



(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 I844524 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 11 日

(21) 申請案號：108104259 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 01 日

(51) Int. Cl. : A61K38/20 (2006.01) A61K47/65 (2017.01)

(30) 優先權：2018/02/09 歐洲專利局 18156141.6

2018/06/22 歐洲專利局 18179313.4

(71) 申請人：義大利商費洛根公司 (義大利) PHILOGEN S.P.A. (IT)
義大利(72) 發明人：維拉 艾麗絲珊卓 VILLA, ALESSANDRA (IT)；瑪塔西 瑪奇亞 MATASCI,
MATTIA (CH)；奧加羅 提齊安諾 ONGARO, TIZIANO (IT)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

WO 2013/014149A1

期刊 Verena Gafner et al., An engineered antibody-interleukin-12 fusion protein with enhanced tumor vascular targeting properties. Int J Cancer. 119(9): doi: 10.1002/ijc.22101. 2006 Nov 1; 2205-2212.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：11 共 113 頁

(54) 名稱

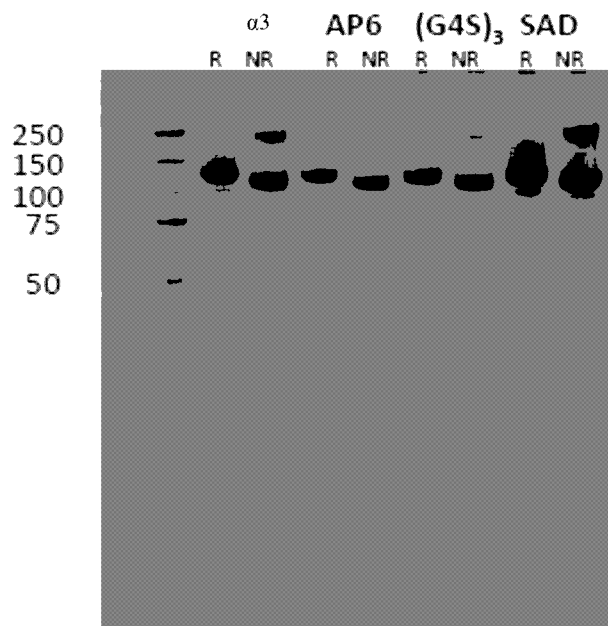
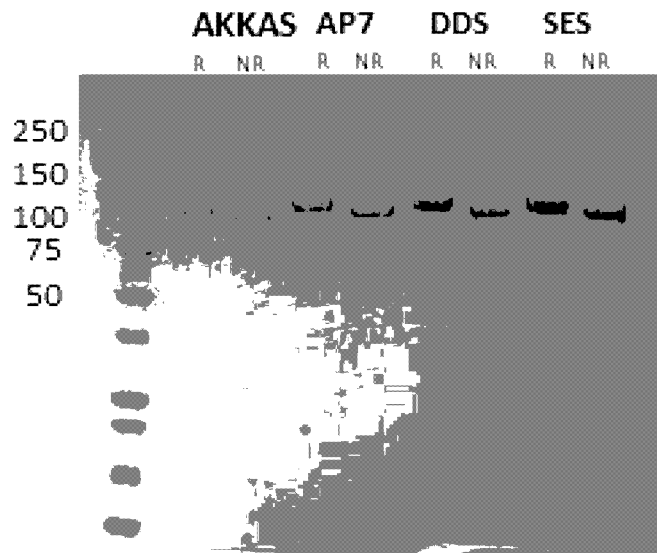
靶向 EDB 之 IL-12 組合物

(57) 摘要

本發明係關於組合物，其包含具有第一及第二亞單元的 IL-12 蛋白、EDB 結合域，及介於 IL-12 蛋白與 EDB 結合域之間的連接子。

The present invention relates to compositions comprising an IL-12 protein having a first and second subunit, an EDB-binding domain, and a linker between the IL-12 protein and the EDB-binding domain.

指定代表圖：



【圖1B】



公告本

I844524

【發明摘要】

【中文發明名稱】

靶向EDB之IL-12組合物

【英文發明名稱】

EDB TARGETING IL-12 COMPOSITIONS

【中文】

本發明係關於組合物，其包含具有第一及第二亞單元的IL-12蛋白、EDB結合域，及介於IL-12蛋白與EDB結合域之間的連接子。

【英文】

The present invention relates to compositions comprising an IL-12 protein having a first and second subunit, an EDB-binding domain, and a linker between the IL-12 protein and the EDB-binding domain.

【指定代表圖】

圖1A、1B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

靶向EDB之IL-12組合物

【英文發明名稱】

EDB TARGETING IL-12 COMPOSITIONS

【技術領域】

【0001】 本申請案係關於包含細胞介素、抗原結合域及改良之連接子的組合物。

【先前技術】

【0002】 IL-12為包含兩種經二硫鍵連接之亞單元(p35及p40)的雜二聚細胞介素。IL-12刺激T細胞及自然殺手細胞產生IFN γ ，且亦誘導Th1輔助細胞分化。IL-12為先天性免疫及細胞介導性免疫之關鍵介體，其具有抗癌及抗轉移活性之潛能。

【0003】 然而，與許多其他細胞介素類似，投與IL-12與嚴重毒性相關(Car等人, 1999)，即使劑量低至每天每公斤1 μg ，此阻礙其作為抗癌藥物的開發。

【發明內容】

【0004】 本發明尤其提供可用於有效治療與EDB纖維結合蛋白表現相關之各種疾病及病症的經改良之組合物及方法。

【0005】 特定言之，本發明提供具有優於已知重組IL-12構築體之較佳治療特性的IL-12連接型EDB結合域。本文所述之組合物驚人地優於先前已知之為了靶向EDB而設計的IL-12構築體且解決了安全且有效投與IL-12以靶向治療疾病或病症(例如癌症)之長期已知問題。本文所述之組

合物及方法藉由增強其生物分佈概況、其耐受性、其治療窗及其到達疾病位點之效力中之一或多者來改良IL-12之治療潛力。本文所述之構築體亦驚人地展現優良的可製造性。

【0006】 此項技術中仍需要改善免疫細胞介素療法對組織的滲透。此項技術中亦需要改良免疫細胞介素療法之製造，因為此等蛋白質為難以產生之高度複雜蛋白質。

【0007】 因此，本發明之一個目標為提供改良版免疫細胞介素，例如包含IL-12及EDB纖維結合蛋白結合域之蛋白質治療劑。本發明之另一目標為提供展現更高生產效率之免疫細胞介素。本發明之另一目標為提供具有改良之活體內效能(例如標靶結合或組織滲透)的免疫細胞介素。

【0008】 本發明提供包含抗原結合域及具有此類優良特性之細胞介素的組合物。本發明及其特徵的總體優勢，包括適合的連接子，將在下文詳細論述。

【0009】 根據本發明之一個態樣，提供一種組合物，其包含

- a.包含第一IL-12亞單元及第二IL-12蛋白亞單元的IL-12蛋白；
- b.包含EDB結合域的肽或蛋白質；及
- c.介於IL-12蛋白與包含EDB結合域之肽或蛋白質之間的連接子。

【0010】 較佳地，IL-12之兩個亞單元係藉由指定連接子、根據以下方案(N→C取向)彼此連接：p40-連接子1-p35。

【0011】 較佳地，IL-12為人類IL-12。根據本發明的一些實施例，單鏈雙功能抗體結合至纖維結合蛋白之剪接同功異型物。較佳地，纖維結合蛋白之該外域B (ED-B)為人類纖維結合蛋白之外域B (UniProt：P02751)。

【0012】 在一些實施例中，在IL-12蛋白與包含EDB結合域之肽或蛋白質之間的連接子包含GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO：4)。

【0013】 在一些實施例中，包含EDB結合域之肽或蛋白質包含scFv。在一些實施例中，包含EDB結合域之肽或蛋白質係雙功能抗體。在一些實施例中，包含EDB結合域之肽或蛋白質係單鏈雙功能抗體。

【0014】 在一些實施例中，IL-12蛋白之第一亞單元為p40且第二亞單元為p35。

【0015】 在一些實施例中，IL-12蛋白之第一亞單元為包含與SEQ ID NO：1中所闡述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之胺基酸序列的p40，或其片段，其中該IL-12蛋白可以活化IL-12受體。

【0016】 在一些實施例中，IL-12蛋白之第二亞單元為包含與SEQ ID NO：3中所闡述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之胺基酸序列的p35，或其片段，其中IL-12蛋白可以活化IL-12受體。

【0017】 在一些實施例中，包含EDB結合域之肽或蛋白質具單特異性或雙特異性。

【0018】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

【0019】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質包含與SEQ ID NO：28至33中所述之胺基酸序列中之一或多者具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0020】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質包含SEQ ID NO：28至33之胺基酸序列中的每一者。

【0021】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質包含與SEQ ID NO：7及5中所述之胺基酸序列中之一或多者具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0022】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質包含SEQ ID NO：7及5之胺基酸序列中的每一者。

【0023】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質包含以下中的至少一者

a)根據以上描述之序列對，其限制條件為該等結構域中之至少一者相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5分別具有 $\geq 80\%$ 之序列一致性，及/或

b)根據以上描述之序列對，其限制條件為該等結構域中之至少一者相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5分別具有至多10個胺基酸取代，同時維持其結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)的能力。

【0024】 在一些實施例中，至少一個胺基酸取代為保守胺基酸取代。

【0025】 在一些實施例中，包含EDB結合域之肽或蛋白質

- 對纖維結合蛋白之外域B (ED-B)的標靶結合親和力為如上文所述包含抗EDB結合域之肽或蛋白質之一的 $\geq 50\%$ ，及/或

- 與如上文所述包含EDB結合域之肽或蛋白質之一競爭結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

【0026】 在一些實施例中，包含EDB結合域之肽或蛋白質包含兩個

L19 VH域及兩個L19 VL域。

【0027】 在一些實施例中，兩個L19 VH域具有相同胺基酸序列；

- 兩個L19 VH域具有不同胺基酸序列；
- 兩個L19 VL域具有相同胺基酸序列；或
- 兩個L19 VL域具有不同胺基酸序列。

【0028】 在一些實施例中，包含EDB結合域的肽或蛋白質包含一個L19 VH域及一個L19 VL域。

【0029】 在一些實施例中，組合物包含：

- p40域，其藉由第一連接子(亦稱為「連接子1」)連接至p35域；
- 第一L19 VH域，其藉由SAD連接子連接至p35域；
- 第一L19 VL域，其藉由第三連接子(亦稱為「連接子3」)連接至第一L19 VH域；
- 第二L19 VH域，其藉由第四連接子(亦稱為「連接子4」)連接至第一L19 VL域；
- 第二L19 VL域，其藉由第五連接子(亦稱為「連接子5」)連接至第二L19 VH域。

【0030】 在一些實施例中，p40域包含與SEQ ID NO：1中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列，或其片段。

【0031】 在一些實施例中，p35域包含與SEQ ID NO：3中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列，或其片段。

【0032】 在一些實施例中，第一連接子為GS連接子。

【0033】 在一些實施例中，第一連接子包含與SEQ ID NO：2中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0034】 在一些實施例中，第一L19 VH域、第二L19 VH域或兩者均包含與SEQ ID NO：28-30中所述之至少一個胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0035】 在一些實施例中，第一L19 VL域、第二L19 VL域或兩者均包含與SEQ ID NO：31-33中所述之至少一個胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0036】 在一些實施例中，第一L19 VH域、第二L19 VH域或兩者均包含與SEQ ID NO：7中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0037】 在一些實施例中，第一L19 VL域、第二L19 VL域或兩者均包含與SEQ ID NO：5中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0038】 在一些實施例中，SAD連接子包含與SEQ ID NO：4中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0039】 在一些實施例中，第三連接子為GS連接子。

【0040】 在一些實施例中，第三連接子包含與SEQ ID NO：6中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0041】 在一些實施例中，第五連接子為GS連接子。

【0042】 在一些實施例中，第三連接子包含與SEQ ID NO：6中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0043】 在一些實施例中，第三連接子與第五連接子包含相同胺基酸序列。

【0044】 在一些實施例中，第四連接子為GS連接子。

【0045】 在一些實施例中，第四連接子包含與SEQ ID NO：8中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0046】 在一些實施例中，組合物包含與SEQ ID NO：16中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列。

【0047】 在一些實施例中，組合物係由與SEQ ID NO：16中所述之胺基酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性的胺基酸序列組成。

【0048】 根據本發明之另一態樣，提供根據前述技術方案中任一方案之組合物之用途，其係用於製造用於治療人類或動物個體中贅生性疾病或用於預防此類病狀之藥劑，該人類或動物個體經診斷、罹患或面臨產生贅生性疾病的風險。

【0049】 在一些實施例中，贅生性疾病係選自惡性黑色素瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌、尿道上皮癌、頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、小型隨體高不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺乏型(dMMR)轉移性結腸直腸癌、肝細胞癌、胃癌、皮膚鱗狀細胞癌、子宮頸癌及彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)。

【0050】 根據本發明之另一態樣，提供根據前述技術方案中任一方案之組合物之用途，其係用於製造用於抑制人類或動物個體中血管生成之藥劑。

【0051】 根據本發明之另一態樣，提供一種醫藥組合物，其至少包含根據以上描述之組合物及視情況存在之一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

【0052】 根據本發明之另一態樣，提供一種組合，其包含(i)根據以上描述之組合物或根據以上描述之醫藥組合物及(ii)一或多種治療活性化化合物。

【0053】 根據本發明之另一態樣，提供一種治療或預防與ED-B纖維結合蛋白之表現或過度表現相關之病症或病狀的方法，其包含向有需要之個體投與有效量的根據以上描述之組合物、根據以上描述之醫藥組合物或根據以上描述之組合。

【0054】 根據本發明之另一態樣，提供一種組成部分之治療套組，其包含：

a)根據以上描述之組合物、根據以上描述之醫藥組合物，或根據以上描述之組合，

b)用於投與該組合物、組合物或組合之裝置，及

c)使用說明書。

【圖式簡單說明】

【0055】

圖1A-1B：蛋白質表現實驗之結果。關於材料及方法，參見下文。

圖1A：具有胺基酸序列SEQ ID NO：4的15聚體連接子(本文中縮寫為「SAD」)迄今展示所有變異體(本文中亦稱為「純系」)之最佳產量。產量比第2最佳變異體DDS優良幾乎100%。

株系AKKAS中的兩個序列為SEQ ID NO 9及18，株系AP7中的兩個序列為SEQ ID NO 15及19，株系DDS中的兩個序列為SEQ ID NO 10及20，株系AP6中的兩個序列為SEQ ID NO 14及21，株系G4S中的兩個序列為SEQ ID NO 11及22，株系SES中的兩個序列為SEQ ID NO 12及23，株系α3中的兩個序列為SEQ ID NO 13及24，株系SAD中的兩個序列為SEQ ID NO 4及25。

圖1中的N端及C端殘基(或5'-核苷酸或3'-核苷酸)以灰色展示。此等不屬於本申請案的揭示內容，因為此等需要搜尋。其僅展示各別連接子可嵌入其中之構架。

圖1B：SDS-PAGE表徵顯示所有變異體之分子量為約120 kDa。

圖2：ELISA實驗。所有變異體均在10 μg/ml及1 μg/ml濃度下結合至人類纖維結合蛋白之結構域7B89。

圖3：Biacore實驗。所有變異體展示與人類纖維結合蛋白之結構域7B89類似的結合行為。

圖4：尺寸排阻層析(SEC)。所有變異體均展示類似的聚集概況，其中13 ml時之主峰對應於單體免疫細胞介素，且10 ml時之較小峰對應於聚

集體。

圖5：免疫螢光染色實驗。相較於陰性對照，所有變異體均特異性地將冷凍的同基因F9畸胎癌試樣之血管結構染色。

圖6：活體內腫瘤標靶。所有變異體及陽性對照物均用¹²⁵I進行放射性碘標記且注射(4-9 μg蛋白質/動物)至皮下植有F9鼠類畸胎癌的免疫勝任小鼠中。注射之後24小時計數之放射性展示所有變異體在腫瘤中之聚積。然而，相較於其他七種純系(約2.9% ID/g (=注射劑量/公克組織)，相比之下，第二最佳者為(G4S)₃且展示約2.4% ID/g)，「SAD」變異體在腫瘤中展示優異的聚積。

圖7及8：使用IL-12及抗纖維結合蛋白抗體之例示性免疫細胞介素形式。

圖9：對不同融合蛋白(A) huIL-12L19L19「SAD」批料A、(B) huIL-12L19L19「SAD」批料B、(C) huIL-12L19L19「Old」批料A、(D) huIL-12L19L19「Old」批料B之SEC分析。

圖10：Biacore實驗。相較於其中「Old」連接子接近纖維結合蛋白7B89域的變異體，「SAD」變異體展示具有改良的表觀親和力(3.8 nM相對於6.7 nM)。此驚人的結果出人意料，因為連接子之變異可影響蛋白質之穩定性，但通常不影響對其標靶之親和力。

圖11：活體內腫瘤標靶實驗。「SAD」及「Old」變異體用¹²⁵I進行放射性碘標記且注射(10-11 μg蛋白質/動物)至皮下植有F9鼠類畸胎癌的免疫勝任小鼠中。相較於「Old」連接子變異體，「SAD」變異體展示具有改良的腫瘤靶向能力。

【實施方式】

【0056】

定義

「抗體」係指包含四聚結構單元之免疫球蛋白家族分子。各四聚體由兩條一致多肽鏈對構成，各對具有經由二硫鍵連接之一條「輕」鏈(約25 kD)及一條「重」鏈(約50-70 kD)。識別之免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 及 μ 恆定區基因以及多種免疫球蛋白可變區基因。輕鏈分類為 κ 或 λ 。重鏈分類為 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ，其又分別限定免疫球蛋白類別IgG、IgM、IgA、IgD及IgE。抗體可為任何同型/類別(例如IgG、IgM、IgA、IgD及IgE)或任何子類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)。

【0057】 輕鏈與重鏈分成具有結構及功能同源區域。術語「恆定」及「可變」係根據結構及功能使用。各鏈之N端界定約100至110個或更多個胺基酸之可變(V)區或域，其主要負責抗原識別。術語可變輕鏈(V_L)及可變重鏈(V_H)分別指輕鏈及重鏈之此等區域。 V_H 與 V_L 配對在一起形成單一抗原結合位點。除V區之外，重鏈與輕鏈均含有恆定(C)區或域。免疫球蛋白C區之分泌形式係由三個C域CH1、CH2、CH3、視情況存在之CH4 (C_μ)及鉸鏈區構成。免疫球蛋白C區之膜結合形式亦具有膜及胞內域。各輕鏈在N端具有 V_L ，繼之在其另一端具有恆定域(C)。輕鏈(CL)及重鏈(CH1、CH2或CH3)之恆定域賦予重要生物特性，諸如分泌、經胎盤遷移、Fc受體結合、補體結合及其類似特性。按照慣例，恆定區之編號隨著其距離抗體之抗原結合位點或胺基端愈遠而增大。N端為可變區且C端為恆定區；CH3及CL域實際上分別包含重鏈及輕鏈之羧基端域。將 V_L 與 V_H 對齊，且將CL與重鏈之第一恆定域對齊。如本文所用，「抗體」涵蓋習知抗體結構及抗體變異體。因此，在此概念之範疇內為全長抗體、嵌合

抗體、人類化抗體、人類抗體及其抗體片段。

【0058】 抗體係以完整免疫球蛋白鏈形式存在或以多種經充分表徵的抗體片段形式存在，該等抗體片段係藉由各種肽酶消化而產生。如本文所用，術語「抗體片段」係指抗體之一或多個部分，其保留與抗原之抗原決定基特異性相互作用(例如結合、空間位阻、穩定化/去穩定化、空間分佈)之能力。因此，舉例而言，胃蛋白酶在鉸鏈區中之二硫鍵下方使抗體消化而產生 $F(ab)'_2$ ，即 Fab' 之二聚體， Fab' 自身為經二硫鍵連接至 V_H-C_{H1} 之輕鏈。 $F(ab)'_2$ 可以在溫和條件下還原以使鉸鏈區中的二硫鍵斷裂，藉此將 $F(ab)'_2$ 二聚體轉化成 Fab' 單體。 Fab' 單體基本上為具有鉸鏈區之一部分的 Fab 。Paul, *Fundamental Immunology*第3版(1993)。儘管各種抗體片段的定義係依據完整抗體的消化，但熟習此項技術者應瞭解此類片段可以化學方法或藉由使用重組DNA方法重新合成。如本文所用，「抗體片段」係指藉由修飾整個抗體之而產生的抗體之一或多個部分，或使用重組DNA方法重新合成之保留結合特異性及功能活性的彼等部分。抗體片段之實例包括Fv片段、單鏈抗體(ScFv)、 Fab 、 Fab' 、Fd (V_h 及 $CH1$ 域)、dAb (V_h 及分離的CDR)；雙功能抗體及單鏈雙功能抗體；及具有相同結合特異性之此等片段的多聚體形式(例如 $F(ab')_2$)。抗體片段亦可併入細胞介素移植之蛋白質中以達成本發明所提供之結合特異性及活性。

【0059】 如本文所用，「 Fab 」域包含重鏈可變域、恆定區 $CH1$ 域、輕鏈可變域及輕鏈恆定區 CL 域。結構域之相互作用係藉由 $CH1$ 與 CL 域之間的二硫鍵穩定化。在一些實施例中， Fab 之重鏈域自N端至C端依次為 $VH-CH$ ，且 Fab 之輕鏈域自N端至C端依次為 $VL-CL$ 。在一些實施例中， Fab 之重鏈域自N端至C端依次為 $CH-VH$ ，且 Fab 之輕鏈域依次為 $CL-VL$ 。

儘管歷史上藉由木瓜蛋白酶消化完整免疫球蛋白而鑑別出Fab，但在本發明的上下文中，「Fab」典型地藉由任何方法重組產生。各Fab片段就抗原結合而言為單價的，亦即，其具有單一抗原結合位點。

