



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I654995 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：104120020

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 22 日

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

A61K31/496 (2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

C07K16/28 (2006.01)

(30)優先權：2014/06/20 美國

62/015,321

(71)申請人：荷蘭商台醫（有限合夥）公司（荷蘭）BIOALLIANCE C. V. (NL)
荷蘭美商台醫國際股份有限公司（美國）ABGENOMICS INTERNATIONAL INC. (US)
美國

(72)發明人：林榮華 LIN, RONG-HWA (US)；林士瑤 LIN, SHIH YAO (TW)；謝昱祁 HSIEH, YU CHI (TW)；黃久珍 HUANG, CHIU CHEN (TW)；李叔樟 LEE, SHU HUA (TW)；蔡育英 TSAI, YU YING (TW)；蔣鳳琳 CHIANG, FENG LIN (TW)；胡立安 HU, LI AN (TW)

(74)代理人：蔡坤財；李世章

(56)參考文獻：

US 8394607B2

WO 2012/112687A1

Ducry, Laurent, and Bernhard Stump. "Antibody- drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies." Bioconjugate chemistry 21.1 (2009): 5-13.

審查人員：陳世芹

申請專利範圍項數：49 項 圖式數：6 共 212 頁

(54)名稱

抗葉酸受體 α (FRA) 抗體藥物複合體及使用彼之方法

ANTI-FOLATE RECEPTOR ALPHA (FRA) ANTIBODY-DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USING THEREOF

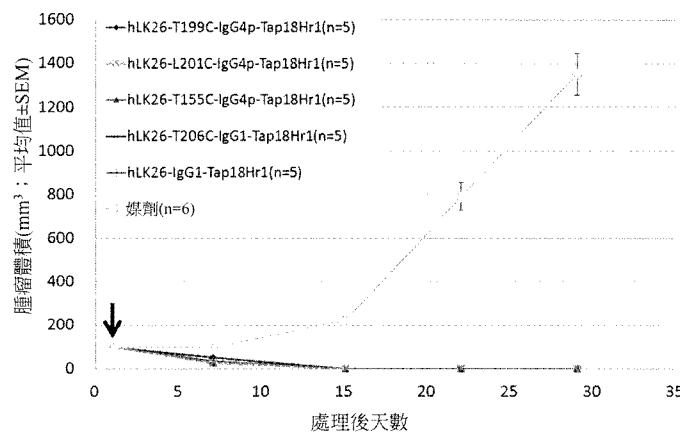
(57)摘要

本揭示內容提供包含親水性自我犧牲連接子之抗葉酸受體 α (FRA) 抗體藥物複合體。本揭示內容進一步提供用於治療癌症之組成物及方法。

The present disclosure provides anti-folate receptor alpha (FRA) antibody-drug conjugates comprising a hydrophilic self-immolative linker. The present disclosures further provide compositions and methods for treating cancers.

指定代表圖：

第6圖



箭頭指示ADC處理之時間。

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗葉酸受體α(FRA)抗體藥物複合體及使用彼之方法

【英文發明名稱】ANTI-FOLATE RECEPTOR ALPHA (FRA)

ANTIBODY-DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USING THEREOF

【相關申請案之交互參照】

【0001】本申請案主張2014年6月20日申請之美國臨時申請案第62/015,321號之優先權權益，該申請案據此以全文引用方式併入。

● ASCII 正文檔案上序列表之提交

【0002】本申請序列表之內容係以全文引用方式併入本文。

【技術領域】

【0003】本發明為癌症治療劑之領域，且提供針對經由抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate；ADC)格式遞送對癌細胞具特異性的細胞毒性藥物之功效及特異性。

● 【先前技術】

【0004】抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate；ADC)為一類將單株抗體(monoclonal antibody；mAb)之特異性與細胞毒性分子之效力組合的治療劑。ADC之使用藉由複合細胞毒性劑賦予抗體之癌症殺滅活性，同時靶特異性遞送避免由暴露於游離毒性劑而引起的全身毒性。到2014年5月為止，FDA已經批准兩種ADC用於治療人類癌症。Adcetris(貝倫妥單抗

維多汀(Brentuximab vedotin)或SGN-35)為一種與細胞毒性劑MMAE複合的抗CD30抗體，其係設計來治療CD30陽性復發性淋巴瘤。Kadcyla(T-DM1)為一種與細胞毒性劑DM1複合的抗HER2抗體，其係設計來治療HER2陽性轉移性乳癌。

【0005】連接子技術顯著地影響ADC效力、特異性及安全性。酶不穩定連接子利用細胞內部與外部的蛋白酶之差異活性來達成對藥物釋放之控制。藥物可經由肽鍵複合至抗體，且僅可藉由細胞內部存在的胞溶體蛋白酶之作用且在某些腫瘤類型中以高位準特異地分裂(Koblinski等人(2000) *Clin. Chem. Acta* 291:113-135)。此確保連接子於血流中之穩定性，以限制對健康組織之損傷。然而，一些酶不穩定連接子之增加的疏水性可導致ADC之聚集，尤其是利用強疏水性藥物的情況下如此。親水性自我犧牲連接子可經由特定酶不穩定設計而提供較好血清穩定性，以及經由異源癌細胞上之旁觀者效應而達成較好功效。

【0006】葉酸受體α(folate receptor alpha; FRA)為一種膜蛋白質，其以高親和力結合葉酸且經由受體介導胞吞作用介導葉酸之細胞攝取(Leammon等人，1991，*PNAS* 88:5572-5576)。在90%上皮卵巢癌以及包括子宮內膜癌、腎癌、肺癌、間皮瘤、乳癌、腦癌及骨髓白血病的眾多其他癌症中發現FRA之過表現，而大多數正常組織表現低位準至可忽略位準(Coney等人，1991，

Cancer Res. 51:6125-6132)。FRA於癌症中對比正常組織中之差分表現分佈保證基於Ab之治療劑之開發。鼠類單株抗FRA抗體之人類化形式經證實在臨床前研究中為有效的(Ebel等人, 2007, Cancer Immun 7:1-8)，且當前正在具有表現FRA之腫瘤的患者中受評估(Kallι等人, 2007, Curr Opin Investig 8:1067-1073)。此外，FRA介導胞吞作用之能力使其成為對癌症靶向ADC之開發有吸引力之候選物。迄今為止，各種藥物複合體及抗FRA抗體正在臨床試驗中受測試，且具有已證明的安全性(Xia等人, 2010, J Med Chem. 53:6811-6824；Zacchetti等人, 2009, Nucl Med Biol. 36:759-770)。

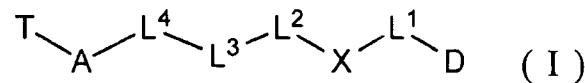
【0007】 對具有改良功效之抗癌症治療劑存在需要，該等抗癌症治療劑可經由抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate；ADC)格式將細胞毒性藥物遞送至癌細胞。

【發明內容】

【0008】 本揭示內容之化合物包含：藥物部分；靶向部分，該靶向部分為能夠靶向選定細胞群體(諸如表現葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)之細胞群體)之抗體；以及連接子，該連接子含有醯基單元、用於在藥物部分與靶向部分(諸如抗FRA抗體)之間提供距離的可選間隔子單元、可在適當條件下為可分裂的肽連接子、親

水性自我犧牲連接子以及可選第二自我犧牲間隔子或環化自我消除連接子。

【0009】本揭示內容提供式(I)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

D 為藥物部分；

T 為靶向部分，其為特異地結合至葉酸受體 A (folate receptor alpha；FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體；

X 為親水性自我犧牲連接子；

L^1 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

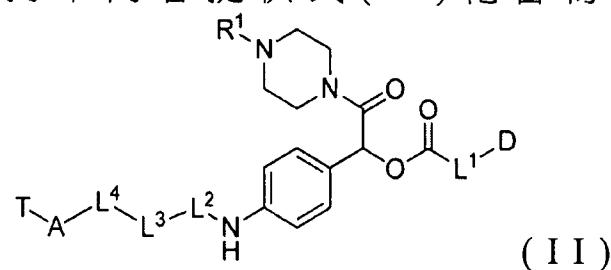
其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；

L^3 為肽連接子；

L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0010】本揭示內容提供式(II)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

D 為藥物部分；

T 為靶向部分，其為特異地結合至葉酸受體 A (folate receptor alpha；FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

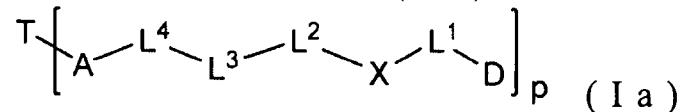
其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；

L³ 為肽連接子；

L⁴ 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0011】 本揭示內容提供式(Ia)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

p 為 1 至 20；

D 為藥物部分；

T 為靶向部分，其為特異地結合至葉酸受體 A (folate receptor alpha；FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體；

X 為親水性自我犧牲連接子；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

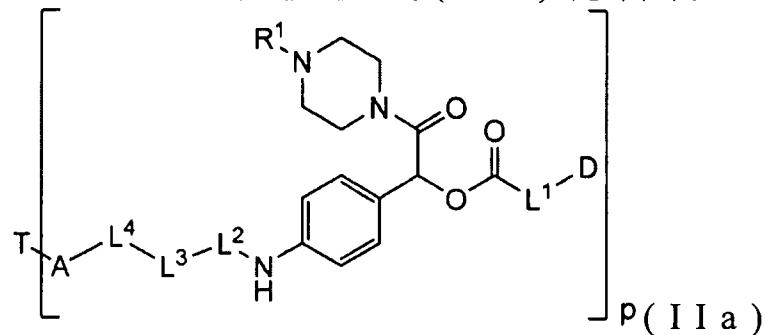
其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；

L^3 為肽連接子；

L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0012】 本揭示內容提供式(IIa)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

p 為 1 至 20；

D 為藥物部分；

T 為靶向部分，其為特異地結合至葉酸受體 A(folate receptor alpha；FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體； R^1 為氫、未經取代或經取代 C_{1-3} 烷基或未經取代或經取代雜環基；

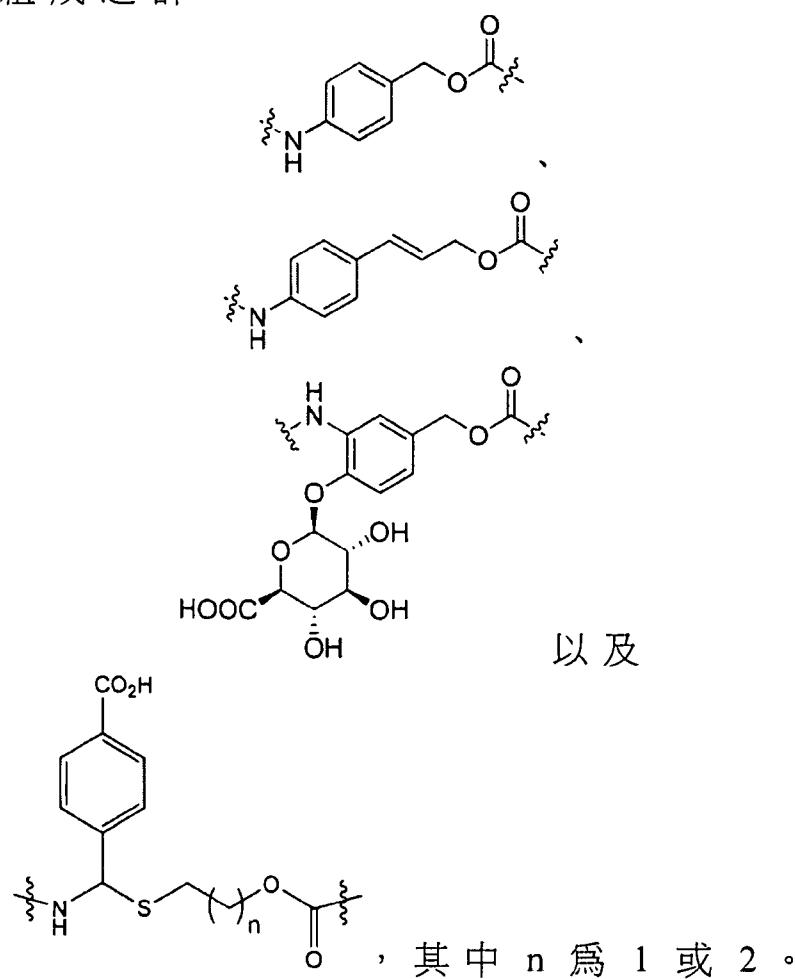
L^1 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

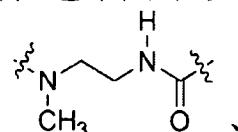
其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；
 L^3 為肽連接子；
 L^4 為鍵或間隔子；且
 A 為醯基單元。

【0013】在以上化合物之某些實施例中， p 為 1 至 4。在某些實施例中， L^1 為鍵。在某些實施例中， L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子。在某些實施例中， L^1 為胺基苄基羥基羰基連接子。在某些實施例中， L^1 係選自由以下組成之群



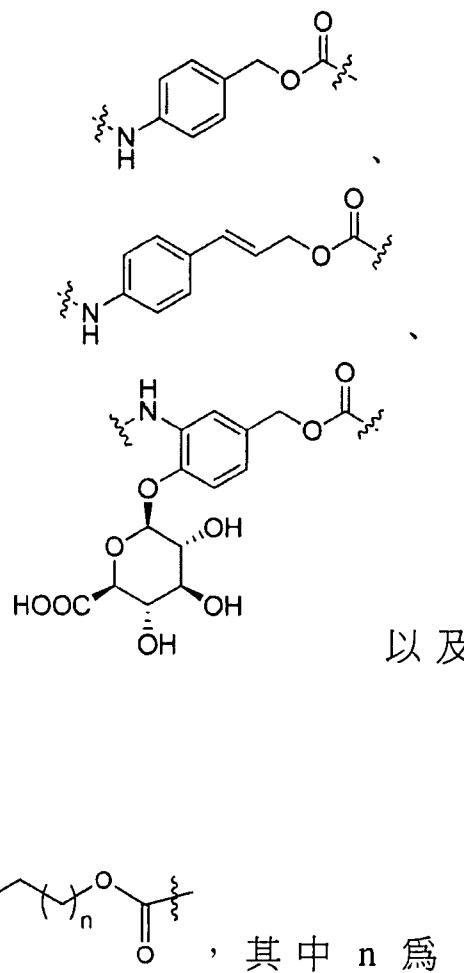
在某些實施例中， L^1 係選自由以下組成之群





以及

【0014】在以上化合物之某些實施例中， L^2 為鍵。在某些實施例中， L^2 為第二自我犧牲連接子。在某些實施例中， L^2 為胺基苄氧基羰基連接子。在某些實施例中， L^2 係選自



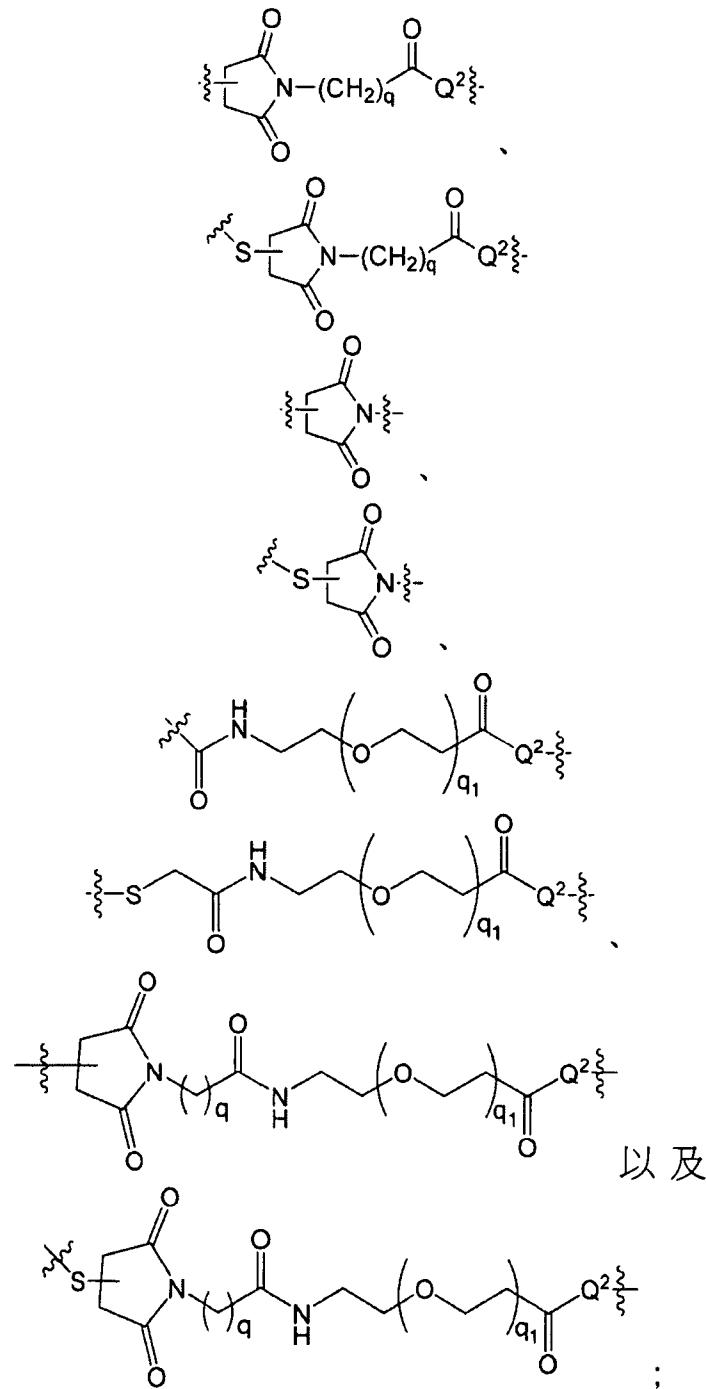
以及

【0015】在以上化合物之某些實施例中， L^3 為具有1至10個胺基酸殘基之肽連接子。在某些實施例中， L^3 為具有2至4個胺基酸殘基之肽連接子。在某些實施例中， L^3

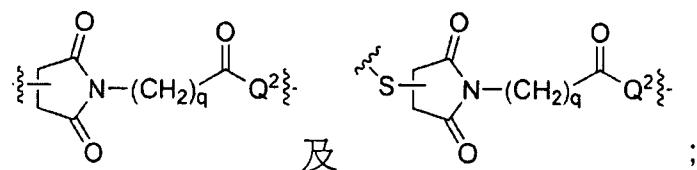
為包含至少一個離胺酸或精胺酸殘基之肽連接子。在某些實施例中， L^3 為包含選自以下者之胺基酸殘基之肽連接子：離胺酸、D-離胺酸、瓜胺酸、精胺酸、脯胺酸、組胺酸、鳥胺酸及麴醯胺酸。在某些實施例中， L^3 為包含選自以下者之胺基酸殘基之肽連接子：纈胺酸、異白胺酸、苯基丙胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺酸、脯胺酸、丙胺酸、白胺酸、色胺酸及酪胺酸。在某些實施例中， L^3 為選自以下者之二肽單元：纈胺酸-瓜胺酸、脯胺酸-離胺酸、甲硫胺酸-D-離胺酸、天冬醯胺酸-D-離胺酸、異白胺酸-脯胺酸、苯基丙胺酸-離胺酸及纈胺酸-離胺酸。在某些實施例中， L^3 為纈胺酸-瓜胺酸。

【0016】在以上化合物之某些實施例中， L^4 為鍵。在某些實施例中， L^4 為間隔子。在某些實施例中，間隔子為聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基或多胺。在某些實施例中， L^4 為 L^{4a} -C(O)、 L^{4a} -C(O)-NH、 L^{4a} -S(O)₂或 L^{4a} -S(O)₂-NH，其中每一 L^{4a} 獨立地為聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基或多胺。在某些實施例中， L^4 為 L^{4a} -C(O)，其中 L^{4a} 為聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基或多胺。在某些實施例中， L^4 為 L^{4a} -C(O)，其中 L^{4a} 為聚烷二醇。在某些實施例中， L^4 為 L^{4a} -C(O)，其中 L^{4a} 為聚乙二醇。在某些實施例中，間隔子具有式-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_m-CH₂-C(O)-，其中m為0至30之整數。在某些實施例中， L^4 為 L^{4a} -C(O)，其中 L^{4a} 為伸烷基。

【0017】在以上化合物之某些實施例中，A係選自由以下組成之群

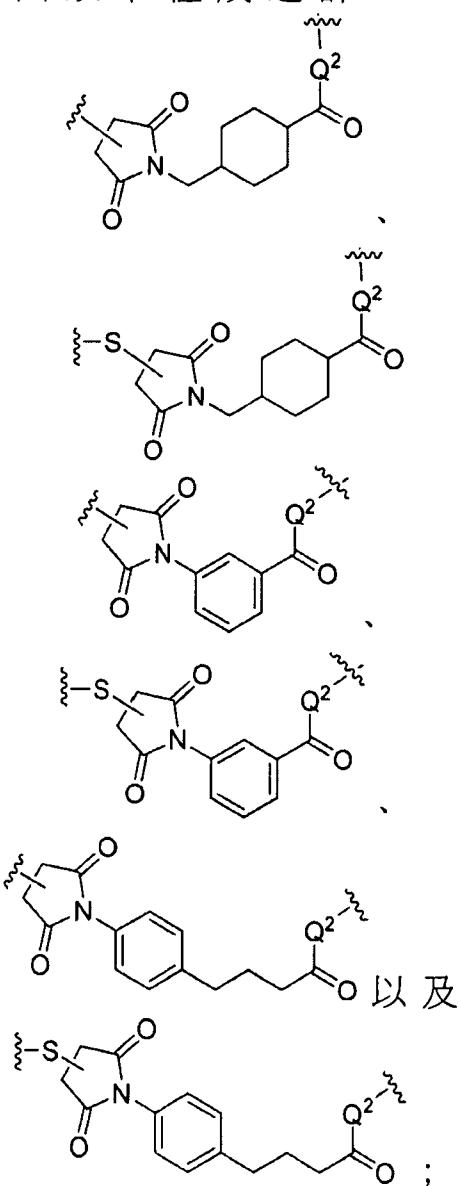


其中每一 Q^2 為 NH 或 O ，且每一 q 為 1 至 10 之整數，且每一 q_1 獨立地為 1 至 10 之整數。在某些實施例中， q 為 2、3、4 或 5。在某些實施例中， q_1 為 2、3、4 或 5。在某些實施例中，A係選自由以下組成之群



及 ;

其中每一 Q^2 獨立地為 NH 或 O ，且每一 q 獨立地為 1 至 10 之整數。在某些實施例中， q 為 2、3、4 或 5。在某些實施例中， A 係選自由以下組成之群



其中每一 Q^2 獨立地為 NH 或 O 。

【0018】在以上化合物之某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 抗體之重鏈之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實

施例中，抗體包含重鏈恆定區(例如，人類 Ig G 之重鏈恆定區)，其中重鏈恆定區中之一或多個胺基酸殘基(例如，CH1、CH2 或 CH3)由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區(例如，人類 Ig G 之重鏈恆定區)，其中重鏈恆定區中選自位置 155、157、165、169、197、199 及 442 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含人類 Ig G1、人類 Ig G2、人類 Ig G3、人類 Ig G4 或人類 Ig G4p 之重鏈恆定區，其中重鏈恆定區中選自位置 155、157、165、169、197、199 及 442 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列，其中重鏈恆定區中選自位置 155、157、165、169、197、199 及 442 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。

【0019】在以上化合物之某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 抗體之輕鏈之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區(例如，人類 κ 輕鏈恆定區)，其中抗體之輕鏈恆定區中之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區，其中輕鏈恆定區中選自位置 201 及 206 之一

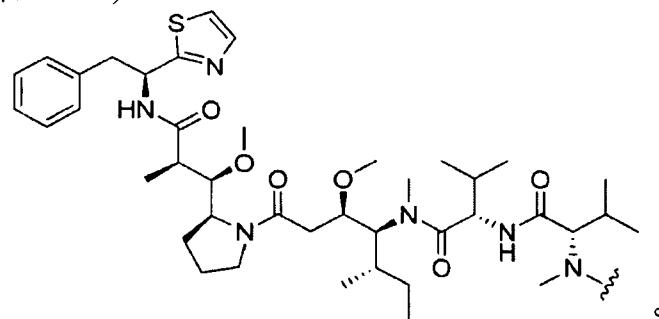
或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含人類 Ig G 1、人類 Ig G 2、人類 Ig G 3、人類 Ig G 4 或人類 Ig G 4 p 之輕鏈恆定區(諸如 κ 輕鏈恆定區)，其中輕鏈恆定區中選自位置 201 及 206 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，且其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列，其中輕鏈恆定區中選自位置 201 及 206 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。

【0020】在以上化合物之某些實施例中，D 藉由(或經由)所添加半胱胺酸殘基連接至 T。在一些實施例中，D 經由所添加半胱胺酸殘基之硫醇基連接至 T，該所添加半胱胺酸殘基經由連接子部分(-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-)連接。在某些實施例中，D 為含胺基藥物部分，其中藥物經由胺基連接至 L¹ 或 X。在某些實施例中，D 為倍癌黴素 (duocarmycin)、尾海兔素 (dolastatin)、微管溶素 (tubulysin)、阿黴素 (DOX)、紫杉醇或絲裂黴素 C (MMC) 或其胺基衍生物。在某些實施例中，D 為選自由以下組成之群的倍癌黴素之胺基衍生物

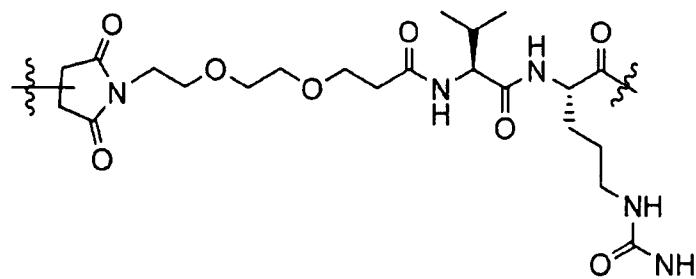
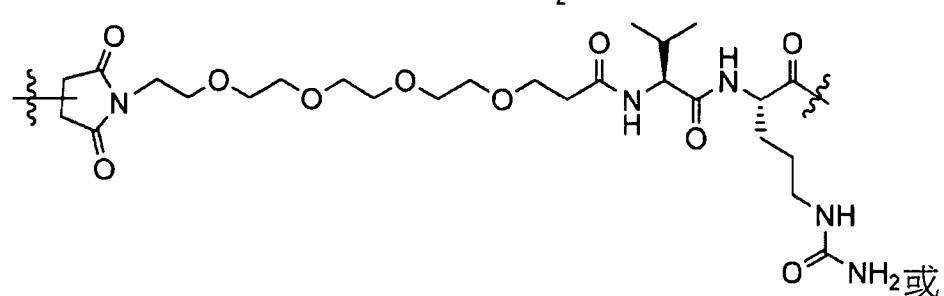
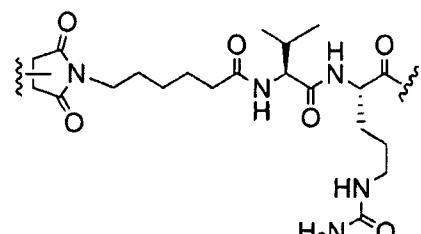
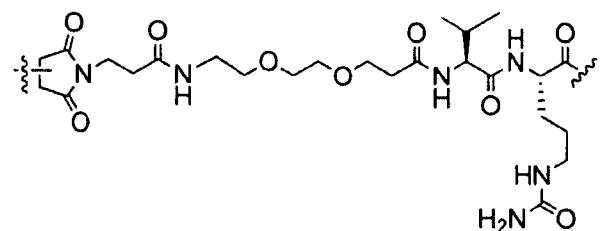
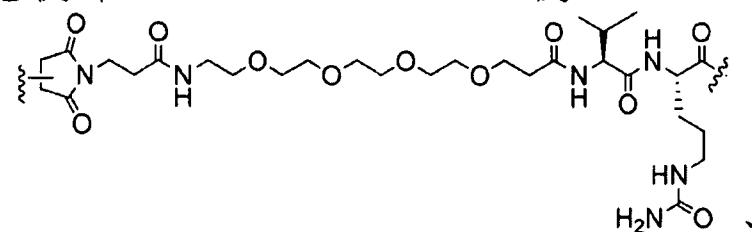


在某些實施例中，D 為尾海兔素之胺基衍生物(例如，單

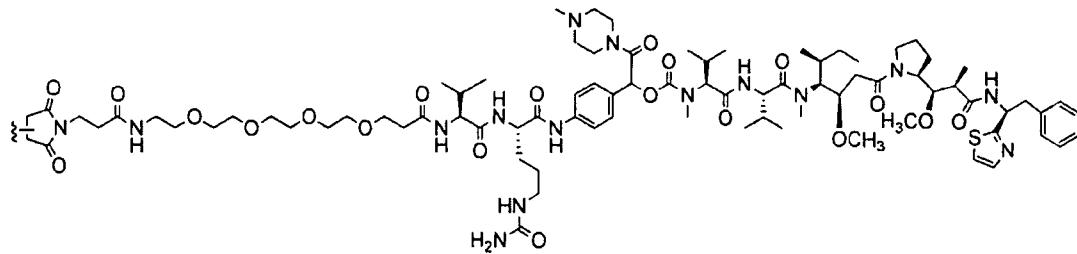
甲基尾海兔素 10) :



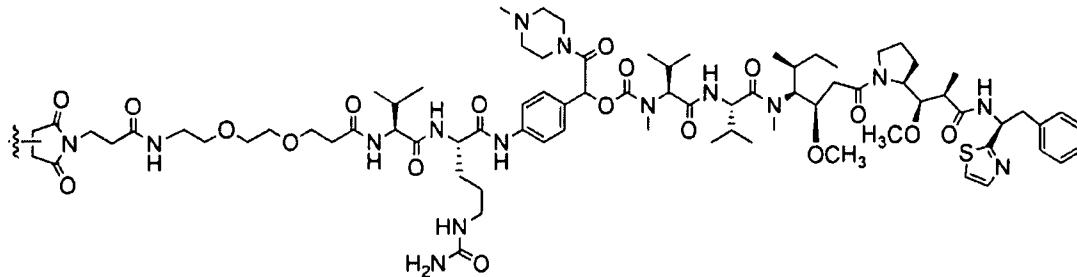
在某些實施例中，-A-L⁴-L³-L²-為



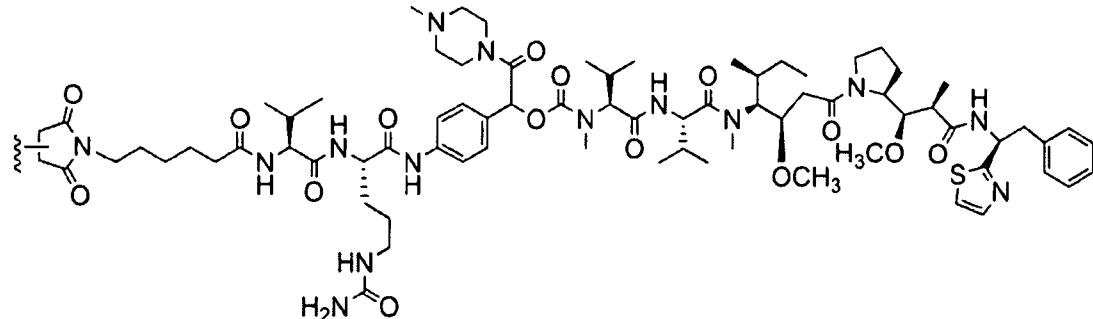
在某些實施例中，-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D 為：



在某些實施例中，-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D 為：



● 在某些實施例中，-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D 為：



【0021】在以上化合物之某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)抗體為人類化抗體、嵌合抗體或人類抗體。

【0022】在某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中：

(1)重鏈可變區包含抗體 hLK26 之三個重鏈 HVR (例如，SEQ ID NO:14、15 及 16)，及/或輕鏈可變區包含抗體 hLK26 之三個輕鏈 HVR (例如，SEQ ID NO:17、18 及 19)；

(2) 重鏈可變區包含抗體 26B3 之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:20、21 及 22), 及 / 或輕鏈可變區包含抗體 26B3 之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:23、24 及 25); 或

(3) 重鏈可變區包含抗體 hMov19 之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:26、27 及 28), 及 / 或輕鏈可變區包含抗體 hMov19 之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:29、30 及 31)。

【0023】在某些實施例中, 抗葉酸受體 α (folate receptor alpha; FRA) 抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區, 其中:

(1) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 14、15 及 16), 及 / 或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 17、18 及 19);

(2) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 20、21 及 22), 及 / 或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 23、24 及 25); 或

(3) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:26、27 及 28), 及 / 或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 29、30 及 31)。

【0024】在某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中

- (1)重鏈可變區包含SEQ ID NO:8之胺基酸序列，及/或輕鏈可變區包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列；
- (2)重鏈可變區包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列，及/或輕鏈可變區包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列；或
- (3)重鏈可變區包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列，及/或輕鏈可變區包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列。

【0025】在某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)抗體包含重鏈及輕鏈，其中

- (1)重鏈包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列，及/或輕鏈包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列；
- (2)重鏈包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列，及/或輕鏈包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列；
- (3)重鏈包含：包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之可變區，及包含SEQ ID NO:32或33之胺基酸序列的恆定區，及/或輕鏈包含：包含SEQ ID NO:11之胺基酸序列之可變區，及包含SEQ ID NO:34之胺基酸序列之恆定區；或
- (4)重鏈包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列，及/或輕鏈包含SEQ ID NO:7之胺基酸序列。

【0026】在某些實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:33之胺基酸序列之人類重鏈恆定

區，及包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列之人類 κ 輕鏈恆定區，其中重鏈恆定區中選自 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 之一或多個胺基酸殘基及/或輕鏈恆定區中選自 L201 及 T206 之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換，且其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在此等實施例之些實施例中，重鏈恆定區中選自 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 之至少一個(例如，一個)胺基酸殘基及/或輕鏈恆定區中選自 L201 及 T206 之至少一個(例如，一個)胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體為選自由以下者組成之群之抗原結合片段：Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 ScFv。

【0027】 本揭示內容提供藥物組合物，其包含以上及在本文中所述的化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物；以及醫藥學上可接受之載劑。

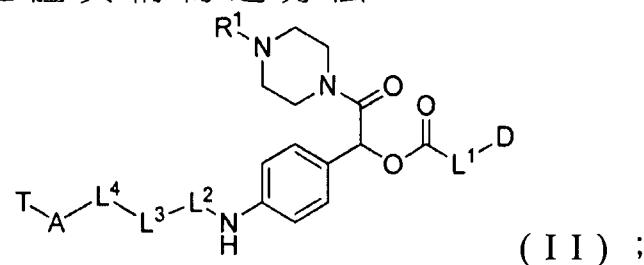
【0028】 本揭示內容提供殺滅表現人類葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 之細胞的方法，該方法包含向該細胞投與足以殺滅該細胞之量的本文所述的化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。在某些實施例中，細胞為癌細胞。在某些實施例中，癌細胞在個體(例如，人類)內。在某些實施例中，在某些實施例中，淋巴瘤或白血病細胞。在某些實施例中，癌細胞為葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 陽性淋巴瘤或葉酸

受體 α (folate receptor alpha ; FRA) 陽性白血病細胞。

【0029】 本揭示內容提供治療個體中之癌症的方法，該方法包含向該個體投與有效量之本文所述的化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。在某些實施例中，個體具有癌症或已診斷為具有癌症。在某些實施例中，癌症為卵巢癌、肺癌、子宮癌、睾丸絨毛膜癌、室管膜瘤、間皮瘤、乳癌、結腸癌或腎細胞癌瘤。在一些實施例中，癌症為葉酸受體 α (folate receptor alpha ; FRA) 陽性癌症。在某些實施例中，個體為人類。

【0030】 本揭示內容提供套組，其包含本文所述的化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。在某些實施例中，套組進一步包含治療癌症使用的說明書。

【0031】 本文中提供用於製造式 (II) 化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



其中：

D 為藥物部分；

T 為靶向部分，其為特異地結合至葉酸受體 A (folate receptor alpha ; FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體；

R^1 為氫、未經取代或經取代 C_{1-3} 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L^1 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；
 L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

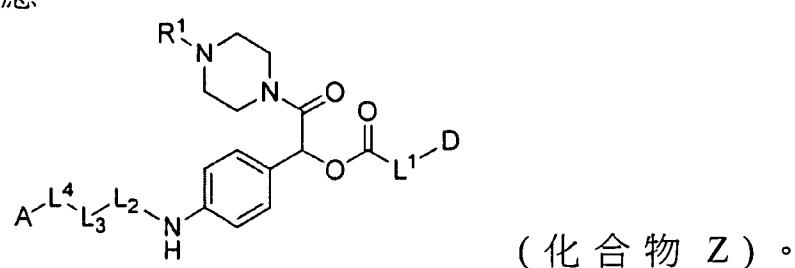
其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；
 L^3 為肽連接子；

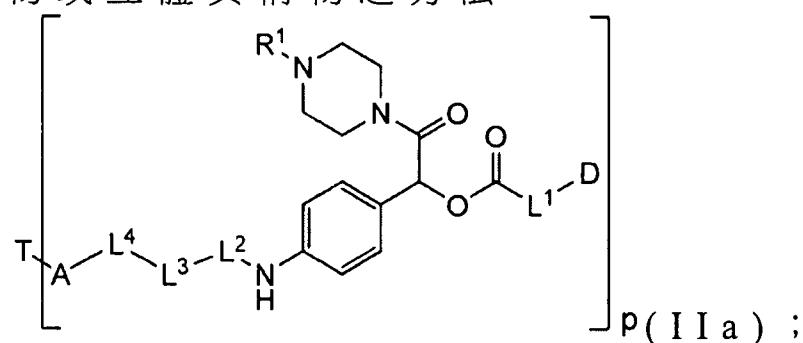
L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元；

該方法包含使抗體與化合物 Z 或其鹽或溶劑合物或立體異構物反應：



【0032】本文中提供用於製造式(IIa)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



其中：

p 為 1 至 20；

D 為藥物部分；

T 為靶向部分，其為特異地結合至葉酸受體 A (folate

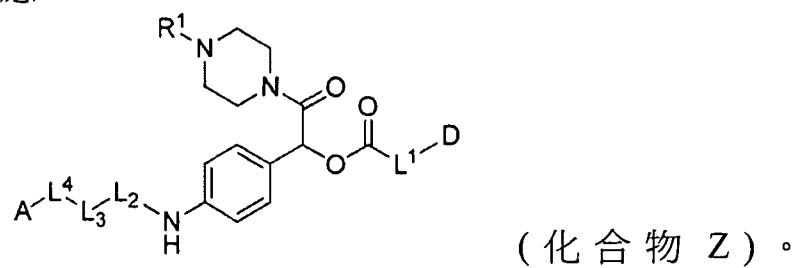
receptor alpha ; FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體；
 R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；
 L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；
 L³ 為肽連接子；
 L⁴ 為鍵或間隔子；且
 A 為醯基單元；

該方法包含使抗體與化合物 Z 或其鹽或溶劑合物或立體異構物反應：



【0033】在本文中之方法 (method) 及方法 (process) 之某些實施例中，抗體包含一或多個硫氫基。在某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha ; FRA) 抗體之重鏈之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，重鏈恆定區中之一或多個胺基酸殘基 (例如，CH1、CH2 或 CH3) 由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區 (例如，人類 IgG 之重鏈恆定區)，其中重鏈恆定

