



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I477513 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：100147190

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 19 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**C07K16/46 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**C07K5/027 (2006.01)**A61K47/48 (2006.01)**G01N33/574 (2006.01)**G01N33/68 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2010/12/20 美國

61/459,962

(71)申請人：建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72)發明人：丹尼斯 馬克 DENNIS, MARK (US)；史加勒斯 蘇沙那 J SCALES, SUZANNA J. (GB)；史潘瑟 蘇珊 D SPENCER, SUSAN D. (US)；章瑩 ZHANG, YIN (CN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2006/099141A2

WO 2009/045957A1

dependent cell-mediated cytotoxicity", Mol. Cancer Ther., 2009, Vol. 8, No. 5, p. 1113~1118.

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：55 項 圖式數：33 共 187 頁

(54)名稱

抗間皮素(MESOTHELIN)抗體及免疫接合物

ANTI-MESOTHELIN ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

(57)摘要

本發明提供抗間皮素(mesothelin)抗體及免疫接合物及其使用方法。

The invention provides anti-mesothelin antibodies and immunoconjugates and methods of using the same.

(無元件符號說明)

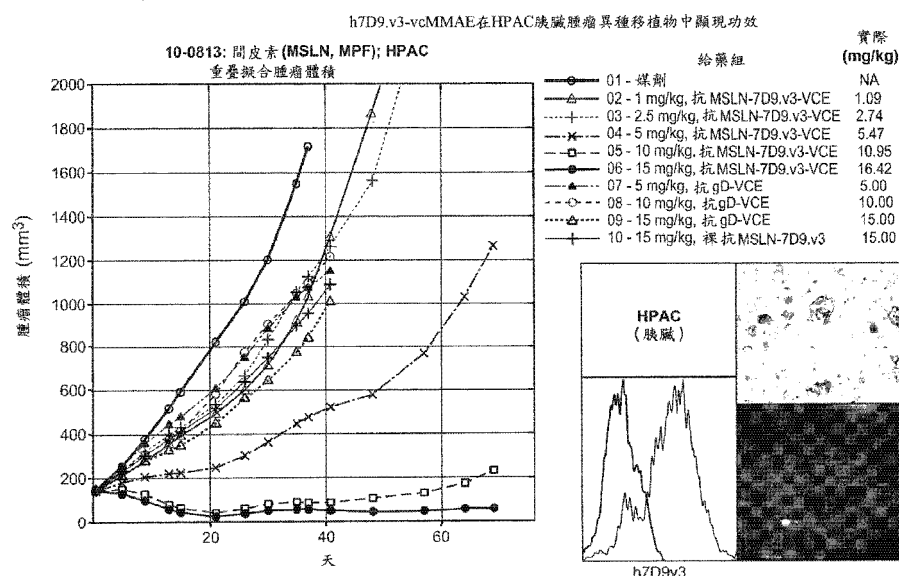
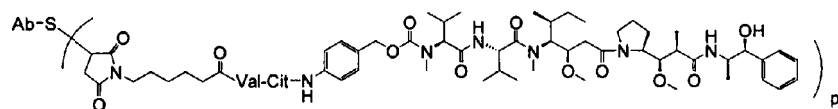


圖 26



## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗間皮素抗體及免疫接合物及其使用方法。

### 相關申請案

本申請案根據35 USC 119(e)主張2010年12月20日申請之美國臨時申請案第61/459962號之權益，該臨時申請案內容係以引用的方式併入本文中。

### 序列表

本申請案含有已經由EFS網路以ASCII格式提交之序列表，且以引用的方式全部併入本文中。該ASCII複本創建於2011年11月29日，命名為P4532R1.txt且大小為53,145個位元組。

### 【先前技術】

間皮素為一種細胞表面醣蛋白，其表現通常侷限於間皮(腹膜、心包膜及胸膜)。然而，間皮素在多種腫瘤類型中明顯過度表現。間皮素與先前鑑別為卵巢瘤抗原之黏蛋白樣醣蛋白MUC16(亦稱為CA125)相互作用。MUC16具有包含至少14,000個殘基且特徵為各156個胺基酸之串聯重複序列(稱為黏蛋白重複序列)之胞外域。(參見例如O'Brien等人，*Tumour Biol.* 22:348-366 (2001)；Yin等人，*J. Biol. Chem.* 276:27371-27375 (2001)。)咸信間皮素與MUC16之間的相互作用在異型細胞黏著及轉移中起作用。(參見例如Rump等人，*J. Biol. Chem.* 279:9190-9198 (2004)。)

間皮素作為71 kDa前驅蛋白合成，其成熟部分表現於細胞表面上。該前驅蛋白由弗林蛋白酶(furin)蛋白水解裂解為31 kDa脫落組分(稱為巨核細胞增強因子(megakaryocyte potentiating factor)或MPF)及40 kDa間皮素組分。後一組分可能經由GPI鍵聯仍與細胞表面締合，但可能亦經由蛋白水解機制脫落。

此項技術中存在對靶向間皮素用於診斷及治療間皮素相關病狀，諸如癌症之藥劑的需要。本發明滿足該需要且提供其他益處。

### 【發明內容】

本發明提供抗間皮素抗體及免疫接合物及其使用方法。

在一個態樣中，提供一種結合於間皮素之經分離抗體，其中該抗體係選自：(i)可與SEQ ID NO:43之包含E153及D174之抗原決定基結合，且視情況具有一或多個以下特徵的抗體：(a)不會降低與糖基化形式之間皮素的結合性；(b)不阻斷間皮素與MUC16結合；及(c)與間皮素之結合親和力 $\leq 5$  nM；(ii)可與SEQ ID NO:43之包含E211之抗原決定基結合，且視情況具有一或多個以下特徵的抗體：(a)不阻斷間皮素與MUC16結合；及(b)與間皮素之結合親和力 $\leq 5$  nM；及(iii)可與SEQ ID NO:43胺基酸1-131內之抗原決定基結合且與間皮素之結合親和力 $\leq 5$  nM的抗體。在某些實施例中，抗體為單株抗體。在某些實施例中，抗體為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。在某些實施例中，抗體為結合間皮素之抗體片段。在某些實施例中，間皮素為SEQ



ID NO:43之人類間皮素。

在某些實施例中，抗體包含：(a)(i)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-H3，(ii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-L3，及(iii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-H2；(b)(i)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3，(ii)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-L3，及(iii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H2；或(c)由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生之抗體的HVR-H3、HVR-L3及HVR-H2。在某些實施例中，抗體包含：(a)(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-H3；(b)(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3；或(c)由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生之抗體的HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3。在一個該種實施例中，抗體包含(a)(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-H2，(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-H3，(iv)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-L3；(b)(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H2，(iii)

包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3，(iv)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-L3；或(c)由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生之抗體的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3。在另一個實施例中，抗體包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-H2，(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-H3，(iv)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-L3，且進一步包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含SEQ ID NO:25之構架FR2序列及SEQ ID NO:27之FR3序列。

在某些實施例中，抗體包含(a)(i)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L1，(ii)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L2，及(iii)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-L3；(b)(i)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L1，(ii)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L2，及(iii)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-L3；或(c)由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生之抗體的HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3。在一個該種實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L1、包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L2、及包含SEQ

ID NO:19之胺基酸序列的HVR-L3，且進一步包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含SEQ ID NO:25之構架FR2序列及SEQ ID NO:27之FR3序列。

在某些實施例中，抗體包含(a)與SEQ ID NO:8之胺基酸序列具有至少95%序列一致性的VH序列；(b)與SEQ ID NO:4之胺基酸序列具有至少95%序列一致性的VL序列；(c)如(a)中之VH序列及如(b)中之VL序列；(d)與SEQ ID NO:16具有至少95%序列一致性的VH序列；(e)與SEQ ID NO:12之胺基酸序列具有至少95%序列一致性的VL序列；(f)如(d)中之VH序列及如(e)中之VL序列；(g)與由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH序列的胺基酸序列具有至少95%序列一致性的VH序列；(h)與由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VL序列的胺基酸序列具有至少95%序列一致性的VL序列；或(i)如(g)中之VH序列及如(h)中之VL序列。在一個該種實施例中，抗體包含SEQ ID NO:8之VH序列、SEQ ID NO:16之VH序列、或由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH序列。在另一個該種實施例中，抗體包含SEQ ID NO:4之VL序列、SEQ ID NO:12之VL序列、或由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VL序列。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含(a)SEQ ID NO:8之VH序列及SEQ ID NO:4之VL序列；(b)SEQ ID NO:16之VH序列及SEQ ID NO:12之VL序列；(c)由具有

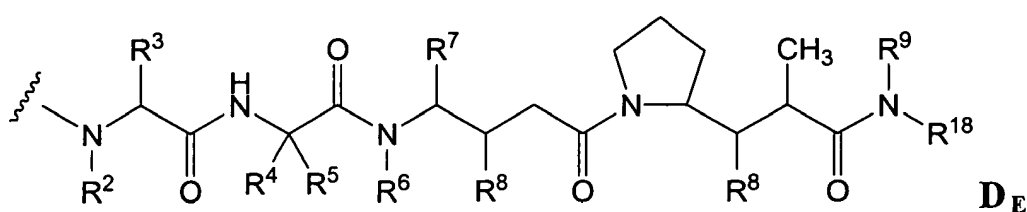
ATCC 寄存編號 PTA-11464 之融合瘤 19C3 所產生抗體之 VH 序列及 VL 序列；或 (d) 由具有 ATCC 寄存編號 PTA-11464 之融合瘤 19C3 所產生之抗體。

在某些實施例中，任一上述實施例之抗體為 IgG1、IgG2a 或 IgG2b 抗體。

在另一個態樣中，本發明提供一種經分離核酸，其編碼任一上述實施例之抗體。在一個實施例中，提供一種包含該核酸之宿主細胞。在另一個實施例中，提供一種產生抗體之方法，該方法包含培養該宿主細胞以使得該抗體產生。

在另一個態樣中，提供一種具有式 Ab-(L-D)<sub>p</sub> 之免疫接合物，其中：

- (a) Ab 為如任一上述實施例之抗體；
- (b) L 為連接子；
- (c) D 為式 D<sub>E</sub> 之藥物，

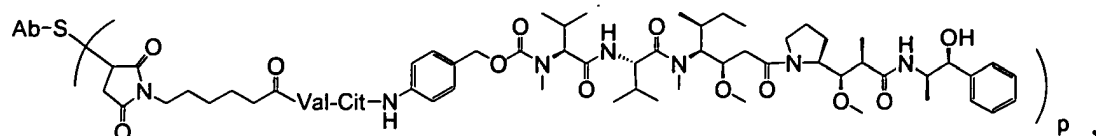


且其中 R<sup>2</sup> 及 R<sup>6</sup> 各為甲基，R<sup>3</sup> 及 R<sup>4</sup> 各為異丙基，R<sup>5</sup> 為 H，R<sup>7</sup> 為第二丁基，各 R<sup>8</sup> 獨立地選自 CH<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、OH 及 H；R<sup>9</sup> 為 H；且 R<sup>18</sup> 為 -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-芳基；及

- (d) p 介於 1-8 範圍內。

在一個實施例中，該藥物為奧利斯坦汀(auristatin)。在一個該種實施例中，該藥物為MMAE。在另一個實施例中，該連接子可由蛋白酶裂解。在一個該種實施例中，該連接子包含val-cit二肽。

在另一個實施例中，該免疫接合物具有下式：



其中S為硫原子。在一個該種實施例中，p介於2-5範圍內。在另一個該種實施例中，該抗體包含(i)包含SEQ ID NO:20之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:21之胺基酸序列的HVR-H2，(iii)包含SEQ ID NO:22之胺基酸序列的HVR-H3，(iv)包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:19之胺基酸序列的HVR-L3。在另一個該種實施例中，該抗體包含(i)包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列的HVR-H2，(iii)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的HVR-H3，(iv)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列的HVR-L1，(v)包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列的HVR-L2，及(vi)包含SEQ ID NO:35之胺基酸序列的HVR-L3。在另一個該種實施例中，該抗體包含(a)SEQ ID NO:8之VH序列及SEQ ID NO:4之VL序列。在另一個該種實施例中，該抗體包含(b)SEQ ID NO:16之VH序列及SEQ ID NO:12之VL序列。

在另一個態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其包含如任一上述實施例中之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。在一個實施例中，該醫藥調配物進一步包含其他治療劑。在一個該種實施例中，該其他治療劑為吉西他濱(gemcitabine)。在另一個該種實施例中，該其他治療劑為與細胞毒性劑接合之抗MUC16抗體。

在另一個態樣中，本發明提供一種如任一上述實施例中之免疫接合物，其適用作藥物。在某些實施例中，本發明提供一種如任一上述實施例中之免疫接合物，其係用於治療間皮素陽性癌症。在一個該種實施例中，該間皮素陽性癌症係選自胰臟癌、卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌及間皮瘤。在另一個該種實施例中，該間皮素陽性癌症為雙陽性癌症。

在另一個態樣中，本發明提供一種如任一上述實施例中之免疫接合物之用途，其係用於製造藥物。在一個實施例中，該藥物係用於治療間皮素陽性癌症。在一個該種實施例中，該間皮素陽性癌症係選自胰臟癌、卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌及間皮瘤。在另一個該種實施例中，該間皮素陽性癌症為雙陽性癌症。

在另一個態樣中，提供一種治療患有間皮素陽性癌症之個體的方法，該方法包含向該個體投與有效量之如任一上述實施例中之免疫接合物。在一個實施例中，該間皮素陽性癌症係選自胰臟癌、卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌及間皮瘤。在另一個實施例中，該間皮素陽性癌症為雙陽性癌

症。在另一個實施例中，該方法進一步包含向該個體投與其他治療劑。在一個該種實施例中，該其他治療劑為吉西他濱。在另一個該種實施例中，該其他治療劑為與細胞毒性劑接合之抗MUC16抗體。

在另一個態樣中，提供一種抑制間皮素陽性細胞增殖之方法，該方法包含在允許免疫接合物與該細胞表面上之間皮素結合的條件下，使該細胞暴露於該免疫接合物，由此抑制該細胞增殖。在一個實施例中，該細胞為胰臟細胞、卵巢細胞、肺細胞、間皮瘤細胞或子宮內膜細胞。在另一個實施例中，該細胞為雙陽性細胞。

在另一個態樣中，本發明提供一種如任一上述實施例中之抗體，其中該抗體係與標記接合。在一個實施例中，該標記為正電子發射體。在一個該種實施例中，該正電子發射體為 $^{89}\text{Zr}$ 。

在另一個態樣中，提供一種偵測生物檢體中之人類間皮素的方法，該方法包含在允許如任一上述實施例中之抗間皮素抗體與天然存在之人類間皮素結合的條件下，使該生物檢體與該抗間皮素抗體接觸，及偵測該抗間皮素抗體與該生物檢體中天然存在之人類間皮素之間是否形成複合物。在一個實施例中，該抗間皮素抗體包含(a)由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3；(b)由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH序列及VL序列；或(d)由具有ATCC寄存編

號PTA-11464之融合瘤19C3所產生之抗體。在另一個實施例中，該生物檢體為胰臟癌檢體、卵巢癌檢體、肺癌檢體、子宮內膜癌檢體或間皮瘤檢體。在另一個實施例中，該方法包含對組織切片進行免疫組織化學。在另一個實施例中，該生物檢體為血清。

在另一個態樣中，提供一種偵測間皮素陽性癌症之方法，該方法包含向患有或疑似患有間皮素陽性癌症之個體投與經標記之抗間皮素抗體，其中該抗間皮素抗體係如任一上述實施例中所述，及偵測該個體中該經標記之抗間皮素抗體，其中偵測到該經標記之抗間皮素抗體表明該個體患有間皮素陽性癌症。在一個實施例中，該經標記之抗間皮素抗體包含與正電子發射體接合之抗間皮素抗體。在一個該種實施例中，該正電子發射體為 $^{89}\text{Zr}$ 。

## 【實施方式】

### I. 定義

出於本文之目的，「受體人類構架」為包含來源於如下文所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之受體人類構架可包含其相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化的數目為10個或10個以下、9個或9個以下、8個或8個以下、7個或7個以下、6個或6個以下、5個或5個以下、4個或4個以下、3個或3個以下、或2個或2個以下。在一些實施例中，VL受體



人類構架之序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

「親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間非共價相互作用的總強度。除非另作指示，否則如本文所用之「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所述之方法)量測親和力。量測結合親和力之具體說明性及例示性實施例描述於下文中。

「親和力成熟」抗體係指在一或多個高變區(HVR)中具有一或多個變化之抗體，與不具有該等變化之親本抗體相比，該等變化使得抗體對抗原之親和力改良。

術語「抗間皮素抗體」及「結合於間皮素之抗體」係指能夠以足夠親和力結合間皮素之抗體，使得該抗體適用作靶向間皮素之診斷劑及/或治療劑。在一個實施例中，如例如藉由放射免疫分析法(RIA)所量測，抗間皮素抗體與不相關非間皮素蛋白結合的程度小於該抗體與間皮素結合之約10%。在某些實施例中，結合於間皮素之抗體具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 $10^{-8} \text{ M}$ 或 $10^{-8} \text{ M}$ 以下，例如 $10^{-8} \text{ M}$ 至 $10^{-13} \text{ M}$ ，例如 $10^{-9} \text{ M}$ 至 $10^{-13} \text{ M}$ )之解離常數(Kd)。在某些實施例中，抗間皮素抗體結合於在不同物種之間皮素間保守的間皮素抗原決定基。

術語「抗體」在本文中以最廣泛含義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需抗原結合活性即可。

「抗體片段」係指包含完整抗體之一部分且結合完整抗體所結合之抗原的不同於完整抗體的分子。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；雙功能抗體；線抗體；單鏈抗體分子(例如 scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

與參考抗體「結合於相同抗原決定基之抗體」係指在競爭分析法中使參考抗體與其抗原之結合受到50%或50%以上阻斷之抗體，且反之，參考抗體在競爭分析法中使該抗體與其抗原之結合受到50%或50%以上阻斷。本文提供例示性競爭分析法。

術語「癌」及「癌的」係指或描述哺乳動物中通常以不受控制的細胞生長/增殖為特徵的生理性病狀。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma))、母細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、神經膠質瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌、白血病

及其他淋巴組織增生性病變，以及各種類型之頭頸癌。

術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同來源或物種之抗體。

抗體「類別」係指由其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。存在五個主要類別之抗體：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等者中之若干者可進一步分成亞類(同型)，例如IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及IgA<sub>2</sub>。對應於不同類別免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 。

如本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞的物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同位素(例如At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如甲胺喋呤、阿黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(vinca alkaloids)(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、小紅莓(doxorubicin)、美法倫(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他嵌入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如核分解酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體；及下文所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。

術語「雙陽性癌症」係指包含同時呈間皮素陽性及MUC16陽性之細胞的癌症。

術語「雙陽性細胞」係指在其表面上表現間皮素及MUC16兩者之細胞。

「效應功能」係指彼等可歸因於抗體Fc區之生物活性，其隨抗體同型而變化。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細胞活化。

藥劑(例如醫藥調配物)之「有效量」係指在所需劑量下且維持所需時段有效達成所要治療性或預防性結果的量。

術語「抗原決定基」係指抗原分子上由抗體所結合之特定定位點。

術語「Fc區」在本文中用以定義含有至少一部分恆定區之免疫球蛋白重鏈的C端區。該術語包括原生序列Fc區及變異體Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至該重鏈之羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)可能存在或可能不存在。除非本文中另外指定，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基的編號根據EU編號系統，亦稱為EU索引，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991中所述。

「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基以外之可變域殘基。可變域之FR一般由4個FR域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般出現在以下序列之

VH(或VL)中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用以指代具有實質上類似於原生抗體結構之結構或具有含有如本文所定義之Fc區之重鏈的抗體。

術語「間皮素之糖基化形式」係指在轉譯後藉由添加碳水化合物殘基修飾之間皮素之天然存在之形式。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用，且係指已引入有外源性核酸之細胞，包括該等細胞之子代。宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括初級轉型細胞及由其產生之子代(與繼代數目無關)。子代之核酸內容物可能不與母細胞完全一致，而可能含有突變。具有與在原始轉型細胞中所篩選或選擇相同的功能或生物活性之突變體子代包括於本文中。

「人類抗體」為具有與由人類或人類細胞產生或來源於利用人類抗體譜或其他人類抗體編碼序列之非人類來源之抗體的胺基酸序列相對應之胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共同構架」為代表所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常出現之胺基酸殘基的構架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。序列之亞群一般為如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第五版，NIH公開案91-3242，Bethesda MD (1991)，第1-3卷中之亞群。在一個實施例

中，對於VL，亞群為如Kabat等人(同上文)中之亞群κI。  
 在一個實施例中，對於VH，亞群為如Kabat等人(同上文)中之亞群III。

「人類化」抗體係指包含非人類HVR之胺基酸殘基及人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含實質上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或實質上所有HVR(例如CDR)對應於非人類抗體之HVR，且所有或實質上所有FR對應於人類抗體之FR。人類化抗體視情況可包含至少一部分來源於人類抗體之抗體恆定區。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經人類化之抗體。

如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指在序列上高變及/或形成結構上確定之環(「高變環」)之抗體可變域的每一區。原生四鏈抗體一般包含6個HVR；三個在VH中(H1、H2、H3)且三個在VL中(L1、L2、L3)。HVR一般包含來自高變環及/或來自「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，後者具有最高序列可變性及/或與抗原識別有關。例示性高變環出現在胺基酸殘基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)處。(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)。)例示性CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)出現在胺基酸殘基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35B(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)處。(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第

5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。)除VH中之CDR1之外，CDR一般包含形成高變環之胺基酸殘基。CDR亦包含「特異性決定殘基」或「SDR」，其為接觸抗原之殘基。SDR包含於CDR之區中，稱為縮寫 -CDR 或 a-CDR。例示性 a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2及a-CDR-H3)出現在胺基酸殘基 31-34(L1)、50-55(L2)、89-96(L3)、31-35B(H1)、50-58(H2)及 95-102(H3)處。(參見 Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)。)除非另外指明，否則HVR殘基及可變域中之其他殘基(例如FR殘基)在本文中根據Kabat等人(同上文)編號。

「免疫接合物」為與一或多種異源分子接合之抗體，該一或多種異源分子包括(但不限於)細胞毒性劑。

「個體」為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及齧齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中，個體為人類。

「經分離抗體」為已與其天然環境組分分離之抗體。在一些實施例中，抗體純化至如藉由例如電泳(例如SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電泳)或層析(例如離子交換或逆相HPLC)測定大於95%或99%的純度。關於評估抗體純度方法之評述，參見例如Flatman等人，*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

「經分離核酸」係指已與其天然環境組分分離之核酸分

子。經分離核酸包括含於通常含有核酸分子之細胞中之核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置。

「編碼抗間皮素抗體之經分離核酸」係指一或多種編碼抗體重鏈及輕鏈之核酸分子(或其片段)，包括單一載體或獨立載體中之該等核酸分子及存在於宿主細胞一或多個位置處之該等核酸分子。

如本文所用之術語「間皮素」係指由加工細胞中之間皮素前驅蛋白所產生之任何原生、成熟間皮素。除非另外指明，否則該術語包括任何脊椎動物來源之間皮素，脊椎動物來源包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類及食蟹獼猴)及齧齒動物(例如小鼠及大鼠)。該術語亦包括天然存在之間皮素變異體，例如剪接變異體或對偶基因變異體。例示性人類間皮素前驅蛋白之胺基酸序列展示於SEQ ID NO:42中，且例示性人類間皮素之胺基酸序列展示於SEQ ID NO:43中。其他例示性間皮素序列描述於本文中。

術語「間皮素陽性癌症」係指包含在其表面上表現間皮素之細胞的癌症。

術語「間皮素陽性細胞」係指在其表面上表現間皮素之細胞。

如本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上同源抗體群所獲得之抗體，亦即該群體所包含之個別抗體為相同的及/或結合相同抗原決定基，除了可能的變異抗體，例如含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間出現，該



等變異體一般以少量存在。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體之多株抗體製劑形成對比，單株抗體製劑之各單株抗體針對抗原上之單個決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體係自實質上同源之抗體群獲得的特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，欲用於本發明之單株抗體可藉由多種技術製造，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分之轉殖基因動物的方法，該等方法及用於製造單株抗體之其他例示性方法描述於本文中。

術語「MUC16陽性癌症」係指包含在其表面上表現MUC16之細胞的癌症。

術語「MUC16陽性細胞」係指在其表面上表現MUC16之細胞。

「裸抗體」係指不與異源部分(例如細胞毒性部分)或放射性標記接合之抗體。裸抗體可存在於醫藥調配物中。

「原生抗體」係指天然存在之具有變化結構的免疫球蛋白分子。舉例而言，天然IgG抗體為約150,000道爾頓之雜四聚醣蛋白，其由以雙硫鍵鍵結之兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈組成。自N端至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，繼之以三個恆定域(CH1、CH2及CH3)。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，繼之以恆定輕鏈(CL)域。抗體輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列而歸於兩

種類型(稱為 $\kappa$ 及 $\lambda$ )之一。

術語「藥品說明書」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用該等治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌症及/或警告之資訊。

相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且不將任何保守性取代視為序列一致性之一部分，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。可以此項技術內之多種方式，例如使用公開可得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體，達成比對以測定胺基酸序列一致性百分比。熟習此項技術者可確定適於比對序列之參數，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。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2來產生胺基酸序列一致性百分比值。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.創作且原始碼已與使用說明書一起在美國版權局(U.S. Copyright Office)(Washington D.C., 20559)存檔，其中其以美國版權登記號TXU510087登記。ALIGN-2程式可自Genentech, Inc.(South San Francisco, California)公開獲得，或可由原始碼編譯。ALIGN-2程式應經編譯用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變。

在採用 ALIGN-2 進行胺基酸序列比較之情況下，如下計算指定胺基酸序列 A 對、與、或相對於指定胺基酸序列 B 之胺基酸序列一致性%(或者可稱為指定胺基酸序列 A 具有或包含某一對、與、或相對於指定胺基酸序列 B 之胺基酸序列一致性%)：

$$100 \times \text{分數 } X/Y,$$

其中 X 為利用序列比對程式 ALIGN-2 對 A 與 B 進行比對時評為一致匹配的胺基酸殘基之數目，且其中 Y 為 B 中胺基酸殘基的總數。應瞭解，當胺基酸序列 A 之長度不等於胺基酸序列 B 之長度時，A 對 B 之胺基酸序列一致性%將不等於 B 對 A 之胺基酸序列一致性%。除非另外具體說明，否則本文中所有胺基酸序列一致性%值均為如上一段落中所述使用 ALIGN-2 電腦程式獲得。

術語「醫藥調配物」係指呈允許其中所含之活性成分的生物活性有效之形式的製劑，且其不含有對該調配物將投與之個體具有不可接受之毒性的其他組分。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分以外之成分，其對個體無毒性。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

如本文所用，「治療(treatment)」(及其文法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指試圖改變所治療個體之自然病程(natural course)且可出於預防目的或在臨床病理期間進行之臨床干預。所需治療效應包括(但不限於)預防疾病發生或復發、減緩症狀、削弱疾病之任

何直接或間接病理性結果、預防轉移、減小疾病進展速率、改善或減輕疾病病況、及症狀緩解或經改良之預後。在一些實施例中，本發明之抗體用於延緩疾病發展或減緩疾病進程。

術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中涉及於抗體與抗原結合之域。原生抗體之重鏈及輕鏈的可變域(分別為VH及VL)一般具有類似結構，其中各域包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。(參見例如 Kindt 等人，*Kuby Immunology*，第6版，W.H. Freeman and Co.，第91頁(2007)。)單一VH或VL域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用結合該抗原之抗體的VH或VL域分別篩選互補VL或VH域庫來分離。參見例如 Portolano 等人，*J. Immunol.* 150:880-887 (1993)；Clarkson 等人，*Nature* 352:624-628 (1991)。

