



(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 I882308 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：112112533

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 29 日

(51)Int. Cl. : A61K47/50 (2017.01)

C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/29 美國

61/387,933

(71)申請人：美商艾澤西公司 (美國) AGENSYS, INC. (US)

美國

美商思進公司 (美國) SEAGEN INC. (US)

美國

(72)發明人：薩帕維 道雷特 SATPAYEV, DAULET (RU)；莫里森 羅伯特 凱達爾
MORRISON, ROBERT KENDALL (GB)；莫里森 凱倫 珍 密瑞克 MORRISON,
KAREN JANE MEYRICK (GB)；古達 珍 GUDAS, JEAN (US)；賈科波斯 艾
亞 JAKOBOVITS, AYA (US)；托格 麥可 TORGOV, MICHAEL (US)；安 吉
利 AN, ZILI (US)

(74)代理人：陳長文

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所 BCRC 960435 2011 年 12 月 08 日

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：35 項 圖式數：21 共 191 頁

(54)名稱

與 191P4D12 蛋白結合之抗體藥物共軛物(ADC)

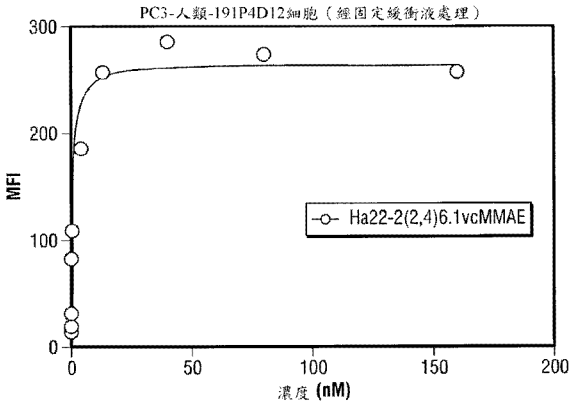
(57)摘要

本發明提供與 191P4D12 蛋白及其變異體結合之抗體藥物共軛物(antibody drug conjugate, ADC)。191P4D12 在正常成人組織中展現組織特異性表現，且在表 I 中所列之癌症中異常地表現。因此，本發明之 ADC 提供一種用於治療癌症之治療性組合物。

Antibody drug conjugates (ADC's) that bind to 191P4D12 protein and variants thereof are described herein. 191P4D12 exhibits tissue specific expression in normal adult tissue, and is aberrantly expressed in the cancers listed in Table I. Consequently, the ADC's of the invention provide a therapeutic composition for the treatment of cancer.

指定代表圖：

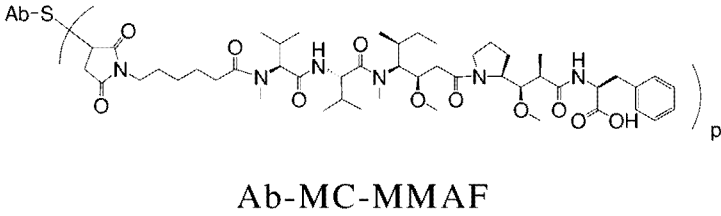
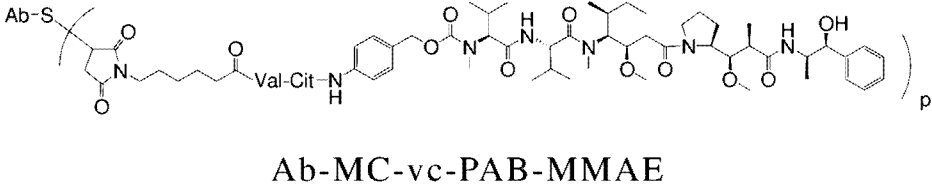
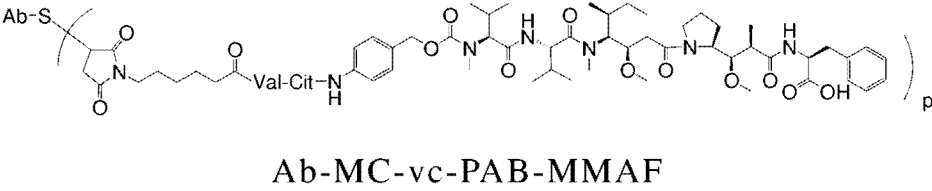
MFI值 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE 貨號vcE-03
160	257
80	273
40	285
13.33	256
4.44	183
1.48	183
0.49	105
0.16	78
0.05	26
0.02	14
0.01	9
0.000	1



	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE 貨號vcE-03
Bmax	265
Kd (nM)	0.69

【圖 6】

特徵化學式：





I882308

【發明摘要】

【中文發明名稱】

與191P4D12蛋白結合之抗體藥物共軛物(ADC)

【英文發明名稱】

ANTIBODY DRUG CONJUGATES (ADC) THAT BIND TO
191P4D12 PROTEINS

【中文】

本發明提供與191P4D12蛋白及其變異體結合之抗體藥物共軛物(antibody drug conjugate, ADC)。191P4D12在正常成人組織中展現組織特異性表現，且在表I中所列之癌症中異常地表現。因此，本發明之ADC提供一種用於治療癌症之治療性組合物。

【英文】

Antibody drug conjugates (ADC's) that bind to 191P4D12 protein and variants thereof are described herein. 191P4D12 exhibits tissue specific expression in normal adult tissue, and is aberrantly expressed in the cancers listed in Table I. Consequently, the ADC's of the invention provide a therapeutic composition for the treatment of cancer.

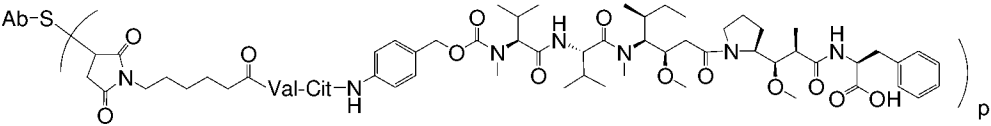
【指定代表圖】

圖6

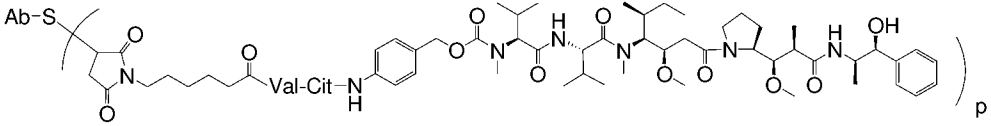
【代表圖之符號簡單說明】

無

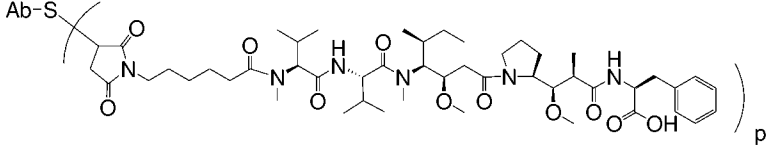
【特徵化學式】



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

【發明說明書】

【中文發明名稱】

與191P4D12蛋白結合之抗體藥物共軛物(ADC)

【英文發明名稱】

ANTIBODY DRUG CONJUGATES (ADC) THAT BIND TO
191P4D12 PROTEINS

【技術領域】

本文所述之本發明係關於結合稱為191P4D12之蛋白質的抗體、其結合片段及抗體藥物共軛物(ADC)。本發明此外係關於適用於治療表現191P4D12之癌症的預後、預防及治療方法及組合物。

相關申請案的交叉引用

本申請案為非臨時專利申請案，其主張2010年9月29日申請之美國臨時專利申請案第61/387,933號的優先權。此段落中所列之每一申請案的內容全部以引用的方式併入本文中。

根據聯邦政府資助研究所作之本發明之權利聲明

不適用。

【先前技術】

癌症係僅次於冠脈疾病之第二大人類死亡原因。在全世界範圍內，每年有數百萬人死於癌症。僅在美國，據美國癌症學會(American Cancer Society)報導，每年死於癌症之人數遠遠超過五十萬，其中每年診斷出超過一百二十萬例新病例。雖然因心臟病所致之死亡已明顯減少，但癌症所致之死亡卻普遍上升。在下個世紀初，預計癌症將成為首要死亡原因。

在全世界範圍內，有數種癌症作為主要殺手而浮現出。詳言之，肺

癌、前列腺癌、乳癌、結腸癌、胰腺癌、卵巢癌及膀胱癌代表主要癌症死亡原因。此等及幾乎所有其他癌瘤均具有共同的致命特點。除了極少數例外情況，癌症轉移性疾病為致命性的。此外，即使對於最初倖免於其原發性癌症之彼等癌症患者，共同經歷已顯示其壽命發生戲劇性的變化。許多癌症患者因知道可能會復發或治療失敗而經歷嚴重焦慮症。許多癌症患者在治療後身體衰弱。此外，許多癌症患者會復發。

在全世界範圍內，前列腺癌為男性第四大最常發生之癌症。在北美及北歐，迄今為止，其仍為男性最常見癌症且為男性第二大癌症死亡原因。僅在美國，每年死於此疾病之男性遠遠超過30,000人，僅次於肺癌。雖然此等數字龐大，但對於轉移性前列腺癌仍無有效的治療法。手術前列腺切除術、放射療法、激素切除療法、手術閹割及化學療法仍為主要治療形式。遺憾的是，此等治療對於許多人無效且往往會伴隨不良後果。

在診斷前沿，缺乏可準確偵測早期局部腫瘤之前列腺腫瘤標誌仍為此疾病之診斷及控制中的明顯局限。儘管血清前列腺特異性抗原(PSA)檢定已成為十分有用的工具，但其特異性及一般效用普遍認為在數個重要方面欠缺。

在鑑別針對前列腺癌之其他特定標誌方面的進展已藉由產生可在小鼠中再現該疾病之不同階段的前列腺癌異種移植物有所改進。LAPC(洛杉磯前列腺癌，Los Angeles Prostate Cancer)異種移植物為如下前列腺癌異種移植物，其已在重度複合性免疫缺陷(severe combined immune deficient, SCID)小鼠體內繼代存活且已展現模擬自雄激素依賴性向雄激素獨立性轉變之能力(Klein等人1997, Nat. Med. 3:402)。近年來，已鑑別出之前列腺癌標誌包括PCTA-1(Su等人1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

93: 7252)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)(Pinto等人Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51)、STEAP(Hubert等人Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8)及前列腺幹細胞抗原(PSCA)(Reiter等人1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735)。

雖然先前鑑別出之標誌(諸如PSA)已有助於試圖診斷及治療前列腺癌，但仍需要鑑別前列腺及相關癌症之其他標誌及治療性標靶以進一步改良診斷及療法。2000年在美國估計出現130,200例結腸直腸癌，包括93,800例結腸癌及36,400例直腸癌。

結腸直腸癌為男性及女性之第三大最常見癌症。在1992年-1996年期間，發病率明顯降低(每年降低2.1%)。研究顯示，此等降低係歸因於篩檢增多及息肉移除，從而預防息肉發展為侵入性癌症。2000年，估計有56,300例死亡(47,700例死於結腸癌、8,600例死於直腸癌)，佔美國所有癌症死亡數之約11%。

目前，手術為結腸直腸癌之最常見治療形式，且對於尚未擴散之癌症而言，其通常有療效。對於癌症已深深穿透腸壁或已擴散至淋巴結之大部分患者，在手術之前或之後進行化學療法或化學療法加放射。結腸癌有時需要永久結腸造口術(在腹部造出開口以排出身體廢物)且直腸癌偶爾需要之。仍需要針對結腸直腸癌之有效診斷及治療形式。

在美國所有癌症新病例中，膀胱癌在男性中佔約5%(第五大最常見贅瘤)且在女性中佔3%(第八大最常見贅瘤)。隨著老年人口的增多，發病率緩慢上升。1998年，估計有54,500例，包括男性39,500例及女性15,000例。在美國，按年齡調整後之發病率為每100,000名男性中有32名及每100,000名女性中有8名。男性/女性之3:1歷史性比率可能不斷降低，此與

女性吸菸行為有關。1998年，估計膀胱癌導致11,000例死亡(男性7,800例且女性3,900例)。膀胱癌發病率及死亡率隨年齡急劇上升且將因人口老齡化而逐漸成為問題。

大部分膀胱癌會在膀胱復發。用經尿道膀胱切除術(TUR)與膀胱內化學療法或免疫療法之組合來控制膀胱癌。膀胱癌之多灶及復發性質說明了TUR之侷限性。大部分肌肉侵入性癌症無法藉由單獨TUR來治癒。根治性膀胱切除術及尿流改道為除去癌症之最有效方法，但對泌尿功能及性功能具有不可否認的影響。仍亟需有益於膀胱癌患者之治療形式。

2000年，估計有164,100例肺及支氣管癌新病例，佔美國所有癌症診斷之14%。肺及支氣管癌之發病率在男性中明顯降低，自1984年每100,000名中有86.5名之高發病率降低至1996年之70.0名。在1990年代，女性增加速率開始減緩。1996年，女性發病率為每100,000名中有42.3名。

2000年，肺及支氣管癌估計導致156,900例死亡，佔所有癌症死亡數之28%。在1992年-1996年期間，肺癌死亡率在男性中明顯降低(每年降低1.7%)，而女性死亡率仍顯著上升(每年上升0.9%)。自1987年以來，每年死於肺癌的女性比死於乳癌的女性要多，此為40多年來女性之主要癌症死亡原因。肺癌發病率及死亡率的降低很可能由前30年來吸菸率的降低引起；然而，女性吸菸行為的減少落後於男性。令人擔憂的是，雖然成人之菸草使用的降低已減緩，但青少年之菸草使用卻再次上升。

肺及支氣管癌之治療選擇方案係依據癌症之類型及階段來判定且包括手術、放射療法及化學療法。對於許多局部癌症，一般選擇手術治療。由於疾病到發現時一般已擴散，因此往往需要將放射療法及化學療法與手

術結合。單獨化學療法或化學療法與放射之組合為選擇用於小細胞肺癌之治療；按照此療法，大部分患者經歷緩解，在一些情況下，此緩解為長久的。然而，不斷需要針對肺及支氣管癌之有效治療及診斷方法。

預期在2000年期間在美國女性中估計有182,800例侵入性乳癌新病例。另外，預期2000年在男性中診斷出約1,400例乳癌新病例。在1980年代每年增加約4%後，1990年代的女性乳癌發病率已平穩至每100,000名中有約110.6例。

僅在美國，2000年估計就有41,200例(女性40,800例、男性400例)死於乳癌。乳癌在女性癌症死亡中位居第二位。根據最新資料，在1992年-1996年期間，死亡率顯著降低，其中白人與黑人年輕女性的降幅最大。此等降低多半為早期偵測及改進治療之結果。

考慮到醫療環境及患者偏好，乳癌治療可包括乳房腫瘤切除術(局部移除腫瘤)及腋下淋巴結移除；乳房切除術(手術移除乳房)及腋下淋巴結移除；放射療法；化學療法；或激素療法。通常將兩種或兩種以上方法組合使用。許多研究已顯示，對於早期疾病，乳房腫瘤切除術加放射療法後之長期存活率類似於改良型根治性乳房切除術後之存活率。重建技術之顯著進步為乳房切除術後之乳房重建提供數種選擇方案。最近，該重建術已與乳房切除術同時進行。

具有足量周圍正常乳房組織之乳腺管原位癌(DCIS)之局部切除術可防止DCIS之局部復發。乳房放射及/或他莫昔芬(tamoxifen)可降低其餘乳房組織中DCIS之發生機率。此為重要的，原因在於若不治療，則DCIS會發展成侵入性乳癌。儘管如此，此等治療仍存在嚴重的副作用或後遺症。因此，需要有效的乳癌治療。

2000年在美國估計有23,100例的卵巢癌新病例。其佔所有女性癌症之4%且在婦科癌症中位居第二位。在1992年-1996年期間，卵巢癌發病率顯著降低。2000年估計有14,000例因卵巢癌而引起的死亡。卵巢癌引起之死亡數比女性生殖系統之任何其他癌症多。

手術、放射療法及化學療法為卵巢癌之治療選擇方案。手術一般包括移除一或兩個卵巢、輸卵管(輸卵管卵巢切除術)及子宮(子宮切除術)。在一些極早期腫瘤中，僅移除所涉及之卵巢，尤其在希望擁有孩子之年輕女性中。在晚期疾病中，設法移除所有腹內疾病以增強化學療法之效果。仍非常需要針對卵巢癌之有效治療選擇方案。

2000年在美國估計有28,300例胰臟癌新病例。在過去20年中，男性胰臟癌發病率已降低。女性胰臟癌發病率保持大致恆定，而且可能開始降低。2000年在美國估計胰腺癌導致28,200例死亡。在過去20年中，男性死亡率存在微小但明顯的降低(每年降低約0.9%)，而女性死亡率略有上升。

手術、放射療法及化學療法為胰臟癌之治療選擇方案。此等治療選擇方案可延長許多患者之存活時間及/或減輕其症狀，但對於大部分患者而言，不大可能治癒。亟需針對癌症之其他治療及診斷選擇方案。此等選擇方案包括使用抗體、疫苗及小分子作為治療形式。另外，在癌症治療及研究之所有領域中，亦需要使用此等形式作為診斷、偵測、監測及促進先前技術之研究工具。

單株抗體(mAb)之治療效用(G. Kohler 及 C. Milstein, Nature 256:495-497 (1975))正在瞭解中。單株抗體現已獲准作為移植、癌症、感染性疾病、心血管疾病及炎症之療法。不同同型具有不同效應功能。該等

功能差異反映在各種免疫球蛋白同型之不同三維結構上(P.M. Alzari等人 Annual Rev. Immunol., 6:555-580 (1988))。

因為小鼠方便進行免疫接種且將大部分人類抗原識別為外來抗原，所以具有治療潛力之針對人類標靶的mAb通常來源於鼠類。然而，鼠類mAb作為人類治療劑具有固有缺陷。由於mAb在人體中具有比人類抗體短的循環半衰期，因此其需要更頻繁的給藥。更關鍵的是，將鼠類抗體重複投與人類免疫系統會引起人類免疫系統產生如下反應：將小鼠蛋白質識別為外來蛋白質且產生人類抗小鼠抗體(HAMA)反應。該HAMA反應可引起過敏反應及鼠類抗體自系統中快速清除，從而使鼠類抗體治療無用。為避免該等影響，已設法在小鼠體內形成人類免疫系統。

初始嘗試希望用具有人類序列之抗體產生能夠對抗原有反應之轉殖基因小鼠(參見Bruggemann等人Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713 (1989))，但其受可由可用選殖運載工具穩定維持之DNA量的限制。酵母人工染色體(YAC)選殖載體之使用對於將人類Ig基因座之大生殖系片段引入轉殖基因哺乳動物體內起到導引作用。存在於人類基因組及人類恆定區中之以相同間距排列之大部分人類V、D及J區基因基本上係使用YAC引入小鼠體內。一種該轉殖基因小鼠品系稱為XenoMouse®小鼠且購自Amgen Fremont, Inc.(Fremont CA)。

【發明內容】

本發明提供與191P4D12蛋白及191P4D12蛋白之多肽片段結合的抗體、其結合片段及抗體藥物共軛物(ADC)。在一些實施例中，本發明包含與治療劑共軛之全人類抗體。在某些實施例中，限制條件為不編碼圖3之整個核酸序列及/或不製備圖2之整個胺基酸序列。在某些實施例中，編碼

圖3之整個核酸序列及/或製備圖2之整個胺基酸序列，兩者皆採用各別人類單位劑型。

本發明進一步提供各種免疫原性或治療性組合物，諸如抗體藥物共軛物，及治療表現191P4D12之癌症(諸如表I中所列之組織癌症)的策略。

【圖式簡單說明】

圖1。191P4D12之cDNA (SEQ ID NO: 1)及胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)展示於圖1中。對起始甲硫胺酸加下劃線。開放閱讀框架自核酸264延伸至核酸1796，包括終止密碼子。

圖2。191P4D12抗體之核酸及胺基酸序列。

圖2A。Ha22-2(2,4)6.1重鏈之cDNA (SEQ ID NO: 3)及胺基酸序列(SEQ ID NO: 4)。對前導序列加雙下劃線，對重鏈可變區加下劃線，且對人類IgG1恆定區加虛下劃線。

圖2B。Ha22-2(2,4)6.1輕鏈之cDNA (SEQ ID NO: 5)及胺基酸序列(SEQ ID NO: 6)。對前導序列加雙下劃線，對輕鏈可變區加下劃線，且對人類 κ 恆定區加虛下劃線。

圖3。191P4D12抗體之胺基酸序列。

圖3A。Ha22-2(2,4)6.1重鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO: 7)。對前導序列加雙下劃線，對重鏈可變區加下劃線，且對人類IgG1恆定區加虛下劃線。

圖3B。Ha22-2(2,4)6.1輕鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO: 8)。對前導序列加雙下劃線，對輕鏈可變區加下劃線，且對人類 κ 恆定區加虛下劃線。

圖4。Ha22-2(2,4)6.1抗體與人類Ig生殖系之比對。

圖4A。Ha22-2(2,4)6.1重鏈(SEQ ID NO: 3、4之一部分)與人類Ig生殖系VH3-48 (SEQ ID NO: 9)之比對。

圖4B。Ha22-2(2,4)6.1輕鏈(SEQ ID NO: 5、6之一部分)與人類Ig生殖系L5 (SEQ ID NO: 10)之比對。

圖5。Ha22-2(2,4)6.1 MAb結合檢定。**圖5A**：使用流動式細胞測量術偵測Ha22-2(2,4)6.1 MAb之結合。用來自融合瘤或CHO細胞之Ha22-2(2,4)6.1 MAb將RAT-對照組及RAT-191P4D12細胞染色。藉由流動式細胞測量術偵測結合。結果顯示在CHO細胞中重組表現之Ha22-2(2,4)6.1 MAb分泌且與細胞表面191P4D12特異性結合。**圖5B**：使用ELISA偵測Ha22-2(2,4)6.1 Mab之結合。藉由ELISA測試來自融合瘤或CHO細胞之Ha22-2(2,4)6.1 MAb與重組191P4D12純化細胞外蛋白質之結合。結果顯示結合於來源於CHO及融合瘤之Ha22-2(2,4)6.1的191P4D12蛋白為一致的。

圖6。藉由FACS使用PC3-人類-191P4D12細胞測定Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE親和性。親和性為0.69 Kd。

圖7。藉由FACS使用PC3-食蟹獼猴-191P4D12細胞測定Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE親和性。親和性為0.34 Kd。

圖8。藉由FACS使用PC3-大鼠-191P4D12細胞測定Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE親和性。親和性為1.6 Kd。

圖9。由Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE介導之細胞毒性。**圖9A**：PC3-人類-191P4D12：4天殺死/每孔1500個細胞。使用PC3-人類-191P4D12細胞進行細胞毒性檢定。**圖9B**：PC3-食蟹獼猴-191P4D12：4天殺死/每孔1500個細胞。使用PC3-食蟹獼猴-191P4D12細胞進行細胞毒性檢定。**圖**

9C：PC3-大鼠-191P4D12：4天殺死/每孔1500個細胞。使用PC3-大鼠-191P4D12細胞進行細胞毒性檢定。**圖9D**：PC-3 Neo：4天殺死/每孔1500個細胞。使用PC3-Neo細胞進行細胞毒性檢定。

圖10。藉由FACS進行Ha22-(2,4)6.1 MAbs之結構域定位。

圖11。藉由西方墨點分析進行Ha22-2(2,4)6.1 MAbs結構域定位。

圖12。在SCID小鼠之人類肺癌異種移植物AG-L4的皮下腫瘤形成模型中評估Ha22-2(2,4)6.1 MAbs。結果顯示191P4D12 MAbs在SCID小鼠之人類肺癌異種移植物AG-L4中不顯著抑制腫瘤生長。

圖13。在SCID小鼠之人類胰臟癌異種移植物HPAC的皮下腫瘤形成模型中評估Ha22-2(2,4)6.1 MAbs。結果顯示與對照抗體相比，191P4D12 MAbs在SCID小鼠之人類胰臟異種移植物中不抑制腫瘤生長。

圖14。在SCID小鼠之人類胰臟癌異種移植物AG-Panc3的皮下腫瘤形成模型中評估Ha22-2(2,4)6.1 MAbs。結果顯示與對照抗體相比，191P4D12 MAbs在SCID小鼠之人類胰臟異種移植物中不抑制腫瘤生長。

圖15。Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類肺癌異種移植物AG-L4中之功效。結果顯示與經處理與未經處理之對照組相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制皮下植入裸小鼠之AG-L4肺癌異種移植物的生長。

圖16。Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類乳癌異種移植物BT-483中之功效。結果顯示與經處理與未經處理之對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制皮下植入SCID小鼠之BT-483乳房腫瘤異種移植物的生長。

圖17。Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類膀胱

癌異種移植植物AG-B1中之功效。結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制AG-B1膀胱癌異種移植植物之生長。

圖18。 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類胰臟癌異種移植植物AG-Panc2中之功效。結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制AG-Panc2胰臟癌異種移植植物之生長。

圖19。 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類肺癌異種移植植物AG-Panc4中之功效。結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制AG-Panc4胰臟癌異種移植植物之生長。

圖20。 Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE以比較劑量在SCID小鼠之皮下形成的人類膀胱癌異種移植植物AG-B8中之功效。結果顯示與5 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE相比，用10 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE處理可顯著抑制AG-B8膀胱癌異種移植植物之生長。

圖21。 藉由免疫組織化學(IHC)偵測癌症患者試樣中之191P4D12蛋白。**圖21(A)及(B)**展示膀胱癌試樣。**圖21(C)及(D)**展示乳癌試樣。**圖21(E)及(F)**展示胰臟癌試樣。**圖21(G)及(H)**展示肺癌試樣。**圖21(I)及(J)**展示卵巢癌試樣。**圖21(K)及(L)**展示食道癌試樣。**圖21(M)及(N)**展示頭頸部癌試樣。

【實施方式】

章節大綱

- I.) 定義
- II.) 191P4D12抗體
- III.) 抗體藥物共軛物概述
 - III(A). 類美登素(maytansinoid)

III(B). 奧瑞他汀(auristatin)及海兔毒素(dolostatin)

III(C). 卡奇黴素(calicheamicin)

III(D). 其他細胞毒性劑

IV.) 結合191P4D12之抗體藥物共軛物

V.) 連接子單元

VI.) 延伸子單元

VII.) 胺基酸單元

VIII.) 間隔子單元

IX.) 藥物單元

X.) 藥物負載

XI.) 測定ADC之細胞毒性作用的方法

XII.) 治療表現191P4D12之癌症

XIII.) 作為基於抗體之療法的標靶之191P4D12

XIV.) 191P4D12 ADC混合物

XV.) 組合療法

XVI.) 套組/製品

I.) 定義：

除非另外定義，否則本文中所用之所有技術術語、註釋及其他科學術語意欲具有熟習本發明所屬技術者通常所瞭解之含義。在一些情況下，為清楚起見及/或供及時參考，具有通常所瞭解含義之術語如本文所定義，且本文包括該等定義應不必理解為表示與此項技術中一般所瞭解之定義相差很大。本文所述或所參考之許多技術及程序經充分瞭解且通常由熟習此項技術者使用習知方法來使用，例如 Sambrook 等人 **Molecular**

Cloning: A Laboratory Manual 第 2 版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 中所述之廣泛使用的分子選殖方法。除非另有說明，否則視情況，涉及使用市售套組及試劑之程序一般根據製造商指定之方案及/或參數來進行。

除非本文另有指示，否則當本文使用商品名稱時，對商品名稱之提及亦指產品調配物、通用藥物及商品名稱產品之活性醫藥成分。

術語「晚期癌症」、「局部晚期癌症」、「晚期疾病」及「局部晚期疾病」意謂已貫穿相關組織被膜之癌症，且意欲包括依據美國泌尿學學會 (American Urological Association, AUA) 系統之 C 期疾病；依據 Whitmore-Jewett 系統之 C1-C2 期疾病；及依據 TNM (腫瘤、結節、轉移) 系統之 T3-T4 期及 N+ 疾病。一般而言，對於患有局部晚期疾病之患者不推薦手術，且與患有臨床上局部 (侷限於器官) 癌症之患者相比，此等患者具有實質上較不利之結果。

縮寫「AFP」係指二甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉異白胺酸 (dolaisoleuine)-多拉脯胺酸 (dolaproine)-苯丙胺酸-對苯二胺 (參見下文式 XVI)。

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

縮寫「AEB」係指藉由使奧瑞他汀 E 與對乙醯基苯甲酸反應所產生之酯 (參見下文式 XX)。

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

縮寫「MMAF」係指多纈胺酸 (dovaline)-纈胺酸-多拉異白胺酸-多拉

脯胺酸-苯丙胺酸(參見下文式XVIV)。

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伸烷基可視情況經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(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炔基可視情況進一步經一或多個基團取代，該等基團包括(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「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)炔系(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。

單獨或作為另一基團之一部分的烯基及炔基可視情況經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(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炔基可視情況進一步經一或多個取代基取代，該等取代基包括(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、 $-C_1-C_8$ 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個碳原子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基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(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、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 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、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基及 $-C_2-C_8$ 炔基可進一步視情況經一或多個取代基取代，該等取代基包括(但不限於) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 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、 $-C_1-C_8$ 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=CHCH₂-)。

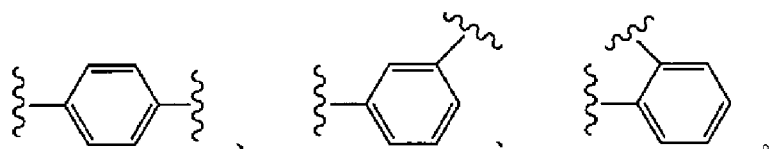
除非另外說明，否則術語「伸炔基」係指含有至少一個碳-碳參鍵之視情況經取代的伸烷基。例示性伸炔基包括例如乙炔(-C≡C-)、炔丙基(-CH₂C≡C-)及4-戊炔基(-CH₂CH₂CH₂C≡CH-)。

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個碳原子移除一個氫原子獲得的單價芳族烴基。在例示性結構中一些芳基以「Ar」表示。典型芳基包括(但不限於)自苯、經取代之苯、苯基、萘、蒽、聯苯及其類似基團得到之基團。

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基團、較佳1至5個或甚至1至2個基團取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-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、-NO₂、-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-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)及-芳基可進一步視情況經一或多個取代基取代，該等取代基包括(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''、-

$C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R'' 係獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 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個碳原子或兩個不同碳原子移除兩個氫原子獲得)且可如以下結構中用苯基作為例示性芳基所示呈鄰位、間位或對位組態。



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的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年至今)，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)。

「雜環」之實例包括例如且不限於吡啶基、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、吡啶基、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、吲哚嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、吡嗪基、噻啶基、喹啉基、喹唑啉基、吡啉基、喋啶基、4H-吡唑基、吡唑基、 β -吡啉基、啡啶基、吡啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋咕基、啡噁嗪基、異吡啶基、吡啶基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡啶啶基、吡啶啉基、哌嗪基、吲哚啉基、異吲哚啉基、吡啶基、嗎啉基、噁啶基、苯并三唑基、苯并異噁唑基、脛吲哚基、苯并噁唑啉基及靛紅醯基(isatinoyl)。較佳「雜環」基包括(但不限於)苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基、異喹

啉基、吡咯基、噻吩基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、噻嗪基、異噻唑基、異噁唑基及四唑基。

單獨或作為另一基團之一部分的雜環基可視情況經一或多個基團、較佳1至2個基團取代，該等基團包括(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，且其中該等-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基及-芳基可進一步視情況經一或多個取代基取代，該等取代基包括(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。

舉例而言且不加限制，碳鍵結之雜環可在以下位置鍵結：吡啶之位置2、3、4、5或6；噻嗪之位置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-噻嗪基、4-噻嗪基、5-噻嗪基、6-噻嗪基、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，氮鍵結之雜環可在以下位置鍵結：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、吡啶、吡啶啉或1H-吡啶之位置1；異吡啶或異吡啶啉之位置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」包括例如稠合於芳環之單環碳環(例如稠合於苯環之單環碳環)。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基團、較佳1或2個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-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'、-

$\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 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-芳基可進一步視情況經一或多個取代基取代，該等取代基包括(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 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 炔基或-芳基。

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個碳原子或兩個不同碳原子移除兩個氫原子獲得)。

除非本文另外指示，否則連字符(-)表示與側位分子之連接點。因此，術語「 $-(\text{C}_1\text{-C}_8\text{伸烷基})\text{芳基}$ 」或「 $-\text{C}_1\text{-C}_8\text{伸烷基}(\text{芳基})$ 」係指如本文所定義之 $\text{C}_1\text{-C}_8$ 伸烷基，其中該伸烷基在伸烷基之任一碳原子處連接於側位分子，且鍵結於伸烷基碳原子的一個氫原子經如本文所定義之芳基置換。

當特定基團「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，該基團一般可具有任何數目之選自鹵素之取代基。經取代之基團如所指示。

規定在分子中之特定位置處之任何取代基或變數的定義與其在彼分子中之其他位置處之定義無關。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容易由此項技術中已知之技術以及本文所述方法合成之化合物。

如本文中所使用，保護基係指暫時或永久地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*之**Protective Groups in Organic Synthesis** (John Wiley & sons, 第3版)(以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)，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-甲氧基四氫硫吡喃醚、4-甲氧基四氫硫吡喃醚S,S-二氧化

物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氫呋喃基醚、四氫硫代呋喃基醚；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-萸基甲酯、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。較佳保護基由式- R^a 、- $Si(R^a)(R^a)(R^a)$ 、- $C(O)R^a$ 、- $C(O)OR^a$ 、- $C(O)NH(R^a)$ 、- $S(O)_2R^a$ 、- $S(O)_2OH$ 、 $P(O)(OH)_2$ 及- $P(O)(OH)OR^a$ 表示，其中 R^a 為 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基、- 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)、- C_6 - C_{10} 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)、- 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)，其中單獨或作為另一基團之一部分的該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環視情況經取代。

出於本文目的，「改變天然糖基化模式」意欲意謂刪去天然序列

191P4D12中存在之一或多個碳水化合物部分(藉由移除潛在糖基化位點或藉由經由化學及/或酶促方法刪去糖基化)，及/或添加天然序列191P4D12中不存在之一或多個糖基化位點。另外，該片語包括天然蛋白質之糖基化的性質變化(qualitative change)，涉及所存在之各種碳水化合物部分之性質及比例的變化。

術語「類似物」係指結構上與另一分子(例如191P4D12相關蛋白)類似或與其共有類似或相應屬性之分子。舉例而言，191P4D12蛋白之類似物可由與191P4D12特異性結合之抗體或T細胞特異性結合。

除非另外明確指示，否則術語「抗體」以最廣泛意義使用。因此，「抗體」可為天然存在之抗體或人造抗體，諸如藉由習知融合瘤技術製備之單株抗體。191P4D12抗體包含單株及多株抗體以及含有此等抗體之抗原結合域及/或一或多個互補決定區的片段。如本文中所使用，術語「抗體」係指特異性結合191P4D12及/或展現所需生物活性之任何形式的抗體或其片段，且特別涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其特異性結合191P4D12及/或展現所需生物活性即可。在本文所提供之方法及組合物中可使用任何特異性抗體。因此，在一實施例中，術語「抗體」涵蓋包含至少一個來自免疫球蛋白輕鏈分子之可變區及至少一個來自重鏈分子之可變區的分，該等可變區組合形成標靶抗原之特異性結合位點。在一實施例中，抗體為IgG抗體。舉例而言，抗體為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗體。適用於本發明方法及組合物中之抗體可在細胞培養物、噬菌體或各種動物中產生，包括(但不限於)母牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠、綿羊、狗、貓、猴、黑猩猩及猿。因此，在一實施例中，本發明之抗體為哺乳動

物抗體。可使用噬菌體技術來分離初始抗體或產生特異性或親合力特徵發生改變之變異體。該等技術為常規技術且為此項技術所熟知。在一實施例中，抗體由此項技術中已知之重組手段產生。舉例而言，重組抗體可經由用包含編碼該抗體之DNA序列的載體轉染宿主細胞來產生。可使用一或多個載體將表現至少一個VL及至少一個VH區之DNA序列轉染至宿主細胞中。抗體產生及製備之重組手段的例示性描述包括Delves, **ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES** (Wiley, 1997)；Shephard等人**MONOCLONAL ANTIBODIES** (Oxford University Press, 2000)；Goding, **MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE** (Academic Press, 1993)；及**CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY** (John Wiley & Sons, 最新版)。本發明之抗體可藉由重組手段進行修飾以增加抗體在介導所需功能方面之功效。因此，使用重組手段藉由取代來修飾抗體係在本發明之範疇內。該等取代通常將為保守性取代。舉例而言，抗體恆定區中之至少一個胺基酸可經不同殘基置換。參見例如美國專利第5,624,821號、美國專利第6,194,551號、申請案第WO 9958572號；及Angal等人*Mol. Immunol.* 30: 105-08 (1993)。胺基酸之修飾包括胺基酸之缺失、添加及取代。在一些情況下，該等改變旨在減少非所需活性，例如補體依賴性細胞毒性。抗體通常藉由與提供可偵測信號之物質共價或非共價連接來標記。已知各種標記及共軛技術且在科學文獻與專利文獻中皆有廣泛報導。可針對與正常或缺陷191P4D12之結合篩選此等抗體。參見例如**Antibody Engineering: A Practical Approach** (Oxford University Press, 1996)。適合之具有所需生物活性的抗體可使用以下活體外檢定來鑑別，該等檢定包括(但不限於)：增殖、遷移、黏附、

軟瓊脂生長、血管生成、細胞間通訊、細胞凋亡、轉運、信號轉導及以下活體內檢定，諸如腫瘤生長之抑制。本文所提供之抗體亦可用於診斷性應用。作為捕捉抗體或非中和抗體，可針對與特異性抗原結合而不抑制抗原之受體結合或生物活性的能力對其進行篩選。作為中和抗體，抗體可用於競爭性結合檢定。其亦可用於定量191P4D12或其受體。

如本文中所使用，術語抗體之「抗原結合部分」或「抗體片段」(或簡稱為「抗體部分」)係指191P4D12抗體之保留與抗原(例如191P4D12及變異體；圖1)特異性結合之能力之一或多個片段。已顯示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段來執行。術語抗體之「抗原結合部分」中所涵蓋之結合片段的實例包括：(i)Fab片段：由V_L、V_H、C_L及C_{H1}域組成之單價片段；(ii)F(ab')₂片段：包含由位於鉸鏈區之二硫橋鍵連接的兩個Fab片段之二價片段；(iii)由V_H及C_{H1}域組成之Fd片段；(iv)由抗體之單一臂的V_L及V_H域組成之Fv片段；(v)由V_H域組成之dAb片段(Ward等人(1989) *Nature* 341:544-546)；及(vi)分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個結構域(V_L及V_H)由各別基因編碼，但其可使用重組法由合成連接子連接，該連接子能夠使其製備成V_L及V_H區配對形成單價分子之單蛋白質鏈(稱為單鏈Fv(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)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」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。

如本文中所使用，可使用任何形式之「抗原」產生對於191P4D12具有特異性之抗體。因此，引發抗原可為單抗原決定基、多抗原決定基、或

單獨完整蛋白質或完整蛋白質與此項技術中已知之一或多種免疫原性增強劑的組合。引發抗原可為分離之全長蛋白質、細胞表面蛋白質(例如免疫接種經抗原之至少一部分轉染之細胞)或可溶性蛋白質(例如僅免疫接種蛋白質之細胞外域部分)。抗原可在經基因改造之細胞中產生。編碼抗原之DNA可為基因組DNA或非基因組DNA(例如cDNA)且編碼細胞外域之至少一部分。如本文中所使用，術語「部分」係指視情況組成所關注抗原之免疫原性抗原決定基的最少數目之胺基酸或核酸。可使用適合於使所關注細胞轉型之任何遺傳載體，包括(但不限於)腺病毒載體、質體及非病毒載體，諸如陽離子性脂質。在一實施例中，本文方法及組合物中的抗體特異性結合所關注之191P4D12之細胞外域的至少一部分。

本文所提供之抗體或其抗原結合片段可與「生物活性劑」共軛。如本文中所使用，術語「生物活性劑」係指結合抗原及/或增強或介導所需生物效應以增加殺死細胞之毒素的任何合成化合物或天然存在之化合物。在一實施例中，適用於本發明之結合片段為生物活性片段。如本文中所使用，術語「生物活性」係指抗體或抗體片段能夠結合所需抗原決定基且直接或間接發揮生物效應。直接作用包括(但不限於)：調節、刺激及/或抑制生長信號；調節、刺激及/或抑制抗細胞凋亡信號；調節、刺激及/或抑制細胞凋亡或壞死信號；調節、刺激及/或抑制ADCC級聯反應；及調節、刺激及/或抑制CDC級聯反應。

「雙特異性」抗體亦適用於本發明方法及組合物。如本文中所使用，術語「雙特異性抗體」係指對至少兩種不同抗原決定基具有結合特異性之抗體，通常為單株抗體。在一實施例中，抗原決定基來自同一抗原。在另一實施例中，抗原決定基來自兩種不同抗原。製備雙特異性抗體之方

法為此項技術所知。舉例而言，雙特異性抗體可使用兩個免疫球蛋白重鏈/輕鏈對之共表現來重組產生。參見例如Milstein等人*Nature* 305:537-39 (1983)。或者，雙特異性抗體可使用化學鍵聯來製備。參見例如Brennan等人*Science* 229:81 (1985)。雙特異性抗體包括雙特異性抗體片段。參見例如Hollinger等人*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48 (1993)，Gruber等人*J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

本文所述之單株抗體具體包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與來源於特定物種或屬於特定抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，而該(等)鏈之其餘部分與來源於另一物種或屬於另一抗體類別或亞類之抗體中的相應序列一致或同源；以及該等抗體之片段，只要其特異性結合標靶抗原及/或展現所需生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984))。

術語「化學治療劑」係指有效抑制腫瘤生長之所有化合物。化學治療劑之非限制性實例包括烷基化劑，例如氮芥、伸乙亞胺化合物及烷基磺酸酯；抗代謝物，例如葉酸、嘌呤或嘧啶拮抗劑；有絲分裂抑制劑，例如抗微管蛋白劑，諸如長春花生物鹼、奧瑞他汀及鬼臼毒素(podophyllotoxin)衍生物；細胞毒性抗生素；損壞或干擾DNA表現或複製之化合物，例如DNA小溝結合物；及生長因子受體拮抗劑。另外，化學治療劑包括細胞毒性劑(如本文所定義)、抗體、生物分子及小分子。

術語「化合物」係指且涵蓋化合物自身以及以下各物(無論明確陳述或未明確陳述，且除非上下文講明以下各物將被排除)：化合物之非晶形及結晶形式，包括多晶形式，其中此等形式可為混合物之一部分或呈分離形式；化合物之游離酸及游離鹼形式，其通常為本文所提供之結構中所示

的形式；化合物之異構體，其係指光學異構體及互變異構異構體，其中光學異構體包括對映異構體及非對映異構體、對掌性異構體及非對掌性異構體，且光學異構體包括分離之光學異構體以及光學異構體之混合物，包括外消旋及非外消旋混合物；其中異構體可呈分離形式或與一或多種其他異構體之混合物形式；化合物之同位素，包括含有氘及氚之化合物，且包括含有放射性同位素(包括治療及診斷有效之放射性同位素)之化合物；化合物之多聚形式，包括二聚、三聚等形式；化合物之鹽，較佳為醫藥學上可接受之鹽，包括酸加成鹽及鹼加成鹽，包括具有有機相對離子及無機相對離子之鹽，且包括兩性離子形式，其中若化合物與兩個或兩個以上相對離子締合，則該兩個或兩個以上相對離子可相同或不同；及化合物之溶劑合物，包括半溶劑合物、單溶劑合物、二溶劑合物等，包括有機溶劑合物及無機溶劑合物，該等無機溶劑合物包括水合物；其中若化合物與兩種或兩種以上溶劑分子締合，則該兩種或兩種以上溶劑分子可相同或不同。在一些情況下，本文對本發明之化合物的提及將包括對上述形式中之一或多者的明確提及，例如鹽及/或溶劑合物；然而，此提及僅用於強調，且不應理解為排除如上文所鑑別之上述形式中之其他形式。

