



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201726746 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：106112626

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 04 日

(51)Int. Cl. : *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K47/48 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2012/11/07 美國 61/723,772
 2013/10/11 美國 61/889,744

(71)申請人：輝瑞股份有限公司 (美國) PFIZER INC. (US)
 美國

(72)發明人：吉里斯 肯尼士 GELES, KENNETH G. (US)；鄧軼潔 GAO, YIJIE (US)；賽普拉
 普加 SAPRA, PUJA (IN)；奇斯特柯發 廖德米拉 TCHISTIAKOVA, LIOUDMILA
 GENNADIEVNA (US)；周斌兵 ZHOU, BIN-BING STEPHEN (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：16 共 184 頁

(54)名稱

抗切口 3 (anti-notch 3) 抗體及抗體-藥物共軛體

ANTI-NOTCH3 ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

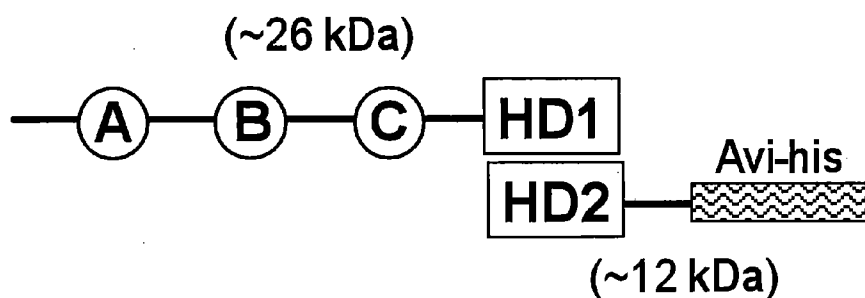
(57)摘要

本發明提供抗切口 3(anti-Notch 3)抗體、抗切口 3 抗體-藥物共軛體及用於製備及使用該相同物之方法。

The present invention provides for anti-Notch3 antibodies, anti-Notch3 antibody-drug conjugates and methods for preparing and using the same.

指定代表圖：

圖 1



發明摘要

※申請案號：106112626（由104121691分割）

C07K 16/28 (2006.01)

※申請日：102 年 11 月 04 日

※IPC 分類：**A61K 39/395** (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

A61P 35/00 (2006.01)

抗切口 3(anti-notch3)抗體及抗體－藥物共軛體

Anti-Notch3 antibodies and antibody-drug conjugates

【中文】

本發明提供抗切口 3(anti-Notch 3)抗體、抗切口 3 抗體－藥物共軛體及用於製備及使用該相同物之方法。

【英文】

The present invention provides for anti-Notch3 antibodies, anti-Notch3 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】(中文/英文)

抗切口 3(anti-notch3)抗體及抗體－藥物共軛體

Anti-Notch3 antibodies and antibody-drug conjugates

相關申請案

本申請案主張於 2012 年 11 月 7 日提出之美國臨時申請案第 61/723,772 號及 2013 年 10 月 11 日提出之美國臨時申請案第 61/889,744 號之權益，各案以參照方式整體納入此處。

序列表

本申請案係經 EFS-Web 以電子方式提出，包括以.txt 格式之電子形式檢送之序列表。該.txt 檔案包含標題為 PC071980A_Sequence_Listing.txt 之序列表，建立日期 2013 年 10 月 11 日，檔案大小 61 KB。此.txt 檔中包含之序列表係本說明書之一部分，以參照方式整體納入此處。

【技術領域】

本發明關於抗切口 3 抗體及抗切口 3 抗體－藥物共軛體。本發明另關於使用該抗體及抗體－藥物共軛體於治療癌之方法。

【 先前技術 】

切口傳訊係由細胞外受體與配體交互作用所引發。切口受體經由傳訊級聯控制多細胞生物體內之正常細胞增生、分化及死亡，該傳訊級聯係由受配體誘發之蛋白水解所引發。在弗林樣(furin-like)蛋白酶切割位點 S1 之後，成熟之切口異二聚體被轉位至細胞膜中，在該處該異二聚體藉由由三個 Lin12/切口重複（LNR-A、B、C）與異二聚化(HD)結構域所組成之近膜負調節區(NRR)保持在自我抑制狀態。該 HD 結構域在位點 S1 切割之後被分成 N 端半段(HD1)及 C 端半段(HD2)。經由不確定之機轉，Delta/Serrate/Lag-2 (DSL)家族之配體與細胞外 EGF 重複區之結合解除此抑制作用，另外誘發二個切割事件。首先，ADAM 型金屬蛋白酶媒介靠近 HD-2 結構域之 C 端區域的位點 S2 之切割，藉以自細胞表面釋放細胞外結構域(ECD)，該 ECD 接著經反式內吞作用(trans-endocytosis)進入該配體表現細胞中。接著， γ 分泌酶媒介在跨膜結構域內之位點 S3 的切割，自該膜釋放切口之細胞內結構域（切口-ICD），允許切口-ICD 轉位至細胞核，活化目標基因之轉錄(Bray, S., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, volume 7, 678-689)。

呈自我抑制構形之人切口 2-NRR 結構域的 X 光晶體結構顯示，NRR 內之 LNR 重複與異二聚體結構域之間廣泛的交互作用隱藏該金屬蛋白酶 S2 位點，表示必須有顯著構形改變才能在配體活化時暴露出該位點(Gordon,

W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300)。研究顯示穩定 NRR 內之交互作用可能防止配體誘發之切口活化。切口自我抑制構形之結構資訊的可用性提供新治療劑的發展機會，特別是以切口傳訊為目標之抗體。(Li, K., et. al, Journal of Biological Chemistry, 2008, volume 283, 8046-8054; Aste-Amezaga, M, et. al, PLOS ONE, 2010, volume 5, e9094; Wu, Y., et. al, Nature, 2010, volume 464, 1052-1057;)。

在哺乳動物細胞中，有四種已知之切口受體。切口 1、切口 2、切口 3 及切口 4 在胚胎及成體組織中具有廣泛、重疊之表現模式，並在造血幹細胞特化、T 細胞發育、腸隱窩細胞特化及血管發育期間扮演非冗餘角色。切口 3 主要表現於血管平滑肌細胞(vSMC)、各種胸腺細胞亞群及發育中之神經系統。與其有限制的組織分布一致，靶向性刪除鼠切口 3 不會像切口 1 及切口 2 刪除導致胚胎死亡。相反地，切口 3 基因剔除鼠可以存活，但 vSMC 的成熟及分化有缺陷 (Domenga, V., et. al, Genes and Development, 2004, volume 18, 2730-2735)。

在許多情況中，切口活化與致癌性有關；所有四種切口同系物的持續活化、細胞內形式在試管內及基因轉殖鼠模型中具有致癌基因之功能。最近的研究顯示，切口 3 在多種人實質腫瘤中通常被擴增及過度表現，而且人癌症之發展傳訊途徑如切口 3 之過度表現，顯示它們也是腫瘤發生之關鍵媒介子。目前有許多阻斷切口傳訊之策略被發展

以用於癌之治療目的；然而本領域仍需更強力、有效之抗切口靶向性治療以治療癌。

抗體－藥物共軛體(ADC)結合高親和性抗體之專一性及靶向性與治療劑之細胞毒性，如細胞毒性劑、生物反應調節劑、酶、細胞凋亡誘發劑及放射性同位素。欲使治療劑自抗體釋放，需要運送及定位該抗體－藥物共軛體至溶酶體，且切口 3-ECD 及切口 3-ICD 皆需被溶酶體降解，因此預期與切口 3 結合之抗體將移動至溶酶體(Jia L, et. al, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2009, volume 41, 2594-2598)。本發明提供新穎的抗切口 3 抗體及抗體－藥物共軛體，以符合在癌症治療的診斷及治療用途上未被符合之臨床需求。

【發明內容】

發明概要

本發明提供抗切口 3 抗體及抗體－藥物共軛體(ADC)。本發明亦提供使用該抗切口 3 抗體及抗體－藥物共軛體於治療癌之方法。

在一實施態樣中，本發明提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其具有 SEQ ID NO:13 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 及具有 SEQ ID NO:25 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之輕鏈可變區。

在另一實施態樣中，本發明提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片

段：(a)經內化至細胞中，(b)不抑制切口 3 傳訊，或(c)不活化切口 3 傳訊。在另一實施態樣中，本發明提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段：(a)與切口 3 負調節區(NRR)之 LNR-C 及 HD-1 結構域結合，(b)不維持該切口 3 NRR 之自我抑制構形，或(c)不抑制 S2 切割。

在另一實施態樣中，本發明提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其具有：(a)包含 SEQ ID NO:15 或 16 之重鏈 CDR1；(b)包含 SEQ ID NO:19 或 20 之重鏈 CDR2；(c)包含 SEQ ID NO:23 之重鏈 CDR3；(d)包含 SEQ ID NO:27 之輕鏈 CDR1；(e)包含 SEQ ID NO:29 之輕鏈 CDR2；及(f)包含 SEQ ID NO:31 之輕鏈 CDR3。

本發明亦提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含與 SEQ ID NO:13 具有至少 90%一致性之重鏈可變區胺基酸序列或與 SEQ ID NO:25 具有至少 90%一致性之輕鏈可變區胺基酸序列。

本發明亦提供與具有 SEQ ID NO:13 之重鏈可變區胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段及與具有 SEQ ID NO:25 之輕鏈可變區胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段。本發明亦提供具有與 SEQ ID NO:33 之重鏈胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段及與具有 SEQ ID NO:35 之輕鏈胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段。

在另一實施態樣中，本發明提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其具有包含 SEQ ID NO:37 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之重鏈可變區及包含 SEQ ID NO:49 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之輕鏈可變區。

在另一實施態樣中，本發明提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其具有：(a)包含 SEQ ID NO:39 或 40 之重鏈 CDR1；(b)包含 SEQ ID NO:43 或 44 之重鏈 CDR2；(c)包含 SEQ ID NO:47 之重鏈 CDR3；(d)包含 SEQ ID NO:51 之輕鏈 CDR1；(e)包含 SEQ ID NO:53 之輕鏈 CDR2；及(f)包含 SEQ ID NO:55 之輕鏈 CDR3。

本發明亦提供與切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含與 SEQ ID NO:37 具有至少 90%一致性之重鏈可變區胺基酸序列或與 SEQ ID NO:49 具有至少 90%一致性之輕鏈可變區胺基酸序列。

本發明亦提供與具有 SEQ ID NO:37 之重鏈可變區胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段及與具有 SEQ ID NO:49 之輕鏈可變區胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段。本發明亦提供與具有 SEQ ID NO:57 之重鏈胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段及與具有 SEQ ID NO:59 之輕鏈胺基酸序列之切口 3 結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段。

本發明另提供與本發明之抗體或彼之抗原結合片段競爭與切口 3 之專一性結合之經分離之抗體。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，其具有與本發明之任何抗體或彼之抗原結合片段共軛之細胞毒性劑。

在另一實施態樣中，本發明提供下式之抗體－藥物共軛體： $Ab-(L-D)_p$ ，或彼之醫藥上可接受之鹽，其中： Ab 係與切口 3 結合之抗體或彼之抗原結合片段； $L-D$ 係連接子-藥物基團，其中 L 係連接子， D 係藥物；且 p 為 1 至約 12 之整數。

在另一實施態樣中，本發明提供下式之抗體－藥物共軛體： $Ab-(L-D)_p$ ，或彼之醫藥上可接受之鹽，其中： Ab 係本發明之任何抗體或彼之抗原結合片段； $L-D$ 係連接子-藥物基團，其中 L 係連接子， D 係藥物；且 p 為 1 至約 12 之整數。

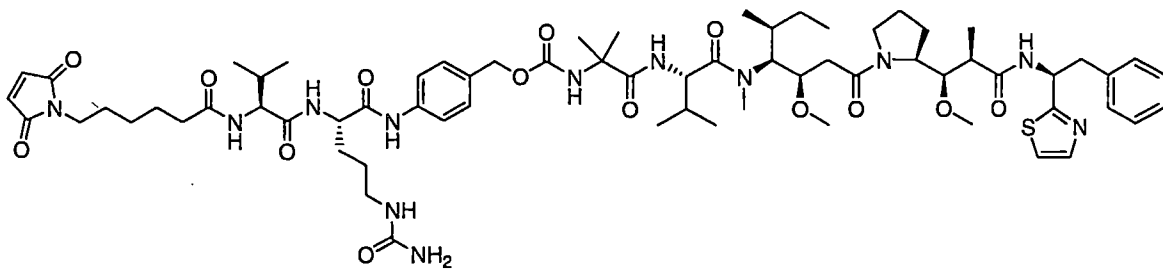
在另一實施態樣中，本發明提供抗體－藥物共軛體，其中 L 係選自 vc 、 mc 、 me 或 $MalPeg6C2$ 。

在另一實施態樣中，本發明提供抗體－藥物共軛體，其中 D 係選自：(a) 0101 (2-甲基丙胺鹽基-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]吡咯啉-1-基}-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺鹽基)，(b) 6780 (2-甲基丙胺鹽基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺鹽基)，(c) 0131 (2-甲基-L-脯胺鹽基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{(1S)-1-

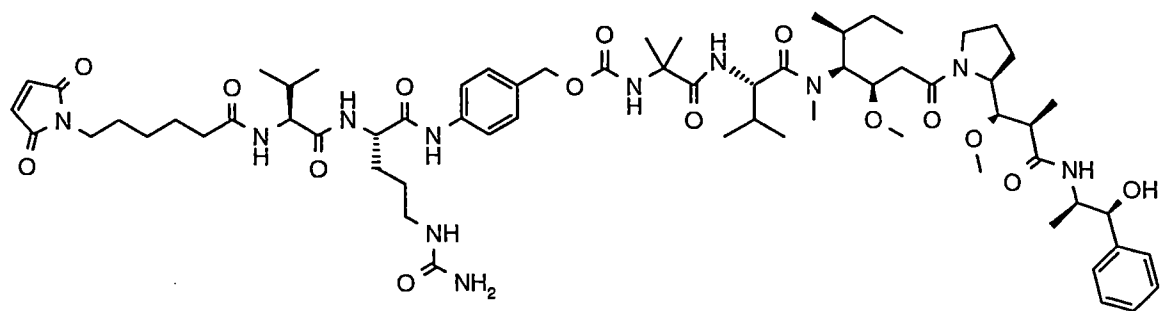
羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺鹽胺，三氟乙酸鹽)，(d) 3377 (N,2-二甲基丙胺鹽基-N-{(1S,2R)-4-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-2-甲氧基-1-[(1S)-1-甲基丙基]-4-側氧基丁基}-N-甲基-L-纈胺鹽胺，三氟乙酸鹽)，及(e) 8261 (2-甲基丙胺鹽基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺鹽胺)。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，其中 L-D 係選自：

具有下式之 vc0101：



及具有下式之 vc6780：



在另一實施態樣中，本發明提供抗體－藥物共軛體，

其中 Ab 包含：(a)具有 SEQ ID NO:13 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之重鏈可變區及(b)具有 SEQ ID NO:25 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之輕鏈可變區。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，其中 Ab 包含：(a)包含 SEQ ID NO:15 之重鏈 CDR1；(b)包含 SEQ ID NO:19 之重鏈 CDR2；(c)包含 SEQ ID NO:23 之重鏈 CDR3；(d)包含 SEQ ID NO:27 之輕鏈 CDR1；(e)包含 SEQ ID NO:29 之輕鏈 CDR2；及(f)包含 SEQ ID NO:31 之輕鏈 CDR3。

在另一實施態樣中，本發明提供抗體－藥物共軛體，其中 Ab 包含：(a)包含 SEQ ID NO:37 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之重鏈可變區；及(b)包含 SEQ ID NO:49 之 CDR1、CDR2 及 CDR3 之輕鏈可變區。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，其中 Ab 包含：(a)包含 SEQ ID NO:39 之重鏈 CDR1；(b)包含 SEQ ID NO:43 之重鏈 CDR2；(c)包含 SEQ ID NO:47 之重鏈 CDR3；(d)包含 SEQ ID NO:51 之輕鏈 CDR1；(e)包含 SEQ ID NO:53 之輕鏈 CDR2；及(f)包含 SEQ ID NO:55 之輕鏈 CDR3。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，其中 Ab 包含選自下列之經建構之人 IgG1 重鏈恆定結構域(Cy)多肽：(a)如 SEQ ID NO:61 所示在位置 L443 具有一個胺基酸取代及(b)如 SEQ ID NO:65 所示在位置 L443 及 K392 具有二個胺基酸取代，該位置編號根據卡巴(Kabat)之 EU 指數。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，其中 Ab 包含經建構之人 κ 輕鏈恆定結構域(CK)多肽，其如 SEQ ID NO:63

所示在位置 κ K183 具有一個胺基酸取代，該位置編號根據卡巴(Kabat)之 EU 指數。

本發明另提供一種醫藥組成物，其具有本發明之任何抗體或彼之抗原結合片段或本發明之任何抗體－藥物共軛體及醫藥上可接受之載劑。

另外，本發明提供一種於需要治療之病患治療與切口 3 表現有關之症狀之方法，該方法包含對該病患投予本發明之任何抗體－藥物共軛體或醫藥組成物。本發明亦提供治療癌之方法，其中該癌係實質腫瘤之癌。另外，本發明提供治療實質腫瘤之癌之方法，該癌包括但不限於肺癌、乳癌、卵巢癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、頭頸癌、膀胱癌、肝癌、皮膚癌及肉瘤。本發明亦提供治療癌之方法，其中該癌係包括但不限於 T 細胞惡性病、T 細胞白血病、T 細胞淋巴瘤、T 細胞急性淋巴胚細胞性白血病、多發性骨髓瘤、B 細胞惡性病、骨髓性惡性病、急性骨髓性白血病及慢性骨髓性白血病之血癌。

本發明提供用於治療之本發明之任何抗體－藥物共軛體或醫藥組成物。本發明另提供治療用途，其中該癌係實質腫瘤之癌。本發明亦提供治療用途，其中該實質腫瘤之癌包括但不限於肺癌、乳癌、卵巢癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、頭頸癌、膀胱癌、肝癌、皮膚癌及肉瘤。本發明亦提供治療用途，其中該癌係包括但不限於 T 細胞惡性病、T 細胞白血病、T 細胞淋巴瘤、T 細胞急性淋巴胚細胞性白血病、多發性骨髓瘤、B 細胞惡性病、骨髓性惡性

病、急性骨髓性白血病及慢性骨髓性白血病之血癌。本發明另提供本發明之任何抗體－藥物共軛體於製造供治療的藥物之用途。本發明另提供本發明之任何抗體－藥物共軛體之用途，其中該用途係供治療切口 3 表現性癌。

本發明另提供編碼本發明之切口 3 抗體或彼之抗原結合片段之核酸、包含該核酸之載體及包含該載體之宿主細胞。本發明亦提供一種用於產製本發明之切口 3 抗體之方法，其中該方法包含培養包含該上述之載體之宿主細胞及自該細胞培養回收該抗體。

在另一實施態樣中，本發明提供一種用於產製本發明之抗體－藥物共軛體之方法，該方法包含：連接 L 與 D；使該 L-D 與自本發明之培養所回收之抗體共軛；及純化該抗體－藥物共軛體。

本發明另提供抗體－藥物共軛體，該抗體－藥物共軛體具有與切口 3 專一性結合之本發明之抗體或彼之抗原結合片段。

在另一實施態樣中，本發明提供一種用於預測罹癌個體是否對本發明之任何抗體－藥物共軛體有反應之方法，該方法藉由測定來自該個體之生物樣本是否表現切口 3。

本發明另提供一種測定生物樣本中之切口 3 的量之方法，該方法包含下列步驟：使來自疑似罹癌之個體的樣本與本發明之任何抗體或彼之抗原結合片段接觸；測定該樣本中之細胞表面的切口 3 之量；及比較該細胞表面的切口 3 之量與參考個體或標準物之該量。

本發明之詳細說明

本發明提供用於治療癌之抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段及抗體－藥物共軛體(ADC)。爲了更清楚地瞭解本發明，首先定義一些用語及常規技術。

本揭示內容中使用之所有胺基酸縮寫係該些於 37 C.F.R. § 1.822 (d)(1)闡述之美國專利商標局接受之縮寫。

除非此處另外加以定義，關於本發明所使用之科學性及技術性用語應具有該領域之一般技藝人士所通常了解之意義。另外，除非內文另外要求，單數用語應包括複數意義且複數用語應包括單數意義。一般來說，與此處所描述之細胞及組織培養、分子生物學、免疫學、微生物學、基因學以及蛋白質及核酸化學和雜交有關所使用之命名法及技術係該領域所廣爲週知且經常使用者。

本發明之方法及技術通常根據該領域所廣爲周知之習用方法進行，除非另外說明否則如同本說明書各處引述及討論之各種一般性及更具體之參考文獻所述。見例如 Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2000); Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Cold Spring Harbor, N.Y.(1998); and Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)。

「切口 3」或「切口-3」係指人切口 3 蛋白之天然體、變異體、異構體及種同源體。舉例來說，天然人切口 3 蛋白係由前導肽、大型表皮生長因子(EGF)樣重複區、三個 Lin12 重複、N 端異二聚結構域(HD-1)、C 端異二聚結構域(HD-2)、跨膜(TM)序列及細胞內結構域(切口 3^{ICD})組成。全長人切口 3 之 NCBI/GenBank 編號係 NM_000435.2。

此處所使用之「切口 3 負調節區」或「切口 3 NRR」除非另外說明，係指由三個 Lin12 結構域及位於該三個 Lin12 結構域之間的胺基酸序列，加上切口 3 之 HD1 及 HD2 結構域所組成之切口 3 的任何天然或合成之多肽區。在一實施態樣中，「切口 3 NRR」包括三個 Lin12 結構域及二個異二聚體結構域 HD-1 及 HD-2，其中切口 3 之 HD-1 及 HD-2 結構域係經共價鍵結且尚未經弗林樣蛋白酶切割（在 S1 切割之前）。在另一實施態樣中，「切口 3 NRR」包括三個 Lin12 結構域及二個異二聚體結構域 HD-1 及 HD-2，其中 HD-1 及 HD-2 結構域係非共價鍵結（在 S1 切割之後）。在此實施態樣之一態樣中，在 HD-2 結構域內之 S2 位點尚未被 ADAM 型之金屬蛋白酶切割。在此實施態樣之另一特定態樣中，在 HD-2 結構域內之 S2 位點係經或已被 ADAM 型之金屬蛋白酶切割。（Gordon,

