

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：97/16902

C07K 16/28 (2006.01)

※ 申請日期：97.5.7

※IPC 分類：~~C07K~~;A61K

一、發明名稱：(中文/英文)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

半胱胺酸工程化之抗MUC16抗體及抗體藥物結合物

CYSTEINE ENGINEERED ANTI-MUC16 ANTIBODIES AND
ANTIBODY DRUG CONJUGATES

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商建南德克公司

GENENTECH, INC.

代表人：(中文/英文)

提摩西 R 史瓦茲

SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州舊金山市DNA路1號

1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：（共 2 人）

姓 名：（中文/英文）

1. 賈斯 R 裘蒂亞
JUNUTULA, JAGATH R.
2. 威廉 麥特
MALLET, WILLIAM

國 籍：（中文/英文）

1. 印度 INDIA
2. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年05月08日；60/916,657

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體而言係關於以反應性半胱胺酸殘基工程化之抗體且更特定而言係關於具有治療或診斷應用之抗體。半胱胺酸工程化抗體可與化療藥物、毒素、諸如生物素之親和配位體及諸如螢光團之偵測標記結合。本發明亦係關於將抗體及抗體-藥物結合化合物用於哺乳動物細胞或相關病理學病況之活體外、原位及活體內診斷或治療之方法。

根據37 CFR § 1.53(b)申請之本非臨時申請案主張2007年5月8日申請之美國臨時申請案第60/916,657號根據35 USC §119(e)之權利，該案以全文引用的方式併入本文中。

【先前技術】

已確立靶向治療患有癌症、免疫學及血管生成病症之患者之抗體療法。已鑑別與正常非癌性細胞相比，特異性表現於癌細胞表面上之跨膜多肽或其他腫瘤相關多肽作為使用抗體之癌症診斷及療法的細胞靶。鑑別該等腫瘤相關細胞表面抗原多肽(亦即腫瘤相關抗原(TAA))可經由基於抗體之療法特異性靶向癌細胞以對其加以破壞。

在癌症治療中，使用抗體-藥物結合物(ADC)(亦即免疫結合物)局部傳遞細胞毒性或細胞生長抑制劑(亦即殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549；Wu等人(2005)Nature Biotechnology 23(9)：1137-1146；Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-

212 ; Syrigos 及 Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614 ; Niculescu-Duvaz及 Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172 ; US 4975278)可將藥物部分靶向傳遞至腫瘤，且於腫瘤中胞內積聚，而全身投與此等未經結合之藥劑可對正常細胞以及設法消除之腫瘤細胞產生不可接受程度之毒性(Baldwin等人(1986)*Lancet*第(1986年3月15日)：603-05頁；Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review," *Monoclonal Antibodies '84 : Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera等人(編)，第475-506頁)。改良ADC之治療指數(亦即最大功效及最小毒性)之努力集中於多株抗體(Rowland等人(1986)*Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)及單株抗體(mAb)之選擇性以及藥物連接及藥物釋放特性(Lambert, J. (2005) *Curr. Opinion in Pharmacology* 5:543-549)。抗體藥物結合物中所用之藥物部分包括細菌蛋白毒素，諸如白喉毒素；植物蛋白毒素，諸如蓖麻毒素(ricin)；小分子，諸如阿瑞他汀(auristatin)、格爾德黴素(geldanamycin)(Mandler等人(2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581；Mandler等人(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028；Mandler等人(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)；類美登素(maytansinoid)(EP 1391213；Liu等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、刺孢黴素(calicheamicin)(Lode等人(1998) *Cancer Res.* 58:2928；Hinman等人(1993) *Cancer Res.*

53:3336-3342)、道諾黴素(daunomycin)、阿黴素(doxorubicin)、甲胺喋呤(methotrexate)及長春地辛(vindesine)(Rowland等人(1986)同上文)。藥物部分可影響細胞毒性及細胞生長抑制機制,包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制。有些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白受體配位體結合時傾向於無活性或活性較弱。

阿瑞他汀肽、阿瑞他汀E(AE)及單甲基阿瑞他汀(MMAE)、海兔毒素(dolastatin)之合成類似物(WO 02/088172)已作為藥物部分與各種抗體結合(Klussman等人(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina等人(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco等人(2003) Blood 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; WO 04/032828; Mao等人(2004) Cancer Research 64(3):781-788; Bhaskar等人(2003) Cancer Res. 63:6387-6394; WO 03/043583; US 5767237; US 6124431; US 2005/0238649)。

將藥物部分經由共價鍵附著(亦即連接)至抗體之習知方式一般產生藥物部分附著在抗體上之許多位點處之異質分子混合物。舉例而言,通常將細胞毒性藥物經由抗體之諸多離胺酸殘基或經由藉由還原鏈間雙硫鍵活化之半胱胺酸硫氫基(硫醇)與抗體結合,產生含有具有不同藥物與抗體莫耳比,於不同位點處連接,各自具有不同活體內藥物動力學、功效及安全性概況之種類的異質抗體-藥物結合混合物(Hamblett等人(2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Wang等人(2005) Protein Sci. 14:2436-2446)。視反

應條件而定，異質混合物通常含有附著有0至約8或更多個藥物部分之抗體分布。此外，藥物部分在抗體之不同位點處附著之可能異質混合物在具有特定藥物部分與抗體整數比之各結合物子群內。分析及製備法可能不足以分離及表徵由結合反應產生之異質混合物內之抗體-藥物結合種類分子。抗體為通常具有許多反應性官能基之較大，複合且結構不同之生物分子。其與連接試劑及藥物-連接子中間物之反應性視諸如pH值、濃度、鹽濃度及共溶劑之因素而定。此外，多步驟結合法由於難於控制反應條件及表徵反應物及中間物，故可能不可再現。

不同於在接近pH值為7下經質子化且具低親核性之大多數胺，半胱胺酸硫醇在中性pH值下具反應性。由於游離硫醇(RSH，硫氫基)基團相對具反應性，故具有半胱胺酸殘基之蛋白質通常係以其氧化形式作為雙硫鍵連接之寡聚物存在或具有內部橋聯之二硫基。胞外蛋白質一般不具有游離硫醇 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling : A Practical Approach, Academic Press, London, 第55頁)。抗體半胱胺酸硫醇基一般比抗體胺或羥基具有對親電子結合試劑之更高反應性，亦即更高親核性。溶劑可接近之鏈間雙硫鍵將半胱胺酸與絲胺酸鍵結，以允許與其餘半胱胺酸之定向結合(McDonagh等人(2006) Protein Eng. Des. Sel. 19:299-307)。然而，消除此等雙硫鍵可破壞抗體之四級結構，藉此擾亂抗體之活體內行為，包括抗體效應功能之變化(Michaelsen等人(1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:9243-

9247 ; Romans 等人 (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:2531-2535 ; Seegan等人(1979) Proc Natl Acad Sci USA 76:907-911)。藉由遺傳工程技術將半胱胺酸殘基引入蛋白質中以形成與配位體之共價附著，或形成新的分子內雙硫鍵 (Better 等人 (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650 ; Bernhard 等人 (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132 ; Greenwood 等人 (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255 ; Tu 等人 (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867 ; Kanno 等人 (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214 ; Chmura 等人 (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484 ; US 6248564)。然而，半胱胺酸硫醇基中藉由使蛋白質之各種胺基酸殘基突變為半胱胺酸胺基酸之工程化可能存在問題，特別在未配對(游離 Cys)殘基或相對易進行反應或氧化之殘基之情況下尤為如此。在蛋白質(在大腸桿菌周質中、培養物上清液中抑或部分或完全純化蛋白質)之濃溶液中，蛋白質表面上未配對之 Cys 殘基可配對且氧化以形成分子間二硫化物，且由此形成蛋白質二聚體或多聚體。二硫化物二聚體形成使得新 Cys 對於與藥物、配位體或其他標記結合不具反應性。此外，若蛋白質以氧化方式形成新工程化之 Cys 與現存 Cys 殘基之間的分子內雙硫鍵，則對於活性位點參與及相互作用而言兩種 Cys 硫醇基皆不可用。此外，可藉由使三級結構摺疊異常或缺失來使蛋白質為非活性或非特異性 (Zhang 等人 (2002) Anal. Biochem. 311:1-9)。

半胱氨酸工程化抗體經設計為FAB抗體片段(thioFab)且表現為全長IgG單株(thioMab)抗體(US 2007/0092940，其內容係以引用的方式併入)。將ThioFab及ThioMab抗體經由連接子在新引入之半胱氨酸硫醇處與硫醇反應性連接試劑及藥物-連接試劑結合來製備抗體藥物結合物(ThioADC)。

MUC16為由人類眼表上皮表現之腫瘤相關抗原多肽且攜有H185碳水化合物抗原決定基(Argueso等人(2003) *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(6):2487-95)。MUC16亦於支氣管、輸卵管及子宮之黏膜中表現。MUC16之一種推薦功能為提供對抗黏膜表面之顆粒及感染物之保護性潤滑障壁。高度多形態MUC16係由三個結構域組成，富含Ser/Thr之N端結構域，具有超過60個各自具有156個胺基酸之部分保守串聯重複序列之重複結構域，及含有跨膜序列及短細胞質尾之C端不重複結構域。MUC16經重度O糖基化及N糖基化(O'Brien等人(2002) *Tumour Biol.* 23:154-169；O'Brien等人(2001) *Tumour Biol.* 22:348-366 (2001)；Fendrick等人(1997) *Tumour Biol.* 18:278-289；Wong等人(2003) *J. Biol. Chem.* 278:28619-28634；McLemore等人(2005) *biol. Res. Nurs.* 6:262-267)。分別與相應正常人類卵巢、乳房及胰腺組織相比，編碼由MUC16基因表現之MUC16多肽之mRNA於特定類型之人類癌性卵巢、乳房及胰腺腫瘤中顯著、可再現性及可偵測性過度表現(WO 2007/001851)。定量分析各種獨立且不同類

型癌性人類卵巢組織樣本之MUC16表現展示MUC16於癌性樣本中之表現量不同，其中大量癌性樣本在與所分析之正常卵巢組織樣本組之平均MUC16表現量相比時展示MUC16表現增加至少6倍(至高達約580倍)。詳言之，與正常卵巢組織相比，針對卵巢癌類型；子宮內膜樣腺癌、漿液性囊腺癌(包括乳頭狀及透明細胞腺癌)觀測可偵測及可再現之MUC16過度表現。由於在特定人類腫瘤中之過度表現，故MUC16多肽及編碼彼多肽之核酸為各種哺乳動物組織樣本之間定量及定性比較之標靶。可利用MUC16多肽及編碼彼多肽之核酸之獨特表現概況來診斷及治療性治療哺乳動物特定類型之癌性腫瘤。

CA125(癌抗原125(O772P、CA-O772P、CA-125))為由MUC16基因編碼之胞外脫落蛋白(Yin等人(2002) *Intl. J. of Cancer* 98(5):737-740)及通常用以監測患有卵巢癌之患者之血清標誌。CA125為於上皮卵巢癌細胞中過度表現且分泌至血液中之苗勒管(mullerian duct)分化抗原，儘管其表現不完全限於卵巢癌(Bast等人(1981) *J. Clin. Invest.* 68:1331-1337)。約80%患有上皮卵巢癌(EOC)之患者之血清CA125含量升高，但少於1%之健康女性之血清CA125含量升高(Bast等人(1983) *N. Engl. J. Med.* 309:883-887)。CA125為與 β 半乳糖苷結合細胞表面凝集素相關之腫瘤細胞之細胞表面上存在的巨大黏蛋白樣糖蛋白， β 半乳糖苷結合細胞表面凝集素為與細胞黏著、細胞凋亡、細胞增殖及腫瘤進程調控有關之胞外基質組份(Seelenmeyer等人

(2003) *Journal of Cell Science* 116(7): 1305-1318)。高CA125血清濃度為漿液性卵巢腺癌之特徵，而其於黏質性卵巢癌中不升高。不推薦將CA125用於卵巢癌篩檢，因為正常含量不排除腫瘤。然而，CA125偵測為監測患有組織學上證實之惡性疾病之患者臨床過程及疾病狀態之標準工具。許多研究已證實CA125含量在監測患有EOC之患者之疾病進程中(Bast等人(1998) *Int. J. Biol. Markers* 13:179-187; Verheijen等人(1999) *Sem. Cancer Biol.* 9:117-124; Menon等人(2000) *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 12:39-42; Meyer等人(2000) *Br. J. Cancer* 82:1535-1538)及作為癌症血清標誌之適用性。CA125含量升高通常比臨床偵測提前約3個月。在化療期間，血清CA125含量之變化與疾病過程相關。CA125用作新藥試驗中臨床反應之替代標誌。另一方面，CA125由於其在許多良性病況中升高故不適用於EOC之初始診斷(Bast等人(1998) *Int. J. Biol. Markers* 13:179-187; Meden等人(1998) *Int. J. Biol. Markers* 13:231-237)。CA125特異性抗體MAb-B43.13(奧戈伏單抗(oregovomab), OvaRex MAb-B43.13)於臨床試驗中作為免疫治療劑用於患有卵巢癌之患者，Mobus等人(2003) *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 189(1):28-36; Ehlen等人(2005) *International journal of gynecological cancer* 15(6): 1023-34。

某些抗MUC16抗體(包括3A5及11D10)已揭示於WO 2007/001851; 2006年6月14日申請之美國專利第11/452,990

號，Dennis 等人 "Compositions and Methods for the Diagnosis and Treatment of Tumor" 中，該等文獻之內容係以引用的方式併入。根據 OVCAR-3 Scatchard 分析，3A5 單株抗體以 433 pM 親和力與 MUC16 多肽之多個位點結合。3A5 及 11D10 抗 MUC16 抗體與阿瑞他汀藥物部分 MMAE 及 MMAF 結合。結合物抑制活體外腫瘤細胞增殖 (WO 2007/001851)。11D10 抗 MUC16 抗體與類美登素 DM1 藥物部分結合 (US 2005/027681)。某些抗 MUC16 抗體變異體藉由引入半胱胺酸胺基酸單元而經半胱胺酸工程化且與 DM1 結合 (US 2007/0092940，其內容係以引用的方式併入)。

【發明內容】

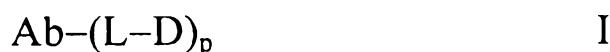
在一態樣中，本發明包括包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自 SEQ ID NO:9-40 之序列的半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體。該半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體可與 MUC16 多肽結合。可使用於此項技術及例如 WO 2007/001851 中熟知之方法及資訊，製備腫瘤相關抗原 (TAA) (諸如 O772P (CA125、MUC16) 多肽) 用於產生半胱胺酸工程化抗體。可藉由包含以半胱胺酸置換親本抗 MUC16 抗體之一或多個胺基酸殘基之方法來製備半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體。

半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體之一或多個游離半胱胺酸胺基酸殘基位於輕鏈或重鏈中。

在一態樣中，本發明包括測定懷疑含有 MUC16 蛋白之樣本中存在 MUC16 蛋白之方法，該方法包含將該樣本曝露於

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體及測定該樣本中該抗體與該MUC16蛋白之結合，其中抗體與該蛋白質之結合指示該樣本中存在該蛋白質。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體可以裸抗體(未與藥物或標記部分結合)形式或以抗體-藥物結合物(ADC)形式使用。半胱胺酸工程化抗MUC16抗體可共價附著至阿瑞他汀藥物部分，藉此形成抗體藥物結合物。抗體-藥物結合物可包含半胱胺酸工程化抗MUC16抗體(Ab)及阿瑞他汀藥物部分(D)，其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係經由一或多個游離半胱胺酸胺基酸以連接子部分(L)附著至D；該化合物具有式I：



其中p為1、2、3或4。阿瑞他汀藥物部分包括MMAE及MMAF。

本發明之一態樣為偵測癌細胞之檢定，其包含：(a)將細胞曝露於半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合物；及(b)測定半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合化合物與細胞之結合程度。

本發明之一態樣為包含半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑之醫藥調配物。

本發明之一態樣為抑制細胞增殖之方法，其包含以半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合化合物處理細胞培養

基中之哺乳動物腫瘤細胞，藉此抑制腫瘤細胞增殖。

本發明之一態樣為治療癌症之方法，其包含向患者投與醫藥調配物。可向患者投與化療劑與半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合化合物之組合。

本發明之一態樣為一製品，其包含醫藥調配物、容器及指示化合物可用以治療以MUC16多肽過度表現為特徵之癌症之包裝仿單或標籤。

本發明之一態樣為製造式I抗體藥物結合化合物之方法，其包含以下步驟：(a)使半胱胺酸工程化抗體之工程化半胱胺酸基與連接試劑反應以形成抗體-連接子中間物Ab-L；及(b)使Ab-L與活性藥物部分D反應；藉此形成抗體-藥物結合物；或包含以下步驟：(c)使藥物部分之親核基團與連接試劑反應以形成藥物-連接子中間物D-L；及(d)使D-L與半胱胺酸工程化抗體之工程化半胱胺酸基反應；藉此形成抗體-藥物結合物。

【實施方式】

現將對本發明之某些實施例進行詳細論述，該等實施例之實例係以隨附結構及化學式說明。雖然將結合所列舉之實施例描述本發明，但應瞭解其並不意欲將本發明限制於彼等實施例。相反，本發明意欲涵蓋可包括於如申請專利範圍所定義之本發明範疇內的所有替代、修正及等效物。

熟習此項技術者將想到許多類似或等同於本文中所述者之方法及材料，可將其用於實踐本發明。本發明決不限於所述之方法及材料。

定義

除非另作定義，否則本文中所用之技術及科學術語具有與普通熟習本發明所屬技術者通常所瞭解之含義相同的含義，且與下列文獻一致：Singleton等人(1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology，第2版，J. Wiley & Sons, New York, NY；及 Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology，第5版，Garland Publishing, New York。

本文之術語"抗體"以最廣義使用且尤其涵蓋單株抗體、多株抗體、二聚體、多聚體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所需生物活性即可(Miller等人(2003) Jour, of Immunology 170:4854-4861)。抗體可為鼠類抗體、人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體或源自其他物種。抗體為能夠識別且結合特異性抗原之蛋白質(Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology，第5版，Garland Publishing, New York)。靶抗原一般具有許多由多個抗體上之CDR識別之結合位點，亦稱作抗原決定基。與不同抗原決定基特異性結合之各抗體具有不同結構。因此，一個抗原可具有一個以上對應抗體。抗體包括全長免疫球蛋白分子或全長免疫球蛋白分子之免疫活性部分，亦即含有免疫特異性結合所關注標靶之抗原之抗原結合位點的分子或其部分，該等標靶包括(但不限於)癌細胞或產生與自體免疫疾病相關之自體免疫抗體之細胞。本文中揭示之免疫球蛋白可為任何類

型(例如 IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)、種類(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可源自諸如人類、鼠類或兔子之任何物種。關於不同種類抗體之結構及特性，參見(例如)**Basic and Clinical Immunology**，第8版，Daniel P. Stites, Abba I. Terr及 Tristram G. Parslow(編)，Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994，第71頁及第6章。

"抗體片段"包含全長抗體之一部分，一般為其抗原結合或可變區。抗體片段實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂及 Fv 片段；雙功能抗體；線性抗體；微型抗體(US 5641870，實例2；Zapata等人(1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062；Olafsen等人(2004) Protein Eng. Design & Sel. 17(4):315-323)；Fab表現庫所產生之片段；抗獨特型(抗Id)抗體；CDR(互補判定區)及以上任一者之與癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原免疫特異性結合之抗原決定基結合片段；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

本文中所使用之術語"單株抗體"係指自大體上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即，構成該群體之個別抗體除可以微量存在之可能的天然產生之突變以外皆相同。單株抗體針對單一抗原位點具高度特異性。此外，與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相反，各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。除單株抗體之特異性外，單株抗體之優勢在於其可在不受其他抗體污染下合成。修飾語"單株"表明抗體獲自大體上均質之抗體群體之

特徵，且不應理解為需要由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可由首先由Kohler等人，(1975) Nature 256:495描述之融合瘤方法製得，或可由重組DNA方法(參見，例如US 4816567；US 5807715)製得。亦可使用描述於Clackson等人(1991)Nature, 352:624-628；Marks等人(1991)J. Mol. Biol., 222:581-597中之技術自噬菌體抗體庫分離單株抗體。

(例如)藉由以人類重鏈及輕鏈恆定域(C_H 及 C_L)序列取代同源鼠類序列(US 4816567；及Morrison等人，Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984))，或藉由將免疫球蛋白編碼序列與非免疫球蛋白多肽(異源多肽)之編碼序列之全部或一部分融合，可修飾編碼抗體之DNA以產生嵌合或融合抗體多肽。非免疫球蛋白多肽序列可取代抗體恆定域或用其取代抗體之一個抗原組合位點之可變域以產生嵌合二價抗體，該嵌合二價抗體包含一個對一抗原具特異性之抗原組合位點及另一個對不同抗原具特異性之抗原組合位點。

"天然抗體"通常為約150,000道爾頓(dalton)，由兩條相同輕鏈(L)及兩條相同重鏈(H)構成之異四聚糖蛋白。各輕鏈係由一個共價雙硫鍵與重鏈連接，而不同免疫球蛋白同型之重鏈間，雙硫鍵之數目不同。各重鏈及輕鏈亦具有規則間隔之鏈內雙硫橋。各重鏈在一端具有可變域(V_H)，繼之以許多恆定域。各輕鏈在一端具有可變域(V_L)且在其另一端具有恆定域。將輕鏈恆定域與重鏈第一恆定域對準，且將輕鏈可變域與重鏈可變域對準。咸信特定胺基酸殘基

在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。

本文之單株抗體特別包括"嵌合"抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中之相應序列一致或同源，而該(等)鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或子類之抗體中之相應序列一致或同源；以及該等抗體之片段(只要其展現所需生物活性)(US 4816567及Morrison等人(1984)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855)。本文所關注之嵌合抗體包括"靈長化"抗體，其包含源自非人類靈長類動物(例如舊世紀猴、猿等)之可變域抗原結合序列及人類恆定區序列。

非人類(例如齧齒動物)抗體之"人類化"形式為含有源自非人類抗體之最小序列的嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體高變區之殘基經來自具有所需抗體特異性、親和力及能力之非人類物種(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)(供體抗體)之高變區的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供體抗體中未見之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含大體上所有至少一個且通常兩個可變域，其中所有或大體上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或大體上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。Fc片段

包含由雙硫鍵固持在一起之兩條H鏈之羧基端部分。抗體之效應功能係由Fc區中之序列決定，該區亦為由見於某些類型細胞上之Fc受體(FcR)所識別之部分(Jones等人(1986)Nature 321:522-525；Riechmann等人(1988) Nature 332:323-329；Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596；Verhoeyen等人(1988)Science, 239:1534-1536；Sims等人(1993) J. Immunol. 151:2296；Chothia等人(1987)J. Mol. Biol., 196:901)。其他方法使用源自具有特定輕鏈或重鏈子群之所有人類抗體之一致序列的特定構架區(Carter等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285；Presta等人(1993) J. Immunol. 151:2623)。

"人類抗體"為具有與人類所產生之抗體之胺基酸序列相對應的胺基酸序列及/或使用本文所揭示之任何製造人類抗體之技術製成的抗體。此人類抗體之定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。可利用能夠在免疫後在不產生內源性免疫球蛋白下產生全套人類抗體譜之轉殖基因動物(例如小鼠)。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變小鼠抗體重鏈接合區(J_H)基因的純合子缺失導致對內源抗體產生之完全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變小鼠體內將致使在抗原激發後產生人類抗體(Jakobovits等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551；Jakobovits等人(1993) Nature, 362:255-258；Bruggemann等人(1993)Year in Immuno. 7:33；US 5545806；US 5569825；US 5591669；US 5545807及WO

97/17852)。

"親和力成熟"抗體為在其一或多個CDR中具有一或多處改變之抗體，與不具有彼等改變之抗體相比，彼等改變致使抗體對抗原之親和力改良。較佳親和力成熟抗體將對靶抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳親和力。藉由VH及VL域改組(Marks等人(1992) *Bio/Technology* 10:779-783)或CDR及/或構架殘基之隨機突變誘發(Barbas等人(1994) *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 ; Schier等人(1995) *Gene* 169:147-155 ; Yelton等人(1995) *J. Immunol.* 155:1994-2004 ; Jackson等人(1995) *J. Immunol.* 154(7):3310-9及 Hawkins等人(1992)*J. Mol. Biol.* 226:889-896)進行親和力成熟來產生親和力成熟抗體。

本文中之"完整抗體"為包含VL及VH域，以及輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域CH1、CH2及CH3之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。完整抗體可具有一或多種"效應功能"，其係指可歸因於抗體之Fc恆定區(天然序列Fc區及胺基酸序列變異體Fc區)之彼等生物活性。抗體效應功能之實例包括：C1q結合；補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；及細胞表面受體(諸如B細胞受體)之下調及BCR。

術語"胺基酸序列變異體"係指具有在某種程序上不同於天然序列多肽之胺基酸序列之多肽。通常，胺基酸序列變異體將與天然序列多肽之至少一個受體結合域或與天然受

體之至少一個配位體結合域具有至少約70%之序列一致性，且其與該等受體或配位體結合域較佳至少約80%，更佳至少約90%序列同源。胺基酸序列變異體在天然胺基酸序列之胺基酸序列中之某些位置上具有取代、缺失及/或插入。胺基酸係以習知名稱，一字母及三字母碼命名。

"序列一致性"係定義為在對準序列與引入空位(若必要)以達成最大序列一致性百分比後胺基酸序列變異體中相同殘基的百分比。對準方法及電腦程式於此項技術中熟知。一種此類電腦程式為Genentech, Inc.創造之"Align 2"，其在1991年12月10日隨使用者文件歸檔於Washington, DC 20559之美國版權辦公室，且其代碼見於WO 2007/001851。

術語"Fc受體"或"FcR"意謂與抗體之Fc恆定區結合的受體。較佳FcR為天然序列人類FcR。此外，較佳FcR為結合IgG抗體之FcR(γ 受體)且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII子類之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及另外剪接形式。Fc γ RII受體包括具有主要在細胞質域中存在不同之類似胺基酸序列之Fc γ RIIA("活化受體")及Fc γ RIIB("抑制受體")。活化受體Fc γ RIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體Fc γ RIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)(參見評論M., Daëron, (1997) "Annu. Rev. Immunol."15:203-234)。FcR係評論於Ravetch及Kinet, (1991) "Annu. Rev. Immunol"., 9:457-92; Capel等人(1994) Immunomethods 4:25-34; 及de Haas等人(1995) J. Lab. Clin. Med. 126:330-

41中。本文之術語"FcR"涵蓋包括有待於將來鑑別之其他FcR。該術語亦包括新生受體FcRn，其負責將母系IgG轉移至胎兒(Guyer等人(1976) J. Immunol., 117:587及Kim等人(1994) J. Immunol. 24:249)。

術語"可變"係指如下事實：抗體間可變域之某些部分在序列上廣泛不同且用於各特定抗體對其特定抗原的結合及特異性。然而，可變性在抗體可變域之整個範圍內並非均勻分布。其集中於輕鏈及重鏈可變域中之三個稱作高變區之片段中。可變域之更高度保守部分稱作構架區(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含大體上採用 β -摺疊構型、由三個高變區連接之四個FR，該三個高變區形成連接 β -摺疊結構且在某些狀況下形成 β -摺疊結構之部分的環。各鏈中之高變區係由FR緊密固持在一起且與來自另一條鏈之高變區一起有助於形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。恆定域並不直接與抗體與抗原之結合有關，但展現各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

術語"高變區"、"HVR"或"HV"當在本文中使用時係指抗體可變域中序列高變且/或形成結構限定之環之區域。一般而言，抗體包含六個高變區；三個在VH中(H1、H2、H3)且三個在VL中(L1、L2、L3)。本文中使用且涵蓋許多關於高變區之描繪。Kabat互補判定區(CDR)係基於序列可

變性且最常使用(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia另外指出結構環之位置(Chothia及Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。"接觸"高變區係基於對可用複雜晶體結構之分析。來自此等各高變區的殘基係如下註解。除非另外表示, 否則將採用根據Kabat資料庫之對準蛋白質序列Kabat編號(Wu及Kabat (1970) J. Exp. Med. 132:211-250 ; Johnson及Wu (2000) Nuc. Acids Res. 28(1):214-218)。高變區位置一般如下: 胺基酸24-34(HVR-L1)、胺基酸49-56(HVR-L2)、胺基酸89-97(HVR-L3)、胺基酸26-35A(HVR-H1)、胺基酸49-65(HVR-H2)及胺基酸93-102(HVR-H3)。高變區亦可於VL中包含如下"延長高變區": 胺基酸24-36(L1)及胺基酸46-56(L2)。根據Kabat等人(同上文)針對此等定義各者對可變域殘基進行編號。出於本文目的之"經改變高變區"為包含一或多個(例如1至約16個)胺基酸取代之高變區。出於本文目的之"未經修飾高變區"為胺基酸序列與產生其之非人類抗體相同之高變區, 亦即缺少一或多個胺基酸取代之高變區。

術語"按照Kabat之可變域殘基編號"、"按照Kabat之胺基酸位置編號"及其變化形式, 係指Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)中用於編譯抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的

編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可對應於可變域之FR或CDR之縮短或插入可變域之FR或CDR中含有較少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可包括在H2之殘基52後插入之單一胺基酸(根據Kabat殘基52a)及在重鏈FR殘基82後插入之殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。可藉由在抗體序列之同源區處與"標準"Kabat編號之序列對準來確定給定抗體之殘基的Kabat編號。

"結合親和力"一般係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)間之非共價相互作用的總強度。除非另作說明，否則本文所使用之"結合親和力"係指反映結合對成員(例如抗體與抗原)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(包括本文所述之彼等方法)量測親和力。低親和力抗體一般與抗原緩慢結合且傾向於容易解離，而高親和力抗體一般與抗原結合較快且傾向於保持較長時間結合。此項技術中已知多種量測結合親和力之方法，該等方法中之任一者均可用於達成本發明之目的。以下描述特定說明性實施例。

"抗原"為抗體可選擇性結合之預定多肽、碳水化合物、核酸、脂質、半抗原或其他天然產生或合成化合物。

"構架"或"FR"殘基為除本文中所定義之高變區殘基以外的彼等可變域殘基。"人類一致構架"為表示在一系列所選人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常產生之胺基酸殘

基的構架。一般而言，該所選人類免疫球蛋白VL或VH序列系列係來自可變域序列之子群。一般而言，序列之子群為如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)中之子群。在一實施例中，VL之子群為如Kabat等人中之子群 κ I。在一實施例中，VH之子群為如Kabat等人中之子群III。"VH子群III一致構架"包含獲自Kabat等人之可變重鏈子群III之胺基酸序列的一致序列。"VL子群I一致構架"包含獲自Kabat等人之可變輕鏈 κ 子群I之胺基酸序列的一致序列。

"Fv"為含有完整抗原識別及抗原結合位點之最小抗體片段。此區由緊密、非共價締合之一個重鏈可變域及一個輕鏈可變域之二聚體組成。在此構型下，各可變域之三個高變區相互作用以界定 V_H - V_L 二聚體表面之抗原結合位點。總體而言，六個高變區賦予抗體以抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含三個對抗原具特異性之高變區之半個Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，儘管其親和力比完整結合位點低。

Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH1)。Fab'片段因在重鏈CH1結構域之羧基端添加幾個殘基(包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸)而不同於Fab片段。Fab'-SH為本文中對恆定域之半胱胺酸殘基具有至少一個游離硫醇基之Fab'的命名。最初F(ab')₂抗體片段係以其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對形式產生。亦已知

抗體片段之其他化學偶合。

來自任何脊椎動物物種之抗體之"輕鏈"可基於其恆定域之胺基酸序列而指派為兩個稱為 κ 及 λ 之明顯不同類型中之一者。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之 V_H 及 V_L 域，其中此等域存在於單一多肽鏈中。較佳地，Fv多肽另外包含在 V_H 與 V_L 域之間的多肽連接子，該連接子使得scFv能夠形成抗原結合所需之結構(Plückhün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994))。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含與同一多肽鏈中之輕鏈可變域(VL)連接的重鏈可變域(VH)(VH-VL)。藉由使用太短而不能使同一鏈上之兩個結構域之間配對之連接子，迫使結構域與另一條鏈之互補結構域配對且產生兩個抗原結合位點(EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger等人(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。

"游離半胱胺酸胺基酸"係指經工程化至親本抗體中，具有硫醇官能基(-SH)且並非配對為分子內或分子間雙硫橋或其部分之半胱胺酸胺基酸殘基。

術語"硫醇反應性值"為游離半胱胺酸胺基酸反應性之定量表徵。硫醇反應性值為半胱胺酸工程化抗體中與硫醇反應性試劑反應且轉化為最大值1之游離半胱胺酸胺基酸百分比。舉例而言，以100%產率與硫醇反應性試劑(諸如生

物素-順丁烯二醯亞胺試劑)反應以形成經生物素標記抗體之半胱胺酸工程化抗體上的游離半胱胺酸胺基酸具有1.0之硫醇反應性值。以80%產率與硫醇反應性試劑反應之工程化至同一或不同親本抗體中之另一種半胱胺酸胺基酸具有0.8之硫醇反應性值。完全無法與硫醇反應性試劑反應之工程化至同一或不同親本抗體中之另一種半胱胺酸胺基酸具有0之硫醇反應性值。可藉由ELISA檢定、質譜法、液相層析法、自動放射顯影術或其他定量分析測試來進行特定半胱胺酸硫醇反應性值之測定。允許俘獲半胱胺酸工程化抗體及比較且定量半胱胺酸反應性之硫醇反應性試劑包括生物素-PEO-順丁烯二醯亞胺((+)-生物素基-3-順丁烯二醯亞胺丙醯胺基-3,6-二氧雜辛二胺，Oda等人(2001) *Nature Biotechnology* 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.)；生物素-BMCC、PEO-碘乙醯基生物素、碘乙醯基-LC-生物素及生物素-HPDP(Pierce Biotechnology, Inc.)及Na-(3-順丁烯二醯亞胺基丙醯基)生物素(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)。生物素化、雙官能及多官能連接試劑之其他商業來源包括Molecular Probes, Eugene, OR及Sigma, St. Louis, MO。

"親本抗體"為包含以一或多個半胱胺酸殘基置換一或多個胺基酸殘基之胺基酸序列之抗體。親本抗體可包含天然或野生型序列。相對於其他天然、野生型或經修飾形式之抗體，親本抗體可具有預先存在之胺基酸序列修飾(諸如添加、缺失及/或取代)。親本抗體可針對所關注之靶抗

原，例如生物學上重要的多肽。亦涵蓋針對非多肽抗原（諸如腫瘤相關糖脂質抗原；參見US 5091178）之抗體。

"分離"抗體為一種已經鑑別且自其天然環境之組份分離及/或回收的抗體。其天然環境之污染組份為將干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白或非蛋白溶質。在較佳實施例中，該抗體純化至(1)如藉由Lowry法所測定大於95重量%之抗體，且最佳大於99重量%；(2)足以藉由使用旋杯式定序儀獲得N-端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度；或(3)藉由SDS-PAGE，在還原條件或非還原條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染劑的均質。由於抗體天然環境之至少一種組份將不存在，故經分離抗體包括原位處於重組細胞內之抗體。然而通常經分離抗體將由至少一個純化步驟來製備。

"結合"所關注分子靶或抗原(例如MUC16或CA125抗原)之抗體為能夠以足夠親和力結合彼抗原使得抗體適用於靶向表現該抗原之細胞的抗體。當抗體為結合MUC16之抗體時，其通常優先結合MUC16且可為不與其他蛋白質顯著交叉反應之抗體。在該等實施例中，如藉由螢光活化細胞揀選(FACS)分析或放射免疫沈澱(RIA)所測定，抗體與此等非MUC16蛋白之結合程度(例如細胞表面與內源性受體之結合)小於10%。

