-1} 之親和力。特異性結合之可偵測量值較高且可與至少一個不相關標靶發生的非特異性結合進行區分。特異性結合可為在特定官能基或特定空間擬合(例如，鎖鑰類型(lock and key type))之間形成鍵的結果，而非特異性結合通常為凡得瓦爾力(van der Waals force)之結果。GPC3定向抗體-藥物結合物和抗GPC3抗體特異性結合於GPC3。

【0021】基本抗體結構單元為子單元之四聚體。各四聚體包括兩對相同之多肽鏈，各對具有一個「輕」鏈(約25 kDa)及一個「重」鏈(約50-70 kDa)。各鏈之胺基端部分包括主要負責抗原識別之具有約100至110個或更多個胺基酸的可變區。此可變區首先與可斷裂信號肽有關的表現。無信號肽之可變區有時稱為成熟可變區。因此，例如，輕鏈成熟可變區意謂無輕鏈信號肽之輕鏈可變區。輕鏈係分類為 κ 或 λ 。重鏈係分類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，且將抗體之同型分別定義為IgG、IgM、IgA、IgD及IgE。在輕鏈及重鏈內，下標及恆定區由約12或更多個胺基酸之「J」區接合，其中重鏈亦包括約10或更多個胺基酸之「D」區。(通常參見*Fundamental Immunology* (Paul, W.,編, 第2版 Raven Press, N.Y., 1989, 第7章)，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中)。各輕鏈/重鏈對之成熟可變區形成抗體結合位點。因此，完整抗體具有兩個結合位點。鏈均呈現藉由三個高變區接合之相對保守構架區(FR)之相同通式結構，亦稱為互補決定區或CDR。自各對之兩鏈之CDR藉由構架區對齊，使得能夠結合於特異性抗原決定基。自N端至C端，輕鏈及重鏈兩者包含域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。根據Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (美國國家衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, MD, 1987及1991)或Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia等人, *Nature* 342:878-883 (1989)之定義將胺基酸分配至各域。Kabat亦提供廣泛使用之編號定則(Kabat編號系統)，其中不同重鏈可變區之間或不同輕鏈可變區之間的對應殘基被分配相同數值。重鏈恆定區之編號係經由如Kabat中所闡述之EU索引(Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (美國國家衛生研究院,

Bethesda, MD, 1987及1991)。

【0022】術語「抗體」包括完整抗體及其抗原結合片段。「完整抗體」為包含抗原結合可變區以及對於抗體類別合適之輕鏈恆定域(C_L)及重鏈恆定域(C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 及 C_{H4})的抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如，人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變體。抗體片段與完整抗體競爭，抗體片段來源於該完整抗體以供特異性結合於標靶，包括單獨重鏈、輕鏈Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_c$ 、雙功能抗體、Dabs、奈米抗體及Fv。片段可藉由重組DNA技術或藉由完整免疫球蛋白之酶促或化學分離來產生。術語「抗體」亦包括雙功能抗體(均二聚Fv片段)或微型抗體(V_L - V_H - C_{H3})、雙特異性抗體或其類似物。雙特異性或雙官能抗體為具有兩個不同重鏈/輕鏈對及兩個不同結合位點之人工雜交抗體(參見例如Songsivilai及Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny等人, J. Immunol., 148:1547-53 (1992))。

【0023】術語「患者」包括接受預防性或治療性治療的人類及其他哺乳動物個體。

【0024】出於將胺基酸取代分類為保守或非保守之目的，胺基酸分組如下：I組(疏水性側鏈)：met、ala、val、leu、ile；II組(中性親水性側鏈)：cys、ser、thr；III組(酸性側鏈)：asp、glu；IV組(鹼性側鏈)：asn、gln、his、lys、arg；V組(影響鏈取向之殘基)：gly、pro；以及VI組(芳族側鏈)：trp、tyr、phe。保守取代涉及在相同類別中之胺基酸之間的取代。非保守取代構成此等類別中之一者之一員與另一類別之一員的交換。

【0025】藉由Kabat編號規約最大限度地比對抗體序列來測定序列

一致性百分比。在比對之後，若個體抗體區域(例如，重鏈或輕鏈之整個成熟可變區)與參考抗體之相同區進行比較，則個體抗體區與參考抗體區之間的序列一致性百分比為由個體抗體區及參考抗體區兩者中之相同胺基酸佔據之位置數目除以兩個區域之比對位置之總數目(不計數間隙)，乘以100以轉換為百分比。

【0026】「包含」一或多種所敘述要素之組合物或方法可包括未特定敘述之其他要素。舉例而言，包含抗體之組合物可單獨或與其他成分組合地含有抗體。

【0027】術語「治療有效量」或「有效量」係指有效治療哺乳動物中之疾病或病症的抗體-藥物結合物之量。在癌症的情況下，治療有效量之結合物可減少癌細胞之數目；減小腫瘤大小；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳地停止)癌細胞穿透至周邊器官中；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳地停止)腫瘤轉移；抑制腫瘤生長；及/或緩解與癌症相關聯之症狀中之一或多者。對於癌症療法，可例如藉由評定疾病進展時間(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測功效。術語「有效療程」係指所投與結合物之量及足以實現病症之治療之劑量頻率的組合。

【0028】除非上下文另外指示，否則術語「治療(treat或treatment)」係指治療性治療，其中目的為抑制或減緩(減輕)非所要生理變化或病症，諸如癌症之進展或擴散。有益或所要的臨床結果包括(但不限於)症狀緩解、疾病程度減輕、疾病狀態穩定(亦即，未惡化)、疾病進展延緩或減慢、疾病狀態改善或緩和以及緩解(部分或完全緩解)，無論為可偵測的或不可偵測的。「治療」亦可意謂與不接受治療之預期存活期相比延長了存活期。需要治療者包括患有可偵測疾病者。需要治療者亦可包

括患有不可偵測疾病者，例如在治療GPC3表現病症之後獲得完全反應但需要治療以便預防復發的患者。

【0029】 除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之術語「化合物」係指且涵蓋化學化合物自身(由結構及其鹽形式命名或表示)，無論是否明確陳述，除非上下文清晰表示排除此等鹽形式。化合物鹽包括兩性離子型鹽形式以及酸加成及鹼加成鹽形式，其具有有機相對離子或無機相對離子，及涉及兩個或更多個相對離子之鹽形式，其可為相同或不同的。在一些態樣中，鹽形式為化合物之醫藥學上可接受之鹽形式。術語「化合物」進一步涵蓋化合物之溶劑合物形式，其中當化合物之羰基經水合以形成羧-二醇時，溶劑與化合物非共價締合或與化合物逆向共價締合。溶劑合物形式包括化合物自身形式及其鹽形式且包括半溶劑合物、單溶劑合物、二溶劑合物(包括水合物)；且當化合物可與兩個或更多個溶劑分子締合時，兩個或更多個溶劑分子可為相同或不同的。在一些情況中，本發明化合物將包括對上述形式中之一或多者，例如鹽及溶劑合物的明確提及，其不會暗示化合物之固態形式；然而，此參考僅為強調且不應被理解為排除如上述鑑別之任何其他形式。此外，當不明確提及化合物或抗體藥物結合物組合物之鹽及/或溶劑合物形式時，該省略不應理解為排除化合物或結合物之鹽及/或溶劑合物形式，除非上下文明確表示排除此類鹽及/或溶劑合物形式。

【0030】 除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之術語「部分」意謂分子或化合物之特定區段、片段或官能基。化學部分有時指示為包埋於分子、化合物或化學式中或附接至分子、化合物或化學式的化學個體(亦即，取代基或變化基團)。

【0031】 除非上下文另外指示或暗示，否則對於本文中藉由給定碳原子範圍所描述之任何取代基或部分，指定範圍意謂描述任何個別數目之碳原子。因此，對例如「視情況經取代之C₁-C₄烷基」或「視情況經取代之C₂-C₆烯基」之提及特定意謂分別存在如本文所定義視情況經取代之1、2、3或4個碳烷基部分或存在如本文所定義視情況經取代之2、3、4、5或6個碳烯基部分。所有此類數值標示明確地意欲揭示所有個別碳原子基團；且因此「視情況經取代之C₁-C₄烷基」包括甲基、乙基、3-碳烷基及4-碳烷基，包括所有其位置異構體，不論經取代或未經取代。因此，當烷基部分經取代時，數值標示係指未經取代之基本部分且並不意欲包括可能存在於該基本部分之取代基中的未直接連接至該基本部分的碳原子。對於如本文中所定義的藉由給定碳原子範圍鑑別之酯、碳酸酯、胺基甲酸酯及脲，指定之範圍包括各別官能基之羰基碳。因此，C₁酯係指甲酸酯且C₂酯係指乙酸酯。

【0032】 本文中所描述之有機取代基、部分及基團，且對於本文中所描述之其他任何其他部分，通常將排除不穩定部分，除了其中出於本文所描述之一或多種用途，此類不穩定部分為吾人可用以製造具有足夠化學穩定性之化合物的暫態物種以外。特定排除藉由本文所提供之定義的操作產生具有五價碳之彼等取代基、部分或基團的取代基、部分或基團。

【0033】 除非由上下文另外陳述或暗示，否則本文中所使用術語「烷基」(單獨地或作為另一術語之部分)係指甲基或一系列連續碳原子(其中之一者為單價的)，其中碳原子中之一或多者為飽和的(亦即，包含以或多個sp³碳)且以正常、二級、三級或環狀配置，亦即以直鏈、分支鏈、環狀配置或其某一組合共價連接在一起。在一些態樣中，當連續飽和

碳原子呈環狀配置時，此等烷基部分被稱為碳環基。

【0034】 當提及烷基部分作為烷基取代基時，馬庫什結構 (Markush structure) 或與其締合之另一有機部分的烷基取代基為甲基或經由烷基取代基之 sp^3 碳共價連接至該結構或部分的連續碳原子鏈。如本文中所使用，烷基取代基因此含有至少一個飽和部分且可另外含有一或多個獨立選擇之雙鍵及/或參鍵以定義不飽和烷基部分，且亦可經包括如本文所描述之合適的視情況存在之取代基的1至4個、通常1至3個或1或2個其他部分取代。飽和烷基部分中之碳原子數可變化且通常為1-8個、1-6個或1-4個且不飽和烷基部分中之碳原子數通常在3-8個、3-6個或3-4之間變化。

【0035】 除非上下文另外指示或暗示，否則術語「烷基」將指示飽和、非環狀烴基，其中該烴基具有指定數目個共價連接之飽和碳原子，使得術語諸如「 C_1 - C_6 烷基」或「C1-C6烷基」意謂含有1個飽和碳原子(亦即，為甲基)或2、3、4、5或6個連續非環狀飽和碳原子之烷基部分或基團且「 C_1 - C_8 烷基」係指具有1個飽和碳原子或2、3、4、5、6、7或8個連續飽和非環狀碳原子之烷基部分或基團。

【0036】 當指定飽和烷基取代基、部分或基團時，物種包括由自親本烷移除氫原子衍生之物種(亦即，烷基部分為單價)且可包括甲基、乙基、1-丙基(正丙基)、2-丙基(異丙基、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、1-丁基(正丁基)、2-甲基-1-丙基(異丁基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)、2-丁基(第二丁基、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)、2-甲基-2-丙基(第三丁基、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$)、戊基、異戊基、第二戊基及其他直鏈及分支鏈烷基部分。

【0037】 除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之術語

「伸烷基」(單獨地或作為另一術語之部分)係指飽和的分支鏈或直鏈烴二價基團(其經取代或未經取代)，其中碳原子中之一或多者為飽和的(亦即，包含一或多個 sp^3 碳)，所陳述碳原子數目通常範圍介於1至8個、1或6個或1至4個碳原子且具有兩個基團中心(亦即，二價)。彼等基團中心可來源於藉由自親本烷之相同或兩個不同飽和(亦即， sp^3)碳原子或自如本文所描述之烷基移除兩個氫原子，其中氫原子已自其飽和碳之另一者或自烷基之基團碳移除以形成二價基團。

【0038】伸烷基部分由以下例示(但不限於):亞甲基($-CH_2-$)、1,2-伸乙基($-CH_2CH_2-$)、1,3-伸丙基($-CH_2CH_2CH_2-$)、1,4-伸丁基($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$)及類似二價基團。通常，伸烷基為僅含 sp^3 碳之分支鏈或直鏈烴(亦即，不管基團碳原子而為完全飽和的)且在一些態樣中未經取代。在其他態樣中，伸烷基含有呈一或多個雙鍵及/或參鍵官能基，通常1或2個、更通常1個此等官能基官能基形式的內部不飽和位點，使得不飽和伸烷基部分之末端碳為單價 sp^3 碳原子。在又其他態樣中，伸烷基未經取代或經1至4個、通常1至3個或1或2個取代基取代，如本文針對視情況存在之取代基所定義。

【0039】除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用「視情況經取代之烷基」或「視情況經取代之苯基」係指如本文所定義之烷基或苯基取代基、部分或基團，其中彼取代基、部分或基團之氫原子已視情況經不同部分或基團替換且包括選自由以下組成之群的彼等：氰基、鹵素、 $-CX_3$ ，其中X獨立地為如本文中所定義之鹵素、N-連接部分及O-連接部分。

【0040】通常，存在的視情況存在之取代基選自由以下組成之群：

-X、-Cl、-OH、-OR'、-OC(=O)R'、-NH₂、-NH(R')、-NR'(R')₂、-N(R')₃、-CF₃、-CN及-NO₂，其中各X獨立地為鹵素，且各R'獨立地為C₁-C₆烷基。

【0041】如本文中所使用，「O-連接部分」係指直接地連接至馬庫什結構之含氧有機部分或經由其氧原子與其締合的另一部分。O-連接部分包括-OH、醯氧基(亦即，-OC(=O)R^a，其中R^a通常為-H)、視情況經取代之烷基或視情況經取代之苯基及醚基團，諸如C₁-C₆烷氧基，其中烷基部分為飽和或不飽和的。其他例示性O-連接取代基由胺基甲酸酯之定義提供。

【0042】如本文中所使用，「N連接之部分」係指直接地連接至馬庫什結構之含氮有機部分或經由其氮原子與其締合的另一部分。N連接部分包括-NH₂、-NHR^a、-N(R^a)₂及醯胺(亦即，-NR^aC(=O)R^a)，其中R^a通常選自由以下組成之群：-H、視情況經取代之C₁-C₆烷基及視情況經取代之苯基。其他例示性N連接之取代基由胺基甲酸酯之定義提供。

【0043】如此處所使用，「胺基甲酸酯」意謂含有由-O-C(=O)N(R^a)-或-O-C(=O)N(R^a)₂表示之胺基甲酸酯官能基的取代基、部分或基團，其中獨立地選擇之R^a為氫或視情況經取代之C₁-C₆烷基且包括-O-C(=O)NH(視情況經取代之烷基)或-O-C(=O)N(視情況經取代之烷基)₂，其為例示性胺基甲酸酯取代基，其中視情況經取代之烷基獨立地為選擇視情況經取代之C₁-C₆烷基。當胺基甲酸酯用作馬庫什基團(亦即，取代基)時，胺基甲酸酯官能基之單鍵氧(O-連接)或氮(N-連接)連接至其所締合之馬庫什式。胺基甲酸酯取代基之連接在提及此取代基之情形中得到明確陳述(N-或O-連接)或暗示。本文中描述之O-連接胺基甲酸酯為例示性單

價O-連接部分且N-連接胺基甲酸酯為例示性N-連接部分。

【0044】如本文所用之「鹵素」或「鹵基」意謂氟、氯、溴或碘，且通常為-F或-Cl。

【0045】除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之片語「其鹽」係指化合物(例如，藥物、藥物連接子化合物或抗體藥物結合物化合物)之鹽形式。化合物之鹽形式具有一或多種內部鹽形式及/或涉及包括另一種分子，諸如醋酸根離子、丁二酸根離子或其他相對離子。呈化合物之鹽形式的相對離子通常為使親本化合物上之電荷穩定的有機或無機部分。化合物之鹽形式在其結構中具有一個或超過一個帶電原子。在多個帶電原子為鹽形式之部分的例項中，存在多個相對離子及/或多個帶電相對離子。因此，化合物之鹽形式通常具有對應於化合物之非鹽形式之原子的一或多個帶電原子及一或多個相反離子。在一些態樣中，化合物之非鹽形式含有至少一個胺基或其他基礎部分，且因此在酸之存在下，獲得基礎部分之酸加成鹽。在其他態樣中，化合物之非鹽形式含有至少一個羧酸基或其他酸性部分，且因此在鹼基之存在下，獲得甲酸鹽或陰離子部分。

【0046】呈化合物鹽形式之例示性相對陰離子及相對陽離子包括(但不限於)硫酸鹽、三氟乙酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯鹽、溴鹽、碘鹽、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、葡糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸(亦即，1,1'亞甲基雙(2-羥基-3-萘甲酸))鹽。

【0047】 化合物之鹽形式之選擇視藥品必須呈現之特性而定，包括視預定投與途徑而定的在各種pH值下之充分水溶性、適合於處理的具有流動特性之結晶度及低吸濕性(亦即，水吸收率相比於相對濕度)以及在加速條件下測定化學及固態穩定性所需的存放期(亦即，用於在40°C及75%相對濕度下儲存時測定降解或固態變化)。

