202214691

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202214691 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：110118262 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 03 月 20 日

(51)Int. Cl.： *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
*A61K47/68 (2017.01)* *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2014/03/21 美國 61/968,819

(71)申請人：美商艾伯維有限公司 (美國) ABBVIE INC. (US)
美國

(72)發明人：賴里 艾德華 B REILLY, EDWARD B. (US)；菲力浦斯 安德魯 C PHILLIPS, ANDREW C. (GB)；班那吐爾 洛瑞歐 BENATUIL, LORENZO (VE)；布恰南 福瑞茲 G BUCHANAN, FRITZ G. (US)；慕爾布羅克 強納森 A MEULBROEK, JONATHAN A. (US)；薛 俊明 HSIEH, CHUNG-MING (US)；皮瑞茲 珍妮佛 PEREZ, JENNIFER (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：5 項 圖式數：21 共 311 頁

(54)名稱

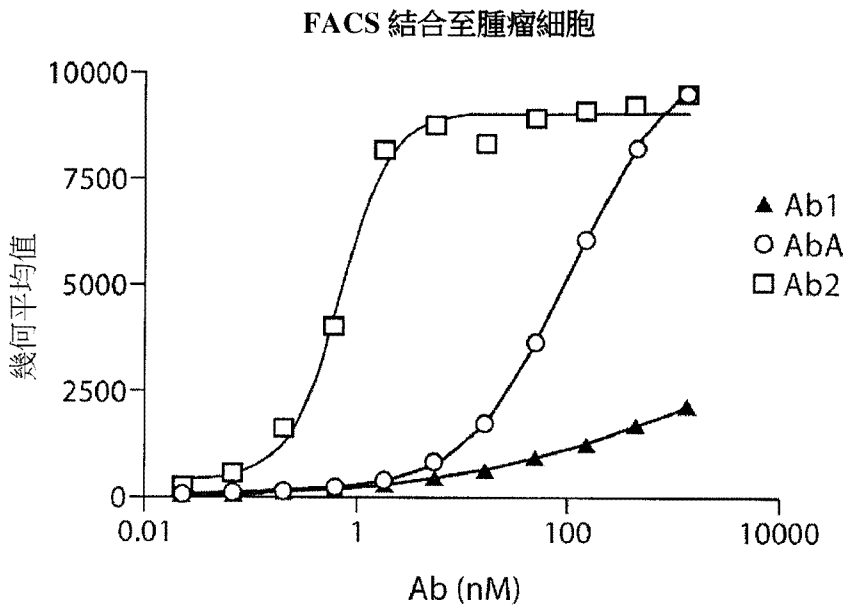
抗-EGFR 抗體及抗體藥物結合物

(57)摘要

本發明係關於抗表皮生長因子(EGFR)抗體及抗體藥物結合物(ADC)，其包括使用該等抗體及 ADC 之組合物及方法。

The invention relates to anti-epidermal growth factor (EGFR) antibodies and antibody drug conjugates (ADCs), including compositions and methods of using said antibodies and ADCs.

指定代表圖：


FACS 結合至腫瘤細胞
10000
7500
5000
2500
0
幾何平均值
0.01
1
100
10000
Ab (nM)
Ab1
AbA
Ab2

【圖 4】

20221210
2022H1406H
專利案號：110118262
原申請案號：108148404

# 【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗-EGFR抗體及抗體藥物結合物

【英文發明名稱】

ANTI-EGFR ANTIBODIES AND ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明係關於抗表皮生長因子(EGFR)抗體及抗體藥物結合物(ADC)，其包括使用該等抗體及ADC之組合物及方法。

【英文】

The invention relates to anti-epidermal growth factor (EGFR) antibodies and antibody drug conjugates (ADCs), including compositions and methods of using said antibodies and ADCs.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

# 【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗-EGFR抗體及抗體藥物結合物

【英文發明名稱】

ANTI-EGFR ANTIBODIES AND ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【技術領域】

【先前技術】

人類表皮生長因子受體(亦稱為HER-1或ErbB-1，且在本文中稱為「EGFR」)係由c-erbB原癌基因編碼之170 kDa跨膜受體，且展現固有酪胺酸激酶活性(Modjtahedi等人，Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)；Herbst及Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002))。SwissProt資料庫條目P00533提供人類EGFR之序列。EGFR經由酪胺酸激酶介導之信號轉導路徑(包括但不限於控制細胞增殖、分化、細胞存活、細胞凋亡、血管生成、致有絲分裂及轉移之信號轉導路徑之活化)調節多種細胞過程(Atalay等人，Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003)；Tsao及Herbst, Signal 4:4-9 (2003)；Herbst及Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)；Modjtahedi等人，Br. J. Cancer 73:228-235 (1996))。

EGFR之已知配體包括EGF、TGFA/TGF-α、雙調蛋白、表皮素(epigen)/EPGN、BTC/β-細胞素(betacellulin)、表皮調節素/EREG及HBEGF/結合肝素之EGF。EGFR之配體結合觸發受體同二聚化及/或異二聚化及關鍵細胞質殘基之自磷酸化。磷酸化EGFR募集如GRB2之轉接蛋白，其繼而活化複合下游信號傳導級聯，包括至少以下主要下游信號傳導

級聯：RAS-RAF-MEK-ERK、PI3激酶-AKT、PLCγ-PKC及STAT模組。此自磷酸化亦藉由若干種經由其自身結合磷酸酪胺酸之SH2結構域與磷酸化酪胺酸結合之其他蛋白質引發下游活化及信號傳導。該等下游信號傳導蛋白質起始導致細胞增殖之若干信號轉導級聯，主要係MAPK、Akt及JNK路徑。EGFR之配體結合亦可活化NF-κ-B信號傳導級聯。配體結合亦直接磷酸化如RGS16之其他蛋白質，活化其GTP酶活性並可能偶合EGF受體信號傳導與G蛋白偶合受體信號傳導。配體結合亦磷酸化MUC1且增強其與SRC及CTNNB1/β-連環蛋白之相互作用。

已在多種人類惡性病況(包括膀胱、腦、頭及頸、胰臟、肺、乳房、卵巢、結腸、前列腺及腎之癌症)中報導EGFR之過表現。(Atalay等人，Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003)；Herbst及Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)；及Modjtahedi等人，Br. J. Cancer 73:228-235 (1996))。在多種該等病況中，EGFR之過表現與患者之較差預後相關聯或相結合。(Herbst及Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)；及Modjtahedi等人，Br. J. Cancer 73:228-235 (1996))。EGFR亦表現於正常組織(尤其皮膚、肝及胃腸道之上皮組織)中，但表現程度一般低於惡性細胞(Herbst及Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002))。

大多數含有EGFR基因擴增(即，EGFR基因之多個拷貝)之腫瘤亦共表現截短形式之受體(Wikstrand等人(1998) J. Neurovirol. 4, 148-158)，稱為de2-7 EGFR、ΔEGFR、EGFRvIII或Δ2-7 (該等術語在本文中可互換使用) (Olapade-Olaopa等人(2000) Br. J. Cancer. 82, 186-94)。在de2-7 EGFR中所見之重排產生缺少跨越外顯子2-7之801個核苷酸之框架內成熟mRNA (Wong等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 2965-9；

Yamazaki等人(1990) Jpn. J. Cancer Res. 81, 773-9；Yamazaki等人(1988) Mol. Cell. Biol. 8, 1816-20；及Sugawa等人(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 8602-6)。相應EGFR蛋白具有267個胺基酸缺失，包含細胞外結構域之殘基6-273及融合接頭處之新穎甘胺酸殘基(Sugawa等人，1990)。此缺失與甘胺酸殘基之插入一起在缺失界面處產生獨特接頭肽(Sugawa等人，1990)。

已在多個腫瘤類型中報導EGFRvIII，包括神經膠質瘤、乳房、肺、卵巢及前列腺腫瘤(Wikstrand等人(1997) Cancer Res. 57, 4130-40；Olapade-Olaopa等人(2000) Br. J. Cancer. 82, 186-94；Wikstrand等人(1995) Cancer Res. 55, 3140-8；Garcia de Palazzo等人(1993) Cancer Res. 53, 3217-20)。儘管此截短受體不結合配體，但其具有低組成型活性且賦予作為腫瘤異種移植物在裸鼠中生長之神經膠質瘤細胞顯著生長優點(Nishikawa等人(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-31)且能轉變NIH3T3細胞(Batra等人(1995) Cell Growth Differ. 6, 1251-9)及MCF-7細胞。神經膠質瘤細胞中之de2-7 EGFR利用之細胞機制並未充分定義但經報導包括細胞凋亡之減少(Nagane等人(1996) Cancer Res. 56, 5079-86)及增殖之少量增強(Nagane等人，1996)。由於此截短受體之表現受限於腫瘤細胞，故其代表抗體療法之高度特異性靶。

抗體藥物結合物(ADC)代表包含經由化學連接體結合至細胞毒性藥物之抗體之新型治療劑。ADC之治療概念係組合抗體與藥物之結合能力，其中使用抗體藉助與靶表面抗原之結合將藥物遞送至腫瘤細胞。

因此，業內仍需要可在癌症治療中用於治療目的之抗-EGFR抗體及ADC。

【發明內容】

在某些態樣中，本發明提供特異性結合至EGFRvIII之抗-EGFR抗體及抗體藥物結合物(ADC)。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗人類表皮生長因子受體(抗-hEGFR)抗體或其抗原結合部分，其結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)內之表位或在競爭性結合分析中與第二抗-hEGFR抗體競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID NO: 33)，其中該第二抗-EGFR抗體包含包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域；該抗體以約$1 \times 10^{-6}$ M或更低之解離常數($K_d$)結合至EGFR(1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定；且該抗體在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體以至少約50%之腫瘤生長抑制%(TGI%)抑制腫瘤生長，其中該人類IgG抗體在NSCLC異種移植物分析中係以與該抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分相同之劑量及頻率投與。

在本發明之某些實施例中，抗體或其抗原結合部分以介於約$1 \times 10^{-6}$ M與約$1 \times 10^{-10}$ M之間之$K_d$結合至EGFR (1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定。

在本發明之其他實施例中，抗體或其抗原結合部分以介於約$1 \times 10^{-6}$ M與約$1 \times 10^{-7}$ M之間之$K_d$結合至EGFR (1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定。

在某些實施例中，本發明之抗體或其抗原結合部分以約$8.2 \times 10^{-9}$ M或更低之$K_d$結合至EGFRvIII (SEQ ID NO: 33)，如藉由表面電漿共振所

測定。在其他實施例中，抗體或其抗原結合部分以介於約$8.2 \times 10^{-9}$ M與約$6.3 \times 10^{-10}$ M之間之$K_d$結合至EGFRvIII (SEQ ID NO: 33)，如藉由表面電漿共振所測定。在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分以介於約$8.2 \times 10^{-9}$ M與約$2.0 \times 10^{-9}$ M之間之$K_d$結合至EGFRvIII (SEQ ID NO: 33)，如藉由表面電漿共振所測定。

在本發明之其他實施例中，抗體或其抗原結合部分在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制至少約60%。

在某些實施例中，本發明之特徵在於抗體或其抗原結合部分，其在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制至少約70%。在某些實施例中，抗體或其抗原結合部分在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制至少約80%。

在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含包含SEQ ID NO: 12中所述胺基酸序列之重鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11中所述胺基酸序列之重鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10中所述胺基酸序列之重鏈CDR1結構域；以及包含SEQ ID NO: 8中所述胺基酸序列之輕鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7中所述胺基酸序列之輕鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6中所述胺基酸序列之輕鏈CDR1結構域。在另一實施例中，抗體或其抗原結合部分包含包含SEQ ID NO: 9中所述胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。在另一實施例中，抗體或其抗原結合部分包含包含SEQ ID NO: 15中所述胺基酸序列之重鏈及包含SEQ ID NO: 13中所述胺基酸序列之輕鏈。

本發明亦在某些實施例中包括抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分，其包含包含SEQ ID NO: 40中所述胺基酸序列之輕鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 39中所述胺基酸序列之輕鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 38中所述胺基酸序列之輕鏈CDR1結構域；以及包含SEQ ID NO: 37中所述胺基酸序列之重鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 36中所述胺基酸序列之重鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 35中所述胺基酸序列之重鏈CDR1結構域。

在某些實施例中，本發明之特徵在於抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分，其包含包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之重鏈可變區：50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76及78；及包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之輕鏈可變區：51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77及79。

在其他實施例中，本發明包括抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分，其包含選自由以下組成之群之重鏈CDR組(CDR1、CDR2及CDR3)：SEQ ID NO: 10、11及12；SEQ ID NO: 16、17及18；SEQ ID NO: 10、11及19；SEQ ID NO: 20、11及12；SEQ ID NO: 21、3及22；SEQ ID NO: 16、17及19；SEQ ID NO: 2、3及4；SEQ ID NO: 10、3及12；SEQ ID NO: 80、11及18；SEQ ID NO: 80、3及18；SEQ ID NO: 20、3及12；SEQ ID NO: 80、11及12；及SEQ ID NO: 81、11及22；及選自由以下組成之群之輕鏈CDR組(CDR1、CDR2及CDR3)：SEQ ID NO: 6、7及8；SEQ ID NO: 23、24及25；SEQ ID NO: 26、27及28；SEQ ID NO: 29、30及31；SEQ ID NO: 6、7及84；SEQ ID NO: 82、83及31；及SEQ ID NO: 82、27及85，其中該抗體或其抗原結合部分不包含SEQ ID NO: 2、

3及4之重鏈CDR組以及SEQ ID NO: 6、7及8之輕鏈CDR組二者。在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含包含SEQ ID NO: 41中所述胺基酸序列之重鏈恆定區及/或包含SEQ ID NO: 43中所述胺基酸序列之輕鏈恆定區。

在本發明之一些實施例中，抗體或其抗原結合部分包含選自由以下組成之群之重鏈免疫球蛋白恆定結構域：人類IgG恆定結構域、人類IgM恆定結構域、人類IgE恆定結構域及人類IgA恆定結構域。在一些實施例中，IgG恆定結構域選自由以下組成之群：IgG1恆定結構域、IgG2恆定結構域、IgG3恆定結構域及IgG4恆定結構域。在其他實施例中，抗體係多特異性抗體。

在本發明之其他實施例中，抗體或其抗原結合部分包含Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫鍵連接之Fv、scFv、單一結構域抗體及雙價抗體。

在本發明之其他實施例中，抗體或其抗原結合部分結合至成像劑。在本發明之某些實施例中，成像劑選自由以下組成之群：放射標記、酶、螢光標記、發光標記、生物發光標記、磁性標記及生物素。在本發明之其他實施例中，放射標記係銦。在其他實施例中，本發明包括醫藥組合物，其包含抗體或其抗原結合部分及醫藥上可接受之載劑。

本發明亦在一些實施例中包括抗體藥物結合物(ADC)，其包含結合至至少一種藥物之本文所述之抗體或其抗原結合部分。在某些實施例中，抗體係抗人類表皮生長因子受體(抗-hEGFR)抗體或其抗原結合部分，其結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)內之表位或在競爭性結合分析中與第二抗-hEGFR抗體競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID NO: 33)，其中該第二抗-EGFR抗體包含

包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域；該抗體以約1 × $10^{-6}$ M或更低之解離常數($K_d$)結合至EGFR(1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定；且該抗體在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體以至少約50%之腫瘤生長抑制% (TGI%)抑制腫瘤生長，其中該人類IgG抗體在NSCLC異種移植物分析中係以與該抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分相同之劑量及頻率投與。在本發明之一個實施例中，至少一種藥物選自由以下組成之群：抗細胞凋亡劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、用於基因療法之核酸、烷基化劑、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼藥劑、化學保護劑、激素藥劑、抗激素藥劑、皮質類固醇、光活性治療劑、寡核苷酸、放射性核種劑、放射致敏劑、拓撲異構酶抑制劑及酪胺酸激酶抑制劑。在某些實施例中，有絲分裂抑制劑係多拉斯他汀(dolastatin)、奧裡斯他汀(auristatin)、類美登素(maytansinoid)及植物鹼。奧裡斯他汀之實例係單甲基奧裡斯他汀F (MMAF)或單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)。類美登素之實例包括(但不限於) DM1、DM2、DM3及DM4。在某些實施例中，抗腫瘤抗生素選自由以下組成之群：放線菌素(actinomycine)、蒽環、卡奇黴素(calicheamicin)及多卡米星(duocarmycin)。在某些實施例中，放線菌素係吡咯并苯并二氮平(PBD)。在其他實施例中，本發明包括醫藥組合物，其包含包含複數種本文所述ADC之ADC混合物及醫藥上可接受之載劑。在某些實施例中，ADC混合物之平均藥物對抗體比率(DAR)為2至4。在其他實施例中，ADC混合物包含DAR各為2至8之ADC。在某些實施例中，ADC混合物之平均藥物對抗體(DAR)為約2.4至約3.6。

在某些實施例中，本發明包括治療患有癌症之個體之方法，其包含將本文所述醫藥組合物投與該個體，使得該患有癌症之個體受到治療。在一個實施例中，癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、神經膠母細胞瘤、前列腺癌、胰臟癌、結腸癌、頭頸癌及腎癌。在一個實施例中，癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、神經膠母細胞瘤、前列腺癌、胰臟癌、結腸癌、結腸直腸癌、頭頸癌、間皮瘤、腎癌、鱗狀細胞癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。在一個實施例中，癌症係乳癌。在一個實施例中，癌症係肺癌。在一個實施例中，癌症係前列腺癌。在一個實施例中，癌症係胰臟癌。在一個實施例中，癌症係結腸癌。在一個實施例中，癌症係頭頸癌。在一個實施例中，癌症係腎癌。在一個實施例中，癌症係結腸直腸癌。在一個實施例中，癌症係間皮瘤。在一個實施例中，癌症係鱗狀細胞癌。在一個實施例中，癌症係三陰性乳癌。在一個實施例中，癌症係非小細胞肺癌。在某些實施例中，鱗狀細胞癌係鱗狀肺癌或鱗狀頭頸癌。

在另一實施例中，癌症含有EGFR之擴增或過表現EGFR。在某些實施例中，癌症之特徵為具有EGFR過表現。在某些實施例中，癌症之特徵為具有EGFR擴增。

本發明在某些實施例中進一步包括在患有實體腫瘤之個體中抑制或降低實體腫瘤生長之方法，其包含將本文所述醫藥組合物投與患有實體腫瘤之個體，使得實體腫瘤生長受到抑制或降低。在某些實施例中，實體腫瘤之特徵為具有EGFR過表現。在某些實施例中，實體腫瘤之特徵為具有EGFR擴增。

在本發明之一個實施例中，本發明提供在患有實體腫瘤之個體中抑制或降低實體腫瘤生長之方法，其包含向患有實體腫瘤之個體投與有效量

之本文所述抗體或ADC，使得實體腫瘤生長受到抑制或降低。

在某些實施例中，實體腫瘤係表現EGFR之實體腫瘤或EGFRvIII陽性實體腫瘤。在其他實施例中，實體腫瘤係非小細胞肺癌或神經膠母細胞瘤。在其他實施例中，實體腫瘤係鱗狀細胞癌。

在某些實施例中，本發明包括治療患有癌症之個體之方法，其包含將本文所述醫藥組合物與額外藥劑或額外療法組合投與該個體。在某些實施例中，額外藥劑選自由以下組成之群：抗PD1抗體(例如，派姆單抗(pembrolizumab) (Keytruda®)或尼沃魯單抗(nivolumab))、抗CTLA-4抗體(例如，伊匹單抗(ipilimumab))、依魯替尼(ibrutinib)、杜維裡斯(duvelisib)、艾代拉裡斯(idelalisib)、維尼托克萊克斯(venetoclax)及替莫唑胺(temozolomide)。在某些實施例中，額外療法係輻射。在某些實施例中，額外藥劑係抗PD1抗體(例如，派姆單抗(Keytruda®)或尼沃魯單抗)。在某些實施例中，額外藥劑係抗CTLA-4抗體(例如，伊匹單抗)。在某些實施例中，額外藥劑係依魯替尼。在某些實施例中，額外藥劑係杜維裡斯。在某些實施例中，額外藥劑係艾代拉裡斯。在某些實施例中，額外藥劑係維尼托克萊克斯。在某些實施例中，額外藥劑係替莫唑胺。

本發明在某些實施例中亦提供分離核酸，其編碼抗體或其抗原結合部分(如本文所述者)。此外，本發明包括包含核酸之載體及包含載體之宿主細胞(例如原核或真核細胞(例如，動物細胞、原生生物細胞、植物細胞及真菌細胞)。在本發明之實施例中，動物細胞選自由以下組成之群：哺乳動物細胞、昆蟲細胞及禽類細胞。在一個實施例中，哺乳動物細胞選自由以下組成之群：CHO細胞、COS細胞及Sp2/0細胞。

在某些實施例中，本發明之特徵在於抗-hEGFR抗體藥物結合物

(ADC)，其包含結合至奧裡斯他汀之抗-hEGFR抗體，其中該抗體包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之重鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之重鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之重鏈CDR1結構域；以及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之輕鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之輕鏈CDR1結構域。在一個實施例中，抗體包含包含SEQ ID NO: 9中所述胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之輕鏈可變區。在另一實施例中，抗體包含IgG重鏈免疫球蛋白恆定結構域。在另一實施例中，IgG係IgG1或IgG4重鏈免疫球蛋白恆定結構域。

在一個實施例中，本發明包括ADC，其中奧裡斯他汀係單甲基奧裡斯他汀F (MMAF)或單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)。在一個實施例中，本發明包括ADC，其中奧裡斯他汀係單甲基奧裡斯他汀F (MMAF)。在一個實施例中，本發明包括ADC，其中奧裡斯他汀係單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)。

在另一實施例中，本發明包括包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之重鏈，且包含包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之輕鏈。

在本發明之另一實施例中，抗-EGFR抗體藉由包含馬來醯亞胺基己醯基、纈胺酸-瓜胺酸、對胺基苄醇之連接體(mc-vc-PABA)共價連接至奧裡斯他汀。

在一個實施例中，本發明包括包含抗-EGFR之ADC及放射標記(例如鋦)。

在一個實施例中，本文所述抗-EGFR抗體共價連接至至少一種吡咯

并苯并二氮平(PBD)。在某些實施例中，本文所揭示抗-EGFR抗體連接至如圖21中所述之PBD (即，SGD-1882)。

在一些實施例中，本發明之特徵在於醫藥組合物，其包含本文所述之ADC及醫藥上可接受之載劑。在某些實施例中，本發明之特徵在於醫藥組合物，其包含包含本文所述之ADC之ADC混合物，其中該ADC混合物中平均藥物對抗體比率(DAR)範圍係2至4。在某些實施例中，ADC混合物中平均藥物對抗體比率(DAR)範圍係2.4至3.6。

在一個實施例中，本發明之特徵在於醫藥組合物，其包含包含抗-hEGFR抗體藥物結合物(ADC)之ADC混合物及醫藥上可接受之載劑，其中該ADC混合物之平均藥物對抗體比率(DAR)為2至4，且其中該ADC包含結合至抗-hEGFR抗體之單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)，該抗-hEGFR抗體包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之重鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之重鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之重鏈CDR1結構域；以及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之輕鏈CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之輕鏈CDR1結構域。

在一個實施例中，抗體之重鏈可變區包含SEQ ID NO: 9中所述之胺基酸序列，且抗-EGFR抗體之輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 5中所述之胺基酸序列。

在本發明之其他實施例中，抗體包含IgG重鏈免疫球蛋白恆定結構域。在其他實施例中，本發明包括具有IgG1或IgG4重鏈免疫球蛋白恆定結構域之抗體。在一個實施例中，本發明包括IgG1同型抗體。

在另一實施例中，本發明包括抗體，其包含包含SEQ ID NO: 15中所

述胺基酸序列之重鏈及包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之輕鏈。在一個實施例中，本發明之特徵在於具有藉由包含馬來醯亞胺基己醯基、val-cit、PABA之連接體結合至抗體之MMAE。

在本發明之一個實施例中，本發明提供治療患有癌症之個體之方法，其包含將包含本文所述抗體或ADC之醫藥組合物投與個體，使得該患有癌症之個體受到治療。在一個實施例中，癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、神經膠母細胞瘤、前列腺癌、胰臟癌、結腸癌、頭頸癌及腎癌。在一個實施例中，癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、神經膠母細胞瘤、前列腺癌、胰臟癌、結腸癌、結腸直腸癌、頭頸癌、間皮瘤、腎癌、鱗狀細胞癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。在另一實施例中，癌症含有EGFR之擴增或過表現EGFR。在一個實施例中，鱗狀細胞癌係鱗狀肺癌或鱗狀頭頸癌。在一個實施例中，癌症係過表現EGFR之癌症。在一個實施例中，癌症之特徵為擴增EGFR。在一個實施例中，癌症係乳癌。在一個實施例中，癌症係肺癌。在一個實施例中，癌症係前列腺癌。在一個實施例中，癌症係胰臟癌。在一個實施例中，癌症係結腸癌。在一個實施例中，癌症係頭頸癌。在一個實施例中，癌症係腎癌。在一個實施例中，癌症係結腸直腸癌。在一個實施例中，癌症係間皮瘤。在一個實施例中，癌症係鱗狀細胞癌。在一個實施例中，癌症係三陰性乳癌。在一個實施例中，癌症係非小細胞肺癌。在某些實施例中，鱗狀細胞癌係鱗狀肺癌或鱗狀頭頸癌。

另外，在某些實施例中，本發明提供在患有實體腫瘤之個體中抑制或降低實體腫瘤生長之方法，該方法包含將本文所述醫藥組合物投與患有實體腫瘤之個體，使得實體腫瘤生長受到抑制或降低。在一個實施例中，實體腫瘤係非小細胞肺癌或神經膠母細胞瘤。在另一實施例中，實體腫瘤

係EGFRvIII陽性腫瘤或表現EGFR之實體腫瘤。在另一實施例中，實體腫瘤係過表現EGFR之實體腫瘤。在另一實施例中，實體腫瘤係EGFR擴增之腫瘤。在一個實施例中，實體腫瘤係具有擴增EGFR之非小細胞肺癌。在一個實施例中，實體腫瘤係具有EGFR過表現之非小細胞肺癌。在一個實施例中，實體腫瘤係具有擴增EGFR之神經膠母細胞瘤。在一個實施例中，實體腫瘤係具有EGFR過表現之神經膠母細胞瘤。

在某些實施例中，本發明提供組合療法，藉此將本文所述醫藥組合物投與有需要至個體(例如，患有癌症或實體腫瘤之個體)。可在投與額外藥劑或額外療法之同時、之前或之後投與本文所述醫藥組合物。在某些實施例中，額外藥劑選自由以下組成之群：抗PD1抗體、抗CTLA-4抗體、替莫唑胺、bcl-xl抑制劑及菸鹼醯胺磷酸核糖基轉移酶(NAMPT)抑制劑。在其他實施例中，額外藥劑係化學治療劑。在某些實施例中，額外療法係輻射。在其他實施例中，額外藥劑係依魯替尼(Imbruvica®, Pharmacyclics)。在其他實施例中，額外藥劑係杜維裡斯。在其他實施例中，額外藥劑係艾代拉裡斯(Zydelig®, Gilead Sciences公司)。在其他實施例中，額外藥劑係維尼托克萊克斯(ABT-199/GDC-0199, AbbVie公司)。在某些實施例中，額外藥劑係抗PD1抗體(例如，派姆單抗(Keytruda®)或尼沃魯單抗)。在某些實施例中，額外藥劑係抗CTLA-4抗體(例如，伊匹單抗)。在某些實施例中，額外藥劑係替莫唑胺。

在某些實施例中，本發明之特徵在於嵌合抗原受體(CAR)，其包含本文所述抗體或本文所述scFv之抗原結合區域(例如CDR)。在某些實施例中，本發明之特徵在於CAR，其包含輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 40中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 39中所述胺

基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 38中所述胺基酸序列之CDR1結構域；以及重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 37中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 36中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 35中所述胺基酸序列之CDR1結構域。

在某些實施例中，本發明之特徵在於CAR，其包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10中所述胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 8中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6中所述胺基酸序列之CDR1結構域。

【圖式簡單說明】

**圖1**提供Ab1 (SEQ ID NO: 1及5)及AbA (SEQ ID NO: 9及5)之可變重鏈(VH)及可變輕鏈(VL)區域胺基酸序列。VH及VL區域內之CDR序列加框，且Ab1 VH序列與AbA VH序列之間之差異加陰影。

**圖2**闡述Ab1 (SEQ ID NO: 13及14)及AbA (SEQ ID NO: 13及15)之全長輕鏈及重鏈。Ab1序列與AbA序列之重鏈之間之差異加強顯示。

**圖3**提供概述與Ab1及Ab2相比之多種Ab1變體抗體之Biacore結合分析親和性量測之表格。在結合分析中使用EGFR (1-525)及EGFRvIII。如圖3中所述之$k_a$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$)係指抗體與抗原結合形成抗體/抗原複合物之速率常數，$k_d$ ($s^{-1}$)係指抗體自抗體/抗原複合物解離之解離速率常數，且$K_d$ (M)係指平衡解離速率常數。

**圖4**提供FACS分析之圖形概述，其顯示AbA具有相對於Ab1改良之與A431腫瘤細胞(人類鱗狀癌細胞)之結合，及與Ab2相比較低之結合親和

性。

**圖5**繪示FACS競爭分析之結果，其指示，Ab1變體抗體識別與Ab1相同之EGFR表位。

**圖6**提供Ab1及Ab1變體抗體與EGFR (1-525)結合之概述。實心圓代表Ab1或Ab2 (對照)且空心圓代表Ab1變體抗體。圓形指示第1組及第2組，其概述圖7中提供之資料。

**圖7**提供西方墨點(Western blot)分析之結果，其檢查Ab1及Ab1變體抗體在活體外對不同細胞系之活性。使來自SCC-15之細胞(圖7A)及H292細胞暴露於如實例4中所述之條件，且使用西方墨點分析使用抗磷酸酪胺酸EGFR (pY EGFR)、抗-EGFR (tot EGFR (總EGFR))及抗肌動蛋白(肌動蛋白)抗體來分析。圖7A提供的結果顯示Ab1、Ab2及Ab1變體抗體在SCC-15細胞中抑制EGFR之EGF介導之酪胺酸磷酸化之能力。圖7B提供的結果顯示Ab1、Ab2及Ab1變體抗體在H292細胞中抑制EGFR之EGF介導之酪胺酸磷酸化之能力。

**圖8**以圖形繪示包括Ab1、Ab2及Ab1變體之pEGFR ELISA分析之結果(圖8A)以及來自A431抑制研究之Ab1與Ab2及AbP相比之抑制程度(圖8B)。圖8A之Y軸係在450 nm下之光學密度(OD)。

**圖9**使用FACS結合分析以圖形繪示Ab1、Ab2及Ab1變體抗體與表現野生型EGFR之正常人類表皮角質細胞之結合。

**圖10**以圖形繪示小鼠異種移植物抑制分析之結果，其比較AbA、AbG、AbK、AbM及AbP與Ab1、Ab2及人類IgG (huIgG)對照相比，在人類NSCLC癌異種移植物中抑制腫瘤生長之能力。箭頭指示投與各種抗體之時間點。

**圖11**提供AbA-馬來醯亞胺基己醯基-vc-PABA-MMAE ADC (在本文中稱作「AbA-vcMMAE」)之結構。

**圖12-1及12-2**提供純化AbA-vcMMAE之疏水相互作用層析(HIC)分析之結果。

**圖13-1及13-2**提供AbA-vcMMAE之粒徑篩析層析(SEC)分析之結果。

**圖14**以圖形繪示使用抗-EGFR ADC之兩隻小鼠異種移植物抑制分析之結果。圖14A繪示小鼠異種移植物抑制分析之結果，其比較對NCI-H1703細胞中人類NSCLC癌異種移植物之腫瘤生長之抑制，顯示AbA-vcMMAE與Ab1及Ab1-mcMMAF ADC相比，抑制有所增強。圖14B繪示小鼠異種移植物抑制分析之結果，其比較對EBC-1細胞中人類NSCLC癌異種移植物之腫瘤生長之抑制，顯示AbA-vcMMAE與Ab1及Ab1-mcMMAF ADC相比，抑制有所增強。箭頭指示投與抗體之時間點。

**圖15**以圖形繪示使用抗-EGFR ADC之小鼠異種移植物抑制分析之結果。圖15A顯示小鼠異種移植物抑制分析之結果，其比較對NCI-H292細胞中之腫瘤生長之抑制，顯示純化AbA-vcMMAE (AbA-vcMMAEp)及AbA-vcMMAE與純化Ab1-vcMMAE (Ab1-vcMMAEp)、Ab1-vcMMAE、純化Ab1-mcMMAF ADC (Ab1-mcMMAFp)及Ab1-mcMMAF (對三種對照)相比，抑制有所增強。圖15B顯示小鼠異種移植物抑制分析之結果，其比較對NCI-H292細胞中之腫瘤生長之抑制，顯示AbA-vcMMAE與純化AbA-vcMMAE (AbA-vcMMAEp)相比，及AbA-vcMMAE與純化Ab1-vcMMAE (Ab1-vcMMAEp)、Ab1-vcMMAE、Ab1-mcMMAF及Ab1-mcMMAFp相比，抑制活性有所增強。圖15A及B中之分子劑量指示於括號中，即3 mg/kg或6 mg/kg。箭頭指示投與抗體或ADC之時間點。圖15

中之對照2代表陰性對照，其係不結合至EGFR之抗破傷風毒素抗體。

**圖16**提供Ab1變體可變重鏈(VH)文庫設計(圖16A)及Ab1變體可變輕鏈(VL)文庫設計(圖16B)之胺基酸序列。

**圖17**顯示EGFR以及Ab1及Ab2所結合區域之示意圖。

**圖18**以圖形繪示使用抗-EGFR ADC之小鼠異種移植物抑制分析(使用NCI-H292 (NSCLC)細胞)之結果。分子劑量指示於括號中，即3 mg/kg或6 mg/kg。箭頭指示投與抗體或ADC之時間點。

**圖19**以圖形繪示使用抗-EGFR MMAE及MMAF ADC之小鼠神經膠母細胞瘤異種移植物抑制分析之結果。圖19中之分子劑量指示於括號中，即1 mg/kg。箭頭指示投與抗體或ADC之時間點。圖19中之對照2代表陰性對照，係不結合至EGFR之抗破傷風毒素抗體。

**圖20A及B**以圖形繪示單光子發射電腦斷層攝影(SPECT)成像分析之結果，其比較在使用經$^{111}$In標記之AbA、Ab1或對照抗體之兩個腫瘤模型(分別係SW48 (圖20A)及EBC1 (圖20B)腫瘤模型)中，表現EGFR之腫瘤之抗體攝取效能。

**圖21**繪示經由馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-丙胺酸連接體結合至抗體(Ab)之PBD二聚體(SGD-1882)之結構(統稱為SGD-1910)。

【實施方式】

**相關申請案**

本申請案主張於2014年3月21日申請之美國臨時申請案第61/968,819號之優先權益。上述優先權申請案之內容係全文以引用方式併入。

**序列表**

本申請案含有以ASCII格式電子提交之序列表且其係全文以引用方式

併入本文中。於2015年3月12日創建的該ASCII拷貝命名為117813-06220_SL.txt且大小為110,863個位元組。

本發明之各個態樣係關於抗-EGFR抗體及抗體片段、抗-EGFR ADC及其醫藥組合物，以及用於製備該等抗體及片段之核酸、重組表現載體及宿主細胞。本發明亦涵蓋使用本文所述抗體及ADC檢測人類EGFR、抑制人類EGFR活性(活體外或活體內)及治療諸如以下等癌症之方法：上皮癌、乳癌、結腸直腸癌、頭頸癌(例如神經膠母細胞瘤)、肺癌、腎癌、胰臟癌、間皮瘤、鱗狀細胞癌(例如，鱗狀肺癌或鱗狀頭頸癌)、三陰性乳癌、非小細胞肺癌及前列腺癌。

**I.定義**

為了可更容易地理解本發明，首先定義某些術語。另外，應注意，無論何時列舉參數之值或值之範圍，所列舉值中間之值及範圍亦意欲係本發明之一部分。

術語「抗表皮生長因子(EGF)受體抗體」或「抗-EGFR抗體」在本文中可互換使用，其係指特異性結合至EGFR之抗體。「結合」所關注抗原(即EGFR)之抗體係能以足夠親和性結合該抗原，使得該抗體可用於靶向表現該抗原之細胞之抗體。在較佳實施例中，抗體特異性結合至人類EGFR (hEGFR)。抗-EGFR抗體之實例揭示於下文實例1中。除非另外指示，否則術語「抗-EGFR抗體」欲指結合至野生型EGFR或EGFR之任何變體(例如EGFRvIII)之抗體。

野生型人類EGFR之胺基酸序列作為SEQ ID NO: 32提供於下文中，其中信號肽(胺基酸殘基1-24)加下劃線，且細胞外結構域(ECD，胺基酸殘基25-645)之胺基酸殘基以粗體加強顯示。EGFR (本文中亦稱作

EGFR(1-525))之截短野生型ECD對應於SEQ ID NO: 47且等效於SEQ ID NO: 32之胺基酸1-525。野生型EGFR之成熟形式對應於不含信號肽之蛋白質，即SEQ ID NO: 32之胺基酸殘基25至1210。

1 mrpsgtagaa llallaalcp asra**leekkv cqgtsnkltq lgtfedhfls lqrmfnncev**

61 **vlgnleityv qrnydlsflk tiqevagyvl ialntverip lenlqiirgn myyensyala**

121 **vlsnydankt glkelpmrnl qeilhgavrf snnpalcnve siqwrdivss dflsnmsmdf**

181 **qnhlgscqkc dpscpngscw gageencqkl tkiicaqqcs grcrgkspsd cchnqcaagc**

241 **tgpresdclv crkfrdeatc kdtcpplmly npttyqmdvn pegkysfgat cvkkcprnyv**

301 **vtdhgscvra cgadsyemee dgvrkckkce gpcrkvcngi gigefkdsls inatnikhfk**

361 **nctsisgdlh ilpvafrgds fthtppldpq eldilktvke itgflliqaw penrtdlhaf**

421 **enleiirgrt kqhgqfslav vslnitslgl rslkeisdgd viisgnknlc yantinwkkl**

481 **fgtsgqktki isnrgensck atgqvchalc spegcwgpep rdcvscrnvs rgrecvdkcn**

541 **llegeprefv enseciqchp eclpqamnit ctgrgpdnci qcahyidgph cvktcpagvm**

601 **genntlvwky adaghvchlc hpnctygctg pglegcptng pkips**iatgm vgallllvv

661 algiglfmrr rhivrkrtlr rllqerelve pltpsgeapn qallrilket efkkikvlgs

721 gafgtvykgl wipegekvki pvaikelrea tspkankeil deayvmasvd nphvcrllgi

781 cltstvqlit qlmpfgclld yvrehkdnig sqyllnwcvq iakgmnyled rrlvhrdlaa

841 rnvlvktpqh vkitdfglak llgaeekeyh aeggkvpikw malesilhri ythqsdvwsy

901 gvtvwelmtf gskpydgipa seissilekg erlpqppict idvymimvkc wmidadsrpk

961 freliiefsk mardpqrylv iqgdermhlp sptdsnfyra lmdeedmddv vdadeylipq

1021 qgffsspsts rtpllsslsa tsnnstvaci drnglqscpi kedsflqrys sdptgalted

1081 siddtflpvp eyinqsvpkr pagsvqnpvy hnqplnpaps rdphyqdphs tavgnpeyln

1141 tvqptcvnst fdspahwaqk gshqisldnp dyqqdffpke akpngifkgs taenaeylrv

1201 apqssefiga (SEQ ID NO: 32)

人類EGFR之ECD之胺基酸序列作為SEQ ID NO: 34提供於下文中，且包括信號序列(加下劃線)。

1 <u>mrpsgtagaa</u> <u>llallaalcp</u> <u>asra</u>leekkv cqgtsnkltq lgtfedhfls

lqrmfnncev

61 vlgnleityv qrnydlsflk tiqevagyvl ialntverip lenlqiirgn myyensyala

121 vlsnydankt glkelpmrnl qeilhgavrf snnpalcnve siqwrdivss dflsnmsmdf

181 qnhlgscqkc dpscpngscw gageencqkl tkiicaqqcs grcrgkspsd cchnqcaagc

241 tgpresdclv crkfrdeatc kdtcpplmly npttyqmdvn pegkysfgat cvkkcprnyv

301 vtdhgscvra cgadsyemee dgvrkckkce gpcrkvcngi gigefkdsls inatnikhfk

361 nctsisgdlh ilpvafrgds fthtppldpq eldilktvke itgflliqaw penrtdlhaf

421 enleiirgrt kqhgqfslav vslnitslgl rslkeisdgd viisgnknlc yantinwkkl

481 fgtsgqktki isnrgensck atgqvchalc spegcwgpep rdcvscrnvs rgrecvdkcn

541 llegeprefv enseciqchp eclpqamnit ctgrgpdnci qcahyidgph cvktcpagvm

601 genntlvwky adaghvchlc hpnctygctg pglegcptng pkips (SEQ ID NO: 34)

EGFR之整體結構闡述於圖17中。EGFR之ECD具有4個結構域(Cochran等人(2004) *J. Immunol. Methods*, 287, 147-158)。已提出結構域

I及III有助於形成對配體之高親和性結合位點。結構域II及IV係富含半胱胺酸之層黏蛋白樣區域，其穩定蛋白質摺疊且含有可能的EGFR二聚化界面。

EGFR變體可得自伴隨EGFR基因擴增之基因重排。EGFRvIII係人類癌症中最常出現的EGFR變體(Kuan等人Endocr Relat Cancer. 8(2):83-96 (2001))。在基因擴增過程期間，在EGFR之細胞外結構域中發生267個胺基酸缺失且在融合接頭處插入甘胺酸殘基。因此，EGFRvIII缺少野生型EGFR之細胞外結構域之胺基酸6-273且包括接頭處之甘胺酸殘基插入。EGFR之EGFRvIII變體含有細胞外結構域中267個胺基酸殘基之缺失，其中在缺失接頭處插入甘胺酸。EGFRvIII胺基酸序列作為SEQ ID NO: 33顯示於下文中(ECD以粗體加強顯示且對應於SEQ ID NO: 46，信號序列加下劃線)。

mrpsgtagaallallaalcpasra**leekkgnyvvtdhgscvracgadsyemeedgvrkck kcegpcrkvcngigigefkdslsinatnikhfknctsisgdlhilpvafrgdsfthtppldpqeld ilktvkeitgflliqawpenrtdlhafenleiirgrtkqhgqfslavvslnitslglrslkeisdgdvi isgnknlcyantinwkklfgtsgqktkiisnrgensckatgqvchalcspegcwgpeprdcvsc rnvsrgrecvdkcnllegeprefvenseciqchpeclpqamnitctgrgpdnciqcahyidgp hcvktcpagvmgenntlvwkyadaghvchlchpnctygctgpglegcptngp**kipsiatgmv gallllvvalgiglfmrrrhivrkrtlrrllqerelvepltpsgeapnqallrilketefkkikvlgsgafgt vykglwipegekvkipvaikelreatspkankeildeayvmasvdnphvcrllgicltstvqlitqlm pfgclldyvrehkdnigsqyllnwcvqiakgmnyledrrlvhrdlaarnvlvktpqhvkitdfglakl lgaeekeyhaeggkvpikwmalesilhriythqsdvwsygvtvwelmtfgskpydgipaseissil ekgerlpqppictidvymimvkcwmidadsrpkfreliiefskmardpqrylviqgdermhlpspt

dsnfyralmdeedmddvvdadeylipqqgffsspstsrtpllsslsatsnnstvacidrnglqscpike dsflqryssdptgaltedsiddtflpvpeyinqsvpkrpagsvqnpvyhnqplnpapsrdphyqdph stavgnpeylntvqptcvnstfdspahwaqkgshqisldnpdyqqdffpkeakpngifkgstaena eylrvapqssefiga (SEQ ID NO: 33)

EGFRvIII以非配體依賴性方式經由組成型信號傳導促進腫瘤進展。已知EGFRvIII在正常組織中不表現(Wikstrand等人Cancer Research 55(14): 3140-3148 (1995)；Olapade-Olaopa等人Br J Cancer. 82(1):186-94 (2000))，但在腫瘤細胞(包括乳癌、神經膠質瘤、NSCL癌症、卵巢癌及前列腺癌)中顯示顯著表現(Wikstrand等人Cancer Research 55(14): 3140-3148 (1995)；Ge等人Int J Cancer. 98(3):357-61 (2002)；Wikstrand等人Cancer Research 55(14): 3140-3148 (1995)；Moscatello等人Cancer Res. 55(23):5536-9 (1995)；Garcia de Palazzo等人Cancer Res. 53(14):3217-20 (1993)；Moscatello等人Cancer Res. 55(23):5536-9 (1995)；及Olapade-Olaopa等人 2(1):186-94 (2000))。

如本文所用「EGFR之生物活性」係指EGFR之所有固有生物性質，包括(但不限於)結合至表皮生長因子(EGF)、結合至腫瘤生長因子α (TGFα)、同二聚化、活化JAK2激酶活性、活化MAPK激酶活性及活化跨膜受體蛋白酪胺酸激酶活性。

在提及抗體或ADC與第二化學物質之相互作用時，如本文所用術語「特異性結合」或「特異性地結合」意指該相互作用取決於該化學物質上之具體結構(例如抗原決定簇或表位)之存在；例如，抗體識別並結合特定蛋白質結構而非一般蛋白質。若抗體或ADC對表位「A」具有特異性，則在含有經標記「A」及抗體之反應中存在含有表位A (或游離未標記A)之

分子將減少結合至抗體或ADC之經標記A之量。

如本文所用片語「特異性地結合至hEGFR」或「特異性結合至hEGFR」係指抗-EGFR抗體或ADC以等於或大於Ab1或Ab1 ADC之親和性與hEGFR相互作用之能力。

如本文所用術語「特異性結合至EGFR(1-525)」或「特異性地結合至EGFR(1-525)」係指結合至EGFR(1-525)且解離常數($K_D$)為$2.3 \times 10^{-6}$ M或更低之抗體或ADC，如藉由表面電漿共振所測定。

術語「抗體」廣義上係指免疫球蛋白(Ig)分子，其一般包括4條多肽鏈，即兩條重鏈(H)及兩條輕鏈(L)，或其任一功能片段、突變體、變體或衍生物，其保留Ig分子之基本靶結合特徵。該等突變體、變體或衍生抗體形式為業內已知。下文論述其非限制性實施例。

在全長抗體中，每一重鏈包括重鏈可變區(本文縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包括三個結構域：CH1、CH2及CH3。每一輕鏈包括輕鏈可變區(本文縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包括一個結構域CL。可將VH及VL區進一步細分成夾雜有稱為框架區(FR)之更保守區域之稱為互補決定區(CDR)之超變區。每一VH及VL由3個CDR及4個FR組成，其自胺基末端至羧基末端按以下順序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可為任一類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)及種類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞類。

如本文所用術語抗體之「抗原結合部分」(或簡稱為「抗體部分」)係指抗體之保留特異性結合至抗原(例如，hIL-13)之能力的一或多個片段。已顯示，抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段來實施。該等抗體實施

例亦可具有雙特異性、雙重特異性或多特異性形式；特異性結合至兩種或更多種不同抗原。術語抗體之「抗原結合部分」內涵蓋之結合片段之實例包括(i) Fab片段，其係由VL、VH、CL及CH1結構域組成之單價片段；(ii) $F(ab')_2$片段，其係包含兩個藉由在鉸鏈區之二硫橋連接之Fab片段之二價片段；(iii) Fd片段，其係由VH及CH1結構域組成；(iv) Fv片段，其係由抗體單臂之VL及VH結構域組成，(v) dAb片段(Ward等人，(1989) *Nature* **341**:544-546，Winter等人，以引用方式併入本文中之PCT公開案WO 90/05144 A1)，其包含單一可變結構域；及(vi) 分離互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個結構域VL及VH係由單獨基因編碼，但其可使用重組方法藉由合成連接體接合，該合成連接體使得該等結構域能成為其中VL及VH區域配對形成單價分子之單一蛋白質鏈(稱作單鏈Fv (scFv)；例如，參見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。在本發明之某些實施例中，可將scFv分子納入融合蛋白中。亦涵蓋單鏈抗體之其他形式，例如雙價抗體。雙價抗體係二價雙特異性抗體，其中VH及VL結構域在單一多肽鏈上表現，但所用連接體過短而不容許相同鏈上之兩個結構域之間配對，由此迫使結構域與另一鏈上之互補結構域配對並產生兩個抗原結合位點(例如，參見Holliger, P.等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6444-6448; Poljak, R.J.等人(1994) *Structure* **2**:1121-1123)。該等抗體結合部分為業內已知(Kontermann及Dubel編輯，**Antibody Engineering** (2001) Springer-Verlag. New York. 第790頁(ISBN 3-540-41354-5))。

如本文所用術語「抗體構築體」係指包含與連接體多肽或免疫球蛋

白恆定結構域連接之一或多個本發明抗原結合部分之多肽。連接體多肽包含兩個或更多個由肽鍵接合之胺基酸殘基且用於連接一或多個抗原結合部分。該等連接體多肽為業內所熟知(例如，參見Holliger, P.等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448；Poljak, R.J.等人(1994) *Structure* 2:1121-1123)。免疫球蛋白恆定結構域係指重鏈或輕鏈恆定結構域。實例性人類IgG重鏈及輕鏈恆定結構域胺基酸序列為業內已知且展示於下文中。

人類IgG重鏈恆定結構域及輕鏈恆定結構域之序列

| 蛋白質 | 序列標識符 | 序列 |
|---|---|---|
| | | 12345678901234567890123456789012 |
| Ig γ-1恆定區 | SEQ ID NO:41 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC<br>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF<br>PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT<br>YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT<br>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH<br>EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Ig γ-1恆定區突變體 | SEQ ID NO:42 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC<br>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF<br>PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT<br>YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT<br>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT |

| | | |
|---|---|---|
| | | LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN<br>KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP<br>PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF<br>FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH<br>EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Ig κ恆定區 | SEQ ID NO:43 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC<br>LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS<br>QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD<br>YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR<br>GEC |
| Ig λ恆定區 | SEQ ID NO:44 | QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV<br>CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG<br>VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ<br>WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE<br>CS |

此外，抗體或其抗原結合部分可為較大免疫黏附分子之一部分，該分子係藉由抗體或抗體部分與一或多種其他蛋白質或肽共價或非共價結合來形成。該等免疫黏附分子之實例包括使用鏈黴抗生物素蛋白核心區域來製造四聚scFv分子(Kipriyanov, S.M.等人(1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101)及使用半胱胺酸殘基、標記肽及C末端聚組胺酸標籤來製造二價生物素化scFv分子(Kipriyanov, S.M.等人(1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)。諸如Fab及$F(ab')_2$片段等抗體部分可使用習用技術自全抗體製備，分別例如全抗體的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化。此外，抗體、抗體部分及免疫黏附分子可使用如本文所述之標準重組DNA技術

來獲得。

如本文所用「分離抗體」欲係指實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體之抗體(例如，特異性結合EGFR之分離抗體實質上不含特異性結合非EGFR抗原之抗體)。然而，特異性結合EGFR之分離抗體可與其他抗原(例如來自其他物種之EGFR分子)具有交叉反應性。此外，分離抗體可實質上不含其他細胞材料及/或化學品。

術語「人類化抗體」係指包含來自非人類物種(例如，小鼠)之重鏈及輕鏈可變區序列，但其中VH及/或VL序列之至少一部分已經改變得更「人類化」，即與人類種系可變序列更相似之抗體。具體而言，術語「人類化抗體」係免疫特異性結合至所關注抗原之抗體或其變體、衍生物、類似物或片段，且其包含實質上具有人類抗體之胺基酸序列之框架(FR)區及實質上具有非人類抗體之胺基酸序列之互補決定區(CDR)。如本文所用術語「實質上」在CDR情況下係指胺基酸序列與非人類抗體CDR之胺基酸序列至少80%、較佳至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%一致之CDR。人類化抗體包含實質上所有之至少一個且通常兩個可變結構域(Fab、Fab'、$F(ab')_2$、FabC、Fv)，其中所有或實質上所有CDR區域皆對應於非人類免疫球蛋白(即供體抗體)之彼等，且所有或實質上所有框架區皆為人類免疫球蛋白共有序列之彼等。較佳地，人類化抗體亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)、通常人類免疫球蛋白之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體含有輕鏈以及重鏈之至少可變結構域二者。抗體亦可包括重鏈之CH1、鉸鏈、CH2、CH3及CH4區域。在一些實施例中，人類化抗體僅含有人類化輕鏈。在其他實施例中，人類化抗體僅含有人類化重鏈。在特定實施例中，人類化抗體僅含有輕鏈之人類化可變結構域及/或人類

化重鏈。

人類化抗體可選自任一種類之免疫球蛋白，包括IgM、IgG、IgD、IgA及IgE及任一同型，包括(但不限於) IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。人類化抗體可包含一個以上種類或同型之序列，且具體恆定結構域可使用業內熟知之技術加以選擇以最佳化期望效應物功能。

術語「Kabat編號」、「Kabat定義」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。業內承認之該等術語係指對抗體或其抗原結合部分之重鏈及輕鏈可變區中較其他胺基酸殘基更可變(即超變)之胺基酸殘基進行編號之系統(Kabat等人(1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391及Kabat, E.A.等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開號91-3242)。對於重鏈可變區，超變區範圍為胺基酸位置31至35 (CDR1)、胺基酸位置50至65 (CDR2)及胺基酸位置95至102 (CDR3)。對於輕鏈可變區，超變區範圍為胺基酸位置24至34 (CDR1)、胺基酸位置50至56 (CDR2)及胺基酸位置89至97 (CDR3)。

如本文所用術語「CDR」係指抗體可變序列內之互補決定區。在重鏈(HC)及輕鏈(LC)之每一可變區中有3個CDR，對於每一可變區，其命名為CDR1、CDR2及CDR3 (或特定而言HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2及LC CDR3)。如本文所用術語「CDR組」係指能結合抗原之單一可變區中存在之一組3個CDR。已根據不同系統不同地定義該等CDR之確切邊界。藉由Kabat闡述之系統(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)及(1991))不僅提供適用於抗體任一可變區之明確殘

基編號系統，且亦提供界定三個CDR之精確殘基邊界。該等CDR可稱為Kabat CDR。Chothia及同事(Chothia及Lesk，J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)及Chothia等人，Nature 342:877-883 (1989))發現，Kabat CDR內之某些子部分採取幾乎相同之肽主鏈構象，但在胺基酸序列層面上具有顯著多樣性。將該等子部分命名為L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中「L」及「H」分別命名輕鏈及重鏈區域。該等區域可稱為Chothia CDR，其具有與Kabat CDR重疊之邊界。界定與Kabat CDR重疊之CDR之其他邊界已闡述於Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995))及MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996))中。其他CDR邊界界定可不嚴格遵循上述系統中之一者，但仍將與Kabat CDR重疊，且其可根據如下預測或實驗發現來縮短或延長：具體殘基或殘基群或甚至整個CDR不顯著影響抗原結合。本文所用方法可利用根據該等系統中之任一者界定之CDR，但較佳實施例使用Kabat或Chothia界定之CDR。