區中選自位置 155、157、165、169、197、199 及 442 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含人類 Ig G1、人類 Ig G2、人類 Ig G3、人類 Ig G4 或人類 Ig G4p 之重鏈恆定區，其中重鏈恆定區中選自位置 155、157、165、169、197、199 及 442 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列，其中重鏈恆定區中選自位置 155、157、165、169、197、199 及 442 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。

【0034】在本文所述的之方法 (method) 及方法 (process) 之某些實施例中，抗體之輕鏈之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體之輕鏈恆定區中之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區 (諸如人類 κ 輕鏈恆定區)，其中輕鏈恆定區中選自位置 201 及 206 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含人類 Ig G1、人類 Ig G2、人類 Ig G3、人類 Ig G4 或人類 Ig G4p 之輕鏈恆定區，其中輕鏈恆定區中選自位置 201 及 206 之一或多個胺基酸殘基由一或多

個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在某些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列，其中輕鏈恆定區中選自位置 201 及 206 之一或多個胺基酸殘基由一或多個半胱胺酸殘基置換，其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。

【0035】在本文中之方法 (method) 或方法 (process) 之某些實施例中，D 藉由 (或經由) 所添加半胱胺酸殘基連接至 T。在一些實施例中，D 經由所添加半胱胺酸殘基之硫醇基連接至 T，該所添加半胱胺酸殘基經由連接子 (-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-) 部分連接。

【0036】在本文中之方法 (method) 或方法 (process) 之某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha; FRA) 抗體為人類化抗體、嵌合抗體或人類抗體。在某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha; FRA) 抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中：

(1) 重鏈可變區包含抗體 hLK26 之三個重鏈 HVR (例如，SEQ ID NO:14、15 及 16)，及 / 或輕鏈可變區包含抗體 hLK26 之三個輕鏈 HVR (例如，SEQ ID NO:17、18 及 19)；

(2) 重鏈可變區包含抗體 26B3 之三個重鏈 HVR (例如，SEQ ID NO:20、21 及 22)，及 / 或輕鏈可變區包含抗體 26B3 之三個輕鏈 HVR (例如，SEQ ID NO:23、24 及 25)；或

(3) 重鏈可變區包含抗體 hMov19 之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:26、27 及 28), 及/或輕鏈可變區包含抗體 hMov19 之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:29、30 及 31)。

【0037】在本文中之方法 (method) 或方法 (process) 之某些實施例中, 抗葉酸受體 α (folate receptor alpha; FRA) 抗體為人類化抗體、嵌合抗體或人類抗體。在某些實施例中, 抗葉酸受體 α (folate receptor alpha; FRA) 抗體包含重鏈可變區及輕鏈可變區, 其中:

(1) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 14、15 及 16), 及/或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 17、18 及 19);

(2) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 20、21 及 22), 及/或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO: 23、24 及 25); 或

(3) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列之三個重鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:26、27 及 28), 及/或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列之三個輕鏈 HVR (例如, SEQ ID NO:29、30 及 31)。

【0038】在本文中之方法 (method) 及方法 (process) 之某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中：

- (1) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列，及 / 或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；
- (2) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列，及 / 或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；或
- (3) 重鏈可變區包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列，及 / 或輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【0039】在某些實施例中，抗葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 抗體包含重鏈及輕鏈，其中

- (1) 重鏈包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列，及 / 或輕鏈包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；
- (2) 重鏈包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列，及 / 或輕鏈包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；
- (3) 重鏈包含：包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列之可變區，及包含 SEQ ID NO:32 或 33 之胺基酸序列的恆定區，及 / 或輕鏈包含：包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列之可變區，及包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列之恆定區；或
- (4) 重鏈包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列，及 / 或輕鏈包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列。

【0040】在本文中之方法 (method) 及方法 (process) 之某些實施例中，抗體包含：包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列之重鏈恆定區，及包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列之人類 κ 輕鏈恆定區，其中重鏈恆定區中選自 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 之一或多個胺基酸殘基及 / 或 κ 輕鏈恆定區中選自 L201 及 T206 之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換，且其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在此等實施例之些實施例中，重鏈恆定區中選自 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 之至少一個(例如，一個)胺基酸殘基及 / 或輕鏈恆定區中選自 L201 及 T206 之至少一個(例如，一個)胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換。

【0041】本揭示內容提供化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物，其中化合物係藉由本文所述的方法 (method) 或方法 (process) 製備，其中抗體包含一或多個硫氫基。

【0042】本揭示內容提供藥物組合物，其包含：化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物，其中化合物係藉由本文所述的方法製備，其中抗體包含一或多個硫氫基；以及醫藥學上可接受之載劑。

【0043】應理解，本文所述的各種實施例之性質之一、一些或全部可組合來形成本發明之其他實施例。本發明之此等及其他態樣將對熟習此項技術者變得明顯。

【圖式簡單說明】

【0044】 第1圖展示 Tap-18H 之 NMR 光譜。

【0045】 第2圖展示 Tap-18Hr1 之 NMR 光譜。

【0046】 第3圖展示 Tap-18Hr2 之 NMR 光譜。

【0047】 第4圖展示 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 對抗來源於卵巢癌細胞系 SK-OV-3 之異種移植物的活體內抗腫瘤活性。

【0048】 第5圖展示位點特異性複合 hLK26-Tap18Hr1 ADC

hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1 、
hLK26-T155C-IgG4p-Tap18Hr1 及
hLK26-S442C-IgG4p-Tap18Hr1 對抗來源於卵巢癌細胞系 SK-OV-3 之異種移植物的活體內抗腫瘤活性。

【0049】 第6圖展示習知 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 及位點特異性複合 hLK26-Tap18Hr1 ADC

hLK26-T206C-IgG1-Tap18Hr1 、
hLK26-T155C-IgG4p-Tap18Hr1 、
hLK26-T199C-IgG4p-Tap18Hr1 及
hLK26-L201C-IgG4p-Tap18Hr1 對抗來源於肺癌細胞系 NCI-H2110 之異種移植物的活體內抗腫瘤活性。

【實施方式】

定義

【0050】除非另外指示，否則以下術語具有以下含義。
任何未經定義之術語具有其於技術中所公認的含義。

【0051】「烷基」係指具有1至10個碳原子且較佳地1至6個碳原子之一價飽和脂族烴基。此術語包括例如直鏈或支鏈烴基，諸如甲基(CH_3-)、乙基(CH_3CH_2-)、正丙基($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、異丙基($(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$)、正丁基($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、異丁基($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$)、第二丁基($(\text{CH}_3)(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}-$)、第三丁基($(\text{CH}_3)_3\text{C}-$)、正戊基($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、新戊基($(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$)及正己基($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-$)。

【0052】「伸烷基」係指較佳含有1至10個碳原子且更佳地1至3個碳原子之為直鏈或支鏈的二價脂族伸烴基。此術語包括如亞甲基($-\text{CH}_2-$)、伸乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、正伸丙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、異伸丙基($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$)、($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$)、($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$)、($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$)及類似基團。

【0053】「烯基」係指具有2至10個碳原子且較佳地2至4個碳原子，且具有至少1個且較佳地1至2個雙鍵不飽和位點之直鏈或支鏈烴基。此術語包括例如雙乙烯基、烯丙基及丁-3-烯-1-基。此術語內包括順式及反式異構物或此等異構物之混合物。

【0054】「伸烯基」係指具有2至10個碳原子且較佳地2至4個碳原子，且具有至少1個且較佳地1至2個雙鍵不飽和位點之直鏈或支鏈伸烴基。伸烯基之實例包括但不限於伸乙烯基(-CH=CH-)、伸烯丙基(-CH₂C=CH-)及伸丁-3-烯-1-基(-CH₂CH₂C=CH-)。此術語內包括順式及反式異構物或此等異構物之混合物。

【0055】「炔基」係指具有2至6個碳原子且較佳地2至3個碳原子，且具有至少1個且較佳地1至2個三鍵不飽和位點之直鏈或支鏈烴基。此等炔基之實例包括乙炔基(-C≡CH)及炔丙基(-CH₂C≡CH)。

【0056】「伸炔基」係指具有2至6個碳原子且較佳地2至3個碳原子，且具有至少1個且較佳地1至2個三鍵不飽和位點之直鏈或支鏈伸烴基。伸炔基之實例包括但不限於伸乙炔基(-C≡C-)及伸丙炔基(-CH₂C≡C-)。

【0057】「胺基」係指基團-NH₂。

【0058】「經取代胺基」係指基團-NRR，其中每一R獨立地選自由以下組成之群：氫、烷基、經取代烷基、環烷基、經取代環烷基、烯基、經取代烯基、環烯基、經取代環烯基、炔基、經取代炔基、芳基、雜芳基及雜環基，前提條件為至少一個R不為氫。

【0059】「芳基」係指具有6至18個碳原子之一價芳族碳環基，其具有單環(如以苯基存在)或具有多個稠環之環系統(此類芳族環系統之實例包括萘基、蒽基及二氯茚基)，該等稠環可為或可不為芳族，前提條件為連接點係

經由芳族環之原子。此術語包括例如苯基及萘基。除非另外由對芳基取代基之定義限制，否則此類芳基可視情況由選自以下之1至5個取代基或1至3個取代基取代：醯基、羥基、硫醇基、醯基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、經取代烷基、經取代烷氧基、經取代烯基、經取代炔基、經取代環烷基、經取代環烯基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、醯胺基、烷芳基、芳基、芳氧基、疊氮基、羧基、羧基酯、氰基、鹵素、硝基、雜芳基、雜芳氧基、雜環基、雜環氧基、胺基醯基、氨基醯基、硫烷氧基、經取代硫烷氧基、硫芳氧基、硫雜芳氧基、礦醯基胺基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及三鹵甲基。

【0060】「環烷基」係指3至10個碳原子之環狀烷基，其具有包括稠合、橋接及螺環系統之單個或多個環狀環。適合的環烷基之實例包括例如金剛烷基、環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及類似基團。此類環烷基包括例如：單環結構，諸如環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及類似基團；或多環結構，諸如金剛烷基及類似基團。

【0061】「雜芳基」係指具有1至15個碳原子，諸如1至10個碳原子及1至10個在環內選自由氧、氮及硫組成之群的雜原子之芳族基。此類雜芳基可在環系統中具有單環(諸如，吡啶基、咪唑基或呋喃基)或多個稠環(例如，如吲哚嗪基、喹啉基、苯并呋喃基、苯并咪唑基或苯并噻

吩基之基團)，其中環系統內之至少一個環為芳族的，且環系統內之至少一個環為芳族的，前提條件為連接點係經由芳族環之原子。在某些實施例中，該雜芳基之氮及/或硫環原子視情況經氧化來提供N-氧化物($N \rightarrow O$)、亞硫醯基或礦醯基部分。此術語包括例如吡啶基、吡咯基、吲哚基、硫苯基及呋喃基。除非另外由對雜芳基取代基之定義限制，否則此類雜芳基可視情況由選自以下之1至5個取代基或1至3個取代基取代：醯氨基、羥基、硫醇基、醯基、烷基、烷氨基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、經取代烷基、經取代烷氨基、經取代烯基、經取代炔基、經取代環烷基、經取代環烯基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、醯胺基、烷芳基、芳基、芳氨基、疊氮基、羧基、羧基酯、氰基、鹵素、硝基、雜芳基、雜芳氨基、雜環基、雜環氨基、胺基醯氨基、氨基醯基胺基、硫烷氨基、經取代硫烷氨基、硫芳氨基、硫雜芳氨基、礦醯基胺基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基，以及三鹵甲基。

【0062】雜芳基之實例包括但不限於：吡咯、咪唑、吡唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、噁嗪、吲哚嗪、異吲哚、吲哚、嘌呤、異噁啉、噁啉、酞嗪、[口+奈]啶(naphthyridine)、噁噁啉、噁唑啉、噁噁啉、噁啶、咔唑、咔啉、啡啶、吖啶、啡啉、異噁唑、啡嗪、異噁唑、

啡噁嗪、吩噁嗪、哌啶、哌嗪、酞醯亞胺、4,5,6,7-四氫苯并[b]噁吩、噁唑、噁吩、苯并[b]噁吩及類似基團。

【0063】 「雜環」、「雜環的」、「雜環烷基」或「雜環基」係指具有單環或包括稠合、橋接及螺接環系統之多縮合環，且具有3至20個環原子，包括1至10個雜原子之飽和或部分不飽和基團。此等環原子選自由碳、氮、硫或氧組成之群，其中，在稠合環系統中，該等環中之一或更多者可為環烷基、芳基或雜芳基，前提條件為連接點係經由該非芳族環。在某些實施例中，該雜環基之氮及/或硫原子視情況經氧化來提供N-氧化物、-S(O)-或-SO₂-部分。

【0064】 雜環之實例包括但不限於：吖丁啶、二氫吖哚、吖唑、喹嗪、咪唑啶、咪唑啉、哌啶、哌嗪、二氫吖哚、1,2,3,4-四氫異喹啉、噁唑啶、嗎啉基、硫嗎啉基(亦稱為噁嗎啉基)、1,1-二側氧基硫嗎啉基、哌啶基、吡咯啶、四氫呋喃基及類似基團。

【0065】 在雜芳基或雜環基經取代的情況下，除非另外由對雜芳基或雜環取代基之定義限制，否則此類雜芳基或雜環基可由選自以下之1至5個取代基或1至3個取代基取代：烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯胺基、醯氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯氧基、疊氮基、氟基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基酯、硫芳氧基、硫雜芳氧基、硫雜環氧基、硫醇基、硫烷

氧基、經取代硫烷氧基、芳基、芳氧基、雜芳基、雜芳氧基、雜環基、雜環氧基、羥胺基、烷氧基胺基、硝基、礦鹽基胺基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO-雜環基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及-SO₂-雜環基。

【0066】「聚烷二醇」係指直鏈或支鏈聚烷二醇聚合物，諸如聚乙二醇、聚丙二醇及聚丁二醇。聚烷二醇次單元為單一聚烷二醇單元。例如，聚乙二醇次單元之實例將為乙二醇、-O-CH₂-CH₂-O-或丙二醇、-O-CH₂-CH₂-CH₂-O-，其皆在鏈鏈終止點處由氫封端。聚(烷二醇)之其他實例包括但不限於：PEG、諸如甲氧基聚(乙二醇)(mPEG)之PEG衍生物、聚(氧化乙烯)、PPG、聚(伸丁二醇)、聚(氧化乙烯-共-氧化丙烯)，或其共聚物及組合。

【0067】「多胺」係指在單體單元中具有胺官能性之聚合物，該胺官能性係併入主鏈中，如在聚伸烷基亞胺中，或併入側基中，如併入聚乙烯胺中。

【0068】除在本文中之揭示內容以外，當用於修飾指定基團或自由基時，術語「經取代」亦可意指該指定基團或自由基之一或多個氫原子各自彼此獨立地由如以下定義之相同或不同取代基置換。

【0069】除在本文中就個別術語所揭示之基團以外，除非另外指定，否則用於取代指定基團或自由基中飽和碳原子上之一或多個氫(單一碳上之任何兩個氫可由=O、

$=NR^{70}$ 、 $=N-OR^{70}$ 、 $=N_2$ 或 $=S$ 置換)之取代基為 $-R^{60}$ 、
 鹵基、 $=O$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、 $-NR^{80}R^{80}$ 、三鹵甲基、
 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、
 $-S(O)R^{70}$ 、 $-S(O)_2R^{70}$ 、 $-SO_3^-M^+$ 、 $-S(O)_2OR^{70}$ 、
 $-OS(O)_2R^{70}$ 、 $-OSO_3^-M^+$ 、 $-OS(O)_2OR^{70}$ 、
 $-PO_3^{2-}(M^+)_2$ 、 $-P(O)(OR^{70})O^-M^+$ 、
 $-P(O)(OR^{70})_2$ 、 $-C(O)R^{70}$ 、 $-C(S)R^{70}$ 、
 $-C(NR^{70})R^{70}$ 、 $-C(O)O^-M^+$ 、 $-C(O)OR^{70}$ 、
 $-C(S)OR^{70}$ 、 $-C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ 、
 $-OC(O)R^{70}$ 、 $-OC(S)R^{70}$ 、 $-OC(O)O^-M^+$ 、
 $-OC(O)OR^{70}$ 、 $-OC(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)R^{70}$ 、
 $-NR^{70}C(S)R^{70}$ 、 $-NR^{70}CO_2^-M^+$ 、 $-NR^{70}CO_2R^{70}$ 、
 $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ 、
 $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ 及 $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ ，其中
 R^{60} 選自由以下組成之群：視情況經取代烷基、環烷基、
 雜環烷基、雜環烷基烷基、環烷基烷基、芳基、芳烷基、
 雜芳基及雜芳基烷基，每一 R^{70} 獨立地為氫或 R^{60} ；每一
 R^{80} 獨立地為 R^{70} 或替代地，兩個 R^{80} 連同與其鍵結之氮
 原子一起形成3、4、5、6或7員雜環烷基，該雜環烷基
 可視情況包括選自O、N及S組成之群的1至4個相同或不
 同的另外雜原子，其中N可具有 $-H$ 、 C_1-C_4 烷基、
 $-C(O)C_{1-4}$ 烷基、 $-CO_2C_{1-4}$ 烷基或 $-S(O)_2C_{1-4}$ 烷基取
 代，且每一 M^+ 為具有淨單一正電荷之相對離子。每一 M^+
 可獨立地為例如鹼金屬離子，諸如 K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ ；銨離

子，諸如 $^+N(R^{60})_4$ ；或鹼土金屬離子，諸如 $[Ca^{2+}]_{0.5}$ 、 $[Mg^{2+}]_{0.5}$ 或 $[Ba^{2+}]_{0.5}$ （"角標0.5意指用於此類二價鹼土金屬離子之相對離子之一可為該等實施例之化合物之離子化形式，而另一者為典型相對離子，諸如氯化物，或本文揭示的兩種離子化化合物可充當此類二價鹼土金屬離子之相對離子，或該等實施例之雙重離子化化合物可充當此類二價鹼土金屬離子之相對離子）。

【0070】除在本文中之揭示內容以外，除非另外指定，否則「經取代」烯烴、炔烴、芳基及雜芳基中之不飽和碳原子上的氫之取代基為 $-R^{60}$ 、鹼基團 $-O^-M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、 $-S^-M^+$ 、 $-NR^{80}R^{80}$ 、三鹼甲基 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-S(O)R^{70}$ 、 $-S(O)_2R^{70}$ 、 $-SO_3^-M^+$ 、 $-SO_3R^{70}$ 、 $-OS(O)_2R^{70}$ 、 $-OSO_3^-M^+$ 、 $-OSO_3R^{70}$ 、 $-PO_3^{2-}(M^+)_2$ 、 $-P(O)(OR^{70})O^-M^+$ 、 $-P(O)(OR^{70})_2$ 、 $-C(O)R^{70}$ 、 $-C(S)R^{70}$ 、 $-C(NR^{70})R^{70}$ 、 $-CO_2^-M^+$ 、 $-CO_2R^{70}$ 、 $-C(S)OR^{70}$ 、 $-C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ 、 $-OC(O)R^{70}$ 、 $-OC(S)R^{70}$ 、 $-OCO_2^-M^+$ 、 $-OCO_2R^{70}$ 、 $-OC(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)R^{70}$ 、 $-NR^{70}CO_2^-M^+$ 、 $-NR^{70}CO_2R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ 及 $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ ，其中 R^{60} 、 R^{70} 、 R^{80} 及 M^+ 如先前所定義，前提條件為在經取代烯烴或炔烴的狀況下，該等取代基不為 $-O^-M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 或 $-S^-M^+$ 。

【0071】除在本文中就個別術語所揭示之取代基以外，除非另外指定，否則「經取代」雜環烷基及環烷基中之氮原子上的氫之取代基為 $-R^{60}$ 、 $-O^+M^+$ 、 $-OR^{70}$ 、 $-SR^{70}$ 、 $-SM^+$ 、 $-NR^{80}R^{80}$ 、三鹵甲基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(O)R^{70}$ 、 $-S(O)_2R^{70}$ 、 $-S(O)_2O^+M^+$ 、 $-S(O)_2OR^{70}$ 、 $-OS(O)_2R^{70}$ 、 $-OS(O)_2OM^+$ 、 $-OS(O)_2OR^{70}$ 、 $-PO_3^{2-}(M^+)_2$ 、 $-P(O)(OR^{70})O^+M^+$ 、 $-P(O)(OR^{70})(OR^{70})$ 、 $-C(O)R^{70}$ 、 $-C(S)R^{70}$ 、 $-C(NR^{70})R^{70}$ 、 $-C(O)OR^{70}$ 、 $-C(S)OR^{70}$ 、 $-C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ 、 $-OC(O)R^{70}$ 、 $-OC(S)R^{70}$ 、 $-OC(O)OR^{70}$ 、 $-OC(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)R^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ 、 $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ 、 $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$ 及 $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ ，其中 R^{60} 、 R^{70} 、 R^{80} 及 M^+ 如先前所定義。

【0072】除在本文中之揭示內容以外，在某一實施例中，經取代之基團具有1、2、3或4個取代基，1、2或3個取代基，1或2個取代基，或1個取代基。

【0073】應理解，在以上所定義之所有經取代基團中，在本文中不意欲包括藉由定義具有自身之其他取代基(例如，具有經取代芳基作為取代基之經取代芳基，該經取代芳基自身由經取代芳基取代，該經取代芳基進一步由經取代芳基取代，等等)之取代基而得到之聚合物。在此等狀

況下，此等取代之最大數量為三。例如，在本文中特定預期之經取代芳基之連續取代限於經取代芳基-(經取代芳基)-經取代芳基。

【0074】除非另外指示，否則在本文中未明確定義之取代基之命名法係藉由命名官能性之末端部分，繼之以朝向連接點之相鄰官能性而獲得。例如，取代基「芳烷氧基羰基」係指基團(芳基)-(烷基)-O-C(O)-。

【0075】關於本文揭示的含有一或多個取代基之任何基團，當然應理解的是，此等基團不含有在空間上不切實際及/或在合成上不可行的任何取代或取代型式。另外，標的化合物包括由此等化合物之取代產生的所有立體化學異構物。

【0076】術語「醫藥學上可接受之鹽」意指對於投與至患者(例如哺乳動物)可接受之鹽(帶有具有針對給定劑量方案而言可接受之哺乳動物安全性的相對離子之鹽)。此等鹽可來源於醫藥學上可接受之無機或有機鹼，且來源於醫藥學上可接受之無機或有機酸。「醫藥學上可接受之鹽」係指化合物之醫藥學上可接受之鹽，該等鹽來源於此項技術中熟知之各種有機及無機相對離子，且僅舉例而言，包括鈉、鉀、鈣、鎂、銨、四烷基銨及類似物；且當分子含有鹼性官能性時，包括有機或無機酸之鹽，諸如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、甲酸鹽、酒石酸鹽、苯磺酸鹽、甲磺酸鹽、乙酸鹽、順丁烯二酸鹽、草酸鹽及類似物。

【0077】基團之結構繪圖中之波形線表示基團與母體結構之連接點。

【0078】術語「其鹽」意指當酸之質子由陽離子(例如金屬陽離子或有機陽離子及類似陽離子)置換時所形成之化合物。在適用的情況下，該鹽為醫藥學上可接受之鹽，儘管對不意欲投與至患者的中間物化合物之鹽而言此狀況並非必需的。舉例而言，本發明化合物之鹽包括其中化合物藉由無機或有機酸來質子化以形成陽離子之彼等鹽，而無機或有機酸之共軛鹼作為鹽之陰離子組分。

【0079】「溶劑合物」係指由溶劑分子與溶質之分子或離子組合而形成之複合物。溶劑可為有機化合物、無機化合物或兩者之混合物。溶劑之些實例包括但不限於：甲醇、*N,N*-二甲基甲醯胺、四氫呋喃、二甲亞碸，及水。當溶劑為水時，所形成之溶劑合物為水合物。

【0080】「立體異構物(Stereoisomer/Stereoisomers)」係指具有相同原子連接性但在空間中不同原子排列之化合物。立體異構物包括順式-反式異構物、*E*及*Z*異構物、鏡像異構物及非鏡像異構物。

【0081】「互變異構物」係指差別僅在於原子之電子鍵結及/或質子之位置的分子之替代形式，諸如烯醇-酮及亞胺-烯胺互變異構物，或含有-*N=C(H)-NH-*環原子排列之雜芳基之互變異構形式，諸如吡唑、咪唑、苯并咪唑、

三唑及四唑。一般技藝人士將認識到其他互變異構環原子排列為可能的。

【0082】 應瞭解，術語「或其鹽或溶劑合物或立體異構物」意欲包括鹽、溶劑合物及立體異構物之所有排列，諸如標的化合物之立體異構物的醫藥學上可接受之鹽之溶劑合物。

【0083】 如本文所用，藥物、化合物、複合體、藥物複合體、抗體藥物複合體或醫藥組成物之「有效劑量」或「有效量」係足以實現有益或所要結果之量。對預防用途而言，有益或所要結果包括諸如以下之結果：消除或降低風險、減輕嚴重性、或延遲疾病之發作，該疾病包括疾病之生物化學、組織學及/或行爲症狀，在疾病發展期間存在的該疾病之併發症及中間病理表現型。對治療用途而言，有益或所要結果包括諸如以下之臨床結果：諸如經由靶向疾病、延遲疾病之發展及/或延長存活來減少由疾病引起之一或多種症狀，提高罹患疾病之彼等患者之生活品質，降低治療疾病所需的其他藥劑之劑量、增強另一藥劑之效應。在癌症或腫瘤的狀況下，藥物之有效量可具有以下效應：減少癌細胞數量；減小腫瘤大小；抑制(亦即，在某種程度上減緩且較佳地終止)癌細胞浸潤至周邊器官；抑制(亦即，在某種程度上減緩且較佳地終止)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病症相關聯之症狀中之一或多者。有效量可在一或多次投與中投與。出於本揭示內容之目的，藥物、化合物或醫藥組

成物之有效劑量為足以直接或間接完成預防性或治療性治療之量。如臨床情形中所理解的，藥物、化合物或醫藥組成物之有效劑量可或可不與另一藥物、化合物或醫藥組成物結合而達成。因此，「有效劑量」可在投與一或多種治療劑之情形中考慮，且若單一藥劑與一或多種其他藥劑結合時可達成或達成所需結果，則該單一藥劑可視為以有效量來給予。

【0084】如本文所使用，「與...結合」係指除一個治療模態以外投與另一治療模態。因而，「與...結合」係指在向個體投與一個治療模態之前、期間或之後投與其他治療模態。

【0085】如本文所使用，「治療」*(treatment/treating)*為用於獲得有益或所要結果之方法，該等結果包括且較佳為臨床結果。出於本揭示內容之目的，有益或所要臨床結果包括但不限於以下一或多者：減少癌細胞之增殖(或破壞癌細胞)，減少由疾病引起之症狀，提高罹患疾病之彼等患者之生活品質，降低治療疾病所需之其他藥劑之劑量，延遲疾病之進展及/或延長個體之存活。

【0086】如本文所使用，「延遲疾病之發展」意指推遲、阻礙、減緩、阻滯、穩定及/或延緩疾病(諸如癌症)之發展。取決於受治療疾病及/或個體之病史，此延遲可具有變化的時間長度。如對熟習此項技術者明顯的，充分或顯

著延遲實際上可涵蓋預防，原因在於個體不會發展該疾病。例如，可延遲晚期癌症，如轉移之發展。

【0087】「個體」或「受試者」為哺乳動物，更佳為人類。哺乳動物亦包括但不限於：農場動物、體育動物、寵物(諸如貓、狗、馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。

【0088】如本文所使用，術語「特異地識別」或「特異地結合」係指可量測及可再現的相互作用，諸如靶標與抗體(或分子或部分)之間的引力或結合，其決定在分子(包括生物分子)之異源群體存在下靶標之存在。例如，特異性或優先地結合至抗原決定基之抗體為一種抗體，其以比其結合至靶標之其他抗原決定基或非靶標抗原決定基更大的親和力、結合性(avidity)、更大的容易性及/或更長的持續時間結合此抗原決定基。亦應理解，例如，特異性或優先地結合至第一靶標之抗體(或部分或抗原決定基)可或可不特異性或優先地結合至第二靶標。同樣地，「特異地結合」或「優先地結合」未必需要(儘管其可包括)排他結合。特異地結合至靶標之抗體可具有至少約 10^3 M^{-1} 或 10^4 M^{-1} ，有時約 10^5 M^{-1} 或 10^6 M^{-1} ，在其他情況下約 10^6 M^{-1} 或 10^7 M^{-1} 、約 10^8 M^{-1} 至 10^9 M^{-1} ，或約 10^{10} M^{-1} 至 10^{11} M^{-1} 或更高之結合常數。各種免疫測定格式可用於選擇與特定蛋白質特異地免疫反應之抗體。例如，固相ELISA免疫測定常規地用於選擇與蛋白質特異地免疫反應之單株抗體。關於可用來測定特異免疫反應性之免疫測定格式及條件之描述，參見，例

如， Harlow 及 Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York。

【0089】如本文所用，術語「癌症」、「腫瘤」、「癌性」及「惡性」係指或描述哺乳動物的特徵通常為不受調節的細胞生長之生理學病狀。癌症之實例包括但不限於癌瘤，該癌瘤包括腺癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、黑素瘤及肉瘤。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌、胃腸癌、霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、神經膠質母細胞瘤、宮頸癌、神經膠質瘤、卵巢癌、諸如肝癌及肝腫瘤之肝臟癌症、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、諸如腎細胞癌及維爾姆斯腫瘤之腎癌、基底細胞癌、黑素瘤、間皮瘤、前列腺癌、甲狀腺癌、睾丸癌、食道癌、膽囊癌以及各種類型之頭頸癌。

【0090】除非上下文另有清楚地指示，否則如本文及隨附發明申請專利範圍所使用，單數形式「一個/種」及「該(該等)」包括複數提及物。例如，對一「抗體」之提及係指一個至許多抗體，諸如就莫耳量而言，且包括熟習此項技術者已知的其等效物，等等。

【0091】在本文中對「約」某一值或參數之提及包括(且描述)針對彼值或參數本身之實施例。例如，對「約X」提及之描述包括對「X」之描述。

【0092】 應理解，本文所述的本發明之態樣及變化包括「由態樣及變化組成」及/或「基本上由態樣及變化組成」。

【0093】 除非另外定義，否則本文所使用的所有技術及科技術語皆具有與本發明所屬領域之一般技藝人士通常所理解相同之含義。雖然亦可在本發明之實踐或測試中使用類似於或等效於本文所述的彼等者之任何方法及材料，但現將描述較佳方法及材料。在本文中提及的所有出版物皆以引用方式併入本文，以便揭示並描述與所引用之出版物相關之方法及/或材料。

【0094】 除非另外指出，否則本發明實施例之方法及技術通常係根據此項技術中熟知且如本說明書通篇引用並論述之各種一般性及更特定參考文獻中所述的習知方法來執行。參見，例如Loudon, *Organic Chemistry*, 第4版, New York: Oxford University Press, 2002, 頁數 360-361, 1084-1085 ; Smith 及 March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第5版, Wiley-Interscience, 2001。

【0095】 本文對標的化合物所使用的命名法在本文中之實例中說明。此命名法通常使用市售AutoNom軟體(MDL, San Leandro, Calif.)來獲得。

【0096】 應瞭解，為清楚起見而在單獨實施例之上下文中所述的本發明之某些特徵亦可以組合方式提供於單一

實施例中。相反地，為簡潔起見在單一實施例之上下文中所述的本發明之各種特徵亦可單獨地提供或以任何適合的子組合形式提供。關於藉由變數表示的化學基團之實施例之所有組合係特定地受本發明涵蓋，且在本文中予以揭示，猶如每個及各個組合經個別地及明確地揭示一般，從而達到此類組合涵蓋作為穩定化合物之化合物(亦即，可得以分離、表徵並針對生物活性加以測試之化合物)的程度。此外，在描述此等變數之實施例中所列出的化學基團之所有子組合亦特定地受本發明涵蓋，且在本文中予以揭示，猶如化學基團之每個及各個子組合經個別地且明確地在本文中揭示一般。

詳細描述

【0097】 本揭示內容提供具有親水性自我犧牲連接子之化合物(抗FRA抗體藥物複合體)，其可在適當條件下為可分裂的且併入親水性基團來提供複合體之較好溶解度。親水性自我犧牲連接子可提供用於常常為疏水性的細胞毒性藥物之藥物複合體的增加溶解度。在藥物複合體中使用親水性自我犧牲連接子之其他優點包括藥物複合體之增加的穩定性，及藥物複合體之減少的聚集。

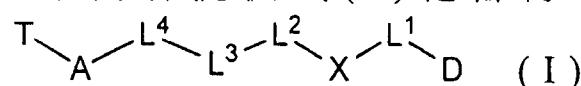
【0098】 本揭示內容提供可具有優異血清穩定性之抗體藥物複合體。例如，與其中藥物之羥基經由不穩定碳酸酯鍵聯(易於在水性緩衝液或人類血清中快速水解)連接至間隔子的抗體藥物複合體對比，利用芋氮基羰基鍵聯之本發明實施例之抗體藥物複合體可在相同條件下相對更

穩定，且可選擇性地經歷碎斷以在用例如組織蛋白酶B之蛋白酶處理之後釋放藥物。在需要向患者之血清投與非活性藥物，使彼非活性藥物經由配位體集中於靶標處，且隨後使彼抗體藥物複合體僅在靶標附近轉化成活性形式的情況下，血清穩定性為抗體藥物複合體之合乎需要的性質。

【0099】 本揭示內容提供可具有減少聚集之抗體藥物複合體。一些酶不穩定連接子之增加的相關聯疏水性可導致抗體藥物複合體之聚集，尤其是利用強疏水性藥物的情況下如此。在親水性基團併入連接子中的情況下，可存在抗體藥物複合體之減少聚集。

【0100】 本揭示內容之化合物(抗體藥物複合體)包含藥物部分；靶向部分，該靶向部分能夠靶向選定細胞群體(例如，FRA 表現細胞)；以及連接子，該連接子含有醯基單元、用於在藥物部分與靶向部分之間提供距離的可選間隔子單元、可在適當條件下為可分裂的肽連接子、親水性自我犧牲連接子以及可選第二自我犧牲間隔子或環化自我消除連接子。以下論述每一特徵。

【0101】 本揭示內容提供式(I)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

D 為藥物部分；

T 為靶向部分；

X 為親水性自我犧牲連接子；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

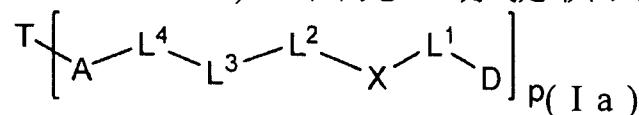
其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；

L³ 為肽連接子；

L⁴ 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0102】 在一些實施例中，靶向部分為特異地結合至 FRA (例如，人類 FRA) 之抗體。在一些實施例中，靶向部分為具有用於連接至藥物部分之一或多個連接位點之抗 FRA 抗體。例如，靶向部分 T 可具有用於連接至連接子 - 藥物部分之多個位點 (例如，A - L⁴ - L³ - L² - X - L¹ - D)。因此，亦提供式(Ia)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中 D、T、X、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 係如對式(I)所定義，且 p 為 1 至 20。在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。在一些實施例中，p 為 2。在一些實施例中，p 為 3。在一些實施例中，p 為 4。

肽連接子

【0103】在式(I)中， L^3 為肽連接子。在某些實施例中， L^3 為具有 1 至 10 個胺基酸殘基之肽連接子。在某些實施例中， L^3 為具有 2 至 4 個胺基酸殘基之肽連接子。在某些情況下， L^3 為二肽連接子。

【0104】胺基酸殘基可為天然存在或非天然胺基酸殘基。術語「天然胺基酸」及「天然存在胺基酸」係指 Ala、Asp、Cys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp 及 Tyr。「非天然胺基酸」(亦即，胺基酸並不天然地存在)舉非限制性實例而言包括：高絲胺酸、高精胺酸、瓜胺酸、苯基甘胺酸、牛磺酸、碘酪胺酸、硒基半胱胺酸、正白胺酸(「Nle」)、正纈胺酸(「Nva」)、 β -丙胺酸、L-或 D-蔡丙胺酸、鳥胺酸(「Orn」)及類似物。

【0105】胺基酸亦包括 D-形式之天然及非天然胺基酸。「D-」指定具有「D」(右旋性)組態之胺基酸，其與天然存在(「L-」)胺基酸之組態相反。在未指示特定組態的情況下，熟習此項技術者將理解胺基酸欲為 L-胺基酸。然而，胺基酸亦可呈 D-組態及 L-組態之外消旋混合物。天然及非天然胺基酸可商購(Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtech)或使用此項技術中已知的方法合成。胺基酸取代可基於殘基之極性相似性、電荷、溶解度、疏水性、親水性及/或兩親性質來製成，只要保持該等殘基之生物活性即可。

【0106】 肽基氨基酸殘基序列可經特定定製，以便其將藉由一或多種腫瘤相關聯蛋白酶而選擇性地自所得肽基衍生物藥物複合體酶促分裂。

【0107】 在某些實施例中， L^3 為包含至少一個離胺酸或精胺酸殘基之肽連接子。

【0108】 在某些實施例中， L^3 為包含選自以下者之胺基酸殘基之肽連接子：離胺酸、D-離胺酸、瓜胺酸、精胺酸、脯胺酸、組胺酸、鳥胺酸及麩醯胺酸。

【0109】 在某些實施例中， L^3 為包含選自以下者之胺基酸殘基之肽連接子：纈胺酸、異白胺酸、苯基丙胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺酸、脯胺酸、丙胺酸、白胺酸、色胺酸及酪胺酸。

【0110】 在某些實施例中， L^3 為選自以下者之二肽連接子：纈胺酸-瓜胺酸、脯胺酸-離胺酸、甲硫胺酸-D-離胺酸、天冬醯胺酸-D-離胺酸、異白胺酸-脯胺酸、苯基丙胺酸-離胺酸及纈胺酸-離胺酸。在某些實施例中， L^3 為纈胺酸-瓜胺酸。

【0111】 適用於本揭示內容之眾多特定肽連接子分子可針對用於藉由特定腫瘤相關聯蛋白酶進行的酶促分裂之選擇性加以設計及最佳化。適用於本揭示內容之某些肽連接子為針對蛋白酶、組織蛋白酶 B 及 D 最佳化的彼等肽連接子。

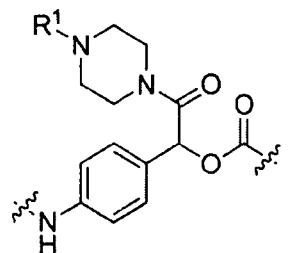
親水性自我犧牲連接子

【0112】 在式(I)中，X 為親水性自我犧牲連接子。

【0113】本揭示內容之化合物使用親水性自我犧牲間隔子部分，其將藥物部分及靶向部分間隔且共價地連接在一起，且併入提供化合物之較好溶解度的親水性基團。一些酶不穩定連接子之增加的相關聯疏水性可導致藥物複合體之聚集，尤其是利用強疏水性藥物的情況下如此。在親水性基團併入連接子中的情況下，可存在藥物複合體之減少聚集。

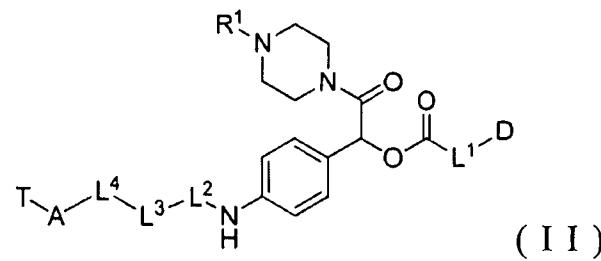
【0114】自我犧牲間隔子可定義為雙官能化學部分，該雙官能化學部分能夠將兩個間隔化學部分共價地連接在一起成為正常穩定的三連分子，可藉助於酶促分裂將該等間隔化學部分中之一自三連分子釋放；且在酶促分裂之後，可自發地自分子之剩餘部分分裂以釋放間隔化學部分之其他者。