W.R., et.al, Nature Structural & Molecular Biology, 2007, volume 14, 295-300)。

「抗體」或「Ab」係免疫球蛋白分子，其可透過位於該免疫球蛋白分子之可變區的至少一個抗原辨認區專一性地與目標（諸如碳水化合物、多核苷酸、脂肪、多肽等）結合。此處所使用之用語「抗體」不僅包含完整之多株或單株抗體，但亦包含維持與給定抗原（例如切口 3）專一性結合之能力的完整抗體之任何抗原結合部分（例如「抗原結合片段」）或彼等之單鏈、包含抗體之融合蛋白、及包含抗原辨認區之免疫球蛋白分子之任何其他經修飾之構型，包括例如但不限於 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd 片段、Fv 片段、單結構域抗體(dAb)片段、經分離之互補決定區(CDR)、單鏈(scFv)及單結構域抗體（例如鯊魚及駱駝抗體）、大型抗體(maxibodies)、迷你抗體(minibodies)、細胞內抗體(intrabodies)、雙價抗體、三價抗體、四價抗體、v-NAR 及 bis-scFv（見例如 Hollinger and Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136）。抗體包括任何類型之抗體，諸如 IgG、IgA 或 IgM（或彼等之亞型），且該抗體不需要是任何特定類型。根據免疫球蛋白之重鏈的恆定區之抗體胺基酸序列，其可被分成不同類型。有五種主要的免疫球蛋白類型：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，其中某些類型可進一步分成亞型（同型），例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。對應不同類型之免疫球蛋白的重鏈(HC)恆定區

分別被稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同類型之免疫球蛋白的次單位結構及三維構型係廣為週知。

「經分離之抗體」係指實質上不含其他具有不同抗原專一性之抗體的抗體（例如與切口 3 專一性結合之經分離之抗體實質上不含與切口 3 以外之抗原專一性結合之抗體）。然而，與切口 3 專一性結合之經分離之抗體可能具有對其他抗原（諸如其他物種之切口 3 分子）之交叉反應性。另外，經分離之抗體可能實質上不含其他細胞材料及／或化學物。

抗體之「可變區」係指抗體輕鏈(VL)之可變區或抗體重鏈(VH)之可變區（不論單獨或組合指稱）。如該領域所知，重鏈及輕鏈之可變區各由四個架構區(FR)及連接彼等之又稱超變異區之三個互補決定區（CDR1、CDR2、CDR3）組成，以形成該抗體之抗原結合部位。若主體可變區之變異體係為所欲，特別是具有 CDR 區以外（即架構區）之胺基酸殘基取代，適當之胺基酸取代（較佳地保守性胺基酸取代）可藉由比較該主體可變區與其他包含和該主體可變區相同之典範類型(canonical class)的 CDR1 及 CDR2 序列之抗體的可變區加以識別(Chothia and Lesk, J Mol Biol 196(4):901-917, 1987)。當選擇 FR 以於旁側連接主體 CDR 時，例如當人化或最佳化抗體時，源自包含該相同典範類型之 CDR1 及 CDR2 序列的抗體之 FR 係較佳。

可變結構域之「CDR」係位於可變區內之胺基酸殘

基，其界定係根據卡巴(Kabat)定義、柯西亞(Chothia)定義、卡巴及柯西亞之累積定義、AbM 定義、接觸定義及／或構形定義，或該領域廣為周知之任何 CDR 界定方法。抗體 CDR 可能被界定為原本由卡巴等人所定義之超變異區。見例如 Kabat et al., 1992, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.。CDR 之位置亦可能被界定為最先由柯西亞等人所描述之結構性圈環結構。見例如 Chothia et al., 1989, *Nature* 342:877-883。其他界定 CDR 之方法包括「AbM 定義」，其係卡巴法及柯西亞法之折衷，源自利用牛津分子(Oxford Molecular)之 AbM 抗體模型軟體（現為 Accelrys®），或如 MacCallum et al., 1996, *J. Mol.Biol.*, 262:732-745 所述以觀察到之抗原接觸為基礎之 CDR 的「接觸定義」。在此處稱為 CDR 之「構形定義」之另一方法中，CDR 之位置可能被界定為對抗原結合造成焓貢獻之殘基。見例如 Makabe et al., 2008, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166。其他 CDR 邊界定義可能仍不嚴格遵守上述方法中之一者，但將與至少部分之卡巴 CDR 重疊，不過它們可能根據特定殘基或殘基群或甚至整個 CDR 不顯著影響抗原結合之預測或實驗結果被縮短或延長。此處所使用之 CDR 可能指由該領域已知之任何方法（包括多種方法之組合）所定義之 CDR。此處所使用之方法可利用根據這些方法中任一者所定義之 CDR。以包含超過一種 CDR 之任何給定實施態樣而言，

該 CDR 可根據卡巴、柯西亞、延長、AbM、接觸及／或構形定義中任一者加以定義。

用語「IgG Fc 區」、「Fc 區」、「Fc 結構域」及「Fc」在此處可交換使用，係指 IgG 分子之可藉由木瓜酶消化 IgG 分子所獲得之可結晶片段之部分。該 Fc 區係由 IgG 分子之二條重鏈的 C 端半組成，該等 C 端半由雙硫鍵連接。其不具抗原結合活性，但包含碳水化合物基團及補體及 Fc 受體包括 FcRn 受體之結合位點（見下）。該 Fc 片段包含完整的第二恆定結構域 CH2（人 IgG1 之殘基 231 至 340，根據卡巴系統）及第三恆定結構域 CH3（殘基 341 至 447）。

此處之用語「經建構之 Fc 多肽」、「經建構之 Fc 區」及「經建構之 Fc」可交換使用，係指包含至少一個突變（例如胺基酸取代）以導入供共軛之位點之 Fc 多肽或彼之部分。較佳地，該突變導入半胱胺酸以取代該位置天然發生之胺基酸殘基，該突變在該處產生反應性位點（例如反應性氫硫基）以供基團與該 Fc 共軛。

用語「單株抗體」或「mAb」係指源自單一細胞或細胞株之抗體，包括例如任何真核、原核或噬菌體株，並不是指彼之產製方法。較佳地，本發明之單株抗體存在於均質或實質上均質之族群。

「人化」抗體係指非人（例如大鼠）抗體之形式，其為包含源自非人免疫球蛋白之最少序列之嵌合性免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或彼等之片段（諸如 Fv、Fab、Fab'、

F(ab')₂ 或抗體之其他抗原結合子序列)。較佳地，人化抗體係其中源自接受者之互補決定區(CDR)的殘基被源自諸如具有該所欲特異性、親和性及能力之小鼠、大鼠或兔等非人物種(捐贈者抗體)之 CDR 的殘基所取代之人免疫球蛋白(接受者抗體)。

「人抗體或全人抗體」係指該些源自帶有人抗體基因之基因轉殖小鼠或源自人細胞之抗體。

用語「嵌合抗體」係用來指其中該可變區序列係源自一物種且該恆定區序列係源自另一物種之抗體，諸如其中該可變區序列係源自大鼠抗體且該恆定區序列係源自人抗體之抗體。

「治療劑」係指對癌細胞或活化免疫細胞具有細胞毒性、細胞靜止及／或免疫調節效應之劑。治療劑之實例包括細胞毒性劑、化學治療劑、細胞靜止劑及免疫調節劑。

「化學治療劑」係可用於治療癌之化學化合物。

「細胞毒性效應」係指除盡、消除及／或殺死標靶細胞。「細胞毒性劑」係指對細胞具有細胞毒性及／或細胞靜止效應之劑。

「細胞靜止效應」係指抑制細胞增生。「細胞靜止劑」係指對細胞具有細胞靜止效應之劑，藉以抑制特定細胞亞群之生長及／或擴張。

「抗體－藥物共軛體」或「ADC」係指與切口 3 結合且與細胞毒性劑、細胞靜止劑及／或治療劑共軛之抗體或彼之抗體片段包括抗體衍生物。

「抗切口 3 抗體－藥物共軛體」或「抗切口 3 ADC」係指如此處所述之與藥物(D)經由連接子(L)連接之抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段。

「連接子(L)」描述該抗體與該藥物間之直接或間接鍵結。將連接子連接至抗體可經由許多方式達成，諸如經由表面離胺酸、還原偶合至經氧化之碳水化合物、及經由還原鏈間雙硫鍵所釋放之半胱胺酸殘基。多種抗體－藥物共軛體鍵接系統係該領域所知，包括以胺、雙硫及肽為基底之鍵接。

「藥物(D)」係具有生物活性或可偵測之活性之任何物質（例如治療劑、可偵測之標記、結合劑等）及在活體內被代謝成活性劑之前藥。用語藥物、載荷藥物及化合物可互相交換使用。

「L-D」係由藥物(D)與連接子(L)連接所導致之連接子-藥物部分。

用語「表位」係指能被抗體之一或多個抗原結合區所辨認及結合之分子的部位。表位通常由分子之化學活性表面基團組成，諸如胺基酸或糖側鏈，且具有特定三維結構特徵以及特定電荷特徵。此處使用之用語「抗原性表位」係定義為可被抗體專一性結合之多肽的部分，該結合藉由該領域廣為周知之任何方法（例如習用之免疫測定法）測定。「非線性表位」或「構型表位」包含對該表位具專一性之抗體所結合之抗原性蛋白內之不連續多肽（或胺基酸）。一旦決定在抗原上之所欲表位，即可使用例如此處

所述之技術，針對該表位產製抗體。在發現過程中，抗體之產製及特徵化可闡釋有關所欲表位之資訊。有此資訊即有可能競爭性地篩選與該相同表位結合之抗體。一種達到此目的之方法係進行競爭及交叉競爭試驗以找到彼此競爭或交叉競爭之抗體，例如競爭與抗原結合之抗體。

此處所使用之用語「結合親和性(K_D)」係意圖指稱特定抗原-抗體交互作用之解離速率。 K_D 係解離速率（或稱為 off-rate(k_d)）對結合速率（或 on-rate(k_a)）之比。因此， K_D 等於 k_d / k_a ，並以莫耳濃度(M)表示。由此可知當 K_D 越小時，該結合之親和性越強。因此， K_D 等於 1 μ M 表示相較於 K_D 等於 1 nM 具有微弱之結合親和性。抗體之 K_D 值可利用該領域完整建立之方法測定。一種用於測定抗體之 K_D 之方法係藉由利用表面電漿共振，通常使用諸如 Biacore®系統之生物感測器系統。

與標靶（例如切口 3 蛋白）「優先結合」或「專一性結合」（在此處可互換使用）之抗體、抗體共軛物或多肽係該領域理解清楚之用語，測定該等專一性或優先結合之方法亦為該領域所廣為周知。若分子與特定細胞或物質之交互反應或相連相較於與其他細胞或物質之交互反應或相連係更頻繁、更快速、更長時間及／或更高親和性，該分子被稱為展現「專一性結合」或「優先結合」。若抗體與標靶之結合相較於與其他物質之結合具有更高親和性、親合力(avidity)、更快速及／或更長時間，則該抗體與標靶「專一性結合」或「優先結合」。舉例來說，與切口 3 表

位專一性或優先地結合之抗體係指相較於彼與其他切口 3 表位或非切口 3 表位結合時以更高之親和性、親合力、更快速及／或更長時間地與此表位結合之抗體。藉由閱讀此定義亦可了解，舉例來說，與第一標靶專一性或優先結合之抗體（或部分或表位）可能與第二標靶或不與第二標靶專一性或優先結合。因此，「專一性結合」或「優先結合」不一定需要（雖然可包括）排他性結合。一般來說（但不必然），所謂的結合係指優先結合。「 EC_{50} 」為結合能力之測量值，係定義為要產生介於基準值與最大值之間一半的反應所需之抗體或抗體－藥物共軛體之半數最高有效濃度。

此處所使用之「醫藥上可接受之鹽」係指分子或巨分子之醫藥上可接受之有機或無機鹽。

用語「效力」係生物活性之測量值，可以 IC_{50} 表示，或分別如實施例 9 及 12 所描述之抑制 50% 之切口 3 依賴性報告基因活性或切口 3 陽性細胞系生長所需之抗切口 3 抗原之抗體或抗體－藥物共軛體之抑制濃度。

此處使用之用語「有效量」或「治療有效量」係指達到所欲治療結果所需之量（劑量及所需時間期間及投予裝置）。有效量係活性劑之至少最小量，但小於有毒量，該量為授予個體治療效益所需。

此處提及本發明之抗體的生活性所使用之用語「抑制」或「中和」係指該抗體實質上拮抗、抑制、預防、克制、延緩、擾亂、消除、停止、減少或逆轉例如該被抑制

者包括但不限於生物活性之進展或嚴重性之能力。

此處關於抗體所使用之用語「競爭」係指第一抗體或彼之抗原結合片段與表位結合之方式充份類似於第二抗體或彼之抗原結合片段之結合，使得第一抗體與彼之同源表位在第二抗體存在時之結合結果相較於第二抗體不存在時第一抗體之結合可偵測地降低。或者，該情況可為但不一定是該第二抗體與彼之表位之結合亦因第一抗體之存在而可偵測地降低。也就是說，第一抗體可抑制第二抗體與彼之表位之結合，但第二抗體不抑制該第一抗體與彼之個別表位之結合。然而，當各種抗體不論以相同、較高或較低程度可偵測地抑制另一抗體與彼之同源表位或配體結合時，該等抗體被稱為彼此「交叉競爭」與彼等個別表位之結合。本發明包含競爭抗體及交叉競爭抗體。不論該競爭或交叉競爭所藉以發生之機轉為何（例如空間位阻、構形變化或與共同表位或彼之片段結合），技藝人士將了解根據此處所提供之揭示，本發明包含競爭及/或交叉競爭抗體且彼等可被用於此處所揭示之方法。

此處所使用之用語「多核苷酸」或「核酸分子」係意圖包括 DNA 分子及 RNA 分子。核酸分子可為單股或雙股，但較佳係雙股 DNA。

編碼本發明之抗體之多核苷酸可能包括下列：僅該變異體之編碼序列、該變異體之編碼序列及額外之編碼序列諸如功能性多肽或信號或分泌性序列或原蛋白質序列、該抗體之編碼序列及非編碼序列諸如該抗體之編碼序列的內

含子或 5'及／或 3'非編碼序列。用語「編碼抗體之多核苷酸」包含包括額外之變異體的編碼序列之多核苷酸，但亦包含包括額外之編碼及／或非編碼序列之多核苷酸。該領域已知的是，對於特定宿主細胞／表現系統而言，最佳化之多核苷酸序列可輕易地得自該所欲蛋白質之胺基酸序列（見 GENEART AG，德國雷根斯堡 (Regensburg, Germany)）。

「宿主細胞」包括可以或已經接受載體以導入多核苷酸插入物之個別細胞或細胞培養物。宿主細胞包括單一宿主細胞之後代，且該後代可能因為天然、意外或蓄意突變而不一定與原始親代細胞完全相同（在形態學或基因學 DNA 互補性上）。宿主細胞包括經本發明之多核苷酸在活體內轉染之細胞。

用語「載體」係指建構物，其能在宿主細胞中遞送及較佳地表現一或多種感興趣之基因或序列。載體之實例包括但不限於病毒性載體、裸 DNA 或 RNA 表現載體、質體載體、黏質體載體、噬菌體載體、與陽離子縮合劑有關之 DNA 或 RNA 表現載體、包封於脂質體中之 DNA 或 RNA 表現載體及某些真核細胞諸如生產細胞。

用語「表現控制序列」係引導核酸轉錄之核酸序列。表現控制序列可為啓動子，諸如組成性或誘導性啓動子或增強子。表現控制序列係可操作地與所欲轉錄之核酸序列連接。

編碼本發明之抗體之多核苷酸通常將包括與該抗體編

碼序列可操作性連接之表現控制多核苷酸序列，包括該領域已知之天然相關性或異源性啟動子區域。較佳地，該表現控制序列將為能轉形或轉染真核宿主細胞之載體中的真核啟動子系統，但用於原核宿主之控制序列亦可被使用。一旦該載體被納入適當宿主細胞系之後，該宿主細胞在適合表現該核苷酸序列之條件下增殖，及如所欲之收集及純化該抗體。較佳之真核細胞系包括 CHO 細胞系、各種 COS 細胞系、海拉(HeLa)細胞、骨髓瘤細胞系、經轉形之 B 細胞、或人胚胎腎細胞系。最佳之宿主細胞係 CHO 細胞系。

抗體

本發明之抗體可利用該領域廣為周知之技術製備，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、或該領域已知之其他技術（見例如 Jayasena, S.D., Clin.Chem., 45:1628-50 (1999)及 Fellouse, F.A., et al, J. Mol.Biol., 373(4):924-40 (2007)）。

本發明之一實施態樣係一種抗體，該抗體與包含與 SEQ ID NO:13 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第一胺基酸序列及與 SEQ ID NO:25 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第二胺基酸序列之抗體所結合之相同的切口 3 表位專一性結合。

本發明之另一實施態樣係一種抗體，該抗體與包含與

SEQ ID NO:37 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第一胺基酸序列及與 SEQ ID NO:49 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第二胺基酸序列之抗體所結合之相同的切口 3 表位專一性結合。

在一些實施態樣中，該抗體或彼之抗原結合片段與切口 3 專一性結合，且該抗體或彼之抗原結合片段與包含與 SEQ ID NO:13 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第一胺基酸序列及與 SEQ ID NO:25 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第二胺基酸序列之抗體競爭該結合。

在一些實施態樣中，該抗體或彼之抗原結合片段與切口 3 專一性結合，且該抗體或彼之抗原結合片段與包含與 SEQ ID NO:37 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第一胺基酸序列及與 SEQ ID NO:49 具有至少 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致性之第二胺基酸序列之抗體競爭該結合。

藥物與抗體之共軛

該藥物已經或係經修飾以包括與該抗體上之共軛點具反應性之基團。舉例來說，藥物可藉由烷化（例如該抗體之 ϵ -胺基離胺酸或 N 端）、經氧化之碳水化合物的還原胺化、羥基與羧基之間的轉酯化、醯胺化胺基或羧基及與硫醇共軛加以連接。在一些實施態樣中，與每個抗體分子

共軛之藥物的數目 p 介於 1 至 12、1 至 11、1 至 10、1 至 9、1 至 8、1 至 7、1 至 6、1 至 5、1 至 4、1 至 3、或 1 至 2 之平均值。在一些實施態樣中， p 介於 2 至 12、2 至 11、2 至 10、2 至 9、2 至 8、2 至 7、2 至 6、2 至 5、2 至 4、或 2 至 3 之平均值。在其他實施態樣中， p 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 之平均值。在一些實施態樣中， p 介於約 1 至約 12、約 1 至約 11、約 1 至約 10、約 1 至約 9、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 或約 1 至約 2 之平均值。在一些實施態樣中， p 介於約 2 至約 12、約 2 至約 11、約 2 至約 10、約 2 至約 9、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 或約 2 至約 3。以可被用於共軛之化學為例，見例如 *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc.), Chapter 15 (Chemical Modifications of Proteins)。

連接子

連接子係可被用於連接藥物及抗體以形成抗體藥物共軛體 (ADC) 之雙功能性化合物。該等共軛體可被用於例如形成針對腫瘤相關抗原之免疫共軛物。該等共軛體允許選擇性遞送細胞毒性藥物至腫瘤細胞。適當之連接子包括例如可切割及不可切割之連接子。可切割之連接子在細胞內之條件下通常易受切割。適當之可切割性連接子包括例如可被細胞內蛋白酶（諸如溶酶體蛋白酶或核內體蛋白酶）

切割之肽連接子。在示範性實施態樣中，該連接子可為雙肽連接子，諸如纈胺酸-瓜胺酸(val-cit)、苯丙胺酸-離胺酸(phe-lys)連接子或順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-p-胺基苯甲氧基羰基(vc)連接子。另一連接子係磺基琥珀醯亞胺基-4-[N-順丁烯二醯亞胺基甲基]環己烷-1-羧酸酯(smcc)。磺基-smcc 共軛經由順丁烯二醯亞胺基發生，該順丁烯二醯亞胺基與氫硫基（硫醇基，-SH）反應，同時彼之磺基-NHS 酯係對一級胺有反應性(如在離胺酸及該蛋白質或肽 N 端中可見)。還有另一種連接子係順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)。其他適當之連接子包括可在特定 pH 或 pH 範圍內被水解之連接子，諸如脲連接子。其他適當之可切割性連接子包括二硫化物連接子。該連接子可與該抗體共價連接，該共價連接之程度使得該抗體必須在細胞內被降解才能讓該藥物被釋放，例如 mc 連接子及該類似物。

本發明之連接子包括順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-p-胺基苯甲氧基羰基(vc)、順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)、me 及 MalPeg6C2。

經建構之 Fc 多肽

先前有報告指出，若干假定存在於抗體之重鏈的 CH2 或 CH3 結構域之表面上的殘基，或在該輕鏈之恆定結構域之上的殘基，或可以其他方式接近之殘基，適合用於以例如半胱胺酸取代天然發生之野生型胺基酸，因此可用於

建構能與各種劑共軛之位點，如國際專利號 WO/2013/093809（其以參照方式納入本文）所述。

胺基酸修飾可藉由該領域已知之任何方法進行，許多該等方法為該領域之技藝人士所廣為周知及例行。例如（但無限制之意），胺基酸取代、刪除及插入可利用任何廣為周知之 PCR 基底技術完成。胺基酸取代可藉由定點突變作用進行（見例如 Zoller and Smith, 1982, Nucl.Acids Res.10:6487-6500; and Kunkel, 1985, Proc.Natl.Acad.Sci USA 82:488）。

在一些實施態樣中，所揭示之該經建構之 Fc 多肽可被用於製備抗體或彼之抗原結合片段，以使得該抗體或其片段藉以包含該可被用於共軛之經建構之 Fc 區，其中該經建構之殘基（相較於野生型未經修飾之 Fc 為經取代之胺基酸）與廣泛種類之基團共軛。

在一些實施態樣中，所揭示之該經建構之 κ 輕鏈恆定多肽可被用於製備抗體或彼之抗原結合片段，以使得該抗體或其片段藉以包含可被用於共軛之包含胺基酸突變之經建構之 CL 區或其片段，其中該經建構之胺基酸殘基與廣泛種類之基團共軛。

應注意的是，在 Fc 多肽中之單一取代，例如半胱胺酸殘基，通常導致該形成之 IgG 抗體中展示二個對應殘基，這是因為 IgG 抗體分子之同型二聚體性質。因此，本發明所形成之經建構之 IgG 抗體可能展示至少 1、2、3、4 或更多個可供與藥物或化合物共軛之用的反應基。在一

實施態樣中，一或多個取代係半胱胺酸殘基之取代，所形成之經建構之抗體可能展示至少 1、2、3、4 或更多個可供與藥物或化合物共軛之用的硫醇基。

在一些實施態樣中，本發明之經建構之 Fc 多肽包含一或多個選自抗體之重鏈的位置 443 及 392 之取代，且其中恆定區之編號系統係如 Kabat et al. (同上) 所述之 EU 指數。

在一些實施態樣中，該經建構之 Fc 多肽包含如 SEQ ID NO:61 所提供之一個胺基酸取代(L443C)。在另一實施態樣中，該經建構之 Fc 多肽包含如 SEQ ID NO:65 所提供之二個胺基酸取代(L443C/K392C)。