如本文所用術語「框架」或「框架序列」係指可變區減去CDR後之保留序列。由於CDR序列之準確界定可藉由不同系統來確定，故框架序列之含義具有相應的不同解釋。6個CDR (輕鏈之CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3以及重鏈之CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)亦在每一鏈上將輕鏈及重鏈上之框架區分成四個亞區(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1定位於FR1與FR2之間，CDR2定位於FR2與FR3之間，且CDR3定位於FR3與FR4之間。在未將具體亞區指定為FR1、FR2、FR3或FR4的情況下，稱為其他名稱之框架區代表單一天然免疫球蛋白鏈之可變區內的組合FR's。如本文所用FR代表四個亞區中之一者，且FRs代表構成框架區之四個亞區中之兩個或更多個。

人類化抗體之框架及CDR區不需精確對應於親代序列，例如，可藉由取代、插入及/或缺失至少一個胺基酸殘基，使得該位點處之CDR或框架殘基不對應於供體抗體或共有框架來誘變供體抗體CDR或共有框架。然而，在較佳實施例中，該等突變將不廣泛。通常，至少80%，較佳至少85%，更佳至少90%且最佳至少95%之人類化抗體殘基將對應於親代FR及CDR序列之彼等。如本文所用術語「共有框架」係指共有免疫球蛋白序列中之框架區。如本文所用術語「共有免疫球蛋白序列」係指自相關免疫球蛋白序列家族中最常出現之胺基酸(或核苷酸)形成之序列(例如，參見Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在免疫球蛋白家族中，共有序列中之每一位置由家族中該位置處最常出現之胺基酸佔據。若兩個胺基酸以相等頻率出現，則共有序列中可包括任一者。

關於肽或多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並引入空位(若需要)以達成最大序列一致性百分比後，且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分之情況下，候選序列中與特定肽或多肽序列中之胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的，可以熟習此項技術者所熟知之各種方式來達成比對，例如使用可公開獲得之電腦軟體，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可測定用於量測比對之適當參數，包括在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需之任何算法。在一個實施例中，本發明包括與SEQ ID NO: 1至31、35至40或50至85中之任一者中所述胺基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性之胺基酸序列。

術語「多價抗體」在本文中表示包含兩個或更多個抗原結合位點之抗體。在某些實施例中，多價抗體可經改造以具有三個或更多個抗原結合位點，且通常並非天然抗體。

術語「多特異性抗體」係指能結合兩種或更多種不相關抗原之抗體。在一個實施例中，多特異性抗體係能結合至兩種不相關抗原之雙特異性抗體，例如結合EGFR (例如，EGFRvIII)及CD3之雙特異性抗體或其抗原結合部分。

如本文中可互換使用之術語「雙重可變結構域」或「DVD」係包含兩個或更多個抗原結合位點且係四價或多價結合蛋白質之抗原結合蛋白質。該等DVD可具有單特異性(即，能結合一種抗原)或多特異性(即，能結合兩種或更多種抗原)。包含兩條重鏈DVD多肽及兩條輕鏈DVD多肽之DVD結合蛋白質稱作DVD Ig。DVD Ig之每一半包含重鏈DVD多肽及輕鏈DVD多肽及兩個抗原結合位點。每一結合位點包含重鏈可變結構域及輕鏈可變結構域，每個抗原結合位點具有總計6個參與抗原結合之CDR。在一個實施例中，本文所述CDR用於抗-EGFR DVD中。

術語「嵌合抗原受體」或「CAR」係指重組蛋白質，其包含至少(1)抗原結合區，例如抗體之可變重鏈或輕鏈，(2) 將CAR錨定至T細胞之跨膜結構域，及(3) 一或多個細胞內信號傳導結構域。

術語「活性」包括諸如以下等活性：抗體或ADC對抗原之結合特異性/親和性，例如結合至hEGFR抗原抗-hEGFR抗體；及/或抗體之中和功效，例如抗-hEGFR抗體與hEGFR之結合抑制hEGFR之生物活性，例如在表現EGFR之細胞系(例如人類肺癌細胞系H292)中抑制EGFR之磷酸化，或抑制表現EGFR之細胞系(例如人類H292肺癌細胞、人類H1703肺癌細

胞或人類EBC1肺癌細胞)之增殖。

如本文所用術語「非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析」係指用於測定抗-EGFR抗體或ADC是否可抑制將NSCLC細胞移植至免疫缺失小鼠中引起之腫瘤生長(例如，進一步生長)及/或降低腫瘤生長之活體內分析。NSCLC異種移植物分析包括將NSCLC細胞移植至免疫缺失小鼠中，使得腫瘤生長至期望大小，例如200-250 $mm^3$，此後將抗體或ADC投與該小鼠以測定該抗體或ADC是否可抑制及/或降低腫瘤生長。在某些實施例中，抗體或ADC之活性係根據相對於不特異性結合腫瘤細胞(例如針對與癌症無關或得自非癌性來源(例如，正常人類血清)之抗原)之對照抗體(例如人類IgG抗體(或其集合))之腫瘤生長抑制百分比(%TGI)來測定。在該等實施例中，抗體(或ADC)及對照抗體係以相同劑量及相同頻率及相同途徑投與小鼠。在一個實施例中，用於NSCLC異種移植物分析中之小鼠係嚴重合併性免疫缺失病(SCID)小鼠及/或無胸腺CD-1裸鼠。可用於NSCLC異種移植物分析中之NSCLC細胞之實例包括(但不限於) H292細胞(例如，NCIH292 [H292] (ATCC® CRL1848™))。

術語「表位」係指抗體或ADC所結合之抗原區域。在某些實施例中，表位決定簇包括分子之化學活性表面基團(例如胺基酸、糖側鏈、磷醯基或磺醯基)，且在某些實施例中可具有特定三維結構特徵及/或特定電荷特徵。在某些實施例中，在抗體在蛋白質及/或大分子之複合混合物中優先識別其靶抗原時，稱該抗體特異性結合抗原。在具體實施例中，本發明抗體結合至由胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45) (其對應於hEGFR成熟形式中之胺基酸殘基287-302)定義之表位。

如本文所用術語「表面電漿共振」係指容許藉由利用(例如) BIAcore

系統(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden及Piscataway, NJ)檢測生物感測器基質內之蛋白質濃度變化來實時分析生物特異性相互作用之光學現象。關於進一步說明參見Jönsson, U.等人(1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26；Jönsson, U.等人(1991) *Biotechniques* 11:620-627；Johnsson, B.等人(1995) *J. Mol. Recognit.* **8**:125-131；及Johnnson, B.等人(1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。在一個實施例中，表面電漿共振係根據實例2中所述方法來測定。

如本文所用術語「$k_{on}$」或「$k_a$」欲係指抗體與抗原結合形成抗體/抗原複合物之結合速率常數。

如本文所用術語「$k_{off}$」或「$k_d$」欲係指抗體自抗體/抗原複合物解離之解離速率常數。

如本文所用術語「$K_D$」欲係指具體抗體-抗原相互作用(例如，AbA抗體及EGFR)之平衡解離常數。$K_D$係藉由$k_a$ / $k_d$來計算。

如本文所用術語「競爭性結合」係指其中第一抗體與第二抗體競爭第三分子(例如抗原)上之結合位點之情況。在一個實施例中，兩種抗體之間之競爭性結合係使用FACS分析來測定。

術語「競爭性結合分析」係用於測定兩種或更多種抗體是否結合至相同表位之分析。在一個實施例中，競爭性結合分析係競爭螢光活化細胞分選(FACS)分析，其用於藉由測定經標記抗體之螢光信號是否因引入未經標記抗體而降低來測定兩種或更多種抗體是否結合至相同表位，其中對相同表位之競爭將降低螢光值。競爭結合FACS分析之實例提供於實例3中，其中闡述競爭FACS分析使用U87MG細胞(其表現EGFRvIII)。

如本文所用術語「經標記抗體」係指納入用於鑑別結合蛋白質(例如

抗體)之標記之抗體或其抗原結合部分。較佳地，標記係可檢測標記物，例如，納入經放射標記之胺基酸或附接至可藉由經標記抗生物素蛋白檢測之生物素基部分之多肽(例如，含有螢光標記物或可藉由光學或比色方法檢測之酶活性之鏈黴抗生物素蛋白)。用於多肽之標記之實例包括(但不限於)以下：放射性同位素或放射性核種(例如，$^{3}H$、$^{14}C$、$^{35}S$、$^{90}Y$、$^{99}Tc$、$^{111}In$、$^{125}I$、$^{131}I$、$^{177}Lu$、$^{166}Ho$或$^{153}Sm$)；螢光標記(例如，FITC、玫瑰紅(rhodamine)、鑭係元素磷光體)、酶標記(例如，辣根過氧化物酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)；化學發光標記物；生物素基；由第二報告子識別之預定多肽表位(例如，白胺酸拉鍊對序列、第二抗體之結合位點、金屬結合結構域、表位標籤)；及磁性劑，例如釓螯合物。

術語「抗體-藥物結合物」或「ADC」係指化學連接至一或多種可視情況係治療劑或細胞毒性劑之化學藥物(本文中亦稱作藥劑)之結合蛋白質(例如抗體或其抗原結合片段)。在較佳實施例中，ADC包括抗體、細胞毒性或治療藥物及使得該藥物能附接至或結合至該抗體之連接體。ADC通常具有1至8中任一數目之結合至抗體之藥物，包括2種、4種、6種或8種藥物負載物質。可包括於ADC中之藥物之非限制性實例係有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、用於基因療法之載體、烷基化劑、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼藥劑、化學保護劑、激素、抗激素劑、皮質類固醇、光活性治療劑、寡核苷酸、放射性核種劑、拓樸異構酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑及放射致敏劑。

在本文中可互換使用之術語「抗表表皮生長因子抗體藥物結合物」、「抗-EGFR抗體藥物結合物」或「抗-EGFR ADC」係指包含特異性結合至EGFR之抗體之ADC，其中該抗體結合之一或多種化學劑。在一個實施

例中，抗-EGFR ADC係與奧裡斯他汀(例如，MMAE或MMAF)結合之抗體AbA。對應於抗體AbA之輕鏈及重鏈之胺基酸序列分別提供於SEQ ID NO: 13及SEQ ID NO: 15中。

如本文所用術語「奧裡斯他汀」係指抗有絲分裂劑家族。在術語「奧裡斯他汀」之定義內亦包括奧裡斯他汀衍生物。奧裡斯他汀之實例包括(但不限於)奧裡斯他汀E (AE)、單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)、單甲基奧裡斯他汀F (MMAF)及多拉斯他汀之合成類似物。在一個實施例中，本文所述抗-EGFR抗體結合至奧裡斯他汀以形成抗-EGFR ADC。

如本文所用術語「AbA-vcMMAE」用於指ADC，其包含經由馬來醯亞胺基己醯基纈胺酸瓜胺酸對胺基苄基氧基胺甲醯基(PABA)連接體偶合至單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)之抗體AbA。AbA-vcMMAE闡述於圖11中。

如本文所用術語「mcMMAF」用於指馬來醯亞胺基己醯基-單甲基奧裡斯他汀F (MMAF)之連接體/藥物組合。

術語「藥物對抗體比率」或「DAR」係指附接至ADC之抗體之藥物(例如奧裡斯他汀)之數目。ADC之DAR可在1至8之範圍內，但更高負載(例如，10)亦係可能的，此取決於抗體上連接位點之數目。術語DAR可在提及個別抗體上負載之藥物數目時使用，或另一選擇為可在提及ADC群之平均DAR時使用。

如本文所用術語「不期望ADC物質」係指欲自具有不同藥物負載之ADC物質分離之任何藥物負載物質。在一個實施例中，術語不期望ADC物質可係指6或更大之藥物負載物質，即DAR為6或更大(包括DAR6、DAR7、DAR8及DAR大於8)之ADC (即，6、7、8或大於8之藥物負載物

質)。在單獨實施例中，術語不期望ADC物質可係指8或更大之藥物負載物質，即DAR為8或更大(包括DAR8及DAR大於8)之ADC (即，8或大於8之藥物負載物質)。

如本文所用術語「ADC混合物」係指含有ADC之異質DAR分佈之組合物。在一個實施例中，ADC混合物含有DAR分佈為1至8之ADC (例如，2、4、6及8，即，2、4、6及8之藥物負載物質)。值得注意的是，降解產物可使得在混合物中亦可包括1、3、5及7之DAR。此外，混合物內之ADC亦可具有大於8之DAR。ADC混合物源自鏈間二硫鍵還原及之後的結合。在一個實施例中，ADC混合物包含DAR為4或更小之ADC (即，4或更小之藥物負載物質)及DAR為6或更大之ADC (即，6或更大之藥物負載物質)二者。

術語「癌症」欲係指或闡述哺乳動物之特徵通常為細胞生長失調之生理病況。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴樣惡性病。該等癌症之其他具體實例包括神經膠母細胞瘤、非小細胞肺癌、肺癌、結腸癌、結腸直腸癌、頭頸癌、乳癌(例如，三陰性乳癌)、胰臟癌、鱗狀細胞腫瘤、鱗狀細胞癌(例如，鱗狀細胞肺癌或鱗狀細胞頭頸癌)、肛門癌、皮膚癌及外陰癌。在一個實施例中，將本發明之抗體或ADC投與腫瘤患者，該腫瘤含有EGFR基因之擴增，藉此表現EGFR之截短形式EGFRvIII。在一個實施例中，將本發明之抗體或ADC投與患有實體腫瘤之患者，該實體腫瘤可能過表現EGFR。在一個實施例中，將本發明之抗體或ADC投與患有鱗狀細胞非小細胞肺癌(NSCLC)之患者。在一個實施例中，將本發明之抗體或ADC投與患有實體腫瘤之患者，該實體腫瘤包括晚期實體腫瘤。

如本文所用術語「表現EGFR之腫瘤」係指表現EGFR蛋白之腫瘤。在一個實施例中，腫瘤中之EGFR表現係使用腫瘤細胞膜之免疫組織化學染色來測定，其中腫瘤樣品中任何高於背景程度之免疫組織化學染色指示該腫瘤係表現EGFR之腫瘤。檢測腫瘤中EGFR表現之方法為業內已知，例如EGFR pharmDx™套組(Dako)。相反，「EGFR陰性腫瘤」定義為如藉由免疫組織化學技術所測定在腫瘤樣品中不存在高於背景之EGFR膜染色之腫瘤。

如本文所用術語「EGFRvIII陽性腫瘤」係指表現EGFRvIII蛋白質之腫瘤。在一個實施例中，腫瘤中之EGFRvIII表現係使用腫瘤細胞膜之免疫組織化學染色來測定，其中腫瘤樣品中任何高於背景程度之免疫組織化學染色指示該腫瘤係表現EGFRvIII之腫瘤。檢測腫瘤中之EGFR表現之方法為業內已知，且包括免疫組織化學分析.相反，「EGFRvIII陰性腫瘤」定義為如藉由免疫組織化學技術所測定在腫瘤樣品中不存在高於背景之EGFRvIII膜染色之腫瘤。

可互換使用之術語「過表現(overexpress)」、「過表現(overexpression)」或「過表現(overexpressed)」係指與正常細胞相比，通常在癌細胞中以顯著較大之程度轉錄或翻譯之基因。因此，過表現係指蛋白及RNA過表現(由於增加之轉錄、轉錄後處理、翻譯、翻譯後處理、改變之穩定性及改變之蛋白質降解)、以及由於改變之蛋白運輸模式(增加核定位)及增強之功能活性(例如，如在受質之增強酶水解中))所致之局部過表現。因此，過表現係指蛋白質或RNA含量。過表現亦可係與正常細胞或比較細胞相比過表現50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或ADC用於治療可能過表現EGFR之實

體腫瘤。

如本文所用術語「投與」欲係指遞送物質(例如，抗-EGFR抗體或ADC)以達成治療目標(例如，治療EGFR相關病症)。投與模式可係非經腸、經腸及局部。非經腸投與通常係注射，且包括(但不限於)靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、真皮內、腹膜內、經氣管、皮下、角質層下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內及胸骨內注射及輸注。

如本文所用術語「組合療法」係指投與兩種或更多種治療物質，例如抗-EGFR抗體或ADC及額外治療劑。可在投與抗-EGFR抗體或ADC的同時、之前或之後投與額外治療劑。

如本文所用術語「有效量」或「治療有效量」係指藥物(例如抗體或ADC)之如下量：足以降低或改善病症(例如癌症)或其一或多種症狀之嚴重性及/或持續時間，防治病症進展，引起病症消退，防止與病症相關之一或多種症狀之復發、發展、發作或進展，檢測病症，或增強或改良另一種療法(例如，預防劑或治療劑)之預防性或治療性效應。抗體或ADC之有效量可(例如)抑制腫瘤生長(例如，抑制腫瘤體積增加)，降低腫瘤生長(例如，減小腫瘤體積)，減少癌細胞數，及/或將與癌症相關之一或多種症狀減輕至一定程度。有效量可(例如)改良無疾病存活(DFS)，改良總體存活(OS)或減低復發概率。

下文子部分中更詳細地闡述本發明之各個態樣。

## II. 抗-EGFR抗體

本發明之一個態樣提供具有相對於Ab1及業內已知其他抗體改良之特徵(例如，增強之對EGFR之結合親和性)之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分。本發明之另一態樣之特徵在於抗體藥物結合物(ADC)，其包含本文所

述抗-EGFR抗體及至少一種藥物(例如(但不限於)奧裡斯他汀)。本發明之抗體或ADC之特徵包括(但不限於)結合至表現EGFRvIII之腫瘤細胞，結合至表現EGFR之腫瘤細胞上之野生型EGFR，識別EGFR上之表位CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)，結合至正常人類上皮角質細胞上之EGFR，及降低或抑制小鼠模型中之異種移植物腫瘤生長。

Ab1 (抗體1)係人類化抗-EGFR抗體。Ab1之輕鏈及重鏈序列分別闡述於SEQ ID NO: 13及SEQ ID NO: 14中(亦參見美國專利申請公開案第20120183471號，其係以引用方式併入本文中)。Ab1之輕鏈可變區闡述於SEQ ID NO: 5中，且包含SEQ ID NO: 6中所述之CDR1胺基酸序列、SEQ ID NO: 7中所述之CDR2胺基酸序列及SEQ ID NO: 8中所述之CDR3胺基酸序列。Ab1之重鏈可變區闡述於SEQ ID NO: 1中，且包含SEQ ID NO: 2中所述之CDR1胺基酸序列、SEQ ID NO: 3中所述之CDR2胺基酸序列及SEQ ID NO: 4中所述之CDR3胺基酸序列。

一般而言，本發明之Ab1變體抗體保留親代抗體Ab1之表位特異性。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體能結合EGFR中由SEQ ID NO: 45界定之表位及/或能與Ab1競爭結合至EGFR。在各個實施例中，可根據下文實例3中所述之方案分析結合。在本發明之較佳實施例中，抗-EGFR抗體與Ab1競爭且對EGFR之1-525 (SEQ ID NO: 47)具有改良之結合親和性，例如解離常數($K_d$)介於約$1 \times 10^{-6}$ M與約$1 \times 10^{-10}$ M之間，如藉由表面電漿共振所測定。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體，其係Ab1變體且具有改良之特徵，例如改良之結合親和性及在活體內抑制NSCLC腫瘤細胞增殖之能力，如下文實例中所述。總之，該等新穎抗體在本文中稱作

「Ab1變體抗體」。一般而言，Ab1變體抗體保留與Ab1相同之表位特異性。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分結合至SEQ ID NO: 45中所述胺基酸序列內之表位，且在競爭性結合分析中與包含包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域之抗-EGFR抗體競爭結合至EGFRvIII。與Ab1相比，本發明之抗-EGFR抗體能在裸鼠中之H292人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中在活體內抑制或降低腫瘤生長，及/或結合至正常人類上皮角質細胞上之野生型EGFR。在各個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或其抗原結合片段能調節EGFR之生物功能。在前述態樣之其他實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合片段結合EGFRvIII，結合過表現EGFR之細胞上之EGFR，且識別EGFR上之表位CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)。在另一實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合片段在與EGFRvIII接頭肽不同之表位處結合EGFRvIII。在前述態樣之其他實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合片段不與西妥昔單抗(cetuximab)競爭結合EGFR。下文實例中闡述之AbA抗體及Ab1變體具有前述特徵。

因此，本發明包括抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其可在競爭性結合分析中與Ab1競爭，但在抑制或降低腫瘤生長方面更有效。在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分能結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)內之表位，並在競爭性結合分析中與Ab1 (或包含包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域之抗-EGFR抗體)競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID

NO: 33)。

在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分以約1 × $10^{-6}$ M或更低之解離常數($K_d$)結合至EGFR(1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定。或者，抗體或其抗原結合部分以介於約1 × $10^{-6}$ M與約1 × $10^{-10}$ M之間之$K_d$結合至EGFR (1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定。在另一替代實施例中，抗體或其抗原結合部分以介於約1 × $10^{-6}$ M與約1 × $10^{-7}$ M之間之$K_d$結合至EGFR (1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定。或者，本發明之抗體或其抗原結合部分以介於約1 × $10^{-6}$ M與約5 × $10^{-10}$ M之間之$K_d$；介於約1 × $10^{-6}$ M與約1 × $10^{-9}$ M之間之$K_d$；介於約1 × $10^{-6}$ M與約5 × $10^{-9}$ M之間之$K_d$；介於約1 × $10^{-6}$ M與約1 × $10^{-8}$ M之間之$K_d$；介於約1 × $10^{-6}$ M與約5 × $10^{-8}$ M之間之$K_d$；介於約5.9 × $10^{-7}$ M與約1.7 × $10^{-9}$ M之間之$K_d$；介於約5.9 × $10^{-7}$ M與約2.2 × $10^{-7}$ M之間之$K_d$結合至EGFR (1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定。在某些實施例中，本發明之抗體及抗原結合片段之解離常數($K_d$)在一個實施例中低於Ab1之解離常數，但高於抗-EGFR抗體西妥昔單抗之速率。

本發明之抗-EGFR抗體及其抗原結合部分之一個優點在於，該等抗體能結合至表現EGFRvIII之腫瘤細胞。儘管EGFRvIII與某些類型之癌症相關，但多種業內已知之抗-EGFR抗體(例如，西妥昔單抗)在抑制或降低表現EGFRvIII之腫瘤之腫瘤生長方面無效。因此，在一個實施例中，本發明之抗體或其抗原結合部分以約8.2 × $10^{-9}$ M或更低之$K_d$結合至EGFRvIII (SEQ ID NO: 33)，如藉由表面電漿共振所測定。或者，本發明之抗體或其抗原結合部分以介於約8.2 × $10^{-9}$ M與約6.3 × $10^{-10}$ M之間

之$K_d$；介於約$8.2 \times 10^{-9}$ M與約$2.0 \times 10^{-9}$ M之間之$K_d$；介於約$2.3 \times 10^{-9}$ M與約$1.5 \times 10^{-10}$ M之間之$K_d$結合至EGFRvIII (SEQ ID NO: 33)，如藉由表面電漿共振所測定。

在一個實施例中，本發明抗體能在活體內異種移植物小鼠模型中抑制或降低腫瘤生長。舉例而言，本發明之抗體或其抗原結合部分能在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制至少約50%。在某些實施例中，在以相同劑量及投藥週期投與時，本發明之抗體或其抗原結合部分能在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制或降低至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%或至少約80%。在某些實施例中，在以相同劑量及投藥週期投與時，本發明之抗體或其抗原結合部分能在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制或降低約80%至約90%，或約84%至約90%，或約88%至約90%。

如本文所用術語「異種移植物分析」係指人類腫瘤異種移植物分析，其中將人類腫瘤細胞在皮膚下或在腫瘤來源之器官類型中移植至不排斥人類細胞之免疫受損小鼠中。

應注意，具有上文所提及特徵之組合之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分亦被視為本發明之實施例。舉例而言，本發明抗體可以約$1 \times 10^{-6}$ M或更低之解離常數($K_d$)結合至EGFR(1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定，且結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)內之表位並在競爭性結合分析中與Ab1 (或包含包含SEQ ID

NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域之抗-EGFR抗體)競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID NO: 33)。

在某些實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合部分結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)內之表位且在競爭性結合分析中與Ab1 (或包含包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域之抗-EGFR抗體)競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID NO: 33)；且以約$8.2 \times 10^{-9}$ M或更低之$K_d$結合至EGFRvIII (SEQ ID NO: 33)，如藉由表面電漿共振所測定。

在某些實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合部分結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)內之表位且在競爭性結合分析中與Ab1 (或包含包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域之抗-EGFR抗體)競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID NO: 33)；並在活體內異種移植物小鼠模型中抑制或降低腫瘤生長。更特定而言，在以相同劑量及投藥週期投與時，本發明之抗體或其抗原結合部分能在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制至少約50%。或者，在以相同劑量及投藥週期投與時，本發明之抗體或其抗原結合部分能在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制或降低至少約55%、至少約60%、至少約65%、至少約70%、至少約75%或至少約80%。在某些實施例中，在以相

同劑量及投藥週期投與時，本發明之抗體或其抗原結合部分能在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體將腫瘤生長抑制或降低約80%至約90%，或約84%至約90%，或約88%至約90%。

涵蓋具有上文所提及特徵中任一者之組合之抗體作為本發明之態樣。下文更詳細地闡述之本發明ADC亦可具有前述特徵中之任一者。

在一個實施例中，本發明包括抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分，其包含包含SEQ ID NO: 40中所述胺基酸序列之LC CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 39中所述胺基酸序列之LC CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 38中所述胺基酸序列之LC CDR1結構域；以及包含SEQ ID NO: 37中所述胺基酸序列之HC CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 36中所述胺基酸序列之HC CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 35中所述胺基酸序列之HC CDR1結構域。

在一個實施例中，本發明包括抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分，其包含包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之重鏈可變區：50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76及78；及包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之輕鏈可變區：51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77及79。

在一個實施例中，本發明包括抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分，其包含選自由以下組成之群之HC CDR組(CDR1、CDR2及CDR3)：SEQ ID NO: 10、11及12；SEQ ID NO: 16、17及18；SEQ ID NO: 10、11及19；SEQ ID NO: 20、11及12；SEQ ID NO: 21、3及22；SEQ ID NO: 16、17及19；SEQ ID NO: 2、3及4；SEQ ID NO: 10、3及12；SEQ ID NO:

80、11及18；SEQ ID NO: 80、3及18；SEQ ID NO: 20、3及12；SEQ ID NO: 80、11及12；及SEQ ID NO: 81、11及22；及選自由以下組成之群之LC 輕鏈CDR組(CDR1、CDR2及CDR3)：SEQ ID NO: 6、7及8；SEQ ID NO: 23、24及25；SEQ ID NO: 26、27及28；SEQ ID NO: 29、30及31；SEQ ID NO: 6、7及84；SEQ ID NO: 82、83及31；及SEQ ID NO: 82、27及85，其中該抗體或其抗原結合部分不包含SEQ ID NO: 2、3及4之HC CDR組及SEQ ID NO: 6、7及8之LC CDR組二者。

較佳地，本發明之抗-EGFR抗體展現降低或中和EGFR活性之高能力，例如如藉由若干種業內已知之活體外及活體內分析中之任一者所評價。舉例而言，可在表現EGFR之細胞系(例如h292細胞系)中量測對EGFR磷酸化之抑制。在某些實施例中，分離抗體或其抗原結合部分結合人類EGFR，其中該抗體或其抗原結合部分以約$5.9 \times 10^{-7}$ M或更低之$K_D$速率常數與人類EGFR (EGFR 1-525)解離，如藉由表面電漿共振所測定。或者，抗體或其抗原結合部分可以約$4.2 \times 10^{-7}$ M之$K_D$速率常數與人類EGFR (1-525)解離，如藉由表面電漿共振所測定。或者，抗體或其抗原結合部分可以約$2.5 \times 10^{-7}$ M之$K_D$速率常數與人類EGFR (1-525)解離，如藉由表面電漿共振所測定。在某些實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分之$K_D$速率常數介於$5.9 \times 10^{-7}$ M與$5 \times 10^{-9}$ M之間。

或者，抗體或其抗原結合部分可以約$6.1 \times 10^{-9}$ M或更低之$K_D$速率常數與人類EGFRvIII解離，如藉由表面電漿共振所測定。或者，抗體或其抗原結合部分可以約$3.9 \times 10^{-9}$ M或更低之$K_D$速率常數與人類EGFRvIII解離，如藉由表面電漿共振所測定。或者，抗體或其抗原結合部分可以約$2.3 \times 10^{-9}$M或更低之$K_D$速率常數與人類EGFRvIII解離，如藉由表面電漿

共振所測定。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbA。AbA具有相對於Ab1改良之對EGFR之結合親和性，且亦相對於Ab1展現獨特活體外及活體內特徵。AbA在活體外角質細胞結合分析中以顯著大於Ab1之親和性結合EGFR。此外，AbA能在異種移植物H292細胞分析中抑制或降低腫瘤生長。值得注意的是，AbA具有改良之活體外及活體內特徵，此與其他結合親和性高於AbA之Ab1變體抗體相當。儘管與其他Ab1變體抗體相比結合親和性較低(例如，參見圖3中之AbP及AbQ對AbA)，但在活體內分析中AbA對細胞生長之抑制與其相當。

術語「AbA」意欲包括具有AbA之至少6個CDR之IgG抗體。AbA抗體具有與Ab1相同之輕鏈，但具有相對於親代抗體Ab1含有6個胺基酸序列變化之重鏈(4個胺基酸變化在重鏈之可變區中且2個變化在恆定區中)。AbA抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR1結構域。AbA之重鏈可變區係由SEQ ID NO: 9中所述之胺基酸序列來定義，且輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。抗體AbA之全長重鏈闡述於SEQ ID NO: 15中所述之胺基酸序列中風，而抗體AbA之全長輕鏈闡述於SEQ ID NO: 13中所述之胺基酸序列中(參見圖2)。AbA之重鏈之核酸序列提供於下文中：

gaggtgcaactccaagagagcgggcccggcctcgtgaagccctctcagactctgtccctgactt

gcactgtgagcgggtattccatcagcagagacttcgcatggaactggatccgccagcctcccggtaag
ggactggagtggatggggtacatcagctacaacggtaatacacgctatcagccctccctgaagtctcgc
attaccattagtcgcgatacctccaagaaccagttctttctgaaactcaacagcgtgacagccgctgaca
ccgccacctactactgcgtgaccgccagcaggggttcccttactggggccagggcactctggtcacc
gtttcttctgcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggg
gcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactca
ggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagc
agcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcc
cagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgt
gcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctc
atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaa
gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagta
caagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg
cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgcgaggagatgaccaagaaccaggtc
agcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggca
gccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaa
gctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctc
tgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa (SEQ ID NO: 86)

AbA之輕鏈之核酸序列提供於下文中：

Gacatccagatgacccagtccccctccagtatgtctgtgtctgtgggcgaccgtgtgaccattac
ctgccactcctcccaggacatcaatagcaatatcggttggttgcaacagaagccaggcaagtccttcaa
agggctgatttaccatggtaccaacctggacgacggggttcctagtcgtttcagcggctccgggtccgg

aaccgattacactctgaccatcagcagtttgcagcctgaggactttgctacctattattgtgtgcagtacg
ctcagttcccatggactttcggcgggggcaccaaactggagatcaaacgtacggtggctgcaccatctg
tcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataactt
ctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggag
agtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaa
gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtca
caaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 87)

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbB。AbB抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbC。AbC抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包

含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbD。AbD抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 83之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 82之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 68之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 69之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbE。AbE抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 85之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 82之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbF。AbF抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之

CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbG。AbG抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 72之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 73之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbH。AbH抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 80之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 55

之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbJ。AbJ抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 80之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbK。AbK抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 74之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 75之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbL。AbL抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 80之胺基酸序列之CDR1結構域；以及

輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbM。AbM抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbN。AbN抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbO。AbO抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 80之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 27之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 26之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbP。AbP抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 79之胺基酸序列之輕鏈可變區。

在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其係抗體AbQ。AbQ抗體包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR3結構域、

包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR1結構域。在其他實施例中，本發明提供抗體，其具有包含SEQ ID NO: 70之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 71之胺基酸序列之輕鏈可變區。

如下文所述實例中之表1中所述，Ab1變體抗體序列提供胺基酸共有序列，其代表導致改良之與Ab1 EGFR表位之結合的CDR結構域。因此，在一個實施例中，本發明之特徵在於抗-EGFR抗體或其抗原結合部分，其包含輕鏈可變區，其包含包含如SEQ ID NO: 40所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含如SEQ ID NO: 39所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 38如所述胺基酸序列之CDR1結構域；以及重鏈可變區，其包含包含如SEQ ID NO: 37所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含如SEQ ID NO: 36所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含如SEQ ID NO: 35所述胺基酸序列之CDR1結構域。

在一個實施例中，抗表皮生長因子受體(抗-EGFR)抗體或其抗原結合部分包含包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之重鏈可變區：50、52、53、56、58、60、62、64、66及68；及包含選自由以下組成之群之胺基酸序列之輕鏈可變區：51、53、55、57、59、61、63、65、67及69。

在另一實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區，其包含包含如SEQ ID NO: 12、18、19及22中所述胺基酸序列之CDR3結構域；包含如SEQ ID NO: 11或17中所述胺基酸序列之CDR2結構域；及包含如SEQ ID NO: 10、16、20及21中所述胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含如SEQ ID NO: 8、25、28及31中所述胺基酸序列之CDR3結構域；包含如SEQ ID NO: 7、24、27及

30中所述胺基酸序列之CDR2結構域；及包含如SEQ ID NO: 6、23、26及29中所述胺基酸序列之CDR1結構域。

磷酸化及增殖分析顯示，本文所述抗體抑制EGFR介導之磷酸化及腫瘤細胞生長。舉例而言，如在實例6中所述，顯示本發明之EGFR抗體(如所測試)可在活體內抑制腫瘤細胞生長。

前述抗-EGFR抗體CDR序列建立新穎EGFR結合蛋白質家族，其係根據本發明來分離，且包含包括下文表1至3中列示之CDR序列之多肽。

為生成並選擇具有較佳EGFR結合及/或關於hEGFR之中和活性之CDR，可使用業內已知用於生成抗體或其抗原結合部分及評價彼等抗體或其抗原結合部分之EGFR結合及/或中和特徵之標準方法，包括(但不限於)彼等本文明確闡述者。

在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區。在某些實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合部分包含選自由以下組成之群之重鏈免疫球蛋白恆定結構域：人類IgG恆定結構域、人類IgM恆定結構域、人類IgE恆定結構域及人類IgA恆定結構域。在其他實施例中，抗體或其抗原結合部分具有IgG1重鏈恆定區、IgG2重鏈恆定區、IgG3恆定區或IgG4重鏈恆定區。較佳地，重鏈恆定區係IgG1重鏈恆定區或IgG4重鏈恆定區。此外，抗體可包含輕鏈恆定區，即κ輕鏈恆定區或λ輕鏈恆定區。較佳地，抗體包含κ輕鏈恆定區。或者，抗體部分可為(例如) Fab片段或單鏈Fv片段。

在某些實施例中，抗-EGFR抗體結合部分係Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、二硫鍵連接之Fv、scFv、單一結構域抗體或雙價抗體。

在某些實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合部分係多特異性抗體，

例如雙特異性抗體。

在某些實施例中，抗-EGFR抗體或其抗原結合部分包含包含SEQ ID NO: 41中所述胺基酸序列之重鏈恆定區及/或包含SEQ ID NO: 43中所述胺基酸序列之輕鏈恆定區。

已闡述替代Fc部分中之胺基酸殘基以改變抗體效應物功能(Winter等人，美國專利第5,648,260號及第5,624,821號，其係以引用方式併入本文中)。抗體之Fc部分介導若干種重要效應物功能，例如抗體及抗原-抗體複合物之細胞介素誘導、ADCC、吞噬作用、補體依賴性細胞毒性(CDC)及半衰期/清除速率。在一些情形中，該等效應物功能為治療性抗體所期望，但在其他情形中，端視治療目的，可能不需要該等效應物功能或其甚至有害。某些人類IgG同型、尤其IgG1及IgG3分別經由結合至FcγR及補體C1q來介導ADCC及CDC。新生兒Fc受體(FcRn)係決定抗體之循環半衰期之關鍵組份。在另一實施例中，替代抗體恆定區(例如，抗體Fc區)中之至少一個胺基酸殘基，使得改變抗體之效應物功能。

本發明之一個實施例包括重組嵌合抗原受體(CAR)，其包含本文所述抗體之結合區域，例如AbA之重鏈及/或輕鏈CDR。如本文所述之重組CAR可用於以非人類白血球抗原(HLA)依賴性方式重定向T細胞對抗原之特異性。因此，本發明之CAR可在免疫療法中用於幫助改造人類個體自身之免疫細胞以識別並攻擊個體之腫瘤(例如，參見美國專利第6,410,319號、第8,389,282號、第8,822,647號、第8,906,682號、第8,911,993號、第8,916,381號、第8,975,071號及美國專利申請公開案第US20140322275號，其各自係關於CAR技術以引用方式併入本文)。此類免疫療法稱為過繼性細胞轉移(ACT)，且可用於治療有需要之個體之癌症。

本發明之抗-EGFR CAR較佳含有對EGFR (例如EGFRvIII)具有特異性之細胞外抗原-結合結構域、用於將CAR錨定至T細胞中之跨膜結構域及一或多個細胞內信號傳導結構域。在本發明之一個實施例中，CAR包括跨膜結構域，其包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜結構域：T細胞受體之α、β或ζ鏈、CD28、CD3 ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及CD154。在本發明之一個實施例中，CAR包含共刺激結構域，例如包含選自由以下組成之群之蛋白質之功能信號傳導結構域之共刺激結構域：OX40、CD2、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)及4-1BB (CD137)。在本發明之某些實施例中，CAR包含包含本文所述CDR或可變區(例如來自AbA抗體之CDR或可變區)之scFv、跨膜結構域、共刺激結構域(例如，來自CD28或4-1BB之功能信號傳導結構域)及包含來自CD3之功能信號傳導結構域(例如，CD3-ζ)之信號傳導結構域。

在某些實施例中，本發明包括包含CAR (亦稱作CAR T細胞)之T細胞，該CAR包含本文所述抗體或本文所述scFv之抗原結合區域(例如CDR)。

在本發明之某些實施例中，CAR包含輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 40中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 39中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 38中所述胺基酸序列之CDR1結構域；以及重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 37中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 36中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 35中所述胺基酸序列之CDR1結構域。

在本發明之某些實施例中，CAR包含重鏈可變區，其包含包含SEQ

ID NO: 12中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10中所述胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 8中所述胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7中所述胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6中所述胺基酸序列之CDR1結構域。

本發明之一個實施例包括經標記抗-EGFR抗體或其抗體部分，其中抗體經衍生或連接至一或多種功能分子(例如，另一肽或蛋白質)。舉例而言，經標記抗體可藉由以下方式衍生：將本發明之抗體或抗體部分(藉由化學偶合、遺傳融合、非共價結合或其他方式)功能性連接至一或多種其他分子實體，例如另一抗體(例如，雙特異性抗體或雙價抗體)、可檢測試劑、醫藥劑、可介導抗體或抗體部分與另一分子(例如鏈黴抗生物素蛋白核心區域或聚組胺酸標籤)之結合之蛋白質或肽及/或選自由以下組成之群之細胞毒性或治療劑：有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、用於基因療法之載體、烷基化劑、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼藥劑、化學保護劑、激素、抗激素藥劑、皮質類固醇、光活性治療劑、寡核苷酸、放射性核種劑、拓撲異構酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑、放射致敏劑及其組合。

可用於衍生抗體或其抗體部分之可用可檢測試劑包括螢光化合物。實例性螢光可檢測試劑包括螢光素、異硫氰酸螢光素、玫瑰紅、5-二甲基胺-1-萘磺醯氯、藻紅素及諸如此類。亦可用可檢測酶來衍生抗體，例如鹼性磷酸酶、辣根過氧化物酶、葡萄糖氧化酶及諸如此類。在用可檢測酶衍生抗體時，藉由添加額外試劑來檢測使用酶來產生可檢測反應產物。舉例而言，在存在可檢測試劑辣根過氧化物酶時，添加過氧化氫及二胺基聯

苯胺產生可檢測之有色反應產物。亦可用生物素衍生抗體並經由間接量測抗生物素蛋白或鏈黴抗生物素蛋白結合來檢測。

在一個實施例中，本發明抗體結合至成像劑。可用於本文所述組合物及方法之成像劑之實例包括(但不限於)放射標記(例如，鋦)、酶、螢光標記、發光標記、生物發光標記、磁性標記及生物素。

在一個實施例中，抗體或ADC連接至放射標記，例如(但不限於)鋦($^{111}$In)。$^{111}$鋦可用於標記本文所述抗體及ADC以用於鑑別EGFR陽性腫瘤。在某一實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體(或ADC)經由雙功能螯合劑(其係雙官能二乙烯三胺五乙酸環己基酯(DTPA)螯合物用$^{111}$I標記(參見美國專利第5,124,471號、第5,434,287號及第5,286,850號，其各自係以引用方式併入本文中)。

本發明之另一實施例提供糖基化結合蛋白質，其中抗-EGFR抗體或其抗原結合部分包含一或多個碳水化合物殘基。活體內新生蛋白之產生可經歷其他處理，稱作翻譯後修飾。具體而言，可以酶方式添加糖(糖基)殘基，此過程稱為糖基化。所得具有共價連接寡糖側鏈之蛋白質稱作糖基化蛋白質或糖蛋白。抗體係在Fc結構域以及可變結構域中具有一或多個碳水化合物殘基之糖蛋白。Fc結構域中之碳水化合物殘基對Fc結構域之效應物功能具有重要效應，且對抗體之抗原結合或半衰期具有極小效應(R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005)，第11–16頁)。相反，可變結構域之糖基化可對抗體之抗原結合活性具有效應。可變結構域中之糖基化可對抗體結合親和性具有負面效應，此可能係立體阻礙所致(Co, M.S.等人，*Mol. Immunol.* (1993) 30:1361- 1367)，或導致對抗原之親和性增加(Wallick, S.C.等人，*Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109；Wright, A.等人，

*EMBO J.* (1991) 10:2717-2723)。

本發明之一個態樣係關於生成糖基化位點突變體，其中結合蛋白質之O-或N-連接糖基化位點已突變。熟習此項技術者可使用標準熟知技術生成該等突變體。保留生物活性，但結合活性增加或降低之糖基化位點突變體係本發明之另一目標。

在另一實施例中，本發明之抗-EGFR抗體或抗原結合部分之糖基化經修飾。舉例而言，可製備無糖基化抗體(即未糖基化抗體)。可改變糖基化以(例如)增加抗體對抗原之親和性。該等碳水化合物修飾可藉由(例如)改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來完成。舉例而言，可製備一或多個胺基酸取代，使得消除一或多個可變區糖基化位點，由此消除該位點之糖基化。該無糖基化可增加抗體對抗原之親和性。此一方法更詳細地闡述於PCT公開案WO2003016466A2及美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中，其各自係全文以引用方式併入本文中。

另外或或者，可製備具有改變糖基化類型之本發明經修飾抗-EGFR抗體，例如具有減少量之岩藻糖基殘基之低岩藻糖基化抗體或具有增加之平分型GlcNac結構之抗體。已顯示該等經改變糖基化模式可增加抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾可藉由(例如)在具有經改變糖基化機構之宿主細胞中表現抗體來完成。業內已闡述具有經改變糖基化機構之細胞且其可用作宿主細胞，其中表現本發明之重組抗體，由此產生具有經改變糖基化之抗體。例如，參見Shields, R. L.等人(2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740；Umana等人(1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1，以及歐洲專利第EP 1,176,195號；PCT公開案WO 03/035835；WO 99/54342 80，其各自係全文以引用方式併入本文中。

蛋白質糖基化取決於所關注蛋白質之胺基酸序列以及其中表現該蛋白質之宿主細胞。不同生物體可產生不同糖基化酶(例如，糖基轉移酶及糖苷酶)且獲得不同可用受質(核苷酸糖)。由於該等因素，蛋白質糖基化模式及糖基殘基之組成可端視其中表現具體蛋白質之宿主系統而有所不同。本發明中之可用糖基殘基可包括(但不限於)葡萄糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、n-乙醯葡糖胺及唾液酸。較佳地，糖基化結合蛋白質包含糖基殘基，使得糖基化模式係人類模式。

不同蛋白質糖基化可導致不同蛋白質特徵。舉例而言，在微生物宿主(例如酵母)中產生並利用酵母內源路徑糖基化之治療蛋白質之效能與在哺乳動物細胞(例如CHO細胞系)中表現之相同蛋白質相比可降低。該等糖蛋白亦可在人類中具有免疫原性且在投與後顯示縮短之活體內半衰期。人類及其他動物中之特定受體可識別特定糖基殘基並促使蛋白質自血流快速清除。其他不良效應可包括以下中之變化：蛋白質摺疊、溶解性、對蛋白酶之易感性、運輸、輸送、分室、分泌、其他蛋白質或因子之識別、抗原性或致敏性。因此，從業者可偏好具有特定糖基化組成及模式之治療蛋白質，例如與人類細胞中或既定個體動物之物種特異性細胞中所產生者相同或至少相似之糖基化組成及模式。

表現不同於宿主細胞之糖基化蛋白質可藉由對宿主細胞進行遺傳修飾以表現異源糖基化酶來達成。從業者可使用重組技術生成展現人類蛋白質糖基化之抗體或其抗原結合部分。舉例而言，酵母菌株已經遺傳修飾以表現非天然糖基化酶，使得該等酵母菌株中產生之糖基化蛋白質(糖蛋白)展現與動物細胞、尤其人類細胞相同之蛋白質糖基化(美國專利公開案第20040018590號及第20020137134號及PCT公開案WO2005100584 A2)。

抗體可藉由多種技術中之任一者來產生。舉例而言，自宿主細胞表現，其中藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。術語「轉染」之各種形式意欲涵蓋眾多種常用於將外源DNA引入原核或真核宿主細胞中之技術，例如，電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-聚葡萄糖轉染及諸如此類。儘管可在原核或真核宿主細胞中表現抗體，但較佳在真核細胞中表現抗體，且最佳在哺乳動物宿主細胞中表現抗體，此乃因該等真核細胞(且尤其哺乳動物細胞)較原核細胞更有可能裝配並分泌經適當摺疊之免疫活性抗體。

用於表現本發明重組抗體之較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)(包括dhfr- CHO細胞，其闡述於Urlaub及Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220中，其與DHFR可選標記物一起使用，例如如R.J. Kaufman及P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621中所述)、NS0骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。在將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，抗體係藉由以下方式來產生：將宿主細胞培養足夠時間段以容許在宿主細胞中表現該抗體或更佳地將該抗體分泌至生長宿主細胞之培養基中。可使用標準蛋白質純化方法自培養基回收抗體。

宿主細胞亦可用於產生功能抗體片段，例如Fab片段或scFv分子。應理解，關於上述程序之變化在本發明範疇內。舉例而言，可期望用編碼本發明抗體之輕鏈及/或重鏈之功能片段之DNA轉染宿主細胞。亦可使用重組DNA技術移除一些或所有編碼與所關注抗原之結合不需要之輕鏈及重鏈之一者或二者之DNA。本發明抗體亦涵蓋自該等截短DNA分子表現之分子。另外，可藉由標準化學交聯方法將本發明抗體交聯至第二抗體來產

生雙功能抗體，其中一條重鏈及一條輕鏈係本發明抗體，且其他重鏈及輕鏈對除所關注抗原以外之抗原具有特異性。

在用於重組表現抗體或其抗原結合部分之較佳系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈及抗體輕鏈二者之重組表現載體引入dhfr-CHO細胞中。在重組表現載體內，抗體重鏈及輕鏈基因各自可操作連接至CMV增強子/AdMLP啟動子調節元件以驅動基因之高程度轉錄。重組表現載體亦攜載DHFR基因，其容許使用胺甲喋呤選擇/擴增來選擇已經該載體轉染之CHO細胞。培養所選擇轉化體宿主細胞以容許表現抗體重鏈及輕鏈，且自培養基回收完整抗體。使用標準分子生物學技術來製備重組表現載體，轉染宿主細胞，針對轉化體進行選擇，培養宿主細胞並自培養基回收抗體。此外，本發明提供藉由在適宜培養基中培養宿主細胞直至合成重組抗體來合成重組抗體之方法。本發明之重組抗體可使用對應於本文所揭示之胺基酸序列之核酸分子來產生。在一個實施例中，在重組抗體產生中使用SEQ ID NO: 86及/或87中所述之核酸分子。該方法可進一步包含自培養基分離重組抗體。

## III. 抗-EGFR抗體藥物結合物(ADC)

本文所述抗-EGFR抗體可結合至藥物部分以形成抗-EGFR抗體藥物結合物(ADC)。由於抗體-藥物偶聯物(ADC)能將一或多個藥物部分選擇性遞送至靶組織(例如表現腫瘤相關抗原(例如EGFR)之腫瘤)，故ADC可增強抗體在治療疾病(例如癌症)中之治療效能。因此，在某些實施例中，本發明提供用於治療用途(例如治療癌症)之抗-EGFR ADC。

本發明之抗-EGFR ADC包含連接至一或多個藥物部分之抗-EGFR抗體(即特異性結合至EGFR之抗體)。ADC之特異性由抗體(即抗-EGFR)之

特異性來定義。在一個實施例中，抗-EGFR抗體連接至一或多種細胞毒性藥物，其內部遞送至表現EGFR之經轉變癌細胞。

如同可用於結合抗體及一或多種藥物之連接體一般，可用於本發明之抗-EGFR ADC中之藥物的實例提供於下文中。術語「藥物」、「藥劑」及「藥物部分」在本文中可互換使用。術語「經連接」及「經結合」在本文中亦可互換使用且指示，抗體及部分共價連接。

在一些實施例中，ADC具有下式(式I)：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_n \qquad (I)$$

其中Ab係抗體，例如抗-EGFR抗體AbA，且(L-D)係連接體-藥物部分。連接體-藥物部分係由L- (其係連接體)及-D (其係具有(例如)細胞生長抑制性、細胞毒性或其他針對靶細胞(例如表現EGFR之細胞)之治療活性之藥物部分)製得；且n係1至20之整數。在一些實施例中，n介於1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、1至2範圍內或係1。ADC之DAR等效於式I中所提及之「n」。在一個實施例中，ADC具有式$Ab\text{-}(L\text{-}D)_n$，其中Ab係抗-EGFR抗體，例如AbA，L係連接體，例如纈胺酸瓜胺酸(vc)，D係藥物，例如奧裡斯他汀，例如MMAF或MMAE，且n係2至4 (等效於2-4之DAR)。關於可用於本發明ADC中之藥物(式I中之D)及連接體(式I中之L)以及替代性ADC結構之其他細節闡述於下文中。

**A. 抗-EGFR ADC：用於結合之實例性藥物**

抗-EGFR抗體可用於ADC中以將一或多種藥物靶向所關注細胞(例如表現EGFR之癌細胞)。本發明之抗-EGFR ADC提供可(例如)在將一或多種藥物遞送至特定細胞時，減少通常使用抗癌療法所見之副作用之靶向療法。

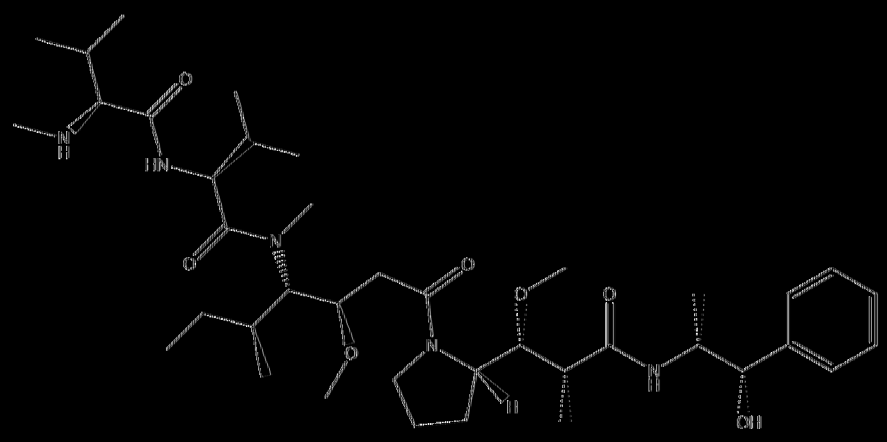
*奧裡斯他汀*

本發明之抗-EGFR抗體(例如AbA抗體)可結合至至少一種奧裡斯他汀。奧裡斯他汀代表一群多拉斯他汀類似物，通常已顯示其藉由以下方式具有抗癌活性：干擾微管動力學及GTP水解，由此抑制細胞分裂。舉例而言，奧裡斯他汀E (美國專利第5,635,483號)係海洋天然產物多拉斯他汀10之合成類似物，該多拉斯他汀10係藉由結合至微管蛋白上與抗癌藥物長春新鹼(vincristine)相同之位點來抑制微管蛋白聚合之化合物(G. R. Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod, 70: 1-79 (1997))。多拉斯他汀10、奧裡斯他汀PE及奧裡斯他汀E係具有4個胺基酸之線性肽，其中3個胺基酸為多拉斯他汀類化合物所獨有。有絲分裂抑制劑之奧裡斯他汀亞類之實例性實施例包括(但不限於)單甲基奧裡斯他汀D (MMAD或奧裡斯他汀D衍生物)、單甲基奧裡斯他汀E (MMAE或奧裡斯他汀E衍生物)、單甲基奧裡斯他汀F (MMAF或奧裡斯他汀F衍生物)、奧裡斯他汀F苯二胺(AFP)、奧裡斯他汀EB (AEB)、奧裡斯他汀EFP (AEFP)及5-苯甲醯基戊酸-AE酯(AEVB)。奧裡斯他汀衍生物之合成及結構闡述於以下文獻中：美國專利申請公開案第2003-0083263號、第2005-0238649號及第2005-0009751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，其各自係以引用方式併入本文中。

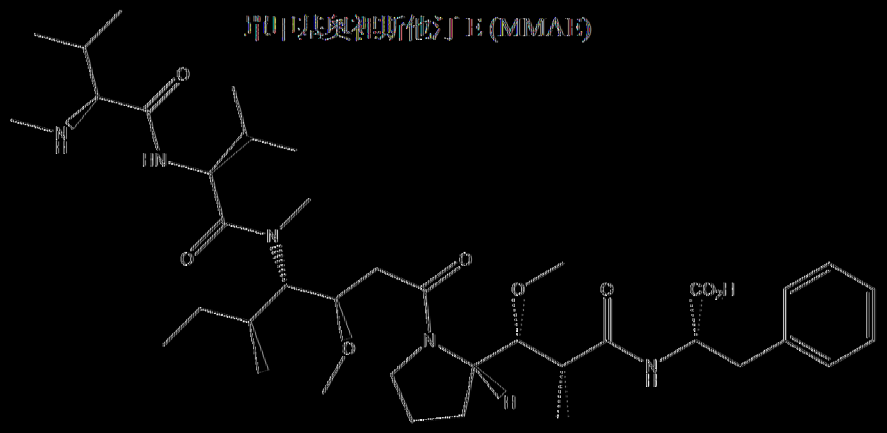
在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體(例如，AbA)結合至少一種MMAE (單甲基奧裡斯他汀E)。單甲基奧裡斯他汀E (MMAE，維多汀(vedotin))藉由阻斷微管蛋白之聚合來抑制細胞分裂。由於其超強毒性，其本身亦不能用作藥物。在最近之癌症療法研發中，將其連接至識別癌細胞中表現之特定標記物且將MMAE引導至癌細胞之單株抗體(mAb)。在一個實施例中，將MMAE連接至抗-EGFR抗體之連接體在細胞外液(即，細胞外部之介質或環境)中穩定，但一旦ADC已結合至特定癌細胞抗原並進入癌細胞即由細胞自溶酶裂解，由此釋放毒性MMAE並活化有效抗有絲分裂機制。

在一個實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體(例如，AbA)結合至至少一種MMAF (單甲基奧裡斯他汀F)。單甲基奧裡斯他汀F (MMAF)藉由阻斷微管蛋白之聚合來抑制細胞分裂。其具有帶電荷之C末端苯丙胺酸殘基，該殘基與其不帶電荷之對應體MMAE相比減弱其細胞毒性活性。由於其超強毒性，其本身不能用作藥物，但可連接至將其引導至癌細胞之單株抗體(mAb)。在一個實施例中，連接至抗-EGFR抗體之連接體在細胞外液中穩定，但一旦結合物進入腫瘤細胞即由細胞自溶酶裂解，由此活化抗有絲分裂機制。

MMAF及MMAE之結構提供於下文中。



甲基奧瑞斯他汀E (MMAE)



甲基奧瑞斯他汀F (MMAF)

AbA-vcMMAE之實例亦提供於圖11中。值得注意的是，圖11闡述抗體(例如，AbA)偶合至單一藥物且因此DAR為1之情形。在某些實施例中，ADC之DAR將為2至8或者2至4。

*用於結合之其他藥物*

可用於ADC中之藥物(即，可結合至本發明之抗-EGFR抗體之藥物)之實例提供於下文中，且包括有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素，免疫調節劑、基因療法試劑、烷基化劑、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼藥劑、化學保護劑、激素藥劑、糖皮質激素、光活性治療劑、寡核苷酸、放射性同位素、放射致敏劑、拓撲異構酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑及其組合。

*1. 有絲分裂抑制劑*

在一個態樣中，抗-EGFR抗體可結合至一或多種有絲分裂抑制劑以

形成用於治療癌症之ADC。如本文所用術語「有絲分裂抑制劑」係指阻斷有絲分裂或細胞分裂(對於癌細胞尤其重要之生物過程)之細胞毒性及/或治療劑。有絲分裂抑制劑通常藉由影響微管聚合或微管解聚中斷微管，使得防止細胞分裂。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至一或多種有絲分裂抑制劑，其藉由抑制微管蛋白聚合來中斷微管形成。在一個實施例中，用於本發明ADC阻止有絲分裂抑制劑係易莎平(Ixempra)(伊沙匹隆(ixabepilone))。可用於本發明之抗-EGFR ADC中之有絲分裂抑制劑之實例提供於下文中。有絲分裂抑制劑種類中包括上述奧裡斯他汀。

*a. 多拉斯他汀*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種多拉斯他汀以形成ADC。多拉斯他汀係自印度洋海兔龍骨海鹿(*Dolabella auricularia*)分離之短肽化合物(參見Pettit等人，J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 4677)。多拉斯他汀之實例包括多拉斯他汀10及多拉斯他汀15。多拉斯他汀15係源自龍骨海鹿之7亞單位酯肽，且係結構上與抗微管蛋白劑多拉斯他汀10 (自相同生物體獲得之5亞單位肽)相關之有效抗有絲分裂劑。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR ADC包含如本文所述之抗-EGFR抗體及至少一種多拉斯他汀。上述奧裡斯他汀係多拉斯他汀10之合成衍生物。

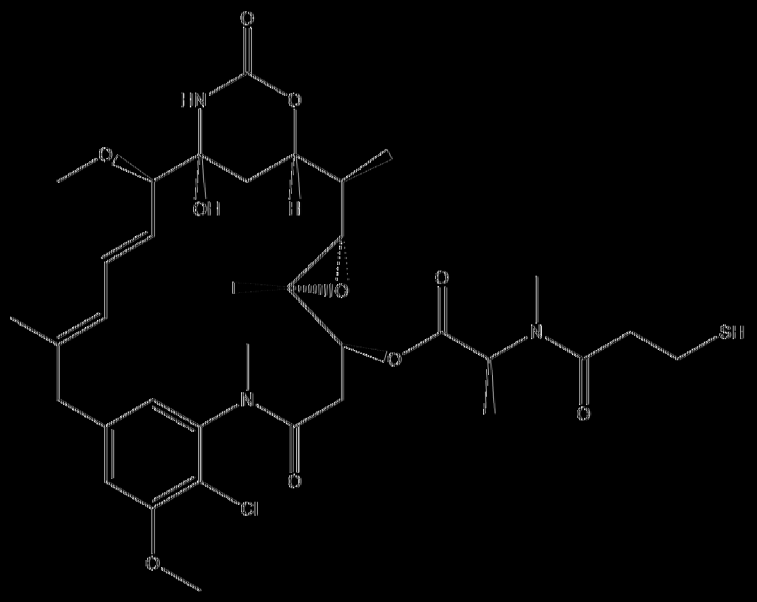
*b. 類美登素*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種類美登素以形成ADC。類美登素係有效抗腫瘤劑，其最初係自高等植物科衛矛科(Celastraceae)、鼠李科(Rhamnaceae)及大戟科(Euphorbiaceae)以及一些苔蘚物種分離(Kupchan等人，J. Am. Chem. Soc. 94:1354-1356 [1972]；Wani等人，J. Chem. Soc. Chem. Commun. 390: [1973]；Powell等人，J. Nat. Prod.

