201840586

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201840586 A

(43)公開日： 中華民國 107 (2018) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：107106880 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 03 月 01 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K47/65 (2017.01)*
A61K47/68 (2017.01) *A61K31/454 (2006.01)*

(30)優先權：2017/02/28 美國 62/465,129
2017/09/20 美國 62/561,151

(71)申請人：美商西雅圖遺傳學公司 (美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)
美國

(72)發明人：韋特 安德魯 WAIGHT, ANDREW (US)；萊斯克 克里斯 LEISKE, CHRIS (US)；碧琪兒 特拉維斯 BIECHELE, TRAVIS (US)；舒思曼 迪強格 SUSSMAN, DJANGO (US)；布魯克 派翠克 BURKE, PATRICK (US)；萊斯克 喬絲琳 LEISKE, JOCELYN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：15 共 101 頁

(54)名稱

用於結合作用之半胱胺酸突變抗體

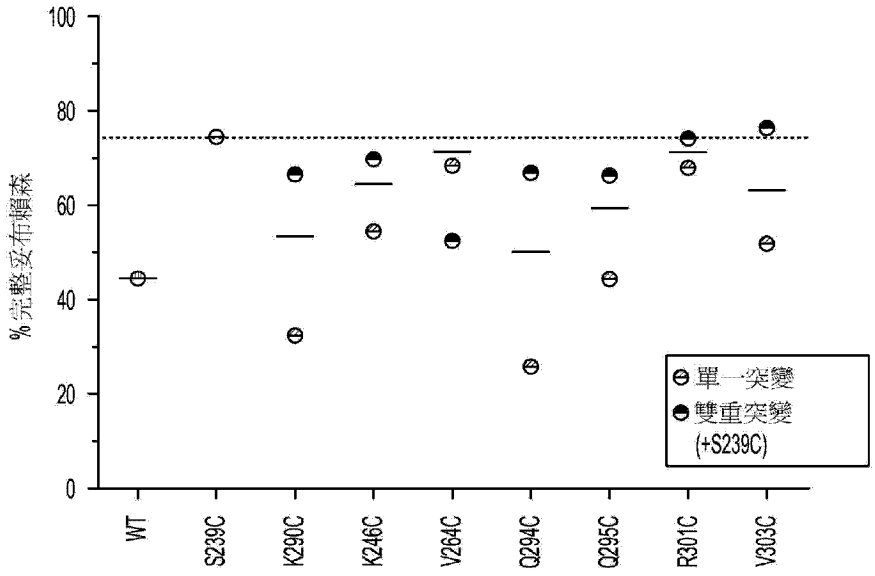
CYSTEINE MUTATED ANTIBODIES FOR CONJUGATION

(57)摘要

本發明提供包括以 EU 編號之位置 295 處及視情況以 EU 編號之位置 239 處之半胱胺酸的經修飾重鏈恆定區。此等半胱胺酸殘基提供用於結合至藥物或標記物之位點。當此兩者半胱胺酸以正常異二聚抗體格式存在時，每分子抗體就存在四個該等位點，可以讓一個抗體分子對四個分子藥物或標記物的化學計量。因為容易表現、穩定性及細胞毒性，所以選擇位置 295 處之半胱胺酸及位置 239 處具有或不具有半胱胺酸是優於多個其他位置處之半胱胺酸。

The invention provides modified heavy chain constant regions including a cysteine at position 295 by EU numbering and optionally at position 239 by EU numbering. These cysteine residues provide sites for conjugation to a drug or label. When both cysteines are present in a normal heterodimeric antibody format, there are four such sites per molecule of antibody allowing a stoichiometry of one molecule of antibody to four of drug or label. Selection of the cysteine at position 295 with or without cysteine at position 239 is advantageous over cysteines at many other positions due to ease of expression, stability and cytotoxicity.

指定代表圖：


100
80
60
40
20
0
% 完整受布賴森
WT
S239C
K290C
K246C
V264C
Q294C
Q295C
R301C
V303C
單一突變
雙重突變
(+S239C)

【圖6】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於結合作用之半胱胺酸突變抗體

【英文發明名稱】

CYSTEINE MUTATED ANTIBODIES FOR CONJUGATION

【技術領域】

【先前技術】

抗體之重鏈恆定區已經受諸多突變以達成各種效應。此等效應包括提高或降低效應功能、增大或減小穩定性或半衰期、增加或減少轉譯後修飾且提供用於結合作用之位點。S239C已描述為用於結合作用之位點，但自身准許在兩個重鏈及兩個輕鏈之抗體中僅負載兩個藥物分子。用於結合作用之不同位點可取決於對結合試劑之可接近性、抗體之表現及糖基化型態及儲存穩定性、抗體藥物結合物之活體內半衰期及細胞毒性而合適地改變，

【發明內容】

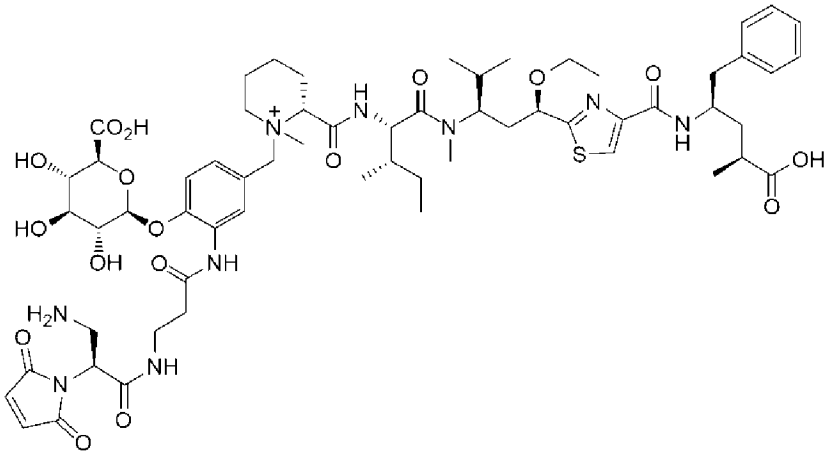
本發明提供包含重鏈恆定區之抗體或融合蛋白質，其中以EU編號之位置295係經半胱胺酸佔據。視情況，抗體或融合蛋白質經由位置295處之半胱胺酸結合至藥物或標記物。視情況，以EU編號之位置239係經半胱胺酸佔據。視情況，抗體或融合蛋白質經由位置295及239處之半胱胺酸結合至藥物或標記物。

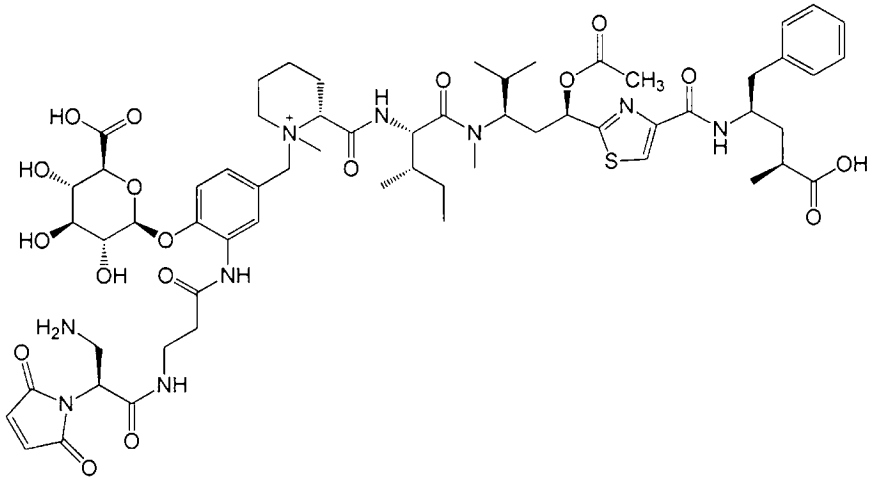
在另一實施例中，抗體或融合蛋白質經由以EU編號之位置294處之半胱胺酸結合至藥物或標記物。視情況，以EU編號之位置239係經半胱胺酸佔據。

本發明進一步提供包含兩個重鏈及兩個輕鏈之異二聚體形式之抗體，其中一個抗體分子經由結合至兩個重鏈中之位置295及239處之半胱胺酸而結合至四個藥物分子。視情況，恆定區具有同型，其為人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

本發明進一步提供包含兩個重鏈及兩個輕鏈之異二聚體形式之抗體，其中一個抗體分子經由結合至兩個重鏈中之位置294及239處之半胱胺酸而結合至四個藥物分子。視情況，恆定區具有同型，其為人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

在一些抗體或融合蛋白質中，藥物為妥布賴森(tubulysin)。視情況，藥物經由葡萄糖苷酸連接子(glucuronide linker)結合至抗體。視情況，抗體結合至具有下文所示之提供妥布賴森及葡萄糖苷酸連接子之結構的化合物。





視情況，藥物為MMAE、MMAF或小凹槽結合劑或PBD。視情況，重鏈恆定區具有SEQ ID NO.5-12中之任一者的序列，其條件是C端離胺酸可為不存在的。

視情況，抗體或融合蛋白質經由可裂解連接子結合至藥物。

本發明進一步提供包含如上文所描述之抗體或融合蛋白質之醫藥組合物。

本發明進一步提供包含重鏈恆定區之抗體或融合蛋白質，其中以EU編號之位置239係經半胱胺酸佔據，該半胱胺酸結合至妥布賴森M。

本發明進一步提供一種產生包含重鏈恆定區之抗體或融合蛋白質之方法，其中以EU編號之位置239及295係經半胱胺酸佔據。該方法包含培養經工程化以對抗體或融合蛋白質進行編碼之細胞，其中表現抗體或融合蛋白質；及純化抗體或融合蛋白質。視情況，該方法進一步包含將抗體或融合蛋白質經由位置239及295處之半胱胺酸結合至藥物。視情況，該方法進一步包含使抗體與抑制在位置239及295處之半胱胺酸之間形成二硫鍵之還原劑接觸。視情況，藉由在培養抗體或融合蛋白質之培養基中包括還原劑來使抗體或融合蛋白質與還原劑接觸。視情況，還原劑為二硫蘇糖醇、β-巯基乙醇或三(2-羧基乙基)膦。視情況，還原劑為濃度為0.1至2 mM之二硫蘇糖醇。

【圖式簡單說明】

圖1顯示說明突變位點及聚糖鏈之相對位置之抗體結構的模型。

圖2顯示引入突變引起變化的聚糖分佈。

圖3顯示在使vcMMAE ADC經受大鼠血漿7天之後的順丁烯二醯亞胺穩定性。

圖4顯示在使妥布賴森ADC經受大鼠血漿7天之後的妥布賴森穩定性。

圖5顯示在使妥布賴森ADC曝露於大鼠血漿7天之後在兩個突變位點進行結合之後的妥布賴森穩定性。

圖6亦顯示妥布賴森穩定性。

圖7顯示在使具有雙重突變之ADC經受大鼠血漿之後的細胞毒性的差異。

圖8及9比較腫瘤異種移植模型中之各種抗體藥物結合物。

圖10A典型的IgG1糖基化型態，圖10B S239C突變糖基化型態，圖10C Q295C糖基化型態，圖10D S239C/Q295C雙重突變糖基化型態。

圖11：(頂部)針對在S239C/Q295C突變情況下穩定表現mAb之糖基化型態，(底部)針對在S239C/Q295C突變情況下短暫表現mAb之糖基化型態。

圖12：(頂部) S239C/E294C突變mAb、(中部) S239C/Q295C突變mAb及(底部)野生型聚糖之聚糖型態之PLRP-MS分析。

圖13：顯示在親代mAb中共價結合在一起之H16 (S239C) (SEQ ID NO:21)及H19 (Q295C) (SEQ ID NO:22)之非還原性肽圖。