經建構之 C κ 多肽

本發明之抗切口 3 抗體可包含經建構之抗體輕鏈恆定區(LC)或其片段，其中該輕鏈恆定區之編號系統係如 Kabat et al.(1991, NIH Publication 91- 3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) (以下簡稱「卡巴」) 所述之卡巴編號系統，其中母代、天然或野生型抗體之抗體輕鏈的 1、2 或 3 個胺基酸係經另一胺基酸取代 (包括天然及非天然／合成胺基酸)。

在其他實施態樣中，由於許多抗體之二聚體特性 (例如 IgG 包含二條輕鏈及二條重鏈，各重鏈包含一 Fc 多肽)，本發明之抗體可包含至少一個經建構之 Fc 多肽，且可另包含至少一個經建構之輕鏈恆定多肽，藉以提供至

少二個定點共軛位點（一個在 Fc 多肽，另一個在 CL 多肽）。

在一些實施態樣中，本發明之該經建構之 C κ 多肽在該抗體之輕鏈的位置 183 包含至少一個取代。在一些實施態樣中，該經建構之 C κ 多肽包含如 SEQ ID NO:63 所提供之一個胺基酸取代(κ K183C)。

癌治療

癌（包括但不限於腫瘤、轉移或其他以不受控制之細胞生長為特徵之疾病或病狀）可藉由投予本發明之抗體或彼之抗原結合片段或抗體－藥物共軛體(ADC)加以治療或預防。

例示性抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段及抗體－藥物共軛體可用於治療其中切口 3 相較於參考個體或標準物（例如非癌性或正常組織）係經表現或過度表現之癌。根據本文所述之方法，切口 3 表現癌之治療或預防可藉由對需要該治療之個體投予有效量之抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段及／或抗體－藥物共軛體達成。在一些實施態樣中，與細胞毒性劑共軛之抗切口 3 全長抗體或彼之抗原結合片段將被投予。在一些例示性實施態樣中，本發明之抗切口 3 抗體－藥物共軛體將(i)與切口 3 表現癌細胞結合，及(ii)展現細胞毒性或細胞靜止效果，以例如抑制該切口 3 表現癌細胞之增生，或殺滅切口 3 表現癌細胞。

在其他實施態樣中，該抗切口 3 抗體或彼之抗原結合

片段，及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體係與另一治療劑共投，或與另一治療劑依序投予。在一些實施態樣中，該抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段，及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體係與化學治療劑共投或依序投予，該化學治療劑包括照護標準化學治療劑。

在一些實施態樣中，該其他治療劑將為所欲治療之特定疾病的標準照護劑，或為所欲治療之特定疾病的救援療法之一部分。抗癌劑及化學治療療法包括例如抗癌抗體，包括例如抗 CD52 抗體（例如阿來組單抗(Alemtuzumab)）、抗 CD20 抗體（例如利妥昔單抗(Rituximab)）及抗 CD40 抗體（例如 SGN40）；化學治療療法包括例如 CHOP（環磷醯胺(cyclophosphamide)、多柔比星(doxorubicin)、長春新鹼(vincristine)及強體松(prednisone)）；CVP（環磷醯胺、長春新鹼及強體松）；RCVP（利妥昔單抗+CVP）；RCHOP（利妥昔單抗+CHOP）；RICE（利妥昔單抗+異環磷醯胺(ifosamide)、卡鉑(carboplatin)、依托泊苷(etoposide)）；RDHAP（利妥昔單抗+地塞米松(dexamethasone)、阿糖胞苷(cytarabine)、順鉑(cisplatin)）；RESHAP（利妥昔單抗+依托泊苷、甲基培尼皮質醇(methylprednisolone)、阿糖胞苷、順鉑）；吉西他濱(gemcitabine)；長春新鹼、強體松與蒽環類(anthracycline)之組合療法，不論有無天冬醯胺酶；正定黴素(daunorubicin)、長春新鹼、強體松與天冬醯胺酶之組合療法；替尼泊苷(teniposide)與 Ara-C（阿糖胞苷）之組

合療法；甲胺喋呤(methotrexate)與菊白葉酸之組合療法；博來黴素(bleomycin)、多柔比星、依托泊苷、雙氯乙基甲胺(mechlorethamine)、強體松、長春鹼(vinblastine)與長春新鹼之組合療法；小分子抑制劑；及蛋白體抑制劑包括例如硼替佐米(bortezomib)。

在一些實施態樣中，治療癌之方法包括對需要治療之病患投予有效量之抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段，及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體與放射治療及可任選地另一治療劑之組合。在一些實施態樣中，該抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體係與抗癌劑（例如化學治療劑）及／或放射治療共同或依序投予。在一些實施態樣中，該化學治療劑或放射治療係於投予本發明之化合物之前或之後至少 1 小時、5 小時、12 小時、1 天、1 周、1 月、數月（例如最長 3 個月）投予。

通常，在投予抗切口 3 抗體及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體時，初始候選劑量可為約 2 mg/kg。就本發明之目的而言，典型之每日劑量可根據上述因子介於自約 3 微克/公斤至 30 微克/公斤、至 300 微克/公斤、至 3 毫克/公斤、至 30 毫克/公斤、至 100 毫克/公斤或至 100 毫克/公斤以上之任何範圍內。舉例來說，可使用約 1 毫克/公斤、約 2.5 毫克/公斤、約 5 毫克/公斤、約 10 毫克/公斤及約 25 毫克/公斤之劑量。視狀況而在數天或更久期間內重複投予時，該治療係持續進行直到發生所欲之症狀抑制或達成足夠之治療量，例如抑制或延緩腫瘤生長／惡化或

癌細胞轉移。示範性給藥方案包含投予初始劑量約 2 毫克/公斤之抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體，隨後投予每週約 1 毫克/公斤之維持劑量或隔週約 1 毫克/公斤之維持劑量。其他示範性給藥方案包含投予漸增之劑量（例如初始劑量 1 mg/kg，逐漸增加至每周或更長期間給予一或多個更高之劑量）。其他給藥方案亦可根據醫師所希望達成之藥物動力學衰減模式使用。舉例來說，在一些實施態樣中，每週投藥一至四次係經考慮。在其他實施態樣中，每月投藥一次或隔月或每三個月投藥一次係經考慮，也考慮每周、每二周及每三周投藥一次。此治療之進展可藉由習知技術及檢測加以輕易地監測。該給藥方案（包括所使用之抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體）可隨時間而異。

就本發明之目的而言，該抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體之適當劑量將依所採用之抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體（或彼等之組成物）、所欲治療之症狀的類型及嚴重性、該劑是否以治療性目的投予、先前治療、該病患之臨床病史及對該劑之反應、該病患清除該經投予之劑之速率及主治醫師之考量而定。醫師可能持續投予抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體直到達到可達成且超越所欲結果之劑量。劑量及／或頻率可依療程而異，但也可能維持固定。經驗性考量諸如半衰期通常將影響該劑量之決定。舉例來說，可相容於人免疫系統之抗體諸如人化抗體或全人抗體可被用以延長該抗體之半

衰期及防止該抗體被宿主之免疫系統攻擊。投予頻率可在療程當中決定及調整，通常但不一定根據症狀之治療及／或抑制及／或改善及／或延緩，例如腫瘤生長之抑制或延緩等。或者，抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體之持續性連續釋放調製劑可為適當。各種用於達成持續釋放之調製劑及裝置係該領域所知。

在一實施態樣中，在已經接受過一或多次抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體投予之個體中，該抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體之劑量可能憑經驗決定。個體係經給予漸增劑量之抗切口 3 抗體或切口 3 拮抗劑。為了評估療效可追蹤疾病之指標。

根據本發明之方法投予抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體可為連續性或間歇性，依例如接受者之生理狀況、該投藥之目的係治療性或預防性及該領域之技藝人士所知之其他因素而定。抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－共軛體之投予可為實質上連續一段預先決定之時間，或可為一系列間隔劑量。

在一些實施態樣中，可能存在超過一種抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體。可能存在至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種不同或更多種抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體。通常，該等抗切口 3 抗體或抗切口 3 抗體－藥物共軛體可能具有不會互相不良影響之互補活性。例如，下列抗切口 3 抗體之一或更多者可能被使用：針對切口 3 上之一表位的第一抗切口 3 抗

體及針對切口 3 上之不同表位的第二抗切口 3 抗體。

本發明之抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體可為供投予之醫藥組成物之形式，其係經調製成適用於經選擇之投予模式，及醫藥上可接受之稀釋劑或賦形劑，諸如緩衝劑、界面活性劑、保存劑、助溶劑、等滲劑、穩定劑、載劑及該類似物。

Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton Pa., 18th ed., 1995 提供該領域通常熟知之調製技術的概要。

這些醫藥組成物可藉由該領域已知之可達成治療癌之一般性目的之任何方法投予。在一實施態樣中，該投予途徑係非經腸，在此處定義為包括但不限於靜脈內、肌肉內、腹腔內、皮下及關節內注射及輸注之投予模式。經投予之劑量將視接受者之年齡、健康及體重、併用治療之種類(若有的話)、治療頻率、及所欲效應之性質而定。

在本發明之範圍內的組成物包括其中抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段及／或抗切口 3 抗體－藥物共軛體係以能有效達成治療癌之所欲醫學效應的量存在之所有組成物。雖然個體需求可能因每位病患而異，決定該等所有成份之有效量的理想範圍係具有一般技藝之臨床醫師之能力範圍之內。

診斷

本發明之抗體或彼之抗原結合片段亦可被用於在活體

外或活體內檢測生物檢體之切口 3。在一實施態樣中，本發明之抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段係用於測定組織或源自該組織的細胞中之切口 3 的量。在一實施態樣中，該組織係生病組織。在一些實施態樣中，該組織係腫瘤或彼之活體樣本。在一實施態樣中，病患組織或活體樣本中之切口 3 的量可於使用本發明之抗體或彼之抗原結合片段的免疫測試中測定。該組織或彼之活體樣本可自病患切除，且可經冷凍或固定。相同方法可被用於測定切口 3 蛋白之其他性質，例如彼之細胞表面表現量或細胞定位。

上述方法可被用於診斷已知或疑似罹癌個體之癌，其中在病患測得之切口 3 之量係與參考個體或標準物之該量比較。該方法接著可被用於測定腫瘤是否表現切口 3，表現切口 3 表示該腫瘤可能對本發明之抗體－藥物共軛體之治療反應良好。在本發明之一實施態樣中，腫瘤係表現切口 3 之實質腫瘤癌，包括但不限於肺癌、乳癌、卵巢癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、頭頸癌、膀胱癌、肝癌、皮膚癌及肉瘤，或表現切口 3 之血癌包括但不限於 T 細胞惡性病(T-cell malignancies)、T 細胞白血病、T 細胞淋巴瘤、T 細胞急性淋巴胚細胞性白血病、多發性骨髓瘤、B 細胞惡性病(B-cell malignancies)、骨髓性惡性並(myeloid malignancies)、急性骨髓性白血病及慢性骨髓性白血病，以及尚未測定其中是否主要表現切口 3 之其他癌。

本發明之一實施態樣為一種治療切口 3 表現癌之方法，該方法包含測定生物樣本中之切口 3 的量，該測定包

含下列步驟：使得自疑似罹癌之個體的樣本與抗切口 3 抗體或彼之抗原結合片段接觸；測定該樣本中之細胞表面的切口 3 之量；比較該細胞表面的切口 3 之量與參考個體或標準物之該量；及對該個體投予本發明之抗體－藥物共軛體。該方法可任意選擇地包含自疑似罹癌之個體取得樣本之步驟。

本發明之另一實施態樣為一種治療切口 3 表現癌之方法，該方法包含測定生物樣本中之切口 3 的量，該測定包含下列步驟：使得自疑似罹癌之個體的樣本進行原位雜交 (ISH)；測定該樣本中切口 3 mRNA 之量；比較該切口 3 mRNA 之量與參考個體或標準物之該量；及對該個體投予本發明之抗體－藥物共軛體。該方法可任意選擇地包含自疑似罹癌之個體取得樣本之步驟。

本發明另提供經進一步標記以用於研究或診斷應用之單株抗體、人化抗體及彼之表位結合片段。在一些實施態樣中，該標記係放射性標記、螢光團、發色團、顯影劑或金屬離子。

本發明亦提供一種診斷方法，其中該經標記之抗體或彼之表位結合片段係經投予至疑似罹癌之個體，且該標記於該個體體內之分布係經測量或監測。

套組

本發明亦包括套組，例如包含所述之細胞毒性共軛體及使用該細胞毒性共軛體殺滅特定細胞類型之說明。該說

明可能包括於試管內、活體內或活體外使用該細胞毒性共軛體之指示。通常，套組將具有包含該細胞毒性共軛體之隔室。該細胞毒性共軛體可能呈冷凍乾燥形式、液體形式或可被修正以包含於套組中之其他形式。該套組亦可能包含實施該套組之說明中所述之方法所需之額外元件，如用於重構冷凍乾燥粉末之滅菌溶液、用於在投予至病患之前與該細胞毒性共軛體組合之其他劑，及協助投予該共軛體至病患之工具。

所有以上或下列實施例中引證之發表文獻及專利文件現以參照方式整體納入以符合所有目的，如同它們被各別納入。

本發明將參考下列實施例進一步說明，然而應了解本發明並不限於該等實施例。

下列實施本發明之特定態樣的實施例僅作為示範之用，無意在任何方面限制本發明之範圍。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示具有 Avi 及 His 標籤之重組、經 S1 切割、異二聚體之切口 3 NRR 蛋白質免疫原之示意圖。

圖 2 顯示經純化之人及小鼠切口 3 NRR 重組蛋白之胺基酸及核苷酸序列。

圖 3 顯示 r28 及 r75 抗體可變區之胺基酸及核苷酸序列（CDR 畫底線）。

圖 4A 至 4C 顯示 [A] hu28 VH 1.0 及 CDR（卡巴及柯

西亞)、[B] hu28 VL 1.0 及 CDR (卡巴及柯西亞) 和[C] hu28 HC 1.0 及 LC 1.0 之胺基酸及核苷酸序列。

圖 5A 至 5C 顯示[A] hu75 VH 1.9 及 CDR (卡巴及柯西亞)、[B] hu75 VL 1.3 及 CDR (卡巴及柯西亞) 和[C] hu75 HC 1.9 及 LC 1.3 之胺基酸及核苷酸序列。

圖 6 顯示用於表位定位抗切口 3 抗體 ch28 及 ch75 之重組人切口 1 NRR 及切口 3 NRR 結構域交換嵌合性建構體。

圖 7 顯示利用 D11B8 抗體進行切口 3 陽性及陰性細胞系之西方墨點分析。

圖 8A 至 8E 顯示[A]在 0 小時 MDA-MB-468 乳癌細胞中抗切口 3 抗體 hu75-Alexa 488 之細胞膜定位及 pHrodo™ 紅色葡聚糖標示之酸性囊胞，[B]在 5 小時 MDA-MB-468 乳癌細胞中抗切口 3 抗體 hu75-Alexa 488 之細胞內運輸及與 pHrodo™ 紅色葡聚糖共位 (箭頭)，[C]在 0 小時 MDA-MB-468 乳癌細胞中抗切口 3 抗體 hu28-DyLight650 之細胞膜定位及 pHrodo™ 紅色葡聚糖標示之酸性囊胞 (細胞內斑點)，[D]在 8 小時 MDA-MB-468 乳癌細胞中抗切口 3 抗體 hu28-DyLight650 之細胞內運輸及與 pHrodo™ 紅色葡聚糖共位 (箭頭)，及[E]皮爾森 (Pearson)相關係數顯示 hu28-DyLight650 與 pHrodo™ 紅色葡聚糖螢光標記於 MDA-MB-468 細胞中隨時間變化之重疊或共位程度。

圖 9 顯示使用經抗切口 3 hu28 及 hu75 處理之

HCC2429 及 MDA-MB-468 細胞的 S2 切割試驗之西方墨點分析。M.W.= 分子量。

圖 10 顯示抗切口 3 hu28-vc0101 處理 OVCAR3 卵巢癌細胞擾亂有絲分裂細胞中之微管（以抗 α -微管蛋白抗體染色），該有絲分裂細胞係以磷酸化組蛋白 H3 抗體染色識別。

圖 11 顯示自 2 至 3 隻小鼠(M)收集之異種移植的切口 3-ECD 之西方墨點分析。

圖 12 顯示劑量為 3 mg/kg 之抗切口 3 hu28-vc0101 及 hu75-vc0101 與劑量為 5 mg/kg 之順鉑 (cisplatin) 於 37622A1 NSCLC 病患衍生性異種移植模型中之療效比較。

圖 13A 及 13B 顯示[A]抗切口 3 hu28-vc0101 於 MDA-MB-468 乳癌模型之療效，以及[B]抗切口 3 hu75-vc0101 於 MDA-MB-468 乳癌模型之療效。

圖 14A 及 14B 顯示[A]抗切口 3 hu28-vc6780 於 MDA-MB-468 乳癌模型之療效，以及[B]抗切口 3 hu75-vc6780 於 MDA-MB-468 乳癌模型之療效。

圖 15 顯示抗切口 3 hu28-vc0101 於 OVCAR3 卵巢癌模型之療效。

圖 16A 及 16B 顯示[A]半胱胺酸單突變體 hu28 HC 1.0 L443C 及 hu28 LC 1.0 κ K183C，與[B]半胱胺酸二突變體 hu28 HC 1.0 L443C/K392C 之胺基酸及核苷酸序列。

【實施方式】

實施例 1

產製重組切口 3 蛋白免疫原

編碼人切口 3 NRR 區域之 cDNA 建構體被選殖至表現載體 pSMED2，該建構體之 N 端具有信號肽，C 端具有 Avi 及 His6 標籤。這些建構體被過渡性轉染至中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，該經分泌至條件培養基中之蛋白質在 SDS-PAGE 上分析。在處理 S1 切割位點後，該切口 3 NRR 結構域之 N 端約 26 kDa 之半(LNR-A、B、C 及 HD1)和 C 端約 12 kDa 之半(HD2 及 Avi_His 標籤)經由非共價交互作用維持相連以形成異二聚體複合物，如圖 1 所示。經測定在 CHO 細胞製備之樣本中，切口 3 NRR 之 S1 處理僅佔約 50%或更少。爲了增進 S1 切割位點之處理，將切口 3 NRR 表現建構體轉染至 CHO-PACE 細胞(Harrison et, al, Semin Hematol.1998 Apr;35(2 Suppl 2):4-10)，並選擇具有最高表現及完全處理切口 3 NRR 之穩定細胞系。這些細胞系培養的規模被放大以收集可自其中純化切口 3 NRR 蛋白之條件培養基。

經純化之人及小鼠切口 3 NRR_Avi_His 標籤蛋白（以下稱爲「切口 3 NRR 重組蛋白」）的胺基酸及核苷酸序列係提供於圖 2。小寫字母代表 Avi_His 標籤。SDS-PAGE 分析顯示 > 90%之經純化之蛋白係經正確切割爲預測的切口 3 NRR N-端及 C-端肽大小（資料未顯示）。

實施例 2

產製及選殖大鼠抗切口 3 抗體

A. 免疫接種及雜交瘤產製

史道二氏 (Sprague-Dawley) 大鼠係經免疫接種，藉由皮下注射含有各 20 μg 之人 (SEQ ID NO.1) 及小鼠 (SEQ ID NO.3) 切口 3 重組蛋白之混合物於完全弗氏 (Freund's) 佐劑。免疫接種以 2 周間隔重複進行 12 周。第一次注射後之第 0、35、49 及 63 天所收集之血清樣本藉由如下述之酶連接免疫吸附測定 (ELISA) 檢測循環中之抗切口 3 抗體力價活性。當達到理想力價時，最終劑量之蛋白混合物經靜脈（尾靜脈）注射至該具有理想抗體力價之大鼠，在 4 天後犧牲該鼠以收集脾細胞。利用 PEG 1500，使收集自該大鼠之全脾細胞 (2×10^8) 與小鼠骨髓瘤細胞系 P3X63.Ag8.653 (2.5×10^7) 融合。經融合之細胞被接種於 96 孔盤 (0.2 mL/孔)，並進行 HAT 篩選 (含有 5×10^{-4} M 次黃嘌呤、 1.6×10^{-5} M 胸苷、 4×10^{-4} M 胺喋呤及 20% 熱失活之 FCS 的 RPMI 1640)。

融合 14 天之後，收集雜交瘤上清液，測試是否存在切口 3 結合活性。二個親代大鼠克隆 28 及 75 (以下分別稱為 r28 及 r75) 展現對人切口 3 NRR 重組蛋白之 ELISA 結合活性，另藉由細胞基底 ELISA 測定也展現對穩定過度表現人全長切口 3 之 U-2 OS 細胞之細胞表面的結合活性，其中 O.D.450nm 值為 1 或以上，抗體濃度為 0.1-1nM。另外，r28 (但非 r75) 展現對小鼠切口 3 NRR 重組

蛋白之 ELISA 結合活性，另藉由細胞基底 ELISA 測定也展現對穩定過度表現小鼠全長切口 3 之 U-2 OS 細胞之細胞表面的結合活性，其中 O.D.450nm 值為 1 或以上，抗體濃度為 0.1-1nM。

B.選殖及定序抗切口 3 抗體

r28 及 r75 可變區係經次選殖以供進一步分析。自次選殖株萃取 RNA，並經由 RT-PCR 選殖獲得該經表現之抗體的可變區 DNA 序列。一至五百萬個經次選殖之雜交瘤細胞係經均質化以利用凱杰(Qiagen)公司 RNaseasy Mini 套組進行總 RNA 分離。接著利用 SuperScript III RT 套組(Invitrogen)製備第一股 cDNA。接著藉由下述之 PCR 條件，使用大鼠 IgG 重鏈 (IgG1、2a、2b) 及輕鏈 (κ 或 λ) 恆定區之引子產製及擴增抗切口 3 IgG 之可變區的雙股 cDNA。PCR 循環條件：1 個 95℃ 1 分鐘循環；25 個 95℃ 1 分鐘、63℃ 1 分鐘循環，及 72 °C 1 分鐘。該形成之 RT-PCR 產物被選殖至 TOPO-Blunt 選殖載體(Invitrogen)，以習用方法定序。該 r28 及 r75 可變區之胺基酸及核苷酸序列係提供於圖 3。CDR 以畫底線表示。