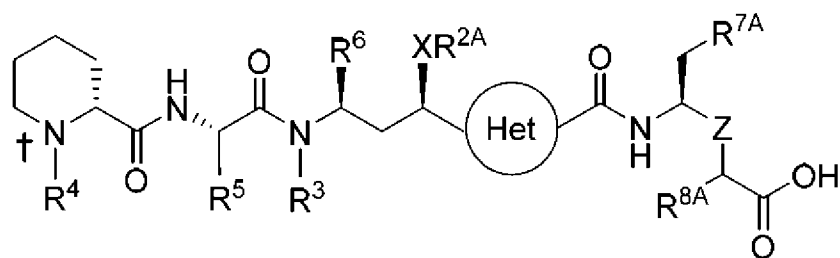
【0048】 術語「醫藥學上可接受」意謂由聯邦政府或州政府或美國所列出之監管機構審批通過。藥典或其他大體上所識別藥典用於動物，且更特定言之用於人類。術語「醫藥學上之相容成分」係指與抗體或抗體-藥物結合物一起投與至個體的醫藥學上可接受之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

【0049】 「醫藥學上可接受之鹽」為如本文所描述適用於投與至個體的化合物之鹽形式且在一些態樣中包括相對陽離子或相對陰離子，如由P. H. Stahl及C. G. Wermuth, 編者, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002所描述。

【0050】 本發明之上下文中之溶劑合物為經由與溶劑分子配位形成複合物的本發明之化合物之彼等形式。水合物為溶劑合物之一種特定形式，其中與水進行配位。在本發明之上下文中，較佳溶劑合物為水合物。

【0051】 如本文中所使用之「特吡萊辛化合物」(除非上下文另外陳述或暗示)為具有細胞毒性或細胞生長抑制活性的基於四胜肽之微管蛋白破壞劑，且特徵在於具有中心5員含氮伸雜芳基部分之非天然胺基酸殘基及N端六氫菸鹼酸殘基，其在一些態樣中含有可用於併入抗體藥物結合物中作為四級銨化藥物單元的三級胺。非限制性例示性特吡萊辛適用於具有

以下結構之四級銨化：

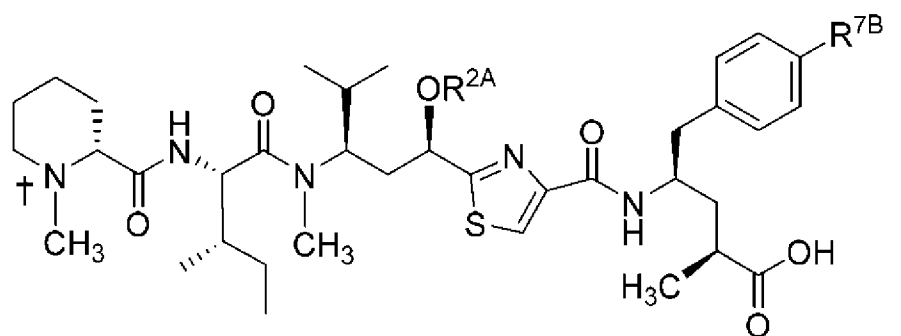


或其鹽，特定言之醫藥學上可接受之鹽，其中經指示氮原子為當特吡萊辛化合物併入四級銨化藥物單元中時四級銨化之位點；環表示5員含氮伸雜芳基部分，其中所展示雜芳基取代基彼此呈1,3關係，其中在其餘位置處視情況取代；X為O、S或NR^{2B}；R³、R⁴、R⁵及R⁶獨立地視情況經C₁-C₆烷基取代，R^{7A}為視情況經取代之苯基；R^{2B}及R^{8A}獨立地為氫或視情況經取代之C₁-C₆烷基；Z為-CH₂-、-CH₂CH₂-或-CH=CH-，且R^{2A}為氫或視情況經取代之C₁-C₆烷基，或-XR^{2A}表示單價O-連接取代基或單價N-連接取代基。

【0052】 製備特吡萊辛藥物之例示性方法及結構-活性關係由以下提供：Shankar等人「Synthesis and structure-activity relationship studies of novel tubulysin U analogs-effect on cytotoxicity of structural variations in the tubuvaline fragment」 *Org. Biomol. Chem.* (2013) 11: 2273-2287；Xiangming等人「Recent advances in the synthesis of tubulysins」 *Mini-Rev. Med. Chem.* (2013) 13: 1572-8；Shankar等人「Synthesis and cytotoxic evaluation of diastereomers and N-terminal analogs of Tubulysin-U」 *Tet. Lett.* (2013) 54: 6137-6141；Shankar等人「Total synthesis and cytotoxicity evaluation of an oxazole analogue of Tubulysin U」 *Synlett* (2011) 2011(12): 1673-6；Raghavan等人 *J. Med. Chem.* (2008) 51: 1530-3；Balasubramanian, R.等人「Tubulysin analogs

incorporating desmethyl and dimethyl tubuphenylalanine derivatives」
Bioorg. Med. Chem. Lett. (2008) 18: 2996-9；及Raghavan等 人
 「Cytotoxic simplified tubulysin analogues」 *J. Med. Chem.* (2008) 51:
 1530-3。

【0053】 在一些態樣中，適用於四級銨化之特吡萊辛包括具有以下結構之彼等：



或其鹽，特定言之醫藥學上可接受之鹽，其中 R^{2A} 為甲基、乙基或丙基或- $C(=O)R^{2B}$ ，其中 R^{2B} 經預先定義；且 R^{7B} 為氫或-OH。在其他態樣中，適用於四級銨化之特吡萊辛為特吡萊辛M，其具有上述結構，其中 R^{2A} 為- $C(=O)CH_3$ 且 R^{7B} 為氫或為具有上述結構之特吡萊辛化合物，其中 R^{2A} 為乙基且 R^{7B} 為氫。

【0054】 如本文中所使用之「四級銨化特吡萊辛藥物單元」(除非上下文另外陳述或暗示)係關於含三級胺之特吡萊辛化合物，其中其三級胺氮存在於四級銨化藥物單元結構中作為四級胺鹽且四級銨化藥物單元在其自抗體藥物結合物之藥物連接子部分釋放時提供游離含三級胺之特吡萊辛化合物。在一些態樣中，四級銨化特吡萊辛藥物單元(D^+)係藉由將特吡萊辛化合物之C端組分之三級胺氮與具有適合脫離基之連接子單元前驅體一起縮合而獲得。在其他態樣中，C端組分首先藉由特吡萊辛化合物之剩餘部分四級銨化接著附接以完成 D^+ 單元。因此，含有四級銨化特吡萊辛藥

物單元之結構暗示無特定方法，其中形成 D^+ 且不需要用於其形成之反應物為含三元胺之藥物，但僅需要併入 D^+ 或對應於意欲自抗體藥物結合物化合物釋放的含三元胺之結構。

【0055】 除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之「延伸子單元」係指插入連接子單元之丁二酸部分或其水解形式(其連接至抗體)與葡萄糖苷酸單元之間的抗體藥物結合物的基於葡萄糖苷酸之藥物連接子部分中的連接子單元之組分。替代地，延伸子單元係指基於葡萄糖苷酸之藥物連接子化合物中的連接子單元之組分，其可用於製備插入連接子單元之順丁烯二醯亞胺部分與葡萄糖苷酸單元之間的抗體藥物結合物。延伸子單元(A)可為單一單元或可含有多個子單元。通常，一個獨立單元或具有2至4個獨立子單元。

【0056】 在一些態樣中，延伸子單元或其第一子單元包含視情況經取代之 C_1 - C_6 伸烷基，其具有連接至順丁烯二醯亞胺或丁二醯亞胺部分或其水解形式之氮原子的其二價中心之一者，且連接至羰基殘基之另一者，其中有時 C_1 - C_6 伸烷基之視情況存在之取代基作為基本單元存在以提供如WO 2013/173337中所描述之自穩定連接子。當A具有2個或更多個獨立子單元時，第二子單元通常為 $-L^P$ (PEG)部分，其中 L^P 為包含含三官能性胺之胺基酸殘基的平行連接子單元且PEG為如本文所定義之PEG單元或 α -胺基酸、 β -胺基酸或其他含胺之酸性殘基，在第二子單元之含胺之酸性殘基之胺氮原子連接至第一子單元之羰基殘基且第二子單元之羰基殘基之碳原子鍵結至基於葡萄糖苷酸之連接子單元之葡萄糖苷酸單元或鍵結至A之第三子單元之胺氮胺氮的例項中，其通常為另一種含胺之酸性殘基，其中其羰基殘基鍵結至基於葡萄糖苷酸之連接子單元之葡萄糖苷酸單元。

【0057】 除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之術語「平行連接子單元」為抗體藥物結合物之藥物連接子部分之連接子單元或具有疏水性藥物單元之藥物連接子化合物之連接子單元中的三官能有機部分，其中三官能基團中之一者連接至PEG單元且其他兩者連接連接子單元內之平行連接子(L^P)單元，使得PEG單元能夠「平行」定向至疏水性藥物單元以便掩蓋(至少部分)其疏水性。連接至 L^P 之PEG單元含有重複數目個乙二醇子單元(通常範圍介於8至24)以提供掩蓋。 L^P 、PEG及疏水性藥物單元由WO 2015/057699進一步描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0058】 除非上下文另外陳述或暗示，否則如本文中所使用之術語「葡萄糖苷酸單元」為連接至抗體藥物結合物或藥物連接子化合物的基於葡萄糖苷酸之藥物連接子部分之藥物單元的連接子單元之可裂解組分且包含胺基苯甲基殘基及經由糖苷鍵鍵結於其之碳水化合物殘基，其中苯甲基殘基能夠在糖苷酶之酶促作用時在彼糖苷鍵處自分解以供釋放藥物單元作為游離藥物。在一些態樣中，四級銨化藥物單元(諸如如本文所定義之四級銨化特吡萊辛藥物單元)共價連接至具有共價連接至連接子單元之剩餘部分之其胺基殘基之氮原子且具有經糖苷鍵結之碳水化合物殘基(諸如葡萄糖醛酸殘基)取代之其伸芳基殘基的胺基苯甲基部分之苯甲基碳原子，其中碳水化合物殘基與苯甲基碳原子呈鄰位或對位關係，使得在藉由糖苷酶裂解糖苷鍵時，苯甲基部分經歷自發分段以釋放四級銨化藥物單元作為游離含三元之藥物。在其他態樣中，胺基甲酸酯官能基插入於含非四級銨化胺之藥物單元之苯甲基碳原子與胺氮原子之間，其中胺基甲酸酯官能基之單價氧原子共價連接至苯甲基碳原子。在彼等態樣中，藥物單元經釋放含

有胺基甲酸官能基，其經歷自發損耗CO₂以提供含游離胺藥物。連接至非四級銨化藥物單元之葡萄糖苷酸單元由WO 2007/011968進一步描述，且連接至四級銨化藥物單元之葡萄糖苷酸單元由WO2016/040684進一步描述。

【0059】除非上下文另外顯而易見，否則術語「約」涵蓋在所陳述值之標準偏差內的值。

I. 綜述

【0060】本發明部分地基於抗體-藥物結合物，包括靶向人類GPC3之抗體-藥物結合物在殺滅GPC3+表現細胞時尤其有效的發現。特定言之，發現高親和力GPC3-1人類化抗體可使用作為重鏈可變區受體序列生殖系hIGHv1-18或hIGHV1-26-2及J外顯子J_H-4，且對於輕鏈可變區受體序列生殖系hIGKv2-30及J外顯子J_K-2，並且藉由使一或多個關鍵位點處之殘基突變回至鼠類抗體或鼠類生殖系序列來構築。對於重鏈，此等關鍵位點包括位置H24、H38、H48、H66、H67、H69、H71、H73、H93及H94中之一或多者。對於輕鏈，此等關鍵位點包括位置L45、L46、L105及L106中之一或多者。GPC3-1人類化抗體在作為抗體藥物結合物(ADC)之部分進行藥物遞送時有效。當與SGD-6859特吡萊辛M藥物-連接子結合時，所得hGPC3-1ec特吡萊辛M結合物(hGPC3-1ec SGD-6859)係高活性抵抗一組HCC細胞株。hGPC3-1之後的「ec」標示指示抗體在重鏈之位置239處(藉由如Kabat中所闡述之EU索引進行編號)具有半胱胺酸取代。

【0061】hGPC3-1ec SGD-6859 ADC可靶向GPC3表現腫瘤，諸如肝細胞癌(HCC)。HCC已經分類為對化療具有通常抵抗性。此係因HCC細胞中之藥物流出轉運體之高表現所致。此等轉運體高效地排除全

身性化學治療劑。特吡萊辛M為用於藥物流出轉運體之較差受質且因此為HCC靶向ADC之有效藥物-連接子。另外，特吡萊辛M係足夠細胞可透的以具有充足旁路活性。

II. 本發明抗體

【0062】 人類化抗體為基因工程改造之抗體，其中來自非人類「供體」抗體之CDR接枝至人類「受體」抗體序列(參見，例如Queen, US 5,530,101及5,585,089；Winter, US 5,225,539；Carter, US 6,407,213；Adair, US 5,859,205；及Foote, US 6,881,557)。受體抗體序列可為例如成熟人類抗體序列、此類序列之複合物、人類抗體序列之共同序列或生殖系區序列。

【0063】 因此，人類化抗體為具有完全或基本上來自非人類供體抗體之一些或所有CDR及完全或基本上來自人類抗體序列之可變區構架序列及恆定區(若存在)的抗體。類似地，人類化重鏈具有完全或基本上來自供體抗體重鏈之至少一個、兩個且通常所有三個CDR及基本上來自人類重鏈可變區框架及恆定區序列之重鏈可變區框架序列以及重鏈恆定區(若存在)。類似地，人類化輕鏈具有完全或基本上來自供體抗體輕鏈之至少一個、兩個且通常所有三個CDR及基本上來自人類輕鏈可變區框架及恆定區序列之輕鏈可變區框架序列以及輕鏈恆定區(若存在)。除奈米抗體及雙功能抗體以外，人類化抗體通常包含人類化重鏈及人類化輕鏈。當至少60%、85%、90%、95%或100%之對應殘基(如藉由Kabat所定義)在各別CDR之間一致時，人類化或人類抗體中之CDR基本上來自非人類抗體中之對應CDR或基本上與其一致。在一些實施例中，當在各CDR中存在不超過3個保守胺基酸取代時，人類化抗體或人類抗體中之CDR基本上來自

非人類抗體中之對應CDR或基本上與其一致。當至少70%、80%、85%、90%、95%或100%之由Kabat所定義之對應殘基一致時，抗體鏈之可變區構架序列或抗體鏈之恆定區基本上分別來自人類可變區構架序列或人類恆定區。在本發明之某些人類化抗體中，抗體之重鏈可變構架區中存在至少三個且至多九個鼠類GPC3-1反突變，且抗體之輕鏈可變區中存在至多四個鼠類GPC3-1反突變。

【0064】 儘管人類化抗體通常併入來自小鼠抗體之所有六個CDR (較佳地如由Kabat所定義)，但其亦可藉由來自小鼠抗體之少於所有CDR (例如，至少3個、4個或5個CDR)進行，(例如，Pascalis等人, *J. Immunol.* 169:3076, 2002；Vajdos等人, *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002；Iwahashi等人, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999；Tamura等人, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000)。

【0065】 來自人類可變區構架殘基的某些胺基酸可基於其對CDR構形及/或結合於抗原的可能影響來選擇取代。藉由模型化、檢查特定位置處之胺基酸之特徵或經驗觀測特定胺基酸之取代或突變誘發之效應來研究此類可能的影響。

【0066】 本發明提供針對人類GPC3抗原之抗體。較佳抗體為來源於鼠類GPC3-1抗體之嵌合或人類化抗體。重鏈可變區之較佳受體序列為生殖系hIGHV1-18或hIGHV1-69-2及J外顯子JH4。對於輕鏈可變區，較佳受體序列為生殖系hIGKV2-30及J外顯子JK2。

【0067】 例示性抗GPC3抗體為包括如SEQ ID NO: 1中所闡述之重鏈CDR及如SEQ ID NO: 2中所闡述之輕鏈CDR且另外具有與SEQ ID NO: 1具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%或95%一致性之成

熟重鏈可變區及與SEQ ID NO: 2具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%或95%一致性之成熟輕鏈可變區的人類化抗體。CDR如由Kabat所定義。較佳地，維持重鏈可變域框架之以下胺基酸殘基：H24由V佔據，H38由Q佔據，H48由M佔據，H66由R佔據，H67由V佔據，H69由L佔據，H71由A佔據，H73由K佔據，H93由G佔據，H94由R佔據，且維持輕鏈之以下胺基酸殘基：L45由R佔據，L46由L佔據，L105由E佔據，L106由I佔據。

【0068】 因此，本文提供包含如SEQ ID NO: 1中所闡述之重鏈可變區及如SEQ ID NO: 2中所闡述之輕鏈可變區的人類化抗體，其限制條件為H24由V或A佔據，H38由Q、R或K佔據，H48由M或I佔據，H66由R或K佔據，H67由V或A佔據，H69由L佔據，H71由A佔據，H73由K或T佔據，H93由G或A佔據，H94由R佔據且存在輕鏈之以下胺基酸殘基：L45由R或K佔據，L46由L或R佔據，L105由E或V佔據，L106由I或M佔據。