如本文中所使用，術語「保守性取代」係指為熟習此項技術者所知且一般可在不改變所得分子之生物活性的情況下進行的胺基酸取代。熟習此項技術者應認識到，一般而言，多肽之非必需區中的單一胺基酸取代不會實質上改變生物活性(參見例如 Watson 等人 **MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE**, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 第224頁(1987年第4版))。該例示性取代較佳根據表II及表III(a-b)中所示之取代來進行。舉例而言，該等改變包括用異白胺酸(I)、纈胺酸(V)及白胺酸(L)中之任一者取

代此等疏水性胺基酸中之任何另一者；用天冬胺酸(D)取代麩胺酸(E)且反之亦然；用麩胺醯胺酸(Q)取代天冬醯胺酸(N)且反之亦然；及用絲胺酸(S)取代蘇胺酸(T)且反之亦然。視特定胺基酸之環境及其在蛋白質之三維結構中的作用而定，其他取代亦可視為保守性取代。舉例而言，甘胺酸(G)與丙胺酸(A)通常可互換，如同丙胺酸(A)與纈胺酸(V)亦可互換一樣。相對疏水性之甲硫胺酸(M)通常可與白胺酸及異白胺酸互換，且有時與纈胺酸互換。離胺酸(K)及精胺酸(R)在胺基酸殘基之重要特點為其電荷且此兩種胺基酸殘基之pK並無顯著不同的位置處通常可互換。其他改變在特殊環境下可視為「保守性」(參見例如本文中之表III(a)；「Biochemistry」第2版，第13-15頁，Lubert Stryer編 (Stanford University)；Henikoff等人PNAS 1992第89卷10915-10919；Lei等人J Biol Chem 1995年5月19日；270(20):11882-11886)。其他取代亦為容許的且可依據經驗或依照已知之保守性取代來判定。

術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞之表現活性、細胞功能及/或引起細胞破損的物質。該術語意欲包括放射性同位素、化學治療劑及毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體。細胞毒性劑之實例包括(但不限於)奧瑞他汀(例如奧瑞他汀E、奧瑞他汀F、MMAE及MMAF)、金黴素(auromycin)、類美登素、蓖麻毒素、蓖麻毒素A鏈、考布他汀(combrestatin)、倍癌黴素(duocarmycin)、海兔毒素、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、紫杉醇(taxol)、順鉑(cisplatin)、cc1065、溴化乙錠、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(colchicine)、二氫基

炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、放線菌素(actinomycin)、白喉毒素、綠膿桿菌外毒素(*Pseudomonas* exotoxin, PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、 α -帚麴菌素(alpha-sarcin)、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(retstrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、卡奇黴素、肥皂草(*Saponaaria officinalis*)抑制劑及糖皮質激素及其他化學治療劑，以及放射性同位素，諸如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 或 213 、 P^{32} 及Lu之放射性同位素(包括 Lu^{177})。抗體亦可與能夠將前藥轉化為其活性形式之抗癌前藥活化酶共軛。

如本文中所使用，術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含在同一多肽鏈(V_H - V_L)中相連接之重鏈可變域(V_H)與輕鏈可變域(V_L)。因使用的連接子過短而無法使同一鏈上兩個域之間配對，該等域被迫與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更全面地描述於以下文獻中：例如EP 404,097；WO 93/11161；及 Hollinger 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993)。

在191P4D12表現細胞上之191P4D12結合劑之作用的情況下，術語「空乏」係指191P4D12表現細胞之數目減少或消除。

術語「基因產物」在本文中用於指示肽/蛋白質或mRNA。舉例而言，「本發明之基因產物」在本文中有時稱為「癌症胺基酸序列」、「癌症蛋白質」、「表I中所列之癌症蛋白質」、「癌症mRNA」、「表I中所列癌症之mRNA」等。在一實施例中，癌症蛋白質由圖1之核酸編碼。癌症蛋白質

可為片段，或者為由圖1之核酸編碼之全長蛋白質。在一實施例中，使用癌症胺基酸序列測定序列一致性或相似性。在另一實施例中，該等序列為由圖1之核酸編碼的蛋白質之天然存在的對偶基因變異體。在另一實施例中，序列為如本文進一步所述之序列變異體。

「異共軛」抗體適用於本發明方法及組合物中。如本文中所使用，術語「異共軛抗體」係指兩個共價連接之抗體。該等抗體可使用合成蛋白質化學技術中之已知方法(包括使用交聯劑)來製備。參見例如美國專利第4,676,980號。

術語「同源物」係指與另一分子展現同源性的分子，例如所具有之化學殘基序列在相應位置處相同或類似。

在一實施例中，本文所提供之抗體為「人類抗體」。如本文中所使用，術語「人類抗體」係指輕鏈與重鏈序列之整個序列(包括互補決定區(CDR))基本上來自人類基因的抗體。在一實施例中，人類單株抗體藉由以下技術製備：三瘤體(trioma)技術、人類B細胞技術(參見例如Kozbor等人 *Immunol. Today* 4: 72 (1983))、EBV轉型技術(參見例如Cole等人 *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* 77-96 (1985))或使用噬菌體呈現(參見例如Marks等人 *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991))。在一特定實施例中，在轉殖基因小鼠中產生人類抗體。製備該等部分至完全人類抗體之技術為此項技術所知且可使用任何該等技術。根據一尤其較佳實施例，在經工程改造以表現人類重鏈及輕鏈抗體基因之轉殖基因小鼠中製備完全人類抗體序列。製備可產生人類抗體之轉殖基因小鼠的例示性描述可見於申請案第WO 02/43478號及美國專利6,657,103(Abgenix)及其後續案中。接著可將產生所需抗體之轉殖基因小鼠的B細胞融合以製備融合瘤細胞株，以

用於連續產生抗體。參見例如美國專利第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號；及第5,545,806號；及Jakobovits, *Adv. Drug Del. Rev.* 31:33-42 (1998)；Green等人*J. Exp. Med.* 188:483-95 (1998)。

如本文中所使用，術語「人類化抗體」係指含有來自非人類(例如鼠類)抗體以及人類抗體之序列的抗體形式。該等抗體為嵌合抗體，其含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR區為人類免疫球蛋白序列之FR區。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。參見例如Cabilly之美國專利第4,816,567號；Queen等人(1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033；及 **Antibody Engineering: A Practical Approach** (Oxford University Press 1996)。

如本文中所使用，術語「抑制」或「...之抑制」意欲減少可量測之量或完全防止。

片語「分離之」或「生物學上純的」係指物質實質上或基本上不含該物質以其天然狀態存在時通常伴隨該物質之組分。因此，本發明之分離之肽較佳不含在其原始環境下通常與該等肽締合之物質。舉例而言，當聚核苷酸與對應於除191P4D12基因外之基因或與其互補或編碼除191P4D12基因產物或其片段外之多肽的污染物聚核苷酸實質上分離時，稱該聚核苷酸為「分離之」聚核苷酸。熟習此項技術者可容易使用核酸分離程序來獲得分離之191P4D12聚核苷酸。舉例而言，當使用物理、機械或化學方法

將191P4D12蛋白自通常與蛋白質締合之細胞組分中移除時，稱該蛋白質為「分離之」蛋白質。熟習此項技術者可容易使用標準純化方法來獲得分離之191P4D12蛋白。或者，可藉由化學手段製備分離之蛋白質。

適合之「標記」包括放射性核素、酶、受質、輔因子、抑制劑、螢光部分、化學發光部分、磁性粒子及其類似物。教示該等標記之使用的專利包括美國專利第3,817,837號；第3,850,752號；第3,939,350號；第3,996,345號；第4,277,437號；第4,275,149號；及第4,366,241號。另外，本文所提供之抗體可用作螢光體(fluorobody)之抗原結合組分。參見例如Zeytun等人*Nat. Biotechnol.* 21:1473-79 (2003)。

術語「哺乳動物」係指歸類為哺乳動物之任何生物體，包括小鼠、大鼠、兔、狗、貓、母牛、馬及人類。在本發明之一實施例中，哺乳動物為小鼠。在本發明之另一實施例中，哺乳動物為人類。

術語「轉移性癌症」及「轉移性疾病」意謂已擴散至區域淋巴結或遠端部位之癌症，且意欲包括依據AUA系統之D期疾病及依據TNM系統之TxNxM+期疾病。

如本文中所使用，術語「調節劑」或「測試化合物」或「候選藥物」或語法上等同者描述任何欲測試直接或間接改變癌症表現型或癌症序列(例如核酸或蛋白質序列)之表現或癌症序列之作用(例如信號傳導、基因表現、蛋白質相互作用等)的分子，例如蛋白質、寡肽、小有機分子、多醣、聚核苷酸等。在一態樣中，調節劑將中和本發明之癌症蛋白質的作用。「中和」意謂將蛋白質活性以及隨之對細胞的影響抑制或阻斷。在另一態樣中，調節劑將藉由使該蛋白質之含量正常化來中和本發明之基因及其相應蛋白質的作用。在較佳實施例中，調節劑改變表現概況，或本文所

提供之核酸或蛋白質之表現概況，或下游效應途徑。在一實施例中，調節劑將癌症表現型抑制為例如正常組織指紋圖譜。在另一實施例中，調節劑誘發癌症表現型。通常以不同藥劑濃度對複數種檢定混合物進行平行試驗，以獲得對各種濃度之差別反應。此等濃度之一通常用作陰性對照，亦即零濃度或偵測水準以下。

調節劑、候選藥物或測試化合物涵蓋許多化學類別，但其通常為有機分子，較佳為分子量大於100道爾頓(Dalton)且小於約2,500道爾頓之有機小化合物。較佳小分子小於2000 D、或小於1500 D、或小於1000 D、或小於500 D。候選藥劑包含結構上與蛋白質相互作用所必需之官能基，尤其氫鍵，且通常至少包括胺、羰基、羥基或羧基，較佳為官能化學基團中之至少兩者。候選藥劑經常包含經一或多個上述官能基取代之環碳或雜環結構及/或芳族或聚芳族結構。調節劑亦包含生物分子，諸如肽、醣、脂肪酸、類固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物、結構類似物或組合。肽尤其較佳。一類調節劑為例如具有約5至約35個胺基酸、較佳約5至約20個胺基酸且尤其較佳約7至約15個胺基酸之肽。較佳地，癌症調節蛋白質為可溶的，包括非跨膜區及/或具有有助於溶解之N端Cys。在一實施例中，片段之C端保持呈游離酸形式且N端為有助於偶合(亦即偶合於半胱胺酸)之游離胺。在一實施例中，本發明之癌症蛋白質與如本文所論述之免疫原性藥劑共軛。在一實施例中，癌症蛋白質與BSA共軛。本發明之肽(例如具有較佳長度)可彼此連接或連接於其他胺基酸以形成更長的肽/蛋白質。調節肽可為如上文所概述之天然存在之蛋白質的消化物、隨機肽或「偏性」隨機肽。在一較佳實施例中，基於肽/蛋白質之調節劑為如本文所定義之抗體及其片段。

如本文中所使用，術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體之群體獲得的抗體，亦即除了可少量存在可能天然存在之突變外，構成該群體之個別抗體為一致的。單株抗體具有針對單一抗原決定基之高度特異性。相比之下，習知(多株)抗體製劑通常包括針對不同抗原決定基(或對其具有特異性)之多種抗體。在一實施例中，多株抗體含有複數種單株抗體，在含有多個抗原決定基之單一抗原內，該等單株抗體具有不同抗原決定基特異性、親和性或親合力。修飾語「單株」指示抗體自實質上均質之抗體群體獲得的特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明欲使用之單株抗體可藉由最初由Kohler等人 *Nature* 256:495 (1975)所述之融合瘤方法來製成，或可藉由重組DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)來製成。「單株抗體」亦可使用例如 Clackson 等人 *Nature* 352:624-628 (1991)及 Marks 等人 *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)中所述之技術自噬菌體抗體庫中分離。一般藉由ELISA所測定，此等單株抗體一般將以至少約1 μM 、更一般至少約300 nM、通常至少約30 nM、較佳至少約10 nM、更佳至少約3 nM或更好之 K_d 結合。

「醫藥賦形劑」包含諸如佐劑、載劑、pH值調節劑及緩衝劑、張力調節劑、濕潤劑、防腐劑及其類似藥劑之物質。

「醫藥學上可接受」係指無毒、惰性及/或生理學上與人類或其他哺乳動物相容之組合物。

術語「聚核苷酸」意謂長度為至少10個鹼基或鹼基對之核苷酸(核糖核苷酸或去氧核苷酸或任一類型核苷酸之經修飾形式)之聚合形式，且意欲包括DNA及/或RNA之單股形式及雙股形式。在此項技術中，此術語通

常可與「寡核苷酸」互換使用。聚核苷酸可包含本文所揭示之核苷酸序列，其中例如圖1中所示之胸苷(T)亦可為尿嘧啶(U)；此定義與DNA與RNA之化學結構之間的差異有關，尤其與以下觀察結果有關：RNA中之四種主要鹼基之一為尿嘧啶(U)而非胸苷(T)。

術語「多肽」意謂具有至少約4、5、6、7或8個胺基酸之聚合物。在整篇說明書中，使用胺基酸之標準三字母或單字母名稱。在此項技術中，此術語通常可與「肽」或「蛋白質」互換使用。

「重組」DNA或RNA分子為已經受活體外分子操作之DNA或RNA分子。

如本文中所使用，術語「單鏈Fv」或「scFv」或「單鏈」抗體係指包含抗體之V_H域及V_L域的抗體片段，其中此等域存在於單一多肽鏈中。Fv多肽一般進一步包含V_H域與V_L域之間的多肽連接子，該多肽連接子能夠使sFv形成抗原結合之所需結構。關於sFv之評述，參見Pluckthun, **The Pharmacology Of Monoclonal Antibodies**，第113卷，Rosenburg及Moore編Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

如本文中所使用，術語「特異性」及「特異性結合」係指抗體與標靶抗原決定基之選擇性結合。藉由在一組特定條件下將與適當抗原之結合同與無關抗原或抗原混合物之結合進行比較來測試抗體之結合特異性。若抗體與適當抗原之結合為抗體與無關抗原或抗原混合物之結合的至少2倍、5倍、7倍及較佳10倍，則其視為具有特異性。在一實施例中，特異性抗體為僅結合191P4D12抗原、而不與無關抗原結合之抗體。在另一實施例中，特異性抗體為結合人類191P4D12抗原、而不結合非人類191P4D12抗原之抗體，其與191P4D12抗原具有70%、75%、80%、

85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上胺基酸同源性。在另一實施例中，特異性抗體為結合人類191P4D12抗原及結合鼠類191P4D12抗原之抗體，但其結合人類抗原之程度較高。在另一實施例中，特異性抗體為結合人類191P4D12抗原及結合靈長類191P4D12抗原之抗體，但其結合人類抗原之程度較高。在另一實施例中，特異性抗體與人類191P4D12抗原及任何非人類191P4D12抗原結合，但其結合人類抗原或其任何組合之程度較高。

如本文中所使用，「治療」或「治療性」及語法上相關術語係指任何疾病後果之任何改善，諸如存活時間延長、發病率減小及/或作為替代治療形式之副產物的副作用減輕；如此項技術中容易瞭解，疾病完全根治雖非治療行為之要求，但為較佳。

術語「變異體」係指展現與所述類型或正常型之變異的分子，諸如在具體描述之蛋白質(例如圖1中所示之191P4D12蛋白)之相應位置處具有一或多個不同胺基酸殘基的蛋白質。類似物為變異蛋白之一實例。剪接同功異型物及單核苷酸多態型(SNP)為變異體之其他實例。

本發明之「191P4D12蛋白」及/或「191P4D12相關蛋白」包括本文特定鑑別之蛋白(參見圖1)，以及按照本文所概述或此項技術中容易得到之方法不經過度實驗可分離/產生及表徵之對偶基因變異體、保守性取代變異體、類似物及同源物。亦包括組合不同191P4D12蛋白或其片段之一部分的融合蛋白以及191P4D12蛋白與異源多肽之融合蛋白。該等191P4D12蛋白共同稱為191P4D12相關蛋白、本發明之蛋白質或191P4D12。術語「191P4D12相關蛋白」係指具有以下數目胺基酸之多肽片段或191P4D12蛋白序列：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、

15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個或大於25個；或至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、330、335、339個或339個以上胺基酸。

II.) 191P4D12抗體

本發明之另一態樣提供與191P4D12相關蛋白結合之抗體(參見圖1)。在一實施例中，與191P4D12相關蛋白結合之抗體為與包含SEQ ID NO.: 2之胺基酸序列的191P4D12蛋白特異性結合之抗體。與包含SEQ ID NO.: 2之胺基酸序列的191P4D12蛋白特異性結合之抗體包括可與其他191P4D12相關蛋白結合之抗體。舉例而言，結合包含SEQ ID NO.: 2之胺基酸序列的191P4D12蛋白之抗體可結合191P4D12相關蛋白，諸如191P4D12變異體及其同源物或類似物。

本發明之191P4D12抗體尤其適用於癌症(參見例如表I)預後檢定、成像及治療性方法。類似地，該等抗體適用於結腸癌及其他癌症之治療及/或預後，達191P4D12亦在此等其他癌症中表現或過表現之程度。此外，細胞內表現抗體(例如單鏈抗體)在治療上適用於治療涉及191P4D12表現之癌症，諸如晚期或轉移性結腸癌或其他晚期或轉移性癌症。

製備抗體、具體而言單株抗體之各種方法為此項技術所熟知。舉例而言，抗體可藉由使用呈分離或免疫共軛形式之191P4D12相關蛋白、肽或片段為適合之哺乳動物宿主免疫接種來製備(Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press編, Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989))。另外，亦可使用191P4D12之融

合蛋白，諸如191P4D12 GST融合蛋白。在一特定實施例中，製備包含圖1之胺基酸序列之全部或大部分的GST融合蛋白，接著作為免疫原用於產生適當抗體。在另一實施例中，191P4D12相關蛋白經合成且用作免疫原。

另外，使用此項技術中已知之裸DNA免疫接種技術(用或不用經純化之191P4D12相關蛋白或191P4D12表現細胞)來對所編碼之免疫原產生免疫反應(關於評論，參見Donnelly等人1997, *Ann. Rev. Immunol.* 15: 617-648)。

可分析如圖1中所示之191P4D12蛋白的胺基酸序列以選擇191P4D12蛋白之特異性區域來產生抗體。舉例而言，使用191P4D12胺基酸序列之疏水性及親水性分析來鑑別191P4D12結構中之親水性區域。顯示免疫原性結構之191P4D12蛋白的區域以及其他區域及結構域可容易地使用此項技術中已知之多種其他方法加以鑑別，諸如Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-Schultz或Jameson-Wolf分析法。親水性概況可使用Hopp, T.P.及Woods, K.R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3824-3828之方法產生。疏水性概況可使用Kyte, J.及Doolittle, R.F., 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-132之方法產生。可接近殘基百分比(%)概況可使用Janin J., 1979, *Nature* 277:491-492之方法產生。平均可撓性概況可使用Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32:242-255之方法產生。 β -轉角概況可使用Deleage, G., Roux B., 1987, *Protein Engineering* 1:289-294之方法來產生。因此，藉由任一此等程序或方法所鑑別之每一區域均在本發明之範疇內。產生191P4D12抗體之較佳方法進一步以本文所提供之實例之方式來說明。製

備用作免疫原之蛋白質或多肽的方法為此項技術所熟知。製備蛋白質與載體(諸如BSA、KLH或其他載體蛋白質)之免疫原性共軛物的方法亦為此項技術所熟知。在一些情況下，使用直接共軛，使用例如碳化二亞胺試劑；在其他情況下，連接試劑(諸如Pierce Chemical Co.(Rockford, IL)供應之連接試劑)為有效的。191P4D12免疫原通常藉由注射一段適合之時間且使用適合之佐劑來投與，如此項技術中所瞭解。在免疫接種時程期間，可獲得抗體之效價以測定抗體形成之適當性。

191P4D12單株抗體可藉由此項技術中熟知之各種方法來產生。舉例而言，分泌所需單株抗體之永生細胞株係使用使產生抗體之B細胞永生化的Kohler及Milstein之標準融合瘤技術或修改來製備，如一般所知。藉由抗原為191P4D12相關蛋白之免疫檢定篩選分泌所需抗體之永生細胞株。當鑑別適當永生細胞培養物時，可繁殖細胞並自活體外培養物或腹水液產生抗體。

本發明之抗體或片段亦可藉由重組方式來產生。與191P4D12蛋白之所需區域特異性結合的區域亦可在來源於多種物種之嵌合抗體或互補決定區(CDR)移植抗體之情形下產生。亦可產生人類化或人類191P4D12抗體，且其較佳用於治療性情況。藉由用一或多種非人類抗體CDR取代對應人類抗體序列來使鼠類及其他非人類抗體人類化之方法為眾所周知(參見例如Jones等人1986, Nature 321: 522-525；Riechmann等人1988, Nature 332: 323-327；Verhoeyen等人1988, Science 239: 1534-1536)。亦參見Carter等人1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285及Sims等人1993, J. Immunol. 151: 2296。

在一較佳實施例中，本發明之抗體包含全人類191P4D12抗體

(191P4D12 MAb)。此項技術中之各種方法提供產生全人類191P4D12 MAb之方式。舉例而言，一較佳實施例提供使用針對抗體產生不活化、用稱為Xenomouse之人類重鏈及輕鏈基因座(Amgen Fremont, Inc.)工程改造的轉殖基因小鼠的技術。製備產生人類抗體之轉殖基因小鼠的例示性描述可見於U.S. 6,657,103中。亦參見美國專利第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號；及第5,545,806號；及Mendez等人Nature Genetics, 15: 146-156 (1998)；Kellerman, S.A.及Green, L.L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593-597 (2002)。

另外，本發明之人類抗體可使用HuMAb小鼠(Medarex, Inc.)產生，該HuMAb小鼠含有編碼未重排人類重鏈(μ 及 γ)及 κ 輕鏈免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因小基因座，以及不活化內源性 μ 及 κ 鏈基因座之靶向突變(參見例如Lonberg等人(1994) Nature 368(6474): 856-859)。

在另一實施例中，本發明之全人類抗體可使用在轉殖基因及轉殖染色體(transchromosome)上帶有人類免疫球蛋白序列之小鼠(諸如帶有人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉殖染色體之小鼠)來培育。該等小鼠在本文中稱為「KM小鼠」，該等小鼠描述於Tomizuka等人(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727及Tomizuka等人之PCT公開案WO 02/43478中。

本發明之人類單株抗體亦可使用用於篩選人類免疫球蛋白基因庫之噬菌體呈現法來製備。分離人類抗體之該等噬菌體呈現法在此項技術中建立。參見例如：Ladner等人之美國專利第5,223,409號；第5,403,484號；及第5,571,698號；Dower等人之美國專利第5,427,908號及第5,580,717號；McCafferty等人之美國專利第5,969,108號及第6,172,197號；及Griffiths等人之美國專利第5,885,793號；第6,521,404號；第6,544,731

號；第6,555,313號；第6,582,915號及第6,593,081號。

本發明之人類單株抗體亦可使用已將人類免疫細胞重新組構於其中以使得可在免疫接種後產生人類抗體反應之SCID小鼠來製備。該等小鼠描述於例如Wilson等人之美國專利第5,476,996號及第5,698,767號中。

在一較佳實施例中，本發明之191P4D12 MAb包含以寄存編號PTA-11267寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, ATCC)之融合瘤所產生之稱為Ha22-2(2,4)6.1之抗體的重鏈及輕鏈可變區(參見圖3)，或包含與Ha22-2(2,4)6.1之重鏈及輕鏈可變區的胺基酸序列同源之胺基酸序列之重及輕可變區，且其中該等抗體保留本發明之191P4D12 MAb的所需功能性質。Ha22-2(2,4)6.1之重鏈可變區由範圍為SEQ ID NO:7之第20位之E殘基至第136位之S殘基的胺基酸序列組成，且Ha22-2(2,4)6.1之輕鏈可變區由範圍為SEQ ID NO:8之第23位之D殘基至第130位之R殘基的胺基酸序列組成。作為本發明之抗體的恆定區，可選擇恆定區之任何亞類。在一實施例中，可使用人類IgG1恆定區作為重鏈恆定區及人類Ig κ 恆定區作為輕鏈恆定區。

舉例而言，本發明提供一種包含重鏈可變區及輕鏈可變區之分離之單株抗體或其抗原結合部分，其中：

(a) 重鏈可變區包含與圖3中所示之重鏈可變區胺基酸序列至少80%同源的胺基酸序列；及

(b) 輕鏈可變區包含與圖3中所示之輕鏈可變區胺基酸序列至少80%同源的胺基酸序列。

在其他實施例中， V_H 及/或 V_L 胺基酸序列可與圖3中所示之 V_H 及 V_L 序列85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或99%同源。

在另一實施例中，本發明提供一種分離之單株抗體或其抗原結合部分，其包含人類化重鏈可變區及人類化輕鏈可變區，其中：

(a) 該重鏈可變區包含具有圖3中所示之重鏈可變區CDR之胺基酸序列的互補決定區(CDR)；

(b) 該輕鏈可變區包含具有圖3中所示之輕鏈可變區之胺基酸序列的CDR。

本發明之經工程改造抗體包括已對V_H及/或V_L內之構架殘基進行修飾(例如用於改良抗體性質)的抗體。通常進行該等構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「回復突變(backmutate)」成相應生殖系序列。更特定言之，已經受體細胞突變之抗體可含有與獲得該抗體之生殖系序列不同的構架殘基。該等殘基可藉由將抗體構架序列與獲得抗體之生殖系序列相比較來鑑別。為使構架區序列恢復至其生殖系組態，體細胞突變可藉由例如定點突變誘發或PCR介導突變誘發而「回復突變」至生殖系序列(例如自白胺酸「回復突變」至甲硫胺酸)。該等「回復突變」之抗體亦意欲為本發明所涵蓋。

另一類型之構架修飾涉及使構架區內或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變以移除T細胞抗原決定基，由此降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為「去免疫(deimmunization)」，且進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第2003/0153043號中。

除構架區或CDR區內所作之修飾外，或取而代之，本發明之抗體可經工程改造以包括Fc區內之修飾，通常以改變抗體之一或多種功能性質，諸如血清半衰期、補體固著、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。此

外，本發明之191P4D12 MAb可經化學修飾(例如一或多個化學部分可連接於該抗體)或經修飾以改變其糖基化，再次改變該MAb之一或多種功能性質。以下進一步詳細描述此等實施例中之每一者。

在一實施例中，CH1之鉸鏈區經修飾以使得該鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數發生改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1之鉸鏈區中的半胱胺酸殘基數發生改變以例如有利於輕鏈及重鏈之組裝或增強或降低191P4D12 MAb之穩定性。

在另一實施例中，抗體之Fc鉸鏈區突變以縮短191P4D12 MAb之生物半衰期。更特定言之，將一或多種胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區內以使得抗體之葡萄球菌蛋白A(Staphylococcal protein A, SpA)結合相對於天然Fc鉸鏈域SpA結合有所削弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在另一實施例中，191P4D12 MAb經修飾以延長其生物半衰期。多種方法可行。舉例而言，可如Ward之美國專利第6,277,375號中所述引入突變。或者，為延長生物半衰期，抗體可在CH1或CL區內發生改變以含有取自IgG之Fc區之CH2域的兩個環之救助受體結合抗原決定基，如Presta等人之美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

在其他實施例中，藉由用不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基來改變Fc區以改變191P4D12 MAb之效應功能。舉例而言，一或多個選自胺基酸特異性殘基之胺基酸可由不同胺基酸殘基置換以使得抗體對於效應配位體之親和性發生改變，但保留親本抗體之抗原結合能力。親和性改變之效應配位體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法進一步詳細描述於Winter等人之美國專利第5,624,821號及第5,648,260號中。

191P4D12抗體與191P4D12相關蛋白之反應性可藉由包括西方墨點法(Western blot)、免疫沈澱、ELISA及FACS分析之多種熟知方法，視情況使用191P4D12相關蛋白、191P4D12表現細胞或其萃取物來確定。191P4D12抗體或其片段可經可偵測標誌標記或與第二分子共軛。適合之可偵測標誌包括(但不限於)放射性同位素、螢光化合物、生物發光化合物、化學發光化合物、金屬螯合劑或酶。此外，對於兩個或兩個以上191P4D12抗原決定基具有特異性之雙特異性抗體係使用此項技術中一般已知之方法來產生。均二聚抗體亦可藉由此項技術中已知之交聯技術(例如Wolff等人Cancer Res. 53: 2560-2565)來產生。

在另一較佳實施例中，本發明之191P4D12 MAb為包含稱為Ha22-2(2,4)6.1之抗體之重鏈及輕鏈的抗體。Ha22-2(2,4)6.1之重鏈由範圍為SEQ ID NO:7之第20位之E殘基至第466位之K殘基的胺基酸序列組成，且Ha22-2(2,4)6.1之輕鏈由範圍為SEQ ID NO:8序列之第23位之D殘基至第236位之C殘基的胺基酸序列組成。該等序列如圖2及圖3中所示。在一較佳實施例中，Ha22-2(2,4)6.1與細胞毒性劑共軛。

產生稱為**Ha22-2(2,4)6.1**之抗體的融合瘤於**2010年8月18日**(經由Federal Express)送至美國菌種保存中心(ATCC)，郵政信箱1549，Manassas，VA 20108且給予寄存編號**PTA-11267**。

III.) 抗體-藥物共軛物概述

在另一態樣中，本發明提供抗體藥物共軛物(ADC)，其包含抗體與細胞毒性劑共軛，該細胞毒性劑諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即放射性共軛物)。在另一態樣中，本發明進一步提供使用

ADC之方法。在一態樣中，ADC包含本文191P4D12 MAb中之任一者共價連接於細胞毒性劑或可偵測藥劑。

使用抗體-藥物共軛物局部傳遞細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即在治療癌症中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)(Syrigos 及 Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172 ; 美國專利4,975,278)允許將藥物部分靶向傳遞至腫瘤，且在腫瘤中進行細胞內積累，其中全身投與此等未共軛之藥物藥劑會對正常細胞以及設法消除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin 等人(1986) *Lancet* 頁碼(1986年3月15日):603-05 ; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review, 」 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等人(編)，第475-506頁)。因此，應設法使毒性最小而功效最大。已報導多株抗體與單株抗體皆適用於此等策略(Rowland 等人(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。此等方法中所用之藥物包括道諾黴素(daunomycin)、阿黴素、甲胺喋呤(methotrexate)及長春地辛(vindesine)(Rowland 等人(1986)同上)。抗體-毒素共軛物中所用之毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素；植物毒素，諸如蓖麻毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素(geldanamycin)(Mandler 等人(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581 ; Mandler 等人(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 ; Mandler 等人(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、類美登素(EP 1391213 ; Liu 等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)及卡奇黴素(Lode 等人(1998) *Cancer Res.* 58:2928 ; Hinman 等人(1993) *Cancer Res.* 53:3336-

3342)。該等毒素可藉由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制之機制來實現其細胞毒性及細胞抑制作用。一些細胞毒性藥物在與大抗體或蛋白質受體配位體共軛時趨於變成非活性的或弱活性的。

抗體藥物共軛物之實例為ZEVALIN® (替伊莫單抗(ibrutinomab tiuxetan), Biogen/Idec), 其為由針對存在於正常及惡性B淋巴細胞表面上的CD20抗原之鼠類IgG1 κ 單株抗體及由硫脲連接子-螯合劑結合之 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素構成之抗體-放射性同位素共軛物(Wiseman等人(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77 ; Wiseman等人(2002) Blood 99(12):4336-42 ; Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63 ; Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。

另外, MYLOTARG™(奧吉妥珠單抗(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals), 一種由hu CD33抗體連接於卡奇黴素構成之抗體藥物共軛物, 於2000年獲准用於注射治療急性骨髓性白血病(Drugs of the Future (2000) 25 (7):686 ; 美國專利第4970198號 ; 第5079233號 ; 第5585089號 ; 第5606040號 ; 第5693762號 ; 第5739116號 ; 第5767285號 ; 第5773001號)。

另外, 美坎珠單抗(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.), 一種由huC242抗體經由二硫化物連接子SPP連接於類美登素藥物部分DM1構成之抗體藥物共軛物, 正進入表現CanAg之癌症(諸如結腸癌、胰臟癌、胃癌及其他癌症)治療的II期試驗。

另外, MLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), 一種由抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體連接於類美登素藥物部分DM1構成之抗體藥物共軛物, 正在開發用於前列腺腫瘤之潛在治

療。

最後，奧瑞他汀肽、奧瑞他汀E(AE)及單甲基奧瑞他汀(MMAE)，海兔毒素之合成類似物，係與嵌合單株抗體cBR96(對癌瘤上之Lewis Y具有特異性)及cAC10(對血液惡性腫瘤上之CD30具有特異性)共軛(Doronina等人(2003) *Nature Biotechnology* 21 (7):778-784)且正在治療開發中。

此外，本文描述適用於產生ADC之化學治療劑。可使用之酶促活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、 α -帚麴菌素、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素(tricothecene)。參見例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。多種放射性核素可用於產生放射性共軛之抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。抗體與細胞毒性劑之共軛物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(諸如雙(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人(1987) *Science*, 238:1098中所述來製備。標記碳14之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二仲乙三

胺五乙酸(MX-DTPA)為使放射性核苷酸與抗體共軛之例示性螯合劑(WO94/11026)。

本文亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素(諸如卡奇黴素、類美登素、海兔毒素、奧瑞他汀、新月毒素(trichothecene)及CC1065以及此等毒素具有毒素活性之衍生物)之共軛物。

III(A). 類美登素

適合用作類美登素藥物部分之美登素(maytansine)化合物為此項技術所熟知，且可根據已知方法自天然來源分離，使用基因工程改造技術產生(參見Yu等人(2002) PNAS 99:7968-7973)，或根據已知方法合成製備美登醇(maytansinol)及美登醇類似物。

例示性類美登素藥物部分包括具有經修飾之芳族環的類美登素藥物部分，該等修飾諸如：C-19-去氯(US 4256746)(藉由安絲菌素(ansamycin)P2之氫化鋰鋁還原來製備)；C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美國專利第4,361,650號及第4,307,016號)(藉由使用鏈黴菌(*Streptomyces*)或放線菌(*Actinomyces*)去甲基或使用LAH去氯來製備)；及C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(-OCOR)、+/-去氯(美國專利第4,294,757號)(藉由使用醯氯醯化來製備)；及在其他位置具有修飾之類美登素藥物部分。

例示性類美登素藥物部分亦包括具有諸如以下修飾之類美登素藥物部分：C-9-SH(US 4,424,219)(藉由美登醇與H₂S或P₂S₅反應來製備)；C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH₂ OR)(US 4331598)；C-14-羥甲基或醯氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(US 4450254)(由奴卡菌(*Nocardia*)製備)；C-15-羥基/醯氧基(US 4,364,866)(藉由鏈黴菌轉化美登醇來製備)；C-15-甲氧

基(美國專利第4,313,946號及第4,315,929號)(自滑桃木(*Trewia nudiflora*)分離)；C-18-N-去甲基(美國專利第4,362,663號及第4,322,348號)(藉由鏈黴菌使美登醇去甲基來製備)；及4,5-去氧(US 4,371,533)(藉由美登醇之三氯化鈦/LAH還原來製備)。

含有類美登素之ADC、製備其之方法及其治療用途揭示於例如美國專利第5,208,020號、第5,416,064號、第6,441,163號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，該等專利之揭示內容以引用的方式明確地併入本文中。Liu等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述包含類美登素(稱為DM1)連接於針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242的ADC。已發現該共軛物對所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性且在活體內腫瘤生長檢定中顯示抗腫瘤活性。Chari等人Cancer Research 52:127-131 (1992)描述如下ADC，其中類美登素經由二硫化物連接子與結合於人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠類抗體A7共軛，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠類單株抗體TA.1共軛。活體外測試TA.1-類美登素共軛物對人類乳癌細胞株SK-BR-3之細胞毒性，該細胞株每個細胞表現 3×10^5 個HER-2表面抗原。藥物共軛物達成與游離類美登素藥物類似之細胞毒性程度，該細胞毒性程度可藉由增加每個抗體分子類美登素化合物分子之數目而增加。A7-類美登素共軛物在小鼠體內顯示低全身性細胞毒性。

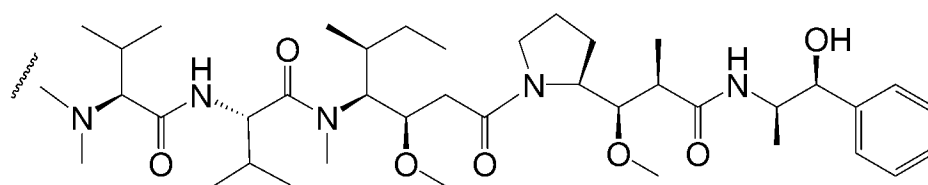
III(B). 奧瑞他汀及海兔毒素

在一些實施例中，ADC包含本發明之抗體與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物，奧瑞他汀共軛(美國專利第5,635,483號、第5,780,588號)。已顯示海兔毒素及奧瑞他汀干擾微管動力學、GTP水解及核分裂與細胞分裂(Woyke 等人 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother.