圖14：比較細胞培養基中之各種DTT及三(2-羧基乙基)膦(TCEP)濃度及使用S239C/Q295C突變體之生成之聚糖的穩定表現資料。

圖15：當在經保持1.2 mM二硫蘇糖醇(DTT)中培養時短暫表現的S239C/Q295C突變體之聚糖分析。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案主張2017年2月28日提交之62/465,129及2017年9月20日提交之62/561,151之權利，出於所有目的各案以全文引用的方式併入本文中。

序列表之參考

本申請案包括59 k字元之命名為508682-ST25之txt序列表，其生成於2018年2月20日且以引用的方式併入。

定義

分離抗體或ADC通常為至少50% w/w純度干擾性蛋白質及其他由其生產或純化產生之污染物，但不排除抗體與過量的醫藥學上可接受之載劑或其他意欲便於其使用之媒劑組合的可能性。有時抗體或ADC為至少60%、70%、80%、90%、95%或99% w/w純度干擾性蛋白質及由生產或純化產生之污染物。

單獨抗體或作為ADC之組分與其靶抗原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靶發生之非特異性結合區分。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)之間形成鍵之結果，而非特異性結合通常為凡得瓦爾力(van der Waals force)之結果。然而，特異性結合不一定意味著單株抗體結合一個且僅一個靶。

基本抗體結構單元為次單元之四聚體。各四聚體包括兩對多肽鏈，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個至110個或多於110個胺基酸之可變區。此可變區首先與可裂解信號肽有關地表現。無信號肽之可變區有時稱為成熟可變區。因此，舉例而言，輕鏈成熟可變區為無輕鏈

信號肽之輕鏈可變區。各鏈之羧基端部分定義恆定區。重鏈恆定區主要負責效應功能。

輕鏈係歸類為κ或λ。重鏈係歸類為γ、μ、α、δ或ε，且分別定義抗體之同型為IgG、IgM、IgA、IgD及IgE。在輕鏈及重鏈內，可變區及恆定區由具有約12個或多於12個胺基酸之「J」區連接，且重鏈亦包括具有約10個或多於10個胺基酸之「D」區。*(一般參見Fundamental Immunology* (Paul, W., 編, 第2版 Raven Press, N.Y., 1989, 第7章)，出於所有目的其以全文引用的方式併入本文中)。

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。但在雙功能或雙特異性抗體中除外，兩個結合位點為相同的。鏈均展現藉由三個高變區連接之相對保守的構架區(FR)之相同的通式結構，該等高變區亦稱為互補決定區或CDR。來自各對之兩個鏈之CDR藉由構架區對準，使得能夠與特異性抗原決定基結合。自N端至C端，輕鏈及重鏈均包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。根據Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (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結構域。Kabat亦提供廣泛使用的編號規約(Kabat編號)，其中給不同重鏈之間或不同輕鏈之間的相應殘基分配相同號碼。

術語「抗體」包括完整抗體及其結合片段。通常，抗體片段與完整抗體競爭，抗體片段衍生自完整抗體以用於特異性結合至包括獨立的重鏈、輕鏈Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F(ab)c、雙功能抗體、Dab、奈米抗體及Fv

之靶。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(均二聚體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。雙特異性或雙功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))。術語「抗體」包括抗體自身(裸抗體)或結合至細胞毒素或細胞生長抑制藥物之抗體。

術語「抗原決定基」係指與抗體結合之抗原上的位點。抗原決定基可由鄰接胺基酸或藉由三級摺疊一或多個蛋白質而並列的非鄰接胺基酸形成。由鄰接胺基酸形成之抗原決定基通常在曝露於變性溶劑後保留，而藉由三級摺疊形成之抗原決定基通常在用變性溶劑處理後喪失。抗原決定基在獨特的空間構形中通常包括至少3個且更通常至少5個或8-10個胺基酸。確定抗原決定基之空間構形之方法包括例如x射線晶體學及2維核磁共振。參見例如Epitope Mapping Protocols, 在Methods in Molecular Biology中, 第66卷, Glenn E. Morris, 編 (1996)。

術語「患者」包括接受預防性或治療性治療之人類及其他哺乳動物個體。

出於將胺基酸取代歸類為保守或非保守之目的，胺基酸分組如下：第I組(疏水性側鏈)：met、ala、val、leu、ile；第II組(中性親水性側鏈)：cys、ser、thr；第III組(酸性側鏈)：asp、glu；第IV組(鹼性側鏈)：asn、gln、his、lys、arg；第V組(影響鏈取向之殘基)：gly、pro；及第VI組(芳族側鏈)：trp、tyr、phe。保守取代涉及處於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成員與另一類別之成員

的交換。

百分比序列一致性用最大限度比對之序列確定。

可藉由使用諸如Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.中之BESTFIT、FASTA及TFASTA的演算法、使用預設間隙參數或藉由檢驗及最佳比對(亦即在比較窗口上產生最高百分比之序列類似性)來比對序列來確定序列一致性。序列一致性之百分比係藉由以下來計算：在比較窗口上比較兩個最佳比對的序列，確定兩個序列中出現相同殘基之位置的數目以得到匹配位置數目，將匹配位置數目除以不計算比較窗口中之間隙的匹配及不匹配位置之總數目(亦即窗口尺寸)，及將結果乘以100以得到序列一致性之百分比。抗體序列係藉由Kabat編號規約來比對以使得佔據相同編號位置之殘基得以進行比對。在比對之後，若使目標序列與參考序列相比較，則目標序列與參考序列之間的序列一致性百分比為目標序列及參考序列中由相同胺基酸佔據之位置的數目除以兩個區域之比對位置的總數目(且不計算間隙)乘以100以轉化成百分比。

「包含」一或多種所敘述要素之組合物或方法可包括未具體敘述之其他元素。舉例而言，包含抗體之組合物可含有單獨的或與其他成分組合的抗體。

值範圍之指定包括在該範圍內或界定該範圍之所有整數。

抗體效應功能係指由Ig之一或多個Fc結構域貢獻的功能。該等功能可為例如抗體依賴性細胞毒性、抗體依賴性細胞吞噬作用或補體依賴性細胞毒性。該功能可由例如使一或多個Fc效應結構域與Fc受體在具有吞噬細胞性或溶解活性之免疫細胞上結合或藉由使一或多個Fc效應結構域與補

體系統之組分結合來實現。通常，由Fc結合細胞或補體組分介導之一或多種效應導致抑制及/或耗乏靶細胞。抗體之Fc區可募集Fc受體(FcR)-表現細胞且使其與經抗體塗佈之靶細胞並列。表現包括FcγRIII (CD16)、FcγRII (CD32)及FcγRIII (CD64)之IgG之表面FcR的細胞可充當用於破壞經IgG塗佈之細胞的效應細胞。該等效應細胞包括單核球、巨噬細胞、自然殺手(NK)細胞、嗜中性球及嗜酸性球。藉由IgG接合FcγR激活抗體依賴性細胞毒性(ADCC)或抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)。由$CD16^+$效應細胞經由分泌形成膜孔的蛋白質及蛋白酶介導ADCC，而吞噬作用係由$CD32^+$及$CD64^+$效應細胞介導(*參見Fundamental Immunology*, 第4版, Paul 編, Lippincott-Raven, N.Y., 1997, 第3、17及30章; Uchida等人，2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop等人，2001, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe等人，1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207)。除了ADCC及ADCP之外，細胞結合抗體之Fc區亦可激活補體經典路徑以誘發補體依賴性細胞毒性(CDC)。當抗體與抗原複合時，使補體系統之C1q結合至抗體之Fc區。C1q與細胞結合抗體之結合可引發涉及蛋白酶激活C4及C2以生成C3轉化酶之事件的級聯。藉由C3轉化酶使C3裂解為C3b允許激活包括C5b、C6、C7、C8及C9之末端補體組分。此等蛋白質共同形成經抗體塗佈之細胞上之膜攻擊複合物孔。此等孔中斷細胞膜完整性，殺死靶細胞(*參見Immunobiology*, 第6版, Janeway等人，Garland Science, N. Y., 2005, 第2章)。

「細胞毒性效應」係指耗乏、消除及/或殺死靶細胞。「細胞毒性劑」係指在細胞上具有細胞毒性效應之試劑。細胞毒性劑可結合至抗體或與抗體組合進行投與。

「細胞生長抑制效應」係指對細胞增殖之抑制。「細胞生長抑制劑」係指在細胞上具有細胞生長抑制效應且由此抑制特異細胞子集之生長及/或擴增之試劑。細胞生長抑制劑可結合至抗體或與抗體組合進行投與。

術語「醫藥學上可接受」意謂經聯邦管制機構或洲政府審批通過或可審批通過，或在美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他一般公認之藥典中列出以用於動物且更特定言之用於人類。術語「醫藥學上相容之成分」係指與抗體或ADC組合之醫藥學上可接受之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

片語「醫藥學上可接受之鹽」係指抗體或其結合物或與抗體一起投與之試劑的醫藥學上可接受之有機鹽或無機鹽。例示性鹽包括硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、柳酸鹽、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、單寧酸鹽、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、葡萄糖二酸鹽、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鹽(亦即1,1'亞甲基雙-(2羥基3萘甲酸))鹽。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子，諸如乙酸根離子、丁二酸根離子或其他相對離子。相對離子可為使親體化合物上之電荷穩定之任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽在其結構中可具有超過一個帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽之一部分的情況可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

除非上下文另外顯而易見，否則術語「約」涵蓋在所述值之標準偏

差內之值。

人類化抗體為基因工程化抗體，其中使非人類「供體」抗體之CDR接枝至人類「接受體」抗體序列中(參見,例如, Queen, 美國專利第5,530,101號及第5,585,089號；Winter，美國專利第5,225,539號，Carter, 美國專利第6,407,213號，Adair，美國專利第5,859,205號、第6,881,557號，Foote，美國專利第6,881,557號)。接受體抗體序列可為例如成熟人類抗體序列、該等序列之複合物、人類抗體序列之共同序列或生殖系區序列。因此，人類化抗體為具有較佳如由Kabat所定義之完全或實質上來自供體抗體之CDR及若存在則完全或實質上來自人類抗體序列之可變區構架序列及恆定區的抗體。除奈米抗體及dAb以外，人類化抗體包含人類化重鏈及人類化輕鏈。當至少85%、90%、95%或100%相應殘基(如由Kabat所定義)在對應的CDR之間相同時，人類化抗體中之CDR實質上來自非人類抗體中之相應CDR。當至少85%、90%、95%或100%之由Kabat所定義之相應殘基相同時，抗體鏈之可變區構架序列或抗體鏈之恆定區分別實質上來自人類可變區構架序列或人類恆定區。