"治療"或"緩解"係指治療性治療或預防性措施，其中目標為預防或減緩(減輕)靶病理病況或病症。需要治療者包括已患有該病症者以及傾向於患該病症者或有待預防該病

症者。若根據本發明方法，接受治療量之抗CA125/O772P抗體(諸如半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物)後，患者展示下列情況中一或多種之可觀測及/或可量測性降低或不存在下列情況中之一或多種，則成功地"治療"受檢者或哺乳動物表現CA125/O772P多肽之癌症：癌細胞數量減少或不存在癌細胞；腫瘤尺寸減小；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳終止)癌細胞浸潤至周圍器官中，包括癌症擴散至軟組織及骨骼；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳終止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上減輕與特定癌症相關之一或多種症狀；發病率及死亡率降低且生活質量改善。就半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物可阻止現有癌細胞生長及/或將其殺死而言，其可具細胞生長抑制性及/或細胞毒性。此等病徵或症狀之減輕亦可為患者所感知。用於評定疾病之成功治療及改善之以上參數可易於藉由醫師所熟知之常規程序量測。可(例如)藉由評定疾病進展時間(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測癌症療法之功效。可藉由分級測試及藉由骨骼掃描及鈣含量及其他酶之測試來測定至骨骼之擴散來測定癌轉移。亦可進行CT掃描來尋找至骨盆及該區域中之淋巴結之擴散。分別使用胸部X線及藉由已知方法進行之肝酶含量量測來尋找至肺及肝之癌轉移。監測疾病之其他常規方法包括經直腸超音波檢查術(TRUS)及經直腸穿刺活檢(TRNB)。

術語"癌症"及"癌性"係指或描述哺乳動物通常以不受調

控之細胞生長為特徵之生理病況。"腫瘤"包含一或多種癌細胞，且係指無論惡性或良性之所有贅生性細胞生長及增殖，及所有癌前及癌性細胞及組織。癌症實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、母細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴惡性病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)；肺癌，包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌("NSCLC")；肺腺癌及肺鱗狀癌；腹膜癌；肝細胞癌；胃癌，包括胃腸癌；胰臟癌，包括胰腺腺癌；神經膠母細胞瘤；子宮頸癌；卵巢癌；肝癌；膀胱癌；肝細胞癌；乳癌；結腸癌；直腸癌；結腸直腸癌；子宮內膜癌或子宮癌；唾液腺癌；腎癌；前列腺癌；陰門癌；甲狀腺癌；肝癌瘤；肛門癌瘤；陰莖癌瘤以及頭頸部癌。

"過度表現"抗原受體之癌症為與相同組織類型之非癌細胞相比，在細胞表面具有顯著較高受體(諸如MUC16)含量之癌症。該過度表現可由基因擴增或由轉錄或轉譯增加引起。可於診斷或預後檢定中，藉由評估細胞表面上存在之受體蛋白含量增加(例如經由免疫組織化學檢定；IHC)來測定受體過度表現。其他或另外，吾人可(例如)經由螢光原位雜交(FISH；參見WO 98/45479)、南方墨點法或聚合酶鏈反應(PCR)技術(諸如實時定量逆轉錄酶PCR(qRT-PCR)量測細胞中編碼受體之核酸含量。

術語"細胞增殖病症"及"增殖病症"係指與某種程度之異常細胞增殖相關之病症。在一實施例中，細胞增殖病症為癌症。

術語"治療有效量"係指藥物(例如半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物或化療劑)有效治療哺乳動物疾病或病症之量。在癌症之情況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞之數量；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳終止)癌細胞浸潤至周圍器官中；抑制(亦即，在一定程度上減緩且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上緩解與癌症相關之一或多種症狀。就藥物可阻止現有癌細胞生長及/或將其殺死而言，其可具細胞抑制性及/或細胞毒性。術語"細胞生長抑制"係指限制細胞功能，諸如限制細胞生長或細胞增殖之效應。可(例如)藉由評定疾病進展時間(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測癌症療法之功效。

"化療劑"為適用於治療癌症的化合物。化療劑之實例包括埃羅替尼(erlotinib)(TARCEVA®， Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(bortezomib)(VELCADE®， Millenium Pharm.)、氟維司群(fulvestrant)(FASLODEX®， AstraZeneca)、索坦(sutent)(SU11248， Pfizer)、來曲唑(letrozole)(FEMARA®， Novartis)、甲磺酸伊馬替尼(GLEEVEC®， Novartis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、奧賽力鉑(oxaliplatin)(Eloxatin®， Sanofi)、5-FU(5-氟尿嘧啶)、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、雷帕黴素(Rapamycin)(西羅莫司(Sirolimus)， RAPAMUNE®， Wyeth)、拉帕替尼(lapatinib)(TYKERB®， GSK572016， GlaxoSmithKline)、洛那法尼(lonafarnib)(SCH 66336)、索拉非尼(sorafenib)(BAY43-

9006, Bayer Labs.)及吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®, Astrazeneca)、AG1478、AG1571(SU 5271; Sugen); 烷化劑, 諸如塞替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺; 烷基磺酸酯, 諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶, 諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa); 伸乙基亞胺及甲基三聚氰胺, 包括六甲密胺(altretamine)、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺; 乙醯精寧(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone)); 喜樹鹼(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)); 苔蘚蟲素(bryostatin); 卡利斯坦汀(callystatin); CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物); 念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8); 海兔毒素; 多卡米星(duocarmycin)(包括合成類似物, KW-2189及CB1-TM1); 艾榴素(eleutherobin); 盤克斯坦汀(pancratistatin); 沙考的汀(sarcodictyin); 海綿抑素(spongistatin); 氮芥類, 諸如苯丁酸氮芥、荼氮芥、氯磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺、二氯甲基二乙胺氧化物鹽酸鹽、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽固醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亞硝基脲,

諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如刺孢黴素，尤其刺孢黴素 γ II及刺孢黴素 ω II(Angew. Chem Intl.編Engl.(1994) 33: 183-186)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新制癌菌素發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)；阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、胺茴黴素(anthramycin)、重氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾菌素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®阿黴素(doxorubicin)(包括嗎啉基-阿黴素、氰基嗎啉基-阿黴素、2-吡咯啉基-阿黴素及脫氧阿黴素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、諸如絲裂黴素C之絲裂黴素(mitomycin)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈佐星

(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、雙脫氧尿苷、脫氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素，諸如卡普峇酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitioanol)、美雄烷(mepitioane)、峇內酯(testolactone)；抗腎上腺素，諸如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸；乙炔尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；倍思曲布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；依氟鳥胺酸(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂(gallium nitrate)；羥基脲；香菇多糖

(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；足葉草酸(podophyllinic acid)；2-乙醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸啞(anguidine))；胺基甲酸乙酯；長春地辛；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖苷(arabinoside)("Ara-C")；環磷醯胺；塞替派；紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™不含十六醇聚氧乙烯醚白蛋白工程化之太平洋紫杉醇奈米顆粒調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)及TAXOTERE®歐洲紫杉醇(doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥；GEMZAR®吉西他濱(gemcitabine)；6-硫代鳥嘌呤

呤；巯基嘌呤；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑及卡波鉑；長春花鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(etoposide)(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼(vincristine)；NAVELBINE®長春瑞賓(vinorelbine)；諾凡特龍(novantrone)；替尼泊甙(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素；胺基蝶呤(aminopterin)；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視色素，諸如視黃酸；卡西他賓(capecitabine)；及以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；

此"化療劑"定義中亦包括：(i)用以調控或抑制對腫瘤之激素作用之抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括(例如)他莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬鹽酸鹽(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON-托瑞米芬(FARESTON-toremifene)；(ii)抑制芳香酶之芳香酶抑制劑，其調節腎上腺中雌激素產生，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、弗米斯坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏羅唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑及ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole)；(iii)抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)、比卡魯胺

(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；(iv)芳香酶抑制劑；(v)蛋白激酶抑制劑；(vi)脂質激酶抑制劑；(vii)反義寡核苷酸，尤其抑制與黏附細胞增殖有關之信號轉導路徑中之基因表現的反義寡核苷酸，諸如PKC- α ，Ralf及H-Ras；(viii)核糖核酸酶，諸如VEGF表現抑制劑(例如ANGIOZYME®核糖核酸酶)及HER2表現抑制劑；(ix)疫苗，諸如基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；(x)抗血管生成劑，諸如貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN®，Genentech)；及(xi)以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

術語"細胞激素"為由一個細胞群體釋放之作為細胞內介體作用於另一細胞的蛋白質之通用術語。該等細胞激素之實例為淋巴因子、單核球激素及傳統多肽激素。細胞激素包括生長激素，諸如人類生長激素、N-甲硫胺醯基人類生長激素及牛生長激素；副甲狀腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；醣蛋白激素，諸如促濾泡激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)及促黃體激素(LH)；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；促乳素；胎盤促乳素；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；苗勒管抑制物質；小鼠促性腺激素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整合素；血小板生成素(TPO)；神經生長因

子，諸如 NGF- β ；血小板生長因子；轉化生長因子 (TGF)，諸如 TGF- α 及 TGF- β ；胰島素樣生長因子-I 及胰島素樣生長因子-II；紅細胞生成素 (EPO)；骨誘導因子；干擾素，諸如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ ；群落刺激因子 (CSF)，諸如巨噬細胞-CSF (M-CSF)；粒細胞-巨噬細胞-CSF (GM-CSF)；及粒細胞-CSF (G-CSF)；介白素 (IL)，諸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；腫瘤壞死因子，諸如 TNF- α 或 TNF- β ；及其他多肽因子 (包括 LIF 及 kit 配位體 (KL))。本文中所使用之術語細胞激素包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白質及天然序列細胞激素之生物活性等效物。

術語 "標記" 意謂可共價附著至抗體且發揮以下作用之任何部分：(i) 提供可偵測信號；(ii) 與第二標記相互作用以改變第一標記或第二標記提供之可偵測信號，例如 FRET (螢光共振能量傳遞)；(iii) 穩定與抗原或配位體之相互作用或增加與抗原或配位體之結合親和力；(iv) 藉由電荷、疏水性、形狀或其他物理參數來影響遷移率，例如電泳遷移率或細胞滲透性；或 (v) 提供俘獲部分來調節配位體親和力、抗體/抗原結合或離子錯合。

本文中所使用之短語 "醫藥學上可接受之鹽" 係指 ADC 之醫藥學上可接受之有機鹽或無機鹽。例示性鹽包括 (但不限於) 硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸

鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽(tannate)、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、糖酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥荼酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-荼甲酸鹽))。醫藥學上可接受之鹽可涉及包涵諸如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他平衡離子之另一分子。平衡離子可為使化合物上電荷穩定之任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽可於其結構中具有一個以上之帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽之一部分的情況可具有多個平衡離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個平衡離子。

"醫藥學上可接受之溶劑合物"係指一或多個溶劑分子與ADC之締合。形成醫藥學上可接受之溶劑合物之溶劑實例包括(但不限於)水、異丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺。

本文中所使用之"載劑"包括在所採用之劑量及濃度下，對曝露其中之細胞或哺乳動物無毒之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑。通常，生理上可接受之載劑為pH值緩衝水溶液。生理上可接受之載劑之實例包括緩衝劑，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；低分子量(小於約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；糖醇，諸如甘露醇或山梨糖醇；成鹽平衡離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)及PLURONICS®。

本文中使用的縮寫且其具有指定之定義：Boc為N-(第三丁氧基羰基)；cit為瓜胺酸(2-胺基-5-脲基戊酸)；dap為多拉普寧(dolaproine)；DCC為1,3-二環己基碳化二醯亞胺；DCM為二氯甲烷；DEA為二乙胺；DMSO為二甲亞砜；DTNB為5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸)；DTPA為二伸乙三胺五乙酸；DTT為二硫蘇糖醇；Fmoc為N-(9-芴基甲氧基羰基)；gly為甘胺酸；HOBt為1-羥基苯并三唑；HPLC為高壓液相層析；Mtr為4-茴香基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯基)；PAB為對胺基苄基胺甲醯基；PBS為磷酸鹽緩衝生理食鹽水(pH值為7)；PEG為聚乙二醇；MC為6-順丁烯醯亞胺己醯基；phe為L-苯丙胺酸；SEC為尺寸排外層析；TFA為三氟乙酸；TLC為薄層層析；UV為紫外線且val為纈胺酸。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體

本發明化合物包括半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中任何形式之野生型或親本抗MUC16抗體之一或多個胺基酸係以半胱胺酸胺基酸置換。工程化半胱胺酸胺基酸為游離

半胱胺酸且不為鏈內或鏈間雙硫鍵單元之一部分。可使任何形式之抗MUC16抗體如此工程化，亦即突變。舉例而言，親本Fab抗體片段可經工程化以形成本文中稱作"ThioFab"之半胱胺酸工程化Fab。類似地，親本單株抗體可經工程化以形成"ThioMab"。應注意ThioFab中單一位點突變產生單一工程化半胱胺酸殘基，而由於IgG抗體之二聚性質，ThioMab中單一位點突變產生兩個工程化半胱胺酸殘基。本發明之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體包括優先結合細胞相關MUC16多肽之單株抗體、人類化或嵌合單株抗體、抗體之抗原結合片段、融合多肽及類似物。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體保持其野生型、親本抗MUC16抗體對應物之抗原結合能力。因此，如J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)；WO 2004045553(請求項14)；WO 200292836(請求項6；圖12)；WO 200283866(請求項15；第116-121頁)；US 2003124140(實例16)；交叉參照案：GI:34501467；AAK74120.3；AF361486_1中所述，半胱胺酸工程化抗MUC16抗體能夠與包括受體蛋白O772P(CA125，MUC16，Genbank寄存編號AF361486)之MUC16抗原結合。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體包含一或多個具有經還原硫氫基(硫醇)之游離半胱胺酸胺基酸，其中半胱胺酸工程化抗MUC16抗體與MUC16多肽結合。

在一實施例中，可藉由包含以半胱胺酸置換親本抗MUC16抗體之一或多個胺基酸殘基之方法來製備半胱胺酸

工程化抗MUC16抗體。

可評估具有經置換("工程化")半胱胺酸(Cys)殘基之突變體之新引入工程化半胱胺酸硫醇基的反應性。硫醇反應性值為0至1.0範圍內之相對數值項且可量測任何半胱胺酸工程化抗體之硫醇反應性值。本發明半胱胺酸工程化抗體之硫醇反應性值可在0.6至1.0；0.7至1.0；或0.8至1.0之範圍內。

在一態樣中，本發明係關於包含由與編碼下列各物之DNA分子補體雜交之核苷酸序列編碼的胺基酸序列之經分離半胱胺酸工程化抗MUC16抗體：(a)如本文中所揭示具有全長胺基酸序列之半胱胺酸工程化抗體；(b)如本文中所揭示缺少信號肽之半胱胺酸工程化抗體胺基酸序列；(c)如本文中所揭示具有或不具有信號肽之跨膜半胱胺酸工程化抗體蛋白之胞外域；(d)由本文中所揭示之核酸序列中之任一者編碼之胺基酸序列，或(e)如本文中所揭示全長半胱胺酸工程化抗體胺基酸序列之任何其他特別定義之片段。

在一態樣中，本發明提供不具有N端信號序列及/或不具有起始甲硫胺酸之經分離半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，且該抗體係由編碼如本中所述之該胺基酸序列之核苷酸序列編碼。產生該抗體之方法亦描述於本文中，其中彼等方法包含在適於表現半胱胺酸工程化抗體之條件下培養包含載體(其包含適當編碼核酸分子)之宿主細胞及自細胞培養物回收半胱胺酸工程化抗體。

本發明之另一態樣提供跨膜域缺失或跨膜域失活之經分

離半胱胺酸工程化抗MUC16抗體。產生該抗體之方法亦描述於本文中，其中彼等方法包含在適於表現半胱胺酸工程化抗體之條件下培養包含載體(其包含適當編碼核酸分子)之宿主細胞及自細胞培養物回收半胱胺酸工程化抗體。

在其他實施例中，本發明提供包含與異源(非MUC16)多肽融合之本文所述半胱胺酸工程化抗體之任一者的經分離抗MUC16嵌合半胱胺酸工程化抗體。該等嵌合分子之實例包含與異源多肽(例如免疫球蛋白之抗原決定基標籤序列或Fc區)融合之本文所述半胱胺酸工程化抗體中之任一者。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體可為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗MUC16多肽抗體與其各別抗原決定基結合之抗體。本發明抗體視情況可與生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，包括例如阿瑞他汀)、抗生素、放射性同位素、核分解酶或其類似物結合。本發明抗體可視情況於CHO細胞或細菌細胞中產生且較佳抑制與其結合之細胞的生長或增殖或誘發該細胞死亡。出於診斷目的，本發明抗體可經可偵測標記，附著至固體支撐物或類似處理。

在本發明之其他實施例中，本發明提供包含編碼本文中所述之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體中任一者之DNA的載體。亦提供包含任何該載體之宿主細胞。舉例而言，宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。另外提供產生本文所述多肽中任一者之方法，且該方法包含在適於

表現所需多肽之條件下培養宿主細胞及自細胞培養物中回收所需多肽。

親本及半胱胺酸工程化抗MUC16抗體與MUC16多肽或MUC16多肽變異體結合，該MUC16多肽或MUC16多肽變異體係描述於"Compositions and Methods for the Diagnosis and Treatment of Tumor", WO 2007/001851；Dennis等人於2006年6月14日申請之Genentech, Inc之美國專利第11/452990號中且稱為O772P、卵巢癌抗原CA125或MUC16人類且Genbank寄存編號為AF361486。交叉參照案：GI:34501467；AAK74120.3；AF361486_1；Swiss-Prot記錄條目Q8WX17。參見：Yin等人(2001) J. Biol. Chem. 276(29):27371-27375)；WO 2004045553(請求項14)；WO 200292836(請求項6，圖12)；WO 200283866(請求項15；第116-121頁)；US 2003124140(實例16)或MUC16多肽變異體。

MUC16多肽變異體為與揭示於WO 2007/001851中之MUC16或CA125/O772P多肽序列具有至少約80%胺基酸序列一致性之MUC16/CA125/O772P多肽，其為：(i)全長天然序列；(ii)缺少信號肽之多肽序列；(iii)具有或不具有信號肽之胞外域；(iv)或全長MUC16/CA125/O772P多肽序列之任何其他片段(諸如由僅表示全長MUC16/CA125/O772P多肽之完整編碼序列之一部分的核酸編碼之片段)。該等MUC16多肽變異體包括(例如)在全長天然胺基酸序列之N端或C端添加或缺失一或多個胺基酸殘基的多肽。通常，

MUC16多肽變異體與全長天然序列MUC16多肽序列、缺少信號肽之MUC16多肽序列、具有或不具有信號肽之MUC16多肽之胞外域或全長MUC16多肽序列之任何其他特別定義之片段具有至少約80%胺基酸序列一致性，或至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之胺基酸序列一致性。通常，MUC16多肽變異體長度至少為約10個胺基酸，或者長度至少約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600個胺基酸或更長。視情況MUC16變異體多肽與天然MUC16多肽序列相比將具有不超過一個保守胺基酸取代，或者與天然MUC16多肽序列相比具有不超過2、3、4、5、6、7、8、9或10個保守胺基酸取代。

MUC16多肽可藉由於下列各物中重組表現來製備：(i)具有pBR322載體之大腸桿菌，(ii)哺乳動物細胞，諸如人類HEK293細胞(ATCC CCL 1573)、COS(猴纖維母細胞，SV-40)細胞、具有pRK5載體之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，(iii)酵母，諸如酵母菌株AB110；或(iv)經桿狀病毒感染之昆蟲細胞(WO 2007/001851)。可藉由蛋白質純化技術中之各

種標準技術來純化天然或重組MUC16多肽。舉例而言，原MUC16多肽、成熟MUC16多肽或前MUC16多肽係藉由免疫親和力層析，使用對所關注之MUC16多肽具特異性之抗體來純化。一般而言，免疫親和力管柱係藉由將抗MUC16多肽抗體共價偶合至活性層析樹脂來建構。MUC16多肽可以與異源多肽之融合多肽形式重組式產生，該異源多肽可為信號序列或在成熟蛋白質或多肽之N端具有特異性裂解位點之其他多肽。或者，MUC16多肽可以與允許純化MUC16融合多肽之信號序列及異源多肽序列之融合蛋白形式產生；該等多肽之實例為聚組胺酸(His₆或His₈)、人類IgG Fc、FLAG抗原決定基(KDYKDDDDDK)及gD抗原決定基(KYALADASLKMADPNRFRGKDLPLV)。信號序列可為載體之組份，或其可為插入載體中之編碼抗MUC16抗體或MUC16多肽之DNA的一部分。信號序列可為選自(例如)鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定型腸毒素II前導子之群的原核信號序列。對於酵母分泌而言，信號序列可為(例如)酵母轉化酶前導子、 α 因子前導子(包括酵母(*Saccharomyces*)及刻魯維拉菌(*Kluyveromyces*) α 因子前導子(US 5010182))或酸性磷酸酯酶前導子、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖澱粉酶前導子(EP 0362179)或WO 90/13646中所述之信號。在哺乳動物細胞表現中，哺乳動物信號序列可用以引導蛋白質之分泌，諸如相同或相關物種之分泌多肽之信號序列以及病毒分泌前導子。

表現MUC16之細胞在細胞表面上或以經分泌形式表現內

源性或經轉染MUC16多肽抗原。表現MUC16之癌症包含細胞表面上存在MUC16多肽或產生且分泌MUC16抗原多肽之細胞。表現MUC16之癌症視情況於其細胞表面上產生足夠量之MUC16多肽，使得抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物可與其結合且可對癌症產生治療效應。過度表現MUC16多肽之癌症為與相同組織類型之非癌性細胞相比，在其細胞表面上具有顯著較高量MUC16多肽或產生或分泌顯著較高量MUC16多肽之細胞。該過度表現可由基因擴增或由轉錄或轉譯增加引起。可在臨床配置中藉由評估存在於細胞表面上或細胞所分泌之MUC16蛋白量之增加來測定MUC16多肽過度表現(例如經由免疫組織化學檢定，使用所製備之對抗經分離MUC16多肽之抗MUC16抗體，該分離MUC16多肽可使用重組DNA技術由編碼MUC16多肽之經分離核酸製備；經由FACS分析等)。其他或另外，吾人可(例如)經由螢光原位雜交(FISH)，使用對應於編碼MUC之核酸或其補體之基於核酸的探針(WO 98/45479)；南方墨點法；北方墨點法或聚合酶鏈反應(PCR)技術(諸如實時定量逆轉錄酶PCR(qRT-PCR))量測細胞中編碼MUC16多肽之核酸或mRNA量。吾人亦可藉由(例如)使用基於抗體之檢定量測諸如血清之生物流體中的脫落抗原來偵測MUC16多肽之過度表現(US 4933294；WO 91/05264；US 5401638；Sias等人(1990)J. Immunol. Methods 132:73-80)。可涵蓋各種其他活體內檢定。或者，可將患者體內細胞曝露於視情況經可偵測標記(例如放射性同位素)標記

之抗體且可(例如)藉由外部掃描放射性或藉由分析取自先前曝露於抗體之患者之活組織來評估患者體內抗體與細胞之結合。

親本及半胱胺酸工程化抗MUC16抗體能夠結合(較佳特異性)結合如本文中所述之MUC16多肽。可使用熟知技術,在無過度實驗下鑑別MUC16結合寡肽。在此點上,注意用於篩檢寡肽庫中能夠特異性結合多肽靶之寡肽的技術為於此項技術中所熟知的(US 5556762; US 5750373; US 4708871; US 4833092; US 5223409; US 5403484; US 5571689; US 5663143; WO 84/03506; WO 84/03564; Geysen等人(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002; Geysen等人(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:178-182; Geysen等人, Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen等人, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs等人, J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E.等人(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B.等人(1991)Biochemistry, 30:10832; Clackson, T.等人(1991)Nature, 352: 624; Marks, J. D.等人(1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S.等人(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363及Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668)。

本發明之親本及半胱胺酸工程化抗MUC16抗體包括多株、單株、人類化、人類、雙特異性及異結合抗體。涵蓋各種形式之人類化抗MUC16抗體。舉例而言,人類化抗體

可為抗體片段，諸如Fab。或者，人類化抗體可為完整抗體，諸如完整IgG1抗體。

雙特異性抗MUC16抗體為對至少兩種不同抗原決定基具有結合特異性之抗體。例示性雙特異性抗MUC16抗體可與如本文中所述之MUC16蛋白之兩個不同抗原決定基結合。其他該等抗體可將MUC16結合位點與另一蛋白質之結合位點組合。或者，可將抗MUC16臂與結合白血球上之觸發分子(諸如T細胞受體分子(例如CD3)或IgG之Fc受體(Fc γ R)，諸如Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)及Fc γ RIII(CD16))之臂組合，以使得細胞防禦機制聚焦或定位於表現MUC16之細胞。雙特異性抗體亦可用於使細胞毒性劑定位於表現MUC16之細胞。此等抗體具有MUC16結合臂及結合細胞毒性劑(例如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素- α 、長春花生物鹼、蓖麻素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。可製備全長抗體或抗體片段形式之雙特異性抗體(例如F(ab')₂雙特異性抗體)。全長雙特異性抗體之傳統產生係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中兩條鏈具有不同特異性(Millstein等人(1983)，Nature, 305:537-539)。

異結合抗MUC16抗體亦在本發明之範疇內。異結合抗體係由兩個共價接合之抗體組成。已(例如)提出該等抗體用於將免疫系統細胞靶向非所要細胞(US 4676980)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360；WO 92/200373；EP 03089)。預期可使用於合成蛋白質化學中已知之方法(包括涉及交

聯劑之方法)於活體外製備抗體。

本發明抗MUC16抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(例如四價抗體)，其可易於藉由重組表現編碼抗體多肽鏈之核酸而產生。多價抗體可包含二聚化域及三個或三個以上抗原結合位點。較佳之二聚化域包含Fc區或鉸鏈區(或由其組成)。在此情形下，抗體將包含Fc區及在Fc區胺基端之三個或三個以上抗原結合位點。本文中較佳之多價抗體包含三至約八個，但較佳四個抗原結合位點(或由其組成)。多價抗體包含至少一條多肽鏈(且較佳兩條多肽鏈)，其中多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，多肽鏈可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中VD1為第一可變域，VD2為第二可變域，Fc為Fc區之一條多肽鏈，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，多肽鏈可包含VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈；或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文之多價抗體較佳另外包含至少兩條(且較佳四條)輕鏈可變域多肽。本文之多價抗體可(例如)包含約兩條至約八條輕鏈可變域多肽。本文所涵蓋之輕鏈可變域多肽包含輕鏈可變域且視情形另外包含CL域。

抗MUC16抗體之效應功能可藉由於Fc區中引入一或多個胺基酸取代而經修飾。該修飾可增強抗MUC16抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。因此產生之均二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增強之補體介導細胞殺傷及抗體依賴性細胞毒性

(ADCC)。參見 Caron 等人(1992) *J. Exp Med.* 176:1191-1195 及 Shopes, B. J. (1992) *Immunol.* 148:2918-2922。具有增強之抗腫瘤活性之均二聚抗 MUC16 抗體亦可使用如 Wolff 等人(1993), *Cancer Research* 53:2560-2565 中所述之異二功能交聯子來製備。或者，可將抗體工程化使其具有雙重 Fc 區且可藉此具有增強之補體溶解及 ADCC 能力 (Stevenson 等人(1989) *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230)。

可藉由併入修補受體結合抗原決定基(例如抗體片段)來調節抗 MUC16 抗體之血清半衰期 (US 5739277)。本文所用之術語 "修補受體結合抗原決定基" 係指 IgG 分子 (例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄) 之 Fc 區之抗原決定基，其負責增加 IgG 分子之活體內血清半衰期。

藉由標準競爭性結合分析及抗原決定基定位 (WO 2007/001851) (包括藉由經工程化以表現 MUC16 之完整 PC3 細胞上之直接螢光使用 PANDEX™ 篩檢機量化螢光進行之交叉阻斷研究) 來測定單株抗體與 MUC16 抗原決定基 (包括 3A5) 之結合 (Fendly 等人(1990) *Cancer Research* 50:1550-1558)。藉由標準流式細胞分析來測定單株抗體 3A5 與 OVCAR-3、OVCA-432 及 SK-OV-3 細胞之結合以匹配如標準定量 PCR 分析所測定之此等三個特異性細胞株各者中表現之 MUC16 mRNA 表現量。更詳言之，如標準定量 PCR 分析所測定，OVCAR-3、OVCA-432 及 SK-OV-3 細胞分別表現高、中等及低之 MUC16 mRNA 量。流式細胞分析展示單株抗 MUC16 抗體 3A5 定量結合且匹配存在於彼等細胞株中

之 MUC16 mRNA 相對量。

圖 3 展示人類化曲妥珠單抗(trastuzumab)(抗 HER2)輕鏈(HuTMAB-LC，SEQ ID NO:5)、人類化 std(標準，親本)3A5 抗 MUC16 輕鏈(Hu3A5-LC，SEQ ID NO:2)及嵌合 std(標準，親本)3A5 抗 MUC16 輕鏈(Ch3A5-LC，SEQ ID NO:4)序列之對準(WO 2007/001851，以引用的方式併入)。編號係根據依序編號慣例。

圖 4 展示人類化曲妥珠單抗重鏈(HuTMAB-HC，SEQ ID NO:6)、人類化 std 3A5 抗 MUC16 重鏈(Hu3A5-HC，SEQ ID NO:7)及嵌合 std 3A5 抗 MUC16 重鏈(Ch3A5-HC，SEQ ID NO:8)序列之對準(WO 2007/001851，以引用的方式併入)。編號係根據依序編號慣例。標記標示之依序編號位置 281 實際上為 278(Kabat 275；Eu 279)。

使用 3A5 單株抗體進行免疫組織化學分析(WO 2007/001851；Sambrook 等人 **Molecular Cloning：A Laboratory Manual**, New York：Cold Spring Harbor Press, 1989；Ausubel 等人，**Current Protocols of Molecular Biology**，第 3.16 單元，John Wiley 及 Sons, 1997)。單株抗體 3A5 與 16/20 個人類子宮內膜樣腺癌腫瘤樣本，24/25 個人類漿液性囊腺癌腫瘤樣本及 5/10 個人類透明細胞瘤樣本牢固結合。

單株抗體 3A5 內化至細胞中，其與細胞表面上之 MUC16 多肽結合。詳言之，將 OVCAR-3 細胞與單株抗體 3A5 及螢光葡聚糖一起培育 18 小時，且接著以經螢光素標記之抗

3A5抗體定量偵測細胞相關3A5。此等分析表明抗體3A5與葡聚糖協同定位，指示3A5抗體轉運至經培育細胞之亞細胞組份(包括此等細胞之溶酶體隔室)中。3A5抗體優於11D10抗體，因為3A5抗體與MUC16結合之化學計量增加，而此為3A5識別MUC16之重複抗原決定基之結果，而11D10識別唯一抗原決定基(WO 2007/001851，以引用的方式併入)。

抗MUC16抗體之修飾

本文中所述之抗MUC16抗體之修飾及變化可(例如)使用此項技術中已知用於保守及非保守突變之技術及準則(例如US 5364934中之技術及準則)中之任一者來進行。變化可為一或多個編碼抗體或多肽之密碼子之取代、缺失或插入，其使得胺基酸序列與天然序列抗MUC16抗體相比改變。視情況，變化係藉由以抗MUC16抗體之一或多個結構域中任何其他胺基酸取代至少一個胺基酸而達成。可使用在此項技術中已知之方法，諸如寡核苷酸介導(定點)之突變誘發、丙胺酸掃描及PCR突變誘發來達成變化。可對經選殖DNA進行定點突變誘發(Carter等人(1986)Nucl. Acids Res., 13:4331；Zoller等人(1987)Nucl. Acids Res., 10:6487)、盒式突變誘發(Wells等人(1985)Gene, 34:315)、限制選擇突變誘發(Wells等人(1986)Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415)或其他已知技術來產生抗MUC16抗體變異體DNA。胺基酸變化可改變抗MUC16抗體之轉譯後加工，諸如改變糖基化位點之數目或位置或改變膜錨定特

徵。其他修飾包括麩醯胺基及天冬醯胺基殘基分別脫醯胺化為對應之麩胺醯基及天冬胺醯基殘基，脯胺酸及離胺酸羥化，絲胺醯基或羥丁胺醯基殘基之羥基磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 α -胺基甲基化(T.E. Creighton, **Proteins : Structure and Molecular Properties**, (1983) W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86頁)，N端胺乙醯化及任何C端羧基醯胺化。可藉由將適當核苷酸變化引入編碼DNA中及/或藉由化學合成來製備抗MUC16抗體。

抗MUC16抗體片段(例如)在與全長抗MUC16抗體比較時可在N端或C端被截短，或可缺乏內部殘基。某些片段缺乏對抗MUC16抗體之所需生物活性並非必需的胺基酸殘基。可藉由許多習知技術中之任何者來製備抗MUC16抗體片段。可化學合成所需肽片段。替代方法包括藉由酶促消化，例如藉由以已知使蛋白質在特定胺基酸殘基所界定之位點處裂解之酶處理蛋白質，或藉由以合適限制酶消化DNA來產生抗體片段及分離所需片段。另一合適技術包括藉由聚合酶鏈反應(PCR)分離及擴增編碼所需抗體或片段之DNA片段。在PCR中在5'及3'引子處採用界定DNA片段之所需末端之寡核苷酸。較佳地，抗MUC16抗體片段與本文中所揭示之天然抗MUC16抗體共有至少一種生物及/或免疫活性。

尤其較佳類型之取代變異體涉及取代人類化或人類抗體之一或多個高變區殘基。一般而言，選擇用於進一步研發

之所得變異體應具有相對於產生其之抗體改良之生物學特性。產生該等取代變異體之便利方式包括使用噬菌體呈現進行之親和力成熟。簡而言之，使若干高變區位點(例如6-7個位點)突變以在各位點處產生所有可能之胺基取代。因此產生之抗體變異體以單價方式自絲狀噬菌體顆粒呈現為與封裝於各顆粒中之M13之基因III產物的融合體。接著針對如本文所揭示之生物學活性(例如結合親和力)篩檢噬菌體呈現之變異體。為鑑別供修飾之候選高變區位點，可進行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別明顯有助於抗原結合之高變區殘基。其他或另外，分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與人類MUC16多肽之間的接觸點可為有益的。該等接觸殘基及鄰近殘基為用於根據本文中詳述之技術取代的候選物。在產生該等變異體後，如本文所述使變異體組經受篩檢，且可在一或多個相關檢定中選擇具有優越特性之抗體以供進一步研發。

包括於本發明範疇內之另一種類型之抗MUC16抗體共價修飾包含藉由消除天然序列抗MUC16抗體中所見之一或多個碳水化合物部分(藉由移除潛在糖基化位點或藉由以化學及/或酶促方式消除糖基化)及/或添加一或多個不存在於天然序列抗MUC16抗體中之糖基化位點來改變抗體或多肽之天然糖基化模式。此外，修飾包括天然蛋白質糖基化之質變，包括存在之各種碳水化合物部分性質及比例之變化。抗體及其他多肽之糖基化通常為N連接或O連接。N連接係指碳水化合物部分與天冬醯胺酸殘基之側鏈連接。三

肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為碳水化合物部分與天冬醯胺酸側鏈酶促連接之識別序列。因此，多肽中此等三肽序列任一者之存在產生潛在糖基化位點。O連接之糖基化係指糖N-乙醯基半乳胺糖、半乳糖或木糖中之一者與羥基胺基酸連接，該羥基胺基酸最通常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。藉由改變胺基酸序列使其含有上述三肽序列中之一或多者來便利地實現抗MUC16抗體中糖基化位點之添加(對於N連接糖基化位點而言)。亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至抗MUC16抗體之序列中或以一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代來達成變化(對於O連接糖基化位點而言)。可視情況經由DNA量之變化，尤其藉由使編碼抗MUC16抗體之DNA在預選擇之鹼基處突變以便產生將轉譯至所需胺基酸中之密碼子來改變抗MUC16抗體胺基酸序列。

增加抗MUC16抗體上碳水化合物部分數目之另一種方式係藉由使糖苷化學或酶促偶合至多肽。該等方法係描述於此項技術中，例如於1987年9月11日公開之WO 87/05330及Aplin及Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 第259-306頁(1981)中。

移除存在於抗MUC16抗體上之碳水化合物部分可以化學方式或酶促方式實現或藉由突變取代編碼用作糖基化靶之胺基酸殘基之密碼子來實現。化學去糖基化技術於此項技術中已知且(例如)由Hakimuddin等人, Arch. Biochem.