【0115】在某些實施例中，X 為苄氨基羰基。在某些實施例中，X 為



其中 R^1 為氫、未經取代或經取代 C_{1-3} 烷基或未經取代或經取代雜環基。

【0116】在此等情況下，本揭示內容提供式(II)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

D 為藥物部分；

T 為靶向部分；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵、第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

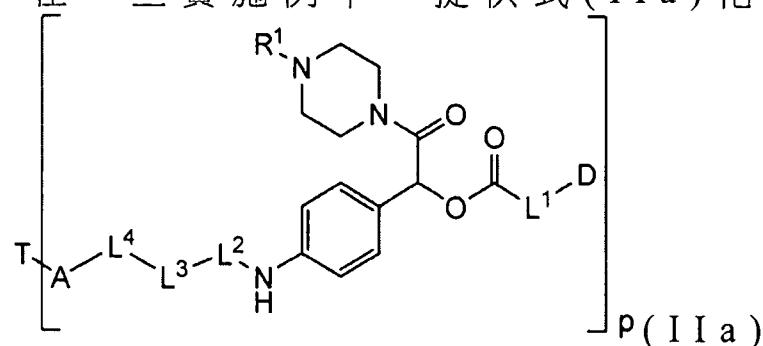
其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；

L³ 為肽連接子；

L⁴ 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0117】 在一些實施例中，提供式(IIa)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中 D、T、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 如對式(II)所定義，且 p 為 1 至 20。在一

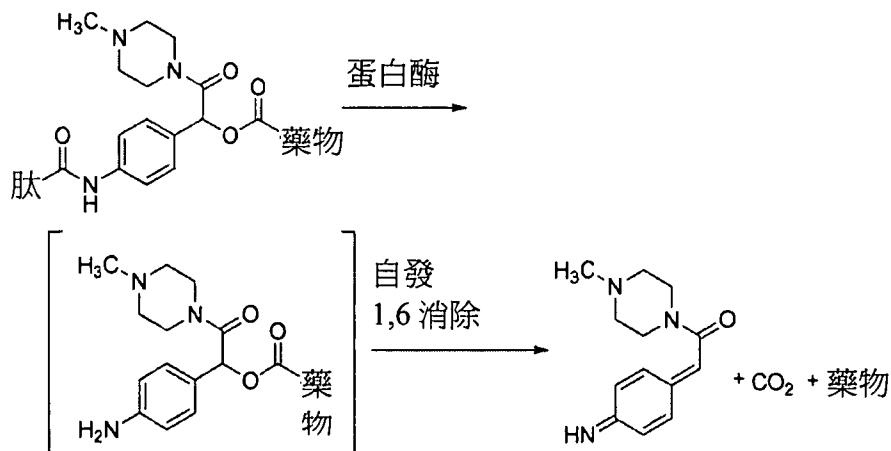
些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。在一些實施例中，p 為 2。在一些實施例中，p 為 3。在一些實施例中，p 為 4。

【0118】 在式(II)或(IIa)之某些實施例中，R¹ 為氫。在某些情況下，R¹ 為甲基。

【0119】 意欲且應理解的是，對式(I)或(Ia)描述的 D、T、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 之每一及各個變化可應用於式(II)或(IIa)，如同每一及各個變化及其組合得以個別地描述一般。例如，在一些實施例中，式(II)或(IIa)之靶向部分為特異地結合至葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體。另外意欲且應理解的是，對式(I)描述的 D、T、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 之一者的每一及各個變化可在適用時與對式(I)描述的 D、T、L¹、L²、L³、L⁴ 及 A 之另一者的每一及各個變化組合，如同每一及各個組合得以個別地描述一般。

【0120】 藥物部分之釋放係基於胺基苄氧基羰基之自我消除反應。出於說明目的，利用連接有藥物及肽之胺基苄氧基羰基之反應流程在以下展示。

流程 1



【0121】參照流程1，自肽分裂時，形成胺基苄氧基羰基且該胺基苄氧基羰基能夠經歷自發1,6消除，以形成環己-2,5-雙亞胺衍生物及二氧化碳且釋放藥物。

可選第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子

【0122】第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子提供另一連接子，以允許精細調整化合物之分裂，以釋放藥物部分。

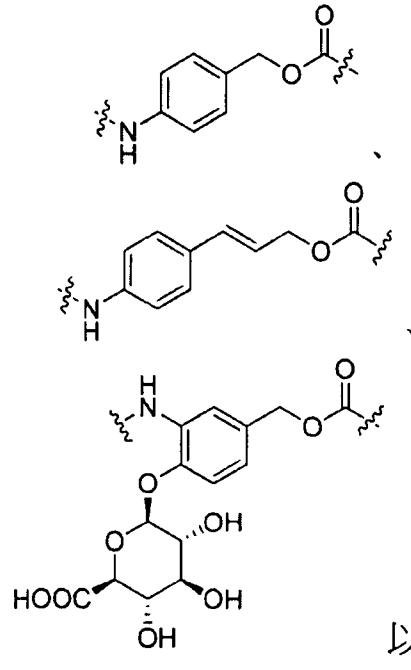
【0123】在式(I)或(Ia)中， L^1 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子； L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^1 為鍵；且其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵。因此，存在相鄰親水性自我犧牲連接子之可選第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子。

【0124】在某些實施例中， L^1 為鍵，且 L^2 為鍵。在某些實施例中， L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，且 L^2 為鍵。在某些實施例中， L^1 為鍵，且 L^2 為第二自我犧牲連接子。

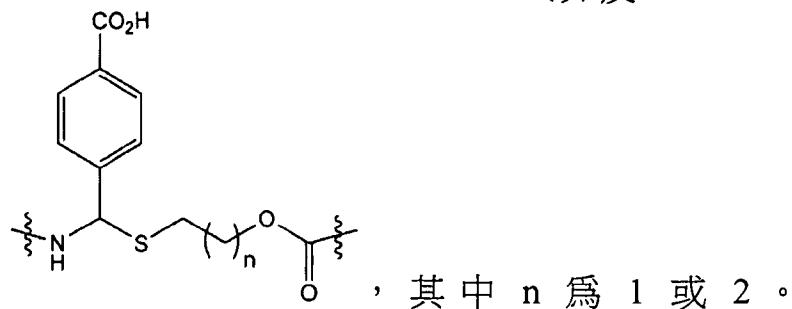
【0125】在式(I)或(Ia)中，在某些實施例中， L^1 為

鍵。在某些實施例中， L^1 為第二自我犧牲間隔子或環化自我消除連接子，其將親水性自我犧牲連接子及藥物部分分離。在某些實施例中， L^1 為胺基苄基氨基羰基連接子。

【0126】 在某些實施例中， L^1 係選自：



以 及



【0127】在某些情況下，第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子提供用於可使用之更廣泛種類之部分的設計潛力。例如，在式(II)或(IIa)中，親水性自我犧牲連接子與藥物部分之間的胺甲酸酯鍵聯(-O-C(O)-N(H)-)鍵聯將提供穩定藥物複合體，且將容易分裂以提供游離藥物部分。親水性自我犧牲連接子將典型地由氨基羰基(-O-C(O)-)封端。若藥物部分具有可用於反應形成胺甲酸酯基的氨基-反應性基團，則第二自我犧牲單元或環化

自我消除連接子不為必要的；儘管仍可使用該第二自我犧牲單元或環化自我消除連接子。然而，若藥物不含有胺基，但替代地含有一些其他反應性官能基，則此等藥物仍可藉由在藥物部分與胺基苄氨基羰基之間包括第二、中間物自我犧牲間隔子或環化自我消除連接子，從而併入本發明實施例之含胺基苄氨基羰基化合物中。

【0128】以下 L^1 之環化自我消除連接子提供含羥基或含硫醇藥物部分與親水性自我犧牲連接子之胺基苄氨基羰基之鍵聯：

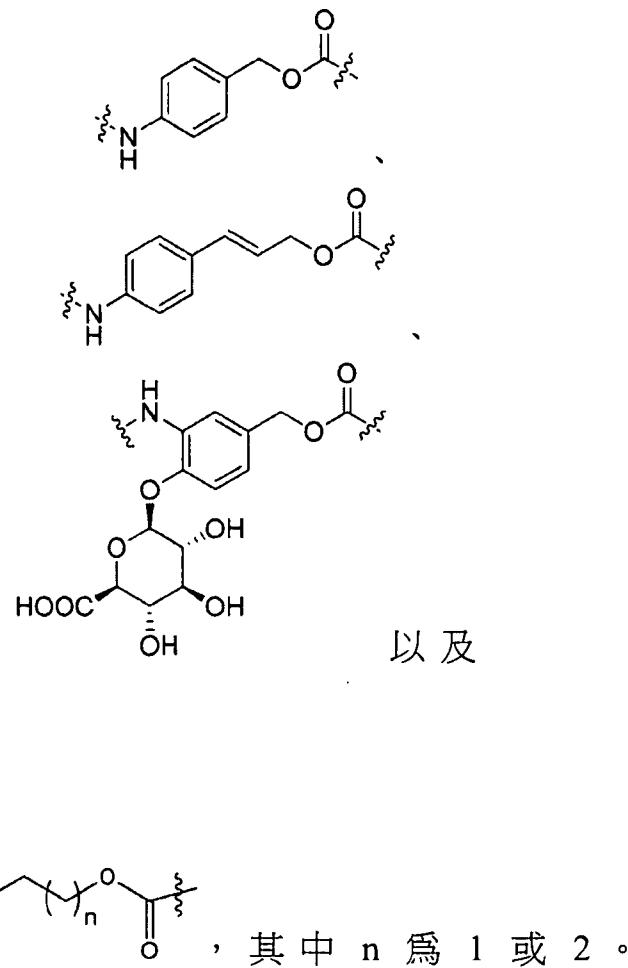


【0129】實施例之化合物中之環化自我消除連接子提供用於化合物之分裂以釋放藥物部分。相鄰親水性自我犧牲連接子之消除機構將顯露 L^1 之胺基。胺基可隨後在環化反應中與 L^1 之胺甲酸酯基或硫胺基甲酸酯鍵聯及藥物部分反應，以釋放含羥基或含硫醇藥物部分。

【0130】在式(I)或(Ia)中，在某些實施例中， L^2 為鍵。在某些實施例中， L^2 為第二自我犧牲間隔子，其將親水性自我犧牲連接子及肽連接子分離。在某些實施例

中， L^2 為胺基苄基羰基連接子。

【0131】在某些實施例中， L^2 係選自



可選間隔子

【0132】在式(I)或(Ia)中， L^4 為鍵或間隔子。在某些實施例中， L^4 為鍵。在某些實施例中， L^4 為間隔子，其可提供藥物部分與靶向部分之間的距離。

【0133】在某些實施例中，間隔子係選自烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、芳基、經取代芳基、環烷基、經取代環烷基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環、經取代雜環，及雜原子，以及其組合。間隔子可在其原子內含物方面為同源或異源的(例如，僅含有碳原子之間隔子，或含有碳原子以及存在於間隔子上之一或

多個雜原子的間隔子。較佳地，間隔子含有 1 至 50 個碳原子，及選自氧、氮及硫之 0 至 30 個雜原子。間隔子亦可為對掌性或非對掌性、直鏈、支鏈或環狀的。

【0134】 在某些實施例中， L^4 為間隔子，其選自聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基及多胺。伸烯基之實例包括但不限於伸乙烯基 ($-CH=CH-$)、伸烯丙基 ($-CH_2C=CH-$) 及伸丁-3-烯-1-基 ($-CH_2CH_2C=CH-$)。伸炔基之實例包括但不限於伸乙炔基 ($-C\equiv C-$) 及伸丙炔基 ($-CH_2C\equiv C-$)。

【0135】 在某些實施例中， L^4 為間隔子，其包含可提供與肽鍵聯之終末端的鍵聯的官能基。諸如 $C(O)$ 、 $C(O)-NH$ 、 $S(O)_2$ 及 $S(O)_2-NH$ 之官能基可提供與肽鍵聯之終末端的鍵聯。在某些情況下， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ 、 $L^{4a}-C(O)-NH$ 、 $L^{4a}-S(O)_2$ 、 $L^{4a}-S(O)_2-NH$ ，其中 L^{4a} 係選自聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基及多胺。在某些情況下， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 係選自聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基及多胺。

【0136】 在某些實施例中， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 為聚烷二醇。在某些實施例中， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 為聚乙二醇。在某些實施例中，間隔子具有式 $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_m-CH_2-C(O)-$ ，其中 m 為 0 至 30 之整數。

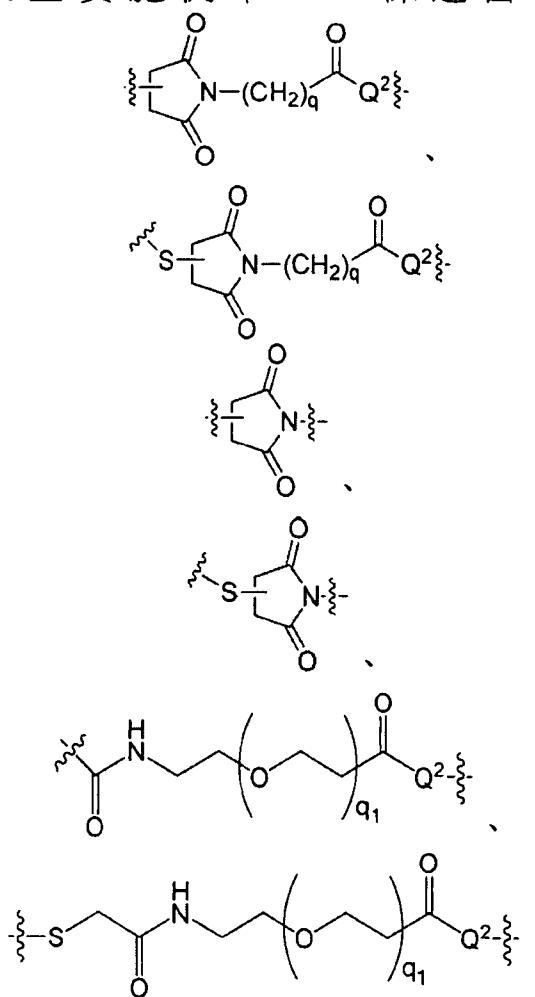
【0137】 在某些實施例中， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 為伸烷基。在某些實施例中， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a}

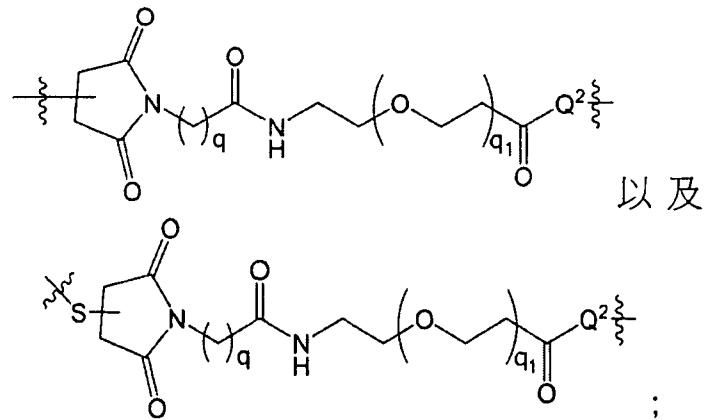
爲 $C_{1.10}$ 伸烷基、 $C_{1.8}$ 伸烷基或 $C_{1.6}$ 伸烷基。在某些實施例中， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 為 C_4 伸烷基、 C_5 伸烷基或 C_6 伸烷基。在某些實施例中， L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 為 C_5 伸烷基。

醯基單元

【0138】在式(I)或(Ia)中，A 為醯基單元。在某些實施例中，醯基單元「A」包含硫原子，且經由來源於靶向部分之硫原子連接至靶向部分。在此等情況下，二硫鍵形成在醯基單元與靶向部分之間。

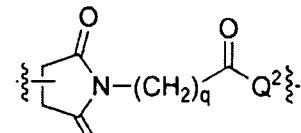
【0139】在某些實施例中，A 係選自



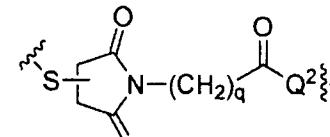


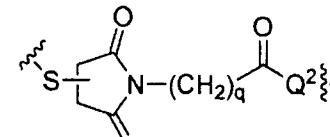
以及

其中 Q^2 為 NH 或 O ，每一 q 獨立地為 1 至 10 之整數，且每一 q_1 獨立地為 1 至 10 之整數。在一些實施例中， q 為 2 至 5 之整數，諸如 2、3、4 或 5。在一些實施例中， q_1 為 2 至 5 之整數，諸如 2、3、4 或 5。

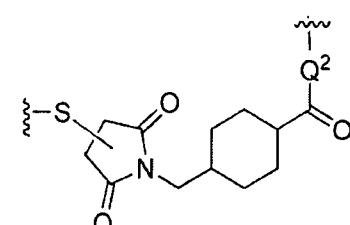
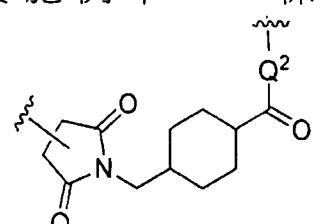


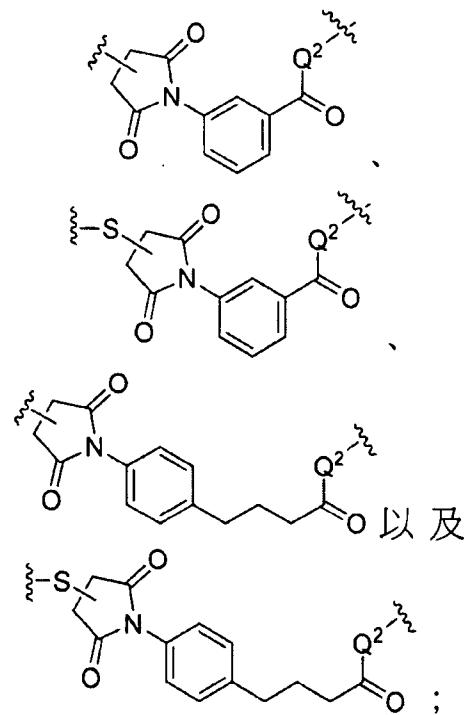
【0140】在某些實施例中， A 為 ，其中 Q^2 為 NH 或 O ，且 q 為 1 至 10 之整數。在某些情況下， q 為 2 至 5 之數，諸如 2、3、4 或 5。



【0141】在某些實施例中， A 為 ，其中 Q^2 為 NH 或 O ，且 q 為 1 至 10 之整數。在某些情況下， q 為 2 至 5 之數，諸如 2、3、4 或 5。

【0142】在某些實施例中， A 係選自





其中 Q^2 為 NH 或 O 。

藥物部分

【0143】本發明實施例之藥物複合體對於相應藥物對其有效之通常目的為有效的，且由於靶向部分中固有的將藥物運送至該藥物具有特定益處的所要細胞之能力而具有優異功效。

【0144】適用於本發明實施例中之較佳藥物為細胞毒性藥物，諸如用於癌症療法之彼等細胞毒性藥物。此類藥物一般而言包括：DNA 損傷劑、抗代謝物、天然產物以及其類似物。細胞毒性劑之某些類別包括例如：諸如二氫葉酸還原酶抑制劑之酶抑制劑、胸苷酸合酶抑制劑、DNA 嵌入劑、DNA 分裂劑、拓撲異構酶抑制劑、蔥環家族之藥物、長春花屬藥物、絲裂黴素、博萊黴素、細胞毒性核苷、喋啶家族之藥物，烯二炔、鬼臼毒素、分化誘導劑以及紫杉醇。彼等類別之某些有用成員包括例如：胺甲喋

吟、胺甲嘌呤、二氯甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、阿糖胞苷、美法伦、长春罗新(leurosine)、异长春碱(leurosidine)、放线菌素、道诺霉素、阿霉素、丝裂霉素C、丝裂霉素A、洋红霉素、氨基喋呤、他利霉素(tallysomycin)、鬼臼毒素以及鬼臼毒素衍生物诸如依托泊苷(etoposide)或磷酸依托泊苷、长春花碱、长春新碱、长春地辛、紫杉醇、泰索帝视黄酸、丁酸、N⁸-乙酰基亚精胺、喜树碱及其类似物。其他药物包括尾海兔素及倍癌霉素。

【0145】熟習此項技術者可對所要化合物進行化學改質，以便使彼化合物之反應更便於達成製備本發明之複合體之目的。

【0146】在某些實施例中，D 為具有化學反應性官能基之藥物部分，藥物藉助於該化學反應性官能基鍵結至 L¹ 或 X。在某些情況下，官能基係選自一級胺、二級胺、羥基及硫氫基。在某些情況下，官能基為一級胺或二級胺。在某些情況下，官能基為羥基。在某些情況下，官能基為硫氫基。

【0147】如以上所論述，親水性自我犧牲連接子將典型地由氧基羰基(-O-C(O)-)封端。因此，含胺基藥物部分將容易與氧基羰基反應以形成胺甲酸酯基。在某些實施例中，D 為含胺基藥物部分，其中藥物經由胺基連接至 L¹ 或 X。

【0148】然而，若藥物部分不含有胺基，則 L¹ 之第二

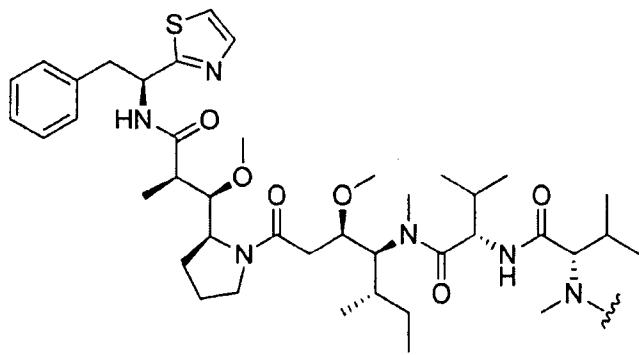
自我犧牲連接子或環化自我消除連接子可提供用於可使用之更廣泛種類之部分的設計潛力。在某些實施例中，D 為含羥基或含硫氫基藥物部分，其中藥物經由羥基或硫氫基連接至 L¹。

【0149】 代表性含胺基藥物包括絲裂黴素 C、絲裂黴素 A、道諾黴素、阿黴素、胺基喋呤、放線菌素、博萊黴素、9-胺基喜樹鹼、N⁸-乙醯基亞精胺、1-(2-氯乙基)-1,2-二甲烷磺醯基醯肼、他利黴素、阿糖胞苷、尾海兔素及其衍生物。含胺基藥物亦包括不天然地含有胺基之藥物之胺基衍生物。在某些實施例中，D 為倍癌黴素、尾海兔素、微管溶素、阿黴素(DOX)、紫杉醇或絲裂黴素 C(MMC)或其胺基衍生物。

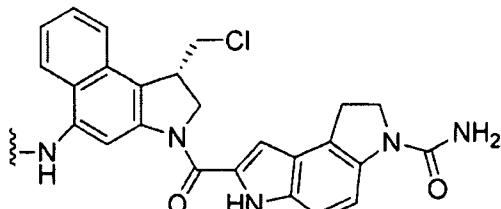
【0150】 代表性含羥基藥物包括依託泊苷、喜樹鹼、紫杉醇、埃斯波黴素(esperamicin)、1,8-二羥基-雙環[7.3.1]十三碳-4-9-二烯-2,6-二炔-13-酮、(美國專利第 5,198,560 號)、鬼臼毒素、蛇形菌素(anguidine)、長春新鹼、長春花鹼、嗎啉-阿黴素、n-(5,5-二乙醯氨基-戊基)阿黴素、倍癌黴素及其衍生物。

【0151】 代表性含硫氫基藥物包括埃斯波黴素及 6-巯基嘌呤及其衍生物。

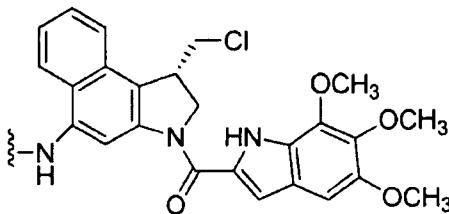
【0152】 在本發明實施例中用作藥物的某些群組之細胞毒性劑包括下式之藥物：



(尾海兔素之胺基衍生物)



(倍癌黴素之胺基衍生物)



(倍癌黴素之胺基衍生物)。

靶向部分

【0153】如本揭示內容所述的靶向部分係指特異地結合給定細胞群體(例如，FRA 表現細胞)、與其複合、與其反應或與其締合的部分或分子。在本文所述的複合體中，本文所述的靶向部分經由連接子連接至複合體中之藥物部分。在一些實施例中，靶向部分能夠將藥物部分(例如，用於治療目的之藥物部分)遞送至特定靶細胞群體，該靶向部分結合該特定靶細胞群體、與其複合、與其反應或與其締合。

【0154】在一些實施例中，靶向部分為抗體(或抗體部分或抗體靶向部分)。在一些實施例中，靶向部分包含硫氫基(-SH)基團(例如，游離反應性硫氫基(-SH)基團)或可經修飾以含有此硫氫基。在一些實施例中，靶向部分包含具有硫氫基(例如，游離反應性硫氫基)之抗體。在一

些實施例中，靶向部分包含游離硫醇基，諸如具有游離硫醇基之抗體，或可經修飾以含有此種硫基。在一些實施例中，包含硫氫基或硫醇基之靶向部分經由硫氫基中之硫原子鍵結至連接子。

【0155】在一些實施例中，靶向部分(例如，抗體靶向部分)具有用於連接至藥物部分之一或多個連接位點。例如，靶向部分 T (例如，抗體)可具有用於連接至連接子-藥物部分(例如， $A - L^4 - L^3 - L^2 - X - L^1 - D$ ，其中 A 適合於鍵結至靶向抗體之硫氫基)之多個位點(例如，多個硫氫基)。在一些實施例中，靶向部分可具有 1 至 20 個連接位點。在一些實施例中，靶向部分可具有 1 至 20 個、1 至 10 個、1 至 8 個、1 至 6 個、1 至 4 個、2 至 8 個、2 至 6 個或 2 至 4 個連接位點。在一些實施例中，靶向部分具有 1、2、3、4、5、6、7 或 8 個連接位點。在一些實施例中，靶向部分具有 2 個連接位點。在一些實施例中，靶向部分具有 1 個連接位點。在一些實施例中，靶向部分具有 4 個連接位點。在一些情況下，某些潛在的連接位點可能不可接近以用於鍵結至藥物部分。因此，靶向部分 T 中之連接位點數量可產生藥物複合體，該藥物複合體具有比潛在連接位點之數量更少數量之所連接藥物部分。在一些實施例中，連接位點中之一或更多者可接近以用於鍵結藥物部分。例如，抗體靶向部分可在抗體之每一鏈上具有可接近以用於經由連接子鍵結至藥物部分之一或兩個硫氫基。

【0156】本文所述的抗體係指免疫球蛋白分子，該免疫球蛋白分子能夠經由位於免疫球蛋白分子之可變區中的至少一個抗原識別位點而特異性結合至靶標(亦即，FRA)。如本文所使用，術語「抗體」不僅涵蓋完整多株或單株抗體，而且涵蓋其抗原結合片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、單鏈(ScFv)、其突變體、包含抗體部分之融合蛋白質，以及包含抗原識別位點之免疫球蛋白分子之任何其他經修飾組態。抗體包括任何類別之抗體，諸如IgG、IgA或IgM(或其子類別)，且抗體無需具有任何特定類別。取決於免疫球蛋白之重鏈之恆定域的抗體胺基酸序列，免疫球蛋白可指定為不同類別。存在五種主要類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等免疫球蛋白中之數種可進一步分成子種類(同種型)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。相應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別之免疫球蛋白之次單元結構及三維組態為熟知。

【0157】包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體可涵蓋單株抗體、多株抗體、抗體片段(例如，Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fc等等)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體(例如，完全人類抗體)、單鏈(ScFv)、雙特異性抗體、多特異性抗體、其突變體、包含抗體部分之融合蛋白質，以及包含具有所需特異性之抗原識別位點的免疫球蛋白分子之任何其他經修飾組態。抗

體可為鼠類、大鼠、駱駝、人類或任何其他起源(包括人類化抗體)。在一些實施例中，用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)之抗體為以下任一者：雙特異性抗體、多特異性分子、單鏈分子、雙功能分子及嵌合及人類化分子，其具有藉由抗體之至少一個高變區(hypervariable region；HVR)或互補判定區(complementarity determining region；CDR)賦予的用於多肽之親和力。用於本揭示內容之抗體亦包括單域抗體，該等單域抗體為抗體重鏈之可變域或抗體輕鏈之可變域。Holt 等人, *Trends Biotechnol.* 21:484-490, 2003。此項技術中亦已知製造包含抗體重鏈之可變域或抗體輕鏈之可變域域抗體之方法，該等域抗體含有來自抗體之六個天然存在HVR或CDR中之三個。參見，例如，Muyldeermans, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74:277-302, 2001。

【0158】在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體為單株抗體。如本文所使用，單株抗體係指實質上同源抗體之抗體，亦即，包含個別抗體之群體除可以微小量存在的可能天然存在的突變之外皆相同。此外，與典型地包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑對比，單株抗體不為離散抗體之混合物。修飾詞「單株」指示抗體之特性，該抗體自抗體之實質上同源群體獲得，且不欲解釋為需要藉由任何特定方法進行抗體之產生。例如，用於本揭示內容之單株抗體可藉由首先由 Kohler 及 Milstein,

1975, *Nature*, 256:495 描述的融合瘤方法來製成，或可藉由諸如美國專利第 4,816,567 號中所述的重組DNA 方法來製成。單株抗體亦可自使用例如 McCafferty 等人, 1990, *Nature*, 348:552-554 中所述的技術所產生之噬菌體文庫分離。

【0159】在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體為嵌合抗體。如本文所使用，嵌合抗體係指具有來自第一物種之可變區或可變區之部分以及來自第二物種之恆定區的抗體。完整嵌合抗體包含嵌合輕鏈之兩個複本及嵌合重鏈之兩個複本。此項技術中已知嵌合抗體之產生(Cabilly 等人(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3273-3277; Harlow and Lane (1988), *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory)。典型地，在此等嵌合抗體中，兩個輕鏈及兩個重鏈之可變區模擬來源於一個哺乳動物物種之抗體之可變區，而恆定部分與來源於另一物種之抗體中之序列同源。此等嵌合形式之一個明顯優點在於：例如，可變區可適宜地來源於使用自非人類寄主生物體容易獲得的融合瘤或 B 細胞的目前已知的來源，該等可變區與來源於例如人類細胞製劑之恆定區相組合。雖然可變區具有的優點為易於製備，且特異性不受其來源影響，但人類恆定區比來自非人類來源之恆定區較不可能在注射抗體時自人類受試者引出免疫反應。然而，定義不限於此特定實例。

【0160】 在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體為人類化抗體。如本文所使用，人類化抗體係指非人類(例如鼠類)抗體之形式，其為含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的特異性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗體之其他抗原結合子序列)。在極大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體之 HVR 或 CDR 之殘基由來自非人類物種(供體抗體)之 HVR 或 CDR 的具有所要特異性、親和力及容量之殘基置換，該等非人類物種諸如小鼠、大鼠或兔。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 Fv 框架區(framework region；FR)殘基由相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含既不在受體抗體亦不在引入 HVR 或 CDR 或架構序列中找到的殘基，但該等殘基係包括來進一步精製及最佳化抗體效能。一般而言，人類化抗體將實質上包含至少一個及典型地兩個可變域的全部，其中 HVR 或 CDR 區之全部或實質上全部相應於非人類免疫球蛋白之彼等者，且 FR 區之全部或實質上全部為人類免疫球蛋白一致序列之彼等者。人類化抗體最佳地亦將包含免疫球蛋白恆定區或域(Fc)之至少一部分，其典型地為人類免疫球蛋白之彼者。抗體可具有如 WO 99/58572 中所述來修飾的 Fc 區。其他形式之人類化抗體具有一或多個 HVR 或 CDR (一個、兩個、三個、四個、五個、六個)，其相對於原始抗體有所改變，其亦稱

爲「來源於」來自原始抗體之一或多個 HVR 或 CDR 的一或多個 HVR 或 CDR。

【0161】 在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體爲人類抗體。如本文所使用，人類抗體意指具有相應於由人類產生的抗體之胺基酸序列的胺基酸序列之抗體，及/或已使用此項技術中已知的用於製造人類抗體之任何技術製成。本文中所使用的人類抗體包括包含至少一個人類重鏈多肽或至少一個人類輕鏈多肽之抗體。一個此種實例爲包含鼠類輕鏈及人類重鏈多肽之抗體。人類抗體可使用此項技術中已知的各種技術產生。在一個實施例中，人類抗體係選自噬菌體文庫，其中彼噬菌體文庫表現人類抗體(Vaughan 等人，1996，Nature Biotechnology，14:309-314；Sheets 等人，1998，PNAS，(USA)95:6157-6162；Hoogenboom 及 Winter，1991，J. Mol. Biol.，227:381；Marks 等人，1991，J. Mol. Biol.，222:581)。人類抗體亦可藉由將人類免疫球蛋白基因座引入基因轉殖動物中來製成，該基因轉殖動物例如其中內源性免疫球蛋白基因已部分地或完全地失活的小鼠。此方法係描述於美國專利第 5,545,807 號；第 5,545,806 號；第 5,569,825 號；第 5,625,126 號；第 5,633,425 號；以及第 5,661,016 號中。或者，人類抗體可藉由使人類 B 淋巴細胞永生化來製備，該等 B 淋巴細胞產生針對靶抗原之抗體(此等 B 淋巴細胞可自個

體回收或可已在活體外免疫)。參見，例如，Cole 等人，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*，Alan R. Liss，第 77 頁 (1985)；Boerner 等人，1991，*J. Immunol.*，147 (1): 86-95；以及美國專利第 5,750,373 號。

【0162】在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體特異地結合至葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)(例如，人類 FRA)。在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗體特異地結合至 FRA 之細胞外域(例如，人類 FRA 之細胞外域)。如本文所使用，「FRA」係指野生型序列及天然存在變異體序列。藉由本發明之抗體識別的 FRA 之非限制性實例為人類 FRA (登錄號 P15328)。

【0163】以下提供人類葉酸受體 α 之胺基酸序列：

SEQ ID NO: 35 (人類 FRA)
 MAQRMTTQLL LLLVWVAVVG EAQTRIAWAR TELLNVCMNA KHHKEKPGPE
 DKLHEQCRPW RKNACCSTNT SQEAHKDVSY LYRFNWNHCG EMAPACKRHF
 IQDTCLYECs PNLPWIQQV DQSWRKERVL NVPLCKEDCE QWWEDCRTSY
 TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VGAACQPFHF YFPTPTVLCN EIWTSHSYKVS
 NYSRGSGRCI QMWFDPAQGN PNEEVARFYA AAMSGAGPWA AWPFLSSLAL
 MLLWLLS

【0164】在一些實施例中，本文所述的抗 FRA 抗體結合至人類細胞(例如，人類癌細胞)之細胞表面上表現的成熟 FRA(例如，人類 FRA)。在一些實施例中，本文所述的抗 FRA 抗體結合人類癌細胞(例如，卵巢癌細胞、肺癌細胞、子宮癌細胞、睾丸絨毛膜癌細胞、室管膜瘤細胞、

間皮瘤細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞或腎細胞癌瘤細胞) 之細胞表面上表現的成熟 F R A 。

【 0165 】 抗 F R A 抗體及其胺基酸序列之實例在以下表 1 中提供。

表 1 : 抗 F R A 抗體之胺基酸序列

SEQ ID NO.	描述
1	h L K 2 6 - I g G 1 重鏈
2	h L K 2 6 - I g G 4 p 重鏈
3	h L K 2 6 - κ 輕鏈
4	2 6 B 3 (小鼠) I g G 1 重鏈
5	2 6 B 3 (小鼠) κ 輕鏈
6	h M o v 1 9 - I g G 1 重鏈
7	h M o v 1 9 - κ 輕鏈
8	h L K 2 6 重鏈可變區
9	h L K 2 6 輕鏈可變區
10	2 6 B 3 重鏈可變區
11	2 6 B 3 輕鏈可變區
12	h M o v 1 9 重鏈可變區
13	h M o v 1 9 輕鏈可變區

【 0166 】 I g G 4 p 表示具有 S e r 2 2 8 至 P r o 之突變 (S 2 2 8 P) 的人類 I g G 4 抗體，該突變將防止 F a b 臂與另一 I g G 4 在活體內交換 Stubenrauch 等人，(2 0 1 0) Drug Metab Dispos. 3 8 (1) : 8 4 - 9 1 。

【 0167 】 以下所示序列之底線部分表示可變區之序列。以下所示序列之粗體部分表示 C D R 。

SEQ ID NO: 1 (h L K 2 6 - I g G 1 重鏈) :

EVQLVESGGVVQPGRLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYT
YYADSVKGRFAISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGTP
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2 (hL26-1gG4p 重鏈) :

EVQLVESGGVVQPGRLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYT
YYADSVKGRFAISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGTP
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 3 (hL26-κ 輕鏈) :

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKPWIYGTSNLASGVP
SRFSGSGSGTDYTFISSLQPEDIATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 4 (26B3 (小鼠) 1gG1 重鏈) :

GPELVKPGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQSHGKSLEWIGRIFPYNGDTFYNQK
FKGRATLTVDKSSSTAHMELRSLASEDSAVIDFCARGTHYFDYWQQGTTLTVSSAKTT
 PPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVWSWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY
 TLSSSVTVPSSPRPSETVCNVVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPK
 PKDVLTTLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSE
 LPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKV
 SLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAG
 NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

SEQ ID NO: 5 (26B3 (小鼠) κ 輕鏈) :

PASLSASVGETVTITCRTSENIFSYLAWYQQKQGISPOLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGS
GTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYAFPWTFGGGSKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS
GGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTKE
YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRC

S E Q I D N O : 6 (h M o v 1 9 - I g G 1 重 鏈) :
QVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGOSLEWIGRIHPYDGD
TFYNQKFOGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

S E Q I D N O : 7 (h M o v 1 9 - κ 輕 鏈) :
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQPGQOPRLLIYRASNLE
AGVPDRFSGSGSKTDFLTISPVEAEDAATYYCQOSREYPYTFGGGTKEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

S E Q I D N O : 8 (h L K 2 6 重 鏈 可 變 區)
EVQLVESGGVVQPGRLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYT
YYADSVKGRFAISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGTP
VTVSS

S E Q I D N O : 9 (h L K 2 6 輕 鏈 可 變 區)
DIQLTQSPSSLASVGDRVTITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKPWIYGTTSNLASGP
SRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKEIK

S E Q I D N O : 1 0 (2 6 B 3 重 鏈 可 變 區)
GPELVKGASVKISCKASDYSFTGYFMNWVMQSHGKSLEWIGRIFPYNGDTFYNQKF
KGRATLTVDKSSTAHMELRSLASEDSAVYFCARGTHYFDYWGQGTTLVSS

S E Q I D N O : 1 1 (2 6 B 3 輕 鏈 可 變 區)
PASLSASVGETVTITCRTSENIFSYLAWYQQKQGISPOLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGS
GTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYAFPWTFGGGSKLEIK

S E Q I D N O : 1 2 (h M o v 1 9 重 鏈 可 變 區)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGD
TFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTT
VTVSS

S E Q I D N O : 13 (h M o v 1 9 輕鏈可變區)
DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLE
AGVPDRFSGSGSKTDFLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGTKLEIK

【 0 1 6 8 】 以上抗 F R A 抗體之 C D R 在以下表 2 中提供。

表 2 : 抗 F R A 抗體之 C D R 之胺基酸序列

	hLK26	26B3	hMov19
CDR-H1	GYGLS (SEQ ID NO: 14)	GYFMN (SEQ ID NO: 20)	GYFMN (SEQ ID NO: 26)
CDR-H2	MISSGGSYTYYAD SVKG (SEQ ID NO: 15)	RIFPYNGDTFYNQK FKG (SEQ ID NO: 21)	RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 27)
CDR-H3	HGDDPAWFAY (SEQ ID NO: 16)	GTHYFDY (SEQ ID NO: 22)	YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 28)
CDR-L1	SVSSSISSNNLH (SEQ ID NO: 17)	RTSENIFSYLA (SEQ ID NO: 23)	KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 29)
CDR-L2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 18)	NAKTLAE (SEQ ID NO: 24)	RASNLEA (SEQ ID NO: 30)
CDR-L3	QQWSSYPYMYT (SEQ ID NO: 19)	QHHYAFPWT (SEQ ID NO: 25)	QQSREYPYT (SEQ ID NO: 31)

【 0 1 6 9 】 以下提供重鏈恆定區之胺基酸序列：

S E Q I D N O : 3 2 (I g G 1 重鏈恆定區)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

S E Q I D N O : 3 3 (I g G 4 p 重鏈恆定區)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQ
 SSGLYSLSSVVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPRE
 EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 34 (κ輕鏈恆定區)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0170】在一些實施例中，抗 F R A 抗體為抗體 h L K 2 6 、 h M o v 1 9 或來源於任何此等抗體之抗體。在一些實施例中，抗 F R A 抗體為抗體 2 6 B 3 或來源於抗體 2 6 B 3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。抗體 h L K 2 6 、 h M o v 1 9 及 2 6 B 3 之輕鏈及重鏈可變序列在以上表 1 列明。在一些實施例中，抗 F R A 抗體包含來自抗體 h L K 2 6 或 h M o v 1 9 (或來源於此等抗體之任一者的抗體)之輕鏈及/或重鏈之一個、兩個或三個 H V R (或 C D R)。在一些實施例中，抗 F R A 抗體包含來自抗體 h L K 2 6 或 h M o v 1 9 (或來源於此等抗體之任一者的抗體)之輕鏈或重鏈之一個、兩個或三個 H V R (或 C D R)，諸如以上表 2 中列明的 C D R 序列。在一些實施例中，抗 F R A 抗體包含來自抗體 h L K 2 6 及 h M o v 1 9 (及來源於此等抗體之任一者的抗體)之輕鏈及重鏈之一個、兩個及三個 H V R (及 C D R)，諸如以上表 2 中列明的 C D R 序列。在一些實施例中，抗 F R A 抗體包含來自抗體 2 6 B 3 或來源於抗體 2 6 B 3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)之輕鏈及/或重鏈之一個、兩個或三個 H V R (或

CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含來自抗體 26B3 或來源於抗體 26B3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)之輕鏈或重鏈之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)，諸如以上表 2 列明的 CDR 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含來自抗體 26B3 或來源於抗體 26B3 之抗體(例如，諸如人類化及嵌合抗體)之輕鏈及重鏈之一個、兩個及三個 HVR (及 CDR)，諸如以上表 2 列明的 CDR 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含抗體 hLK26 或 hMov19 之片段或區域。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含來源於抗體 26B3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)之片段或區。在一個實施例中，片段包含抗體 hLK26 或 hMov19 之輕鏈可變區。在一個實施例中，片段包含抗體 26B3 或來源於抗體 26B3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)之輕鏈可變區。在另一實施例中，片段包含抗體 hLK26 或 hMov19 之重鏈可變區。在另一實施例中，片段包含抗體 26B3 或來源於抗體 26B3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)之重鏈可變區。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含抗體 hLK26 或 hMov19 之輕鏈及重鏈可變區。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含抗體 26B3 或來源於抗體 26B3 之抗體(例如，諸如人類化或嵌合抗體)之輕鏈及重鏈可變區。在另一實施例中，片段包含來自抗體 hLK26、26B3 或 hMov19 之輕鏈及/或重鏈之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在另一實施例中，片段包含來自抗體 hLK26、

26B3 或 hMov19 之輕鏈或重鏈之一個兩個或三個 HVR (或 CDR)。在另一實施例中，片段包含來自抗體 hLK26、26B3 或 hMov19 之輕鏈及重鏈之一個兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，來源於抗體 hLK26、26B3 或 hMov19 之一或多個 HVR (或 CDR) 與 hLK26、26B3 或 hMov19 之至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個或至少六個 HVR (或 CDR) 至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99% 一致。

【0171】在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:8 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:9 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:8 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:9 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:8 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自

SEQ ID NO:9 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:14-16 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:17-19 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含選自 SEQ ID NO:14-16 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含選自 SEQ ID NO:17-19 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:8 之三個 HVR (或 CDR)；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:9 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:8 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:9 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:8 之三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:9 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:14 中列明的重鏈可變區 (VH) CDR1 序列、SEQ ID NO:15 中列明的 VH CDR2 序

列及 SEQ ID NO:16 中列明的 VH CDR3 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:17 中列明的輕鏈可變區 (VL) CDR1 序列、SEQ ID NO:18 中列明的 VL CDR2 序列及 SEQ ID NO:19 中列明的 VL CDR3 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:14 中列明的 VH CDR1 序列、SEQ ID NO:15 中列明的 VH CDR2 序列及 SEQ ID NO:16 中列明的 VH CDR3 序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:17 中列明的 VL CDR1 序列、SEQ ID NO:18 中列明的 VL CDR2 序列及 SEQ ID NO:19 中列明的 VL CDR3 序列。

【0172】在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:8 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99% 一致的胺基酸序列；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:9 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99% 一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈

可變區包含與 SEQ ID NO:8 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:9 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:8 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:9 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列。

【0173】在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；及/或輕鏈，該輕鏈包含與 SEQ ID NO:3 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；或輕鏈，

該輕鏈包含與 SEQ ID NO:3 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含與 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；以及輕鏈，該輕鏈包含與 SEQ ID NO:3 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO:1 或 2 之胺基酸序列；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO:1 或 2 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO:1 或 2 之胺基酸序列；

以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體為人類化抗體。

【0174】在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:10 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:11 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:10 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:11 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:10 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:11 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:20-22 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:23-25 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含選自 SEQ ID NO:20-22 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含選自 SEQ ID NO:23-25 之一個、兩個或三個 HVR (或

CDR)。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:10 之三個 HVR (或 CDR)；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:11 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:10 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:11 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:10 之三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:11 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:20 中列明的重鏈可變區 (VH) CDR1 序列、SEQ ID NO:21 中列明的 VH CDR2 序列及 SEQ ID NO:22 中列明的 VH CDR3 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:23 中列明的輕鏈可變區 (VL) CDR1 序列、SEQ ID NO:24 中列明的 VL CDR2 序列及 SEQ ID NO:25 中列明的 VL CDR3 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:20 中列明的 VH CDR1 序列、SEQ ID NO:21 中列明的 VH CDR2 序列及 SEQ ID NO:22 中列明的 VH CDR3 序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:23 中列明的 VL CDR1

序列、SEQ ID NO:24 中列明的 VL CDR2 序列及 SEQ ID NO:25 中列明的 VL CDR3 序列。

【0175】 在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:10 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:11 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:10 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:11 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。

一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:10 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:11 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列。

【0176】在一些實施例中，抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少

約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；及/或輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:34 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:34 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、

約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:34 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列；及/或輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列；以及輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體為嵌合抗體。在一些實施例中，抗體為人類化抗體。

【0177】在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:12 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:13 之一個、兩個或三個

HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:12 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:13 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:12 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:13 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:26-28 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:29-31 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含選自 SEQ ID NO:26-28 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含選自 SEQ ID NO:29-31 之一個、兩個或三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:12 之三個 HVR (或 CDR)；及 / 或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:13 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:12 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗

體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:13 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:12 之三個 HVR (或 CDR)；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含來自 SEQ ID NO:13 之三個 HVR (或 CDR)。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:26 中列明的重鏈可變區 (VH) CDR1 序列、SEQ ID NO:27 中列明的 VH CDR2 序列及 SEQ ID NO:28 中列明的 VH CDR3 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:29 中列明的輕鏈可變區 (VL) CDR1 序列、SEQ ID NO:30 中列明的 VL CDR2 序列及 SEQ ID NO:31 中列明的 VL CDR3 序列。在一些實施例中，抗 FRA 抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:26 中列明的 VH CDR1 序列、SEQ ID NO:27 中列明的 VH CDR2 序列及 SEQ ID NO:28 中列明的 VH CDR3 序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:29 中列明的 VL CDR1 序列、SEQ ID NO:30 中列明的 VL CDR2 序列及 SEQ ID NO:31 中列明的 VL CDR3 序列。

【0178】在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:12 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至

少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:13 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:12 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:13 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:12 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸

序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:13 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【0179】在一些實施例中，抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；及/或輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:34 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、

至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:34 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO:34 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、

至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列；及/或輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列；以及輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。

【0180】在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含與 SEQ ID NO:6 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99%一致的胺基酸序列；及/或輕鏈，該輕鏈包含與 SEQ ID NO:7 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含與 SEQ ID NO:6 之序列至

少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：輕鏈，該輕鏈包含與 SEQ ID NO:7 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含與 SEQ ID NO:6 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列；以及輕鏈，該輕鏈包含與 SEQ ID NO:7 之序列至少約 85%、至少約 86%、至少約 87%、至少約 88%、至少約 89%、至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98%或至少約 99%一致的胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；及/或輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO:6 之

胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體包含：重鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體為人類化抗體。

【0181】在一些實施例中，包括於或用於本文所述的靶向部分(或抗體靶向部分)中之抗 FRA 抗體特異地結合至由癌細胞(例如，FRA 陽性卵巢癌細胞、肺癌細胞、子宮癌細胞、睾丸絨毛膜癌細胞、室管膜瘤細胞、間皮瘤細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞或腎細胞癌瘤細胞)表現的 FRA(諸如，人類 FRA)。

【0182】如本文所使用，相對於序列之「百分比(%)胺基酸序列一致性」及「同源性」係指在比對序列且必要時引入間隙以達成最大百分比序列一致性之後，且不將任何保守取代考慮為序列一致性之部分的情況下，候選序列中之胺基酸殘基與特定序列中之胺基酸殘基一致之百分比。出於測定百分比胺基酸序列一致性之目的的比對可以此項技術之技藝內的各種方式達成，例如，使用諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™ (DNASTAR) 軟體之公眾可利用的電腦軟體來達成。熟習此項技術者可判定用於量測比對之適當參數，包括在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需的任何演算法。

【0183】在一些實施例中，本文所述的 CDR 為 Kabat

CDR、Chothia CDR 或接頭 CDR。在一些實施例中，CDR 為 Kabat CDR。在一些實施例中，CDR 為 Chothia CDR。在其他實施例中，CDR 為 Kabat 及 Chothia CDR 之組合(亦稱為「組合 CDR」或「延長 CDR」)。換言之，對含有一個以上 CDR 之任何給定實施例而言，CDR 可為 Kabat、Chothia 及/或組合中之任何者。本領域中已知測定 CDR 之方法。

【0184】抗體之可變區係指抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區，其為單獨的或呈組合的。通常，可變區介導抗原結合且限定特定抗體對其特定抗原之特異性。可變區可具有稱為框架區(framework region；FR)(例如，15-30 個胺基酸之 FR)之相對不變的伸展段，該等框架區藉由稱為「超變區」(hypervariable region；「HVR」)(例如，各自 9-12 個胺基酸長的 HVR)之極具可變性之較短區分離。在一些實施例中，原生重鏈及輕鏈之可變域各自包含主要採用 β 片組態的藉由三個高變區連接的四個 FR，該等 FR 形成環，該等環連接且在一些狀況下形成 β 片結構之部分。每一鏈中之高變區可藉由 FR 固持在一起呈緊密接近，並且利用來自其他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，Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定域可不直接涉及將抗體結合至抗原，但可

展現各種效應子功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞細胞 毒 性 (antibody dependent cellular cytotoxicity ADCC)。抗體之恆定區係指抗體輕鏈之恆定區或抗體重鏈之恆定區，其為單獨的或呈組合的。抗體之恆定區通常提供結構穩定性及其他生物功能，諸如抗體鏈結合、分泌、介胎盤移動性及補體結合，但不涉及結合至抗原。恆定區之基因中之胺基酸序列及相應外顯子序列將取決於其所來源之物種；然而，胺基酸序列中導致異型之變異將對物種內之特定恆定區而言相對受限。每一鏈之可變區藉由連接多肽序列而接合至恆定區。鍵聯序列藉由輕鏈基因中之「J」序列以及重鏈基因中之「D」序列及「J」序列之組合來編碼。

【0185】當在本文中使用時，術語「超變區」(hypervariable region；「HVR」)係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。高變區通常包含來自「互補判定區」或「CDR」之胺基酸殘基(例如，VL中之大約殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)，及VH中之大約31-35B(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)(在一個實施例中，H1為大約31-35)；Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))及/或來自「超變環」之彼等殘基(例如，VL中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)，及

V H 中之 26-32 (H1)、53-55 (H2) 及 96-101 (H3)； Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)。存在用於測定 CDR 之多種方式，例如，基於交叉物種序列可變性之方法（亦即，Kabat 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, (第 5 版, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)）；及基於抗原-抗體複合物之結晶學研究之方法 (Al-lazikani 等人 (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948)。為 Kabat 互補判定區 (complementarity-determining region; CDR) 之 HVR 係基於序列可變性且為最常用的 (Kabat 等人, 同上)。Chothia 替代地涉及結構環之位置 (Chothia 及 Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVR 表示 Kabat CDR 與 Chothia 結構環之間的折衷，且由 Oxford Molecular's AbM 抗體模型化軟體使用。「接頭」HVR 係基於可利用複合晶體結構之分析。如本文所使用，CDR 可為藉由任何方法或藉由該等方法中之任何兩種或三種方法之組合來定義的 CDR。CDR 可為 Kabat CDR、Chothia CDR 或接頭 CDR。來自此等 HVR 中之每一者的殘基在以下指出。

環	Kabat	AbM	Chothia	接頭
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 編號)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 編號)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

【0186】HVR 可包括如下「延長 HVR」：VL 中之 24-36 或 24-34 (L1)、46-56 或 50-56 (L2) 及 89-97 或 89-96 (L3)，及 VH 中之 26-35 (H1)、50-65 或 49-65 (較佳實施例) (H2) 及 93-102、94-102 或 95-102 (H3)。針對此等延長 HVR 定義中之每一者，根據 Kabat 等人(同上)對可變域殘基編號。

【0187】在一些實施例中，抗體為半胱胺酸工程化抗體，其在重鏈或輕鏈(例如，重鏈及/或輕鏈恆定區，及/或重鏈及/或輕鏈可變區)中包含游離半胱胺酸胺基酸。抗體中之游離半胱胺酸胺基酸之工程化可提供反應性親電官能性，其可進一步允許實現抗體複合體化合物，諸如在特定位點處具有藥物分子(亦即，位點特異性複合)之抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate；ADC)化合物。半胱胺酸工程化抗體及產生半胱胺酸工程化抗體之手段之實例藉由 Junutula, JR 等人，(2008) *Nat. Biotech.* 26(8):925-932；Lyons, A 等人，(1990) *Prot. Engineering* 3(8):703-708；以及 Stimmel, JB 等人，(2000) *J. Biol. Chem.* 275(39):30445-30450 提供。在一些實施例中，抗體經工程化以利用一或多個半胱胺酸殘基取代重鏈(例如，恆定區)或輕鏈(例如，恆定區)上之胺基酸殘基(例如，天然存在胺基酸)，前提條件為半胱胺酸殘基之反應性硫醇基對抗體折疊或裝配很少有或沒有影響，且不會顯著地改

變抗原結合。在一些實施例中，針對新引入、工程化半胱胺酸硫醇基之反應性來評估半胱胺酸殘基。硫醇反應性值為在 0 至 1.0 範圍內之相對數值項，且針對任何半胱胺酸工程化抗體加以量測。在一些實施例中，本發明之半胱胺酸工程化抗體之硫醇反應性值為約 0.6 至 1.0；0.7 至 1.0；或 0.8 至 1.0 中之任一者。用於位點特異性複合之半胱胺酸工程化抗體藉由以下者提供 WO 2006/034488 、 WO 2010/141902 、 WO 2013/093809 、 WO 2008/038024 、 WO 2008/070593 、 WO 2009/092011 、 WO 2011/005481 及 WO 2011/156328 。

【0188】半胱胺酸工程化抗體可藉由突變母體抗體之核酸序列，藉由以編碼半胱胺酸工程化抗體之半胱胺酸置換一或多個胺基酸殘基；表現半胱胺酸工程化抗體；以及分離半胱胺酸工程化抗體來製備。在一些實施例中，半胱胺酸工程化抗體為抗體片段；例如，Fab、Fab'、F(ab')2、Fv 或單鏈(ScFv)抗體。在一些實施例中，抗體經工程化以包括重鏈中之胺基酸殘基 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 以及輕鏈中之 L201、V205 及 T206 (EU 編號)之一或多個半胱胺酸取代。在本發明之某些實施例中，本文所述的抗體 (例如，抗體 hLK26、hMov19 或來源於抗體 26B3 之抗體，諸如人類化或嵌合抗體)，或來源於此等抗體中之任何抗體之抗體經工程化以包含一或多個游離半胱胺酸

殘基。工程化半胱胺酸殘基亦稱為「添加的半胱胺酸殘基」。

【0189】 在一些實施例中，在 IgG 重鏈之以下位置之任何一或多者處的一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：40、43、84、88、103、112、113、114、115、131、132、133、134、135、136、137、138、139、161、168、172、234、235、237、239、246、249、265、267、269、270、276、278、282、283、284、287、289、292、293、297、298、299、300、302、303、312、314、315、318、320、324、326、327、330、332、333、334、335、336、337、339、345、347、354、355、356、358、359、360、361、362、370、373、376、378、380、382、383、384、386、388、398、390、392、393、400、401、404、411、413、414、416、418、419、421、422、428、431、432、437、438、439、440、442、443 及 444；根據 Kabat 等人之 EU 索引編號 (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA，在下文為「Kabat」)。

【0190】 在一些實施例中，在 IgG 重鏈之以下位置之任何組合處的一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個或十個以上胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：40、43、84、88、103、112、113、114、

115、131、132、133、134、135、136、137、138、
 139、161、168、172、234、235、237、239、246、
 249、265、267、269、270、276、278、282、283、
 284、287、289、292、293、297、298、299、300、
 302、303、312、314、315、318、320、324、326、
 327、330、332、333、334、335、336、337、339、
 345、347、354、355、356、358、359、360、361、
 362、370、373、376、378、380、382、383、384、
 386、388、398、390、392、393、400、401、404、
 411、413、414、416、418、419、421、422、428、
 431、432、437、438、439、440、442、443 及 444；
 根據 Kabat 之 EU 索引編號。

【0191】在一些實施例中，IgG 重鏈（例如，人類 IgG1、人類 IgG2、人類 IgG3、人類 IgG4 或人類 IgG4p）之以下位置之任何一或多者處的一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442；根據 Kabat 之 EU 索引編號。胺基酸之突變位置（EU 編號）及側接序列在以下表 3 中列出。

表 3：胺基酸之突變位置（EU 編號）及側接序列

EU 編號	側接序列	SEQ ID NO:
T155C(CH1)	GCLVKDYFPEPV <u>C</u> VSWNSGALTSGV (hIgG1~4)	36
S157C(CH1)	LVKDYFPEPV <u>T</u> VCWNNSGALTSGVHT (hIgG 1~4)	37
S165C(CH1)	PVTVSWNNSGALT <u>C</u> GVHTFPAVLQSS (hIgG 1~4)	38
T169C(CH1)	SWNSGALTSGV <u>H</u> CFPAVLQSSGLYS (hIgG 1~4)	39
T197C(CH1)	VVTVPSSSLGT <u>Q</u> CYICNVNHKPSNT (hIgG1)	40

	VVTVPSSNFGT <u>QC</u> YTCNVVDHKPSNT (hIgG2)	41
	VVTVPSSSLGT <u>QC</u> YTCNVNVHKPSNT (hIgG3)	42
	VVTVPSSSLGT <u>KC</u> YTCNVVDHKPSNT (hIgG4)	43
I199C(CH1)	VVTVPSSSLGT <u>QTYCC</u> NVNHKPSNT (hIgG1)	44
T199C(CH1)	VVTVPSSNFGT <u>QTYCC</u> NVDHKPSNT (hIgG2)	45
	VVTVPSSSLGT <u>QTYCC</u> NVNHKPSNT (hIgG3)	46
	VVTVPSSSLGT <u>KTYCC</u> NVDHKPSNT (hIgG4)	47
S442C(CH3)	EALHNHYT <u>QKSLCLSPGK</u> (hIgG1、hIgG2)	48
	EALHNRFT <u>QKSLCLSPGK</u> (hIgG3)	49
	EALHNHYT <u>QKSLCLSLGK</u> (hIgG4)	50

【0192】在一些實施例中，本文所述的抗 F R A 抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所述的抗 F R A 抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。在一些實施例中，本文所述的抗 F R A 抗體包含：重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:33 之胺基酸序列；以及輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含 SEQ ID NO:34 之胺基酸序列。

【0193】IgG 重鏈上可經半胱胺酸工程化以用於位點特異性複合之另外位置包括 (EU 編號) 118-215、234-239、246、248、249、254、265、267、269、270、273、276、278、279、282、283、284、286、287、289、292、293、294、297、298、299、300、302、303、312、314、315、318、320、324、326、327、330、332-337、339、341-447 (描述於 U S

2012/0148580 A1；WO 2013/093809 A1；US 2009/0258420 A1；US 7521541 B2；US 7855275 B2；US 2011/0137017 A1；US 2012/0213705 A1；US 2011/0033378 A1；US 8455622 B2 中)。

【0194】 IgG 輕鏈上可經半胱胺酸工程化以用於位點特異性複合之另外位置包括(EU 編號)108-211(描述於 WO 2013/093809 A1；US 2009/0258420 A1；US 7855275 B2；US 8455622 B2 中)。

【0195】 在一些實施例中，在 IgG λ 輕鏈之以下位置之任何一或多者處的一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：7、15、20、22、25、43、110、111、125、144、149、155、158、161、168、185、188、189、191、197、205、206、207、208 及 210，根據 Kabat 之 EU 索引。

【0196】 在一些實施例中，在 IgG λ 輕鏈之以下位置之任何組合處的一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個或十個以上胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：7、15、20、22、25、43、110、111、125、144、149、155、158、161、168、185、188、189、191、197、205、206、207、208 及 210，根據 Kabat 之 EU 索引。

【0197】 在一些實施例中，在 IgG κ 輕鏈之以下位置之任何一或多者處的一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：7、15、20、22、25、43、110、111、144、

168、183 及 210，根據 Kabat 之編號。

【0198】在一些實施例中，在 IgG κ 輕鏈之以下位置之任何組合處的一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個或十個以上胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：7、15、20、22、25、43、110、111、144、168、183 及 210，根據 Kabat 之編號。

【0199】在一些實施例中，在 IgG κ 輕鏈之以下位置之任何一或多者處的一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換：L201、V205 及 T206；根據 Kabat 之 EU 索引編號。胺基酸之突變位置(EU 編號)及側接序列在以下表 4 中列出。

表 4：胺基酸之突變位置(EU 編號)及側接序列

EU 編號	側接序列	SEQ ID NO:
L201C (CL)	EVTHQGCSSPVTKSFNRGEC	51
T206C (CL)	EVTHQGLSSPV <u>C</u> KSFNRGEC	52
V205C (CL)	EVTHQGLSSP <u>C</u> TKSFNRGEC	53

【0200】在一些實施例中，抗體包含重鏈恆定區及輕鏈恆定區，其中重鏈恆定區中選自 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 之一或多個胺基酸殘基或輕鏈恆定區中選自 L201 及 T206 之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換，且其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。在一些實施例中，抗體包含重鏈恆定區及輕鏈恆定區，其中重鏈恆定區中選自 T155、S157、S165、T169、T197、T199 及 S442 之一或多個胺基酸殘基及輕鏈恆定區中選自 L201 及 T206 之一或多個胺基酸殘基由半

胱胺酸殘基置換，且其中編號係根據 Kabat 之 EU 索引。

【0201】 在一些實施例中，抗體為分離的。分離抗體係指已獲鑑別且自其自然環境之組分分離及/或回收的抗體。在一些實施例中，抗體為實質上純的。術語「實質上純的」可指為至少 50% 純(亦即，不含污染物)、更佳地至少 90% 純、更佳地至少 95% 純、更佳地至少 98% 純、更佳地至少 99% 純的材料。在一些實施例中，抗體為單株抗體。在一些實施例中，抗體為人類化抗體。在一些實施例中，抗體為嵌合抗體。在一些實施例中，抗體為人類抗體。在一些實施例中，抗體為 IgG (諸如 IgG₁、IgG₂ 或 IgG₄)。在一些實施例中，抗體為人類 IgG，諸如人類 IgG₁。在一些實施例中，抗體為包含 IgG4p 恒定域之人類 IgG。

【0202】 本文所述的抗體可進一步包括經任一修飾，亦即，藉由任何類型之分子之共價連接修飾的類似物及衍生物，只要此等共價連接允許抗體保持其抗原結合免疫特異性即可。例如，抗體之衍生物及類似物包括已例如藉由已知保護/阻隔基、蛋白水解分裂、與細胞配位體或其他蛋白質之鍵聯等等進行糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、衍生化而進一步修飾的彼等者。化學修飾可藉由已知技術進行，該等已知技術包括但不限於特定化學分裂、乙醯化、調配等等。另外，類似物或衍生物可含有一或多個非天然胺基酸。

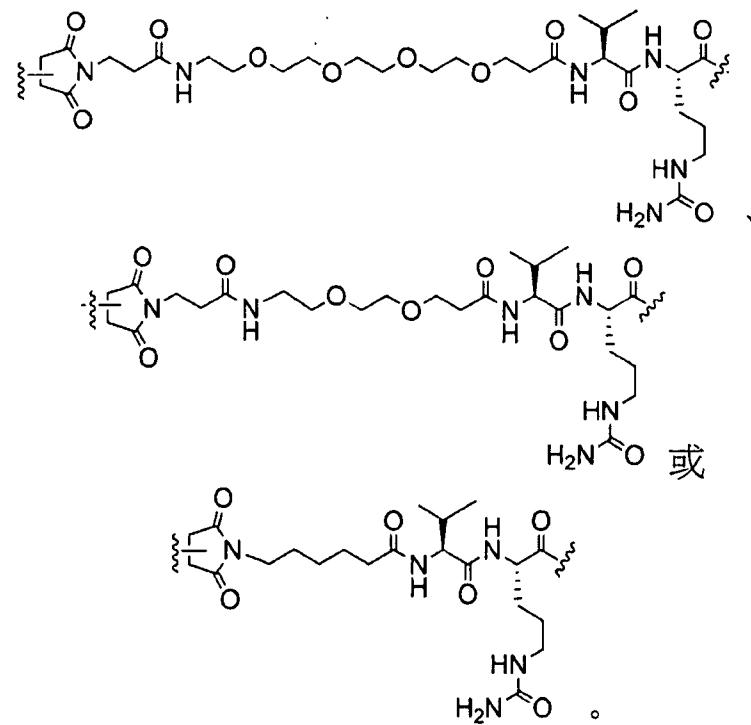
【0203】 在一些實施例中，式(I)-(V)化合物或其鹽或

溶劑合物或立體異構物中之抗體靶向部分 T 為與藥物部分部分地複合以使得其可進一步連接至另外的藥物部分之抗體。因此，在一些實施例中，式(I)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物意欲涵蓋式(Ia)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。同樣地，式(II)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物意欲涵蓋式(IIa)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物；式(III)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物意欲涵蓋式(IIIa)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物；式(IV)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物意欲涵蓋式(IVa)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物；且式(V)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物意欲涵蓋式(Va)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。

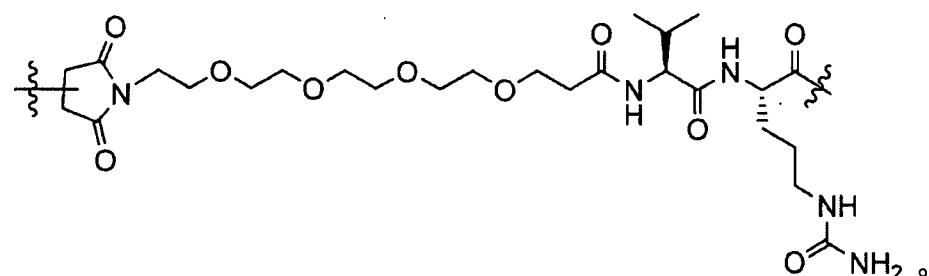
【0204】此項技術中已知製造靶向部分(例如，抗體、多肽、肽或非肽基部分)之方法，諸如美國專利第7,674,605號、美國專利第7,982,017號、PCT/US2007/013587(公開案第WO2007/146172號)或PCT/US2008/087515(公開案第WO2009/079649號)中所述的方法。

代表性連接子

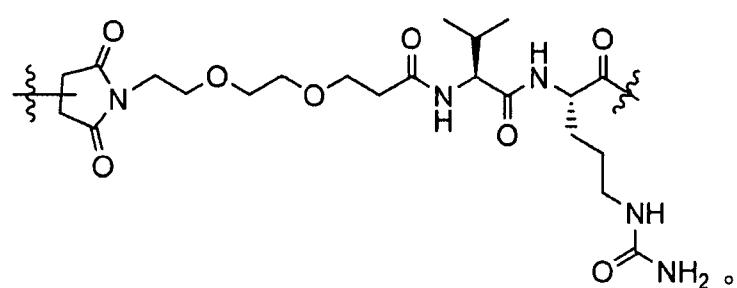
【0205】在某些情況下，式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)化合物中之「-A-L⁴-L³-L²-」或「-A-L⁴-L³-」部分為：



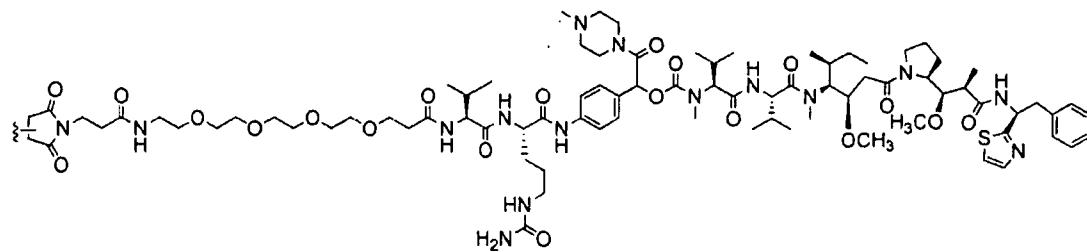
【0206】在某些情況下，式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)化合物中之「-A-L⁴-L³-L²-」或「-A-L⁴-L³-」部分爲：



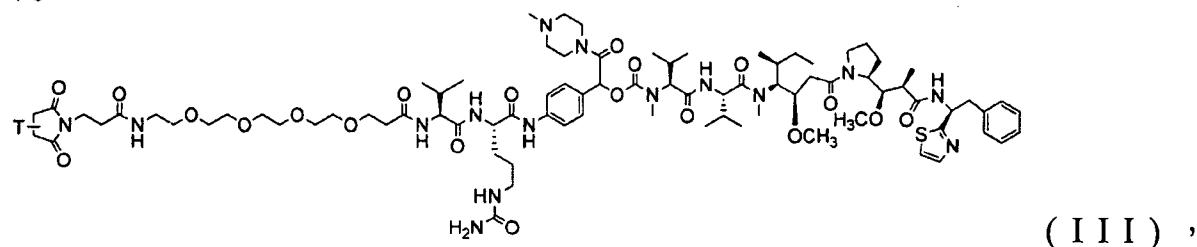
【0207】在某些情況下，式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)化合物中之「-A-L⁴-L³-L²-」或「-A-L⁴-L³-」部分爲：



【0208】在某些情況下，式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)化合物中之「-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D」部分爲：

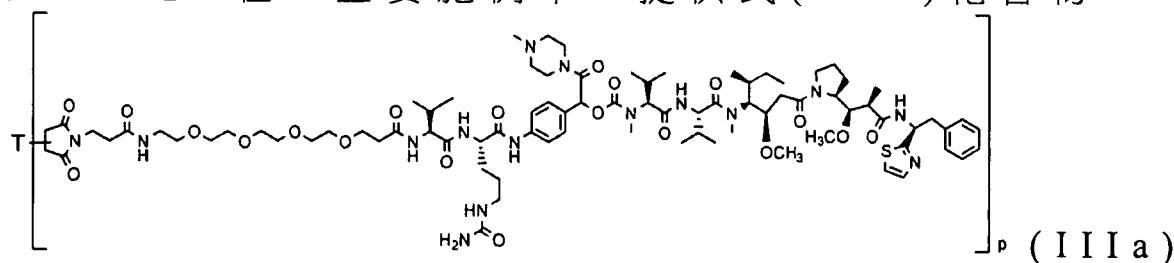


【0209】在此情況下，本揭示內容提供式(III)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中T為靶向部分。在某些情況下，在式(III)中，T為抗體。在一些實施例中，T為抗FRA抗體。在一些實施例中，T為抗體hLK26或hMOV19。在一些實施例中，T為抗體26B3之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。

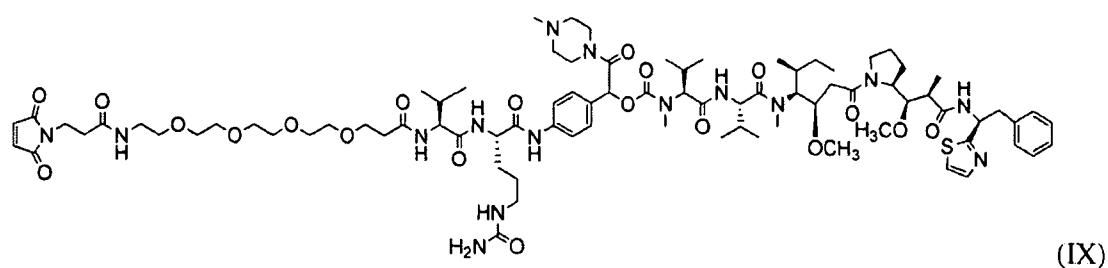
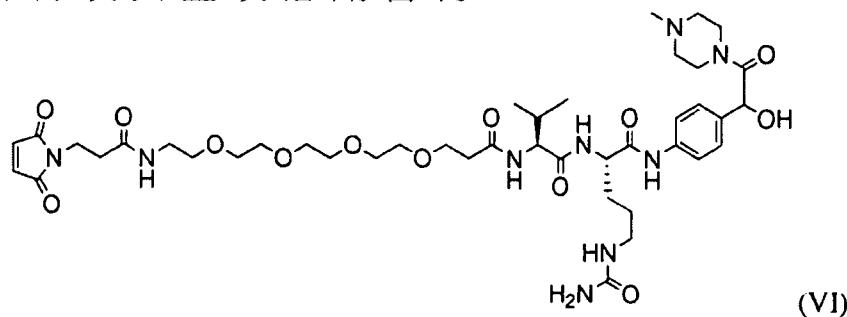
【0210】在一些實施例中，提供式(IIIa)化合物：



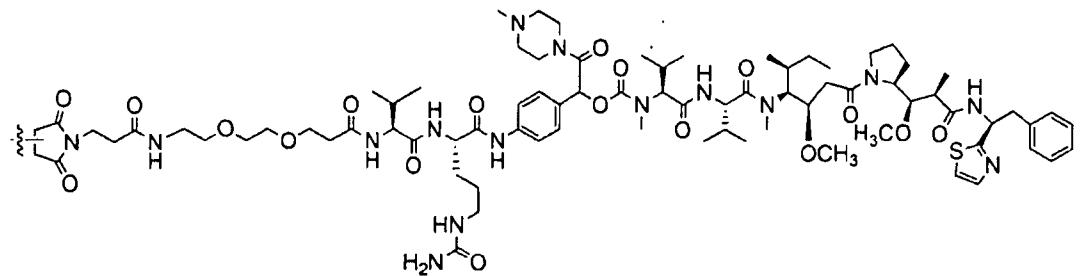
或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中T為靶向部分且p為1至20。在一些實施例中，p為1至8。在一些實施例中，p為1至6。在一些實施例中，p為1至4。在一些實施例中，p為2至4。在一些實施例中，p為1、2、3或4。在一些實施例中，p為2。在一些實施例中，p為3。在一些實施例中，p為4。在某些情況下，在式(IIIa)

中，T 為抗體，視需要其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換。在某些實施例中，抗體為抗 F R A 抗體。在一些實施例中，抗 F R A 抗體為 h L K 2 6 或 h M O V 1 9 或其衍生物，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h L K 2 6，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h M O V 1 9。在一些實施例中，抗 F R A 抗體為 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。

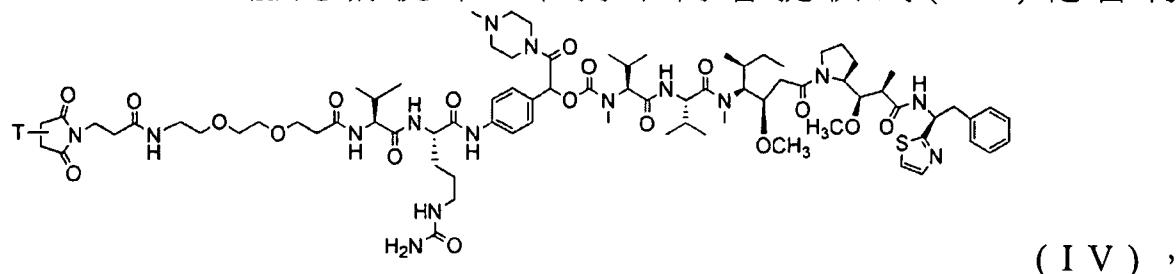
【0211】在某些實施例中，式(I)或(Ia)化合物，諸如式(III)或(IIIa)化合物可使用合成中間物製備，該等合成中間物諸如式(VI)化合物或其鹽或溶劑合物，及/或式(IX)化合物或其鹽或溶劑合物。



【0212】在某些情況下，式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)化合物中之「-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D」部分為：

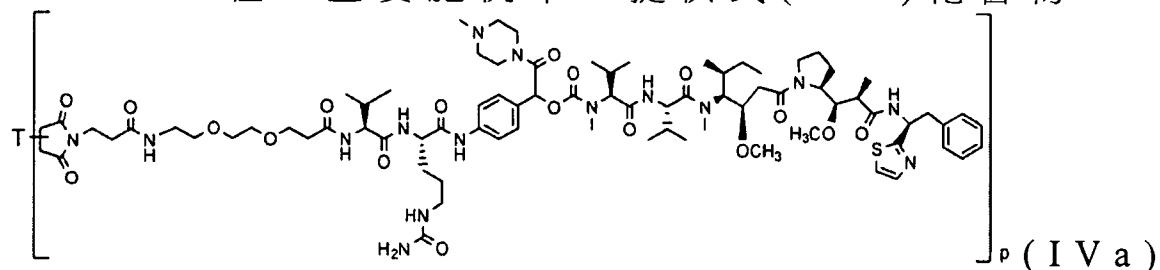


【0213】在此情況下，本揭示內容提供式(IV)化合物：



● 或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中 T 為靶向部分。在某些情況下，在式(IV)中，T 為抗體。在一些實施例中，T 為抗 FRA 抗體。在一些實施例中，抗體為抗體 hLK26 或 hMOV19。在一些實施例中，抗體為抗體 26B3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。