嵌合抗體為其中非人類抗體(例如小鼠)之輕鏈及重鏈之成熟可變區與人類或非人類靈長類輕鏈及重鏈恆定區組合之抗體。該等抗體實質上或完全保留小鼠抗體之結合特異性，且為約三分之二人類或非人類靈長類序列。

面飾化抗體為一種類型之人類化抗體，其保留一些且通常所有的CDR及非人類抗體之非人類可變區構架殘基中之一部分，但用人類抗體序列之相應位置的殘基置換可有助於B細胞或T細胞抗原決定基的其他可變區構架殘基，例如經曝露殘基(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)。結

果為其中CDR完全或實質上來自非人類抗體且非人類抗體之可變區構架藉由取代而變得更像人類之抗體。

抗體-藥物結合物(ADC)包含結合至藥物之抗體。藥物為已知或疑似具有通常為細胞毒性或細胞生長抑制活性之藥理學活性之化合物。

當據稱抗體藥物結合物之抗體組分包括位置239及/或295處或位置239及/或294處之半胱胺酸時，這意謂該抗體在結合至結合物中之藥物之前包括半胱胺酸。在結合物中，半胱胺酸經由使其硫氫基結合至藥物或連接子而衍生化。

當據稱抗體與藥物結合時，連接可為直接的或經由一或多個連接部分為間接的。

I. 概要

本發明提供包括以EU編號之位置294或295處及視情況以EU編號之位置239處之半胱胺酸的經修飾重鏈恆定區。此等半胱胺酸殘基提供用於結合至藥物或標記物之位點。當每重鏈兩個半胱胺酸均以正常異二聚抗體格式存在時，每抗體分子存在四個該等位點，允許一個抗體分子對四個藥物或標記物之化學計量。由於容易表現、穩定性及細胞毒性，所以選擇位置294或295處之半胱胺酸及位置239處具有或不具有半胱胺酸優於多個其他位置處之半胱胺酸。本發明亦提供包括結合至妥布賴森M之以EU編號之位置295處之半胱胺酸的經修飾重鏈恆定區。

位置239、294及295處之半胱胺酸特別地有利於結合至諸如妥布賴森或PBD之疏水性藥物。儘管本發明之實踐並非取決於對機制之理解，但咸信接近於該等結合位點之糖基化遮蔽疏水性部分，增大其穩定性及半衰期。

II. 重鏈恆定區

提供人類IgG1、IgG2、IgG3及IgG4之例示性野生型序列作為SEQ ID NO.1-4。本發明之較佳恆定區具有SEQ ID NO. 1、2、3或4之序列，除了位置295係經半胱胺酸佔據(分別為SEQ ID NO.5-8)或位置295及位置239係經半胱胺酸佔據(分別為SEQ ID NO.9-12)。本發明之其他較佳恆定區具有SEQ ID NO: 1、2、3或4之序列，除了位置294係經半胱胺酸佔據(分別為SEQ ID NO: 13-16)或位置294及239係經半胱胺酸佔據(分別為SEQ ID NO.17-20)。

若恆定區不同於指定同型不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次取代、缺失或內部插入，則恆定區視為具有彼同型，然而CH1結構域可完全省略如同上鉸鏈區一樣。與指定SEQ ID NO之變化可代表一種或數種自然的異型或同種異型變化，即提高或降低諸如補體介導之細胞毒性或ADCC的效應功能(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)或延長人類中之半衰期(參見 例如 Hinton等人，J. Biol. Chem. 279:6213, 2004)之變化，其中例示性取代包括位置250處之Gln及/或位置428處之Leu (EU編號)。其他變化可添加或移除轉譯後修飾(諸如N-X-S/T基元處之N-連接的糖基化)之位點。變化亦可包括引入旋鈕(亦即用更大的胺基酸置換一或多個胺基酸)或孔洞(亦即用更小的胺基酸置換一或多個胺基酸)以促進在不同重鏈之間形成異二聚體來用於產生雙特異性抗體。形成旋鈕及孔洞對之例示性取代分別為T336Y及Y407T (Ridgeway等人，Protein Engineering 第9卷, 第7號, 第617-621頁, 1996)。恆定區之C端之一或多個殘基，尤其重鏈上之C端離胺酸，可由於轉譯後修飾而喪

失。

經修飾恆定區及合併該等恆定區之抗體或融合蛋白質之特徵較佳在於容易表現、穩定性、減少的糖基化、結合可接近性及實質上不變的效應功能及抗原之親和力。亦即，結合親和力通常在實驗誤差內或至少在具有同型匹配的野生型恆定區之合適對照抗體之2或3倍內為相同的。效應功能之情況相同。

經修飾恆定區或合併與同型匹配的對照物相比較之經修飾恆定區之抗體或融合蛋白質的免疫原性可在活體外自攻擊時之樹突成熟或T-細胞增殖(Gaitonde等人，Methods Mol. Biol. 2011;716:267-80)或在活體內藉由比較群體之間的反應性抗體對抗經投與抗體之發生率來評定。經修飾恆定區或合併經修飾恆定區之抗體或融合蛋白質的免疫原性較佳不顯著地不同於同型匹配的對照物或不差於同型匹配的對照物之2、3或5倍。

III. 抗體及融合蛋白質

上文所描述之經修飾重鏈恆定區可併入至抗體或融合蛋白質中。例如，以二價單特異性抗體之表現而言，經修飾重鏈恆定區表現為與重鏈可變區融合且連同包括輕鏈可變區及輕鏈恆定區之輕鏈一起表現。重鏈及輕鏈經由重鏈及輕鏈恆定區之CH1區域彼此結合以形成異二聚體。隨後兩個異二聚體藉由聯合IgG重鏈之鉸鏈、CH2及CH3區域進行配對以形成四聚體單元，如同習知抗體之情況。以雙特異性抗體之表現而言，經修飾重鏈恆定區表現為與具有不同靶特異性之兩個重鏈可變區中之每一者融合。重鏈可各自與共表現的輕鏈組合且重鏈-輕鏈複合物形成兩個重鏈均存在之異二聚體。輕鏈可變區在一個單元內可相同(參見例如US 20100331527A1)或不同。

經修飾恆定區可與包括嵌合、人類化、面飾化或人類抗體之任何類型的工程化抗體一起使用。抗體可為單株抗體或基因工程化多株抗體製劑(參見US 6,986,986)。

以融合蛋白質而言，經修飾恆定區表現為連接至異源多肽。融合蛋白質中之異源多肽為非自然性地連接至免疫球蛋白恆定區之多肽。此類多肽可為全長蛋白質或其長度足以保持與由全長蛋白質結合之抗原的特異性結合之任何片段。例如，異源多肽可為受體細胞外結構域或其配位體。異源多肽提供恆定區之N端處之結合區且有時簡稱為結合區。IgG CH1區域通常不包括於融合蛋白質之恆定區中。鉸鏈區或其部分，尤其上鉸鏈區，有時被省略或置換為合成連接子肽。細胞外結構域可與本發明之經修飾重鏈恆定區組合之例示性受體蛋白質包括TNF-α受體ECD、LFA-3 ECD、CTLA-4 ECD、IL-1R1 ECD、TPO模擬物、VEGFR1或VEGFR2 ECD。

IV. 抗體表現

編碼抗體鏈或融合蛋白質之核酸可藉由固態合成、PCR擴增重疊的寡核苷酸片段或定點突變誘發現有之核酸來製成。該等核酸在表現載體中表現。載體可經組態以對經修飾重鏈恆定區及/或人類輕鏈恆定區進行編碼以使得其可表現為與插入的重鏈及輕鏈可變區或異源多肽之融合體。

載體中之複製起點及表現控制元件(啟動子、強化子、信號肽等)可經組態以用於不同細胞類型，諸如細菌、酵母或其他真菌、昆蟲細胞及哺乳動物細胞。哺乳動物細胞為用於表現對本發明之抗體或融合蛋白質進行編碼之核苷酸片段的較佳宿主(參見Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987))。能夠分泌完整異源蛋白質之多種合適的宿主細胞株已在此項技術中研發出，且包括CHO細胞株、各種COS細胞

株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞及包括Sp2/0及NS0之非抗體產生之骨髓瘤。該等細胞較佳為非人類的。本發明之抗體或融合蛋白質較佳由單株細胞株表現。

此等細胞之表現載體可包括諸如複製起點、啟動子、強化子(Queen等人，Immunol. Rev. 89:49 (1986))之表現控制序列，及諸如核糖體結合位點、RNA剪接位點、多腺苷酸化位點之必需的加工資訊位點，以及轉錄終止子序列。較佳表現控制序列係衍生自內源基因、細胞巨大病毒、SV40、腺病毒、牛乳突狀瘤病毒及其類似物之啟動子。參見Co等人，J. Immunol. 148:1149 (1992)。

細胞經一或多種編碼待表現之抗體或融合蛋白質之載體轉染。對於多鏈抗體，重鏈及輕鏈可表現在相同或單獨載體上。對於多重特異性複合物之表現，對複合物之組分(亦即不同抗體或融合蛋白質)進行編碼之DNA可處於相同或不同載體上。

表現抗體或融合蛋白質鏈、加工以移除信號肽、組合且自宿主細胞分泌。抗體或融合蛋白質可藉由習知的抗體純化方法由細胞培養上澄液純化。若雜交體恆定區包括IgG部分，則隨後純化可包括使用蛋白質A或蛋白質G作為親和性試劑之層析步驟。亦可使用諸如離子交換、羥磷灰石層析或HPLC之習知抗體純化程序(一般參見Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982))。

在一些方法中，其中重鏈包括位置(a) 239及(b) 294或295處之半胱胺酸的抗體或融合蛋白質在結合之前經還原劑處理以抑制二硫鍵，尤其位置239及294或295處之半胱胺酸之間的分子內二硫化物形成。還原劑較佳包括於用於培養抗體之培養基中。用於保護硫氫基鍵之合適的還原劑之實

例包括二硫蘇糖醇、β-巯基乙醇或三(2-羧基乙基)膦或其任何組合。培養基中之較佳還原劑為二硫蘇糖醇。培養基中之二硫蘇糖醇或其他還原劑之濃度可為例如0.1-5 mM或0.5-2.5或0.9至1.5 mM。

相反地，具有位置239及294或295處之半胱胺酸的抗體或融合蛋白質當在不具有還原劑之培養基中培養時產生超唾液酸化及/或GlcNac之三及四觸角分支化。

V. 抗體藥物結合物

引入至重鏈恆定區中之半胱胺酸殘基提供用於結合至藥物之位點，尤其細胞毒性或細胞生長抑制部分作為抗體藥物結合物(ADC)。相較於裸抗體，ADC提供額外的機制，特別地輸送偶合至抗體之毒性部分至細胞內部，由此殺死細胞或以其他方式抑制其增殖。當前,發售四種ADC：本妥昔單抗維多汀(brentuximab vedotin)(抗CD30，商標名：ADCETRIS®，由Seattle Genetics and Millennium/Takeda發售)、曲妥珠單抗恩他新(trastuzumab emtansine)(抗HER2，商標名：Kadcyla®，由Genentech and Roche發售)、奧英妥珠單抗奧佐米星(inotuzumab ozogamicin)(抗CD22，商標名Besponsa，由Pfizer發售)及吉妥單抗奧佐米星(gemtuzumab ozogamicin)(抗CD33，商標名：Mylotarg，由Pfizer發售)。多種其他ADC在研發之各種階段中。

