I679022

(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 I679022 B**

(45)公告日： 中華民國 108 (2019) 年 12 月 11 日

(21)申請案號：104113994　(22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 04 月 30 日

(51)Int. Cl.：　*A61K47/50* *(2017.01)*　*C07K16/40* *(2006.01)*

C07K16/46 *(2006.01)*　*A61K39/395* *(2006.01)*

A61P35/00 *(2006.01)*

(30)優先權：2014/04/30　美國　61/986,520

(71)申請人：美商輝瑞大藥廠 (美國) PFIZER INC.　(US)

美國

美商艾伯維史坦森特瑞斯有限責任公司 (美國) ABBVIE STEMCENTRX LLC　(US)

美國

(72)發明人：達美林　馬克　埃薩克 DAMELIN, MARC ISAAC (US)；薩普拉　蒲嘉 SAPRA, PUJA (IN)；戴拉　史考特 J DYLLA, SCOTT J. (US)；斑寇維奇　亞利山德　約翰 BANKOVICH, ALEXANDER JOHN (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW　201309729A1　US　2013/0129753A1

審查人員：吳姵諄

申請專利範圍項數：32 項　圖式數：23　共 242 頁

(54)名稱

抗-ＰＴＫ７抗體-藥物結合物

(57)摘要

本發明提供抗-PTK7 抗體-藥物結合物及其製備及使用方法。

The present invention provides anti-PTK7 antibody-drug conjugates and methods for preparing and using the same.

指定代表圖：

>gi|47938093|gb|AAH71557.1|PTK7 蛋白質酪胺酸激酶 7 [智人]

```
   1  MGAARGSPAR PRRLPLLSVL LLPLLGGTQT AIVFIKQPSS QDALQGRRAL LRCEVEAPGP
  61  VHVYWLLDGA PVQDTERRFA QGSSLSFAAV DRPQDSGTFQ CVARDDVTGE EARSANASFN
 121  IKWIEAGPVV LKHPASEAEI QPQTQVTLRC HIDGHPRPTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
 181  KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNFTLSIA DESFARVVLA PQDVVVAEYE
 241  EAMFHCQFSA QPPPSLQWLF EDETPITNRS RPPHLRRATV FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR
 301  CIGQGQRGPP IILEATLHLA EIEDMPLFEP RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG
 361  VRLPTHGRVY QKGHELVLAN IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDVNITVAT VPSWLKKPQD
 421  SQLEEGKPGY LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSRFEV FKNGTLRINS VEVYDGTWYR
 481  CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPPQP QQCMEFDKEA TVPCSATGRE KPTIKWERAD
 541  GSSLPEWVTD NAGTLHFARV TRDDAGNYTC IASNGPQGQI RAHVQLTVAV FITFKVEPER
 601  TTVYQGHTAL LQCEAQGDPK PLIQWKGKDR ILDPTKLGPR MHIFQNGSLV IHDVAPEDSG
 661  RYTCIAGNSC NIKHTEAPLY VVDKPVPEES EGPGSPPPYK MIQTIGLSVG AAVAYIIAVL
 721  GLMFYCKKRC KAKRLQKQPE GEEPEMECLN GGPLQNGQPS AEIQEEVALT SLGSGPAATN
 781  KRHSTSDKMH FPRSSLQPIT TLGKSEFGEV FLAKAQGLEE GVAETLVLVK SLQSKDEQQQ
 841  LDFRRELEMF GKLNHANVVR LLGLCREAEP HYMVLEYVDL GDLKQFLRIS KSKDEKLKSQ
 901  PLSTKQKVAL CTQVALGMEH LSNNRFVHKD LAARNCLVSA QRQVKVSALG LSKDVYNSEY
 961  YHFRQAWVPL RWMSPEAILE GDFSTKSDVW AFGVLMWEVF THGEMPHGGQ ADDEVLADLQ
1021  AGKARLPQPE GCPSKLYRLM QRCWALSPKD RPSFSEIASA LGDSTVDSKP
```

(SEQ ID NO 73)

圖 1

公告本

I679022

發明摘要

※ 申請案號：104113994

※ 申請日：104年4月30日

※IPC 分類： ***A61K 47/50*** (2017.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗-PTK7抗體-藥物結合物

ANTI-PTK7 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明提供抗-PTK7抗體-藥物結合物及其製備及使用方法。

【英文】

The present invention provides anti-PTK7 antibody-drug conjugates and methods for preparing and using the same.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

抗-PTK7抗體-藥物結合物

ANTI-PTK7 ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

相關申請案

本申請案主張於2014年4月30日提出申請之臨時美國申請案第61/986,520號之優先權，該臨時申請案之全文以引用方式併入本文中。

序列表

本申請案係經由EFS-Web以電子形式申請且包括以.txt格式以電子形式呈送之序列表。.txt文件含有標題為「PC072045_Sequence_Listing.txt」之序列表，其係於2014年4月30日創建且具有57.7 KB之大小。此.txt文件中所含有之序列表係說明書之一部分且其全文以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本發明係關於蛋白質酪胺酸激酶7 (PTK7)抗體及抗體-藥物結合物。本發明進一步係關於使用該等抗體及抗體-藥物結合物治療癌症之方法。

【先前技術】

蛋白質酪胺酸激酶7(PTK7) (亦稱作結腸癌激酶4 (CCK4))係最初自人類黑色素細胞及單獨自結腸癌組織選殖之受體酪胺酸激酶。已在多種腫瘤細胞(包括膀胱、乳房、結腸直腸、腎及肺癌及黑色素瘤)中鑑別高含量之PTK7。亦在成人骨髓性白血病(AML)及急性淋巴母細胞性白血病(ALL)細胞上觀察到PTK7表現。

在過去十年中，癌症之治療已利用作為一級治療選擇之手術、輻射療法及化學療法得以改良。該等治療在許多患者中可延長存活及/或減輕症狀，但對於許多患者不可能產生治癒。因此，仍顯著需要癌症之額外治療選擇。

為此，本發明提供靶向PTK7陽性癌症之新穎抗體-藥物結合物。所揭示抗-PTK7抗體-藥物結合物可對PTK7表現腫瘤細胞發揮臨床上有用之細胞毒性效應，而不對非PTK7表現細胞發揮不合意效應。

【發明內容】

本發明提供PTK7抗體-藥物結合物及其在PTK7相關之病症之檢測、預防及治療中之用途。本發明之PTK7抗體-藥物結合物通常具有式：Ab-(L-D)，其中Ab係結合至PTK7之抗體或其抗原結合片段或其PTK7-結合片段；且L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係藥物。

所揭示抗體-藥物結合物之Ab可為任何PTK7-結合抗體。在本發明之一些態樣中，Ab係嵌合、CDR移植、人類化或重組人類抗體或其PTK7-結合片段。在本發明之一些態樣中，Ab係內化抗體及/或中和抗體。

本發明亦提供PTK7抗體-藥物結合物及其在PTK7相關之病症之檢測、預防及治療中之用途。本發明之PTK7抗體-藥物結合物通常具有式：Ab-(L-D)，其中Ab係結合至PTK7之抗體或其抗原結合片段或其PTK7-結合片段；且L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係奧裡斯他汀(auristatin)。

在本發明之特定態樣中，Ab係hu23、hu24或hu58抗體、或與hu23、hu24或hu58競爭結合至人類PTK7之抗體及/或與hu23、hu24或hu58抗體結合至相同表位之抗體。舉例而言，Ab可與包含以下之抗體競爭結合至人類PTK7及/或結合相同表位：(a)闡述為SEQ ID NO: 1

之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區；(b) 闡述為SEQ ID NO: 25之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 39之輕鏈可變區；或(c) 闡述為SEQ ID NO: 49之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 63之輕鏈可變區。

在與hu23競爭結合至人類PTK7、及/或與hu23結合至相同表位之Ab中，可用於製備本發明之PTK7抗體-藥物結合物之代表性Ab包括包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體，其中至少一個重鏈可變區包含三個由SEQ ID NO: 3、7及11定義之CDR。額外Ab包括包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體，其中至少一個輕鏈可變區包含三個定義為SEQ ID NO: 17、19及21之CDR。額外Ab包括包含以下之抗體：(a) 包含三個闡述為SEQ ID NO: 3、7及11之CDR之重鏈可變區；及(b) 包含三個闡述為SEQ ID NO: 17、19及21之CDR之輕鏈可變區。

在本發明之其他PTK7抗體-藥物結合物中，Ab包含具有與SEQ ID NO: 1至少90%一致之胺基酸序列之重鏈可變區及具有與SEQ ID NO: 15至少90%一致之胺基酸序列之輕鏈可變區，例如，闡述為SEQ ID NO: 1之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區。

在與hu24競爭結合至人類PTK7及/或與hu24結合至相同表位之Ab中，可用於製備本發明之PTK7抗體-藥物結合物之代表性Ab包括包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體，其中至少一個重鏈可變區包含三個由SEQ ID NO: 27、31及35定義之CDR。額外Ab包括包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體，其中至少一個輕鏈可變區包含三個定義為SEQ ID NO: 41、43及45之CDR。額外Ab包括包含以下之抗體：(a) 包含三個闡述為SEQ ID NO: 27、31及35之CDR之重鏈可變區；及(b) 包含三個闡述為SEQ ID NO: 41、43及45之CDR之輕鏈可變區。

在本發明之其他PTK7抗體-藥物結合物中，Ab包含具有與SEQ ID NO: 25至少90%一致之胺基酸序列之重鏈可變區及具有與SEQ ID NO: 39至少90%一致之胺基酸序列之輕鏈可變區，例如，闡述為SEQ ID NO: 25之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 39之輕鏈可變區。

在與hu58競爭結合至人類PTK7及/或與hu58結合至相同表位之Ab中，可用於製備本發明之PTK7抗體-藥物結合物之代表性Ab包括包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體，其中至少一個重鏈可變區包含三個由SEQ ID NO: 51、55及59定義之CDR。額外Ab包括包含至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體，其中至少一個輕鏈可變區包含三個定義為SEQ ID NO: 65、67及69之CDR。額外Ab包括包含以下之抗體：(a) 包含三個闡述為SEQ ID NO: 51、55及59之CDR之重鏈可變區；及(b) 包含三個闡述為SEQ ID NO: 65、67及69之CDR之輕鏈可變區。

在本發明之其他PTK7抗體-藥物結合物中，Ab包含具有與SEQ ID NO: 49至少90%一致之胺基酸序列之重鏈可變區及具有與SEQ ID NO: 63至少90%一致之胺基酸序列之輕鏈可變區，例如，闡述為SEQ ID NO: 49之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 63之輕鏈可變區。

在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包含包含IgG1重鏈恆定區、κ輕鏈恆定區、或IgG1重鏈恆定區及κ輕鏈恆定區之Ab。舉例而言，可用於製備本發明之PTK7抗體-藥物結合物之Ab包括包含闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈、闡述為SEQ ID NO: 23之輕鏈或闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 23之輕鏈的抗體。額外實例包括包含闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈、闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈、或闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈的抗體。又一些實例包括包含闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈、闡述為SEQ ID NO: 71之輕鏈、或闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈及闡述為SEQ

ID NO: 71之輕鏈的抗體。

在本發明之其他態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物包含具有闡述為SEQ ID NO: 1、25或49之重鏈可變區的抗體。在本發明之其他態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物包含具有闡述為SEQ ID NO: 15、39或63之輕鏈可變區的抗體。

在本發明之特定態樣中，Ab係hu23、hu24或hu58抗體、或與hu23、hu24或hu58抗體競爭結合至人類PTK7之抗體及/或與hu23、hu24或hu58抗體結合至相同表位之抗體。舉例而言，Ab可與包含以下之抗體競爭結合至人類PTK7及/或結合至相同表位：(a) SEQ ID NO:13之重鏈可變區及SEQ ID NO:23之輕鏈可變區；(b) SEQ ID NO:25之重鏈可變區及SEQ ID NO:39之輕鏈可變區；或(c) SEQ ID NO:49之重鏈可變區及SEQ ID NO:63之輕鏈可變區。

在本發明之另一態樣中，Ab係人類化單株抗體，例如hu23、hu24或hu58抗體。

本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物中之任一者皆可利用可裂解或不可裂解之連接體製備。在一個態樣中，可裂解連接體可為馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)。在另一態樣中，可裂解連接體可為4-(4'-乙醯基苯氧基)丁酸(AcBut)。在另一態樣中，不可裂解連接體可為馬來醯亞胺基己醯基(mc)。

本文揭示之PTK7抗體藥物結合物中之任一者皆可利用藥物奧裡斯他汀製備。在一個態樣中，奧裡斯他汀可為0101 (2-甲基丙胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺)。在另一態樣中，奧裡斯他汀可為8261 2-甲基丙胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯

啶-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺。

本文揭示之PTK7抗體藥物結合物中之任一者皆可利用藥物製備，該藥物係卡奇黴素(calicheamicin)，包括卡奇黴素之N乙醯基衍生物，例如N-乙醯基-γ-卡奇黴素及N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼(CM)。

本文揭示之PTK7抗體中之任一者皆可藉由與連接體-藥物部分(L-D)結合用於抗體-藥物結合物。在一個態樣中，L-D可為vc0101 (N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-丁-2-基]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-2-側氧基乙基)-18,18,23-三甲基-3,16,19,22-四側氧基-21-(丙-2-基)-2,7,10,13,26-五氧雜-4,17,20,23-四氮雜二十七-1-基]苯基}-N~5~-胺甲醯基-L-鳥胺醯胺)。在另一態樣中，L-D可為mc8261 (N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-2-甲基丙胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺)。在又一態樣中，L-D可為AcButCM (4(4’乙醯基苯氧基)丁酸 N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼)。本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物中之任一者皆可具有1至8之藥物-對-抗體比率(DAR)。

在本發明之特定態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 23之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包

含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 71之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 23之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯基(mc)，且其中藥物係8261。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯基(mc)，且其中藥物係8261。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 71之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯基(mc)，且其中藥物係8261。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 23之輕

鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係AcBut (4-(4’-乙醯基苯氧基)丁酸)且其中藥物係CM (N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼)。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係AcBut (4-(4’-乙醯基苯氧基)丁酸)且其中藥物係CM (N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼)。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 71之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係AcBut (4-(4’-乙醯基苯氧基)丁酸)且其中藥物係CM (N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼)。

本發明提供包含複數種本文揭示之抗體-藥物結合物及視情況選用之醫藥載劑之組合物，其中該組合物具有介於1至8範圍內之平均DAR。在本發明之特定態樣中，該組合物可具有介於3至5範圍內之平均DAR。在本發明之另一態樣中，該組合物具有介於3至4範圍內之平均DAR。在本發明之另一態樣中，該組合物具有約4之平均DAR。

本發明進一步提供包含複數種本文揭示之抗體-藥物結合物及視情況選用之醫藥載劑之組合物，其中該組合物具有至少50%抗體-藥物結合物且具有3至5之DAR。在本發明之另一態樣中，該組合物具有至少60%抗體-藥物結合物且具有3至5之DAR。

本發明進一步提供PTK7抗體-藥物結合物，其通常具有式：Ab-(L-D)，其中Ab係結合至PTK7之抗體或其抗原結合片段或其PTK7-結合片段；且L-D係連接體-藥物部分，其中L係vc或mc或AcBut，且D係藥物。

本發明進一步提供PTK7抗體-藥物結合物，其通常具有式：Ab-(L-D)，其中Ab係結合至PTK7之抗體或其抗原結合片段或其PTK7-結合片段；且L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係奧裡斯他汀(例如0101或8261)或CM。

本發明進一步提供製備本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物之方法。舉例而言，產生抗體-藥物結合物之方法可包括以下步驟：(a) 將連接體連接至藥物；(b) 將連接體-藥物部分結合至抗體；及(c) 純化抗體-藥物結合物。

本發明之另一態樣包括本文揭示之抗體-藥物結合物之製造方法、製備方法、合成方法、結合方法及純化方法及用於製備、合成及結合本文揭示之抗體-藥物結合物之中間體。

進一步提供包含本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物。

在其他態樣中，提供藉由投與治療有效量之包含本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物之組合物治療PTK7相關之病症的方法。代表性PTK7相關之病症包括過度增殖病症，例如贅瘤性病症，例如實體腫瘤(例如，乳癌、例如三陰性乳癌(TNBC)、助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)、雌激素-受體陽性乳癌(ER+)及雙陽性乳癌；卵巢癌；結腸直腸癌；食道癌；胃癌；黑色素瘤；肉瘤；腎癌；胰臟癌；前列腺癌；肝癌，例如肝細胞癌(HCC)；及肺癌，例如非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC)等)及血液惡性病(例如，白血病，例如成人骨髓性白血病(AML)或急性淋巴母細胞性白血病(ALL)等)。亦提供所揭示PTK7抗體-藥物結合物之用途，其用於製造用於治療個體之PTK7相關之病症之藥劑。亦提供PTK7抗體-藥物結合物，其用於治療PTK7相關之病症。

在其他態樣中，本發明提供藉由投與治療有效量之包含本文揭

示之PTK7抗體-藥物結合物及化學治療劑之組合物治療個體之PTK7相關之病症的方法。

本發明之另一態樣包括利用本文揭示之抗體-藥物結合物治療患者之特徵在於PTK7過表現之病症的方法。在其他態樣中，本發明提供利用本文揭示之抗體-藥物結合物治療患者之特徵在於PTK7過表現之癌症的方法。

在再一些態樣中，本發明提供減少腫瘤細胞群體中之腫瘤起始細胞之方法。舉例而言，該方法可包含使腫瘤細胞群體與PTK7抗體-藥物結合物接觸，其中該群體包含腫瘤起始細胞及除腫瘤起始細胞外之腫瘤細胞；藉此降低腫瘤細胞群體中之腫瘤起始細胞之頻率。接觸步驟可在活體外或活體內實施。

本發明之另一態樣包括本文揭示之化合物及組合物之診斷及治療用途。

本發明之其他態樣包括製品，即套組，其包含本文揭示之抗體-藥物結合物、容器及指示治療之包裝插頁或標記。

藉由整體申請案之綜述將瞭解本發明之該等及其他態樣。

【圖式簡單說明】

圖1提供代表性全長PTK7蛋白質之胺基酸序列(SEQ ID NO. 73)

圖2A-B顯示，hu24結合與PTK7之細胞表現相關。(A)具有抗-PTK7及抗GAPDH抗體之全細胞裂解物之免疫印跡。免疫印跡信號先前已藉由展示在PTK7基因表現由siRNA抑制時之信號損失進行驗證。(B) 來自流式細胞術之平均螢光強度值，抗-PTK7 (hu24)在與免疫印跡中相同之癌細胞系上。虛線代表在一級抗體係陰性對照抗體而非hu24時之信號。

圖3顯示藉由免疫組織化學之來自七個PDX模型之組織試樣上之PTK7表現。染色指示PTK7。顯示每一模型之代表性顯微照片。比例

尺，100 μM。

圖4A-C係顯示原發性腫瘤中之PTK7 mRNA表現之圖。顯示(A)乳癌；(B) NSCLC癌症及(C) 卵巢癌。

圖5係顯示NSCLC患者中較高PTK7 mRNA表現與較差整體存活率之間的關聯。

圖6係顯示健康人類及代表8種不同腫瘤類型之癌症患者之血清中之PTK7蛋白質含量的圖。水平線指示每一組之平均值。

圖7提供hu24-vc0101之疏水性相互作用層析(HIC)分析。

圖8係顯示乳房-13 (BR13)三陰性乳癌(TNBC) PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能的圖。

圖9係顯示BR13 TNBC PDX中hu24-vc0101及抗-PTK7-mc8261 ADC之效能的數據表。

圖10係顯示BR13 TNBC PDX中hu24-vc0101及抗-PTK7-mc8261 ADC之效能之圖9之數據的表。

圖11係顯示乳房-22 (BR22) TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能的圖。

圖12係顯示BR22 TNBC PDX中hu23-vc0101及抗-PTK7-mc8261 ADC之效能的數據表。

圖13係顯示BR22 TNBC PDX中hu23-vc0101及抗-PTK7-mc8261 ADC之效能之圖12之數據的圖。

圖14係顯示乳房-31 (BR31) TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能的圖。

圖15係顯示乳房-64 (BR64) TNBC PDX中hu24-vc0101 ADC之效能的圖。

圖16係顯示BR5 TNBC PDX中hu24-vc0101 ADC之效能的圖。

圖17係顯示BR36 PR+ TNBC PDX中hu24-vc0101 ADC之效能的

圖。

圖18A-B係顯示兩種不同SCLC PDX模型(A) H1048 PDX模型及(B) SCLC 95 PDX模型中hu24-vc0101及hu23-AcBut CM之效能的圖。

圖19A-B係顯示兩種不同SCLC PDX模型(A) SCLC 117 PDX模型及(B) SCLC 102 PDX模型中hu24-AcButCM之效能的圖。

圖20係顯示肺-135 (LU135)非小細胞肺癌(NSCLC) PDX中hu24-vc0101 ADC之效能的圖。

圖21係顯示肺-176 (LU176)非小細胞肺癌(NSCLC) PDX中hu24-vc0101 ADC之效能的圖。

圖22顯示在用4 μg/mL hu24-vc0101 ADC、4 μg/mL未結合hu24 mAb、4 μg/mL陰性對照ADC或0.1 nM游離0101奧裡斯他汀治療後微管結構之顯微照片。將H661細胞處理48小時且隨後針對抗微管蛋白及DAPI染色以使DNA可視化。

圖23顯示活體外hu24-vc0101 ADC對內皮細胞之效應。

【實施方式】

本發明提供結合至PTK7之抗體-藥物結合物、使用PTK7抗體、連接體及藥物製備結合物之方法。本發明之抗體-藥物結合物可用於製備及製造組合物，例如藥劑，其可用於診斷、預防及/或治療特徵在於PTK7表現之過度增殖病症。在本發明之一些態樣中，所揭示抗體-藥物結合物可降低腫瘤起始細胞(TIC)之頻率，該等腫瘤起始細胞涵蓋腫瘤永存細胞(TPC)及高度增殖性腫瘤祖細胞(TProg)。

I. PTK7生理學

蛋白質酪胺酸激酶(PTK7) (亦稱作結腸癌激酶4 (CCK4))係最初自正常人類黑色素細胞(Lee等人，Oncogene 8(12):3403-3410, 1993)及單獨自結腸癌組織(Mossie等人，Oncogene 11(10):2179-2184, 1995)選殖之受體酪胺酸激酶。PTK7基因位於6p21.1-pl2.2處。已自睪丸cDNA

選殖人類PTK7之五種剪接同種型(Jung,等人，Biochim Biophys Acta 1579, 2002)。同種型關於另一者之相對豐度在睪丸與肝細胞瘤或結腸癌系之間不同，但該等同種型之功能意義(若存在)未知。生物資訊分析已表明，小鼠可表現經選擇性剪接之mRNA之可溶性PTK7同種型(Forrest, Taylor等人，Genome Biol 7, 2006)。

全長PTK7蛋白質係I型跨膜蛋白質，其具有674個胺基酸細胞外結構域(ECD)、之後短TM跨越部分及345個胺基酸細胞質結構域。PTK7之代表性全長胺基酸序列示於圖1中(SEQ ID NO. 73)。代表性PTK7同種型之胺基酸序列參見基因庫登錄號EAX04154.1 (同種型a)、EAX04155.1 (同種型b)、EAX04156.1 (同種型c)、EAX04157.1 (同種型d)、EAX04158.1 (同種型e)、EAX04159.1 (同種型f)及EAX04160.1 (同種型g)。所有同種型編碼相同細胞內結構域。人類PTK7之代表性同種型(即轉錄變體PTK7-1)之完整核酸序列具有基因庫登錄號NM_002821。

成熟全長PTK7 ECD包含七個免疫球蛋白樣結構域，而各種剪接變體編碼ECD結構不同之PTK7同種型。所有同種型皆含有與酪胺酸激酶之一般類別中發現者具有實質同源性之細胞質結構域。然而，PTK7無可檢測之酪胺酸激酶活性，且因此屬偽激酶之亞家族，其中各種保守激酶亞結構域之若干胺基酸變化導致ATP之結合受損(Boudeau等人，Trends Cell Biol. 16, 2006)。特定而言，亞結構域I及VII中之關鍵殘基在PTK7中改變，使得與ATP之不可轉移磷酸鹽之直接相互作用、以及橋接該等磷酸鹽之Mg^{2+}輔因子之螯合可受損。

PTK7功能之生物重要性可自水螅屬(Hydra)、自果蠅屬(Drosophila)至雞及人類之保守直向同源物之存在推斷，其各自藉由序列分析預測無激酶活性。基於與螺旋-螺旋締合傾向相關之特異性TM結構域基序，已表明TM結構域可介導PTK7二聚化。預計PTK7偽

激酶結構域自身不直接傳遞信號，但其可作為信號傳導路徑中之其他分子之支架相互作用，或可招募其他酪胺酸激酶。已顯示PTK7可在細胞黏附、細胞遷移、細胞極性、增殖、肌動蛋白細胞骨架重組及細胞凋亡中起作用以調控胚胎發生、上皮組織構造、神經元管閉合、神經元脊形成及軸突導向(Peradziryi, H.等人 Arch Biochem Biophys. 524, 2012)。

據報導表現PTK7之正常組織及細胞包括肺、甲狀腺、卵巢、CD4+最近胸腺移出T細胞及正常骨髓性祖細胞及CD34+CD38-骨髓細胞。關於癌性組織，亦在結腸癌細胞、成人骨髓性白血病(AML)試樣、CD34- pre-TALL細胞及胃癌中發現PTK7表現。在含有染色體6p21缺失之某些乳癌中可損失PTK7，但表現在乳癌細胞系中可見。PTK7亦在肺腺癌中表現。骨肉瘤中之6pl 2-p21區之擴增之精細定位已顯示基因拷貝數增加不一定引起PTK7過表現，如藉由qRT-PCR所測定。

PTK7之一或多種配體尚未可知，但PTK7與多種生物信號傳導路徑及發育過程相關聯。舉例而言，PTK7在非正準(亦稱作Wnt/平面細胞極性信號傳導)及正準Wnt信號傳導路徑中用作共受體。在非正準Wnt路徑中，PTK7藉由與RACK1直接相互作用及將DSH招募至膜定位受體複合物中活化下游信號傳導。PTK7經由競爭膜表面處之捲曲受體結合對正準Wnt路徑信號轉導發揮抑制效應。PTK7基因表現係由Cdx調控，而蛋白質穩定性係由膜相關蛋白酶降解調控。PTK7靶向由金屬蛋白酶MMP14及Adam17脫落之蛋白水解降解及細胞外結構域，從而導致增強之細胞增殖、遷移及促進之癌細胞侵襲(Peradziryi等人 Arch Biochem Biophys. 524, 2012)。可溶性PTK7 (sPTK7)用於顯示PTK7在VEGF誘導之血管生成、以及活體外管形成、人類內皮細胞之遷移及侵襲中之作用。

在癌性組織內，除其調節Wnt路徑之潛能外，PTK似乎在HCT116結腸癌系中傳送促增殖及抗細胞凋亡信號，其表型可藉由RNAi介導之PTK7敲低逆轉(Meng,等人，2010, PLoS One 5(11):e14018)。PTK7抗細胞凋亡信號對成人骨髓性白血病(AML)胚細胞中之蒽環介導之細胞殺死傳送抗性，其可使用可溶性PTK7-Fc蛋白質逆轉(Prebet等人，2010, Blood 116(13):2315-23)。在靶向將道諾黴素(daunorubicin)遞送至T-ALL細胞之策略中使用結合PTK7且隨後經內化之適配體利用PTK7由特異性癌細胞過表現。

II. PTK7抗體-藥物結合物

本發明提供式Ab-(L-D)之抗體-藥物結合物，其中(a) Ab係結合至PTK7之抗體或其抗原結合片段，且(b) L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係藥物。亦提供製備及製造該等抗體-藥物結合物之方法及其在臨床應用中之使用。「抗體-藥物結合物」或「ADC」係指結合至PTK7且結合至藥物(例如細胞毒性劑、細胞生長抑制劑及/或治療劑，如下文進一步闡述)之抗體或其抗原結合片段，包括抗體衍生物。舉例而言，細胞毒性劑可連接或結合至如本文所述抗-PTK7抗體用於細胞毒性劑至腫瘤(例如，PTK7表現腫瘤)之靶向局部遞送。

如本文所用術語「PTK7」包括變體、同種型、同系物、直向同源物及橫向同源物。PTK7在本文中亦稱作結腸癌激酶4 (CCK4或CCK-4)。出於本申請案之目的，應瞭解，術語「PTK7」及「CCK4」可互換使用且包括人類PTK7或人類CCK4之剪接變體、同種型、物種直向同源物及同系物。應進一步瞭解，該等術語亦可係指含有PTK7抗體可特異性結合之表位之PTK7或CCK4之天然或變體形式的任何衍生物或片段。

在本發明之一些態樣中，抗體及抗體-藥物結合物與來自除人類外之物種之PTK7 (例如小鼠、大鼠或靈長類動物之PTK7)以及不同形

式之PTK7 (例如，糖基化PTK7)交叉反應。在其他態樣中，抗體及抗體-藥物結合物可對人類PTK7具有完全特異性且可不展現物種或其他類型之交叉反應性。除非上下文另有規定，否則如本文所用術語PTK7係指天然人類PTK7。因此，「PTK7抗體」或「抗-PTK7抗體」或其他類似名稱意指與人類PTK7或其片段或衍生物締合、結合或反應之任何抗體(如本文中所定義)。此外，「PTK7抗體-藥物結合物」或「抗-PTK7抗體-藥物結合物」意指與人類PTK7或其片段或衍生物締合、結合或反應之任何抗體-藥物結合物或ADC (如本文中所定義)。

「連接體(L)」闡述抗體與藥物之直接或間接連接。連接體附接至抗體可以多種方式完成，例如經由表面離胺酸、還原性偶合至氧化碳水化合物、藉由還原鏈間二硫鍵釋放之半胱胺酸殘基、在特定位點處經改造之反應性半胱胺酸殘基、及含有醯基供體麩醯胺酸之標籤或藉由在轉麩胺醯胺酶及胺存在下多肽改造具有反應性之內源性麩醯胺酸。多種ADC連接系統為業內已知，包括基於腙-、二硫化物-及肽-之連接。

「藥物(D)」係任何具有生物或可檢測活性之物質，例如治療劑、可檢測標記、結合劑等及在活體內代謝成活性劑之前藥。術語藥物、酬載及化合物可互換使用。

「L-D」係自藥物(D)連接至連接體(L)產生之連接體-藥物部分。

除非本文另有指示，否則結合本發明使用之額外科學及技術術語應具有彼等業內普通技術者通常所瞭解之含義。此外，除非上下文另有需求，否則單數術語應包括複數形式且複數術語應包括單數形式。通常，結合本文所述細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、遺傳學及蛋白質及核酸化學及雜交使用之術語及其技術係業內熟知且常用之彼等。

在本發明之特定態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 1之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 23之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 25之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 39之輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 49之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 63之輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係

0101。

在本發明之另一態樣中，式Ab-(L-D)之PTK7抗體-藥物結合物包含(a) 包含闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 71之輕鏈之抗體或其抗原結合片段，Ab；及(b) 連接體-藥物部分，L-D，其中L係連接體，且D係藥物，其中連接體係馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且其中藥物係0101。

指示每個抗體結合之藥物分子之數目之DAR (藥物-對-抗體比率)或載藥量可為1至8。抗體-藥物結合物之組合物、批料及/或調配物之特徵可在於平均DAR。DAR及平均DAR可藉由各種習用方式(例如UV譜、質譜術、ELISA分析、輻射測量方法、疏水性相互作用層析(HIC)、電泳及HPLC)測定。

在本發明之特定態樣中，純化抗-PTK7 ADC可不存在未結合抗體(游離抗體)。在本發明之其他態樣中，純化抗-PTK7 ADC可為單體ADC，且不存在聚集物及二聚體。在本發明之其他態樣中，純化抗-PTK7 ADC可不存在游離藥物。在本發明之其他態樣中，純化抗-PTK7 ADC可為單體ADC且不存在游離藥物。

IIA. PTK7抗體

對於本發明之PTK7抗體-藥物結合物之製備，抗體或其抗原結合片段可為特異性結合PTK7之任何抗體或其抗原結合片段。本發明抗體進一步揭示並表徵於PCT國際公開案第WO 2012/112943號中，其全文以引用方式併入本文中。更具體而言，其中揭示之PTK7抗體(包括完整重鏈及輕鏈、其可變區及其CDR)之序列以引用方式併入本文中。對於在PTK7抗體-藥物結合物之製備中之使用，抗體或其抗原結合片段可經分離、純化或衍生。

「抗體」或「Ab」係能夠經由位於免疫球蛋白分子之可變區中之至少一個抗原識別位點識別並結合至特異性靶標或抗原(例如碳水

化合物、多核苷酸、脂質、多肽等)之免疫球蛋白分子。如本文所用術語「抗體」可涵蓋任何類型之抗體，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、保留特異性結合給定抗原(例如PTK7)之能力之完整抗體之「抗原結合片段」 (或部分) (例如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fd、Fv、Fc等)、分離之互補決定區(CDR)、雙特異性抗體、異源結合物抗體、其突變體、具有抗體或其抗原結合片段(例如，結構域抗體)之融合蛋白、單鏈(ScFv)及單一結構域抗體(例如，鯊魚及駱駝科動物抗體)、大抗體、微小抗體、細胞內抗體、二價抗體、三價抗體、四價抗體、v-NAR及雙-scFv (例如，參見Holliger及Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9): 1126-1136)、人類化抗體、嵌合抗體及包括所選特異性之抗原識別位點之免疫球蛋白分子之任何其他經修飾構形，包括抗體之糖基化變體、抗體之胺基酸序列變體及經共價修飾之抗體。抗體可為鼠類、大鼠、人類或任何其他起源(包括嵌合或人類化抗體)。在本發明之一些態樣中，所揭示PTK7抗體-藥物結合物之抗體或其抗原結合片段係嵌合、人類化或重組人類抗體或其PTK7-結合片段。

「特異性結合」或「優先結合」 (在本文中可互換使用)至靶標或抗原(例如，PTK7蛋白質)之抗體、抗體-藥物結合物或多肽係業內充分瞭解之術語，且用以測定該特異性或優先結合之方法亦為業內所熟知。據稱若分子與特定細胞或物質較與替代細胞或物質更頻繁、更快速、以更大持續時間及/或以更大親和力反應或締合，則其展現「特異性結合」或「優先結合」。若抗體較其結合至其他物質以更大親和力、親合力、更易於及/或以更大持續時間結合，則抗體「特異性結合」或「優先結合」至靶標或抗原。舉例而言，特異性或優先結合至PTK7表位之抗體係較其結合至其他PTK7表位或非PTK7表位以更大親和力、親合力、更易於及/或以更大持續時間結合此表位之抗

體。

本文所用術語「結合親和力」或「K_D」欲指特定抗原-抗體相互作用之平衡解離常數。K_D係解離速率(rate of dissociation，亦稱作「解離速率」(「off-rate」)或「K_d」)對締合速率(rate of association或「on-rate」)或「K_a」之比率。因此，K_D等於K_d/ K_a且表示為莫耳濃度(M)。因而斷定，K_D愈小，則結合親和力愈強。因此，與1 nM之K_D相比，1 μM之K_D指示弱結合親和力。可使用業內已確立之方法測定抗體之K_D值。一種測定抗體之K_D的方法係藉由使用表面電漿共振、通常使用生物感測器系統(例如BIACORE®系統)。

所揭示PTK7抗體-藥物結合物之特異性結合係指在具有多種不同抗原之非均相試樣中抗體-藥物結合物優先結合至人類PTK7抗原。通常，若抗體-藥物結合物或其抗體部分(Ab)之結合親和力係至少約10^{-7} M或更高(例如至少約10^{-8} M或更高，包括至少約10^{-9} M或更高、至少約10^{-10} M或更高、至少約10^{-11} M或更高或至少約10^{-12} M或更高)，則發生特異性結合。舉例而言，本發明之抗體-藥物結合物或其抗體部分(Ab)與人類PTK7抗原之特異性結合包括以介於至少約1 × 10^{-7} M至約1 × 10^{-12} M範圍內、例如在約1 × 10^{-8} M至約1 × 10^{-12} M之範圍內、或在約1 × 10^{-8} M至約1 × 10^{-11} M之範圍內、或在約1 × 10^{-8} M至約1 × 10^{-10} M之範圍內、或在約1 × 10^{-9} M至約1 × 10^{-10} M之範圍內結合。特異性結合亦係指在向個體投與抗體後，PTK7抗體-藥物結合物或其抗體部分(Ab)選擇性靶向PTK7表現細胞。

亦應瞭解，特異性或優先結合至第一靶標之抗體(或部分或表位)可或可不特異性或優先結合至第二靶標。因此，「特異性結合」或「優先結合」不一定需要(但其可包括)排他性結合。通常但不一定，在提及結合時意指優先結合。

如本文所用之「表位」包括能夠特異性結合至免疫球蛋白或T細

胞受體或以其他方式與分子相互作用之任何蛋白質決定子。表位決定子通常係由分子之化學活性表面基團(例如，胺基酸或碳水化合物或糖側鏈)組成，且通常具有特定三維結構特徵以及特定電荷特徵。表位可為「線性」或「構象」。在線性表位中，蛋白質與相互作用分子(例如抗體)之間之所有相互作用點皆沿蛋白質之主要胺基酸序列線性發生。在構象表位中，相互作用點包括蛋白質上彼此分離之胺基酸殘基。在測定抗原上之期望表位後，可(例如)使用本發明中所述之技術生成針對該表位之抗體。或者，在發現過程期間，抗體之生成及表徵可闡明關於合意表位之資訊。根據此資訊，則可競爭性篩選結合至相同表位之抗體。達成此之方法係執行交叉競爭研究以發現彼此競爭性結合之抗體，即抗體競爭結合至抗原。基於抗體之交叉競爭之「分揀」抗體之高通量方法闡述於PCT國際公開案第WO 03/48731號中。如本文所用術語「分揀」係指基於抗體之抗原結合特徵及彼此之競爭將抗體分組之方法。

如本文所使用，「經分離抗體」係指實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體(例如，特異性結合PTK7之經分離抗體實質上不含特異性結合除PTK7外之抗原的抗體)。此外，經分離抗體可實質上不含其他細胞材料及/或化學品。然而，特異性結合PTK7之經分離抗體可與來自其他物種(即直向同源物)之其他抗原(例如PTK7分子)或與PTK7之一種以上同種型具有交叉反應性。

在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括與具有以下之抗體或其抗原結合片段競爭結合至人類PTK7及/或結合相同表位之抗體：(a) 闡述為SEQ ID NO: 1之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 15之輕鏈可變區；或(c) 闡述為SEQ ID NO: 25之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 39之輕鏈可變區；或(c) 闡述為SEQ ID NO: 49之重鏈可變區及闡述為SEQ ID NO: 63之輕鏈可變區。

如本文關於抗體使用之術語「競爭」意指第一抗體或其抗原結合片段以足夠類似於第二抗體或其抗原結合片段之結合之方式結合至表位，使得與在不存在第二抗體下第一抗體之結合相比，在第二抗體存在下第一抗體與其同源表位之結合之結果可檢測地降低。在第一抗體存在下第二抗體與其表位之結合亦可檢測地降低之替代方案可(但無需)如此。亦即，第一抗體可抑制第二抗體與其表位之結合，而第二抗體不抑制第一抗體與其各別表位之結合。然而，若每一抗體可檢測地抑制另一抗體與其同源表位或配體之結合(不管抑制至相同、更大或更小程度)，則據稱該抗體彼此「交叉競爭」結合其各別表位。本發明涵蓋競爭及交叉競爭抗體。與藉由該競爭或交叉競爭發生之機制(例如，立體阻礙、構象變化或結合至共同表位或其部分)無關，熟習此項技術者應瞭解，基於本文提供之技術，涵蓋該等競爭及/或交叉競爭抗體且其可用於本文揭示之方法。

天然或天然存在之抗體及天然免疫球蛋白通常係約150,000道爾頓之異四倍體糖蛋白，由兩條相同輕(L)鏈及兩條相同重(H)鏈組成。每一輕鏈係由一個共價二硫鍵連接至重鏈，而在不同免疫球蛋白同型之重鏈中二硫鍵之數目各不相同。每一重鏈及輕鏈亦具有規則地間隔開之鏈內二硫鍵。每一重鏈在一端均具有可變結構域(VH)，後接多個恆定結構域。每一輕鏈在一端均具有可變結構域(VL)且在其另一端具有恆定結構域；輕鏈之恆定結構域與重鏈之第一恆定結構域比對，且輕鏈可變結構域與重鏈可變結構域比對。據信，特定胺基酸殘基可在輕鏈與重鏈可變結構域之間形成界面。術語「可變」係指抗體之間可變結構域之某些區段之序列差異極大的事實。

抗體及上述抗體結構域可闡述為「多肽」、「寡肽」、「肽」及「蛋白質」，即任何長度、較佳相對較短(例如，10-100個胺基酸)之胺基酸之鏈。該鏈可為直鏈或具支鏈，其可包含經修飾胺基酸，及

/或可雜有非胺基酸。應進一步瞭解，多肽可以單鏈或相關鏈形式存在。胺基酸在本文中可由其通常習知之三個字母符號或由IUPAC-IUB Biochemical推薦之一個字母符號提及。術語「多肽」、「寡肽」、「肽」及「蛋白質」亦涵蓋天然或藉由介入修飾之胺基酸鏈；例如，二硫鍵形成、糖基化、脂化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾，例如與標記組份結合。該定義內亦包括(例如)含有一或多種胺基酸類似物(例如，包括非天然胺基酸等)之多肽、以及業內已知之其他修飾形式。胺基酸修飾可藉由業內已知之任何方法進行且許多該等方法為彼等熟習此項技術者熟知且常見。舉例而言，但不限於，可使用任何熟知基於PCR之技術完成胺基酸取代、缺失及插入。胺基酸取代可藉由定點誘變進行(例如，參見Zoller及Smith, 1982, Nucl.Acids Res.) 10:6487-6500；及Kunkel, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:488)。

抗體之「恆定區」係指單獨或組合之抗體輕鏈之恆定區或抗體重鏈之恆定區。嵌合及人類化PTK7抗體之恆定區可衍生自IgA、IgD、IgE、IgG、IgM及其同型(例如，IgG之IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型)以及其亞類及突變型式中任一者之恆定區。端視重鏈之恆定區之抗體胺基酸序列而定，可將免疫球蛋白歸類為不同種類。存在5大類免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等種類中之若干可進一步分成亞類(同型)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。對應於不同種類之免疫球蛋白之重鏈恆定區分別稱為α、δ、ε、γ及μ區。不同種類之免疫球蛋白之亞單元結構及三維構形已眾所周知。

恆定結構域並不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應物功能，例如Fc受體(FcR)結合、使抗體參與抗體依賴性細胞毒性、調理作用、補體依賴性細胞毒性之起始及肥胖細胞脫粒。如業內所

知，術語「Fc區」用於定義免疫球蛋白重鏈之C-末端區。「Fc區」可為天然序列Fc區或變體Fc區。儘管免疫球蛋白重鏈之Fc區之邊界可有所變化，但通常將人類IgG重鏈Fc區界定為自Cys226位處之胺基酸殘基或自Pro230延伸至其羧基末端。Fc區中殘基之編號係如Kabat中之EU索引。Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. The Fc region of an immunoglobulin generally having two constant regions, CH2 and CH3。

如業內所用，「Fc受體」及「FcR」闡述結合至抗體之Fc區之受體。較佳FcR係天然序列人類FcR。此外，較佳FcR係結合IgG抗體者(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII亞類之受體，包括該等受體之對偶基因變體及選擇性剪接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA(「活化受體」)及FcγRIIB(「抑制受體」)，二者具有類似胺基酸序列，主要在其胞質結構域上有所不同。FcR綜述於Ravetch及Kinet, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92, 1991；Capel等人，Immunomethods, 4:25-34, 1994；及de Haas等人，J. Lab. Clin. Med., 126:330-41, 1995。「FcR」亦包括負責將母體IgG轉移至胎中之新生受體FcRn (Guyer等人，J. Immunol., 117:587-593 (1976)；及Kim等人，European J. Immunol., 24:2429-2434 (1994))。

先前已報導，抗體重鏈之CH2或CH3結構域之表面上、或輕鏈之恆定結構域上可能存在或以其他方式可及之某些殘基適於用(例如)半胱胺酸取代天然野生型胺基酸，且因此可用於改造能夠結合至各種試劑之位點。

如術語「經改造Fc多肽」、「經改造Fc區」及「經改造Fc」在本文中可互換使用，意指包含至少一個突變(例如，引入結合位點之胺基酸取代)之Fc多肽或其部分。突變於該位置處引入半胱胺酸代替

天然胺基酸殘基，其中突變產生反應性位點(例如，反應性硫氫基)用於使部分結合至Fc。

如本文所用術語「含有醯基供體麩醯胺酸之標籤」或「麩醯胺酸標籤」係指含有一或多個用作轉麩胺醯胺酶胺受體之Gln殘基的多肽或蛋白質。

抗體之「可變區」係指單獨或組合之抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區。如業內所知，重鏈及輕鏈之可變區各自由四個由三個互補決定區(CDR，亦稱作超變區)連接之框架區(FR)組成。每一鏈中之CDR藉由FR保持緊密靠近在一起，且與另一鏈之CDR一起促進形成抗體之抗原結合位點。存在至少兩種測定CDR之技術：(1) 基於交叉物種序列可變性之方法(即，Kabat等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, (第5版，1991, National Institutes of Health, Bethesda MD))；及(2) 基於抗原-抗體複合物之結晶學研究之方法(Al-Lazikani等人，J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997)。如本文所用，CDR可係指藉由任一方法或藉由兩種方法之組合界定之CDR。

可變結構域之CDR係根據Kabat、Chothia、Kabat及Chothia二者之累積、VBASE2、AbM、接觸及/或構象定義或業內熟知之任一CDR測定方法之定義鑑別之可變區內之胺基酸殘基。抗體CDR可鑑別為最初由Kabat等人定義之超變區。例如，參見Kabat等人，1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, NIH, Washington D.C。CDR之位置亦可鑑別為最初由Chothia及其他人定義之結構環結構。例如，參見Chothia等人，Nature 342:877-883, (1989)。CDR位置亦可衍生自VBASE2資料庫之分析。(例如，參見Retter等人，2005, Nucleic Acids Res. 33 (資料庫期號):D671-D674)。

CDR鑑別之其他方法包括「AbM定義」，其係Kabat與Chothia之

間之折衷且使用Oxford Molecular's AbM抗體建模軟體(現為ACCELRYS®)或基於抗原接觸中觀察之CDR之「接觸定義」衍生，如MacCallum等人，J. Mol. Biol., 262:732-745, (1996)中所述。在另一方法(在本文中稱作CDR之「構象定義」)中，CDR之位置可鑑別為對抗原結合具有焓貢獻之殘基。例如，參見Makabe等人，Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166, 2008。其他CDR邊界定義可不嚴格地遵循上述方法中之一者，但將與Kabat CDR之至少一部分重疊，儘管其可根據特定殘基或殘基群或甚至整個CDR不顯著地影響抗原結合之預測或實驗發現來縮短或延長。如本文所用，CDR可係指藉由業內已知之任一方法(包括方法之組合)定義之CDR。本文所用方法可利用根據該等方法中之任一者定義之CDR。對於本文所述PTK7抗體-藥物結合物而言，CDR可根據Kabat、Chothia、延伸、VBASE2、AbM、接觸及/或構象定義中之任一者定義。

在本發明之其他態樣中，PTK7抗體或其抗原結合片段包括抗體之一或多個CDR (例如1、2、3、4、5或所有6個CDR)。

對於本發明而言，下表1中所述之hu23、hu24及hu58之CDR (SEQ ID NOS: 1-72)係使用Kabat及Chothia衍生。如PCT國際公開案第WO 2012/112943號(其以引用方式併入本文中)之圖6中所述之CDR係衍生自VBASE2資料庫之分析。因此，具有由該術語定義之CDR之抗體明確包括於本發明之範疇內。更廣泛地，術語「可變區CDR胺基酸殘基」包括如藉由使用上述任何基於序列或結構之方法鑑別之CDR中的胺基酸。

在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括具有hu23抗體之CDR之抗體或其抗原結合片段。舉例而言，PTK7抗體-藥物結合物可包括包括至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個重鏈可變區具有三個闡述為SEQ ID

NO: 3、7及11之CDR。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個輕鏈可變區具有三個闡述為SEQ ID NO: 17、19及21之CDR。本發明之PTK7抗體-藥物結合物亦可包括包括以下之抗體或其抗原結合片段：(a) 具有三個闡述為SEQ ID NO: 3、7及11之CDR之重鏈可變區；及(b) 具有三個闡述為SEQ ID NO: 17、19及21之CDR之輕鏈可變區。

在本發明之再一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括抗體或其抗原結合片段，其具有一或多個根據Chothia定義或衍生自VBASE2資料庫之分析之hu23 CDR。舉例而言，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個重鏈可變區包括三個由Chothia定義之hu23 CDR (參見表1)或三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu23 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)。作為另一實例，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個輕鏈可變區包括三個由Chothia定義之hu23 CDR (參見表1)或三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu23 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)。在本發明之一些態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有以下之抗體或其抗原結合片段：(a) 具有三個根據Chothia定義之hu23 CDR之重鏈可變區(參見表1)；及(b) 具有三個根據Chothia定義之hu23 CDR (參見表1)之輕鏈可變區。在本發明之一些態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有以下之抗體或其抗原結合片段：(a)包括三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu23 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)之重鏈可變區；及(b) 包括三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu23 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)之輕

鏈可變區。

在本發明之其他態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括具有hu24抗體之CDR之抗體或其抗原結合片段。舉例而言，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個重鏈可變區包括三個闡述為SEQ ID NO: 27、31及35之CDR。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個輕鏈可變區包括三個闡述為SEQ ID NO: 41、43及45之CDR。本發明之PTK7抗體-藥物結合物亦可包括(a)具有三個闡述為SEQ ID NO: 27、31及35之CDR之重鏈可變區；及(b)具有三個闡述為SEQ ID NO: 41、43及45之CDR之輕鏈可變區。

在本發明之其他態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括抗體或其抗原結合片段，其具有一或多個根據Chothia定義或衍生自VBASE2資料庫之分析之hu24 CDR。舉例而言，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個重鏈可變區包括三個由Chothia定義之hu24 CDR (參見表1)或三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu24 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)。作為另一實例，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個輕鏈可變區包括三個由Chothia定義之hu24 CDR (參見表1)或三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu24 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)。在本發明之一些態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有以下之抗體或其抗原結合片段：(a) 具有三個根據Chothia定義之hu24 CDR (參見表1)之重鏈可變區；及(b) 具有三個根據Chothia定義之hu24 CDR (參見表1)之輕鏈可變區。在本發明之一些態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結

合物可包括具有以下之抗體或其抗原結合片段：(a) 包括三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu24 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)之重鏈可變區；及(b) 包括三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu24 CDR (參見PCT國際公開案第WO 2012/112943號)之輕鏈可變區。

在本發明之其他態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括具有hu58抗體之CDR之抗體或其抗原結合片段。舉例而言，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個重鏈可變區包括三個闡述為SEQ ID NO: 51、55及59之CDR。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個輕鏈可變區包括三個闡述為SEQ ID NO: 65、67及69之CDR。本發明之PTK7抗體-藥物結合物亦可包括(a)具有三個闡述為SEQ ID NO: 51、55及59之CDR之重鏈可變區；及(b)具有三個闡述為SEQ ID NO: 65、67及69之CDR之輕鏈可變區。

在本發明之其他態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括抗體或其抗原結合片段，其具有一或多個根據Chothia定義或衍生自VBASE2資料庫之分析之hu58 CDR。舉例而言，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個重鏈可變區包括三個由Chothia定義之hu58 CDR或三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu58 CDR。作為另一實例，PTK7抗體-藥物結合物可包括具有至少一個重鏈可變區及至少一個輕鏈可變區之抗體或其抗原結合片段，其中至少一個輕鏈可變區包括三個由Chothia定義之hu58 CDR或三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu58 CDR。在本發明之一些態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有以下之抗體或其抗原結合片段：(a) 具有三個根據Chothia

定義之hu58 CDR之重鏈可變區；及(b) 具有三個根據Chothia定義之hu58 CDR之輕鏈可變區。在本發明之一些態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有以下之抗體或其抗原結合片段：(a) 包括三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu58 CDR之重鏈可變區；及(b) 包括三個衍生自VBASE2資料庫之分析之hu24 CDR之輕鏈可變區。

在本發明之一些態樣中，用於製備本發明之PTK7抗體-藥物結合物之抗體將為單株抗體。術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群體獲得之抗體，即，除可能存在極少量天然存在之突變外，構成該群體之個別抗體均相同。單株抗體具有高度特異性，其針對一單個抗原性位點。此外，與通常包括針對不同決定子(表位)之不同抗體之多株抗體製劑不同，每一單株抗體針對抗原上之單一決定子。修飾詞「單株」指示抗體之特徵在於自實質上同源之抗體群體獲得，且不應理解為需要藉由任一特定方法來產生該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由首先由Kohler及Milstein, Nature 256:495-497 (1975)闡述之雜交瘤方法製得或可藉由(例如)美國專利第4,816,567號中闡述之重組DNA方法製得。單株抗體亦自使用(例如) McCafferty等人，Nature 348:552-554 (1990)中所述之技術生成之噬菌體文庫分離。

在本發明之一些態樣中，用於製備本發明之抗體-藥物結合物之抗體可為單價，即每分子具有一個抗原結合位點(例如，IgG或Fab)。在一些情況下，單價抗體可具有一個以上抗原結合位點，但該等結合位點係來自不同抗原。在本發明之一些態樣中，本發明之抗體-藥物結合物之抗體或其抗原結合片段可包括「二價抗體」，即，每分子具有兩個抗原結合位點(例如，IgG)。在一些情況下，兩個結合位點具有相同抗原特異性。或者，二價抗體可具有雙特異性。「雙特異性」、「雙重特異性」或「雙功能」抗體係具有兩個不同抗原結合位

點之雜合抗體。雙特異性抗體之兩個抗原結合位點結合至兩個可駐留於相同或不同蛋白質靶標上之不同表位。

術語「嵌合抗體」欲指其中部分或全部可變區序列係衍生自一種物種且恆定區序列係衍生自另一物種之抗體，例如其中可變區序列係衍生自小鼠抗體且恆定區序列係衍生自人類抗體之抗體。

如本文所用，「人類化」或「CDR移植」抗體係指非人類(例如鼠類)抗體之形式，其係含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$或抗體之其他抗原結合序列)。較佳地，人類化抗體係人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者之一或多個互補決定區(CDR)之殘基經來自諸如小鼠、大鼠或兔等非人類物種(供體抗體)之一或多個CDR且具有期望特異性、親和力及能力的殘基置換。

在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv框架區(FR)殘基由相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包括既不於抗體中亦不於導入CDR或框架序列中發現、但經包括以進一步改進並優化抗體性能之殘基。一般而言，人類化抗體將包括實質上全部的至少一個、且通常兩個可變結構域，其中全部的或實質上全部的CDR區對應於非人類免疫球蛋白之CDR區，且全部的或實質上全部的FR區係人類免疫球蛋白一致序列之FR區。人類化抗體最佳亦包括至少一部分免疫球蛋白恆定區或結構域(Fc) (通常為人類免疫球蛋白之恆定區或結構域)。在本發明之一些態樣中，抗體具有如PCT國際公開案第WO 99/58572號中所述修飾之Fc區。其他形式之人類化抗體具有一或多個可關於原始抗體改變之CDR (CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2或CDR H3)，其亦稱作一或多個「衍生自」原始抗體之一或多個CDR的CDR。

人類化可基本上遵循Winter及同事之方法(Jones等人，Nature

321:522-525 (1986)；Riechmann等人，Nature 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等人，Science 239:1534-1536 (1988))藉由用齧齒類動物或突變齧齒類動物CDR或CDR序列取代人類抗體之相應序列實施。亦參見美國專利第5,225,539號、第5,585,089號、第5,693,761號、第5,693,762號、第5,859,205號，其全文以引用方式併入本文中。在一些情況下，人類免疫球蛋白之一或多個可變區之框架區內之殘基由相應非人類殘基置換(例如，參見美國專利第5,585,089號、第5,693,761號、第5,693,762號及第6,180,370號)。此外，人類化抗體可包括未在接受者抗體或供體抗體中發現之殘基。進行該等修飾以進一步改進抗體性能(例如，以獲得期望親和力)。一般而言，人類化抗體將包括實質上全部的至少一個、且通常兩個可變結構域，其中全部的或實質上全部的超變區對應於非人類免疫球蛋白之超變區，且全部的或實質上全部的框架區係人類免疫球蛋白序列之框架區。人類化抗體視情況亦包括免疫球蛋白恆定區(Fc) (通常為人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。關於進一步詳情，參見Jones等人 Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann等人 Nature 332:323-327 (1988)；及Presta Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)；其全文以引用方式併入本文中。因此，該等「人類化」抗體可包括其中實質上小於一個完整人類可變結構域已由來自非人類物種之相應序列取代的抗體。實際上，人類化抗體通常為人類抗體，其中一些CDR殘基及可能一些框架殘基由來自齧齒類動物抗體中類似位點的殘基取代。例如，參見美國專利第5,225,539號、第5,585,089號、第5,693,761號、第5,693,762號、第5,859,205號。亦參見美國專利第6,180,370號及PCT國際公開案第WO 01/27160號，其中揭示人類化抗體及產生對預定抗原具有改良親和力之人類化抗體的技術。