實施例 3

產製及特徵化嵌合性抗切口 3 抗體

來自 r28 及 r75 之可變區 cDNA 經次選殖至哺乳動物表現載體，其中大鼠可變重鏈(VH)符合讀框地與人 IgG1

(hIgG1)融合，且大鼠可變輕鏈(VL)與人 κ 融合。大鼠-人嵌合抗體 28 及 75（以下分別稱為 ch28 及 ch75）係自過渡性轉染至 HEK293 細胞之這些建構體產製，並經進一步分析。

ch28 及 ch75 係於重組蛋白 ELISA 中測試結合活性。經純化之人或小鼠切口 3 NRR 重組蛋白係包覆於 CoStar 高結合性 96 孔 ELISA 盤上，以 $1\mu\text{g/ml}$ 之濃度於含鎂／鈣之 $100\mu\text{l}$ PBS 中包覆隔夜。該盤以 PBS-Mg/Ca 清洗並以 1% BSA 於 PBS-Mg/Ca 中封閉 1 小時。將盤中之封閉溶液倒掉，加入 1:3 之抗體於封閉溶液中之連續稀釋液至該盤。在室溫中培養 1 小時後，再次以 PBS-Mg/Ca 清洗該盤，然後才加入於封閉緩衝液中稀釋(1:20,000)之經辣根過氧化酶(HRP)共軛之二級抗體。當該經測試之一級抗體係大鼠 IgG 時，該二級抗體係山羊抗大鼠 IgG Fc (Bethyl Biotech)；當該一級抗體係人 IgG 時，該二級抗體係山羊抗人 IgG Fc (Southern Biotech)。

在經二次抗體培養 1 小時之後，再次如上述清洗該盤，並添加 TMB 受質溶液。允許呈色反應進行 10 分鐘，然後加入停止溶液 0.18M H_2SO_4 。測量在 O.D. 450 nm 之吸光度，對資料作圖並以微軟 Excel 及 Graphpad-Prism 軟體分析。ch28 及 ch75 展現對人切口 3 NRR 重組蛋白之高度結合活性， EC_{50} 為 1nM 或更低，且 ch28（但非 ch75）亦展現對小鼠切口 3 NRR 重組蛋白之高度結合活性， EC_{50} 為 1nM 或更低。選擇 ch28 及 ch75 進行進一步以細

胞為基底之 ELISA，如下所述。

實施例 4
人化

選擇 r28 及 r75 進行人化以供後續發展。人化係將 CDR 移植至人接受體架構上（重鏈為 DP-54，輕鏈為 DPK9），然後在人接受體架構進行選擇性回復突變，以恢復親代大鼠抗體之完整功能。表 1 顯示不同變異體之人接受體架構中之選擇性回復突變。

表1：人化抗切口 3 抗體變異體之選擇性回復突變。

變異體	回復突變 (卡巴)
VH	
hu28 VH1.0	無
hu28 VH1.1	A93T, V37I
VL	
hu28 VL1.0	無
hu28 VL1.1	Y36F
VH	
hu75 VH1.8	R71V
hu75 VH 1.9	V34M (CDR1), R71V
VL	
hu75 VL 1.1	S60D
hu75 VL 1.2	S60D, T85F
hu75 VL 1.3	S67Y

由 Genewiz 合成具有選擇性回復突變之含有 r28 及 r75 之 CDR 捐贈者序列移植至人接受體架構 DP-54 及 DPK9 之 cDNA。該合成之 cDNA 產物係經次選殖且分別在哺乳動物表現載體 pSMED2 及 pSMEN3 中符合讀框地與人 IgG1 重鏈恆定區及人 κ 融合以合成重鏈及輕鏈。

人化 r28 變異體 VH1.0/VL1.0（以下稱為 hu28）完全

保留 ch28 之抗原結合表位及親和性，且缺乏在 ch28 觀察到之有效傳訊抑制活性。hu28 之 VH 及 VL 區的 CDR 分別與 r28 之 VH 及 VL 區的 CDR 相同。人化 r75 變異體 VH1.9/VL1.3（以下稱為 hu75）完全保留 ch75 之抗原結合表位及親和性及在 ch75 觀察到之有效傳訊抑制活性。hu75 之 VH 區的 CDR2 及 CDR3 分別與 r75 之 VH 區的 CDR2 及 CDR3 相同。hu75 之 VH 區的 CDR1 包含一個回復突變 V34M。hu75 之 VL 區的 CDR 與 r28 之 VL 區的 CDR 相同。圖 4A 至 4C 提供 hu28 的胺基酸及核苷酸序列並載明 CDR（卡巴及柯西亞），圖 5A 至 5C 提供 hu75 的胺基酸及核苷酸序列並載明 CDR（卡巴及柯西亞）。

r28 與 hu28 以及 r75 與 hu75 的人接受體架構之 VH 及 VL 區的排比係顯示於表 2。卡巴 CDR 係經畫底線表示。大鼠與人化序列之間的架構區之殘基差異係以小寫字母表示。接受 r28 及 hu28 可變區之人接受體架構之間的同源性為 VH 73%及 VL 76%。接受 r75 及 hu75 可變區之人接受體架構之間的同源性為 VH 46%及 VL 64%。卡巴 CDR 係經畫底線表示。

表2：抗切口 3 抗體之人接受體架構之排比。

r28 VH:									
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	<u>SYWMS</u>	WVRQAPGKGLEWVA	<u>NIKQDGSEKYYVDSVKG</u>	RFTISRDN	AKNSLY			
r28VH	EVQLVESGGGLVQPGSLTLSCVASGFTFR	<u>DYGMT</u>	WIRQAPGKGLTWVA	<u>YISSGSNYIYYAEAVKG</u>	RFTISRDN	AKNTLY			
hu28VH1.0	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFR	<u>DYGMT</u>	WVRQAPGKGLEWVA	<u>YISSGSNYIYYAEAVKG</u>	RFTISRDN	AKNSLY			
DP54_JH4	LQMNSLRAEDTAVYYCAR	----YFDY	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 67)					
r28VH	LQMTSLRSEDALYFCFR	<u>RGPFVLDA</u>	WGQGASVTVSS	(SEQ ID NO: 5)					
hu28VH1.0	LQMNSLRAEDTAVYYCAR	<u>RGPFVLDA</u>	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 13)					
r28 VL:									
DPK9_Jk4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>RASQSISSYLN</u>	<u>WYQKPGKAPKLLIY</u>	<u>AASSLQS</u>	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP			
r28VL	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINC	<u>KASQSINRYLH</u>	<u>WFQQLGEAPKLLIY</u>	<u>NANGLQT</u>	GIPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQS			
hu28VL1.0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>KASQSINRYLH</u>	<u>WYQKPGKAPKLLIY</u>	<u>NANGLQT</u>	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP			
DPK9_Jk4	EDFATYYC	<u>QSYSTPLT</u>	FGGGTKVEIK	(SEQ ID NO: 68)					
r28VL	EDVATYFC	<u>LQHNTWPD</u>	FGAGTKLEIK	(SEQ ID NO: 7)					
hu28VL1.0	EDFATYYC	<u>LQHNTWPD</u>	FGGGTKVEIK	(SEQ ID NO: 25)					
r75 VH:									
DP54_JH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	<u>SYWMS</u>	WVRQAPGKGLEWVA	<u>NIKQDGSEKYYVDSVKG</u>	RFTISrDN	AKNSLY			
r75VH	QVKLLQSGAALVKPGASVKMSCKASGYAFT	<u>DYWvT</u>	WVKQSHGKSLEWIGEISPNSGGTNFNEKFKG	KATLTvDK	STSTAY				
hu75VH1.9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFT	<u>DYWmt</u>	WVRQAPGKGLEWVAEISPNSGGTNFNEKFKG	RFTISvDN	AKNSLY				
DP54_JH4	LQMNSLRAEDTAVYYCAR	-----YFDY	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 67)					
r75VH	MELSLRTSEDSAIYYCTR	<u>GEIRYNWFAY</u>	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 9)					
hu75VH1.9	LQMNSLRAEDTAVYYCAR	<u>GEIRYNWFAY</u>	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 37)					
r75 VL:									
DPK9_Jk4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>RASQSISSYLN</u>	<u>WYQKPGKAPKLLIY</u>	<u>AASSLQS</u>	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP			
r75VL	NIVMTQSPKSMISISVGDRVTMNC	<u>KASQNVGNINIA</u>	<u>WYQKPGQSPKLLIY</u>	<u>YASNRYT</u>	GVDRFTGGGyGTDFTLT	INSMQA			
hu75VL1.3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	<u>KASQNVGNINIA</u>	<u>WYQKPGKAPKLLIY</u>	<u>YASNRYT</u>	GVPSRFSGSGGyGTDFTLT	ISSLQP			
DPK9_Jk4	EDFATYYC	<u>QSYSTPLT</u>	FGGGTKVEIK	(SEQ ID NO: 68)					
r75VL	EDAAFYFC	<u>QRLYNPFT</u>	FGSGTKLEIK	(SEQ ID NO: 11)					
hu75VL1.3	EDFATYYC	<u>QRLYNPFT</u>	FGGGTKVEIK	(SEQ ID NO: 49)					

實施例 5

hu28 及 hu75 之特徵描述

A.以細胞為基底之 ELISA

在以細胞為基底之 ELISA 中，篩選人化 hu28 及 hu75 以及大鼠-人嵌合性 ch28 及 ch75 抗切口 3 抗體與細胞表面切口 3 之結合力。在 ELISA 分析前一天，將細胞表面上穩定過度表現人或小鼠全長切口 3 蛋白（以下分別稱為 U2OS/hNotch3 及 U2OS/mNotch3）之 U-2 OS 細胞以 50,000 細胞／孔接種於 96 孔盤（白色不透明，BD/VWR）。在 ELISA 當天，移除孔槽中之培養基，施加經連續

稀釋（1:3 於封閉緩衝液中）之抗體溶液於孔盤。孔盤於室溫中培養 2 小時，之後以 PBS-Mg/Ca 清洗。經 HRP 共軛之二級抗體接著如上述用於重組蛋白 ELISA 中被施加及培養於細胞中 1 小時。孔盤先經 PBS-Mg/Ca 清洗，接著以 Pico 化學發光劑呈色套組(Thermal Scientific)呈色，按照廠商說明進行化學發光測量。資料作圖及分析係利用微軟 Excel 及 Graphpad-Prism 軟體進行。EC₅₀ (nM)值係自細胞表面切口 3 結合 ELISA 計算，並提供於表 3。

資料顯示，hu28 與表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 結合之能力和 ch28 類似。另外，資料顯示 hu28 完全保留 ch28 與表現於 U2OS/mNotch3 細胞之細胞表面上的小鼠切口 3 之交叉反應性。資料亦顯示，hu75 與表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 結合之能力和 ch75 類似。另外，資料顯示 hu75 完全保留 ch75 對人切口 3 之專一性；但未觀察到與表現於 U2OS/mNotch3 細胞之細胞表面上的小鼠切口 3 之交叉反應性。N/B 代表不結合。

表3. 抗切口 3 抗體於細胞表面切口 3 結合性ELISA之EC₅₀ (nM)值。

抗體	EC ₅₀ (nM)			
	ch28	hu28 VH1.0/VL1.0	ch75	hu75 VH1.9/VL1.3
全長 人切口3	0.098	0.093	0.20	0.22
全長 小鼠切口3	0.13	0.13	N/B	N/B

B.競爭性 ELISA

進行 hu28 與 ch28 以及 hu75 與 ch75 對細胞表面上表現之全長人切口 3 之競爭性 ELISA。將 U2OS/hNotch3 細胞接種於 96 孔細胞培養板(Co-star)。含有 0.8 nM 之 ch28 (生物素基化) 或 ch75 (生物素基化) 抗體之連續稀釋 (1:3 於封閉液) 的抗體溶液被施加至孔盤。在培養 2 小時後，該孔盤如上述清洗，並加入以封閉液稀釋 5000 倍之經 HRP 共軛之鏈黴抗生物素蛋白(Southern Biotech)。與鏈黴抗生物素蛋白培養 30 分鐘之後，再次清洗孔盤，然後以 TMB 溶液發色 10 分鐘。發色反應以添加 0.18M H_2SO_4 停止，並測量 450 nM 之吸光度。資料作圖及分析係利用微軟 Excel 及 Graphpad-Prism 軟體進行。

表 4 顯示競爭與表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 結合之 ELISA 的 EC_{50} (nM)值。該資料顯示 hu28 與未經標記之 r28 具有類似 EC_{50} 值，表示 hu28 類似未經標記之 ch28 與生物素基化 ch28 競爭與表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 之結合。該資料顯示 hu28 與 ch28 所結合至表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 之相同表位或高度類似表位結合。

該資料另外顯示 hu75 與未經標記之 ch75 具有類似 EC_{50} 值，表示 hu75 類似未經標記之 ch75 與生物素基化 ch75 競爭與表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 之結合。該資料顯示 hu75 與 ch75 所結合至表現於 U2OS/hNotch3 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 之

相同表位或高度類似表位結合。

表4. 抗切口 3 抗體之競爭性ELISA的EC₅₀ (nM) 值。

	EC ₅₀ (nM)				
抗體	ch28	hu28 VH1.0/VL1.0	ch75	hu75 VH1.9/VL1.3	抗球蟲(E.Tenella) 抗體對照
全長 人切口3	3.0	3.1	1.3	1.7	不競爭

C.與其他人切口同源物結合之專一性

其他切口受體家族之成員在生物程序扮演重要角色。舉例來說，切口 1 或切口 2 缺乏導致小鼠模型中之胚胎死亡。相對地，切口 4 缺乏在小鼠模型未導致可偵測之表型。切口 3 NRR 區之最近同源物係切口 1 及切口 2（約 50% 同源性），切口 4 係較遠之同源物（約 30% 同源性）。抗切口 3 抗體與切口家族之其他成員（特別是切口 1 及 2）的交叉反應性可能在病患導致非所欲之效應。因此，應評估 r28 與 hu28 以及 r75 與 hu75 對其他切口家族成員之潛在交叉反應性。

編碼與人 IgG1 Fc 片段融合之人切口 1 及切口 2 NRR 區的表現建構體被穩定導入 CHO-PACE 細胞中。收集表現 NRR-Fc 融合物之細胞的條件培養基。人切口 2 NRR-Fc 及人切口 1 NRR-Fc 係藉由蛋白 A 親和性及大小排除層析 (SEC) 純化。經純化之製劑係經透析至含 1mM CaCl₂ 之 TBS 中，並於分析性 SEC 上分析得到 >99% 之純度。

如表 5 所示，r28 及 hu28 以及 r75 及 hu75 皆缺乏與人切口 2 NRR-Fc 融合蛋白之可檢測結合。另外，hu28 與

hu75 亦缺乏與全長人切口 1 NRR-Fc 之可檢測結合。這表示 hu28 和 hu75 不會與切口 1 或切口 2 交叉反應。N/B 代表不結合。

表5. 抗切口 3 抗體與切口 2 NRR-Fc 及切口 1 NRR-Fc 之結合。

	抗體	結合
切口2 NRR-Fc	ch28	N/B
	hu28 VH1.0/V1.0	N/B
	ch75	N/B
	hu75 VH1.9/V1.3	N/B
切口1 NRR-Fc	ch28	N/B
	hu28 VH1.0/V1.0	N/B
	ch75	N/B
	hu75 VH1.9/V1.3	N/B

D.與人切口 3 NRR 之結合親和性

抗切口 3 NRR 交互作用之動力學常數係藉由表面電漿共振(Biacore® T100，Biacore 公司，紐澤西州皮斯卡塔威(Piscataway, NJ))測定。CM5 晶片之流動池係經大約 10,000 反應單位(RU)之抗人 IgG-Fc (Biacore®)於 10mM 甘胺酸 pH 5.0 中以 10 微升/分鐘固定 600 秒。於含 1mM CaCl₂ 之 TBS 中稀釋之 10 微克/毫升之抗切口 3 抗體 ch28 和 hu28 以及 ch75 和 hu75 係以 10 微升/分鐘被捕捉。四種濃度（自 3.7 至 100nM）之人切口 3 NRR 重組蛋白及零濃度（流動緩衝液）於 100 微升/分鐘之結合係於含 1mM CaCl₂ 之 TBS 中記錄 3 分鐘。複合物之解離係經測量 10 分鐘。晶片表面藉由以 10 微升/分鐘注射 3M MgCl₂ 與 3mM EGTA 達 60 秒以再生。在減去參考物及緩衝液信號後得到之曲線利用 Biacore® T100 評估軟體(Biacore®)帶入 1:1 蘭繆爾(Langmuir)結合模型。

K_a 、 K_d 及 K_D 係顯示於表 6。動力學分析顯示 ch28 與 hu28 具有類似之 k_a (on)及 k_d (off)速率。另外，觀察到 hu75 相較於 ch75 具有較高之 k_a (on)及較低之 k_d (off)速率，導致 hu75 具有較低之 K_D 值。

表6. 抗切口 3 抗體之動力學分析。

抗體	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
ch28	4.09E+05	2.49E-04	0.61
hu28 VH1.0/VL1.0	3.86E+05	3.47E-04	0.90
ch75	5.70E+04	9.92E-04	17.40
hu75 VH1.9/VL1.3	3.48E+04	3.40E-04	9.76

D. 熱穩定性

蛋白或蛋白結構域之熱穩定性與該蛋白或蛋白結構域之整體穩定性具正向相關。較高熔點之蛋白或蛋白結構域通常提供較佳之可製造性及較長之貨架時間。使用示差掃描量熱儀(DSC)以分別檢測 hu28 及 hu75 相對於 ch28 及 ch75 之熱穩定性。蛋白樣本被稀釋於體積 250 微升之 PBS 中成為 0.3 毫克/毫升。該對應之調製空白緩衝液被用來作為參照樣本。二個樣本皆利用設定至 8°C 之 MicroCal ThermoVac 樣本脫氣恆溫機(Microcal, Inc., Northampton, MA)徹底脫氣。樣本係經分注至 MicroCal VP-DSC 毛細池微量熱計(MicroCal, Inc., Northampton, MA)之適當池中。樣本係於 15°C 平衡 4 分鐘，接著以每小時 100°C 之速率掃描至 100°C。選擇 20 秒之過濾期。原始資料係經基準校正，該蛋白濃度係經正常化。Origin 軟體(OriginLab Corporation, Northampton, MA)被用於適配該資料至具有適當數量之同類鹼基置換之 MN2-State 模型。

如下表 7 所示，hu28 與 hu75 二者皆具有較高之熱穩定性，即彼等之 Fab 區相較於 ch28 與 ch75 分別顯示較高熔點（皆高於 77℃）。

表7. 抗切口 3 抗體之熱穩定性 (DSC) 分析。

抗體	Tm (°C) ± 標準差		
	CH2	Fab	CH3
ch28	70.20 ± 0.05	73.22 ± 0.73	84.24± 0.07
hu28 VH1.0/VL1.0	72.63±0.03		83.45±0.17
ch75	73.32±0.01		84.59±0.03
hu75 VH1.9/VL1.3	70.46±0.02	74.63±0.17	84.17±0.05

實施例 6

結構域交換嵌合性建構體

如實施例 3 所述，hu28 及 hu75 皆缺乏與切口 1 蛋白之交叉反應性。製備切口 1 及切口 3 NRR 之結構域交換嵌合性建構體，以進行抗切口 3 ch28 及 ch75 抗體之表位定位。編碼具有 C 端 Fc 融合（人 IgG1 Fc 片段）之人切口 1-切口 3（以下稱為切口 1-3）NRR 區結構域交換嵌合物的表現建構體係經個別轉染至 CHO-PACE，並建立表現各種嵌合物之穩定庫。源自各穩定細胞庫之條件培養基被施用至蛋白 A 親和性層析，接著進行大小排除層析(SEC)以純化該嵌合性融合蛋白。經純化之製劑被透析至含 1mM CaCl₂ 之 TBS 中，並於分析性 SEC 上分析。圖 6 顯示，該重組 NRR 嵌合性蛋白係由與人 Fc（未顯示）融合之各種切口 1（以灰色顯示）及切口 3（以黑色顯示）結構域組成。

ch28 及 ch75 與切口 1-3 NRR 結構域交換嵌合物之相

對結合能力利用實施例 3 及 5 所述之 ELISA 測試。將該切口 1-3 NRR 結構域交換嵌合物以 1ug/ml 包覆於 ELISA 板，然後以含 0.9mM Mg^{2+} 及 Ca^{2+} 之 1% BSA 於 PBS 中封閉。接著添加經封閉溶液稀釋為 5ug/ml 之 ch28 及 ch75 於該封閉板。培養 1 小時後，以含 0.9mM Mg^{2+} 及 Ca^{2+} 之 PBS 清洗該板，接著添加經 HRP 共軛之二次山羊抗人 Fc 抗體至該板並培養。再次清洗之後，添加 TMB 至該板發色，發色反應藉由加入 0.18M H_2SO_4 停止。O.D.450nm 係於孔盤讀取儀上讀取，相對結合能力以 O.D.值顯示。

如圖 6 所示，ch28 及 ch75 與切口 3 NRR 之結構域的表位結合特性不同。更具體地，ch28 與切口 3 NRR 之結合較依賴 LNR-C 及 HD-1 結構域，而 ch75 則較依賴 LNR-A 及 HD-1 和 HD-2 二個結構域。該觀察到之 ch28 和 ch75 的結合特性與抗體之傳訊抑制活性一致。特別是，ch28 僅與切口 3 NRR 異二聚體之 N 端(HD-1)交互作用，其不會使該切口 3 NRR 區維持在抑制切口 3 傳訊活化所需之自我抑制構形。相對地，ch75 與切口 3 NRR 異二聚體之 HD-1 及 HD-2 結構域二者交互作用，使該切口 3 NRR 區維持自我抑制構形，藉以抑制切口 3 傳訊活化。

實施例 7

識別切口 3 表現性癌細胞系

切口 3 之表現係於一群癌細胞系中測定，該測定藉由西方墨點法識別切口 3 陽性細胞以用於進一步分析及測試

抗切口 3 抗體及抗切口 3 抗體－藥物共軛體。該群癌細胞系包括 HCC2429 肺癌細胞系、OVCAR3 卵巢癌細胞系、MDA-MB-468 乳癌細胞系、N87 胃癌細胞系，以及經建構以過度表現人切口 3 之細胞系，包括 U-2 OS 及 MDA-MB-468 細胞（以下分別稱為 U2OS/hNotch3 及 MDAMB468/hNotch3）。切口 3 係以兔抗切口 3 單株抗體 D11B8 (Cell Signaling Technologies)或小鼠單株抗體 1G5 (Abnova)，利用標準西方墨點法檢測。

D11B8 抗切口 3 抗體與人切口 3 蛋白之 C 端尾內環繞 Glu2312 之表位結合，且識別未經切割之全長切口 3（約 270 kDa）及包含切口 3 蛋白片段之經切割之 C 端結構域（約 80-90 kDa）。分子量約 80-90 kDa 之切口 3 條帶代表跨膜及細胞內結構域 (TMIC) 及／或切口細胞外截短 (NEXT) 蛋白水解片段，如圖 7 所示。1G5 抗體與切口 3 胞外域 (ECD) 之胺基酸 47-156 內之表位結合，且識別未經切割之全長切口 3（約 270kDa）及經切割之 N 端片段（約 210 kDa）（資料未顯示）。