如本文所用之術語「載體」係指能夠使與其連接之另一核酸增殖的核酸分子。該術語包括作為自體複製核酸結構之載體以及併入於其已引入之宿主細胞基因體中之載體。某些載體能夠引導其可操作性地連接之核酸之表現。該等載體在本文中稱為「表現載體」。

## II. 組合物及方法

在一個態樣中，本發明部分係基於結合於間皮素之抗體及包含該等抗體之免疫接合物。本發明之抗體及免疫接合物適用於例如診斷或治療間皮素陽性癌症。

### A. 例示性抗間皮素抗體

在一個態樣中，本發明提供結合於間皮素之經分離抗體。如圖1中所示，天然存在之間皮素由細胞中之間皮素前驅蛋白裂解而得，產生間皮素及巨核細胞增強因子(MPF)。間皮素較之前驅蛋白含有C端截斷。該截斷可允許GPI錨定物附著。間皮素可例如經由GPI錨定物保持與細胞表面締合，或間皮素可自細胞釋放(例如GPI錨定物可由至今未鑑別的酶裂解)以在細胞培養物或動物血清中產生脫落間皮素。

例示性天然存在之人類間皮素前驅蛋白序列提供於SEQ ID NO:42中，且相應間皮素序列展示於SEQ ID NO:43中(對應於SEQ ID NO:42之胺基酸296-580)。替代性間皮素序列對應於SEQ ID NO:42之胺基酸296-598。SEQ ID NO:44為天然存在之SEQ ID NO:42之變異體，其加工得到具有SEQ ID NO:45序列之間皮素。SEQ ID NO:45較之SEQ ID NO:43在胺基酸116處含有8個胺基酸插入。SEQ ID NO:45中所展示之間皮素的變異體形式似乎包含腫瘤細胞株中約5%之間皮素轉錄本。

在某些實施例中，抗間皮素抗體具有至少一或多個任意組合之以下特徵：

- (a) 結合於SEQ ID NO:43之包含(i)E153及D174或(ii)E211之抗原決定基；
- (b) 展現或不展現與間皮素之不同糖基化形式的結合改變或減小；
- (c) 阻斷或不阻斷間皮素與MUC16結合；

(d) 以  $\leq 5$  nM、或者  $\leq 1$  nM、或者  $\leq 0.5$  nM、或者  $\leq 0.1$  nM 且視情況  $\geq 0.0001$  nM 之親和力結合間皮素。

在任一上述實施例中，不阻斷間皮素與 MUC16 結合之抗體為增強間皮素與 MUC16 結合之抗體。

在另一個實施例中，抗間皮素抗體結合於 SEQ ID NO:43 之包含 E153 及 D174 之抗原決定基。在一個該種實施例中，抗間皮素抗體進一步具有一或多個任意組合的以下特徵：

(a) 不會降低與糖基化形式之間皮素的結合性；

(b) 不阻斷間皮素與 MUC16 結合；

(c) 以  $\leq 5$  nM、或者  $\leq 1$  nM、或者  $\leq 0.5$  nM 且視情況  $\geq 0.0001$  nM 之親和力結合間皮素。

在該等實施例中，不阻斷間皮素與 MUC16 結合之抗體增強間皮素與 MUC16 結合及/或該抗體以  $\leq 1$  nM 之親和力結合。具有上述特徵之例示性抗體為本文中所揭示之 7D9 及其人類化變異體，諸如 h7D9.v3。在任一上述實施例中，抗間皮素抗體所結合之間皮素為人類間皮素。

在另一個實施例中，抗間皮素抗體結合於 SEQ ID NO:43 之包含 E211 之抗原決定基。在一個該種實施例中，抗間皮素抗體進一步具有一或多個以下特徵：

(a) 不阻斷間皮素與 MUC16 結合；

(b) 以  $\leq 5$  nM、或者  $\leq 1$  nM、或者  $\leq 0.5$  nM 且視情況  $\geq 0.0001$  nM 之親和力結合間皮素。

在該等實施例中，不阻斷間皮素與 MUC16 結合之抗體增

強間皮素與MUC16結合，及/或該抗體以 $\leq 1$  nM之親和力結合。具有上述特徵之例示性抗體為本文中所揭示之22A10及其人類化變異體，諸如22A10.v83。在任一上述實施例中，抗間皮素抗體所結合之間皮素為人類間皮素、食蟹獼猴間皮素及/或大鼠間皮素。

在另一個實施例中，抗間皮素抗體：

(a) 結合於SEQ ID NO:43之胺基酸1-131內的抗原決定基；及

(b) 以 $\leq 5$  nM、或者 $\leq 1$  nM、或者 $\leq 0.5$  nM、或者 $\leq 0.1$  nM且視情況 $\geq 0.0001$  nM之親和力結合間皮素。

在一個該種實施例中，該抗體阻斷間皮素與MUC16結合及/或該抗體結合於SEQ ID NO:43之胺基酸1-64或1-70內的胺基酸。在一個該種實施例中，該抗體置換結合於間皮素之MUC16。具有上述特徵之例示性抗體為本文中所揭示之19C3。在任一上述實施例中，抗間皮素抗體所結合之間皮素為人類間皮素。

## 分析法

為測定抗間皮素抗體是否「結合於SEQ ID NO:43之包含E153及D174之抗原決定基」或「結合於SEQ ID NO:43之包含E211之抗原決定基」，使包含SEQ ID NO:43之多肽中的彼等殘基突變，且如實例G中所述藉由FACS測試抗體與293細胞中所表現之突變多肽之結合，其中抗體與突變多肽之結合大幅度減小( $\geq 70\%$ 減小)或消除表示該抗體結合於SEQ ID NO:43之包含E153及D174或包含E211之抗原決定基。

為測定抗間皮素抗體是否「不會降低與糖基化形式之間皮素的結合性」，如實例H中所述，使帶有標籤之人類間皮素在CHO細胞中表現，純化(經由標籤)且於Mono S管柱上依據電荷進一步分為具有高度糖基化(溶離份A11)、中度糖基化(A12)、低度糖基化(B1)及低度至無糖基化(B5)間皮素的溶離份。使各溶離份流過預先結合抗間皮素抗體的晶片，且量測各溶離份之締合及解離速率。若各溶離份之親和力在彼此之25%之內，表示抗該體不會降低與糖基化形式之間皮素的結合性。

為測定抗間皮素抗體是否「阻斷間皮素與MUC16結合」、「不阻斷間皮素與MUC16結合」或「增強間皮素與MUC16結合」，如下進行MUC16結合分析法。特定言之，將MUC16之生物素標記片段(涵蓋三個黏蛋白重複序列)與穩定表現間皮素之A431細胞在抗間皮素抗體存在或不存在下一起培育，且藉由FACS採用抗生蛋白鏈菌素-PE測定與細胞結合之MUC16-生物素之量。間皮素之MUC16結合位點已暫時經過圖譜分析定位於間皮素之前64個胺基酸(Kaneko等人，*J. Biol Chem.* 284:3739-49 (2009))。反過來，將穩定表現MUC16之PC3細胞與預先與抗間皮素抗體一起培育之經純化之間皮素-his8(「his8」揭示為SEQ ID NO: 49)一起培育，且藉由FACS使用Alexa-647接合之抗His6抗體(「His6」揭示為SEQ ID NO: 50)偵測經純化之間皮素-his8:抗體複合物與表現MUC16之細胞之結合。若在上述分析法之任一者中，在抗間皮素抗體存在下之FACS



信號比在抗間皮素抗體不存在下之FACS信號低 $\geq 50\%$ ，則認為該抗體阻斷間皮素與MUC16結合。若在上述分析法之任一者中，在抗間皮素抗體存在下之FACS信號未減少 $\geq 50\%$ ，則認為該抗體不阻斷間皮素與MUC16結合。若在上述分析法之後者中，在抗間皮素抗體存在下之FACS信號比抗間皮素抗體不存在下之FACS信號增加時，則認為該抗體增強間皮素與MUC16結合。

根據如本文在II.A.1節中所述之Biacore分析法，測定抗間皮素抗體是否「以 $\leq 5$  nM、或者 $\leq 1$  nM、或者 $\leq 0.5$  nM、或者 $\leq 0.1$  nM之親和力結合」。特定言之，使用表面電漿共振分析法，使用BIACORE<sup>®</sup>-2000或BIACORE<sup>®</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在25°C下以經固定之抗原CM5晶片在約10個反應單位(RU)下量測Kd。簡言之，根據供應商說明書，以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5, BIACORE, Inc.)。待用抗原為如實例B中所述自大腸桿菌產生及分離之間皮素。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋抗原至5  $\mu\text{g/ml}$ (約0.2  $\mu\text{M}$ )，隨後以5  $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射以獲得約10個反應單位(RU)之偶合蛋白。繼注射抗原之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應基團。為進行動力學量測，在25°C下，以約25  $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射Fab於含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20<sup>™</sup>)界面活性劑之PBS(PBST)中之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合

模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore®評估軟體3.2版)，藉由同時擬合締合及解離感測器圖譜來計算締合速率( $k_{on}$ )及解離速率( $k_{off}$ )。以 $k_{off}/k_{on}$ 比率來計算平衡解離常數(Kd)。參見例如Chen等人，*J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若藉由上述表面電漿子共振分析法測定，締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術來測定締合速率，該技術量測在25°C下，在遞增濃度之抗原存在下，PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)的增大或減小，如在分光計(諸如配備停流之分光光度計(Aviv Instruments)或具有經攪拌比色管的8000系列SLM-AMINCO™分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測。

#### 抗體7D9及其他實施例

在一個態樣中，本發明提供一種抗間皮素抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下之HVR：(a)包含SEQ ID NO:20胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:17胺基酸序列之HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:18胺基酸序列之HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之VH HVR序列：(a)包含SEQ ID NO:20胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2；及(c)包含SEQ ID NO:22胺

基酸序列之HVR-H3。在一個實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3。在另一個實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3及包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。在另一個實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3、包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3及包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2。在另一個實施例中，該抗體包含(a)包含SEQ ID NO:20胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2；及(c)包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之VL HVR序列：(a)包含SEQ ID NO:17胺基酸序列之HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:18胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。在一個實施例中，該抗體包含(a)包含SEQ ID NO:17胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:18胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。

在另一個態樣中，本發明之抗體包含(a)包含至少一個、至少兩個、或全部三個選自以下之VH HVR序列的VH域：(i)包含SEQ ID NO:20胺基酸序列之HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2，及(iii)包含選自SEQ ID NO:22之胺基酸序列之HVR-H3；及(b)包含至少一個、至少兩個、或全部三個選自以下之VL HVR序列的VL域：(i)

包含SEQ ID NO:17胺基酸序列之HVR-L1，(ii)包含SEQ ID NO:18胺基酸序列之HVR-L2，及(iii)包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:20胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:17胺基酸序列之HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:18胺基酸序列之HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。

在任一上述實施例中，抗間皮素抗體經人類化。在一個實施例中，抗間皮素抗體包含如任一上述實施例中之HVR，且另外包含人類受體構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。在某些實施例中，該人類受體構架為人類VL  $\kappa$  I共同(VL<sub>KI</sub>)構架及/或VH構架VH<sub>ATA</sub>，其在以下3個位置處不同於人類VH亞群III共同(VH<sub>III</sub>)構架：R71A、N73T及L78A(Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992))。在另一個實施例中，抗間皮素抗體包含如任一上述實施例中之HVR，且另外包含：包含SEQ ID NO:25之構架FR2序列及SEQ ID NO:27之FR3序列的輕鏈可變域。在一個該種實施例中，該輕鏈可變域構架為經修飾之人類VL  $\kappa$  I共同(VL<sub>KI</sub>)構架，其具有SEQ ID NO:25之FR2序列及SEQ ID NO:27之FR3序列。

在另一個態樣中，抗間皮素抗體包含與SEQ ID NO:8胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列較之參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗間皮素抗體保留結合於間皮素之能力。在某些實施例中，SEQ ID NO:8中已取代、插入及/或缺失總共1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區(亦即FR中)。抗間皮素抗體視情況包含SEQ ID NO:8之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該VH包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含SEQ ID NO:20胺基酸序列之HVR-H1，(b)包含SEQ ID NO:21胺基酸序列之HVR-H2，及(c)包含SEQ ID NO:22胺基酸序列之HVR-H3。

在另一個態樣中，提供一種抗間皮素抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO:4胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列較之參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗間皮素抗體保留結合於間皮素之能力。在某些實施例中，SEQ ID NO:4中已取代、插入及/或缺失總共1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區(亦即FR中)。抗間皮素抗體視情況包含SEQ ID NO:4之VL序列，

包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該VL包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含SEQ ID NO:17胺基酸序列之HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:18胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含SEQ ID NO:19胺基酸序列之HVR-L3。

在另一個態樣中，提供一種抗間皮素抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任一實施例中之VH，及如上文所提供之任一實施例中之VL。在一個實施例中，該抗體包含分別為SEQ ID NO:8及SEQ ID NO:4之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

在另一個態樣中，本發明提供一種與本文中所提供之抗間皮素抗體結合於相同抗原決定基的抗體。舉例而言，在某些實施例中，提供一種與抗間皮素抗體結合於相同抗原決定基且包含SEQ ID NO:8之VH序列及SEQ ID NO:4之VL序列的抗體。在某些實施例中，提供一種結合於SEQ ID NO:43之來自胺基酸152-175、在胺基酸152-175內或覆蓋胺基酸152-175之抗原決定基的抗體。在某些實施例中，提供一種結合於SEQ ID NO:43之包含E153及D174之抗原決定基的抗體。在某些該等實施例中，該抗體結合於胺基酸殘基E153及D174。

在本發明之另一個態樣中，任一上述實施例之抗間皮素抗體為單株抗體，包括嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。在一個實施例中，抗間皮素抗體為抗體片段，例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或F(ab')<sub>2</sub>片段。在另一

個實施例中，該抗體為實質上全長抗體，例如如本文所定義之IgG1抗體或其他抗體類別或同型。

在另一個態樣中，任一上述實施例之抗間皮素抗體可併有如下文1-7節中所述之任何單獨或組合特徵：

#### **抗體22A10及其他實施例**

在一個態樣中，本發明提供一種抗間皮素抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下之HVR：(a)包含SEQ ID NO:36胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:33胺基酸序列之HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:34胺基酸序列之HVR-L2；及(f)包含SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3。

在一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之VH HVR序列：(a)包含SEQ ID NO:36胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2；及(c)包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3。在一個實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3。在另一個實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3及包含SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3。在另一個實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3、包含SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3及包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2。

在另一個實施例中，該抗體包含(a)包含SEQ ID NO:36胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2；及(c)包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或全部三個選自以下之VL HVR序列：(a)包含SEQ ID NO:33胺基酸序列之HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:34胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3。在一個實施例中，該抗體包含(a)包含SEQ ID NO:33胺基酸序列之HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:34胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3。

在另一個態樣中，本發明之抗體包含(a)包含至少一個、至少兩個、或全部三個選自以下之VH HVR序列的VH域：(i)包含SEQ ID NO:36胺基酸序列之HVR-H1，(ii)包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2，及(iii)包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3；及(b)包含至少一個、至少兩個、或全部三個選自以下之VL HVR序列的VL域：(i)包含SEQ ID NO:33胺基酸序列之HVR-L1，(ii)包含SEQ ID NO:34胺基酸序列之HVR-L2，及(c)包含SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:36胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:38或39



胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:33胺基酸序列之HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:34胺基酸序列之HVR-L2；及(f)包含選自SEQ ID NO:35胺基酸序列之HVR-L3。

在任一上述實施例中，抗間皮素抗體經人類化。在一個實施例中，抗間皮素抗體包含如任一上述實施例中之HVR，且另外包含人類受體構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。在某些實施例中，該人類受體構架為VL<sub>KI</sub>及/或VH<sub>III</sub>受體構架。

在另一個態樣中，抗間皮素抗體包含與SEQ ID NO:16胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之重鏈可變域(VH)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列較之參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗間皮素抗體保留結合於間皮素之能力。在某些實施例中，SEQ ID NO:16中已取代、插入及/或缺失總共1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區(亦即FR中)。抗間皮素抗體視情況包含SEQ ID NO:16之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該VH包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：(a)包含SEQ ID NO:36胺基酸序列之HVR-H1，(b)包含SEQ ID NO:37胺基酸序列之HVR-H2，及(c)包含SEQ ID NO:38或39胺基酸序列之HVR-H3。

在另一個態樣中，提供一種抗間皮素抗體，其中該抗體

包含與 SEQ ID NO:12 胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列一致性之輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 一致性之 VL 序列較之參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗間皮素抗體保留結合於間皮素之能力。在某些實施例中，SEQ ID NO:12 中已取代、插入及/或缺失總共 1 至 10 個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在 HVR 外之區(亦即 FR 中)。抗間皮素抗體視情況包含 SEQ ID NO:12 之 VL 序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該 VL 包含一個、兩個或三個選自以下之 HVR：(a) 包含 SEQ ID NO:33 胺基酸序列之 HVR-L1；(b) 包含 SEQ ID NO:34 胺基酸序列之 HVR-L2；及(c) 包含 SEQ ID NO:35 胺基酸序列之 HVR-L3。

在另一個態樣中，提供一種抗間皮素抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任一實施例中之 VH 及如上文所提供之任一實施例中之 VL。在一個實施例中，該抗體包含分別為 SEQ ID NO:16 及 SEQ ID NO:12 之 VH 及 VL 序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

在另一個態樣中，本發明提供一種與本文中所提供之抗間皮素抗體結合於相同抗原決定基的抗體。舉例而言，在某些實施例中，提供一種與抗間皮素抗體結合於相同抗原決定基且包含 SEQ ID NO:16 之 VH 序列及 SEQ ID NO:12 之

VL序列的抗體。在某些實施例中，提供一種結合於SEQ ID NO:43之來自胺基酸211-327、在胺基酸211-327內或覆蓋胺基酸211-327之抗原決定基的抗體。在某些實施例中，提供一種結合於SEQ ID NO:43之包含E211之抗原決定基的抗體。在某些該等實施例中，該抗體結合於胺基酸殘基E211。

在本發明之另一個態樣中，任一上述實施例之抗間皮素抗體為單株抗體，包括嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。在一個實施例中，抗間皮素抗體為抗體片段，例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或F(ab')<sub>2</sub>片段。在另一個實施例中，該抗體為實質上全長抗體，例如如本文所定義之IgG2a抗體或其他抗體類別或同型。

在另一個態樣中，任一上述實施例之抗間皮素抗體可併有如下文1-7節中所述之任何單獨或組合特徵：

#### **抗體19C3及其他實施例**

在一個態樣中，本發明提供一種抗間皮素抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR。出於本節之目的，如本文所定義，HVR由對應於CDR之胺基酸範圍所描繪。

在一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或全部三個由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH HVR序列。在一個實施例中，該抗體包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤

19C3所產生抗體之HVR-H3。在另一個實施例中，該抗體包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-H3及HVR-L3。在另一個實施例中，該抗體包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-H3、HVR-L3及HVR-H2。在另一個實施例中，該抗體包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-H1、HVR-H2、及HVR-H3。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或全部三個由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VL HVR序列。在一個實施例中，該抗體包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-L1、HVR-L2、及HVR-L3。

在另一個態樣中，本發明之抗體包含(a)包含至少一個、至少兩個或全部三個由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH HVR序列的VH域；及(b)包含至少一個、至少兩個或全部三個由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VL HVR序列的VL域。

在另一個態樣中，本發明提供一種抗體，其包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3。

在任一上述實施例中，抗間皮素抗體經人類化。在一個該種實施例中，該抗體為由具有ATCC寄存編號PTA-11464

之融合瘤19C3所產生抗體之人類化形式。在另一個實施例中，抗間皮素抗體包含如任一上述實施例中之HVR，且另外包含人類受體構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

在另一個態樣中，抗間皮素抗體包含與由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，VH序列較之參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗間皮素抗體保留結合於間皮素之能力。在某些實施例中，在由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH中已取代、插入及/或缺失總共1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區(亦即FR中)。抗間皮素抗體視情況包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該VH包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-H1、HVR-H2及HVR-H3。

在另一個態樣中，提供一種抗間皮素抗體，其中該抗體包含與由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之輕鏈可變域(VL)具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之VL。在某些實施例中，具有至少90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列較之參考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗間皮素抗體保留結合於間皮素之能力。在某些實施例中，在由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VL中已取代、插入及/或缺失總共1至10個胺基酸。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區(亦即FR中)。抗間皮素抗體視情況包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VL序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，該VL包含一個、兩個或三個選自以下之HVR：由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之HVR-L1、HVR-L2及HVR-L3。

在另一個態樣中，提供一種抗間皮素抗體，其中該抗體包含如上文所提供之任一實施例中之VH及如上文所提供之任一實施例中之VL。在一個實施例中，該抗體分別包含由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

在另一個態樣中，本發明提供一種與本文中所提供之抗間皮素抗體結合於相同抗原決定基的抗體。舉例而言，在某些實施例中，提供一種與由具有ATCC寄存編號PTA-11464之融合瘤19C3所產生抗體結合於相同抗原決定基的抗體。

在本發明之另一個態樣中，任一上述實施例之抗間皮素抗體為單株抗體，包括嵌合抗體、人類化抗體或人類抗

體。在一個實施例中，抗間皮素抗體為抗體片段，例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。在另一個實施例中，該抗體為實質上全長抗體，例如如本文所定義之 IgG2b 抗體或其他抗體類別或同型。

在另一個態樣中，任一上述實施例之抗間皮素抗體可併有如下文 1-7 節中所述之任何單獨或組合特徵：

### 1. 抗體親和力

在某些實施例中，本文中所提供之抗體具有  $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、或  $\leq 0.001 \text{ nM}$  且視情況  $\geq 10^{-13} \text{ M}$  (例如  $10^{-8} \text{ M}$  或  $10^{-8} \text{ M}$  以下，例如  $10^{-8} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ ，例如  $10^{-9} \text{ M}$  至  $10^{-13} \text{ M}$ ) 之解離常數 (Kd)。

在一個實施例中，Kd 係如以下分析法所述，藉由使用所關注之抗體的 Fab 型式及其抗原進行放射性標記之抗原結合分析法 (RIA) 來量測。藉由在連續滴定未經標記抗原存在下使 Fab 與最小濃度之經 (<sup>125</sup>I) 標記抗原平衡，隨後使用經抗 Fab 抗體塗佈之板捕捉所結合之抗原來量測 Fab 對抗原之溶液結合親和力 (參見例如 Chen 等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999))。為了建立分析條件，MICROTITER<sup>®</sup> 多孔板 (Thermo Scientific) 用 50 mM 碳酸鈉 (pH 9.6) 中之 5  $\mu\text{g/ml}$  捕捉抗 Fab 抗體 (Cappel Labs) 塗佈隔夜，隨後在室溫 (約 23°C) 下用 PBS 中之 2% (w/v) 牛血清白蛋白阻斷 2 至 5 小時。在無吸附劑板 (Nunc #269620) 中，將 100 pM 或 26 pM [<sup>125</sup>I] 抗原與所關注之 Fab 之連續稀釋液混合 (例如與抗

VEGF抗體Fab-12之評定相一致，Presta等人，*Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)。隨後培育所關注之Fab隔夜；然而，可持續培育較長時間(例如約65小時)以確保達到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉板中且在室溫下培育(例如1小時)。接著移除溶液且用含0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20<sup>®</sup>)之PBS洗滌板8次。當板乾燥時，添加150微升/孔之閃爍體(MICROSCINT-20<sup>™</sup>；Packard)，且在TOPCOUNT<sup>™</sup>  $\gamma$ 計數器(Packard)上對板計數十分鐘。選擇提供小於或等於20%最大結合之各Fab的濃度用於競爭性結合分析法。

根據另一個實施例，使用表面電漿子共振分析法，使用BIACORE<sup>®</sup>-2000或BIACORE<sup>®</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在25°C下以經固定之抗原CM5晶片在約10個反應單位(RU)下量測Kd。簡言之，根據供應商說明書，以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5，BIACORE, Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋抗原至5  $\mu\text{g/ml}$ (約0.2  $\mu\text{M}$ )，隨後以5  $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射以獲得約10個反應單位(RU)之偶合蛋白。繼注射抗原之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應基團。為進行動力學量測，在25°C下，以約25  $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射Fab於含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20<sup>™</sup>)界面活性劑之PBS(PBST)中之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(BIACORE<sup>®</sup>評估軟體3.2版)，藉由同時擬合締合及解離感測器圖譜來計算締合速



率( $k_{on}$ )及解離速率( $k_{off}$ )。以 $k_{off}/k_{on}$ 比率來計算平衡解離常數( $K_d$ )。參見例如Chen等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若藉由上述表面電漿子共振分析法測定, 締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , 則可藉由使用螢光淬滅技術來測定締合速率, 該技術量測在 $25^\circ\text{C}$ 下, 在遞增濃度之抗原存在下, PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm; 發射=340 nm, 16 nm帶通)的增大或減小, 如在分光計(諸如配備停流之分光光度計(Aviv Instruments)或具有經攪拌比色管的8000系列SLM-AMINCO™分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測。

## 2. 抗體片段

在某些實施例中, 本文中所提供之抗體為抗體片段。抗體片段包括(但不限於)Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv及scFv片段, 及如下所述之其他片段。關於某些抗體片段之評述, 參見Hudson等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。關於scFv片段之評述, 參見例如Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編, (Springer-Verlag, New York), 第269-315頁(1994); 亦參見WO 93/16185; 及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基且活體內半衰期延長的Fab及F(ab')<sub>2</sub>片段的論述, 參見美國專利第5,869,046號。

雙功能抗體為具有兩個抗原結合位點之抗體片段, 其可為二價或雙特異性抗體片段。參見例如EP 404,097; WO

1993/01161；Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人，*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第6,248,516 B1號)。

如本文所述，抗體片段可藉由多種技術製備，包括(但不限於)蛋白水解完整抗體以及由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生。

### 3. 嵌合及人類化抗體

在某些實施例中，本文中所提供之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於例如美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如來源於小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物(諸如猴)之可變區)及人類恆定區。在另一個實例中，嵌合抗體為「類別轉換」抗體，其中該類別或子類已相對於親本抗體之類別或子類而改變。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

在某些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。通常使非人類抗體人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親本非人類抗體之特異性及親和力。人類化抗體一般包含一或多

個可變域，其中HVR，例如CDR(或其部分)來源於非人類抗體，且FR(或其部分)來源於人類抗體序列。人類化抗體視情況亦包含至少一部分人類恆定區。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經非人類抗體(例如獲得HVR殘基之抗體)之相應殘基取代，例如以恢復或改良抗體特异性或親和力。

人類化抗體及其製造方法在例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中評述，且進一步描述於例如 Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；Queen 等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Kashmiri 等人，*Methods* 36:25-34 (2005)(描述 SDR(a-CDR)移植)；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991)(描述「表面重修」)；Dall'Acqua 等人，*Methods* 36:43-60 (2005)(描述「FR改組」)；及 Osbourn 等人，*Methods* 36:61-68 (2005) 及 Klimka 等人，*Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000)(描述 FR 改組之「定向選擇」方法)中。

可用於人類化之人類構架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合」方法所選擇之構架區(參見例如 Sims 等人，*J. Immunol.* 151:2296 (1993))；來源於輕鏈或重鏈可變區特定亞群之人類抗體之共同序列的構架區(參見例如 Carter 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及 Presta 等人，*J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突

變)構架區或人類生殖系構架區(參見例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 及篩選FR庫所獲得之構架區(參見例如 Baca 等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 及 Rosok 等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

#### 4. 人類抗體

在某些實施例中，本文中所提供之抗體為人類抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之多種技術產生。人類抗體大略描述於 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) 中。