用於將藥物結合至抗體之技術為眾所周知的(參見例如Arnon等人，「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」, 在*Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld 等人編, Alan R. Liss, Inc., 1985)中；Hellstrom等人，「Antibodies For Drug Delivery」, 在*Controlled Drug Delivery* (Robinson 等人編, Marcel

Dekker, Inc., 第2版 1987)中；Thorpe,「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, 在*Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera 等人編, 1985)中；「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」, 在*Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin 等人編, Academic Press, 1985)中；及Thorpe等人，1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58。*亦參見*例如WO 89/12624。)。

半胱胺酸含有游離硫氫基，其比胺更具有親核性且通常為蛋白質中之最具反應性官能基。不同於大部分胺，硫氫基通常在中性pH下具有反應性，且因此可在存在胺的情況下選擇性地偶合至其他分子。此選擇性使硫氫基成為用於偶合抗體之精選連接子。每分子抗體之分子藥物之平均數目通常為1、2、3或4。

藥物可以減少其活性之方式結合，除非其自抗體裂解掉(例如藉由水解，藉由抗體降解或藉由裂解劑)。此類藥物連接至具有可裂解連接子的抗體，該連接子對在靶細胞之細胞內環境中裂解具有敏感性但對細胞外環境不具有實質敏感性，從而使得結合物當由靶細胞內在化時自抗體裂解(例如在胞內體環境中或例如藉助於pH敏感性或蛋白酶敏感性，在溶酶體環境中或在胞膜窖(caveolear)環境中)。

ADC通常在藥物與抗體之間包含連接子區域。連接子可在細胞內條件下裂解以使得細胞內環境中之連接子裂解自抗體釋放藥物(例如在溶酶體或胞內體或胞膜窖內)。連接子可為例如藉由包括溶酶體或胞內體蛋白酶之細胞內肽酶或蛋白酶裂解之肽基連接子。肽基連接子通常為至少兩個

胺基酸長或至少三個胺基酸長。裂解劑可包括組織蛋白酶B及D及纖維蛋白溶酶(參見例如Dubowchik及Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123)。最典型的肽基連接子為可由存在於靶細胞中之酶裂解的肽基連接子。舉例而言，可使用可由在癌性組織中高度表現之硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶B裂解之肽基連接子(例如包含Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly肽之連接子)。其他此類連接子描述於例如US 6,214,345中。可藉由細胞內蛋白酶裂解之例示性肽基連接子包含Val-Cit連接子或Phe-Lys二肽(參見例如US 6,214,345，其描述具有Val-Cit連接子之小紅莓之合成)。使用細胞內蛋白酶釋放藥物之一個優點為試劑當結合時通常弱化且結合物之血清穩定性通常較高。

可裂解連接子可具有pH敏感性，即對在特定pH值下之水解具有敏感性。pH敏感性連接子通常可在酸性條件下水解。舉例而言，可使用可在溶酶體中水解之酸不穩定連接子(例如腙、半卡腙、硫半卡腙、順式烏頭酸醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或其類似物)。(參見例如US 5,122,368；5,824,805；5,622,929；Dubowchik及Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123；Neville等人，1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661。) 此類連接子在中性pH條件(諸如血液中之pH值條件)下相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0即溶酶體之近似pH下不穩定。此類可水解連接子之一個實例為硫醚連接子(諸如(例如)經由醯腙鍵連接至藥物之硫醚(*參見*例如US 5,622,929))。

其他連接子可在還原條件下裂解(例如二硫化物連接子)。二硫化物連接子包括彼等可使用SATA (N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫基乙酸酯)、SPDP (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB (N-丁二醯亞

胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT (N-丁二醯亞胺基-氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫基)甲苯)形成之二硫化物連接子。(參見例如Thorpe等人，1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931；Wawrzynczak等人，*Immunoconjugates*: *Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel 編, Oxford U. Press, 1987。*亦參見*美國專利第4,880,935號)。

連接子亦可為丙二酸酯連接子(Johnson等人，1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93)、順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基連接子(Lau等人，1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304)或3'-N-醯胺類似物(Lau等人，1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12)。

連接子亦可為不可裂解連接子，諸如直接連接至藥物之順丁烯二醯亞胺基-伸烷基-或順丁烯二醯亞胺-芳基連接子。活性藥物-連接子藉由降解抗體來釋放。

連接子為包含對存在於抗體上之基團具有反應性之官能基的連接子。例如，連接子可經由連接子之硫原子與抗體之硫原子之間的雙硫鍵連接至抗體。作為另一實例，連接子可經由延伸子單元之順丁烯二醯亞胺基與抗體之硫原子一起形成鍵。硫原子可來自鏈間二硫化物之半胱胺酸殘基或來自引入至抗體中之半胱胺酸殘基。

對結合至抗體之有用類別的細胞毒性劑包含例如抗微管蛋白劑、DNA小凹槽結合劑、DNA複製抑制劑、化學治療敏化劑、吡咯并苯并二氮呯二聚體或其類似物。其他例示性類別的細胞毒性劑包括蒽環黴素、奧瑞他汀(auristatin)、喜樹鹼、倍癌黴素、依托泊苷(etoposide)、類美登素及長春花屬生物鹼。一些例示性細胞毒性劑包括奧瑞他汀(例如奧瑞他汀

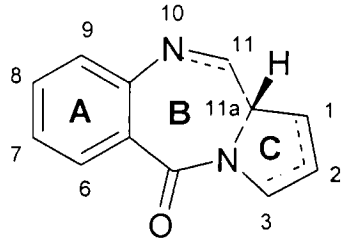
E、AFP、MMAF、MMAE)、DNA小凹槽結合劑(例如烯二炔及萊克希托普森(lexitropsin))、倍癌黴素、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇)、長春花屬生物鹼、小紅莓、N-嗎啉基-小紅莓及氰基-N-嗎啉基-小紅莓。

細胞毒性劑可為化學治療劑，諸如(例如)小紅莓、太平洋紫杉醇、美法侖(melphalan)、長春花屬生物鹼、甲胺喋呤、絲裂黴素C或依托泊苷。試劑亦可為CC-1065類似物、卡奇黴素、美登素、海兔毒素10之類似物、根黴毒素(rhizoxin)或沙海葵毒素。

細胞毒性劑亦可為奧瑞他汀。奧瑞他汀可為奧瑞他汀E衍生物，其例如為形成於奧瑞他汀E與酮基酸之間的酯。例如，可使奧瑞他汀E與對乙醯基苯甲酸或苯甲醯基戊酸反應以分別產生AEB及AEVB。其他典型的奧瑞他汀包括奧瑞他汀苯丙胺酸苯二胺(AFP)、單甲基奧瑞他汀F (MMAF)及單甲基奧瑞他汀E (MMAE)。各種奧瑞他汀之合成及結構描述於例如US 2005-0238649及US2006-0074008中。

細胞毒性劑可為DNA小凹槽結合劑。(*參見*例如US 6,130,237)。例如，小凹槽結合劑可為CBI化合物或烯二炔(例如卡奇黴素)。另一種類別的小凹槽結合劑為吡咯并苯并二氮呼(PBD)二聚體。PBD經由其N10-C11亞胺/甲醇胺部分共價結合至DNA小凹槽內部之鳥嘌呤殘基之C2氨基位置來發揮其生物活性。例示性抗體-藥物結合物包括基於PBD之抗體-藥物結合物；亦即其中藥物組分為PBD藥物之抗體-藥物結合物。

PBD具有通式結構：



其在取代基之數目、類型與位置方面不同，在其芳族A環與吡咯并C環方面不同且在C環之飽和度方面不同。在B環中，在N10-C11位置處存在亞胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲基醚(NH-CH(OMe))，其為引起DNA烷基化之親電子中心。所有已知的天然產物在手性C11a位置處均具有(S)-組態，當由C環朝向A環查看時該(S)-組態為其提供右旋扭轉。這賦予其具有B-形態DNA之小凹槽之等螺旋性的適當三維形狀，引起結合位點處之適貼擬合。PBD在小凹槽中形成加合物之能力使其能夠干擾DNA加工，因此其用作抗瘤劑。

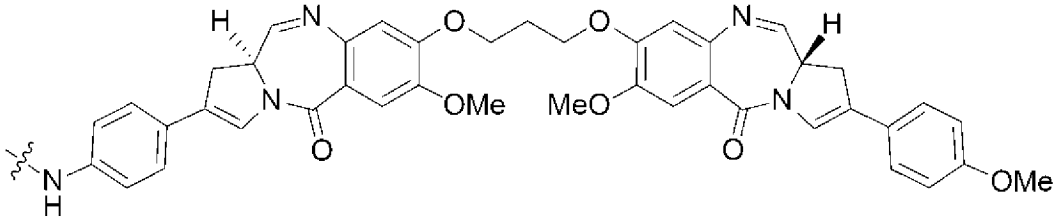
此等分子之生物活性可藉由使兩個PBD單元經其C8/C'-羥基官能基經由可撓性伸烷基連接子連接在一起來增強。認為PBD二聚體形成序列選擇性DNA損傷，諸如認為主要對其生物活性負責之回文5'-Pu-GATC-Py-3'股間交叉連接。

在一些實施例中，基於PBD之抗體-藥物結合物包含與抗體連接之PBD二聚體。形成PBD二聚體之單體可相同或不同，亦即對稱或不對稱。PBD二聚體可在適合與連接子結合之任何位置處與抗體連接。舉例而言，在一些實施例中，PBD二聚體將在C2位置處具有提供用於將化合物連接至抗體之錨定物的取代基。在替代實施例中，PBD二聚體之N10位置將提供用於將化合物連接至抗體之錨定物。

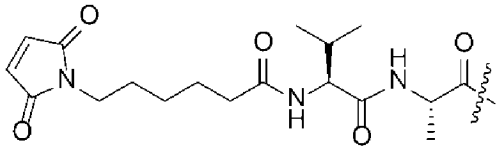
基於PBD之抗體-藥物結合物通常在PBD藥物與結合至原發癌之抗原的抗體之間包含連接子。連接子可包含可裂解單元(例如胺基酸或作為酶

之靶受質的連續序列之胺基酸)或不可裂解連接子(例如藉由降解抗體釋放之連接子)。連接子可進一步包含用於與抗體連接之順丁烯二醯亞胺基，例如，順丁烯二醯亞胺基己醯基。在一些實施例中，連接子可進一步包含自我分解型基團，諸如(例如)對胺基苯甲醇(PAB)單元。