「重組人類抗體」或「完全人類抗體」係指具有對應於由人類

產生及/或使用熟習此項技術者已知或本文揭示之製備人類抗體之技術中之任一者製備之抗體之胺基酸序列之胺基酸序列的彼等抗體。人類抗體之此定義包括具有至少一種人類重鏈多肽或至少一種人類輕鏈多肽之抗體。一個該實例係具有鼠類輕鏈及人類重鏈多肽之抗體。人類抗體可使用業內已知之各種技術製備。舉例而言，人類抗體係選自噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表現人類抗體(Vaughan等人，Nature Biotechnology, 14:309-314, (1996)；Sheets等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162, (1998)；Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227(2):381-388 (1992)；Marks等人，J. Mol. Biol., 222(3):581-597 (1991))。人類抗體亦可藉由對動物進行免疫製得，已向該等動物中以轉基因方式引入人類免疫球蛋白基因座代替內源性基因座，例如其中內源性免疫球蛋白基因經部分或完全滅活之小鼠。此方法闡述於美國專利第5,545,807號、第5,545,806號、第5,569,825號、第5,625,126號、第5,633,425號及第5,661,016號中。或者，人類抗體可藉由使產生針對靶抗原之抗體之人類B淋巴球(該等B淋巴球可自個體或自cDNA之單一細胞選殖回收，或可在活體外經免疫)無限增殖製備。參見(例如) Cole等人 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 第77頁, (1985)；Boerner等人，J. Immunol., 147 (1):86-95, (1991)；及美國專利第5,750,373號。

本發明抗體可使用業內熟知之技術(例如，重組技術、噬菌體展示技術、合成技術或該等技術之組合或業內易知之其他技術)產生(例如，參Jayasena, S.D., *Clin. Chem*., 45: 1628-50 (1999)及Fellouse, F.A.等人，*J. MoI. Biol*., 373(4):924-40 (2007))。額外指南可參見Sambrook J.及Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)；Ausubel等人，*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of*

Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons公司(2002)；Harlow及Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998)；及Coligan等人，*Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons公司(2003)。代表性方法亦闡述於下文實例1中。

一般而言，對於雜交瘤細胞系之產生，宿主動物之免疫之途徑及排程表通常與用於抗體刺激及產生之確立之習用技術一致。預計任何哺乳動物個體(包括人類或自其產生抗體之細胞)可經操縱以用作用於產生哺乳動物(包括人類及雜交瘤細胞系)之基礎。通常，經腹膜內、肌內、經口、皮下、足蹠及/或真皮內向宿主動物接種一定量之免疫原(包括如本文所述免疫原)。

雜交瘤可自淋巴球及無限增殖之骨髓瘤細胞使用Kohler, B.及Milstein, C., Nature 256:495-497, 1975或如由Buck, D. W.,等人，In Vitro, 18:377-381, 1982修飾之一般體細胞雜交技術來製備。可獲得之骨髓瘤系(包括但不限於 X63-Ag8.653及彼等來自Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA者)可用於雜交。通常，該技術涉及使用融合劑(例如聚乙二醇)或藉由熟習此項技術者熟知之電構件融合骨髓瘤細胞及淋巴細胞。在融合後，自融合培養基分離細胞並使其在選擇性生長培養基(例如次黃嘌呤-胺喋呤-胸苷(HAT)培養基)中生長以消除未雜交之親代細胞。補充有或沒有血清之本文所述培養基中之任一者皆可用於培養分泌單株抗體之雜交瘤。作為細胞融合技術之另一替代方案，EBV無限增殖之B細胞可用於產生本發明之PTK7單株抗體。使雜交瘤擴增並亞選殖，若期望，並藉由習用免疫分析程序(例如，放射免疫分析、酶免疫分析或螢光免疫分析)分析上清液之抗免疫原活性。可用作抗體之來源之雜交瘤涵蓋產生對PTK7具有特異性之單株抗體或其部分之親代雜交瘤的所有衍生物、後代細胞。

可使用已知程序使產生該等抗體之雜交瘤在活體外或活體內生長。若期望，可藉由習用免疫球蛋白純化程序(例如硫酸銨沈澱、凝膠電泳、透析、層析及超濾)自培養基或體液分離單株抗體。可藉由(例如)使製劑流經由附接至固相之免疫原製得之吸附劑並自免疫原溶析或釋放期望抗體移除不期望活性(若存在)。用人類PTK7或含有結合至在欲免疫物種中具有免疫原性之蛋白質(例如，鑰孔帽貝血藍蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑)之靶標胺基酸序列之片段使用雙功能試劑或衍生劑(例如，馬來醯亞胺基苯甲醯基磺基琥珀醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基結合)、N-羥基琥珀醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、琥珀酸酐、$SOCl_2$或$R^1N=C=NR$ (其中R及R^1係不同烷基)對宿主動物進行免疫可產生抗體(例如，單株抗體)之群體。

若期望，可對所關注PTK7抗體(單株或多株)進行測序且隨後可將多核苷酸序列選殖至載體中用於表現或繁殖。可將編碼所關注抗體之序列維持於宿主細胞中之載體中且隨後可使宿主細胞擴增並冷凍用於將來使用。可藉由業內已知之方式經由自B細胞選殖抗體基因在細胞培養中產生重組單株抗體。參見(例如) Tiller等人，J. Immunol. Methods 329:112-124 (2008)；美國專利第7,314,622號。

「宿主細胞」包括可為或已為載體接受者之個別細胞或細胞培養物，該(等)載體用於納入多核苷酸插入物。宿主細胞包括單一宿主細胞之子代，且子代可因天然、偶然或特意突變而未必與初始親代細胞完全相同(在形態上或在基因組DNA互補上)。宿主細胞包括在活體內經本發明之多核苷酸轉染之細胞。

術語「載體」意指能夠遞送且較佳表現宿主細胞中一或多個所關注基因或序列之構築體。載體之實例包括(但不限於)病毒載體、裸DNA或RNA表現載體、質體、黏粒或噬菌體載體、與陰離子縮合劑相

關之DNA或RNA表現載體、囊封於脂質體中之DNA或RNA表現載體及某些真核細胞(例如產生細胞)。

術語「表現控制序列」意指引導核酸轉錄之核酸序列。表現控制序列可為啟動子(例如組成型或可誘導型啟動子)或增強子。表現控制序列以操作方式連接至欲轉錄之核酸序列。

或者，多核苷酸序列可用於遺傳操縱以「人類化」抗體或改良抗體之親和力或其他特徵。舉例而言，若抗體用於人類中之臨床試驗及治療中，則恆定區可經改造以更接近類似於人類恆定區以避免免疫反應。可期望遺傳操縱抗體序列以獲得針對PTK7之更大親和力及抑制PTK7之更大效能。

存在四個可用於人類化單株抗體之一般步驟：(1) 測定起始抗體輕及重可變結構域之核苷酸及預測胺基酸序列，(2) 設計人類化抗體，即，決定在人類化過程期間使用何種抗體框架區，(3) 實際人類化方法/技術及(4) 人類化抗體之轉染並表現。參見(例如)美國專利第4,816,567號、第5,807,715號、第5,866,692號、第6,331,415號、第5,530,101號、第5,693,761號、第5,693,762號、第5,585,089號及第6,180,370號。

可使用多種方法中之任一者(包括鑲飾(veneering)、互補決定區(CDR)之移植、縮短CDR之移植、特異性決定區(SDR)之移植及弗蘭肯斯坦組裝(Frankenstein assembly)，如下文所述)製備人類化抗體。人類化抗體亦包括超人類化抗體，其中已在CDR中引入一或多個變化。舉例而言，可用人類殘基取代CDR中之非人類殘基。可將該等一般方法與標準誘變及合成技術組合以產生任何期望序列之抗-PTK7抗體。

鑲飾係基於以下概念：藉由用人類胺基酸序列對抗體之可及外部進行表面重修來減少齧齒類動物或其他非人類抗體中之潛在免疫原

性胺基酸序列。因此，經鑲飾抗體相對於人類細胞似乎較未經修飾之非人類抗體具有較少外來性。參見Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-98。藉由鑑別非人類抗體中暴露之外部框架區殘基(其不同於人類抗體之框架區中之相同位置處的殘基)並用通常佔據人類抗體中之該等相同位置之胺基酸置換經鑑別殘基來鑲飾非人類抗體。

CDR移植係藉由用供體抗體(例如非人類抗體)之CDR置換受體抗體(例如，人類抗體或具有期望框架殘基之其他抗體)之一或多個CDR來實施。可基於候選受體抗體與供體抗體之間框架殘基之類似性來選擇受體抗體。舉例而言，根據弗蘭肯斯坦方法，將人類框架區鑑別為與相關非人類抗體之各框架區具有實質序列同源性，且將非人類抗體之CDR移植至不同人類框架區之複合物上。亦可用於製備本發明抗體之相關方法闡述於美國專利第7,321,026號中。

縮短CDR之移植係相關方法。縮短CDR包括特異性決定殘基及毗鄰胺基酸，包括輕鏈中位置27d-34、50-55及89-96處之胺基酸及重鏈中位置31-35b、50-58及95-101處之胺基酸(Kabat等人(1987)之編號慣例)。參見(Padlan等人 (1995) *FASEB J.* 9: 133-9)。特異性決定殘基(SDR)移植係依據以下理解：抗體組合位點之結合特異性及親和力係由各互補決定區(CDR)內最高度可變殘基來決定。可使用抗體-抗原複合物之三維結構之分析以及可用胺基酸序列數據之分析基於CDR內各位置處存在之胺基酸殘基的結構差異對序列可變性建模。將SDR鑑別為由接觸殘基組成之具有最小免疫原性的多肽序列。參見Padlan等人(1995) *FASEB J.* 9: 133-139。

一般而言，人類受體框架係基於其實質上類似於供體抗體之框架區或其最類似於可變區亞家族之共有序列加以選擇。在移植後，可在供體及/或受體序列中進行額外改變以使抗體結合、功能、密碼子使用、表現程度等最佳化，包括向框架區中引入非人類殘基。參見

(例如) PCT國際公開案第WO 91/09967號。

對於將CDR移植至重鏈可變框架區上，有用之框架序列可衍生自DP-21 (VH7)、DP-54 (VH3-07)、DP-47 (VH3-23)、DP-53 (VH-74)、DP-49 (VH3-30)、DP-48 (VH3-13)、DP-75、DP-8(VH1-2)、DP-25、VI-2b及VI-3 (VH1-03)、DP-15及V1-8 (VH1-08)、DP-14及V1-18 (VH1-18)、DP-5及V1-24P (VH1-24)、DP-4 (VH1-45)、DP-7 (VH1-46)、DP-10、DA-6及YAC-7 (VH1-69)、DP-88 (VH1-e)、DP-3及DA-8 (VH1-f)。對於將CDR移植至輕鏈可變區框架區上，有用之框架序列可衍生自DPK24亞組IV種系純系、Will亞組(DPK23、DPK22、DPK20、DPK21)或VκI亞組種系純系(DPK9、DPK1、O2、DPK7)。

可藉由如上所述重組方法(即，單一或融合多肽)或藉由化學合成藉由抗體之蛋白水解或其他降解產生抗原結合片段或抗體片段。藉由化學合成便捷地製備抗體之多肽、尤其至多約50個胺基酸之較短多肽。化學合成方法為業內已知且有市售。舉例而言，可藉由採用固相方法之自動化多肽合成器產生抗體或抗體片段。亦參見美國專利第5,807,715號、第4,816,567號及第6,331,415號。

在本發明之其他態樣中，PTK7抗體-藥物結合物包括抗體或其抗原結合片段，其具有hu23、hu24或hu58重鏈及/或輕鏈可變區或實質上類似於hu23、hu24或hu58重鏈或輕鏈可變區之可變區。

如施用於多肽之術語「實質一致性」或「實質類似性」意指兩個胺基酸序列在藉由(例如)程式GAP或BESTFIT使用如與程式一起供應之缺省空位權重最佳比對時共享至少70%、75%或80%序列一致性、較佳至少90%或95%序列一致性且更佳至少97%、98%或99%序列一致性。在一些實質上類似之胺基酸序列中，不一致之殘基位置因保守胺基酸取代而不同。

實質上類似之多肽亦包括經保守取代之變體，其中一或多個殘

基經功能上類似之殘基保守取代。保守取代之實例包括用一個非極性(疏水)殘基(例如異白胺酸、纈胺酸、白胺酸或甲硫胺酸)取代另一者；用一個極性(親水)殘基取代另一者，例如精胺酸與離胺酸之間之取代、麩醯胺酸與天冬醯胺之間之取代、甘胺酸與絲胺酸之間之取代；用一個鹼性殘基(例如離胺酸、精胺酸或組胺酸)取代另一者；或用以個酸性殘基(例如天冬胺酸或麩胺酸)取代另一者。

兩種蛋白質實質上相同之進一步指示在於其共享整體三維結構，或係生物功能等效物。

在本發明之一些態樣中，結合至PTK7之抗體-藥物結合物包括具有闡述為SEQ ID NO: 1、25或49中之任一者之重鏈可變區及/或闡述為SEQ ID NO: 15、39或63中之任一者之輕鏈可變區的抗體或其抗原結合片段。舉例而言，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有具有與SEQ ID NO: 1至少90%一致之胺基酸序列之重鏈可變區及具有與SEQ ID NO: 15至少90%一致之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體或其抗原結合片段；或具有闡述為SEQ ID NO: 1之重鏈可變區及具有闡述為SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體或其抗原結合片段。作為另一實例，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有具有與SEQ ID NO: 25至少90%一致之胺基酸序列之重鏈可變區及具有與SEQ ID NO: 39至少90%一致之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體或其抗原結合片段；或具有闡述為SEQ ID NO: 25之重鏈可變區及具有闡述為SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體或其抗原結合片段。作為另一實例，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可包括具有具有與SEQ ID NO: 49至少90%一致之胺基酸序列之重鏈可變區及具有與SEQ ID NO: 63至少90%一致之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體或其抗原結合片段；或具有闡述為SEQ ID NO: 49之重鏈可變區及具有闡述為SEQ ID NO: 63之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體或其抗原結

合片段。

抗體亦可在(例如)重鏈及/或輕鏈之可變結構域中經修飾以(例如)改變抗體之結合性質。舉例而言，在可一或多個CDR區進行突變以增加或減少抗體對PTK7之K_D、增加或減少K_{off}或改變抗體之結合特異性。定點誘變中之技術為業內所熟知。參見(例如) Sambrook等人及Ausubel等人，上文文獻。

亦可在框架區或恆定區中進行修飾或突變以增加PTK7抗體之半衰期。參見(例如) PCT國際公開案第WO 00/09560號。亦可在框架區或恆定區中進行突變以改變抗體之免疫原性、提供共價或非共價結合至另一分子之位點或改變作為補體固定、FcR結合及抗體依賴性介導之細胞毒性之該等性質。根據本發明，單一抗體可在可變結構域之CDR或框架區中之一或多者中或在恆定區中具有突變。

在稱作「種系化」之過程中，VH及VL序列中之某些胺基酸可經突變以匹配種系VH及VL序列中天然發現之胺基酸。具體而言，VH及VL序列中之框架區之胺基酸序列可經突變以匹配種系序列以降低在投與抗體時免疫原性之風險。如本文所用術語「種系」係指抗體基因及基因區段之核苷酸序列及胺基酸序列，此乃因其係經由生殖細胞自親代傳遞至後代。此種系序列不同於編碼成熟B細胞中之抗體之核苷酸序列，該等成熟B細胞在B細胞成熟期間藉由組合及高度突變事件得以改變。「利用」特定種系之抗體具有與種系核苷酸序列或與其指定之胺基酸序列最緊密比對之核苷酸或胺基酸序列。與種系序列相比，該等抗體通常經突變。人類VH及VL基因之種系DNA序列為業內已知(例如，參見the 「Vbase」 human germline sequence database；亦參見Kabat, E. A.,等人，1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號；Tomlinson等人，J. Mol. Biol.

227:776-798, 1992；及Cox等人，Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994。

可進行之另一類型之胺基酸取代係移除抗體中之潛在蛋白水解位點。該等位點可在可變結構域之CDR或框架區或抗體之恆定區中出現。半胱胺酸殘基之取代及蛋白水解位點之移除可降低抗體產物中之異質性之風險且因此增加其均質性。另一類型之胺基酸取代係藉由改變一個或兩個殘基消除天冬醯胺-甘胺酸對，該等對形成潛在去醯胺位點。在另一實例中，本發明之PTK7抗體之重鏈之C-末端離胺酸可經裂解。在本發明之各個態樣中，PTK7抗體之重鏈及輕鏈可視情況包括信號序列。

為表現本發明之PTK7抗體，可使用上述方法中之任一者首先獲得編碼VH及VL區之DNA片段。如業內所知，「多核苷酸」、「核酸/核苷酸」及「寡核苷酸」在本文中可互換使用，且包括任何長度之聚合形式之核苷酸(去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)、其類似物或可藉由DNA或RNA聚合酶納入鏈中之任何受質。多核苷酸可具有任何三維結構，且可實施任何已知或未知功能。以下係多核苷酸之非限制性實例：基因或基因片段、外顯子、內含子、信使RNA (mRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、核酶、DNA、cDNA、基因體DNA、重組多核苷酸、具支鏈多核苷酸、質體、載體、任何序列之經分離DNA、任何序列之經分離RNA、核酸探針及引子。多核苷酸可天然存在、合成、重組或其任一組合。多核苷酸可包括經修飾核苷酸，例如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，可在組裝鏈之前或之後賦予對核苷酸結構之修飾。非核苷酸組份可中斷核苷酸序列。多核苷酸可在聚合後藉由(例如)與標記組份結合經進一步修飾。其他類型之修飾包括(例如) 「帽子」、用類似物取代天然核苷酸中之一或多者、核苷酸間修飾，例如彼等具有不帶電連接(例如，膦酸甲基酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等)及具有帶電連接(例如，硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)

者、彼等含有側接部分(例如，蛋白質(例如，核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚-L-離胺酸等)者、彼等具有嵌入劑(例如，吖啶、補骨脂素等)者、彼等含有螯合劑(例如，金屬、放射性金屬、硼、氧化金屬等)者、彼等含有烷基化劑者、彼等具有經修飾連接(例如，α變旋異構核酸等)者以及多核苷酸之未經修飾形式。此外，通常在糖中存在之羥基中之任一者皆可由(例如)膦酸酯基團、磷酸基團置換，由標準保護基團保護，或經活化以製備與額外核苷酸之額外連接，或可結合至固體載體。5’及3’末端OH可經胺或1至20個碳原子之有機封端基團部分磷酸化或取代。其他羥基亦可衍生化成標準保護基團。多核苷酸亦可含有通常業內已知之核糖或去氧核糖糖之類似形式，包括(例如) 2’-O-甲基-、2’-O-烯丙基、2’-氟-或2’-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、α-或β-變旋異構糖、差向異構糖(例如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖)、吡喃糖糖、呋喃糖糖、景天庚酮糖、非環類似物及無鹼基核苷類似物(例如甲基核苷)。一或多個磷酸二酯連接可由替代連接基團置換。該等替代連接基團包括(但不限於)如下特徵：其中磷酸酯由P(O)S(「硫代酯」)、P(S)S (「二硫代酯」)、(O)NR_2 (「醯胺化物」)、P(O)R、P(O)OR’、CO或CH_2 (「甲乙縮醛」)置換，其中每一R或R’皆獨立地係H或視情況含有醚(-O-)連接之經取代或未經取代之烷基(1-20個C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基(araldyl)。多核苷酸中之所有連接並不需要皆相同。前述說明適於本文中提及之所有多核苷酸，包括RNA及DNA。

編碼抗-PTK7抗體重鏈及輕鏈可變區之代表性DNA闡述為SEQ ID NO: 2 (hu23 VH DNA)、SEQ ID NO: 16 (hu23 VL DNA)、SEQ ID NO: 26 (hu24 VH DNA)、SEQ ID NO: 40 (hu24 VL DNA)、SEQ ID NO: 50 (hu58 VH DNA)及SEQ ID NO: 64 (hu58 VL DNA)。編碼抗-PTK7抗體重鏈及輕鏈之代表性DNA闡述為SEQ ID NO: 14 (hu23 HC DNA)、

SEQ ID NO: 24 (hu23 LC DNA)、SEQ ID NO: 38 (hu24 HC DNA)、SEQ ID NO: 48 (hu24 LC DNA)、SEQ ID NO: 62 (hu58 HC DNA)及SEQ ID NO: 72 (hu58 LC DNA)。

亦可使用彼等熟習此項技術者已知之標準方法向hu23、hu24及hu58 DNA序列中引入各種修飾(例如突變、取代、缺失及/或添加)。舉例而言，可使用標準方法(例如PCR介導之誘變)實施誘變，其中向PCR引子中納入突變核苷酸，使得PCR產物含有期望突變或定點誘變。

因此，基於本申請案之揭示內容，熟習此項技術者應容易地識別實質上類似於hu23、hu24及hu58 DNA之DNA之序列。術語「實質類似性」或「實質序列類似性」在指核酸或其片段時意指，在與另一核酸(或其互補鏈)最佳比對時(其中適當插入或缺失核苷酸)，在至少約85%、較佳至少約90%且更佳至少約95%、96%、97%、98%或99%之核苷酸鹼基中存在核苷酸序列一致性，如藉由序列一致性之任何熟知算法(例如FASTA、BLAST或Gap)所量測。

術語「序列一致性%」在核酸序列上下中意指兩個序列中之殘基在針對最大對應比對時相同。序列一致性比較之長度可超過至少約9個核苷酸、通常至少約18個核苷酸、更通常至少約24個核苷酸、典型地至少約28個核苷酸、更典型地至少約32個核苷酸且較佳至少約36、48或更多個核苷酸之鏈段。存在多種業內已知可用於量測核苷酸序列一致性之不同算法。舉例而言，可使用FASTA、Gap或Bestfit (其係Wisconsin Package 10.0版, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin中之程式)比較多核苷酸序列。FASTA (其包括(例如)程式FASTA2及FASTA3)提供詢問與搜索序列之間之最佳重疊之區的比對及序列一致性% (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990)；Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000)；Pearson, Methods

Enzymol. 266:227-258 (1996)；Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998)；其全文以引用方式併入本文中)。除非另外規定，否則針對特定程式或算法使用缺省參數。舉例而言，可使用FASTA與其缺省參數(對於分值矩陣而言，6之字長及NOPAM因子)或使用Gap與其缺省參數(如GCG 6.1版中所提供，其全文以引用方式併入本文中)測定核酸序列之間之序列一致性%。

兩個核酸序列實質上相同之進一步指示在於由核酸編碼之蛋白質實質上相同，共享整體三維結構，或係生物功能等效物。該等術語在下文中進一步加以定義。若相應蛋白質實質上相同，則在嚴格條件下彼此不雜交之核酸分子仍實質上相同。此可在(例如)兩個核苷酸序列包含如由遺傳代表允許之保守取代之變體時發生。

保守取代之變體係具有簡併密碼子取代之核酸序列，其中一或多個所選(或全部)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代。參見Batzer等人(1991) Nucleic Acids Res. 19:5081；Ohtsuka等人(1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608；及Rossolini等人(1994) Mol. Cell Probes 8:91-98。

(例如)可進行之一種類型之取代係將抗體中一或多個可具有化學反應性之半胱胺酸變為另一殘基(例如但不限於，丙胺酸或絲胺酸)。舉例而言，可存在非正準半胱胺酸之取代。該取代可在可變結構域之CDR或框架區中或抗體之恆定區中進行。作為另一實例，半胱胺酸可為正準的。

在獲得編碼本發明之VH及VL區段之DNA片段後，該等DNA片段可藉由重組DNA技術經進一步操縱以(例如)將可變區轉化成全長抗體鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。在該等操縱中，VL-或VH-編碼DNA片段以操作方式連接至編碼另一蛋白質之另一DNA片段，例如抗體恆定區或撓性連接體。如本上下文中使用之術語「以操作方式連

接」欲指兩個DNA片段結合，使得由該兩個DNA片段編碼之胺基酸序列保持在框架內。

可藉由將VH-編碼DNA以操作方式連接至編碼重鏈恆定區(CH1、CH2及CH3)之另一DNA分子將編碼VH區之經分離DNA轉化成全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列為業內已知(例如，參見Kabat, E. A.,等人，1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)且可藉由標準PCR擴增獲得涵蓋該等區之DNA片段。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但最佳係IgG1或IgG2恆定區。IgG恆定區序列可為已知在不同個體中出現之各種等位基因或異型中之任一者，例如Gm(1)、Gm(2)、Gm(3)及Gm(17)。該等異型代表IgG1恆定區中之天然胺基酸取代。對於Fab片段重鏈基因而言，可將VH-編碼DNA以操作方式連接至僅編碼重鏈CH1恆定區之另一DNA分子。CH1重鏈恆定區可衍生自重鏈基因中之任一者。

可藉由將編碼VL之DNA以操作方式連接至編碼輕鏈恆定區CL之另一DNA分子，將編碼VL區之經分離DNA轉化成全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列為業內已知(例如，參見Kabat, E. A.等人，1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)且可藉由標準PCR擴增法獲得涵蓋該等區之DNA片段。輕鏈恆定區可為κ或λ恆定區。κ恆定區可為已知在不同個體中出現之各種等位基因中之任一者，例如Inv(1)、Inv(2)及Inv(3)。λ恆定區可衍生自三個λ基因中之任一者。

為產生scFv基因，將編碼VH及VL之DNA片段以操作方式連接至編碼撓性連接體之另一片段，使得VH及VL序列可呈鄰接單鏈蛋白質

表現，其中VL及VH區由撓性連接體結合(參見(例如) Bird等人，1988, Science 242:423-426；Huston等人，1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；McCafferty等人，1990, Nature 348:552-554)。僅若使用單一VH及VL，則單鏈抗體可為單價，若使用兩個VH及VL則為二價，或若使用兩個以上VH及VL則為多價。可產生特異性結合至PTK7及另一分子之雙特異性或多價抗體。

在本發明之另一態樣中，可製備融合抗體或免疫黏附素，其包括連接至另一多肽之本發明之PTK7抗體之全部或一部分。在另一態樣中，僅PTK7抗體之可變結構域連接至多肽。在另一態樣中，PTK7抗體之VH結構域連接至第一多肽，而PTK7抗體之VL結構域連接至第二多肽，該第二多肽與第一多肽之締合方式使得VH及VL結構域可彼此相互作用以形成抗原結合位點。在另一態樣中，藉由連接體分隔VH結構域與VL結構域，使得VH及VL結構域可彼此相互作用。隨後使VH-連接體- VL抗體連接至所關注多肽。另外，可產生兩種(或更多種)單鏈抗體彼此連接之融合抗體。若希望在單一多肽鏈上產生二價或多價抗體或若希望產生雙特異性抗體，則適用此作法。

可使用編碼核酸分子之PTK7抗體製備其他經修飾抗體。舉例而言，可使用標準分子生物技術遵循說明書之教示製備「κ體」 (Ill等人，Protein Eng. 10:949-57, 1997)、「微小抗體」 (Martin等人，EMBO J., 13:5303-9, 1994)、「二價抗體」 (Holliger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993)或「鉀努星(Janusin)」(Traunecker等人，EMBO J. 10:3655-3659, 1991及Traunecker等人，Int. J. Cancer (增刊) 7:51-52, 1992)。

可藉由多種方法(包括雜交瘤之融合或Fab'片段之連接)產生雙特異性抗體或抗原結合片段。參見(例如)Songsivilai及Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990, Kostelny等人，J. Immunol.

148:1547-1553, 1992。另外，雙特異性抗體可以「二價抗體」或「鉀努星」形式形成。在本發明之一些態樣中，雙特異性抗體結合至PTK7之兩個不同表位。在其他態樣中，上述經修飾抗體係使用來自本文所提供PTK7抗體之可變結構域或CDR區中之一或多者製備。

對於用於抗體-藥物結合物而言，本文所述PTK7抗體可實質上純，即，至少50%純(即，無雜質)、更佳至少90%純、更佳至少95%純、仍更佳至少98%純且最佳至少99%純。

表1提供本發明之人類化抗-PTK7抗體之胺基酸(蛋白質)序列及相關核酸(DNA)序列。

如由Kabat及Chothia定義之hu23 VH、hu23 VL、hu24 VH、hu24 VL、hu58 VH及hu58 VL之CDR闡述為單獨序列。

表1.人類化抗-PTK7抗體之序列.

SEQ ID NO.	說明	序列
1	hu23 VH 蛋白質	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSNMGVG WIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYSPSLKSRLTIT KDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCVRSNYGYA WFAYWGQGTLVTVSS
2	hu23 VH DNA	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGG TGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCAC CTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATGG GTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGC CCTGGAGTGGCTTGCACACATTTGGTGGGATGAT GATAAGTACTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGC TCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGT GGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGTTCGAAGTAACTATG

		GTTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTTCA
3	hu23 VH CDR1 蛋白質-Kabat	TSNMGVG
4	hu23 VH CDR1 蛋白質-Chothia	GFSLSTSNM
5	hu23 VH CDR1 DNA -Kabat	ACTAGTAACATGGGTGTGGGC
6	hu23 VH CDR1 DNA -Chothia	GGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATG
7	hu23 VH CDR2 蛋白質-Kabat	HIWWDDDKYYSPSLKS
8	hu23 VH CDR2 蛋白質-Chothia	WWDDD
9	hu23 VH CDR2 DNA-Kabat	CACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTACAGCC CATCTCTGAAGAGC
10	hu23 VH CDR2 DNA -Chothia	TGGTGGGATGATGAT
11	hu23 VH CDR3 蛋白質-Kabat及 Chothia	SNYGYAWFAY
12	hu23 VH CDR3 DNA -Kabat 及 Chothia	AGTAACTATGGTTACGCCTGGTTTGCTTAC
13	hu23 HC 蛋白質-HuIgG1	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSNMGVG WIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYSPSLKSRLTIT KDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCVRSNYGYA WFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP

		PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
14	hu23 HC DNA- HuIgG1	CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGG TGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCAC CTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTAACATGG GTGTGGGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGC CCTGGAGTGGCTTGCACACATTTGGTGGGATGAT GATAAGTACTACAGCCCATCTCTGAAGAGCAGGC TCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGT GGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGAC ACAGCCACATATTACTGTGTTCGAAGTAACTATG GTTACGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCGAGCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC

		GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
15	hu23 VL 蛋白質	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYPYLNWF QQKPGKAPKTLIYRTNRLLDGVPSRFSGSGSGTDFT FTISSLQPEDIATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEIK
16	hu23 VL DNA	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGATAGAGTCACTATCACTTGC AAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAACT GGTTCCAACAAAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGA CCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGCTAGATGG GGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGA ACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAAC CTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTAT GATGAGTTTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCA AGCTGGAAATCAAA
17	hu23 VL CDR1 蛋白質-Kabat及 Chothia	KASQDIYPYLN

18	hu23 VL CDR1 DNA -Kabat 及 Chothia	AAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAAC
19	hu23 VL CDR2 蛋白質-Kabat及 Chothia	RTNRLLD
20	hu23 VL CDR2 DNA -Kabat 及 Chothia	CGTACAAATAGATTGCTAGAT
21	hu23 VL CDR3 蛋白質-Kabat及 Chothia	LQYDEFPLT
22	hu23 VL CDR3 DNA -Kabat 及 Chothia	CTACAGTATGATGAGTTTCCGCTCACG
23	hu23 LC 蛋白質-κ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIYPYLNWF QQKPGKAPKTLIYRTNRLLDGVPSRFSGSGSGTDFT FTISSLQPEDIATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
24	hu23 LC DNA- κ	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTC TGCATCTGTAGGAGATAGAGTCACTATCACTTGC AAGGCGAGTCAGGACATTTATCCCTATTTAAACT GGTTCCAACAAAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGA CCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGCTAGATGG GGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGA ACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAAC CTGAAGATATTGCAACTTATTATTGTCTACAGTAT GATGAGTTTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCA AGCTGGAAATCAAACGGACTGTGGCTGCACCAA

		GTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
25	hu24 VH 蛋白質	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAV HWVRQAPGKRLEWIGVISTYNDYTYNNQDFKGRV TMTRDTSASTAYMELSRLRSEDTAVYYCARGNSYF YALDYWGQGTSVTVSS
26	hu24 VH DNA	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACCTTCACTGACTATGCTGTGC ATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGAAAAAGGCTTGA GTGGATTGGAGTGATCAGCACTTACAATGATTAC ACATACAATAACCAGGACTTCAAGGGCAGAGTC ACCATGACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCT ACATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTGAAGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTAACTCCTA CTTCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTCACCGTCTCCTCA
27	hu24 VH CDR1 蛋白質-Kabat	DYAVH
28	hu24 VH CDR1 蛋白質-Chothia	GYTFTDY
29	hu24 VH CDR1 DNA-Kabat	GACTATGCTGTGCAT
30	hu24 VH CDR1	GGATACACCTTCACTGACTAT

	DNA -Chothia	
31	hu24 VH CDR2 蛋白質-Kabat	VISTYNDYTYNNQDFKG
32	hu24 VH CDR2 蛋白質-Chothia	STYNDY
33	hu24 VH CDR2 DNA -Kabat	GTGATCAGCACTTACAATGATTACACATACAATA ACCAGGACTTCAAGGGC
34	hu24 VH CDR2 DNA -Chothia	AGCACTTACAATGATTAC
35	hu24 VH CDR3 蛋白質-Kabat及 Chothia	GNSYFYALDY
36	hu24 VH CDR3 DNA -Kabat 及 Chothia	GGTAACTCCTACTTCTATGCTTTGGACTAC
37	hu24 HC 蛋白質-HuIgG1	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAV HWVRQAPGKRLEWIGVISTYNDYTYNNQDFKGRV TMTRDTSASTAYMELSRLRSEDTAVYYCARGNSYF YALDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
38	hu24 HC DNA- HuIgG1	CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACCTTCACTGACTATGCTGTGC

		ATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGAAAAAGGCTTGA GTGGATTGGAGTGATCAGCACTTACAATGATTAC ACATACAATAACCAGGACTTCAAGGGCAGAGTC ACCATGACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCT ACATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTGAAGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGTAACTCCTA CTTCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACC TCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCC CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCGAGCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACGGTGT CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCC AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA

		GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGA
39	hu24 VL 蛋白質	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFM HWYQQKPGQAPRLLIYRASNLESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSNEDPWTFGGGTKLE IK
40	hu24 VL DNA	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTGAGAGTGTTGACAGCTATGGCAA AAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATAGGGCATCCA ACCTGGAATCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGG CAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
41	hu24 VL CDR1 蛋白質-Kabat及 Chothia	RASESVDSYGKSFMH
42	hu24 VL CDR1 DNA -Kabat 及 Chothia	AGGGCCAGTGAGAGTGTTGACAGCTATGGCAAA AGTTTTATGCAC
43	hu24 VL CDR2 蛋白質-Kabat及 Chothia	RASNLES
44	hu24 VL CDR2 DNA -Kabat 及	AGGGCATCCAACCTGGAATCT

	Chothia	
45	hu24 VL CDR3 蛋白質-Kabat及 Chothia	QQSNEDPWT
46	hu24 VL CDR3 DNA -Kabat 及 Chothia	CAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGACG
47	hu24 LC 蛋白質-κ	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDSYGKSFM HWYQQKPGQAPRLLIYRASNLESGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSNEDPWTFGGGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
48	hu24 LC DNA- κ	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTGAGAGTGTTGACAGCTATGGCAA AAGTTTTATGCACTGGTACCAACAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATAGGGCATCCA ACCTGGAATCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGG CAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAGAGTAATGAGGATCCGTGGACGTT CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGAC TGTGGCTGCACCAAGTGTCTTCATCTTCCCGCCAT CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA

		AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGT
49	hu58 VH 蛋白質	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRYWMS WVRQAPGKGLEWIGDLNPDSSAINYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLITTLVPY TMDFWGQGTSVTVSS
50	hu58 VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCGACTTTAGTAGATATTGGAT GAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGATCGGCGACCTAAACCCAGATTCAAGT GCGATAAACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCTGTGTATTACTGTACACTCATTACTACGT TAGTACCCTATACTATGGACTTCTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
51	hu58 VH CDR1 蛋白質-Kabat	RYWMS
52	hu58 VH CDR1 蛋白質-Chothia	GFDFSRY
53	hu58 VH CDR1 DNA -Kabat	AGATATTGGATGAGC
54	hu58 VH CDR1 DNA -Chothia	GGATTCGACTTTAGTAGATAT
55	hu58 VH CDR2 蛋白質-Kabat	DLNPDSSAINYVDSVKG
56	hu58 VH CDR2 蛋白質-Chothia	NPDSSA
57	hu58 VH CDR2	GACCTAAACCCAGATTCAAGTGCGATAAACTATG

	DNA-Kabat	TGGACTCTGTGAAGGGC
58	hu58 VH CDR2 DNA -Chothia	AACCCAGATTCAAGTGCG
59	hu58 VH CDR3 蛋白質-Kabat及 Chothia	ITTLVPYTMDF
60	hu58 VH CDR3 DNA -Kabat 及 Chothia	ATTACTACGTTAGTACCCTATACTATGGACTTC
61	hu58 HC 蛋白質-HuIgG1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRYWMS WVRQAPGKGLEWIGDLNPDSSAINYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTLITTLVPY TMDFWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
62	hu58 HC DNA- HuIgG1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCGACTTTAGTAGATATTGGAT GAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCT GGAGTGGATCGGCGACCTAAACCCAGATTCAAGT GCGATAAACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT GTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGA CACGGCTGTGTATTACTGTACACTCATTACTACGT

		TAGTACCCTATACTATGGACTTCTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCGAGCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

63	hu58 VL 蛋白質	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWY QQKPGEAAILLISEGNGLRPGIPPRFSGSGYGTDFTL TINNIESEDAAYYFCLQSDNLPLTFGSGTKLEIK
64	hu58 VL DNA	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTCATGT CAGCGACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTG CATAACCAACACAGACATTGATGATGATATGAAC TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTATTC TCCTTATTTCAGAAGGTAATGGTCTCCGTCCTGGA ATCCCACCTCGATTCAGTGGCAGCGGGTATGGAA CAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATC TGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCTACAAAGT GATAACTTGCCTCTCACGTTCGGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAA
65	hu58 VL CDR1 蛋白質-Kabat及 Chothia	ITNTDIDDDMN
66	hu58 VL CDR1 DNA -Kabat 及 Chothia	ATAACCAACACAGACATTGATGATGATATGAAC
67	hu58 VL CDR2 蛋白質-Kabat及 Chothia	EGNGLRP
68	hu58 VL CDR2 DNA -Kabat 及 Chothia	GAAGGTAATGGTCTCCGTCCT
69	hu58 VL CDR3 蛋白質-Kabat及 Chothia	LQSDNLPLT
70	hu58 VL CDR3 DNA -Kabat 及 Chothia	CTACAAAGTGATAACTTGCCTCTCACG

71	hu58 LC 蛋白質-κ	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISCITNTDIDDDMNWY QQKPGEAAILLISEGNGLRPGIPPRFSGSGYGTDFTL TINNIESEDAAYYFCLQSDNLPLTFGSGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	hu58 LC DNA- κ	GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCATTCATGT CAGCGACTCCAGGAGACAAAGTCAACATCTCCTG CATAACCAACACAGACATTGATGATGATATGAAC TGGTACCAACAGAAACCAGGAGAAGCTGCTATTC TCCTTATTTCAGAAGGTAATGGTCTCCGTCCTGGA ATCCCACCTCGATTCAGTGGCAGCGGGTATGGAA CAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATC TGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCTACAAAGT GATAACTTGCCTCTCACGTTCGGCTCGGGGACAA AGTTGGAAATAAAACGGACTGTGGCTGCACCAA GTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

II.B. 連接體

本發明之抗-PTK7抗體-藥物結合物可使用連接體以使藥物連接或結合至抗-PTK7抗體來製備。連接體係雙功能化合物，其可用於連接藥物及抗體以形成抗體藥物結合物(ADC)。該等結合物可用於(例如)形成針對腫瘤相關抗原之免疫結合物。該等結合物容許細胞毒性

藥物選擇性遞送至腫瘤細胞。適宜連接體包括(例如)可裂解及不可裂解連接體。可裂解連接體在細胞內條件下通常易於裂解。結合藥物自抗體裂解之主要機制包括在溶酶體(腙、縮醛及順式-烏頭酸鹽樣醯胺)之酸性pH中水解、藉由溶酶體酶(細胞自溶酶及其他溶酶體酶)之肽裂解及二硫化物之還原。由於該等變化之裂解機制，將藥物連接至抗體之機制亦廣泛變化且可使用任何適宜連接體。

適宜可裂解連接體包括(例如)可藉由細胞內蛋白酶(例如溶酶體蛋白酶或胞內體蛋白酶)裂解之肽連接體。在本發明之態樣中，連接體可為二肽連接體，例如纈胺酸-瓜胺酸(val-cit)、苯丙胺酸-離胺酸(phe-lys)連接體或馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)連接體。在另一態樣中，連接體可為磺基琥珀醯亞胺基-4-[N馬來醯亞胺基甲基]環己烷-1-甲酸酯(smcc)。磺基-smcc結合經由馬來醯亞胺基團發生，該基團與硫氫基(硫醇、-SH)反應，而其磺基-NHS酯對於一級胺(如離胺酸及蛋白質或肽N-末端中所發現)具有反應性。此外，連接體可為馬來醯亞胺基己醯基(mc)。

其他適宜連接體包括可在特定pH或pH範圍下水解之連接體，例如腙連接體。額外適宜可裂解連接體包括二硫化物連接體。連接體可共價結合至抗體至抗體必須在細胞內降解以使藥物釋放之程度，例如mc連接體及諸如此類。

在本發明之特定態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物之連接體可為馬來醯亞胺基己醯-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)、馬來醯亞胺基己醯基(mc)或AcBut。

適宜結合程序之實例依賴於醯肼及其他親核劑與藉由氧化抗體上天然存在之碳水化合物生成之醛的結合。可利用提供期望藥物釋放性質之所引入羰基製備含腙之結合物。亦可利用在一端具有二硫化物、在中間具有烷基鏈且在另一端具有肼衍生物之連接體製備結合

物。蒽環係可使用此技術結合至抗體之細胞毒素的一個實例。

含有除腙外之官能基之連接體具有在溶酶體之酸性環境中裂解之潛能。舉例而言，結合物可自硫醇反應性連接體製得，該等連接體含有細胞內可裂解之除腙外之位點，例如酯、醯胺及縮醛/縮酮。喜樹鹼係可使用該等連接體之結合之一種細胞毒性劑。亦可使用由5至7員環酮製得且一個氧附接至細胞毒性劑且另一氧附接至用於抗體附接之連接體的縮酮。蒽環亦係與該等連接體一起使用之適宜細胞毒素之實例。

一類pH敏感性連接體之另一實例係順式-烏頭酸鹽，其具有併置於醯胺鍵之羧酸。羧酸在酸性溶酶體中加速醯胺水解。亦可使用具有若干其他類型之結構且達成類似類型之水解速率加速的連接體。類美登素(maytansinoid)係可與於C-9處附接之連接體結合之細胞毒素的實例。

藥物結合物之另一潛在釋放方法係肽由溶酶體酶進行酶水解。在一個實例中，肽經由醯胺鍵附接至對胺基苄醇且隨後在苄醇與細胞毒性劑之間製備胺基甲酸酯或碳酸酯。肽之裂解導致胺基甲酸胺基苄基酯或碳酸酯塌陷或自焚。利用此策略例示之細胞毒性劑包括蒽環、紫杉烷(taxane)、絲裂黴素C (mitomycin C)及奧裡斯他汀。在一個實例中，酚亦可藉由連接體代替胺基甲酸酯塌陷來釋放。在另一變化中，使用二硫化物還原以起始胺基甲酸對巰基苄基酯或碳酸酯之塌陷。

許多結合至抗體之細胞毒性劑在水中具有極小(若存在)溶解性且可由於結合物之聚集限制結合物上之載藥量。一種克服此之方法向連接體添加增溶基團。可使用利用由PEG及二肽組成之連接體製得之結合物，包括彼等具有附接至抗體之PEG-二酸、硫醇-酸或馬來醯亞胺-酸、二肽間隔體及至蒽環或多卡米星(duocarmycin)類似物之胺之醯胺

鍵者。另一實例係利用鍵結至細胞毒性劑之含有PEG之連接體二硫化物及鍵結至抗體之醯胺製得的結合物。納入PEG基團之方法可有利於克服聚集並限於載藥量。

美國專利第5,773,001號(其全文以引用方式併入本文中)揭示可與自卡奇黴素製得之親核藥物、具體而言醯肼及相關親核劑一起使用之連接體。該等連接體尤其可用於在藥物與連接體之間形成之連接可水解時獲得較佳活性之彼等情形。該等連接體含有兩個官能基，包括(1) 用於與抗體反應之基團(例如，羧酸)，及(2) 用於與藥物反應之羰基(例如，醛或酮)。羰基可與藥物上之醯肼基團反應以形成腙連接。此連接可裂解水解，從而容許在結合至靶細胞後自結合物釋放治療劑。在本發明之特定態樣中，本發明之PTK7抗體-藥物結合物之連接體可為4-(4-乙醯基苯氧基)丁酸(AcBut)。在本發明之其他態樣中，抗體-藥物結合物可使用(3-乙醯基苯基)乙酸(AcPAc)或4-巰基-4-甲基-戊酸(醯胺)作為連接體分子來製備。

N-羥基琥珀醯亞胺(OSu)酯或其他相當活化酯可用於生成活化可水解連接體-藥物部分。其他適宜活化酯之實例包括NHS (N-羥基琥珀醯亞胺)、磺基-NHS (磺化NHS)、PFP (五氟苯基)、TFP (四氟苯基)及DNP (二硝基苯基)。

在本發明之一些態樣中，抗體-藥物結合物係藉由使卡奇黴素或其衍生物、AcBut連接體及本發明之抗-PTK7抗體反應來製備。參見(例如)美國專利第5,773,001號。AcBut連接體產生在循環中實質上穩定、從而於37℃下在人類血漿中活體外分析時每天釋放估計2%卡奇黴素的結合物。結合物在酸性溶酶體中釋放卡奇黴素。

在本發明之一些態樣中，AcButCM部分可使用業內(例如PCT國際公開案第WO 08/147765號及美國專利第8,273,862號，其全文以引用方式併入本文中)所述之方法及製程生成。在本發明之一些態樣

中，AcButCM部分可使用如美國臨時申請案第61/899,682號(其全文以引用方式併入本文中)中所述之經改良合成方法生成。

可用於放射性同位素之結合之代表性連接體包括二伸乙基三胺五乙酸酯(DTPA)-異硫氰酸酯、6-肼菸酸琥珀醯亞胺基酯鹽酸鹽(SHNH)及六甲基伸丙基胺肟(HMPAO) (Bakker等人 (1990) *J. Nucl. Med.* 31: 1501-1509, Chattopadhyay等人 (2001) *Nucl. Med. Biol.* 28: 741-744, Dewanjee等人 (1994) *J. Nucl. Med.* 35: 1054-63, Krenning等人 (1989) Lancet 1: 242-244, Sagiuchi等人 (2001) *Ann. Nucl. Med.* 15: 267-270)；美國專利第6,024,938號)。或者，靶向分子可經衍生，以使放射性同位素可與其直接結合(Yoo等人 (1997) *J. Nucl. Med.* 38: 294-300)。碘化方法亦為業內已知，且代表性方案可參見(例如) Krenning等人 (1989) *Lancet* 1:242-4及Bakker等人 (1990) *J. Nucl. Med.* 31:1501-9。

II.C. 藥物

可用於製備所揭示PTK7抗體-藥物結合物之藥物包括具有生物或可檢測活性之任何物質(例如治療劑、可檢測標記、結合劑等)及在活體內代謝成活性劑之前藥。藥物亦可為藥物衍生物，其中藥物經官能化以使能夠與本發明抗體結合。根據所揭示方法，藥物用於製備式Ab-(L-D)之抗體-藥物結合物，其中(a) Ab係結合至PTK7之抗體或其抗原結合片段；及(b) L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係藥物。藥物-對-抗體比率(DAR)或載藥量指示每抗體結合之藥物(D)分子之數目。本發明之抗體-藥物結合物具有介於1至8範圍內之DAR。因此，在本發明之態樣中，PTK7抗體-藥物結合物可包括1個藥物分子(1之DAR)、或2個藥物分子(2之DAR)、或3個藥物分子(3之DAR)、或4個藥物分子(4之DAR)、或5個藥物分子(5之DAR)、或6個藥物分子(6之DAR)、或7個藥物分子(7之DAR)、或8個藥物分子(8之

DAR)。DAR可藉由各種習用方式(例如UV譜、質譜術、ELISA分析、輻射測量方法、疏水性相互作用層析(HIC)、電泳及HPLC)測定。

式Ab-(L-D)之抗體-藥物結合物(ADC)之組合物、批料及/或調配物可包括複數種抗體，每一抗體皆結合至特定數目之藥物分子(DAR為1至8)。組合物、批料及/或調配物具有平均DAR。

在本發明之特定態樣中，抗體-藥物結合物之組合物、批料及/或調配物特徵可在於平均DAR在約1至約8之範圍內，例如平均DAR在約2至約7之範圍內，或平均DAR在約3至約6之範圍內，或平均DAR在約4至約5之範圍內，或平均DAR在約5至約7之範圍內，或平均DAR在約6至約8至範圍內。在一些態樣中，抗體-藥物結合物之組合物、批料及/或調配物之平均DAR為約1，或平均DAR為約2，或平均DAR為約3，或平均DAR為約4，或平均DAR為約5，或平均DAR為約6，或平均DAR為約7，或平均DAR為約8。如平均DAR之上述範圍中所用，術語「約」意指+/- 0.5%。

此外，抗體-藥物結合物之組合物、批料及/或調配物之特徵可在於較佳範圍之平均DAR，例如平均DAR在約3至約5之範圍內，平均DAR在約3至約4之範圍內，或平均DAR在約4至約5之範圍內。此外，抗體-藥物結合物之組合物、批料及/或調配物之特徵可在於較佳範圍之平均DAR，例如，平均DAR在3至5之範圍內，平均DAR在3至4之範圍內，或平均DAR在4至5之範圍內。

式Ab-(L-D)之ADC之組合物、批料及/或調配物可藉由DAR分佈來表徵。DAR分佈提供各種ADC物質之百分比或分數，例如ADC之組合物、批料及/或調配物中可存在之DAR 1至8。ADC之組合物、批料及/或調配物之DAR分佈可藉由業內已知之方法(例如毛細管等電聚焦(cIEF))測定。

在本發明之一個態樣中，式Ab-(L-D)之ADC之組合物、批料及/

或調配物的DAR分佈之特徵可在於具有寬DAR分佈之ADC之高度非均相混合物，通常含有具有1至8之DAR之寬範圍之ADC物質。

在本發明之另一態樣中，ADC之組合物、批料及/或調配物之DAR分佈之特徵可在於具有窄DAR分佈之高度均質混合物，通常含有具有特定DAR (例如3至5之DAR)之窄範圍之ADC物質。

舉例而言，治療劑係對癌細胞或活化免疫細胞發揮細胞毒性、細胞生長抑制及/或免疫調節效應之藥劑。治療劑之實例包括細胞毒性劑、化學治療劑、細胞生長抑制劑及免疫調節劑。化學治療劑係可用於治療癌症之化學化合物。

治療劑係可用於治療或預防有需要之個體之病症之組合物。可用於本發明中之治療劑包括抗癌劑，即在PTK7表現細胞中具有抗癌活性之藥劑，該等細胞係(例如)來自以下之癌細胞：乳癌，例如三陰性乳癌(TNBC)、助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)、雌激素-受體陽性乳癌(ER+)及雙陽性乳癌；卵巢癌；結腸直腸癌；白血病，例如急性骨髓性白血病(AML)及急性淋巴母細胞性白血病(ALL)；食道癌；胃癌；黑色素瘤；肉瘤；腎癌；胰臟癌；前列腺癌；肝癌，例如肝細胞癌(HCC)；及肺癌，例如非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC)。

代表性治療劑包括細胞毒素、細胞毒性劑及細胞生長抑制劑。細胞毒性效應係指缺失、消除及/或殺死靶細胞。細胞毒性劑係指對細胞具有細胞毒性及/或細胞生長抑制效應之藥劑。細胞生長抑制效應係指抑制細胞增殖。細胞生長抑制劑係指對細胞具有細胞生長抑制效應、藉此抑制細胞之特定亞組之生長及/或擴增的藥劑。

額外代表性治療劑包括放射性同位素、化學治療劑、免疫調節劑、抗血管生成劑、抗增殖劑、促細胞凋亡劑及細胞溶解酶(例如，RNAse)。藥劑亦包括治療性核酸，例如編碼免疫調節劑、抗血管生成劑、抗增殖劑或促細胞凋亡劑之基因。該等藥物描述詞並不互斥，

且因此，可使用一或多個上述術語描述治療劑。舉例而言，所選放射性同位素亦係細胞毒素。治療劑可製備為上述任一者之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物。通常，具有放射性同位素作為藥物之結合物稱作放射性免疫結合物且彼等具有化學治療劑作為藥物者稱作化學免疫結合物。

細胞毒性劑之實例包括(但不限於)蒽環、奧裡斯他汀、CC-1065、多拉斯他汀(dolastatin)、多卡米星、烯二炔、格爾德黴素(geldanamycin)、美登素(maytansine)、嘌呤黴素、紫杉烷、長春花生物鹼、SN-38、微管溶素、哈米特林(hemiasterlin)及其立體異構物、等排物、類似物或衍生物。亦可使用化學治療劑、植物毒素、其他生物活性蛋白質、酶(即，ADEPT)、放射性同位素、光敏劑(即，對於光動力療法)。在一個實施例中，細胞毒性劑並非核糖體滅活蛋白質。在更具體實施例中，細胞毒性劑並非肥皂草毒素(saporin)。

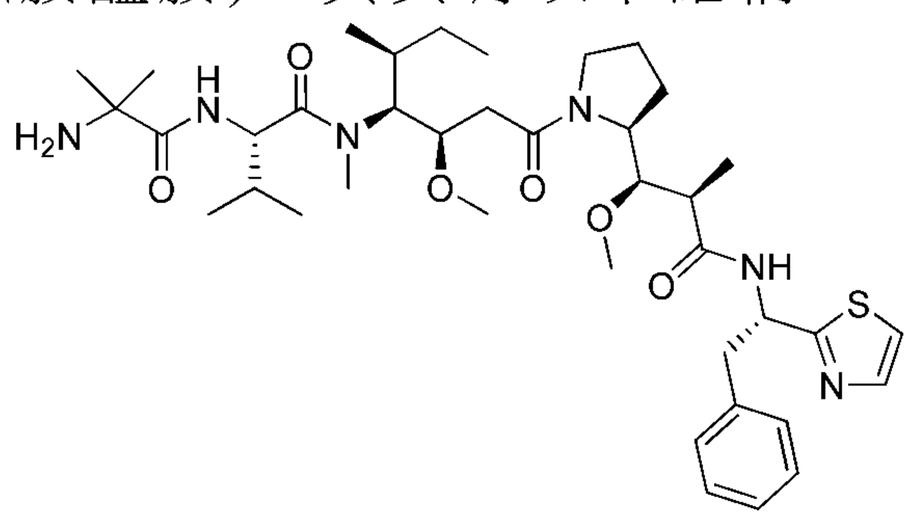
蒽環係衍生自細菌鏈黴菌屬(*Strepomyces*)且已用於治療多種癌症，例如白血病、淋巴瘤、乳癌、子宮癌、卵巢癌及肺癌。實例性蒽環包括(但不限於)道諾黴素、多柔比星(doxorubicin) (即，阿德力黴素(adriamycin))、表柔比星(epirubicin)、伊達比星(idarubicin)、戊柔比星(valrubicin)及米托蒽醌(mitoxantrone)。