人類抗體可藉由向已經修飾成可回應於抗原攻擊產生完整人類抗體或具有人類可變區之完整抗體的轉殖基因動物投與免疫原來製備。該等動物通常含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或其存在於染色體外或隨機整合於動物染色體中。在該等轉殖基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座通常已不活化。關於自轉殖基因動物獲得人類抗體之方法之評述，參見 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如描述 XENOMOUSE<sup>TM</sup> 技術之美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號；描述 HUMAB® 技術之美國專利第 5,770,429 號；描述 K-M MOUSE® 技術之美國專利第 7,041,870 號；及描述 VELOCIMOUSE® 技術之美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號。由該等動物產生之完整抗體的人類可變

區可例如藉由與不同人類恆定區組合而進一步修飾。

人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製備。已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞株。(參見例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及 Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)。)經由人類B細胞融合瘤技術產生人類抗體亦描述於Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)中。其他方法包括例如美國專利第7,189,826號(描述自融合瘤細胞株產生單株人類IgM抗體)及Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)(描述人類-人類融合瘤)中所述者。人類融合瘤技術(Trioma技術)亦描述於 Vollmers 及 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005)與 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005)中。

人類抗體亦可藉由分離選自來源於人類之噬菌體呈現庫之Fv純系可變域序列而產生。該等可變域序列可隨後與所需人類恆定域組合。自抗體庫選擇人類抗體之技術描述如下。

### 5. 來源於庫之抗體

本發明之抗體可藉由篩選組合庫中具有所需活性之抗體來分離。舉例而言，此項技術中已知多種方法可用於產生

噬菌體呈現庫及篩選該等庫中具有所需結合特徵之抗體。該等方法在例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人, 編, Human Press, Totowa, NJ, 2001) 中評述, 且進一步描述於例如 McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554; Clackson 等人, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks 及 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, 編, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu 等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee 等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); 及 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) 中。

在某些噬菌體呈現方法中, 藉由聚合酶鏈反應(PCR)單獨選殖 VH 及 VL 基因之譜系且在噬菌體庫中隨機重組, 其可隨後如 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) 中所述篩選抗原結合噬菌體。噬菌體通常以單鏈 Fv(scFv) 片段形式或以 Fab 片段形式呈現抗體片段。來自經免疫來源之庫提供抗免疫原之高親和力抗體而無需構建融合瘤。或者, 如 Griffiths 等人, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) 所述, 可(例如自人類)選殖原生譜系以提供抗多種非自體抗原以及自體抗原之抗體的單一來源而無需任何免疫接種。最後, 如 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 所述, 亦可藉由自幹細胞選殖未重排之 V 基因區段且使用含有隨機序列之 PCR 引子編碼高可變

CDR3區且完成活體外重排來合成製造原生庫。描述人類抗體噬菌體庫之專利公開案包括例如：美國專利第5,750,373號及美國專利公開案第2005/0079574號、第2005/0119455號、第2005/0266000號、第2007/0117126號、第2007/0160598號、第2007/0237764號、第2007/0292936號及第2009/0002360號。

自人類抗體庫分離之抗體或抗體片段在本文中視為人類抗體或人類抗體片段。

## 6. 多特異性抗體

在某些實施例中，本文中所提供之抗體為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，一種結合特異性係針對間皮素而另一者係針對任意其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合於間皮素之兩個不同抗原決定基。雙特異性抗體亦可用於使細胞毒性劑定位於表現間皮素之細胞。雙特異性抗體可以全長抗體或抗體片段形式製備。

用於製備多特異性抗體之技術包括(但不限於)重組共表現具有不同特異性之兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(參見Milstein及Cuellar, *Nature* 305: 537 (1983); WO 93/08829; 及Traunecker等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991))及「杵入白(knob-in-hole)」工程改造(參見例如美國專利第5,731,168號)。多特異性抗體亦可藉由以下方法製備：工程改造靜電牽引效應以製備抗體Fc-雜二聚分子(WO 2009/089004A1)；

交聯兩個或兩個以上抗體或片段(參見例如美國專利第4,676,980號及Brennan等人, *Science*, 229: 81 (1985)); 使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體(參見例如Kostelny等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 使用「雙功能抗體」技術製備雙特異性抗體片段(參見例如Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 及使用單鏈Fv(sFv)二聚體(參見例如Gruber等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 及如例如Tutt等人, *J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所述製備三特異性抗體。

具有三個或三個以上功能性抗原結合位點的經工程改造抗體(包括「章魚抗體」)亦包括於本文中(參見例如US 2006/0025576A1)。

本文中之抗體或片段亦包括「雙作用FAb」或「DAF」, 其包含結合於間皮素以及另一不同抗原之抗原結合位點(參見例如US 2008/0069820)。

## 7. 抗體變異體

在某些實施例中, 涵蓋本文中所提供之抗體的胺基酸序列變異體。舉例而言, 可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物學特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由於編碼抗體之核苷酸序列中引入適當修飾或藉由肽合成來製備。此等修飾包括例如抗體胺基酸序列內之殘基缺失及/或插入及/或取代。產生任何缺失、插入及取代之組合以得到最終構築體, 其限制條件為最終構築體具有所需特徵, 例如抗原結合。



### a) 取代、插入及缺失變異體

在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。所關注之取代突變誘發位點包括HVR及FR。保守性取代展示於表1中「較佳取代」之題頭下。更多實質性變化提供於表1中「例示性取代」之題頭下，且如下關於胺基酸側鏈類別進一步描述。胺基酸取代可引入所關注之抗體中且針對所需活性篩選產物，例如抗原結合保留/改良、免疫原性減小、或ADCC或CDC改良。

表 1

原始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala(A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg(R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn(N)	Gln ; His ; Asp ; Lys ; Arg	Gln
Asp(D)	Glu ; Asn	Glu
Cys(C)	Ser ; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu(E)	Asp ; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile(I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu(L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys(K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met(M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe(F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val ; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val(V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據常見側鏈性質分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 鹼性：His、Lys、Arg；

(5) 影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；

(6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要將此等類別之一之成員換成另一類別。

一種類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。通常，選擇用於進一步研究之所得變異體較之親本抗體將在某些生物學性質方面有改變(例如改良)(例如親和力增加、免疫原性減小)，及/或將實質上保留親本抗體之某些生物學性質。例示性取代變異體為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所述之技術)方便地產生。簡言之，使一或多個HVR殘基突變且在噬菌體上呈現變異抗體並針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

可在HVR中產生改變(例如取代)例如以改良抗體親和力。該等改變可在HVR「熱點」，亦即由在體細胞成熟過程中發生高頻突變之密碼子所編碼之殘基(參見例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))；及/或SDR(a-CDR)中產生，針對結合親和力測試所得變異體VH或VL。藉由構建及自次級庫再選擇之親和力成熟已描述於例如Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien等人，編，Human Press, Totowa, NJ,

(2001))中。在親和力成熟之一些實施例中，藉由多種方法中之任一者(例如易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸定向突變誘發)於選擇用於成熟之可變基因中引入多樣性。接著創建次級庫。接著篩選該庫以鑑別具有所需親和力之任何抗體變異體。引入多樣性之另一方法涉及HVR定向方法，其中使若干HVR殘基(例如一次4-6個殘基)隨機化。抗原結合所涉及之HVR殘基可特別例如使用丙胺酸掃描突變誘發或模擬來鑑別。尤其，通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

在某些實施例中，取代、插入或缺失可在一或多個HVR內發生，只要該等變化不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。舉例而言，可在HVR中產生不實質上減小結合親和力之保守改變(例如本文中所提供之保守性取代)。該等改變可在HVR「熱點」或SDR之外。在上文所提供之變異體VH及VL序列的某些實施例中，各HVR不變或含有不超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

適用於鑑別抗體中可為突變誘發目標之殘基或區的方法稱作如由Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述之「丙胺酸掃描突變誘發」。在此方法中，殘基或目標殘基群(例如帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)經鑑別且替換為中性或帶負電荷之胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)以確定抗體與抗原之相互作用是否受影響。可在顯示對初始取代功能敏感之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，使用抗原-抗體複合物之晶體結構鑑別抗體與抗原之間的接觸點。該等接觸殘基及相鄰殘基

可作為取代候選物而靶向或除去。可篩選變異體以確定其是否含有所需性質。

胺基酸序列插入物包括長度為一個殘基至含有一百個或更多殘基之多肽之胺基端及/或羧基端融合物，以及具有單個或多個胺基酸殘基之序列內插入物。末端插入物之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與酶(例如，對於ADEPT)或延長抗體之血清半衰期之多肽的融合物。

#### b) 糖基化變異體

在某些實施例中，本文中所提供之抗體經改變以增加或減小抗體糖基化程度。抗體糖基化位點之添加或缺失可方便地藉由改變胺基酸序列使得一或多個糖基化位點形成或移除來實現。

在抗體包含Fc區之情況下，可改變連接於其上之碳水化合物。哺乳動物細胞所產生之原生抗體通常包含一般經N鍵聯與Fc區之CH2域之Asn297連接的分支鏈雙觸寡糖。參見例如Wright等人，*TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及連接至雙觸寡糖結構「主幹」中之GlcNAc的海藻糖。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡糖進行修飾以便形成具有某些改良性質之抗體變異體。

在一個實施例中，提供抗體變異體，其具有缺乏海藻糖連接(直接或間接)於Fc區之碳水化合物結構。舉例而言，

該抗體中海藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。海藻糖之量係如例如WO 2008/077546中所述，藉由計算糖鏈內Asn297處之海藻糖相對於如藉由MALDI-TOF質譜分析所量測之連接於Asn 297之所有糖結構(例如複合、雜合及高甘露糖結構)的總和的平均量來測定。Asn297係指位於Fc區之約位置297處(Fc區殘基之Eu編號)之天冬醯胺殘基；然而，由於抗體中之微小序列變化，Asn297亦可位於位置297上游或下游約 $\pm 3$ 個胺基酸處，亦即在位置294與300之間。該海藻糖化變異體可具有改良之ADCC功能。參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108號(Presta, L.)；第US 2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。關於「去海藻糖化」或「海藻糖缺乏」抗體變異體之公開案之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；Okazaki等人*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。能夠產生去海藻糖化抗體之細胞株實例包括缺乏蛋白質海藻糖化之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其

實例11)及基因剔除細胞株，諸如 $\alpha$ -1,6-海藻糖基轉移酶基因 *FUT8* 基因剔除 CHO 細胞(參見例如 Yamane-Ohnuki 等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda, Y. 等人，*Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及 WO2003/085107)。

進一步提供具有平分型寡糖之抗體變異體，例如，其中連接於抗體 Fc 區之雙觸寡糖由 GlcNAc 平分。該等抗體變異體可具有減少之海藻糖基化及/或改良之 ADCC 功能。該等抗體變異體之實例描述於例如 WO 2003/011878(Jean-Mairet 等人)、美國專利第 6,602,684 號(Umana 等人)及 US 2005/0123546(Umana 等人)中。亦提供在連接於 Fc 區之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基之抗體變異體。該等抗體變異體可具有改良之 CDC 功能。該等抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087(Patel 等人)；WO 1998/58964(Raju, S.)；及 WO 1999/22764(Raju, S.)中。

### c) Fc 區變異體

在某些實施例中，一或多個胺基酸修飾可引入本文中所提供之抗體之 Fc 區中，由此產生 Fc 區變異體。Fc 區變異體可包含人類 Fc 區序列(例如人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 區)，其在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)。

在某些實施例中，本發明涵蓋具有一些但非全部效應功能之抗體變異體，該等效應功能使得該抗體成為許多應用之所要候選物，在該等應用中，活體內抗體半衰期較重要，而某些效應功能(諸如補體及 ADCC)為多餘或有害

的。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以確認CDC及/或ADCC活性之降低/耗盡。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合分析，以確保抗體缺乏FcγR結合能力(從而可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現Fc(RIII，而單核細胞表現Fc(RI、Fc(RII及Fc(RIII。FcR在造血細胞上之表現概括於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)之第464頁之表3中。評估所關注之分子之ADCC活性之活體外分析法的非限制性實例描述於美國專利第5,500,362號(參見例如Hellstrom, I.等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))及Hellstrom, I等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；5,821,337(參見Bruggemann, M.等人，*J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))中。或者，可使用非放射性分析方法(參見例如流動式細胞測量術之ACTI™非放射性細胞毒性分析法(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析法(Promega, Madison, WI))。用於該等分析法之適用效應細胞包括外周血液單核細胞(PBMC)及自然殺傷(NK)細胞。或者或另外，可在活體內，例如在動物模型(諸如Clynes等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中所揭示者)中，評估所關注分子之ADCC活性。亦可進行C1q結合分析以確認抗體不能結合C1q且因此缺乏CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為評估補體活化，可進行CDC分析(參

見例如 Gazzano-Santoro 等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S. 等人，*Blood* 101:1045-1052 (2003)；及 Cragg, M.S. 及 M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法進行 FcRn 結合及活體內清除率/半衰期測定(參見例如 Petkova, S.B. 等人，*Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。

具有減小之效應功能之抗體包括 Fc 區殘基 238、265、269、270、297、327 及 329 中之一或多者經取代之抗體(美國專利第 6,737,056 號)。該等 Fc 突變體包括在胺基酸位置 265、269、270、297 及 327 中之兩者或兩者以上處經取代之 Fc 突變體，包括殘基 265 及 297 經丙胺酸取代之所謂「DANA」Fc 突變體(美國專利第 7,332,581 號)。

描述某些與 FcR 結合改良或削弱之抗體變異體。(參見例如美國專利第 6,737,056 號；WO 2004/056312；及 Shields 等人，*J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001))。

在某些實施例中，抗體變異體包含具有一或多個改良 ADCC 之胺基酸取代的 Fc 區，例如在 Fc 區之位置 298、333 及/或 334 處之取代(EU 殘基編號)。

在一些實施例中，在 Fc 區中產生改變，致使 C1q 結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)改變(亦即改良或削弱)，例如如美國專利第 6,194,551 號、WO 99/51642 及 Idusogie 等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000) 中所述。

在 US2005/0014934A1(Hinton 等人)中描述半衰期延長且與新生兒 Fc 受體(FcRn)之結合改良的抗體，新生兒 Fc 受體



負責將母體 IgG 轉移至胎兒中 (Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。此等抗體包含其中具有一或多個改良 Fc 區與 FcRn 之結合的取代之 Fc 區。該等 Fc 變異體包括在以下一或多個 Fc 區殘基處經取代之 Fc 變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434，例如 Fc 區殘基 434 經取代 (美國專利第 7,371,826 號)。

關於 Fc 區變異體之其他實例，亦參見 Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利第 5,648,260 號；美國專利第 5,624,821 號；及 WO94/29351。

#### d) 經半胱胺酸工程改造之抗體變異體

在某些實施例中，可能需要形成經半胱胺酸改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代之殘基出現在抗體之可達位點處。如本文進一步所述，藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基藉此位於抗體之可達位點且可用於使該抗體與其他部分 (諸如藥物部分或連接子-藥物部分) 接合，形成免疫接合物。在某些實施例中，以下殘基中之任一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之 V205 (Kabat 編號)；重鏈之 A118 (EU 編號)；及重鏈 Fc 區之 S400 (EU 編號)。經半胱胺酸工程改造之抗體可如例如美國專利第 7,521,541 號中所述產生。

#### e) 抗體衍生物

在某些實施例中，可進一步修飾本文中所提供之抗體以含有此項技術中已知且易於獲得的其他非蛋白部分。適於抗體衍生化之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(N-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可具有分枝或無分枝。連接至抗體之聚合物之數目可變化，且若連接一個以上聚合物，則該等聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特定性質或功能，抗體衍生物是否將用於指定條件下之療法等考慮來確定。

在另一個實施例中，提供抗體與可藉由暴露於輻射來選擇性加熱之非蛋白部分的接合物。在一個實施例中，該非蛋白部分為奈米碳管(Kam等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。此輻射可具有任一波長，且包括(但不限於)不損傷一般細胞但能將非蛋白部分加熱至可殺死接近抗體-非蛋白部分之細胞之溫度的波長。

## B. 重組方法及組合物

抗體可使用如例如美國專利第4,816,567號中所述之重組方法及組合物來產生。在一個實施例中，提供編碼本文所述之抗間皮素抗體之經分離核酸。該核酸可編碼包含該抗體之VL之胺基酸序列及/或包含該抗體之VH之胺基酸序列(例如該抗體之輕鏈及/或重鏈)。在另一個實施例中，提供一或多個包含該核酸之載體(例如表現載體)。在另一個實施例中，提供包含該核酸之宿主細胞。在一個該種實施例中，宿主細胞包含(例如已用其轉型)：(1)包含編碼包含該抗體之VL之胺基酸序列及包含該抗體之VH之胺基酸序列之核酸的載體，或(2)包含編碼包含該抗體之VL之胺基酸序列之核酸的第一載體及包含編碼包含該抗體之VH之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個實施例中，該宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)細胞或淋巴樣細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，提供一種製造抗間皮素抗體之方法，其中該方法包含在適於表現該抗體之條件下，培養包含如上文所提供之編碼該抗體之核酸的宿主細胞，及視情況自該宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該抗體。

為重組產生抗間皮素抗體，分離例如如上所述之編碼抗體之核酸且插入一或多個載體中用於進一步在宿主細胞中選殖及/或表現。該核酸可易於使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及測序。

適用於選殖或表現編碼抗體之載體的宿主細胞包括本文

所述之原核細胞或真核細胞。舉例而言，抗體可在細菌中產生，尤其在不需要糖基化及Fc效應功能時。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見例如美國專利第5,648,237號、第5,789,199號及第5,840,523號。(亦參見 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C. Lo, 編, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254頁，描述抗體片段在大腸桿菌中之表現。)在表現後，抗體可自可溶部分中之細菌細胞漿分離且可進一步純化。

除原核生物之外，真核微生物(諸如絲狀真菌或酵母)為編碼抗體之載體的合適選殖或表現宿主，包括真菌及酵母菌株，其糖基化路徑已「經人類化」，致使產生具有部分或完全人類糖基化型態之抗體。參見 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)及 Li 等人，*Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

適於表現糖基化抗體之宿主細胞亦自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)獲得。脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別許多桿狀病毒株可與昆蟲細胞結合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞。

植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述用於在轉殖基因植物中產生抗體之 PLANTIBODIES™ 技術)。

脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適應於在懸浮

液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為由SV40(COS-7)轉型之猴腎CV1細胞株；人類胚腎細胞株(如例如Graham等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977)中所述之293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞托利細胞(mouse sertoli cell)(如例如Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所述之TM4細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠色猴腎細胞(VERO-76)；人類宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell, BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562)；TRI細胞，如例如Mather等人，*Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用的哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR<sup>-</sup> CHO細胞(Urlaub等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株的評述，參見例如Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C. Lo編，Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁(2003)。

### C. 分析法

本文中所提供之抗間皮素抗體可藉由此項技術中已知的多種分析法針對其物理/化學性質及/或生物學活性進行鑑別、篩選或表徵。

在一個態樣中，例如藉由諸如ELISA、FACS或西方墨點

法之已知方法測試本發明抗體的抗原結合活性。

在另一個態樣中，競爭分析法可用於鑑別與任何本文所述之抗體競爭結合於間皮素之抗體。在某些實施例中，該競爭抗體結合之抗原決定基與本文所述之抗體所結合者相同（例如線型或構形抗原決定基）。Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, *Methods in Molecular Biology*, 第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中提供定位抗體所結合之抗原決定基的詳細例示性方法。

在例示性競爭分析法中，在包含結合於間皮素之第一標記抗體(例如任何本文所述之抗體)及第二未標記抗體(測試其與該第一抗體競爭結合於間皮素之能力)的溶液中培育經固定之間皮素。該第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照，在包含第一標記抗體但無第二未標記抗體之溶液中培育經固定之間皮素。在容許第一抗體與間皮素結合的條件下培育之後，移除過量未結合之抗體，且量測與經固定之間皮素締合之標記之量。若測試檢體中與經固定之間皮素締合的標記之量較之對照檢體實質上減小，則表明第二抗體與第一抗體競爭結合於間皮素。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

#### D. 免疫接合物

本發明亦提供免疫接合物，其包含本文中之抗間皮素抗體與一或多種細胞毒性劑，諸如化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如蛋白質毒素、細菌、真菌、植物或動

物來源之酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素接合。

在一個實施例中，免疫接合物為抗體-藥物接合物(ADC)，其中抗體與一或多種藥物接合，該等藥物包括(但不限於)類美登素(maytansinoid)(參見美國專利第5,208,020號、第5,416,064號及歐洲專利EP 0 425 235 B1)；奧利斯坦汀，諸如單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF(MMAE及MMAF)(參見美國專利第5,635,483號及第5,780,588號及第7,498,298號)；海兔毒素(dolastatin)；刺孢黴素(calicheamicin)或其衍生物(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；Hinman等人，*Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993)；及Lode等人，*Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998))；蒽環黴素(anthracycline)，諸如道諾黴素或小紅莓(參見Kratz等人，*Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006)；Jeffrey等人，*Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006)；Torgov等人，*Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005)；Nagy等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000)；Dubowchik等人，*Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002)；King等人，*J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002)；及美國專利第6,630,579號)；甲胺喋呤；長春地辛(vindesine)；紫杉烷，諸如多西他賽(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉羅他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel)；單端孢黴烯毒素

(trichothecene)；及CC1065。

在另一個實施例中，免疫接合物包含如本文所述之抗體與酶促活性毒素或其片段接合，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉(diphtheria)A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素(ricin)A鏈、相思子鹼(abrin)A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、 $\alpha$ -帚麴菌素(alpha-sarcin)、三年桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、洋商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯毒素。

在另一個實施例中，免疫接合物包含如本文所述之抗體與放射性原子接合形成放射性接合物。多種放射性同位素可用於產生放射性接合物。實例包括 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Pb}^{212}$ 及Lu之放射性同位素。當使用放射性接合物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如tc99m或I123；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、鋁、錳或鐵。

抗體與細胞毒性劑之接合物可使用多種雙功能蛋白偶合



劑製得，該等蛋白偶合劑諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如己二醯亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙-(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人，*Science* 238:1098 (1987) 中所述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於使放射性核苷酸與抗體接合之例示性螯合劑。參見 WO94/11026。連接子可為促進細胞毒性藥物在細胞中釋放之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定性連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、二甲基連接子或含有二硫鍵之連接子(Chari 等人，*Cancer Res.* 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

本文中之免疫接合物或ADC明確涵蓋(但不限於)用包括(但不限於)以下之交聯劑試劑製備之該等接合物：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC、及磺基-SMPB、及市售SVSB(4-乙

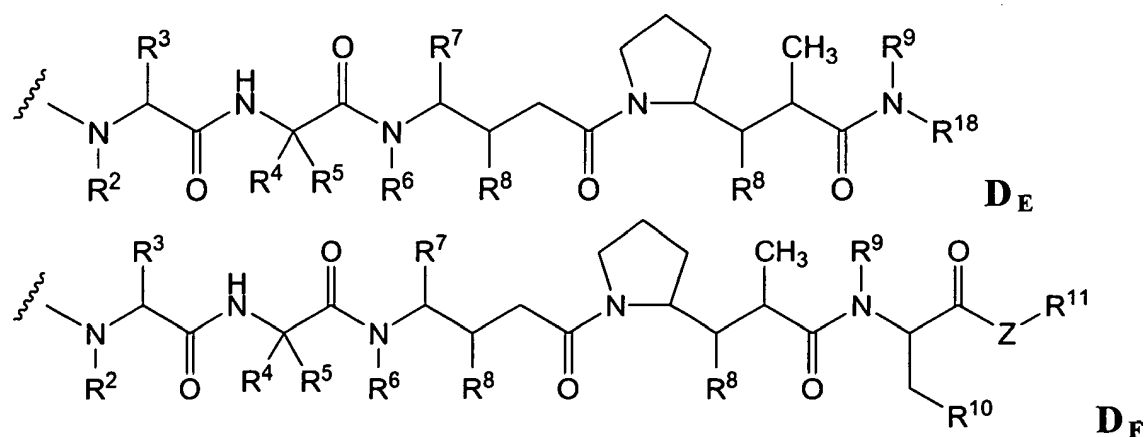
烯基 磺) 苯甲酸丁二鹽亞胺酯)(例如購自 Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

### 包含奧利斯坦汀及海兔毒素之免疫接合物

在一些實施例中，免疫接合物包含本發明之抗體與海兔毒素或海兔毒素肽類似物或衍生物(例如奧利斯坦汀)接合(美國專利第5635483號；第5780588號)。已展示海兔毒素及奧利斯坦汀干擾微管動力學、GTP水解及核分裂與細胞分裂(Woyke 等人 (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)且具有抗癌(美國專利第5663149號)及抗真菌活性(Pettit等人 (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。海兔毒素或奧利斯坦汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)端或C(羧基)端連接於抗體(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦汀實施例包括N端連接之單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF。(參見美國專利第7,659,241號、第7,498,298號及第7,745,394號)。

肽藥物部分可選自下式D<sub>E</sub>及D<sub>F</sub>：



其中  $D_E$  及  $D_F$  之波形線表示與抗體或抗體-連接子組分之共價連接位點，且在各位置處獨立地：

$R^2$  係選自 H 及  $C_1-C_8$  烷基；

$R^3$  係選自 H、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  碳環、芳基、 $C_1-C_8$  烷基-芳基、 $C_1-C_8$  烷基- $(C_3-C_8$  碳環)、 $C_3-C_8$  雜環及  $C_1-C_8$  烷基- $(C_3-C_8$  雜環)；

$R^4$  係選自 H、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  碳環、芳基、 $C_1-C_8$  烷基-芳基、 $C_1-C_8$  烷基- $(C_3-C_8$  碳環)、 $C_3-C_8$  雜環及  $C_1-C_8$  烷基- $(C_3-C_8$  雜環)；

$R^5$  係選自 H 及 甲基；

或  $R^4$  及  $R^5$  共同形成碳環且具有式  $-(CR^aR^b)_n-$ ，其中  $R^a$  及  $R^b$  係獨立地選自 H、 $C_1-C_8$  烷基及  $C_3-C_8$  碳環且  $n$  係選自 2、3、4、5 及 6；

$R^6$  係選自 H 及  $C_1-C_8$  烷基；

$R^7$  係選自 H、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  碳環、芳基、 $C_1-C_8$  烷基-芳基、 $C_1-C_8$  烷基- $(C_3-C_8$  碳環)、 $C_3-C_8$  雜環及  $C_1-C_8$  烷基- $(C_3-C_8$  雜環)；

各  $R^8$  係獨立地選自 H、OH、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  碳環及 O- $(C_1-C_8$  烷基)；

$R^9$  係選自 H 及  $C_1-C_8$  烷基；

$R^{10}$  係選自 芳基 或  $C_3-C_8$  雜環；

Z 為 O、S、NH 或  $NR^{12}$ ，其中  $R^{12}$  為  $C_1-C_8$  烷基；

$R^{11}$  係選自 H、 $C_1-C_{20}$  烷基、芳基、 $C_3-C_8$  雜環、 $-(R^{13}O)_m-$   
 $R^{14}$  或  $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ；

$m$ 為介於1-1000範圍內之整數；

$R^{13}$ 為 $C_2$ - $C_8$ 烷基；

$R^{14}$ 為H或 $C_1$ - $C_8$ 烷基；

$R^{15}$ 在每次出現時獨立地為H、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n$ - $N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ 烷基；

$R^{16}$ 在每次出現時獨立地為H、 $C_1$ - $C_8$ 烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ；

$R^{18}$ 係選自 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -芳基、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 雜環)及 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$ 碳環)；及

$n$ 為介於0至6範圍內之整數。

在一實施例中， $R^3$ 、 $R^4$ 及 $R^7$ 係獨立地為異丙基或第二丁基，且 $R^5$ 為-H或甲基。在一例示性實施例中， $R^3$ 及 $R^4$ 各為異丙基， $R^5$ 為-H，且 $R^7$ 為第二丁基。