【0060】 「互補決定域」或「互補決定區」(「CDR」)可互換地指 V_L 及 V_H 之高變區。CDR為抗體鏈之靶蛋白結合位點，其對此類靶蛋白具有特異性。各人類 V_L 或 V_H 中存在三個CDR (CDR1-3，自N端依序編號)，佔可變域之約15-20%。CDR在結構上與靶蛋白之抗原決定基互補且因此直接促成結合特異性。 V_L 或 V_H 之剩餘片段，所謂的構架區(FR)，在胺基酸序列中展現較少的變異(Kuby, Immunology, 第4版, 第4章, W.H. Freeman & Co., New York, 2000)。

【0061】 CDR及構架區之位置可以利用此項技術中熟知之各種定義確定，例如Kabat、Chothia、國際ImMunoGeneTics資料庫(IMG)及AbM(參見例如Johnson等人, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia及Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia等人, Nature, 342:877-883 (1989); Chothia等人, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani等人, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997))。抗原組合位點之定義亦描述於以下文獻中：Ruiz等人, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); 及Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum等人, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); 及Martin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin等人, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); 及Rees等人, 於Sternberg M.J.E. (編), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

【0062】 根據 Kabat， V_H 中之 CDR 胺基酸殘基編號為 31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2)及95-102 (HCDR3)；且 V_L 中之CDR胺基酸殘基編號為 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)及 89-97 (LCDR3)。根據 Chothia， V_H 中之CDR胺基酸編號為26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2)及 95-102 (HCDR3)；且 V_L 中之胺基酸殘基編號為26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2)及91-96 (LCDR3)。藉由將Kabat與Chothia之CDR定義組合，CDR係由人類 V_H 中之胺基酸殘基26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2)及95-102 (HCDR3)及人類 V_L 中之胺基酸殘基 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)及89-97 (LCDR3)組成。

【0063】 如本文所用，「抗體可變輕鏈」或「抗體可變重鏈」係指分別包含 V_L 或 V_H 之多肽。內源 V_L 係由基因區段V (可變)及J (接合)編碼，且內源 V_H 係由V、D (多樣)及J編碼。 V_L 或 V_H 各包括CDR以及構架區 (FR)。術語「可變區」或「V區」可互換地指包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4之重鏈或輕鏈。V區可為天然存在的、重組的或合成的。在本申請案中，抗體輕鏈及/或抗體重鏈有時可統稱為「抗體鏈」。如本文所提供及進一步描述，「抗體可變輕鏈」或「抗體可變重鏈」及/或「可變區」及/或「抗體鏈」視情況包含移植至CDR中的細胞介素多肽序列。

【0064】 如本文所揭示之包含例如CH2及CH3域的免疫球蛋白重鏈之C端部分為「Fc」域。如本文所用，「Fc區」係指抗體之恆定區，不包括第一恆定區(CH1)免疫球蛋白域。Fc係指IgA、IgD及IgG之最後兩個恆定區免疫球蛋白域、以及IgE及IgM之最後三個恆定區免疫球蛋白結構域、以及此等結構域N端之柔性鉸鏈。對於IgA及IgM而言，Fc可包括J

鏈。對於IgG而言，Fc包含免疫球蛋白域C γ 2及C γ 3以及介於C γ 1與C γ 之間的鉸鏈。在此項技術中，應瞭解Fc區之邊界可變化，然而，人類IgG重鏈Fc區通常經定義而包含殘基C226或P230至其羧基端，其使用的編號係根據Kabat等人(1991, NIH公告91-3242, 國家技術資訊服務中心(National Technical Information Service), Springfield, Va.)中之EU索引。「Fc區」可以指分離的該區域或抗體或抗體片段情形下的該區域。「Fc區」包括Fc區(例如CH2及CH3區中)之天然存在之對偶基因變異體，包括例如調節效應功能之修飾。Fc區亦包括不引起生物功能改變之變異體。舉例而言，免疫球蛋白Fc區之N端或C端缺失一或多個胺基酸而生物功能無實質性損失。舉例而言，在某些實施例中，C端離胺酸係藉由置換或移除而經修飾。在特定實施例中，改變或移除Fc區中之一或多個C端殘基。在某些實施例中，Fc中之一或多個C端殘基(例如末端離胺酸)缺失。在某些其他實施例中，Fc中之一或多個C端殘基經替代的胺基酸取代(例如末端離胺酸經置換)。此類變異體係根據此項技術中已知之通用規則選擇以使對活性的影響最小(參見例如Bowie等人, Science 247:306-1310, 1990)。Fc域為免疫球蛋白(Ig)的一部分，其被細胞受體(諸如FcR)識別且與補體活化蛋白質C1 q結合。CH2外顯子之5'部分中所編碼的下鉸鏈區在抗體內向對FcR受體的結合提供靈活性。

【0065】 「嵌合抗體」為如下抗體分子，其中(a)恆定區或其一部分經改變、置換或交換，使得抗原結合位點(可變區)連接至不同或所變類別、效應功能及/或物種之恆定區，或賦予嵌合抗體新特性的完全不同分子，例如酶、毒素、激素、生長因子及藥物；或(b)可變區或其一部分改變成具有不同或所變抗原特異性之可變區、經具有不同或所變抗原特異性

之可變區置換或交換。

【0066】 「人類化」抗體為保留非人類抗體之反應性(例如結合特異性、活性)、同時在人體中免疫原性較弱的抗體。此可例如藉由保留非人類CDR區且用人類對應物置換抗體之剩餘部分來達成。參見例如Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison及Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994)。

【0067】 「人類抗體」包括具有可變區之抗體，其中構架區與CDR區均來源於人類來源之序列。此外，若抗體含有恆定區，則恆定區亦來源於此類人類序列，例如人類生殖系序列，或人類生殖系序列之突變型，或含有來源於人類構架序列分析之共同構架序列的抗體，例如如Knappik等人, *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000中所述。人類抗體可包括不由人類序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變，或促進穩定性或製造之保守性取代)。

【0068】 術語「分離」在用於核酸或蛋白質時表示核酸或蛋白質基本上不含在天然狀態下其所締合之其他細胞組分。其較佳呈均質狀態。其可呈乾燥或水溶液形式。純度及均質性通常使用諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳或高效液相層析之分析化學技術來確定。作為主導物種存在於製劑中的蛋白質得以實質上純化。詳言之，經分離之基因與側接該基因且編碼除所關注基因外之蛋白質的開放閱讀框架分離。術語「純化」表示核酸或蛋白質基本上在電泳凝膠中產生一個色帶。特定言之，其意謂核酸或蛋白質至少85%純、更佳至少95%純且最佳至少99%純。

【0069】術語「核酸」或「聚核苷酸」指去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其呈單股或雙股形式之聚合物。除非明確限制，否則該術語涵蓋含有天然核苷酸之已知類似物的核酸，該等已知類似物具有與參考核酸類似的結合特性且以與天然存在之核苷酸類似的方式代謝。除非另外指明，否則特定核酸序列亦隱含地涵蓋其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)、對偶基因、直系同源物、SNP及互補序列以及明確指示之序列。特定言之，簡併密碼子取代可藉由產生其中一或多個所選(或所有)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代的序列來達成(Batzer等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 及Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

【0070】術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用，且係指胺基酸殘基之聚合物。該等術語適用於胺基酸聚合物，其中一或多個胺基酸殘基為相應天然存在之胺基酸的人工化學模擬物，以及適用於天然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。

【0071】術語「胺基酸」係指天然存在及合成之胺基酸，以及以類似於天然存在之胺基酸的方式發揮功能的胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然存在之胺基酸為由遺傳密碼編碼之胺基酸，以及後來經修飾之彼等胺基酸，例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸及O-磷酸化絲胺酸。胺基酸類似物係指基本化學結構與天然存在之胺基酸相同(亦即 α 碳與氫、羧基、胺基及R基團結合)的化合物，例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞磺、甲硫胺酸甲基銻。此等類似物具有經修飾之R基團(例如正白胺酸)或經修飾之肽主鏈，但保留與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構。胺基酸模擬物係

指具有與胺基酸之一般化學結構不同之結構，但以與天然存在之胺基酸類似之方式起作用的化合物。

【0072】 「保守修飾之變異體」適用於胺基酸與核酸序列。相對於特定核酸序列，保守修飾之變異體係指編碼一致或基本上一致胺基酸序列之彼等核酸，或其中核酸不依照基本上一致序列來編碼胺基酸序列。由於遺傳密碼之簡併性，大量功能上一致之核酸編碼任何既定蛋白質。舉例而言，密碼子GCA、GCC、GCG及GCU均編碼胺基酸丙胺酸。因此，在丙胺酸藉由密碼子說明之每個位置上，密碼子可在不改變所編碼之多肽的情況下改變成任一個所述對應密碼子。此類核酸變異為「靜默變異」，其為一種保守修飾型變異。本文中編碼多肽之每個核酸序列亦描述核酸之每個可能的靜默變異。熟習此項技術者應認識到核酸中之各密碼子(除通常為甲硫胺酸之唯一密碼子之AUG及通常為色胺酸之唯一密碼子之TGG之外)可經修飾以產生功能上相同之分子。因此，編碼多肽之核酸的各靜默變異隱含於各所述序列中。

【0073】 關於胺基酸序列，熟習此項技術者應認識到改變、添加或缺失編碼序列中之單個胺基酸或較小百分比之胺基酸的核酸、肽、多肽或蛋白質序列的個別取代、缺失或添加為「經保守修飾之變異體」，其中該變化使胺基酸經化學上類似之胺基酸取代。提供功能上類似之胺基酸的保守取代表在此項技術中已熟知。此等保守修飾型變異體另外為且不排除多形性變異體、種間同源物及對偶基因。以下八組各含有彼此為保守取代之胺基酸：1)丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；2)天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；3)天冬醯胺(N)、麩醯胺(Q)；4)精胺酸(R)、離胺酸(K)；5)異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；6)苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸

(W)；7)絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及8)半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)(參見例如Creighton, *Proteins* (1984))。

【0074】 「序列一致性百分比」可藉由在比較窗上比較兩個經最佳比對的序列來確定，其中為了使兩個序列達成最佳比對，聚核苷酸序列在比較窗中之部分相較於不包含添加或缺失的參考序列(例如多肽)可包含添加或缺失(亦即，空隙)。如下計算百分比：測定兩個序列中存在之一致核酸鹼基或胺基酸殘基的位置數，得到匹配位置數，將匹配位置數除以比較窗中之總位置數且將結果乘以100，得到序列一致性百分比。

【0075】 在兩個或更多個核酸或多肽序列之上下文中，術語「一致」或「一致性」百分比係指兩個或更多個序列或子序列為相同序列。當在比較窗或指定區域上根據最大一致性比較及比對時，若兩個序列具有指定百分比之胺基酸殘基或核苷酸相同(亦即，在指定區域上至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，或當未指定時係在參考序列之整個序列上)，則該兩個序列「基本上一致」，如使用以下序列比較算法之一或藉由人工比對及目視檢查所量測。本發明提供分別與本文例示之多肽或聚核苷酸基本上一致的多肽或聚核苷酸。視情況，一致性存在於長度為至少約15、25或50個核苷酸之區域上，或更佳存在於長度為100至500或1000個或更多個核苷酸之區域上，或存在於參考序列之全長上。關於胺基酸序列，一致性或實質一致性可存在於長度為至少5、10、15或20個胺基酸，視情況長度為至少約25、30、35、40、50、75或100個胺基酸、視情況長度為至少約150、200或250個胺基酸之區域上或參考序列之全長上。關於較短之胺基酸序列，例如具有20個或更少個胺基酸的胺基酸序列，當一個或兩個胺基酸殘基根據本文中定義之保守取代經保守取代

時，存在實質性一致。

【0076】 術語「個體(subject)」、「患者」及「個體(individual)」可互換地指哺乳動物，例如人類或非人類靈長類哺乳動物。哺乳動物亦可為實驗室哺乳動物，例如小鼠、大鼠、兔、倉鼠。在一些實施例中，哺乳動物可為農用哺乳動物(例如馬、綿羊、牛、豬、駱駝)或馴養哺乳動物(例如犬、貓)。

【0077】 如本文所用，術語「治療」任何疾病或病症在一些實施例中係指改善疾病或病症(亦即，減緩或遏制或減少疾病或其至少一個臨床症狀之發展)。在另一個實施例中，「治療」係指緩解或改善至少一種身體參數，包括患者可能辨別不出之身體參數。在又另一個實施例中，「治療」係指在身體上(例如可辯別症狀之穩定化)、生理學上(例如身體參數之穩定化)或在兩方面調節疾病或病症。在又另一個實施例中，「治療」或「預防」係指防止或延遲疾病或病症之發作或發展或進展。

【0078】 術語「共投藥」係指兩種(或更多種)活性劑同時存在於個體中。共投與的活性劑可同時或依序遞送。

【0079】 在以下章節中詳細描述本發明之各種態樣。章節的使用不意欲限制本發明。各章節可適用於本發明之任何態樣。本發明不限於所述組合物或所述方法之程序步驟的特定組成部分，因為此類組合物及方法可以改變。亦應理解，本文所用之術語僅出於描述特定實施例之目的，且不欲作為限制。

【0080】 除非上下文另外清楚指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括單數及/或複數個指示物。在本申請案中，除非另有說明，否則使用「或」意謂「及/或」。

另外應理解，倘若給定的參數範圍係由數值定界，則認為範圍包括此等限值。本文中所引用之所有技術之揭示內容均以全文引用之方式併入。

【0081】 如本文所使用，術語「GS連接子」係指主要或排他性地由甘胺酸及絲胺酸殘基組成的肽連接子(亦稱為「Gly-Ser連接子」)。在不同實施例中，GS連接子為本文在SEQ ID NO：2、6或8中之任一者中所示之連接子。

【0082】 如本文所用，「保守胺基酸取代」對抗體功能的影響小於非保守取代。儘管胺基酸分類方式有多種，但其通常基於其結構及其R基團之一般化學特徵而分成六個主要類別。

【0083】 在一些實施例中，「保守胺基酸取代」為胺基酸殘基被具有相似側鏈之胺基酸殘基置換的取代。舉例而言，具有相似側鏈之胺基酸殘基家族在此項技術中已定義。此等家族包括具有以下之胺基酸

- 鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)，
- 酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)，
- 不帶電荷的極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)，
- 非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)，
- β -分支側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及
- 芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。

【0084】 其他保守胺基酸取代亦可發生於整個胺基酸側鏈家族中，諸如用天冬醯胺取代天冬胺酸以便修飾肽之電荷時。保守變化可進一步包括取代化學同源非天然胺基酸(亦即，合成非天然疏水性胺基酸替代白胺

酸，合成非天然芳族胺基酸代替色胺酸)。

【0085】 如本文所用，術語「標靶結合親和力」係指本發明之結合分子對其標靶之親和力，且在數值上使用「KD」值表示。一般而言，較高KD值對應於較弱結合。在一些實施例中，「KD」係藉由放射性標記抗原結合分析(MA)或表面電漿子共振(SPR)分析、使用例如BIAcore™-2000或BIAcore™-3000量測。在某些實施例中，「結合速率」或「締合之速率」或「締合速率」或「k合」，及「解離速率」或「解離之速率」或「解離速率」或「k離」亦利用表面電漿子共振(SPR)技術測定。在其他實施例中，使用Octet®系統來量測「KD」、「k合」及「k離」。

【0086】 如本文所用，術語「競爭結合」係參考由如上序列定義之抗體中之一者使用，意謂實際抗體具有與該序列所限定之抗體結合至相同標靶或靶抗原決定基或結構域或亞域的活性，且為後者之變異體。結合效率(例如動力學或熱力學)可同於或大於或小於後者之效率。舉例而言，結合至受質之平衡結合常數對於兩種抗體而言可不同。

【0087】 如本文所用，術語「維持結合至指定標靶的能力」意謂例如各別變異體的標靶結合親和力為未經修飾之肽之標靶結合親和力的 $\geq 50\%$ 。

【0088】 如本文所用，術語「包含EDB結合域的肽或蛋白質」係指作為整體或其子片段結合至EDB (亦即，含有外域-B的纖維結合蛋白)的肽或蛋白質。

【0089】 其中，肽可為例如具有 ≥ 3 個胺基酸殘基且 ≤ 50 個胺基酸殘基之長度的單體分子(因此，為寡肽或多肽)，而蛋白質可為例如具有一或多種蛋白質的單體或二聚合或多聚合分子，各鏈具有 ≥ 50 個胺基酸殘基之

長度。

【0090】

EDB纖維結合蛋白

纖維結合蛋白(UniProt : P02751)為一種具有細胞外基質之高分子量(約440 kDa)醣蛋白，其結合至稱為整合素之跨膜受體蛋白。與整合素類似，纖維結合蛋白結合細胞外基質組分，諸如膠原蛋白、纖維蛋白及硫酸乙醯肝素蛋白聚醣(例如多配體蛋白聚糖)。

【0091】 纖維結合蛋白已牽涉於癌瘤發展。在肺癌中，纖維結合蛋白表現增加，尤其在非小細胞肺癌中。肺癌細胞與纖維結合蛋白之黏附增強致瘤性且賦予針對誘導細胞凋亡之化學治療劑的抗性。纖維結合蛋白可促進肺腫瘤生長/存活及對療法之抗性，且已論述為代表新抗癌藥物之開發的新穎標靶。

【0092】 纖維結合蛋白以蛋白質二聚體形式存在，該二聚體由藉由一對二硫鍵連接之兩種幾乎一致單體組成。纖維結合蛋白係由單一基因產生，但由單一複本纖維結合蛋白基因產生之其前驅mRNA的替代性剪接發生於編碼EDA、EDB及IIICS域之三個位點且引起若干同功異型物的產生。

【0093】 包含EDA或EDB域之纖維結合蛋白同功異型物由於其在胚胎發育中之重要性及其有限存在於正常成人組織中而稱為癌胚形式。此等同功異型物亦識別為血管生成之重要標記物，血管生成為發育中且為腫瘤細胞在癌症進展中所需之關鍵生理學過程。ED-B纖維結合蛋白表現於腫瘤組織中，尤其表現於乳癌、腦瘤、淋巴瘤細胞及前列腺癌中。ED-B纖維結合蛋白由於其組織特異性表現特徵而為用作治療標靶之引人注目的腫

瘤抗原。

【0094】

IL-12

介白素-12為對免疫系統具有多重生物效應的雜二聚細胞介素。其由兩個亞單元p35及p40構成，兩者均為IL-12、p70之活性形式之分泌所需。介白素-12作用於樹突狀細胞(DC)，引起增強的成熟及抗原呈遞，從而能夠起始針對腫瘤特異性抗原的T細胞反應。其亦驅動DC分泌IL-12，從而產生正反饋機制以擴增反應。一旦反應起始，則IL-12在將免疫系統引向Th1細胞介素概況中發揮基本作用，從而誘導CD4+ T細胞分泌干擾素- γ (IFN- γ)且產生CD8+細胞毒性T細胞反應。

【0095】 IL-12亦為引起其他細胞介素(包括腫瘤壞死因子- α (TNF- α))分泌的強促發炎細胞介素，其與IFN- γ 組合，成為CD4+細胞毒性T淋巴球(CTL)發育的前提條件。另外，IL-12可以經由其誘導IFN- γ 及其他細胞介素來促進先天免疫細胞(諸如巨噬細胞及嗜伊紅血球)活化。此活化接著引起此等細胞分泌IL-12且使得先天反應及後天反應進一步擴增。然而，IL-12及因此IFN- γ 之含量高亦與拮抗分子(諸如IL-10)之誘導及IL-12下游信號傳導分子(諸如STAT4)之耗乏有關。

【0096】 先前利用IL-12作為治療劑之嘗試不成功，因為IL-12最多展示適度抗腫瘤作用，其通常伴隨不可接受的毒性副作用，包括發熱、疲乏、血液變化、高血糖症及/或器官功能異常。

【0097】 如本文所用，「p35」意謂一種多肽，其包含與如下所示的胺基酸序列至少百分之八十(80%)一致的胺基酸序列：

RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIK
LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID:3)。

【0098】 如本文所用，「p40」意謂一種多肽，其包含與如下所示的
胺基酸序列至少百分之八十(80%)一致的胺基酸序列：

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQ
VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAK
NYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV
ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:1)。

【0099】 如本文所用，「IL-12」意謂一種多肽，其(i)包含：

(a) p35或其片段，其中p35包含與下文所示之胺基酸序列至少百分之
八十(80%)一致的胺基酸序列：

RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKT
STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIK
LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (SEQ ID NO:3)

及

(b) p40或其片段，其中p40包含與下文所示之胺基酸序列至少百分之
八十(80%)一致的胺基酸序列：

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQ
VKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCEAK
NYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSV
ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDIIKPDPPKNLQKPLKNSR
QVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASIS
VRAQDRYSSSWSEWASVPCS (SEQ ID NO:1)

且(ii)可以活化IL-12受體。

【0100】

連接子

在某些實施例中，一或多種肽連接子獨立地選自 $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m$ 序列、 $(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ 序列，或 $(\text{Gly}_n\text{-Ser})_m/(\text{Gly}_n\text{-Ala})_m$ 序列之任何組合，其中各 n 獨立地為1至5之整數且各 m 獨立地為0至10之整數。在一些實施例中，肽連接子為 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_m$ ，其中 m 為0至10之整數。在一些實施例中，肽連接子為 $(\text{Gly}_4\text{-Ala})_m$ ，其中 m 為0至10之整數。連接子之實例包括(但不限於)某些實施例，一或多種連接子包括 G_4S 重複，例如 Gly-Ser 連接子 GGGGS (SEQ ID NO : 34)或 $(\text{GGGGS})_m$ ，其中 m 為等於或大於1之正整數。舉例而言， $m=1$ ， $m=2$ ， $m=3$ ， $m=4$ ， $m=5$ 及 $m=6$ ， $m=7$ ， $m=8$ ， $m=9$ 及 $m=10$ 。在一些實施例中，連接子包括 GGGGS (SEQ ID NO : 34)之多個重複，包括(但不限於) $(\text{GGGGS})_3$ 或 $(\text{GGGGS})_4$ 。在一些實施例中， Ser 可經 Ala 置換，例如連接子 G/A ，諸如 (GGGGA) (SEQ ID NO : 35)，或 $(\text{GGGGA})_m$ ，其中 m 為等於或大於1之正整數。在一些實施例中，連接子包括 GGGGA (SEQ ID NO : 35)之多個重複。在其他實施例中，連接子包括 GGGGS (SEQ ID NO : 34)與 GGGGA (SEQ ID NO : 35)之組合及倍增。

