



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I483736 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：099136206

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 10 月 22 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

A61K39/44 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/10/23 美國

61/254,474

(71)申請人：千禧製藥公司(美國) MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (US)

美國

安美基卑斯公司(加拿大) AMGEN BRITISH COLUMBIA (CA)

加拿大

(72)發明人：南姆 山繆 S NAM, SAMUEL S. (US)；葛林菲爾 艾德華 A GREENFIELD,
EDWARD A. (US)；巴庫克 約翰 BABCOOK, JOHN (CA)；歐奇夫 泰瑞莎 L
O'KEEFE, THERESA L. (US)；秦士新 QIN, SHIXIN (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2003/0147809A1

US 2009/0041717A1

審查人員：廖彥昱

申請專利範圍項數：60 項 圖式數：4 共 334 頁

(54)名稱

抗-GCC 抗體分子及其相關之組合物及方法

ANTI-GCC ANTIBODY MOLECULES AND RELATED COMPOSITIONS AND METHODS

(57)摘要

本發明揭示結合 GCC 之抗體及抗體之抗原結合片段。該等抗體結合 GCC 之細胞外域且可內化。在一些實施例中，抗體為人類化、嵌合或人類抗體。亦揭示編碼該等抗體或其部分之核酸及載體、含有該等核酸之重組細胞及包含該等抗體或抗原結合片段之組合物。本發明亦提供利用本文所提供之抗體及抗原結合片段的治療法及診斷方法。

Antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind GCC are disclosed. The antibodies bind an extracellular domain of GCC and can be internalized. In some embodiments, the antibodies are humanized, chimeric or human. Nucleic acids and vectors encoding the antibodies or portions thereof, recombinant cells that contain the nucleic acids, and compositions comprising the antibodies or antigen-binding fragments are also disclosed. The invention also provides therapeutic and diagnostic methods utilizing the antibodies and antigen-binding fragments provided herein.

(無元件符號說明)

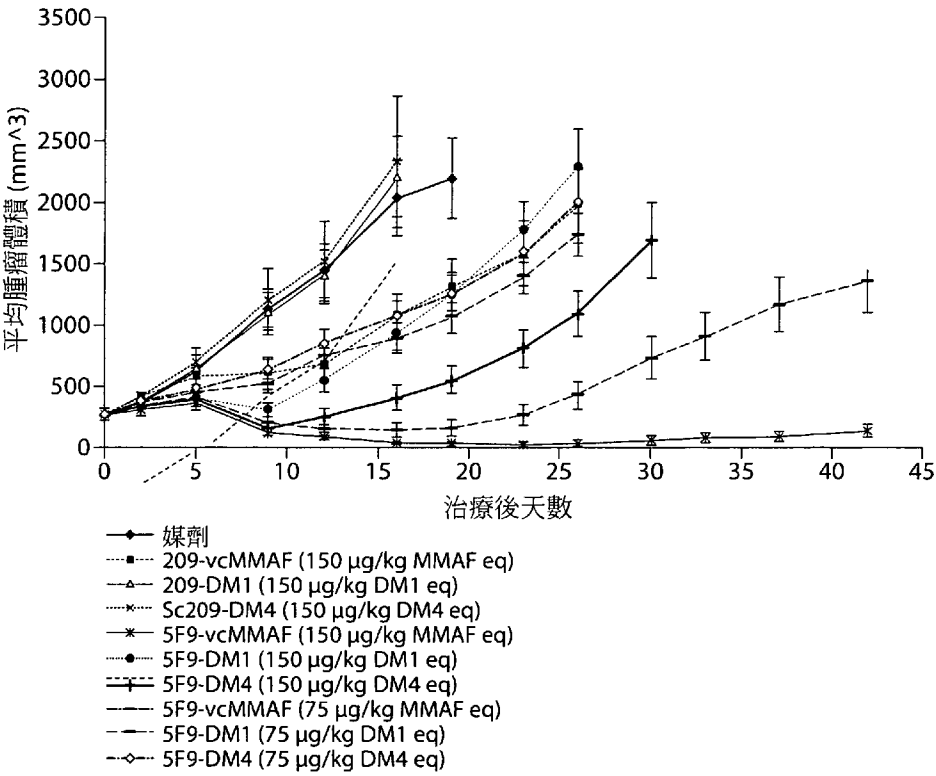


圖 1

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 99136206

※申請日： 99-10-22

※IPC 分類：C07K; A61K

一、發明名稱：(中文/英文)

抗-GCC抗體分子及其相關之組合物及方法

ANTI-GCC ANTIBODY MOLECULES AND RELATED
COMPOSITIONS AND METHODS

A61K39/395 (2006.01) C07K16/46 (2006.01)
A61K39/44 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明揭示結合GCC之抗體及抗體之抗原結合片段。該等抗體結合GCC之細胞外域且可內化。在一些實施例中，抗體為人類化、嵌合或人類抗體。亦揭示編碼該等抗體或其部分之核酸及載體、含有該等核酸之重組細胞及包含該等抗體或抗原結合片段之組合物。本發明亦提供利用本文所提供之抗體及抗原結合片段的治療法及診斷方法。

三、英文發明摘要：

Antibodies and antigen-binding fragments of antibodies that bind GCC are disclosed. The antibodies bind an extracellular domain of GCC and can be internalized. In some embodiments, the antibodies are humanized, chimeric or human. Nucleic acids and vectors encoding the antibodies or portions thereof, recombinant cells that contain the nucleic acids, and compositions comprising the antibodies or antigen-binding fragments are also disclosed. The invention also provides therapeutic and diagnostic methods utilizing the antibodies and antigen-binding fragments provided herein.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於結合GCC之抗體分子，以及相關分子(例如編碼該等抗體分子之核酸)、組合物及相關方法(例如治療及診斷方法)。

本申請案主張2009年10月23日申請之美國臨時申請案第61/254,474號之權益。美國臨時申請案第61/254,474號之全部內容以引用之方式併入本文中。

【先前技術】

鳥苷酸環化酶C(Guanylyl cyclase C, GCC)為一種跨膜細胞表面受體，其功能在於維持腸液、電解質內穩定及細胞增殖，參見例如Carrithers等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3018-3020 (2003)。GCC表現於襯在小腸、大腸及直腸內之黏膜細胞上(Carrithers等人，*Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996))。GCC表現在腸上皮細胞發生贅生性轉型後被維持，其中在所有原發性及轉移性結腸直腸腫瘤中均有表現(Carrithers等人，*Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)；Buc等人，*Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)；Carrithers等人，*Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994))。

【發明內容】

本發明者已發現諸多抗-GCC抗體，包括人類與鼠類抗體。因此，在一態樣中，本發明之特徵在於一種抗-GCC抗體分子，如本文所揭示。抗-GCC抗體分子適用作裸抗體分子且適用作免疫結合物之組分。因此，在另一態樣

中，本發明之特徵在於免疫結合物，其包含抗-GCC抗體分子及治療劑或標記。本發明之特徵亦在於醫藥組合物，其包含本文所述之抗-GCC抗體分子及免疫結合物。本發明之特徵亦在於使用本文所述之抗-GCC抗體分子及免疫結合物用於以下之方法：偵測GCC及表現GCC之細胞或組織；對GCC介導之疾病進行診斷、預後、成像或分期；調節GCC蛋白之活性或功能；及治療GCC介導之疾病，如本文所述。在另一態樣中，本發明之特徵亦在於編碼抗-GCC抗體分子胺基酸序列之經分離及/或重組核酸以及包含該等核酸之載體及宿主細胞，及製備抗-GCC抗體分子之方法。

本文所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻以全文引用的方式併入本文中。

本文所揭示之本發明之其他特徵、目的及優勢將由實施方式及圖式以及申請專利範圍而顯而易知。

【實施方式】

鳥苷酸環化酶C

鳥苷酸環化酶C(GCC)(亦稱作STAR、ST受體、GUC2C及GUCY2C)為一種跨膜細胞表面受體，其功能在於維持腸液、電解質內穩定及細胞增殖(Carrithers等人, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3018-3020 (2003)；Mann等人, *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997)；Pitari等人, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2695-2699 (2003)；GenBank寄存編號NM_004963，其各自均以引用的方式併

入本文中)。此功能經由結合鳥苷素(guanylin)介導(Wiegand等人, FEBS Lett. 311:150-154 (1992))。GCC亦為熱穩定腸毒素(ST, 例如胺基酸序列為NTFYCCELCCNPACAGCY, SEQ ID NO:316)之受體, 熱穩定腸毒素為由大腸桿菌(*E. coli*)以及其他感染性生物體產生之肽(Rao, M.C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoop F.C.及Owens, M. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72 (1992))。ST結合於GCC活化導致腸道疾病(例如腹瀉)之信號級聯。

人類GCC之核苷酸序列(GenBank寄存編號NM_004963)：

```

1      atgaagacgt tgctgttga cttggctttg tggcactgc tctccagcc cgggtggctg
61     tccttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg
121    atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag
181    gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct
241    acttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt
301    gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggatgggctg tgcctcata
361    gggccctcat gtacatactc cacctccag atgtaccttg acacagaatt gagctacccc
421    atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg
481    atgtctccag ctagaaagtt gatgtacttc ttggttaact ttggaaaac caacgatctg
541    cccctcaaaa ctattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtac agaaactgag
601    gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaactc
661    ggctttaagg tgggtttaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac

```

721 aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggt
 781 gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac
 841 tttaggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgctgtct
 901 cctgggaatt ccttctaaa tagctcttct tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac
 961 ttgtctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctcttggac atatgctgaa gataattctt
 1021 gaaaatggag aaaatattac ccccccaaa ttgctcatg cttcaggaa tctcactttt
 1081 gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatggtg
 1141 ctctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggctc tttagaccta tgataccac
 1201 gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca ctggaagaa ctctaaactt
 1261 cctaataata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact
 1321 ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgtc ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat
 1381 tatgaacttc gtcagaaaaa atgggtccac attcctcctg aaaatatctt tcctctggag
 1441 accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc
 1501 cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac
 1561 aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac
 1621 tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat ctfcgggggtg
 1681 atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttctaccct
 1741 gatggcacat tcatggattg ggagttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga
 1801 atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc
 1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacct
 1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa
 1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc
 2041 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga
 2101 atgaaaccct tccgccaga ttatttcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg
 2161 tacctacttg taaaaaactg ttggaggaa gatccagaaa agagaccaga ttcaaaaaa
 2221 attgagacta cacttgccaa gatatttga cttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat

2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag
 2341 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg
 2401 ctccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gaaaaaggct ttgtggagcc ggaactatat
 2461 gaggaagta caatctactt cagtgcatt gtaggttca ctactatctg caaatacagc
 2521 acccccatgg aagtgggtga catgcttaac gacatctata agagtttga ccacattgtt
 2581 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggtagt cgtacatggt ggctagtgg
 2641 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc ctggaaatc
 2701 ctacgcttca tggggacctt tgagctggag catcttctg gcctcccaat atggattcgc
 2761 attggagttc actctgggcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat
 2821 tgtctatttg gagatacggc caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg
 2881 agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt
 2941 tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg
 3001 actgggatga aggaccagaa atcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag
 3061 cgtttgcaag cagaatttc agacatgatt gccactctt tacagaaaag acaggcagca
 3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac
 3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatttt aa

(SEQ ID NO:227)

人類 GCC 之 胺 基 酸 序 列 (GenPept 寄 存 編 號 NP_004954) :

1 mktllldlal wslfqpgwl sfssqvsqnc hngsyaisvl mmgnsafaep lknledavne
 61 gleivrglrq naglnvtvna tfmysdglih nsgdcrrstc egldllrkis naqrmgcvli
 121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktncl
 181 pfktyswsts yvykngtete dcfwylnale asvsyfshef gfkvvlrqdk efqdilmhdn
 241 rksnviiicg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls
 301 pgnslinssf smlsptkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafnltf
 361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms pftfwknskl
 421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qlrqckydk krviikdlkh ndgnftekkq ielnkllqid

541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergrslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrrkstnc vvdsmvsvki tdfgcnsilp pkkdltwtape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeiiirketf ytlscdrne kifrvnsng mkpfrpdlfl etaeekelev
 721 yllvkncwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysmlehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lpkmgnrha idiakmalei
 901 lsfmgtfele hlpplpiwir igvhsGPCAA gvgikmpy clfgdtvnta srmestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
 1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprv asykkgtley lqlnttdkes tyf

(SEQ ID NO:228)

GCC蛋白具有一些一般公認之結構域，其各自可促成GCC分子之可分離功能。GCC之諸部分包括SEQ ID NO:228之胺基酸殘基1至約殘基23或殘基1至約殘基21的信號序列(用於將蛋白質引向細胞表面)(切除以進行成熟，得到SEQ ID NO:228之約胺基酸殘基22或24至1073之功能性成熟蛋白質)、SEQ ID NO:228之約胺基酸殘基24至約殘基420或約殘基54至約殘基384的用於配位體(例如鳥苷素或ST)結合的細胞外域、SEQ ID NO:228之約胺基酸殘基431至約殘基454或約殘基436至約殘基452的跨膜域、SEQ ID NO:228之約胺基酸殘基489至約殘基749或約殘基508至約殘基745的預期具有酪胺酸激酶活性的激酶同源域、及SEQ ID NO:228之約殘基750至約殘基1007或約殘基816至約殘基1002的鳥苷酸環化酶催化域。

在正常人類組織中，GCC表現於襯在小腸、大腸及直腸內之黏膜細胞(例如頂端刷狀緣膜(apical brush border

membrane))上(Carrithers等人, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996))。GCC表現在腸上皮細胞發生贅生性轉型後被維持, 其中在所有原發性及轉移性結腸直腸腫瘤中均有表現(Carrithers等人, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc等人, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers等人, *Gastroenterology* 107: 1653-1661(1994))。來自胃、食道及胃食道接合點之贅生性細胞亦表現GCC(參見例如美國專利第 6,767,704 號; Debruyne 等人, *Gastroenterology* 130:1191-1206 (2006))。可利用組織特異性表現及與癌症(例如胃腸來源之癌症, 例如結腸癌、胃癌或食道癌)之相關性以使用GCC作為此疾病之診斷標記(Carrithers等人, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc等人, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005))。

作為細胞表面蛋白, GCC亦可充當受體結合蛋白(諸如抗體或配位體)之治療目標。在正常腸組織中, GCC表現於在內腔環境與血管隔室之間形成不滲透障壁層之上皮細胞緊密接合點之頂端側上(Almenoff等人, *Mol Microbiol* 8: 865-873; Guarino 等人, *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987))。因此, 全身性靜脈內投與GCC結合蛋白治療劑在接近胃腸系統之贅生性細胞(包括侵襲性或轉移性結腸癌細胞、腸外或轉移性結腸腫瘤、食道腫瘤或胃腫瘤、胃食道接合點之腺癌)時對腸GCC受體僅具極小作用。此外, GCC在配位體結合時經由受體介導之內飲作用而內化(Buc等人, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski等人,

Biochem Biophys Acta 1245: 29-36 (1995))。

針對 GCC 之細胞外域產生之多株抗體 (Nandi 等人, *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996)) 能夠抑制 ST 肽結合於人類及大鼠 GCC, 且抑制 ST 介導之人類 GCC 產生 cGMP。

GCC 已表徵為一種牽涉於癌症 (包括結腸癌) 中之蛋白質。亦參見 Carrithers 等人, *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc 等人, *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers 等人, *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994); Urbanski 等人, *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)。針對 GCC 之抗體分子治療劑可以未結合形式單獨使用, 從而抑制表現 GCC 之癌性細胞。本發明之抗-GCC 抗體分子可結合人類 GCC。在一些實施例中, 本發明之抗-GCC 抗體分子可抑制配位體 (例如鳥苷素或熱穩定腸毒素) 與 GCC 之結合。在其他實施例中, 本發明之抗-GCC 抗體分子不抑制配位體 (例如鳥苷素或熱穩定腸毒素) 與 GCC 之結合。

對 GCC 具特異性之單株抗體包括 GCC:B10 (Nandi 等人, *J. Cell. Biochem.* 66:500-511 (1997))、GCC:4D7 (Vijayachandra 等人, *Biochemistry* 39:16075-16083 (2000)) 及 GCC:C8 (Bakre 等人, *Eur. J. Biochem.* 267:179-187 (2000))。GCC:B10 具有 κ 輕鏈及 IgG2a 同型, 且與大鼠、豬及猴 GCC 交叉反應。GCC:B10 結合於 GCC 細胞內域之前 63 個胺基酸, 特定言之結合於 SEQ ID NO:228 之殘基 470-480 (Nandi 等人, *Protein Sci.* 7:2175-2183 (1998))。GCC:4D7 結合於

GCC 之殘基 491-568 內之激酶同源域 (Bhandari 等人, *Biochemistry* 40:9196-9206 (2001))。GCC:C8 結合於 GCC 之細胞質部分中的蛋白激酶樣域。

定義及方法

除非另外定義，否則在本文中，與本發明關聯使用之科學及技術術語應具有一般技術者通常瞭解之含義。一般而言，結合本文所述之細胞及組織培養、分子生物學以及蛋白質及寡核苷酸或聚核苷酸化學及雜交利用之命名法及其技術為此項技術中所已知。GenBank 或 GenPept 寄存編號及適用核酸及肽序列可見於由馬里蘭州貝賽思達市美國生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnological Information, Bethesda MD) 維護之網站。使用標準技術進行重組 DNA、寡核苷酸合成及組織培養以及轉型及轉染 (例如電穿孔、脂質體轉染)。根據製造商之說明或如此項技術中所通常完成或如本文所述來執行酶促反應及純化技術。上述技術及程序一般根據此項技術中已知之方法 (例如如本說明書中整篇引用及論述之各種一般及更特定之參考文獻所述) 執行。參見例如 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)) 或一般參見 Harlow, E. 及 Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY。結合本文所述之分析化學、合成有機化學以及醫藥及藥物化學利用之命名法、及其實驗室程序及技術

為此項技術中所已知。使用標準技術進行化學合成、化學分析、藥物製備、調配及傳遞、及患者治療。此外，除非上下文另外需要，否則單數術語應包括複數且複數術語應包括單數。

如本文所用之術語「抗體分子」係指抗體、抗體肽或免疫球蛋白或上述任一者(例如抗體)之抗原結合片段。抗體分子包括單鏈抗體分子(例如 scFv)(參見例如 Bird 等人, (1988) *Science* 242:423-426; 及 Huston 等人, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)及單域抗體分子(參見例如 WO 9404678)。儘管不屬於術語「抗體分子」，但本發明亦包括「抗體類似物」，基於其他非抗體分子蛋白質之骨架(例如使用 CDR 提供特異性抗原結合之融合蛋白及/或免疫結合物)。

「抗-GCC 抗體分子」係指如下抗體分子(亦即抗體、抗體或抗體類似物之抗原結合部分)，其與 GCC(例如人類 GCC)相互作用或識別(例如結合，例如特異性結合)GCC(例如人類 GCC)。例示性抗-GCC 抗體分子為諸如表 1 及 2 中概述之分子。

如本文所用之術語「抗體」、「抗體肽」或「免疫球蛋白」係指單鏈、雙鏈及多鏈蛋白質及醣蛋白。術語抗體包括多株、單株、嵌合、CDR 移植及人類或人類化抗體，其中所有在本文別處更詳細地論述。該術語亦包括駱駝類抗體(參見例如 US 2005/0037421)及奈米抗體(nanobody)(例如 IgNAR(鯊魚抗體)，參見例如 WO 03/014161)。術語「抗

體」亦包括合成及遺傳工程改造之變異體。

如本文所用之術語「抗體片段」或抗體之「抗原結合片段」係指例如 Fab、Fab'、F(ab')₂及 Fv 片段、單鏈抗體、功能性重鏈抗體(奈米抗體)以及抗體之對至少一種所要抗原決定基具有特異性且與完整抗體競爭特異性結合之任何部分(例如具有足夠 CDR 序列且具有足夠構架序列以特異性結合於抗原決定基之片段)。舉例而言，抗原結合片段可競爭結合於抗原決定基，該抗原決定基結合該片段所來源之抗體。本文及類似情形中所用之所來源不意指任何特定獲得方法或製程，而僅指序列類似性。抗原結合片段可藉由重組技術或藉由酶促或化學裂解完整抗體而產生。術語抗原結合片段當用於具有輕鏈及重鏈之抗體的單鏈(例如重鏈)時意謂該鏈之該片段當與另一鏈(例如輕鏈)之完整可變區配對時足以使得其結合可達成使用完整重鏈及輕磅可變區可見之結合的至少 25、50、75、85 或 90%。

如本文所用之術語「CDR 之抗原結合集群」或「足以允許結合之多個 CDR」(及其類似措辭)係指鏈(例如重鏈)之 CDR 當置於構架中且與另一鏈(例如輕鏈)之完整可變區或與另一鏈可變區之具有類似長度且具有相同數目之 CDR 的部分配對時足以使得其結合可達成使用完整重鏈及輕鏈可變區可見之結合的例如至少 25、50、75、85 或 90%。

如本文所用之術語「人類抗體」包括具有來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之序列的抗體，諸如來源於具有人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠(例如 XENOMOUSETM 遺

傳工程改造小鼠(Abgenix, Fremont, CA))、人類噬菌體呈現文庫、人類骨髓瘤細胞或人類B細胞的抗體。

如本文所用之術語「人類化抗體」係指來源於非人類(例如齧齒動物，例如鼠類)抗體之抗體，其保留或實質上保留親本抗體之抗原結合特性，但在人類中具有較低免疫原性。如本文所用之人類化意欲包括去免疫化抗體。通常人類化抗體包括非人類CDR及人類或人類來源之構架及恆定區。

如本文所用之術語「經修飾」抗體係指藉由重組方式製備、表現、產生或分離之抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現的抗體，自重組、組合抗體文庫分離的抗體，自轉殖人類免疫球蛋白基因之動物(例如小鼠、綿羊或山羊)分離的抗體，或藉由涉及使人類免疫球蛋白基因序列拼接於其他DNA序列的任何其他方式製備、表現、產生或分離的抗體。該等經修飾抗體包括人類化抗體、CDR移植抗體(例如CDR係來自第一抗體而構架區係來自不同來源(例如第二抗體或共同構架)的抗體)、嵌合抗體、活體外產生之抗體(例如藉由噬菌體呈現)，且可視情況包括來源於人類生殖系免疫球蛋白序列或人類免疫球蛋白基因的可變區或恆定區，或藉由涉及使人類免疫球蛋白基因序列拼接於替代性免疫球蛋白序列的任何方式製備、表現、產生或分離的抗體。在實施例中，經修飾抗體分子包括相較於參考抗體具有序列變化之抗體分子。

術語「單特異性抗體」係指對特定抗原決定基顯示單一

結合特異性及親和力的抗體或抗體製劑。此術語包括「單株抗體」或「單株抗體組合物」。

術語「雙特異性抗體」或「雙功能抗體」係指對兩個抗原決定基顯示雙重結合特異性的抗體，其中各結合位點不同且識別不同抗原決定基。

術語「非結合抗體」及「裸抗體」可互換用於指未結合於非抗體部分(例如治療劑或標記)之抗體分子。

術語「免疫結合物」、「抗體結合物」、「抗體藥物結合物」及「ADC」可互換使用且指結合於非抗體部分(例如治療劑或標記)之抗體。

術語「藥劑」在本文中用於表示化合物、化合物之混合物、生物大分子或自生物材料製得之萃取物。術語「治療劑」係指具有生物活性之藥劑。

術語「抗癌劑」或「化學治療劑」在本文中用於指具有抑制人類之贅瘤(尤其惡性(癌性)病變，諸如癌瘤、肉瘤、淋巴瘤或白血病)產生或發展之功能特性的藥劑。抑制轉移或血管生成通常為抗癌劑或化學治療劑之特性。化學治療劑可為細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。術語「細胞生長抑制劑」係指抑制或阻礙細胞生長及/或細胞繁殖之藥劑。

「細胞毒性劑」係指主要藉由直接干擾細胞功能而造成細胞死亡之化合物，包括(但不限於)烷化劑、腫瘤壞死因子抑制劑、嵌入劑、微管抑制劑、激酶抑制劑、蛋白酶體抑制劑及拓撲異構酶抑制劑。如本文所用之「毒性有效負

載」係指當傳遞至細胞時造成細胞死亡之足量細胞毒性劑。傳遞毒性有效負載可藉由投與足量包含本發明之抗體或抗原結合片段及細胞毒性劑的免疫結合物來完成。傳遞毒性有效負載亦可藉由投與足量包含細胞毒性劑之免疫結合物來完成，其中該免疫結合物包含識別且結合本發明之抗體或抗原結合片段的第二抗體或其抗原結合片段。

如本文所用之短語「來源於指定序列」或「對指定序列具特異性」的序列係指包含與例如指定序列之相連區域對應(亦即一致或互補)的約至少6個核苷酸或至少2個胺基酸、至少約9個核苷酸或至少3個胺基酸、至少約10-12個核苷酸或4個胺基酸或至少約15-21個核苷酸或5-7個胺基酸之相連序列的序列。在某些實施例中，該序列包含指定核苷酸或胺基酸序列之全部。序列可與對於特定序列獨特之序列區域互補(在聚核苷酸序列的情況下)或一致，如此項技術中已知之技術所測定。序列可能來源之區域包括(但不限於)編碼特異性抗原決定基之區域、編碼CDR之區域、編碼構架序列之區域、編碼恆定域區之區域、編碼可變域區之區域以及非轉譯及/或非轉錄區。所得序列並非必需在實體上來源於所研究之相關序列，而可以任何方式產生，該方式包括(但不限於)化學合成、複製、反轉錄或轉錄且基於該聚核苷酸所來源之區域的鹼基序列所提供的資訊。因此，其可表示原始聚核苷酸之有義或反義位向。另外，對應於指定序列之區域的區域之組合可以此項技術中已知之方式修飾或組合而符合預定用途。舉例而言，序

列可包含兩個或兩個以上各包含指定序列之一部分的相連序列，且穿插有與指定序列不一致但意欲表示來源於指定序列之序列的區域。對於抗體分子，「來源於其」者包括功能上或結構上與比較抗體有關之抗體分子，例如「來源於其」者包括具有類似或實質上相同之序列或結構(例如具有相同或類似之CDR、構架或可變區)的抗體分子。對於抗體，來源於其者亦包括以下殘基，例如一或多個，例如2、3、4、5、6個或更多個以下殘基，該或該等殘基可能相連或可能不相連，但可根據編號方案或與一般抗體結構之同源性或與比較序列之三維接近度(three-dimensional proximity)(亦即在CDR或構架區內)進行定義或鑑別。術語「來源於其」並不限於在實體上來源於其，而是包括藉由任何方式、例如藉由使用來自比較抗體之序列資訊設計另一抗體而產生。

如本文所用之短語「由...編碼」係指核酸序列編碼多肽序列，其中該多肽序列或其部分含有具有由該核酸序列所編碼多肽中之至少3至5個胺基酸、至少8至10個胺基酸或至少15至20個胺基酸的胺基酸序列。

計算兩個序列之間的「同源性」可如下執行。出於最佳比較目的對準序列(例如，為達成最佳對準可在第一及第二胺基酸或核酸序列之一者或兩者中引入間隙，且出於比較目的可忽略非同源序列)。出於比較目的對準之參考序列的長度為參考序列長度之至少30%、40%或50%，至少60%或至少70%、80%、90%、95%、100%。隨後比較相應

胺基酸位置或核苷酸位置處之胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中之位置由與第二序列中相應位置相同之胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則分子在此位置上一致(如本文所用之胺基酸或核酸「一致性」等效於胺基酸或核酸「同源性」)。兩個序列之間的一致性百分比為考慮出於兩個序列之對準而需要引入之間隙之數目及各間隙之長度，該等序列共有之一致位置數目之函數。

可使用數學演算法完成兩個序列之間的序列比較及同源性百分比測定。可使用此項技術中已知之任何方法測定兩個胺基酸序列之間的同源性百分比。舉例而言，尼德曼(Needleman)及烏尼史(Wunsch)(*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970))演算法，其已併入GCG軟體套件中之GAP程式中，該演算法使用Blossum 62矩陣或PAM250矩陣及間隙權數16、14、12、10、8、6或4及長度權數1、2、3、4、5或6。亦可使用GCG軟體套件(Accelrys, Inc. San Diego, CA)中之GAP程式，使用NWSgapdna.CMP矩陣及間隙權數40、50、60、70或80及長度權數1、2、3、4、5或6來測定兩個核苷酸序列之間的同源性百分比。用於測定同源性之例示性參數集為Blossum 62計分矩陣，其中間隙處罰為12，間隙延長處罰為4，且讀框轉移間隙處罰為5。

如本文所用之術語「在嚴格條件下雜交」描述雜交及洗滌之條件。執行雜交反應之規則可見於*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中。該參考文獻描述水性及非水性方法且可使

用任一方法。本文提及之特定雜交條件如下：1)低嚴格度雜交條件，在約45°C下在6×氯化鈉/檸檬酸鈉(SSC)中，繼而至少在50°C(對於低嚴格度條件，洗滌溫度可提高至55°C)下用0.2×SSC、0.1% SDS洗滌兩次；2)中等嚴格度雜交條件，在約45°C下在6×SSC中，繼而在60°C下用0.2×SSC、0.1% SDS洗滌一或多次；3)高嚴格度雜交條件，在約45°C下在6×SSC中，繼而在65°C下用0.2×SSC、0.1% SDS洗滌一或多次；及4)極高嚴格度雜交條件為在65°C下0.5 M磷酸鈉、7% SDS，繼而在65°C下用0.2×SSC、1% SDS洗滌一或多次。極高嚴格度條件(4)通常為較佳條件且除非另外規定，否則應使用該等條件。

應瞭解本發明之抗體及其抗原結合片段可具有額外保守性或非必需胺基酸取代，其對多肽功能無實質影響。特定取代是否耐受(亦即不會不利地影響所要生物特性，諸如結合活性)可如Bowie, JU等人, *Science* 247:1306-1310 (1990)或Padlan等人, *FASEB J.* 9:133-139 (1995)所述判定。「保守性胺基酸取代」為如下取代，其中胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換。具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族已在此項技術中定義。此等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺

酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、具有 β -分支鏈側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。

「非必需」胺基酸殘基為可自結合劑(例如抗體)之野生型序列改變而不會消除生物活性或不會實質上改變生物活性的殘基，而「必需」胺基酸殘基會產生該種變化。在抗體中，必需胺基酸殘基可為特異性決定殘基(SDR)。

如本文所用之術語「經分離」係指物質自其原始環境(例如若其天然存在，則為自然環境)移出。舉例而言，活動物中存在之天然存在的聚核苷酸或多肽為未經分離的，但與自然系統中共存物質中之一些或全部分離之相同聚核苷酸或DNA或多肽為經分離的。該聚核苷酸可為載體之一部分，及/或該聚核苷酸或多肽可為組合物(例如包含含有該聚核苷酸或多肽之經分離細胞或培養細胞之混合物、溶液或懸浮液)之一部分，且在載體或組合物不為自然環境之一部分的情況下仍為經分離的。

如本文所用之術語「複製子」係指在細胞內呈現為聚核苷酸複製之自主單元的任何遺傳元件(諸如質體、染色體或病毒)。

如本文所用之術語「可操作地連接」係指如下情形，其中所述組分處於使其能以預定方式發揮作用之關係中。因此，例如，「可操作地連接」於編碼序列之控制序列以某種方式連接以使得編碼序列之表現在與控制序列相容之條件下達成。

如本文所用之術語「載體」係指連接有另一聚核苷酸區段諸如以便達成所連接區段之複製及/或表現的複製子。

如本文所用之術語「控制序列」係指如下聚核苷酸序列，其為實現其所連接之編碼序列之表現所必需。該等控制序列之性質視宿主生物體而不同。在原核生物中，該等控制序列一般包括啟動子、核糖體結合位點及終止子，且在一些情況下包括強化子。因此，術語「控制序列」意欲至少包括存在為表現所必需之所有組分，且亦可包括存在有利之其他組分(例如前導序列)。

如本文所用之術語「經純化產物」係指產物之製劑，其與該產物通常締合之細胞組分及/或可存在於相關樣品中之其他類型之細胞分離。

如本文所用之術語「抗原決定基」係指能夠特異性結合於抗體之蛋白質決定子。抗原決定基決定子通常由諸如胺基酸或糖側鏈之分子的化學活性表面群組成，且通常具有特定三維結構特徵及特定電荷特徵。一些抗原決定基為線性抗原決定基，而其他為構形抗原決定基。線性抗原決定基為相連胺基酸一級序列包含所識別之抗原決定基的抗原決定基。線性抗原決定基通常包括至少3個、且更通常至少5個、例如約8至約10個相連胺基酸。構形抗原決定基可由至少兩種情形產生，諸如：a)僅以某些蛋白質構形暴露於抗體結合之線性序列，例如視配位體結合而定或視信號傳導分子進行之修飾(例如磷酸化)而定；或b)蛋白質中多於一個部分或在多次單位蛋白質中多於一個次單位之結構

特徵的組合，其中該等特徵在三維空間中足夠緊密接近以參與結合。

如本文所用之「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類別(例如IgM或IgG1)。

如本文所用之術語「可偵測劑」或「標記」用於指在多肽或醣蛋白上併入可偵測標記。標記多肽及醣蛋白之各種方法為此項技術中所已知且可供使用。用於多肽之標記的實例包括(但不限於)以下：放射性同位素或放射性核種(例如銦(^{111}In)、碘(^{131}I 或 ^{125}I)、釔(^{90}Y)、鐳(^{177}Lu)、銦(^{225}Ac)、鉍(^{212}Bi 或 ^{213}Bi)、硫(^{35}S)、碳(^{14}C)、氚(^3H)、銨(^{188}Rh)、鐳($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、鎘或磷(^{32}P)或發射正電子之放射性核種，例如碳11(^{11}C)、鉀40(^{40}K)、氮13(^{13}N)、氧15(^{15}O)、氟18(^{18}F)及碘121(^{121}I)、螢光標記(例如FITC、若丹明(rhodamine)、鐳系元素磷光體)、酶促標記(例如辣根過氧化酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)、化學發光、生物素基團(其可藉由經標記之抗生物素蛋白(例如含有抗生蛋白鏈菌素部分之分子)及螢光標記或可藉由光學方法或量熱法偵測的酶促活性偵測)、及由二次報導體識別之預定多肽抗原決定基(例如白胺酸拉鏈對序列、二次抗體之結合位點、金屬結合域、抗原決定基標籤)。在一些實施例中，標記藉由各種長度之間隔臂連接以減少可能之位阻。

對於抗-GCC抗體分子，如本文所用之「特異性結合」或「結合特異性」意謂抗體分子結合於GCC(例如人類

GCC蛋白)的親和力大於其結合於非GCC蛋白(例如BSA)之親和力。通常，抗-GCC分子對於非GCC蛋白(例如BSA)應具有如下 K_d ，其為該分子對於GCC(例如人類GCC蛋白)之 K_d 的大於2倍、大於10倍、大於100倍、大於1,000倍、大於 10^4 倍、大於 10^5 倍或大於 10^6 倍。在測定 K_d 時，對於GCC及非GCC蛋白(例如BSA)之 K_d 應在相同條件下進行測定。

如本文所用之術語「治療」係定義為向個體(例如患者)投與抗-GCC抗體分子，或向個體之經分離組織或細胞投與(例如藉由施用)，該經分離組織或細胞將返回至個體中。抗-GCC抗體分子可單獨投與或與第二藥劑組合投與。治療可為治癒、復原、緩和、緩解、改變、補救、改善、減輕、改良或影響病症、病症之症狀或病症(例如癌症)之誘因。儘管不希望受理論限制，但咸信治療可在活體外或在活體內抑制、去除或殺滅細胞，或以其他方式降低細胞(例如異常細胞)介導病症(例如如本文所述之病症，例如癌症)之能力。

如本文所用之術語「個體」意欲包括哺乳動物、靈長類動物、人類及非人類動物。舉例而言，個體可為患有癌症(例如胃腸起源之癌症，例如結腸癌)、具有癌症(例如胃腸起源之癌症，例如結腸癌)症狀(其中至少一些細胞表現GCC)或具有癌症(例如胃腸起源之癌症，例如結腸癌)誘因(其中至少一些細胞表現GCC)的患者(例如人類患者或獸類患者)。除非另外說明，否則術語本發明之「非人類動物」包括所有非人類脊椎動物，例如非人類哺乳動物及非

哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、狗、母牛、雞、兩棲動物、爬行動物等。在一實施例中，個體不包括小鼠、大鼠、兔或山羊中之一或多者或全部。

如本文所用之抗-GCC抗體分子「有效」或「足以」治療病症之量或「治療有效量」或「治療足夠量」係指抗體分子在單次或多次劑量投與個體後有效治療細胞(例如癌細胞，例如表現GCC之腫瘤細胞)或延長患有本文所述病症之個體的生命、治癒、緩和、緩解或改良該個體超過在無該治療的情況下預期之結果的量。如本文所用之「抑制腫瘤或癌症之生長」係指減緩、中斷、遏止或終止其生長及/或轉移且未必表示腫瘤生長完全消除。

如本文所用之「GCC」(亦稱作「STAR」、「GUC2C」、「GUCY2C」或「ST受體」蛋白)係指哺乳動物GCC，較佳為人類GCC蛋白。人類GCC係指SEQ ID NO:228中所示之蛋白質及其天然存在之對偶基因蛋白質變異體。SEQ ID NO:228之對偶基因可由SEQ ID NO:227中所示之GCC核酸序列編碼。其他變異體為此項技術中所已知。參見例如寄存編號 Ensp0000261170、Ensembl 資料庫(Ensembl Database)、歐洲生物資訊學研究院(European Bioinformatics Institute)及韋爾科姆基金會桑格研究院(Wellcome Trust Sanger Institute)(其在殘基281處具有白胺酸)；已公開之美國專利申請案第US 20060035852號之SEQ ID NO:14；或GenBank寄存編號AAB19934。通常，天然存在之對偶基因變異體的胺基酸序列與SEQ ID NO:228之

GCC 序列至少 95%、97% 或 99% 一致。轉錄物編碼具有 1073 個胺基酸之蛋白質產物，且描述於 GenBank 寄存編號 NM_004963 中。GCC 蛋白表徵為跨膜細胞表面受體蛋白，且咸信在維持腸液、電解質內穩定及細胞增殖方面起關鍵作用。

除非另外說明，否則術語「烷基」係指具有約 1 至約 20 個碳原子(及其中之碳原子範圍及特定數目之所有組合及子組合)、較佳約 1 至約 8 個碳原子之飽和直鏈或分支鏈烴。烷基之實例為甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基及 3,3-二甲基-2-丁基。

單獨或作為另一基團之一部分的烷基可稱作「經取代」。經取代之烷基為經一或多個如下基團、較佳 1 至 3 個如下基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代之烷基：包括(但不限於)-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN，其中各 R' 係獨立地選自 -H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳

基，且其中該等 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-\text{芳基}$ 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 及 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 可視情況經一或多個如下基團進一步取代：包括(但不限於) $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、 $-\text{鹵素}$ 、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-\text{芳基}$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-\text{OC}(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-\text{NHC}(O)R''$ 、 $-\text{SR}''$ 、 $-\text{SO}_3R''$ 、 $-\text{S}(O)_2R''$ 、 $-\text{S}(O)R''$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(R'')$ 、 $-\text{N}(R'')_2$ 及 $-\text{CN}$ ，其中各 R'' 係獨立地選自 $-\text{H}$ 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或 $-\text{芳基}$ 。

除非另外說明，否則術語「烯基」及「炔基」係指具有約2至約20個碳原子(及其中之碳原子範圍及特定數目之所有組合及子組合)、較佳約2至約8個碳原子之直鏈及分支鏈碳鏈。烯基鏈在鏈中具有至少一個雙鍵，且炔基鏈在鏈中具有至少一個參鍵。烯基之實例包括(但不限於)乙烯(ethylene)或乙烯基、烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基及-2,3-二甲基-2-丁烯基。炔基之實例包括(但不限於)乙炔基(acetylenic)、炔丙基、乙炔基、丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基及-3-甲基-1-丁炔基。

如烷基一般，烯基及炔基可經取代。「經取代之」烯基或炔基為經一或多個如下基團、較佳1至3個如下基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代之烯基或炔基：包括(但

不限於)-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN，其中各R'係獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基，且其中該等-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基及-C₂-C₈炔基可視情況經一或多個如下取代基進一步取代：包括(但不限於)-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂及-CN，其中各R''係獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基。

除非另外說明，否則術語「伸烷基」係指具有約1至約20個碳原子(及其中之碳原子範圍及特定數目之所有組合及子組合)、較佳具有約1至約8個碳原子且具有藉由自母烷烴之同一或兩個不同碳原子移除兩個氫原子獲得之兩個單價基團中心的飽和分支鏈或直鏈烴基。典型伸烷基包括(但不限於)亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基、伸戊基、伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基、伸癸基、1,4-伸環己基及其類似基團。單獨或作為另一基團之一部分的伸烷基

可視情況經一或多個如下基團、較佳1至3個如下基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代：包括(但不限於)-鹵素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R' 係獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或-芳基，且其中該等 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 及 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 可視情況經一或多個如下取代基進一步取代：包括(但不限於) $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、-鹵素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R'' 係獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或-芳基。

除非另外說明，否則術語「伸烯基」係指含有至少一個碳-碳雙鍵之視情況經取代的伸烷基。例示性伸烯基包括例如伸乙烯基($-CH=CH-$)及伸丙烯基($-CH=CHCH_2-$)。

除非另外說明，否則術語「伸炔基」係指含有至少一個碳-碳參鍵之視情況經取代的伸烷基。例示性伸炔基包括例如伸乙炔基($-C\equiv C-$)、炔丙基($-CH_2C\equiv C-$)及4-戊炔基

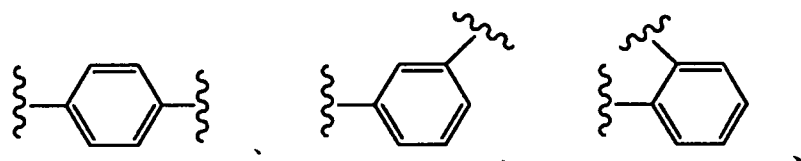
$(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-)$ 。

除非另外說明，否則術語「芳基」係指具有6-20個碳原子(及其中之碳原子範圍及特定數目之所有組合及子組合)且藉由自母芳族環系統之單一碳原子移除一個氫原子獲得的單價芳族烴基。一些芳基在例示性結構中表示為「Ar」。典型芳基包括(但不限於)自苯、經取代之苯、苯基、萘、蒽、聯苯及其類似基團獲得的基團。

單獨或作為另一基團之一部分的芳基可視情況經一或多個如下基團、較佳1至5個或甚至1至2個如下基團取代：包括(但不限於)-鹵素、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{烯基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 及 $-\text{CN}$ ，其中各 R' 係獨立地選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基或-芳基，且其中該等 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基、 $\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{烯基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{炔基})$ 及-芳基可視情況經一或多個如下取代基進一步取代：包括(但不限於) $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基、-鹵素、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{烯基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}'')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{SR}''$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}'')$ 、 $-\text{N}(\text{R}'')_2$ 及 $-\text{CN}$ ，其中各 R'' 係獨立地

選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或 $-$ 芳基。

除非另外說明，否則術語「伸芳基」係指視情況經取代之芳基，其為二價基團(亦即藉由自母芳族環系統之同一或兩個不同碳原子移除兩個氫原子獲得)且可如以下結構用苯基作為例示性芳基所示呈鄰位、間位或對位構型：



典型「 $-(C_1-C_8$ 伸烷基)芳基」、「 $-(C_2-C_8$ 伸烯基)芳基」及「 $-(C_2-C_8$ 伸炔基)芳基」包括(但不限於)苯甲基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苯甲基、2-萘并苯基乙-1-基及其類似基團。

除非另外說明，否則術語「雜環」係指如下具有3至14個環原子(亦稱作環成員)之單環、雙環或多環系統，其中至少一個環中之至少一個環原子為選自N、O、P或S之雜原子(及其中之碳原子及雜原子範圍及特定數目之所有組合及子組合)。雜環可具有1至4個獨立地選自N、O、P或S之環雜原子。雜環中之一或多個N、C或S原子可經氧化。單環雜環較佳具有3至7個環成員(例如2至6個碳原子及1至3個獨立地選自N、O、P或S之雜原子)，且雙環雜環較佳具有5至10個環成員(例如4至9個碳原子及1至3個獨立地選自N、O、P或S之雜原子)。包括雜原子之環可為芳族或非芳族環。除非另外說明，否則雜環在產生穩定結構之任何

雜原子或碳原子處連接於其側基。

雜環描述於以下文獻中：Paquette, 「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」 (W.A. Benjamin, New York, 1968), 尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」 (John Wiley & Sons, New York, 1950 至今), 尤其第13卷、第14卷、第16卷、第19卷及第28卷；及 *J. Am. Chem. Soc.* 82:5566 (1960)。

除非另外說明，否則術語「雜環基」係指視情況經取代之如上文所定義之雜環基團，其為二價基團(亦即藉由自母雜環系統之同一或兩個不同碳原子移除兩個氫原子獲得)。

「雜環」之實例包括(舉例而言且並不限於)吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、噻萘基、吲哚基、吲哚烯基、喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙四氫呋喃基、四氫哌喃基、雙四氫哌喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹啉基、𧄀辛因基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻噁基、哌喃基、異苯并呋喃基、吡烯基、吡基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、噻嗪基、吲嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、

S

素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、
 $- \text{芳基}$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、
 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、
 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$
 及 $-CN$ ，其中各 R'' 係獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或 芳基 。

舉例而言且不加限制，碳鍵結之雜環可在如下位置鍵結：
 吡啶之位置2、3、4、5或6；噻吩之位置3、4、5或6；
 嘧啶之位置2、4、5或6；吡嗪之位置2、3、5或6；
 呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之位置
 2、3、4或5；噁唑、咪唑或噻唑之位置2、4或5；異噁
 唑、吡唑或異噻唑之位置3、4或5；氮丙啶之位置2或3；
 氮雜環丁烷之位置2、3或4；喹啉之位置2、3、4、5、6、
 7或8；或異喹啉之位置1、3、4、5、6、7或8。碳鍵結之
 雜環更通常包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶
 基、6-吡啶基、3-噻吩基、4-噻吩基、5-噻吩基、6-噻吩
 基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪
 基、3-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、2-噻唑基、4-噻唑
 基或5-噻唑基。

舉例而言且不加限制，氮鍵結之雜環可在如下位置鍵結：
 氮丙啶、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-
 吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡
 唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉
 或1H-吲哚之位置1；異吲哚或異吲哚啉之位置2；嗎啉之

位置4；及呋唑或 β -呋啉之位置9。氮鍵結之雜環更通常包括1-氮丙啶基、1-氮雜環丁烷基(1-azetedy1)、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡唑基及1-哌啶基。

除非另外說明，否則術語「碳環」係指具有3至14個環原子(及其中之碳原子範圍及特定數目之所有組合及子組合)之飽和或不飽和非芳族單環、雙環或多環系統，其中所有環原子均為碳原子。單環碳環較佳具有3至6個環原子，更佳具有5或6個環原子。雙環碳環較佳具有7至12個環原子，例如排列成雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統，或9或10個環原子排列成雙環[5,6或[6,6]系統。術語「碳環」包括例如單環碳環稠合至芳環(例如單環碳環稠合至苯環)。碳環較佳具有3至8個碳環原子。

單獨或作為另一基團之一部分的碳環基可視情況經例如一或多個如下基團、較佳1或2個如下基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代：包括(但不限於)-鹵素、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R' 係獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基，且其中該等 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)及-芳基可視情況經一或多個如下取代基進一步取代：包括(但不

限於)-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂及-CN，其中各R''係獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基。

單環碳環取代基之實例包括-環丙基、-環丁基、-環戊基、-1-環戊-1-烯基、-1-環戊-2-烯基、-1-環戊-3-烯基、環己基、-1-環己-1-烯基、-1-環己-2-烯基、-1-環己-3-烯基、-環庚基、-環辛基、-1,3-環己二烯基、-1,4-環己二烯基、-1,3-環庚二烯基、-1,3,5-環庚三烯基及-環辛二烯基。

單獨或作為另一基團之一部分使用的「碳環」係指視情況經取代之如上文所定義之碳環基，其為二價基團(亦即藉由自母碳環系統之同一或兩個不同碳原子移除兩個氫原子獲得)。

除非另外指定，否則在上下文中，連字符(-)表示與側位分子之連接點。因此，術語「-(C₁-C₈伸烷基)芳基」或「-C₁-C₈伸烷基(芳基)」係指如本文所定義之C₁-C₈伸烷基，其中該伸烷基在該伸烷基之任一碳原子處連接於側位分子，且鍵結於伸烷基之碳原子的氫原子之一經如本文所定義之芳基置換。

當特定基團係「經取代」時，該基團可具有一或多個取代基，較佳1至5個取代基，更佳1至3個取代基，最佳1至2

個取代基，該等取代基係獨立地選自取代基之清單。然而，一般該基團可具有任何數目之選自鹵素之取代基。經取代之基團如所示。

預期任何取代基或變數在分子中特定位置之定義獨立於其在該分子中別處之定義。應瞭解，本發明化合物上之取代基及取代模式可由一般技術者選擇以提供化學上穩定且可易於由此項技術中已知之技術以及本文所述方法合成的化合物。

如本文所用之保護基係指暫時或永久性選擇性阻斷多官能化合物中之一個反應性位點的基團。適用於本發明之羥基保護基為醫藥學上可接受的，且可能需要或可能不需要在投與個體後自母化合物裂解以使化合物具有活性。裂解係經由體內之正常代謝過程達成。羥基保護基為此項技術中所熟知，參見 T. W. Greene 及 P. G. M. Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & sons, 第3版)(以全文引用的方式併入本文中且出於所有目的)，且包括例如醚(例如烷基醚及矽烷基醚，包括例如二烷基矽烷基醚、三烷基矽烷基醚、二烷基烷氧基矽烷基醚)、酯、碳酸酯、胺基甲酸酯、磺酸酯及磷酸酯保護基。羥基保護基之實例包括(但不限於)甲基醚；甲氧基甲基醚、甲基硫基甲基醚、(苯基二甲基矽烷基)甲氧基甲基醚、苯甲氧基甲基醚、對甲氧基苯甲氧基甲基醚、對硝基苯甲氧基甲基醚、鄰硝基苯甲氧基甲基醚、(4-甲氧基苯氧基)甲基醚、愈創木酚甲基醚、第三丁氧基甲基醚、4-

戊烯氧基甲基醚、矽烷氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、2,2,2-三氯乙氧基甲基醚、雙(2-氯乙氧基)甲基醚、2-(三甲基矽烷基)乙氧基甲基醚、甲氧基甲基醚、四氫吡喃基醚、1-甲氧基環己基醚、4-甲氧基四氫硫吡喃基醚、4-甲氧基四氫硫吡喃基醚S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基吡啶-4-基醚、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基吡啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氫呋喃基醚、四氫硫呋喃基醚；經取代之乙基醚，諸如1-乙氧基乙基醚、1-(2-氯乙氧基)乙基醚、1-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]乙基醚、1-甲基-1-甲氧基乙基醚、1-甲基-1-苯甲氧基乙基醚、1-甲基-1-苯甲氧基-2-氟乙基醚、1-甲基-1-苯氧基乙基醚；2-三甲基矽烷基醚、第三丁基醚、烯丙基醚、炔丙基醚、對氯苯基醚、對甲氧基苯基醚、苯甲基醚、對甲氧基苯甲基醚、3,4-二甲氧基苯甲基醚、三甲基矽烷基醚、三乙基矽烷基醚、三丙基矽烷基醚、二甲基異丙基矽烷基醚、二乙基異丙基矽烷基醚、二甲基己基矽烷基醚、第三丁基二甲基矽烷基醚、二苯基甲基矽烷基醚、苯甲醯基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯基乙酸酯、苯甲酸酯、碳酸烷酯甲酯、碳酸烷酯9-芡基甲酯、碳酸烷酯乙酯、碳酸烷酯2,2,2,-三氯乙酯、碳酸1,1,-二甲基-2,2,2-三氯乙酯、烷基磺酸酯、甲烷磺酸酯、苯甲基磺酸酯、甲苯磺酸酯、亞甲基縮醛、亞乙基縮醛及第三丁基次甲基縮酮。較佳保護基由下式表示： $-R$ 、 $-\text{Si}(\text{R})(\text{R})(\text{R})$ 、

-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NH(R)、-S(O)₂R、-S(O)₂OH、P(O)(OH)₂及-P(O)(OH)OR，其中R為C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基、-C₁-C₂₀伸烷基(碳環)、-C₂-C₂₀伸烯基(碳環)、-C₂-C₂₀伸炔基(碳環)、-C₆-C₁₀芳基、-C₁-C₂₀伸烷基(芳基)、-C₂-C₂₀伸烯基(芳基)、-C₂-C₂₀伸炔基(芳基)、-C₁-C₂₀伸烷基(雜環)、-C₂-C₂₀伸烯基(雜環)或-C₂-C₂₀伸炔基(雜環)，其中該等單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基視情況經取代。

縮寫「AFP」係指二甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉索因(dolaisoleuine)-多拉普因(dolaproine)-苯丙胺酸-對苯二胺(參見下文式(XVIII))。

縮寫「MMAE」係指單甲基奧瑞他汀E(monomethyl auristatin E)(參見下文式(XIII))。

縮「AEB」係指藉由使奧瑞他汀E(auristatin E)與對乙醯基苯甲酸反應產生之酯(參見下文式(XXII))。

縮寫「AEVB」係指藉由使奧瑞他汀E與苯甲醯基戊酸反應產生之酯(參見下文式(XXIII))。

縮寫「MMAF」係指單甲基奧瑞他汀F(monomethyl auristatin F)(參見下文式(XXI))。

抗體

在某些態樣中，本發明係關於具有諸如表1及2中概述之特徵的抗-GCC抗體分子。在其他態樣中，本發明係關於具有諸如表3、4、5及/或6中概述之特徵的抗-GCC抗體分

子。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子為人類融合瘤抗體，且為抗體5F9、5H3、6H8、8C2、10C10、10D3及1D3之一。在一實施例中，抗-GCC抗體分子係來源於抗體5F9、5H3、6H8、8C2、10C10、10D3或1D3。在一實施例中，抗-GCC抗體分子由融合瘤5F9(PTA-8132)產生。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子為所選淋巴細胞抗體，且為抗體Abx-12、Abx-020、Abx-106、Abx-198、Abx-221、Abx-229、Abx-338及Abx-393之一。在一實施例中，抗-GCC抗體分子係來源於抗體Abx-12、Abx-020、Abx-106、Abx-198、Abx-221、Abx-229、Abx-338及Abx-393。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子為鼠類抗體，且為抗體mAb 3G1、mAb 8E12、mAb10B8及mAb 8F1之一。在一實施例中，抗-GCC抗體分子係來源於抗體mAb 3G1、mAb 8E12及mAb 8F1。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子對於GCC之親和力(例如由直接結合或競爭結合檢定所量測)將在本文所述之範圍內。在一實施例中，抗-GCC抗體分子之 K_d 小於 1×10^{-6} M，小於 1×10^{-7} M，小於 1×10^{-8} M，小於 1×10^{-9} M，小於 1×10^{-10} M，小於 1×10^{-11} M，小於 1×10^{-12} M或小於 1×10^{-13} M。在一實施例中，抗體分子為IgG或其抗原結合片段，且 K_d 小於 1×10^{-6} M，小於 1×10^{-7} M，小於 1×10^{-8} M或小於 1×10^{-9} M。在一實施例中，抗-GCC抗體分子(例如5F9抗體或來源於其