切口 3-ECD（資料未顯示）與包含切口 3 蛋白片段之 C 端結構域二者皆於 HCC2429、OVCAR3、MDA-MB-468、N87、MDAMB468/hNotch3 及 U2OS/hNotch3 檢測到，如圖 7 所示。另外，切口 3 並未在 SW900 肺癌細胞系中檢測到，因此代表切口 3 陰性對照細胞系。

實施例 8

抗切口 3 抗體之內化及運輸

抗切口 3 抗體－藥物共軛體係由肽可切割之順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-p-胺基苯甲氧基羰基(vc)連接子或不可切割之以硫醚為基底之順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)連接子與一系列細胞毒性劑共軛組成。自該抗體釋放載荷藥物需要運送及定位該抗體－藥物共軛體至具有蛋白水解酶如組織蛋白酶 B 之溶酶體以切割該 vc 型連接子，或運送至末期溶酶體以完整分解代謝該抗體以釋放該 mc 連接之載荷藥物。抗切口 3 抗體之內化及細胞內運送至溶酶體囊胞係藉由間接及直接免疫螢光顯微鏡基底測定監測。為了直接看見抗切口 3 抗體之細胞內運送，該抗體係與螢光染料共軛，並於 pHrodo™ 紅色葡聚糖(Life Technologies)存在下與活細胞一起培養以染色酸性囊胞如溶酶體。進行活細胞顯影，以識別該螢光標記抗體與溶酶體及其他酸性囊胞之共位。另外，在細胞上進行間接免疫螢光顯微鏡基底測定以證實抗切口 3 抗體與 LAMP1（一種溶酶體相關蛋白）之共位。

A.內化及溶酶體運輸

HCC2429 或 MDA-MB-468 細胞係於 Lab Tec II 4 室蓋玻片含蓋 #1.5 硼矽酸無菌玻片(Thermo Fisher Scientific Inc.)中培養。第 1 天，添加 pHrodo™ 紅色葡聚糖(Life Technologies) 10 µg/ml 濃度至該培養基，培養 16 小時以染色酸性囊胞如溶酶體。第 2 天，以 HBSS++ (Gibco Life

Technologies)清洗細胞二次。抗切口 3 抗體 hu75 係與 Alexa Fluor 488 染料 (Life Technologies 蛋白標記套組) 共軛 (以下稱爲「hu75-Alexa488」)，hu28 係與 DyLight650 順丁烯二醯亞胺試劑(Thermo Scientific)根據製造商說明直接共軛 (以下稱爲「hu28-DyLight650」)。hu75-Alexa488 或 hu28-DyLight650 標記抗體係以濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ 於 2% 牛血清白蛋白 (BSA)/HBSS++中添加至於濕冰上之細胞中 25 分鐘。細胞以在冰上之冰冷 HBSS++ 清洗二次，被放入 2% BSA/HBSS++ 中，在配有 eXcelon Evolve 512 相機 (Photometrics)及溫度、濕度及 5% CO_2 控制之 XL S 系列培養室 (Zeiss)之轉盤 CSU-X1M 5000 顯微鏡 (Yokogawa) 上，自 5 分鐘至 12-18 小時成像。每 5 分鐘捕捉成像一次，利用 Zen CZI 檔案格式 (Zeiss)組合。利用 Volocity v6.3 軟體 (PerkinElmer)計算皮爾森 (Pearson)相關係數，以測定 hu28-DyLight650 與 pHrodoTM 紅色葡聚糖之間的共位程度。

一旦細胞經製備以供活細胞成像，可被檢測的最早時間點爲 10 分鐘，因爲需要設定及最佳化用於取得影像之儀器設定。在細胞被放入潮濕、37°C、5% CO_2 之室內約 10 分鐘後，可在細胞表面以及細胞內的多個斑點樣結構觀察到 hu75-Alexa488，如圖 8A 所示。此結果顯示抗切口 3 抗體 hu75 在與細胞膜之切口 3 受體結合後快速進行內化。在較早之時間點 (10 分鐘至約 65 分鐘)，細胞內

抗切口 3 抗體 hu75-Alexa488 與被 pHrodo™ 紅色葡聚糖染色之酸性囊胞看似不共位之分離斑點。從大約 70 分鐘以後，抗切口 3 抗體 hu75 及 pHrodo™ 紅色葡聚糖標記之囊胞共位至相同的分離點樣結構，如圖 8B 中之箭頭所示。此資料顯示抗切口 3 抗體 hu75 在切口 3 表現性 HCC2429（資料未顯示）及 MDA-MB-468 細胞中被內化及運送至酸性囊胞如溶酶體，如圖 8B 所示。

在細胞被放入潮濕、37°C、5% CO₂ 之室內約 10 分鐘後，可在細胞表面觀察到 hu28-DyLight650，如圖 8C 所示。細胞內抗切口 3 抗體 hu28-DyLight650 和 pHrodo™ 紅色葡聚糖染色之酸性囊胞呈現分離斑點樣，隨時間逐漸共位，如圖 8D 中之箭頭所示。計算皮爾森相關係數 (PCC) 以決定 hu28-DyLight650 與 pHrodo™ 紅色葡聚糖螢光標記在 MDA-MB-468 細胞中隨時間變化之重疊或共位程度。PCC 數值越高，hu28-DyLight650 與 pHrodo™ 紅色葡聚糖螢光標記之間的共位程度越高。圖 8E 顯示 hu28-DyLight650 與 pHrodo™ 紅色葡聚糖之間的共位穩定增加至約 360 分鐘，最大共位發生在約 420 分鐘然後達到高原。此資料顯示抗切口 3 抗體 hu28-DyLight650 在切口 3 表現性 MDA-MB-468 細胞中被內化及運送至酸性囊胞如溶酶體。

B. 與溶酶體相關性膜蛋白 1 (LAMP1) 共位

HCC2429 或 MDA-MB-468 細胞係於 Lab Tec II 4 室

蓋玻片含蓋#1.5 硼矽酸無菌玻片(Thermo Fisher Scientific Inc.)中培養。要進行結合和內化試驗，細胞經 HBSS++沖洗二次，然後加入濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ 之未經共軛之抗切口 3 抗體 hu75 及 hu28 (於 2%牛血清白蛋白(BSA)/HBSS++中)，置於冰上 25 分鐘。要觀測在時間 0 分鐘之膜結合，對照細胞以冰冷 HBSS++清洗，然後以 4%多聚甲醛於 PBS 中固定 10 分鐘。以抗體內化作用而言，細胞經冰冷 HBSS++清洗二次，加入預熱之完全培養基，然後放入潮濕 37°C、5% CO_2 培養箱中。在 5 分鐘至 18 小時之間的多個時間點，將細胞自培養箱移出，如前述方法清洗及固定。接著以 PBS 清洗細胞 3 次，利用 0.3%Triton X-100 (於 PBS 中)通透化 10 分鐘。每次都用 PBS 清洗 5 分鐘三次，然後以 3% BSA/PBS 封閉 1 小時。添加 1:100 之抗 LAMP-1 小鼠單株抗體(H4A3, Abcam) (於 2% BSA/PBS 中)，於 4°C培養隔夜。細胞用 PBS 清洗二次，每次各 5 分鐘，然後添加二次山羊抗人 Alexa Fluor 488 及山羊抗小鼠 Alexa Fluor 555 (Life technologies)，於暗室反應 45 分鐘。細胞以 PBS 清洗三次，在 Zeiss LSM510 共軛焦顯微鏡或 CSU-X1M 5000 (Yokogawa)轉盤式共軛焦顯微鏡上成像。

在對照組中，細胞與抗切口 3 抗體於冰上培養然後立即固定，hu28 及 hu75 皆被定位於切口 3 表現性細胞之細胞表面，在細胞內未觀察到染色。在對照細胞中，溶酶體係經抗 LAMP1 抗體染色，呈現不與抗切口 3 抗體 hu28 及

hu75 共位之在細胞內之分離斑點樣結構。在 37°C 培養 90 分鐘後，抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 被觀察到位於細胞內之斑點樣結構，其與抗 LAMP1 抗體共位。在 37°C 培養後，抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 之細胞膜染色減少，最終變成無法檢測。此資料顯示抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 在與細胞在冰上培養後與細胞表面結合，然後在 37°C 進行溫度依賴性內化。一經內化後，抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 與 LAMP1 蛋白共位，顯示它們被專一運送至溶酶體（資料未顯示）。

實施例 9

抗切口 3 抗體在以細胞為基底之試驗中對切口 3 傳訊之影響

切口 3 傳訊係藉由配體誘導之蛋白水解開始。成熟的切口 3 異二聚體在弗林樣蛋白酶切割位點 S1 之後，由近膜負調節區(NRR)保持於自我抑制狀態。配體（如 DLL4 或 Jagged1）與切口 3-ECD 之結合誘導在位點 S2 及 S3 之二個連續的額外切割，彼等分別由 ADAM 型金屬蛋白酶及 γ 分泌酶催化。後者之切割釋放切口 3 之細胞內結構域(NICD3)，允許其轉位至細胞核並活化含有 CSL 蛋白之一致 DNA 結合位點模體(motif)之目標基因的轉錄。

抗切口 3 嵌合抗體 ch28-huIgG1 及 ch75-huIgG1 和人化抗體 hu28 及 hu75 抑制切口 3 傳訊之能力係於切口 3 依賴性報告基因共培養測試中測定。抗切口 3 抗體係與切口 3 報告細胞預先培養，接著與 DLL4-HEK293 細胞共培養

以活化切口 3 傳訊或與親代 HEK293 細胞共培養以作為對照。

A. 用於切口 3 報告基因共培養試驗之細胞系建構

為了產製切口 3 報告細胞系，在 U-2 OS 人骨肉瘤細胞系（美國菌種保存中心(ATCC)，Manassas, VA）連續實施三次穩定轉染。第一次轉染使用以 pCMV6-Entry-Myc-Flag 骨架(Origene)為基礎之表現全長人切口 3 之載體，其中切口 3 插入物之正確 DNA 序列係經證實。在經 TransIT-LT1 轉染試劑(Mirus, Madison, WI)之轉染後，U-2 OS 細胞係於 G418 中篩選並分離克隆株。第二，穩定表現切口 3 之 U-2 OS 克隆經 pGL4.27 [luc2P/minP/Hygro]載體(Promega, Madison, WI)之再轉染，該載體含有 8 份串聯之 CSL 增強子序列(CGTGGGAAAAT)，以潮黴素 B 加上 G418 篩選並分離克隆株。該 8xCSL 螢火蟲螢光素酶報告建構體對經活化之切口傳訊有反應（例如見 Jeffries et al., Mol.Cell.Biol.22(11):3927-3941, 2002）。第三，該人切口 3 8xCSL 螢火蟲螢光素酶 U-2 OS 細胞係經 Cignal Lenti Renilla 對照(luc) (Qiagen, CA)慢病毒顆粒轉導，以嘌呤黴素(puromycin)、潮黴素 B 及 G418 篩選並分離克隆株。該 Cignal Lenti Renilla 對照(luc)載體編碼水母冷光酶基因，該水母冷光酶基因係自 CMV 啟動子組成性表現並作為內部對照。該經三重穩定轉染之 U-2 OS 細胞系（以下稱為「切口 3 報告細胞」）被維持於含有 10% FBS、

1X 青黴素／鏈黴素／L-麩醯胺酸(Gibco)、0.25 mg/ml G418 硫酸鹽、0.3 mg/ml 潮黴素 B 及 0.001 mg/ml 嘌呤黴素之 McCoy's 5A 培養基中(Gibco, Grand Island, NY)。

爲了產製配體表現細胞，HEK293 細胞(ATCC)係經表現人 DLL4 之載體轉染。該載體以 pCMV6-AC-HA-His 骨架爲基礎(Origene, Rockville, MD)，該 DLL4 插入物之正確 DNA 序列係經證實。在轉染後，HEK293 細胞係於 0.5 mg/ml G418 中篩選，克隆株係經分離、擴增及分析 DLL4 之表現。在 U-2 OS 細胞中具有高度 DLL4 表現及高度誘導切口 3 報告活性之克隆被用來評估抗切口 3 抗體之抑制效應。

將源自螢火蟲螢光素酶之螢光讀數除以內部對照水母冷光酶之讀數以正常化該信號（以下稱爲「F/R 比」）。爲了計算切口 3 傳訊之誘導倍數，自該 DLL4-HEK293 共培養報告試驗所產生之 F/R 比係除以源自親代 HEK293 共培養之 F/R 比，並稱爲相對螢光素酶單位(RLU)或活性。

B.報告基因共培養測試

在培養板之人切口 3 報告細胞係經胰蛋白酶消化、收集及計數，其中測試培養基係由 50%完全 McCoy's 5A 培養基（含 10% FBS 及青黴素、鏈黴素之 McCoy's 5A 培養基，Invitrogen）及 50%之完全 MEM 培養基（含 10% FBS 及青黴素、鏈黴素之 MEM，Invitrogen）組成。適當細胞稀釋液係以相同培養基製備，以允許在含有經連續稀釋

(1:3 於完全 McCoy's 5A 培養基中) 之抗體溶液或雜交瘤培養上清液之 96 孔盤 (白色不透明, BD/VWR) 上, 每孔 45 微升之總體積中有每孔 10,000 個細胞。該等細胞及抗體稀釋液之混合物係在孔盤上於室溫中之無菌通風櫃培養 1 小時, 接著在各孔中添加每 45 微升 30,000 個人 DLL4-HEK293 細胞。在添加 hDLL4-HEK293 細胞後, 該盤於培養箱中繼續培養 20 小時, 按照廠商說明使用 Dual-Glo 螢光素酶測試系統 (Promega) 以測量螢火蟲螢光素酶及內部對照水母冷光酶活性。資料係利用微軟 Excel 及格飛派德軟體 (Graphpad Prism) 作圖及分析。

ch75-huIgG1 及 hu75 於人切口 3 報告共培養測試中之力價顯示以劑量依賴性方式有效抑制切口 3 之傳訊。表 8 顯示 ch75-huIgG1 及 hu75 抗體在人切口 3 報告細胞中對切口 3 依賴性傳訊之抑制活性。ch75-huIgG1 及 hu75 在人切口 3 依賴性傳訊報告試驗中顯示類似之中和活性。因此, hu75 完全保留 ch75-huIgG1 之抑制活性。ch28-huIgG1 及 hu28 二者皆微弱抑制切口 3 傳訊, 程度類似對照 ch2H6-huIgG1 及 huNeg8.8 抗體。這表示 ch28-huIgG1 及 hu28 之抑制活性並不具專一性。另外, 資料顯示抗切口 3 抗體 ch28-huIgG1 及 hu28 不抑制切口 3 傳訊, 因此其功能與 ch75-huIgG1 及 hu75 不同。

表8. 人化及嵌合抗體之劑量依賴性抑制活性。

	%抑制 (SD)					
nM	hu28 VH1.0/VL1.0	hu75 VH1.9/VL1.3	huNeg-8.8	ch28-hIgG1	ch75-hIgG1	ch2H6-hIgG1
0	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)	100 (0)
0.27	99.9 (6.2)	104.4 (4.9)	84.5 (8.6)	102.8 (6.1)	88.4 (8.7)	95.7 (6.9)
0.82	88.6 (11.8)	103.0 (17.8)	88.2 (9.0)	83.2 (11.7)	70.6 (4.1)	93.1 (11.0)
2.47	77.7 (9.5)	65.6 (12.3)	84.6 (7.5)	75.0 (5.2)	48.4 (4.2)	92.4 (9.0)
7.41	71.9 (4.7)	40.5 (4.1)	79.3 (10.4)	74.0 (2.9)	26.8 (1.9)	84.8 (9.4)
22.2	68.6 (7.9)	22.7 (3.2)	83.5 (8.8)	76.5 (6.2)	20.3 (2.1)	94.8 (8.6)
66.7	66.8 (2.0)	14.2 (1.1)	81.4 (4.3)	72.3 (8.9)	13.2 (1.0)	83.1 (2.8)
200	71.1 (10.3)	13.7 (0.9)	75.7 (5.1)	70.3 (4.1)	13.9 (1.4)	78.2 (5.1)

ch75-huIgG1 及 hu75 變異體之 IC₅₀ (nM)值係自切口 3 報告基因共培養測試之切口 3 依賴性傳訊抑制計算。來自二或三個獨立試驗之 IC₅₀ (nM)的資料係經平均，如表 9 所示。hu75 及 ch75-huIgG1 皆具有低 IC₅₀ 值，表示它們是切口 3 傳訊之有效抑制劑。

表9. hu75及ch75-hIgG1之抑制活性的IC₅₀ 值 (nM)。

抗體	IC ₅₀ (nM)	SD
hu75 VH1.9/VL1.3	4.43	2.36
ch75-hIgG1	2.10	0.66

C.抗切口 3 抗體對於金屬蛋白酶在位點 2 切割的影響

爲了證實抗切口 3 抗體 hu75（但非 hu28）對切口 3 之 NRR 結構域的結合伴隨 S2 切割之減少，因此進行西方墨點分析。兔抗切口 3 單株抗體 D11B8 (Cell Signaling Technologies)辨識 S1 及 S2 蛋白水解切割事件之產物切口 3 C 端片段。如 NRR 結構域交換試驗所示，抗切口 3 抗體 hu75 與 LNR-A、HD-1 及 HD-2 結構域同時結合，該等結

構域位於由三呋喃基二氫咪唑切割之位點 1(S1)所分開之 NRR 的二個非共價連接區上。抗切口 3 抗體 hu28 與 LNR-C 及 HD1 結構域結合，該等結構域位於 S1 位點 N 端之 NRR 結構域的線性、共價連接區域。預期抑制抗體會降低 S2 切割之切口 3 的檢測，因為抑制抗體穩定 NRR 結構域於自我抑制構形，因此防止 S2 切割，非抑制抗體則不預期有對 S2 切割的這種效應。

切口 3 受體之位點 2 (S2)切割係由蛋白之西方墨點分析檢測，使用辨識在 C 端結構域之 Glu2312 周圍之表位的 D11B8 (Cell Signaling Technologies)抗體。HCC2429 及 MDA-MB-468 乳癌細胞被用來檢測抑制性抗切口 3 抗體 hu75 及非抑制性抗切口 3 抗體 hu28 對 S2 切割之作用。以該測定而言， $1-2.5 \times 10^6$ 細胞被接種於完全培養基。hu75、hu28 及 huNeg8.8 對照抗體被添加於 5 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度。細胞被培養於 37°C 之 5% CO_2 培養箱中 24 小時，然後直接溶解於緩衝液。萃取物藉由變性 7.5%聚丙醯胺膠體(Bio-Rad criterion gel)上之 SDS-PAGE 解出，並利用 iBlot 膠體轉移系統(Invitrogen)被轉印至硝化纖維素紙。切口 3 利用 D11B8 抗體檢測，抗 GAPDH 抗體(Sigma)利用標準西方墨點程序作為裝載對照。

圖 9 顯示該 S2 切割測試的西方墨點分析。在未處理及對照 huNeg8.8 處理之 HCC2429 及 MDA-MB-468 細胞 24 小時後，S1 及 S2 切割之 C 端切口 3 蛋白片段皆可如預期般藉由西方墨點分析被 D11B8 抗體檢測。另外，在

經抑制性抗切口 3 抗體 hu75 處理之細胞中，S1 切割之切口 3 C 端片段可被檢測，但 S2 切割片段則未被檢測，顯示金屬蛋白酶切割被 hu75 阻斷。另外，在經非抑制性抗切口 3 抗體 hu28 處理之細胞中，S1 及 S2 切割之切口 3 C 端片段皆被檢測，顯示 hu28 不抑制該受體之蛋白水解。因此，hu28 如實施例 5 所示以高親和性與該切口 3 NRR 結合，且對表現在細胞表面上之全長切口 3 具有高結合活性，但不抑制切口 3 傳訊，顯示其在功能上與抑制性抗切口 3 NRR 抗體（包括 hu75）不同。

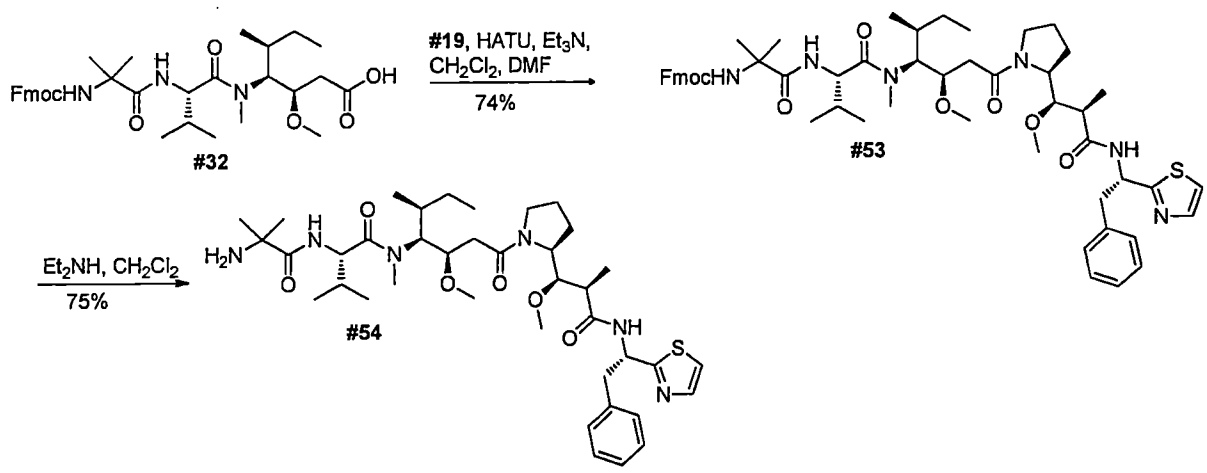
實施例 10

化合物之合成

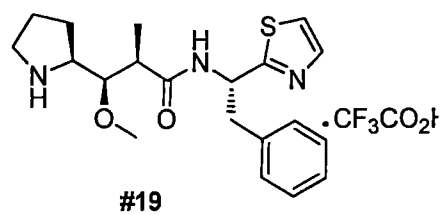
化合物 0101、6780、0131、3377 及 8261 係根據國際專利公開案 WO/2013/072813 所述之方法製備，該案以參照方式納入本文。

A. 化合物 0101（圖中之 #54）之實驗數據

製備 2-甲基丙胺鹽基-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-纈胺鹽基(#54)



步驟 1：合成 *N*-[(9*H*-芴-9-基甲氧基)羰基]-2-甲基丙
胺鹽基-*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-羰基-3-{[(1*S*)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]
胺基}丙基]吡咯啉-1-基}-5-甲基-1-羰基庚-4-基]-*N*-甲基-
L-纈胺鹽胺(#53)。根據一般程序 D (如下)，自 #32 (2.05
g, 2.83 mmol, 1 eq.) (於二氯甲烷(20 mL, 0.1 M)及 *N,N*-二
甲基甲醯胺(3 mL)中)，與胺 #19 (2.5 g, 3.4 mmol, 1.2
eq.)、HATU (1.29 g, 3.38 mmol, 1.2 eq.)