Biophys., 259:52 (1987) 及 Edge 等人, Anal. Biochem., 118:131 (1981) 描述。碳水化合物部分之酶促裂解可如 Thotakura 等人 (1987) Meth. Enzymol. 138:350 所述藉由使用各種內切糖苷酶及外切糖苷酶來達成。

另一種類型之抗 MUC16 抗體之共價修飾包含以 US 4640835、US 4496689、US 4301144、US 4670417、US 4791192 或 US 4179337 中所列之方式使抗體或多肽與各種非蛋白聚合物(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧伸烷基)中之一者連接。亦可將抗體或多肽囊包於(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微囊(分別例如羥甲基纖維素或明膠微囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊), 膠狀藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或巨乳液中。該等技術揭示於 **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 第 16 版, Oslo, A. 編 (1980) 中。

本發明之抗 MUC16 抗體亦可以形成包含與另一異源多肽或胺基酸序列融合之抗 MUC16 抗體之嵌合分子的方式修飾。在一實施例中, 該嵌合分子包含抗 MUC16 抗體與提供抗標籤抗體可選擇性結合之抗原決定基之標籤多肽的融合。一般將抗原決定基標籤置於抗 MUC16 抗體之胺基端或羧基端。可使用抗標籤多肽之抗體偵測該等抗原決定基標記形式之抗 MUC16 抗體的存在。再者, 抗原決定基標籤之提供使得抗 MUC16 抗體能夠易於藉由親和力純化使用抗標籤抗體或另一類型之與抗原決定基標籤結合的親和力基質純化。各種標籤多肽及其各別抗體為此項技術中所熟知。

實例包括聚組胺酸(聚 his)或聚組胺酸-甘胺酸(聚-his-gly)標籤；flu HA 標籤多肽及其抗體 12CA5(Field 等人(1988)Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165)；c-myc 標籤及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 及 9E10 抗體(Evan 等人(1985)Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616)；及疱疹單純型病毒糖蛋白 D(gD)標籤及其抗體(Paborsky 等人(1990) Protein Engineering, 3(6):547-553)。其他標籤多肽包括 Flag 肽(Hopp 等人(1988)BioTechnology 6:1204-1210)；KT3 抗原決定基肽(Martin 等人(1992) Science, 255:192-194)； α 微管蛋白抗原決定基肽(Skinner 等人(1991) J. Biol. Chem., 266:15163-15166)及 T7 基因 10 蛋白肽標籤(Lutz-Freyermuth 等人(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397)。

在一替代實施例中，嵌合分子可包含抗 MUC16 抗體與免疫球蛋白或免疫球蛋白之特定區域之融合。對於二價形式之嵌合分子(亦稱作"免疫黏附素")而言，該融合可為與 IgG 分子 Fc 區之融合。Ig 融合較佳包括以可溶性(跨膜域缺失或失活)形式之抗 MUC16 抗體取代 Ig 分子中之至少一個可變區。在一特別較佳實施例中，免疫球蛋白融合體包括 IgG₁ 分子之鉸鏈、CH₂ 及 CH₃，或鉸鏈、CH₁、CH₂ 及 CH₃ 區(US 5428130)。

抗 MUC16 抗體之製備

編碼本發明之半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體及親本抗 MUC16 抗體之胺基酸序列變異體的 DNA 係藉由各種方法製

備，該等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然產生之胺基酸序列變異體之情況下)，藉由先前製備之編碼多肽之DNA的定點(或寡核苷酸介導)突變誘發(Carter (1985) 等人 *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443；Ho等人(1989) *Gene* (Amst.) 77:51-59；Kunkel等人(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488；Liu等人(1998) *J. Biol. Chem.* 273:20252-20260)；PCR突變誘發(Higuchi, (1990) *PCR Protocols*，第177-183頁，Academic Press；Ito等人(1991) *Gene* 102:67-70；Bernhard等人(1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132；及Vallette等人(1989) *Nuc. Acids Res.* 17:723-733)及盒式突變誘發(Wells等人(1985) *Gene* 34:315-323)製備。突變誘發方案、套組及試劑可購得，例如QuikChange®多定點突變誘發套組(Stratagene, La Jolla, CA)。單一突變亦係藉由寡核苷酸引導之突變誘發使用雙股質體DNA作為模板，藉由基於PCR之突變誘發產生(Sambrook及Russel, (2001) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*，第3版；Zoller等人(1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500；Zoller, M.J.及Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500)。重組抗體之變異體亦可藉由限制片段操作或藉由以合成寡核苷酸重疊延長PCR來建構。突變引子編碼半胱胺酸密碼子置換。可採用標準突變誘發技術來產生編碼該等突變半胱胺酸工程化抗體之DNA(Sambrook等人 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, N.Y., 1989 ; 及 Ausubel 等人 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

可使用噬菌體呈現技術(McCafferty等人(1990), Nature 348, 552-553)以於活體外自未經免疫之供體的免疫球蛋白可變(V)域基因譜產生抗MUC16人類抗體及抗體片段。根據此技術,使抗體V域基因同框選殖至絲狀噬菌體(諸如M13或fd)之主要或次要鞘蛋白基因中,且以功能性抗體片段之形式呈現於噬菌體顆粒之表面上。由於該絲狀顆粒含有噬菌體基因組之單鏈DNA複本,因此基於抗體功能特性之選擇亦產生編碼展現彼等性質之抗體之基因的選擇。因此,噬菌體模擬B細胞之某些特性(Johnson等人(1993)Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson等人(1991) Nature, 352:624-628; Marks等人(1991)J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith等人(1993)EMBO J. 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275)。

抗MUC16抗體可使用已知寡肽合成方法化學合成或可使用重組技術製備及純化。可藉由直接肽合成法使用固相技術產生適當胺基酸序列或其部分(Stewart等人, **Solid-Phase Peptide Synthesis**, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc, 85:2149-2154)。可使用手動技術或藉由自動操作進行活體外蛋白質合成。可(例如)採用t-BOC或Fmoc保護之胺基酸

並使用製造者說明使用應用生物系統肽合成器 (Foster City, CA) 來實現自動固相合成。抗 MUC16 抗體或 MUC16 多肽之各個部分可獨立地化學合成且使用化學或酶促法組合以產生所需抗 MUC16 抗體或 MUC16 多肽。

已開發各種技術來產生抗體片段。在傳統上，此等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化產生 (Morimoto 等人 (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; 及 Brennan 等人 (1985) *Science*, 229:81) 或直接由重組宿主細胞產生。Fab、Fv 及 ScFv 抗 MUC16 抗體片段均可於大腸桿菌中表現且由大腸桿菌分泌，因此可容易地產生大量此等片段。可自上文所論述之抗體噬菌體庫中分離抗體片段。或者，Fab'-SH 片段可直接自大腸桿菌回收且化學偶合以形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter 等人 (1992) *Bio/Technology* 10:163-167) 或直接自重組宿主細胞培養物分離。抗 MUC16 抗體可為 (scFv) 單鏈 Fv 片段 (WO 93/16185; US 5571894; US 5587458)。抗 MUC16 抗體片段亦可為 "線性抗體" (US 5641870)。該等線性抗體片段可具單特異性或雙特異性。

以下描述主要係關於藉由培養經含有編碼抗 MUC16 抗體的核酸之載體轉化或轉染之細胞產生抗 MUC16 抗體。編碼抗 MUC16 抗體之 DNA 可獲自由咸信具有抗 MUC16 抗體 mRNA 且以可偵測量表現抗 MUC16 抗體 mRNA 之組織製備之 cDNA 庫。因此，人類抗 MUC16 抗體或 MUC16 多肽 DNA 可便利地獲自由人類組織製備之 cDNA 庫。編碼抗 MUC16 抗體之基因亦可自染色體組庫或藉由已知合成程序 (例如

自動核酸合成)獲得。

可以經設計以鑑別所關注基因或所關注基因編碼之蛋白質的探針(諸如具有至少約20-80個鹼基之寡核苷酸)篩檢庫。可使用諸如 Sambrook 等人, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述之標準程序以所選探針篩選 cDNA 或染色體組庫。分離編碼抗 MUC16 抗體或 MUC16 多肽之基因的替代方式為 PCR 方法(Sambrook 等人同上文; Dieffenbach 等人, **PCR Primer: A Laboratory Manual** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)。

將宿主細胞以本文中關於抗 MUC16 抗體或 MUC16 多肽產生所述之表現或選殖載體轉染或轉化且在視情況經改質之習知培養基中培養以誘導啟動子、選擇轉化子或擴增編碼所需序列之基因。可由熟習此項技術者在無不當實驗下選擇諸如培養基、溫度、pH 值及其類似物之培養條件。一般而言, 使細胞培養物之生產率最大的原理、方案及實踐技術可見於 **Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach**, M. Butler 編 (IRL Press, 1991) 及 Sambrook 等人同上文。

用以在本文之載體中選殖或表現 DNA 之合適宿主細胞包括原核生物、酵母或較高等真核生物細胞。合適原核生物包括(但不限於)真細菌, 諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體, 例如腸內菌科, 諸如大腸桿菌。各種大腸桿菌菌株可公開獲得, 諸如大腸桿菌 K12 菌株 MM294(ATCC 31,446); 大腸桿菌 X1776(ATCC 31,537); 大腸桿菌菌株

W3110(ATCC 27,325)及K5 772(ATCC 53,635)。其他合適原核宿主細胞包括腸內菌科，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)，例如大腸桿菌；腸桿菌屬(*Enterobacter*)；歐文菌屬(*Erwinia*)；克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)；變形桿菌屬(*Proteus*)；沙門氏菌屬(*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門菌(*Salmonella typhimurium*)；沙雷氏菌屬(*Serratia*)，例如黏質沙雷菌(*Serratia marcescans*)；及志賀氏菌屬(*Shigella*)；以及芽胞桿菌屬(*Bacilli*)，諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)(例如，1989年4月12日公開之DD 266,710中揭示之地衣芽孢桿菌41P)；假單胞桿菌屬(*Pseudomonas*)，諸如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)；及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。此等實例係出於說明而非限制之目的。菌株W3110為用於重組DNA產物醱酵之例示性宿主菌株。較佳地，宿主細胞分泌最少量之蛋白水解酶。舉例而言，菌株W3110可經修飾以實現編碼宿主內源性蛋白質之基因中的基因突變，該等宿主之實例包括大腸桿菌W3110菌株1A2，其具有完整基因型 *tonA*；大腸桿菌W3110菌株9E4，其具有完整基因型 *tonA ptr3*；大腸桿菌W3110菌株27C7(ATCC 55,244)，其具有完整基因型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*；大腸桿菌W3110菌株37D6，其具有完整基因型 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*；大腸桿菌W3110菌株40B4，其為具有非卡那黴素(kanamycin)抗性 *degP* 缺失突變之菌株37D6；及具有突變周質蛋白酶之大腸桿菌菌株

(US 4946783)。或者，例如PCR或其他核酸聚合酶反應的活體外選殖方法為合適的。

可於細菌中產生全長抗體、抗體片段及抗體融合蛋白，當不需要糖基化及Fc效應功能時，諸如當治療抗體結合至細胞毒性劑(例如毒素)且免疫結合物自身展示於腫瘤細胞破壞中之有效性時尤其如此。全長抗體在循環中具有較長半衰期。使用(例如)抗體片段及多肽於具有使表現及分泌最佳化之轉譯起始區(TIR)及信號序列之細菌中的表現，大腸桿菌中之產生可較快且更具成本經濟性(US 5,648,237；US 5789199；US 5840523)。表現後，自大腸桿菌細胞糊狀物可溶部分中分離抗體且其可視同型而定(例如)經由蛋白A或G管柱純化。可類似於純化(例如)表現於CHO細胞中之抗體之方法來進行最終純化。

除原核生物以外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為編碼抗MUC16抗體或MUC16多肽之載體的合適選殖或表現宿主。釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)為常用之較低等真核宿主微生物。其他包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach及Nurse, (1981) Nature, 290: 140；EP 139,383)；刻魯維拉菌(*Kluyveromyces*)宿主(US 4943529；Fleer等人(1991) Bio/Technology, 9:968-975)，諸如乳酸刻魯維拉酵母(*K. lactis*)(MW98-8C、CBS683、CBS4574；Louvencourt等人(1983) J. Bacteriol., 154(2):737-742))、脆壁刻魯維拉酵母(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維拉酵母(*K. bulgaricus*)(ATCC

16,045)、魏氏克魯維拉酵母(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、沃氏克魯維拉酵母(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維拉酵母(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906; Van den Berg等人(1990) *Bio/Technology*, 8:135); 耐熱克魯維拉酵母(*K. thermotolerans*)及馬克斯克魯維拉酵母(*K. marxianus*); 耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402226); 甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183070; Sreekrishna等人(1988) *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278); 假絲酵母(*Candida*); 裏氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244234); 粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)(Case等人(1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263); 許旺酵母(*Schwanniomyces*), 諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)(EP 394538); 及絲狀真菌, 諸如脈孢菌(*Neurospora*)、青黴菌(*Penicillium*)、彎頸黴菌(*Tolypocladium*)(WO 91/00357)及曲黴菌(*Aspergillus*)宿主, 諸如構巢麴黴(*A. nidulans*)(Ballance等人(1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289; Tilburn等人(1983) *Gene*, 26:205-221; Yelton等人(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1474)及黑麴黴(*A. niger*)(Kelly及Hynes, (1985) *EMBO J.*, 4:475-479)。甲醇酵母在本文中為合適的且包括(但不限於)能夠在甲醇上生長之酵母, 其係選自由漢森酵母屬(*Hansenula*)、假絲酵母屬、克勒克酵母屬(*Kloeckera*)、畢赤酵母屬(*Pichia*)、酵母屬(*Saccharomyces*)、球擬酵母屬(*Torulopsis*)及紅酵母屬(*Rhodotorula*)組成之屬。

表現糖基化抗MUC16抗體或MUC16多肽之合適宿主細

胞亦可源自多細胞有機體。無脊椎動物細胞之實例包括昆蟲細胞，諸如果蠅S2(*Drosophila* S2)及夜蛾Sf9(*Spodoptera* Sf9)以及植物細胞，諸如棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛花、番茄及煙草之細胞培養物。已鑑別出多種桿狀病毒之病毒株及變異體與來自諸如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的相應許可昆蟲宿主細胞。用於轉染之多種病毒株可公開獲得，例如苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且根據本發明該等病毒可在本文中用作病毒，尤其用於轉染草地夜蛾細胞。

適用之哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉化之猴腎臟CV1細胞株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎臟細胞株(經次選殖以在懸浮培養物中生長之293或293細胞，Graham等人(1977)*J. Gen Virol.* 36:59)；幼倉鼠腎臟細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人(1980)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216)；小鼠賽托利細胞(mouse sertoli cell)(TM4, Mather (1980) *Biol. Reprod.* 23:243-251)；猴腎臟細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎臟細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎臟細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝臟細胞(buffalo rat liver cell)(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；

人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75); 人類肝臟細胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞(Mather等人(1982)Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68); MRC 5細胞; FS4細胞; 及人類肝癌細胞株(Hep G2)。

將宿主細胞用上述用於產生抗MUC16抗體之表現或選殖載體轉化, 且於視情況經改質之習知營養培養基中培養以誘發啟動子、選擇轉化子或擴增編碼所需序列之基因。可將編碼抗MUC16抗體或MUC16多肽之核酸(例如cDNA或染色體組DNA)插入用於選殖(擴增DNA)或用於表現之可複製載體中。載體可(例如)為質體、黏質體、病毒顆粒或噬菌體之形式。可藉由各種程序將適當核酸序列插入載體中。

可以此項技術中已知之各種方式來測定活體外或活體內腫瘤細胞生長抑制, 諸如在一實施例中, 在約0.5至30 $\mu\text{g/ml}$ 之抗體濃度下, 與未經處理之腫瘤細胞相比, 使活體外或活體內表現MUC16之腫瘤細胞之細胞增殖抑制約25-100%, 或約30-100%, 或約50-100%或70-100%。可藉由於此項技術中已知之方法, 例如使用內源性表現或在以MUC16基因轉染後表現MUC16多肽之細胞來評定抗MUC16抗體之活體外生長抑制效應。舉例而言, 可將適當腫瘤細胞株及經MUC16轉染之細胞以各種濃度之抗MUC16單株抗體處理若干天(例如2-7天)且以結晶紫或MTT染色或藉由某些其他比色檢定分析。信號降低表示生長抑制。量測增殖之另一種方法為藉由比較在存在或不存在抗

MUC16抗體下經處理細胞所吸收之³H-胸苷。處理後，收集細胞，且以閃爍計數器量化併入DNA中之放射能之量。增殖之抑制係由放射能之降低來顯示。為選擇誘發細胞死亡之抗MUC16抗體，可相對於對照物評定如由(例如)碘化丙啶(PI)、錐蟲藍或7AAD吸收表示之膜完整性損失。適當陽性對照包括以已知抑制彼細胞株生長之生長抑制性抗體處理所選細胞株。可在細胞培養物中約0.5至30 µg/ml或約0.5 nM至200 nM之抗體濃度下量測生長抑制，其中生長抑制係在將腫瘤細胞曝露於抗體後1-10天測定。若以每公斤體重約1微克至約100毫克投與抗MUC16抗體致使在距第一次投與抗體約5天至3個月內，較佳在約5至30天內，腫瘤尺寸減小，或腫瘤細胞增殖降低，則抗體在活體內具生長抑制性。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體之製備

本發明之設計、選擇及製備法能夠產生與親電子官能基具有反應性之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體。此等方法另外能夠產生在所指定、設計、選擇性位點處具有藥物分子之抗體結合化合物(諸如抗體-藥物結合物(ADC))。抗體表面上之反應性半胱胺酸殘基允許經由諸如順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯基之硫醇反應性基團特異性結合藥物部分。Cys殘基之硫醇官能基與順丁烯二醯亞胺基之親核反應性比蛋白質中任何其他胺基酸官能基(諸如離胺酸殘基之胺基或N端胺基)高約1000倍。碘乙醯基及順丁烯二醯亞胺試劑中之硫醇特異性官能基可與胺基反應，但需要較高pH值(>

9.0) 及較長反應時間 (Garman, 1997, Non-Radioactive labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。
可藉由標準Ellman氏檢定來評估蛋白質中游離硫醇之量。
免疫球蛋白M為雙硫鍵連接之五聚體之實例；而免疫球蛋白G為具有將次單元鍵結在一起之內部雙硫橋之蛋白質的實例。在諸如此類之蛋白質中，需要以諸如二硫蘇糖醇 (DTT) 或硒醇之試劑還原雙硫鍵 (Singh 等人 (2002) Anal. Biochem. 304:147-156) 以產生反應性游離硫醇。此方法可導致抗體三級結構及抗原結合特異性之損耗。

PHESELECTOR(用於選擇反應性硫醇之噬菌體ELISA)檢定允許偵測ELISA噬菌體形式之抗體-Fab中之反應性半胱胺酸基，藉此有助於設計半胱胺酸工程化抗體 (US 2007/0092940)。將與半胱胺酸工程化抗體結合之抗原塗覆於孔表面上，隨後與呈現半胱胺酸工程化Fab之噬菌體顆粒一起培育，添加經HRP標記之二次抗體，且偵測吸收率。可以快速、穩固且高產量之方式篩檢呈現於噬菌體上之突變蛋白質。可產生半胱胺酸工程化抗體之庫且使用相同方法進行結合選擇以自抗體或其他蛋白質之隨機蛋白質-噬菌體庫鑑別游離Cys併入之適當反應性位點。此技術包括使呈現於噬菌體上之半胱胺酸突變蛋白質與亦具硫醇反應性之親和力試劑或報導體基團反應。

PHESELECTOR檢定允許篩檢抗體中之反應性硫醇基。藉由此方法來鑑別A121C變異體為例示性的。可有效地搜尋完整Fab分子來鑑別更多具有反應性硫醇基之ThioFab變

異體。採用參數表面可接近性分數來確定且量化溶劑對多肽中胺基酸殘基之可接近性。可將表面可接近性表述為可由溶劑分子(例如水)接觸之表面積(\AA^2)。水所佔據的空間大約為1.4 \AA 半徑之球體。軟體可自由使用或可獲許使用 (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, 傳真: (+44) 1925 603825 或經由網際網路: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) , 如採用以已知x線結晶學導出之座標計算蛋白質各胺基酸之表面可接近性的演算法之結晶學程式CCP4套組 ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763)。進行表面可接近性計算之兩種例示性軟體模組為基於B. Lee及F.M. Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400 之演算法之 "AREAIMOL" 及 "SURFACE"。AREAIMOL將蛋白質之溶劑可接近表面定義為探針球體(表示溶劑分子)在環繞蛋白質範德瓦爾表面 (Van der Waals surface)轉動時之中心軌跡。AREAIMOL藉由於各原子周圍(距原子中心之距離等於原子半徑與探針半徑之總和)之延伸球體上產生表面點且消除位於與相鄰原子相締合之等效球體內的表面點來計算溶劑可接近表面積。AREAIMOL得到PDB座標檔案形式之原子溶劑可接近面積且匯總殘基, 鏈及對整個分子之可接近面積。可將個別原子之可接近面積(或面積差)寫成準PDB輸出檔案。AREAIMOL對於各要素採用單一半徑, 且僅識別有限數目之不同要素。

AREAIMOL及SURFACE報導絕對可接近性，亦即平方埃(Å)數。表面可接近性分數係藉由參考與多肽內胺基酸相關之標準狀態來計算。參考狀態為三肽Gly-X-Gly，其中X為所關注之胺基酸，且參考狀態應為"擴展"構型，亦即類似於 β 鏈構型。擴展構型使X之可接近性最大化。將所計算之可接近面積除以Gly-X-Gly三肽參考狀態中之可接近面積，且報導商，其為可接近性分數。可接近性百分比為可接近性分數乘以100。計算表面可接近性之另一種例示性演算法係基於程式xsae之SOLV模組(Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)，其基於多肽之X線座標來計算胺基酸殘基對水球體之可接近性分數。可使用可用晶體結構資訊來計算抗體中各胺基酸之表面可接近性分數(Eigenbrot等人(1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

編碼半胱胺酸工程化抗體之DNA易於使用習知程序(例如藉由使用能夠與編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合之寡核苷酸探針)分離且定序。融合瘤細胞用作該DNA之來源。分離後，可將DNA置放於表現載體中，接著將表現載體轉染至不會以其他方式產生抗體蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或其他哺乳動物宿主細胞(諸如骨髓瘤細胞)(US 5807715；US 2005/0048572；US 2004/0229310))中以獲得單株抗體於重組宿主細胞中之合成。

鑑別不干擾抗體效應功能之位點且將其以半胱胺酸殘基替代以進行位點特異性標記。出於此目的，理想地定位抗

體 Fab 之恆定區 (CL 及 CH₁)，因為此結構域在抗原結合或 Fc 效應功能中不具有顯著作用 (Jefferis, R. "Structure-function relationships of the IgG subclasses," The Human IgG Subclasses (Pergamon Press, Oxford; 1990))。用以篩檢 Fab 表面上之反應性半胱胺酸之基於 PHESELECTOR 噬菌體呈現的方法鑑別適於抗體 Fab 之位點特異性標記之變異體 LC-V110C (Kabat 編號) 及 HC-A114C (Kabat 編號，等於抗 MUC16 抗體按照 Eu 編號之 A118C 及按照依序編號之 A117C) 以及其他 (Junutula, J.R. 等人 Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *J Immunol Methods* **332**, 41-52 (2008))。

設計且選擇後，具有工程化高反應性未配對 Cys 殘基之半胱胺酸工程化抗體 (例如 ThioFab) 可藉由以下步驟產生：(i) 於細菌 (例如大腸桿菌) 系統中表現 (Skerra 等人 (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262; Plückthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151-188) 或於哺乳動物細胞培養物系統 (WO 01/00245)，例如中國倉鼠卵巢細胞 (CHO) 中表現；及 (ii) 使用常用蛋白質純化技術純化 (Lowman 等人 (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17):10982-10988)。

工程化 Cys 硫醇基與親電子連接試劑及藥物-連接子中間物反應以形成半胱胺酸工程化抗體藥物結合物及其他經標記之半胱胺酸工程化抗體。經配對且形成鏈間及鏈內雙硫鍵之半胱胺酸工程化抗體之 Cys 殘基及存在於親本抗體中之 Cys 殘基不具有任何反應性硫醇基 (除非以還原劑處理)。

且不與親電子連接試劑或藥物-連接子中間物反應。新工程化之Cys殘基可保持未配對且能夠與親電子連接試劑或藥物-連接子中間物(諸如藥物-順丁烯二醯亞胺)反應(亦即與其結合)。例示性藥物-連接子中間物包括：MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-MMAE及MC-vc-PAB-MMAF。根據依序編號系統對重鏈及輕鏈之工程化Cys殘基之結構位置編號。此依序編碼系統與以N端起始之Kabat編號系統(Kabat等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)相關，其與Kabat編號機制之區別在於由a、b、c標註之插入(底端列)。使用Kabat編號系統，實際線性胺基酸序列可對應於可變域FR或CDR之縮短或插入可變域之FR或CDR中含有較少或額外胺基酸。藉由依序編號及Kabat編號機制鑑別半胱胺酸工程化重鏈變異位點。

在一實施例中，半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係藉由包含以下步驟之方法製備：

(a) 以半胱胺酸置換親本抗MUC16抗體之一或多個胺基酸殘基；及

(b) 藉由使半胱胺酸工程化抗體與硫醇反應性試劑反應測定半胱胺酸工程化抗MUC16抗體之硫醇反應性。

半胱胺酸工程化抗體對硫醇反應性試劑之反應性可高於親本抗體對硫醇反應性試劑之反應性。

可使游離半胱胺酸胺基酸殘基定位於重鏈或輕鏈中或定

位於恆定域或可變域中。亦可以一或多個半胱胺酸胺基酸置換抗體片段之胺基酸來使抗體片段(例如Fab)工程化以形成半胱胺酸工程化抗體片段。

本發明之另一實施例提供製備(製造)半胱胺酸工程化抗MUC16抗體之方法，其包含：

(a) 將一或多個半胱胺酸胺基酸引入親本抗MUC16抗體中以產生半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，及

(b) 測定半胱胺酸工程化抗體與硫醇反應性試劑之硫醇反應性；

其中半胱胺酸工程化抗體對硫醇反應性試劑之反應性高於親本抗體對硫醇反應性試劑之反應性。

製備半胱胺酸工程化抗體之方法之步驟(a)可包含：

- (i) 誘發編碼半胱胺酸工程化抗體之核酸序列突變；
- (ii) 表現半胱胺酸工程化抗體；及
- (iii) 分離且純化半胱胺酸工程化抗體。

製備半胱胺酸工程化抗體之方法之步驟(b)可包含於選自噬菌體或噬菌粒顆粒之病毒顆粒上表現半胱胺酸工程化抗體。

製備半胱胺酸工程化抗體之方法中之步驟(b)亦可包含：

(i) 使半胱胺酸工程化抗體與硫醇反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記之半胱胺酸工程化抗體；及

(ii) 量測經親和力標記之半胱胺酸工程化抗體與俘獲培養基之結合。

本發明之另一實施例為篩檢具有高反應性未配對半胱胺酸胺基酸之半胱胺酸工程化抗體之硫醇反應性的方法：

(a) 將一或多個半胱胺酸胺基酸引入親本抗體中以產生半胱胺酸工程化抗體；

(b) 使半胱胺酸工程化抗體與硫醇反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記之半胱胺酸工程化抗體；及

(c) 量測經親和力標記之半胱胺酸工程化抗體與俘獲培養基之結合；及

(d) 測定半胱胺酸工程化抗體與硫醇反應性試劑之硫醇反應性。

篩檢半胱胺酸工程化抗體之方法之步驟(a)可包含：

(i) 誘發編碼半胱胺酸工程化抗體之核酸序列突變；

(ii) 表現半胱胺酸工程化抗體；及

(iii) 分離且純化半胱胺酸工程化抗體。

篩檢半胱胺酸工程化抗體之方法之步驟(b)可包含於選自噬菌體或噬菌粒顆粒之病毒顆粒上表現半胱胺酸工程化抗體。

篩檢半胱胺酸工程化抗體之方法之步驟(b)亦可包含：

(i) 使半胱胺酸工程化抗體與硫醇反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記之半胱胺酸工程化抗體；及

(ii) 量測經親和力標記之半胱胺酸工程化抗體與俘獲培養基之結合。

3A5 IgG變異體之半胱胺酸工程化

藉由本文中所述之半胱胺酸工程化方法於重鏈117(依序

編號)位點處將半胱胺酸引入全長、人類化及嵌合親本單株抗MUC16 3A5抗體中得到具有重鏈序列：SEQ ID NO:1及輕鏈序列：SEQ ID NO:2之A117C thio hu抗MUC16 3A5人類化變異體(圖1)及具有重鏈序列：SEQ ID NO:3及輕鏈序列：SEQ ID NO:4之A117C thio ch抗MUC16 3A5嵌合變異體(圖2)。藉由於含有1 mM半胱胺酸之培養基中瞬時醱酵來使此等半胱胺酸工程化單株抗體於CHO(中國倉鼠卵巢)細胞中表現。

藉由流式細胞分析比較OVCAR-3細胞(表現內源性MUC16)上人類化thio抗MUC16半胱胺酸工程化抗體與標準3A5 IgG之親和力，連續稀釋抗體直至觀測到位移減少；選擇結合條件使得抗體在整個滴定期間超過細胞結合位點。使用螢光抗人類Fc二次抗體偵測結合抗體。流式細胞分析直方圖展示在飽和濃度(400 ng/mL)及亞飽和(25 ng/mL)濃度下之結合。在所分析之所有抗體濃度下，兩個抗MUC16變異體(標準抗MUC16變異體及thio抗MUC16變異體)提供等效結合，其暗示對抗原之等效親和力。在所測試之各濃度下，thio抗MUC16抗體與標準(親本)抗MUC16抗體同等有效地結合OVCAR-3細胞。使用MUC16胞外域(ECD)之部分進行之表面電漿共振分析亦證實thio 3A5抗MUC16抗體對此抗原之高親和力($K_D=116$ pM)。比較基於RT-PCR研究具有高或低/不存在MUC16表現之細胞，thio抗MUC16抗體與表現MUC16之細胞結合，但不與MUC16陰性細胞株結合。因此，HC-A118處之取代不影響

抗原結合。

根據一實施例，人類化3A5半胱胺酸工程化抗MUC16抗體包含一或多個以下具有游離半胱胺酸胺基酸之可變區重鏈序列(SEQ ID NO：9-17，表1)。

表1 hu 3A5半胱胺酸工程化抗MUC16抗體變異體之重鏈依序、Kabat及Eu編號的比較

序列	依序編號	Kabat編號	Eu編號	SEQ ID NO:
EVQL <u>C</u> ESGGG	V5C	V5C		9
LRLSCC <u>A</u> SGYS	A23C	A23C		10
MNSLR <u>C</u> EDTAV	A88C	A84C		11
TLVTVC <u>S</u> ASTK	S115C	S112C		12
VTVSSC <u>S</u> TKGP	A117C	A114C	A118C	13
VSSAS <u>C</u> KGPSV	T119C	T116C	T120C	14
KFNWYC <u>D</u> GVEV	V278C	V275C	V279C	15
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S374C	S371C	S375C	16
PPVLDC <u>D</u> GSFF	S399C	S396C	S400C	17

根據一實施例，嵌合3A5半胱胺酸工程化抗MUC16抗體包含一或多個以下具有游離半胱胺酸胺基酸之可變區重鏈序列(SEQ ID NO：18-26，表2)。

表2 預測 ch 3A5 半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體變異體之重鏈依序、Kabat 及 Eu 編號的比較

序列	依序編號	Kabat編號	Eu編號	SEQ ID NO:
DVQL <u>C</u> ESGPG	Q5C	Q5C		18
LSLTCC <u>V</u> TGYS	T23C	T23C		19
LNSVT <u>C</u> EDTAT	T88C	T84C		20
TLVTVC <u>A</u> ASTK	S115C	S112C		21
VTVSAC <u>S</u> TKGP	A117C	A114C	A118C	22
VSAAS <u>C</u> KGPSV	T119C	T116C	T120C	23
KFNWY <u>C</u> DGVEV	V278C	V275C	V279C	24
KGFYPC <u>D</u> IAVE	S374C	S371C	S375C	25
PPVLDC <u>G</u> DSFF	S399C	S396C	S400C	26

根據一實施例，人類化 3A5 半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體包含一或多個以下具有游離半胱胺酸胺基酸之可變區輕鏈序列 (SEQ ID NO: 27-33，表3)。

表3 hu 3A5 半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體變異體之輕鏈依序及 Kabat 編號的比較

序列	依序編號	Kabat編號	SEQ ID NO:
SLSAS <u>C</u> GDRVT	V15C	V15C	27
EIKRT <u>C</u> AAPSV	V110C	V110C	28
TVAAPC <u>V</u> FIFP	S114C	S114C	29
FIFPPC <u>D</u> EQLK	S121C	S121C	30
DEQLK <u>C</u> GTASV	S127C	S127C	31
VTEQD <u>C</u> KDSTY	S168C	S168C	32
GLSSP <u>C</u> TKSFN	V205C	V205C	33

根據一實施例，嵌合3A5半胱胺酸工程化抗MUC16抗體包含一或多個以下具有游離半胱胺酸胺基酸之可變區輕鏈序列(SEQ ID NO: 34-40，表4)。

表4 ch 3A5半胱胺酸工程化抗MUC16抗體變異體之重鏈依序及Kabat編號的比較

序列	依序編號	Kabat編號	SEQ ID NO:
FLSVSCGGRVT	L15C	L15C	34
EIKRTCAAPSV	V110C	V110C	35
TVAAPCVFIFP	S114C	S114C	36
FIFPPCDEQLK	S121C	S121C	37
DEQLKCGTASV	S127C	S127C	38
VTEQDCKDSTY	S168C	S168C	39
GLSSPCTKSFN	V205C	V205C	40

經標記之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體可位點特異性且有效地與硫醇反應性試劑偶合。硫醇反應性試劑可為多官能連接試劑；俘獲(亦即親和力)標記試劑(例如生物素-連接試劑)；偵測標記(例如螢光團試劑)；固相固定試劑(例如SEPHAROSETM、聚苯乙烯或玻璃)或藥物-連接子中間物。硫醇反應性試劑之一實例為N-乙基順丁烯二醯亞胺(NEM)。在一例示性實施例中，ThioFab與生物素-連接試劑之反應提供可藉以偵測且量測工程化半胱胺酸殘基之存在及反應性的經生物素標記之ThioFab。ThioFab與多官能連接試劑之反應提供具有可與藥物部分試劑或其他標記進

一步反應之官能化連接子之ThioFab。ThioFab與藥物-連接子中間物之反應提供ThioFab藥物結合物。

一般可將本文中所述之例示性方法經由應用本文所述之設計及篩檢步驟而應用於鑑別及產生抗體且更一般而言應用於其他蛋白質。

可將該方法應用於其他硫醇反應性試劑之結合，其中反應性基團為(例如)順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶基二硫化物或其他硫醇反應性結合搭配物(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, 第40-55頁, 643-671)。硫醇反應性試劑可為藥物部分; 螢光團, 諸如螢光染料, 如螢光素或羅丹明(rhodamine); 成像或放射性治療金屬、肽基或非肽基標記或偵測標籤之螯合劑; 或清除改良劑, 諸如各種聚乙二醇異構體、與第三組份或另一種碳水化合物或親脂劑結合之肽。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體之用途

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體及其結合物可用作治療劑及/或診斷劑。本發明進一步提供預防、處理、治療或改善與MUC16相關病症相關之一或多種症狀之方法。詳言