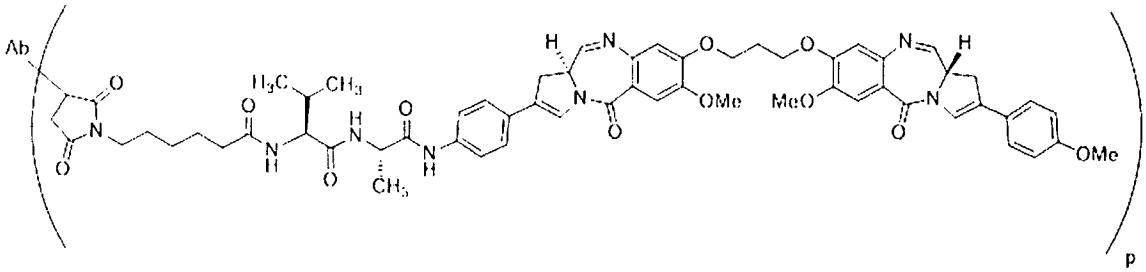
用作結合物之例示性PBD描述於國際申請案第WO 2011/130613號中且如下，其中波浪線指示連接至連接子之位點：



或其醫藥學上可接受之鹽。例示性連接子如下，其中波浪線指示連接至藥物之位點且抗體經由順丁烯二醯亞胺基連接。



例示性基於PBD之抗體-藥物結合物包括如下文所示之抗體-藥物結合物，其中Ab為如本文所描述之抗體：



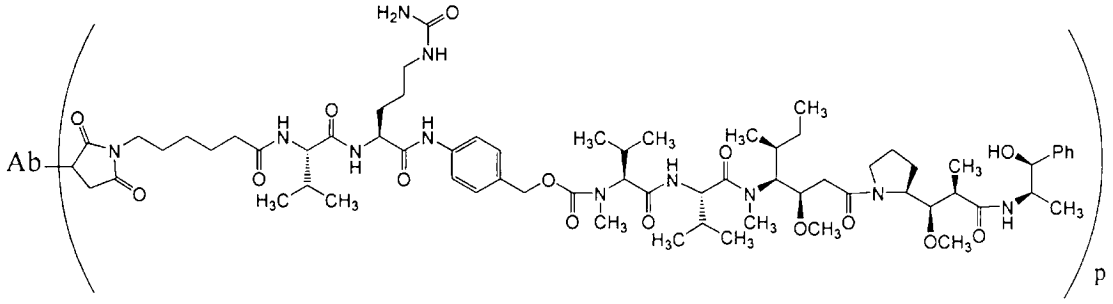
或其醫藥學上可接受之鹽。藥物負載量由p表示，即每抗體之藥物-連接子分子之數目。

細胞毒性劑或細胞生長抑制劑可為抗微管蛋白劑。抗微管蛋白劑之實例包括紫杉烷(例如Taxol® (太平洋紫杉醇)、Taxotere® (多烯紫杉醇))、T67 (Tularik)、長春花屬生物鹼(例如長春新鹼、長春鹼、長春地辛

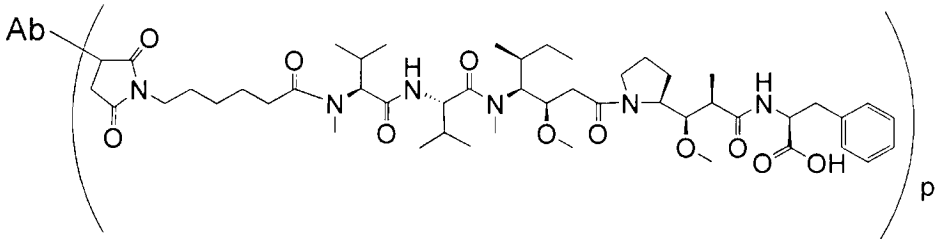
及長春瑞濱)及奧瑞他汀(例如奧瑞他汀E、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)。例示性奧瑞他汀以式III-XIII顯示在下文中。其他合適的抗微管蛋白劑包括例如漿果赤黴素衍生物、紫杉烷類似物(例如埃坡黴素A及B)、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙素及乙醯甲基秋水仙素(colcimid)、雌莫司汀(estramustine)、克瑞普托非森(cryptophysin)、西馬多丁(cemadotin)、類美登素、康普瑞汀(combretastatin)、迪斯德莫來(discodermolide)及艾榴素(eleutherobin)。

細胞毒性劑可為類美登素，即另一組抗微管蛋白劑。例如，類美登素可為美登素或含有諸如DM -1或DM-4之藥物連接子之美登素(ImmunoGen, Inc.；亦參見Chari等人，1992, Cancer Res. 52:127-131)。

例示性抗體藥物結合物包括如下的vcMMAE及mcMMAF抗體藥物結合物，其中p表示藥物負載量且通常在1至4範圍內，較佳2或4，且Ab為抗體：



vcMMAE



mcMMAF

用於結合至抗體之其他細胞毒性劑為妥布賴森及其類似物，其為另

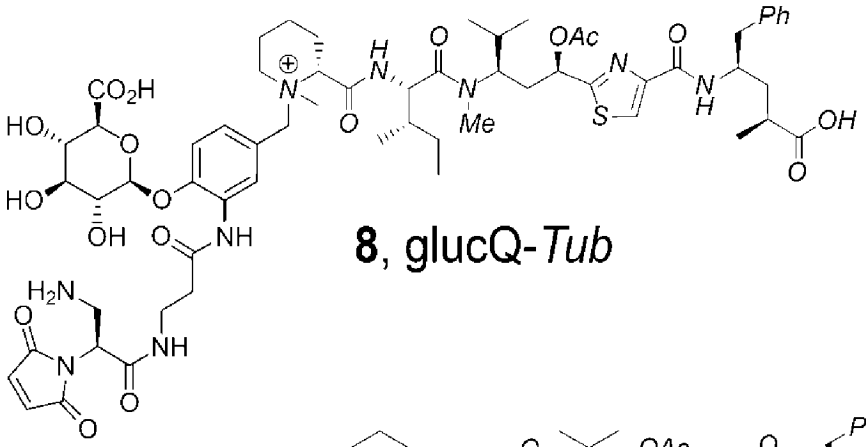
一組如下文所例示之抗微管蛋白劑。

在一些態樣中，彼等細胞毒性劑經由β-葡萄糖苷酸連接子結合至抗體。葡萄糖苷酸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。

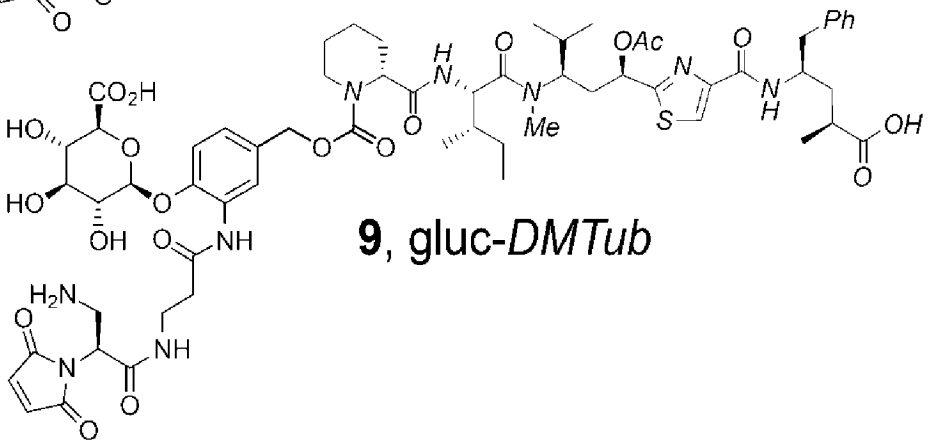
位置295或294及239雙半胱胺酸變異體特別地適合於結合至疏水性藥物，因為接近於聚糖殘基之結合位點係用於遮蔽疏水性藥物。連接至此等細胞毒性劑之妥布賴森及葡萄糖苷酸連接子更完全地描述於WO2016040684中。

用於結合至雙半胱胺酸殘基之連接葡萄糖苷酸之妥布賴森藥物連接子化合物之非限制性實例藉由化合物8及9 (下文)給出，其中妥布賴森藥物單元為妥布賴森M或去甲基妥布賴森M。妥布賴森M亦稱為：

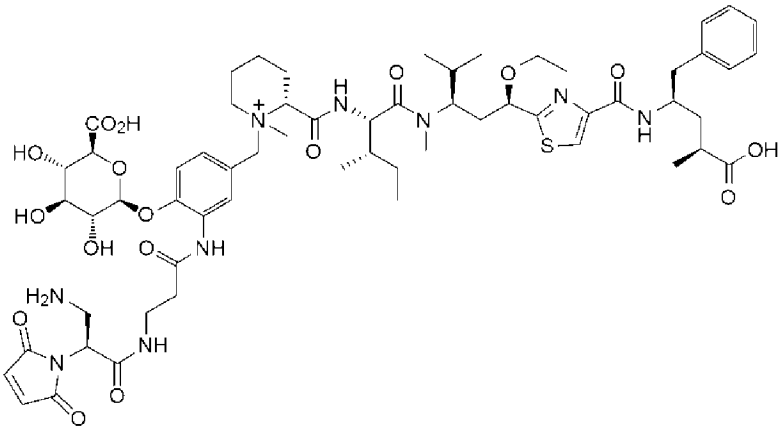
(αS,γR)-γ-[[[2-[(1R,3R)-1-(乙醯氧基)-4-甲基-3-[甲基[(2S,3S)-3-甲基-2-[[[(2R)-1-甲基-2-哌啶基]羰基]胺基]-1-側氧基戊基]胺基]戊基]-4-噻唑基]羰基]胺基]-α-甲基-苯戊酸且具有CAS第936691-46-2號。