【0101】 在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列 GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO : 2)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列 GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO : 4)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列 GSSGG (SEQ ID NO : 6)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列 SSSSG SSSSG SSSSG (SEQ ID NO : 8)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列 GGGAKGGGGKAGGGS (SEQ ID NO : 9)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列

GGGGDGGGGDGGGGS (SEQ ID NO : 10)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO : 11)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列GGGGSGGGGEGGGGS (SEQ ID NO : 12)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列AEAAAKEAAAKEAAKA (SEQ ID NO : 13)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列APAPAPAPAP (SEQ ID NO : 14)。在一些實施例中，連接子包含胺基酸序列APAPAPAPAPAP (SEQ ID NO : 15)。

【0102】

抗EDB連接之IL-12

本發明尤其提供用於治療與EDB纖維結合蛋白表現相關之疾病或病症(包括癌症)的方法及組合物。本文描述新穎組合物及方法，其利用纖維結合蛋白作為標靶來完成IL-12向癌症之定向遞送。此方法有望完全利用IL-12之治療潛力，同時減少全身性毒性且增加IL-12之治療窗。

【0103】 雖然先前已描述含有IL-12及EDB纖維結合蛋白靶向域之其他構築體，但本發明所揭示之組合物驚人地優良。

【0104】 WO2006/119897揭示IL-12與EDB纖維結合蛋白靶向抗體(命名「L19」)組合之三種不同分子形式，該文獻的內容以引用之方式併入本文中。

【0105】 如圖7A中所說明，一種形式為sc(IL-12)-scFv(L19)。該形式由IL-12雜二聚體組成，其中兩個亞單元經由肽連接子連接(因此，為「單鏈」IL-12，或sc(IL-12))，且該IL-12接著經由第二肽連接子連接至亦呈單鏈Fv形式的L19抗體(因此，為scFv(L19))。該形式展示適度的腫瘤靶向能力，與先前技術的發現一致。

【0106】 另一種形式為sc(IL-12)-SIP(L19)之均二聚體，如圖7B中所說明。WO2003/076469之申請人已開發出SIP形式(「小免疫蛋白質」)且亦命名為「小型抗體」。SIP為由兩個亞單元組成的均二聚體，該兩個亞單元包含與CH4域連接的scFv。兩個CH4域藉由二硫橋彼此連接。儘管先前技術指示可使用SIP形式改良L19之腫瘤靶向特性，但未觀測到此結合物之腫瘤吸收增加。

【0107】 另一形式為IL-12 p40與p35亞單元之雜二聚體，該等亞單元彼此藉由二硫橋連接，且各亞單元與scFv (L19)融合，從而形成scFv(L19)-p35/p40-scFv(L19)雜二聚體，如圖7C中所說明。藉由此雜二聚形式，使腫瘤對組合物之吸收達成顯著改良。

【0108】 在WO2013/014149中，申請人已揭示與抗EDA纖維結合蛋白腫瘤靶向抗體(命名為「F8」)連接之IL-12的兩種新替代分子形式，該文獻的內容以引用之方式併入本文中。

【0109】 其中，另一種形式之IL-12免疫結合物包含「單鏈雙功能抗體」。其基本上由兩個scFv抗體與一個五胺基酸短連接子組成(因此形成「雙功能抗體」)，其彼此藉由更長的十五胺基酸肽連接子連接。

【0110】 已表明以IL-12與單特異性F8單鏈雙功能抗體融合為特徵的分子形式(參見圖8B)在腫瘤靶向方面經證實優於(i) scFv(F8)-p35/p40-scFv(F8)雜二聚體(圖8A)，其L19變異體經證實為WO2006/119897中所揭示之最佳形式；或(ii)與雙功能抗體連接的兩個IL-12分子(圖8C)。

【0111】

L19

如本文所用，「L19抗體」意謂結合至EDB纖維結合蛋白或其任何部

分且包含與以下胺基酸序列中之一或多者至少百分之七十五(75%)一致之

胺基酸序列的任何抗體：

L19 VH (SEQ ID NO: 7)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
VSS

L19 VL (SEQ ID NO: 5)

EIVLTQSPGTL SLS PGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

CDR1 VH (SEQ ID NO: 28)

SFSMS

CDR2 VH (SEQ ID NO: 29)

SISGSSGTTYYADSVKG

CDR3 VH (SEQ ID NO: 30)

PFYFDY

CDR1 VL (SEQ ID NO: 31)

RASQSVSSSFLA

CDR2 VL (SEQ ID NO: 32)

YASSRAT

CDR3 VL (SEQ ID NO: 33)

QQTGRIPPT

L19雙功能抗體(SEQ ID NO : 36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVT
VSSGSSGGEIVLTQSPGTL SLS PGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYY
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

【0112】

醫藥組合物

本發明之另一態樣係關於一種醫藥組合物，其包含至少一種本發明結合物及視情況存在之醫藥學上可接受之賦形劑。

【0113】 本發明之醫藥組合物典型地包含治療有效量之根據本發明之結合物及視情況存在之輔助物質，諸如醫藥學上可接受之賦形劑。該等醫藥組合物以醫藥技術中熟知之方式製備。載劑或賦形劑可為液體材料，其可充當活性成分之媒劑或介質。適合載劑或賦形劑為此項技術中所熟知且包括例如穩定劑、抗氧化劑、pH調節物質、控制釋放賦形劑。

【0114】 本發明之醫藥製劑可經調適用於例如非經腸用途，且可以溶液或其類似物之形式投與患者。包含本發明組合物之組合物可投與患者。投藥較佳以「治療有效量」進行，此足以對患者展示益處。此類益處可至少為至少一種症狀的改善。實際投藥量及投藥速率與投藥時程將視治療之性質及嚴重度而定。治療之處方(例如劑量等決定)在一般從業者及其他醫療醫生之職責內。在醫師判斷下，治療可每日、每週兩次、每週一次或依每個月的時間間隔重複進行。

【0115】 經口投與之醫藥組合物可呈錠劑、膠囊、散劑或液體形式。錠劑可以包含固體載劑，諸如明膠或佐劑。液體醫藥組合物通常包含液體載劑，諸如水、石油、動物油或植物油、礦物油或合成油。可包括生理食鹽水溶液，右旋糖或其他醣溶液或二醇(諸如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇)。

【0116】 對於靜脈內注射或在罹患位點注射而言，活性成分將呈非經腸可接受的水溶液形式，其無熱原質且具有適合的pH值、等張性及穩

定性。熟習此項技術者充分能夠使用例如等張媒劑(諸如氯化鈉注射液、林格氏注射液(Ringer's Injection)、乳酸化林格氏注射液)製備適合溶液。視需要可包括防腐劑、穩定劑、緩衝劑、抗氧化劑及/或其他添加劑。

【0117】 另外應理解，本文所揭示之實施例不意欲理解為彼此不相關之個別實施例。用一個特定實施例論述之特徵意欲亦結合本文中所示之其他實施例揭示。若在一種情況下，具體特徵不用一個實施例而用另一實施例揭示，則熟習此項技術者將理解不必意謂該特徵不意欲與該另一實施例組合揭示。熟習此項技術者將理解本申請案之要旨為揭示該特徵亦適用於其他實施例，但僅出於清楚起見且使說明書保持在可管理的卷量，此尚未進行。

【0118】 此外，本文所提及之參考文獻之內容以引用之方式併入。此尤其指揭示標準或常規方法之先前技術文獻。在彼情況下，以引用之方式併入主要目的係提供充分的授權揭示且避免冗長重複。

【0119】 一般而言，本發明之組合物能夠結合至細胞、組織、器官或患者中之特定靶結構，該等靶結構係根據包含EDB結合域之肽或蛋白質之特異性定義。

【0120】 到達標靶後，IL-12刺激T細胞及自然殺手細胞產生IFN γ ，且亦誘導Th1輔助細胞分化。IL-12為先天免疫及細胞介導性免疫之關鍵介體。若構築體中包含EDB結合域之肽或蛋白質對靶結構(例如以贅生性為特徵的受體或細胞外基質蛋白，例如腫瘤、血液學疾病，或處於轉化成癌症之過程中的細胞)具有特異性，則組合物之結合促使IL-12介導強抗癌及抗轉移活性。

【0121】 申請人已驚人地發現，當使用包含含有

GSADGGSSAGGSDAG之胺基酸基元的連接子使IL-12連接至包含EDB結合域的肽或蛋白質(亦即，如WO2013/014149所揭示的雙功能抗體)時，可以達成較佳的腫瘤靶向效能以及優良的生產產量。同時，此變異體之結合行為優於較短GSADGG連接子之結合行為，在本文中命名為「Old」且揭示於WO2013/014149中。

【0122】申請人首先已評估且表徵與L19抗體連接之人類IL-12之八種純系的單鏈雙功能抗體形式(huIL-12L19L19)，其中細胞介素與L19單鏈雙功能抗體之間存在不同的多肽連接子。

【0123】五種純系(命名為：(i)「AKKAS」，(ii)「DDS」，(iii)「(G4S)₃」，(iv)「SAD」及(v)「SES」)含有用於免疫細胞介素與重組抗體結合的連接子，且由於其不同電荷特徵(中性、帶正電、帶負電)而選擇。

【0124】開發出三種其他純系，命名為(vi) $\alpha 3$ 、(vii) AP6及(viii) AP7。就此等三種純系而言，考量且實施Chen等人(2013)中所報導的原理。此評論表明剛性連接子可以具有較佳穩定性且可以維持細胞介素與抗體之間的正確距離，從而增加治療功效。

【0125】連接子(i)-(viii)中無一者先前在此特異性免疫細胞介素中測試。

【0126】驚人地發現，「SAD」連接子大大增強(i)腫瘤靶向效能及(ii)與包含EDB結合域之肽或蛋白質連接之IL-12的生產產量，而不(iii)損害ED-B之結合行為(相較於其他純系)。此非常驚人，即使考量Chen報導之原理，僅SAD連接子得到的組合物相較於「Old」純系(下文更詳細地描述)與本文所述之其他新變異體亦具有多種優良特性。

【0127】最後，對包含WO2013/014149中所揭示之連接子的第九種純系(命名為「Old」)與「SAD」連接子進行比較。驚人地發現，「SAD」連接子儘管與「Old」連接子共享序列的第一部分，亦具有優良的針對ED-B之結合親和力。

【0128】另外，尺寸排阻層析之後，相較於「Old」連接子，「SAD」連接子展示更高單體部分，意謂整個結合物之組裝更高效。預期由「SAD」連接子得到之較高單體部分使總體製造產量增加。

【0129】如本文所用，術語「單鏈雙功能抗體」係指使用短連接子(較佳具有3-10個胺基酸長度，更佳5個胺基酸長度)之兩種單鏈Fv (scFv)抗體的構築體(亦稱為「雙功能抗體」)，該構築體彼此間藉由更長連接子(較佳5-20個胺基酸長度，更佳15個胺基酸長度)、根據以下方案(N→C取向)連接：L19VH-連接子₃-L19VL-連接子₄-L19VH-連接子₃-L19VL。

【0130】根據本發明之一些實施例，雜二聚IL-12蛋白中之第一亞單元為p40且第二亞單元為p35。

【0131】如上文所論述，包含EDA或EDB域之纖維結合蛋白同功異型物由於其對發育的重要性及其在腫瘤中之再表現(與有限存在於正常成人組織中對比)而稱為癌胚形式。

【0132】此等同功異型物亦識別為血管生成之重要標記物，血管生成為發育中且為腫瘤細胞在癌症進展中所需之關鍵生理學過程。

【0133】因此，纖維結合蛋白之外域B (ED-B)為抗癌療法之引人注目之標靶，包括使用如本文中所論述之免疫細胞介素。

【0134】根據本發明之一些實施例，單鏈雙功能抗體可以包含具有互補決定區(CDR)的抗原結合位點，或能夠特異性結合至所關注抗原之抗

體的VH及/或VL域，例如能夠特異性結合至纖維結合蛋白之外域B之抗原的抗體的一或多個CDR或VH及/或VL域。

【0135】 可藉助於互補決定區(CDR)之排列提供抗原結合位點。用於攜帶CDR或CDR集合之結構通常為抗體重鏈或輕鏈序列或其實質性部分，其中CDR或CDR集合定位的位置對應於由重排免疫球蛋白基因編碼之天然存在之VH及VL抗體可變域之CDR或CDR集合。免疫球蛋白可變域之結構及位置可藉由參考以下文獻來確定：Kabat等人(1987)(Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版, 美國健康及人類服務部(US Department of Health and Human Services))及其更新版，現可在網際網路上獲得(在immuno.bme.nwu.edu或使用任何搜尋引擎找到「Kabat」)。

【0136】 CDR區或CDR意指如以下文獻中所定義之免疫球蛋白重鏈及輕鏈的高變區：Kabat等人(1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版, 美國健康及人類服務部(Kabat等人, (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美國健康及人類服務部, 公眾服務署, NIH, Washington, 及後續版本)。抗體典型地含有3個重鏈CDR及3個輕鏈CDR。術語CDR或CDRs在本文中用於指，根據個案，此等區域之一或此等區域中之若干者或甚至全部，含有負責抗體對其所識別之抗原或抗原決定基親和結合之胺基酸殘基中的大部分。

【0137】 因此，單鏈雙功能抗體可包含具有一個、兩個、三個、四個、五個或六個CDR或抗體L19之VH及/或VL域的抗原結合位點。

【0138】 根據本發明之一些實施例，單鏈雙功能抗體可以包含具有SEQ ID NO 28-33中所述之抗體L19之互補決定區(CDR)的抗原結合位點。抗原結合位點可包含分別闡述於SEQ ID NO 7及5中之抗體L19之VH

及/或VL域。

【0139】 抗原結合位點可包含抗體L19之一個、兩個、三個、四個、五個或六個CDR。L19之CDR之胺基酸序列為：

SEQ ID NO：28 (VH CDR1)；

SEQ ID NO：29 (VH CDR2)；

SEQ ID NO：30 (VH CDR3)；

SEQ ID NO：31 (VL CDR1)；

SEQ ID NO：32 (VL CDR2)，及/或

SEQ ID NO：33 (VL CDR3)。

【0140】 SEQ ID NO 28-30為人類單株抗體L19之VH CDR區(分別為1-3)的胺基酸序列。SEQ ID NO 31-33為人類單株抗體L19之VL CDR區(分別為1-3)的胺基酸。抗體L19之VH及VL域的胺基酸序列分別對應於SEQ ID NO 7及5。

【0141】 根據本發明之一些實施例，單鏈雙功能抗體包含以下中之至少一者：

a)包含本文中定義為SEQ ID NO 28-30之3個重鏈CDR及本文中定義為SEQ ID NO 31-33之3個輕鏈CDR的集合

b)在本文中定義為SEQ ID NO 7之VH中之3個重鏈CDR的集合及在本文中定義為SEQ ID NO 5之VL中之3個輕鏈CDR的集合

c) a)或b)之重鏈CDR/輕鏈CDR組合，其限制條件為CDR中之至少一者相對於如a)或b)中所指定之各別CDR具有至多3個胺基酸取代，同時維持其結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)的能力，

d) a)或b)之重鏈CDR/輕鏈CDR組合，其限制條件為CDR中之至少一

者相對於如a)或b)中所指定之各別CDR具有 $\geq 66\%$ 的序列一致性，同時維持其結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)的能力，

其中CDR嵌入適合的蛋白質構架中以便能夠結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

【0142】 在一些實施例中，至少一個CDR相對於各別CDR具有 $\geq 67\%$ 、較佳 $\geq 68\%$ 的序列一致性，更佳為 $\geq 69\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 71\%$ 、 $\geq 72\%$ 、 $\geq 73\%$ 、 $\geq 74\%$ 、 $\geq 75\%$ 、 $\geq 76\%$ 、 $\geq 77\%$ 、 $\geq 78\%$ 、 $\geq 79\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 81\%$ 、 $\geq 82\%$ 、 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 中之任一者，或最佳 $\geq 99\%$ 序列一致性。

【0143】 在另一實施例中，至少一個CDR已藉由親和力成熟或其他修飾加以修飾，相較於上文所揭示之序列，產生序列修飾。

【0144】 在一些實施例中，至少一個CDR相對於如a)或b)中所指定之各別CDR具有至多2個且較佳1個胺基酸取代。

【0145】 根據本發明之一些實施例，單鏈雙功能抗體包含以下中之至少一者：

a) SEQ ID NO 7及5中所述之抗體L19之VH及VL域

b) a)之重鏈/輕鏈可變域序列對，其限制條件為該等結構域中之至少一者分別相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5具有 $\geq 80\%$ 之序列一致性，及/或

c) a)之重鏈/輕鏈可變域序列對，其限制條件為該等結構域中之至少一者分別相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5具有至多10個胺基酸取代，同時維持其結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)的能力。

【0146】 在一些實施例中，至少一個結構域分別相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5具有 $\geq 81\%$ 、較佳 $\geq 82\%$ 、更佳 $\geq 83\%$ 、 $\geq 84\%$ 、 $\geq 85\%$ 、 $\geq 86\%$ 、 $\geq 87\%$ 、 $\geq 88\%$ 、 $\geq 89\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 96\%$ 、 $\geq 97\%$ 、 $\geq 98\%$ 或最佳 $\geq 99\%$ 之序列一致性。

【0147】 在一些實施例中，至少一個結構域分別相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5具有至多9個、較佳至多8個、更佳至多7個、6個、5個、4個、3個或2個且最佳至多1個胺基酸取代。

【0148】 根據本發明之一些實施例，單鏈雙功能抗體中之至少一個胺基酸取代係保守胺基酸取代。

【0149】 根據另一實施例，組合物具有全長結構「[p40]-[連接子1]-[p35]-[SAD 連接子]-[L19VH]-[連接子3]-[L19VL]-[連接子4]-[L19VH]-[連接子5]-[L19VL]」。

【0150】 根據另一個實施例，組合物具有根據SEQ ID NO 16之全長序列。

【0151】

病症

根據本發明之另一態樣，提供根據以上描述之組合物之用途，其係用於製造用於治療人類或動物個體中贅生性疾病或用於預防此類病狀之藥劑，該人類或動物個體經診斷、罹患或面臨產生產生贅生性疾病的風險。

【0152】 根據本發明之另一態樣，根據前述技術方案中任一方案之組合物之用途，其係用於製造用於抑制人類或動物個體中血管生成之藥劑。

【0153】 因此，如本文所述之結合物可用於治療贅生性疾病或藉由

活體內使IL-12靶向新生血管來抑制血管生成之方法中。

【0154】 術語「贅生性疾病」涵蓋惡性轉化及癌症，包括腫瘤及血液疾病。

【0155】 亦涵蓋一種藉由使藥劑(特定而言，治療劑，例如IL-12)靶向患者中之新生血管來治療癌症或抑制血管生成的方法，該方法包含向患者投與治療有效量之如本文所述之結合物。可使用如本文所述之組合物治療的病狀包括癌症、其他腫瘤及贅生性病狀。組合物可用於抑制血管生成且藉此治療類風濕性關節炎、糖尿病性視網膜病變、年齡相關之肌肉退化、血管瘤、腫瘤及癌症。治療可包括預防性治療。組合物亦可在診斷方法中投與，例如靶向及診斷可能與上述病狀中之任一者相關的血管生成。亦可根據組合物中所含之蛋白質治療劑或診斷劑之性質及靶向部分之特異性來診斷及治療其他疾病及病狀。

【0156】 適於如本文所述治療之癌症包括任何類型之實體或非實體癌症或惡性淋巴瘤，具體而言，肝癌、淋巴瘤、白血病(例如急性骨髓白血病)、肉瘤、皮膚癌、膀胱癌、乳癌、子宮癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、頭頸癌、食道癌、胰臟癌、腎癌、胃癌及腦癌。癌症可具家族性或偶發性。癌症可具轉移性或非轉移性。

【0157】 較佳地，癌症為選自以下之群之癌症：腎癌、乳癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、肉瘤(例如腸胃基質腫瘤)、皮膚癌(例如黑色素瘤)、結腸直腸癌及神經內分泌腫瘤。

【0158】 在一些實施例中，贅生性疾病之特徵為ED-B纖維結合蛋白之表現或過度表現。

【0159】 本發明之組合物可經由任何適合之途徑投與需要治療之患

者，通常藉由注射至血流中及/或直接注射至待治療之位點，例如腫瘤或腫瘤血管。精確劑量及其投藥頻率將視多種因素、治療途徑、待治療區域(例如腫瘤)之尺寸及位置而定。

【0160】 就反應而言，若個體之癌症(例如血液癌症，例如癌細胞生長、增殖及/或存活)之參數遲延或降低可偵測的量，例如約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多，如藉由任何適當量測方式所測定，例如根據腫塊、細胞計數或體積所測定，則個體對治療有反應。在一個實例中，若個體經歷的預期壽命延長超過未投與療法之情況下所預測之預期壽命約5%、10%、20%、30%、40%、50%或更多，則個體對治療有反應。在另一實例中，若個體具有增加之無疾病存活率、總存活率或增加之進展時間，則個體對治療有反應。若干方法可用於確定患者是否對治療有反應，包括例如NCCN腫瘤學臨床實務指南(Clinical Practice Guidelines in Oncology)(NCCN Guidelines[®])提供之標準。

【0161】

組合療法

視所治療之病狀而定，組合物可單獨或與其他療法同時或依序組合投與。其他療法可包括投與適合劑量之疼痛緩解藥物，諸如非類固醇消炎藥(例如阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)或酮基布洛芬)或鴉片劑，諸如嗎啡鹼(morphine)或止吐藥。