45(12):3580-3584)且具有抗癌活性(US 5,663,149)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) Antimicrob. Agents Chemother.42:2961-2965)。海兔毒素或奧瑞他汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)端或C(羧基)端連接於抗體(WO 02/088172)。

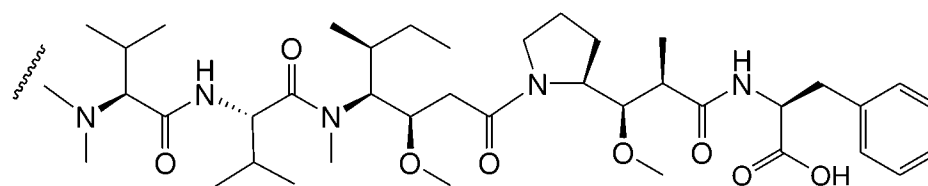
例示性奧瑞他汀實施例包括「Senter等人 Proceedings of the American Association for Cancer Research，第45卷，摘要編號623, 2004年3月28日提交」中所揭示及美國專利公開案第2005/0238649號中所述之N端連接之單甲基奧瑞他汀藥物部分DE及DF，該等專利之揭示內容以全文引用的方式明確地併入本文中。

一例示性奧瑞他汀實施例為MMAE(其中波形線指示共價連接於抗體藥物共軛物之連接子(L))。



MMAE

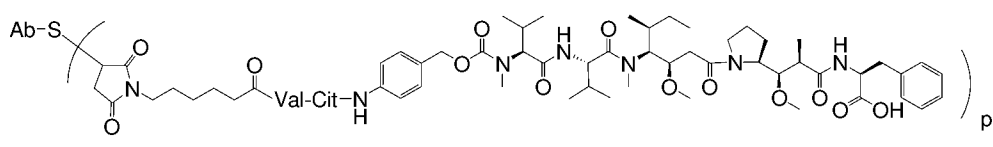
另一例示性奧瑞他汀實施例為MMAF，其中波形線指示共價連接於抗體藥物共軛物之連接子(L)(US 2005/0238649)：



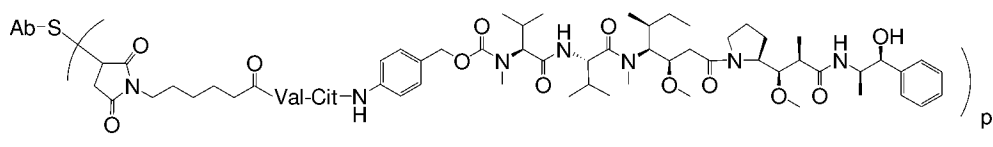
MMAF。

包含MMAE或MMAF及各種連接子組分(本文進一步描述)之其他例

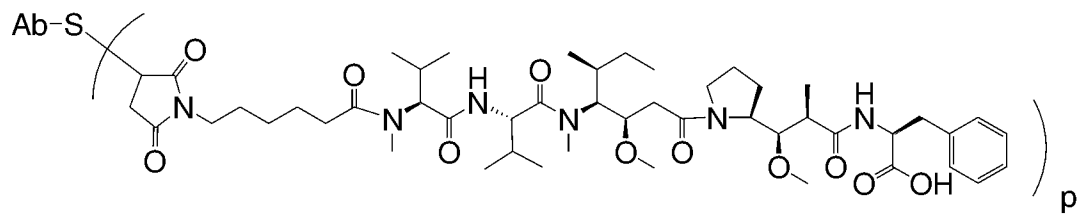
示性實施例具有以下結構及縮寫(其中Ab意謂抗體，S為抗體之硫，且p為1至約8)：



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF。

肽基藥物部分通常可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。該等肽鍵可例如根據肽化學領域中熟知之液相合成法(參見E. Schröder及K. Lübke, 「The Peptides」, 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)來製備。奧瑞他汀/海兔毒素藥物部分可根據以下方法來製備：US 5635483；US 5780588；Pettit等人(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R.等人 Synthesis, 1996, 719-725；Pettit等人(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784。

III(C). 卡奇黴素

在其他實施例中，ADC包含本發明之抗體與一或多個卡奇黴素分子共軛。抗生素之卡奇黴素家族能夠在次皮莫耳濃度下產生雙股DNA碎片。關於卡奇黴素家族共軛物之製備，參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號、第5,877,296號(全部均屬於American Cyanamid Company)。可使用之卡奇黴素的結構類似物包括(但不限於) γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-醯基- γ_1^I 、PSAG及 θ_1^I (Hinman等人Cancer Research 53:3336-3342 (1993)；Lode等人Cancer Research 58:2925-2928 (1998)；及屬於American Cyanamid之上述美國專利)。可與抗體共軛之另一抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸劑。卡奇黴素與QFA皆具有細胞內作用位點且不易跨過質膜。因此，細胞經由抗體介導之內化作用攝取此等藥劑可顯著增強其細胞毒性作用。

III(D). 其他細胞毒性劑

可與本發明之抗體共軛的其他抗腫瘤劑包括BCNU、鏈脲黴素(streptozotycin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶，美國專利第5,053,394號、第5,770,710號中所述之共同稱為LL-E33288複合物的藥劑家族，以及埃坡黴素(esperamicin)(美國專利第5,877,296號)。

可使用之酶促活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素A鏈、 α -帶麴菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。

參見例如1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如核糖核酸酶或DNA內切酶，諸如去氧核糖核酸酶；DNA酶)之間所形成的ADC。

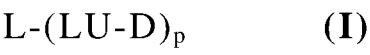
為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高放射性原子。可使用多種放射性同位素產生放射性共軛抗體。實例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu之放射性同位素。當使用共軛物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如tc^{99m}或I¹²³；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如又為碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

可以已知方式將放射性標記或其他標記併入共軛物中。舉例而言，肽可經生物合成，或可藉由使用涉及例如以氟-19替代氫之適合胺基酸前驅物進行化學胺基酸合成來合成。諸如tc^{99m}或I¹²³、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸及In¹¹¹之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釷-90可經由離胺酸殘基連接。IODOGEN方法(Fraker等人(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) 可用於合併碘-123。「Monoclonal Antibodies in Immunosciintigraphy」(Chatal,CRC Press 1989)詳細地描述其他方法。

IV.) 結合191P4D12之抗體-藥物共軛物化合物

本發明提供用於靶向傳遞藥物之抗體-藥物共軛物化合物。發明者已發現抗體-藥物共軛物化合物具有針對表現191P4D12之細胞的有效細胞毒性及/或細胞生長抑制活性。抗體-藥物共軛物化合物包含抗體單元共價連接於至少一個藥物單元。該等藥物單元可直接或經由連接子單元(LU)共價連接。

在一些實施例中，抗體藥物共軛物化合物具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物，其中

L為抗體單元，例如本發明之191P4D12 MAbs，且

(LU-D)為連接子單元-藥物單元部分，其中：

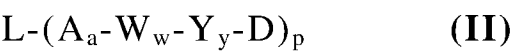
LU-為連接子單元，且

-D為具有針對標靶細胞之細胞生長抑制活性或細胞毒性活性的藥物單元；且

p為整數1至20。

在一些實施例中，p在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之範圍內。在一些實施例中，p在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之範圍內。在其他實施例中，p為1、2、3、4、5或6。在一些實施例中，p為2或4。

在一些實施例中，抗體藥物共軛物化合物具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物，其中：

L為抗體單元，例如191P4D12 MAbs；且

-A_a-W_w-Y_y-為連接子單元(LU)，其中：

-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；

-D為具有針對標靶細胞之細胞生長抑制活性或細胞毒性活性的藥物單元；且

p為整數1至20。

在一些實施例中，a為0或1，w為0或1，且y為0、1或2。在一些實施例中，a為0或1，w為0或1，且y為0或1。在一些實施例中，p在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之範圍內。在一些實施例中，p在2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3之範圍內。在其他實施例中，p為1、2、3、4、5或6。在一些實施例中，p為2或4。在一些實施例中，當w不為0時，y為1或2。在一些實施例中，當w為1至12時，y為1或2。在一些實施例中，w為2至12且y為1或2。在一些實施例中，a為1且w及y為0。

對於包含複數個抗體之組合物，藥物負載由每個抗體藥物分子之平均數目p表示。藥物負載可在每個抗體1至20個藥物(D)之範圍內。在預備共軛反應時每個抗體之藥物平均數目可藉由諸如質譜法、ELISA檢定及HPLC之習知手段來表徵。亦可根據p確定抗體-藥物共軛物之定量分佈。在一些情況下，均質抗體-藥物共軛物可藉由諸如逆相HPLC或電泳之手段來分離、純化及表徵，其中p為具有其他藥物負載之抗體藥物共軛物的某一值。在例示性實施例中，p為2至8。

抗體-藥物共軛物化合物可藉由熟習此項技術者已知之任何技術來產生。簡言之，抗體-藥物共軛物化合物包含191P4D12 MAb作為抗體單元、藥物及視情況存在之連接藥物與結合劑之連接子。在一較佳實施例中，抗體為包含上述稱為Ha22-2(2,4)6.1之抗體之重鏈及輕鏈可變區的

191P4D12 MAb。在更佳實施例中，抗體為包含上述稱為Ha22-2(2,4)6.1之抗體之重鏈及輕鏈的191P4D12 MAb。多種不同反應可用於使藥物及/或連接子共價連接於結合劑。此通常藉由使結合劑(例如抗體分子)之胺基酸殘基反應來完成，該等胺基酸殘基包括離胺酸之胺基、麩胺酸及天冬胺酸之游離羧酸基、半胱胺酸之氫硫基及芳族胺基酸之各種部分。共價連接之最常用非特異性方法之一為使化合物之羧基(或胺基)連接於抗體之胺基(或羧基)之碳化二亞胺反應。另外，已使用雙官能劑(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結合劑。此方法涉及含有二醇或羥基之藥物的過碘酸鹽氧化，從而形成醛，接著使其與結合劑反應。經由用結合劑之胺基形成席夫鹼來進行連接。異硫氰酸酯亦可用作使藥物共價連接於結合劑之偶合劑。其他技術為熟習此項技術者所知且在本發明之範疇內。

在某些實施例中，在適當條件下使作為連接子之前驅體的中間物與藥物反應。在某些實施例中，使用藥物及/或中間物上之反應性基團。隨後在適當條件下使藥物與中間物之間的反應產物或衍生藥物與191P4D12 MAb反應。

本文更詳細地描述抗體-藥物共軛物化合物之各特定單元。例示性連接子單元、延伸子單元、胺基酸單元、自我分解型間隔子單元及藥物單元之合成及結構亦描述於美國專利申請公開案第2003-0083263號、第2005-0238649號及第2005-0009751號中，其中每一者均以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中。

V.) 連接子單元

通常，抗體-藥物共軛物化合物在藥物單元與抗體單元之間包含連接

子單元。在一些實施例中，連接子在細胞內條件下可裂解，以使得在細胞內環境中連接子之裂解可自抗體釋放藥物單元。在其他實施例中，連接子單元不可裂解且藥物例如藉由抗體降解而釋放。

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，肽基連接子為至少兩個胺基酸長或至少三個胺基酸長。裂解藥劑可包括組織蛋白酶B及D及纖維蛋白溶酶，已知其全部均可水解二肽藥物衍生物，使得活性藥物在標靶細胞內釋放(參見例如Dubowchik及Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123)。更典型為可由191P4D12表現細胞中存在之酶裂解的肽基連接子。舉例而言，可使用可由在癌性組織中高度表現之硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶B裂解的肽基連接子(例如Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly連接子(SEQ ID NO:9))。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連接子之阿黴素的合成)。細胞內蛋白水解釋放治療劑之一優勢為藥劑通常在共軛時會減毒且共軛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 and 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(諸如經由醯基胺鍵連接於治療劑之硫醚(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)。各種二硫化物連接子為此項技術所知，包括例如可使用以下形成之二硫化物連接子：SATA(N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫基乙酸酯)、SPDP(N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB(N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT(N-丁二醯亞胺基-氧羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)甲苯)、SPDB及SMPT。(參見例如Thorpe等人 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931；Wawrzynczak等人 *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager 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)。

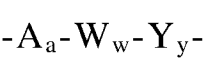
在其他實施例中，連接子單元不可裂解且藥物藉由抗體降解而釋放。(參見美國公開案第2005/0238649號，該案以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)。

通常，連接子不對細胞外環境相當敏感。如本文中所使用，在連接子之情況下，「不對細胞外環境相當敏感」意謂當抗體-藥物共軛物化合物呈現於細胞外環境中(例如血漿中)時，抗體藥物共軛物化合物之樣品中不超過約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%之連接子裂解。連接子是否不對細胞外環境相當敏感可例如藉由使抗體-藥物共軛物化合物與血漿一起培育一段預定時間(例如2、4、8、16或24小時)，接著定量血漿中存在之游離藥物的量來判定。

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，當連接子與治療劑共軛時(亦即在如本文所述之抗體藥物共軛物化合物的連接子-治療劑部分的環境下)，其促進細胞內化。在其他實施例中，當連接子與奧瑞他汀化合物與191P4D12 MAbs共軛時，其促進細胞內化。

可用於本發明組合物及方法之各種例示性連接子描述於WO 2004-010957、美國公開案第2006/0074008號、美國公開案第20050238649號及美國公開案第2006/0024317號(其中每一者均以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)中。

「連接子單元」(LU)為可用於連接藥物單元及抗體單元以形成抗體-藥物共軛物化合物之雙官能化合物。在一些實施例中，連接子單元具有下式：



其中：-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，且

y為0、1或2。

在一些實施例中，a為0或1，w為0或1，且y為0、1或2。在一些實施例中，a為0或1，w為0或1，且y為0或1。在一些實施例中，當w為1至12時，y為1或2。在一些實施例中，w為2至12且y為1或2。在一些實施例中，a為1且w及y為0。

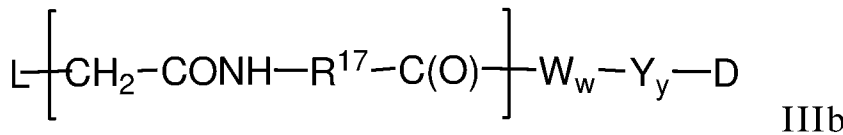
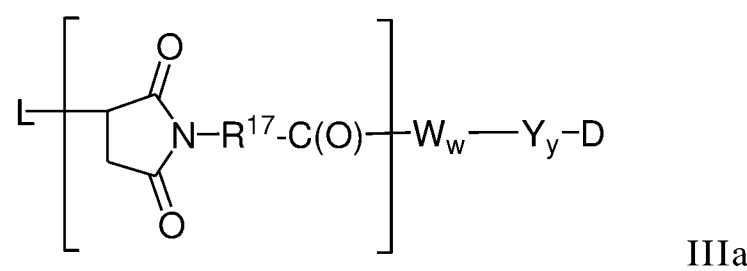
VI.) 延伸子單元

延伸子單元(A)(若存在)能夠使抗體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)或連接於藥物單元(-D)。可存在於191P4D12 MAb(例如Ha22-2(2,4)6.1)上之天然或經由化學處理的適用官能基包括(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。適合之官能基為氫硫基及胺基。在一實施例中，氫硫基可藉由還原191P4D12 MAb之分子內二硫鍵來產生。在另一實施例中，氫硫基可藉由使191P4D12 MAb之離胺酸部分的胺基與2-亞胺基硫雜環戊烷(陶氏試劑(Traut's reagent))或其他氫硫基產生劑反應來產生。在某些實施例中，191P4D12 MAb為重組抗體且經工程改造以帶有一或多個離胺酸。在某些其他實施例中，重組191P4D12 MAb經工程改造以帶有其他氫硫基，例如其他半胱胺酸。

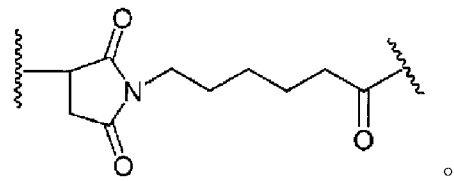
在一實施例中，延伸子單元與抗體單元之硫原子形成一鍵。該硫原子可來源於抗體之氫硫基。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式IIIa及IIIb之方括號中，其中L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義，且R¹⁷係選自-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烯基-、-C₁-C₁₀伸炔基-、碳環基-、-O-

(C₁-C₈伸烷基)-、O-(C₁-C₈伸烯基)-、-O-(C₁-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-、-C₁-C₁₀伸烷基-(雜環)-、-C₂-C₁₀伸烯基-(雜環)-、-C₂-C₁₀伸炔基-(雜環)-、-(雜環)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(雜環)-C₂-C₁₀伸烯基-、-(雜環)-C₁-C₁₀伸炔基-、-(CH₂CH₂O)_r-或-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-，且r為1-10範圍內之整數，其中單獨或另一基團之一部分的該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環及伸芳基視情況經取代。在一些實施例中，單獨或作為另一基團之一部分的該等烷基、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，R¹⁷係選自-C₁-C₁₀伸烷基-、-碳環基-、-O-(C₁-C₈伸烷基)-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(碳環基)-、-(碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(雜環基)-、-(雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(CH₂CH₂O)_r-及-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-；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。

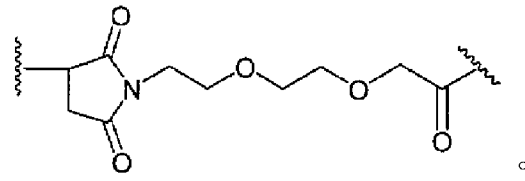
自所有例示性實施例應瞭解，當未明確表示時，1至20個藥物部分可連接於抗體(p=1-20)。



說明性延伸子單元為式IIIa之延伸子單元，其中R¹⁷為-(CH₂)₅-：

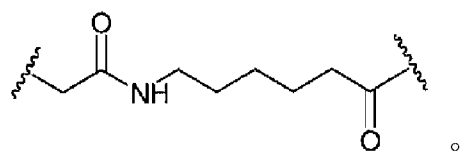


另一說明性延伸子單元為式IIIa之延伸子單元，其中R¹⁷為-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-；且r為2：

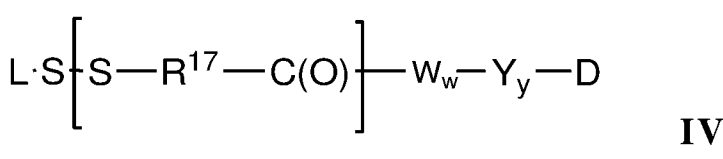


說明性延伸子單元為式IIIa之延伸子單元，其中R¹⁷為伸芳基-或伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-。在一些實施例中，該芳基為未經取代之苯基。

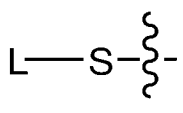
又一說明性延伸子單元為式IIIb之延伸子單元，其中R¹⁷為-(CH₂)₅-：



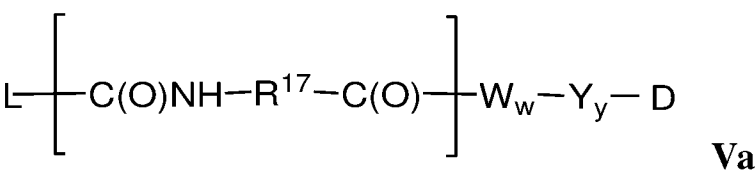
在某些實施例中，延伸子單元經由抗體單元之硫原子與延伸子單元之硫原子之間的二硫鍵連接於抗體單元。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式IV之方括號中，其中R¹⁷、L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義。

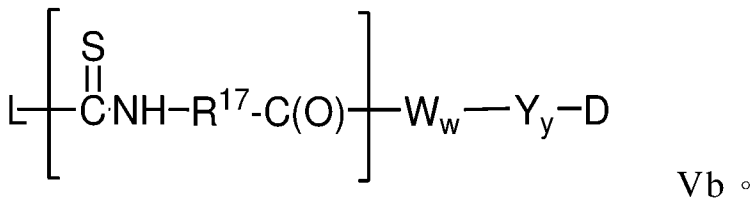


應注意在本申請案中，除非本文另有指示，否則下式中之S部分係指抗體單元之硫原子。

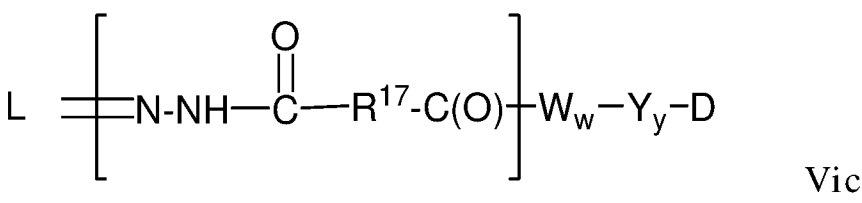
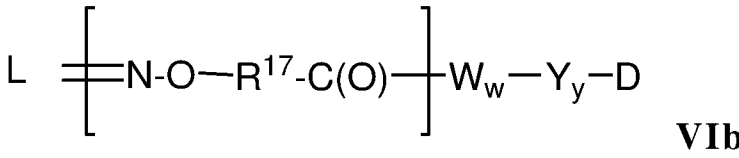
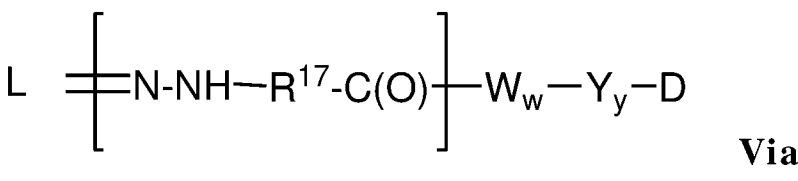


在其他實施例中，延伸子含有可與抗體之一級或二級胺基形成一鍵的反應性位點。此等反應性位點之實例包括(但不限於)活化酯，諸如丁二醯亞胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酸氯化物、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性延伸子單元描繪於式Va及Vb之方括號中，其中-R¹⁷-、L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義；





在一些實施例中，延伸子含有可與可存在於抗體上之經修飾之碳水化合物之(-CHO)基團反應之反應性位點。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所產生的氧化碳水化合物之(-CHO)單元可與含有諸如醯肼、肼、一級或二級胺、肼、硫半卡巴腓、羧酸肼及芳基醯肼之官能基的延伸子縮合，諸如Kaneko等人1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41所述之延伸子。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-R¹⁷-、L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義。

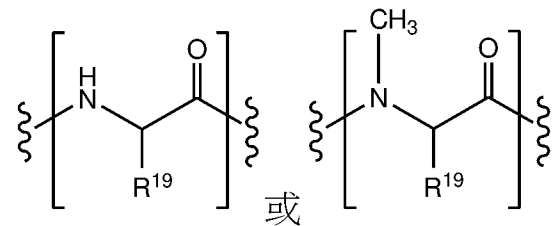


VII.) 胺基酸單元

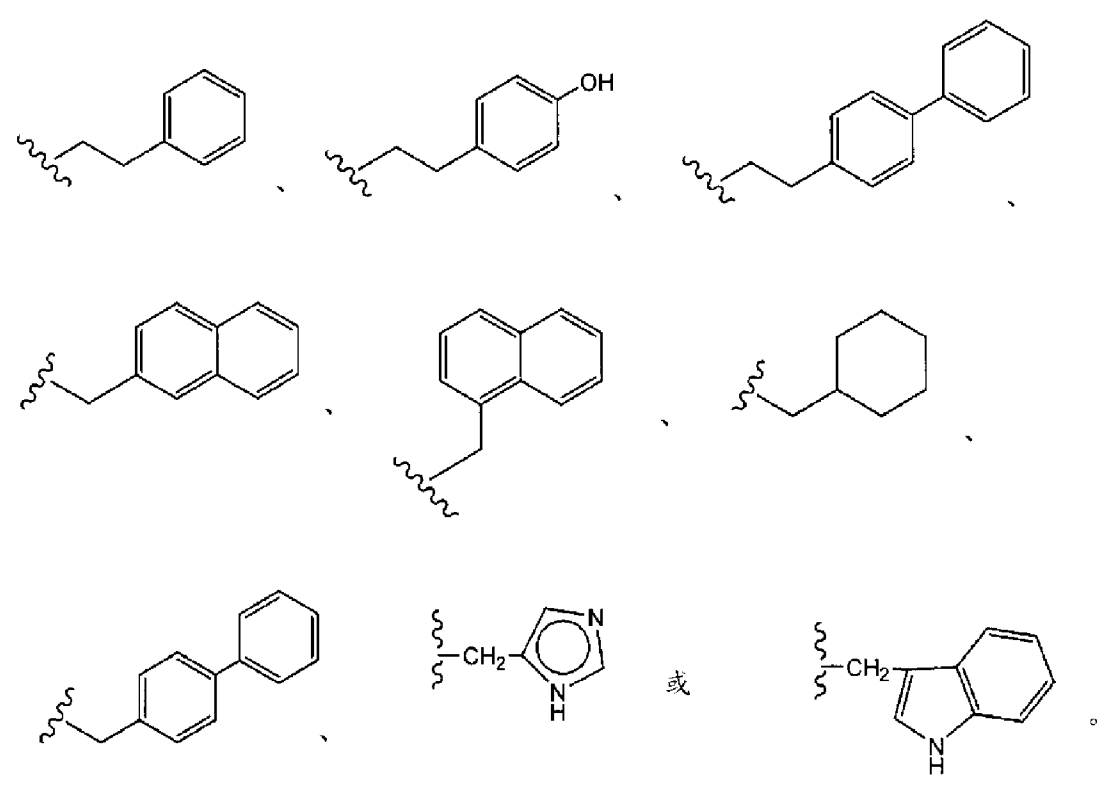
若間隔子單元存在，則胺基酸單元(-W-)(若存在)使延伸子單元連接於間隔子單元，若間隔子單元不存在，則使延伸子單元連接於藥物部分，

且若延伸子單元及間隔子單元不存在，則使抗體單元連接於藥物單元。

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：

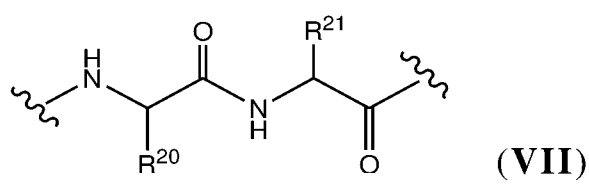


其中 R^{19} 為氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苯甲基、對羥基苯甲基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、



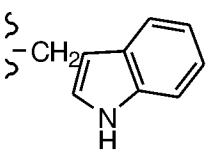
在一些實施例中，胺基酸單元可以酶方法由一或多種酶(包括癌症或腫瘤相關蛋白酶)裂解，以釋放藥物單元(-D)，在一實施例中，其在釋放後在活體內經質子化以提供藥物(D)。

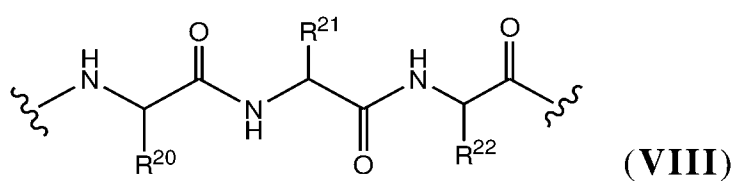
在某些實施例中，胺基酸單元可包含天然胺基酸。在其他實施例中，胺基酸單元可包含非天然胺基酸。說明性Ww單元由式(VII)-(IX)表示：



其中R²⁰及R²¹如下：

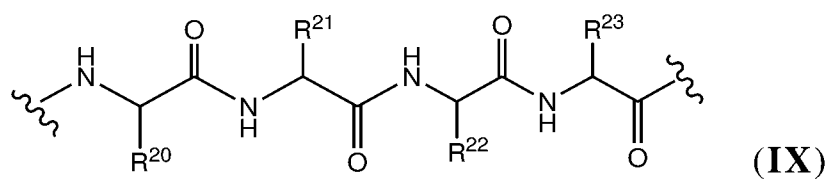
R ²⁰	R ²¹
苯甲基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ；
甲基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ；
異丙基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ；

異丙基	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
苯甲基	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
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R²⁰、R²¹及R²²如下：

R ²⁰	R ²¹	R ²²
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R²⁰、R²¹、R²²及R²³如下：

R ²⁰	R ²¹	R ²²	R ²³
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：R²⁰為苯甲基且R²¹為-(CH₂)₄NH₂；R²⁰為異丙基且R²¹為-(CH₂)₄NH₂；或R²⁰為異丙基且R²¹為-(CH₂)₃NHCONH₂。另一例示性胺基酸單元為式VIII之單元，其中

R^{20} 為苯甲基， R^{21} 為苯甲基，且 R^{22} 為 $-(CH_2)_4NH_2$ 。

適用 $-W_w$ -單元可關於其對由特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解之選擇性進行設計及最佳化。在一實施例中， $-W_w$ -單元為其裂解由組織蛋白酶B、C及D或纖維蛋白溶酶蛋白酶催化之單元。

在一實施例中， $-W_w$ -為二肽、三肽、四肽或五肽。當 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 不為氫時， R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 所連接之碳原子為對掌性碳原子。

R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 所連接之各碳原子獨立地呈(S)或(R)組態。

在胺基酸單元之一態樣中，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，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。

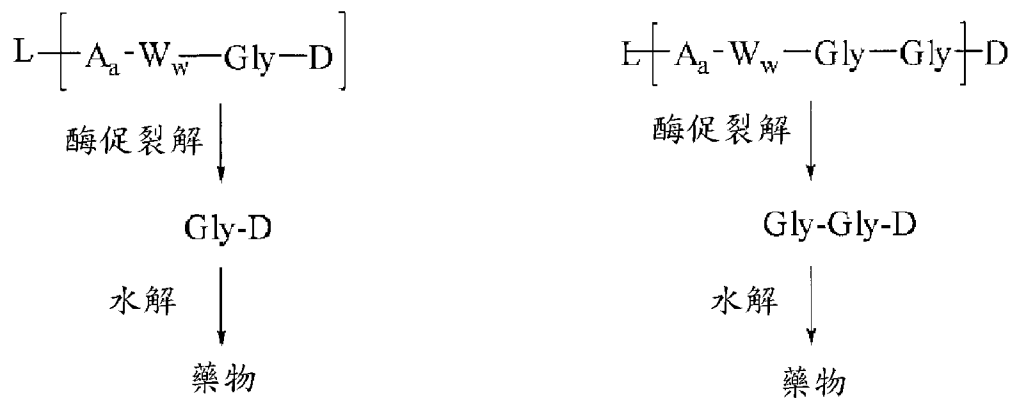
VIII.) 間隔子單元

當胺基酸單元存在時，間隔子單元(-Y-)(若存在)使胺基酸單元連接於藥物單元。或者，當胺基酸單元不存在時，間隔子單元使延伸子單元連接於藥物單元。當胺基酸單元與延伸子單元皆不存在時，間隔子單元亦使藥物單元連接於抗體單元。

間隔子單元具有兩種一般類型：非自我分解型或自我分解型。非自我分解型間隔子單元為在胺基酸單元自抗體-藥物共軛物裂解(尤其酶促)後間隔子單元之部分或全部保持與藥物部分結合的間隔子單元。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(兩者皆描繪於流程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共軛物經歷經由酶(例如腫瘤細胞相關蛋白酶、癌症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-藥物部分或甘胺酸-藥物部分自L-Aa-W_w-裂解。在一實施例中，在標靶細胞內進行獨立的水解反應，從而使甘胺酸-藥物部分之鍵裂解且釋放藥物。

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-。

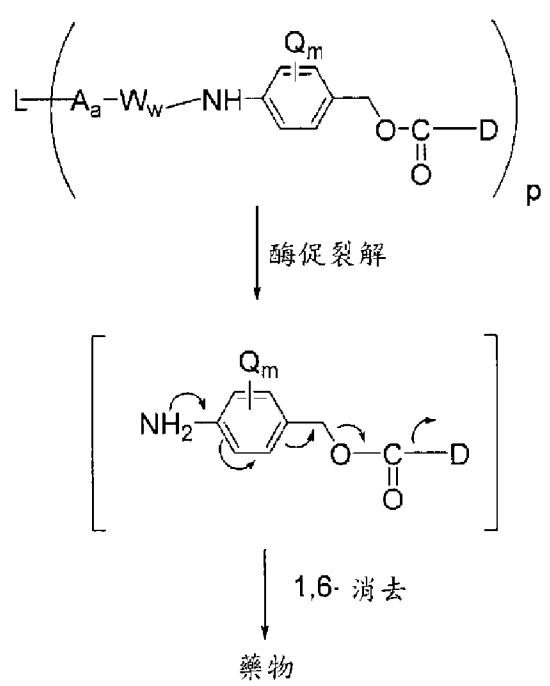
在一實施例中，提供不存在間隔子單元(-Y_y-, 其中y=0)之藥物-連接子共軛物或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

或者，含有自我分解型間隔子單元之共軛物可釋放-D。如本文中所使用，術語「自我分解型間隔子」係指能夠將兩個間隔之化學部分共價連接在一起形成穩定三聯分子之雙官能化學部分。若其與第一部分之鍵裂解，則其將自發地與第二化學部分分離。

在一些實施例中，-Y_y-為對氨基苯甲醇(PAB)單元(參見流程2及3)，其伸苯基部分經Q_m取代，其中Q為-C₁-C₈烷基、-C₁-C₈烯基、-C₁-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₁-C₈烯基)、-O-(C₁-C₈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。

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、胺基甲酸酯或醚基直接連接於-D之PAB基團。在不受任何特定理論或機制束縛之情況下，流程2描繪如Toki等人2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872所述經由胺基甲酸酯基或碳酸酯基直接連接於-D之PAB基團之藥物釋放的可能機制。

流程2

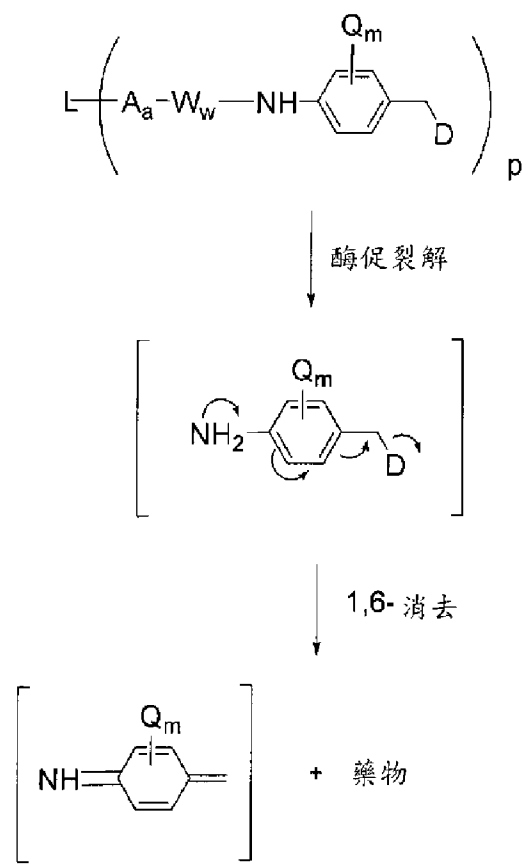


在流程2中，Q為-C₁-C₈烷基、-C₁-C₈烯基、-C₁-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₁-C₈烯基)、-O-(C₁-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為0-4範圍內之整數；且p在1至約20之範圍內。單獨或作為另一基團之一部分

的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

在不受任何特定理論或機制束縛之情況下，流程3描繪經由醚或胺鍵直接連接於-D之PAB基團之藥物釋放的可能機制，其中D包括作為藥物單元之一部分的氧或氮基團。

流程3



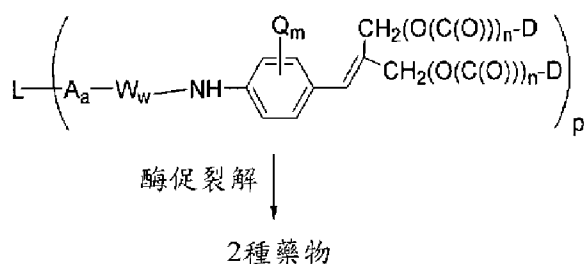
在流程3中，Q為-C₁-C₈烷基、-C₁-C₈烯基、-C₁-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₁-C₈烯基)、-O-(C₁-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為0-4範圍內之整數；且p在1至約20之範圍內。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

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。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔子，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(羥甲基)-苯乙烯(BHMS)單元，其可用於併入多種藥物中並釋放多種藥物。

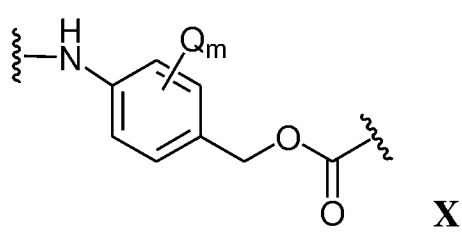
流程4



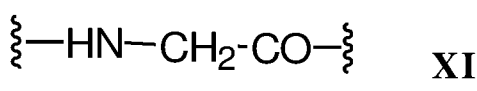
在流程4中，Q為-C₁-C₈烷基、-C₁-C₈烯基、-C₁-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₁-C₈烯基)、-O-(C₁-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為0-4範圍內之整數；n為0或1；且p在1至約20之範圍內。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

在一些實施例中，-D部分相同。在另一實施例中，-D部分不同。

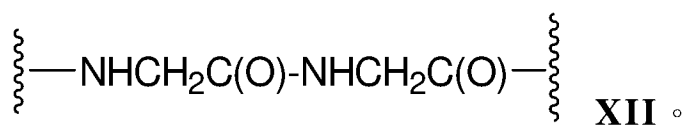
在一態樣中，間隔子單元(-Y_y-)由式(X)-(XII)表示：



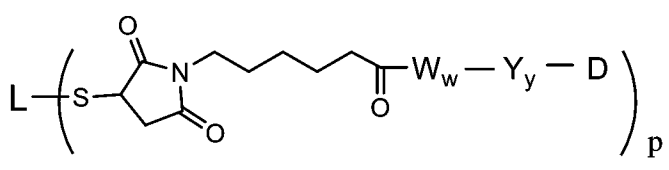
其中Q為-C₁-C₈烷基、-C₁-C₈烯基、-C₁-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₁-C₈烯基)、-O-(C₁-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為0-4範圍內之整數。單獨或作為另一基團之一部分的烷基、烯基及炔基可視情況經取代。



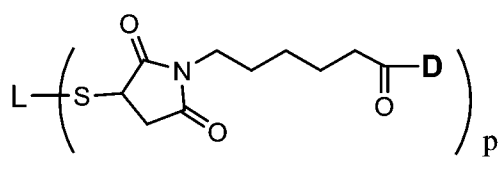
及



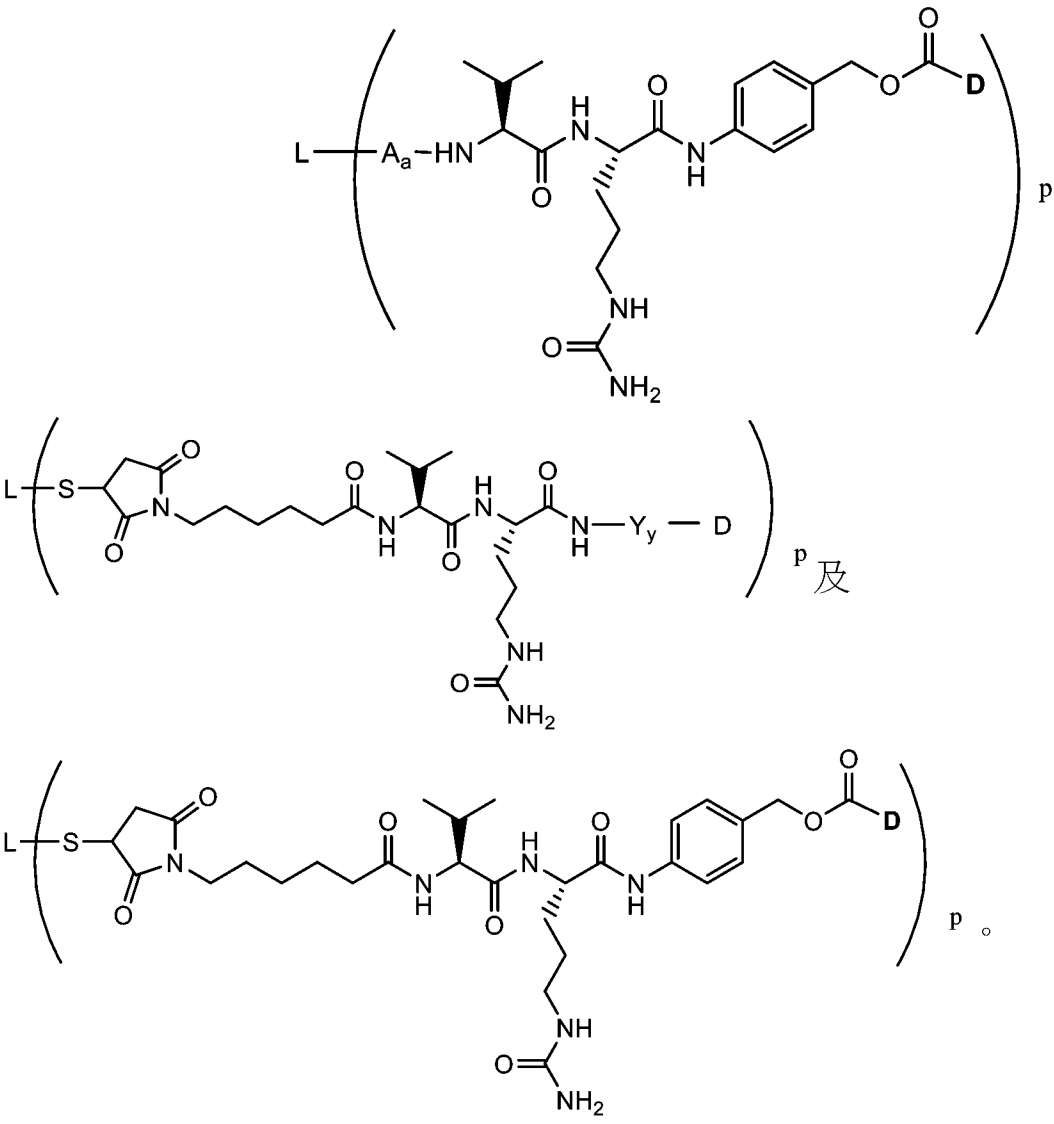
包含抗體-藥物共軛物化合物之式I及II的實施例可包括：



其中w及y各為0、1或2，及



其中w及y各為0，



IX.) 藥物單元

藥物部分(D)可為任何細胞毒性、細胞生長抑制或免疫調節(例如免疫抑制)藥物。D為具有可與間隔子單元、與胺基酸單元、與延伸子單元或與抗體單元形成一鍵的原子之藥物單元(部分)。在一些實施例中，藥物單元D具有可與間隔子單元形成一鍵之氮原子。如本文中所使用，術語「藥

物單元」及「藥物部分」為同義詞且可互換使用。

適用種類之細胞毒性劑、細胞生長抑制劑或免疫調節劑包括例如抗微管蛋白劑、DNA小溝結合物、DNA複製抑制劑及烷基化劑。

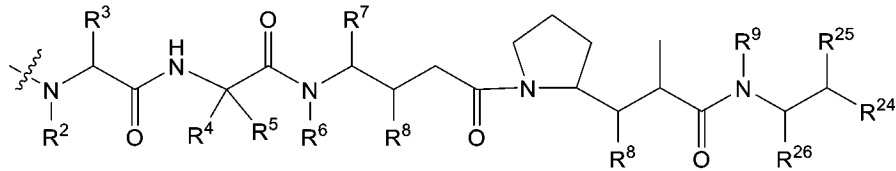
在一些實施例中，藥物為奧瑞他汀，諸如奧瑞他汀E(此項技術中亦稱為海兔毒素-10之衍生物)或其衍生物。奧瑞他汀可為例如奧瑞他汀E與酮酸之間形成的酯。舉例而言，可使奧瑞他汀E與對乙醯基苯甲酸或苯甲醯基戊酸反應以分別產生AEB及AEVB。其他典型奧瑞他汀包括AFP、MMAF及MMAE。例示性奧瑞他汀之合成及結構描述於以下專利中：美國專利申請公開案第2003-0083263號；國際專利公開案第WO 04/010957號、國際專利公開案第WO 02/088172號及美國專利第7,498,298號、第6,884,869號、第6,323,315號；第6,239,104號；第6,034,065號；第5,780,588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；及第4,486,414號，其中每一者均以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中。

已顯示奧瑞他汀可干擾微管動力學及細胞核及細胞分裂並具有抗癌活性。奧瑞他汀結合微管蛋白且可對191P4D12表現細胞發揮細胞毒性或細胞生長抑制作用。存在此項技術中已知之多種不同檢定，其可用於判定奧瑞他汀或所得抗體-藥物共軛物是否對所需細胞株發揮細胞生長抑制或細胞毒性作用。

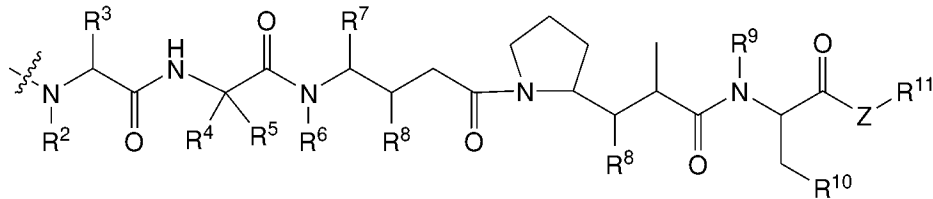
判定化合物是否結合微管蛋白之方法為此項技術中所知。參見例如

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性。本發明之一些較佳奧瑞他汀結合微管蛋白之親和性在為 MMAE 結合微管蛋白之親和性的 1/10 (較弱親和性) 至為 MMAE 結合微管蛋白之親和性的 10 倍、20 倍或甚至 100 倍 (較高親和性) 之範圍內。

在一些實施例中，-D 為式 **D_E** 或 **D_F** 之奧瑞他汀：



D_E



D_F

或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物形式；

其中在各位置獨立地：

波形線指示一鍵；

R² 為 -C₁-C₂₀ 烷基、-C₂-C₂₀ 烯基或 -C₂-C₂₀ 炔基；

R³ 為 -H、-C₁-C₂₀ 烷基、-C₂-C₂₀ 烯基、-C₂-C₂₀ 炔基、-碳環、-C₁-C₂₀ 伸烷基(碳環)、-C₂-C₂₀ 伸烯基(碳環)、-C₂-C₂₀ 伸炔基(碳環)、-芳基、-C₁-

C₂₀伸烷基(芳基)、-C₂-C₂₀伸烯基(芳基)、-C₂-C₂₀伸炔基(芳基)、雜環、-C₁-C₂₀伸烷基(雜環)、-C₂-C₂₀伸烯基(雜環)或-C₂-C₂₀伸炔基(雜環)；

R⁴為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、碳環、-C₁-C₂₀伸烷基(碳環)、-C₂-C₂₀伸烯基(碳環)、-C₂-C₂₀伸炔基(碳環)、-芳基、-C₁-C₂₀伸烷基(芳基)、-C₂-C₂₀伸烯基(芳基)、-C₂-C₂₀伸炔基(芳基)、-雜環、-C₁-C₂₀伸烷基(雜環)、-C₂-C₂₀伸烯基(雜環)或-C₂-C₂₀伸炔基(雜環)；

R⁵為-H或-C₁-C₈烷基；

或**R⁴**與**R⁵**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、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基或-碳環，且s為2、3、4、5或6，

R⁶為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基；

R⁷為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、碳環、-C₁-C₂₀伸烷基(碳環)、-C₂-C₂₀伸烯基(碳環)、-C₂-C₂₀伸炔基(碳環)、-芳基、-C₁-C₂₀伸烷基(芳基)、-C₂-C₂₀伸烯基(芳基)、-C₂-C₂₀伸炔基(芳基)、雜環、-C₁-C₂₀伸烷基(雜環)、-C₂-C₂₀伸烯基(雜環)或-C₂-C₂₀伸炔基(雜環)；

各**R⁸**獨立地為-H、-OH、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、-O-(C₁-C₂₀烷基)、-O-(C₂-C₂₀烯基)、-O-(C₂-C₂₀炔基)或-碳環；

R⁹為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基；

R²⁴為-芳基、-雜環或-碳環；

R²⁵為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、-碳環、-O-(C₁-C₂₀烷基)、-O-(C₂-C₂₀烯基)、-O-(C₂-C₂₀炔基)或OR¹⁸，其中**R¹⁸**為-H、羥基保護基、或當OR¹⁸表示=O時為直接鍵；

R²⁶為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基、-芳基、-雜環

或-碳環；

R^{10} 為-芳基或-雜環；

Z 為-O、-S、-NH或-NR¹²，其中 R^{12} 為-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基；

R^{11} 為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、-芳基、-雜環、-(R¹³O)_m-R¹⁴或-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂；

m 為1-1000範圍內之整數或 $m=0-1000$ ；

R^{13} 為-C₂-C₂₀伸烷基、-C₂-C₂₀伸烯基或-C₂-C₂₀伸炔基；

R^{14} 為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基；

R^{15} 在每次出現時獨立地為-H、-COOH、-(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂、-(CH₂)_n-SO₃H、-(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₂₀烷基、-(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀烯基或-(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀炔基；