之抗體)之 K_d 為約80至約200 pM，較佳為約100至約150 pM或約120 pM。在一實施例中，抗-GCC抗體分子(例如5F9抗體或來源於其之抗體)之 k_a 為約0.9至約 $1.25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，較佳為約 $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。在一實施例中，抗體分子為ScFv，且 K_d 小於 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ ，小於 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ，小於 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ，小於 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ，小於 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ ，小於 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ ，小於 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 或小於 $1 \times 10^{-13} \text{ M}$ 。

在實施例中，抗體分子不為免疫結合物，亦即為「裸」抗體，且在實施例中在結合於GCC時引起細胞反應。在相關實施例中，細胞反應係由抗體所結合之GCC表現細胞執行。該種細胞反應可為由GCC介導之信號轉導，例如在抗體分子為GCC之促效劑之情況下(參見例如美國專利申請公開案第US 20040258687號)。在其他實施例中，細胞反應係由第二細胞(例如免疫效應細胞(例如自然殺手細胞)，其識別結合於第一細胞上之GCC之抗體分子)執行。在一些實施例中，監視分子(surveillance molecule)(例如補體分子)接觸結合GCC之抗體分子，隨後發生細胞反應。此等實施例中之細胞反應可導致GCC表現細胞死亡。

在其他實施例中，為免疫結合物的抗體分子可在結合於GCC時引起細胞反應，且可內化以向其所結合之GCC表現細胞傳遞藥劑。

在一些實施例中，本發明之抗-GCC抗體分子可阻斷配位體結合於GCC。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子不能與大鼠GCC及小

鼠GCC中之一者或兩者展示實質交叉反應。

在一實施例中，抗體分子不為GCC:B10、GCC:4D7或GCC:C8。在另一實施例中，抗-GCC抗體分子不結合GCC之細胞內域，亦即SEQ ID NO:228之約胺基酸殘基455至1073。舉例而言，在此實施例中，抗-GCC抗體分子不結合GCC之激酶同源域或鳥苷酸環化酶域。

天然存在之哺乳動物抗體結構單元通常為四聚體。各四聚體由兩對多肽鏈構成，各對具有一條「輕鏈」(約25 kDa)及一條「重鏈」(約50-70 kDa)。各鏈之胺基端部分包括具有約100至110個或更多個胺基酸之可變區，其主要負責抗原識別。各鏈之羧基端部分界定主要負責效應功能之恆定區。人類輕鏈可分類為 κ 及 λ 輕鏈。重鏈可分類為 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 重鏈，且將抗體之同型分別定義為IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。在輕鏈及重鏈內，可變區及恆定區由具有約12個或更多個胺基酸之「J」區聯接，其中重鏈亦包括具有約10個或更多個胺基酸之「D」區。一般參見*Fundamental Immunology*第7章 (Paul, W.編，第2版，Raven Press, N.Y. (1989))。各輕鏈/重鏈對之可變區形成抗體結合位點。抗-GCC抗體分子之較佳同型為IgG免疫球蛋白，其可分類成具有不同 γ 重鏈之4個子類，IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。大多數治療性抗體為IgG1型之人類、嵌合或人類化抗體。在一特定實施例中，抗-GCC抗體分子具有IgG1同型。

各重鏈及輕鏈對之可變區形成抗原結合位點。因此，完

整IgG抗體具有兩個相同結合位點。然而，雙功能或雙特異性抗體為人造雜交構築體，其具有兩個不同重鏈/輕鏈對，從而產生兩個不同結合位點。

該等鏈均展現如下相同一般結構：相對保守之構架區(FR)由三個高變區(亦稱作互補決定區或CDR)聯接。各對之兩條鏈的CDR由構架區對準，使得能夠結合於特定抗原決定基。自N端至C端，輕鏈與重鏈均包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。根據如下參考文獻之定義將胺基酸分配於各域：Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (馬里蘭州貝賽思達市國家健康研究院(National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1987及1991))，或 Chothia及 Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)；Chothia等人，*Nature* 342:878-883 (1989)。如本文所用，CDR對於重鏈及輕鏈分別稱為(HCDR1、HCDR2、HCDR3)及(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

抗-GCC抗體分子可包含上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一的重鏈及輕鏈中之一或兩者之CDR的全部或抗原結合子集。人類融合瘤、所選淋巴細胞及鼠類抗體部分(包括可變區及CDR)之胺基酸序列可見於表3及表5。

因此，在一實施例中，抗體分子包括以下一或兩者：

(a)上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一的一個、兩個、三個或抗原結合數個輕鏈CDR(LCDR1、LCDR2及/或LCDR3)。在實施例中，CDR可包含如下

LCDR1-3 中之一或多者或全部的胺基酸序列：LCDR1 或經修飾 LCDR1，其中一至七個胺基酸經保守取代；LCDR2 或經修飾 LCDR2，其中一或兩個胺基酸經保守取代；或 LCDR3 或經修飾 LCDR3，其中一或兩個胺基酸經保守取代；及

(b) 上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一的一個、兩個、三個或抗原結合數個重鏈 CDR(HCDR1、HCDR2 及 / 或 HCDR3)。在實施例中，CDR 可包含如下 HCDR1-3 中之一或多者或全部的胺基酸序列：HCDR1 或經修飾 HCDR1，其中一或兩個胺基酸經保守取代；HCDR2 或經修飾 HCDR2，其中一至四個胺基酸經保守取代；或 HCDR3 或經修飾 HCDR3，其中一或兩個胺基酸經保守取代。

適用於產生抗-GCC 抗體之免疫原包括表現 GCC(例如人類 GCC)之細胞(例如腫瘤細胞株(例如 T84 細胞或新鮮或冷凍之結腸腫瘤細胞)、表現 GCC 之重組細胞)；GCC 表現細胞之膜部分(例如結腸腫瘤細胞株(例如 T84 細胞或新鮮或冷凍之結腸腫瘤細胞)、表現 GCC 之重組細胞(例如表現全長 GCC 之 HT-29-GCC#2 細胞)或表現 GCC 之部分的重組細胞(例如 CHO GCC #27 細胞，其表現包含 GCC 細胞外域(例如 SEQ ID NO:318)之部分))；經分離或純化之 GCC(例如人類 GCC 蛋白)(例如以生物化學方式分離之 GCC，例如自表現 GCC 或其變異體之胃腸腫瘤細胞或重組細胞分離)或其部分(例如 GCC 之細胞外域、GCC 之激酶同源域、或 GCC 之鳥

苷酸環化酶催化域、或對應於其部分的肽，例如包含SEQ ID NO:228之至少約8、10、12、14、16、20、24、28或32個胺基酸殘基)；或包含SEQ ID NO:229或包含其成熟部分且無信號序列(亦即無SEQ ID NO:229之胺基酸殘基1至約21或23)的免疫原(例如成熟TOK107-hIgG蛋白，SEQ ID NO:317)。

可使免疫原與異源序列融合以有助於生物化學操作、純化、免疫或抗體力價量測。該等免疫原可包含GCC之部分(例如細胞外域)及包含非GCC多肽之部分。有多種選擇可用於建構融合蛋白以便於純化或固定於固體支撐物(例如親和管柱或微量滴定板或其他適合檢定基板/晶片)上。舉例而言，融合部分可添加域，例如麩胱甘肽-S-轉移酶/激酶(GST)，其可結合麩胱甘肽；免疫球蛋白之Fc區，其可結合於蛋白質A或蛋白質G；胺基酸殘基，例如兩個、三個、四個、五個、較佳六個組胺酸殘基，其可結合親和管柱上之鎳或鈷；抗原決定基標籤，例如c-myc致癌基因之部分(myc標籤)、FLAG標籤(美國專利第4,703,004號)、血球凝集素(HA)標籤、T7基因10標籤、V5標籤、HSV標籤或VSV-G標籤，其可結合標籤特異性抗體；或輔因子，例如生物素，其可結合抗生蛋白鏈菌素。

包含免疫球蛋白之Fc部分的免疫原可使GCC(於溶液中或附著於細胞)保持呈允許宿主免疫監視組分在結構上接近GCC抗原決定基之構型以便有效產生抗體。因為包含Fc區之免疫球蛋白重鏈經由鏈間二硫鍵締合成二聚體，故由

與Fc區融合產生之免疫原為二聚體。融合蛋白之價數可反映提供Fc區之免疫球蛋白的類型。舉例而言，與IgG蛋白形成之融合物可為二聚體，IgA融合物可製備四聚免疫原，且IgM融合物可製備十聚免疫原，後兩者可藉由共轉染J鏈容易地獲得。Fc融合蛋白之一例示性免疫球蛋白為IgG1。所用部分通常具有由單一外顯子編碼之IgG1鉸鏈、CH2及CH3域。因為此外顯子亦具有CH1區之部分，該CH1區之部分具有傾向與輕鏈之半胱胺酸形成二硫鍵之半胱胺酸，故適用修飾為將CH1半胱胺酸突變為例如絲胺酸以確保融合蛋白中不存在未配對之半胱胺酸。該突變亦提高了鉸鏈之可撓性。

用於與免疫原融合以供在宿主物種(例如小鼠、大鼠、兔、山羊)中進行免疫的來源於非宿主物種之Fc部分(例如人類Ig Fc區)可起輔助作用。此輔助功能可引發針對Fc與GCC抗原決定基之特異性抗體。在篩選期間可鑑別且去除Fc反應性抗體。Fc部分可具有野生型序列或經突變以改變效應功能的序列。舉例而言，可將突變型恆定區(變異體)併入融合蛋白中以使與Fc受體之結合及/或固定補體之能力減至最小(參見例如 Winter 等人，GB 2,209,757 B；Morrison 等人，WO 89/07142；Morgan 等人，WO 94/29351)。在一較佳實例中，使根據Fc區標準物編號之離胺酸235及甘胺酸237突變為例如丙胺酸。具有Fc經突變之IgG的免疫原/融合蛋白可具有減小的與宿主中Fc受體之相互作用。一較佳可溶性免疫原融合蛋白(在成熟以裂解信

號肽及分泌之後)為TOK-107-hIgG(替代名稱hGCC-ECD/hIgG1 Fc)，其由SEQ ID NO:228之胺基酸殘基24至430與突變型人類IgG1免疫球蛋白Fc(SEQ ID NO:317)融合組成。

為製備細胞表現之免疫原，免疫球蛋白部分可進行結構化以模擬B細胞受體之免疫球蛋白部分。舉例而言，免疫球蛋白Fc區可另外與包含免疫受體(諸如Fc γ 受體、Fc α 受體、Fc α / μ 受體或Fc ϵ 受體)之跨膜區的多肽融合。若表現免疫原融合蛋白之細胞另外包含抗原受體複合物(例如B細胞IgM受體或IgD受體)之其他組分，則可改良充分暴露於細胞表面上之該種Fc受體細胞結合之免疫原的適當位向。複合物之適合組分包括免疫球蛋白(Ig)鞘蛋白，諸如MB-1及B29(CD79A及CD79B；Hombach等人，*Eur. J. Immunol.* 20:2795-2799 (1990)，對於IgM受體)，其形成雜二聚體。Ig鞘蛋白可由轉染細胞內源性產生(例如若轉染B細胞淋巴瘤細胞株)；或藉由共轉染免疫原與鞘蛋白(例如在各別載體中或在同一載體中)來提供。用於在小鼠中進行免疫之較佳IgG鞘蛋白為小鼠CD79a及CD79b(GenBank寄存編號分別為NM_007655及NM_008339)。較佳細胞結合之免疫原融合蛋白(在成熟以裂解信號肽及移位至細胞表面後)為TOK111產物，其由TOK-107hIgG(hGCC-ECD/hIgG1 Fc)與小鼠IgG2a(例如GenPept寄存編號AAB59661)跨膜及細胞內域(SEQ ID NO:318)融合組成。

適用抗原決定基(例如GCC分子之參考抗原決定基，抗-

GCC抗體分子(例如本文所述之單株抗體、人類抗體或人類化抗體)可與其結合)可發現於GCC之細胞外部分中。該等GCC抗原決定基可結合細胞表面上(例如細胞外部)之抗體分子。

舉例而言，用於抗-GCC抗體分子之抗原決定基可存在於以下中或包括以下之殘基：SEQ ID NO:228之殘基1-50或其結合本發明之抗-GCC抗體分子的片段(例如其5F9結合片段)。該等片段可包含SEQ ID NO:228之殘基1-25、5-30、10-35、15-40、20-45、25-50、5-45、10-40、15-35、20-30或33-50。在一些實施例中，用於抗-GCC抗體分子(例如5F9抗體)之抗原決定基為構形抗原決定基，其另外包含GCC胺基酸序列中殘基50以外的一或多個其他胺基酸殘基，亦即選自SEQ ID NO:228之約殘基50至1073之殘基。

在另一實例中，用於抗-GCC抗體分子之抗原決定基可存在於以下中或包括以下之殘基：SEQ ID NO:225，或SEQ ID NO:228之殘基271-300，或其結合本發明之抗-GCC抗體分子的片段(例如其ABX-198、3G1、8F1或10B8結合片段)。該等片段可包含SEQ ID NO:228之殘基281-290，或SEQ ID NO:228之殘基281-290(其中殘基281為白胺酸)，或SEQ ID NO:228之殘基281-300或殘基271-290。在一些實施例中，用於抗-GCC抗體分子(例如ABX-198、3G1、8F1或10B8抗體)之抗原決定基為構形抗原決定基，其另外包含一或多個其他胺基酸殘基，亦即GCC胺基酸序

列中之非SEQ ID NO:225殘基，例如選自SEQ ID NO:228之約殘基1至270及/或約301至1073之殘基。

在另一實例中，用於抗-GCC抗體分子之抗原決定基可存在於以下中或包括以下之殘基：SEQ ID NO:226，或SEQ ID NO:228之殘基351-375，或其結合本發明之抗-GCC抗體分子的片段(例如其ABX-012、ABX-338或ABX-106結合片段)。該等片段可包含SEQ ID NO:228之356-370，或SEQ ID NO:228之殘基351-370，或SEQ ID NO:228之殘基356-375。在一些實施例中，用於抗-GCC抗體分子(例如ABX-012、ABX-338或ABX-106抗體)之抗原決定基為構形抗原決定基，其另外包含一或多個其他胺基酸殘基，亦即GCC胺基酸序列中之非SEQ ID NO:226殘基，例如選自SEQ ID NO:228之約殘基1至350及/或約376至1073之殘基。

針對該等抗原決定基或細胞外域(例如存在於以下中或包括以下之殘基的抗原決定基：SEQ ID NO:228之胺基酸殘基24至420或其參考部分，例如GCC之殘基24至75、75至150、150至225、225至300、300至375或375至420)產生之抗體或來源於其之抗體分子可適用作如本文所述之治療性或診斷抗體。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子具有一或多個以下特性：

a)其與表1及2中概述之上述抗-GCC抗體分子(例如人類融合瘤抗體(例如5F9)、所選淋巴細胞抗體(例如Abx-229)

或鼠類抗體(例如3G1))之一競爭結合(例如結合於細胞表面GCC或經純化GCC)；

b)其與表1及2中概述之上述抗-GCC抗體分子(例如人類融合瘤抗體(例如5F9)、所選淋巴細胞抗體(例如Abx-229)或鼠類抗體(例如3G1))之一結合於GCC上之相同或實質上相同之抗原決定基。在一實施例中，抗體結合相同抗原決定基，如由一或多個肽陣列檢定或藉由與表現於細胞表面或膜製劑上的截短突變體、嵌合體或點突變體之結合(例如此等檢定如本文所述)所測定；

c)其結合於如下抗原決定基，該抗原決定基具有至少1、2、3、4、5、8、10、15或20個相連胺基酸殘基與表1及2中概述之上述抗-GCC抗體分子(例如人類融合瘤抗體(例如5F9)、所選淋巴細胞抗體(例如Abx-229)或鼠類抗體(例如3G1))之一的抗原決定基相同；

d)其結合人類GCC中由本發明之抗-GCC抗體結合之區域，其中該區域(例如細胞外或細胞質區)之長度為10-15、10-20、20-30或20-40個殘基，且結合例如藉由與截短突變體之結合來測定；在一實施例中，抗-GCC抗體分子結合人類GCC之細胞外區。在一實施例中，抗-GCC抗體分子可結合人類GCC中由SEQ ID NO:228之胺基酸殘基24至420界定的細胞外域部分。在一實施例中，抗-GCC抗體分子可結合SEQ ID NO:228之胺基酸殘基931至954的鳥苷酸環化酶特徵位點；或

e)其結合於本文所述之參考抗原決定基。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子結合GCC序列ILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS(SEQ ID NO:225)。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子結合GCC序列FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV(SEQ ID NO:226)。

在一實施例中，抗體分子結合構形抗原決定基。在其他實施例中，抗體分子結合線性抗原決定基。

抗-GCC抗體分子可為多株抗體、單株抗體、單特異性抗體、嵌合抗體(參見美國專利第6,020,153號)或人類或人類化抗體或其抗體片段或衍生物。本發明亦涵蓋上述任一者之合成及遺傳工程改造之變異體(參見美國專利第6,331,415號)。單株抗體可藉由多種技術製備，包括習知鼠類單株抗體方法，例如Kohler及Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)之標準體細胞雜交技術。一般而言，參見Harlow, E.及Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY。

用蛋白質(例如GCC或可溶性部分，或包含GCC之部分的融合蛋白(例如TOK107-hIg)，或其細胞或膜部分(例如表現表面暴露之GCC的細胞)或其部分(例如pLKTOK4產物或pLKTOK111產物))免疫可用經製備用於以誘導反應之方式(例如在佐劑、例如完全傅氏佐劑(complete Freund's adjuvant)存在下)注射的免疫原執行。其他適合佐劑包括TITERMAX GOLD® 佐劑 (CYTRX Corporation, Los Angeles, CA)及巰。小肽免疫原可連接至較大分子(諸如匙

孔螺血藍蛋白(keyhole limpet hemocyanin))。小鼠可以多種方式(例如皮下、靜脈內或肌肉內)在多個位點(例如腹膜(腹膜內)、尾基或足墊中，或位點之組合，例如腹膜內及尾基中(BIP))注射。增強注射可包括相同或不同免疫原且可另外包括佐劑(例如不完全傅氏佐劑(incomplete Freund's adjuvant))。用DNA(例如編碼GCC或其部分或包含GCC或其部分之融合蛋白(例如編碼TOK107-hIg)的DNA)免疫可使用基因槍技術進行注射。舉例而言，將DNA裝載於微觀金粒子上且經短期以頻繁的時間間隔注射至小鼠中。

一般而言，若需要單株抗體，則藉由使來自永生細胞株(例如骨髓瘤細胞株，諸如SP2/0、P3X63Ag8.653或雜骨髓瘤)之適合細胞與抗體產生細胞融合來製備融合瘤。抗體產生細胞可自人類、人類抗體轉殖基因動物或用相關抗原免疫之其他適合動物的周邊血液或較佳脾或淋巴結獲得。產生人類來源之抗體(例如人類抗體)的細胞可使用適合方法製備，例如使人類抗體產生細胞與雜骨髓瘤或三體雜交瘤融合，或經由用EB病毒(Epstein Barr virus)感染對經活化之人類B細胞進行永生化。(參見例如美國專利第6,197,582號(Trakht)；Niedbala等人，*Hybridoma*, 17:299-304 (1998)；Zanella等人，*J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992)；Gustafsson等人，*Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991)。)融合或永生化之抗體產生細胞(融合瘤)可使用選擇性培養條件分離且藉由限制稀釋進行選殖。產生具有所要特異性之抗體的細胞可使用適合檢定(例如

ELISA(例如用固定於微量滴定孔上之免疫原，例如 TOK107-hIgG)或藉由對表現GCC或其部分之細胞(例如表現pLKTOK111產物之細胞)進行FACS)鑑別。舉例而言，若GCC-免疫原包含作為親和力試劑之融合部分，則此部分可允許包含GCC或其部分的融合蛋白結合於基質(例如塗佈蛋白質G、塗佈抗生蛋白鏈菌素、經麩胱甘肽衍生化或塗佈抗體之微量滴定板或檢定晶片)，隨後將其與免疫血清或來自融合瘤或抗體表現重組細胞之條件培養基組合，且在有助於複合物形成之條件(例如在鹽及pH值之生理條件下)下培育混合物。培育之後，洗滌微量滴定板孔或晶片單元以移除任何未結合組分且量測抗-GCC抗體之結合。

在實施例中，為進行治療性應用，本發明之抗體為人類或人類化抗體。人類或人類化抗體之優勢在於其潛在地降低或消除抗體在宿主接受者中之免疫原性，從而允許提高生物可用性且降低不利免疫反應之可能性，從而潛在地使得能夠進行多次抗體投與。

經修飾抗體包括人類化、嵌合或CDR移植抗體。人類抗小鼠抗體(HAMA)反應導致產生嵌合或人類化抗體。儘管嵌合抗體具有人類恆定區及鼠類可變區，但預期將會觀測到某些人類抗嵌合抗體(HACA)反應，尤其在抗體之長期或多劑量利用中。該等鼠類或大鼠來源之蛋白質的存在可能導致抗體快速清除或可能導致患者產生針對抗體之免疫反應。為避免利用鼠類或大鼠來源之抗體，已開發將序列

引入抗體序列以使得抗體更接近人類抗體序列的人類化抗體或藉由於齧齒動物中引入人類抗體功能產生的完全人類抗體，使得齧齒動物可產生具有完全人類序列之抗體。人類抗體可避免與具有鼠類、兔或大鼠可變區及/或恆定區之抗體有關的某些問題。

人類抗體

完全人類抗體分子可使小鼠mAb或小鼠來源之mAb所固有的免疫原性及過敏反應減至最小，從而提高所投與抗體之功效及安全性。使用完全人類抗體分子可在治療慢性及復發性人類疾病(諸如發炎、自體免疫性及癌症，其需要重複投與抗體)中提供實質優勢。另外，人類抗體分子可使用遺傳工程改造之動物品系製備，其中動物之抗體基因表現被抑制且在功能上用人類抗體分子基因表現置換。

製備人類抗體之方法為此項技術中所已知。一種製備人類抗體之方法使用轉殖基因動物(諸如轉殖基因小鼠)。此等轉殖基因動物含有產生人類抗體之基因組之實質部分，例如可進行功能性重排、插入其自身基因組中之人類免疫球蛋白基因座，且在抗體產生時使動物自身之內源性抗體產生缺乏。製備該等轉殖基因動物之方法為此項技術中所已知。該等轉殖基因動物可使用XENOMOUSE™技術或藉由使用「微基因座(minilocus)」法製備。製備XENOMICE™之方法描述於美國專利第6,162,963號、第6,150,584號、第6,114,598號及第6,075,181號中，該等專利以引用的方式併入本文中。使用「微基因座」法製備轉

殖基因動物的方法描述於美國專利第 5,545,807 號、第 5,545,806 號及第 5,625,825 號中；亦參見國際公開案第 WO 93/12227 號，該等文獻各自以引用的方式併入本文中。其他轉殖基因人類抗體產生小鼠包括 HUMAB-MOUSE®、KIRIN TC MOUSE™ 轉染色體小鼠、KM-MOUSE® (MEDAREX, Princeton, NJ)。

使用人類抗體轉殖基因動物技術(例如 XENOMOUSE™ 技術)，可藉由用相關抗原免疫 XENOMOUSE™ 小鼠 (Abgenix, Fremont, Calif) 來獲得人類抗體。自表現抗體之小鼠回收(例如自脾組織分離)淋巴細胞(諸如 B 細胞)。可使用標準方法將此等回收之細胞與骨髓型細胞株融合以製備永生融合瘤細胞株。可對此等融合瘤細胞株進行篩選及選擇以鑑別產生對相關抗原具特異性之抗體的融合瘤細胞株。

人類抗體轉殖基因動物提供可增濃編碼具有所要特性(諸如特異性及親和力)之抗體之核酸的核酸來源。舉例而言，可自己用 GCC 蛋白或其變異體或部分免疫之人類抗體轉殖基因小鼠分離編碼抗體或抗體可變區之核酸。所分離之核酸或其部分(例如編碼可變區、CDR、構架區之部分)可使用任何適合方法(例如噬菌體呈現)表現，以產生可針對結合 GCC 蛋白之抗體或抗原結合片段進行增濃的抗體或抗體之抗原結合片段(例如單鏈抗原結合片段、雙鏈抗原結合片段)的文庫。相對於經免疫之人類抗體轉殖基因動物中所產生的抗體譜系，該種文庫可展現增強之多樣性

(例如經由重鏈可變區與輕鏈可變區配對產生之組合多樣性)。文庫可使用任何適合檢定(例如GCC蛋白結合檢定)進行篩選以鑑別具有所要特性(例如特異性、親和力)之抗體或抗原結合片段。編碼具有所要特性之抗體或抗原結合片段的核酸可使用任何適合方法回收。(參見例如美國專利第5,871,907號(Winter等人)及美國專利第6,057,098號(Buechler等人)。)

或者，抗體可在除融合瘤細胞株以外的細胞株中表現。更特定言之，可自產生抗體之細胞選殖編碼特定抗體之序列，且用於轉型適合哺乳動物宿主細胞。在一較佳方法中，自經免疫小鼠分離該小鼠之脾及/或淋巴結淋巴細胞，且如先前在Babcook等人，*Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 7843-8 (1996)(其以引用的方式併入本文中)中所述塗鋪於斑塊檢定中。簡言之，將細胞塗鋪於含有綿羊紅血球且用GCC抗原塗佈之瓊脂中，且分泌針對GCC抗原之mAb的細胞將固定補體且緊鄰mAb產生細胞周圍溶解紅血球。將透明斑塊內之細胞挑出以進行免疫球蛋白序列定序且次選殖於表現載體中。隨後藉由ELISA及藉由流動式細胞測量術針對與細胞之結合篩選含有GCC特異性mAb之經短暫轉染細胞之上清液。所產生人類抗體之可變序列或其包含結合特定抗原決定基之CDR的部分可用於製備修飾之抗體。舉例而言，可將所產生抗體之可變區拼接於表現卡匣中以便於轉移構築體、增加構築體之表現及/或將構築體併入能夠表現全長抗體之載體中，參見例如US 20060147445。

在一特定實施例中，表現卡匣包含IgG1同型之重鏈恆定區。

亦可使用選擇淋巴細胞抗體法(Selected Lymphocyte Antibody Method, SLAM, 參見美國專利第5,627,052號, Babcook等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:7843-7848 (1996))來鑑別可提供相關抗體之細胞。在SLAM中, 直接培養B細胞, 從而繞過通常僅捕捉低百分比之小鼠最初產生之抗體的融合瘤技術。使用基於微板之檢定, 可經數天之時間快速檢定B細胞。通常, 鑑別到數千個抗原反應性細胞純系, 代表數千個個別抗原特異性(例如GCC特異性)單株抗體。通常使單個實驗中鑑別出的不同抗原反應性單株抗體之數目增加許多倍。在應用其他基於微板之快速檢定量測抗體且藉由親和力及功能對抗體進行分級之後, 可選擇產生極高品質抗體之個別B細胞純系。另外, 藉由繞過融合瘤產生步驟, 製備可快速進入重組體製造細胞株。分離使用該技術選擇之個別B細胞且可將抗體基因直接引入製造細胞株中。所得細胞株可隨後經與融合瘤細胞株產生所需基本上相同之時間進行發展用於臨床試驗測試。

人類mAb 5F9(IgG2, κ)可由融合瘤5F9產生, 融合瘤5F9亦稱作融合瘤46.5F9.8.2, 其在2007年1月10日以Millennium Pharmaceuticals Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, MA, 02139, USA之名義以寄存編號PTA-8132寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(10801 University Boulevard, Manassas,

Virginia 20110, U.S.A.)。(該寄存係根據出於專利申請程序目的進行微生物備案以取得國際承認的布達佩斯條約(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure)進行且滿足該條約。)本發明係關於融合瘤5F9、其產生之抗體、其抗原結合片段及編碼該抗體及其部分(例如重鏈、重鏈可變區、輕鏈、輕鏈可變區、CDR)的核酸。如本文所述，融合瘤5F9產生IgG2 κ 抗體。

抗體之人類化及呈現技術及修飾

如上所述，宜製備具有降低之免疫原性的抗體。此可結合人類化技術及使用適當文庫之呈現技術來完成。應瞭解鼠類抗體或來自其他物種之抗體可使用此項技術中已知之技術進行人類化或靈長類化。參見例如 Winter及 Harris, *Immunol Today* 14:43-46 (1993) 及 Wright 等人, *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)。相關抗體可藉由重組DNA技術進行工程改造以用相應人類序列取代CH1、CH2、CH3、鉸鏈域及/或構架域(參見WO 92/02190及美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,761號、第5,693,792號、第5,714,350號及第5,777,085號)。另外，使用Ig cDNA來建構嵌合免疫球蛋白基因為此項技術中所已知(Liu等人, *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:3439 (1987)及 *J. Immunol.* 139:3521 (1987))。自融合瘤或產生抗體之其他細胞分離mRNA且用於產生cDNA：相關cDNA可藉由聚合酶鏈反應使用特定引子進行擴增(美國專利第4,683,195號

及第4,683,202號)。

或者，可使用噬菌體呈現技術(參見例如 McCafferty 等人, *Nature*, 348:552-553 (1990))由例如來自未免疫供體之譜系的免疫球蛋白可變(V)域基因在活體外製備人類抗體及抗體片段。根據此技術，使抗體V域基因同框選殖於絲狀噬菌體之主要或次要鞘蛋白基因(諸如M13或fd)中，且以功能性抗體片段形式呈現於噬菌體粒子之表面上。由於絲狀粒子含有噬菌體基因組之單股DNA複本，故基於抗體之功能特性進行的選擇亦使得可選擇編碼展現彼等特性之抗體的基因。因此，噬菌體模擬B細胞之一些特性。可以多種格式進行噬菌體呈現；關於其評述參見例如 Johnson 及 Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3:564-571 (1993)。V基因區段之若干來源可用於噬菌體呈現。Clackson 等人, *Nature*, 352:624-628 (1991)自來源於經免疫小鼠之脾的V基因之小隨機組合文庫分離出不同抗噁唑酮抗體陣列。可建構未免疫人類供體之V基因的譜系且可基本上按照 Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)或 Griffith 等人, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993)所述之技術分離針對不同抗原(包括自體抗原)陣列之抗體。亦參見美國專利第5,565,332號及第5,573,905號。呈現文庫可含有抗體或抗體之含有人工胺基酸序列的抗原結合片段。舉例而言，文庫可含有Fab片段，其含有人工CDR(例如隨機胺基酸序列)及人類構架區。(參見例如美國專利第6,300,064號(Knappik 等人)。)

人類抗體亦可藉由活體外活化之B細胞產生(參見美國專利第5,567,610號及第5,229,275號)。

人類恆定區基因之序列可見於Kabat等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, N.I.H.出版號91-3242中。人類C區基因易於自己知純系獲得。同型之選擇受所要效應功能影響, 諸如補體固定, 或在抗體依賴性細胞毒性中之活性。同型可為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在特定實施例中, 本發明之抗體分子為IgG1及IgG2。可使用任一人類輕鏈恆定區 κ 或 λ 。嵌合、人類化抗體隨後藉由習知方法進行表現。

在一些實施例中, 本發明之抗-GCC抗體分子可對表現GCC之細胞(例如腫瘤細胞)引起抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。具有IgG1及IgG3同型之抗體因其結合Fc受體之能力而適用於引發抗體依賴性細胞毒性能力中之效應功能。具有IgG2及IgG4同型之抗體因其結合Fc受體之能力低而適用於使ADCC反應減至最小。在相關實施例中, 可例如藉由在經修飾真核細胞株中生長來在抗體之Fc區中進行取代或改變抗體之糖基化組成以增強Fc受體識別、結合及/或介導抗-GCC抗體所結合之細胞的細胞毒性的能力(參見例如美國專利第7,317,091號、第5,624,821號及公開案, 包括WO 00/42072, Shields等人, J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001), Lazar等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:4005-4010 (2006), Satoh等人, Expert Opin Biol. Ther. 6:1161-1173 (2006))。在某些實施例中, 抗體或抗原結合

片段(例如人類來源之抗體、人類抗體)可包括改變或調整功能(例如效應功能)的胺基酸取代或置換。舉例而言，人類來源之恆定區(例如 $\gamma 1$ 恆定區、 $\gamma 2$ 恆定區)可設計成降低補體活化及/或Fc受體結合。(參見例如美國專利第5,648,260號(Winter等人)、第5,624,821號(Winter等人)及第5,834,597號(Tso等人)，其全部教示內容以引用的方式併入本文中。)較佳地，含有該等胺基酸取代或置換之人類來源恆定區之胺基酸序列在全長範圍內與未改變之人類來源恆定區之胺基酸序列至少約95%一致，更佳在全長範圍內與未改變之人類來源恆定區之胺基酸序列至少約99%一致。

在另一實施例中，效應功能亦可藉由調節抗體之糖基化模式來改變。改變意謂缺失抗體中所存在之一或多個碳水化合物部分，及/或添加抗體中不存在之一或多個糖基化位點。舉例而言，美國專利申請公開案第2003/0157108號(Presta)中描述具有增強之ADCC活性的抗體，其具有缺乏連接於抗體之Fc區之海藻糖的成熟碳水化合物結構。亦參見美國專利申請公開案第2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。Glycofi亦已開發出能夠產生特定糖型之抗體的酵母細胞株。

或者或另外，可製備糖基化類型已改變之抗體，諸如海藻糖基殘基量減少之低海藻糖基化抗體或對分GlcNac結構增加之抗體。已證明該等改變之糖基化模式將增強抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由例如於糖基化機

構改變之宿主細胞中表現抗體來完成。糖基化機構改變之細胞已描述於此項技術中且可用作經工程改造以表現本發明之重組抗體從而產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，Hang等人之EP 1,176,195描述具有功能被破壞之FUT8基因的細胞株，該基因編碼海藻糖基轉移酶，使得在該種細胞株中表現之抗體顯示低海藻糖基化。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述一種變異型CHO細胞株Lec13細胞，其使海藻糖連接於Asn(297)-連接型碳水化合物的能力降低，亦使得在該宿主細胞中表現之抗體具有低海藻糖基化(亦參見Shields, R. L.等人, 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述如下細胞株，其經工程改造成可表現修飾醣蛋白之糖基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N乙醯基葡糖胺轉移酶III(GnTIII))，使得在該等工程改造細胞株中表現之抗體顯示對分GlcNac結構增加，此使得該等抗體之ADCC活性增強(亦參見Umana等人, 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180)。

人類化抗體亦可使用CDR移植法製備。產生該等人類化抗體之技術為此項技術中所已知。一般而言，人類化抗體可藉由獲得編碼結合於GCC之抗體的可變重鏈及可變輕鏈序列的核酸序列、鑑別可變重鏈及可變輕鏈序列中之互補決定區或「CDR」、及移植CDR核酸序列於人類構架核酸序列上來製備。(參見例如美國專利第4,816,567號及第5,225,539號)。可確定CDR及構架殘基之位置(參見Kabat, E.A.等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological*

Interest, 第5版, 美國衛生與公眾服務部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH出版號91-3242; 及 Chothia, C.等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。本文所述之抗-GCC抗體分子具有表5及表6中所列之CDR胺基酸序列及編碼CDR之核酸序列。在一些實施例中, 表5及表6之序列可併入識別GCC之分子中以用於本文所述之治療或診斷方法中。所選人類構架為適用於活體內投藥之構架, 意謂其不顯示免疫原性。舉例而言, 該種確定可利用關於該等抗體之活體內用法及胺基酸類似性研究的先前經驗來進行。適合構架區可選自如下人類來源之抗體, 其在構架區之長度範圍內與供體抗體(例如抗-GCC抗體分子, 例如3G1)之等效部分(例如構架區)的胺基酸序列具有至少約65%胺基酸序列一致性, 及較佳至少約70%、80%、90%或95%胺基酸序列一致性。胺基酸序列一致性可使用適合胺基酸序列比對演算法(諸如CLUSTAL W)使用預設參數來測定。(Thompson J.D.等人, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994)。)

鑑別欲進行人類化之選殖抗體的CDR及FR後, 即鑑別編碼CDR之胺基酸序列且將相應核酸序列移植於所選人類FR上。此可使用已知引子及連接子進行, 該等引子及連接子之選擇為此項技術中所已知。特定人類抗體之全部CDR可用非人類CDR之至少一部分置換, 或僅一些CDR可用非人類CDR置換。僅需要置換人類化抗體結合於預定抗原所需數目的CDR。CDR移植於所選人類FR上之後, 表現所得

「人類化」可變重鏈及可變輕鏈序列以產生結合於GCC之人類化Fv或人類化抗體。較佳地，CDR移植(例如人類化)抗體以類似於、實質上相同於或優於供體抗體的親和力結合GCC蛋白。通常，人類化可變重鏈及輕鏈序列與人類恆定域序列表現成融合蛋白，從而獲得結合於GCC之完整抗體。然而，可產生不含恆定序列之人類化Fv抗體。

特定胺基酸已經取代、缺失或添加之人類化抗體亦屬於本發明之範疇內。詳言之，人類化抗體可在構架區中具有胺基酸取代諸如以便改良與抗原之結合。舉例而言，人類化免疫球蛋白鏈之所選少數受者構架殘基可經相應供體胺基酸置換。取代位置包括與CDR相鄰或能夠與CDR相互作用之胺基酸殘基(參見例如美國專利第5,585,089號或第5,859,205號)。受者構架可為成熟人類抗體構架序列或共同序列。如本文所用之術語「共同序列」係指在相關家族成員中之區域的序列中，最常發現於各位置或根據各位置之最常見殘基設計的序列。可獲得多個人類抗體共同序列，包括人類可變區之不同子群的共同序列(參見Kabat, E.A.等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, 美國衛生與公眾服務部(U.S. Department of Health and Human Services), U.S. Government Printing Office (1991))。可線上自由獲得Kabat資料庫及其應用，例如經由馬里蘭州貝賽思達市美國生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)的IgBLAST(亦參見Johnson, G. and Wu, T.T., *Nucleic Acids*

Research 29:205-206 (2001))。

對抗體進行人類化之其他技術描述於1992年12月23日公開之Padlan等人, EP 519596 A1中。

抗-GCC抗體分子包括亦可藉由PCT公開案第WO 98/52976號及WO 00/34317(其內容以引用的方式併入本文中)中所揭示之方法特異性缺失人類T細胞抗原決定基或進行「去免疫化」而修飾的其他人類化抗體。簡言之, 分析抗-GCC抗體之鼠類重鏈及輕鏈可變區中結合於II類MHC之肽; 此等肽代表潛在T細胞抗原決定基。為偵測潛在T細胞抗原決定基, 可應用稱作「肽穿線(peptide threading)」之電腦模型化法, 且另外可在人類II類MHC結合肽之資料庫中搜尋鼠類VH及VL序列中所存在之基元, 如PCT公開案第WO 98/52976號及第WO 00/34317號中所述。此等基元結合於18種主要II類MHC DR異型中之任一者, 從而構成潛在T細胞抗原決定基。所偵測到之潛在T細胞抗原決定基可藉由取代可變區中之少數胺基酸殘基或較佳藉由進行單一胺基酸取代來消除。儘可能進行保守性取代, 一般而言但非排他地, 可使用人類生殖系抗體序列中此位置常見之胺基酸。人類生殖系序列揭示於Tomlinson, I.A.等人, *J. Mol. Biol.* 227:776-798 (1992); Cook, G. P.等人, *Immunol. Today* Vol. 16 (5): 237-242 (1995); Chothia, D.等人, *J. Mol. Bio.* 227:799-817 (1992)中。V BASE目錄提供人類免疫球蛋白可變區序列的全面目錄(Tomlinson, I.A.等人彙編, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK)。藉

由對鼠類 VH 及 VL 基因進行突變誘發來建構抗-GCC 抗體之去免疫化 VH 及 VL 之後，可視情況使經突變誘發之可變序列與人類恆定區(例如人類 IgG1 或 κ 恆定區)融合。

在其他實施例中，降低 CDR 移植抗體之免疫原性反應可藉由改變(例如缺失、取代)CDR 中之胺基酸殘基來達成(Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34 (2005)，美國專利第 6,818,749 號，Tan 等人, *J. Immunol.* 169:1119-1125 (2006))。舉例而言，較佳不改變參與接觸抗原之位置的殘基。通常，該等殘基(SDR)處於在抗體間顯示高度可變性之位置中。舉例而言，藉由 Clustal 法(Higgins D. G. 等人, *Meth. Enzymol.* 266:383-402 (1996))自抗-GCC 抗體分子(例如本文所述之抗體)獲得之共同序列(例如 SEQ ID NOs:302-307，表 5)可幫助鑑別 SDR。在本文所述之人類抗-GCC 抗體分子中，SDR 為以下：重鏈 CDR1 之至少第一個殘基，或在一些實施例中前 4 個殘基；重鏈 CDR2 之至少 N 端部分，例如前 7 個、10 個或 13 個殘基；重鏈 CDR3 之幾乎全部；輕鏈 CDR1 之 C 端部分，例如殘基 6、8 或 9 之後的部分；輕鏈 CDR2 之大致第一殘基、中間之殘基及/或最後之殘基；及輕鏈 CDR3 之大部分，或至少殘基 2 或 3 之後部分。因此，為使抗-GCC 抗體分子在進行人類化或修飾之後維持與 GCC 蛋白之結合，抗-GCC 抗體分子之 CDR 中的該等 SDR 殘基相較於 CDR 之其他殘基或構架區中之殘基不太適合例如自鼠類殘基變為人類共同殘基。相反，宜將非人類(例如鼠類 CDR)中之殘基變為鑑別為人類 CDR(例如本文

所述之抗-GCC抗體分子的CDR，例如表5中所列之序列)之共同殘基的殘基。舉例而言，絲胺酸可代表重鏈CDR1 C端之人類殘基，及/或酪胺酸可代表重鏈CDR1之第二及/或第三殘基的人類殘基；重鏈CDR2可以S-(L/V)-K-(S/G)(SEQ ID NO:312)為末端以代表人類CDR；為代表人類CDR3，重鏈CDR3之4至6個殘基及/或天冬胺酸6至9個殘基之後可能存在甘胺酸；輕鏈CDR1可以(K/R)-(A/S)-SQS-(V/L)-(S/L)(SEQ ID NO:313)為開端以代表人類CDR；輕鏈CDR2可在第三殘基中具有絲胺酸及/或在第五殘基中具有精胺酸以代表人類CDR；及/或輕鏈CDR3可在第二殘基中具有麩醯胺酸及/或在第三殘基中具有酪胺酸或絲胺酸以代表人類CDR。

呈不完整抗體形式之抗-GCC抗體亦適用於本發明。該等抗體可來源於上述任何抗體。此類型之適用抗體分子包括(i)Fab片段，由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；(ii)F(ab')₂片段，包含兩個Fab片段在鉸鏈區由二硫橋連接之二價片段；(iii)由VH及CH1域組成之Fd片段；(iv)由抗體單個臂之VL及VH域組成之Fv片段；(v)由VH域組成之dAb片段(Ward等人，*Nature* 341:544-546 (1989))；(vi)由VHH域組成之單域功能性重鏈抗體(稱作奈米抗體)，參見例如 Cortez-Retamozo 等人，*Cancer Res.* 64: 2853-2857(2004)及其中所引用之參考文獻；及(vii)經分離之CDR，例如一或多個經分離之CDR連同足夠構架一起提供抗原結合片段。此外，儘管Fv片段之兩個結構域(VL及

VH)由各別基因編碼，但其可使用重組方法藉由合成連接子聯接，該合成連接子使其能夠製成VL及VH區配對形成單價分子之單一蛋白質鏈(稱作單鏈Fv(scFv)；參見例如Bird等人，*Science* 242:423-426 (1988)；及Huston等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988))。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合片段」內。此等抗體片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得，且以與完整抗體相同之方式針對效用對該等片段進行篩選。諸如Fv、F(ab')₂及Fab之抗體片段可藉由對完整蛋白質進行裂解(例如，藉由蛋白酶或化學裂解)來製備。

在實施例中，重鏈及輕鏈中之一或兩者的CDR序列中的一些或全部可用於另一抗體分子中，例如CDR移植、人類化或嵌合抗體分子中。

實施例包括包含足夠CDR(例如上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一的全部六個CDR)之抗體分子以允許結合於細胞表面GCC。

在一實施例中，使CDR(例如全部HCDR或全部LCDR或所有六個CDR)嵌入人類構架區或人類來源之構架區中。人類構架區之實例包括人類生殖系構架序列、已進行親和力成熟(活體內或活體外)之人類生殖系序列、或合成之人類序列(例如共同序列)。在一實施例中，重鏈構架為IgG1或IgG2構架。在一實施例中，輕鏈構架為κ構架。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子(例如CDR移植或人類化抗體分子)包含足夠CDR(例如本文所述抗體之一的所有

六個CDR，例如表5中所列之序列)以允許結合於GCC。(可編碼表5中所列之CDR胺基酸序列的例示性核酸序列提供於本文之表6中)。在特定實施例中，抗-GCC抗體分子可包含來自5F9或Abx-229之CDR。

用於活體內治療或診斷用途之抗體片段可受益於提高其血清半衰期之修飾。旨在提高抗體之活體內血清半衰期的適合有機部分可包括選自以下之一個、兩個或兩個以上直鏈或分支鏈部分：親水性聚合基團(例如線性或分支聚合物(例如聚烷二醇，諸如聚乙二醇、單甲氧基-聚乙二醇及其類似物)、碳水化合物(例如聚葡萄糖、纖維素、多醣及其類似物)、親水性胺基酸之聚合物(例如聚離胺酸、聚天冬胺酸及其類似物)、聚烷烴氧化物及聚乙烯吡咯啶酮)、脂肪酸基(例如單羧酸或二羧酸)、脂肪酸酯基、脂質基團(例如二醯基甘油基、鞘脂基(例如神經醯胺基))或磷脂基(例如磷脂醯乙醇胺基)。較佳地，使有機部分結合於如下預定位點，其中有機部分相較於非結合抗體部分不會削弱所得免疫結合物之功能(例如降低抗原結合親和力)。有機部分之分子量可為約500 Da至約50,000 Da，較佳為約2000、5000、10,000或20,000 Da。用有機部分修飾多肽(例如抗體)之實例及方法可見於例如美國專利第4,179,337號及第5,612,460號、PCT公開案第WO 95/06058號及第WO 00/26256號、及美國專利申請公開案第20030026805號中。

抗-GCC抗體分子可包含上述人類融合瘤、所選淋巴細

胞或鼠類抗體之一的重鏈及輕鏈中之一或兩者之可變區的全部或抗原結合片段。

在一實施例中，(a)之輕鏈胺基酸序列與(a)(i-ii)中所提及之參考胺基酸序列之一可有多達1、2、3、4、5、10或15個殘基不同。在實施例中，該等差異為保守性取代。在實施例中，差異係在構架區中。在一實施例中，(b)之重鏈胺基酸序列與(b)(i-ii)中所提及之參考胺基酸序列之一可有多達1、2、3、4、5、10或15個殘基不同。在實施例中，該等差異為保守性取代。在實施例中，差異係在構架區中。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子包含以下中之一或兩者：

(a)具有(i)表3之輕鏈可變區胺基酸序列(例如SEQ ID NO:20)或(ii)由表4之核苷酸序列(SEQ ID NO:19)編碼之輕鏈可變區胺基酸的全部或抗原結合片段之輕鏈胺基酸序列；及

(b)具有(i)表3之重鏈可變區胺基酸序列(例如SEQ ID NO:18)或(ii)由表4之核苷酸序列(SEQ ID NO:17)編碼之重鏈胺基酸序列的全部或抗原結合片段之重鏈胺基酸序列。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子包含以下中之一或兩者：

a)如下輕鏈可變區或其抗原結合片段，其與本發明之抗-GCC抗體分子(例如上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一)的輕鏈可變區具有至少85、90、95、97或99%

同源性；及

(b)如下重鏈可變區或其抗原結合片段，其與本發明之抗-GCC抗體分子(例如上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一)的重鏈可變區具有至少85、90、95、97或99%同源性。

人類融合瘤、所選淋巴細胞及鼠類抗體之可變區的胺基酸序列可見於表3中。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子為5F9抗體分子且包括以下中之一或兩者：a) SEQ ID NO:231之重鏈恆定區的全部或片段；及b) SEQ ID NO:233之輕鏈恆定區的全部或片段。

在另一實施例中，抗-GCC抗體分子為Abx-229抗體分子且包括以下中之一或兩者：a) SEQ ID NO:46之重鏈可變區的全部或GCC結合片段；及b) SEQ ID NO:48之輕鏈可變區的全部或GCC結合片段。

在一種方法中，可使用編碼重鏈及輕鏈J區之共同序列來設計用作引子之寡核苷酸以將適用限制位點引入J區中，以供隨後將V區區段連接於人類C區區段。可藉由定點突變誘發來修飾C區cDNA以將限制位點置於人類序列中之類似位置。

表現載體包括質體、反轉錄病毒、黏質體、YAC、EBV來源之游離基因體及其類似物。適宜載體為編碼功能完整之人類CH或CL免疫球蛋白序列的載體，其具有經工程改造之適當限制位點以便可易於插入及表現任何VH或VL序

列。在該等載體中，拼接通常在所插入J區中之拼接供體位點與人類C區前方之拼接受體位點之間進行，且亦在人類CH外顯子內存在之拼接區進行。適合表現載體可含有多個組分，例如複製起點、可選擇標記基因、一或多個表現控制元件(諸如轉錄控制元件(例如啟動子、強化子、終止子))及/或一或多個轉譯信號、信號序列或前導序列及其類似物。聚腺苷酸化及轉錄終止在編碼區下游之原生染色體位點處進行。所得嵌合抗體可聯接於任何強啟動子。可使用之適合載體之實例包括適用於哺乳動物宿主及基於病毒複製系統的載體，諸如猿猴病毒40(SV40)、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)、腺病毒2、牛乳突狀瘤病毒(BPV)、乳多泡病毒BK突變體(BKV)或小鼠及人類細胞巨大病毒(CMV)及莫洛尼鼠類白血病毒(moloney murine leukemia virus, MMLV)、原生Ig啟動子等。多種適合載體為此項技術中所已知，包括維持於單一複本或多個複本中或例如經由LTR或經由經工程改造而具有多個整合位點的人工染色體來整合於宿主細胞染色體中的載體(Lindenbaum等人, *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004); Kennard等人, *Biotechnol. Bioeng.* Online May 20, 2009)。適合載體之其他實例列於以下章節中。

因此，本發明提供一種表現載體，其包含編碼結合GCC蛋白的抗體、抗體之抗原結合片段(例如人類、人類化、嵌合抗體或上述任一者之抗原結合片段)、抗體鏈(例如重鏈、輕鏈)或抗體鏈之抗原結合部分的核酸。

在真核宿主細胞中表現為適用的，因為該等細胞相較於原核細胞更可能組裝及分泌經適當摺疊且具有免疫活性之抗體。然而，所產生之由於不適當摺疊而無活性的任何抗體可根據已知方法 (Kim 及 Baldwin, 「 Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding 」, *Ann. Rev. Biochem.* 51, 第 459-89 頁 (1982)) 複性。宿主細胞可產生完整抗體之部分，諸如輕鏈二聚體或重鏈二聚體，其亦為本發明之抗體同源物。

另外，如本文別處所述，人類抗體或來自其他物種之抗體可經由呈現型技術(包括(但不限於)噬菌體呈現、反轉錄病毒呈現、核糖體呈現及其他技術)使用此項技術中熟知之技術來產生，且可對所得分子再進行成熟(諸如親和力成熟)，該等技術為此項技術中所已知。Winter 及 Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993)；及 Wright 等人，*Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)；Hanes 及 Pluckthau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997)(核糖體呈現)；Parmley 及 Smith *Gene* 73:305-318 (1988)(噬菌體呈現)；Scott *TIBS* 17:241-245 (1992)；Cwirla 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382 (1990)；Russel 等人，*Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993)；Hoganboom 等人，*Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992)；Chiswell 及 McCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992)；及美國專利第 5,733,743 號。若使用呈現技術來製備非人類抗體，則該等抗體可如上所述進行人類化。

應瞭解，所產生之抗體最初無需具有特定所要同型，而是相反，所產生之抗體可具有任何同型。舉例而言，由5F9融合瘤(ATCC寄存編號PTA-8132)產生之抗體具有IgG2同型。該抗體之同型可在之後使用此項技術中已知之習知技術轉變為例如IgG1或IgG3以在抗體結合細胞上之GCC時引發ADCC反應。該等技術包括使用定向重組技術(參見例如美國專利第4,816,397號)、細胞與細胞融合技術(參見例如美國專利第5,916,771號)及其他技術。在細胞與細胞融合技術中，製備具有有任何所要同型之重鏈的骨髓瘤或其他細胞株及製備具有輕鏈之另一骨髓瘤或另一細胞株。該等細胞可在之後進行融合且可分離表現完整抗體之細胞株。

在某些實施例中，GCC抗體分子為人類抗-GCC IgG1抗體。因為該等抗體具有與GCC分子之所需結合性，故該等抗體中之任一者均容易進行同型轉變，以產生例如人類IgG4同型，同時仍具有相同可變區(其在某種程度上定義抗體之特異性及親和力)。因此，因為所產生之抗體候選者滿足上述所要「結構」特徵，故其一般可經由同型轉變而具有至少某些所要其他「功能」特徵。

在一實施例中，可使可變區或其抗原結合片段偶合於除與其一起產生之恆定區以外的恆定區(或其片段)，例如來自另一抗體之恆定區(或其片段)，或偶合於合成恆定區(或其片段)。在實施例中，恆定區為IgG1或IgG2恆定區(或其片段)。可在可變區或恆定區中進行序列改變，以改良抗

體分子之效應活性。

其他治療劑之設計及產生

本文中針對GCC產生及分析特徵之抗體有助於設計其他治療模態，包括其他抗體、其他拮抗劑或除抗體以外之化學部分。該等模態包括(但不限於)具有類似結合活性或功能之抗體、改進之抗體治療劑(諸如雙特異性抗體、免疫結合物及經放射性標記之治療劑)、產生肽治療劑(尤其細胞內抗體)及小分子。此外，如上所述，本發明抗體之效應功能可藉由同型轉變成IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA1、IgA2、IgE或IgM進行改變，以用於各種治療用途。

對於雙特異性抗體，可產生包含以下之雙特異性抗體：
(i)結合在一起的兩個抗體，一者對GCC具特異性而另一者對第二分子具特異性，(ii)具有一條對GCC具特異性之鏈及對第二分子具特異性之第二鏈的單一抗體，或(iii)對GCC及另一分子具特異性的單鏈抗體。該等雙特異性抗體可使用已知技術產生。舉例而言，雙特異性抗體可藉由使兩個或兩個以上抗體(相同類型或不同類型)交聯來製備。合適交聯劑包括具有由適當間隔子隔開之兩個不同反應性基團的雜雙官能性交聯劑(例如間-順丁烯二醯亞胺苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯)；或同雙官能性交聯劑(例如辛二酸二丁二醯亞胺酯)。該等連接子可自Pierce Chemical Company, Rockford, IL獲得。亦參見例如Fanger等人，*Immunomethods* 4:72-81 (1994)，及Winte及Harris *Immunol*

Today 14:43-46 (1993)，及 Wright 等人，*Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992)，且對於 (iii) 參見例如 Traunecker 等人，*Int. J. Cancer* (增刊) 7:51-52 (1992)。Songsivilai 及 Lachmann *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990)，Kostelny 等人，*J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)。