【0162】 根據本發明之另一態樣，提供根據以上描述之組合物或醫藥組合物與一或多種治療活性化合物之組合。

【0163】 根據本發明之另一態樣，提供一種治療或預防與ED-B纖

維結合蛋白表現或過度表現相關之病症或病狀的方法，其包含向有需要之個體投與有效量的根據以上描述之組合物、醫藥組合物或組合。

【0164】

套組

根據本發明之另一態樣，提供組成部分之套組，其包含：

- a)根據以上描述之組合物、醫藥組合物或組合，
- b)用於投與該組合物、組合物或組合之裝置，及
- c)使用說明書。

【0165】 在一些實施例中，此類組成部分之套組包含具有適合患者說明書之預裝藥注射器。在另一個實施例中，此類組成部分之套組包含具有適合使用者說明書的輸注瓶。

【0166】 套組之組分較佳為無菌的且存在於密封小瓶或其他容器中。

【0167】 套組可進一步包含在本文所述之方法中使用組分之說明書。套組之組分可包含或封裝於容器中，例如袋、盒、缸、罐或泡殼包裝。

【0168】

實例

雖然已在圖式及前述描述中詳細地說明及描述了本發明，但此類說明及描述應被視為說明性或例示性的，而非限制性的；本發明不限於所揭示實施例。熟習此項技術者在實施本發明時經由研究附圖、揭示內容和所附申請專利範圍可以理解且實現所揭示實施例的其他變化形式。在申請專利範圍中，詞語「包含」不排除其他元件或步驟，且不定冠詞「一(a或

an)」不排除複數個。某些措施敘述於相互不同之附屬項中的純粹事實不表示此等措施不能有利地組合使用。申請專利範圍中之任何參考符號均不應視為限制範疇。

【0169】 本文所揭示之全部胺基酸序列均以N端至C端展示；本文所揭示之全部核酸序列均以5'→3'展示。

【0170】

實例1

申請人已驚人地發現，當某些連接子用於將IL-12與單鏈雙功能抗體(亦即，WO2013/014149中所揭示之優良形式)連接時，可達成較佳的腫瘤靶向效能以及優良的生產產量。

【0171】 申請人已評估且表徵與L19抗體連接之人類IL-12之八種純系的單鏈雙功能抗體形式(huIL-12L19L19)，其中細胞介素與L19單鏈雙功能抗體之間存在不同的多肽連接子。

【0172】 五種純系(命名為：(i)「AKKAS」，(ii)「DDS」，(iii)「(G4S)₃」，(iv)「SAD」及(v)「SES」)含有用於免疫細胞介素與重組抗體結合的連接子，且由於其不同電荷特徵(中性、帶正電、帶負電)而選擇。

【0173】 開發出三種其他純系，命名為(vi) $\alpha 3$ 、(vii) AP6及(viii) AP7。就此等三種純系而言，考量且實施Chen等人(2013)中所報導的教示內容。此評論表明剛性連接子可以具有較佳穩定性且可以維持細胞介素與抗體之間的正確距離，從而增加治療功效。

【0174】 連接子(i)-(viii)中無一者先前在此特異性免疫細胞介素中測試。

【0175】驚人地發現，相較於其他純系，「SAD」連接子大大增強腫瘤靶向效能及與單鏈雙功能抗體連接之IL-12的生產產量，同時能夠同等地結合至ED-B。

【0176】

材料及方法

實例中所測試的變異體具有以下共同結構：

結構域 (N→C)	p40	連接子 ₁	p35	連接子 ₂	L19VH	連接子 ₃	L19VL	連接子 ₄	L19VH	連接子 ₃	L19VL
SEQ ID NO	1	2	3	4, 9 - 15	7	6	5	8	7	6	5

【0177】如表2中所詳述，不同變異體(本文中亦稱為「純系」)在連接子2之序列中彼此不同：

連接子2	SEQ ID NO	序列
AKKAS	9	GGGAKGGGKAGGGS
DDS	10	GGGGDGGGGDGGGGS
(G4S) ₃	11	GGGSGGGSGGGGS
SAD	4	GSADGGSSAGGSDAG
SES	12	GGGSGGGGEGGGGS
α3	13	AEAAAKEAAAKEAAKA
AP6	14	APAPAPAPAPAP
AP7	15	APAPAPAPAPAPAP

【0178】

利用不同連接子選殖八種融合蛋白

【0179】 huIL-12L19L19編碼序列已藉由組裝不同PCR片段：L19抗體及IL12有效負載來產生。使用適合的引子，自先前產生之融合蛋白L19-IL2模板對L19基因進行PCR擴增。用適合引子對第二L19基因進行PCR擴增。

【0180】同時，使用適合的引子，自先前產生之基於IL12的免疫細胞介素對IL-12之p35域的一部分基因進行PCR擴增。對兩個中間片段進行PCR組裝(以產生P35-L19片段)，用BamHI/BspEI進行雙重消化且選殖入

含有p35的雙重消化載體中。新產生的p35-L19載體隨後用BspEI/NotI-HF進行雙重消化且與第二L19雙功能抗體片段基因連接。片段p35-L19L19藉由BamHI/NotI-HF消化且選殖於攜帶p40次單位基因之先前經雙重消化之哺乳動物細胞表現載體pcDNA3.1 (+)中，從而產生全長IL12-L19L19。

【0181】 IL12與單鏈雙功能抗體L19片段之間的不同連接子係藉助於PCR組裝片段「A」(編碼p35之一部分與連接子)及片段「B」(編碼連接子及抗體之一部分)來插入。使用適合引子，自作為模板的IL12-L19L19擴增不同片段「A」及片段「B」。

【0182】 針對純系AP7設計的選殖策略引起突變型純系(命名為AP6)產生。所有PCR產物用BamHI-HF及BspEI限制酶進行雙重消化且與P35-L19L19 pcDNA3.1質體連接。擴增所得質體，用NotI-HF及BamHI-HF限制酶進行雙重消化且將插入序列次選殖至含有IL12之pcDNA3.1質體中。擴增所得DNA質體且用於細胞轉染。

【0183】

具有不同連接子之八種融合蛋白的表現純化

為了產生各種人類IL-12融合體，使用懸浮液中之CHO-S細胞。利用短暫基因表現來表現huIL-12L19L19變異體。為了1 ml產量，將懸浮液中的 4×10^6 個CHO-S細胞離心且再懸浮於1 mL適於CHO-S的培養基中。接著將每百萬個細胞0.625 μ g質體DNA、隨後2.5 μ g聚乙烯亞胺(PEI；1 mg/mL水溶液，pH 7.0)添加至細胞中且輕輕混合。經轉染之培養物在振盪培育箱中、在31°C下培育6天。

【0184】 最後，藉由短暫基因表現而產生的融合蛋白係藉由蛋白質A親和層析而自細胞培養基中純化且接著相對於PBS透析。

【0185】

SDS-PAGE

藉由SDS-PAGE 10%及SDS-PAGE 12%，在還原及非還原條件下分析融合蛋白之正確分子量。

【0186】

ELISA

為了檢查各種IL-12融合體之正確結合，Elisa盤用50 ug/ml纖維結合蛋白域7B89塗佈隔夜(參見WO2001/062800 A1，其內容以引用之方式併入本文中)。免疫細胞介素係在10ug/ml及1 ug/ml下測試。使用蛋白質A辣根過氧化酶作為第二試劑。分析係使用BM-Blue POD可溶性受質顯影。藉由添加333 mM H₂SO₄來中止比色反應且使用微量滴定盤讀取器量測波長450 nm及650 nm下的吸光度。

【0187】

尺寸排阻層析及Biacore

在使用Superdex 200增加管柱之ÄKTA FPLC系統上進行尺寸排阻層析。在表面電漿子共振實驗中，藉由Biacore X100儀器、使用經純化的huIL-12L19L19純系、在塗有纖維結合蛋白7B89域的CM5晶片上進行親和力量測。樣品係以連續稀釋液(1 μM至250 nM濃度範圍)形式注射。

【0188】

免疫螢光

為證實各種huIL-12融合體結合癌細胞之能力，對冷凍的同基因F9畸胎癌試樣冷凍切片(8 um)執行免疫螢光術。腫瘤切片藉由冰冷的丙酮固定(5分鐘)。固定之後，洗滌蓋玻片且用含20%胎牛血清之PBS阻斷45分鐘。

5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度之HuIL-12L19L19純系於2% BSA/PBS溶液中、在室溫下添加1小時。蓋玻片接著用PBS洗滌兩次且二次抗體小鼠抗人類介白素-12於2% BSA/PBS溶液中(最終稀釋度1:1000)在室溫下添加1小時。蓋玻片接著用PBS再次洗滌兩次且添加三次抗體山羊抗小鼠(最終稀釋度1:500)。使用DAPI將細胞核對比染色。

【0189】

放射性標記及活體內腫瘤靶向

為證實各種IL-12融合體活體內結合腫瘤之能力，藉由生物分佈分析來評估其靶向能力。100 μg 各IL-12L19L19純系用 ^{125}I 及氯胺T水合物進行放射性碘標記且在PD10管柱上純化。將經放射性標記之蛋白質注射至皮下植有F9鼠類畸胎癌之免疫勝任小鼠的外側尾靜脈中。每隻小鼠之注射劑量在4與9 μg 之間變化。注射之後24小時處死小鼠。將器官稱重且使用Packard Cobra γ 計數器對放射性計數。代表性器官之放射活性含量係以每公克組織之注射劑量百分比(% ID/g \pm 標準誤差)表示。

【0190】

結果

選殖、表現及SDS-PAGE

成功地選殖huIL-12L19L19融合蛋白之八種變異體，每一種在細胞介素與L19單鏈雙功能抗體之間使用不同多肽連接子。SDS-PAGE表徵顯示所有變異體的分子量為約120 kDa，證實預期的蛋白質尺寸(約109 kDa，未發生糖基化)。所有變異體的表現產量(根據在CHO-S細胞中的短暫基因表現)在3.5與5 mg/L之間的範圍內。驚人地，命名為「SAD」的純系展示9 mg/L之產量，顯著高於其他7種純系之產量。結果展示於圖1

中。

【0191】

ELISA

在ELISA中，八種純系 $\alpha 3$ 、AP6、AP7、DDS、SES、AKKAS、 $(G4S)_3$ 及SAD皆證實對人類纖維結合蛋白之結構域7B89的結合(均在10 $\mu\text{g/ml}$ 及1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下)。結果展示於圖2中。

【0192】

BiaCore

藉由Biacore分析，在人類纖維結合蛋白所塗的晶片上對結構域7B89進行更精確的親和力常數測定(圖3)。樣品係以濃度等於1000 nM、750 nM、500 nM及250 nM的連續稀釋液形式注射(圖3)。藉由Biacore X100評估軟體估算表觀KD。

【0193】

尺寸排阻層析

經由尺寸排阻層析(SEC-200增加)來表徵八種純系 $\alpha 3$ 、AP6、AP7、DDS、SES、AKKAS、 $(G4S)_3$ 及SAD，其中所有純系均展示類似的分佈，其中主峰對應於單體免疫細胞介素(圖4)。

【0194】

免疫螢光

使用純系 $\alpha 3$ 、AP6、AP7、DDS、SES、AKKAS、 $(G4S)_3$ 及SAD，對冷凍的同基因F9畸胎癌試樣冷凍切片(8 μm)進行免疫螢光實驗。相較於陰性對照，所有純系的血管均展示特異性結合(圖5)。

【0195】

活體內腫瘤靶向

藉由生物分佈分析來評估活體內靶向。八種純系 $\alpha 3$ 、AP6、AP7、DDS、SES、AKKAS、(G4S)₃及SAD以及陽性對照(與鼠類IL-12連接的L19單鏈雙功能抗體)用¹²⁵I進行放射性碘標記且注射(4-9 μg 蛋白質/動物)至皮下植有F9鼠類畸胎癌的免疫勝任小鼠中。注射之後24小時計數之放射性展示所有純系均在腫瘤中聚積，然而，相較於其他七種純系，「SAD」純系優良聚積於腫瘤中。(圖6)。

【0196】

實例2

在另一組比較實驗中驚人地發現，就結合能力、單體分佈及腫瘤靶向能力而言，「SAD」連接子亦優於WO2013/014149中所揭示之舊(且較短)GSADGG連接子(SEQ ID NO 26)。

【0197】

材料及方法

此實例中所測試的變異體具有以下共同結構：

結構域(N→C)	p40	連接子 ₁	p35	連接子 ₂	L19VH	連接子 ₃	L19VL	連接子 ₄	L19VH	連接子 ₃	L19VL
SEQ ID NO	1	2	3	4, 26	7	6	5	8	7	6	5

【0198】 不同變異體(本文中亦稱為「純系」)在連接子2之序列上彼此不同：

連接子2	SEQ ID NO	序列
SAD	4	GSADGGSSAGGSDAG
Old	26	GSADGG

【0199】

融合蛋白之選殖

沿著上述株系選殖融合蛋白，該等融合蛋白包含經由6或15個胺基酸

連接子與L19抗體融合的huIL-12，呈單鏈雙功能抗體形式(分別亦即，huIL-12L19L19「Old」及huIL-12L19L19「SAD」變異體)。

【0200】

融合蛋白之表現

在懸浮液調適的CHO細胞培養物中，藉由短暫基因表現來產生融合蛋白，該等融合蛋白包含經由6或15個胺基酸連接子與L19抗體融合的huIL-12，呈單鏈雙功能抗體形式(分別亦即，huIL-12L19L19「Old」及huIL-12L19L19「SAD」變異體)。轉染之後，使細胞在31°C下、在振盪條件下、在ProCHO-4培養基(補充有4 mM超麩醯胺酸)中維持6天，隨後藉由離心收穫培養物上清液且進一步處理以純化融合蛋白。

【0201】

使用蛋白質A樹脂純化融合蛋白

使轉染之CHO細胞懸浮液培養物在4°C下以5000 rpm離心30分鐘。藉由使用0.45 μ m過濾器過濾來進一步澄清上清液。將蛋白質A樹脂添加至經過濾的上清液中且在振盪條件下培育混合物約1小時。接著在液相層析管柱中收集樹脂，且用「緩衝液A」(100 mM NaCl、0.5 mM EDTA、0.1% Tween 20/PBS pH 7.4)洗滌，隨後用「緩衝液B」(500 mM NaCl、0.5 mM EDTA/PBS pH 7.4)進行第二次洗滌。包含huIL-12之融合蛋白藉由重力流、使用100 mM TEA溶離。收集等分試樣且合併含有融合蛋白之溶離份(如藉由UV光譜法所證實)且相對於PBS透析隔夜。

【0202】

融合蛋白之尺寸排阻層析

在ÄKTA-FPLC系統上，使用Superdex 200增加10/300 GL管柱，以

PBS作為操作緩衝液，對融合蛋白進行尺寸排阻層析。將100 μ l蛋白質溶液注射至迴路中且自動注射至管柱上。評估隨時間變化的280 nm UV吸光度。利用UNICORN軟體之峰積分函數來分析融合蛋白之SEC分佈，以定量單體分率相對於總面積%或相對於峰面積%的百分比。為排除由於樣品裝載量或樣品緩衝液中存在之鹽所致的峰值偽影，僅考慮滯留體積5-17.5 mL之間的時間進行定量。

【0203】

BIACore

在表面電漿子共振實驗中，藉由BiacoreX100儀器、使用經純化的「Old」及「SAD」純系、在纖維結合蛋白7B89域剛塗佈的CM5晶片上進行親和力量測。樣品係以濃度等於250 nM、125 nM及62.5 mM的連續稀釋液注射(圖10)。藉由Biacore X100評估軟體估算表觀KD。

【0204】

放射性標記及活體內腫瘤靶向

純化之蛋白質樣品 huIL-12L19L19 「SAD」(使用連接子GSADGGSSAGGSDAG, SEQ ID NO 4)及huIL-12L19L19 「Old」(使用連接子GSADGG, SEQ ID NO 26)(100 μ g)用¹²⁵I及氫胺T水合物進行放射性碘標記且在PD10管柱上純化。蛋白質A親和層析之後，對蛋白質進行放射性碘標記。將蛋白質注射至皮下植有F9鼠類畸胎癌之免疫勝任(129/Sv)小鼠的外側尾靜脈中。每隻小鼠之注射劑量在10與11 μ g之間變化。注射之後24小時處死小鼠。將器官樣品稱重且使用Packard Cobra γ 計數器對放射性計數。計算不同器官中之蛋白質吸收率且以每公克組織之注射劑量百分比(% ID/g \pm 標準誤差)表示。根據Tarli等人(1999)，依據腫

瘤生長來調整腫瘤中之蛋白質吸收率。

【0205】

結果

融合蛋白之表現及純化及尺寸排阻層析

藉由在 CHO 細胞中短暫基因表現來產生兩種 huIL-12L19L19 「SAD」及 huIL-12L19L19 「Old」變異體。雙重複進行實驗，其中在不同日進行兩組產生實驗，分別產生批料 A 及 B。藉由蛋白質 A 親和層析進行單步純化且相對於 PBS 透析之後，藉由尺寸排阻層析來評估蛋白質樣品之均質性(圖9)。兩種蛋白質變異體均展示一定程度之蛋白質聚集，如以早期滯留體積溶離之高分子量變異體之存在所突出顯示。huIL-12L19L19 「SAD」在兩種情況下均展示較佳分佈，如藉由使用 UNICORN 軟體之峰積分函數對蛋白質之單體部分進行的定量所證實。的確，huIL-12L19L19 「SAD」變異體的聚集傾向低於 huIL-12L19L19 「Old」，此考慮單體峰面積相對於基線上之曲線下總面積的百分比(平均值分別為：54.57% 相對於 46.69%)，或單體峰面積相對於所有積分峰值之總和的百分比(平均值分別為：58.83% 相對於 52.74%)(表1)。

蛋白質	連接子 長度(胺 基酸)	批料	單體峰滯 留體積 (mL)	單體峰面積/ 總面積(*) (%)	平均面積/ 總面積(*) (%)	單體峰面 積/峰面積 (°) (%)	平均面 積/峰面 積(°) (%)
huIL- 12L19L19 「SAD」	15	A	11.70	54.06	54.57	58.51	58.83
huIL- 12L19L19 「SAD」	15	B	11.72	55.08		59.14	
huIL- 12L19L19 「Old」	6	A	11.87	46.73	46.69	48.99	52.74

huIL-12L19L19 「Old」	6	B	11.86	46.65		56.48	
------------------------	---	---	-------	-------	--	-------	--

【0206】 表1：藉由UNICORN軟體之峰積分函數所評估之不同融合蛋白之單體分率的定量。(*)峰面積相對於基線上之曲線下總面積的百分比。(°)峰面積相對於所有積分峰值之總和的百分比。

【0207】

Biacore

藉由Biacore X100評估軟體估算「Old」純系(使用連接子GSADGG的huIL-12L19L19「Old」)的表觀KD為6.7 nM且「SAD」純系(使用連接子GSADGGSSAGGSDAG的huIL-12L19L19「SAD」)的表觀KD為3.8 nM (圖10)。

【0208】

活體內腫瘤靶向

注射之後24小時計數之放射性表明，「SAD」純系相較於「Old」純系具有出乎意料的優良腫瘤吸收率(圖11)。

【0209】

實例3

評估huIL-12L19L19「SAD變異體」在人類患者中的效力，該等人類患者患有惡性黑色素瘤、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌、尿道上皮癌、頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、小型隨體高不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺乏型(dMMR)轉移性結腸直腸癌、肝細胞癌、胃癌、皮膚鱗狀細胞癌、子宮頸癌及彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)。至少一組患者展現作為先前最近療法投與之基於免疫檢查點阻斷療法之方案的疾病進展。

【0210】 患者藉由靜脈內投與8週每週一次來接受huIL-12L19L19

「SAD」變異體。患者接受的劑量為4 µg/kg；8 µg/kg；12 µg/kg；16 µg/kg；或20 µg/kg。

【0211】 患者自治療開始隨訪6個月，或直至撤回同意書或直至進行性疾病。

【0212】 利用融合分子及IL12部分之夾心捕捉，評估IL12-L19L19L19-L12之藥物動力學分析。藉由表面電漿子共振分析及夾心捕捉術來測試人類抗融合蛋白抗體(HAFA)。使用RECIST (1.1版)針對實體腫瘤或以LUGANO準則作為惡性淋巴瘤評估準則來評估第8週、第16週及第24週的抗腫瘤活性，例如功效。

【0213】

其他實施例

根據第一組實施例，提供以下各者：

1. 一種結合物，包含

a)具有第一及第二亞單元之雜二聚IL-12蛋白，

b)單鏈雙功能抗體，及

c)介於IL-12蛋白與單鏈雙功能抗體之間的連接子，該連接子包含含有SAD的胺基酸基元。

2. 根據第1點之結合物，其中該SAD連接子包含胺基酸基元GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO：4)。

3. 根據第1點至第2點中任一點之結合物，其中該雜二聚IL-12蛋白之第一亞單元為p40且第二亞單元為p35。

4. 根據第1點至第3點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體具單特異性或雙特異性。

5. 根據第1點至第4點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

6. 根據第1點至第5點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體包含兩個L19 VH域及兩個L19 VL域。

7. 根據第1點至第6點中任一點之結合物，其具有全長結構[p40]-[連接子 1]-[p35]-[SAD 連接子]-[L19VH]-[連接子 3]-[L19VL]-[連接子 4]-[L19VH]-[連接子 3]-[L19VL]。

8. 根據第1點至第7點中任一點之結合物，其具有根據SEQ ID NO：16之全長序列。

9. 一種根據前述要點中任一點之結合物之用途，其係用於製造用於治療人類或動物個體中產生贅生性疾病或用於預防此類病狀之藥劑，該個體經診斷、罹患或面臨產生贅生性疾病的風險。

10. 一種根據前述要點中之任一點之結合物之用途，其係用於製造用於抑制人類或動物個體中血管生成之藥劑。

11. 一種醫藥組合物，其至少包含根據第1點至第8點中任一點之結合物及視情況存在之一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

12. 一種組合，其包含(i)根據第1點至第8點中任一點之結合物或根據第11點之醫藥組合物及(ii)一或多種治療活性化合物。

13. 一種用於治療或預防與ED-B纖維結合蛋白表現或過度表現相關之病症或病狀的方法，其包含向有需要之個體投與有效量的根據第1點至第8點中任一點之結合物、根據第11點之醫藥組合物或根據第12點之組合。

14. 一種組成部分之治療套組，其包含：

a)根據第1點至第8點中任一點之結合物、根據第11點之醫藥組合物或根據第12點之組合，

b)用於投與該結合物、組合物或組合之裝置，及

c)使用說明書。

【0214】 根據第二組實施例，提供以下各者：

1. 一種結合物，包含

a)具有第一及第二亞單元之雜二聚IL-12蛋白，

b)單鏈雙功能抗體，及

c)介於該IL-12蛋白與該單鏈雙功能抗體之間的連接子，該連接子包含含有GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO：4)之胺基酸基元。