之，本發明提供預防、處理、治療或改善與細胞增殖性病
症相關之一或多種症狀之方法，該細胞增殖性病諸如癌
症，例如卵巢癌、子宮頸癌、子宮癌、胰臟癌(包括胰腺
腺癌)、肺癌及乳癌。本發明另外提供診斷MUC16相關病
症或易產生該病症之體質之方法，以及鑑別優先結合細胞
相關MUC16多肽之抗體及抗體之抗原結合片段的方法。

本發明之另一實施例係關於半胱胺酸工程化抗MUC16抗
體於製備適用於治療反應MUC16相關病症之病況之藥劑的
用途。

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合物

半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藉由引導藥物部分在指定
位點且以接近均一之化學計量(藥物/抗體比率，p值)附著
來解決抗體-藥物結合物異質性之問題。此外，結合條件
使得所有原生免疫球蛋白雙硫鍵得以保留。

本發明之一態樣為包含半胱胺酸工程化抗MUC16抗體
(Ab)及阿瑞他汀藥物部分(D)之抗體-藥物結合化合物，其
中半胱胺酸工程化抗體係經由一或多個游離半胱胺酸胺基
酸，由連接子部分(L)附著至D；化合物具有式I：



其中p為1、2、3或4；且其中半胱胺酸工程化抗體係藉
由包含以一或多個游離半胱胺酸胺基酸置換親本抗MUC16
抗體之一或多個胺基酸殘基之方法來製備。

圖5展示半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物

(ADC)之實施例，其中阿瑞他汀藥物部分係附著至輕鏈(LC-ADC)；重鏈(HC-ADC)及Fc區(Fc-ADC)中之工程化半胱胺酸基團。

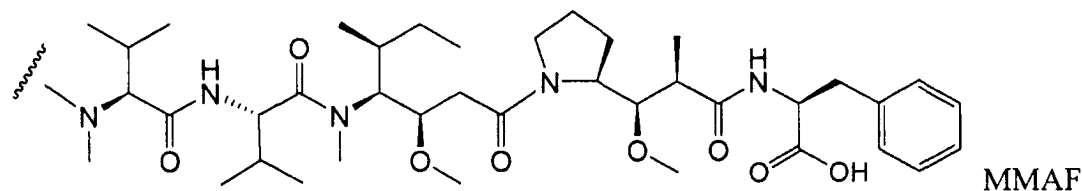
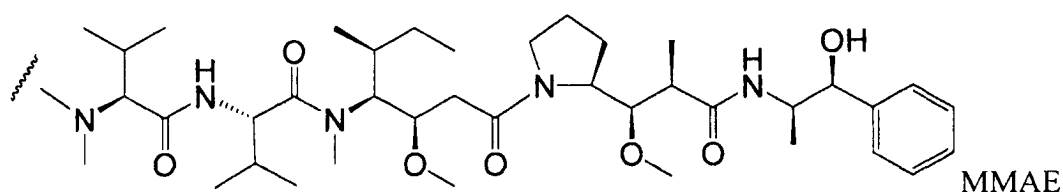
習知抗體藥物結合策略產生對靶細胞具活性，但亦可產生系統毒性之異質結合物。半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物之潛在優點包括：改良之安全性(較大治療指數)；改良之PK參數；保留抗體鏈間二硫鍵，其可使結合物穩定且保持其活性結合構型；限定藥物結合之位點；及由半胱胺酸工程化抗體與藥物-連接試劑結合製備半胱胺酸工程化抗體藥物結合物產生更均質之產物。實際上，thio抗MUC16 ADC於臨床前動物模型中展現比標準抗MUC16 ADC大之治療窗(約四倍)。當比較經匹配之IgG抗體(mg/kg)劑量水平時，吾人之資料展示thio MUC16 ADC與標準MUC16 ADC在小鼠異種移植物中之均等功效，而在大鼠中，68.6 mg/kg(2820 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)劑量之thio ADC產生與16.6 mg/kg(1500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)劑量之標準ADC類似之毒性。當就細胞毒性藥物劑量($\mu\text{g}/\text{m}^2$)比較時，thio ADC比標準ADC安全且有效。thio ADC優於標準ADC之所得優點會減少在ADC有效(mg/kg)劑量下之MMAE曝露。又，改良之thio ADC耐受性可容許以mg/kg抗體計之較高劑量水平，且其對於對患有更具挑戰性之惡性疾病(例如對MMAE之敏感性相對較低或MUC16表現量相對較低)之患者產生治療益處而言為關鍵的。

藥物部分

式I之抗體-藥物結合物(ADC)之阿瑞他汀藥物部分包括海兔毒素、阿瑞他汀(US 5635483、US 5780588、US 5767237、US 6124431)及其類似物及衍生物。已展示海兔毒素及阿瑞他汀干擾微管動力學、GTP水解，及核及細胞分裂(Woyke等人(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。可將各種形式之海兔毒素或阿瑞他汀藥物部分經由肽藥物部分之N(胺基)端或C(羧基)端共價附著至抗體(WO 02/088172；Doronina等人(2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784；Francisco等人(2003) *Blood* 102(4):1458-1465)。

例示性阿瑞他汀實施例包括N端連接之單甲基阿瑞他汀藥物部分DE及DF，其係揭示於：WO 2005/081711；Senter等人，*Proceedings of the American Association for Cancer Research*，第45卷，文摘號623，於2004年3月28日公開，各參考文獻之揭示內容係明確地以全文引用的方式併入。例示性阿瑞他汀藥物部分包括MMAE及MMAF。

式I之抗體藥物結合物(ADC)之阿瑞他汀藥物部分(D)包括單甲基阿瑞他汀藥物部分MMAE及MMAF。將MMAE或MMAF藥物部分之N端係經由連接子共價附著至抗體之工程化半胱胺酸上。



其他例示性阿瑞他汀藥物部分包括於五肽阿瑞他汀藥物部分C端處具有苯丙胺酸羧基修飾之單甲基纈胺酸化合物(WO 2007/008848)及於五肽阿瑞他汀藥物部分之C端具有苯丙胺酸側鏈修飾之單甲基纈胺酸化合物(WO 2007/008603)。

通常，基於肽之藥物部分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而製備。該等肽鍵例如可根據肽化學領域中熟知之液相合成法(參見E. Schröder及K. Lübke, "The Peptides", 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)製備。

連接子

"連接子"、"連接子單元"或"連接"意謂包含將抗體共價附著至藥物部分之共價鍵或原子鏈之化學部分。在各個實施例中，將連接子表示為L。"連接子"(L)為可用以連接一或多個藥物部分(D)及抗體單元(Ab)以形成式I之抗體-藥物結合物(ADC)之雙官能或多官能部分。可使用具有與藥物及與抗體結合之反應官能性之連接子來便利地製備抗體-藥物結合物(ADC)。半胱胺酸工程化抗體(Ab)之半胱胺酸

硫醇可與連接試劑、藥物部分或藥物-連接子中間物之親電子官能基形成鍵。

在一態樣中，連接子具有反應性位點，該反應性位點具有可與存在於抗體上之親核半胱胺酸反應之親電子基團。抗體之半胱胺酸硫醇可與連接子上之親電子基團反應且與連接子形成共價鍵。適用之親電子基團包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺及鹵乙醯胺基團。

連接子包括二價基團，諸如烷二基、伸芳基、伸雜芳基、諸如 $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ 、烷氧基重複單元(例如聚伸乙基氧基、PEG、聚亞甲基氧基)及烷胺基重複單元(例如聚伸乙基胺基、JeffamineTM)之部分；及二元酸酯及醯胺，包括琥珀酸酯、琥珀醯胺、二羥基乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

根據 Klussman 等人 (2004) , Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773 第 766 頁之結合法，且根據實例 3 之方案，半胱胺酸工程化抗體與具有諸如順丁烯二醯亞胺或 α 鹵基羰基之親電子官能基之連接試劑或藥物-連接子中間物反應。

連接子可由一或多種連接子組份組成。例示性連接子組份包括 6-順丁烯二醯亞胺己醯基("MC")、順丁烯二醯亞胺丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit"或"vc")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe"或"af")、對胺基苄氧基羰基("PAB")、N-琥珀醯亞胺基 4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯("SPP")、N-琥珀醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1 甲酸酯

("SMCC")、N-琥珀醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯("SIAB")、呈一或多個重複單元形式之伸乙基氧基-CH₂CH₂O-("EO"或"PEO")。額外之連接子組份已為此項技術中所知且有一些描述於本文中。

在一實施例中，ADC之連接子L具有下式：



其中：

-A-為共價附著至抗體(Ab)之半胱胺酸硫醇之延伸單元；

a為0或1；

各-W-獨立為胺基酸單元；

w獨立為0至12範圍內之整數；

-Y-為共價附著至藥物部分之間隔單元；且

y為0、1或2。

延伸單元

延伸單元(-A-)(若存在)能夠將抗體單元連接至胺基酸單元(-W-)。就此而言，抗體(Ab)具有可與延伸單元之親電子官能基形成鍵之游離半胱胺酸硫醇基。式I結合物中之例示性延伸單元係以式II及III描述，其中Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上所定義，且R¹⁷為選自下列基團之二價基團：(CH₂)_r、C₃-C₈碳環基、O-(CH₂)_r、伸芳基、(CH₂)_r-伸芳基、-伸芳基-(CH₂)_r-、(CH₂)_r-(C₃-C₈碳環基)、(C₃-C₈碳環基)-(CH₂)_r、C₃-C₈雜環基、(CH₂)_r-(C₃-C₈雜環基)、-(C₃-C₈

雜環基)-(CH₂)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)-CH₂-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-、-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂CH₂O)_r-CH₂-及-(CH₂CH₂O)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-；其中R^b為H、C₁-C₆烷基、苯基或苄基；且r獨立為1-10範圍內之整數。

伸芳基包括藉由自芳環系統移除兩個氫原子產生之具有6-20個碳原子之二價芳族烴基。典型伸芳基包括(但不限於)自苯、經取代苯、萘、蒽、聯苯及其類似物衍生之基團。

雜環基包括一或多個環原子為雜原子(例如氮、氧及硫)之環系統。雜環基包含1至20個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜環可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之單環，或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環係描述於Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1、3、4、6、7及9章；"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950至今)，尤其第13、14、16、19及28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中。

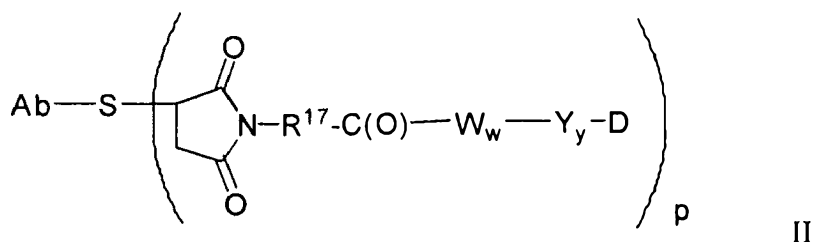
雜環之實例包括(舉例而言但不限於)吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氫噻吩基、經硫氧

化之四氫噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫茛基、吲哚基、吲哚烯基、喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙-四氫呋喃基、四氫哌喃基、雙四氫哌喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹啉基、吡辛因基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻噁基、哌喃基、異苯并呋喃基、吡烯基、吡基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、噻嗪基、吲嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲哚基、嘌呤基、4H-喹嗪基、吡嗪基、噻啶基、喹啉基、喹唑啉基、吡啉基、喋啶基、4Ah-吡唑基、吡唑基、 β -吡啉基、啡啶基、吡啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋咕基、啡噁嗪基、異吡基、吡基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡唑啶基、吡唑啉基、哌嗪基、吲哚啉基、異吲哚啉基、吡啶基、嗎啉基、噁唑啶基、苯并三唑基、苯并異噁唑基、羧基吲哚基、苯并噁唑啉及靛紅醯基(isatinoyl)。

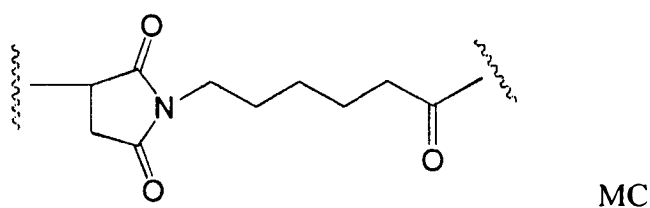
碳環基包括具有3至7個碳原子呈單環形式或具有7至12個碳原子呈雙環形式之飽和或不飽和環。單環碳環具有3至6個環原子，更通常具有5或6個環原子。雙環碳環具有7至12個環原子(例如)排列為雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統或具有9或10個環原子排列為雙環[5,6]或[6,6]系統。單環碳環之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-

烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環庚基及環辛基。

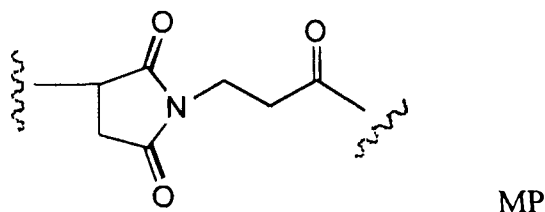
自式I ADC之所有例示性實施例(諸如II-V)應瞭解，即使在未明確表示時，視工程化半胱胺酸殘基數而定，1至4個藥物部分與抗體連接($p=1-4$)。



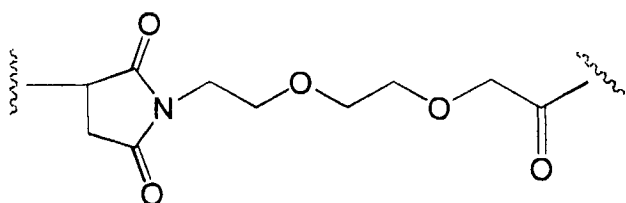
說明性式II延伸單元係衍生自順丁烯二醯亞胺-己醯基(MC)，其中 R^{17} 為 $-(CH_2)_5-$ ：



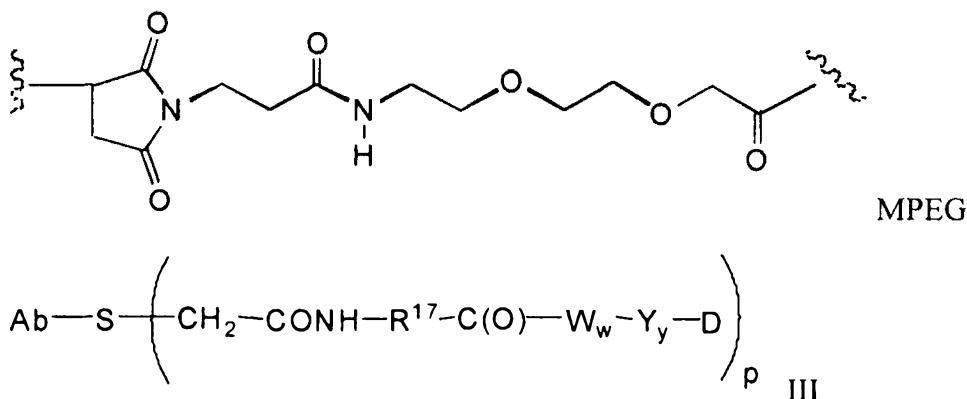
說明性式II延伸單元，且其係衍生自順丁烯二醯亞胺基-丙醯基(MP)，其中 R^{17} 為 $-(CH_2)_2-$ ：



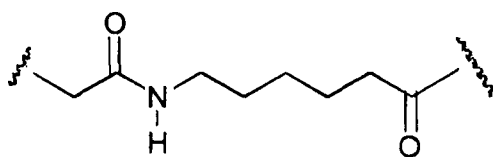
另一說明性式II延伸單元，其中 R^{17} 為 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ 且 r 為2：



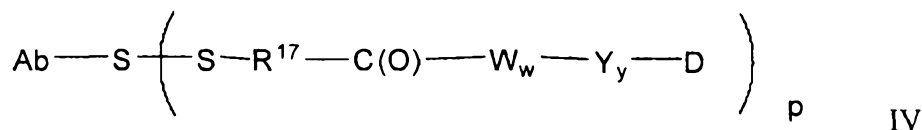
另一說明性式II延伸單元，其中 R^{17} 為 $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$
 CH_2- ，其中 R^b 為H且各r為2：



說明性式III延伸單元，其中 R^{17} 為 $-(CH_2)_5-$ ：

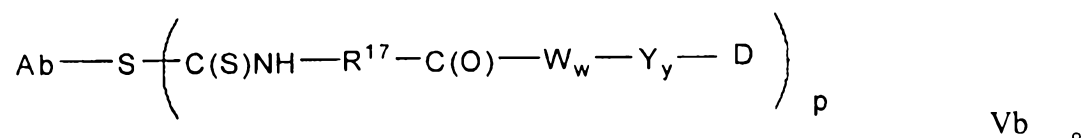
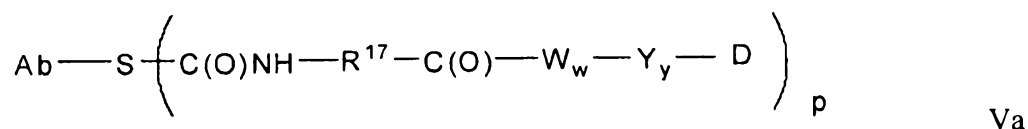


在另一實施例中，延伸單元係經由半胱胺酸工程化抗MUC16抗體之工程化半胱胺酸硫原子與延伸單元之硫原子之間的二硫鍵連接至該抗體。此實施例之代表性延伸單元係以式IV描述，其中 R^{17} 、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上所定義。



在另一實施例中，延伸單元之反應基團含有可與抗體之游離半胱胺酸硫醇形成鍵之硫醇反應性官能基。硫醇反應

官能基之實例包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺、 α -鹵乙醯基、活性酯(諸如琥珀醯亞胺酯)、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性延伸單元係以式Va及Vb來描述，其中 $-R^{17}-$ 、 $Ab-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 及 y 係如上所定義；

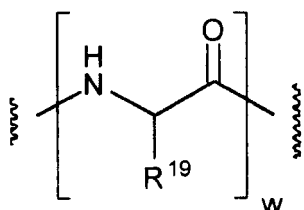


在另一實施例中，連接子可為使一個以上藥物部分經由分支、多官能性連接子部分共價附著至抗體之樹突狀類型連接子(Sun等人(2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215；Sun等人(2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768；King(2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990)。樹突狀連接子可增加藥物與抗體之莫耳比(亦即負載)，其與ADC之效能相關。因此，當半胱氨酸工程化抗體僅具有一個反應性半胱氨酸硫醇基時，多個藥物部分可經由樹突狀連接子附著。

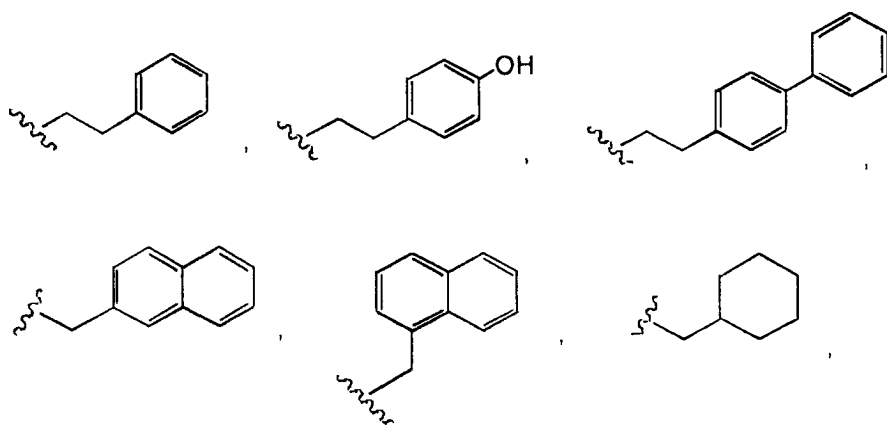
胺基酸單元

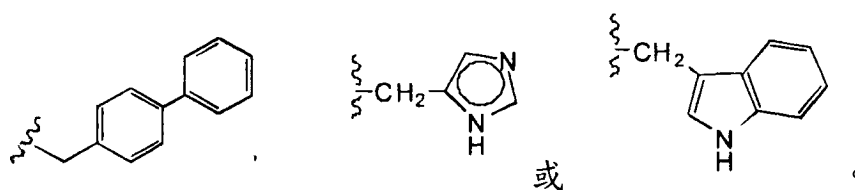
連接子可含有胺基酸殘基。胺基酸單元($-W_w-$)(若存在)將本發明半胱氨酸工程化抗體-藥物結合物(ADC)之抗體(Ab)與藥物部分(D)連接。

-W_w-為二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。包含胺基酸單元之胺基酸殘基包括天然產生之胺基酸以及次要胺基酸及非天然產生之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。各-W-單元獨立具有以下方括號中所表示之式，且w為0至12範圍內之整數：



其中R¹⁹為氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苄基、對羥基苄基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、





當 R^{19} 不為氫時， R^{19} 所附著之碳原子具對掌性。 R^{19} 所附著之各碳原子獨立為 (S) 或 (R) 構型或為外消旋混合物。因此，胺基酸單元可為對映異構性純、外消旋或非對映異構胺基酸單元。

例示性 $-W_w$ -胺基酸單元包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸 (vc 或 val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸 (af 或 ala-phe)。例示性三肽包括甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸 (gly-val-cit) 及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸 (gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組份之胺基酸殘基包括天然產生之胺基酸以及次要胺基酸及非天然產生之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。

可由一或多種酶(包括腫瘤相關蛋白酶)來酶促裂解胺基酸單元以釋放藥物部分 (-D)，在一實施例中該藥物部分釋放後於活體內質子化以提供藥物 (D)。可對胺基酸連接子組份進行設計且優化其對特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶 B、C 及 D 或纖溶蛋白酶)之酶促裂解之選擇性。

間隔單元

間隔單元 $(-Y_y-)$ (若存在) ($y=1$ 或 2) 在胺基酸單元存在時 ($w=1-12$) 將胺基酸單元 $(-W_w-)$ 與藥物部分 (D) 連接。或者，間隔單元在胺基酸單元不存在時將延伸單元與藥物部分連

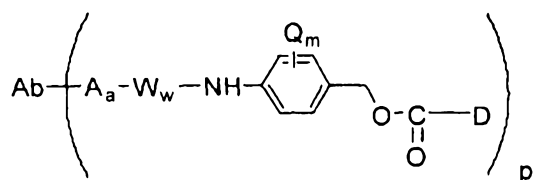
接。間隔單元亦在胺基酸單元與延伸單元皆不存在時($w, y=0$)將藥物部分與抗體單元連接。間隔單元具有兩種一般類型：自我犧牲型及非自我犧牲型。非自我犧牲型間隔單元為在胺基酸單元自抗體-藥物結合物或藥物部分-連接子裂解(尤其酶促裂解)後，部分或所有間隔單元保持與藥物部分結合之間隔單元。當含有甘胺酸-甘胺酸間隔單元或甘胺酸間隔單元之ADC經歷經由腫瘤細胞相關蛋白酶、癌細胞相關蛋白酶或淋巴細胞相關蛋白酶之酶促裂解時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分自 $Ab-A_a-W_w$ -裂解。在一實施例中，在靶細胞內發生非依賴性水解反應，從而裂解甘胺酸-藥物部分鍵且釋放藥物。

在另一實施例中， $-Y_y-$ 為伸苯基部分經 Q_m 取代之對胺基苄基胺甲醯基(PAB)單元，其中 Q 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-鹵素$ 、 $-硝基$ 或 $-氰基$ ；且 m 為0-4範圍內之整數。

非自我犧牲型間隔單元($-Y-$)之例示性實施例為： $-Gly-Gly-$ 、 $-Gly-$ 、 $-Ala-Phe-$ 、 $-Val-Cit-$ 。

在一實施例中，提供不存在間隔單元($y=0$)之藥物部分-連接子或ADC，或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

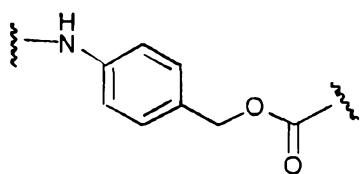
或者，含有自我犧牲型間隔單元之ADC可釋放 $-D$ 。在一實施例中， $-Y-$ 為經由PAB基團之胺基氮原子與 $-W_w-$ 連接，且經由碳酸酯基、胺基甲酸酯基或醚基直接與 $-D$ 連接之PAB基團，其中ADC具有例示性結構：



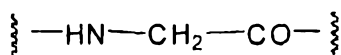
其中 Q 為 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8 \text{ 烷基})$ 、-鹵素、-硝基或-氰基；m 為 0-4 範圍內之整數；且 p 在 1 至 4 之範圍內。

自我犧牲型間隔基之其他實例包括(但不限於)電子上類似於 PAB 基團之芳族化合物，諸如 2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay 等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、雜環 PAB 類似物(US 2005/0256030)、 β -葡萄糖苷酸(WO 2007/011968)及鄰胺基苄基縮醛或對胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後進行環化之間隔基，諸如經取代及未經取代之 4-胺基丁醯胺(Rodrigues 等人(1995) Chemistry Biology 2:223)，經適當取代之雙環[2.2.1]環系統及雙環[2.2.2]環系統(Storm 等人(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)及 2-胺基苯基丙醯胺(Amsberry 等人(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。消除在甘胺酸處經取代之含胺藥物(Kingsbury 等人(1984) J. Med. Chem. 27:1447)亦為適用於 ADC 之自我犧牲型間隔基之實例。

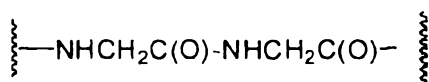
例示性間隔單元($-\text{Y}_y-$)係由式 X-XII 表示：



X



XI

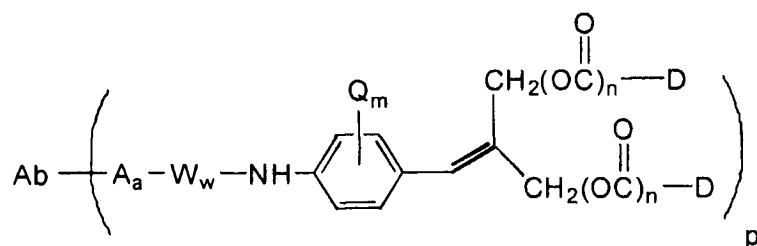


XII

樹突狀連接子

在另一實施例中，連接子L可為使一個以上藥物部分經由分支多官能連接子部分共價附著至抗體之樹突狀類型連接子(Sun等人(2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215；Sun等人(2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768)。樹突狀連接子可增加藥物與抗體之莫耳比(亦即負載)，其與ADC之效能相關。因此，當半胱胺酸工程化抗體僅具有一個反應性半胱胺酸硫醇基時，多個藥物部分可經由樹突狀連接子附著。分支樹突狀連接子之例示性實施例包括2,6-雙(羥甲基)-對甲酚及2,4,6-參(羥甲基)-酚樹突狀單元(WO 2004/01993；Szalai等人(2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125:15688-15689；Shamis等人(2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126:1726-1731；Amir等人(2003) *Angew. Chem. Int. 編* 42:4494-4499)。

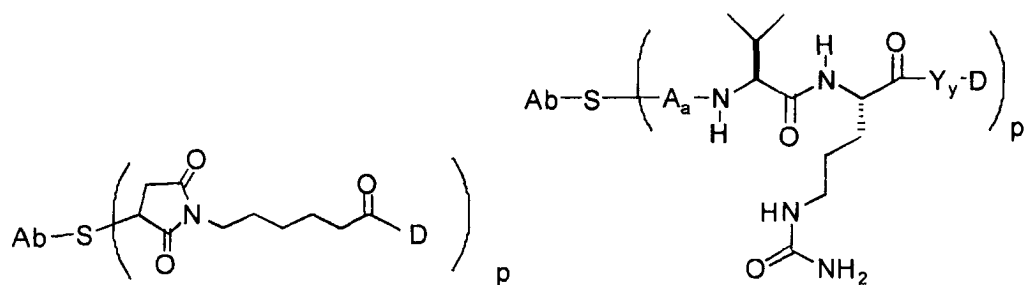
在一實施例中，間隔單元為可用以合併及釋放多種藥物之分支雙(羥甲基)苯乙烯(BHMS)，其具有以下結構：



其包含2-(4-胺基亞苺基)丙烷-1,3-二醇樹突狀單元(WO 2004/043493；de Groot等人(2003) *Angew. Chem. Int. 編* 42:4490-4494)，其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為0-4範圍內之整數；n為0或1；

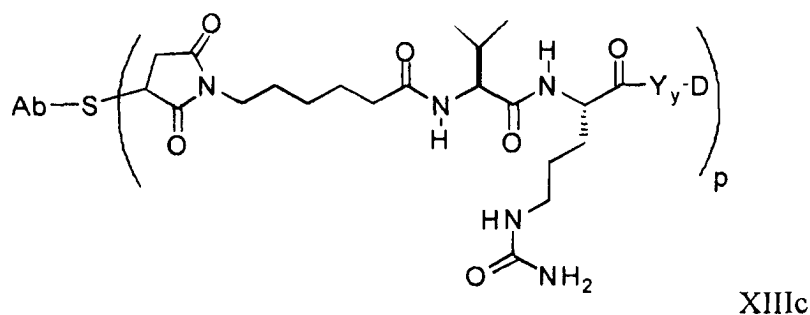
且 p 在 1 至 4 之範圍內。

式 I 抗體 - 藥物結合化合物之例示性實施例包括 XIIIa(MC)、XIIIb(val-cit)、XIIIc(MC-val-cit)及 XIId(MC-val-cit-PAB)：

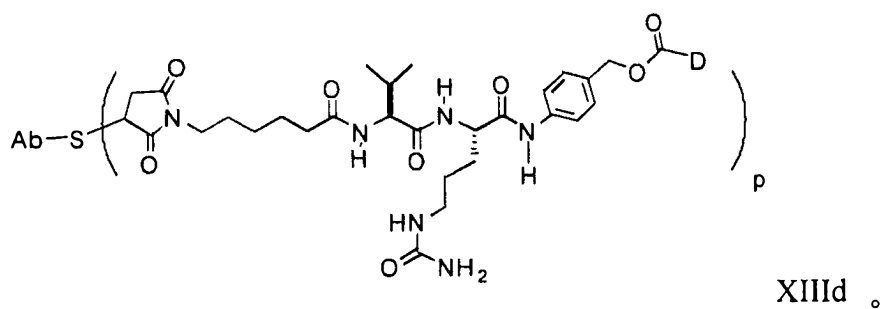


XIIIa

XIIIb

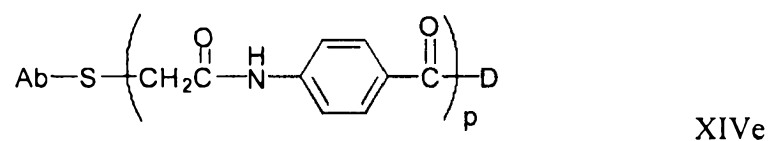
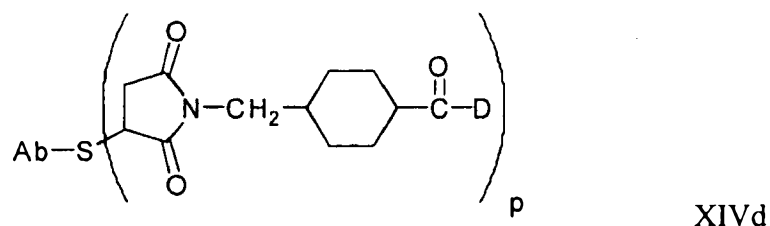
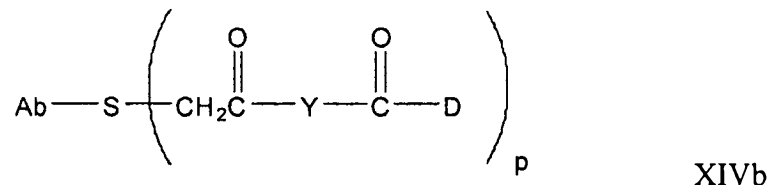
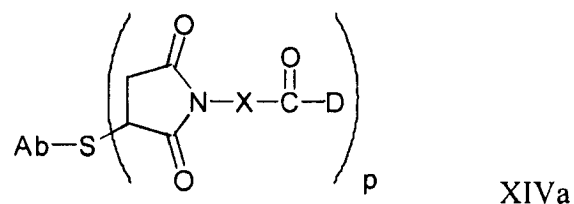


XIIIc

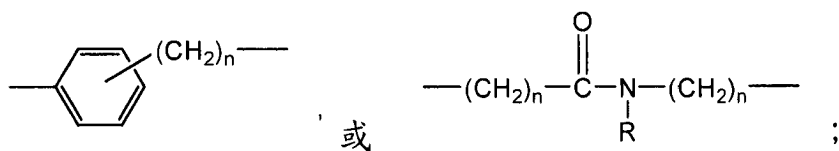
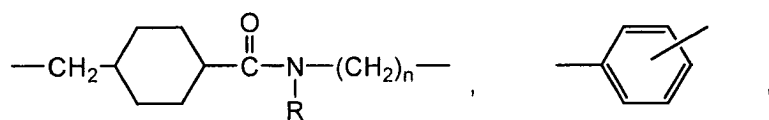
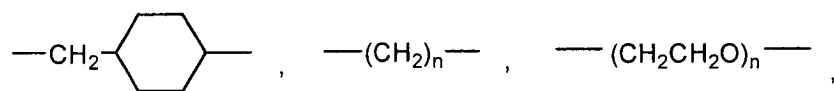


XIId。

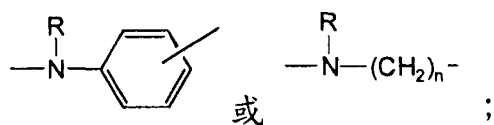
式 Ia 抗體 - 藥物結合化合物之其他例示性實施例包括 XIVa-e：



其中 X 為：



Y 為：



其中 R 獨立為 H 或 C₁-C₆ 烷基，且 n 為 1 至 12。

在另一實施例中，連接子具有反應性官能基，該反應性官能基具有可與存在於抗體上之親電子基團反應之親核基團。抗體上適用之親電子基團包括(但不限於)醛及酮羰基。連接子親核基團之雜原子可與抗體上之親電子基團反應且與抗體單元形成共價鍵。連接子上適用之親核基團包括(但不限於)醯肼、肟、胺基、肼、縮胺基硫脲、肼羧酸酯及芳基醯肼。抗體上之親電子基團提供用於附著至連接子之便利位點。

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肽類型連接子。該等肽鍵例如可根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見E. Schröder及K. Lübke (1965), "The Peptides", 第1卷, 第76-136頁, Academic Press)製備。連接子中間物可與包括間隔單元、延伸單元及胺基酸單元之任何反應組合或序列組裝。間隔單元、延伸單元及胺基酸單元可採用性質上為親電子基團、親核性基團或自由基之反應性官能基。反應性官能基包括(但不限於)羧基、羥基、對硝基苯基碳酸酯基、異硫氰酸酯基及諸如O-甲磺醯基、O-甲苯磺醯基、-Cl、-Br、-I之離去基；或順丁烯二醯亞胺。

在另一實施例中，連接子可經調節溶解性或反應性之基團取代。舉例而言，視用以製備ADC之合成途徑而定，帶電取代基(諸如磺酸根($-\text{SO}_3^-$)或銨可增加試劑之水溶解性且促進連接試劑與抗體或藥物部分之偶合反應或促進Ab-L(抗體-連接子中間物)與D，或D-L(藥物-連接子中間物)與

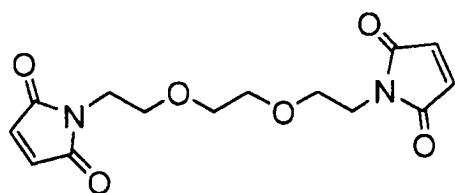
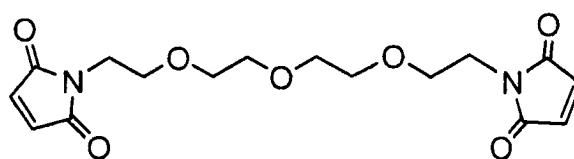
Ab之偶合反應。