多拉斯他汀及其肽類似物及衍生物奧裡斯他汀係高度有效力之抗有絲分裂劑，已顯示其具有抗癌及抗真菌活性。參見(例如)美國專利第5,663,149號及Pettit等人, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965, (1998)。實例性多拉斯他汀及奧裡斯他汀包括(但不限於)多拉斯他汀10、奧裡斯他汀E、奧裡斯他汀EB (AEB)、奧裡斯他汀EFP (AEFP)、MMAD (單甲基奧裡斯他汀D或單甲基多拉斯他汀10)、MMAF (單甲基奧裡斯他汀F或N-甲基纈胺酸-纈胺酸-D,L-異白胺酸(dolaisoleuine)-D,L-脯胺酸(dolaproine)-苯丙胺酸)、MMAE (單甲基

奧裡斯他汀E或N-甲基纈胺酸-纈胺酸-D,L-異白胺酸-D,L-脯胺酸-降麻黃鹼)、5-苯甲醯基戊酸-AE酯(AEVB)。

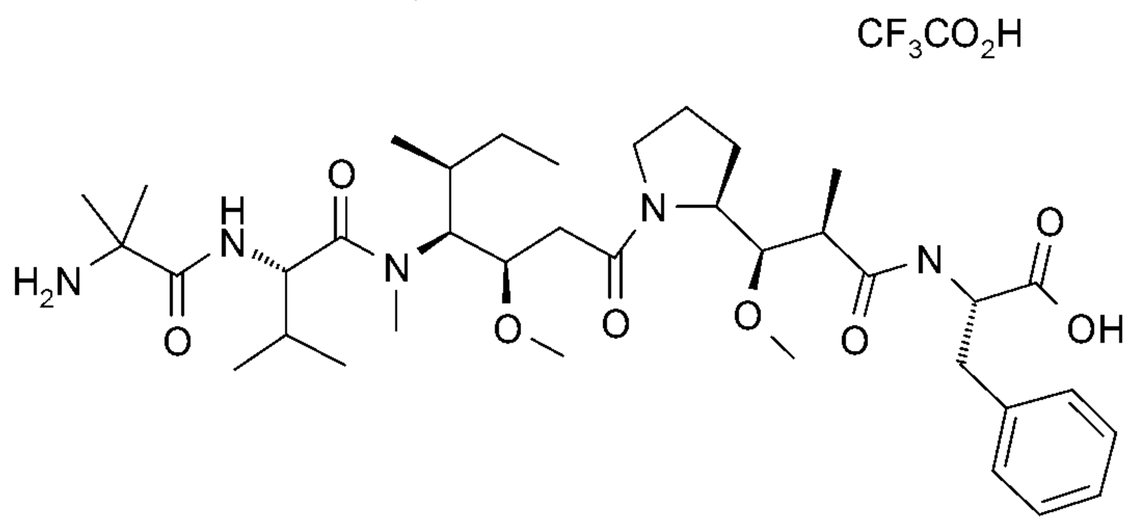
在本發明之一些態樣中，本文使用闡述於PCT國際公開案第WO 2013/072813號(其其全文以引用方式併入本文中)中之奧裡斯他汀及產生彼等奧裡斯他汀之方法。

舉例而言，奧裡斯他汀係0101，(2-甲基丙胺醯基-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-甲氧基-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1*S*)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-*N*-甲基-L-纈胺醯胺)，其具有以下結構：



。

在另一實例中，奧裡斯他汀係8261，(8261 2-甲基丙胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺)，其具有以下結構：



。

多卡米星及CC-1065係具有細胞毒性功效之DNA烷基化劑。參見Boger及Johnson, *PNAS* 92:3642-3649, 1995。實例性多拉斯他汀及奧裡斯他汀包括(但不限於) (+)-多卡米星A及(+)-多卡米星SA及(+)-CC-1065。

烯二炔係一類抗腫瘤細菌產品，其特徵在於9員及10員環或存在結合三鍵-雙鍵-三鍵之環狀系統。實例性烯二炔包括(但不限於)卡奇黴素、埃斯波黴素(esperamicin)及達內黴素(dynemicin)。

在本發明之一些態樣中，細胞毒性劑係抗生素，例如卡奇黴素，亦稱作LL-E33288複合物，例如β-卡奇黴素、γ-卡奇黴素或N-乙醯基-γ-卡奇黴素(γ-卡奇黴素(γ_1))。適用於本發明中之卡奇黴素之實例揭示於(例如)美國專利第4,671,958號、第4,970,198號、第5,053,394號、第5,037,651號、第5,079,233號及第5,108,912號中，其全文以引用方式併入本文中。該等化合物含有甲基三硫化物，其可與適當硫醇反應以形成二硫化物，同時引入官能基(例如醯肼或用於使卡奇黴素結合至抗-PTK7抗體之其他官能基)。亦可使用卡奇黴素之二硫化物類似物，例如闡述於美國專利第5,606,040號及第5,770,710號(其全文以引用方式併入本文中)中之類似物。在本發明之一些態樣中，二硫化物類似物係N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼(下文為「CM」)。

格爾德黴素係結合至Hsp90 (熱休克蛋白90)且使用抗腫瘤藥物之苯醌利福布汀(ansamycin)抗生素。實例性格爾德黴素包括(但不限於)17-AAG (17-N-烯丙基胺基-17-去甲氧基格爾德黴素)及17-DMAG (17-二甲基胺基乙基胺基-17-去甲氧基格爾德黴素)。

美登素或其衍生物類美登素藉由在有絲分裂期間經由抑制微管蛋白聚合抑制微管形成來抑制細胞增殖。參見Remillard等人，Science 189:1002-1005, 1975。實例性美登素及類美登素包括(但不限於)莫登素(DM1)及其衍生物以及安絲菌素(ansamitocin)。

紫杉烷係用作抗微管蛋白劑或有絲分裂抑制劑之二萜。實例性紫杉烷包括(但不限於)太平洋紫杉醇(例如，TAXOL ®)及多西他賽(TAXOTERE ®)。

長春花生物鹼亦係抗微管蛋白劑。實例性長春花生物鹼包括(但

不限於)長春鹼(vincristine)、長春新鹼(vinblastin)、長春地辛(vindesine)及長春瑞濱(viorelbine)。

在本發明之一些態樣中，藥劑係免疫調節劑。免疫調節劑之實例包括(但不限於)更昔洛韋(gancyclovier)、依那西普(etanercept)、他克莫司(tacrolimus)、西羅莫司(sirolimus)、伏環孢素(voclosporin)、環孢素(cyclosporine)、雷帕黴素(rapamycin)、環磷醯胺、硫唑嘌呤、麥考酚酸嗎乙酯(mycophenolate mofetil)、胺甲蝶呤(methotrexate)、糖皮質激素及其類似物、細胞介素、黃嘌呤、幹細胞生長因子、淋巴毒素、腫瘤壞死因子(TNF)、造血因子、介白素(例如，介白素-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18及IL-21)、群落刺激因子(例如，顆粒球-群落刺激因子(G-CSF)及顆粒球巨噬細胞-群落刺激因子(GM-CSF))、干擾素(例如，干擾素-α、-β及-γ)、命名為「S 1因子」之幹細胞生長因子、促紅血球生成素及促血小板生成素或其組合。

可用於本發明中之免疫調節劑亦包括阻斷對腫瘤之激素作用之抗激素及阻抑細胞介素產生、下調自體抗原表現或遮蔽MHC抗原之免疫阻抑劑。代表性抗激素包括抗雌激素，包括(例如)他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、芳香酶抑制4(5)-咪唑、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY 117018、奧那司酮(onapnstone)及托瑞米芬(toremifene)；及抗雄激素，例如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、柳培林(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；及抗腎上腺劑。代表性免疫阻抑劑包括2-胺基-6-芳基-5-取代之嘧啶、硫唑嘌呤、環磷醯胺、溴隱亭(bromocryptine)、達那唑(danazol)、胺苯碸(dapsone)、戊二醛、MHC抗原及MHC片段之抗個體基因型抗體、環孢素A、類固醇例如(糖皮質類固醇)、細胞介素或細胞介素受體拮抗劑(例如，抗干擾素抗

體、抗IL10抗體、抗TNFα抗體、抗IL2抗體)、鏈球菌激酶、TGFβ、雷帕黴素、T細胞受體、T細胞受體片段及T細胞受體抗體。

在本發明之一些態樣中，藥物係治療性蛋白質，其包括但不限於毒素、激素、酶及生長因子。

毒素蛋白質(或多肽)之實例包括(但不限於)白喉(例如，白喉A鏈)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)外毒素及內毒素、蓖麻毒蛋白(例如，蓖麻毒蛋白A鏈)、相思子素(abrin) (例如，相思子素A鏈)、莫迪素(modeccin) (例如，莫迪素A鏈)、α-八疊球菌、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌(*Staphylococcal*)腸毒素-A、商陸(pokeweed antiviral)抗病毒蛋白、白樹素(gelonin)、白喉菌素毒素、美洲商陸(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、瀉果素、巴豆毒素、皂草(sapaonaria officinalis)抑制劑、有絲分裂素、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、依諾黴素(enomycin)、新月毒素(tricothecene)、抑制劑胱胺酸結(ICK)肽(例如，角毒素(ceratotoxin))及芋螺毒素(conotoxin) (例如，KIIIA或SmIIIa)。

激素之實例包括(但不限於)雌激素、雄激素、助孕素及皮質類固醇。

在本發明之一些態樣中，細胞毒性劑可使用脂質體或生物相容聚合物製得。如本文所述之抗-PTK7抗體可結合至生物相容性聚合物以增加血清半衰期及生物活性，及/或延長活體內半衰期。生物相容性聚合物之實例包括水溶性聚合物(例如聚乙二醇(PEG)或其衍生物)及含有兩性離子之生物相容性聚合物(例如，含有磷醯膽鹼之聚合物)。

在本發明之一些態樣中，藥物係寡核苷酸，例如反義寡核苷酸。

可用於本發明中之額外藥物包括抑制血管形成之抗血管生成劑，例如法尼基(farnesyl)轉移酶抑制劑、COX-2抑制劑、VEGF抑制劑、bFGF抑制劑、類固醇硫酸酯酶抑制劑(例如，2-甲氧基雌二醇雙-胺基磺酸酯(2-MeOE2雙MATE))、介白素-24、凝血酶敏感蛋白、金屬底板反應蛋白、I類干擾素、介白素12、魚精蛋白、血管抑素、層黏蛋白、內皮抑素及泌乳素片段。

抗增殖劑及促細胞凋亡劑包括PPAR-γ之活化劑(例如，環戊烯酮前列腺素(cyPG))、類視色素、三萜(例如，環波羅烷(cycloartane)、羽扇烷(lupane)、烏斯烷(ursane)、齊墩果烷(oleanane)、木栓烷(friedelane)、達瑪烷(dammarane)、葫蘆素(cucurbitacin)及檸檬苦素類似物(limonoid)三萜)、EGF受體抑制劑(例如，HER4)、雷帕黴素、CALCITRIOL® (1,25-二羥基維生素D3 (維生素D))、芳香酶抑制劑(FEMARA ® (來曲松(letrozone)))、末端轉移酶端粒抑制劑、鐵螯合劑(例如，3-胺基吡啶-2-甲醛縮胺基硫脲(Triapine))、凋亡素(apoptin)(病毒蛋白質3 - VP3，來自雞貧血病毒)、Bcl-2及Bcl-X(L)之抑制劑、TNF-α、FAS配體、TNF相關細胞凋亡誘導配體(TRAIL/Apo2L)、TNF-α/FAS配體/TNF相關細胞凋亡誘導配體(TRAIL/Apo2L)信號傳導之活化劑及PI3K-Akt存活路徑信號傳導之抑制劑(例如，UCN-01及格爾德黴素)。

代表性化學治療劑包括烷基化劑，例如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺；磺酸烷基酯，例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，例如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)及烏瑞替派(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基蜜胺，包含六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基蜜胺；氮芥，例如氮芥苯丁酸(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺

(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲基二氯乙基胺(mechiorethamine)、氫氯酸氧氮芥(mechiorethamine oxide hydrochloride)、美法倉(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥膽甾醇酯(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimnustine)；抗生素，例如阿克拉黴素(aclacinomysin)、放線菌素(actinomycin)、歐洛黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素c (cactinomycin)、卡奇黴素、卡柔比星(carabicin)、卡波黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊達比星、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、普非洛黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，例如胺甲喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，例如二甲葉酸(denopterin)、胺甲喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，例如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-阿紮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷

(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、5-FU；雄激素類，例如卡普睪酮(calusterone)、丙酸甲雄烷酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睪內酯(testolactone)；抗腎上腺試劑，例如胺魯米特(arninoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，例如亞葉酸；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基酮戊酸(arninolevulinic acid)；安吖啶(amsacrine)；貝斯特氮芥(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；伊爾福尼辛(elformithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎵；羥基脲；香菇多糖；氯尼達明(lonidamine)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌；莫哌達醇(mopidamol)；硝胺丙吖啶(nitracrine)；噴司他汀(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；鬼臼酸；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；雷佐生(razoxane)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；替奴佐酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌；2,2',2'-三氯三乙胺；烏拉坦(urethan)；長春地辛；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加賽特辛(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside) (Ara-C)；環磷醯胺；噻替派；紫杉烷類，例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, N.J.)及多西他賽(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer of Antony, France)；氮芥苯丁酸；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；胺甲喋呤；鉑類似物，例如順鉑及卡鉑(carboplatin)；長春鹼；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；絲裂黴素C；米托蒽醌；長春新鹼；長春瑞濱；溫諾平

(navelbine)；能滅瘤(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；道諾黴素；胺基蝶呤；截瘤達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；視黃酸；埃斯波黴素類；及卡培他濱(capecitabine)。

可根據本發明使用之額外治療劑包括用於光動力療法之光敏劑，例如美國專利第7,498,029號及第5,952,329號，其全文以引用方式併入本文中；用於溫熱療法之磁粒子，例如美國專利第6,997,863號，其全文以引用方式併入本文中；結合劑，例如肽、配體、細胞黏附配體等及可轉化成更具活性且無細胞毒性之藥物之前藥，例如含有磷酸酯之前藥、含有硫代磷酸酯之前藥、含有硫酸酯之前藥、含有肽之前藥、含有β-內醯胺之前藥)、含有經取代之苯氧基乙醯胺之前藥或含有經取代之苯基乙醯胺之前藥、5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿苷前藥。

對於使用抗-PTK7抗體之診斷方法，藥物可包括用於在活體外或活體內檢測表現PTK7之細胞之可檢測標記。在活體內可檢測之放射性同位素(例如可使用閃爍法、磁共振成像或超音波檢測之彼等標記)可用於臨床診斷應用中。有用之閃爍法標記包括正電子發射體及γ-發射體。用於磁源成像之代表性對比劑係順磁或超順磁離子(例如，鐵、銅、錳、鉻、鉺、銪、鏑、釩及釓)、氧化鐵粒子及水溶性對比劑。對於超音波檢測，可將氣體或液體誘捕於以微氣泡對比劑形式釋放之多孔無機粒子中。對於活體外檢測，有用之檢測標記包括螢光團、可檢測表位或結合劑及放射性標記。

因此，在本發明之一些態樣中，藥物係成像劑(例如，螢光團或PET (正電子發射斷層攝影)標記、SPECT (單光子發射電腦斷層攝影)標記)或MRI (磁共振成像)標記。

術語「標記」在本文中使用時係指直接或間接結合至抗體以便

生成「經標記」抗體之可檢測化合物或組合物。標記可係自身可檢測(例如，放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶標記情形下，標記可催化受質化合物或組合物發生可檢測之化學變化。可用作可檢測標記之包括放射性核種(例如) I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212及Pd-109。標記亦可為不可檢測之實體，例如毒素。

螢光團之實例包括(但不限於)螢光黃異硫氰酸酯(FITC) (例如，5-FITC)、螢光黃醯亞胺酯(FAM) (例如，5-FAM)、曙紅(eosin)、羧基螢光黃、赤蘚紅(erythrosine)、Alexa Fluor® (例如，Alexa 350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、647、660、680、700或750)、羧基四甲基玫瑰紅(TAMRA) (例如，5'-TAMRA)、四甲基玫瑰紅(TMR)及磺醯羅丹明(sulforhodamine，SR) (例如，SR101)。

治療型或診斷性放射性同位素或其他標記(例如，PET或SPECT標記)可納入用於結合至如本文所述之抗-PTK7抗體之試劑中。同位素可在抗體中存在之(例如)半胱胺酸殘基處直接結合至抗體，或螯合劑可用於介導抗體及放射性同位素之結合。適於放射療法之放射性同位素包括(但不限於) α-發射體、β-發射體及歐傑電子(auger electron)。對於診斷應用，有用之放射性同位素包括正電子發射體及γ-發射體。本發明之抗-PTK7抗體可在(例如)抗體之酪胺酸殘基上進一步經碘化以有利於抗體之檢測或治療效應。

放射性同位素或其他標記之實例包括(但不限於) ^{3}H、^{11}C、^{13}N、^{14}C、^{15}N、^{15}O、^{35}S、^{18}F、^{32}P、^{33}P、^{47}Sc、^{51}Cr、^{57}Co、^{58}Co、^{59}Fe、^{62}Cu、^{64}Cu、^{67}Cu、^{67}Ga、^{68}Ga、^{75}Se、^{76}Br、^{77}Br、^{86}Y、^{89}Zr、^{90}Y、^{94}Tc、^{95}Ru、^{97}Ru、^{99}Tc、^{103}Ru、^{105}Rh、^{105}Ru、^{107}Hg、^{109}Pd、^{111}Ag、^{111}In、^{113}In、^{121}Te、^{122}Te、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{125}Te、^{126}I、

^{131}I、^{131}In、^{133}I、^{142}Pr、^{143}Pr、^{153}Pb、^{153}Sm、^{161}Tb、^{165}Tm、^{166}Dy、^{166}H、^{167}Tm、^{168}Tm、^{169}Yb、^{177}Lu、^{186}Re、^{188}Re、^{189}Re、^{197}Pt、^{198}Au、^{199}Au、^{201}Tl、^{203}Hg、^{211}At、^{212}Bi、^{212}Pb、^{213}Bi、^{223}Ra、^{224}Ac及^{225}Ac。

II.D. 製備PTK7抗體-藥物結合物之方法

亦提供用於製備本發明之抗體-藥物結合物之方法。舉例而言，產生如本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物之製程可包括(a) 將連接體連接至藥物；(b) 使連接體-藥物部分結合至抗體；及(c) 純化抗體-藥物結合物。合成vc0101及mc8261之代表性方法闡述於實例9中，且結合抗-PTK7-vc0101、抗-PTK7-mc8621 ADC及抗-PTK7-AcButCM ADC之代表性方法闡述於實例10中。

在一個態樣中，式Ab-(L-D)之抗體-藥物結合物可藉由以下製備：(a) 向抗-PTK7抗體或其抗原結合片段添加連接體-藥物部分(例如vc0101或mc8261)，其中於介於約0℃至37℃範圍內之溫度下在介於約30分鐘至16小時範圍內之時間段內，抗-PTK7抗體可在含有以下之溶液中部分還原：2-10莫耳濃度過量之叁(2-羧基乙基)膦(TCEP)、具有6-9之pH之100 mM 4-(2-羥基乙基)-1-六氫吡嗪乙烷磺酸緩衝液(HEPES)及1 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)。隨後於約0℃至37℃範圍內之溫度下在介於約30分鐘至16小時範圍內之培育時間段內，可以約4-10之連接體-酬載/抗體莫耳比添加vc0101或mc8261連接體-酬載與二甲基乙醯胺(DMA)。隨後，可用N-乙基馬來醯亞胺封端未反應之硫醇且可藉由L-Cys驟冷未反應之連接體-酬載。

在另一態樣中，式Ab-(L-D)之抗體-藥物結合物可藉由以下製備：(a) 向抗-PTK7抗體或其抗原結合片段添加連接體-藥物部分(例如AcButCM)，其中抗體之濃度可介於1 mg/ml至25 mg/ml之範圍內且連接體-藥物部分對1個抗-PTK7抗體係以介於約1至15範圍內之莫耳

比；(b) 在pH介於約7至9範圍內之非親核蛋白質相容之緩衝溶液中培育連接體-藥物部分及抗-PTK7抗體以產生單體抗體-藥物結合物，其中溶液進一步包含(i) 適宜有機共溶劑，及(ii) 具有至少一個C_6-C_{18}羧酸或其鹽之添加劑，且其中培育係於介於約0℃至約45℃範圍內之溫度下執行介於約1分鐘至約24小時範圍內之時間段；及(c) 使步驟(b)中產生之結合物經受層析分離過程以分離具有1至8之DAR之抗體-藥物結合物；且自未結合抗-PTK7抗體、連接體-藥物部分及聚集結合物提供低於10%之低結合分數(LCF)。

結合物形成之最佳反應條件可藉由反應變量(例如溫度、pH、連接體-酬載部分輸入及添加劑濃度)之變化以經驗測定。適於其他藥物之結合之條件可由熟習此項技術者測定而無需過多實驗。

在一些態樣中，藥物可經修飾以包括與抗體之結合點反應之基團。舉例而言，藥物可藉由烷基化(例如，於抗體之ε胺基離胺酸或N-末端處)、氧化碳水化合物之還原性胺化、羥基與羧基之間之轉酯化、胺基或羧基處之醯胺化及與硫醇之結合來附接。在一些實施例中，每抗體分子結合之藥物(D)分子之數目介於1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2範圍內。在其他實施例中，每抗體結合之藥物(D)分子之數目係1、2、3、4、5、6、7或8。在一些實施例中，複數種抗體-藥物結合物之組合物、批料,及/或調配物之特徵可在於平均DAR。平均DAR介於約1至約8、約1至約7、約1至約6、約1至約5、約1至約4、約1至約3、約1至約2之範圍內。在一些實施例中，複數種抗體-藥物結合物之組合物、批料及/或調配物之平均DAR介於約2至約8、約2至約7、約2至約6、約2至約5、約2至約4、約2至約3或約3至約5之範圍內。如平均DAR之上述範圍中使用之術語「約」意指+/-0.5%。對於可用於結合之化學法之實例，參見(例如) Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons公司), 第15章

(Chemical Modifications of Proteins)。

用於製備抗體-藥物結合物之其他方法已闡述於各種公開案中。舉例而言，可在抗體中經由離胺酸側鏈胺或經由藉由還原鏈間二硫鍵活化之半胱胺酸硫氫基進行化學修飾用於發生結合反應。參見(例如) Tanaka等人，FEBS Letters 579:2092-2096, 2005及Gentle等人，Bioconjugate Chem. 15:658-663, 2004。此外，亦已闡述在抗體之特定位點經改造之反應性半胱胺酸殘基，其用於具有確定化學計量之特定藥物結合。參見(例如) Junutula等人, Nature Biotechnology, 26:925-932, 2008。

另外如國際公開案第WO 2013/093809號中所述，抗體之重鏈之CH2或CH3結構域表面上、或輕鏈之恆定結構域上可能存在或以其他方式可及之某些殘基適於用(例如)半胱胺酸取代天然野生型胺基酸，且因此可用於改造能夠結合至各種試劑之位點。

在一些態樣中，本發明之經改造Fc多肽可用於製備PTK7抗體或抗體-藥物結合物，使得抗體或其片段藉此包含經改造Fc區，該區可用於在經改造殘基(即，與野生型未經修飾之Fc相比，經取代胺基酸)處結合多種藥劑。

本發明之PTK7抗體及抗體-藥物結合物可涵蓋經改造Fc多肽，其中親代、天然或野生型抗體之抗體重鏈(HC)之選自位置347、392、398、422及443之1、2或更多個胺基酸經另一胺基酸(包括天然及非天然/合成胺基酸)取代，其中恆定區之編號系統係根據Kabat之EU索引之編號系統。

應注意，(例如)半胱胺酸殘基之Fc多肽中之單一取代由於IgG抗體分子之同二聚體性質通常可展示所得IgG抗體中之兩個相應殘基。因此，出於結合至藥物或化合物之目的，本發明之所得經改造IgG抗體可展示至少1、2、3、4或更多個反應基團。在態樣中，一或多個取

代係利用半胱胺酸殘基，且出於結合至藥物或化合物之目的，所得經改造抗體可展示至少1、2、3、4或更多個硫醇基團。

在另一態樣中，本揭示內容之經改造Fc多肽可包含抗體之重鏈(HC)之一或多個選自位置347、392、398、422及443之取代，其中恆定區之編號系統係如Kabat中所述之EU索引之編號系統，且其中重鏈之胺基酸序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 37及SEQ ID NO: 61。

本發明之PTK7抗體及抗體-藥物結合物可涵蓋經改造抗體輕鏈恆定區(LC) 或其部分，其中親代、天然或野生型抗體之抗體輕鏈之選自位置111、183或188之1、2或3個胺基酸經另一胺基酸(包括天然及非天然/合成胺基酸)取代，其中輕鏈恆定區之編號系統係根據Kabat之編號系統。

在一些態樣中，本揭示內容之經改造LC多肽包含抗體輕鏈之一或多個來自位置111、183或188之取代，其中輕鏈之胺基酸序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 47及SEQ ID NO: 71。

在其他態樣中，由於抗體之二聚體性質(例如，IgG包含兩條輕鏈及兩條重鏈，每一重鏈皆包含Fc多肽)，本發明抗體可包含至少一種經改造Fc多肽且可進一步包含至少一種經改造輕鏈恆定多肽，藉此提供至少兩個位點特異性結合位點- 一個在Fc多肽中且另一個在LC多肽中。

在本發明之一些態樣中，所揭示PTK7抗體-藥物結合物之抗體或其抗原結合片段包括IgG1重鏈恆定區，例如闡述為SEQ ID NO: 13之hu23重鏈、闡述為SEQ ID NO: 37之hu24重鏈或闡述為SEQ ID NO: 61之hu58重鏈。在其他態樣中，所揭示PTK7抗體-藥物結合物之抗體或其抗原結合片段包括κ輕鏈恆定區，例如闡述為SEQ ID NO: 23之hu23

輕鏈、闡述為SEQ ID NO: 47之hu24輕鏈或闡述為SEQ ID NO: 71之hu58輕鏈。在本發明之特定態樣中，PTK7抗體-藥物結合物可包括IgG1重鏈恆定區及κ輕鏈恆定區，例如闡述為SEQ ID NO: 13之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 23之輕鏈；或作為另一實例，闡述為SEQ ID NO: 37之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 47之輕鏈；或作為另一實例，闡述為SEQ ID NO: 61之重鏈及闡述為SEQ ID NO: 71之輕鏈。

同樣，如國際公開案第WO2012/059882號中所述，結合方法包括使用含有醯基供體麩醯胺酸之標籤或藉由在轉麩胺醯胺酶及胺(例如，包含或附接至反應性胺之細胞毒性劑)存在下多肽改造使得具有反應性(即，作為醯基供體形成共價鍵之能力)之內源性麩醯胺酸。

在一些態樣中，PTK7抗體或抗體-藥物結合物可包含在PTK7抗體之抗體之特異性位點處(例如，羧基末端、胺基末端或於另一位點處)經改造之含有醯基供體麩醯胺酸之標籤。在一些態樣中，標籤包含胺基酸麩醯胺酸(Q)或胺基酸序列GGLLQGG (SEQ ID NO:74)、LLQGA (SEQ ID NO:75)、GGLLQGA (SEQ ID NO:76)、LLQ、LLQGPGK (SEQ ID NO: 77)、LLQGPG (SEQ ID NO: 78)、LLQGPA (SEQ ID NO: 79)、LLQGP (SEQ ID NO: 80)、LLQP (SEQ ID NO: 81)、LLQPGK (SEQ ID NO: 82)、LLQGAPGK (SEQ ID NO: 83)、LLQGAPG (SEQ ID NO: 84)、LLQGAP (SEQ ID NO: 85)、$LLQX_1X_2X_3X_4X_5$ (其中X_1係G或P，其中X_2係A、G、P或不存在，其中X_3係A、G、K、P或不存在，其中X_4係G、K或不存在，且其中X_5係K或不存在) (SEQ ID NO: 86)或$LLQX_1X_2X_3X_4X_5$ (其中X_1係任何天然胺基酸且其中X_2、X_3、X_4及X_5係任何天然胺基酸或不存在) (SEQ ID NO: 87)。在一些實施例中，PTK7抗體或抗體-藥物結合物可包含在PTK7抗體之297位處自天冬醯胺(N)至麩醯胺酸(Q)之胺基酸取代。

在另一態樣中，PTK7抗體或抗體-藥物結合物可包含含有醯基供

體麩醯胺酸之標籤及抗體之位置222、340或370處之胺基酸修飾(EU編號方案)，其中修飾係胺基酸缺失、插入、取代、突變或其任一組合。因此，在一些態樣中，PTK7抗體或抗體-藥物結合物可包含於PTK7抗體之特異性位點處(例如，於重鏈或輕鏈之羧基末端處或於另一位點處)結合之含有醯基供體麩醯胺酸之標籤(例如，Q、GGLLQGG (SEQ ID NO:74)、LLQGA (SEQ ID NO:75)、GGLLQGA (SEQ ID NO:76)、LLQ、LLQGPGK (SEQ ID NO: 77)、LLQGPG (SEQ ID NO: 78)、LLQGPA (SEQ ID NO: 79)、LLQGP (SEQ ID NO: 80)、LLQP (SEQ ID NO: 81)、LLQPGK (SEQ ID NO: 82)、LLQGAPGK (SEQ ID NO: 83)、LLQGAPG (SEQ ID NO: 84)、LLQGAP (SEQ ID NO: 85)、$LLQX_1X_2X_3X_4X_5$ (其中X_1係G或P，其中X_2係A、G、P或不存在，其中X_3係A、G、K、P或不存在，其中X_4係G、K或不存在，且其中X_5係K或不存在) (SEQ ID NO: 86)或$LLQX_1X_2X_3X_4X_5$ (其中X_1係任何天然胺基酸且其中X_2、X_3、X_4及X_5係任何天然胺基酸或不存在) (SEQ ID NO: 87)及抗體之位置222、340或370 (EU編號方案)處之胺基酸修飾。

為進一步增加每抗體-藥物結合物之藥物分子之數目，藥物可結合至聚乙二醇(PEG) (包括直鏈或具支鏈聚乙二醇聚合物)及單體。PEG單體具有式：—(CH_2CH_2O)—。藥物及/或肽類似物可直接或間接(即經由適當間隔體基團，例如糖)結合至PEG。PEG-抗體-藥物組合物亦可包括額外親脂性及/或親水性部分以有利於藥物穩定性及遞送至活體內靶位點。用於製備含有PEG之組合物之代表性方法尤其可參見美國專利第6,461,603號、第6,309,633號及5,648,095號。

舉例而言，為增加本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物中之奧裡斯他汀或卡奇黴素之量，抗體在與藥物結合之前可使用(例如) PEG-SPA, PEG-SBA或PEG-雙-馬來醯亞胺結合至PEG。使用PEG製備之抗體-藥物結合物可顯示對靶抗原降低之結合親和力，但由於增加之藥

物載量仍有效。

在結合後，可藉由習用方法自未結合反應物及/或聚集形式之結合物分離並純化結合物。此可包括諸如粒徑篩析層析(SEC)、超濾/滲濾、離子交換層析(IEC)、層析聚焦(CF) HPLC、FPLC或Sephacryl S-200層析等方法。分離亦可藉由疏水性相互作用層析(HIC)完成。適宜HIC介質包括Phenyl Sepharose 6快速流動層析介質、Butyl Sepharose 4快速流動層析介質、Octyl Sepharose 4快速流動層析介質、Toyopearl Ether-650M層析介質、Macro-Prep甲基HIC介質或Macro-Prep第三丁基HIC介質。

在本發明之一些態樣中，分離可使用Butyl Sepharose 4快速流動層析介質實施。在使用定製梯度時，移除仍結合至管柱之較高DAR物質。在一些態樣中，純化製程可包括離心細胞移除步驟、視情況蛋白質A親和力捕獲步驟、之後一個或兩個正交層析精製步驟、病毒過濾步驟及切向流過濾步驟用於濃縮及調配。

III.用於PTK7抗體-藥物結合物之表徵之功能分析

本發明進一步揭示活體外及活體內分析以特徵PTK7抗體-藥物結合物之活性，包括PTK7結合活性、在結合至細胞表面上呈遞之PTK7抗原後之細胞內化及靶向個體之表現PTK7之細胞。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物之特徵在於抗體或其抗原結合片段之中和或缺失態樣。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物之特徵在於與替代藥物無效能相比，特定藥物具有意外的效能。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體-藥物結合物之特徵為勝過與藥物具有相同作用模式之標準護理治療劑。

用於檢測PTK7抗體-藥物結合物與PTK7抗原或其他PTK7抗原之結合之技術為業內已知，包括(例如) BIACORE®分析。額外代表性技術包括離心、親和力層析及其他免疫化學方法。參見(例如) Manson

(1992) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, N.J., United States of America；Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Elsevier, Amsterdam/New York。抗原結合分析可使用經分離PTK7抗原或表現PTK7之細胞實施。

PTK7抗體-藥物結合物之結合特異性可藉由結合表位之定義(即殘基之鑑別，包括參與抗原結合之非毗鄰殘基)及/或影響抗原結合之殘基之定義進一步闡述。

可藉由觀察隨時間結合至表現PTK7之細胞表面之抗體或結合物之量分析PTK7抗體-藥物結合物由表現PTK7之細胞之內化。參見(例如)實例7。所選PTK7配體或其同種型可以可溶性形式存在，且至少一些PTK7可能仍與細胞表面締合，藉此容許內化本文揭示之抗體。因此，本發明之抗-PTK7抗體-藥物結合物可由表現PTK7之細胞內化。舉例而言，在腫瘤起始細胞表面上結合至PTK7之抗-PTK7抗體-藥物結合物可由腫瘤起始細胞內化。內化ADC分子之數目可足夠或充分殺死表現PTK7之細胞、尤其表現PTK7之腫瘤細胞。端視ADC之功效而定，在一些情況下，單一ADC分子攝取至細胞中足以殺死ADC結合之靶細胞。舉例而言，某些毒素在殺滅中高度有效力，使得結合至抗體之一分子毒素之內化即足以殺死腫瘤細胞。

可使用功能分析評價PTK7抗體之內化，其中將細胞與結合至肥皂草毒素毒素之PTK7抗體即二級抗體Fab片段一起培育。隨後藉由任何適宜方法量測細胞存活力，其中細胞毒性指示抗體內化。參見實例7。

在本發明之一些態樣中，所揭示PTK7抗體-藥物結合物之抗體或其抗原結合片段係以最廣泛含義使用之「拮抗劑」，即部分或完全阻斷、抑制或中和本文揭示之天然靶標或其轉錄或轉譯形式之之生物活性的任何分子。如本文中關於本發明抗體之生物活性之使用術語「抑

制」或「中和」意指抗體實質上拮抗、禁止、阻止、限制、減緩、破壞、消除、停止、減輕或逆轉(例如)所抑制者(包括但不限於生物活性)之進展或嚴重程度的能力。舉例而言，在本發明之一些態樣中，抗-PTK7抗體-藥物結合物有利於在內化抗體-藥物結合物後之細胞殺死。舉例而言，中和抗體或拮抗劑較佳將PTK7功能減小至少約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。

在本發明之其他態樣中，本發明之間抗-PTK7抗體-藥物結合物可為消耗抗體。術語消耗抗體係指結合至細胞表面上或其附近之PTK7或與其締合且誘導、促進或引起細胞死亡或消除(例如，藉由補體依賴性細胞毒性或抗體依賴性細胞毒性)之抗體。較佳地，消耗抗體將能夠移除、消除或殺死界定細胞群體中之至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%或99%之腫瘤永存細胞。

功能分析亦包括用於評價抗體-藥物結合物之抗癌活性(例如，破壞現存癌細胞或延長或阻止癌細胞生長之能力)的方法。由本發明之抗體-藥物結合物靶向之癌症包括個體中任何組織之原發性及轉移腫瘤及癌症，包括癌及造血惡性病，例如白血病及淋巴瘤。

具有生長抑制活性之PTK7抗體-藥物結合物可消除表現PTK7之細胞或阻止或降低表現PTK7之癌細胞增殖。細胞生長抑制之快速活體外評價之代表性方法闡述於Jones等人(2001) J. Immunol. Methods 254:85-98。

PTK7抗體-藥物結合物亦可包括誘導細胞死亡、例如特徵在於核DNA降解、核變性及縮聚、膜完整性損失及吞噬作用之程式化細胞死亡的能力。用以評價細胞之代表性分析闡述於Hoves等人 (2003) Methods 31:127-34；Peng等人 (2002) Chin. Med. Sci. J. 17:17-21；

Yasuhara等人 (2003) J. Histochem. Cytochem. 51:873-885中。

舉例而言，為評價PTK7抗體-藥物結合物之活體外細胞毒性，在PTK7抗體-藥物結合物存在下及單獨在游離藥物下培養表現PTK7之癌細胞及對照細胞。每一藥劑之細胞毒性報告為ED50 (ng/ml)，其係以結合物形式或以游離藥物形式給出之藥物引起細胞培養物相對於未經處理之對照減少50%的量。在藥物暴露後使用活體染料(MTS)測定培養物中之細胞之數目。參見實例12。

為評價PTK7抗體-藥物結合物之活體內細胞毒性，在NOD/SCID、裸(nu/nu)或其他品系之免疫受損小鼠中藉由皮下注射各種癌細胞製備腫瘤。可藉由(例如)腹膜內注射向帶有腫瘤之小鼠投與PTK7抗體-藥物結合物及對照化合物，一週兩次持續兩週(q4dx4)。可量測之治療結果包括腫瘤細胞生長之抑制。參見實例13。

此外，本發明提供PTK7抗體-藥物結合物，其端視(例如)抗-PTK7抗體或投藥及遞送方法而定可經由多種機制(包括激動或拮抗所選路徑或消除特定細胞)缺失、沉默、中和、消除或抑制腫瘤細胞(包括腫瘤起始細胞(TIC))之生長、繁殖或存活及/或相關贅瘤形成。

如本文所用術語腫瘤起始細胞(TIC)涵蓋腫瘤永存細胞(TPC；即，癌症幹細胞或CSC)及高度增殖性腫瘤祖細胞(TProg)二者，其一起通常包括體腫瘤或團塊之獨特亞群體(即0.1 -40%)。出於本發明之目的，術語腫瘤永存細胞及癌症幹細胞等效且在本文中可互換使用。相反，TPC與TProg之不同之處在於其可完全概括腫瘤中存在之腫瘤細胞之組合物且具有無限自我更新能力，如藉由低數目分離細胞之連續移植(經由小鼠兩代或更多代)所展示。如本文所用術語「腫瘤起始細胞」亦係指各種血液惡性病之癌症幹細胞，其特徵並不在於腫瘤本身。

本發明提供PTK7抗體-藥物結合物，其靶向腫瘤起始細胞(TIC)

及尤其腫瘤永存細胞(TPC)，藉此有利於贅瘤性病症及過度增殖病症之治療、管控或預防。更特定而言，特定腫瘤細胞亞群體表現PTK7且可能修飾對癌症幹細胞自我更新及細胞存活重要之形態發生素信號傳導的定域配位。因此，PTK7抗體-藥物結合物可用於在投與個體後降低TIC之頻率。腫瘤起始細胞頻率之降低可由於以下發生：a) 消除、缺失、致敏、沉默或抑制腫瘤起始細胞；b) 控制腫瘤起始細胞之生長、擴增或復發；c) 中斷腫瘤起始細胞之起始、繁殖、維持或增殖；或d) 藉由以其他方式阻礙致腫瘤細胞之存活、再生及/或轉移。在本發明之一些態樣中，腫瘤起始細胞頻率之降低係由於一或多個生理路徑之變化而發生。路徑之變化(無論係藉由減少或消除腫瘤起始細胞或藉由修飾其潛能(例如，誘導之分化、生態位破壞)或以其他方式干擾其對腫瘤環境或其他細胞發揮效應之能力進而容許藉由抑制腫瘤形成、腫瘤維持及/或轉移及復發更有效治療PTK7相關之病症。

可用於評價腫瘤起始細胞頻率之該降低之方法係活體外或活體內限制稀釋分析、較佳之後使用蔔瓦松(Poisson)分佈統計學或評價預定明確事件之頻率(例如活體內生成或不生成腫瘤之能力)之列舉。亦可經由熟知流式細胞或免疫組織化學方式測定頻率值之降低。關於所有上文所提及之方法，參見(例如) Dylla等人 2008, PMCID: PMC2413402及Hoey等人 2009, PMID: 19664991，其各自係全文以引用方式併入本文中。與本發明相容之可用於計算腫瘤起始細胞頻率之其他方法包括可定量流式細胞技術及免疫組織化學染色程序。

使用上文提及之方法中之任一者，則可根據本文之教示定量由所揭示PTK7抗體-藥物結合物提供之TIC (或其中之TPC)之頻率降低。在一些情況下，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可將TIC之頻率降低(藉由上述多種機制，包括消除、誘導之分化、生態位破壞、沉默等)

10%、15%、20%、25%、30%或甚至35%。在本發明之其他態樣中，TIC之頻率之降低可為約40%、45%、50%、55%、60%或65%。在本發明之某些態樣中，所揭示化合物可將TIC之頻率降低70%、75%、80%、85%、90%或甚至95%。應瞭解，TIC頻率之任何降低皆可能引起贅瘤形成之致腫瘤性、持久性、復發及侵犯性之相應降低。

累積證據支持以下假說：腫瘤生長、對療法之抗性及病症復發係由TPC控制。TPC之頻率可在腫瘤類型中或在具有相同腫瘤類型之患者之間作為病症階段及/或腫瘤內之分化程度之產物變化。可使用細胞表面標記組鑑別並富集TPC，該等細胞表面標記之表現通常在具有某些類型之癌症之患者中重疊。TPC係由其在連續移植後起始腫瘤之功能能力最佳定義，而非致腫瘤(NTG)細胞無此能力。首先在乳癌中鑑別出針對獨特腫瘤起始能力富集之實體腫瘤細胞；然而，乳癌包括一系列惡性病。迄今為止，科學團體不能將特定TPC身份與特定病症亞型相關聯，此可成為橫跨各組及各組內之差異結果之基礎且可亦增加不能轉移至診療所之可能性。

本發明提供改良TPC之富集之新細胞表面標記之組合。在特定態樣中，本發明提供促進三陰性乳癌(TNBC) TPC之富集之新細胞表面標記之組合。本發明進一步可鑑別PTK7作為TNBC中之新穎TPC相關治療靶標；其表現程度顯著高於其他乳癌亞型及正常組織中。

可在各種動物中評估PTK7抗體-藥物結合物之藥物動力學並與未結合抗體之藥物動力學進行比較。舉例而言，此可遵循以下完成：在雌性NOD/SCID、裸(nu/nu)或其他品系之免疫受損小鼠、雄性Sprague-Dawley大鼠及雌性食蟹猴中單一靜脈內濃注投與。PTK7抗體-藥物結合物之藥物動力學通常特徵在於在各種物種中之低清除率、低體積分佈及長表觀終末半衰期。預計未結合奧裡斯他汀衍生物之血清濃度低於量化限值。預計單一劑量毒性範圍研究中該等結合物之毒

性特性類似於針對相當劑量下其他抗體-藥物結合物所觀察者。

「誘導細胞凋亡」之抗體、抗體-藥物結合物或其他試劑係誘導程式化細胞死亡者，如藉由膜聯蛋白V之結合、DNA之斷裂、細胞皺縮、內質網之擴張、細胞斷裂及/或膜囊泡(稱作細胞凋亡體)之形成所測定。細胞係腫瘤細胞，例如乳房、卵巢、結腸直腸、前列腺、肝及肺。各種方法可用於評估與細胞凋亡相關之細胞事件。舉例而言，可藉由膜聯蛋白結合量測磷脂醯基絲胺酸(PS)易位；可經由DNA階梯法評估DNA斷裂；且可藉由亞二倍體細胞之任何增加評估核/染色質縮聚以及DNA斷裂。

如本文所用「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指細胞介導之反應，其中表現Fc受體(FcR)之非特異性細胞毒性細胞(例如天然殺傷(NK)細胞、嗜中性球及巨噬細胞)識別靶標細胞上之結合抗體且隨後引起靶標細胞之溶解。可使用活體外ADCC分析(例如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之分析)評價所關注分子之ADCC活性。可用於該等分析之效應細胞包括末梢血單核細胞(PBMC)及NK細胞。或者或另外，可在活體內(例如在諸如揭示於Clynes等人PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中之動物模型等動物模型中)評價所關注分子之ADCC活性。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下靶細胞之溶解。補體活化途徑係藉由補體系統(C1q)之第一組份與與同源抗原複合之分子(例如抗體)之結合來起始。為評價補體活化，可實施CDC分析，例如如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163-171 (1997)中所述。

「人類效應細胞」係表現一或多種FcR且執行效應物功能之白血球。該等細胞可表現FcγRIII且實施抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)效應物功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括末梢血單核

細胞(PBMC)、天然殺傷(NK)細胞、單核球、巨噬細胞、嗜伊紅球及嗜中性球，其中PBMC及NK細胞較佳。具有ADCC活性之抗體通常屬IgG1或IgG3同型。該等ADCC介導之抗體亦可藉由將非ADCC抗體之可變區或可變區片段改造成IgG1或IgG3同型恆定區來製得。

IV. PTK7抗體-藥物結合物之使用

本發明之抗體及抗體藥物-結合物可用於各種應用，包括但不限於治療性治療方法及診斷性治療方法。

IV.A. 活體外應用

本發明提供使用PTK7抗體-藥物結合物之活體外方法。舉例而言，所揭示抗體可單獨或與細胞毒性劑或其他藥物組合使用以特異性結合PTK7陽性癌細胞以自細胞試樣缺失該等細胞。亦提供經由使表現PTK7之細胞與PTK7抗體-藥物結合物接觸來誘導細胞凋亡及/或細胞增殖抑制的方法。於上文中在「用於PTK7抗體-藥物結合物之表徵之功能分析」之標題下闡述代表性活體外方法。

本發明之PTK7抗體-藥物結合物亦可基於其特異性結合PTK7抗原之能力用於活體外檢測PTK7陽性細胞。用於檢測表現PTK7之細胞之方法可包括：(a) 製備具有細胞之生物試樣；(b) 使PTK7抗體-藥物結合物與生物試樣在活體外接觸，其中藥物係可檢測標記；及(c)檢測PTK7抗體-藥物結合物之結合。

本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物亦可用於降低腫瘤試樣中腫瘤起始細胞之頻率。舉例而言，該方法可包括使腫瘤細胞群體(其中該群體包含腫瘤起始細胞及除腫瘤起始細胞外之腫瘤細胞)與PTK7抗體-藥物結合物活體外接觸之步驟；藉此細胞群體中腫瘤起始細胞之百分比降低。如本文所用術語「腫瘤起始細胞」亦係指各種血液惡性病之癌症幹細胞，其特徵並不在於腫瘤本身。代表性腫瘤試樣包括含有腫瘤細胞之任何生物或臨床試樣，例如組織試樣、生檢、血樣、血漿、

唾液、尿液、精液等。

IV.B. 治療性應用

PTK7相關之病症或病況包括(但不限於)間皮瘤、肝膽(肝及膽管)癌、肝細胞癌、原發性或繼發性CNS腫瘤、原發性或繼發性腦瘤、肺癌(NSCLC及SCLC)、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、胃腸癌(例如胃、結腸直腸及十二指腸癌)、乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC)、助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)、雌激素-受體陽性乳癌(ER+)及雙陽性乳癌)、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、睪丸癌、白血病(例如急性骨髓性白血病(AML)及急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病)、淋巴球性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、脊軸腫瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤、腎上腺皮質癌、膽囊癌、多發性骨髓瘤、膽道癌、纖維肉瘤、神經胚細胞瘤、視網膜母細胞瘤及表8及9中顯示之由表現PTK7之細胞類型代表之所有癌症或本文揭示之一或多種癌症之組合。

如本文所用片語「有效量」、「有效劑量」係指達成一或多種有益或期望治療結果所需之藥物、化合物或醫藥組合物之量。對於預防性應用而言，有益或期望結果包括消除或降低病症之風險、減輕其嚴重程度或延遲其發作，該病症包括病症之生物化學、組織學及/或行為症狀、其在病症發展期間呈現之併發症及中間病理學表型。對於治療性應用而言，有益或期望結果包括諸如以下等臨床結果：降低各種PTK7相關之病症之一或多種症狀之發病率或改善該等症狀、降低

治療病症所需之其他藥劑之劑量、增強另一藥劑之效應及/或延遲患者之PTK7相關之病症之進展。

在一個態樣中，本發明提供用於治療個體之與PTK7表現相關之病症的方法。本發明亦提供如本文所述之抗體-藥物結合物或醫藥組合物，其用於治療個體之與PTK7表現相關之病症的方法中。本發明進一步提供如本文所述之抗體-藥物結合物或醫藥組合物之用途，其用於製造用於治療個體之與PTK7表現相關之病症的藥劑。

在本發明之一些態樣中，治療個體之與PTK7表現相關之病症之方法包括向有需要之個體投與有效量之具有如本文所述PTK7抗體-藥物結合物之組合物(例如，醫藥組合物)。與PTK7表現相關之病症包括(但不限於)異常PTK7表現、改變或異常PTK7表現、PTK7過表現及增殖病症(例如，癌症)。

在本發明之一個態樣中，病症係癌症，包括但不限於間皮瘤、肝膽癌(肝及膽管)、肝細胞癌、原發性或繼發性CNS腫瘤、原發性或繼發性腦瘤、肺癌(NSCLC及SCLC)、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、黑色素瘤、卵巢癌、結腸癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、胃腸癌(例如胃、結腸直腸及十二指腸癌)、乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC)、助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)、雌激素-受體陽性乳癌(ER+)及雙陽性乳癌)、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、睪丸癌、白血病(例如急性骨髓性白血病(AML)及急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病)、淋巴球性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、脊軸腫瘤、腦幹膠質瘤、垂體腺瘤、腎上腺皮質癌、膽囊癌、多發性骨髓瘤、膽道癌、纖維肉瘤、神經胚細胞

瘤、視網膜母細胞瘤及表8及9中顯示之由表現PTK7之細胞類型代表之所有癌症或本文揭示之一或多種癌症之組合。

在另一實施例中，適於使用抗-PTK7抗體-藥物結合物靶向之癌症包括表現PTK7之原發性及轉移性癌症，例如乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC)、助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)、雌激素-受體陽性乳癌(ER+)及雙陽性乳癌)；卵巢癌；結腸直腸癌；食道癌；胃癌；黑色素瘤；肉瘤；腎癌；胰臟癌；前列腺癌；肝癌，例如肝細胞癌(HCC)；及肺癌，例如非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC)。

在更具體實施例中，適於使用抗-PTK7抗體-藥物結合物靶向之癌症包括表現PTK7之原發性及轉移性癌症，例如乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC)、助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)、雌激素-受體陽性乳癌(ER+)及雙陽性乳癌) NSCLC、前列腺癌及食道癌。在更具體實施例中，適於使用抗-PTK7抗體-藥物結合物靶向之癌症包括表現PTK7之原發性及轉移性癌症，例如乳癌(例如三陰性乳癌(TNBC))及NSCLC。

在本發明之一些態樣中，提供抑制患有表現PTK7之腫瘤之個體之腫瘤生長或進展的方法，其包括向有需要之個體投與有效量之具有如本文所述PTK7抗體-藥物結合物之組合物。在本發明之其他態樣中，提供抑制個體之表現PTK7之癌細胞轉移之方法，其包括向有需要之個體投與有效量之具有如本文所述PTK7抗體-藥物結合物之組合物。在本發明之其他態樣中，提供誘導個體之表現PTK7之腫瘤消退之方法，其包括向有需要之個體投與有效量之具有如本文所述PTK7抗體-藥物結合物之組合物。在其他態樣中，本發明提供如本文所述抗體-藥物結合物或醫藥組合物，其用於如上文所述方法中。在其他態樣中，本發明提供如本文所述抗體-藥物結合物或醫藥組合物之用途，其用於製造用於上述方法中之藥劑。

因此，可基於生物標記表現選擇欲經本發明之PTK7抗體-藥物結

合物治療之患者，該生物標記表現包括(但不限於)體腫瘤試樣之mRNA (qPCR)及PTK7抗原之升高表現，其產生針對富集靶標表現而非腫瘤來源或組織學選擇之患者群體。靶標表現可量測為隨細胞染色之數目以及細胞染色之強度變化。舉例而言，PTK7之高表現之分類包括藉由免疫組織化學染色測試大於30% (即，40%、50%或60%)之細胞以3+ (利用1至4之量表)之水準對於PTK7呈陽性的彼等患者，而PTK7之中度表現可包括大於20%之細胞以1+至2+細胞染色的彼等患者。靶標表現亦可藉由檢測如本文所述腫瘤起始細胞(TIC)上之PTK7表現來量測。

除PTK7表現外之生物標記亦可用於患者選擇，例如，包括基於多藥物抗性(MDR)之腫瘤之表徵。幾乎50%人類癌症完全抵抗化學療法或僅瞬時反應，之後其不再受常用抗癌藥物影響。此現象稱作MDR且由一些腫瘤類型固有地表現，而其他類型在暴露於化學療法治療後獲得MDR。藥物流出幫浦P-糖蛋白介導與細胞毒性化學治療相關之大多數MDR。可執行癌症患者腫瘤樣品中存在之MDR機制之表型及功能分析以使特定腫瘤類型中特定MDR機制與對化學療法之抗性相關。

癌症生長或異常增殖係指多個指數中之任一者，該等指數表明至更發展癌症形式或疾病狀態之細胞內變化。癌細胞或非贅瘤性增殖病症之細胞之生長之抑制可藉由業內已知之方法(例如延遲腫瘤生長及轉移抑制)分析。用於量測癌症生長之抑制之其他指數生長包括癌症細胞存活減少、腫瘤體積或形態減少(例如，如使用電腦斷層攝影(CT)、超音波掃描或其他成像方法所測定)、腫瘤血管分佈之破壞、延遲過敏性皮膚測試中改良之性能、細胞溶解T-淋巴球之活性增加及腫瘤特異性抗原之含量減少。

所揭示治療方法之期望結果通常係與對照或基線量測相比之可

定量量度。如本文所用，有關術語(例如)「改良」、「增加」或「降低」指示相對於對照之值，例如在起始本文所述治療之前相同個體中之量測或在不存在本文所述治療下對照個體(或多個對照個體)中之量測。代表性對照個體係患有與所治療個體相同形式之過度增殖病症之個體，其與所治療個體之年齡大致相同(以確保所治療個體與對照個體之病症階段相當)。

對療法之反應之變化或改良通常在統計上顯著。如本文所用術語「顯著性」或「顯著」係指兩個或更多個實體之間存在無規締合之概率的統計分析。為確定關係是否係「顯著」或具有「顯著性」，數據之統計操縱可為「p值」。將低於使用者定義之截止點之彼等p值視為顯著。將小於或等於0.1、小於0.05、小於0.01、小於0.005或小於0.001之p值視為顯著。

如上文在標題「III.用於PTK7抗體-藥物結合物之表徵之功能分析」下所闡述，本發明亦提供靶向腫瘤起始細胞之方法。更具體而言，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可缺失、沉默、中和、消除或抑制腫瘤細胞(包括腫瘤起始細胞)之生長、繁殖或存活。

因此，本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物亦可用於降低腫瘤試樣中腫瘤起始細胞之頻率。舉例而言，該方法可包括使腫瘤細胞群體(其中該群體包含腫瘤起始細胞及除腫瘤起始細胞外之腫瘤細胞)與PTK7抗體-藥物結合物接觸之步驟；藉此細胞群體中腫瘤起始細胞之百分比降低。如本文所用術語「腫瘤起始細胞」亦係指各種血液惡性病之癌症幹細胞，其特徵並不在於腫瘤本身。該接觸步驟可在活體外實施，其中腫瘤細胞群體包含於生物試樣中，如上文所述。或者，該接觸步驟可在活體內實施，如在向個體投與PTK7抗體-藥物結合物後發生。

IV.C. 活體內檢測及診斷

在另一態樣中，提供檢測、診斷及/或監測與PTK7表現相關之病症之方法。舉例而言，可用於可檢測部分(例如成像劑及酶-受質標記)標記如本文所述PTK7抗體。如本文所述抗體亦可用於活體內診斷分析(例如活體內成像(例如，PET或SPECT))或染色試劑。

在向個體投與PTK7抗體-藥物結合物後(其中藥物係可檢測標記)及在足夠結合之時間後，可視化由抗體結合之表現PTK7之細胞之生物分佈。所揭示診斷方法可與治療方法組合使用。另外，本發明之PTK7抗體-藥物結合物可出於檢測及治療之雙重目的投與。

代表性非侵襲性檢測方法包括閃爍法(例如，SPECT (單光子發射電腦斷層攝影)、PET (正電子發射斷層攝影)、γ相機成像及直線移動型掃描)、磁共振成像(例如，習用磁共振成像、磁化傳遞成像(MTI)、質子磁共振光譜(MRS)、擴散加權成像(DWI)及功能MR成像(fMRI))及超音波。