8, glucQ-*Tub*

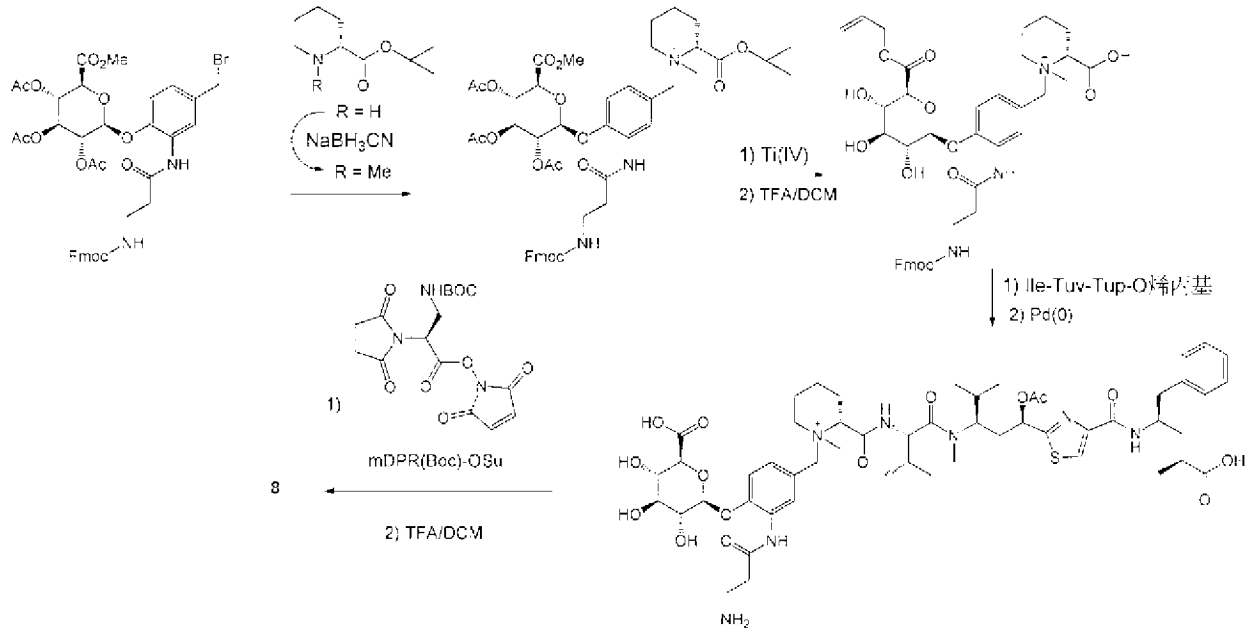


9, gluc-*DMTub*



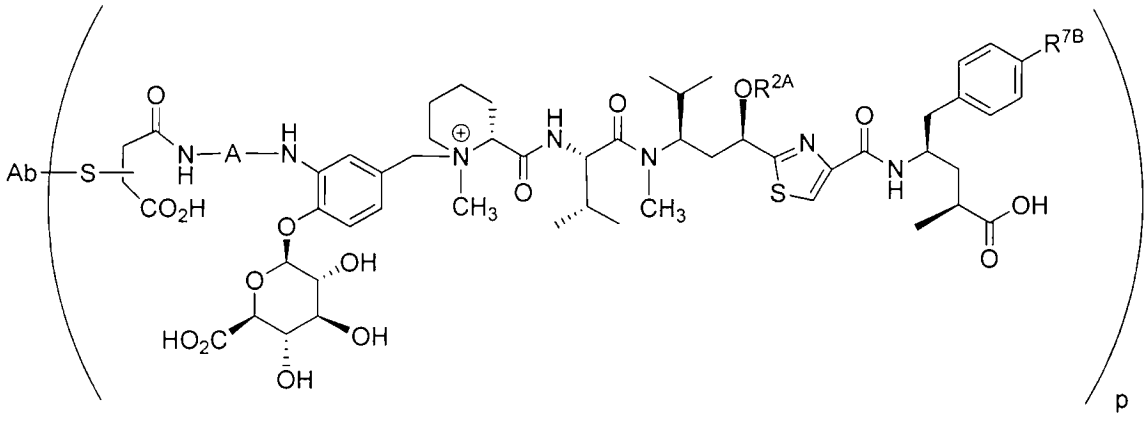
連接至葡萄糖苷酸連接子之妥布賴森M之醚變異體顯示於上文中。

基於葡萄糖苷酸之妥布賴森藥物連接子化合物8及其妥布賴森酯及醚變異體之製備係詳述於WO2016040684中且特定言之以引用的方式併入本文中，其藉由以下反應流程例示：



mDPR(Boc)-OH轉化成其活化酯mDPR(BOC)-OSu及mDPR(BOC)-OPFF之製備係描述於Nature Biotech, 2014, 32, 1059-1062中，其程序特定地以引用的方式併入本文中，且製備葡萄糖苷酸中間物，將其溴化用於四級銨化妥布賴森M藉由Molecular Cancer Therapeutics 15, 938-945 (2016)來描述，其程序特定地以引用的方式併入本文中。

妥布賴森M及其類似物之抗體藥物結合物如下例示，其中特吡瓦林(tubuvaline)殘基之乙酸酯基置換為使葡萄糖苷酸連接子經由四級銨化氮原子而連接至妥布賴森Mep殘基之三級胺氮的醚或另一酯基，且其可由諸如上文所描述之彼等的藥物連接子化合物製備：



,

其中R2A為-C(=O)R2B，其中R2B為甲基、乙基、丙基、異丙基、3-

甲基-丙-1-基、3,3-二甲基-丙-1-基或乙烯基，或R2A為甲基、乙基、丙基、異丙基、丙-2-烯-1-基或2-甲基-丙-2-烯-1-基，且其中R7B為-H或-OH，其中p表示藥物負載量且通常在1至4範圍內且在一些態樣中為2或4，Ab為抗體且S為半胱胺酸295或半胱胺酸239之硫原子。

抗體或融合蛋白質亦可經由佔據位置295及視情況239之半胱胺酸結合至可檢測標識物，諸如酶、發色團或螢光標記物。

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來連接(參見例如WO2003/068934、WO2004/009638、WO 2009/025846、WO2101/081173及WO2014103973)。連接子可設計成藉由對特定組織或病理具有特異性之酶來裂解，因此允許抗體在所需位置中優先活化。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。

VI. 靶

一些此類抗體對癌細胞抗原具有免疫特異性，較佳在抗體結合時在細胞內可內在化之細胞表面上之抗原。抗體可針對的靶包括癌細胞上之受體及其配位體或反受體(例如CD3、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD40、CD44、CD47、CD52、CD70、CD79a、CD123、Her-2、EphA2、GPC3淋巴細胞相關的抗原1、VEGF或VEGFR、CTLA-4、LIV-1、結合素-4、CD74及SLTRK-6)。

商業抗體及其適合於應用本發明方法之靶的一些實例包括本妥昔單抗或本妥昔單抗維多汀、CD30、阿侖單抗、CD52、利妥昔單抗、CD20、曲妥珠單抗Her/neu、尼妥珠單抗、西妥昔單抗、EGFR、貝伐單抗、VEGF、帕利珠單抗、RSV、阿昔單抗、GpIIb/IIIa、英利昔單抗、

阿達木單抗、賽妥珠單抗、戈利木單抗TNF-α、巴利昔單抗、達利珠單抗、IL-2、奧馬珠單抗、IgE、吉妥單抗或瓦達斯妥昔單抗(vadastuximab)、CD33、那他珠單抗、VLA-4、維多珠單抗α4β7、貝利木單抗、BAFF、奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗CD3 (teplizumab CD3)、奧法木單抗、奧瑞珠單抗CD20、依帕珠單抗CD22、阿拉珠木單抗CD52 (alemtuzumumab CD52)、艾庫組單抗C5、卡那奇木單抗IL-1β (canakimumab IL-1β)、美泊利單抗IL-5、瑞利珠單抗、托珠單抗IL-6R、優特克單抗、貝伐珠單抗(briakinumab) IL-12、23、hBU12 (CD19) (US20120294853)、人類化1F6或2F12 (CD70) (US20120294863)、BR2-14a及BR2-22a (LIV-1) (WO2012078688)。例示性抗體之一些序列在序列表中提供。

VII. 醫藥組合物及治療方法

根據上文所描述之方法生成之抗體藥物結合物以有效療法進行投與，該有效療法意謂延遲發作、降低嚴重性、進一步抑制惡化及/或改善至少一種意欲治療之疾病(諸如癌、自體免疫疾病或感染，包括如上文所述之適應症中之任一者)之徵兆或症狀的劑量、投與途徑及投與頻率。若病患已患有疾病，則療法可稱作治療上有效之療法。若病患係相對於一般群體而言具有高得病風險，但又未經歷症狀，則療法可稱作預防上有效之療法。在一些情況下，可以在個別病患中相對於同一病患之歷史對照或過去經歷觀察到治療性或預防性功效。在其他情況下，可在臨床前或臨床試驗中在經治療病患群體中相對於未經治療病患之對照群體證實治療性或預防性功效。

用於抗體藥物結合物之例示性劑量為0.001 mg/kg至100 mg/kg、5

mg-50 mg/kg、10 mg-25 mg/kg、1 mg/kg至7.5 mg/kg或2 mg/kg至7.5 mg/kg或3 mg/kg至7.5 mg/kg個體體重，或以0.1-20或0.5-5 mg/kg 體重(例如0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10 mg/kg)或作為固定劑量之10-15000、200-15000或500-10,000 mg。用於例如結合至奧瑞他汀或妥布賴森之其活性單株抗體藥物結合物之例示性劑量為1 mg/kg至7.5 mg/kg，或2 mg/kg至7.5 mg/kg或3 mg/kg至7.5 mg/kg個體體重，或0.1-20或0.5-5 mg/kg體重 (例如0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10 mg/kg)或作為固定劑量之10-1500或200-1500 mg。用於例如結合至PBD之其高度活性單株抗體藥物結合物之例示性劑量為1.0 μg/kg至1.0 mg/kg或1.0 μg/kg至500.0 μg/kg個體體重。

在一些方法中，每兩週、三週或四週投與病患ADC。除其他因素之外，劑量視投與頻率、病患情況及先前治療之反應而定，若存在，則無論該治療為預防性或治療性且無論病症為急性或慢性的。劑量亦視結合、效應功能或細胞毒性之降低而定。

投與可以非經腸、靜脈內、經口、皮下、動脈內、顱內、鞘內、腹膜內、局部、鼻內或肌肉內方式進行。投與亦可直接諸如定位至腫瘤中。較佳係藉由靜脈內或皮下投與而投與至體循環中。靜脈內投與可例如藉由在諸如30-90時間之一時段內之輸液或藉由單次快速注射來進行。

除其他因素之外，投與頻率視循環中之抗體之半衰期、病患情況及投與途徑而定。回應於病患情況之變化或所治療癌症之進展，頻率可為每天一次、每週一次、每月一次、每季度一次或以不規律間隔。在治療之連續性過程內，靜脈內投與之例示性頻率在一週兩次與每季度一次之間，但更高頻率或更低頻率的給藥亦為有可能的。在治療之連續性過程內，用於

靜脈內投與之其他例示性頻率在每週一次或每四週三次之間，但更高頻率或更低頻率的給藥亦為有可能的。對於皮下投與，例示性給藥頻率為每天一次至每月一次，但更高頻率或更低頻率的給藥亦為有可能的。

投與劑量之數目視疾病本質(例如無論呈現急性或慢性症狀)及病症對治療之反應而定。對於急性病症或慢性病症之急性惡化，1個與10個劑量之間常常為足夠的。有時，視情況呈分開形式之單次快速給藥對於急性病症或慢性病症之急性惡化而言為足夠的。對於急性病症之復發或急性惡化，治療可以重複。對於慢性病症，抗體可以常規間隔投與，例如每週一次、每兩週一次、每月一次、每季度一次、每六個月一次，持續至少1、5或10年，或病患的一生。

用於非經腸投與之醫藥組合物較佳為無菌且實質上等滲的(240-360 mOsm/kg)且在GMP條件下製造。醫藥組合物可以單位劑型(亦即用於單次投與之劑量)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。調配視所選之投與途徑而定。對於注射，抗體可調配成水溶液，較佳成生理上相容之緩衝液，諸如漢氏溶液(Hank's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理鹽水或乙酸鹽緩衝液(以減少注射部位的不適)。溶液可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。可替代地，抗體可呈凍乾形式，以在使用前用合適的媒劑(例如無菌的無熱原水)進行復水還原。液體調配物中之抗體之濃度可為例如1-100 mg/ml，諸如10 mg/ml。