R^{16} 在每次出現時獨立地為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基或-(CH₂)_n-COOH；且

n 為0至6範圍內之整數；

其中單獨或作為另一基團之一部分的該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基視情況經取代。

式D_E之奧瑞他汀包括該等烷基、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之奧瑞他汀。

式D_E之奧瑞他汀包括R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸及R⁹基團未經取代且R¹⁹、R²⁰及R²¹基團如本文所述視情況經取代之奧瑞他汀。

式D_E之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R^2 為C₁-C₈烷基；

R³、**R⁴**及**R⁷**係獨立地選自-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、單環C₃-C₆碳環、-C₁-C₂₀伸烷基(單環C₃-C₆碳環)、-C₂-C₂₀伸烯基(單環C₃-C₆碳環)、-C₂-C₂₀伸炔基(單環C₃-C₆碳環)、C₆-C₁₀芳基、-C₁-C₂₀伸烷基(C₆-C₁₀芳基)、-C₂-C₂₀伸烯基(C₆-C₁₀芳基)、-C₂-C₂₀伸炔基(C₆-C₁₀芳基)、雜環、-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；

R⁵為-H；

R⁶為-C₁-C₈烷基；

各**R⁸**係獨立地選自-OH、-O-(C₁-C₂₀烷基)、-O-(C₂-C₂₀烯基)或-O-(C₂-C₂₀炔基)，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R⁹為-H或-C₁-C₈烷基；

R²⁴為視情況經取代之-苯基；

R²⁵為-OR¹⁸；其中**R¹⁸**為H、羥基保護基、或當OR¹⁸表示=O時為直接鍵；

R²⁶係選自-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀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或溶劑合物形式。

式**D_E**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為甲基；

R³為-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基或C₂-C₈炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R⁴為-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、單環C₃-C₆碳環、-

C₆-C₁₀芳基、-C₁-C₈伸烷基(C₆-C₁₀芳基)、-C₂-C₈伸烯基(C₆-C₁₀芳基)、-C₂-C₈伸炔基(C₆-C₁₀芳基)、-C₁-C₈伸烷基(單環C₃-C₆碳環)、-C₂-C₈伸烯基(單環C₃-C₆碳環)、-C₂-C₈伸炔基(單環C₃-C₆碳環)；其中單獨或作為另一基團之一部分的該等烷基、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；

R⁵為H；

R⁶為甲基；

R⁷為-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基或-C₂-C₈炔基；

各**R⁸**為甲氧基；

R⁹為-H或-C₁-C₈烷基；

R²⁴為-苯基；

R²⁵為-OR¹⁸；其中**R¹⁸**為H、羥基保護基、或當OR¹⁸表示=O時為直接鍵；

R²⁶為甲基；

或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式**D_E**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為甲基；**R³**為-H或-C₁-C₃烷基；**R⁴**為-C₁-C₅烷基；**R⁵**為-H；**R⁶**為甲基；**R⁷**為異丙基或第二丁基；**R⁸**為甲氧基；**R⁹**為-H或-C₁-C₈烷基；**R²⁴**為苯基；**R²⁵**為-OR¹⁸；其中**R¹⁸**為-H、羥基保護基、或當OR¹⁸表示=O時為直接鍵；且**R²⁶**為甲基；或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物形式。

式**D_E**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為甲基或C₁-C₃烷基；

R³為-H或-C₁-C₃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-H或 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^{24} 為苯基；

R^{25} 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^{26} 為 $-C_1-C_3$ 烷基；

或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式 D_F 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)；其中單獨或作為另一基團之一部分的該等烷基、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-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；

Z 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、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ，其中該等烷基、烯基、炔基、芳基及雜環基視情況經取代；

m 為 1-1000 範圍內之整數或 $m=0$ ；

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 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 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 $-(CH_2)_n-COOH$ ，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

n 為 0 至 6 範圍內之整數；

或其醫藥學上可接受之鹽。

在某些此等實施例中， R^{10} 為視情況經取代之苯基。

式 D_F 之奧瑞他汀包括 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及 R^9 基團未經取代且 R^{10} 及 R^{11} 基團如本文所述之奧瑞他汀。

式**D_F**之奧瑞他汀包括該等烷基、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之奧瑞他汀。

式**D_F**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為-C₁-C₃烷基；**R³**為-H或-C₁-C₃烷基；**R⁴**為-C₁-C₅烷基；**R⁵**為-H；**R⁶**為-C₁-C₃烷基；**R⁷**為-C₁-C₅烷基；**R⁸**為-C₁-C₃烷氧基；**R⁹**為-H或-C₁-C₈烷基；**R¹⁰**為視情況經取代之苯基；**Z**為-O-、-S-或-NH-；**R¹¹**如本文所定義；或其醫藥學上可接受之鹽。

式**D_F**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為甲基；**R³**為-H或-C₁-C₃烷基；**R⁴**為-C₁-C₅烷基；**R⁵**為-H；**R⁶**為甲基；**R⁷**為異丙基或第二丁基；**R⁸**為甲氧基；**R⁹**為-H或-C₁-C₈烷基；**R¹⁰**為視情況經取代之苯基；**Z**為-O-、-S-或-NH-；且**R¹¹**如本文所定義；或其醫藥學上可接受之鹽。

式**D_F**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為甲基；**R³**為-H或-C₁-C₃烷基；**R⁴**為-C₁-C₅烷基；**R⁵**為-H；**R⁶**為甲基；**R⁷**為異丙基或第二丁基；**R⁸**為甲氧基；**R⁹**為-H或C₁-C₈烷基；**R¹⁰**為苯基；且**Z**為-O-或-NH-，且**R¹¹**如本文所定義，較佳為氫；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式**D_F**之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中

R²為-C₁-C₃烷基；**R³**為-H或-C₁-C₃烷基；**R⁴**為-C₁-C₅烷基；**R⁵**為-H；**R⁶**為-C₁-C₃烷基；**R⁷**為-C₁-C₅烷基；**R⁸**為-C₁-C₃烷氧基；**R⁹**為-H或-C₁-C₈烷基；**R¹⁰**為苯基；且**Z**為-O-或-NH-，且**R¹¹**如本文所定義，較佳為氫；或其醫藥學上可接受之鹽形式。

式**D_E**或**D_F**之奧瑞他汀包括**R³**、**R⁴**及**R⁷**獨立地為異丙基或第二丁基且

R^5 為-H之奧瑞他汀。在一例示性實施例中， R^3 及 R^4 各為異丙基， R^5 為H，且 R^7 為第二丁基。其餘取代基如本文所定義。

式 D_E 或 D_F 之奧瑞他汀包括 R^2 及 R^6 各為甲基且 R^9 為H之奧瑞他汀。其餘取代基如本文所定義。

式 D_E 或 D_F 之奧瑞他汀包括 R^8 在每次出現時為-OCH₃之奧瑞他汀。其餘取代基如本文所定義。

式 D_E 或 D_F 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中 R^3 及 R^4 各為異丙基， R^2 及 R^6 各為甲基， 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 D_F 之奧瑞他汀包括其中Z為-O-或-NH-之奧瑞他汀。其餘取代基如本文所定義。

式 D_F 之奧瑞他汀包括 R^{10} 為芳基之奧瑞他汀。其餘取代基如本文所定義。

式 D_F 之奧瑞他汀包括 R^{10} 為-苯基之奧瑞他汀。其餘取代基如本文所定義。

式 D_F 之奧瑞他汀包括Z為-O-且 R^{11} 為H、甲基或第三丁基之奧瑞他汀。其餘取代基如本文所定義。

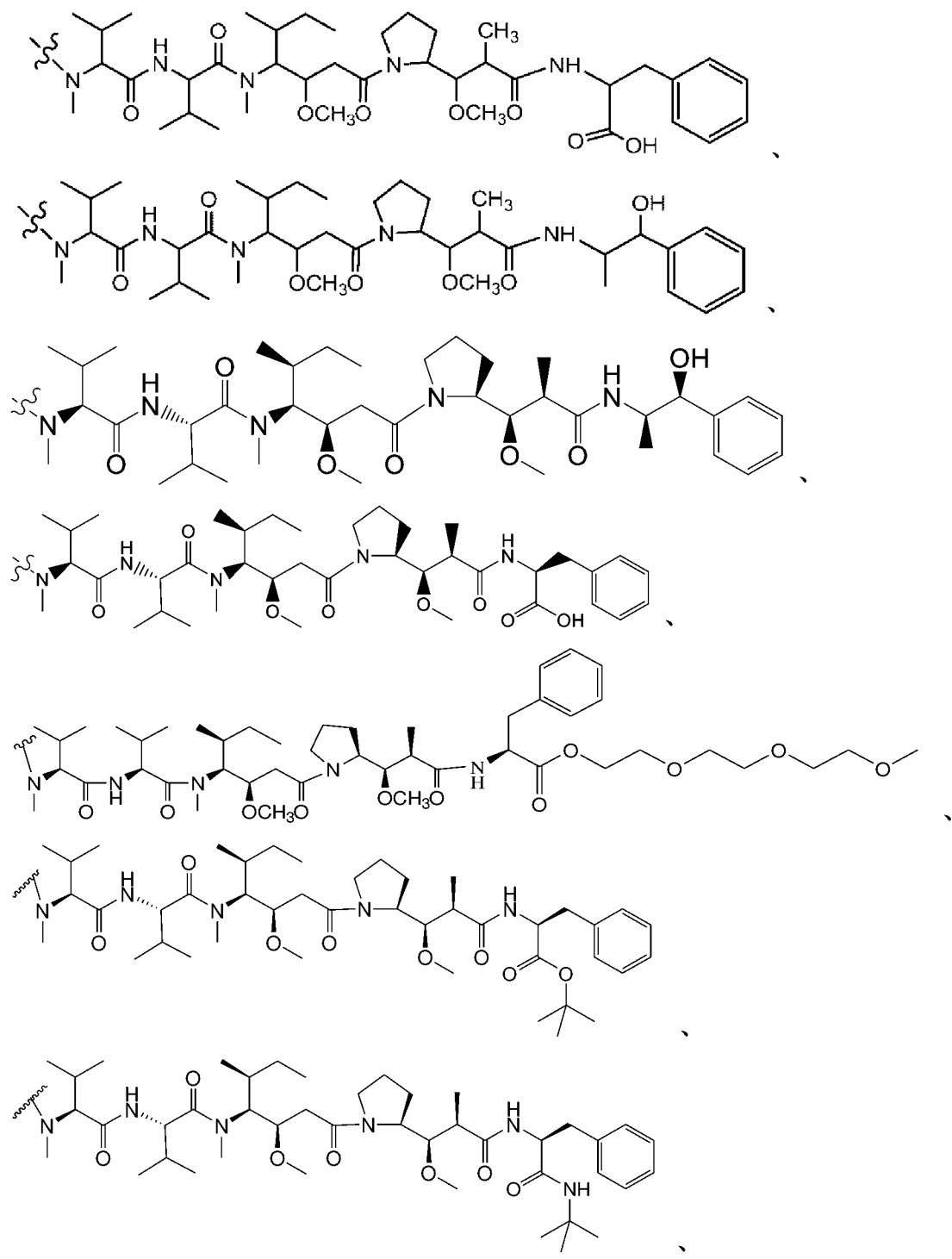
式 D_F 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中當Z為-NH-時， R^{11} 為-($R^{13}O$)_m-CH(R^{15})₂，其中 R^{15} 為-(CH₂)_n-N(R^{16})₂，且 R^{16} 為-C₁-C₈烷基或-(CH₂)_n-COOH。其餘取代基如本文所定義。

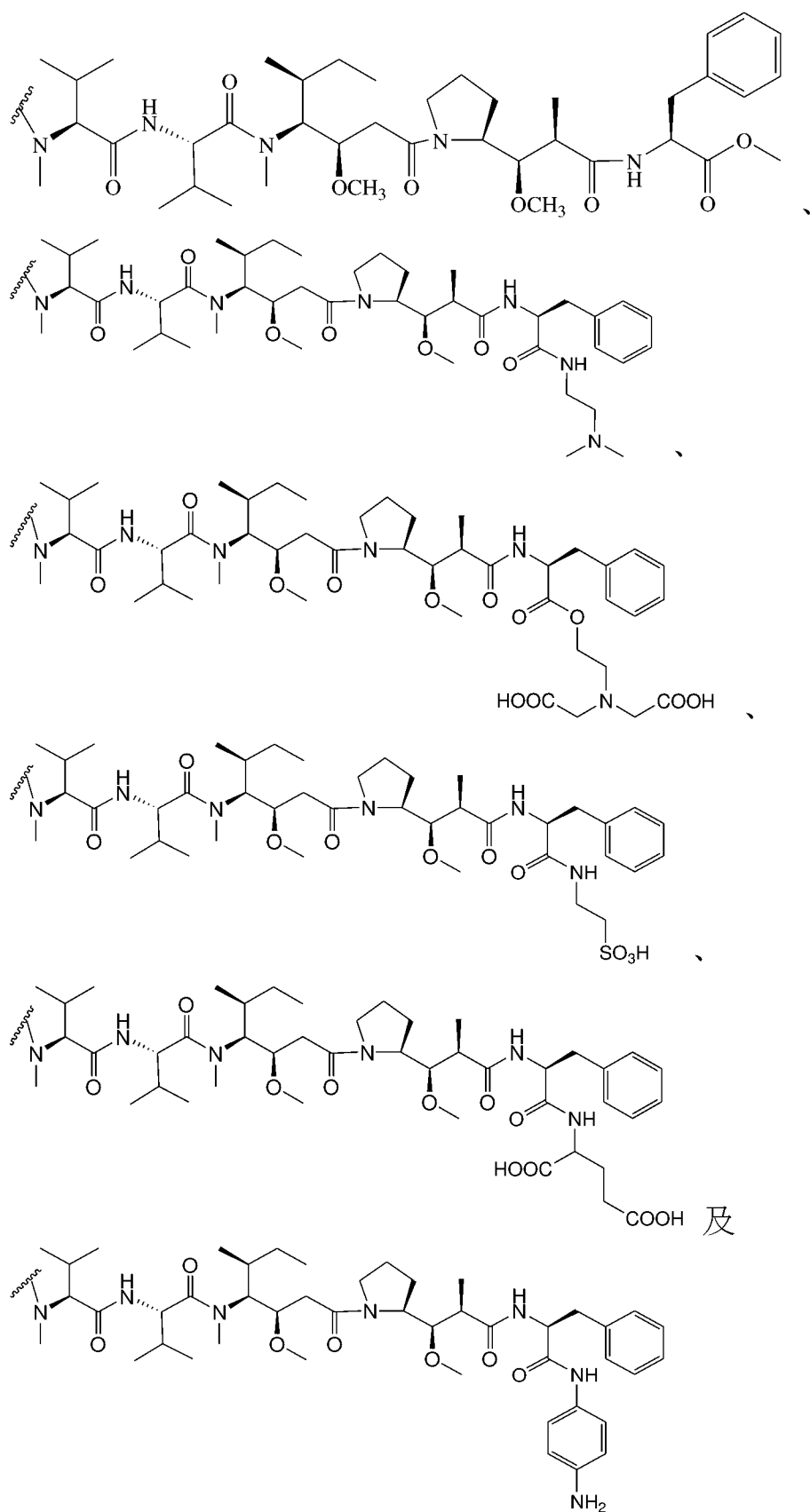
式 D_F 之奧瑞他汀包括如下奧瑞他汀，其中當Z為-NH-時， R^{11} 為-($R^{13}O$)_m-CH(R^{15})₂，其中 R^{15} 為-(CH₂)_n-SO₃H。其餘取代基如本文所定義。

在較佳實施例中，當D為式D_E之奧瑞他汀時，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。

在一些實施例中，當D為式D_F之奧瑞他汀時，a為1且w及y為0。

說明性藥物單元(-D)包括具有以下結構之藥物單元：



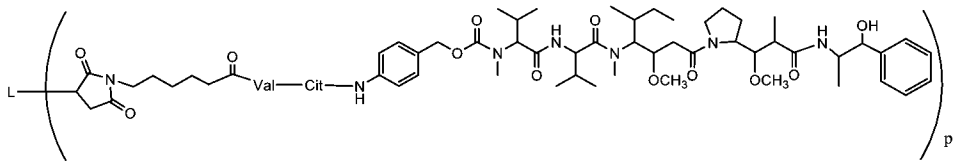
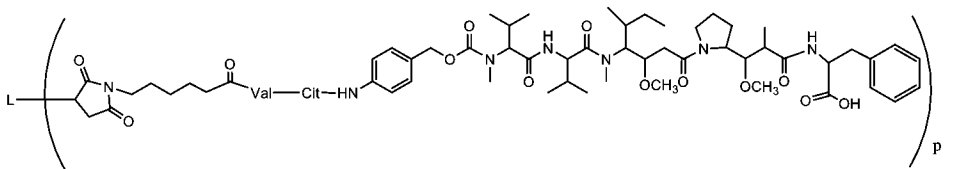


或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

在一態樣中，諸如(但不限於)三乙二醇酯(TEG)之親水性基團可連接於藥物單元之 R^{11} 。在不受理論束縛之情況下，親水性基團幫助藥物單元之內化及非聚結。

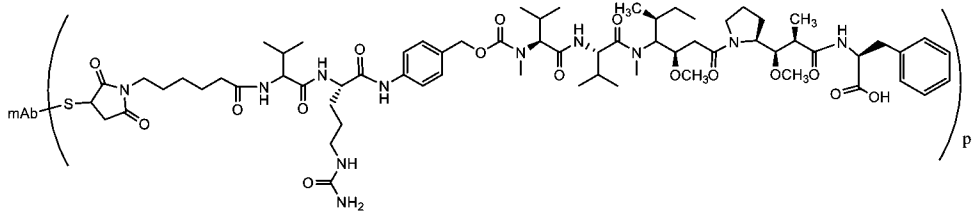
在一些實施例中，藥物單元不為TZT-1027。在一些實施例中，藥物單元不為奧瑞他汀E、海兔毒素10或奧瑞他汀PE。

例示性抗體-藥物共軛物化合物具有以下結構，其中「L」或「mAb-s」表示本文所述之稱為Ha22-2(2,4)6.1的191P4D12 MAb：



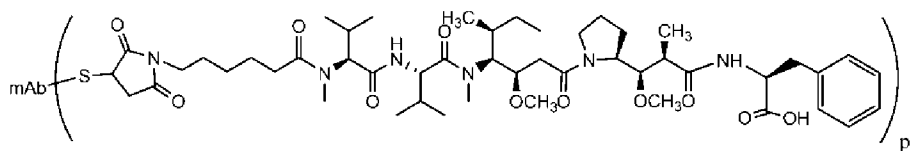
L-MC-vc-PAB-MMAF

或



L-MC-vc-PAB-MMAE.

或



L-MC-MMAF

或其醫藥學上可接受之鹽。

在一些實施例中，藥物單元為卡奇黴素、喜樹鹼(camptothecin)、類美登素或蒽環黴素(anthracycline)。在一些實施例中，藥物為紫杉烷、拓撲異構酶抑制劑、長春花生物鹼或其類似物。

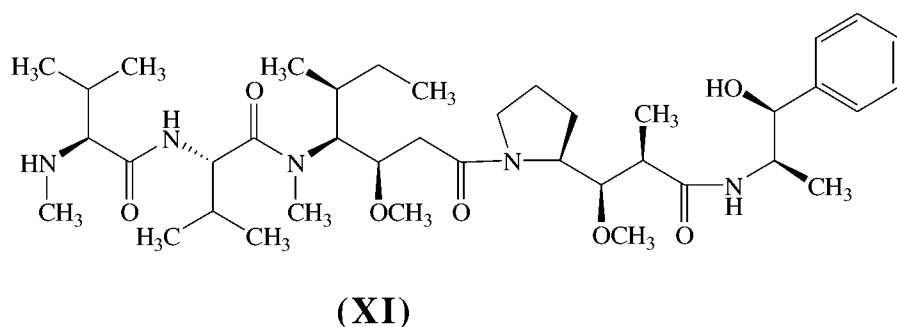
在一些典型實施例中，適合之細胞毒性劑包括例如DNA小溝結合物(例如烯二炔類及雷西曲星(lexitropsins)、CBI化合物；亦參見美國專利第6,130,237號)、倍癌黴素、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)及多西他賓(docetaxel))、嘌呤黴素(puromycin)及長春花生物鹼。其他細胞毒性劑包括例如CC-1065、SN-38、拓撲替康(topotecan)、嗎啉基-阿黴素、根瘤菌素(rhizoxin)、氰基嗎啉基-阿黴素、棘黴素(echinomycin)、考布他汀、紡錘菌素(netropsin)、埃坡黴素(epothilone)A及B、雌莫司汀(estramustine)、念珠藻環肽(cryptophysins)、西馬多丁(cemadotin)、類美登素、迪斯德莫來(discodermolide)、艾榴素(eleutherobin)及米托蒽醌(mitoxantrone)。

在一些實施例中，藥物為抗微管蛋白劑。抗微管蛋白劑之實例包括奧瑞他汀、紫杉烷(例如Taxol®(太平洋紫杉醇)、Taxotere®(多西他賓))、T67(Tularik)及長春花生物鹼(例如長春新鹼、長春鹼、長春地辛及長春瑞濱(vinorelbine))。其他抗微管蛋白劑包括例如漿果赤黴素(baccatin)衍生物、紫杉烷類似物(例如埃坡黴素A及B)、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙

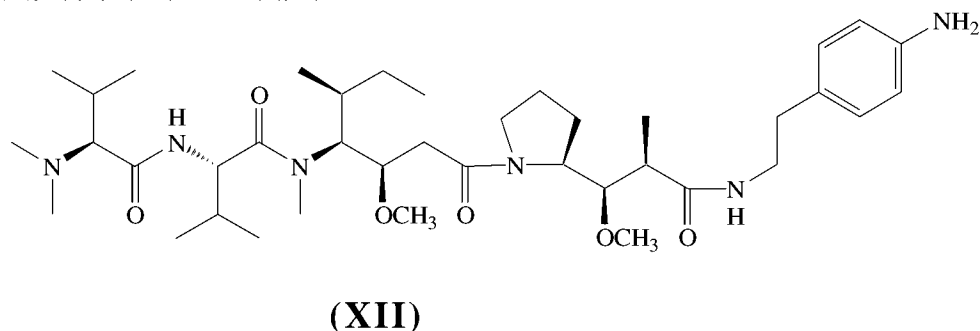
鹼及秋水鹼胺(colcimid)、雌莫司汀、念珠藻環肽、西馬多丁、類美登素、考布他汀、迪斯德莫來及艾榴素。

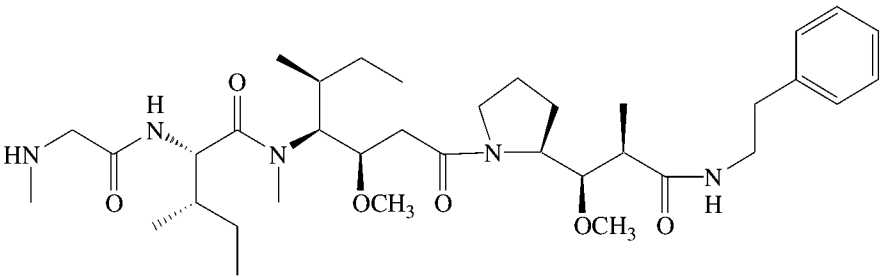
在某些實施例中，細胞毒性劑為類美登素，另一組抗微管蛋白劑。舉例而言，在特定實施例中，類美登素為美登素或DM-1(ImmunoGen, Inc.；亦參見Chari等人1992, *Cancer Res.* 52:127-131)。

在某些實施例中，細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為海兔毒素。在某些實施例中，細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為奧瑞他汀種類。因此，在一特定實施例中，細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為MMAE(式XI)。在另一特定實施例中，細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為AFP(式XVI)。

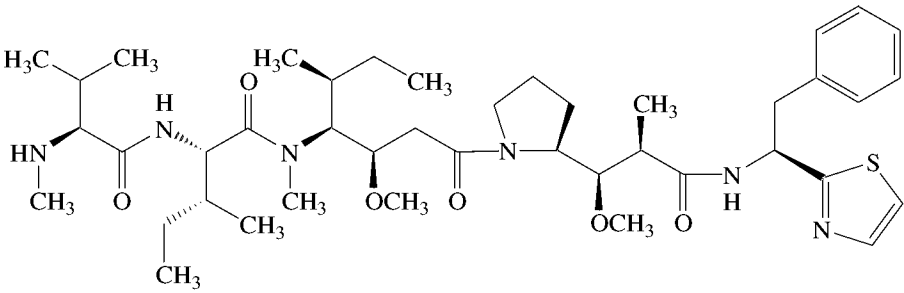


在某些實施例中，細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為式XII-XXI之化合物或其醫藥學上可接受之鹽：

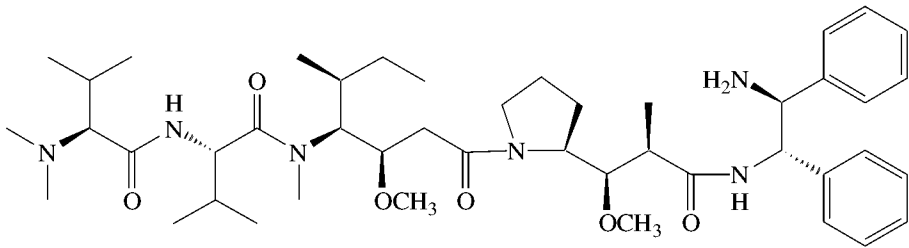




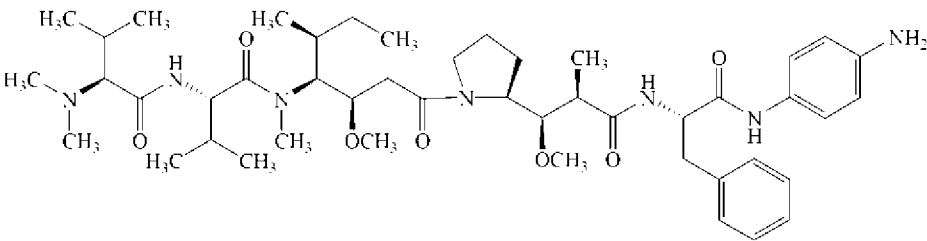
(XIII)



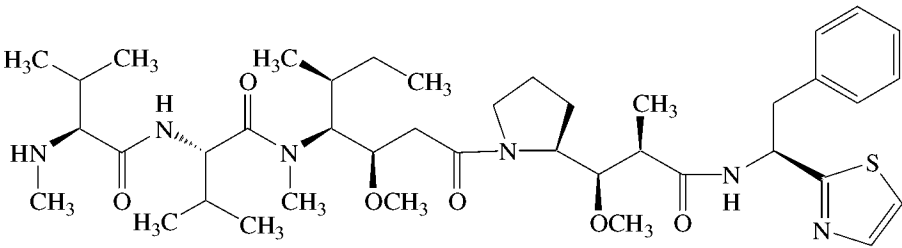
(XIV)



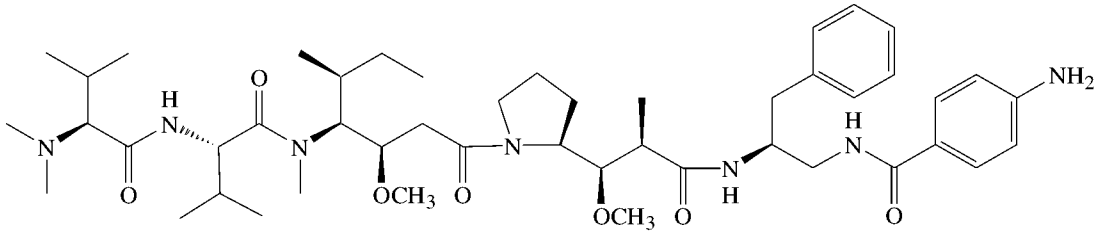
(XV)



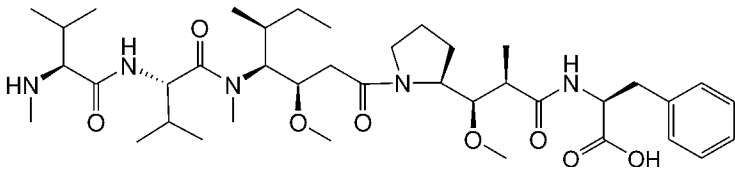
(XVI)



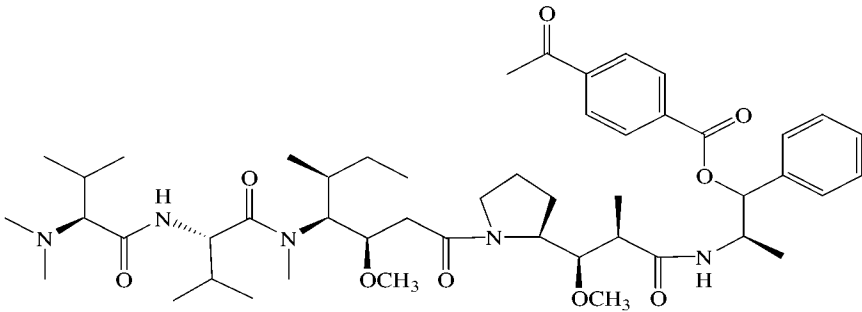
(XVII)



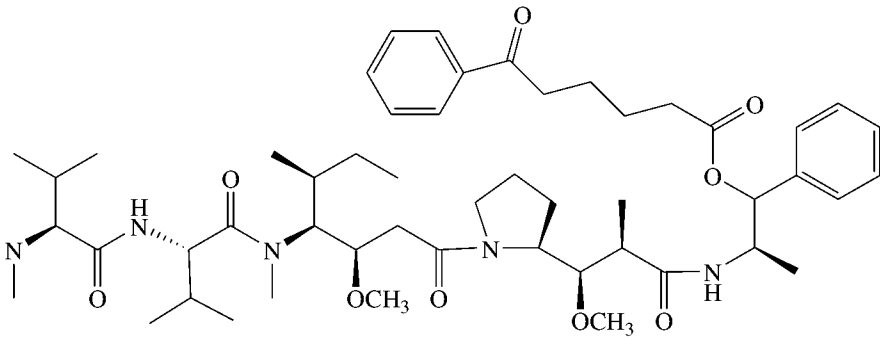
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

X.) 藥物負載

藥物負載由 p 表示且為分子中每個抗體的藥物部分之平均數目。藥物負載可在每個抗體1至20個藥物部分(D)之範圍內。本發明之ADC包括與1至20個範圍內之藥物部分共軛的抗體之集合。在由共軛反應製備ADC中每個抗體的藥物部分之平均數目可藉由諸如質譜法及ELISA檢定之習知手段來表徵。亦可測定ADC中 p 之定量分佈。在一些情況下，均質ADC可藉由諸如電泳之手段來分離、純化及表徵，其中 p 為具有其他藥物負載之ADC的某一值。

對於一些抗體藥物共軛物， p 可能受抗體上之連接位點數目的限制。舉例而言，若如以上例示性實施例中連接為半胱胺酸硫氫基，則抗體可能僅具有一個或數個半胱胺酸硫氫基，或可能僅具有一個或數個具有足夠反應性之硫氫基，連接子可經由該等硫氫基連接。在某些實施例中，較高藥物負載(例如 $p > 5$)可能使得某些抗體藥物共軛物凝集、不溶、具毒性或喪失細胞滲透性。在某些實施例中，本發明之ADC的藥物負載在以下範圍內：1至約8；約2至約6；約3至約5；約3至約4；約3.1至約3.9；約3.2至約3.8；約3.2至約3.7；約3.2至約3.6；約3.3至約3.8；或約3.3至約3.7。實際上，已顯示對於某些ADC，每個抗體的藥物部分之最佳比率可小於8，且可為約2至約5。參見美國專利第7,498,298號(以全文引用的方式併入本文中)。

在某些實施例中，在共軛反應期間，少於理論最大值之藥物部分與抗體共軛。抗體可含有例如不與藥物-連接子中間物或連接子試劑反應之

離胺酸殘基，如下文所論述。一般，抗體不含有可連接於藥物部分之許多游離及反應性半胱胺酸硫醇基；實際上，抗體中大多數半胱胺酸硫醇殘基以二硫橋鍵形式存在。在某些實施例中，抗體可在部分或完全還原條件下用諸如二硫蘇糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)之還原劑還原，產生反應性半胱胺酸硫醇基。在某些實施例中，使抗體經受變性條件以暴露諸如離胺酸或半胱胺酸之反應性親核基團。

ADC之負載(藥物/抗體比)可以不同方式進行控制，例如藉由：(i)相對於抗體限制藥物-連接子中間物或連接子試劑之莫耳過量；(ii)限制共軛反應時間或溫度；(iii)部分限制或限制半胱胺酸硫醇修飾之還原條件；(iv)藉由重組技術對抗體之胺基酸序列進行工程改造以使得半胱胺酸殘基之數目及位置經調節以控制連接子-藥物連接數目及/或位置(諸如如本文及WO 2006/034488(以全文引用的方式併入本文中)中所揭示製得之thioMab或thioFab)。

應瞭解當一個以上親核基團與藥物-連接子中間物或連接子試劑、隨後藥物部分試劑反應時，所得產物為具有一或多個藥物部分連接於抗體之分佈的ADC化合物之混合物。每個抗體之藥物平均數目可由該混合物藉由雙ELISA抗體檢定計算，該檢定對於抗體具有特異性且對於藥物具有特異性。個別ADC分子可藉由質譜法在混合物中鑑別出且藉由HPLC(例如疏水性相互作用層析)分離(參見例如Hamblett, K.J.等人「Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate,」摘要編號624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, Proceedings of the AACR, 第45卷, 2004年3月；Alley, S.C.等人「Controlling the

location of drug attachment in antibody-drug conjugates,」摘要編號627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, Proceedings of the AACR, 第45卷, 2004年3月)。在某些實施例中, 可藉由電泳或層析自共軛混合物分離具有單一負載值之均質ADC。

XI.) 測定ADC之細胞毒性作用的方法

判定藥物或抗體-藥物共軛物是否對細胞發揮細胞生長抑制及/或細胞毒性作用之方法為已知的。一般, 抗體藥物共軛物之細胞毒性或細胞生長抑制活性可藉由以下量測: 使表現抗體藥物共軛物之標靶蛋白的哺乳動物細胞暴露於細胞培養基中; 培養該等細胞約6小時至約5天之時段; 及量測細胞活力。可使用基於細胞之活體外檢定量測抗體藥物共軛物之活力(增殖)、細胞毒性及細胞凋亡之誘導(卡斯蛋白酶(caspase)活化)。

為判定抗體藥物共軛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孔板中以每孔5,000個細胞之密度培養表現標靶抗原之癌細胞72小時時段, 且在72小時時段之最後8小時期間暴露於0.5 μ Ci 3 H-胸苷。在抗體藥物共軛物存在及不存在下量測培養物之細胞中 3 H-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。測定出對癌細胞之任一此等作用指示抗體藥物共軛物適用於治療癌症。

細胞活力可藉由測定細胞中染料(諸如中性紅(neutral red)、錐蟲藍(trypsin 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，在用於藉由偵測活的而非死的細胞來測定哺乳動物細胞存活及增殖之定量比色檢定中使用諸如MTT之四唑鎢鹽(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斷裂之市售光度法。包括基於TUNEL(其偵測DNA片段中經標記核苷酸之併入)及ELISA之檢定的該等檢定之實例描述於*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，且觀察細胞之染色質凝聚及沿內部核膜之蝕邊現象。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。

可在培養物之附著與「漂浮」部分(compartment)中量測凋亡細胞之存在。舉例而言，收集的兩個部分皆可移除上清液、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)後合併製備物及偵測細

胞凋亡(例如藉由量測DNA斷裂)。(參見例如Piazza等人1995, *Cancer Research* 55:3110-16)。

可在適合之動物模型中活體內評估191P4D12治療性組合物之作用。舉例而言，可使用異體癌症模型，其中將癌症外植體或繼代異種移植組織引入免疫受損動物體內，諸如裸小鼠或SCID小鼠(Klein等人1997, *Nature Medicine* 3: 402-408)。舉例而言，PCT專利申請案WO 98/16628及美國專利6,107,540描述人類前列腺癌之多種異種移植模型，該等模型能夠重演原發性腫瘤之發展、微轉移及晚期疾病之特徵成骨細胞轉移的形成。可使用對腫瘤形成之抑制、腫瘤消退或轉移及其類似過程進行量測之檢定預測功效。

評估細胞凋亡加快之活體內檢定適用於評估治療性組合物。在一實施例中，可檢查經治療性組合物處理之具有腫瘤之小鼠的異種移植物中細胞凋亡中心之存在且與未經處理之具有異種移植物之對照小鼠比較。經處理小鼠之腫瘤中存在細胞凋亡焦點的程度表明組合物之治療功效。

用於實施上述方法之治療性組合物可調配成包含適用於所需傳遞方法之載劑的醫藥組合物。適合之載劑包括與治療性組合物組合時保持該治療性組合物之抗腫瘤功能且與患者免疫系統通常無反應性的任何物質。實例包括(但不限於)多種標準醫藥載劑中之任一者，諸如無菌磷酸鹽緩衝生理鹽水溶液、抑菌水及其類似物(一般參見Remington's *Pharmaceutical Sciences*第16版，A. Osal.編，1980)。

治療性調配物可溶解且可經由能夠將治療性組合物傳遞至腫瘤部位之任何途徑來投與。潛在有效的投藥途徑包括(但不限於)靜脈內、非經腸、腹膜內、肌肉內、腫瘤內、皮內、器官內、正位及其類似途徑。用於

靜脈內注射之較佳調配物包含於經防腐處理之抑菌水、未經防腐處理之無菌水的溶液中及/或稀釋於含有0.9%注射用無菌氯化鈉(USP)之聚氯乙烯或聚乙烯袋中的治療性組合物。治療性蛋白質製劑可經凍乾，且可以無菌粉末形式，較佳在真空下儲存，接著用抑菌水(含有例如苯甲醇防腐劑)或無菌水復原後再注射。

使用上述方法治療癌症之劑量及投藥方案將隨方法及標靶癌症而變，且通常將視此項技術中所瞭解之多種其他因素而定。

XII.) 治療表現191P4D12之癌症

鑑別191P4D12為在一組有限組織中正常表現、但亦在癌症(諸如表I中所列之癌症)中表現之蛋白質為治療該等癌症開拓了多種治療方法。

值得注意的是，靶向抗腫瘤療法為有用的，即使當靶向蛋白在正常組織、甚至正常生命器官組織中表現時。生命器官為維持生命所必需之器官，諸如心臟或結腸。非生命器官為在移除後個體仍能存活之器官。非生命器官之實例為卵巢、乳房及前列腺。

標靶蛋白在正常組織、甚至正常生命組織中之表現並不能阻撓該蛋白質之靶向劑作為蛋白質亦過表現之某些腫瘤的治療劑之效用。舉例而言，在生命器官中進行表現本身並不有害。另外，視為不必要之器官(諸如前列腺及卵巢)可進行移除而不影響壽命。最後，一些生命器官因免疫赦免而不受正常器官表現影響。免疫赦免器官為受血液-器官障壁保護而與血液隔離之器官且因此免疫療法無法到達。免疫赦免器官之實例為腦及睪丸。

因此，抑制191P4D12蛋白活性之治療方法適用於罹患表現191P4D12之癌症的患者。此等治療方法通常分為三類。第一類調節

191P4D12功能，因為其與腫瘤細胞生長有關，從而抑制或延緩腫瘤細胞生長或誘導將其殺死。第二類包含抑制191P4D12蛋白與其結合搭配物或與其他蛋白質之結合或締合的各種方法。第三類包含抑制191P4D12基因之轉錄或191P4D12 mRNA之轉譯的各種方法。

因此，可評估癌症患者之191P4D12表現的存在及水準，較佳使用腫瘤組織之免疫組織化學評估、定量191P4D12成像或可靠地指示191P4D12表現之存在及程度的其他技術。對腫瘤活檢體或手術試樣之免疫組織化學分析較佳用於此目的。腫瘤組織之免疫組織化學分析方法為此項技術中所熟知。

XIII.) 作為基於抗體之療法的標靶之191P4D12

191P4D12為用於基於抗體之治療性策略之吸引人的標靶。用於靶向細胞外分子與細胞內分子之多種抗體策略為此項技術中所知(參見例如補體及ADCC介導之殺死作用以及胞內抗體(intrabody)之使用)。因為相對於對應正常細胞，191P4D12由各種譜系之癌細胞表現，所以準備191P4D12免疫反應性組合物之全身投與，從而展現由免疫反應性組合物與非標靶器官及組織結合引起之極佳敏感性而無毒性、非特異性及/或非標靶作用。與191P4D12之結構域特異性反應的抗體適用於全身地治療表現191P4D12之癌症，較佳呈抗體藥物共軛物(亦即ADC)形式，其中該共軛物含有毒素或治療劑。

熟習此項技術者瞭解，抗體可用於特異性靶向及結合免疫原性分子，諸如圖1中所示之191P4D12序列的免疫原性區。另外，熟習此項技術者瞭解，抗體與細胞毒性劑共軛為慣例(參見例如Slevers等人Blood 93:113678-3684 (1999年6月1日))。當將細胞毒性劑及/或治療劑直接傳遞至細

胞時(諸如藉由將其與對由彼細胞(例如191P4D12)表現之分子具有特異性的抗體共軛)，細胞毒性劑對彼等細胞發揮已知生物效應(亦即細胞毒性)。

用於使用抗體-細胞毒性劑共軛物殺死細胞之各種組合物及方法為此項技術中所知。在癌症之情況下，典型方法需要向具有腫瘤之哺乳動物投與生物有效量之共軛物，該共軛物包含所選細胞毒性劑及/或治療劑連接於與所表現、易結合或定位於細胞表面上之抗原(例如191P4D12)結合的靶向劑(例如191P4D12 MAb，較佳為Ha22-2(2,4)6.1)。一典型實施例為將細胞毒性劑及/或治療劑傳遞至表現191P4D12之細胞的方法，其包含使該細胞毒性劑與免疫特異性結合於191P4D12抗原決定基之抗體共軛及使該細胞暴露於抗體藥物共軛物(ADC)。另一說明性實施例為治療懷疑罹患轉移癌之個體的方法，該方法包含向該個體非經腸投與醫藥組合物之步驟，該醫藥組合物包含治療有效量之抗體與細胞毒性劑及/或治療劑之共軛物。

使用191P4D12抗體之癌症免疫療法可根據已成功地用於治療其他類型癌症之各種方法來進行，該等癌症包括(但不限於)結腸癌(Arlen等人1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138)、多發性骨髓瘤(Ozaki等人1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari等人1997, Blood 90:2437-2444)、胃癌(Kasprzyk等人1992, Cancer Res. 52:2771-2776)、B細胞淋巴瘤(Funakoshi等人1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101)、白血病(Zhong等人1996, Leuk. Res. 20:581-589)、結腸直腸癌(Moun等人1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders等人1995, Cancer Res. 55:4398-4403)及乳癌(Shepard等人1991, J. Clin. Immunol. 11:117-

127)。一些治療方法包括將裸抗體與毒素或放射性同位素共軛，諸如分別將Y⁹¹或I¹³¹與抗CD20抗體(例如ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals Corp.)或BexxarTM(Coulter Pharmaceuticals))共軛，而其他方式包括將抗體與其他治療劑共投與，諸如將HerceptinTM (曲妥珠單抗(trastuzu Mab))與太平洋紫杉醇(Genentech, Inc)共投與。在一較佳實施例中，抗體將與細胞毒性劑(見上)、較佳稱為MMAE之奧瑞他汀衍生物(Seattle Genetics, Inc)共軛。