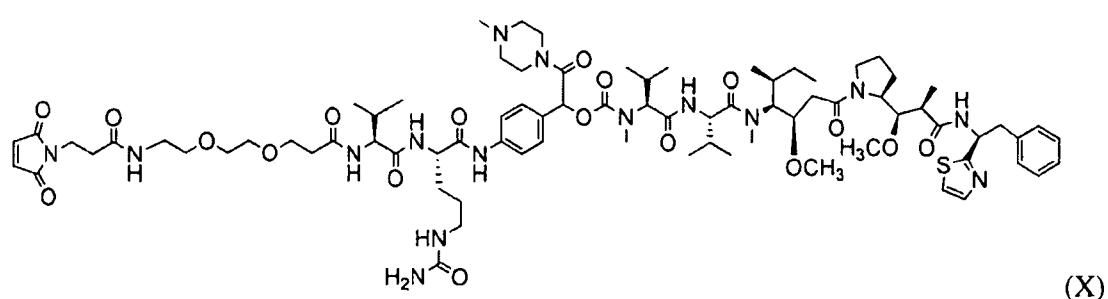
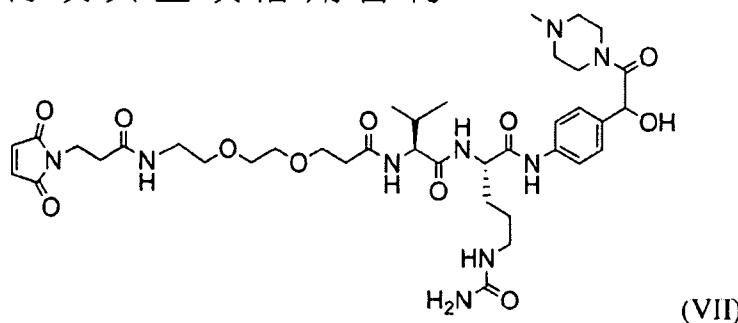
【0214】在一些實施例中，提供式(IVa)化合物：



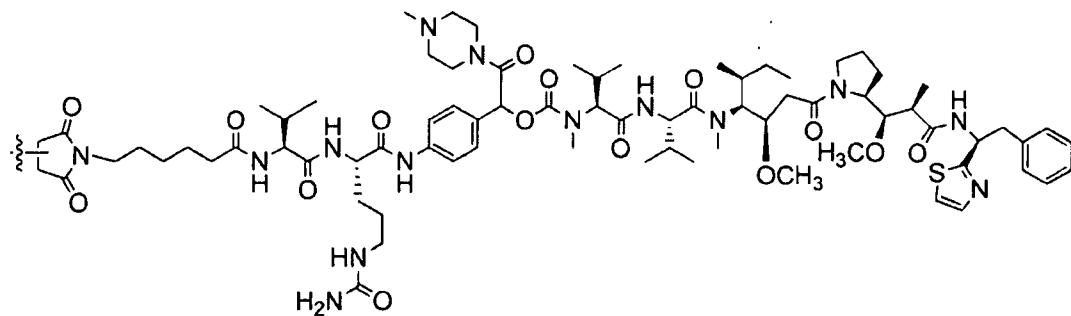
或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中 T 為靶向部分且 p 為 1 至 20。在一些實施例中，p 為 1 至 8。在一些實施例中，p 為 1 至 6。在一些實施例中，p 為 1 至 4。在一些實施例中，p 為 2 至 4。在一些實施例中，p 為 1、2、3 或 4。在一些實施例中，p 為 2。在一些實施例中，p 為 3。在一些實施例中，p 為 4。在某些情況下，在式(IVa)中，T 為抗體，視需要其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或

多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換。在一些實施例中，抗體為抗 F R A 抗體。在一些實施例中，抗 F R A 抗體為 h L K 2 6 或 h M O V 1 9 或其衍生物，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h L K 2 6，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h M O V 1 9。在一些實施例中，抗體為 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。

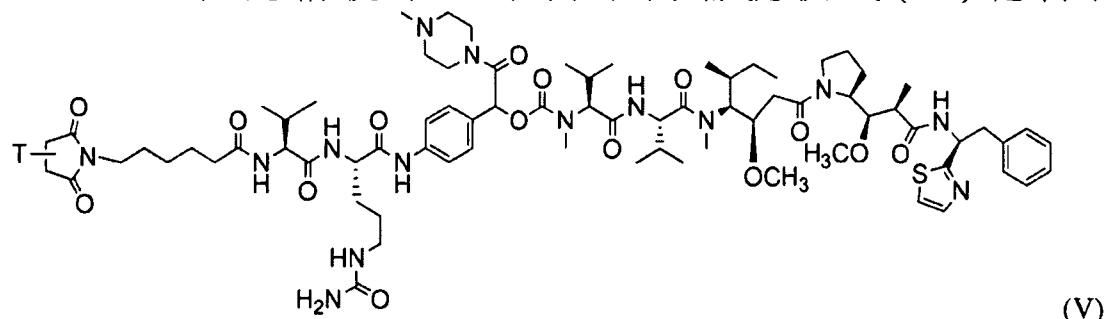
【0215】在某些實施例中，式(I)或(Ia)化合物，諸如式(IV)或(IVa)化合物可使用合成中間物製備，該等合成中間物諸如式(VII)化合物或其鹽或溶劑合物，及/或式(X)化合物或其鹽或溶劑合物。



【0216】在某些情況下，式(I)、(Ia)、(II)或(IIa)化合物中之「-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D」部分為：

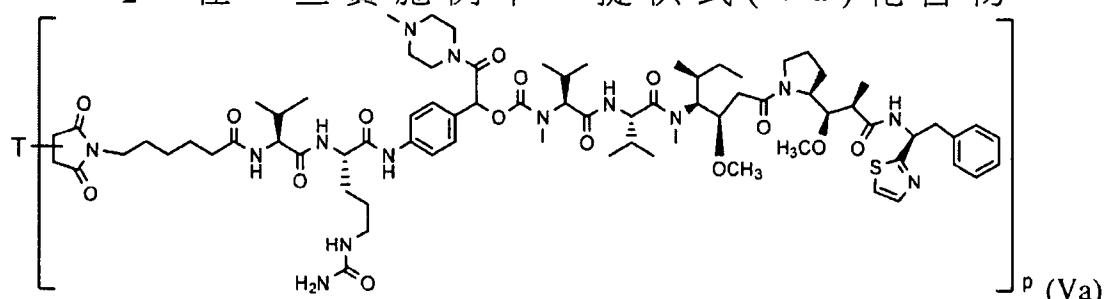


【0217】在此情況下，本揭示內容提供式(V)化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中T為靶向部分。在某些情況下，在式(V)中，T為抗體。在一些實施例中，抗體為抗FRA抗體。在一些實施例中，抗體為抗體hLK26或hMOV19。在一些實施例中，抗體為抗體26B3之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。

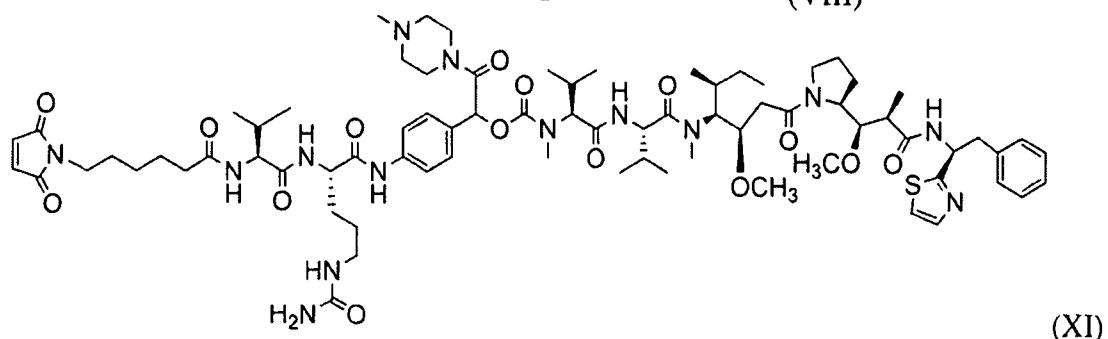
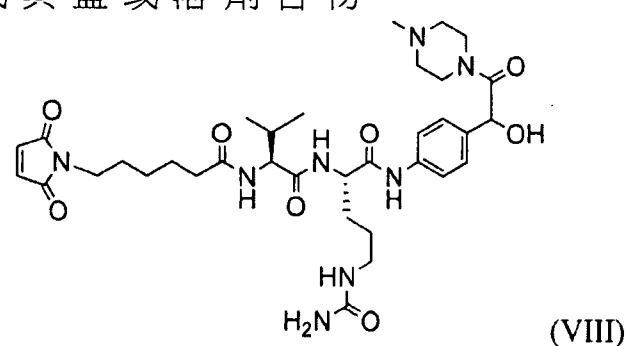
【0218】在一些實施例中，提供式(Va)化合物：



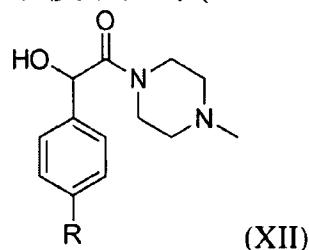
或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中T為靶向部分且p為1至20。在一些實施例中，p為1至8。在一些實施例中，p為1至6。在一些實施例中，p為1至4。在一些實施例中，p為2至4。在一些實施例中，p為1、2、3或4。在一些實施例中，p為2。在一些實施例中，p

為 3。在一些實施例中，p 為 4。在某些情況下，在式(Va)中，T 為抗體，視需要其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換。在一些實施例中，抗體為抗 F R A 抗體。在一些實施例中，抗 F R A 抗體為 h L K 2 6 或 h M O V 1 9 或其衍生物，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h L K 2 6，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h M O V 1 9。在一些實施例中，抗體為 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。

【0219】在某些實施例中，式(I)或(Ia)化合物，諸如式(V)或(Va)化合物可使用合成中間物製備，該等合成中間物諸如式(VIII)化合物或其鹽或溶劑合物，及/或式(XI)化合物或其鹽或溶劑合物。



【0220】在某些實施例中，本文所述的式(I)或(Ia)化合物或任何變化形式可使用式(XII)化合物製備：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；其中R為NO₂或NH₂。

【0221】式(I)-(V)或(Ia)-(Va)化合物可製備及/或調配為醫藥學上可接受之鹽。醫藥學上可接受之鹽為游離鹼形式之化合物的無毒鹽，其擁有游離鹼之所要藥理學活性。此等鹽可來源於無機酸或有機酸。醫藥學上可接受之鹽之非限制性實例包括硫酸鹽、焦硫酸鹽、硫酸氫鹽、亞硫酸鹽、亞硫酸氫鹽、磷酸鹽、磷酸一氫鹽、磷酸二氫鹽、偏磷酸鹽、焦磷酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸鹽、丙酸鹽、癸酸鹽、辛酸鹽、丙烯酸鹽、甲酸鹽、異丁酸鹽、己酸鹽、庚酸鹽、丙炔酸鹽、草酸鹽、丙二酸鹽、琥珀酸鹽、辛二酸鹽、癸二酸鹽、反丁烯二酸鹽、順丁烯二酸鹽、丁炔-1,4-二酸鹽、己炔-1,6-二酸鹽、苯甲酸鹽、氯苯甲酸鹽、甲基苯甲酸鹽、二硝基苯甲酸鹽、羥基苯酸鹽、甲氧基苯甲酸鹽、鄰苯二甲酸鹽、磺酸鹽、甲基磺酸鹽、丙基磺酸鹽、苯磺酸鹽、二甲苯磺酸鹽、萘-1-磺酸鹽、萘-2-磺酸鹽、苯基乙酸鹽、苯基丙酸鹽、苯基丁酸鹽、檸檬酸鹽、乳酸鹽、 γ -羥基丁酸鹽、羥乙酸鹽、酒石酸鹽及杏仁酸鹽。其他適合的醫藥學上可接受之鹽之清單見於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第17版,

Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985.

【0222】 對含有鹼氮的具有式(I)-(V)或(Ia)-(Va)中任一者之化合物而言，醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中可利用的任何適合方法製備，例如，利用無機酸處理游離鹼，該等無機酸諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、胺磺酸、硝酸、硼酸、磷酸及類似無機酸；或用有機酸處理游離鹼，該等有機酸諸如乙酸、苯乙酸、丙酸、硬脂酸、乳酸、抗壞血酸、順丁烯二酸、羥基順丁烯二酸、2-羥乙磺酸、丁二酸、戊酸、反丁烯二酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、羥基乙酸、水楊酸、油酸、棕櫚酸、月桂酸、哌喃糖基酸（諸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸）、 α -羥基酸（諸如扁桃酸、檸檬酸或酒石酸）、胺基酸（諸如天冬胺酸或麩胺酸）、芳族酸（諸如苯甲酸、2-乙醯基苯甲酸、萘甲酸或肉桂酸）、磺酸（諸如月桂基磺酸、對甲苯磺酸、甲烷磺酸或乙烷磺酸），或諸如在本文中作為實例給出的彼等者的酸之任何相容混合物，以及根據本技術一般技藝水平視為等效或可接受之替代物的任何其他酸及其混合物。

【0223】 亦提供組成物，該等組成物包含式(I)-(V)或(Ia)-(Va)之一或多種化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。在式(I)-(V)或(Ia)-(Va)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物中，靶向部分可具有用於連接至藥物部分之一或多個連接位點。取決於靶向部分中連接位點之可接近性及藥物部分在形成複合體中之相對濃度，連接位點之一部分可不鍵結至所形成複合體中之藥物部分。可形

成在每一靶向部分處具有各種數量之藥物部分的化合物之混合物。因此，亦提供組成物，該組成物包含式(I a)-(V a)之一或多種化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。例如，對具有4個連接位點之靶分子而言，組成物可包含選自以下者之一或多種化合物：式(I a)化合物，其中p為1；式(I a)化合物，其中p為2；式(I a)化合物，其中p為3；以及式(I a)化合物，其中p為4。組成物中化合物之相對量可經調整以在藥物部分與靶向部分之間達成合乎需要比率。在一些實施例中，組成物主要包含該等化合物中之一或兩種。

【0224】本發明之化合物或組成物中之「藥物-抗體比率」(drug-antibody ratio; DAR)係定義為化合物或組成物中之藥物部分與化合物或組成物中之抗體之間的莫耳比率。在抗體具有一個以上連接位點的情況下，一個以上藥物部分可連接至每一抗體。在一些情況下，獲得包含一個以上抗體藥物複合體(antibody-drug conjugate; ADC)分子之混合物。抗體藥物複合體之藥物-抗體比率可藉由此項技術中已知的分析方法來量測，該等分析方法例如如Jeffrey等人，*Bioconjug. Chem.* 24(7):1256-1263 (2013)；以及Sun等人，*Bioconjug. Chem.* 16(5): 1282-1290 (2005)中所述的方法。在一些實施例中，包含本文中詳述的一或多個ADC之組成物具有約0.5至約6、約1至約5、約1至約4、約1.5至約3.5或約2至約4平均DAR。在一

些實施例中，組成物具有約 1.5 至約 3.5，或約 2 至約 3.5，或約 2.7 至約 3.5，或約 2 至約 3，或約 3 至約 3.3，或約 2，或約 3 之平均 DAR。在一些其他較佳實施例中，組成物具有約 $2.5 \pm 10\%$ (例如，約 2.25 至約 2.75) 之平均 DAR。在一些實施例中，靶向抗體含有半胱胺酸工程化連接位點，且組成物具有約 1.6 至約 2.1 或約 2.0 之平均 DAR。

醫藥組成物及治療方法

【0225】 對治療目的而言，實施例之醫藥組成物包含式 (I)-(V) 或 (Ia)-(Va) 之至少一種化合物或其醫藥學上可接受之鹽。醫藥組成物可進一步包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑或醫藥學上可接受之載劑。醫藥學上可接受之賦形劑為無毒且另外在生物上適用於投與至受試者的物質。此等賦形劑有助於本文所述的化合物之投與且與活性成分相容。醫藥學上可接受之賦形劑之實例包括穩定劑、潤滑劑、界面活性劑、稀釋劑、抗氧化劑、黏合劑、著色劑、增積劑、乳化劑或味道改良劑。在較佳實施例中，根據實施例之醫藥組成物為無菌組成物。醫藥組成物可使用已知的或變為熟習此項技術者可利用的混合技術來製備。

【0226】 實施例亦預期無菌組成物，包括與管制此等組成物之國家及地方法規一致的組成物。

【0227】 本文所述的醫藥組成物及化合物可根據此項技術中已知用於製備各種劑型之習知方法在適合醫藥溶

劑或載劑中調配為溶液、乳液、懸浮液、分散液或包容錯合物(諸如環糊精)，或調配為丸劑、錠劑、口含劑、栓劑、藥囊、糖衣錠、粒劑、粉劑、用於復水之粉劑或與固體載劑一起使用的膠囊。實施例之醫藥組成物可藉由適合遞送路線來投與，該遞送路線諸如經口、非經腸、經直腸、經鼻、局部或眼部路線，或藉由吸入。較佳地，組成物經調配用於靜脈內或經口投與。

【0228】對經口投與而言，實施例之化合物可以諸如錠劑或膠囊之固體形式提供，或作為溶液、乳液或懸浮液來提供。為製備經口組成物，實施例之化合物可經調配以產生例如每天約 0.01 mg/kg 至約 50 mg/kg ，或每天約 0.05 mg/kg 至約 20 mg/kg ，或每天約 0.1 mg/kg 至約 10 mg/kg 之劑量。經口錠劑可包括與相容醫藥學上可接受之賦形劑混合的活性成分，該等賦形劑諸如稀釋劑、崩解劑、黏合劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、著色劑及防腐劑。適合惰性填充劑包括碳酸鈉及碳酸鈣、磷酸鈉及磷酸鈣、乳糖、澱粉、糖、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、甘露糖醇、山梨糖醇及類似物。示範性液體經口賦形劑包括乙醇、甘油、水及類似物。澱粉、聚乙烯吡咯啶酮(polyvinyl-pyrrolidone; PVP)、羥乙酸澱粉鈉、微晶纖維素及海藻酸為示範性崩解劑。黏合劑可包括澱粉及明膠。若存在潤滑劑，則潤滑劑可為硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石。若需要，則錠劑可由諸如單硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯之材料包衣，以延遲在胃腸道中之吸收，或

可由腸溶衣來包衣。

【0229】用於經口投與之膠囊包括硬明膠膠囊及軟明膠膠囊。為製備硬明膠膠囊，活性成分可與固體、半固體或液體稀釋劑混合。軟明膠膠囊可藉由將活性成分與以下者混合來製備：水；油，諸如花生油或橄欖油；液體石蠟；短鏈脂肪酸之單甘油酯及二甘油酯之混合物；聚乙二醇400；或丙二醇。

【0230】用於經口投與之液體可呈懸浮液、溶液、乳液或糖漿形式，或可經凍乾或作為用於在使用之前利用水或其他適合媒劑進行復水的乾燥產品存在。此等液體組成物可視需要含有：醫藥學上可接受之賦形劑，諸如懸浮劑（例如，山梨糖醇、甲基纖維素、海藻酸鈉、明膠、羥乙基纖維素、羧甲基纖維素、硬脂酸鋁凝膠及類似物）；非水性媒劑，例如油（例如，杏仁油或分餾椰子油）、丙二醇、乙醇或水；防腐劑（例如，對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸）；濕潤劑，諸如卵磷脂；以及若需要，調味劑或著色劑。

【0231】實施例之組成物可經調配為栓劑以用於經直腸投與。對包括靜脈內、肌肉內、腹膜內、鼻內或皮下路線之非經腸使用而言，實施例之藥劑可在無菌水溶液或懸浮液提供，該等無菌水溶液或懸浮液經緩衝至適當pH且為等滲性的；或在非經腸可接受之油中提供。適合水性媒劑包括林格氏溶液及等滲氯化鈉。此等形式可以諸如安瓿或拋棄式注射裝置之單位劑量形式、以諸如可自其抽取適

當劑量的小瓶之多劑量形式，或以可用於製備可注射調配物之固體形式或預濃縮物而存在。在若干分鐘至若干天範圍變化的時期內，說明性輸注劑量在與醫藥載劑混合的約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分鐘}$ 藥劑至 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分鐘}$ 藥劑範圍變化。

【0232】對經鼻、吸入或經口投與而言，實施例之醫藥組成物可使用例如亦含有適合載劑之噴霧調配物來投與。

【0233】對局部應用而言，實施例之化合物較佳地調配為乳膏或軟膏或適用於局部投與之類似媒劑。對局部投與而言，本發明之化合物可以藥物對媒劑之約 0.1% 至約 10% 之濃度與醫藥載劑混合。投與實施例之藥劑的另一模式可利用貼片調配物以實現經皮遞送。

【0234】本揭示內容提供殺滅表現葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 之細胞的方法，該方法包含向該細胞投與有效量之式(I)-(V)或(Ia)-(Va)化合物或其鹽、溶劑合物或立體異構物。在一些實施例中，提供殺滅表現人類葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) 之細胞的方法，該方法包含向該細胞投與足以殺滅該細胞之量的式(I)-(V)或(Ia)-(Va)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物。在某些實施例中，細胞為癌細胞。在某些實施例中，癌細胞為卵巢癌細胞、肺癌細胞、子宮癌細胞、睾丸絨毛膜癌細胞、室管膜瘤細胞、間皮瘤細胞、乳癌細胞、結腸癌細胞或腎細胞癌瘤細胞。在某些實施例中，癌細胞為 FRA 陽性卵巢癌細胞、FRA 陽性肺癌細胞、FRA 陽性子宮癌細胞、FRA 陽性睾丸絨毛膜癌細

胞、F R A 陽性室管膜瘤細胞、F R A 陽性間皮瘤細胞、F R A 陽性乳癌細胞、F R A 陽性結腸癌細胞或 F R A 陽性腎細胞癌瘤細胞。

【0235】 在另一態樣中，本揭示內容提供治療個體之癌症的方法，該方法包含向該個體投與有效量之式(I)-(V)或(Ia)-(Va)化合物或其鹽、溶劑合物或立體異構物。可用本文所述的方法治療的癌症之實例包括但不限於癌瘤，包括腺癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、黑素瘤及肉瘤。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌、胃腸癌、霍奇金氏及非霍奇金氏淋巴瘤、胰腺癌、神經膠質母細胞瘤、宮頸癌、神經膠質瘤、卵巢癌、諸如肝癌及肝腫瘤之肝臟癌症、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、唾液腺癌、諸如腎細胞癌及維爾姆斯腫瘤之腎癌、基底細胞癌、黑素瘤、間皮瘤、前列腺癌、甲狀腺癌、睾丸癌、食道癌、膽囊癌以及各種類型之頭頸癌。

【0236】 在用於治療癌症之方法之某些實施例中，癌症係選自卵巢癌、肺癌、子宮癌、睾丸絨毛膜癌、室管膜瘤、間皮瘤、乳癌、結腸癌及腎細胞癌瘤。在一些實施例中，癌症為 F R A 陽性癌症。在某些實施例中，癌症為 F R A 陽性卵巢癌、F R A 陽性肺癌、F R A 陽性子宮癌、F R A 陽性睾丸絨毛膜癌、F R A 陽性室管膜瘤、F R A 陽性間皮瘤、F R A 陽性乳癌、F R A 陽性結腸癌或 F R A 陽性腎細胞癌瘤。在某些實施例中，個體具有癌症或已診斷為具有

癌症。在某些實施例中，個體具有 F R A 陽性惡性病或已診斷為具有 F R A 陽性惡性病(諸如，卵巢癌、肺癌、子宮癌、睪丸絨毛膜癌、室管膜瘤、間皮瘤、乳癌、結腸癌及腎細胞癌瘤)。在某些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，該方法進一步包含以下步驟：在投與化合物之前，偵測癌細胞上之 F R A 之表現位準。在一些實施例中，化合物係腹膜內、靜脈內、肌肉內、皮下、鞘內、心室內、經口、經腸、非經腸、鼻內、經皮、舌下或藉由吸入來投與。

套組

【0237】 本揭示內容提供醫藥包裝或套組，其包含一或多個容器，該一或多個容器包含適用於治療或防止癌症的式(I)-(V)或(Ia)-(Va)化合物或其鹽、溶劑合物或立體異構物。套組可進一步包含治療癌症使用的說明書。

【0238】 本揭示內容亦提供醫藥包裝或套組，其包含一或多個容器，該一或多個容器包含本發明實施例之醫藥組成物之一或多種成分。視需要與此容器相關聯的為呈藉由管制醫藥或生物產品之製造、使用或銷售的政府機構規定之形式的注意事項，該注意事項反映出製造、使用或銷售機構針對人類投與之批准。

藥物複合體之合成

【0239】 實施例亦針對適用於製備標的化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法及中間物。

【0240】 可利用提供適用於合成所揭示化合物之通常

已知化學合成流程及條件之許多一般參考文獻(參見，例如，Smith 及 March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 第 5 版, Wiley-Interscience, 2001)。

【0241】如本文所述的化合物可藉由此項技術中已知的任何手段純化，該等手段包括層析手段，諸如高效液相層析 (high performance liquid chromatography; HPLC)、製備性薄層層析、急驟管柱層析及離子交換層析。可使用任何適合的固定相，包括正相及逆相以及離子型樹脂。最典型地，所揭示化合物係經由矽膠及 / 或氧化鋁層析來純化。參見，例如，*Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 第 2 版, L. R. Snyder 及 J. J. Kirkland 編, John Wiley and Sons, 1979；以及 *Thin Layer Chromatography*, E. Stahl (編), Springer-Verlag, New York, 1969。

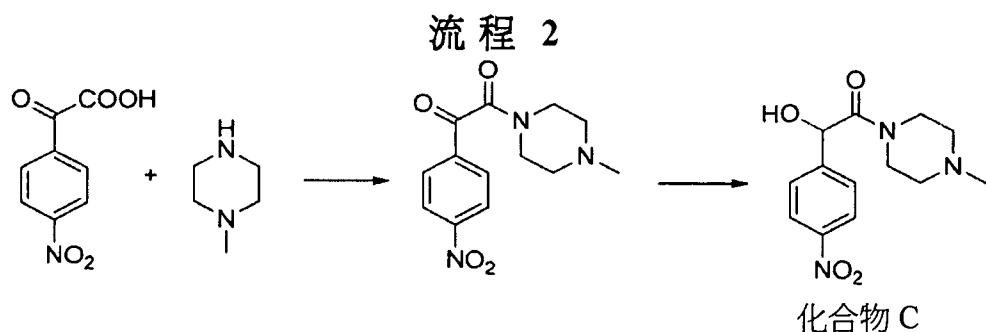
【0242】在用於製備標的化合物之任何方法期間，可能必需及 / 或需要保護所關注任何分子上之敏感或反應性基團。此可藉助於如權威著作中所述的習知保護基來達成，該等權威著作諸如 T. W. Greene 及 P. G. M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」，第 4 版, Wiley, New York 2006。保護基可在適宜後續階段使用此項技術中已知的方法來移除。

【0243】現將參考說明性合成流程來描述適用於實施

例之方法的示範性化學實體，該等說明性合成流程用於本文中該等示範性化學實體之通用製備及隨後之特定實例。技藝人士將認識到，為獲得本文中之各種化合物，起始材料可經適合選擇以便最終所要取代基將在利用或不利用適當保護的情況下獲攜帶歷經反應流程以產生所要產物。或者，可能必需或需要使用可獲攜帶歷經反應流程且在適當時由所要取代基置換的適合基團來替代使用最終所要取代基。此外，熟習此項技術者將認識到，以下流程中所示的轉變可以與特定側基之官能性相容的任何次序來執行。通用流程中繪示的每一反應較佳地在約 0 °C 至所使用有機溶劑之回流溫度的溫度下進行。除非另外指定，否則變數如以上參考式(I)所定義。

【0244】 本發明實施例之複合體可藉由將藥物部分經由包含親水性自我犧牲間隔子之連接子連接至抗體來構造。

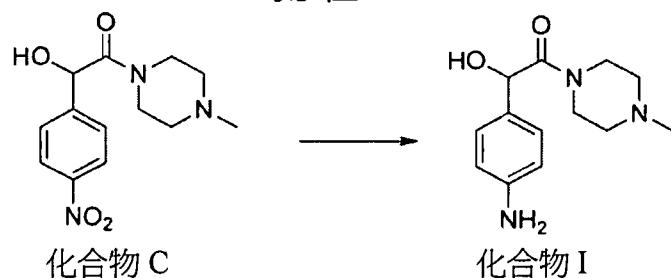
【0245】 以下流程及隨後之特定實例中所述用於式(I)化合物之連接子部分的代表性合成。



【0246】 以上流程 2 中展示化合物 C 自 4 - 硝基苯甲醛之合成。使用諸如 SOCl_2 、 PCl_3 或 PCl_5 之氯化試劑將

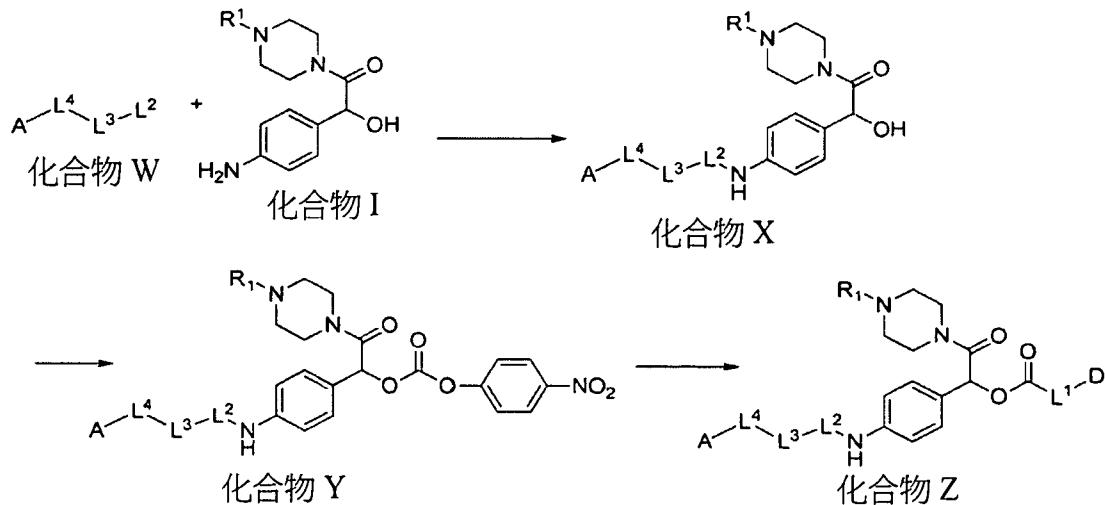
4 - 硝基苯基羥基乙酸轉化成相應醯基氯。醯基氯隨後與 1 - 甲基哌嗪反應以得到酮醯胺中間物。或者，4 - 硝基苯基羥基乙酸可藉由使用諸如 E D C I 之偶合劑而偶合至 1 - 甲基哌嗪。酮醯胺中間物含有酮基，其隨後由諸如 D I B A L - H 、 BH_3 、 $LiAlH_4 - AlCl_3$ 、 $LiAlH_4 - BF_3 - Et_2O$ 或氫化硼鈉之還原劑還原，以產生化合物 C 。

流程 3



【0247】 參考流程 3，化合物 C 之硝基藉由利用諸如鈀、鎳或鉑之觸媒進行催化氫化來還原以產生化合物 I 中之苯胺基。適合氫化觸媒之實例包括 Pd/C 及雷氏鎳。

流程 4



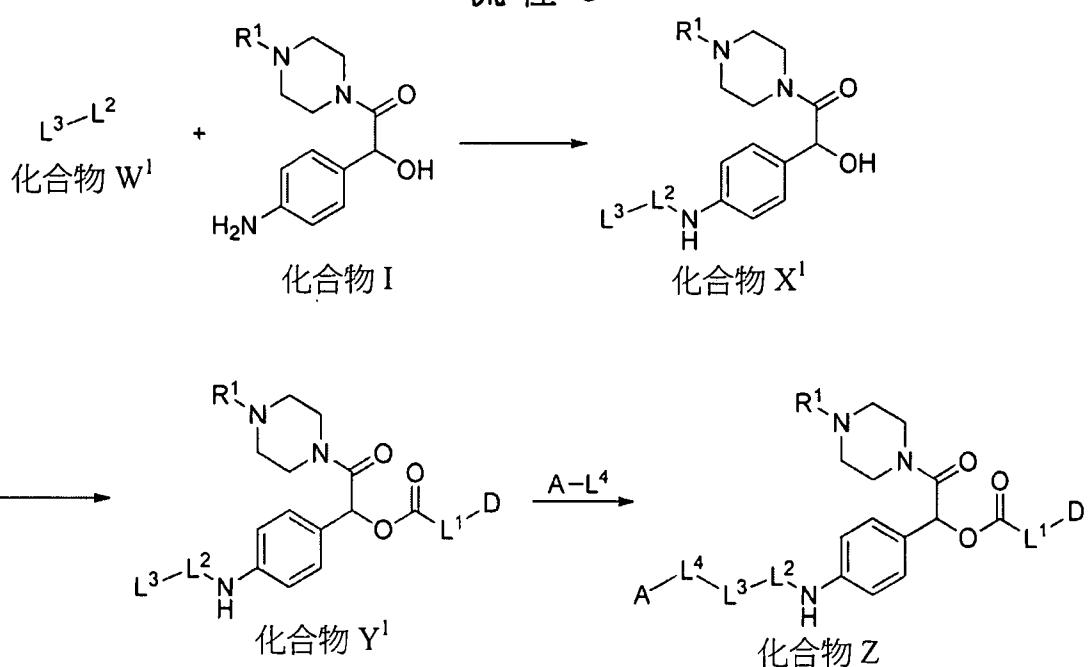
【0248】 參考流程 4，化合物 I 提供本發明實施例之化合物中的親水性自我犧牲連接子部分。化合物 I 之胺基可

經由標準肽偶合條件與化合物 W 反應，以產生化合物 X。可於諸如 DIEA 之鹼或對熟習此項技術者熟悉的其他鹼存在下且在適當溶劑中使用諸如 EDCI/HOBt、HOBt、PyBOP、HATU 或 BEM 之試劑 (Carpino, L. A. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4397. Carpino, L. A.; El-Faham, A. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5401. Li, P.; Xu, J. C. J. Pept. Res. 2001, 58, 129.)。

【0249】繼續參考流程 4，使用氯甲酸 4-硝基苯酯將化合物 X 之羥基轉化成活化碳酸酯。利用化合物 Y，與具有胺基之藥物的反應可產生化合物 Z。若藥物不含有胺基，則第二、中間自我犧牲間隔子或環化自我消除連接子可位於藥物部分與胺基苄基羥基羰基之間，如以上所論述。

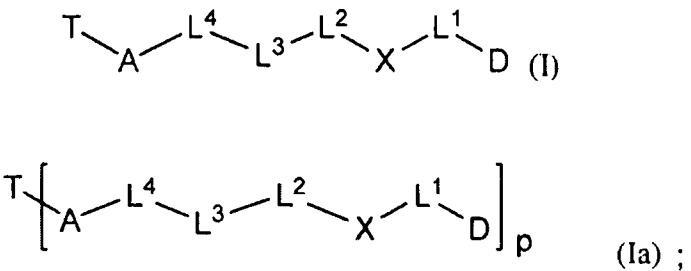
【0250】在某些實施例中，參考以下流程 5，連接子之 $-L^3-L^2-$ 部分連接至化合物 I。隨後，連接 $-A-L^4-$ 部分。

流程 5



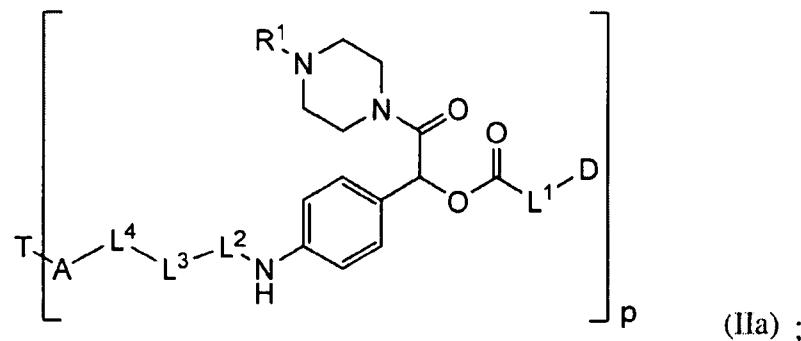
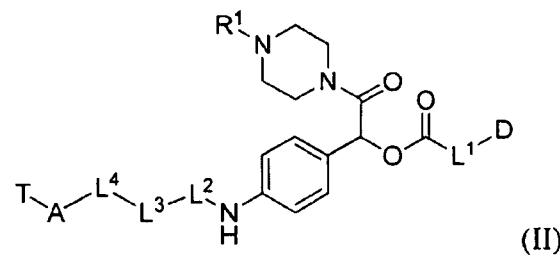
【0251】用於製備本發明實施例之化合物的方法包括製備抗體於緩衝液中之溶液，且用諸如 TCEP 之還原劑之溶液處理。測定游離硫醇之量。當游離硫醇之量達到預定量時，部分還原抗體由連接子-藥物部分烷基化。

【0252】在一些實施例中，提供用於製造式(I)或(Ia)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：

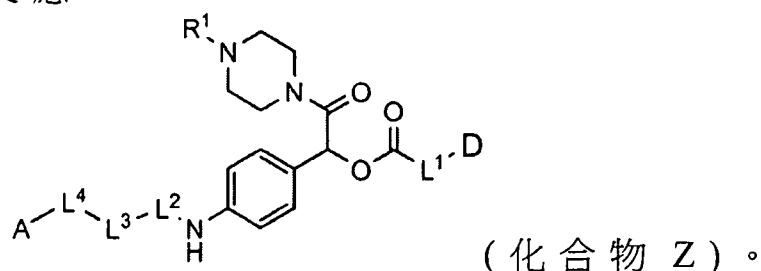


其中 D、T、X、L¹、L²、L³、L⁴、A 及 p 在適用時如對式(I)或(Ia)所定義，該方法包含使包含靶向部分 T 之化合物與式：A - L⁴ - L³ - L² - X - L¹ - D 之化合物反應。在一些實施例中，T 為特異地結合至葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA) (例如，人類 FRA) 之抗體。在一些實施例中，提供藉由該方法產生的化合物。另外提供包含藉由該方法產生的一或多種化合物之組成物。

【0253】在一些實施例中，提供用於製造式(II)或(IIa)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



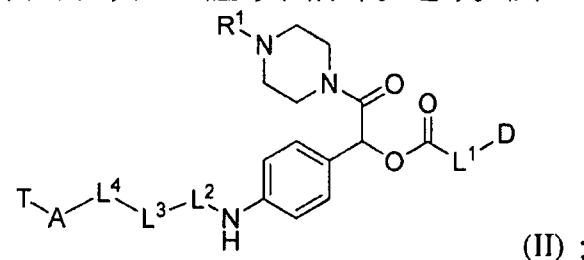
其中 D 、 T 、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 、 A 且 p 在適用時如對式 (II) 或 (IIa) 所定義，該方法包含使帶有一或多個游離硫醇(或硫氫基)之抗體與化合物 Z 或其鹽或溶劑合物或立體異構物反應：