連接試劑

抗體與阿瑞他汀之結合物可使用多種雙官能連接試劑製得，該等雙官能連接試劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如鹽酸己二亞胺酸二甲酯)、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-(對疊氮基苄醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苄醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

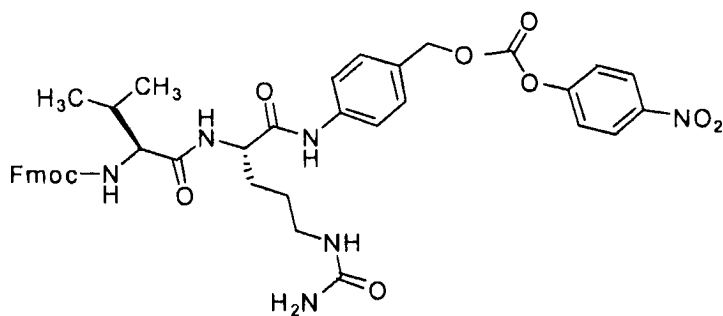
適用於本發明抗體藥物結合物之連接試劑包括(但不限於)BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺酸基-EMCS、磺酸基-GMBS、磺酸基-KMUS、磺酸基-MBS、磺酸基-SIAB、磺酸基-SMCC及磺酸基-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基砵)苯甲酸酯)，且包括雙順丁烯二醯亞胺試劑：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、1,8-雙-順丁烯二醯亞胺二乙二醇(BM(PEO)₂)及1,11-雙-順丁烯二醯亞胺三乙二醇(BM(PEO)₃)，其可自Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL及其他試劑供應商購得。雙順丁烯二醯亞胺試劑允許抗體半胱胺酸殘基之游離硫醇基以連續或同時的方式附著至含

有硫醇之藥物部分、標記或連接子中間物。除順丁烯二醯亞胺以外可與抗體硫醇基、奈莫柔比星(nemorubicin)代謝物及類似藥物部分或連接子中間物反應之其他官能基包括碘乙醯胺、溴乙醯胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、異氰酸酯及異硫氰酸酯。

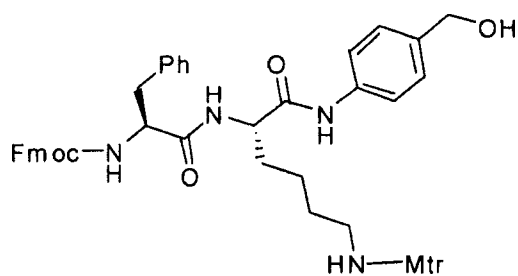
BM(PEO)₂BM(PEO)₃

適用之連接試劑亦可經由其他商業來源獲得或根據描述於Toki等人(2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch等人(1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US 2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583及WO 04/032828中之程序合成。

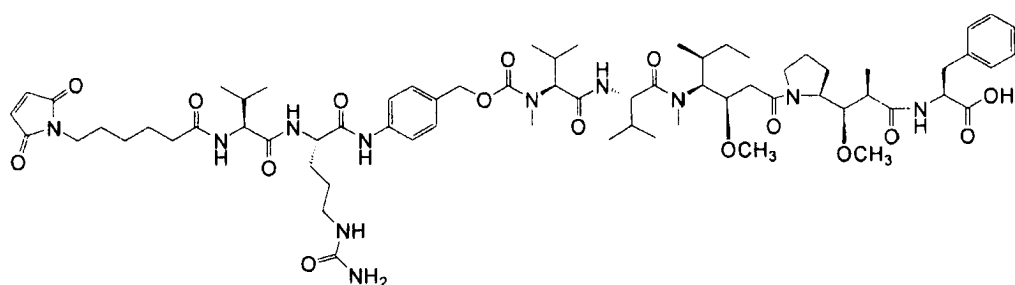
具有順丁烯二醯亞胺延伸部分及對胺基苄基胺甲醯基(PAB)自我犧牲型間隔基之例示性纈胺酸-瓜胺酸(val-cit或vc)二肽連接試劑具有以下結構：



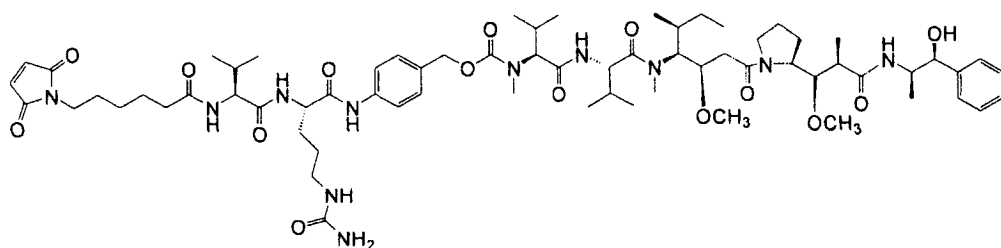
具有順丁烯二醯亞胺延伸單元及PAB自我犧牲型間隔單元之例示性phe-lys(Mtr, 單-4-甲氧基三苯甲基)二肽連接試劑可根據Dubowchik等人(1997)Tetrahedron Letters, 38:5257-60製備且具有以下結構：



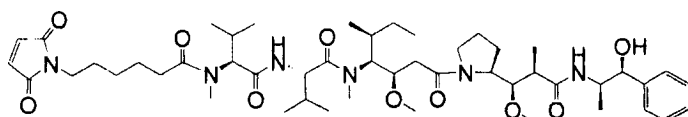
例示性藥物-連接子中間物包括：



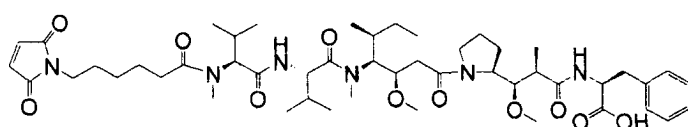
MC-val-cit-PAB-MMAF



MC-val-cit-PAB-MMAE

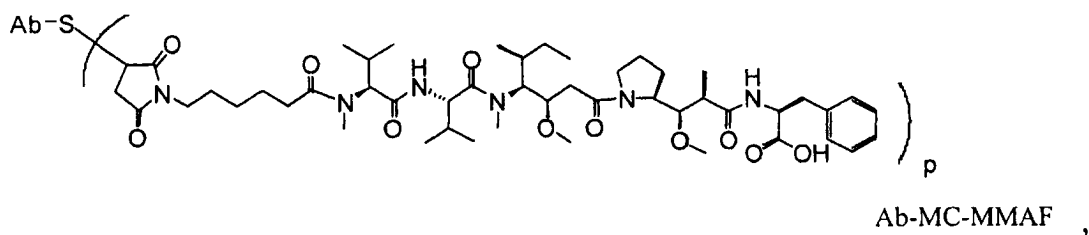
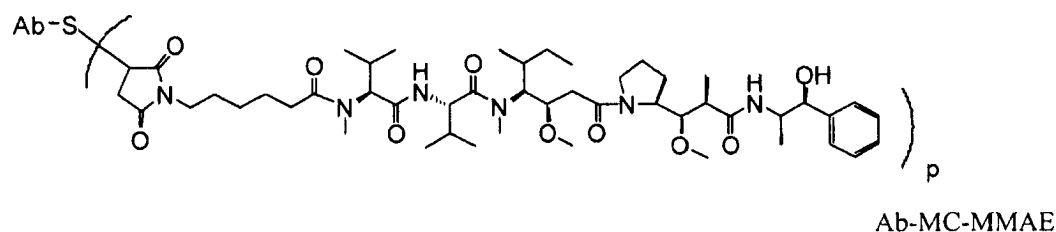
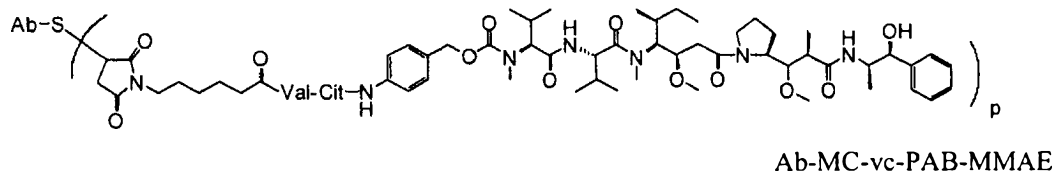
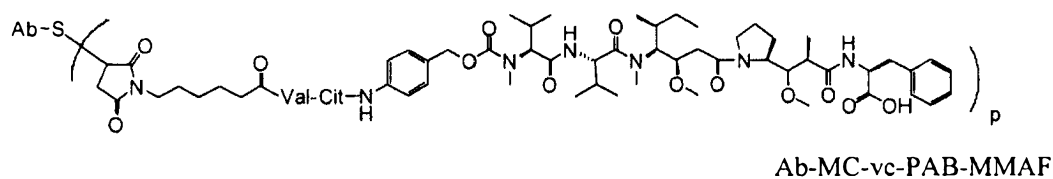


MC-MMAE



MC-MMAF

本發明之例示性抗體-藥物結合化合物包括：



其中 Val 為纈胺酸；Cit 為瓜胺酸；p 為 1、2、3 或 4；且 Ab 為半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體。

半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體-藥物結合物之製備

可藉由若干途徑，採用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑來製備式 I 之 ADC，該等途徑包括：(1) 使半胱胺酸工程化抗體之半胱胺酸基團與連接試劑反應以經由共價鍵形成抗體-連接子中間物 Ab-L，隨後與活性藥物部分 D 反應；及 (2) 使藥物部分之親核基團與連接試劑反應以經由共價鍵形成藥物-連接子中間物 D-L，隨後與半胱胺酸工程化抗體之半胱胺酸基團反應。結合法 (1) 及 (2) 可

在各種半胱胺酸工程化抗體、藥物部分及連接子之情況下採用以製備式I之抗體-藥物結合物。

抗體半胱胺酸硫醇基具親核性且能夠與連接試劑及藥物-連接子中間物上之親電子基團反應以形成共價鍵，該等連接試劑及藥物-連接子中間物包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯鹵；(ii)烷基鹵化物及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基；及(iv)二硫化物，包括吡啶基二硫化物，其係經由硫化物交換。藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：能夠與連接子部分及連接試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵之胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、縮胺基硫脲、肼羧酸酯及芳基醯肼基團。

可藉由以諸如DTT(克萊蘭氏試劑(Cleland's reagent)，二硫蘇糖醇)或TCEP(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽，Getz等人(1999) Anal. Biochem.第273卷：73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)之還原劑處理，隨後再氧化以重新形成鏈間及鏈內雙硫鍵(實例2)來使半胱胺酸工程化抗體對於與連接試劑結合而言具反應性。舉例而言，在37°C下，將表現於CHO細胞中之全長半胱胺酸工程化單株抗體(ThioMab)以約50倍過量之TCEP還原3小時來使可形成於新引入之半胱胺酸殘基與存在於培養基中之半胱胺酸之間的半胱胺酸與麩胱甘肽加合物中的雙硫鍵還原。此破壞鏈間雙硫鍵但不破壞鏈內雙硫鍵之部分還原之後可進行滲濾。將經還原之ThioMab稀釋且負載至於pH值為5之10 mM乙酸鈉中之

HiTrap S管柱上，且以含有0.3 M氯化鈉之PBS溶離。在室溫下以稀(200 nM)硫酸銅(CuSO_4)水溶液使親本Mab中存在之半胱胺酸殘基之間重新建立雙硫鍵隔夜。或者，如SDS-PAGE分析表明，脫氫抗壞血酸(DHAA)為在還原性裂解半胱胺酸加合物後重新建立半胱胺酸工程化抗體鏈內雙硫基之有效氧化劑。可使用此項技術中已知之其他氧化劑(oxidant)，亦即氧化試劑(oxidizing agent)及氧化條件。周圍空氣氧化亦為有效的。此輕度部分再氧化步驟以高保真度有效地形成鏈內雙硫鍵且保存新引入之半胱胺酸殘基之硫醇基。添加相對於抗體約3倍過量之藥物-連接子中間物(例如MC-vc-PAB-MMAE)(相對於新引入之半胱胺酸殘基約1.5倍過量)，將其混合且使其在室溫下靜置約一小時以實現結合且形成3A5抗MUC16抗體-藥物結合物。將結合混合物凝膠過濾且負載且經由HiTrap S管柱溶離以移除過量藥物-連接子中間物及其他雜質。

圖6展示製備由細胞培養物表現之半胱胺酸工程化抗體以供結合之一般方法。當細胞培養基含有半胱胺酸時，可於新引入之半胱胺酸胺基酸與來自培養基之半胱胺酸之間形成二硫化物加合物。必須使在圖6中例示性ThioMab(左)中表示為圓之此等半胱胺酸加合物還原以產生對於結合而言具反應性之半胱胺酸工程化抗體。以諸如TCEP之還原劑使半胱胺酸加合物(可能連同多個鏈間雙硫鍵)還原性裂解得到經還原形式之抗體。在部分氧化條件下以硫酸銅、DHAA或曝露於周圍氧來重新形成經配對半胱胺酸殘基之

間的鏈間雙硫鍵。新引入之經工程化且未配對之半胱氨酸殘基仍可用於與連接試劑或藥物-連接子中間物反應以形成本發明之抗體結合物。哺乳動物細胞株中表現之 ThioMab 經由 -S-S- 鍵形成產生外部結合之 Cys 與工程化 Cys 之加合物。因此，以實例 2 中所述之還原及再氧化程序處理經純化之 ThioMab 以產生反應性 ThioMab。使用此等 ThioMab 與含有順丁烯二醯亞胺之細胞毒性藥物、螢光團及其他標記結合。

分析半胱氨酸工程化抗體藥物結合反應展示相對於藉由還原鏈間或鏈內雙硫鍵，隨後與硫醇反應性藥物連接子中間物結合製備之抗體藥物結合物(標準 ADC)降低之異質性。圖 7 展示標準嵌合 3A5 與 MC-vc-PAB-MMAE 結合產物之 HIC(疏水性相互作用層析)分析(頂部)。HIC 分析基於每個抗體之藥物數分離 ADC。產生每個抗體之藥物數不同之 ADC 組之分布，其中 ADC 具有每個 3A5 抗體 0(12%)、1(3%)、2(43%)、3(3%)、4(32%)及 6(6%)個 MMAE。在各組內，關於在八個鏈間雙硫鍵之任一者處與 3A5 連接之 MMAE 存在假定額外異質性。此等種類可藉由質譜偵測，但不藉由 HIC 層析解析。比較而言，圖 7 亦展示半胱氨酸工程化嵌合 3A5 與 MC-vc-PAB-MMAE 之結合產物之 HIC 分析(底部)。產生較低異質性產物分布及較低藥物負載值(p，平均藥物/Ab)。產物混合物主要為單一種類，每個 3A5 2 個 MMAE(60%)，其中藥物係在重鏈中各 A117C 半胱氨酸突變位點處附著。不完全反應產生約 32%之每個抗體一個

MMAE及7%之未結合抗體。不可偵測較高負載之ADC。

圖8展示還原及去糖基化後標準(親本)嵌合3A5與MC-vc-PAB-MMAE之結合產物之質譜分析，其展示與重鏈(HC)及輕鏈(LC)結合之藥物相對量(頂部)。約一半輕鏈與一個藥物結合。重鏈具有0、1、2及3個藥物之分布。在各可偵測質量內，關於在鏈間雙硫鍵之任一者處與3A5連接之MMAE存在假定額外異質性。比較而言，圖8亦展示半胱胺酸工程化嵌合3A5與MC-vc-PAB-MMAE之結合產物之質譜分析(底部)。如所預期，輕鏈不具有MMAE。大多數重鏈經由A117C半胱胺酸突變位點與一個MMAE結合。在LC/MS分析之前，使標準ADC及thio ADC去糖基化及還原。標準ADC之去糖積質譜(頂部，圖8)展示輕鏈上零或一個藥物種類及重鏈上零、一、二或三個藥物種類，而thio ADC展示重鏈上僅一個藥物種類，表示如所預期thio ADC更均質。

亦在非還原及還原條件下，藉由SDS-PAGE分析標準ADC及thio(半胱胺酸工程化)ADC。標準ADC展示歸因於缺失鏈間雙硫鍵之多個種類。

圖9比較藉由聯合液相層析及質譜分析(LC-MS)偵測之標準Hu3A5-VC-MMAE及兩種製備物ThioHu3A5-VC-MMAE之主要種類。在層析分析之前，將樣本以DTT處理以使雙硫鍵還原性裂解或保持完整。藉由習知方法製備之Hu3A5-VC-MMAE產生廣泛之種類分布，反映結合法之異質性及鏈間雙硫鍵之缺失。對照而言，兩種ThioHu3A5-VC-

MMAE製備物更加接近均質，且所偵測之種類表示完整未結合抗體(具有所有正常雙硫鍵)或在工程化半胱胺酸(且不在其他處)與連接子-藥物結合之抗體。

篩檢法

本發明之另一實施例係關於測定懷疑含有MUC16/CA125/O772P多肽之樣本中MUC16/CA125/O772P多肽之存在的方法，其中該方法包含將樣本曝露於與MUC16/CA125/O772P多肽結合之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物及測定樣本中半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物與MUC16/CA125/O772P多肽之結合，其中該結合之存在表示樣本中存在MUC16/CA125/O772P多肽。視情況，樣本可含有懷疑表現MUC16/CA125/O772P多肽之細胞(可為癌細胞)。該方法中所用之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物可視情況經可偵測標記，附著於固體支撐物或類似處理。

本發明之另一實施例係關於診斷哺乳動物體內腫瘤存在之方法，其中該方法包含(a)使包含獲自哺乳動物之組織細胞之測試樣本與結合CA125/O772P多肽之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物接觸，及(b)偵測半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物與測試樣本中CA125/O772P多肽之間複合物之形成，其中複合物之形成表示哺乳動物體內存在腫瘤。視情況，半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物經可偵測標記，附著至固體支撐物或類似處理及/或組織細胞之測試樣本係獲自

懷疑患有癌性腫瘤之個體。

活體外細胞增殖檢定

本發明之一實施例係關於抑制表現MUC16多肽之細胞生長之方法，其中該方法包含使細胞與半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物接觸，與MUC16多肽結合引起表現MUC16之細胞生長抑制。細胞可為癌細胞且半胱胺酸工程化抗體或其抗體藥物結合物與MUC16多肽之結合引起表現MUC16多肽之細胞死亡。

一般而言，抗體-藥物結合物(ADC)之細胞毒性或細胞生長抑制活性係藉由以下步驟量測：在細胞培養基中將表現MUC16多肽之哺乳動物細胞曝露於ADC；將細胞培養約6小時至約5天之時段；及量測細胞生存力。適用於細胞增殖檢定之哺乳動物細胞包括：(1)表現MUC16多肽之細胞株OVCAR-3；(2)經工程化以於細胞表面上穩定表現一部分MUC16多肽之PC3產生之細胞株(PC3/MUC16)；及(3)不表現MUC16多肽之PC3細胞株(PC3/neo)。使用基於細胞之活體外檢定來量測本發明ADC之生存力(增殖)、細胞毒性及對細胞凋亡之誘發(卡斯蛋白酶(caspase)活化)。

抗體-藥物結合物之活體外效力係藉由細胞增殖檢定量測(圖10及11，實例4)。CellTiter-Glo[®]發光細胞生存力檢定為可購得的(Promega Corp., Madison, WI)基於鞘翅目(Coleoptera)螢光素酶重組表現(US 5583024、US 5674713、US 5700670)之均質檢定法(Mendoza等人(2002) Cancer Res. 62:5485-5488)。此細胞增殖檢定基於所存在

之ATP量(指示代謝活性細胞)來測定培養物中之活細胞數(Crouch 等人 (1993)J. Immunol. Meth. 160:81-88 ; US 6602677)。

來自活體外細胞增殖檢定之結果展示於圖10及11中且表明各半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物於OVCAR-3及PC3/MUC16細胞(亦即於細胞表面上表現MUC16多肽之細胞)中引起顯著程度之細胞死亡，而在PC3/neo細胞(在細胞表面上不表現MUC16多肽)中任何抗體均未觀測到顯著細胞殺傷。此等資料表明所測試之結合物能夠在活體外與表現於細胞表面上之MUC16多肽結合且引起彼等細胞死亡。

藥物動力學-血清清除率及穩定性

藉由在對Sprague-Dawley大鼠進行單次靜脈內快速給藥後量測抗體及藥物結合物之血清濃度來分析抗MUC16抗體-藥物結合物活體內之處置。以使用抗MMAE進行俘獲且使用經生物素標記MUC16胞外域(ECD)及抗生蛋白鏈菌素辣根過氧化物酶(HRP)進行偵測之ELISA來量測具有至少一種細胞毒性藥物之抗體-藥物結合物濃度。以使用MUC16 ECD進行俘獲且使用抗人類Fc HRP作為二次抗體之ELISA來量測血清中Ch3A5及ThioCh3A5之總濃度。此檢定量測具有及不具有結合MMAE之任何抗MUC16抗體。該等檢定在1:100之最小稀釋下具有16.4 ng/mL之量化下限。使用IV快速輸入、一級消除及大速率常數之二室模型(模型8, WinNonlin Pro v.5.0.1, Pharsight Corporation,

Mountain View, CA)來分析來自各動物之血清濃度-時間數據。總適合度係基於初級及次級參數之預測估算，預測之標準誤差及變異係數百分比，以及對所觀測與所預測之濃度-時間數據之間的剩餘曲線圖的檢視。個別初級PK參數包含分別與 α 及 β 相關之零時截距(A及B)及小速率常數(α 及 β)。使用以下模型化選擇：使用WinNonlin測定初始估算；藉由所預測濃度平方之倒數($1/\hat{y}^2$)來加權濃度；使用Nelder-Mead最小化演算法。報導以下PK參數： $AUC_{0\text{INF}}$ 、 CL 、 C_{max} 、 MRT 、 $t_{1/2,a}$ 、 $t_{1/2,b}$ 、 V_1 及 V_{ss} 。

大鼠28天藥物動力學分析結果展示於圖12中。以每公斤體重3毫克thio ch3A5-VC-MMAE或5毫克ch 3A5-VC-MMAE對大鼠給藥。在給藥後5分鐘、1小時、6小時、24小時及2、3、4、8、11、15、21及28天收集來自大鼠之血清。觀測ch 3A5-VC-MMAE在0.5與5 mg/kg劑量之間的動力學劑量線性度，故在算術上轉化5 mg/kg劑量數據來反映所預測之3 mg/kg之數據以與thio ch3A5-VC-MMAE比較。就總抗體而言或就經藥物結合之抗體而言，thio ch3A5-VC-MMAE展示較緩慢之活體內清除動力學。此特性可有利於改良治療惡性疾病或其他病症過程中對治療劑之曝露，同時減輕細胞毒性藥物經由包括代謝之快速清除路徑清除之潛在有害效應。

動物毒性

在急性毒性大鼠模型中評估半胱氨酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合物之安全性。藉由以ADC處理雌性Sprague-

Dawley大鼠且隨後檢視且分析對各器官之效應來研究ADC毒性。基於大體觀測(體重)，臨床病理學參數(血清化學及血液學)及組織病理學，可觀測、表徵且量測ADC之毒性。發現在均等劑量水平下，半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合物與比對應標準抗體-藥物結合物低之急性毒性相關。

藉由在第1天單次注射：std ch 3A5-VC-MMAE(24.19 mg/kg=1934 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)、thio ch 3A5-VC-MMAE(49.99 mg/kg=1934 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)及對照媒劑來對青春期雌性大鼠(100-125公克)進行12天之急性毒性研究。Std ch 3A5為稱作3A5之親本嵌合抗MUC16抗體，且thio ch 3A5為半胱胺酸工程化嵌合抗MUC16 3A5抗體。每日量測體重。在第5天及第12天進行臨床化學、血清酶及血液學分析；以組織病理學評估之完全屍檢結束。毒性信號包括臨床觀測到重量減輕。

藉由血清中肝臟酶(包括天冬胺酸轉胺酶(AST)、丙胺酸轉胺酶(ALT)及g-麩胺醯基轉移酶(GGT))之升高來量測肝臟毒性。藉由白血球(主要為粒細胞(嗜中性白血球))及/或血小板之耗盡及涉及淋巴器官來觀測淋巴造血系統毒性，亦即萎縮或細胞凋亡活性。發現半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合物與經媒劑處理之動物相比不引起血清AST含量或循環血小板或嗜中性白血球含量之可偵測變化。此等觀測結果呈現於圖13中。對照而言，在相同劑量之細胞毒性藥物及一半劑量之抗體下，標準抗MUC16抗體-藥物結合物產生AST之瞬時升高及循環中嗜中性白血球及血小

板之耗盡(於第5天觀測到)。亦觀測到血清AST及GGT升高。半胱胺酸工程化抗體結合技術似乎改良齧齒動物模型中抗體-藥物結合物之安全性。在大鼠體內，單一劑量之16.6 mg/kg標準抗MUC16 ADC(等效於1500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物暴露)在第5天(給藥後四天；圖13)產生循環嗜中性白血球及其他白血球之顯著耗盡，隨後在第12天補償性回彈。此標準ADC劑量亦引起肝臟酶天冬胺酸轉胺酶(AST；圖13)之血清含量輕度升高及瞬時體重減輕(圖14)。AST含量受50%劑量增加(24.5 mg/kg ADC；2250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)之更明顯影響。在彼劑量下，六隻大鼠中有三隻未存活至研究結束(第12天)。對照而言，36.4 mg/kg thio抗MUC16 ADC(等效於1500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物暴露)不產生不利效應，其中所有參數基本上與經媒劑處理之動物相同。68.6 mg/kg劑量之thio抗MUC16 ADC(2820 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物)產生與使用四分之一彼劑量之標準抗MUC16抗體-藥物結合物所觀測到之彼等毒性幾乎等效之毒性。重要的是，儘管最高thio抗MUC16 ADC劑量(100.8 mg/kg；4150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物)確實產生顯著效應，但總不利效應概況與在較高標準抗MUC16 ADC劑量(24.5 mg/kg ADC；2250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)下所觀測到之不利效應相當類似。在使用嵌合結合物之初步研究中觀測到相同趨勢。

認為以ADC給藥後之動物相對於僅以媒劑給藥之動物的體重減輕或體重變化為系統或局部毒性之大體及一般指示。圖14展示12天內體重之變化(公克)。接受半胱胺酸工

程化結合物之大鼠以與經媒劑處理之動物相同之速率增加體重，而接受標準抗體-藥物結合物之大鼠經歷瞬時體重減輕或體重增加延遲。

亦對獼猴評估標準及thio抗MUC16抗體-藥物結合物之安全性。儘管大鼠及猴物種皆表現藉由3A5抗體識別之MUC16，但關於初級序列獼猴抗原更類似於人類抗原。在競爭性結合檢定中，MAb 3A5與CA125之結合受類似濃度之人類及猴子MUC16 ECD蛋白抑制(IC₅₀分別為0.76 nM及1.89 nM)，但大鼠MUC16 ECD之競爭較為低效(IC₅₀=13.5 nM)。大鼠及獼猴皆對抗體-MMAE結合物敏感。獼猴之初步研究大體上重複大鼠之觀測結果。以標準及thio抗MUC16-MC-vc-PAB-MMAE ADC給藥之靈長類動物體內之最顯著不利作用為可逆性嗜中性白血球減少。然而標準抗MUC16-MC-vc-PAB-MMAE ADC在1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物之藥物曝露(5.9 mg/kg抗體)下誘發顯著減少，thio ADC在1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物(12.8 mg/kg抗體)下不產生顯著不利作用，其中嗜中性白血球數趨近於假性治療之動物(圖17)。在第1天及第22天對動物給藥。第22天嗜中性白血球含量為第二次給藥之前。使劑量加倍至25.6 mg/kg；2400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物產生完全可逆之嗜中性白血球數減少。甚至更高劑量之thio抗MUC16 ADC(38.4 mg/kg，3600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物)除嗜中性白血球減少外未產生顯著效應，該嗜中性白血球減少比中等劑量水平下之減少顯著，但仍為可逆的。重要的是，在已知表現MUC16之器官(包括角膜、肺、輸卵管及子宮)中未觀

測到毒性。以TDC給藥之猴子體內唯一顯著之組織病理學觀測結果最小化至骨髓成髓作用輕微增加且最小化至輕度胸腺淋巴耗盡，其與嗜中性白血球減少一致且指示再生反應。此等結果表明，在臨床前模型中即使基於細胞毒性藥物劑量(亦即均等 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)比較時，thio ADC亦比標準ADC安全。

量測大鼠體內thio ADC及標準ADC之清除動力學。在大鼠體內，即使在考慮劑量水平差異後，以36.4 mg/kg IgG($1500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)給藥之thio ADC在循環中亦保持比以16.6 mg/kg IgG($1500 \mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)給藥之標準ADC高得多的含量；而彼劑量下之thio ADC不產生不利效應。在以匹配之mg/kg劑量之嵌合標準ADC及嵌合thio ADC對大鼠給藥時，觀測到相同結果(圖12)。使用嵌合抗體對大鼠進行之更徹底動力學分析展示總thio ADC比標準ADC清除得略慢，且一定比例之仍具有至少一藥物之thio ADC明顯比對應對例之標準ADC減少得慢(圖12)。在具有腫瘤之小鼠體內，標準ADC與thio ADC動力學相當。

活體內活性檢定

藉由於齧齒動物體內植入癌細胞之同種異體移植物或異種移植物且以ADC處理腫瘤來活體內量測半胱胺酸工程化抗MUC16抗體-藥物結合物之功效。根據細胞株、ADC與存在於癌細胞上之受體之抗體結合特異性、給藥方案及其他因素而預期不同結果。使用表現適度量MUC16之轉殖基因外植體小鼠模型來量測ADC之活體內功效。將受檢者以

ADC處理一次且監測3-6週以量測腫瘤倍增、對數細胞殺死及腫瘤縮小之時間。進行追蹤劑量反應及多劑量實驗。

圖15及16展示半胱胺酸工程化抗MUC16藥物結合物與標準結合物相比對抗移植至雌性SCID小鼠乳房脂肪墊中之OVCAR-3腫瘤細胞之活性。在第0天之單次處理之前，建立腫瘤且使其生長至150-200 mm³之體積(如使用測徑規量測)。根據式： $V(\text{mm}^3)=0.5A \times B^2$ ，使用測徑規量測腫瘤體積，其中A及B分別為長直徑及短直徑。在腫瘤體積達到3000 mm³前或當腫瘤展示即將發生潰瘍之跡象時，對小鼠施以安樂死。將自各實驗組(每組10隻小鼠)收集之數據表示為平均數±SE。圖15展示6 mg/kg劑量之std hu 3A5-VC-MMAE(328 mg/m²藥物劑量)與thio hu3A5-VC-MMAE(150 mg/m²藥物劑量)之活性相當。圖16比較施用1.5、3及6 mg/kg劑量之嵌合結合物；半胱胺酸工程化結合物及標準結合物在各劑量水平下展現相似活性。將數據以表格形式匯總如下。

圖15之表格	PR	CR	mg/kg	μg/m ²	藥物/Ab
媒劑(PBS)	0	0	--	--	--
Std Hu 3A5-VC-PAB-MMAE	8	0	6	328	3.5
Thio Hu 3A5-VC-PAB-MMAE	8	0	6	150	1.6

* Std Hu 3A5為稱作3A5之親本嵌合抗MUC16抗體，且
Thio Hu 3A5為半胱胺酸工程化嵌合抗MUC16 3A5抗體。

圖16之表格	PR	CR	mg/kg	$\mu\text{g}/\text{m}^2$	藥物/Ab
媒劑(PBS)	0	0	--	--	--
ADC緩衝劑	0	0	--	--	--
std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	1	0	1.5	71	3.1
std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	2	6	3	141	3.1
std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	4	6	6	283	3.1
thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	1	1	1.5	35	1.5
thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	4	3	3	69	1.5
thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	3	7	6	139	1.5

* Std ch 3A5為稱作3A5之親本嵌合抗MUC16抗體，且
thio ch 3A5為半胱胺酸工程化嵌合抗MUC16 3A5抗
體。

在各IgG劑量水平下，Thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE至少具有與std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE相同之對抗卵巢癌移植異種移植模型之活性，在1.5 mg/kg(thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE之MMAE劑量為35 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ，且std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE之MMAE劑量為71 $\mu\text{g}/\text{m}^2$)下提供部分功效，且在3 mg/kg(69對141 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)及6 mg/kg(139對283 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE)下幾乎完全消除腫瘤。當以MMAE劑量闡述時，thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE之功效大約為std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE之兩倍。在任何劑量水平下均未觀測到任一結合物之不利效應。

治療法

本發明之另一實施例係關於治療性治療患有包含表現MUC16/CA125/O772P多肽之細胞之癌性腫瘤的哺乳動物

之方法，其中該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之與MUC16/CA125/O772P多肽結合之半胱胺酸工程化抗體或其抗體藥物結合物，藉此產生對腫瘤的有效治療性治療。

本發明之另一實施例係關於用於治療或預防與改變(較佳增加)之MUC16/CA125/O772P多肽表現或活性相關之細胞增殖病症的方法，該方法包含向需要該治療之受檢者投與有效量之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物。例示性細胞增殖病症為癌症。細胞增殖病症之有效治療或預防可為以半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物直接殺死表現MUC16/CA125/O772P多肽之細胞或使其生長抑制之結果或藉由以半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物拮抗MUC16/CA125/O772P多肽之細胞生長增強活性。

本發明之另一實施例係關於使半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物與表現MUC16/CA125/O772P多肽之細胞結合之方法，其中該方法包含在適於使半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物與該MUC16/CA125/O772P多肽結合之條件下，使表現MUC16/CA125/O772P多肽之細胞與該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物接觸，且使其間結合。在較佳實施例中，以適用於定性及/或定量測定半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物與細胞結合之位置及/或量之分子或化合物標記半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其

抗體藥物結合物。

本發明之其他實施例係關於半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物於製備適用於(i)治療性治療或診斷性偵測癌症或腫瘤，或(ii)治療性治療或預防細胞增殖病症之藥劑的用途。

本發明之另一實施例係關於抑制癌細胞生長之方法，其中該癌細胞生長至少部分依賴於MUC16/CA125/O772P多肽之生長增強效應(其中CA125/O772P多肽可由癌細胞自身表現或由產生對癌細胞具有生長增強效應之多肽之細胞表現)，其中該方法包含使MUC16/CA125/O772P多肽與半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體藥物結合物接觸，藉此拮抗MUC16/CA125/O772P多肽之生長增強活性且進而抑制癌細胞生長，藉此抑制癌細胞生長。

本發明之另一實施例係關於治療性治療哺乳動物腫瘤之方法，其中該腫瘤之生長至少部分依賴MUC16/CA125/O772P多肽之生長增強效應，其中該方法包含向哺乳動物投與治療有效量之與MUC16/CA125/O772P多肽結合之抗MUC16半胱胺酸工程化抗體或其抗體藥物結合物，藉此拮抗該MUC16/CA125/O772P多肽之生長增強活性且產生對腫瘤的有效治療性治療。

抗體、抗體片段及其結合物識別釋放至胞外液中之質膜MUC16蛋白之胞外抗原決定基。本發明另外提供使用抗體、抗體片段及結合物來偵測、監測及治療惡性疾病(諸如乳癌及卵巢癌)之方法。

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可用以治療(例如)以MUC16腫瘤抗原之過度表現為特徵之各種疾病或病症。例示性病況或過度增殖病症包括良性或惡性腫瘤；白血病及淋巴惡性疾病。其他包括神經元、神經膠質、星形膠質細胞、下丘腦、腺性、巨噬細胞、上皮、基質、囊胚腔、炎症、血管生成及免疫(包括自體免疫)病症。

可於具有腫瘤之高級靈長類動物及人類臨床試驗中進一步測試動物模型及基於細胞之檢定中所鑑別之ADC化合物。可設計臨床試驗來評估ADC組合已知治療方案(諸如輻射及/或涉及已知化療及/或細胞毒性劑之化療法)的功效。