及三甲胺(1.57 mL, 11.3 mmol, 4 eq.)合成粗製之所欲
物質，該粗製物質藉由矽膠層析純化 (梯度：0%至 55%
丙酮於庚烷中)，產製固體狀之 #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；HPLC (程序 A)： *m/z* 965.4 [M+H⁺], 滯留時間 =

11.344 分鐘 (純度 > 97%) ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 假設為旋轉異構體之混合物的特徵信號 : δ 7.86-7.91 (m, 2H), [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) and 7.79 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.67-7.74 (m, 2H), [7.63 (d, $J=3.2$ Hz) and 7.65 (d, $J=3.2$ Hz), total 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) and 5.52 (ddd, $J=11.7, 8.8, 4.2$ Hz), total 1H], [4.49 (dd, $J=8.6, 7.6$ Hz) and 4.59 (dd, $J=8.6, 6.8$ Hz), total 1H], 3.13, 3.17, 3.18 and 3.24 (4 s, total 6H), 2.90 and 3.00 (2 br s, total 3H), 1.31 and 1.36 (2 br s, total 6H), [1.05 (d, $J=6.7$ Hz) and 1.09 (d, $J=6.7$ Hz), total 3H]。

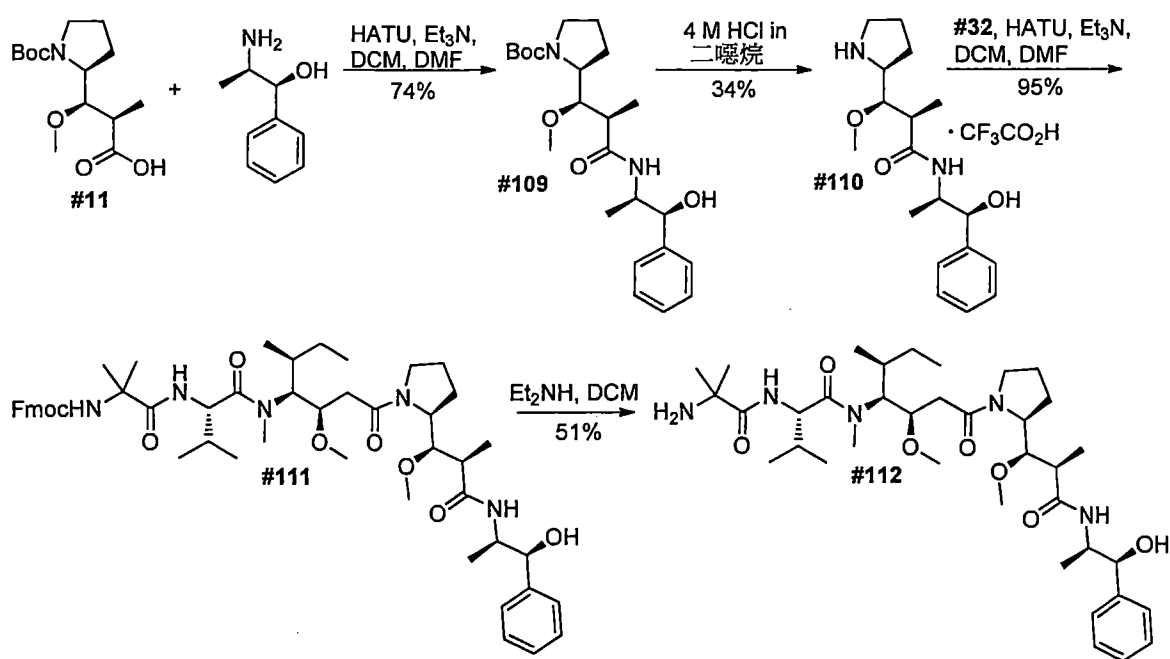
步驟 2 : 合成 2-甲基丙胺鹽基-*N*-[(3*R*,4*S*,5*S*)-3-甲氧基-1-{(2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-1-甲氧基-2-甲基-3-羰基-3-{[(1*S*)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]胺基}丙基]吡咯啉-1-基}-5-甲基-1-羰基庚-4-基]-*N*-甲基-*L*-纈胺鹽胺(#54)

根據一般程序 A (如下), 自 #53 (701 mg, 0.726 mmol) 於二氯甲烷中 (10 mL, 0.07 M) 合成該粗製之所欲物質, 該粗製物質藉由矽膠層析純化 (梯度: 0% 至 10% 甲醇於二氯甲烷中)。該殘餘物係經二乙基醚及庚烷稀釋, 並於真空中濃縮以得到白色固體狀之 #54 (406 mg, 75%)。LC-MS: m/z 743.6 [$\text{M}+\text{H}^+$], 滯留時間 = 0.70 分鐘; HPLC (程序 A): m/z 743.4 [$\text{M}+\text{H}^+$], 滯留時間 = 6.903 分鐘 (純度 > 97%) ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 假設為旋

轉異構體之混合物的特徵信號： δ [8.64 (br d, $J=8.5$ Hz) and 8.86 (br d, $J=8.7$ Hz), total 1H], [8.04 (br d, $J=9.3$ Hz) and 8.08 (br d, $J=9.3$ Hz), total 1H], [7.77 (d, $J=3.3$ Hz) and 7.80 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], [7.63 (d, $J=3.3$ Hz) and 7.66 (d, $J=3.2$ Hz), total 1H], 7.13-7.31 (m, 5H), [5.39 (ddd, $J=11, 8.5, 4$ Hz) and 5.53 (ddd, $J=12, 9, 4$ Hz), total 1H], [4.49 (dd, $J=9, 8$ Hz) and 4.60 (dd, $J=9, 7$ Hz), total 1H], 3.16, 3.20, 3.21 and 3.25 (4 s, total 6H), 2.93 and 3.02 (2 br s, total 3H), 1.21 (s, 3H), 1.13 and 1.13 (2 s, total 3H), [1.05 (d, $J=6.7$ Hz) and 1.10 (d, $J=6.7$ Hz), total 3H], 0.73-0.80 (m, 3H)。

B. 化合物 6780 (圖中之#112) 之實驗數據

製備 2-甲基丙胺鹽基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺鹽胺(#112)

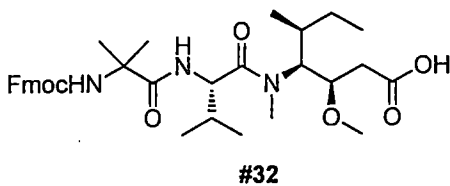


步驟 1：合成三級丁基 (2*S*)-2-[(1*R*,2*R*)-3-{[(1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啶-1-羧酸酯(#109)。在#11 (2.00 g, 6.96 mmol, 1 eq.)於二氯甲烷(21 mL, 0.3 M)及 *N,N*-二甲基甲醯胺(3 mL)之溶液中，添加 HATU (3270 mg, 8.35 mmol, 1.2 eq.)。在二分鐘後，添加胺 (1*R*,2*S*)-(+)-降麻黃鹼 (1.07 mg, 6.96 mmol, 1 eq.)及三乙胺 (1.94 mL, 13.9 mmol, 2 eq.)。在二小時後，該反應混合物以乙酸乙酯(100 mL)稀釋，用 1 M 氯化氫水性溶液及鹽水沖洗，以硫酸鈉乾燥，過濾，在真空中濃縮，並藉由矽膠層析純化（梯度：0%至 60%乙酸乙酯於庚烷中），以提供白色固體狀之#109 (2.18 g, 74%)。LC-MS： *m/z* 321.3 [(M - Boc)+H⁺]，滯留時間 = 3.14 分鐘；¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)假設為旋轉異構體之混合物的特徵信號：δ 7.64 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.24-7.33 (m,

4H), 7.15-7.21 (m, 1H), 5.35 (br d, $J=5$ Hz, 1H), 4.45 (br dd, $J=5, 5$ Hz, 1H), 3.91-4.00 (m, 1H), 3.30-3.39 (m, 1H), 3.26 (s, 3H), 2.94-3.07 (m, 1H), 2.04-2.14 (m, 1H), 1.46-1.78 (m, 4H), 1.40 (s, 9H), 0.97-1.04 (m, 6H)。

步驟 2：合成 (2*R*,3*R*)-*N*-[(1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]-3-甲氧基-2-甲基-3-[(2*S*)-吡咯啉-2-基]丙醯胺，三氟乙酸鹽 (#110)。根據一般程序 C (如下)，在 0 °C 自 #109 (414 mg, 0.984 mmol, 1 eq.)、二噁烷 (5 mL, 0.2 M) 及氯化氫於二噁烷之 4 M 溶液 (15 mL, 60 mmol, 60 eq.) 中合成粗製之所欲化合物，其藉由逆相層析 (方法 C) 純化以產生黏稠液體之 #110 (120 mg, 34%)。LC-MS: m/z 321.1 $[M+H^+]$ ，滯留時間 = 0.55 分鐘； 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)，特徵信號： δ 7.90 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.28-7.36 (m, 4H), 7.20-7.27 (m, 1H), 4.46 (d, $J=6.2$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J=8.6, 2.3$ Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.92-3.16 (m, 3H), 2.24-2.35 (m, 1H), 1.49-1.88 (m, 4H), 1.09 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.01 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)。

步驟 3：合成 *N*-[(9*H*-芴-9-基甲氧基)羰基]-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*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-*N*-甲基-L-纈胺醯胺 (#111)。根據一般程序 D (如下)，自 #32 (140 mg, 0.230 mmol, 1 eq.)、



#110 (110 mg, 0.253 mmol, 1.1 eq.)、二氯甲烷(3 mL, 0.08 M)、*N,N*-二甲基甲醯胺(0.5 mL)、HATU (96.2 mg, 0.253 mmol, 1.1 eq)及三乙胺(96 μ L, 0.69 mmol, 3 eq.)合成粗製之所欲產物，其藉由矽膠層析純化（梯度：0%至40%丙酮於庚烷中）以產製#111 (220 mg, 95%)。LC-MS： m/z 912.4 $[M+H^+]$ ，935.4 $[M+Na^+]$ ，滯留時間= 2.15 分鐘；HPLC（程序 B）： m/z 912.5 $[M+H^+]$ ，934.5 $[M+Na^+]$ ，滯留時間= 10.138 分鐘（純度>94%）； 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)假設為旋轉異構體之混合物的特徵信號： δ 7.89 (d, $J=7.8$ Hz, 2H), 7.66-7.75 (m, 2H), 7.41 (dd, $J=7.4, 7.4$ Hz, 2H), 7.12-7.20 (m, 1H), [5.33 (d, $J=4.7$ Hz) and 5.38 (d, $J=4.7$ Hz), total 1H], 3.15, 3.18, 3.22 and 3.23 (4 s, total 6H), 1.30, 1.33, 1.36 and 1.39 (4 s, total 6H), 0.95-1.06 (m, 6H)。

步驟 4：合成 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*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-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(#112)。根據一般程序 A（如下），自#111 (210 mg, 0.230 mmol)於二氯甲烷(5 mL, 0.05 M)及二乙胺(5 mL)中合成該粗製之所欲物質，該粗製物質藉由矽膠層析純化（梯度：0%至 10%

甲醇於二氯甲烷)以產生油及固體之混合物。添加二乙基醚及庚烷，該混合物於真空濃縮，產生白色固體之#112 (81 mg, 51%)。LC-MS： m/z 690.4 $[M+H^+]$ ，滯留時間= 1.10 分鐘；HPLC (程序 A)： m/z 690.5 $[M+H^+]$ ，712.4 $[M+Na^+]$ ，滯留時間= 7.229 分鐘 (純度>90%)； 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)假設為旋轉異構體之混合物的特徵信號： δ [7.62 (br d, $J=8$ Hz), 7.88 (br d, $J=8$ Hz), 8.07 (br d, $J=9$ Hz) and 8.11 (br d, $J=9$ Hz), total 2H], 7.15-7.34 (m, 5H), [5.34 (d, $J=4$ Hz) and 5.41 (d, $J=5$ Hz), total 1H], 3.18, 3.21, 3.23 and 3.25 (4 s, total 6H), 2.93 and 3.08 (2 br s, total 3H), 1.15, 1.18, 1.21 and 1.25 (4 s, total 6H)。

C.一般程序

一般程序 A：利用二乙胺或哌啶移除 Fmoc。在含 Fmoc 化合物之二氯甲烷或 *N,N*-二甲基甲醯胺 (亦稱為 DMF) 之溶液中，添加等體積之二乙胺或哌啶。反應之進行係由 LC-MS (或 HPLC 或 TLC) 監測。在真空中移除溶劑，在一些情況中該殘餘物用庚烷共沸一至四次。殘餘物通常用二氯甲烷及少量甲醇稀釋，然後被減量至矽並以矽膠層析純化，利用於二氯甲烷中之甲醇 (或其他溶劑之適當混合物) 洗脫以得到該所欲之物質 (或使用得到之粗製物質)。

一般程序 C：利用氯化氫於二噁烷中進行 Boc 移除或三級丁酯 (亦稱為 *t*-Bu 酯) 切割。在含 Boc 化合物之溶

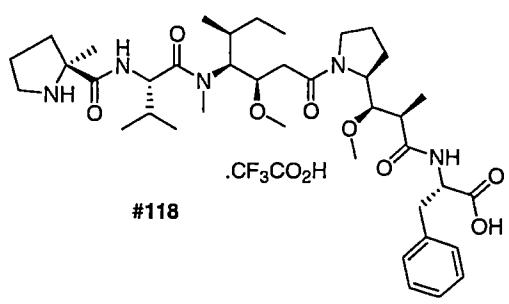
液或含三級丁酯化合物於二噁烷之溶液（或在一些情況中無溶液或其他相關溶劑）添加 4 M 氯化氫於二噁烷溶液中。反應之進行係由 LC-MS（或 HPLC 或 TLC）監測。該反應於真空中濃縮，在一些情況中以庚烷共沸一至四次。

一般程序 D：與 *O*-(7-吡啶并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)偶合。在胺(1.0 eq.)及酸(1.0-2.0 eq.)於二氯甲烷中、*N,N*-二甲基甲醯胺（亦稱為 DMF）之攪拌溶液或二者之混合物中，添加 HATU (1.0-2.0 eq.)，然後再添加三乙胺(2.0-4.0 eq.)或二異丙基乙胺（2.0-4.0 eq.，又稱為 Hunig 鹼）。反應過程藉由 LC-MS（或 HPLC 或 TLC）監測；該反應通常在三小時內完成。在真空中移除溶劑。殘餘物藉由矽膠或逆相層析純化，或在一些情況中利用庚烷共沸三次，以少量乙酸乙酯稀釋，然後減量至矽或 C18 鍵結矽並經由矽膠或逆相層析純化。

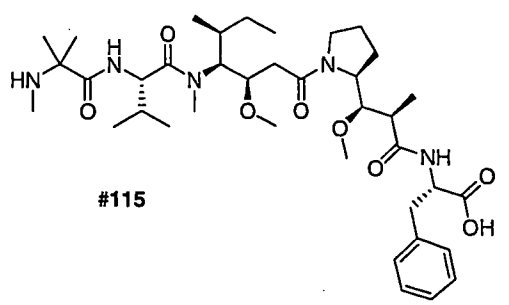
D.其他化合物

其他用於本發明之化合物係描述於國際專利公開案 WO/2013/072813 並顯示於下。

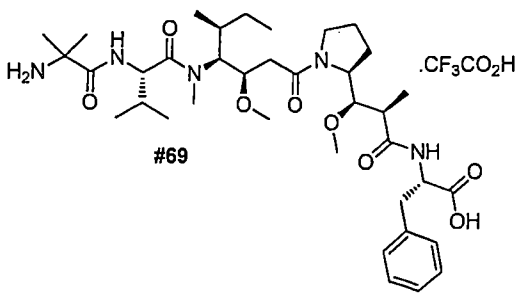
本文所使用之化合物 0131，或 2-甲基-L-脯胺醯基-N-[(3R,4S,5S)-1-{(2S)-2-[(1R,2R)-3-{[(1S)-1-羧基-2-苯基乙基]胺基}-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基}-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺醯胺，三氟乙酸鹽(#118)具有下式：



本文所使用之化合物 3377，或 N,2-二甲基丙胺鹽基-N-{(1S,2R)-4-[(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]吡咯啉-1-基}-2-甲氧基-1-[(1S)-1-甲基丙基]-4-側氧基丁基}-N-甲基-L-纈胺鹽基，三氟乙酸鹽(#115)具有下式：



本文所使用之化合物 8261 或 2-甲基丙胺鹽基-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]吡咯啉-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-N-甲基-L-纈胺鹽基(#69)具有下式：



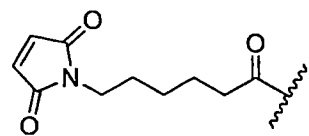
實施例 11

製備抗切口 3 抗體－藥物共軛體(ADC)

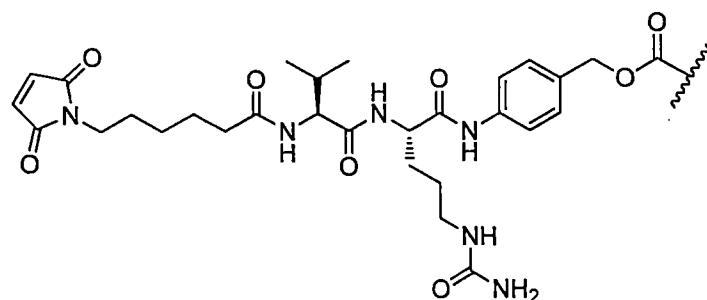
本發明之 ADC 的製備係利用具有用於與化學化合物結合之反應性位點之連接子的一部分，並導入具有用於連接抗體之反應性位點之連接子單位的另一部分。在一態樣中，該連接子單位具有一具有親電子基之反應性位點，該親電子基可與存在於抗體單位如抗體上之親核基反應。抗體上之可用親核基包括但不限於氫硫基、羥基及胺基。抗體之親核基的雜原子可與連接子單位上之親電子基反應，形成與連接子單位之共價鍵。連接子上之可用親電子基包括但不限於順丁烯二醯亞胺及鹵乙醯胺基。

該連接子單位具有一具有親核基之反應性位點，該親核基可與存在於抗體單位上之親電子基反應。在抗體上之親電子基提供用於連接連接子單位之方便位點。抗體上之可用親電子基包括但不限於醛及酮羰基。連接子單位之親核基的雜原子可與抗體上之親電子基反應，形成連接至該抗體之共價鍵。在連接子單位上可用之親核基包括但不限於醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡巴腓、羧酸肼及芳醯肼。

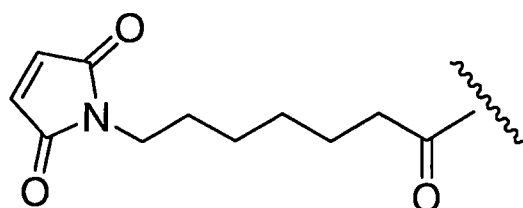
如本文中所使用，「mc-」亦稱為「MalC-」係指：



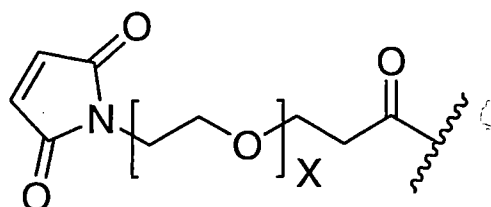
如本文中所使用，「vc-」亦稱為「mcValCitPABC-」或「MalCValCitPABC-」係指：



如本文中所使用，「me-」係指：



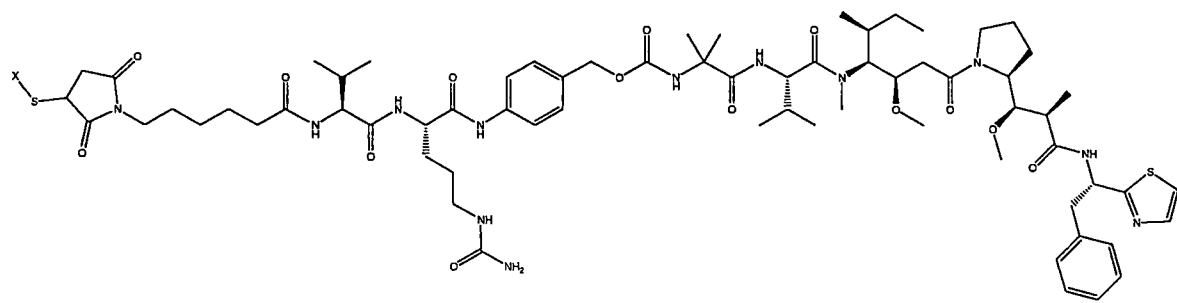
如本文中所使用，「MalPeg6C2-」係指如下所示之「MalPegXC2-」，其中 X=6：



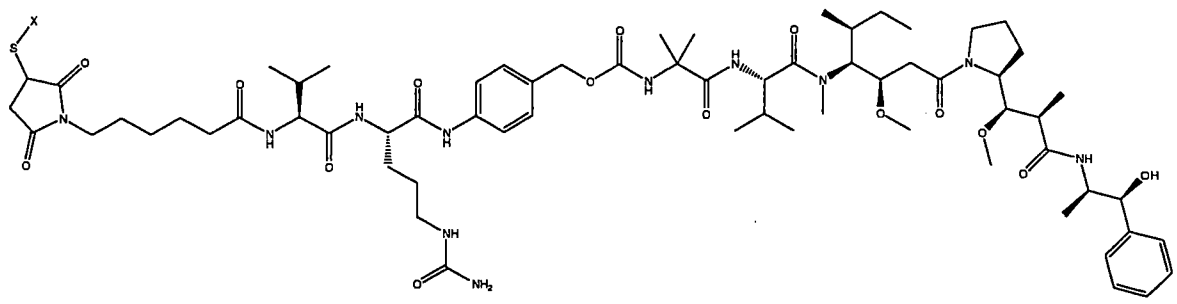
本發明之 ADC 之製備係藉由三(2-羧基乙基)膦(TCEP)部分還原該抗體，接著由經還原之半胱胺酸殘基與該所欲之順丁烯二醯亞胺端連接子-載荷藥物反應。特別是，該抗體經由添加約 2.3 至 3.0 倍莫耳過量之三(2-羧基乙基)膦(TCEP)於 100 mM HEPES (4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙磺酸緩衝液) pH 7.0 及 1 mM 二伸乙基三胺五乙酸(DTPA)於 37 °C 部分還原二小時。該所欲之連接子-載荷藥物接著被添加至該反應混合物，該連接子-載荷藥物／抗體之莫耳