此外，亦可製備「 κ 型抗體 (Kappa body)」(Ill. 等人，「Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions」*Protein Eng* 10:949-57 (1997))、「微型抗體」(Martin 等人，*EMBO J* 13:5303-9 (1994)，美國專利第 5,837,821 號)、「雙功能抗體」(Holliger 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-6448 (1993))或「兩面蛋白」(Traunecker 等人，*EMBO J* 10:3655-3659 (1991)，及 Traunecker 等人，*Int J Cancer* 增刊，7:51-52 (1992))。

核酸及多肽

在另一實施例中，本發明係關於編碼或代表本文所述之抗體分子的聚核苷酸及多肽序列。該等聚核苷酸編碼重鏈及輕鏈各自之可變區與恆定區，不過根據本文所述之組合物，本發明亦涵蓋其他組合。本發明亦涵蓋來源於所揭示之聚核苷酸的寡核苷酸片段及與此等聚核苷酸互補之核酸序列。

聚核苷酸可呈 RNA 或 DNA 之形式。DNA、cDNA、基因組 DNA、核酸類似物及合成 DNA 形式之聚核苷酸屬於本發

明之範疇。DNA可為雙股或單股DNA，且若為單股DNA，則可為編碼(有義)股或非編碼(反義)股。編碼多肽之編碼序列可與本文所提供之編碼序列一致，或可為不同編碼序列，該編碼序列由於遺傳密碼子之冗餘或簡併性而與本文所提供之DNA編碼相同多肽。

在所提供之實施例中，聚核苷酸編碼本發明之至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區，例如如表4中所概述。

本發明亦包括含有修飾(諸如聚核苷酸缺失、取代或添加)之變異型聚核苷酸及由變異型聚核苷酸序列產生之任何多肽修飾。本發明之聚核苷酸亦可具有作為本文所提供之編碼序列之變異體的編碼序列。舉例而言，變異型聚核苷酸可與表4中所列之聚核苷酸具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或97%一致性。在實施例中，變異型聚核苷酸編碼抗-GCC抗體分子。

本發明另外係關於代表本發明之抗體的多肽以及該等多肽之片段、類似物及衍生物。本發明之多肽可為重組多肽、天然產生之多肽或合成多肽。本發明多肽之片段、衍生物或類似物可為如下片段、衍生物或類似物，其中一或多個胺基酸殘基經保守或非保守胺基酸殘基(較佳保守胺基酸殘基)取代，且該取代之胺基酸殘基可能為或可能不為由遺傳密碼子編碼之胺基酸殘基；或其可為如下片段、衍生物或類似物，其中一或多個胺基酸殘基包括取代基；或其可為如下片段、衍生物或類似物，其中該多肽與另一

化合物(諸如延長多肽半衰期之化合物，例如聚乙二醇)融合；或其可為如下片段、衍生物或類似物，其中其他胺基酸融合於該多肽，諸如前導序列或分泌序列或用於純化多肽的序列或原蛋白序列。該等片段、衍生物及類似物屬於本發明之範疇。在各種態樣中，本發明之多肽可為部分純化或純化之產物。

本發明之多肽可具有與本文所述之抗體(例如表2或表3中所概述)一致或因一或多個胺基酸取代所致之少量變化而不同的胺基酸序列。變化可為通常在約1至5個胺基酸範圍內的「保守性改變」，其中所取代之胺基酸具有類似結構或化學特性，例如用異白胺酸置換白胺酸或用絲胺酸置換蘇胺酸；用精胺酸或組胺酸置換離胺酸。相反，變化可包括非保守性改變，例如用色胺酸置換甘胺酸。類似的少量變化亦可包括胺基酸缺失或插入或兩者。可使用此項技術中已知之電腦程式(例如DNASTAR軟體(DNASTAR, Inc., Madison, Wis.))發現用於確定可對何胺基酸殘基進行取代、插入或缺失及如何對胺基酸殘基進行取代、插入或缺失而不會改變生物或免疫活性的規則。

在另一態樣中，本發明之特徵在於編碼抗-GCC抗體分子之經分離及/或重組核酸。在實施例中，核酸編碼以下中之一或多者：本文所述之抗體分子、抗體分子之重鏈、輕鏈、輕鏈可變區、重鏈可變區、重鏈及輕鏈之部分(例如當與全長重鏈可變區配對時結合抗原之輕鏈可變區片段，或當與全長輕鏈可變區配對時結合抗原之重鏈可變區

片段)及CDR。實施例包括安置於載體(例如表現載體)中之該等核酸。在特定實施例中，本發明包括質體pTOK58D-5F9LC及pTOK58D-5F9HC。此外，本發明涵蓋由宿主細胞(例如表現由質體pTOK58D-5F9LC及pTOK58D-5F9HC編碼之抗體分子的宿主細胞)產生的抗體分子。

在一實施例中，提供一種載體，例如表現載體，其包含以下中之一或兩者：

本文例如表6中所述編碼以下之序列：輕鏈可變區(例如表4中所列之序列)、其抗原結合片段、或輕鏈之一個、兩個或三個CDR(及視情況存在之構架區)；及

本文例如表6中所述編碼以下之序列：重鏈可變區(例如表4中所列之序列)、其抗原結合片段、或重鏈之一個、兩個或三個CDR(及視情況存在之構架區)。

在所提供之實施例中，聚核苷酸編碼本發明抗體之至少一個重鏈可變區或至少一個輕鏈可變區。在所提供之實施例中，多肽可編碼本發明抗體之至少一個重鏈可變區及一個輕鏈可變區。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子包含以下中之一或兩者：

(a)由在所選嚴格度條件下與以下雜交之核酸編碼的輕鏈可變區或其抗原結合片段：(i)本文例如在表4中所述之編碼抗-GCC抗體分子之核酸序列的互補序列，或(ii)編碼表1及表2中所概述之本發明抗-GCC抗體分子(例如上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一)之輕鏈的任何核酸

序列；及

(b)由在所選嚴格度條件下與以下雜交之核酸編碼的重鏈可變區或其抗原結合片段：(i)本文例如在表4中所述之編碼抗-GCC抗體分子之核酸序列的互補序列，或(ii)編碼表1及表2中所概述之本發明抗-GCC抗體分子(例如上述人類融合瘤、所選淋巴細胞或鼠類抗體之一)之重鏈的任何核酸序列。

在一實施例中，所選嚴格度條件為高嚴格度或極高嚴格度條件，例如如本文所述之條件。

在其他態樣中，抗體或抗原結合片段包含由具有ATCC寄存編號PTA-8132之DNA編碼之抗體之輕鏈可變區胺基酸序列的胺基酸序列。在其他態樣中，抗體或抗原結合片段包含由具有ATCC寄存編號PTA-8132之DNA編碼之抗體之重鏈可變區的胺基酸序列。

本發明亦提供包括本發明之聚核苷酸的載體、用本發明之載體遺傳工程改造的宿主細胞、及藉由重組技術製備本發明之抗體。

適當DNA序列可藉由多種程序插入載體中。一般而言，DNA序列可藉由此項技術中已知之程序插入適當限制性核酸內切酶位點中。表現載體中之聚核苷酸序列可操作地連接於適當表現控制序列(亦即啟動子)以引導mRNA合成。該等啟動子之實例包括(但不限於)勞斯肉瘤病毒LTR或早期或晚期SV40啟動子、大腸桿菌lac或trp、噬菌體 λ P_L啟動子及已知控制原核(例如大腸桿菌之tac、T3、T7啟動子)或

真核(例如細胞巨大病毒啟動子、腺病毒晚期啟動子、EF-1a啟動子)細胞中之基因表現的其他啟動子或其病毒。表現載體亦含有用於轉譯起始之核糖體結合位點及轉錄終止子。載體亦可包括用於擴增表現之適當序列。舉例而言，載體可含有強化子，其為病毒來源之刺激轉錄的DNA序列(諸如來源於猿猴病毒(諸如SV40)、多瘤病毒、細胞巨大病毒、牛乳突狀瘤病毒或莫洛尼肉瘤病毒(Moloney sarcoma virus)的DNA序列)或基因組來源之刺激轉錄的DNA序列。載體較佳亦含有複製起點。載體可經建構以含有外源性複製起點，或該種複製起點可來源於SV40或另一病毒來源，或藉由宿主細胞染色體複製機制獲得。

此外，載體視情況含有用於選擇經轉染宿主細胞之標記基因，諸如允許在多種宿主中用甲胺喋呤(methotrexate)進行選擇的二氫葉酸還原酶標記基因；或抗生素標記基因，諸如 β -內醯胺酶基因(安比西林(ampicillin)抗性)、*Tet*基因(四環素(tetracycline)抗性)(用於原核細胞中)，或新黴素(neomycin)、GA418(遺傳黴素(geneticin)，一種新黴素衍生物)、gpt(黴酚酸)、安比西林或潮黴素(hygromycin)抗性基因；或補充宿主細胞之遺傳損傷(諸如無胸苷激酶、次黃嘌呤磷酸核糖轉移酶、二氫葉酸還原酶等)的基因。一般使用編碼宿主之營養缺陷標記之基因產物的基因(例如*LEU2*、*URA3*、*HIS3*)作為酵母中之可選擇標記。

為獲得本發明之抗體，應將編碼本發明抗體之輕鏈及重鏈可變區及輕鏈及重鏈恆定區的一或多個聚核苷酸序列併

入載體中。可將編碼本發明抗體之輕鏈及重鏈的聚核苷酸序列併入一或多個載體中，並隨後併入宿主細胞中。

用於在哺乳動物細胞中表現之適合表現載體包括例如 pCDM8、pCDNA1.1/amp、pCDNA3.1、pRc/RSV、pEF-1(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、pCMV-SCRIPT、pFB、pSG5、pXT1(Stratagene, La Jolla, CA)、pCDEF3(Goldman, L.A.等人, *Biotechniques*, 21:1013-1015 (1996))、pSVSPORT(GIBCO 部, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)、pEF-Bos(Mizushima, S.等人, *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990))、雙順反子 GPEX®反轉錄病毒載體(Gala Biotech, Middleton, WI)及其類似物。亦可利用適用於各種表現宿主中之表現載體，該等宿主諸如原核細胞(大腸桿菌)、昆蟲細胞(果蠅施耐德 S2 細胞 (*Drosophila Schnieder S2 cell*), Sf9)及酵母(甲醇畢赤酵母 (*P. methanolica*)、巴斯德畢赤酵母 (*P. pastoris*)、釀酒酵母 (*S. cerevisiae*))。例示性載體為 pLKTOK58(野生型 IgG1 Fc 序列)及 pLKTOK59(突變型 IgG1 Fc 序列)(參見美國專利申請公開案第 20060147445 號)。

應瞭解，本發明之抗體可在除融合瘤細胞株以外的細胞株中表現。編碼特定抗體之 cDNA 或基因組純系的序列可用於適合哺乳動物或非哺乳動物宿主細胞。轉型可如下進行：藉由用於將聚核苷酸引入宿主細胞中之任何已知方法，包括例如將聚核苷酸封裝於病毒中(或於病毒載體中)並用該病毒(或載體)轉導宿主細胞；或藉由此項技術中已

知之用於將異源聚核苷酸引入哺乳動物細胞中之轉染程序，例如聚葡萄糖介導之轉染、磷酸鈣沈澱、凝聚胺介導之轉染、原生質體融合、電穿孔、將聚核苷酸囊封於脂質體中及直接顯微注射DNA分子。所用轉型程序視欲轉型之宿主而定。用於將異源聚核苷酸引入哺乳動物細胞中之方法為此項技術中所已知，且包括(但不限於)：聚葡萄糖介導之轉染、磷酸鈣沈澱、凝聚胺介導之轉染、原生質體融合、電穿孔、粒子轟擊、將聚核苷酸囊封於脂質體中、肽結合物、樹枝狀聚合物及將DNA直接顯微注射於細胞核中。

在另一態樣中，本發明之特徵在於包含本文所述核酸之宿主細胞。在實施例中，該細胞表現本文所述之抗體分子或其組分。另一實施例提供一種製備抗體分子(例如本文所述之抗-GCC抗體分子，例如人類或人類化抗體分子)之方法，其包含將宿主細胞維持於適於表現之條件下，藉此表現免疫球蛋白鏈且產生抗體分子。另一實施例提供一種宿主細胞，其包含編碼重鏈及輕鏈抗體序列之任何上述表現載體。宿主細胞可為真核細胞(例如哺乳動物細胞、昆蟲細胞、酵母細胞)或原核細胞(例如大腸桿菌)。舉例而言，哺乳動物細胞可為培養之細胞或細胞株。例示性哺乳動物細胞包括淋巴細胞細胞株(例如NS0)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)、COS細胞。在一特定實施例中，培養之宿主細胞為包含編碼5F9抗體分子之核酸序列的COS細胞。在另一實施例中，宿主細胞為融合瘤5F9(PTA-8132)。另

外，細胞包括卵母細胞及來自轉殖基因動物之細胞，例如乳腺上皮細胞。舉例而言，編碼本文所述之抗體分子的核酸可在轉殖基因非人類動物中表現。

可用作表現宿主之哺乳動物細胞株為此項技術中所已知且包括可自美國菌種保藏中心(ATCC)獲得之許多永生化細胞株，包括(但不限於)中國倉鼠卵巢(CHO)細胞、NSO細胞、海拉細胞(HeLa cell)、幼倉鼠腎(BHK)細胞、猴腎細胞(COS)、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)及多種其他細胞株。非哺乳動物細胞(包括(但不限於)細菌、酵母、昆蟲及植物)亦可用於表現重組抗體。為防止由於非人類糖基化作用引起免疫原性、藥物動力學及/或效應功能發生變化，可較佳對抗體CH2域進行定點突變誘發以消除糖基化作用。藉由確定哪一系統產生最高表現量且產生具有組成型GCC結合特性之抗體來選擇表現方法。

另一實施例提供一種製備抗-GCC抗體分子(例如人類或人類化抗體分子)的方法，其包含將包含本文所述之核酸(例如表4或表6中所列之一或多個核酸序列)的宿主細胞維持於適於表現免疫球蛋白之條件下，藉此表現免疫球蛋白鏈且產生結合GCC之抗體分子(例如人類或人類化抗體分子)或其片段或變異體。舉例而言，表現抗體分子之方法包括使用宿主細胞，其中編碼抗體分子(例如人類或人類化抗體)輕鏈之第一重組核酸分子及編碼抗體分子(例如人類或人類化抗體)重鏈之第二重組核酸分子包含於單個表現載體中。在其他實施例中，其處於各別載體中。必要

時，該方法可另外包含分離或回收抗體、抗體之抗原結合片段、抗體鏈或抗體鏈之抗原結合片段的步驟。

舉例而言，可使用適於所選宿主細胞之任何方法(例如轉型、轉染、電穿孔、感染)將編碼結合GCC蛋白之人類抗體之重鏈及輕鏈的核酸分子(亦即一或多個核酸分子)或包含該(該等)核酸分子的表現構築體(亦即一或多個構築體)引入適合宿主細胞中以產生重組宿主細胞，使得該(該等)核酸分子可操作地連接於一或多個表現控制元件(例如載體中、藉由細胞中之處理產生之構築體中、整合於宿主細胞基因組中之控制元件)。可將所得重組宿主細胞維持於適於表現之條件下(例如在誘導劑存在下，於適合非人類動物中，在補充有適當鹽、生長因子、抗生素、營養補充劑等之適合培養基中)，藉此產生所編碼之多肽。必要時，可分離或回收(例如自動物、宿主細胞、培養基、奶)所編碼之蛋白質。此方法涵蓋在轉殖基因非人類動物(參見例如 WO 92/03918, GenPharm International)或植物之宿主細胞中進行表現。

另外，可使用多種已知技術增強本發明抗體(或來源於其之其他部分)自生產細胞株之表現。舉例而言，麩醯胺酸合成酶及DHFR基因表現系統為用於在某些條件下增強表現之普通方法。可使用習知技術(諸如限制稀釋選殖、微滴技術)或此項技術中已知之任何其他方法來鑑別高表現細胞純系。GS系統完全或部分結合歐洲專利第0 216 846號、第0 256 055號及第0 323 997號及歐洲專利申請案

第 89303964.4 號進行了論述。

在用於重組表現本發明之經修飾抗體或其抗原結合部分的例示性系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈與抗體輕鏈之重組表現載體引入 dhfr-CHO 細胞中。在重組表現載體中，抗體重鏈及輕鏈基因各自可操作地連接於強化子/啟動子調節元件(例如來源於 SV40、CMV、腺病毒及其類似物的強化子/啟動子調節元件，諸如 CMV 強化子/AdMLP 啟動子調節元件或 SV40 強化子/AdMLP 啟動子調節元件)以驅動基因之高含量轉錄。重組表現載體亦帶有 DHFR 基因，其允許使用甲胺喋呤選擇/擴增來選擇已轉染有載體之 CHO 細胞。培養所選轉型體宿主細胞以允許表現抗體重鏈及輕鏈且自培養基回收完整抗體。使用標準分子生物學技術來製備重組表現載體、轉染宿主細胞、選擇轉型體、培養宿主細胞及自培養基回收抗體。

亦可經由產生轉殖有相關免疫球蛋白重鏈及輕鏈序列之基因的哺乳動物或植物，且自其中產生可回收形式之抗體來以轉殖基因方式製備本發明之抗體。對於在哺乳動物中以轉殖基因方式製備，抗體可在山羊、母牛或其他哺乳動物之奶中產生且自其中回收。參見例如美國專利第 5,827,690 號、第 5,756,687 號、第 5,750,172 號及第 5,741,957 號。

本文所述之抗體、抗原結合片段、抗體鏈及其抗原結合部分亦可在適合活體外表現系統中藉由化學合成或藉由任何其他適合方法製備。

融合蛋白及免疫結合物

本文所述之抗-GCC抗體可藉由任何適合方法(例如化學偶合、遺傳融合、非共價締合或其他方法)功能性連接於一或多個非抗體分子實體。

可製備如下融合蛋白，其中本文所述之抗-GCC抗體分子及非抗體部分為單個連續多肽鏈之組分。非抗體部分可相對於抗體部分位於N端、C端或內部。舉例而言，一些實施例可藉由將編碼免疫球蛋白序列之核酸插入適合表現載體(諸如pET載體(例如pET-15b，Novagen)、噬菌體載體(例如pCNATAB 5 E，Pharmacia)或其他載體(例如pRIT2T蛋白質A融合載體，Pharmacia))中來製備。所得構築體可經表現以產生包含非抗體部分(例如組胺酸標籤、E標籤或蛋白質A IgG結合域)之抗體鏈。可使用任何適合技術分離或回收融合蛋白，諸如使用適合親和力基質進行層析(參見例如 *Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubel, F.M 等人編，第2卷，增刊26，第16.4.1-16.7.8頁(1991)))。

本發明提供引導至細胞中且在實施例中內化於細胞中的抗-GCC抗體分子。其能夠向表現GCC之細胞傳遞治療劑或可偵測藥劑或將治療劑或可偵測藥劑傳遞至該等細胞中，但不會向不表現目標之細胞傳遞或不會傳遞至該等細胞中。因此，本發明亦提供包含如本文所述之抗-GCC抗體分子的抗-GCC免疫結合物，該抗-GCC抗體分子結合於治療劑或可偵測藥劑。在實施例中，抗-GCC免疫結合物

對 GCC 之親和力為未結合抗體之至少 10、25、50、75、80、90 或 95%。此可使用細胞表面 GCC 或經分離之 GCC 來測定。在一實施例中，抗-GCC 抗體分子(例如免疫結合物)之 LD50 小於 1,000、500、250、100 或 50 pM，如本文所述之檢定所測定。

抗-GCC 抗體分子可利用此項技術中已知之技術進行修飾從而以免疫結合物形式發揮作用。參見例如 Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993)。亦參見美國專利第 5,194,594 號。經放射性標記之抗體的製備亦可易於利用此項技術中已知之技術來製備。參見例如 Junghans 等人, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (第 2 版, Chafner 及 Longo 編, Lippincott Raven (1996))。亦參見美國專利第 4,681,581 號、第 4,735,210 號、第 5,101,827 號、第 5,102,990 號(美國參考專利第 35,500 號)、第 5,648,471 號及第 5,697,902 號。

在一些實施例中，抗體分子及非抗體部分藉助於連接子連接。在該等實施例中，免疫結合物由式(I)表示：



其中，

Ab 為本文所述之抗-GCC 抗體分子；

X 為連接 Ab 與 Z 之部分，例如本文所述之連接子在共價連接於 Ab 及 Z 中之一或兩者之後的殘基；

Z 為治療劑或標記；且

m 在約1至約15範圍內。

變數 m 表示式 (I) 免疫結合物中每個抗體分子所對應 -X-Z 部分的數目。在各種實施例中， m 之範圍為 1 至 15、1 至 10、1 至 9、1 至 8、1 至 7、1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3 或 1 至 2。在一些實施例中， m 之範圍為 2 至 10、2 至 9、2 至 8、2 至 7、2 至 6、2 至 5、2 至 4 或 2 至 3。在其他實施例中， m 為 1、2、3、4、5 或 6。在包含複數種式 (I) 免疫結合物之組合物中， m 為每個 Ab 所對應 -X-Z 部分的平均數，亦稱作平均藥物負載率。平均藥物負載率之範圍可為每個 Ab 對應 1 至約 15 個 -X-Z 部分。在一些實施例中，當 m 表示平均藥物負載率時， m 為約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7 或約 8。在例示性實施例中， m 為約 2 至約 8。在一實施例中， m 為約 8。在另一實施例中， m 為約 4。在另一實施例中， m 為約 2。

每個 Ab 所對應 -X-Z 部分的平均數可藉由習知方式 (諸如質譜、ELISA 檢定及 HPLC) 進行表徵。亦可測定免疫結合物中 m 之定量分佈。在一些情況下，分離、純化及表徵 m 為特定值之均質免疫結合物 (不同於具有其他藥物負載率之免疫結合物) 可藉由諸如逆相 HPLC 或電泳之方式達成。

式 (I) 之免疫結合物可以混合物形式存在，其中混合物之各組分具有不同 m 值。舉例而言，式 (I) 免疫結合物可以兩種各別免疫結合物組分之混合物形式存在： m 為 7 之一種免疫結合物組分及 m 為 8 之另一免疫結合物組分。

在一實施例中，式 (I) 免疫結合物以三種各別免疫結合物

之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為1、2及3。

在一實施例中，式(I)免疫結合物以三種各別免疫結合物之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為3、4及5。

在一實施例中，式(I)免疫結合物以三種各別免疫結合物之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為5、6及7。

在一實施例中，式(I)免疫結合物以三種各別免疫結合物之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為7、8及9。

在一實施例中，式(I)免疫結合物以三種各別免疫結合物之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為9、10及11。

在一實施例中，式(I)免疫結合物以三種各別免疫結合物之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為11、12及13。

在一實施例中，式(I)免疫結合物以三種各別免疫結合物之混合物形式存在，其中三種各別免疫結合物之 m 分別為13、14及15。

多種適合連接子(例如用於將抗體分子連接於治療劑或標記的雜雙官能試劑)及用於製備免疫結合物之方法為此項技術中所已知。(參見例如 Chari 等人, Cancer Research 52:127-131 (1992)。)連接子可例如在生理條件下(例如在

細胞內條件下)裂解，使得連接子之裂解在細胞內環境中釋放藥物(治療劑或標記)。在其他實施例中，連接子不可裂解，且藥物例如藉由抗體降解而釋放。

連接子可鍵結於抗體部分上之化學反應性基團，例如鍵結於游離胺基、亞胺基、羥基、硫氫基或羧基(例如鍵結於N端或C端、一或多個離胺酸殘基之 ϵ 胺基、一或多個麩胺酸或天冬胺酸殘基之游離羧酸基、或一或多個半胱胺醯基殘基之氫硫基)。連接子所結合之位點可為抗體部分之胺基酸序列中的天然殘基，或其可例如藉由DNA重組技術(例如藉由在胺基酸序列中引入半胱胺酸或蛋白酶裂解位點)或藉由蛋白質生物化學(例如還原、pH值調整或蛋白水解)引入抗體部分中。

共價連接之最常用非特異性方法之一為進行碳化二亞胺反應以使化合物之羧基(或胺基)連接於抗體分子之胺基(或羧基)。此外，已使用雙官能試劑(諸如二醛或醯亞胺酯)使化合物之胺基連接於抗體分子之胺基。席夫鹼反應(Schiff base reaction)亦可用於使藥物連接於抗體分子。此方法涉及對含有二醇或羥基之藥物進行高碘酸氧化，從而形成醛，該醛隨後與抗體分子反應。連接經由與抗體分子之胺基形成席夫鹼來進行。亦可使用異硫氰酸酯作為偶合劑來使藥物共價連接於抗體分子。其他技術為熟習此項技術者所已知且屬於本發明之範疇。

在某些實施例中，使作為連接子(X)之前驅物的中間物與藥物(Z)在適當條件下反應。在某些實施例中，使用藥

物及/或中間物上之反應性基團。隨後使藥物與中間物之間反應的產物或經衍生化之藥物與抗體分子在適當條件下反應。

可藉由採用熟習此項技術者熟知之方法自反應物純化免疫結合物，該等方法為例如管柱層析(例如親和層析、離子交換層析、凝膠過濾、疏水性相互作用層析)、透析、透濾或沈澱。可藉由採用熟習此項技術者熟知之方法(例如 SDS-PAGE、質譜或毛細管電泳)對免疫結合物進行評估。

在一些實施例中，連接子可由細胞內環境中(例如溶酶體或內體或胞膜窖(caveolea)內)存在之裂解劑裂解。連接子可為例如肽基連接子，其可由細胞內之肽酶或蛋白酶(包括(但不限於)溶酶體或內體蛋白酶)裂解。在一些實施例中，肽基連接子長度為至少兩個胺基酸或長度為至少三個胺基酸。裂解劑可包括組織蛋白酶B及D及纖維蛋白酶，已知其全部均可水解二肽藥物衍生物，從而使得藥物釋放於目標細胞中(參見例如 Dubowchik 及 Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123)。最典型連接子為肽基連接子，其可由 GCC 表現細胞中存在之酶裂解。舉例而言，可使用可由高度表現於癌性組織中之硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶B裂解的肽基連接子(例如 Phe-Leu 或 Gly-Phe-Leu-Gly 連接子(SEQ ID NO:319))。該等連接子之其他實例描述於例如美國專利第 6,214,345 號中，該專利以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中。在一特定實施例中，可由

細胞內蛋白酶裂解之肽基連接子為 Val-Cit 連接子或 Phe-Lys 連接子(參見例如美國專利 6,214,345，其描述具有 val-cit 連接子之小紅莓(doxorubicin)的合成)。使用細胞內蛋白水解釋放治療劑之一優勢為藥劑通常在結合時會減毒且結合物之血清穩定性通常較高。

在其他實施例中，可裂解連接子對 pH 值敏感，亦即對在某些 pH 值下水解敏感。通常，pH 值敏感性連接子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性連接子(例如脲、半卡巴脲(semicarbazone)、硫半卡巴脲(thiosemicarbazone)、順烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或其類似物)。(參見例如美國專利第 5,122,368 號；第 5,824,805 號；第 5,622,929 號；Dubowchik 及 Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123；Neville 等人, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661。)該等連接子在中性 pH 值條件(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(近似溶酶體之 pH 值)下不穩定。在某些實施例中，可水解連接子為硫醚連接子(諸如經由醯基脲鍵連接於治療劑的硫醚(參見例如美國專利第 5,622,929 號))。

在其他實施例中，連接子可在還原條件下裂解(例如二硫化物連接子)。多種二硫化物連接子為此項技術中所已知，包括例如可使用 SATA(N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫代乙酸酯)、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)、SPDB及SMPT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。)

在其他特定實施例中, 連接子為丙二酸酯連接子(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)。

在其他實施例中, 連接子單元不可裂解, 且藥物藉由抗體降解而釋放。(參見例如美國公開案第20050238649號, 其係以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)。

通常, 連接子對細胞外環境實質上不敏感。在連接子之情形中, 如本文所用之「對細胞外環境實質上不敏感」意謂當免疫結合物存在於細胞外環境中(例如血漿中)時, 免疫結合物樣品中不超過約20%、通常不超過約15%、更通常不超過約10%且甚至更通常不超過約5%、不超過約3%或不超過約1%的連接子裂解。連接子是否對細胞外環境實質上不敏感可例如藉由將免疫結合物與血漿一起培育預定時段(例如2、4、8、16或24小時), 並隨後對血漿中存在之游離藥物之量定量來判定。

在其他非互斥實施例中, 連接子促進細胞內化。在某些實施例中, 連接子當結合於治療劑或標記(Z)時促進細胞

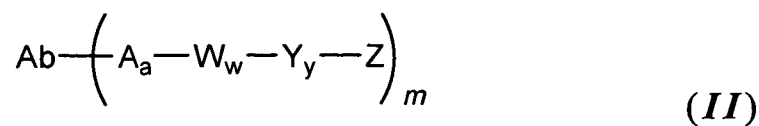
內化。在其他實施例中，連接子當結合於Z部分與抗-GCC抗體分子時促進細胞內化。

可用於本發明之組合物及方法的多種例示性連接子描述於WO 2004-010957、美國公開案第20060074008號、美國公開案第20050238649號及美國公開案第20060024317號(其各自以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)中。

能夠用於將抗體分子偶合於治療劑或標記的連接子之實例包括例如順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)；順丁烯二醯亞胺基己醯基-對胺基苯甲基胺基甲酸酯；順丁烯二醯亞胺基己醯基-肽-胺基苯甲基胺基甲酸酯連接子，例如順丁烯二醯亞胺基己醯基-L-苯丙胺酸-L-離胺酸-對胺基苯甲基胺基甲酸酯及順丁烯二醯亞胺基己醯基-L-纈胺酸-L-瓜胺酸-對胺基苯甲基胺基甲酸酯(vc)；3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(亦稱作4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯或SPP)；4-丁二醯亞胺基-氧基羰基-2-甲基-2-(2-吡啶基二硫基)-甲苯(SMPT)；3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)；4-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯(SPDB)；2-亞胺基硫雜環戊烷；S-乙醯基丁二酸酐；二硫化苯甲基胺基甲酸酯；碳酸酯；脰連接子；N-(α -順丁烯二醯亞胺基乙醯氧基)丁二醯亞胺酯；N-[4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺(AMAS)；N-[β -順丁烯二醯亞胺基丙氧基]丁二醯亞胺酯(BMPS)；[N- ϵ -順丁烯二醯亞胺基己醯氧基]丁二醯亞胺酯(EMCS)；N-[γ -

順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基]丁二醯亞胺酯(GMBS)；丁二醯亞胺基-4-[N-順丁烯二醯亞胺基甲基]環己烷-1-羧基-[6-醯胺基己酸酯](LC-SMCC)；6-(3-[2-吡啶基二硫基]-丙醯胺基)己酸丁二醯亞胺酯(LC-SPDP)；間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯(MBS)；[4-碘乙醯基]胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)；4-[N-順丁烯二醯亞胺基甲基]環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)；N-丁二醯亞胺基3-[2-吡啶基二硫基]-丙醯胺基(SPDP)；[N- ϵ -順丁烯二醯亞胺基己醯氧基]磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-EMCS)；N-[γ -順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基]磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-GMBS)；4-磺酸基丁二醯亞胺基-6-甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯醯胺基]己酸酯(Sulfo-LC-SMPT)；6-(3'-[2-吡啶基二硫基]-丙醯胺基)己酸磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-LC-SPDP)；間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-MBS)；[4-碘乙醯基]胺基苯甲酸N-磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-SIAB)；4-[N-順丁烯二醯亞胺基甲基]環己烷-1-甲酸磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-SMCC)；4-[對順丁烯二醯亞胺基苯基]丁酸磺酸基丁二醯亞胺酯(Sulfo-SMPB)；乙二醇-雙(丁二酸N-羥基丁二醯亞胺酯)(EGS)；酒石酸二丁二醯亞胺酯(DST)；1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)；二伸乙三胺-五乙酸(DTPA)；及硫脲連接子。

在一些實施例中，連接子-X-具有式-A_a-W_w-Y_y-，且式(I)之免疫結合物之特徵為式(II)：



其中，

Ab為本文所述之抗-GCC抗體分子；

-A-為延伸子單元；

a為0或1；

各-W-獨立地為胺基酸單元；

w為0至12範圍內之整數；

-Y-為自我分解型間隔子單元；

y為0、1或2；

Z為治療劑或標記；且

m在約1至約15之範圍內。

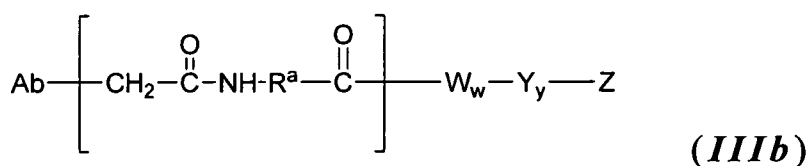
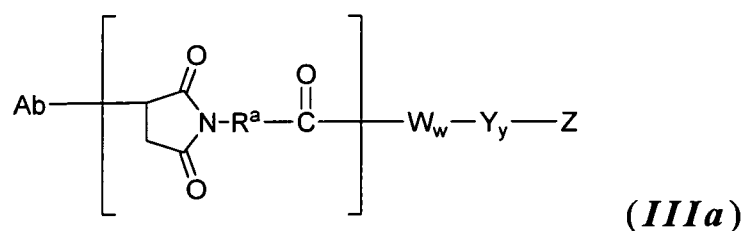
延伸子單元(A)當存在時能夠將Ab單元連接於胺基酸單元(-W-)(若存在)、連接於間隔子單元(-Y-)(若存在)；或連接於治療劑或標記(Z)。可存在於抗-GCC抗體分子上之適用官能基(天然存在或經由化學操作而存在)包括(但不限於)氫硫基、胺基、羥基、碳水化合物之變旋異構羥基及羧基。適合官能基為氫硫基及胺基。在一實例中，氫硫基可藉由還原抗-GCC抗體分子之分子內二硫鍵而產生。在另一實施例中，氫硫基可藉由使抗-GCC抗體分子之離胺酸部分的胺基與2-亞胺基硫雜環戊烷(喬特氏試劑(Traut's reagent))或其他氫硫基產生試劑反應而產生。在某些實施例中，抗-GCC抗體分子為重組抗體，且經工程改造成攜

帶一或多個離胺酸。在某些其他實施例中，重組抗-GCC抗體分子經工程改造成攜帶其他氫硫基，例如其他半胱胺酸。

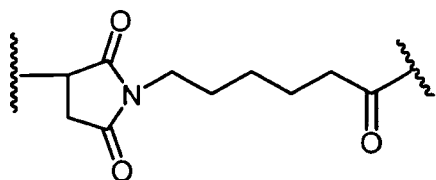
在一實施例中，延伸子單元與Ab單元之硫原子形成一鍵。硫原子可來源於Ab之氫硫基。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式(IIIa)及(IIIb)之方括號中，其中Ab-、-W-、-Y-、-Z-、w及y如上文所定義，且R^a係選自：-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₂-C₁₀伸烯基-、-C₂-C₁₀伸炔基-、-碳環基-、-O-(C₁-C₈伸烷基)-、O-(C₂-C₈伸烯基)-、-O-(C₂-C₈伸炔基)-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-C₂-C₁₀伸烯基-伸芳基-、-C₂-C₁₀伸炔基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-伸芳基-C₂-C₁₀伸烯基-、-伸芳基-C₂-C₁₀伸炔基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(碳環基)-、-C₂-C₁₀伸烯基-(碳環基)-、-C₂-C₁₀伸炔基-(碳環基)-、-(碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(碳環基)-C₂-C₁₀伸烯基-、-(碳環基)-C₂-C₁₀伸炔基-、雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(雜環基)-、-C₂-C₁₀伸烯基-(雜環基)-、-C₂-C₁₀伸炔基-(雜環基)-、-(雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(雜環基)-C₂-C₁₀伸烯基-、-(雜環基)-C₂-C₁₀伸炔基-、-(CH₂CH₂O)_r-或-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-，且r為1-10範圍內之整數，其中該等單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環基及伸芳基視情況經取代。在一些實施例中，該等單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環基及伸芳基未經取

代。在一些實施例中， R^a 係選自 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、-碳環基-、 $-O-(C_1-C_8 \text{伸烷基})-$ 、-伸芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-(碳環基)-、-(碳環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_3-C_8$ 雜環基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-(雜環基)-、-(雜環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 及 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ ；且 r 為 1-10 範圍內之整數，其中該等伸烷基未經取代且該等基團之其餘部分視情況經取代。

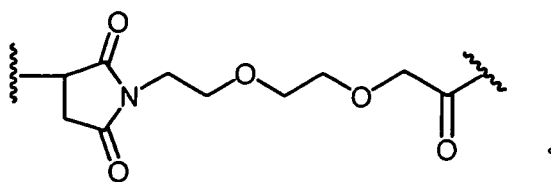
即使不明確表示，自所有例示性實施例亦可顯而易知有 1 至 15 個藥物部分連接於 $Ab(m=1-15)$ 。



說明性延伸子單元為式 (IIIa) 之延伸子單元，其中 R^a 為 $-(CH_2)_5-$ ：

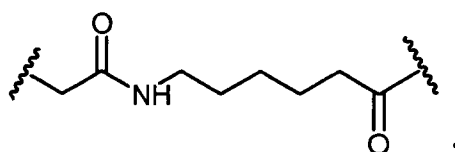


另一說明性延伸子單元為式 (IIIa) 之延伸子單元，其中 R^a 為 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ ；且 r 為 2：

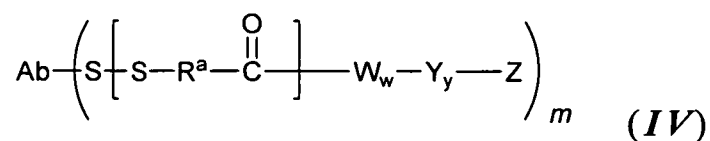


另一說明性延伸子單元為式(IIIa)之延伸子單元，其中 R^a 為 -伸芳基- 或伸芳基- C_1 - C_{10} 伸烷基-。在一些實施例中，芳基為未經取代之苯基。

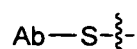
另一說明性延伸子單元為式(IIIb)之延伸子單元，其中 R^a 為 $-(CH_2)_5-$ ：



在某些實施例中，延伸子單元經由Ab單元之硫原子與延伸子單元之硫原子之間的二硫鍵連接於Ab單元。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式(IV)之方括號中，其中 R^a 、Ab-、-W-、-Y-、-Z、w及y如上文所定義。

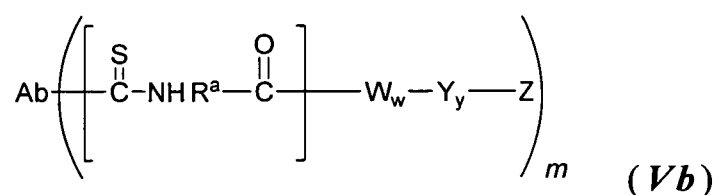
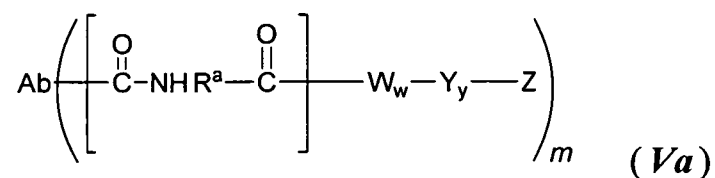


應注意，除非上下文另外指定，否則在整篇本申請案中，下式中之S部分係指Ab單元之硫原子。

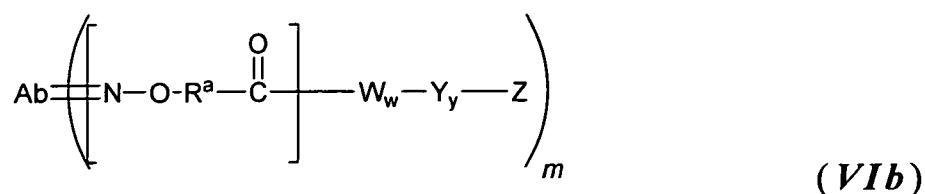
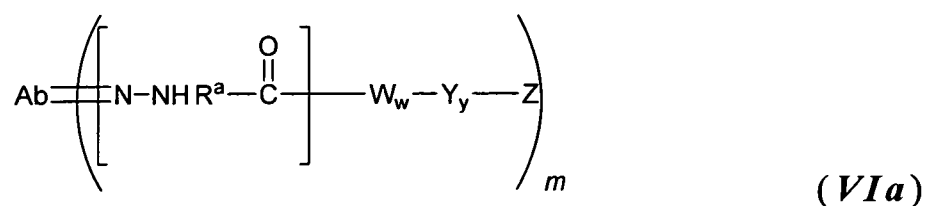


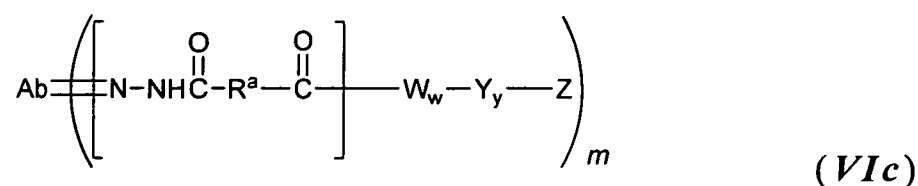
在其他實施例中，延伸子在連接於Ab之前含有可與Ab之一級或二級胺基形成一鍵的反應性位點。此等反應性位點之實例包括(但不限於)活化酯，諸如丁二醯亞胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酸氯化物、磺醯

氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式(Va)及(Vb)之方括號中，其中-R^a-、Ab-、-W-、-Y-、-Z、w及y如上文所定義；



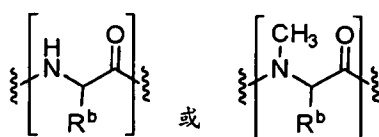
在一些實施例中，延伸子含有可與Ab上可能存在之經修飾碳水化合物之(-CHO)基團反應的反應性位點。舉例而言，碳水化合物可使用諸如過碘酸鈉之試劑適度氧化，且可使經氧化碳水化合物之所得(-CHO)單元與含有諸如醯肼、肼、一級或二級胺、肼、硫半卡巴脒、羧酸肼及芳基醯肼之官能基的延伸子(諸如 Kaneko 等人，1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41所述)縮合。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式(VIa)、(VIb)及(VIc)之方括號中，其中-R^a-、Ab-、-W-、-Y-、-Z、w及y如上文所定義。



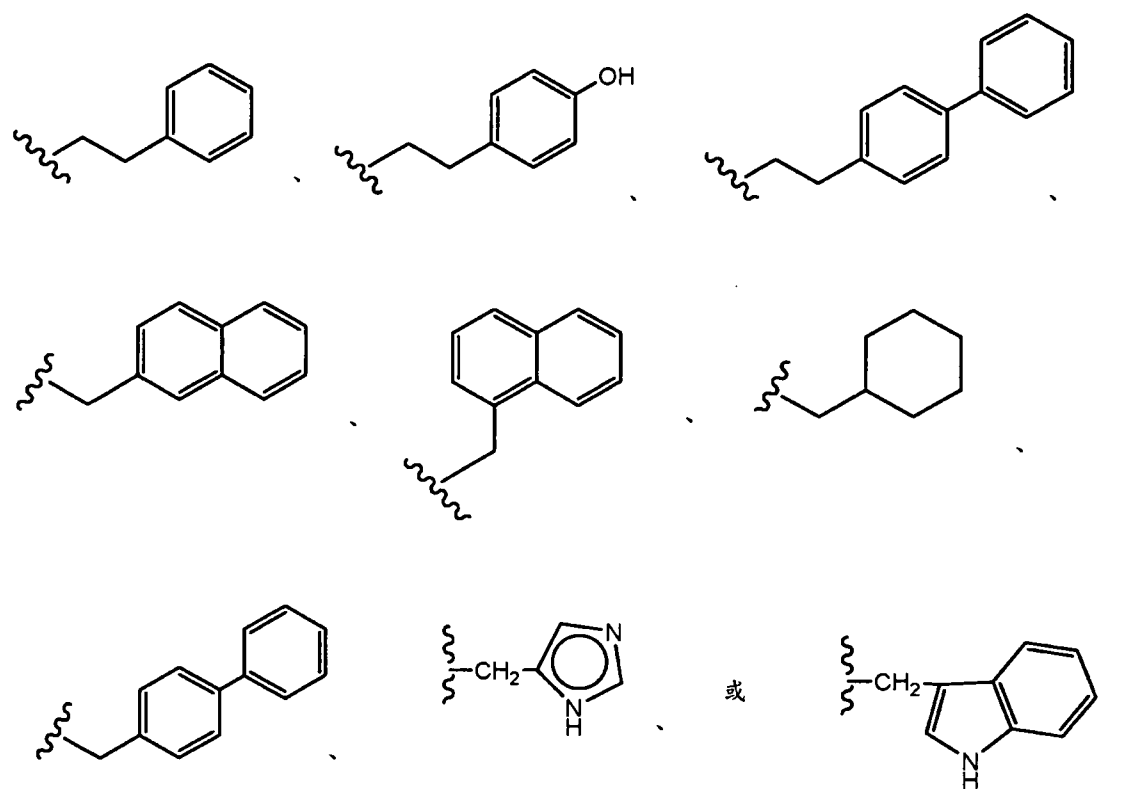


胺基酸單元(-W-)當存在時，若存在間隔子單元，則將延伸子單元連接於間隔子單元，若不存在間隔子單元，則將延伸子單元連接於藥物部分，且若不存在延伸子單元及間隔子單元，則將Ab單元連接於治療劑或標記部分。

W_w-可為例如單肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。各-W-單元獨立地具有以下方括號中所示之式，且w為0至12範圍內之整數：

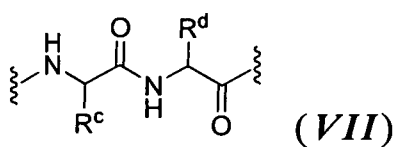


其中R^b為氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苯甲基、對羥基苯甲基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、



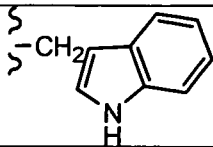
在一些實施例中，胺基酸單元可由一或多種酶(包括癌症或腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解以釋放治療劑或標記部分(-Z)，在一實施例中該治療劑或標記部分(-Z)在釋放時在活體內質子化以提供治療劑或標記(Z)。

在某些實施例中，胺基酸單元可包含天然胺基酸。在其他實施例中，胺基酸單元可包含非天然胺基酸。說明性W_w單元由式(VII)-(IX)表示：



其中R^c及R^d為如下：

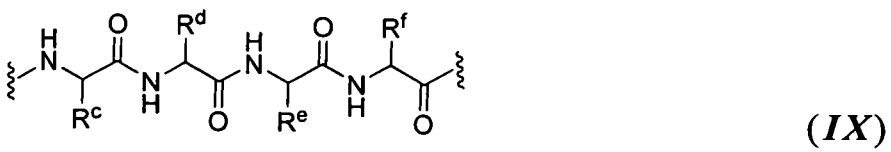
R ^c	R ^d
苯甲基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ；
甲基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ；
異丙基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ；
異丙基	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ；
苯甲基	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ；

異丁基	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
第二丁基	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
苯甲基	甲基 ;
苯甲基	$(\text{CH}_2)_3\text{NHC(=NH)NH}_2$;



其中 R^c 、 R^d 及 R^e 為如下：

R^c	R^d	R^e
苯甲基	苯甲基	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
異丙基	苯甲基	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$; 及
H	苯甲基	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;



其中 R^c 、 R^d 、 R^e 及 R^f 為如下：

R^c	R^d	R^e	R^f
H	苯甲基	異丁基	H ; 及
甲基	異丁基	甲基	異丁基。

例示性胺基酸單元包括(但不限於)式(VII)之單元，其中： R^c 為苯甲基且 R^d 為 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ； R^c 為異丙基，且 R^d 為 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ；或 R^c 為異丙基，且 R^d 為 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 。另一例示性胺基酸單元為式(VIII)之單元，其中 R^c 為苯甲基， R^d 為苯甲基，且 R^e 為 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 。

適用 $-W_w-$ 單元可關於其對由特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解的選擇性進行設計及最佳化。在一實施例

中， $-W_w-$ 單元為裂解由組織蛋白酶B、C及D或纖維蛋白酶溶酶蛋白酶催化的單元。

在一實施例中， $-W_w-$ 為二肽、三肽、四肽或五肽。當 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 或 R^f 不為氫時， R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 或 R^f 所連接之碳原子具有對掌性。

R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 或 R^f 所連接之各碳原子獨立地為(S)或(R)構型。

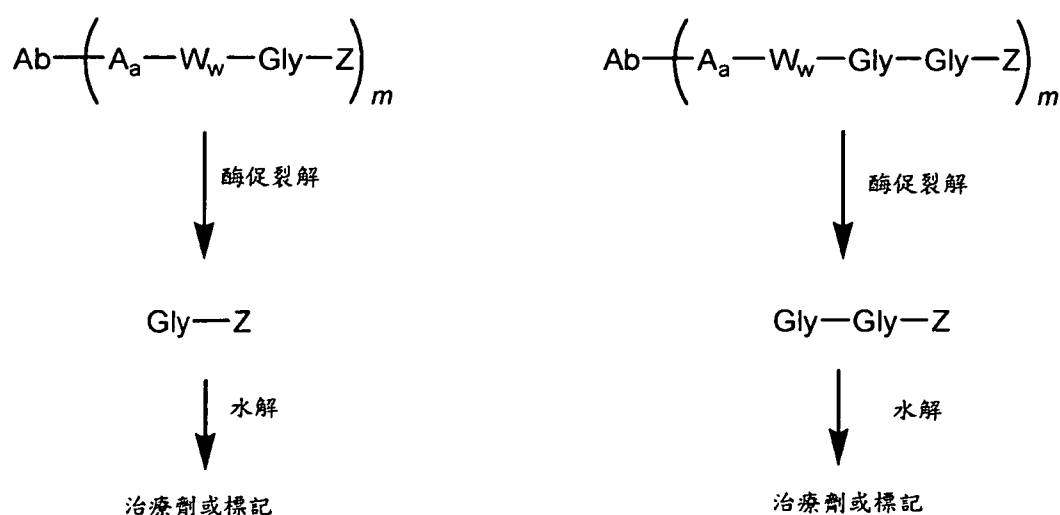
在胺基酸單元之一態樣中，該胺基酸單元為纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)。在另一態樣中，胺基酸單元為苯丙胺酸-離胺酸(亦即fk)。在胺基酸單元之另一態樣中，該胺基酸單元為N-甲基纈胺酸-瓜胺酸。在另一態樣中，胺基酸單元為5-胺基戊酸、高苯丙胺酸離胺酸、四異喹啉甲酸離胺酸、環己基丙胺酸離胺酸、異哌啶甲酸離胺酸、 β -丙胺酸離胺酸、甘胺酸絲胺酸纈胺酸麩醯胺酸及異哌啶甲酸。

間隔子單元(-Y-)當存在時，在存在胺基酸單元時，將胺基酸單元連接於治療劑或標記部分(-Z-)。或者，當不存在胺基酸單元時，間隔子單元將延伸子單元連接於治療劑或標記部分。當胺基酸單元與延伸子單元均不存在時，間隔子單元亦將治療劑或標記部分連接於Ab單元。

間隔子單元具有兩種一般類型：非自我分解或自我分解型。非自我分解型間隔子單元為在胺基酸單元自抗體-藥物結合物裂解(尤其酶促裂解)後，部分或全部間隔子單元仍結合於治療劑或標記部分的間隔子單元。非自我分解型間隔子單元之實例包括(但不限於)(甘胺酸-甘胺酸)間隔子

單元及甘胺酸間隔子單元(兩者均描繪於流程1中)(下文)。
當含有甘胺酸-甘胺酸間隔子單元或甘胺酸間隔子單元之結合物經由酶(例如腫瘤細胞相關蛋白酶、癌細胞相關蛋白酶或淋巴細胞相關蛋白酶)進行酶促裂解時，甘胺酸-甘胺酸-Z部分或甘胺酸-Z部分自Ab-A_a-W_w-裂解。在一實施例中，目標細胞內發生獨立的水解反應，從而使甘胺酸-Z部分之鍵裂解且釋放治療劑或標記。

流程 1



在一些實施例中，非自我分解型間隔子單元(-Y-)為-Gly-。在一些實施例中，非自我分解型間隔子單元(-Y-)為-Gly-Gly-。

在一實施例中，本發明提供一種式(II)免疫結合物，其中不存在間隔子單元(y=0)，或其醫藥學上可接受之鹽。

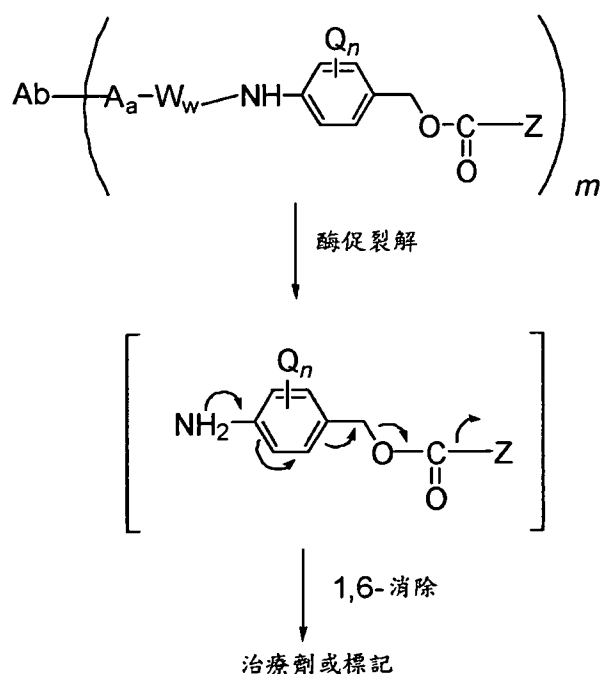
或者，含有自我分解型間隔子單元之結合物可釋放-Z。如本文所用之術語「自我分解型間隔子」係指能夠將兩個間隔開之化學部分共價連接在一起形成穩定三聯分子的雙官能化學部分。若其與第一部分之鍵裂解，則其自發地與

第二化學部分分離。

在一些實施例中， $-Y_y-$ 為對胺基苯甲醇(PAB)單元(參見流程2及3)，其伸苯基部分經 Q_n 取代，其中 Q 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、 $-$ 鹵素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基；且 n 為0-4範圍內之整數。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

在一些實施例中， $-Y-$ 為經由PAB基團之胺基氮原子連接於 $-W_w-$ 且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚基團直接連接於 $-Z$ 的PAB基團。不受任何特定理論或機制束縛，流程2描繪一種自經由胺基甲酸酯或碳酸酯基直接連接於治療劑或標記($-Z$)的PAB基團釋放 $-Z$ 之可能機制，如Toki等人, 2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872所述。

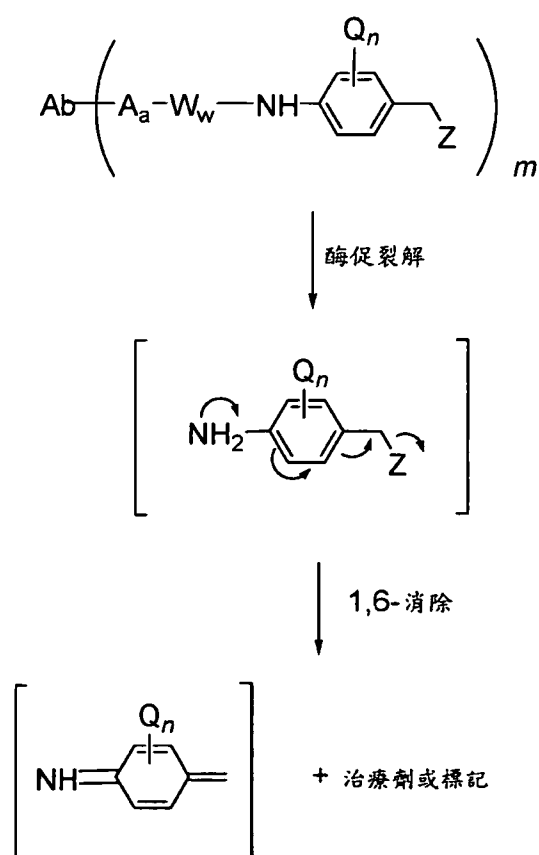
流程2



在流程2中，Q為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、 $-$ 鹵素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基； m 為0-4範圍內之整數；且 m 在1至約20範圍內。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