【0069】 小鼠GPC3-1抗體之人類化形式包括四個經例示人類化重鏈成熟可變區(HA-HD)及七個經例示人類化輕鏈成熟可變區(LA-LE、LB-Q、LB-V)。此等鏈之排列包括HALA、HALB、HALC、HBLA、HBLB、HBLC、HBLD、HBLE、HBLB-Q、HBLB-V、HCLA、HCLB、HCLC、HDLA、HDLB及HDLC。在此等排列中，HBLE為較佳的。HBLE包含SEQ ID NO: 1中所闡述之重鏈及SEQ ID NO: 2中所闡述之輕鏈。然而，可使用HALA、HALB、HALC、HBLA、HBLB、HBLC、HBLD、HBLE、HBLB-Q、HBLB-V、HCLA、HCLB、HCLC、HDLA、HDLB及HDLC中之任一者代替HBLE。

【0070】 在一些態樣中，人類化GPC3-1抗體對於人類GPC3之表觀

解離常數(kd)較佳在0.1 nM至10 nM之範圍內，甚至更佳在0.1 nM至5 nM之範圍內，甚至較佳在1 nM至3 nM或2 nM至約3 nM之範圍內。在一些態樣中，本發明抗體具有在鼠類GPC3-1抗體對於人類GPC3之表觀解離常數之0.1至1.5倍，或甚至0.5至2倍之範圍內的表觀解離常數。在一些態樣中，抗體對於人類化GPC3-1之表觀解離常數(kd)為約2.7。

A. 恆定區之選擇

【0071】 人類化GPC3-1抗體之重鏈及輕鏈可變區可連接至人類恆定區的至少部分。恆定區之選擇可部分視抗體依賴性細胞介導之細胞毒性、抗體依賴性細胞噬菌作用及/或補體依賴性細胞毒性是否為所要的而定。舉例而言，人類同位素IgG1及IgG3具有較強補體依賴性細胞毒性，人類同型IgG2具有較弱補體依賴性細胞毒性且人類IgG4缺乏補體依賴性細胞毒性。人類IgG1及IgG3亦比人類IgG2及IgG4誘發更強的細胞介導之效應子功能。輕鏈恆定區可為 λ 或 κ 。抗體可表現為含有兩個輕鏈及兩個重鏈之四聚體，表現為單獨重鏈、輕鏈，表現為Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv，或表現為單鏈抗體，其中重鏈及輕鏈下標域經由間隔子連結。

【0072】 人類恆定區展示在不同個體之間的同種異型變化及異種異型變化，亦即，恆定區在不同個體中在一個或多個多態位置處可不同。異種異型不同於同種異型係因為識別同種異型之血清結合於一或多個其他同種型之非多態區。

【0073】 輕鏈及/或重鏈之胺基或羧基端處之一個或若干個胺基酸(諸如重鏈之C端離胺酸)可在一定比例或所有分子中遺失或衍生。取代可在恆定區中進行以減小或增加效應子功能，諸如補體介導之細胞毒性或ADCC (參見，例如Winter等人，美國專利第5,624,821號；Tso等人，美

國專利第5,834,597號；及Lazar等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006), 或以延長在人類中之半衰期(參見, 例如Hinton等人, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004)。

【0074】恆定區可經修飾以允許藥物-連接物之位點特異性結合。此類技術包括使用天然存在或經工程改造之半胱胺酸殘基、二硫橋鍵、聚組胺酸序列、糖基工程改造標籤及轉麩醯胺酸酶識別序列。使用細菌轉麩醯胺酸酶之位點特異性結合的例示性取代為N297S或N297Q。使用經工程改造之半胱胺酸之位點特異性結合的例示性取代為S239C (US 20100158909；Fc區之編號係根據EU索引進行)。在一些態樣中，額外半胱胺酸殘基之存在允許鏈間雙硫鍵形成。此類鏈間雙硫鍵形成可造成位阻，由此減小Fc區-FcγR結合相互作用之親和力。引入IgG恆定區之Fc區中或接近IgG恆定區之Fc區的半胱胺酸殘基亦可充當結合於治療劑之位點(亦即，使用硫醇特異性試劑，諸如藥物之順丁烯二醯亞胺衍生物偶合細胞毒性藥物)。治療劑之存在造成位阻，由此進一步減小Fc區-FcγR結合相互作用之親和力。抗體片段亦可經修飾以用於藥物-連接物之位點特異性結合，參見例如 Kim等人, *Mol Cancer Ther* 2008;7(8)。

B. 重組抗體之表現

【0075】人類化或嵌合GPC3-1抗體可藉由重組表現產生。重組性聚核苷酸構築體通常包括可操作地連接至抗體鏈之編碼序列的表現控制序列，包括天然締合或異源啟動子區。較佳地，表現控制序列為能夠轉化或轉染真核宿主細胞的載體中之真核啟動子系統。一旦載體併入適當宿主中，宿主在適合於核苷酸序列之高水準表現及交叉反應抗體之收集及純化之條件下維持。

【0076】 哺乳動物細胞為用於表現編碼免疫球蛋白或其片段之核苷酸區段的較佳宿主。參見Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)。能夠分泌完整異源蛋白質之若干適合宿主細胞株已在此項技術中研發，且包括CHO細胞株(例如，DG44)、各種COS細胞株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞及非抗體產生骨髓瘤(包括Sp2/0及NS0)。較佳地，細胞為非人類的。此等細胞之表現載體可包括表現控制序列，諸如複製起點、啟動子、強化子(Queen等人，*Immunol. Rev.* 89:49 (1986))，及必需的加工資訊位點，諸如核糖體結合位點、RNA剪接位點、聚腺苷酸化位點，以及轉錄終止子序列。較佳的表現控制序列為來源於內源基因、巨細胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳突狀瘤病毒等之啟動子。參見 Co等人, *J. Immunol.* 148:1149 (1992)。

【0077】 一旦表現，抗體可根據此項技術之標準程序純化，包括HPLC純化、管柱層析、凝膠電泳及其類似者(通常參見，Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982))。

III. 核酸

【0078】 本發明進一步提供編碼本文所描述之人類化重鏈及輕鏈中之任一者的核酸。通常，核酸亦編碼稠合至成熟重鏈及輕鏈可變區之信號肽。核酸上之編碼序列可與調節序列之可操作的連接以保證諸如啟動子、強化子、核糖體結合位點、轉錄終止信號及其類似者之編碼序列之表現。編碼重鏈及輕鏈之核酸可以分離形式出現或可選殖至一或多個載體中。核酸可藉由例如重疊寡核苷酸之固態合成或PCR來合成。編碼重鏈及輕鏈之核酸可接合作為一個連續核酸，例如在表現載體內，或可經分離，例如各自選殖至其自身表現載體中。

【0079】 在一個實施例中，本發明提供編碼抗體重鏈可變區之經分離聚核苷酸，該抗體重鏈可變區包含如HA、HB、HC或HD中所闡述之胺基酸序列。舉例而言，經分離聚核苷酸可編碼包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的抗體重鏈可變區。此經分離聚核苷酸可進一步編碼人類IgG重鏈恆定區。IgG恆定區之同種型為例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一個實施例中，IgG恆定區之同種型為IgG1。在另一實施例中，經編碼IgG1恆定區具有包含殘基239處之取代的胺基酸序列，根據如Kabat系統中所闡述之EU索引，亦即S239C。本發明亦提供包含編碼抗體重鏈可變區之經分離聚核苷酸之表現載體及另外包含彼表現載體之宿主細胞，該抗體重鏈可變區包含如HA、HB、HC或HD (例如，SEQ ID NO: 1或其變體)中所闡述之胺基酸序列。在一些實施例中，宿主細胞為哺乳動物宿主細胞，例如CHO細胞。

【0080】 在另一實施例中，本發明提供編碼抗體輕鏈可變區之經分離聚核苷酸，該抗體輕鏈可變區包含如LA、LB、LC、LD、LE、LB-Q或LB-V中所闡述之胺基酸序列。舉例而言，經分離聚核苷酸編碼包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的抗體輕鏈可變區。此經分離聚核苷酸可進一步編碼人類IgG輕鏈恆定區。IgG輕鏈恆定區之同種型為例如 κ 恆定區。本發明亦提供包含編碼抗體輕鏈可變區之經分離聚核苷酸之表現載體及另外包含彼表現載體之宿主細胞，該抗體輕鏈可變區包含如LA、LB、LC、LD、LE、LB-Q或LB-V (例如，SEQ ID NO: 2或其變體)中所闡述之胺基酸序列。在一些實施例中，宿主細胞為哺乳動物宿主細胞，例如CHO細胞。

【0081】 在另一實施例中，本發明提供一或多個經分離聚核苷酸，

其編碼包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之抗體重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之抗體輕鏈可變區，重鏈可變域及輕鏈可變域形成特異性結合於人類GPC3之抗體或抗原結合片段。本發明亦提供一種表現載體，其包含編碼包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之抗體重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之抗體輕鏈可變區的一或多個經分離聚核苷酸。亦提供包含一或多個表現載體之宿主細胞。宿主細胞較佳為哺乳動物細胞，例如CHO細胞。

【0082】 在另一實施例中，本發明提供第一及第二載體，其包含編碼包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之抗體重鏈可變區的聚核苷酸及編碼包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之抗體輕鏈可變區的聚核苷酸，重鏈可變域及輕鏈可變域形成特異性結合於人類GPC3之抗體或抗原結合片段。提供包含載體之宿主細胞，較佳地哺乳動物寄主細胞，諸如CHO細胞。

IV. 抗體-藥物結合物

【0083】 抗GPC3抗體可與細胞毒性部分或細胞生長抑制部分結合以形成抗體-藥物結合物(ADC)。用於與抗體結合之尤其適合部分為細胞毒性劑(例如，化學治療劑)、前藥轉換酶、放射性同位素或化合物，或毒素(此等部分統稱為治療劑)。舉例而言，抗GPC3抗體可與諸如化學治療劑之細胞毒性劑或毒素(例如，細胞生長抑制或殺細胞劑，例如相思子毒素、蓖麻毒素A、綠膿桿菌外毒素或白喉毒素)結合。適用類別之細胞毒性劑之實例包括例如DNA小溝結合劑(DNA minor groove binder)、DNA烷基化劑及微管妨礙劑。例示性細胞毒性劑包括例如特吡萊辛、奧瑞他汀(auristatins)、喜樹鹼(camptothecins)、卡奇黴素(calicheamicins)、倍癌黴素(duocarmycins)、依託泊苷(etoposides)、類美登素(maytansinoids)

(例如，DM1、DM2、DM3、DM4)、紫杉烷、苯并二氮呋(例如，吡咯并[1,4]苯并二氮呋、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉并苯并二氮呋)以及長春花屬生物鹼(vinca alkaloids)。例示性抗體-藥物結合物包括基於特吡萊辛之抗體-藥物結合物，其意謂藥物組分為特吡萊辛藥物；基於奧瑞他汀之抗體-藥物結合物，其意謂藥物組分為奧瑞他汀藥物；類美登素抗體-藥物結合物，其意謂藥物組分為類美登素藥物；以及苯并二氮呋抗體藥物結合物，其意謂藥物組分為苯并二氮呋(例如，吡咯并[1,4]苯并二氮呋、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉并苯并二氮呋)。

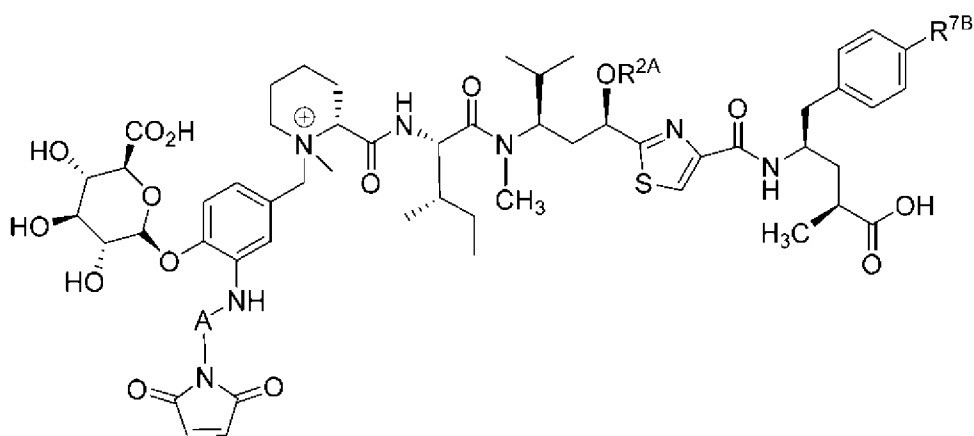
【0084】 用於將治療劑與抗體結合之技術為熟知的。(參見例如，Alley等人, *Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14:1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14(3):154-169。)除非治療劑裂解抗體(例如，藉由水解、藉由蛋白水解降解或藉由裂解劑)，否則治療劑可以減小其活性之方式結合。在一些態樣中，治療劑藉由可裂解連接子連接至抗體，該可裂解連接子對GPC3-表現癌細胞之胞內環境中的裂解敏感但對胞外環境基本上不敏感，使得結合物在其藉由GPC3表現癌細胞內化(例如，在內體中或例如藉助於pH靈敏度或蛋白酶靈敏度，在溶酶體環境或小窩環境中(caveolar environment))時自抗體裂解。在一些態樣中，治療劑亦可藉由不可裂解連接子連接至抗體。

【0085】 本發明人已出乎意料地發現，包含四級銨化特吡萊辛藥物-連接子之GPC3靶向ADC有效用於治療GPC3-表現病症，尤其在連接子單元包含葡萄糖苷酸單元時。

【0086】 基於葡萄糖苷酸之連接子為蛋白酶可裂解連接子之親水性替代物，諸如纈胺酸-瓜胺酸及纈胺酸-丙胺酸，且利用細胞內 β 葡萄糖苷

酸酶以引發藥物釋放。同樣，位置239或239/295或294處之半胱胺酸變體(及雙半胱胺酸變體)尤其適用於與疏水性藥物(諸如特吡萊辛M)結合，此係因為聚糖殘基附近之結合位點用於掩蓋疏水性藥物。特吡萊辛及連接至特吡萊辛之葡萄糖苷酸連接子更完整地描述於WO2016040684中。在一實施例中，GPC靶向ADC在內化後將未修飾特吡萊辛M釋放至細胞中。

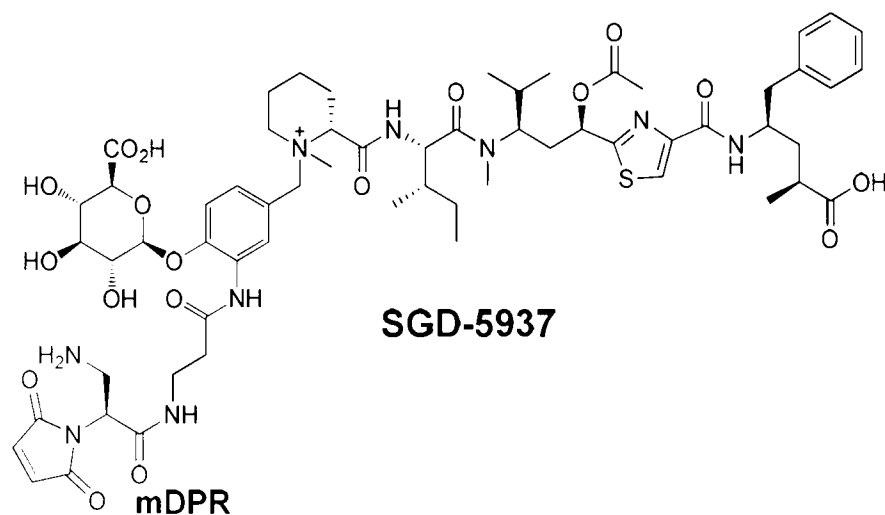
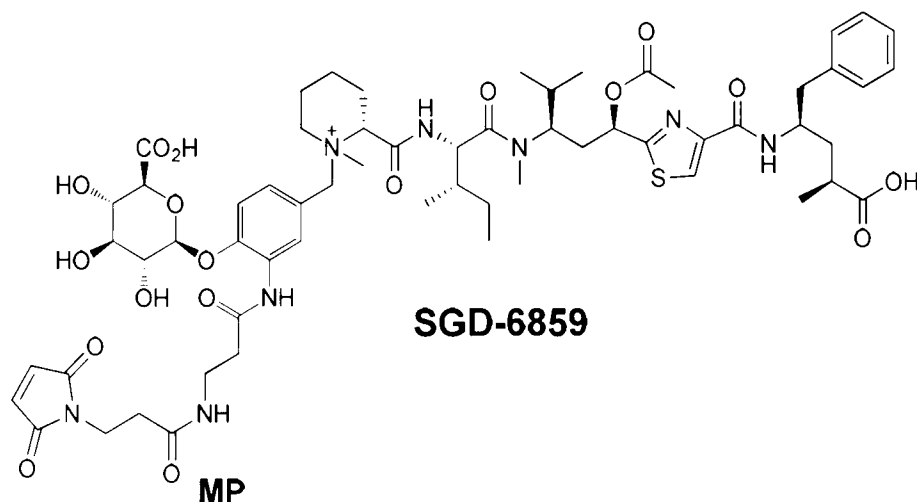
【0087】 因此，用於本發明的具有四級銨化特吡萊辛藥物單元之較佳的基於葡萄糖苷酸之藥物連接子化合物具有以下結構：



呈鹽形式，特定言之醫藥學上可接受之鹽，其中A為延伸子單元； R^{2A} 為 $-C(=O)R^{2B}$ ，其中 R^{2B} 為甲基、乙基、丙基、異丙基、2-甲基-丙-1-基、2,2-二甲基-丙-1-基或乙烯基，或 R^{2A} 為甲基、乙基、丙基、異丙基、丙-2-烯-1-基或2-甲基-丙-2-烯-1-基且 R^{7B} 為-H或-OH。