在另一個實施例中， $R^2$ 及 $R^6$ 各為甲基，且 $R^9$ 為-H。

在另一個實施例中， $R^8$ 在每次出現時為 $-OCH_3$ 。

在一個例示性實施例中， $R^3$ 及 $R^4$ 各為異丙基， $R^2$ 及 $R^6$ 各為甲基， $R^5$ 為-H， $R^7$ 為第二丁基， $R^8$ 在每次出現時為 $-OCH_3$ ，且 $R^9$ 為-H。

在一個實施例中， $Z$ 為-O-或-NH-。

在一個實施例中， $R^{10}$ 為芳基。

在一個例示性實施例中， $R^{10}$ 為-苯基。

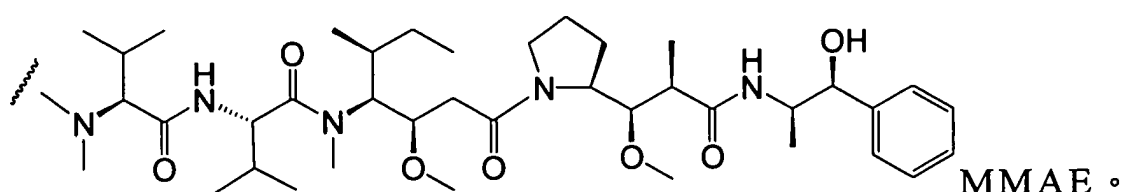
在一個例示性實施例中，當 $Z$ 為-O-時， $R^{11}$ 為-H、甲基或第三丁基。

在一個實施例中，當 $Z$ 為-NH時， $R^{11}$ 為 $-CH(R^{15})_2$ ，其中

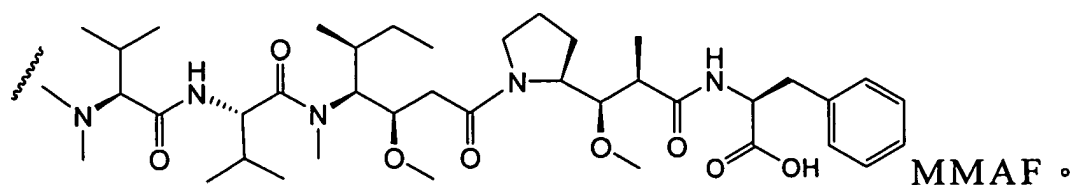
$R^{15}$  為  $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ，且  $R^{16}$  為  $-C_1-C_8$  烷基或  $-(CH_2)_n-COOH$ 。

在另一個實施例中，當  $Z$  為  $-NH$  時， $R^{11}$  為  $-CH(R^{15})_2$ ，其中  $R^{15}$  為  $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。

式  $D_E$  之例示性奧利斯坦汀實施例為 MMAE (單甲基奧利斯坦汀 E)，其中波形線表示共價連接於抗體-藥物接合物之連接子：



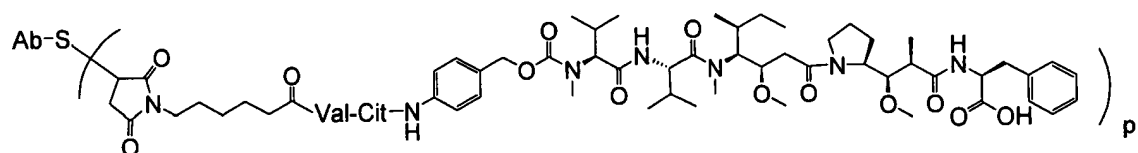
式  $D_F$  之例示性奧利斯坦汀實施例為 MMAF (單甲基奧利斯坦汀 F，為在藥物 C 端處具有苯丙胺酸之奧利斯坦汀 E (MMAE) 之變異體)，其中波形線表示共價連接於抗體-藥物接合物之連接子 (參見 US 2005/0238649 及 Doronina 等人 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124)：



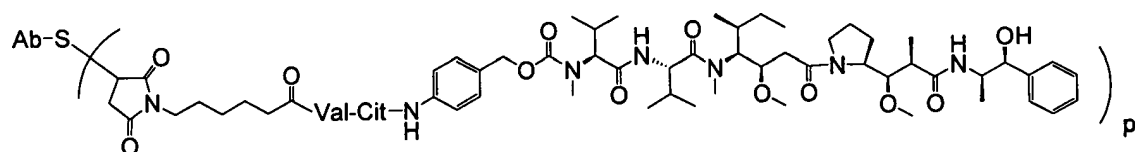
在一個態樣中，包括 (但不限於) 三乙二醇酯 (TEG) 之親水性基團如上所示可在  $R^{11}$  處連接至藥物部分。在不受任何特定理論限制的情況下，親水性基團有助於藥物部分之內化及不聚結。

包含奧利斯坦汀/海兔毒素或其衍生物之 ADC 之例示性

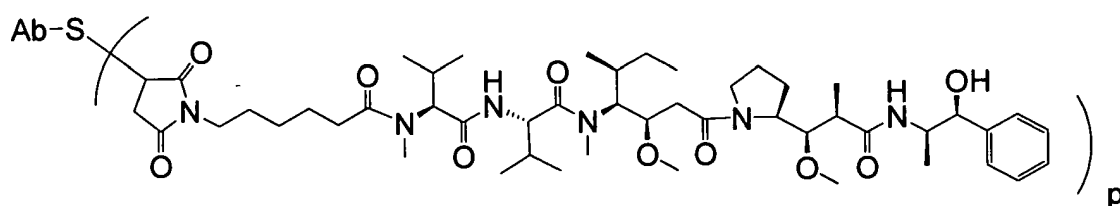
實施例描述於US 2005/0238649 A1及Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124中，其係以引用的方式明確地併入本文中。包含MMAE或MMAF及多種連接子組分之ADC之例示性實施例具有以下結構及縮寫(其中「Ab」為抗體；p為藥物負載(每個抗體藥物部分之平均數)且介於約1至約8之範圍內；「vc」為「val-cit」，亦即纈胺酸-瓜胺酸二肽；且「S」為硫原子：



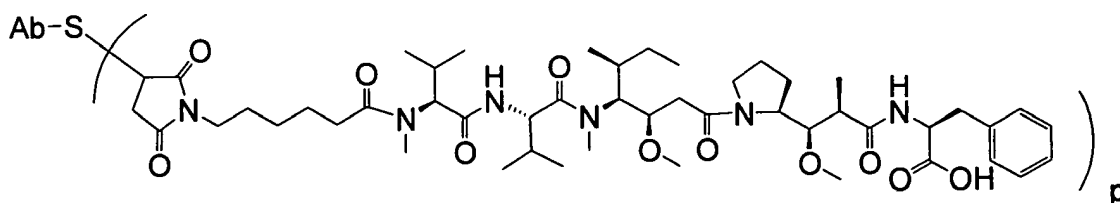
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

包含MMAF及多種連接子組分之ADC之例示性實施例進

一步包括 Ab-MC-PAB-MMAF 及 Ab-PAB-MMAF。有趣的是，包含 MMAF 由不可以蛋白水解方式裂解之連接子連接於抗體的免疫接合物已展示具有與包含 MMAF 由可以蛋白水解方式裂解之連接子連接於抗體的免疫接合物相當的活性。參見 Doronina 等人 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124。在該等情況下，咸信藥物釋放藉由細胞內之抗體降解實現。同前。

基於肽之藥物部分通常可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。該等肽鍵可例如根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見 E. Schröder 及 K. Lübke, 「The Peptides」, 第 1 卷, 第 76-136 頁, 1965, Academic Press)製備。奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分可根據以下所述方法製備: US 2005/0238649 A1; 美國專利第 5635483 號; 美國專利第 5780588 號; Pettit 等人 (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit 等人 (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R. 等人, *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit 等人 (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; 及 Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784。

詳言之，式 D<sub>F</sub> 之奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分(諸如 MMAF 及其衍生物)可使用 US 2005/0238649 A1 及 Doronina 等人 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124 中所述之方法製備。式 D<sub>E</sub> 之奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分(諸如 MMAE 及其衍生物)可使用 Doronina 等人 (2003) *Nat. Biotech.*

21:778-784 中所述之方法製備。藥物-連接子部分 MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF 及 MC-vc-PAB-MMAE 可方便地藉由例如如 Doronina 等人 (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784 及專利申請公開案第 US 2005/0238649 A1 號中所述之常規方法合成，隨後與所關注之抗體接合。

#### E. 用於診斷及偵測之方法及組合物

在某些實施例中，本文中所提供之任何抗間皮素抗體均適用於偵測生物檢體中間皮素之存在。如本文所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。「生物檢體」包含例如細胞或組織(例如活組織檢查物質，包括癌性或潛在癌性胰臟、卵巢、肺或子宮內膜組織、或間皮瘤)或血清。

在一個實施例中，提供一種適用於診斷或偵測方法中之抗間皮素抗體。在另一個態樣中，提供一種偵測生物檢體中間皮素之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含在容許如本文所述之抗間皮素抗體與間皮素結合的條件下，使該生物檢體與該抗間皮素抗體接觸，及偵測在該抗間皮素抗體與該生物檢體中之間皮素之間是否形成複合物。該方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中，抗間皮素抗體用以選擇適於使用抗間皮素抗體之療法的個體，例如在間皮素為選擇患者之生物指標的情況下。在另一個實施例中，該生物檢體為血清，例如其中偵測到已自癌細胞脫落至血清中之間皮素。

在另一個實施例中，抗間皮素抗體用以活體內例如藉由活體內成像偵測個體之間皮素陽性癌症，例如用於癌症診



斷、預測或分級、確定合適療程或監測癌症對療法之反應的目的。此項技術中已知用於活體內偵測之一種方法為免疫正電子發射斷層攝影法(免疫-PET)，如例如 van Dongen 等人，*The Oncologist* 12:1379-1389 (2007)及 Verel 等人，*J. Nucl. Med.* 44:1271-1281 (2003)中所述。在該等實施例中，提供一種用於偵測個體中之間皮素陽性癌症的方法，該方法包含向患有或疑似患有間皮素陽性癌症之個體投與經標記之抗間皮素抗體，及偵測該個體中之該經標記之抗間皮素抗體，其中偵測到該經標記之抗間皮素抗體表明該個體患有間皮素陽性癌症。在某些該等實施例中，該經標記之抗間皮素抗體包含與正電子發射體接合之抗間皮素抗體，該正電子發射體諸如  $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$  及  $^{124}\text{I}$ 。在一特定實施例中，該正電子發射體為  $^{89}\text{Zr}$ 。

在其他實施例中，診斷或偵測方法包含使固定於基板之第一抗間皮素抗體與待測試間皮素存在之生物檢體接觸，使該基板暴露於第二抗間皮素抗體，及偵測該第二抗間皮素是否結合於該第一抗間皮素抗體與該生物檢體中之間皮素之間形成的複合物。基板可為任何支撐介質，例如玻璃、金屬、陶瓷、聚合珠粒、載片、晶片及其他基板。在某些實施例中，生物檢體包含細胞或組織(例如活組織檢查物質，包括癌性或潛在癌性胰臟、卵巢、肺或子宮內膜組織、或間皮瘤)或血清，亦即間皮素已脫落於其中之血清。在某些實施例中，該第一或第二抗間皮素抗體為本文所述之任何抗體。在該等實施例中，該第二抗間皮素抗體

可為如本文所述之19C3或來源於19C3之抗體。

可根據任一上述實施例診斷或偵測之例示性病症包括間皮素陽性癌症，諸如間皮素陽性胰臟癌(包括胰管腺癌)、間皮素陽性卵巢癌(包括卵巢漿液性腺癌)、間皮素陽性肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC))、間皮瘤及間皮素陽性子宮內膜癌。在一個實施例中，間皮素陽性癌症為在本文實例J中所述之條件下，得到大於「0」之抗間皮素免疫組織化學(IHC)得分之癌症，其對應於>90%之腫瘤細胞染色極弱或無染色。在另一個實施例中，如在本文實例J中所述之條件下所定義，間皮素陽性癌症以1+、2+或3+等級表現間皮素。任一上述實施例之間皮素陽性癌症可為雙陽性癌症。

在某些實施例中，提供經標記之抗間皮素抗體。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶促反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配位體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素 $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 及 $^{131}\text{I}$ ；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素(fluorescein)及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹醯基(dansyl)；傘酮(umbelliferone)；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素(luciferin)；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶； $\beta$ -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫

氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，以及使用過氧化氫來氧化染料前驅體之酶(諸如HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶)；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似物。在另一個實施例中，標記為正電子發射體。正電子發射體包括(但不限於) $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{76}\text{Br}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 及 $^{124}\text{I}$ 。在一特定實施例中，正電子發射體為 $^{89}\text{Zr}$ 。

#### F. 醫藥調配物

如本文所述之抗間皮素抗體或免疫接合物之醫藥調配物係藉由使具有所需純度之該抗體或免疫接合物與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑混合來製備(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版，Osol, A.編(1980))，呈凍乾調配物或水溶液形式。醫藥學上可接受之載劑通常在所用劑量及濃度下對受者無毒，且包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲煙銨)；苜蓿素銨；苯酚、丁醇或苜蓿醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄

糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間隙藥物分散劑，諸如可溶性中性-活性玻尿酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶醣蛋白，諸如rHuPH20(HYLENEX<sup>®</sup>, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP及使用方法，包括rHuPH20，描述於美國專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多個其他葡萄糖胺聚糖(諸如硫酸軟骨素酶)組合。

例示性凍乾抗體或免疫接合物調配物描述於美國專利第6,267,958號中。水性抗體或免疫接合物調配物包括美國專利第6,171,586號及WO 2006/044908中所述者，後者調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝劑。

本文中之調配物亦可含有一種以上為所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性成分。舉例而言，可能需要進一步提供吉西他濱，例如用於治療間皮素陽性癌症，諸如間皮素陽性胰臟癌(胰腺癌)。在另一個實例中，可能需要進一步提供與細胞毒性劑接合之抗MUC16抗體，例如用於治療間皮素陽性癌症或雙陽性癌症，諸如間皮素陽性卵巢癌(卵巢漿液性腺癌)或雙陽性卵巢癌。該等活性成分適合以有效用於預定目標之量組合存在。

活性成分亦可包埋於以下各者中：例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊，分別例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；膠體藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)或巨乳液。該等技術揭示於*Remington's Pharmaceutical Sciences*第16版，Osol, A.編(1980)中。

可製備持續釋放型製劑。持續釋放型製劑之合適實例包括含有抗體或免疫接合物之固體疏水性聚合物的半透性基質，此等基質呈成形物品(例如薄膜或微膠囊)之形式。

欲用於活體內投藥之調配物通常為無菌的。無菌可易於例如藉由經無菌過濾膜過濾來實現。

#### G. 治療方法及組合物

本文中所提供之任何抗間皮素抗體或免疫接合物可用於方法(例如治療方法)中。

在一個態樣中，本文中所提供之抗間皮素抗體或免疫接合物用於抑制間皮素陽性細胞增殖之方法中，該方法包括在容許該抗間皮素抗體或免疫接合物與該細胞表面上之間皮素結合的條件下，將該細胞暴露於該抗間皮素抗體或免疫接合物，由此抑制該細胞增殖。在某些實施例中，該方法為活體外或活體內方法。在其他實施例中，該細胞為胰臟細胞、卵巢細胞、肺細胞、間皮瘤細胞或子宮內膜細胞。在其他實施例中，該細胞為雙陽性細胞。

可使用購自Promega(Madison, WI)之CellTiter Glo™發光細胞活力分析法來分析活體外細胞增殖之抑制。該分析法

基於定量所存在之ATP(其為代謝活性細胞之指示)來測定培養物中之活細胞數。參見Crouch等人(1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; 美國專利第6602677號。該分析法可在96孔或384孔格式中進行,使其可進行自動高通量篩選(HTS)。參見Cree等人 (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404。該分析程序涉及將單一試劑(CellTiter-Glo<sup>®</sup>試劑)直接添加至培養細胞中。其引起細胞溶解及產生由螢光素酶反應產生之發光信號。發光信號與所存在ATP之量成正比,所存在ATP之量則與培養物中所存在之活細胞數成正比。可由光度計或CCD相機攝影裝置來記錄數據。發光度輸出則以相對光單位(RLU)表示。

在另一個態樣中,提供一種適用作藥物之抗間皮素抗體或免疫接合物。在其他態樣中,提供一種適用於治療方法之抗間皮素抗體或免疫接合物。在某些實施例中,提供一種適用於治療間皮素陽性癌症之抗間皮素抗體或免疫接合物。在某些實施例中,本發明提供一種適用於治療患有間皮素陽性癌症之個體之方法中之抗間皮素抗體或免疫接合物,該方法包括向該個體投與有效量之抗間皮素抗體或免疫接合物。在一項該實施例中,該方法進一步包括向該個體投與有效量之至少一種其他治療劑,例如如下所述。

在另一個態樣中,本發明提供一種抗間皮素抗體或免疫接合物之用途,其係用於製造或製備藥物。在一個實施例中,該藥物係用於治療間皮素陽性癌症。在另一個實施例中,該藥物係用於治療間皮素陽性癌症之方法中,該方法

包含向患有間皮素陽性癌症之個體投與有效量之該藥物。在一個該種實施例中，該方法進一步包含向該個體投與有效量之至少一種其他治療劑，例如如下所述。

在另一個態樣中，本發明提供一種用於治療間皮素陽性癌症之方法。在一個實施例中，該方法包含向患有該間皮素陽性癌症之個體投與有效量之抗間皮素抗體或免疫接合物。在一個該種實施例中，該方法進一步包含向該個體投與有效量之至少一種其他治療劑，如下所述。

任一上述實施例之間皮素陽性癌症可為例如間皮素陽性胰臟癌(包括胰管腺癌)、間皮素陽性卵巢癌(包括卵巢漿液性腺癌)、間皮素陽性肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC))、間皮瘤及間皮素陽性子宮內膜癌。在一個實施例中，間皮素陽性癌症為在本文實例J中所述之條件下，得到大於「0」之抗間皮素免疫組織化學(IHC)得分之癌症，其對應於>90%之腫瘤細胞染色極弱或無染色。在另一個實施例中，如在本文實例J中所述之條件下所定義，間皮素陽性癌症以1+、2+或3+等級表現間皮素。任一上述實施例之間皮素陽性癌症可為雙陽性癌症。

任一上述實施例之「個體」可為人類。

在另一個態樣中，本發明提供醫藥調配物，其包含本文中所提供之任何抗間皮素抗體或免疫接合物，例如用於任何上述治療方法中。在一個實施例中，醫藥調配物包含本文中所提供之任何抗間皮素抗體或免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。在另一個實施例中，醫藥調配物包含本文

中所提供之任何抗間皮素抗體或免疫接合物及至少一種其他治療劑，例如如下所述。

本發明之抗體或免疫接合物在療法中可單獨使用或與其他藥劑組合使用。舉例而言，本發明之抗體或免疫接合物可與至少一種其他治療劑共投與。在某些實施例中，其他治療劑為吉西他濱。在某些實施例中，其他治療劑為與細胞毒性劑接合之抗MUC16抗體。

上述該等組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括於同一或各別調配物中)，及各別投藥，在此情況下，本發明之抗體或免疫接合物之投與可在其他治療劑及/或佐劑投與之前、同時及/或之後進行。本發明之抗體或免疫接合物亦可與放射療法組合使用。

本發明之抗體或免疫接合物(及任何其他治療劑)可藉由任何合適方式投與，包括非經腸、肺內及鼻內，及(若需要用於局部治療)病灶內投藥。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。可藉由任何合適途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥，部分取決於投藥為短期的或長期的。本文涵蓋多種給藥時程，包括(但不限於)單次投與或經不同時間點多次投與、大丸劑投與及脈衝輸注。

本發明之抗體或免疫接合物應以符合良好醫療規範之方式調配、給藥及投與。在此情況下考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床病狀、病症之起因、藥劑之傳遞位點、投藥方法、投藥時程



及從業醫生已知之其他因素。抗體或免疫接合物無需但視情況可與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量取決於存在於該調配物中之抗體或免疫結合物之量、病症或治療之類型及上述其他因素。該等藥劑通常以與本文中所述相同之劑量及投藥途徑使用，或以本文中所述劑量之約1%至99%使用，或以憑經驗/臨床上確定為適當的任意劑量及任何途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明之抗體或免疫接合物之合適劑量(當單獨使用或與一或多種其他其他治療劑組合使用時)將取決於所治療疾病之類型、抗體或免疫接合物類型、該疾病之嚴重程度及進程、該抗體或免疫接合物是出於預防性或治療性目的投與、先前療法、患者病史及對該抗體或免疫接合物之反應及主治醫師之判斷。宜一次性或經一系列治療向患者投與抗體或免疫接合物。視疾病之類型及嚴重程度而定，約1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15  $\text{mg}/\text{kg}$ (例如0.1  $\text{mg}/\text{kg}$ -10  $\text{mg}/\text{kg}$ )之抗體或免疫接合物可為向患者投與之最初候選劑量，無論例如藉由一或多次各別投與或藉由連續輸注。一種典型日劑量可在約1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100  $\text{mg}/\text{kg}$ 或更高劑量之範圍內，取決於上文所提及之因素。對於經數天或更長時間重複投藥，視病狀而定，治療通常可持續至對疾病症狀之所需抑制出現為止。抗體或免疫接合物之一種例示性劑量在約0.05  $\text{mg}/\text{kg}$ 至約10  $\text{mg}/\text{kg}$ 之範圍內。因此，可向患者投與約0.5  $\text{mg}/\text{kg}$ 、2.0  $\text{mg}/\text{kg}$ 、4.0  $\text{mg}/\text{kg}$ 或10  $\text{mg}/\text{kg}$ 之一或多個劑量(或其任何組合)。該等劑量可間歇地投與，

例如，每週或每三週(例如，以使得患者接受約二至約二十或例如約六個劑量的抗體)。可投與最初較高負荷劑量，接著可投與一或多個較低劑量。然而，其他給藥方案可為適用的。此療法之進程易於藉由習知技術及分析法監測。

應瞭解，任何上述調配或治療方法可使用本發明之免疫接合物及抗間皮素抗體進行。

## H. 製品

在本發明之另一個態樣中，提供一種含有可用於治療、預防及/或診斷上文所述病症之物質的製品。該製品包含容器及在該容器上或該容器隨附之標籤或藥品說明書。合適容器包括例如瓶、小瓶、注射器、靜脈內溶液袋等。容器可由諸如玻璃或塑料之多種材料形成。容器容納單獨組合物或與有效治療、預防及/或診斷病症之另一組合物組合之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之抗體或免疫接合物。標籤或藥品說明書指示該組合物用於治療所選病狀。另外，製品可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中該組合物包含本發明之抗體或免疫接合物；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或其他治療劑。本發明之該實施例中的製品可另外包含藥品說明書，該藥品說明書指示組合物可用於治療特定病狀。或者或另外，該製品可進一步包含一包含醫藥學上可接受之緩衝劑

(諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林葛爾氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液)的第二(或第三)容器。其可另外包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

# I. 生物材料之寄存

以下生物材料已寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC)：

融合瘤名稱	ATCC編號	寄存日期
MPF:3542(19C3.1.2)	PTA-11464	2010年11月9日

以上提及之寄存融合瘤產生本文中所提及之19C3抗體。

此寄存係依據布達佩斯條約(Budapest Treaty)關於國際認可之用於專利程序目的之微生物寄存之條款及其下(布達佩斯條約)條例進行。其確保自寄存之日起維持寄存物之活培養物30年且在最近一次要求提供寄存物樣本後至少五(5)年。寄存應由ATCC按照布達佩斯條約之條款進行，且遵守Genentech, Inc.與ATCC之間的協定，其保證由寄存者關於寄存材料為公眾之可用性所施加的所有限制將在有關美國專利授予之後不可撤回地取消，保證寄存培養物之子代在相關美國專利頒佈後或在任何美國或國外專利申請案公諸於眾(無論先後)後永久且不受限制的為公眾所用，且保證子代為由對其授權之美國專利商標局委員根據35 U.S.C.§122及其所遵循之委員規則(包括37 C.F.R.§1.14，

特定參考 886 OG 638)所確定人員的可用性。

### III. 實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應瞭解，鑒於上文提供之一般說明，可實踐各種其他實施例。

#### A. 人類間皮素基因表現

使用含有基因表現資訊之專用資料庫 (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) 分析人類間皮素基因表現。使用微陣列分佈觀測儀進行 GeneExpress® 資料庫之圖解分析。圖 2 為不同組織中人類間皮素基因表現之圖示，該等組織列在左側。圖形頂部上之標度指示基於雜交信號強度之基因表現程度。點出現在鄰近於各列舉組織之線條的上方及下方。出現在線條上方的點表示正常組織中之基因表現，且出現在線條下方的點表示腫瘤及患病組織中之基因表現。圖 2 展示某些腫瘤或患病組織中的間皮素基因表現較之其正常對應物增加。詳言之，間皮素展示在卵巢腫瘤、胰臟腫瘤、子宮內膜腫瘤及肺腫瘤 (包括腺癌及間皮瘤) 中實質性過度表現。除正常間皮 (腹膜、心包膜及胸膜) 之外，正常組織中基本上不存在人類間皮素表現。

#### B. 抗體生成

使用以下程序生成針對人類間皮素之單株抗體。使人類 MPF: 間皮素 (SEQ ID NO:42 之胺基酸 34-580) 或人類間皮素 (SEQ ID NO:43，對應於 SEQ ID NO:42 之胺基酸 296-580) (各融合於 N 端 unizyme His (HQ)-標籤) 於大腸桿菌 58F3 中表現且在 Ni-NTA 管柱 (Qiagen) 上純化，接著如先前所述

(Kirchhofer等人，2003)，在Superdex 200管柱上於20 mM MES pH 6.0, 6 M GdnHCl中凝膠過濾且透析於1 mM HCl中以便在-80℃下儲存。

用2 µg兩種抗原於Ribi佐劑(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO)中之混合物對5隻Balb/c小鼠(Charles River Laboratories, Hollister, CA)超免疫6次。基於藉由直接ELISA測定之高抗體力價選擇兩隻最佳小鼠，且彙集其B細胞並使用類似於先前所述方案(Koehler及Milstein, 1975; Hongo等人，1995)之經修飾方案與小鼠骨髓瘤細胞(X63.Ag8.653；美國菌種保存中心，Manassas, VA)融合。在10-12天之後，自融合瘤收集上清液且藉由直接ELISA針對與兩種抗原(各別)之結合進行篩選。為驗證正確摺疊、糖基化細胞表面表現之間皮素之識別，藉由關於gD-間皮素轉染之SVT2細胞(gD為用作具有抗gD抗體之陽性對照的N端抗原決定基標籤)之FACS進一步篩選ELISA陽性上清液。藉由限制稀釋法次選殖陽性融合瘤兩次且按比例擴大11個融合瘤，並藉由蛋白質A層析純化抗體。

圖3展示經分離單株抗體，以及下文進一步詳細描述之某些性質。

### C. 7D9及22A10之人類化

如下所述使單株抗體7D9及22A10人類化。殘基編號係根據Kabat等人，*Sequences of proteins of immunological interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。

## 1. 7D9之人類化

### a) 選殖鼠類7D9可變域

使用標準方法自產生鼠類7D9之融合瘤細胞提取總RNA。使用RT-PCR用重鏈及輕鏈之簡併引子擴增可變輕鏈(VL)及可變重鏈(VH)域。正向引子對VL及VH區之N端胺基酸序列具有特異性。LC及HC反向引子分別經設計成黏接於在各物種間高度保守的恆定輕鏈域(CL)及恆定重鏈域1(CH1)中之區域。使用常規測序方法測定插入物之聚核苷酸序列。7D9 VL及VH胺基酸序列分別展示於圖4及5中。