不受任何特定理論或機制束縛，流程3描繪一種自經由醚或胺鍵直接連接於治療劑或標記部分(-Z)之PAB基團釋放-Z的可能機制，其中-Z包括作為治療劑或標記部分之一的氧或氮基。

流程3



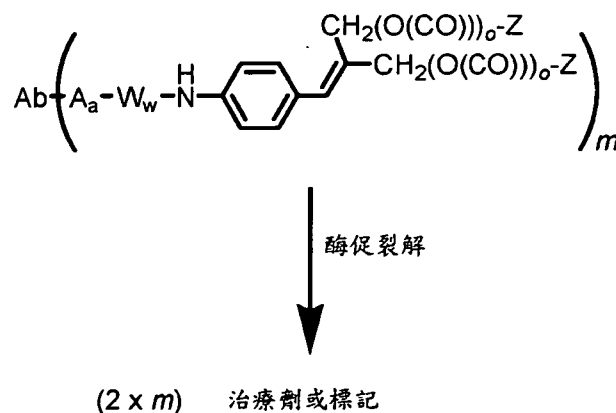
在流程3中，Q為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、

-鹵素、-硝基或-氰基； n 為0-4範圍內之整數；且 m 在1至約20範圍內。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

自我分解型間隔子之其他實例包括(但不限於)電子方面類似於PAB基團之芳族化合物，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰胺基苯甲基縮醛或對胺基苯甲基縮醛。可使用醯胺鍵水解後經歷環化的間隔子，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(Rodrigues等人, 1995, *Chemistry Biology* 2:223)；經適當取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815)；及2-胺基苯基丙酸醯胺(Amsberry等人, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)。消除甘胺酸之 α 位經取代之含胺藥物(Kingsbury等人, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447)亦為自我分解型間隔子之實例。

在一實施例中，間隔子單元為如流程4中所描繪之分支鏈雙(羥基甲基)-苯乙烯(BHMS)單元，其可用於併入及釋放多種藥物。

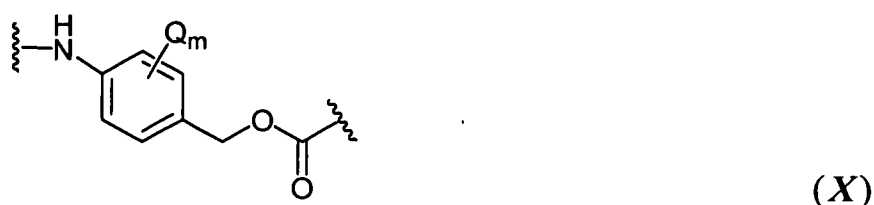
流程 4



在流程 4 中，Q 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、 $-$ 鹵素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基； n 為 0-4 範圍內之整數； o 為 0 或 1；且 m 為 1 至約 20 之整數。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

在一些實施例中， $-Z$ 部分相同。在另一實施例中， $-Z$ 部分不同。

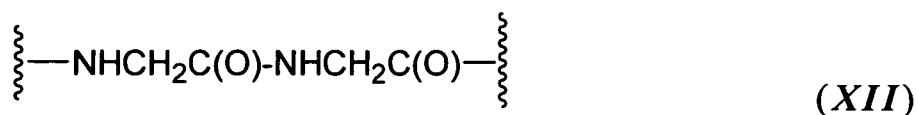
在一態樣中，間隔子單元 ($-Y_y-$) 由式 (X)-(XII) 表示：



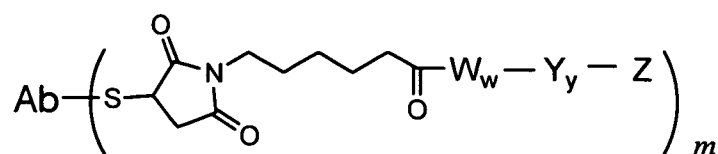
其中 Q 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、 $-$ 鹵素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基；且 m 為 0-4 範圍內之整數。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。



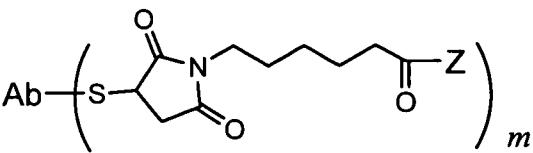
及



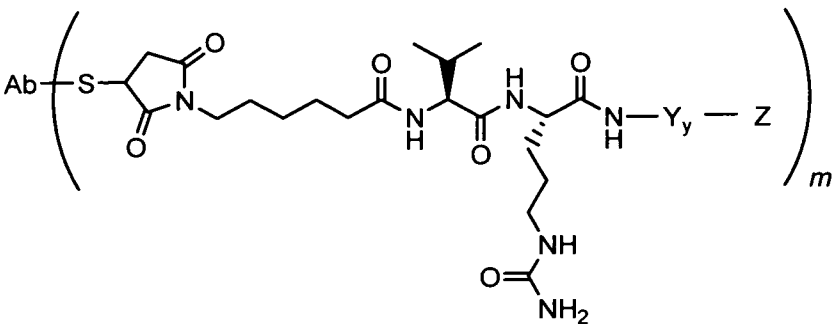
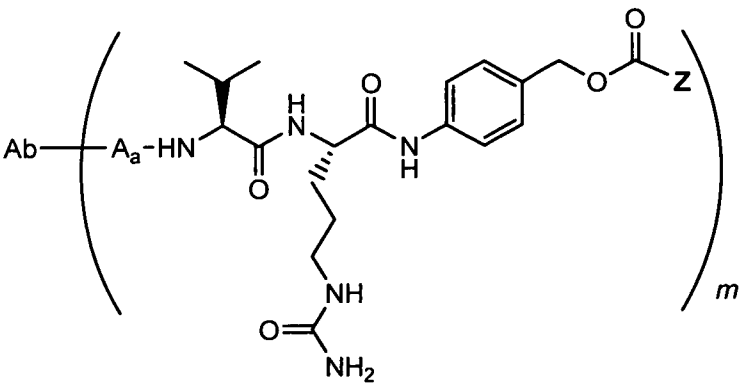
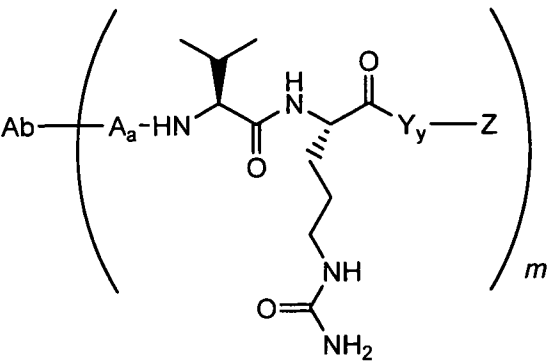
在一組所選實施例中，式 (I) 及式 (II) 之結合物為：



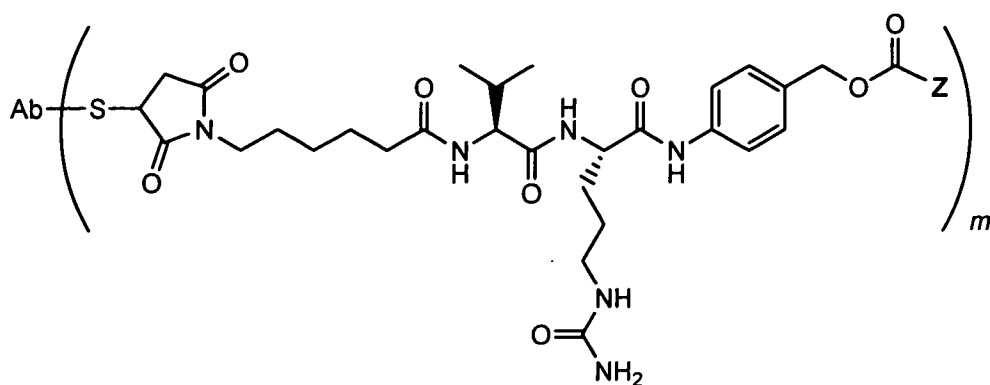
其中 w 及 y 各自為 0、1 或 2；



其中 w 及 y 各自為 0 ；



， 及



其中 A_a 、 W_w 、 Y_y 、 Z 及 Ab 具有上文所提供之含義。

式 (I) 中之變數 Z 為治療劑或標記。治療劑可為能夠發揮所要生物作用之任何藥劑。在一些實施例中，治療劑使細胞對第二治療模態 (例如化學治療劑、輻射療法、免疫療法) 敏感。

在一些實施例中，治療劑為細胞生長抑制劑或細胞毒性劑。實例包括 (但不限於) 抗代謝物 (例如硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、氟達拉濱 (fludarabine)、噴司他汀 (pentostatin)、克拉屈濱 (cladribine)、5-氟尿嘧啶 (5FU)、氟尿苷 (FUDR)、胞嘧啶阿拉伯糖 (阿糖胞苷)、甲胺喋呤、甲氧苄胺嘧啶 (trimethoprim)、嘧啶甲胺 (pyrimethamine)、培美曲唑 (pemetrexed))；烷化劑 (例如環磷醯胺 (cyclophosphamide)、二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、烏拉莫司汀 (uramustine)、美法倫 (melphalan)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、塞替派 (thiotepa)/ 苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、異環磷醯胺 (ifosfamide)、卡莫司汀 (carmustine)、洛莫司汀 (lomustine)、鏈佐星 (streptozocin)、白消安 (busulfan)、二溴甘露糖醇 (dibromomannitol)、順鉑 (cisplatin)、卡鉑 (carboplatin)、

奈達鉑 (nedaplatin)、奧賽力鉑 (oxaliplatin)、沙鉑 (satraplatin)、四硝酸三鉑 (triplatin tetranitrate)、丙卡巴肼 (procarbazine)、六甲蜜胺 (altretamine)、達卡巴嗪 (dacarbazine)、米托唑胺 (mitozolomide)、替莫唑胺 (temozolomide)；蒽環黴素 (anthracycline)(例如道諾黴素 (daunorubicin)、小紅莓、表柔比星 (epirubicin)、依達比星 (idarubicin)、伐柔比星 (valrubicin))；抗生素(例如放線菌素 D(dactinomycin)、博來黴素 (bleomycin)、光神黴素 (mithramycin)、安麴黴素 (anthramycin)、鏈尿黴素 (streptozotocin)、短桿菌肽 D(gramicidin D)、絲裂黴素 (mitomycin)(例如絲裂黴素 C(mitomycin C))、倍癌黴素 (duocarmycin)(例如 CC-1065)、刺孢黴素 (calicheamicin))；抗有絲分裂劑(包括例如類美登素 (maytansinoid)、奧瑞他汀 (auristatin)、海兔毒素 (dolastatin)、念珠藻環肽 (cryptophycin)、長春花生物鹼(例如長春新鹼 (vincristine)、長春鹼 (vinblastine)、長春地辛 (vindesine)、長春瑞濱 (vinorelbine))、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、多西他賽 (docetaxel)或新穎紫杉烷(參見例如 2001年5月31日公開之國際專利公開案第 WO 01/38318號))及秋水仙鹼 (colchicine))；拓撲異構酶抑制劑(例如伊立替康 (irinotecan)、拓撲替康 (topotecan)、安吡啶 (amsacrine)、依託泊苷 (etoposide)、替尼泊苷 (teniposide)、米托蒽醌 (mitoxantrone))；及蛋白酶體抑制劑(例如肽基酮酸)。

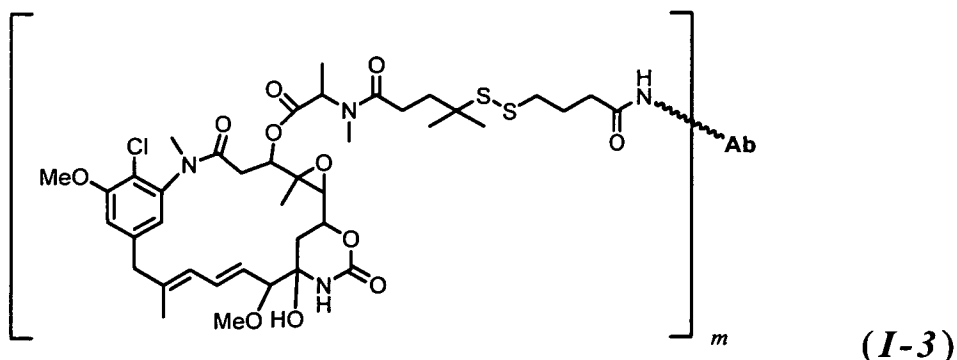
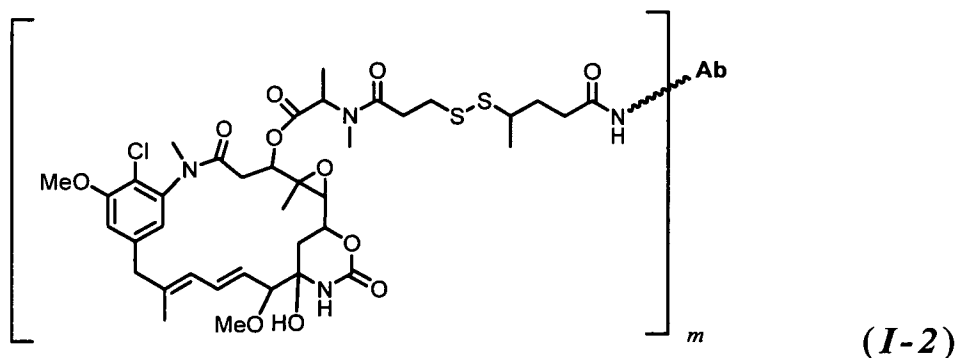
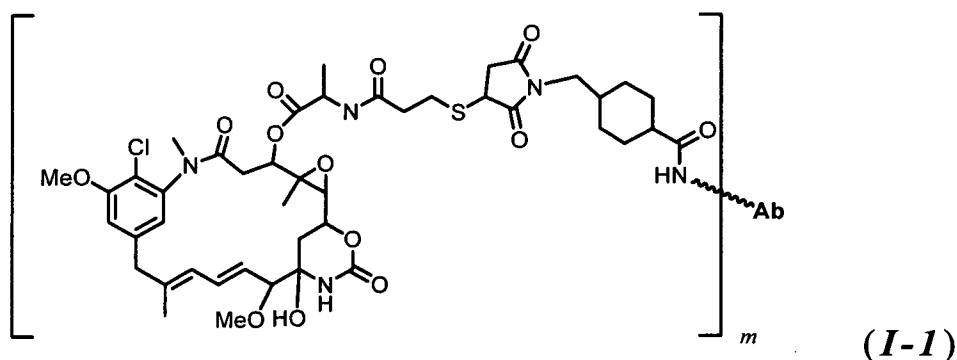
類美登素免疫結合物

在一些實施例中，治療劑為類美登素。類美登素化合物及其結合於抗體之方法描述於例如 Chari 等人，*Cancer Res.*, 52: 127-131 (1992)；Widdison 等人，*J. Med. Chem.* 49: 4392-4408 (2006)；及美國專利第 5,208,020 號及第 6,333,410 號中。類美登素之實例包括具有經修飾芳族環 (C19-去氯、C20-去甲氧基、C20-醯氧基) 及其他位置具有修飾 (例如 C9-CH、C14-烷氧基甲基、C14-羥基甲基或醯氧基甲基、C15-羥基 / 醯氧基、C15-甲氧基、C18-N-去甲基、4,5-去氧) 的美登素 (maytansine) 類似物。在某些實施例中，類美登素為 N^{2'}-去乙醯基-N^{2'}-(4-巰基-1-側氧基戊基) 美登素 (DM3)、N^{2'}-去乙醯基-N^{2'}-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素 (DM1) 或 N^{2'}-去乙醯基-N^{2'}-(4-巰基-4-甲基-1-側氧基戊基) 美登素 (DM4)。

包含氫硫基之類美登素化合物可使用雜雙官能連接子偶合於抗體，該連接子經由硫醚或二硫鍵連接於類美登素化合物。在一些該等實施例中，使連接子偶合於抗體上之胺基 (例如末端胺基或離胺酸殘基之 ϵ 胺基)。在一些實施例中，用於使類美登素化合物偶合於抗體之雜雙官能連接子為 3-(2-吡啶基二硫基) 丙酸 N-丁二醯亞胺酯 (亦稱作 4-(2-吡啶基二硫基) 戊酸 N-丁二醯亞胺酯或 SPP)、4-丁二醯亞胺基-氧基羰基-2-甲基-2-(2-吡啶基二硫基)-甲苯 (SMPT)、4-[N-順丁烯二醯亞胺基甲基環己烷-1-甲酸 N-丁二醯亞胺酯 (SMCC)、3-(2-吡啶基二硫基) 丙酸 N-丁二醯亞胺酯

(SPDP)；4-(2-吡啶基二硫基)丁酸 N-丁二醯亞胺酯 (SPDB)、2-亞胺基硫雜環戊烷或 S-乙醯基丁二酸酐。

在某些實施例中，式 (I) 之免疫結合物之特徵為式 Ab-(SMCC-DM1)_m (式 (I-1))；Ab-(SPP-DM1)_m (式 (I-2))；或 Ab-(SPDB-DM4)_m (式 (I-3))，其中 Ab 為如本文所述之抗-GCC 抗體分子，且 *m* 具有上文對於式 (I) 所述之值及較佳值。



在一些實施例中，式 (I-1)、(I-2) 或 (I-3) 中之變數 Ab 為具有表 1 至表 6 中所概述之特徵的抗體分子。在某些實施例

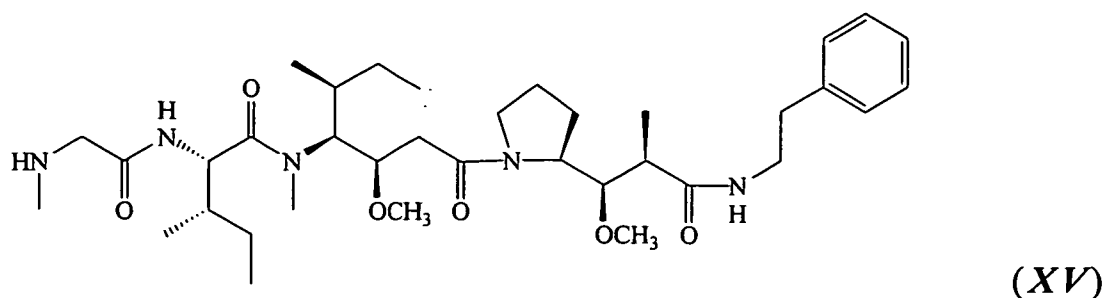
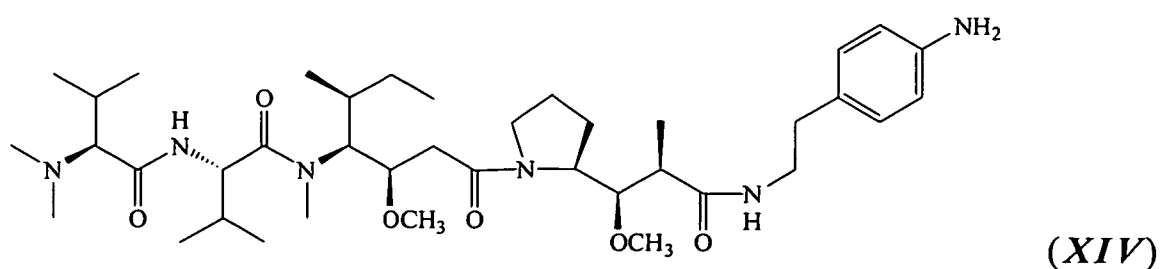
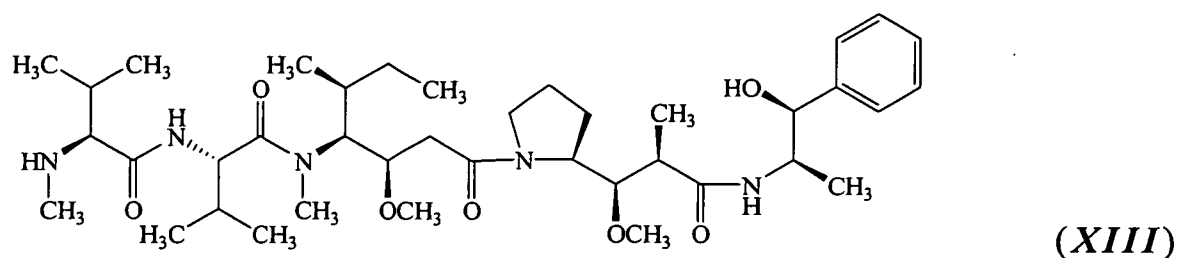
中，變數Ab為5F9抗體分子或Abx-229抗體分子。

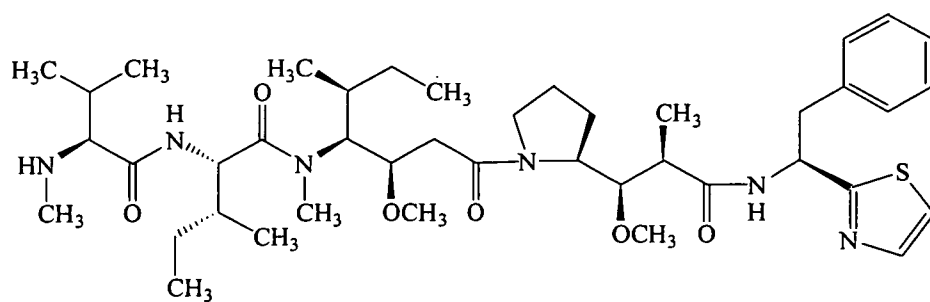
在一些實施例中，式(I-1)、(I-2)或(I-3)中之變數 m 在約1至約10、約3至約7或約3至約5之範圍內。

在某些特定實施例中，本發明係關於式(I-1)、(I-2)或(I-3)之免疫結合物，其中Ab為5F9抗體分子且 m 為約4。

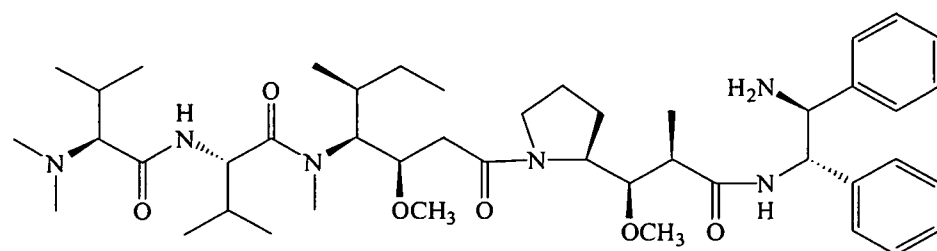
海兔毒素及奧瑞他汀免疫結合物

在一些其他實施例中，治療劑為海兔毒素。在一些實施例中，治療劑為奧瑞他汀，諸如奧瑞他汀E(此項技術中亦稱作海兔毒素-10之衍生物)，或其衍生物。在一些實施例中，治療劑為選自式(XIII)-(XXIII)化合物之化合物或其醫藥學上可接受之鹽形式：

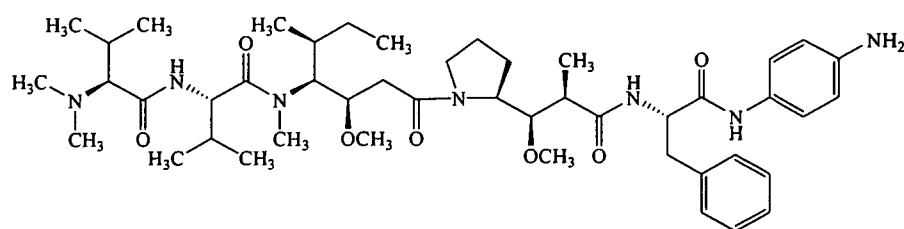




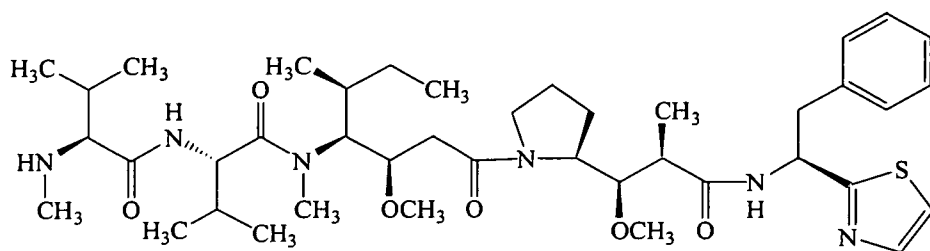
(XVI)



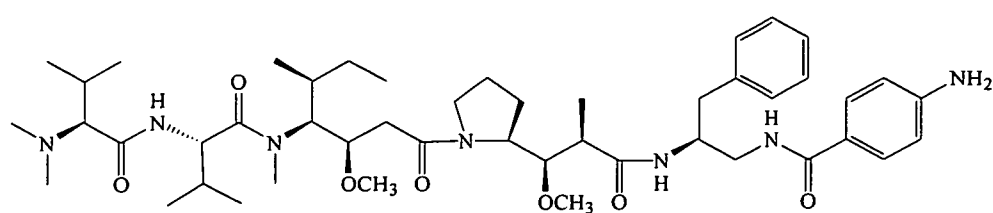
(XVII)



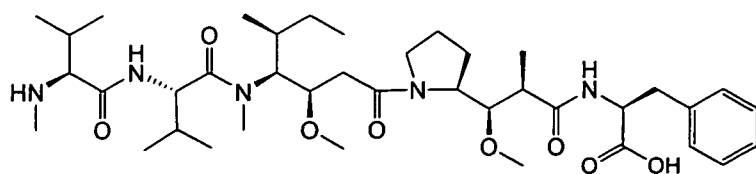
(XVIII)



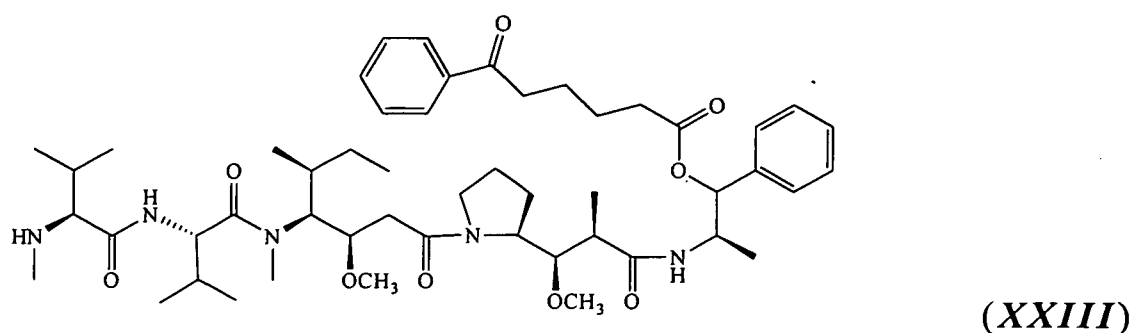
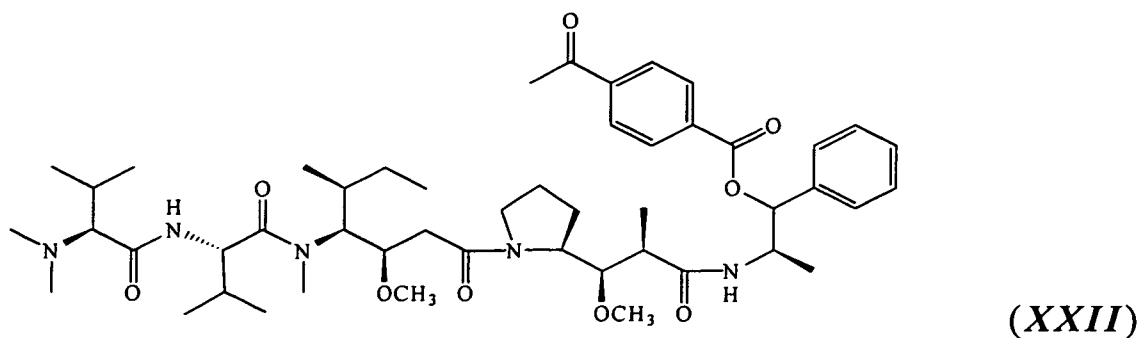
(XIX)



(XX)



(XXI)



奧瑞他汀化合物及使其與抗體結合之方法描述於例如以下文獻中：Doronina等人，*Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003)；Hamblett等人，*Clin. Cancer Res.*, 10: 7063-7070 (2004)；Carter及Senter, *Cancer J.*, 14 154-169 (2008)；美國專利第 7,498,298 號、第 7,091,186 號、第 6,884,869 號；第 6,323,315 號；第 6,239,104 號；第 6,034,065 號；第 5,780,588 號；第 5,665,860 號；第 5,663,149 號；第 5,635,483 號；第 5,599,902 號；第 5,554,725 號；第 5,530,097 號；第 5,521,284 號；第 5,504,191 號；第 5,410,024 號；第 5,138,036 號；第 5,076,973 號；第 4,986,988 號；第 4,978,744 號；第 4,879,278 號；第 4,816,444 號；第 4,486,414 號；美國專利公開案第 20090010945 號、第 20060074008 號、第 20080300192 號、第 20050009751 號、第 20050238649 號及第 20030083236 號；及國際專利公開案第 WO 04/010957 號及第 WO 02/

088172號，該等文獻各自以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中。

奧瑞他汀可為例如奧瑞他汀E與酮酸之間形成的酯。舉例而言，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。其他典型奧瑞他汀包括奧瑞他汀苯丙胺酸苯二胺(AFP；(XVIII))、單甲基奧瑞他汀E(MMAE；(XIII))及單甲基奧瑞他汀F(MMAF；(XXI))。

已展示奧瑞他汀可干擾微管動力學及細胞核及細胞分裂且具有抗癌活性。用於本發明之奧瑞他汀結合微管蛋白且可對表現GCC之細胞株發揮細胞毒性或細胞生長抑制作用。判定化合物是否結合微管蛋白之方法為此項技術中所已知。參見例如Muller等人，*Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397；Hamel等人，*Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976；及Hamel等人，*The Journal of Biological Chemistry*, 1990 265:28, 17141-17149。出於本發明之目的，可測定化合物對微管蛋白之相對親和力。本發明之一些較佳奧瑞他汀結合微管蛋白的親和力在MMAE與微管蛋白之結合親和力的1/10(較弱親和力)至MMAE與微管蛋白之結合親和力的10倍、20倍或甚至100倍(較高親和力)之範圍內。

此項技術中已知多種不同檢定可用於判定奧瑞他汀或所得免疫結合物是否對所要細胞株發揮細胞生長抑制或細胞毒性作用。舉例而言，免疫結合物之細胞毒性或細胞生長抑制活性可藉由以下量測：使表現免疫結合物之目標蛋白

質的哺乳動物細胞暴露於細胞培養基中；培養細胞約6小時至約5天；及量測細胞活力。可使用基於細胞之活體外檢定來量測活力(增殖)、細胞毒性、及免疫結合物之細胞凋亡誘導作用(卡斯蛋白酶活化)。

為判定免疫結合物是否發揮細胞生長抑制作用，可使用胸苷併入檢定。舉例而言，可在96孔板中每孔5,000個細胞之密度下培養表現目標抗原之癌細胞72小時，且在72小時時期之最後8小時期間暴露於0.5 μCi ^3H -胸苷。在免疫結合物存在及不存在下量測培養物之細胞中 ^3H -胸苷之併入。

為測定細胞毒性，可量測壞死或細胞凋亡(漸進式細胞死亡)。壞死通常伴隨有質膜之滲透性增加；細胞膨脹及質膜破裂。細胞凋亡通常特徵為膜起泡、細胞質凝聚及內源核酸內切酶活化。對癌細胞之任何此等作用的確定均可表明免疫結合物適用於治療癌症。

細胞活力可藉由測定細胞中染料(諸如中性紅(neutral red)、錐蟲藍(trypan blue)或ALAMAR™藍)之吸收來量測(參見例如Page等人, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476)。在該種檢定中，在含有染料之培養基中培育細胞，洗滌細胞且以分光光度法量測剩餘染料，其反映細胞對染料之吸收。亦可使用結合蛋白質之染料磺酸基若丹明B(sulforhodamine B, SRB)量測細胞毒性(Skehan等人, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12)。

或者，在定量比色檢定中使用四唑鎢鹽(諸如MTT或

WST)以藉由偵測活細胞而非死亡細胞來測定哺乳動物細胞存活及增殖(參見例如 Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63)。

細胞凋亡可藉由量測例如DNA斷裂來定量。可利用用於活體外定量測定DNA斷裂的市售光度法。該等檢定之實例(包括TUNEL(其偵測斷裂DNA中經標記核苷酸之併入)及基於ELISA之檢定)描述於*Biochemica*, 1999, 第2期, 第34-37頁(Roche Molecular Biochemicals)中。

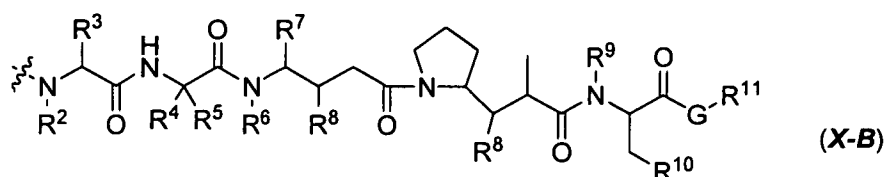
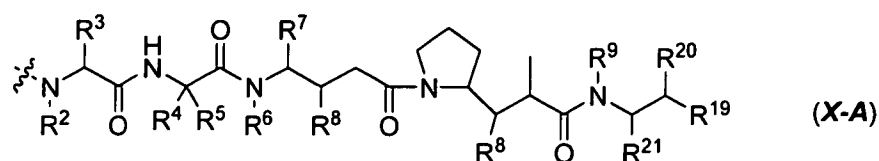
細胞凋亡亦可藉由量測細胞中之形態變化來測定。舉例而言, 與壞死相同, 喪失質膜完整性可藉由量測某些染料(例如螢光染料, 諸如吖啶橙或溴化乙錠)之吸收來確定。量測凋亡細胞數目之方法已由 Duke 及 Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan等人編, 1992, 第3.17.1-3.17.16頁)描述。亦可用DNA染料(例如吖啶橙、溴化乙錠或碘化丙錠)標記細胞, 且觀測細胞的染色質凝聚及沿內部核膜的蝕邊現象。可量測以確定細胞凋亡之其他形態變化包括例如細胞質凝聚、膜起泡增加及細胞收縮。

可在培養物之附著及「漂浮」部分(compartment)中量測凋亡細胞之存在。舉例而言, 兩個部分均可藉由移除上清液、將附著之細胞胰蛋白酶化、在離心洗滌步驟(例如在2000 rpm下10分鐘)後組合製備物及偵測細胞凋亡(例如藉由量測DNA斷裂)來收集。(參見例如 Piazza等人, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16)。

可在動物模型中測試或證實免疫結合物之作用。熟習此

項技術者已知癌症之多種已建立動物模型，其中任何模型均可用於檢定免疫結合物之功效。下文描述該等模型之非限制性實例。此外，檢驗免疫結合物之活體內功效的小動物模型可藉由將人類腫瘤細胞株植入適當免疫缺陷型齧齒動物品系(例如無胸腺裸小鼠或SCID小鼠)中來產生。

在一些實施例中，式(I)中之變數-Z為式(X-A)或式(X-B)之奧瑞他汀部分：



其中在各位置，獨立地：

波形線表示一鍵；

R^2 為 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^3 為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(碳環)、 $-芳基$ 、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(芳基)、 $-雜環$ 、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；

R^4 為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、碳

環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(碳環)、-芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(芳基)、-雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；

R^5 為-H或 $-C_1-C_8$ 烷基；

或 R^4 及 R^5 共同形成碳環且具有式 $-(CR^aR^b)_s-$ ，其中 R^a 及 R^b 獨立地為-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或-碳環，且s為2、3、4、5或6，

R^6 為-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^7 為-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(碳環)、-芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(芳基)、雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；

各 R^8 獨立地為-H、-OH、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_{20}$ 炔基)或-碳環；

R^9 為-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{19} 為-芳基、-雜環或-碳環；

R^{20} 為-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-碳環、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 炔基)或 OR^{18} ，其中 R^{18} 為-H、羥基保護基、或當 OR^{18} 表

示=O時為直接鍵；

R^{21} 為 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-雜環或-碳環；

R^{10} 為 -芳基或-雜環；

G 為 -O-、-S-、-NH- 或 $-NR^{12}-$ ，其中 R^{12} 為 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{11} 為 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-雜環、 $-(R^{13}O)_s-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ ；

s 為 0-1000 範圍內之整數；

R^{13} 為 $-C_2-C_{20}$ 伸烷基、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基；

R^{14} 為 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{15} 在每次出現時獨立地為 -H、-COOH、 $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_t-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_t-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{16} 在每次出現時獨立地為 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_t-COOH$ ；且

t 為 0 至 6 範圍內之整數；其中該等單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基視情況經取代。

式 (X-A) 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基未經取代。

式 (X-A) 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中基團 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及 R^9 未經取代且基團 R^{19} 、 R^{20} 及

R^{21} 視情況如本文所述經取代。

式(X-A)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^3 、 R^4 及 R^7 係獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、單環 C_3-C_6 碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(C_6-C_{10} 芳基)、-雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環、芳基及雜環基視情況經取代；

R^5 為 -氫；

R^6 為 $-C_1-C_8$ 烷基；

各 R^8 係獨立地選自 $-OH$ 、 $-O-(C_1-C_{20} \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 烯基})$ 或 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 炔基})$ ，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^9 為 -氫或 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^{19} 為視情況經取代之苯基；

R^{20} 為 OR^{18} ；其中 R^{18} 為 H 、羥基保護基、或當 OR^{18} 表示 $=O$ 時為直接鍵；

R^{21} 係選自 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 -碳環；其中該等烷基、烯基、炔基及碳環基視情況經取代；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-A)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為甲基；

R^3 為-H、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^4 為-H、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、單環 C_3-C_6 碳環、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_8$ 伸烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_8$ 伸烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_8$ 伸炔基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_1-C_8$ 伸烷基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_8$ 伸烯基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_8$ 伸炔基(單環 C_3-C_6 碳環)；其中該等單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基及碳環基視情況經取代；

R^5 為H； R^6 為甲基；

R^7 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基；

各 R^8 為甲氧基；

R^9 為-氫或 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^{19} 為苯基；

R^{20} 為 OR^{18} ；其中 R^{18} 為-H、羥基保護基、或當 OR^{18} 表示=O時為直接鍵；

R^{21} 為甲基；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-A)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為甲基； R^3 為H或 C_1-C_3 烷基； R^4 為 C_1-C_5 烷基； R^5 為H； R^6 為甲基； R^7 為異丙基或第二丁基； R^8 為甲氧基； R^9 為氫或 C_1-C_8 烷基； R^{19} 為苯基； R^{20} 為 OR^{18} ；其中 R^{18} 為H、羥基保護基、或當 OR^{18} 表示=O時為直接鍵；且 R^{21} 為甲基；

或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-A)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為甲基或 C_1-C_3 烷基； R^3 為H或 C_1-C_3 烷基； R^4 為 C_1-C_5 烷基； R^5 為H； R^6 為 C_1-C_3 烷基； R^7 為 C_1-C_5 烷基； R^8 為 C_1-C_3 烷氧基； R^9 為氫或 C_1-C_8 烷基； R^{19} 為苯基； R^{20} 為 OR^{18} ；其中 R^{18} 為H、羥基保護基、或當 OR^{18} 表示=O時為直接鍵；且 R^{21} 為 C_1-C_3 烷基；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為甲基；

R^3 、 R^4 及 R^7 係獨立地選自-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、單環 C_3-C_6 碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(單環 C_3-C_6 碳環)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(C_6-C_{10} 芳基)、-雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；其中該等單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環、芳基及雜環基視情況經取代；

R^5 為-H；

R^6 為甲基；

各 R^8 為甲氧基；

R^9 為-H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^{10} 為視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜環；

G 為 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 或 $-NR^{12}-$ ，其中 R^{12} 為 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基，其各自視情況經取代；

R^{11} 為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-$ 芳基、 $-$ 雜環、 $-(R^{13}O)_s-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ ，其中該等烷基、烯基、炔基、芳基及雜環基視情況經取代；

s 為 0-1000 範圍內之整數；

R^{13} 為 $-C_2-C_{20}$ 伸烷基、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基，其各自視情況經取代；

R^{14} 為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^{15} 在每次出現時獨立地為 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_t-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_t-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^{16} 在每次出現時獨立地為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_t-COOH$ ，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

t 為 0 至 6 範圍內之整數；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

在某些此等實施例中， R^{10} 為視情況經取代之苯基；

式 $(X-B)$ 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中基團 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及 R^9 未經取代，且基團 R^{10} 及 R^{11} 如本文所述。

式 $(X-B)$ 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中該等烷

基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基未經取代。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為 C_1-C_3 烷基； R^3 為 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 為 C_1-C_5 烷基； R^5 為 H； R^6 為 C_1-C_3 烷基； R^7 為 C_1-C_5 烷基； R^8 為 C_1-C_3 烷氧基； R^9 為氫或 C_1-C_8 烷基；

R^{10} 為視情況經取代之苯基；G 為 O、S 或 NH；且 R^{11} 如本文所定義；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為甲基； R^3 為 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 為 C_1-C_5 烷基； R^5 為 H； R^6 為甲基； R^7 為異丙基或第二丁基； R^8 為甲氧基； R^9 為氫或 C_1-C_8 烷基；

R^{10} 為視情況經取代之苯基；G 為 O、S 或 NH；且 R^{11} 如本文所定義；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為甲基； R^3 為 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 為 C_1-C_5 烷基； R^5 為 H； R^6 為甲基； R^7 為異丙基或第二丁基； R^8 為甲氧基； R^9 為氫或 C_1-C_8 烷基； R^{10} 為苯基；且 G 為 O 或 NH，且 R^{11} 如本文所定義，較佳為氫；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中：

R^2 為 C_1-C_3 烷基； R^3 為 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 為 C_1-C_5 烷基； R^5 為 H； R^6 為 C_1-C_3 烷基； R^7 為 C_1-C_5 烷基； R^8 為 C_1-C_3 烷氧基； R^9 為氫或 C_1-C_8 烷基；

R^{10} 為苯基；且 G 為 O 或 NH，且 R^{11} 如本文所定義，較佳

為氫；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式(X-A)或(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^3 、 R^4 及 R^7 獨立地為異丙基或第二丁基，且 R^5 為-H。在一例示性實施例中， R^3 及 R^4 各自為異丙基， R^5 為H，且 R^7 為第二丁基。其餘取代基如本文所定義。

式(X-A)或(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^2 及 R^6 各自為甲基，且 R^9 為H。其餘取代基如本文所定義。

式(X-A)或(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^8 在每次出現時為-OCH₃。其餘取代基如本文所定義。

式(X-A)或(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^3 及 R^4 各自為異丙基， R^2 及 R^6 各自為甲基， R^5 為H， R^7 為第二丁基， R^8 在每次出現時為-OCH₃，且 R^9 為H。其餘取代基如本文所定義。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中G為-O-或-NH-。其餘取代基如本文所定義。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^{10} 為芳基。其餘取代基如本文所定義。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^{10} 為-苯基。其餘取代基如本文所定義。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中G為-O-，且 R^{11} 為H、甲基或第三丁基。其餘取代基如本文所定義。

式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中當G為-NH時， R^{11} 為-($R^{13}O$)_s-CH(R^{15})₂，其中 R^{15} 為-(CH₂)_i-N(R^{16})₂，且 R^{16} 為-C₁-C₈烷基或-(CH₂)_i-COOH。其餘取代基如本文所

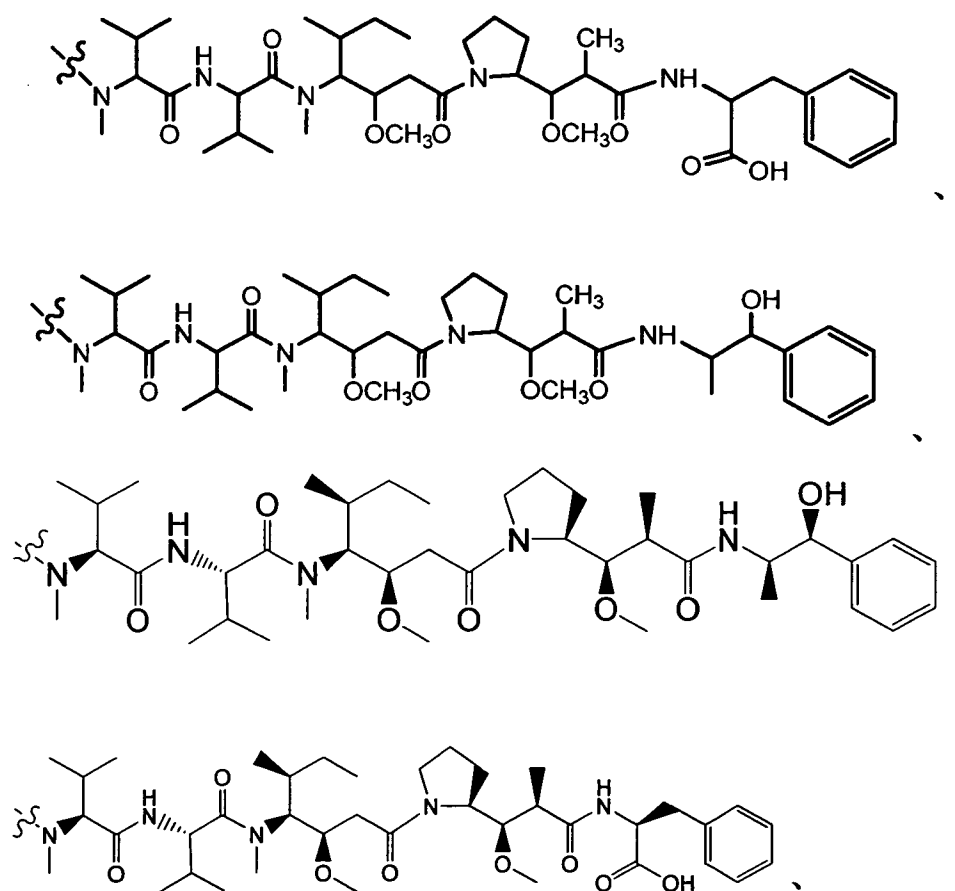
定義。

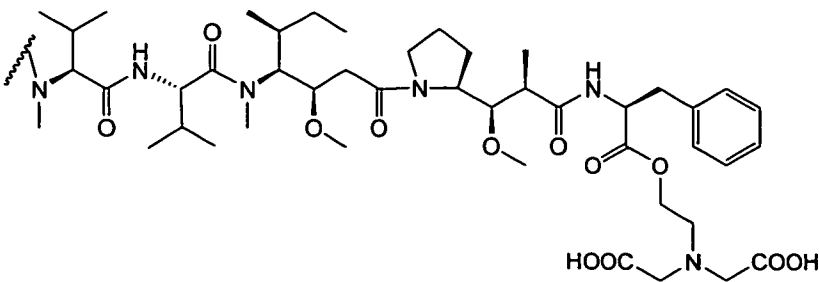
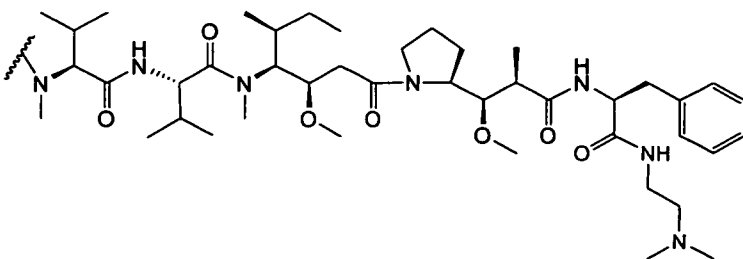
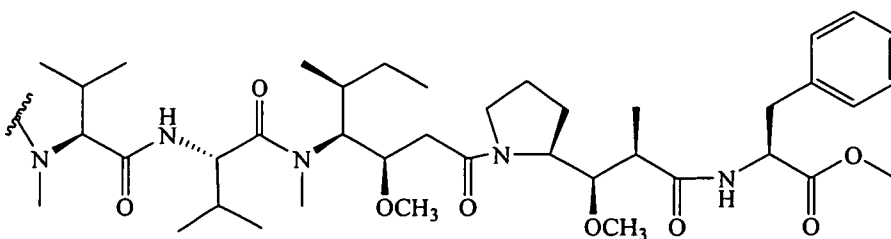
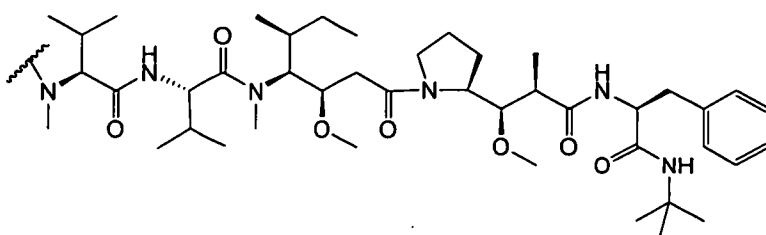
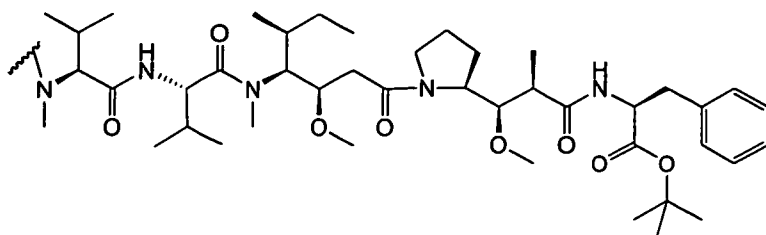
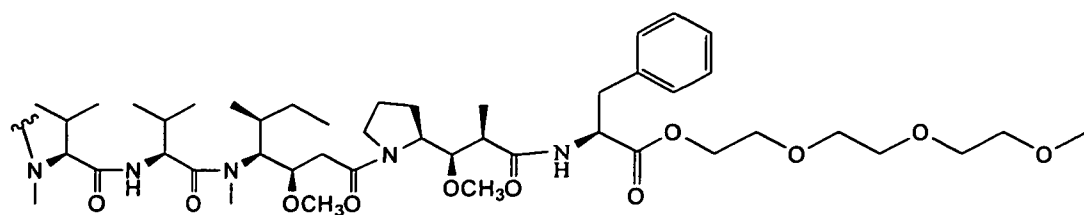
式(X-B)之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中當G為-NH時， R^{11} 為 $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$ ，其中 R^{15} 為H或 $-(CH_2)_t-SO_3H$ 。其餘取代基如本文所定義。

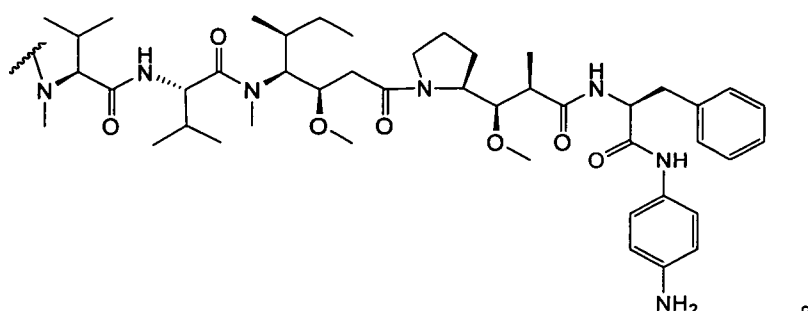
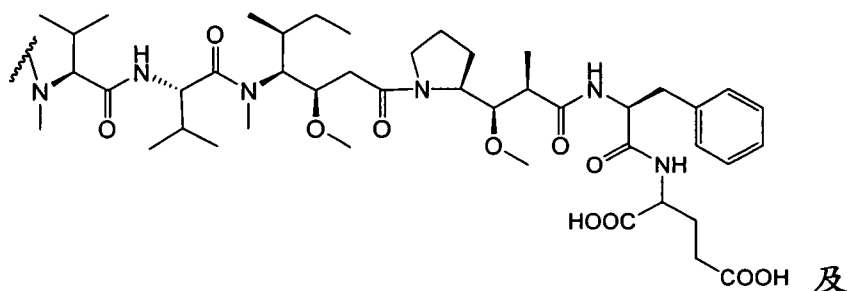
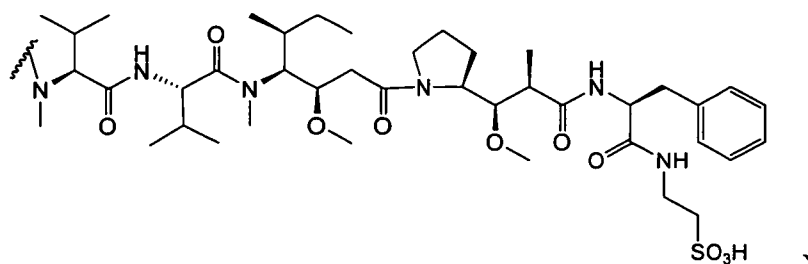
在式(II)免疫結合物之較佳實施例中，當Z為式(X-A)之奧瑞他汀分子時，w為1至12，較佳2至12範圍內之整數，y為1或2，且a較佳為1。

在式(II)免疫結合物之一些實施例中，當Z為式(X-B)之奧瑞他汀分子時，a為1，且w及y為0。

說明性治療劑(-Z)包括具有以下結構之治療劑(-Z)：







在一態樣中，親水性基團(諸如(但不限於)三乙二醇酯(TEG))可連接於式(X-B)奧瑞他汀分子之 R^{11} 。不受理論束縛，親水性基團有助於治療劑之內化及不聚結。

在一些實施例中，治療劑不為TZT-1027。在一些實施例中，治療劑不為奧瑞他汀E、海兔毒素10或奧瑞他汀PE。

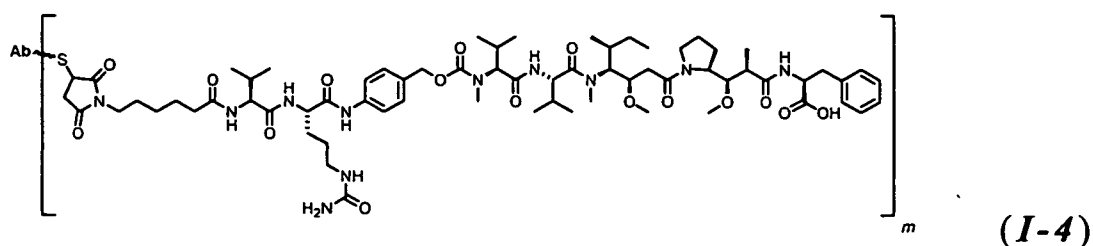
在一些實施例中，奧瑞他汀分子經由含有順丁烯二醯亞胺部分(例如順丁烯二醯亞胺基己醯基部分)之連接子連接於抗體分子上之半胱胺酸部分。

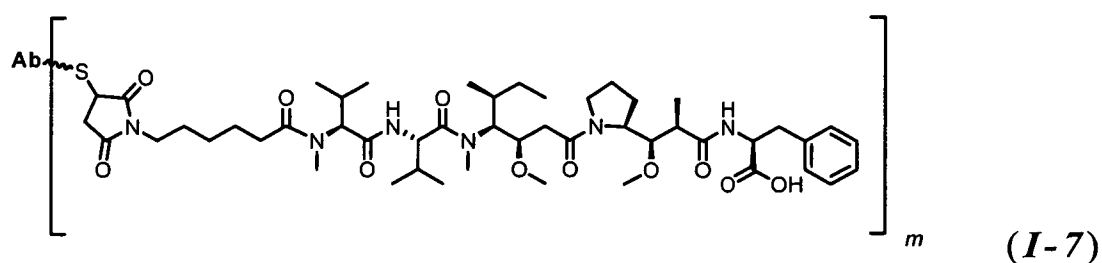
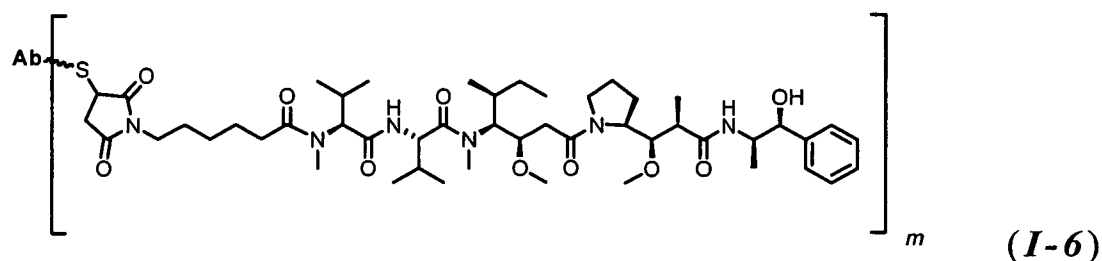
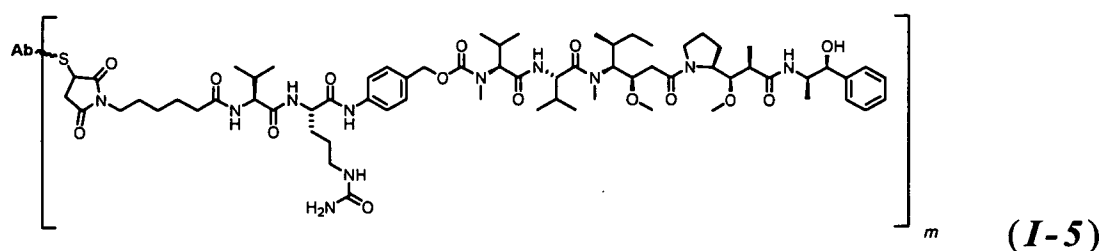
在一些實施例中，奧瑞他汀分子使用連接於奧瑞他汀分子上之羥基的雜雙官能連接子偶合於抗體分子。在一些該等實施例中，連接子包含脗。在一些實施例中，連接子為

由順丁烯二醯亞胺基己醯肼與酮基羧酸(例如5-苯甲醯基戊酸)反應形成的脎化合物。在特定實施例中，連接子為(Z)-6-(2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基)亞肼基)-6-苯基己酸。

在一些其他實施例中，奧瑞他汀分子使用連接於奧瑞他汀分子上之單甲基胺基的雜雙官能連接子偶合於抗體。在一些實施例中，連接子包含可裂解部分，例如肽部分，及自我分解型對胺基苯甲基胺基甲酸酯間隔子。例示性連接子包括順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)、順丁烯二醯亞胺基己醯基-L-苯丙胺酸-L-離胺酸-對胺基苯甲基胺基甲酸酯及順丁烯二醯亞胺基己醯基-L-纈胺酸-L-瓜胺酸-對胺基苯甲基胺基甲酸酯(vc)。

在某些實施例中，式(I)免疫結合物之特徵為式Ab-(vc-MMAF)_m(式(I-4))；Ab-(vc-MMAE)_m(式(I-5))；Ab-(mc-MMAE)_m(式(I-6))；或Ab-(mc-MMAF)_m(式(I-7))，其中Ab為如本文所述之抗-GCC抗體分子，S為抗體之硫原子且m具有上文對於式(I)所述之值及較佳值。在某些實施例中，m為1至約5之整數。





在一些實施例中，式(I-4)、(I-5)、(I-6)或(I-7)中之變數Ab為具有表1至表6中所概述之特徵的抗體分子。在某些實施例中，變數Ab為5F9抗體分子或Abx-229抗體分子。

在一些實施例中，式(I-4)、(I-5)、(I-6)或(I-7)中之變數m在約2至約10、約6至約8或約4至約6之範圍內。

在某些特定實施例中，本發明係關於式(I-4)、(I-5)、(I-6)或(I-7)之免疫結合物，其中Ab為5F9抗體分子且m為約4。

本文所揭示之免疫結合物可用於調節指定生物反應。治療劑不應理解為限於典型化學治療劑。舉例而言，治療劑可為具有所要生物活性之核酸、蛋白質或多肽。舉例而言，抗體分子可結合於可干擾基因表現之反義分子、siRNA分子、shRNA分子或miRNA分子，由此產生所要生

物作用。

可結合於本發明之抗體分子的蛋白質及多肽包括例如毒素及其組分，諸如相思豆毒素(abrin)、相思豆毒素A鏈、蓖麻毒素(ricin)、蓖麻毒素A鏈、莫迪素(modeccin)、莫迪素A鏈、 α -帶麴菌素(alpha-sarcin)、外毒素A(exotoxin A)(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、PE38(截短型綠膿桿菌外毒素)、白樹素(gelonin)、白喉毒素(diphtheria toxin)、白喉毒素A片段、某些油桐(*Aleurites fordii*)蛋白質、某些香石竹(*Dianthus caryophyllus*)蛋白質(例如康乃馨(dianthin)30及康乃馨32)、某些美洲商陸(*Phytolacca Americana*)蛋白質(例如PAP、PAPII及PAP-S)、某些石鹼草(*Saponaria officinlis*)蛋白質(例如沙泊寧6(saporin 6))、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒素(curcin)、巴豆毒素(croton)、米托潔林(mitogillin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)及伊諾黴素(enomycin)；參與針對腫瘤之免疫系統或誘導針對腫瘤之效應功能的蛋白質，諸如腫瘤壞死因子、干擾素、神經生長因子、血小板衍生生長因子及組織纖維蛋白溶酶原活化因子；及生物反應調節劑，諸如細胞激素及淋巴介質(例如介白素-1(「IL-1」))、介白素-2(「IL-2」)、介白素-6(「IL-6」)、顆粒球巨噬細胞群落刺激因子(「GM-CSF」)及顆粒球群落刺激因子(「G-CSF」)及其他生長因子。

本發明之抗體亦可結合或融合於病毒粒子上存在的病毒

表面蛋白質。舉例而言，本發明之單鏈抗-GCC抗體可與病毒表面蛋白質融合(例如形成融合蛋白)。或者，本發明之完整抗-GCC抗體或其片段可以化學方式結合(例如經由化學連接子結合)於病毒表面蛋白質。較佳地，病毒為與內飲膜(endocytic membrane)融合之病毒(例如流感病毒)，使得病毒與抗-GCC抗體一起內化且藉此感染表現GCC之細胞。病毒可遺傳工程改造為細胞毒素。舉例而言，病毒可表現或誘導對細胞具有毒性之基因(例如細胞死亡促進基因)的表現。較佳地，該等病毒應不能進行病毒複製。

本文所述之抗-GCC抗體分子亦可結合於前藥或前藥活化劑。在一種殺滅或抑制腫瘤細胞之方法中，使本發明之第一抗-GCC抗體分子與僅在與前藥活化劑緊密接近時活化的前藥結合。使前藥活化劑與第二抗體分子結合，該第二抗體分子較佳為結合於GCC分子上之非競爭位點的抗體分子。兩種抗體結合於競爭抑或非競爭結合位點可由習知競爭性結合檢定確定。適用於實施本發明之藥物-前藥對描述於Blakely等人，「ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts,」(1996) *Cancer Research*, 56:3287-3292中。

亦可將治療活性放射性同位素偶合於抗-GCC抗體或其抗原結合片段或衍生物。放射性同位素可用於診斷或治療應用。可偶合於抗-GCC抗體之放射性同位素包括(但不限於) α -、 β -或 γ -發射體或 β -及 γ -發射體。參見例如 S.E.