在一些實施例中，帶有一或多個游離硫醇(或硫氫基)之抗體為抗 F R A 抗體。在一些實施例中，帶有一或多個游離硫醇(或硫氫基)之抗體為 h L K 2 6 或 h M O V 1 9 。在一些實施例中，帶有一或多個游離硫醇(或硫氫基)之抗體為抗體 2 6 B 3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。在一些實施例中，帶有一或多個游離硫醇(硫氫基)之抗體為其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 h L K 9 6 ，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈

之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 hMOV19。在一些實施例中，帶有一或多個游離硫醇(或硫氫基)之抗體為抗體 26B3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)，或其中抗體之重鏈及/或輕鏈之一或多個胺基酸殘基由半胱胺酸殘基置換的 26B3 之衍生物(例如，諸如人類化或嵌合抗體)。在一些實施例中，該方法進一步包含用於製備如本文中詳述的化合物 Z 之方法。在一些實施例中，該方法進一步包含用於製備獲得如本文中詳述之化合物 Z 的一或多種合成中間物(例如，化合物 Y 及化合物 X)之方法。在一些實施例中，提供藉由本文中詳述之任何方法所製成的化合物。另外提供包含藉由本文中詳述之任何方法所製成的一或多種化合物之組成物。

【0254】在一些實施例中，提供用於製造式(II)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



其中：

D 為藥物部分；

T 為抗體；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

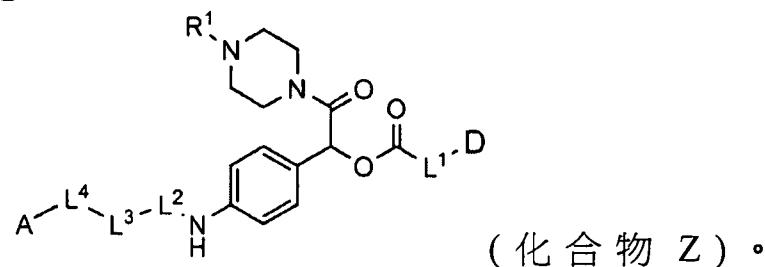
其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；

L^3 為肽連接子；

L^4 為鍵或間隔子；且

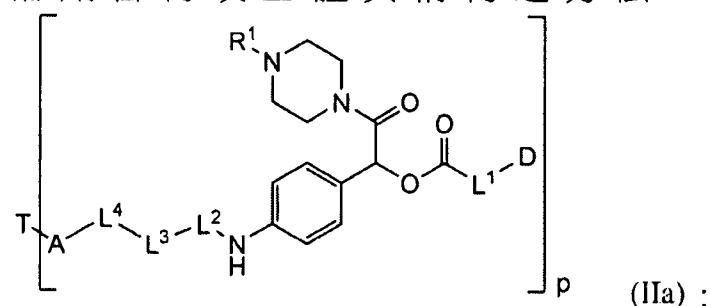
A 為醯基單元；

該方法包含使抗體與化合物 Z 或其鹽或溶劑合物或立體異構物反應：



在一些實施例中，T 為特異地結合至葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)(例如，人類 FRA)之抗體。

【0255】 在一些實施例中，提供用於製造式(IIa)化合物或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



其中：

p 為 1 至 20；

D 為藥物部分；

T 為抗體；

R^1 為氫、未經取代或經取代 C_{1-3} 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L^1 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

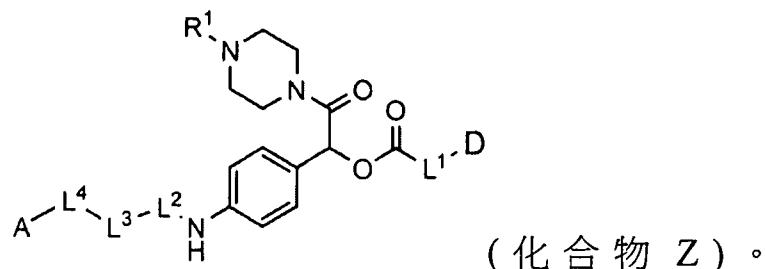
其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；

L^3 為肽連接子；

● L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元；

該方法包含使抗體與化合物 Z 或其鹽或溶劑合物或立體異構物反應：



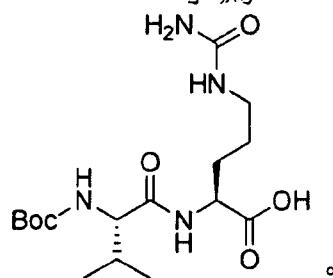
● 在一些實施例中， T 為特異地結合至葉酸受體 α (folate receptor alpha；FRA)(例如，人類 FRA)之抗體。

【0256】 另外提供藉由製造化合物之方法及/或製備如本文中詳述之化合物之方法中的任何方法所製成的化合物。亦提供組成物(例如，醫藥組成物)，其包含藉由製造化合物之任何方法及/或製備如本文中詳述之化合物之方法中的任何方法所製成的一或多種化合物。

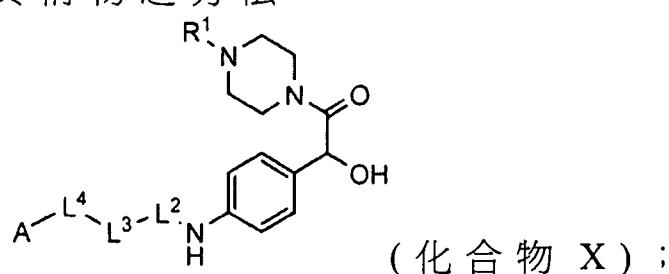
【0257】 本揭示內容提供用於製備流程 4 及 5 中之化

合物及中間物的方法。流程 4 及 5 中表示的化合物意欲具有完全原子價，或在適當時由可選保護基或離去基適當封端。例如，如流程「化合物 TAP-18H 之合成」所示，

$L^3 - L^2$ 可為



【0258】 本揭示內容提供製備化合物 X 或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



其中：

R^1 為氫、未經取代或經取代 C_{1-3} 烷基或未經取代或經取代雜環基；

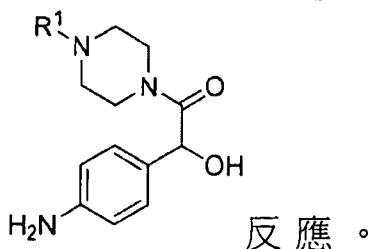
L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

L^3 為肽連接子；

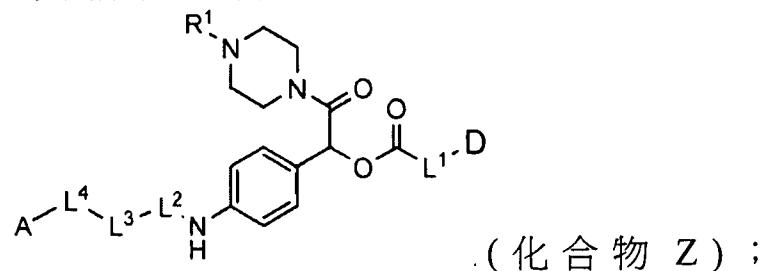
L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元；

該方法包含：使化合物 W : $A - L^4 - L^3 - L^2$ 與化合物 I :



【0259】本揭示內容提供製備化合物 Z 或其鹽或溶劑
合物或立體異構物之方法：



其中：

D 為藥物部分；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

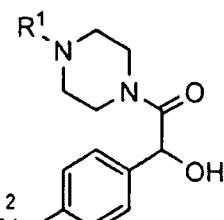
其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；

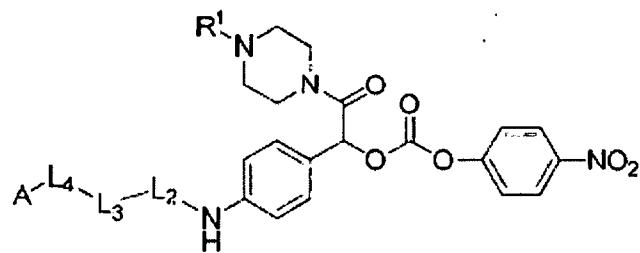
L³ 為肽連接子；

L⁴ 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元；



該方法包含：使化合物 X : A-L⁴-L³-L²-N_H 与氯甲酸對硝基苯酯反應以形成化合物 Y :



；以及使化合物 Y 與包含
L¹ - D 之化合物反應。

【0260】本揭示內容提供製備化合物 X¹ 或其鹽或溶劑
化合物或立體異構物之方法：



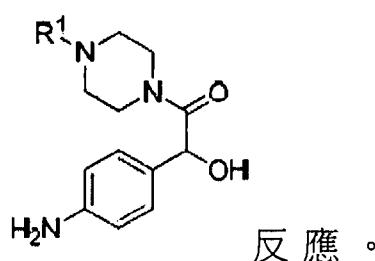
其中：

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁ -₃ 烷基或未經取代或經取
代雜環基；

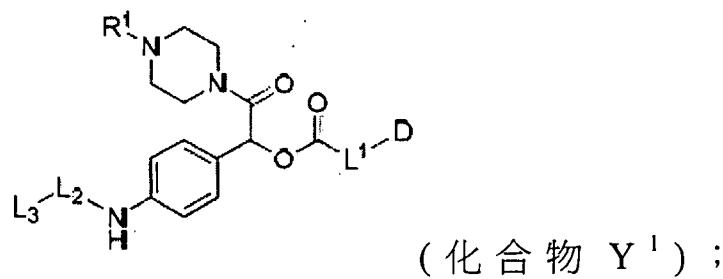
L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；且

L³ 為肽連接子；

該方法包含：使化合物 W¹ : L⁴ - L³ 與化合物 I :



【0261】本揭示內容提供製備化合物 Y¹ 或其鹽或溶劑
化合物或立體異構物之方法：



其中：

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

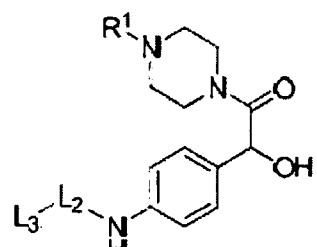
D 為藥物部分；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

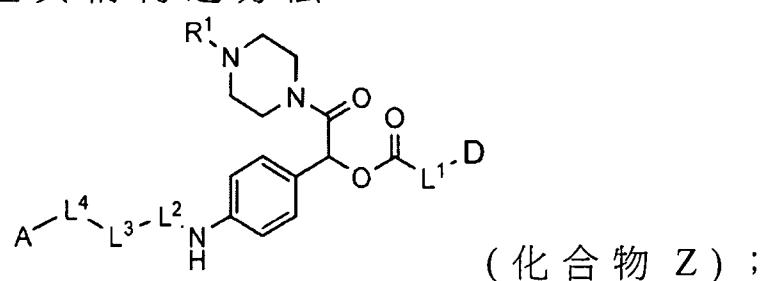
其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；且 L³ 為肽連接子；



該方法包含：使化合物 X¹： 與包含 L¹ - D 之化合物反應。

【0262】 本揭示內容提供製備化合物 Z 或其鹽或溶劑合物或立體異構物之方法：



其中：

D 為藥物部分；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

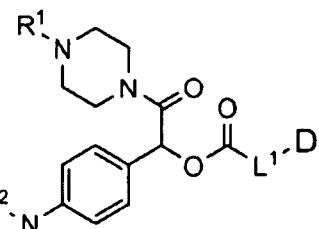
其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；

L³ 為肽連接子；

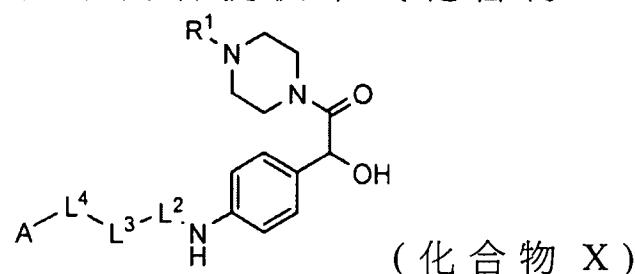
L⁴ 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元；



該方法包含：使化合物 Y¹： L^3-L^2-NH 與包含 A-L⁴ 之化合物反應。

【0263】 本揭示內容提供下式化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

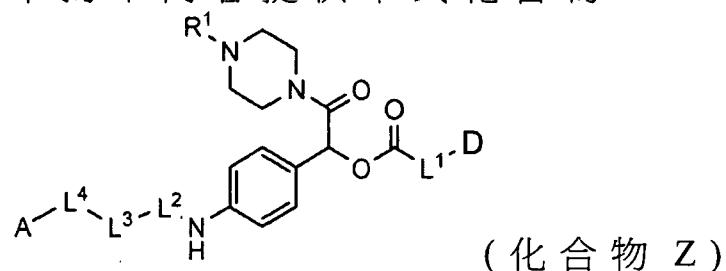
L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

L^3 為肽連接子；

L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0264】 本揭示內容提供下式化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

R^1 為氫、未經取代或經取代 C_{1-3} 烷基或未經取代或經取代雜環基；

D 為藥物部分；

L^1 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L^2 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L^1 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L^2 為鍵；

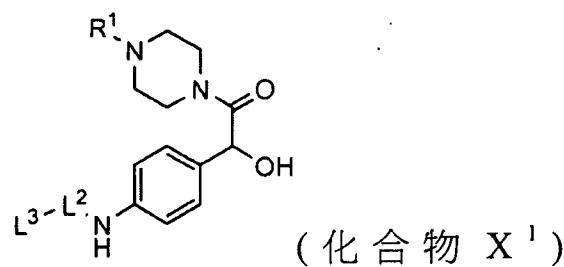
其中若 L^2 為第二自我犧牲連接子，則 L^1 為鍵；

L^3 為肽連接子；

L^4 為鍵或間隔子；且

A 為醯基單元。

【0265】 本揭示內容提供下式化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

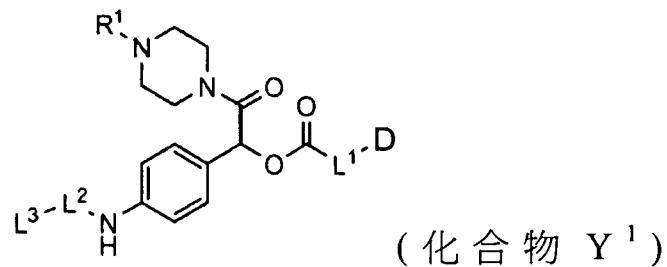
其中：

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；且

L³ 為肽連接子。

【0266】 本揭示內容提供下式化合物：



或其鹽或溶劑合物或立體異構物；

其中：

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

D 為藥物部分；

L¹ 為鍵、第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子；

L² 為鍵或第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為第二自我犧牲連接子或環化自我消除連接子，則 L² 為鍵；

其中若 L² 為第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為鍵；且

L^3 為肽連接子。

【0267】 本說明書視為足以允許熟習此項技術者實踐本發明。除本文所示及所述的彼等者之外，本發明之各種修改將根據前述描述而對熟習此項技術者變得明顯，且落入隨附發明申請專利範圍之範疇內。本文引用的所有出版物、專利及專利申請案皆據此以全文引用方式併入以用於所有目的。

實例

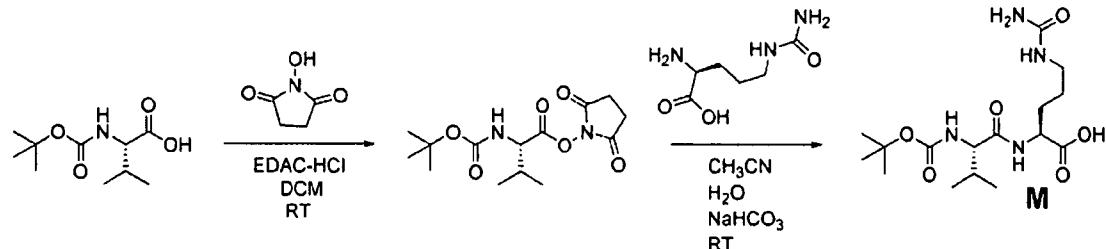
【0268】 本發明可進一步藉由參考以下實例來進一步理解，該等實例係藉由說明方式提供且不意欲為限制。

實例 1：用於實例 2-6 之材料及方法

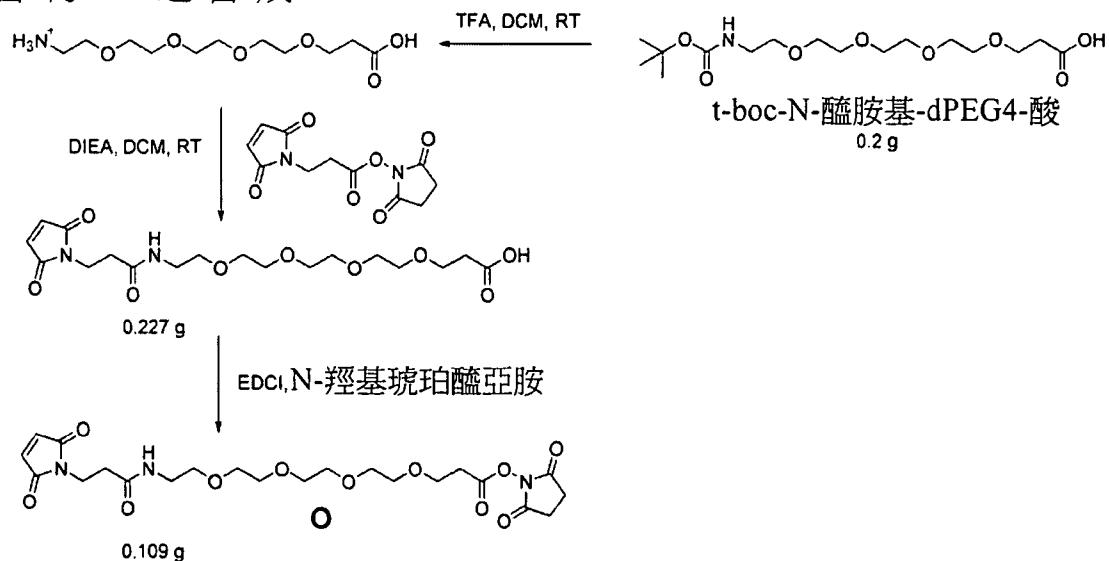
連接子-藥物之合成

【0269】 化合物 Tap-18H 之合成在以下流程中展示。中間化合物 M 及 O 之合成亦在以下流程中展示。

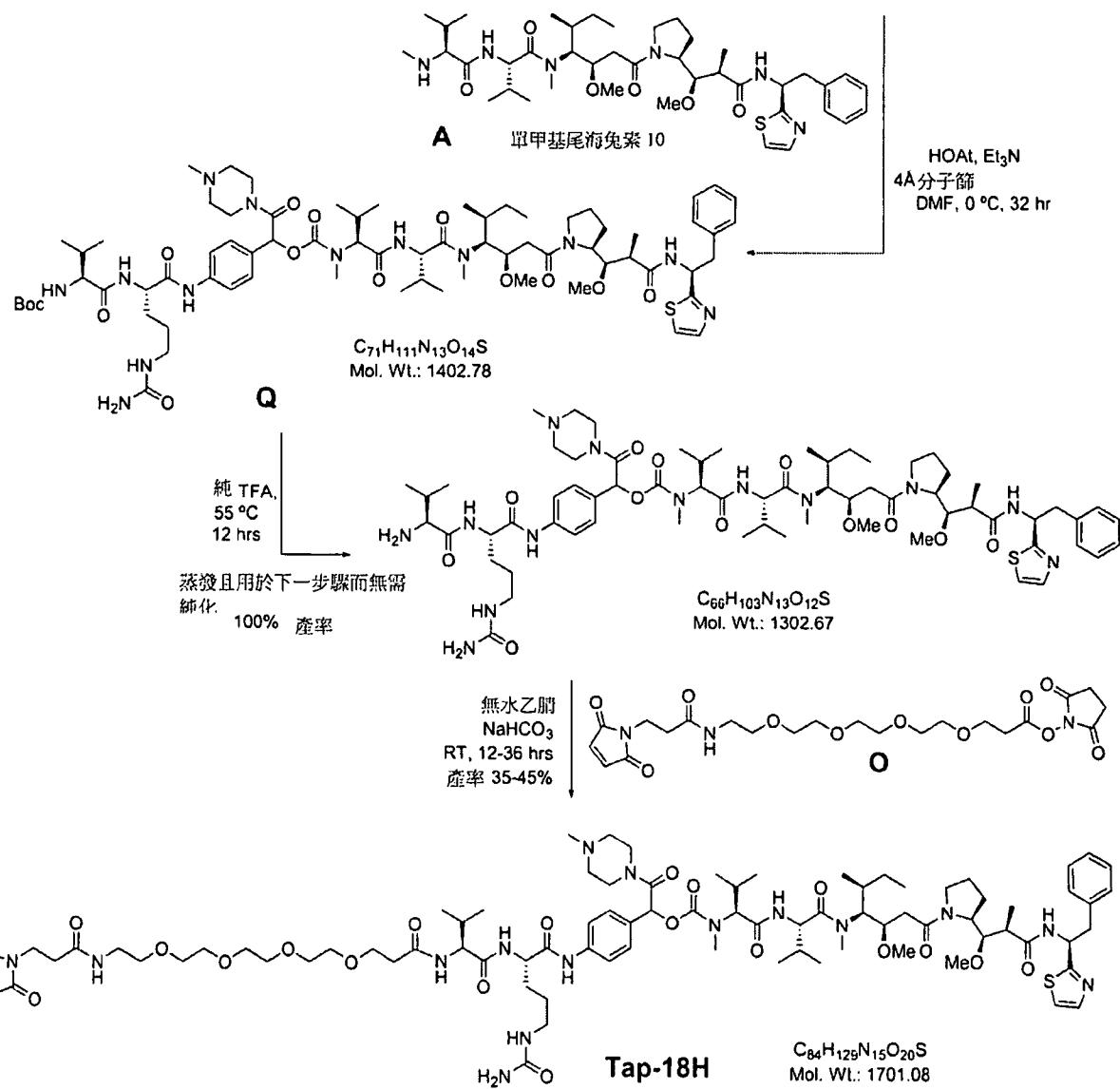
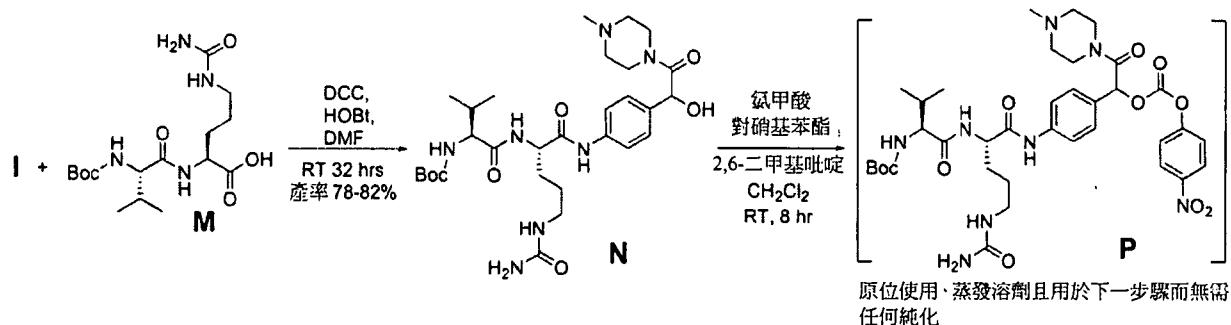
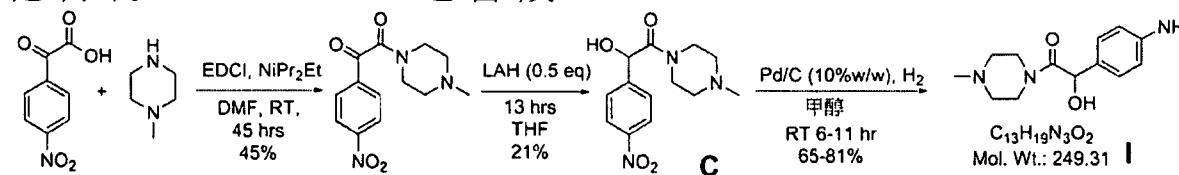
化合物 M 之合成



化合物 O 之合成



化合物 *TAP-18H* 之合成



【0270】 參考化合物 Tap-18H 之合成之流程，使用 PCl_5 、或於 DMF 中之 EDCI 及 NiPr_2Et 、或於 CH_2Cl_2

及 N - 甲基嗎啉中之 2 - 氯 - 4 , 6 - 二甲氧基 - 1 , 3 , 5 - 三嗪作為偶合劑，使市售 4 - 硝基苯基乙醛酸與 N - 甲基哌嗪縮合以產生所要酮醯胺。在典型程序中，在 0 - 5 °C 下，於連續攪拌下添加 2 - 氯 - 4 , 6 - 二甲氧基 - 1 , 3 , 5 - 三嗪 (5 mmol) 於 CH_2Cl_2 (20 ml) 、 N - 甲基嗎啉 (15 mmol) 中之溶液。在 30 - 40 分鐘之後形成白色懸浮液，且向此混合物添加於 CH_2Cl_2 (10 ml) 中之 4 - 硝基苯基乙醛酸，從而引起澄清溶液之形成。在攪拌混合物 1 小時之後，在室溫下添加 N - 甲基哌嗪 (5 mmol)。在反應完成 (TLC, 10 分鐘) 之後，用 10 % NaHCO_3 水溶液 (2×10 ml) 繼之以 H_2O (3×10 ml) 洗滌混合物。經由無水硫酸鈉乾燥有機層，且減壓下移除溶劑提供粗產物，該粗產物進一步藉由再結晶或管柱層析 (石油醚 : 乙酸乙酯 = 8 : 2) 來純化。

【0271】 酮醯胺化合物進一步藉由 0.5 當量之 LiAlH_4 於 THF 或 DIBAL-H 或氫化硼鈉存在下還原，以產生硝基化合物 C [B. P. Bandgar 及 S. S. Pandit, *Tetrahedron Letters* 44 (2003) 3855 - 3858]。

【0272】 硝基化合物 C 藉由用 SnCl_2 處理，或用 Pd/C (10 % w/w) 作為觸媒，於甲醇中在室溫下催化氫化約 6 - 11 小時來還原成苯胺化合物 I，產率為 65 - 81 %。其可經由以下程序，使用具有 RB04-50 反應器 B 之 MultiMaxIR 系統來獲得。反應器最初由 35 ml 之甲醇、0.03 mg 之 10 % Pd/C 及 0.0252 mol 之硝基化合物 C 填充，且在反應器中添加氫至多達 6.3 巴之壓力

(H₂，恒定)。

【0273】 參考化合物 M 之合成流程，用 DCM 中之 N-羥基琥珀醯亞胺及 EDAC-HCl 或 DCM 中之 N-羥基琥珀醯亞胺及 EDC 處理 Boc 保護的 L-纈氨酸，以得到琥珀醯亞胺酯。此活化的酯與 L-瓜氨酸及 CH₃CN、H₂O、NaHCO₃ 反應，以提供 Boc 保護的化合物 M。

【0274】 參考化合物 Tap-18H 之合成流程，苯胺化合物 I 藉助於 DMF 中之 DCC/HOBt 在室溫下與 Boc 保護的化合物 M 偶合 32 小時以得到化合物 N (產率 78 - 82%)，或與 PS-碳化二醯亞胺偶合，其中化合物 N 之合成的反應自 100 mg 之化合物 M 與 1.5 當量之苯胺化合物 I 於 DCM 中之兩當量之 PS-碳化二醯亞胺及 1.7 當量之 HOBt 存在下開始進行 24 小時。藉由 LC/MS 之分析展示具有所要質量及大致 50 - 60% 轉化率之峰值。

【0275】 偶合產物化合物 N 隨後與氯甲酸 4-硝基苯酯於 DCM 中之 2,6-二甲基吡啶存在下、在 RT 下反應 8 小時，以產生碳酸鹽酯化合物 P，LC/MS 展示具有所要質量之峰值。

【0276】 碳酸酯化合物 P 由單甲基尾海兔素 10 於 DMF 中之 HOAt 及 Et₃N 存在下之處理引起化合物 Q 之形成。

【0277】 參考化合物 O 之合成流程，由 DMF 中之順丁烯二酸酐處理 β-丙氨酸，且由此獲得的酸於 DCC 偶合下與 N-羥基琥珀醯亞胺

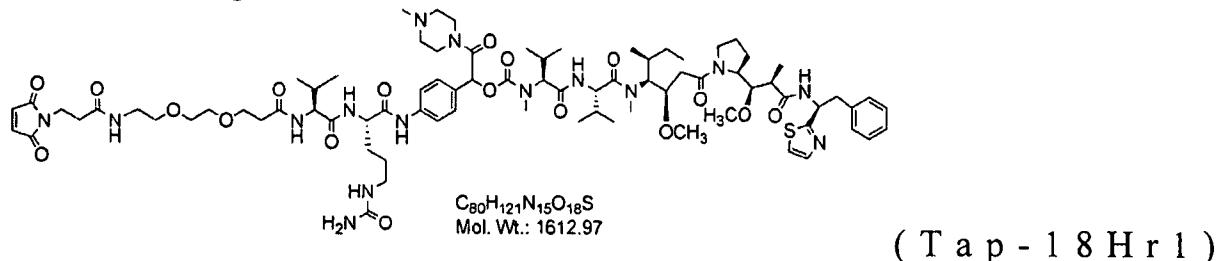
(N-hydroxysuccinimide; NHS)反應，以得到 NHS-酯。市售 t-boc-N-醯胺基-dPEG4-酸中之 BOC 保護基藉由用 TFA 之處理移除，以得到胺之 TFA 鹽，該 TFA 鹽與先前合成的 NHS 酯反應。分離由此獲得的羧酸，且使用 EDCI 使其與 N-羥基琥珀醯亞胺偶合以提供 NHS 酯化合物 O。

【0278】 參考化合物 Tap-18H 之合成流程，由 TFA 移除化合物 Q 中之 Boc 基團，且使游離胺與 NHS 酯化合物 O 在無水乙腈及 NaHCO₃ 中在室溫下偶合 12-36 小時，以產生最終產物 Tap-18H，產率為 35-45%。

【0279】 第 1 圖展示 Tap-18H 之 NMR 光譜。

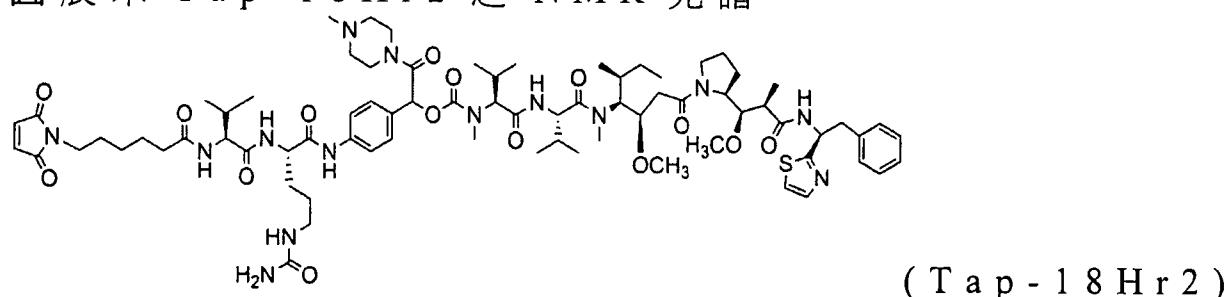
化合物 TAP-18H r1 之合成

【0280】 合成具有以下展示之式的 Tap-18H r1。第 2 圖展示 Tap-18H r1 之 NMR 光譜。



化合物 TAP-18H r2 之合成

【0281】 合成具有以下展示之式的 Tap-18H r2。第 3 圖展示 Tap-18H r2 之 NMR 光譜。



細胞系

【0282】 將卵巢癌細胞 SK-OV-3 (ATCC®, 目錄號 HTB-77™) 在補充有 10% FBS (HYCLONE®, 目錄號 SH30071.03) 及 100 U/mL 青黴素 / 100 μg/mL 鏈黴素 (GIBCO®, 目錄號 15140) 之 McCoy 氏 5A 培養基 (GIBCO®, 目錄號 16600) 中培養。將卵巢癌細胞 OVCAR-3 (Bioresource Collection and Research Center®, 目錄號 60551) 在補充有 20% FBS、1 mM 丙酮酸鈉 (GIBCO®, 目錄號 11360)、0.01 mg/mL 牛胰島素 (SIGMA®, 目錄號 I6634) 及 100 U/mL 青黴素 / 100 μg/mL 鏈黴素之 RPMI 培養基 1640 (GIBCO®, 目錄號 22400) 中培養。卵巢癌細胞 OVCAR-3B 係由 OVCAR-3 改編，且在補充有 10% FBS、1 mM 丙酮酸鈉 (GIBCO®, 目錄號 11360) 及 100 U/mL 青黴素 / 100 μg/mL 鏈黴素之 RPMI 培養基 1640 (GIBCO®, 目錄號 22400) 中培養。胰腺癌細胞 Panc 02.03B 係由 Panc 02.03 (ATCC®, 目錄號 CRL-2553™) 改編，且在補充有 15% FBS、1 mM 丙酮酸鈉及 100 U/mL 青黴素 / 100 μg/mL 鏈黴素之 RPMI 培養基 1640 中不利用胰島素培養。將肺癌細胞 NCI-H2110 (ATCC®, 目錄號 CRL-5924™) 在補充有 10% FBS、1 mM 丙酮酸鈉、2.5 g/公升 D-葡萄糖 (SIGMA®, 目錄號 G8270) 及 100 U/mL 青黴素 / 100 μg/mL 鏈黴素之 RPMI 培養基 1640 中培養。將肺癌細

胞 N C I - H 2 9 2 (B I O R E S O U R C E C O L L E C T I O N
A N D R E S E A R C H C E N T E R ® , 目 錄 號 6 0 3 7 2) 在 補
充 有 1 0 % F B S 、 1 m M 丙 酮 酸 鈉 及 1 0 0 U / m L 青 黴 素
/ 1 0 0 μ g / m L 鏈 黴 素 之 R P M I 培 養 基 1 6 4 0 中 培 養 。

試 劑

【 0 2 8 3 】 D T T 及 D T P A 自 S I G M A - A L D R I C H ® (S t .
L o u i s , M O) 獲 得 。 T C E P 自 A c r o s (M o r r i s P l a i n s ,
N J) 獲 得 。 D T N B 自 T h e r m o S c i e n t i f i c (R o c k f o r d ,
I L) 獲 得 。 磷 酸 鈉 、 硼 酸 鈉 及 氯 化 鈉 自 J . T . B A K E R ™
(C e n t e r V a l l e y , P A) 獲 得 。 半 脫 胺 酸 自 A L F A
A E S A R ® (W a r d H i l l , M A) 獲 得 。

表 5 : 抗 F R A 抗 體 h L K 2 6 之 胺 基 酸 序 列

SEQ ID NO.	描述
1	hLK26-IgG1 重鏈
2	hLK26-IgG4p 重鏈
3	hLK26-κ 輕鏈

【 0 2 8 4 】 S E Q I D N O : 1 (h L K 2 6 - I g G 1 重 鏈)
E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C S A S G F T F S G Y G L S W V R Q A P G K G L E W V A M I S S G G S
Y T Y Y A D S V K G R F A I S R D N A K N T L F L Q M D S L R P E D T G V Y F C A R H G D D P A W F A Y W G Q
G T P V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V
H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T
C P P C P A E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E
V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

【 0 2 8 5 】 S E Q I D N O : 2 (h L K 2 6 - I g G 4 p 重 鏈)

EVQLVESGGVVQPGRLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGS
YTYYADSVKGRFAISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQ
GTPVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPALQSSGLYSLSSVTVPSQLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

【 0 2 8 6 】 S E Q I D N O : 3 (h L K 2 6 - κ 輕鏈)
 DIQLTQSPSSLSASVGDRVITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGKAPKWIYGTASNLAG
 VPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQWSSYPYMYTFGQGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

h L K 2 6 - 半胱胺酸變異體之產生

【 0 2 8 7 】 利用定位突變方法將半胱胺酸殘基引入 h L K 2 6 之重鏈(C H)或 κ 輕鏈(C L)之恆定區中。簡言之，藉由重疊 P C R 執行突變。可藉由併入核苷酸改變的引子引入所要鹼基中之特異性變更。因為將引子延長，所以在所得擴增子中產生突變。胺基酸之突變位置(E U 編號)及側接序列在以下表 6 中列出。

表 6 : 胺基酸之突變位置(E U 編號)及側接序列

用於突變之鏈	EU 編號	側接序列	SEQ ID NO:
重鏈	T155C	GCLVKDYFPEPV <u>C</u> VSWNSGALTSGV	36
	T199C	VVTVPSSSLGTKY <u>C</u> CNVDHKPSNT	47
	S442C	EALHNHYTQ <u>K</u> SL <u>C</u> SPGK	48
κ 輕鏈	L201C	EVTHQ <u>G</u> CSSPVTKSFNRGEC	51
	T206C	EVTHQ <u>G</u> GLSSPV <u>C</u> KSFRGEC	52

表現 h L K 2 6 - C y s 變異體之穩定細胞系的產生

【 0 2 8 8 】 h L K 2 6 - 半胱胺酸(h L K 2 6 - C y s)變異體係於 F l p - I n C H O 細胞(I n v i t r o g e n TM)，目錄號：

R 758-07) 中穩定地表現並產生。將半胱胺酸取代的抗體變異體之 DNA 序列插入 pCDNA5/FRT 輽體 (Invitrogen™, 目錄號: V6010-20) 中, 且遵照由供應商提供的標準程序與 pOG44 (Invitrogen™, 目錄號 V6005-20) 共同轉染。收集所建立的細胞系之培養物上清液, 且利用蛋白質 A 瓊脂糖珠粒 (GE Healthcare™, 目錄號: 17-5280-04) 純化。利用 SDS-PAGE 及粒徑排阻層析分析純化蛋白質, 以確保抗體之品質。

● hL26-IgG1 抗體之習知複合

【0289】 習知藥物複合體藉由將連接子有效負載與抗體經由四鏈間二硫鍵之還原來複合而達成, 且複合因此限於游離半胱胺酸之八個暴露硫氫基。每抗體之連接子-藥物在 0-8 個範圍變化。hL26-IgG1 抗體部分地由 0.025 M 硼酸鈉 pH 8、0.025 M NaCl、1 mM DTPA 中之 1.85 當量之 TCEP 在 37°C 下還原 2 小時。使用針對 1.0 mg/mL 溶液在 280 nm 為 1.616 之吸光度值定量蛋白質濃度, 且使用 145,055 g/mol 之分子量測定莫耳濃度。藉由以 DTNB 滴定來測定所產生的 mAb-半胱胺酸硫醇之濃度。典型地獲得 3.22 個硫醇 / mAb。部分還原的抗體由 1.2 莫耳之馬來醯亞胺己醯基-藥物 (Tap18Hr1、Tap-18Hr1) / mAb-半胱胺酸硫醇或馬來醯亞胺基-藥物 / mAb-半胱胺酸硫醇烷基化。在 4°C 下執行烷基化反應 12~16 小時。半胱胺酸 (最終 1 mM) 係用於猝滅任何未反應的過量馬來醯亞胺己醯基-藥物或馬來