【0088】 在更佳實施例中，四級銨化特吡萊辛藥物單元係關於特吡萊辛M，其亦稱為 $(\alpha S, \gamma R)$ - γ -[[[2-[(1R,3R)-1-(乙醯氧基)-4-甲基-3-[甲基[(2S,3S)-3-甲基-2-[[[(2R)-1-甲基-2-哌啶基]羰基]-胺基]-1-側氧基戊基]胺基]戊基]-4-噻唑基]羰基]胺基]- α -甲基-苯戊酸且具有CAS編號936691-46-2。因此，更佳的具有四級銨化特吡萊辛藥物單元的基於葡萄糖苷酸之藥物連接子化合物具有上述結構，其中 R^{2A} 為 $-C(=O)CH_3$ 且 R^{7B} 為氫。

【0089】 因此，用於本發明之尤佳的基於葡萄糖苷酸之藥物連接子化合物如下：

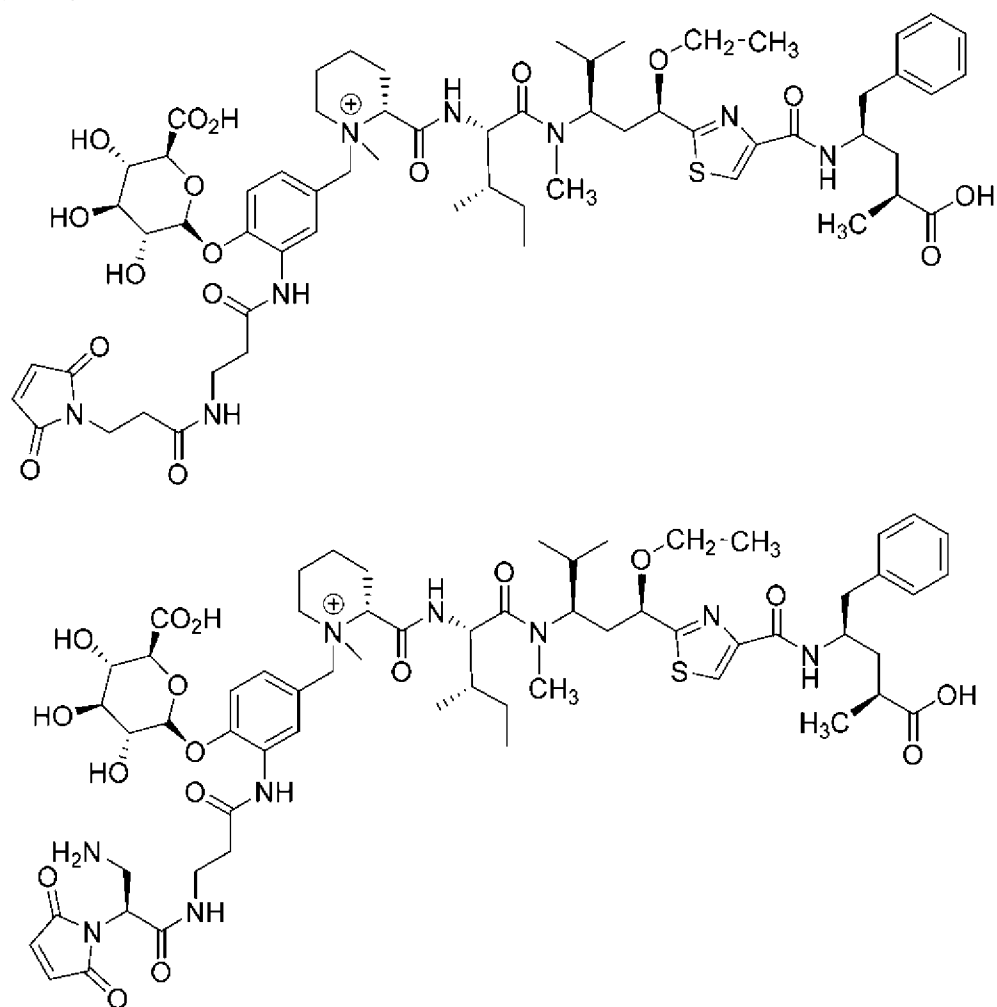


呈鹽形式，特定言之醫藥學上可接受之鹽，其中所指示mDPR部分之胺氮原子較佳經質子化或由適合之酸不穩定保護基(諸如BOC)保護。其他尤佳的基於葡萄糖苷酸之藥物連接子化合物用乙基或正丙基取代基置換特吡瓦林(tubuvaline) N-甲基取代基。

【0090】 其他更佳實施例，四級銨化特吡萊辛藥物單元係關於特吡萊辛M，其中特吡瓦林部分之O-連接乙酸鹽取代基經O-連接乙基醚取代基置換(亦即， R^{2A} 為乙基)。

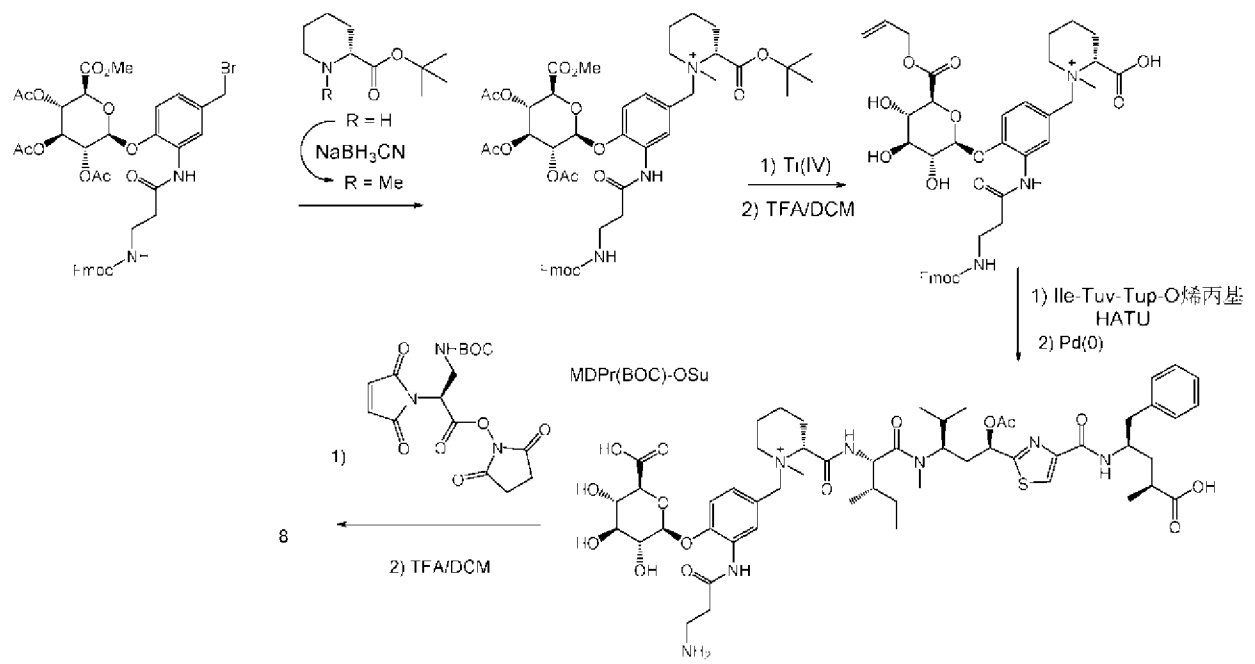
【0091】 因此，用於本發明之其他尤佳的基於葡萄糖苷酸之藥物連

接子化合物如下：



呈鹽形式，特定言之醫藥學上可接受之鹽。

【0092】 基於葡萄糖苷酸之特吡萊辛藥物連接子化合物之製備詳述於WO20160404684中，且特定而言以引用之方式併入本文中。彼等製備由以下反應流程例示：

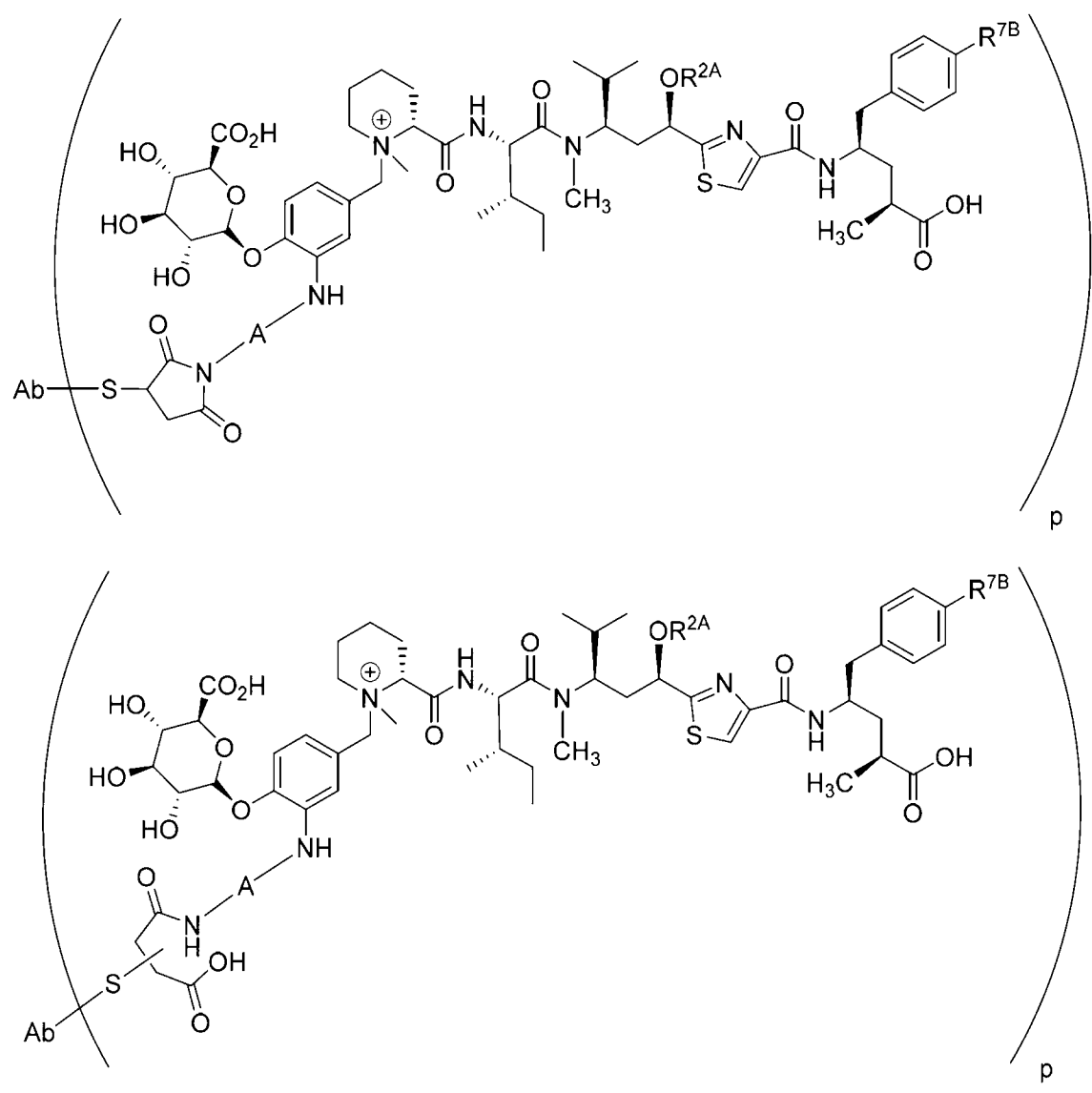


【0093】 mDPR(Boc)-OH轉化為其活化酯mDPR(BOC)-OSu及mDPR(BOC)-OPFF之製備係描述於Nature Biotech, 2014, 32, 1059-1062中，其之程序特定而言以引用之方式併入本文中，且溴化以用於特吡萊辛M之四級銨化的葡萄糖苷酸中間物之製備由Molecular Cancer Therapeutics, 2016, 15, 938-945來描述，其之程序特定而言以引用之方式併入本文中。

【0094】 本發明之抗體藥物結合物具有基於葡萄糖苷酸之藥物連接子化合物之以上實施例中之任一者之結構，其中抗GPC3抗體之位置239或239/295或294處之半胱胺酸變體殘基經由邁克爾添加(Michael addition)與化合物之順丁烯二醯亞胺部分縮合，由此將該部分轉換為丁二醯亞胺部分，其接著可在其羰基碳中之一者處經歷水解。

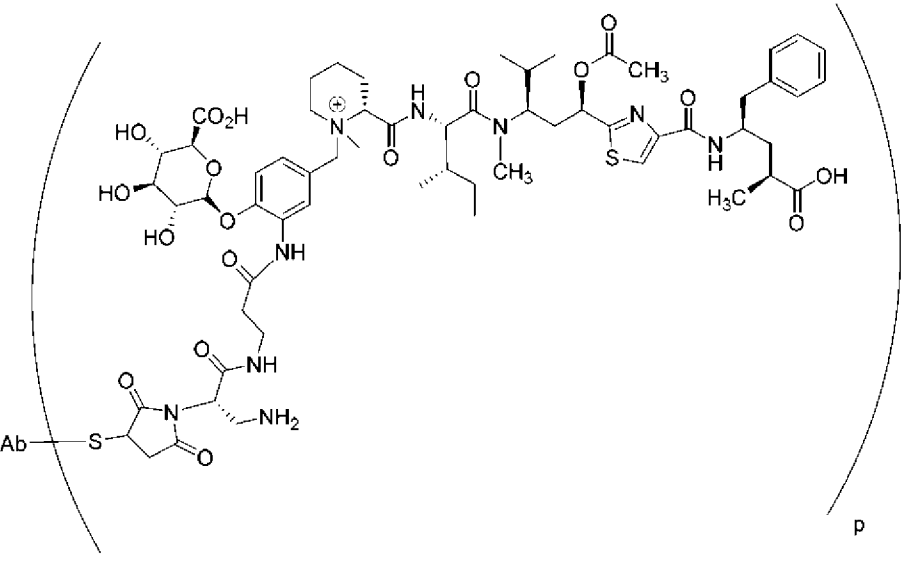
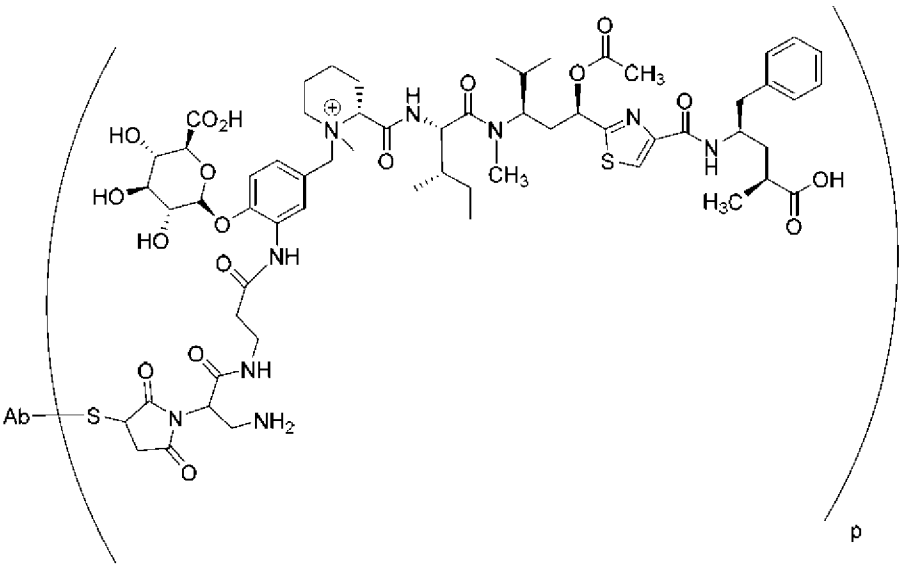
【0095】 特吡萊辛M及其類似物之代表性抗體藥物結合物如下例示，其中特吡瓦林殘基之乙酸酯基團經醚或另一酯基團置換，該醚或另一酯基團經由氮原子之四級銨化將葡萄糖苷酸連接子連接至特吡萊辛Mep殘基之三級胺氮，且其可由諸如上文所描述之彼等的藥物連接子化合物來製

備：

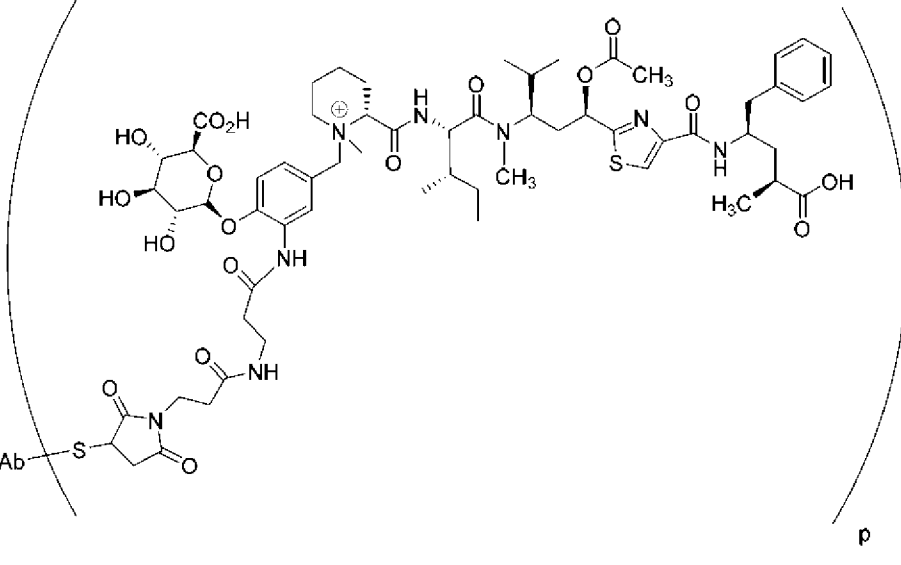


視情況，呈醫藥學上可接受之鹽形式，其中下標p表示藥物負載且通常範圍介於1至4，且在一些態樣中為2或4，Ab為抗GPC3抗體且S為來自半胱胺酸239或半胱胺酸295之硫原子。抗體或融合蛋白質亦可經由佔據位置239及295之半胱胺酸與可偵測標識物(諸如酶、發色團或螢光標記物)結合。後者ADC結構藉由水解其羰基基團中之一者處之丁二醯亞胺部分而與前者相關，且在一些實施例中在延伸子單元A包含基本單元時發生。