2. 根據第1點中任一點之結合物，其中該雜二聚IL-12蛋白之第一亞單元為p40且第二亞單元為p35。

3. 根據第1點至第2點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體具單特異性或雙特異性。

4. 根據第1點至第3點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

5. 根據第1點至第4點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體包含兩個L19 VH域及兩個L19 VL域。

6. 根據第1點至第5點中任一點之結合物，其具有全長結構[p40]-[連接子1]-[p35]-[SAD連接子]-[L19VH]-[連接子3]-[L19VL]-[連接子4]-[L19VH]-[連接子3]-[L19VL]。

7. 根據第1點至第6點中任一點之結合物，其具有根據SEQ ID NO：16之全長序列。

8. 一種根據前述要點中任一點之結合物之用途，其係用於製造用於治療人類或動物個體中贅生性疾病或用於預防此類病狀之藥劑，該個體經診斷、罹患或面臨產生贅生性疾病的風險。

9. 一種根據前述要點中之任一點之結合物之用途，其係用於製造用於抑制人類或動物個體中血管生成之藥劑。

10. 一種醫藥組合物，其至少包含根據第1點至第7點中任一點之結合物及視情況存在之一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

11. 一種組合，其包含(i)根據第1點至第7點中任一點之結合物或根據第10點之醫藥組合物及(ii)一或多種治療活性化合物。

12. 一種用於治療或預防與ED-B纖維結合蛋白表現或過度表現相關之病症或病狀的方法，其包含向有需要之個體投與有效量的根據第1點至第7點中任一點之結合物、根據第10點之醫藥組合物或根據第11點之組合。

13. 一種組成部分之治療套組，其包含：

a)根據第1點至第7點中任一點之結合物、根據第10點之醫藥組合物或根據第11點之組合，

b)用於投與該結合物、組合物或組合之裝置，及

c)使用說明書。

【0215】 根據第三組實施例，提供以下各者：

1. 一種結合物，包含

a)具有第一及第二亞單元之雜二聚IL-12蛋白，

b)單鏈雙功能抗體，及

c)介於該IL-12蛋白與該單鏈雙功能抗體之間的連接子，該連接子包

含含有GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO : 4)之胺基酸基元。

2. 根據第1點之結合物，其中該雜二聚IL-12蛋白之第一亞單元為p40且第二亞單元為p35。

3. 根據第1點至第2點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體具單特異性或雙特異性。

4. 根據第1點至第3點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

5. 根據第1點至第4點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體包含具有SEQ ID NO 28至33中所述之抗體L19之互補決定區(CDR)的抗原結合位點。

6. 根據第1點至第5點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體包含SEQ ID NO 7及5中所述之抗體L19的VH及VL域。

7. 根據第1點至第6點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體包含以下中之至少一者：

a)第6點之重鏈/輕鏈可變域序列對，其限制條件為該等結構域中之至少一者分別相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5具有 $\geq 80\%$ 之序列一致性，且/或

b)第6點之重鏈/輕鏈可變域序列對，其限制條件為結構域中之至少一者分別相對於SEQ ID NO 7或SEQ ID NO 5具有至多10個胺基酸取代，同時維持其結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)的能力。

8. 根據第1點至第7點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體中之至少一個胺基酸取代為保守胺基酸取代。

9. 根據第1點至第8點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體

- 相較於第5點或第6點之抗體之一，對纖維結合蛋白之外域B (ED-B)具有 $\geq 50\%$ 之標靶結合親和力，且/或

- 與第5點或第6點之抗體之一競爭結合以結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

10. 根據第1點至第9點中任一點之結合物，其中該單鏈雙功能抗體包含兩個L19 VH域及兩個L19 VL域。

11. 根據第1點至第10點中任一點之結合物，其具有全長結構[p40]-[連接子1]-[p35]-[SAD連接子]-[L19VH]-[連接子3]-[L19VL]-[連接子4]-[L19VH]-[連接子3]-[L19VL]。

12. 根據第1點至第11點中任一點之結合物，其具有根據SEQ ID NO：16之全長序列。

13. 一種根據前述要點中任一點之結合物之用途，其係用於製造用於治療人類或動物個體中贅生性疾病或用於預防此類病狀之藥劑，該個體經診斷、罹患或面臨產生贅生性疾病的風險。

14. 一種根據前述要點中之任一點之結合物之用途，其係用於製造用於抑制人類或動物個體中血管生成之藥劑。

15. 一種醫藥組合物，其至少包含根據第1點至第12點中任一點之結合物及視情況存在之一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

16. 一種組合，其包含(i)根據第1點至第12點中任一點之結合物或根據第15點之醫藥組合物及(ii)一或多種治療活性化合物。

17. 一種用於治療或預防與ED-B纖維結合蛋白表現或過度表現相關之病症或病狀的方法，其包含向有需要之個體投與有效量的根據第1點至第12點中任一點之結合物、根據第15點之醫藥組合物或根據第16點之組

合。

18. 一種組成部分之治療套組，其包含：

a)根據第1點至第12點中任一點之結合物、根據第15點之醫藥組合物或根據第16點之組合，

b)用於投與該結合物、組合物或組合之裝置，及

c)使用說明書。

【0216】 根據本發明之另一實施例，SAD連接子包含胺基酸基元GSADGGSSAGGSDAG (SEQ ID NO：4)。如本文所用，術語「單鏈雙功能抗體」係指使用短連接子(較佳5個胺基酸長度)之兩種單鏈Fv (scFv)抗體的構築體，該構築體彼此藉由更長連接子(較佳15個胺基酸長度)根據以下方案(N→C取向)結合：L19VH-連接子₃-L19VL-連接子₄-L19VH-連接子₃-L19VL。

【0217】 根據本發明之一個實施例，連接子₃為GSSGG (SEQ ID NO：6)且連接子₄為SSSSGSSSSGSSSSG (SEQ ID NO：8)。根據本發明之一個實施例，雜二聚IL-12蛋白中之第一亞單元為p40且第二亞單元為p35。較佳地，該兩個亞單元係藉由指定連接子、根據以下方案(N→C取向)彼此結合：p40-連接子₁-p35。

【0218】 較佳地，IL-12為人類IL-12。在一個較佳實施例中，連接子₁為GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO：2)。根據本發明之一個實施例，該單鏈雙功能抗體具單特異性或雙特異性。根據本發明之一個實施例，該單鏈雙功能抗體結合至纖維結合蛋白之剪接同功異型物。根據本發明之一個實施例，該單鏈雙功能抗體結合至纖維結合蛋白之外域B (ED-B)。

【0219】

參考文獻

Car et al., Toxicologic Pathology (1999), 27(1), 58-63

Chen et al., Adv Drug Deliv Rev. (2013), 65(10), 1357-1369

WO2013/014149

WO2006/119897

Tarli et al., Blood (1999), 94(1), 192-198.

【0220】

序列

以下序列形成本申請案之揭示內容之一部分。WIPO ST 25相容性電子序列表亦隨本申請案一起提供。為避免疑問，若下表中之序列與電子序列表之間存在差異，則此表中之序列應視為正確序列。

SEQ ID No	限定詞	序列
1	P40	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDI LKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDI IKPDPKPNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS
2	連接子1	GGGGSGGGSGGGGS
3	P35	RNLPVATPDPMFPC LHHSQNL LRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEDPFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
4	連接子2 (「SAD」)	GSADGGSSAGGSDAG
5	L19VL	EIVLTQSPGTL LSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
6	連接子3/連接子5	GSSGG
7	L19VH	EVQLLES GGLVQP GGSRLR LSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLLTVSS
8	連接子4	SSSSGSSSSGSSSSG
9	連接子2 (「AKKAS」)	GGGAKGGGGKAGGGS
10	連接子2 (「DDS」)	GGGGDGGGGDGGGGS

11	連接子 2 (「G4S ₃ 」)	GGGGSGGGGSGGGGS
12	連接子 2 (「SES」)	GGGGSGGGGEggggs
13	連接子 2 (「α3」)	AEAAAKEAAAKEAAAKA
14	連接子 2 (「AP6」)	APAPAPAPAPAP
15	連接子 2 (「AP7」)	APAPAPAPAPAPAP
16	全長SAD變異體	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDIKLDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAE RVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPKPNLQKPLKNSRQVEVSWEYPDWTWSTPHSYFSLTFCVQVQKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGSGGGSRNLVPATPDPGMFPCLLHHSQNLRAVSNMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLAVI DELMQALNFNSETVPQKSSLEEDPFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGSADGGSSAGSDAGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFPYFDYWGQGTLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVEQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFPYFDYWGQGTLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
17	全長 muLL-12-L19-L19	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFNKNTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVRQNMMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQONKYENYSTSFFIRDI IKPDPKPNLQMRPLKNSQVEVSWEYPDWSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVERTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYNSSCSKWACVPCRVRSGGGSGGGSGGGGSRVIPVSGPARCLSQRNLLKTDDMVKTAREKLKHY SCTAEDIDHEDITRDQSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTRGSCLPQKTSLMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHQIQIILDKGMVAIDELMQSLNHGETLRQKPPVGEADPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGSADGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFPYFDYWGQGTLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGVEQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFPYFDYWGQGTLVTVSSGSSGGEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
18	AKKAS 連接子 核苷酸序列	ggaggggggag ctaaaggtgg cgggtggcaag gcagggggag ggagt
19	AP7 連接子核苷 酸序列	gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcaccagcac ca
20	DDS 連接子核苷 酸序列	ggaggtgggg gtgatggtgg gggaggtgac ggcggaggtg ggtct

21	AP6 連接子核苷酸序列	gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcacca
22	(G4S)3 連接子核苷酸序列	ggtggaggcg ggtcaggcgg agggggttct ggcggtggcg gatcg
23	SES 連接子核苷酸序列	ggtgggggtg ggtccggagg cggaggcgaa ggcggagggtg ggtcg
24	α 3 連接子核苷酸序列	gcagaagcag cagcaaaaga agcagcagca aaagaagcag cagcaaaagc a
25	SAD 連接子核苷酸序列	gggtctgcag acggcggatc atcagctggg ggaagtgacg cagga
26	連接子 2 (「Old」)	GSADGG
27	全長「Old」變異體	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWLLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQCEDSACPAEESLPIEVMVDVAVHKLKYENYTSFFIRDI IKPDPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGGGGSGGGSGGGGSRNLPVATPDPMFPC LHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVM SYLNASGSADGGEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSGSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGGEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSGSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
28	L19 VH CDR1	SFSMS
29	L19 VH CDR2	SISGSSGTTYADSVKG
30	L19 VH CDR3	PFYFDY
31	L19 VL CDR1	RASQSVSSSFLA
32	L19 VL CDR2	YASSRAT
33	L19 VL CDR3	QQTGRIPPT
34	GGGGS 連接子	GGGGS
35	GGGGA 連接子	GGGGA
36	L19 雙功能抗體	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSGSGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

【序列表】

<110> 義大利商費洛根公司 (Philogen S.p.A.)

<120> 靶向EDB之IL-12組合物

<140> 108104259

<141> 2019-02-01

<150> EP 18156141.6

<151> 2018-02-09

<150> EP 18179313.4

<151> 2018-06-22

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 306

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
 20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
 35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
 85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
 100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
 115 120 125

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

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
 145 150 155 160

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
 165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
 180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
 195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
 210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
 225 230 235 240

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
 245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
 260 265 270

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
 275 280 285

Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro

290

295

300

Cys Ser
305

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 197
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
1 5 10 15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
20 25 30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
35 40 45

His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
50 55 60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
 100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
 115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
 130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
 145 150 155 160

Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
 165 170 175

Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
 180 185 190

Tyr Leu Asn Ala Ser
 195

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 4

Gly Ser Ala Asp Gly Gly Ser Ser Ala Gly Gly Ser Asp Ala Gly
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (可變域)

<400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
 85 90 95

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

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 6

Gly Ser Ser Gly Gly
1 5

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (可變域)

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 8

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 1 5 10 15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 9

Gly Gly Gly Ala Lys Gly Gly Gly Gly Lys Ala Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

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

<220>
<223> 連接子

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 13

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

Ala

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 14

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 15

Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro
 1 5 10

<210> 16

<211> 1006

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫結合物序列

<400> 16

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
 1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
 20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
 35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
 85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
 100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
 115 120 125

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

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
145 150 155 160

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
225 230 235 240

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
260 265 270

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
275 280 285

Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
290 295 300

Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
305 310 315 320

Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys
325 330 335

Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln
340 345 350

Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile
 355 360 365

Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys
 370 375 380

Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu
 385 390 395 400

Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser
 405 410 415

Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met
 420 425 430

Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro
 435 440 445

Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu
 450 455 460

Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser
 465 470 475 480

Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile
 485 490 495

Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met
 500 505 510

Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Ser Ala Asp Gly Gly Ser Ser Ala Gly
 515 520 525

Gly Ser Asp Ala Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
 530 535 540

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
545 550 555 560

Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
565 570 575

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr
580 585 590

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
595 600 605

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
610 615 620

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
625 630 635 640

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile
645 650 655

Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
660 665 670

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu
675 680 685

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
690 695 700

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
705 710 715 720

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
725 730 735

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
740 745 750

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser
755 760 765

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser
770 775 780

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
785 790 795 800

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln
805 810 815

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser
820 825 830

Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
835 840 845

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
850 855 860

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe
865 870 875 880

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser
885 890 895

Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
900 905 910

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
915 920 925

Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
930 935 940

Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
 945 950 955 960

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 965 970 975

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg
 980 985 990

Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 995 1000 1005

<210> 17

<211> 999

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫結合物序列

<400> 17

Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Val Asp Trp Thr
 1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
 20 25 30

Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln Arg His Gly Val Ile Gly
 35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys Glu Phe Leu Asp Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr Leu Ser His Ser His Leu
 65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp Ser Thr Glu Ile Leu Lys
 85 90 95

Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys Glu Ala Pro Asn Tyr Ser
 100 105 110

Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln Arg Asn Met Asp Leu Lys
 115 120 125

Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Pro Asp Ser Arg Ala Val Thr
 130 135 140

Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys Val Thr Leu Asp Gln Arg
 145 150 155 160

Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln Glu Asp Val Thr Cys Pro
 165 170 175

Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu Ala Leu Glu Ala Arg Gln
 180 185 190

Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile
 195 200 205

Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Met Arg Pro Leu Lys Asn
 210 215 220

Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Ser Trp Ser Thr Pro
 225 230 235 240

His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val Arg Ile Gln Arg Lys Lys
 245 250 255

Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys Asn Gln Lys Gly Ala Phe
 260 265 270

Leu Val Glu Arg Thr Ser Thr Glu Val Gln Cys Lys Gly Gly Asn Val
 275 280 285

Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn Ser Ser Cys Ser Lys Trp
 290 295 300

Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
305 310 315 320

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro
325 330 335

Ala Arg Cys Leu Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asp
340 345 350

Met Val Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala
355 360 365

Glu Asp Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu
370 375 380

Lys Thr Cys Leu Pro Leu Glu Leu His Lys Asn Glu Ser Cys Leu Ala
385 390 395 400

Thr Arg Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln
405 410 415

Lys Thr Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp
420 425 430

Leu Lys Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln
435 440 445

Asn His Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala
450 455 460

Ile Asp Glu Leu Met Gln Ser Leu Asn His Asn Gly Glu Thr Leu Arg
465 470 475 480

Gln Lys Pro Pro Val Gly Glu Ala Asp Pro Tyr Arg Val Lys Met Lys
485 490 495

Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Ser Thr Arg Val Val Thr Ile Asn
500 505 510

Arg Val Met Gly Tyr Leu Ser Ser Ala Gly Ser Ala Asp Gly Glu Val
515 520 525

Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
530 535 540

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met
545 550 555 560

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser
565 570 575

Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
580 585 590

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
595 600 605

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
610 615 620

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
625 630 635 640

Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly
645 650 655

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala
660 665 670

Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
675 680 685

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
690 695 700

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
705 710 715 720

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
725 730 735

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
740 745 750

Glu Ile Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
755 760 765

Ser Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
770 775 780

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
785 790 795 800

Ser Phe Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
805 810 815

Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
820 825 830

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
835 840 845

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
850 855 860

Tyr Cys Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
865 870 875 880

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr
885 890 895

Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
 900 905 910

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr
 915 920 925

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser
 930 935 940

Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 945 950 955 960

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 965 970 975

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 980 985 990

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 995

<210> 18
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 18

Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Cys Thr Ala Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys
 20 25 30

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr
 35 40 45

<210> 19
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 19
gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcaccagcac ca 42

<210> 20
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 20
ggaggtgggg gtgatgggtgg gggaggtgac ggcggaggtg ggtct 45

<210> 21
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 21
gcaccagcac cagcaccagc accagcacca gcacca 36

<210> 22
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 22
ggtggaggcg ggtcaggcgg agggggttct ggcggtggcg gatcg 45

<210> 23
<211> 45

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 23
ggtaggggggtg ggtccggagg cggaggcgaa ggcggagggtg ggtcg 45

<210> 24
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 24
gcagaagcag cagcaaaaga agcagcagca aaagaagcag cagcaaaagc a 51

<210> 25
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 25
gggtctgcag acggcggatc atcagctggg ggaagtgcag cagga 45

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 26

Gly Ser Ala Asp Gly Gly
1 5

<210> 27
<211> 997

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫結合物序列

<400> 27

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
 1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
 20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
 35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
 50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
 85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
 100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
 115 120 125

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

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
 145 150 155 160

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
 165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
 180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
 195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
 210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
 225 230 235 240

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
 245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
 260 265 270

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
 275 280 285

Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
 290 295 300

Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 305 310 315 320

Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys
 325 330 335

Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln
 340 345 350

Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile
 355 360 365

Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys
370 375 380

Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu
385 390 395 400

Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser
405 410 415

Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met
420 425 430

Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro
435 440 445

Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu
450 455 460

Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser
465 470 475 480

Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile
485 490 495

Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met
500 505 510

Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Gly Ser Ala Asp Gly Gly Glu Val Gln Leu
515 520 525

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
530 535 540

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ser Met Ser Trp
545 550 555 560

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser
565 570 575

Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
580 585 590

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
595 600 605

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Phe
610 615 620

Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
625 630 635 640

Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
645 650 655

Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
660 665 670

Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
675 680 685

Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
690 695 700

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
705 710 715 720

Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
725 730 735

Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
740 745 750

Lys Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
755 760 765

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
770 775 780

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
785 790 795 800

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
805 810 815

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
820 825 830

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
835 840 845

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
850 855 860

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
865 870 875 880

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
885 890 895

Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
900 905 910

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
915 920 925

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg
930 935 940

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
945 950 955 960

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
965 970 975

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 980 985 990

Lys Val Glu Ile Lys
 995

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (CDR)

<400> 28

Ser Phe Ser Met Ser
 1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (CDR)

<400> 29

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (CDR)

<400> 30

Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (CDR)

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (CDR)

<400> 32

Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗體序列 (CDR)

<400> 33

Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GGGGS 連接子

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GGGGA 連接子

<400> 35

Gly Gly Gly Gly Ala
1 5

<210> 36
<211> 229
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> L19 雙功能抗體

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Gly Ser Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser
115 120 125

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

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
145 150 155 160

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg
165 170 175

Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
180 185 190

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
195 200 205

Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
210 215 220

Lys Val Glu Ile Lys
225

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種融合蛋白，其具有：

a. 由第一IL-12亞單元及第二IL-12亞單元組成的人類IL-12部分 (moiety)；

b. 由纖維結合蛋白之外域B (fibronectin extra-domain B, EDB)結合域組成的部分；及

c. 介於該IL-12部分與由該EDB結合域組成的部分之間的連接子，其中該融合蛋白由以下所組成：

p40域，其藉由第一連接子連接至p35域；

第一L19 VH域，其藉由SAD連接子連接至該p35域；

第一L19 VL域，其藉由第三連接子連接至該第一L19 VH域；

第二L19 VH域，其藉由第四連接子連接至該第一L19 VL域；

第二L19 VL域，其藉由第五連接子連接至該第二L19 VH域，且

其中該融合蛋白由根據SEQ ID NO：16之全長序列組成。

【請求項2】

一種如請求項1之融合蛋白之用途，其係用於製造用於治療人類或動物個體中贅生性疾病或預防此類病狀之藥劑，該個體係經診斷、罹患或面臨產生贅生性疾病的風險。

【請求項3】

如請求項2之用途，其中該贅生性疾病係選自惡性黑色素瘤、非小細胞肺癌 (NSCLC)、腎細胞癌、尿道上皮癌、頭頸部鱗狀細胞癌 (HNSCC)、小型隨體高不穩定性 (MSI-H) 或錯配修復缺乏型 (dMMR) 轉移

性結腸直腸癌、肝細胞癌、胃癌、皮膚鱗狀細胞癌、子宮頸癌及彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)。

【請求項4】

一種如請求項1之融合蛋白之用途，其係用於製造用於抑制人類或動物個體中血管生成之藥劑。

【請求項5】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1之融合蛋白，及一或多種醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項6】