IV.D. 調配物

本發明進一步提供包括本文揭示之PTK7抗體-藥物結合物中之任一者及醫藥上可接受之載劑的醫藥組合物。此外，組合物可包括一種以上PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物(例如，識別PTK7之不同表位之PTK7抗體之混合物)。其他實例性組合物包括一種以上PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物，其識別結合至PTK7 (例如，人類PTK7)之不同表位之PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之相同表位或不同物種。

本發明中所用之組合物可進一步包括呈凍乾調配物或水溶液形式之醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington: The Science and practice of Pharmacy第21版, 2005, Lippincott Williams及Wilkins編輯，K. E. Hoover)。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在劑量及濃度下對接受者無毒性，且可包括緩衝液，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如

十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紮氯銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；鰲合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；鹽形成抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。如本文所用「醫藥上可接受之鹽」係指分子或大分子之醫藥上可接受之有機或無機鹽。本文中進一步闡述醫藥上可接受之賦形劑。

PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之各種調配物可用於投與。在本發明之一些態樣中，PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物可淨投與。PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物及醫藥上可接受之賦形劑可於各種調配物中投與。醫藥上可接受之賦形劑為業內已知，且係有利於藥理學有效物質之投與之相對惰性物質。舉例而言，賦形劑可產生形式或一致性，或用作稀釋劑。適宜賦形劑包括(但不限於)穩定劑、潤濕及乳化劑、用於改變滲透性之鹽、囊封劑、緩衝液及皮膚滲透促進劑。用於非經腸及經腸藥物遞送之賦形劑以及調配物闡述於Remington, The Science and Practice of Pharmacy第20版，Mack Publishing, 2000中。

在本發明之一些態樣中，該等試劑經調配用於藉由注射(例如，經腹膜內、靜脈內、皮下、肌內等)投與。因此，該等試劑可與醫藥上可接受之媒劑(例如鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)、右旋糖溶液及諸如此類)組合。特定劑量方案(即劑量、定時及重複)將端視特

定個體及該個體之病史而定。

藉由混合具有期望純度之抗體與呈凍乾調配物或水溶液形式之可選醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington, The Science and Practice of Pharmacy第21版. Mack Publishing, 2005)來製備根據本發明使用之PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之治療性調配物進行儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒性，且可包括緩衝劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；鹽，例如氯化鈉；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紮氯銨、苄索氯銨；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；鹽形成抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

含有PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之脂質體係藉由業內已知方法(例如闡述於以下文獻中之方法)製備：Eppstein等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985)；Hwang等人，Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980)；及美國專利第4,485,045號及第4,544,545號。具有增強循環時間之脂質體揭示於美國專利第5,013,556號中。尤其有用之脂質體可藉由反相蒸發方法利用脂質組合物(包括磷脂醯基膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯基乙醇胺(PEG-PE))生成。經由具有界定孔徑之過濾器擠出脂質體以獲得具有期望直

徑之脂質體。

亦可將活性成份包埋入分別(例如)藉由凝聚技術或藉由介面聚合製備之微膠囊中，例如羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊，該等微膠囊分別呈膠體藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)形式或呈粗乳液形式。該等技術揭示於Remington, The Science and Practice of Pharmacy第21版. Mack Publishing, 2005中。

亦可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適宜實例包括含有抗體之固態疏水性聚合物之半滲透性基質，該等基質呈成型物件形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(甲基丙烯酸-2-羥乙基酯)或聚(乙烯基醇))、聚交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與L-麩胺酸7-乙基酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(例如LUPRON DEPOT ™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)組成之可注射微球體))、蔗糖乙酸異丁酸酯及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。

用於活體內投與之調配物必須無菌。此點很容易藉由(例如)經由無菌過濾膜過濾來完成。通常將治療性PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物置於具有無菌出入孔之容器中，例如具有可由皮下注射針頭刺入之塞子的靜脈內注射溶液袋或小瓶。

本發明組合物可呈用於經口、非經腸或直腸投與或藉由吸入或吹入投與之單元劑型，例如錠劑、丸劑、膠囊、粉劑、顆粒、溶液或懸浮液或栓劑。

製備固體組合物(例如錠劑)時，將主要活性成份與醫藥載劑(例如習用製錠成份，例如玉米澱粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸鎂、磷酸二鈣或樹膠)及其他醫藥稀釋劑(例如水)混合，以形成含有本發明化合物或其無毒性醫藥上可接受之鹽之均質混合物的

固體預調配組合物。在提及該等預調配組合物呈均相時，意指活性成份係均勻分散於整個組合物中，以便可容易地將組合物再分成相等地有效單位劑型，例如，錠劑、丸劑及膠囊。隨後將此固體預調配組合物再分成上述類型之單位劑型，其含有0.1mg至約500 mg之本發明活性成份。新穎組合物之錠劑或丸劑可經包覆或者複合以提供具有持久作用優點之劑型。舉例而言，錠劑或藥丸可包括內部劑量組份及外部劑量組份，後者為前者之包膜形式。該兩種組份可藉由腸溶性層分開，該腸溶性層用以抵抗胃內之分解作用並允許內部組份完整地進入十二指腸或延遲釋放。該等腸溶性層或包衣可使用多種材料，該等材料包括多種聚合酸及聚合酸與諸如蟲膠、十六烷醇及乙酸纖維素等材料之混合物。

適宜表面活性劑包括(具體而言)非離子試劑，例如聚氧乙烯山梨醇酐(例如TWEEN™ 20、40、60、80或85)及其他山梨醇酐(例如Span™ 20、40、60、80或85)。具有表面活性劑之組合物將便捷地包括介於0.05%與5%之間之表面活性劑，且可介於0.1%與2.5%之間。應瞭解，若需要，可添加其他成份，例如甘露醇或其他醫藥上可接受之媒劑。

適宜乳液可使用市售脂肪乳液(例如INTRALIPID™、LIPOSYN™、INFONUTROL™、LIPOFUNDIN™及LIPIPHYSAN™)製備。可將活性成份溶解於預混合乳液組合物中或另一選擇為可將其溶解於油(例如大豆油、紅花油、棉籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)中且在與磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)及水混合後形成乳液。應瞭解，可添加其他成份(例如甘油或葡萄糖)以調節乳液之滲性。適宜乳液通常將含有至多20%油，例如介於5%與20%之間。脂肪乳液可包括介於0.1 μm與1.0 μm之間、具體而言0.1 μm與0.5 μm之間之脂肪微滴，且具有介於5.5至8.0範圍內之pH。

乳液組合物可為彼等藉由混合PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物與INTRALIPID™或其組份(大豆油、卵磷脂、甘油及水)製備者。

供吸入或吹入用之組合物包括醫藥上可接受之水性或有機溶劑或其混合物中之溶液及懸浮液、以及粉末。該等液體或固體組合物可含有上文所述醫藥上可接受之適宜賦形劑。在本發明之一些態樣中，該等組合物係藉由經口或經鼻呼吸途徑或全身效應投與。較佳醫藥上可接受之無菌溶劑中之組合物可藉由使用氣體霧化。經霧化溶液可直接自霧化裝置吸入或可將該霧化裝置附裝至面罩帷罩、帳篷或間歇式正壓呼吸機。溶液、懸浮液或粉末組合物可較佳經口或經鼻自以適當方式遞送調配物之裝置投與。

本發明亦提供用於本發明方法之套組。本發明之套組包括一或多個包括如本文所述PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之容器及根據本發明所述之本發明方法中之任一者使用之說明書。通常，該等說明書包括投與PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物用於上述治療性治療之說明。

與如本文所述PTK7抗體或PTK7抗體結合物之使用有關之說明書通常包括關於用於預期治療之劑量、投藥排程表及投與途徑的資訊。容器可為單位劑量、體包裝(例如，多劑量包裝)或亞單位劑量。本發明套組中供應之說明書通常係標記或包裝插頁(例如，套組中包括在紙頁)上之書面說明書，但亦可接受機讀說明書(例如，載於磁性或光學存儲盤上之說明書)。

本發明之套組係呈適宜包裝。適宜包裝包括(但不限於)小瓶、瓶、廣口瓶、撓性包裝(例如，密封Mylar或塑膠袋)及諸如此類。亦涵蓋與特定裝置(例如吸入器、經鼻投與裝置(例如，霧化器)或輸注裝置(例如微型幫浦)組合使用之包裝。套組可具有無菌出入孔(例如，容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。容

器亦可具有無菌出入孔(例如，容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。組合物中之至少一種活性劑係PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物。容器可進一步包括第二醫藥活性劑。

套組可視情況提供額外組份，例如緩衝液及解釋性資訊。通常，套組包括容器及位於該容器上或與該容器相連之標記或包裝插頁。

IV.E. 劑量及投與

對於活體外及活體內應用，PTK7抗體-藥物結合物係以有效劑量提供或投與。在臨床背景下，藥物、化合物或醫藥組合物之有效劑量係足以達成直接或間接預防性或治療性治療之量。有效劑量可以一或多次投與來投與。藥物、化合物或醫藥組合物之有效劑量可或可不結合另一藥物、化合物或醫藥組合物達成。因此，可在投與一或多種治療劑之背景下考慮「有效劑量」，且若結合一或多種其他藥劑可達成或達成期望結果，則可認為單一藥劑係以有效量給予。對於使用所揭示PTK7抗體-藥物結合物之PTK7陽性細胞之檢測，向個體投與本發明組合物之可檢測量，即，使得可在活體外或活體內測定結合物之存在之結合物的劑量。

舉例而言，在投與具有癌症之個體時，有效量包括足以引發抗癌活性(包括癌細胞細胞溶解、抑制癌細胞增殖、誘導癌細胞細胞凋亡、減少癌細胞抗原、延遲腫瘤生長及/或抑制轉移)之量。腫瘤皺縮被廣泛接受為效能之臨床替代標記。效能之另一廣泛接受之標記係無進展之存活。

PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物可經由任何適宜途徑投與個體。熟習此項技術者應瞭解，本文所述實例並不意欲具有限制性，而是闡釋可用技術。因此，在本發明之一些態樣中，PTK7抗體或PTK7抗體結合物係根據已知方法、例如靜脈內投與(例如以濃度形式或藉

由在一段時間內連續輸注)、藉由肌內、腹膜內、腦脊髓內、顱內、經皮、皮下、關節內、舌下、滑膜內、經由吹入、鞘內、經口、吸入或局部途徑投與個體。投與可為全身性投與(例如靜脈內投與)或局部投與。用於液體調配物之市售霧化器(包括噴射霧化器及超音波霧化器)可用於投與。液體調配物可直接霧化且凍乾粉末可在重構後霧化。或者，PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物可使用氟碳調配物及定量吸入器氣溶膠化或以凍乾之研磨粉末形式吸入。

在本發明之一些態樣中，PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物係經由位點特異性或靶向局部遞送技術投與。位點特異性或靶向局部遞送技術之實例包括PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之多種可植入儲積源或局部遞送導管，例如輸注導管、留置導管、或針導管、合成移植物、外膜套、分流器及支架或其他可植入裝置、位點特異性載劑、直接注射或直接施加。參見(例如) PCT國際公開案第WO 2000/53211號及美國專利第5,981,568號。

如本文所述之PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物可使用任何適宜方法(包括藉由注射(例如，腹膜內、靜脈內、皮下、肌內等))投與。PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物亦可經由吸入投與，如本文所述。通常，對於PTK7抗體及PTK7抗體-藥物結合物之投與，初始候選劑量可為約2 mg/kg。出於本發明之目的，端視上文提及之因素而定，典型日劑量可介於3 μg/kg至30 μg/kg至300 μg/kg至3 mg/kg、至30 mg/kg、至100 mg/kg或更大之大約任一者之範圍內。舉例而言，可使用約1 mg/kg、約2.5 mg/kg、約5 mg/kg、約10 mg/kg及約25 mg/kg之劑量。對於經若干天或更長時間之重複投與而言，端視病症而定，持續治療直至出現症狀之期望阻抑或直至達成足夠治療程度以(例如)抑制或延遲腫瘤生長/進展或癌細胞之轉移。實例性投藥方案包括投與約2 mg/kg之初始劑量，之後每週約1 mg/kg PTK7抗體或PTK7

抗體-藥物結合物之維持劑量、或每隔一週約1 mg/kg之維持劑量。其他實例性投藥方案包括投與增加劑量(例如，1 mg/kg之初始劑量且逐漸增加至每週或更長時間段一或多個更高劑量)。端視從業人員希望達成之藥物動力學衰減之型式而定，其他劑量方案亦可為有用的。舉例而言，在本發明之一些態樣中，涵蓋每週投藥一至四次。在其他態樣中，涵蓋每月一次或每隔一個月一次或每三個月一次投藥，以及每週、每兩週及每三週投與。此療法之進展可藉由習用技術及分析來容易地監測。投藥方案(包括所用之PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物)可隨時間變化。

出於本發明之目的，PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之適當劑量將端視所用之PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物(或其組合物)、欲治療之症狀之類型及嚴重程度、藥劑是否係出於治療目的投與、先前療法、患者之臨床史及對藥劑之反應、患者對於所投與藥劑之清除率及主治醫師之決定而定。臨床醫師可投與PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物直至達成獲得期望結果及以上之劑量。劑量及/或頻率可在療程內變化，但亦可保持恆定。經驗考慮因素(例如半衰期)通常將促使劑量之測定。舉例而言，可使用與人類免疫系統相容之抗體(例如人類化抗體或完全人類抗體)以延長抗體之半衰期並防止抗體由宿主之免疫系統攻擊。投與頻率可經測定且在療程內進行條件，且通常係(但不必)基於症狀之治療及/或阻抑及/或改善及/或延遲，例如腫瘤生長抑制或延遲等。或者，PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之持續連續釋放調配物可適當。用於達成持續釋放之各種調配物及裝置為業內已知。

在本發明之一些態樣中，可在已給予一或多次PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物投與之個體中憑經驗測定PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之劑量。給予個體PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之遞增

劑量。為評價效能，可追蹤病症之指示因子。

端視(例如)接受者之生理病症、投與目的係治療性或預防性及熟練從業人員已知之其他因素而定，根據本發明方法之PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之投與可連續或間歇。PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物之投與可為在預選時間段內基本上連續或可以一系列間隔性劑量。

IV.F. 組合療法

在本發明之一些態樣中，本文所述方法進一步包括用其他形式之療法治療個體之步驟。在一些態樣中，其他形式之療法係其他抗癌療法，包括但不限於化學療法、輻射、手術、激素療法及/或其他免疫療法。

所揭示PTK7抗體-藥物結合物可作為初始治療投與，或用於治療對習用療法無反應之病症。另外，PTK7抗體-藥物結合物可與其他療法(例如，手術切除、放射、其他抗癌藥物等)組合使用以藉此引發加性或強化治療效應及/或降低一些抗癌劑之肝細胞毒性。本發明之PTK7抗體-藥物結合物可與其他藥劑共投與或共調配，或經調配用於與其他藥劑以任一次序投與。

可用於組合療法之代表性藥劑包括如在副標題「藥物」下可用於製備PTK7抗體-藥物結合物之上文所述藥物中之任一者。本發明之PTK7抗體-藥物結合物亦可與其他治療性抗體及抗體-藥物結合物(包括除所揭示抗-PTK7抗體外之抗-PTK7抗體以及靶向不同抗原之抗體及結合物)組合使用。可單獨使用或作為抗體-藥物結合物使用之代表性抗體包括抗5T4抗體(例如，A1、A2及A3)、抗CD19抗體、抗CD20抗體(例如，RITUXAN®、ZEVALIN®、BEXXAR®)、抗CD22抗體、抗CD33抗體(例如，MYLOTARG®)、抗CD33抗體-藥物結合物、抗Lewis Y抗體(例如，Hu3S193、Mthu3S193、AGmthu3S193)、抗HER-

2抗體(例如，HERCEPTIN® (曲妥珠單抗(trastuzumab))、MDX-210、OMNITARG® (帕妥珠單抗(pertuzumab)、rhuMAb 2C4))、抗CD52抗體(例如，CAMPATH®)、抗EGFR抗體(例如，ERBITUX® (西妥昔單抗(cetuximab))、ABX-EGF (帕尼單抗) (panitumumab))、抗VEGF抗體(例如，AVASTIN® (貝伐珠單抗(bevacizumab)))、抗DNA/組織蛋白複合抗體(例如，ch-TNT-1/b)、抗CEA抗體(例如，CEA-Cide、YMB-1003) hLM609、抗CD47抗體(例如，6H9)、抗VEGFR2 (或含有激酶插入結構域之受體，KDR)抗體(例如，IMC-1C11)、抗Ep-CAM抗體(例如，ING-1)、抗FAP抗體(例如，西羅珠單抗(sibrotuzumab))、抗DR4抗體(例如，TRAIL-R)、抗助孕酮受體抗體(例如，2C5)、抗CA19.9抗體(例如，GIVAREX®)及抗纖維蛋白抗體(例如，MH-1)。

所揭示PTK7抗體-藥物結合物亦可與作為治療方案之一部分之細胞毒性劑之一或多種組合一起投與。出於此目的之有用之細胞毒性製劑包括CHOPP (環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼、普賴松及丙卡巴肼)；CHOP (環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及普賴松)；COP (環磷醯胺、長春新鹼、普賴松)；CAP-BOP (環磷醯胺、多柔比星、丙卡巴肼、博來黴素、長春新鹼及普賴松)；m-BACOD (胺甲喋呤、博來黴素、多柔比星、環磷醯胺、長春新鹼、地塞米松及甲醯四氫葉酸)；ProMACE-MOPP (普賴松、胺甲喋呤、多柔比星、環磷醯胺、依託泊苷、甲醯四氫葉酸、二氯甲基二乙胺(mechloethamine)、長春新鹼、普賴松及丙卡巴肼)；ProMACE-CytaBOM (普賴松、胺甲喋呤、多柔比星、環磷醯胺、依託泊苷、甲醯四氫葉酸、阿糖胞苷、博來黴素及長春新鹼)；MACOP-B (胺甲喋呤、多柔比星、環磷醯胺、長春新鹼、普賴松、博來黴素及甲醯四氫葉酸)；MOPP (二氯甲基二乙胺、長春新鹼、普賴松及丙卡巴肼)；ABVD (阿德力黴素/多柔比星、博來黴素、長春鹼及達卡巴嗪)；與ABV (阿德力黴素/多柔比

星、博來黴素、長春鹼)交替之MOPP (二氯甲基二乙胺、長春新鹼、普賴松及丙卡巴肼)；與ABVD (阿德力黴素/多柔比星、博來黴素、長春鹼及達卡巴嗪)交替之MOPP (二氯甲基二乙胺、長春新鹼、普賴松及丙卡巴肼(procarbazin))；ChIVPP (氮芥苯丁酸、長春鹼、丙卡巴肼、普賴松)；IMVP-16 (異環磷醯胺、胺甲喋呤、依託泊苷)；MIME (甲基-gag、異環磷醯胺、胺甲喋呤、依託泊苷)；DHAP (地塞米松、高劑量阿糖胞苷及順鉑)；ESHAP (依託泊苷、甲基普賴松穠(methylpredisolone)、HD阿糖胞苷及順鉑)；CEPP(B) (環磷醯胺、依託泊苷、丙卡巴肼、普賴松及博來黴素)；CAMP (洛莫司汀、米托蒽醌、阿糖胞苷及普賴松)；及CVP-1 (環磷醯胺、長春新鹼及普賴松)；DHAP (順鉑、高劑量 阿糖胞苷及地塞米松)；CAP (環磷醯胺、多柔比星、順鉑)；PV (順鉑、長春鹼或長春地辛)；CE (卡鉑、依託泊苷)；EP (依託泊苷、順鉑)；MVP (絲裂黴素、長春鹼或長春地辛、順鉑)；PFL (順鉑、5-氟尿嘧啶、甲醯四氫葉酸)；IM (異環磷醯胺、絲裂黴素)；IE (異環磷醯胺、依託泊苷)；IP (異環磷醯胺、順鉑)；MIP (絲裂黴素、異環磷醯胺、順鉑)；ICE (異環磷醯胺、卡鉑、依託泊苷)；PIE (順鉑、異環磷醯胺、依託泊苷)；長春瑞濱及順鉑；卡鉑及太平洋紫杉醇；CAV (環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼)；CAE (環磷醯胺、多柔比星、依託泊苷)；CAVE (環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼、依託泊苷)；EP (依託泊苷、順鉑)；及CMCcV (環磷醯胺、胺甲喋呤、洛莫司汀、長春新鹼)。

PTK7抗體-藥物結合物可與全身性抗癌藥物(例如埃坡黴素(epithilone) (BMS-247550、Epo-906)、紫杉烷之再調配物(亞伯杉烷(Abraxane)、Xyotax)、微管蛋白抑制劑(MST-997、TTI-237))或與靶向細胞毒素(例如CMD-193及SGN-15)組合使用。其他有用之抗癌劑包括TAXOTERE®、TARCEVA®、GEMZAR® (吉西他濱)、5-FU、

AVASTIN® ERBITUX® 、 TROVAX® 、 麻 安 莫 單 抗 (anatumomab mafenatox)、來曲唑(letrazole)、多西他賽及蒽環。

對於組合療法而言，PTK7抗體-藥物結合物及/或一或多種其他治療劑或診斷劑係在適於預期療法或診斷之性能之任何時間框內投與。因此，單一藥劑可實質上同時投與(即，以單一調配物形式或在數分鐘或小時內)或以任一次序連續投與。舉例而言，單一藥劑治療可在彼此約1年內、例如在約10、8、6、4或2個月內、或在4、3、2或1週內、或在約5、4、3、2或1天內投與。PTK7抗體-藥物結合物與第二治療劑之組合之投與較佳引發較單獨任一者大之效應。

在本發明之一些態樣中，其他形式之療法包括除如本文所述PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物外亦投與一或多種治療劑。治療劑包括(但不限於)第二抗體(例如，抗VEGF抗體、抗HER2抗體、抗CD25抗體及/或抗CD20抗體)、血管生成抑制劑、細胞毒性劑、抗發炎劑(例如，太平洋紫杉醇、多西他賽、順鉑、多柔比星、普賴松、絲裂黴素、助孕酮、他莫昔芬或氟尿嘧啶)。

在本發明之一些態樣中，可存在一種以上PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物。可存在至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種或更多種不同PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物。通常，彼等PTK7抗體或PTK7抗體-藥物結合物可具有不會不利地影響彼此之互補活性。舉例而言，可使用以下PTK7抗體中之一或多者：針對PTK7上之一個表位之第一PTK7抗體及針對PTK7上之不同表位之第二PTK7抗體。

所揭示組合療法可引發協同治療效應，即較其個別效應或治療結果之和大之效應。本文闡述可量測之治療結果。舉例而言，協同治療效應可為由單一藥劑引發之治療效應或由給定組合之單一藥劑引發之治療效應之和之至少約2倍、或至少約5倍、或至少約10倍、或至少

約20倍、或至少約50倍、或至少約100倍的效應。協同治療效應亦可觀察為與由單一藥劑引發之治療效應或由給定組合之單一藥劑引發之治療效應之和相比，治療效應增加至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少100%或更多。協同效應亦係在組合使用治療劑時允許其減少投用的效應。

除非另外指示，否則如貫穿實施方式所用，術語「約」意指在術語「約」之後之值之值+/- 1%。

實例

提供以下實例僅係出於闡釋性目的，而不意欲以任何方式限制本發明之範疇。實際上，除彼等本文所示及闡述者以外，彼等熟習此項技術者根據上述說明將明瞭本發明之各種修改，且該等修改屬隨附申請專利範圍之範疇內。

實例1

抗-PTK7抗體之生成及人類化

呈鼠類抗體形式之PTK-7抗體係根據業內已知且如PCT國際公開案第WO 2012/112943號中所述之程序產生。使用互補決定區(CDR)移植人類化所生成鼠類抗體。重鏈及輕鏈之人類框架係基於關於功能人類種系基因之序列及結構類似性加以選擇。藉由比較小鼠正準CDR結構與具有相同正準結構之人類候選者評估功能類似性，如Chothia等人 (上文文獻)中所述。

更具體而言，使用電腦輻照之CDR-移植方法(Abysis Database, UCL Business PIc.)及標準分子改造技術人類化PCT國際公開案第WO 2012/112943號中所述之本文中命名為mu23、mu24及mu58之鼠類抗體，以提供人類化mu23、mu24及mu58(下文中分別為hu23、hu24及hu58)。可變區之人類框架區係基於其與小鼠框架序列及其正準結構

之最高序列同源性加以選擇。出於分析之目的，將胺基酸分配至CDR結構域中之每一者係根據Kabat等人之編號。製造若干人類化抗體變體以利用通常保留與人類框架區締合之小鼠雜交瘤之抗原結合互補決定區(CDR)的人類化抗體生成最佳人類化抗體。Hu23、hu24及hu58 mAb以與其鼠類對應體類似之親和力結合至人類PTK7抗原，如使用BIACORE®系統所量測。

使用業內公認之技術執行分子改造程序。根據製造商之方案(TRIZOL® Plus RNA純化系統，Life Technologies)自雜交瘤提取總mRNA。經設計以使每一雜交瘤擴增之序列特異性5'前導序列引子與3'人類*Cγl*引子組合使用以擴增並選殖每一人類化抗體之可變區。類似地，經特定設計以使每一Vk區擴增之*5'* Vk前導序列與對人類κ恆定區具有特異性之單一反向引子組合用於擴增並選殖κ輕鏈。將擴增片段選殖為嵌合人類γ1/κ鏈且其用作每一人類化mAb之基準。

根據核苷酸序列資訊，獲得關於鼠類抗體mu23、mu24及mu58之重鏈及輕鏈之V、D及J基因區段的數據。基於序列數據，設計對抗體之Ig VH及Vk鏈之前導序列具有特異性之新引子組用於重組單株抗體之選殖。隨後，將V-(D)-J序列與小鼠Ig種系序列進行比對。

mu23之重鏈基因鑑別為VH3609 (V)、DSP2.3 (D)及JH3。mu24之重鏈基因鑑別為VHJ558 (V)、DSP2.7 (D)及JH4。mu58之重鏈基因鑑別為IGHV 4-1 (V)、DFL 16.1 (D)及JH4。所有三條輕鏈皆係κ類別。對於mu23而言，輕鏈基因鑑別為IGKVI4-111及JK5，對於mu24而言鑑別為IGKV3-5及JK1，且對於mu58而言鑑別為IGKV17-121及JK4種系序列。該等結果概述於下表2中。

表2

純系	VH	DH	JH	VL	JL
mu23	VH3609	DSP2.3	JH3	IGKVI4-111	JK5

mu24	VHJ558	DSP2.7	JH4	IGKV3-5	JKl
mu58	IGHV4-1	DFL16.1	JH4	IGKV17-121	JK4

將自所有三個純系所得之重鏈及輕鏈序列與功能人類可變區序列進行比對且針對同源性及正準結構進行審查。對於人類化抗-PTK7抗體hu23、hu24及hu58，人類化重鏈及輕鏈分析之結果分別示於下表3及4中。

表3

人類化 mAb	人類 VH	人類 DH	人類 JH	與人類種系序列之同源性%	與小鼠種系序列之同源性%
hu23	VH2-5	IGHD5-5	JH4	91	81
hu24	VH1-3	IGHD4-23	JH6	82	82
hu58	VH3-7	IGHD2-8	JH6	86	88

表4

人類化 mAb	人類 VK	人類 JK	與人類種系序列之同源性%	與小鼠序列之同源性%
hu23	O8	JK5	91	81
hu24	L6	JK1	82	82
hu58	B2	JK4	86	88

hu23、hu24及hu58之胺基酸序列及相關核酸序列在上文中示於上表1中。hu23、hu24及hu58之VH區之胺基酸序列分別示於SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 25及SEQ ID NO: 49中，且相應核酸序列分別闡述於SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 26及SEQ ID NO: 50中。hu23、hu24及hu58之κ VL區之胺基酸序列分別示於SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 39及SEQ ID NO: 63中，且相應核酸序列分別闡述於SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 40及SEQ ID NO: 64中。

如下文實例中所展示，上文所提及之人類化抗體中之每一者用作根據本文教示之有效抗-PTK7抗體-藥物結合物。

實例2

人類化抗體之表現

使用業內公認之技術且如PCT國際公開案第WO 2012/112943號中所述表現並分離抗-PTK7抗體hu23、hu24及hu58。將重鏈之合成人類化可變DNA片段(Integrated DNA Technologies)選殖至人類IgG 1表現載體中。將可變輕鏈片段選殖至人類C-κ表現載體中。藉由將相應重鏈及輕鏈共轉染至CHO細胞中表現每一抗體。

更具體而言，對於抗體產生而言，將人類化可變基因PCR產物定向選殖至人類免疫球蛋白表現載體中。Ig基因特異性PCR中所用之所有引子包括IgH之限制位點、AgeI及XhoI、Igk之XmaI及DraIII，其容許定向選殖至分別含有人類IgG 1及Igk恆定區之表現載體中。簡言之，利用Qiaquick PCR純化套組(Qiagen公司)純化PCR產物，之後分別用AgeI及XhoI (IgH)、XmaI及DraIII (Igk)消解。在連接至表現載體中之前純化經消解之PCR產物。連接反應係以10 μL之總體積利用200U T4-DNA連接酶(New England Biolabs)、7.5 μL經消解且純化之基因特異性PCR產物及25 ng線性化載體DNA實施。利用3 μL連接產物經由於42℃下熱激轉變勝任大腸桿菌DH10B細菌(Life Technologies)並將其放置於胺苄青黴素板(100 μg/mL)上。隨後將VH區之AgeI-EcoRI片段插入pEE6.4HulgG1 (Lonza AG)表現載體之相同位點中，同時將合成XmaI-DraIII Vκ插入物選殖至各別pEE12.4Hu-κ表現載體之XmaI-DraIII位點中。

藉由使用293fectin用適當質體轉染HEK 293細胞生成產生人類化抗體之細胞。利用QIAprep自旋管柱(Qiagen)純化質體DNA。在標準條件下在補充有10%熱滅活FCS、100 μglmL鏈黴素、100 U/mL青黴素G (所有皆來自Life Technologies)之杜貝克氏改良伊氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium，DMEM)中在150 mm板(Falcon,

Becton Dickinson)中培養人類胚腎(HEK) 293T (ATCC編號CRL-11268)細胞。

對於瞬時轉染而言，使細胞生長至80%鋪滿。向與1.5 mL opti-MEM中之50 μL HEK 293轉染試劑混合之1.5 mL OptiMEM中添加相等量之IgH及相應IgL鏈載體DNA (12.5 μg每一載體DNA)。將混合物於室溫下培育30分鐘並均勻分佈至培養板。轉染後三天收穫上清液，由20 mL補充有10% FBS之新鮮DMEM更換且在轉化後第6天再次收穫。藉由以800xg離心10分鐘自細胞碎片清除培養上清液並於4℃下儲存。利用蛋白G珠粒(GE Healthcare)純化重組嵌合及人類化抗體。需要藉由離子交換層析進一步純化hu23及hu24以達成與vc0101及mc8261之恆定、可再現生物結合。在無額外純化步驟情況下，實例10中所述之硫醇還原之效率及因此所得ADC藥物-對-抗體比率(DAR)顯著且不可預測地波動。未預計對額外純化之需求，但憑經驗測定。

實例3

hu24結合之表徵

藉由SPR使用Biacore™ 2000 (GE Healthcare)測定嵌合及人類化純系24 mAb之比較。使用抗人類抗體捕獲套組以將捕獲mAb固定於CM5生物感測器晶片上。在每一抗原注射週期之前，將2 μg/mL之濃度之人類化mAb捕獲於表面上，其中接觸時間為2分鐘且流速為5 μL/分鐘。自基線之所捕獲mAb載量以80-120反應單位恆定。在測試物件捕獲及1分鐘基線後，使單體人類PTK7蛋白以50 nM、25 nM及12.5 nM之濃度流經表面用於2分鐘締合期，之後2-分鐘解離期，其中流速為5 μL/分鐘。在每一週期後，利用3M $MgCl_2$之30秒接觸時間以10 μL/分鐘再生抗人類捕獲表面。

藉由最初自特異性mAb結合表面減去對照IgG表面處理Biacore™數據。隨後將反應數據縮短至締合及解離期。使用利用三種不同抗原

濃度之所得反應曲線以擬合1:1 Langmuir結合模型並藉由計算之K_{on}及K_{off}動力學常數生成表觀親和力，且平衡解離常數定義為Kd = K_{off}/K_{on}。所有數據分析步驟皆係在BiaEvaluation 軟體3.1 (GE Healthcare)中完成。

嵌合及人類化mAb之間之計算之親和力及動力學常數經測定在2倍內(表5)。

表5. 嵌合及人類化純系24 mAb對人類PTK7之親和力常數

測試mAb	**K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)**	**K_{off} (s^{-1})**	**Kd (nM)**
嵌合純系24	3.9 E+05	2.3 E-04	0.6
人類化純系24 (hu24)	2.7 E+05	3.1 E-04	1.2

K_{on}= 締合速率常數；K_{off} = 解離速率常數；Kd = 平衡解離常數；M = 莫耳濃度；mAb = 單株抗體；s = 秒；nM = 奈米莫耳濃度；使用重組人類PTK7胞外結構域。

為測定由hu24 mAb識別之表位，評估其與PTK7胞外結構域之若干變體之結合。PTK7胞外結構域包括7個Ig結構域，且變體經設計以包括兩個或更多個鄰接Ig結構域。變體表現為Fc融合蛋白，且藉由ELISA測定hu24結合。

利用擴增如藉由結構同源性預測之各種鄰接PTK7 Ig結構域之引子設計構築體。使用標準分子生物學技術使所得序列與人類免疫球蛋白G2 (IgG2) Fc結構域在框內且在其上游融合。將Fc融合蛋白轉染至哺乳動物細胞中且72小時後收穫上清液。藉由ELISA測試抗-PTK7 mAb hu24結合至具有定義Ig結構域之PTK7蛋白質變體的能力。

結果顯示，hu24結合至PTK7需要Ig結構域1-4 (表6)，且暗示mAb識別PTK7之三級結構特徵。

表6. hu24 mAb與PTK7結構域之結合

構築體中之PTK7 ECD Ig結構域	**1-2**	**2-3**	**1-4**	**1-5**	**3-7**	**6-7**	**1-7**
hu24 mAb結合	-	-	+	+	-	-	+

ECD = 細胞外結構域. Ig = 免疫球蛋白.

結構域1-2 =殘基31-236；

結構域2-3 =殘基110-321；

結構域1-4 =殘基31-409；

結構域1-5 =殘基31-510；

結構域3-7 =殘基230-703；

結構域6-7 =殘基503-703；

結構域1-7 = 全長ECD，殘基31-703。

實施實驗以表徵抗-PTK7 mAb hu24之細胞結合性質。為確認抗原特異性，在如藉由免疫印跡所測定具有實質或可忽略PTK7表現之細胞系中評估結合。

藉由凝膠電泳分解全細胞提取物並將其轉移至硝基纖維素膜。將膜與hu6M024在具有0.1% Tween-20 (TBST)，其具有5重量/體積%之脫脂乳)之Tris -緩衝鹽水中一起培育，隨後用TBST洗滌，與辣根過氧化酶結合之山羊抗人類抗體(Santa Cruz Biotechnology編號sc-2453)一起培育並在暴露於化學發光基材之前廣泛洗滌。

免疫印跡指示細胞系BxPC3及MDAMB436中之PTK7實質上表現且細胞系ASPC1中之PTK7可忽略表現(圖2A)。利用hu24之基於流式細胞術之細胞結合結果與免疫印跡數據完全一致(圖2B)，其展示hu24之抗原特異性。

執行額外流式細胞術實驗以評估hu24 mAb與具有PTK7之內源性表現之癌細胞系之結合。簡言之，利用TrypLE™ Express (Gibco®編

號12604-021)解離黏附細胞，隨後用培養基中和。藉由離心收穫懸浮細胞。將細胞再懸浮於具有所述濃度之mAb之染色緩衝液(具有3% BSA之PBS)中並在冰上培育30分鐘。將細胞在染色緩衝液中洗滌，再懸浮於具有藻紅素(PE)標記之抗人類抗體(Jackson ImmunoResearch編號109-115-098)之染色緩衝液中並在冰上培育30分鐘。將細胞洗滌，再懸浮於具有7-AAD存活染劑(BD Biosciences, Pharmingen編號51-68981E)之染色緩衝液中並藉由流式細胞術利用BD FACSCalibur™進行分析。針對每一試樣測定活細胞群體之PE通道之平均螢光強度(MFI)。

Hu24 mAb於所測試最低濃度(0.1 μg/ml)下展現與各種癌細胞系之結合。相反，對照抗體於所測試最高濃度(10 μg/ml)下不顯示可估計之結合(表7)。

表7. hu24 mAb與癌細胞系之結合性質

癌細胞系 (腫瘤類型)	MFI，對照mAb	MFI，hu6M024 mAb		
	10 μg/mL	0.1 μg/mL	1 μg/mL	10 μg/mL
H661 (肺癌)	4.2	60	243	309
H446 (肺癌)	11	95	342	411
U2OS (骨肉瘤)	5.3	122	385	431

mAb = 單株抗體；MFI = 平均螢光強度；μg/mL = 微克/毫升.

實例4

各種癌細胞系中之PTK7之表現

抗-PTK7抗體hu23及hu24展現特異性結合至培養癌細胞系，其係自寬範圍之腫瘤類型(包括實體及血液適應症)確立，參見下表8。使用TrypLE Express (GIBCO)解離黏附細胞，用細胞培養基中和並計數。將細胞以5×10^5個細胞/100 μL培養基/孔平鋪於U形底96孔板中。於4℃下將板以300xg離心5分鐘以使細胞成糰粒並棄去上清液。將每

一糰粒再懸浮於PBS中之3% BSA中之10 μg/mL hu23、hu24或非結合對照抗體中，且將板在冰上培育30分鐘。將板離心並將細胞糰粒在200 μL PBS中之冰冷3% BSA中洗滌。將每一細胞糰粒再懸浮於1:50稀釋於PBS中之3% BSA之100 μL R-藻紅素(PE)結合之山羊抗人類IgG Fc片段中，且將板在冰上培育30分鐘。將板離心並於4℃下將細胞糰粒在200 μL PBS中之3% BSA中洗滌。將每一糰粒再懸浮於100 μL PBS中之3% BSA中並轉移至含有250 μL PBS中之3% BSA之5 mL聚碳酸酯管。藉由流式細胞術每試樣使用5 μL 7-胺基-放線菌素D (7-AAD)染色溶液作為存活染劑來分析試樣。自分析排除無活力細胞。

表8中之數據顯示藉由流式細胞術之結合至癌細胞系之抗體的平均螢光強度(MFI)。與人類化抗體hu23及hu24結合之細胞指示多種細胞系中之PTK7表現。PTK7表現在各種非小細胞肺癌(NSCLC)、小細胞肺癌(SCLC)、結腸、乳房、胰臟及紅白血病癌細胞系中係顯著的。不結合至PTK7之陰性對照抗體用於比較。

表8

細胞系	**起源之腫瘤類型**	**平均螢光強度(10 μg/ml Ab)**		
		hu24	hu23	陰性對照Ab
H520	肺(NSCLC)	1384	1212	4.8
H446	肺(SCLC)	937	915	7.1
H1048	肺(SCLC)	955	900	4.4
DMS114	肺(SCLC)	793	568	9.9
HCT116	結腸	629	436	17.8
H69	肺(SCLC)	404	391	11.2
MDAMB468	乳房(BR)	364	302	12
MDAMB361-DYT2	乳房(BR)	295	227	8.7
BxPC3	胰臟	207	192	4.6
MDAMB436	乳房(BR)	189	171	3.5
H1299	肺(NSCLC)	70.9	59.2	3

SKBR3	乳房(BR)	39.7	31.2	14.9
DU4475	乳房(BR)	697	ND	3.8
DMS79	肺(SCLC)	682	ND	8.5
H522	肺(NSCLC)	672	ND	3.8
MiaPaca	胰臟	611	ND	3.5
H358	肺(NSCLC)	474	ND	4.5
HCC70	乳房(BR)	474	ND	9.4
H1975	肺(NSCLC)	444	ND	4.8
H526	肺(NSCLC)	438	ND	12.2
H661	肺(NSCLC)	376	ND	3.8
HCC1937	乳房(BR)	370	ND	7.8
H596	肺(NSCLC)	355	ND	21.4
HCC827	肺(NSCLC)	251	ND	5.8
Hs700T	胰臟	241	ND	4.9
HCC38	乳房(BR)	227	ND	7.2
TF1a	紅白血病(AML)	208	ND	6.2
H2110	肺(NSCLC)	171	ND	4.9
KG1	紅白血病(AML)	159	ND	5.2
TF1	紅白血病(AML)	135	ND	5.9
Hs578T	乳房(BR)	124	ND	2.7
BT-549	乳房(BR)	114	ND	3.6
HCC1806	乳房(BR)	77.5	ND	4.6
Kasumi-1	紅白血病(AML)	68.2	ND	5.3
K562	慢性 骨髓性白血病(CML)	56.1	ND	54.7
HEL	紅白血病(AML)	46	ND	15.7
RL	非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)	44.2	ND	29.8
Raji	非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)	36.3	ND	20.3
HL60 MX2	前髓細胞性白血病(AML)	25.7	ND	25.2
HEL92.1	紅白血病(AML)	23	ND	7.7
NB4	前髓細胞性白血病(AML)	19.5	ND	6.8

RPMI8226	多發性骨髓瘤	17.8	ND	8.3
HL60	前髓細胞性白血病(AML)	12.7	ND	10.9
MV411	單核球性白血病	10.1	ND	7.7
U937	單核球性白血病	5.8	ND	5.0
ASPC1	胰臟	4.5	ND	2.6
THP-1	單核球性白血病	4.0	ND	4.0
EKVX	肺(NSCLC)	3.8	ND	3.1

ND=無數據.

使用Agilent SurePrint GE 8x60 v2陣列使用自PDX腫瘤細胞分離之總RNA生成表9中所示針對29 PDX腫瘤系之微陣列數據。利用單色收集之原始微陣列數據之處理包括背景減除及分位數正規化。將正規化數據轉變為以2為底之對數，從而生成用於下游分析中之基因表現值。此數據反映與指示PDX細胞系相關之PTK7表現之相對量。BR=乳房，LU-肺，OV=卵巢，SK=黑色素瘤，CR=結腸直腸，LIV=肝。

表9

PDX細胞系	**相對mRNA含量**
BR13	484.4
BR22	714.1
BR31	210.8
BR56	393.4
BR64	237.2
BR120	319.6
BR36	324.0
BR133	639.1
LU176	643.6
LU135	576.0
LU58	113.8
OV39	238.9

OV45	410.1
OV55	364.6
SK23	464.7
SK25	171.3
SK19	484.4
LU86	288.0
LU95	377.4
LU64	247.3
LU49	56.5
LU70	221.3
LU50	195.4
CR2	286.0
CR14	187.4
CR42	471.1
CR88	143.0
LIV13	75.6
LIV40	254.2

亦在免疫受損小鼠中之七個PDX模型中藉由免疫組織化學評估PTK7表現：四個三陰性乳癌PDX (BR13、BR22、BR31及BR5)；一個助孕酮受體陽性(PR+)乳癌PDX (BR36)；及兩個NSCLC PDX (NSCLC135及NSCLC176)。

簡言之，使用標準組織學程序將來自每一異種移植物之組織片段用福馬林固定，處理並石蠟包埋(FFPE)。將5微米切片切割至帶電載玻片上，乾燥，在二甲苯中去石蠟化並利用分級醇再水合成蒸餾水。在Borg Decloaker (Biocare Medical)中使用Retriever 2100壓力鍋(Electron Microscopy Sciences)實施熱誘導之表位恢復並冷卻至室溫(RT)並保持20分鐘(min)。於RT下將內源性過氧化酶用Peroxidazed 1 (Biocare Medical)淬滅10 min。於RT下用Background Punisher (Biocare

Medical)阻斷非特異性蛋白質相互作用10 min。於RT下將組織切片與一級抗體以0.5 μg/mL一起培育1小時。一級抗體係兔抗-PTK7純系(Stem CentRx™公司)或兔同型對照(DA1E) mAb免疫球蛋白G (IgG) XP® (Cell Signaling Technologies編號3900)。於RT下利用SignalStain® Boost IHC檢測試劑(Cell Signaling Technologies編號8114)檢測一級抗體之結合30 min。於RT下利用DAB+ (3',3'-二胺基聯苯胺；DAKO)使染色顯色5 min。將載玻片在CAT蘇木素(Biocare Medical)中簡單複染，在水中洗滌，在分級醇中脫水，在二甲苯中清潔，並利用Permount™封固劑(Fisher Chemicals)蓋上蓋玻片。

在所有PDX模型中在血漿膜上觀察PTK7 (圖3)。

實例5

各種腫瘤組織中之PTK7之表現

在原發性人類腫瘤中測定PTK7 mRNA表現。簡言之，使冷凍腫瘤及正常組織斷裂，並利用Qiagen RNeasy Mini套組(Qiagen，目錄編號74106)分離mRNA。使用HT RNA微流體LabChip分析及LabChip GX微流體毛細管電泳儀器(Perkin Elmer)實施RNA定量及品質評價。稀釋每一試樣之RNA，以使該量在儀器之線性範圍(25 - 250 ng/μL)內。使用Life Technologies, High Capacity RNA-to-cDNA套組(目錄號4387406)遵循製造商之指導中概述之方案將經分離RNA試樣逆轉錄成cDNA。使用基於TaqMan Probe之基因表現分析及ABI ViiA7即時PCR系統(Life Technologies)實施qRT-PCR反應。對於設定於預製造之TaqMan低密度陣列卡上之每一探針一式四份地運行靶基因及內源性對照。使用ExpressionSuite軟體v1.0.3 (Life Technologies)生成用於大多數試樣之信號擴增之自動化臨限值。很少對自動化臨限值進行人工調節。棄去產生Ct值>35之擴增曲線，如同生成Ct值但不展現對數擴增之趨勢之彼等曲線。所有Ct值皆係自ExpressionSuite軟體導出且在

Microsoft Excel 2010 (Microsoft公司)中實施相對量化計算。

圖4A-C顯示(A) 乳癌、(B) NSLC及(C) 卵巢癌中之PTK7 mRNA之含量。使用相對倍數差異(RQ)或比較Ct方法、使用方程$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$之($2^{-\Delta\Delta Ct}$)方法評價PTK7表現之定量。RQ數據代表相對於對照RNA試樣之PTK7表現倍數差異。對於乳癌試樣，使用自BioChain (Newark, CA，目錄編號R1234086-50，批號B610189，75歲雌性)購得正常乳房RNA試樣生成RQ數據。對於肺癌，所報告RQ數據代表相對於自Life Technologies (目錄號AM7968，批號1308017，80歲雌性)購得之正常肺RNA之PTK7表現之倍數差異。對於卵巢癌試樣，所報告RQ數據代表相對於自由Cleveland Clinic (Cleveland, OH)提供之正常卵巢組織(組織ID編號0204C011C)分離之RNA的PTK7表現之倍數差異。亦相對於來自正常人類組織之RNA池(BioChain，目錄編號R4234565，批號B611043)、以及Universal Human Reference RNA池(Agilent，目錄號740000) (其包括10個獨特癌細胞系之相等份數之RNA)計算所有腫瘤之RQ值。

乳房、NSCLC及卵巢腫瘤顯示與相應正常組織相比PTK7 mRNA表現增加(圖4A-C)。TNBC中之過表現最引人關注，而卵巢腫瘤中之過表現中等。

圖5顯示NSCLC患者中較高PTK7 mRNA表現與較差整體存活之間之關聯。為測定PTK7表現是否與肺癌中之存活終點相關，利用freeware http://kmplot.com/analysis將Kaplan-Meier分析施用至生物資訊數據組(Gyorffy等人，2013, PloS One. 18；8(12):e82241)。使用工具之自動選擇最佳截止值針對719 NSCLC-腺癌患者繪示PTK7 mRNA含量及患者存活數據之曲線。高PTK7表現與較短存活相關(危險比HR = 4.06，對數秩P = 1.1E-16)。

在食道癌中觀察PTK7蛋白質表現。使用組織微陣列(ES1502，來

自US Biomax)進行免疫組織化學。簡言之，將來自福馬林固定、石蠟包埋之腫瘤塊之切片以5微米切割且在載玻片上烘焙。將載玻片在二甲苯中清潔並在分級醇洗滌液中再水合，最後在去離子水中洗滌。在Retriever 2100 (電子顯微鏡術)中在pH6檸檬酸鹽HIER緩衝液中恢復載玻片。將Peroxidazed (一種過氧化氫封阻溶液) (Biocare Medical)施加至載玻片達10 min。將載玻片用TBST洗滌2次，之後用Background Punisher (一種蛋白質組件) (Biocare Medical)洗滌10 min。將一級抗體H.235 (批號：110325MM，儲存液濃度：12.7mg/mL)以2 ug/mL之濃度施加60 min。在用TBST (2×)洗滌後，將二級抗體DAKO抗小鼠Envision+施加30min。在用TBST (2×)再次洗滌後，將載玻片用Betazoid DAB+ (Biocare Medical)顯影5 min。隨後將載玻片在CAT蘇木素(Biocare Medical)中複染30秒並蓋上蓋玻片。

70個腫瘤試樣中之40個評分為對細胞膜上之PTK7表現呈陽性。在對PTK7呈陽性之40個試樣中，1個展現高表現，11個展現中度表現且28個展現低表現。

在前列腺癌中觀察PTK7蛋白質表現。如上文針對食道癌所述，使用組織微陣列(BC19013，來自Biomax)進行免疫組織化學。26個腫瘤試樣中之11個評分為對PTK7表現呈陽性。在對PTK7呈陽性之11個試樣中，2個展現中度表現且9個展現低表現。

實例6

血清中PTK7蛋白質之量測

文獻中報告已表徵質膜處PTK7之裂解，其導致細胞外結構域之一部分脫落(Golubkov等人，2010, J Biol Chem 285(46):35740-9；Golubkov等人，2012, J Biol Chem 287(50):42009-18；Na等人，2012, J Biol Chem 287(30):25001-9)。循環抗原可影響治療性化合物(例如PTK7 ADC)之藥物動力學。自各種血清來源評估脫落PTK7之循環

量。利用定量分析使用Meso Scale Discovery (MSD®)平臺量測PTK7蛋白質含量。

健康人類之血清試樣係自Stanford University血庫購得。癌症患者之血清試樣係自Asterand公司及Bioreclamation公司購得。食蟹猴血清試樣係自Bioreclamation公司購得。

小鼠血清試樣係自具有人類腫瘤異種移植物之免疫受損小鼠獲得。雌性非肥胖型糖尿病-嚴重合併性免疫缺失病(NOD-scid)小鼠係自Harlan Laboratories®購得且根據Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)指南圈養。藉由直接植入新鮮切除之人類腫瘤試樣確立患者衍生之異種移植物(PDX)並藉由使異種移植物傳代至未經處理之動物中繁殖。異種移植物係衍生自原發性腫瘤切除試樣，該等試樣遵循Institutional Review Board for the Protection of Human Subjects批准且根據Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA)法規購自臨床地點。

用以量測PTK7蛋白質含量之分析利用兩種藉由雜交瘤技術生成之特異性抗-PTK7單株抗體(mAb)。mAb結合人類及食蟹猴PTK7，但不結合鼠類PTK7。利用MSD®平臺研發分析並針對線性反應最佳化。將MSD®高結合板用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中之PTK7特異性mAb H2.35以1 μg/ml塗佈。將板於4℃下培育過夜。次日，將板洗滌並添加第二mAb。對於人類及猴試樣，在MSD®稀釋劑2 (MSD編號R51BB-4)中以0.5 μg/ml添加25 μl磺基標記之PTK7特異性mAb 6M38，且對於帶有腫瘤之小鼠試樣，在MSD®稀釋劑2 (MSD編號R51BB-4)中以0.5 μg/ml添加生物素化6M38，之後添加辣根過氧化酶結合之鏈黴抗生物素蛋白。在振盪下將板培育30分鐘。在培育後，在未洗滌情況下，向孔中添加血清試樣或不同量之重組PTK7蛋白質並在板振盪器上培育2小時。將血清試樣在MSD®稀釋劑2中稀釋4×至最終25%。將板用具有

0.2% Tween-20之磷酸鹽緩衝鹽水洗滌3次。向板中添加MSD® 1×讀取緩衝液(MSD編號R92TC-3) (150 µl/孔)，並在MSD® Sector Imager上對板進行讀數。自基於重組蛋白質之標準曲線內插血清試樣之值。

在來自健康人類及代表8種腫瘤類型之癌症患者之試樣中量測人類血清中之PTK7蛋白質含量。結果概述於表10中。每一種類中之報告值指示所有個體試樣之平均值。來自健康人類之血清中之PTK7的平均值係12.4 ± 3.3 ng/mL。一般而言，癌症患者之平均值稍微較高，大約至多24.6 ± 3.8 ng/mL且個別值之分佈較寬(圖6)。

表10. 人類血清中之PTK7蛋白質含量

試樣類型	試樣之數目	PTK7蛋白質含量(ng/mL)
健康人類	30	12.4 ± 3.3
乳癌患者	29	24.0 ± 24.1
結腸直腸癌患者	17	13.3 ± 4.3
黑色素瘤患者	6	15.4 ± 7.4
非小細胞肺癌患者	21	19.8 ± 12.1
卵巢癌患者	7	17.9 ± 8.1
胰臟癌患者	9	20.4 ± 6.5
前列腺癌患者	14	16.2 ± 5.7
小細胞肺癌患者	7	24.6 ± 3.8

ng/mL = 奈克/毫升.

量測係提供為平均值 ± 獨立性生物試樣之平均值之標准偏差。

在來自29個動物之試樣中量測未經處理之食蟹猴血清中之PTK7蛋白質之含量。平均值係35.8 ± 13.4 ng/mL (表11)，其較健康人類及癌症患者之相應值高。

表11.食蟹猴血清中之PTK7蛋白質含量

試樣類型	試樣之數目	PTK7蛋白質含量 (ng/mL)
健康食蟹猴	29	35.8 ± 13.4

ng/mL = 奈克/毫升.

量測係提供為平均值 ± 獨立性生物試樣之平均值之標准偏差。

小鼠血清試樣係自具有人類腫瘤異種移植物之免疫受損小鼠獲得。特定而言，異種移植物係PDX，其通常保存衍生其之人類腫瘤之架構及基因型(DeRose等人，2011, Nat Med 17(11):1514-20)。所有11個腫瘤類型之血清中之PTK7蛋白質的平均值對於所有腫瘤類型皆係< 1 ng/mL (表12)，且因此，顯著低於針對人類及猴獲得之值。由於分析中所用之mAb並不與鼠類PTK7交叉反應，故該等值理解為自腫瘤異種移植物而非正常鼠類組織脫落之人類PTK7蛋白質。

表12. 帶有腫瘤之小鼠血清中之PTK7蛋白質含量

腫瘤異種移植物	腫瘤模型之數目	PTK7蛋白質含量(ng/mL)
未經處理(無異種移植物)	不適用	0 ± 0
乳癌	11	0.454 ± 0.872
結腸直腸癌	29	0.023 ± 0.083
頭頸癌	2	0.355 ± 0.501
腎癌	7	0.004 ± 0.009
肝癌	7	0.008 ± 0.021
非小細胞肺癌	20	0.065 ± 0.104
卵巢癌	9	0.053 ± 0.086
胰臟癌	9	0.018 ± 0.055
前列腺癌	2	0 ± 0
皮膚癌	9	0.208 ± 0.307
小細胞肺癌	10	0.004 ± 0.011

ng/mL = 奈克/毫升.