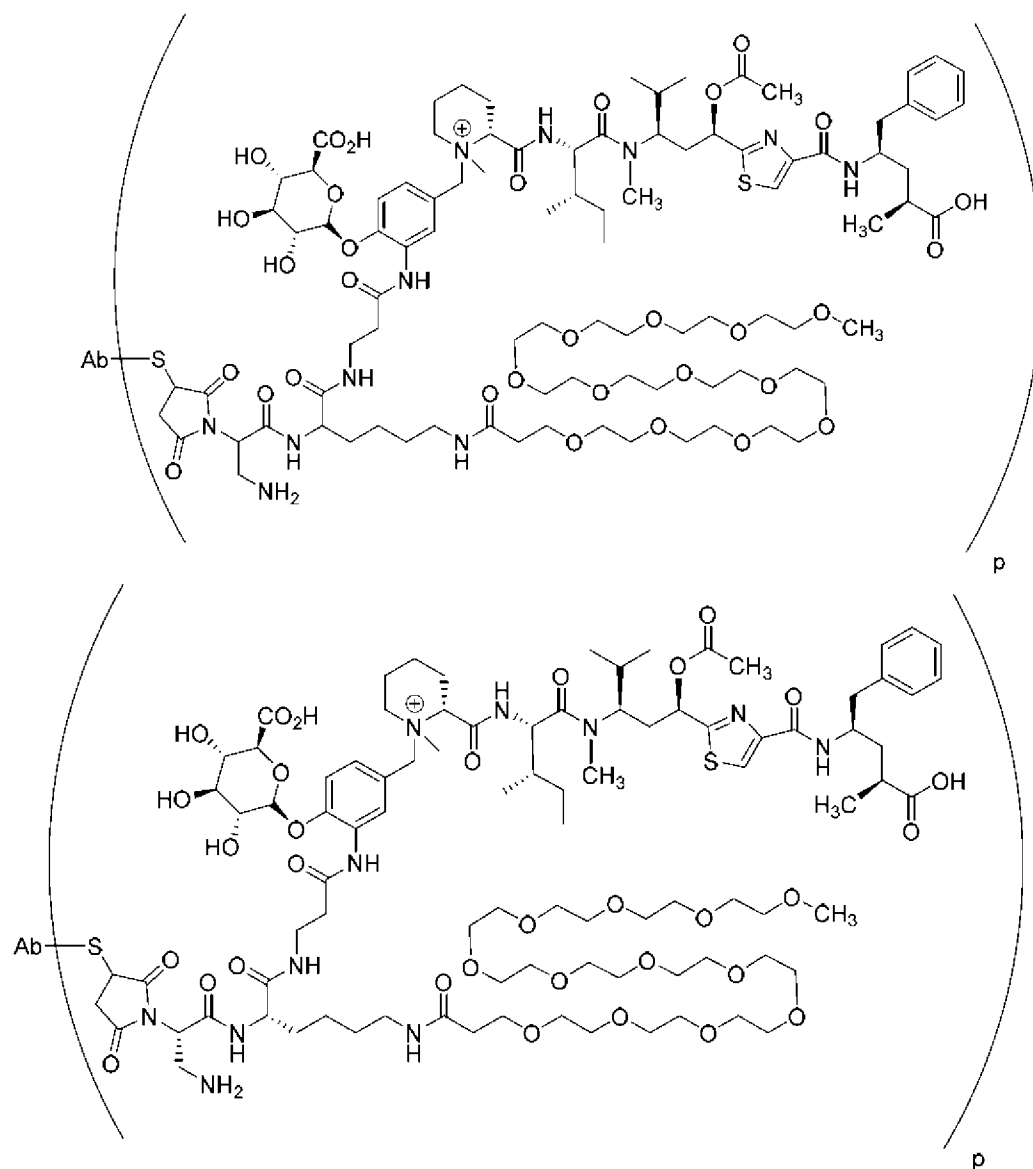
【0096】 其他例示性GPC3靶向抗體藥物結合物展示如下：



SGD-5937 ADC



SGD-6859 ADC



SGD-6183 ADC

視情況，呈醫藥學上可接受之鹽形式，其中下標p表示藥物負載且通常範圍介於1至4，且在一些態樣中為2或4，Ab為抗GPC3抗體且S為來自半胱胺酸239或半胱胺酸295之硫原子。

【0097】 抗體既可與藥物或標記物結合，亦可經由連接至抑制抗體結合之抑制性或遮蔽性結構域的可裂解連接子連接(參見例如 WO2003/068934、WO2004/009638、WO 2009/025846、WO2101/081173及WO2014103973)。連接子可經設計以藉由對某些組織或病理具有特異性之酶來裂解，因此使得抗體能夠在所需位置中較佳地活

化。遮蔽部分可藉由直接結合至抗體之結合位點而起作用或可經由位阻間接地起作用。

藥物負載-「p」

【0098】 參考上文展示之GPC3靶向抗體-藥物結合物，下標p表示抗體分子之藥物負載(連接至抗體分子之藥物之分子數目)且為整數值。在包含抗體-藥物結合物分子群體之組合物中，平均藥物負載(例如，群體中每抗體之藥物-連接物分子之平均數目)為重要品質屬性，因為其測定可遞送至靶細胞之藥物的量。平均藥物負載可為整數或非整數值但通常為非整數值。最佳平均藥物負載將視藥物或藥物-連接物組合之屬性而變化。

【0099】 在一些態樣中，抗體-藥物結合物組合物之異質性將視用於將藥物-連接子分子結合於抗體分子的結合技術而定。舉例而言，在一些態樣中，用於將藥物-連接子分子結合於抗體分子的結合技術將產生相對於藥物-連接子分子在抗體上之分佈及/或相對於藥物-連接子在抗體分子上之數目異質的抗體-藥物結合物組合物(例如，當使用非位點特異性技術經由鏈間二硫化物結合時)。在其他態樣中，用於結合藥物-連接子分子的結合技術將產生相對於藥物-連接子分子在配位體分子上之分佈及/或相對於藥物-連接子分子在抗體分子上之數目基本上均質的抗體-藥物結合物組合物(例如，當使用位點特異性結合技術時)。在位點特異性及非位點特異性方法兩者之情況下，通常將亦存在較小百分比之未結合抗體分子。未結合抗體分子之百分比包括於平均藥物負載值中。

【0100】 在本發明之較佳態樣中，當參考包含抗體-藥物結合物化合物群體之組合物時，平均藥物負載為約2至約14，較佳約2至約10。對於本文中例示之特吡萊辛M抗體藥物結合物，尤佳平均藥物負載為約2。在

一些態樣中，抗體-藥物結合物化合物群體中之個別抗體分子之實際藥物負載為1至4，1至3或1至2，其中主要藥物負載為2。在較佳態樣中，經由位點特異性結合技術(例如，引入抗體之經工程改造之半胱胺酸)實現約2之平均藥物負載。

【0101】 在本發明之一些其他態樣中，當參考包含抗體-藥物結合物化合物群體之組合物時，平均藥物負載為約3或約4，且抗體-藥物結合物化合物群體中之個別抗體分子之實際藥物負載為1至8。

【0102】 在一些態樣中，抗體-藥物結合物化合物群體中之個別抗體分子之實際藥物負載為1至10 (或6至10或6至8)。舉例而言，除鏈間二硫化物之外，若將藥物-連接子與所引入半胱胺酸殘基(諸如根據EU索引，在位置239處引入之半胱胺酸殘基)結合，則可實現更高藥物負載。

V. 治療性應用

【0103】 本文所描述之GPC3靶向抗體-藥物結合物可用於治療GPC3表現病症，諸如GPC3表現癌症。通常，此類癌症展示以蛋白(例如，藉由免疫分析)或RNA水準量測的可偵測水準之GPC3。一些此類癌症相對於相同類型之非癌性組織(較佳地來自同一患者)展示升高的GPC3水準。視情況，在執行治療之前量測癌症中之GPC3水準。

【0104】 與GPC3表現相關聯的癌症之實例包括肝細胞癌(HCC)及肺癌瘤(GPC3以大約70% HCC及20%肺癌瘤表現)。其他癌症包括威爾姆斯腫瘤(Wilms tumor) (腎母細胞瘤)、卵巢透明細胞癌瘤、結腸直腸癌及肉瘤。

【0105】 本發明之方法包括治療患有表現GPC3之癌症的患者，該方法包含向該患者投與本發明之抗體-藥物結合物。癌症可為任何GPC3表

現癌症，包括例如HCC、肺癌、威爾姆斯腫瘤、卵巢透明細胞癌、結腸直腸癌或肉瘤。

【0106】 在增加蛋白質之表現增加了治療劑自癌細胞之流出之後，一些癌細胞對治療劑顯現抗性。此類蛋白質包括P-醣蛋白、多藥耐藥相關蛋白質、肺耐藥相關蛋白質及乳癌耐藥蛋白質。癌細胞抗藥性之偵測可由熟習此項技術者執行。偵測流出蛋白質之抗體或分析可購自例如Promega、Millipore、Abcam及Sigma-Aldrich。待由本發明方法治療之癌症可為表現GPC3之多耐藥性癌症。在一些態樣中，癌症將為多耐藥性GPC3+HCC。

【0107】 GPC3定向抗體-藥物結合物係以意謂延遲發作、減低嚴重度、抑制進一步惡化及/或改善癌症之至少一個標誌或症狀的劑量、投與途徑及投與頻率的有效療程投與。

【0108】 GPC3定向結合物之例示性劑量包括約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至約10 mg/kg、1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至約5 mg/kg、1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至約5 mg/kg、約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至約1.0 mg/kg、約10 $\mu\text{g/kg}$ 至約3 mg/kg、約10 $\mu\text{g/kg}$ 至約2 mg/kg、約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至1.0 mg/kg或約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至500.0 $\mu\text{g/kg}$ 或約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至80.0、100.0或200.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

【0109】 GPC3定向特吡萊辛M結合物之例示性劑量通常為約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至1.0 mg/kg或約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至500.0 $\mu\text{g/kg}$ 、或約1.0 $\mu\text{g/kg}$ 至80.0、100.0或200.0 $\mu\text{g/kg}$ ，但涵蓋替代劑量。

【0110】 投與可藉由多種投與途徑。在某些實施例中，結合物經腸胃外，諸如靜脈內、肌肉內或皮下投與。對於治療癌症之ADC投與，可藉由靜脈內或皮下投與遞送至全身循環中。在一特定實施例中，投與係經

由靜脈內遞送。靜脈內投與可例如藉由在諸如30-90分鐘之時段內輸液或藉由單次快速注射。在一些態樣中，投與將經由在周邊插入中心導管中緩慢IV推注(亦即，在30-60秒內)。

【0111】 投與頻率視許多不同因素而定，包括投與手段、靶點、患者之生理狀態，患者係人類抑或動物，以及所投與之其他藥劑。回應於患者之病況或所治療癌症之進展之變化，頻率可為每天、每週、每月、每季或以不規律時間間隔。靜脈內投與之例示性頻率在連續治療療程內為一週兩次與每季度一次之間，但更頻繁或較不頻繁的給藥亦為可能的。靜脈內投與之其他例示性頻率在連續治療療程內為每三週一次或在每週一次或每月一次之間，但更頻繁或較不頻繁的給藥亦為可能的。對於皮下投與，例示性給藥頻率為每天一次至每月一次，但是更頻繁或較不頻繁的給藥亦為可能的。

【0112】 非經腸投與之醫藥組合物較佳係無菌的且基本上等張的且在GMP條件下製造。醫藥組合物可以單位劑型(亦即，用於單一投與之劑量)提供。醫藥組合物可使用一或多種生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑來調配。調配視所選投與途徑而定。對於注射，結合物可經調配呈水溶液形式，較佳地呈生理相容緩衝劑形式，諸如漢克氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)，或生理鹽水或乙酸鹽緩衝液(以減小注射部位處之不適)。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，抗體可以呈凍乾形式，以供在使用之前用適合媒劑(例如無菌無熱原質水)復原。液體調配物中之結合物之濃度可廣泛變化。在一些態樣中，ADC以約0.5 mg/ml至約30 mg/ml、約0.5 mg/ml至約10 mg/ml、約1 mg/ml至約10 mg/ml、約2 mg/ml至約10 mg/ml、或約

2 mg/ml至約5 mg/ml之濃度存在。

【0113】 用本發明之結合物治療可與化學療法、放射、幹細胞治療、手術及對所治療病症有效之其他治療(包括對所治療之特定病症的標準照護療法)組合。因此，本發明涵蓋治療本文所描述疾病及病症之方法作為單一療法或與例如標準照護療法或用於治療此類疾病及/或病症之研究性藥物的組合療法。用於治療癌症之方法包括向有需要之患者投與有效量的本發明之GPC3定向抗體-藥物結合物以及額外抗癌劑或其他藥劑以治療癌症。

【0114】 用於組合療法之一些藥劑包括：索拉非尼(sorafenib)、瑞戈非尼(regorafenib)、納武單抗(nivolumab)、小紅莓(doxorubicin)、FEMOX (吉西他濱(gemcitabine)及奧沙利鉑(oxaliplatin))、多西濱(doxorubin)、順鉑(cisplatin)、卡鉑(carboplatin)、多西他賽(docetaxel)、吉西他濱、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、長春瑞賓(vinorelbine)及絲裂黴素C (mitomycin C)。在一實施例中，索拉非尼、瑞戈非尼、納武單抗、小紅莓、FEMOX (吉西他濱及奧沙利鉑)、多西濱、順鉑、卡鉑、多西他賽、吉西他濱、太平洋紫杉醇、培美曲塞、長春瑞賓及絲裂黴素C中之一或多者與本發明之GPC3定向ADC以組合療法投與。

【0115】 在另一實施例中，索拉非尼、瑞戈非尼、納武單抗、小紅莓、FEMOX (吉西他濱及奧沙利鉑)、多西濱、順鉑、卡鉑、多西他賽、吉西他濱、太平洋紫杉醇、培美曲塞、長春瑞賓及絲裂黴素C中之一或多者與本發明之人類化GPC3-1 ADC以組合療法投與。在另一實施例中，索拉非尼、瑞戈非尼、納武單抗、小紅莓、FEMOX (吉西他濱及奧沙利

鉑)、多西濱、順鉑、卡鉑、多西他賽、吉西他濱、太平洋紫杉醇、培美曲塞、長春瑞賓及絲裂黴素C中之一或多者與本發明之hGPC3-1ec-SGD-6859以組合療法投與。

【0116】 除非另外特別指示，否則本發明之任何特徵、步驟、元件、實施例或態樣可與任何其他者組合使用。儘管出於清楚及理解之目的已藉助於說明及實例相當詳細地描述本發明，但顯而易見可在所附申請專利範圍之範疇內實踐某些改變及修改。

實例

【0117】 描述於以下實例中之細胞株係維持在根據由美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)或德國微生物菌種保藏中心(DMSZ)或另外已知指定之條件之培養物中。

方法

抗體選擇

【0118】 主要抗體GPC3-1係藉由用涵蓋胺基酸殘基375-563之重組GPC3免疫小鼠來鑑別(參見圖1)。自GPC3抗體產生小鼠之脾及淋巴結採集的淋巴球稠合至骨髓瘤細胞。所稠合細胞隔夜回收於融合瘤生長介質中。回收後，細胞經短暫離心且接著接種於半固體介質中。培育融合瘤且選取IgG產生融合瘤純系。篩選來自此融合瘤操作之抗體作為GPC3表現細胞株上之ADC。來自若干抗原決定基類別之抗體展示ADC活性。主要抗體係基於其優異ADC細胞毒性以及具有抗原決定基來選擇，該抗原決定基為靠近可引起分離之蛋白水解裂解位點的膜。

競爭結合分析

【0119】 將十萬GPC3陽性細胞轉移至96孔培養盤且在具有3-5 nM

AlexaFluor-488標記之mGPC3-1及增加濃度(10 pM至2 uM)之未標記人類化或鼠類GPC3-1 mAb的冰上培育1小時。細胞經離心，用PBS洗滌3次，且再懸浮於125 μ L之PBS+2% FBS溶液中。使用流式細胞儀分析螢光，且飽和螢光信號之百分比係用於測定經標記GPC3-1 mAb結合百分比。藉由將數據擬合成具有可變斜率之S形劑量-反應曲線來外推EC50。