一種組合，其包含(i)如請求項1之融合蛋白或如請求項5之醫藥組合物及(ii)一或多種治療活性化合物。

【請求項7】

一種如請求項1之融合蛋白、如請求項5之醫藥組合物或如請求項6之組合之用途，其用於製備治療或預防與ED-B纖維結合蛋白表現或過度表現相關之病症或病狀的藥劑。

【請求項8】

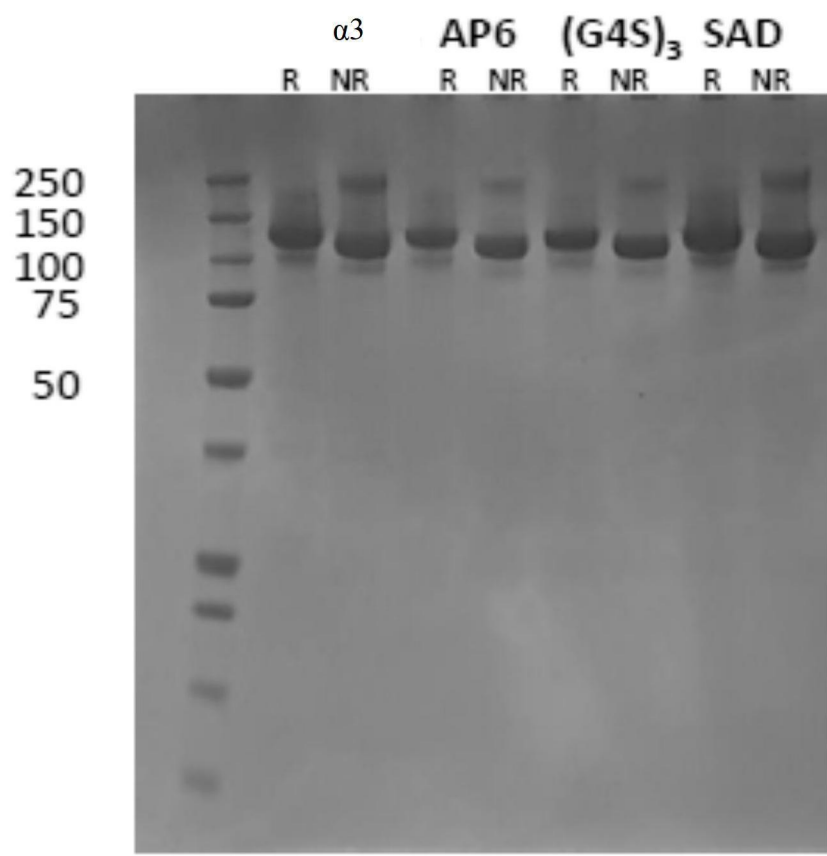
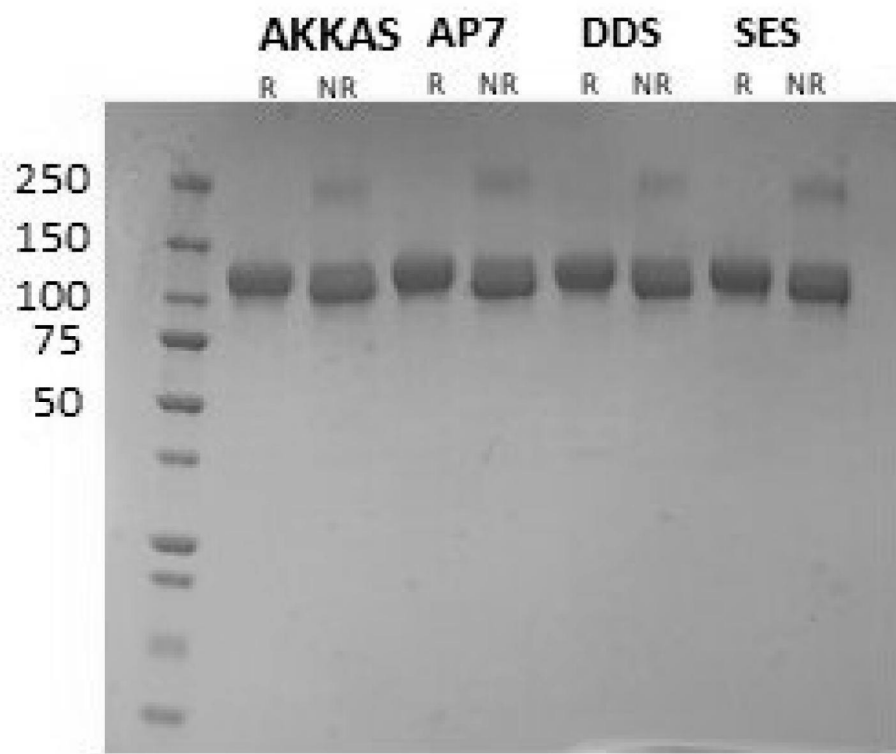
一種套組，其包含：

- a)如請求項1之融合蛋白、如請求項5之醫藥組合物或如請求項6之組合，
- b)用於投與該融合蛋白、該醫藥組合物或該組合之裝置，及
- c)使用說明書。

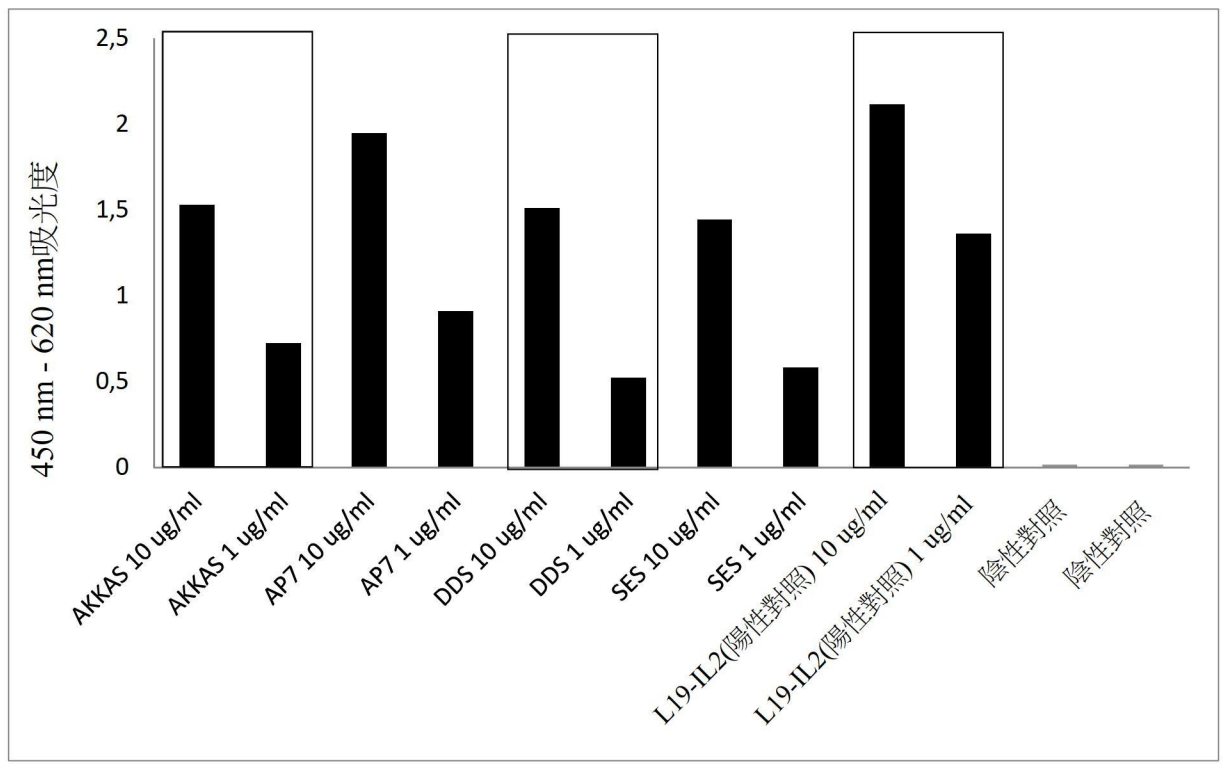
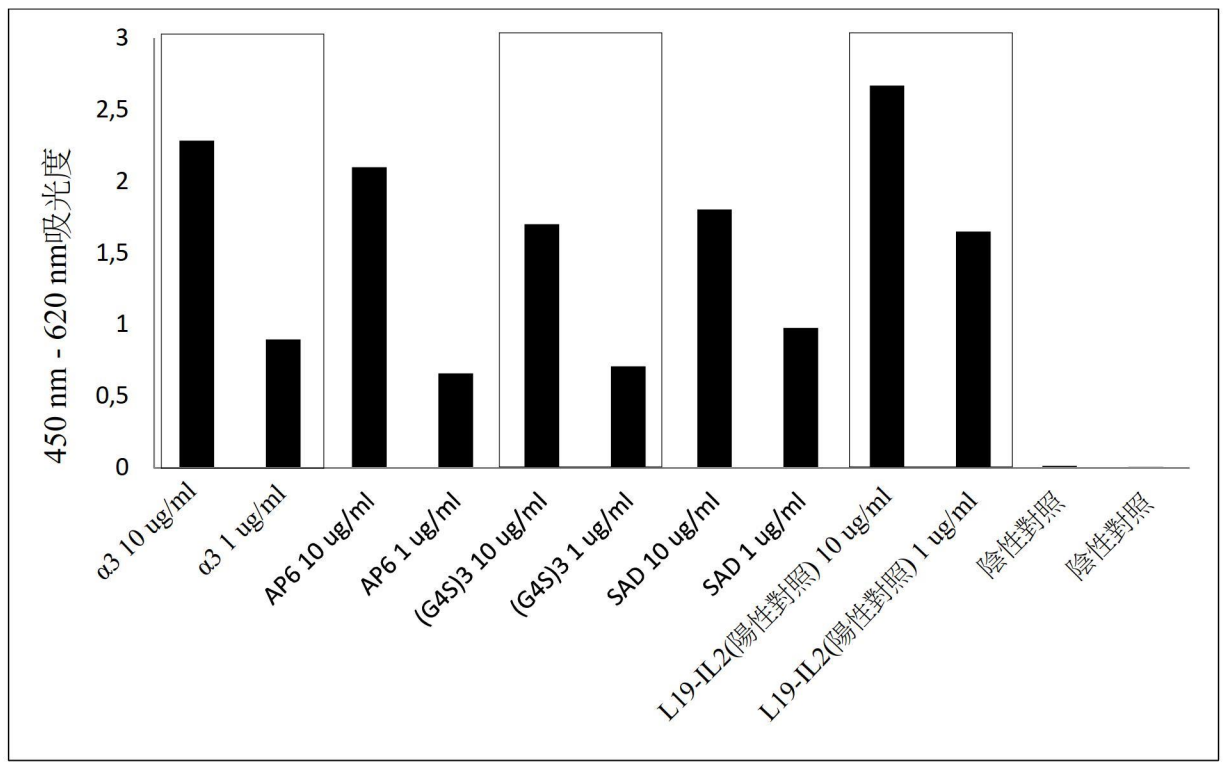
【發明圖式】

純系	...P35-L19... 連接子序列(核苷酸)	...P35-L19... 連接子序列(胺基酸)	生產產量
AKKAS	AATGCTCCGGAGGGGAGCTAAAGGTGCGGTGGCAAGGCAGGGGGAGGGGAGTGAGGTGCAG	NAS GGGAKGGGKAGGGG EVQ	4.6 mg/L
AP7	AATGCTCCGCACCAGCACCAGCACCAGCACAGCACCAGCACACCAGCACCAGAGGTGCAG	NAS APAPAPAPAPAPAP EVQ	4.7 mg/L
DDS	AATGCTCCGGAGGTGGGGGTGATGGTGGGGAGGGTGAACGGCGGAGGTGGGTCTGAGGTGCAG	NAS GGGGDGGGGDGGGGG EVQ	5.0 mg/L
AP6	AATGCTCCGCACCAGCACCAGCACCAGCACAGCACCAGCACACCAGAGGTGCAG	NAS APAPAPAPAPAP EVQ	3.5 mg/L
(G4S)₃	AATGCTCCGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGGGGTTCCTGGCGGTGGCGGATCGGAGGTGCAG	NAS GGGGGGGGGGGG EVQ	3.5 mg/L
SES	AATGCTCCGGTGGGGTGGTCCGGAGCGGAGGGCGAAGGCGGAGGTGGTGGAGGTGCAG	NAS GGGGGGGGGGGG EVQ	4.4 mg/L
α3	AATGCTCCGCAGAAAGCAGCAGCAAAAG AAGCAGCAGCAAAAGAAAGAAAGCAGCAGCAAAAGCAAGGTGCAG	NAS AAAAAKEAAAAKEAAAAKA EVQ	4.5 mg/L
SAD	AATGCTCCGGGTCTGCAGACGGCGGATCATCAGCTGAGGGGAAAGTGACGCAGGAGAGGTGCAG	NAS GSADGGSSAGGSDAG EVQ	9.0 mg/L