用本發明之抗體進行之治療可與化學治療、輻射、幹細胞治療、手術、抗病毒劑、抗生素、免疫抑止劑或刺激劑或其他有效對抗所治療之病症的治療組合。可與ADC一起投與以用於治療癌症或自體免疫疾病之有

用類別之其他試劑包含例如針對表現於癌細胞上之其他受體的抗體、抗微管蛋白劑(例如奧瑞他汀)、DNA小凹槽結合劑、DNA複製抑制劑、烷基化劑(例如鉑錯合物，諸如順鉑(cis-platin)、單(鉑)、雙(鉑)及三核鉑錯合物及卡鉑)、蒽環黴素、抗生素、抗葉酸劑、抗代謝物、化學治療敏化劑、倍癌黴素、依托泊苷、氟化嘧啶、離子載體、萊克希托普森、亞硝基脲、順鉑(platinol)、預成型化合物、嘌呤抗代謝物、嘌黴素、輻射敏化劑、類固醇、紫杉烷、拓樸異構酶抑制劑、長春花屬生物鹼及其類似物。

與相同但不具有抗體的治療(例如化學治療)相比，具有抗體之治療可延長患有腫瘤之病患的中間無進展存活時間或總存活時間，尤其當腫瘤為復發性或難治性時，延長至少30%或40%但較佳50%、60%至70%或甚至100%或更長。另外或替代地，與相同但不具有抗體之治療(例如化學治療)相比，包括抗體之治療(例如標準化學治療)可提高患有腫瘤之病患的完全反應率、部分反應率或客觀反應率(完全+部分)至少30%或40%但較佳50%、60%、至70%或甚至100%。

通常，在臨床試驗(例如II期、II/III期或III期試驗)中，相對於獲得單獨標準治療(或加上安慰劑)之對照組病患，用標準治療加上抗體治療之病患的中間無進展存活期及/或反應率之前述增加在統計學上較顯著，例如達到p=0.05或0.01或甚至0.001程度。完全及部分反應率係藉由常用於癌症之臨床試驗中之客觀準則來確定，例如由(美國)國家癌症研究院(National Cancer Institute)及/或食品藥物管理署(Food and Drug Administration)所列或所公認的客觀準則。

儘管本發明出於清楚理解之目的已進行詳細地描述，但可在隨附申請專利範圍之範疇內實施特定修改。本申請案中所引用之所有公開、寄存

編號、網址、專利文件及其類似物出於所有目的均以全文引用的方式併入本文中，其引用程度如同各者係如此單獨指示一般。就不同資訊係與在不同時間之引用文件相關聯而言，意謂自本申請案之有效提交日起所存在之資訊。有效提交日為揭示所述寄存編號之最早的優先申請案的日期。除非自上下文中另外顯而易見，否則本發明之任何要素、實施例、步驟、特性或態樣可與任何其他者組合執行。

實例

抗體表現及純化

使用吉布森組件(Gibson Assembly)將含有IgG1 Fc突變之DNA串選殖至表現載體中。半胱胺酸突變質體以及相應的輕鏈經轉染至自由式CHO-S細胞中且9天之後收穫所得上澄液。重鏈中含有半胱胺酸突變之抗體係藉由Mab精選蛋白質A親和性柱來純化。

聚糖分析

使用反相(RP)UPLC-MS來評定半胱胺酸工程化抗體之質量及聚糖含量。使用DTT還原抗體且接著在具有或不具有去糖基化處理(PNGase)之情況下進行分析。

順丁烯二醯亞胺及妥布賴森穩定性檢定

為評定順丁烯二醯亞胺水解及穩定性，使用vcMMAE來結合半胱胺酸工程化抗體且接著在大鼠血漿中培育0、4及7天。ADC係使用抗人類捕捉樹脂來自血漿純化，用DTT還原且接著使用RP UPLC-MS進行分析。順丁烯二醯亞胺水解係藉由分析含有重鏈之藥物且評定18道耳頓質量添加來識別。順丁烯二醯亞胺穩定性係藉由在每個時間點比較DAR (藥物抗體比率)來評定。藥物損失經量測為1317道耳頓損失且以t=0處之總藥物計計算

為剩餘總藥物之百分比。

為評定妥布賴森穩定性，使用妥布賴森M結合半胱胺酸突變抗體且接著在大鼠血漿中培育0、4及7天。ADC係使用抗人類捕捉樹脂來自血漿純化，還原且接著使用RP UPLC-MS進行分析。妥布賴森乙酸酯水解係藉由分析含有重鏈之藥物且評定42道耳頓質量損失來識別。

細胞培養

Hep3B、HepG2及Huh7細胞係獲自ATCC。JHH-7細胞係分別獲自Creative Bioarray。Hep3B及HepG2細胞生長於具有5% CO2之37℃含濕氣培育箱中之含有10% FBS的EMEM中。Huh7細胞生長於具有5% CO2之37℃含濕氣培育箱中之含有10% FBS的DMEM中。JHH-7細胞生長於具有5% CO2之37℃含濕氣培育箱中之含有10% FBS的Williams-E中。

活體外細胞毒性

檢定在384孔組織培養經處理板中進行且使用CellTiter Glo®(Promega)來評定細胞生存率。1250 Hep3B、HepG2或Huh7或1500 JHH-7細胞/孔塗於40 μL適當培養基中。塗完後的24小時，用適當的濃度下之指定測試物品處理10 μL細胞。給藥96小時後，將10 μL CellTiter Glo添加至各孔中且用Envision多標記板讀取器(PerkinElmer)量測總發光。相對於對照經媒劑處理之細胞一式四份計算平均百分比生存率及標準差。

活體內抗腫瘤活性

動物研究係按照Institutional Animal Care and Use Committee協定進行。2.5×10^6 Hep3B或5×10^5 JHH-7細胞經皮下植入無胸腺裸小鼠中。在整個研究過程中利用雙向游標測徑規量測來監測腫瘤生長，且使用等式(0.5×[長度×寬度2])來計算平均腫瘤體積。當腫瘤達到約100 mm^3時，使

小鼠任意分配至指定治療組且在單次200 μL劑量之適當的治療情況下經腹膜內給藥。對於Hep3B研究，各治療組由5隻小鼠組成。對於JHH-7研究，各治療組由6隻小鼠組成。每週兩次量測腫瘤且當腫瘤達到1000 mm3時犧牲動物。

結果

基於物理接近位置297處之聚糖鏈，選擇20個突變作為用於結合作用之潛在位點，如圖1中所展示。認為聚糖鏈可用來遮蔽連接至結合位點之疏水性藥物。成功地表現且結合14個突變。選擇8個突變與S239C組合作為雙重突變。表現且結合雙重突變。

圖2顯示用於不同突變之聚糖的分佈。較佳為主要G0與更少量之G1、G2及其他之聚糖分佈。Q295C之聚糖分佈因此為有利的(正如K246C、E294C、Y296C、V303C、K334C、I336C及S337C)，然而R301C、F243C、V262C、V264C、S267C並不為有利的。

在37℃下將結合至妥布賴森之抗體浸沒在大鼠血漿中7天。隨後純化ADC且使用質譜法評定藥物分解。使用活體外細胞毒性檢定來評定粗製血漿混合物之效能損失。

圖3顯示Q295C展示順丁烯二醯亞胺連接子之中間物穩定性。S239C展示經測試突變之最大順丁烯二醯亞胺穩定性。

圖4顯示Q295C亦展示妥布賴森藥物之中間物穩定性。此外，S239C展示經測試突變之最大穩定性。

圖5顯示其中一種突變為S239C之數種雙重突變組合之妥布賴森穩定性。Q295C展示與其他經測試突變相比較之中間物穩定性。然而，S239C Q295C雙重突變之穩定性高於由圖6中之條形表示之個別突變的預期穩定

性。

圖7顯示單獨對抗兩個癌細胞株之各種雙重突變組合之細胞毒性。S239C Q295C雙重突變體展示中間物細胞毒性。

在小鼠異種移植模型中以如下之相同抗體之各種其他結合物比較S239C、Q295C雙重突變之細胞毒性：

4830(8) [AT] 1 mg/kg

5937(4) 2 mg/kg

S239C K246C-5937(4) 2 mg/kg

S239C K290C-5937(4) 2 mg/kg

S239C Q295C-5937(4) 2 mg/kg

S239C V303C-5937(4) 2 mg/kg

S239C K246C V303C-5937(6) 1.33 mg/kg

S239C K246C V303C-6242(6) 1.33 mg/kg

S239C K246C V303C-6238(6) 1.33 mg/kg

S239C K246C V303C Q295C-5937(8) 1 mg/kg

1-6183(8) 1 mg/kg

無論藥物負載量之化學計量如何，所示劑量皆輸送等莫耳的藥物。

圖8顯示結合至妥布賴森之S239C Q295C雙重突變體展示對腫瘤Hep3B-8上之腫瘤生長的最大抑制。圖9顯示針對JHH7-E腫瘤細胞株之相同結論。

雙重突變之聚糖分析

含有單點突變S239C或Q295C之抗體含有典型的糖基化型態(圖10A-D)。成對突變S239C及Q295C導致N-連接之聚糖異常。此等異常聚糖(表

1)包括超唾液酸化以及GlcNac之三及四觸角分支化。顯示使用暫態(圖10D)與穩態(圖11) CHO細胞製造技術來保存此等糖基化型態。另外，S239C與E294C配對亦證實此類似糖基化型態(圖12)。

藉由非還原性RP-MS及非還原性肽定位分析此等分子(圖13)證實緊靠著N-連接之聚糖鏈內二硫化物釘住工程化半胱胺酸位點。此等抗體之習知還原及再氧化作用移除此釘且留下工程化位點可供用於與剩餘異常聚糖結合。

使用DTT (二硫蘇糖醇)之細胞培養

含有雙突變S239C及Q295C之抗體在還原條件下短暫地表現。DTT、TCEP及β-巯基乙醇(BME)用作細胞培養基中之總濃度為0.1、1.0及1.2 mM之還原劑(圖14)。當使用DTT作為培養基之部分時，此等蛋白質之聚糖型態之分析展現聚糖複雜度之降低(圖15)。DTT之提高的濃度與唾液酸化以及聚糖之三及四觸角分支化之減少相關。在此等還原條件中表現之抗體藉由SEC呈現單體且具有與親代抗體結合類似之結合。如同親代抗體一樣，此等抗體之還原及氧化作用留下可供用於結合作用之工程化位點。