飽和度結合分析

【0120】 將十萬個GPC3陽性細胞轉移至96孔培養盤。AlexaFluor-488標記之GPC3mAb以範圍介於10 pM至5 uM之濃度添加且將細胞在冰上培育30分鐘。細胞藉由離心造粒，用PBS+1% BSA溶液洗滌3次，且再懸浮於125 μ L之PBS + 2% FBS中。使用流式細胞儀分析螢光，飽和螢光信號之百分比係用於測定結合百分比且用於隨後計算表觀Kd。

藉由表面電漿子共振量測親和力

【0121】 人類GPC3 (hGPC3 GP3-H5258)係購自AcroBiosystems且使用Pierce NHS-LC-LC生物素以1.5:1生物素/蛋白質率之莫耳比經生物素標記。以高精度抗生蛋白鏈菌素(SAX)生物感測器及GPC3作為探針，使用hGPC3-1ec作為分析物，對八位位組紅色384系統(ForteBio)執行生物層干擾量測法(BLI)。對於600sec之締合及1800sec解離，與經結合hGPC3結合之二價經量測為 $2.04\text{E}-10\text{M}$ ($k_{\text{diss}} 2.3\text{E}-5/k_{\text{on}} 1.134\text{E}5$)，其中 $X^2=0.59$ 及 $R^2=0.9998$ ，且在400、160、64、25.6、10.2、4.1及1.64 nM處之八個濃度點上以1:1之比率擬合。hGPC3-1ec (HBLE)之結合親和力(K_D)經測定為14 nM (圖6)。

人類化抗體之設計

【0122】 人類化抗體來源於鼠類GPC3-1抗體。四個人類化重鏈(HA-HD)及七個人類化輕鏈(LA-LE)在不同位置處併入回復突變製得。在一些情況下，回復突變將匹配鼠類生殖系，但在其他情況下其將不匹配(如在體細胞突變之情況下)。將人類化重鏈及輕鏈配對。序列比對參見圖2至圖5及表1-5。在用HA、HB、HC、HD及LA、LB及LC變體進行初始人類化後，產生額外L-鏈變體以解決CDR-L1 (SEQ ID NO: 13)中發現之潛在的去醯胺基元(「NG」)(表5)。

表1：hGPC3-1可變重(vH)鏈變體中之人類化突變

vH變體	HV外顯子受體序列	供體構架殘基	受體CDR殘基
hvHA	HV1-18/HJ4	H48、H67、H69、H71	無
hvHB	HV1-69-2/HJ4	H69、H73、H93、H94	無
hvHC	HV1-69-2/HJ4	H24、H48、H67、H69、 H73、H93、H94	無
hvHD	HV1-69-2/HJ4	H24、H38、H48、H66、 H67、H69、H73、H93、 H94	無

表2：hGPC3-1可變輕(vL)鏈變體中之人類化突變

vL變體	KV外顯子受體序列	供體構架殘基	受體CDR殘基
hvLA	KV2-30/KJ2	無	無
hvLB	KV2-30/KJ2	L46	無
hvLB-Q	KV2-30/KJ2	L46	無
hvLB-V	KV2-30/KJ2	L46	無
hvLC	KV2-30/KJ2	L45、L46、L105、L106	無
hvLD	KV2-30/KJ2	L46	L28
hvLE	KV2-30/KJ2	L46	無

表3：hGPC3-1重鏈變體中之特異性構架突變

變體	24	38	48	66	67	69	71	73	93	94	人類%
hvHA	A	R	I*	R	A*	L*	A*	T	A	R	83.7
hvHB	V	Q	M	R	V	L*	A	K*	G*	R*	88.5
hvHC	A*	Q	I*	R	A*	L*	A	K*	G*	R*	85.4
hvHD	A*	K*	I*	K*	A*	L*	A	K*	G*	R*	83.3

* 鼠類殘基

表4：hGPC3-1輕鏈變體中之特異性構架突變

變體	45	46	105	106	人類%
h _v LA	R	R	E	I	92.0
h _v LB	R	L*	E	I	91.0
h _v LB-Q	R	L*	E	I	90.0
h _v LB-V	R	L*	E	I	91.0
h _v LC	K*	L*	V*	M*	90.0
h _v LD	R	L*	E	I	92.0
h _v LE	R	L*	E	I	90.0

* 鼠類殘基

表5：hGPC3-1輕鏈變體中之特異性CDR-L1去醯胺突變

變體	28	29
h _v LA	N	G
h _v LB	N	G
h _v LB-Q	Q	G
h _v LB-V	N	V
h _v LC	N	G
h _v LD	D	G
h _v LE	N	A

產生抗體藥物結合物

【0123】 如US 62/465,129 (2017年2月28日申請)及US 62/561,151 (2017年9月20)中所描述使用本文中所描述之抗GPC3抗體來製備抗體藥物結合物。IgG1 mAb之半胱胺酸突變體之製備通常描述於US20100158909中。藥物-連接子SGD-6859經由抗體之IgG1鏈之位置239處引入的半胱胺酸殘基之硫醇基而與抗GPC3抗體結合且平均藥物負載為約2藥物/抗體。在位置239處具有半胱胺酸之抗體攜帶標示ec。

活體外細胞毒性分析

【0124】 在抗體-藥物結合物(ADC)治療之前24小時接種細胞株。細胞經指示劑量之ADC處理且在37°C下培育96小時。在一些實驗中，包括

非抗原結合ADC作為陰性對照。使用CelltiterGlo (Promega Corporation, Madison, WI)根據製造商之說明書來量測細胞株之細胞存活率。細胞在室溫下與CelltiterGlo試劑一起培育25分鐘，且在Envision盤讀取器(Perkin Elmer, Waltham, MA)上量測螢光。結果報導為IC50，即相較於經媒劑處理之細胞(對照=100%)，化合物濃度需要引起存活率最大降低一半。

活體內活性研究

皮下HCC及肺癌模型

【0125】裸鼠皮下接種有 5×10^5 個JHH7或 2.5×10^6 個Hep3B或 2.5×10^6 個Huh7 HCC細胞。NSG小鼠皮下接種有 1×10^6 個NCI-H661細胞。用測徑規監測腫瘤生長且使用公式($0.5 \times [\text{長度} \times \text{寬度}^2]$)計算平均腫瘤體積。當平均腫瘤體積達到大約 100 mm^3 時，小鼠未經處理或經腹膜內給藥有單一劑量之人類化GPC3-1 ADC。當腫瘤體積達到大約 400 mm^3 時，將小鼠安樂死。在由機構動物護理及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)審批通過之協議下在實驗動物護理評估和認可委員會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)認可之設施中執行所有動物程序。

當與S239C或天然半胱胺酸結合時活體內評定SGD-5937或SGD-6859之順丁烯二醯亞胺及特吡萊辛M乙酸鹽穩定性

【0126】在SCID小鼠中評定隨藥物-連接子化學物質而變化之藥物穩定性，株系用於異種移植模型中。人類化IgG結合物經製備含有在天然半胱胺酸上以4-藥物/mAb負載且在經工程改造之S239C上以2-藥物/mAb負載的MP葡萄糖苷酸-特吡萊辛M (SGD-6859)及mDPR葡萄糖苷酸-特吡萊辛M (SGD-5937)。SCID小鼠以 3 mg/kg 之單一腹膜內劑量給藥結合物

且接著在給藥後4天及10天經歷末端採血。來自各動物之血液樣本使用離心處理成血漿至經EDTA塗佈之埃彭道夫管(Eppendorf tubes)中。血漿在2-8°C下使用抗人類捕獲親和力樹脂(IgSelect, GE Healthcare)分批純化三個小時。經結合樣本使用PBS pH 7.4 (1×)+0.5 M NaCl洗滌且使用50 mM 甘胺酸pH 3溶離。溶離樣本經Tris pH 7.4中和且使用PNGase F (New England BioLabs Inc)去糖基化，接著使用10 mM DTT還原。各樣本使用與質譜偵測(Waters Xevo G2-S QTOF)偶合之逆向UPLC (PLRP 8 μm, Agilent)分析。各樣本之藥物抗體比率(DAR)係使用來自非負載及藥物負載(乙醯化及去乙醯化)抗體峰之解卷積質量的總離子計數之相對比率來計算。完整藥物(乙醯化%)係使用藥物負載輕鏈及重鏈物種之總離子數來計算，藉由42道爾頓損失評定。

結果

實例1：人類化mAb之設計及測試

【0127】 使用hIGHv1-18/hIGHJ4或hIGHV1-69-2/hIGHJ4重鏈可變區人類生殖系及hIGK2-30 hIGKJ2輕鏈可變區人類生殖系作為人類受體序列來構築若干人類化GPC3-1抗體。抗體在選擇將突變回小鼠抗體或小鼠生殖系序列之胺基酸殘基中不同。稱為HBLE之抗體(如SEQ ID NO: 1中所闡述之重鏈可變區(vHB)及如SEQ ID NO:2中所闡述之輕鏈可變區(vLE))係基於其(i)結合特徵(參見表6及表7)，(ii)遞送藥物之能力及(iii)相較於其他變體回復突變之數目而經選擇作為主要人類化GPC3-1抗體。

【0128】 稱為HALA (具有稱為vHA之重鏈可變區及稱為vLA之輕鏈可變區的抗體)、HALB (具有稱為vHA之重鏈可變區及稱為vLB之輕鏈可變區的抗體)、HALC (具有稱為vHA之重鏈可變區及稱為vLC之輕鏈可變

區的抗體)、HBLA (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLA之輕鏈可變區的抗體)、HBLB (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLB之輕鏈可變區的抗體)、HBLC (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLC之輕鏈可變區的抗體)、HBLD (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLD之輕鏈可變區的抗體)、HBLE (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLE之輕鏈可變區的抗體)、HBLB-Q (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLB-Q之輕鏈可變區的抗體)、HBLB-V (具有稱為vHB之重鏈可變區及稱為vLB-V之輕鏈可變區的抗體)、HCLA (具有稱為vHC之重鏈可變區及稱為vLA之輕鏈可變區的抗體)、HCLB (具有稱為vHC之重鏈可變區及稱為vLB之輕鏈可變區的抗體)、HCLC (具有稱為vHC之重鏈可變區及稱為vLC之輕鏈可變區的抗體)、HDLA (具有稱為vHD之重鏈可變區及稱為vLA之輕鏈可變區的抗體)、HDLB (具有稱為vHD之重鏈可變區及稱為vLB之輕鏈可變區的抗體)及HDLC (具有稱為vHD之重鏈可變區及稱為vLC之輕鏈可變區的抗體)的抗體可替代HBLE抗體用於本發明中。對於vHA、vHB、vHC、vHD、vLA、vLB、vLB-Q、vLB-V、vLC、vLD及vLE序列，參見圖2至圖5。

表6：hGPC3-1抗體變體之hGPC3結合

	EC50 (nM)
mGPC3-1	9
hGPC3-1 HALA	>300
hGPC3-1 HALB	91
hGPC3-1 HALC	63
hGPC3-1 HBLA	203
hGPC3-1 HBLB	14
hGPC3-1 HBLC	25
hGPC3-1 HCLA	76
hGPC3-1 HCLB	18
hGPC3-1 HCLC	19
hGPC3-1 HDLA	149
hGPC3-1 HDLB	10
hGPC3-1 HDLC	13

表7：hGPC3-1去醯胺變體之hGPC3結合

	EC50 (nM)
hGPC3-1 HBLB	3
hGPC3-1 HBLB-Q	7
hGPC3-1 HBLB-V	4
hGPC3-1 HBLD	74
hGPC3-1 HBLE	3

實例2：hGPC3-1ec SGD-6859/SGD-6183之活體外抗腫瘤活性

【0129】 評估人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 SGD-6183抗體-藥物結合物抵抗一組GPC3表現HCC細胞株(包括JHH7、Huh7及Hep3B)的細胞毒活性。如圖7中所展示，人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 SGD-6183抗體-藥物結合物在全部三種細胞株中為活性的。

【0130】 評估人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 SGD-6183抗體-藥物結合物抵抗一組GPC3表現肺癌細胞株(包括NCI-H661及NCI-H446)的細胞毒活性。如圖8中所展示，人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 SGD-6183抗體-藥物結合物在兩種細胞株中為活性的。

實例3：人類化GPC3-1ec SGD-6859或GPC3-1 (S239C、Q295C) SGD-5937或GPC3-1 SGD-6183在HCC腫瘤上之活體內抗腫瘤活性

【0131】 在三個皮下HCC異種移植模型JHH7、Huh7及Hep3B中測試hGPC3-1ec SGD-6859或hGPC3-1ec SGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183之活性。攜帶形成(約100 mm³)腫瘤之裸鼠給藥有如針對JHH7模型之圖9中所描繪之hGPC3-1ecSGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183，針對Huh7腫瘤模型之圖10中之hGPC3-1ec SGD-6859或hGPC3-1 SGD-6183以及針對Hep3B腫瘤模型之圖11中之hGPC3-1ec SGD-6859或hGPC3-1 SGD-6183。相較於未經治療，用hGPC3-1ec SGD-6859或hGPC3-1ecSGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183治療減小腫瘤生長。在單一ADC劑量後在若

于小鼠中獲得持久消退。在一個皮下肺癌異種移植模型NCI-H661中測試hGPC3-1 (S239C、Q295C) SGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183之活性。攜帶形成(約100 mm³)腫瘤之NSG小鼠給藥有如圖12中所描繪之hGPC3-1 (S239C、Q295C) SGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183。相較於未經治療，用hGPC3-1 (S239C、Q295C) SGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183治療減小腫瘤生長。在單一ADC劑量後在若干小鼠中獲得持久消退。資料顯示，hGPC3-1ec SGD-6859或hGPC3-1ec SGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183展示表現GPC3之HCC異種移植模型中明顯的劑量依賴型抗腫瘤活性且hGPC3-1 (S239C、Q295C) SGD-5937或hGPC3-1 SGD-6183展示表現GPC3之肺異種移植模型中明顯的劑量依賴型抗腫瘤活性。

實例4：當與S239C或天然半胱胺酸結合時活體內評定SGD-5937或SGD-6859之順丁烯二醯亞胺及特吡萊辛M乙酸鹽穩定性

【0132】 去乙醯化特吡萊辛M明顯減小其效能。h00ec SGD-6859或h00ec SGD-5937經製備作為與S239C結合之DAR 2 ADC。h00 SGD-6859或h00 SGD-5937經製備作為與天然半胱胺酸結合之混合平均DAR 4 ADC。SCID小鼠腹膜內給藥有3 mg/kg ADC中之一者。順丁烯二醯亞胺穩定性及特吡萊辛M乙酸鹽穩定性係藉由PLRP-MS在給藥後之時間0天、4天及10天時評定。當相較於與S239C結合時，與天然半胱胺酸結合之SGD-6859及SGD-5937兩者展示增強的順丁烯二醯亞胺及特吡萊辛M不穩定性(圖13)。此資料展示與S239C結合產生對於效能至關重要的特吡萊辛M乙酸鹽之更穩定DAR及保護。

非正式序列表

SEQ ID NO:1，HB之重鏈可變區

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYEMHWVQQAPGKGLEWMGGID
PETGGTAYNQKFKGRVTLTADKSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCGRYYSFAYW
GQGT LVT VSS

SEQ ID NO:2，LE之輕鏈可變區

DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSIVHSNANTYLQWFQQRP GQSPRL LIY
KVS NRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGT
KLEIK

SEQ ID NO:3，具有突變IgG1之HB之重鏈，根據如Kabat中所闡述之EU索引，在位置239處具有半胱胺酸取代

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYEMHWVQQAPGKGLEWMGGID
PETGGTAYNQKFKGRVTLTADKSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCGRYYSFAYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:4，LE之輕鏈

DVVM TQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSIVHSNANTYLQWFQQRP GQSPRL LIY
KVS NRFSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

SEQ ID NO:5，突變重鏈恆定區(根據如Kabat中所闡述之EU索引，在位置239處具有半胱胺酸取代)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6，天然存在之重鏈恆定區

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:7，輕鏈恆定區

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO:8，鼠類GPC3-1抗體重鏈可變區

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGID
PETGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCGRYYSFAYW
GQGTSLTVSA

SEQ ID NO:9，鼠類GPC3-1抗體輕鏈可變區

DVLMTQTPLSLPLSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLQWFLQKPGQSPKLLIY
KVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKIGRVEAEDLGYYCFQVSHVPYTFGGGT
KLVMK

SEQ ID NO:10，人類化GPC3-1之CDR-H1之胺基酸序列

DYEMH

SEQ ID NO:11，人類化GPC3-1之CDR-H2之胺基酸序列

WIGGIDPETGGTAYNQKFKG

SEQ ID NO:12，人類化GPC3-1之CDR-H3之胺基酸序列
YYSFAY

SEQ ID NO:13，人類化GPC3-1之CDR-L1之胺基酸序列
RSSQSIVHSNGNTYLQ

SEQ ID NO:14，人類化GPC3-1之CDR-L2之胺基酸序列
KVSNRFS

SEQ ID NO:15 -人類化GPC3-1之CDR-L3之胺基酸序列
FQVSHVPYT

SEQ ID NO: 16 GPC3-1 hvHA
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGIDP
PETGGTAYNQKFKGRATLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYYSFAYW
GQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 17 GPC3-1 hvHC
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTDYEMHWVQQAPGKGLEWIGGIDP
ETGGTAYNQKFKGRATLTADKSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCGRYYSFAYW
GQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 18 GPC3-1 hvHD
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYTFTDYEMHWVKQAPGKGLEWIGGIDP
ETGGTAYNQKFKGKATLTADKSTDATAYMELSSLRSEDATVYYCGRYYSFAYW
GQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 19 GPC3-1 hvLA
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLQWFQQRPGQSPRRLI
YKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQG
TKLEIK

SEQ ID NO: 20，GPC3-1 hvLB
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLQWFQQRPGQSPRLLIY
KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQG
KLEIK

SEQ ID NO: 21 GPC3-1 hvLB-Q
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSQGNNTYLQWFQQRPGQSPRLLI
YKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQG
TKLEIK

SEQ ID NO: 22 GPC3-1 hvLB-V

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNVNTYLQWFQQRPGQSPRLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGT
KLEIK

SEQ ID NO: 23 GPC3-1 hvLC

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLQWFQQRPGQSPKLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGT
KLVMK

SEQ ID NO: 24 GPC3-1 hvLD

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSDGNTYLQWFQQRPGQSPRLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQVSHVPYTFGQGT
KLEIK

SEQ ID NO: 25 Mu IGHV1-15 (最接近鼠類生殖系V-基因)

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAID
PETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTR

SEQ ID NO: 26 Hu IGHV1-18/HJ4 vH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWIS
AYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYFDYWG
QGTLLTVSS

SEQ ID NO: 27 Hu IGHV1-69-2/HJ4 vH

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHWWQQAPGKGLEWMGLVD
PEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDTAVYYCATYFDYWGG
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 28 Mu IGKV1-117 (最接近鼠類生殖系V基因)

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVP

SEQ ID NO: 29 Hu IGKV2-30/KJ2 vL

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLI
YKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQ
GTKLEIK

【序列表】

<110> 美商思進公司(SEAGEN INC.)