Order, 「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy,」 *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin 等人, (編), 第 303-316 頁 (Academic Press 1985)。該等放射性同位素包括(但不限於)碘 (^{131}I 或 ^{125}I)、釔 (^{90}Y)、鐳 (^{177}Lu)、銦 (^{225}Ac)、鐳、砒、(^{211}At)、銑 (^{186}Re)、鉍 (^{212}Bi 或 ^{213}Bi)、銲 (^{111}In)、鐳 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、磷 (^{32}P)、銑 (^{188}Rh)、硫 (^{35}S)、碳 (^{14}C)、氫 (^3H)、鉻 (^{51}Cr)、氯 (^{36}Cl)、鈷 (^{57}Co 或 ^{58}Co)、鐵 (^{59}Fe)、硒 (^{75}Se) 或 鎳 (^{67}Ga)。適用作治療劑之放射性同位素包括釔 (^{90}Y)、鐳 (^{177}Lu)、銦 (^{225}Ac)、鐳、砒 (^{211}At)、銑 (^{186}Re)、鉍 (^{212}Bi 或 ^{213}Bi) 及銑 (^{188}Rh)。適用作標記以供例如用於診斷之放射性同位素包括碘 (^{131}I 或 ^{125}I)、銲 (^{111}In)、鐳 ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、磷 (^{32}P)、碳 (^{14}C) 及氫 (^3H) 或上列治療用同位素中之一或多者。

使用以 ^{131}I 、 ^{90}Y 及 ^{177}Lu 標記之抗體進行的放射免疫療法 (RIT) 正在進行深入的臨床研究。此三種核種之物理特徵顯著不同，且因此放射性核種之選擇可能很重要以向腫瘤傳遞最大輻射劑量。 ^{90}Y 之較高 β 能量粒子可能適用於大腫瘤，但小腫瘤且尤其骨轉移可能並不需。 ^{131}I 之相對低能量 β 粒子為理想的，但放射性碘化分子之活體內去鹵化作用為內化抗體之主要缺點。相比之下， ^{177}Lu 具有範圍僅為 0.2-0.3 mm 之低能量 β 粒子，且相較於 ^{90}Y 向骨髓傳遞低得多的輻射劑量。此外，由於物理半衰期較長 (相較於 ^{90}Y)，故腫瘤滯留時間較長。因此，可以相對較低輻射劑

量向骨髓投與較高活性(較多 mCi 量)之經 ^{177}Lu 標記之藥劑。有數個臨床研究調查了經 ^{177}Lu 標記之抗體在治療各種癌症中之使用。(Mulligan T 等人, *Clin Cancer Res.* 1: 1447-1454 (1995); Meredith RF 等人, *J Nucl Med* 37:1491-1496(1996); Alvarez RD 等人, *Gynecologic Oncology* 65: 94-101 (1997))。

可用於衍生化(或標記)本發明之抗體或抗體部分的適用可偵測劑包括螢光化合物、各種酶、輔基、發光物質、生物發光物質、發射螢光之金屬原子(例如鎔(Eu)及其他鐳系元素)及放射性物質(如上所述)。例示性螢光可偵測劑包括螢光素(fluorescein)、異硫氰酸螢光素、若丹明、5-二甲基胺-1-萘磺醯氯、藻紅素(phycoerythrin)及其類似物。亦可用諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶、 β -半乳糖苷酶、乙醯膽鹼酯酶、葡萄糖氧化酶及其類似物之可偵測酶對抗體進行衍生化。當用可偵測酶對抗體進行衍生化時，藉由添加該酶用於產生可偵測反應產物之其他試劑對其進行偵測。舉例而言，當存在可偵測劑辣根過氧化酶時，添加過氧化氫及二胺基聯苯胺會產生可偵測之有色反應產物。抗體亦可用輔基(例如抗生物素蛋白/生物素及抗生物素蛋白/生物素)進行衍生化。舉例而言，抗體可用生物素進行衍生化且經由間接量測抗生物素蛋白或抗生物素蛋白結合來進行偵測。適合螢光物質之實例包括繖酮(umbelliferone)、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光物質之實例

包括魯米諾(luminol)；且生物發光物質之實例包括螢光素酶(luciferase)、螢火蟲螢光素(luciferin)及水母素(aequorin)。

醫藥組合物

在另一態樣中，本發明之特徵在於組合物，例如醫藥學上可接受之組合物，其包括如本文所述之抗-GCC抗體分子或其免疫結合物與醫藥學上可接受之載劑調配在一起。在實施例中，抗-GCC抗體分子為具有表1及表2中所概述之例示性特徵的抗-GCC抗體分子。

如本文所用之「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有生理上相容之溶劑、分散介質、等張劑及吸收延遲劑及其類似物。載劑可適合於靜脈內、肌肉內、皮下、非經腸、經直腸、經脊椎或表皮投藥(例如藉由注射或輸注)。醫藥組合物可包括一或多種其他賦形劑，例如鹽。緩衝劑、張力調節劑、低溫保護劑、非離子型清潔劑、界面活性劑及防腐劑。

組合物可呈多種形式。此等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、脂質體及栓劑。較佳形式視預定投藥模式及治療應用而定。一些典型組合物呈欲用於非經腸投藥(例如靜脈內、皮下、腹膜內、肌肉內)的可注射或可輸注溶液之形式。在一些實施例中，抗體係藉由靜脈內輸注或注射投與。在其他實施例中，抗體係藉由肌肉內或皮下注射投與。

如本文所用之短語「非經腸投藥」意謂除腸內及局部投藥以外的通常藉由注射進行的投藥模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心臟內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

在一些實施例中，醫藥組合物無菌且在製造及儲存條件下穩定。組合物可調配成溶液、微乳液、分散液、脂質體、微球體或適合於高抗體濃度之其他有序結構。無菌可注射溶液可藉由將所需量的活性化合物(亦即抗體或抗體部分)與上文所列舉之成分之一或組合一起併入適當溶劑中，繼而視需要例如藉由過濾進行滅菌來製備。一般而言，分散液藉由將活性化合物併入含有基礎分散介質及上文所列舉之所需其他成分的無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況下，所提供之製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其產生活性成分加上其先前無菌過濾溶液之任何其他所要成分之粉末。溶液之適當流動性可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、在分散液之情況下藉由維持所要粒徑及藉由使用界面活性劑來維持。可注射組合物之延長吸收可藉由在該組合物中納入延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來達成。

本發明之抗體及抗原結合片段可藉由此項技術中已知之多種方法投與，不過對於許多治療應用，投藥途徑/模式為靜脈內注射或輸注。如熟習此項技術者所瞭解，投藥途徑及/或模式應視所要結果而變化。在某些實施例中，活



性化合物可用將會防止該化合物快速釋放之載劑來製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊化傳遞系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法已獲得專利權或一般為熟習此項技術者所已知。參見例如 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson 編, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

在某些實施例中，本文所述之抗-GCC抗體分子或免疫結合物可例如與惰性稀釋劑或可同化之可食用載劑一起經口投與。該化合物(及必要時其他成分)亦可封裝於硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓製成錠劑、頰內錠劑、糖衣錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、粉片及其類似物。為藉由以除非經腸投藥以外之方式投與本發明之抗體或抗體片段，可能必需將化合物用阻止其失活之物質包覆或將化合物與該物質共投與。

可用此項技術中已知之醫療裝置投與治療組合物。舉例而言，可將醫藥製劑置於裝置(例如含有一或多個劑量之不透氣或不透液容器)中。傳遞裝置之實例包括(但不限於)小瓶、套管、針、滴液袋及管線。本發明亦提供將本文所述之抗體分子或免疫結合物置於該種裝置中之方法。

在一些實施例中，本發明提供調配於脂質體組合物中之本文所述之抗-GCC抗體分子或免疫結合物。在一些實施例中，脂質體包覆有抗體分子。在一些該等實施例中，脂

質體填充有治療劑。脂質體傳遞可允許傳遞未與抗體連接之藥劑，例如治療劑。此方法可用於傳遞不適合與抗體分子交聯之藥劑(例如治療劑)或將會整合或與非目標細胞之接觸應減至最小的藥劑(例如治療劑)。在特定實施例中，脂質體填充有細胞生長抑制劑或細胞毒性劑。在某些特定實施例中，治療劑係選自由以下組成之群：類美登素、奧瑞他汀、海兔毒素、倍癌黴素、念珠藻環肽、紫杉烷、DNA烷化劑、刺孢黴素及上述治療劑之衍生物。在其他實施例中，脂質體填充有包含RNA干擾分子(例如反義分子、siRNA、hsRNA或miRNA分子)之核酸序列，其能夠減少表現GCC之細胞中之GCC表現或另一基因(例如致癌基因)的表現。在一些其他實施例中，脂質體包覆或填充有包含抗-GCC抗體分子及治療劑或標記的免疫結合物。

調整給藥方案以提供最佳所要反應(例如治療反應)。舉例而言，可投與單次劑量，可隨時間投與數個分次劑量，或劑量可根據治療情況之緊急性所示按比例減少或增加。尤其宜調配呈單位劑型之非經腸組合物以便於投藥及使劑量均一。如本文所用之術語「單位劑型」係指適用作用於欲治療個體之單一劑量的物理個別單元；各單元含有經計算產生所要治療作用之預定量之活性化合物以及所需醫藥載劑。本發明之單位劑型的規格由以下因素指定或直接取決於以下因素：(a)活性化合物之獨特特徵及欲達成之特定治療作用，及(b)混配該種活性化合物以供治療個體敏感性之技術中固有的限制。

本發明之抗體或抗原結合片段的治療或預防有效量之一例示性非限制性範圍為0.1-20 mg/kg，或1-10 mg/kg。應注意，劑量值可能隨欲緩和之病狀的類型及嚴重性而變化。應進一步瞭解，對於任何特定個體，特定給藥方案應根據個體需要及投與或監視組合物投與之人士的專業判斷而隨時間進行調整，且本文所述之劑量範圍僅為例示性且不欲限制所主張組合物之範疇或實踐。

本發明之醫藥組合物可包括「治療有效」量之本發明之抗體或抗原結合片段。「治療有效」量係指在必需劑量下及歷時必需時間有效達成所要治療結果的量。經修飾抗體或抗體片段之治療有效量可根據以下因素改變，諸如疾病病況、個體之年齡、性別及體重，及抗體或抗體部分在個體中引發所要反應的能力。治療有效量亦為如下量，其中經修飾抗體或抗體片段之治療有益作用超過任何毒性或有害作用。「治療有效劑量」較佳使所治療個體中可量測之參數(例如腫瘤生長速率)相對於未治療個體抑制至少約20%，至少約40%，至少約60%，且在一些實施例中至少約80%。化合物抑制可量測參數(例如癌症)之能力可在預測在人類腫瘤中之功效的動物模型系統中進行評估。或者，組合物之此特性可藉由熟練此項技術者已知之檢定檢驗化合物抑制(諸如活體外抑制)之能力進行評估。

包含本文所述之抗-GCC抗體分子或免疫結合物的套組亦屬於本發明之範疇。另外包括包含含有抗-GCC抗體分子或免疫結合物之脂質體組合物的套組。套組可包括一或

多個其他要素，包括：使用說明；其他試劑，例如標記、治療劑或適用於使抗體螯合或以其他方式偶合於標記或治療劑之藥劑、或放射保護組合物；用於製備抗體以供投藥的裝置或其他物質；醫藥學上可接受之載劑；及用於投與個體之裝置或其他物質。使用說明可包括關於抗-GCC抗體分子或免疫結合物在活體外(例如樣品中，例如活檢物或來自患有癌症之患者的細胞)或活體內偵測GCC之診斷應用的說明。說明可包括治療應用之規則，包括例如在患有癌症(例如胃腸起源之癌症，諸如結腸癌、胃癌、食道癌)之患者中之建議劑量及/或投藥模式。其他說明可包括關於使抗體偶合於螯合劑、標記或治療劑之說明或例如自未反應之結合組分純化已結合之抗體的說明。如上所述，套組可包括標記，例如本文所述之任何標記。如上所述，套組可包括治療劑，例如本文所述之治療劑。在一些應用中，將使抗體與其他組分(例如螯合劑或標記或治療劑，例如放射性同位素，例如釷或鐳)反應。在該等情況下，套組可包括一或多個用於進行反應之反應容器或用於使最終產物與起始物質或反應中間物分離的分離裝置(例如層析管柱)。

套組可另外含有至少一種其他試劑，諸如診斷或治療劑，例如本文所述之診斷或治療劑，及/或一或多種其他抗-GCC抗體分子或免疫結合物，適當時調配於一或多種各別醫藥製劑中。

套組可另外含有放射保護劑。已知同位素(例如⁹⁰釷

(^{90}Y)之放射分解性質。為克服此放射分解作用，可例如在反應緩衝液中納入放射保護劑，只要該等放射保護劑為良性的即可，意謂其不會抑制或以其他方式不利地影響例如同位素(諸如 ^{90}Y)對抗體之標記反應。本發明之調配緩衝液可包括放射保護劑，諸如人類血清白蛋白(HSA)或抗壞血酸鹽，其使因釷或其他強放射性核種導致之放射分解作用減至最小。其他放射保護劑為此項技術中所已知且亦可用於本發明之調配緩衝液中，亦即自由基清除劑(苯酚、亞硫酸鹽、麩胱甘肽、半胱胺酸、2,5-二羥苯甲酸、菸鹼酸、抗壞血酸棕櫚酸酯、 $\text{HOP}(:\text{O})\text{H}_2\text{I}$ 甘油、甲醛合次硫酸氫鈉、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 及 SO_2 等)。

所提供之套組為適用於用治療性放射性同位素對結合螯合劑之蛋白質或肽進行放射性標記以供投與患者的套組。套組包括(i)含有結合螯合劑之抗體的小瓶，(ii)含有調配緩衝液的小瓶以用於穩定及投與患者經放射性標記之抗體，及(iii)用於執行放射性標記程序之說明。套組可供將結合螯合劑之抗體在溫和條件(例如說明中推薦之條件)下暴露於放射性同位素或其鹽維持足夠時間量。產生具有足夠純度、放射性比度及結合特異性的經放射性標記之抗體。經放射性標記之抗體可例如用調配緩衝液稀釋至適當濃度且在進行或未經進一步純化下直接投與患者。結合螯合劑之抗體可以凍乾形式提供。

用途

本文所述之抗-GCC抗體分子具有活體外及活體內診

斷、預後、成像、治療及預防效用。舉例而言，可將此等抗體分子例如活體外或離體投與培養中之細胞，或例如活體內投與個體以治療、預防及/或診斷多種病症。

本文所述之抗體分子、免疫結合物及融合蛋白可用於調節GCC蛋白之活性或功能，諸如配位體結合(例如結合ST或烏苷素)、GCC介導之信號轉導、維持腸液、電解質內穩定、細胞內鈣釋放(鈣流出)、細胞分化、細胞增殖或細胞活化。

在一態樣中，本發明之特徵在於一種殺滅、抑制或調節GCC表現細胞之生長或干擾GCC表現細胞之代謝的方法。在一實施例中，本發明提供一種抑制GCC介導之細胞信號傳導的方法或殺滅細胞之方法。該方法可用於表現GCC之任何細胞或組織，諸如癌性細胞(例如來自胃腸系統之癌症(諸如結腸、胃或食道之癌症)的細胞)或轉移性病變。GCC表現細胞之非限制性實例包括T84人類結腸腺癌細胞、新鮮或冷凍之結腸腫瘤細胞、及包含編碼GCC或其部分之重組核酸的細胞。

本發明之方法包括如下步驟：使細胞與有效量之如本文所述之抗-GCC抗體分子或其免疫結合物接觸，該有效量亦即為足以抑制GCC介導之細胞信號傳導的量或足以殺滅細胞的量。該方法可例如活體外、活體內、離體或當場用於培養中之細胞。舉例而言，可於培養基中活體外培養表現GCC之細胞(例如藉由腫瘤或轉移性病變之活檢收集的細胞；已建立癌細胞株之細胞；或重組細胞)，且可藉由



向培養基中添加抗-GCC抗體分子或免疫結合物來實現接觸步驟。在殺滅細胞之方法中，該方法包含使用裸抗-GCC抗體分子或包含抗-GCC抗體分子及細胞毒性劑之免疫結合物。該方法將導致殺滅表現GCC之細胞，尤其包括表現GCC之腫瘤細胞(例如結腸腫瘤細胞)。

參考表7可充當選擇用於各種方法之抗體的指南。舉例而言，表7指示哪些抗體證實在結合GCC之後內化。該等抗體將在連接於細胞毒性部分或用於細胞成像之部分時適用。不內化之抗體可用於診斷目的或使用設計成可引發抗體依賴性細胞介導之細胞毒性反應的裸抗體之治療方法，或可能用於脂質體傳遞方法。

本發明之抗-GCC抗體分子結合於表現GCC之細胞中的該抗原之細胞外域或其部分。因此，當實施本發明之方法以殺滅、抑制或偵測癌性細胞時，抗體或抗原結合片段結合於所有該等細胞，不僅結合於固定之細胞，而且亦細胞內抗原域以其他方式暴露於細胞外環境的細胞。因此，抗體或抗原結合片段之結合集中在存在表現GCC之細胞的區域，而與此等細胞固定抑或未固定、有活力抑或壞死無關。或者或另外，抗-GCC抗體分子結合於GCC且在結合表現GCC之細胞時與該抗原一起內化。

該方法亦可對存在於個體中之細胞執行，作為活體內方案之一部分。在一實施例中，個體為人類個體。或者，個體可為表現與本文所揭示之抗-GCC抗體分子交叉反應之GCC抗原的哺乳動物。可出於治療目的向人類個體投與

抗-GCC抗體分子或其免疫結合物。亦可出於獸醫目的或作為人類疾病之動物模型向表現與抗-GCC抗體交叉反應之GCC樣抗原之非人類哺乳動物(例如靈長類動物、豬或小鼠)投與抗-GCC抗體分子或免疫結合物。動物模型可適用於評估本發明抗體之治療功效(例如測試投藥之劑量及時程)。對於活體內實施例，接觸步驟在個體中實施，且包括在有效使得抗體分子可結合表現於細胞上之GCC之細胞外域且允許處理該細胞的條件下投與個體抗-GCC抗體分子或其免疫結合物。

在一實施例中，本發明提供一種治療癌症之方法，其係藉由投與需要該治療之患者抗-GCC抗體分子或包含抗-GCC抗體分子及細胞毒性劑之免疫結合物來達成。該方法可用於治療包括至少一些表現GCC抗原之細胞的任何癌性病變。如本文所用之術語「癌症」意欲包括所有類型之癌性生長或致癌過程、轉移性組織或惡性轉型細胞、組織或器官，而與組織病理學類型或侵襲階段無關。術語「癌症」及「腫瘤」可互換使用(例如，當在治療方法之上下文中使用時，「治療癌症」及「治療腫瘤」具有相同含義)。

在實施例中，治療足以減少或抑制個體腫瘤之生長，減少轉移性病變之數目或尺寸，減少腫瘤負載，減少原發性腫瘤負載，降低侵襲性，延長存活時間，或維持或改良生活品質。

癌性病變之實例包括(但不限於)實體腫瘤、軟組織腫瘤及轉移性病變。實體腫瘤之實例包括各種器官系統之惡性

疾病，例如肉瘤、腺癌及癌瘤，諸如影響結腸之惡性疾病。腺癌包括諸如非小細胞肺癌之惡性疾病。上述癌症之轉移性病變亦可使用本發明之方法及組合物進行治療或預防。在一些實施例中，欲治療之癌症為胃腸系統之癌症(例如結腸直腸癌、食道癌或胃癌)。

在一實施例中，癌症為結腸直腸癌，例如結腸直腸腺癌、結腸直腸平滑肌肉瘤、結腸直腸淋巴瘤、結腸直腸黑色素瘤或結腸直腸神經內分泌腫瘤。在一特定實施例中，癌症為轉移性結腸癌。在另一實施例中，癌症為胃癌(例如胃腺癌、淋巴瘤或肉瘤)或其轉移。在另一實施例中，癌症為食道癌(例如食道之鱗狀細胞癌或腺癌)。

該方法可適用於治療任何階段或子類之相關病症。舉例而言，方法可用於治療早期或晚期結腸癌，或階段0、I、IIA、IIB、IIIA、IIIB、IIIC及IV中任一者之結腸癌。

在一些實施例中，治療癌症(例如結腸直腸癌、食道癌或胃癌)之方法包含投與需要該治療之患者本文所述之裸抗-GCC抗體分子。在其他實施例中，方法包含投與包含本文所述之抗-GCC抗體分子及細胞毒性劑的免疫結合物。在一些該等實施例中，免疫結合物之特徵為如本文所述之式(I)。在某些實施例中，免疫結合物之特徵為如本文所述之式(I-1)、(I-2)、(I-3)、(I-4)、(I-5)、(I-6)或(I-7)。在特定實施例中，免疫結合物之特徵為式(I)、(I-1)、(I-2)、(I-3)、(I-4)、(I-5)、(I-6)或(I-7)，其中變數Ab為具有表1至表6中所概述之特徵的抗體分子。在某些實施例中，

變數 Ab 為 5F9 抗體分子或 Abx-229 抗體分子。在某些特定實施例中，免疫結合物之特徵為式 (I-5) 或 (I-7)，其中變數 Ab 為 5F9 抗體分子。

投與抗體分子及免疫結合物之方法如上文所述。所用分子之適合劑量將視個體之年齡及體重及所用特定化合物而定。

在一些實施例中，抗-GCC 抗體分子或免疫結合物以治療循環投與。「治療循環」由如下組成：治療期，在此期間如上文所述投與抗-GCC 抗體分子或免疫結合物；繼而為中止期，在此期間不投與抗-GCC 抗體分子或免疫結合物。可視需要重複治療循環以達成所要效果。

本文所述之抗-GCC 抗體(例如裸抗-GCC 抗體分子或包含抗-GCC 抗體分子及治療劑之免疫結合物)可與其他療法組合使用。舉例而言，組合療法可包括本發明之組合物與一或多種其他治療劑(例如一或多種抗癌劑，例如細胞毒性劑或細胞生長抑制劑)、激素治療、疫苗及/或其他免疫療法共調配及/或共投與。在其他實施例中，抗-GCC 抗體與其他治療性處理模態(包括手術、輻射、冷凍手術及/或熱療法)組合投與。該等組合療法宜使用較低劑量之所投與治療劑，從而避免與各種單一療法有關之可能毒性或併發症。

如本文所用之「組合」投與意謂在個體罹患病症之過程中將兩種(或兩種以上)不同治療傳遞至個體，例如在個體已診斷患有病症之後且在該病症治癒或消除之前傳遞兩種或兩種以上治療。在一些實施例中，一種治療之傳遞在第二治療之傳遞開始時仍存在，使得存在重疊。有時本文中

將此稱作「同時」或「共同傳遞」。在其他實施例中，一種治療之傳遞在另一治療傳遞開始之前結束。在任一情況之一些實施例中，治療由於組合投藥而更有效。舉例而言，相較於在無第一治療存在下投與第二治療可見，第二治療更有效，例如使用較少第二治療即可見同等效果，或第二治療減少症狀達更大程度，或對於第一治療可見類似情形。在一些實施例中，傳遞使得症狀減少或與病症有關之其他參數大於用一種治療在無另一治療存在下傳遞所觀測到的參數。兩種治療之作用可部分加和，完全加和或大於加和。傳遞可使得所傳遞第一治療之作用在傳遞第二治療時仍可偵測。

在一些實施例中，抗-GCC抗體分子或其免疫結合物與化學治療劑組合使用。損傷DNA之化學治療劑之非限制性實例包括拓撲異構酶I抑制劑(例如伊立替康、拓撲替康、喜樹鹼及其類似物或代謝物，及小紅莓)；拓撲異構酶II抑制劑(例如依託泊苷、替尼泊苷及道諾黴素)；烷化劑(例如美法倫、苯丁酸氮芥、白消安、塞替派、異環磷醯胺、卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、鏈佐星、氮烯唑胺、甲胺喋呤、絲裂黴素C及環磷醯胺)；DNA嵌入劑(例如順鉑、奧賽力鉑及卡鉑)；DNA嵌入劑及自由基產生劑(諸如博來黴素)；及核苷模擬物(例如5-氟尿嘧啶、卡培他濱(capecitabine)、吉西他濱(gemcitabine)、氟達拉濱、阿糖胞苷、巯基嘌呤、硫鳥嘌呤、噴司他汀及羥基脲)。

干擾細胞複製之化學治療劑包括：太平洋紫杉醇、多西

他賽及相關類似物；長春新鹼、長春花鹼(vinblastin)及相關類似物；沙力度胺(thalidomide)、來那度胺(lenalidomide)及相關類似物(例如CC-5013及CC-4047)；蛋白質酪胺酸激酶抑制劑(例如甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)及吉非替尼(gefitinib))；蛋白酶體抑制劑(例如硼替佐米(bortezomib))；NF- κ B抑制劑，包括I κ B激酶之抑制劑；結合於過度表現於癌症中之蛋白質且藉此下調細胞複製的抗體(例如曲妥珠單抗(trastuzumab)、利妥昔單抗(rituximab)、西妥昔單抗(cetuximab)及貝伐單抗(bevacizumab))；及已知在癌症中上調、過度表現或活化之蛋白質或酶之其他抑制劑，對該等蛋白質或酶之抑制下調細胞複製。

欲與本發明之抗-GCC抗體分子或免疫結合物組合之治療劑或治療模態的選擇將視欲治療之病症而定。其他藥劑或治療模態可包括例如用於所治療適應症之標準批准療法。舉例而言，當使用抗-GCC抗體分子或其免疫結合物來治療結腸癌時，其可與以下組合使用：例如手術；輻射療法；5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他濱、甲醯四氫葉酸、伊立替康、奧賽力鉑、貝伐單抗、西妥昔單抗、帕尼單抗(panitumum)或其組合(例如奧賽力鉑/卡培他濱(XELOX)、5-氟尿嘧啶/甲醯四氫葉酸/奧賽力鉑(FOLFOX)、5-氟尿嘧啶/甲醯四氫葉酸/伊立替康(FOLFIRI)、FOLFOX加貝伐單抗或FOLFIRI加貝伐單抗)。

在另一態樣中，本發明之特徵在於本文所述之抗-GCC

抗體分子或免疫結合物在製造藥物中之用途。在一實施例中，該藥物係用於治療癌症，例如胃腸癌。在一些實施例中，藥物包含具有表1-6中所概述之特徵的抗-GCC抗體分子。在一些實施例中，藥物包含5F9抗體分子或Abx-229抗體分子。

本文所述之抗-GCC抗體及免疫結合物可用於偵測GCC之存在，例如偵測生物樣品中GCC之存在，或偵測個體中GCC之存在或分佈。如本文所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。如本文所用之偵測GCC或GCC蛋白意謂偵測完整GCC蛋白或偵測GCC蛋白中包含抗-GCC抗體分子所結合之抗原決定基的部分。

因此，在另一態樣中，本發明之特徵在於一種偵測GCC蛋白、例如偵測表現GCC之細胞或組織(例如腫瘤細胞)或具有表現GCC之細胞的腫瘤之方法。該方法包含：使表現GCC之物質(例如細胞或組織，例如腫瘤之樣品)與抗-GCC抗體分子(例如本文所述之抗-GCC抗體分子)在允許抗-GCC抗體分子與GCC蛋白之間形成複合物之條件下接觸；及偵測抗體分子與GCC蛋白之間複合物之形成，藉此偵測GCC蛋白之存在，例如偵測表現GCC之細胞或腫瘤。

在一實施例中，抗-GCC抗體分子為一種包含可偵測標記之免疫結合物。

在某些實施例中，組織包括正常組織及/或相對於其他組織表現較高含量之GCC的癌性組織，舉例而言，其他組織為諸如B細胞及/或B細胞相關組織。

可使用本文所述之活體外或活體內偵測方法評估個體。在一實施例中，該方法可在活體內執行且可用於例如對患者進行成像、分期、評估或診斷。在某些實施例中，病症為細胞增殖病症，諸如癌症或腫瘤，例如結腸癌。

因此，在另一態樣中，本發明提供一種活體外(例如在生物樣品中，諸如組織活檢，例如來自腫瘤組織、個體)或活體內(例如藉由在個體中進行活體內成像)偵測GCC蛋白之方法。該方法包含：(i)使樣品與抗-GCC抗體分子或其免疫結合物接觸，或投與個體抗-GCC抗體分子或其免疫結合物；及(ii)偵測抗-GCC抗體分子與GCC蛋白之間複合物之形成。複合物形成指示GCC之存在或含量。

在實施例中，將樣品或個體中所偵測到之複合物的含量與參考值(例如複合物形成之值或GCC之含量)相比較。在一實施例中，超過參考值之GCC含量指示GCC介導之病症。

在一實施例中，該方法包含使參考樣品(例如對照樣品(例如對照生物樣品，諸如血漿、組織、活檢物)或對照個體)與抗-GCC抗體分子或其免疫結合物接觸，且比較其中所偵測到之複合物含量與樣品或個體中所偵測到之含量。

在某些實施例中，自懷疑患有與GCC表現增加有關之病症的個體獲得測試細胞或組織。

在一實施例中，將個體樣品中或個體中之GCC含量與參考含量相比較，該參考含量為例如對照物質(例如與個體細胞具有相同組織來源的正常細胞或具有類似於該種正常細胞之含量之GCC的細胞)中之GCC含量。該方法可包含



例如對所偵測到含量之GCC作出反應，從而提供對病症之診斷、預後、治療功效之評估或分期。相較於對照物質，樣品或個體中之GCC含量較高表明存在與GCC表現增加有關的病症。相較於對照物質，樣品或個體中之GCC含量較高亦可表明對疾病之治療功效相對缺乏、預後相對不良或疾病處於較晚期。GCC之含量亦可用於評估或選擇將來之治療，例如需要更具侵襲性或侵襲性較低之治療、或需要自一種治療方案換為另一治療方案。

GCC之含量亦可用於選擇或評估患者。舉例而言，在實施例中，認為腫瘤細胞表面表現大量GCC之患者為用結合毒素之抗-GCC抗體分子治療的良好候選者。在實施例中，腫瘤細胞表面表現少量GCC之患者不為此療法之良好候選者，或可為抗-GCC抗體分子與另一治療方法組合的候選者，或為裸抗體療法之候選者。在另一實例中，可調整結合毒素之抗-GCC抗體分子的劑量以反映腫瘤細胞表面上所表現之GCC分子的數目。腫瘤細胞表面具有大量GCC分子之患者相較於具有少量GCC分子之患者可用較低劑量治療。活體內偵測表現GCC之腫瘤細胞的存在可允許鑑別原發性GCC表現腫瘤所轉移到之組織。瞭解哪些組織具有轉移可產生腫瘤療法之靶向應用。

如上文所論述，本文所述之抗體分子允許評估正常與贅生性組織中GCC蛋白之存在，經由該評估可對疾病之存在或嚴重性、疾病進程及/或療法之功效進行評估。舉例而言，可對療法進行監測且對功效進行評估。在一實例中，

可偵測及/或量測自患有發炎性疾病之個體獲得之第一樣品中之GCC蛋白且可開始治療。隨後，可自該個體獲得第二樣品，且可偵測及/或量測該樣品中之GCC蛋白。第二樣品中偵測到或測得之GCC蛋白之量的減少可指示治療功效。

可使用本文所揭示之抗體評估(例如診斷)之例示性細胞增殖病症包括增殖性病症，包括(但不限於)結腸癌、胃癌、食道癌。

在某些實施例中，方法(諸如上述方法)包含偵測抗-GCC抗體與細胞表面上或自表面上表現GCC之細胞獲得的膜製劑中GCC之結合。在某些實施例中，該方法包含使細胞與抗-GCC抗體在允許抗-GCC抗體結合於GCC之條件下接觸，及偵測抗-GCC抗體與細胞表面上之GCC之間是否形成複合物。偵測抗-GCC抗體與細胞表面上表現之GCC之結合的一例示性檢定為「FACS」檢定。

用於本文所述方法之例示性樣品包含組織或體液，諸如發炎滲出物、血液、血清、腸液、糞便樣品或活檢物。在一實例中，可自個體獲得樣品(例如組織及/或體液)且可使用適合免疫學方法偵測及/或量測GCC蛋白表現。偵測或量測GCC蛋白表現之適合免疫學方法包括酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA)、放射免疫檢定、免疫組織學、流動式細胞測量術及其類似方法。

本文所述方法(例如活體內及活體外偵測，例如診斷、分期或成像方法)中所用的抗-GCC抗體分子可直接或間接

用可偵測物質標記以有利於偵測結合或未結合之結合劑。適合可偵測物質包括各種生物活性酶、配位體、輔基、螢光物質、發光物質、化學發光物質、生物發光物質、發色團物質、電子緻密物質、順磁(例如核磁共振活性)物質及放射性物質。在一些實施例中，使抗-GCC抗體分子偶合於放射性離子，例如銦(^{111}In)、碘(^{131}I 或 ^{125}I)、釷(^{90}Y)、鐳(^{177}Lu)、銅(^{225}Ac)、鉍(^{212}Bi 或 ^{213}Bi)、硫(^{35}S)、碳(^{14}C)、氚(^3H)、銩(^{188}Rh)、鐳($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、鎳或磷(^{32}P)；或發射正電子之放射性核種，例如碳11(^{11}C)、鉀40(^{40}K)、氮13(^{13}N)、氧15(^{15}O)、氟18(^{18}F)及碘121(^{121}I)。

例示性標記包括螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；若丹明及其衍生物；丹磺醯基；繖酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢火蟲螢光素；及2,3-二氫酞嗪二酮。其他例示性標記包括辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶；半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶；與使用過氧化氫來氧化染料前驅物的酶(諸如HRP)偶合之雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶；乳過氧化酶或微過氧化酶；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基；及其類似物。

經螢光團及發色團標記之抗體分子可自此項技術中已知之標準部分製備。因為抗體及其他蛋白質吸收波長高達約310 nm之光，故應選擇在高於310 nm且較佳高於400 nm之

波長下具有實質吸收的螢光部分。Stryer *Science*, 162:526 (1968)及 Brand, L. 等人, *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972)描述多種適合螢光化合物及發色團。可藉由習知程序(諸如美國專利第3,940,475號、第4,289,747號及第4,376,110號中所揭示之程序)用螢光發色團標記抗體。

具有上述多種適宜特性之一組螢光劑為二苯并呖喃染料，其包括衍生自3,6-二羥基-9-苯基咕噸醇之螢光素及瑞沙明(resamine)及衍生自3,6-二胺基-9-苯基咕噸醇之若丹明及麗絲胺若丹明B(lissanime rhodamine B)。9-鄰羧基苯基咕噸醇之若丹明及螢光素衍生物具有9-鄰羧基苯基。具有反應性偶合基團(諸如胺基及異硫氰酸酯基)的螢光素化合物(諸如異硫氰酸螢光素及螢光胺)易於獲得。螢光化合物之另一群組為萘胺，其在 α 位或 β 位具有胺基。

經標記抗體分子可例如在診斷上及/或實驗上用於多種情形，包括(i)藉由標準技術(諸如親和層析或免疫沈澱)分離預定抗原；(ii)偵測預定抗原(例如在細胞溶胞物或細胞上清液中)以評估蛋白質表現之豐度及模式；(iii)監測組織中之蛋白質含量，作為臨床測試程序之一部分例如以測定指定治療方案之功效。

可使用某些其他方法來偵測抗-GCC抗體與GCC之結合。該等方法包括(但不限於)此項技術中已知之抗原結合檢定，諸如西方墨點法(western blot)、放射免疫檢定、ELISA(酶聯結免疫吸附劑檢定)、「夾心」免疫檢定、免疫



沈澱檢定、螢光免疫檢定、蛋白質A免疫檢定及免疫組織化學(IHC)。

抗-GCC抗體分子與GCC之間的複合物形成可藉由量測或觀測結合於GCC抗原之抗體(或抗體片段)或未結合抗體分子來偵測。可使用習知偵測檢定，例如西方墨點法、放射免疫檢定、ELISA(酶聯結免疫吸附劑檢定)、「夾心」免疫檢定、免疫沈澱檢定、螢光免疫檢定、蛋白質A免疫檢定及免疫組織化學(IHC)或放射免疫檢定(RIA)。

作為對抗-GCC抗體分子進行標記之替代，可藉由競爭免疫檢定利用經可偵測物質標記之標準物及未標記抗-GCC抗體分子來檢定樣品中GCC之存在。在此檢定中，將生物樣品、經標記標準物及GCC結合劑組合且測定結合於未標記抗體之經標記標準物之量。樣品中GCC之量與結合於GCC結合劑之經標記標準物之量成反比。

亦有可能不對任一組分(GCC或抗體分子)進行進一步操作或標記而例如藉由利用螢光能量傳遞(FET，參見例如Lakowicz等人，美國專利第5,631,169號；Stavrianopoulos等人，美國專利第4,868,103號)之技術直接偵測GCC與抗-GCC抗體分子之複合物形成。選擇第一『供體』分子上之螢光團標記以使得在用適當波長之入射光激發時其發射之螢光能量由第二『受體』分子上之螢光標記吸收，該螢光標記又由於所吸收之能量而能夠發螢光。或者，『供體』蛋白質分子可僅利用色胺酸殘基之天然螢光能量。選擇發射不同波長之光的標記，使得可區別『受體』分子標

記與『供體』分子。因為標記之間的能量傳遞效率與分子之間隔距離有關，故可評估分子之間的空間關係。在分子之間存在結合的情況下，檢定中『受體』分子標記之螢光發射應最大。FET結合事件宜經由此項技術中熟知之標準螢光測定偵測手段(例如使用螢光計)進行量測。

在另一實施例中，測定抗體分子識別GCC之能力可在不對任一檢定組分(GCC或抗體分子)進行標記下藉由利用諸如即時生物分子相互作用分析(BIA)(參見例如Sjolander, S. 及Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345及Szabo等人, 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705)之技術來完成。如本文所用之「BIA」或「表面電漿子共振」為用於在不對任何相互作用物進行標記下即時研究生物特異性相互作用之技術(例如BIACORE™)。結合表面之質量變化(指示結合事件)使表面附近之光的折射率改變(表面電漿子共振(SPR)之光學現象)，產生可用作生物分子之間即時反應之指示的可偵測信號。

在另一實施例中，本發明提供一種活體內偵測表現GCC之腫瘤組織之存在的方法。該方法包括(i)投與個體(例如患有癌症之患者)抗-GCC抗體或其抗原結合片段，較佳結合於可偵測標記或標記物之抗體或其抗原結合片段；(ii)使個體暴露於用於偵測表現GCC之組織或細胞的該可偵測標記或標記物的構件。

根據本發明，適用於診斷成像之標記的實例為放射性標記，諸如 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{68}Ga 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{32}P 、 ^{125}I 、 ^3H 、



^{14}C 及 ^{188}Rh ；螢光標記，諸如螢光素及若丹明；核磁共振活性標記；可藉由單光子發射電腦化斷層攝影(「SPECT」)偵測器或正電子發射斷層攝影(「PET」)掃描儀偵測的發射正電子之同位素；化學發光劑，諸如螢火蟲螢光素；及酶標記，諸如過氧化酶或磷酸酶。亦可使用短程輻射發射體，諸如可藉由短程偵測探針(諸如經直腸探針)偵測的同位素。可使用此項技術中已知之技術用該等試劑標記抗體。舉例而言，對於與對抗體進行放射性標記有關之技術，請參見 Wensel 及 Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York。亦參見 D. Colcher 等人，*Meth. Enzymol.* 121: 802-816 (1986)。

在經放射性標記之抗體的情況下，向患者投與該抗體，該抗體定位於具有與該抗體反應之抗原的腫瘤，且使用已知技術(諸如使用例如 γ 相機或發射斷層攝影法或電腦斷層攝影法進行放射性核種掃描)進行活體內偵測或「成像」。參見例如 A.R. Bradwell 等人，「Developments in Antibody Imaging」，*Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin 等人，(編)，第 65-85 頁 (Academic Press 1985)。或者，可使用正電子發射橫軸斷層攝影掃描儀(諸如位於布魯克赫文國家研究所 (Brookhaven National Laboratory)之指定 Pet VI)，其中放射性標記發射正電子(例如， ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 及 ^{13}N)。

在其他實施例中，本發明提供確定當投與個體(例如人

類個體)結合於放射性同位素之抗-GCC抗體分子時不同組織所暴露之劑量(例如輻射劑量)的方法。該方法包括：(i)投與個體本文所述之抗-GCC抗體分子，例如經放射性同位素標記之抗-GCC抗體分子；(ii)量測各時間點定位於不同組織(例如腫瘤)或血液的放射性同位素之量直至放射性同位素中之一些或全部已自個體之身體去除；及(iii)計算所分析之各組織所接受之總輻射劑量。量測可在預定時間點(例如投與個體經放射性標記之抗-GCC抗體分子(第0天)後第1天、第2天、第3天、第5天、第7天及第12天)進行。指定組織中所存在之放射性同位素之濃度對時間積分且乘以放射性同位素之放射性比度的結果可用於計算指定組織所接受之劑量。使用經一種放射性同位素(例如 γ -發射體，例如 ^{111}In)標記之抗-GCC抗體分子產生的藥理學資訊可用於計算相同組織將自不同放射性同位素(其可能不易量測，例如 β -發射體，例如 ^{90}Y)接受的預期劑量。

抗-GCC抗體序列

抗-GCC抗體可藉由若干方法產生，該等方法更詳細地論述於實例中。簡言之，小鼠單株抗體3G1 8F1及10B8係藉由傳統免疫技術在習知小鼠中產生。人類單株抗體1D2、5F9、5H3、6H8、8C2及10C10係使用產生完全人類IgG2抗體之轉殖基因小鼠利用Abgenix XENOMOUSE轉殖基因技術產生，且使用融合瘤技術分離。人類mAb Abx-012、mAb Abx-020、mAb Abx-106、mAb Abx-198、mAb Abx-221、mAb Abx-229、mAb Abx-338及mAb Abx-393係



使用產生完全人類IgG2抗體之轉殖基因小鼠產生。使用Abgenix SLAM技術分離單一抗體。其用於製備完全人類IgG1抗體。抗體針對GCC之特異性藉由ELISA及流動式細胞測量術(FCM)進行測試。選擇所產生抗體之子集供進行進一步表徵。

下表1概述若干種抗-GCC抗體之抗體名稱、用於產生該抗體之免疫原、所用動物、來源、物種及分離之同型。

表 1

Ab	免疫原	動物	來源	物種	同型
3G1	TOK107-hIg	C57習知小鼠	融合瘤	小鼠	IgG1,k
8F1	TOK107-hIg	C57習知小鼠	融合瘤	小鼠	IgG1,k
10B8	TOK107-hIg	C57習知小鼠	融合瘤	小鼠	IgG1,k
1D3	TOK107-hIg	C57習知小鼠	融合瘤	小鼠	IgG1,k
8E12	TOK107-hIg	C57習知小鼠	融合瘤	小鼠	IgG1,k
5F9	TOK107-hIg	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
1D2	TOK107-hIg	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
5H3	CHO-GC-C#27 cells	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
6H8	CHO-GC-C#27 cells	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
8C2	CHO-GC-C#27 cells	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
10C10	CHO-GC-C#27 cells	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
10D3	CHO-GC-C#27 cells	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
1C9	CHO-GC-C#27 cells	XenoMouse	融合瘤	人類	IgG2,k
229	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
012	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
221	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
020	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
338	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
106	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
198	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k
393	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	人類	IgG1,k

測定了輕鏈及重鏈可變區之序列。下表2為若干種抗體之可變區之SEQ ID NO的概述。表3及表4分別展示鼠類及人類抗-GCC抗體之重鏈及輕鏈各自之可變區的胺基酸及核酸序列。

表5及表6分別展示抗-GCC抗體之重鏈及輕鏈之各CDR的胺基酸及核酸序列。

舉例而言，表3第9列說明mAb 5F9之成熟重鏈可變區之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:18)；且表4第9列描述編碼mAb 5F9之成熟重鏈可變區的核酸序列(SEQ ID NO:17)。表5第25-27列分別描述mAb 5F9重鏈CDR(CDR)1之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:106)、CDR2之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:108)及CDR3之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:110)；且表6第25-27列分別展示mAb 5F9重鏈CDR1之核酸序列(SEQ ID NO:105)、CDR2之核酸序列(SEQ ID NO:107)及CDR3之核酸序列(SEQ ID NO:109)。

表3第10列說明mAb 5F9之成熟輕鏈可變區之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:20)；且表4第10列描述編碼mAb 5F9之成熟κ輕鏈可變區的核酸序列(SEQ ID NO:19)。表5第28-30列分別描述mAb 5F9輕鏈CDR(CDR)1之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:112)、CDR2之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:114)及CDR3之所編碼胺基酸序列(SEQ ID NO:116)；且表6第28-30列分別展示mAb 5F9輕鏈CDR1之核酸序列(SEQ ID NO:111)、CDR2之核酸序列(SEQ ID NO:113)及CDR3之核酸序列(SEQ ID NO:115)。



CDR之定序允許測定可用作毒素結合位點之殘基的豐度。抗原結合區中之未配對游離半胱胺酸可為奧瑞他汀結合位點且離胺酸可為美登素結合位點。毒素結合於CDR之胺基酸將產生改變抗體對GCC之結合親和力的擔憂。因此，在實施例中，CDR缺乏可結合於治療劑之胺基酸。

表2.單株抗體可變區之SEQ ID NO的概述

mAb	IgG鏈	NA SEQ ID	AA SEQ ID
3G1	重鏈	1	2
	輕鏈	3	4
8E12	重鏈	5	6
	輕鏈	7	8
8F1	重鏈	9	10
	輕鏈	11	12
1D3	重鏈	13	14
	輕鏈	15	16
5F9	重鏈	17	18
	輕鏈	19	20
5H3	重鏈	21	22
	輕鏈	23	24
6H8	重鏈	25	26
	輕鏈	27	28
8C2	重鏈	29	30
	輕鏈	31	32
10C10	重鏈	33	34
	輕鏈	35	36
10D3	重鏈	286	287
	輕鏈	288	289
Abx-012	重鏈	238	239
	輕鏈	240	241
Abx-020	重鏈	37	38
	輕鏈	39	40
Abx-106	重鏈	242	243
	輕鏈	244	245
Abx-198	重鏈	41	42
	輕鏈	43	44

Abx-221	重鏈	246	247
	輕鏈	248	249
Abx-229	重鏈	45	46
	輕鏈	47	48
Abx-338	重鏈	49	50
	輕鏈	51	52
Abx-393	重鏈	53	54
	輕鏈	55	56

表 3. mAb 可變區之胺基酸序列

	mAb	IgG 鏈	SEQ ID NO:	胺基酸序列e
1	3G1	重鏈	2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSRNAISWVRQP PGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSIRKENS KSQVF LKMNSLQTEDTARYFCARSGYDGF Y WGQGT L TVSA
2	3G1	輕鏈	4	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMH W YQQKS GTSPKRWIYDTSK L ASGVPARFSGSGSGTSYSLTITSMEA EDAATYYCQQWSGNPYTFGGG T KLEIK
3	8E12	重鏈	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVK QRPQG L EWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGT L TVS
4	8E12	輕鏈	8	DVVMQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQAPK H LMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLK ISRVEAEDLG V YYCLQGTYYPYTFGGG T KLEIK
5	8F1	重鏈	10	QVQLQQGAELVKPGASVQMSCKASGYIFTGYW Y WV KQRPQG L EWIGRIHPSDSNTNYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCTHALAYWGQGT L TVS
6	8F1	輕鏈	12	DVVLTQTPLTSLITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWL LQRPQGSPKRLIYLV S QLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR VEAEDLG V YYCVQGTHLFTFGSG T KLEIK
7	1D3	重鏈	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWV KQRPQG L EWIGKIGPRSGSTYYNEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGT L TVSA
8	1D3	輕鏈	16	DVVMQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQAPK H LMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLK ISRVEAEDLG V YYCLQGTYYPYTFGGG T KLEIK
9	5F9	重鏈	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKS R VTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGT L VT VSS
10	5F9	輕鏈	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSE DFAVYYCQQYKTPRTFGQGTNVEIK