醯亞胺基-藥物。首先用結合緩衝液、10 mM 磷酸鈉、10 mM NaCl、5% DMSO (pH 7.0) 將複合混合物稀釋 5 倍，且針對 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 純化，以每 20 mg 複合抗體 1 mL 羅磷灰石之負荷容量施用於羅磷灰石管柱 (Macroprep ceramic I 型 40 μ m, BioRad®, Hercules, CA)。管柱先前用 5 管柱體積之結合緩衝液平衡。在樣本施用之後，用 3 管柱體積之結合緩衝液洗滌管柱，且用 5 管柱體積之 10 mM 磷酸鈉、10 mM NaCl (pH 7.0) 使其平衡。結合 ADC 隨後用 200 mM 磷酸鈉、10 mM NaCl (pH 7.0) 溶離。溶離之後，將緩衝液改變成杜貝卡氏磷酸鹽緩衝鹽水，使用 HIPREP™ 26/10 除鹽管柱 (可選)。

hLK26-Cys 變異體之位點特異性複合

【0290】位點特異性藥物複合體藉由將連接子有效負載 (亦即，包含連接至藥物部分之連接子之分子) 與抗體之恆定域 (CH 或 CL) 經由兩個工程化半胱胺酸殘基之還原來複合而達成，且複合因此限於游離半胱胺酸之兩個暴露硫氫基。為特異地複合引入半胱胺酸上之連接子有效負載，使用還原/氧化程序。為移除所引入半胱胺酸位點上可已在培養條件期間出現的半胱胺酸或麩胱甘肽，首先用 10 ~ 15 倍 莫耳 過量之 TCEP (ACROS ORGANICS®, 目錄號：363830100) 在 37 °C 下、於含有 1 mM DTPA (SIGMA-ALDRICH®, 目錄號：D6518) 之 PBS (GIBCO®, 目錄號：21600-069) 中

處理 h L K 2 6 - C y s 變異體 - T a p 1 8 H r 1 及 h L K 2 6 - T 1 5 5 C 及 h L K 2 6 - S 4 4 2 C 之重鏈突變體 2 ~ 5 小時。在移除過量 T C E P 之後，隨後用去氫抗壞血酸 (d e h y d r o a s c o r b i c a c i d ; D H A) (S I G M A - A L D R I C H ®, 目錄號: 2 6 1 5 5 6) 以超過蛋白質的 2 0 ~ 3 0 倍莫耳過量在室溫下將抗體還原氧化 3 ~ 5 小時，以確保鏈間二硫鍵之重新形成。將樣本緩衝液更換成 P B S 。隨後添加順丁烯二醯亞胺連接的藥物有效負載 T a p 1 8 H r 1 ，以與所處理抗體上之游離硫醇反應。過量有效負載以 N - 乙醯基 - L - 半胱氨酸 (S I G M A - A L D R I C H ®, 目錄號: A 7 2 5 0) 猥滅，且 C H T 陶瓷羥磷灰石珠粒 (B I O - R A D ®, 目錄號: 1 5 7 - 0 0 4 0) 係用於純化位點特異性複合 h L K 2 6 - C y s 變異體 - T a p 1 8 H r 1 ' 、 h L K 2 6 - T 1 5 5 C - T a p 1 8 H r 1 及 h L K 2 6 - S 4 4 2 C - T a p 1 8 H r 1 。

【0291】還原 / 氧化程序亦與一些修飾一起使用，以特異地複合重鏈之 T 1 9 9 處及在 κ 輕鏈之 L 2 0 1 及 T 2 0 6 處之所引入半胱氨酸上之連接子有效負載。首先用 1 5 ~ 5 0 倍莫耳過量之 T C E P (A C R O S O R G A N I C S ®, 目錄號: 3 6 3 8 3 0 1 0 0) 在 3 7 °C 下、於含有 1 ~ 5 0 m M D T P A (S I G M A - A L D R I C H ®, 目錄號: D 6 5 1 8 或 E 5 1 3 4) 之 P B S (G I B C O ®, 目錄號: 2 1 6 0 0 - 0 6 9) 中處理 T 1 9 9 C 之 h L K 2 6 重鏈突變體及 L 2 0 1 C 及 T 2 0 6 C 之輕鏈突變體 2 ~ 5 小時。在移除過量 T C E P 之後，隨後

用去氫抗壞血酸 (dehydroascorbic acid ; DHA) (SIGMA-ALDRICH®, 目錄號：261556) 以超過蛋白質的 50 ~ 70 倍莫耳過量在室溫下將抗體在 4 °C 下還原氧化 2 ~ 5 小時，以確保鏈間二硫鍵之重新形成。將樣本緩衝液更換成 PBS。隨後添加順丁烯二醯亞胺連接的藥物有效負載 Tap18Hr1，以與所處理抗體上之游離硫醇反應。過量有效負載以 N- 乙醯基 -L- 半胱氨酸 (SIGMA-ALDRICH®, 目錄號：A7250) 猥滅，且 CHT 陶瓷羥磷灰石珠粒 (BIO-RAD®, 目錄號：157-0040) 係用於純化此等位點特異性 ADC。

藉由逆相 HPLC 分析進行藥物抗體比率 (drug antibody ratio ; DAR) 測定

【0292】開發由還原及變性逆相 HPLC (reducing and denaturing reversed-phase HPLC ; RP-HPLC) 組成之方法來分離並定量各種輕鏈物種及重鏈物種，以測定複合 ADC 之 DAR。在 HPLC 分析之前，複合體樣本用 6 M 脯鹽酸鹽及 20 mM DTT 於 50 °C 加熱下處理 15 min。將 100 µg 之所處理複合體樣本施用於 PLRP-S 管柱 (2.1 x 150 mm, 8 µm, 1000 Å, Agilent)。流率係設定在 0.8 mL/min 下，且管柱溫度係設定在 80 °C 下，恆定地貫穿該分析。溶劑 A 為 Milli Q 水中之 0.05% 三氟乙酸，且溶劑 B 為乙腈中之 0.04% 三氟乙酸。該方法由以下組成：3 mL 的等度 25% B、25 mL 線性梯度至 50% B、2 mL 線性梯度至 95% B、

1 ml 線性梯度至 25% B 以及 2 ml 的等度 25% B。在此方法中，用過量 DTT 預處理 ADC 使鏈間及鏈內二硫化物斷裂，且允許具有 0 或 1 個藥物之輕鏈(L0 及 L1)與具有 0、1、2 或 3 個藥物之重鏈(H0、H1、H2 及 H3)分離。藉由每一分離物種之溶離時間及 UV 光譜(A248/280 比率隨藥物負荷增加)指定該等物種之峰值。基於所測試 ADC 之 RP-HPLC 分佈中之個別峰之面積計算的 DAR 在表 7A 及 7B 中列出。

表 7：藥物抗體比率

(A) 量測 1

hLK26-ADC	DAR 範圍
hLK26-IgG1-Tap18Hr1 (習知 ADC)	2.6~3.0
hLK26-Cys-變異體-Tap18Hr1 (位點特異性 ADC)	1.80~1.94

(B) 量測 2

hLK26-ADC	DAR 範圍
hLK26-IgG1-Tap18Hr1 (習知 ADC)	2.49~3.00
hLK26-T155C-Tap18Hr1	1.77~1.97
hLK26-T199C-Tap18Hr1	
hLK26-S442C-Tap18Hr1 (具有重鏈突變體之位點特異性 ADC)	
hLK26-T206C-Tap18Hr1	1.74~1.87
hLK26-L201C-Tap18Hr1 (具有 κ 輕鏈突變體之位點特異性 ADC)	

hLK26-Cys 變異體及 Tap18Hr1 複合體與癌細胞之結合

【0293】 在 V 形底 96 孔板中，以每孔接種 1×10^5 個細胞，且用 50 μ l 之未複合 Ab 或 ADC 以所滴定濃度或

用同種型對照抗體人類 IgG 以 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 孵育。在 4°C 下孵育 $30 \sim 60$ 分鐘之後，將細胞用 $200 \mu\text{l}$ FACS 緩衝液(含有 1% FBS 之 $1\times\text{PBS}$)洗滌一次，用 FACS 緩衝液中之 $50 \mu\text{l}$ 之 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 山羊 $\text{F}(\text{ab}')2$ -抗人類 IgG ($\text{H}+\text{L}$)-RPE 或山羊抗人類 IgG-RPE (SOUTHERN BIOTECH®，目錄號 2043-09 或 2040-09)染色，且隨後在 4°C 下孵育 30 min 。將細胞用 FACS 緩衝液洗滌一次，且藉由流式細胞儀(BD LSR, BD Life Sciences)分析。

活體外 *WST-8* 細胞毒性測定

【0294】 在 96 孔微量滴定板上，分別以每孔 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個細胞接種 SK-OV-3、OVCA R-3、OVCA R-3B 及 Panc 02.03B 細胞。以在以下於最終體積 $200 \mu\text{l}/\text{孔}$ 中之最終指示濃度範圍，一式三份或一式五份添加 Tap18Hr 複合 ADC 或未複合抗體：針對 SK-OV-3 及 Panc 02.03B 利用 2.5 倍或 3 倍連續稀釋以達 600 nM 至 0.03 nM ($90 \mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.005 \mu\text{g}/\text{mL}$)，以及針對 OVCA R-3 及 OVCA R-3B 利用 3 倍連續稀釋以達 200 nM 至 0.01 nM ($30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 至 $0.005 \mu\text{g}/\text{mL}$)。隨後將細胞在 37°C 及 $5\% \text{ CO}_2$ 下孵育。在針對 OVCA R-3 為 3 天且針對 SK-OV-3、Panc 02.03B 及 OVCA R-3B 為 3-6 天之孵育之後，藉由細胞計數套組-8 (Dojindo，目錄號 CK04)遵照製造商之說明書量測細胞活力。簡言之，在孵育結束時，移除

100 μ L/孔之培養基且將 10 μ L/孔之試劑染料(WST-8)添加至每一孔中。在最佳色彩顯影(當未處理對照之OD₄₅₀ ≥ 1 時)之後，藉由分光光度計(Molecular Devices®，VERSAMAX™微板閱讀器)量測450 nm下之吸光度(OD₄₅₀值)。獲得平行測試之平均值，且減去背景(培養基對照)。所得 OD₄₅₀ 值隨後用於根據下式計算生長抑制%：[未處理 OD₄₅₀ - 樣本 OD₄₅₀]/[未處理 OD₄₅₀] * 100。

● 癌症異種移植模型中之 ADC 處理

用 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 處理的卵巢腫瘤 SK-OV-3

【0295】 為建立皮下異種移植模型，將於含有 25% BD MATRIGEL™ 基底膜基質高濃度(BD Biosciences，目錄號 354248)之 120 μ L PBS 中的 1×10^7 個 SK-OV-3 細胞植入 6 週大雌性 C.B-17 SCID 小鼠(Lasco, Taipei, Taiwan)之右側腹中。在腫瘤細胞接種之後大致 1 小時，以於 100 μ L 中之 3 mg/kg 靜脈內注射 hLK26-IgG1-Tap18Hr1(標記為第 1 天)。用卡尺在兩個垂直尺寸上每週量測腫瘤體積一次，且根據式($0.52 * \text{長度} * \text{寬度} * \text{厚度}$)來計算腫瘤體積。為測定所處理小鼠中之潛在藥物毒性，每週記錄體重。用與 Tap18Hr1 複合的 hLK26-Cys 變異體處理的卵巢腫瘤 SK-OV-3

【0296】 為建立皮下異種移植模型，將於含有 50% BD

MATRIGELTM 基底膜基質高濃度 (BD Biosciences, 目錄號 354234) 之 100 μ L PBS 中的 1×10^7 個 SK-OV-3 細胞植入 6 週大雌性 C.B-17 SCID 小鼠 (Lasco, Taipei, Taiwan) 之右側腹中。在腫瘤細胞接種之後大致 2 小時，以於 150 μ L 中之 5 mg/kg 靜脈內注射位點特異性 ADC hLK26-Cys 變異體 - Tap18Hr1 (標記為第 1 天)。用卡尺在兩個垂直尺寸上每週量測腫瘤體積一次，且根據式 ($0.52 * \text{長度} * \text{寬度} * \text{厚度}$) 來計算腫瘤體積。為測定所處理小鼠中之潛在藥物毒性，每週記錄體重。

用習知 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 及位點特異性複合 hLK26-Cys 變異體 - Tap18Hr1 處理的肺腫瘤 NCI-H2110

【0297】為建立皮下異種移植肺腫瘤模型，將於 100 μ L PBS 中的 5×10^6 個 NCI-H2110 細胞植入 6 週大雌性 C.B-17 SCID 小鼠 (Lasco, Taipei, Taiwan) 之右側腹中。在腫瘤細胞接種之後大致 6 小時，各以於 150 μ L 中之 5 mg/kg 靜脈內注射習知複合 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 及位點特異性 hLK26-Cys 變異體 - Tap18Hr1 (標記為第 1 天)。用卡尺在兩個垂直尺寸上每週量測腫瘤體積一次，且根據式 ($0.52 * \text{長度} * \text{寬度} * \text{厚度}$) 來計算腫瘤體積。為測定所處理小鼠中之潛在藥物毒性，每週記錄體重。

實例 2：基於 hLK26 之抗體藥物複合體 (antibody

drug conjugate ; ADC) 於卵巢及肺癌細胞中之結合活性

hLK26-IgG1-Tap18Hr1 結合活性

【0298】 在表現 FRA 之 SK-OV-3 、 OVCAR-3 、 NCI-h2110 及 NCI-h292 細胞中藉由流式細胞分析評估 hLK26-IgG1 裸 Ab 及 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 之結合活性。結果(表 8)展示為利用一系列 Ab/ADC 濃度達成最佳結合所處的平均螢光強度 (mean fluorescence intensity ; MFI) 。

hLK26-IgG1-Tap18Hr1 正性地結合至所有表現 FRA 之受測試細胞系，且顯示與裸 Ab hLK26-IgG1 等效的結合能力。此等資料證明：習知 ADC hLK26-IgG1-Tap18Hr1 保持 hLK26-IgG1 之抗原反應性，且有效地結合至表現 FRA 之癌細胞。

表 8 : hLK26-IgG1-Tap18Hr1 及未複合 hLK26-IgG1 與癌細胞之結合

		hLK26-IgG1-Tap18Hr1 (1.1 µg/mL)	hLK26-IgG1 (1.1 µg/mL)	同種型對照 (10 µg/mL)
卵巢癌細胞	OVCAR-3	1114	1154	7
	SK-OV-3	2973	3174	6
肺癌細胞	NCI-H2110	666	644	5
	NCI-H292	1420	1398	6

【0299】 在卵巢癌 SK-OV-3 及 OVCAR-3B (表 9-10) 及肺癌 NCI-H2110 及 NCI-H292 (表 11-12) 細胞中藉由流式細胞分析評估 hLK26-Cys 變異體

- Tap18Hr1 之位點特異性複合體之結合活性。表中之平均螢光強度 (mean fluorescence intensity ; MFI) 值表示 ADC 於測試濃度下之結合活性。在 IgG1 變異體中 , hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1 及 hLK26-T206C-IgG1-Tap18Hr1 與野生型、裸 hLK26-IgG1 相當地結合 , 但 hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1 展示結合反應性之稍微降低。IgG4p 變異體 - Tap18Hr1 複合體亦結合至在此測試的所有 FRA 陽性癌細胞 , 但螢光強度通常低於利用 IgG1 變異體所觀察到的彼等螢光強度。結合活性之此種降低可能歸因於 IgG4 同種型而非半胱胺酸突變。總之 , 位點特異性複合 hLK26-Cys 變異體保持對所測試卵巢及肺癌細胞之抗原反應性。

表 9 : 未複合 hLK26-IgG1 及 hLK26-Cys 變異體 - Tap18Hr1 與 SK-OV-3 細胞之結合

(1) T155C 及 S442C 突變體之位點特異性 ADC

抗體(1.1 μ g/mL)	MFI
hLK26-T155C-IgG4p-Tap18Hr1	1888
hLK26-S442C-IgG4p-Tap18Hr1	1885
hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	2474
hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	2077
hLK26-IgG1	2446
僅二次 Ab	6

(2) T199C 、 L201C 及 T206C 突變體之位點特異性 ADC

抗體(1.1 μ g/mL)	MFI
hLK26-T199C-IgG4p-Tap18Hr1	966
hLK26-L201C-IgG4p-Tap18Hr1	1004

hLK26-T206C-IgG1-Tap18Hr1	1274
hLK26-IgG1	1403
僅二次 Ab	5

表 10 : 未複合 hLK26-IgG1 及 hLK26-Cys 變異體

- Tap18Hr1 與 OVCAR-3B 細胞之結合

抗體(1.1 μg/mL)	MFI
hLK26-T155C-IgG4p-Tap18Hr1	806
hLK26-S442C-IgG4p-Tap18Hr1	769
hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	1062
hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	967
hLK26-IgG1	1154
僅二次 Ab	5

表 11 : 未複合 hLK26-IgG1 及 hLK26-Cys 變異體

- Tap18Hr1 與 NCI-H2110 細胞之結合

(1) T155C 及 S442C 突變體之位點特異性 ADC

抗體(3.3 μg/mL)	MFI
hLK26-T155C-IgG4p-Tap18Hr1	494
hLK26-S442C-IgG4p-Tap18Hr1	479
hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	649
hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	605
hLK26-IgG1	679
僅二次 Ab	5

(2) T199C、L201C 及 T206C 突變體之位點特異性

ADC

抗體(3.3 μg/mL)	MFI
hLK26-T199C-IgG4p-Tap18Hr1	898
hLK26-L201C-IgG4p-Tap18Hr1	890
hLK26-T206C-IgG1-Tap18Hr1	1180
hLK26-IgG1	1186
僅二次 Ab	5

表 12 : 未複合 hLK26-IgG1 及 hLK26-Cys 變異體

- Tap18Hr1 與 NCI-H292 細胞之結合

抗體(3.3 μg/mL)	MFI
hLK26-T155C-IgG4p-Tap18Hr1	1179

hLK26-S442C-IgG4p-Tap18Hr1	1087
hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	1447
hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	1281
hLK26-IgG1	1455
僅二次 Ab	6

實例 3 : h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 A D C 及
h L K 2 6 - I g G 1 於表現 F R A 之細胞系中之活體外細胞毒性

【 0 3 0 0 】 在 F R A 陽性癌細胞系 (S K - O V - 3 及 O V C A R - 3) 及 F R A 陰性細胞系 (P a n c 0 2 . 0 3 B) 評估 h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 之活體外細胞毒性活性。亦平行測試藉由裸 h L K 2 6 - I g G 1 抗體引起之細胞毒性。 A D C h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 誘導針對 F R A 陽性癌細胞 (S K - O V - 3 及 O V C A R - 3) 之特異性及劑量依賴性生長抑制，而其對 F R A 陰性細胞 P a n c 0 2 . 0 3 B 具有更加小的生長抑制效應，從而證明此細胞毒性之抗原特異性 (表 13)。相較於 A D C ，裸體 A b h L K 2 6 - I g G 1 對所處理細胞之活力具有可忽略影響。

表 13 : h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 及 h L K 2 6 - I g G 1
之活體外細胞毒性活性

		生長抑制%	
所測試 AB/ADC 之濃度		3 μ g/mL	1 μ g/mL
SK-OV-3	hLK26-IgG1-Tap18Hr1	87.2	79.6
	hLK26-IgG1	3.1	1.0
OVCAR-3	hLK26-IgG1-Tap18Hr1	99.2	98.3
	hLK26-IgG1	18.0	8.2
Panc 02.03B	hLK26-IgG1-Tap18Hr1	15.9	6.5
	hLK26-IgG1	5.1	1.3

【0301】亦在 SK-OV-3 及 OVCAR-3B 細胞中評估位點特異性複合 hLK26 Cys 變異體-Tap18Hr1 之活體外細胞毒性活性。表 14 展示 IgG1 變異體之結果，且表 15 展示 IgG4p 變異體。如同習知複合 ADC 一樣(表 13)，hLK26 Cys 變異體-Tap18Hr1 針對 FRA 陽性癌細胞(SK-OV-3 及 OVCAR-3)誘導特異性及劑量依賴性生長抑制。其對 FRA 陰性細胞 Panc 02.03B 之活力具有更加小的影響，從而證明此細胞毒性之抗原特異性(表 14 及 15)。此等結果證明：習知及位點特異性複合 hLK26-Tap18Hr1 ADC 可以抗原特異性將細胞毒性藥物遞送至靶癌細胞。

表 14：複合 hLK26 IgG1 Cys 變異體之活體外細胞毒性活性

		生長抑制%	
所測試 ADC 之濃度		10 µg/mL	3 µg/mL
SK-OV-3	hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	79.1	34.9
	hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	85.9	53.1
OVCAR-3B	hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	108.0	74.4
	hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	99.9	85.3
Panc 02.303B	hLK26-S442C-IgG1-Tap18Hr1	17.5	5.5
	hLK26-T155C-IgG1-Tap18Hr1	26.1	10.7

表 15：複合 hLK26 IgG4p Cys 變異體之活體外細胞毒性活性

		生長抑制%	
所測試 ADC 之濃度		10 µg/mL	3 µg/mL
SK-OV-3	hLK26-T155C-IgG4P-Tap18Hr1	78.6	41.6
	hLK26-S442C-IgG4P-Tap18Hr1	58.7	27.0
OVCAR-3B	hLK26-T155C-IgG4P-Tap18Hr1	99.5	52.4

	hLK26-S442C-IgG4P-Tap18Hr1	89.5	21.6
Panc 02.03B	hLK26-T155C-IgG4P-Tap18Hr1	25.2	7.2
	hLK26-S442C-IgG4P-Tap18Hr1	6.7	6.5

實例 4：習知 A D C h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 於卵巢癌中之活體內功效

【0302】在來源於卵巢癌細胞 SK-OV-3 之異種移植模型中活體內評估 h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 之效力。在腫瘤細胞植入之後大致一小時，用媒劑 (P B S) 或單一劑量之 A D C 以 3 m g / k g 靜脈內處理小鼠 (標記為第 1 天，參見第 4 圖中之箭頭)。歸因於細胞 - M a t r i g e l 混合物之接種體積，第 1 天之腫瘤大小因此記錄為 1 2 0 m m ³。所注射 M a t r i g e l 在第 1 5 天呈現吸收，在此期間產生腫瘤且如媒劑對照群組中所觀察穩定地生長。在第 5 7 天，媒劑對照之平均腫瘤大小已超過 5 0 0 m m ³ (第 4 圖)，而在研究結束時，用 h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 處理的小鼠之群組中 (6 只中 6 只) 未偵測到腫瘤生長。未觀察到毒性，因為兩個群組之體重改變保持無差異 (資料未展示)。因此，研究證明：單獨的 h L K 2 6 - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 A D C 為對卵巢癌有效的抗腫瘤劑。

實例 5：位點特異性 A D C h L K 2 6 C y s 變異體 - T a p 1 8 H r 1 於卵巢癌中之活體內功效

【0303】S C I D 小鼠中之 S K - O V - 3 異種移植模型亦用於評估位點特異性複合 h L K 2 6 C y s 變異體 - T a p 1 8 H r 1 之活體內抗腫瘤效應。將癌細胞皮下接枝於

S C I D 小鼠中，且在腫瘤細胞植入之後大致兩小時給予 5 mg / kg A D C 或媒劑對照之單一劑量(標記為第 1 天)。

比 較 四 個 處 理 群 組 :

h L K 2 6 - S 4 4 2 C - I g G 1 - T a p 1 8 H r 1 、

h L K 2 6 - T 1 5 5 C - I g G 4 P - T a p 1 8 H r 1 、

h L K 2 6 - S 4 4 2 C - I g G 4 P - T a p 1 8 H r 1 及媒劑對照，其中每一處理群組 6 只小鼠。每週量測腫瘤大小一次。結果展示於第 5 圖中。歸因於所接種細胞 - M a t r i g e l 混合物之體積，第 1 天之腫瘤大小記錄為 100 mm^3 。相較於媒劑對照，5 mg / kg h L K 2 6 C y s 變異體 - T a p 1 8 H r 1 之單一劑量在所有 A D C 處理群組中延遲腫瘤生長(p 值 < 0.005 ，自處理之後第 16 天起)。第 5 圖中之箭頭指示給予處理之時間。在用 A D C 處理的小鼠群組中未觀察到明顯毒性，因為所有群組之體重改變保持無差異(資料未展示)。研究證明：位點特異性複合 h L K 2 6 C y s 變異體 - T a p 1 8 H r 1 為用於卵巢癌之有效抗腫瘤劑，即使利用一些變異體看到細胞結合活性之降低亦如此。

實例 6：基於抗 F R A 之 T a p 1 8 H r 1 複合體對抗肺癌之活體內抗腫瘤活性

【0304】 在來源於肺癌細胞 N C I - H 2 1 1 0 之異種移植模型中活體內評估知及位點特異性抗 F R A - T a p 1 8 H r 1 複合體之功效。將癌細胞皮下接枝於 S C I D 小鼠中，且在腫瘤細胞植入之後大致 6 小時，給予 5 mg / kg A D C 或媒劑對照之單一劑量(標記為第 1 天)，

參見第 6 圖中之箭頭），該等 ADC 包括：
 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 、
 hLK26-T206C-IgG1-Tap18Hr1 、
 LK26-T155C-IgG4p-Tap18hr1 、
 hLK26-T199C-IgG4p-Tap18Hr1 及
 hLK26-L201C-IgG4p-Tap18Hr1 歸因於所接種細胞混合物之體積，第 1 天之腫瘤大小記錄為 100 mm^3 。每週量測一次具有 5 只動物之每一處理群組的腫瘤大小。 5 mg/kg 習知 hLK26-IgG1-Tap18Hr1 或位點特異性 hlk26 Cys 變異體 - Tap18Hr1 複合體之單一劑量完全地抑制所處理小鼠中之腫瘤生長。在所有 ADC 處理群組中，至多第 29 天皆未偵測到腫瘤生長。對比而言，媒劑群組之腫瘤快速地生長且在第 29 天越過 1000 mm^3 (p 值 < 0.05 ，自處理之後第 7 天起)。在用 ADC 處理的小鼠群組中未觀察到明顯毒性，因為所有群組之體重增加保持無差異(資料未展示)。研究證明：無論習知抑或位點特異性基於抗 FRA 之 Tap18Hr1 複合體，其單獨對肺癌而言皆為有效抗腫瘤劑。

參考文獻

1. Carter, PJ 及 Senter, PD. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J.* 2008; 14: 154-169)
2. Teicher, BA. Antibody-drug conjugate targets. *Current Cancer Drug Targets* 2009, 9:

982-1004。

3. Ducry, L 及 Stump, B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21: 5-13。

4. Koblinski, JE., Ahram, M 及 Sloane, BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chem. Acta* 2000; 291:113-135。

【0305】本文引用的所有專利、專利申請案、文件及論文皆以全文以引用方式併入本文中。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

【0306】國內寄存資訊(請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

【0307】國外寄存資訊(請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

<110> 荷蘭商 · 台醫(有限合夥)公司

美商 · 台醫國際股份有限公司

林榮華

林士瑤

謝昱祁

黃久珍

李叔樺

蔡育英

蔣鳳琳

胡立安

<120> 抗葉酸受體 α (FRA) 抗體藥物複合體及使用彼之方法

<130> 606592001040

<140> 未指定

<141> 同此

<150> US 62/015,321

<151> 2014-06-20

<160> 53

<170> 用於 Windows 的 FastSEQ 4.0 版

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

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

<210> 2
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 2

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 3
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

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

<210> 4
 <211> 433
 <212> PRT

<213> 家鼴鼠

<400> 4

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
 1 5 10 15
 Ala Ser Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Phe Met Asn Trp Val Met Gln
 20 25 30
 Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Tyr Asn
 35 40 45
 Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr
 50 55 60
 Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Glu Leu Arg Ser Leu Ala
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Thr His Tyr Phe
 85 90 95
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 100 105 110
 Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
 115 120 125
 Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
 145 150 155 160
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
 165 170 175
 Val Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
 180 185 190
 Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
 195 200 205
 Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser
 210 215 220
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp
 245 250 255
 Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
 260 265 270
 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser
 275 280 285
 Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 290 295 300
 Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 305 310 315 320
 Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
 325 330 335
 Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
 340 345 350
 Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
 355 360 365
 Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
 370 375 380
 Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys

385	390	395	400
Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu			
405	410	415	
Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly			
420	425	430	

Lys

<210> 5
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> 家鼴鼠

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 6

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr 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 Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

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

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

<210> 7

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 7

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 8

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

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

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

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> 家鼴鼠

<400> 10

Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

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

<210> 11
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> 家鼴鼠

<400> 11			
Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys			
1	5	10	15
Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys			
20	25	30	
Gln Gly Ile Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala			
35	40	45	
Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe			
50	55	60	
Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr			
65	70	75	80
Cys Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Ser Lys			
85	90	95	
Leu Glu Ile Lys			
100			

<210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 12			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
20	25	30	
Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 14

Gly Tyr Gly Leu Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 16
His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 17
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 19
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 家鼴鼠

<400> 20
 Gly Tyr Phe Met Asn
 1 5

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 家鼴鼠

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

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 家鼴鼠

<400> 22
 Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 家鼴鼠

<400> 23
 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala

1

5

10

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 家鼴鼠

<400> 24

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 家鼴鼠

<400> 25

Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr

1

5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 26

Gly Tyr Phe Met Asn

1

5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 27

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 28

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 28
 Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 29
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 30
 Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
 1 5

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 31
 Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 32

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 33

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

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

<210> 35

<211> 257

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

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

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220
 Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 225 230 235 240
 Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255
 Ser

<210> 36
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 36
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Cys Val Ser Trp
 1 5 10 15
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 37
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Cys Trp Asn Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 20 25

<210> 38
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 38
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Cys Gly Val His
 1 5 10 15
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

20

25

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 39

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Cys Phe Pro Ala

1

5

10

15

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

20

25

<210> 40

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 40

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Cys Tyr Ile Cys

1

5

10

15

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

20

25

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 41

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Cys Tyr Thr Cys

1

5

10

15

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

20

25

<210> 42

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 42

Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Cys	Tyr	Thr	Cys
1				5						10				15	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr							
					20					25					

<210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 43

Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Cys	Tyr	Thr	Cys
1				5						10				15	
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr							
					20					25					

<210> 44

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 44

Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Cys	Cys
1				5						10				15	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr							
					20					25					

<210> 45

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 45

Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Cys	Cys
1				5						10				15	

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 20 25

<210> 46
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 46
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Cys Cys
 1 5 10 15
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 20 25

<210> 47
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 47
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Cys Cys
 1 5 10 15
 Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
 20 25

<210> 48
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成構築體

<400> 48
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Cys Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Gly Lys

<210> 49
 <211> 18
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 49

Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys	Leu	Ser	Pro
1															15
Gly	Lys														

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 50

Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu
1															15
Gly	Lys														

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 51

Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Cys	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
1															15
Arg	Gly	Glu	Cys												
			20												

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 52

Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Ser	Phe	Asn
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



1 5
Arg Gly Glu Cys
20

10 15

<210> 53
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 53
Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
1 5 10 15
Arg Gly Glu Cys
20

I654995

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗葉酸受體α(FRA)抗體藥物複合體及使用彼之方法

【英文發明名稱】ANTI-FOLATE RECEPTOR ALPHA (FRA)

ANTIBODY-DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USING THEREOF

【中文】

本揭示內容提供包含親水性自我犧牲連接子之抗葉酸受體α(FRA)抗體藥物複合體。本揭示內容進一步提供用於治療癌症之組成物及方法。

【英文】

The present disclosure provides anti-folate receptor alpha (FRA) antibody-drug conjugates comprising a hydrophilic self-immolative linker. The present disclosures further provide compositions and methods for treating cancers.