<120> 磷脂醯肌醇蛋白聚醣(GLYPICAN)3抗體及其結合物

<130> 4700-00111PC

<140> TW 108105041

<141> 2019-02-15

<150> US 62/631,353

<151> 2018-02-15

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HB之重鏈可變區

<400> 1

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

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

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

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

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

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

85 90 95

Gly Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LE之輕鏈可變區

<400> 2

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

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

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 3

<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有突變體IgG1之HB之重鏈

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

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

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 4
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LE之輕鏈

<400> 4

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

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

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變體重鏈恆定區

<400> 5

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

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

210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	245	250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	260	265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	275	280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330

<210> 6
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 天然存在之重鏈恆定區

<400> 6

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈恆定區

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類GPC3-1抗體重鏈可變區

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類GPC3-1抗體輕鏈可變區

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Val Met Lys
100 105 110

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化GPC3-1之CDR-H1之胺基酸序列

<400> 10

Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化GPC3-1之CDR-H2之胺基酸序列

<400> 11

Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
20

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化GPC3-1之CDR-H3之胺基酸序列

<400> 12

Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr
1 5

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化GPC3-1之CDR-L1之胺基酸序列

<400> 13

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln

1	5	10	15
<210> 14			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人類化GPC3-1之CDR-L2之胺基酸序列			
<400> 14			
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser			
1	5		
<210> 15			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人類化GPC3-1之CDR-L3之胺基酸序列			
<400> 15			
Phe Gln Val Ser His Val Pro Tyr Thr			
1	5		
<210> 16			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> GPC3-1 hvHA			
<400> 16			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
<210> 17			
<211> 125			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> GPC3-1 hvHA			
<400> 17			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
<210> 18			
<211> 135			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> GPC3-1 hvHA			
<400> 18			
Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			

35 40 45

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GPC3-1 hvHC

<400> 17

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

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

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

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

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

Gly Arg Tyr Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GPC3-1 hvLA

<400> 19

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GPC3-1 hvLB

<400> 20

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GPC3-1 hvLB-Q

<400> 21

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

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

Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GPC3-1 hvLB-V

<400> 22

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

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

Asn Val Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 23
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GPC3-1 hvLC

<400> 23

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Val Met Lys
100 105 110

<210> 24
<211> 112
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GPC3-1 hvLD

<400> 24

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

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

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 25

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Mu IGHV1-15

<400> 25

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

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

354045

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65707580

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

859095

Thr Arg

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu IGHV1-18/HJ4 vH

<400> 26

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

151015

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

202530

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

354045

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu

505560

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 27
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu IGHV1-69-2/HJ4 vH

<400> 27

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

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

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

	100		105		110
Ser					
<210>	28				
<211>	100				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	Mu IGKV1-117				
<400>	28				
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly					
1 5 10 15					
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser					
20 25 30					
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser					
35 40 45					
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro					
50 55 60					
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile					
65 70 75 80					
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly					
85 90 95					
Ser His Val Pro					
100					
<210>	29				
<211>	112				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				

<220>

<223> Hu IGKV2-30/KJ2 vL

<400> 29

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化GPC3-1之CDR-H2之胺基酸序列

<400> 30

Trp Met Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln
1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly
20

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化GPC3-1之CDR-L1之胺基酸序列

<400> 31

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Gln
1 5 10 15

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種抗體，其特異性結合於人類磷脂醯肌醇蛋白聚醣(Glypican) 3 (GPC3)蛋白質，其中該抗體包含具有SEQ ID NO: 1之成熟重鏈可變區及具有SEQ ID NO: 2之成熟輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含三個如Kabat所定義之CDR，且該輕鏈可變區包含三個如Kabat所定義之CDR。

【第2項】

如請求項1之抗體，其為人類化、嵌合或面飾化抗體。

【第3項】

如請求項1或2之抗體，其包含重鏈恆定區，其中該重鏈恆定區屬於IgG1同型。

【第4項】

如請求項1或2之抗體，其包含重鏈恆定區，其中該重鏈恆定區具有包含SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 6之胺基酸序列，且包含輕鏈恆定區，其中該輕鏈恆定區具有包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列。

【第5項】

如請求項1或2之抗體，其中該抗體與細胞毒性或細胞生長抑制劑結合。

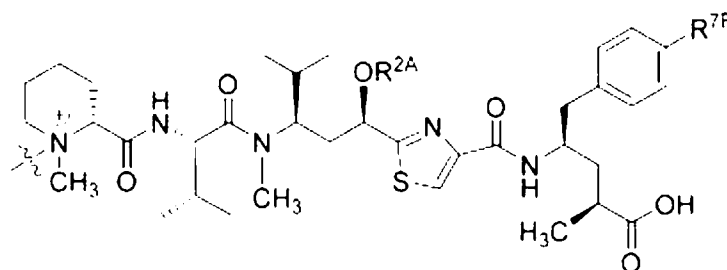
【第6項】

如請求項5之抗體，其中該結合的細胞毒性劑為特吡萊辛(tubulysin)。

【第7項】

如請求項5之抗體，其中該結合的細胞毒性劑為具有以下結構之結合

的特吡萊辛：



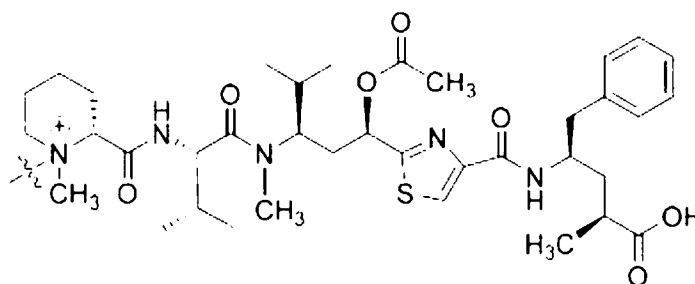
其中該結合的特吡萊辛呈鹽形式，特定言之醫藥學上可接受之鹽形式，或其溶劑合物，且其中波浪線指示該特吡萊辛與該抗體結合的位點；

R^{2A} 為 $-C(=O)R^{2B}$ ，其中 R^{2B} 為甲基、乙基、丙基、異丙基、2-甲基-丙-1-基、2,2-二甲基-丙-1-基或乙烯基，或 R^{2A} 為甲基、乙基、丙基、異丙基、丙-2-烯-1-基或2-甲基-丙-2-烯-1-基；以及

R^{7B} 為 $-H$ 或 $-OH$ 。

【第8項】

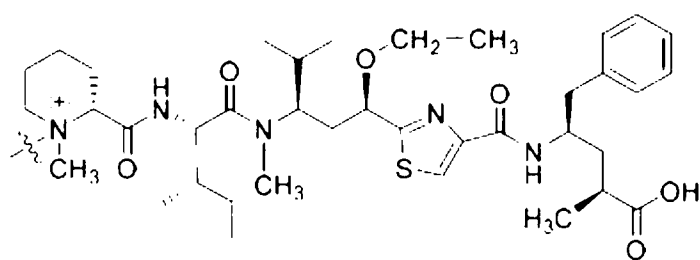
如請求項5之抗體，其中該結合的細胞毒性劑為具有以下結構之結合的特吡萊辛：



其中該結合的特吡萊辛呈鹽形式，特定言之呈醫藥學上可接受之鹽形式，或其溶劑合物，且其中波浪線指示該特吡萊辛與該抗體結合的位點。

【第9項】

如請求項5之抗體，其中該結合的細胞毒性劑為具有以下結構之結合的特吡萊辛：



其中該結合的特吡萊辛呈鹽形式，特定言之呈醫藥學上可接受之鹽形式，或其溶劑合物，且其中波浪線指示該特吡萊辛與該抗體結合的位點。

【第10項】

一種如請求項1至9中任一項之抗體之用途，其係用於製備治療患有表現GPC3之癌症患者的藥物。

【第11項】

如請求項10之用途，其中該癌症為肝細胞癌(HCC)、肺癌瘤、威爾姆斯腫瘤(Wilms tumor) (腎母細胞瘤)、卵巢透明細胞癌瘤、結腸直腸癌或肉瘤。

【第12項】

如請求項10之用途，其中該癌症為HCC。

【第13項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之抗體；以及醫藥學上可接受之載劑。

【第14項】

如請求項1之抗體，其中該三個重鏈CDR如SEQ ID NO:10、WMGGIDPETGGTAYNQKFKG及SEQ ID NO:12中所闡述，且該三個輕鏈CDR為RSSQSIVHSNANTYLQ及如SEQ ID NO: 14及15中所闡述。

【發明圖式】

1 magtvtactl vvamlislidf pgaagppppp pdatcqvrs ffqrlqpglk wvpetvpqgs 60
61 dlqvclpkgp tccsrkmeek yqitarlme qllqsasmel kfliiqnaav fgeafeivvr 120
121 hakNytnamf knnypsiltpq afefvgefft dvslyilgsd invddmvnel fdsلفpviyt 180
181 qlmnpqjpdS aldineclrg arralkvfgn fpklimtqvs kslqvtrifl qalnlgievi 240
241 Nttdhlfesk dcgrmltrmw ycsycggllmm vkpcggycnv vmqgemagvv eidkywreyi 300
301 lsleelvngm yriydmenvl lglfstihds igvvqknagk ltttigklca hsqgROYRsa 360
361 yypedlfidk kvlkvahveh eetlssrrre liqklksfis fysalpgyic shspvaeNdt 420
421 lcwnggelve rysqkaarng mkqfnlhel kmkgpepvvs qiidklkhin qllrtmsmpk 480
481 grvldknide egfegdcgd, dedeciggsg dgmikvkngl rflaelaydl dvddapqnsq 540
541 qatpkDNEIS Tfhnlgvhs plklitsmai svvffflvh 580
563 580 546

【圖1】

A

```

Mu GPC3-1 vH      10 20 30 40 50 60
Hu IGHV1-18/HJ4  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSYTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAVNGNTNVAQKIQGRVTM
GPC3-1 hvHA      .....LVR.....TL.....D.EMH..K.T.VH.....I.G.DPET.G.A.N..FK.KA.L
Kabat CDRs      .....LVR.....TL.....D.EMH.....I.G.DPET.G.A.N..FK.A.L
IMGT CDRs      .....LVR.....TL.....D.EMH.....I.G.DPET.G.A.N..FK.A.L
                    *****
                    ++++++++
                    ++++++++

Mu GPC3-1 v      70 80 90 101 110
Hu IGHV1-18/HJ4  .A.K.S.....D....T.E.S.....G.YS.A.....A
GPC3-1 hvHA      TTDTSSTAYMELSLRSDDTAVVYCARY--FDYWGQGLTVTVSS
Kabat CDRs      .A.....
IMGT CDRs      .A.....
                    *****
                    ++++++++
                    ++++++++
```

B

```

Mu GPC3-1 vH      10 20 30 40 50 60
Hu IGHV1-69-2/HJ4 Q...Q....LVR...S.TL..A.....E....K.T.VH...I.GI...T.G.A.NQ..K.KA.L
GPC3-1 hvHB      EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKVSGYITFDYIMHWVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFGQGRVTI
GPC3-1 hvHC      .....A.....E.....E.....I.GI...T.G.A.NQ..K...L
GPC3-1 hvHD      .....A.....E.....E.....I.GI...T.G.A.NQ..K.A.L
Kabat CDRs      .....A.....E.....E.....I.GI...T.G.A.NQ..K.KA.L
IMGT CDRs      .....A.....E.....E.....I.GI...T.G.A.NQ..K.KA.L
                    *****
                    ++++++++
                    ++++++++

Mu GPC3-1 vH      70 80 90 101 110
Hu IGHV1-69-2/HJ4 .....K.SS....D.R..T...S.....GR.YS.A.....A
GPC3-1 hvHB      TADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVVYCAIY--FDYWGQGLTVTVSS
GPC3-1 hvHC      ...K.....GR.YS.A.....
GPC3-1 hvHD      ...K.....GR.YS.A.....
Kabat CDRs      ...K.....GR.YS.A.....
IMGT CDRs      ...K.....GR.YS.A.....
                    *****
                    ++++++++
                    ++++++++
```

【圖2】

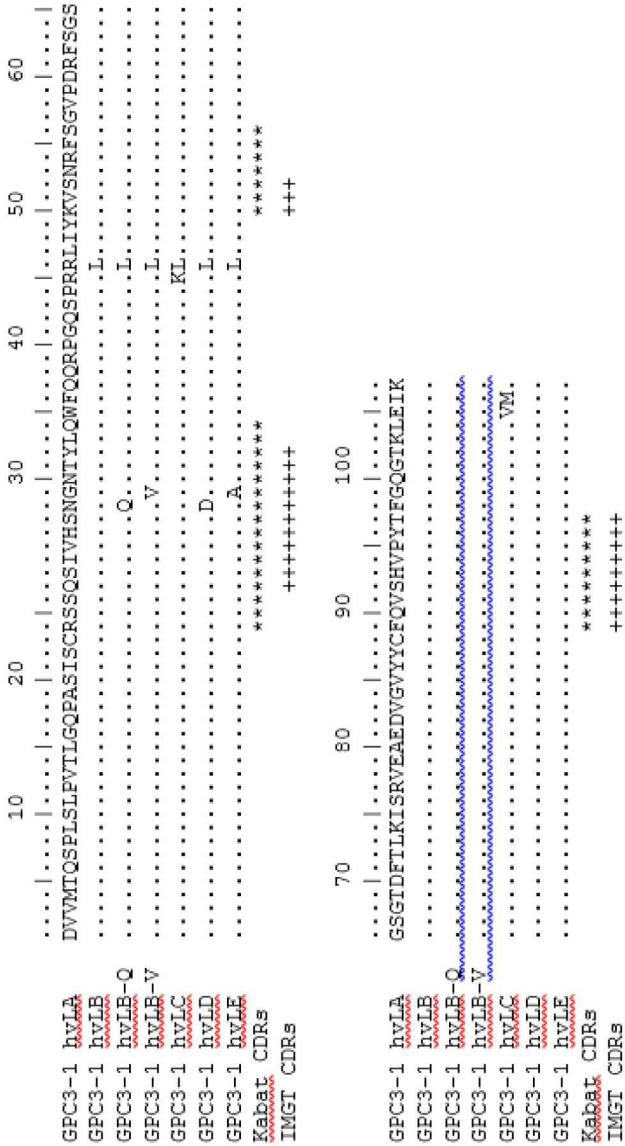
	10	20	30	40	50	60
GPC3-1 hvHA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTD	YEMHWVRQAPGQGLEWIGGIDPETGGTAYNQKFKGRATL				
GPC3-1 hvHB	E.....T.I..V.....Q..K..M.....V					
GPC3-1 hvHC	F.....T.I.....Q..K.....					
GPC3-1 hvHD	E.....T.I.....K..K.....K..					
Kabat CDRs		*****		*****		
IMGT CDRs		+++++++		+++++++		

	70	80	90	101	110
GPC3-1 hvHA	TADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYVCARYSFAYWGQGLVTVSS				
GPC3-1 hvHB	...K..D.....S...E...G.....				
GPC3-1 hvHC	...K..D.....S...E...G.....				
GPC3-1 hvHD	...K..D.....S...E...G.....				
Kabat CDRs		*****			
IMGT CDRs		+++++++			