11	5H3	重鏈	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMSWIRQ SPGKGLEWVSYITTSNTIYYADSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWFGMDVWGQGTTV TVSS
12	5H3	輕鏈	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHNDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNNRFGVPDRFSSSGSXTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIK
13	6H8	重鏈	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAIWDGSKYYADSVKGRFTISRDNKNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGTLLV TVSS
14	6H8	輕鏈	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNNRFGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
15	8C2	重鏈	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVGAIWDGSKYYAASVKGRFTISRDNKNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYFDYWGQGTLLV TVSS
16	8C2	輕鏈	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNNRFGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
17	10C10	重鏈	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAIWDGSKYYADSVKGRFTISRDNKNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGTLLV TVSS
18	10C10	輕鏈	36	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASFSCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKISNNRFGVPDRFSGSGAGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
35	10D3	重鏈	287	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKS VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGN FDHWGQGTLLTVSS
36	10D3	輕鏈	289	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGTPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYERSFTFGPGTKVD
19	Abx-012	重鏈	239	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ AGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDRLTGFDYWGQGTLLTVSS
20	Abx-012	輕鏈	241	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
21	Abx-020	重鏈	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQ APGKGLEWISYITSSGSTIYYASVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDFSGWFGVHFDYWGQGTLLV TVSS
22	Abx-020	輕鏈	40	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNNRFGVPNNRFGSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLTWTFGQGTKVEIK

23	Abx-106	重鏈	243	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQP AGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGT LVTVSS
24	Abx-106	輕鏈	245	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPMCSFGQGTKLEIK
25	Abx-198	重鏈	42	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLDWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDLWGRGTLVTV SS
26	Abx-198	輕鏈	44	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRARQRVDSRYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPLTFGGG TKVEIK
27	Abx-221	重鏈	247	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSGPFDYWGQGT LVTVSS
28	Abx-221	輕鏈	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSED VAVYYCQQYNNWMCSFGQGTKLEIK
29	Abx-229	重鏈	46	EVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSGPFDYWGQGT LVTVSS
30	Abx-229	輕鏈	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSED FAVYYCHQYSNWMCSFGQGTKLEIK
31	Abx-338	重鏈	50	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYYSWIRQP AGKGLEWIGRIYISGRITTFNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYFCARDRYGYLDYWGQGT LVTVSS
32	Abx-338	輕鏈	52	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSSPSTFGQGT RLEIK
33	Abx-393	重鏈	54	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRHYYSWIRQP PGKGLEWIGYIYYSGSTNYNLSLKSRTISRDT SKNQVSL KLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGT LVTVSS
34	Abx-393	輕鏈	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITTCRASQAIRNDLGWYQLKP GKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DSATYYCLQHNSFPPTFGQGTKVEIK



表 4. mAb 可變區之核酸序列

	mAb	IgG鏈	SEQ ID NO:	核苷酸序列
1	3G1	重鏈	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTCT CTGGGTTCTCATTAAGCAGAAATGCTATAAGCTGGGT TCGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGG AGTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAATTCA GCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCCGCAAAGAGAAC TCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTAC AAACTGAAGACACAGCCAGGTACTTCTGTGCCAGAA GTGGTTACGACGGGTTTGATTACTGGGGCCAAGGGA CTCTGGTCACTGTCTCTGCA
2	3G1	輕鏈	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTAATTACATGCACTGGTACCAGCA GAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGA CACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACA TCACCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTA CTGCCAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACGTTCGG AGGGGGGACCAAACCTGGAAATAAAA
3	8E12	重鏈	5	CAGGTCCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATAAACTGGGT GAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG AAAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACTACAAT GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGA CAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCA AGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCT
4	8E12	輕鏈	7	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCTCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATAT TTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCCA AAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCCTG GCATCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGAAA CAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTG AAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTACATAT TATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAG

5	8F1	重鏈	9	CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGTAAGGCTT CTGGCTATATTTTACACGGCTACTGGATGTACTGGGTG AAGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTGGA AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAATAATCA AAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAA ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTG ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACCCATG CCCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGT CTCT
6	8F1	輕鏈	11	GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGA TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTAT TTGAGTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAA AGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTCAACTGGACTCTGG AGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAAC AGATTTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGA GGATTGAGGAGTGTATTACTGCGTGCAAGGTACACAT TTATTCACGTTCTGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAA AA
7	1D3	重鏈	13	CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAACTGGG TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTG GAAAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTACAA TGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAG ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGC AAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCTGCA
8	1D3	輕鏈	15	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTGCGG TTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATAT TTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCCA AAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAACTGGACCCTG GCATCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGAAA CAGATTTTACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTG AAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTACATAT TATCCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAA ATAAAA
9	5F9	重鏈	17	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCT TTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGG GGAAATCAATCATCGTGGAACACCAACGACAACCC GTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACG TCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCTGTG ACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGA GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA



10	5F9	輕鏈	19	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGGTATCA GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTC ACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTT ATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAA
11	5H3	重鏈	21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTCAGTGACTGCTACATGAGCTGGA TCCGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTT CATACTACTACTAGTGGTAATACCATTACTACGCA GACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGAC AACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG AGAGACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
12	5H3	輕鏈	23	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTC TAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAAGACCTAT TTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCAC AACTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGG AGTGCCAGATAGGTTCACTAGCAGCGGGTCNNGGAC AGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGA GGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAG CTTCCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAA
13	6H8	重鏈	25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCA GACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG AGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
14	6H8	輕鏈	27	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCTG GGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGA CAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGCTG AGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACGCA ATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGAT TAAA

15	8C2	重鏈	29	caggtgcagctggtggagtctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggTCCCT GAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGT AGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGTATGATG GAAGTAATAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTATTTTACTGTGCGAGAGGGGAGGAGCAGCTCGT ATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCG TCTCCTCA
16	8C2	輕鏈	31	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCTG GGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGA CAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGCTG AGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACGCA ATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGAT TAAA
17	10C10	重鏈	33	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CAGCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCA GACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCG AGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
18	10C10	輕鏈	35	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCTTCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACGTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTG GGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGA CAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAAGCTG AGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACA ATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGAT TAAA



35	10D3	重鏈	286	CAGGTGCA GCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTC GGAGACCCTGTCCC TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTA CTACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGGAAATCAATCA TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAG TCGAGTCACCATAT CAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGC TGAGTTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAA CGTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCA
36	10D3	輕鏈	288	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGGTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCACCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT GGAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTTCTGTGTCAGCAGTATGAAAGGTCATT CACTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGAT
19	Abx-012	重鏈	238	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTG CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAG CCGCGCGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTATC TATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTC GAGTCACCGTGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTTG ACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG

20	Abx-012	輕鏈	240	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCA GCAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATG GTAGCTCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAA AC
21	Abx-020	重鏈	37	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTCAGTGACTIONTACATGAGCTGGA TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT CATACTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACTCA GCCTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGGGAC AACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG AGAGATTTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG
22	Abx-020	輕鏈	39	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAAGTC TAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCTAT TTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCAC AGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGG AGTGCCAAATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGAC AGATTTCACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGA GGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAA CTTACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAA ATCAAA
23	Abx-106	重鏈	242	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAG CCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTATC TATATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTC GAGTACCGTGTGAGTAGACACGTCCAAGAACCAGT TCTCCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTTG ACTACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC



24	Abx-106	輕鏈	244	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT ACATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAG CCTGAAGACTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATG GTAGCTCACCCATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCA AGCTGGA GATCAAACG
25	Abx-198	重鏈	41	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTCT CAGATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCACAGC CTGAGCGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGA AACGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTCTGGGGCC GTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
26	Abx-198	輕鏈	43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTACTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGA CAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAC TCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
27	Abx-221	重鏈	246	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATT CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATT AGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTGGAGTG GTCCATT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCAGC

28	Abx-221	輕鏈	248	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGG CCAGTCA GAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGTGCA TCCACCA GGGCCACTGGGATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCCT GCAGTCT GAAGATGTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAA CTGGATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAA ACG
29	Abx-229	重鏈	45	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTACCTTTAGCCGCTATGCCATGAAGTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CAGGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACACTATATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG AAAGATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
30	Abx-229	輕鏈	47	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCTG TGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTAGCCTGGTACCA GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCCTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTT ATTACTGTCACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGTTTT GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
31	Abx-338	重鏈	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG ACGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAACCCC TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTGGACACGT CCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGA CCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAG ATAGATATTATGGCTACCTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
32	Abx-338	輕鏈	51	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAAGTTACTTAGCCTGGTA CCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT CTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCA GTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGTTACCGAGCA CCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA



33	Abx-393	重鏈	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCT CTGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAGCTGGAT CCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGG GTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCTC TCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAAGAGACACG TCCAAGAATCAGGTCTCCCTG AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTG TATTATTGTGCGGCGGGTATGGGCTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
34	Abx-393	輕鏈	55	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTG CATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC AAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAG CTGAAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATT CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCAC AATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCAACTTAT TACTGTCTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACGTTCCG CCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

表 5：CDR 之 胺 基 酸 序 列

	mAb	IgG鏈	SEQ ID NO :	胺基酸序列
1	3G1	VH CDR1	58	RNAIS
2	3G1	VH CDR2	60	VIWTGGGTNYNSALKS
3	3G1	VH CDR3	62	SGYDGFYD
4	3G1	VL CDR1	64	SASSSVNYMH
5	3G1	VL CDR2	66	DTSKLAS
6	3G1	VL CDR3	68	QQWSGNPYT
7	8E12	VH CDR1	70	DYYIN
8	8E12	VH CDR2	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	VH CDR3	74	WDAY
10	8E12	VL CDR1	76	KSSQSLLYSNGKTYLN
11	8E12	VL CDR2	78	QVSKLDP
12	8E12	VL CDR3	80	LQGTYYPYT

13	8F1	VH CDR1	82	GYWMY
14	8F1	VH CDR2	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG
15	8F1	VH CDR3	86	ALAY
16	8F1	VL CDR1	88	KSSQSLLYSNGKTYLS
17	8F1	VL CDR2	90	LVSQLDS
18	8F1	VL CDR3	92	VQGTHLFT
19	1D3	VH CDR1	94	DYYIN
20	1D3	VH CDR2	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG
21	1D3	VH CDR3	98	WDAY
22	1D3	VL CDR1	100	KSSQSLLYSNGKTYL
23	1D3	VL CDR2	102	QVSKLDP
24	1D3	VL CDR3	104	LQGTYYPYT
25	5F9	VH CDR1	106	GYYS
26	5F9	VH CDR2	108	EINHRGNTNDNPSLKS
27	5F9	VH CDR3	110	ERGYTYGNFDH
28	5F9	VL CDR1	112	RASQSVSRNLA
29	5F9	VL CDR2	114	GASTRAT
30	5F9	VL CDR3	116	QQYKTWPRT
31	5H3	VH CDR1	118	DCYMS
32	5H3	VH CDR2	120	YITTSGNTIYYADSVKG
33	5H3	VH CDR3	122	DWGWFYGM DV
34	5H3	VL CDR1	124	KSSQSLLHNDGKTYLY
35	5H3	VL CDR2	126	EVS NRFS
36	5H3	VL CDR3	128	MQSIQLPRT



37	6H8	VH CDR1	130	SYGMH
38	6H8	VH CDR2	132	AIWYDGSNKYYADSVKG
39	6H8	VH CDR3	134	GRSSSYFDY
40	6H8	VL CDR1	136	RSSQSLVHSDGNTYLS
41	6H8	VL CDR2	138	KTSNRFS
42	6H8	VL CDR3	140	MQATQFPT
43	8C2	VH CDR1	142	SYGMH
44	8C2	VH CDR2	144	AIWYDGSNKYYAASVKG
45	8C2	VH CDR3	146	GRSSSYFDY
46	8C2	VL CDR1	148	RSSQSLVHSDGNTYLS
47	8C2	VL CDR2	150	KTSNRFS
48	8C2	VL CDR3	152	MQATQFPT
49	10C10	VH CDR1	154	SYGMH
50	10C10	VH CDR2	156	AIWYDGSNKYYADSVKG
51	10C10	VH CDR3	158	GRSSSYFDY
52	10C10	VL CDR1	160	RSSQSLVHSDGNTYLS
53	10C10	VL CDR2	162	KISNRFS
54	10C10	VL CDR3	164	MQATQFPT
103	10D3	VH CDR1	291	GYYSWS
104	10D3	VH CDR2	293	EINHRGNTNDNPSLKS
105	10D3	VH CDR3	295	ERGYTYGNFDH
106	10D3	VL CDR1	297	RASQSVSSRYLA
107	10D3	VL CDR2	299	GASSRAT
108	10D3	VL CDR3	301	QQYERSFT

55	Abx-012	VH CDR1	251	HYYWS
56	Abx-012	VH CDR2	253	RIYISGRTSYNPSLKS
57	Abx-012	VH CDR3	255	DRLTGYFDY
58	Abx-012	VL CDR1	257	RASQSVSSSYLA
59	Abx-012	VL CDR2	259	GASSRAA
60	Abx-012	VL CDR3	261	QQYGSSLT
61	Abx-020	VH CDR1	166	DYYMS
62	Abx-020	VH CDR2	168	YITSSGSTIYYASVKG
63	Abx-020	VH CDR3	170	DFSGWFGVHFDY
64	Abx-020	VL CDR1	172	KSSQSLHSDGKTYLY
65	Abx-020	VL CDR2	174	EVSNRFS
66	Abx-020	VL CDR3	176	MQSIQLTWT
67	Abx-0106	VH CDR1	263	HYYWS
68	Abx-106	VH CDR2	265	RIYISGRTSYNPSLKS
69	Abx-106	VH CDR3	267	DRLTGYFDY
70	Abx-106	VL CDR1	269	RASQSVSSSYLA
71	Abx-106	VL CDR2	271	GTSSRAT
72	Abx-106	VL CDR3	273	QQYGSSPMCS
73	Abx-198	VH CDR1	178	SYAMS
74	Abx-198	VH CDR2	180	DISGSGGSTYYADSVKG
75	Abx-198	VH CDR3	182	RRWQGYFDL
76	Abx-198	VL CDR1	184	RARQRVDSRYLA
77	Abx-198	VL CDR2	186	GASSRAT
78	Abx-198	VL CDR3	188	QQYGSSPLT



79	Abx-221	VH CDR1	275	RYAMN
80	Abx-221	VH CDR2	277	GISGSGGSTYYADSVKG
81	Abx-221	VH CDR3	279	DRDFWSGPFDY
82	Abx-221	VL CDR1	281	RASQSVSRSLA
83	Abx-221	VL CDR2	283	GASTRAT
84	Abx-221	VL CDR3	285	QQYNNWMCS
85	Abx-229	VH CDR1	190	RYAMN
86	Abx-229	VH CDR2	192	GISGSGGRTYYADSVKG
87	Abx-229	VH CDR3	194	DRDFWSGPFDY
88	Abx-229	VL CDR1	196	RASQSVSRNLA
89	Abx-229	VL CDR2	198	GASTRAT
90	Abx-229	VL CDR3	200	HQYSNWMCS
91	Abx-338	VH CDR1	202	SYAWS
92	Abx-338	VH CDR2	204	RIYISGRRTTFNPSLKS
93	Abx-338	VH CDR3	206	DRYYGYLDY
94	Abx-338	VL CDR1	208	RASQSVSRSYLA
95	Abx-338	VL CDR2	210	DASSRAT
96	Abx-338	VL CDR3	212	QQYGSSPST
97	Abx-393	VH CDR1	214	HYYWS
98	Abx-393	VH CDR2	216	YIYYSGSTNYNLSLKS
99	Abx-393	VH CDR3	218	GMGFDY
100	Abx-393	VL CDR1	220	RASQAIRNDLG
101	Abx-393	VL CDR2	222	SASSLQS
102	Abx-393	VL CDR3	224	LQHNSFPPT

109	共同序列	VH CDR1	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	共同序列	VH CDR2	303	x-I-x-x-SG-[x或無]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	共同序列	VH CDR3	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	共同序列	VL CDR1	305	R/K-A/S-SQS-V/L-S/L-[5-9x]
113	共同序列	VL CDR2	306	x-x-S-x-R-x-x
114	共同序列	VL CDR3	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

表 6. CDR之核酸序列

	mAb	IgG鏈	SEQ ID NO:	核苷酸序列
1	3G1	VH CDR1	57	AGAAATGCTATAAGC
2	3G1	VH CDR2	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAA TTCAGCTCTCAAATCC
3	3G1	VH CDR3	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC
4	3G1	VL CDR1	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCAC
5	3G1	VL CDR2	65	GACACATCCAACTGGCTTCT
6	3G1	VL CDR3	67	<u>CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACG</u>
7	8E12	VH CDR1	69	GACTACTATATAAAC
8	8E12	VH CDR2	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACTA CAATGAGAAGTTCAAGGGC
9	8E12	VH CDR3	73	TGGGATGCTTAC
10	8E12	VL CDR1	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGG AAAGACATATTTGAAT
11	8E12	VL CDR2	77	CAGGTGTCCAACTGGACCCT
12	8E12	VL CDR3	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
13	8F1	VH CDR1	81	<u>GGCTACTGGATGTAC</u>
14	8F1	VH CDR2	83	<u>AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTA</u> <u>CAATCAAAAGTTCAAGGGC</u>
15	8F1	VH CDR3	85	<u>GCCCTTGCTTAC</u>



16	8F1	VL CDR1	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGG AAAAACCTATTTGAGT
17	8F1	VL CDR2	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT
18	8F1	VL CDR3	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG
19	1D3	VH CDR1	93	GACTACTATATAAAC
20	1D3	VH CDR2	95	AAGATTGGTCCTAGAAAGTGGTAGTACTTACT ACAATGAGAAAGTTCAAGGGC
21	1D3	VH CDR3	97	TGGGATGCTTAC
22	1D3	VL CDR1	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGG AAAGACATATTTGAAT
23	1D3	VL CDR2	101	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
24	1D3	VL CDR3	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
25	5F9	VH CDR1	105	GGTTACTACTGGAGC
26	5F9	VH CDR2	107	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACA ACCCGTCCCTCAAG
27	5F9	VH CDR3	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
28	5F9	VL CDR1	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTA GCC
29	5F9	VL CDR2	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
30	5F9	VL CDR3	115	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG
31	5H3	VH CDR1	117	GACTGCTACATGAGC
32	5H3	VH CDR2	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACTAC GCAGACTCTGTGAAGGGC
33	5H3	VH CDR3	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTC
34	5H3	VL CDR1	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATG GAAAGACCTATTTG
35	5H3	VL CDR2	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
36	5H3	VL CDR3	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG
37	6H8	VH CDR1	129	AGCTATGGCATGCAC
38	6H8	VH CDR2	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGC
39	6H8	VH CDR3	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT

40	6H8	VL CDR1	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
41	6H8	VL CDR2	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
42	6H8	VL CDR3	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACC
43	8C2	VH CDR1	141	AGCTATGGCATGCAC
44	8C2	VH CDR2	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGCCTCCGTGAAGGGC
45	8C2	VH CDR3	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTAC
46	8C2	VL CDR1	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
47	8C2	VL CDR2	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
48	8C2	VL CDR3	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCCA
49	10C10	VH CDR1	153	AGCTATGGCATGCAC
50	10C10	VH CDR2	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGC
51	10C10	VH CDR3	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
52	10C10	VL CDR1	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACGCTACTTGAGT
53	10C10	VL CDR2	161	AAGATTTCTAACCGGTTCTCT
54	10C10	VL CDR3	163	ATGCAAGCTACACAATTTCCAACC
103	10D3	VH CDR1	290	GGTACTACTGGAGC
104	10D3	VH CDR2	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACA ACCCGTCCCTCAAG
105	10D3	VH CDR3	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
106	10D3	VL CDR1	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTAC TTAGCCT
107	10D3	VL CDR2	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
108	10D3	VL CDR3	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTT
55	Abx-012	VH CDR1	250	CATTACTACTGGAGC
56	Abx-012	VH CDR2	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT
57	Abx-012	VH CDR3	254	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC



58	Abx-012	VL CDR1	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACT TAGCC
59	Abx-012	VL CDR2	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT
60	Abx-012	VL CDR3	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT
61	Abx-020	VH CDR1	165	GACTACTACATGAGC
62	Abx-020	VH CDR2	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTAC TCAGCCTCTGTGAAGGGC
63	Abx-020	VH CDR3	169	GATTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTG ACTAC
64	Abx-020	VL CDR1	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATG GAAAGACCTATTTGTAT
65	Abx-020	VL CDR2	173	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
66	Abx-020	VL CDR3	175	ATGCAAAGTATACAACTTACGTGGACG
67	Abx-106	VH CDR1	262	CATTACTACTGGAGC
68	Abx-106	VH CDR2	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT
69	Abx-106	VH CDR3	266	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGACTAC
70	Abx-106	VL CDR1	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACT TAGCC
71	Abx-106	VL CDR2	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
72	Abx-106	VL CDR3	272	CAGCAGTATGGTAGCTCACCCATGTGCAGT
73	Abx-198	VH CDR1	177	AGCTATGCCATGAGC
74	Abx-198	VH CDR2	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGC
75	Abx-198	VH CDR3	181	CGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTC
76	Abx-198	VL CDR1	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTAC TTAGCC
77	Abx-198	VL CDR2	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
78	Abx-198	VL CDR3	187	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT
79	Abx-221	VH CDR1	274	CGCTATGCCATGAAC
80	Abx-221	VH CDR2	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGC
81	Abx-221	VH CDR3	278	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTGACTA C

82	Abx-221	VL CDR1	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTAG CC
83	Abx-221	VL CDR2	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
84	Abx-221	VL CDR3	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT
85	Abx-229	VH CDR1	189	CGCTATGCCATGAAC
86	Abx-229	VH CDR2	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
87	Abx-229	VH CDR3	193	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACTA C
88	Abx-229	VL CDR1	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTAG CC
89	Abx-229	VL CDR2	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
90	Abx-229	VL CDR3	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGT
91	Abx-338	VH CDR1	201	AGTTACTACTGGAGC
92	Abx-338	VH CDR2	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAA CCCCTCCCTCAAGAGT
93	Abx-338	VH CDR3	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACTAC
94	Abx-338	VL CDR1	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACT TAGCC
95	Abx-338	VL CDR2	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	Abx-338	VL CDR3	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACC
97	Abx-393	VH CDR1	213	CATTACTACTGGAGC
98	Abx-393	VH CDR2	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAA CCTCTCCCTCAAGAGT
99	Abx-393	VH CDR3	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	Abx-393	VL CDR1	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAG GC
101	Abx-393	VL CDR2	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	Abx-393	VL CDR3	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACG

如上文所述產生表現載體，其含有 mAb 5F9 及 Abx-229 各自之重鏈與輕鏈的編碼序列。

本發明藉由以下實例來說明，該等實例不應視為進一步

限制本發明。

實例

實例 1：抗-GCC抗體之產生及表徵

如下產生用於免疫及篩選之GCC蛋白。藉由將GCC基因中編碼包含以下GCC序列(信號序列及細胞外域)之序列的部分次選殖於表現載體中來製備GCC抗原。

```
MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVR
GRLQNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCYSTYTFQMY
LDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMS PARKL MYFLVNFWKTN DL PFKTYSWSTS YVYKNGTE
TEDCFWYLNAL EASVS YFSHELGFKV VLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLG DRAV
AEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLF
GHMLKIFLENGENITTPKFAHA FRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTY
DTHVNKTYPVDMSPFTFTWKNSKL (SEQ ID NO:229)
```

表現載體(pLKTOK107)提供C端IgG1Fc區與GCC序列融合。此載體包含外顯子，其中IgG1鉸鏈、CH2及CH3域經突變以消除該外顯子中CH1片段之未配對半胱胺酸。此IgG1Fc區在離胺酸235及甘胺酸237處進一步突變為丙胺酸。該構築體在轉染有SV40 T-抗原之基因的人類胚腎(HEK)293細胞中重組表現為分泌型GCC序列(SEQ ID NO:228之胺基酸殘基24至430)融合於C端人類IgG1 Fc。藉由蛋白質A層析及尺寸排阻層析純化該蛋白質(稱作TOK107-hIg，替代名稱hGCC-ECD/hIgG1 Fc，SEQ ID NO:317)。

亦可藉由將上述融合蛋白次選殖於允許鼠類IgG2a跨膜區融合於C端上的表現載體(諸如pLKTOK111)中來製備GCC抗原。當此構築體在CHO細胞中重組表現時，於細胞

表面上偵測到GCC細胞外域。當pLKTOK111載體與包含鼠類CD79a(MB-1)及CD79b(B29)之pLKTOK123共轉染時，達成GCC-Ig融合蛋白(SEQ ID NO:318)之高細胞表面表現。使用來自此轉染之純系#27(CHO-GCC#27)作為免疫原。亦可使用HT-29-GCC#2細胞作為免疫原。

為藉由ELISA對融合瘤上清液及經純化之mAb進行篩選，將編碼GCC融合構築體之核酸選殖於pCMV1表現載體(Sigma)中。亦將純化標籤：FLAG標籤(N端)及His標籤(C端)選殖於構築體中。將融合蛋白構築體轉染至293細胞中，表現，且用抗FLAG®M2-瓊脂糖親和管柱(Sigma)純化重組蛋白。

試劑及細胞株。HEK293細胞、CHO及T84人類結腸癌細胞係自ATCC獲得且根據ATCC方案維持。

小鼠：雌性C57BL/6小鼠(4-6週齡)購自Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY)用於產生鼠類融合瘤。室內飼養至4-6週齡且產生人類IgG2抗體之異種移植小鼠(Xenomice)係獲自Abgenix, Inc.(Fremont, CA)用於產生人類融合瘤。所有動物係根據Millennium Pharmaceuticals, Inc之研究動物使用與管理委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)的準則獲得及飼養。

細胞株：用於功能檢定之細胞株為GCC轉染細胞及載體對照HEK293或HT29細胞的細胞對。用受EF-1 α 啟動子控制之全長GCC或用空載體(pLKTOK4)轉染HT29細胞且於G418中選擇。證實此等細胞中之GCC當與ST肽(1-18或5-



18)接觸時具有cGMP反應。用受CMV啟動子控制之全長GCC或用空載體(pN8mycSV40)轉染HEK293細胞且於殺稻瘟菌素(blasticidin)中選擇。此等細胞中之GCC具有myc標籤。選用於最高GCC表現的純系為293-GCC#2、HT29-GCC#2及HT29-GCC#5。亦使用HT29-GCC#2作為產生抗-GCC抗體分子之免疫原。其他GCC表現細胞為CT26細胞。為產生表現GCC之CT26細胞株，使用pTOK58D載體。將全長GCC選殖於通常用於重鏈選殖之位點中且將螢光素酶選殖於通常用於輕鏈選殖之位點中。轉染至CT26細胞中後，證實GCC與螢光素酶均獨立表現。藉由流動式細胞測量術使用5F9抗體證實GCC之表面表現。選擇純系#32用於進一步研究。

T84結腸癌細胞株內源性表現GCC。在一組廣泛的細胞株中對GCC進行的Taqman分析揭示T84為唯一表現GCC之mRNA的細胞株。在T84細胞之細胞集結塊上用GCC選擇性mAb對GCC染色顯示顯著GCC蛋白表現。

用經放射性標記之配位體(ST-毒素)對GCC受體含量進行定量表明293-GCC#2細胞所表現之GCC多於T84細胞，而HT29-GCC#2或#5每個細胞表現之GCC分子最少。

細胞株	全細胞結合檢定(受體/細胞)
HT-29-GCC#2/#5	100,000
T84內源性GCC	300,000
293-GCC	600,000

藉由蛋白質免疫產生鼠類mAb：將人類GCC細胞外域/

人類Ig融合蛋白(TOK107-hIg, 50 µg)懸浮於杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝生理食鹽水(Dulbecco's phosphate buffered saline)(PBS; GIBCO, Grand Island, NY)中且用等體積完全傅氏佐劑(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)乳化。藉由在三個皮下部位及一個腹膜內(i.p.)部位注射該乳液對C57BL/6小鼠進行免疫。初始免疫後兩週, 用含25 µg TOK107-hIg之不完全傅氏佐劑對小鼠進行腹膜內增強免疫。一週後, 自尾靜脈收集少量血液且藉由ELISA滴定針對TOK107-Ig之血清結合活性。將力價超過1:24,300(藉由ELISA)或1:500(藉由FACS)之小鼠選用於融合。所選小鼠藉由注射含25 µg TOK107-hIg之PBS進行增強。四天後, 對一隻小鼠實施安樂死, 製備脾細胞懸浮液且用PBS洗滌以供與P3細胞融合。一個月後, 自另一隻小鼠製備脾細胞以供與P3細胞融合。測試融合細胞的特異性結合於GCC之抗體的產生, 對於與非GCC抗原或IgG之Fc區相比較測試與TOK107-hIg之結合藉由ELISA進行, 且對於與載體對照組相比較及與不表現GCC之MCF-7細胞相比較測試與T84細胞或Caco-2細胞或HT-29純系#2細胞之結合藉由FACS進行。使用ISOSTRIP®小鼠單株抗體同型分析套組(Roche Diagnostics Mannheim Germany)測定同型。此等免疫方案及融合瘤融合物產生1D3、8E12、3G1及10B8鼠類抗-GCC抗體分子。

產生人類mAb。對XENOMOUSE遺傳工程改造小鼠(Abgenix, Fremont, CA)(8至10週齡)進行免疫以產生人類



單株抗體。參見Mendez等人, *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green及Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)。可使用若干種免疫方案。在一種方案中, 將100微克人類GC-C細胞外域/人類Ig融合蛋白(TOK107-hIg)懸浮於杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS; GIBCO, Grand Island, NY)中且用等體積完全傅氏佐劑(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)乳化。藉由在三個皮下部位、尾基及一個腹膜內(i.p.)部位注射該乳液對XENOMOUSETM進行免疫。初始免疫之後14天, 用含50 µg TOK107-hIg之不完全傅氏佐劑對小鼠進行增強免疫。血清測試指示力價不足, 故中止數週後, 給與50 µg人類TOK107-hIg的第二次增強免疫。兩週後, 自尾靜脈收集少量血液, 藉由ELISA滴定針對TOK107-Ig之血清活性且藉由FACS滴定針對HT29-GCC#2細胞的血清活性。將力價超過1:24,300(藉由ELISA)或1:500(藉由FACS)之小鼠選用於融合。增強之後約三個月, 用含 10^7 個HT 29 #2細胞之不完全傅氏佐劑對小鼠進行增強, 且次日用含50 µg TOK107-hIg之不完全傅氏佐劑進行增強。用此方案免疫之小鼠產生5F9及1D2人類抗-GCC抗體分子。用此方案免疫之小鼠產生5F9及1D2人類抗-GCC抗體分子。

四天後, 對該小鼠實施安樂死, 製備脾細胞懸浮液且用PBS洗滌以供進行融合。測試融合細胞的特異性結合於GCC之抗體的產生, 對於與非GCC抗原或IgG之Fc區相比較測試與TOK107-hIg之結合藉由ELISA進行, 且對於與載

體對照組相比較及與不表現GCC之MCF-7細胞相比較測試與T84細胞或HT-29純系#2細胞之結合藉由FACS進行。使用ELISA或藉由FACS使用IgG或IgM特異性二次抗體測定同型。用此方案免疫之小鼠產生5F9及1D2人類抗-GCC抗體分子。

在另一方案中，兩次使用包含pkTOK111載體且表面表現GCC細胞外域之CHO-GCC#27細胞(5×10^6 個)作為免疫原，其中BIP(尾基+腹膜內)免疫之間間隔兩週。進行血液取樣以藉由ELISA鑑別針對TOK107-hIg之抗-GCC反應性之後，用HT-29 GCC #2細胞對小鼠進行增強(前一次增強之後三週或兩個月以上)。最後一次增強之後四天，收集各別脾以供進行細胞融合。測試融合細胞的特異性結合於GCC之抗體的製備，對於與非GCC抗原或IgG之Fc區相比較測試與TOK107-hIg之結合藉由ELISA進行，且對於與載體對照組、T84細胞或與不表現GCC之MCF-7細胞相比較測試與HT-29純系#2細胞之結合藉由FACS進行。使用ELISA測定同型。此等免疫方案及融合瘤融合物產生5H3、6H8、8C2、10C10、10D3及1C9人類抗-GCC抗體分子。

產生人類mAb之融合瘤：對脾細胞進行計數且將其與不能分泌重鏈或輕鏈免疫球蛋白鏈之SP 2/0骨髓瘤細胞(ATCC編號CRL8-006，Rockville, MD)以2:1之脾:骨髓瘤比率混合。根據標準程序使細胞在聚乙二醇1450(ATCC)存在下，於12個96孔組織培養板中，在HAT選擇培養基中融



合。在融合之後第10天與第21天之間，融合瘤群落變得可見，且收集培養物上清液，隨後藉由ELISA及FACS進行篩選。

基於SLAM技術的抗體產生：亦可藉由Abgenix之SLAM技術(Babcock等人, PNAS 93:7843-7848 (1996))分離單株抗體。此方法之初始步驟為藉由下述方案之一用GCC抗原對XENOMOUSE小鼠進行免疫。隨後SLAM(選擇淋巴細胞抗體法)步驟涉及首先在一大群淋巴細胞內鑑別產生具有所要特異性或功能之抗體的單個淋巴細胞，隨後自該淋巴細胞獲取編碼該抗體特異性之遺傳資訊。擴增該種淋巴細胞(最初產生IgG2或IgG4抗體)之可變區且轉移至具有IgG1同型之載體中。

SLAM抗體(例如 Abx-229、-012、-221、-020、-338、-106、-198或-393)之免疫方案包括使用結合於匙孔螺血凝蛋白之TOK-hIg或TOK-hIg。免疫係經由足墊或尾基與腹膜內之組合達成。初始免疫10 µg免疫原包括TITERMAX®金佐劑或完全傅氏佐劑。使用礬、TITERMAX®金佐劑或不完全傅氏佐劑用5 µg免疫原執行六至八次增強免疫。若TITERMAX金為初始佐劑，則礬為增強佐劑且以3至4天間隔進行增強免疫。若初始免疫及增強免疫相繼使用完全傅氏佐劑及不完全傅氏佐劑，則所執行增強免疫之間的時間間隔為約兩週。第四至第六次增強免疫時之力價的血清測試之後有時另外再進行增強免疫。四天後收集之前的最後一次增強免疫使用含免疫原之PBS。

藉由 ELISA 對 mAb 進行分析。用每孔 50 μ l 2 μ g/ml TOK107-hIg 溶液(每孔 0.1 μ g TOK107-hIg)塗佈高蛋白質結合 96 孔 EIA 板(Costar/Corning, Inc. Corning, NY)且在 4°C 下培育隔夜。吸出過量溶液且用 PBS/0.05% Tween-20(三次)洗滌板，隨後在室溫(RT)下用 1% 牛血清白蛋白(BSA，部分 V，Sigma Chemical Co., MO)阻斷 1 小時以抑制非特異性結合。移除 BSA 溶液，且每孔添加 50 μ l 來自各融合物板孔的融合瘤上清液。隨後在 37°C 下培育板 45 分鐘且用 PBS/0.05% Tween-20 洗滌三次。向各孔中添加用 1% BSA/PBS 以 1:4000 稀釋的結合辣根過氧化酶(HRP)之山羊抗小鼠或抗人類 IgG F(ab)2(H 及 L)(Jackson Research Laboratories, Inc., West Grove, PA)，隨後在 37°C 下培育板 45 分鐘。洗滌後，每孔添加 50 μ l ABTS 溶液(Zymed, South San Francisco, CA)。在 Vmax 微量滴定板讀取器(Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA)上評估 405 nm 下陽性孔之綠色的強度。隨後將所有提供陽性反應之融合瘤孔擴展為 24 孔培養物，藉由限制稀釋進行次選殖且藉由 ELISA 及 FACS 進行分析。進一步擴展三個最佳產生次純系。

藉由流動式細胞測量術對 mAb 進行分析。平行於 ELISA 篩選，對所有融合物板上清液進行流動式細胞測量術(FACS)篩選。使 HT-29 純系 #2 或未轉染之 HT-29 細胞在 T225 燒瓶(Costar/Corning, Inc., Corning, NY)中補充 10% 胎牛血清(GIBCO)的 DMEM(GIBCO)中生長。使用維耳新(Versene, GIBCO)使細胞自燒瓶表面脫落，收集且用



DMEM洗滌兩次，隨後用1% BSA/PBS溶液洗滌一次。將細胞再懸浮於1% BSA/PBS中，且向V形底96孔板(Costar)之各孔中添加 2×10^6 個細胞，且在2500 RPM下離心5分鐘(洗滌)。去除洗滌液，且每孔添加50 μ l來自各融合物板孔洗滌液的上清液。應用板封口膜(Linbro/MP Biomedicals, LLC, Solon, OH)，且隨後溫和地渦旋培養板以使細胞再懸浮，並使細胞與上清液混合且在4°C(於冰上)下培育板30分鐘。隨後用冷1% BSA/PBS(三次)洗滌板，且在4°C下(於冰上，在黑暗中)向各孔中每孔添加50 μ l以1:50稀釋的結合FITC之驢抗小鼠IgG F(Ab)2(H及L)或結合FITC之山羊抗人類IgG F(Ab)2(H及L)(Jackson)歷時30分鐘。再次用冷1% BSA/PBS洗滌板三次且固定於冷1%三聚甲醛(Sigma)/PBS中。將細胞轉移至排管(cluster tube, Costar)且在FACScalibur流動式細胞儀(Becton Dickinson, San Jose, CA)上分析。隨後將顯示陽性轉變的任何融合瘤孔擴展為24孔培養物，藉由限制稀釋進行次選殖。

內化檢定。在GCC表現細胞與載體對照細胞中使用免疫螢光顯微術測試抗-GCC抗體分子之內化。使細胞於蓋玻片上生長，且置於冰上10分鐘，隨後與10 μ g/ml抗體一起在冰上於冷培養基中培育20分鐘。為進行內化，將含抗體培養基置換為新鮮培養基，且將細胞變為37°C培育2-3小時或維持於冰上。用PBS沖洗且在室溫下於4%三聚甲醛中短暫固定之後，在0.5% TRITON X-100中使細胞滲透化(permeabilize)15分鐘。藉由雷射掃描共焦顯微術使用經螢

光標記之抗IgG抗體確定測試抗體之位置。當於冰上時，抗體分子定位於GCC表現細胞的細胞表面。在37°C下培育時，5F9在細胞膜內顯示斑點染色，指示發生了內化。載體細胞未偵測到內化。

抗-GCC抗體分子特性之概述。在上述多種檢定中測試了大多數本文產生之抗體。表7概述各自之活體外特性。(T84 =人類結腸腫瘤細胞，MCF7 =人類乳房腫瘤細胞，WB =西方墨點法，IP =免疫沈澱，IHC =免疫組織化學；內化使用T84細胞與MCF-7細胞相比較)

表7. 抗-GCC抗體分子之特性

Ab	ELISA		FACS							
	TOK1 07-hIg	TOK82 -hIg	HT- 29#2	HT- 29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	內化
8F1	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+		+	
3G1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10B8	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
5H3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6H8	+	-	+	-	+	-	-	+		+
8C2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10C10	-	-	+	-	+	-	-	+		
10D3	+	-	+	-	+	-	+	+		
1D2	+	-	+	-	+	-	-	+		
4A12	+	-	+	-	+	-	-	+		
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1C9	+	-	+	-	+	-	-	+		
Abx-012	+		+				-	+	+	+
Abx-015	+		-				+	+		
Abx-020	+		+				-	+		+
Abx-106	+		+					+		-
Abx-198	+		+					+		+
Abx-221	+		+					+		+
Abx-229	+		+					+		+
Abx-252	+		+					+		+
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

此外，在GCC表現細胞中測試了一些抗體抑制ST肽誘導



之鈣離子流出的能力。在HT29-GCC#18中，在50 nM ST存在下，在抗-GCC抗體分子存在或不存在下執行cGMP檢定。5F9對鈣離子流出存在劑量依賴性抑制。其他抗體5H3及Abx-338亦抑制ST誘導之鈣離子流出。

估算抗-GCC抗體分子之相對親和力。對於TOK107-hIg自ELISA量測值且對於GCC表現細胞用FACS量測值估算一些抗-GCC抗體分子之相對親和力(EC50；半數最大結合之抗體濃度)。下表顯示一些結果。

表 8. 抗-GCC抗體分子之EC50

抗體	EC50, TOK107-hIg, M	EC50, 細胞, M
5F9	3.65×10^{-8}	1.24×10^{-9}
5H3	4.16×10^{-9}	4.7×10^{-7}
Abx-338	4.9×10^{-12}	9.0×10^{-8}
3G1	2.28×10^{-8}	5.8×10^{-10}
Abx-229	2.95×10^{-8}	
Abx-221	6.55×10^{-9}	
Abx-020	4.58×10^{-9}	
Abx-012	5.55×10^{-10}	
Abx-198	4.77×10^{-8}	

量測抗-GCC抗體分子之親和力。在22℃下使用BIACORE™ T100系統(GE Healthcare, Piscataway, NJ)量測抗-GCC 5F9抗體之親和力。

步驟1：用10 mM乙酸鈉(pH 4.0)稀釋MAb 5F9(Prep A)至20 µg/mL，且用10 mM乙酸鈉(pH 4.0)稀釋參考5F9 MAb(Prep B)至10 µg/mL。使用標準胺偶合使各mAb共價固定於若干個CM4 BIACORE晶片。對於所製備之各CM4晶片，Prep A 5F9以約75-100 RU固定在兩個流槽上，而Prep B 5F9以約70-80 RU固定於一個流槽。使用各CM4晶

片之剩餘第四流槽作為參考流槽。

步驟2：使用 Pace 等人, *Protein Science*, 4:2411 (1995)、及 Pace 及 Grimsley, *Current Protocols in Protein Science* 3.1.1-3.1.9 (2003) 詳述之方法測定 GCC-ECD-Fc(TOK107-hIg)之儲備濃度。

步驟3：對於步驟1中所述製備之各CM4晶片，注射濃度範圍為202 nM-1.6 nM(2倍連續稀釋)之GCC-ECD-Fc歷時2分鐘，繼而進行7分鐘解離。一式三份隨機注射樣品，其中交替有若干個緩衝液注射循環，以供雙重參考。為獲得更顯著之解離速率下降(off-rate decay)資料，執行三次額外的101 nM GCC-ECD-Fc注射及三次額外的緩衝液注射，其中注射時間為2分鐘且解離時間為4小時。對於所有實驗使用100 μ L/min之流速，且所有表面均用20秒之10 mM甘胺酸-HCl(pH 2.0)脈衝再生。所有樣品均在操作緩衝液中製備，該操作緩衝液為添加有100 μ g/mL BSA的Hepes緩衝生理食鹽水、0.005%聚山梨醇酯20(pH 7.4)(HBS-P)。

步驟4：所有感測器圖譜(表面電漿子共振相對於時間之圖)資料均用 Scrubber 2.0 軟體 (BioLogic Software, Campbell, Australia)處理，且使用 CLAMP™ 軟體 (Myszka 及 Morton *Trends Biochem. Sci.* 23:149-150 (1998))全面擬合成1:1相互作用模型(納入項質量傳輸常數 k_m)。

在mAb固定量保持足夠低以使各表面由全面分析感測器圖譜資料產生之 R_{max} 至少低於12 RU時，1:1模型提供資料之極佳擬合。在大多數情況下，兩個Prep A 5F9表面之一



的 $R_{\max}$ 過低 (低於 2 RU) 而不能獲得可靠的動力學量測值。然而，只要有可能，就要將來自結合於同一 CM4 晶片上之 Prep A 5F9 的 GCC-ECD-Fc 的兩個流槽的資料同時擬合。當 mAb 表面經製備得到較高 $R_{\max}$ (>12 RU) 時，感測器圖譜明顯展示複雜的動力學且因此 1:1 模型擬合該等資料不佳。此並不令人驚訝，因為實情為 GCC-ECD-Fc 為二價構築體，且經固定 mAb 之較高表面密度很可能使 GCC-ECD-Fc 過度結合於該表面的可能性增加。對此研究報導之重複實驗僅包括良好地擬合成 1:1 相互作用模型的資料。關於 Prep A 5F9 及 Prep B 參考 mAb 的所有重複實驗所得之 K_D 值及速率常數分別列於表 9 及表 10 中。

表 9：結合於經固定 Prep A 5F9 mAb 之 GCC-Fc

重複實驗	$R_{\max}$ (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(pM)$
A	11	1.06×10^5	1.19×10^{-5}	112
B	8	1.20×10^5	1.10×10^{-5}	91.7
C	5	1.07×10^5	2.15×10^{-5}	201
D	9	1.22×10^5	1.11×10^{-5}	91.0
E	6,4	9.64×10^4	1.77×10^{-5}	184
平均值(95%信賴區間)		$1.10(0.13) \times 10^5$	$1.46(0.59) \times 10^{-5}$	136(65)

表 10：結合於經固定 Prep B 5F9 mAb 之 GCC-Fc

重複實驗	$R_{\max}$ (RU)	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(pM)$
F	9	9.68×10^4	7.64×10^{-6}	78.9
G	8	1.20×10^5	1.24×10^{-5}	103
H	7	9.09×10^4	9.57×10^{-6}	105
I	12	1.21×10^5	1.54×10^{-5}	127
平均值(95%信賴區間)		$1.07(0.25) \times 10^5$	$1.13(0.54) \times 10^{-5}$	103(31)

毒素與抗體之結合

美登素。根據如美國專利第 6,441,163 號中所述製備類美登素之細胞毒性結合物的單步驟方法，產生小鼠抗人類

(MAH)-IgG-DM1及抗-GCC-DM1。

簡言之，使用公開程序使類美登素結合於抗體。使用SMCC雜雙官能交聯劑(丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯；Chari等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992))使DM1結合於抗體。使用SPDB雜雙官能交聯劑(Widdison等人，*J. Med. Chem.* 49:4392-4408 (2006))使DM4結合於抗體。藉由凝膠過濾層析法，使用SEPHADEX™ G-25管柱分離已結合之抗體與未反應之反應副產物。

奧瑞他汀。可使用公開程序(例如Doronina等人，*Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003))結合奧瑞他汀。一般而言，使奧瑞他汀連接於抗體鏈之半胱胺酸。與半胱胺酸之連接法首先係還原抗體分子中之二硫鍵。控制還原過程可設法限制一些(但不必所有)鏈間二硫鍵之還原。因此，奧瑞他汀能夠結合於游離半胱胺酸。淬滅結合反應，繼而移除反應副產物且進行緩衝液交換，得到所要調配物。

簡言之，由7.6 mg/mL之抗-GCC抗體分子在37°C下預先平衡，隨後添加15體積%之500 mM硼酸鈉(pH 8.0)，使pH值升至7.5-8.0。該溶液亦含有1 mM DTPA。藉由相應於每莫耳抗-GCC抗體分子添加2.6當量參(2-羧基乙基)膦(TCEP)且在37°C下攪拌，使抗體部分還原。28分鐘後，將經還原抗-GCC抗體分子之溶液置於冰上，隨後立即用4.8-4.9莫耳當量(相對於抗-GCC抗體分子)之藥物連接子(例如mc-vc-MMAF或mc-vc-MMAE或mc-MMAF)處理為20.5 mM



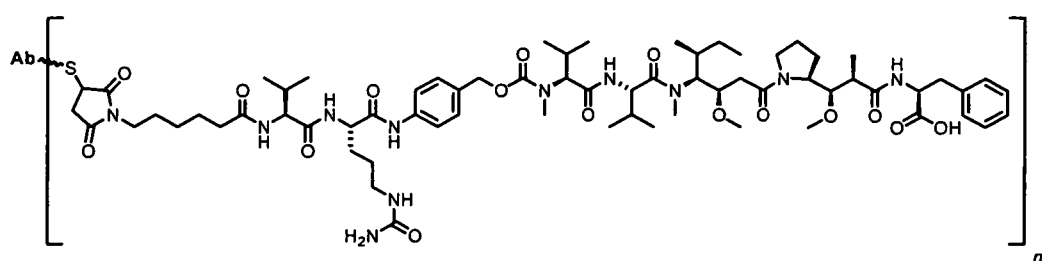
之DMSO溶液。再引入DMSO，使混合物含有10體積%之DMSO。於冰上攪拌反應混合物約90分鐘，隨後用5倍莫耳過量之N-乙醯基半胱胺酸(相對於mc-vc-MMAF)處理。藉由切向流動過濾分離結合物，首先濃縮至約10 mg/mL，隨後用約10置換體積之PBS透濾。所得抗體藥物結合物之平均藥物負載率為每個抗體負載有約四個藥物-連接子單元。為方便起見，在以下實例及附圖中，奧瑞他汀免疫結合物以如下簡寫形式提及，而與藥物負載率無關：「Ab-vc-MMAF」係指抗-GCC抗體分子與mc-vc-MMAF結合；「Ab-vc-MMAE」係指抗-GCC抗體分子與mc-vc-MMAE結合；且「Ab-mc-MMAF」係指抗-GCC抗體分子與mc-MMAF結合。包含特異性抗-GCC抗體分子之免疫結合物以相同形式提及，例如5F9-vc-MMAF、5F9-vc-MMAE及5F9-mc-MMAF。

為製備平均藥物負載率為每個抗體負載有約兩個藥物-連接子單元的抗體藥物結合物，(以上)方案修改為TCEP之量減少50%。藥物連接子之量亦減少50%。相應的抗體藥物結合物簡寫為Ab-vc-MMAF(2)。

製備5F9 vcMMAE

使用類似於上文所述一般方法之方法，使用本文所述之vc(Val-Cit)連接子使5F9 mAb結合於稱作MMAE之奧瑞他汀衍生物(式(XIII))，產生稱作5F9 vcMMAE之免疫結合物。如先前所述(參見例如US 2006/0074008)完成vc連接子與MMAE(Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA)之結合。

簡言之，用 0.3 M 磷酸氫二鈉將 5F9 mAb 於 100 mM 乙酸鹽中之 17.8 mg/mL 溶液 (pH 5.8) 調整至 pH 8，得到 11.3 mg/mL 之最終 mAb 濃度。隨後，添加 DTPA 以使其在反應混合物中之最終濃度為 1 mM。隨後藉由添加 2.28 莫耳當量 TCEP (相對於 mAb 之莫耳數) 使 mAb 部分還原，隨後在 37°C 下攪拌 1.5 小時。隨後將部分還原之 mAb 溶液冷卻至 4°C，且添加 4.4 莫耳當量之 vcMMAE (相對於抗體之莫耳數) 得到 20.3 mM 之 DMSO 溶液。在 22°C 下攪拌混合物 30 分鐘，隨後在添加 5 莫耳當量 N-乙醯基半胱胺酸 (相對於 vcMMAE 之莫耳數) 之後再攪拌 15 分鐘。藉由用 10 置換體積之 PBS (pH 7.4) 對免疫結合物進行超濾 / 透濾移除過量已淬滅之 vcMMAE 及其他反應組分。所得免疫結合物稱作 5F9 vcMMAE 且具有下式：



其中 Ab 為 5F9 mAb，且 m 為 1 至 8。平均藥物負載率 (m) 為約 3.6。

細胞毒性檢定。為量測各抗體結合、內化及殺滅目標表現細胞之能力，進行細胞毒性檢定。在此檢定中，將細胞與各種濃度的未結合一次抗-GCC 抗體及固定無毒濃度之結合 DM1 的抗人類 Fc 二次抗體 (間接細胞毒性) 或各種濃度之結合毒素的抗-GCC mAb (直接細胞毒性) 一起培育。培育

4天後，藉由WST檢定量測細胞活力。人類抗-GCC抗體對293-GCC#2細胞之相對功效展示於表8中，且使用結合DM1之小鼠抗人類IgG mAb(MAH-IgG係自純系HP607(CRL1753，ATCC)純化)測定。5F9及229為最有效之抗-GCC mAb，其中LD50值為26及78 pM。儘管本文未示，但誤差一般在此等平均值之20%以內，如重複實驗之範圍或多於2個重複實驗之標準差所量測。

表 11. 抗-GCC抗體對293-GCC#2細胞的細胞毒性檢定結果

抗-GCC Ab	LD50(pM)
5F9	26
229	78
106	166
221	207
338	267
12	279
20	569
5H3	722
10D3	1596
8C2	2038
10C10	2443
1D2	>3055
6H8	>4818
393	>5400
198	>5400

細胞表面結合。藉由間接免疫螢光檢定使用流動式細胞測量術來評估未結合之5F9或結合於奧瑞他汀之5F9的結合。將每孔 1×10^6 個細胞塗鋪於V形底96孔板中，且與1-0.001 $\mu\text{g/ml}$ 之連續抗體稀釋液一起於冰上培育1小時。用含3% FBS之冰冷PBS洗滌細胞兩次且與1:200小鼠抗人類PE IgG(Southern Biotech 2043-09)一起於冰上培育1小時。再次洗滌細胞且藉由流動式細胞測量術於BD FACS Canto

II流動式細胞儀上進行分析。使用FACS Canto II系統軟體對資料進行分析且測定平均螢光強度。

抗原決定基定位。啟動多種策略來鑑別抗原決定基。

肽陣列。產生具有15個aa重疊的20-mer肽，覆蓋GCC之細胞外域(ECD)至跨膜域(aa 1-440)。合成肽且提供為固定於玻璃載片上之陣列。使陣列與各抗-GCC抗體雜交以判定線性肽是否足以進行結合。Abx-198結合肽55及56，而3G1、8F1及10B8抗體結合肽55、56及57。此等肽涵蓋序列 ILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKNVLVLTLS(SEQ ID NO:225)。該等肽中重疊之區域為LEDNVTAPDY(SEQ ID NO:314)。Abx-012、Abx-338及Abx-106結合肽71及72。序列 FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV(SEQ ID NO:226)及序列 RNLTFEGYDGPVTLDD(SEQ ID NO:315)在該兩個肽中重疊。

細胞表面與GCC截短突變體之結合。產生呈經FLAG標記之構築體(pFLAG-CMV-3)形式之GCC ECD的截短突變體(FL成熟肽及8個截短形式(Δ 1-32、 Δ 1-49、 Δ 1-94、 Δ 1-128、 Δ 1-177、 Δ 1-226、 Δ 1-279、 Δ 1-229及 Δ 1-379)，代表以約50個aa為增量之缺失。使構築體於293細胞中表現，繼而藉由抗-GCC抗體分子進行免疫沈澱且對轉染有GCC ECD突變體之293細胞的溶胞物中的FLAG抗原決定基進行西方墨點分析。抗體5F9結合具有 Δ 1-32突變之細胞，但不結合具有 Δ 1-49突變之細胞。當該蛋白質在aa 33-50之間截斷時，5F9與GCC之結合喪失，表明此區域參與5F9對GCC