比係約 7 至 8，在 15%體積比之二甲基乙醯胺(DMA)存在時於 25℃再反應一小時。經 1 小時之培養期後，添加 3 倍過量之 N-乙基順丁烯二醯亞胺以加蓋未反應之硫醇基，允許反應 15 分鐘，接著添加 6 倍過量之 L-Cys 以淬熄任何未反應之連接子-載荷藥物。該反應混合物係於磷酸緩衝鹽水(PBS) pH 7.4、4℃中隔夜透析，並經由 SEC (AKTA explorer 蛋白質純化儀，Superdex 200) 純化。琥珀醯亞胺環之水解進一步經由在 37℃培養該經純化之 ADC 於 100mM 硼酸鹽 pH 9.2 緩衝液中 24 至 72 小時達成。該環之打開經由液體層析電噴灑離子化串聯質譜分析(LC-ESI MS)監測，並經由大小排除層析(SEC)純化。該 ADC 接著利用 SEC 分析純度，以疏水交互作用層析(HIC)及液體層析電噴灑離子化串聯質譜(LC-ESI MS)計算藥物-抗體比(載荷量)。蛋白濃度係經由 UV 分光光度計測定。

vc0101 (顯示經由半胱胺酸殘基與抗體 X 共軛)



vc6780 (顯示經由半胱胺酸殘基與抗體 X 共軛)



人化抗切口抗體 hu28 及 hu75，以及大鼠-人嵌合性抗切口抗體 ch28 及 ch75 係與表 10 提供之各種連接子-載荷藥物組合共軛。ADC 及彼之元件係根據本發明之方法及根據國際專利公開號 WO/2013/072813 製備。

表10. 抗切口 3 ADC命名。

ADC命名	對應之 ADC連接子-載荷藥物#
hu28-vc0101	Notch3-28-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#54
hu28-vc6780	Notch3-28-v1010-hG1-(C)_mcValCitPABC-#112
hu75-vc0101	Notch3-75-v1913-hG1-(C)_mcValCitPABC-#54
hu75-vc6780	Notch3-75-v1913-hG1-(C)_mcValCitPABC-#112
ch28-vc0101	Notch3-28-cG1-(C)_mcValCitPABC-#54
ch28-vc6780	Notch3-28-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112
ch28-mc0101	Notch3-28-cG1-(C)_mc-#54
ch28-mc0131	Notch3-28-cG1-(C)_mc-0#118
ch28-mc3377	Notch3-28-cG1-(C)_mc-#115
ch28-mc8261	Notch3-28-cG1-(C)_mc-#69
ch28-MalPeg6C2-0131	Notch3-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118
ch28-MalPeg6C2-8261	Notch3-28-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69
ch28-me0131	Notch3-28-cG1-(C)_me-0#118
ch28-m(H ₂ O)c-0131	Notch3-28-cG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118
ch75-vc0101	Notch3-75-cG1-(C)_mcValCitPABC-#54
ch75-vc6780	Notch3-75-cG1-(C)_mcValCitPABC-#112
ch75-mc0131	Notch3-75-cG1-(C)_mc-0#118
ch75-mc3377	Notch3-75-cG1-(C)_mc-#115
ch75-MalPeg6C2-0131	Notch3-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-0#118
ch75-MalPeg6C2-8261	Notch3-75-cG1-(C)_MalPeg6C2-#69
ch75-me0131	Notch3-75-cG1-(C)_me-0#118
ch75-m(H ₂ O)c-0131	Notch3-75-cG1-(C)_m(H ₂ O)c-0#118
huNeg8.8-vc0101	huNeg8.8-(C)_mcValCitPABC-#54
huNeg8.8-vc6780	huNeg8.8-(C)_mcValCitPABC-#112
huNeg8.8-mc0131	huNeg8.8-(C)_mc-0#118
huNeg8.8-mc3377	huNeg8.8-(C)_mc-#115
huNeg8.8-me0131	huNeg8.8-(C)_me-0#118
huNeg8.8-MalPeg6C2-8261	huNeg8.8-(C)_MalPeg6C2-#69
ch2H6-mc8261	ch2H6-(C)_mc-#69

實施例 12

抗切口 3 抗體及 ADC 之結合活性及專一性

A.以細胞為基底之 ELISA

在以細胞為基底之 ELISA 中，篩選未共軛之抗切口 3

抗體、抗切口 3 ADC 及陰性對照抗體(huNeg8.8)對切口 3 表現性細胞系之細胞表面結合活性。過度表現切口 3 細胞系 U2OS/hNotch3 及內源性切口 3 表現性細胞系 HCC2429 及 MDA-MB-468 在 ELISA 試驗前一天分別以 50,000、200,000 及 100,000 細胞／孔被接種於 96 孔盤（白色不透明，BD/VWR）。在 ELISA 當天，移除孔槽中之培養基，施加經連續稀釋（1:3 於含氯化鈣及氯化鎂(Ca/Mg)及 1% BSA 之 DPBS 中）之抗體及 ADC 溶液於孔盤。孔盤於室溫中培養 2 小時，之後以含 Ca/Mg 及 1% BSA 之 DPBS 清洗。經 HRP 共軛之二級抗體接著被施加及培養於細胞中 1 小時。孔盤先經含 Ca/Mg 及 1% BSA 之 DPBS 清洗，接著以 Pico 化學發光劑呈色套組(Thermal Scientific)呈色，按照廠商說明進行化學發光測量。資料作圖及分析係利用微軟 Excel 及 Graphpad-Prism 軟體進行。

表 11 顯示自二至四個細胞表面切口 3 結合 ELISA 獨立實驗所計算之 EC_{50} (nM)值及標準差(SD)，測試抗體包括未共軛之抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 和抗切口 3 ADC hu28-vc0101、hu28-vc6780、hu75-vc0101 及 hu75-vc6780。該資料證實 hu28-ADC 及 hu75-ADC 在結合表現於 U2OS/hNotch3、HCC2429 及 MDA-MB-468 細胞之細胞表面上的全長人切口 3 方面，分別與未共軛之抗體 hu28 及 hu75 類似。另外，資料證實共軛各種連接子-載荷藥物至 hu28 及 hu75 抗體不會影響或改變其結合特徵。另外，資料證實 hu28 及 hu28-vc0101 和 hu28-vc6780 二者相較

於 hu75 及 hu75-vc0101 和 hu75-vc6780 對細胞表面切口 3 具有較高之結合能力，由彼等之較低 EC₅₀ 值可示。陰性對照（未共軛之 huNeg8.8 抗體）不與測試之任何細胞系結合。缺乏結合(LB)之對照抗體的 EC₅₀ 值如所示不會產生。（SD = 標準差）

表11. 未共軛抗切口 3 抗體及抗切口 3 ADC 之EC₅₀ (nM) 值 (SD = 標準差)

	EC ₅₀ (nM) 及 (SD)					
	HCC2429		MDA-MB-468		U2OS/ hNotch3	
	EC50	SD	EC50	SD	EC50	SD
hu28 VH1.0/VL1.0	0.132	0.009	0.192	0.054	0.172	0.077
hu28-vc0101	0.176	0.025	0.273	0.063	0.266	0.029
hu28-vc6780	0.154	0.034	0.242	0.046	0.236	0.008
hu75 VH1.9/VL1.3	0.335	0.053	1.284	0.176	0.585	0.160
hu75-vc0101	0.427	0.115	2.022	0.167	0.798	0.057
hu75-vc6780	0.343	0.063	1.804	0.062	0.723	0.041
huNeg8.8	LB	-	LB	-	LB	-

B.流式細胞分析

利用流式細胞分析檢測未共軛抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 與切口 3 表現性細胞系之細胞表面結合活性。螢光激活細胞分選(FACS)分析係根據標準程序進行。細胞以含有氯化鈣及氯化鎂之 HBSS（以下稱為 HBSS++）潤洗，利用不含 EDTA 之胰蛋白酶收集，並以含 FBS 之培養基中和。細胞與 4 μg/mL 之抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 於含有 3%熱失活小牛血清(HICS)之 HBSS++中在冰上培養 30 分鐘。用冷的 HBSS++、3% HICS 緩衝液清洗細胞三次。細胞於 10 μg/mL 之別藻藍蛋白共軛之 AffiniPure F(ab')₂ 片段山羊抗人 IgG Fc 片段二次抗體 (Jackson

ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)中，在暗室之冰上培養 30 分鐘。用冷的 HBSS++/3% HICS 緩衝液清洗細胞一次。將細胞重懸於 HBSS++/3% HICS、25mM HEPES、1 mM MgCl₂ 及 25 µg/ml DNaseI 中。添加 7-胺基-放線菌素 D (7-AAD)以排除非存活細胞。活細胞係於 BD FACSCalibur 流式細胞分析儀(BD Biosciences, San Jose, CA)上分析。利用 FlowJo 流式細胞分析軟體 (Ashland, OR)計算來自 FL-4 通道之平均螢光強度(MFI)。

表 12 顯示藉由 FACS 分析未共軛之抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 對一群切口 3 表現性細胞系之結合活性。U-2 OS 細胞系被用來作為切口 3 陰性／低對照細胞系。hu28 及 hu75 皆對 U-2 OS 具有低量結合，僅稍高於陰性對照 huNeg8.8。另外，資料顯示 hu28 及 hu75 與切口 3 過度表現性細胞（U2OS/hNotch3 及 MDAMB468/hNotch3）及切口 3 內源性表現性細胞（MDA-MB-468、HCC2429 及 OVCAR3）專一性結合。另外，資料顯示 hu28 對所有切口 3 表現性細胞系的結合活性皆高於 hu75，此結果類似在以細胞為基底之 ELISA 所觀察到之結合活性。

表12. 抗切口 3 抗體之FACS分析的MFI值。

細胞系	MFI		
	hu28 VH1.0/VL1.0 (抗切口 3)	hu75 VH1.9/VL1.3 (抗切口 3)	huNeg8.8 (陰性對照)
U2OS/hNotch3 (陽性對照)	256	171	6
MDA-MB-468	557	274	6
MDA-MB-468/hNotch3	1192	530	6
HCC2429	564	322	3
OVCAR3	116	80	5
U-2 OS (陰性/低對照)	17	18	7

實施例 13

試管內細胞毒性試驗

抗切口 3 ADC 之作用係於下列檢測：1)內源性表現切口 3 蛋白之細胞系：HCC2429（肺癌）、OVCAR3（卵巢癌）及 MDA-MB-468（乳癌），2)經建構以過度表現全長人切口 3 蛋白之細胞系：MDA-MB-468/hNotch3 及 U2OS/hNotch3，及 3)陰性對照細胞系(SW900)，使用 MTS 細胞存活性試劑(Promega, Madison, WI)。這些細胞系與漸增濃度之包含與本發明之各種連接子-載荷藥物組合共軛之大鼠-人嵌合性抗切口 3 抗體（ch28 及 ch75）及人化抗切口 3 抗體（hu28 及 hu75）之抗切口 3 ADC 一起培養。作為抗切口 3-ADC 之專一性對照的非靶向性對照 ADC（huNeg8.8-ADC 或 ch2H6-ADC）亦於該相同之細胞系上測試。經過四天後，檢測各培養之存活性。IC₅₀ 值係藉由邏輯非線性回歸模式 #203 以 XL fit v4.2 (IDBS, Guildford, Surry, UK)計算並以 ng Ab/mL 表示。也提供藥物抗體比率(DAR)。

表 13 顯示大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 處理之 IC₅₀ (ng Ab/mL)值。對於分別重複 2 至 4 次之實驗，計算平均 IC₅₀ 值及該平均值之標準誤(S.E.M.)。資料顯示具有各種連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 在切口 3 表現性及過度表現性癌細胞系 HCC2429、OVCAR3、MDA-MB-468、MDA-MB-468/hNotch3、U2OS/hNotch3 中有活性且誘導細胞死亡。非靶向性對照 ADC 不是缺乏效

力(LP)因此如所示未提供 IC₅₀ 值，就是僅在測試最高劑量下具最小活性。具有與對照 ADC 之 IC₅₀ 值相等或較高之 IC₅₀ 值之抗切口 3 ADC 被視為在活體外缺乏效力並以 LP 表示。

表13. 大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC之IC₅₀ (ng Ab/mL) 值 (nd= 未測定)。

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/mL) ± S.E.M.				
		HCC2429	OVCAR3	MDA-MB-468	MDA-MB-468/hNotch3	U2OS/hNotch3
ch28-mc8261	3.7	LP	nd	12147±4806.4	nd	nd
ch2H6-mc8261	4.1	LP	nd	LP	nd	nd
ch28-MalPeg6C2-8261	4.3	LP	nd	83±35.5	nd	nd
ch75-MalPeg6C2-8261	3.8	LP	nd	4255±2375	nd	nd
huNeg8.8-MalPeg6C2-8261	4.1	LP	nd	LP	nd	nd
ch28-mc0131	3.4	251±77.5	6±1.0	35±18.5	nd	3±0.5
ch75-mc0131	3.3	671±406.5	289	8202±2773.0	nd	19
huNeg8.8-mc0131	3.9	nd	LP	LP	nd	LP
ch28-me0131	3.9	30	8±2.0	24±14.0	nd	3±1.15
ch75-me0131	3.5	nd	nd	259	nd	nd
huNeg8.8-me0131	3.7	nd	LP	LP	nd	LP
ch28-mc3377	3.7	LP	14±5.5	27±11.3	nd	3±0.5
ch75-mc3377	3.7	nd	nd	560	nd	nd
huNeg8.8-mc3377	3.6	nd	LP	LP	nd	LP
ch28-MalPeg6C2-0131	4.1	LP	10±2.0	10±1.0	nd	3±0.85
ch28-vc0101	3.8	3230±1116.5	635	5443±2630.9	4±0.5	95±18.2
ch75-vc0101	2.7	2112±826.0	LP	4064±1793.9	24±4.0	LP
huNeg8.8-vc0101	3.7	15341	LP	4523±2789.5	8833	LP
ch28-vc6780	4.1	324±78.9	90±48.5	4407±2128.2	3±0.5	LP
ch75-vc6780	2.8	1004±177.0	922	6873±4230.0	21±3.5	LP
huNeg8.8-vc6780	4.1	LP	LP	LP	LP	LP

表 14 顯示人化抗切口 3 ADC 處理之 IC₅₀ (ng Ab/mL) 值。HCC2429 及 MDA-MB-468/hNotch3 細胞系具有二個個別重複。資料顯示具有各種連接子-載荷藥物之人化抗切口 3 ADC 在切口 3 表現性及過度表現性癌細胞系 HCC2429 、 OVCAR3 、 MDA-MB-468 、 MDA-MB-

468/hNotch3、U2OS/hNotch3 中有活性且誘導細胞死亡，但在缺乏切口 3 表現之陰性對照細胞系 SW900 則否。非靶向性對照 ADC 不是缺乏效力(LP)因此如所示未提供 IC₅₀ 值，就是僅在測試最高劑量下具最小活性。具有與對照 ADC 之 IC₅₀ 值相等或較高之 IC₅₀ 值之抗切口 3 ADC 被視為在活體外缺乏效力並以 LP 表示。未共軛之人化抗切口 3 抗體 hu28 及 hu75 不影響 HCC2429 或 MDAMB468/hNotch3 之存活性，顯示細胞毒性是因載荷藥物所致（資料未顯示）。

表14. 人化抗切口 3 ADC之IC₅₀ (ng Ab/mL)值。

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/mL)							
		HCC2429		OVCAR3	MDA-MB-468	MDA-MB-468/hNotch3		U2OS/hNotch3	SW900
hu28-vc0101	3.9	473	2940	306	6545	3.2	3	1330	LP
hu75-vc0101	3.8	611	3295	515	7001	37	36	523	LP
huNeg8.8-vc0101	3.7	18417	23978	3770	LP	5122	LP	LP	23379
hu28-vc6780	3.9	148	2050	17	LP	1.3	3	LP	LP
hu75-vc6780	4.2	214	630	254	LP	26	25	LP	LP
huNeg8.8-vc6780	4.2	LP	LP	9238	LP	LP	LP	LP	LP

利用抑制切口 3 基因表現之 siRNA 來證實抗切口 3 ADC 之活體外細胞毒性依賴切口 3 蛋白之表現。siRNA 轉染係利用 ON-TARGET 加 SMART 池人切口 3 (L-011093-00)、ON-TARGET 加對照非靶向池(D-001810-10) (Thermo Scientific Dharmacon)及 Lipofectamine RNAiMAX 試劑 (Invitrogen)產製。2 至 2.5×10⁶ 個 HCC2429、OVCAR3 及 MDA-MB-468/hNotch3 細胞在轉染前一天被接種於 10cm 培養皿中不含抗生素之生長培養基。隔天加入不含抗生素

之新鮮培養基。該 siRNA 及 Lipofectamine RNAiMAX 係經 OPTI-MEM 培養基稀釋，並按照廠商說明使用。各細胞系皆經對照及切口 3 siRNA 轉染。細胞與轉染混合物在潮濕、37°C、5% CO₂ 培養箱中培養 24 小時。在 24 小時後，細胞經胰蛋白酶消化並接種以利用 MTS 細胞存活性試劑(Promega, Madison, WI)評估。

依細胞系而定，接著在處理前 24 小時以每孔 2,500 至 5,000 個細胞的密度接種細胞。細胞以 3 倍連續稀釋之人化抗切口 3 ADC 三重處理，共以 10 個濃度（範圍 0-30 µg Ab/ml）處理。相對細胞存活性係以未處理對照之百分比表示。IC₅₀ 值係藉由邏輯非線性回歸模式#203 以 XL fit v4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, UK)計算並以 ng Ab/mL 表示。對於分別重複 2 次之實驗，計算平均 IC₅₀ 值及該平均值之標準誤(S.E.M.)。在自對照及切口 3 siRNA 處理之細胞製備之萃取物進行西方墨點分析，以證實抑制切口 3 基因表現發生於最多 144 小時（資料未顯示）。表現切口 3（以下稱為對照 siRNA）或在 siRNA 抑制基因表現之後減少切口 3 表現（以下稱為切口 3 siRNA）之細胞系與漸增濃度之人化抗切口 3 ADC 一起培養。作為抗切口 3 ADC 之專一性對照的非靶向性對照 ADC（huNeg8.8-ADC）亦於該相同之細胞系上測試。經過四天後，檢測各培養之存活性。IC₅₀ 值係藉由邏輯非線性回歸模式#203 以 XL fit v4.2 (IDBS, Guildford, Surrey, UK)計算並以 ng Ab/mL 表示。也提供藥物抗體比率(DAR)。

表 15 顯示人化抗切口 3 ADC 處理一群對照 siRNA 或切口 3 siRNA 處理之癌細胞系之 IC₅₀ (ng Ab/mL)值。資料顯示具有各種連接子-載荷藥物之人化抗切口 3 ADC 對於切口 3 表現性癌細胞系（對照 siRNA）具有活性且誘導細胞死亡。在 siRNA 抑制基因表現後減少切口 3 表現之細胞中（切口 3 siRNA）的 IC₅₀ 值高於對照 siRNA，顯示減少切口 3 之表現伴隨抗切口 3 ADC 之細胞毒性減少。對照 ADC 缺乏效力(LP)因此如所示未提供 IC₅₀ 值，或僅在測試最高劑量下具最小活性。資料另外顯示人化抗切口 3 ADC 專一性誘導切口 3 表現性及過度表現性癌細胞系之細胞死亡。該觀察到之細胞毒性依賴切口 3 之表現，因為在該相同細胞上以切口 3 siRNA 抑制基因表現，減少由抗切口 3 ADC 造成之細胞死亡。因此，人化抗切口 3 ADC 之活體外細胞毒性依賴切口 3 之表現。

表15. 人化抗切口 3 ADC之IC₅₀ (ng Ab/ml)值。

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/mL) ± S.E.M.					
		HCC2429		OVCAR3		MDA-MB 468 /hNotch3	
		對照 siRNA	切口 3 siRNA	對照 siRNA	切口 3 siRNA	對照 siRNA	切口 3 siRNA
hu28-vc0101	3.9	930±529	7138±827	684±183	1994±262	3.0	3340
hu75-vc0101	3.8	956±259	8972±891	1056±158	2408±27.5	29.0	3187
huNeg8.8-vc0101	3.7	17832±2319	21374±1614	3751±922	2902±654	4226	5580
hu28-vc6780	3.9	259±179	14120±1175	189±6.0	6100±200	2.0	LP
hu75-vc6780	4.2	236±30.5	LP	690±137	7300±147	17.0	7981
huNeg8.8-vc6780	4.2	LP	LP	8163±1031	7674±705	LP	LP

實施例 14

於活體外評估抗切口 3 ADC 之作用機轉

A.抗切口 3 ADC 之擾亂微管

在內化及在細胞內釋放該切口 3-ADC 之載荷藥物之後，假設該釋放之載荷藥物的作用機轉係擾亂細胞分裂所需之微管，藉以導致細胞週期停止、誘導細胞凋亡及細胞死亡。爲了證實此作用機轉，OVCAR3 卵巢癌細胞係經 hu28-vc0101、huNeg8.8-vc0101（對照 ADC）處理或未經處理，然後進行免疫螢光分析，藉由抗 α -微管蛋白抗體染色以標示微管，以及磷酸化組蛋白 H3 抗體染色以識別進行細胞分裂或停止細胞分裂之細胞。

OVCAR3 細胞係經接種於 Lab Tec II 4 室蓋玻片含蓋 #1.5 硼矽酸無菌玻片(Thermo Fisher Scientific Inc.)。隔天，細胞以 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 之 hu28-vc0101、對照 huNeg8.8-vc0101 處理或未經處理。經過 48 小時後，細胞以 HBSS++清洗二次，並固定於 4%多聚甲醛 10 分鐘。細胞以 PBS 清洗三次，並以 0.5 %氘核 X-100 進行通透化 2 分鐘。細胞經 PBS 清洗三次後，在室溫中以 3% BSA/PBS 固定 30 分鐘。細胞接著在室溫中以 1:100 之磷酸化組蛋白 H3 抗體(Ser10) (Cell Signaling)及 2 $\mu\text{g/ml}$ 之抗 α -微管蛋白抗體(Millipore)於 2%BSA/PBS 中培養 2 小時。在 2 小時後，細胞以 PBS 清洗二次然後與 1:500 稀釋之山羊抗小鼠 Alexa Fluor 488 及山羊抗兔 555 抗體於室溫中培養 45 分鐘。細胞以 PBS 清洗二次，樣本在 LSM710 共軛焦顯微鏡(Zeiss)上成像。

如圖 10 所示，未經處理之 OVCAR3 細胞在細胞分裂之細胞週期中，會被磷酸化組蛋白 H3 抗體染色成陽性，

且包含由抗 α -微管蛋白抗體染色所示之正常雙極性紡錘體。hu28-vc0101 之處理（但非對照 huNeg8.8-vc0101）會擾亂有絲分裂紡錘體之結構，如磷酸化組蛋白 H3 染色細胞中彼之異常形態學所示。該資料證實 hu28-vc0101 藉由在有絲分裂期間擾亂完整細胞分裂所需之微管以抑制細胞增生。