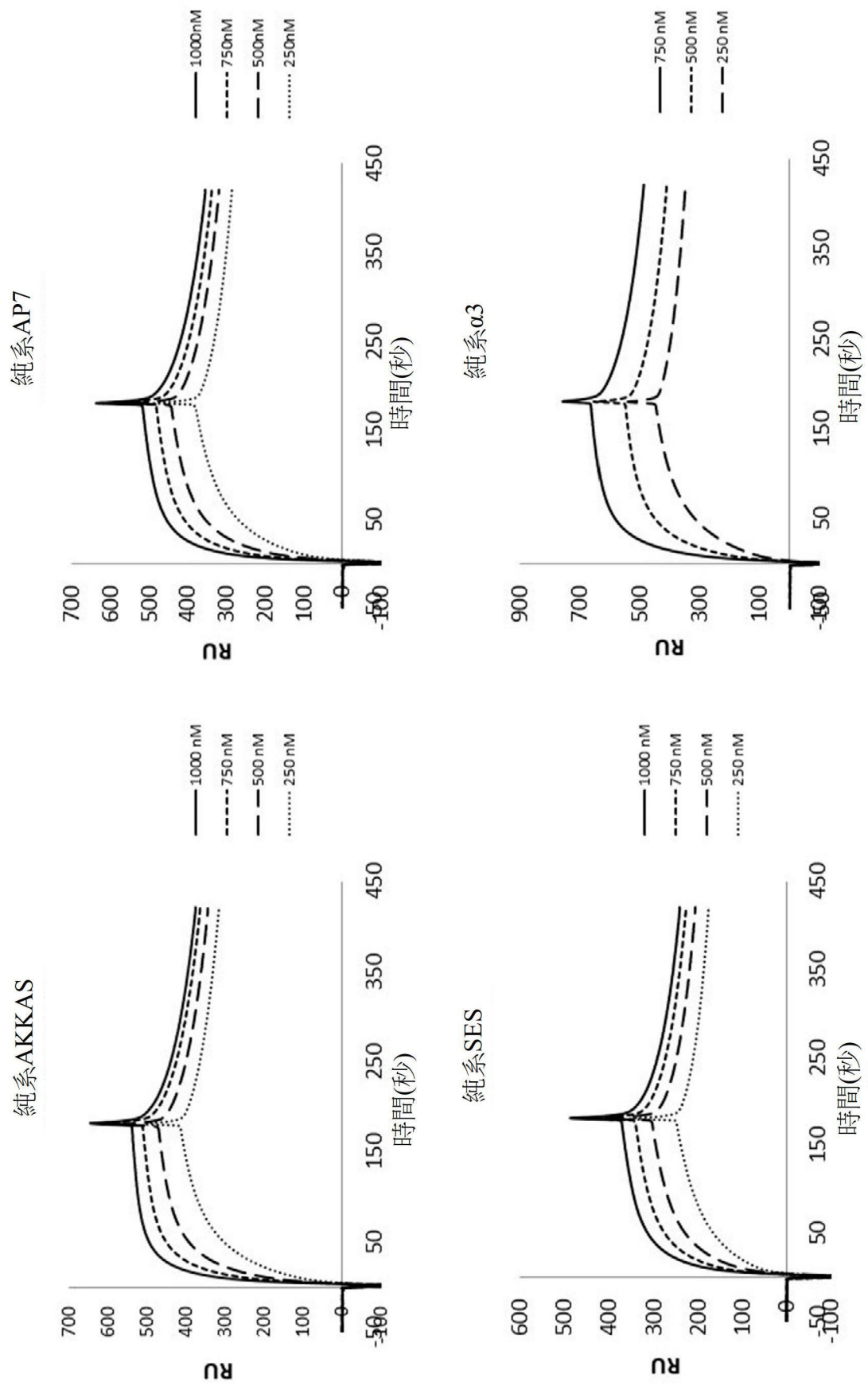
【圖1A】



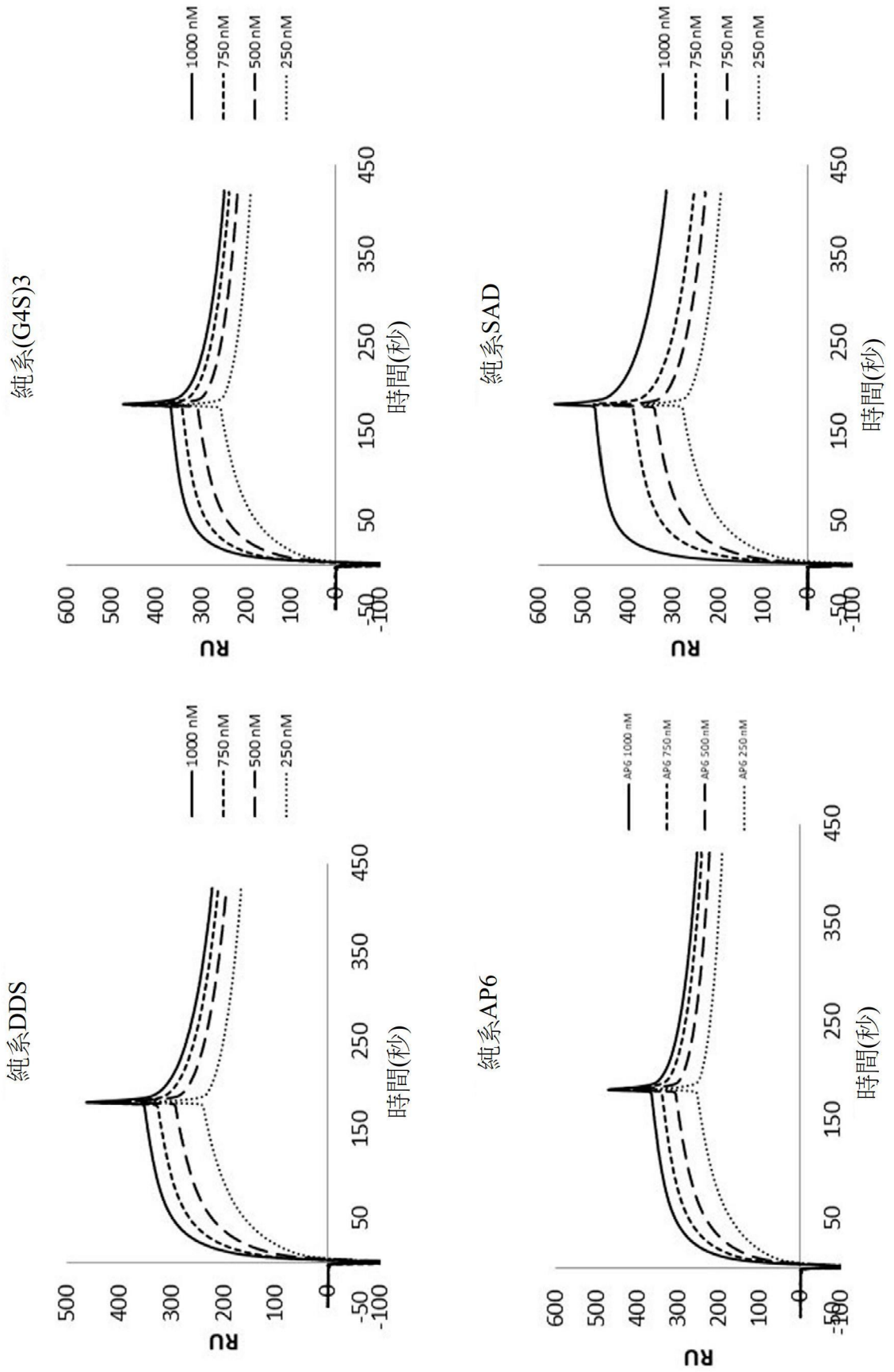
【圖1B】



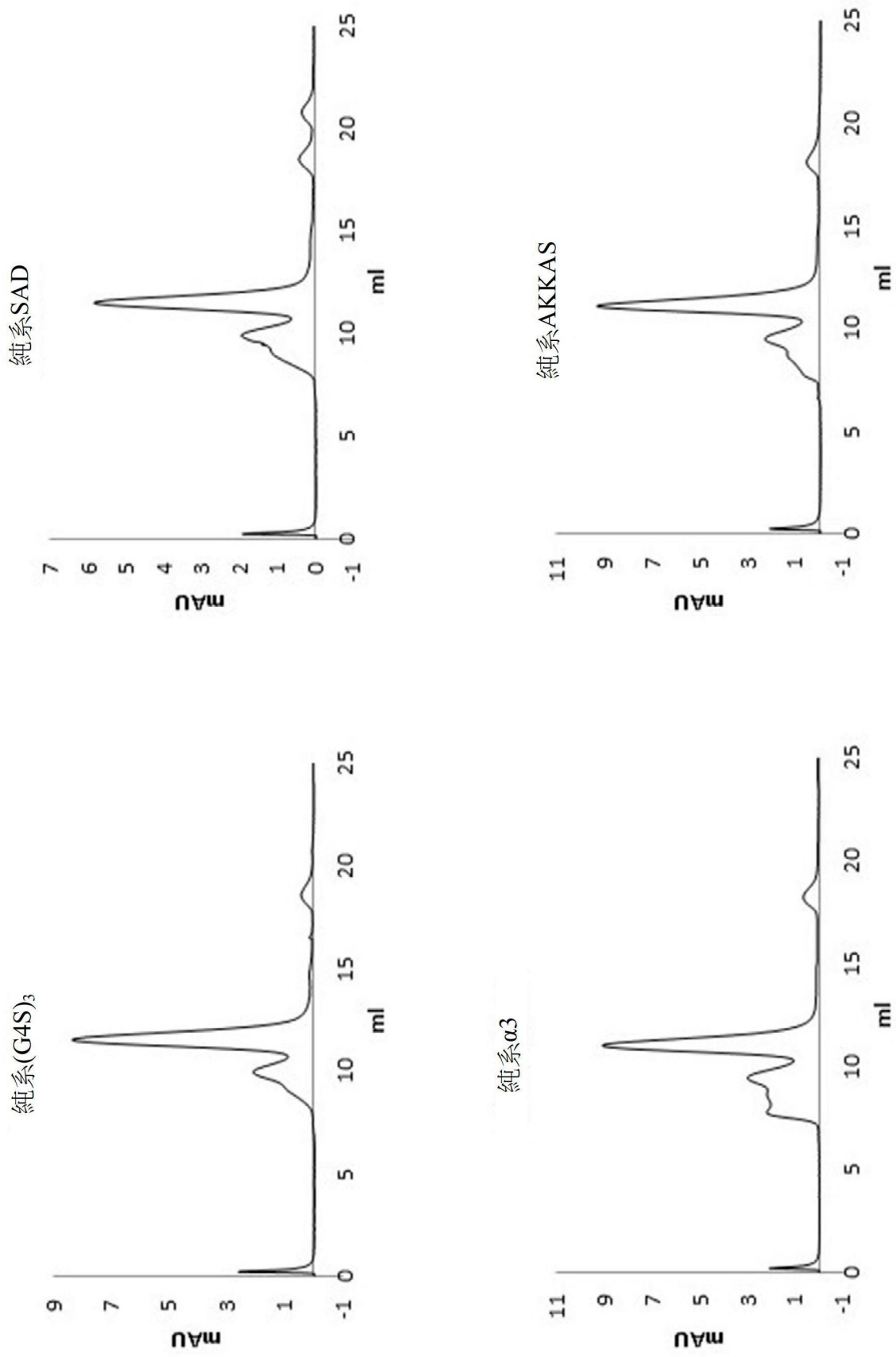
【圖2】



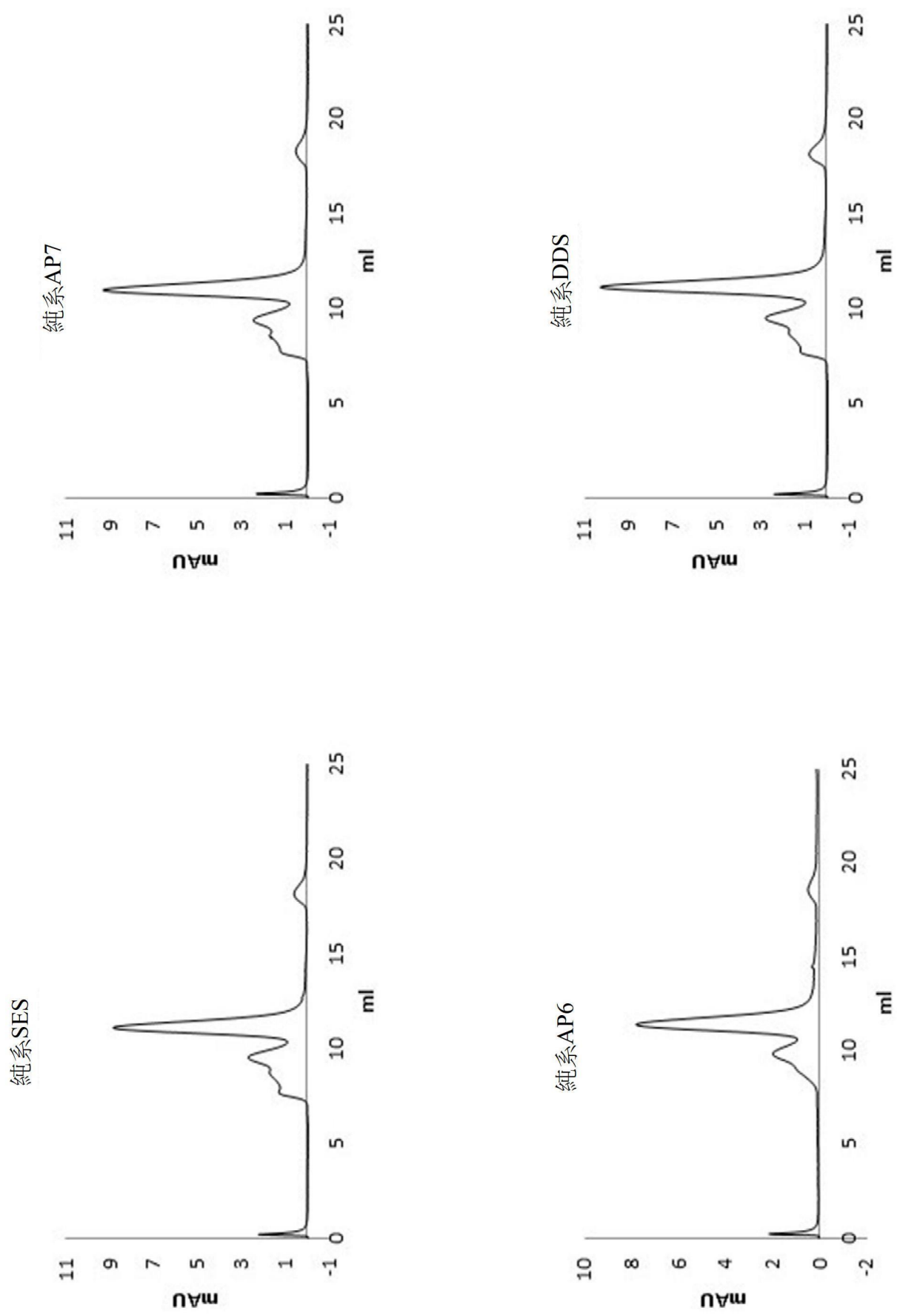
【圖3】



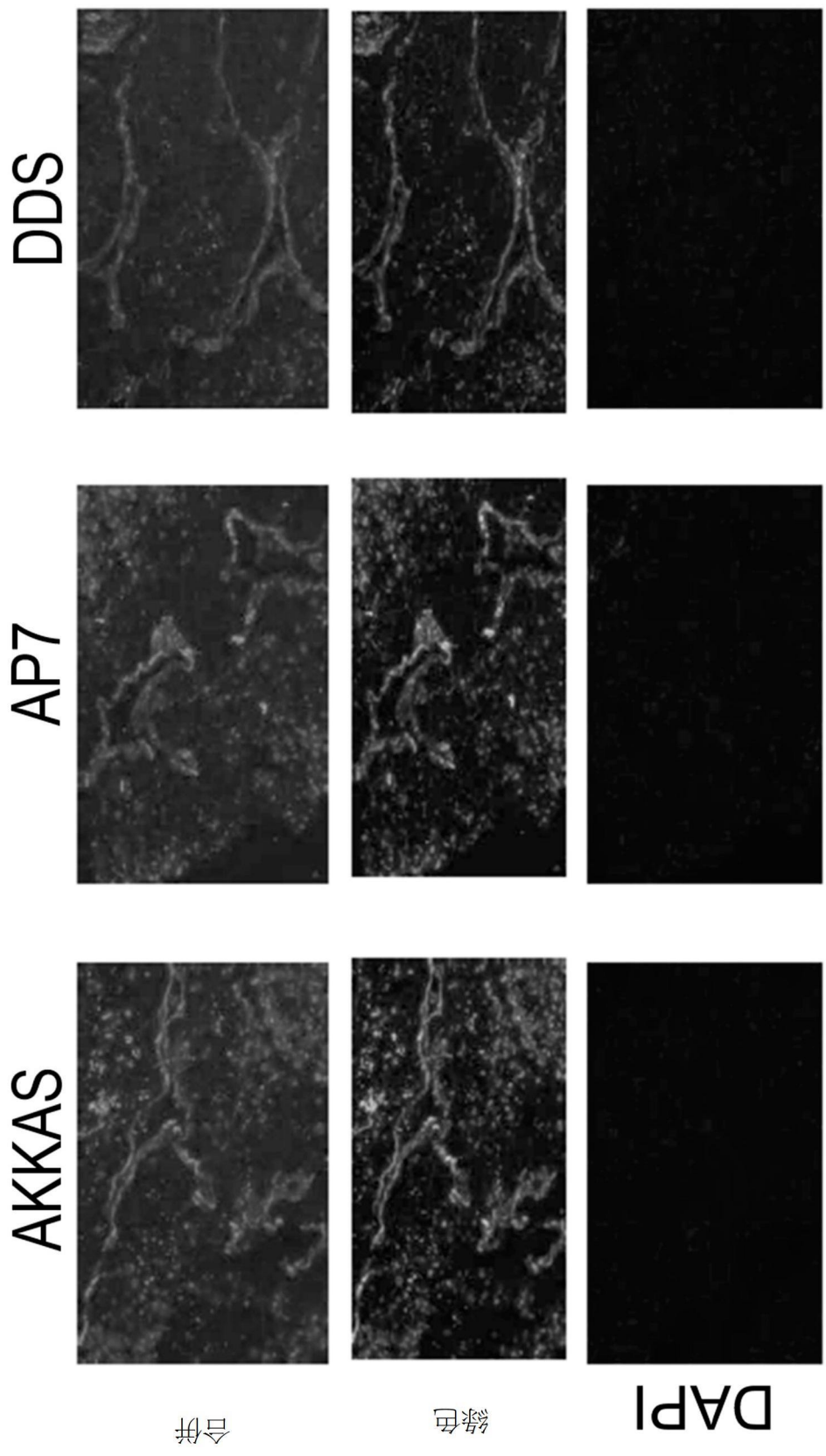
【圖3】(續)



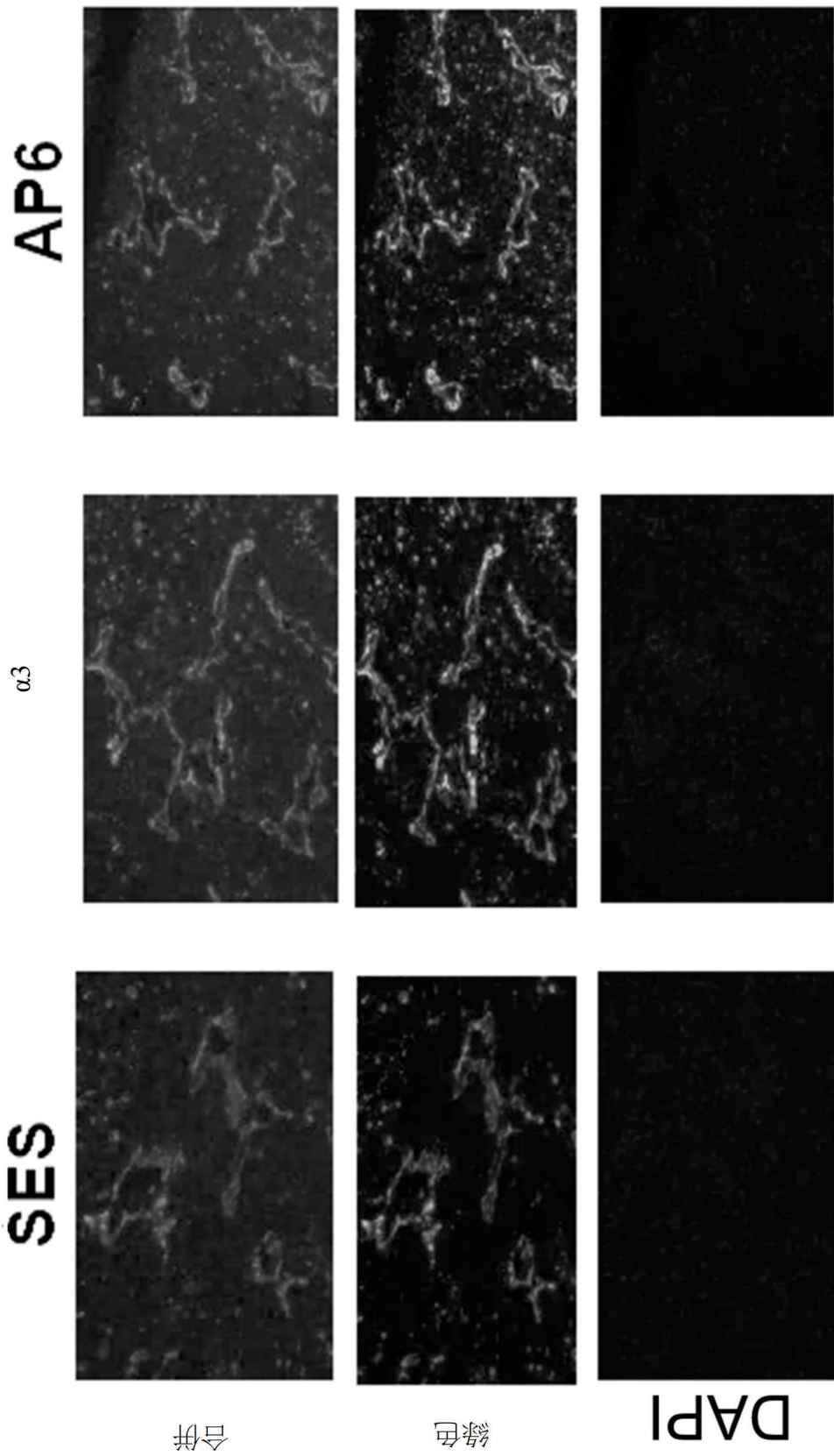
【圖4】



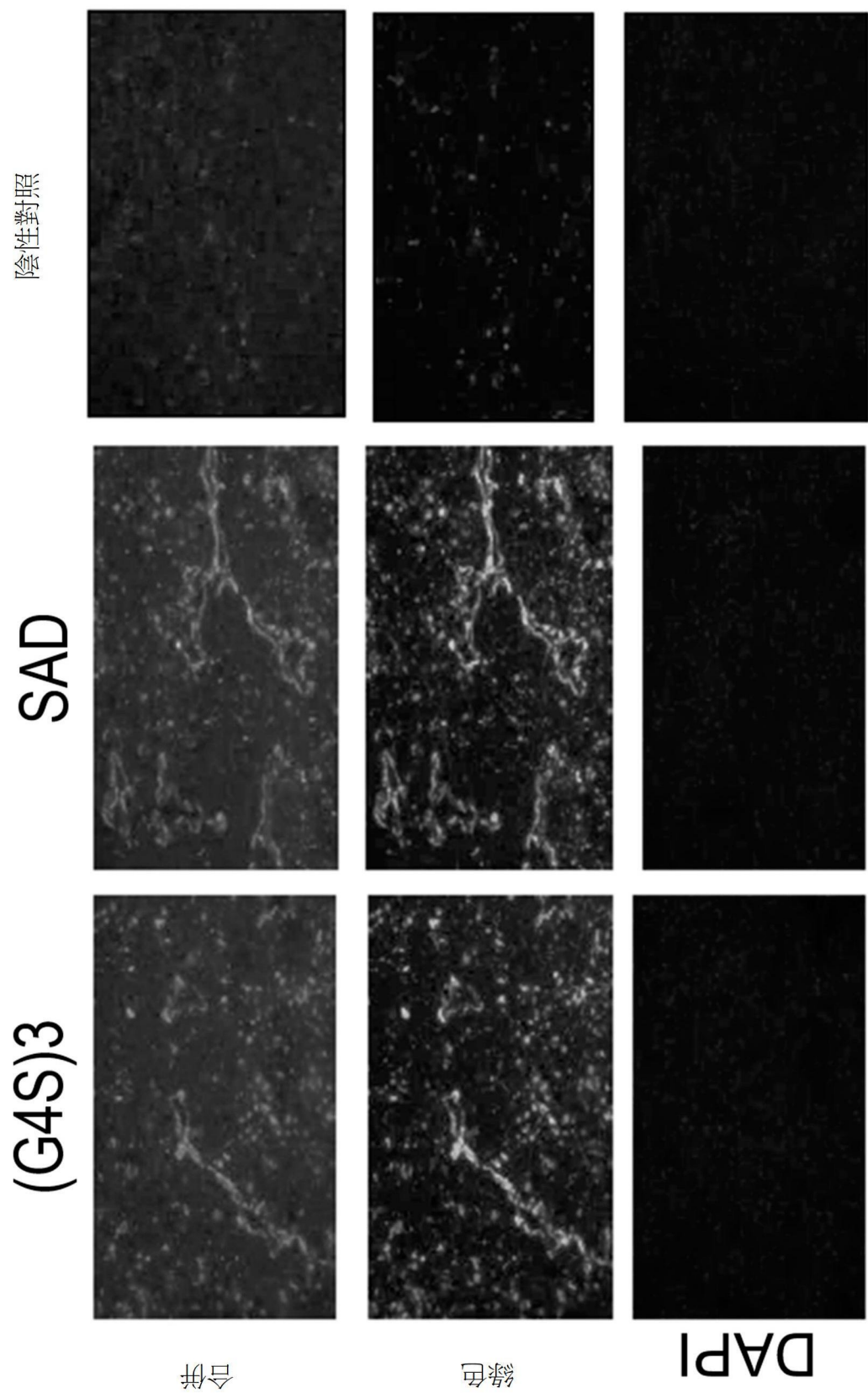
【圖4】(續)



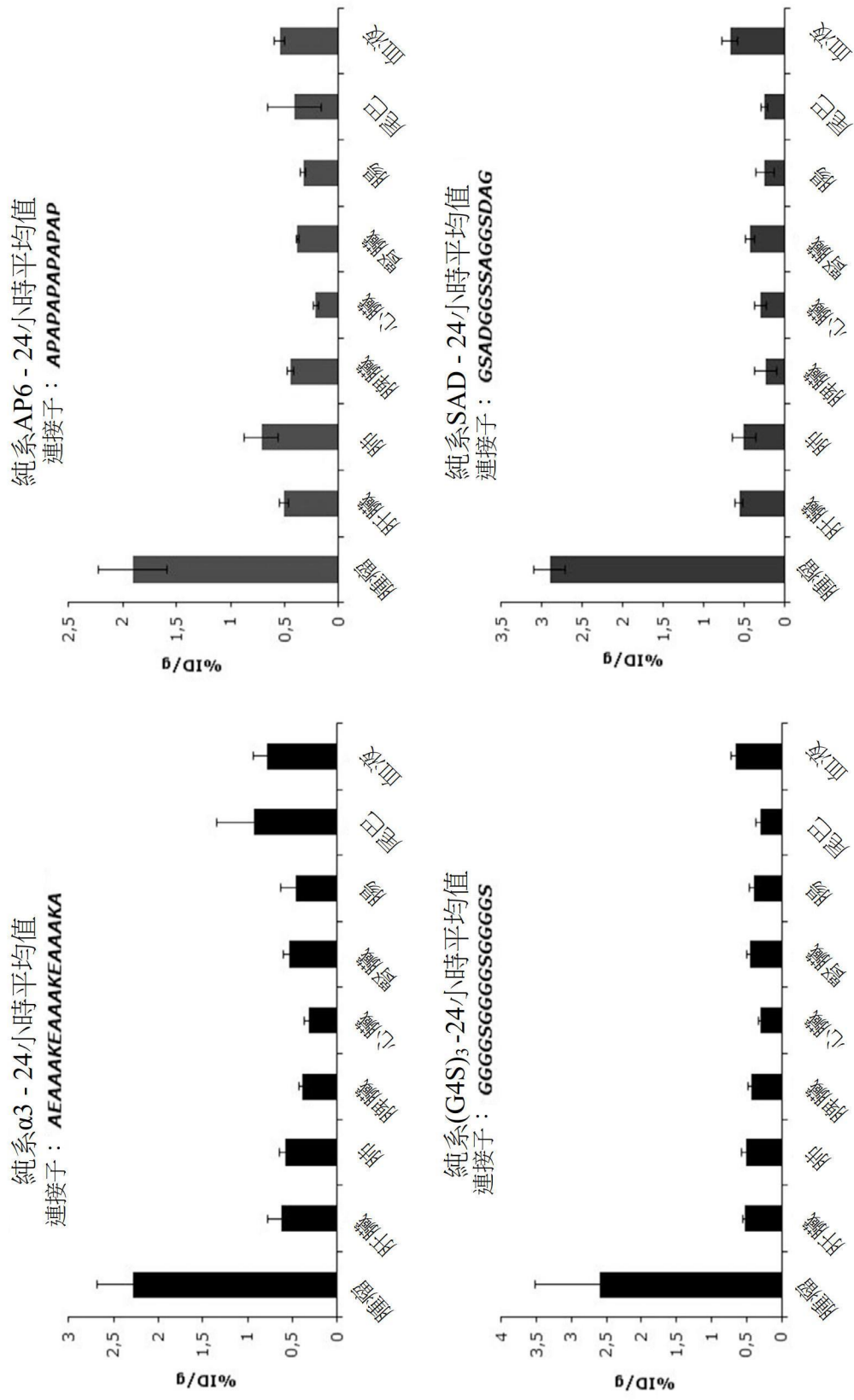
【圖5】



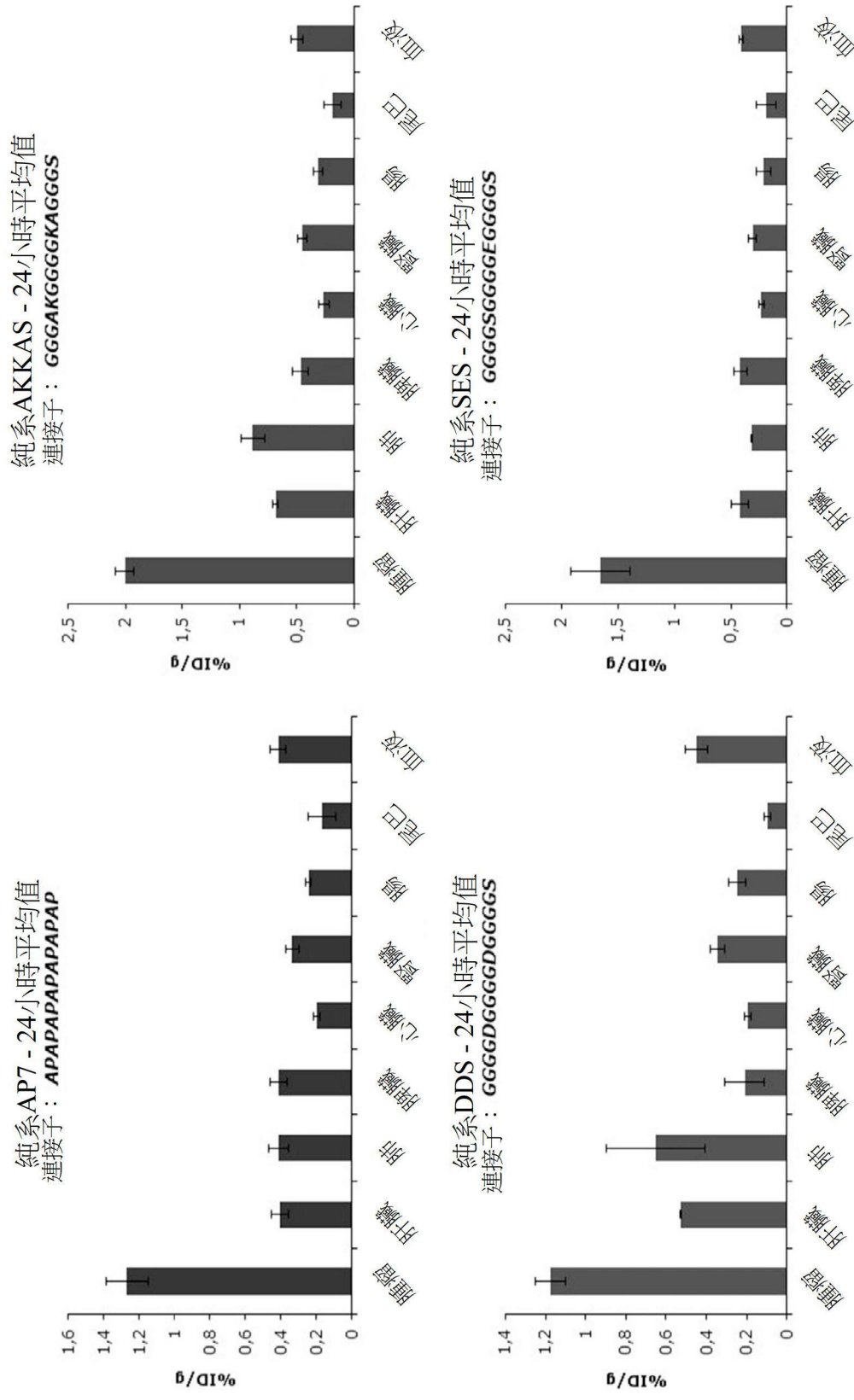
【圖5】(續)