上其結合抗原決定基的識別。然而，因為大鼠及小鼠GCC序列與人類GCC在此區域中一致，且5F9不結合小鼠或大鼠GCC，故5F9抗體可能結合因存在人類GCC之胺基酸33至50而形成的構形抗原決定基。

實例2.毒素-連接子選擇/ADC表徵

在抗體藥物結合物(ADC)策略中，高度有效毒素結合於抗體，毒素之細胞毒性可以目標特異性方式引導至腫瘤，從而將毒素傳遞至表現抗原之腫瘤細胞而不會影響正常組織中之抗原陰性細胞，從而降低全身性毒性。奧瑞他汀(海兔毒素10之類似物)及美登素類毒素以與抗-GCC mAb結合之ADC形式進行評估。此等毒素均為微管聚合之抑制劑，可充當抗有絲分裂劑。使細胞與游離毒素接觸的測試表明游離毒素之細胞毒性不能區分表現GCC之細胞與無GCC之對照細胞。此等游離毒素對293-載體、293-GCC#2細胞有效，且在HT29-載體及HT29-GCC#5細胞中有效，如表9所示。

表12. 游離毒素之細胞毒性

細胞株	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD
293載體	0.07	6	3.37	2.34	2.83	2.00	0.79	0.79
293 GCC#2	4	3	2.07	1.48	2.96	2.23	0.83	1.03
HT29	4	1	5.21	1.91	2.69	1.09	0.57	0.27
HT29 GCC#5	7	4	7.65	3.32	1.00	0.14	0.40	0.17

藉以使不同毒素結合於抗體之化學不同且影響連接子穩定性。連接子穩定性藉由影響血液或非目標組織中之藥物釋放與腫瘤處之藥物釋放而影響治療窗。理想的ADC連接

子在血液中具有高穩定性，但在經目標介導進入細胞後有效釋放。

奧瑞他汀

評估了三種奧瑞他汀-連接子對。為首先在活體外評估此等結合物，並隨後確定何種毒素-連接子用於大規模活體內研究，使 5F9 結合於 vcMMAE、vcMMAF 及 mcMMAF(每種結合物使用 20 mg)。

奧瑞他汀為與天然產物海兔毒素 10 有關之合成毒素。MMAE 與 MMAF 稍微不同，其中 MMAF 形式在 R2 位置具有羧酸基團，從而降低了游離毒素的細胞滲透性及效能。MMAE 為 Pgp 藥物泵受質，而 MMAF 不為 Pgp 藥物泵受質。

奧瑞他汀經由如下方法結合於鏈間半胱胺酸：部分抗體還原，與順丁烯二醯亞胺基藥物衍生物反應，用過量半胱胺酸淬滅，濃縮且緩衝液交換至 PBS 中。奧瑞他汀可與在細胞攝取後裂解的組織蛋白酶 B 敏感性二肽連接子或與不可裂解連接子連接。

在 vc 單甲基奧瑞他汀連接子中，纈胺酸瓜胺酸二肽鍵聯經由胺基甲酸對胺基苯甲酯(PAB)基團連接於藥物，且經由順丁烯二醯亞胺基己醯基結合基團連接於抗體。內化後，二肽連接子由溶酶體蛋白酶組織蛋白酶 B 裂解，PAB 基團自毀且釋放游離毒素。此連接子設計成可維持血清穩定性，同時使由組織蛋白酶 B 釋放之細胞內藥物達到最大限度。

奧瑞他汀亦可經由不可裂解連接子連接於抗體，諸如



MMAF不經肽酶敏感性連接子直接連接於順丁烯二醯亞胺基結合基團。結合MC之ADC在目標介導之細胞殺滅方面亦有效。

認為不可裂解奧瑞他汀結合物之藥物釋放機制為經由溶酶體中之一般性抗體降解。經由LC/MS研究，已報導Ab-mcMMAF結合物釋放呈單半胱胺酸加合物形式的毒素。

抗體藥物結合物之結合

所有 5F9 抗體藥物結合物均同樣良好地結合於 293-GCC#2細胞。表 10 展示 293-GCC#2細胞上遞增濃度之 5F9 結合物之平均螢光強度。其他研究確定 5F9-SPDB-DM4 結合物以濃度依賴性方式結合 293-GCC#2細胞，而 209-SPDB-DM4 抗體不結合該等細胞。

表 13. 來自 293 GCC #2細胞中 5F9及 5F9結合物之結合檢定的MFI的圖表：

	5F9或5F9結合物(μg/ml)					
	0.001	0.004	0.016	0.063	0.25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

在多種轉染有GCC核酸且選用於表現GCC之細胞的直接細胞毒性檢定中測試5F9-奧瑞他汀毒素結合物。審視GCC之表面表現量發現293 GCC#2細胞表現高含量之GCC；HT 29 #2及CT 26 #2.5細胞表現中等至低含量之GCC；CT 26 #32細胞表現高含量之GCC；而HT 29 GCC #5及HT 29 GCC #18表現低含量之GCC。表11展示得到三種奧瑞他汀

結合物在目標表現細胞或在野生型細胞或載體對照細胞中之細胞毒性資料的多個研究的彙編。在結合5F9之毒素的所有情況下均觀測到對293 GCC #2細胞的目標殺滅增強，當使用MMAF時相對於MMAE治療窗大大增加。可裂解與不可裂解形式之MMAF均類似地有效。作為陰性對照組，抗體藥物結合物亦用sc209抗體製成，該抗體為針對不相關目標產生且對GCC無反應性的人類IgG1單株抗體。用209 ADC與5F9 vcMMAF ADC進行之直接細胞毒性檢定展示在293細胞模型及HT29細胞模型中目標細胞殺滅增強。在細胞株間對結合5F9之毒素之活性進行比較表明細胞毒性程度與細胞表現之GCC量在一定程度上相關。此等資料表明至少一些表現最多GCC之細胞株比表現較低量之GCC的細胞更易受結合物之細胞毒性活性影響。關於每個細胞之相對GCC數目請參見實例1。細胞毒性程度差異之另一因素可能為結合物之內化或細胞內處理的差異，在野生型細胞株中結合物之內化或細胞內處理可能不同。

表14. 抗-GCC奧瑞他汀ADC之細胞毒性。

細胞株	5F9結合物之LD 50(nM)			209結合物之LD50(nM)
	vcMMAE	vcMMAF	mcMMAF	
293載體	128	> 10	> 10	
293 GCC # 2	0.37	0.001	0.002	
293載體	1.8	>10	>10	
293 GCC # 2	0.13	0.005	0.007	
293載體		>10		>10
293 GCC # 2		0.0004		>10

HT 29 WT	84	> 10	> 10	
HT 29 GCC #2	24.1	0.127	3.1	
CT 26 WT	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #2.5	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #32	267	0.004	0.064	
HT 29載體	520.6	> 10,000	> 10,000	
HT 29 GCC #5	653.5	563.2	> 10,000	
HT 29 GCC #18	554.6	> 10,000	> 10,000	
HT29	0.93	>10	>10	
HT29 GCC#5	0.59	0.32	>10	
HT29		>10		>10
HT29 GCC#5		0.035		>10

若此等效能轉化成活體內，其中mc與vcMMAF之間功效相等，則mcMMAF之較高預期MTD將表明此結合物之治療窗較大。

美登素

5F9-美登素ADC展示在293-GCC#2細胞中有效目標殺滅增強(表12)。有趣的是，5F9-美登素結合物在293模型中均展示目標殺滅增強，然而在HT29模型中未觀測到目標殺滅增強，從而產生對此模型用於活體內評估美登素結合物之效用的擔憂。此外，此差異之原因不易解釋，但可能歸因於不同受體密度及/或結合物在細胞內之內化或處理的差異。作為陰性對照組，抗體藥物結合物亦用sc209抗體製成，該抗體為針對不相關目標產生且對GCC無反應性的人類IgG1單株抗體。用209 ADC與5F9 ADC進行之直接細胞毒性檢定展示在293細胞模型中所有5F9結合物均達成目標細胞殺滅增強。在HT29細胞模型中，5F9-DMx結合物及209-DMx結合物能同等良好地殺滅，表明在此等細胞中為

非目標特異性殺滅機制。

表 15 抗 -GCC 美登素 ADC 之細胞毒性

細胞株	LD50(nM)			
	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
293 載體	25.3		10.4	
293 GCC#2	<0.004		<0.004	
293 載體	32	11	13	7.4
293 GCC#2	<0.000004	6.7	<0.000004	4.8
HT29	22.4		7.7	
HT29 GCC#5	20.8		9.1	
HT29	22	12	4.8	2.1
HT29 GCC#5	30	22	5.8	4.2

實例 3：活體內評估

腫瘤模型：

在小鼠異種移植模型中評估 5F9 ADC 之活體內細胞毒性。用 HT29-GCC#5 及 #18 細胞株進行初始活體內研究。亦測試 293-GCC#2 細胞株之活體內生長，且將該細胞株發展為連續可移植套管針模型。

為解答異種移植模型中之 GCC 表現量是否與患有轉移性結腸癌之患者的 GCC 表現量有關的問題，藉由對異種移植組織、人類原發性結腸腫瘤及轉移進行 IHC 分析來比較 GCC 表現量。使用一組新鮮冷凍細胞株及組織藉由 rIHC 用針對 GCC 3G1 之小鼠 mAb 進行 GCC 定量。為進行 IHC 定量，使用半定量 0-3 評分系統進行評分。若腫瘤模型 GCC 含量 ≤ 臨床 GCC 含量，則模型建立可能為精確的或高估了臨床上所需之暴露。若腫瘤模型 GCC 含量 > 臨床 GCC 含量，則模型建立可能低估了臨床上所需之暴露。

雖然轉移性樣品中之 GCC 表現存在一定程度的可變性，

但HT29-GCC#5及#18細胞之表現在許多轉移性樣品之範圍內。藉由IHC，HT29-GCC#5及#18細胞上GCC之染色等於或少於轉移性細胞。此等資料表明吾等之腫瘤模型表現含量類似於metCRC之臨床樣品中發現之含量的GCC。

表16表示192小時時間點收集的各種組織之閃爍計數，其為所提供之三個動物的平均值。5F9相對於在HT29-載體腫瘤中優先在HT29-GCC#5腫瘤中積累，而209未展示很大差異之積累。所提供之此結果支持可預期5F9抗體藥物結合物於GCC表現腫瘤中積累。在所評估之所有其他組織中，5F9與mAb 209抗體積累程度之差異極小。

經放射性標記之5F9在帶有HT29-GCC#5及HT29-載體腫瘤之小鼠中的活體內分佈

在帶有腫瘤之小鼠中執行放射成像研究以評估抗-GCC抗體5F9及陰性對照抗體sc209(靶向不相關細胞表面目標之人類IgG1單株抗體)的腫瘤靶向及活體內生物分佈。使用DTPA作為雙官能螯合劑用¹¹¹In對抗體進行放射性標記。利用具有GCC(-)與GCC(+)腫瘤之鼠類雙腫瘤模型研究活體內行為，包括腫瘤靶向及在正常組織中隨時間之生物分佈。獲取活體內影像(SPECT/CT)，且使用組織放射性計數來補充空間解析率。

使皮下腫瘤生長於裸小鼠中，其中HT29-載體腫瘤在右邊而HT29-GCC#5腫瘤在左邊。以0.3 mCi =每隻動物15 µg給與抗體。每組有三隻動物，且在1小時、24小時、48小時、72小時、120小時及192小時對該等組進行收集。

審視192小時組中之動物的組織指示5F9與209在大多數正常組織(例如血液、心臟、胃、小腸、大腸、肌肉及皮膚)及HT29-載體對照腫瘤中積累程度類似。在肝臟中Ab 209之積累量略高於5F9，而在肺、脾及腎臟中5F9之積累量略高於209。在HT29-GCC#5腫瘤中，5F9優先積累，含量超過209含量兩倍。所提供之此結果支持可預期5F9抗體藥物結合物於GCC表現腫瘤中積累。

為瞭解腫瘤中抗體積累之動力學，針對整個研究之所有時間點獲得各抗體之腫瘤資料。展示積累之唯一組織為5F9抗體於GCC表現腫瘤中積累。在所有其他組織中放射性含量保持相對平穩，5F9含量與209含量之間差異極小。5F9優先於HT29-GCC#5腫瘤中積累，而209不展示任何積累。所提供之此結果支持可預期5F9抗體藥物結合物於GCC表現腫瘤中積累。

表 16. 經 ^{111}In 標記之 GCC 特異性 mAb 而非對照 mAb 於 GCC 表現腫瘤中積累。

	平均ID% 5F9	平均ID%對照IgG
1小時	2.816+/-0.133	2.494+/-0.167
24小時	3.057+/-0.107	3.010+/-0.630
72小時	4.485+/-1.029	3.564+/-0.152
120小時	5.162+/-1.012	3.412+/-0.048
192小時	6.550+/-1.015	2.782+/-0.085

經7天經放射性標記之5F9於GCC表現腫瘤中之積累支持每週一次給藥方案。

HT29-GCC#5皮下腫瘤中之預備功效研究

執行研究以確定帶有HT29-GCC#5腫瘤之小鼠中的有效



結合物及給藥方案。給與小鼠單次或多次劑量。此等研究確定以較高含量之毒素結合物過於頻繁地給藥(例如 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 5F9vcMMAF, 以 q3d $\times$ 5 時程)存在毒性。另一研究確定在此模型中 q14d $\times$ 5 時程頻率過低以致一些毒素結合物相對於對照組未展示顯著功效。此外, 在此模型中用類美登素-抗體結合物進行之PD研究顯示僅DM4毒素存在劑量依賴性磷酸化組蛋白積累, 而DM1毒素不存在。在此模型中之另一研究展示非特異性209-毒素結合物可在一定程度上抑制腫瘤生長。此等結果表明需要評估其他活體內模型。

用 5F9 ADC 在攜帶 293-GCC#2 腫瘤之小鼠中進行 PK/PD 研究。

替代性腫瘤模型使用 293-GCC#2 細胞。在帶有 293-GCC#2 腫瘤之小鼠中利用 5F9 ADC 進行 PD 研究。以 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 或 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 給與小鼠單次劑量之 5F9vcMMAF, 且在 1 小時至 4 天之時間點採集血清進行磷酸化組蛋白 H3 之 PD 分析來測試該毒素對腫瘤細胞之抗有絲分裂作用。藉由利用抗體 (Upstate Biotechnology, 現在 Millipore, Billerica, MA) 對腫瘤之石蠟包埋切片進行染色來偵測磷酸化組蛋白 H3。表 17 中之資料展示各 ADC 均可引起腫瘤中 pH3 陽性細胞群體顯著增加, 表明在 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 與 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 毒素劑量當量下該等 ADC 各自均能夠到達腫瘤且對腫瘤細胞具有所要抗有絲分裂作用。

表 17. PD反應，如藉由在單次靜脈內給與5F9 ADC後進行有絲分裂之細胞的阻滯(pH3陽性腫瘤細胞%)所評估。

	平均pH3陽性 腫瘤細胞%	SD
媒劑對照組	2.556801	2.37707
5F9-vcMMAE 75 µg/kg 1小時	4.525187	0.178882
4小時	2.551616	1.688255
8小時	4.243988	0.352938
24小時	9.8199	4.82057
48小時	8.692061	4.756786
96小時	8.628345	1.065456
5F9-vcMMAE 150 µg/kg 1小時	3.334943	1.351667
4小時	2.78543	1.690216
8小時	4.575611	1.130484
24小時	13.78776	3.343155
48小時	14.26067	5.448921
96小時	14.67942	1.827724
5F9-vcMMAF 75 µg/kg 1小時	4.235245	0.617585
4小時	4.18364	0.846752
8小時	4.930098	0.54746
24小時	20.22484	2.453935
48小時	9.920771	3.788795
96小時	10.38187	1.896461
5F9-vcMMAF 150 µg/kg 1小時	3.465674	1.341187
4小時	4.416646	0.807636
8小時	8.594385	4.005021
24小時	21.53718	7.25212
48小時	15.15814	4.28407
96小時	11.12288	2.150476
5F9-mcMMAF 75 µg/kg 1小時	5.365582	1.14198
4小時	4.044478	0.992449
8小時	8.228597	3.098222
24小時	14.10734	1.611093
48小時	19.37223	8.146504
96小時	7.749388	1.180759
5F9-mcMMAF 150 µg/kg 1小時	3.212482	0.509604
4小時	4.722554	1.577531
8小時	9.105349	5.963128
24小時	27.51416	10.96057
48小時	13.34043	3.414961
96小時	15.60917	3.386154



類似研究量測用 5F9vcMMAF、5F9-SPDB-DM4 及 5F9-SMCC-DM1 處理之帶有 293-GCC#2 腫瘤之小鼠中的磷酸化組蛋白含量。以 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 給與小鼠單次劑量，且在 1 小時至 21 天之時間點採集血清以對總抗體及結合毒素之抗體進行 PK 分析。293-GCC#2 腫瘤中磷酸化組蛋白 H3 陽性細胞之百分比回應於所有三種 ADC (5F9vcMMAF、5F9-SMCC-DM1 及 5F9-SPDB-DM4) 而增加。最大磷酸化組蛋白 H3 含量超過基線 3 至 5 倍，其中在注射後 24 小時達到峰值。

利用 5F9vcMMAF 及 5F9-DMx 於 293-GCC#2 皮下腫瘤中進行的功效研究

以兩種劑量 (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 毒素) 用 q14d $\times$ 5 時程測試 5F9-SPDB-DM4、5F9-SMCC-DM1 及 5F9vcMMAF 於 293-GCC#2 腫瘤模型中之功效。特定言之，此研究包括媒劑處理對照組、Sc209-DM1 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1 eq)、Sc209-DM4 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM4 eq)、Sc209-vcMMAF (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MMAF eq)、5F9-DM1 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1 eq)、5F9-DM1 (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1 eq)、5F9-DM4 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM4 eq)、5F9-DM4 (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM4 eq)、5F9-vcMMAF (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MMAF eq) 及 5F9-vcMMAF (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MMAF eq)。使用帶有 293-GCC#2 細胞之 Taconic 雌性小鼠 (每組 10 隻小鼠)。

圖 1 描繪用 5F9vc-MMAF、-DM1 及 -DM4 以 q14d 時程處理之帶有 293-GCC#2 之 SCID 小鼠中的腫瘤生長。觀測到 5F9-SPDB-DM4 在 293-GCC#2 模型中存在劑量依賴性功效，而 209-SPDB-DM4 對照組無作用。5F9-SMCC-DM1 亦有效，

但在 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 下遠低於 5F9-SPDB-DM4。5F9vcMMAF(75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 最有效，然而 209vcMMAF 亦具有一定程度的活性。因此，在此等劑量及時程下，5F9-SPDB-DM4 與其對照結合物具有最大有效性差異。

利用 5F9vcMMAF 及 5F9-DMx 於 293-GCC#2 皮下腫瘤中進行的功效研究

以兩種劑量(75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 毒素)用 q7d $\times$ 5 時程測試 5F9-SPDB-DM4 及 5F9-SMCC-DM1 於 293-GCC#2 腫瘤模型中之功效。特定言之，此研究包括媒劑處理對照組、單獨 5F9(15 mg/kg)、DM1(300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、DM4(300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、Sc209-DM1(150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1 eq)、Sc209-DM4(150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM4 eq)、Sc209-vcMMAF(150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ MMAF eq)、5F9-DM1(150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1 eq)、5F9-DM1(75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM1 eq)、5F9-DM4(150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM4 eq) 及 5F9-DM4(75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DM4 eq)。使用帶有 293-GCC#2 細胞之 Taconic 雌性小鼠(每組 10 隻小鼠)。

利用奧瑞他汀結合物於 293 GCC#2 腫瘤中進行之功效研究

以三種劑量用 5F9 與 vc MMAE、vcMMAF 或 mcMMAF 之結合物處理帶有 293 GCC#2 腫瘤之 SCID 小鼠，與此等毒素之 209 結合物或游離毒素或媒劑對照組進行比較。以 q7d $\times$ 4 時程靜脈內投與劑量。在第 3 天、第 7 天、第 10 天、第 13 天及第 17 天收集腫瘤。用對照試劑處理之小鼠的腫瘤展示體積不斷增加。用 5F9 奧瑞他汀結合物處理之腫瘤展示對此腫瘤生長之劑量及時間依賴性抑制。表 18 提供結果之概述



(TGI=腫瘤生長抑制，T/C=處理組/對照組，TGD=腫瘤生長延遲，CR/PR=完全反應/部分反應；p值=判定統計顯著性之量度，NS=不明顯)。

表 18. 在帶有 293 GCC#2 腫瘤之小鼠中進行的對奧瑞他汀 ADC 之分析

組	TGI	T/C	TGD	CR/PR	P值
209-vcMMAE 300 µg/kg	24.5	0.76	0.9	0	0.38>0.05 NS
209-vcMMAF 150 µg/kg	29.4	0.71	1.4	0	0.27>0.05 NS
209-mcMMAE 150 µg/kg	36.5	0.63	1.4	0	0.15>0.05 NS
游離MMAE 300 µg/kg	35.6	0.64	2	0	0.18>0.05 NS
游離mcMMAF 150 µg/kg	-3.4	1.03	-1.3	0	0.73>0.05 NS
5F9-vcMMAE 300 µg/kg	96.9	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 150 µg/kg	83.5	0.17		2/10 PR	<0.01
5F9-vcMMAF 150 µg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 150 µg/kg	97	0.03		9/10 PR	<0.001
5F9-vcMMAE 75 µg/kg	54.5	0.45	4.4		0.01<p<0.05
5F9-vcMMAF 75 µg/kg	88.5	0.12		6/10 PR	<0.001
5F9-mcMMAF 75 µg/kg	87.5	0.13		7/10 PR	=0.001
5F9-vcMMAF 37.5 µg/kg	65.2	0.35	7.1		=0.01
5F9-mcMMAF 37.5 µg/kg	63.6	0.36	5.8		=0.01

以 q7d 時程使用的所有此等三種 ADC 在 293 GCC#2 模型中均有效。5F9-vcMMAF 及 5F9-mcMMAF 比 5F9-vcMMAE 更有效，此與活體內 PD(pHisH3) 及活體外細胞毒性資料相關。

利用 5F9vcMMAF 及 5F9-DMx 於 T84 皮下腫瘤中進行之功效研究

以兩種劑量 (75 µg/kg 及 150 µg/kg 毒素) 用 q7d×5 時程測試 5F9-SPDB-DM4 及 5F9-SMCC-DM1 於 T84 腫瘤模型中之功效。特定言之，此研究包括媒劑處理對照組、單獨 5F9 (15 mg/kg)、DM1 (300 µg/kg)、DM4 (300 µg/kg)、Sc209-DM1 (150 µg/kg DM1 eq)、Sc209-DM4 (150 µg/kg DM4 eq)、

Sc209-vcMMAF(150 $\mu\text{g/kg}$ MMAF eq) 、 5F9-DM1(150 $\mu\text{g/kg}$ DM1 eq) 、 5F9-DM1(75 $\mu\text{g/kg}$ DM1 eq) 、 5F9-DM4(150 $\mu\text{g/kg}$ DM4 eq)及5F9-DM4(75 $\mu\text{g/kg}$ DM4 eq) 。 使用帶有T84細胞之Taconic雌性小鼠(每組10隻小鼠)。

免疫組織化學

可藉由免疫組織化學對GCC於組織(諸如活檢物及異種移植物)中之相對量進行偵測及量測。在室溫下將冷凍組織切片於丙酮與甲醇之1:1溶液中固定20分鐘。用1×PBS洗滌載片5分鐘。用自動染色裝置(諸如Ventana Discovery XT自動染色器(Ventana Medical Systems, Tucson, AZ))使用製造商建議之反應緩衝液處理載片。用5%山羊血清稀釋抗-GCC抗體至5 $\mu\text{g/ml}$ 。對於人類抗-GCC抗體(例如5F9)，二次偵測抗體為山羊抗人類生物素標記抗體於Dako蛋白質阻斷劑(Dako, Carpinteria, CA)中之1:500溶液。自動染色器處理抗體反應物後，自自動染色器移出載片，用反應緩衝液沖洗，經由標準系列最後用二甲苯脫水，且用基於二甲苯之封固介質提供蓋玻片。

於原發性腫瘤模型中進行ADC之功效研究

原發性結腸直腸癌及胃癌之模型發展為小鼠中之皮下腫瘤。在帶有PHTX-11c原發性腫瘤之小鼠中測試5F9-vcMMAE及5F9-mcMMAF ADC。以q7d×4時程靜脈內投與劑量。向對照小鼠投與毒素與209之結合物。

ADC於原發性腫瘤模型中之抗腫瘤活性

進行兩個類似研究以測定5F9-vcMMAE之活體內抗腫瘤



活性，且比較各種劑量及給藥時程下 5F9-vcMMAE 及游離毒素 MMAE 及非免疫性 vcMMAE 抗體毒素結合物 (209-vcMMAE) 於 PHTX-9c 原發性人類結腸腫瘤異種移植小鼠中之抗腫瘤活性，且測定處理之後的再生長動力學。皮下 (SC) 接種 PHTX-9c 腫瘤片段 (2 mm×2 mm) 於雌性 CB-17 SCID 小鼠 (八週齡) 之側腹中。每週兩次使用游標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。當平均腫瘤體積到達約 150 mm³ (研究 A) 或 160 mm³ (研究 B) 時，將動物隨機分成處理組 (n = 10/組 (研究 A) 且 n = 9/組 (研究 B))。

用 0.938、1.875、3.75 或 7.5 mg/kg 5F9-vcMMAE 以每週一次 (QW) 給藥時程 (3 次劑量) 靜脈內 (IV) 處理 (研究 A) 小鼠 20 天，或用對照組 (其包括媒劑 (0.9% 生理食鹽水)、以 QW 時程靜脈內投與 0.075 或 0.15 mg/kg MMAE 或以 QW 給藥時程靜脈內投與 1.875 或 3.75 mg/kg 209-vcMMAE) 處理 20 天。在第二研究 (研究 B) 中，用 0.938、1.875、3.75、7.5 或 10.0 mg/kg 5F9-vcMMAE 以 QW 時程 (3 次劑量) 靜脈內或用 3.75 mg/kg 以每週兩次 (BIW) 時程 (6 次劑量) 靜脈內，或用對照組 (包括以 QW 時程靜脈內投與之媒劑、7.5 或 10 mg/kg 209-vcMMAE 或 0.135 或 0.18 mg/kg MMAE) 處理小鼠 20 天。對於 QW 時程在第 1 天、第 8 天及第 15 天投與劑量，且對於 BIW 時程在第 1 天、第 4 天、第 8 天、第 11 天、第 15 天及第 18 天投與劑量。藉由以下原理計算游離 MMAE 之劑量以匹配免疫結合物劑量中 MMAE 之量：MMAE 之等效劑量為

MLN0264劑量之1.8%。連接子+MMAE之等效劑量為5F9-vcMMAE劑量之4%。此等計算係基於平均每個抗體3.9個MMAE分子及游離抗體分子量為150 kD。實際抗體分子量將由於糖基化程度而略微變化。

每週兩次量測腫瘤體積及體重且在處理期後繼續以量測再生長動力學，如由腫瘤生長延遲(TGD)所證明。繼續量測腫瘤體積直至腫瘤體積達到處理組中單個小鼠體重之10%，此時結束該組。在第20天測定腫瘤生長抑制(TGI)百分比($[\text{對照組平均腫瘤體積}-\text{處理組平均腫瘤體積}]/\text{對照組平均腫瘤體積}$ ；T/C比率)。使用雙尾韋爾奇氏t-試驗法(two-tailed Welch's t-test)比較處理組之T/C比率與對照組之T/C比率。因為在一個腫瘤達到尺寸極限(約1000 mm³)時即結束整個組，故對於平均再生長緩慢之組不能計算TGD。

使用線性混合作用回歸模型(linear mixed effects regression model)評估處理組對之間腫瘤生長趨勢隨時間的差異。此等模型說明各動物在多個時間點量測之原因。各別模型適合於各比較，且使用該模型之預測值計算各處理組之曲線下面積(AUC)。隨後計算相對於參考組之AUC減少百分比(dAUC)。統計上顯著之P值(< 0.05)表明兩個處理組隨時間之趨勢不同。結果概述於下表19及20中。

在兩個研究中在所有5F9-vcMMAE處理組中均觀測到抗腫瘤活性，且該作用顯示具有劑量依賴性。兩個研究之結果類似。在用0.938 mg/kg之5F9-vcMMAE以QW時程靜脈內處理之小鼠中，相較於媒劑組，TGI為20.7-21.4%，p值

為 <0.05 。在以QW時程靜脈內投與之1.875 mg/kg處理組中，TGI為41.3-44.7%， p 值 <0.001 。在以QW時程靜脈內投與之3.75 mg/kg處理組中，相較於媒劑組，TGI為65.3-65.7%($p < 0.001$)。以QW時程靜脈內投與之7.5 mg/kg 5F9-vcMMAE產生之TGI為84.1-84.3%($p < 0.001$)，且以QW時程靜脈內投與之10 mg/kg 5F9-vcMMAE(僅研究B)產生之TGI為91.2%($p < 0.001$)。當以BIW時程靜脈內投與3.75 mg/kg時，觀測到顯著抑制，其中TGI為84.9%($p < 0.001$)。

在7.5及10.0 mg/kg之較高劑量209-vcMMAE下觀測到中等抗腫瘤活性，其中TGI分別為35.7及45.4%($p < 0.001$)，但低劑量之209-vcMMAE(1.875及3.75 mg/kg)未展現抑制($p > 0.05$)。利用高劑量209-vcMMAE所觀測到之抗腫瘤活性可能歸因於免疫結合物之MMAE部分的非特異性活性。

投與游離毒素MMAE產生混合之結果：以QW時程靜脈內投與0.075、0.135及0.15 mg/kg未產生腫瘤生長抑制($p > 0.05$)，但以QW時程靜脈內投與0.18 mg/kg產生之TGI為50.4%($p < 0.001$)。

在處理期中，在第7天，在研究B之游離毒素0.18 mg/kg MMAE組及同一研究之0.938 mg/kg 5F9-vcMMAE組中觀測到2.3%之最大體重降低。此表明該藥物具有良好耐受性。

在處理期後繼續量測腫瘤體積直至腫瘤體積達到處理組中單個小鼠體重之10%，隨後結束該處理組。在此等研究中，腫瘤再生長呈現出劑量依賴性。

表 19. 對 SCID 小鼠中原發性人類結腸腫瘤異種移植物進行處理的研究 A 結果。

處理	劑量 (mg/kg)	投藥方法/頻率	TGI	BW變化 (平均最大百分比)	TGD(天)/(或 直至第一個 腫瘤>1000 mm ³ 之天數)
媒劑	0	靜脈內， QW×3次劑量	N/A	-0.2	0
209-vcMMAE	1.875	靜脈內， QW×3次劑量	-2.0(p>0.05)	8.3	0.6
209-vcMMAE	3.75	靜脈內， QW×3次劑量	4.5(p>0.05)	6.9	0.4
MMAE	0.075	靜脈內， QW×3次劑量	5.0(p>0.05)	8.3	1.0
MMAE	0.15	靜脈內， QW×3次劑量	11.1(p>0.05)	10.8	2.0
5F9-vcMMAE	0.938	靜脈內， QW×3次劑量	21.4(p>0.05)	9.0	3.3
5F9-vcMMAE	1.875	靜脈內， QW×3次劑量	44.7(p>0.001)	10.6	8.2
5F9-vcMMAE	3.75	靜脈內， QW×3次劑量	65.3(p>0.001)	9.0	17.8
5F9-vcMMAE	7.5	靜脈內， QW×3次劑量	84.1(p>0.001)	7.5	(第一個腫 瘤，>58天)

表 20. 對 SCID 小鼠中原發性人類結腸腫瘤異種移植物進行處理的研究 B 結果。

處理	劑量 (mg/kg)	投藥方法/頻率	TGI	BW變化 (平均最大百分比)	TGD(天)/(或 直至第一個 腫瘤>1000 mm ³ 之天數)
媒劑	0	靜脈內， QW×3次劑量	N/A	-1.8	0
209-vcMMAE	7.5	靜脈內， QW×3次劑量	35.7(p>0.001)	4.2	4.2
209-vcMMAE	10.0	靜脈內， QW×3次劑量	45.4(p>0.001)	2.6	11.3
MMAE	0.135	靜脈內， QW×3次劑量	2.2(p>0.05)	9.3	0.2



MMAE	0.18	靜脈內， QW×3次劑量	50.4(p>0.001)	-2.3	8.6
5F9-vcMMAE	0.938	靜脈內， QW×3次劑量	20.7(p>0.001)	-2.3	3.8
5F9-vcMMAE	1.875	靜脈內， QW×3次劑量	41.3(p>0.001)	5.6	6.6
5F9-vcMMAE	3.75	靜脈內， QW×3次劑量	65.7(p>0.001)	-2.2	16
5F9-vcMMAE	3.75	靜脈內， BIW×6次劑量	84.9(p>0.001)	-1.8	31.9
5F9-vcMMAE	7.5	靜脈內， QW×3次劑量	84.3(p>0.001)	6.5	(第一個腫瘤，>47天)
5F9-vcMMAE	10.0	靜脈內， QW×3次劑量	91.2(p>0.001)	7.2	(第一個腫瘤，>56天)

● 利用裸5F9抗hGCC抗體於CT26 hGCC/luc #32播散性模型 (balb/c小鼠) 中進行之預備功效研究

此模型測試裸抗體結合於循環中表現GCC之腫瘤細胞及預防形成新腫瘤的能力。用CT26 hGCC/luc #32細胞以每隻小鼠 1×10^5 個及每隻小鼠 5×10^5 個靜脈內接種雌性balb/c小鼠。向對照組投與媒劑0.9% NaCl及非特異性抗體(裸209)以供與投與裸5F9進行比較。將兩種抗體工程改造(於pLKTOK58載體中)成具有IgG1同型，以使得在結合於細胞表面抗原(亦即對於5F9為GCC且對於209為不相關目標)之後其Fc區可引發抗體依賴性細胞介導之細胞毒性反應。接種前一日開始藉由靜脈內給藥，給藥時程為每週一次靜脈內 $\times 4$ (q7d $\times 4$)。藉由Xenogen成像系統一週兩次監測腫瘤生長。亦一週兩次監測體重及存活。在此研究結束時獲得肺重量及影像(包括MRI影像)。

如圖2中所示，兩個5F9組(40 mg/kg及10 mg/kg；每隻小鼠 1×10^5 個)均展示功效(在接種後(p.i)第34天：T/C(處理組/

對照組)為0.04至0.05)。在接種後第34天，相較於209組，5F9組之T/C為0.18至0.14。相較於0.9% NaCl(標準生理食鹽水)，209 40 mg/kg組之T/C為0.64。在 5×10^5 組中利用5F9未見效益。

在此研究結束時各組之肺重量展示於圖3中。T試驗法：媒劑相對於209 40 mg/kg， $P=0.4$ ；媒劑相對於5F9 40 mg/kg， $P<0.05$ ；媒劑相對於5F9 10 mg/kg， $P<0.01$ 。對肺進行目測證實相較於媒劑或209處理組，5F9處理組中之腫瘤結節更少。小鼠之活體內MRI展示媒劑處理小鼠中大量肺腫瘤外滲至周圍組織及心臟移位。在5F9 40 mg/kg處理小鼠中，可見正常肺外觀，不存在腫瘤跡象。

存活曲線展示於圖4中。對5F9處理組(1×10^5)觀測到顯著存活增加，且5F9 10 mg/kg組與40 mg/kg組之間無差異。

實例4：產生抗體生產細胞株

為以 >600 mg/L之生產力產生表現5F9之穩定CHO細胞株純系，藉由將輕鏈可變區(SEQ ID NO:19)及重鏈可變區(SEQ ID NO:17)次選殖於含有WT人類IgG1 Fc及新黴素抗性基因之pLKTOK58表現載體中產生5F9之表現載體。5F9可變區-IgG1融合產物之表現受EF-1a啟動子之控制。

抗-GCC人類單株抗體5F9可變區之選殖及定序

自人類融合瘤46.5F9次純系8.2分離(Qiagen之RNeasy套組)總RNA。此融合瘤攜帶輕鏈之「標準」公開 κ 恆定區(GenBank寄存編號AW383625或BM918539)及重鏈之「標準」公開IgG2恆定區(GenBank寄存編號BX640623或

AJ294731)。藉由傳統方法(Nature Methods 2, 629-630 (2005))合成備用快速5'末端擴增(5' race-ready)聚G尾cDNA。自cDNA藉由快速5'末端擴增使用聚C錨定寡聚物(poly-C anchor oligo)與特異於 κ 恆定區之反向引子的組合PCR擴增輕鏈可變區。用特異於IgG2恆定區之反向引子與特異於已知重鏈前導序列之正向引子的多個組合擴增重鏈可變區。用TOPO®選殖PCR產物(Invitrogen™, Life Technologies, Inc.)且用M13F及M13R引子進行定序。

建構攜帶抗-GCC人類單株抗體5F9之哺乳動物表現載體

建構攜帶5F9輕鏈及重鏈可變區之哺乳動物表現載體以產生生產CHO細胞株。對於原生構築體，將5F9輕鏈及重鏈之可變區次選殖於pLKTOK58D中(美國專利申請案第20040033561號)。此載體攜帶兩個哺乳動物選擇標記：新黴素抗性標記及DHFR/甲胺喋呤標記(用於擴增)。該載體允許自串聯之EF1 α 啟動子共表現輕鏈及重鏈，該等啟動子各自位於載體之前導序列- κ 恆定區及前導序列-IgG1(野生型Fc)恆定區之上游。為進行次選殖，自序列已經確認之TOPO純系用含有獨特限制位點的基因特異性引子PCR擴增輕鏈及重鏈之可變區以供定向選殖於載體之各別前導序列- κ 及前導序列-IgG1區之接合點中。引子之序列如下(5F9可變區特異性序列以粗體表示)：

原生5F9輕鏈前導序列-可變區引子：

正向NotI

5' ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA
GCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-3'
 (SEQ ID NO: 234)

反向 BsiWI

5'- GCCACCGTACGTTTGATTTCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC-3' (SEQ ID
 NO:235)

原生 5F9重鏈前導序列-可變區引子

正向 EcoRI

5' ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCT
ACAGGTGTCCACTCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC-3' (SEQ ID
 NO:236)

反向 BlnI

5'-GGAGGCTGAGCTGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGTGGTC-3' (SEQ ID
 NO: 237)

純系藉由輕鏈與重鏈之雙股DNA定序證實。

使用兩種轉染方法將構築體引入CHO細胞中：傳統MPI法及Crucell法。用原生5F9構築體使用傳統MPI法開始CHO細胞轉染。使用線性化及非線性化DNA進行電穿孔或脂染胺2000 CD(Lipopfectamine 2000 CD)轉染。經由於G418、非核苷培養基及5 nM甲胺喋呤中選擇產生約30個穩定池。基於對抗體產生量之FMAT分析，選擇三個穩定池進行選殖。產量最高之池分泌12.2 µg/ml之抗體。將此三個池冷凍。

評估Crucell STAR元件以製備含有STAR元件之5F9表現載體。

5F9/hIgG1重鏈核苷酸序列為：

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCC
 ACTCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCT
 TCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTC
 TGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAAC
 TTTGACCACTGGGGCCAGGAACCCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 TCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA
 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
 TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
 CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGA
 GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATACTAGAG

(SEQ ID NO:230)

5F9/hIgG1重鏈蛋白質序列為：

MGWSCILFLVATATGVHSQVLQWAGLLKPSETLSLTCAVFSGSFSGYYSWIRQPPGKGLE
 WIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

(SEQ ID NO:231)

5F9/hκ輕鏈核苷酸序列為：

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGT
CCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTG
GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT
GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAACGTGG
AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

(SEQ ID NO:232)

5F9/hκ輕鏈蛋白質序列為：

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASTRATGIPARFSGSGSTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:233)

將下列 5F9 之重鏈及輕鏈核酸序列插入 pTOK58D 載體中：

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccgaatagtgtatgacgcagctctccagccaccctgtctgtgt
ctccagg

ggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagaaacttagcctggtatcagcagaaacctggccagg

ctccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggaatccagccaggttcagtggcagtgggctctgggaca

gagttcactctcaccatcggcagcctgcagctgaagattttgcagtttattactgtcagcagataaaacctggcctcg

gacgttcggccaagggaaccaacgtggaaatcaaactacgggtggctgcacatctgtcttcatcttcccgccatctgatg

agcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggag

gtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag

cagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtacccatcagggcctgagct

cgcccgtcacaaagagcttaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO:308)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagct

acaggtgtccactccaggtgcagctacagcagtgggcgaggactgtgaagccttcggagaccctgtccctcacctg

cgctgtcttgggtgggtctttcagtggttactactggagctggatccgccagccccaggaaggggctggagtgattg



gggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatacagtagacacgtccaag
aaccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgcccggacacggctgtttattactgtgcgagagaacgtggatacac
ctatggtaactttgaccactggggccagggaacccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaaggggcccatcggtcttcc
ccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacacggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccg
gtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactcta
ctccctcagcagcgtggtagaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccca
gcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaa
ctcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgagggtcac
atgcgtgggtggtagcgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggagggtgcataatg
ccaagacaaagccgcccggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg
ctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcctaaagccaa
agggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacct
gcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc
acgcctcccgtgtcgtgactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg
gaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtga
aataa (SEQ ID NO:309)

將以下編碼 Abx-229 重鏈及輕鏈序列之序列插入
pTOK58D 載體中：

atggagtttgggctgagctggcttttctgtggctatt
ttaaagggtgtccagtgtgaggtgcagctgttggagtctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcaccttagccgctatgccatgaactgggtccgcccaggctccagggaaggggctggagtggg
tctcaggtattagtgaggagtggtgtaggacatactacgcagactccgtgaaggggccggttcaccatctccagagacaat
tccaagaacacactatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagatcgga
tttttgagtggtccattgactactggggccagggaacccctgggtcaccgtcagctcagcctccaccaaggggcccatcgg
tcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacacggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccc
gaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagg
actctactccctcagcagcgtgtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagca
cctgaactcctggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctga

年 12 月) 修正
月 29 日 對線

gggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagtgacggcggtggaggtgc
ataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaaataa (SEQ ID NO:310)

atgaggctccctgctcagcttctc
ttctctgctactctggctcccagataccactggagaaatagtgatgacgccgtcttcagccaccctgtctgtgtctcc
aggggagagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtagtagaaacttagcctgtgaccagcagaaacctggcc
aggctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggatcccagccaggttcagtgccagtggtgtgg
acagaattcactctcaccatcagcagcctgcagctgaagatttgcagtttactgtcaccagtatagtaactggat
gtgcagttttggccaggggaccaagctggagatcaaacgtacgggtgctcaccatctgtcttcttcccgcctctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
aaggtggataacgccctccaatcggttaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacgcct
cagcagcaccctgaccctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctga
gctcgcctgcacaaagagcttcaacaggggagagtgtag (SEQ ID NO:311)

雖然本發明已參考其所提供之實施例進行了展示及描述，但熟習此項技術者應瞭解，在不背離本發明之由隨附申請專利範圍涵蓋之範疇下，可在其中對形式及細節進行各種改變。

【圖式簡單說明】

圖 1 描繪用 5F9vc-MMAF、-DM1 及 -DM4 以 q14d 時程處理之帶有 293-GCC#2 之 SCID 小鼠中的腫瘤生長來顯示 5F9vc-MMAF、5F9-DM1 及 5F9-DM4 之效果。

圖 2 描繪用 0.9%NaCl；40 mg/kg 之 209 抗體；或 10 或 40

mg/kg 之 5F9 抗體處理小鼠後之腫瘤生長。

圖 3 描繪用 0.9%NaCl；40 mg/kg 之 209 抗體；或 10 或 40 mg/kg 之 5F9 抗體處理之小鼠在接種後第 41 天的平均肺重量 (g)。

圖 4 描繪用 5F9 抗體處理之帶有 CT26-hGCC 腫瘤之小鼠的存活曲線。

序列表

<110> 美商千禧製藥公司

<120> 抗-GCC抗體分子及其相關之組合物及方法

<130> M2051-7027WO

<140> 099136206

<141> 2010-10-22

<150> 61/254,474

<151> 2009-10-23

<160> 319

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 1

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggggcgcc cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcactg tctctgggtt ctcatlaagc agaaatgcta taagctgggt tcgccagcca	120
ccaggaaagg gctctggagtg gcttggagta atatggactg gtggaggcac aaattataat	180
tcagctctca aatccagact gagcatccgc aaagagaact ccaagagtca agttttctta	240
aaaaatgaaca gtctacaaac tgaagacaca gccaggctact tctgtgccag aagtggttac	300
gacgggtttg attactgggg ccaagggaact ctggctactg tctctgca	348

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 2

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln	1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Asn	20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	35 40 45
Gly Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Glu Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu	65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Arg Tyr Phe Cys Ala	85 90 95

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

Thr Val Ser Ala
115

<210> 3
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 3
cagattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120
acctccccca aaagatggat ttaigacaca tccaaactgg ctcttgaggt ccctgtctgc 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcaccagcat ggaggctgaa 240
gatgttgcca cttattactg ccagcagtggt agtggttaacc cgtacacgtt cggagggggg 300
accaaactgg aaataaaa 318

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 4
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 5
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 5

caggctccagt	igaagcagtc	iggagctgaa	ctgggaagc	ctggggcttc	agtaagata	60
tcctgcaagg	ctcttggtta	caccttact	gactactata	taaactgggt	gaagcagagg	120
cctggacagg	gccttgagtg	gattggaaag	attggctctc	gaagtggtaa	tacttactac	180
aalagaagt	tcaagggcaa	ggccacactg	actgcagaca	aatcgtccag	cacagcciac	240
atgcagctca	gcagccigac	atctgaggac	ctgcagctct	attctgtgct	aagatgggat	300
gccttactggg	gccaaggagc	ctggttact	gtctct			336

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 6

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	20	25	30	
Tyr	Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	35	40	45	
Gly	Lys	Ile	Gly	Pro	Arg	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	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	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Trp	Asp	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	100	105	110	

<210> 7

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 7

gatgttgtga	tgaccagac	tccactgtct	tgtcgggta	ccattggaca	accagcctct	60
atctcttgca	agicaagta	gagcctctta	tatagtaatg	gaaagacata	tttgaattgg	120
ttacaacaga	ggcctggcca	ggctccaaag	cacctaatgt	atcagggtgc	caaactggac	180
cctggcatcc	ctgacagggt	cagtggcagt	ggatcagaaa	cagattttac	acttaaaatc	240
agcagagtgg	aggctgaaga	tttgggagtt	tattactgct	tgcaagggtac	atattatccg	300

tacacgiltcg gaggggggac caagctggaa ataaag

336

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 8
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Ile Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 9
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 9	
cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgcagatg	60
tcctgtaagg ctctctggcta tattttcacc ggctactgga tglactgggt gaagcagagg	120
ccctggccaag gccctgagtg gattggaagg attcatcctt ctgatatgaa tactaactac	180
aatcaaaaagt tcaagggcaa ggcacattg actgtagaca aatccctccag cacagcctac	240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctc attactgtac ccatgccctt	300
gccttactggg gccaaaggac tctgggtcact gtctct	336

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 10

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 11
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 11
gatgttgtgt tgaccagac tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctct 60
atctcttgca agtcaagtca gaggctctta tatagtaatg gaaaaccta ttgagttgg 120
ttattacaga ggccaggcca gttccaaag cgcctaactc atctggtgtc tcaactggac 180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttggggagtg tattactgcg tgcaaggtac acatttattc 300
acgttcggct cggggacaaa gttggaata aaa 333

<210> 12
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 12
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Ile Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Thr 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 Val Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 13
caggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctgggaagc ctggggcttc agtgaagaig 60
tcttgcaagg ctcttggtca caccitcaca gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
ccctggacagg gccctgagtg gattggaaag atgggtccta gaagtggtag tacttactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagccigac atctgaggac tctgcagtc atitctgtgc aagatgggat 300
gccttactggg gcccaaggac tctgggtact gtccttgca 339

<210> 14
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 14
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu 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 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

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



Ala

<210> 15
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 15
gatgttga tgaccagac tccactgct ttgtcgtta ccatggaca accagcctct 60
atctcttga agtcaagta gagcctctta tatagtaatg gaaagacata ttgaattgg 120
ttacaacaga ggctggcca ggctccaaag cacctaattgt atcagggtgc caaactggac 180
cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240
agcagagigg aggcctaaga ttggggagtt tattactgct tgcaaggta atattatccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 16
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala
35 40 45
Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro Gly Ile Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95
Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 17

```

caggtagcagc tacagcagtg gggcgagga ctgtgaagc cticggagac cctgtccctc    60
acctgcgctg tctttgggtg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc    120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatt gtggaaacac caacgacaac    180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gticgccctg    240
aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaactggga    300
tacacctatg gtaacttga ccactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca      357

```

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

```

<400> 18
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15

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

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

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys
          50          55          60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ala Leu
65          70          75          80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 19
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