【指定代表圖】第(6)圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

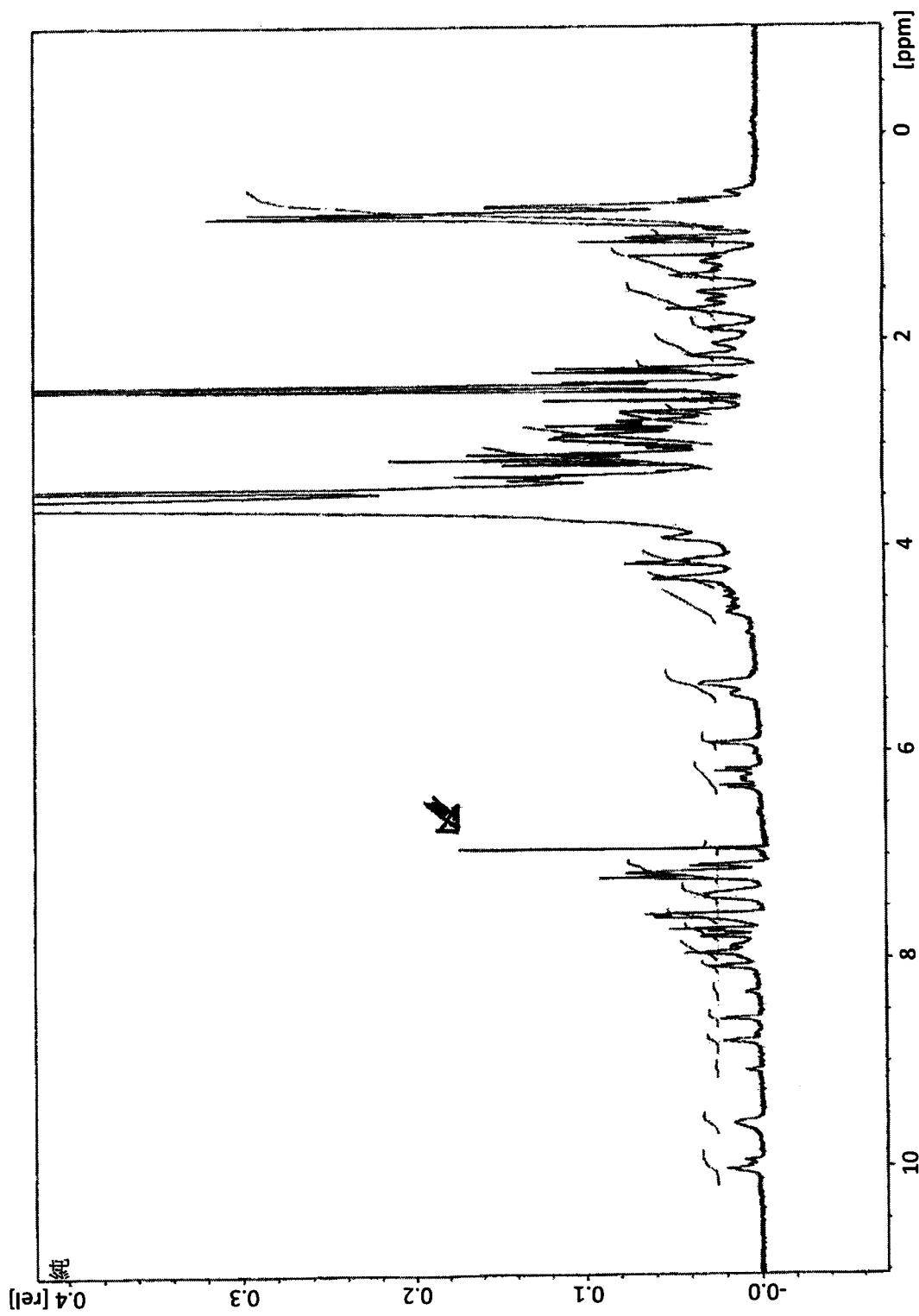
【特徵化學式】

無

I654995

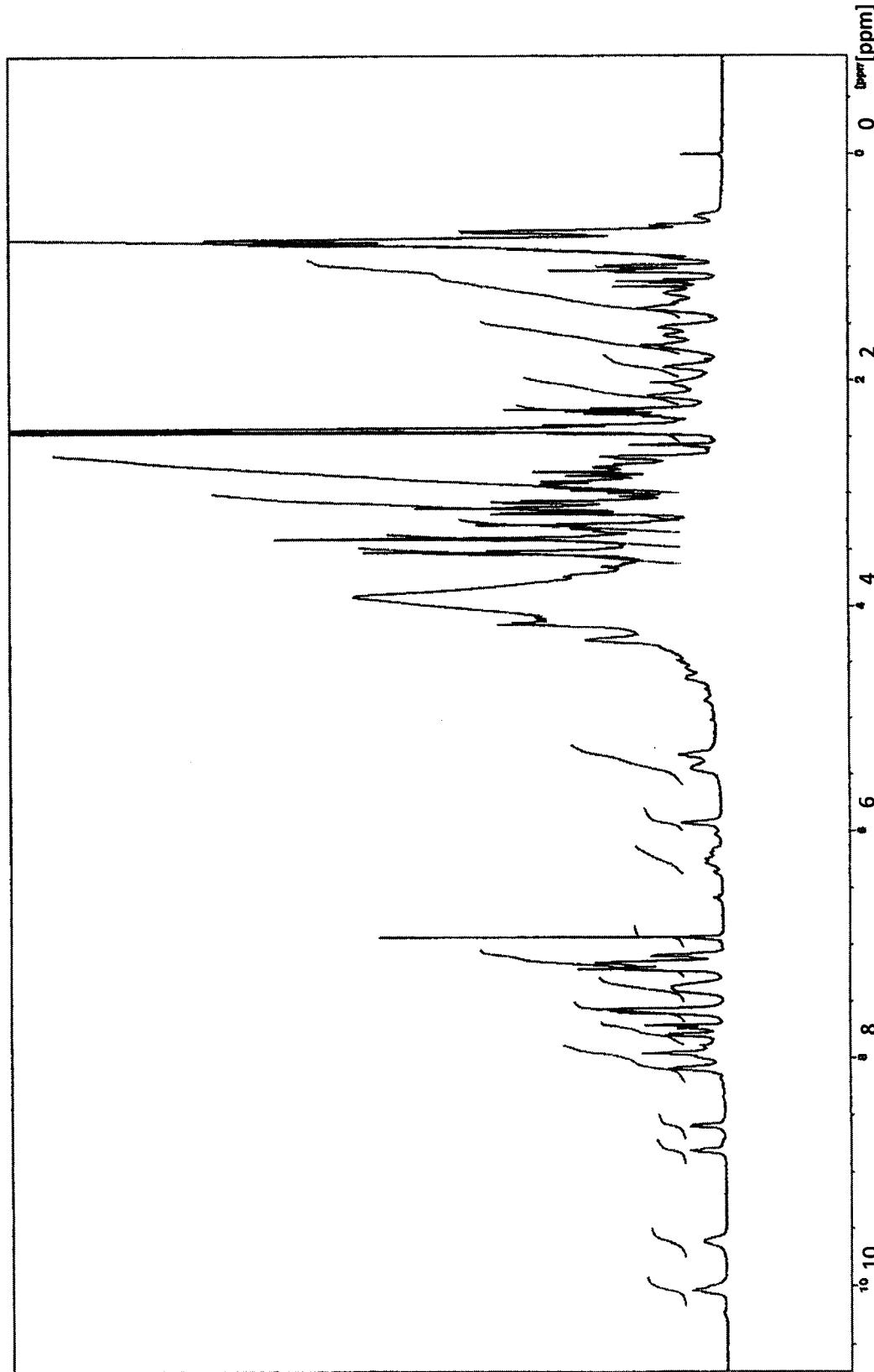
圖式

第1圖



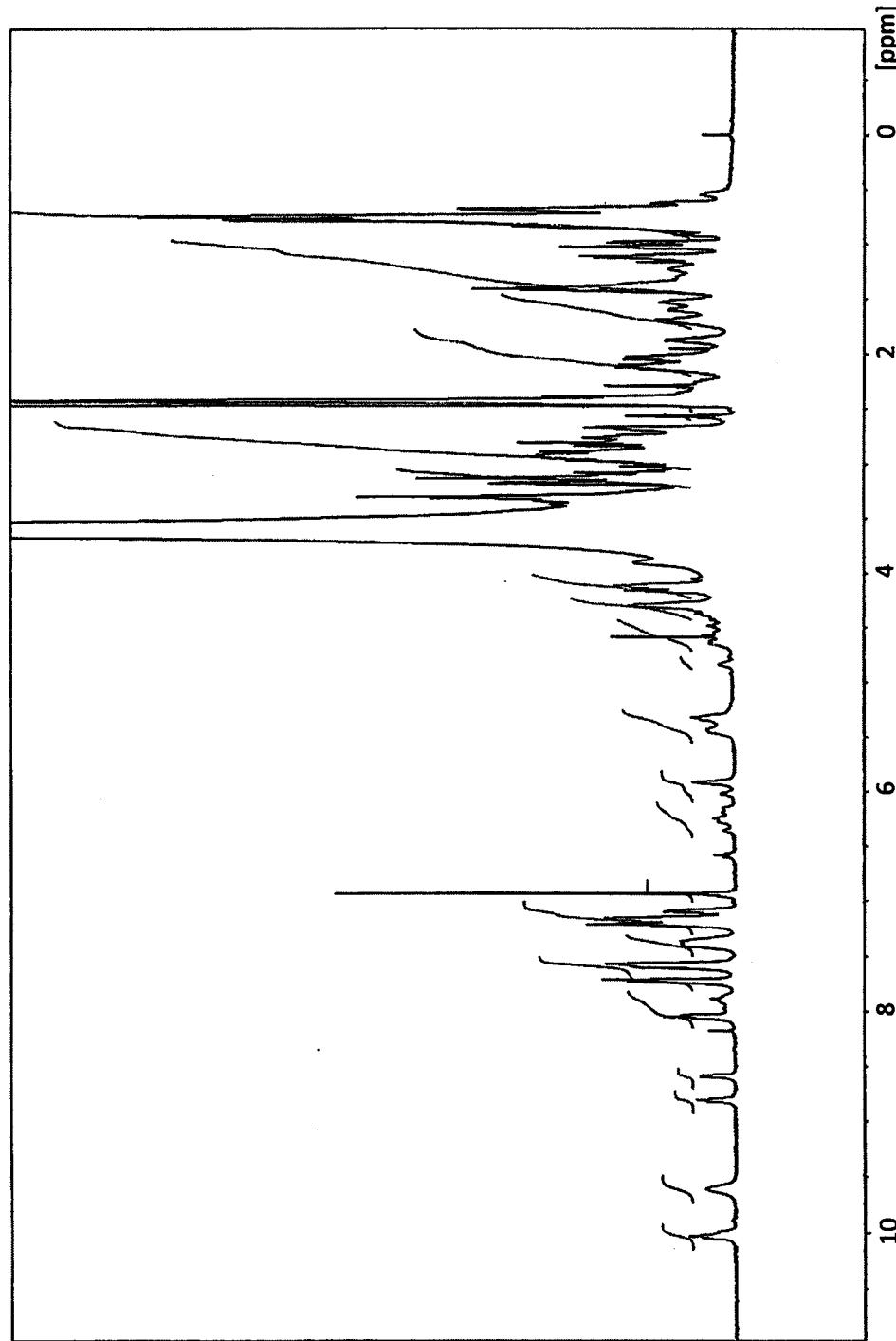
I654995

第2圖

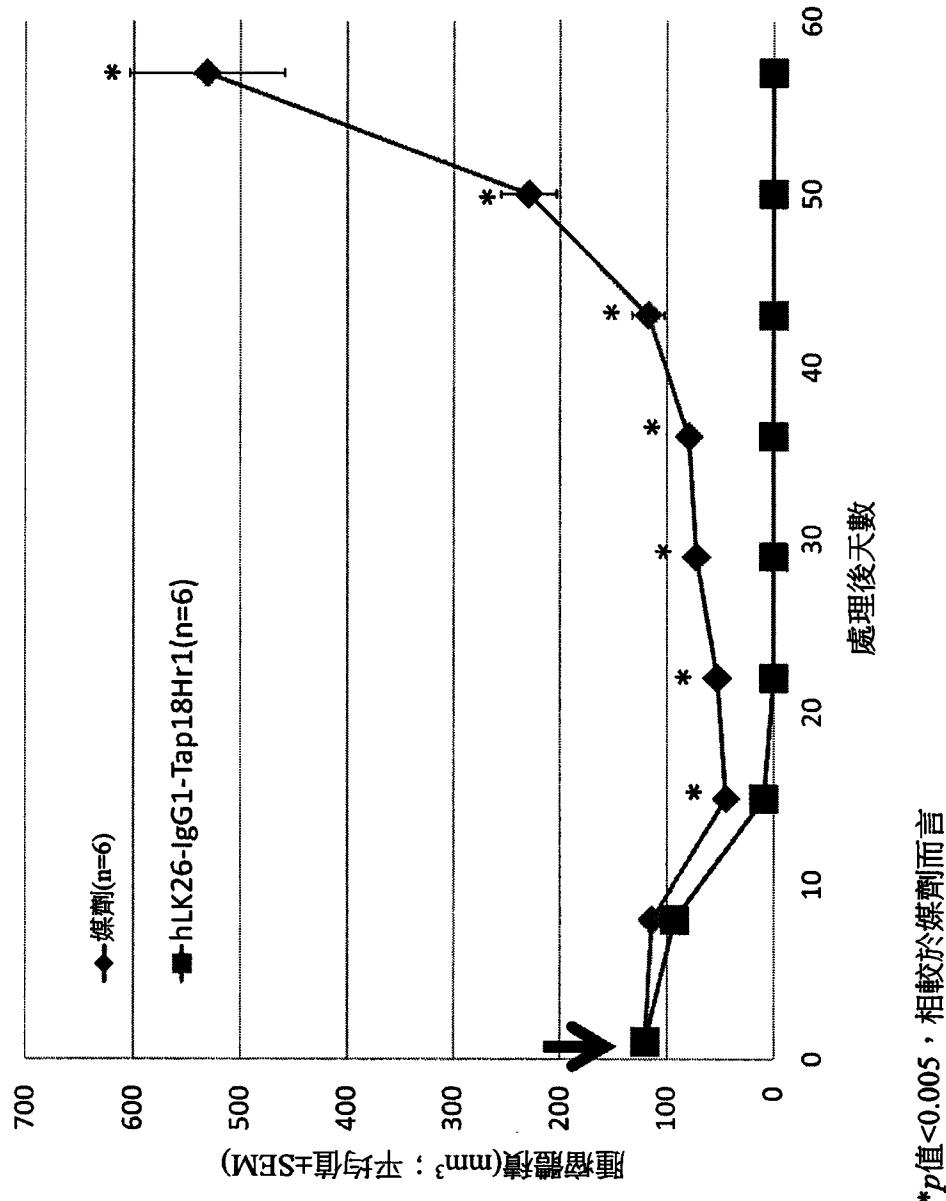


I654995

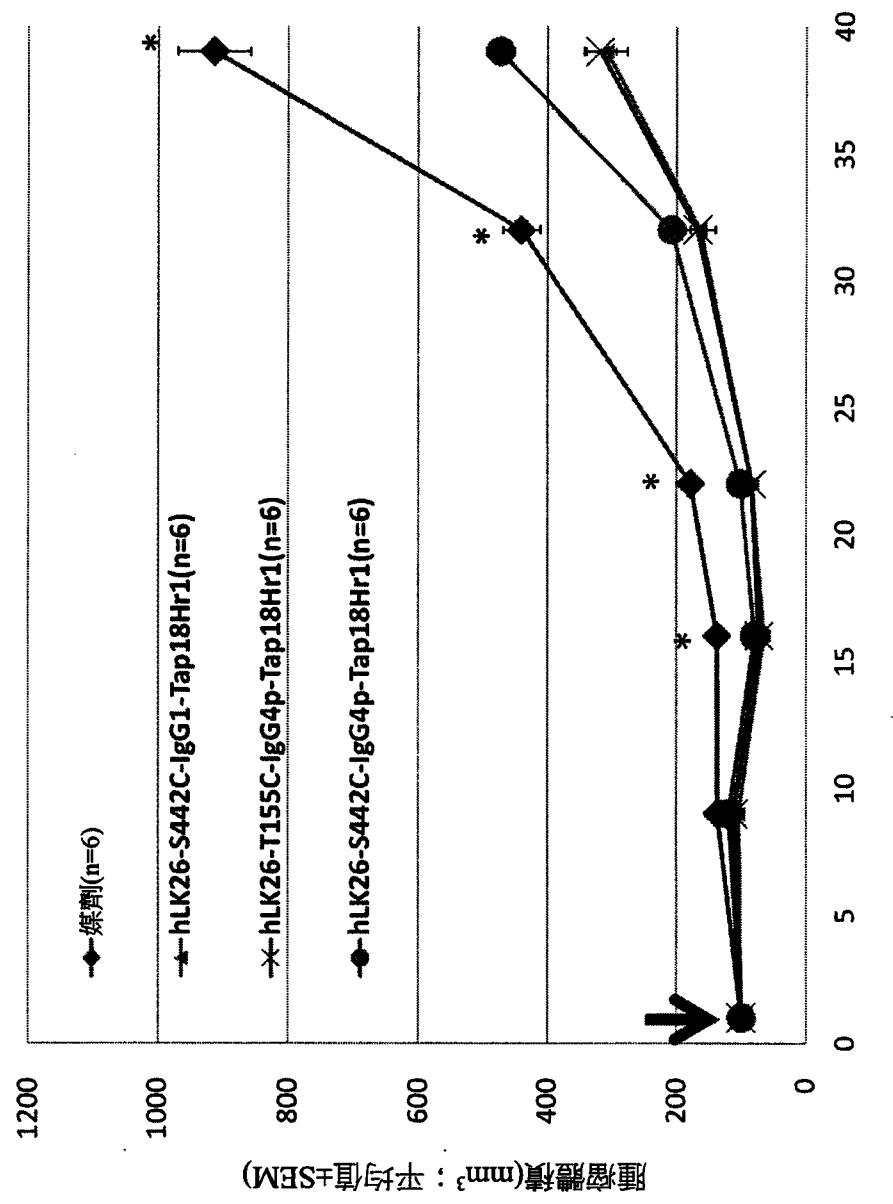
第3圖



第4圖

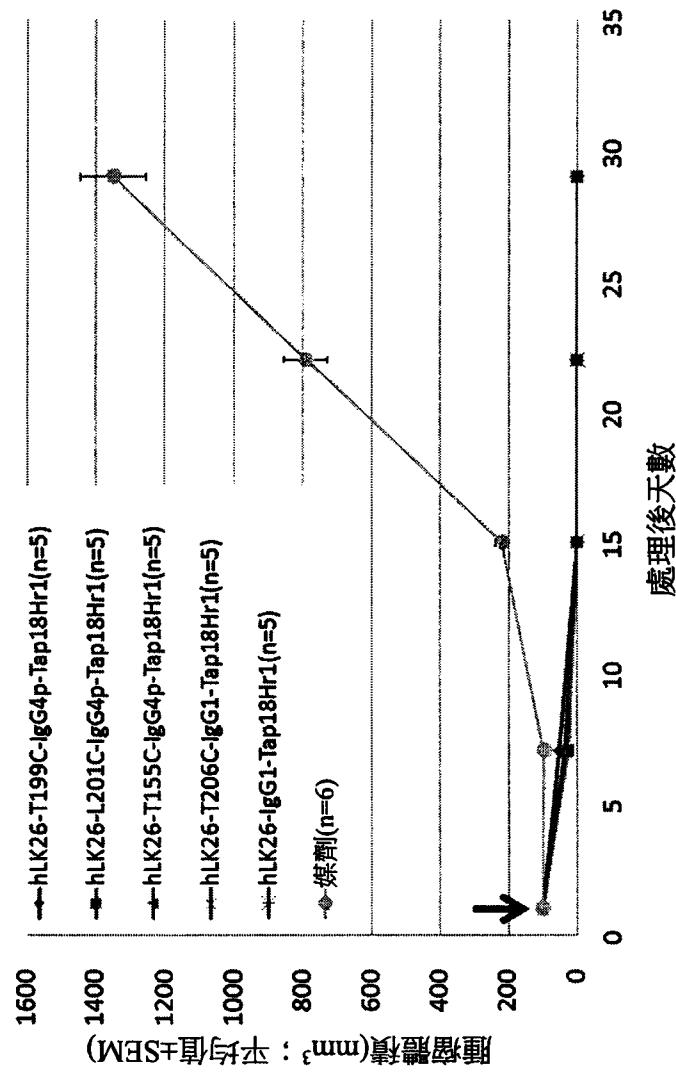


第5圖



* p 值 <0.005 ，相較於媒劑而言

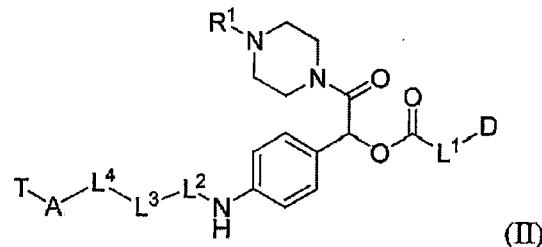
圖6第



箭頭指示ADC處理之時間。

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種式(II)之化合物或其鹽或立體異構物，



其中：

D 為一藥物部分；

T 為一靶向部分，其為特異地結合至人類葉酸受體 α (FRA)之一抗體；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為一鍵、一第二自我犧牲連接子或一環化自我消除連接子；

L² 為一鍵或一第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為一第二自我犧牲連接子或一環化自我消除連接子，則 L² 為一鍵；

其中若 L² 為一第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為一鍵；

L³ 為一肽連接子；

L⁴ 為一鍵或一間隔子；且

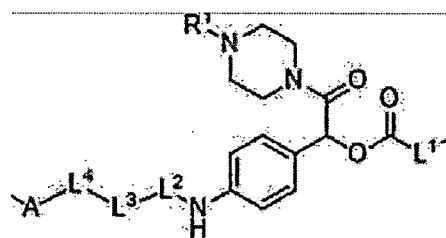
A 為一醯基單元；

其中：

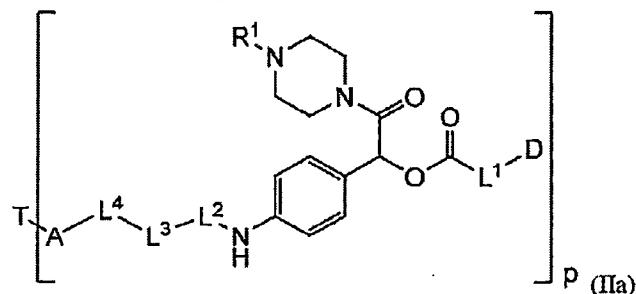
(i) 該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基；或

(ii) 該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該重鏈恆定區中位置 199 處的胺基酸殘基，及 / 或其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基；

其中該編號係根據 Kabat 之 EU 索引；以及
其中 D 經由通過下列連接子部分所連接的半胱胺酸殘基連接至 T



【第 2 項】 一種式 (IIa) 化合物或其鹽或立體異構物，



其中：

p 為 1 至 20；

D 為一藥物部分；

T 為一靶向部分，其為特異地結合至人類葉酸受體 α (FRA)之一抗體；

R¹ 為氫、未經取代或經取代 C₁₋₃ 烷基或未經取代或經取代雜環基；

L¹ 為一鍵、一第二自我犧牲連接子或一環化自我消除連接子；

L² 為一鍵或一第二自我犧牲連接子；

其中若 L¹ 為一第二自我犧牲連接子或一環化自我消除連接子，則 L² 為一鍵；

其中若 L² 為一第二自我犧牲連接子，則 L¹ 為一鍵；

L³ 為一肽連接子；

L⁴ 為一鍵或一間隔子；且

A 為一醯基單元；

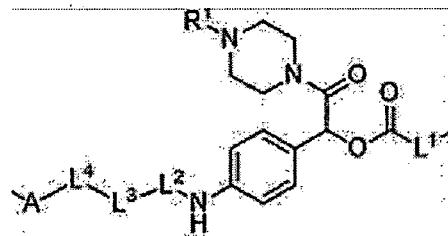
其中：

(i) 該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基；或

(ii) 該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ

ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該重鏈恆定區中位置 199 處的胺基酸殘基，及 / 或其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基；

其中該編號係根據 Kabat 之 EU 索引；以及其中 D 經由通過下列連接子部分所連接的半胱胺酸殘基連接至 T



【第3項】如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 p 為 1 至 4。

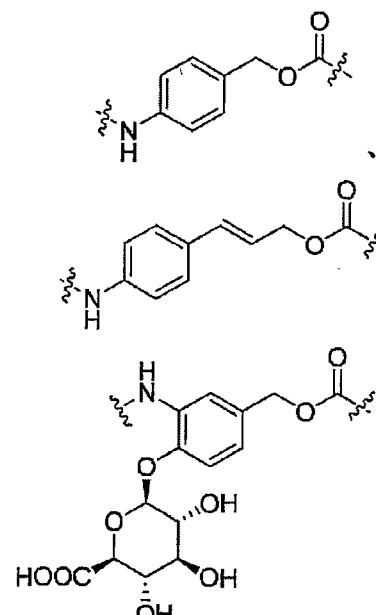
【第4項】如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 L¹ 為一鍵。

【第5項】如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 L¹ 為一第二自我犧牲連接子或一環化自我消除連接子。

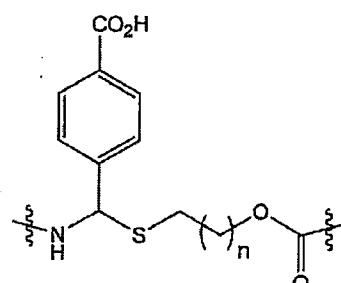
【第6項】如請求項 5 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 L¹ 為一胺基苄基羥基羰基連接子。

【第7項】如請求項 5 所述之化合物或其鹽或立體異構

物，其中 L^1 級選自由以下組成之群



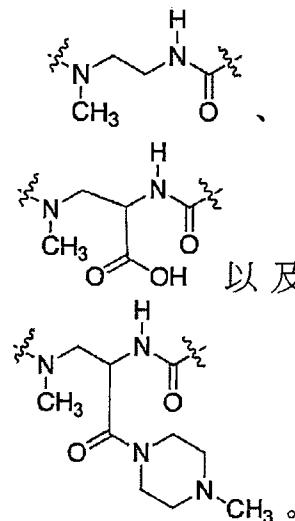
以 及



，其中 n 為 1 或 2 。

【第8項】如請求項5所述之化合物或其鹽或立體異構

物，其中 L^1 級選自由以下組成之群



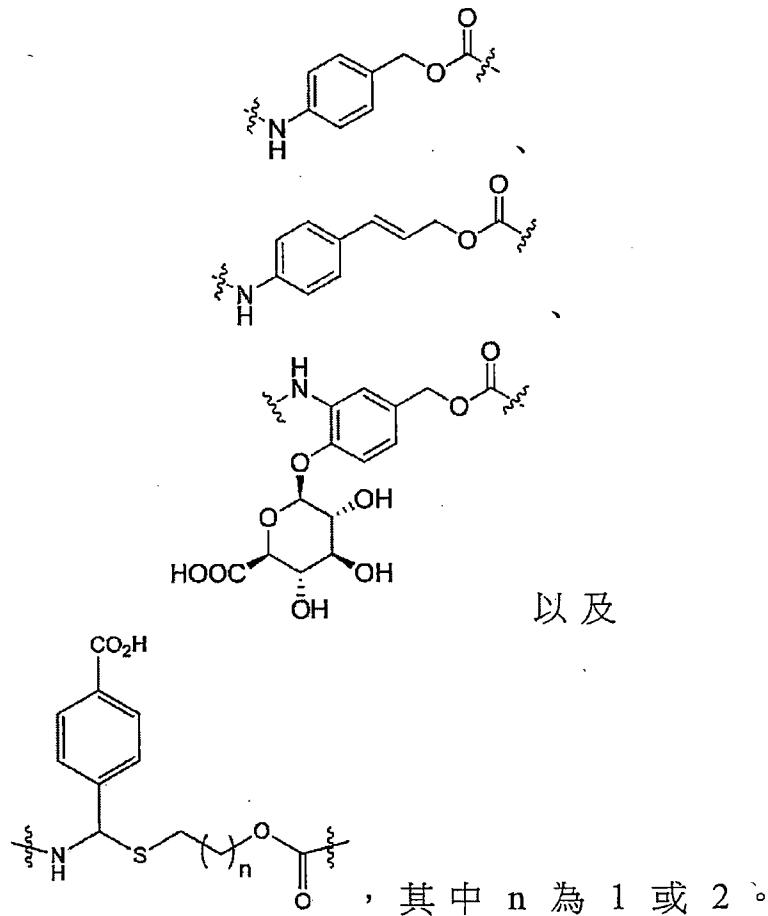
【第9項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構

物，其中 L^2 為一鍵。

【第10項】 如請求項4所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L²為一第二自我犧牲連接子。

【第11項】 如請求項10所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L²為一胺基苄基羧基連接子。

【第12項】 如請求項10所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L²係選自



【第13項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為具有1至10個胺基酸殘基之一肽連接子。

【第14項】 如請求項13所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為具有2至4個胺基酸殘基之一肽連接子。

接子。

【第15項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為包含至少一個離胺酸或精胺酸殘基之一肽連接子。

【第16項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為包含選自以下之一胺基酸殘基之一肽連接子：離胺酸、D-離胺酸、瓜胺酸、精胺酸、脯胺酸、組胺酸、鳥胺酸及麴醯胺酸。

【第17項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為包含選自以下之一胺基酸殘基之一肽連接子：纈胺酸、異白胺酸、苯基丙胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺酸、脯胺酸、丙胺酸、白胺酸、色胺酸及酪胺酸。

【第18項】 如請求項13所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為一選自以下之二肽單位：纈胺酸-瓜胺酸、脯胺酸-離胺酸、甲硫胺酸-D-離胺酸、天冬醯胺酸-D-離胺酸、異白胺酸-脯胺酸、苯基丙胺酸-離胺酸及纈胺酸-離胺酸。

【第19項】 如請求項18所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L³為纈胺酸-瓜胺酸。

【第20項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L⁴為一鍵。

【第21項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L⁴為一間隔子。

【第22項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該間隔子為聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基或多胺。

【第23項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L⁴為L^{4a}-C(O)、L^{4a}-C(O)-NH、L^{4a}-S(O)₂或L^{4a}-S(O)₂-NH，其中每一L^{4a}獨立地為聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基或多胺。

【第24項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L⁴為L^{4a}-C(O)，其中L^{4a}為聚烷二醇、伸烷基、伸烯基、伸炔基或多胺。

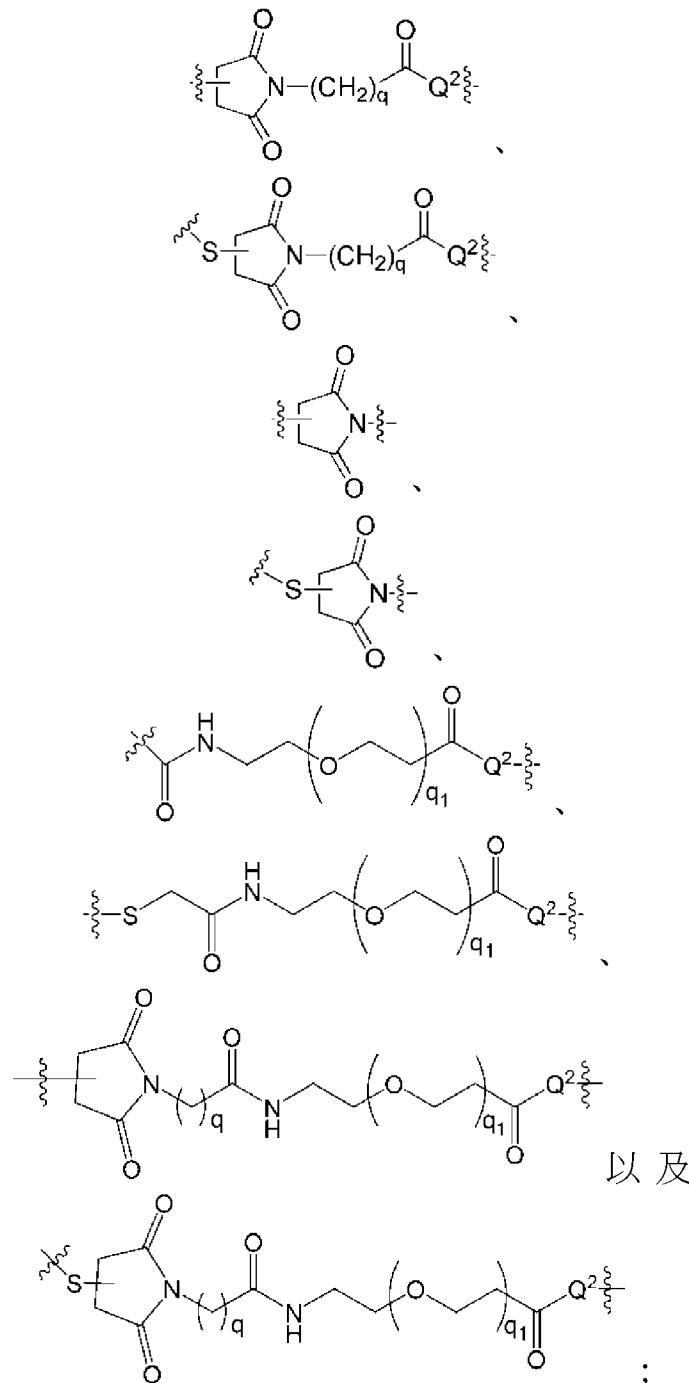
【第25項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L⁴為L^{4a}-C(O)，其中L^{4a}為一聚烷二醇。

【第26項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中L⁴為L^{4a}-C(O)，其中L^{4a}為一聚乙二醇。

【第27項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該間隔子具有式-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_m-CH₂-C(O)-，其中m為0至30之一整數。

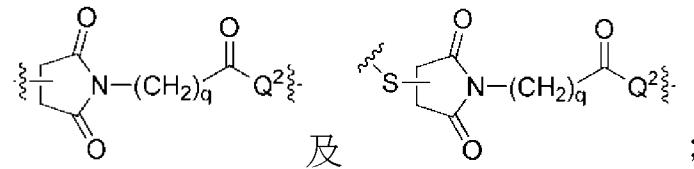
【第28項】 如請求項21所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 L^4 為 $L^{4a}-C(O)$ ，其中 L^{4a} 為伸烷基。

【第29項】 如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中A係選自由以下所組成之群



其中每一 Q^2 為 NH 或 O ，每一 q 獨立地為1至10之一整數，且每一 q_1 獨立地為1至10之一整數。

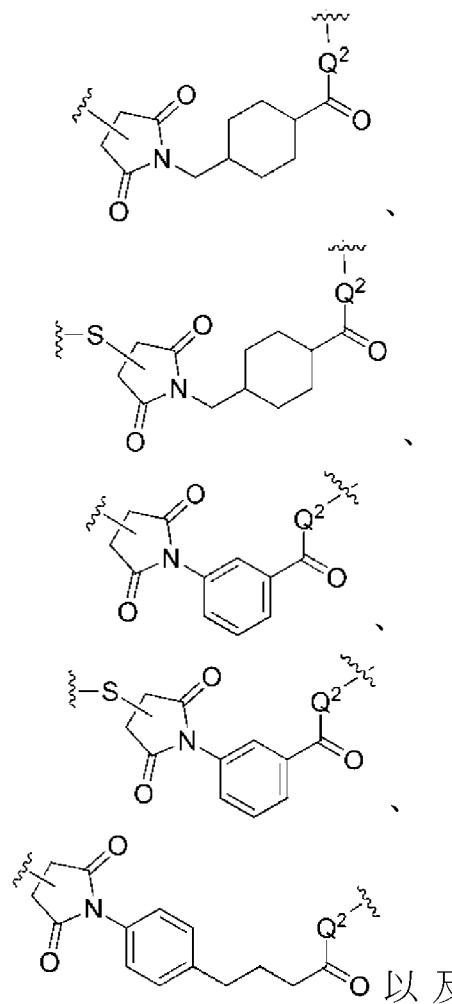
【第30項】如請求項29所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中A係選自由以下所組成之群

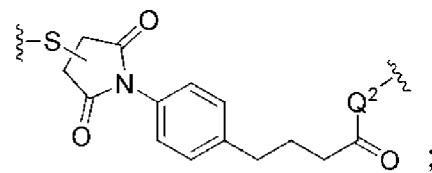


其中每一 Q^2 獨立地為 NH 或 O，且每一 q 獨立地為 1 至 10 之一整數。

【第31項】如請求項30所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 q 為 2、3、4 或 5。

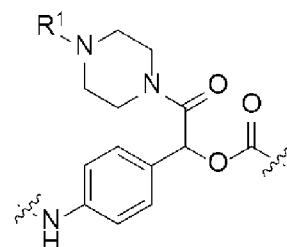
【第32項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中A係選自由以下者組成之群





其中每一 Q^2 獨立地為 NH 或 O 。

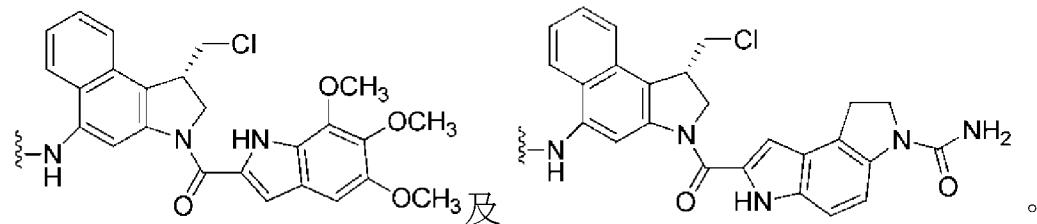
【第33項】 如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 D 為一含胺基藥物部分，其中該藥物經由



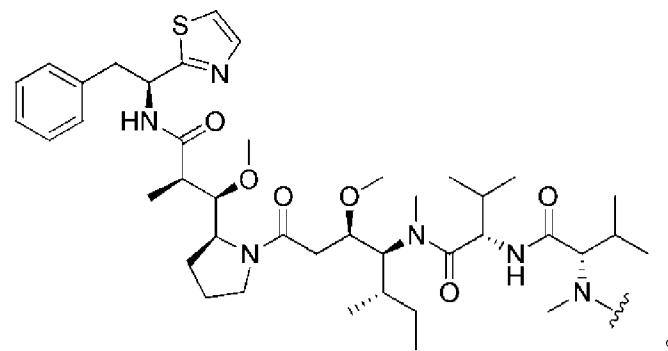
該胺基連接至 L^1 或 部分。

【第34項】 如請求項 33 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 D 為倍癌黴素 (duocarmycin)、尾海兔素 (dolastatin)、微管溶素 (tubulysin)、阿黴素 (doxorubicin；DOX)、紫杉醇 (paclitaxel) 或絲裂黴素 C (mitomycin C；MMC) 或其胺基衍生物。

【第35項】 如請求項 33 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 D 係選自由以下所組成之群

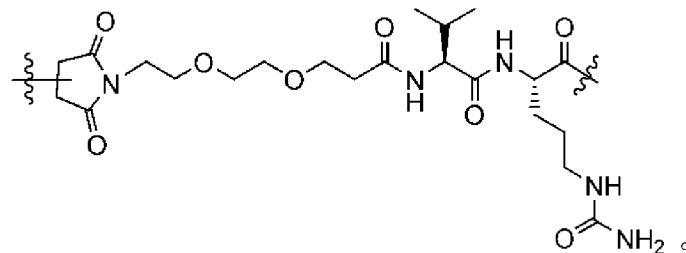
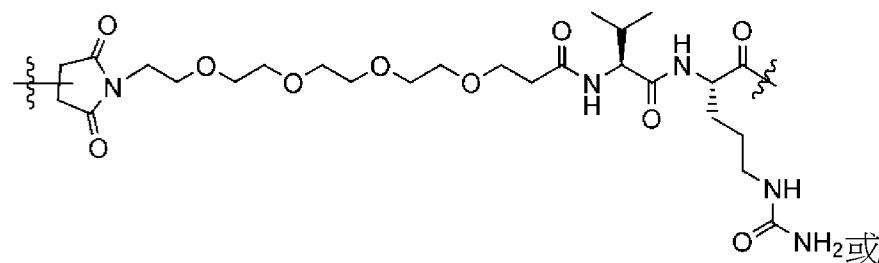
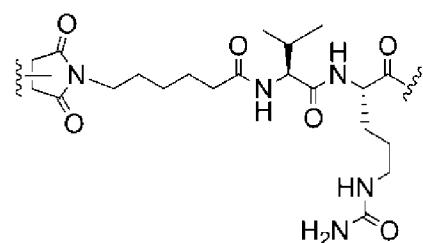
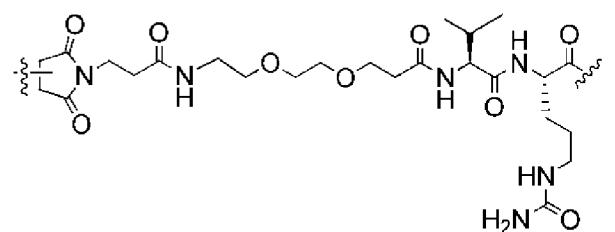
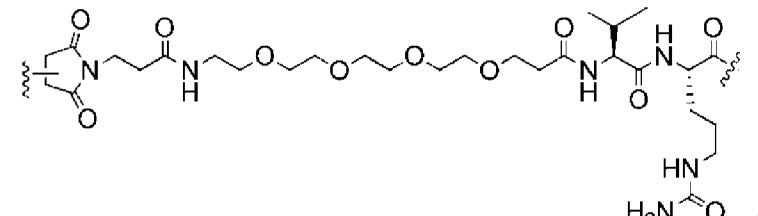


【第36項】 如請求項 33 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中 D 為：

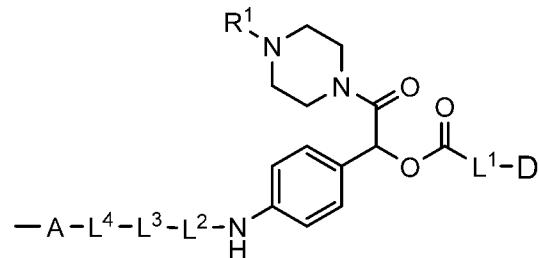


【第37項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異

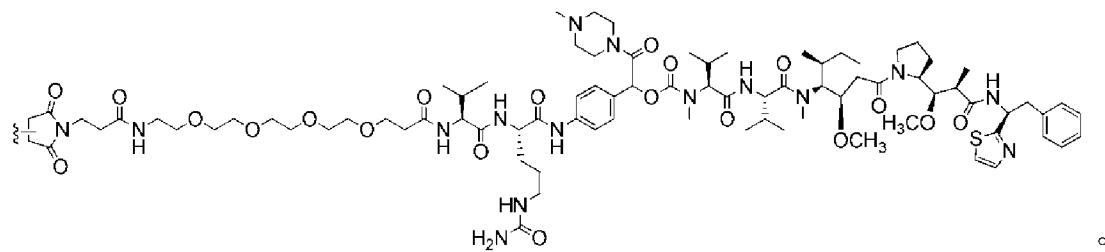
構物，其中-A-L⁴-L³-L²-為



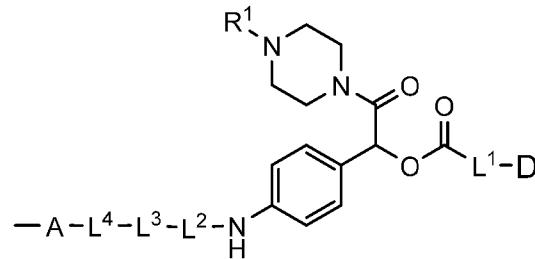
【第38項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該



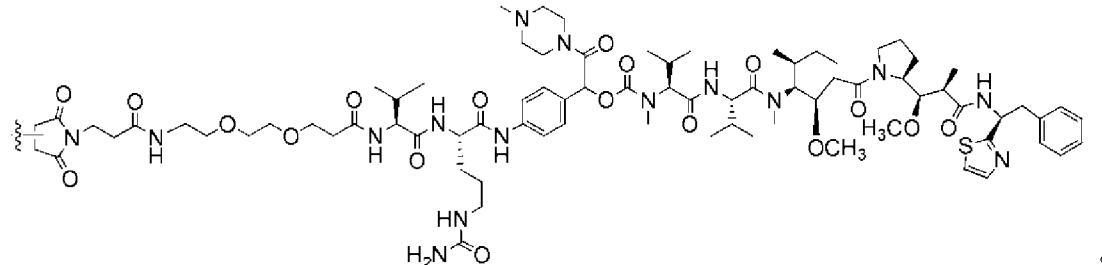
部分為：



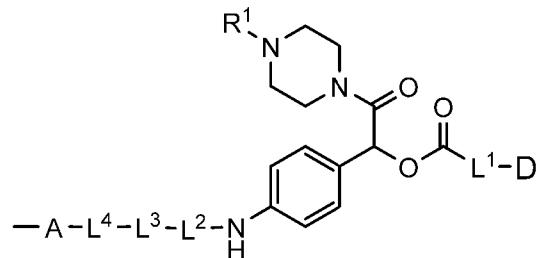
【第39項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該



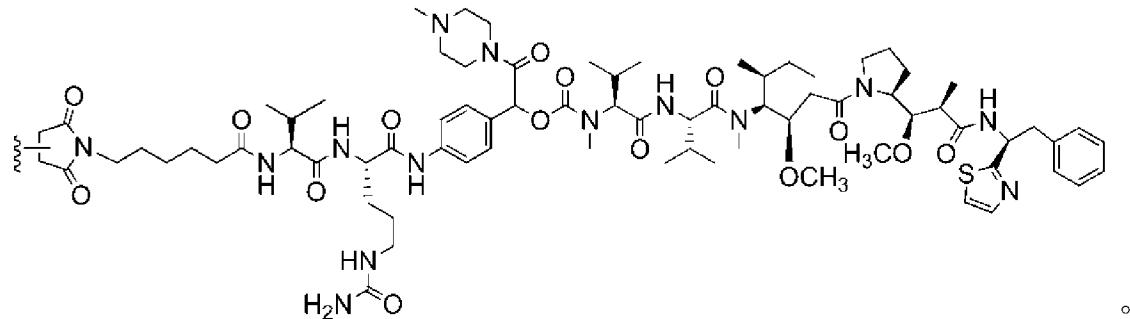
部分為：



【第40項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該



部分為：



【第41項】如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗葉酸受體 α (FRA)抗體為一人類化抗體、一嵌合抗體或一人類抗體。

【第42項】 一種醫藥組成物，其包含如請求項2所述之化合物或其鹽或立體異構物，及一醫藥學上可接受之載劑。

【第43項】 一種套組，其包含一或多個容器，該一或多個容器包含如請求項1或2所述之化合物或其鹽或立體異構物。

【第44項】如請求項1所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含

SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該重鏈恆定區中位置 199 處的胺基酸殘基。

【第45項】 如請求項 1 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基。

【第46項】 如請求項 1 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該重鏈恆定區中位置 199 處的胺基酸殘基，以及其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基。

【第47項】 如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該重鏈恆定區中位置 199 處的胺基酸殘基。

【第48項】 如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含

SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基。

【第 49 項】 如請求項 2 所述之化合物或其鹽或立體異構物，其中該抗體包含一重鏈及一輕鏈，該重鏈包含 SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列，該輕鏈包含 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列，其中以半胱胺酸殘基置換在該重鏈恆定區中位置 199 處的胺基酸殘基，以及其中以半胱胺酸殘基置換在該輕鏈恆定區中位置 201 處的胺基酸殘基。