### b) 於受體人類共同構架上之直接高變區移植

以IgG形式評估在7D9之人類化期間所構建的變異體。使鼠類7D9之VL及VH域與人類VL  $\kappa$  I(VL<sub>KI</sub>)及人類VH亞群III(VH<sub>III</sub>)共同序列比對。將鼠類7D9(mu7D9)抗體之高變區工程改造於VL<sub>KI</sub>及VH<sub>ATA</sub>受體構架中以生成7D9.v1。受體VH構架VH<sub>ATA</sub>在3個位置處不同於VH<sub>III</sub>：R71A、N73T及L78A(Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992))。自mu7D9 VL域，將位置24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)移植於VL<sub>KI</sub>中。自mu7D9 VH域，將位置26-35(H1)、49-65(H2)及95-102(H3)移植於VH<sub>ATA</sub>中(圖1及2)。此等CDR定義包括由其序列高變性(Wu, T. T. & Kabat, E. A. (1970))、其結構位置(Chothia, C. & Lesk, A. M. (1987))及其與抗原-抗體接觸的牽連(MacCallum等人 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))所定義之位置。

藉由Kunkel突變誘發使用各高變區之各別寡核苷酸生成直接移植物7D9.v1。將用於重鏈或輕鏈之三種磷酸化寡核苷酸添加至含571 ng Kunkel模板之50 mM Tris pH 7.5、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 中，最終體積為40  $\mu\text{l}$ 。使混合物在90°C下黏接2分鐘，在50°C下黏接5分鐘，接著於冰上冷卻。接著在室溫下藉由添加0.5  $\mu\text{l}$  100 mM ATP、0.5  $\mu\text{l}$  25 mM dNTP(dATP、dCTP、dGTP及dTTP各25 mM)、1  $\mu\text{l}$  100 mM DTT、1  $\mu\text{l}$  10X TM緩衝劑(0.5 M Tris pH 7.5、0.1 M  $\text{MgCl}_2$ )、80 U T4連接酶及4 U T7聚合酶來填充10  $\mu\text{l}$ 黏接模板2小時，總體積為13.6  $\mu\text{l}$ 。接著將10  $\mu\text{l}$ 填充且接合之產物轉型至XL1-blue細胞(Stratagene)中。藉由DNA測序鑑別正確的純系且表現為IgG。

### c) 變異體評估

藉由CHO瞬時轉染使7D9變異體表現為IgG。用蛋白質G親和性層析純化IgG。藉由表面電漿共振使用BIAcoreTM-2000測定各7D9 IgG變異體對人類間皮素之親和力。使用Biacore之胺偶合套組，將Biacore研究級CM5晶片用約110 RU來源於大腸桿菌之重組人類間皮素固定。以30  $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率注射各7D9變異體之連續2倍稀釋液(0.488至1000 nM於含有0.05% Tween 20之PBS中)。以5分鐘締合及3.5分鐘解離分析各樣本。在各注射後，使用10 mM甘胺酸(pH 1.7)使晶片再生。藉由自具有以類似密度固定之不相干IgG之流動細胞減去RU來校正結合反應。使用同時擬合 $k_{\text{on}}$ 與 $k_{\text{off}}$ 之1:1朗繆爾模型進行動力學分析。

#### d) 結果

用於7D9人類化之人類受體構架係基於人類VL  $\kappa$  I共同構架(VL<sub>KI</sub>)及受體VH構架VH<sub>ATA</sub>，其在3個位置處不同於人類VH亞群III共同構架(VH<sub>III</sub>)：R71A、N73T及L78A(Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992))。使鼠類7D9之VL及VH域與人類VL<sub>KI</sub>及VH<sub>III</sub>域比對；鑑別高變區且移植於人類受體構架中以生成7D9.v1(圖4及5)。作為IgG，如藉由Biacore所評估，7D9.v1之親和力較之mu7D9(呈嵌合7D9格式)減小約2倍(圖6)。

為改良7D9.v1之結合親和力，將輕鏈中之位置36及87及重鏈中之位置48、67、69、71、73、75、76、78及80變為mu7D9中在此等位置處發現之殘基。將此等改變之輕鏈及重鏈與7D9.v1之鏈之組合轉染於CHO中，表現為IgG且純化，並藉由Biacore針對與人類間皮素之結合進行評估(圖6)。

變異體7D9.v2及7D9.v3(兩者皆含有改變之輕鏈)具有與嵌合7D9相當的親和力。變異體7D9.v3在輕鏈中之2個位置處不同於7D9.v1。任一單獨改變均不足以改良與mu7D9之結合相當的結合(圖6)。

人類化7D9.v3之改變的概述：將6個鼠類7D9 CDR(定義為位置24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)、26-35(H1)、49-65(H2)及93-102(H3))移植於人類共同VL<sub>KI</sub>及VH<sub>ATA</sub>受體域中。將輕鏈之兩個其他構架殘基36及87變回鼠類殘基，產生親和力與mu7D9相當的7D9.v3。



## 2. 22A10之人類化

### a) 選殖鼠類22A10可變域

使用標準方法自產生鼠類22A10之融合瘤細胞提取總RNA。使用RT-PCR用重鏈(HC)及輕鏈(LC)之簡併引子擴增可變輕鏈(VL)及可變重鏈(VH)域。正向引子對VL及VH區之N端胺基酸序列具有特異性。LC及HC反向引子分別經設計成黏接於在各物種間高度保守的恆定輕鏈域(CL)及恆定重鏈域1(CH1)中之區域。使用常規測序方法測定插入物之聚核苷酸序列。22A10 VL及VH胺基酸序列分別展示於圖7及8中。

### b) 於受體人類共同構架上之直接高變區移植物

在22A10之人類化期間構建的變異體以IgG形式評估或作為Fab單價呈現於噬菌體上。用於此研究之噬菌粒為單價Fab-g3呈現載體，其由在單一phoA啟動子控制下的兩個開放閱讀框架組成。第一開放閱讀框架由stII信號序列融合於受體輕鏈之VL及CH1域組成，且第二開放閱讀框架由stII信號序列融合於受體重鏈之VH及CH1域，繼之以次要噬菌體鞘蛋白P3組成。

使鼠類22A10之VL及VH域與人類VL  $\kappa$  I(VL<sub>KI</sub>)及人類VH亞群III(VH<sub>III</sub>)共同序列比對。將鼠類22A10(mu22A10)抗體之高變區工程改造於VL<sub>KI</sub>及VH<sub>III</sub>受體構架中以生成22A10移植物。自mu22A10 VL域，將位置24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)移植於VL<sub>KI</sub>中。自mu22A10 VH域，將位置26-35(H1)、49-65(H2)及95-102(H3)移植於VH<sub>III</sub>中(圖

7及8)。此等CDR定義包括由其序列高變性(Wu, T. T.及Kabat, E. A. (1970))、其結構位置(Chothia, C.及Lesk, A. M. (1987))及其與抗原-抗體接觸的牽連(MacCallum等人*J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))所定義之位置。

藉由Kunkel突變誘發使用各高變區之各別寡核苷酸生成22A10移植物。將用於重鏈或輕鏈之三種磷酸化寡核苷酸添加至含571 ng Kunkel模板之50 mM Tris pH 7.5、10 mM  $MgCl_2$ 中，最終體積為40  $\mu l$ 。使混合物在90°C下黏接2分鐘，在50°C下黏接5分鐘，接著於冰上冷卻。接著在室溫下藉由添加0.5  $\mu l$  100 mM ATP、0.5  $\mu l$  25mM dNTP(dATP、dCTP、dGTP及dTTP各25 mM)、1  $\mu l$  100 mM DTT、1  $\mu l$  10X TM緩衝劑(0.5 M Tris pH 7.5、0.1 M  $MgCl_2$ )、80 U T4連接酶及4 U T7聚合酶來填充10  $\mu l$ 黏接模板2小時，總體積為13.6  $\mu l$ 。接著將10  $\mu l$ 填充且接合之產物轉型至XL1-blue細胞(Stratagene)中。藉由DNA測序鑑別正確的純系且表現為IgG。

### c) 高變區之軟隨機化

使用軟隨機化策略使22A10移植物親和力成熟。使用毒化寡核苷酸合成策略(Gallop等人, *J Med Chem* 37:1233-51 (1994))將序列多樣性分別引入各高變區，使得朝向鼠類高變區序列之偏向得以保留。對於各多樣化位置，用核苷酸之70-10-10-10混合物毒化編碼野生型胺基酸之密碼子，在各位置處引起平均50%之突變。使用Kunkel突變誘發將序列多樣性引入22A10移植物之高變區，以生成分別分選之6

個軟隨機化噬菌體庫。製備6個庫，其各由單一軟隨機化高變區組成。

#### d) 產生噬菌體庫

在37°C下，經設計以將多樣性引入各高變區中之寡核苷酸在含有660 ng寡核苷酸、50 mM Tris pH 7.5、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、20 mM DTT及5 U多核苷酸激酶之20 µl反應物中分別磷酸化1小時。

對於各庫，將2 µl磷酸化寡核苷酸添加至含300 ng Kunkel模板之50 mM Tris pH 7.5、10 mM MgCl<sub>2</sub>中，最終體積為10 µl。使混合物在90°C下黏接2分鐘，在50°C下黏接5分鐘，接著於冰上冷卻。接著在室溫下藉由添加0.5 µl 10 mM ATP、0.5 µl 10 mM dNTP(dATP、dCTP、dGTP及dTTP各10 mM)、1 µl 100 mM DTT、1 µl 10×TM緩衝液(0.5 M Tris(pH 7.5)、0.1 M MgCl<sub>2</sub>)、80 U T4連接酶及4 U T7聚合酶來填充黏接之模板2小時，總體積為20 µl。接著，將此等填充且接合之產物各轉型至XL1-blue細胞中，在37°C下於0.5 ml含有5 µg/mL四環素及M13/KO7輔助噬菌體(MOI 10)之2YT中生長2小時，隨後彙集，且轉移至500 ml含有50 µg/mL卡苯尼西林(carbenicillin)之2YT中並在37°C下生長16小時。

#### e) 噬菌體選擇

對於固相噬菌體選擇，將來源於293之人類或食蟹獼猴間皮素在4°C下於MaxiSorp微量滴定板(Nunc, Rochester, NY)上在50 mM碳酸氫鈉(pH 9.6)中固定隔夜。使用酪蛋白

阻斷劑(Pierce, Rockford, IL)阻斷板至少1小時。

自培養上清液中收集噬菌體且懸浮於含有5%乳粉及0.05% Tween 20之PBS(PBSBT)中。在添加噬菌體庫及培育1小時後，用含有0.05% Tween 20之PBS(PBST)充分洗滌微量滴定孔且藉由用20 mM HCl、500 mM KCl培育各孔30分鐘來溶離所結合之噬菌體。用1 M Tris(pH 8)中和所溶離之噬菌體，且使用XL1-Blue細胞及M13/KO7輔助噬菌體擴增並在37°C下於2YT、50 µg/mL卡苯尼西林中生長隔夜。將自含標靶之孔中溶離之噬菌體的力價與自不含標靶之孔中回收之噬菌體的力價相比較來評估富集。

對於溶液相噬菌體選擇，將生物素標記之來源於293之人類間皮素或生物素標記之食蟹獼猴間皮素添加至懸浮於含有5%乳粉及0.05% Tween 20之PBS(PBSBT)中之噬菌體中。在培育後，結合於生物素標記之間皮素的噬菌體捕捉於塗有抗生蛋白鏈菌素之微量滴定板上歷時5分鐘。用含有0.05% Tween 20之PBS(PBST)充分洗滌微量滴定孔且藉由用20 mM HCl、500 mM KCl培育各孔30分鐘來溶離所結合之噬菌體。用1 M Tris(pH 8)中和所溶離之噬菌體，且使用XL1-Blue細胞及M13/KO7輔助噬菌體擴增並在37°C下於2YT、50 µg/mL卡苯尼西林中生長隔夜。將自含標靶之孔中溶離之噬菌體的力價與自不含標靶之孔中回收之噬菌體的力價相比較來評估富集。

對於溶液相噬菌體選擇，藉由捕捉結合於溶液中濃度減小之生物素標記之間皮素的噬菌體接著捕捉於中性鏈親和

素上10分鐘(締合速率選擇)且藉由增加洗滌時間及溫度使微弱結合噬菌體洗去(解離速率選擇)兩者來逐漸增加選擇嚴格度(Fuh等人, *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093 (2004))。

#### f) IgG產生

出於篩選目的，最初在293細胞中產生IgG變異體。使用FUGENE系統(Roche, Basel, Switzerland)將編碼VL及VH之載體(25 µg)轉染至293細胞中。使500 µl FuGene與4.5 ml不含有FBS之DMEM培養基混合且在室溫下培育5分鐘。將各鏈(25 µg)添加至此混合物中且在室溫下培育20分鐘，隨後轉移至5個T-150燒瓶中以便在37°C下，於5% CO<sub>2</sub>中轉染隔夜。第二天，移除含有轉染混合物之培養基且用23 ml含有0.1 ml/L微量元素(A0934)及10 mg/L胰島素(A0940)之PS04培養基置換。將細胞再培育5天，此後在1000 rpm下收集培養基5分鐘，且使用0.22 µm低蛋白結合過濾器無菌過濾。可在每125 ml培養基添加2.5 ml 0.1% PMSF之後在4°C下儲存樣本。用蛋白質G親和性層析純化IgG。

#### g) 親和力測定

藉由表面電漿子共振使用BIAcore™-2000測定22A10 IgG變異體對人類或食蟹獼猴間皮素之親和力。使用Biacore之胺偶合套組，用約110 RU來源於大腸桿菌之重組人類或食蟹獼猴間皮素固定Biacore研究級CM5晶片。以30 µl/min之流動速率注射各22A10變異體之連續2倍稀釋液(0.488至1000 nM於含有0.05% Tween 20之PBS中)。以5分鐘締合及3.5分鐘解離分析各樣本。在各注射後，使用10 mM

甘胺酸 (pH 1.7) 使晶片再生。藉由自具有以類似密度固定之不相干 IgG 之流動細胞減去 RU 來校正結合反應。使用同時擬合  $k_{on}$  與  $k_{off}$  之 1:1 朗繆爾模型進行動力學分析。

#### h) 結果

用於 22A10 人類化之人類受體構架係基於共同人類  $\kappa$  I VL 域及共同人類亞群 III VH 域。使 mu22A10 之 VL 及 VH 域與人類  $\kappa$  I 及亞群 III 域比對；鑑別各互補決定區 (CDR) 且移植於人類受體構架中以生成可表現為 IgG 或以 Fab 形式呈現於噬菌體上之 CDR 移植物 (圖 7 及 8)。

生成 6 個軟隨機化庫，其中多樣性分別引入 22A10 CDR 移植物之各 CDR 中。使用固相及溶液兩種分選策略針對人類及食蟹獼猴間皮素 (來源於 293 細胞，旨在改良與食蟹獼猴或人類間皮素糖基化形式之結合) 淘選庫。溶液分選方法可經由操控生物素標記之目標濃度及噬菌體捕捉時間來選擇高親和力純系，同時可使用添加未標記之目標來除去具有較快解離速率之純系 (Fuh 等人 *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093 (2004))。挑選各庫最後一輪之純系進行 DNA 序列分析且顯示靶向除 CDR-L2 及 CDR-H2 以外之各 CDR 的序列改變，表明許多可能的變化改良抗原結合。針對人類或食蟹獼猴間皮素選擇之若干純系在 CDR-H3 中有變化，最豐富的為在位置 99 處酪胺酸變為異白胺酸。此變異體以及若干其他變異體表現為 IgG 且藉由 Biacore 及藉由 Scatchard 分析針對與間皮素之結合進行表徵 (圖 9A)。若干純系超過 22A10 移植物之親和力。

使用人類化22A10變異體以使間皮素自穩定表現間皮素之細胞株免疫沈澱。用如圖9B中所示之人類化22A10變異體(Gr, 移植物; v1(1)、v17(17)及v83(83))或h7D9.v3、h5B6抗gD或hIgG陰性對照(用於比較)使穩定表現帶有gD標籤之不同物種之間皮素的BJAB細胞免疫沈澱。洗滌免疫沈澱物且用鼠類抗gD抗體西方墨點染色以偵測gD-間皮素。h22A10.v83使全部三個物種之間皮素(食蟹獼猴, 上部; 人類, 中部; 及大鼠, 下部墨點)免疫沈澱的能力在h22A10變異體中為最佳。最右側之色帶展示20%輸入溶胞物(無免疫沈澱)用於比較總表現量。分子量標記(kDa)標在左側。

**人類化22A10.v83之改變的概述：**由6個鼠類22A10 CDR(定義為位置24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、26-35(H1)、49-65(H2)及95-102(H3))於人類共同 $\kappa$ I VL及亞群III VH中之移植物起始，使用CDR軟隨機化來鑑別CDR H3(Y99I)中改良與人類及食蟹獼猴間皮素之結合之變化。22A10.v83較之其他人類化變異體展示高親和力結合，且亦展示識別更多結合位點之能力。

在本申請案通篇中，小鼠單株抗體7D9及22A10分別替代地稱為7D9、m7D9或mu7D9；及22A10、m22A10或mu22A10。除非另外指明，否則人類化單株抗體7D9.v3及22A10.v83分別替代地稱為7D9.v3、h7D9.v3或hu7D9.v3；及22A10.v83、h22A10.v83或hu22A10.v83。

#### D. 物種交叉反應性

測試單株抗體以確定其是否與來自除人類以外之物種之間皮素交叉反應。圖11展示人類(SEQ ID NO:43)、食蟹獼猴(SEQ ID NO:46)、大鼠(SEQ ID NO:47)及小鼠(SEQ ID NO:48)間皮素之間的序列同源性。加陰影殘基在至少兩個物種之間相同。未加陰影之殘基於四個物種中之至少兩者之間不同。圖12展示以帶有gD抗原決定基標籤之間皮素(人類、獼猴、大鼠或小鼠間皮素)穩定轉染；用10  $\mu\text{g/mL}$  h7D9.v3、h22A10.v83或抗gD h5B6染色；且用Alexa 647抗人類抗體偵測之293細胞的FACS分析結果。未經轉染之293細胞通常不表現間皮素(「WT」)。h7D9.v3對於人類間皮素具有特異性，而h22A10.v83結合於人類、獼猴及大鼠間皮素，但不結合於小鼠間皮素。抗gD染色證實小鼠間皮素確實得以表現。

#### E. 抗體親和力

為測定h7D9.v3及h22A10.v83之相對結合親和力，根據標準程序(Holmes等人，*Science* 256:1205-1210 (1992))來進行Scatchard分析，簡言之在室溫下，在濃度遞增之未標記之抗體存在下，將分離細胞與 $[I^{125}]$ 標記之h7D9.v3或h22A10.v83一起培育2小時，洗滌且藉由閃爍計數定量細胞結合之放射性。在New Ligand程式(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)中，用非線性回歸曲線擬合分析數據以估算Kd值(Munson等人，*Anal. Biochem.*, 107 220-239 (1980))。

如圖13中所示，h7D9.v3分別以0.2、0.25及0.97 nM之親



和力結合於在穩定轉染之293、BJAB及HT1080細胞株(其均不表現內源性間皮素)上所表現之帶有gD標籤之人類間皮素。此等Kd值涵蓋對於四個胰臟細胞株及兩個卵巢細胞株中之內源性間皮素所發現之範圍(0.41-1 nM)。根據h22A10.v83對內源性人類間皮素之親和力(約9-10 nM)，其對相同穩定細胞株上所表現之人類間皮素的親和力分別為2.7、1.8及6.2 nM。h22A10.v83分別以7.3 nM及2.7 nM之親和力結合於穩定轉染之293細胞及BJAB細胞上所表現之大鼠間皮素，其與對於正常胸膜細胞株4/4-RM4上之內源性大鼠間皮素所觀察到的6.2 nM之Kd值一致(Aronson等人，*In Vitro* 17: 61-70 (1981))。

#### F. 抗原決定基

為確定7D9及22A10是否共有與圖3中所列之其他抗間皮素抗體相同的抗原決定基，藉由標準交叉阻斷ELISA進行單株抗體之抗原決定基定位。在4°C下，用100 µL含1 µg/mL人類間皮素胞外域之塗佈緩衝液(50 mM碳酸鈉，pH 9.5)塗佈96孔Nunc Immunosorp板(Nalge Nunc, USA)隔夜。以下步驟均在室溫下進行。在200 µL洗滌緩衝液(含有0.05% Tween 20之PBS，pH 7.4)中洗滌三次後，用ELISA緩衝液(含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)及0.05% Tween 20之PBS，pH 7.4)阻斷板60分鐘。接著添加於ELISA緩衝液中之20 µg/mL鼠類單株抗體7D9或22A10，歷時2小時(每孔100 µL)。未經洗滌，亦添加所有測試抗間皮素抗體之生物素標記型式(100 µL，2 µg/mL)至1 µg/mL之最終濃度，歷時

30分鐘。在200  $\mu$ L洗滌緩衝液中洗滌三次之後，藉由以1:5000之稀釋率添加抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化酶(HRP)(Zymed; Carlsbad, CA)來偵測任何生物素標記之抗體結合，歷時30分鐘。在如上三次洗滌之後，添加100  $\mu$ L生色3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)受質(BioFX Laboratories; Owings Mills, MD)，歷時5分鐘。藉由添加100  $\mu$ L終止試劑(BioFX Laboratories)終止生色反應，且在超級微量板讀取儀(Ultramicroplate Reader)(Biotek Instruments; Winooski, VT)上讀取620 nm下之吸光度。藉由在非生物素標記抗體7D9及22A10不存在下將生物素標記抗體與間皮素一起培育來並行地測定各生物素標記抗體之最大可能結合程度。

結果展示於圖14中。9種生物素標記抗間皮素抗體(\*)任一者之信號指示不存在與第一抗體之競爭(出於比較之目的，在第一抗體不存在下，各生物素標記抗體之最大結合亦展示於右側組中)。7D9(在圖14中稱為7D9.5.2)為在7D9存在時不能結合之唯一抗體(亦即其與自身競爭，左側第二條)，而22A10(在圖14中稱為22A10.1.2)正常結合(左側組中之黑色條)。相對比而言，當22A10經預先結合時，22A10不能結合(中間組之最後一條)，而7D9及其他抗體能結合。因此，不僅7D9及22A10不互相競爭，而且每一者結合與其他7種抗體不同的抗原決定基。7D9與自身而非任何其他抗體競爭(將每條與在ELISA塗佈抗體7D9或22A10不存在下各抗體與板上之間皮素結合之最大信號相比較)。類似地，22A10僅與自身而非其他抗體(包括7D9)競

爭。因此，7D9及22A10具有相互之間不同且與其他經分離單株抗體不同的抗原決定基。

#### G. 使用人類:小鼠及獼猴:人類間皮素嵌合體之抗原決定基定位及突變分析

進行胰蛋白酶肽定位實驗，其中使h7D9.v3結合於經固定之人類間皮素，接著與胰蛋白酶一起培育，且溶離剩餘受抗體保護之肽並藉由質譜分析來鑑別。彼等實驗涉及SEQ ID NO:43之胺基酸133-183作為h7D9.v3結合位點。為證實此區，吾等利用7D9與人類(圖15中展示之構築體387)間皮素而非小鼠(構築體385)或獼猴(構築體383)間皮素反應生成嵌合體，吾等預測其應比截斷突變體較佳摺疊。吾等在胺基酸131處使用沉默MfeI位點(編碼QL)且在胺基酸213處使用沉默BglII位點(編碼DL)構建人類:小鼠間皮素嵌合體(398及399)以將人類序列引入小鼠構築體中。另外，產生獼猴構築體(400)，其中胺基酸131-178經由MfeI位點經人類間皮素之彼等胺基酸置換。各構築體具有N端gD標籤(未展示)來驗證表現。

圖15中展示之帶有gD標籤之GPI錨定之間皮素構築體暫時表現於293細胞中且用0.02  $\mu\text{g/mL}$ 鼠類7D9、1  $\mu\text{g/mL}$ 鼠類22A10或1  $\mu\text{g/mL}$ 抗gD標籤染色(以校正差異表現量)。在用Alexa 488抗小鼠抗體偵測之後，洗滌樣本且藉由FACS分析，且在減去野生型293陰性對照細胞上之任何背景染色之後，螢光強度數據針對抗gD信號進行校正。如圖16中所示，7D9結合於人類:小鼠嵌合體399(具有人類胺基酸

1-213)而不結合於全長小鼠間皮素385或398(具有僅1-131之人類胺基酸),表明7D9結合於胺基酸131與213之間的抗原決定基。其結合獼猴:人類嵌合體400(具有人類胺基酸131-178)而不結合於全長獼猴(383)的能力將抗原決定基限定在胺基酸131與178之間。(注意在7D9情況下所發現之結合%相對於22A10較低係由於7D9使用1/50之抗體濃度)。

使用相同嵌合體定位大鼠、獼猴及人類(而非小鼠)反應性22A10抗原決定基。在表現嵌合體399而非398之細胞上觀察到結合。因此,22A10結合於具有在胺基酸131-213之間之關鍵殘基的抗原決定基(圖16)。

由於7D9及22A10不互相競爭(圖13),因此其可能結合於胺基酸131-213內之不同抗原決定基。為鑑別彼等不同抗原決定基,使399嵌合體背景中人類間皮素之2-4個胺基酸延伸段突變為相應小鼠胺基酸。四個物種間胺基酸132-212之比對展示於圖17中,其中帶編號之框指示15個突變體之位置。對於圖17底部表格中所列之15個突變體中之每一者,展示突變為小鼠序列(下方)之人類序列(上方)。(注意:並未成功生成突變體11)。

圖17中除突變體11以外之全部突變體均表現於293細胞中且進行如圖16中之FACS分析,除了使用5  $\mu\text{g/mL}$ 各抗體之人類化型式(亦即h7D9.v3、h22A10.v83及h5B6抗gD標籤(陽性對照)),使用Alexa488抗人類抗體偵測。結果展示於圖18A中,其中螢光數據展示為抗gD信號之百分比以校正表現量。(注意:突變體13不在293細胞中表現且因此自數

據集省略)。h7D9.v3結合於除6及9以外之所有突變體；而h22A10.v83結合除突變體15(箭頭)以外之所有突變體。

藉由比對不同間皮素種類，h7D9.v3抗原決定基中之關鍵殘基精確定位至人類序列與非交叉反應性獼猴序列之間不同的兩個單胺基酸殘基：突變體6中之E153及突變體9中之D174。用於抗體結合之彼等殘基的重要性係藉由使獼猴間皮素中之相等殘基突變為相應人類殘基(亦即R153突變為E且G174突變為D)來確認。不另外結合於獼猴間皮素之h7D9.v3能夠結合獼猴間皮素突變體(圖18B)。人類間皮素序列之殘基E152突變為Q導致對h7D9.v3結合之抑制之其他研究表明殘基E152亦在抗體結合中起作用。

基於最近預測之間皮素的狢狢樣重複結構(Sathyanarayana等人, *BMC Structural Biology* 9:1 (2009))，7D9抗體可能橋聯間皮素之內螺旋4及外螺旋5。類似地，因為h22A10.v83與大鼠而非小鼠交叉反應，故突變體15中之殘基E211(Sathyanarayana等人上述之外螺旋6中)可能為其抗原決定基之關鍵決定子。圖19描述由h7D9.v3及h22A10.v83結合之殘基。

#### H. h7D9.v3之結合不受糖基化抑制

為確定h7D9.v3是否結合於糖基化間皮素，在CHO細胞中表現帶有C端his標籤之人類間皮素，純化且根據Mono S管柱上之電荷進一步分離為具有高(溶離份A11)、中等(A12)、低(B1)及低至無(B5)間皮素糖基化的溶離份，如藉由SDS-PAGE凝膠上庫馬斯藍染色所示(圖20，左上方)。