一般而言，待治療之疾病或病症為過度增殖疾病，諸如癌症。本文中待治療之癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴惡性疾病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(例如上皮鱗狀細胞癌)；肺癌，包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌；肺腺癌及肺鱗狀癌；腹膜癌；肝細胞癌；胃癌，包括胃腸癌；胰腺腺癌；神經膠母細胞瘤；子宮頸癌；卵巢癌；肝癌；膀胱癌；肝細胞癌；乳癌；結腸癌；直腸癌；結腸直腸癌；子宮內膜癌或子宮癌；唾液腺癌；腎癌；前列腺癌；陰門癌；甲狀腺癌；肝癌瘤；肛門癌瘤；陰莖癌瘤以及頭頸部癌。

對於預防或治療疾病而言，ADC之適當劑量將視如上所述待治療之疾病類型、疾病嚴重度及過程、出於預防或治

療目的投與分子、先前療法、患者臨床病史及對抗體之反應及主治醫師之判斷而定。分子合適在某一時刻或經一系列治療投與患者。視疾病類型及嚴重度而定，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1-20 mg/kg)之分子為(例如)藉由一或多次單獨投藥或藉由連續輸液投與患者之初始候選劑量。視以上所提及之因素而定，典型日劑量可在約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg 或更高之範圍內。待投與患者之ADC例示性劑量在每公斤患者體重約0.1至約10毫克之範圍內。

就經若干天或更長時間重複投藥而言，視病況而定，持續治療直至出現所需之疾病症狀抑制。例示性給藥方案包含投與約4 mg/kg 之初始負載劑量之抗MUC16抗體，隨後投與約2 mg/kg 之每週維持劑量之抗MUC16抗體。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包括超音波成像之檢定來監測。

抗體-藥物結合物之投與

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可藉由適用於待治療病況之任何途徑來投與。ADC通常係非經腸投與(亦即輸液、皮下、腹膜內、肌肉內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外)。

醫藥調配物

通常製備本發明之治療性抗體-藥物結合物(ADC)之醫藥調配物以便以醫藥學上可接受之非經腸媒劑且以單位劑量無菌可注射形式非經腸投藥(亦即快速、靜脈內、腫瘤內注射)。視情況將具有所需純度之抗體-藥物結合物(ADC)

與醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑、賦形劑或穩定劑 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 第 16 版, Osol, A. 編) 混合成凍乾調配物或水溶液形式。

可接受之稀釋劑、載劑、賦形劑及穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸之緩衝劑；包括抗壞血酸及甲硫胺酸之抗氧化劑；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苄基銨；氯化六甲銨；氯化苯甲烴銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；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；親水聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺酸、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、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉離子；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 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇(PEG)。

亦可將活性藥物成份囊包於(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合製造之微囊(分別例如羥甲基纖維素或凝膠微囊及聚(甲基丙稀酸甲酯)微囊)、膠狀藥物輸送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或巨乳液中。該等技術揭示於 Remington's Pharmaceutical

Sciences第16版，Osol, A.編(1980)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之合適實例包括含有ADC之固體疏水性聚合物之半透性基質，該等基質係呈成形物品(例如薄膜或微囊)的形式。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(US 3773919)、L-麩胺酸與 γ -乙基-L-麩胺酸之共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、諸如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林組成之可注射微球體)之可降解乳酸-乙醇酸共聚物及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

調配物包括適用於上述投藥途徑之調配物。調配物可便利地以單位劑型存在且可由藥劑學技術中熟知之任何方法來製備。技術及調配物一般見於**Remington's Pharmaceutical Sciences**(Mack Publishing Co., Easton, PA)中。該等方法包括使活性成份與構成一或多種副成份之載劑締合之步驟。一般而言，該等調配物係藉由均勻且緊密地使活性成份與液體載劑或細粉狀固體載劑或兩者締合，且接著若需要使該產物成形來製備。

本發明之水性懸浮液含有與適用於製造水性懸浮液之賦形劑混雜之活性物質。該等賦形劑包括懸浮劑，諸如羧甲基纖維素鈉、交聯羧甲纖維素、聚乙烯吡咯酮、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、海藻酸鈉、聚乙烯吡咯啉酮、黃芪膠及阿拉伯膠；及分散劑或濕潤劑，諸如天然產生之磷脂(例如卵磷脂)、氧化烯與脂肪酸之縮合產物(例如聚氧乙

烯硬脂酸酯)、氧化乙烯與長鏈脂族醇之縮合產物(例如十七伸乙基氧基十六醇)、氧化乙烯與衍生自脂肪酸及己糖醇酐之偏酯之縮合產物(例如聚氧化乙烯山梨糖醇酐單油酸酯)。水性懸浮液亦可含有一或多種防腐劑,諸如對羥基苯甲酸乙酯或對羥基苯甲酸正丙酯;一或多種著色劑;一或多種調味劑及一或多種甜味劑,諸如蔗糖或糖精。

ADC之醫藥組合物可為無菌可注射製劑之形式,諸如無菌可注射水性或油性懸浮液。此懸浮液可根據已知技術使用上文已提及之彼等合適分散劑或濕潤劑及懸浮劑來調配。無菌可注射製劑亦可為於無毒非經腸可接受之稀釋劑或溶劑中之無菌可注射溶液或懸浮液(諸如1,3-丁烷-二醇中之溶液),或製備為凍乾粉末。可採用之可接受媒劑及溶劑為水、林格氏溶液(Ringer's solution)及等張氯化鈉溶液。此外,無菌不揮發性油可習知地用作溶劑或懸浮介質。出於此目的,可採用包括合成單甘油酯或二甘油酯之任何無刺激性不揮發性油。此外,諸如油酸之脂肪酸同樣可用於製備可注射劑。

可與載劑物質組合以產生單一劑型之活性成份量將視所治療之主體及特定投藥模式而變化。舉例而言,意欲用於靜脈內輸液之水溶液每毫升溶液可含有約3至500 μg 之活性成份以便產生約30 mL/h之速率之合適體積輸液。

適用於非經腸投與之調配物包括水性及非水性無菌注射溶液,其可含有抗氧化劑、緩衝劑、抑菌劑及使調配物與預定接受者之血液等張之溶質;及水性及非水性無菌懸浮

液，其可包括懸浮劑及增稠劑。

儘管經口投與蛋白質治療劑由於在消化道中水解或變性而為不利的，但可將適用於經口投與之ADC調配物製備為各自含有預定量ADC之離散單元，諸如膠囊、扁膠劑或錠劑。

可將調配物封裝於單位劑量或多劑量容器(例如密封安瓿及小瓶)中，且可在冷凍乾燥(凍乾)條件下儲存，僅需在臨用前添加注射用無菌液體載劑(例如水)。可由先前描述之種類之無菌粉末、顆粒及錠劑製備即用注射溶液及懸浮液。較佳單位劑量調配物為含有日劑量或單位日次劑量(如上文所述)或其適當部分之活性成份之調配物。

亦可將本發明之組合物調配為免疫脂質體。"脂質體"為由各種類型之脂質、磷脂及/或適用於傳遞藥物至哺乳動物之界面活性劑組成之小微脂粒。脂質體之組份通常排列為雙層結構，類似於生物膜之脂質排列。含有抗體之脂質體係藉由此項技術中已知，諸如描述於Epstein等人(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688；Hwang等人(1980) Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030；US 4485045；US 4544545；US 5013556；WO 97/38731中之方法製備。脂質體可由逆相蒸發法使用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG-衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組合物產生。脂質體可經具有指定孔徑之過濾器擠出以產生具有所需直徑之脂質體。可經由二硫鍵交換反應使本發明組合物之Fab'片段與脂質體結合(Martin等人(1982) J. Biol. Chem. 257:286-

288)。化療劑視情況含於脂質體內(Gabizon等人(1989)J. National Cancer Inst. 81(19): 1484)。

組合療法

可將本發明之抗體-藥物結合物(ADC)與具有抗癌特性之第二化合物組合於醫藥組合調配物中或作為組合療法之給藥方案中。醫藥組合調配物或給藥方案中之第二化合物較佳地具有與組合中之ADC互補之活性，使得其彼此無不利影響。

第二化合物可為化療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或保心藥。該等分子合適地以有效達成預期目的之量組合存在。含有本發明ADC之醫藥組合物亦可具有治療有效量之化療劑，諸如微管蛋白形成抑制劑、拓撲異構酶抑制劑、DNA嵌入劑或DNA黏合劑。

其他治療方案可與投與根據本發明鑑別之抗癌劑組合。組合療法可以同時或連續方案投與。當連續投與時，可以兩次或兩次以上投藥來投與組合。該組合投藥包括使用獨立調配物或單一醫藥調配物共同投藥及以任一次序連續投藥，其中較佳地當所有(兩種或兩種以上)活性藥劑同時發揮其生物活性時存在一段時間。

在一實施例中，以ADC治療涉及組合投與半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體-藥物結合物，及一或多種化療劑、治療性生物劑或生長抑制劑，包括共同投與不同化療劑之混合物。化療劑包括(但不限於)紫杉烷(諸如太平洋紫杉醇及歐洲紫杉醇)；含鉑化合物，諸如卡波鉑；EGFR抑

制劑，諸如埃羅替尼及吉非替尼；酪胺酸激酶抑制劑，諸如伊馬替尼；及蔥環黴素抗生素（諸如阿黴素或多星（doxil））。與半胱胺酸工程化抗MUC16抗體或其抗體-藥物結合物組合使用之治療性生物藥劑包括貝伐單抗（Avastin®）或帕妥珠單抗（pertuzumab）（Omnitarg™，Genentech Inc）。可根據製造者說明或如熟習此項技術者憑經驗確定來使用該等化療劑之製備及給藥時程。該化療之製備及給藥時程亦描述於 "Chemotherapy Service", (1992)出版，M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md中。

ADC可與抗激素化合物，例如抗雌激素化合物，諸如他莫昔芬；抗孕酮，諸如奧那司酮（EP 616812）；或抗雄激素，諸如氟他胺以關於該等分子已知之劑量組合。當待治療之癌症為激素非依賴性癌症時，可預先使患者經受抗激素療法且在癌症變為激素非依賴性後，向患者投與ADC（及視情況之本文所述之其他藥劑）。亦向患者共同投與保心藥（以防止或減少與療法相關之心肌功能異常）或一或多種細胞激素可為有益的。除以上治療方案以外，可使患者經受外科手術移除癌細胞及/或放射療法。

以上共同投與之任何藥劑之合適劑量為目前所使用之劑量且可因新鑑別之藥劑與其他化療劑或治療之組合作用（協同作用）而降低。

組合療法可提供"協同作用"且顯示出"協同性"，亦即在一起使用活性成份時所達成之效應大於獨立使用該等化合

物產生之效應總和。協同效應可在活性成份：(1)以組合單位劑量調配物共調配且同時投與或傳遞；(2)以獨立調配物形式交替或同時傳遞；或(3)藉由一些其他方案實現。當以交替療法傳遞時，可在連續投與或傳遞化合物(例如藉由以獨立注射器不同注射)時實現協同效應。一般而言，在交替療法期間，連續(亦即順次)投與有效劑量之各活性成份，而在組合療法中，一起投與有效劑量之兩種或兩種以上活性成份。

抗體-藥物結合物之代謝物

本文所述之ADC化合物之活體內代謝產物亦在本發明之範疇內，以至於該等產物相較於先前技術為新穎且不顯著的。該等產物可(例如)由所投與化合物之氧化、還原、水解、醯胺化、酯化、酶促裂解及其類似作用產生。因此，本發明包括藉由包含使本發明化合物與哺乳動物接觸足以產生其代謝產物之時段的方法而產生之新穎且不顯著之化合物。

通常藉由製備經放射性標記(例如 ^{14}C 或 ^3H)ADC，將其以可偵測劑量(例如大於約0.5 mg/kg)非經腸投與諸如大鼠、小鼠、豚鼠、猴子之動物或人，允許足夠時間進行代謝(通常約30秒至30小時)且自尿、血液或其他生物樣本中分離其轉化產物來鑑別代謝產物。此等產物由於其經標記而易於分離(其他產物係藉由使用能夠結合存活於代謝物中之抗原決定基之抗體而分離)。代謝物結構係以習知方式，例如藉由MS、LC/MS或NMR分析來測定。一般而

言，代謝物分析係以與熟習此項技術者熟知之習知藥物代謝研究相同之方式進行。轉化產物(只要其未見於活體內)適用於本發明ADC化合物之治療性給藥之診斷檢定。

製品

在本發明之另一實施例中，提供一種含有適用於治療上述病症之物質的製品或"套組"。該製品包含容器及容器上或與容器相聯之標籤或包裝仿單。包裝仿單可指通常包括於治療性產品之商業包裝中且含有關於使用該等治療產品之適應症、用法、劑量、投藥、禁忌症及/或警告之資訊的說明書。合適容器包括(例如)瓶、小瓶、注射器、發泡包裝等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。

在一實施例中，製品包含容器及含於該容器內之半胱氨酸工程化抗MUC16抗體或其抗體-藥物結合物之調配物。該物品視情況可另外包含附於容器上之標籤，或包括於容器中之包裝仿單，其提及所關注組合物於治療性治療或診斷偵測腫瘤之用途。容納調配物之容器有效儲存及傳遞治療劑且可能具有無菌接取孔(例如容器可為靜脈內溶液袋或具有可為皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。標籤或包裝仿單指示該調配物係用於治療諸如癌症之選定病況。其他或另外，製品可另外包含含有醫藥學上可接受之緩衝劑之第二(或第三)容器，該等緩衝劑諸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可另外包括其他就商業及使用者觀點而言所需之物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

以下實例僅係出於說明之目的而提供，且不意欲以任何方式限制本發明之範疇。

本說明書中所引用之所有專利及參考文獻之全文係以引用的方式併入本文中。

實例

除非另有說明，否則實例中所提及之市售試劑係根據製造者說明使用。以下實例中所鑑別及在整個說明書中以ATCC寄存編號鑑別之彼等細胞之來源為美國菌種保存中心(American Type Culture Collection), Manassas, VA。

實例1 製備抗MUC16 3A5抗體

人類化及嵌合3A5抗MUC16 3A5抗體(圖3及4)係根據WO 2007/001851製備，其序列及抗體係以引用的方式併入。

輕鏈胺基酸係根據Kabat編號(Kabat等人，**Sequences of proteins of immunological interest**, (1991)第5版，US Dept of Health and Human Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。除按Kabat系統標註處以外，根據EU編號系統對重鏈胺基酸編號(Edelman等人(1969)Proc. Natl. Acad of Sciences 63(1):78-85)。使用單字母胺基酸縮寫。

表現且純化呈A117C變異體之人類化(thio hu)及嵌合(thio ch)半胱胺酸工程化抗MUC16 3A5單株抗體，其包括兩個實施例：

thio hu 抗 MUC16 HC A117C 3A5 : MW=144834.84 ;
pI=8.28 ; pI(氧化C)=8.79 ; 長度=1320 ; 延長係數(280)=

1.61。重鏈 446 aa；MW：48952.23，pI：8.55，pI(經氧化 c)：9.12，延長係數(280)：1.70；在計算前修剪去潛在信號序列(MGWSCIILFLVATATGVHS)。長度=19；DNA起始位置：987，DNA終止位置：2324，圖1，SEQ ID NO:1，輕鏈 214 aa；MW：23483.20，pI：6.71，pI(經氧化之 c)：6.72，延長係數(280)：1.43；在計算前修剪去潛在信號序列(MGWSCIILFLVATATGVHS)。長度=19；DNA起始位置：7103，DNA終止位置：7744，圖1，SEQ ID NO:2。

thio ch抗MUC16 HC A117C：MW=145118.9；pI=7.99；pI(經氧化 C)=8.44；長度=1320；延長係數(280)=1.59。重鏈 446 aa；MW：49236.50，pI：8.29，pI(經氧化 c)：8.85，延長係數(280)：1.66；在計算前修剪去潛在信號序列(MGWSCIILFLVATATGAYA)。長度=19；DNA起始位置：987，DNA終止位置：2324，圖2，SEQ ID NO:3。輕鏈 214 aa；MW：23340.96，pI：6.71，pI(經氧化 c)：6.72，延長係數(280)：1.44；在計算前修剪去潛在信號序列(MGWSCIILFLVATATGVHS)。長度=19；DNA起始位置：7103，DNA終止位置：7744。圖2，SEQ ID NO:4

實例2 藉由還原及再氧化製備供結合之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體

表現於CHO細胞中之全長半胱胺酸工程化抗MUC16單株抗體(ThioMab)帶有半胱胺酸加合物(半胱胺酸)或由於細胞培養條件而於工程化半胱胺酸上麩胱甘肽化。為釋放工程化半胱胺酸之反應性硫醇基，在37°C下將ThioMab溶解於

pH值約為8.0之500 mM硼酸鈉及500 mM氯化鈉中且以約50-100倍過量之1 mM TCEP(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽；Getz等人(1999) Anal. Biochem.第273卷：73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)還原約1-2小時。或者，可將DTT用作還原劑。藉由非還原性SDS-PAGE或藉由變性逆相HPLC PLRP管柱層析來監測鏈間雙硫鍵之形成。將經還原之ThioMab(圖6)稀釋且負載於pH值為5之10 mM乙酸鈉中之HiTrap S管柱上，且以含有0.3 M氯化鈉之PBS溶離。將經溶離之還原ThioMab以pH值為7之2 mM脫氫抗壞血酸(dhAA)處理3小時，或在室溫下以2 mM硫酸銅(CuSO_4)水溶液處理隔夜。周圍空氣氧化亦可為有效的。將緩衝劑藉由經Sephadex G25樹脂溶離而交換且以含有1 mM DTPA之PBS溶離。硫醇/Ab值係藉由自溶液在280 nm下之吸光率測定經還原抗體之濃度且藉由與DTNB(Aldrich, Milwaukee, WI)反應測定硫醇濃度且測定在412 nm下之吸光率來檢驗。

標準3A5抗體之三種主要糖型之理論質量為：147407、147568及147731 Da。在標準3A5抗體之去卷積質量譜中所觀測到的質量為147410、147569及147734 Da，與所預期之理論質量良好一致。thio 3A5抗體之三種主要糖型之理論質量為147469、147631及147793 Da。去卷積質譜中所觀測到之thio-3A5抗體質量(異質且不良解析)大約為147774、147904及148061。異質性係由於在兩個新引入之半胱氨酸上存在封端基團(通常為半胱氨酸或麩胱甘肽)之

混合物。

在質量範圍擴展之TSQ Quantum Triple四極質譜儀(Thermo Electron, San Jose California)上進行液相層析/質譜分析。將樣本於PRLP-S, 1000 Å微孔管柱(50 mm×2.1 mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK)上層析, 加熱至75°C。使用30-40% B之線性梯度(溶劑A: 水中0.05% TFA, 溶劑B: 乙腈中0.04% TFA)且使用電噴霧源直接電離溶離液。藉由Xcalibur數據系統來收集數據且使用ProMass(Novatia, LLC, New Jersey)進行去卷積。在LC/MS分析之前, 在37°C下以PNGase F(每毫升2單位; PROzyme, San Leandro, CA)處理抗體或藥物結合物(50 µg)2小時來移除N連接之碳水化合物。

將疏水性相互作用層析(HIC)樣本注入丁基HIC NPR管柱(2.5 µm, 4.6 mm×3.5 cm)(Tosoh Bioscience)上且在0.8 ml/min下, 以0至70% B之線性梯度溶離(A: pH值為7之50 mM磷酸鉀中1.5 M硫酸銨, B: pH值為7之50 mM磷酸鉀, 20%異丙醇)。使用裝備有多波長偵測器及Chemstation軟體之Agilent 1100系列HPLC系統來解析且定量具有不同每抗體藥物比率之抗體種類。

實例3 半胱胺酸工程化抗MUC16抗體與藥物-連接子中間物之結合

實例2之還原及再氧化程序後, 將半胱胺酸工程化抗MUC16抗體溶解於PBS(磷酸鹽緩衝生理食鹽水)緩衝劑中且在冰上冷卻。將相對於每抗體之工程化半胱胺酸約1.5

莫耳當量之具有硫醇反應性官能基(諸如順丁二醯亞胺基)之阿瑞他汀藥物連接子中間物，諸如MC-MMAE(順丁烯二醯亞胺己醯基-單甲基阿瑞他汀E)、MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE 或 MC-val-cit-PAB-MMAF 溶解於 DMSO 中，於乙腈及水中稀釋且添加至PBS中之經冷卻、還原、再氧化之抗體中。約一小時後，添加過量的順丁烯二醯亞胺中止反應且將任何未反應的抗體硫醇基封端。藉由離心超濾濃縮反應混合物且將半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物藉由經由PBS中G25樹脂溶離而純化且脫鹽，在無菌條件下經0.2 µm過濾器過濾且冷凍以供儲存。

藉由以上程序，製備以下半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物：

藉由A117C thio hu 3A5與MC-MMAF之結合製備thio hu 3A5-MC-MMAF；

藉由A117C thio hu 3A5與MC-val-cit-PAB-MMAE之結合製備thio hu 3A5-MC-val-cit-PAB-MMAE；

藉由A117C thio ch 3A5與MC-MMAF之結合製備thio ch 3A5-MC-MMAF；及

藉由A117C thio ch 3A5與MC-val-cit-PAB-MMAE之結合製備thio ch 3A5-MC-val-cit-PAB-MMAE。

實例4 活體外細胞增殖檢定

抗體-藥物結合物之活體外效能係藉由細胞增殖檢定量測(圖10及11)。CellTiter-Glo[®]發光細胞生存力檢定為可購得的(Promega Corp., Madison, WI)基於鞘翅目螢光素酶重

組表現(US 5583024、US 5674713、US 5700670)之均質檢定法。此細胞增殖檢定基於所存在之ATP量(指示代謝活性細胞)來測定培養物中之活細胞數(Crouch等人(1993)J. Immunol. Meth. 160:81-88; US 6602677)。以96孔形式進行CellTiter-Glo[®]檢定，使其經受自動高產率篩檢(HTS)(Cree等人(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404)。均質檢定程序涉及直接向於補充有血清之培養基中培養之細胞中添加單一試劑(CellTiter-Glo[®]試劑)。

均質"添加-混合-量測"形式致使細胞分解且產生與所存在ATP量成比例之發光信號。將受質、甲蟲螢光素由重組螢火蟲螢光素酶氧化脫羧，伴隨以ATP轉化為AMP且產生光子。以相對發光單位(RLU)反映活細胞。藉由光度計或CCD攝影機成像裝置記錄數據。發光輸出係以隨時間量測之RLU表示。或者，可在閃爍體存在下，於閃爍計數器中對來自發光之光子進行計數。接著可以每秒之計數CPS來表示光單位。

藉由採用以下方案，由CellTiter Glo發光細胞生存力檢定，Promega Corp. Technical Bulletin TB288及Mendoza等人(2002) Cancer Res. 62:5485-5488改編之細胞增殖檢定來量測ADC功效：

1. 將於培養基中之50 μ l細胞培養物等分試樣沈積於96孔不透明壁培養盤之各孔中，該細胞培養物含有約1000(PC3)或3000(OVCAR-3)細胞：(1)表現MUC16多肽之細胞株OVCAR-3；(2)經工程化以於細胞表面上穩定表現

MUC16多肽之PC3產生之細胞株(PC3/MUC16)；及(3)不表現MUC16多肽之PC3細胞株(PC3/neo)。

2. 將ADC(50 ml)添加至三個重複實驗孔中至9000、3000、1000、333、111、37、12.4、4.1或1.4 ng/mL之最終濃度，其中"無ADC"對照孔僅接受培養基，且將其培育3(PC3)或5(OVCAR-3)天。

3. 將培養盤平衡至室溫歷時約30分鐘。

4. 添加CellTiter-Glo試劑(100 ml)。

5. 將內容物於回轉式震盪器上混合2分鐘以誘導細胞分解。

6. 將培養盤在室溫下培育10分鐘以使發光信號穩定。

7. 以RLU=相對發光單位於圖中記錄且報導發光。繪製0.46 ng/ml下來自以無ADC之培養基培育之細胞的數據。

培養基：使PC3/neo及PC3/MUC16生長於50/50/10% FBS/麩醯胺酸/250 µg/mL G-418，OVCAR-3生長於RPMI/20% FBS/麩醯胺酸中

實例5 藥物動力學-血清清除率及穩定性

藉由在對Sprague-Dawley雌性大鼠進行單次靜脈內快速給藥後量測抗體或藥物結合物之血清濃度來分析抗MUC16抗體-藥物結合物在活體內之處置。以使用抗MMAE進行俘獲且使用經生物素標記MUC16胞外域(ECD)及抗生蛋白鏈菌素辣根過氧化物酶(HRP)進行偵測之ELISA來量測具有至少一細胞毒性藥物之抗體-藥物結合物濃度(圖12)。以使用MUC16 ECD進行俘獲且使用抗人類Fc HRP作為二次

抗體之ELISA來量測血清中std ch 3A5及thio ch3A5之總濃度。此檢定量測具有及不具有結合MMAE之任何抗MUC16抗體。該等檢定在1:100之最小稀釋下具有16.4 ng/mL之量化下限。使用IV快速輸入、一級消除及大速率常數之二室模型(模型8, WinNonlin Pro v.5.0.1, Pharsight Corporation, Mountain View, CA)來分析來自各動物之血清濃度-時間數據。總適合度係基於初級及次級參數之預測估算, 預測之標準誤差及變異係數百分比, 以及對所觀測與所預測之濃度-時間數據之間的剩餘曲線圖的檢視。個別初級PK參數包含分別與 α 及 β 相相關之零時截距(A及B)及小速率常數(α 及 β)。使用以下模型化選擇: 使用WinNonlin測定初始估算; 藉由所預測濃度平方之倒數($1/\hat{y}^2$)來加權濃度; 使用Nelder-Mead最小化演算法。量測PK參數AUC、CL、 C_{\max} 、MRT、 $t_{1/2,a}$ 、 $t_{1/2,b}$ 、 V_1 及 V_{ss} 且結果包括:

參數	裸3A5 Ab	總thio ch 3A5	thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	總std ch 3A5	std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE
劑量(mg/kg)	3 *	3 *	3 *	3#	3#
CL(毫升/天/公斤)	8.70±3.56	7.76±1.25	15.9±1.69	9.74	39.0
V1(毫升/公斤)	47.6±3.81	32.5±2.01	33.4±2.44		
$T^{1/2}, \alpha$ (天)	0.721±0.0833	0.345±0.0481	0.410±0.0880		
$T^{1/2}, \beta$ (天)	9.50±3.33	8.83±1.49	4.89±0.402		

* 0.5 mg/kg劑量下之相似參數

#使用來自0.5 mg/kg及5 mg/kg劑量之數據內插

實例6 動物毒性

藉由在第1天單次注射：標準 ch 3A5-VC-MMAE($24.19 \text{ mg/kg} = 1934 \text{ } \mu\text{g/m}^2$)、thio ch 3A5-VC-MMAE($49.99 \text{ mg/kg} = 1934 \text{ } \mu\text{g/m}^2$)及對照媒劑來對青春期雌性大鼠($100\text{-}125$ 公克)進行12天之急性毒性研究。以靜脈內快速注射來注射測試物品。每日量測體重。於第5天及第12天進行臨床化學、血清酶及血液學分析。毒性信號包括臨床觀測到重量減輕。

在另一研究中，以特定劑量水平之標準及thio人類化抗MUC16 ADC對正常Sprague-Dawley大鼠給藥一次(第1天)。劑量水平係以 $\mu\text{g/m}^2$ MMAE(由結合化學計量導出之每體表面積之細胞毒性藥物劑量)及 mg/kg IgG為單位。舉例而言，"TDC 1500/36.4"表示以 36.4 mg/kg IgG給藥之thio ADC，其在每個IgG 1.6個藥物下對應於 $1500 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ MMAE。在研究第5天(給藥後四天)及第12天(臨處死前)自大鼠抽取血液用於血液學檢驗(嗜中性白血球數)及血清化學檢驗(血清AST含量)。給藥後，每日稱重大鼠；量測相對於第1天體重隨時間之變化。

需要較高劑量之thio ADC來減少獼猴體內之嗜中性白血球數。在兩個獨立研究中，於第1天及第22天以下列各物對雌性中國獼猴給藥：標準人類化抗MUC16 ADC(5.9 mg/kg IgG= $1200 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ MMAE；白色條狀圖)； 12.8 mg/kg IgG之thio ADC($1200 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ MMAE；淺灰色條狀圖)； 25.6 mg/kg IgG之thio ADC($2400 \text{ } \mu\text{g/m}^2$ MMAE；深灰色條狀

圖)；或38.4 mg/kg IgG之thio ADC($3600 \mu\text{g}/\text{m}^2$ MMAE；黑色條狀圖)。以指定之時間間隔抽取血液用於血液學及血清化學檢驗(第22天之值係來自第二次給藥之前)。使平均循環嗜中性白血球數標準化至同一研究指定時間點來自經媒劑處理之猴子之平均數。嗜中性白血球含量之最低點出現在給藥後大約一週，隨後在三週內恢復至正常含量。

實例7 腫瘤生長抑制，活體內功效小鼠模型

使用雌性SCID米色小鼠(Charles River實驗室)來進行功效研究。所有研究係根據實驗動物養護及使用導則(Institute of Laboratory Animal Resources, "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"(NIH公開號85-23). Washington (DC): National Academy Press; 1996.)來進行。如所述(Chen等人(2007)Cancer Res 67:4924-4932)採用OVCAR-3乳房脂肪墊移植功效模型，評估雌性C.B-17 SCID米色小鼠(Charles River實驗室)在單次靜脈內給藥後之腫瘤體積。OVCAR-3/螢光素酶模型亦已於先前描述且使用雌性C.B-17 SCID小鼠(Charles River實驗室)。

使用自具有腹膜內腫瘤之小鼠切除之腫瘤來形成OVCAR-3乳房脂肪墊移植模型，接著將其順次繼代入接受小鼠之乳房脂肪墊中。當腫瘤達到約 $150\text{-}200 \text{ mm}^3$ 之體積時，將小鼠分為五組，每組十隻小鼠且如所述給藥。根據式： $V(\text{mm}^3) = 0.5A \times B^2$ ，使用測徑規量測腫瘤體積，其中A及B分別為長直徑及短直徑。在腫瘤體積達到 3000 mm^3 前或當腫瘤展示即將發生潰瘍之跡象時，對小鼠施以安樂

死。將自各實驗組收集之數據表示為平均數 \pm SE。

為測試半胱胺酸工程化抗MUC16抗體藥物結合物之活體內功效，將每隻SCID小鼠 2×10^7 個OVCAR-3細胞(總共110隻小鼠)一次接種於乳房脂肪墊中且使其在注射後生長14-21天。當腫瘤體積達到150-200 mm³(通常在接種後第14天至第21天)時，將小鼠分離為8個不同組，每組9-10隻小鼠且測定各小鼠之腫瘤體積，如下：

組	樣本	劑量
A	媒劑(PBS)	
B	ADC緩衝劑	
C	std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	1.5 mg/kg
D	std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	3.0 mg/kg
E	std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	6.0 mg/kg
F	thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	1.5 mg/kg
G	thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	3.0 mg/kg
H	thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE	6.0 mg/kg

實例8 流式細胞分析及活體外研究

將OVCAR-3細胞(每個樣本30000個細胞)於冰上以1 mL總體積與人類化標準或thio抗MUC16 MAbs一起培育75分鐘。以於PBS+1% FBS+2 mM EDTA中25、50、100、200及400 ng/mL應用抗體。在此培育後，將細胞洗滌且接著與經藻紅蛋白標記之山羊抗人類Fc二次抗體一起培育(在冰上培育一小時)。接著將細胞洗滌且藉由流式細胞分析法分析。 3×10^4 OVCAR-3細胞表現大約 1×10^{10} 個抗MUC16

抗體 3A5 之結合位點。即使所測試之最低抗體濃度(25 ng 或約 1×10^{11} 個抗體)亦提供相較於結合位點莫耳過量之抗體。因此，結合降低時之濃度(藉由流式細胞分析偵測)反映抗體對 MUC16 之親和力。

以 96 孔形式評定 PC3/neo(MUC16 陰性)、PC3/MUC16 及 OVCAR-3 細胞中抗體-藥物結合物存在下之細胞增殖。藉由表面電漿共振及藉由酶聯結免疫吸附檢定(ELISA)，使用習知程序來測定抗 MUC16 變異體之結合親和力。

應瞭解，上述書面說明足以使熟習該項技術者能夠實施本發明。本發明之範疇不受限於所寄存之構築體，因為所寄存之實施例預期為本發明某些態樣之單一說明且功能上等效之任何構築體均在本發明之範疇內。本文材料之寄存並不承認本文所含之書面說明不足以使本發明任何態樣(包括其最佳模式)之實踐成為可能，亦不認為其將申請專利範圍之範疇限制於其所提出之特定說明。實際上，根據上述說明，除本文中所展示及描述者以外，本發明之各種修正對於熟習此項技術者而言將變得顯而易見且屬於隨附申請專利範圍之範疇。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示人類化半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體 A117C thio hu 3A5 之重鏈序列：SEQ ID NO:1 及輕鏈序列：SEQ ID NO:2。

圖 2 展示嵌合半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體 A117C thio ch 3A5 之重鏈序列：SEQ ID NO:3 及輕鏈序列：SEQ ID

NO:4。

圖 3 展示人類化曲妥珠單抗輕鏈(HuTMAB-LC，SEQ ID NO:5)、人類化 std 3A5 抗 MUC16 輕鏈(Hu3A5-LC，SEQ ID NO:2)及嵌合 std 3A5 抗 MUC16 輕鏈(Ch3A5-LC，SEQ ID NO:4)序列之對準。編號係根據依序編號慣例。

圖 4 展示人類化曲妥珠單抗重鏈(HuTMAB-HC，SEQ ID NO:6)、人類化 std 3A5 抗 MUC16 重鏈(Hu3A5-HC，SEQ ID NO:7)及嵌合 std 3A5 抗 MUC16 重鏈(Ch3A5-HC，SEQ ID NO:8)之對準。編號係根據依序編號慣例。標記標示之依序編號位置 281 實際上為 278(Kabat 275；Eu 279)。

圖 5 展示半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體藥物結合物(ADC)之圖示，其中藥物部分係附著至輕鏈(LC-ADC)；重鏈(HC-ADC)及 Fc 區(Fc-ADC)中之工程化半胱胺酸基上。

圖 6 展示以下步驟：(i)使半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體(ThioMab)中之半胱胺酸二硫化物加合物及鏈間及鏈內雙硫鍵還原；(ii)部分氧化(亦即再氧化)以重新形成鏈間及鏈內雙硫鍵；及(iii)使再氧化之抗體與藥物-連接子中間物結合以形成半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體藥物結合物(ADC)。

圖 7 展示結合反應產物之 HIC(疏水性相互作用層析)層析圖：(頂部)std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE；及(底部)thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，其中 std ch 3A5 為稱為 3A5 之親本嵌合抗 MUC16 抗體且 thio ch 3A5 為半胱胺酸工程化嵌合抗 MUC16 3A5 抗體。

圖 8 展示還原及去糖基化後，結合反應產物之質譜分析：(頂部)std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE；及(底部)thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE。

圖 9 匯總藉由聯合液相層析及質譜(LC-MS)分析標準人類化 3A5-VC-MMAE 結合物(Hu3A5-VC-MMAE)及兩種對應 thio 結合物製備物(Thio Hu3A5-VC-MMAE)所偵測之主要種類。在用以破壞鏈間雙硫鍵之還原條件("還原(DTT)")下及在天然條件下("完整")分析蛋白質。

圖 10 展示以每毫升 0.1 至 10000 ng 之不同濃度之 ADC 處理之 MUC16 表現(PC3/MUC16)腫瘤細胞及非 MUC16 表現(PC3 親本)腫瘤細胞的活體外細胞增殖檢定結果曲線，其包括：(A) std hu 3A5(v4b.52)-MC-vc-PAB-MMAE，3.5 MMAE/Ab 負載，PC3/MUC16；(B) thio hu 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.9 MMAE/Ab 負載，PC3/MUC16；(C) thio hu 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.60 MMAE/Ab 負載，PC3/MUC16；(D) std hu 3A5(v4b.52)-MC-vc-PAB-MMAE，3.5 MMAE/Ab 負載，PC3 親本；(E) thio hu 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.9 MMAE/Ab 負載，PC3 親本；及(F) thio hu 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.60 MMAE/Ab 負載，PC3 親本。Std ch 3A5 為稱作 3A5 之親本嵌合抗 MUC16 抗體，且 thio ch 3A5 為半胱氨酸工程化嵌合抗 MUC16 3A5 抗體。