儘管191P4D12抗體療法適用於癌症之所有階段，但抗體療法可尤其適合於晚期或轉移性癌症。用本發明之抗體療法治療適用於已接受一或多輪化學療法之患者。或者，將本發明之抗體療法與化學療法或放射療法組合用於尚未接受化學療法治療之患者。另外，抗體療法能夠使用低劑量之伴隨化學療法，尤其對於不能極好地耐受化學治療劑毒性之患者。Fan等人(Cancer Res. 53:4637-4642, 1993)、Prewett等人(International J. of Onco. 9:217-224, 1996)及 Hancock 等人(Cancer Res. 51:4575-4580, 1991)描述各種抗體連同化學治療劑之使用。

治療表I中所示之癌症的191P4D12單株抗體包括引發針對腫瘤之有效免疫反應的抗體或直接具有細胞毒性之抗體。就此而言，191P4D12單株抗體(MAb)可藉由補體介導或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)機制引起腫瘤細胞溶解，兩種機制皆需要免疫球蛋白分子之完整Fc部分與補體蛋白上之效應細胞Fc受體位點相互作用。另外，對腫瘤生長發揮直接生物作用之191P4D12 MAb適用於治療表現191P4D12之癌症。細胞毒性MAb直接起作用之機制包括：抑制細胞生長、調節細胞分化、調節腫瘤血管生成因子概況及誘導細胞凋亡。如此項技術中一般已知，使用多種活體外檢定評估

特定191P4D12 MAb發揮抗腫瘤作用之機制，該等檢定評估諸如ADCC、補體介導細胞溶解等細胞死亡。

因此，用於本發明之治療方法中的較佳單株抗體為全人類單株抗體及以高親和性與標靶191P4D12抗原特異性結合之單株抗體。

XIV.) 191P4D12 ADC混合物

本發明之治療方法涵蓋投與單一191P4D12 ADC以及不同MAb(亦即191P4D12 MAb或結合另一蛋白質之Mab)之組合或混合物。該等MAb混合物由於含有靶向不同抗原決定基之MAb、利用不同效應機制或將直接細胞毒性MAb與依賴免疫效應功能之MAb組合而可具有某些優點。該等組合形式之MAb可展現協同治療作用。另外，191P4D12 MAb可伴隨其他治療形式投與，該等治療形式包括(但不限於)多種化學治療劑及生物藥劑、雄激素阻斷劑、免疫調節劑(例如IL-2、GM-CSF)、手術或放射。在一較佳實施例中，191P4D12 MAb以共軛形式投與。

191P4D12 ADC調配物經由能夠將抗體傳遞至腫瘤細胞之任何途徑來投與。投藥途徑包括(但不限於)靜脈內、腹膜內、肌肉內、腫瘤內、皮內及其類似途徑。治療通常包括經由可接受之投藥途徑(諸如靜脈內注射(IV))重複投與191P4D12 Mab製劑，其劑量範圍通常包括(但不限於)每公斤體重0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或25 mg。一般而言，每週10-1,000 mg MAb之劑量範圍為有效的且耐受良好。

基於用Herceptin®(曲妥珠單抗(Trastuzumab))治療轉移性乳癌之臨床經驗，MAb製劑之每公斤患者體重約4 mg的靜脈內初始速效劑量、接著每週每公斤約2 mg之靜脈內劑量代表一種可接受之給藥方案。初始速

效劑量較佳以90分鐘或長於90分鐘之輸注形式投與。定期維持劑量以30分鐘或長於30分鐘之輸注形式投與，其限制條件為初始劑量耐受良好。如熟習此項技術者所瞭解，在特定情況下，多種因素可影響理想給藥方案。該等因素包括例如所用MAb之結合親和性及半衰期；患者中之191P4D12表現程度；循環排出191P4D12抗原之程度；所需穩態抗體濃度水準；治療頻率；及化學治療劑或其他藥劑與本發明之治療方法組合使用的影響，以及特定患者之健康狀況。

視情況，應在特定樣品中評估患者之191P4D12含量(例如循環191P4D12抗原及/或191P4D12表現細胞之含量)以幫助確定最有效給藥方案等。該等評估亦用於監測治療目的，且適用於結合評估其他參數(例如膀胱癌療法中之尿細胞學及/或ImmunoCyt含量，或以此類推，前列腺癌療法中之血清PSA含量)估量治療成果。

本發明之目的在於提供191P4D12 ADC，其抑制或延緩表現191P4D12之腫瘤細胞的生長。本發明之另一目的在於提供使用該等191P4D12 ADC及尤其使用該等191P4D12 ADC與其他藥物或免疫學有效治療之組合來抑制血管生成及其他生物功能且由此減少哺乳動物(較佳為人類)之腫瘤生長的方法。

XV.) 組合療法

在一實施例中，當用191P4D12 ADC結合化學治療劑或放射或其組合治療腫瘤(包括人類腫瘤)時，存在協同作用。換言之，當與化學治療劑或放射或其組合組合時，由191P4D12 ADC對腫瘤生長之抑制的增強超過預期。可例如藉由使用組合治療對腫瘤生長之抑制超過僅使用191P4D12 ADC之治療所預期的效應或使用191P4D12 ADC與化學治療劑或放射治療

之累加效應來顯示協同作用。較佳地，藉由癌症緩解來說明協同作用，其中使用191P4D12 ADC之治療或使用191P4D12 ADC與化學治療劑或放射之累加組合的治療未預期有緩解。

使用191P4D12 ADC及化學療法或放射或兩者之組合來抑制腫瘤細胞生長之方法包含在開始化學療法或放射療法之前、期間或之後投與191P4D12 ADC，以及其任何組合(亦即在開始化學療法及/或放射療法之前與期間，之前與之後，期間與之後，或之前、期間及之後)。舉例而言，191P4D12 ADC通常在開始放射療法及/或化學療法前1至60天、較佳3至40天、更佳5至12天投與。然而，視治療方案及特定患者需要而定，該方法可以提供最有效治療且最終延長患者壽命之方式進行。

化學治療劑可以多種方式投與，包括藉由非經腸及經腸途徑全身性投與。在一實施例中，191P4D12 ADC及化學治療劑作為各別分子進行投與。化學治療劑或化學療法之特定實例包括順鉑、達卡巴嗪(dacarbazine，DTIC)、更生黴素(dactinomycin)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)(氮芥(nitrogen mustard))、鏈佐黴素(streptozocin)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、卡莫司汀(carmustine，BCNU)、洛莫司汀(lomustine，CCNU)、阿黴素(阿德力黴素(adriamycin))、道諾黴素、丙卡巴肼(procarbazine)、絲裂黴素、阿糖胞苷(cytarabine)、依託泊苷、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶、長春鹼、長春新鹼、博萊黴素(bleomycin)、太平洋紫杉醇(紫杉醇)、多烯紫杉醇(紫杉德(taxotere))、阿地白介素(aldesleukin)、天冬醯胺酶、白消安(busulfan)、卡鉑(carboplatin)、克拉屈濱(cladribine)、達卡巴嗪、氟尿苷(floxuridine)、氟達拉濱(fludarabine)、羥基脲、異環磷醯胺(ifosfamide)、干擾素 α 、亮丙立德

(leuprolide)、甲地孕酮(megestrol)、美法侖(melphalan)、巯嘌呤(mercaptopurine)、普卡黴素(plicamycin)、米托坦(mitotane)、培門冬酶(pegaspargase)、噴司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡黴素、鏈佐黴素、他莫昔芬、替尼泊苷(teniposide)、睪內酯(testolactone)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、噻替派(thiotepa)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、長春瑞濱、吉西他濱(gemcitabine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、紫杉醇及其組合。

與¹⁹¹P⁴D¹² ADC組合使用之放射源可在所治療患者外部或內部。當放射源在患者外部時，此療法稱為外部射束放射療法(external beam radiation therapy；EBRT)。當放射源在患者內部時，此療法稱為近接療法(called brachytherapy；BT)。

上述治療方案可進一步與其他癌症治療劑及/或方案組合，該等癌症治療劑及/或方案例如其他化學療法、癌症疫苗、信號轉導抑制劑、適用於治療異常細胞生長或癌症之藥劑、抗體(例如WO/2005/092380(Pfizer)中所述之抗CTLA-4抗體)或藉由與IGF-1R及細胞因子結合來抑制腫瘤生長之其他配位體。

當哺乳動物經受其他化學療法時，可使用上述化學治療劑。另外，可使用生長因子抑制劑、生物反應調節劑、抗激素療法、選擇性雌激素受體調節劑(SERM)、血管生成抑制劑及抗雄激素劑。舉例而言，可使用抗激素劑，例如抗雌激素劑，諸如諾瓦得士(Nolvadex)(他莫昔芬)；或抗雄激素劑，諸如康士得(Casodex)(4'-氰基-3-(4-氟苯磺醯基)-2-羥基-2-甲基-3'-(三氟甲基)丙醯苯胺)。

可將上述治療方法與多種手術、化學療法或放射療法方案中之任一

者組合。本發明之治療方法能夠使用低劑量之化學療法(或其他療法)及/或頻率較低的投藥，此對於所有患者且尤其對於不能良好耐受化學治療劑毒性之患者為一優點。

XVI.) 套組/製品

用於本文所述之實驗室、預後、預防、診斷及治療應用的套組在本發明之範疇內。該等套組可包含分成各區室以容納一或多個容器(諸如小瓶、試管及其類似物)之載器(carrier)、包裝或容器，各容器包含方法中欲使用之各別要素之一連同包含使用(諸如本文所述之使用)說明書之標籤或插頁。舉例而言，容器可包含標記可偵測物或可標記可偵測物之抗體。套組可包含含藥物單元之容器。套組可包括圖2或圖3中之胺基酸序列的全部或部分或其類似物，或編碼該等胺基酸序列之核酸分子。

本發明之套組通常將包含上述容器及一或多個與此相關之其他容器，該等容器包含依據商業及使用者立場所需之物質，包括緩衝液、稀釋劑、過濾器、針、注射器；列有內含物及/或使用說明書之載器、包裝、容器、小瓶及/或試管標籤；及具有使用說明書之包裝插頁。

標籤可存在於容器上或與容器一起存在，以指示組合物用於特定療法或非治療性應用，諸如預後、預防、診斷或實驗室應用，且亦可指示活體內或活體外使用指導，諸如本文所述之指導。與套組一起包括在內或包括於套組上之插頁或標籤上亦可包括指導及/或其他資訊。標籤可位於容器上或伴隨容器。當形成標籤之字母、數字或其他字符模製或蝕刻於容器自身時，標籤可位於容器上；當標籤存在於亦容納容器之貯器或載器內時，其可伴隨該容器，例如包裝插頁。標籤可指示組合物用於診斷、治療、預防或預後病狀，諸如表I中所示之組織癌症。

術語「套組」與「製品」可作為同義詞使用。

在本發明之另一實施例中，提供製品，其含有組合物，諸如抗體或抗體藥物共軛物(ADC)，例如適用於診斷、預後、預防及/或治療組織癌症(諸如表I中所示之癌症)之物質。該製品通常包含至少一個容器及至少一個標籤。適合之容器包括例如瓶子、小瓶、注射器及試管。容器可由多種材料(諸如玻璃、金屬或塑膠)形成。容器可容納胺基酸序列、小分子、核酸序列、細胞群體及/或抗體。在另一實施例中，容器包含用於評估細胞及組織中之191P4D12的蛋白質表現或用於相關實驗室、預後、診斷、預防及治療目的之抗體、其結合片段或特異性結合蛋白質；關於該等用途之指示及/或指導可包括於容器上或與容器一起包括在內，用於此等目的之試劑及其他組合物或工具亦可包括於容器上或與容器一起包括在內。

容器可或者容納有效治療、診斷、預後或預防病狀之組合物且可具有無菌接取孔(例如容器可為靜脈內注射溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。組合物中之活性劑可為能夠特異性結合191P4D12之抗體或特異性結合於191P4D12之抗體藥物共軛物。

製品可進一步包含第二容器，該第二容器包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如磷酸鹽緩衝生理鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及/或右旋糖溶液。其可進一步包括依據商業及使用者立場所需之其他物質，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、攪拌器、針、注射器及/或具有使用指示及/或指導之包裝插頁。

實例：

藉由以下若干實例進一步描述並說明本發明之多種態樣，但不希望該等實例限制本發明之範疇。

實例1

191P4D12抗原

使用此項技術中已知之抑制消滅雜交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH)顯現191P4D12基因序列。使用標準方法自膀胱腫瘤減去來源於9個正常組織混合物之cDNA而鑑別出223 bp之191P4D12 SSH序列。自膀胱癌cDNA文庫分離191P4D12之全長cDNA純系。cDNA之長度為3464 bp且編碼510個胺基酸之ORF(參見圖1)。191P4D12基因與Nectin-4基因顯示同源性。關於其他參考文獻，參見US 2004/0083497(Agensys, Inc., Santa Monica, CA)及PCT公開案WO 2004/016799(Agensys, Inc., Santa Monica, CA)。關於191P4D12抗原之例示性實施例，參見圖1。

實例2

產生191P4D12單株抗體(MAb)

在一實施例中，191P4D12及191P4D12變異體之治療性單株抗體(「MAb」)包含與對於各蛋白質具有特異性之抗原決定基反應之單株抗體，或對於變異體之間共同的序列具有特異性之單株抗體，其將結合191P4D12或191P4D12變異體，使191P4D12或191P4D12變異體內化，破壞或調節191P4D12或191P4D12變異體之生物功能，例如將破壞與配位體、受質及結合搭配物之相互作用的單株抗體。產生該等MAb之免疫原包括設計成編碼或含有細胞外域或整個191P4D12蛋白序列、預計含有功能基元之區域、及由對胺基酸序列之電腦分析預計具有抗原性之191P4D12蛋白變異體之區域的免疫原。免疫原包括肽及重組蛋白質，諸如tag5-191P4D12，其為來源於經純化之哺乳動物細胞的標記His之蛋白

質。另外，使用經工程改造以表現高含量之191P4D12(諸如RAT1-191P4D12或300.19-191P4D12)的細胞對小鼠進行免疫接種。

使用XenoMouse technology®(Amgen Fremont)產生191P4D12之MAb，其中已使鼠類重鏈及κ輕鏈基因座不活化且已插入大部分人類重鏈及κ輕鏈免疫球蛋白基因座。稱為**Ha22-2(2,4)6.1**之MAb自免疫接種具有pTag5/mychis-191P4D12(胺基酸23-351)之產生人類γ1之異種小鼠(XenoMice)產生。

191P4D12 MAb **Ha22-2(2,4)6.1**藉由ELISA可知與pTag5/mychis-191P4D12蛋白以及與表現重組191P4D12之細胞及表現191P4D12之多種癌細胞株特異性結合。

產生稱為**Ha22-2(2,4)6.1**之抗體的融合瘤於**2010年8月18日**(經由Federal Express)送至美國菌種保存中心(ATCC)，郵政信箱1549，Manassas，VA 20108且給予寄存編號**PTA-11267**。

用Trizol試劑(Life Technologies, Gibco BRL)自各別融合瘤細胞分離mRNA後，測定編碼191P4D12 MAb **Ha22-2(2,4)6.1**之序列的DNA。

使用以下方案自融合瘤細胞對抗191P4D12 **Ha22-2(2,4)6.1**重鏈及輕鏈可變核酸序列進行測序。用Trizol試劑(Life Technologies, Gibco BRL)溶解分泌**Ha22-2(2,4)6.1**之融合瘤細胞。純化總RNA並進行定量。使用Gibco-BRL Superscript Preamplification系統用oligo (dT)12-18激活自總RNA產生第一股cDNA。使用人類免疫球蛋白可變重鏈引子及人類免疫球蛋白可變輕鏈引子擴增第一股cDNA。對PCR產物測序且測定可變重鏈及輕鏈區。

可變重鏈及輕鏈區之核酸及胺基酸序列列於圖2及圖3中。**Ha22-**

2(2,4)6.1 MAb與人類Ig生殖系之比對陳列於圖4A-4B中。

實例3

使用重組DNA方法表現Ha22-2(2,4)6.1

為在轉染細胞中重組表現Ha22-2(2,4)6.1 MAb，將Ha22-2(2,4)6.1 MAb可變重鏈及輕鏈序列分別選殖至人類重鏈IgG1及人類輕鏈Igκ恆定區之上游。將完整Ha22-2(2,4)6.1 MAb人類重鏈及輕鏈卡匣選殖至選殖載體中CMV啟動子/強化子之下游。在MAb編碼序列之下游包括聚腺苷酸化位點。將表現重組Ha22-2(2,4)6.1 MAb之構築體轉染至CHO細胞中。藉由流動式細胞測量術評估自重組細胞分泌之Ha22-2(2,4)6.1 MAb與細胞表面191P4D12之結合(圖5A)。用來自融合瘤或來自經Ha22-2(2,4)6.1重鏈及輕鏈載體構築體轉染之CHO細胞的Ha22-2(2,4)6.1 MAb將RAT-對照組及RAT-191P4D12細胞染色。藉由流動式細胞測量術偵測結合。

結果顯示類似於自融合瘤純化之Ha22-2(2,4)6.1，在CHO細胞中表現之重組表現的Ha22-2(2,4)6.1結合191P4D12。亦藉由ELISA評估自重組細胞分泌之Ha22-2(2,4)6.1 MAb與191P4D12重組蛋白之結合。如圖5B中所示，Ha22-2(2,4)6.1與191P4D12蛋白之結合在來源於CHO與來源於融合瘤細胞之MAb物質之間為一致的。

實例4

Ha22-2(2,4)6.1 MAb之抗體藥物共軛

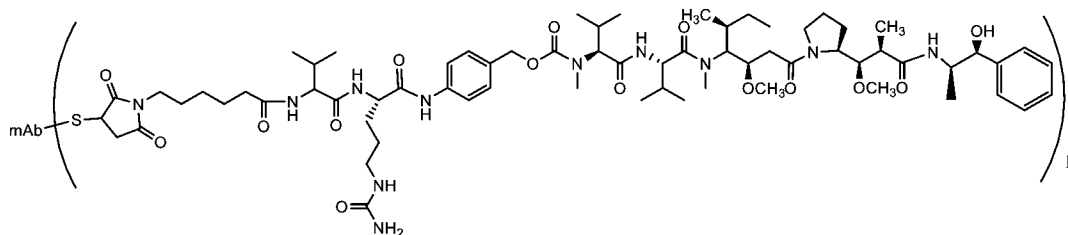
使用以下方案，使用本文所述之vc(Val-Cit)連接子使Ha22-2(2,4)6.1 MAb(圖2)與稱為MMAE(式XI)之奧瑞他汀衍生物共軛以形成本發明之稱為Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE的抗體藥物共軛物(ADC)。使用表IV中所示之一般方法使vc(Val-Cit)連接子與MMAE(Seattle Genetics, Inc., Seattle,

WA)共軛形成細胞毒性vcMMAE(參見美國專利第7,659,241號)。

接著使用以下方案製備本發明之稱為Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE的抗體藥物共軛物(ADC)。

簡言之，將15 mg/mL之Ha22-2(2,4)6.1MAb於10 mM乙酸酯(pH 5.0)、1%山梨糖醇、3% L-精胺酸中之溶液與20%體積之0.1 M TrisCl(pH 8.4)、25 mM EDTA及750 mM NaCl一起添加以使溶液之pH值調整至7.5、5 mM EDTA及150 mM氯化鈉。接著藉由添加2.3莫耳當量TCEP(相對於MAb之莫耳數)部分還原MAb，接著在37°C下攪拌2小時。接著使部分還原之MAb溶液冷卻至5°C且以6% (v/v)DMSO溶液形式添加4.4莫耳當量vcMMAE(相對於抗體之莫耳數)。在5°C下攪拌混合物60分鐘，接著在添加1莫耳當量N-乙醯半胱胺酸(相對於vcMMAE)後再攪拌15分鐘。藉由用10體積之20 mM組胺酸(pH 6.0)超濾/透濾抗體藥物共軛物(ADC)來移除過量淬滅之vcMMAE及其他反應組分。

所得抗體藥物共軛物(ADC)稱為Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE且具有下式：



其中MAb為Ha22-2(2,4)6.1(圖2及圖3)且p為1至8。此實例中所示之抗體藥物共軛物的p值為約3.8。

實例5

Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE之表徵

使用標題為「Ha22-2(2,4)6.1 MAb之抗體藥物共軛」之實例中所示

的程序產生結合191P4D12之抗體藥物共軛物，且使用此項技術中已知之檢定組合篩選、鑑別及表徵。

A. 藉由FACS測定親和性

測試Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE對分別在PC3-人類-191P4D12、PC3-食蟹獼猴-191P4D12及PC3-大鼠-191P4D12細胞表面上表現之191P4D12的結合親和性。簡言之，在4°C下將11種Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE稀釋液與各細胞類型(每孔50,000個細胞)一起培育隔夜，最終濃度為160 nM至0.011 nM。在培育結束時，洗滌細胞且在4°C下與抗hIgG-PE偵測抗體一起培育45分鐘。洗滌未結合之偵測抗體後，藉由FACS分析細胞。獲得如圖6-8中所列之平均螢光強度(Mean Florescence Intensity, MFI)值。將MFI值輸入Graphpad Prism軟體中且使用單位點結合(雙曲線)方程式 $Y=B_{max} * X / (K_d + X)$ 分析，得到Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE飽和曲線，其亦分別展示於圖6-8中。B_{max}為Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE與191P4D12之最大結合MFI值；K_d為達成半最大結合所需之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE濃度的Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE結合親和性。

計算出的Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE對分別在PC3-人類-191P4D12、PC3-食蟹獼猴-191P4D12及PC3-大鼠-191P4D12細胞表面上表現之191P4D12的親和性(K_d)為0.69 nM(圖6)、0.34 nM(圖7)及1.6 nM(圖8)。

B. 藉由SPR測定親和性

藉由表面電漿子共振(SPR)(BIAcore)測定Ha22-2(2,4)6.1 MAb及Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE對經純化之重組191P4D12 (ECD胺基酸1-348)的親和性。簡言之，將山羊-抗人類Fcγ多株Ab(Jackson Immuno Research Labs, Inc.)共價固定於CM5感應晶片(Biacore)之表面上。接著將經純化之

Ha22-2(2,4)6.1 MAb或Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE捕捉於該晶片之表面上。在每個循環中平均捕捉約300 RU之測試Ha22-2(2,4)6.1 MAb或Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE。隨後，將一系列1 nM至100 nM範圍內之5至6個重組191P4D12(ECD胺基酸1-348)稀釋液注射到該表面上以產生結合曲線(感測器圖譜)，使用BIAevaluation 3.2及CLAMP軟體(Myszka and Morton, 1998)處理該等曲線且整體擬合為1:1相互作用模型(表V)。表VI總結締合及解離速率常數以及Ha22-2(2,4)6.1 MAb及Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE對重組191P4D12 (ECD胺基酸1-348)之親和性。

C. Ha22-2(2,4)6.1 MAb之結構域定位

為定位Ha22-2(2,4)6.1 MAb與191P4D12蛋白之特異性結構域的結合位點，產生表現該等結構域(或其組合)之若干種大鼠1(E)重組細胞株(表VII)。藉由FACS使用標準方案評估Ha22-2(2,4)6.1與細胞表面之結合。如圖10中所示，Ha22-2(2,4)6.1 MAb與表現VC1域之細胞以及野生型191P4D12結合，而不與表現C1C2域之細胞結合。另外，稱為Ha22-8e6.1之另一191P4D12 MAb識別細胞表面上之191P4D12的C1C2域而非VC1域。此表明Ha22-2(2,4)6.1 MAb之結合位點位於191P4D12之1-147 aa結構域中，而非與191P4D12結合之每個MAb均識別此結構域。

為進一步確證圖10中所示之結果，進行西方墨點分析(Western Blot Analysis)。簡言之，表VII中所示之191P4D12(全長)之整個細胞外部分以及特異性結構域在293T細胞中表現為鼠類Fc融合蛋白並加以純化。使用山羊抗小鼠-HRP作為對照組。如圖11中所示，當在SDS-PAGE(非還原)上解析且使用Ha22-2(2,4)6.1-生物素、隨後抗生蛋白鏈菌素-HRP作為探針時，認出對應於全長191P4D12(泳道1)、V(泳道2)及VC1(泳道3)融合構築

體而非C1C2融合構築體(泳道4)之條帶。此進一步表明Ha22-2(2,4)6.1 MAb之結合抗原決定基位於191P4D12之1-147 aa結構域中。

實例6

由Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE介導之細胞毒性

在經工程改造以表現人類191P4D12、食蟹獼猴191P4D12及大鼠191P4D12之PC3細胞中評估Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE介導191P4D12依賴性細胞毒性之能力。簡言之，在第1天，將PC3-Neo、PC3-人類-191P4D12細胞、PC3-食蟹獼猴-191P4D12或PC3-大鼠-191P4D12細胞(每孔1500個細胞)接種至96孔盤中。第二天，向各孔中添加等體積的含有指定濃度之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE或與vcMMAE共軛之對照MAb(亦即對照-vcMMAE)的培養基。在37°C下培育細胞4天。在培育期結束時，向各孔中添加阿拉馬藍(Alamar Blue)且繼續再培育4小時。使用Biotek培養盤讀取器，在620 nM激發波長及540 nM發射波長下偵測所得螢光。

圖9A-9D中之結果顯示Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE在PC3-人類-191P4D12(圖9A)、PC3-食蟹獼猴-191P4D12(圖9B)及PC3-大鼠-191P4D12細胞(圖9C)中介導細胞毒性，而與vcMMAE共軛之對照人類IgG無效。Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE之特異性進一步藉由對不表現191P4D12之PC3-Neo細胞缺乏毒性來說明(圖9D)。因此，此等結果指示Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE可將細胞毒性藥物選擇性傳遞至191P4D12表現細胞，從而將其殺死。

實例7

Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE活體內抑制腫瘤生長

191P4D12在腫瘤組織之細胞表面上的顯著表現以及其在正常組織中

之有限表現使191P4D12成為抗體療法及類似地經由ADC之療法的良好標靶。因此，評估Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE在人類膀胱癌、肺癌、乳癌及胰臟癌異種移植小鼠模型中之治療功效。

在小鼠癌症異種移植模型(例如皮下及正位)中研究抗體藥物共軛物對腫瘤生長及轉移形成之功效。

藉由在雄性 SCID 小鼠之右腹注射以 1:1 稀釋度與瑪崔膠 (Matrigel)(Collaborative Research)混合之 5×10^4 - 10^6 個癌細胞來產生皮下 (s.c.)腫瘤。為測試ADC對腫瘤形成之功效，在與腫瘤細胞注射的同一天開始ADC注射。作為對照組，給小鼠注射經純化之人類IgG或PBS；或識別不在人類細胞中表現之無關抗原的經純化MAb。在初級研究中，在對照IgG或PBS對腫瘤生長之作用之間未發現差異。藉由測徑器量測來測定腫瘤尺寸，且以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。處死皮下腫瘤直徑大於1.5 cm之小鼠。

卵巢腫瘤通常發生轉移並在腹膜腔內生長。因此，藉由將2百萬細胞直接注入雌性小鼠之腹膜內來使小鼠卵巢腫瘤腹膜內生長。監測小鼠之一般健康狀況、身體活動及外觀，直至其瀕臨死亡。處死時，可檢查腹膜腔以測定腫瘤負荷且收集肺以評估向遠端部位之轉移。或者，可使用死亡作為終點。接著將小鼠分成用腹膜內注射之191P4D12或對照MAb適當處理之組。

異種移植癌症模型之優點為研究新血管生成及血管生成之能力。腫瘤生長部分視新血管發育而定。儘管毛細管系統及發育中的血液網來源於宿主，但新血管之起始及結構由異種移植腫瘤調節(Davidoff等人 Clin Cancer Res. (2001) 7:2870；Solesvik等人 Eur J Cancer Clin Oncol.

(1984) 20:1295)。根據此項技術中已知之程序，諸如藉由腫瘤組織及其周圍微環境之IHC分析來研究抗體及小分子對新血管生成之作用。

Ha22-2(2,4)6.1ADC抑制肺癌、膀胱癌、乳癌及胰臟癌異種移植植物之形成。此等結果指示Ha22-2(2,4)6.1ADC在治療局部及晚期癌症及較佳為表I中所示之彼等癌症中之效用。

191P4D12 ADC：

如標題為「產生191P4D12單株抗體(MAb)」之實例中所述，產生針對191P4D12之單株抗體。此外，如標題為「Ha22-2(2,4)6.1 MAb之抗體藥物共軛」之實例中所述，使MAb與毒素共軛以形成Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE。Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE藉由FACS及此項技術中已知之其他方法表徵以測定其結合191P4D12之能力。

細胞株及異種移植植物：

如此項技術中已知，將BT-483及HPAC細胞維持於補充有L-麩醯胺酸及10% FBS之DMEM中。藉由連續繁殖將AG-B8、AG-Panc4、AG-Panc2、AG-B1、AG-L4及AG-Panc3異種移植植物維持於SCID小鼠體內。

在SCID小鼠之人類肺癌異種移植植物AG-L4的皮下腫瘤形成模型中評估Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE MAb

在此實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之肺癌異種移植植物AG-L4維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且以酶方法消化成單細胞懸浮液中。將兩百萬個細胞植入個別SCID小鼠之側腹中。接著將動物隨機分配成七組：六個191P4D12抗體處理組及一個對照抗體H3-1.10.1.2組(n=10)。所有抗體均以每隻動物750 µg腹膜內給藥，每週兩次直至研究結束。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤

體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示191P4D12 MAbs在SCID小鼠之人類肺癌異種移植AG-L4中不顯著抑制腫瘤生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAbs。不展示結果。(圖12)。

在SCID小鼠之人類胰臟癌異種移植HPAC的皮下腫瘤形成模型中 評估Ha22-2(2,4)6.1 MAbs

在另一實驗中，將人類胰臟癌HPAC細胞(每隻小鼠兩百萬個)注入個別SCID小鼠之側腹中。接著將動物隨機分配成八組：七個191P4D12抗體處理組及一個對照抗體H3-1.4.1.2組(n=10)。所有抗體均以每隻動物500 μ g腹膜內給藥，每週兩次直至研究結束。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照抗體相比，191P4D12 MAbs在SCID小鼠之人類胰臟異種移植中不抑制腫瘤生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAbs。不展示結果。(圖13)。

在SCID小鼠之人類胰臟癌異種移植AG-Panc3的皮下腫瘤形成模型中評估Ha22-2(2,4)6.1 MAbs。

在另一實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之胰臟癌異種移植AG-Panc3維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將六片植入個別SCID小鼠之側腹中。接著將動物隨機分配成以下各組(n=10)：兩個191P4D12 MAbs處理組及一個對照抗體H3-1.4.1.2組。所有抗體均以每隻動物500 μ g腹膜內給藥，每週兩次直至研究結束。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬

度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照抗體相比，191P4D12 MAbs在SCID小鼠之人類胰臟異種移植物中不抑制腫瘤生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAbs。不展示結果。(圖14)。

Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類肺癌異種移植物AG-L4中之功效

在另一實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之肺癌異種移植物AG-L13維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將六片植入個別SCID小鼠之側腹中。在未處理之情況下使腫瘤生長直至其達到約200 mm³之體積。每七天藉由靜脈內快速注射給與10 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE及對照ADC持續兩次劑量。ADC之投與量係基於在即將給藥前獲得之各動物之個別體重。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制皮下植入裸小鼠中之AG-L4肺癌異種移植物之生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAbs。不展示結果。(圖15)。

Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類乳癌異種移植物BT-483中之功效

在此實驗中，使用人類乳癌BT-483細胞產生異種移植物原料，其藉由連續繼代維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將六片植入個別SCID小鼠之側腹中。在未處理之情況下使腫瘤生長直至其達到約100 mm³之體積。每四天藉由靜脈內快速注射給與5 mg/kg

之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE及對照ADC持續四次劑量。ADC之投與量係基於在即將給藥前獲得之各動物之個別體重。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制皮下植入SCID小鼠中之BT-483乳房腫瘤異種移植物的生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAbs。不展示結果。(圖16)。

Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類膀胱癌異種移植植物AG-B1中之功效

在另一實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之膀胱癌異種移植植物AG-B1維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將六片植入個別SCID小鼠之側腹中。在未處理之情況下使腫瘤生長直至其達到約230 mm³之體積。藉由靜脈內快速注射給與4 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE及對照ADC一次。ADC之投與量係基於在即將給藥前獲得之各動物之個別體重。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制AG-B1膀胱癌異種移植植物之生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAbs。不展示結果。(圖17)。

Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類胰臟癌異種移植植物AG-Panc2中之功效

在另一實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之胰臟癌異種移植植物AG-Panc2維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將

五片植入個別SCID小鼠之側腹中。在未處理之情況下使腫瘤生長直至其達到約100 mm³之體積。每四天藉由靜脈內快速注射給與5 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE及對照ADC持續四次劑量。ADC之投與量係基於在即將給藥前獲得之各動物之個別體重。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制AG-Panc2胰臟癌異種移植植物之生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAb。不展示結果。(圖18)。

Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE在SCID小鼠之皮下形成的人類胰臟癌異種移植植物AG-Panc4中之功效

在另一實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之胰臟癌異種移植植物AG-Panc4維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將六片植入個別SCID小鼠之側腹中。每七天藉由靜脈內快速注射給與5 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE及對照ADC持續三次劑量。ADC之投與量係基於在即將給藥前獲得之各動物之個別體重。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與對照ADC相比，用Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理可顯著抑制AG-Panc4胰臟癌異種移植植物之生長。另外，在此研究中使用其他191P4D12 MAb。不展示結果。(圖19)。

Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE以比較劑量在SCID小鼠之皮下形成的人類膀胱癌異種移植植物AG-B8中之功效

在此實驗中，藉由連續繼代將來源於患者之膀胱癌異種移植植物AG-B8維持於SCID小鼠體內。無菌收集腫瘤原料且切碎成1 mm³的片。將六片植入個別SCID小鼠之側腹中。在未處理之情況下使腫瘤生長直至其達到約200 mm³之體積。接著將動物隨機分配成以下三組(n=6)：兩個Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE處理組及一個對照ADC VCD37-5ce5p-vcMMAE組。給與5 mg/kg或10 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1-vcMMAE且給與5 mg/kg之對照ADC。所有ADC均藉由靜脈內快速注射給與一次。ADC之投與量係基於在即將給藥前獲得之各動物之個別體重。每3至4天使用測徑器量測來監測腫瘤生長。以寬度²×長度/2計算腫瘤體積，其中寬度為最小尺寸且長度為最大尺寸。

結果顯示與5 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE相比，用10 mg/kg之Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE處理可抑制AG-B8膀胱癌異種移植植物之生長。(圖20)。

結論

總而言之，圖 12-20 展示與對照 ADC 相比，稱為 Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE之191P4D12 ADC顯著抑制表現191P4D12之腫瘤細胞的生長。因此，Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE可用於治療性目的以治療及控制表I中所示之癌症。

實例8

經由使用191P4D12 ADC治療及診斷人類腫瘤之人類臨床試驗

根據本發明使用與191P4D12特異性結合之191P4D12 ADC，且將其用於治療某些腫瘤、較佳為表I中所列之彼等腫瘤。關於此等適應症之每一者，成功地進行兩種臨床方法。

I.) 輔助療法：在輔助療法中，用191P4D12 ADC結合化學治療劑或抗贅生劑及/或放射療法或其組合治療患者。根據標準方案，藉由將191P4D12 ADC添加至標準第一及第二線療法中來治療諸如表I中所列之彼等標靶的原發性癌症標靶。方案設計致力於如藉由以下實例所評估之有效性，其包括(但不限於)原發性或轉移性病變之腫瘤質量減小、無進展存活時間增加、總存活時間增加、患者健康狀況改善、疾病穩定、以及減少標準化學療法及其他生物藥劑常用劑量的能力。此等劑量減少由於降低化學治療劑或生物藥劑之劑量相關毒性而使得可進行額外及/或延長之治療。在若干種輔助臨床試驗中使用191P4D12 ADC與化學治療劑或抗贅生劑之組合。

II.) 單一療法：關於191P4D12 ADC在腫瘤單一療法中之使用，向未投與化學治療劑或抗贅生劑之患者投與191P4D12 ADC。在一實施例中，臨床上對患廣泛轉移性疾病之末期癌症患者進行單一療法。方案設計致力於如藉由以下實例所評估之有效性，其包括(但不限於)原發性或轉移性病變之腫瘤質量減小、無進展存活時間增加、總存活時間增加、患者健康狀況改善、疾病穩定、以及減少標準化學療法及其他生物藥劑常用劑量的能力。

劑量

可調節給藥方案以提供最佳所需反應。舉例而言，可投與單次劑量；可隨時間投與若干分次劑量；或可按治療情況之緊急需要指示按比例減小或增加劑量。為了便於投藥及劑量均一性，將非經腸組合物調配成單位劑型尤其有利。如本文中所使用，單位劑型係指適合作為單一劑量用於欲治療哺乳動物個體之物理個別單元；各單元含有經計算可產生所需治療

作用的預定量之活性化合物與所需醫藥載劑結合。關於本發明之單位劑型的說明由以下決定且直接視以下而定：(a)抗體及/或ADC之獨特特徵及欲達成之特定治療性或預防性作用；及(b)此項技術中固有的混配用於治療個體敏感性之該活性化合物的侷限性。

根據本發明組合投與之191P4D12 ADC的治療有效量之例示性、非限制性範圍為約0.5至約10 mg/kg、約1至約5 mg/kg、至少1 mg/kg、至少2 mg/kg、至少3 mg/kg或至少4 mg/kg。其他例示性非限制性範圍為例如約0.5至約5 mg/kg、或例如約0.8至約5 mg/kg、或例如約1至約7.5 mg/kg。本發明之高劑量實施例係關於大於10 mg/kg之劑量。應注意劑量值可隨欲減輕之病狀的類型及嚴重程度而變化，且可包括單次或多次劑量。應進一步瞭解，對於任何特定個體而言，特定給藥方案應根據個體需要及投與或監督組合物投與之人士的專業判斷隨著時間來加以調整，且本文所述之劑量範圍僅為例示性的，而不欲限制所主張之組合物的範疇或實踐。

臨床開發計劃(CDP)

關於輔助療法或單一療法，隨後進行CDP且其開發191P4D12 ADC之治療。試驗最初證明安全性且之後證實重複劑量之功效。試驗為比較標準化學療法與標準療法加上191P4D12 ADC之開放標籤試驗(open label)。如所應瞭解，關於招募患者使用之一個非限制性準則為如藉由活組織檢查所測定之191P4D12在其腫瘤中之表現水準。

如同基於蛋白質或抗體輸注之任何療法，安全性考量主要係關於：(i)細胞因子釋放症候群，亦即低血壓、發燒、發抖、寒戰；(ii)對物質產生免疫原性反應(亦即患者針對抗體療法產生人類抗體，或HAHA反應)；

及(iii)對表現191P4D12之正常細胞具有毒性。使用標準測試及隨訪來監測此等安全性考量中之每一者。發現191P4D12 ADC在投與人類後為安全的。

實例9

藉由IHC偵測癌症患者試樣中之191P4D12蛋白

藉由免疫組織化學測試191P4D12蛋白在來自以下之患者腫瘤試樣中的表現：(i)膀胱癌、(ii)乳癌、(iii)胰臟癌、(iv)肺癌、(v)卵巢癌、(vi)食道癌及(vii)頭頸部癌患者。簡言之，將經福馬林(formalin)固定、石蠟包埋之組織切成4微米切片且安裝於玻璃載片上。除去該等切片之蠟，再水化且在95°C下在EZ-Retriever微波(Biogenex, San Ramon, CA)中用EDTA抗原修復溶液(Biogenex, San Ramon, CA)處理30分鐘。接著用3%過氧化氫溶液處理切片以使內源性過氧化酶活性不活化。使用無血清蛋白質阻斷劑(Dako, Carpinteria, CA)抑制非特異性結合，隨後與單株小鼠抗191P4D12抗體或同型對照組一起培育。隨後，用Super Sensitive™聚合物-辣根過氧化酶(HRP)偵測系統處理切片，該處理由在Super Enhancer™試劑中培育，隨後與聚合物-HRP二級抗體共軛物(BioGenex, San Ramon, CA)一起培育組成。接著使用DAB套組(BioGenex, San Ramon, CA)使切片顯影。使用蘇木素將細胞核染色，且藉由明視野顯微法分析。如藉由棕色染色所指示，使用191P4D12免疫反應性抗體在患者試樣中偵測特殊染色。(參見圖21(A)、21(C)、21(E)、21(G)、21(I)、21(K)及21(M))。相比之下，對照抗體不會使任一患者試樣染色。(參見圖21(B)、21(D)、21(F)、21(H)、21(J)、21(L)及21(N))。

結果顯示191P4D12在患者膀胱癌、乳癌、胰臟癌、肺癌、卵巢癌、

食道癌及頭頸部癌組織之腫瘤細胞中表現。此等結果指示191P4D12在人類癌症中表現且針對此抗原之抗體及稱為Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE之抗體藥物共軛物適用於診斷性及治療性目的。(圖21)。

實例10

測定Ha22-2(2,4)6.1 MAb之結合抗原決定基

人類、食蟹獼猴、大鼠及鼠類來源之191P4D12蛋白在PC3細胞株中重組過表現以測定Ha22-2(2,4)6.1與此等直系同源物之交叉反應性。顯示Ha22-2(2,4)6.1與191P4D12之食蟹獼猴及大鼠直系同源物高度交叉反應(表VIII)。EC50結合值展示於表IX中。Ha22-2(2,4)6.1與鼠類直系同源物之結合顯示結合EC50值顯著降低，其顯示V域中之重要胺基酸取代(與人類及大鼠序列相比)影響Ha22-2(2,4)6.1對191P4D12之親和性。

表X展示含有V域之191P4D12直系同源物的aa 1-180蛋白質序列比對。大鼠直系同源物序列中僅兩個胺基酸，Thr-75及Ser-90分別取代鼠類直系同源物序列中之Ile及Asn(以紅色標記)。應注意人類序列中之對應胺基酸為Ala-76及Ser-91。為判定此等胺基酸是否包含Ha22-2(2,4)6.1之結合抗原決定基，產生191P4D12及其鼠類直系同源物之若干種突變構築體且使其在PC3細胞中表現(表XI)。將「鼠類」胺基酸替代標準丙胺酸取代突變誘發引入人類序列中且亦反過來引入小鼠序列中。

顯示191P4D12中Ser-91突變為Asn嚴重地削弱Ha22-2(2,4)6.1之結合，從而證實此胺基酸Ser-91為結合所必需的且必須包含由Ha22-2(2,4)6.1 MAb識別之抗原決定基。亦將位置76之Ala的其他突變(A76I、S91N雙重突變體)引入191P4D12中。顯示Ha22-2(2,4)6.1與雙重突變體A76I、S91N之結合極類似於鼠類直系同源物結合(表XII)。相反，鼠類序

列中之Asn-90突變為Ser顯著改良Ha22-2(2,4)6.1與鼠類突變體直系同源物之結合，其進一步證實此位置之胺基酸對於Ha22-2(2,4)6.1結合的重要性。Ha22-2(2,4)6.1與鼠類直系同源物雙重突變體A90S、I75A之結合似乎極類似於191P4D12之人類直系同源物。

綜上所述，此等數據證明Ser-91及Ala-76在Ha22-2(2,4)6.1與細胞表面上之191P4D12蛋白的結合中起關鍵作用且構成191P4D12表面上由Ha22-2(2,4)6.1識別的抗原決定基之一部分。

為觀察此概念，基於191P4D12及含有Ig域之蛋白質的家族成員之公開晶體結構資料，使用PyMOL產生191P4D12之V域的電腦模型(表XIII)。展示Ala-76(綠色)及Ser-91(紅色)之位置。