46:660-666 [1983]；Sakai等人，J. Nat. Prod. 51 :845-850 [1988]；及Suwanborirux等人，Experientia 46:117-120 [1990])。證據表明，類美登素藉由抑制微管蛋白質微管蛋白的聚合，由此防止形成微管，來抑制有絲分裂(例如，參見美國專利第6,441,163號及Remillard等人，Science, 189, 1002-1005 (1975))。已在活體外使用細胞培養模型，且在活體內使用實驗室動物系統顯示類美登素可抑制腫瘤細胞生長。此外，類美登素之細胞毒性係習用化學治療劑(例如胺甲喋呤、道諾黴素(daunorubicin)及長春新鹼)之1,000倍(例如，參見美國專利第5,208,020號)。

類美登素包括美登素(maytansine)、美登醇(maytansinol)、美登醇之C-3酯及其他美登醇類似物及衍生物(例如，參見美國專利第5,208,020號及第6,441,163號，其各自以引用方式併入本文中)。美登醇之C-3酯可為天然或合成產生的。此外，天然及合成C-3美登醇酯二者皆可歸類為與簡單羧酸之C-3酯，或與N-甲基-L-丙胺酸衍生物之C-3酯，後者之細胞毒性強於前者。合成類美登素類似物闡述於(例如) Kupchan等人，J. Med. Chem., 21, 31-37 (1978)中。

適用於本發明ADC中之類美登素可自天然來源分離，以合成方式產生，或以半合成方式產生。此外，類美登素可以任一適宜方式經修飾，只要在最終結合物分子中保存足夠細胞毒性即可。就此而言，類美登素缺少可連接至抗體之適宜官能基。期望利用連接部分將類美登素連接至抗體以形成結合物，且更詳細地闡述於III.B章節中。實例性類美登素莫登素(mertansine) (DM1)之結構提供於下文中。



美登素(DM1)

類美登素之代表性實例包括(但不限於) DM1 (N$^{2'}$-去乙醯基-N$^{2'}$-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素；亦稱作美登素、藥物類美登素1；ImmunoGen公司；亦參見Chari等人(1992) *Cancer Res* 52:127)、DM2、DM3 (N$^{2'}$-去乙醯基-N$^{2'}$-(4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素)、DM4 (4-甲基-4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素)及美登醇(合成類美登素類似物)。類美登素之其他實例闡述於以引用方式併入本文中之美國專利第8,142,784號中。

安絲菌素(ansamitocin)係一群已自各種細菌來源分離之類美登素抗生素。該等化合物具有有效抗腫瘤活性。代表性實例包括(但不限於)安絲菌素P1、安絲菌素P2、安絲菌素P3及安絲菌素P4。

在本發明之一個實施例中，抗-EGFR抗體結合至至少一種DM1。在一個實施例中，抗-EGFR抗體結合至至少一種DM2。在一個實施例中，抗-EGFR抗體結合至至少一種DM3。在一個實施例中，抗-EGFR抗體結合至至少一種DM4。

*d. 植物鹼*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種植物鹼，例如紫杉烷或長

春花生物鹼。植物鹼係自某些類型之植物製得之化學療法治療。長春花生物鹼係自長春花植物(長春花(*catharanthus rosea*))製得，而紫杉烷係自太平洋紫衫(紫衫(*taxus*))之樹皮製得。長春花生物鹼及紫杉烷二者亦作為抗微管劑而為人所知，且更詳細地闡述於下文中。

**紫杉烷**

本文所述抗-EGFR抗體可結合至至少一種紫杉烷。如本文所用術語「紫杉烷」係指一類抗瘤劑，其具有微管作用機制且具有包括紫杉烷環結構及細胞生長抑制性活性所需之立體特異性側鏈之結構。術語「紫杉烷」內亦包括多種已知衍生物，包括親水衍生物及疏水衍生物二者。紫杉烷衍生物包括(但不限於)國際專利申請案第WO 99/18113號中所述之半乳糖及甘露糖衍生物；WO 99/14209中所述之六氫吡嗪基及其他衍生物；WO 99/09021、WO 98/22451及美國專利第5,869,680號中所述之紫杉烷衍生物；WO 98/28288中所述之6-硫代衍生物；美國專利第5,821,263號中所述之次磺醯胺衍生物；及美國專利第5,415,869號中所述之紫杉醇衍生物，其各自以引用方式併入本文中。紫杉烷化合物先前亦已闡述於美國專利第5,641,803號、第5,665,671號、第5,380,751號、第5,728,687號、第5,415,869號、第5,407,683號、第5,399,363號、第5,424,073號、第5,157,049號、第5,773,464號、第5,821,263號、第5,840,929號、第4,814,470號、第5,438,072號、第5,403,858號、第4,960,790號、第5,433,364號、第4,942,184號、第5,362,831號、第5,705,503號及第5,278,324號中，其皆係以引用方式明確併入本文中。紫杉烷之其他實例包括(但不限於)多西他賽(docetaxel) (剋癌易(Taxotere)；Sanofi Aventis)、太平洋紫杉醇(亞伯杉烷(Abraxane)或紫杉醇；Abraxis Oncology)及奈米

粒子太平洋紫杉醇(ABI-007 / 亞伯杉烯(Abraxene)；Abraxis Bioscience)。

在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種MMAF (單甲基奧裡斯他汀F)。在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至少一種多西他賽。

**長春花生物鹼**

在一個實施例中，抗-EGFR抗體結合至至少一種長春花生物鹼。長春花生物鹼係一類細胞週期特異性藥物，其藉由作用於微管蛋白並防止形成微管來抑制癌細胞分裂之能力以起作用。可用於本發明ADC之長春花生物鹼之實例包括(但不限於)硫酸長春地辛(vindesine sulfate)、長春新鹼、長春鹼及長春瑞濱(vinorelbine)。

*2. 抗腫瘤抗生素*

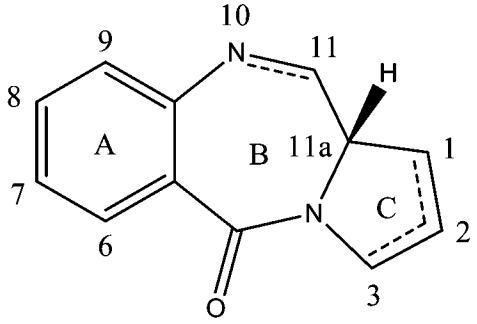
本發明之抗-EGFR抗體可結合至一或多種用於治療癌症之抗腫瘤抗生素。如本文所用術語「抗腫瘤抗生素」意指抗瘤藥物，其藉由干擾DNA來阻斷細胞生長且係自微生物製得。通常，抗腫瘤抗生素斷裂DNA鏈或減慢或終止DNA合成。可包括於本發明之抗-EGFR ADC中之抗腫瘤抗生素之實例包括(但不限於)放線菌素(例如，吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮平)、蒽環、卡奇黴素及多卡米星，其更詳細地闡述於下文中。

*a. 放線菌素*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種放線菌素。放線菌素係自鏈黴菌屬(*Streptomyces*)細菌分離之抗腫瘤抗生素亞類。放線菌素之代表性實例包括(但不限於)放線菌素D (可美淨(Cosmegen) [亦稱作放線菌素、更生黴素(dactinomycin)、放線菌素IV、放線菌素C1], Lundbeck公司)、安麴黴素(anthramycin)、契卡黴素A (chicamycin A)、DC-81、甲基胺茴

黴素(mazethramycin)、新茴黴素A (neothramycin A)、新茴黴素B、泊羅黴素(porothramycin)、普拉卡素B (prothracarcin B)、SG2285、西班米星(sibanomicin)、西伯利亞黴素(sibiromycin)及富山黴素(tomaymycin)。在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種吡咯并苯并二氮平(PBD)。PBD之實例包括(但不限於)安麴黴素、契卡黴素A、DC-81、甲基胺茴黴素、新茴黴素A、新茴黴素B、泊羅黴素、普拉卡素B、SG2000 (SJG-136)、SG2202 (ZC-207)、SG2285 (ZC-423)、西班米星、西伯利亞黴素及富山黴素。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種放線菌素(例如放線菌素D)或至少一種PBD(例如吡咯并苯并二氮平(PBD)二聚體)。

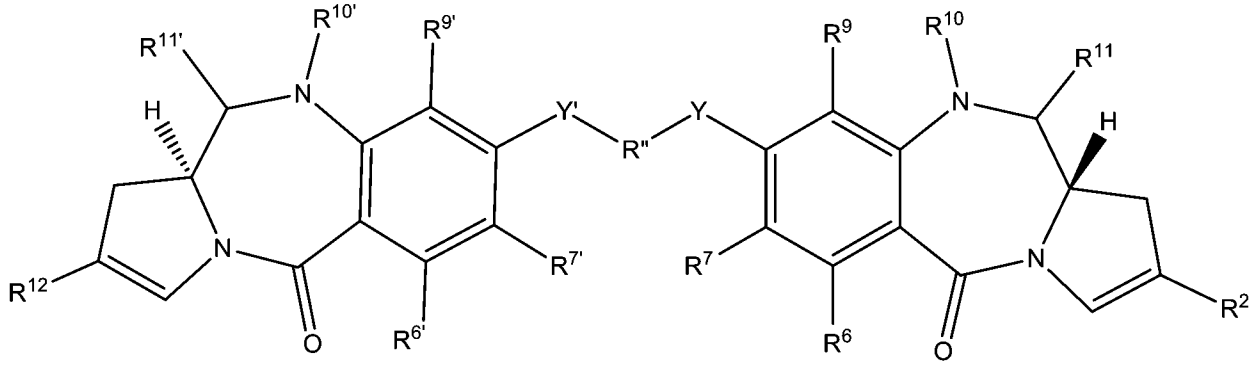
PBD之結構可參見(例如)美國專利申請公開案第2013/0028917號及第2013/0028919號以及WO 2011/130598 A1，其各自係全文以引用方式併入本文中。PBD之一般結構提供於下文中。




PBD之取代基之數目、類型及位置，其芳香族A環及吡咯并C環二者，及其C環之飽和度各不相同。在B環中，一般在N10-C11位置存在亞胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲基醚(NH-CH(OMe))，其係負責烷基化DNA之親電子中心。所有已知天然產物皆在手性C11α位置處具有(*S*)-構形，此在自C環朝向A環察看時為其提供右撚。本文所提供PBD實例可結合至本發明之抗-EGFR抗體。可結合至本發明之抗-EGFR抗體之PBD

之其他實例可參見(例如)美國專利申請公開案第2013/0028917 A1號及第2013/0028919 A1號、美國專利第7,741,319 B2號以及WO 2011/130598 A1及WO 2006/111759 A1，其各自係全文以引用方式併入本文中。

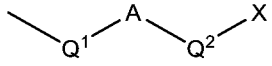
具有下式II之代表性PBD二聚體可結合至本發明之抗-EGFR抗體：



II

其中：

$R^2$具有式III：



(III)

其中A係$C_{5-7}$芳基，X係結合至選自由以下組成之群之連接體單元之基團：—O—、—S—、—C(O)O—、—C(O)—、—NH(C═O)—及—N($R^N$)—，其中$R^N$選自由以下組成之群：H、$C_{1-4}$烷基及$(C_2H_4O)_mCH_3$，其中m係1至3，且以下中之任一者：

(i) $Q^1$係單鍵，且$Q^2$選自由以下組成之群：單鍵及—Z—$(CH_2)_n$—，其中Z選自由以下組成之群：單鍵、O、S及NH且n係1至3；或

(ii) $Q^1$係—CH═CH—，且$Q^2$係單鍵；

$R^{12}$係視情況經一或多個選自由以下組成之群之取代基取代之$C_{5-10}$芳基：鹵基、硝基、氰基、$C_{1-12}$烷氧基、$C_{3-20}$雜環烷氧基、$C_{5-20}$芳基氧基、雜芳基氧基、烷基烷氧基、芳基烷氧基、烷基芳基氧基、雜芳基烷氧基、烷基雜芳基氧基、$C_{1-7}$烷基、$C_{3-7}$雜環基及雙-氧基-$C_{1-3}$伸烷基；

$R^6$及$R^9$獨立地選自由以下組成之群：H、R、OH、OR、SH、SR、$NH_2$、NHR、NRR′、硝基、$Me_3Sn$及鹵基；

其中R及R′獨立地選自由以下組成之群：視情況經取代之$C_{1-12}$烷基、$C_{3-20}$雜環基及$C_{5-20}$芳基；

$R^7$選自由以下組成之群：H、R、OH、OR、SH、SR、$NH_2$、NHR、NHRR′、硝基、$Me_3Sn$及鹵基；

以下中之任一者：

(a) $R^{10}$係H，且$R^{11}$係OH、$OR^A$，其中$R^A$係$C_{1-4}$烷基；

(b) $R^{10}$及$R^{11}$在其所鍵結之氮與碳原子之間形成氮-碳雙鍵；或

(c) $R^{10}$係H且$R^{11}$係$SO_zM$，其中z係2或3；

R''係$C_{3-12}$伸烷基，該鏈可夾雜有一或多個選自由O、S、NH及芳香族環組成之群之雜原子；

Y及Y′選自由以下組成之群：O、S及NH；

$R^{6'}$、$R^{7'}$、$R^{9'}$分別選自與$R^6$、$R^7$及$R^9$相同之群，且$R^{10'}$及$R^{11'}$與$R^{10}$及$R^{11}$相同，且每一M係醫藥上可接受之單價陽離子，或兩個M基團一起係醫藥上可接受之二價陽離子。

如本文所用片語「視情況經取代」係關於可未經取代或可經取代之母體基團。

除非另外規定，否則如本文所用術語「經取代」係關於具有一或多個取代基之母體基團。術語「取代基」在本文中係以習用含義使用且係指共價附接至或(若適宜)稠合至母體基團之化學部分。眾多種取代基為業內所熟知，且其形成及引入多種母體基團中之方法亦眾所周知。

$C_{1-12}$烷基：如本文所用術語「$C_{1-12}$烷基」係關於藉由自具有1至12個

碳原子之烴化合物之碳原子移除氫原子獲得之單價部分，其可係脂肪族或脂環族，且其可係飽和或不飽和(例如部分不飽和、全不飽和)。因此，術語「烷基」包括下文所論述之烯基、炔基、環烷基等亞類。

飽和烷基之實例包括(但不限於)甲基($C_1$)、乙基($C_2$)、丙基($C_3$)、丁基($C_4$)、戊基($C_5$)、己基($C_6$)及庚基($C_7$)。

飽和直鏈烷基之實例包括(但不限於)甲基($C_1$)、乙基($C_2$)、正丙基($C_3$)、正丁基($C_4$)、正戊基(戊基) ($C_5$)、正己基($C_6$)及正庚基($C_7$)。

飽和具支鏈烷基之實例包括異丙基($C_3$)、異丁基($C_4$)、第二丁基($C_4$)、第三丁基($C_4$)、異戊基($C_5$)及新戊基($C_5$)。

$C_{3-20}$雜環基：如本文所用術語「$C_{3-20}$雜環基」係關於藉由自雜環化合物之環原子移除氫原子獲得之單價部分，該部分具有3至20個環原子，其中1至10個環原子係環雜原子。較佳地，每一環具有3至7個環原子，其中1至4個環原子係環雜原子。

在此情況下，前綴(例如$C_{3-20}$、$C_{3-7}$、$C_{5-6}$等)表示環原子(不論係碳原子或雜原子)數目或環原子數目之範圍。舉例而言，如本文所用術語「$C_{5-6}$雜環基」係關於具有5或6個環原子之雜環基。

單環雜環基之實例包括(但不限於)彼等衍生自以下者：

$N_1$：氮丙啶($C_3$)、氮雜環丁烷($C_4$)、吡咯啶(四氫吡咯) ($C_5$)、吡咯啉(例如，3-吡咯啉、2,5-二氫吡咯) ($C_5$)、2H-吡咯或3H-吡咯(異吡咯(isopyrrole)、異吡咯(isoazole)) ($C_5$)、六氫吡啶($C_6$)、二氫吡啶($C_6$)、四氫吡啶($C_6$)、氮呯($C_7$)；$O_1$：環氧乙烷($C_3$)、氧雜環丁烷($C_4$)、氧雜環戊烷(四氫呋喃) ($C_5$)、氧雜環戊二烯(二氫呋喃) ($C_5$)、噁烷(四氫吡喃) ($C_6$)、二氫吡喃($C_6$)、吡喃($C_6$)、氧呯($C_7$)；$S_1$：硫環丙烷($C_3$)、硫雜環丁烷($C_4$)、

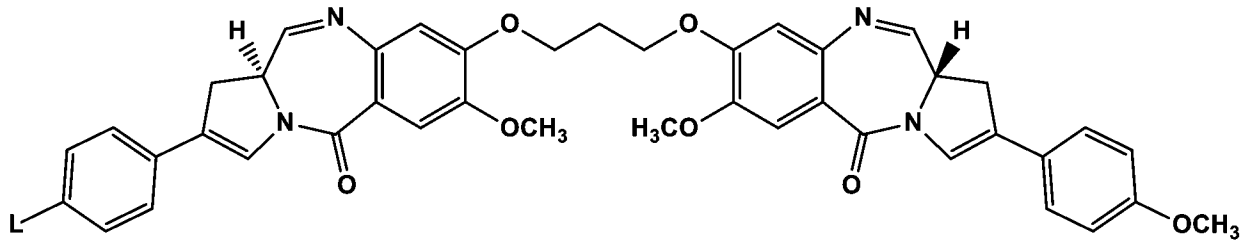
四氫噻吩(四氫噻吩) ($C_5$)、硫代環己烷(四氫噻喃) ($C_6$)、硫雜環庚烷($C_7$)；$O_2$：二氧戊環($C_5$)、二噁烷($C_6$)及二氧雜環庚烷($C_7$)；$O_3$：三噁烷($C_6$)；$N_2$：咪唑啶($C_5$)、吡唑啶(二唑啶) ($C_5$)、咪唑啉($C_5$)、吡唑啉(二氫吡唑) ($C_5$)、六氫吡嗪($C_6$)；$N_1O_1$：四氫噁唑($C_5$)、二氫噁唑($C_5$)、四氫異噁唑($C_5$)、二氫異噁唑($C_5$)、嗎啉($C_6$)、四氫噁嗪($C_6$)、二氫噁嗪($C_6$)、噁嗪($C_6$)；$N_1S_1$：噻唑啉($C_5$)、噻唑啶($C_5$)、硫嗎啉($C_6$)；$N_2O_1$：噁二嗪($C_6$)；$O_1S_1$：氧硫雜環戊二烯($C_5$)及氧硫雜環己烷(噻噁烷) ($C_6$)；及$N_1O_1S_1$：噁噻嗪($C_6$)。

經取代單環雜環基之實例包括彼等呈環狀形式之衍生自糖類者，例如呋喃糖($C_5$)，例如阿拉伯呋喃糖、來蘇呋喃糖、呋喃核糖及呋喃木糖；以及吡喃糖($C_6$)，例如別吡喃糖、吡喃阿卓糖、葡萄吡喃糖、吡喃甘露糖、古洛吡喃糖、吡喃艾杜糖、半乳吡喃糖及塔洛吡喃糖。

$C_{5-20}$芳基：如本文所用術語「$C_{5-20}$芳基」係關於藉由自芳香族化合物之芳香族環原子移除氫原子獲得之單價部分，該部分具有3至20個環原子。較佳地，每一環具有5至7個環原子。

在此情況下，前綴(例如$C_{3-20}$、$C_{5-7}$、$C_{5-6}$等)表示環原子(不論係碳原子或雜原子)數目或環原子數目之範圍。舉例而言，如本文所用術語「$C_{5-6}$芳基」係關於具有5或6個環原子之芳基。

在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體可結合至具有下式之PBD二聚體：



其中上述結構闡述PBD二聚體SG2202 (ZC-207)且經由連接體L結合至本發明之抗-EGFR抗體。SG2202 (ZC-207)揭示於(例如)美國專利申請公開案第2007/0173497號，其係全文以引用方式併入本文中。

在另一實施例中，PBD二聚體SGD-1882經由藥物連接體結合至本發明之抗-EGFR抗體，如圖21中所繪示。SGD-1882揭示於Sutherland等人(2013) *Blood* 122(8):1455及美國專利申請公開案第2013/0028919號中，其係全文以引用方式併入本文中。如圖21中所述，PBD二聚體SGD-1882可經由mc-val-ala-二肽連接體結合至抗體(在圖21中統稱為SGD-1910)。在某一實施例中，如本文所揭示之抗-EGFR抗體結合至圖21中所述之PBD二聚體。因此，在另一實施例中，本發明包括經由mc-val-ala-二肽連接體結合至PBD二聚體之如本文所揭示之抗-EGFR抗體，如圖21中所述。

在某些實施例中，本發明包括抗-EGFR抗體，其包含重鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之CDR1結構域；以及輕鏈可變區，其包含包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之CDR3結構域、包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之CDR2結構域及包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之CDR1結構域，該抗體結合至PBD，包括(但不限於)圖21中所述之PBD二聚體。在某些實施例中，本發明包括抗-EGFR抗體，其包含如藉由SEQ ID NO: 9中所述之胺基酸序列定義之AbA之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之輕鏈可變區，其中該抗體結合至PBD，例如(但不限於)圖21之實例性PBD二聚體。

*b. 蒽環*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種蒽環。蒽環係自鏈黴菌屬

之細菌分離之抗腫瘤抗生素亞類。代表性實例包括(但不限於)道諾黴素(正定黴素(Cerubidine)，Bedford Laboratories)、多柔比星(doxorubicin)(阿德力黴素(Adriamycin)，Bedford Laboratories；亦稱作鹽酸多柔比星、羥基道諾黴素及羅拜克斯(Rubex))、表柔比星(epirubicin) (艾倫斯(Ellence)，Pfizer)及伊達比星(idarubicin) (去甲氧柔紅黴素(Idamycin)；Pfizer公司)。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種蒽環(例如，多柔比星)。

*c. 卡奇黴素*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種卡奇黴素。卡奇黴素係烯二炔抗生素家族源自土壤生物體棘孢小單孢菌(*Micromonospora echinospora*)。卡奇黴素結合DNA小溝且誘導雙鏈DNA斷裂，導致細胞死亡，相對於其他化學治療劑增加100倍(Damle等人(2003) *Curr Opin Pharmacol* 3:386)。已闡述可用作本發明之藥物結合物之卡奇黴素之製備，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號及第5,877,296號。可用卡奇黴素之結構類似物包括(但不限於) $\gamma_1^I$、$\alpha_2^I$、$\alpha_3^I$、N-乙醯基-$\gamma_1^I$、PSAG及$\theta^I_1$ (Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993)，Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及上文所提及之美國專利第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號及第5,877,296號)。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種卡奇黴素。

*d. 多卡米星*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種多卡米星。多卡米星係自鏈黴菌屬之細菌分離之抗腫瘤抗生素亞類。(參見Nagamura及Saito (1998) *Chemistry of Heterocyclic Compounds*，第34卷，第12期)。多卡米星結合至DNA小溝且烷基化N3位置處之核鹼基腺嘌呤(Boger (1993) *Pure and Appl Chem* 65(6):1123；以及Boger及Johnson (1995) *PNAS USA* 92:3642)。多卡米星之合成類似物包括(但不限於)阿多來新(adozelesin)、比折來新(bizelesin)及卡折來新(carzelesin)。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種多卡米星。

*e. 其他抗腫瘤抗生素*

除前述以外，可用於本發明之抗-EGFR ADC之其他抗腫瘤抗生素包括博來黴素(bleomycin)(硫酸博來黴素(Blenoxane)，Bristol-Myers Squibb)、絲裂黴素(mitomycin)及普卡黴素(plicamycin) (亦稱作光輝黴素(mithramycin))。

*3. 免疫調節劑*

在一個態樣中，本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種免疫調節劑。如本文所用術語「免疫調節劑」係指可刺激或改變免疫反應之藥劑。在一個實施例中，免疫調節劑係增強個體之免疫反應之免疫刺激劑。在另一實施例中，免疫調節劑係防止或降低個體之免疫反應之免疫抑制劑。免疫調節劑可調節骨髓細胞(單核球、巨噬細胞、樹突細胞、巨核細胞及顆粒球)或淋巴樣細胞(T細胞、B細胞及天然殺傷(NK)細胞)及其任一進一步分化之細胞。代表性實例包括(但不限於)卡介苗(bacillus calmette-guerin) (BCG)及左旋咪唑(levamisole) (抑美索(Ergamisol))。可用於本發明ADC之免疫調節劑之其他實例包括(但不限於)癌症疫苗、細胞介素及免疫調節

基因療法。

*a. 癌症疫苗*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至癌症疫苗。如本文所用術語「癌症疫苗」係指引發腫瘤特異性免疫反應之組合物(例如，腫瘤抗原及細胞介素)。該反應係藉由投與癌症疫苗或在本發明情形中投與包含抗-EGFR抗體及癌症疫苗之ADC自個體自身之免疫系統引發。在較佳實施例中，免疫反應導致根除體內之腫瘤細胞(例如，原發或轉移腫瘤細胞)。癌症疫苗之使用一般涉及投與(例如)存於具體癌細胞表面上或存於顯示促進癌症形成之具體傳染原之表面上之具體抗原或抗原群。在一些實施例中，癌症疫苗用於預防性目的，而在其他實施例中，用於治療性目的。可用於本發明之抗-EGFR ADC中之癌症疫苗之非限制性實例包括重組二價人類乳頭瘤病毒(HPV)疫苗類型16及18疫苗(Cervarix, GlaxoSmithKline)、重組四價人類乳頭瘤病毒(HPV)類型6、11、16及18疫苗(Gardasil, Merck & Company)及西普魯塞-T (sipuleucel-T) (Provenge, Dendreon)。因此，在一個實施例中，本發明之抗-EGFR抗體結合至至少一種係免疫刺激劑或係免疫抑制劑之癌症疫苗。

*b. 細胞介素*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種細胞介素。術語「細胞介素」一般係指一個細胞群體釋放之蛋白質，其作為細胞間媒介物作用於另一細胞。細胞介素直接刺激腫瘤位點之免疫效應細胞及基質細胞並增強細胞毒性效應細胞之腫瘤細胞識別(Lee及Margolin (2011) *Cancers* 3:3856)。多種動物腫瘤模型研究已顯示，細胞介素具有寬抗腫瘤活性，且此已轉換為多種基於細胞介素之用於癌症療法之方法(Lee及Margoli，上文文獻)。

近年來，多種細胞介素(包括GM-CSF、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21)進入臨床試驗用於患有晚期癌症之患者(Lee及Margoli，上文文獻)。

可用於本發明ADC之細胞介素之實例包括(但不限於)副甲狀腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；糖蛋白激素，例如濾泡刺激激素(FSH)、甲狀腺刺激激素(TSH)及黃體促素(LH)；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；泌乳素；胎盤生乳素；腫瘤壞死因子；苗勒管(mullerian)抑制物質；小鼠促性腺激素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整聯蛋白；促血小板生成素(TPO)；神經生長因子，例如NGF；血小板生長因子；轉變生長因子(TGF)；胰島素樣生長因子-I及-II；促紅血球生成素(EPO)；骨誘導因子；干擾素，例如干擾素α、β及γ；群落刺激因子(CSF)；顆粒球-巨噬細胞-C-SF (GM-CSF)；及顆粒球-CSF (G-CSF)；介白素(IL)，例如IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘤壞死因子；及其他多肽因子，包括LIF及套組配體(KL)。如本文所用術語細胞介素包括來自天然來源或來自重組細胞培養之蛋白質及天然序列細胞介素之生物活性等效物。因此，在一個實施例中，本發明提供包含本文所述抗-EGFR抗體及細胞介素之ADC。

*c. 群落刺激因子(CSF)*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種群落刺激因子(CSF)。群落刺激因子(CSF)係輔助骨髓製造紅血球之生長因子。由於一些癌症治療(例如，化學療法)可影響白血球(其幫助對抗感染)，可引入群落刺激因子以幫助支持白血球含量並強化免疫系統。群落刺激因子亦可在骨髓移植後用於幫助新骨髓開始產生白血球。可用於本發明之抗-EGFR ADC中之CSF

之代表性實例包括(但不限於)促紅血球生成素(Epoetin)、非格司亭(filgrastim) (Neopogen (亦稱作顆粒球群落刺激因子(G-CSF)；Amgen公司)、沙格司亭(sargramostim) (leukine (顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子及GM-CSF)；Genzyme公司)、促巨核細胞生成素(promegapoietin)及奧普瑞白介素(Oprelvekin) (重組IL-11；Pfizer公司)。因此，在一個實施例中，本發明提供包含本文所述抗-EGFR抗體及CSF之ADC。

*4. 基因療法*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種用於基因療法之核酸(直接或間接經由載體)。基因療法一般係指將遺傳物質引入細胞中，其中遺傳物質設計為治療疾病。由於其係關於免疫調節劑，故使用基因療法來刺激個體抑制癌細胞增殖或殺死癌細胞之天然能力。在一個實施例中，本發明之抗-EGFR ADC包含編碼功能性治療基因之核酸，該治療基因用於替代突變或以其他方式功能不良(例如截短)之癌症相關基因。在其他實施例中，本發明之抗-EGFR ADC包含編碼用於治療癌症之治療蛋白質或以其他方式提供該治療蛋白質之產生的核酸。編碼治療基因之核酸可直接結合至抗-EGFR抗體，或另一選擇為可經由載體結合至抗-EGFR抗體。可用於遞送用於基因療法之核酸之載體的實例包括(但不限於)病毒載體或脂質體。

*5. 烷基化劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至一或多種烷基化劑。烷基化劑係一類將烷基附接至DNA之抗瘤化合物。可用於本發明ADC之烷基化劑之實例包括(但不限於)烷基磺酸鹽、次乙亞胺、甲胺衍生物、環氧化物、氮芥、亞硝基脲、三嗪及肼。

*a. 烷基磺酸鹽*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種烷基磺酸鹽。烷基磺酸鹽係具有以下通式之烷基化劑亞類：$R\text{-}SO_2\text{-}O\text{-}R^1$，其中R及$R^1$通常係烷基或芳基。烷基磺酸鹽之代表性實例包括(但不限於)白消安(busulfan) (馬利蘭(Myleran), GlaxoSmithKline；補束克IV (Busulfex IV), PDL BioPharma公司)。

*b. 氮芥*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種氮芥。此抗癌化合物亞類之代表性實例包括(但不限於)氮芥苯丁酸(瘤克寧(Leukeran)，GlaxoSmithKline)、環磷醯胺(癌得星(Cytoxan)，Bristol-Myers Squibb；癌得散(Neosar), Pfizer公司)、雌氮芥(estramustine) (雌氮芥磷酸鈉或依立適(Estracyt))，Pfizer公司)、異環磷醯胺(益菲克斯(Ifex)，Bristol-Myers Squibb)、甲基二氯乙基胺(氮芥(Mustargen)，Lundbeck公司)及美法侖(melphalan) (威克瘤(Alkeran)或L-Pam或苯丙胺酸氮芥；GlaxoSmithKline)。

*c. 亞硝基脲*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種亞硝基脲。亞硝基脲係脂質可溶之烷基化劑亞類。代表性實例包括(但不限於)卡莫司汀(carmustine) (BCNU [亦稱作BiCNU、*N,N*-雙(2-氯乙基)-*N*-亞硝基脲或1,3-雙(2-氯乙基)-*l*-亞硝基脲]，Bristol-Myers Squibb)、福莫司汀(fotemustine) (亦稱作武活龍(Muphoran))、洛莫司汀(lomustine) (CCNU或1-(2-氯-乙基)-3-環已基-1-亞硝基脲，Bristol-Myers Squibb)、尼莫司汀(nimustine) (亦稱作ACNU)及鏈脲菌素(streptozocin) (鏈佐星(Zanosar)，Teva Pharmaceuticals)。

*d. 三嗪及肼*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種三嗪或肼。三嗪及肼係含氮烷基化劑亞類。在一些實施例中，該等化合物自發分解或可經代謝以產生促進將烷基轉移至核酸、肽及/或多肽之烷基重氮中間體，由此引起誘變、致癌或細胞毒性效應。代表性實例包括(但不限於)達卡巴嗪(dacarbazine) (DTIC-Dome, Bayer Healthcare Pharmaceuticals公司)、丙卡巴肼(procarbazine) (穆塔蘭(Mutalane)，Sigma-Tau Pharmaceuticals公司)及替莫唑胺(特莫多(Temodar)，Schering Plough)。

*e. 其他烷基化劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種次乙亞胺、甲胺衍生物或環氧化物。次乙亞胺係通常含有至少一個氮丙啶環之烷基化劑亞類。環氧化物代表特徵為僅具有3個環原子之環狀醚之烷基化劑亞類。

次乙亞胺之代表性實例包括(但不限於)噻替派(thiopeta) (賽普萊克斯(Thioplex)，Amgen)、地吖醌(diaziquone) (亦稱作氮丙啶基苯并醌(AZQ))及絲裂黴素C，絲裂黴素C係含有氮丙啶環之天然產物且似乎經由交聯DNA誘導細胞毒性(Dorr RT等人，Cancer Res. 1985；45:3510；Kennedy KA等人，*Cancer Res.* 1985；45:3541)。甲胺衍生物及其類似物之代表性實例包括(但不限於)六甲蜜胺(克瘤靈(Hexalen)，MGI Pharma公司)，其亦稱為六甲胺及六甲氰胺(hexastat)。此類抗癌化合物之環氧化物之代表性實例包括(但不限於)環氧乳醇(dianhydrogalactitol)。環氧乳醇(1,2:5,6-去水衛矛醇)在化學上與氮丙啶相關且一般經由與上文所述類似之機制促進烷基之轉移。二溴衛矛醇水解為環氧乳醇且因此係環氧化物之前藥(Sellei C等人*Cancer Chemother Rep.* 1969；53:377)。

*6. 抗血管生成劑*

在一個態樣中，本文所述抗-EGFR抗體結合至至少一種抗血管生成劑。抗血管生成劑 抑制新血管生長。抗血管生成劑以多種方式發揮其效應。在一些實施例中，該等藥劑干擾生長因子到達其靶之能力。舉例而言，血管內皮生長因子(VEGF)係藉由結合至細胞表面上之具體受體來起始血管生成中所涉及之一種主要蛋白質。因此，防止VEGF與其同源受體之相互作用之某些抗血管生成劑防止VEGF起始血管生成。在其他實施例中，該等藥劑干擾細胞內信號傳導級聯。舉例而言，一旦觸發細胞表面上之具體受體，即起始其他化學信號之級聯以促進血管生長。因此，某些已知可促進有助於(例如)細胞增殖之細胞內信號傳導級聯之酶(例如一些酪胺酸激酶)係癌症治療靶。在其他實施例中，該等藥劑干擾細胞間信號傳導級聯。然而，在其他實施例中，該等藥劑使活化並促進細胞生長之特定靶失能，或直接干擾血管細胞生長。已在超過300種物質中發現血管生成抑制性質，其具有多種直接及間接抑制效應。

可用於本發明ADC之抗血管生成劑之代表性實例包括(但不限於)血管抑素(angiostatin)、ABX EGF、C1-1033、PKI-166、EGF疫苗、EKB-569、GW2016、ICR-62、EMD 55900、CP358、PD153035、AG1478、IMC-C225 (爾必得舒(Erbitux))、ZD1839 (艾瑞莎(Iressa))、OSI-774、厄洛替尼(Erlotinib) (得舒緩(tarceva))、血管抑素、抑制蛋白、內皮抑素(endostatin)、BAY 12-9566以及氟尿嘧啶或多柔比星、血管能抑素(canstatin)、羧胺三唑以及太平洋紫杉醇、EMD121974、S-24、維他辛(vitaxin)、二甲基吡酮乙酸、IM862、介白素-12、介白素-2、NM-3、HuMV833、PTK787、RhuMab、血管酶(angiozyme) (核酶)、IMC-1C11、

新伐司他(Neovastat)、馬立馬司他(marimstat)、普啉司他(prinomastat)、BMS-275291、COL-3、MM1270、SU101、SU6668、SU11248、SU5416、及太平洋紫杉醇、及吉西他濱(gemcitabine)及順鉑、以及伊立替康(irinotecan)及順鉑以及輻射、替康蘭(tecogalan)、替莫唑胺及PEG干擾素α2b、四硫鉬酸鹽、TNP-470、沙利竇邁(thalidomide)、CC-5013以及剋癌易、腫瘤抑素(tumstatin)、2-甲氧基雌二醇、VEGF阱、mTOR抑制劑(地伏莫司(deforolimus)、依維莫司(everolimus)(癌伏妥(Afinitor)，Novartis Pharmaceutical公司)及替西羅莫司(temsirolimus)(特癌適(Torisel)，Pfizer公司))、酪胺酸激酶抑制劑(例如，厄洛替尼(得舒緩，Genentech公司)、伊馬替尼(imatinib)(基利克(Gleevec)，Novartis Pharmaceutical公司)、吉非替尼(gefitinib)(艾瑞莎，AstraZeneca Pharmaceuticals)、達沙替尼(dasatinib)(施達塞(Sprycel)，Brystol-Myers Squibb)、舒尼替尼(sunitinib)(舒癌特(Sutent)，Pfizer公司)、尼羅替尼(nilotinib)(泰息安(Tasigna)，Novartis Pharmaceutical公司)、拉帕替尼(lapatinib)(泰嘉(Tykerb)，GlaxoSmithKline Pharmaceuticals)、索拉菲尼(sorafenib)(蕾莎瓦(Nexavar)，Bayer and Onyx)、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)。

*7. 抗代謝物*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種抗代謝物。抗代謝物係與細胞內之正常物質極為相似之化學療法治療類型。在細胞將抗代謝物納入細胞代謝中時，結果對於細胞為負面的，例如該細胞不能分裂。抗代謝物係根據其所干擾之物質來歸類。可用於本發明ADC中之抗代謝物之實例包括(但不限於)葉酸拮抗劑(例如，胺甲喋呤)、嘧啶拮抗劑(例如，5-氟尿

嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、卡培他濱(Capecitabine)及吉西他濱)、嘌呤拮抗劑(例如，6-巰基嘌呤及6-硫鳥嘌呤)及腺苷去胺酶抑制劑(例如，克拉屈濱(Cladribine)、氟達拉濱(Fludarabine)、奈拉濱(Nelarabine)及噴斯他汀(Pentostatin))，如下文更詳細地闡述。

*a. 抗葉酸劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種抗葉酸劑。抗葉酸劑係結構類似於葉酸鹽之抗代謝物亞類。代表性實例包括(但不限於)胺甲喋呤、4-胺基-葉酸(亦稱作胺喋呤及4-胺基喋酸)、洛美曲索(lometrexol) (LMTX)、培美曲塞(pemetrexed) (力比泰(Alimpta)，Eli Lilly and Company)及三甲曲沙(trimetrexate) (寧賜新(Neutrexin)，Ben Venue Laboratories公司)。

*b. 嘌呤拮抗劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種嘌呤拮抗劑。嘌呤類似物係結構上類似於稱為嘌呤之化合物群之抗代謝物亞類。嘌呤拮抗劑之代表性實例包括(但不限於)硫唑嘌呤(癌雜散(Azasan)，Salix；依木蘭(Imuran)，GlaxoSmithKline)、克拉屈濱(祿斯得停(Leustatin) [亦稱作2-CdA]，Janssen Biotech公司)、巰基嘌呤(巰基嘌呤(Purinethol) [亦稱作6-巰基乙醇]，GlaxoSmithKline)、氟達拉濱(福達樂(Fludara)，Genzyme公司)、噴斯他汀(尼噴提(Nipent)，亦稱為2'-去氧助間型黴素(2'-deoxycoformycin) (DCF))、6-硫鳥嘌呤(蘭快舒(Lanvis) [亦稱作硫鳥嘌呤]，GlaxoSmithKline)。

*c. 嘧啶拮抗劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種嘧啶拮抗劑。嘧啶拮抗劑

係結構上類似於稱為嘌呤之化合物群之抗代謝物亞類。嘧啶拮抗劑之代表性實例包括(但不限於)阿紮胞苷(azacitidine) (委丹紮(Vidaza)，Celgene公司)、卡培他濱(截瘤達(Xeloda)，Roche Laboratories)、阿糖胞苷(亦稱作胞嘧啶阿拉伯糖苷及阿拉伯糖胞嘧啶，Bedford Laboratories)、地西他濱(decitabine) (達珂(Dacogen)，Eisai Pharmaceuticals)、5-氟尿嘧啶(阿魯塞(Adrucil)，Teva Pharmaceuticals；氟優(Efudex)，Valeant Pharmaceuticals公司)、5-氟-2'-去氧尿苷5'-磷酸(FdUMP)、5-氟尿苷三磷酸及吉西他濱(健擇(Gemzar)，Eli Lilly and Company)。

*8. 含硼藥劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種含硼藥劑。含硼藥劑包含一類干擾細胞增殖之癌症治療化合物。含硼藥劑之代表性實例包括(但不限於)博羅菲森(borophycin)及硼替佐米(bortezomib) (萬科(Velcade)，Millenium Pharmaceuticals)。

*9. 化學保護劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種化學保護劑。化學保護藥物係一類幫助保護身體抵抗化學療法之特定毒性效應之化合物。化學保護劑可與多種化學療法一起投與，以在容許用所投與化學治療劑治療癌細胞的同時，保護健康細胞免受化學療法藥物之毒性效應侵襲。代表性化學保護劑包括(但不限於)阿米福汀(amifostine) (益護爾(Ethyol)，Medimmune公司)，其用於降低與累積劑量之順鉑相關之腎毒性；右雷佐生(dexrazoxane) (托泰克(Totect)，Apricus Pharma；辛尼卡(Zinecard))，其用於治療因投與蒽環引起之外滲(托泰克)，且用於治療因投與抗腫瘤抗生素多柔比星引起之心臟相關併發症(辛尼卡)；及美司鈉(mesna) (美斯奈

(Mesnex)，Bristol-Myers Squibb)，其用於在用異環磷醯胺治療之化學療法期間預防出血性膀胱炎。

*10. 激素藥劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種激素藥劑。激素藥劑(包括合成激素)係干擾內分泌系統之內源產生激素之產生或活性之化合物。在一些實施例中，該等化合物干擾細胞生長或產生細胞毒性效應。非限制性實例包括雄激素、雌激素、乙酸甲羥助孕酮(普維拉(Provera)，Pfizer公司)及助孕素。

*11. 抗激素藥劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種抗激素藥劑。「抗激素」藥劑係阻抑某些內源激素之產生及/或防止其發揮功能之藥劑。在一個實施例中，抗激素藥劑干擾選自包含以下之群之激素之活性：雄激素、雌激素、孕甾酮及釋放促性腺激素之激素，由此干擾各種癌細胞之生長。抗激素藥劑之代表性實例包括(但不限於)胺魯米特(aminoglutethimide)、阿那曲唑(anastrozole) (安美達(Arimidex)，AstraZeneca Pharmaceuticals)、比卡魯胺(bicalutamide) (可蘇多(Casodex)，AstraZeneca Pharmaceuticals)、乙酸環丙孕酮(cyproterone acetate) (色普龍(Cyprostat)，Bayer PLC)、地加瑞克(degarelix) (輔美康(Firmagon)，Ferring Pharmaceuticals)、依西美坦(exemestane) (諾曼癌素(Aromasin)，Pfizer公司)、氟他胺(flutamide) (佐吉能(Drogenil)，Schering-Plough Ltd)、氟維司群(fulvestrant) (法洛德(Faslodex)，AstraZeneca Pharmaceuticals)、戈舍瑞林(goserelin) (諾雷德(Zolodex)，AstraZeneca Pharmaceuticals)、來曲唑(letrozole) (複乳納(Femara)，Novartis

Pharmaceuticals公司)、柳培林(leuprolide) (普羅塔普(Prostap))、柳菩林(lupron)、乙酸甲羥助孕酮(普維拉，Pfizer公司)、乙酸甲地孕酮(梅格施(Megace)，Bristol-Myers Squibb公司)、他莫昔芬(tamoxifen) (諾瓦得士(Nolvadex)，AstraZeneca Pharmaceuticals)及曲普瑞林(triptorelin) (弟凱得(Decapetyl)，Ferring)。

*12. 皮質類固醇*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種皮質類固醇。皮質類固醇可用於本發明ADC中以減少發炎。皮質類固醇之實例包括(但不限於)糖皮質激素，例如普賴松(prednisone) (德爾塔松(Deltasone)，Pharmacia & Upjohn公司，Pfizer公司分部)。

*13. 光活性治療劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種光活性治療劑。光活性治療劑包括可用於在暴露於具體波長之電磁輻射後殺死所治療細胞之化合物。治療相關化合物吸收穿透組織之波長之電磁輻射。在較佳實施例中，該化合物係以非毒性形式投與，該形式能在充分活化後產生對細胞或組織具有毒性之光化學效應。在其他較佳實施例中，該等化合物保留於癌組織中且易於自正常組織清除。非限制性實例包括各種色素原及染料。

*14. 寡核苷酸*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種寡核苷酸。寡核苷酸由短核酸鏈製得，其藉由干擾遺傳資訊之處理來工作。在一些實施例中，用於ADC之寡核苷酸係未經修飾之單鏈及/或雙鏈DNA或RNA分子，而在其他實施例中，該等治療寡核苷酸係經化學修飾之單鏈及/或雙鏈DNA或RNA分子。在一個實施例中，用於ADC中之寡核苷酸相對較短(19–25個核苷

酸)且與存於細胞中之核酸靶總池中之獨特核酸序列雜交。一些重要寡核苷酸技術包括反義寡核苷酸(包括RNA干擾(RNAi))、適配體、CpG寡核苷酸及核酶。

*a. 反義寡核苷酸*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種反義寡核苷酸。反義寡核苷酸經設計以經由Watson–Crick雜交結合至RNA。在一些實施例中，反義寡核苷酸與編碼EGFR之區域、結構域、部分或區段之核苷酸互補。在一些實施例中，反義寡核苷酸包含約5至約100個核苷酸、約10至約50個核苷酸、約12至約35個及約18至約25個核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸與EGFR基因之區域、部分、結構域或區段至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少100%同源。在一些實施例中，在EGFR基因之至少15、20、25、30、35、40、50或100個連續核苷酸中存在實質性序列同源性。在較佳實施例中，該等反義寡核苷酸之大小介於12至25個核苷酸長度範圍內，且大多數反義寡核苷酸之長度為18至21個核苷酸。在寡核苷酸結合至靶RNA後，有多種機制可用於抑制RNA之功能(Crooke ST. (1999). *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 30–42)。最佳表徵之反義機制導致內源細胞核酸酶(例如RNA酶H或與RNA干擾機制相關之核酸酶)裂解所靶向RNA。然而，藉由非催化性機制(例如調節剪接或阻止翻譯)抑制靶基因之表現之寡核苷酸亦可係基因功能之有效選擇性調節劑。

最近非常受人關注之另一RNA酶依賴性反義機制係RNAi (Fire等人(1998). *Nature*, 391, 806–811.；Zamore PD. (2002). *Science*, 296, 1265–1269.)。RNA干擾(RNAi)係轉錄後過程，其中雙鏈RNA以序列特異性方

式抑制基因表現。在一些實施例中，RNAi效應係經由引入相對較長之雙鏈RNA (dsRNA)來達成，而在較佳實施例中，此RNAi效應係藉由引入較短雙鏈RNA (例如，小干擾RNA (siRNA)及/或微小RNA (miRNA))來達成。在另一實施例中，RNAi亦可藉由引入生成與靶基因互補之dsRNA之質體來達成。在前述實施例中之每一者中，雙鏈RNA經設計以干擾細胞內具體靶序列之基因表現。一般而言，該機制涉及將dsRNA轉化為短RNA，其將核糖核酸酶引導至同源mRNA靶(概述於Ruvkun, *Science* 2294:797 (2001)中)，然後其降解相應內源mRNA，由此導致調節基因表現。值得注意的是，已報導dsRNA具有抗增殖性質，此使得亦可能設想治療應用(Aubel等人，*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 88:906 (1991))。舉例而言，已顯示合成dsRNA可抑制小鼠之腫瘤生長(Levy等人 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 62:357-361 (1969))，在白血病小鼠之治療中具有活性(Zeleznick等人，*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130:126-128 (1969))，且抑制小鼠皮膚中化學誘導之腫瘤形成(Gelboin等人，*Science* 167:205-207 (1970))。因此，在較佳實施例中，本發明提供ADC中之反義寡核苷酸用於治療乳癌之用途。在其他實施例中，本發明提供用於起始反義寡核苷酸治療之組合物及方法，其中dsRNA在mRNA層面干擾EGFR之靶細胞表現。如上文使用之dsRNA係指天然RNA、部分純化RNA、重組產生之RNA、合成RNA，以及因引入非標準核苷酸、非核苷酸物質、核苷酸類似物(例如鎖核酸(LNA))、去氧核糖核苷酸及其任一組合而與天然RNA不同之經改變RNA。本發明RNA僅需要與天然RNA足夠相似，使得其能介導本文所述之基於反義寡核苷酸之調節即可。

*b. 適配體*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種適配體。適配體係基於其結合其他分子之能力自隨機池選擇之核酸分子。與抗體類似，適配體可以極佳親和性及特異性結合靶分子。在多個實施例中，適配體假定具有複雜的序列依賴性的三維形狀，其容許其與靶蛋白相互作用，產生與抗體-抗原相互作用類似之緊密結合複合物，由此干擾該蛋白質之功能。適配體緊密且特異性地結合至其靶蛋白之具體能力強調其作為靶向分子療法之潛力。

*c. CpG寡核苷酸*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種CpG寡核苷酸。已知細菌及病毒DNA係人類之先天及特異性免疫二者之強活化劑。該等免疫特徵已與在細菌DNA中發現之未甲基化CpG二核苷酸基序相關聯。由於該等基序在人類中稀少之事實，人類免疫系統已進化出將該等基序識別為感染之早期指示且隨後起始免疫反應之能力。因此，含有此CpG基序之寡核苷酸可用於起始抗腫瘤免疫反應。