圖 11 展示包括以每毫升 1.4 至 9000 ng 不同濃度之 ADC 處理之腫瘤細胞的活體外細胞增殖檢定結果曲線，其包括：

(A) std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, 3.1 MMAE/Ab 負載, PC3/MUC16 細胞; (B) thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, 1.6 MMAE/Ab 負載, PC3/MUC16 細胞; (C) std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, 3.1 MMAE/Ab 負載, PC3/neo 細胞; (D) thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, 1.6 MMAE/Ab 負載, PC3/neo 細胞; (E) std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, 3.1 MMAE/Ab 負載, OVCAR-3 細胞; (F) thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE, 1.6 MMAE/Ab 負載, OVCAR-3 細胞。Std ch 3A5 為稱作 3A5 之親本嵌合抗 MUC16 抗體, 且 thio ch 3A5 為半胱胺酸工程化嵌合抗 MUC16 3A5 抗體。繪製 0.46 ng/ml 下來自接受無 ADC 之培養基之細胞的數據。

圖 12 展示在對大鼠單次投與 3 mg/kg: thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE 及 std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE 後藉由量測總抗體及 ADC 獲得之血漿清除率隨時間之藥物動力學曲線。藉由轉換來自 5 mg/kg 劑量之數據來模擬 std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE 曲線; 此結合物之藥物動力學在 0.5 mg/kg 至 5 mg/kg 範圍內成線性, 支持 3 mg/kg 內插之有效性。

圖 13 展示藉由量測嗜中性白血球(頂部左側)、血清 AST(頂部右側)及血小板(底部右側), 大鼠體內 ch 3A5-VC-MMAE 及 thio ch 3A5-VC-MMAE 在 $1934 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 細胞毒性藥物曝露下之毒性。

圖 14 展示以媒劑(琥珀酸鹽緩衝劑); $24.19 \text{ mg}/\text{kg} = 1934 \mu\text{g}/\text{m}^2$ ch 3A5-VC-MMAE; $49.99 \text{ mg}/\text{kg} = 1934 \mu\text{g}/\text{m}^2$ thio ch

3A5-VC-MMAE給藥之大鼠(每組6隻)體重隨時間的變化。

圖 15 展示在單次給與：媒劑(10 mL/kg琥珀酸鹽緩衝劑)；6 mg/kg=328 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ std hu 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，3.5 MMAE/Ab負載或6 mg/kg=150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ thio hu 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.6 MMAE/Ab負載後，具有OVCAR-3乳房脂肪墊之SCID米色小鼠活體內平均腫瘤體積隨時間的變化。

圖 16 展示單次給與：A)媒劑(PBS)；B) ADC緩衝劑；C)std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.5 mg/kg；D) std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，3.0 mg/kg；E) std ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，6.0 mg/kg；F) thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，1.5 mg/kg；G) thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，3.0 mg/kg；H)thio ch 3A5-MC-vc-PAB-MMAE，6.0 mg/kg後，具有OVCAR-3乳房脂肪墊腫瘤之SCID米色小鼠活體內平均腫瘤體積隨時間的變化。

圖 17 展示於第1天及第22天，在1200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 藥物(5.9 mg/kg抗體)之藥物曝露下以標準抗MUC16-MC-vc-PAB-MMAE ADC給藥及在1200、2400及3600 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 之藥物曝露下，以thio抗MUC16-MC-vc-PAB-MMAE ADC(TDC)給藥之獼猴的安全性研究。給藥後8天、22天(第二次給藥前)、32天及43天量測嗜中性白血球含量。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 半胱氨酸工程化之抗 MUC16 抗体及抗体药物结合物

<130> P2435R1 PCT

<140> 097116902

<141> 2008-05-07

<150> US 60/916,657

<151> 2007-05-08

<160> 40

<210> 1

<211> 446

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化学合成

<400> 1

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

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

Asn	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly
				35					40					45

Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Thr	Tyr
				50					55					60

Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser
				65					70					75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Trp	Thr	Ser	Gly	Leu	Asp	Tyr
				95					100					105

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys
				110					115					120

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser
				125					130					135

Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
				140					145					150

Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
				155					160					165

Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
				170					175					180

Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
				185					190					195

Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
				200					205					210

Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys
				215					220					225

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

Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp Leu Ile His
 20 25 30
 Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Trp Thr Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 110 115 120
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu

125	130	135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	Lys Val Gln Trp Lys Val	
140	145	150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser	Gln Glu Ser Val Thr Glu	
155	160	165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr Leu Thr	
170	175	180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr Ala Cys Glu	
185	190	195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro	Val Thr Lys Ser Phe Asn	
200	205	210
Arg Gly Glu Cys		

<210> 3
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 3
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
 35 40 45
 Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Gln Phe Phe Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Asp Gly Gly Leu Thr Tyr
 95 100 105
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Cys Ser Thr Lys
 110 115 120
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 125 130 135
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 140 145 150
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 155 160 165
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 170 175 180
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 185 190 195
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 200 205 210
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 215 220 225
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

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

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Phe Leu Ser Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Asp Leu Ile His
 20 25 30
 Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg
 35 40 45
 Leu Leu Ile Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Asp Tyr Thr Leu Ser Ile
 65 70 75
 Ala Ser Leu Gln Thr Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Trp Thr Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

	110		115		120
Ser Asp Glu Gln	Leu Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val Cys	Leu		
	125		130		135
Leu Asn Asn Phe	Tyr Pro Arg Glu Ala	Lys Val Gln Trp Lys	Val		
	140		145		150
Asp Asn Ala Leu	Gln Ser Gly Asn Ser	Gln Glu Ser Val Thr	Glu		
	155		160		165
Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser	Leu Ser Ser Thr Leu	Thr		
	170		175		180
Leu Ser Lys Ala	Asp Tyr Glu Lys His	Lys Val Tyr Ala Cys	Glu		
	185		190		195
Val Thr His Gln	Gly Leu Ser Ser Pro	Val Thr Lys Ser Phe	Asn		
	200		205		210
Arg Gly Glu Cys					

<210> 5
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

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

<210> 6
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30
 Asp Thr Tyr Ile His Trp Val His Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
 95 100 105
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 185 190 195
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Gly Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 200 205 210
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 215 220 225
 Thr His Thr Gly Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala

320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly Phe	
365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp Gly	
395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg Trp	
410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu	
425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
440	445	450

<210> 7
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

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

200	205	210
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys 215	Asp Lys Thr His Thr Cys 220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 230	Gly Gly Pro Ser Val Phe 235	
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245	Leu Met Ile Ser Arg Thr 250	
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 260	Val Ser His Glu Asp Pro 265	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 275	Gly Val Glu Val His Asn 280	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln 290	Tyr Asn Ser Thr Tyr Ala 295	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 305	Gln Asp Trp Leu Asn Gly 310	
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 320	Lys Ala Leu Pro Ala Pro 325	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 335	Gly Gln Pro Arg Glu Pro 340	
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 350	Glu Glu Met Thr Lys Asn 355	
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 365	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 370	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 380	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 385	
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser 395	Asp Gly Ser Phe Phe Leu 400	
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 410	Arg Trp Gln Gln Gly Asn 415	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu 425	Ala Leu His Asn His Tyr 430	
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 440	Gly Lys 445	

<210> 8
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 8
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Asn Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30
 Asn Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
 35 40 45
 Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Tyr Thr Thr Tyr
 50 55 60
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Gln Phe Phe Leu His Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp

80	85	90
Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp	Asp Gly Gly Leu Thr Tyr	
95	100	105
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	Ser Ala Ala Ser Thr Lys	
110	115	120
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	Ser Ser Lys Ser Thr Ser	
125	130	135
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	Val Lys Asp Tyr Phe Pro	
140	145	150
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	Gly Ala Leu Thr Ser Gly	
155	160	165
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
170	175	180
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	Ser Ser Leu Gly Thr Gln	
185	190	195
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	Pro Ser Asn Thr Lys Val	
200	205	210
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	Asp Lys Thr His Thr Cys	
215	220	225
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	Gly Gly Pro Ser Val Phe	
230	235	240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg Thr	
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	Val Ser His Glu Asp Pro	
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val His Asn	
275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	Lys Ala Leu Pro Ala Pro	
320	325	330
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
335	340	345
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	Glu Glu Met Thr Lys Asn	
350	355	360
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
365	370	375
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	
380	385	390
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	Asp Gly Ser Phe Phe Leu	
395	400	405
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
410	415	420
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	Ala Leu His Asn His Tyr	
425	430	435
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	Gly Lys	
440	445	

<210> 9

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 9
 Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
 5 10

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 10
 Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Ser
 5 10

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 11
 Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 12
 Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 13
 Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
 5 10

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 14
 Val Ser Ala Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
 5 10

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

<400> 15

Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val Glu Val
5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

<400> 16

Lys Gly Phe Val Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
5 10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

<400> 17

Pro Pro Val Leu Asp Cys Gly Asp Ser Phe Phe
5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

<400> 18

Asp Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly
5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

<400> 19

Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser
5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

<400> 20

Leu Asn Ser Val Thr Cys Glu Asp Thr Ala Thr
5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 化學合成

200902554

<400> 21
Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
 5 10

<210>	22
<211>	11
<212>	PRT
<213>	人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 22
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 23
Val Ser Ala Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 24
Lys Phe Asn Trp Tyr Cys Asp Gly Val Glu Val
 5 10

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 25
Lys Gly Phe Val Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 26
Pro Pro Val Leu Asp Cys Gly Asp Ser Phe Phe
 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 27
Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 28
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 29
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 30
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 31
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 32
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 33
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 34

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 34
 Phe Leu Ser Val Ser Cys Gly Gly Arg Val Thr
 5 10

<210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 35
 Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
 5 10

<210> 36
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 36
 Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
 5 10

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 37
 Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 38
 Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
 5 10

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 化學合成

<400> 39
 Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
 5 10

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
<223> 化學合成

<400> 40
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
 5 10

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種半胱胺酸工程化之抗MUC16抗體，其係藉由以非交聯、反應性半胱胺酸胺基酸置換親本抗MUC16抗體之一或多個胺基酸而被工程化。本發明提供設計、製備、篩檢及選擇該等半胱胺酸工程化抗MUC16抗體之方法。半胱胺酸工程化抗MUC16抗體(Ab)係經由一連接子(L)與一或多個藥物部分(D)結合以形成具有式I之半胱胺酸工程化之抗MUC16抗體-藥物結合物：



其中 p 為 1 至 4。本發明揭示半胱胺酸工程化抗體藥物化合物及組合物之診斷及治療用途。

六、英文發明摘要：

Cysteine engineered anti-MUC16 antibodies are engineered by replacing one or more amino acids of a parent anti-MUC16 antibody with non cross-linked, reactive cysteine amino acids. Methods of design, preparation, screening, and selection of the cysteine engineered anti-MUC16 antibodies are provided. Cysteine engineered anti-MUC16 antibodies (Ab) are conjugated with one or more drug moieties (D) through a linker (L) to form cysteine engineered anti-MUC16 antibody-drug conjugates having Formula I:



where p is 1 to 4. Diagnostic and therapeutic uses for cysteine engineered antibody drug compounds and compositions are disclosed.

十、申請專利範圍：

1. 一種半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自SEQ ID NO：9-40之序列。
2. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體與MUC16多肽結合。
3. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其係藉由包含以半胱胺酸置換親本抗MUC16抗體之一或多個胺基酸殘基之方法來製備。
4. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中該一或多個游離半胱胺酸胺基酸殘基係位於輕鏈中。
5. 如請求項4之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其包含一或多個選自下列之序列：

EVQLCESGGG	SEQ ID NO:9
LRLSCCASGYS	SEQ ID NO:10
MNSLRCEDTAV	SEQ ID NO:11
TLVTVCSASTK	SEQ ID NO:12
VTVSSCSTKGP	SEQ ID NO:13
VSAASCKGPSV	SEQ ID NO:14
KFNWYCDGVEV	SEQ ID NO:15
KGFVPCDIAVE	SEQ ID NO:16
PPVLDCGDSFF	SEQ ID NO:17

6. 如請求項4之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其包含一或多個選自下列之序列：

DVQLCESGPG	SEQ ID NO:18
LSLTCCVTGYS	SEQ ID NO:19
LNSVTCEDTAT	SEQ ID NO:20
TLVTVCSASTK	SEQ ID NO:21
VTVSSCSTKGP	SEQ ID NO:22
VSAASCKGPSV	SEQ ID NO:23
KFNWYCDGVEV	SEQ ID NO:24
KGFVPCDIAVE	SEQ ID NO:25
PPVLDCGDSFF	SEQ ID NO:26

7. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中該一或多個游離半胱胺酸胺基酸殘基係位於重鏈中。
8. 如請求項7之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其包含一或多個選自下列之序列：

SLSASCGDRV	SEQ ID NO:27
EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:28
TVAAPCVFIFP	SEQ ID NO:29
FIFPPCDEQLK	SEQ ID NO:30
DEQLKCGTASV	SEQ ID NO:31
VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:32
GLSSPCTKSFN	SEQ ID NO:33

9. 如請求項7之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其包含一或多個選自下列之序列：

FLSVSC <u>G</u> GRVT	SEQ ID NO:34
EIKRTCAAPSV	SEQ ID NO:35
TVAAPC <u>V</u> FIFP	SEQ ID NO:36
FIFPPCDEQLK	SEQ ID NO:37
DEQLKCGTASV	SEQ ID NO:38
VTEQDCKDSTY	SEQ ID NO:39
GLSSPCTKSFN	SEQ ID NO:40

10. 如請求項1之半胱氨酸工程化抗MUC16抗體，其包含含有以下序列之重鏈序列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITNDYAWNWRQAPGKGLEWVGYSISYSGYTTY
 NPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWTSGLDYWGQGTLVTVSSCSTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:1

11. 如請求項1之半胱氨酸工程化抗MUC16抗體，其包含含有以下序列之輕鏈序列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGATSLETGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYWTTPTFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
 LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:2

12. 如請求項1之半胱氨酸工程化抗MUC16抗體，其包含含有以下序列之重鏈序列：

DVQLQESGPGLVNPSQSLSLTCTVTGYSTNDYAWNWIQFPGNKLEWMGYINYSGYTTY
 NPSLKSRISITRDTSKNQFFLHLNSVTTEDTATYYCARWDGGLTYWGQGLTVTVSACSTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3

13. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其包含含有以下序列之輕鏈序列：

DIQMTQSSSFLSVSLGGRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPS
 RFGSGSGNDYTLSTIASLQTEDAATYYCQQYWTTPFTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:4

14. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中該親本抗MUC16抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗體及人類化抗體。
15. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其為抗體片段。
16. 如請求項15之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中該抗體片段為Fab片段。
17. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其係選自嵌合抗體、人類抗體或人類化抗體。
18. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其係於細菌中產生。
19. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其係於CHO細胞中產生。
20. 一種測定懷疑含有MUC16蛋白之樣本中存在MUC16蛋白

之方法，該方法包含以下步驟：

將該樣本曝露於具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自 SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，及；

測定該樣本中該抗體與該MUC16蛋白之結合，其中該抗體與該蛋白質之結合指示該樣本中存在該蛋白質。

21. 如請求項20之方法，其中該樣本包含表現該MUC16蛋白之細胞。
22. 如請求項20之方法，其中該細胞為卵巢癌細胞、乳癌細胞、肺癌細胞或胰臟癌細胞。
23. 如請求項20之方法，其中該抗體係共價附著至選自螢光染料、放射性同位素、生物素或金屬錯合配位體之標記。
24. 如請求項1之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，其中該抗體係共價附著至阿瑞他汀(auristatin)藥物部分，藉由形成抗體-藥物結合物。
25. 一種醫藥調配物，其包含具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自 SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。
26. 一種抗體-藥物結合化合物，其包含具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自 SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體(Ab)，及阿瑞他汀藥物部分(D)，其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係經由一或多個游

離半胱胺酸胺基酸，由連接子部分(L)附著至D；該化合物具有式I：



其中p為1、2、3或4。

27. 如請求項26之抗體-藥物結合化合物，其中p為2。

28. 如請求項26之抗體-藥物結合化合物，其中L具有下式：



其中：

A為共價附著至該半胱胺酸工程化抗體(Ab)之半胱胺酸硫醇之延伸單元(Stretcher unit)；

a為0或1；

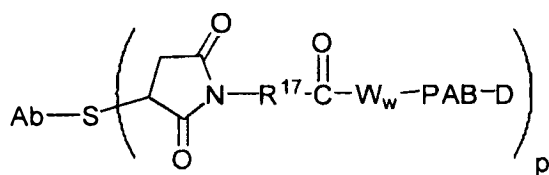
各W獨立為胺基酸單元；

w為0至12範圍內之整數；

Y為共價附著至該藥物部分之間隔單元(Spacer unit)；且

y為0、1或2。

29. 如請求項28之抗體-藥物結合化合物，其具有下式：



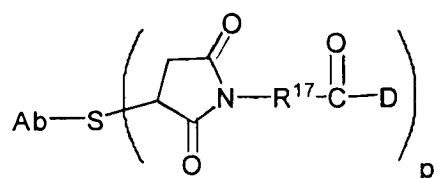
其中PAB為對胺基苄基胺甲鹽基，且R¹⁷為選自下列基團之二價基團：(CH₂)_r、C₃-C₈碳環基、O-(CH₂)_r、伸芳基、(CH₂)_r-伸芳基、-伸芳基-(CH₂)_r-、(CH₂)_r-(C₃-C₈碳環基)、(C₃-C₈碳環基)-(CH₂)_r、C₃-C₈雜環基、(CH₂)_r-(C₃-C₈雜環基)、-(C₃-C₈雜環基)-(CH₂)_r-、-(CH₂)_rC(O)NR^b(CH₂)_r-

、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 及 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r-$ ，其中 R^b 為 H 、 C_1-C_6 烷基、苯基或苄基；且 r 獨立為1至10範圍內之整數。

30. 如請求項28之抗體-藥物結合化合物，其中 W_w 為纈胺酸-瓜胺酸。

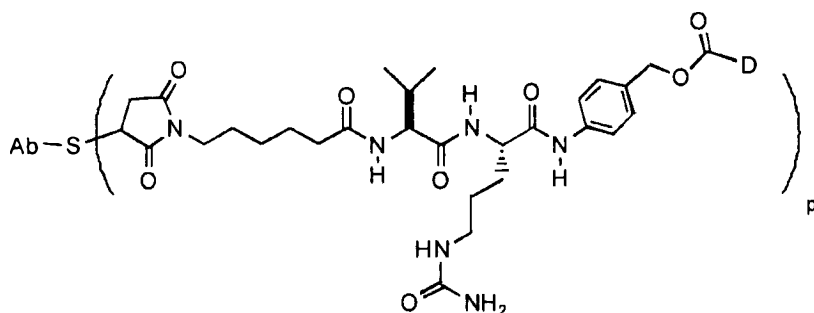
31. 如請求項28之抗體-藥物結合化合物，其中 R^{17} 為 $(\text{CH}_2)_5$ 或 $(\text{CH}_2)_2$ 。

32. 如請求項28之抗體-藥物結合化合物，其具有下式：



33. 如請求項32之抗體-藥物結合化合物，其中 R^{17} 為 $(\text{CH}_2)_5$ 或 $(\text{CH}_2)_2$ 。

34. 如請求項28之抗體-藥物結合化合物，其具有下式：

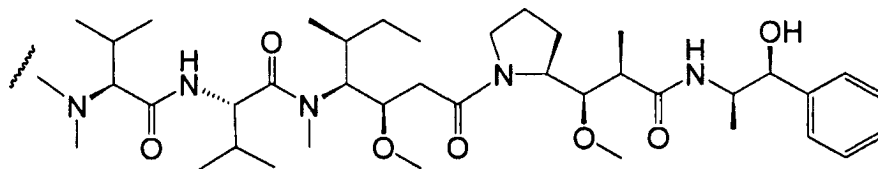


35. 如請求項26之抗體藥物結合化合物，其中 L 為 MC-val-cit-PAB 或 MC 。

36. 如請求項26之抗體-藥物結合化合物，其中 L 為由連接試

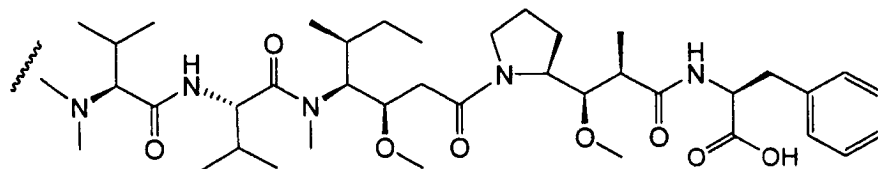
劑 SMCC、BM(PEO)₂ 或 BM(PEO)₃ 形成之連接子。

37. 如請求項 26 之抗體-藥物結合化合物，其中 D 為具有以下結構之 MMAE：



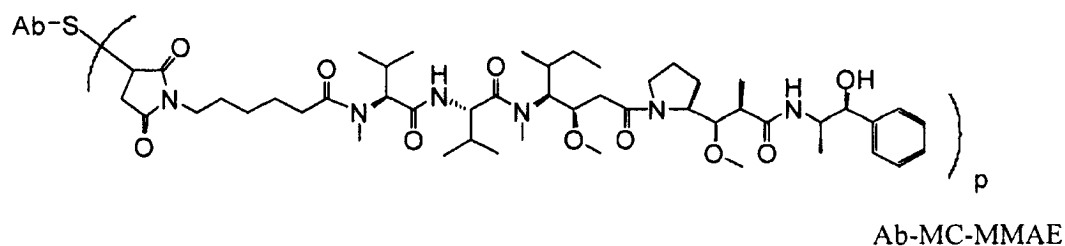
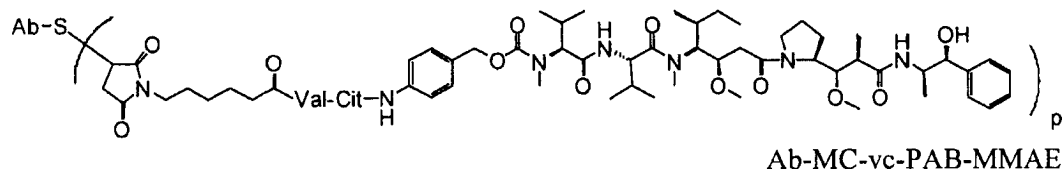
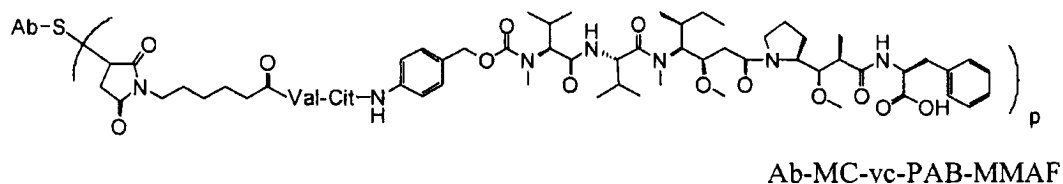
其中波形線表示與連接子 L 之附著位點。

38. 如請求項 26 之抗體-藥物結合化合物，其中 D 為具有以下結構之 MMAF：

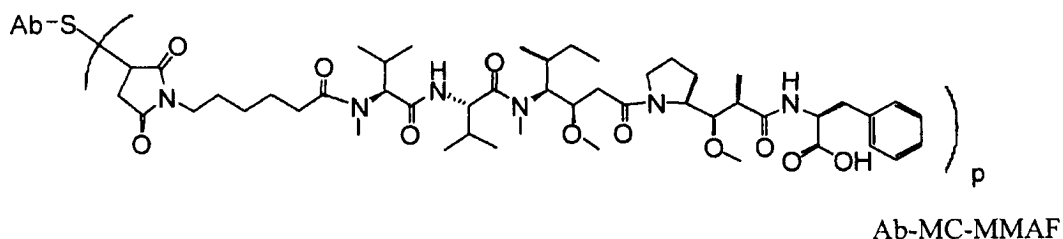


其中波形線表示與連接子 L 之附著位點。

39. 如請求項 26 之抗體-藥物結合化合物，其中該半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗體及人類化抗體。
40. 如請求項 26 之抗體-藥物結合化合物，其中該半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體為抗體片段。
41. 如請求項 40 之抗體-藥物結合化合物，其中該抗體片段為 Fab 片段。
42. 一種抗體-藥物結合化合物，其係選自以下結構：



及



其中 Val 為纈胺酸；Cit 為瓜胺酸；p 為 1、2、3 或 4；且 Ab 為具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自 SEQ ID NO:9-40 之序列之半胱胺酸工程化抗 MUC16 抗體。

43. 如請求項 42 之抗體藥物結合化合物，其中 Ab 包含 SEQ ID NO:1。
44. 如請求項 42 之抗體藥物結合化合物，其中 Ab 包含 SEQ ID NO:2。
45. 如請求項 42 之抗體藥物結合化合物，其中 Ab 包含 SEQ ID NO:3。

46. 如請求項42之抗體藥物結合化合物，其中Ab包含SEQ ID NO:4。
47. 如請求項42之抗體藥物結合化合物，其中Ab包含SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2。
48. 如請求項42之抗體藥物結合化合物，其中Ab包含SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4。
49. 一種抑制細胞增殖之方法，其包含以包含具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體且其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係共價附著至阿瑞他汀藥物部分的抗體-藥物結合物處理細胞培養基中之哺乳動物腫瘤細胞，藉此抑制腫瘤細胞增殖。
50. 如請求項49之方法，其中該等哺乳動物腫瘤細胞為卵巢瘤細胞。
51. 一種醫藥調配物，其包含包括具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，且其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係共價附著至阿瑞他汀藥物部分的抗體-藥物結合物，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。
52. 如請求項51之醫藥調配物，其另外包含治療有效量之選自來曲唑(letrozole)、奧賽力鉑(oxaliplatin)、歐洲紫杉醇(doxetaxel)、5-FU、拉帕替尼(lapatinib)、卡西他賓(capecitabine)、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、埃羅替尼(erlotinib)、帕妥珠單抗(pertuzumab)、貝伐單抗

(bevacizumab)及吉西他濱(gemcitabine)之化療劑。

53. 一種醫藥調配物之用途，其係用於製造供治療癌症之藥劑，其中該醫藥調配物包含包括具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，且其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係共價附著至阿瑞他汀藥物部分之抗體藥物結合物，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

54. 如請求項53之用途，其中該癌症係選自由前列腺癌、尿道癌、胰臟癌、肺癌、乳癌、結腸癌及卵巢癌組成之群。

55. 如請求項53之用途，其中向患者投與化療劑與該抗體-藥物結合化合物之組合，其中該化療劑係選自來曲唑、順鉑(cisplatin)、卡波鉑(carboplatin)、紫杉酚(taxol)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、奧賽力鉑、歐洲紫杉醇、5-FU、甲醯四氫葉酸、埃羅替尼、帕妥珠單抗、貝伐單抗、拉帕替尼及吉西他濱。

56. 一種製品，其包含：

醫藥調配物，其包含包括具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體，且其中該半胱胺酸工程化抗MUC16抗體係共價附著至阿瑞他汀藥物部分的抗體-藥物結合物，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑；

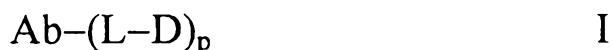
容器；及

指示該化合物可用以治療以MUC16多肽之過度表現為

特徵之癌症的包裝仿單或標籤。

57. 如請求項56之製品，其中該癌症為卵巢癌、前列腺癌、尿道癌、胰臟癌、肺癌、乳癌或結腸癌。

58. 一種製造抗體藥物結合化合物之方法，該抗體藥物結合化合物包含具有一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自 SEQ ID NO:9-40之序列之半胱胺酸工程化抗MUC16抗體 (Ab)，及阿瑞他汀藥物部分(D)，其中該半胱胺酸工程化抗體係經由該一或多個工程化半胱胺酸胺基酸，由連接子部分(L)附著至D；該化合物具有式I：



其中p為1、2、3或4；該方法包含以下步驟：

(a) 使該半胱胺酸工程化抗體之工程化半胱胺酸基與連接試劑反應以形成抗體-連接子中間物Ab-L；及

(b) 使Ab-L與活性藥物部分D反應；藉此形成該抗體-藥物結合化合物；

或包含以下步驟：

(c) 使藥物部分之親核基團與連接試劑反應以形成藥物-連接子中間物D-L；及

(d) 使D-L與該半胱胺酸工程化抗體之工程化半胱胺酸基反應；藉此形成該抗體-藥物結合化合物。

59. 如請求項58之方法，其另外包含於中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中表現該半胱胺酸工程化抗體之步驟。

60. 如請求項59之方法，其另外包含以還原劑處理該經表現之半胱胺酸工程化抗體之步驟。

61. 如請求項60之方法，其中該還原劑係選自TCEP及DTT。
62. 如請求項61之方法，其另外包含在以該還原劑處理後，
以氧化劑處理該經表現之半胱氨酸工程化抗體之步驟。
63. 如請求項62之方法，其中該氧化劑係選自硫酸銅、脫氫
抗壞血酸及空氣。

十一、圖式：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSITNDYAWNWRQAPGKGLEWVGYISYSGYT
 NPSLKSRTISRDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWTSGLDYWGQGLTVTVSSCSTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGATSLETGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQYWTTPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2

圖 1

DVQLQESGPGLVNPSQSLSLTCTVTGYSITNDYAWNWRQAPGKLEWVGYINYSYGYTTY
 NPSLKSRTISRDTSKNQFFLHLNSVTEDTATYYCARWDGGLTYWGQGLTVTVSACSTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
 LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 3

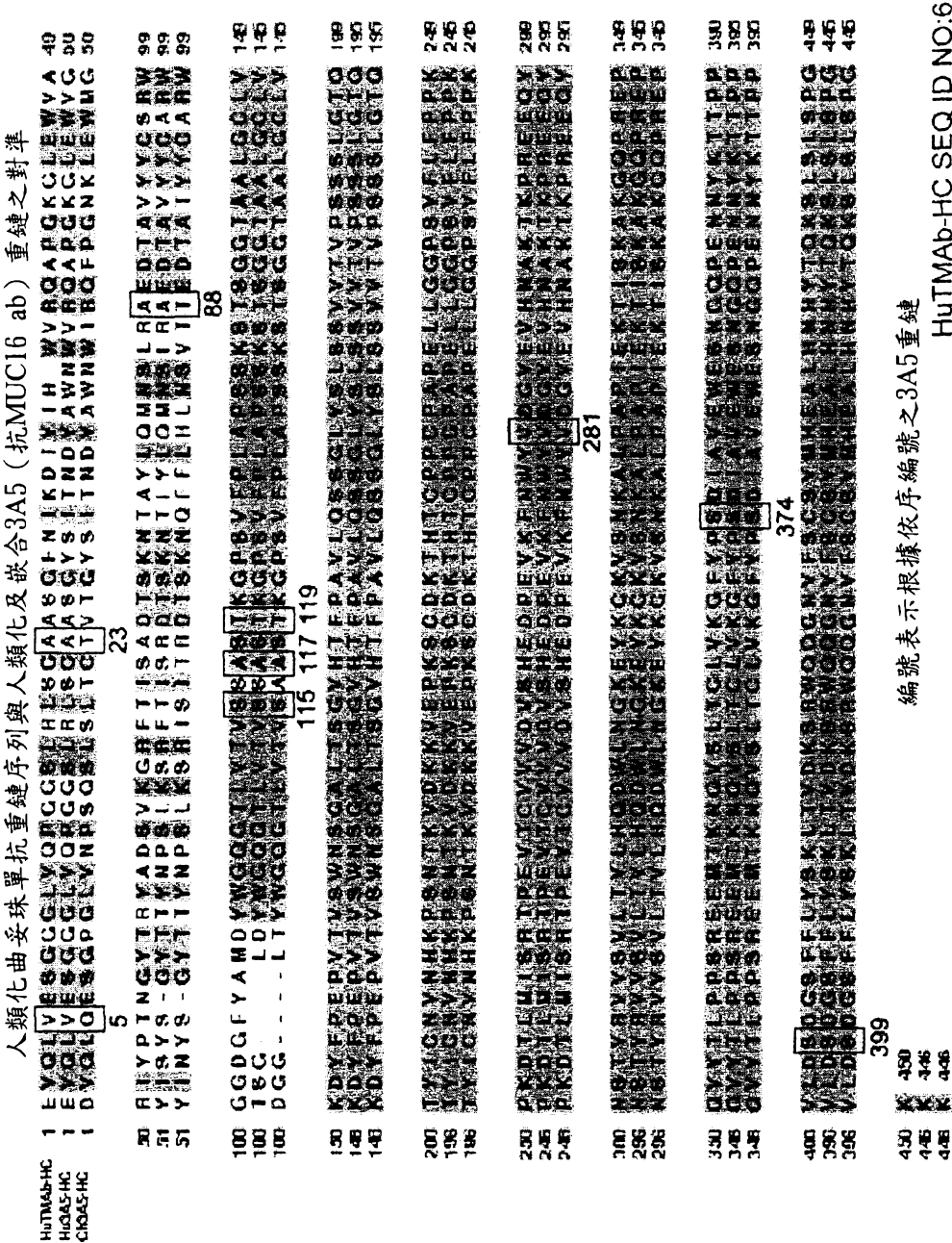
DIQMTQSSSFLSVSLGGRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPS
 RFSGSGSGNDYTLTSLASLTQEDAAATYYCQYWTTPFTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 4