量測係提供為平均值 ±腫瘤模型之平均值之標准偏差。

個別模型之值係1至12個帶有腫瘤之動物之量測之中值。

實例7

內化

抗體內化係針對表現PTK7之細胞中之細胞毒性遞送ADC的關鍵特徵。觀察到抗-PTK7抗體hu24內化至癌細胞中，此表明抗體係適於向細胞中遞送毒素之媒介。使用TrypLE Express (Gibco)解離黏附細胞，用細胞培養基中和且隨後計數。將細胞以5×10^5個細胞/100μL培養基/孔等分至U形底96孔板中。於4℃下將板以300xg離心5分鐘以使細胞成糰粒並抽吸上清液。所有試劑皆保持在冰上用於接下來之步驟。

將每一細胞糰粒再懸浮於100 μL PBS中之3% BSA中之3 μg/ml hu24或非結合抗體(Human IgG, Thermo Scientific)中。將板在冰上培育30分鐘且隨後離心，並將細胞糰粒在PBS中之200 μL 3% BSA中洗滌。將細胞糰粒再懸浮於100 μL 37℃預加溫之細胞培養基中並在37℃培育箱中放置1或4小時。將欲於4℃下培育之細胞糰粒類似地再懸浮且隨後放置於冰上。在培育後，離心試樣，抽吸上清液並用200 μL/孔之冰冷之PBS中之3% BSA洗滌並再懸浮於100 μL/孔之冰冷之PBS中之3% BSA中並放置於冰上。隨後離心所有試樣，抽吸上清液，將每一細胞糰粒再懸浮於100 μL於冰冷之PBS中之3% BSA中1:50稀釋之別藻藍蛋白(Allophycocyanin，APC)結合之抗人類IgG Fc片段中。將板在冰上培育30分鐘且隨後離心，且將細胞糰粒在200 μL PBS中之3% BSA中洗滌，再懸浮於100 μL PBS中之3% BSA中，並轉移至含有250 μL PBS中之3% BSA之5 mL聚碳酸酯管。藉由流式細胞術每試樣使用5 μL 7-AAD做額外存活染劑來分析試樣。針對每一試樣量測平均螢光強度(MFI)，且自分析排除無活力細胞。「內化%」之值計算為(100% - [培育後之MFI /培育前之MFI])。表13中之結果指示，hu24抗體內化至所有測試細胞系中，且內化具有溫度依賴性，由此反

映由細胞之主動(非被動)內化。

表13

細胞系	內化% (相對於實驗之起始)				實驗之數目
	1 hr，於37℃下	4 hr，於37℃下	1 hr，於4℃下	4 hr，於4℃下	
BT549	14.3 ± 9.8	42.5 ± 9.1	4.3 ± 8.1	8.5 ± 7.7	6
H661	21.2 ± 12.7	36 ± 17.4	2.2 ± 11.5	2 ± 5.6	5
MDAMB468	21.7 ± 5.7	34.3 ± 9.0	7.0 ± 0.8	9.3 ± 2.5	3

實例8

由肥皂草毒素結合之抗人類Fab片段介導之細胞毒性

實施活體外細胞毒性分析以測定hu23或hu24抗體是否可介導細胞毒性劑至細胞系之遞送。就此而言，將共價連接至肥皂草毒素毒素(Advanced Targeting Systems)之抗人類IgG Fab片段與未經標記之hu23、hu24或8.84 Ab (未結合，陰性對照抗體)組合且隨後與細胞一起培育4天(表現PTK7之細胞H446及DMS114)或7天(OE19非表現PTK7之細胞；OE21表現PTK7之細胞)，其後量測細胞存活力。

在一個實驗中，將H446或DMS114癌細胞系以9600個細胞/孔(H446)或6400個細胞/孔(DMS114)平鋪至100 μl細胞培養基中之清潔平底組織培養板中。將細胞於37℃下在5% CO_2培育箱中培育過夜。在次日，按照10點濃度曲線以一式三份試樣向細胞中添加以1:2莫耳比與肥皂草毒素結合之抗人類IgG Fab (Fab-ZAP；Advanced Targeting Systems)預混合之50 μl hu23、hu24或8.84 Ab，以1 μg/ml開始，且在細胞培養基中以1:3稀釋。將板在37℃、5% CO_2培育箱中培育4天。為量測細胞存活力，根據供應商之說明書使用MTS分析(Promega Cell Titer 96水性非放射性細胞增殖分析)。向每一孔中添加30 μL合併MTS試劑。將板在37℃、5% CO_2培育箱中培育2小時。於490 nm下利用96

孔板讀數器測定光學密度(OD)。自具有細胞之孔之讀數減去僅具有培養基之孔之平均讀數以針對背景OD進行對照。使數據經受邏輯非線性回歸分析(GraphPad Prism軟體)以測定將細胞存活力抑制50%之一級抗體之濃度(IC50)。

表14中之數據指示，抗-PTK7抗體hu23及hu24二者皆賦予H446及DMS114細胞肥皂草毒素介導之細胞毒性，而8.84陰性對照抗體並不賦予該毒性。結果展示，hu23及hu24之活性對表現PTK7之細胞具有特異性。

表14

細胞系	**IC50值(ng/mL)**		
	hu23+Fab-ZAP	**hu24+Fab-ZAP**	**8.84+Fab-ZAP**
H446	44.7	60.3	>1000
DMS114	10.3	12.0	>1000

在另一實驗中，在兩個衍生自食道癌之細胞系OE19及OE21 (Sigma Aldrich)上實施肥皂草毒素分析。為測定細胞系上之PTK7表現，培養細胞並使用Versene (Invitrogen)分離單一細胞懸浮液。將細胞在PBS/2% FCS中洗滌並以5 μg/mL之濃度與hu24抗體或HuIgG1 (同型對照)一起培育30分鐘。將細胞在PBS/2% FCS中再次洗滌，隨後與抗人類Alexa Fluor647 (Jackson Immunoresearch)以1:200一起培育20分鐘。將細胞再次洗滌，再懸浮於DAPI中，且隨後在BD FACSCanto上分析以測定平均螢光強度變化(ΔMFI)。OE19細胞不展現高於同型對照之染色螢光(ΔMFI = 0)，而OE21細胞展現螢光強度幾乎雙對數增加(ΔMFI = 5976)，此指示PTK7在OE21 (一種食道鱗狀細胞癌)之表面上表現。

為測定hu24是否可介導細胞毒性劑之遞送，將2500個細胞/孔之來自OE21或OE19之解離單一細胞懸浮液平鋪於培養基中之BD組織培

養板(BD Biosciences)上。在平鋪後一天，向培養物中添加不同濃度之純化hu24及固定濃度之共價連接至肥皂草毒素(Advanced Targeting Systems)之4 nM抗HuIgG Fab片段。7天培育後，根據製造商之說明書使用CELL TITER GLO® (Promega)列舉活細胞數目。將使用含有具有肥皂草毒素Fab片段之細胞之培養物的原始發光計數設定為100%參照值且相應地計算所有其他計數(稱作「正規化RLU」)。使用此分析，展示hu24介導針對OE21細胞、而非OE19細胞之細胞毒性，且同型對照不影響細胞計數，如表15中所示。該等結果指示，需要抗體hu24之細胞結合以對表現PTK7之細胞引發肥皂草毒素介導之細胞毒性，但對不表現PTK7之細胞無效應。

表15

細胞系	**IC50值(μg/ml)**	
	hu24+Fab-ZAP	**HuIgG1對照 + Fab-ZAP**
OE21	0.5	>100
OE19	>100	>100

實例9

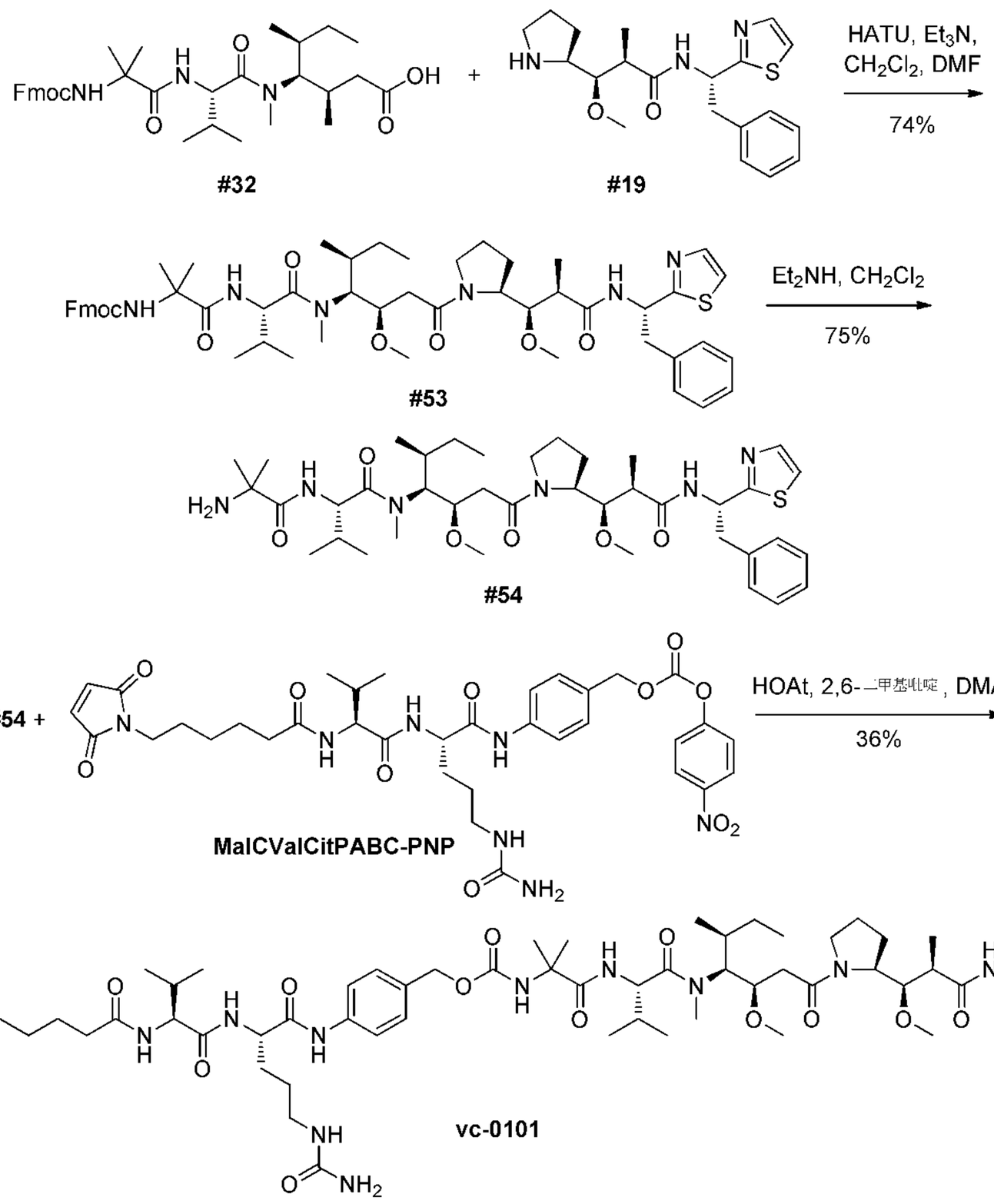
vc0101及mc8261之合成

vc0101 (vc係連接體且0101係藥物)及mc8261 (mc係連接體且8261係藥物)之合成係根據國際公開案第WO/2013/072813號中所述之方法製備，該申請案之全文以引用方式併入本文中。

A. 用於vc0101之合成之實驗方法

N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-丁-2-基]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-2-側氧基乙基)-18,18,23-三甲基-3,16,19,22-四側氧基-21-(丙-2-基)-2,7,10,13,26-五氧雜-4,17,20,23-四氮雜二十七-1-基]苯

基}-N~5~-胺甲醯基-L-鳥胺醯胺(vc0101)之製備.



步驟 1. *N*-[(9*H*-茀-9-基甲氧基)羰基]-2-甲基丙胺醯基-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-甲氧基-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1*S*)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-*N*-甲基-L-纈胺醯胺(編號53)之合成. 向化合物編號32 (2.05 g, 2.83 mmol, 1當量)於二氯甲烷(20 mL, 0.1 M)及*N*,*N*-二甲基甲醯胺(3 mL)中之溶液中添加胺編號19 (2.5 g, 3.4 mmol, 1.2當量)、HATU (1.29 g, 3.38 mmol, 1.2當量)及三乙胺(1.57 mL, 11.3 mmol, 4當量)。將混合物於室溫下攪拌，同時藉由LC-MS及TLC監測反應進程。一旦完成，在真空中濃縮反應物，將殘餘物與庚烷共沸三次，且藉由矽膠層析(梯度：庚烷中之0%至55%丙酮)純化所得粗產物，從而產生固體狀化合物編號53 (2.42 g, 74%)。LC-MS: *m/z* 965.7

[M+H$^+$]，987.6 [M+Na$^+$]，滯留時間 = 1.04分鐘(方案H-下文)；HPLC (方案A-下文)：*m/z* 965.4 [M+H$^+$]，滯留時間 = 11.344分鐘(純度 > 97%)；^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)，假定為旋轉異構物之混合物，特徵信號：δ 7.86-7.91 (m, 2H), [7.77 (d, *J*=3.3 Hz)及7.79 (d, *J*=3.2 Hz), 總1H], 7.67-7.74 (m, 2H), [7.63 (d, *J*=3.2 Hz)及7.65 (d, *J*=3.2 Hz), 總1H], 7.38-7.44 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 2H), 7.11-7.30 (m, 5H), [5.39 (ddd, *J*=11.4, 8.4, 4.1 Hz)及5.52 (ddd, *J*=11.7, 8.8, 4.2 Hz), 總1H], [4.49 (dd, *J*=8.6, 7.6 Hz)及4.59 (dd, *J*=8.6, 6.8 Hz), 總1H], 3.13, 3.17, 3.18及3.24 (4 s, 總6H), 2.90及3.00 (2 br s, 總3H), 1.31及1.36 (2 br s, 總6H), [1.05 (d, *J*=6.7 Hz)及1.09 (d, *J*=6.7 Hz), 總3H]。

步驟 2. 0101：2-甲基丙胺醯基-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-甲氧基-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1*S*)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-*N*-甲基-L-纈胺醯胺(編號54)之合成.

向化合物編號53 (701 mg, 0.726 mmol)於二氯甲烷(10 mL, 0.07 M)中之溶液中添加二乙胺(10 mL)，並將反應混合物於室溫下攪拌，同時藉由LC-MS及TLC監測反應進程。一旦完成，在真空中濃縮反應物，將殘餘物與庚烷共沸三次，且藉由矽膠層析(梯度：二氯甲烷中之0%至10%甲醇)純化所得粗產物。將殘餘物用二乙醚及庚烷稀釋並在真空中濃縮，從而得到白色固體狀編號54 (406 mg, 75%)。LC-MS: *m/z* 743.6 [M+H$^+$]，滯留時間 = 0.70分鐘(方案F-下文)；HPLC (方案A-下文)：*m/z* 743.4 [M+H$^+$]，滯留時間 = 6.903分鐘，(純度 > 97%)；^{1}H NMR (400 MHz，DMSO-d_6)，假定為旋轉異構物之混合物，特徵信號：δ [8.64 (br d, *J*=8.5 Hz)及8.86 (br d, *J*=8.7 Hz), 總1H], [8.04 (br d, *J*=9.3 Hz)及8.08 (br d, *J*=9.3 Hz), 總1H], [7.77 (d, *J*=3.3 Hz)及7.80 (d, *J*=3.2 Hz), 總1H], [7.63 (d, *J*=3.3 Hz)及7.66 (d,

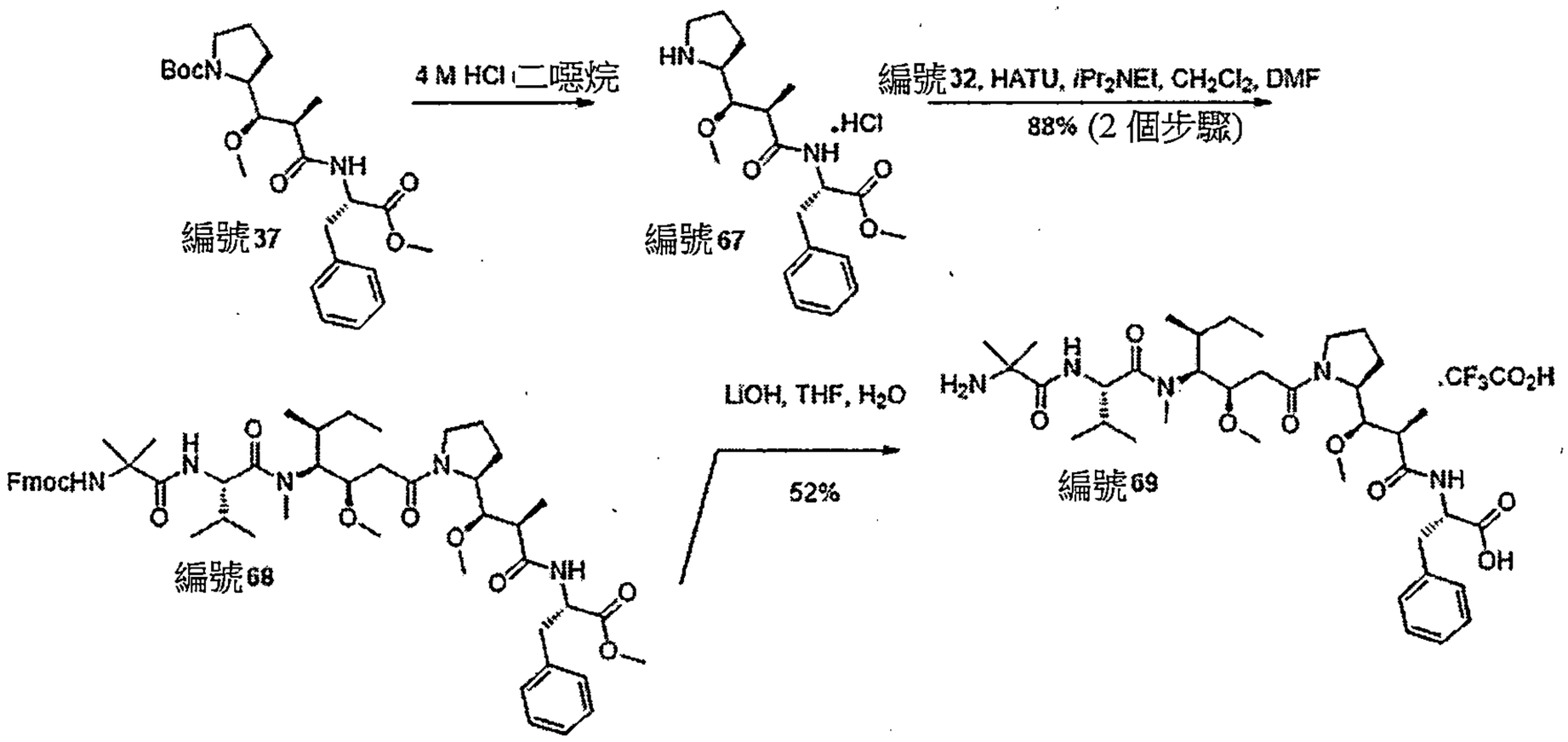
J=3.2 Hz), 總1H], 7.13-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, *J*=11, 8.5, 4 Hz)及5.53 (ddd, *J*=12, 9, 4 Hz), 總1H], [4.49 (dd, *J*=9, 8 Hz)及4.60 (dd, *J*=9, 7 Hz), 總1H], 3.16, 3.20, 3.21及3.25 (4 s, 總6H), 2.93及3.02 (2 br s, 總3H), 1.21 (s, 3H), 1.13及1.13 (2 s, 總3H), [1.05 (d, *J*=6.7 Hz)及1.10 (d, *J*=6.7 Hz), 總3H], 0.73-0.80 (m, 3H)。

步驟 3. vc0101：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N-{4-[(21S,24S,25R)-24-[(2S)-丁-2-基]-25-(2-{(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基-3-{[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啶-1-基}-2-側氧基乙基)-18,18,23-三甲基-3,16,19,22-四側氧基-21-(丙-2-基)-2,7,10,13,26-五氧雜-4,17,20,23-四氮雜二十七-1-基]苯基}-N~5~-胺甲醯基-L-鳥胺醯胺之合成.

根據一般程序E (下文)使用適當量之DMA作為溶劑、及HOAT及2,6-二甲基吡啶作為添加劑完成化合物0101 (編號54)與連接體vc (*N*-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-*N*-[4-({[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基}甲基)苯基]-L-鳥胺醯胺)(MalcValCitPABC-PNP)之偶合，且根據方法D (下文)純化所得粗製期望物質，從而產生33 mg (36%)期望產物。在方案A (下文)指定且管柱維持於45℃下之條件下，此物質產生9.114分鐘之HPLC滯留時間(方案A-下文)；LC-MS: *m/z* 1342.6 [M+H$^+$]，滯留時間3.48分鐘(方案H-下文)。

B. 用於mc8261之合成之實驗方法

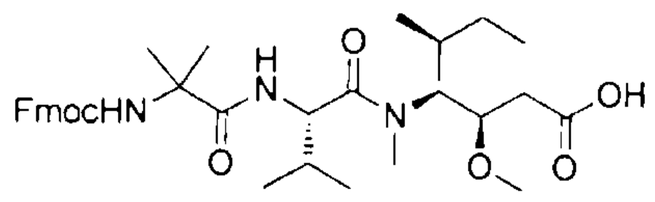
N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-2-甲基丙胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺(mc8261)之製備.



步驟 1. *N*-{(2*R*,3*R*)-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2*S*)-吡咯啶-2-基]丙醯基}-L-苯基丙胺酸甲基酯鹽酸鹽(編號67)之合成. 根據一般程序C(下文)，自編號37 (2.39 g, 5.33 mmol, 1當量)、二噁烷(10 mL, 0.53 M)及二噁烷中之4 M鹽酸溶液(10 mL, 40 mmol, 7.5當量)合成白色固體狀編號67 (2.21 g)，其未經進一步純化即用於下一步驟。LC-MS: *m/z* 349.2 [M+H$^+$]，滯留時間 = 0.53分鐘；^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.45-9.58 (br m, 1H), 8.63 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 8.51-8.62 (br m, 1H), 7.25-7.33 (m, 4H), 7.18-7.25 (m, 1H), 4.50 (ddd, *J*=10.8, 8.1, 4.5 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.54 (dd, *J*=6.8, 4.5 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.11 (dd, *J*=13.8, 4.5 Hz, 1H), 2.99-3.14 (br m, 3H), 2.89 (dd, *J*=13.8, 10.9 Hz, 1H), 2.44-2.50 (m, 1H, 假定；由溶劑峰至少部分遮蔽), 1.77-1.89 (m, 1H), 1.60-1.73 (m, 2H), 1.46-1.57 (m, 1H), 1.05 (d, *J*=6.8 Hz, 3H)。

步驟 2. *N*-[(9*H*-茀-9-基甲氧基)羰基]-2-甲基丙胺醯基-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-甲氧基-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-甲氧基-3-{[(2*S*)-1-甲氧基-1-側氧基-3-苯基丙-2-基]胺基}-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-基}-5-

甲基-1-側氧基庚-4-基]-*N*-甲基-L-纈胺醯胺(編號68)之合成. 根據一般程序D (下文)，自二氯甲烷(10 mL, 0.04 M)中之編號32 (353 mg, 0.488 mmol, 1當量)、



編號32

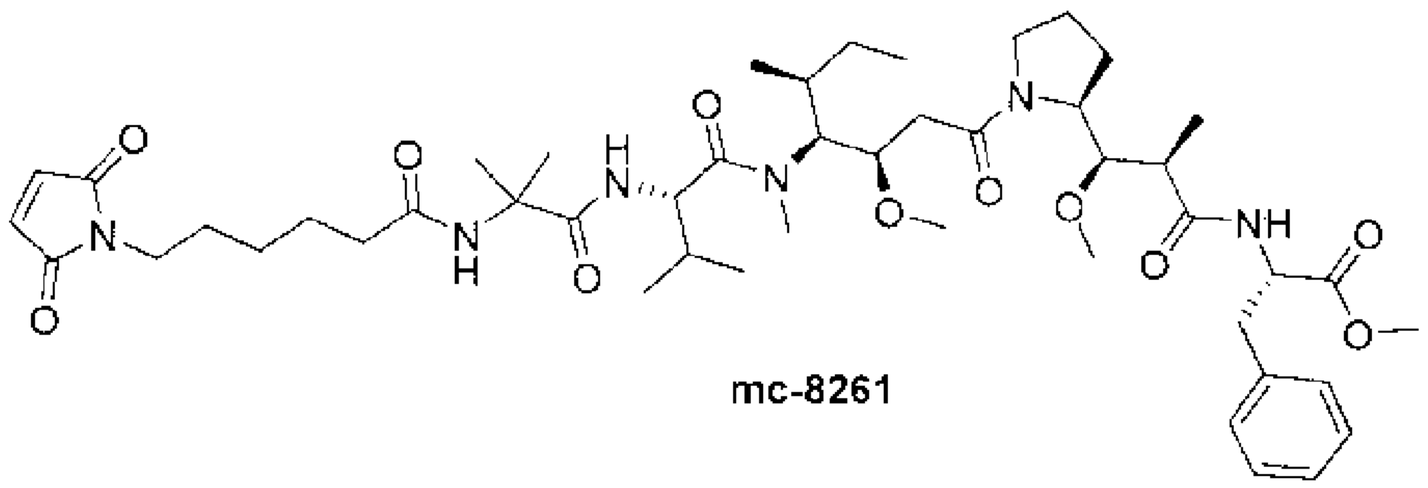
胺編號67 (271 mg, ≤0.588 mmol, 1.3當量)、HATU (223 mg, 0.586 mmol, 1.2當量)及二異丙基乙胺(238 μL, 1.71 mmol, 3.5當量)合成粗製期望物質，藉由矽膠層析(梯度：庚烷中之0%至40%丙酮)對其進行純化，從而得到固體狀編號68 (404 mg，經兩個步驟為88%)。LC-MS: *m/z* 940.7 [M+H$^+$], 962.7 [M+Na$^+$], 滯留時間 = 1.04分鐘；HPLC (方案C-下文)：滯留時間 = 9.022分鐘；^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6)，假定為旋轉異構物之混合物，特徵信號：δ [8.25 (br d, *J*=8 Hz)及8.48 (br d, *J*=8 Hz), 總1H], 7.89 (d, *J*=7.4 Hz, 2H), 7.67-7.75 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.14-7.24 (m, 5H), 4.43-4.69 (m, 3H), 4.17-4.26 (m, 3H), 3.91-3.99 (br m, 1H), 3.63及3.65 (2 s, 總3H), 3.19及3.24 (2 s, 總3H), 3.14及3.15 (2 s, 總3H), 2.90及2.99 (2 br s, 總3H), 1.36及1.37 (2 br s, 總3H), 1.30及1.32 (2 s, 總3H), [1.02 (d, *J*=6.8 Hz)及1.06 (d, *J*=6.6 Hz), 總3H]。

步驟3A. 8261：2-甲基丙胺醯基-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-*N*-甲基-L-纈胺醯胺，三氟乙酸鹽(編號69)之合成.

向編號68 (143 mg, 0.152 mmol, 1當量)於四氫呋喃(5 mL, 0.02 M)中之溶液中添加氫氧化鋰(9.10 mg, 0.378 mmol, 2.5當量)於水(3 mL)中之溶液。5小時後，在真空中濃縮反應物，與庚烷共沸三次，溶解於

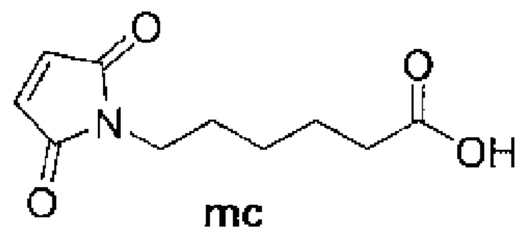
二甲基亞碸(2.2 mL)中並藉由反相層析(方法C-下文)純化，從而產生編號69 (56 mg, 52%)。HPLC (方案A-下文，於45℃下)：704.4 [M+H$^+$], 滯留時間 = 6.623分鐘；^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6), 假定為旋轉異構物之混合物，特徵信號：δ 8.08-8.22及8.37-8.49 (2 m, 總5H), 7.12-7.28 (m, 5H), 3.18, 3.20及3.24 (3 s, 總6H), 2.95及3.04 (2 br s, 總3H), 1.52及1.53 (2 s, 總3H), 1.39及1.41 (2 s, 總3H), [1.02 (d, *J*=6.8 Hz)及1.05 (d, *J*=6.6 Hz), 總3H], 0.74-0.81 (m, 3H)。

步驟4：mc8261：N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]-2-甲基丙胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺之合成.



mc-8261

化合物8261 (編號69)與連接體馬來醯亞胺基己醯基(mc)之偶合



mc

係根據一般程序D (下文)完成且根據方法C (下文)純化所得粗製期望物質，從而產生30.2 mg (24%)期望產物。在方案A (下文)指定且管柱維持於45℃下之條件下，此物質產生9.058分鐘之HPLC滯留時間(方案A-下文)；LC-MS: *m/z* 897.7 [M+H$^+$]，滯留時間0.81分鐘(方案H-下文)。

C. 一般程序、方法及方案

一般程序C：使用二噁烷中之鹽酸之Boc移除或第三丁基酯(亦稱

作*t*-Bu酯)裂解. 向含有Boc之化合物或含有第三丁基酯之化合物於二噁烷(或在一些情形下無溶液或其他相關溶劑)之溶液中添加鹽酸於二噁烷中之4 M溶液。藉由LC-MS (或HPLC或TLC)監測反應進程。在真空中濃縮反應物且在一些情形下與庚烷共沸一至四次。

一般程序D：與六氟磷酸*O*-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N*,*N*,*N*',*N*'-四甲基脲鎓鹽(HATU)偶合。向胺(1.0當量)及酸(1.0-2.0當量)於二氯甲烷中之攪拌溶液中添加*N*,*N*-二甲基甲醯胺(亦稱作DMF)或二者之混合物，添加HATU (1.0-2.0當量)，之後添加三乙胺(2.0-4.0當量)或二異丙基乙胺(2.0-4.0當量，亦稱作休尼格鹼(Hunig's base))。藉由LC-MS (或HPLC或TLC)監測反應進程；反應通常在3小時內完成。在真空中移除溶劑。藉由矽膠或反相層析純化殘餘物或在一些情形下與庚烷共沸三次，用少量乙酸乙酯稀釋，之後在二氧化矽或C18鍵結之二氧化矽上減少並藉由矽膠或反相層析純化。

一般程序E：與*N*-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-*N*-[4-({[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基}甲基)苯基]-L-鳥胺醯胺(MalcValCitPABC-PNP)偶合.向酬載胺(1當量)及*N*-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯基]-L-纈胺醯基-N^5-胺甲醯基-*N*-[4-({[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基}甲基)苯基]-L-鳥胺醯胺(MalcValCitPABC-PNP, Eur. Pat. Appl. (1994), EP624377, 1.0-2.0當量)於*N*,*N*-二甲基甲醯胺或二甲基乙醯胺(亦稱作DMA)中之混合物中添加吡啶(0.0-4.0當量)、二異丙基乙胺(0.0-4.0當量)、2,6-二甲基吡啶(0.0-4.0當量，亦稱作2,6-二甲基吡啶)及1-羥基苯并三唑水合物(0.01-1.1當量，亦稱作HOBT)或3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-醇(0.01-1.1當量，亦稱作HOAT)。於40℃至50℃下攪拌1-48小時後，在真空中濃縮反應混合物並與庚烷共沸三次。藉由反相層析根據指定方法純化粗物質，從而得到期望物質。

方法C：管柱：Phenomenex Luna C18, 100 × 30 mm, 10 μm；移動相A：水中之0.02%三氟乙酸(v/v)；移動相B：甲醇中之0.02%三氟乙酸(v/v)；梯度：經20分鐘10%至90% B；流速：20 mL/分鐘。溫度：未控制；檢測：DAD 210 nm、254 nm；注射體積：變量；儀器：Gilson。

方法D：管柱：Phenomenex Synergi Max-RP, 150 × 21. 2 mm, 4 pm；移動相A：水中之0.1%甲酸；移動相B：乙腈中之0.1%甲酸；梯度：30% B達1.5分鐘，經8.5分鐘30%至60% B，經0.5分鐘60%至100% B，隨後經2分鐘100% B；流速：27 mL/分鐘；檢測：DAD 210-360 nm；MS (+)範圍為150-20005道爾頓；儀器：Waters FractionLynx。

方案：管柱：Phenomenex Luna C18 (2), 150 × 3.0 mm, 5 μm；移動相A：水中之0.1%甲酸(v/v)；移動相B：乙腈中之0.1%甲酸(v/v)；梯度：經1.5分鐘5% B，經8.5分鐘5%至100% B，隨後100% B達1分鐘；流速：0.75 mL/分鐘。溫度：25℃；檢測：DAD 215 nm；MS (+)範圍為150-2000道爾頓；注射體積：10 μL，儀器：Agilent 1200 LCMS。

方案C：管柱：Phenomenex Luna C18 (2), 150 × 3.0 mm, 5 μm；移動相A：水中之0.02%三氟乙酸(v/v)；移動相B：甲醇中之0.02%三氟乙酸(v/v)；梯度：經10分鐘50%至100% B；流速：0.75 mL/分鐘。溫度：未控制；檢測：DAD 215 nm、254 nm；注射體積：10 μL；儀器：Agilent 1100 HPLC。

方案F：管柱：Waters Acquity UPLC BEH, C18, 2.1 × 50 mm, 1.7 μm；移動相A：水中之0.1%甲酸(v/v)；移動相B：乙腈中之0.1%甲酸(v/v)；梯度：經0.1分鐘5% B，經0.7分鐘5%至95% B，經0.1分鐘95% B；流速：1.25 mL/分鐘。溫度：60℃；檢測：200-450 nm；MS

(+)範圍為100-1200道爾頓；注射體積：5 μL；儀器：Waters Acquity。

方案H：管柱：Phenomenex Gemini-NX, C18, 4.6 × 50 mm, 3 μm, 110 Å；移動相A：水中之0.1%甲酸(v/v)；移動相B：乙腈中之0.1%甲酸(v/v)；梯度：經4.10分鐘0%至100% B，線性，隨後經0.4分鐘100% B；流速：1.5 mL/分鐘。溫度：60℃；檢測：DAD 200-450 nm；MS (+)範圍為100-2000道爾頓；注射體積：5 μL；儀器：Agilent。

實例10

抗-PTK7抗體之生物結合

A. 抗-PTK7-vc0101抗體-藥物結合物

在本發明中，抗-PTK7抗體hu23、hu24及hu58結合至vc0101以生成hu23-vc0101 ADC、hu24-vc0101 ADC及hu58-vc0101 ADC，或結合至mc8261以生成hu23-mc8261 ADC、hu24- mc8261 ADC及hu58-mc8261 ADC。hu23、hu24及hu58與vc0101 mc8261之結合係藉由半胱胺酸殘基之側鏈之衍生達成。該等半胱胺酸通常配對為鏈間半胱胺酸二硫橋，其中在IgG1抗體上存在4個保守對(涉及8個半胱胺酸殘基)。該等二硫鍵之部分還原提供游離硫醇之分佈，該等游離硫醇可經vc連接體上之馬來醯亞胺柄官能化。特定而言，於37℃下經由添加100 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-六氫吡嗪乙烷磺酸緩衝液，pH 7.0)及1 mM二乙烯三胺五乙酸(DTPA)中之2.4莫耳濃度過量之叁(2-羧基乙基)膦(TCEP)將本發明之抗-PTK7抗體部分還原2小時。隨後以7之連接體-酬載/抗體莫耳比向反應混合物中添加vc0101或mc8261連接體-酬載並於25℃下在15% v/v之二甲基乙醯胺(DMA)存在下反應額外1小時。1小時培育時段後，添加3倍過量之N-乙基馬來醯亞胺以封端未反應之硫醇並使其反應15分鐘，之後添加6倍過量之L-Cys以淬滅任何未反應

之連接體-酬載。

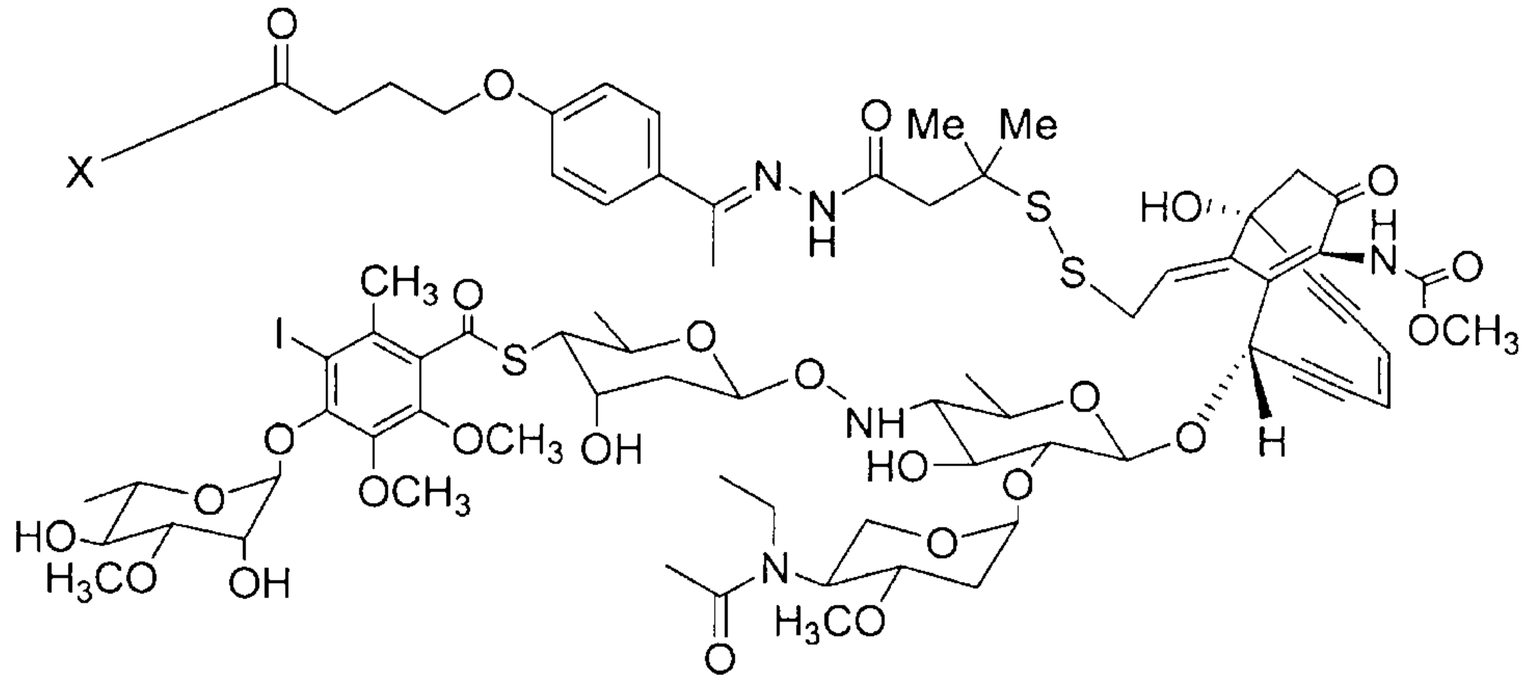
將反應混合物於4℃下在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS，pH 7.4)中透析過夜，並經由粒徑篩析層析(SEC；AKTA explorer, Superdex 200)純化。在20 mM組胺酸、85 mg/mL蔗糖、pH 5.8緩衝液中調配最終ADC原料藥。

經由用於純度之SEC及疏水性相互作用層析(HIC)及液體層析電噴霧離子化質譜(LC-ESI MS) (其用於計算藥物-抗體比率(載藥量))進一步表徵抗PTK抗體-藥物結合物。經由紫外(UV)分光光度法測定蛋白質濃度。此方法提供呈官能化抗體之非均相混合物形式之抗體-藥物結合物，該等抗體含有約4 mol/mol之平均藥物-對-抗體比率(DAR)。

針對hu24-vc0101經由HIC評價藥物分佈特性且其提供於圖7中之層析圖中。簡言之，在TSK凝膠丁基-NPR管柱上實施分析型HIC。在1.5 M硫酸銨、50 mM磷酸氫二鉀(pH 7)中使ADC結合至管柱並用50 mM磷酸氫二鉀及20%異丙醇(IPA) (pH 7)溶析。

B. 抗-PTK7-AcBut CM抗體-藥物結合物

在本發明中，抗-PTK7抗體hu23、hu24及hu58結合至AcBut-N-乙醯基-γ-卡奇黴素二甲基醯肼(AcButCM) Osu酯以生成hu23-AcButCM ADC、hu24-AcButCM ADC及hu58-AcButCM ADC，如下文所示，其中X可為任何抗體，例如hu23、hu24及hu58。



反應混合物包括莫耳比為4-4.5對1之10 mg/ml或較少抗-PTK7抗體及AcButCM OSu酯。在向混合渦旋機中添加AcButCM期間執行高攪動。反應pH係8.3且其他反應組份之濃度係如下：180 mM HEPES緩衝液、41 mM癸酸鈉及8% (v/v)乙醇。將反應於33℃下執行5分鐘。在完成結合反應後，在混合下將反應混合物用1.3體積之調節至pH 8.5之1M K_2HPO_4緩慢稀釋。

為純化，將上述稀釋之反應混合物裝載於Butyl Sepharose-4快速流動HIC管柱(GE Healthcare)之兩個批料上，該管柱先前在5管柱體積(cv)之0.52M磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)中平衡。裝載於管柱上之蛋白質係3.5 mg/ml床體積。經由試樣裝載，流速係15 ml/分鐘，且貫穿層析之洗滌及溶析期係22 ml/分鐘。此改良梯度移除結合至管柱之較高DAR ADC。

裝載期間未結合部分主要係反應試劑及棄去之大部分未結合抗體。隨後將管柱用0.3 cv之0.52M磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)洗滌以移除任何剩餘試劑。隨後使用具有1 cv之0.52M至0.4M磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)之分級梯度以溶析任何鬆散結合之未結合抗體以及低裝載之抗-PTK7-AcButCM (若存在)。隨後使用1 cv自0.4M至5 mM磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)之分級梯度溶析主要部分，以隨著梯度結束提供具有介於3至5範圍內之DAR之抗-PTK7-AcButCM。若存在具有較高DAR之抗-PTK7-AcButCM結合物，則使用2 cv之5 mM磷酸鉀緩衝液(pH 8.5)之梯度溶析該部分，且隨後溶析純去離子水。使用2 cv之10 mM含有20%乙醇之氫氧化鈉溶析任何具有較高DAR且在去離子水溶析後保持結合之抗-PTK7-AcButCM結合物。純化批料含有具有3至5之DAR之抗-PTK7-AcButCM結合物。

此改良結合及純化製程生成具有小於6、且在一些態樣中介於3至5範圍內之DAR的ADC。此外，該等製程生成載量之較窄分佈，例

如產物內較小異質性。對結合及純化製程之改良進一步包括：1)將AcButCM對抗-PTK7抗體比率減小至4-4.5對1，以生成具有較低DAR之ADC，2) 在向抗-PTK7抗體中添加AcButCM期間執行高攪動，以生成具有低量之未結合抗體(游離抗體)之ADC，3) 與60-90分鐘相比，將培育時間減少至5分鐘，以提供低聚集物，及4)乙醇量降低至6-8%以提供低聚集物。將來自兩個批料之純化之彙集峰以經調配緩衝液透析兩次以促進以冷凍狀態儲存。經調配緩衝液組合物係20 mM Tris、7.5%蔗糖、0.01%聚山梨醇酯80、10 mM NaCl (pH 8.0)。

實例11

hu24 mAb及hu24 ADC之結合特徵

為測定hu24 mAb及hu24-vc0101 ADC是否結合至PTK7之食蟹猴直向同源物，選殖食蟹猴PTK7蛋白質並使其表現。序列分析揭示，該蛋白質與人類PTK7蛋白質97.9%一致。

執行表面電漿共振(SPR)分析以表徵mAb就ADC與人類及食蟹猴PTK7蛋白質胞外結構域之結合特徵。藉由SPR分析測定結合相當。mAb與ADC對人類或食蟹猴PTK7蛋白質之親和力之間無顯著差異(表16)。所有K_{on}量測皆在3倍內，且所有K_{off}量測皆在2倍內，現場考慮之範圍皆在典型系統誤差內，且因此不可能在生理上顯著。

表16. hu24及hu24-vc0101對人類PTK7及食蟹猴PTK7之親和力常數

測試物件	抗原物種	K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	K_{off} (s^{-1})	Kd (nM)
hu24 mAb	人類	7.9 E+05	5.4 E-04	0.7
	食蟹猴	4.3 E+05	5.2 E-04	1.2
hu24-vc0101	人類	5.1 E+05	5.3 E-04	1.4
	食蟹猴	2.8 E+05	1.0 E-03	3.6

K_{on} = 締合速率常數； K_{off} = 解離速率常數；Kd = 平衡解離常數；M = 莫耳濃度；mAb = 單株抗體；nM = 奈米莫耳濃度；

s = 秒

亦藉由夾心式ELISA評估抗-PTK7 mAb結合至PTK7直向同源物之能力。簡言之，藉由直接塗佈將人類、食蟹猴、大鼠或小鼠PTK7-His標記之蛋白質捕獲於ELISA板上。以1 μg/ml、100 μl/孔捕獲所有抗原。以810 ng/ml開始將Hu24 mAb及hu24-vc0101 ADC連續稀釋並添加至經洗滌且封阻之孔中以測試與抗原之結合。藉由多株抗人類IgG辣根過氧化酶結合物檢測mAb及ADC結合並利用TMB基材進行讀數。

藉由ELISA，mAb及ADC相當地結合至人類及食蟹猴PTK7蛋白質(表17)。與SPR結果一起，該等結果確認與食蟹猴PTK7之交叉反應性且展示生物結合過程不改變mAb之觀察之結合特徵。然而，於係觀察與人類PTK7之結合所需之100倍抗原濃度下，mAb及ADC皆不展現與大鼠或小鼠PTK7蛋白質之可檢測之結合(表17)。藉由結合至已知交叉反應性抗體確認大鼠及小鼠抗原經正確摺疊(數據未顯示)。

表17. 藉由ELISA之hu24及hu24-vc0101與PTK7蛋白質之結合

	ED50值(ng/mL)			
	人類PTK7	**食蟹猴PTK7**	**大鼠PTK7**	**小鼠PTK7**
hu24 mAb	4.7	5.0	未結合	未結合
hu24-vc0101	6.6	7.4	未結合	未結合

ADC =抗體-藥物結合物；ED50 = 產生50%最大信號之有效劑量；mAb = 單株抗體；ng/mL = 奈克/毫升

藉由流式細胞術使用實例3中所述之方法比較未結合hu24及結合至vc0101之hu24結合至表現PTK7之細胞之能力。簡言之，收穫經培養之H1975或EKVX細胞並於4℃下與hu24-vc0101 ADC或未結合hu24 mAb一起培育，之後與螢光團結合之二級mAb及存活染劑一起培育且隨後藉由流式細胞術分析。

表18提供活細胞群體之平均螢光道數(mean channel fluorescence)。在獨立重複實驗中獲得可比數據，因此，hu24與連接體酬載之結合不改變其與表現PTK7之細胞之結合。

表18.結合及未結合hu24之可比細胞結合

細胞系	**測試物件**	**hu24-vc0101 ADC或hu24 mAb之濃度**			
		0.1 μg/mL	**0.3 μg/mL**	**1 μg/mL**	**3 μg/mL**
H1975	hu24-vc0101 ADC	94	196	302	341
	hu24 mAb	91	183	310	348
EKVX	hu24-vc0101 ADC	4	4	4	5
	hu24 mAb	4	4	4	5

實例12

活體外細胞毒性分析

利用表現靶PTK7之細胞系評估抗體-藥物結合物hu24-vc0101之細胞毒性。將經改造之HEK293T-PTK7過表現細胞系以500個細胞/180 μL細胞培養基/孔平鋪於清潔平底組織培養板(BD Falcon)中。亦在此分析中測試人類癌細胞系並將其以先前經測定根據其生長速率對於每一細胞系最佳之密度(H661 1500個細胞/孔及H446 9600個細胞/孔，於150 μl中)平鋪。將細胞於37℃下在5% CO_2培育箱中培育過夜。在次日，按照10點濃度曲線以一式三份試樣向細胞中添加hu24-vc0101 ADC及8.84 Ab-vc0101 ADC (陰性對照)，以3μg/mL或10 μg/mL開始，且在細胞培養基中以1:3稀釋。將板在37℃、5% CO_2培育箱中培育4天。根據供應商之說明書使用MTS分析(Promega CellTiter 96水性非放射性細胞增殖分析)。向每一孔中添加30 μL (H446, H661)或40 μL (HEK293T-PTK7)合併MTS試劑，且將板在37℃、5% CO_2培育箱中培育2小時。於490 nm下利用96孔板讀數器測定OD。自具有細胞之孔之讀數減去僅具有培養基之孔之平均讀數以針對背景OD進行對照。使

數據經受邏輯非線性回歸分析(GraphPad Prism軟體)以測定將細胞存活力抑制50%之抗體-藥物結合物之濃度(IC50)。

表19提供細胞毒性分析中hu24-vc0101 ADC之IC50值。在所有三個細胞系中，hu24-vc0101引發有效力之細胞毒性，而未結合8.84 Ab-vc0101不引發；該等數據展示，hu24-vc0101之有效力之細胞毒性取決於抗-PTK7抗體。

表19

細胞系	**IC50值(ng/mL)**		
	hu24-vc0101 ADC	**8.84 Ab-vc0101 ADC**	**游離0101**
HEK293-PTK7	1.7	>3000	ND
H661	27.5 ± 20.5	>10000	0.33
H446	7.6 ± 5.0	>10000	0.59

ND=未測定

實例13

抗-PTK7抗體-藥物結合物之活體內效能

進一步評估抗-PTK7抗體-藥物結合物對人類腫瘤患者衍生之異種移植物(PDX)之活體內生長之效應。原發性腫瘤切除試樣遵循Institutional Review Board for the Protection of Human Subjects批准且根據HIPAA法規購自臨床地點。在Hypothermasol (Biolife Solutions)中在冰上儲存並運輸腫瘤片段並將其包埋於含有生長因子之專賣混合物之基質膠(BD)中並在切除之24小時內皮下植入雌性NOD/SCID小鼠之乳腺脂肪墊中。每日監測小鼠之健康狀態且最初藉由目視檢查每週兩次監測腫瘤生長。一旦腫瘤可觸及，腫瘤體積之量測開始追蹤腫瘤生長且估計細胞倍增時間。使用方程$V = (A*B^2)/2$估計腫瘤體積，其中A係長軸且B係短軸。在腫瘤達到500 mm^3之1,500mm^3之體積時，將

其收穫用於研究並用於再移植作為患者衍生之異種移植物(PDX)。端視該系而定，可使用機械及/或化學解離以分離個別細胞用於傳代。將活細胞以10,000至50,000個細胞/動物接種至未經處理之動物中。

對於效能研究，自傳代研究收穫腫瘤並將細胞解離至單一細胞懸浮液中。使用錐蟲藍(Trypan blue)排除對製劑之活細胞進行計數並在基質膠中每小鼠接種10,000至50,000個細胞。為考慮PDX之差異生長速率，開始至少25%更多動物以容許隨機化時最小腫瘤體積方差。腫瘤生長，之後最初可觸及，在腫瘤體積達到約30mm^3後量測開始。在帶有腫瘤之小鼠之隊列達到140 mm^3至180 mm^3後基於腫瘤大小隨機化研究。藉由腹膜內注射投用動物，每週兩次持續兩週(q4dx4)。隨訪研究組直至個別小鼠或整個組腫瘤量測達到1200 mm^3，此時根據IACUC方案指示處死。對於選擇投藥研究，在2小時、36小時及72小時時實施藥物動力學下頜下流血。立刻將10 μL體積之血液移取至90 μL HBS-P (GE Healthcare)中。在分析之前將試樣儲存於-80℃下。對於每一腫瘤量測，提供腫瘤體積 ± 平均值之標準誤差(SEM)。GT = 由於大的腫瘤大小終止之組。所有研究皆包括對照抗體藥物結合物，其包括結合至所分析之相同連接體-酬載之未結合hIgG1抗體且具有可比藥物-對-抗體比率(DAR)及載量分佈。

表20-37展示使用各種人類腫瘤細胞確立之PDX模型中抗體-藥物結合物hu23-vc0101、hu24-vc0101、hu58-vc0101、hu23-AcButCM、hu24-AcButCM及hu58-AcButCM之有效性，其具有經測定低、中等或高之相對PTK7表現。

A. 乳癌(BR)

表20及圖8顯示，與媒劑及藥物對照相比，hu23-vc0101、hu24-vc0101及hu58-vc0101 ADC在使用人類乳房-13 (BR13)三陰性乳癌(TNBC) PDX模型(高PTK7表現)之PDX模型中皆有效。在BR13 PDX模

型中，hu24-vc0101 ADC較hu23-vc0101及hu58-vc0101二者更有效。所有測試之PTK7 ADC皆較多柔比星(其係用於TNBC之標準護理治療)更有效。

表20. BR13 TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能.

天	媒劑	1 mg/kg 多柔比星	3 mg/kg 對照-vc0101	3 mg/kg hu23-vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101	3 mg/kg hu58-vc0101
0	144 ± 13	156 ± 13	153 ± 9	154 ± 9	153 ± 10	151 ± 10
7	174 ±13	219 ± 29	211 ± 17	199 ± 12	194 ± 12	183 ± 14
14	255 ± 22	295 ± 39	277 ± 28	206 ± 16	175 ± 17	159 ± 15
21	349 ± 40	353 ± 45	323 ± 44	116 ± 16	97 ± 11	110 ± 12
28	428 ± 48	432 ± 50	413 ± 48	48 ± 7	41 ± 4	61 ± 13
35	734 ± 74	696 ± 84	537 ± 66	39 ± 6	37 ± 5	37 ± 3
42	940 ± 105	1001 ± 159	591 ± 74	23 ± 7	20 ± 5	27 ± 3
49	GT	GT	775 ± 87	23 ± 7	19 ± 7	40 ± 5
56	GT	GT	952 ± 89	15 ± 6	4 ± 4	32 ± 3
63	GT	GT	1181 ± 119	6 ± 4	0 ± 0	40 ± 6
70	GT	GT	1287 ± 98	7 ± 5	0 ± 0	48 ± 7
77	GT	GT	1449 ± 125	8 ± 5	0 ± 0	64 ± 10
84	GT	GT	GT	14 ± 10	0 ± 0	85 ± 15
91	GT	GT	GT	20 ± 11	0 ± 0	119 ± 28
98	GT	GT	GT	39 ± 18	0 ± 0	165 ± 26
105	GT	GT	GT	52 ± 22	0 ± 0	236 ± 29
112	GT	GT	GT	94 ± 41	0 ± 0	314 ± 37
119	GT	GT	GT	116 ± 50	0 ± 0	389 ± 51
126	GT	GT	GT	123 ± 52	0 ± 0	538 ± 73
133	GT	GT	GT	152 ± 71	0 ± 0	624 ± 76
140	GT	GT	GT	204 ± 97	0 ± 0	849 ± 78
147	GT	GT	GT	257 ± 125	0 ± 0	935 ± 74
154	GT	GT	GT	318 ± 141	0 ± 0	954 ± 65
161	GT	GT	GT	352 ± 148	0 ± 0	GT

圖9及10顯示與hu24-vc0101相比，hu23-mc8261、hu24-mc8261及hu58-mc8261 ADC在BR13 TNBC PDX模型(高PTK7表現)中之效能。經hu24-vc0101之治療產生持續腫瘤消退達200天以上且展示與抗-PTK7-mc8261 ADC相比更大之腫瘤生長抑制。

表21及圖11顯示，與媒劑及藥物對照相比，hu23-vc0101、hu24-vc0101及hu58-vc0101 ADC在使用人類乳房-22 (BR22) TNBC PDX模型(高PTK7表現)之PDX模型中皆有效。在此模型中，hu23-vc0101及hu24-vc0101 ADC較hu58-vc0101更有效，從而展示針對相同靶標(PTK7)之類似抗體具有不同程度之效能。所有測試之PTK7 ADC皆較多西他賽(其係用於TNBC之標準護理治療)更有效。尤其，多西他賽及ADC之藥物組份奧裡斯他汀0101具有類似作用機制，其類似之處在於其抑制微管蛋白聚合。

表21. BR22 TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能.

天	媒劑	20 mg/kg 多西他賽	3 mg/kg 對照-vc0101	1 mg/kg hu24- vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101	3 mg/kg hu58-vc0101	3 mg/kg hu23-vc0101
0	171 ± 19	182 ± 21	164 ± 14	172 ± 22	170 ± 19	143 ± 7	150 ± 9
7	354 ± 52	154 ± 23	221 ± 34	245 ± 28	89 ± 22	169 ± 13	100 ± 11
14	655 ± 99	107 ± 51	207 ± 49	157 ± 48	21 ± 5	49 ± 12	10 ± 6
21	1028 ± 142	218 ± 98	129 ± 40	213 ± 97	0 ± 0	38 ± 24	1 ± 1
28	GT	418 ± 165	209 ± 71	266 ± 114	0 ± 0	84 ± 55	0 ± 0
35	GT	1191±264	482 ± 142	357 ± 156	0 ± 0	157 ± 91	0 ± 0
42	GT	GT	724 ± 212	758 ± 225	0 ± 0	301 ± 178	0 ± 0
49	GT	GT	1054 ± 308	912 ± 203	0 ± 0	584 ± 339	0 ± 0
56	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	813 ± 381	0 ± 0
63	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	943 ± 409	0 ± 0
70	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
77	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0

84	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
91	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
98	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
105	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
119	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
126	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
133	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
140	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
147	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
154	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0
161	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	GT	0 ± 0

表22顯示與媒劑及藥物對照相比，hu23-AcButCM、hu24-AcButCM及hu58-AcButCM ADC在BR22 TNBC PDX模型(高PTK7表現)中皆有效。然而，hu58-AcButCM較hu23-AcButCM及hu24-AcButCM二者更有效，從而闡釋具有針對相同靶標之類似抗體之各種酬載之使用的不可預測性質。hu23-vc0101及hu24-vc0101 ADC較hu58-vc0101更有效，而hu58-AcButCM較hu23-AcButCM及hu24-AcButCM ADC二者更有效。所有測試之PTK7 ADC皆較多柔比星(其係用於TNBC之標準護理治療)更有效。

表22. BR22 TNBC PDX中ADC之效能.