*d. 核酶*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種核酶。核酶係長度介於約40至155個核苷酸範圍內之催化性RNA分子。核酶識別並切割特定RNA分子之能力使其成為治療劑之潛在候選者。代表性實例包括血管酶。

*15. 放射性核種劑(放射性同位素)*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種放射性核種劑。放射性核種劑包含特徵為能經歷放射性衰變之不穩定核之藥劑。成功放射性核種治療之基礎取決於放射性核種之足夠濃度及癌細胞對該放射性核種之延長保留。欲考慮之其他因素包括放射性核種半衰期、發射粒子之能量及發射粒子可移動之最大範圍。在較佳實施例中，治療劑係選自由以下組成之群之

放射性核種：$^{111}$In、$^{177}$Lu、$^{212}$Bi、$^{213}$Bi、$^{211}$At、$^{62}$Cu、$^{64}$Cu、$^{67}$Cu、$^{90}$Y、$^{125}$I、$^{131}$I、$^{32}$P、$^{33}$P、$^{47}$Sc、$^{111}$Ag、$^{67}$Ga、$^{142}$Pr、$^{153}$Sm、$^{161}$Tb、$^{166}$Dy、$^{166}$Ho、$^{186}$Re、$^{188}$Re、$^{189}$Re、$^{212}$Pb、$^{223}$Ra、$^{225}$Ac、$^{59}$Fe、$^{75}$Se、$^{77}$As、$^{89}$Sr、$^{99}$Mo、$^{105}$Rh、$^{109}$Pd、$^{143}$Pr、$^{149}$Pm、$^{169}$Er、$^{194}$Ir、$^{198}$Au、$^{199}$Au及$^{211}$Pb。亦較佳者係具有Auger發射粒子之實質性衰變之放射性核種。舉例而言，Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-1111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m及Ir-192。可用β-粒子發射核種之衰變能較佳為Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213及Fm-255。可用α-粒子發射放射性核種之衰變能較佳係2,000-10,000 keV，更佳3,000-8,000 keV，且最佳4,000-7,000 keV。所用其他潛在放射性同位素包括$^{11}$C、$^{13}$N、$^{15}$O、$^{75}$Br、$^{198}$Au、$^{224}$Ac、$^{126}$I、$^{133}$I、$^{77}$Br、$^{113m}$In、$^{95}$Ru、$^{97}$Ru、$^{103}$Ru、$^{105}$Ru、$^{107}$Hg、$^{203}$Hg、$^{121m}$Te、$^{122m}$Te、$^{125m}$Te、$^{165}$Tm、$^{167}$Tm、$^{168}$Tm、$^{197}$Pt、$^{109}$Pd、$^{105}$Rh、$^{142}$Pr、$^{143}$Pr、$^{161}$Tb、$^{166}$Ho、$^{199}$Au、$^{57}$Co、$^{58}$Co、$^{51}$Cr、$^{59}$Fe、$^{75}$Se、$^{201}$Tl、$^{225}$Ac、$^{76}$Br、$^{169}$Yb及諸如此類。

*16. 放射致敏劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種放射致敏劑。如本文所用術語「放射致敏劑」定義為分子、較佳低分子量分子，其係以治療有效量投與動物，以提高欲放射致敏之細胞對電磁輻射之敏感性及/或促進對可用電磁輻射治療之疾病的治療。放射致敏劑係使癌細胞對輻射療法更敏感，同時通常對正常細胞之效應顯著較低之藥劑。因此，放射致敏劑可與經放射標記抗體或ADC組合使用。在與僅用經放射標記抗體或抗體片段治療相比時，添加放射致敏劑可增強效能。放射致敏劑闡述於D. M. Goldberg

(編輯), Cancer Therapy with Radiolabeled Antibodies, CRC Press (1995)中。放射致敏劑之實例包括吉西他濱、5-氟尿嘧啶、紫杉烷及順鉑。

放射致敏劑可藉由X射線之電磁輻射來活化。X射線活化之放射致敏劑之代表性實例包括(但不限於)以下：甲硝唑(metronidazole)、迷索硝唑(misonidazole)、去甲基迷索硝唑、哌莫硝唑(pimonidazole)、依他硝唑(etanidazole)、尼莫拉唑(nimorazole)、絲裂黴素C、RSU 1069、SR 4233、E09、RB 6145、菸鹼醯胺、5-溴去氧尿苷(BUdR)、5-碘去氧尿苷(IUdR)、溴去氧胞苷、氟去氧尿苷(FUdR)、羥基脲、順鉑及其治療有效類似物及衍生物。或者，放射致敏劑可使用光動力療法(PDT)來活化。光動力放射致敏劑之代表性實例包括(但不限於)血紫質衍生物、光卟啉(Photofrin) (r)、苯并卟啉衍生物、NPe6、初卟啉錫(SnET2)、去鎂葉綠素酸a、細菌葉綠素a、萘酞菁、酞青素、酞青鋅及其治療有效類似物及衍生物。

*17. 拓撲異構酶抑制劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種拓撲異構酶抑制劑。拓撲異構酶抑制劑係經設計以干擾拓撲異構酶(拓撲異構酶I及II)之作用之化學治療劑，拓撲異構酶係藉由在正常細胞週期期間催化然後斷裂並再接合DNA鏈之磷酸二酯主鏈來控制DNA結構變化之酶。DNA拓撲異構酶I抑制劑之代表性實例包括(但不限於)喜樹鹼(camptothecin)及其衍生物伊立替康(CPT-11，抗癌妥(Camptosar)，Pfizer公司)及托泊替康(topotecan) (癌康定(Hycamtin)，GlaxoSmithKline Pharmaceuticals)。DNA拓撲異構酶II抑制劑之代表性實例包括(但不限於)安吖啶(amsacrine)、道諾黴素、多柔比星、表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)、玫瑰樹鹼(ellipticine)、表柔

比星、依託泊苷(etoposide)、雷佐生(razoxane)及替尼泊苷(teniposide)。

*18. 酪胺酸激酶抑制劑*

本發明之抗-EGFR抗體可結合至至少一種酪胺酸激酶抑制劑。酪胺酸激酶係細胞內起作用以將磷酸基附接至胺基酸酪胺酸之酶。藉由阻斷蛋白質酪胺酸激酶發揮功能，可抑制腫瘤生長。可用於本發明ADC之酪胺酸激酶之實例包括(但不限於)阿西替尼(Axitinib)、伯舒替尼(Bosutinib)、西地尼布(Cediranib)、達沙替尼、厄洛替尼、吉非替尼、伊馬替尼、拉帕替尼、來他替尼(Lestaurtinib)、尼羅替尼、西馬夏尼(Semaxanib)、舒尼替尼及凡德他尼(Vandetanib)。

*19. 其他藥劑*

可用於本發明ADC中之其他藥劑之實例包括(但不限於)相思子素(abrin) (例如相思子素A鏈)、α毒素、油桐(Aleurites fordii)蛋白質、毒傘肽(amatoxin)、巴豆毒素(crotin)、瀉果素(curcin)、石竹素(dianthin)蛋白質、白喉(diptheria)毒素(例如白喉A鏈及白喉毒素之非結合活性片段)、去氧核糖核酸酶(Dnase)、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、莫迪素(modeccin) A鏈、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、新黴素(neomycin)、抗腫瘤核糖核酸酶(onconase)、酚黴素(phenomycin)、美洲商陸(Phytolaca americana)蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、商陸抗病毒蛋白質、假單胞菌屬(Pseudomonas)內毒素、假單胞菌屬外毒素(例如外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(Pseudomonas aeruginosa)))、侷限麴菌素(restrictocin)、蓖麻毒蛋白(ricin) A鏈、核糖核酸酶(Rnase)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制劑、肥皂草毒素(saporin)、α-八疊球菌(α-sarcin)、葡萄球菌腸毒素-A、破傷風毒素、順鉑、卡鉑及奧利沙鉑

(oxaliplatin) (益樂鉑(Eloxatin)，Sanofi Aventis)、蛋白酶體抑制劑(例如PS-341 [硼替佐米或萬科])、HDAC抑制劑(伏立諾他(vorinostat) (容立莎(Zolinza)，Merck & Company公司))、貝林司他(belinostat)、恩替諾特(entinostat)、莫賽替諾司他(mocetinostat)及帕比司他(panobinostat))、COX-2抑制劑、經取代尿素、熱休克蛋白抑制劑(例如格爾德黴素(Geldanamycin)及其多種類似物)、腎上腺皮質抑制劑及新月毒素(tricothecene)。(例如，參見WO 93/21232)。其他藥劑亦包括天冬醯胺酶(埃什帕爾(Espar)，Lundbeck公司)、羥基脲、左旋咪唑、米托坦(mitotane) (解腺瘤(Lysodren)，Bristol-Myers Squibb)及維甲酸(tretinoin) (瑞諾瓦(Renova)，Valeant Pharmaceuticals公司)。

應注意，上文所提及之可用於本發明之抗-EGFR ADC中之藥物部分群並非排他性，此乃因藥物之某些實例可在一個以上種類中發現，例如，安絲菌素既係有絲分裂抑制劑亦係抗腫瘤抗生素。

本發明化合物涵蓋上文藥物部分之所有立體異構物，即D之手性碳處之R及S構形之任一組合。

上文藥劑(即，未結合至抗體之裸藥劑)亦可用於與本文所述抗-EGFR抗體之組合療法中。在一個實施例中，抗-EGFR抗體或ADC係在用於治療癌症之組合療法中與前述藥劑中之任一者一起使用，其中該藥劑係在將抗-EGFR抗體或ADC投與個體之前、同時或之後投與。

**B. 抗-EGFR ADC：實例性連接體**

抗-EGFR ADC包含抗-EGFR抗體及至少一種藥物，其中抗體及至少一種藥物藉由連接體結合。如本文所用術語「連接體」係指可為雙官能或多官能，且用於將抗體附接至藥物部分之化學部分。連接體可包括一個結

合組份或可包括多個組份。舉例而言，連接體可包括間隔體，其係擴展藥物連接以避免(例如)遮蔽抗體之活性位點或改良ADC之溶解性之部分。連接體中之組份之其他實例包括延伸體單元及胺基酸單元。

一般使用兩種方法將藥物結合至抗體：經由酶不可裂解之馬來醯亞胺基或簡單且可裂解之二硫連接體將經還原鏈間半胱胺酸二硫鍵烷基化，及藉由可裂解直鏈胺基酸將離胺酸醯化。

在一個態樣中，連接體將抗體共價附接至藥物部分。ADC係使用具有用於結合至抗體及藥物之反應性官能基之連接體來製備。舉例而言，抗體之半胱胺酸硫醇或胺(例如N末端或胺基酸側鏈，例如離胺酸)可與連接體之官能基形成鍵。

在一個態樣中，連接體具有能與存於抗體上之游離半胱胺酸反應以形成共價鍵之官能基。非限制實例性之該等反應性官能基包括馬來醯亞胺、鹵代乙醯胺、α-鹵代乙醯基、活化酯(例如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯)、酸酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。例如，參見Klussman等人(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773中第766頁之結合方法。

在一些實施例中，連接體具有能與存於抗體上之親電子基團反應之官能基。實例性之該等親電子基團包括(但不限於)醛及酮羰基。在一些實施例中，連接體中反應性官能基之雜原子可與抗體上之親電子基團反應並與抗體單元形成共價鍵。非限制實例性之該等反應性官能基包括(但不限於)醯肼、肟、胺基、肼、縮胺基硫脲、肼羧酸酯及芳基醯肼。

實例性連接體組份包括6-馬來醯亞胺基己醯基、馬來醯亞胺基丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」或「vc」)、丙胺酸-苯丙胺酸

(「ala-phe」)及對胺基苄氧基羰基(「PAB」)、4-(2-吡啶基硫代)戊酸N-琥珀醯亞胺基酯(「SPP」)及4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1甲酸酯(「MCC」)。

在一個態樣中，抗-EGFR抗體經由包含馬來醯亞胺基己醯基(「mc」)、纈胺酸瓜胺酸(val-cit或「vc」)及PABA之連接體(稱作「mc-vc-PABA連接體」)結合至奧裡斯他汀(例如MMAE)。馬來醯亞胺基己醯基用作與抗-EGFR抗體之連接體且不可裂解。Val-cit係二肽，其係連接體之胺基酸單元且容許藉由蛋白酶(特定而言蛋白酶細胞自溶酶B)裂解連接體。因此，連接體之val-cit組份提供在暴露於細胞內環境後自ADC釋放奧裡斯他汀之方式。在連接體內，對胺基苄醇(PABA)用作間隔體且具有自分解性，從而容許釋放MMAE。mc-vc-PABA-MMAE連接體之結構提供於圖11中。

適宜連接體包括(例如)可裂解及不可裂解連接體。連接體可係促進藥物釋放之「可裂解連接體」。非限制實例性可裂解連接體包括酸不穩定連接體(例如，包含腙)、蛋白酶敏感性(例如，肽酶敏感性)連接體、光不穩定連接體或含有二硫鍵之連接體(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。可裂解連接體通常在細胞內條件下易於裂解。適宜可裂解連接體包括(例如)可藉由細胞內蛋白酶(例如溶酶體蛋白酶或胞內體蛋白酶)裂解之肽連接體。在實例性實施例中，連接體可係二肽連接體，例如纈胺酸-瓜胺酸(val-cit)或苯丙胺酸-離胺酸(phe-lys)連接體。

連接體較佳在細胞外足夠穩定以治療有效。在輸送或遞送至細胞中之前，ADC較佳穩定且保持完整，即抗體保持結合至藥物部分。在靶細

胞外穩定之連接體一旦位於細胞內即可以某一有效速率裂解。因此，有效連接體將：(i) 維持抗體之特異性結合性質；(ii) 容許遞送(例如細胞內遞送)藥物部分；及(iii) 維持藥物部分之治療效應(例如細胞毒性效應)。

在一個實施例中，連接體在細胞內條件下可裂解，使得連接體之裂解在細胞內環境中充分自抗體釋放藥物以治療有效。在一些實施例中，可裂解連接體具有pH敏感性，即在某些pH值下對水解敏感。通常，pH敏感性連接體可在酸性條件下水解。舉例而言，可使用可在溶酶體中水解之酸不穩定連接體(例如，腙、縮胺基脲、縮胺基硫脲、順烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或諸如此類)。(例如，參見美國專利第5,122,368號、第5,824,805號、第5,622,929號；Dubowchik及Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123；Neville等人，1989, Biol. Chem. 264:14653-14661。)該等連接體在中性pH條件下(例如血液中之彼等)相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0下(溶酶體之近似pH)不穩定。在某些實施例中，可水解連接體是硫醚連接體，例如經由醯腙鍵附接至治療劑之硫醚(例如，參見美國專利第5,622,929號)。

在其他實施例中，連接體可在還原條件下裂解(例如，二硫連接體)。多種二硫連接體為業內已知，包括(例如)彼等可使用以下化合物形成者：SATA (5-乙醯基硫代乙酸N-琥珀醯亞胺基酯)、SPDP (3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-琥珀醯亞胺基酯)、SPDB (3-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀醯亞胺基酯)及SMPT (N-琥珀醯亞胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB及SMPT。(例如，參見Thorpe等人，1987, Cancer Res. 47:5924-5931；Wawrzynczak等人，In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel編輯，

Oxford U. Press, 1987。亦參見美國專利第4,880,935號。)

在一些實施例中，連接體可藉由存於細胞內環境中(例如，在溶酶體或胞內體或胞膜窖內)之裂解劑裂解。連接體可為(例如)藉由細胞內肽酶或蛋白酶(包括(但不限於)溶酶體或胞內體蛋白酶)裂解之肽基連接體。在一些實施例中，肽基連接體長至少兩個胺基酸或長至少三個胺基酸。裂解劑可包括細胞自溶酶B及D及胞漿素，已知所有該等裂解劑皆可水解二肽藥物衍生物，從而導致在靶細胞內釋放活性藥物(例如，參見Dubowchik及Walker，1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123)。最典型者係可藉由存於表現EGFR之細胞中之酶裂解之肽基連接體。該等連接體之實例闡述於(例如)美國專利第6,214,345號中，其係全文出於所有目的以引用方式併入本文中。在特定實施例中，可藉由細胞內蛋白酶裂解之肽基連接體係Val-Cit連接體或Phe-Lys連接體(例如，參見美國專利第6,214,345號，其闡述使用val-cit連接體來合成多柔比星)。使用細胞內蛋白分解釋放治療劑之一個優點在於，該藥劑在結合時通常會減弱且結合物之血清穩定性通常較高。

在其他實施例中，連接體係丙二酸酯連接體(Johnson等人，1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、馬來醯亞胺基苯甲醯基連接體(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，連接體單元不可裂解，且藥物係藉由(例如)抗體降解來釋放。參見美國公開案第20050238649號，其係全文以引用方式併入本文中。包含不可裂解連接體之ADC可經設計，使得ADC保持實質上在細胞外部且與靶細胞表面上之某些受體相互作用，使得ADC之結合起始

(或防止)具體細胞信號傳導路徑。

在一些實施例中，連接體係實質上親水之連接體(例如，PEG4Mal及磺基-SPDB)。可使用親水連接體來降低可經由MDR (多重抗藥性)或功能類似之輸送劑自抗性癌細胞泵送藥物之程度。

在其他實施例中，在裂解後，連接體用於直接或間接抑制細胞生長及/或細胞增殖。舉例而言，在一些實施例中，連接體在裂解後可用作嵌入劑，由此抑制巨分子生物合成(例如DNA複製、RNA轉錄及/或蛋白質合成)。

在其他實施例中，連接體經設計以經由連接體-藥物及/或單獨之藥物擴散至鄰近細胞而促進旁觀者殺死(殺死鄰近細胞)。在其他實施例中，連接體促進細胞內化。

立體阻礙二硫化物之存在可增強具體二硫鍵之穩定性，從而增強ADC之功效。因此，在一個實施例中，連接體包括立體阻礙二硫鍵。立體阻礙二硫化物係指存於具體分子環境中之二硫鍵，其中該環境之特徵在於通常在相同分子或化合物內之原子之具體空間排列或取向，其防止或至少部分抑制二硫鍵之還原。因此，靠近二硫鍵存在巨大(或立體阻礙)化學部分及/或巨大胺基酸側鏈防止或至少部分抑制二硫鍵之會導致二硫鍵還原之潛在相互作用。

值得注意的是，上文所提及之連接體類型並不互斥。舉例而言，在一個實施例中，用於本文所述抗-EGFR ADC中之連接體係促進細胞內化之不可裂解連接體。

在一些實施例中，ADC具有下式(式I)：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_n \qquad (I)$$

或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物；其中Ab係抗體，例如抗-EGFR抗體AbA，且(L-D)係連接體-藥物部分。連接體-藥物部分係由L- (其係連接體)及-D (其係具有(例如)細胞生長抑制性、細胞毒性或針對靶細胞(例如表現EGFR之細胞)之其他治療活性之藥物部分)製得；且n係1至20之整數。

在一些實施例中，n介於1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、1至2之範圍內，或係1。

在一些實施例中，-D部分相同。在另一實施例中，-D部分不同。

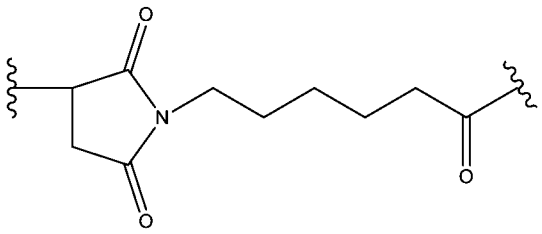
如上所述，連接體可為單一部分或可包括兩個或更多個組份。因此，在一些實施例中，ADC具有下式(II)：

$$Ab\text{-}(A_a\text{-}W_w\text{—}Y_y\text{-}D)_n \qquad (II)$$

或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物，其中Ab係抗體，例如抗-EGFR抗體AbA，且-$A_a$-$W_w$—$Y_y$-係包含三個或更多個組份之連接體(L)，包括

-A-，其係可選延伸體單元，a係0或1，每一—W—獨立地為胺基酸單元(或在一些實施例中，葡萄糖醛酸苷單元，亦參見美國公開案第2012/0107332 A1號)，w係介於0至12範圍內之整數，—Y—係自分解性間隔體單元，y係0、1或2；-D係具有(例如)細胞生長抑制性、細胞毒性或針對靶細胞(例如表現EGFR之細胞)之其他治療活性之藥物部分；且n係1至20之整數。

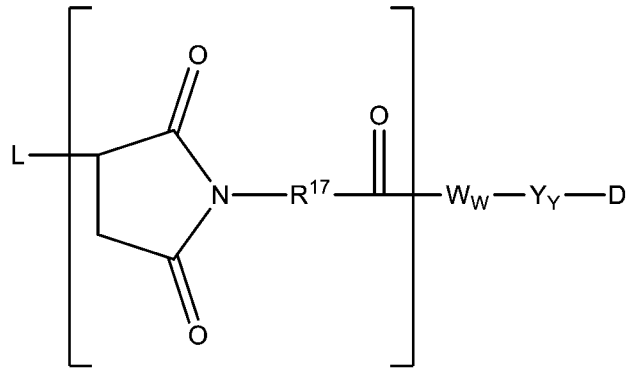
在一些實施例中，連接體組份包含「延伸體單元」(A)，其將抗體連接至另一連接體組份或藥物部分。非限制實例性之延伸體單元顯示於下文中(其中波形線指示與抗體、藥物或其它連接體組份之共價附接位點)：



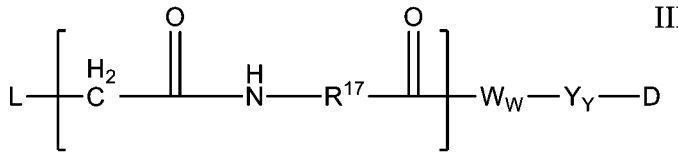
MC

延伸體單元(A)在存在時能將抗體連接至胺基酸單元(—W—) (若存在)，連接至間隔體單元(—Y—) (若存在)；或連接至藥物(-D) (參見式II)。可天然地或經由化學操作存於本文所述抗-EGFR抗體上之可用官能基包括(但不限於)硫氫基、胺基、羥基、碳水化合物之變旋異構羥基及羧基。適宜官能基係硫氫基及胺基。在一個實例中，硫氫基可藉由還原抗-EGFR抗體之分子內二硫鍵來生成。在另一實施例中，硫氫基可藉由抗-EGFR抗體中之離胺酸部分之胺基與2-亞胺基四氫噻吩(喬特試劑(Traut's reagent))或其他硫氫基生成劑之反應來生成。在某些實施例中，抗-EGFR抗體係重組抗體且經改造以攜載一或多個離胺酸部分。在某些其他實施例中，重組抗-EGFR抗體經改造以攜載額外硫氫基，例如額外半胱胺酸。

在一個實施例中，延伸體單元與抗體之硫原子形成鍵。該硫原子可源自抗體之硫氫基。此實施例之代表性延伸體單元繪示於如下文所示之式IIIa及IIIb之方括號內，



IIIa



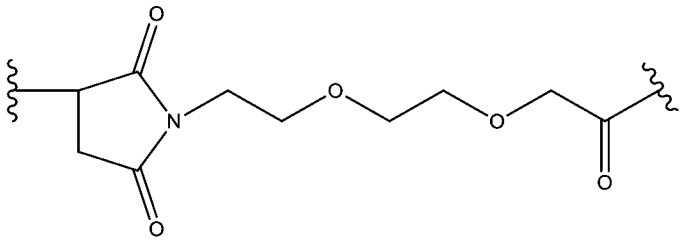
IIIb

其中L-、—W—、—Y—、-D、w及y如上文所定義，且$R^{17}$選自—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、—$C_1$-$C_{10}$伸烯基-、—$C_1$-$C_{10}$伸炔基-、碳環-、—O—($C_1$-$C_8$伸烷基)-、O—($C_1$-$C_8$伸烯基)-、—O—($C_1$-$C_8$伸炔基)-、-伸芳基-、—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-伸芳基-、—$C_2$-$C_{10}$伸烯基-伸芳基、—$C_2$-$C_{10}$伸炔基-伸芳基、伸芳基-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、-伸芳基-$C_2$-$C_{10}$伸烯基-、-伸芳基-$C_2$-$C_{10}$伸炔基-、—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-(碳環)-、—$C_2$-$C_{10}$伸烯基-(碳環)-、$C_2$-$C_{10}$伸炔基-(碳環)-、-(碳環)-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、-(碳環)-$C_2$-$C_{10}$伸烯基-、-(碳環)-$C_2$-$C_{10}$伸炔基、-雜環-、—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-(雜環)-、—$C_2$-$C_{10}$伸烯基-(雜環)-、—$C_2$-$C_{10}$伸炔基-(雜環)-、-(雜環)-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、-(雜環)-$C_2$-$C_{10}$伸烯基-、-(雜環)-$C_1$-$C_{10}$伸炔基-、—$(CH_2CH_2O)_r$—或—$(CH_2CH_2O)_r$—$CH_2$—，且r係介於1-10範圍內之整數，其中單獨或作為另一基團之一部分之該等烷基、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之該等烷基、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，$R^{17}$選自—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、-碳環-、—O—($C_1$-$C_8$伸烷基)-、-伸芳基-、—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-(碳環)-、-(碳環)-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、—$C_3$-$C_8$雜環-、—$C_1$-$C_{10}$伸烷基-(雜環)-、-(雜環)-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-、—$(CH_2CH_2O)_r$—及— $(CH_2CH_2O)_r$ — $CH_2$—；且r係介於1-10範圍內之整數，其中該等伸烷基未經取代且其餘基團視情況經取代。

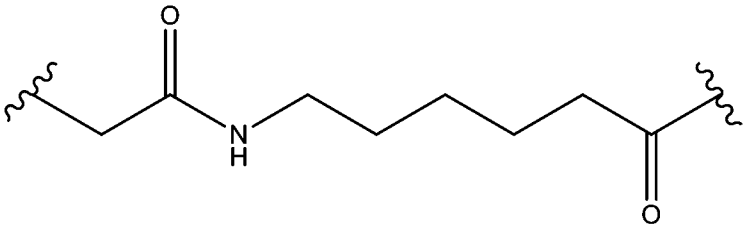
說明性延伸體單元具有式IIIa，其中$R^{17}$係—$(CH_2)_5$—，如下文所繪示(亦參見U.S. 8,309,093)。

另一說明性延伸體單元具有式IIIa，其中$R^{17}$係—$(CH_2CH_2O)_r$—

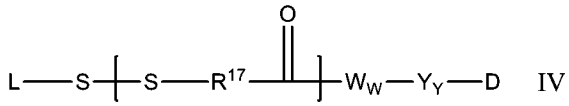
$CH_2$—；且r為2，如下文所繪示(亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中)。



另一說明性延伸體單元具有式IIIa，其中$R^{17}$係伸芳基-或伸芳基-$C_1$-$C_{10}$伸烷基-。在一些實施例中，芳基係未經取代之苯基。而且，另一說明性延伸體單元具有式IIIb，其中$R^{17}$係—$(CH_2)_5$—，如下文所繪示(亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中)。

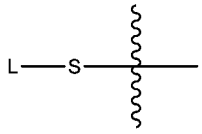


在某些實施例中，延伸體單元經由抗-EGFR抗體單元之硫原子與延伸體單元之硫原子之間之二硫鍵連接至抗-EGFR抗體。此實施例之代表性延伸體單元繪示於式IV之方括號內(參見下文，且亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中)，其中$R^{17}$、L-、—W—、—Y—、-D、w及y如上文所定義。



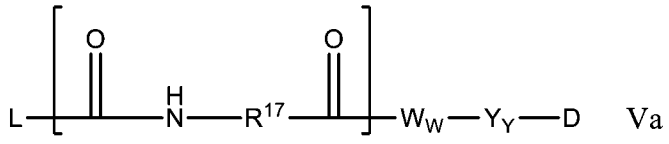
IV

應注意，除非上下文中另有指示，否則下文所示之式(亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中)中之S部分係指抗體之硫原子。

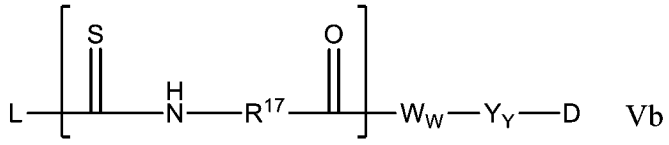


在其他實施例中，延伸體含有可與抗體之一級或二級胺基形成鍵之反應位點。該等反應位點之實例包括(但不限於)活化酯(例如琥珀醯亞胺

酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯)、酸酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性延伸體單元繪示於式Va及Vb之方括號內(參見下文，亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中)，其中$R^{17}$、L-、—W—、—Y—、-D、w及y如上文所定義。

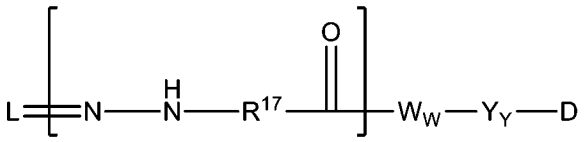


Va

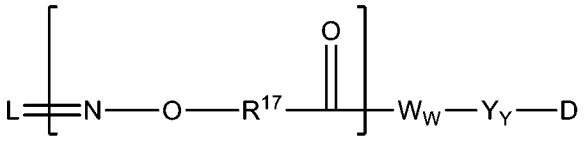


Vb

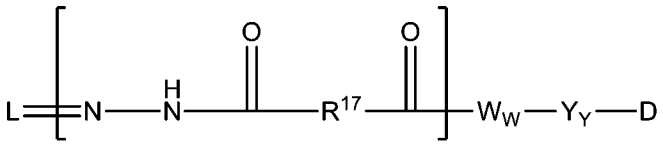
在一些實施例中，延伸體含有對可存於抗體上之經修飾碳水化合物之(—CHO)基團具有反應性之反應位點。舉例而言，碳水化合物可使用諸如過碘酸鈉等試劑進行輕度氧化，且氧化碳水化合物之所得(—CHO)單元可與含有諸如以下等官能基之延伸體縮合：醯肼、肟、一級或二級胺、肼、縮胺基硫脲、肼羧酸酯及芳基醯肼，例如彼等於Kaneko等人，1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41中所述者。此實施例之代表性延伸體單元繪示於式VIa、VIb及VIc之方括號內(參見下文，亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中)，其中—$R^{17}$-、L-、—W—、—Y—、-D、w及y如上文所定義。



VIa



VIb



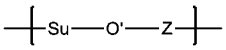
VIc

在一些實施例中，連接體組份包含「胺基酸單元」(W)。在一些該等實施例中，胺基酸單元容許藉由蛋白酶裂解連接體，由此促進在暴露於細胞內蛋白酶(例如溶酶體酶)後自免疫結合物釋放藥物(Doronina等人(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784)。實例性胺基酸單元包括(但不限於)二肽、三肽、四肽及五肽。實例性二肽包括(但不限於)纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)；苯丙胺酸-離胺酸(fk或phe-lys)；苯丙胺酸-高離胺酸(phe-homolys)或N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸(Me-val-cit)。實例性三肽包括(但不限於)甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。胺基酸單元可包含天然存在之胺基酸殘基及/或次要胺基酸及/或非天然胺基酸類似物，例如瓜胺酸胺基酸單元可經設計及最佳化用於藉由具體酶(例如，腫瘤相關蛋白酶、細胞自溶酶B、C及D或胞漿素蛋白酶)酶裂解。

在一個實施例中，W胺基酸單元係纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)。在另一態樣中，胺基酸單元係苯丙胺酸-離胺酸(即，fk)。在胺基酸單元之另一態樣中，胺基酸單元係N-甲基纈胺酸-瓜胺酸。在另一態樣中，胺基酸單元係5-胺基戊酸、高苯丙胺酸離胺酸、四異喹啉羧酸酯離胺酸、環己基

丙胺酸離胺酸、異哌啶酸離胺酸、β-丙胺酸離胺酸、甘胺酸絲胺酸纈胺酸麩醯胺酸及異哌啶酸。

或者，在一些實施例中，—W—係葡萄糖醛酸苷單元，其將延伸體單元連接至間隔體單元(若存在延伸體及間隔體單元)，將延伸體單元連接至藥物部分(若不存在間隔體單元)，及將連接體單元連接至藥物(若不存在延伸體及間隔體單元)。葡萄糖醛酸苷單元包括可藉由β-葡萄糖醛酸苷酶裂解之位點(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)。在一些實施例中，葡萄糖醛酸苷單元包含如下文所繪示之式之經由糖苷鍵(—O'—)連接至自分解性基團(Z)之糖部分(Su) (亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)。

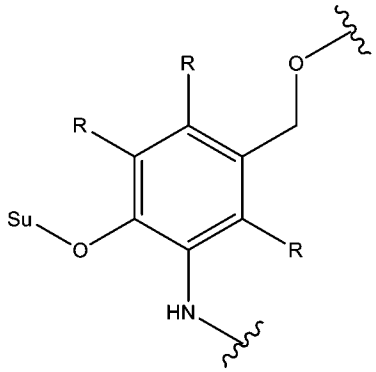


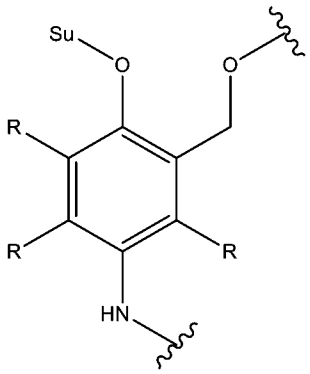
糖苷鍵(—O'—)通常係β-葡萄糖醛酸苷酶-裂解位點，例如可藉由人類溶酶體β-葡萄糖醛酸苷酶裂解之鍵。在葡萄糖醛酸苷單元情況下，術語「自分解性基團」係指二官能或三官能化學部分，其能將兩個或三個間隔化學部分(即，糖部分(經由糖苷鍵)、藥物部分(直接或間接經由間隔體單元)，且在一些實施例中，連接體(直接或間接經由延伸體單元))一起共價連接成穩定分子。若自分解性基團與糖部分之鍵裂解，則其將自發與第一化學部分(例如，間隔體或藥物單元)分離。

在一些實施例中，糖部分(Su)係環狀己糖，例如吡喃糖，或環狀戊糖，例如呋喃糖。在一些實施例中，吡喃糖係葡萄糖醛酸苷或己糖。糖部分通常呈β-D構象。在特定實施例中，吡喃糖係β-D-葡萄糖醛酸苷部分(即，經由可藉由β-葡萄糖醛酸苷酶裂解之糖苷鍵連接至自分解性基團—Z—之β-D-葡糖醛酸)。在一些實施例中，糖部分未經取代(例如，天然環狀己糖

或環狀戊糖)。在其他實施例中，糖部分可係經取代β-D-葡萄糖醛酸苷(即，經一或多個諸如以下等基團取代之葡糖醛酸：氫、羥基、鹵素、硫、氮或低碳烷基)。

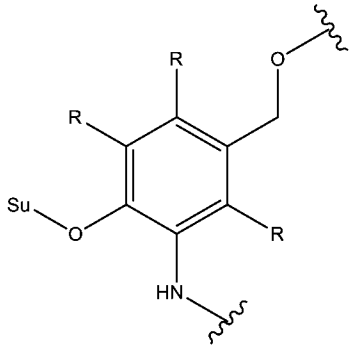
在一些實施例中，葡萄糖醛酸苷單元具有如下文所繪示之式中之一者(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，

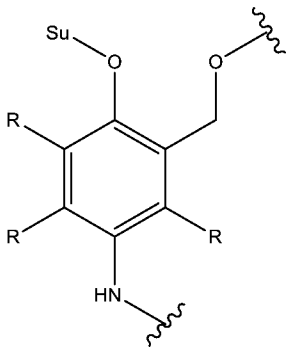



其中Su係糖部分，糖苷鍵包含Su與自分解性基團Z之間之氧鍵，且每一R獨立地為氫、鹵基(例如，氯、溴、氟等)、—CN、—$NO_2$或其他拉電子或推電子基團，前提係葡萄糖醛酸苷單元(及具體而言Z)在糖苷鍵裂解後經歷自分解。在一些實施例中，每一R獨立地為氫、鹵基(例如，氯、溴、氟等)、—CN或—$NO_2$。

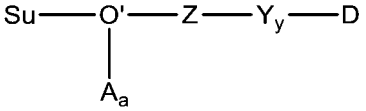
在一些實施例中，葡萄糖醛酸苷單元具有如下文所繪示之式中之一者(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，



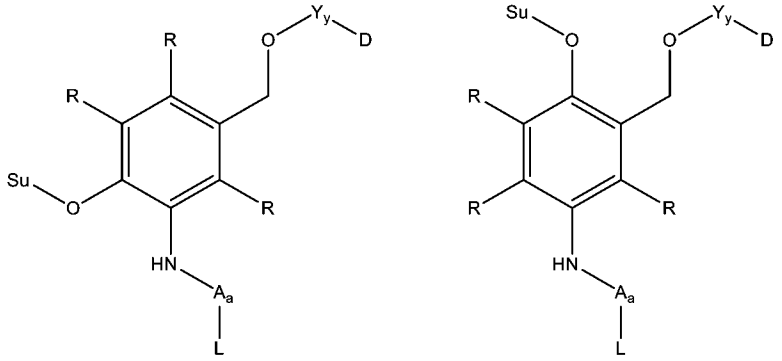

其中Su係糖部分，糖苷鍵(—O'—)包含Su與自分解性基團Z之間之氧鍵，且每一R獨立地為氫。

在一些實施例中，自分解性基團(Z)共價連接至糖部分，連接至藥物(直接或間接經由間隔體單元)，且連接至連接體(直接或間接經由延伸體單元)。在一些實施例中，藥物連接體結合物具有如下文所繪示之式(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，

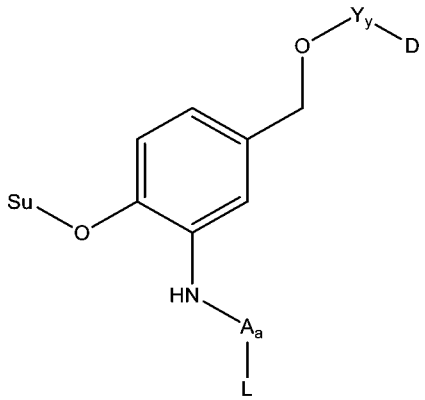


其中Su、O'、Z、Y、y、D、A及a定義於本文中。通常1至20個該等藥物-連接體結合物可連接至連接體。

在一些實施例中，包含葡萄糖醛酸苷單元之ADC具有如下文所繪示之式中之一者(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，其中Su、Y、y、D、A、a及L係如本文所述來定義。

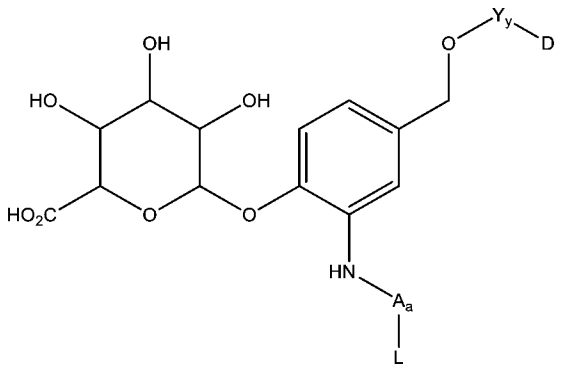


在一些實施例中，包含葡萄糖醛酸苷單元之ADC具有如下文所繪示之式(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，其中Y、y、D、A、a及L定義於本文中。

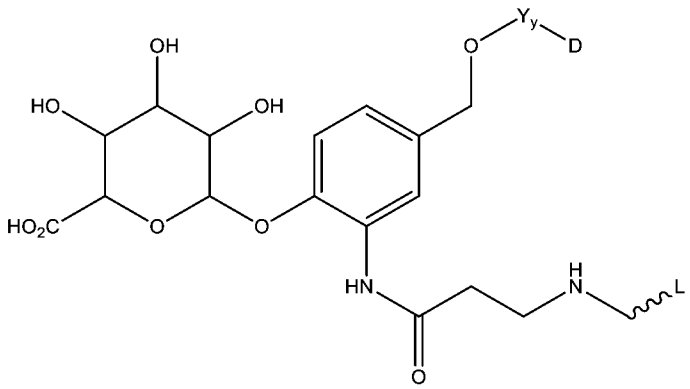


在一些實施例中，包含葡萄糖醛酸苷單元之ADC具有如下文所繪示

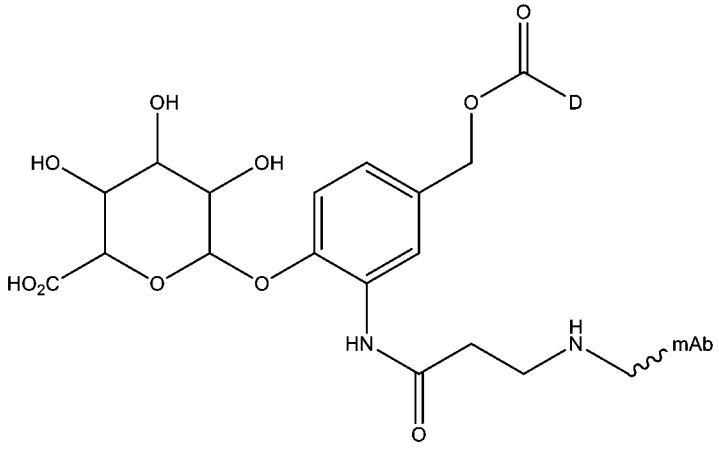
之式(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，其中Y、y、D及L係如本文所述來定義。



在一些實施例中，包含葡萄糖醛酸苷單元之ADC具有如下文所繪示之式(亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)，其中Y、y、D及L係如本文所述來定義。



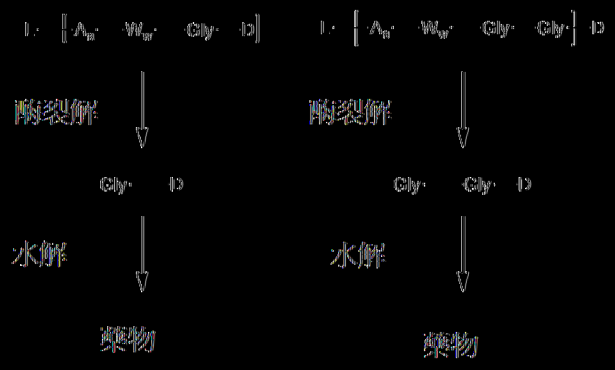
在一些實施例中，包含葡萄糖醛酸苷單元之ADC具有如下文所繪示之式(亦參見US 2012/0107332 A1)，其中D係如本文所定義且mAb係單株抗體。



在間隔體單元( Y )存在時，在胺基酸單元存在時，其將胺基酸單元(或葡萄糖醛酸苷單元，亦參見US 2012/0107332，其係以引用方式併入本文中)連接至藥物部分。或者，在胺基酸單元不存在時，間隔體單元將延伸體單元連接至藥物部分。在胺基酸單元及延伸體單元二者不存在時，間隔體單元亦可將藥物單元連接至抗體單元。

間隔體單元具有兩種一般類型：非自分解性或自分解性。非自分解性間隔體單元係其中在胺基酸單元(或葡萄糖醛酸苷單元)自抗體-藥物偶聯物裂解(尤其酶裂解)後，部分或所有間隔體單元保持結合至藥物部分者。非自分解性間隔體單元之實例包括(但不限於) (甘胺酸-甘胺酸)間隔體單元及甘胺酸間隔體單元(二者給示下文方案1中(亦參見U.S. 8,309,093，其係以引用方式併入本文中))。

方案1




在含有甘胺酸-甘胺酸間隔體單元或甘胺酸間隔體單元之結合物經歷經由酶(例如，腫瘤細胞相關蛋白酶、癌細胞相關蛋白酶或淋巴球相關蛋白酶)之酶裂解時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分自L-$A_a$-$W_w$-裂解。在一個實施例中，獨立水解反應發生於靶細胞內，裂解甘胺酸-藥物部分鍵並釋放藥物。

在一典實施例中，非自分解性間隔體單元( Y )係-Gly-。在一典實施例中，非自分解性間隔體單元( Y )係-Gly-Gly-。

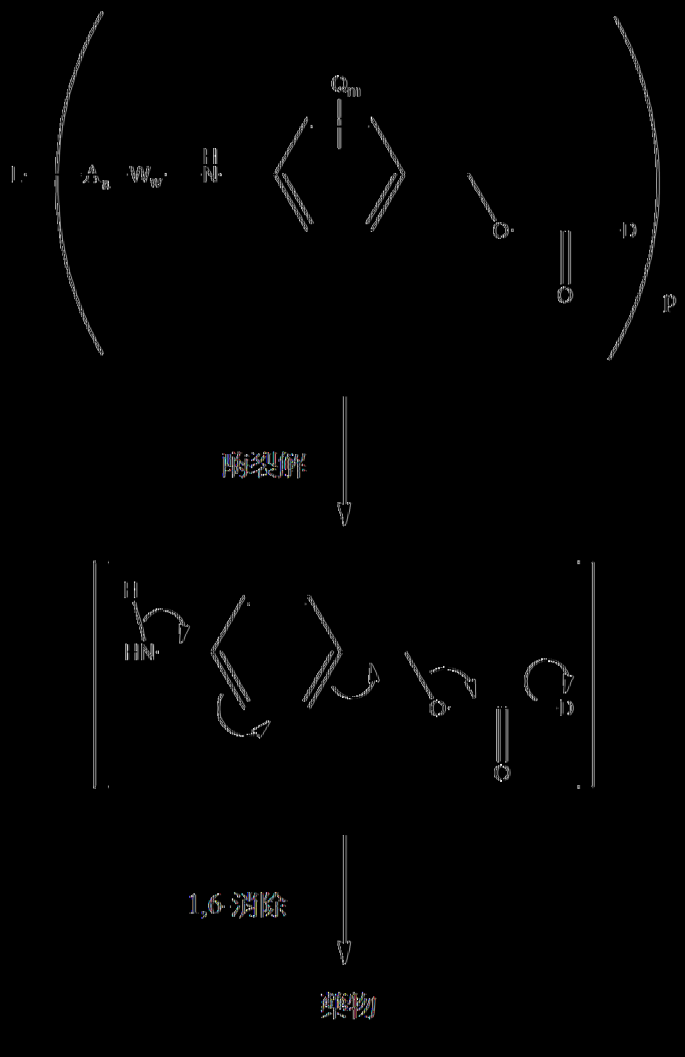
在一個實施例中，提供其中間隔體單元不存在(y=0)之藥物-連接體結合物或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物。

或者，含有自分解性間隔體單元之結合物可容許釋放藥物部分。若自分解性間隔體單元與第一部分之鍵裂解，則其將自發自第二化學部分分離。

在一些實施例中，—$Y_y$—係對胺基苄醇(PAB)單元，其伸苯基部分經$Q_m$取代，其中Q係–$C_1$-$C_8$烷基、—$C_1$-$C_8$烯基、—$C_1$-$C_8$炔基、—O—($C_1$-$C_8$烷基)、—O—($C_1$-$C_8$烯基)、—O—($C_1$-$C_8$炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m係介於0-4範圍內之整數。單獨或作為另一基團之一部分之烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

在一些實施例中，—Y—係PAB基團，其經由PAB基團之胺基氮原子連接至—$W_w$—，且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚基團直接連接至-D。不受限於任何具體理論或機制，下文方案2 (亦參見U.S. 8,309,093)繪示經由胺基甲酸酯或碳酸酯基團直接附接至-D PAB基團之藥物釋放之可能機制，如Toki等人，2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872所述。

方案 2

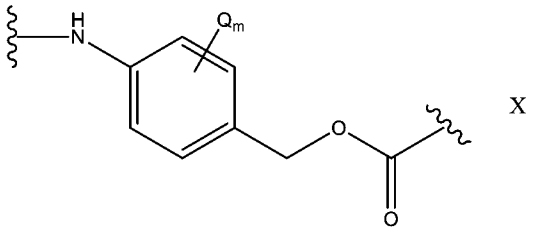



在方案2中，Q係 C1-C8烷基、 C1-C8烯基、 C1-C8炔基、 O (C1-C8烷基)、 O (C1-C8烯基)、 O (C1-C8炔基)、鹵素、硝基或氰基；m係介於0-4範圍內之整數；且p介於1至約20範圍內。單獨或作為另一基團之一部分之烷基、烯基及炔基可視情況經取代。

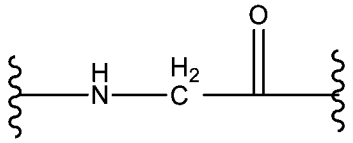
自分解性間隔體之其他實例包括(但不限於)電子類似於PAB基團之芳香族化合物，例如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人，1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)及鄰胺基下基縮醛或對胺基下基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔體，例如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(Rodrigues等人，1995, Chemistry Biology 2:223)、經適當取代之二

環[2.2.1]及二環[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)。在甘胺酸之α-位置經取代之含胺藥物之消除(Kingsbury等人，1984, J. Med. Chem. 27:1447)亦係自分解性間隔體之實例。

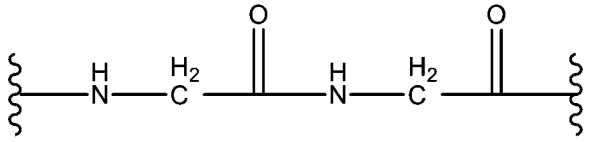
在一個態樣中，間隔體單元(—$Y_y$—)由式(X)-(XII)表示(參見下文(亦參見U.S. 8,309,093)，其中Q係—$C_1$-$C_8$烷基、—$C_1$-$C_8$烯基、—$C_1$-$C_8$炔基、—O—($C_1$-$C_8$烷基)、—O—($C_1$-$C_8$烯基)、—O—($C_1$-$C_8$炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m係介於0-4範圍內之整數。



X



XI



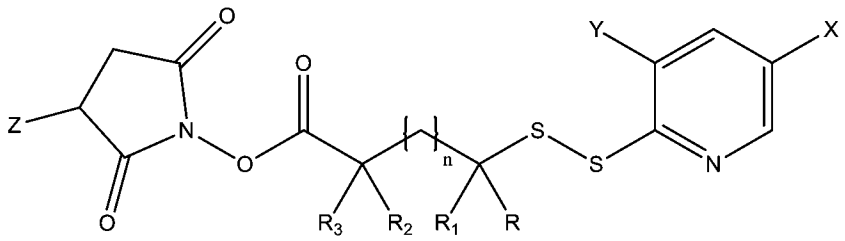
XII

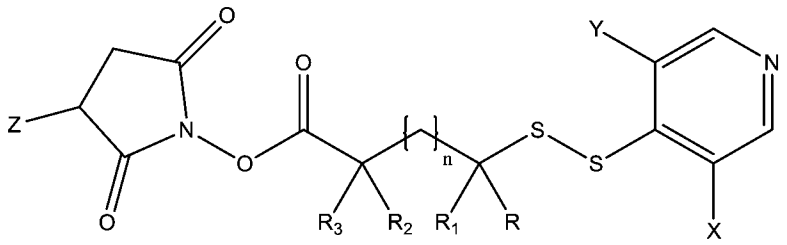
自分解性間隔體之其他實例包括(但不限於)電子類似於PAB基團之芳香族化合物，例如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(例如，參見Hay等人，1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰胺基苄基縮醛或對胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔體，例如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(例如，參見Rodrigues等人，1995, *Chemistry Biology* 2:223)、經適當取代之二環[2.2.1]及二環[2.2.2]環系統(例如，參見Storm等人，1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815)及2-胺基苯基丙酸醯胺(例如，參見Amsberry等人，1990, J. Org. Chem. 55:5867)。在甘胺酸之α-位置經取

代之含胺藥物之消除(例如，參見Kingsbury等人，1984, *J. Med. Chem.* 27:1447)亦係自分解性間隔體之實例。

其他適宜間隔體單元揭示於已公開美國專利申請案第2005-0238649號中，其揭示內容係以引用方式併入本文中。

另一種生成ADC之方法涉及使用將抗-EGFR抗體連接至藥物部分之異雙官能交聯劑。可用交聯劑之實例包括4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)-戊酸N-琥珀醯亞胺基酯或高水溶性類似物4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)-戊酸N-磺基琥珀醯亞胺基酯、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀醯亞胺基酯(SPDB)、4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀醯亞胺基酯(SNPB)及4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)丁酸N-磺基琥珀醯亞胺基酯(SSNPB)、4-甲基-4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)戊酸N-琥珀醯亞胺基酯(SMNP)、4-(5-N,N-二甲基甲醯胺基-2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀醯亞胺基酯(SCPB)或4-(5-N,N-二甲基甲醯胺基-2-吡啶基二硫代)丁酸N-磺基琥珀醯亞胺基酯(SSCPB))。本發明抗體可經交聯劑4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)-戊酸N-琥珀醯亞胺基酯、4-(5-硝基-2-吡啶基二硫代)-戊酸N-磺基琥珀醯亞胺基酯、SPDB、SNPB、SSNPB、SMNP、SCPB或SSCPB修飾，然後可與少量含有硫醇部分之具體藥物反應以獲得優良產率之ADC。較佳地，交聯劑係如下文所繪示之式之化合物(亦參見美國專利第6,913,748，其係以引用方式併入本文中)，



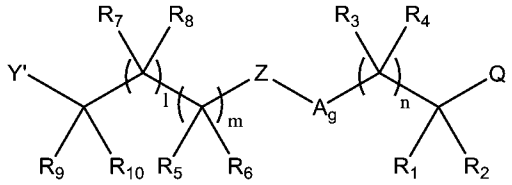


其中R、$R_1$、$R_2$及$R_3$相同或不同且係H、甲基、乙基或具有3至6個碳原子之直鏈、具支鏈或環狀烷基，n係0或1至4之整數，X及Y相同或不同且係H、$CONR_4R_5$或$NO_2$，前提係X及Y不同時為H，$R_4$及$R_5$相同或不同且各自係H、甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基、異丁基或第三丁基，且Z係$SO_3^-M^+$或H，其中$M^+$代表金屬離子或四烷基銨離子，前提係在X及/或Y係$NO_2$時，Z不為H。其他異雙官能交聯劑及使用其製備ADC之方法闡述於美國專利第6,913,748號中，其係以引用方式明確併入本文中。

在一個實施例中，使用帶電荷連接體(亦稱作預帶電荷連接體)將抗-EGFR抗體結合至藥物以形成ADC。帶電荷連接體包括在細胞處理後帶電荷之連接體。在細胞處理後在具體ADC之連接體中或藥物上存在帶電荷基團提供若干優點，例如(i) ADC之水溶性較大，(ii) 能在水溶液中以較高濃度操作，(iii) 每個抗體能連接更大數目之藥物分子，潛在地產生較高功效，(iv) 帶電荷結合物質可能保留在靶細胞內部，產生較高功效，及(v) 提高多重抗藥性細胞之敏感性，其原本不能自細胞排出帶電荷之藥物物質。

一些適宜帶電荷或預帶電荷交聯劑及其合成之實例顯示於美國專利第8,236, 319號之圖1至10中，且係以引用方式併入本文中。較佳地，帶電荷或預帶電荷交聯劑係彼等含有磺酸酯、磷酸酯、羧基或四級胺取代基者，此顯著提高ADC、尤其具有2至20種結合藥物之ADC之溶解性。自含有預帶電荷部分之連接體製備之結合物將在結合物於細胞中代謝後產生一或多個帶電荷部分。