```

<400> 19
gaaatagta tgacgcagtc tccagccacc ctgtctglt ctccagggga aagagccacc    60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agaaacttag cctggatca gcagaaacct    120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatccagcc    180
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagag ticactcica ccatcggcag cctgcagctc    240
gaagatttgc cagtttatta ctgtcagcag tataaaacct ggccicggac gticggccaa    300

```



gggaccaacg tggaaatcaa a

321

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 20
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 21
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt gactgctaca tgagctggat ccgccagtct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactacta gtggttaatac cattactac 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctacactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagactgg 300
ggatggttct acggtatgga cgctcggggc caagggaacca cggtcaccgt ctccctca 357

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Cys

202530

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ser Tyr Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65707580

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

859095

Ala Arg Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100105110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 23
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<220>
<221> modified_base
<222> (216)..(217)
<223> a、c、t、g、未知或其他

<400> 23
gatattgiga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctctgca agtctagica gagcctcctg cataatgatg gaaagacctt ttgtattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctctgatct atgaagtctt caaccggctc 180
tctggaglgc cagatagggt cagtagcagc gggtcnngga cagatttcac actgaaaatc 240
agccggglgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagiat acagcttctt 300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (73)..(73)
<223> 任何氨基酸



<400> 24
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Xaa 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 Ser
85 90 95

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

<210> 25
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 25
cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactic 60
tcctgtgcag cgtctggatt cacccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg gggtggcagct atatggtaig atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctglat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagg 300
agcagctcgt actltgacta ttggggccag ggaacctgg tcaccgtctc cica 354

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 27
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca ccttiggaca gccggcctcc 60
 atctcctgca ggctcagta aagcctcgta cacagigatg gaaacaccta cttgagttgg 120
 cttcagcaga ggccaggcca gccccaaga ctctaatit ataagacttc taaccgcttc 180
 tctgggtcc cagacagall cagtggcagl ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagggtgg gagctgagga tgcggggll taltactgca tgcaagctac gcaatttcca 300
 accttcggcc aaggacacg actggagall aaa 333

<210> 28
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95



Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 29
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 29
caggatgcagc tggatggagtc tgggggaggc gtaggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tcctgtgttag cgctcggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgggagct atatggatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagcctccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat ttctactgtc gagagggagg 300
agcagctcgt attttgacta ctggggccag ggaacctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Gly Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 31

gataatgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc	60
atctctgtca ggctctagta aagcctcgta cacagtgatg gaaacacctt cttaggttgg	120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatat ataagacttc taaccgcttc	180
tctggggctc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc	240
agcagggtgg gagctgagga tgcgggggtt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca	300
accttcggcc aagggaacag actggagatt aaa	333

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 32

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

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

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

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

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

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

Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	

<210> 33

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 33

cagggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ggggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tccgtgtcag cgctcggatt caccctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtag atggaagtaa taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcgtgtg attactgtgc gagaggagg	300



agcagctcgt actttgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca

354

<210> 34
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 35
gatatigiga tgaccagac tccactctcc tcaccigtca ccctiggaca gccggcctcc 60
ttctctcgca ggctctagta aagcctcgta cacagtgatg gaaacacgta ctigagtgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaatitl ataagatttc taaccggttc 180
tctgggggcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatitcac actgaaaatc 240
agcagggigg aagctgagga tgcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcca 300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa 333

<210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 36

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

Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala 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 Ala
85 90 95

Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 37

caggigcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccctcagt gaclactaca tgagctggat ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggagtg gattcatac attactagta gggtagtac catactac	180
tcagcctctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc	300
agtggcttgt tgggagtcga ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	360
tgc	363

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 38

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

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



Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Ser Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Phe Ser Gly Trp Phe Gly Val His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 39
gatatgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60
atctccigta agtctagica gagccicctg catagtgaig gaaagaccta ttigtattgg 120
taccigcaga agccaggcca gcctccacag ctctctgatct atgaagtitt caaccggttc 180
tciggagtgc caaatagggt cagtggcagc gggicaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acaacttacg 300
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 40
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asn 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 Ser
85 90 95

Ile Gln Leu Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 41
gaggtgcagc tgliggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttlagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggtctgactc ggtctcagat attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gtlcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
ctgcaaatgc acagcctgag cgccgaggac acggccatat attactgtgc gaaacggcgg 300
tggcaggggt acttcgatct ctggggccgt ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 42
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 42
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115



<210> 43
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 43
gaaatiglt igacgcagtc tccaggcacc cigtcttltgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccaggca gcgigtigac agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120
ccitggccagg ctcccaggct cctcatctat ggigcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggltca gtggcagigg gctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
ccigaagatt ttgcagtgtg ttactgticag cagtatggta gctcacgct cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 44
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 45
gaggtagcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtagcagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctcaggat caccctttagc cgctatgccg tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggcigggagig ggtctcaggt attagiggga gtggiggtag gacatactac 180
gcagactccg lgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactatat 240
ctgcaaatga acagccigag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300
gatttttggg ggggtccatt tgactactgg ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca 360

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 46
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 47
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 47
gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ciccagggga gagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gagtgtagt agaaacttag cctggtagca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg talccagcc 180
agggtcagtg gcagtggtgc tgggacagaa ttactctca ccatcagcag cctgcagtc 240
gaagatttgg cagtttatla ctgtcaccag tatagtaact ggalgtgcag ttltggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 48



<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 48
Glu Ile Val Met Thr Pro Ser Ser Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ser Asn Trp Met Cys
85 90 95

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

<210> 49
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 49
caggtagcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcacig tctctggtgg ctccatcaga agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggagtg gatggacgt atttatatca gtgggaggac caccitcaac 180
ccctccctca agagtcgagc caccataatc gttggacacgt ccaagaacca gtctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt tctgtgcgag agatagatat 300
tatggctacc ttgactactg gggccaggga accctggatc ccgtctctc a 351

<210> 50
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 50
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Thr Phe Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 51
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 51
 gaaattgltg tgcgcagtc tccaggcacc ctgtcttltgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctccgtgca gggccagtca gagtgtagc cgcagttact tagccttgta ccaacagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat galcatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggltca gggcagttgg gtcgggaca gacttactc tcacatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgag caccttcggc 300
 caagggacac gactggagat taac 324

<210> 52
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 52
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60



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

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

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 53
caggatgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc cticggagac cctgtccctc 60
accatgcactg tctctggcgg ctccatccgt callactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattggglat atctattaca gggggagcac caactacaac 180
ctctccctca agagtcgagt caccataatca agagacacgt ccaagaatca ggtctccctg 240
aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt atgtgcggc ggglatgggc 300
tttgactact ggggccaggg aacctggtc accgtctcct ca 342

<210> 54
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg His Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Ser Ser



<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 58
Arg Asn Ala Ile Ser
1 5

<210> 59
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 59
gtaaatatgga cttgtggagg cacaaattat aattcagctc tcaaatcc 48

<210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 60
Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 61
agtgggttacg acgggtttga ttac 24

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 62
Ser Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 63
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 63
agtgccagct caagtgtaaa ttacatgcac 30

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 64
Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 65
gacacatcca aactggcttc t 21

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 66
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 67
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 67
cagcagtgga gtggtaaccc glacacg 27

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 68
Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5



<210> 69
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 69
gactactata taaac

15

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 70
Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 71
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 71
aagattggc ctcgaagtgg taatacttac tacaatgaga agtccaaggg c

51

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 72
Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 73
igggatgcctt ac

12

<210> 74
<211> 4
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 74
Trp Asp Ala Tyr
1

<210> 75
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 75
aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat attigaat 48

<210> 76
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 76
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 77
caggtgtcca aactggaccc t 21

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 78
Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

<210> 79
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 79



ttgcaaggta cataattatcc gtacacg

27

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 80

Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 81

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 81

ggctactgga tgtac

15

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 82

Gly Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 83

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 83

aggattcatc ctctgatag taatactaac tacaatcaaa agticaaggg c

51

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 84

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

Gly

<210> 85
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 85
gcccttgctt ac

12

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 86
Ala Leu Ala Tyr
1

<210> 87
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 87
aagtcaggc agagcctctt atataglaat ggaaaaacct atttgagt

48

<210> 88
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 88
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 89
ctgggtgtctc aactggactc t

21

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽



<400> 90
Leu Val Ser Gln Leu Asp Ser
1 5

<210> 91
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 91
gtgcaaggta cacatttatt cag

24

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 92
Val Gln Gly Thr His Leu Phe Thr
1 5

<210> 93
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 93
gactactata taaac

15

<210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 94
Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 95
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 95
aagattggtc ctagaagtg tagtacttac tacaatgaga agttcaaggg c

51

<210> 96
<211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 96
Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 97
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 97
tgggatgcctt ac

12

<210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 98
Trp Asp Ala Tyr
1

<210> 99
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 99
aagtcgaagtc agagccctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat

48

<210> 100
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 100
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15

<210> 101
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列



<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 101
cagglgicca aactggaccc t 21

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 102
Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

<210> 103
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 103
ttgcaaggta catattatcc gtacacg 27

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 104
Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 105
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 105
ggttactact ggagc 15

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 106
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 107
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 107
gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aacccgtccc tcaag

45

<210> 108
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 108
Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 109
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 109
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac

33

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 110
Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
1 5 10

<210> 111
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 111
agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc

33

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽



<400> 112
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 113
ggatgcatcca ccagggccac t 21

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 114
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 115
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 115
cagcagtata aaacctggcc tcggacg 27

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 116
Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 117
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 117
gacigctaca tgagc 15

<210> 118

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 118
Asp Cys Tyr Met Ser
1 5

<210> 119
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 119
tacattacta ciagtggtaa taccatttac tacgcagact ctgtgaaggg c 51

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 120
Tyr Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 121
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 121
gactggggat ggttctacgg tatggacgic 30

<210> 122
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 122
Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 123
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 123

aagtctagtc agagcctcct gcataatgat ggaaagacct atttg

45

<210> 124

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 124

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 125

gaagtttcca accggttcct t

21

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 126

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 127

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 127

atgcaaagta tacagcttcc tggacg

27

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 128

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 129
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 129
agctatggca tgcac

15

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 130
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 131
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 131
gctatattggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgigaaggg c

51

<210> 132
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 132
Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 133
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 133
gggaggagca gclcgctactt tgaciat

27

<210> 134
<211> 9



<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成肽

<400> 134
Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 135
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 135
aggcttagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt 48

<210> 136
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 136
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 137
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 137
aagacttcta accgcttcctc t 21

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 138
Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 139
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 139
atgcaagcia cgcaatttcc aacc

24

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 140
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

<210> 141
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 141
agctatggca tgcac

15

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 142
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 143
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 143
gctatatggt atgatggaag taataaatatc tatgcagcct ccgtgaaggg c

51

<210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 144
Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 145
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 145
gggaggagca gctcgtattt tgactac 27

<210> 146
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 146
Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 147
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 147
aggcttagtc aaagcctcgt acacaglgat ggaaacacct acttgagt 48

<210> 148
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 148
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 149
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 149
aagacttctta accgcttctc t 21

<210> 150
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 150
Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 151
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 151
atgcaagcga cgcaatttcc a 21

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 152
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

<210> 153
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 153
agctatggca tgcac 15

<210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 154
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 155
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 155
gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgigaaggg c 51

<210> 156



<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 156
Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 157
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 157
gggaggagca gctcgtactt tgactat 27

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 158
Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 159
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 159
aggcttagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacgt acttgagt 48

<210> 160
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 160
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 161
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 161
aagatttcta accggttctc t 21

<210> 162
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 162
Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 163
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 163
atgcaagcta cacaatttcc aacc 24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 164
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

<210> 165
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 165
gaclactaca tgagc 15

<210> 166
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 166
Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5



<210> 167
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 167
tacattacta gtagtggtag taccatatac tactcagcct ctggaaggg c 51

<210> 168
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 168
Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 169
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 169
gatttcagt gctggttcgg agtccacttt gactac 36

<210> 170
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 170
Asp Phe Ser Gly Trp Phe Gly Val His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 171
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 171
aagctcagtc agagccctcct gcatagtgat ggaaagacct atttgtat 48

<210> 172
<211> 16

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 172
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 173
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 173
gaagtttcca accggttctc t

21

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 174
Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 175
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 175
atgcaaagta tacaacttac gttgacg

27

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 176
Met Gln Ser Ile Gln Leu Thr Trp Thr
1 5

<210> 177
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸



<400> 177
agctatgccca tgagc 15

<210> 178
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 178
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 179
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 179
gatattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 180
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 180
Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 181
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 181
cggcgglggc aggggtacct cgatctc 27

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 182
Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5

<210> 183
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 183
agggccaggc agcgtgttga cagcaggtagc ttagcc

36

<210> 184
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 184
Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 185
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 185
ggtagcatcca gcagggccac t

21

<210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 186
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 187
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 187
cagcagtagtgc gtagctcacc gctcact

27

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽



<400> 188
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 189
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 189
cgctatgcc a tgaac 15

<210> 190
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 190
Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 191
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 191
ggatattagtg ggagtggtgg taggacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 192
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 192
Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 193
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 193

gatcgcgatt ttggagtggt tccatttgac tac

33

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 194
Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 195
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 195
agggccagtc agagtggttag tagaaactta gcc

33

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 196
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 197
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 197
ggtgcatcca ccagggccac t

21

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 198
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 199
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列



<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 199
caccagtata glaactggat gtgcagt

27

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 200
His Gln Tyr Ser Asn Trp Met Cys Ser
1 5

<210> 201
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 201
agttactact ggagc

15

<210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 202
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 203
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 203
cgtatttata tcagtgaggag gaccaccttc aaccctcccc tcaagagt

48

<210> 204
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 204
Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Thr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 205
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 205
gatagatatt atggctacct tgactac 27

<210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 206
Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr
1 5

<210> 207
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 207
agggccagtc agagtgttag ccgcagttac ttagcc 36

<210> 208
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 208
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 209
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 209
gaigcatcca gcagggccac t 21

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

<220>

<223>人工序列之描述：合成肽

<400> 210
Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 211
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 211
cagcagtatg gtagttcacc gagcacc 27

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

<220>
<223>人工序列之描述：合成肽

<400> 212
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

<210> 213
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 213
cattactact ggagc 15

<210> 214
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 214
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 215
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 215
tatactcatt acagtgggag caccaactac aacctctccc tcaagagt 48

<210> 216
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 216
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Leu Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 217
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 217
ggatagggt ttgactac

18

<210> 218
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 218
Gly Met Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 219
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 219
cgggcaagtc aggccattag aaatgatlla ggc

33

<210> 220
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 220
Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 221
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸



<400> 221
tctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 222
Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 223
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 223
ctacagcata atagtttccc tccgacg 27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 224
Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 225
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 225
Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr
1 5 10 15

Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 226
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 226
Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro
1 5 10 15

Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
20 25

<210> 227
<211> 3222
<212> DNA
<213> 智人

```

<400> 227
algaagacgt tgctgttggg cttggctttg tggtcactgc tcttccagcc cgggtggctg      60
tccttttagtt cccagggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg      120
atgatgggca actcagccctt tgcagagccc ctgaaaaact tgggaagatgc ggtgaatgag      180
gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct      240
actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcaccigt      300
gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggatgggctg tgtccctata      360
gggccctcat gtacatactc caccctccag atgtaccttg acacagaatt gagctacccc      420
atgatctcag ctgggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg      480
atgtctccag ctagaagatt gatgtacttc ttggtaact ttggaaaac caacgatctg      540
cccttcaaaa cttattccctg gagcacttcg tatgtttaca agaattgtac agaaactgag      600
gactgtttct ggtaccttaa tgcctcggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaactc      660
ggctttaagg tgggtttaag acaagalaag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac      720
aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggctccagagt tcctctacaa gctgaagggt      780
gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagttg atcttttcaa tgaccaglac      840
tttgaggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgctgtct      900
cctgggaatt cccctctaaa tagctctttc tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac      960
tttgctcttg cctattttgaa tggaaatcctg ctctttggac atatgctgaa gataattctt      1020
gaaaatggag aaaalattac ccccccaaa ttgtctcatg ctttcaggaa tctcactttt      1080
gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatgggtg      1140
cttctgtata cctctgttga caccaagaaa tacaaggttc ttltgacctt tgataccac      1200
gtaaataaga cctatccctg ggatattgagc ccacattca ctgggaagaa ctctaaactt      1260
cctaatgata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact      1320
ggagctgttg tgctgtcctt gctcgtcgtt ctccgatgc tcagaaaata tagaaaagat      1380
tatgaacttc gtcagaaaaa atgggtccac attcctcctg aaaatactt ttctctggag      1440
accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgtatgag acaaaagacg agatacaatc      1500
cagagactac gacagtgcga atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac      1560
aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac      1620
tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca glgaaacttg ataccatgat cttcgggggtg      1680
atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttccctacct      1740
gatggcacat tcatggattg ggagtttaag alcctgtctt tgtatgacat tgcataaggga      1800
atgtcataat tgcactccag taagacagaa gtccatgggt gtcigaaatc taccaactgc      1860
gtatgggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc caatttacct      1920
ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag caccctcgcc aagccaacat ctctcagaaa      1980
ggagatgigt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcttgcggaa agaaaccttc      2040
tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga      2100

```



```

atgaaacct tccgccaga ttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagt 2160
tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga ttcaaaaaa 2220
atlgagacta cacttgccaa gatatttga ctttttcag accaaaaaaa tgaagctat 2280
atggatacct tgalccgacg tctacagcta tatctcgaa acctggaaca tctgtagag 2340
gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgtt 2400
cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaggct ttgaggagcc ggaactatat 2460
gaggaagtia caatctactt cagigacatt gtaggttica ctactatctg caatacagc 2520
acccccatgg aagtggttga calgcitaa gacatctata agagttttga ccacattgt 2580
galcatcatg atgtctacaa ggttgaaacc atcggtagtg cgtacatggt ggctagtgt 2640
ttgcciaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc 2700
ctcagcttca tggggacctt tgagciggag catcttcttg gcctcccaat atggattcgc 2760
attggagttc actctgggcc ctgtgtgtgt ggagtttggg gaatcaagat gcctcgtaa 2820
tgctatttg gagatacgtt caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctcccttg 2880
agaattcacg tgagtggctc caccaatagc atcctgaaga gaactgagtg ccagttctt 2940
tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg 3000
acigggatga aggaccagaa attcaacctg ccaacccctc ctactgtgga gaatcaacag 3060
cgtttgcaag cagaatttct agacatgatt gccactctt tacagaaaag acaggcagca 3120
gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac 3180
ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatttt aa 3222

```

<210> 228
 <211> 1073
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 228
 Met Lys Thr Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
 20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
 35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
 50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
 65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
 85 90 95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
 100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr

115	120	125
Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala		
130	135	140
Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu		
145	150	155
Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys		
165	170	175
Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val		
180	185	190
Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala		
195	200	205
Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val		
210	215	220
Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn		
225	230	235
Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr		
245	250	255
Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu		
260	265	270
Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro		
275	280	285
Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser		
290	295	300
Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp		
305	310	315
Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu		
325	330	335
Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala		
340	345	350
His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr		
355	360	365
Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr		
370	375	380
Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His		
385	390	395
Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys		
405	410	415



Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
 420 425 430
 Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu
 435 440 445
 Val Ala Leu Leu Met Leu Arg Lys Tyr Arg Lys Asp Tyr Glu Leu Arg
 450 455 460
 Gln Lys Lys Trp Ser His Ile Pro Pro Glu Asn Ile Phe Pro Leu Glu
 465 470 475 480
 Thr Asn Glu Thr Asn His Val Ser Leu Lys Ile Asp Asp Asp Lys Arg
 485 490 495
 Arg Asp Thr Ile Gln Arg Leu Arg Gln Cys Lys Tyr Asp Lys Lys Arg
 500 505 510
 Val Ile Leu Lys Asp Leu Lys His Asn Asp Gly Asn Phe Thr Glu Lys
 515 520 525
 Gln Lys Ile Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gln Ile Asp Tyr Tyr Asn Leu
 530 535 540
 Thr Lys Phe Tyr Gly Thr Val Lys Leu Asp Thr Met Ile Phe Gly Val
 545 550 555 560
 Ile Glu Tyr Cys Glu Arg Gly Ser Leu Arg Glu Val Leu Asn Asp Thr
 565 570 575
 Ile Ser Tyr Pro Asp Gly Thr Phe Met Asp Trp Glu Phe Lys Ile Ser
 580 585 590
 Val Leu Tyr Asp Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Ser Lys
 595 600 605
 Thr Glu Val His Gly Arg Leu Lys Ser Thr Asn Cys Val Val Asp Ser
 610 615 620
 Arg Met Val Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Cys Asn Ser Ile Leu Pro
 625 630 635 640
 Pro Lys Lys Asp Leu Trp Thr Ala Pro Glu His Leu Arg Gln Ala Asn
 645 650 655
 Ile Ser Gln Lys Gly Asp Val Tyr Ser Tyr Gly Ile Ile Ala Gln Glu
 660 665 670
 Ile Ile Leu Arg Lys Glu Thr Phe Tyr Thr Leu Ser Cys Arg Asp Arg
 675 680 685
 Asn Glu Lys Ile Phe Arg Val Glu Asn Ser Asn Gly Met Lys Pro Phe
 690 695 700
 Arg Pro Asp Leu Phe Leu Glu Thr Ala Glu Glu Lys Glu Leu Glu Val
 705 710 715 720

Tyr Leu Leu Val Lys Asn Cys Trp Glu Glu Asp Pro Glu Lys Arg Pro
 725 730 735
 Asp Phe Lys Lys Ile Glu Thr Thr Leu Ala Lys Ile Phe Gly Leu Phe
 740 745 750
 His Asp Gln Lys Asn Glu Ser Tyr Met Asp Thr Leu Ile Arg Arg Leu
 755 760 765
 Gln Leu Tyr Ser Arg Asn Leu Glu His Leu Val Glu Glu Arg Thr Gln
 770 775 780
 Leu Tyr Lys Ala Glu Arg Asp Arg Ala Asp Arg Leu Asn Phe Met Leu
 785 790 795 800
 Leu Pro Arg Leu Val Val Lys Ser Leu Lys Glu Lys Gly Phe Val Glu
 805 810 815
 Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Thr Ile Tyr Phe Ser Asp Ile Val Gly
 820 825 830
 Phe Thr Thr Ile Cys Lys Tyr Ser Thr Pro Met Glu Val Val Asp Met
 835 840 845
 Leu Asn Asp Ile Tyr Lys Ser Phe Asp His Ile Val Asp His His Asp
 850 855 860
 Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met Val Ala Ser Gly
 865 870 875 880
 Leu Pro Lys Arg Asn Gly Asn Arg His Ala Ile Asp Ile Ala Lys Met
 885 890 895
 Ala Leu Glu Ile Leu Ser Phe Met Gly Thr Phe Glu Leu Glu His Leu
 900 905 910
 Pro Gly Leu Pro Ile Trp Ile Arg Ile Gly Val His Ser Gly Pro Cys
 915 920 925
 Ala Ala Gly Val Val Gly Ile Lys Met Pro Arg Tyr Cys Leu Phe Gly
 930 935 940
 Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Thr Gly Leu Pro Leu
 945 950 955 960
 Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
 965 970 975
 Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
 980 985 990
 Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
 995 1000 1005
 Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
 1010 1015 1020



Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
1040 1045 1050

Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
1055 1060 1065

Glu Ser Thr Tyr Phe
1070

<210> 229

<211> 420

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 229

Met Lys Thr Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
130 135 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
165 170 175

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
180 185 190

Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
195 200 205

Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
210 215 220

Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
225 230 235 240

Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
245 250 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
260 265 270

Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
275 280 285

Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
290 295 300

Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
305 310 315 320

Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
325 330 335

Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
340 345 350

His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365

Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400

Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415

Asn Ser Lys Leu
420

<210> 230

<211> 1444

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 230

gaattcctca ccatgggaig gagctgiatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt 60

gtccactccc aggtgcagct acagcagtg ggccgaggac tgttgaagcc ttcggagacc 120



```

cigtccclca ccigcgcigt ctttgggtggg tctttcagtg gtactactg gagciggatc 180
cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg atggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc 240
aacgacaacc cgtccclcaa gagtcgagtc accataicag tagacacgtc caagaaccag 300
ttcgccclga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga 360
gaacgiggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaacct ggtcaccgtc 420
agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctcttc caagagcacc 480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
gtgtcgttga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgcctacag 600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg tlgaccgtgc cctccagcag ctgggcacc 660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaaagt 720
gagcccaaat ctgttgacaa aactcacaca tggccaccgt gccagcacc tgaactcctg 780
gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gacttccgg 840
acccctgagg tcacatgcgt gggtgtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900
aactggtacg tggacggcgt ggagggtcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1080
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacagggt acaccctgcc cccatccgg 1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgccctg tcaaaggctt ctatccagc 1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct 1260
cccgtgttgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1320
agggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat agggataaca gggtaatact 1440
agag 1444

```

<210> 231
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 231
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ala Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val



370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<10> 232
<11> 722
<12> DNA
<13> 人工序列

<20>
<23> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 232
gcggccgcct caccatggga tggagctgia tcatcctcct ctggtagca acagctacag 60
gtgtccactc cgaatagtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg 120
aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gccctggtatc 180
agcagaäacc tggccaggtc cccaggcicc tcatctatgg tgcattccacc agggccactg 240
gaatcccagc cagggtcagt ggcagtggtt ctgggacaga gttaactctc accatcggca 300
gcctgcagtc tgaagatttt gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga 360
cgltcggcca agggaccaac gttgaaatca aacgtacggt ggcctgcacca tctgtcttca 420
tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctcgtttgtg tgcctgtctga 480
ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaagt ggataacgcc ctccaatcgg 540
gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca 600
gcacccctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca 660
cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttagtcta 720
ga 722

<10> 233
<11> 233
<12> PRT
<13> 人工序列

<20>
<23> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 233
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15
Val His Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val
20 25 30
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45
Ser Arg Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60
Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser
85 90 95
Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr
100 105 110
Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 234
<211> 112
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 234
ataagaatgc ggccgcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggttagcaac 60
agctacaggt giccactccg aaatagtgat gacgcagctc ccagccaccc tg 112

<210> 235



<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 235
gccaccgiac glllgalltc cacgtlggc ccllggccga acgtc 45

<210> 236
<211> 103
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 236
ccggaattcc lcaccalggg alggagctgt atcatcctct lcltggtagc aacagctaca 60
ggtgtccact ccaggtgca gctacagcag tggggcgag gac 103

<210> 237
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成引子

<400> 237
ggaggcigag ctagcggtag ccagggltcc ctggccccag tggtc 45

<210> 238
<211> 352
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 238
caggigcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
accigcactg lctctggtag ctcacacagt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactiggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccgltgca glagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct cigtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta 300
actgggtact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc ag 352

<210> 239
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 239
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 240
<211> 322
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 240	
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gattgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120
ccctggccagg ctcaccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccgc tggcatccca	180
gacaggltca gggcagtggt gctctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
ccctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caglatggta gctccctcac ttctggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa ac	322

<210> 241
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 241
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45



Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 242
<211> 353
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 242
cagggtcagt tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcacig tctctggigc ctccalcagt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120
gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctalatca gtgggaggac cagctacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccgigtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta 300
actgggtact ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc agc 353

<210> 243
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 243
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser His Tyr
20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 244
<211> 329
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 244
gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct ccicacatcat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacagggtca gtggcagtggt gctggggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag 240
cctgaagact ttgcagtgta ttactgtcag cagtaaggta gctcacccat gtgcagtttt 300
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacg 329

<210> 245
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 245
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 246
<211> 362
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸



<400> 246
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagacac 60
tcttgtgcag cctctggatt cacctttagc cgtatgcc aagaactggg cgcagggt 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta ggggtgtag cacatactac 180
gcagactccg tgaaggccg gttaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300
gatttttggg gtggctcatt tgactactgg ggccaggga ccttggtcac cgtctctca 360
gc 362

<210> 247
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 247
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 248
<211> 323
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 248
gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctcaggggga aagagccacc 60
ctctccigtg gggccagtca gagtgttagt agaagcttag cctgggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctacggt gcatccacca gggccactgg gatccagcc 180

agggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagctt240

gaagatgttg cagttttatla ctgtcagcag tataataact ggatgtgcag ttttggccag300

gggaccaagc tggagatcaa acg323

<210> 249
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 249
Glu Ile Val Met Thr Pro Ser Ser Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys
85 90 95

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

<210> 250
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 25015

cattactact ggagc

<210> 251
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 251
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 252
<211> 48
<212> DNA



<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 252

cgtaatctata tcagtgggag gaccagctac aacccctccc tcaagagt

48

<210> 253

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 253

Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 254

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 254

gatcggctaa ctgggtactt tgactac

27

<210> 255

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 255

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 256

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 256

agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc

36

<210> 257

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 257

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 258
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 258
ggtgcatcca gcagggccgc t 21

<210> 259
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 259
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala
1 5

<210> 260
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 260
cagcagtaag gtagctccct cact 24

<210> 261
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 261
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 262
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 262
cattactact ggagc 15

<210> 263
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列



<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 263
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 264
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 264
cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 265
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 265
Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 266
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 266
gatcggtctaa ctgggtactt tgactac 27

<210> 267
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 267
Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 268
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 268
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

<210> 269
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 269
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 270
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 270
 ggtacatcca gcagggccac t

21

<210> 271
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 271
 Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 272
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 272
 cagcagiatg gtagctcacc catgtgcagt

30

<210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 273
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser
 1 5 10

<210> 274
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>



<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 274
cgctatgccca tgaac

15

<210> 275
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成肽

<400> 275
Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 276
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 276
ggatattagtg gtagtggtgg tagcacatcac tacgcagact ccgtgaaggg c

51

<210> 277
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>人工序列之描述：合成肽

<400> 277
Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 278
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 278
gatcgcgatt ttggagtgg tccatttgac tac

33

<210> 279
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 279

Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 280
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 280
agggccagtc agagtgttag lagaagctta gcc 33

<210> 281
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 281
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 282
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 282
ggigcatcca ccagggccac t 21

<210> 283
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 283
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 284
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 284
cagcagtata ataactggat gtgcagt 27

<210> 285
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 285

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys Ser
1 5

<210> 286

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 286

caggcgcagc tacagcaglg gggcgagga ctgtgaagc ctccgagac cctgtccctc	60
accigcgtg tcttggggg gtccttcagl gggtactact ggagctggat ccgccagccc	120
ccaggggaagg ggctggaglg gattggggaa atcaatcatt gtggaaacac caacgacaac	180
ccgtccctca agagtcgagc caccatata gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg	240
aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga	300
tacacctatg gtaactttga ccactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca	357

<210> 287

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 287

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ala Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 288
<211> 315
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 288
gaaatigigt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctctctgca gggccagtcga gagtgttagc agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120
ccaggccagg ctccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcacccca 180
gacaggltca gtggcagttgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
ccigaagait ttgcagtga tttctgtcag cagtaigaaa ggtcattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggat 315

<210> 289
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 289
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp
100 105

<210> 290
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 290
ggttactact ggagc 15

<210> 291



<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 291
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 292
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 292
gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aacccgtccc tcaag 45

<210> 293
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 293
Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 294
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 294
gaacgtggat acacctaagg taactttgac cac 33

<210> 295
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 295
Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
1 5 10

<210> 296
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 296
agggccagtc agagtgttag cagcaggtag ttagcct 37

<210> 297
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 297
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 298
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 298
ggtagcatcca gcagggccac tg 22

<210> 299
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 299
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 300
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成寡核苷酸

<400> 300
cagcagtagt aaaggtagt cactt 25

<210> 301
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 301
Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe Thr
1 5

<210> 302
<211> 5



<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列之描述：合成共同序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(3)
 <223> 任何胺基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Met或Trp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ser或Asn

<400> 302
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 303
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成共同序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 任何胺基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> 任何胺基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> 任何胺基酸或不存在

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> 任何胺基酸

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Thr 或 Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr、Thr或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(12)
 <223> 任何胺基酸

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Leu或Val

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Ser或Gly

<400> 303

Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa
1 5 10 15

<210> 304

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成共同序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(6)

<223> 任何胺基酸且此區域可涵蓋4至6個殘基

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(10)

<223> 任何胺基酸且此區域可涵蓋2至3個殘基

<400> 304

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

<210> 305

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成共同序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Arg或Lys

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Ala或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Val或Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Ser或Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(16)

<223> 任何胺基酸且此區域可涵蓋5至9個殘基

<400> 305

Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

<210> 306
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成共同序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(2)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> 任何胺基酸

<400> 306
Xaa Xaa Ser Xaa Arg Xaa Xaa
1 5

<210> 307
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成共同序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gln、His或Met

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Tyr或Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(10)
<223> 任何胺基酸且此區域可涵蓋5至7個殘基

<400> 307
Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 308
<211> 702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 308
algggaigga gctgtatcat cctcticttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgaa 60

atagtgaatga cgcagctctc agccacccctg tctgtgtctc caggggaaag agccacccctc	120
tcctgcaggg ccagtcagag tgttagcaga aacttagcct ggtalcagca gaaacctggc	180
caggctccca ggctctctat ctatgggtca tccaccaggg ccactggaat cccagccagg	240
ttcagtggca gtgggtctgg gacagagttc acitctacca tgggcagcct gcagctgaa	300
gattttgcag ttatttacig tcagcagiat aaaacctggc ctgggacgtt cggccaaggg	360
accaacgtgg aaatcaaacg tacgggtggc gcacatctg tcttcatctt cccgccatct	420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgcgaataa ctctatccc	480
agagaggcca aagtacagtg gaagggtgat aacgcccicc aatcgggtaa ctcccaggag	540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacctg	600
agcaaacgag actacagaa acacaaagtc tacgcttgcg aagtcaccca tcagggcctg	660
agctcgtccc tcacaaagag cttaacagg ggagagtgt ag	702

<210> 309

<211> 1407

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 309

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtgt ccactcccag	60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc	120
tgcgctgctt ttgggtgggtc tticagtggt tactactgga gctggatccg ccagccccca	180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcactgtg gaaacaccaa cgacaacccg	240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt cggcctgaag	300
ctgagttctg tgaccgccgc ggacacggct gtttattact gtgcgagaga acgtggatac	360
acctatggta accttgacca ctggggccag ggaaccttgg tcaccgtcag ctacacctcc	420
accaagggcc catcggtctt ccccttggca cctctcctca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggcccttg gctgccctgt caaggactac tccccgaac cgggtgacgtt gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccggctg tcttacagtc ctacaggactc	600
tactccctca gcagcgttgt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagttga gcccaaattc	720
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttccctt tcccccaaaa acccaaggac acctcatga tctcccgac cctgaggtc	840
acatgcgttg tgggtgacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgttg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgttg tcagctcct caccgtcctg caccaggact ggctgaattg caaggagtac	1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacct ctccaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac acctgcccc catcccgga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgctgtgtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260



tccgacggct ccttcttcc ttcagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1380
agccctctcc tgtctccggg taaataa	1407

<210> 310
 <211> 1410
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 310	
atggagtlilg ggctgagctg gctttttctt gtggctatlt taaaaggigt ccagltgag	60
gtgcagctgt tggagcttgg gggaggcttg gtacagcctg gggggctcc t gagactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac ctltagccgc tatgccatga actgggtccg ccaggctcca	180
gggaaggggc tggagtgggt ctacagttat agtgggagtg gtggtaggac atactacgca	240
gactccgtga agggccgggt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac actatattctg	300
caaatgaaca gccctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa agatcgcgat	360
ttttggagtg gtccatttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt cagctcagcc	420
tccaccaagg gcccatcgggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	480
acagcggccc tgggtctcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtagc ggtgtcgttg	540
aactcaggcg ccttgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttcagca gcttgggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa	720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tggccagcac ctgaacacct ggggggaccg	780
tcagctctcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag	840
gtcatatgct tgggtgttga cgtgagccac gaagaccttg aggtcaagtt caactggtac	900
gtggacggcg tggagggtga laalgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
tacaagtgtc aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1080
gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccttgc ccccatcccc ggatgagctg	1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgtg	1260
gactccgacg gtctcttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggltggcag	1320
caggggaaacg tcttctcatg ctccgtgatg calgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1380
aagagcctct cctgtcttcc gggtaaaataa	1410

<210> 311
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

```

<400> 311
atgaggctcc ctagcagct tctcttccct ctagctactct ggctcccaga taccactgga    60
gaaatagtga tgaagccgtc ttcagccacc ctagctgtgt ctcaggggga gagagccacc    120
ctctccgtca gggccagtca gagtgttagt agaaacttag cctggtagca gcagaaacct    180
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatccagcc    240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagctt    300
gaagatttg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggaatgicag ttltggccag    360
gggaccaagc tggagatcaa acgtacggig gcctgacccat ctgtcttcat ctltcccgcca    420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtgtgtt gccctgcigaa taacttctat    480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggig gataacgccc lccaatcggg taactcccag    540
gagagigtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gccacagcag caccctgacc    600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc    660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                        705

```

```

<210> 312
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Leu或Val

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Ser或Gly

```

```

<400> 312
Ser Xaa Lys Xaa
1

```

```

<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys或Arg

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala或Ser

```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Val或Leu

```



<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ser或Leu

<400> 313
Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 314
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 314
Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 315
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 315
Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 316
<211> 18
<212> PRT
<213> 大腸桿菌

<400> 316
Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 317
<211> 638
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 317
Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu
20 25 30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn
35 40 45

Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60
 Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu
 65 70 75 80
 Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala Gln Arg Met Gly Cys Val Leu
 85 90 95
 Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr
 100 105 110
 Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys
 115 120 125
 Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
 130 135 140
 Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys
 145 150 155 160
 Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 165 170 175
 Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
 180 185 190
 Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
 195 200 205
 Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
 210 215 220
 Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
 225 230 235 240
 Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
 245 250 255
 Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
 260 265 270
 Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser
 275 280 285
 Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
 290 295 300
 Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
 305 310 315 320
 Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
 325 330 335
 Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
 340 345 350

Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
355 360 365

Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
370 375 380

Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp
385 390 395 400

Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
405 410 415

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
420 425 430

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
435 440 445

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
450 455 460

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
465 470 475 480

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
485 490 495

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
500 505 510

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
515 520 525

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
530 535 540

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
545 550 555 560

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
565 570 575

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
580 585 590

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
595 600 605

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
610 615 620

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
625 630 635

<210> 318
<211> 707

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 318

Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu
20 25 30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn
35 40 45

Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala Gln Arg Met Gly Cys Val Leu
85 90 95

Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr
100 105 110

Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys
115 120 125

Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
130 135 140

Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
165 170 175

Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
180 185 190

Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
195 200 205

Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
210 215 220

Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
225 230 235 240

Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
245 250 255

Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
260 265 270

Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser
275 280 285

Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
290 295 300

Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
305 310 315 320

Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
325 330 335

Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
340 345 350

Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
355 360 365

Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
370 375 380

Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp
385 390 395 400

Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
405 410 415

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe
420 425 430

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
435 440 445

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
450 455 460

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
465 470 475 480

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
485 490 495

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
500 505 510

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
515 520 525

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
530 535 540

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
545 550 555 560

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
565 570 575

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
580 585 590

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
595 600 605

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
610 615 620

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Asp Leu
625 630 635 640

Asp Asp Val Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp
645 650 655

Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr
660 665 670

Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val
675 680 685

Val Glu Leu Lys Gln Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly
690 695 700

Gln Gly Ala
705

<210> 319
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 319
Gly Phe Leu Gly
1



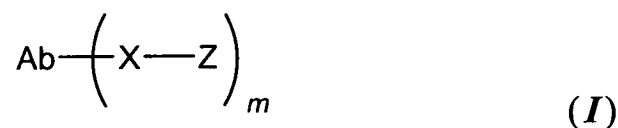
七、申請專利範圍：

1. 一種抗-GCC抗體分子，其包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中該輕鏈可變區包含3個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2及LCDR3)，且該重鏈可變區包含3個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2及HCDR3)，

其中該輕鏈可變區包含：包含SEQ ID NO:112之胺基酸序列之LCDR1、包含SEQ ID NO:114之胺基酸序列之LCDR2及包含SEQ ID NO:116之胺基酸序列之LCDR3；
且

其中該重鏈可變區包含：包含SEQ ID NO:106之胺基酸序列之HCDR1、包含SEQ ID NO:108之胺基酸序列之HCDR2及包含SEQ ID NO:110之胺基酸序列之HCDR3。

2. 如請求項1之抗-GCC抗體分子，其另外包含人類或人類來源之輕鏈及重鏈可變區構架。
3. 如請求項1或2之抗-GCC抗體分子，其中該抗-GCC抗體分子為IgG1抗體。
4. 如請求項1或2之抗-GCC抗體分子，其中該輕鏈可變區包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列且該重鏈可變區包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列。
5. 如請求項1或2之抗-GCC抗體分子，其中該抗-GCC抗體分子未結合於治療劑。
6. 如請求項1或2之抗-GCC抗體分子，其中該抗-GCC抗體分子結合於治療劑或可偵測標記。
7. 一種式(I)之免疫結合物，



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

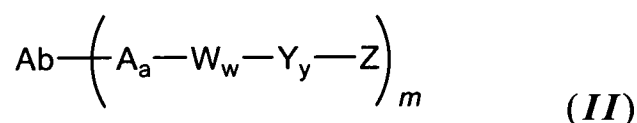
Ab為如請求項1至4中任一項之抗-GCC抗體分子；

X為連接Ab與Z之連接子部分；

Z為治療劑或標記；且

m為式(I)免疫結合物中每個抗-GCC抗體分子中-X-Z部分的數目，且m為1至15之整數。

8. 如請求項7之免疫結合物，其中Z為可偵測標記。
9. 如請求項7之免疫結合物，其中-Z為美登素(maytansine)或奧瑞他汀(auristatin)。
10. 如請求項7之免疫結合物，其中-Z為DM1或DM4。
11. 如請求項7之免疫結合物，其中-Z為MMAE或MMAF。
12. 如請求項7之免疫結合物，其中該連接子-X-具有式-A_a-W_w-Y_y-，且該免疫結合物之特徵為式(II)：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

-A-為延伸子單元(Stretcher unit)；

a為0或1；

各-W-獨立地為胺基酸單元；

w為0至12範圍之整數；

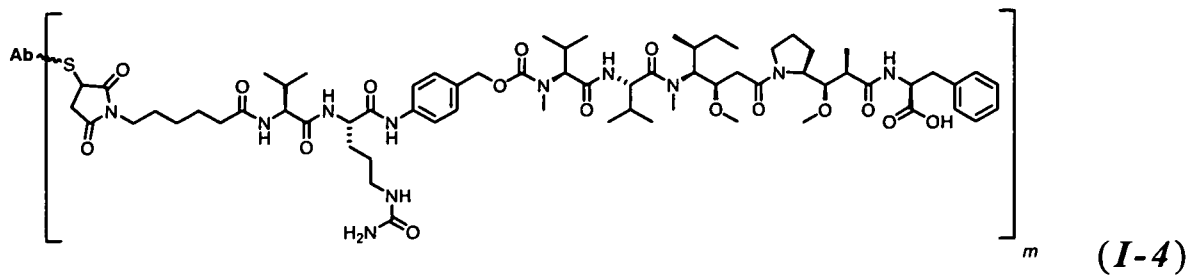
-Y-為自我分解型間隔子單元；

y 為 0、1 或 2；

Z為治療劑或標記；且

m 在 1 至 15 之整數。

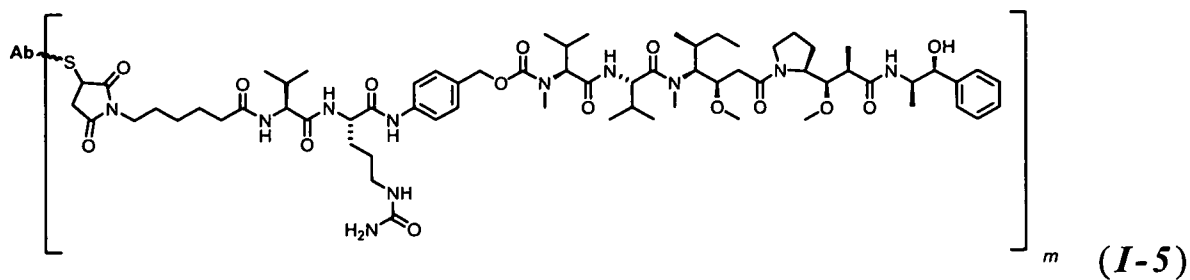
13. 如請求項7之免疫結合物，其具有式(I-4)，



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

m 為 1 至 8 之整數。

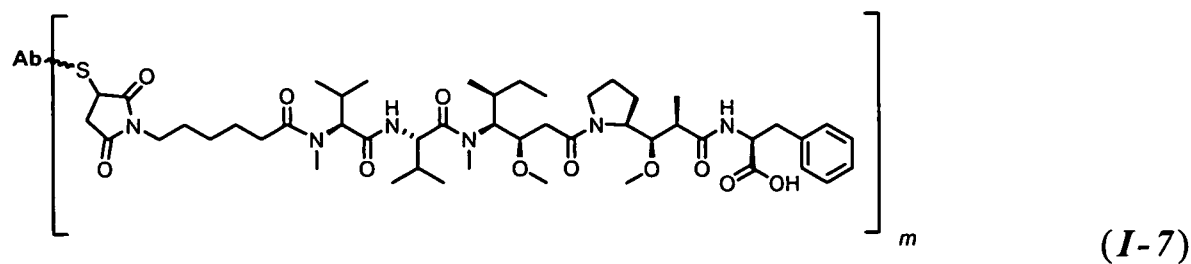
14. 如請求項7之免疫結合物，其具有式(I-5)，



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

m 為 1 至 8 之整數。

15. 如請求項7之免疫結合物，其具有式(I-7)之免疫結合物，



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

m 為 1 至 8 之整數。

16. 如請求項 13 至 15 中任一項之免疫結合物，其中 m 為 1 至 3。
17. 如請求項 13 至 15 中任一項之免疫結合物，其中 m 為 3 至 5。
18. 如請求項 1 或 2 之抗體分子或如請求項 7 至 15 中任一項之免疫結合物，其係用於治療個體癌症之方法。
19. 如請求項 18 之抗體分子或免疫結合物，其中該癌症為胃腸系統癌症或其轉移性病變。
20. 如請求項 18 之抗體分子或免疫結合物，其中該癌症為原位或轉移性結腸直腸癌、胃癌、食道癌或肺癌。
21. 一種如請求項 1 至 6 中任一項之抗體分子或如請求項 7 至 17 中任一項之免疫結合物之用途，其係用於製備治療癌症之藥物。
22. 如請求項 21 之用途，其中該癌症為胃腸系統癌症或其轉移性病變。
23. 如請求項 21 之用途，其中該癌症為原位或轉移性結腸直腸癌、胃癌、食道癌或肺癌。
24. 如請求項 21 至 23 中任一項之用途，其中該藥物係用於與一或多種額外治療劑併用。
25. 如請求項 24 之用途，其中該一或多種額外治療劑包含 5-氟尿嘧啶 (5-FU)、卡培他濱 (capecitabine)、甲醯四氫葉酸 (leucovorin)、伊立替康 (irinotecan)、奧賽力鉑 (oxaliplatin)、貝伐單抗 (bevacizumab)、西妥昔單抗

(cetuximab)、帕尼單抗(panitumum)或其組合。

26. 如請求項25之用途，其中該組合係選自奧賽力鉑/卡培他濱(XELOX)、5-FU/甲醯四氫葉酸/奧賽力鉑(FOLFOX)、5-FU/甲醯四氫葉酸/伊立替康(FOLFIRI)、FOLFOX加貝伐單抗或FOLFIRI加貝伐單抗。
27. 如請求項24之用途，其中該一或多種額外治療劑包含化學治療劑。
28. 如請求項27之用途，其中該化學治療劑為DNA損傷劑。
29. 如請求項28之用途，其中該化學治療劑係選自拓撲異構酶I抑制劑；拓撲異構酶(topoisomerase)II抑制劑；烷化劑；DNA嵌入劑；DNA嵌入劑及自由基產生劑；及核苷模擬物。
30. 如請求項29之用途，其中該拓撲異構酶I抑制劑係選自伊立替康(irinotecan)、拓撲替康(topotecan)、喜樹鹼(camptothecin)及其代謝物，或小紅莓(doxorubicin)。
31. 如請求項29之用途，其中該拓撲異構酶II抑制劑係選自依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)或道諾黴素(daunorubicin)。
32. 如請求項29之用途，其中該烷化劑係選自美法侖(melphalan)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、白消安(busulfan)、塞替派(thiotepa)、異環磷醯胺(isosfamide)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、鏈佐星(streptozocin)、氮烯唑胺(decarbazine)、甲胺喋呤

(methotrexate)、絲裂黴素 C(mitomycin C)或環磷醯胺(cyclophosphamide)。

33. 如請求項29之用途，其中該DNA嵌入劑係選自順鉑、奧賽力鉑或卡鉑(carboplatin)。

34. 如請求項29之用途，其中該自由基產生劑係為博來黴素(bleomycin)。

35. 如請求項29之用途，其中該核苷模擬物係選自5-氟尿嘧啶、卡培他濱(capecitabine)、吉西他濱(gemcitabine)、氟達拉濱(fludarabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、噴司他汀(pentostatin)及羥基脲。

36. 如請求項27之用途，其中該化學治療劑為干擾細胞複製之藥劑。

37. 如請求項36之用途，其中該化學治療劑係選自太平洋紫杉醇、多西他賽、長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastin)、沙力度胺(thalidomide)、來那度胺(lenalidomide)、CC-5013、CC-4047、蛋白質酪胺酸激酶抑制劑、蛋白酶體抑制劑、包括I κ B激酶之抑制劑的NF- κ B抑制劑、結合於過度表現於癌症中之蛋白質且藉此下調細胞複製的抗體、及已知在癌症中上調、過度表現或活化之蛋白質或酶之其他抑制劑，對該等蛋白質或酶之抑制下調細胞複製。

38. 如請求項37之用途，其中該蛋白質酪胺酸激酶抑制劑係為甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)或吉非替尼

(gefitinib)。

39. 如請求項37之用途，其中該蛋白酶體抑制劑係為硼替佐米(bortezomib)。
40. 如請求項37之用途，其中該結合於過度表現於癌症中之蛋白質且藉此下調細胞複製的抗體係選自曲妥珠單抗(trastuzumab)、利妥昔單抗(rituximab)、西妥昔單抗(cetuximab)或貝伐單抗(bevacizumab)。
41. 如請求項21之用途，其中該用途進一步包含於活體外偵測GCC分子，該偵測GCC分子包含將該分子與抗體分子接觸及判定是否該抗體分子結合至該GCC分子。
42. 一種經分離之核酸，其編碼如請求項1至4中任一項之抗體分子。
43. 一種經分離之核酸，其編碼如請求項1至4中任一項之抗體分子之可變區。
44. 如請求項42或43之經分離之核酸，其包含SEQ ID NO:17或19之核酸序列。
45. 一種細胞，其包含如請求項42至44中任一項之之經分離之核酸。
46. 一種製備如請求項1至4中任一項之抗體分子的方法，其包含在允許產生抗體分子之條件下培養如請求項45之細胞，藉此產生如請求項1至4中任一項之抗體分子。
47. 一種載體，其包含如請求項1至4中任一項之抗體分子的輕鏈及重鏈中之一或兩者。
48. 一種於活體外偵測GCC分子之方法，其包含使該分子與

- 如請求項1至6中任一項之抗體分子接觸，及判定該抗體分子是否結合於該GCC分子。
49. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至6中任一項之抗體分子及醫藥上可接受之載劑。
50. 一種醫藥組合物，其包含如請求項7至17中任一項之免疫結合物及醫藥上可接受之載劑。
51. 如請求項50之醫藥組合物，其包含複數個式(I)之免疫結合物，其中至少二個之該等免疫結合物具有不同之 m 值。
52. 如請求項50之醫藥組合物，其包含複數個式(I)之免疫結合物，其中 m 為每個抗-GCC抗體分子中-X-Z部分的平均數目。
53. 如請求項52之醫藥組合物，其中 m 為整數4。
54. 如請求項51至53中任一項之醫藥組合物，其包含複數個式(I-5)之免疫結合物。
55. 如請求項49或50中任一項之醫藥組合物，其係用於治療個體癌症之方法。
56. 如請求項55之醫藥組合物，其中該癌症為胃腸系統癌症或其轉移性病變。
57. 如請求項55之醫藥組合物，其中該癌症為原位或轉移性結腸直腸癌、胃癌、食道癌或肺癌。
58. 一種容器，其包含如請求項50至57中任一項之醫藥組合物。
59. 一種套組，其包含如請求項1至6中任一項之抗-GCC抗體

分子。

60. 一種套組，其包含如請求項7至17中任一項之免疫結合物。

八、圖式：

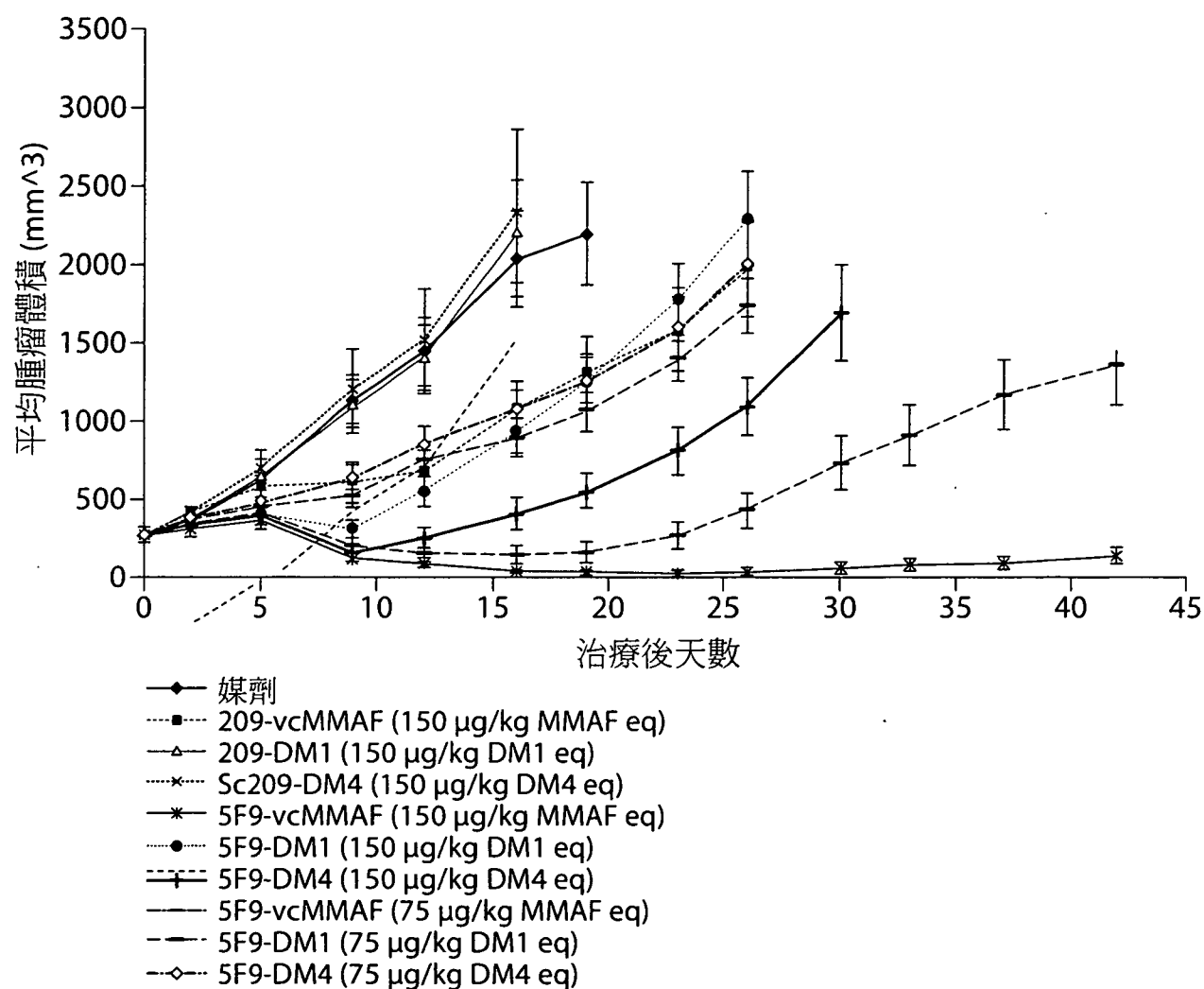


圖1

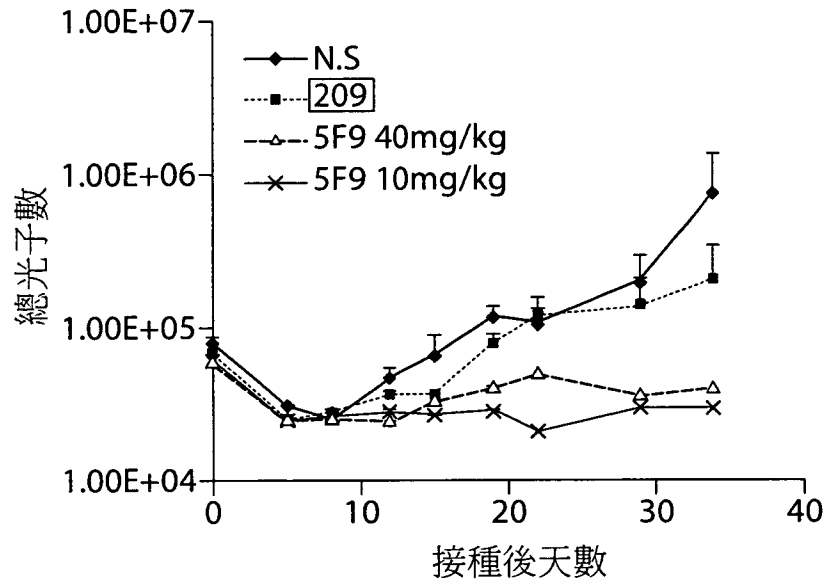
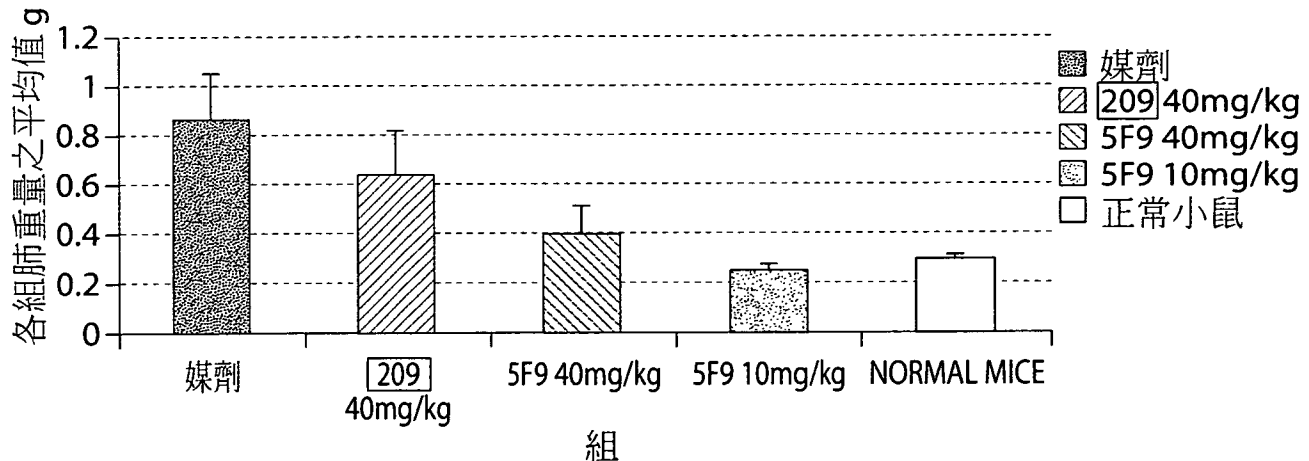


圖2



T 測驗法：媒劑相對於209 40mg/kg P=0.4
媒劑相對於5F9 40mg/kg P=<0.05
媒劑相對於 5F9 10mg/kg P=<0.01

圖3

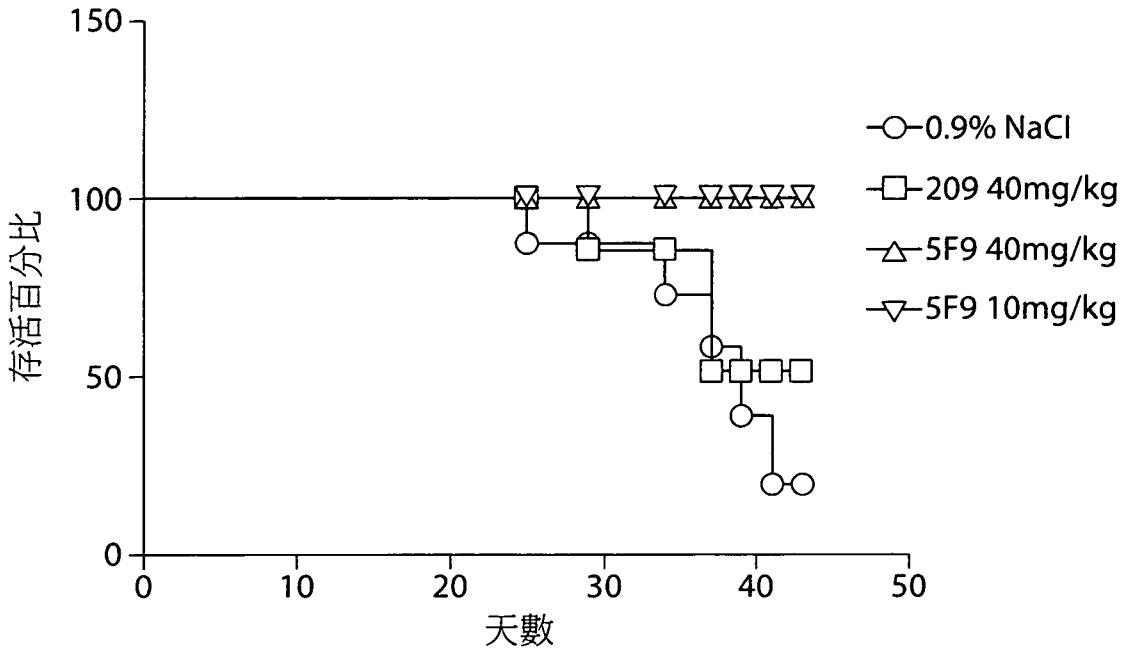


圖4