圖 2

編號表示根據依序編號之3A5輕鏈

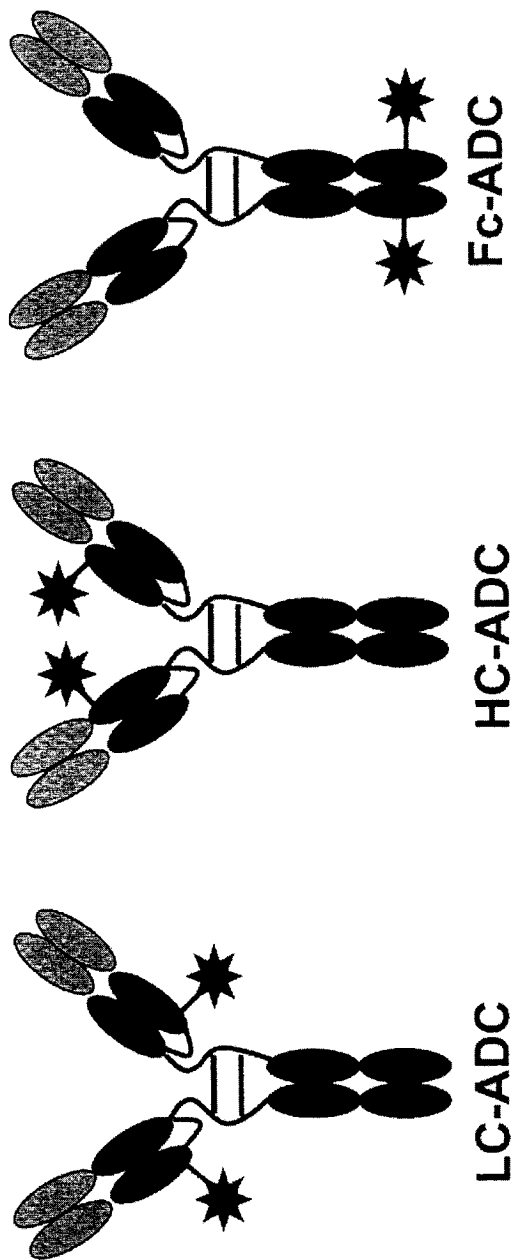
三回



編號表示根據依序編號之3A5重鏈

HuTMab-HC SEQ ID NO:6
Hu3A5-HC SEQ ID NO:7
Ch3A5-HC SEQ ID NO:8

圖4



★ - 藥物部分

圖5

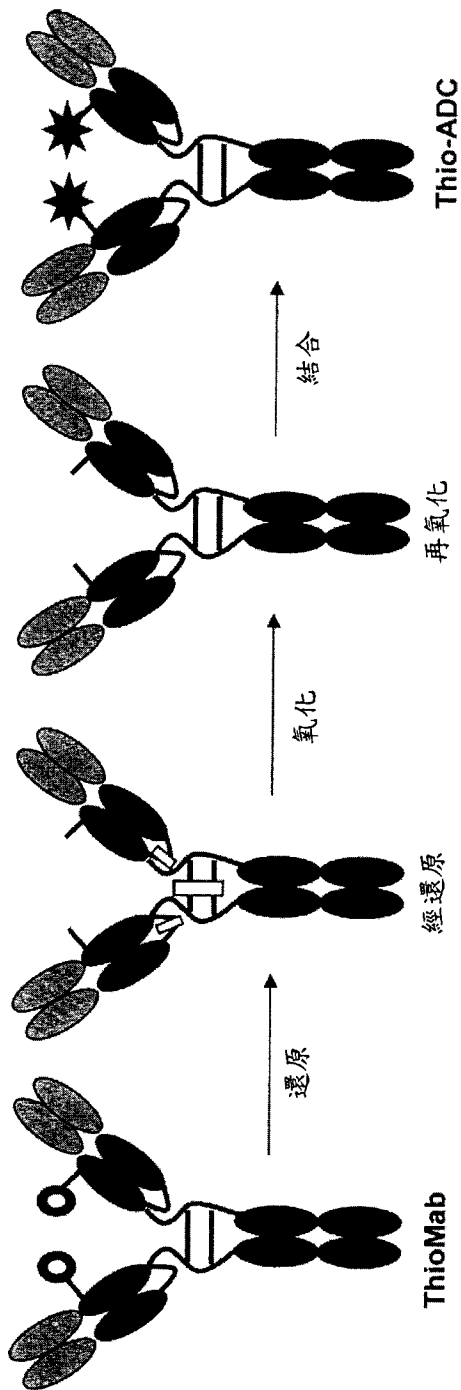


圖6

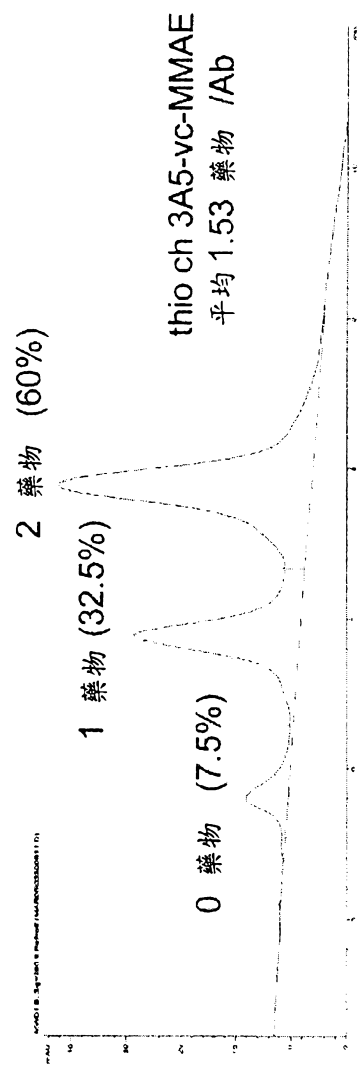
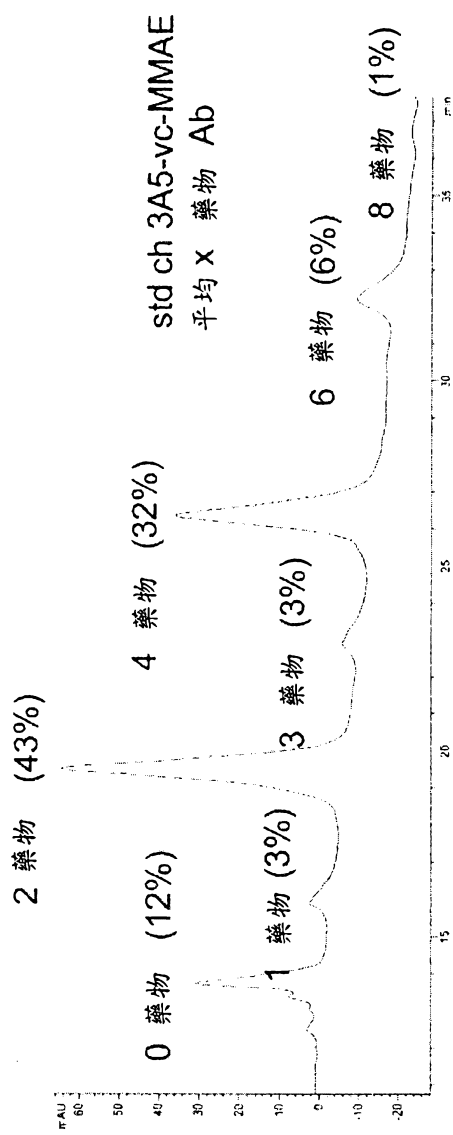


圖7

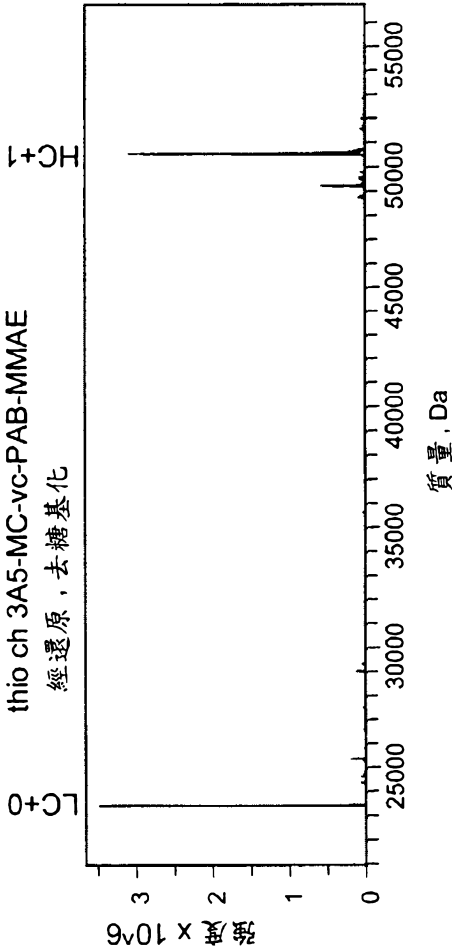
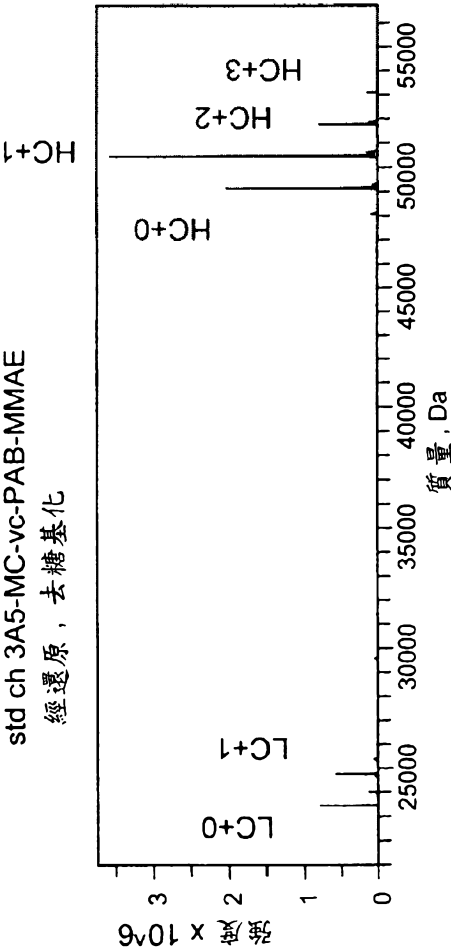


圖8

經結合抗體	還原 (DTT)	完整
Std Hu 3A5-VC-MMAE 每個IgG 3.5個藥物	LC LC + 1 MCvcPAB-MMAE LC+ 1 MCvcPAB HC HC + 1 MCvcPAB-MMAE HC + 2 MCvcPAB-MMAE HC + 3 MCvcPAB-MMAE	LC + 1 MCvc LC + 1 MCvcPAB LC + 1 MCvcPAB-MMAE HC + 1 MCvcPAB-MMAE HC + 3 MCvcPAB-MMAE LC/HC + 2 MCvcPAB-MMAE 2 HC + 2 MCvcPAB-MMAE LC/2HC + 1 MCvcPAB-MMAE
Thio Hu3A5-VC-MMAE 每個IgG 1.9個藥物	LC HC HC + 1 MCvcPAB-MMAE	完整 + 2 MCvcPAB-MMAE
Thio Hu3A5-VC-MMAE 每個IgG 1.6個藥物	LC HC HC + 1 MCvcPAB-MMAE	完整 + 2 MCvcPAB-MMAE 完整 + 1 MCvcPAB-MMAE + 1 MCvc

圖9

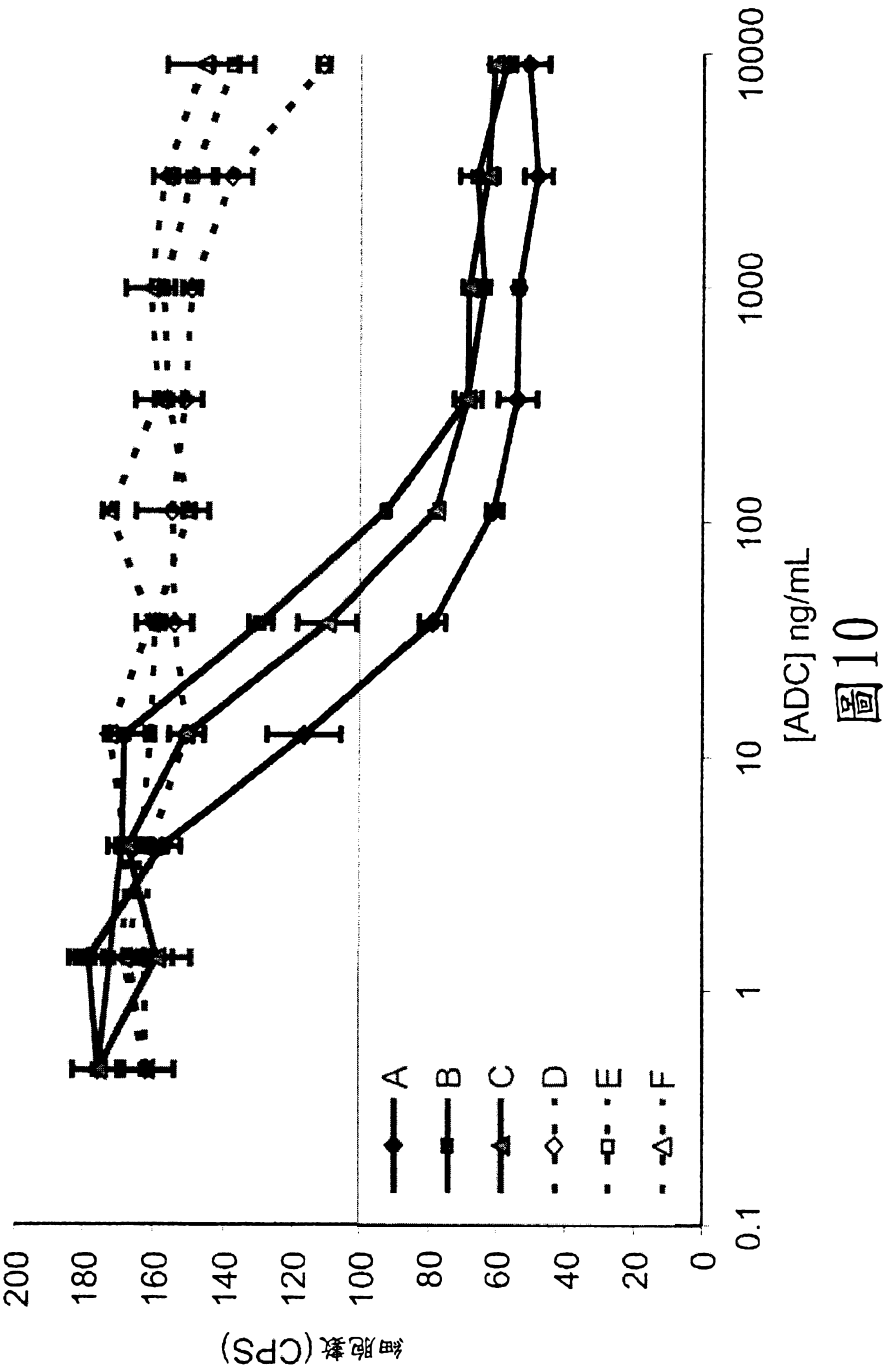


圖10

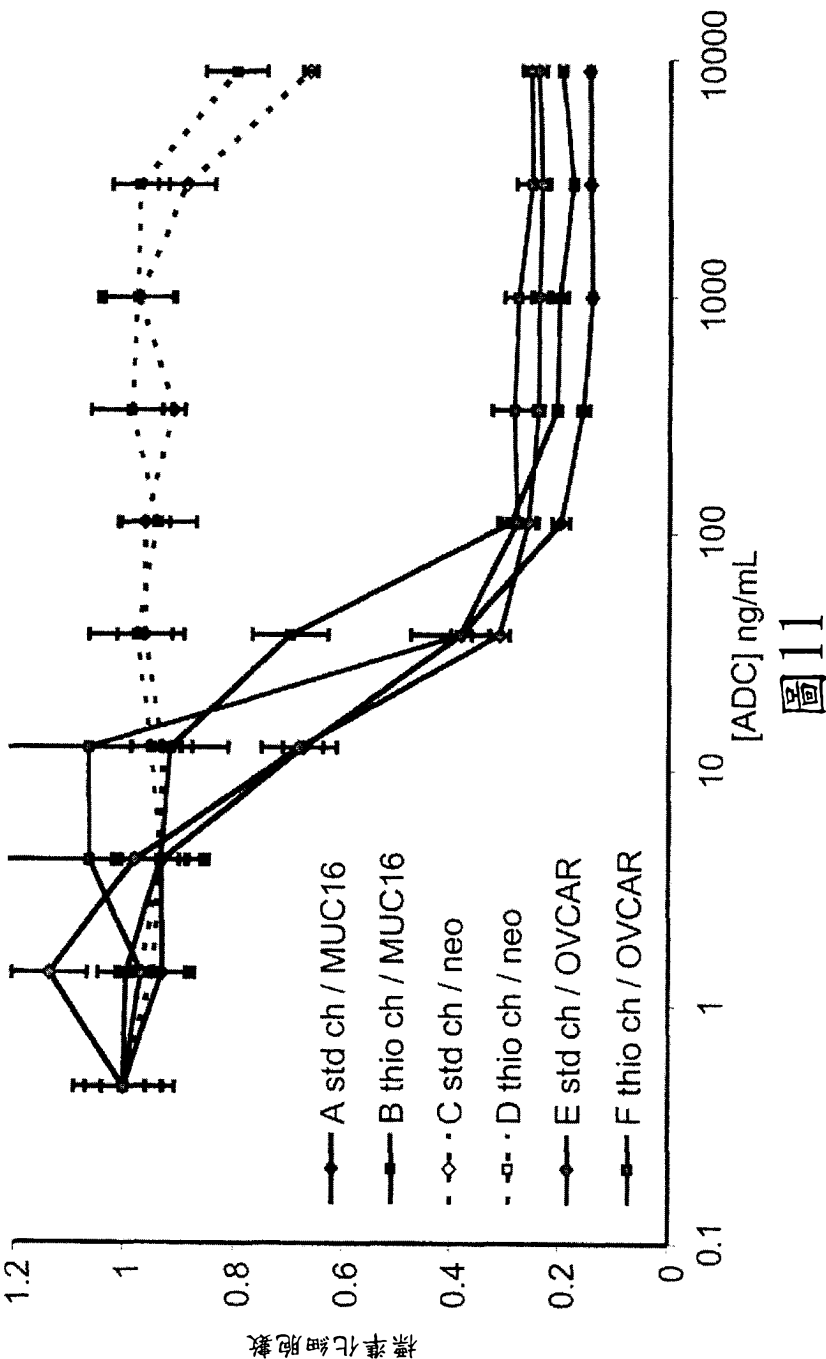


圖11

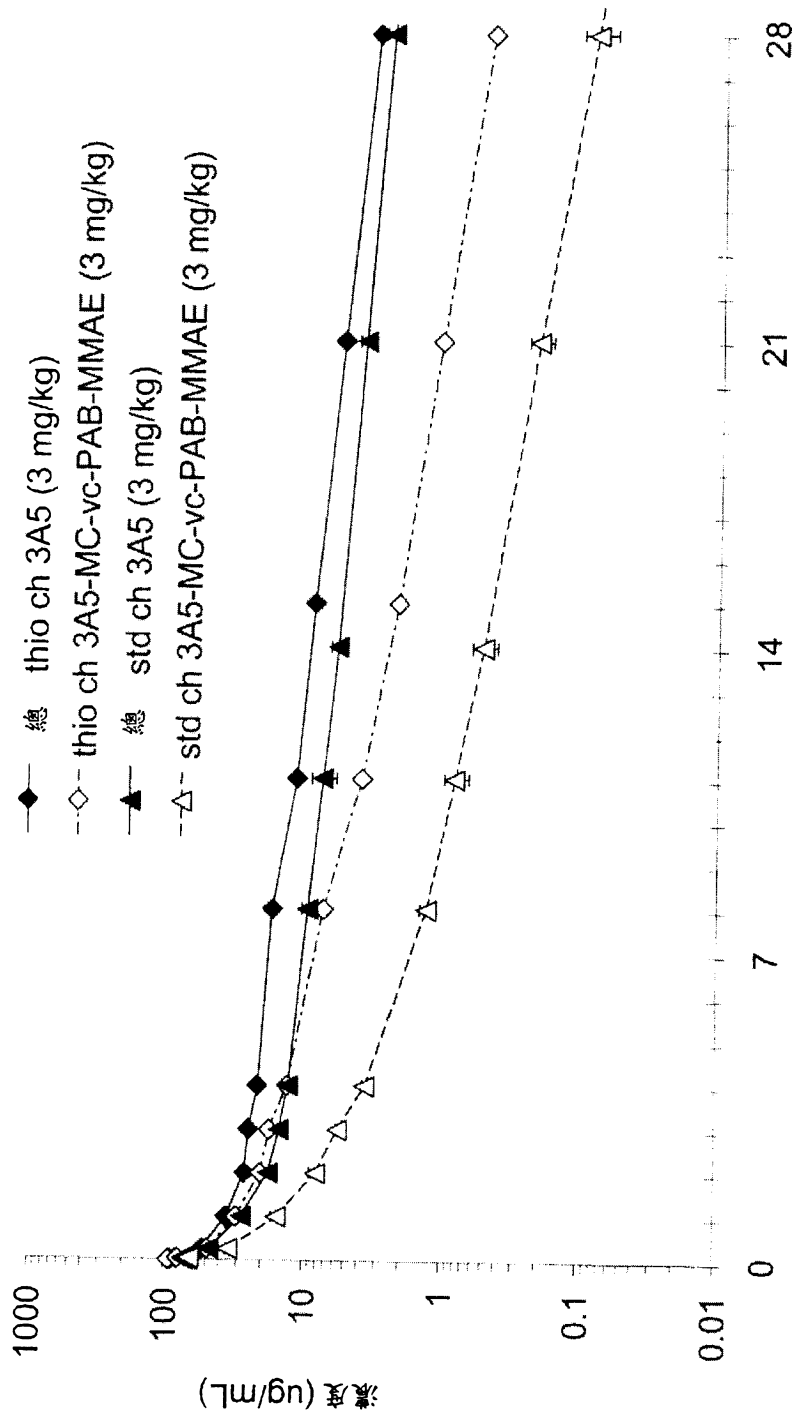


圖12

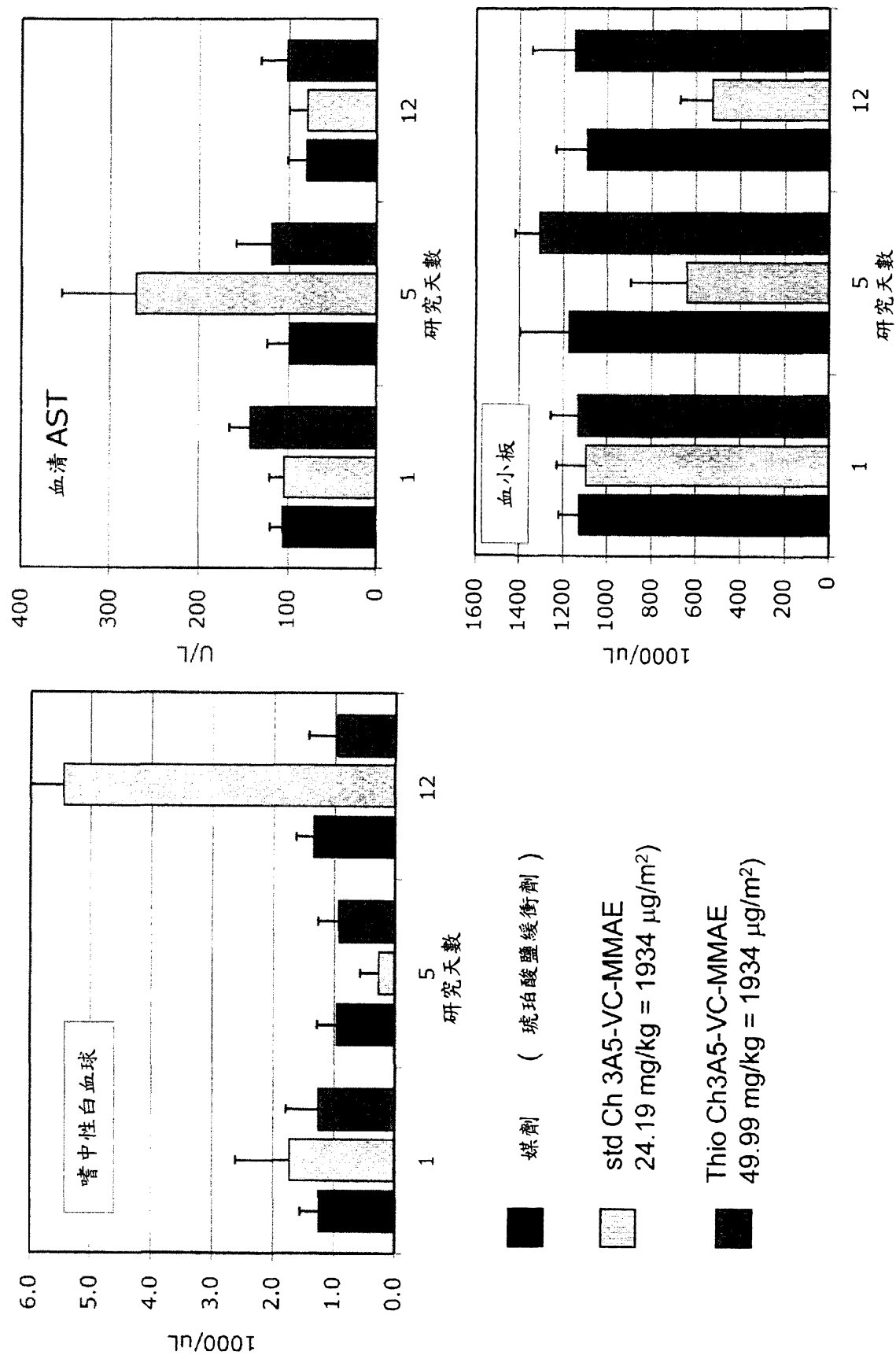


圖13

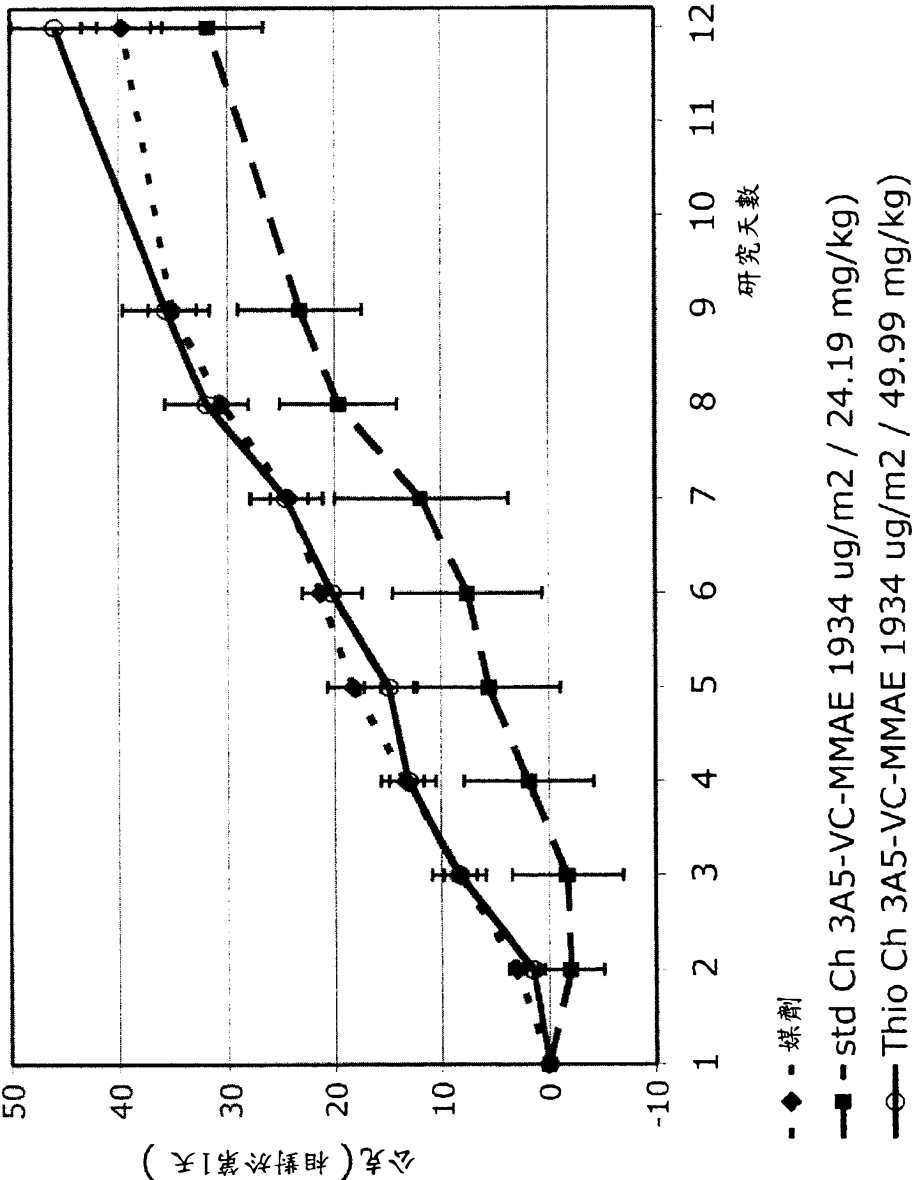


圖14

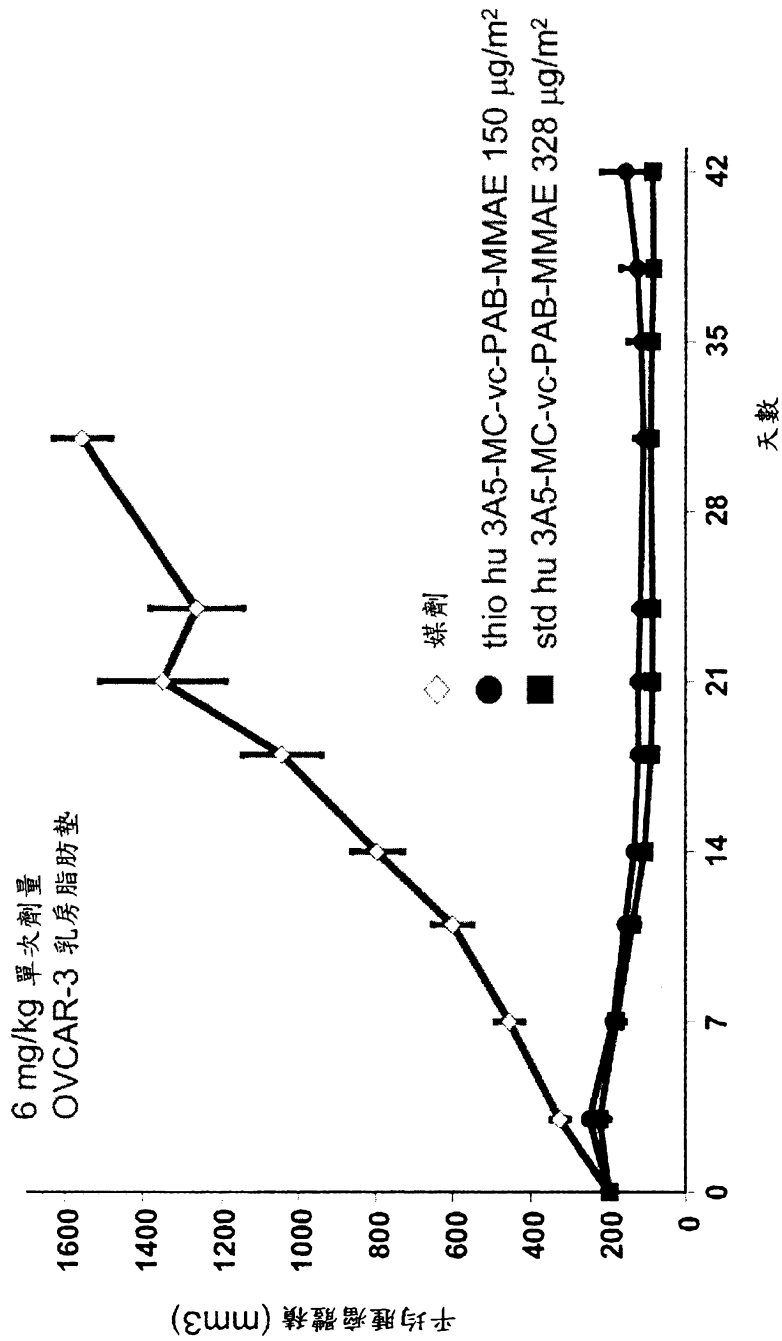


圖15

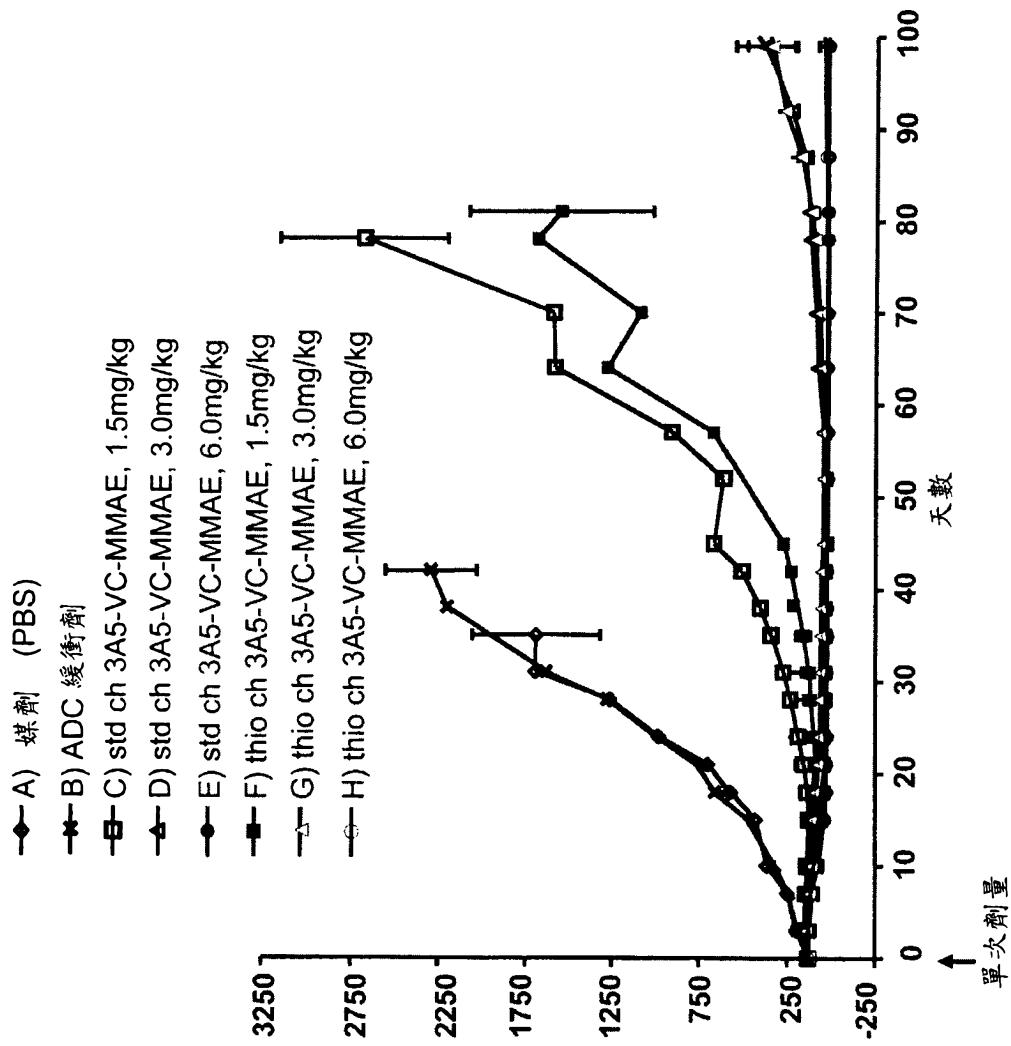


圖16

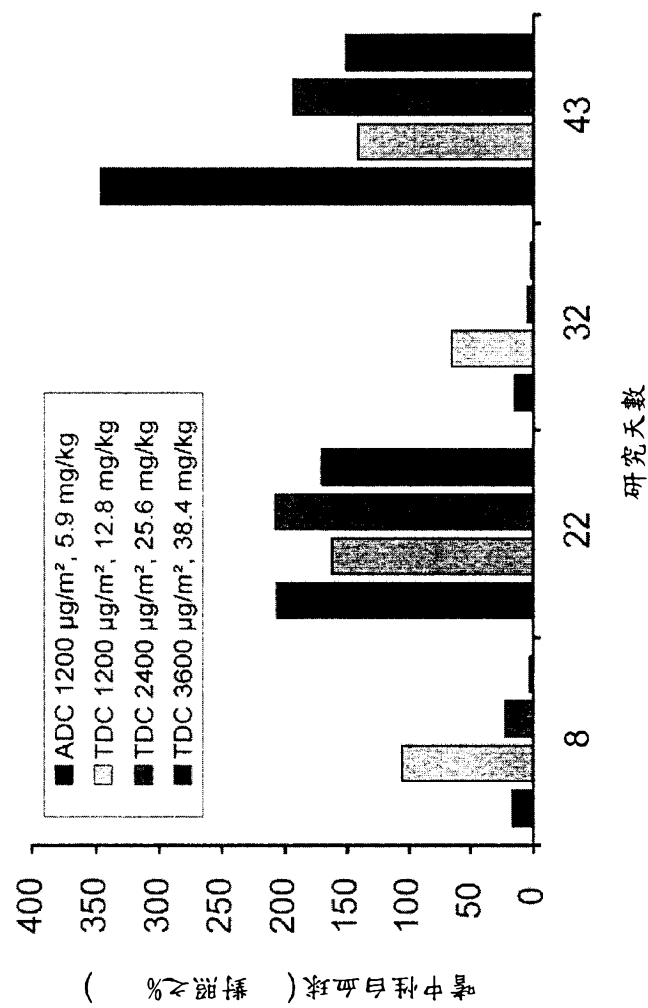


圖17

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)