另外，為進一步修正191P4D12分子上之Ha22-2(2,4)6.1結合位點，設計並表現191P4D12中對應於大鼠(1)E細胞表面上之V域的片段。在反轉錄病毒載體中產生以下構築體：

191P4D12(aa1-150、347-510)。

藉由FACS評估Ha22-2(2,4)6.1 MAb之結合。如表XIV中所示，Ha22-2(2,4)6.1與表現V域之細胞(A)以及野生型191P4D12(B)結合，而不與較早產生之表現C1C2域之細胞(C)結合。此證實此抗體之結合位點位於191P4D12之V域的開頭150個胺基酸中。

結果顯示Ha22-2(2,4)6.1 Mab自位置aa 1-150與191P4D12蛋白之v域結合且另外顯示包含aa Ser-91及aa Ala-76之特異性抗原決定基為結合Ha22-2(2,4)6.1 MAb之關鍵。

在本申請案通篇中，參考多個網站資料內容、公開案、專利申請案及專利。(網站係依據其統一資源定位器(Uniform Resource Locator)或

URL，全球資訊網(World Wide Web)上之位址來參考)。此等參考文獻各自之揭示內容係以全文引用的方式併入本文中。

本發明之範疇不欲受本文所揭示之實施例限制，該等實施例意欲單獨說明本發明之個別態樣，且任何功能等同者均在本發明之範疇內。除本文所述外，對本發明之模型及方法的各種修改對於熟習此項技術者根據以上描述及教示將顯而易知，且同樣意欲在本發明之範疇內。可在不脫離本發明之真實範疇及精神的情況下實施該等修改或其他實施例。

表格

表I：當為惡性病時表現191P4D12之組織。

- 結腸
- 胰臟
- 卵巢
- 乳房
- 肺
- 膀胱

表II：胺基酸縮寫

單字母	三字母	全稱
F	Phe	苯丙胺酸
L	Leu	白胺酸
S	Ser	絲胺酸
Y	Tyr	酪胺酸
C	Cys	半胱胺酸
W	Trp	色胺酸
P	Pro	脯胺酸
H	His	組胺酸
Q	Gln	麩醯胺酸

R	Arg	精胺酸
I	Ile	異白胺酸
M	Met	甲硫胺酸
T	Thr	蘇胺酸
N	Asn	天冬醯胺
K	Lys	離胺酸
V	Val	纈胺酸
A	Ala	丙胺酸
D	Asp	天冬胺酸
E	Glu	麩胺酸
G	Gly	甘胺酸

表III：胺基酸取代矩陣

由GCG軟體9.0 BLOSUM62胺基酸取代矩陣(區塊取代矩陣)改編而來。值愈高，愈有可能在相關天然蛋白質中存在取代。

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	.
4	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R
															4	1	-2	-3	-2	S
																5	0	-2	-2	T
																	4	-3	-1	V
																		11	2	W
																			7	Y

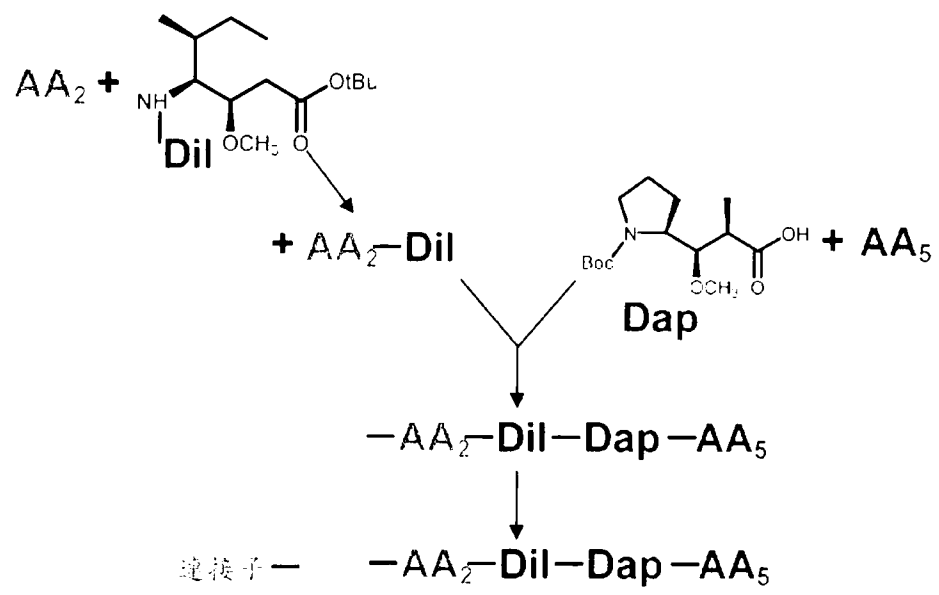
表IV。合成vcMMAE之通用方法

其中： AA1=胺基酸1
AA2=胺基酸2
AA5=胺基酸5

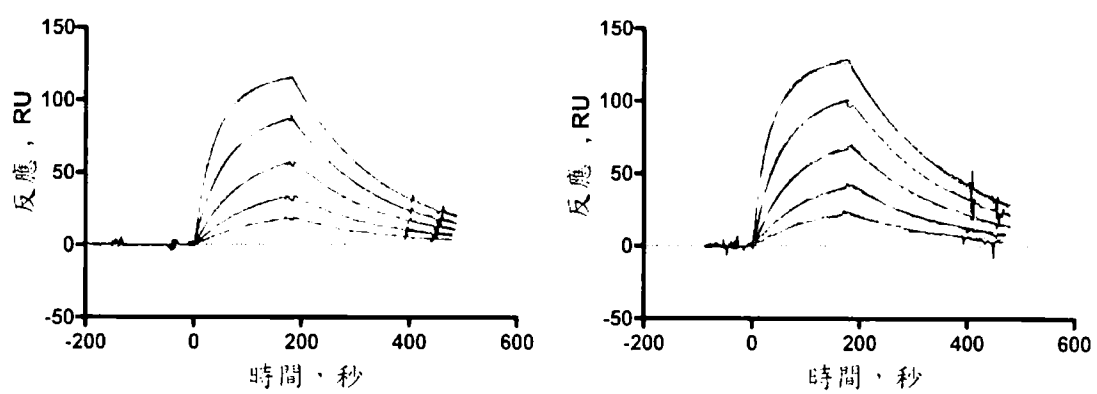
DIL=多拉異白胺酸

DAP=多拉脯胺酸

連接子=Val-Cit(vc)



表V。用於經由SPR測定親和性之結合曲線(感測器圖譜)



表VI。拜克爾締合及解離速率及所得親和性計算結果

	kon, M-1s-1	koff, s-1	KD, M
Ha22-2(2,4)6.1	3.8E+05	5.8E-03	1.6E-08
Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE	4.5E+05	5.2E-03	1.1E-08

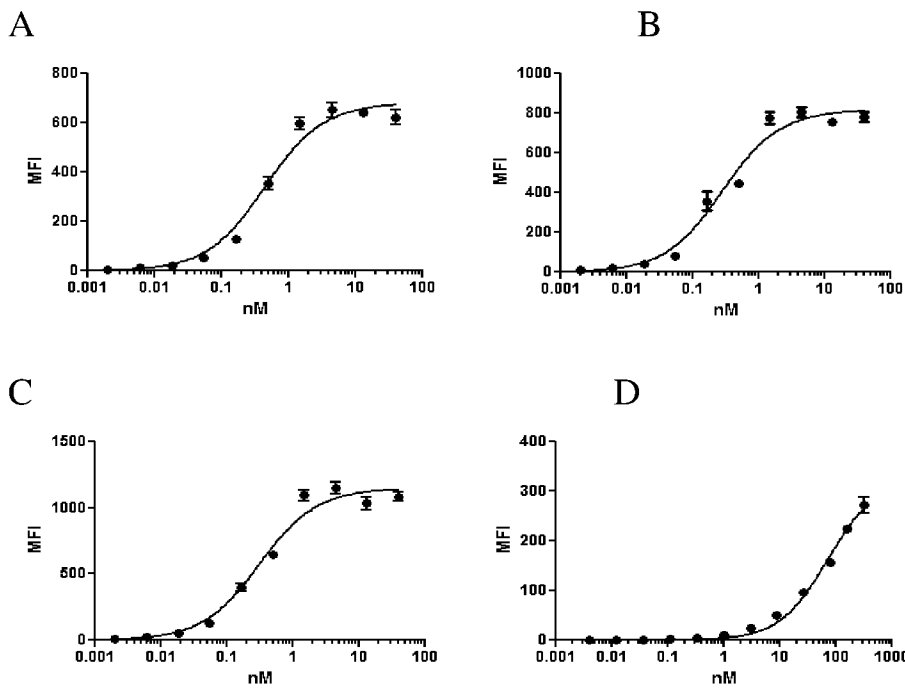
表VII。用於結構域定位檢定中之191P4D12構築體

構築體 名稱

191P4D12(aa 1-242、347-510)	VC1，大鼠1(E)表現株
191P4D12(aa 1-31、147-510)	C1C2，大鼠1(E)表現株
191P4D12(aa 1-242)	mFc-VC1，融合蛋白
191P4D12(aa 1-31、147-346)	mFc-C1C2，融合蛋白
191P4D12(aa 1-141)	mFc-V，融合蛋白

表VIII

Ha22-2(2,4)6.1與表現191P4D12(A)及來自食蟹獼猴(B)、大鼠(C)及小鼠(D)之直系同源物的PC3細胞結合



表IX

	PC3-191P4D12	食蟹獼猴直系同源物	大鼠直系同源物	鼠類直系同源物
Bmax(MFI)	816	1146	679	325
EC ₅₀ (nM)	0.28	0.30	0.44	70.3

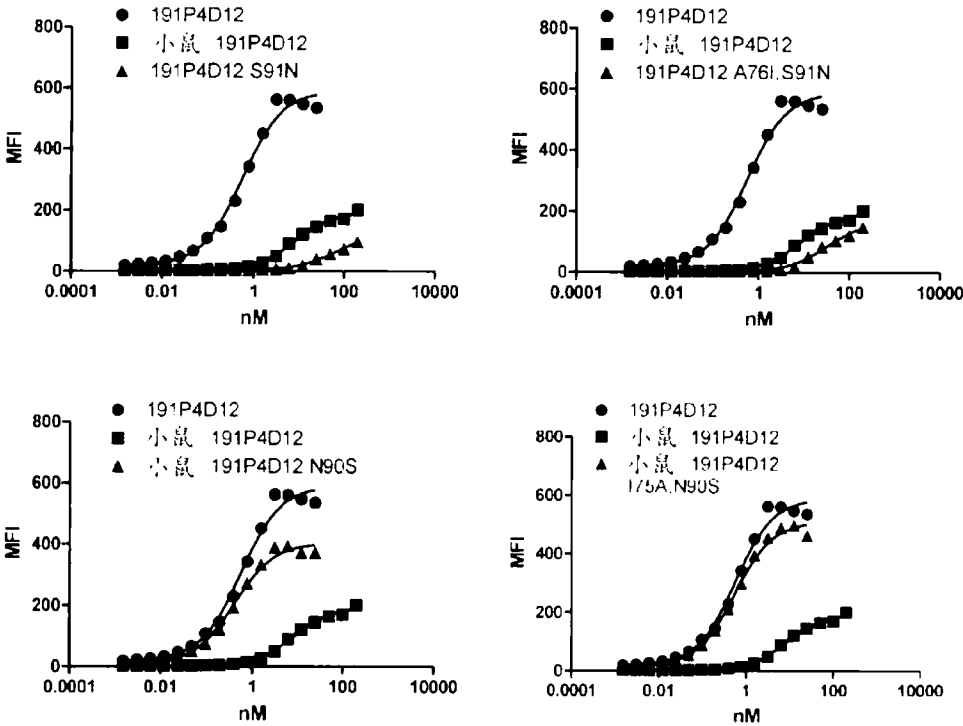
表X

小鼠	MIQLLALMMSEIQAWEKFLLEHAR+RQVLEGR+LNTVAVVVIQTAPLEDEVELEDFE+D
大鼠	MPLEETGADNKEIQAWEKFLLEHAR+RQVLEGR+LNTVAVVVIQTAPLEDEVELEDFE+D
人類	MPLEETGADNKEIQAWEKFLLEHAR+RQVLEGR+LNTVAVVVIQTAPLEDEVELEDFE+D
小鼠	
大鼠	
人類	
小鼠	
大鼠	
人類	
小鼠	
大鼠	
人類	

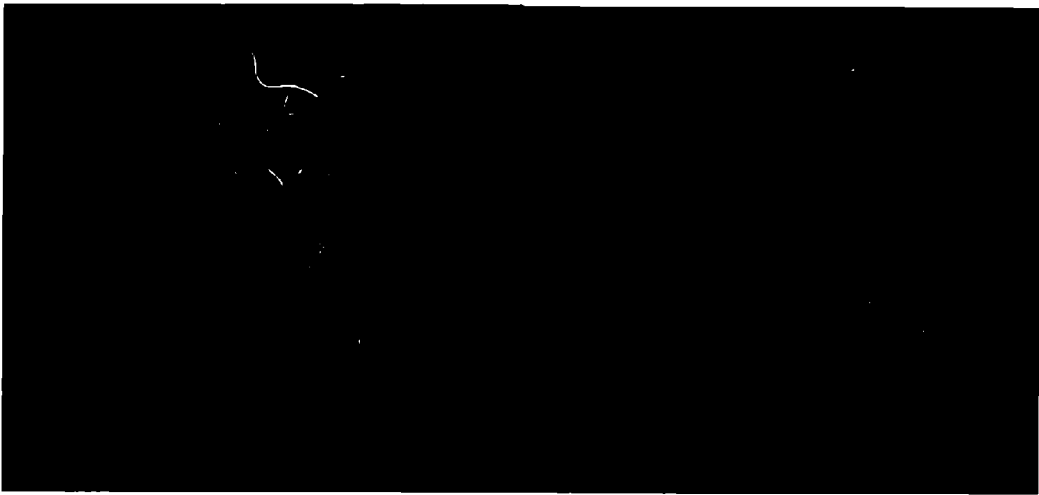
表XI

野生型構築體	突變型構築體	雙重突變體構築體
191P4D12，野生型	S91N	S91N、A76I
191P4D12之鼠類直系同源物，野生型	N90S	N90S、I75A

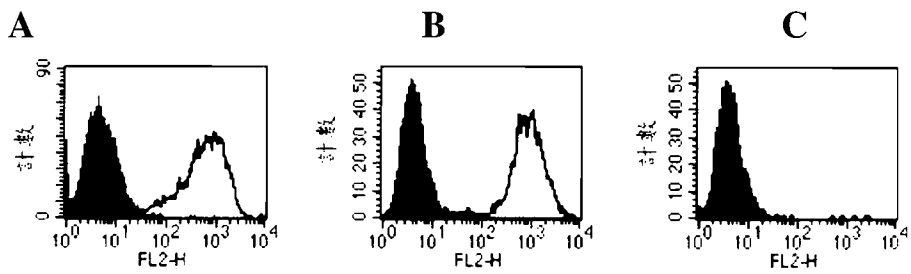
表XII



表XIII



表XIV



【生物材料寄存】

食品工業發展研究所；100年12月08日；BCRC 960435

美國；American Type Culture Collection (ATCC)；2010年08月19

日；PTA-11267

【序列表】

<110> 美商艾澤西公司(AGENSYS, INC.)
美商西雅圖遺傳學公司(SEATTLE GENETICS, INC.)

<120> 與191P4D12蛋白結合之抗體藥物共軛物(ADC)

<130> TW 109135992
TW 107143990
TW 107103146
TW 104140581
TW 100135340
TW 111117461

<150> US 61/387,933
<151> 2010-09-29

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 3464
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (264)...(1796)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(3464)
<223> 191P4D12

<400> 1
ggccgtcgtt gttggccaca gcgtgggaag cagctctggg ggagctcgga gctcccgatc 60
acggcttctt gggggttagct acggctgggt gtgtagaacg gggccggggc tggggctggg 120
tcccctagtg gagaccaag tgcgagaggc aagaactctg cagcttcctg ctttctgggt 180
cagttcctta ttcaagtctg cagccggctc ccagggagat ctcggtggaa cttcagaaac 240
gctgggcagt ctgccittca acc atg ccc ctg tcc ctg gga gcc gag atg tgg 293
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp
1 5 10

ggg cct gag gcc tgg ctg ctg ctg ctg cta ctg ctg gca tca ttt aca 341
Gly Pro Glu Ala Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr
15 20 25

ggc cgg tgc ccc gcg ggt gag ctg gag acc tca gac gtg gta act gtg 389

Gly Arg Cys Pro Ala Gly Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val	
303540	
gtg ctg ggc cag gac gca aaa ctg ccc tgc ttc tac cga ggg gac tcc	437
Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser	
455055	
ggc gag caa gtg ggg caa gtg gca tgg gct cgg gtg gac gcg ggc gaa	485
Gly Glu Gln Val Gly Gln Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu	
606570	
ggc gcc cag gaa cta gcg cta ctg cac tcc aaa tac ggg ctt cat gtg	533
Gly Ala Gln Glu Leu Ala Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val	
75808590	
agc ccg gct tac gag ggc cgc gtg gag cag ccg ccg ccc cca cgc aac	581
Ser Pro Ala Tyr Glu Gly Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn	
95100105	
ccc ctg gac ggc tca gtg ctc ctg cgc aac gca gtg cag gcg gat gag	629
Pro Leu Asp Gly Ser Val Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu	
110115120	
ggc gag tac gag tgc cgg gtc agc acc ttc ccc gcc ggc agc ttc cag	677
Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln	
125130135	
gcg cgg ctg cgg ctc cga gtg ctg gtg cct ccc ctg ccc tca ctg aat	725
Ala Arg Leu Arg Leu Arg Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn	
140145150	
cct ggt cca gca cta gaa gag ggc cag ggc ctg acc ctg gca gcc tcc	773
Pro Gly Pro Ala Leu Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser	
155160165170	
tgc aca gct gag ggc agc cca gcc ccc agc gtg acc tgg gac acg gag	821
Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu	
175180185	
gtc aaa ggc aca acg tcc agc cgt tcc ttc aag cac tcc cgc tct gct	869
Val Lys Gly Thr Thr Ser Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala	
190195200	
gcc gtc acc tca gag ttc cac ttg gtg cct agc cgc agc atg aat ggg	917
Ala Val Thr Ser Glu Phe His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly	
205210215	
cag cca ctg act tgt gtg gtg tcc cat cct ggc ctg ctc cag gac caa	965
Gln Pro Leu Thr Cys Val Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln	
220225230	

agg atc acc cac atc ctc cac gtg tcc ttc ctt gct gag gcc tct gtg	1013
Arg Ile Thr His Ile Leu His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val	
235 240 245 250	
agg ggc ctt gaa gac caa aat ctg tgg cac att ggc aga gaa gga gct	1061
Arg Gly Leu Glu Asp Gln Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala	
255 260 265	
atg ctc aag tgc ctg agt gaa ggg cag ccc cct ccc tca tac aac tgg	1109
Met Leu Lys Cys Leu Ser Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp	
270 275 280	
aca cgg ctg gat ggg cct ctg ccc agt ggg gta cga gtg gat ggg gac	1157
Thr Arg Leu Asp Gly Pro Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp	
285 290 295	
act ttg ggc ttt ccc cca ctg acc act gag cac agc ggc atc tac gtc	1205
Thr Leu Gly Phe Pro Pro Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val	
300 305 310	
tgc cat gtc agc aat gag ttc tcc tca agg gat tct cag gtc act gtg	1253
Cys His Val Ser Asn Glu Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val	
315 320 325 330	
gat gtt ctt gac ccc cag gaa gac tct ggg aag cag gtg gac cta gtg	1301
Asp Val Leu Asp Pro Gln Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val	
335 340 345	
tca gcc tcg gtg gtg gtg gtg ggt gtg atc gcc gca ctc ttg ttc tgc	1349
Ser Ala Ser Val Val Val Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys	
350 355 360	
ctt ctg gtg gtg gtg gtg gtg ctc atg tcc cga tac cat cgg cgc aag	1397
Leu Leu Val Val Val Val Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys	
365 370 375	
gcc cag cag atg acc cag aaa tat gag gag gag ctg acc ctg acc agg	1445
Ala Gln Gln Met Thr Gln Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg	
380 385 390	
gag aac tcc atc cgg agg ctg cat tcc cat cac acg gac ccc agg agc	1493
Glu Asn Ser Ile Arg Arg Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser	
395 400 405 410	
cag ccg gag gag agt gta ggg ctg aga gcc gag ggc cac cct gat agt	1541
Gln Pro Glu Glu Ser Val Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser	
415 420 425	
ctc aag gac aac agt agc tgc tct gtg atg agt gaa gag ccc gag ggc	1589

Leu	Lys	Asp	Asn	Ser	Ser	Cys	Ser	Val	Met	Ser	Glu	Glu	Pro	Glu	Gly	
			430					435					440			
cgc	agt	tac	tcc	acg	ctg	acc	acg	gtg	agg	gag	ata	gaa	aca	cag	act	1637
Arg	Ser	Tyr	Ser	Thr	Leu	Thr	Thr	Val	Arg	Glu	Ile	Glu	Thr	Gln	Thr	
		445						450					455			
gaa	ctg	ctg	tct	cca	ggc	tct	ggg	cgg	gcc	gag	gag	gag	gaa	gat	cag	1685
Glu	Leu	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Gln	
		460						465					470			
gat	gaa	ggc	atc	aaa	cag	gcc	atg	aac	cat	ttt	gtt	cag	gag	aat	ggg	1733
Asp	Glu	Gly	Ile	Lys	Gln	Ala	Met	Asn	His	Phe	Val	Gln	Glu	Asn	Gly	
		475				480				485					490	
acc	cta	cgg	gcc	aag	ccc	acg	ggc	aat	ggc	atc	tac	atc	aat	ggg	cgg	1781
Thr	Leu	Arg	Ala	Lys	Pro	Thr	Gly	Asn	Gly	Ile	Tyr	Ile	Asn	Gly	Arg	
			495							500					505	
gga	cac	ctg	gtc	tga	cccaggcctg	cctcccttcc	ctaggcctgg	ctccttctgt								1836
Gly	His	Leu	Val	*												
			510													
tgacatggga	gattttagct	catcttgggg	gcctccttaa	acacccccat	ttcttgcgga											1896
agatgctccc	catcccaactg	actgcttgac	cittacctcc	aacccttctg	ttcatcggga											1956
gggctccacc	aattgagtct	ctcccacat	gcatgcaggt	cactgtgtgt	gtgcatgtgt											2016
gcctgtgtga	gtgttgactg	actgtgtgtg	tgtggagggg	tgactgtccg	tggaggggtg											2076
actgtgtccg	tgggtgtgat	tatgctgtca	tatcagagtc	aagtgaactg	tgggtgtatgt											2136
gccacgggat	ttgagtggtt	gcgtgggcaa	cactgtcagg	gtttggcgtg	tgtgtcatgt											2196
ggctgtgtgt	gacctctgcc	tgaaaaagca	ggtattttct	cagaccccag	agcagtatta											2256
atgatgcaga	ggttggagga	gagaggtgga	gactgtggct	cagaccag	tgtgcgggca											2316
tagctggagc	tggaatctgc	ctccggtgtg	agggaacctg	tctcctacca	cttcggagcc											2376
atgggggcaa	gtgtgaagca	gccagtcctt	gggtcagcca	gaggcttgaa	ctgttacaga											2436
agccctctgc	cctctgggtgg	cctctgggcc	tgtgtcatgt	acatattttc	tgtaaata											2496
catgcgccgg	gagcttcttg	caggaatact	gtccgaatc	acttttaatt	tttttctttt											2556
ttttttcttg	ccctttccat	tagttgtatt	ttttatttat	ttttattttt	attttttttt											2616
agagatggag	tctcactatg	ttgtcaggc	tggccttgaa	ctcctgggct	caagcaatcc											2676
tctgcctca	gcctccctag	tagctgggac	tttaagtgt	caccactgtg	cctgctttga											2736
atccttttac	aagagaaaaa	aaaaattaaa	gaaagccttt	agatttatcc	aatgtttact											2796
actgggattg	cttaaagtga	ggcccccca	acaccagggg	gttaattcct	gtgattgtga											2856
aaggggctac	ttccaaggca	tcttcatgca	ggcagcccct	tgggagggca	cctgagagct											2916
ggtagagtct	gaaattaggg	atgtgagcct	cgtgggttact	gagtaaggta	aaattgcata											2976
caccattgtt	tgtgatacct	tagggaattg	cttggacctg	gtgacaaggg	ctcctgttca											3036
atagtgggtg	tggggagaga	gagagcagtg	attatagacc	gagagagtag	gagttgaggt											3096
gaggtgaagg	aggtgctggg	ggtgagaatg	tcgcctttcc	ccctgggttt	tggatcacta											3156
attcaaggct	cttctggatg	tttctctggg	ttggggctgg	agttcaatga	ggtttatttt											3216
tagctggccc	accagatac	actcagccag	aataacctaga	tttagtacc	aaactcttct											3276
tagtctgaaa	tctgtggat	ttctggccta	agggagaggc	tccatcctt	cgttccccag											3336
ccagcctagg	acttcgaatg	tggagcctga	agatctaaga	tcctaacaatg	tacattttat											3396
gtaaatatgt	gcataattgt	acataaaatg	atattctgtt	tttaataaaa	cagacaaaac											3456

ttgaaaaa

3464

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(510)

<223> 191P4D12

<400> 2

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala

35 40 45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln

50 55 60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala

65 70 75 80

Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly

85 90 95

Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val

100 105 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg

115 120 125

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

130 135 140

Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu

145 150 155 160

Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser

165 170 175

Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr Thr Ser

180 185 190

Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser Glu Phe

195 200 205

His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr Cys Val

210 215 220

Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His Ile Leu

225 230 235 240

His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu Asp Gln

245 250 255

Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys Leu Ser

260 265 270

Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp Gly Pro

275 280 285

Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp Thr Leu Gly Phe Pro Pro

290 295 300
Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser Asn Glu
305 310 315 320
Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp Pro Gln
325 330 335
Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Val
340 345 350
Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val
355 360 365
Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys Ala Gln Gln Met Thr Gln
370 375 380
Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg Glu Asn Ser Ile Arg Arg
385 390 395 400
Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser Gln Pro Glu Glu Ser Val
405 410 415
Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser Leu Lys Asp Asn Ser Ser
420 425 430
Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Thr Leu
435 440 445
Thr Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr Glu Leu Leu Ser Pro Gly
450 455 460
Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln Asp Glu Gly Ile Lys Gln
465 470 475 480
Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly Thr Leu Arg Ala Lys Pro
485 490 495
Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Gly His Leu Val
500 505 510

<210> 3
<211> 1432
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (32)...(1432)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(1432)
<223> Ha22-2(2,4)6.1重鏈

<400> 3
ggtgatcagc actgaacaca gaggactcac c atg gag ttg ggg ctg tgc tgg 52
Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp
1 5

gtt ttc ctt gtt gct att tta gaa ggt gtc cag tgt gag gtg cag ctg 100
Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu

10	15	20	
gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg tcc ctg aga ctc	148		
Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu			
25	30	35	
tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat aac atg aac tgg	196		
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp			
40	45	50	55
gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtt tca tac att agt	244		
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser			
60	65	70	
agt agt agt agt acc ata tac tac gca gac tct gtg aag ggc cga ttc	292		
Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe			
75	80	85	
acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac tca ctg tct ctg caa atg aac	340		
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn			
90	95	100	
agc ctg aga gac gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gca tac	388		
Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr			
105	110	115	
tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc	436		
Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser			
120	125	130	135
tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc	484		
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			
140	145	150	
aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac	532		
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
155	160	165	
tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc	580		
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
170	175	180	
agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac	628		
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
185	190	195	
tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag	676		
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
200	205	210	215

acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac	724
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	
220225230	
aag aga gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg	772
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	
235240245	
tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc	820
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
250255260	
cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca	868
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	
265270275	
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac	916
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	
280285290295	
tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg	964
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	
300305310	
gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc	1012
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	
315320325	
ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc	1060
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	
330335340	
aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa	1108
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
345350355	
ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gag	1156
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu	
360365370375	
gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc	1204
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	
380385390	
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag	1252
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	
395400405	
aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc	1300
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	

410415420

ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg 1348
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
425430435

aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac 1396
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
440445450455

acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga 1432
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
460465

<210> 4
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(466)
<223> Ha22-2(2,4)6.1重鏈

<400> 4
Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
151015
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
202530
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
354045
Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
505560
Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65707580
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
859095
Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
100105110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
115120125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130135140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145150155160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165170175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180185190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460
Gly Lys
465

<210> 5
<211> 735
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (25)...(735)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(735)

<223> Ha22-2(2,4)6.1輕鏈

<400> 5

agtcagaccc agtcaggaca cagc atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc	51
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu	
1 5	
ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ttc cca ggt tcc aga tgc gac atc cag	99
Leu Gly Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln	
10 15 20 25	
atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct gtt gga gac aga gtc	147
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val	
30 35 40	
acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc ggc tgg tta gcc tgg	195
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp	
45 50 55	
tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ttc ctg atc tat gct gca	243
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Ala Ala	
60 65 70	
tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct	291
Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	
75 80 85	
ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt	339
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe	
90 95 100 105	
gca act tac tat tgt caa cag gct aac agt ttc cct ccc act ttc ggc	387
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly	
110 115 120	
gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc	435
Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val	
125 130 135	
ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct	483
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser	
140 145 150	
gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag	531
Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln	
155 160 165	
tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc	579
Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val	
170 175 180 185	

aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg 627
Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
190 195 200

acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa 675
Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
205 210 215

gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg 723
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
220 225 230

gga gag tgt tag 735
Gly Glu Cys *
235

<210> 6
<211> 236
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(236)
<223> Ha22-2(2,4)6.1輕鏈

<400> 6
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Gly Ile Ser Gly Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60
Ala Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Ala Asn Ser Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 7
<211> 466
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(466)
<223> Ha22-2(2,4)6.1重鏈

<400> 7
Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Ser Tyr Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
115 120 125
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
325 330 335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
340 345 350
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
355 360 365
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
370 375 380
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
385 390 395 400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
405 410 415
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460
Gly Lys
465

<210> 8
<211> 236
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(236)
<223> Ha22-2(2,4)6.1輕鏈

<400> 8
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

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

<210> 9
<211> 98
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(98)
<223> 人類Ig生殖系VH3-48

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val 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
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp 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 Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 10
<211> 96
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(96)
<223> 人類Ig生殖系L5

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

<210> 11
<211> 179
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(179)
<223> 含有V域之I91P4D12直系同源物

<400> 11
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15
Arg Leu Leu Phe Leu Ala Ser Phe Thr Gly Gln Tyr Ser Ala Gly Glu
 20 25 30
Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys
 35 40 45
Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Pro Asp Glu Gln Val Gly Gln Val
 50 55 60
Ala Trp Ala Arg Val Asp Pro Asn Glu Gly Ile Arg Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80

Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Asn Pro Ala Tyr Glu Asp Arg
85 90 95
Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Ser Val Leu
100 105 110
Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val
115 120 125
Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Met Arg Leu Arg Val
130 135 140
Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Pro Leu Glu Glu
145 150 155 160
Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro
165 170 175
Ala Pro Ser

<210> 12
<211> 179
<212> PRT
<213> 褐家鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(179)
<223> 含有V域之191P4D12直系同源物

<400> 12
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Tyr Ser Ala Gly Glu
20 25 30
Leu Glu Thr Ser Asp Leu Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala Lys
35 40 45
Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Pro Asp Glu Gln Val Gly Gln Val
50 55 60
Ala Trp Ala Arg Val Asp Pro Asn Glu Gly Thr Arg Glu Leu Ala Leu
65 70 75 80
Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Asp Arg
85 90 95
Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asp Pro Leu Asp Gly Ser Ile Leu
100 105 110
Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg Val
115 120 125
Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Met Arg Leu Arg Val
130 135 140
Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Pro Leu Glu Glu
145 150 155 160
Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser Pro
165 170 175
Ala Pro Ser

<210> 13
<211> 180
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)...(180)
<223> 含有V域之191P4D12直系同源物

<400> 13
Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly
20 25 30
Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala
35 40 45
Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln
50 55 60
Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala
65 70 75 80
Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly
85 90 95
Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val
100 105 110
Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg
115 120 125
Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg
130 135 140
Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu
145 150 155 160
Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser
165 170 175
Pro Ala Pro Ser
180

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種包含抗191P4D12抗體或其抗原結合片段之抗體藥物共軛物，其中：

a)該抗191P4D12抗體或其抗原結合片段結合191P4D12之V域中之抗原決定基，其中該V域包含SEQ ID NO: 2之胺基酸1-150，以及其中該抗體或其抗原結合片段結合至至少SEQ ID NO: 2之A76及S91；或

b)藉由表面電漿子共振測定，該抗體或其抗原結合片段以 1.6×10^{-8} M或更低之KD結合至191P4D12之細胞外域，以及其中該191P4D12之細胞外域包含SEQ ID NO: 2之胺基酸1-348，及

其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 7之重鏈可變區胺基酸序列至少80%同源的胺基酸序列，且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區胺基酸序列至少80%同源的胺基酸序列。

【請求項2】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中，藉由表面電漿子共振測定，該抗體或其抗原結合片段以 1.6×10^{-8} M或更低之KD結合至191P4D12之細胞外域，其中該191P4D12之細胞外域包含SEQ ID NO: 2之胺基酸1-348，以及其中該抗體或其抗原結合片段結合至至少SEQ ID NO: 2之A76及S91。

【請求項3】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 7之重鏈可變

區胺基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%或90%同源的胺基酸序列，且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區胺基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%或90%同源的胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中該抗原結合片段為Fab、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

【請求項5】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中該抗體為全人類抗體。

【請求項6】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中該抗體或其抗原結合片段經重組產生。

【請求項7】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中該抗體或其抗原結合片段係藉由連接子與單甲基奧瑞他汀E(monomethyl auristatin E，MMAE)共軛。

【請求項8】

如請求項7之抗體藥物共軛物，其中該連接子包含纈胺酸-瓜胺酸。

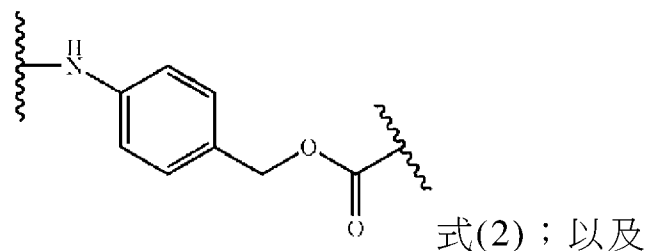
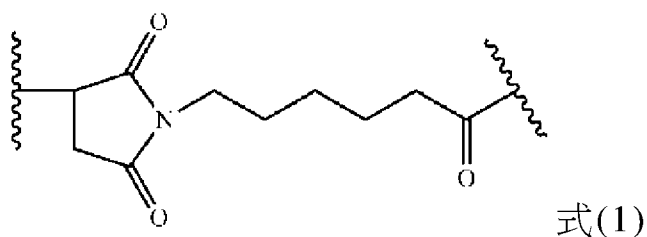
【請求項9】

如請求項7之抗體藥物共軛物，其中該連接子係可由酶裂解之連接子，且其中該連接子與該抗體或其抗原結合片段之硫原子形成鍵。

【請求項10】

如請求項7之抗體藥物共軛物，其中該連接子具有下式： $-A_a-W_w-Y_y-$ ；其中-A-為延伸子單元，a為0或1；-W-為胺基酸單元，w為0至12範圍內之整數；且-Y-為間隔子單元，y為0、1或2；其中該延伸子單元具有如下

所示之式(1)結構；該胺基酸單元為纈胺酸瓜胺酸；以及該間隔子單元為具有如下所示之式(2)結構之PAB基團；



其中該延伸子單元與該抗體或其抗原結合片段之硫原子形成鍵；且其中該間隔子單元係藉由胺基甲酸酯基連接至MMAE。

【請求項11】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其包含每個抗體或其抗原結合片段自1至10單元之MMAE。

【請求項12】

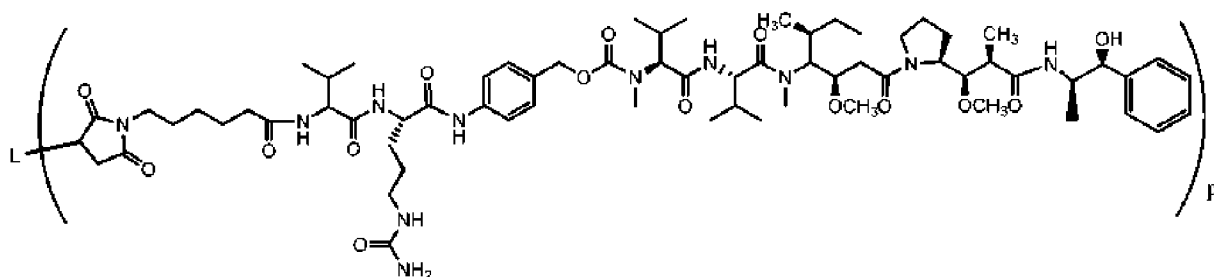
如請求項1之抗體藥物共軛物，其包含每個抗體或其抗原結合片段自2至5單元之MMAE。

【請求項13】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其包含每個抗體或其抗原結合片段自3至5單元之MMAE。

【請求項14】

如請求項1之抗體藥物共軛物，其中該抗體藥物共軛物具有以下結構：



其中L-表示該抗191P4D12抗體或其抗原結合片段，且p為1至10之範圍。

【請求項15】

如請求項14之抗體藥物共軛物，其中p為3至5。

【請求項16】

如請求項14之抗體藥物共軛物，其中p為3.8。

【請求項17】

一種包含複數之如請求項14至16中任一項之抗體藥物共軛物的組合物，其中該組合物中之該抗體藥物共軛物的平均p值為約3.8。

【請求項18】

一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1至16中任一項之抗體藥物共軛物以及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項19】

一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項14至16中任一項之抗體藥物共軛物以及醫藥學上可接受之賦形劑，其中該醫藥組合物中之該抗體藥物共軛物的平均p值為約3.8。

【請求項20】

一種抗191P4D12抗體或其抗原結合片段，其中：

a)該抗191P4D12抗體或其抗原結合片段結合191P4D12之V域中之抗原決定基，其中該V域包含SEQ ID NO: 2之胺基酸1-150，以及其中該抗

體或其抗原結合片段結合至至少SEQ ID NO: 2之A76及S91；及

b)藉由表面電漿子共振測定，該抗191P4D12抗體或其抗原結合片段以 1.6×10^{-8} M或更低之KD結合至191P4D12之細胞外域，以及其中該191P4D12之細胞外域包含SEQ ID NO: 2之胺基酸1-348；及

其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 7之重鏈可變區胺基酸序列至少80%同源的胺基酸序列，且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區胺基酸序列至少80%同源的胺基酸序列。

【請求項21】

如請求項20之抗體或其抗原結合片段，其中，藉由表面電漿子共振測定，該抗191P4D12抗體或其抗原結合片段以 1.6×10^{-8} M或更低之KD結合至191P4D12之細胞外域，其中該191P4D12之細胞外域包含SEQ ID NO: 2之胺基酸1-348，以及其中該抗體或其抗原結合片段結合至至少SEQ ID NO: 2之A76及S91。

【請求項22】

如請求項20之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 7之重鏈可變區胺基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%或90%同源的胺基酸序列，且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變區胺基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%或90%同源的胺基酸序列。

【請求項23】

如請求項20之抗體或其抗原結合片段，其中該抗原結合片段為Fab、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

【請求項24】

如請求項20之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為全人類抗體。

【請求項25】

如請求項20之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段經重組產生。

【請求項26】

一種如請求項1至16中任一項之抗體藥物共軛物、如請求項17之組合物或如請求項18或19之醫藥組合物用於製備藥物之用途，其中該藥物係用於治療或預防個體之癌症。

【請求項27】

如請求項26之用途，其中該個體係人類個體。

【請求項28】

如請求項26之用途，其中該癌症包含表現191P4D12之腫瘤細胞。

【請求項29】

如請求項26之用途，其中該癌症係結腸癌、卵巢癌、食道癌、頭頸部癌、胰腺癌、肺癌、膀胱癌或乳癌。

【請求項30】

如請求項26之用途，其中該癌症係膀胱癌。

【請求項31】

如請求項26之用途，其中該癌症係乳癌。

【請求項32】

如請求項26之用途，其中該癌症係食道癌。

【請求項33】

如請求項26之用途，其中該癌症係頭頸部癌。

【請求項34】

如請求項30之用途，其中該膀胱癌係晚期膀胱癌。

【請求項35】

如請求項30之用途，其中該膀胱癌係轉移性膀胱癌。

【發明圖式】

1 ggccgtcggttgttgccacagcgtgggaagcagctctgggggagctcggagctcccgatc
61 acggcttcttggggtagctacggctgggtgtgtagaacggggccgggctggggtggg
121 tccccagtgagacccaagtgcgagaggcaagaactctgcagcttctgccttctgggt
181 cagttccttattcaagtctgcagccggctcccaggagatctcggtggaacttcagaaac
1 M P L S L G A E M W G P E
241 gctgggcagtcctgcctttcaaccATGCCCTGTCCCTGGGAGCCGAGATGTGGGGCCTG
14 A W L L L L L L L A S F T G R C P A G E
301 AGGCCTGGCTGCTGCTGCTGCTACTGCTGGCATCATTTACAGGCCGGTGCCCCGGGGTG
34 L E T S D V V T V V L G Q D A K L P C F
361 AGCTGGAGACCTCAGACGTGGTAACGTGGTGCTGGGCCAGGACGCAAACTGCCCTGCT
54 Y R G D S G E Q V G Q V A W A R V D A G
421 TCTACCGAGGGGACTCCGGCGAGCAAGTGGGGCAAGTGGCATGGGCTCGGGTGGACGCGG
74 E G A Q E L A L L H S K Y G L H V S P A
481 GCGAAGGCGCCAGGAAGTAGCGCTACTGCACTCCAAATACGGGCTTCATGTGAGCCCGG
94 Y E G R V E Q P P P P R N P L D G S V L
541 CTTACGAGGGCCGCGTGGAGCAGCCGCCGCCACGCAACCCCTGGACGGCTCAGTGC
114 L R N A V Q A D E G E Y E C R V S T F P
601 TCCTGCGCAACGCAGTGCAGGCGGATGAGGGCGAGTACGAGTGCCGGGTGAGCACCTTCC
134 A G S F Q A R L R L R V L V P P L P S L
661 CCGCCGGCAGCTTCCAGGCGCGGCTGCGGCTCCGAGTGCTGGTGCTCCCTGCCCTCAC
154 N P G P A L E E G Q G L T L A A S C T A
721 TGAATCCTGGTCCAGCACTAGAAGAGGGCCAGGGCCTGACCCTGGCAGCCTCCTGCACAG
174 E G S P A P S V T W D T E V K G T T S S
781 CTGAGGGCAGCCAGCCCCAGCGTGACCTGGGACACGGAGGTCAAAGGCACAACGTCCA
194 R S F K H S R S A A V T S E F H L V P S
841 GCCGTTCTTCAAGCACTCCCGCTGCTGCCGTACCTCAGAGTTCCTTGGTGCCTA
214 R S M N G Q P L T C V V S H P G L L Q D
901 GCCGCAGCATGAATGGGCAGCCACTGACTTGTGTGGTGTCCCATCCTGGCCTGCTCCAGG
234 Q R I T H I L H V S F L A E A S V R G L
961 ACCAAAGGATCACCCACATCCTCCAGTGTCCTTCCTTGCTGAGGCCTCTGTGAGGGGCC
254 E D Q N L W H I G R E G A M L K C L S E
1021 TTGAAGACCAAAATCTGTGGCACATTGGCAGAGAAGGAGCTATGCTCAAGTGCCTGAGTG
274 G Q P P P S Y N W T R L D G P L P S G V
1081 AAGGGCAGCCCCCTCCCTCATACAACTGGACACGGCTGGATGGGCCTCTGCCCAGTGGGG
294 R V D G D T L G F P P L T T E H S G I Y
1141 TACGAGTGGATGGGGACACTTTGGGCTTCCCCCACTGACCACTGAGCACAGGGCATCT
314 V C H V S N E F S S R D S Q V T V D V L
1201 ACGTCTGCCATGTCAGCAATGAGTTCTCCTCAAGGGATTCTCAGGTCACTGTGGATGTT
334 D P Q E D S G K Q V D L V S A S V V V V