使各溶離份流經預先結合有h7D9.v3的晶片，且量測締合速率及解離速率以揭示各溶離份之相同親和力(1.5 nM)(圖20，左下方)，表明h7D9.v3之結合並未受糖基化抑制。此等數據藉由展示h7D9.v3可使與人類化抗gD h5B6抗體相同的所有條帶自穩定表現gD-人類間皮素(其gD抗原決定基標籤缺乏糖基化位點)之HT1080細胞免疫沈澱來證實，表明h7D9.v3可在與糖基化狀態無關的情況下使人類間皮素免疫沈澱。相比之下，人類化22A10優先使較低分子量(最少糖基化)種類免疫沈澱，表明22A10結合可受糖基化影響(圖20，右側)。

為評估測試抗體與h7D9.v3相比結合糖基化間皮素之能力，進行FACS分析，其中將測試抗體與OVCAR3細胞之結合與h7D9.v3與OVCAR3細胞之結合相比較。使用合適第二抗體來偵測h7D9.v3及測試抗體與OVCAR3細胞之結合(例如，使用Alexa 647抗人類抗體來偵測h7D9.v3之結合)。

### I. 單株抗體19C3阻斷MUC16與間皮素之相互作用

測試單株抗體以確定其是否能夠阻斷MUC16與間皮素之結合。經純化之生物素標記之MUC16片段(Muc16-Bt，具有三個黏蛋白重複序列)與A431細胞(其一般不表現間皮素)上穩定表現之間皮素之結合展示於圖21(「無抗體」)左側畫面中。如藉由FACS使用抗生蛋白鏈菌素-PE所偵測，將細胞與5倍莫耳比之19C3(而非7D9)一起預培育抑制MUC16-Bt與間皮素之結合，如圖21左側畫面中所示。相

比較而言，在5倍莫耳過量之指定抗間皮素抗體不存在或存在下，評估帶有C端his8標籤之重組間皮素(自293細胞純化)與穩定表現MUC16之PC3細胞的結合(圖21右側畫面)，其係藉由FACS使用Alexa647抗his6抗體偵測。間皮素與19C3(而非7D9或22A10)一起預培育抑制間皮素與表現MUC16之細胞之結合(圖21，右側畫面)。事實上，在此分析法中，7D9及22A10似乎增強間皮素與MUC16之結合。

#### J. 人類間皮素在各種癌症類型中之流行率

使用免疫組織化學分析人類間皮素在各種癌症中之表現。將胰管腺癌(圖22)、卵巢漿液性腺癌(圖23)及非小細胞肺癌(圖24)之福馬林固定石蠟包埋(FFPE)之腫瘤微陣列(每個腫瘤具有一個1 mm核)切片於顯微鏡載片上，脫去石蠟且經由稀釋的醇系列再水合。使用目標修復溶液(Target Retrieval Solution)(Dako, Glostrup, Denmark)預處理載片用於抗原修復，淬滅，阻斷且在Dako自動染色儀上用10 µg/mL小鼠抗人類間皮素單株抗體19C3染色60分鐘。在洗滌後，用生物素標記之抗小鼠抗體繼之以ABC複合物(VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA)偵測19C3，且使用DAB(Pierce Laboratories)作為色原顯色。接著使用邁爾氏蘇木精(Meyers Hematoxylin)將載片對比染色且使用一系列醇及二甲苯脫水，隨後使用有機封固劑(PermaMount, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)蓋片。

由專業病理學家根據以下流程，考慮染色之強度(棕色染色之暗度)以及廣度對間皮素染色(棕色)計分。對於各種

瘤類型，各間皮素計分之代表性實例展示於圖22-24中。

0(陰性)：>90%腫瘤細胞中染色極弱或無染色

1+(輕度)：主要染色型態為弱

2+(中度)：大多數(>50%)贅生性細胞中主要染色型態為中等強度

3+(強度)：大多數(>50%)贅生性細胞中主要染色型態為強

圖22展示70%之胰管腺癌為間皮素陽性，展示1+、2+或3+程度之染色，其中33%展示2+或3+染色。圖23展示98%之卵巢漿液性腺癌為間皮素陽性，其中74%展示2+或3+程度之染色。另外，來自卵巢漿液性腺癌之全部八種測試轉移腺癌為間皮素陽性，表明原發性卵巢腫瘤在轉移後並不喪失間皮素表現。圖24展示44%之非小細胞肺癌(NSCLC，腺癌亞型)為間皮素陽性，其中26%展示2+或3+程度之染色。另外，來自間皮素陽性原發性NSCLC患者腫瘤之8種測試匹配轉移腫瘤中有三者(38%)保持間皮素陽性染色。

如藉由IHC使用19C3抗體所測定，間皮素亦在間皮瘤及子宮內膜癌中表現。

亦檢驗間皮素在食蟹獼猴中之表現。製作來自人類(福馬林固定石蠟包埋切片)及食蟹獼猴(冷凍切片)之肺胸膜及心包膜間皮切片且分別用19C3單株抗體或22A10單株抗體染色。人類間皮用19C3特異性染色(圖25，左側)，且食蟹獼猴間皮用22A10特異性染色(圖25，右側)。此等結果證明22A10可識別內源性食蟹獼猴間皮素，其具有與在人類



中類似的分佈。

### K. 抗間皮素抗體藥物接合物之產生

抗間皮素抗體-藥物接合物(ADC)係藉由使h7D9.v3及h22A10.v83與藥物-連接子部分MC-vc-PAB-MMAE接合而產生，其描述於上文II.D節中。為方便起見，藥物-連接子部分MC-vc-PAB-MMAE在此等實例及圖式中另外稱為「vcMMAE」或「VCE」。(舉例而言，h7D9.v3-MC-vc-PAB-MMAE在此等實例及圖式中稱為h7D9.v3-vcMMAE或h7D9.v3-VCE。)在接合之前，使用根據WO 2004/010957 A2中所述之方法的標準方法，用TCEP部分還原抗體。使用根據Doronina等人(2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784及US 2005/0238649 A1中所述之方法的標準方法，使部分還原之抗體與藥物-連接子部分接合。簡言之，使部分還原之抗體與藥物-連接子部分組合，以使該部分與半胱胺酸殘基接合。淬滅接合反應，且純化ADC。測定各ADC之藥物負載量(每個抗體之藥物部分之平均數)且在所有情況下為3.33至4.0。

### L. h7D9.v3-vcMMAE在活體內HPAC模型中之功效

使用胰腺癌異種移植物模型研究h7D9.v3-vcMMAE之功效。將五百萬個HPAC細胞(間皮素陽性(2+)，藉由IHC使用19C3)於HBSS中皮下注射於SCID米色小鼠中，且腫瘤用1.1、2.7、5.5、11及16.4 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE(3.5個MMAE/抗體)；或5、10及15 mg/kg h5B6抗gD-vcMMAE(3.3個MMAE/抗體)；或使用15 mg/kg裸h7D9.v3(無MMAE)

給藥。如圖 26 中所示，在 5.5 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE 下實現實質性腫瘤生長抑制，且在 11-16 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE 下實現消退，但使用 15 mg/kg 裸抗體或 gD-vcMMAE 對照未觀察到明顯作用。展示基於總體生長率之模型曲線擬合。圖 26 之右下方畫面展示 h7D9.v3 在 HPAC 細胞及 IHC 中之 FACS 分析及內化。

#### **M. h7D9.v3-vcMMAE 在原發性胰腺癌模型中之功效**

研究 h7D9.v3-vcMMAE 在原發性胰腺癌模型 (Oncotest, GMBH, Germany) 中之功效。將原發性人類間皮素陽性胰腺瘤 (藉由 IHC 以 1-2+ 表現間皮素) 厚塊皮下植入雌性 NMRI 裸小鼠中，以 5、10 及 20 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE 給藥 (3.5 個 MMAE/抗體)。平均腫瘤體積 $\pm$ 標準差標繪於圖 27 中。在 h7D9.v3-vcMMAE 之所有劑量下發現明顯腫瘤生長抑制。右側展示原發性胰臟瘤之 IHC。

#### **N. h7D9.v3-vcMMAE 在卵巢癌模型中之功效**

使用卵巢癌異種移植物模型研究 h7D9.v3-vcMMAE 之功效。將一千萬個 OvCar3x2.1 細胞 (間皮素陽性 (2-3+)，藉由 IHC 使用 19C3) 注射於 CB17 SCID 米色小鼠之乳房脂墊中，隨後用 1、2.5、5、10 及 15 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE (3.5 個 MMAE/抗體) 或 h5B6 抗 gD-vcMMAE (3.3 個 MMAE/抗體) 給藥。如圖 28 中所示，在 2.5 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE 下發現適度活性，且在 5 mg/kg 及更高劑量下發現消退，而抗 gD-vcMMAE 在 5 mg/kg 以下不展現活性 (在 10 mg/kg 下僅展現適度活性且在 15 mg/kg 下展現腫瘤停滯)。展示基於總體生

長率之模型曲線擬合。圖 28 之右下方畫面展示 h7D9.v3 在 OvCar3x2.1 細胞及 IHC 中之 FACS 分析及內化。

#### **O. h7D9.v30-vcMMAE 在肺癌模型中之功效**

使用肺癌(鱗狀細胞癌)異種移植物模型研究 h7D9.v3-vcMMAE 之功效。將五百萬個 H226x2 細胞(間皮素陽性(3+)，藉由 IHC)於 Matrigel:HBSS 之 50:50 混合物中注射於 CB17 SCID 小鼠側腹中。平均腫瘤體積±標準差標繪於圖 29 中。h7D9.v3-vcMMAE(3.5 個 MMAE/抗體)在 5 mg/kg 下展示適度活性且在 10 mg/kg 下展示腫瘤停滯，而在任一劑量下之對照抗 gD-vcMMAE 接合物(3.97 個 MMAE/抗體)無明顯活性。圖 29 之右下方畫面展示 h7D9.v3 在 H226x2 細胞及 IHC 中之 FACS 分析及內化。

#### **P. h7D9.v3-vcMMAE 及 h22A10.v83-vcMMAE 具有類似功效**

研究 h7D9.v3-vcMMAE 與 h22A10.v83-vcMMAE 相比較之功效。將兩千萬個穩定表現 gD-人類間皮素(左)或 gD-食蟹獼猴間皮素(右)之 BJAB 細胞於 HBSS 緩衝液中皮下接種於 CB17 SCID 小鼠中。小鼠用 0.5 或 2 mg/kg h7D9.v3-vcMMAE(在接種有 BJAB-gD-人類間皮素之小鼠中)、或 h22A10.v83-vcMMAE(在接種有 BJAB-gD-食蟹獼猴間皮素之小鼠中)、或 2 mg/kg 之抗 gD-vcMMAE(用作陽性對照及兩個物種細胞株之間任何表現差異之校正物)給藥。平均腫瘤體積±標準差標繪於圖 30 中。相比於 gD-vcMMAE 對照，h7D9.v3-vcMMAE 及 h22A10.v83-vcMMAE 兩者在 2 mg/kg 下分別針對 BJAB-gD-人類間皮素及 BJAB-gD-食蟹獼猴間皮素腫瘤

均展現較佳活性。此實驗中之陰性對照為與vcMMAE接合之不相干抗體，其不顯示明顯活性。

為進一步評估 h22A10.v83-vcMMAE 之活性，圖 29 之 H226x2 腫瘤及如圖 28 中所述生長之 OvCar3x2.1 腫瘤用指定濃度之 h7D9.v3-vcMMAE 及 h22A10.v83-vcMMAE(3.53 個 MMAE/抗體)、或作為陰性對照之抗 gD-vcMMAE 給藥。平均腫瘤體積±標準差標繪於圖 31 中。儘管藉由 FACS 所測定，裸 h22A10.v83 相比於 h7D9.v3 與兩種此等細胞株之結合明顯較弱，但如由在 6 mg/kg 給藥後腫瘤較快消退所指示，h22A10.v83-vcMMAE 在 H226x2 模型中與 h7D9.v3-vcMMAE 同樣有效(左上方畫面)，且在 OvCar3x2.1 模型中活性僅略小(右上方畫面)。

#### Q. MUC16 及間皮素在「雙陽性」細胞株上形成複合物

研究 MUC16 及間皮素在細胞株上之相互作用。將表現間皮素及 MUC16 兩者之 OvCar3 細胞於 1% NP40 緩衝液中溶解。如圖 32 左側畫面中所示，溶胞物用 m7D9 或同型對照 IgG 免疫沈澱且用抗 MUC16 抗體(上部墨點)或 h7D9(下部墨點)西方墨點染色以分別偵測間皮素：MUC16 複合物或總間皮素。(20% 非免疫沈澱輸入展示於左側色帶中。)m7D9 能夠使 MUC16 與間皮素一起自 OvCar3 細胞溶解物共同免疫沈澱。該結果證明在表現間皮素及 MUC16 兩者之細胞株(亦即「雙陽性」細胞株)中，MUC16 與間皮素形成複合物。

如圖 32 右側畫面中所示，使用針對間皮素或 MUC16 之抗

體以使彼等蛋白質自指定細胞株於其中生長之條件培養基免疫沈澱(IP)。該等細胞株僅表現間皮素(HPAC)、僅表現MUC16(A431)、兩者均不表現(H520)、或兩者均表現(OvCar3、CAPAN-2、EKVX及OvCar429細胞)。使用抗間皮素嵌合抗體ch7D9(頂部及底部畫面)或抗MUC16抗體(中間畫面)進行免疫沈澱。經洗滌之免疫沈澱物用鼠類抗間皮素抗體2E5(頂部)或鼠類抗MUC16 B域(M11-樣)抗體1.B.823(US Biological, Swampscott, MA; 中間及底部畫面)西方墨點(WB)染色。因此，上部畫面展示自表現間皮素之細胞株免疫沈澱的間皮素，中間畫面展示自表現MUC16之細胞株免疫沈澱的MUC16，且底部畫面展示共同免疫沈澱之間皮素:MUC16複合物，其對表現兩種蛋白質之細胞株(雙陽性細胞株)具有特異性。此等結果表明間皮素可在結合於MUC16的同時脫落於培養基中。因此，本發明之抗體及免疫接合物適用於治療間皮素陽性癌症，包括雙陽性癌症。

#### **R. 19C3(而非7D9)自間皮素置換預先結合之MUC16**

研究在MUC16存在下19C3與間皮素之結合。使MUC16-生物素(1  $\mu\text{g/ml}$ 或9.2 nM)預先結合於表現間皮素之HT1080細胞。添加19C3(5  $\mu\text{g/ml}$ )以確定其是否可置換預先結合之MUC16。用SAPE偵測試劑偵測MUC16-生物素，且用Alexa488抗小鼠抗體偵測所結合之抗體。圖33展示19C3確實能置換MUC16且結合於間皮素。結合於MUC16結合位點外之間皮素區的抗體7D9(33 nM)用作陰性對照，且如所

預期不能置換預先結合之MUC16。其他實驗證明19C3在0.1  $\mu\text{g/ml}$ 下亦置換MUC16，而抗體2E5僅可在 $\geq 5$   $\mu\text{g/ml}$ 下置換MUC16(數據未展示)。

雖然上文已出於理解清晰之目的藉助於說明及實例略為詳細地描述本發明，但不應將該等描述及實例解釋為限制本發明之範疇。本文中引用之所有專利及科學文獻之揭示內容以全文引用的方式明確地併入。

### 【圖式簡單說明】

圖1展示間皮素係由前驅蛋白蛋白水解裂解為31 kDa脫落組分(稱為巨核細胞增強因子或MPF)及40 kDa間皮素組分而產生。後一組分可能仍與細胞表面締合，但可能亦脫落。「CHO」表示4個糖基化位點，1個在MPF中且3個在間皮素中。

圖2展示如實例A中所述人類間皮素基因在各種組織中之表現程度的圖示。

圖3展示如實例B中所述分離之抗間皮素單株抗體之性質。

圖4展示鼠類抗體7D9(mu7D9)及其人類化變異體(7D9.v1及7D9.v3)之可變輕鏈區序列的比對。

圖5展示鼠類抗體7D9(mu7D9)及其人類化變異體(7D9.v1及7D9.v3)之可變重鏈區序列的比對。

圖6展示如實例C中所述7D9之嵌合及人類化變異體的性質。

圖7展示鼠類抗體22A10(22A10)及其人類化變異體

(hu22A10移植物及22A10.v83)之可變輕鏈區序列的比對。

圖8展示鼠類抗體22A10(22A10)及其人類化變異體(hu22A10移植物及22A10.v83)之可變重鏈區序列的比對。

圖9A展示如實例C中所述，穩定間皮素轉染之BJAB細胞上22A10之人類化變異體之斯卡查德分析。

圖9B展示如實例C中所述，由來自同一穩定轉染之BJAB細胞之22A10人類化變異體引起之間皮素免疫沈澱。

圖10A展示7D9人類化變異體之高變區序列及構架區序列。

圖10B展示22A10人類化變異體之高變區序列及構架區序列。

圖11展示如實例D中所述，不同物種之間皮素間的序列同源性。圖11按照出現次序分別揭示SEQ ID NO 43及46-48。

圖12展示如實例D中所述，h7D9.v3及h22A10.v83與不同物種之間皮素的交叉反應性。

圖13展示如實例E中所述，藉由穩定表現間皮素之經轉染細胞株及表現內源性間皮素之細胞株的斯卡查德分析所測定之人類化抗間皮素抗體的親和力。

圖14展示如實例F中所述，抗體7D9或22A10與圖3中所列之其他單株抗體之間競爭分析法的結果。

圖15展示如實例G中所述，用於抗原決定基定位之嵌合間皮素構築體(按比例描繪)。圖15揭示「EVEK」、「DAEQ」及「DVER」分別為SEQ ID NO 51-53。

圖16展示如實例G中所述，評估7D9及22A10與表現嵌合

間皮素之細胞之結合的FACS結果。

圖17展示如實例G中所述，鑑別h7D9.v3及h22A10.v83所結合之胺基酸的突變策略。圖17揭示「EVEK」為SEQ ID NO: 51；「人類132-212」、「獼猴132-212」、「大鼠132-212」及「小鼠132-212」分別為SEQ ID NO 54-57；人類及小鼠「MUT1」、「MUT3」、「MUT6」、「MUT7」、「MUT9」、「MUT10」、「MUT13」及「MUT15」分別為SEQ ID NO 58-73；且「STKD」及「SVKD」分別為SEQ ID NO 73及74。

圖18A展示如實例G中所述，評估h7D9.v3及h22A10.v83與表現人類間皮素突變體之細胞之結合的FACS結果。

圖18B展示如實例G中所述，評估h7D9.v3與表現食蟹獼猴間皮素突變體之細胞之結合的FACS結果。

圖19展示如實例G中所述，7D9/h7D9.v3及22A10/h22A10.v83所結合之抗原決定基內的關鍵胺基酸殘基。圖19按照出現次序分別揭示SEQ ID NO 54-57。

圖20展示如實例H中所述，h7D9.v3與糖基化間皮素之結合。

圖21展示如實例I中所述，測定抗體19C3、7D9及22A10是否阻斷間皮素與MUC16結合及MUC16與間皮素結合之兩種分析法的結果。

圖22展示如實例J中所述，藉由免疫組織化學(IHC)間皮素在胰管腺癌中之表現。

圖23展示如實例J中所述，藉由免疫組織化學(IHC)間皮



素在卵巢漿液性腺癌腫瘤中之表現。

圖 24 展示如實例 J 中所述，藉由免疫組織化學(IHC)間皮素在非小細胞肺癌(NSCLC)腺癌中之表現。

圖 25 展示如實例 J 中所述，藉由免疫組織化學(IHC)間皮素在食蟹獼猴組織(右側畫面)中之表現。

圖 26 展示如實例 L 中所述，免疫接合物 h7D9.v3-vcMMAE 在 HPAC 胰臟腫瘤異種移植物中顯現功效。

圖 27 展示如實例 M 中所述，免疫接合物 h7D9.v3-vcMMAE 在原發性胰臟腫瘤異種移植物中顯現功效。

圖 28 展示如實例 N 中所述，免疫接合物 h7D9.v3-vcMMAE 在卵巢腫瘤異種移植物模型中顯現功效。

圖 29 展示如實例 O 中所述，免疫接合物 h7D9.v3-vcMMAE 在肺鱗狀細胞癌異種移植物模型中顯現功效。

圖 30 展示如實例 P 中所述，在經轉染之 BJAB 異種移植腫瘤模型中免疫接合物 h7D9.v3-vcMMAE 針對人類間皮素之功效類似於免疫接合物 h22A10.v83-vcMMAE 針對食蟹獼猴間皮素之功效。

圖 31 展示如實例 P 中所述，在間皮瘤及卵巢腫瘤模型中免疫接合物 h7D9.v3-vcMMAE 之功效類似於免疫接合物 h22A10.v83-vcMMAE 之功效。

圖 32 展示如實例 Q 中所述，MUC16 與間皮素形成複合物，且兩種蛋白質自雙陽性細胞株共同脫落。

圖 33 展示 19C3(但非 7D9)自間皮素置換預先結合之 MUC16。

# 序 列 表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗間皮素(MESOTHELIN)抗體及免疫接合物

<130> P4532R1

<140> 100147190

<141> 2011-12-19

<150> 61/459,962

<151> 2010-12-20

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
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 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠屬

<400> 2

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

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

65                      70                      75                      80  
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln  
                     85                      90                      95

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

Arg

<210> 3  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 3  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15

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

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
                     50                      55                      60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65                      70                      75                      80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln  
                     85                      90                      95

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

Arg

<210> 4  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成多肽

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

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

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
35 40 45  
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60  
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
65 70 75 80  
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln  
85 90 95  
Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

<210> 5  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> 智人

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

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

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

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

<210> 6  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 小鼠属

<400> 6  
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser  
115

<210> 7  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 7  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser  
115

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

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 8  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser  
115

<210> 9  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 9  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr  
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 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp  
85 90 95

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

<210> 10  
<211> 97  
<212> PRT  
<213> 小鼠属

<400> 10  
Gly Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
1 5 10 15

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr

20 25 30

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro  
35 40 45

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
50 55 60

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
65 70 75 80

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
85 90 95

Arg

<210> 11  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 11  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

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

<210> 12  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 13  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 13  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser

<210> 14  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 小鼠属

<400> 14  
Glu Leu Leu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30



Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser  
115

<210> 15  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 16  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 16  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
115

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

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 17  
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 18  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 18  
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 19  
His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr  
1 5

<210> 20  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 20  
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His  
1 5 10

<210> 21  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 21  
Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 22  
Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr  
1 5

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

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 23  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 24  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 24  
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 25  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 25  
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 26  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 26  
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 27  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 27  
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys  
20 25 30

<210> 28  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 28  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
1 5 10

<210> 29  
<211> 25  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 29

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
20 25

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
1 5 10

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 31

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 32

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 34  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成肽

<400> 34  
 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
 1 5

<210> 35  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成肽

<400> 35  
 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成肽

<400> 36  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Ser  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成肽

<400> 37  
 Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成肽

<400> 38  
 Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 39

<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 39  
Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 40  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成多肽

<400> 40  
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 41  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成肽

<400> 41  
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 42  
<211> 622  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 42  
Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln  
20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu  
35 40 45

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

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu  
65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu  
85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro  
100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro  
115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile  
130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln  
145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu  
165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu  
180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu  
195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg  
210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp  
225 230 235 240

Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly  
245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg  
260 265 270

Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile  
275 280 285

Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser  
290 295 300

Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys  
305 310 315 320

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met  
325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu  
340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val  
355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile  
370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu  
385 390 395 400



Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp  
405 410 415

Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr  
420 425 430

Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu  
435 440 445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp  
450 455 460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala  
465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile  
485 490 495

Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser  
500 505 510

Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr  
515 520 525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly  
530 535 540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg  
545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu  
565 570 575

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser  
580 585 590

Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro  
595 600 605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
610 615 620

<210> 43  
<211> 285  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 43  
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val  
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro  
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu  
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met  
100 105 110

Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly  
115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly  
130 135 140

Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser  
145 150 155 160

Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg  
165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met  
180 185 190

Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala  
195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp  
210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr  
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys  
245 250 255

Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg  
260 265 270

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly  
275 280 285

<210> 44  
<211> 630  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 44  
Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro  
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln  
20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu

35	40	45
Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg		
50	55	60
Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu		
65	70	75
Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu		
85	90	95
Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro		
100	105	110
Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro		
115	120	125
Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile		
130	135	140
Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln		
145	150	155
Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu		
165	170	175
Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu		
180	185	190
Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu		
195	200	205
Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg		
210	215	220
Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp		
225	230	235
Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly		
245	250	255
Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg		
260	265	270
Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile		
275	280	285
Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser		
290	295	300
Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys		
305	310	315
Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met		
325	330	335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu  
340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val  
355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile  
370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu  
385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu  
405 410 415

Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln  
420 425 430

Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr  
435 440 445

Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser  
450 455 460

Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln  
465 470 475 480

Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn  
485 490 495

Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro  
500 505 510

Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu  
515 520 525

Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val  
530 535 540

Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala  
545 550 555 560

Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln  
565 570 575

Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn  
580 585 590

Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr  
595 600 605

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu  
610 615 620

Leu Ala Ser Thr Leu Ala  
625 630

<210> 45  
<211> 293  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 45  
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val  
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro  
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu  
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met  
100 105 110

Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile  
115 120 125

Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp  
130 135 140

Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu  
145 150 155 160

Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln  
165 170 175

Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys  
180 185 190

Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys  
195 200 205

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

Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg  
225 230 235 240

Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu  
245 250 255

Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val  
260 265 270

Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly  
275 280 285

Leu Gly Leu Gln Gly  
290

<210> 46  
<211> 285  
<212> PRT  
<213> 食蟹猴

<400> 46  
Asp Val Glu Arg Thr Thr Cys Pro Pro Glu Lys Glu Val His Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Arg Glu Leu Glu Ala Cys Val  
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Gln Met Asp Arg Val Asp Ala Ile Pro  
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu  
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Arg His Leu Gly His Leu  
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly His Glu Met  
100 105 110

Ser Ala Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Val Val Val Gly Arg Gly  
115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Val Asp Thr Leu Thr Ala Phe Cys Pro Gly  
130 135 140

Cys Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser  
145 150 155 160

Val Ile Gly Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Gly Pro Arg  
165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met  
180 185 190

Ser Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Arg Pro Phe Leu Gly Gly Ala  
195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp  
210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Arg Glu Ala Val Leu Pro Leu Thr  
225 230 235 240

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

245	250	255
Val Glu Glu Gln His Ser Pro Val	Arg Asp Trp Ile Leu Lys Gln Arg	
260	265	270
Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly		
275	280	285
<210> 47		
<211> 285		
<212> PRT		
<213> 大鼠属		
<400> 47		
Asp Thr Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Asn Val Val		
1	5	10 15
Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val		
20	25	30
Asp Gly Thr Leu Leu Ala Gly Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro		
35	40	45
Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr		
50	55	60
Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Lys Gln Leu Gly His Phe		
65	70	75 80
Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile Arg Gln Trp Asn Val Thr Ser		
85	90	95
Pro Asp Thr Val Asn Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met		
100	105	110
Asp Ala Gln Val Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly		
115	120	125
Lys Leu Asp Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser		
130	135	140
Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser		
145	150	155 160
Val Met Trp Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg		
165	170	175
His Leu Gly Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val		
180	185	190
Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala		
195	200	205
Ser Arg Glu Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp		
210	215	220
Ile Ala Thr Phe Lys Lys Leu Gln Val Asp Ala Leu Val Gly Leu Ser		
225	230	235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Ile Gly Asp Leu Lys  
245 250 255

Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln Gln  
260 265 270

Gln Lys Asp Leu Asp Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly  
275 280 285

<210> 48  
<211> 285  
<212> PRT  
<213> 小鼠属

<400> 48  
Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val  
1 5 10 15

Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val  
20 25 30

Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro  
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr  
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe  
65 70 75 80

Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser  
85 90 95

Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met  
100 105 110

Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly  
115 120 125

Gln Leu Asp Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser  
130 135 140

Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser  
145 150 155 160

Val Met Trp Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg  
165 170 175

His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val  
180 185 190

Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala  
195 200 205

Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp  
210 215 220



Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser  
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro Asn Ile Val Asp Leu Lys  
245 250 255

Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln His  
260 265 270

Gln Lys Asp Leu Asp Arg Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly  
275 280 285

<210> 49  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成8xHis標籤

<400> 49  
His His His His His His His  
1 5

<210> 50  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述：合成6xHis標籤

<400> 50  
His His His His His  
1 5

<210> 51  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 51  
Glu Val Glu Lys  
1

<210> 52  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 小鼠屬

<400> 52  
Asp Ala Glu Gln  
1

<210> 53  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 食蟹猴

<400> 53  
Asp Val Glu Arg  
1

<210> 54  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 54  
Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys  
1 5 10 15  
Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp  
20 25 30  
Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp  
35 40 45  
Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser  
50 55 60  
Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu  
65 70 75 80

Asp

<210> 55  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> 食蟹猴

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

Asp

<210> 56  
<211> 81  
<212> PRT  
<213> 大鼠属

<400> 56  
Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys  
1 5 10 15  
Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser Val Met Trp  
20 25 30  
Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly

35 40 45  
 Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu  
 50 55 60

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

Asp

<210> 57  
 <211> 81  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠屬

<400> 57  
 Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys  
 1 5 10 15

Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp  
 20 25 30

Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly  
 35 40 45

Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu  
 50 55 60

Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Val Lys  
 65 70 75 80

Asp

<210> 58  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 58  
 Lys Asp Thr Leu  
 1

<210> 59  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠屬

<400> 59  
 Glu Asp Met Val  
 1

<210> 60  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 60  
 Thr Ala Phe Tyr  
 1

<210> 61  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠屬

<400> 61  
 Gly Asp Ile Pro  
 1

<210> 62  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 62  
 Glu Glu Leu Ser  
 1

<210> 63  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠屬

<400> 63  
 Gln Asp Leu His  
 1

<210> 64  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 64  
 Pro Ser Ser Ile  
 1

<210> 65  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠屬

<400> 65  
 Ser Ser Val Met  
 1

<210> 66  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 66  
 Thr Cys Asp Pro  
 1

<210> 67  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠屬

<400> 67  
 Lys Cys Ser Gln  
 1

<210> 68  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 68  
Gln Leu Asp Val Leu  
1 5

<210> 69  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小鼠屬

<400> 69  
His Leu Gly Leu Leu  
1 5

<210> 70  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 70  
Met Asn Gly Ser  
1

<210> 71  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 小鼠屬

<400> 71  
Val Ser Gly Leu  
1

<210> 72  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 72  
Pro Thr Glu Asp  
1

<210> 73  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 小鼠屬

<400> 73  
Ser Thr Lys Asp  
1

<210> 74  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 小鼠屬

<400> 74  
Ser Val Lys Asp  
1

## 公告本

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100147190

※申請日：100.12.19

※IPC 分類：

C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 5/027 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抗間皮素(MESOTHELIN)抗體及免疫接合物

ANTI-MESOTHELIN ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES

二、中文發明摘要：

本發明提供抗間皮素(mesothelin)抗體及免疫接合物及其使用方法。

三、英文發明摘要：

The invention provides anti-mesothelin antibodies and immunoconjugates and methods of using the same.