在另一實施例中，本發明之ADC包含具有如下文所繪示之式之連接體(亦參見美國專利第8,236, 319，其係以引用方式併入本文中)，




其中Y'代表使得能與抗體反應之官能基；Q代表使得能經由二硫化物、硫醚、硫酯、肽、腙、酯、醚、胺基甲酸酯或醯胺鍵連接藥物之官能基；$R_1$、$R_2$、$R_3$、$R_4$、$R_5$、$R_6$、$R_7$、$R_8$、$R_9$及$R_{10}$相同或不同且係H、具有1至6個碳原子之直鏈烷基、具有3至6個碳原子之具支鏈或環狀烷基、具有2至6個碳原子之直鏈、具支鏈或環狀烯基或炔基、陰離子(例如但不限於$SO_3^-$、X—$SO_3^-$、$OPO_3^{2-}$、X—$OPO_3^{2-}$、$PO_3^{2-}$、X—$PO_3^{2-}$、$CO_2$—)、陽離子(例如但不限於含氮雜環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$或X—$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$或苯基，其中：$R_{11}$、$R_{12}$及$R_{13}$相同或不同且係H、具有1至6個碳原子之直鏈烷基或具有3至6個碳原子之具支鏈或環狀烷基，且X代表苯基或具有1至6個碳原子之直鏈烷基或具有3至6個碳原子之具支鏈或環狀烷基)；l、m及n係0或1至4之整數；A係苯基或經取代苯基，其中取代基係具有1至6個碳原子之直鏈烷基或具有3至6個碳原子之具支鏈或環狀烷基或選自以下之帶電荷取代基：陰離子(例如但不限於$SO_3^-$、X—$SO_3^-$、$OPO_3^{2-}$、X—$OPO_3^{2-}$、$PO_3^{2-}$、X—

$PO_3^{2-}$、$CO_2$—)及陽離子(例如但不限於含氮雜環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$或X—$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$，其中X具有與上文相同之定義)，且其中g係0或1；Z係式$(OCH_2CH_2)_p$之可選聚乙烯氧基單元，其中p係0或2至約1000之整數，或F1-E1-P-E2-F2單元，其中E1及E2相同或不同且係C=O、O或NR14，其中$R_{14}$係H、具有1至6個碳原子之直鏈烷基、具有3至6個碳原子之具支鏈或環狀烷基、具有2至6個碳原子之直鏈、具支鏈或環狀烯基或炔基；P係長度介於2與20個胺基酸之間之肽單元，其中E1或E2可經由末端氮、末端碳或經由肽中一個胺基酸之側鏈連接至肽；且F1及F2相同或不同且係式$(OCH_2CH_2)_p$之可選聚乙烯氧基單元，其中p係0或2至約1000之整數，前提係在Z不為F1-E1-P-E2-F2時，$R_1$、$R_2$、$R_3$、$R_4$、$R_5$、$R_6$、$R_7$、$R_8$、$R_9$及$R_{10}$中之至少一者係帶電荷取代基，或在g係1時，A、$R_1$、$R_2$、$R_3$、$R_4$、$R_5$、$R_6$、$R_7$、$R_8$、$R_9$及$R_{10}$中之至少一者係帶電荷取代基。

可與組合物及方法一起使用之連接體之其他實例包括纈胺酸-瓜胺酸；馬來醯亞胺基己醯基；胺基苯甲酸；對胺基苄基胺甲醯基(PAB)；溶酶體酶可裂解之連接體；馬來醯亞胺基己醯基-聚乙二醇(MC(PEG)6-OH)；N-甲基-纈胺酸瓜胺酸；4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸N-琥珀醯亞胺基酯(SMCC)；4-(2-吡啶基二硫代)丁酸N-琥珀醯亞胺基酯(SPDB)；及4-(2-吡啶基硫代)戊酸N-琥珀醯亞胺基酯(SPP) (亦參見US 2011/0076232)。用於本發明之另一連接體包括抗生物素蛋白-生物素連接以提供含有抗生物素蛋白-生物素之ADC (亦參見美國專利第4,676,980號、PCT公開案第WO1992/022332A2號、第WO1994/016729A1號、第WO1995/015770A1號、第WO1997/031655A2號、第WO1998/035704A1號、第WO1999/019500A1號、第WO2001/09785A2號、第WO2001/090198A1

號、第WO2003/093793A2號、第WO2004/050016A2號、第WO2005/081898A2號、第WO2006/083562A2號、第WO2006/089668A1號、第WO2007/150020A1號、第WO2008/135237A1號、第WO2010/111198A1號、第WO2011/057216A1號、第WO2011/058321A1號、第WO2012/027494A1號及第EP77671B1號)，其中一些該等連接體抵抗生物素酶裂解。可用於本發明之其他連接體包括黏蛋白/停靠蛋白對以提供含有黏蛋白-停靠蛋白之ADC (參見PCT公開案第WO2008/097866A2號、第WO2008/097870A2號、第WO2008/103947A2號及第WO2008/103953A2號)。

用於本發明之其他連接體可含有非肽聚合物(實例包括(但不限於)聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多糖、聚葡萄糖、聚乙烯基乙基醚、PLA (聚(乳酸))、PLGA (聚(乳酸-乙醇酸))及其組合，其中較佳聚合物係聚乙二醇) (亦參見PCT公開案第WO2011/000370號)。其他連接體亦闡述於WO 2004-010957、美國公開案第20060074008號、美國公開案第20050238649號及美國公開案第20060024317號，其各自係全文以引用方式併入本文中)。

對於含有類美登素之ADC，類美登素上之多個位置可用作化學連接連接部分之位置。在一個實施例中，包含含有反應性化學基團之連接部分之類美登素係美登醇之C-3酯及其類似物，其中連接部分含有二硫鍵且化學反應基團包含N-琥珀醯亞胺基或N-磺基琥珀醯亞胺基酯。舉例而言，具有羥基之C-3位置、經羥基甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置皆可用。連接部分最佳連接至美登醇之C-3位置。

藥物與抗體經由連接體之結合可藉由任一業內已知技術來完成。可

使用多種不同反應將藥物及連接體共價附接至抗體。此可藉由抗體之胺基酸殘基之反應來完成，包括離胺酸之胺基、麩胺酸及天冬胺酸之游離羧酸基團、半胱胺酸之硫氫基及芳香族胺基酸之各個部分。最常用非特異性共價附接方法中之一者係將化合物之羧基(或胺基)連接至抗體之胺基(或羧基)之碳二亞胺反應。另外，已使用諸如二醛或亞胺酸酯等雙官能試劑來將化合物之胺基連接至抗體之胺基。席夫鹼(Schiff base)反應亦可用於將藥物附接至抗體。此方法涉及含有二醇或羥基之藥物之過碘酸鹽氧化，由此形成醛，隨後使其與結合劑反應。經由與抗體之胺基形成席夫鹼來進行附接。亦可使用異硫氰酸酯作為偶合劑用於將藥物共價附接至抗體。其他技術為熟習此項技術者已知且在本發明之範疇內。

在某些實施例中，使為連接體前體之中間體在適當條件下與藥物反應。在某些實施例中，在藥物或中間體上使用反應性基團。隨後使藥物與中間體之間之反應產物或經衍生藥物與抗-EGFR抗體在適當條件下反應。實例性連接體、延伸體單元、胺基酸單元、自分解性間隔體單元之合成及結構闡述於美國專利申請公開案第20030083263號、第20050238649號及第20050009751號中，每一者係以引用方式併入本文中。

ADC之穩定性可藉由標準分析技術來量測，例如質譜術、HPLC及分離/分析技術LC/MS。

## IV. 抗-EGFR ADC之純化

ADC之純化可以收集具有某些DAR之ADC之方式來達成。舉例而言，可使用HIC樹脂來分離高藥物負載ADC與具有最佳藥物對抗體比率(DAR)、例如DAR為4或更小之ADC。在一個實施例中，將疏水性樹脂添加至ADC混合物中，使得不期望ADC (即，較高藥物負載ADC)結合樹脂且可自混

合物選擇性移除。在某些實施例中，ADC之分離可藉由使ADC混合物(例如，包含4或更小之ADC藥物負載物質與6或更大之ADC藥物負載物質之混合物)與疏水性樹脂接觸來達成，其中樹脂之量足以容許結合自ADC混合物移除之藥物負載物質。將樹脂及ADC混合物混合在一起，使得所移除之ADC物質(例如，6或更大之藥物負載物質)結合至樹脂且可與ADC混合物中之其他ADC物質分離。該方法中所用樹脂之量係基於欲移除物質與樹脂之間之重量比，其中所用樹脂之量不容許所期望藥物負載物質之顯著結合。因此，可使用多種方法將平均DAR 5.5減小至小於4。此外，可使用本文所述純化方法來分離具有期望範圍之藥物負載物質(例如，4或更小之藥物負載物質、3或更小之藥物負載物質、2或更小之藥物負載物質、1或更小之藥物負載物質)之ADC。

分子之某些物質基於該等物質與疏水性樹脂之間之疏水性相互作用結合至表面。在一個實施例中，本發明方法係指依賴於疏水性樹脂與ADC混合物之間之互混之純化製程，其中添加至混合物中之樹脂之量決定將結合之物質(例如，DAR為6或更大之ADC)。在自表現系統(例如，哺乳動物表現系統)產生並純化抗體後，將該抗體還原並經由結合反應偶合至藥物。所得ADC混合物經常含有具有一定DAR範圍(例如，1至8)之ADC。在一個實施例中，ADC混合物包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質。根據本發明方法，ADC混合物可使用製程(例如(但不限於)分批製程)來純化，使得選擇具有4或更小之藥物負載物質之ADC並將其與具有較高藥物負載之ADC (例如，具有6或更大之藥物負載物質之ADC)分離。值得注意的是，本文所述純化方法可用於分離具有任何期望DAR範圍(例如，4或更小之DAR、3或更小之DAR、2或更小之DAR)之

ADC。

因此，在一個實施例中，可使包括4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸以形成樹脂混合物，其中與ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合；及自ADC混合物移除疏水性樹脂，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體。在單獨實施例中，本發明方法包含使包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸以形成樹脂混合物，其中與該ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合；及自該ADC混合物移除該疏水性樹脂，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體，其中疏水性樹脂之重量係ADC混合物中6或更大之藥物負載物質之重量的3至12倍。

本文所述之ADC分離方法可使用分批純化方法來實施。分批純化製程通常包括將ADC混合物添加至容器中之疏水性樹脂，混合及隨後自上清液分離樹脂。舉例而言，在分批純化情況下，可在期望平衡緩衝液中製備疏水性樹脂或將該疏水性樹脂平衡至該緩衝液中。可由此獲得疏水性樹脂漿液。然後可使ADC混合物與漿液接觸以藉由疏水性樹脂吸附欲分離之特定ADC物質。然後可藉由(例如)過濾或藉由容許漿液沉降並移除上清液自漿液分離包含不結合至疏水性樹脂材料之期望ADC之溶液。所得漿液可經受一或多個洗滌步驟。為溶析經結合ADC，可降低鹽濃度。在一

個實施例中，本發明中所用製程包括不超過50 g之疏水性樹脂。

因此，可使用分批方法使包括4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸以形成樹脂混合物，其中與ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以使6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合；及自ADC混合物移除疏水性樹脂，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體。在單獨實施例中，使用分批方法使包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸以形成樹脂混合物，其中與ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合；及自ADC混合物移除疏水性樹脂，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中該ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體，其中疏水性樹脂之重量係ADC混合物中6或更大之藥物負載物質之重量之3至12倍。

或者，在單獨實施例中，可使用循環製程實施純化，其中將樹脂填充於容器中並使ADC混合物經過疏水性樹脂床，直至已移除欲分離之特定ADC物質為止。然後自容器泵送上清液(含有期望ADC物質)且樹脂床可經受洗滌步驟。

可使用循環製程使包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸以形成樹脂混合物，其中與ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合；及自該ADC混合物移

除該疏水性樹脂，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中該ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體。在單獨實施例中，使用循環製程使包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸以形成樹脂混合物，其中與該ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合；及自該ADC混合物移除該疏水性樹脂，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中該ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體，其中疏水性樹脂之重量係該ADC混合物中6或更大之藥物負載物質之重量之3至12倍。

或者，可使用流過式製程純化ADC混合物以獲得所包含大部分ADC具有某一期望DAR之組合物。在流過式製程中，將樹脂填充於容器(例如管柱)中，且使ADC混合物經過所填充樹脂，使得期望ADC物質實質上不結合至樹脂並流過樹脂，且不期望ADC物質結合至樹脂。流過式製程可以單程模式(其中由於單程經過容器中之樹脂而獲得所關注ADC物質)或以多程模式(其中由於多程經過容器中之樹脂而獲得所關注ADC物質)實施。實施流過式製程，使得所選重量之樹脂結合至不期望ADC群體，且期望ADC (例如，DAR 2-4)流經樹脂並在單程或多程經過後於流過物中收集。

可使用流過式製程使包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物與疏水性樹脂接觸，其中與該ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合，其中4或更小之藥物負載物質經過樹脂且隨後在一或多次經過後經收集，使得獲得包含期望ADC (例如DAR

2-4)之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中該ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體。在單獨實施例中，使用流過式製程藉由使包含4或更小之藥物負載物質及6或更大之藥物負載物質之ADC混合物經過疏水性樹脂來使該ADC混合物與該樹脂接觸，其中與該ADC混合物接觸之疏水性樹脂之量足以容許6或更大之藥物負載物質結合至樹脂，但不容許4或更小之藥物負載物質之顯著結合，其中4或更小之藥物負載物質經過該樹脂且隨後經收集，使得獲得包含ADC之組合物，其中該組合物包含小於15%之6或更大之藥物負載物質，且其中該ADC包含結合至奧裡斯他汀之抗體，其中疏水性樹脂重量之量係ADC混合物中6或更大之藥物負載物質之重量之3至12倍。

在流過式製程後，可用一或多次洗滌來洗滌樹脂，以進一步回收具有期望DAR範圍之ADC (在洗滌濾液中發現)。舉例而言，可使用具有降低傳導性之複數次洗滌進一步回收具有所關注DAR之ADC。隨後可將自洗滌樹脂獲得之溶析材料與流過式製程產生之濾液合併，用於提高具有所關注DAR之ADC之回收率。

上文所提及之分批、循環及流過式製程純化方法係基於使用疏水性樹脂來分離ADC之高藥物負載物質對低藥物負載物質。疏水性樹脂包含與ADC之疏水性性質相互作用之疏水性基團。ADC上之疏水性基團與疏水性樹脂內之疏水性基團相互作用。蛋白質之疏水性愈高，其將與疏水性樹脂發生之相互作用愈強。

疏水性樹脂通常包含與疏水性配體(例如，烷基或芳基)偶合之基底基質(例如，交聯瓊脂糖或合成共聚物材料)。多種疏水性樹脂可自市面購得。實例包括(但不限於)具有低或高取代之Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow

(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)；Phenyl Sepharose™ High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)；Octyl Sepharose™ High Performance (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)；Fractogel™ EMD丙基或Fractogel™ EMD苯基管柱(E. Merck, Germany)；Macro-Prep™甲基或Macro-Prep™第三丁基載體(Bio-Rad, California)；WP HI-Propyl ($C_3$)™ (J. T. Baker, New Jersey)；及Toyopearl™醚、己基、苯基或丁基(TosoHaas, PA)。在一個實施例中，疏水性樹脂係丁基疏水性樹脂。在另一實施例中，疏水性樹脂係苯基疏水性樹脂。在另一實施例中，疏水性樹脂係己基疏水性樹脂、辛基疏水性樹脂或癸基疏水性樹脂。在一個實施例中，疏水性樹脂係具有正丁基配體之甲基丙烯酸聚合物(例如TOYOPEARL® Butyl-600M)。

用於純化ADC混合物以獲得具有期望DAR之組合物之其他方法闡述於美國申請案第14/210,602號(美國專利申請公開案第US 2014/0286968號)中，其係全文以引用方式併入本文中。

## V. 抗-EGFR抗體及抗-EGFR ADC之用途

本發明之抗體及抗體部分(及ADC)較佳能在活體內中和人類EGFR活性。因此，本發明之該等抗體及抗體部分可用於在(例如)含有hEGFR之細胞培養物中、在人類個體中或在具有與本發明抗體交叉反應之EGFR之其他哺乳動物個體中抑制hEGFR活性。在一個實施例中，本發明提供抑制hEGFR活性之方法，其包含使hEGFR與本發明之抗體或抗體部分接觸，使得hEGFR活性受到抑制。舉例而言，在含有或懷疑含有hEGFR之細胞培養物中，可將本發明之抗體或抗體部分添加至培養基中以抑制培養物中之hEGFR活性。

在另一實施例中，本發明提供用於降低個體、有利地患有其中EGFR活性有害之疾病或病症之個體之hEGFR活性之方法。本發明提供降低患有此一疾病或病症之個體之EGFR活性之方法，該方法包含向該個體投與本發明之抗體或抗體部分，使得降低該個體之EGFR活性。較佳地，EGFR係人類EGFR，且個體係人類個體。或者，個體可為表現能與本發明抗體結合之EGFR之哺乳動物。此外，個體可為已向其中引入EGFR (例如，藉由投與EGFR或藉由表現EGFR轉基因)之哺乳動物。可將本發明抗體投與人類個體用於治療目的。此外，可將本發明抗體投與表現能與該抗體結合之EGFR之非人類哺乳動物用於獸醫目的或作為人類疾病之動物模型。關於後者，該等動物模型可用於評估本發明抗體之治療效能(例如，測試投與劑量及時程)。

如本文所用術語「其中EGFR活性有害之病症」意欲包括疾病及其他病症，其中已顯示在患有該病症之個體中，EGFR活性之存在應對或懷疑對該病症之病理生理學或促使該病症惡化之因素負責。因此，其中EGFR活性有害之病症係其中預期降低EGFR活性會減輕病症之症狀及/或進展之病症。該等病症可藉由(例如)患有該病症之個體之生物流體中EGFR之濃度增加(例如，EGFR在該個體之腫瘤、血清、血漿、滑液等中之濃度增加)來證實，該增加可使用(例如)如上文所述之抗-EGFR抗體來檢測。可用本發明抗體(例如AbA)或其抗原結合片段治療之病症之非限制性實例包括下文所論述之彼等病症。舉例而言，適宜病症包括(但不限於)多種癌症，包括(但不限於)乳癌、肺癌、神經膠質瘤、前列腺癌、胰臟癌、結腸癌、頭頸癌及腎癌。可使用本文中所揭示之組合物及方法治療之癌症之其他實例包括鱗狀細胞癌(例如，鱗狀肺癌或鱗狀頭頸癌)、三陰性乳癌、非小細胞

肺癌、結腸直腸癌及間皮瘤。在一個實施例中，本文中所揭示之抗體及ADC用於治療過表現EGFR或係EGFR陽性之實體腫瘤，例如抑制實體腫瘤生長或減小其大小。在一個實施例中，本發明係關於治療EGFR擴增之鱗狀肺癌。在一個實施例中，本文中所揭示之抗體及ADC用於治療EGFR擴增之鱗狀頭頸癌。在另一實施例中，本文中所揭示之抗體及ADC用於治療三陰性乳癌(TNBC)。本文所述之疾病及病症可藉由本發明之抗-EGFR抗體或ADC以及包含該等抗-EGFR抗體或ADC之醫藥組合物治療。

在某些實施例中，將本文中所揭示之抗體及ADC投與有需要之個體以治療可能展現升高含量之表皮生長因子受體(EGFR)之晚期實體腫瘤類型。該等腫瘤之實例包括(但不限於)頭頸鱗狀細胞癌、非小細胞肺癌、三陰性乳癌、結腸直腸癌及多形性神經膠母細胞瘤。

在某些實施例中，本發明包括抑制或降低患有實體腫瘤之個體之實體腫瘤生長之方法，該方法包含將本文所述之抗-EGFR抗體或ADC投與患有實體腫瘤之個體，使得實體腫瘤生長受到抑制或降低。在某些實施例中，實體腫瘤係非小細胞肺癌或神經膠母細胞瘤。在其他實施例中，實體腫瘤係EGFRvIII陽性腫瘤或表現EGFR之實體腫瘤。在其他實施例中，實體腫瘤係EGFR擴增之實體腫瘤或過表現EGFR之實體腫瘤。在某些實施例中，將本文所述之抗-EGFR抗體或ADC單獨或與額外藥劑(例如輻射及/或替莫唑胺)組合投與患有多形性神經膠母細胞瘤之個體。

在某些實施例中，本發明包括抑制或降低患有實體腫瘤之個體之實體腫瘤生長之方法，該實體腫瘤經鑑別為表現EGFR或過表現EGFR之腫瘤(或表現EGFRvIII之腫瘤)，該方法包含將本文所述之抗-EGFR抗體或ADC投與患有實體腫瘤之個體，使得實體腫瘤生長受到抑制或降低。鑑

別表現EGFR之腫瘤(例如，過表現EGFR之腫瘤)之方法為業內已知，且包括FDA批准之測試及驗證分析。舉例而言，EGFR pharmDx™分析(Dako North America公司)係定性免疫組織化學(IHC)套組系統，其用於鑑別以常規方式固定以供組織學評估之正常及瘤組織中之EGFR表現。EGFR pharmDx特異性檢測表現EGFR之細胞中之EGFR (HER1)蛋白質。另外，亦可使用基於PCR之分析來鑑別過表現EGFR之腫瘤。舉例而言，該等分析可使用對變體EGFR基因(例如，SEQ ID NO: 33)及/或cDNA具有特異性之引子，且導致擴增EGFR基因/cDNA或其部分。隨後可藉由(例如)凝膠電泳使用業內已知用於測定PCR產物大小之標準方法來分析經擴增PCR產物。可使用該等測試來鑑別可用本文所述之方法及組合物治療之腫瘤。

可根據本發明使用業內可得之用於基因療法之任一方法。關於基因療法之方法的一般評論，參見Goldspiel等人，1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505；Wu及Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95；Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596；Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993)；以及Morgan及Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217；1993年5月, *TIBTECH* 11(5):155-215。業內一般已知之重組DNA技術之可用方法闡述於Ausubel等人(編輯)，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993)；及Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)中。基因療法之各種方法之詳細說明提供於US20050042664 A1中，其係以引用方式併入本文中。

在另一態樣中，本申請案之特徵為治療(例如，治癒、阻抑、改善、延遲或預防其發作或預防其復發或復發)或預防個體之EGFR相關病症之方

法。該方法包括：以足以治療或預防EGFR相關病症之量向個體投與EGFR結合劑(尤其拮抗劑，例如如本文所述之抗-EGFR抗體或其片段)。EGFR拮抗劑(例如，抗-EGFR抗體或其片段)可單獨或與如本文所述之其他治療模式組合投與個體。

本發明之抗體或ADC或其抗原結合部分可單獨或組合用於治療該等疾病。應理解，本發明抗體或其抗原結合部分可單獨或與額外藥劑(例如，治療劑)組合使用，該額外藥劑係由熟習此項技術者根據其既定目的來選擇。舉例而言，額外藥劑可係業內公認可用於治療藉由本發明抗體治療之疾病或病況之治療劑。額外藥劑亦可係賦予治療組合物有益屬性之藥劑，例如影響組合物黏度之藥劑。

另外應理解，欲包括於本發明內之組合係彼等可用於其既定目的之組合。下文所述藥劑係用於說明性目的且不欲具有限制性。為本發明一部分之組合可係本發明抗體及至少一種選自下文列表之額外藥劑。若組合使得所形成組合物可發揮其既定功能，則該組合亦可包括一種以上之額外藥劑，例如兩種或三種額外藥劑。

組合療法可包括一或多種EGFR拮抗劑(例如抗-EGFR抗體或其片段)，其與一或多種如本文中更詳細闡述的額外治療劑(例如，一或多種細胞介素及生長因子抑制劑、免疫抑制劑、消炎劑(例如，全身性消炎劑)、抗纖維化劑、代謝抑制劑、酶抑制劑及/或細胞毒性或細胞生長抑制劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、用於基因療法之載體、烷基化劑、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼藥劑、化學保護劑、激素、抗激素藥劑、皮質類固醇、光活性治療劑、寡核苷酸、放射性核種劑、拓撲異構酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑或放射致敏劑)一起調配及/或共投與。

在具體實施例中，本文闡述之抗-EGFR結合蛋白質(例如抗-EGFR抗體)係與抗癌劑或抗瘤劑組合使用。術語「抗癌劑」及「抗瘤劑」係指用於治療惡性病(例如癌性生長)之藥物。藥物療法可單獨或與諸如手術或輻射療法等其他治療組合使用。端視所涉及器官之性質，癌症治療中可使用若干藥物類別。舉例而言，乳癌一般受雌激素刺激，且可用使性激素失活之藥物來治療。類似地，前列腺癌可用使雄激素、及雄性性激素失活之藥物來治療。可結合本發明之抗-EGFR抗體或ADC使用之抗癌劑尤其包括以下藥劑：

| **抗癌劑** | **註解** | **實例** |
|---|---|---|
| 抗體 | 結合IGF-1R (胰島 | A12 (完全人類化mAb) |
| (a) 除抗-EGFR | 素樣生長因子1型 | 19D12 (完全人類化mAb) |
| 抗體外之抗 | 受體)之抗體，其在 | Cp751-871 (完全人類化mAb) |
| 體；及 | 大多數人類癌症之 | H7C10 (人類化mAb) |
| (b) 結合不同表 | 細胞表面上表現 | alphaIR3 (小鼠) |
| 位之抗-EGFR抗 | | ScFV/FC (小鼠/人類嵌合體) |
| 體 | | EM/164 (小鼠) |
| | 結合EGFR (表皮生 | 馬妥珠單抗(Matuzumab) (EMD72000) |
| | 長因子受體)之抗 | 爾必得舒® / 西妥昔單抗(Imclone) |
| | 體；影響EGFR表 | 維必施(Vectibix)® / 帕尼單抗(Amgen) |
| | 現或活性之突變可 | mAb 806 |
| | 引發癌症 | 尼妥珠單抗(Nimotuxumab) |
| | | (TheraCIM) |

| | | |
|---|---|---|
| | ———————— | AVEO (AV299) (AVEO) |
| | 結合cMET (間葉上皮轉變因子)之抗體；受體酪胺酸激酶之MET家族之成員) | AMG102 (Amgen)<br>5D5 (OA-5d5) (Genentech)<br>H244G11 (Pierre Fabre) |
| | 結合不同表位之抗ErbB3抗體 | 14號Ab (MM 121-14)<br>賀癌平(Herceptin)® (曲妥珠單抗；Genentech)<br>1B4C3；2D1D12 (U3 Pharma AG) |
| 靶向IGF1R之小分子 | 在多種人類癌症之細胞表面上表現之胰島素樣生長因子1型受體 | NVP-AEW541-A<br>BMS-536,924 (1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡啶-2-酮)<br>BMS-554,417<br>環木脂體(Cycloligan)<br>TAE226<br>PQ401 |
| 靶向EGFR之小分子 | EGFR (表皮生長因子受體)；過表現或影響EGFR表現或活性之突變可引發癌症 | 艾瑞莎® / 吉非替尼 (AstraZeneca)<br>CI-1033 (PD 183805) (Pfizer)<br>拉帕替尼(GW-572016) (GlaxoSmithKline)<br>泰嘉® / 二甲苯磺酸拉帕替尼(Smith Kline Beecham)<br>得舒緩® / 厄洛替尼HCL (OSI-774) (OSI Pharma)<br>PKI-166 (Novartis)<br>PD-158780<br>EKB-569<br>酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 1478 (4-(3- |

| | | |
|---|---|---|
| | | 氯苯胺基)-6,7-二甲氧基喹唑啉) |
| 靶向cMET之小分子 | cMET (間葉上皮轉變因子)；受體酪胺酸激酶之MET家族之成員) | PHA665752<br>ARQ 197 |
| 抗代謝物 | | 氟尿嘧啶(5-FU)<br>卡培他濱 / 截瘤達® (HLR Roche)<br>5-三氟甲基-2'-去氧尿苷<br>胺甲喋呤鈉(Trexall) (Barr)<br>雷替曲塞(Raltitrexed)/ 妥妙得適(Tomudex)® (AstraZeneca)<br>培美曲塞 / 愛甯達(Alimta)® (Lilly)<br>替加氟(Tegafur)<br>胞嘧啶阿拉伯糖苷(阿糖胞苷, Ara-C) / 硫鳥嘌呤® (GlaxoSmithKline)<br>5-氮胞苷<br>6-巰基嘌呤(巰基嘌呤, 6-MP)<br>硫唑嘌呤 / 癌雜散® (AAIPHARMA LLC)<br>6-硫鳥嘌呤(6-TG) / 巰基嘌呤® (TEVA)<br>噴斯他汀/ 尼噴提® (Hospira公司)<br>磷酸氟達拉濱 / 福達樂® (Bayer Health Care)<br>克拉屈濱(2-CdA, 2-氯去氧腺苷) / 祿斯得停® (Ortho Biotech) |
| 烷基化劑 | 烷基化抗瘤劑係將烷基附接至DNA之烷基化劑。由於癌 | 核糖核苷酸還原酶抑制劑(RNR)<br>環磷醯胺 / 癌得星(BMS)<br>癌得散(TEVA) |

| | | |
|---|---|---|
| | 細胞之增殖一般不受限地多於健康細胞，其對DNA損傷更敏感，且烷基化劑在臨床上用於治療多種腫瘤。 | 異環磷醯胺 / 米托薩那(Mitoxana)® (ASTA Medica)<br>噻替派(Bedford, Abraxis, Teva)<br>BCNU→ 1,3-雙(2-氯乙基)-1-亞硝基脲<br>CCNU→ 1, -(2-氯乙基)-3-環已基-1-亞硝基脲(甲基CCNU)<br>六甲基三聚氰胺(六甲蜜胺, HMM) / 克瘤靈® (MGI Pharma公司)<br>白消安 / 馬利蘭 (GlaxoSmithKline)<br>丙卡巴肼HCL/ 甲苯肼(Matulane) (Sigma Tau Pharmaceuticals公司)<br>達卡巴嗪 (DTIC)<br>氮芥苯丁酸 / 留卡拉(Leukara)® (SmithKline Beecham)<br>美法侖 / 威克瘤® (GlaxoSmithKline)<br>順鉑 (順鉑, CDDP) / 鉑帝爾(Platinol) (Bristol Myers)<br>卡鉑 / 佳鉑帝(Paraplatin) (BMS)<br>奧利沙鉑 /益樂鉑® (Sanofi-Aventis US) |
| 拓撲異構酶抑制劑 | 拓撲異構酶抑制劑係經設計以干擾拓撲異構酶(拓撲異構酶I及II)之作用之化學治療劑，該等酶在正常細胞週期期間藉由催化DNA鏈中磷酸二酯主鏈之斷裂及再接合來控制DNA結構之變 | 多柔比星HCL / 多克希爾(Doxil)® (Alza)<br>檸檬酸道諾黴素/ 道諾黴素脂質體(Daunoxome)® (Gilead)<br>米托蒽醌HCL / 能滅瘤(Novantrone) (EMD Serono)<br>放線菌素D<br>依託泊苷 / 滅必治(Vepesid)® (BMS)/ 凡畢複(Etopophos)® (Hospira、Bedford、Teva Parenteral等) |

| | | |
|---|---|---|
| | 化。 | 托泊替康HCL / 癌康定® (GlaxoSmithKline)<br>替尼泊苷(VM-26) / 威猛(Vumon)® (BMS)<br>伊立替康HCL(CPT-ll) / 抗癌妥® (Pharmacia & Upjohn) |
| 微管靶向劑 | 微管係細胞骨架之一種組份。其直徑為約24 nm且長度自數微米至神經細胞軸突中之可能數毫米變化。微管用作細胞內之結構組份且參與多種細胞過程，包括有絲分裂、細胞質分裂及囊泡輸送。 | 長春新鹼 / 安可平(Oncovin)® (Lilly)<br>硫酸長春鹼/ 威爾班(Velban)®(中斷) (Lilly)<br>酒石酸長春瑞濱 / 溫諾平® (PierreFabre)<br>硫酸長春地辛 / 愛得生(Eldisine)® (Lilly)<br>太平洋紫杉醇 / 紫杉醇® (BMS)<br>多西他賽 / 剋癌易® (Sanofi Aventis US)<br>奈米粒子太平洋紫杉醇(ABI-007) / 亞伯杉烷® (Abraxis BioScience公司)<br>伊沙匹隆 / 易莎平™ (BMS) |
| 激酶抑制劑 | 酪胺酸激酶係細胞內用於將磷酸基附接至胺基酸酪胺酸之酶。藉由阻斷蛋白質酪胺酸激酶起作用之能力，該等化合物提供控制癌細胞生長之工具。 | 甲磺酸伊馬替尼 / 基利克 (Novartis)<br>蘋果酸舒尼替尼/ 舒癌特® (Pfizer)<br>甲苯磺酸索拉菲尼 / 蕾莎瓦® (Bayer)<br>鹽酸尼羅替尼單水合物 / 泰息安® (Novartis) |
| 蛋白質合成抑制劑 | 誘導細胞凋亡 | L-天冬醯胺酶 / 愛施巴(Elspar)® (Merck & Co.) |

| | | |
|---|---|---|
| 免疫治療劑 | 誘導癌症患者展現免疫反應性 | α干擾素<br>血管生成抑制劑 / 癌思停(Avastin)® (Genentech)<br>IL-2→ 介白素 2 (阿地介白素 (Aldesleukin)) / 普留淨(Proleukin) ® (Chiron)<br>IL-12→ 介白素12 |
| | 抗體/小分子免疫檢查點調節劑 | 抗CTLA-4及PR-1療法<br>益伏(Yervoy)® (伊匹單抗；Bristol-Myers Squibb)<br>歐普迪沃(Opdivo)® (尼沃魯單抗；Bristol-Myers Squibb)<br>提特魯達(Keytrada)® (派姆單抗；Merck) |
| 激素 | 與絕經及衰老相關之激素療法試圖增加體內某些激素之量，以補償年齡或疾病相關之激素下降。激素療法作為癌症治療降低特定激素之含量或改變癌症使用該等激素生長並擴散之能力。 | 檸檬酸托瑞米芬(Toremifene citrate) / 弗瑞斯(Fareston)® (GTX公司)<br>氟維司群 / 法洛德® (AstraZeneca)<br>雷洛昔芬HCL / 鈣穩(Evista)® (Lilly)<br>阿那曲唑/ 安美達® (AstraZeneca)<br>來曲唑 / 複乳納® (Novartis)<br>法曲唑(Fadrozole) (CGS 16949A)<br>依西美坦 / 諾曼癌素® (Pharmacia & Upjohn)<br>乙酸柳培林/ 癌立佳(Eligard)® (QTL USA)<br>柳菩林® (TAP Pharm)<br>乙酸戈舍瑞林/ 諾雷德(Zoladex)® (AstraZeneca)<br>雙羥萘酸曲普瑞林 / 曲爾斯他 |

| | | |
|---|---|---|
| | | (Trelstar)® (Watson Labs)<br>布舍瑞林(Buserelin) / 舒攝癌(Suprefact)® (Sanofi Aventis)<br>那法瑞林(Nafarelin) / 先納若(Synarel)® (Pfizer)<br>西曲瑞克(Cetrorelix) / 欣得泰(Cetrotide)® (EMD Serono)<br>比卡魯胺 / 可蘇多® (AstraZeneca)<br>尼魯米特 / 尼蘭德龍(Nilandron)® (Aventis Pharm.)<br>乙酸甲地孕酮/ 梅格施® (BMS)<br>體抑素(Somatostatin)類似物 (乙酸奧曲肽(Octreotide acetate) / 善得定(Sandostatin)® (Novartis) |
| 糖皮質激素 | 用於減少引起癌症疼痛之腫脹之消炎藥物。 | 普賴蘇濃(Predinsolone)<br>地塞米松 / 德卡德隆(Decadron)® (Wyeth) |
| 芳香化酶(Aromatose)抑制劑 | 包括咪唑 | 酮康唑 |
| mTOR抑制劑 | mTOR信號傳導路徑最初係在免疫抑制劑雷帕黴素(rapamycin)之研究期間被發現。此高度保守路徑因應環境因素調節細胞增殖及代謝，經由磷酸肌醇-3-激酶(PI-3K)將細胞生長因 | 西羅莫司 (雷帕黴素) / 斥消靈(Rapamune)® (Wyeth)<br>替西羅莫司 (CCI-779) / 特癌適® (Wyeth)<br>地伏莫司(AP23573) / (Ariad Pharm.)<br>依維莫司 (RAD00I) / 卓定康(Certican)® (Novartis) |

子受體信號傳導與
細胞生長、增殖及
血管生成相關聯。

除上文抗癌劑外，本文所述之抗-EGFR抗體及ADC可與章節II中所述之藥劑組合投與。此外，上文所提及之抗癌劑亦可用於本發明ADC中。

在具體實施例中，抗-EGFR抗體或ADC可單獨或與結合抗體作用或與抗體協同作用之另一抗癌劑一起投與，以治療與EGFR活性相關之疾病。該等抗癌劑包括(例如)業內熟知之藥劑(例如，細胞毒素、化學治療劑、小分子及輻射)。抗癌劑之實例包括(但不限於)口外環口放射攝影(Panorex) (Glaxo-Welcome)、瑞圖宣(Rituxan) (IDEC/Genentech/Hoffman la Roche)、滅髓瘤(Mylotarg) (Wyeth)、坎帕斯(Campath) (Millennium)、澤娃靈(Zevalin) (IDEC及Schering AG)、百克沙(Bexxar) (Corixa/GSK)、爾必得舒(Imclone/BMS)、癌思停(Genentech)及賀癌平(Genentech/Hoffman la Roche)。其他抗癌劑包括(但不限於)彼等揭示於美國專利第7,598,028號及國際公開案第WO2008/100624中者，其內容係以引用方式併入本文中。一或多種抗癌劑可在投與本發明之抗體或其抗原結合部分的同時、之前或之後投與。

在本發明之具體實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體或ADC可用於與細胞凋亡劑(例如bcl-xl抑制劑或Bcl-2 (B細胞淋巴瘤2)抑制劑(例如，ABT-199 (維尼托克萊克斯)))之組合療法中，以治療個體之癌症，例如白血病。在一個實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體或ADC可用於與bcl-xl抑制劑之組合療法中用於治療癌症。在一個實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體或ADC可用於與維尼托克萊克斯之組合療法中用於治療癌症。

在本發明之具體實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體或ADC可用於

與NAMPT抑制劑(參見US 2013/0303509中抑制劑之實例；AbbVie公司，其係以引用方式併入本文中)之組合療法中以治療有需要之個體。NAMPT(亦稱作前B細胞群落增強因子(PBEF)及內臟脂肪素(visfatin))係催化菸鹼醯胺之磷酸核糖基化之酶且係兩個補救NAD之路徑中之一者之限速酶。在本發明之一個實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體及ADC係與NAMPT抑制劑組合投與用於治療個體之癌症。

在本發明之具體實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體或ADC可用於與SN-38之組合療法中，SN-38係拓撲異構酶抑制劑伊立替康之活性代謝物。

在本發明之其他實施例中，本文所述之抗-EGFR抗體或ADC可用於與PARP (聚ADP核糖聚合酶)抑制劑(例如維利帕尼(veliparib))之組合療法中，以治療癌症，包括乳癌、卵巢癌及非小細胞肺癌。

可與本文所述之抗-EGFR抗體或抗-EGFR ADC共投與及/或一起調配之額外治療劑之其他實例包括(但不限於)以下中之一或多者：吸入式類固醇；β-激動劑，例如短效或長效β-激動劑；白三烯或白三烯受體拮抗劑；組合藥物，例如ADVAIR；IgE抑制劑，例如抗IgE抗體(例如，XOLAIR®，奧馬珠單抗(omalizumab))；磷酸二酯酶抑制劑(例如，PDE4抑制劑)；黃嘌呤；抗副交感神經藥物；肥胖細胞穩定劑，例如色甘酸(cromolyn)；IL-4抑制劑；IL-5抑制劑；伊紅趨素(eotaxin)/CCR3抑制劑；組織胺或其受體(包括H1、H2、H3及H4)之拮抗劑；及前列腺素D或其受體(DP1及CRTH2)之拮抗劑。該等組合可用於治療(例如)氣喘及其他呼吸病症。可與本文所述之抗-EGFR抗體或抗-EGFR ADC共投與及/或一起調配之額外治療劑之其他實例包括(但不限於)以下中之一或多者：替莫唑胺、

依魯替尼、杜維裡斯及艾代拉裡斯。可與一或多種抗-EGFR抗體或其片段共投與及/或一起調配之治療劑之其他實例尤其包括以下中之一或多者：TNF拮抗劑(例如，TNF受體(例如p55或p75人類TNF受體或其衍生物之可溶片段，例如75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF受體-IgG融合蛋白，恩博(ENBREL)))；TNF酶拮抗劑，例如TNF轉化酶(TACE)抑制劑；毒蕈鹼受體拮抗劑；TGF-β拮抗劑；干擾素γ；吡非尼酮(perfenidone)；化學治療劑，例如胺甲喋呤、來氟米特(leflunomide)或西羅莫司(雷帕黴素)或其類似物，例如CCI-779；COX2及cPLA2抑制劑；NSAID；免疫調節劑；p38抑制劑、TPL-2、MK-2及NFkB抑制劑。

其他較佳組合係細胞介素抑制性消炎藥物(CSAID)；其他人類細胞介素或生長因子(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-31、干擾素、EMAP-II、GM-CSF、FGF、EGF、PDGF及內皮素-1)以及該等細胞介素及生長因子之受體之抗體或拮抗劑。本發明抗體或其抗原結合部分可與細胞表面分子(例如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80 (B7.1)、CD86 (B7.2)、CD90、CTLA、CTLA-4、PD-1)或其配體(包括CD154 (gp39或CD40L))之抗體組合。

治療劑之較佳組合可在發炎級聯中之不同點進行干擾；較佳實例包括TNF拮抗劑，如嵌合、人類化或人類TNF抗體、阿達木單抗(adalimumab)、(HUMIRA；D2E7；PCT公開案第WO 97/29131號及美國專利第6,090,382號，其係以引用方式併入本文中)、CA2 (類克(Remicade)TM)、CDP 571及可溶p55或p75 TNF受體、其衍生物(p75TNFR1gG (恩博TM)或p55TNFR1gG (來那西普(Lenercept))亦及

TNF轉化酶(TACE)抑制劑；類似地，IL-1抑制劑(介白素-1轉化酶抑制劑，IL-1RA等)可因相同原因而有效。其他較佳組合包括介白素4。

本發明醫藥組合物可包括「治療有效量」或「預防有效量」之本發明之抗體或抗體部分。「治療有效量」係指在所需劑量及時間段下有效達成期望治療結果之量。抗體或抗體部分之治療有效量可由熟習此項技術者決定且可根據諸如以下等因素而變化：疾病狀態、個體年齡、性別及體重以及抗體或抗體部分在該個體中引發期望反應之能力。治療有效量亦為抗體或抗體部分之治療有益效應大於其任何毒性或有害效應之量。「預防有效量」係指在所需劑量及時間段下有效達成期望預防結果之量。通常，由於預防劑量係在患病之前或在患病早期用於個體中，故預防有效量將小於治療有效量。

可調節劑量方案以提供最佳期望反應(例如，治療性或預防性反應)。例如，可投與單次濃注劑，可隨時間投與若干個分次劑量或可根據治療狀況緊急程度所指示按比例減少或增加劑量。尤其有利者係以劑量單位形式調配非經腸組合物以便於劑量之投與及均勻性。如本文所用之劑量單位形式係指適於作為欲治療哺乳動物個體之單式劑量之物理離散單位；每一單位含有預定量之活性化合物與所需醫藥載劑之組合，該預定量經計算以產生期望治療效應。本發明劑量單位形式之規格取決於且直接依賴於以下因素：(a) 活性化合物之獨特特徵及欲達成之具體治療或預防效應，及(b) 複合此一治療用活性化合物之技術中之個體敏感性之固有限制。

本發明之ADC、抗體或抗體部分之治療或預防有效量之實例性非限制性範圍係0.1-20 mg/kg，更佳1-10 mg/kg。在一個實施例中，本文所述抗體及ADC之劑量係1至6 mg/kg，包括其中列舉之個別劑量，例如1

mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg及6 mg/kg。在另一實施例中，本文所述抗體及ADC之劑量為1至200 μg/kg，包括其中列舉之個別劑量，例如1 μg/kg、2 μg/kg、3 μg/kg、4 μg/kg、5 μg/kg、10 μg/kg、20 μg/kg、30 μg/kg、40 μg/kg、50 μg/kg、60 μg/kg、80 μg/kg、100 μg/kg、120 μg/kg、140 μg/kg、160 μg/kg、180 μg/kg及200 μg/kg。應注意，劑量值可隨欲緩和病況之類型及嚴重度而變。應進一步理解，對於任一具體個體，應根據個體需要及投與組合物或監督組合物投與者之專業判斷隨時間調節特定劑量方案，且本文所述劑量範圍僅為實例性，且不欲限制所主張組合物之範疇或實踐。

在一個實施例中，將本文所述抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以0.1至30 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以1至15 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以1至10 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以2至3 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以1至4 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。

在一個實施例中，將本文所述抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以1至200 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以5至150 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之

個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以5至100 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以5至90 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以5至80 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以5至70 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以5至60 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將抗-EGFR抗體(例如AbA)或其抗原結合部分以ADC形式以10至80 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。

在一個實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以0.1至6 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以0.5至4 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以1.8至2.4 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以1至4 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以約1 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以3至6 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。

在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以3 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以2至3 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC (例如AbA-vc-MMAE)以6 mg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。

在另一實施例中，將結合至藥物(例如PBD)之本文所述抗-EGFR抗體(ADC)以1至200 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC以5至100 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC以5至90 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC以5至80 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC以5至70 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。在另一實施例中，將本文所述抗-EGFR ADC以5至60 μg/kg之劑量投與有需要之個體(例如患有癌症之個體)。

上文所述劑量可用於投與本文所揭示之抗-EGFR ADC或抗體。

在另一態樣中，本申請案提供檢測活體外樣品(例如，生物樣品，例如血清、血漿、組織、生檢)中EGFR之存在之方法。可使用標的方法來診斷病症，例如癌症。該方法包括：(i) 使樣品或對照樣品與如本文所述之抗-EGFR抗體或其片段接觸；及(ii) 檢測抗-EGFR抗體或其片段與樣品或對照樣品之間之複合物之形成，其中樣品之複合物形成相對於對照樣品之統計學上顯著之變化指示在樣品中存在EGFR。

慮及本發明之抗人類EGFR抗體或其部分(以及其ADC)結合至人類EGFR之能力，其可用於習用免疫分析(例如酶聯免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)或組織免疫組織化學)來檢測人類EGFR(例如，在諸如血清或血漿等生物樣品中)。在一個態樣中，本發明提供檢測生物樣品中之人類EGFR之方法，其包含使生物樣品與本發明之抗體或抗體部分接觸，及檢測結合至人類EGFR之抗體(或抗體部分)或未結合抗體(或抗體部分)，以藉此檢測生物樣品中之人類EGFR。抗體直接或間接經可檢測物質標記以有助於檢測結合或未結合抗體。適宜可檢測物質包括各種酶、輔基、螢光材料、發光材料及放射性材料。適宜酶之實例包括辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適宜輔基複合物之實例包括鏈黴抗生物素蛋白/生物素及抗生物素蛋白/生物素；適宜螢光材料之實例包括傘形酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、玫瑰紅、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光材料之實例包括發光胺(luminol)；且適宜放射性材料之實例包括$^{3}H$、$^{14}C$、$^{35}S$、$^{90}Y$、$^{99}Tc$、$^{111}In$、$^{125}I$、$^{131}I$、$^{177}Lu$、$^{166}Ho$或$^{153}Sm$。

作為標記抗體之替代方案，可藉由利用經可檢測物質標記之rhEGFR標準物及未標記抗人類EGFR抗體之競爭免疫分析來分析生物流體中之人類EGFR。在此分析中，將生物樣品、經標記rhEGFR標準物及抗人類EGFR抗體組合並測定結合至未經標記抗體之經標記rhEGFR標準物之量。生物樣品中人類EGFR之量與結合至抗-EGFR抗體之經標記rhEGFR標準物之量成反比。類似地，亦可藉由利用經可檢測物質標記之rhEGFR標準物及未標記抗人類EGFR抗體之競爭免疫分析來分析生物流體中之人類EGFR。

在另一態樣中，本申請案提供檢測活體內EGFR之存在之方法(例如，個體之活體內成像)。可使用標的方法來診斷病症，例如EGFR相關病症。該方法包括：(i) 在容許抗體或片段結合至EGFR之條件下將如本文所述之抗-EGFR抗體或其片段投與個體或對照個體；及(ii) 檢測抗體或片段與EGFR之間之複合物之形成，其中個體之複合物形成相對於對照個體之統計學上顯著之變化指示存在EGFR。

**VI. 醫藥組合物**

本發明亦提供包含本發明之抗體或其抗原結合部分或ADC及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物。包含本發明抗體或ADC之醫藥組合物用於(但不限於)診斷、檢測或監測病症，用於預防、治療、管控或改善病症或其一或多種症狀，及/或用於研究。在特定實施例中，組合物包含本發明之一或多種抗體。在另一實施例中，醫藥組合物包含本發明之一或多種抗體或ADC及一或多種除本發明抗體或ADC以外之預防劑或治療劑，用於治療其中EGFR活性有害之病症。較佳地，已知預防劑或治療劑可用於或已用於或當前正用於預防、治療、管控或改善病症或其一或多種症狀。根據該等實施例，組合物可進一步包含載劑、稀釋劑或賦形劑。

可將本發明抗體及抗體部分或ADC納入適於投與個體之醫藥組合物中。通常，醫藥組合物包含本發明之抗體或抗體部分及醫藥上可接受之載劑。如本文所用「醫藥上可接受之載劑」包括任一及所有生理上相容之溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑及諸如此類。醫藥上可接受之載劑之實例包括以下中之一或多者以及其組合：水、鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及諸如此類。在多種情形中，將較佳在組合物中包括等滲劑(例如糖、多元醇(例如，甘露醇、山梨醇))

或氯化鈉。醫藥上可接受之載劑可進一步包含少量增強抗體或抗體部分或ADC之儲放壽命或有效性之輔助物質，例如潤濕劑或乳化劑、防腐劑或緩衝液。

在一個實施例中，本發明之特徵為凍乾調配物，其包含抗-EGFR抗體藥物結合物、蔗糖、聚山梨醇酯80及組胺酸，其中該調配物之pH為約5-7，其中該抗-EGFR抗體藥物結合物包含結合至單甲基奧裡斯他汀E(MMAE)之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分。在一個實施例中，本發明進一步提供凍乾調配物，其包含抗-EGFR ADC (包含結合至奧裡斯他汀(例如，MMAE)之如本文所述之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分)、糖(例如蔗糖)、表面活性劑(例如聚山梨醇酯，例如聚山梨醇酯80)及組胺酸。在一個實施例中，凍乾調配物包含1-20 mg組胺酸、約320-410 mg糖、約0.1至0.9 mg表面活性劑及約1-150 mg包含結合至奧裡斯他汀(例如，MMAE)之如本文所述之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分之抗-EGFR ADC。本發明亦提供水性調配物，其包含約1-100 mg/ml包含結合至奧裡斯他汀(例如，MMAE)之如本文所述之抗-EGFR抗體或其抗原結合部分之抗-EGFR ADC；約1-10 mg/mL組胺酸；約50-90 mg/ml糖(例如蔗糖)；及約0.01-0.2 mg/ml表面活性劑(例如聚山梨醇酯80)。

已知各種遞送系統且其可用於投與本發明之一或多種抗體或ADC或本發明之一或多種抗體與可用於預防、管控、治療或改善病症或其一或多種症狀之預防劑或治療劑之組合，該等遞送系統係(例如)脂質體封裝、微粒、微膠囊、能表現抗體或抗體片段之重組細胞，受體介導之胞吞作用(例如，參見Wu及Wu，J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987))，作為逆轉錄病毒或其他載體之一部分之核酸構築體等。投與本發明之預防劑或治療

劑之方法包括(但不限於)非經腸投與(例如，真皮內、肌內、腹膜內、靜脈內及皮下)、硬膜外投與、瘤內投與及黏膜投與(例如，鼻內及經口途徑)。另外，可採用肺投與，例如使用吸入器或噴霧器且與氣溶膠化劑一起調配。例如，參見美國專利第6,019,968號、第5,985,320號、第5,985,309號、第5,934,272號、第5,874,064號、第5,855,913號、第5,290,540號及第4,880,078號；及PCT公開案第WO 92/19244號、第WO 97/32572號、第WO 97/44013號、第WO 98/31346號及第WO 99/66903號，其各自係全文以引用方式併入本文中。在一個實施例中，本發明抗體、組合療法或本發明組合物係使用Alkermes AIR®經肺藥物遞送技術(Alkermes公司, Cambridge, Mass.)投與。在特定實施例中，本發明預防劑或治療劑係經肌內、靜脈內、瘤內、經口、鼻內、經肺或皮下投與。預防劑或治療劑可藉由任何便捷途徑(例如，藉由輸注或濃注，藉由經上皮或皮膚黏膜內層(例如，口腔黏膜、直腸及腸黏膜等)吸收)投與，且可與其他生物活性劑一起投與。投與可為全身或局部投與。

在特定實施例中，可期望將本發明預防劑或治療劑局部投與需要治療之區域；此可藉由(例如但不限於)局部輸注、藉由注射、或藉助植入體來達成；該植入體為多孔或無孔材料，包括膜及基質，例如矽橡膠膜(sialastic membrane)、聚合物、纖維基質(例如Tissuel®)或膠原基質。在一個實施例中，將有效量之本發明拮抗劑之一或多種抗體局部投與個體之受影響區域，以預防、治療、管控及/或改善病症或其症狀。在另一實施例中，將有效量之本發明之一或多種抗體與有效量之除本發明抗體以外之一或多種療法(例如，一或多種預防劑或治療劑)之組合局部投與個體之受影響區域，以預防、治療、管控及/或改善病症或其一或多種症狀。

在另一實施例中，可以控制釋放或持續釋放系統遞送本發明預防劑或治療劑。在一個實施例中，可使用幫浦來達成控制釋放或持續釋放(參見Langer，上文文獻；Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20；Buchwald等人，1980, Surgery 88:507；Saudek等人，1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574)。在另一實施例中，可使用聚合材料來達成本發明療法之控制釋放或持續釋放(例如，參見Medical Applications of Controlled Release, Langer及Wise (編輯)，CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974)；Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen及Ball (編輯), Wiley, New York (1984)；Ranger及Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61；亦參見Levy等人，1985, *Science* 228:190；During等人，1989, *Ann. Neurol.* 25:351；Howard等人，1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105)；美國專利第5,679,377號；美國專利第5, 916,597號；美國專利第5,912,015號；美國專利第5,989,463號；美國專利第5,128,326號；PCT公開案第WO 99/15154號；及PCT公開案第WO 99/20253號。用於持續釋放調配物之聚合物之實例包括(但不限於)聚(2-羥基乙基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯基吡咯啶酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯醯胺、聚(乙二醇)、聚乳酸交酯(PLA)、聚(乳酸交酯-共-乙交酯) (PLGA)及聚原酸酯。在較佳實施例中，用於持續釋放調配物中之聚合物係惰性的、不含可浸出雜質、儲存時穩定、無菌且生物可降解。在另一實施例中，可將控制釋放或持續釋放系統置於預防或治療靶附近，因此僅需要全身劑量之一部分(例如，參見Goodson，Medical Applications of Controlled Release，上文文獻，