天	**媒劑**	**1.5 mg/kg 多柔比星**	**0.3 mg/kg 對照-AcButCM**	**0.3mg/kg hu23-AcButCM**	**0.3 mg/kg hu58-AcButCM**	**0.3 mg/kg hu24-AcButCM**
0	303 ± 16	297 ± 17	186 ± 16	186 ± 15	157 ± 13	193 ± 16
14	797 ± 71	641 ± 39	456 ± 55	140 ± 15	30 ± 5	185 ± 71
28	GT	GT	1019 ± 148	11 ± 2	0 ± 0	32 ± 28
63	GT	GT	GT	100 ± 83	10 ± 10	118 ± 117
91	GT	GT	GT	652 ± 479	67 ± 67	723 ± 695

119	GT	GT	GT	999 ± 527	125 ± 125	862 ± 797
133	GT	GT	GT	GT	125 ± 125	968 ± 794
161	GT	GT	GT	GT	125 ± 125	1538 ± 1098
175	GT	GT	GT	GT	150 ± 150	GT

圖12及13顯示與hu23-vc0101相比，hu23-mc8261、hu24-mc8261及hu58-mc8261 ADC在BR22 TNBC PDX模型(高PTK7表現)中之效能。經hu23-vc0101之治療產生持續腫瘤消退達200天以上且展示與抗-PTK7-mc8261 ADC相比更大之腫瘤生長抑制。

表23-25及圖14顯示hu23-vc0101、hu24-vc0101、hu58-vc0101、hu23-mc8261及hu24-mc8261、hu58-mc8261及hu23-AcButCM、hu24-AcButCM、hu58-AcButCM ADC在乳房-31 (BR31) TNBC PDX模型(高PTK7表現)中之效能。在此模型中，具有vc0101連接體-酬載之所有三種ADC皆較具有AcButCM或mc8261之ADC更有效。此結果係意外的，此乃因在所測試活體內PDX模型中，AcButCM連接體酬載通常較vc0101連接體酬載更有效力。另外，PTK7-vc0101 ADC較多西他賽更有效且PTK7-AcButCM ADC較多柔比星更有效。多西他賽及多柔比星二者皆係用於TNBC之標準護理。

表23. BR31 TNBC PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能.

天	**媒劑**	**20 mg/kg 多西他賽**	**3 mg/kg 對照-vc0101**	**3 mg/kg hu23-vc0101**	**3 mg/kg hu24-vc0101**	**3 mg/kg hu58-vc0101**
0	159 ± 10	259 ± 47	148 ± 12	164 ± 14	159 ± 15	158 ± 12
7	269 ± 17	331 ± 70	227 ± 23	178 ± 23	188 ± 12	170 ± 25
14	425 ± 32	371 ± 82	133 ± 10	79 ± 8	82 ± 7	100 ± 11
21	668 ± 50	451 ± 91	101 ± 21	28 ± 7	21 ± 3	38 ± 3
28	1088 ± 93	510 ± 103	70 ± 17	8 ± 3	0 ± 0	21 ± 7
35	GT	614 ± 117	105 ± 28	0 ± 0	0 ± 0	8 ± 5

42	GT	790 ± 117	21 ± 76	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
49	GT	837 ± 126	234 ± 83	2 ± 0	0 ± 0	30 ± 18
56	GT	ND	393 ± 103	2 ± 1	0 ± 0	3 ± 1
63	GT	1131 ± 148	680 ± 181	2 ± 1	0 ± 0	17 ± 9
70	GT	1317 ± 182	1169 ± 300	8 ± 3	0 ± 0	35 ± 18
77	GT	GT	1300 ± 331	13 ± 4	1 ± 1	70 ± 24
84	GT	GT	GT	32 ± 10	2 ± 2	108 ± 32
91	GT	GT	GT	59 ± 24	10 ± 10	143 ± 36
98	GT	GT	GT	59 ± 15	13 ± 13	213 ± 46
105	GT	GT	GT	115 ± 35	111 ± 92	295 ± 68
112	GT	GT	GT	249 ± 75	370 ± 269	551 ± 155
119	GT	GT	GT	293 ± 72	521 ± 429	691 ± 143
126	GT	GT	GT	449 ± 100	551 ± 428	826 ± 155
133	GT	GT	GT	541 ± 135	745 ± 499	914 ± 155
140	GT	GT	GT	658 ± 130	765 ± 494	GT
147	GT	GT	GT	810 ± 145	794 ± 488	GT

表24. BR31 TNBC PDX中抗-PTK7-mc8261 ADC之效能.

天	媒劑	**10 mg/kg hu23-mc8261**	**10 mg/kg hu24-mc8261**	**10 mg/kg hu58-mc8261**
0	159 ± 10	154 ± 8	154 ± 9	161 ± 13
7	269 ± 17	238 ± 7	202 ± 20	225 ± 21
14	425 ± 32	304 ± 12	275 ± 35	280 ± 29
21	668 ± 50	383 ± 32	370 ± 53	390 ± 39
28	1088 ± 93	601 ± 70	609 ± 81	635 ± 55
35	GT	857 ± 88	862 ± 139	889 ± 118

表25. BR31 TNBC PDX中抗-PTK7-AcButCM ADC之效能.

天	媒劑	1.5 mg/kg 多柔比星	0.3 mg/kg 對照- AcButCM	0.3 mg/kg hu58-AcButCM	0.3 mg/kg hu23-AcButCM	0.3 mg/kg hu24-AcButCM
0	159 ± 10	160 ± 11	145 ± 11	145 ± 12	144 ± 9	149 ± 11
7	269 ± 17	304 ± 20	223 ± 25	199 ± 21	236 ± 20	188 ± 14
28	1088 ± 93	759 ± 111	675 ± 158	270 ± 42	236 ± 36	106 ± 7
35	GT	GT	869 ± 204	381 ± 46	339 ± 69	139 ± 15
63	GT	GT	GT	885 ± 150	920 ± 208	299 ± 41
77	GT	GT	GT	GT	GT	590 ± 104
84	GT	GT	GT	GT	GT	882 ± 183

表26及圖15顯示與媒劑及藥物對照相比，hu24-vc0101 ADC在人類乳房-64 (BR64) TNBC PDX模型中有效(中等PTK7表現)。數據展示，利用hu24-vc0101有效地靶向具有中度PTK7靶標表現之PDX模型。Hu24-vc0101較多西他賽(一種用於TNBC之標準護理)更有效。

表26. BR64 TNBC PDX中hu24-vc0101之效能.

天	媒劑	20 mg/kg 多西他賽	3 mg/kg 對照-vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101
0	499 ± 36	543 ± 46	190 ± 30	173 ± 24
7	832 ± 119	1112 ± 97	418 ± 62	271 ± 30
14	1768 ± 284	1805 ± 206	839 ± 91	180 ± 55
21	GT	GT	1907 ± 576	96 ± 30
28	GT	GT	GT	53 ± 21
35	GT	GT	GT	15 ± 6
42	GT	GT	GT	27 ± 22
49	GT	GT	GT	65 ± 58
56	GT	GT	GT	144 ± 141
63	GT	GT	GT	394 ± 392
70	GT	GT	GT	422 ± 385
77	GT	GT	GT	690 ± 460
84	GT	GT	GT	1094 ± 594

圖16顯示在BR5 TNBC PDX模型中hu24-vc0101具有效能且未結合hu24無效能。向具有Br5人類乳癌異種移植物之小鼠投用hu24-vc0101 ADC、未結合hu24 mAb或媒劑，每四天一次持續四個週期(Q4Dx4)。使用數位測徑器每週兩次記錄腫瘤量測且顯示為平均值 ± SEM。3 mg/kg劑量之hu24-vc0101 ADC直至第49天引起腫瘤消退而無腫瘤生長。相反，未結合hu24 mAb不抑制腫瘤生長(圖16)。因此，所觀察效能取決於連接體-酬載之遞送。

圖17顯示與太平洋紫杉醇相比，hu24-vc0101在BR36 PR+ TNBC PDX模型中之效能。向具有BR36人類乳癌異種移植物之小鼠Q4Dx4投用hu24-vc0101 ADC、太平洋紫杉醇、陰性對照ADC或媒劑。使用數位測徑器每週兩次記錄腫瘤量測且顯示為平均值 ± SEM。3 mg/kg劑量之hu24-vc0101 ADC直至第103天引起腫瘤消退而無腫瘤生長。Hu24-vc0101勝過MTD時投與之太平洋紫杉醇。陰性對照ADC僅展現中等活性(圖17)。

B. 小細胞肺癌(SCLC)

表27-28中之數據闡釋hu24-vc0101及hu24-AcButCM ADC在小細胞肺癌-64 (LU64) PDX模型(低PTK7表現)中之有效性。在此模型中，兩種ADC皆顯示在低PTK7表現之此PDX中有效，但具有AcButCM連接體酬載之ADC較具有vc0101連接體酬載之ADC更有效。hu24-vc0101及hu24-AcButCM二者皆較SCLC之標準護理(其係順鉑加上依託泊苷)更有效。

表27. LU64 PDX中hu24-vc0101 ADC之效能.

天	媒劑	5 mg/kg順鉑 + 24 mg/kg依託泊苷	3 mg/kg 對照-vc0101	10 mg/kg 對照-vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101	10 mg/kg hu24-vc0101
0	139 ± 12	139 ± 10	156 ± 11	168 ± 14	166 ± 15	178 ± 19
7	241 ± 25	25 ± 5	255 ± 26	312 ± 38	252 ± 11	348 ± 32
14	376 ± 33	31 ± 5	379 ± 26	433 ± 49	310 ± 38	391 ± 42
21	613 ± 39	77 ± 22	493 ± 38	619 ± 72	389 ± 35	377 ± 66
28	1087 ± 86	151 ± 38	718 ± 92	824 ± 85	537 ± 67	500 ± 76
35	GT	214 ± 54	912 ± 158	GT	651 ± 70	618 ± 113
42	GT	285 ± 72	GT	GT	932 ± 128	773 ± 141
49	GT	738 ± 127	GT	GT	GT	838 ± 171
56	GT	1011 ± 172	GT	GT	GT	1054 ± 185
63	GT	GT	GT	GT	GT	1367 ± 290

表28. LU64 PDX中hu24-AcButCM ADC之效能.

天	媒劑	5 mg/kg順鉑 + 24 mg/kg 依託泊苷	0.1 mg/kg 對照-AcButCM	0.02 mg/kg hu24-AcButCM	0.05 mg/kg hu24-AcButCM	0.1 mg/kg hu24-AcButCM
0	139 ± 12	139 ± 10	171 ± 11	137 ± 10	137 ± 10	136 ± 9
21	613 ± 39	77 ± 22	575 ± 45	13 ± 4	1 ± 1	0 ± 0
28	1087 ± 86	151 ± 38	723 ± 77	12 ± 4	0 ± 0	0 ± 0
35	GT	214 ± 54	998 ± 107	24 ± 10	0 ± 0	0 ± 0
42	GT	285 ± 72	GT	36 ± 17	0 ± 0	0 ± 0
56	GT	1011 ± 172	GT	168 ± 55	0 ± 0	0 ± 0
63	GT	GT	GT	274 ± 89	0 ± 0	0 ± 0
105	GT	GT	GT	760 ± 206	0 ± 0	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0
168	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0

表 29 顯 示 hu23-mc8261 、 hu24-mc8261 及 hu58-mc8261 ADC 在 LU64 PDX模型(低PTK7表現)中之效能。在此模型中，經hu24-vc0101之治療展示較抗mc8261 ADC大之腫瘤生長抑制。

表29. LU64 PDX中抗-PTK7-mc8261 ADC之效能.

天	媒劑	10 mg/kg hu23-mc8261	10 mg/kg hu24-mc8261	10 mg/kg hu58-mc8261
0	184 ± 24	171 ± 11	170 ± 12	177 ± 15
7	269 ± 26	239 ± 14	257 ± 29	279 ± 32
14	417 ± 16	311 ±19	330 ± 45	364 ± 31
21	591 ± 37	455 ± 38	435 ± 76	517 ± 47
28	738 ± 103	572 ± 51	622 ± 119	760 ± 74
35	771 ± 92	770 ± 92	903 ± 197	1029 ± 95
42	970 ± 64	1088 ± 116	GT	GT

表30-31顯示hu24-vc0101、hu23-vc0101及hu24- AcButCM ADC在小細胞肺癌-86 (LU86) PDX模型(高PTK7表現)中之效能。在此模型中，hu24-vc0101及hu23-vc0101二者皆有效阻抑腫瘤生長。Hu24-vc0101較對照-vc0101 ADC更有效。然而， hu24-AcButCM ADC較具有vc0101連接體酬載之兩種ADC更有效力(表22)，從而提供與SCLC模型中之vc0101相比AcButCM之一般更大功效的又一實例。Hu24-AcButCM較順鉑加上依託泊苷(其係用於SCLC之標準護理)更有效。

表30. LU86 PDX中抗-PTK7-vc0101 ADC之效能.

天	媒劑	3 mg/kg 對照-vc0101	0.3 mg/kg hu24-vc0101	1 mg/kg hu24-vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101	3 mg/kg hu23-vc0101
0	139 ± 11	164 ± 19	145 ± 11	143 ± 12	141 ± 11	200 ± 23
7	334 ± 44	228 ± 45	362 ± 39	282 ± 46	194 ± 24	42 ± 11
14	758 ± 100	310 ± 39	758 ± 62	363 ± 77	56 ± 11	0 ± 0
21	1213 ± 140	394 ± 57	1441 ± 97	420 ± 115	5 ± 4	0 ± 0
28	GT	748 ± 102	GT	621 ± 159	0 ± 0	0 ± 0
35	GT	1279 ± 198	GT	784 ± 141	0 ± 0	0 ± 0
42	GT	GT	GT	915 ± 105	0 ± 0	0 ± 0
49	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0

56	GT	GT	GT	GT	0 ± 0	0 ± 0
63	GT	GT	GT	GT	17 ± 17	0 ± 0
70	GT	GT	GT	GT	73 ± 45	0 ± 0
77	GT	GT	GT	GT	121 ± 67	0 ± 0
84	GT	GT	GT	GT	204 ± 90	0 ± 0
91	GT	GT	GT	GT	477 ± 272	0 ± 0
98	GT	GT	GT	GT	570 ± 270	0 ± 0
105	GT	GT	GT	GT	689 ± 281	19 ± 19
112	GT	GT	GT	GT	GT	72 ± 72
119	GT	GT	GT	GT	GT	154 ± 154
203	GT	GT	GT	GT	GT	154 ± 154

表31. LU86 PDX中hu24-AcButCM ADC之效能.

天	**媒劑**	**5 mg/kg順鉑 + 24 mg/kg依託泊苷**	**0.3 mg/kg對照-AcButCM**	**0.03 mg/kg hu24-AcButCM**	**0.1 mg/kg hu24-AcButCM**	**0.3 mg/kg hu24-AcButCM**
0	206 ± 25	149 ± 13	158 ± 20	147 ± 13	143 ± 12	150 ± 13
14	1019 ± 6	468 ± 47	393 ± 115	756 ± 79	443 ± 90	73 ± 25
21	GT	946 ± 77	571 ± 173	1245 ± 138	548 ± 120	18 ± 5
28	GT	GT	788 ± 166	GT	761 ± 154	3 ± 2
35	GT	GT	962 ± 176	GT	908 ± 155	0 ± 0
42	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
112	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
140	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
154	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0
203	GT	GT	GT	GT	GT	0 ± 0

表32顯示hu23-mc8261、hu24-mc8261及hu58-mc8261 ADC在LU86 PDX模型(高PTK7表現)中之效能。經hu23-vc0101之治療在LU86 PDX模型中產生持續腫瘤消退且展示與抗-PTK7-mc8261 ADC相比更大之腫瘤生長抑制。

表32. LU86 PDX中抗-PTK7-mc8261 ADC之效能.

天	媒劑	10 mg/kg hu23-mc8261	10 mg/kg hu24-mc8261	10 mg/kg hu58-mc8261
0	147 ± 11	159 ± 13	159 ± 14	158 ± 15
7	317 ± 33	228 ± 29	257 ± 27	225 ± 20
14	672 ± 62	256 ± 30	300 ± 37	321 ± 34
21	1233 ± 83	340 ± 48	383 ± 65	425 ± 42
28	GT	455 ± 68	544 ± 90	574 ± 57
35	GT	740 ± 78	815 ± 117	736 ± 76
42	GT	870 ± 99	903 ± 157	887 ± 106
49	GT	1165 ± 137	1333 ± 173	1265 ± 206

圖18A-B顯示兩個不同SCLC PDX模型(即分別H1048 PDX模型(高PTK7表現)及SCLC 95 PDX模型(高PTK7表現))中結合至0101或CM之PTK7 ADC的效能。

圖19A-B顯示兩個不同SCLC PDX模型(即分別SCLC 117 PDX模型(中度PTK7表現)及SCLC 102 PDX模型(低PTK7表現))中hu24-AcButCM之效能。 結果展示，hu24-AcButCM或hu23-AcButCM ADC針對SCLC較hu24-vc0101 ADC更有效。根據其他腫瘤類型(例如TNBC及NSCLC)之PDX模型中hu24-vc0101之強抗腫瘤活性，此發現係意外的。另外，結果表明，ADC之活性與PTK7之表現相關，此乃因hu24-AcButCM ADC在具有低PTK7表現之SCLC102中引發最弱反應。

C. 非小細胞肺癌(NSCLC)

表33及圖20顯示與媒劑及藥物對照相比，hu24-vc0101 ADC在人類非小細胞肺癌-135 (LU135) PDX模型(高PTK7表現)中有效。此數據展示在NSCLC PDX中hu24-vc0101在阻抑腫瘤生長中之有效性。Hu24-vc0101較太平洋紫杉醇(其係NSCLC中之標準護理)更有效。

表33. LU135 PDX中hu24-vc0101之效能.

天	媒劑	20 mg/kg 太平洋紫杉醇	1 mg/kg 對照-vc0101	3 mg/kg 對照-vc0101	1 mg/kg hu24-vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101
0	162 ± 17	175 ± 24	161 ± 15	168 ± 18	158 ± 18	186 ± 23
7	446 ± 28	77 ± 13	461 ± 19	329 ± 39	369 ± 53	79 ± 6
14	615 ± 34	58 ± 12	655 ± 39	337 ± 50	520 ± 81	41 ± 4
21	830 ± 71	60 ± 11	752 ± 46	414 ± 31	651 ± 95	60 ± 8
28	982 ± 68	93 ± 20	815 ± 101	488 ± 40	838 ± 133	84 ± 15
35	GT	110 ± 31	GT	627 ± 60	GT	104 ± 17
42	GT	184 ± 48	GT	871 ± 117	GT	175 ± 26
49	GT	284 ± 78	GT	GT	GT	244 ± 19
56	GT	384 ± 106	GT	GT	GT	347 ± 34
63	GT	538 ± 178	GT	GT	GT	387 ± 47
70	GT	667 ± 174	GT	GT	GT	502 ± 96
77	GT	724 ± 171	GT	GT	GT	628 ± 152

表34及圖21顯示與媒劑及藥物對照相比，hu24-vc0101 ADC在人類非小細胞肺癌-176 (LU176) PDX模型(高PTK7表現)中有效。此數據展示在NSCLC PDX中hu24-vc0101在阻抑腫瘤生長中之有效性。Hu24-vc0101較順鉑(其係NSCLC中之標準護理)更有效。

表34. LU176 PDX中hu24-vc0101之效能.

天	媒劑	5 mg/kg 順鉑	3 mg/kg 對照-vc0101	1 mg/kg hu24-vc0101	3 mg/kg hu24-vc0101
0	262 ± 17	259 ± 26	139 ± 9	148 ± 12	138 ± 10
7	658 ± 71	124 ± 30	245 ± 29	446 ± 222	77 ± 21
14	964 ± 196	97 ± 22	208 ± 26	401 ± 214	27 ± 6
21	2087 ± 381	102 ± 24	244 ± 54	458 ± 204	34 ± 9
28	GT	179 ± 71	366 ± 88	685 ± 193	21 ± 3

35	GT	207 ± 69	679 ± 154	1046 ± 288	22 ± 8
42	GT	297 ± 97	955 ± 129	GT	20 ± 7
49	GT	619 ± 262	GT	GT	28 ± 14
56	GT	GT	GT	GT	14 ± 4
63	GT	GT	GT	GT	10 ± 4
70	GT	GT	GT	GT	5 ± 2
77	GT	GT	GT	GT	9 ± 5
84	GT	GT	GT	GT	8 ± 8
91	GT	GT	GT	GT	11 ± 11
98	GT	GT	GT	GT	21 ± 16
105	GT	GT	GT	GT	28 ± 27
112	GT	GT	GT	GT	46 ± 44
119	GT	GT	GT	GT	140 ± 140
126	GT	GT	GT	GT	281 ± 281
133	GT	GT	GT	GT	366 ± 366
140	GT	GT	GT	GT	649 ± 649

D. 卵巢癌(OV)

表35顯示與媒劑及藥物對照相比，hu24-vc0101及hu24-AcButCM ADC在卵巢-55 (OV55) PDX模型(中等PTK7表現)中之效能。此數據展示，藉由兩種ADC有效地靶向具有中度PTK7靶標表現之卵巢PDX模型。令人驚訝的是，在終止實驗時，經hu24-vc0101治療之動物無腫瘤，且hu24-AcButCM ADC在此模型中較不有效。

表35 OV55 PDX中hu24 ADC之效能.

天	**0.1 mg/kg 對照- AcButCM**	**3 mg/kg 對照-vc0101**	**0.1 mg/kg hu24- AcButCM**	**3 mg/kg hu24-vc0101**
0	168 ± 7	167 ± 7	162 ± 6	166 ± 8
14	438 ± 58	134 ± 46	105 ± 15	33 ± 6

35	1204 ± 46	427 ± 196	137 ± 101	0 ± 0
42	GT	564 ± 210	194 ± 158	0 ± 0
49	GT	807 ± 265	294 ± 204	0 ± 0
77	GT	GT	895 ± 169	0 ± 0
84	GT	GT	GT	0 ± 0
133	GT	GT	GT	0 ± 0
168	GT	GT	GT	0 ± 0
182	GT	GT	GT	0 ± 0

E. 黑色素瘤(SK)

表36顯示與媒劑及藥物對照相比，hu24-vc0101 ADC在人類黑色素瘤-23 (SK23) PDX模型(中等PTK7表現)中有效。此數據展示hu24-vc0101在具有中度PTK7靶標表現之黑色素瘤PDX模型中之有效性，從而提供ADC之使用之潛在指示。

表36. SK23 PDX中hu24-vc0101之效能.

天	**2 mg/kg 對照-vc0101**	**4 mg/kg 對照-vc0101**	**2 mg/kg hu24-vc0101**	**4 mg/kg hu24-vc0101**
0	183 ± 20	184 ± 14	187 ± 11	196 ± 17
7	587 ± 82	541 ± 54	432 ± 28	356 ± 45
14	871 ± 107	697 ± 61	456 ± 36	227 ± 45
21	1123 ± 86	910 ± 93	509 ± 51	150 ± 33
28	GT	GT	679 ± 65	135 ± 41
35	GT	GT	793 ± 65	166 ± 58
42	GT	GT	868 ± 63	178 ± 62
49	GT	GT	GT	228 ± 81
56	GT	GT	GT	250 ± 93
63	GT	GT	GT	295 ± 103
70	GT	GT	GT	398 ± 130
77	GT	GT	GT	568 ± 181
84	GT	GT	GT	688 ± 167

F. 乳房及NSCLC PDX模型中之腫瘤生長抑制

藉由腹膜內注射向動物投藥，每四天一次持續四個週期(Q4Dx4)，只是以相同排程表藉由靜脈內注射之BR5研究除外。使用數位測徑器每週一次或兩次記錄腫瘤量測且使用方程$V=(A \times B^2)/2$估計腫瘤體積，其中A係長軸且B係短軸。至少一週一次量測並記錄動物體重。隨訪研究組直至個別小鼠或整個組腫瘤量測達到1200 mm^3，此時根據IACUC方案指示處死。對於BR5研究，在根據IACUC方案分期時，一旦腫瘤體積接近體重之15%，立即處死動物。

使用方程TGI%= [1-(經治療平均腫瘤體積)/(媒劑之平均腫瘤體積)]計算腫瘤生長抑制(TGI)。在最近可能時間點時計算TGI，該時間點通常係中斷對照組之前之最後量測。腫瘤消退定義為投藥後平均腫瘤體積減少。在腫瘤消退之情形下，至進展之時間(TTP)指示在首次劑量與平均腫瘤體積自前一次量測增加至統計上顯著之程度之時間之間的天數。若腫瘤在實驗過程期間不再生長，則TTP係首次症狀與實驗結束之間之天數。

為確認效能研究中hu24-vc0101 ADC之暴露，針對兩個PDX模型(即BR13 PDX及BR22 PDX)測定ADC及總抗體之血漿濃度。在第三次投與ADC後之三個時間點採集試樣且藉由配體結合分析(LBA)量測濃度(數據未顯示)。數據指示，藥物暴露在該等腫瘤模型中相當。

Hu24-vc0101 ADC在乳癌及NSCLC腫瘤模型中引發抗腫瘤活性。腫瘤在治療後消退且通常在最後投與ADC後數月不再生長。未結合hu24 mAb在展示奧裡斯他汀依賴性作用機制之所測試模型中不引發抗腫瘤活性。結果概述於表37中。

表37. 利用hu24-vc0101 ADC之活體內藥理學研究的概述

腫瘤模型	**藉由IHC之靶標表現**	**投藥方案**	**暴露數據**	**hu24-vc0101劑量量(mg/kg)**	**消退(TTP，天)或TGI%**
BR13 TNBC PDX	高	Q4Dx4 ip	是	1	37% TGI
				2	消退(35)
				4	消退(105)
BR22 TNBC PDX	高	Q4Dx4 ip	是	0.3	無
				1	消退(21)
				3	消退(205)
BR31 TNBC PDX	中度	Q4Dx4 ip	否	3	消退(105)
BR5 TNBC PDX	高	Q4Dx4 iv	否	3	消退(49)
				hu24 mAb, 3 mg/kg	無
BR36 PR+ PDX	高	Q4Dx4 ip	否	3	消退(103)
NSCLC135 PDX	高	Q4Dx4 ip	否	1	15% TGI
				3	消退(32)
NSCLC176 PDX	高	Q4Dx4 ip	否	1	78% TGI
				3	消退(98)

% = 百分比；BR = 乳癌；IHC = 免疫組織化學；ip = 腹膜內；iv = 靜脈內；mAb = 單株抗體；mg/kg = 毫克/公斤；NSCLC = 非小細胞肺癌；PDX = 患者衍生之異種移植物；PR+ = 助孕酮受體陽性；Q4Dx4 = 劑量每4天一次持續4個學週期；TGI = 腫瘤生長抑制；TNBC = 三陰性乳癌；TTP = 至進展之時間。

實例14

0101之作用機制

為研究hu24-vc0101 ADC之作用機制，將細胞用ADC處理且隨後評價其微管結構。奧裡斯他汀係微管蛋白聚合之完全合成之基於多拉斯他汀之五肽抑制劑，其於低皮莫耳濃度細胞內濃度下誘導G2/M細胞週期停滯及細胞死亡(Sapra等人，2011, Expert Opin Investig Drugs 20(8):1131-49及Turner等人，1998, Prostate 34(3):175-81)。

將H661肺癌細胞接種至具有CC2塗佈生長表面之4孔室載玻片系統(Thermo Scientific)上並用0 - 4 μg/mL之hu24-vc0101、陰性對照ADC、未結合hu24mAb或0.1 - 10 nM之游離0101奧裡斯他汀處理48小時。隨後將細胞固定於3%對甲醛中，用PBS洗滌，用PBS中之0.5% Triton-X® (Sigma Chemical)滲透，用PBS洗滌，且與封阻緩衝液(5%正常山羊血清及0.2% Tween-20，於PBS中)一起培育。於室溫下將細胞與一級抗α-微管蛋白抗體(Sigma編號T9026，純系DM1A)在封阻緩衝液中一起培育1小時。其後，將細胞用PBS洗滌並與Alexa Fluor® 488結合之二級抗體(Invitrogen公司)及4',6-二甲脒基-2-苯基吲哚(DAPI)一起培育30分鐘以染色DNA。利用Zeiss LSM 510 Meta共焦顯微鏡使細胞可視化。

用游離0101或hu24-vc0101 ADC處理細胞會破壞微管結構且導致G2/M細胞週期停滯。相反，未結合hu24 mAb及陰性對照mAb皆不引發該等反應(圖22)。該等結果展示，hu24-vc0101 ADC可藉由破壞微管結構並引起G2/M停滯以抗原依賴性方式引發細胞毒性。此機制與關於未結合奧裡斯他汀之先前研究一致。

實例15

hu24-vc0101 ADC對內皮細胞之效應

圖23顯示在標準活體外HUVEC發芽分析中，hu24-vc0101 ADC抑制血管生成。簡言之，以約1×10^6個細胞/2500個珠粒之比率使用HUVEC細胞*(Lonza- 編號CC-2517)*以塗佈Cytodex珠粒*(Sigma編號*

C0646-5G)，且隨後在具有內皮細胞生長培養基*(Lonza編號*CC-3162)之37℃/ 5% CO2培育箱中放置過夜。次日，將珠粒用內皮細胞生長培養基洗滌，並再懸浮於2.0 mg/ml纖維蛋白原I型(過濾滅菌)於DPBS中之溶液及0.15單位/ml抑肽酶(Aprotinin)中。在添加500 ul珠粒溶液之前向24孔板之每一孔中添加0.3125單位凝血酶。為促進凝血，將板於37℃培育箱中放置15分鐘。最後，將懸浮於內皮細胞生長培養基中之皮膚纖維母細胞(*Detroit 551 - ATCC編號CCL-110)*小心地放在所形成纖維蛋白原凝塊之頂部上。每隔一天向細胞餵入其各別藥物治療並使其生長8天。觀察HUVEC發芽及分支血管之形成之程度。

在此分析中，Hu24-vc0101 ADC於1 μg/mL下抑制發芽血管生成，而陰性對照ADC不抑制。此結果展示，抗-PTK7 ADC可以靶標特異性方式抑制血管生成。

實例16

腫瘤起始細胞(TIC)之減少

為測定抗-PTK7抗體-藥物結合物治療是否降低腫瘤中之腫瘤起始細胞(TIC)頻率，將BR13 TNBC乳房腫瘤用4 mg/kg hu24-vc0101 ADC、4 mg/kg對照IgG ADC或20 mg/kg多西他賽化學療法治療，每週兩次，總共3個劑量(第0、3及7天)。在第10天時自解離腫瘤分離活的殘餘人類腫瘤細胞(即$hESA^+$ $mCD45^-$ $mH\text{-}2Kd^-$)並在限制稀釋分析(LDA)中將其再植入未經處理之動物中。在移植後監測所得腫瘤發病率達至多40週。基於在hu24-vc0101暴露後腫瘤開始消退時選擇腫瘤收穫之天(第10天)及連續移植之天。將腫瘤解離並用抗人類ESA、抗小鼠CD45及抗小鼠H-2Kd抗體染色。彙集三個腫瘤/治療組，且藉由流式細胞術分選活的人類腫瘤細胞。向10只小鼠之組注射293、73、37或15個自對照IgG ADC處理之腫瘤分選之腫瘤細胞；159、90、40或10個自hu24-vc0101處理之腫瘤分選之腫瘤細胞；或257、33或15個

自多西他賽處理之腫瘤分選之腫瘤細胞。每週量測接受者小鼠中之腫瘤且將接受者小鼠中超過200 mm^3之腫瘤分選為陽性。使用葡瓦松分佈統計經由L-Calc軟體(Stemcell Technologies, Vancouver, BC)，使用直至移植後40週具有及無腫瘤之接受者之注射細胞劑量以計算每一處理後之TIC之頻率，

hu24-vc0101處理之腫瘤中之TIC頻率係對照IgG ADC處理之腫瘤中之1/5.5 (p = 0.0013；表38)。多西他賽處理之腫瘤中之TIC頻率係對照IgG ADC處理之腫瘤中之1/2.1 (p = 0.09；表38)。概言之，注射hu24-vc0101處理之腫瘤細胞之小鼠較注射類似數目之對照IgG ADC處理之腫瘤細胞之小鼠始終產生較少腫瘤，此指示hu24-vc0101處理尤其降低TIC。

表38. BR13腫瘤模型中之腫瘤起始細胞(TIC)頻率.

預處理	組	植入細胞數目/動物	具有腫瘤之動物數目	組中之動物數目	TIC頻率	相對於ADC之p值
對照ADC (4 mpk)	A1	293	9	9	1/71	不適用
	A2	73	6	8		
	A3	37	3	8		
	A4	15	0	8		
hu24-vc0101 (4 mpk)	B1	159	3	7	1/393	0.0013
	B2	90	2	8		
	B3	40	0	10		
	B4	10	0	8		
多西他賽 (20 mpk)	C1	257	8	9	1/149	0.09
	C2	33	1	8		
	C3	15	0	6		

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商輝瑞大藥廠
馬克　達美林

<120> 抗-PTK7 抗體-藥物結合物

<130> PC72045

<160> 87

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 1

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 2
cagatcacct tgaaggagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60

acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt 120

cagccccag gaaaggccct ggagtggctt gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180

tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctccaa aaaccaggtg 240

gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgttcgaagt 300

aactatggtt acgcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca 360

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 3

Thr Ser Asn Met Gly Val Gly
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Asn Met
1 5

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 5
actagtaaca tgggtgtggg c 21

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 6
gggttctcac tcagcactag taacatg 27

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 7

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 8

Trp Trp Asp Asp Asp
1 5

<210> 9
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 9
cacatttggt gggatgatga taagtactac agcccatctc tgaagagc 48

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 10
tggtgggatg atgat 15

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

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 11

Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 12
agtaactatg gttacgcctg gtttgcttac 30

<210> 13
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 13

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Arg Ser Asn Tyr Gly Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

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

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

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

Gly

<210> 14
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 14
cagatcacct tgaaggagtc tggtcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60

acctgcacct tctctgggtt ctcactcagc actagtaaca tgggtgtggg ctggatccgt 120

cagccccag gaaaggccct ggagtggctt gcacacattt ggtgggatga tgataagtac 180

tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctccaa aaaccaggtg 240

gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgttcgaagt 300

aactatggtt acgcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctcttca 360

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cgagcaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 16
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtca ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120

gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggaacagat tttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240

gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 17

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Pro Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 18
aaggcgagtc aggacattta tccctattta aac 33

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 19

Arg Thr Asn Arg Leu Leu Asp
1 5

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸序列

<400> 20
cgtacaaata gattgctaga t 21

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 21

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 22
ctacagtatg atgagtttcc gctcacg 27

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 23

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 24
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga tagagtcact 60

atcacttgca aggcgagtca ggacatttat ccctatttaa actggttcca acaaaaacca 120

gggaaagctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgctagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggaacagat tttactttca ccatcagcag cctgcaacct 240

gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgatgagt ttccgctcac gttcggtgct 300

gggaccaagc tggaaatcaa acggactgtg gctgcaccaa gtgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 25

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

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

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

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 26
caggtccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120

cccggaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180

aaccaggact tcaagggcag agtcaccatg accagggaca catccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagactgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggtaac 300

tcctacttct atgctttgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 357

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 27

Asp Tyr Ala Val His
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

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

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 29
gactatgctg tgcat 15

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 30
ggatacacct tcactgacta t 21

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 31

Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 32

Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr

1 5

<210> 33
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 33
gtgatcagca cttacaatga ttacacatac aataaccagg acttcaaggg c 51

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 34
agcacttaca atgattac 18

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 35

Gly Asn Ser Tyr Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 36
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 36
ggtaactcct acttctatgc tttggactac 30

<210> 37
<211> 448

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 37

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

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

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

Gly Val Ile Ser Thr Tyr Asn Asp Tyr Thr Tyr Asn Asn Gln Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Ser 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

<210> 38
<211> 1344
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 38
caggtccagc ttgtgcagtc tgggcctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact gactatgctg tgcattgggt gcgccaggcc 120

cccggaaaaa ggcttgagtg gattggagtg atcagcactt acaatgatta cacatacaat 180

aaccaggact tcaagggcag agtcaccatg accagggaca tccgcgagag cacagcctac 240

atggagctga gcagactgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagaggtaac 300

tcctacttct atgctttgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctcagcc 360

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcga gcaagagcac ctctgggggc 420

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg agccggtgac ggtgtcgtgg 480

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 540

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 660

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 720

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 780

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1020

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320

aagagcctct ccctgtctcc ggga 1344

<210> 39
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 39

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

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

Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 40
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成核苷酸序列

<400> 40
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtga gagtgttgac agctatggca aaagttttat gcactggtac 120

caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctata gggcatccaa cctggaatct 180

ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240

agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 41

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Lys Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 42
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 42
agggccagtg agagtgttga cagctatggc aaaagtttta tgcac 45

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 43

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 44
agggcatcca acctggaatc t 21

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 45

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 46
cagcagagta atgaggatcc gtggacg 27

<210> 47
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 47

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

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

Gly Lys Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly 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> 48
<211> 654
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 48
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtga gagtgttgac agctatggca aaagttttat gcactggtac 120

caacagaaac ctggccaggc tcccaggctc ctcatctata gggcatccaa cctggaatct 180

ggcatcccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcactct caccatcagc 240

agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc agagtaatga ggatccgtgg 300

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacggactg tggctgcacc aagtgtcttc 360

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 654

<210> 49
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 49

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 50
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg gatcggcgac ctaaacccag attcaagtgc gataaactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact 300

acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 51
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 51

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 52

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
1 5

<210> 53
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 53
agatattgga tgagc 15

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 54
ggattcgact ttagtagata t 21

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 55

Asp Leu Asn Pro Asp Ser Ser Ala Ile Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 56

Asn Pro Asp Ser Ser Ala
1 5

<210> 57
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 57
gacctaaacc cagattcaag tgcgataaac tatgtggact ctgtgaaggg c 51

<210> 58
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 58
aacccagatt caagtgcg 18

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 59

Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe
1 5 10

<210> 60
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 60
attactacgt tagtacccta tactatggac ttc 33

<210> 61
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Ile Thr Thr Leu Val Pro Tyr Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

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

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

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

Gly

<210> 62
<211> 1347
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 62
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cgactttagt agatattgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg gatcggcgac ctaaacccag attcaagtgc gataaactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac actcattact 300

acgttagtac cctatactat ggacttctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cgagcaagag cacctctggg 420

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgagccggt gacggtgtcg 480

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 600

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 660

aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 720

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 780

gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 840

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 900

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 960

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1020

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1080

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1140

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1200

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1260

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1320

cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 1347

<210> 63
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 63

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

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

Ser Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 64
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 64
gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60

atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120

ggagaagctg ctattctcct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtcctgg aatcccacct 180

cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240

gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgcctctcac gttcggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa a 321

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 65

Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
1 5 10

<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 66
ataaccaaca cagacattga tgatgatatg aac 33

<210> 67
<211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 67

Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro
1 5

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 68
gaaggtaatg gtctccgtcc t 21

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 69

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 70
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 70
ctacaaagtg ataacttgcc tctcacg 27

<210> 71
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 71

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Ile Thr Asn Thr Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

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

Ser Glu Gly Asn Gly Leu Arg Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 72
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 72

gaaacgacac tcacgcagtc tccagcattc atgtcagcga ctccaggaga caaagtcaac 60

atctcctgca taaccaacac agacattgat gatgatatga actggtacca acagaaacca 120

ggagaagctg ctattctcct tatttcagaa ggtaatggtc tccgtcctgg aatcccacct 180

cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat tttaccctca caattaataa catagaatct 240

gaggatgctg catattactt ctgtctacaa agtgataact tgcctctcac gttcggctcg 300

gggacaaagt tggaaataaa acggactgtg gctgcaccaa gtgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 73
<211> 1070
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Met Gly Ala Ala Arg Gly Ser Pro Ala Arg Pro Arg Arg Leu Pro Leu
1 5 10 15

Leu Ser Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Gly Gly Thr Gln Thr Ala Ile
20 25 30

Val Phe Ile Lys Gln Pro Ser Ser Gln Asp Ala Leu Gln Gly Arg Arg
35 40 45

Ala Leu Leu Arg Cys Glu Val Glu Ala Pro Gly Pro Val His Val Tyr
50 55 60

Trp Leu Leu Asp Gly Ala Pro Val Gln Asp Thr Glu Arg Arg Phe Ala
65 70 75 80

Gln Gly Ser Ser Leu Ser Phe Ala Ala Val Asp Arg Pro Gln Asp Ser
85 90 95

Gly Thr Phe Gln Cys Val Ala Arg Asp Asp Val Thr Gly Glu Glu Ala
100 105 110

Arg Ser Ala Asn Ala Ser Phe Asn Ile Lys Trp Ile Glu Ala Gly Pro
115 120 125

Val Val Leu Lys His Pro Ala Ser Glu Ala Glu Ile Gln Pro Gln Thr
130 135 140

Gln Val Thr Leu Arg Cys His Ile Asp Gly His Pro Arg Pro Thr Tyr
145 150 155 160

Gln Trp Phe Arg Asp Gly Thr Pro Leu Ser Asp Gly Gln Ser Asn His
165 170 175

Thr Val Ser Ser Lys Glu Arg Asn Leu Thr Leu Arg Pro Ala Gly Pro
180 185 190

Glu His Ser Gly Leu Tyr Ser Cys Cys Ala His Ser Ala Phe Gly Gln
195 200 205

Ala Cys Ser Ser Gln Asn Phe Thr Leu Ser Ile Ala Asp Glu Ser Phe
210 215 220

Ala Arg Val Val Leu Ala Pro Gln Asp Val Val Val Ala Arg Tyr Glu
225 230 235 240

Glu Ala Met Phe His Cys Gln Phe Ser Ala Gln Pro Pro Pro Ser Leu
245 250 255

Gln Trp Leu Phe Glu Asp Glu Thr Pro Ile Thr Asn Arg Ser Arg Pro

260 265 270

Pro His Leu Arg Arg Ala Thr Val Phe Ala Asn Gly Ser Leu Leu Leu
275 280 285

Thr Gln Val Arg Pro Arg Asn Ala Gly Ile Tyr Arg Cys Ile Gly Gln
290 295 300

Gly Gln Arg Gly Pro Pro Ile Ile Leu Glu Ala Thr Leu His Leu Ala
305 310 315 320

Glu Ile Glu Asp Met Pro Leu Phe Glu Pro Arg Val Phe Thr Ala Gly
325 330 335

Ser Glu Glu Arg Val Thr Cys Leu Pro Pro Lys Gly Leu Pro Glu Pro
340 345 350

Ser Val Trp Trp Glu His Ala Gly Val Arg Leu Pro Thr His Gly Arg
355 360 365

Val Tyr Gln Lys Gly His Glu Leu Val Leu Ala Asn Ile Ala Glu Ser
370 375 380

Asp Ala Gly Val Tyr Thr Cys His Ala Ala Asn Leu Ala Gly Gln Arg
385 390 395 400

Arg Gln Asp Val Asn Ile Thr Val Ala Thr Val Pro Ser Trp Leu Lys
405 410 415

Lys Pro Gln Asp Ser Gln Leu Glu Glu Gly Lys Pro Gly Tyr Leu Asp
420 425 430

Cys Leu Thr Gln Ala Thr Pro Lys Pro Thr Val Val Trp Tyr Arg Asn
435 440 445

Gln Met Leu Ile Ser Glu Asp Ser Arg Phe Glu Val Phe Lys Asn Gly
450 455 460

Thr Leu Arg Ile Asn Ser Val Glu Val Tyr Asp Gly Thr Trp Tyr Arg
465 470 475 480

Cys Met Ser Ser Thr Pro Ala Gly Ser Ile Glu Ala Gln Ala Arg Val
485 490 495

Gln Val Leu Glu Lys Leu Lys Phe Thr Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln
500 505 510

Cys Met Glu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Val Pro Cys Ser Ala Thr Gly
515 520 525

Arg Glu Lys Pro Thr Ile Lys Trp Glu Arg Ala Asp Gly Ser Ser Leu
530 535 540

Pro Glu Trp Val Thr Asp Asn Ala Gly Thr Leu His Phe Ala Arg Val
545 550 555 560

Thr Arg Asp Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Cys Ile Ala Ser Asn Gly Pro
565 570 575

Gln Gly Gln Ile Arg Ala His Val Gln Leu Thr Val Ala Val Phe Ile
580 585 590

Thr Phe Lys Val Glu Pro Glu Arg Thr Thr Val Tyr Gln Gly His Thr
595 600 605

Ala Leu Leu Gln Cys Glu Ala Gln Gly Asp Pro Lys Pro Leu Ile Gln
610 615 620

Trp Lys Gly Lys Asp Arg Ile Leu Asp Pro Thr Lys Leu Gly Pro Arg
625 630 635 640

Met His Ile Phe Gln Asn Gly Ser Leu Val Ile His Asp Val Ala Pro
645 650 655

Glu Asp Ser Gly Arg Tyr Thr Cys Ile Ala Gly Asn Ser Cys Asn Ile
660 665 670

Lys His Thr Glu Ala Pro Leu Tyr Val Val Asp Lys Pro Val Pro Glu
675 680 685

Glu Ser Glu Gly Pro Gly Ser Pro Pro Pro Tyr Lys Met Ile Gln Thr
690 695 700

Ile Gly Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Ala Tyr Ile Ile Ala Val Leu
705 710 715 720

Gly Leu Met Phe Tyr Cys Lys Lys Arg Cys Lys Ala Lys Arg Leu Gln
725 730 735

Lys Gln Pro Glu Gly Glu Glu Pro Glu Met Glu Cys Leu Asn Gly Gly
740 745 750

Pro Leu Gln Asn Gly Gln Pro Ser Ala Glu Ile Gln Glu Glu Val Ala
755 760 765

Leu Thr Ser Leu Gly Ser Gly Pro Ala Ala Thr Asn Lys Arg His Ser
770 775 780

Thr Ser Asp Lys Met His Phe Pro Arg Ser Ser Leu Gln Pro Ile Thr
785 790 795 800

Thr Leu Gly Lys Ser Glu Phe Gly Glu Val Phe Leu Ala Lys Ala Gln
805 810 815

Gly Leu Glu Glu Gly Val Ala Glu Thr Leu Val Leu Val Lys Ser Leu
820 825 830

Gln Ser Lys Asp Glu Gln Gln Gln Leu Asp Phe Arg Arg Glu Leu Glu
835 840 845

Met Phe Gly Lys Leu Asn His Ala Asn Val Val Arg Leu Leu Gly Leu
850 855 860

Cys Arg Glu Ala Glu Pro His Tyr Met Val Leu Glu Tyr Val Asp Leu
865 870 875 880

Gly Asp Leu Lys Gln Phe Leu Arg Ile Ser Lys Ser Lys Asp Glu Lys
885 890 895

Leu Lys Ser Gln Pro Leu Ser Thr Lys Gln Lys Val Ala Leu Cys Thr
900 905 910

Gln Val Ala Leu Gly Met Glu His Leu Ser Asn Asn Arg Phe Val His
915 920 925

Lys Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Ser Ala Gln Arg Gln Val
930 935 940

Lys Val Ser Ala Leu Gly Leu Ser Lys Asp Val Tyr Asn Ser Glu Tyr
945 950 955 960

Tyr His Phe Arg Gln Ala Trp Val Pro Leu Arg Trp Met Ser Pro Glu
965 970 975

Ala Ile Leu Glu Gly Asp Phe Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe
980 985 990

Gly Val Leu Met Trp Glu Val Phe Thr His Gly Glu Met Pro His Gly
995 1000 1005

Gly Gln Ala Asp Asp Glu Val Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Lys
1010 1015 1020

Ala Arg Leu Pro Gln Pro Glu Gly Cys Pro Ser Lys Leu Tyr Arg
1025 1030 1035

Leu Met Gln Arg Cys Trp Ala Leu Ser Pro Lys Asp Arg Pro Ser
1040 1045 1050

Phe Ser Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Asp Ser Thr Val Asp Ser
1055 1060 1065

Lys Pro
1070

<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 74

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly
1 5

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 75

Leu Leu Gln Gly Ala
1 5

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 76

Gly Gly Leu Leu Gln Gly Ala
1 5

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 77

Leu Leu Gln Gly Pro Gly Lys
1 5

<210> 78
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 78

Leu Leu Gln Gly Pro Gly
1 5

<210> 79
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 79

Leu Leu Gln Gly Pro Ala
1 5

<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 80

Leu Leu Gln Gly Pro
1 5

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 81

Leu Leu Gln Pro
1

<210> 82
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 82

Leu Leu Gln Pro Gly Lys

1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 83

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly Lys
1 5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 84

Leu Leu Gln Gly Ala Pro Gly
1 5

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 85

Leu Leu Gln Gly Ala Pro
1 5

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 可為 G 或 P

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可為 A、G、P 或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa 可為 A、G、K、P 或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可為 G、K 或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa 可為 K 或不存在

<400> 86

Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 可為任何天然胺基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 可為任何天然胺基酸或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa 可為任何天然胺基酸或不存在

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa 可為任何天然胺基酸或不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa 可為任何天然胺基酸或不存在

<400> 87

Leu Leu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

申請專利範圍

1. 一種下式之抗體-藥物結合物，

Ab-(L-D)，其中：

(a) Ab係抗體，其結合至蛋白質酪胺酸激酶7 (PTK7)，該抗體包含：

重鏈，其包含如SEQ ID NO: 37所示之胺基酸序列；及

輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 47所示之胺基酸序列；且

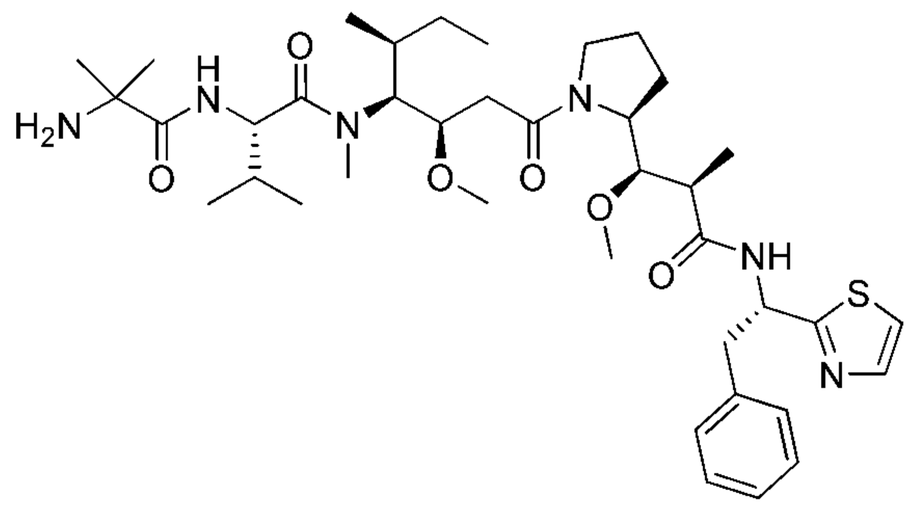
(b) L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係奧裡斯他汀(auristatin)。

2. 如請求項1之抗體-藥物結合物，其中該連接體係選自由馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)及馬來醯亞胺基己醯基(mc)組成之群。

3. 如請求項2之抗體-藥物結合物，其中該連接體係馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)。

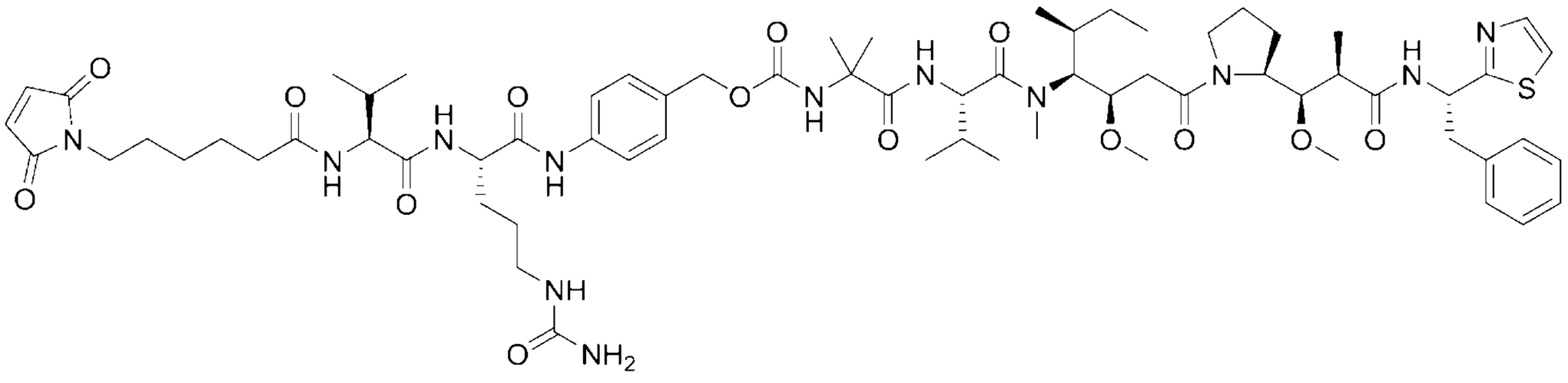
4. 如請求項2之抗體-藥物結合物，其中該連接體係馬來醯亞胺基己醯基(mc)。

5. 如請求項1之抗體-藥物結合物，其中該奧裡斯他汀係0101，其具有下式：



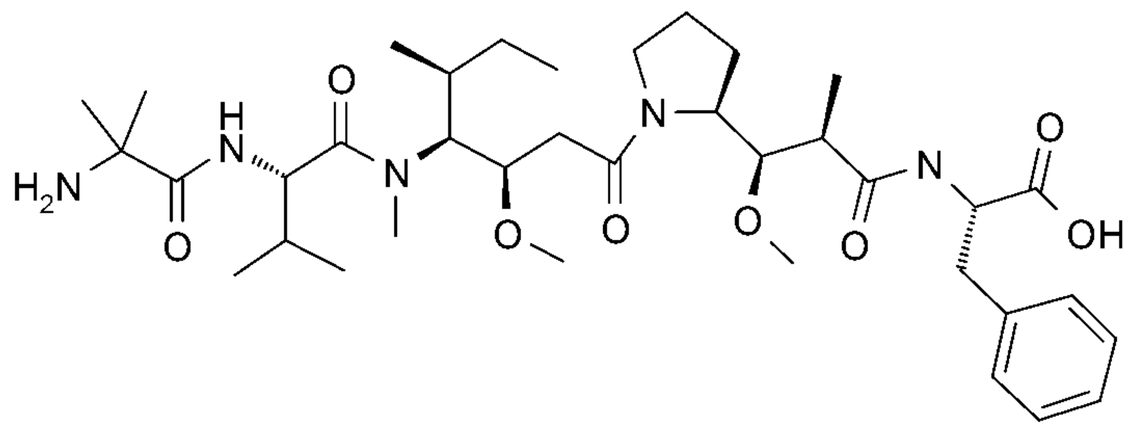
。

6. 如請求項5之抗體-藥物結合物，其中該連接體及奧裡斯他汀係vc0101，其具有下式：



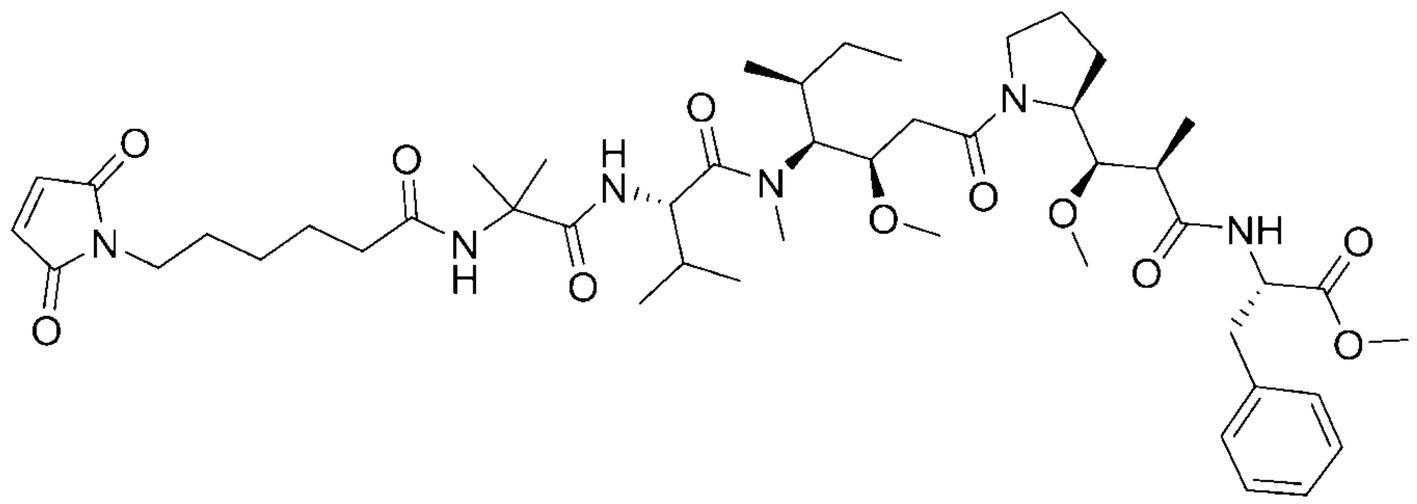
。

7. 如請求項1之抗體-藥物結合物，其中該奧裡斯他汀係8261，其具有下式：



。

8. 如請求項7之抗體-藥物結合物，其中該連接體及奧裡斯他汀係mc8261，其具有下式：



。

9. 如請求項1之抗體-藥物結合物，其中該抗體-藥物結合物具有1至8之藥物-對-抗體比率(DAR)。

10. 一種下式之抗體-藥物結合物，

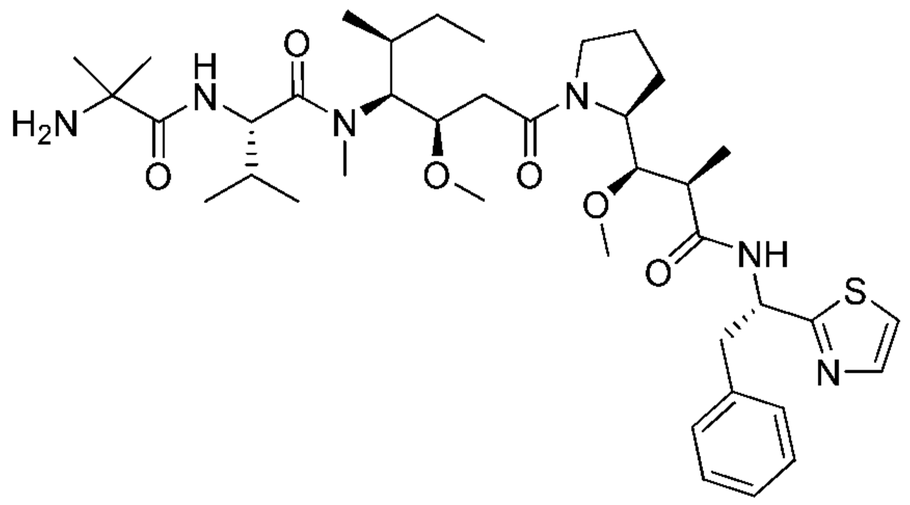
Ab-(L-D)，其中：

(a) Ab係抗體，其結合至人類蛋白質酪胺酸激酶7 (PTK7)，該抗體包含：

重鏈，其包含如SEQ ID NO: 37所示之胺基酸序列，及

輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 47所示之胺基酸序列；且

(b) L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係奧裡斯他汀，其中該連接體係馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且該奧裡斯他汀係0101，其具有下式：