八、圖式：

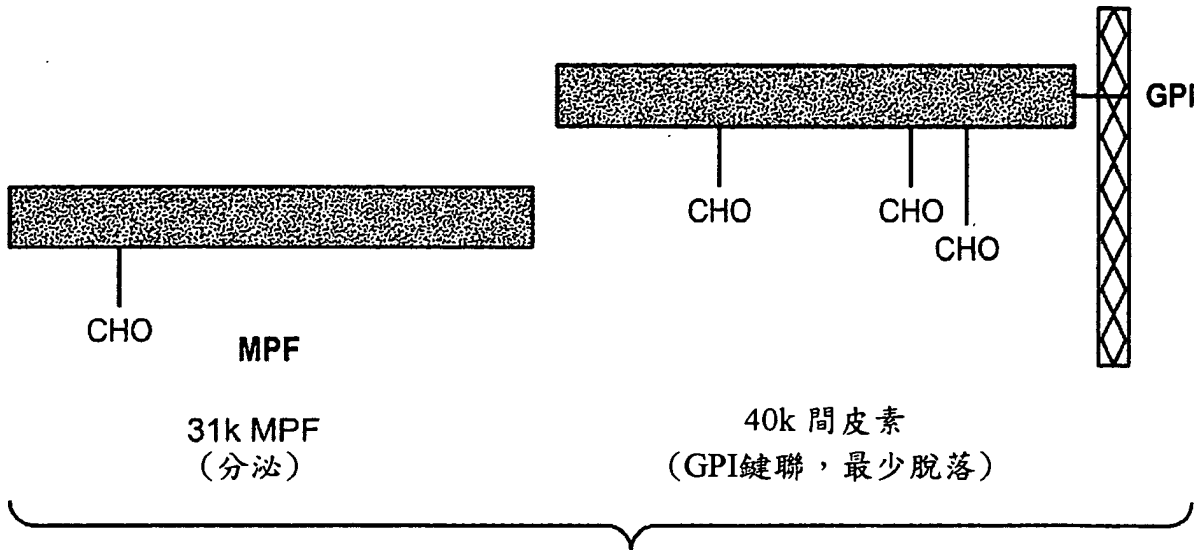


圖 1

204885\_s\_at gen.NM\_005823 智人間皮素，轉錄變異體1

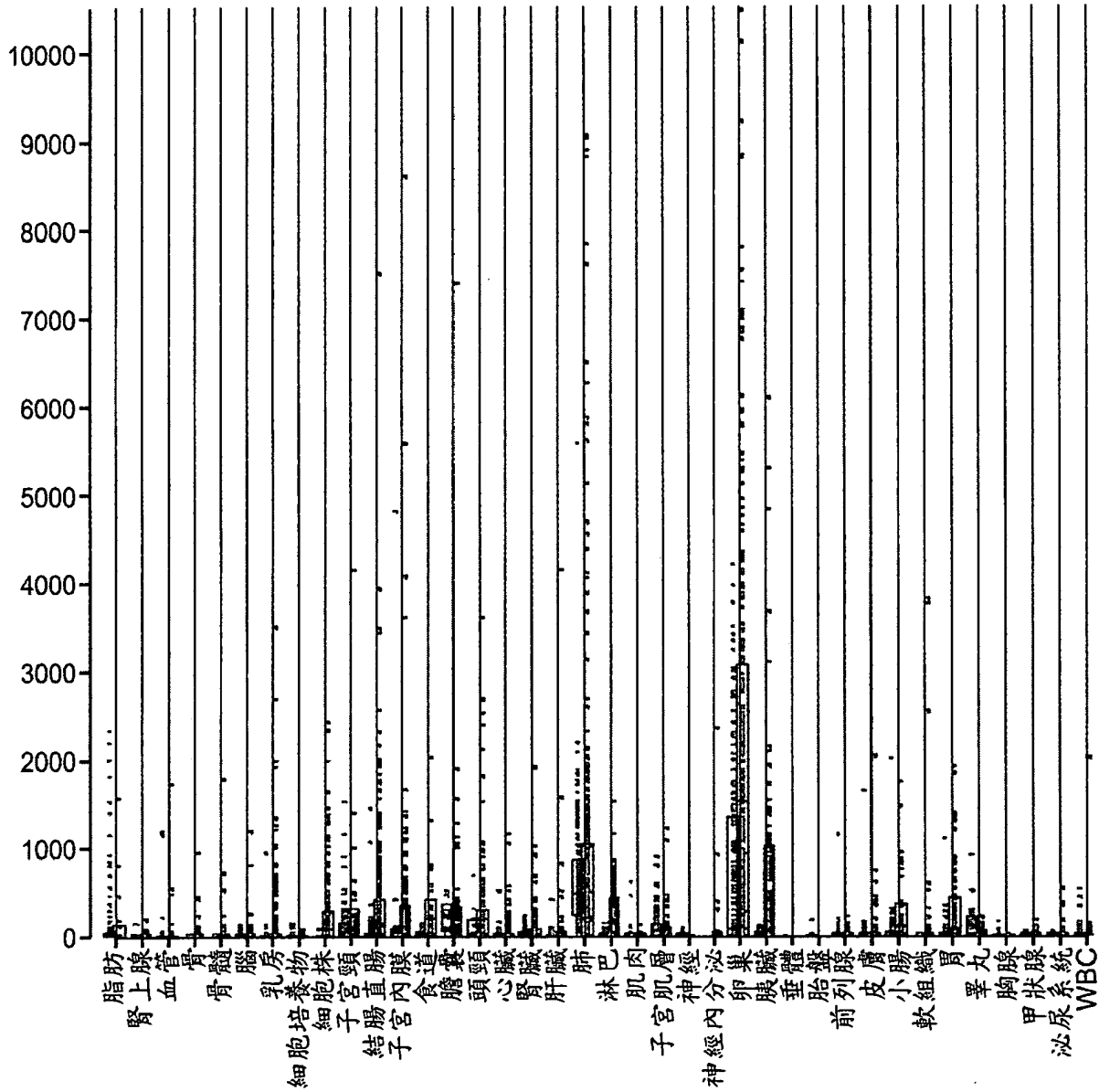


圖2



抗間皮素單株抗體

mAb	同型	抗原決定基	抗原決定基區	阻斷muc16結合？	Kd (nM) Biacore
7D9	G1	A	152-175	增強	0.23
19C3	G2b	C	1-70	是	0.06
2E5	G2	C	1-70	是	0.49
8B11	G1	B1	71-131	否	138
17A5	G1	B1	71-131	否	n.d.
11H8	G2b	B1	71-131	否	n.d.
16D5	G2a	B2	71-131	增強	2.21
18D12	G2b	B3	131-178	否	n.d.
3H2	G1	B	71-131	增強	n.d.
22A10	G2a	D	209-212	增強	4.25
15F7	G2a	E	1-131	否	n.d.
12F6	G2a	E	n.d.	n.d.	780

圖3

## 160192-fig.doc

圖 4

可變重鏈區的比對(鼠類及人類化7D9)

Kabat# 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41

Kabat - CDR H1  
Choithia - CDR H1  
Contact - CDR H1

hum III  
mu7D9  
7D9.v1  
7D9.v3

E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	P	S	S	Y	A	N	S	W	V	R	Q	A	P	
Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	A	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	G	T	T	P	T	Y	Y	M	E	W	V	K	Q	R	P	
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	T	T	P	T	Y	Y	M	E	W	V	R	Q	A	P	
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	G	T	T	P	T	Y	Y	M	E	W	V	R	Q	A	P	
*																																					*				*

Kabat# 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

Kabat - CDR H2  
Choithia - CDR H2  
Contact - CDR H2

hum III  
mu7D9  
7D9.v1  
7D9.v3

G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G			D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L			
G	Q	G	L	E	W	I	G	Y	I	R	P			S	T	G	Y	T	E	Y	N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	A	Y	M					
G	K	G	L	E	W	V	G	Y	I	R	P			S	T	G	Y	T	E	Y	N	Q	K	F	K	D	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L			
G	K	G	L	E	W	V	G	Y	I	R	P			S	T	G	Y	T	E	Y	N	Q	K	F	K	D	R	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L			
*					*	*	*				*															*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Kabat# 81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D E F G H I J K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112

Kabat - CDR H3  
Choithia - CDR H3  
Contact - CDR H3

hum III  
mu7D9  
7D9.v1  
7D9.v3

Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	G																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

SEQ ID NO:

5	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6	W	G	Q	G	T	S	L	T	V	S
7	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
8	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S

圖5

7D9之嵌合及人類化變異體

	LC	HC	對於人類 MSLN之KD(nM)
嵌合 7D9	嵌合	嵌合	1.84
7D9.v1	V <sub>KI</sub> 移植物	VH <sub>ATA</sub> 移植物	3.98
7D9.v2	Y36F, Y87F	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S 及 L80M	1.78
7D9.v3	Y36F, Y87F	VH <sub>ATA</sub> 移植物	1.9
7D9.v4	V <sub>KI</sub> 移植物	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S 及 L80M	3.01
7D9.v5	Y36F	VH <sub>ATA</sub> 移植物	3.49
7D9.v6	Y87F	VH <sub>ATA</sub> 移植物	4.08

圖6

可變輕鏈區的比對(鼠類及人類化22A10)

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37								
	Kabat - CDR L1																																																		
	Chothia - CDR L1																																																		
	Contact - CDR L1																																																		
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	N	Y	Q														
22A10													G	A	S	L	G	D	R	V	T	I	S	C	R	A	S	Q																							
hu22A10移植	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q																								
22A10.v83	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q																								
	*																																											*							
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80							
	Kabat - CDR L2																																																		
	Chothia - CDR L2																																																		
	Contact - CDR L2																																																		
huKI	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P								
22A10	Q	K	P	D	G	T	V	K	L	L	I	Y	Y	T	S	R	L	H	S	S	G	V	P	S	R	F	S	A	S	G	S	G	T	D	Y	S	L	T	I	S	N	L	E	Q							
hu22A10移植	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	Y	T	S	R	L	H	S	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
22A10.v83	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	Y	Y	T	S	R	L	H	S	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P						
	*							*	*	*	*	*															*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																	
	Kabat - CDR L3																																																		
	Chothia - CDR L3																																																		
	Contact - CDR L3																																																		
huKI	E	D	P	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	M	T	P	F	G	Q	G	Q	G	Q	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R																
22A10	E	D	P	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	T	L	P	Y	T	P	F	G	G	G	G	G	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R																	
hu22A10移植	E	D	P	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	T	L	P	Y	T	P	F	G	G	G	G	G	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R																	
22A10.v83	E	D	P	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	T	L	P	Y	T	P	F	G	G	G	G	G	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R																	
	*							*																																										*	

圖7

## 160192-fig.doc

8  
回



人類化抗體7D9區	序列	SEQ ID NO:
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L1	KSSQSVLYSSNQKNYLA	17
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L2	WASTRES	18
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L3	HQYLSSYT	19
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H1	GYTFTTYWMH	20
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H2	GYIRPSTGYTEYNQKFKD	21
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H3	ARSRWLLDY	22
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h7D9.v1 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h7D9.v3 VL-FR2	WFQQKPGKAPKLLIY	25
h7D9.v1 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	26
h7D9.v3 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC	27
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	31
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR4	WGQGTLVTVS	32

圖10A

人類化抗體22A10區	序列	SEQ ID NO:
h22A10graft, h22A10.v83 HVR-L1	RASQDISNYLN	33
h22A10graft, h22A10v.83 HVR-L2	YTSRLHS	34
h22A10graft, h22A10v.83 HVR-L3	QQGNTLPYT	35
h22A10graft, h22A10v.83 HVR-H1	GFTFSDYFMS	36
h22A10graft, h22A10v.83 HVR-H2	ATISNGGTYTYYPDSVKG	37
h22A10graft HVR-H3	ARFDGYFFDY	38
h22A10v.83 HVR-H3	ARFDGYIFDY	39
h22A10graft, h22A10.v83 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h22A10graft, h22A10.v83 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h22A10graft, h22A10.v83 VL-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	26
h22A10graft, h22A10.v83 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h22A10graft, h22A10.v83 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h22A10graft, h22A10.v83 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h22A10graft, h22A10.v83 VH-FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	40
h22A10graft, h22A10.v83 VH-FR4	WGQGTLVTVSS	41

圖10B



不同物種間之間皮素序列同源性

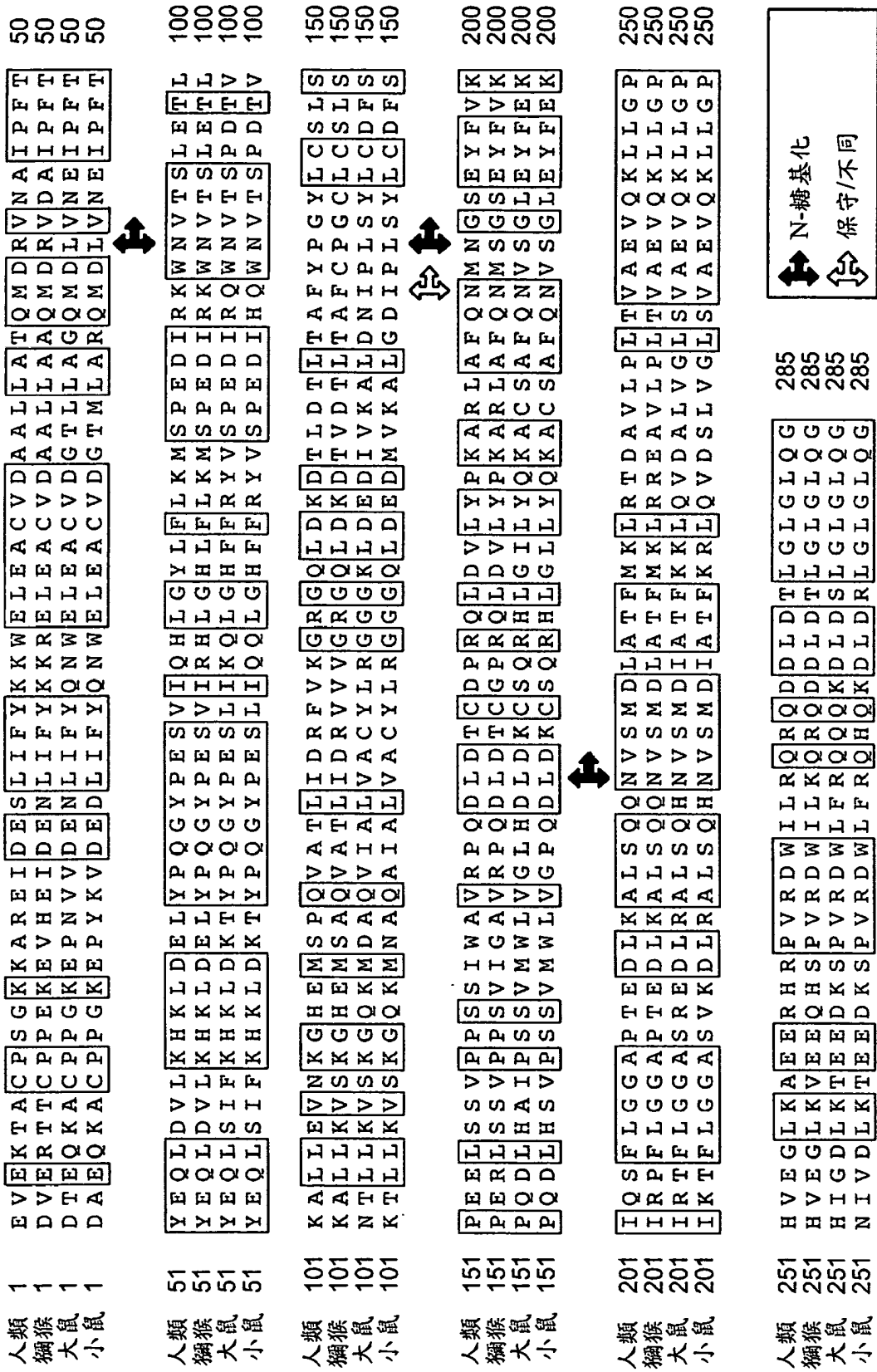


圖 11

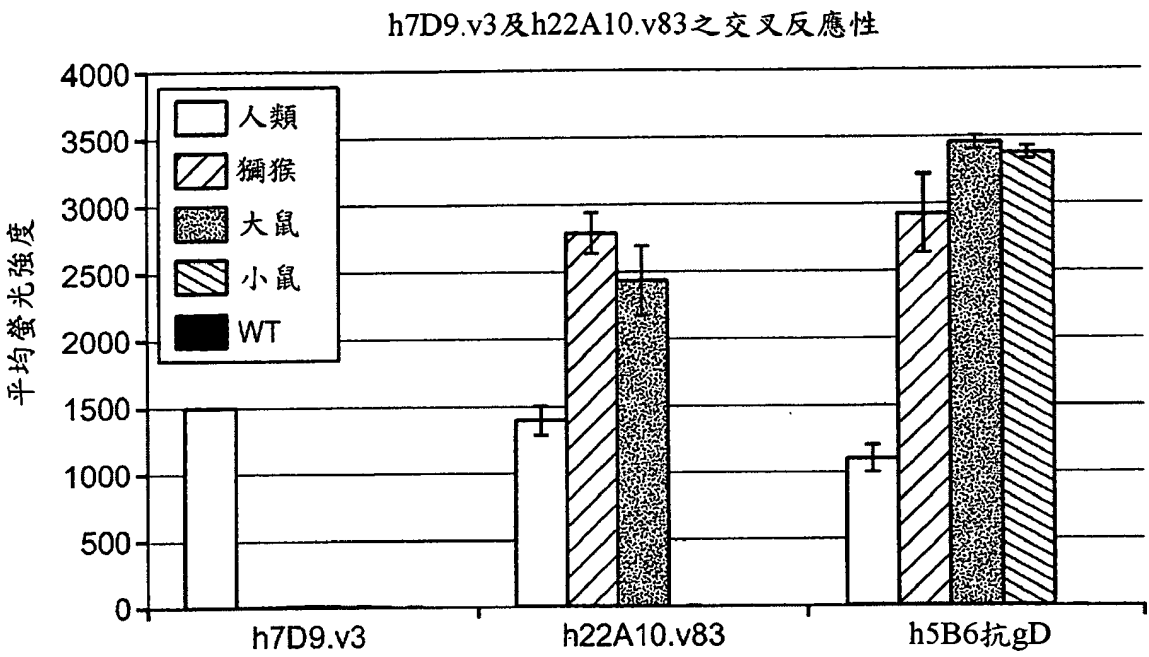


圖12

抗間皮素抗體親和力

於間皮素穩定轉染細胞株及內源性細胞株上之斯卡查德分析：

	h7D9.v3 Kd (nM)	複本 #	h22A10.v83 Kd (nM)	複本 #
人類 BJAB	0.25	20000	1.8	45000
獼猴 BJAB	n.d.		1.3	31000
大鼠 BJAB	n.d.		2.7	31000

人類 293	0.2	n.d.	2.7	80500
獼猴 293	n.b.		4.3	356000
大鼠 293	n.d.		7.3	81000

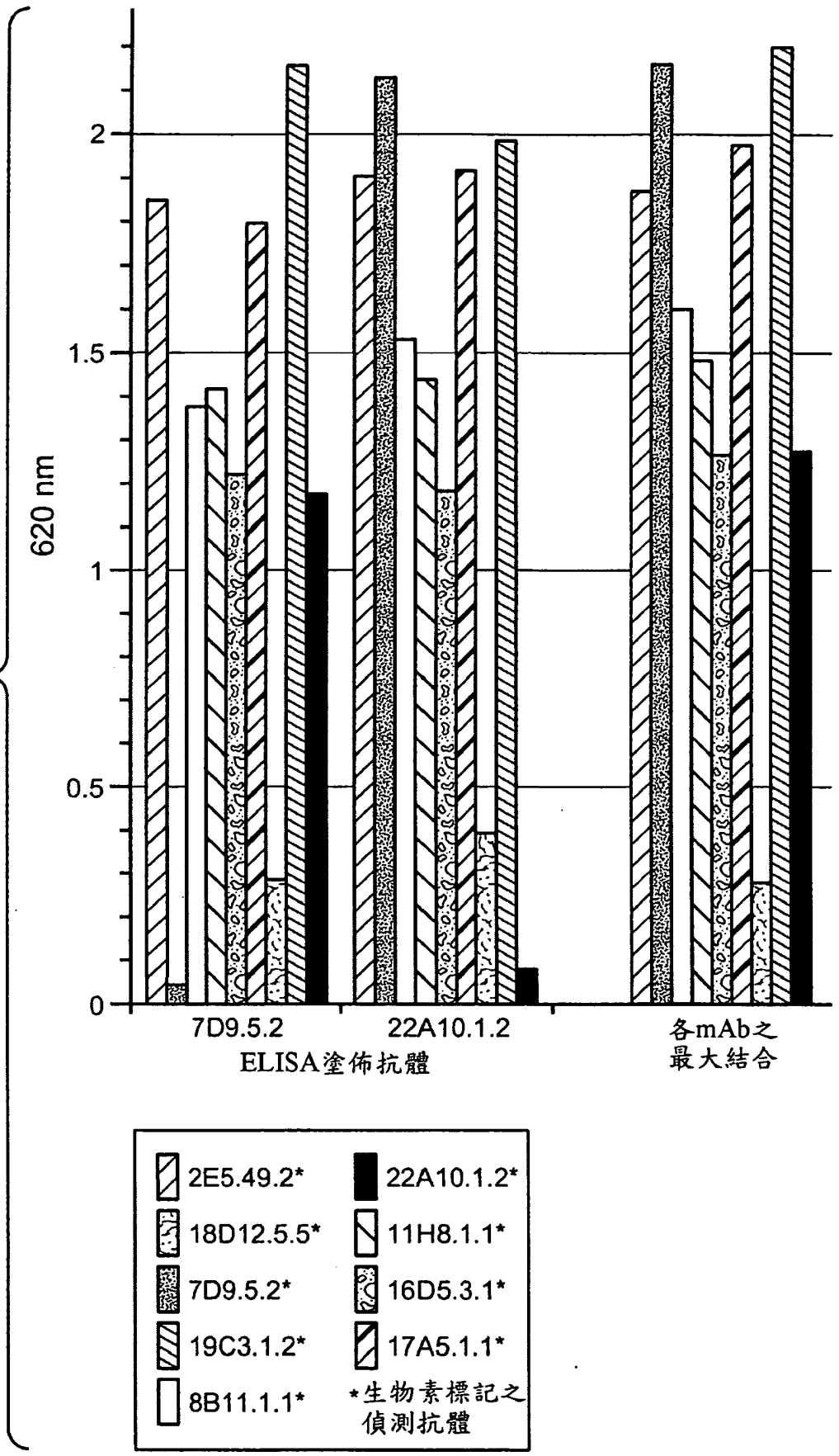
人類 HT1080	0.97	130000	6.2	38000
獼猴 HT1080	n.d.		6.4	113000
大鼠 4/4-RM4	n.d.		6.2	171000