【圖 1】

[illegible]

【圖 1】(續)

M E L G L C W V F L V A I L E

1 GGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTTCCTTGTGTCTATTTTAGA
· G V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
76 AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
· C A A S G F T F S S Y N M N W V R Q A P G K G L E
151 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATAACATGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGA
· W V S Y I S S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S
226 GTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTC
· R D N A K N S L S L Q M N S L R D E D T A V Y Y C
301 CAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTCTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTG
· A R A Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K
376 TGCAGAGACTACTACTACGGTATGGAGCTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAACGCTCTCCTCAGCCTCCACCAA
· G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V
451 GGGCCCATCGGTCTTCCCTCTGGCACCCTCCCTCCAAGAGCACCCTCTGGGGGCACAGCGGCTGGGCTGCCTGGT
· K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P
526 CAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCC
· A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
601 GGCTGTCTCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
· T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D
676 GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCACCAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
· K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K
751 CAAACTCAGACATGCCCGACCTGCGCAGCACTGAAGTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAA
· P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
826 ACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTGGAGTGAAGCCACGAAGACCC
· E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
901 TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATCCCAAGACAAAGCCCGGGGAGGAGTGA
· N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
976 CAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGGCTCTCAGCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAAGTG
· K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
1051 CAAGTCTCCCAACAAAGCCTCCCGAGCCCTCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCC
· Q V Y I L P P S R E E M T K N Q V S L T C L K G
1126 ACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGCTTGGTCAAGGG
· F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
1201 CTCTATCCCGGACATCCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAGACCCAGCCCTCC
· V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
1276 CGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACBAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA
· V F T S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
1351 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCGGG
· K *
1426 TAAATGA

【圖 2A】

M D M R V P A Q L L G L L L L W F

1 AGTCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGTTC
P G S R C D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T
76 CCAGGTTCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTGGAGACAGATCACC
I T C R A S Q G I S G W L A W Y Q Q K P G K A P K
151 ATCACTTGTCCGGCAGTCAGGATATTAGCGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAG
F L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D
226 TTCTGATCTAIGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P
301 TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGACGCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTCCTCT
P T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
376 CCCACTTTCCGGCGGAGGACCAAGGTGGAGATCAAAAGCAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K
451 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCGAGAGGCCCAA
V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D
526 GTACAGTGAAGGTGGATAAAGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
601 AGCACTTACAGCCTCAGCAGCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTTCCGAA
V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
676 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

【圖 2B】

1 MELGLCWVFLVAILEGVOCEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
51 YNMNVWRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSL
101 QMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
151 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
201 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
251 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
301 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
351 IEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
401 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
451 LHNHYTQKSLSLSPGK

【圖 3A】

1 MDMRVPAQLLGLLLWEPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRVTTTCRASQG
51 ISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
101 QPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
201 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖 3B】

ID%	2(2,4)6.1 VH3-48 D2-21 JH6	89 1	-----FWR1-----	
			E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A	
			GAGTCCAGCTGCTGAGTCTGGGGAGGCTTGTACAGCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG	
			E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A	
ID%	2(2,4)6.1 VH3-48 D2-21 JH6	159 71	-----FWR2-----	
			CCTCT GGATTCACCTTCAGTAGCTATAAC ATGAAC TGGTCCGCCAGGCTCCAGGAGGGGTGGACTG	
			A S G F T F S S Y S M N W V R Q A P G K G L E W	
			G.	
ID%	2(2,4)6.1 VH3-48 D2-21 JH6	229 141	<-----CDR1-----> <-----FWR2-----	
			V S Y I S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I	
			GGTTTCATAC ATTAGTAGTAGTAGTAGTACCAFA TACTACGAGACTCTGTGAAGGCGGATTTCACCATC	
			V S Y I S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I	
ID%	2(2,4)6.1 VH3-48 D2-21 JH6	299 211	<-----CDR2-----> <-----FWR3-----	
			S R D N A K N S L S L Q M N S L R D E D T A V	
			TCCAGAGACAATGCCAAGAACTCACTGTCTCTGCAATGACAGCTGAGACACGACACGGCTGTGT	
			S R D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D T A V	

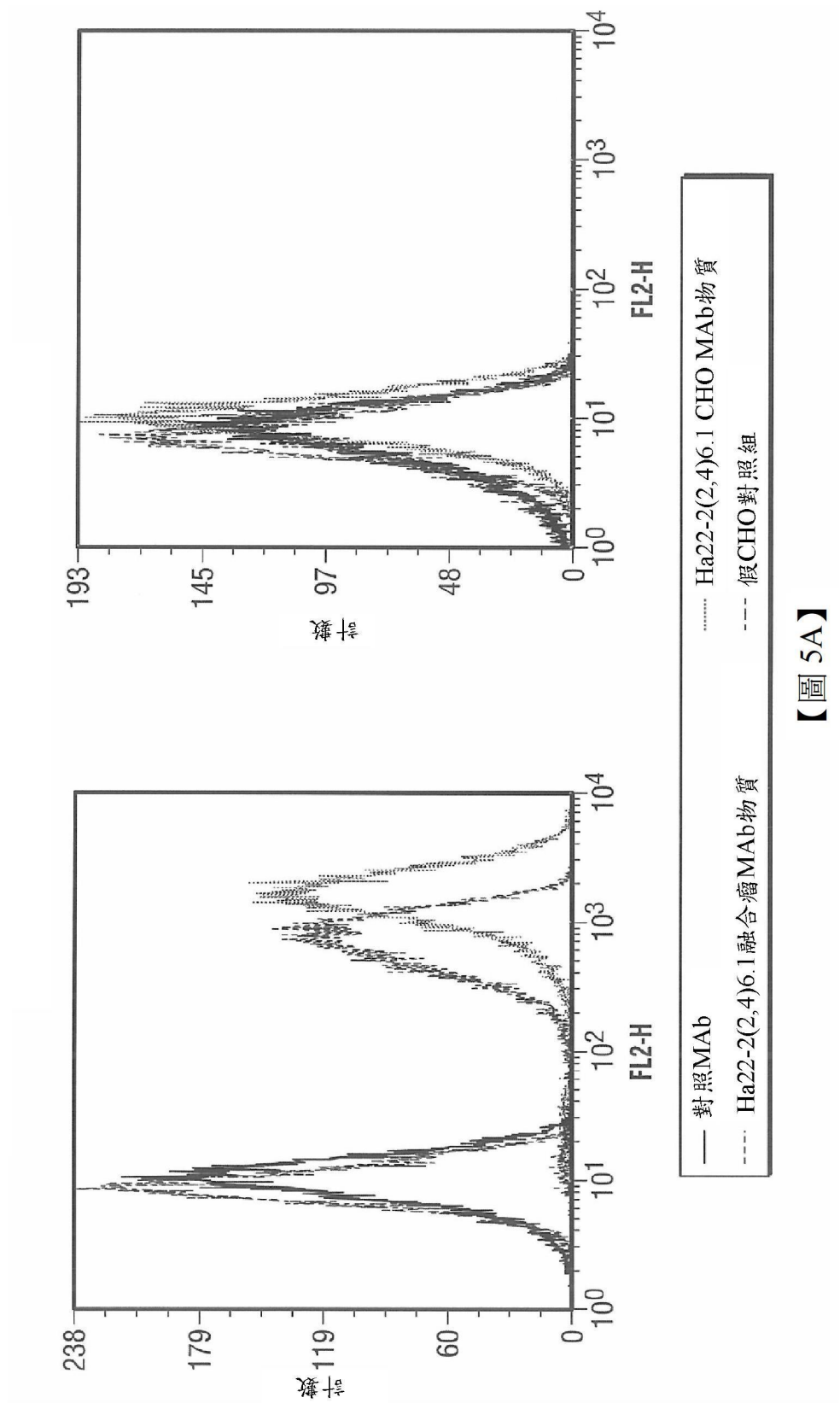
【圖 4A】

<u>ID#</u>	<u>2(2,4)6.1</u>	369	----->																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
			Y	Y	C	A	R	A	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
99.3(293/295)	<u>VH3-48</u>	281	-----																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
			ATTACTGT	G	C	G	A	G	A	G	C	A	T	G	G	G	C	C	A	G	G	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T	C	C	T

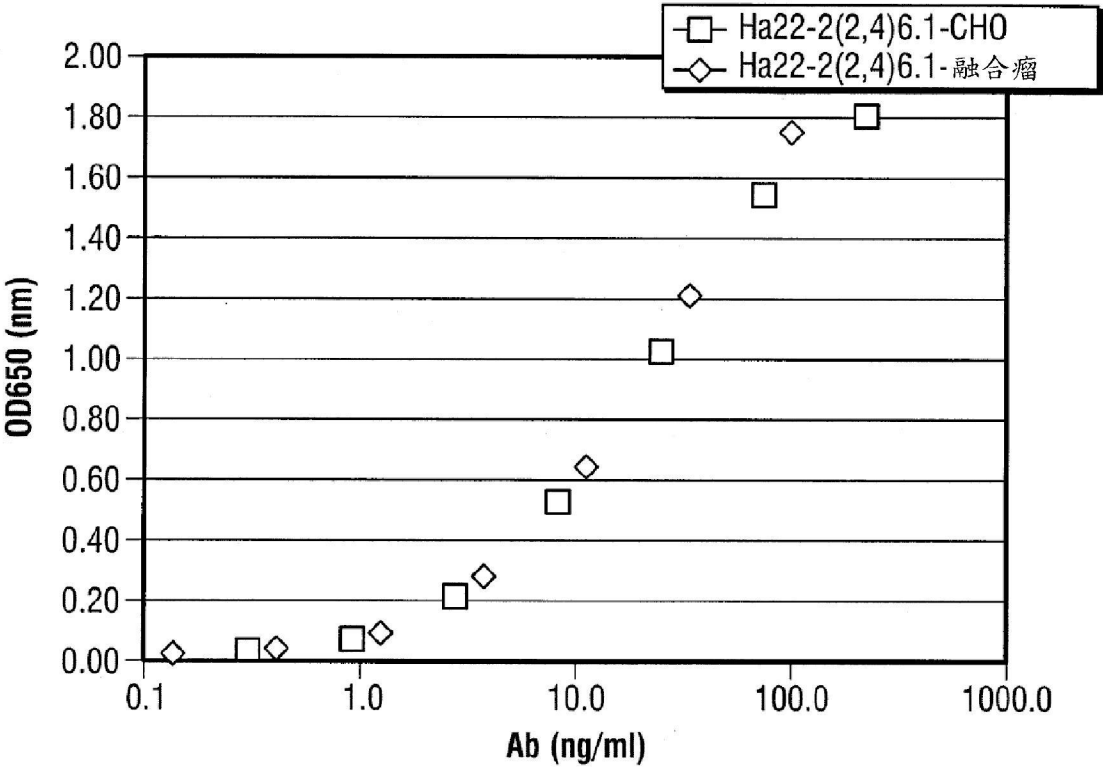
【圖 4A】(續)

ID%	<-----FWR1----->		D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C	
	2(2,4)6.1	91	G A C A T C C A G A T G A C C C A G T C T C A T C T T C C G T G T C A T C T G T T G G A G A C A G A G T C A C C A T C A C T T G T C	160
98.6(283/287)	L5	1	D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C	70
100(35/35)	JK4		A.....	
ID%	<-----CDR1-----> <-----FWR2----->		R A S Q G I S G W L A W Y Q Q K P G K A P K F L	
	2(2,4)6.1	161	G G C C G A G T C A G G G T A T T A G C G G T G G T T A G C C T G G T A T C A G A G A A C C A G G A A G C C C C T A A G T C C T	230
98.6(283/287)	L5	71	R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P G K A P K L L	140
100(35/35)	JK4		A.....C....	
ID%	<-----CDR2-----> <-----F----->		I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G T D	
	2(2,4)6.1	231	G A T C T A T G C T G C A T C C A C T T T G C A A A G T G G G T C C C A T C A A G T T C A G G T T C A G C G G C A G T G G A T C T G G A C A G A T	300
98.6(283/287)	L5	141	I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G T D	210
100(35/35)	JK4		G.....	
ID%	WR3----->		F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S	
	2(2,4)6.1	301	T T C A C T C T C A C C A T C A G C A G C C T G C A G C T G A A G A T T T T G C A A C T T A C T A T T G T C A A C A G G C T A A C A G T T	370
98.6(283/287)	L5	211	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S	280
100(35/35)	JK4			
ID%	F P P T F G G G T K V E I K		F P P T F G G G T K V E I K	
	2(2,4)6.1	371	T C C C T C C C A C T T T C G G C G G A G G A C C A A G G T G G A G A T C A A C	412
98.6(283/287)	L5	281	F P P	287
100(35/35)	JK4	4		38

【圖 4B】

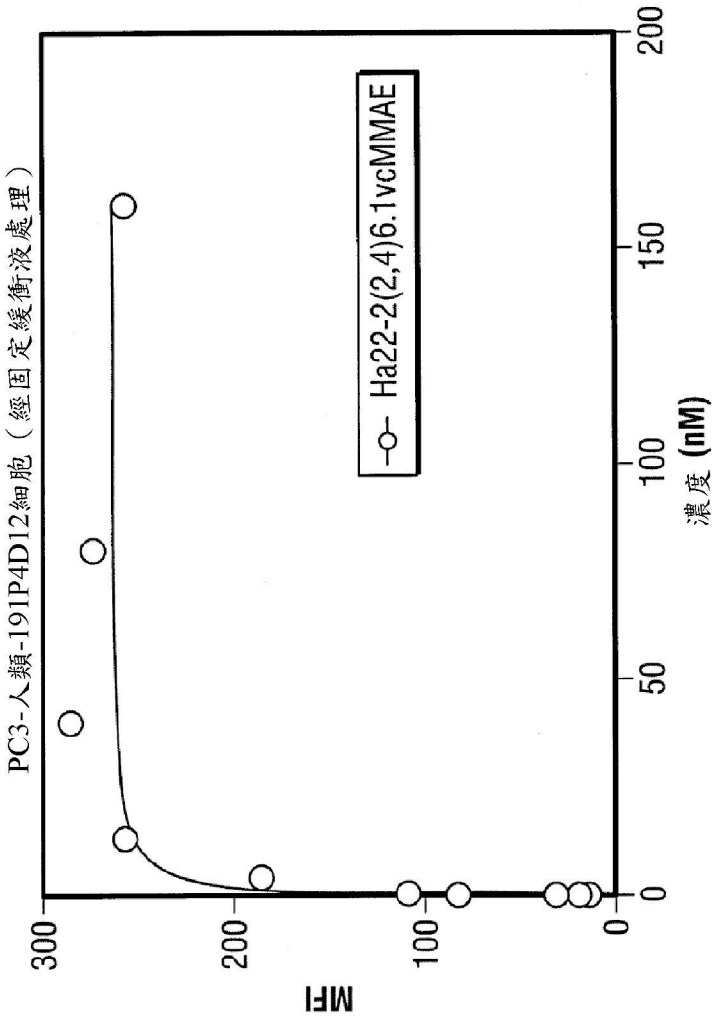


【圖 5A】



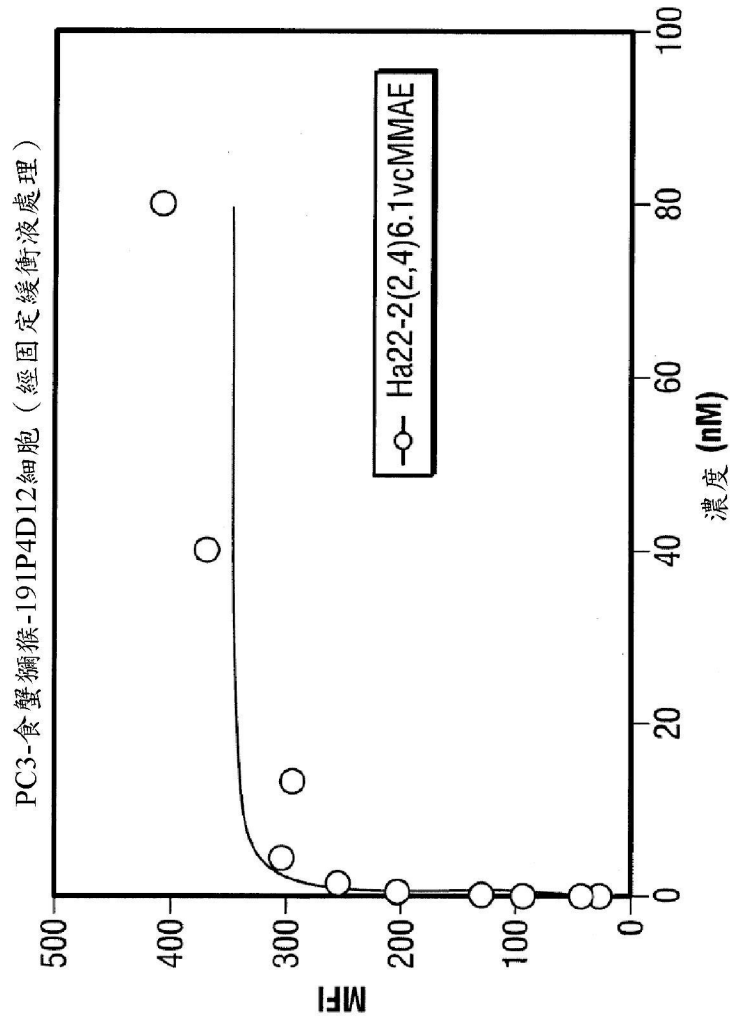
【圖 5B】

MF1值 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE
	貨號vcE-03
160	257
80	273
40	285
13.33	256
4.44	183
1.48	183
0.49	105
0.16	78
0.05	26
0.02	14
0.01	9
0.000	1



	Ha22- 2(2,4)6.1vcMMAE
	貨號vcE-03
Bmax	265
Kd (nM)	0.69

【圖 6】

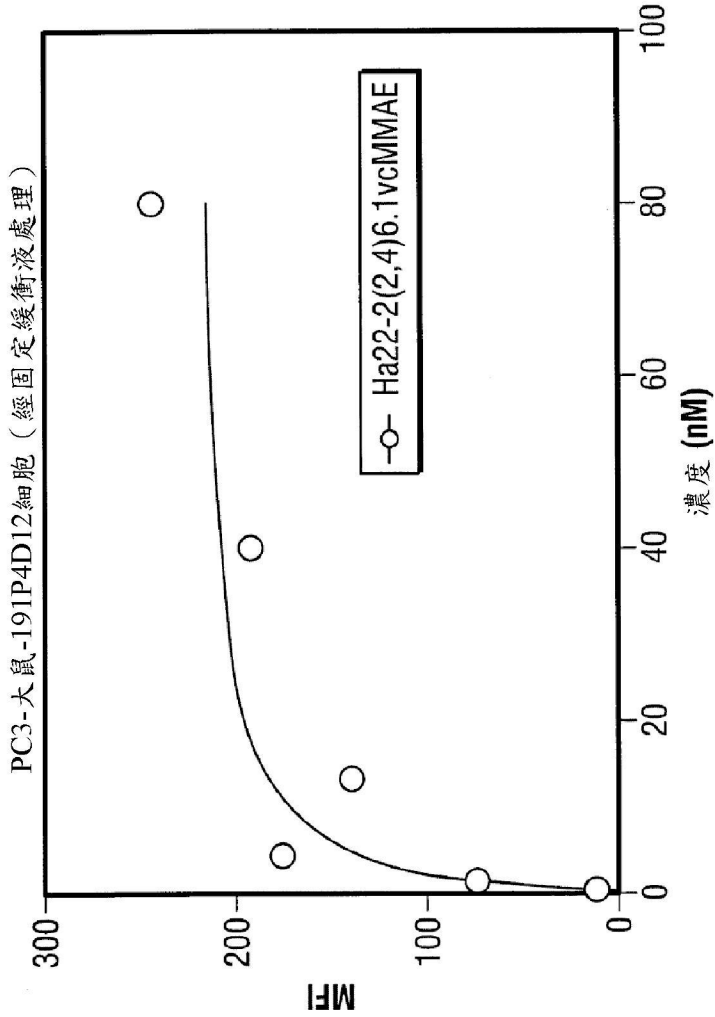


	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE
	貨號vcE-03
Bmax	343
Kd (nM)	0.34

【圖 7】

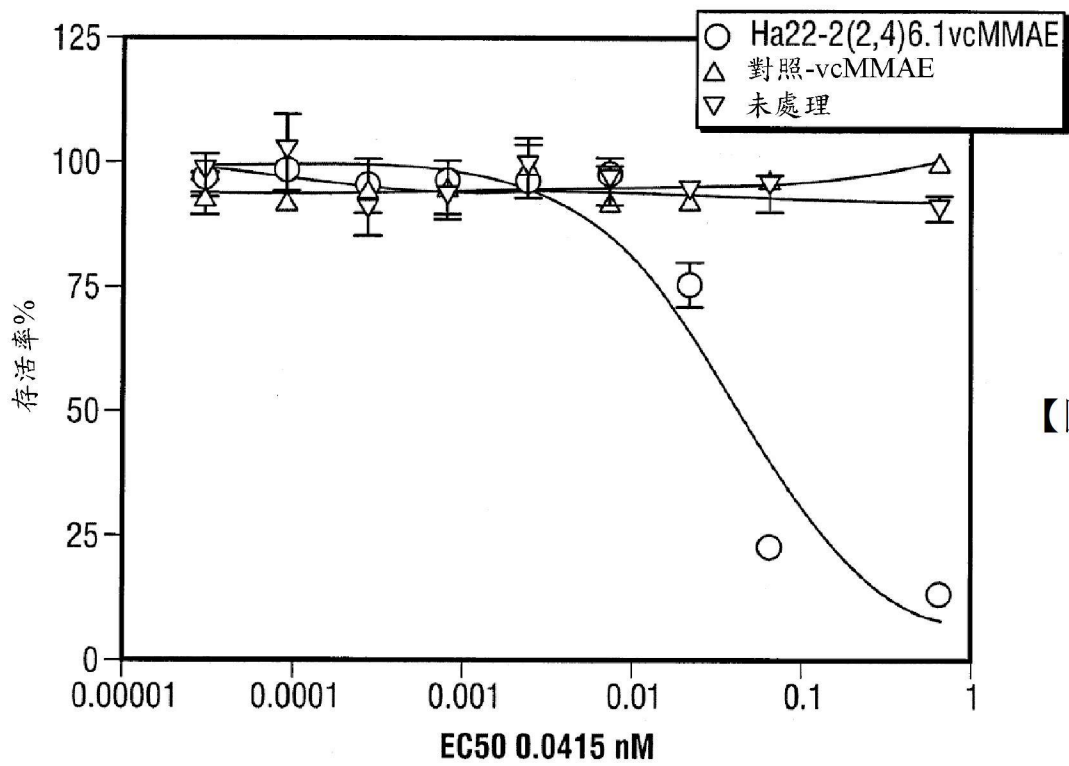
MFI值 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE
	貨號vcE-03
160	375
80	403
40	364
13.33	288
4.44	298
1.48	248
0.49	196
0.16	122
0.05	86
0.02	34
0.01	19
0.000	1

MFI值 (nM)	Ha22-2(2,4)6.1 vcMMAE
	貨號vcE-03
160	205
80	296
40	243
13.33	192
4.44	224
1.48	121
0.49	56
0.16	40
0.05	22
0.02	11
0.01	8
0.000	4

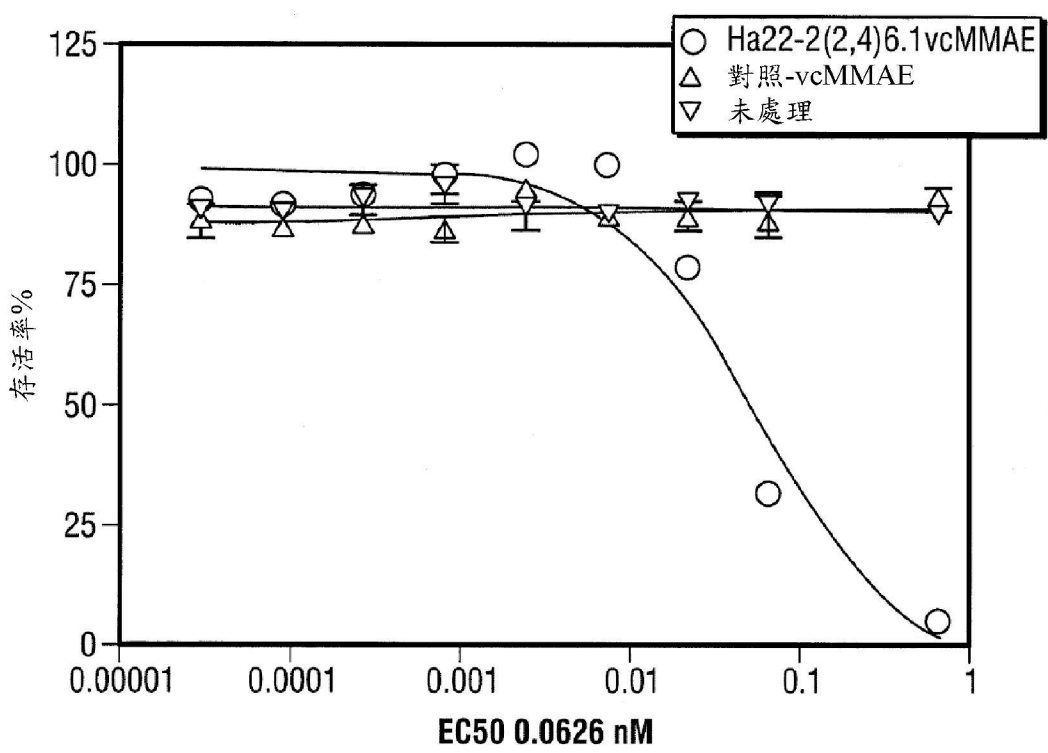


	Ha22-2(2,4)6.1vcMMAE
	貨號vcE-03
Bmax	265
Kd (nM)	1.6

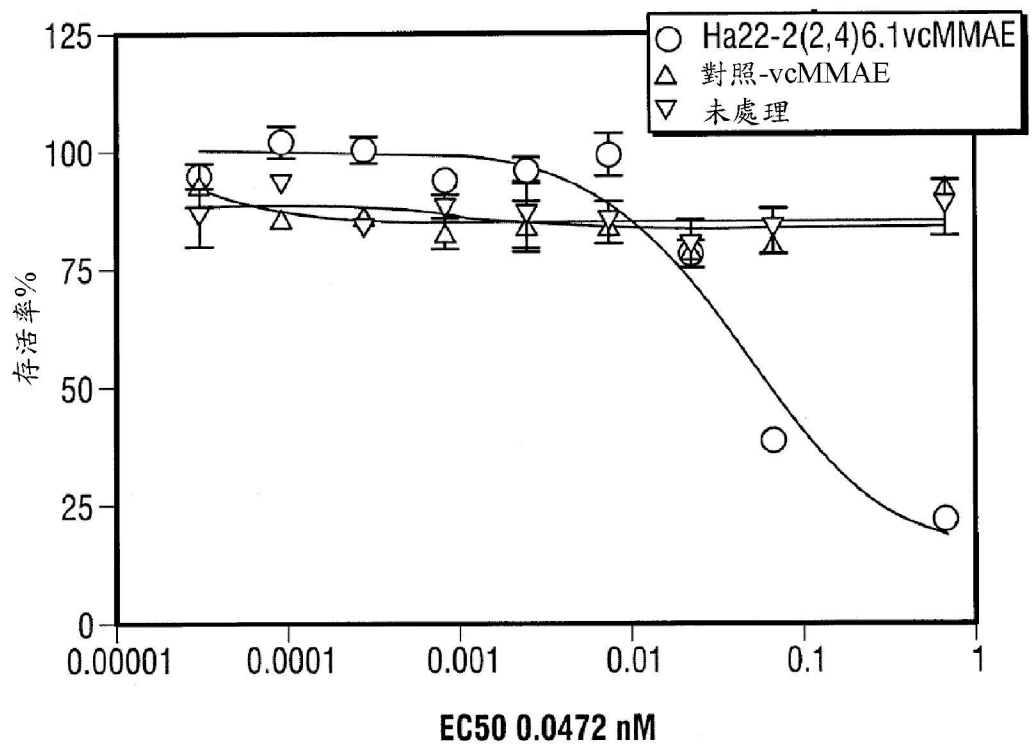
【圖 8】



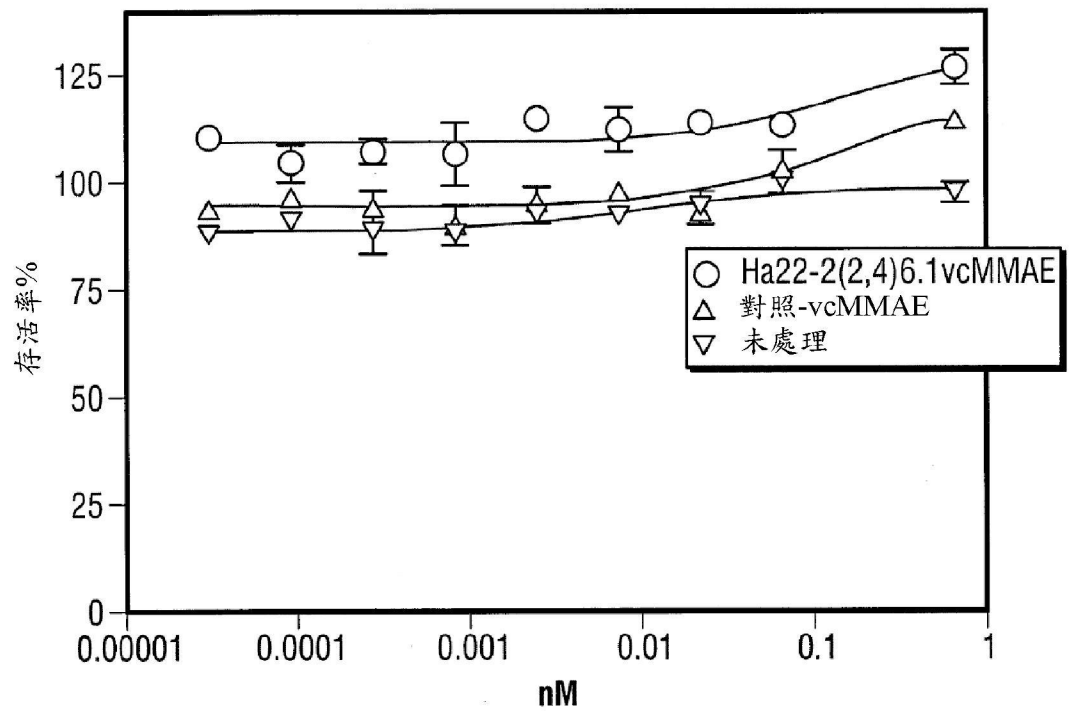
【圖 9A】



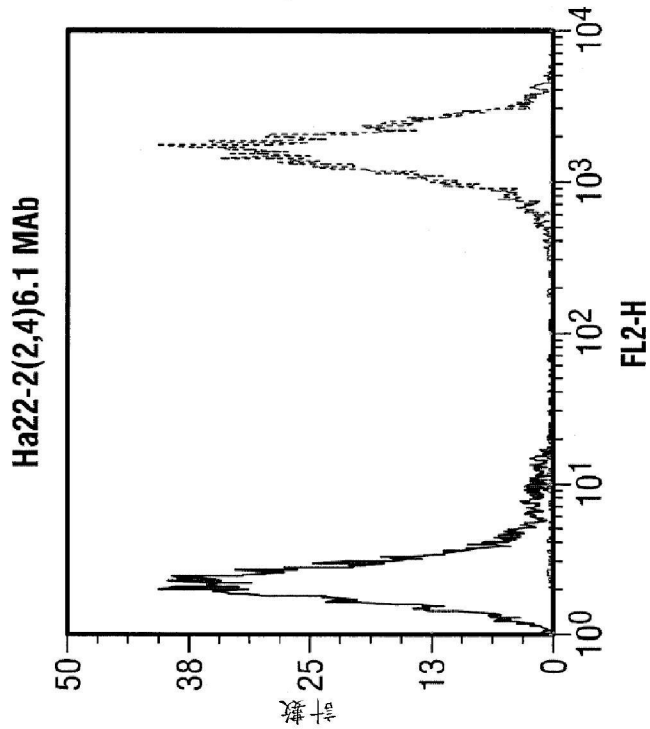
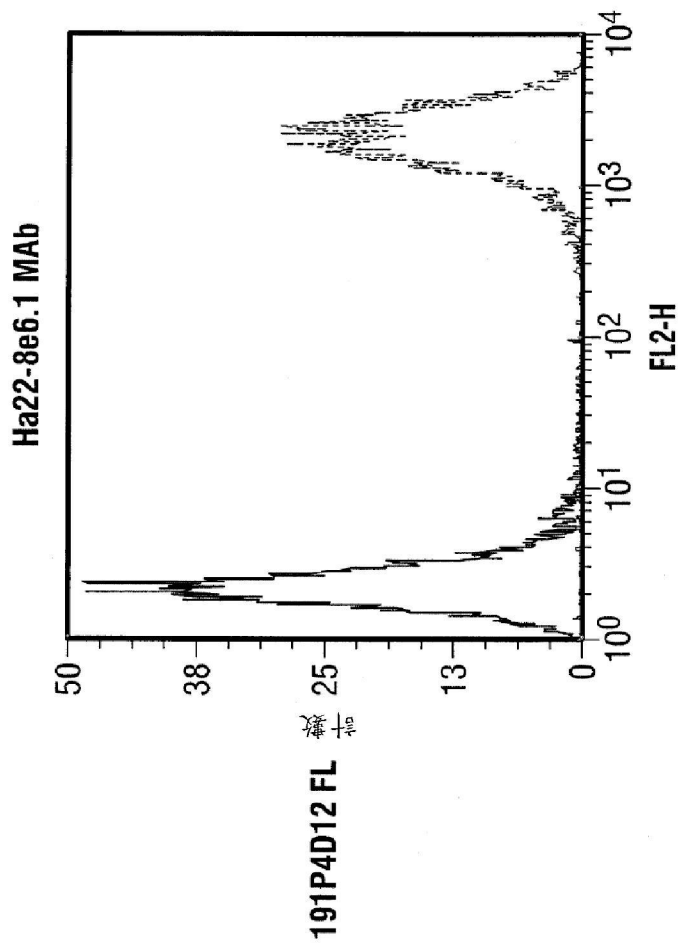
【圖 9B】



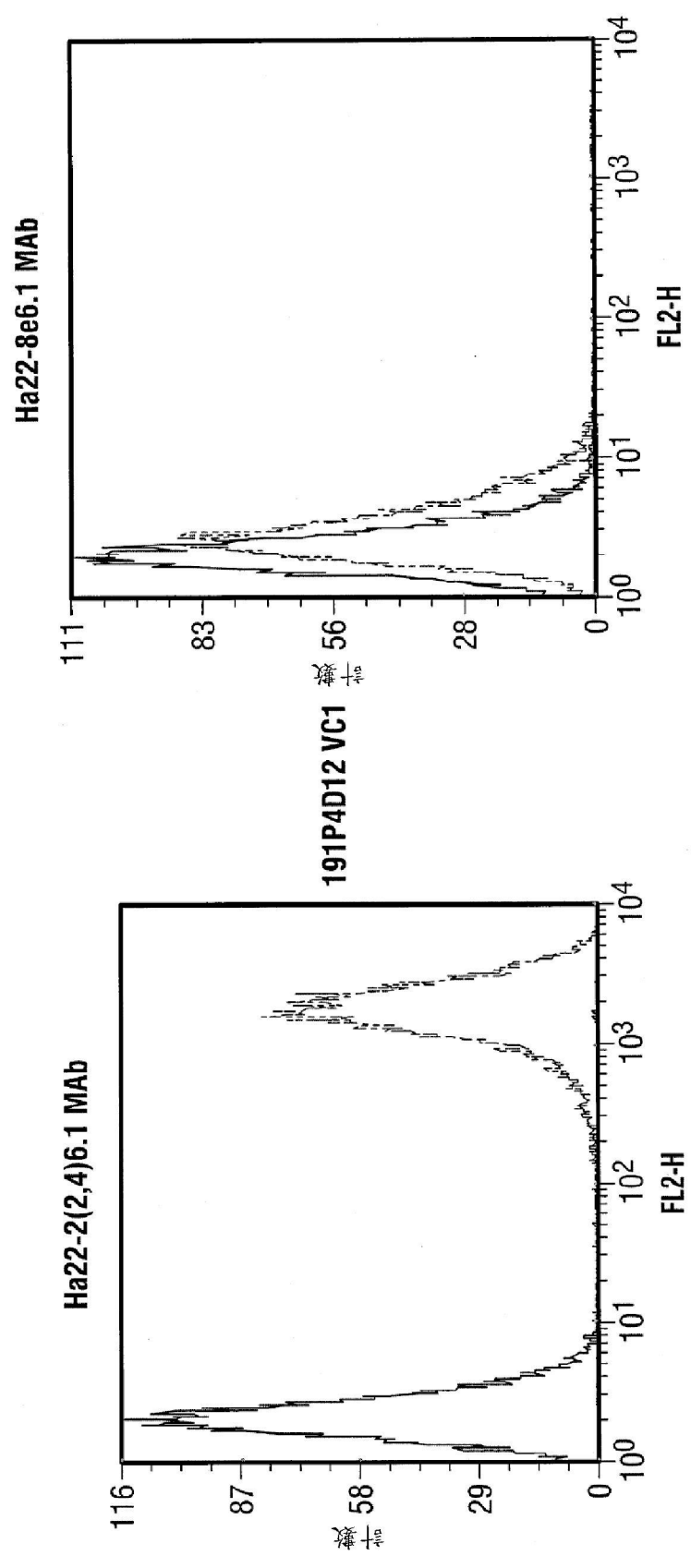
【圖 9C】



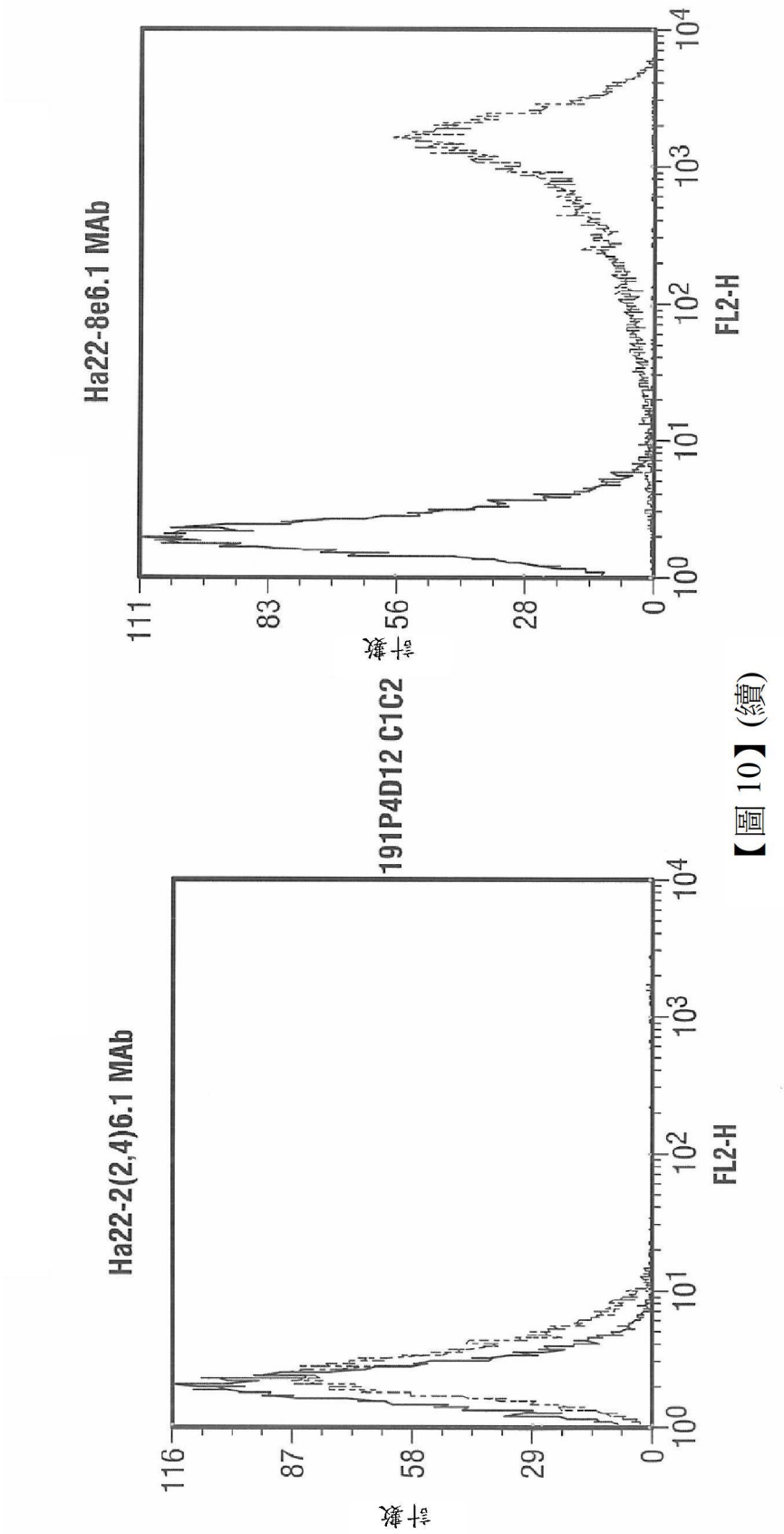
【圖 9D】



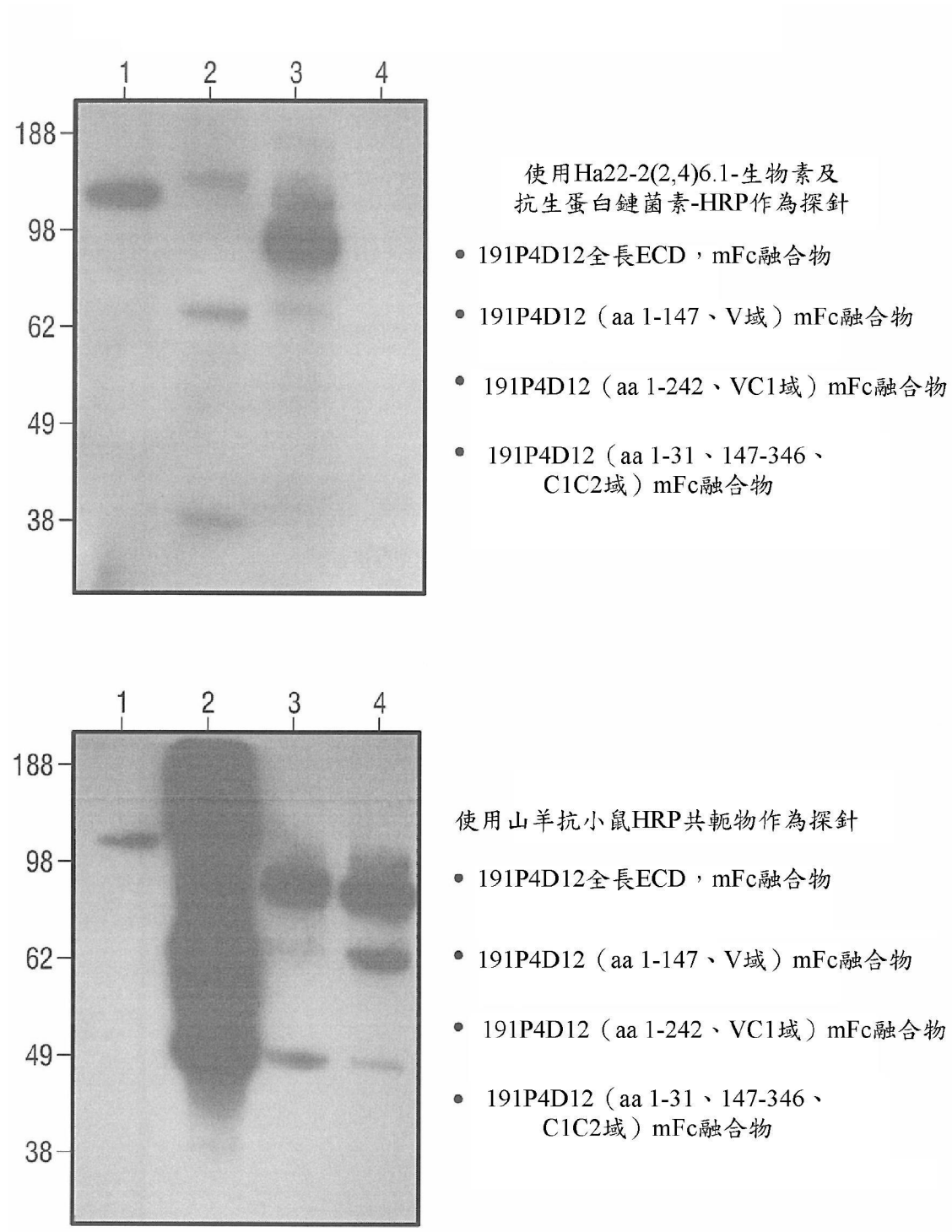
【圖 10】



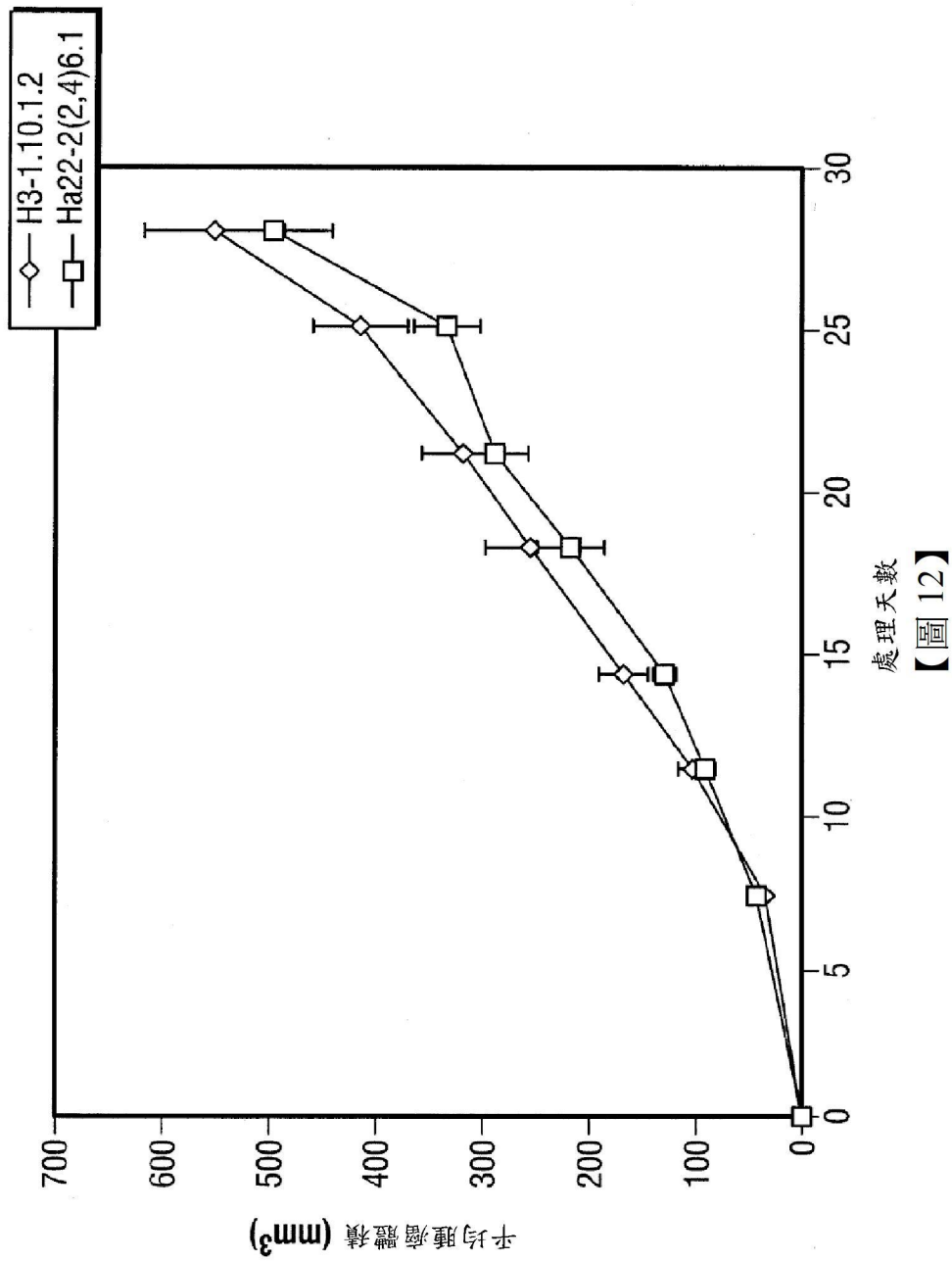
【圖 10】(續)