；

其中該抗體-藥物結合物具有1至8之DAR。

11. 一種下式之抗體-藥物結合物，

Ab-(L-D)，其中：

(a) Ab係抗體或其抗原結合片段，其結合至蛋白質酪胺酸激酶7 (PTK7)，該抗體或其抗原結合片段包含：

重鏈，其包含如SEQ ID NO: 13所示之胺基酸序列；及

輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 23所示之胺基酸序列；且

(b) L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係奧裡斯他汀。

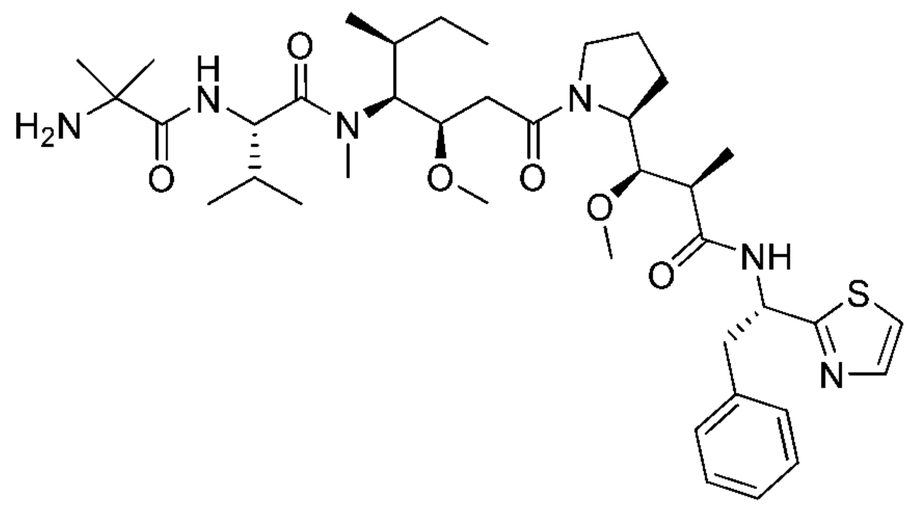
12. 如請求項11之抗體-藥物結合物，其中該連接體係選自由馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)及馬來醯亞胺基己醯基(mc)組成之群。

13. 如請求項12之抗體-藥物結合物，其中該連接體係馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)。

14. 如請求項12之抗體-藥物結合物，其中該連接體係馬來醯亞胺基己醯基(mc)。

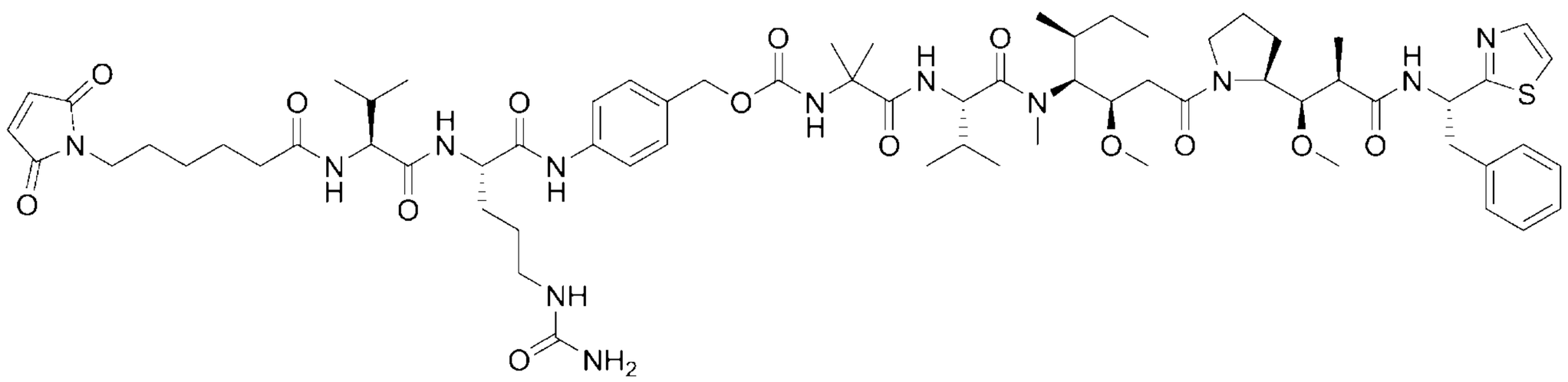
15. 如請求項11之抗體-藥物結合物，其中該奧裡斯他汀係0101，其

具有下式：



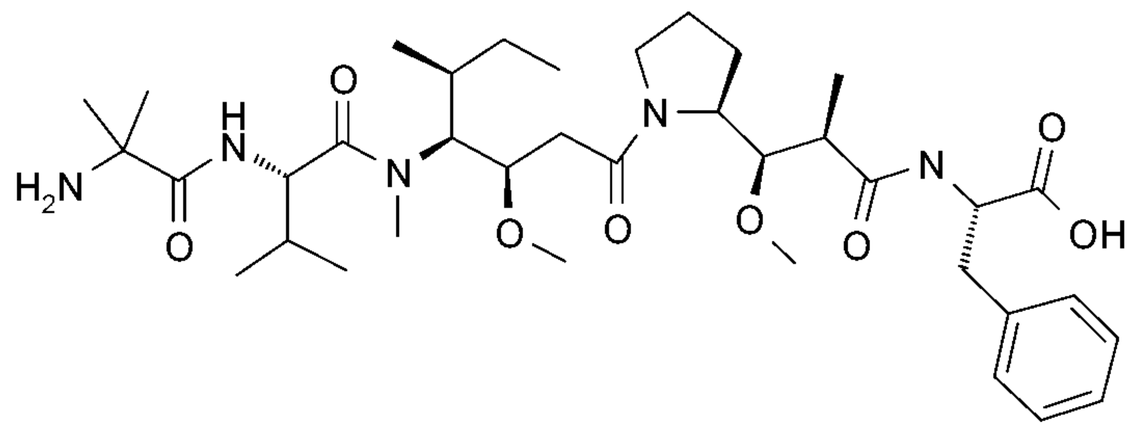
。

16. 如請求項15之抗體-藥物結合物，其中該連接體及奧裡斯他汀係vc0101，其具有下式：



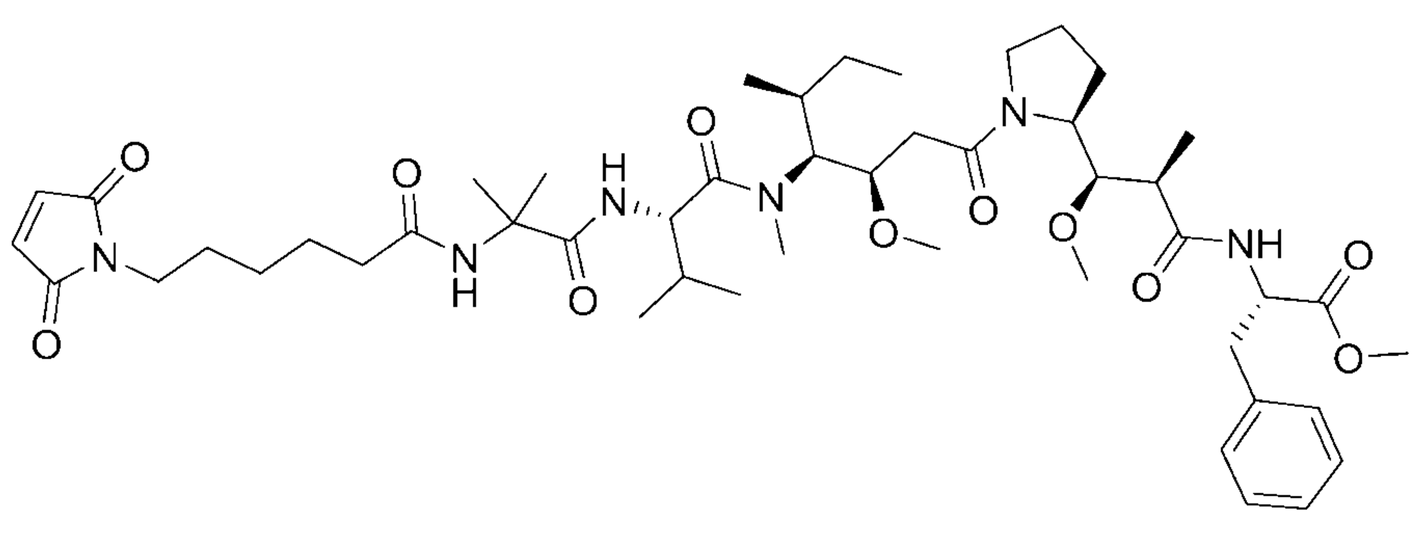
。

17. 如請求項11之抗體-藥物結合物，其中該奧裡斯他汀係8261，其具有下式：



。

18. 如請求項17之抗體-藥物結合物，其中該連接體及奧裡斯他汀係mc8261，其具有下式：



。

19. 如請求項11之抗體-藥物結合物，其中該抗體-藥物結合物具有1至8之DAR。

20. 一種下式之抗體-藥物結合物，

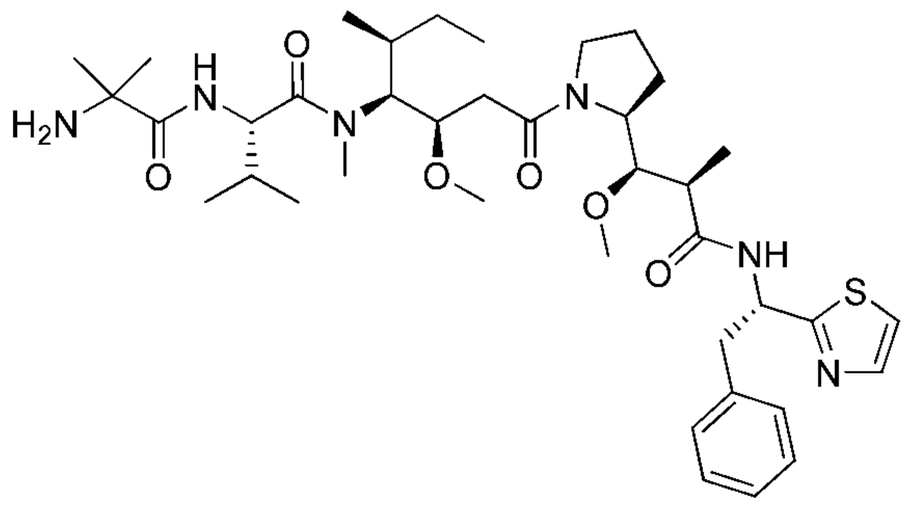
Ab-(L-D)，其中：

(a) Ab係抗體，其結合至人類蛋白質酪胺酸激酶7 (PTK7)，該抗體包含：

重鏈，其包含如SEQ ID NO: 13所示之胺基酸序列，及

輕鏈，其包含如SEQ ID NO: 23所示之胺基酸序列；且

(b) L-D係連接體-藥物部分，其中L係連接體，且D係奧裡斯他汀，其中該連接體係馬來醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對-胺基苄基氧基羰基(vc)，且該奧裡斯他汀係0101，其具有下式：



；

其中該抗體-藥物結合物具有1至8之DAR。

21. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至20中任一項之抗體-藥物結合物及醫藥上可接受之載劑。

22. 一種組合物，其包含複數種如請求項1至20中任一項之抗體-藥物結合物及視情況選用之醫藥載劑，其中該組合物之平均DAR介於1至8範圍內。

23. 一種產生如請求項1至20中任一項之抗體-藥物結合物之方法，其包含：

(a) 將連接體連接至藥物；

(b)使該連接體-藥物部分結合至抗體；及

(c)純化該抗體-藥物結合物。

24. 一種如請求項1至20中任一項之抗體-藥物結合物之用途，其用於製造治療患有PTK7相關病症之個體之藥劑。

25. 如請求項24之用途，其中該PTK7相關病症係過度增殖病症。

26. 如請求項25之用途，其中該過度增殖病症係贅瘤性病症。

27. 如請求項26之用途，其中該贅瘤性病症包含實體腫瘤。

28. 如請求項27之用途，其中該贅瘤性病症係乳癌，例如三陰性乳癌(TNBC)及助孕酮-受體陽性乳癌(PR+)；卵巢癌；結腸直腸癌；食道癌；胃癌；黑色素瘤；肉瘤；腎癌；胰臟癌；前列腺癌；肝癌，例如肝細胞癌(HCC)；及肺癌，例如非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌(SCLC)。

29. 如請求項26之用途，其中該贅瘤性病症包含血液惡性病。

30. 如請求項29之用途，其中該血液惡性病係白血病。

31. 如請求項30之用途，其中該血液惡性病係成人骨髓性白血病(AML)或急性淋巴母細胞性白血病(ALL)。

32. 一種如請求項1-20中任一項之抗體-藥物結合物之用途，其用於製造減少患有PTK7相關病症之個體中之腫瘤起始細胞之出現頻率之藥劑。

圖式

>gi|47938093|gb|AAH71557.1|PTK7 蛋白質酪胺酸激酶 7 [智人]

```
   1 MGAARGSPAR PRRLPLLSVL LLPLLGGTQT AIVFIKQPSS QDALQGRRAL LRCEVEAPGP
  61 VHVYWLLDGA PVQDTERRFA QGSSLSFAAV DRPQDSGTFQ CVARDDVTGE EARSANASFN
 121 IKWIEAGPVV LKHPASEAEI QPQTQVTLRC HIDGHPRPTY QWFRDGTPLS DGQSNHTVSS
 181 KERNLTLRPA GPEHSGLYSC CAHSAFGQAC SSQNFTLSIA DESFARVVLA PQDVVVAREE
 241 EAMFHCQFSA QPPPSLQWLF EDETPITNRS RPPHLRRATV FANGSLLLTQ VRPRNAGIYR
 301 CIGQGQRGPP IILEATLHLA EIEDMPLFEP RVFTAGSEER VTCLPPKGLP EPSVWWEHAG
 361 VRLPTHGRVY QKGHELVLAN IAESDAGVYT CHAANLAGQR RQDVNITVAT VPSWLKKPQD
 421 SQLEEGKPGY LDCLTQATPK PTVVWYRNQM LISEDSRFEV FKNGTLRINS VEVYDGTWYR
 481 CMSSTPAGSI EAQARVQVLE KLKFTPPPQP QQCMEFDKEA TVPCSATGRE KPTIKWERAD
 541 GSSLPEWVTD NAGTLHFARV TRDDAGNYTC IASNGPQGQI RAHVQLTVAV FITFKVEPER
 601 TTVYQGHTAL LQCEAQGDPK PLIQWKGKDR ILDPTKLGPR MHIFQNGSLV IHDVAPEDSG
 661 RYTCIAGNSC NIKHTEAPLY VVDKPVPEES EGPGSPPPYK MIQTIGLSVG AAVAYIIAVL
 721 GLMFYCKKRC KAKRLQKQPE GEEPEMECLN GGPLQNGQPS AEIQEEVALT SLGSGPAATN
 781 KRHSTSDKMH FPRSSLQPIT TLGKSEFGEV FLAKAQGLEE GVAETLVLVK SLQSKDEQQQ
 841 LDFRRELEMF GKLNHANVVR LLGLCREAEP HYMVLEYVDL GDLKQFLRIS KSKDEKLKSQ
 901 PLSTKQKVAL CTQVALGMEH LSNNRFVHKD LAARNCLVSA QRQVKVSALG LSKDVYNSEY
 961 YHFRQAWVPL RWMSPEAILE GDFSTKSDVW AFGVLMWEVF THGEMPHGGQ ADDEVLADLQ
1021 AGKARLPQPE GCPSKLYRLM QRCWALSPKD RPSFSEIASA LGDSTVDSKP
```

(SEQ ID NO 73)

圖 1

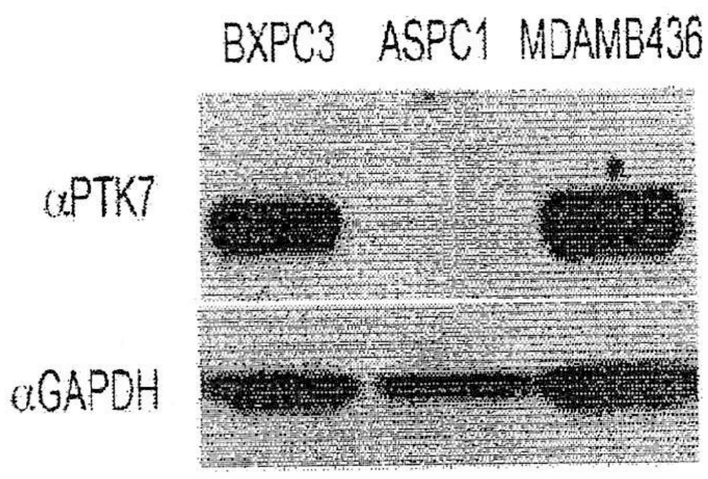

BXPC3 ASPC1 MDAMB436
αPTK7
αGAPDH

圖 2A

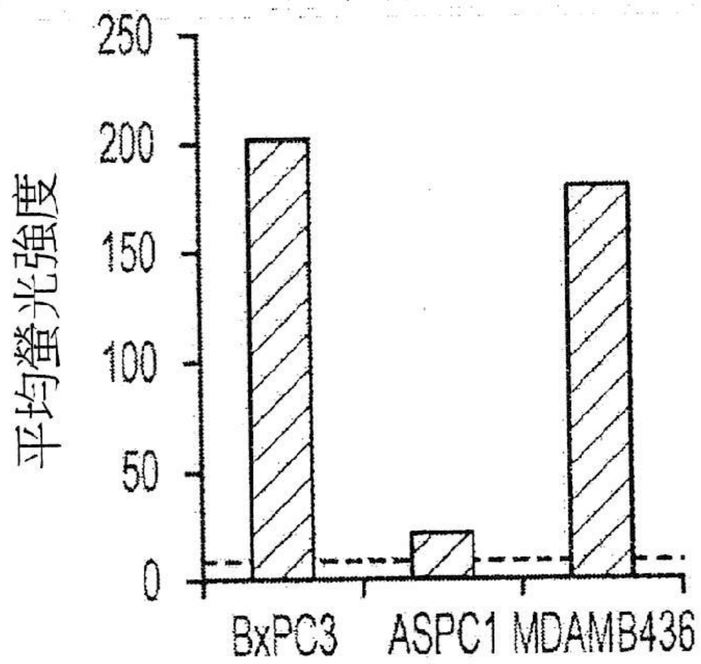

250
200
150
100
50
0
平均螢光強度
BxPC3 ASPC1 MDAMB436

圖 2B

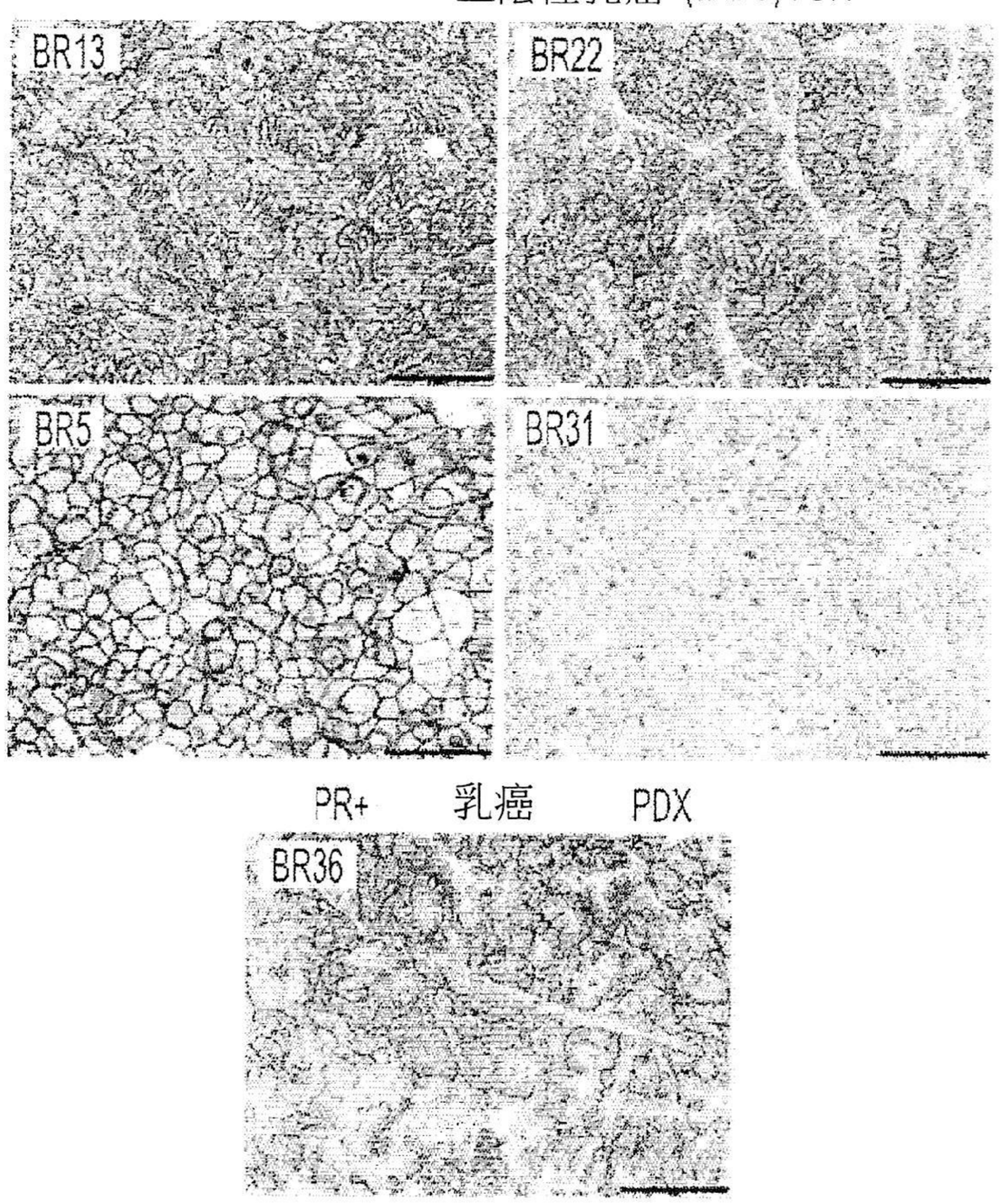

三陰性乳癌 (TNBC) PDX
BR13
BR22
BR5
BR31
PR+ 乳癌 PDX
BR36
非小細胞肺癌 (NSCLC) PDX
NSCLC135
NSCLC176

圖 3

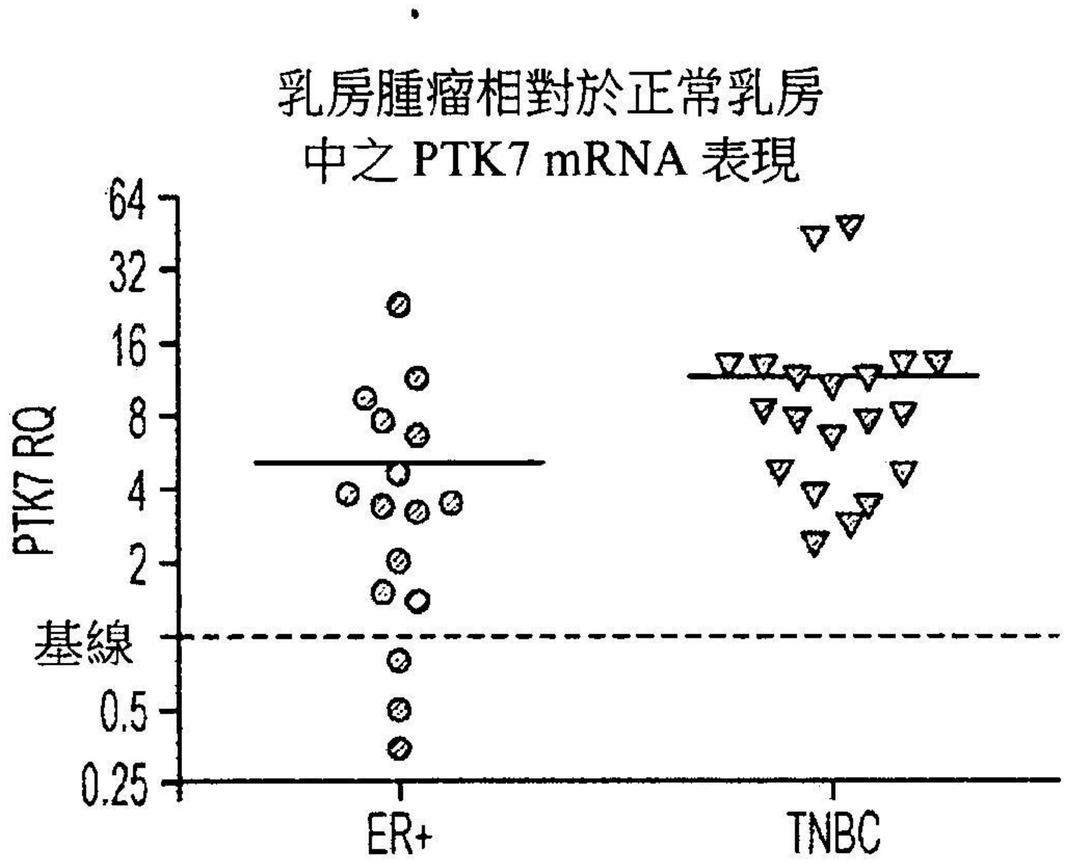

乳房腫瘤相對於正常乳房
中之 PTK7 mRNA 表現
PTK7 RQ
64
32
16
8
4
2
基線
0.5
0.25
ER+
TNBC

圖 4A

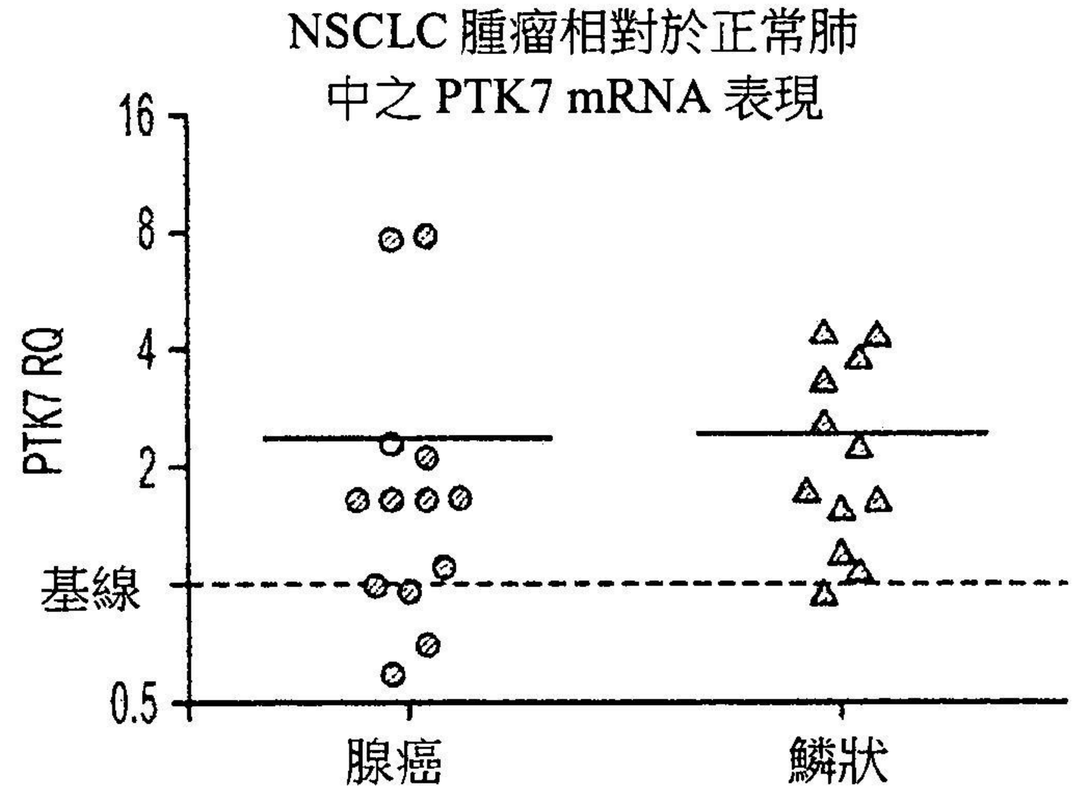

NSCLC 腫瘤相對於正常肺
中之 PTK7 mRNA 表現
PTK7 RQ
16
8
4
2
基線
0.5
腺癌
鱗狀

圖 4B

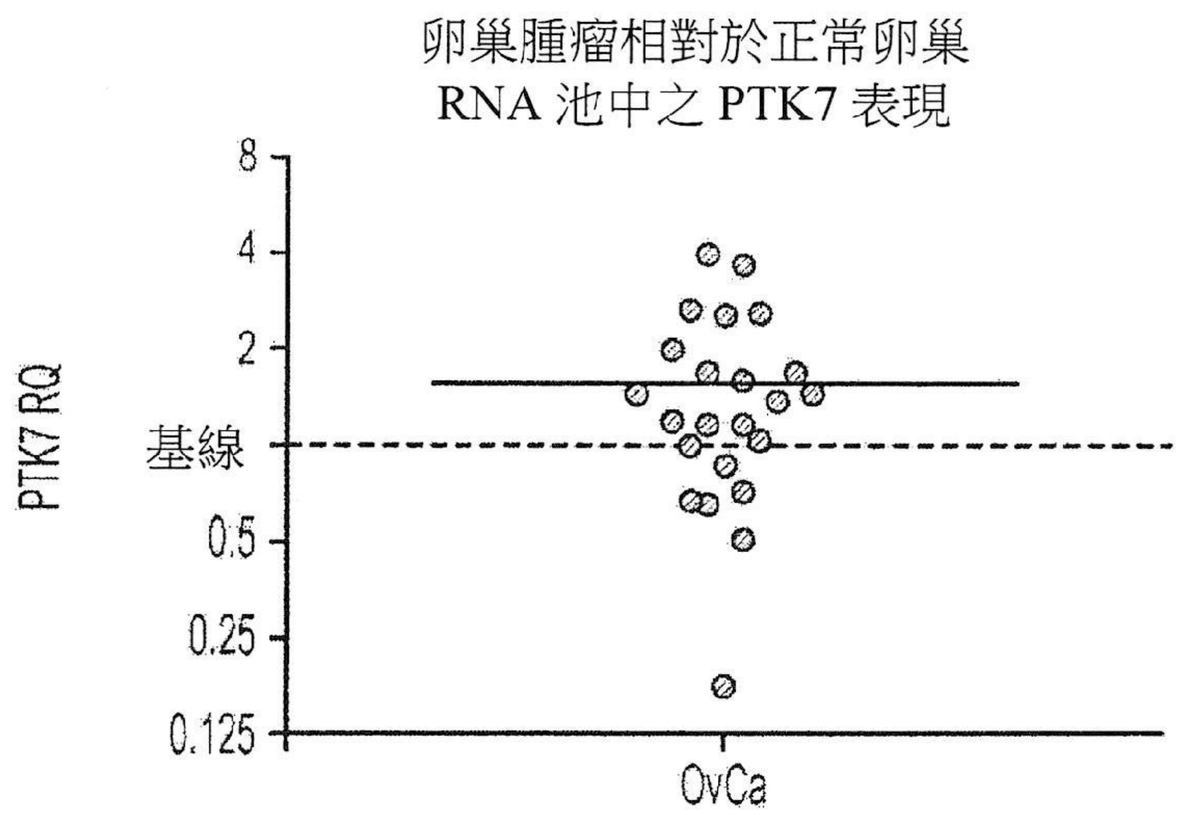


圖 4C

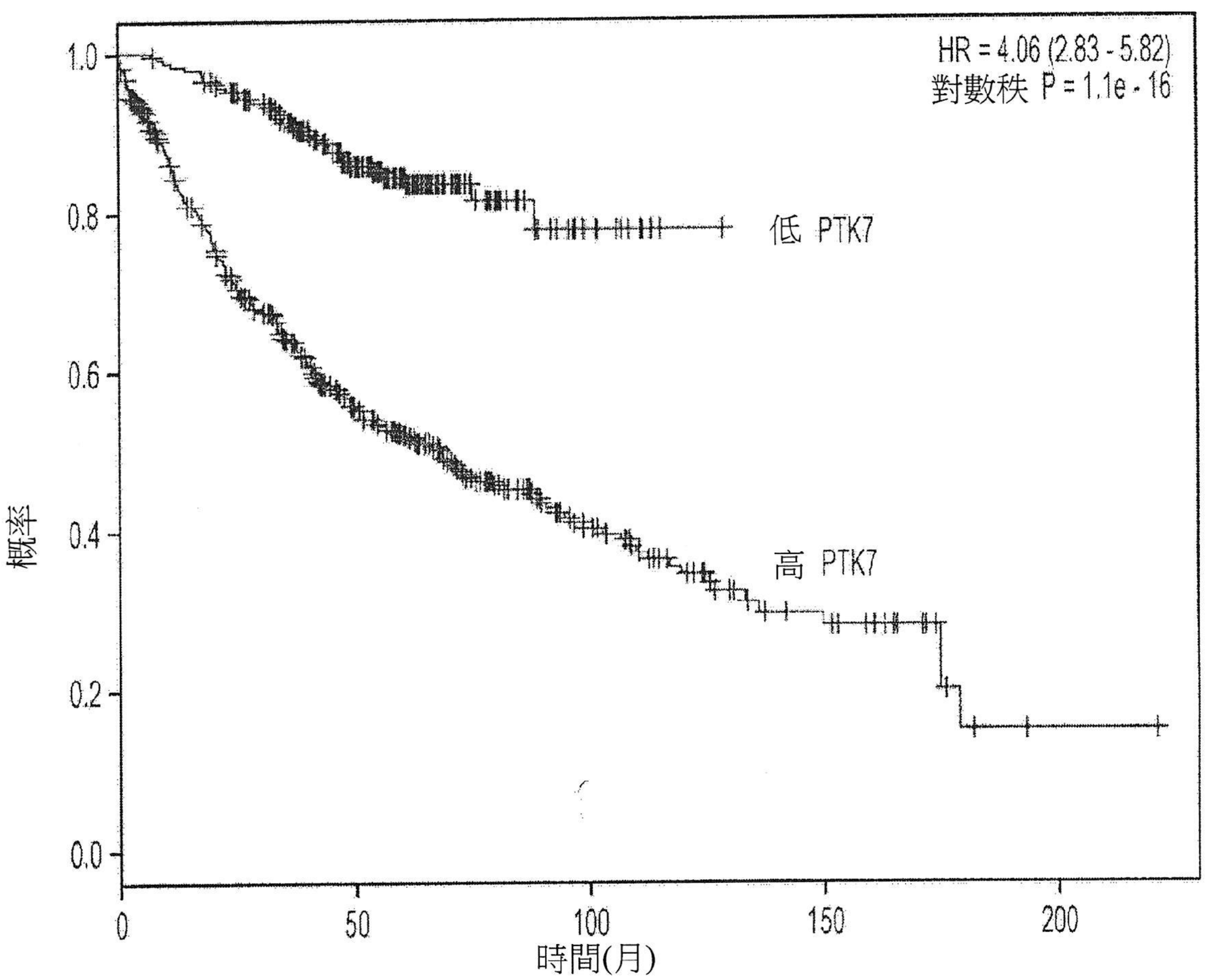

HR = 4.06 (2.83 - 5.82)
對數秩 P = 1.1e - 16
低 PTK7
高 PTK7
概率
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
200
時間(月)
具有風險之數目
低 226 141 11 0 0
高 493 206 58 19 1

圖 5

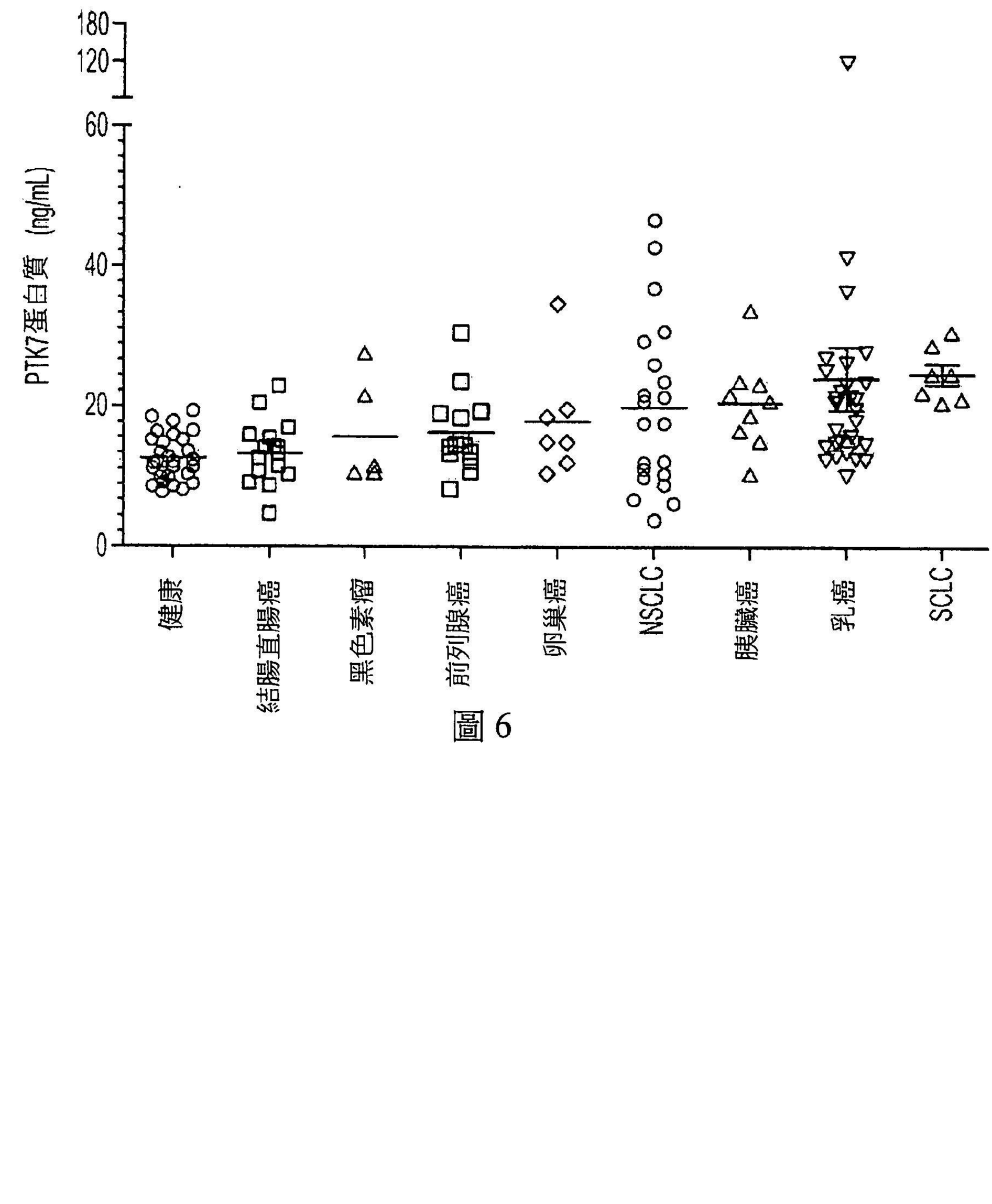

180
120
60
40
20
0
PTK7蛋白質 (ng/mL)
健康
結腸直腸癌
黑色素瘤
前列腺癌
卵巢癌
NSCLC
胰臟癌
乳癌
SCLC

圖 6

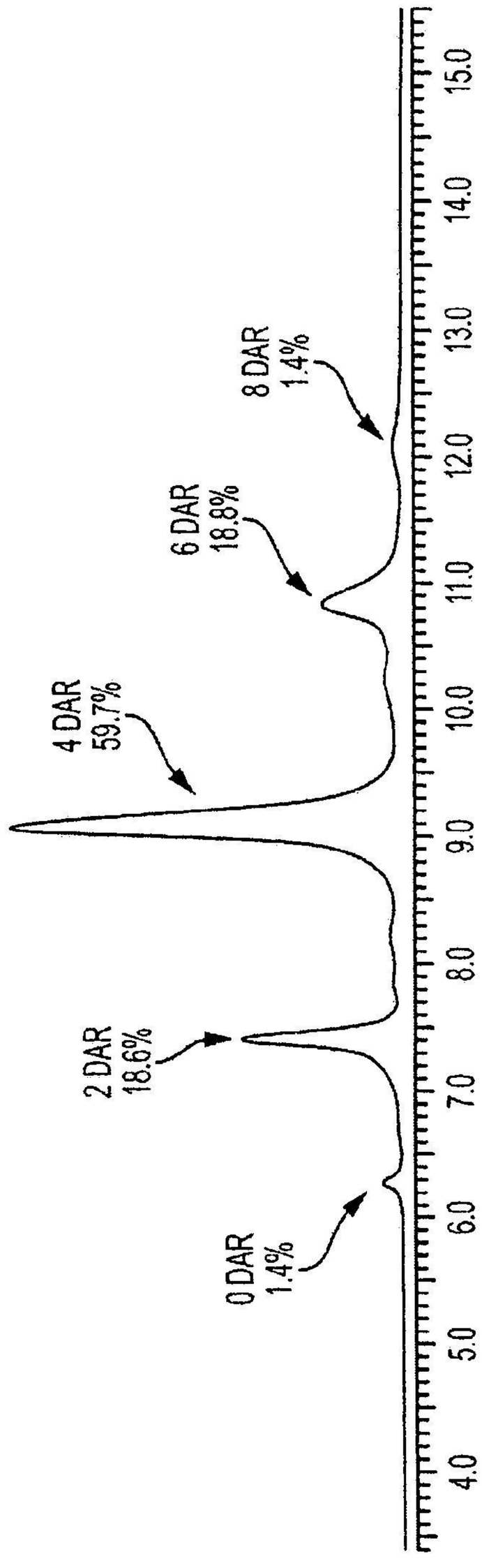

4 DAR
59.7%
6 DAR
18.8%
8 DAR
1.4%
2 DAR
18.6%
0 DAR
1.4%
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
15.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
分鐘

圖 7

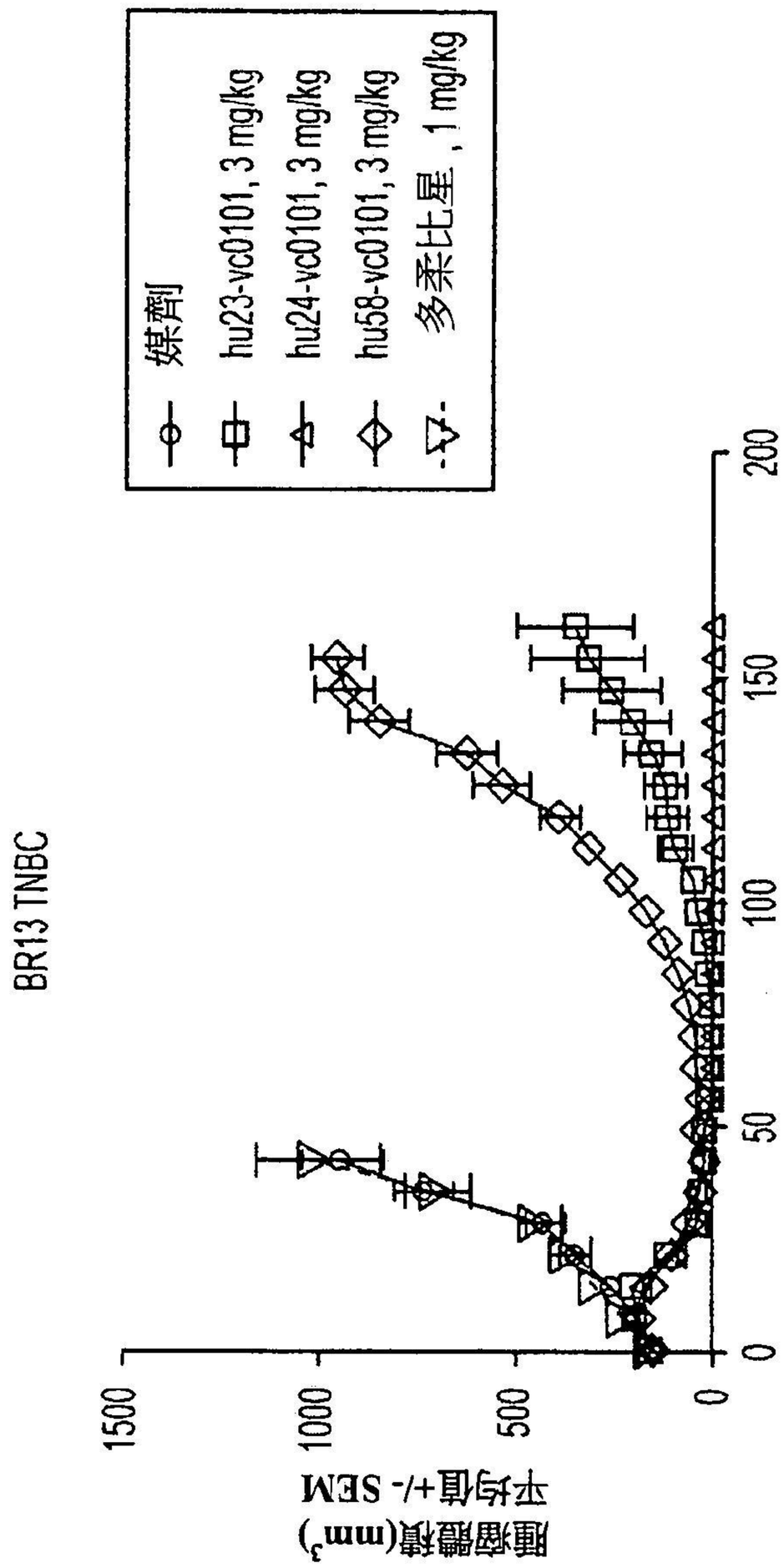

媒劑
hu23-vc0101, 3 mg/kg
hu24-vc0101, 3 mg/kg
hu58-vc0101, 3 mg/kg
多柔比星, 1 mg/kg
BR13 TNBC
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
研究天數
0
50
100
150
200
0
500
1000
1500

圖 8

BR13 TNBC PDX 中抗-PTK7 ADC 之效能

天	媒劑	10mg/kg hu24-vc0101	10mg/kg hu23-mc8261	3mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	3mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261	3mg/kg hu58-mc8261
0	144 ± 13	192 ± 23	157 ± 11	162 ± 8	196 ± 26	160 ± 12	163 ± 14	153 ± 8
7	255 ± 22	203 ± 30	205 ± 12	188 ± 11	248 ± 23	196 ± 21	233 ± 15	230 ± 20
14	349 ± 40	136 ± 14	142 ± 12	203 ± 13	243 ± 30	188 ± 23	249 ± 20	277 ± 29
21	428 ± 48	36 ± 6	148 ± 21	125 ± 12	166 ± 19	150 ± 15	301 ± 24	366 ± 26
28	650 ± 62	20 ± 5	169 ± 19	159 ± 15	158 ± 23	187 ± 25	525 ± 77	463 ± 51
35	734 ± 74	4 ± 2	286 ± 41	207 ± 26	216 ± 41	237 ± 37	717 ± 78	599 ± 55
42	940 ± 105	6 ± 3	404 ± 53	286 ± 40	276 ± 53	310 ± 46	GT	688 ± 64
49	GT	5 ± 2	629 ± 83	394 ± 54	419 ± 97	435 ± 76	GT	GT
56	GT	3 ± 3	776 ± 54	611 ± 63	582 ± 130	587 ± 95	GT	GT
63	GT	3 ± 2	935 ± 115	700 ± 76	798 ± 53	650 ± 102	GT	GT
70	GT	0 ± 0	1166 ± 81	1024 ±100	1107 ± 240	924 ± 117	GT	GT
77	GT	4 ± 2	GT	GT	1215 ± 207	GT	GT	GT
84	GT	3 ± 2	GT	GT	GT	GT	GT	GT
91	GT	3 ± 3	GT	GT	GT	GT	GT	GT
98	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
105	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
112	GT	9 ± 9	GT	GT	GT	GT	GT	GT
119	GT	10 ± 10	GT	GT	GT	GT	GT	GT
126	GT	11 ± 11	GT	GT	GT	GT	GT	GT
133	GT	1 ± 1	GT	GT	GT	GT	GT	GT
140	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
147	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
154	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
161	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT
168	GT	5 ± 5	GT	GT	GT	GT	GT	GT
175	GT	9 ± 9	GT	GT	GT	GT	GT	GT
182	GT	10 ± 10	GT	GT	GT	GT	GT	GT
189	GT	15 ± 15	GT	GT	GT	GT	GT	GT
196	GT	19 ± 19	GT	GT	GT	GT	GT	GT
203	GT	28 ± 28	GT	GT	GT	GT	GT	GT
210	GT	30 ± 30	GT	GT	GT	GT	GT	GT
217	GT	34 ± 34	GT	GT	GT	GT	GT	GT
224	GT	65 ± 65	GT	GT	GT	GT	GT	GT
231	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT

圖 9

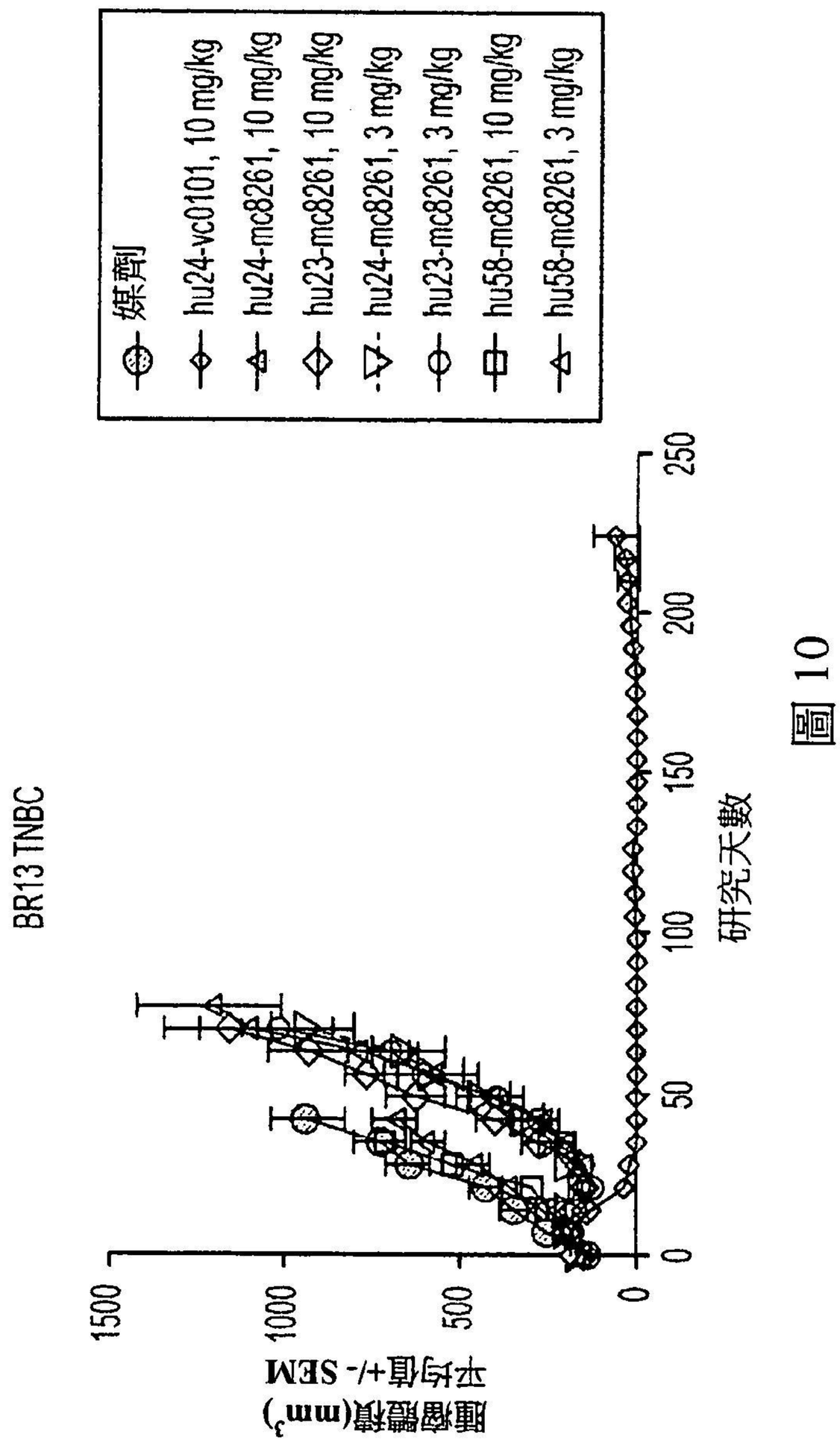

媒劑
hu24-vc0101, 10 mg/kg
hu24-mc8261, 10 mg/kg
hu23-mc8261, 10 mg/kg
hu24-mc8261, 3 mg/kg
hu23-mc8261, 3 mg/kg
hu58-mc8261, 10 mg/kg
hu58-mc8261, 3 mg/kg
BR13 TNBC
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
研究天數