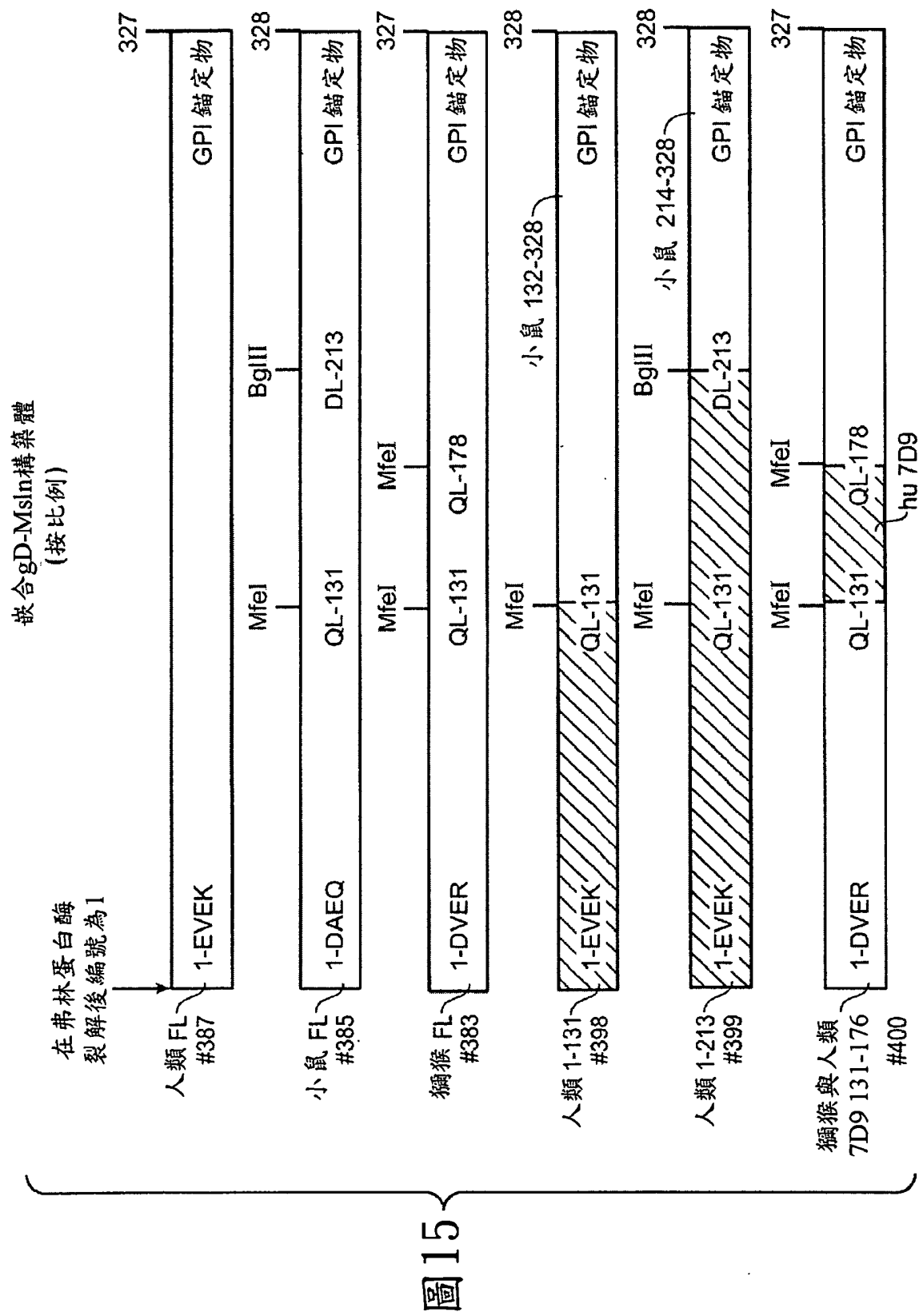
OvCar3	0.53	14178	9.2	5516
OvCar3x2.1	0.56	39963	9	15294
HPAC	1	2600	9.4	7300
Capan2	0.63	10000	4.2	11250
AsPC1	0.58	2300	9.3	7100
HPAF-II	0.41	4200	10.45	6400

內源性

圖13

圖14





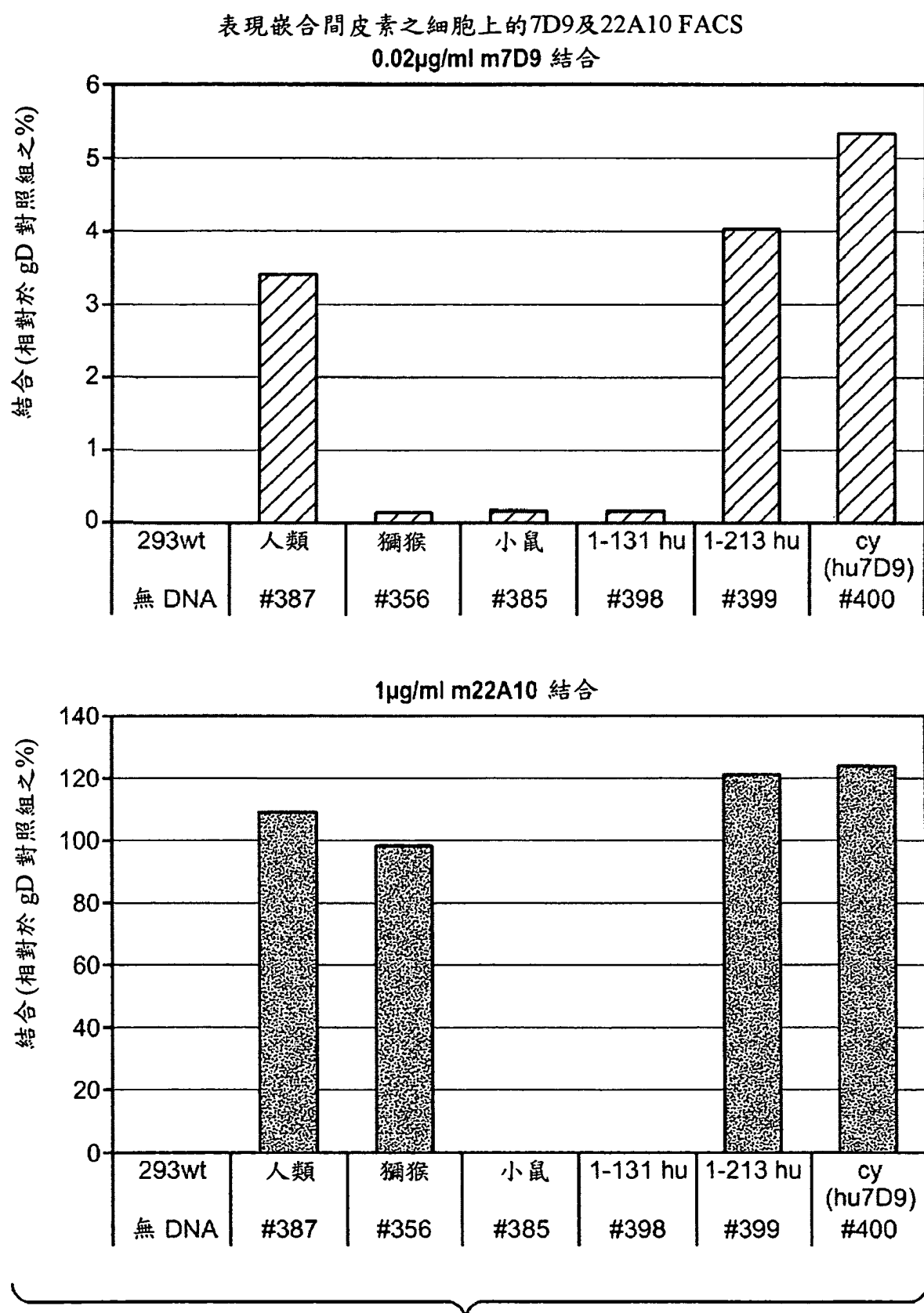
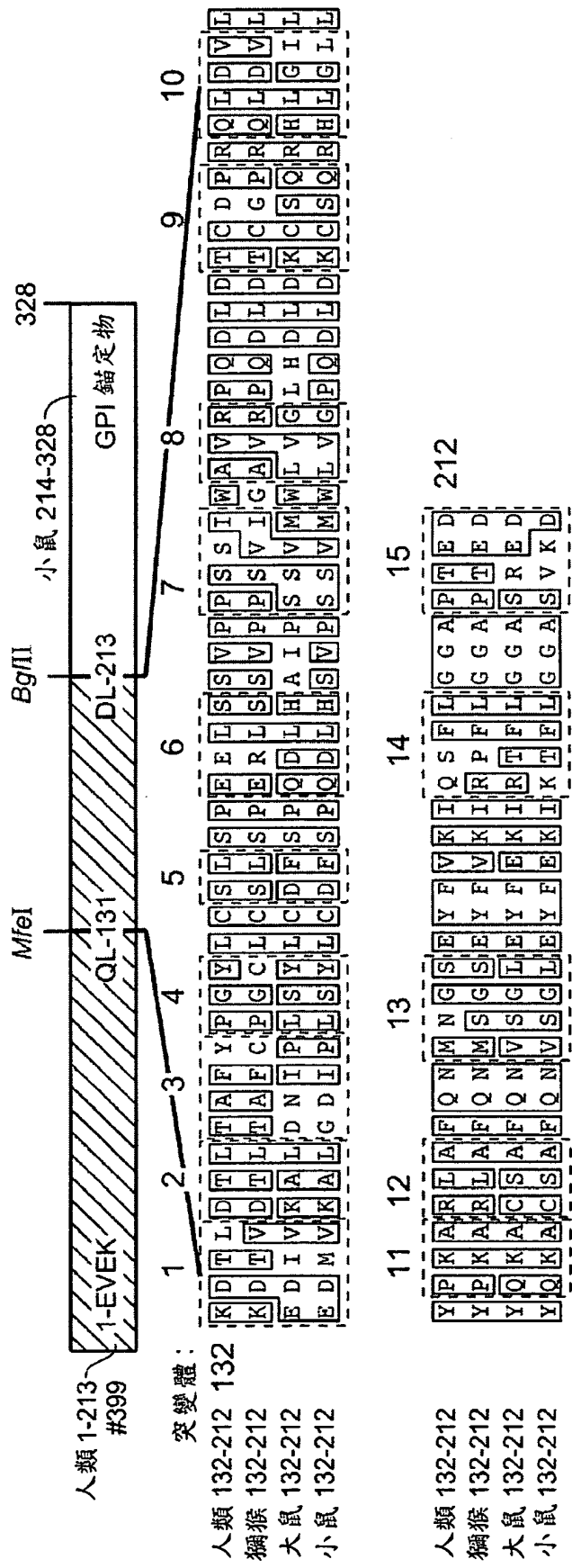


圖 16



在胺基酸132-212之間形成  
15個人類至小鼠突變體  
在各突變體中，所示人類序列  
突變成為所示小鼠序列

MUT1	KDTL EDMV	MUT6	EELS QDLH	MUT11	PKA QKA
MUT2	DTL KAL	MUT7	PSSI SSVM	MUT12	RLA CSA
MUT3	TAFY GDIP	MUT8	AVR LVG	MUT13	MNGS VSGL
MUT4	PGY LSY	MUT9	TCDP KCSQ	MUT14	QSF KTF
MUT5	SL DF	MUT10	QLDVL HLGLL	MUT15	PTED STKD (非 SVKD)

圖17

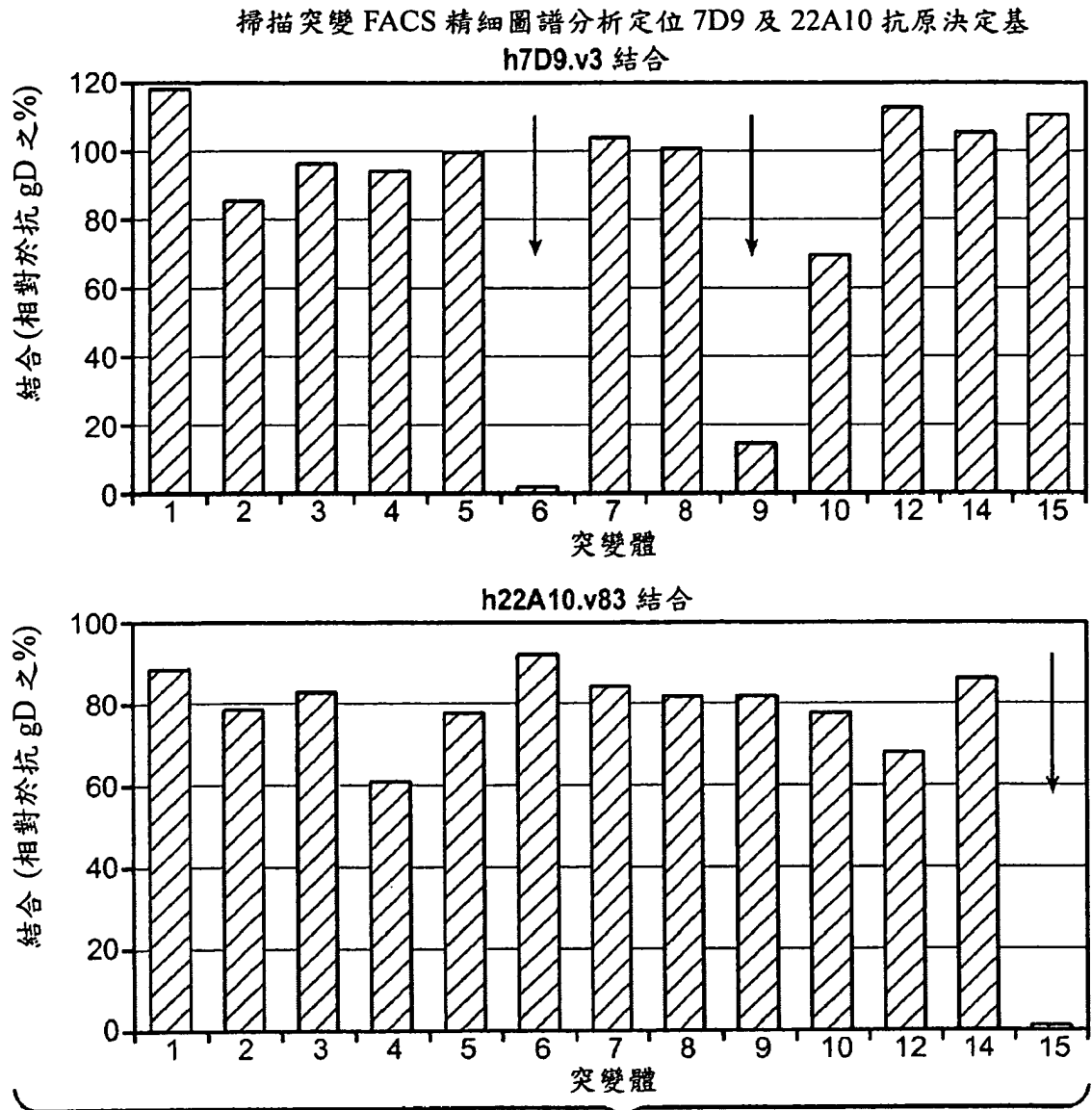


圖 18A

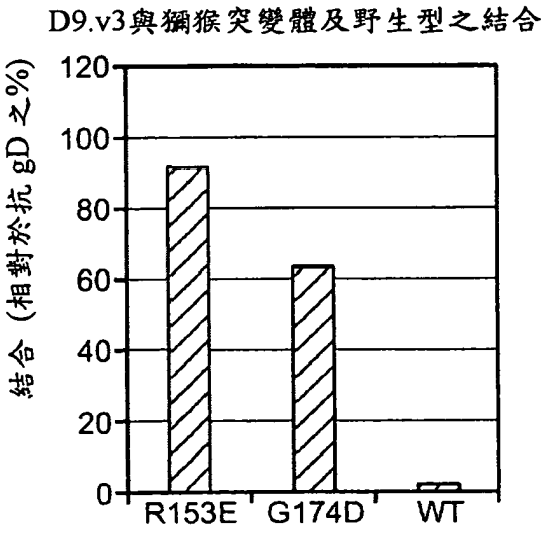


圖 18B

圖譜分析定位於不同位點的 7D9 及 22A10 抗原決定基

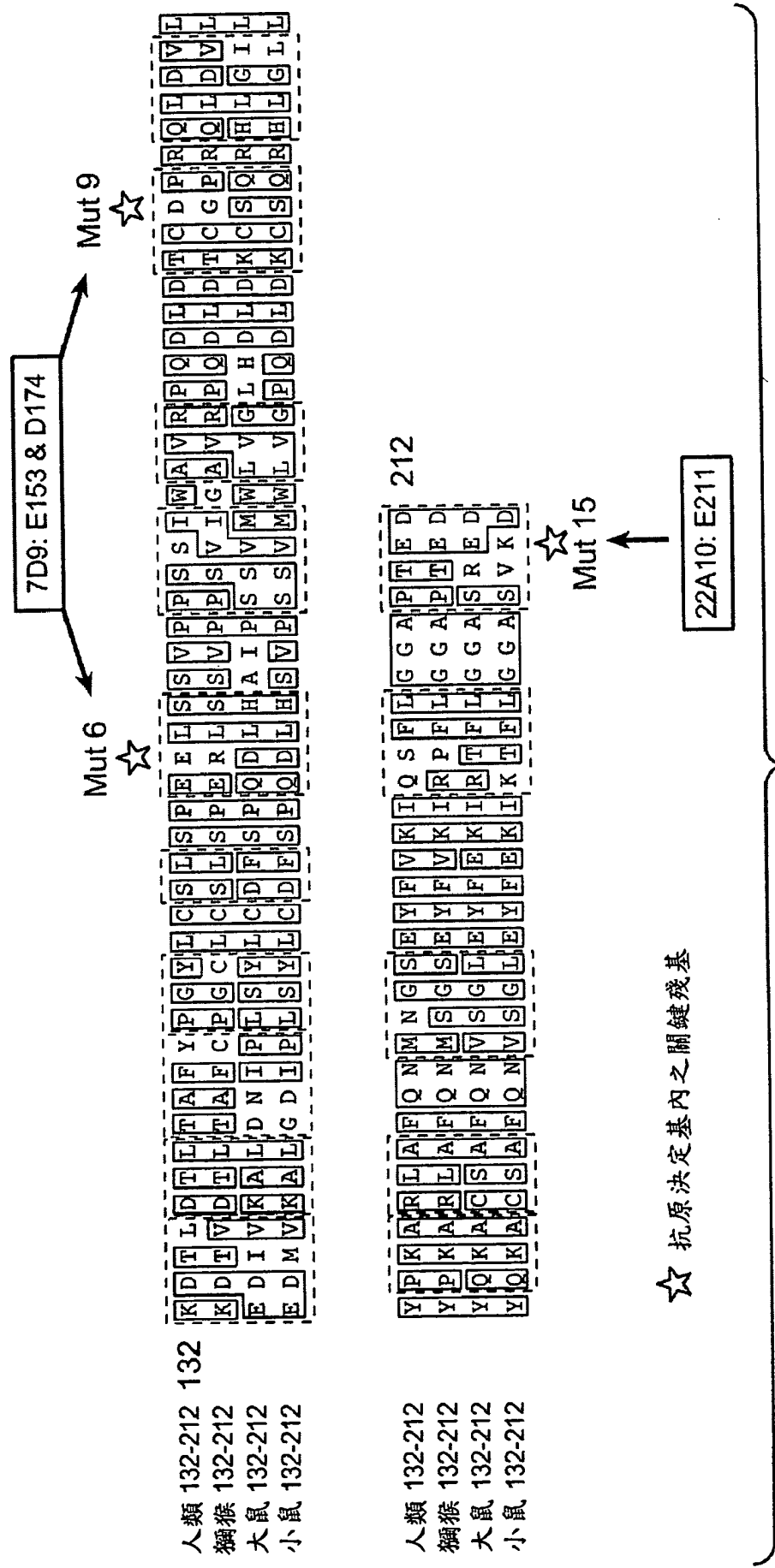


圖19































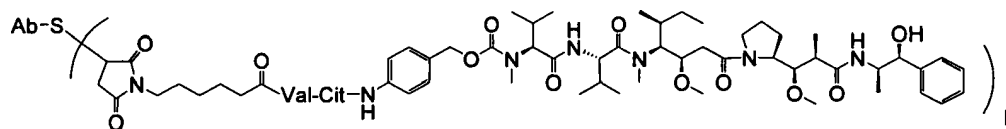


**四、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第(26)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

**五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

## 七、申請專利範圍：

1. 一種與間皮素結合之經分離抗體，其中該抗體可與 SEQ ID NO:43 之包含 E153 及 D174 之抗原決定基結合，且具有一或多個以下特徵：

- (a) 不會降低與糖基化形式之間皮素的結合性；
- (b) 不阻斷間皮素與 MUC16 結合；及
- (c) 與間皮素之結合親和力  $\leq 5$  nM；

及其中該抗體包含 (i) 包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列的 HVR-H1，(ii) 包含 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列的 HVR-H2，(iii) 包含 SEQ ID NO:22 之胺基酸序列的 HVR-H3，(iv) 包含 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列的 HVR-L1，(v) 包含 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列的 HVR-L2，及 (vi) 包含 SEQ ID NO:19 之胺基酸序列的 HVR-L3。

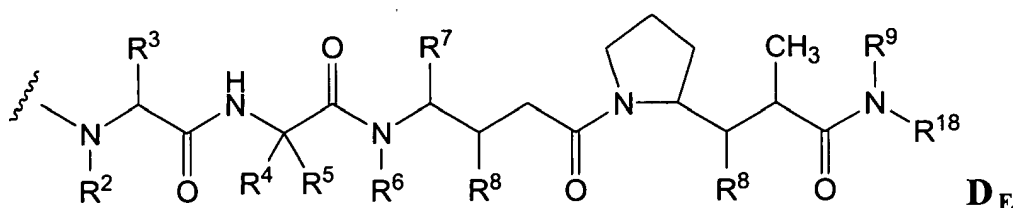
2. 如請求項 1 之抗體，其為單株抗體。
3. 如請求項 1 之抗體，其為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。
4. 如請求項 1 之抗體，其為結合間皮素之抗體片段。
5. 如請求項 1 之抗體，其中間皮素為 SEQ ID NO:43 之人類間皮素。
6. 如請求項 1 之抗體，其進一步包含 SEQ ID NO:25 之構架 FR2 序列及 SEQ ID NO:27 之 FR3 序列的輕鏈可變域。
7. 如請求項 1 之抗體，其中該抗體包含：
  - (a) 與 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列具有至少 95% 序列一致性的 VH 序列；



(b) 與 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列具有至少 95% 序列一致性的 VL 序列；或

(c) 如 (a) 中之 VH 序列及如 (b) 中之 VL 序列。

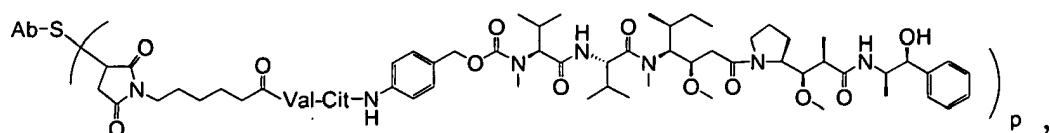
8. 如請求項 7 之抗體，其包含 SEQ ID NO:8 之 VH 序列。
9. 如請求項 7 之抗體，其包含 SEQ ID NO:4 之 VL 序列。
10. 一種抗體，其包含 SEQ ID NO:8 之 VH 序列及 SEQ ID NO:4 之 VL 序列。
11. 如請求項 1 之抗體，其為 IgG1、IgG2a 或 IgG2b 抗體。
12. 一種經分離核酸，其編碼如請求項 1 至 11 中任一項之抗體。
13. 一種宿主細胞，其包含如請求項 12 之核酸。
14. 一種產生抗體之方法，其包括培養如請求項 13 之宿主細胞，以產生該抗體。
15. 一種具有式 Ab-(L-D)<sub>p</sub> 之免疫接合物，其中：
  - (a) Ab 為如請求項 1 至 11 中任一項之抗體；
  - (b) L 為連接子；
  - (c) D 為式 D<sub>E</sub> 之藥物，



且其中 R<sup>2</sup> 及 R<sup>6</sup> 各為甲基，R<sup>3</sup> 及 R<sup>4</sup> 各為異丙基，R<sup>5</sup> 為 H，R<sup>7</sup> 為第二丁基，各 R<sup>8</sup> 獨立地選自 CH<sub>3</sub>、O-CH<sub>3</sub>、OH 及 H；R<sup>9</sup> 為 H；且 R<sup>18</sup> 為 -C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-C(R<sup>8</sup>)<sub>2</sub>-芳基；及

(d) p 介於 1-8 範圍內。

16. 如請求項 15 之免疫接合物，其中該藥物為奧利斯坦汀 (auristatin)。
17. 如請求項 16 之免疫接合物，其中該藥物為 MMAE。
18. 如請求項 15 之免疫接合物，其中該連接子可被蛋白酶裂解。
19. 如請求項 18 之免疫接合物，其中該連接子包含 val-cit 二肽。
20. 如請求項 15 之免疫接合物，其具有下式：



其中 S 為硫原子。

21. 如請求項 20 之免疫接合物，其中 p 介於 2 至 5 範圍內。
22. 如請求項 20 之免疫接合物，其包含如請求項 1 之抗體。
23. 如請求項 20 之免疫接合物，其包含如請求項 9 之抗體。
24. 一種醫藥調配物，其包含如請求項 15 至 23 中任一項之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。
25. 如請求項 24 之醫藥調配物，其進一步包含其他治療劑。
26. 如請求項 25 之醫藥調配物，其中該其他治療劑為吉西他濱 (gemcitabine)。
27. 如請求項 25 之醫藥調配物，其中該其他治療劑為與細胞毒性劑接合之抗 MUC16 抗體。
28. 如請求項 15 至 23 中任一項之免疫接合物，其適用作藥

物。

29. 如請求項15至23中任一項之免疫接合物，其適用於治療間皮素陽性癌症。
30. 如請求項29中使用之免疫接合物，其中該間皮素陽性癌症係選自胰臟癌、卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌及間皮瘤。
31. 如請求項29中使用之免疫接合物，其中該間皮素陽性癌症為雙陽性癌症。
32. 一種如請求項15至23中任一項之免疫接合物之用途，其係用於製造藥物。
33. 如請求項32之用途，其中該藥物係用於治療間皮素陽性癌症。
34. 如請求項33之用途，其中該間皮素陽性癌症係選自胰臟癌、卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌及間皮瘤。
35. 如請求項33之用途，其中該間皮素陽性癌症為雙陽性癌症。
36. 如請求項32之用途，其中該藥物進一步包含其他藥劑。
37. 如請求項36之用途，其中該其他治療劑為吉西他濱。
38. 如請求項36之用途，其中該其他治療劑為與細胞毒性劑接合之抗MUC16抗體。
39. 一種如請求項15至23中任一項之免疫接合物之用途，其係用於製造用於抑制間皮素陽性細胞增殖之藥物。
40. 如請求項39之用途，其中該細胞為胰臟癌細胞、卵巢癌細胞、肺癌細胞、或子宮內膜癌細胞或間皮瘤細胞。

41. 如請求項39之用途，其中該細胞為雙陽性細胞。
42. 一種抑制間皮素陽性細胞增殖之活體外方法，該方法包括在容許如請求項15至23中任一項之免疫接合物與該細胞表面上之間皮素結合的條件下，使該細胞暴露於該免疫接合物，由此抑制該細胞增殖。
43. 如請求項42之方法，其中該細胞為胰臟癌細胞、卵巢癌細胞、肺癌細胞、或子宮內膜癌細胞或間皮瘤細胞。
44. 如請求項42之方法，其中該細胞為雙陽性細胞。
45. 如請求項1至11中任一項之抗體，其係與標記接合。
46. 如請求項45之抗體，其中該標記為正電子發射體。
47. 如請求項46之抗體，其中該正電子發射體為 $^{89}\text{Zr}$ 。
48. 一種偵測生物檢體中之人類間皮素的方法，其包括在允許如請求項1至11中任一項之抗間皮素抗體與天然存在之人類間皮素結合的條件下，使該生物檢體與該抗間皮素抗體接觸，及偵測該抗間皮素抗體與該生物檢體中天然存在之人類間皮素之間是否形成複合物。
49. 如請求項48之方法，其中該生物檢體為胰臟癌檢體、卵巢癌檢體、肺癌檢體、子宮內膜癌檢體或間皮瘤檢體。
50. 如請求項48之方法，其中該方法包括對組織切片進行免疫組織化學。
51. 如請求項48之方法，其中該生物檢體為血清。
52. 一種如請求項1至11中任一項之抗間皮素抗體之用途，其係用於製造用於偵測間皮素陽性癌症之經標記之抗間皮素抗體。

53. 如請求項52之用途，其中該經標記之抗間皮素抗體為經標記之如請求項1或10之抗體。
54. 如請求項52或53之用途，其中該經標記之抗間皮素抗體包含與正電子發射體接合之抗間皮素抗體。
55. 如請求項54之用途，其中該正電子發射體為 $^{89}\text{Zr}$ 。