第2卷，第115-138頁(1984))。

控制釋放系統論述於Langer之綜述中(1990, *Science* 249:1527-1533)。可使用熟習此項技術者已知之任一技術來產生包含本發明之一或多種治療劑之持續釋放調配物。例如，參見美國專利第4,526,938號、PCT公開案WO 91/05548、PCT公開案WO 96/20698；Ning等人，1996,「Intratumoral Radioimmunotheraphy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel,」 *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189；Song等人，1995,「Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions,」 *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397；Cleek等人，1997,「Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application,」 *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854；及Lam等人，1997,「Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,」 *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760，其各自係全文以引用方式併入本文中。

在特定實施例中，倘若本發明組合物係編碼預防劑或治療劑之核酸，則可活體內投與該核酸以促進其所編碼預防劑或治療劑之表現，此係藉由以下方式來達成：將該核酸構築為適當核酸表現載體之一部分並藉由諸如以下等方式投與，使得其到達細胞內：使用逆轉錄病毒載體(參見美國專利第4,980,286號)，或直接注射，或使用微粒轟擊(例如，基因槍；Biolistic，DuPont)，或用脂質或細胞表面受體或轉染劑塗佈，或將其與已知可進入核中之同源異形盒樣肽相連投與(例如，參見Joliot等人，1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868)。或者，可將核酸引入細胞內

並藉由同源重組納入宿主細胞DNA內以供表現。

本發明醫藥組合物可經調配以與其既定投與途徑相容。投與途徑之實例包括(但不限於)非經腸，例如，靜脈內、真皮內、皮下、經口、鼻內(例如吸入)、經皮(例如局部)、經黏膜及直腸投與。在特定實施例中，將組合物根據常規程序調配為適用於靜脈內、皮下、肌內、經口、鼻內或局部投與人類之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之組合物係無菌等滲水性緩衝劑中之溶液。若需要，組合物亦可包括增溶劑及局部麻醉劑(例如利多卡因(lignocaine))以減輕注射位點之疼痛。

若本發明方法包含鼻內投與組合物，則可將組合物調配為氣溶膠形式、噴霧劑、霧劑或滴劑形式。具體而言，根據本發明使用之預防劑或治療劑可使用適宜推進劑(例如，二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他適宜氣體)便捷地以自加壓包裝或霧化器呈遞之氣溶膠噴霧劑形式來遞送。在加壓氣溶膠之情形中，劑量單位可藉由提供遞送計量量之閥門來確定。用於吸入器或吹入器中之膠囊及藥筒(例如，由明膠組成)可經調配含有化合物與適宜粉劑基質(例如乳糖或澱粉)之粉劑混合物。

若本發明方法包含經口投與，則可將組合物經口調配為錠劑、膠囊、扁囊劑、凝膠膠囊、溶液、懸浮液及諸如此類之形式。錠劑或膠囊可藉由習用方式以諸如以下等醫藥上可接受之賦形劑來製備：結合劑(例如，預膠凝玉米澱粉、聚乙烯基吡咯啶酮或羥丙基甲基纖維素)、填充劑(例如，乳糖、微晶纖維素、或磷酸氫鈣)、潤滑劑(例如，硬脂酸鎂、滑石粉或二氧化矽)、崩解劑(例如，馬鈴薯澱粉或澱粉乙醇酸鈉)或潤濕劑(例如，月桂基硫酸鈉)。錠劑可藉由業內熟知之方法加包衣。經口投與之液體製劑

可採取(但不限於)溶液、糖漿或懸浮液形式，或可將其製備為乾燥產物以供在使用前用水或其他適宜媒劑構造。該等液體製劑可藉由習用方式用醫藥上可接受之添加劑來製備，例如懸浮劑(例如，山梨醇糖漿、纖維素衍生物或氫化食用脂肪)；乳化劑(例如，卵磷脂或阿拉伯樹膠)；非水性媒劑(例如，杏仁油、油性酯、乙醇或經分餾植物油)；及防腐劑(例如，對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸)。若適宜，製劑亦可含有緩衝鹽、矯味劑、著色劑及甜味劑。用於經口投與之製劑可經適宜調配用於預防劑或治療劑之緩慢釋放、控制釋放或持續釋放。

本發明方法可包含藉由(例如)使用吸入器或噴霧器經肺投與用氣溶膠化劑調配之組合物。例如，參見美國專利第6,019,968號、第5,985,320號、第5,985,309號、第5,934,272號、第5,874,064號、第5,855,913號、第5,290,540號及第4,880,078號；及PCT公開案第WO 92/19244號、第WO 97/32572號、第WO 97/44013號、第WO 98/31346號及第WO 99/66903號，其各自係全文以引用方式併入本文中。在特定實施例中，本發明抗體、組合療法及/或本發明組合物係使用Alkermes AIR®經肺藥物遞送技術(Alkermes公司，Cambridge, Mass.)來投與。

本發明方法可包含藉由注射(例如，藉由濃注或連續輸注)投與經調配以供非經腸投與之組合物。注射用調配物可以單位劑型(例如存於安瓿瓶或存於多劑量容器中)呈遞，且添加防腐劑。組合物可採取諸如於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式，且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑等調配劑。或者，活性成份可呈粉劑形式，以供在使用前用適宜媒劑(例如無菌無熱原水)構造。

本發明方法可另外包含投與調配為儲積製劑之組合物。該等長效調

配物可藉由植入(例如，皮下或肌內)或藉由肌內注射來投與。因此，例如，組合物可用適宜聚合或疏水材料(例如作為可接受油中之乳液)或離子交換樹脂來調配，或調配為微溶性衍生物(例如，微溶性鹽)。

本發明方法涵蓋投與調配為中性或鹽形式之組合物。醫藥上可接受之鹽包括彼等與陰離子形成者，例如彼等衍生自以下者：鹽酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等；及彼等與陽離子形成者，例如彼等衍生自以下者：氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣、氫氧化鐵、異丙胺、三乙胺、2-乙基胺基乙醇、組胺酸、普魯卡因(procaine)等。

一般而言，組合物之成份可單獨供應或以單位劑型混合在一起，例如，作為於指示活性劑之量之氣密性密封容器(例如安瓿或小藥囊)中之乾燥凍乾粉劑或無水濃縮物。倘若投與模式係輸注，則組合物可用含有無菌醫藥級水或鹽水之輸注瓶來分配。倘若投與模式係注射，則可提供具有注射用無菌水或鹽水之安瓿，使得可在投與之前混合各成份。

具體而言，本發明亦提供，將本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物包裝於指示藥劑之量之氣密性密封容器(例如安瓿或小藥囊)中。在一個實施例中，本發明一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物係作為乾燥滅菌凍乾粉劑或無水濃縮物供應於氣密性密封容器中或可重構(例如，用水或鹽水)至適於投與個體之濃度。較佳地，本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物係作為乾燥滅菌凍乾粉劑以以下單位劑量供應於氣密性密封容器中：至少5 mg、至少10 mg、至少15 mg、至少25 mg、至少35 mg、至少45 mg、至少50 mg、至少75 mg或至少100 mg。本發明之凍乾預防劑或治療劑或醫藥組合物應在其初始容器中儲存於2℃與8℃之間，且本發明之預防劑或治療劑或醫藥組合物應在重構後1週內、5天內、72

小時內、48小時內、24小時內、12小時內、6小時內、5小時內、3小時內或1小時內投與。在替代實施例中，本發明之一或多種預防劑或治療劑或醫藥組合物係以液體形式供應於指示藥劑之量及濃度之氣密性密封容器中。較佳地，所投與組合物之液體形式係以以下劑量供應於氣密性密封容器中：至少0.25 mg/ml、至少0.5 mg/ml、至少1 mg/ml、至少2.5 mg/ml、至少5 mg/ml、至少8 mg/ml、至少10 mg/ml、至少15 mg/kg、至少25 mg/ml、至少50 mg/ml、至少75 mg/ml或至少100 mg/ml。液體形式應在其初始容器中儲存於2℃與8℃之間。

可將本發明抗體及抗體部分納入適於非經腸投與之醫藥組合物中。較佳地，抗體或抗體部分將被製備為含有0.1 mg/mL至250 mg/mL抗體之可注射溶液。可注射溶液可由硬質或琥珀色小瓶、安瓿或預填充注射器中之液體或凍乾劑型組成。緩衝液可為pH 5.0至7.0(最佳pH 6.0)之L-組胺酸(1 mM至50 mM，最佳5 mM至10 mM)。其他適宜緩衝液包括(但不限於)琥珀酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀。可使用氯化鈉以改變0 mM至300 mM (對於液體劑型，最佳150 mM)濃度之溶液的毒性。凍乾劑型可包括主要為0-10%蔗糖(最佳0.5-1.0%)之低溫保護劑。其他適宜低溫保護劑包括海藻糖及乳糖。凍乾劑型可包括主要為1-10%甘露醇(最佳為2-4%)之增積劑。穩定劑可用於液體及凍乾劑型二者中，主要為1 mM至50 mM L-甲硫胺酸(最佳5 mM至10 mM)。其他適宜增積劑包括甘胺酸、精胺酸，其可作為0-0.05%聚山梨醇酯-80(最佳0.005-0.01%)來納入。其他表面活性劑包括(但不限於)聚山梨醇酯20及BRIJ表面活性劑。製備為用於非經腸投與之可注射溶液之包含本發明抗體及抗體部分之醫藥組合物可進一步包含可用作佐劑之藥劑，例如彼等用於促進治療蛋白質(例如，抗體)之吸收或

分散者。尤其可用之佐劑係玻尿酸酶，例如Hylenex® (重組人類玻尿酸酶)。在可注射溶液中添加玻尿酸酶改良在非經腸投與、尤其皮下投與後之人類生物利用度。其亦容許較大注射位點體積(即大於1 ml)且疼痛及不適較少，且注射位點反應之發生率極低。(參見WO2004078140、US2006104968，其係以引用方式併入本文中)。

本發明組合物可呈多種形式。該等形式包括(例如)液體、半固體及固體劑型，例如液體溶液(例如，可注射及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、粉劑、脂質體及栓劑。較佳形式取決於既定投與模式及治療應用。典型較佳組合物呈可注射或可輸注溶液形式，例如與彼等用於以其他抗體對人類進行被動免疫者類似之組合物。較佳投與模式係非經腸(例如，靜脈內、皮下、腹膜內、肌內)。在較佳實施例中，抗體係藉由靜脈內輸注或注射投與。在另一較佳實施例中，抗體係藉由肌內或皮下注射投與。

通常，治療組合物必須無菌且在製造及儲存條件下穩定。可將該組合物調配為溶液、微乳液、分散液、脂質體或其他適於高藥物濃度之有序結構。無菌可注射溶液可藉由以下步驟來製備：將活性化合物(即抗體或抗體部分)以所需量納入具有上文所列舉成份中之一者或組合(若需要)之適宜溶劑中，隨後過濾滅菌。通常，分散液係藉由將活性化合物納入含有基礎分散介質及來自彼等上文所列舉者之所需其他成份之無菌媒劑中來製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌凍乾粉劑之情形中，較佳製備方法係真空乾燥及噴霧乾燥，其可產生活性成份加任何其他期望成份(來自其先前無菌過濾之溶液)之粉劑。可藉由(例如)使用諸如卵磷脂等包衣、藉由在分散液情形中維持所需粒徑及藉由使用表面活性劑來維持溶液之適當

流動性。可藉由在組合物中包括延遲吸收之試劑(例如，單硬脂酸鹽及明膠)使可注射組合物之吸收延長。

本發明之抗體及抗體部分或ADC可藉由業內已知之多種方法來投與，但對於多種治療應用而言，較佳投與途徑/模式係皮下注射、靜脈內注射或輸注。如熟習此項技術者將瞭解，投與途徑及/或模式可端視期望結果而變化。在某些實施例中，活性化合物可用將防止該化合物快速釋放之載劑來製備，例如控制釋放調配物，包括植入體、經皮貼劑及微囊化遞送系統。可使用生物可降解之生物相容聚合物，例如乙烯/乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原、聚原酸酯及聚乳酸。多種製備該等調配物之方法已獲得專利權或通常為熟習此項技術者已知。例如，參見*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson編輯，Marcel Dekker公司，New York, 1978。

在某些實施例中，本發明之抗體或抗體部分或ADC可經口投與，例如用惰性稀釋劑或可同化食用載劑投與。亦可將此化合物(及其他成份，若需要)封裝於硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓縮成錠劑或直接納入個體飲食中。對於經口治療投與，化合物可與賦形劑一起納入並以可吸收錠劑、口頰錠、糖錠劑、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿、圓片劑及諸如此類之形式來使用。為藉由除非經腸外之途徑投與本發明化合物，可能需要用防止化合物失活之材料包覆化合物或將該化合物與該材料共投與。

在其他實施例中，本發明之抗體或抗體部分或ADC可結合至基於聚合物之物質，使得該基於聚合物之物質可賦予本發明之該抗體或抗體部分足夠大小，使得本發明之該抗體或抗體部分受益於增強之滲透性及保持效應(EPR效應) (亦參見PCT公開案第WO2006/042146A2號及美國公開案第

2004/0028687A1號、第2009/0285757A1號及第2011/0217363A1號，以及美國專利第7,695,719號(其各自係全文且出於所有目的以引用方式併入本文中)。

亦可將補充活性化合物納入組合物中。在某些實施例中，本發明之抗體或抗體部分或ADC係與一或多種可用於治療EGFR活性有害之病症之其他治療劑一起調配及/或共投與。舉例而言，本發明之抗hEGFR抗體或抗體部分或ADC可與一或多種結合其他靶之其他抗體(例如，結合細胞介素或結合細胞表面分子之抗體)一起調配及/或共投與。此外，本發明之一或多種抗體可與兩種或更多種上述治療劑組合使用。該等組合療法可有利地利用較低劑量之所投與治療劑，由此避免與各種單一療法相關之可能的毒性或併發症。

在某些實施例中，將針對EGFR或其片段之抗體或ADC連接至業內已知之半衰期延長媒劑。該等媒劑包括(但不限於) Fc結構域、聚乙二醇及聚葡萄糖。該等媒劑闡述於(例如)美國申請案第09/428,082號及已公開PCT申請案第WO 99/25044號中，其係出於任一目的以引用方式併入本文中。

熟習此項技術者將容易地瞭解到，本文所述之本發明方法之其他適宜修改及調整顯而易見，且可在不背離本發明或本文所揭示實施例之範疇的情況下使用適宜等效內容來作出該等修改及調整。現已詳細闡述本發明，藉由參照以下實例將更明確地理解本發明，包括該等實例僅用於說明性目的而並不意欲具有限制性。

**實例**

**實例1： 改良抗-EGFR抗體之鑑別**

*抗體1*

抗體1 (Ab1)係人類化抗-EGFR抗體。Ab1之重鏈可變區(VH)胺基酸序列作為SEQ ID NO: 1提供於下文中。Ab1之VH CDR胺基酸序列在下文加下劃線且如下：GYSISSDFAWN (VH CDR1；SEQ ID NO: 2)；YISYSGNTRYQPSLKS (VH CDR2；SEQ ID NO: 3)；及AGRGFPY (VH CDR3；SEQ ID NO: 4)。

Ab1 VH序列

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA TYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

Ab1之輕鏈可變區(VL)胺基酸序列作為SEQ ID NO 5提供於下文中。Ab1之VL CDR胺基酸序列在下文加下劃線且如下：HSSQDINSNIG (VL CDR1；SEQ ID NO: 6)；HGTNLDD (VL CDR2；SEQ ID NO: 7)；及VQYAQFPWT (VL CDR3；SEQ ID NO: 8)。

Ab1 VL序列

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 5)

實施篩選以鑑別具有相對於Ab1改良之性質之抗-EGFR抗體。Ab1變體鑑別之詳情提供於下文中。

*Ab1變體VL及VH文庫之製備*

Ab1變體抗體係藉由篩選三個含有Ab1之變體重鏈或輕鏈可變區之單鏈(scFv)文庫來鑑別。一個scFv文庫含有Ab1變體可變重鏈(即，scFv含有Ab1變體可變重鏈及Ab1可變輕鏈)，而第二scFv文庫含有Ab1變體可變輕

鏈(即，scFv含有Ab1變體可變輕鏈及Ab1可變重鏈)。Ab1變體VH及VL區域亦組合為第三scFv文庫，隨後對其進行多輪篩選以選擇結合親和性高於Ab1之VH及VL Ab1變體之組合。Ab1變體VH及VL文庫之設計顯示於圖16中。

為產生變體Ab1 VH區域，選擇12個胺基酸殘基進行至少部分基於Ab1之VH與VH4-4 (SEQ ID NO: 93)及VH4-b種系序列之比對之突變(參見圖16A，其中突變胺基酸殘基指定為「X」)。亦基於人類種系及Ab1序列生成P101D改變(在圖16A中指定為「Z」)。使用上述密碼子使用來計算，藉由靶向12個殘基(圖16A中之「X」殘基)，$10^9$文庫可提供大部分VH Ab1變體，每個純系具有4個或更少突變殘基。如圖16A中所述，1個框架殘基(Q1E)亦經變化以防止形成N-末端焦麩胺酸鹽。

為產生變體Ab1 VL區域，選擇11個胺基酸殘基進行至少部分基於Ab1之VL區域與IGKV1-12 (L5)種系序列之比對之突變(參見圖16B中標為「X」之殘基) (IGKV1-12 闡述於SEQ ID NO: 94中)。位置33及52之殘基(在圖16B中分別標為「1」及「2」)經設計具有有限多樣性。位置33之殘基受限於L、V、I或F，且位置52之殘基受限於S、A、T及P。

使用闡述於以下之轉變方法產生基於上文之酵母文庫：Benatuil等人(2010) *Protein Eng, Design, and Selection*, 23 (4): 155-159。

*scFv Ab1變體文庫之篩選*

自各別文庫表現含有Ab1變體VH或VL區域之單鏈可變片段(scFv)，且基於scFv結合截短野生型(wt)人類EGFR1-525及突變體EGFR(CA)之能力加以篩選。EGFR (CA)係在位置295及307含有半胱胺酸至丙胺酸突變之EGFR變體(參見Garrett等人(2009) *PNAS USA* 106(13): 5082-5087)。

篩選含有約$1 \times 10^9$個純系之文庫。

慮及Ab1結合至EGFR (CA)但實質上不結合wtEGFR，最初幾輪篩選使用EGFR (CA)以鑑別具有相對於Ab1改良之對EGFR(CA)之結合親和性($k_{on}$、$k_{off}$或兩種速率)之Ab1變體重鏈及輕鏈。然而，後續幾輪篩選使用EGFR(1-525)以鑑別具有相對於Ab1改良之對EGFR(1-525)之結合親和性($k_{on}$、$k_{off}$或兩種速率)之Ab1變體。

文庫篩選係使用兩種方法來實施，包括磁性珠分選(MACS (磁性細胞分離技術))及基於FACS之分析(關於MACS及FACS參見(例如) Chao等人(2006) *Nature Protocols* 1:755-765；Feldhaus等人(2003) *Nature Biotech* 21:163-170；及VanAntwerp (2000) *Biotechnol. Prog.* 16:31-37)。實施至少兩輪基於磁性珠富集之篩選，之後實施至少三輪基於流式細胞術分選之篩選(Feldhaus及Siegel，*Flow Cytometry Protocols*第2版第17章，Hawley及Hawley編輯，第263卷)。使用平衡及$k_{off}$選擇二者來鑑別具有相對於Ab1改良之結合之scFv。

總之，篩選3個文庫之具有相對於Ab1改良之結合之Ab1變體VH及VL區域。使用Ab1變體VH及VL文庫實施4至5輪篩選，且對於合併Ab1變體VH/VL文庫實施5至6輪篩選。對Ab1變體VL文庫、Ab1變體VH文庫及合併Ab1變體VH及VL文庫之篩選導致鑑別含有具有高於Ab1之對EGFR (EGFR(1-525)及EGFR (CA))之結合親和性之Ab1變體VH及VL區域之scFv。

*改良抗體之鑑別*

選擇15種鑑別為具有改良結合特徵(包括特異性結合至EGFR(1-525))之Ab1變體scFv用於轉化為IgG蛋白質(特定而言IgG1抗體)。15種Ab1變

體抗體闡述於本文中，且包括抗體A (通篇稱作「AbA」) (參見VH SEQ ID NO: 9；VL SEQ ID NO: 5)、抗體B (在本文中稱作「AbB」) (參見VH SEQ ID NO: 64；VL SEQ ID NO: 65)、抗體C (在本文中稱作「AbC」) (參見VH SEQ ID NO: 66；VL SEQ ID NO: 67)及抗體D (在本文中稱作「AbD」) (參見VH SEQ ID NO: 68；VL SEQ ID NO: 69)、抗體E (在本文中稱作「AbE」) (參見VH SEQ ID NO: 50；VL SEQ ID NO: 51)、抗體F (在本文中稱作「AbF」) (參見VH SEQ ID NO: 52；VL SEQ ID NO: 53)、抗體G (在本文中稱作「AbG」) (參見VH SEQ ID NO: 72；VL SEQ ID NO: 73)、抗體H (在本文中稱作「AbH」) (參見VH SEQ ID NO: 54；VL SEQ ID NO: 55)、抗體J (在本文中稱作「AbJ」) (參見VH SEQ ID NO: 56；VL SEQ ID NO: 57)、抗體K (在本文中稱作「AbK」)、抗體L (在本文中稱作「AbL」) (參見VH SEQ ID NO: 58；VL SEQ ID NO: 59)、抗體M (在本文中稱作「AbM」) (參見VH SEQ ID NO: 76；VL SEQ ID NO: 77)、抗體N (在本文中稱作「AbN」) (參見VH SEQ ID NO: 60；VL SEQ ID NO: 61)、抗體O (在本文中稱作「AbO」) (參見VH SEQ ID NO: 62；VL SEQ ID NO: 63)及抗體P (在本文中稱作「AbP」) (參見VH SEQ ID NO: 78；VL SEQ ID NO: 79)。將自VH及VL文庫選擇之純系分別與Ab1 VL或VH區域配對(參見AbA、AbB、AbC、AbD、AbE及AbF)。

Ab1變體抗體之VH區域之胺基酸序列提供於下文中。CDR加下劃線，且相對於Ab1之胺基酸變化以粗體加強顯示。

AbA VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS<u>GYSIS**R**DFAWN</u>WIRQPPGK

GLEWMGYISYNGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT

ATYYCVTASRGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)

AbB VH

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISNDFAWNWIRQPPGK

GLEWMGYISYKGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT

ATYYCVTASRGFPWWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)

AbC VH

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK

GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA

TYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66)

AbD VH

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK

GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA

TYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 68)

AbE VH

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK

GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA

TYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50)

AbF VH

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISRDFAWNWIRQPPGK

GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA

TYYCVTASRGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)

AbG VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSIS**N**DFAWNWIRQ**L**PGK GLEWMGYISY**K**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**RG**L**PYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)

AbH VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSI**G**K**K**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISY**N**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**RG**L**PYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

AbJ VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSI**G**K**K**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA TYYCVTA**S**RG**L**PYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)

AbK VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSIS**R**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISY**N**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**RGFP**W**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 74)

AbL VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSI**G**K**K**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISY**N**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**RG**L**PYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 58)

AbM VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSI**G**R**K**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISY**N**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**RGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76)

AbN VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSI**GR**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA TYYCVTA**S**RGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 60)

AbO VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSI**GK**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISY**N**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**RGFPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 62)

AbQ VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSIS**H**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISY**N**GNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADT ATYYCVTA**S**W**G**L**P**WWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 70)

AbP VH

**E**VQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSIS**H**DFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTA TYYCVTA**S**W**G**L**P**WWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)

Ab1變體抗體之VL區域之胺基酸序列提供於下文中。CDR加下劃線，且相對於Ab1之胺基酸變化以粗體加強顯示。

AbA VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 5)

AbB VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 65)

AbC VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY**E** QFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 67)

AbD VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSN**L**GWLQQKPGKSF KGLIYHGA**N**L**H**DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY A**E**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 69)

AbE VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSN**L**GWLQQKPGKSF KGLIYHG**S**NLD**H**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **D**QFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 51)

AbF VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSF KGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 53)

AbG VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**TY**NIGWLQQKPGKSF KGLIYHGANLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DE**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 73)

AbH VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**IGWLQQKPGKSF KGLIYHG**A**NLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DE**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 55)

AbJ VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**IGWLQQKPGKSF KGLIYHG**A**NLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DE**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 57)

AbK VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**V**G**WLQQKPGKSF KGLIYHG**S**NLD**H**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DD**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 75)

AbL VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**V**G**WLQQKPGKSF KGLIYHG**S**NLD**H**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DD**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 59)

AbM VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**V**G**WLQQKPGKSF KGLIYHG**S**NLD**H**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DD**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 77)

AbN VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**V**G**WLQQKPGKSF KGLIYHG**S**NLD**H**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY

**DD**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 61)

AbO VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDI**T**Y**N**V**G**WLQQKPGKSF KGLIYHG**S**NLD**H**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY **DD**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 63)

AbQ VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDIN**M**N**V**GWLQQKPGKS FKGLIYHG**A**I**L**DDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY A**E**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71)

AbP VL

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDIN**M**N**V**GWLQQKPGKS FKGLIYHG**A**I**L**DDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY A**E**FPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 79)

將15種Ab1變體VH及/或VL結構域之核酸序列亞選殖至表現載體中以供表現全長IgG抗體(參見揭示於美國專利第8,187,836號及美國專利第8,455,219號中之載體及方法，該兩個專利係以引用方式併入本文中)。根據標準方法將抗體表現載體瞬時轉染至HEK293細胞中(參見Durocher等人(2002) *Nucleic Acid Res.* 30(2;e9))。用於表現每一Ab1變體之重鏈之前導序列之胺基酸序列係MEFGLSWLFLVAILKGVQC (SEQ ID NO: 88)，而用於表現每一Ab1變體之輕鏈之前導序列之胺基酸序列係MRVPAQLLGLLLLWFPGSRC (SEQ ID NO: 89)。隨後藉由蛋白質A層析自介質純化Ab1抗體變體用於親和性及功能評價。

*抗體AbA*

所鑑別Ab1變體抗體中之一者係AbA。AbA具有與Ab1 (SEQ ID NO: 5)相同之可變輕鏈序列，包括相同CDR1、CDR2及CDR3胺基酸序列(分別闡述於SEQ ID NO: 6、7及8中)。

AbA之VH胺基酸序列提供於下文之SEQ ID NO: 9中。AbA之VH CDR胺基酸序列如下：GYSISRDFAWN (CDR1；SEQ ID NO: 10)；YISYNGNTRYQPSLKS (CDR2；SEQ ID NO: 11)；及ASRGFPY (CDR3；SEQ ID NO: 12)，且在下文加下劃線。AbA之重鏈可變區中與Ab1不同之殘基在下文以粗體顯示。

AbA VH胺基酸序列

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS<u>GYSIS**R**DFAWN</u>WIRQPPGKGLEWMG<u>YISY**N**GNTRYQPSLKS</u>RITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVT<u>A**S**RGFPY</u>WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)

圖1及2提供Ab1及AbA之VH及VL區域(圖1)及完整重鏈及輕鏈(圖2)之胺基酸序列之比對。Ab1及AbA之輕鏈胺基酸序列相同(SEQ ID NO: 13)。然而，Ab1及AbA之重鏈胺基酸序列在兩個序列之間具有6個胺基酸差異，其中三個在CDR中。Ab1 VH胺基酸序列與AbA VH胺基酸序列之間之差異在圖1中加陰影且在每一VH CDR中發現。AbA之可變重鏈之CDR1結構域包括絲胺酸(Ab1)至精胺酸之胺基酸變化。可變重鏈之CDR2結構域包括Ab1中之絲胺酸至AbA中之天冬醯胺之胺基酸變化。最後，可變重鏈之CDR3結構域包括Ab1中之甘胺酸至AbA中之絲胺酸之胺基酸變化。AbA內之兩個胺基酸變化在重鏈恆定區中(D354E及L356M)。AbA中之Fc區胺基酸突變代表自z, a異型至z, 非a異型之人類IgG異型變化。除了其他變化外，第一胺基酸自麩醯胺酸(Q)變為麩胺酸(E)，例如如圖1中所

述。

*Ab1變體抗體序列與Ab1序列之比較*

表1提供Ab1變體抗體AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之重鏈及輕鏈CDR胺基酸序列與Ab1相比之比對。表2提供Ab1、AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之抗-EGFR抗體CDR共有序列之比較。表1及3中之空白區指示，殘基與Ab1相同。

**表1：Ab1對AbA、AbG、AbK、AbM及AbP變體之重鏈及輕鏈CDR序列比較**

| 重鏈CDR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 可變重鏈(VH) CDR1 | | | | | | | | | | | SEQ ID NO: | VH CDR2 | | | | | | | | | | | | | | | SEQ ID NO: | VH CDR3 | | | | | | | | SEQ ID NO: |
| Ab1 | G | Y | S | I | S | S | D | F | A | W | N | 2 | Y | I | S | Y | S | G | N | T | R | Y | Q | P | S | L | K | S | 3 | | | A | G | R | G | F | P | Y | 4 |
| AbA | | | | | | R | | | | | | 10 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | | | | | | 12 |
| AbG | | | | | | N | | | | | | 16 | | | | | K | | | | | | | | | | | | 17 | | | | S | | | L | | | 18 |
| AbK | | | | | | R | | | | | | 10 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | | | | | W | 19 |
| AbM | | | | | G | R | | | | | | 20 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | | | | | | 12 |
| AbP | | | | | H | | | | | | | 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | S | W | | L | | W | 22 |

| 輕鏈CDR | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 可變輕鏈(VL) CDR1 | SEQ ID NO: | VL CDR2 | SEQ ID NO: | VL CDR3 | SEQ ID NO: |

| Ab1 | H | S | S | Q | D | I | N | S | N | I | G | 6 | H | G | T | N | L | D | D | 7 | V | Q | Y | A | Q | F | P | W | T | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AbA | | | | | | | | | | | | 6 | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | 8 |
| AbG | | | | | | | T | Y | | | | 23 | | | A | | | | | 24 | | | | D | E | | | | | 25 |
| AbK | | | | | | | T | Y | | V | | 26 | | | S | | | | H | 27 | | | | D | D | | | | | 28 |
| AbM | | | | | | | T | Y | | V | | 26 | | | S | | | | H | 27 | | | | D | D | | | | | 28 |
| AbP | | | | | | | | M | | V | | 29 | | | A | I | | | | 30 | | | | | E | | | | | 31 |

**表2：來自表1之Ab1變體之CDR共有序列**

| CDR 區域 | SEQ ID NO: | Ab1變體之CDR共有序列 |
|---|---|---|
| VH CDR1 | SEQ ID NO:35 | G Y S I(S/G/H)(S/R/N)D F A W N |
| VH CDR2 | SEQ ID NO:36 | Y I S Y(S/N/K)G N T R Y Q P S L K S |
| VH CDR3 | SEQ ID NO:37 | A **S**(R/W)G(F/L)P(Y/W) |
| VL CDR1 | SEQ ID NO:38 | H S S Q D I(N/T)(Y/M/S)N(I/V)G |
| VL CDR2 | SEQ ID NO:39 | H G(T/A/S)(N/I)L D(D/H) |
| VL CDR3 | SEQ ID NO:40 | V Q Y(A/D)(Q/E/D)F P W T |

如表2中所述，Ab1變體抗體AbA、AbG、AbK、AbM、AbP各自在CDR3之可變重鏈中具有絲胺酸殘基代替甘胺酸(在表2中以粗體/加下劃線顯示)。

Ab1對抗體AbB、AbC、AbD、AbE、AbF、AbH、AbJ、AbL、AbN、AbO及AbQ之VH及VL CDR序列之比較闡述於表3中。除了表3中所述之CDR變化以外，AbG在VH之框架2區域內具有胺基酸殘基變化。

**表3：Ab1對某些Ab1變體之重鏈及輕鏈CDR序列比較**

| | 重鏈CDR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 可變重鏈(VH) CDR1 | | | | | | | | | | | SEQ ID NO: | VH CDR2 | | | | | | | | | | | | | | | | SEQ ID NO: | VH CDR3 | | | | | | | | | SEQ ID NO: |
| Ab1 | G | Y | S | I | S | S | D | F | A | W | N | 2 | Y | I | S | Y | S | G | N | T | R | Y | Q | P | S | L | K | S | 3 | | | A | G | R | G | F | P | Y | 4 |
| AbB | | | | | | N | | | | | | 16 | | | | | K | | | | | | | | | | | | 17 | | | | S | | | | | W | 19 |
| AbC | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 |
| AbD | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 |
| AbE | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | 4 |
| AbF | | | | | | R | | | | | | 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | S | | | | | | 12 |
| AbH | | | | | G | K | | | | | | 80 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | | | L | | | 18 |
| AbJ | | | | | G | K | | | | | | 80 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | S | | | L | | | 18 |
| AbL | | | | | G | K | | | | | | 80 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | | | L | | | 18 |
| AbN | | | | | G | R | | | | | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | S | | | | | | 12 |
| AbO | | | | | G | K | | | | | | 80 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | | | | | | 12 |
| AbQ | | | | | | H | | | | | | 81 | | | | | N | | | | | | | | | | | | 11 | | | | S | W | | L | | W | 22 |

**表3續**

| 輕鏈CDR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 可變輕鏈(VL) CDR1 | | | | | | | | | | | SEQ ID NO: | VL CDR2 | | | | | | | SEQ ID NO: | VL CDR3 | | | | | | | | | SEQ ID NO: |
| Ab1 | H | S | S | Q | D | I | N | S | N | I | G | 6 | H | G | T | N | L | D | D | 7 | V | Q | Y | A | Q | F | P | W | T | 8 |
| AbB | | | | | | | | | | | | 6 | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | 8 |
| AbC | | | | | | | | | | | | 6 | | | | | | | | 7 | | | | E | | | | | | 84 |
| AbD | | | | | | | | | | L | | 82 | | | A | | | H | | 83 | | | | | E | | | | | 31 |
| AbE | | | | | | | | | | L | | 82 | | | S | | | | H | 27 | | | | D | | | | | | 85 |
| AbF | | | | | | | | | | | | 6 | | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | 8 |
| AbH | | | | | | | T | Y | | | | 23 | | | A | | | | | 24 | | | | D | E | | | | | 25 |
| AbJ | | | | | | | T | Y | | | | 23 | | | A | | | | | 24 | | | | D | E | | | | | 25 |
| AbL | | | | | | | T | Y | | V | | 26 | | | S | | | | H | 27 | | | | D | D | | | | | 28 |
| AbN | | | | | | | T | Y | | V | | 26 | | | S | | | | H | 27 | | | | D | D | | | | | 28 |
| AbO | | | | | | | T | Y | | V | | 26 | | | S | | | | H | 27 | | | | D | D | | | | | 28 |
| AbQ | | | | | | | | M | | V | | 29 | | | A | I | | | | 30 | | | | | E | | | | | 31 |

Ab1變體抗體之表徵闡述於下文實例2至8中。

**實例2： 抗-EGFR抗體之結合分析**

*Biacore分析*

實施Biacore分析以比較Ab1、Ab2 (具有與西妥昔單抗相同之6個CDR胺基酸序列之抗體)及實例1中所鑑別抗-EGFR抗體對3種形式之重組EGFR之親和性，具體而言該3種形式係野生型EGFR細胞外結構域(ECD) (EGFR 1-645) (SEQ ID NO: 34)、EGFRvIII (EGFR (1-29)-G-(298-645) (SEQ ID NO: 46))及截短野生型EGFR 1-525 (EGFR1 (1-525) (SEQ ID NO: 47))。Ab2包括如分別在SEQ ID NO: 48及49中提供之Ab2之重鏈及輕鏈胺基酸序列，且係根據標準方法製得。

儘管Ab1及Ab2二者皆係抗-EGFR抗體，但其具有不同性質且結合至獨特表位。Ab2結合至EGFR之L2結構域(Gan等人(2012) *Cancer Res* 72(12)1-7；Li等人(2005) *Cancer Cell* 7:301)，而Ab1結合至EGFR之CR1結構域(結構域II)之胺基酸殘基287-302 (Gan等人(2012) 72(12)1-7；Johns等人(2004) *J BiolChem* 279:30375-30384)。EGFR之結構域II暴露於EGFR之擴展構象中(Li等人(2005) *Cancer Cell* 7:301)。圖17提供EGFR之總體結構域組織之圖且指示Ab2及Ab1之表位一般位於何處。與Ab2不同，Ab1不結合(或具有極弱結合)至EGFR ECD (SEQ ID NO: 34)。儘管Ab1可結合至活化野生型EGFR，但在活體內對EGFRvIII具有相對於Ab2較高之結合親和性。因此，在實驗中使用Ab2作為對照，其在本文中闡述為與Ab1結合至不同表位且具有不同結合親和性特徵之第二抗-EGFR抗體。

Biacore分析係使用具有CM5感測晶片之Biacore T100來實施，且經

由使用標準胺偶合套組根據製造商說明書(GE healthcare)胺基偶合至該晶片之抗人類Fc抗體捕獲測試抗體。簡言之，用EDC/NHS活化CM5晶片表面。將山羊抗人類Fc特異性多株抗體(Thermo Fisher Scientific公司, Rockford, IL)在10 mM乙酸鈉(pH 4.5)中稀釋至25 μg/mL並注射至活化表面上以達成固定。用乙醇胺封阻生物感測器表面上之未反應部分。Biacore T100係基於表面電漿共振之生物感測器，其用於檢測、表徵及定量生物分子相互作用，包括抗體與其抗原之間之相互作用。抗原係以80 μL/分鐘注射3分鐘且之後解離15分鐘。所測試EGFR ECD包括與myc及組胺酸標籤融合之EGFR之胺基酸1-645 (EGFR (1-645)-LESRGPF-Myc-NMHTG-6His (「LESRGPF」 (SEQ ID NO: 90)；「6His」 (SEQ ID NO: 91))。EGFRvIII變體亦與myc及組胺酸標籤融合(EGFR (1-29)-G-(298-645)-LESRGPF-Myc-NMHTG-6His)，如同ECD EGFR 1-525一般(EGFR1 (1-525)-SRGPF-Myc-NMHTG-6His (「SRGPF」 (SEQ ID NO: 92))。Biacore分析中所用運行緩衝液係HBS-EP+：10 mM Hepes，pH7.5，150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% Tween 20。

Biacore結合分析之結果顯示於圖3中。在所測試Ab1變體抗體中，AbK對截短EGFR (1-525)之結合親和性最高，$K_D$為$1.7 \times 10^{-9}$ M，相對於Ab1之$K_D$增加超過1300倍。如圖3中所述，AbE顯示對截短EGFR (1-525)之最低可測定親和性，且$K_D$為$5.9 \times 10^{-7}$ M，親和性相對於Ab1之$K_D$僅增加約4倍。AbA顯示對截短EGFR (1-525)之$K_D$之10倍改良($2.2 \times 10^{-7}$ M之$K_D$ (AbA)對$2.3 \times 10^{-6}$ M之$K_D$ (Ab1))。對於截短EGFR 1-525，AbB、AbC、AbD、AbF、AbG、AbH、AbJ、AbL、AbM、AbN、AbO及AbP對Ab1之$K_D$比率亦闡述於圖3中。

亦測試Ab1變體抗體、Ab1及Ab2對EGFRvIII之結合親和性。如圖3中所示，所有Ab1變體皆顯示高於Ab1之對EGFRvIII之結合親和性。舉例而言，AbA以$2.3 \times 10^{-9}$ M之$K_D$與EGFRvIII解離，而Ab1之解離常數$K_D$為$9.4 \times 10^{-9}$ M。因此，AbA之親和性(藉由解離常數來測定)相對於Ab1增加4倍。

顯示相對於Ab1較高之對截短EGFR(1-525)之解離常數之Ab1變體抗體不一定顯示相同之對EGFRvIII之親和性增加。舉例而言，儘管AbO顯示對EGFRvIII之親和性相對於Ab1之最大增加倍數(63倍)，但AbK顯示對截短EGFR(1-525)之親和性相對於Ab1之最大增加倍數(增加超過1300倍)，如圖3中所述。在另一實例中，在Ab1變體抗體之間，AbG顯示與EGFRvIII之結合之第二大增加倍數(增加超過47倍)，但對截短EGFR(1-525)之親和性相對於Ab1之增加排名第六(增加263倍)，如圖3中所述。

在Biacore測試中測定多種Ab1變體對EGFR 1-525及EGFRvIII二者之親和性低於Ab2，Ab2對截短EGFR(1-525)之$K_D$為(例如) $4.0 \times 10^{-9}$ M。

Biacore分析揭示，Ab1及Ab1變體抗體皆不結合至EGFR之全長ECD(EGFR胺基酸1-645)。相反，Ab2結合至EGFR之ECD。因此，儘管觀察到Ab1變體與野生型EGFR ECD之結合不存在或可忽略不計，如同對於Ab1亦觀察到者一般，但使用Ab1變體時對截短受體EGFR(1-525)之結合親和性增加。

*FACS (螢光活化細胞分選)分析*

實施FACS分析以測定與Ab1及Ab2相比，AbA與腫瘤細胞(A431細胞)之結合特徵。使用FACS分析測定螢光強度及細胞計數，其中結合至細胞之抗體之量係以經由使用流式細胞術軟體分析獲得之螢光強度(即，幾

何平均值之值)來反映。特定而言，藉由經結合抗體之量代表之抗體之結合活性係藉由測定幾何平均值之值來評價。

在約80%鋪滿時使用細胞解離緩衝液自燒瓶收穫A431細胞。將所收穫A431細胞在PBS/1% FBS (胎牛血清) (FACS緩衝液)中洗滌一次，然後以2.5 × $10^6$細胞/mL再懸浮於FACS緩衝液中。以100 μL細胞/孔添加至圓底96孔板。使用10 μL 10×濃度之抗體(最終濃度指示於圖4中)。將孔用FACS緩衝液洗滌兩次並再懸浮於50 μL稀釋於FACS緩衝液中之二級抗體(AlexaFluor 488)中。將板在4℃下培育1小時並用FACS緩衝液洗滌兩次。將細胞再懸浮於100 μL PBS/1%甲醛中並在Becton Dickinson LSRII流式細胞儀上分析。使用WinList流式細胞術分析軟體來分析資料。

Ab1、Ab2及AbA與A431腫瘤細胞結合之FACS分析之結果提供於圖4中，其顯示與細胞一起培育之抗體之幾何平均值對濃度。如圖4中所述，AbA與A431腫瘤細胞上之EGFR之結合高於Ab1，但AbA之結合親和性與Ab2相比較低。圖4中之資料代表每一抗體與其抗原之直接結合。

如圖3及4中所述，AbA具有增加之對EGFR之結合親和性，且顯示相對於Ab1增加之與具有大量EGFR之細胞(A431腫瘤細胞)之結合。亦測定，相對於與A431細胞之結合，AbA與具有較低量EGFR之細胞之結合展現更少增加(資料未顯示)。

**實例3： 抗-EGFR抗體之表位分析**

實施測試以測定實例1中所鑑別抗-EGFR抗體是否具有與抗體Ab1相同之表位，或Ab1變體抗體AbA、AbG、AbK、AbM及AbP內之胺基酸變化是否影響表位結合。

*競爭分析分析*

使用競爭結合FACS分析測定與Ab1、Ab2及對照1抗體(用作陰性對照之抗CD20抗體(利妥昔單抗(Roche)))相比，改良抗-EGFR抗體之間之表位特異性。使用表現EGFRvIII之U87MG細胞(人類神經膠母細胞瘤細胞系(自A. Scott, Ludwig Institute for Cancer Research獲得)) (U87MG細胞可自ATTC以ATCC HTB-14™獲得；例如，亦參見人類U-87MG細胞系，Sigma-Aldrich)。在約80%鋪滿時使用細胞解離緩衝液自燒瓶收穫U87MG細胞。將細胞在PBS/1% FBS (胎牛血清) (FACS緩衝液)中洗滌一次，然後以2.5 × $10^6$細胞/mL再懸浮於FACS緩衝液中。以100 µL細胞/孔添加至圓底96孔板。對於競爭FACS，藉由以100 nM最終濃度添加異硫氰酸螢光素(FITC) (含有或不含競爭抗體)使Ab1螢光結合，然後將孔在FACS緩衝液中洗滌兩次，懸浮於100 µL PBS/1%甲醛中，並在Becton Dickinson LSRII流式細胞儀上分析。在488 nm下量測螢光。

競爭分析之結果闡述於圖5中且指示，慮及螢光之幾何平均值計算隨未標記Ab1變體抗體濃度增加而降低，所測試Ab1變體抗體(即，AbA、AbG、AbK、AbM及AbP)識別與Ab1相同之表位(EGFR之結構域II，其暴露於「擴展」EGFR構象中)。結果亦顯示，Ab1/AbA/AbG/AbK/AbM/AbP表位不同於Ab2表位，此乃因在Ab2與Ab1之間或在Ab2與Ab1變體抗體之間未觀察到競爭。對照1抗體亦在競爭分析中顯示無與Ab1表位之可檢測結合，此乃因對照1抗體未能與經FITC標記之Ab1競爭結合至細胞。

*成像分析*

為評估表現EGFR之腫瘤之抗體攝取效能，使用經$^{111}$In標記之AbA實施SPECT成像分析(例如，參見Khalil等人International Journal of

Molecular Imaging，第2011卷，論文ID 796025，第1-15頁)。由於其基於免疫組織化學分析之中等EGFR表現程度，選擇兩個腫瘤模型SW48細胞(結腸腫瘤細胞；ATCC編號CCL-231™)及EBC-1細胞(EBC-1細胞來自Japanese Research Resources Bank (Id編號RCB1965) (Tokyo, Japan)中之人類肺鱗狀細胞癌系)。在將腫瘤細胞注射至小鼠中，且隨後投與經標記AbA抗體、經標記Ab1或經標記陰性對照(非EGFR結合IgG)後，在注射後4、12、24、48、72、120及168小時使用nanoSPECT/CT獲取小鼠之SPECT/CT影像。所有經標記抗體皆係經由尾靜脈注射來給予。為解釋抗體之血液清除率之差異，以腫瘤對血液之比率來報告資料。圖20A及20B二者中提供之結果顯示，與Ab1及IgG對照相比，小鼠中SW48 (圖20A)及EBC-1 (圖20B)細胞中之AbA攝取較高。在EBC1模型(圖20B) (其係具有較低EGFR表現程度之模型)中，Ab1攝取與IgG對照類似，而AbA攝取高於Ab1或陰性對照二者。圖20中提供之結果顯示，AbA能靶向特定表現EGFR之腫瘤。亦使用A431腫瘤細胞(源自表皮樣癌實體腫瘤(ATCC編號CRL-1555)，已知具有高EGFR表現程度)觀察到對於AbA之類似成像結果。

**實例4： 腫瘤細胞系中抗-EGFR抗體活性之活體外分析**

*SCC-15及H292腫瘤細胞系中EGFR信號傳導之活體外分析*

藉由西方墨點分析使用鱗狀癌細胞(SCC)-15 (ATCC® CRL-1623™)及H292細胞(肺癌細胞系；ATCC® CRL-1848™)在活體外腫瘤細胞系中評價Ab1、Ab2、AbA、AbB、AbC、AbD、AbG、AbK、AbM及AbP抑制EGFR之EGF介導之酪胺酸磷酸化之能力。SCC-15及H292細胞二者皆表現野生型EGFR。表現野生型EGFR之腫瘤細胞中藉由抗體處理誘導之pEGFR之下調指示，彼等抗體至少部分藉由抑制經由受體之信號傳導來

起作用。SCC-15細胞(人類舌鱗狀細胞癌)係經轉變角質細胞且在活體內對Ab1敏感。儘管SCC-15細胞在活體內對Ab1敏感，但H292 (人類非小細胞肺癌(NSCLC))細胞在活體外及活體內皆抵抗EGFR之EGF介導之酪胺酸磷酸化之Ab1抑制。因此，使用兩種細胞系在活體外腫瘤細胞中測試AbA、AbB、AbC、AbD、AbG、AbK、AbM及AbP抑制EGFR信號傳導之能力。

將細胞以60,000-80,000/孔平鋪於24孔板中，或以100,000-200,000/孔平鋪於6孔組織培養板中。將細胞在生長培養基中培育過夜。在37℃下血清饑餓24小時後，若適宜，將細胞在37℃下與抗體一起培育1小時，然後在37℃下用重組人類EGF (R&D Systems)刺激10分鐘。然後將細胞用冰冷PBS洗滌兩次，並用100-200 μL/孔之補充有全小型蛋白酶抑制劑混合劑(Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail，Roche)及0.1% NP40 (Tergitol型NP-40；壬基苯氧基聚乙氧基乙醇)之細胞裂解緩衝液(Cell Signaling Technolgy)裂解。在-80℃下急速冷凍至少20分鐘後，藉由在4℃下以14,000 rpm離心10分鐘來使細胞裂解物澄清。經由BCA蛋白質分析(Pierce_Thermo Scientific)測定澄清樣品裂解物之蛋白質濃度。藉由SDS-PAGE使用4-12%雙-Tris, Midi凝膠(Life Technologies)解析細胞裂解物(10 μg)，並使用iBlot乾燥轉移系統(Life Technologies)將其轉移至硝基纖維素膜上。用5%乳汁/Tween-Tris緩衝鹽水(TTBS)將墨點在室溫下封阻1小時，用TTBS洗滌三次，然後在4℃下與適宜一級抗體(抗磷酸酪胺酸(4G10)生物素結合物(Millipore)，1:1000稀釋液，用於檢測磷酸化EGFR；兔抗-EGFR (Lifespan Biosciences)，1:2000稀釋液，用於檢測總EGFR；兔抗全肌動蛋白(Cell Signaling Technology)，1:1000稀釋液，用於檢測內部對照肌動蛋白)一起培育過夜。在與一級抗體一起培育過夜後，

將墨點用TTBS洗滌3次5分鐘，然後在室溫下與驢抗兔抗體(Jackson Laboratories, 1:2000稀釋液)一起培育1小時以檢測總EGFR及肌動蛋白，或與鏈黴抗生物素蛋白-HRP結合物(KPL, 1:1000稀釋液)一起培育以檢測磷酸化EGFR。然後將墨點用TTBS洗滌3次，並用West Dura化學發光受質(Thermo Scientific)處理。藉由使用LAS-4000掃描儀(Fuji)掃描來使墨點可視化。

使用Ab2作為陽性對照(即，EGFR磷酸化之抑制劑)且使用對照1抗體作為陰性對照(即，不結合EGFR且因此對磷酸化EGFR無影響)。

使用SCC-15細胞之活體外研究之西方墨點分析之結果提供於圖7A中且指示，Ab1及抗體AbA、AbB、AbC及AbD不能顯著抑制SCC-15細胞中之EGFR信號傳導，如無磷酸化EGFR之顯著下調所指示。相反，如圖7A中所指示之磷酸化EGFR之減少指示，慮及磷酸化EGFR含量相對於陰性對照及Ab1較低且與陽性對照(Ab2)含量相當，抗體AbG、AbK、AbP及AbM降低活體外SCC-15細胞中之EGFR活性。因此，多種Ab1變體獲得相對於Ab1之活體外活性。

使用H292細胞之活體外研究之西方墨點分析之結果提供於圖7B中。圖7B中之結果指示，Ab1及抗體AbA、AbB、AbC及AbD在活體外H292細胞中顯示對EGFR信號傳導之極少抑制，且與Ab2及抗體AbG、AbK、AbM及AbP相比，磷酸化EGFR無顯著降低。抗體AbG、AbK、AbM及AbP在抑制H292細胞中之EGFR之酪胺酸磷酸化方面更有效(參見圖7B)，優於Ab1。Ab2 (陽性對照)亦抑制EGFR磷酸化，如圖7B中所述，而慮及與Ab2相比之結果，陰性對照(對照1抗體)顯示對磷酸化無可檢測抑制。

如下文所述，與在相同條件下測試之抗體Ab1相比，儘管發現AbA對

於在活體外抑制野生型EGFR陽性細胞(H292)中之EGFR磷酸化相對無活性，但AbA能在活體內抑制該等細胞之磷酸化。

因此，闡述於圖7A及7B中之活體外結果指示，儘管AbA、AbB、AbC、AbD、AbG、AbK、AbM及AbP與EGFR之結合增加(相對於Ab1)，但一些Ab1變體抗體(即，AbG、AbK、AbM及AbP)能在活體外在所測試腫瘤細胞系中顯著抑制或降低EGF介導之信號傳導。一般而言，所測試Ab1變體抗體在活體外SCC-15及H292細胞中抑制EGFR之EGF介導之酪胺酸磷酸化之能力與對EGFRvIII及截短EGFR(1-525)二者之親和性增加相關，如藉由表面電漿共振所測定。

圖6提供Ab1、Ab2及Ab1變體抗體對EGFR(1-525)之結合親和性之概述。圖6中之兩個圓形輪廓反映關於抗體在H292細胞或SCC-15細胞中抑制EGFR磷酸化之能力(指示對EGFR活性之抑制)之上述活體外結果(或類似測試之結果)。如圖6中所述，可將Ab1變體抗體分類為兩組(第1組及第2組)：基於圖7中所提供結果，彼等在所測試腫瘤細胞系中不抑制活體外EGFR信號傳導者(包括Ab1、AbA、AbB、AbD、AbE及AbF；在圖6中指定為第1組)，以及如圖7中所述之彼等在所測試腫瘤細胞系中抑制活體外EGFR信號傳導者(包括AbG、AbH、AbL、AbK、AbJ、AbM、AbN、AbO及AbP；在圖6中指定為第2組)。圖6中提供之比較指示，所有Ab1變體抗體皆具有與Ab1相比較高之對EGFR(1-525)之親和性，且如圖7中所呈現之結果所述，彼等$K_d$小於$1 \times 10^{-4}$ $s^{-1}$者(第2組)能顯著抑制活體外EGFR-信號傳導。如圖6中所述，Ab1之成熟過程主要產生具有提高之解離速率之Ab1變體。

*A431腫瘤細胞系之活體外分析*

亦使用A431人類上皮癌細胞使用磷酸-EGFR ELISA分析測試Ab1及Ab1變體抗體抑制EGFR之EGF介導之磷酸化之能力。A431細胞表現野生型EGFR。

將細胞以20,000/孔平鋪於經膠原塗佈之96孔碟中之生長培養基中。24小時後，在無血清培養基中洗滌細胞並將其血清饑餓4小時。若適宜，將細胞用單株抗體預處理1小時，然後在37℃下用重組EGF刺激10分鐘。在EGF刺激後，將細胞用冰冷PBS洗滌兩次，並用100 μL/孔之補充有蛋白酶抑制劑之細胞裂解緩衝液裂解，且在-80℃下急速冷凍至少20分鐘。藉由用50 μL抗-EGFR抗體(R&D systems，件號841402，0.8 μg/mL)預塗佈孔來生成捕獲板，之後用PBS/1% BSA處理封阻1小時，且在Tween-Tris緩衝鹽水(TTBS)中洗滌3次。將細胞裂解物添加至捕獲板並在4℃下培育過夜。將板在TTBS中洗滌5次，並與pTry-辣根過氧化酶(R&D Systems, DYC1095)一起培育1小時。將板在TTBS中洗滌5次並將100 μL之3,3,5,5-四甲基聯苯胺(TMB)添加至每孔且在室溫下培育直至顯色。藉由添加1N HCl終止反應，且在450 nm下讀取OD。