圖 10

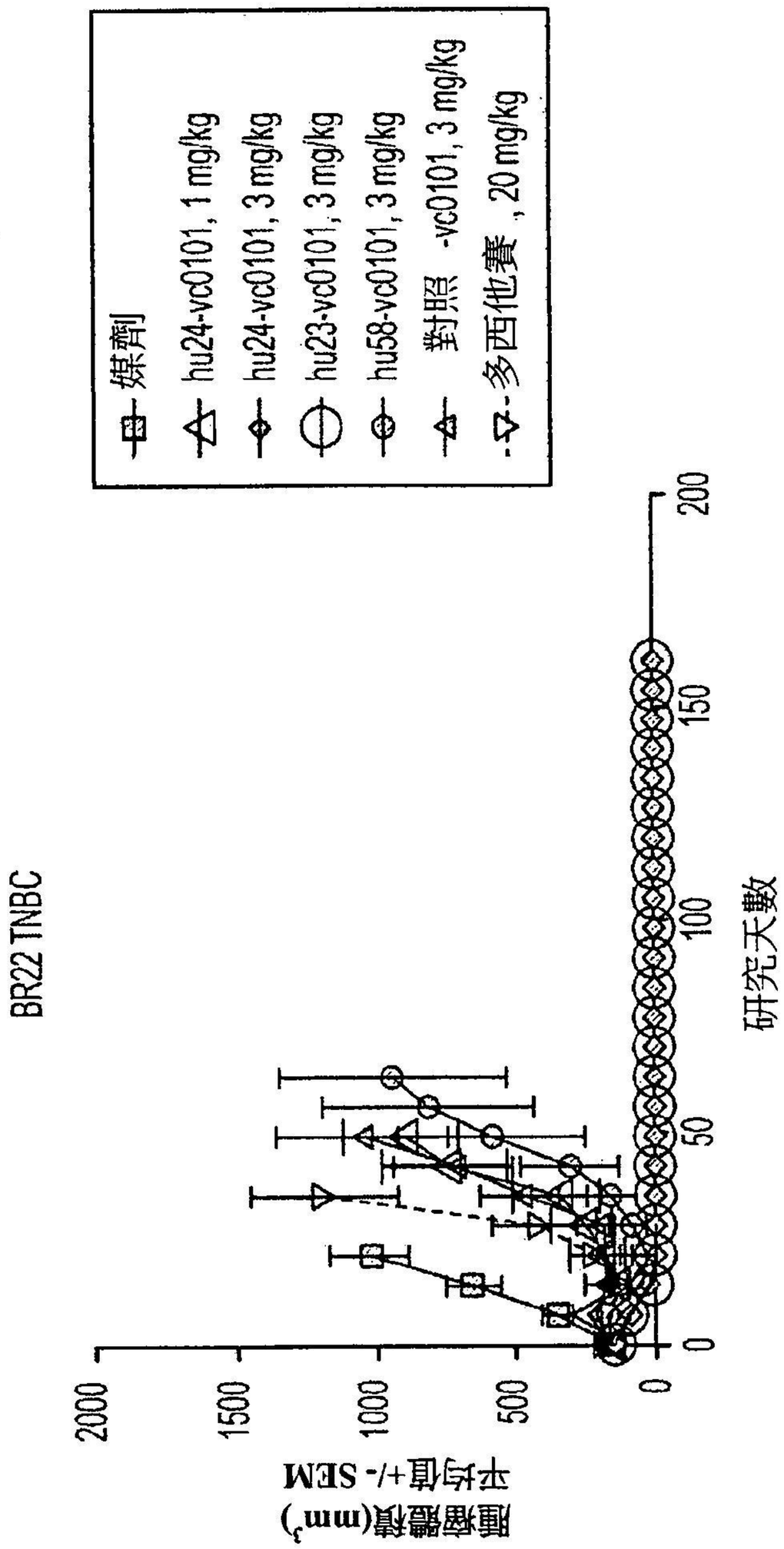

媒劑
hu24-vc0101, 1 mg/kg
hu24-vc0101, 3 mg/kg
hu23-vc0101, 3 mg/kg
hu58-vc0101, 3 mg/kg
對照 -vc0101, 3 mg/kg
多西他賽 , 20 mg/kg
BR22 TNBC
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
研究天數
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200

圖 11

BR22 TNBC PDX 中抗-PTK7 ADC 之效能

天	媒劑	10mg/kg hu23-vc0101	10mg/kg hu23-mc8261	3mg/kg hu23-mc8261	10mg/kg hu24-mc8261	3mg/kg hu24-mc8261	1mg/kg hu24-mc8261	10mg/kg hu58-mc8261	3mg/kg hu58-mc8261
0	195 ± 17	166 ± 24	164 ± 19	156 ± 12	188 ± 13	185 ± 10	184 ± 13	164 ± 17	149 ± 12
7	376 ± 43	69 ± 14	258 ± 50	335 ± 41	359 ± 24	315 ± 17	413 ± 44	289 ± 35	370 ± 19
14	564 ± 54	12 ± 3	364 ± 40	360 ± 59	588 ± 42	633 ± 55	750 ± 69	563 ± 69	672 ± 39
21	819 ± 97	0 ± 0	701 ± 106	916 ± 93	878 ± 79	1265 ± 218	1134 ± 112	1133 ± 133	984 ± 65
28	GT	0 ± 0	1189 ± 176	1534 ± 112	GT	GT	GT	GT	1555 ± 121
35	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
42	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
49	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
56	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
63	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
70	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
77	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
84	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
91	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
98	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
105	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
112	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
119	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
126	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
133	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
140	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
147	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
154	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
161	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
168	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
175	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
182	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
189	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
196	GT	0 ± 0	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT

圖 12

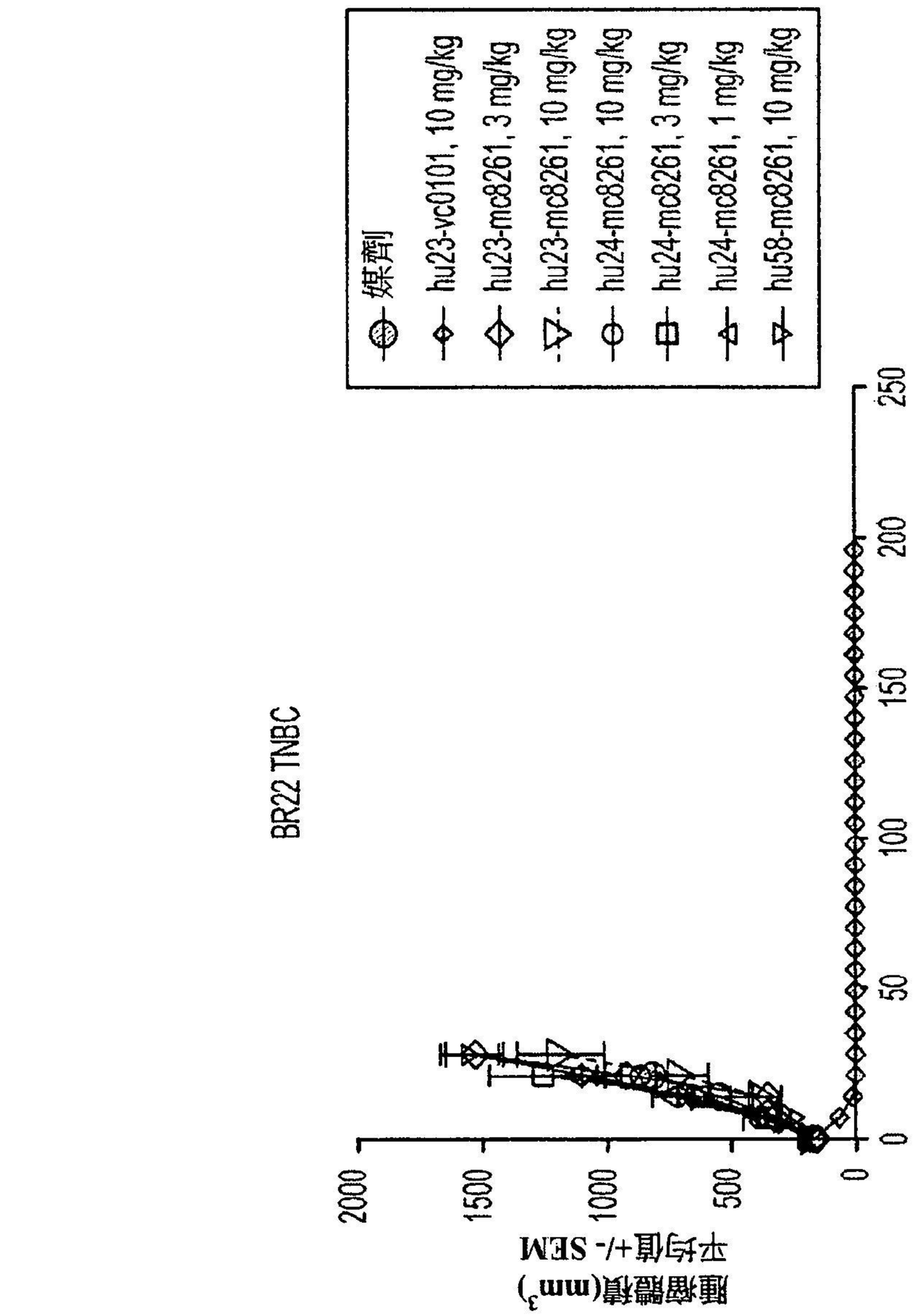

BR22 TNBC
媒劑
hu23-vc0101, 10 mg/kg
hu23-mc8261, 3 mg/kg
hu23-mc8261, 10 mg/kg
hu24-mc8261, 10 mg/kg
hu24-mc8261, 3 mg/kg
hu24-mc8261, 1 mg/kg
hu58-mc8261, 10 mg/kg
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
研究天數

圖 13

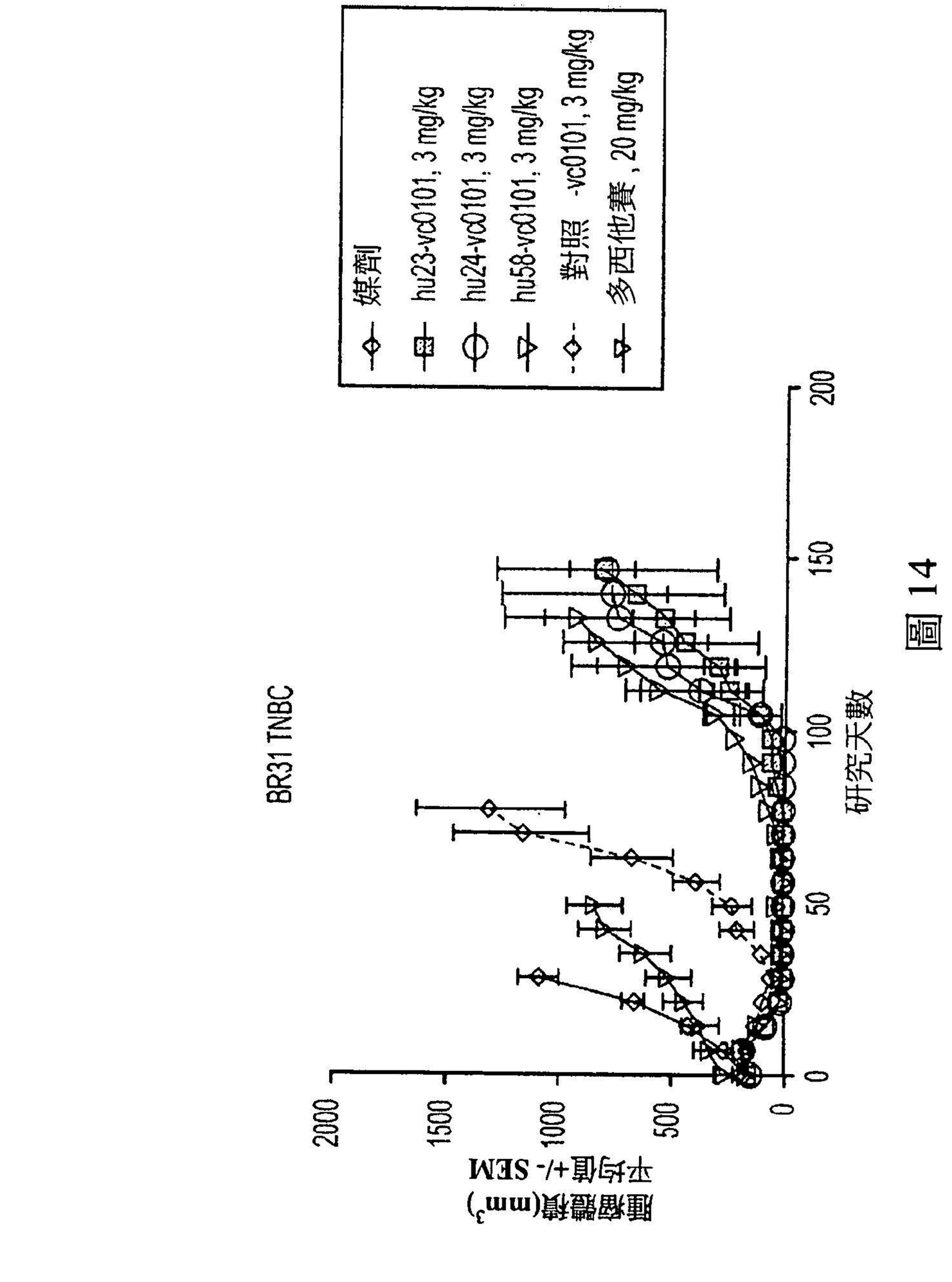

媒劑
hu23-vc0101, 3 mg/kg
hu24-vc0101, 3 mg/kg
hu58-vc0101, 3 mg/kg
對照 -vc0101, 3 mg/kg
多西他賽, 20 mg/kg
BR31 TNBC
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
研究天數

圖 14

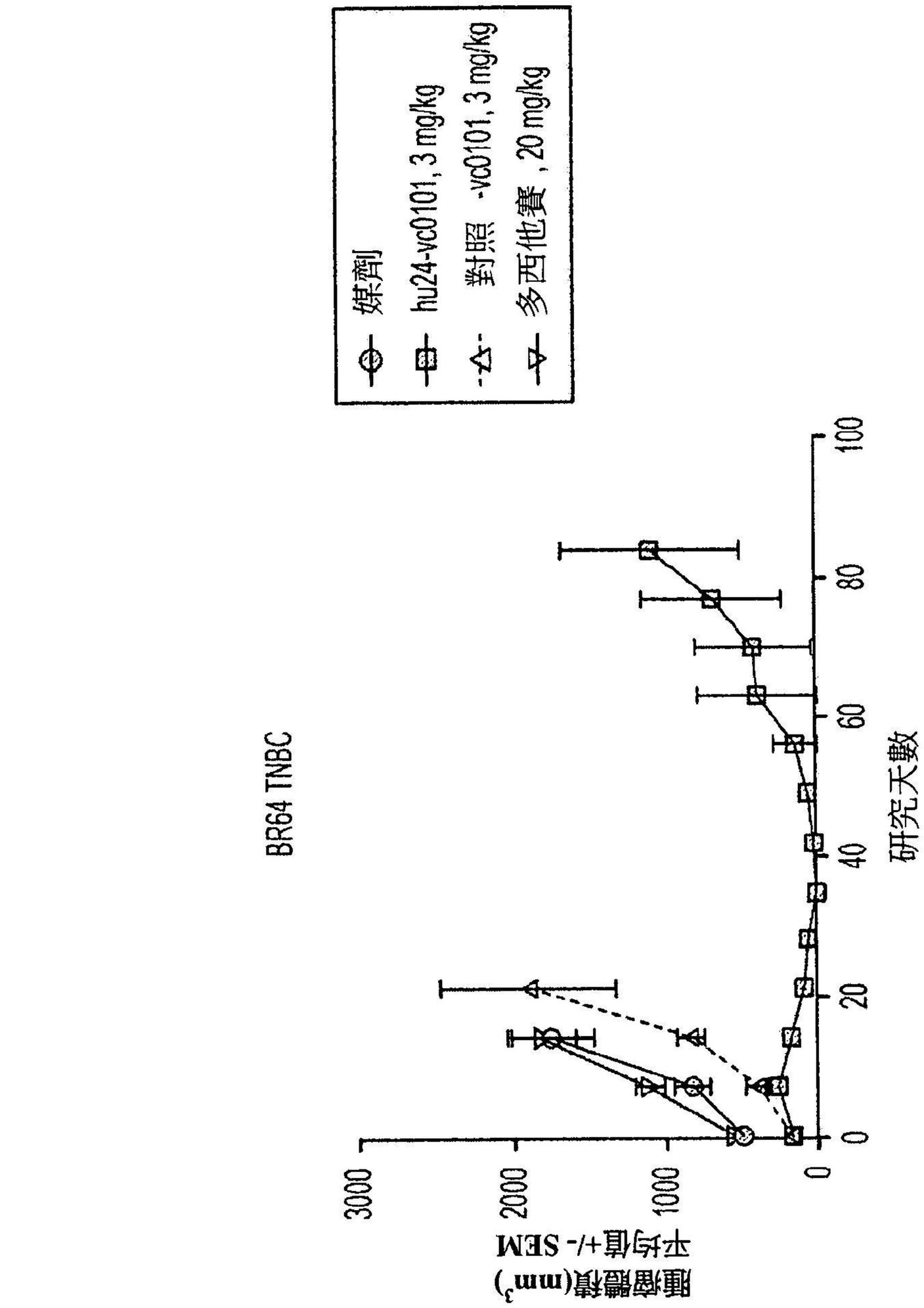

BR64 TNBC
媒劑
hu24-vc0101, 3 mg/kg
對照 -vc0101, 3 mg/kg
多西他賽 , 20 mg/kg
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
研究天數
0
1000
2000
3000
0
20
40
60
80
100

圖 15

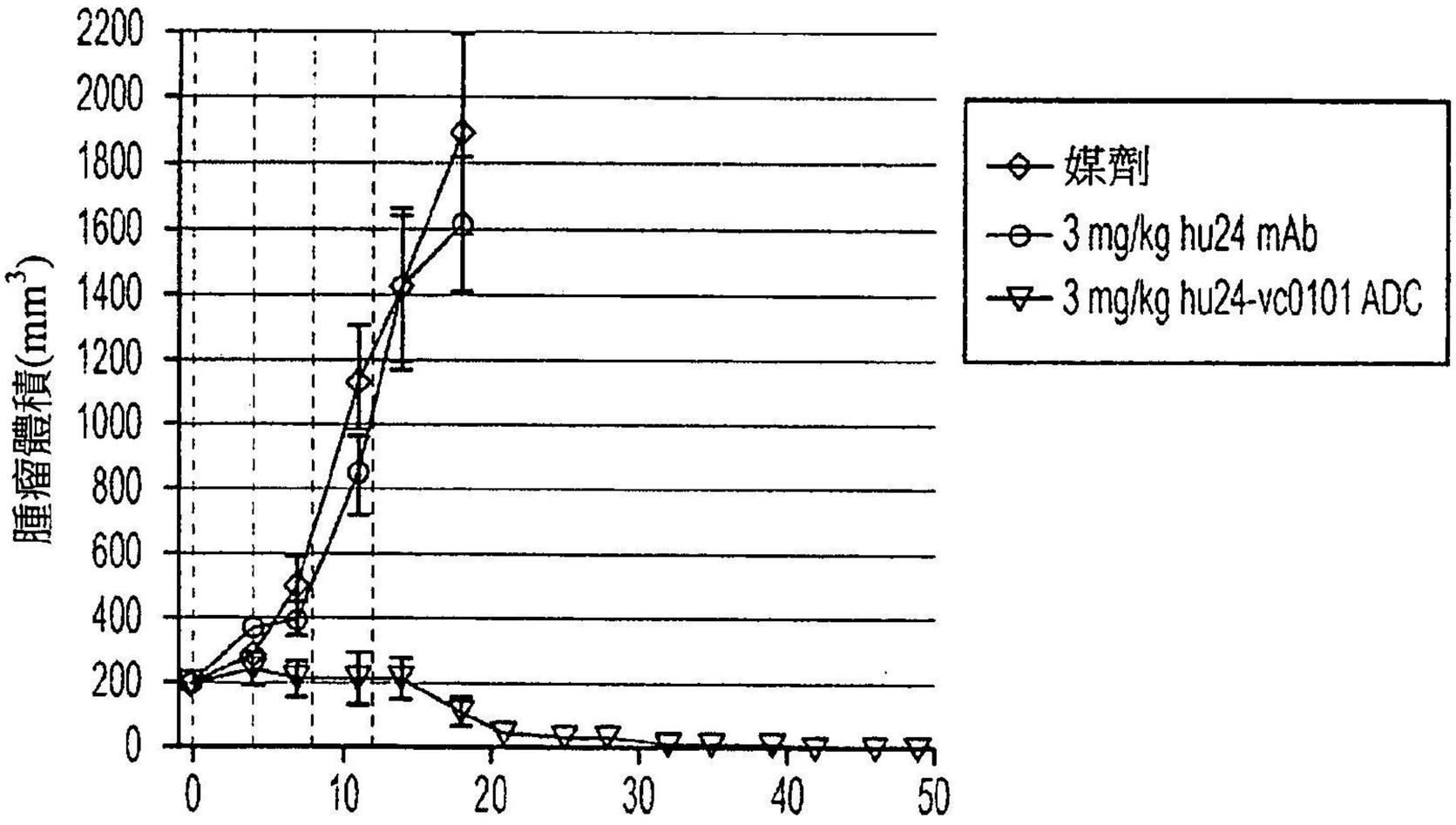

2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
40
50
自隨機化後之天數
媒劑
3 mg/kg hu24 mAb
3 mg/kg hu24-vc0101 ADC

圖 16

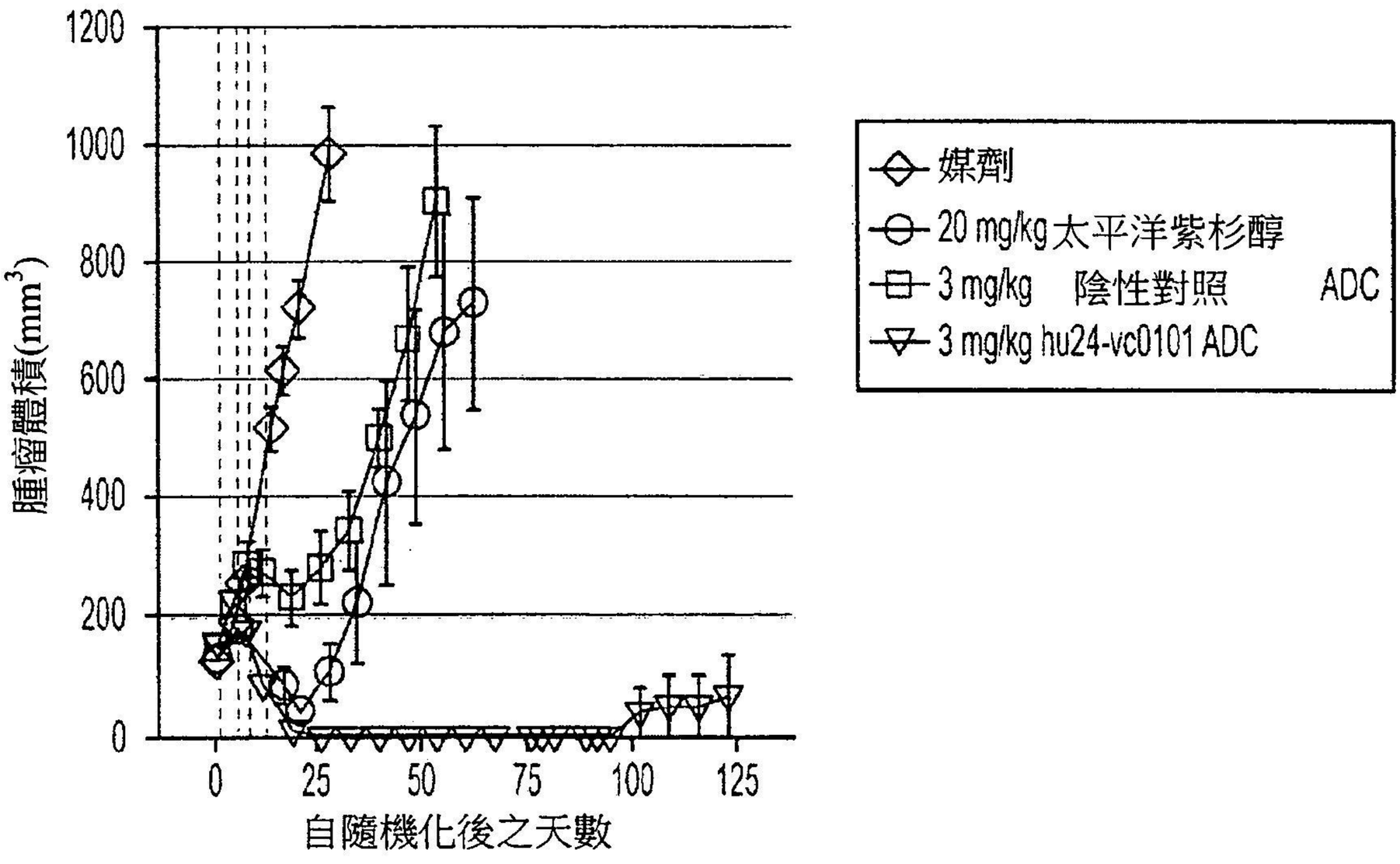

1200
1000
800
600
400
200
0
腫瘤體積(mm3)
0
25
50
75
100
125
自隨機化後之天數
媒劑
20 mg/kg太平洋紫杉醇
3 mg/kg 陰性對照 ADC
3 mg/kg hu24-vc0101 ADC

圖 17

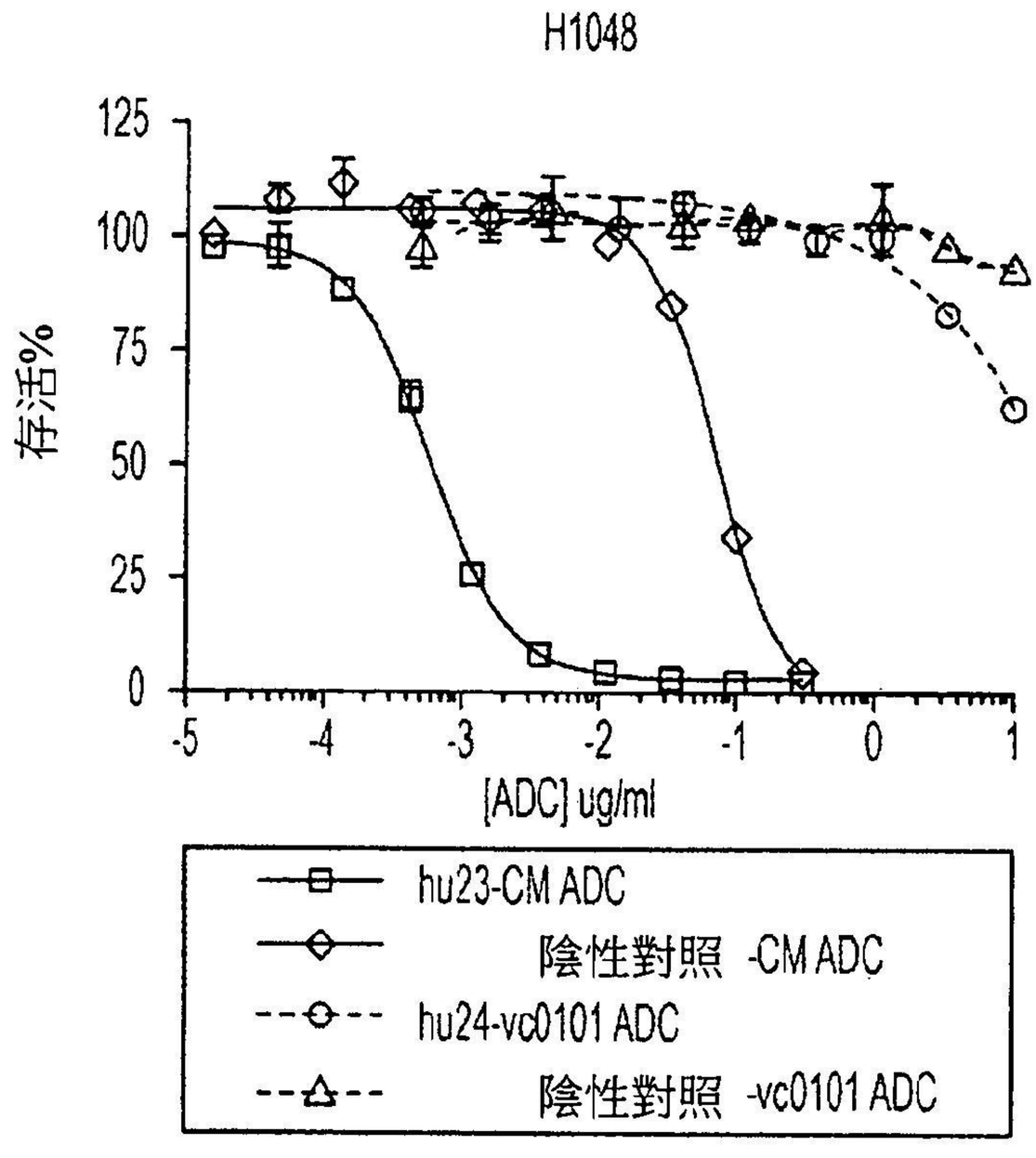

H1048
125
100
75
50
25
0
存活%
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
[ADC] ug/ml
hu23-CM ADC
陰性對照 -CM ADC
hu24-vc0101 ADC
陰性對照 -vc0101 ADC

圖 18A

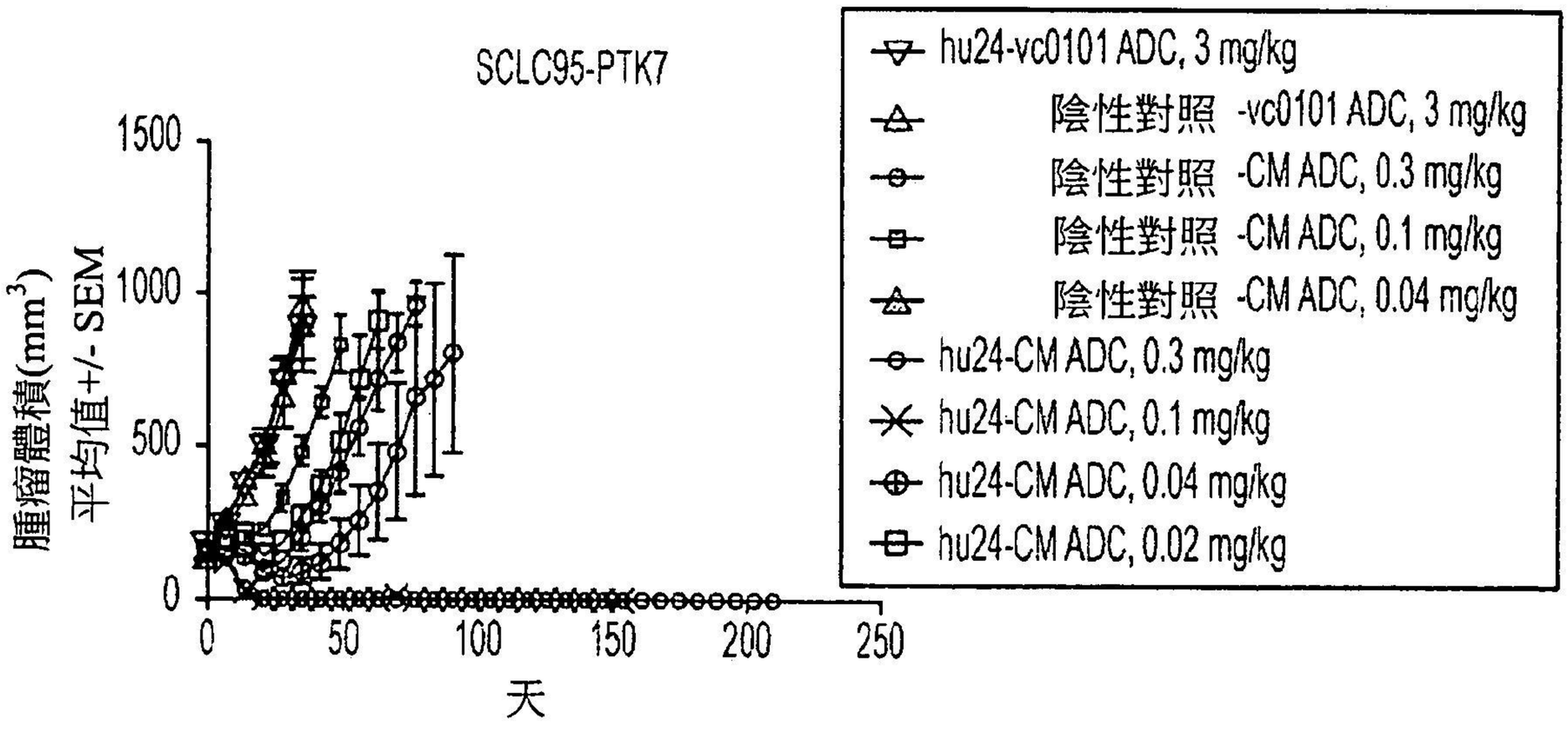

SCLC95-PTK7
腫瘤體積(mm3)
平均值+/- SEM
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
天
hu24-vc0101 ADC, 3 mg/kg
陰性對照 -vc0101 ADC, 3 mg/kg
陰性對照 -CM ADC, 0.3 mg/kg
陰性對照 -CM ADC, 0.1 mg/kg
陰性對照 -CM ADC, 0.04 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.3 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.1 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.04 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.02 mg/kg

圖 18B

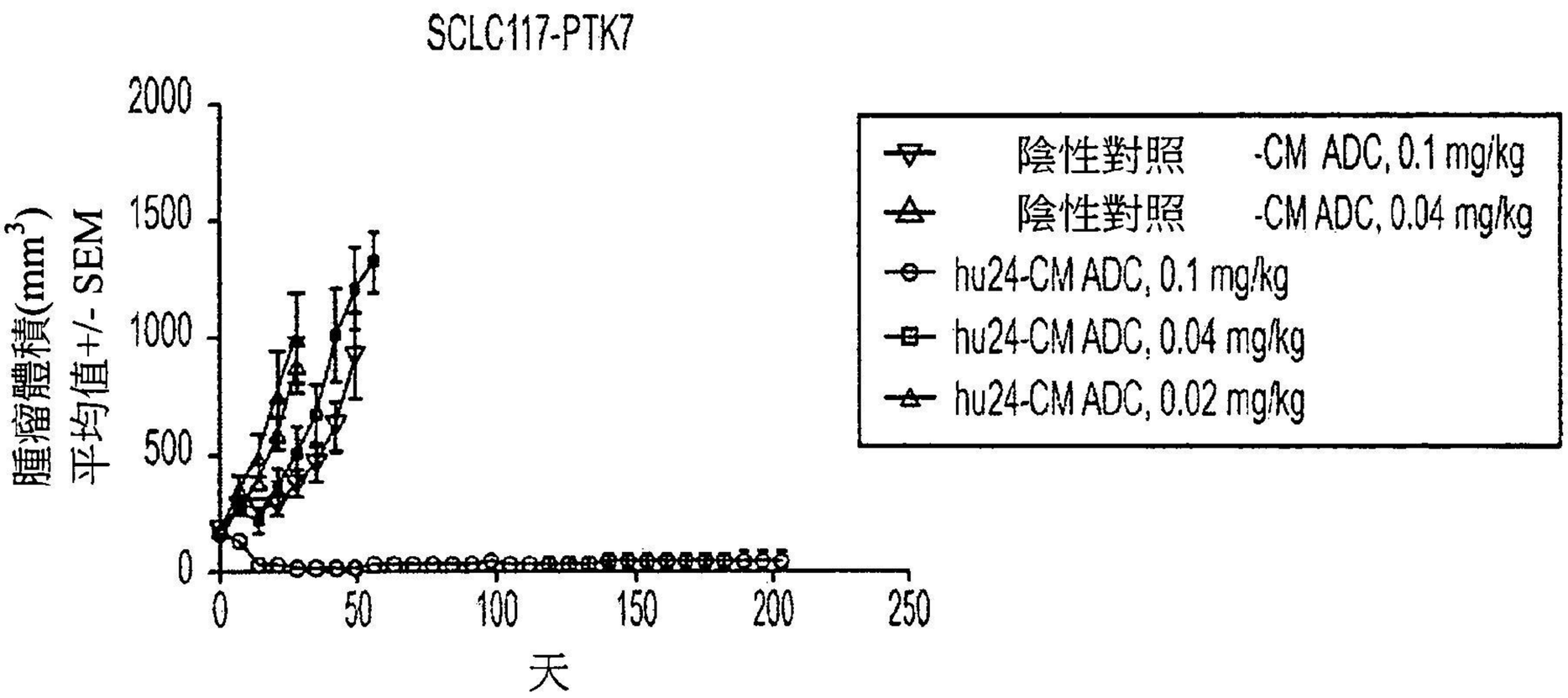

SCLC117-PTK7
腫瘤體積(mm3)
平均值+/- SEM
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
200
250
天
陰性對照 -CM ADC, 0.1 mg/kg
陰性對照 -CM ADC, 0.04 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.1 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.04 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.02 mg/kg

圖 19A

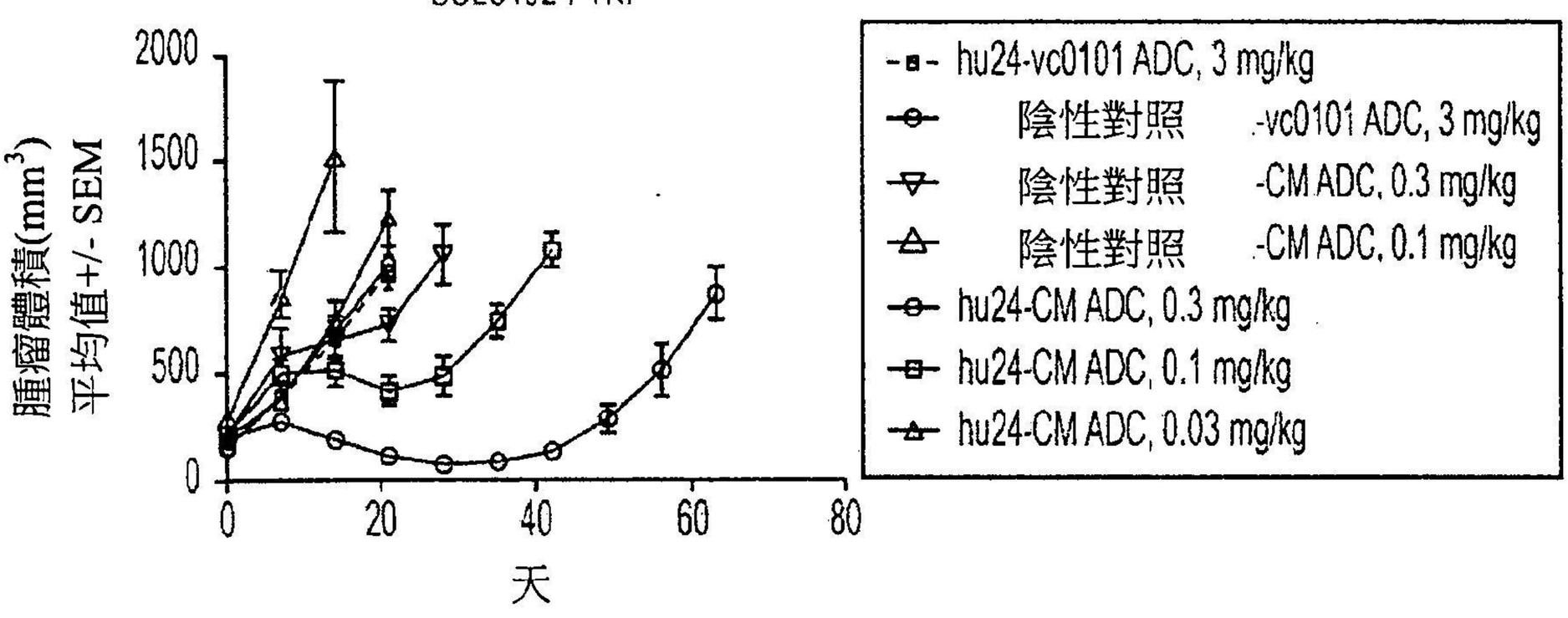

SCLC102-PTK7
腫瘤體積(mm3)
平均值+/- SEM
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
天
hu24-vc0101 ADC, 3 mg/kg
陰性對照 -vc0101 ADC, 3 mg/kg
陰性對照 -CM ADC, 0.3 mg/kg
陰性對照 -CM ADC, 0.1 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.3 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.1 mg/kg
hu24-CM ADC, 0.03 mg/kg

圖 19B

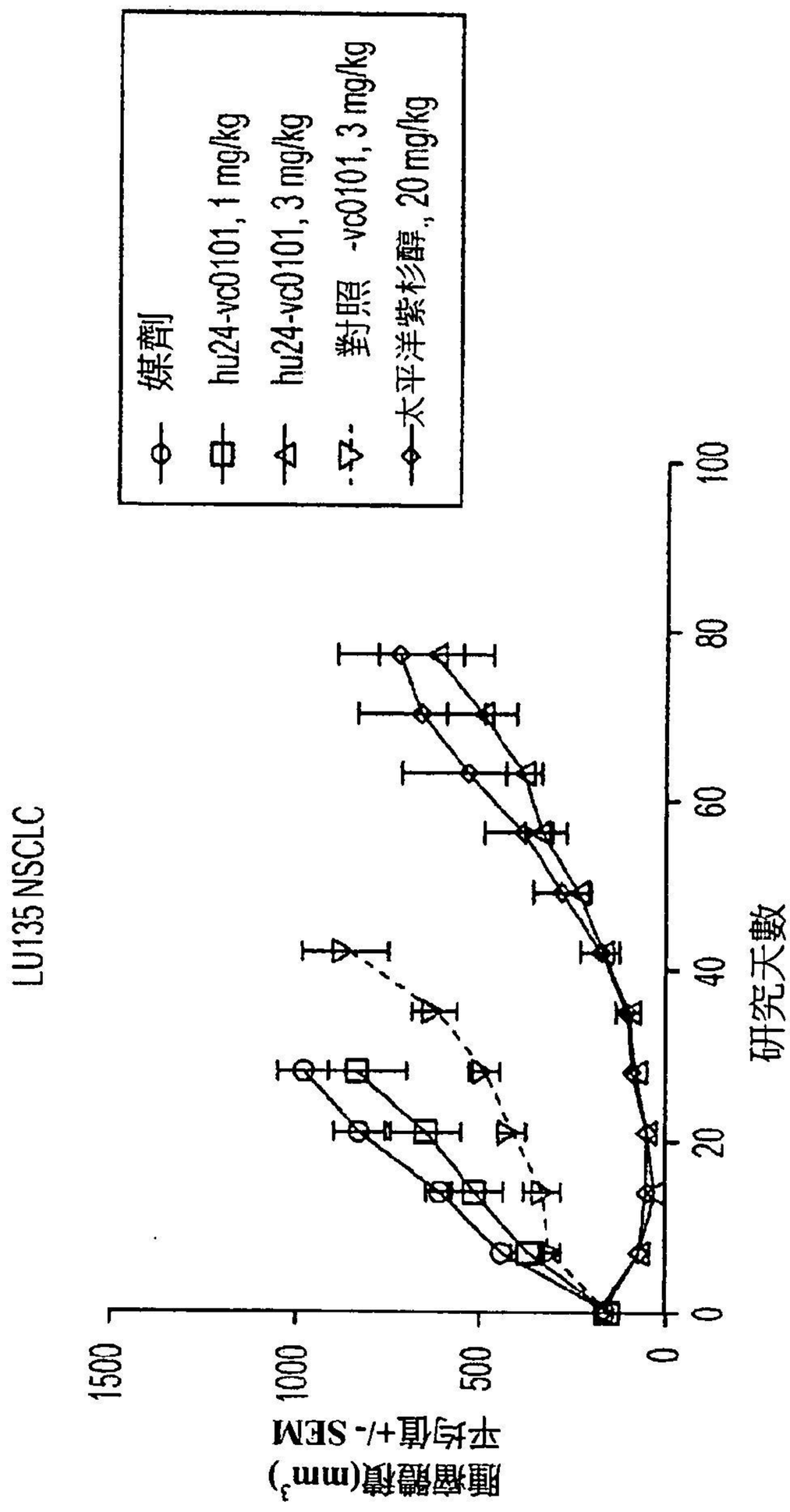

媒劑
hu24-vc0101, 1 mg/kg
hu24-vc0101, 3 mg/kg
對照 -vc0101, 3 mg/kg
太平洋紫杉醇., 20 mg/kg
LU135 NSCLC
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
研究天數
0
500
1000
1500
0
20
40
60
80
100

圖 20

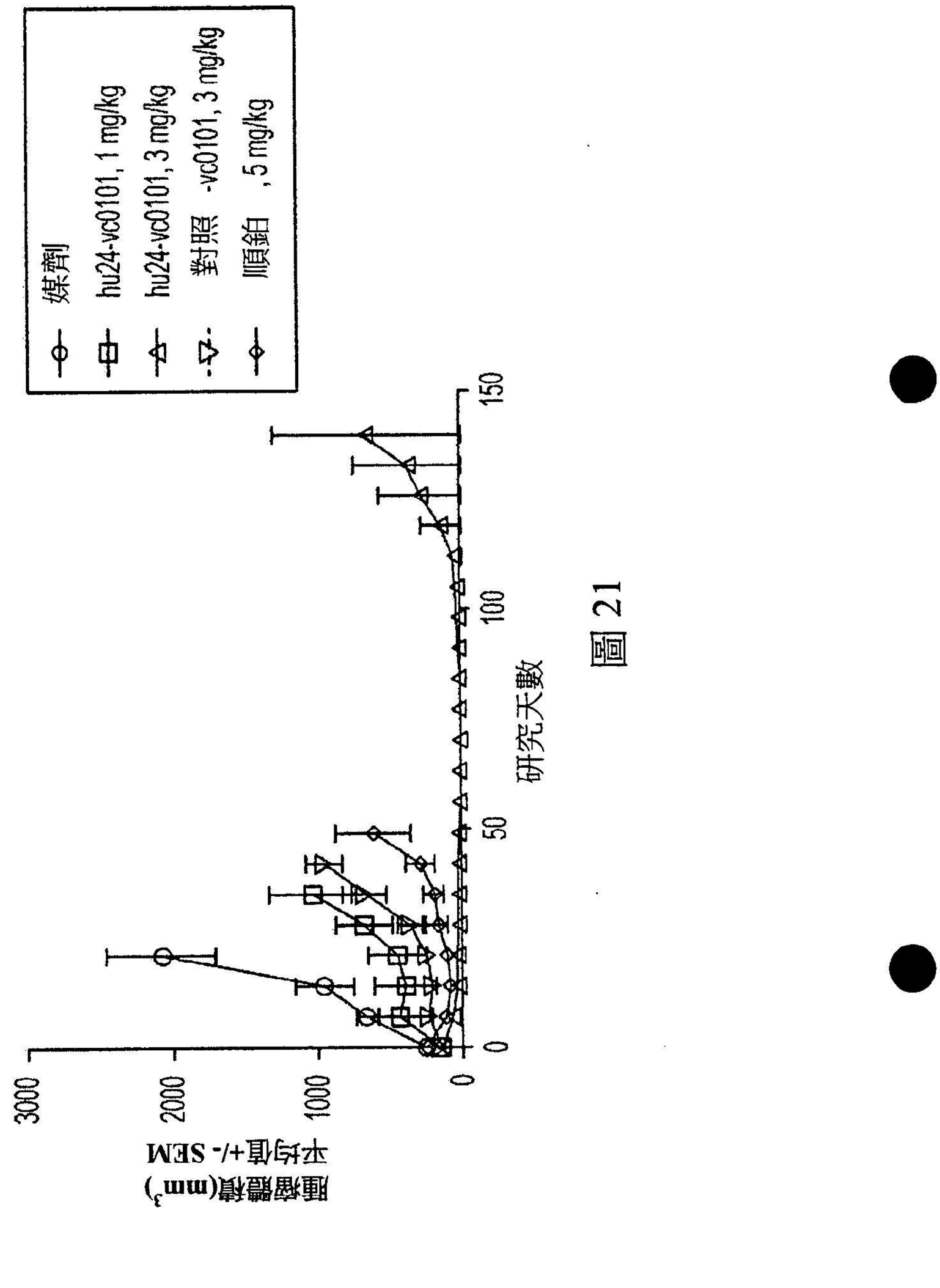

媒劑
hu24-vc0101, 1 mg/kg
hu24-vc0101, 3 mg/kg
對照 -vc0101, 3 mg/kg
順鉑 ,5 mg/kg
150
100
50
0
研究天數
3000
2000
1000
0
腫瘤體積(mm³)
平均值+/- SEM
LU176 NSCLC

圖 21

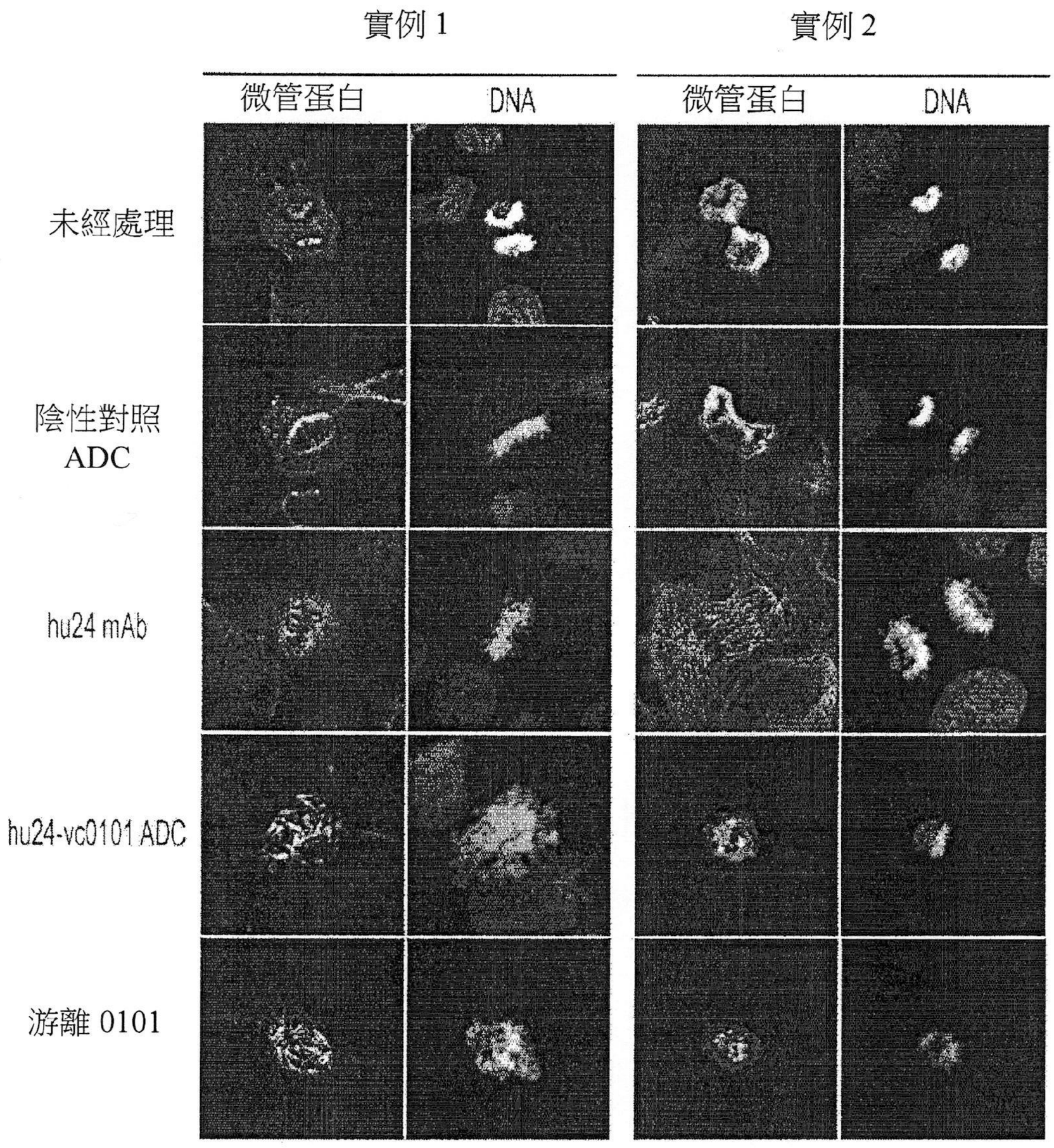

實例 1
實例 2
微管蛋白
DNA
微管蛋白
DNA
未經處理
陰性對照
ADC
hu24 mAb
hu24-vc0101 ADC
游離 0101

圖 22

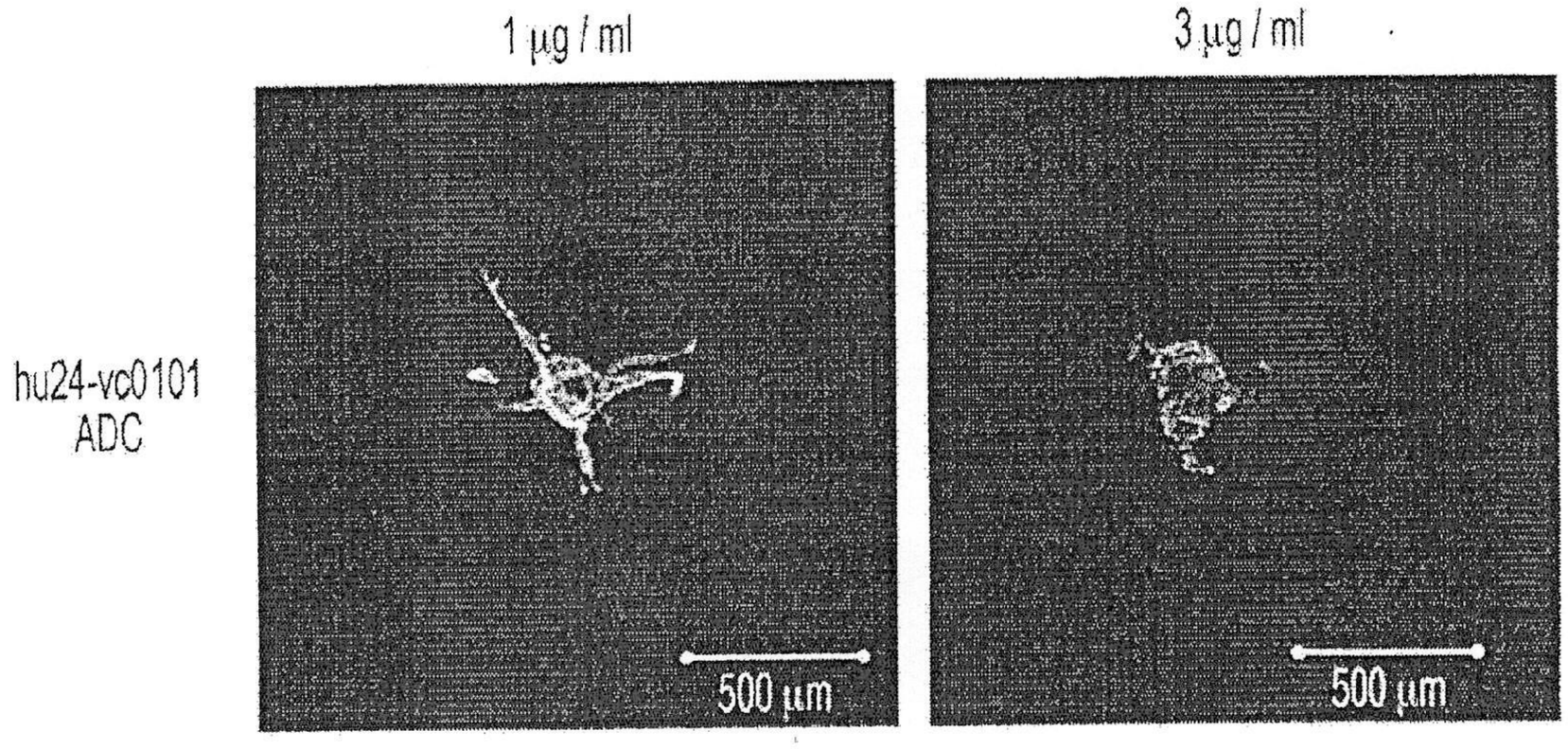

1 μg / ml
3 μg / ml
hu24-vc0101
ADC
500 μm
500 μm
陰性對照
ADC
500 μm
500 μm

圖 23