【圖5】(續)

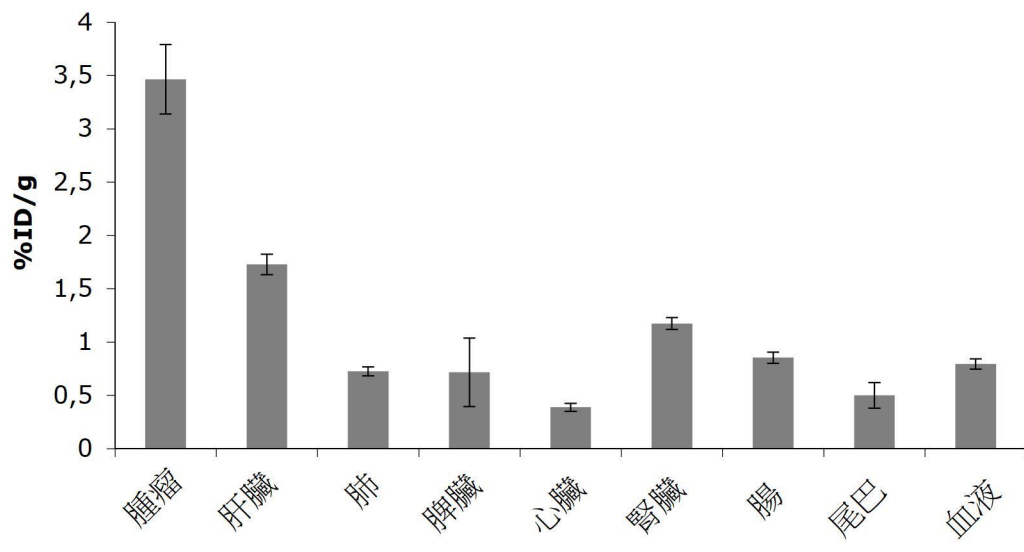


【圖6】



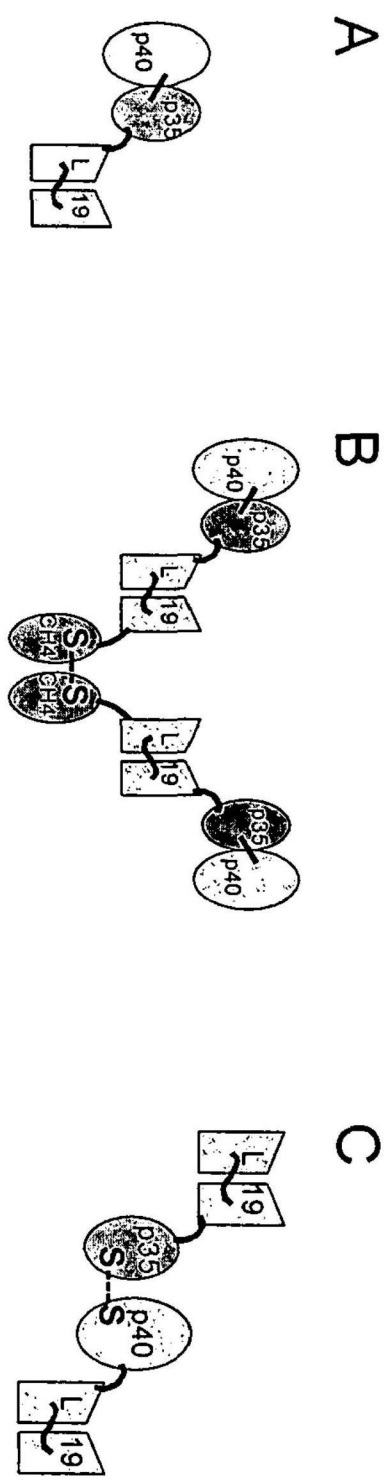
【圖6】(續)

陽性對照 - 24小時平均值 **muIL12L19L19**



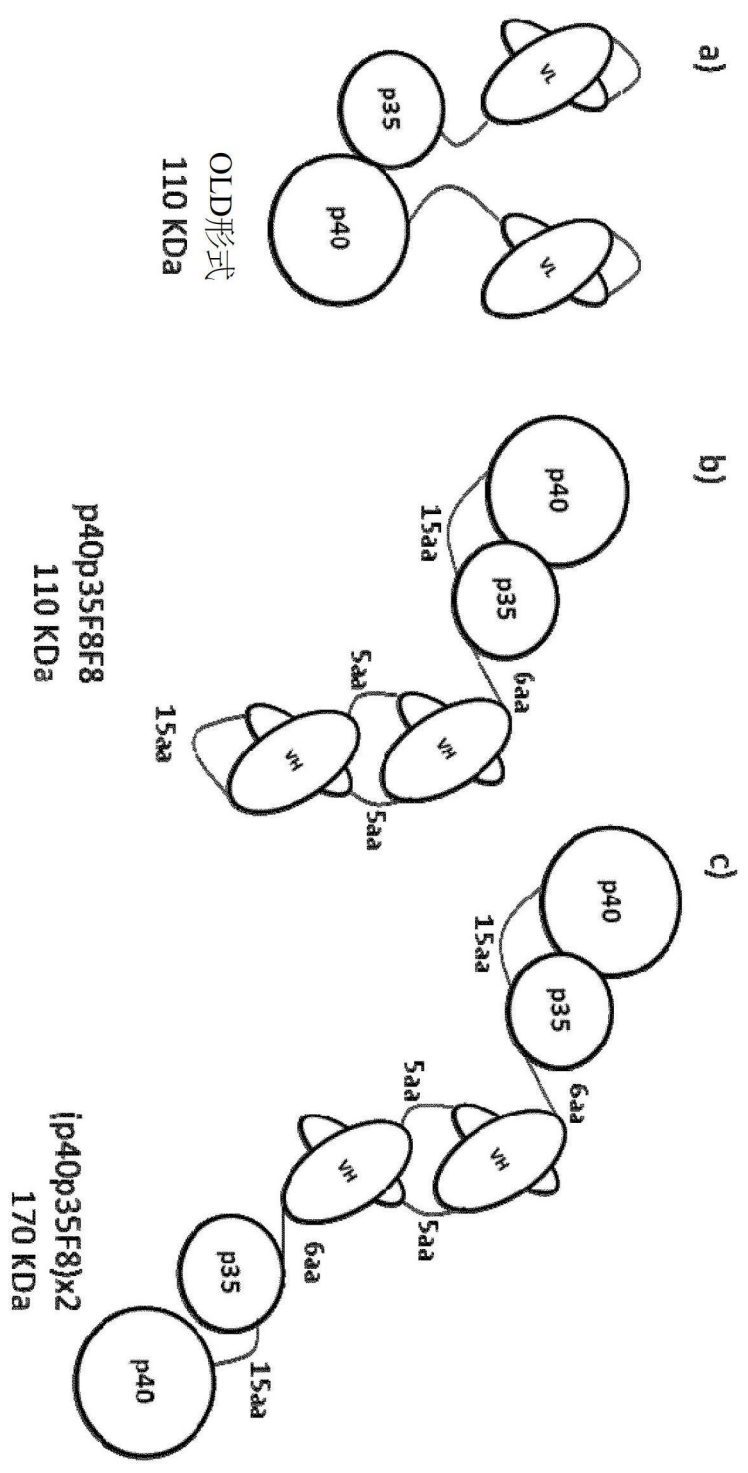
【圖6】(續)

[用於說明目的之先前技術]



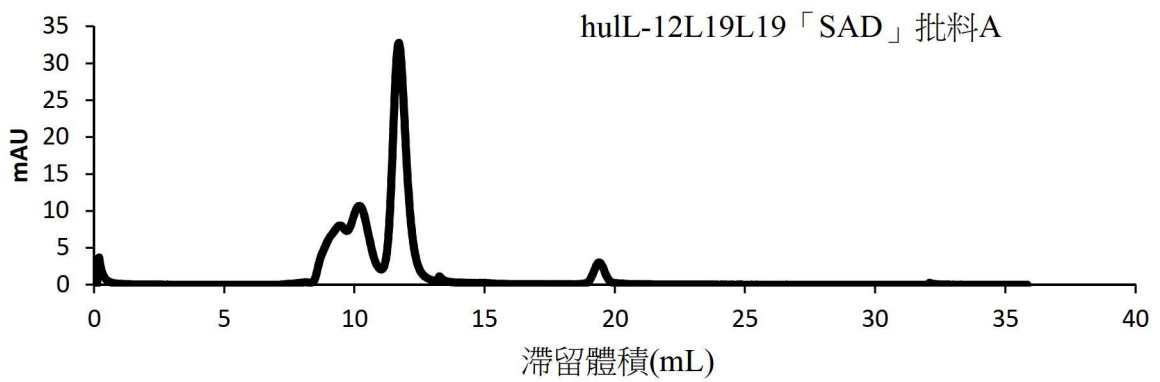
【圖7】

[用於說明目的之先前技術]

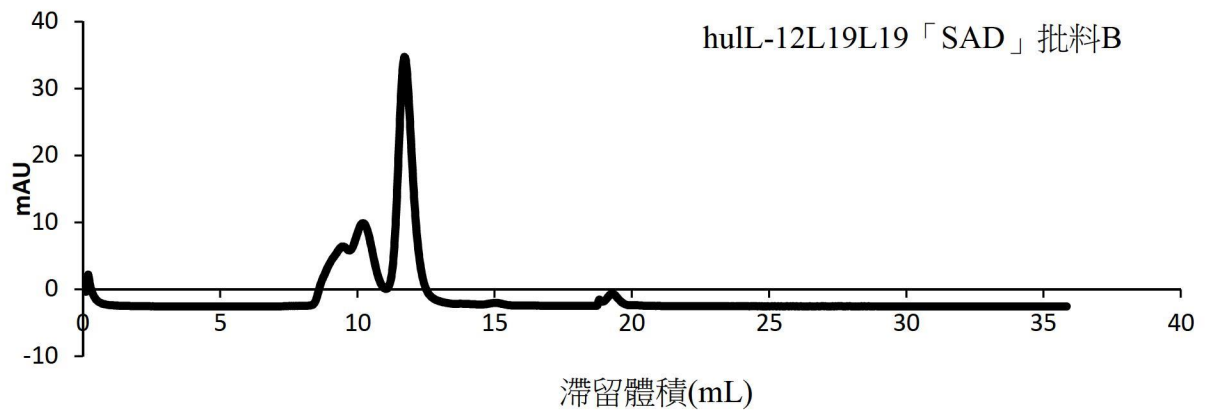


【圖8】

A

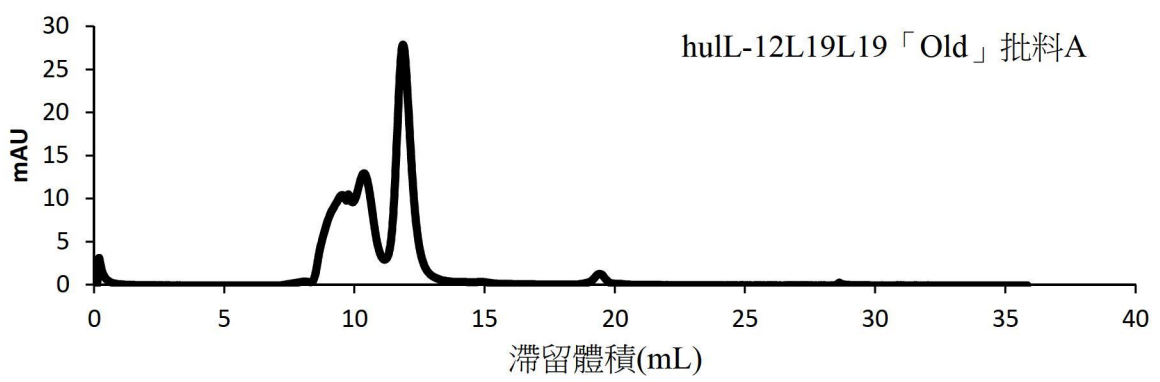


B

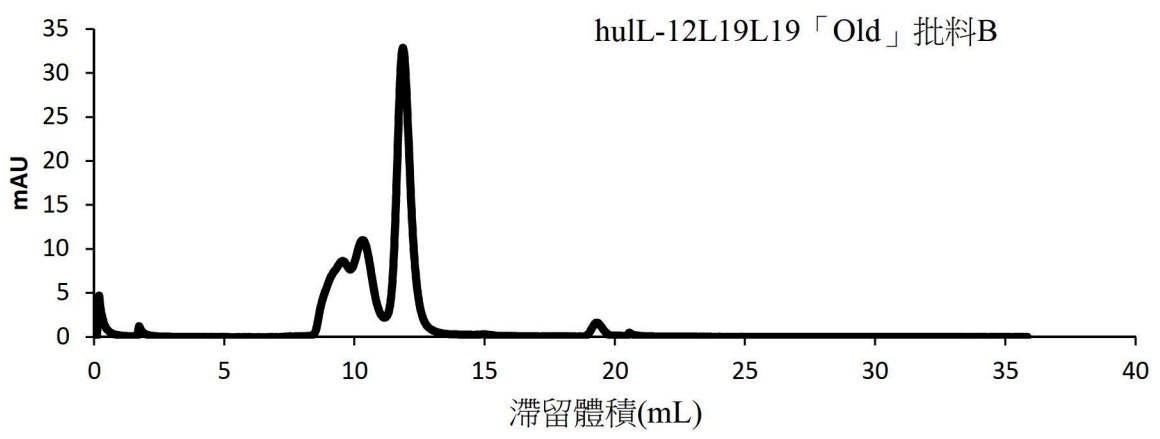


【圖9】

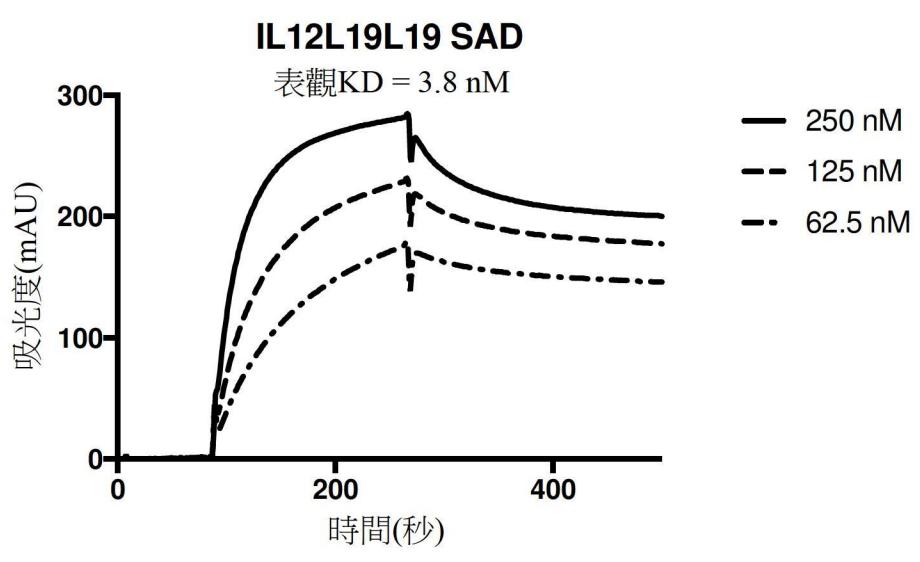
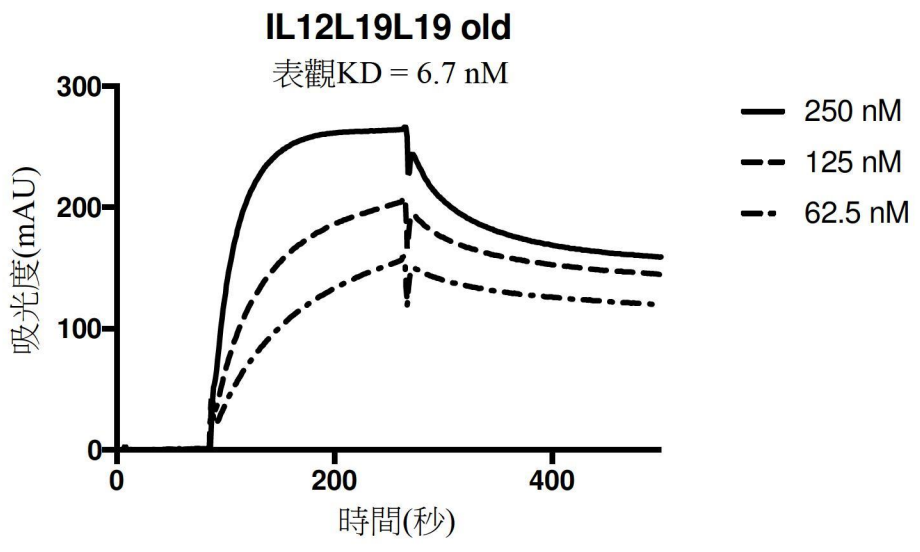
C



D

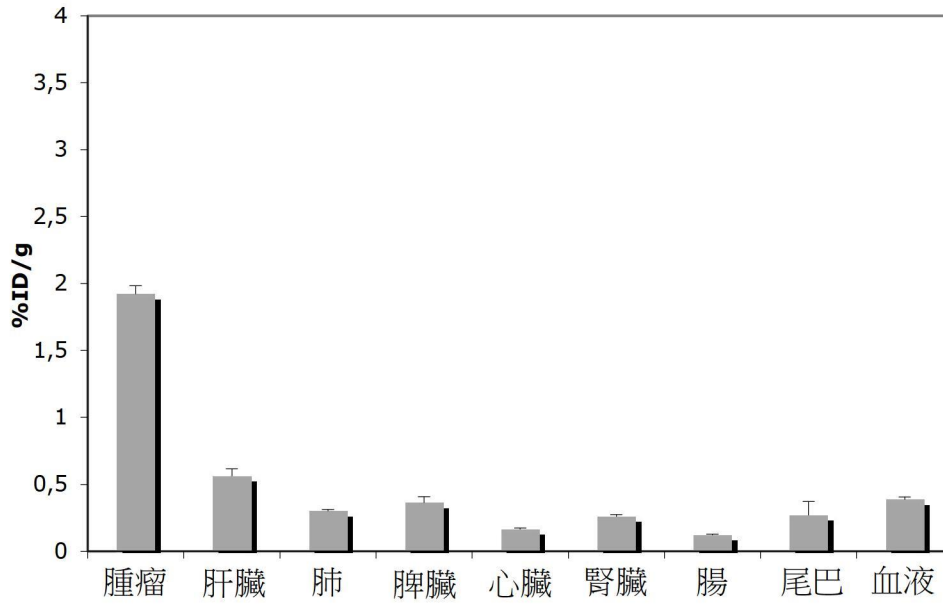


【圖9】(續)

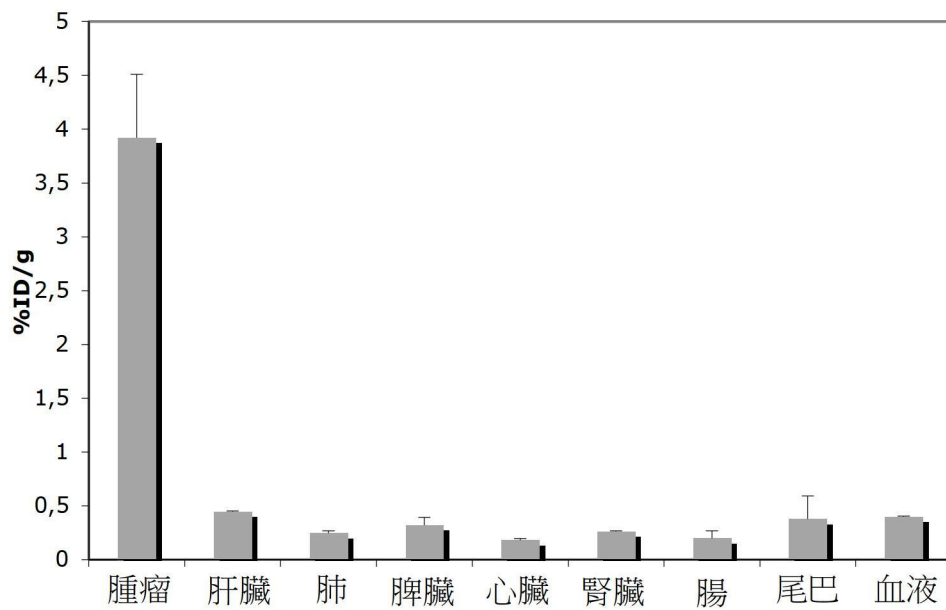


【圖10】

使用《Old》變異體進行的24小時
腫瘤靶向



使用《SAD》變異體進行的24小時
腫瘤靶向



【圖11】