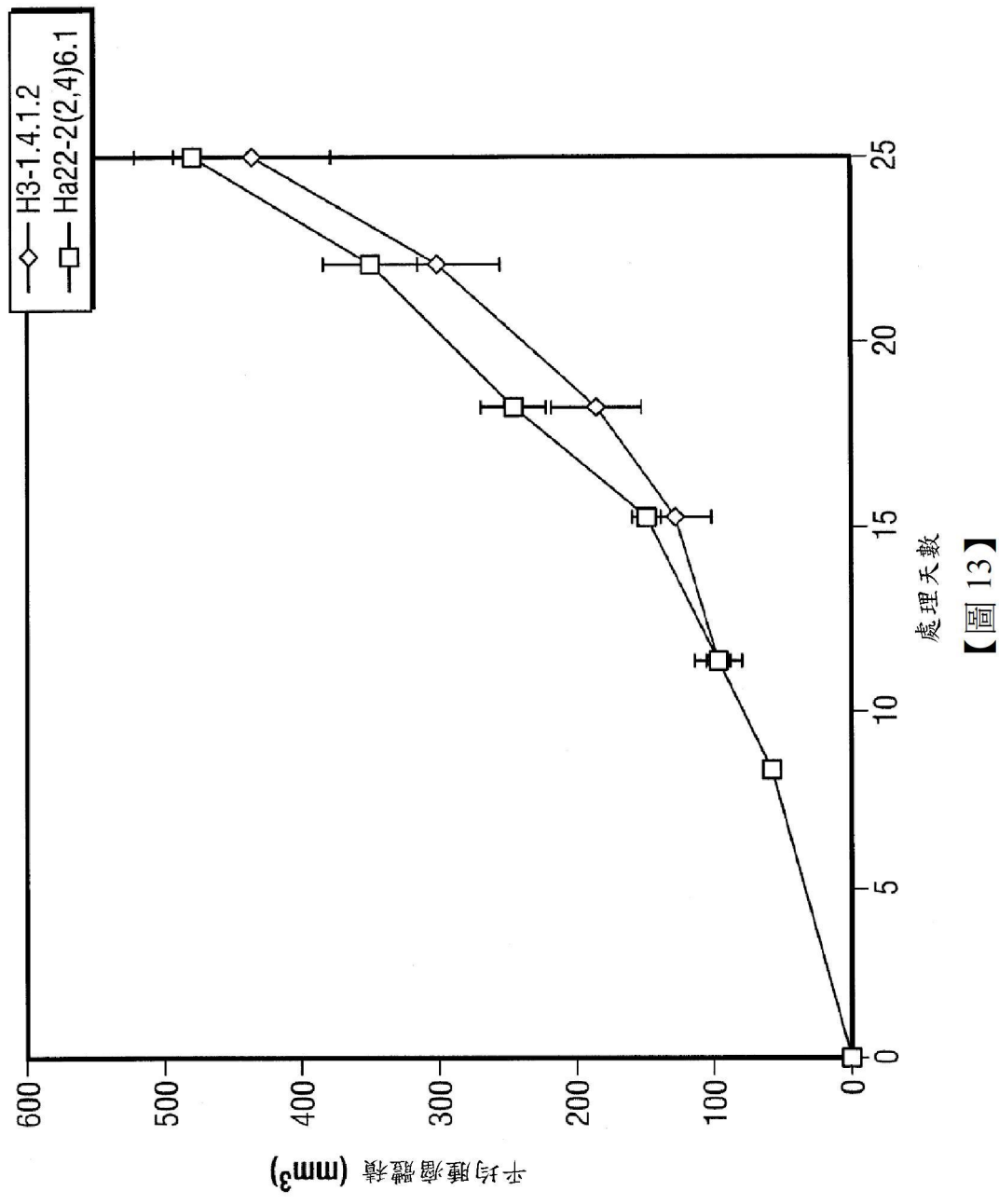


【圖 10】(續)

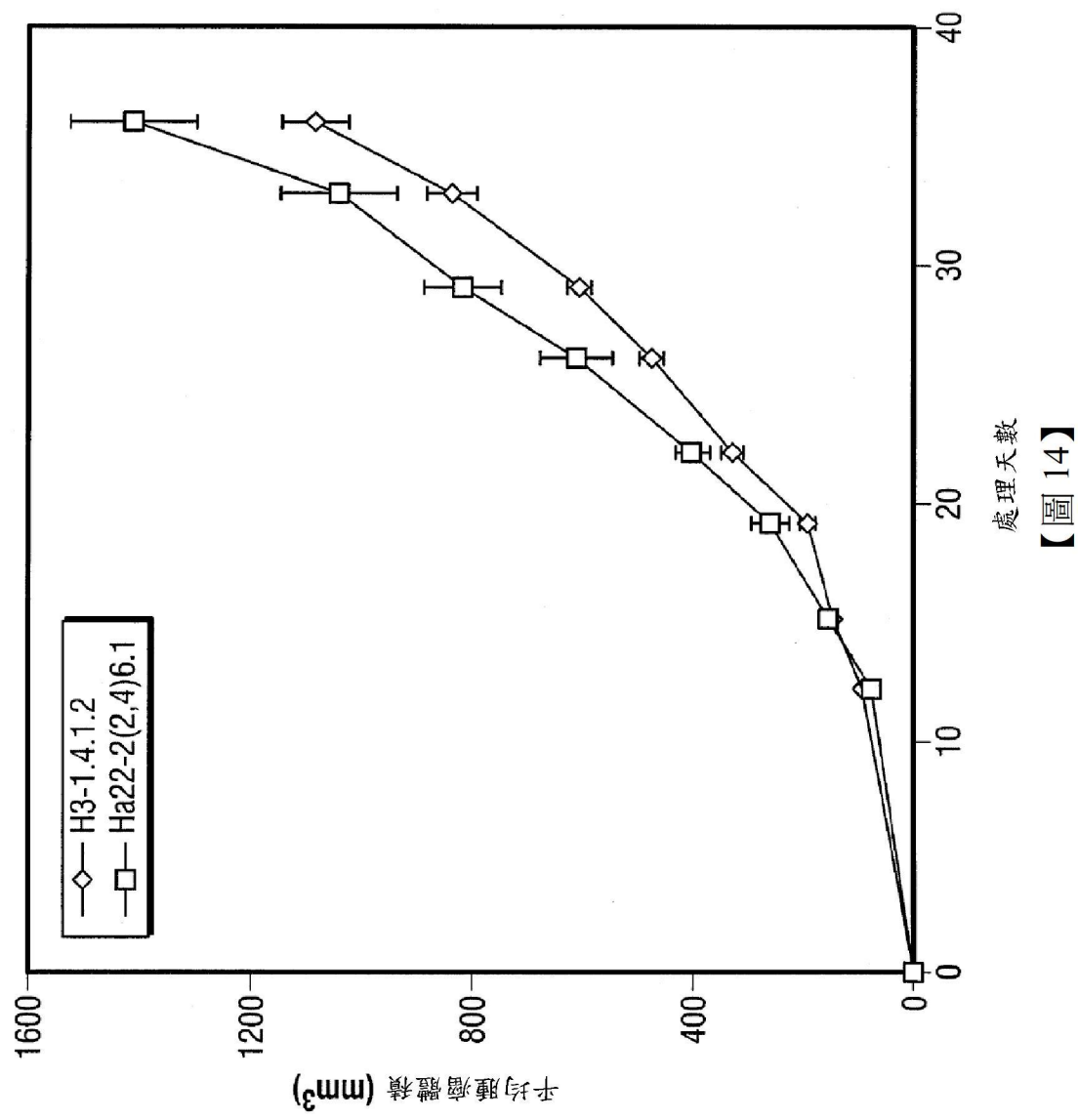


【圖 11】

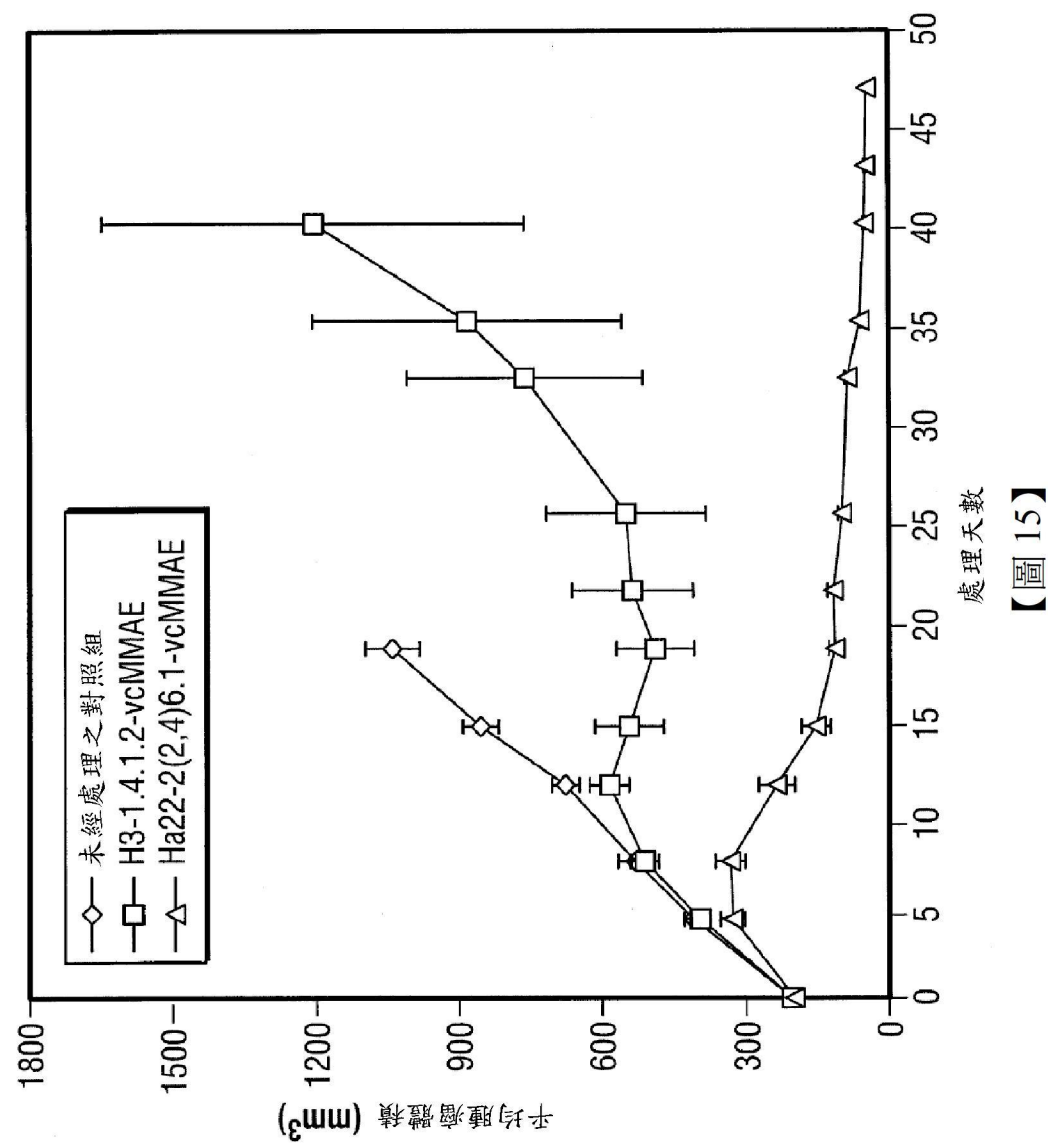


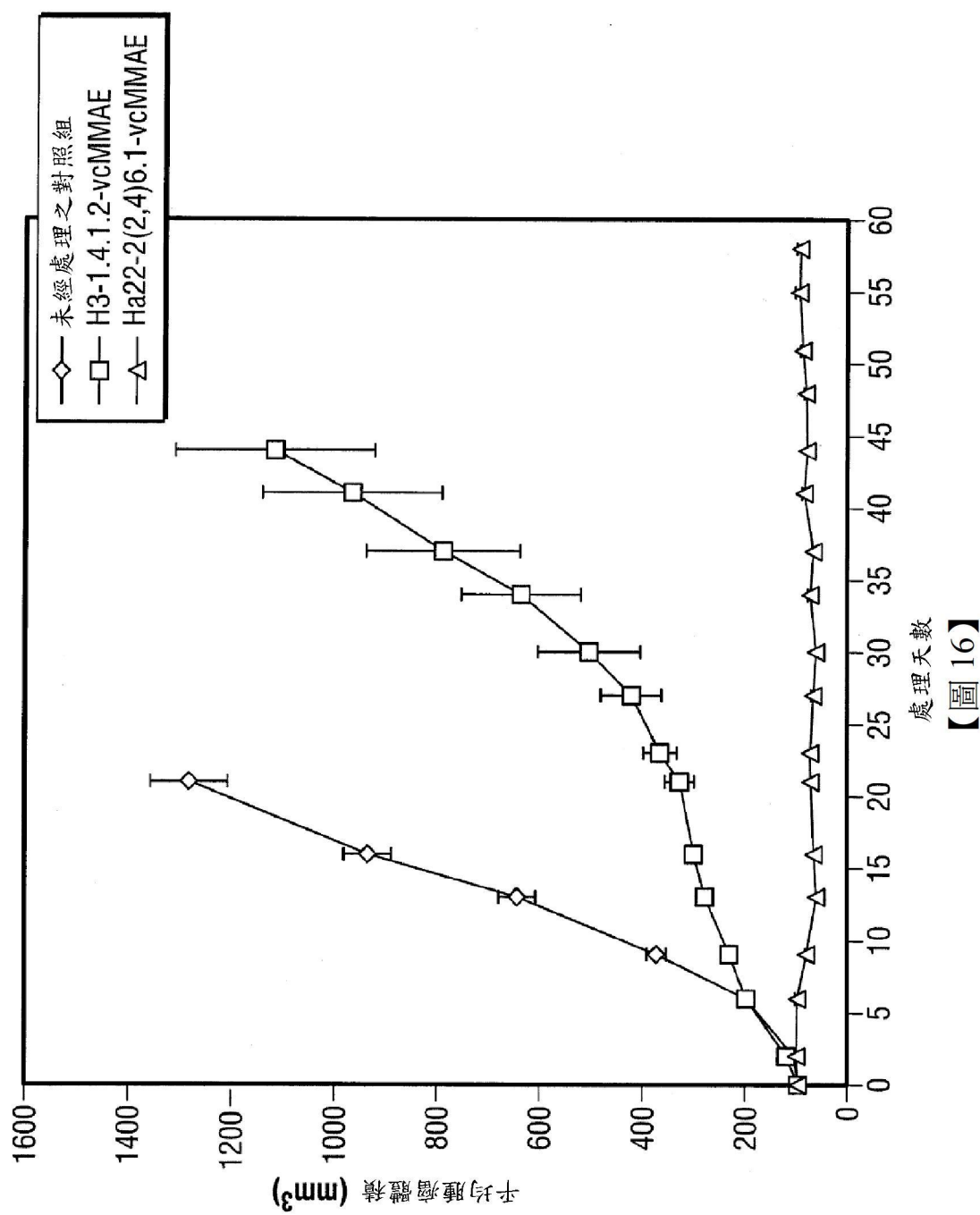


【圖 13】

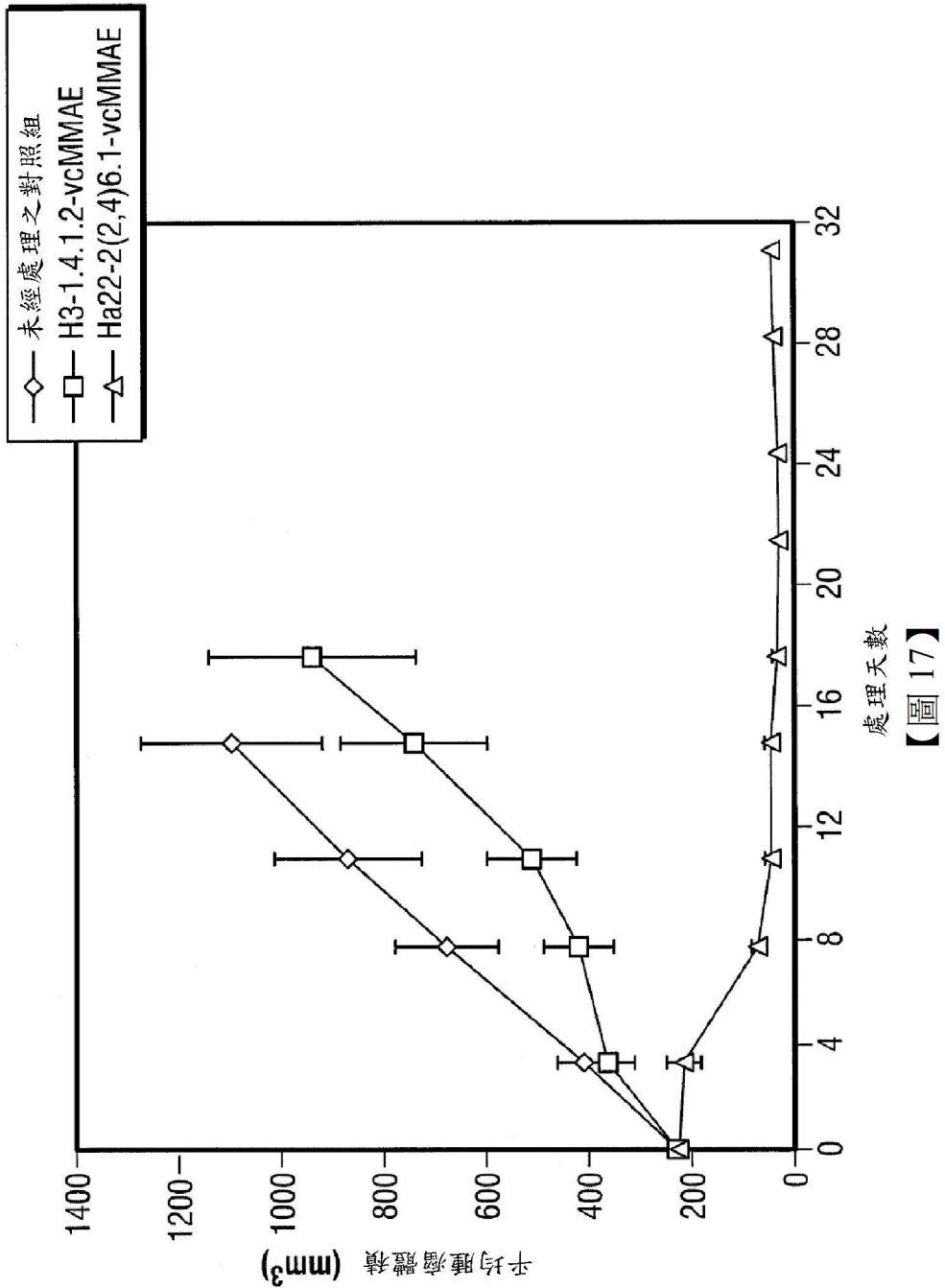


【圖 14】

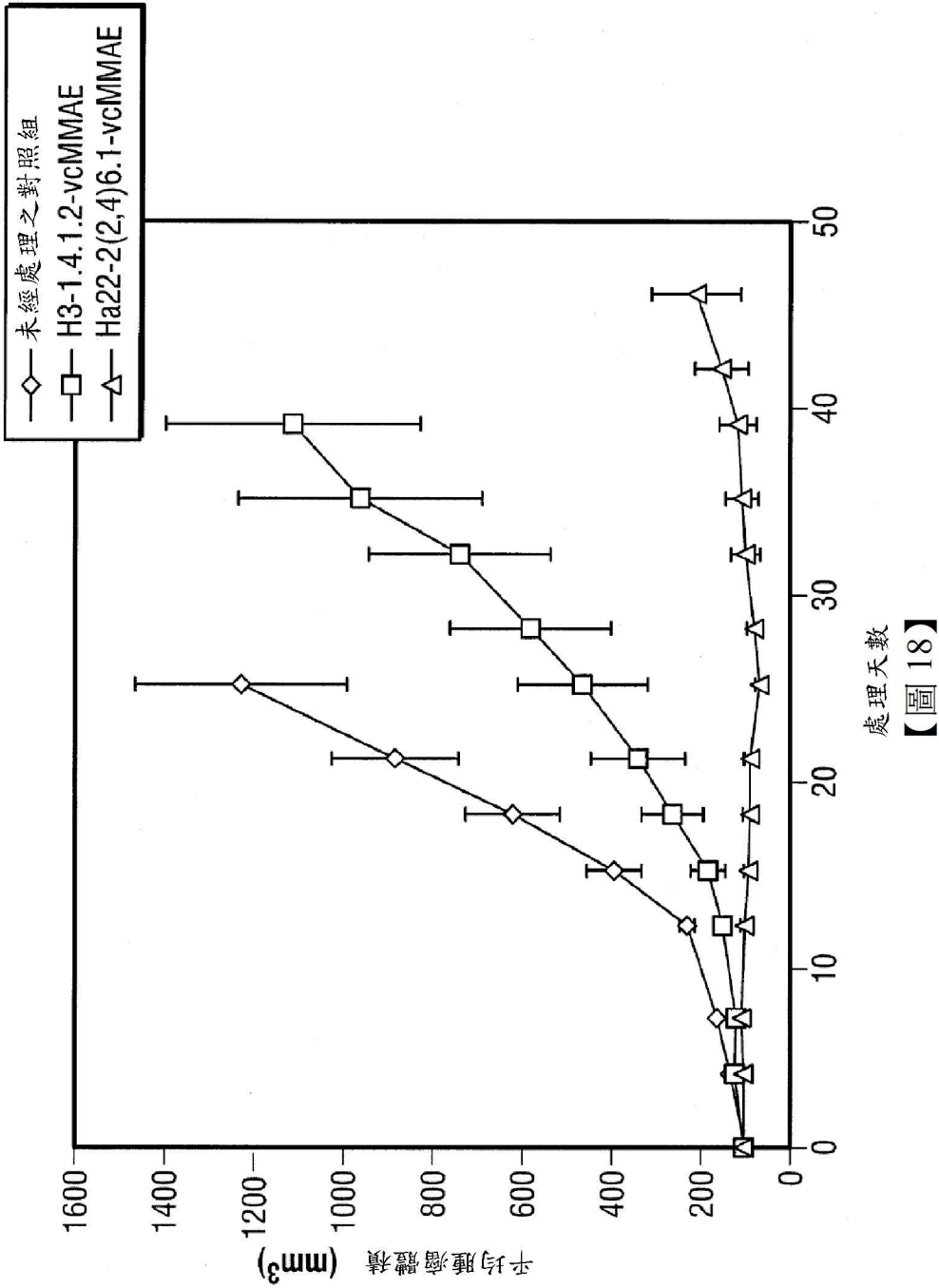




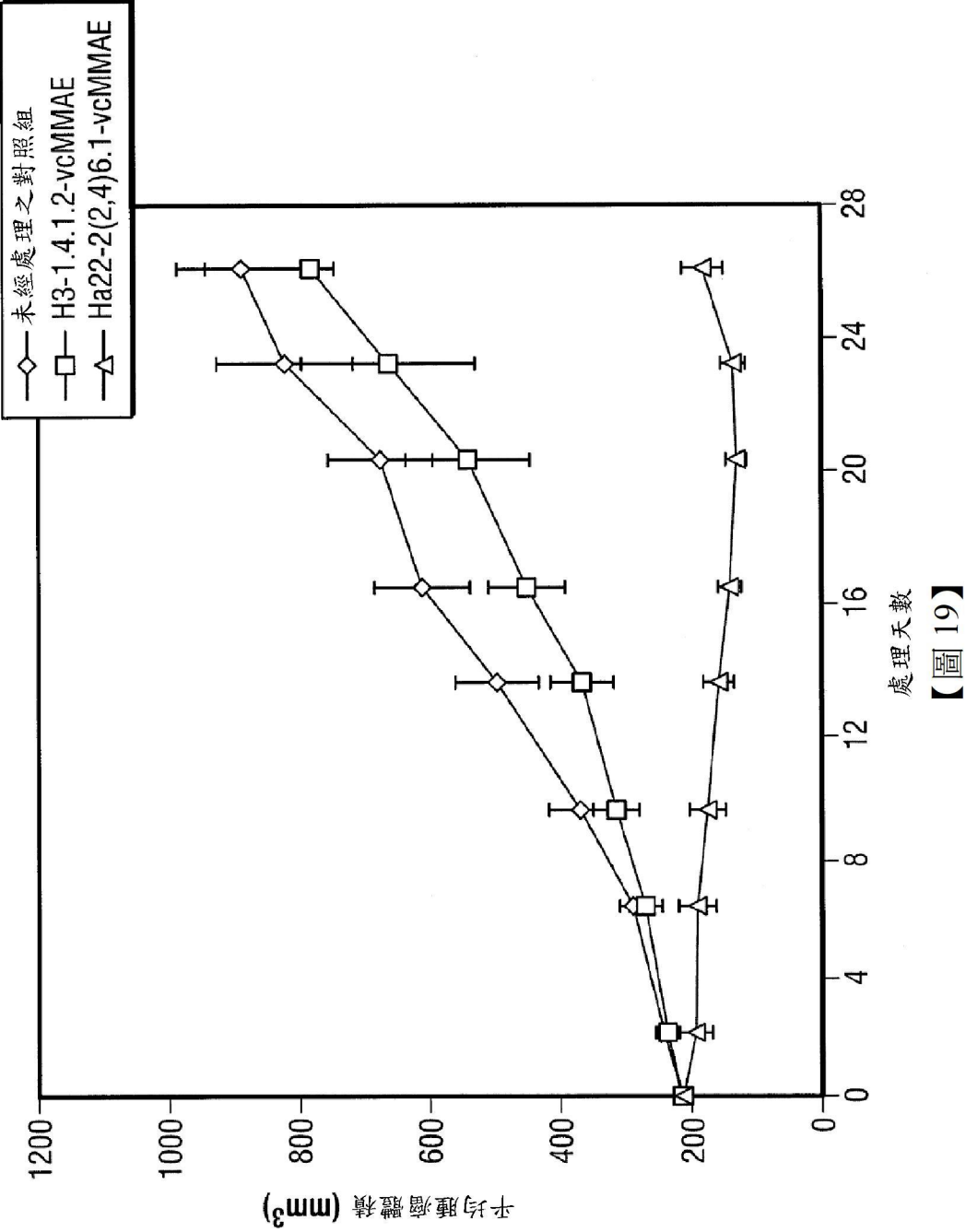
處理天數
【圖 16】



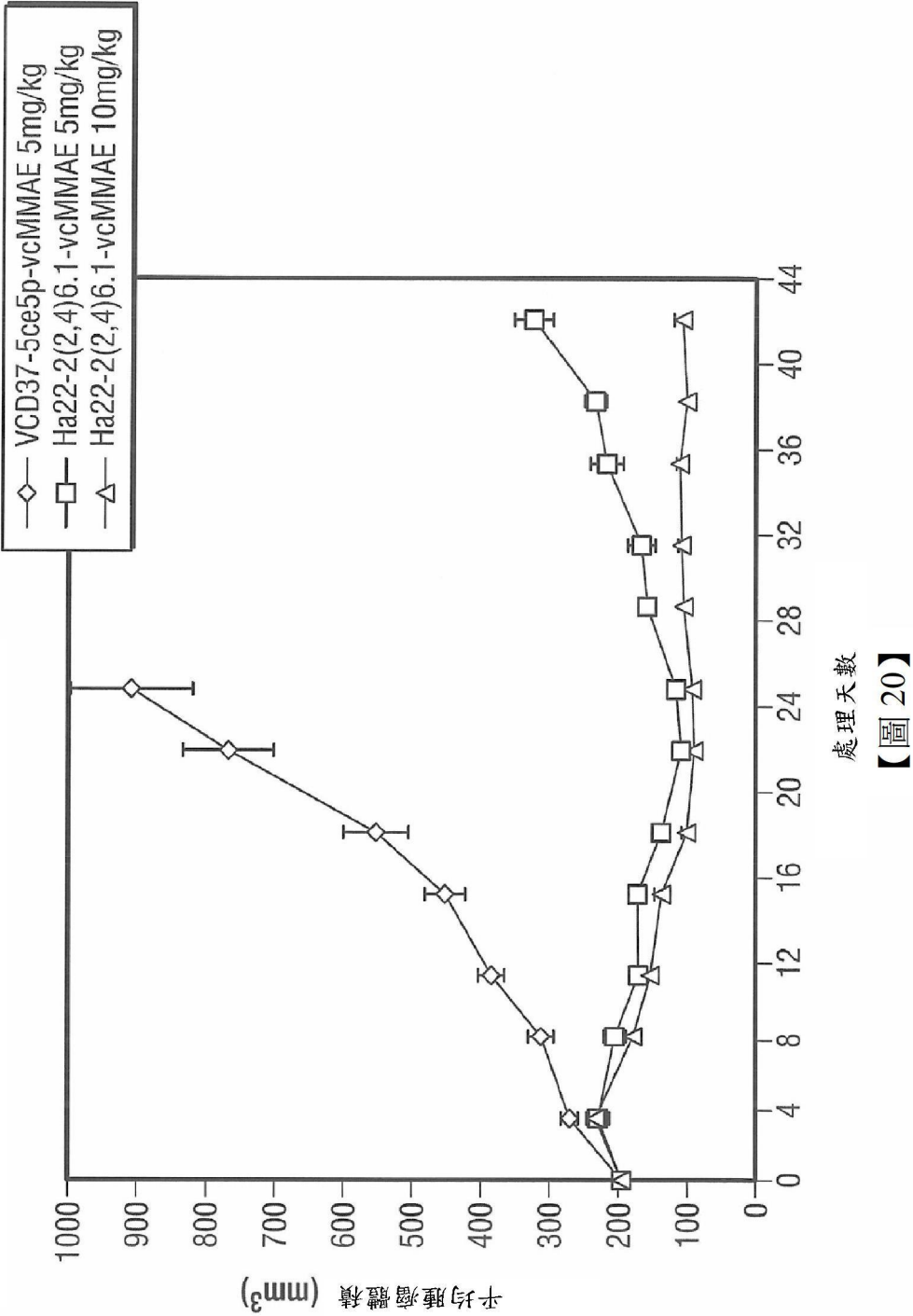
【圖 17】



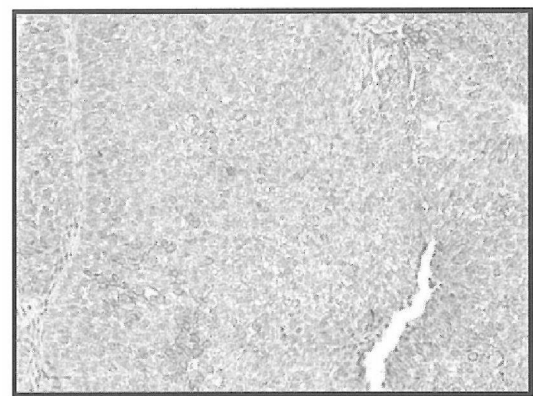
【圖 18】



【圖 19】



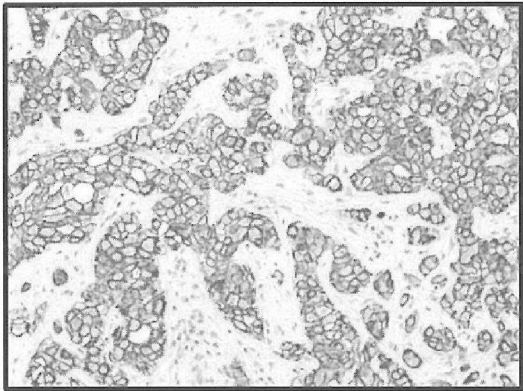
處理天數
【圖 20】



【圖 21A】



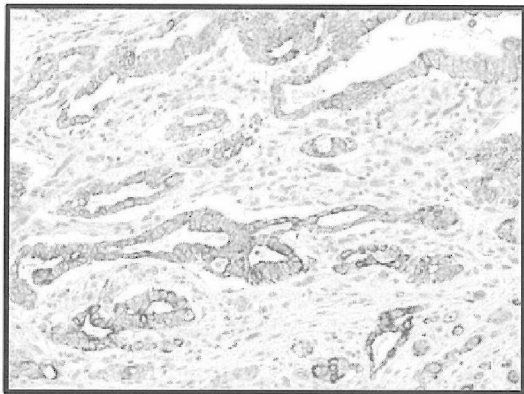
【圖 21B】



【圖 21C】



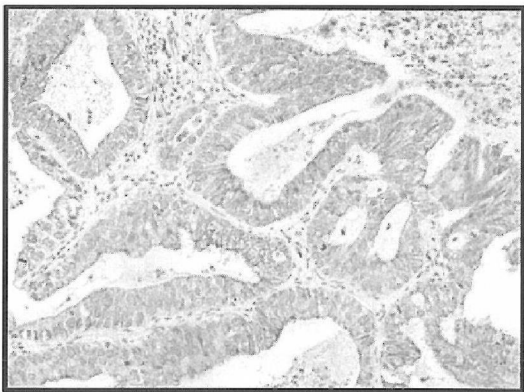
【圖 21D】



【圖 21E】



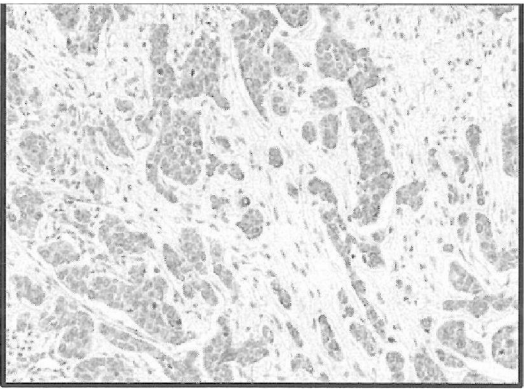
【圖 21F】



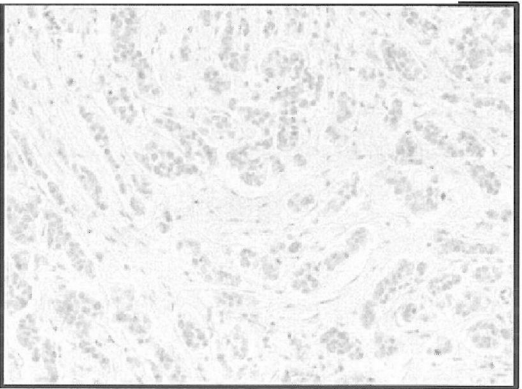
【圖 21G】



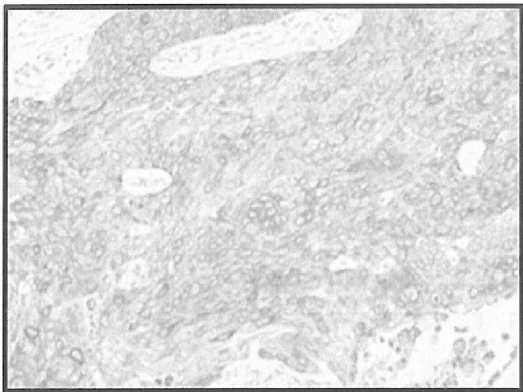
【圖 21H】



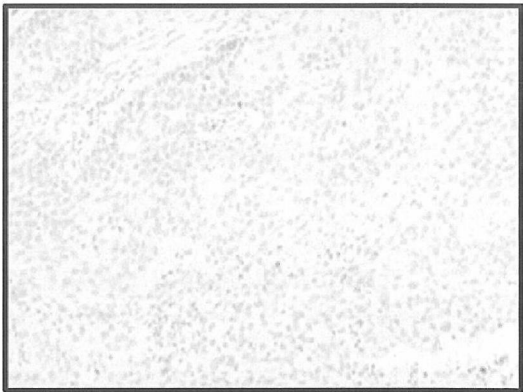
【圖 21I】



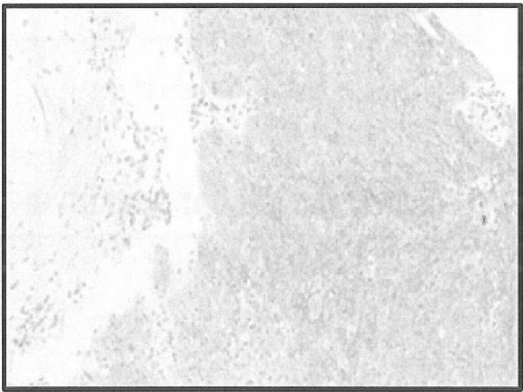
【圖 21J】



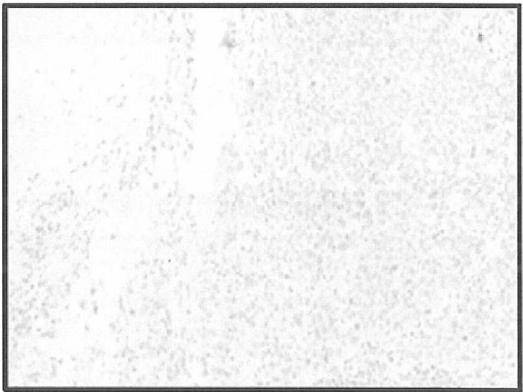
【圖 21K】



【圖 21L】



【圖 21M】



【圖 21N】