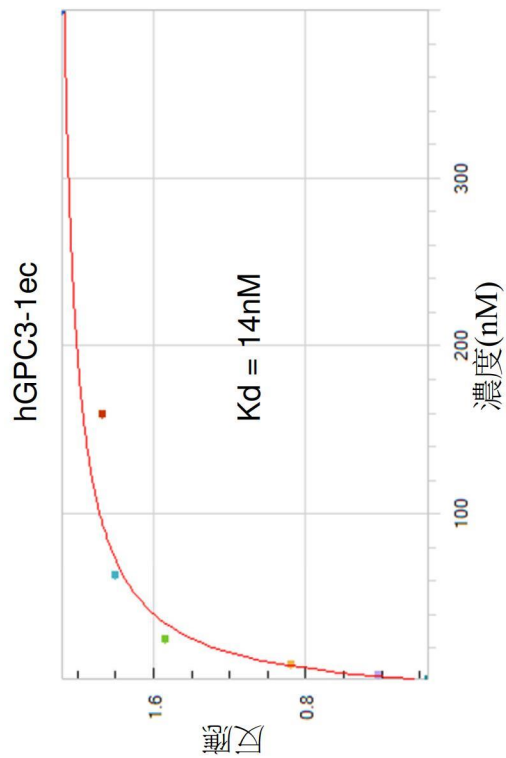
【圖3】

[illegible]

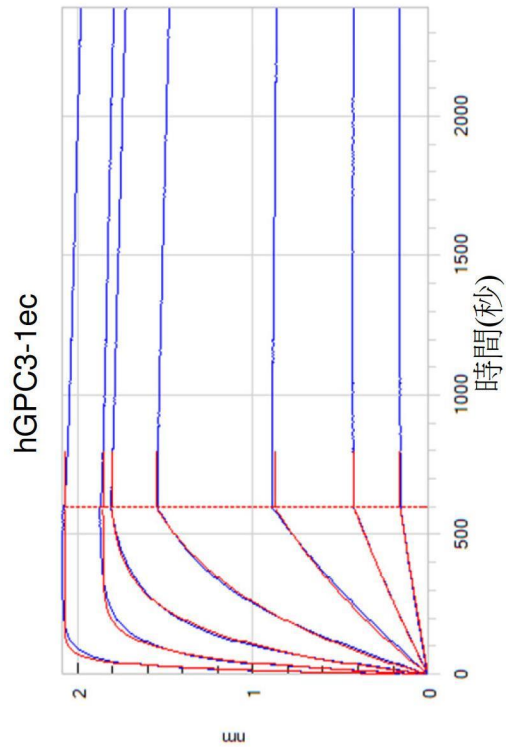
4回

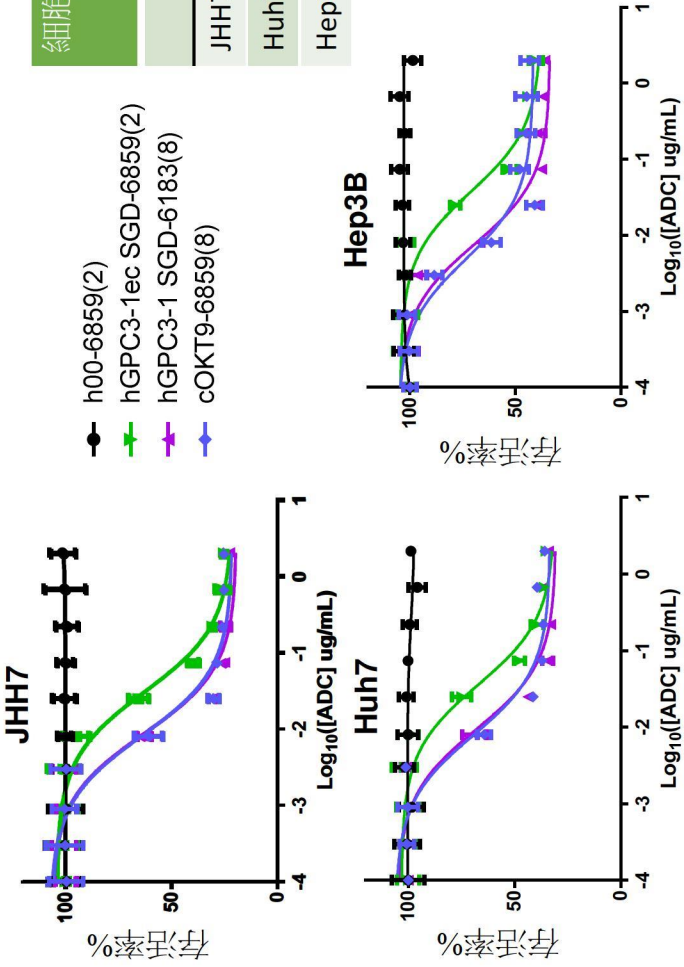


【5回】



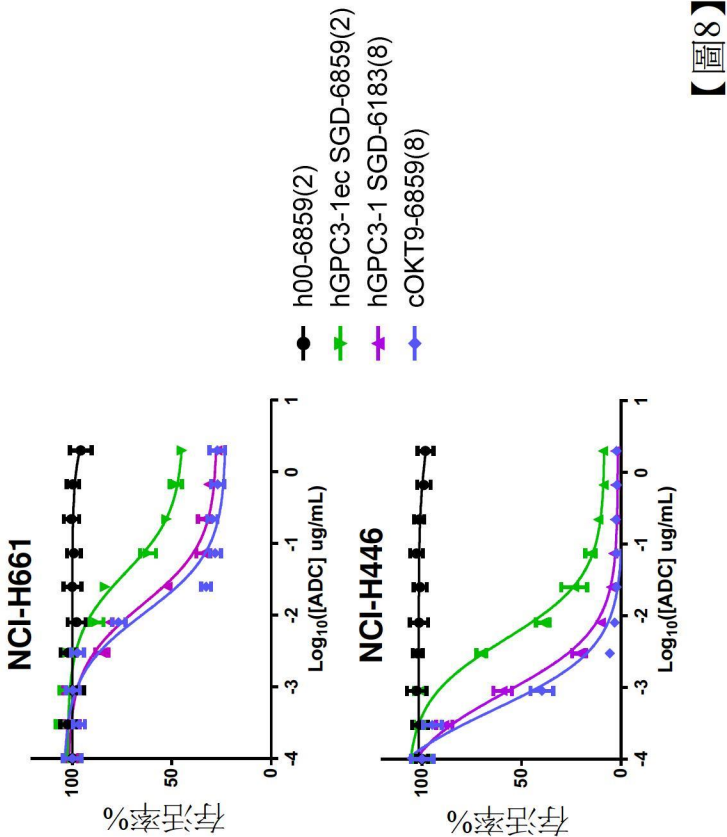
【圖6】





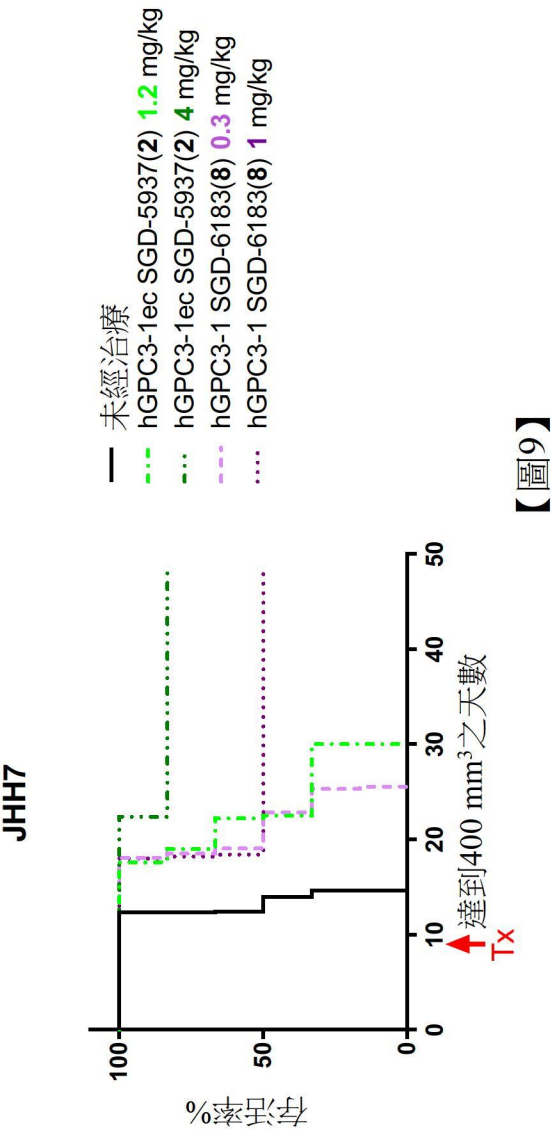
【圖7】

細胞株	GPC3 密度	效能 (IC50 ng/mL)	功效(最小存 活率%)
	GPC3/細胞		
JHH7	80,000	31 8 8	21 20 21
Huh7	40,000	36 9 8	31 32 33
Hep3B	30,000	34 8 5	38 34 41

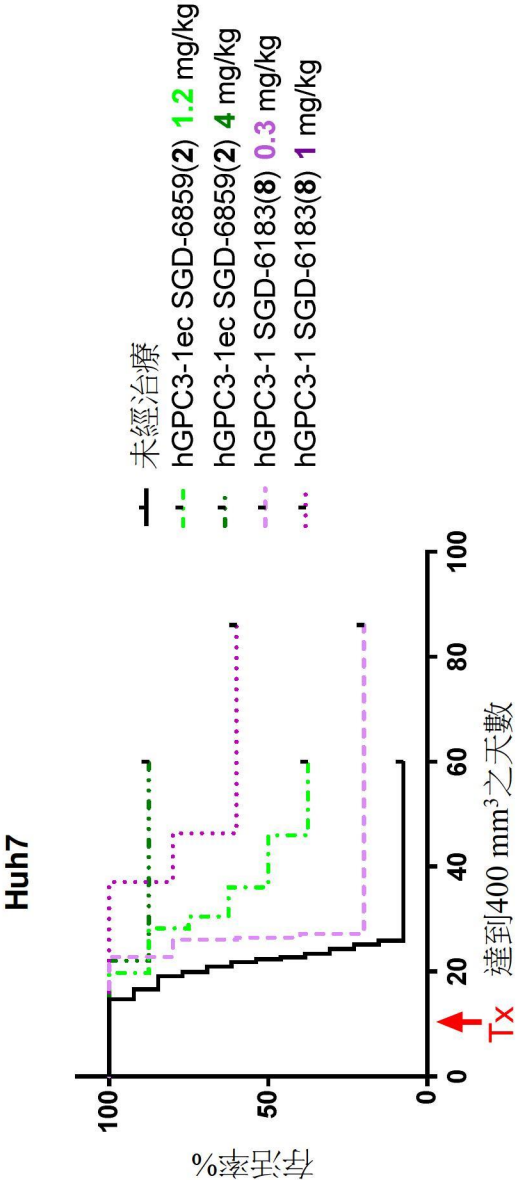


【圖8】

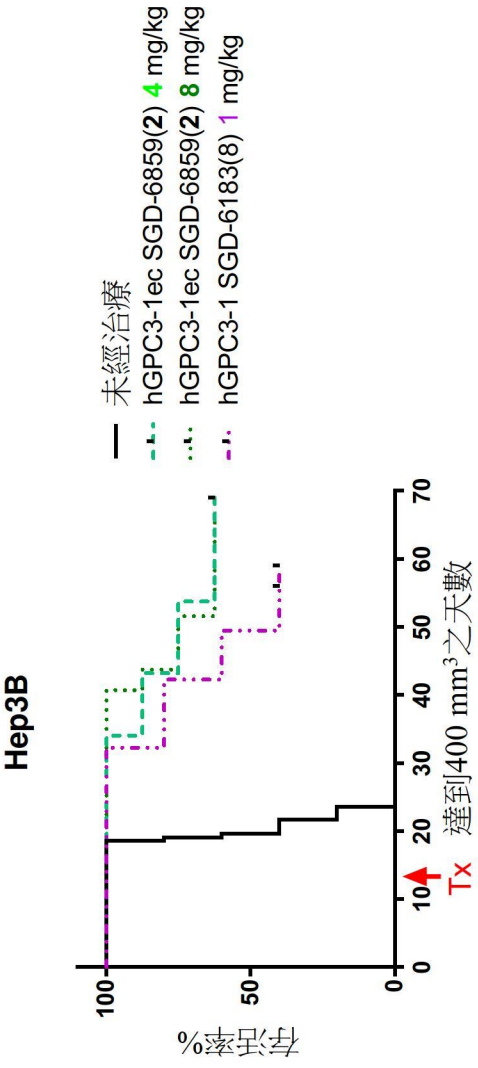
細胞株	GPC3 密度	效能 (IC50 ng/mL)				功效(最小存活率%)			
	GPC3 細胞	▼	▲	◆	▼	▲	◆		
NCI-H661	100,000	39	14	11	44	27	23		
NCI-H446	55,000	4	1	0.5	8	1	0		
NCI-H524	15,000	17	3	1	75	23	3		



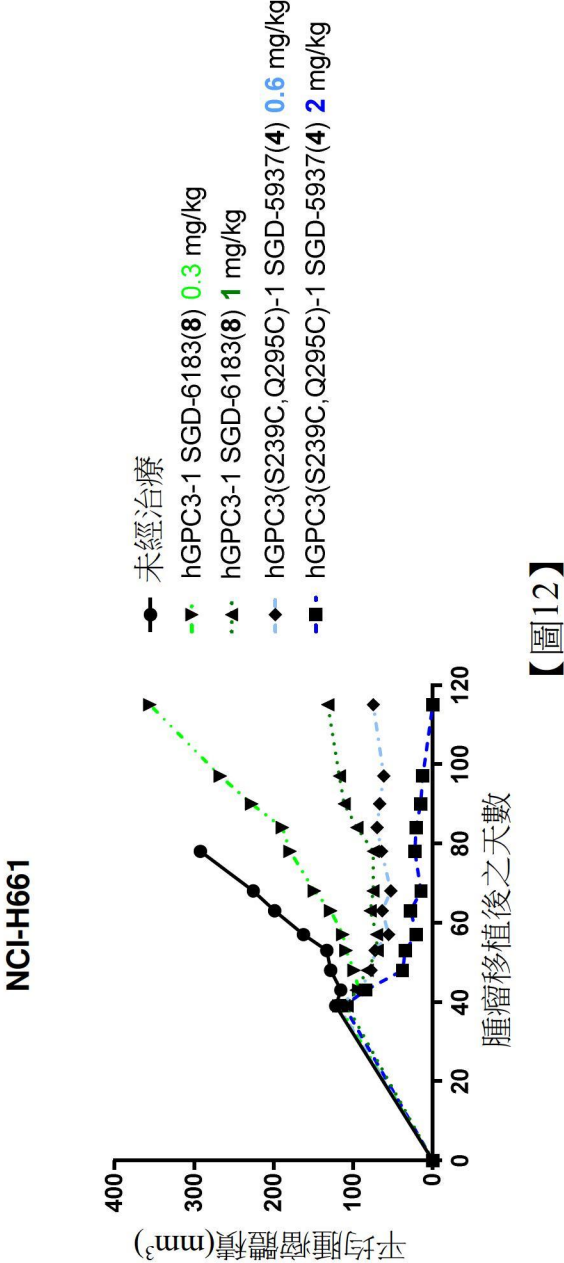
【圖9】



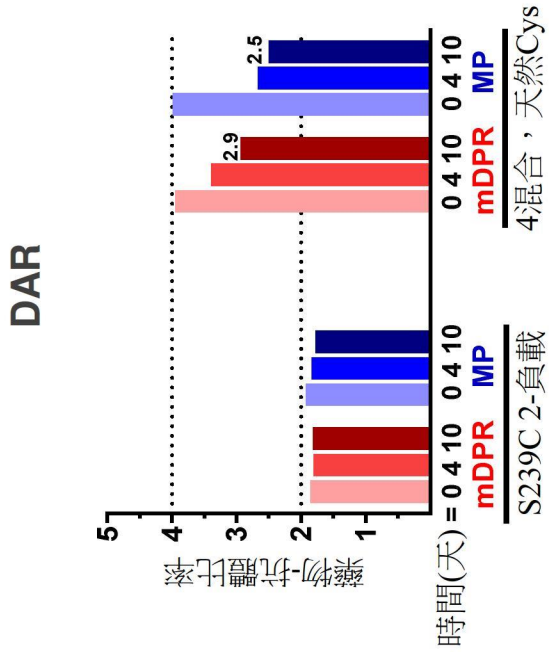
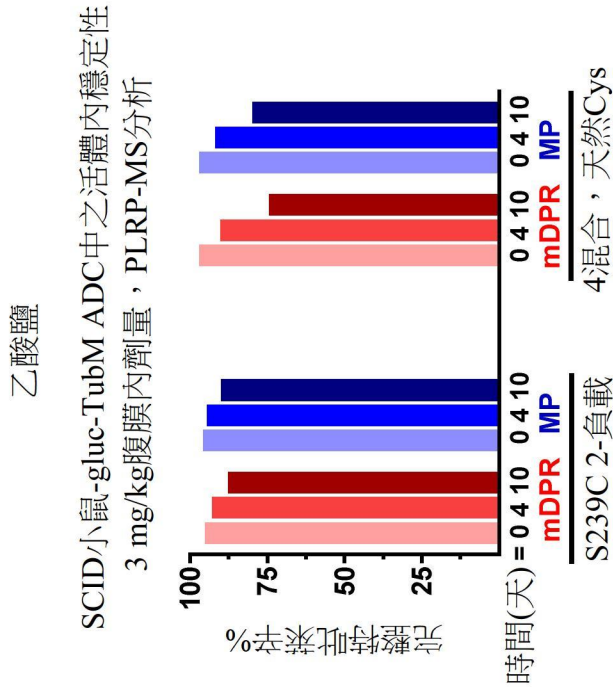
【圖10】



【圖11】



【圖12】



【圖13】