A431抑制研究之結果闡述於圖8A及8B中且顯示，Ab1變體抗體顯示其抑制A431細胞中之EGFR活性之能力的範圍。如圖8A中所示，即使在1333 nM抗體之濃度下，Ab1及變體AbA、AbB、AbC、AbD、AbE及AbF亦在抑制A431細胞中之EGFR信號傳導(藉由EGFR之EGF介導之磷酸化來測定)方面無效。相反，即使在高於Ab2之濃度下，Ab1變體抗體AbG、AbH、AbJ、AbK、AbL、AbM、AbN、AbO、AbP及AbQ較Ab1在阻斷EGFR磷酸化方面更有效。不結合至EGFR之對照1抗體對A431細胞中之EGFR抑制無效應。

圖8B基於圖8A中所提供之資料詳述抗體Ab1、AbP及Ab2。如圖8B中所述，與Ab2或AbP相比，Ab1顯示低抑制程度，即平均10%或更低。儘管測定Ab1抑制A431細胞中之EGFR信號傳導之$IC_{50}$值大於1333 nM，但AbP之$IC_{50}$值大於40 nM，其相對於Ab1有所改良。Ab2之$IC_{50}$值大於2.3 nM。

**實例5： 在活體外角質細胞結合分析中抗-EGFR抗體之FACs分析**

實施角質細胞FACs結合分析以測定Ab1變體抗體對正常人類表皮角質細胞(NHEK)細胞之結合親和性。NHEK細胞表現野生型EGFR。

在約80%鋪滿時使用胰蛋白酶收穫細胞，中和並在PBS/1% FBS (FACS緩衝液)中洗滌一次，然後以2.5 × $10^6$細胞/mL再懸浮於FACS緩衝液中。將100 μL細胞/孔添加至圓底96孔板。添加10 μL之10×濃度之Ab (最終濃度列示於圖中)並將板在4℃下培育1小時。將孔用FACS緩衝液洗滌兩次，然後再懸浮於50 μL稀釋於FACS緩衝液中之二級Ab (AlexaFluor 488)中。將板在4℃下培育1小時，然後用FACS緩衝液洗滌兩次。然後將細胞再懸浮於100 μL之PBS/1%甲醛中並在Becton Dickinson LSRII流式細胞儀上分析。使用WinList流式細胞術分析軟體來分析資料。

活體外角質細胞結合分析之結果闡述於圖9中，其指示，隨著經標記AbA、AbG、AbK、AbM及AbP抗體之濃度增加，所量測螢光由於結合角質細胞上之EGFR而增加。使用Ab2作為陽性對照且產生隨著將抗體添加至NHEK細胞而增加之螢光。即使在高抗體濃度下，Ab1亦顯示顯著較低之結合。

圖9中呈現之結果指示，所測試Ab1變體抗體結合角質細胞上之野生型EGFR且對正常人類表皮角質細胞之親和性大於Ab1 (及陰性對照、對

照1抗體)。圖9中之結果亦顯示，抗體AbA、AbG、AbK、AbM及AbP與正常人類表皮角質細胞之結合與Ab2相比較低。該等結果指示，Ab1變體抗體與角質細胞上之野生型EGFR之結合能優於Ab1。

**實例6： 抗-EGFR抗體對腫瘤之活體內分析**

使用小鼠異種移植物分析評估Ab1變體抗體在活體內對腫瘤生長之效應。

自Charles River (Wilmington, MA)獲得SCID及無胸腺CD-1裸鼠。每籠飼養10隻小鼠。小鼠到達時之體重為18-20 g。所有實驗皆係根據國立衛生研究院(National Institutes of Health)實驗室動物護理及使用指南(Guide for Care and Use of Laboratory Animals)規範在實驗動物管理評鑑及授証協會(Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)授證之設施中實施。對於每一皮下研究，在第0天將活細胞皮下接種至小鼠右側腹。注射體積為0.2 mL，由S-MEM與基質膠(Matrigel) (BD, Franklin Lakes, NJ)之1:1混合物組成。以約200-250 $mm^3$對腫瘤進行大小匹配。在腫瘤大小匹配當天或之後24小時開始療法。使用人類IgG混合物對照作為陰性對照(類似於人類血清之純化人類IgG；Innovative Research)。在療法開始時，小鼠稱重為約25 g。每週2到3次估計腫瘤體積。經由電子測徑器量測腫瘤長度(L)及寬度(W)，且根據以下等式計算體積：$V = (L \times W^2)/2$。在腫瘤體積達到3,000 $mm^3$時或在發生皮膚潰瘍時將小鼠安樂死。將適宜量之抗體原液在投與前稀釋於磷酸鹽緩衝鹽水中。如圖中所指示，腹膜內投與藥物。在異種移植物研究中使用H292 (人類非小細胞肺癌(NSCLC))細胞。

活體內實驗之結果顯示，Ab1變體抗體AbA、AbG、AbK、AbM及

AbP相對於Ab1能顯著抑制腫瘤生長(參見圖10)。與Ab1相比，Ab1變體抗體亦能提高反應持續時間之耐久性，例如，在注射腫瘤細胞後(遵循相同劑量及投與排程)，AbA維持腫瘤體積小於500 $mm^3$達29天，與之相比Ab1維持腫瘤體積小於500 $mm^3$約18天。如圖10中所示，在第20天，注射AbA之小鼠顯示約300 $mm^3$之腫瘤體積，而在第20天，注射Ab1之小鼠顯示體積約700 $mm^3$之腫瘤。截至第29天，經AbA注射之小鼠顯示腫瘤體積與第20天(即，約300 $mm^3$)相比類似，而經Ab1注射之小鼠之腫瘤體積增加至約1000 $mm^3$。

計算腫瘤生長抑制百分比(%TGI)以量化圖10中闡述之結果。圖10中所述抗體之%TGI如下：

AbA = 74

AbG = 88

AbK = 90

AbM = 84

AbP = 86

Ab1 = 31

Ab2 = 73

%TGI值係相對於經人類IgG對照治療之小鼠之腫瘤體積而言。如上所述，Ab1相對於人類IgG對照產生31% TGI，而AbA具有經計算74% TGI。值得注意的是，Ab1變體抗體顯示相對於Ab2相等或較大之%TGI。

AbA能在活體內在H292異種移植物腫瘤模型中提高反應耐久性並減小腫瘤體積(如圖10中所述)，但在活體外在相同細胞系中未能抑制EGFR磷酸化，如實例4及圖7中所述。儘管對EGFR(1-525)及EGFRvIII之結合

親和性較低，但抗體AbA之活體內活性亦與抗體AbG、AbK、AbM及AbP相當(參見圖3)。因此，儘管事實上AbA在活體外顯示極小至無細胞信號傳導抑制，但AbA在活體內以類似於其他具有較強親和性值之抗-EGFR變體抗體(例如AbK、AbM及AbP)之方式降低或抑制H292腫瘤細胞生長。

**實例7： 使用AbA ADC之活體內腫瘤生長抑制分析**

使用活體內小鼠異種移植物分析測定AbA-vcMMAE ADC抑制腫瘤生長之能力。此實例中所用AbA ADC係根據實例8中所述方法來結合，但未根據本文所述之分批純化方法加以純化。此實例中所用AbA ADC組合物之平均DAR為3.7。小鼠異種移植物分析(類似於彼等闡述於實例6中者)係使用兩種不同NSCLC細胞系NCI-H1703及EBC1來實施。兩種不同細胞系之結果提供於圖14中。

如圖14A中所示，AbA-vcMMAE (在1 mg/kg體重之劑量下)在NCI-H1703細胞中減小腫瘤體積及提高反應耐久性方面優於Ab1 (在10 mg/kg體重之劑量下)以及含有Ab1及MMAF及mc連接體之Ab1 ADC。單獨之Ab1 (在10 mg/kg劑量下)導致總體缺乏腫瘤體積抑制，與陰性對照抗體對照2 (抗破傷風毒素抗體)類似，其在10 mg/kg劑量下不抑制腫瘤生長。

亦在使用EBC1細胞之異種移植物小鼠模型中研究AbA-vcMMAE ADC之效能。研究結果顯示於圖14B中且指示，AbA-mcMMAF ADC (在3 mg/kg體重之劑量下)在減小腫瘤體積及提高反應耐久性方面與Ab1 (在3 mg/kg體重之劑量下)相比及與含有Ab1及MMAF及mc連接體之Ab1 ADC (在3 mg/kg體重之劑量下)相比更有效。

總之，圖14中之結果顯示，相對於單獨之Ab1或Ab1-MMAF ADC，兩種不同AbA奧裡斯他汀ADC (AbA-vcMMAE及AbA-mcMMAF)在活體

內減小腫瘤體積及提高反應耐久性方面有效。

**實例8： 純化抗-EGFR抗體藥物結合物(ADC)**

所製得抗體藥物結合物(ADC)包含經由纈胺酸-瓜胺酸(vc)連接體連接至單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)之AbA抗體。此ADC (稱作AbA-vcMMAE)之圖闡述於圖11中。

AbA抗體與vcMMAE之結合開始於AbA之部分還原，之後進行與Val-Cit-MMAE (vcMMAE)之反應。藉由添加TCEP (TCEP:mAb之莫耳當量為2.1)之後在0℃下培育過夜來使AbA抗體(20 mg/mL)部分還原。然後使還原反應物升溫至20℃。為結合所有硫醇，添加vcMMAE至最終vcMMAE:還原Cys莫耳比為1.15。結合反應係在10% v/v之DMSO存在下進行且容許在20℃下繼續進行60分鐘。

在結合反應後，添加過量游離N(乙醯基)-半胱胺酸(2當量，相對於vcMMAE電荷)以淬滅未反應之vcMMAE以產生Cys-Val-Cit-MMAE加成物。容許Cys淬滅反應在20℃下繼續進行約30分鐘。根據下文純化Cys淬滅之反應混合物。

上述結合方法亦可用於將mcMMAF結合至抗體。

*分批純化*

使用分批純化方法純化AbA ADC。用適當量之水洗Bu-HIC樹脂(ToyoPearl；Tosoh Biosciences)處理反應混合物，即將7重量之樹脂添加至混合物。將樹脂/反應混合物攪拌適當時間，且藉由分析型疏水相互作用層析監測藥物結合物產物之移除，經由粗聚丙烯過濾器過濾，並藉由兩個床體積之緩衝液(0.28 M氯化鈉、7 mM磷酸鉀，pH 7)洗滌。合併經合併濾液及沖洗液且藉由HIC HPLC分析產物譜。藉由超濾/用10滲濾體積

之15 nM組胺酸緩衝液滲濾(UF/DF)至15 mM組胺酸(pH 6)中來使經合併濾液及沖洗液進行緩衝液交換。

在結合及純化後，實施所得ADC混合物之分析型分析。取樣並使用疏水相互作用層析–高效液相層析(HIC-HPLC)來分析。所用管柱為TSK凝膠丁基-NPR管柱(4.6 mm ID × 3.5 cm, 2.5 µm, 30℃；Tosoh Bioscience LLC, Japan)且係以0.8 mL/min之流速使用。移動相包括A：25 mM $Na_2HPO_4$ (pH7)、1.5 M$(NH_4)_2SO$及B：25 mM $Na_2HPO_4$ (pH7) (75%)至IPA (25%)。所用梯度為0% B相2分鐘，在12分鐘內0至100% B，且保持1分鐘。

使用UV分析來分析蛋白質含量。HIC痕量分析顯示，AbA-vcMMAE之所得平均藥物對抗體比率(DAR)為3.1，如下文表4及圖12中所述。平均DAR係藉由將0、1、2、3、4、5、6、7及8種ADC產物加和，乘以PA% (PA%係峰面積百分比，如藉由所需藥物負載在$A_{280}$處之峰下量測之面積來確定)，且除以100來確定。

**表4：使用分批純化之AbA-vcMMAE之HIC分析(PA%)之結果**

| 280 nm下之HIC pa%結果 | | | |
|---|---|---|---|
| 滯留時間 min | DAR | 寬分佈 | 純化 (分批) |
| 6.7 | 0 | 4.27 | 6.15 |
| 7.6 | 1 | 0.67 | 1.43 |
| 8.6 | 2 | 24.74 | 34.27 |
| 9.6 | 3 | 1.95 | 3.94 |
| 10.4 | 4 | 35.28 | 45.88 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 11.5 | 5 | 4.67 | 5.37 |
| 11.9 | 6 | 13.90 | 2.09 |
| 12.4 | 7 | 6.40 | 0.88 |
| 12.9 | 8 | 8.12 | |
| Σ (>E6), pa% 280nm = | | 28.4 | 3.0 |
| | E4/E2 = | 1.4 | 1.3 |
| | DAR = | 4.1 | 3.1 |

如自表4及圖12可見，AbA-vcMMAE之分批純化產生介於2-4之間之DAR。初始平均DAR為4.1，其中純化後之最終平均DAR為3.1。

亦藉由尺寸排除層析(SEC)分析AbA-vcMMAE ADC混合物。SEC HPLC係使用Tosoh TSKgel GS3000SWXL管柱(7.58 × 30 cm, 5 µm)來實施。使用0.3 mL/min之流速。移動相包括92.5%之25 mM $Na_2PO_4$ (pH 6.8)、350 mM NaCl及7.5%之異丙醇(IPA)。稀釋劑係移動相，且分析係在214 nm之UV下實施。在214 nm下之SEC pa%結果提供於下文表5中。SEC結果顯示於圖13中。

**表5：AbA-vcMMAE之SEC結果(PA%)**

| | 高分子量 | 單體 | 低分子量 |
|---|---|---|---|
| 寬 | 3.2 | 96.8 | |
| 純化 | 2.2 | 97.8 | |
| DAR 2 | 0.4 | 99.6 | |
| DAR4 | 1.0 | 96.2 | 2.8 |
| | | | |
| mAb<br>AbA | | 95.9 | |

在214 nm下之SEC PA%結果

因此，AbA-vcMMAE之分批純化產生介於2-4之間之DAR，且平均值為3.1。

**實例9： 使用AbA-MMAE ADC之活體內腫瘤生長抑制分析**

如實例8中所述，製備AbA-vcMMAE之純化組合物，使得組合屋內ADC之平均DAR為3.1。隨後使用肺癌異種移植物模型測試純化ADC以測定純化AbA ADC組合物是否在抑制活體內腫瘤生長方面有效。更特定而言，實施異種移植物腫瘤生長抑制分析以評價純化AbA-vcMMAE (Ab1-vcMMAEp)對NCI-H292細胞(人類NSCLC癌細胞系)之效應。

圖15A中提供之結果顯示，與未純化AbA-vcMMAE相比，AbA-vcMMAEp (在3 mg/kg體重之劑量下)在NCI-H292細胞中減小腫瘤體積及延長反應持續時間(提高反應耐久性)方面更有效。類似地，圖15B顯示，與AbA-vcMMAE之未純化形式相比，純化AbA-vcMMAEp (在6 mg/kg體重之劑量下)在抑制腫瘤生長方面亦更有效。如在圖15A及15B二者中所述，純化AbA-vcMMAE在減小腫瘤體積及延長反應持續時間方面亦較陰性對照2抗體(單獨或結合至MMAE)、呈未純化或純化形式之結合至MMAE或MMAF之Ab1更有效。對照2抗體係不結合至EGFR之抗破傷風毒素抗體。

在評價純化AbA-vcMMAE (Ab1-vcMMAEp)對NCI-H292細胞(肺癌細胞系；ATCC® CRL-1848™)之效應之另一研究中，測試在3 mg/kg及6 mg/kg劑量下之純化AbA-vcMMAE對在類似劑量下之Ab1-mcMMAF。此在NSCLC腫瘤模型中之第二研究之結果提供於圖18中，且顯示與AbA-vcMMAE相比，純化AbA-vcMMAEp在抑制腫瘤生長方面更有效。

**實例10：AbA-vcMMAE之流過式製程純化**

使用流過式製程製備包含AbA-vcMMAE ADC及降低之每抗體vc-

MMAE分子藥物負載之組合物。AbA-vcMMAE ADC之製備闡述於上文實例7中。

純化具有DAR範圍(1-8)之ADC之AbA-vcMMAE組合物之流過式製程係根據下文來實施。首先用約28 mM NaCl、7 mM磷酸鉀(pH 7)平衡Bu-HIC樹脂之5 mL管柱。隨後以其體積之1/6使用1.95 M NaCl、50 mM磷酸鉀(pH 7)稀釋反應混合物，並將其以約100 mg蛋白質/mL樹脂之比率以1 mL/min之流速(約5 min滯留時間或36 cm/hr線流)加載至樹脂中。施加由1份異丙醇及10份(以體積計)28 mM NaCl、7 mM磷酸鉀(pH 7)組成之沖洗液進行約12管柱體積之沖洗。在約1管柱體積後開始收集產物，直至UV信號平衡後為止(其亦可以多個部分收集)。藉由HIC HPLC分析多個部分且將期望等份試樣彙集在一起並藉由TFF (切向流過濾)濃縮，且用10滲濾體積之組胺酸緩衝液交換至15 mM組胺酸(pH 6)中。下表6提供反應混合物在純化之前及之後的純度結果。

**表6：使用流過式純化之AbA-vcMMAE之HIC分析(PA%)結果**

| 在280 nm下之HIC PA%結果 | | | |
|---|---|---|---|
| Rt, min | DAR | 寬分佈 | 純化(流過) |
| 6.4 | 0 | 3.89 | 5.25 |
| 7.2 | 1 | 0.67 | 0.99 |
| 8.4 | 2 | 22.36 | 30.21 |
| 9.4 | 3 | 2.95 | 4.04 |
| 10.2 | 4 | 39.82 | 52.76 |
| 11.3 | 5 | 5.41 | 4.67 |
| 11.8 | 6 | 12.52 | 1.42 |
| 12.3 | 7 | 5.31 | 0.67 |
| 12.9 | 8 | 7.07 | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Σ (>E6), pa% 280nm = | | 24.9 | 2.1 |
| | E4/E2 = | 1.8 | 1.7 |
| | DAR = | 4.1 | 3.2 |

與實例8中所述之分批純化相比，每一純化模式(分批純化及流過式純化)之蛋白質對樹脂之負載相當。在分批純化製程中，基於調節功效相對於ADC使用2.26重量之樹脂。樹脂密度為約0.23 g/ml。因此，例如，若使用10 g ADC，則使用98.2 ml樹脂。所用負載為(10 g × 1000 ml/L)/98.2 ml = 102 g/L負載。流過式純化實驗以100 g/L負載為目標。在每一情形中，加載溶液與沖洗溶液相同，但流過式純化沖洗溶液係10% IPA v/v。

使用實例8中所述分批純化方法獲得之純化AbA-vcMMAE組合物與使用上述流過式製程獲得之純化AbA-vcMMAE組合物之間之比較提供於表7中。

**表7：AbA-vcMMAE分批純化對流過式純化之HIC分析(PA%)結果**

| 在280 nm下之HIC PA%結果 | | | |
|---|---|---|---|
| Rt, min | DAR | 純化 (Batch) | 純化 (流過) |
| 6.4 | 0 | 4.99 | 5.25 |
| 7.2 | 1 | 1.02 | 0.99 |
| 8.4 | 2 | 30.99 | 30.21 |
| 9.4 | 3 | 4.61 | 4.04 |
| 10.2 | 4 | 50.75 | 52.76 |
| 11.3 | 5 | 5.5 | 4.67 |
| 11.8 | 6 | 2.1 | 1.42 |
| 12.3 | 7 | - | 0.67 |
| Σ (>E6), pa% 280nm = | | 2.1 | 2.1 |
| | E4/E2 = | 1.6 | 1.7 |
| | DAR = | 3.2 | 3.2 |

總之，流過式及分批純化製程二者皆順利獲得包含約80% DAR為2-4之ADC之組合物，其中DAR為0-1或5-8之ADC之量受限於組合物中少於約20%之總ADC群體，如例如表7中所示。

**實例11： 使用AbA MMAE ADC之活體內腫瘤生長抑制分析**

使用活體內小鼠異種移植物分析來測定AbA-vcMMAE ADC抑制神經膠母細胞瘤腫瘤生長之能力。小鼠異種移植物分析(類似於彼等在實例6中實施者)係使用U87MGde2-7細胞(其表現EGFRvIII)來實施。U87細胞源自人類惡性神經膠質瘤(ATCC編號HTB-14™)。對於該研究，將腫瘤細胞與50%基質膠(BD BioSciences, Franklin Lakes, NJ)混合且在第0天將3 × $10^6$細胞皮下接種至6-8週齡Nu/Nu雌性小鼠之側腹中(Nu/Nu雌性小鼠係自Charles River (Wilmington, MA)獲得)。經由電子測徑器量測腫瘤長度(L)及寬度(W)並根據以下等式計算體積：$V = (L \times W^2)/2$。在腫瘤體積達到3,000 $mm^3$時或在發生皮膚潰瘍時將小鼠安樂死。圖19中提供之結果顯示，在抑制神經膠母細胞瘤細胞生長中，AbA-vcMMAEp較陰性對照(對照2抗體；抗破傷風抗體)更有效。

**序列概述**

| SEQ ID NO: | 說明 |
|---|---|
| 1 | Ab1 VH胺基酸序列 |
| 2 | Ab1、AbC、AbD及AbE VH CDR1胺基酸序列 |
| 3 | Ab1、AbC、AbD、AbE、AbF、AbJ及AbN VH CDR2胺基酸序列 |
| 4 | Ab1、AbC、AbD及AbE VH CDR3胺基酸序列 |
| 5 | Ab1及AbA VL胺基酸序列 |
| 6 | Ab1、AbA、AbB、AbC及AbF VL CDR1胺基酸序列 |
| 7 | Ab1、AbA、AbB及AbC及AbF VL CDR2胺基酸序列 |
| 8 | Ab1、AbA、AbB及AbF VL CDR3胺基酸序列 |

| | |
|---|---|
| 9 | AbA VH胺基酸序列 |
| 10 | AbA、AbF及AbK VH CDR1胺基酸序列 |
| 11 | AbA、AbH、AbK、AbL、AbM、AbO及AbQ VH CDR2胺基酸序列 |
| 12 | AbA、AbF、AbM、AbN及AbO VH CDR3胺基酸序列 |
| 13 | Ab1及AbA輕鏈胺基酸序列 |
| 14 | Ab1重鏈胺基酸序列 |
| 15 | AbA重鏈胺基酸序列 |
| 16 | AbB及AbG VH CDR1胺基酸序列 |
| 17 | AbB及AbG VH CDR2胺基酸序列 |
| 18 | AbG、AbH、AbJ及AbL VH CDR3胺基酸序列 |
| 19 | AbB及AbK VH CDR3胺基酸序列 |
| 20 | AbM及AbN VH CDR1胺基酸序列 |
| 21 | AbP VH CDR1胺基酸序列 |
| 22 | AbP及AbQ VH CDR3胺基酸序列 |
| 23 | AbG、AbH及AbJ VL CDR1胺基酸序列 |
| 24 | AbG、AbH及AbJ VL CDR2胺基酸序列 |
| 25 | AbG、AbH及AbJ VL CDR3胺基酸序列 |
| 26 | AbK、AbL、AbM、AbN及AbO VL CDR1胺基酸序列 |
| 27 | AbE、AbK、AbL、AbM、AbN及AbO VL CDR2胺基酸序列 |
| 28 | AbK、AbL、AbM、AbN及AbO VL CDR3胺基酸序列 |
| 29 | AbP及AbQ VL CDR1胺基酸序列 |
| 30 | AbP及AbQ VL CDR2胺基酸序列 |
| 31 | AbD、AbP及AbQ VL CDR3胺基酸序列 |
| 32 | 人類EGFR胺基酸序列(具有信號序列) |
| 33 | 人類表皮生長因子受體變體III (hEGFRvIII)胺基酸序列 |
| 34 | 人類EGFR細胞外結構域(ECD)胺基酸序列 |
| 35 | AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之VH CDR1共有序列 |
| 36 | AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之VH CDR2共有序列 |
| 37 | AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之VH CDR3共有序列 |
| 38 | AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之VL CDR1共有序列 |

| | |
|---|---|
| 39 | AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之VL CDR2共有序列 |
| 40 | AbA、AbG、AbK、AbM及AbP之VL CDR3共有序列 |
| 41 | Ig γ-1恆定區 |
| 42 | Ig γ-1恆定區突變體 |
| 43 | Ig κ恆定區 |
| 44 | Ig λ恆定區 |
| 45 | EGFR之表位 |
| 46 | EGFRvIII胺基酸序列之ECD |
| 47 | EGFR 1-525胺基酸序列 |
| 48 | 重鏈胺基酸序列Ab2 |
| 49 | 輕鏈胺基酸序列Ab2 |
| 50 | VH胺基酸序列AbE |
| 51 | VL胺基酸序列AbE |
| 52 | VH胺基酸序列AbF |
| 53 | VL胺基酸序列AbF |
| 54 | VH胺基酸序列AbH |
| 55 | VL胺基酸序列AbH |
| 56 | VH胺基酸序列AbJ |
| 57 | VL胺基酸序列AbJ |
| 58 | VH胺基酸序列AbL |
| 59 | VL胺基酸序列AbL |
| 60 | VH胺基酸序列AbN |
| 61 | VL胺基酸序列AbN |
| 62 | VH胺基酸序列AbO |
| 63 | VL胺基酸序列AbO |
| 64 | VH胺基酸序列AbB |
| 65 | VL胺基酸序列AbB |
| 66 | VH胺基酸序列AbC |
| 67 | VL胺基酸序列AbC |
| 68 | VH胺基酸序列AbD |

| | |
|---|---|
| 69 | VL胺基酸序列AbD |
| 70 | VH胺基酸序列AbQ |
| 71 | VL胺基酸序列AbQ |
| 72 | VH胺基酸序列AbG |
| 73 | VL胺基酸序列AbG |
| 74 | VH胺基酸序列AbK |
| 75 | VL胺基酸序列AbK |
| 76 | VH胺基酸序列AbM |
| 77 | VL胺基酸序列AbM |
| 78 | VH胺基酸序列AbP |
| 79 | VL胺基酸序列AbP |
| 80 | AbH、AbJ、AbL及AbO VH CDR1胺基酸序列 |
| 81 | AbQ VH CDR1胺基酸序列 |
| 82 | AbD及AbE VL CDR1胺基酸序列 |
| 83 | AbD VL CDR2胺基酸序列 |
| 84 | AbC VL CDR3胺基酸序列 |
| 85 | AbE VL CDR3胺基酸序列 |
| 86 | AbA重鏈核酸序列 |
| 87 | AbA輕鏈核酸序列 |
| 88 | 重鏈胺基酸前導序列 |
| 89 | 輕鏈胺基酸前導序列 |

## 以引用方式併入

本申請案中通篇引用之所有參考文獻、專利、待決專利申請案及公開專利之內容皆係以引用方式明確併入本文中。

## 等效形式

熟習此項技術者僅使用常規實驗即可認識到或能確定本文所述之本發明特定實施例之多個等效形式。該等等效形式意欲涵蓋於下文申請專利範圍內。

【序列表】

<110> 美商艾伯維有限公司(ABBVIE, INC.)

<120> 抗-EGFR抗體及抗體藥物結合物

<140>
<141>

<150> 61/968,819
<151> 2014-03-21

<160> 94

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
            20                  25                  30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 2
Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 3
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 4
Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 6
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 7
His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 8
Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 9

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 10
Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 11
Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 12
Ala Ser Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 14

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
            20                  25                  30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
```

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285
```

```
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 16
Gly Tyr Ser Ile Ser Asn Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 17
Tyr Ile Ser Tyr Lys Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 18
Ala Ser Arg Gly Leu Pro Tyr
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 19
Ala Ser Arg Gly Phe Pro Trp
1 5

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

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 20
Gly Tyr Ser Ile Gly Arg Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 21
Gly Tyr Ser Ile His Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 22
Ala Ser Trp Gly Leu Pro Trp
1 5

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 23
His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 24
His Gly Ala Asn Leu Asp Asp
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 25
Val Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 26
His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn Val Gly
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 27
His Gly Ser Asn Leu Asp His
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 28
Val Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 29
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Met Asn Val Gly
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 30
His Gly Ala Ile Leu Asp Asp
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 31
Val Gln Tyr Ala Glu Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 32
<211> 1210
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

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

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu
645 650 655

Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His
660 665 670

Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu
675 680 685

Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu
690 695 700

Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser
705 710 715 720

Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu
725 730 735

Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser
740 745 750

Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser
755 760 765

Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser
770 775 780

Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp
785 790 795 800

Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn
805 810 815

Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg
820 825 830

Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro
835 840 845

Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala
850 855 860

```
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
865                 870                 875                 880

Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
                885                 890                 895

Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
            900                 905                 910

Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
        915                 920                 925

Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
    930                 935                 940

Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
945                 950                 955                 960

Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
                965                 970                 975

Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
            980                 985                 990

Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala  Leu Met Asp Glu Glu  Asp Met Asp
        995                 1000                1005

Asp Val  Val Asp Ala Asp Glu  Tyr Leu Ile Pro Gln  Gln Gly Phe
    1010                1015                1020

Phe Ser  Ser Pro Ser Thr Ser  Arg Thr Pro Leu Leu  Ser Ser Leu
    1025                1030                1035

Ser Ala  Thr Ser Asn Asn Ser  Thr Val Ala Cys Ile  Asp Arg Asn
    1040                1045                1050
```

Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
1055 1060 1065

Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
1070 1075 1080

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro
1085 1090 1095

Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln
1100 1105 1110

Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro
1115 1120 1125

His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln
1130 1135 1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala
1145 1150 1155

Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln
1160 1165 1170

Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys
1175 1180 1185

Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln
1190 1195 1200

Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
1205 1210

<210> 33
<211> 943
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

```
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1               5                  10                  15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr
            20                  25                  30

Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser
        35                  40                  45

Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly
    50                  55                  60

Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp
65                  70                  75                  80

Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr
                85                  90                  95

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp
            100                 105                 110

Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu
        115                 120                 125

Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro
    130                 135                 140

Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg
145                 150                 155                 160

Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu
                165                 170                 175

Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly
            180                 185                 190

Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile
        195                 200                 205
```

Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile
210 215 220

Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His
225 230 235 240

Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys
245 250 255

Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys
260 265 270

Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys
275 280 285

Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys
290 295 300

Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp
305 310 315 320

Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn
325 330 335

Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu
340 345 350

Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly
355 360 365

Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val
370 375 380

Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe
385 390 395 400

Met Arg Arg Arg His Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu
405 410 415

Gln Glu Arg Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro
420 425 430

Asn Gln Ala Leu Leu Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile
435 440 445

Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp
450 455 460

Ile Pro Glu Gly Glu Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu
465 470 475 480

Arg Glu Ala Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala
485 490 495

Tyr Val Met Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly
500 505 510

Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe
515 520 525

Gly Cys Leu Leu Asp Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser
530 535 540

Gln Tyr Leu Leu Asn Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr
545 550 555 560

Leu Glu Asp Arg Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
565 570 575

Leu Val Lys Thr Pro Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
580 585 590

Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys
595 600 605

Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr
610 615 620

Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
625 630 635 640

Met Thr Phe Gly Ser Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile
645 650 655

Ser Ser Ile Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
660 665 670

Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala
675 680 685

Asp Ser Arg Pro Lys Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met
690 695 700

Ala Arg Asp Pro Gln Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met
705 710 715 720

His Leu Pro Ser Pro Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp
725 730 735

Glu Glu Asp Met Asp Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro
740 745 750

Gln Gln Gly Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu
755 760 765

Ser Ser Leu Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp
770 775 780

Arg Asn Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln
785 790 795 800

Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp
805 810 815

Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro Lys
820 825 830

Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln Pro Leu
835 840 845

Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro His Ser Thr
850 855 860

Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln Pro Thr Cys Val
865 870 875 880

Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala Gln Lys Gly Ser His
885 890 895

Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln Gln Asp Phe Phe Pro Lys
900 905 910

Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala
915 920 925

Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala
930 935 940

<210> 34
<211> 645
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

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

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145 150 155 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
165 170 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
180 185 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
195 200 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
210 215 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225 230 235 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
245 250 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
260 265 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
275 280 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
290 295 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305 310 315 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
325 330 335

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser
645

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /替代=「Gly」或「His」

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(6)
<223> /替代=「Arg」或「Asn」

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> /注=「序列中給出之變體殘基相對於變體
位置注釋中之殘基無優先性」

<400> 35
Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<220>

<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /替代=「Asn」或「Lys」

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(16)
<223> /注=「序列中給出之變體殘基相對於變體
位置注釋中之殘基無優先性」

<400> 36
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /替代=「Trp」

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /替代=「Leu」

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /替代=「Trp」

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /注=「序列中給出之變體殘基相對於變體
位置注釋中之殘基無優先性」

<400> 37
Ala Ser Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /替代=「Thr」

<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(8)
<223> /替代=「Met」或「Ser」

<220>
<221> VARIANT
<222> (10)..(10)
<223> /替代=「Val」

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(11)
<223> /注=「序列中給出之變體殘基相對於變體
位置注釋中之殘基無優先性」

<400> 38
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Tyr Asn Ile Gly
1 5 10

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /替代=「Ala」或「Ser」

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /替代=「Ile」

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(7)
<223> /替代=「His」

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> /注=「序列中給出之變體殘基相對於變體
位置注釋中之殘基無優先性」

<400> 39
His Gly Thr Ala Leu Asp Asp
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /替代="Asp"

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /替代=「Glu」或「Asp」

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(9)

<223> /注=「序列中給出之變體殘基相對於變體
位置注釋中之殘基無優先性」

<400> 40
Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 41
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
<211> 330

<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 44
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45
Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
1 5 10 15

<210> 46
<211> 350
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46
Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Gly Ser Cys
1 5 10 15

Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val
20 25 30

Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val Cys Asn Gly
35 40 45

Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn
50 55 60

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

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

Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly
100 105 110

Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala
115 120 125

Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln
130 135 140

Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg
145 150 155 160

Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys
165 170 175

Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr
180 185 190

Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys
195 200 205

Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys
210 215 220

Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg
225 230 235 240

Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg
245 250 255

Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu
260 265 270

Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys
275 280 285

Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys
290 295 300

Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly
325 330 335

Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro
340 345 350

<210> 47
<211> 525
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
35 40 45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50 55 60

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

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
85 90 95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
100 105 110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
115 120 125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
130 135 140

```
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145                 150                 155                 160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
                165                 170                 175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
            180                 185                 190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
        195                 200                 205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg
    210                 215                 220

Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys
225                 230                 235                 240

Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp
                245                 250                 255

Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro
            260                 265                 270

Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly
        275                 280                 285

Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His
    290                 295                 300

Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu
305                 310                 315                 320

Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val
                325                 330                 335
```

Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn
340 345 350

Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp
355 360 365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr
370 375 380

Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu
385 390 395 400

Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp
405 410 415

Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln
420 425 430

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
515 520 525

<210> 48
<211> 452

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 48
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

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

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

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

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 49
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 49
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

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

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Ala
210

<210> 50
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成

多肽」

<400> 50
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 51
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Leu Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Ser Asn Leu Asp His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 52
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 52
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 53
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 54
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 54
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 55
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Ala Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 56
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 56
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 57
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Ala Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 58
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 58
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 59
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ser Asn Leu Asp His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 60
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 60
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Arg Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ser Asn Leu Asp His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 62
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 62
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Lys Asp

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 63
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ser Asn Leu Asp His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 64
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 64
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asn Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Lys Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 65
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 66
<211> 116

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 66
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 67
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 68
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 68
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 69
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

Leu Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Ala Asn Leu His Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 70
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 70
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Val Thr Ala Ser Trp Gly Leu Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成多肽」

<400> 71
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Met Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ala Ile Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 72
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 72
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asn Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Lys Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

Tyr His Gly Ala Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 74
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 74
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Arg Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu

50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 75
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ser Asn Leu Asp His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 76
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 76
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Gly Arg Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 77
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Thr Tyr Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ser Asn Leu Asp His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 78
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 78
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Val Thr Ala Ser Trp Gly Leu Pro Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 79
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Met Asn
20 25 30

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

Tyr His Gly Ala Ile Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 80
Gly Tyr Ser Ile Gly Lys Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 81
Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp Phe Ala Trp Asn
1 5 10

<210> 82
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 82
His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Leu Gly
1 5 10

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 83
His Gly Ala Asn Leu His Asp
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 84
Val Gln Tyr Glu Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 85
Val Gln Tyr Asp Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 86
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多核苷酸」

<400> 86
gaggtgcaac tccaagagag cgggcccggc ctcgtgaagc cctctcagac tctgtccctg 60

acttgcactg tgagcgggta ttccatcagc agagacttcg catggaactg gatccgccag 120

cctcccggta agggactgga gtggatgggg tacatcagct acaacggtaa tacacgctat 180

cagccctccc tgaagtctcg cattaccatt agtcgcgata cctccaagaa ccagttcttt 240

ctgaaactca acagcgtgac agccgctgac accgccacct actactgcgt gaccgccagc 300

aggggttcc cttactgggg ccagggcact ctggtcaccg tttcttctgc gtcgaccaag 360

ggcccatcgg tcttcccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420

ctgggctgcc tggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc 480

gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600

gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660

aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 720

ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc 780

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840

gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960

aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gcgaggagat gaccaagaac 1080

caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200

ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320

tccctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 87
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多核苷酸」

<400> 87
gacatccaga tgacccagtc cccctccagt atgtctgtgt ctgtgggcga ccgtgtgacc 60

attacctgcc actcctccca ggacatcaat agcaatatcg gttggttgca acagaagcca 120

ggcaagtcct tcaaagggct gatttaccat ggtaccaacc tggacgacgg ggttcctagt 180

cgtttcagcg gctccgggtc cggaaccgat tacactctga ccatcagcag tttgcagcct 240

gaggactttg ctacctatta ttgtgtgcag tacgctcagt tcccatggac tttcggcggg 300

ggcaccaaac tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 88
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 88
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 89
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 89
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15

Gly Ser Arg Cys
20

<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成

肽」

<400> 90
Leu Glu Ser Arg Gly Pro Phe
1 5

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 91
Asn Met His Thr Gly His His His His His His
1 5 10

<210> 92
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
肽」

<400> 92
Ser Arg Gly Pro Phe
1 5

<210> 93
<211> 98
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 93
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

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

Thr Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 94
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /注=「人工序列之說明：合成
多肽」

<400> 94
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met 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 Glu 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
85 90 95

# 【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種抗人類表皮生長因子受體(hEGFR)抗體，特徵為其包含：包含如SEQ ID NO: 18中所述之胺基酸序列之重鏈CDR3、包含如SEQ ID NO: 17中所述之胺基酸序列之重鏈CDR2、及包含如SEQ ID NO: 16中所述之胺基酸序列之重鏈CDR1；及包含如SEQ ID NO: 25中所述之胺基酸序列之輕鏈CDR3、包含如SEQ ID NO: 24中所述之胺基酸序列之輕鏈CDR2、及包含如SEQ ID NO: 23中所述之胺基酸序列之輕鏈CDR1。

【請求項2】

如請求項1之抗體，特徵為該抗體包含：包含如SEQ ID NO: 72中所述之胺基酸序列之重鏈可變區及，包含如SEQ ID NO: 73中所述之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【請求項3】

如請求項1或2之抗體，其中該抗體包含選自由以下組成之群之重鏈免疫球蛋白恆定結構域：人類IgG恆定結構域、人類IgM恆定結構域、人類IgE恆定結構域及人類IgA恆定結構域。

【請求項4】

如請求項3之抗體，其中該IgG恆定結構域選自由以下組成之群：IgG1恆定結構域、IgG2恆定結構域、IgG3恆定結構域及IgG4恆定結構域。

【請求項5】

一種抗人類表皮生長因子受體(抗-hEGFR)抗體或其抗原結合部分，其：

a)　結合至胺基酸序列CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 45)

內之表位或在競爭性結合分析中與第二抗-hEGFR抗體競爭結合至表皮生長因子受體變體III (EGFRvIII) (SEQ ID NO: 33)，其中該第二抗-EGFR抗體包含包含SEQ ID NO: 1中所述胺基酸序列之重鏈可變結構域及包含SEQ ID NO: 5中所述胺基酸序列之輕鏈可變結構域；

b) 以約$1 \times 10^{-6}$ M或更低之解離常數($K_d$)結合至EGFR(1-525) (SEQ ID NO: 47)，如藉由表面電漿共振所測定；且

c) 在活體內人類非小細胞肺癌(NSCLC)異種移植物分析中相對於對EGFR無特異性之人類IgG抗體以至少約50%之腫瘤生長抑制% (TGI%)抑制腫瘤生長，其中該人類IgG抗體在NSCLC異種移植物分析中係以與該抗-hEGFR抗體或其抗原結合部分相同之劑量及頻率投與。

# 【發明圖式】

VH 結構域：

Ab1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSS

AbA EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISRDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYISYNGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTASRGFPYWGQGTLVTVSS

CDR1 CDR2 CDR3

VL 結構域：(Ab1 及 AbA 具有相同 VL 序列)

Ab1 DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIK

AbA DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIK

CDR1 CDR2 CDR3

【圖 1】

LC:
相同

DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGT
DYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC SEQ ID NO: 13

---

HC:
6 個胺基酸變化

Ab1 QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI
AbA EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSISRDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYISYNGNTRYQPSLKSRITI

Ab1 SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
AbA SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTASRGFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA

Ab1 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
AbA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

Ab1 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
AbA VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

Ab1 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
AbA GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT

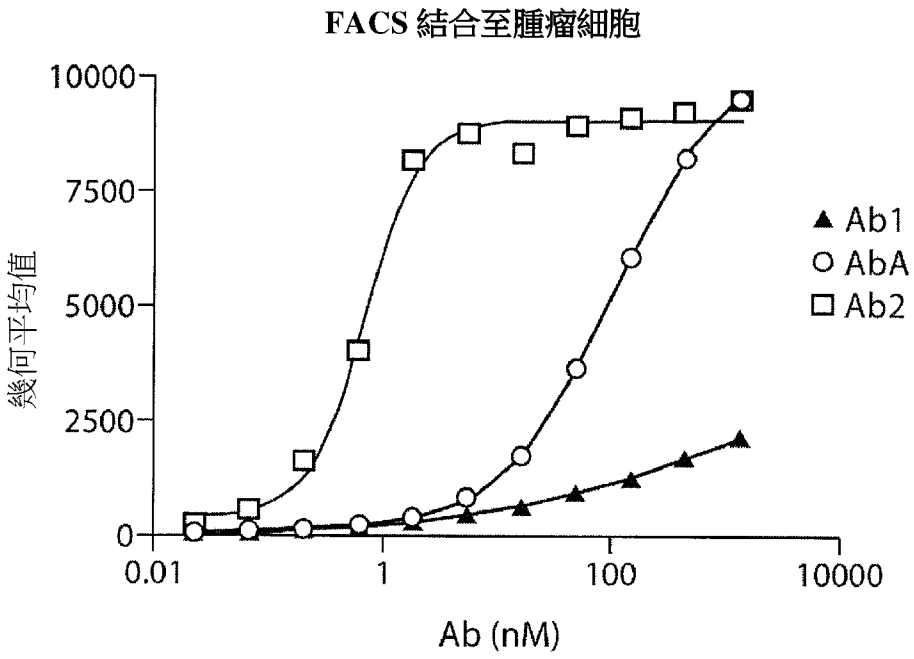
Ab1 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
AbA LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ

Ab1 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG SEQ ID NO: 14
AbA GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG SEQ ID NO: 15

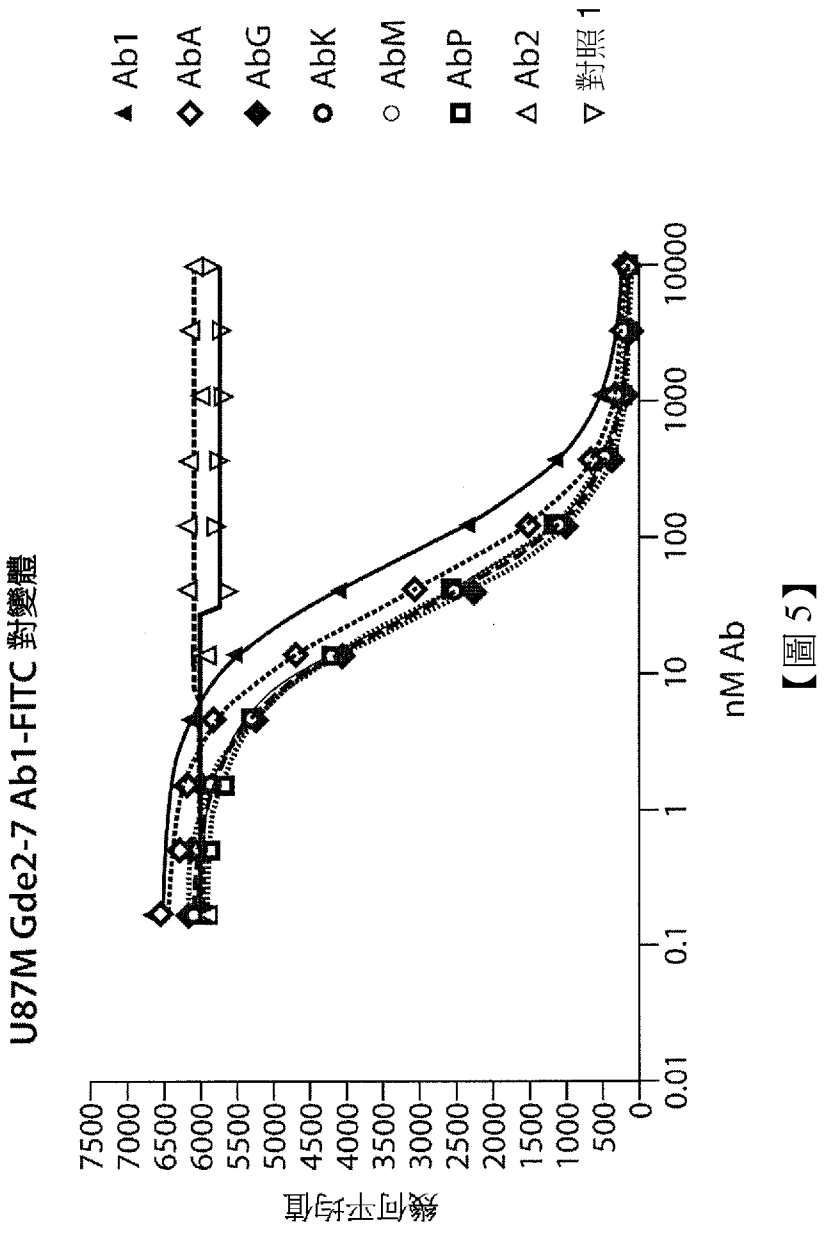
【圖 2】

| | EGFR (1-525) | | | | EGFRvIII | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mAb / DVD | $k_a$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$) | $k_d$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (M) | $K_D$比率 (Ab1/變體 Ab) | $k_a$ ($M^{-1}$ $s^{-1}$) | $k_d$ ($s^{-1}$) | $K_D$ (M) | $K_D$比率 (Ab1/變體 Ab) |
| Ab1 | 3.53E+03 | 8.02E-03 | 2.3E-06 | | 8.43E+04 | 7.93E-04 | 9.4E-09 | |
| Ab2 | 4.26E+05 | 1.71E-03 | 4.0E-09 | | 3.46E+06 | 1.32E-03 | 3.8E-10 | |
| AbK | 4.78E+03 | 7.92E-06 | 1.7E-09 | 1372.6 | 1.30E+05 | 7.75E-05 | 6.0E-10 | 15.8 |
| AbL | 5.65E+03 | 1.78E-05 | 3.1E-09 | 722.5 | 2.00E+05 | 6.95E-05 | 3.5E-10 | 27.1 |
| AbN | 4.84E+03 | 1.71E-05 | 3.5E-09 | 641.7 | 1.37E+05 | 1.03E-04 | 7.5E-10 | 12.5 |
| AbO | 5.25E+03 | 2.05E-05 | 3.9E-09 | 582.4 | 1.96E+05 | 5.22E-05 | 2.7E-10 | 35.2 |
| AbH | 7.90E+03 | 4.07E-05 | 5.2E-09 | 441.0 | 3.27E+05 | 4.89E-05 | 1.5E-10 | 63.1 |
| AbM | 3.84E+03 | 2.26E-05 | 5.9E-09 | 386.6 | 1.87E+05 | 1.18E-04 | 6.3E-10 | 14.9 |
| AbG | 6.80E+03 | 5.88E-05 | 8.6E-09 | 263.0 | 3.74E+05 | 7.44E-05 | 2.0E-10 | 47.2 |
| AbP | 3.58E+03 | 7.67E-05 | 2.1E-08 | 106.0 | 1.17E+05 | 1.35E-04 | 1.2E-09 | 8.2 |
| AbJ | 2.20E+03 | 8.27E-05 | 3.8E-08 | 60.5 | 3.18E+05 | 9.40E-05 | 3.0E-10 | 31.8 |
| AbB | 5.46E+03 | 1.19E-03 | 2.2E-07 | 10.5 | 7.83E+04 | 1.73E-04 | 2.2E-09 | 4.2 |
| AbA | 3.26E+03 | 7.31E-04 | 2.2E-07 | 10.1 | 7.61E+04 | 1.73E-04 | 2.3E-09 | 4.1 |
| AbF | 1.98E+03 | 8.31E-04 | 4.2E-07 | 5.4 | 8.36E+04 | 3.24E-04 | 3.9E-09 | 2.4 |
| AbD | 5.82E+03 | 3.22E-03 | 5.5E-07 | 4.1 | 1.41E+05 | 8.66E-04 | 6.1E-09 | 1.5 |
| AbE | 6.17E+03 | 3.67E-03 | 5.9E-07 | 3.8 | 1.93E+05 | 1.58E-03 | 8.2E-09 | 1.2 |
| AbC | 擬合較差，無動力學資訊 | | | | 2.20E+05 | 7.90E-04 | 3.6E-09 | 2.6 |

【圖 3】


FACS 結合至腫瘤細胞
10000
7500
5000
2500
0
幾何平均值
0.01
1
100
10000
Ab (nM)
Ab1
AbA
Ab2

【圖 4】

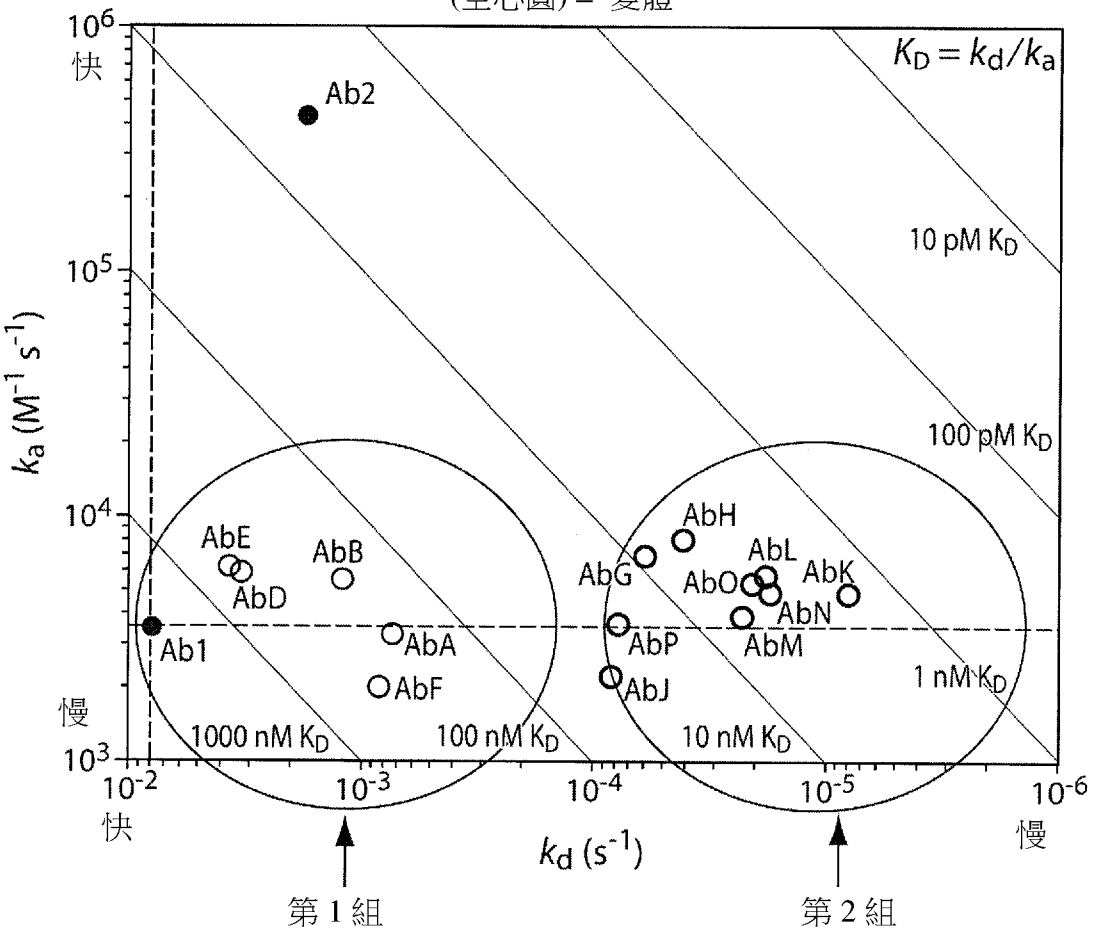

U87M Gde2-7 Ab1-FITC 對變體
幾何平均值
nM Ab
Ab1
AbA
AbG
AbK
AbM
AbP
Ab2
對照 1

【圖 5】

**EDFR (1-525)結合動力學**

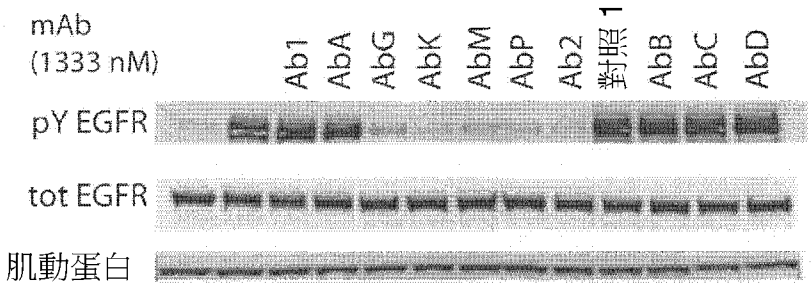
(實心圓) = Ab1 及 Ab2

(空心圓) = 變體



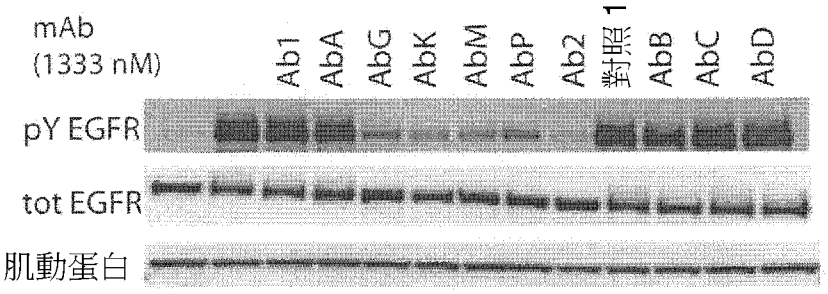

【圖 6】

SCC-15 (Ab1 敏感性)

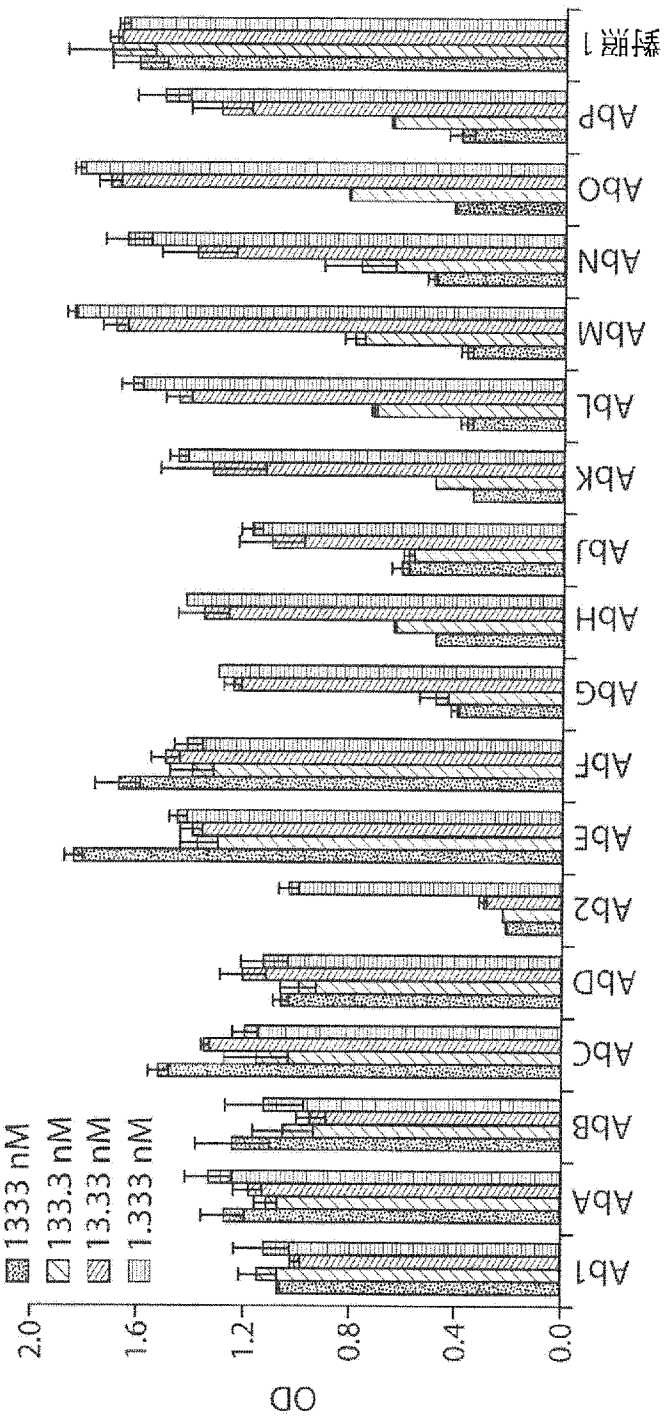



【圖 7A】

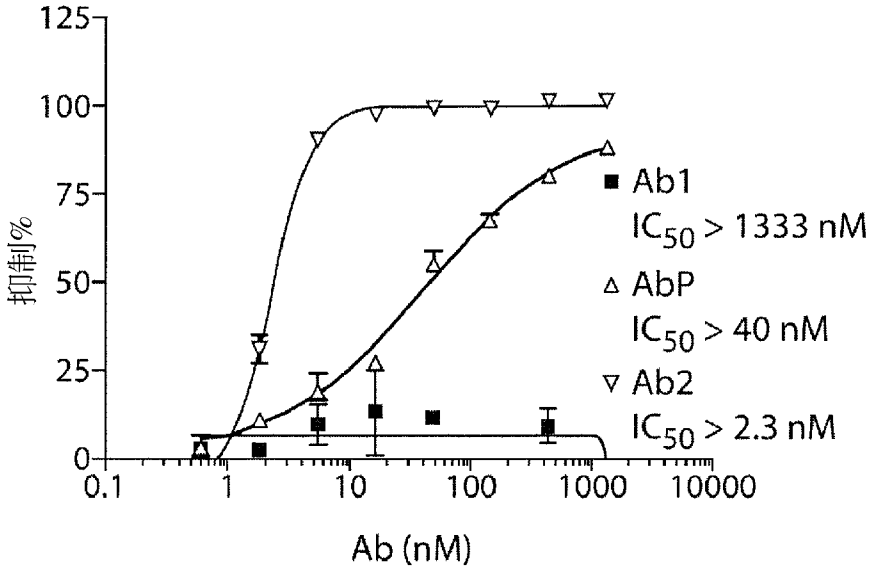
H292 (Ab1 抵抗性)



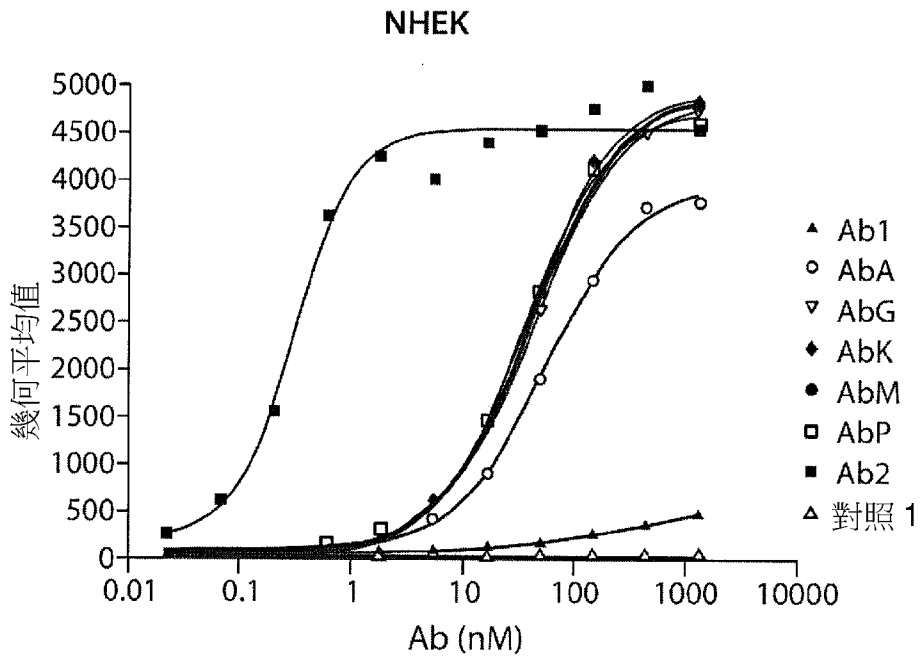

【圖 7B】


1333 nM
133.3 nM
13.33 nM
1.333 nM
OD
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
Ab1
AbA
AbB
AbC
AbD
Ab2
AbE
AbF
AbG
AbH
Abl
AbK
AbL
AbM
AbN
AbO
AbP
對照 1

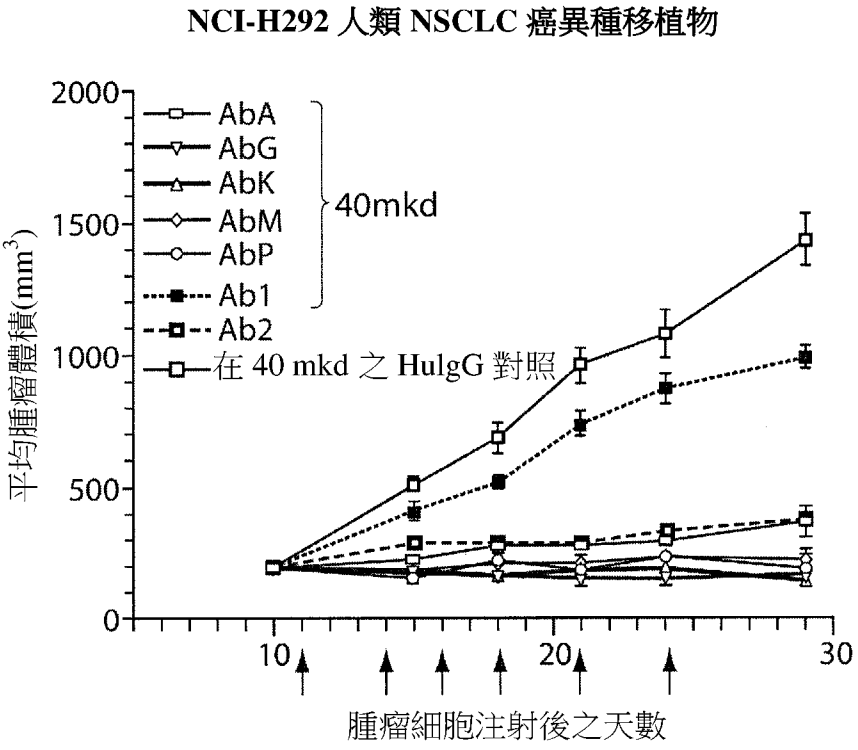
【圖 8A】


125
100
75
50
25
0
抑制%
0.1
1
10
100
1000
10000
Ab (nM)
Ab1
IC50 > 1333 nM
AbP
IC50 > 40 nM
Ab2
IC50 > 2.3 nM

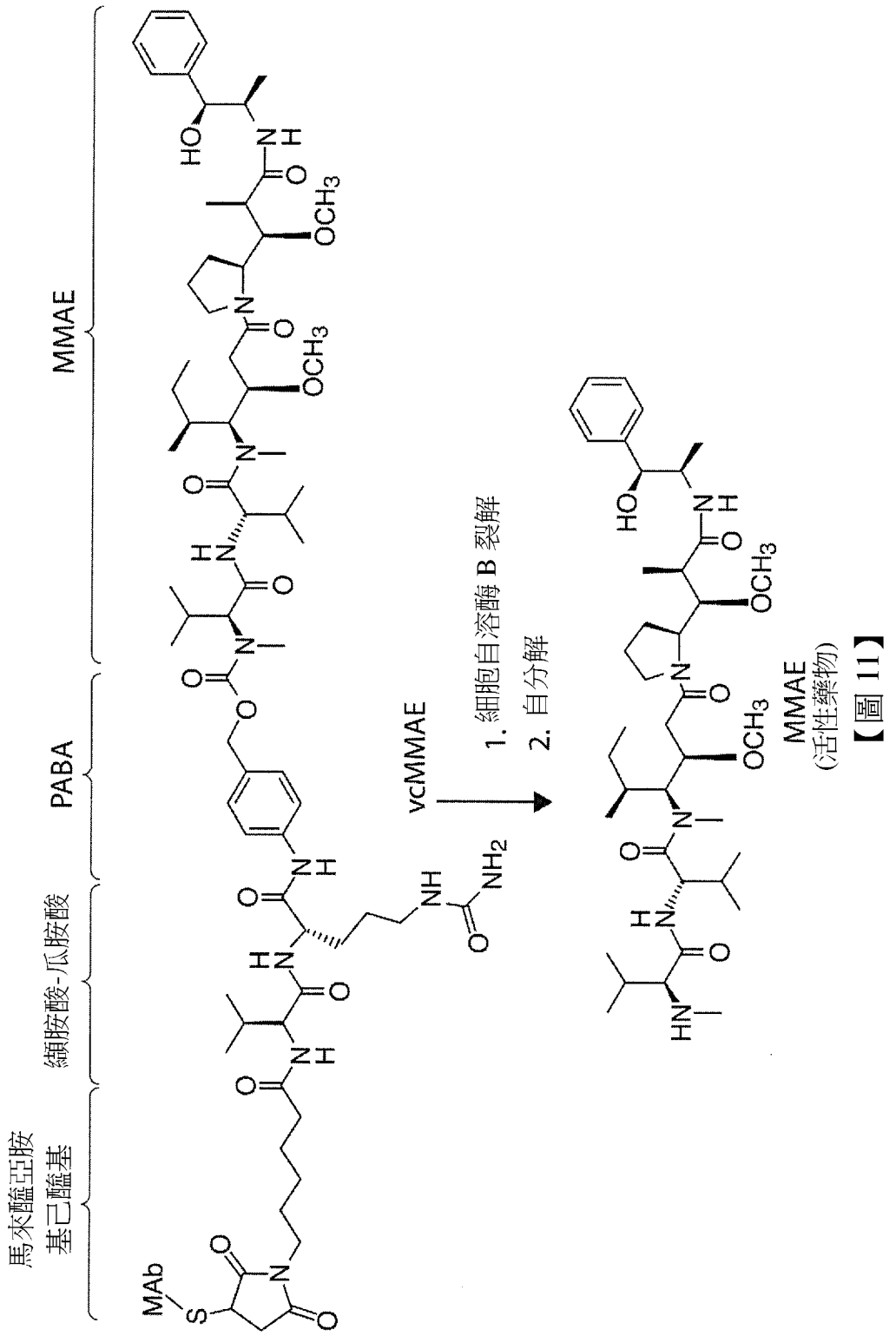
【圖 8B】


NHEK
幾何平均值
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Ab (nM)
Ab1
AbA
AbG
AbK
AbM
AbP
Ab2
對照 1

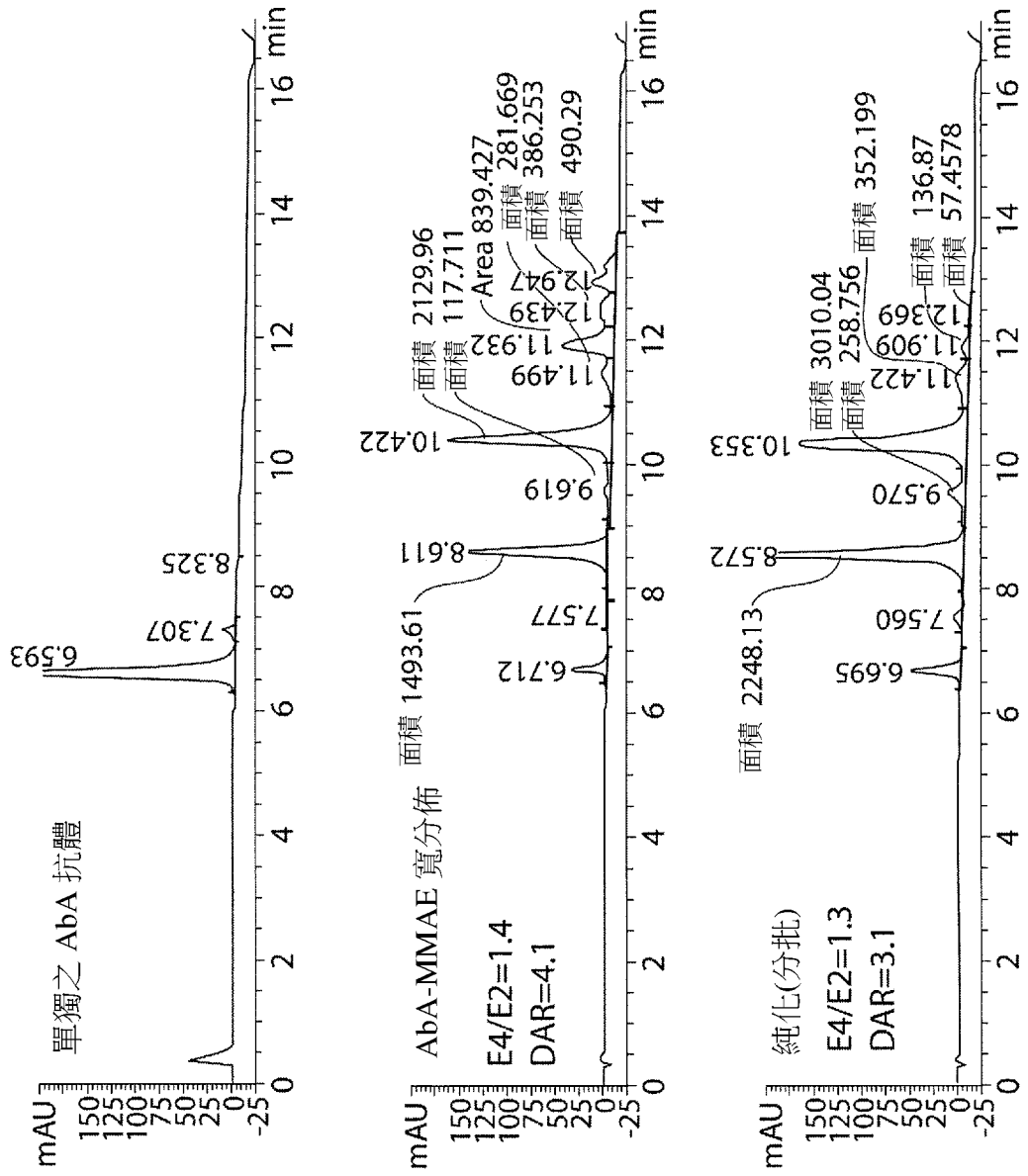
【圖 9】


NCI-H292 人類 NSCLC 癌異種移植物
2000
1500
1000
500
0
平均腫瘤體積(mm3)
AbA
AbG
AbK
AbM
AbP
Ab1
Ab2
40mkd
在 40 mkd 之 HulgG 對照
10
20
30
腫瘤細胞注射後之天數

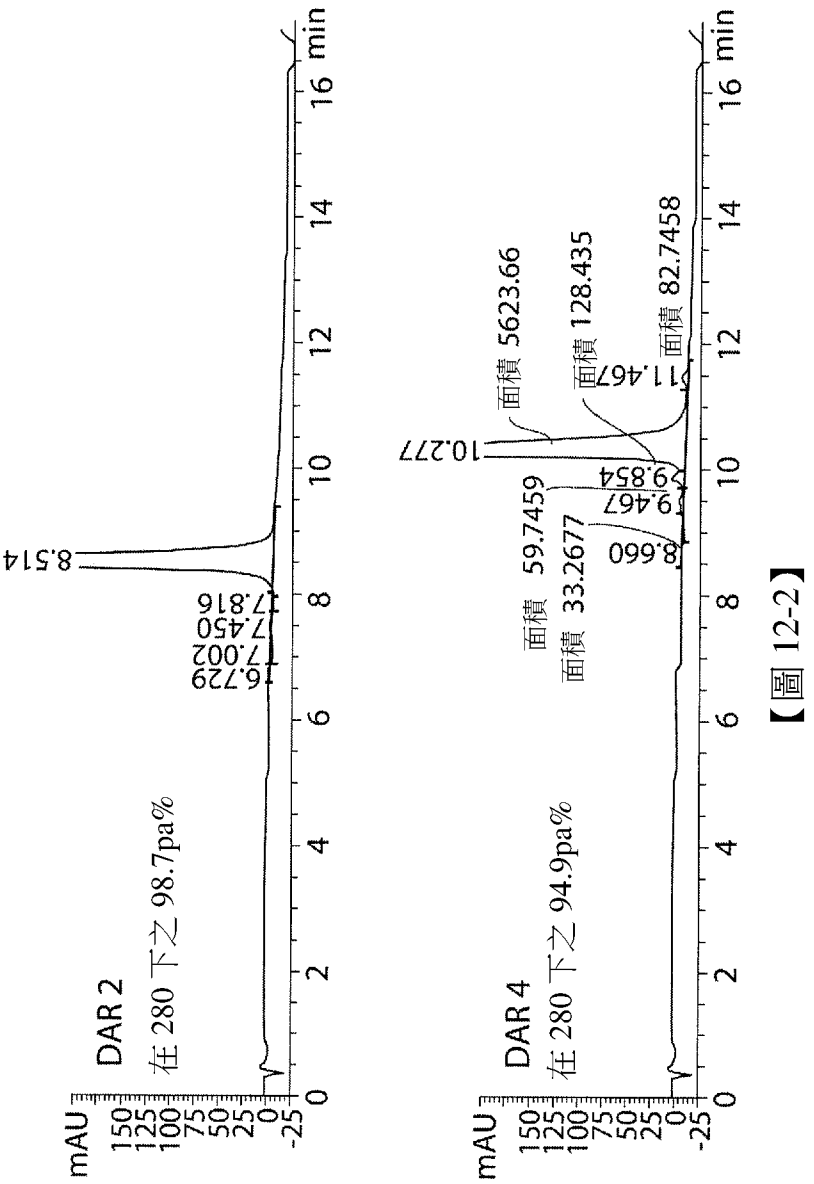
【圖 10】


馬來醯亞胺基己醯基
纈胺酸-瓜胺酸
PABA
MMAE
MAb
vcMMAE
1. 細胞自溶酶 B 裂解
2. 自分解
MMAE
(活性藥物)

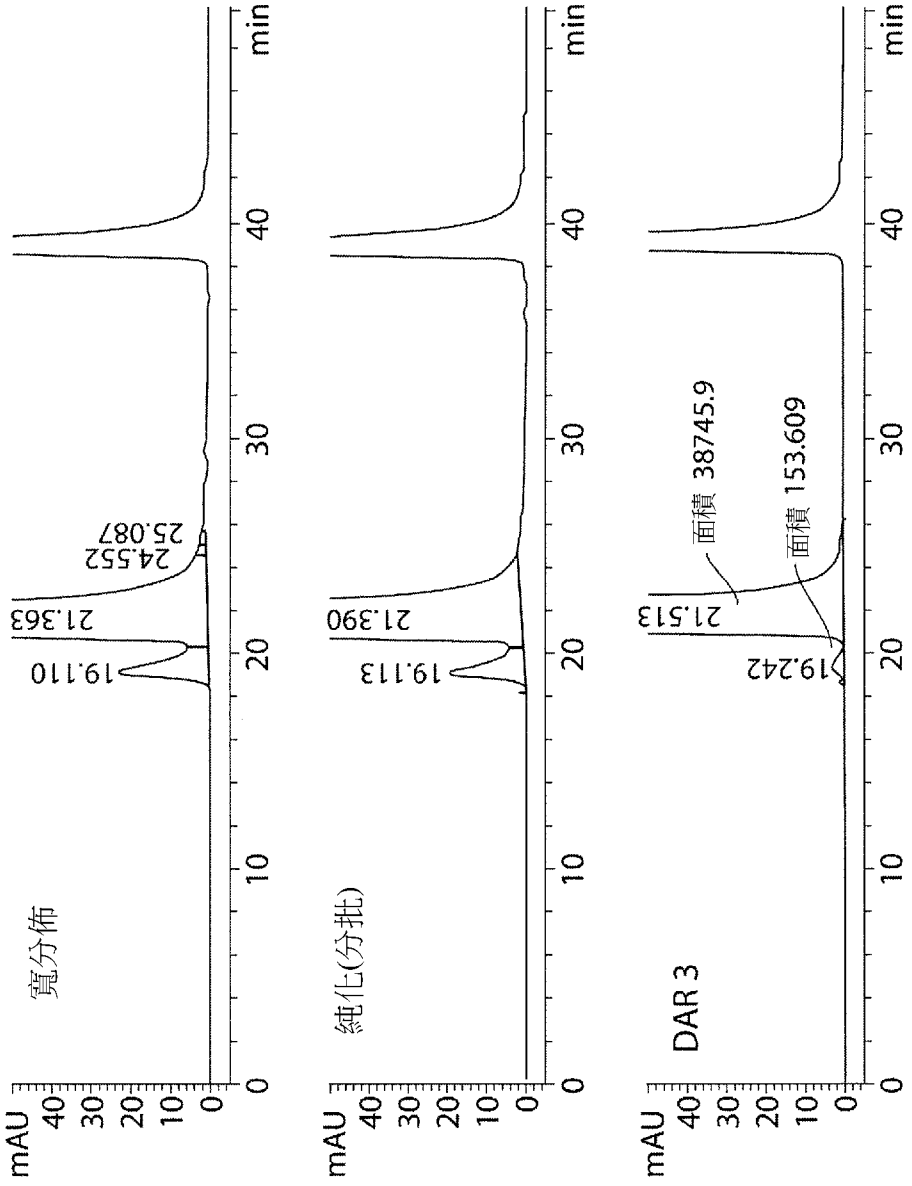
【圖 11】


單獨之 AbA 抗體
6.593
7.307
8.325
AbA-MMAE 寬分佈
面積 1493.61
E4/E2=1.4
DAR=4.1
6.712
7.577
8.611
9.619
10.422
11.499
11.932
12.439
12.947
面積 2129.96
面積 117.711
Area 839.427
面積 281.669
面積 386.253
面積 490.29
純化(分批)
面積 2248.13
E4/E2=1.3
DAR=3.1
6.695
7.560
8.572
9.570
10.353
11.422
11.909
12.369
面積 3010.04
面積 258.756
面積 352.199
面積 136.87
面積 57.4578
mAU
min

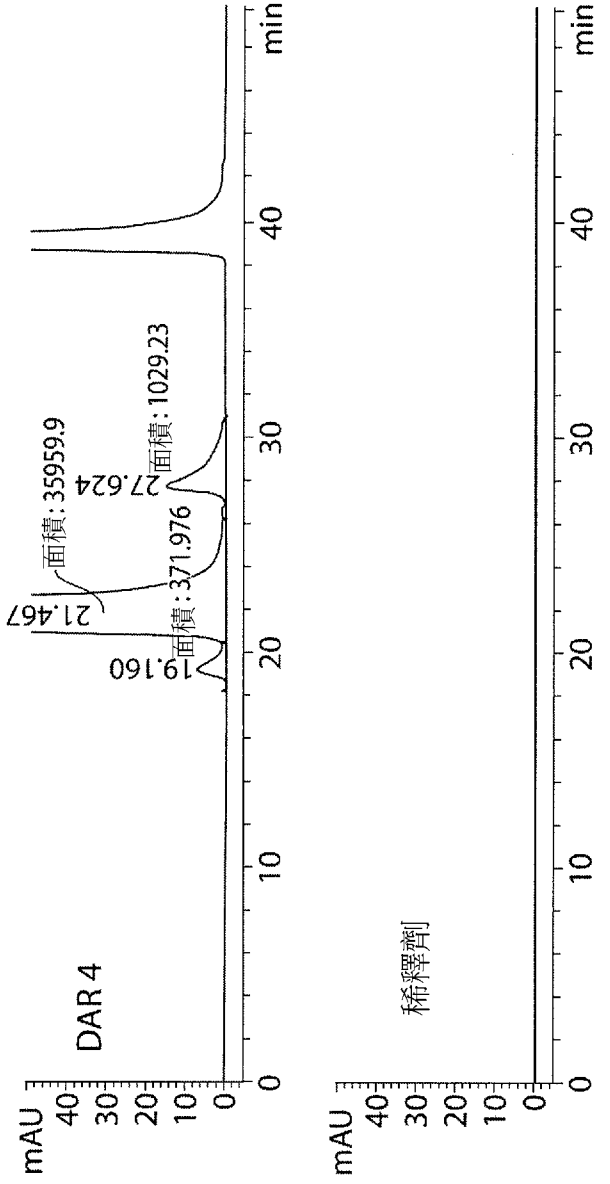
【圖 12-1】


DAR 2
在 280 下之 98.7pa%
mAU
150
125
100
75
50
25
0
-25
0
2
4
6
8
10
12
14
16 min
8.514
16.729
17.002
17.450
17.816
DAR 4
在 280 下之 94.9pa%
面積 59.7459
面積 33.2677
面積 5623.66
面積 128.435
面積 82.7458
8.660
9.467
9.854
10.277
11.467

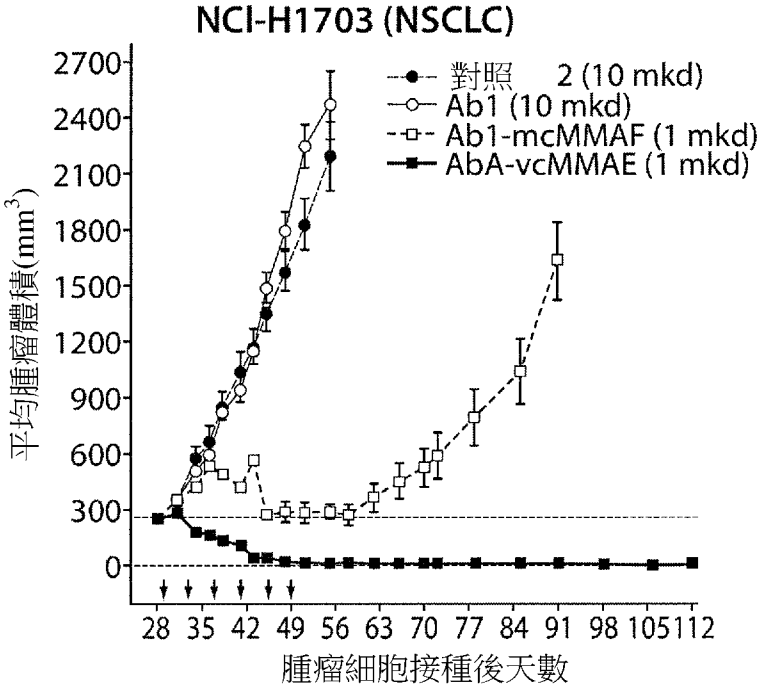
【圖 12-2】


寬分佈
mAU
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
min
19.110
21.363
24.552
25.087
純化(分批)
19.113
21.390
DAR 3
19.242
21.513
面積 153.609
面積 38745.9

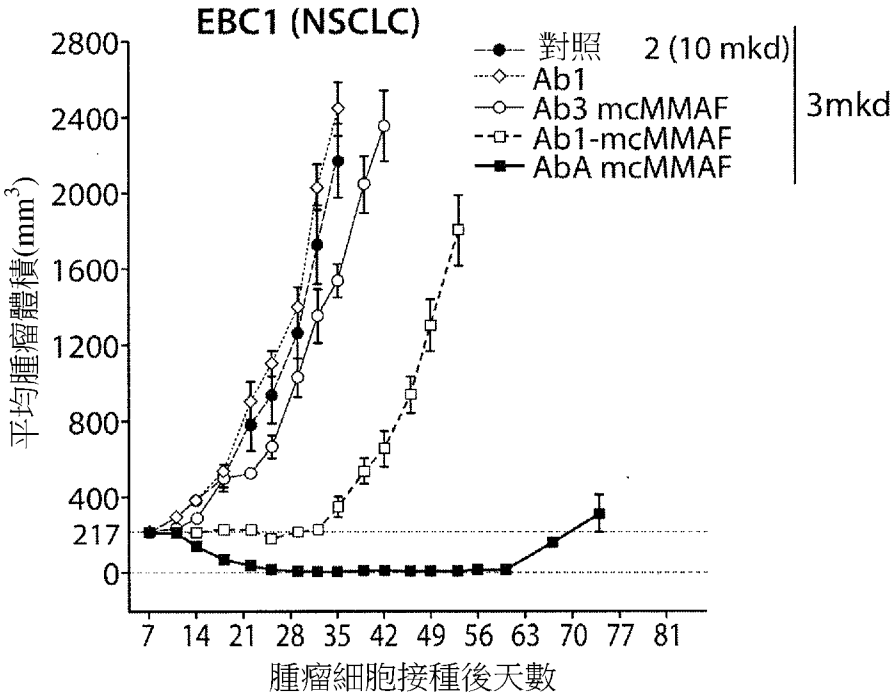
【圖 13-1】


DAR 4
mAU
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
min
19.160
面積:371.976
21.467
面積:35959.9
27.624
面積:1029.23
稀釋劑
mAU
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
min

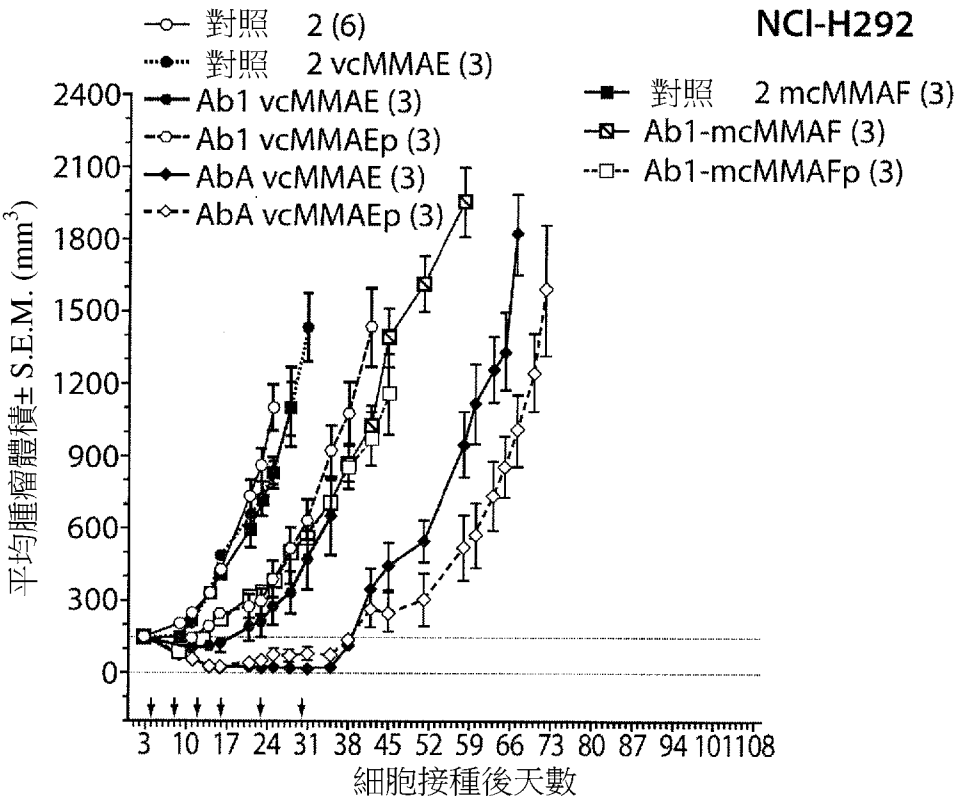
【圖 13-2】


NCI-H1703 (NSCLC)
對照 2 (10 mkd)
Ab1 (10 mkd)
Ab1-mcMMAF (1 mkd)
AbA-vcMMAE (1 mkd)
平均腫瘤體積(mm3)
2700
2400
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105 112
腫瘤細胞接種後天數

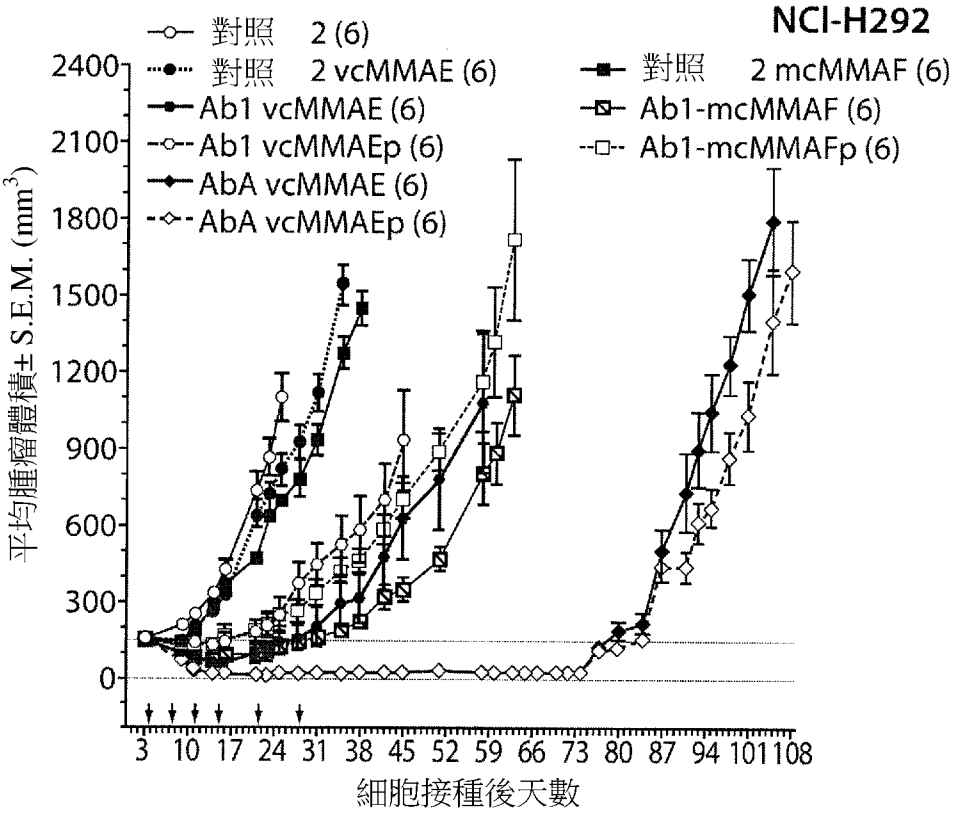
【圖 14A】


EBC1 (NSCLC)
對照 2 (10 mkd)
Ab1
Ab3 mcMMAF
Ab1-mcMMAF
AbA mcMMAF
3mkd
平均腫瘤體積(mm3)
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
217
0
7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 81
腫瘤細胞接種後天數

【圖 14B】

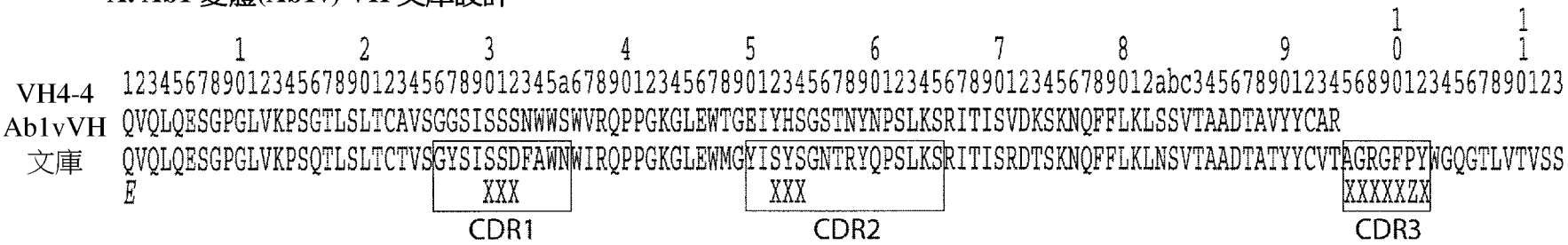

NCI-H292
對照 2 (6)
對照 2 vcMMAE (3)
Ab1 vcMMAE (3)
Ab1 vcMMAEp (3)
AbA vcMMAE (3)
AbA vcMMAEp (3)
對照 2 mcMMAF (3)
Ab1-mcMMAF (3)
Ab1-mcMMAFp (3)
平均腫瘤體積± S.E.M. (mm3)
2400
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
3 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101108
細胞接種後天數

【圖 15A】

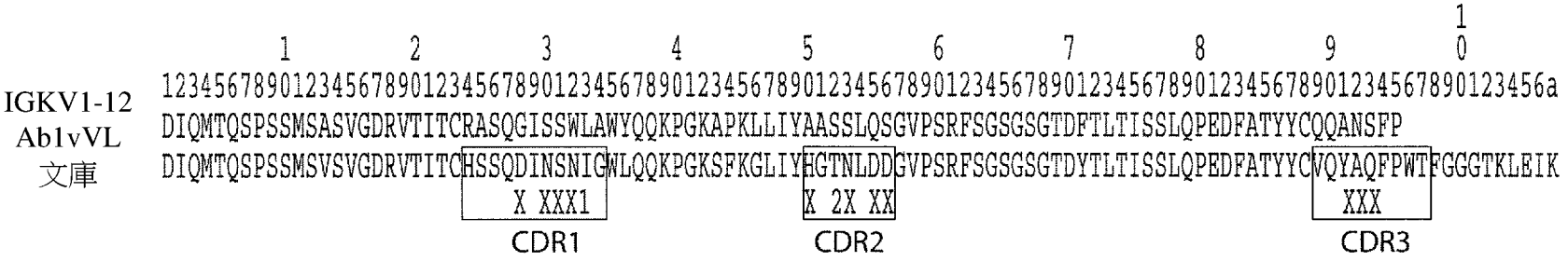

NCI-H292
對照 2 (6)
對照 2 vcMMAE (6)
Ab1 vcMMAE (6)
Ab1 vcMMAEp (6)
AbA vcMMAE (6)
AbA vcMMAEp (6)
對照 2 mcMMAF (6)
Ab1-mcMMAF (6)
Ab1-mcMMAFp (6)
平均腫瘤體積± S.E.M. (mm3)
2400
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
3 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101108
細胞接種後天數

【圖 15B】

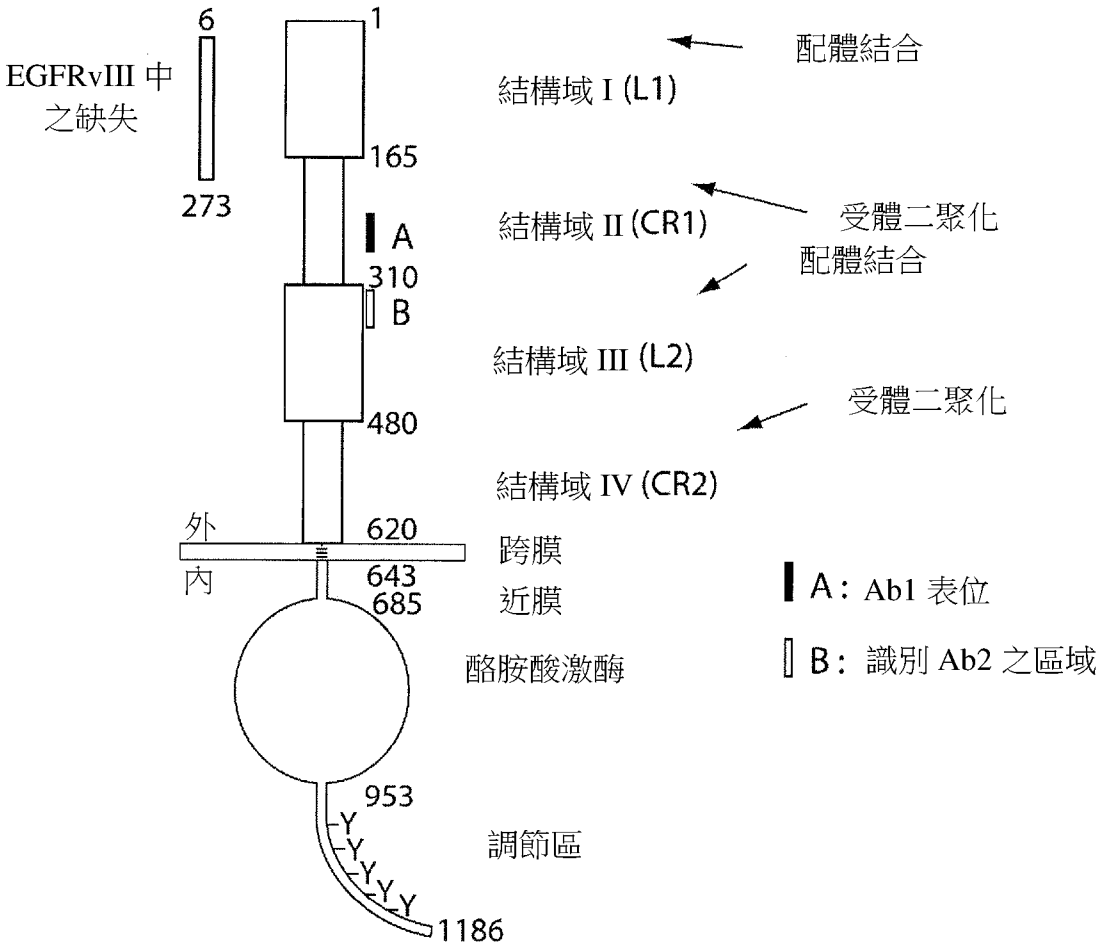
**A. Ab1 變體(Ab1v) VH 文庫設計**



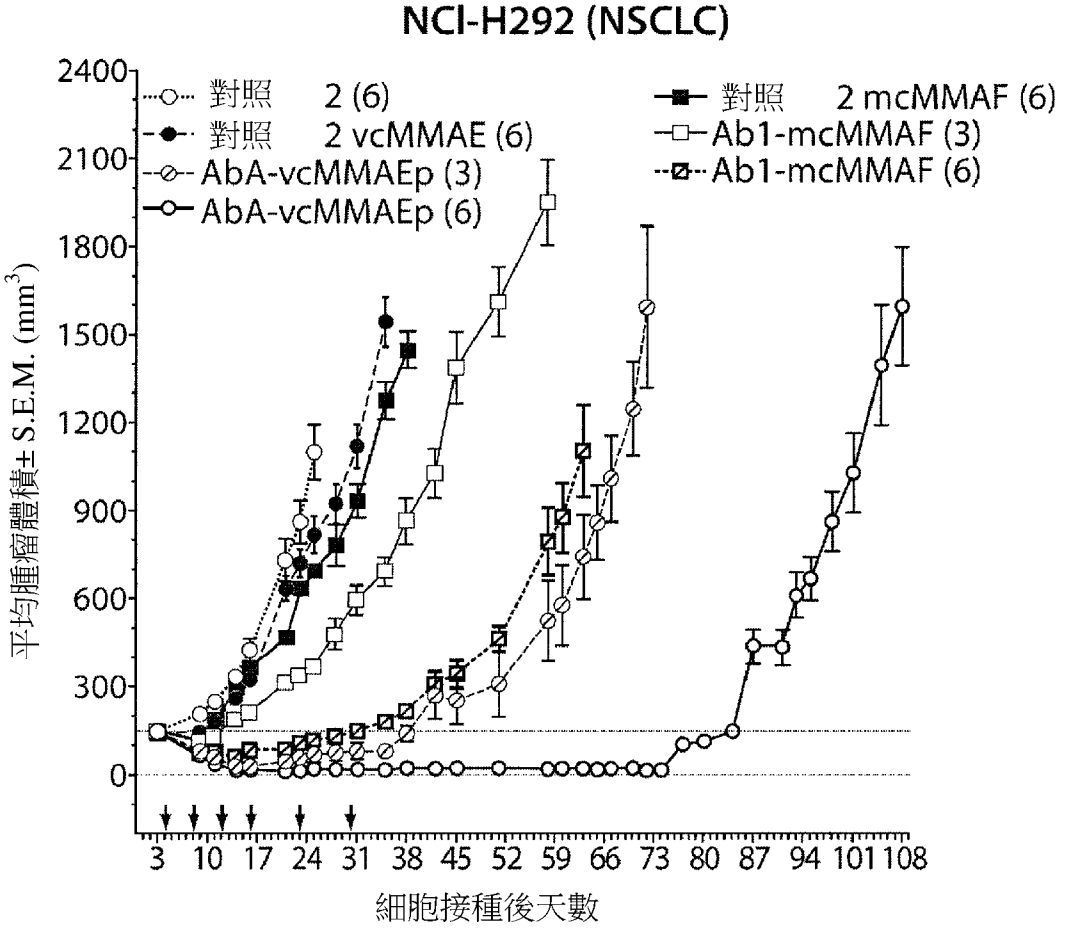

**B. Ab1 變體(Ab1v) VL 文庫設計**



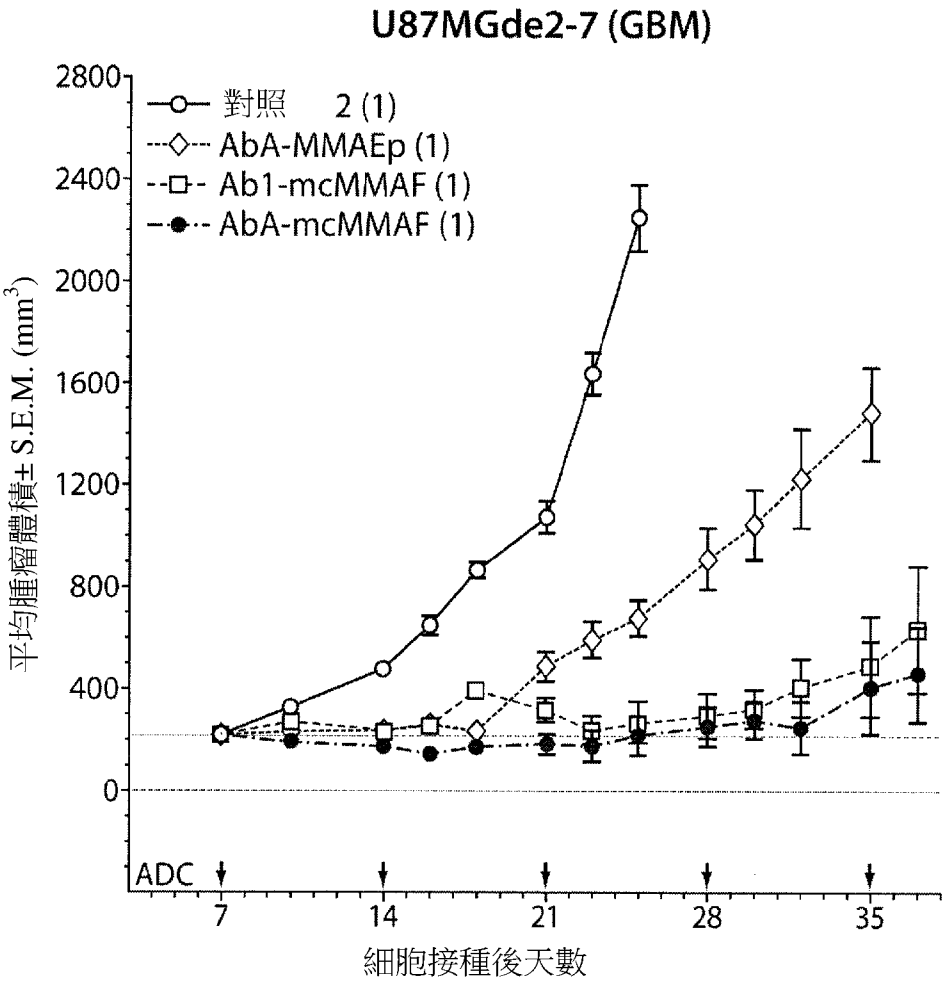

【圖 16】


6
1
EGFRvIII 中
之缺失
配體結合
結構域 I (L1)
165
273
A
結構域 II (CR1)
受體二聚化
配體結合
310
B
結構域 III (L2)
受體二聚化
480
結構域 IV (CR2)
外
620
跨膜
內
643
近膜
685
A：Ab1 表位
B：識別 Ab2 之區域
酪胺酸激酶
953
Y
Y
Y
Y
Y
調節區
1186

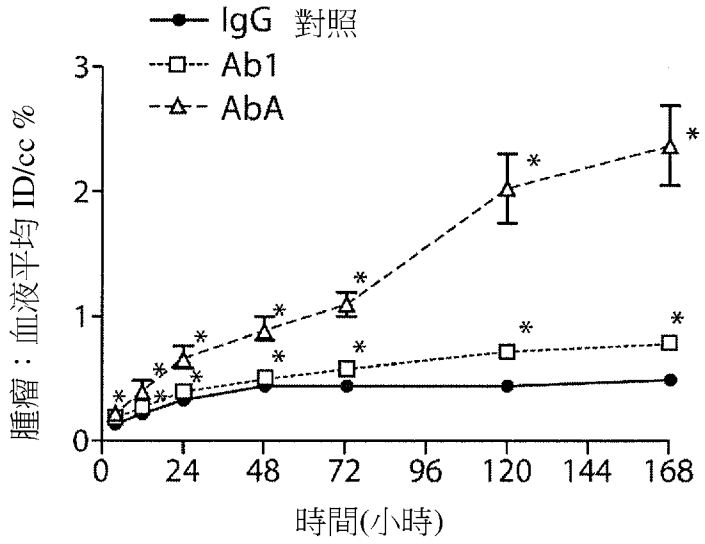
【圖 17】


NCI-H292 (NSCLC)
對照 2 (6)
對照 2 vcMMAE (6)
AbA-vcMMAEp (3)
AbA-vcMMAEp (6)
對照 2 mcMMAF (6)
Ab1-mcMMAF (3)
Ab1-mcMMAF (6)
平均腫瘤體積± S.E.M. (mm3)
2400
2100
1800
1500
1200
900
600
300
0
3 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108
細胞接種後天數

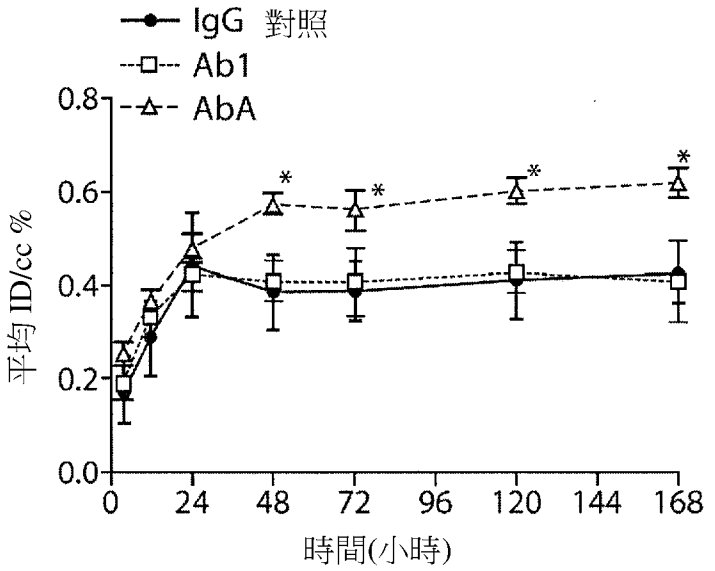
【圖 18】


U87MGde2-7 (GBM)
對照 2 (1)
AbA-MMAEp (1)
Ab1-mcMMAF (1)
AbA-mcMMAF (1)
平均腫瘤體積± S.E.M. (mm3)
2800
2400
2000
1600
1200
800
400
0
ADC
7
14
21
28
35
細胞接種後天數

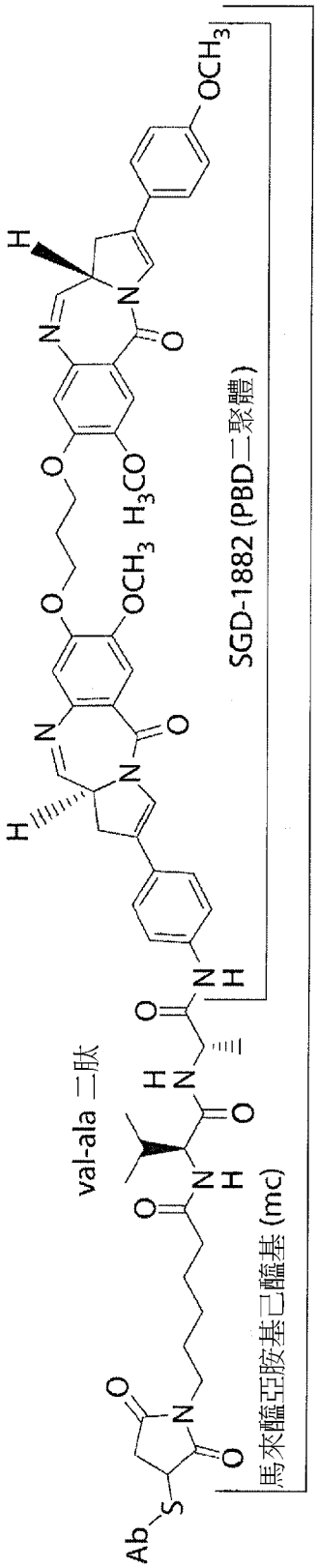
【圖 19】


IgG 對照
Ab1
AbA
腫瘤：血液平均 ID/cc %
3
2
1
0
0
24
48
72
96
120
144
168
時間(小時)

【圖 20A】


IgG 對照
Ab1
AbA
平均 ID/cc %
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
24
48
72
96
120
144
168
時間(小時)

【圖 20B】


SGD-1910
SGD-1882 (PBD二聚體)
馬來醯亞胺基己醯基 (mc)
val-ala 二肽
Ab
S
O
N
H
$H_3CO$
$OCH_3$

【圖 21】