S239C/Q295C抗體之糖基化型態不受細胞表現系統之影響。當抗體表現於經穩定轉染之細胞株對經短暫轉染之細胞株中時，糖基化型態基本上為相等的。參見例如下表1。

名稱	穩態 S239C/Q295C	暫態 S239C/Q295C	Δ (暫態-穩態)
FA1	1.18	2.26	1.08
A2	0.36	0.27	-0.09
FA2	17.48	22.41	4.93
M5	2.63	2.73	0.1
FA1G1	0.38	0.46	0.08
FA2G1a	4.84	5.52	0.68
FA2G1b	3.42	5.2	1.78
FA2G2	10.7	12.97	2.27
FA2G2S1a	9.61	8.87	-0.74
FA2G2S1b	8.24	7.46	-0.78
FA2G2S2	15.48	10.19	-5.29
FA3G3S1	2.46	2.2	-0.26
FA3G3S2a	1.39	0.85	-0.54
FA3G3S2b	0.63	0.39	-0.24
FA3G3S2c	1.86	1.09	-0.77
FA3G3S3	2.37	1.1	-1.27
二觸角	70.13	72.89	2.76
三觸角	8.71	5.63	-3.08
半乳糖苷化	43.53	45.01	1.48
唾液酸化	42.04	32.15	-9.89
未知	16.99	16.04	-0.95

表1：S239C/Q295C突變體之暫態對穩態表現之糖基化分析

序列表

IgG1 (SEQ ID NO:1)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG2 (SEQ ID NO:2)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG
FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

IgG3 (SEQ ID NO:3)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK

IgG4 (SEQ ID NO:4)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

IgG1 (SEQ ID NO:5)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

YVDGVEVHNAKTKPREECYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

IgG2 (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER

KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP

EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REECFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC

KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG

FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN

VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

IgG3 (SEQ ID NO:7)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL

KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC

DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREECYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK

GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK

IgG4 (SEQ ID NO:8)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREECFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

IgG1 (SEQ ID NO:9)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREECYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

IgG2 (SEQ ID NO:10)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER

KCCVECPPCP APPVAGPCVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP

EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REECFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC

KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG

FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN

VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

IgG3 (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL

KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC

DTPPPCPRCP APELLGGPCV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREECYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK

GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK

IgG4 (SEQ ID NO:12)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPCV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREECFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

IgG1 (SEQ ID NO:13)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPRECQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

IgG2 (SEQ ID NO:14)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER

KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP

EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP RECQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC

KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG

FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN

VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

IgG3 (SEQ ID NO:15)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL

KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC

DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PRECQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK

GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK

IgG4 (SEQ ID NO:16)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PRECQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

IgG1 (SEQ ID NO:17)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPRECQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

IgG2 (SEQ ID NO:18)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER

KCCVECPPCP APPVAGPCVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP

EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP RECQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC

KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG

FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN

VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

IgG3 (SEQ ID NO:19)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL

KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC

DTPPPCPRCP APELLGGPCV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED

PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PRECQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK

CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK

GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK

IgG4 (SEQ ID NO:20)
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPCV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PRECQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

【序列表】

<110> 美商西雅圖遺傳學公司
安德魯　韋特
克里斯　萊斯克
特拉維斯　碧琪兒
迪強格　舒思曼
派翠克　布魯克
喬絲琳　萊斯克

<120> 用於結合作用之半胱胺酸突變抗體

<130> 057762-508682

<150> US 62/465,129
<151> 2017-02-28

<150> US 62/561,151
<151> 2017-09-20

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 1

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> 2
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 2

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3
<211> 377
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

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

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

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

<220>
<223> 經合成

<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 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 Cys 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> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 6

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Cys Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7
<211> 377
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 7

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr

195 200 205

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

Cys Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 8
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 8

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Cys Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 9
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 9

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 Cys 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> 10
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 10

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Cys Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 11

<211> 377
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Tar Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Tar Leu Met Ile Ser Arg Tar Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

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

Cys Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 12
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 12

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Cys Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 13
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 13

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

Cys 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

Glu Pro Arg Gln 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> 14
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 14

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Tar
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Cys Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 15
<211> 377
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Cys
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 16
<211> 327

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 16

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Cys Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 17
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 17

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

Cys 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> 18
<211> 326
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 18

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Cys Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 19
<211> 377
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 19

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Cys
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 20
<211> 327
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 20

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Cys Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 21
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 21

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
1 5 10 15

Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

20 25

<210> 22
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 經合成

<400> 22

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Cys Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
1 5 10 15

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
20 25

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於結合作用之半胱胺酸突變抗體

【英文發明名稱】

CYSTEINE MUTATED ANTIBODIES FOR CONJUGATION

【中文】

本發明提供包括以EU編號之位置295處及視情況以EU編號之位置239處之半胱胺酸的經修飾重鏈恆定區。此等半胱胺酸殘基提供用於結合至藥物或標記物之位點。當此兩者半胱胺酸以正常異二聚抗體格式存在時，每分子抗體就存在四個該等位點，可以讓一個抗體分子對四個分子藥物或標記物的化學計量。因為容易表現、穩定性及細胞毒性，所以選擇位置295處之半胱胺酸及位置239處具有或不具有半胱胺酸是優於多個其他位置處之半胱胺酸。

【英文】

The invention provides modified heavy chain constant regions including a cysteine at position 295 by EU numbering and optionally at position 239 by EU numbering. These cysteine residues provide sites for conjugation to a drug or label. When both cysteines are present in a normal heterodimeric antibody format, there are four such sites per molecule of antibody allowing a stoichiometry of one molecule of antibody to four of drug or label. Selection of the cysteine at position 295 with or without cysteine at position 239 is advantageous over cysteines at many other positions due to ease of expression, stability and

cytotoxicity.

【指定代表圖】

圖6

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種包含重鏈恆定區之抗體或融合蛋白質，其中以EU編號之位置295處係經半胱胺酸佔據。

【第2項】

如請求項1之抗體或融合蛋白質，其係經由位置295處之半胱胺酸結合至藥物或標記物。

【第3項】

如請求項1之抗體或融合蛋白質，其中以EU編號之位置239處係經半胱胺酸佔據。

【第4項】

如請求項3之抗體或融合蛋白質，其係經由位置295及239處之半胱胺酸結合至藥物或標記物。

【第5項】

如請求項4之抗體或融合蛋白質，其中該抗體為包含兩個重鏈及兩個輕鏈之異二聚體，其中一個抗體分子係經由結合至兩個重鏈中之位置295及239處之半胱胺酸而結合至四個藥物分子。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之抗體或融合蛋白質，其中該恆定區具有同型，其為人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

【第7項】

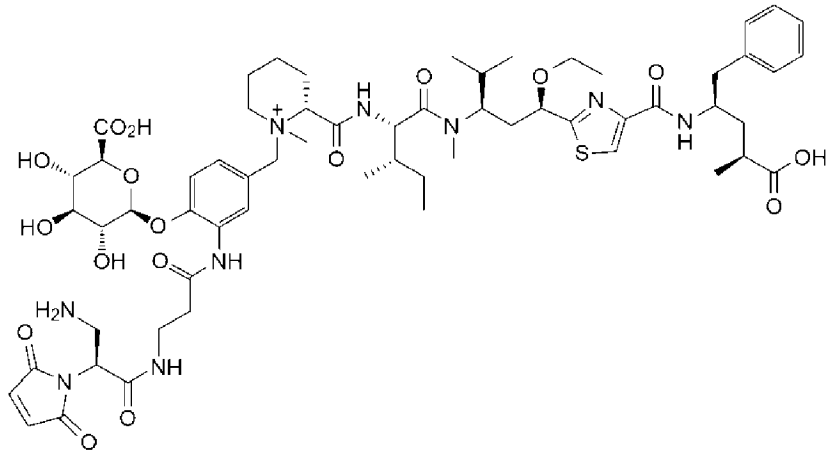
如請求項1至5中任一項之抗體或融合蛋白質，其中該藥物為妥布賴森(tubulysin)。

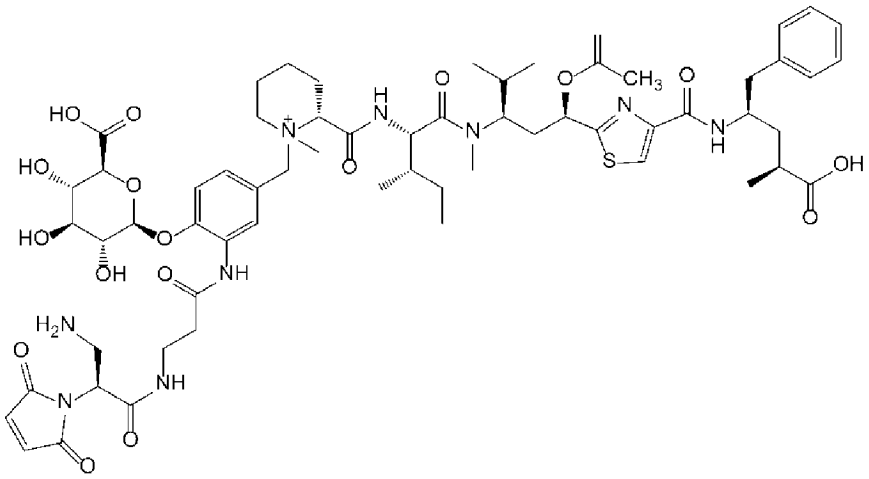
【第8項】

如請求項7之抗體或融合蛋白質，其中該藥物係經由葡萄糖苷酸連接子(glucuronide linker)結合至該抗體或融合蛋白質。

【第9項】

如請求項8之抗體或融合蛋白質，其中該抗體或融合蛋白質係經結合至具有下文所示之結構的化合物，該化合物提供妥布賴森及葡萄糖苷酸連接子





。

【第10項】

如請求項1至5中任一項之抗體或融合蛋白質，其中該藥物為MMAE、MMAF或小凹槽結合劑(minor groove binder)。

【第11項】

如請求項1至5中任一項之抗體或融合蛋白質，其中該重鏈恆定區具有SEQ ID NO. 5-12中之任一者的序列，其條件是C端離胺酸可為不存在的。

【第12項】

如請求項1之抗體或融合蛋白質，其中抗體係經由可裂解連接子結合至該藥物。

【第13項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至12中任一項之抗體或融合蛋白質。

【第14項】

一種包含重鏈恆定區之抗體或融合蛋白質，其中以EU編號之位置239處係經半胱胺酸佔據，該半胱胺酸係結合至妥布賴森M。

【第15項】

一種產生包含重鏈恆定區之抗體或融合蛋白質之方法，其中以EU編號之位置239及295處係經半胱胺酸佔據，該方法包含：

培養經工程化以對該抗體或融合蛋白質進行編碼之細胞，其中該抗體或融合蛋白質係經表現；及

純化該抗體或融合蛋白質。

【第16項】

如請求項15之方法，其進一步包含經由位置239及295處之半胱胺酸將該抗體或融合蛋白質結合至藥物。

【第17項】

如請求項15之方法，其進一步包含使該抗體或融合蛋白質與還原劑

接觸，該還原劑抑制在位置239及295處之半胱胺酸之間形成二硫鍵。

【第18項】

如請求項17之方法，其中該抗體或融合蛋白質與還原劑接觸係藉由在培養該抗體或融合蛋白質之培養基中包含該還原劑來完成。

【第19項】

如請求項17或18之方法，其中該還原劑為二硫蘇糖醇、β-巯基乙醇或三(2-羧基乙基)膦。

【第20項】

如請求項18之方法，其中該還原劑為濃度為0.1至2 mM之二硫蘇糖醇。