B.抗切口 3 ADC 誘導之細胞凋亡

胱冬酶 3 及胱冬酶 7（胱冬酶 3/7）蛋白酶是負責媒介哺乳動物細胞中之晚期細胞凋亡事件的計畫性細胞死亡程序之主要成員。胱冬酶 3/7 之活性係於以切口 3 ADC 處理之切口 3 表現性細胞系中測量。

OVCAR3、HCC2429 及 MDA-MB-468/hNotch3 細胞被接種於白色不透明之組織培養板並培養隔夜。OVCAR3 及 HCC2429 係以 1.1 $\mu\text{g/ml}$ 之 hu28-vc0101 及 huNeg8.8-vc010（對照 ADC）處理，MDA-MB-468/hNotch3 細胞係以 1 $\mu\text{g/ml}$ 之 hu28-vc0101 及 huNeg8.8-vc010（對照 ADC）處理。在培養 48 小時後，細胞於室溫中以 Caspase-Glo 3/7 試劑(Promega #G8090)處理 2 小時。在冷光儀中測量發光，在減去背景值後，數值以相對發光單位報告。

表 16 顯示 hu28-vc0101 誘導切口 3 表現性細胞系 MDA-MB-468/hNotch3、HCC2429 及 OVCAR3 細胞中之胱冬酶 3/7 的活性，其活性為經對照 Neg8.8-vc0101 處理之

細胞的 2 至 3 倍。因此，hu28-vc0101 藉由誘導細胞凋亡而抑制細胞生長。

表16. 抗切口 3 ADC之相對發光單位。

	hu28-vc0101	huNeg8.8-vc0101
MDA-MB-468/hNotch3	78,622 ± 1160	47,362 ± 678
HCC2429	128,518 ± 3483	55,255 ± 2965
OVCAR3	209, 715 ± 15572	118,150 ± 4280

實施例 15

切口 3 免疫組織化學

抗切口 3 ADC 之作用係於臨床前模型評估，該模型於異種移植之人腫瘤細胞的細胞膜上具有可檢測之切口 3 的表現量。爲了識別表現切口 3 之臨床前模型，在一群異種移植模型上進行使用抗切口 3 抗體之免疫組織化學分析（以下稱爲「IHC」），包括：37622A1 NSCLC（源自病患）、HCC2429 肺癌、MDA-MB-468 乳癌及 N87 胃癌異種移植模型。

源自各異種移植之組織片段係利用標準組織學程序經福馬林固定及石蠟包埋(FFPE)。切出 5 微米之 FFPE 切片，進行脫蠟及蒸餾水水合。在壓力鍋、pH 8.0 之 EDTA 緩衝液中修復抗原。內源性過氧化酶係利用 3.0 % H₂O₂ 封閉 10 分鐘。切片與 DAKO 蛋白質封片液培養 20 分鐘。1:2000 稀釋之兔抗切口 3 (D11B8; Cell Signaling Technologies)在室溫中被施用於切片上 1 小時。Signalstain Boost 抗兔 IgG-HRP 聚合物(Cell Signaling

Technologies)於室溫中被施加於切片上 30 分鐘。DAB 被用來顯色 5 分鐘。切片經 Mayer's 蘇木精快速對比染色、脫水、清潔及蓋上蓋玻片。表 17 顯示以 0 至 4 之量表評分之染色強度及染色分布分級，0 表示陰性，4 表示最高強度。

表17. 染色強度及染色分布分級。

染色強度 分級	染色分布 分級
0 = 陰性	0 = 陰性
1 = 最低	1 = 0-25%
2 = 輕微	2 = 26-50%
3 = 中度	3 = 51-75%
4 = 明顯	4 = 76-100%

如表 18 所示，切口 3 蛋白係於來自 37622A1 NSCLC、HCC2429、MDA-MB-468 及 N87 異種移植之細胞的細胞膜上 (Mem)及細胞質中 (Cyto)及／或細胞核中 (Nuc)被檢測。該資料顯示 HCC2429 及 N87 兩種異種移植的切口 3 蛋白均勻分布於 76 至 100%之細胞的細胞膜上。另外，該資料顯示 37622A1 NSCLC 及 MDA-MB-468 異種移植的切口 3 蛋白異質性地分布於 51 至 75%之細胞的細胞膜上。另外，D11B8 抗體在若干上皮腫瘤細胞之細胞核中檢測到切口 3 C 端細胞內結構域，顯示這些細胞中的切口 3 傳訊活躍。

表18. 異種移植模型中之切口 3 免疫組織化學之次細胞定位、強度及分布評分。

異種移植	組織類型	細胞種類	次細胞定位	強度評分 (0至4分)	分布分級 (0至4分)
37622A1 NSCLC	肺臟	人上皮	Cyto / Mem / Nuc	Cyto/Mem/Nuc=1-3	Cyto/Mem/Nuc =3
HCC2429	肺臟	人上皮	Cyto / Mem / Nuc	Cyto=2-3 Mem=2-4 Nuc=1	Cyto/Mem=4 Nuc=2
MDA-MB-468	乳房	人上皮	Cyto / Mem / Nuc	Cyto = 3-4 Mem/Nuc = 2	Mem = 3 Cyto/Nuc = 4
N87	胃	人上皮	Cyto / Mem / Nuc	Cyto/Mem = 2-4 Nuc= 1-2	Cyto/Mem/Nuc = 4
OVCAR3	卵巢	人上皮	Cyto / Mem / Nuc	Cyto/Nuc =1 Mem = 1-3	Cyto/Nuc = 2 Mem = 4

如圖 11 所示，西方墨點分析證實被用於活體內療效試驗之異種移植中的切口 3 表現量。胞外域之大約 210 kDa 的切口 3 蛋白片段（以下稱為切口 3-ECD）係於 HCC2429、MDA-MB-468、N87 及 37622A1 異種移植萃取物中利用小鼠單株抗切口 3 抗體 1G5 (Abnova)檢測。因此，使用抗切口 3 抗體 D11B8 之 IHC 的資料顯示切口 3 位於人上皮腫瘤細胞之細胞膜，使用抗切口 3 抗體 1G5 之西方墨點分析顯示包含 NRR 結構域（抗切口 3 ADC 之標靶）的切口 3-ECD 之表現。

實施例 16

活體內腫瘤異種移植模型

人化抗切口 3 抗體（hu28 及 hu75）和大鼠-人嵌合性抗切口 3 抗體（ch28 及 ch75）係與各種連接子-載荷藥物組合共軛，並於 37622A1 非小細胞肺癌(NSCLC)、HCC2429 肺癌、MDA-MB-468 乳癌及 N87 胃癌異種移植模型中測試。在以下所述之每個模型中，第一劑皆於第 0 天給予。每周至少測量一次腫瘤，彼等之體積係以下式計

算：腫瘤體積(mm^3) = $0.5 \times (\text{腫瘤寬度}^2) \times (\text{腫瘤長度})$ 。各治療組之平均腫瘤體積($\pm \text{S.E.M.}$)係由包括最多 10 隻動物，最少 6 隻動物加以計算。

A. 37622A1 病患衍生性 NSCLC 異種移植

於免疫不全小鼠中檢測抗切口 3 ADC 對於人腫瘤異種移植之活體內生長之效應，該異種移植係自根據適當受試者同意程序(Asterand)獲得之新鮮切除之 37622A1 NSCLC 腫瘤之片段建立。該 37622A1 NSCLC 病患衍生性異種移植係於活體內皮下繼代，以片段形式於母裸鼠(Nu/Nu)間繼代。當腫瘤到達 150 至 300 mm^3 之體積時，它們被分期以確保在不同處理組之間的腫瘤大小之一致性。37622A1 NSCLC 病患衍生性異種移植模型經靜脈投藥每四天四次(Q4dx4)，按表 19 提供之劑量投予 PBS 載劑、人化抗切口 3 ADC、對照 huNeg-8.8 ADC 及順鉑(cisplatin)。圖 12 顯示表 19 之資料，具有 vc0101 連接子-載荷藥物之 ADC 以 3 mg/kg 劑量投予與順鉑(5 mg/kg)及 PBS 載體之比較。

順鉑係用於治療癌之以鉑為基底之抗癌劑，其被視為標準照顧療法。順鉑與 DNA 交聯，藉以誘發細胞凋亡及細胞生長抑制。該資料顯示抗切口 3 ADC hu28-vc0101、hu28-vc6780、hu75-vc0101 及 hu75-vc6780 抑制 37622A1 NSCLC 病患衍生性異種移植腫瘤之生長。3 mg/kg 劑量之 hu28-vc0101 為此試驗中測試之最有效的 ADC，到第 84

天，仍在試驗中的 9 隻動物中有 4 隻維持無腫瘤。另外，該資料顯示抗切口 3 ADC 相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。另外，資料顯示抗切口 3 ADC 相較於順鉑更有效地抑制腫瘤生長，表示相較於以鉑為基底之標準照顧化學治療藥物具有更高效力（圖 12）。

表19. 抗切口 3 ADC 於 37622A1 NSCLC 異種移植之療效。

	37622A1 NSCLC 病患衍生性異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)							
	PBS	hu28-vc0101	hu28-vc6780	hu75-vc0101	hu75-vc6780	huNeg-8.8-vc0101	huNeg-8.8-vc6780	順鉑 (Cisplatin)
劑量 mg/kg	0	3	10	3	10	3	10	5
第-1天	187 ±10	186 ±13	182 ±16	185 ±17	183 ±17	184 ±18	182 ±17	185 ±11
第4天	227 ±19	202 ±16	176 ±13	200 ±16	205 ±23	225 ±17	226 ±26	226 ±15
第7天	279 ±24	202 ±15	176 ±19	227 ±16	195 ±22	274 ±18	265 ±28	280 ±29
第11天	371 ±42	130 ±11	122 ±10	175 ±20	147 ±23	309 ±26	246 ±30	301 ±34
第14天	419 ±49	119 ±11	95 ±7	156 ±19	118 ±18	303 ±26	277 ±41	345 ±47
第18天	516 ±63	71 ±6	65 ±6	112 ±16	93 ±14	298 ±28	219 ±31	309 ±37
第21天	562 ±65	55 ±6	56 ±6	122 ±27	98 ±20	320 ±41	218 ±42	373 ±50
第25天	610 ±78	49 ±6	51 ±6	137 ±33	93 ±24	315 ±52	264 ±52	401 ±58
第28天	624 ±94	41 ±7	51 ±8	161 ±53	99 ±26	358 ±61	246 ±51	446 ±64
第32天	817 ±99	42 ±13	72 ±15	175 ±52	165 ±45	398 ±64	332 ±77	482 ±62
第35天	900 ±104	42 ±11	92 ±21	271 ±79	229 ±59	487 ±79	384 ±94	587 ±80
第39天	960 ±117	62 ±26	120 ±31	319 ±103	294 ±78	569 ±102	431 ±114	591 ±83
第42天	931 ±108	75 ±34	151 ±37	357 ±113	318 ±71	590 ±101	495 ±128	612 ±92
第46天	1037 ±102	92 ±44	172 ±47	431 ±137	412 ±106	743 ±133	610 ±165	723 ±119
第49天	1119 ±120	120 ±63	248 ±62	519 ±135	521 ±132	810 ±121	718 ±202	853 ±139
第53天	1345 ±158	144 ±67	339 ±93	678 ±195	629 ±162	989 ±146	848 ±251	970 ±193
第56天	1485 ±185	126 ±51	376 ±100	818 ±251	808 ±196	1149 ±191	776 ±184	1215 ±231
第60天	1691 ±220	180 ±85	503 ±138	710 ±162	917 ±209	1287 ±194	964 ±232	1428 ±273
第63天	1736 ±193	223 ±111	604 ±160	824 ±191	917 ±147	1503 ±227	1097 ±254	-
第67天	-	296 ±152	888 ±272	938 ±202	1116 ±173	1600 ±251	1167 ±260	-
第70天	-	312 ±162	773 ±235	953 ±209	1181 ±203	-	1352 ±305	-
第74天	-	331 ±160	881 ±264	-	-	-	-	-
第77天	-	422 ±210	1029 ±325	-	-	-	-	-
第81天	-	510 ±248	-	-	-	-	-	-
第84天	-	622 ±322	-	-	-	-	-	-

B. HCC2429 肺異種移植

類似之活體內實驗係如上述以 HCC2429 肺癌細胞系進行。爲了產製異種移植物，母裸鼠(Nu/Nu)係經 3.5×10⁶

HCC2429 細胞於 50%基質膠(BD Biosciences)之皮下植入。當腫瘤到達 200 至 400 mm³ 之體積時，該腫瘤被分期以確保在不同處理組之間的腫瘤大小之一致性。HCC2429 肺模型經靜脈投藥每四天四次(Q4dx4)，按表 20 及 21 所提供之劑量投予 PBS 載劑、人化抗切口 3 ADC 及對照 huNeg-8.8 ADC。該資料顯示抗切口 3 ADC hu28-vc0101、hu28-vc6780、hu75-vc0101 及 hu75-vc6780 以劑量依賴性方式抑制 HCC2429 肺異種移植腫瘤之生長。另外，該資料顯示具有 vc0101 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 在 1 及 3 mg/kg 之劑量時以及具有 vc6780 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 在 3 及 10 mg/kg 之劑量時相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。另外，該資料顯示 3mg/kg 劑量之 hu28-vc0101 比 10 mg/kg 劑量之 hu28-vc6780 更有效。

表20. 抗切口 3-vc0101 ADC 於 HCC2429 肺異種移植之療效。

	HCC2429 肺異種移植之腫瘤體積 (mm³ +/- SEM)									
	PBS	hu28-vc0101			hu75-vc0101			huNeg-8.8-vc0101		
劑量 mg/kg	0	3	1	0.3	3	1	0.3	3	1	0.3
第-1天	245 ±24	245 ±23	246 ±26	246 ±30	245 ±28	246 ±23	247 ±29	244 ±30	245 ±33	246 ±27
第1天	529 ±52	548 ±52	532 ±36	528 ±50	498 ±39	548 ±37	524 ±66	482 ±59	519 ±72	514 ±50
第3天	742 ±73	606 ±78	757 ±68	733 ±78	498 ±44	753 ±93	713 ±74	695 ±91	756 ±97	724 ±73
第6天	1205 ±120	723 ±101	1095 ±119	1112 ±132	469 ±70	1096 ±146	1078 ±74	1075 ±132	1144 ±100	1207 ±100
第8天	1720 ±181	696 ±100	1324 ±173	1617 ±172	407 ±71	1428 ±200	1499 ±115	1404 ±183	1598 ±133	1683 ±165
第10天	2312 ±197	620 ±90	1606 ±250	2027 ±233	370 ±81	1611 ±189	1830 ±120	1735 ±253	1974 ±185	2163 ±260
第13天	3235 ±120	543 ±92	1717 ±223	2642 ±297	273 ±69	1803 ±208	2408 ±226	2162 ±376	2676 ±346	2589 ±287
第15天	-	512 ±111	1865 ±263	-	298 ±88	1871 ±232	-	-	-	-
第17天	-	442 ±114	2228 ±333	-	250 ±77	1948 ±228	-	-	-	-
第20天	-	428 ±144	-	-	177 ±44	-	-	-	-	-
第23天	-	405 ±149	-	-	160 ±35	-	-	-	-	-
第27天	-	422 ±164	-	-	174 ±51	-	-	-	-	-
第30天	-	394 ±182	-	-	196 ±72	-	-	-	-	-
第34天	-	505 ±236	-	-	295 ±121	-	-	-	-	-
第37天	-	606 ±283	-	-	433 ±179	-	-	-	-	-
第41天	-	750 ±361	-	-	606 ±259	-	-	-	-	-
第45天	-	872 ±415	-	-	836 ±359	-	-	-	-	-
第49天	-	558 ±303	-	-	732 ±350	-	-	-	-	-
第52天	-	571 ±310	-	-	-	-	-	-	-	-
第56天	-	704 ±399	-	-	-	-	-	-	-	-

表21. 抗切口 3-vc6780 ADC 於 HCC2429 肺異種移植之療效。

	HCC2429 肺異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)										
	PBS	hu28-vc6780				hu75-vc6780			huNeg-8.8-vc6780		
劑量 mg/kg	0	10	3	1	10	3	1	10	3	1	
第-1天	245 ±28	244 ±22	245 ±24	245 ±27	244 ±19	246 ±30	245 ±16	244 ±22	244 ±26	245 ±20	
第1天	398 ±50	369 ±31	379 ±45	400 ±66	407 ±43	403 ±51	418 ±34	429 ±56	427 ±49	402 ±53	
第3天	701 ±102	318 ±31	493 ±65	579 ±113	339 ±36	526 ±74	629 ±65	619 ±62	689 ±83	655 ±97	
第5天	949 ±140	228 ±28	609 ±82	826 ±191	251 ±33	615 ±98	916 ±97	808 ±101	965 ±114	837 ±117	
第7天	1345 ±200	172 ±22	638 ±86	1023 ±259	225 ±24	615 ±115	1164 ±131	1072 ±154	1380 ±136	1099 ±172	
第10天	2045 ±356	143 ±22	784 ±115	1439 ±398	198 ±24	717 ±129	1705 ±184	1452 ±210	2082 ±192	1722 ±363	
第12天	-	134 ±20	883 ±132	1442 ±487	166 ±22	807 ±130	2029 ±270	1673 ±290	2701 ±228	1586 ±337	
第14天	-	115 ±16	895 ±175	-	150 ±22	831 ±145	2294 ±287	1809 ±314	-	-	
第17天	-	127 ±18	1105 ±253	-	158 ±32	1017 ±178	-	-	-	-	
第20天	-	149 ±27	1219 ±311	-	164 ±48	1297 ±231	-	-	-	-	
第24天	-	206 ±60	1618 ±468	-	261 ±89	1813 ±343	-	-	-	-	
第27天	-	290 ±100	-	-	316 ±135	1970 ±462	-	-	-	-	
第31天	-	378 ±150	-	-	438 ±201	-	-	-	-	-	
第34天	-	551 ±244	-	-	423 ±177	-	-	-	-	-	
第38天	-	718 ±332	-	-	504 ±203	-	-	-	-	-	
第42天	-	1011 ±504	-	-	655 ±266	-	-	-	-	-	
第46天	-	-	-	-	793 ±320	-	-	-	-	-	
第49天	-	-	-	-	901 ±351	-	-	-	-	-	
第53天	-	-	-	-	1228 ±472	-	-	-	-	-	

表22. 劑量5 mg/kg之大鼠 - 人嵌合性抗切口3 ADC於HCC2429肺異種移植之療效。

HCC2429 肺異種移植之腫瘤體積 (mm ³ +/- SEM)															
天	PBS	ch28- mc0101	ch28- mc3377	ch28- me0131	ch28- MALPEG6 C2-Q131	ch75- mc0131	ch28- vc0101	ch28- vc6780	ch75- vc0101	ch75- vc6780	huNeg8. 8- mc0131	huNeg8. 8- mc3377	huNeg8. 8- me0131	huNeg8.8 -vc0101	huNeg8. 8- vc6780
-2	198 ±44	195 ±37	195 ±39	196 ±39	196 ±47	195 ±35	195 ±26	195 ±33	195 ±25	205 ±35	195 ±43	175 ±47	195 ±42	196 ±41	195 ±43
2	503 ±106	457 ±73	525 ±101	458 ±101	505 ±128	483 ±96	395 ±54	378 ±77	450 ±48	420 ±66	603 ±119	546 ±140	543 ±115	602 ±127	516 ±117
4	838 ±187	506 ±96	654 ±136	504 ±112	638 ±192	522 ±125	298 ±46	329 ±73	366 ±47	430 ±92	845 ±149	714 ±186	746 ±168	766 ±191	759 ±177
6	1008 ±229	562 ±126	789 ±156	600 ±152	750 ±207	634 ±158	259 ±33	319 ±79	318 ±48	474 ±108	1117 ±171	939 ±243	1016 ±225	1000 ±262	988 ±229
9	1618 ±265	652 ±133	1186 ±253	787 ±177	1020 ±213	620 ±129	177 ±24	280 ±72	217 ±30	502 ±125	1773 ±264	1346 ±284	1506 ±367	1372 ±385	1449 ±304
11	1605± 228	761 ±166	1458 ±314	941 ±199	1302 ±257	737 ±162	169 ±22	290 ±77	196 ±30	601 ±155	1986 ±170	1608 ±259	1475 ±283	1331 ±399	1582 ±316
13	2033± 293	865 ±176	1534 ±339	1096 ±264	1599 ±274	802 ±184	122 ±15	293 ±88	166 ±33	735 ±186	2535 ±228	2257 ±350	1831 ±400	-	-
16	-	917 ±207	-	949 ±190	1556 ±190	878 ±200	97 ±13	266 ±105	120 ±26	781 ±210	-	-	-	-	-
19	-	1222 ±275	-	1322 ±276	1966 ±414	1051 ±247	88 ±14	484 ±171	102 ±28	770 ±153	-	-	-	-	-
23	-	1694 ±401	-	-	-	1354 ±340	79 ±25	496 ±238	72 ±25	855 ±156	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	77 ±47	658 ±329	64 ±28	1159 ±253	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	109 ±86	533 ±290	36 ±20	1270 ±205	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	138 ±128	775 ±411	36 ±34	1628 ±309	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	210 ±199	-	46 ±45	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	323 ±311	-	58 ±57	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	17 ±17	-	108 ±107	-	-	-	-	-	-
51	-	-	-	-	-	-	43 ±43	-	201 ±200	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	82 ±82	-	0±0	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	138 ±138	-	0±0	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	301 ±301	-	0±0	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-	-	-	-	0±0	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	0±0	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	0±0	-	-	-	-	-	-

該 HCC2429 肺模型亦經靜脈投藥每四天四次，按表 22 所提供之 5 mg/kg 劑量投予 PBS 載劑、大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 及對照 huNeg-8.8 ADC。該資料顯示具有不可切割(mc)及可切割(vc)連接子與各種載荷藥物組合之抗切口 3 ADC 抑制 HCC2429 肺癌異種移植之生長。另外，該資料顯示大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。另外，該資料顯示具有 vc0101 連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 比其他測試之抗切口 3 ADC 更為有效。

其他活體內實驗利用 HCC2429 肺癌細胞系進行，使用未共軛之大鼠-人嵌合性抗切口 3 抗體 ch75-hIgG1，以決定 ch75-hIgG1 之切口 3 傳訊抑制是否導致觀察到之抗切口 3 hu75-ADC 之效力。為了產製異種移植物，母裸鼠(Nu/Nu)係經 3.5×10^6 HCC2429 細胞於 50%基質膠(BD Biosciences)之皮下植入。當腫瘤到達 75 至 200 mm³ 之體積時，該腫瘤被分期以確保在不同處理組之間的腫瘤大小之一致性。

該 HCC2429 肺癌模型係經靜脈投藥每四天四次，按表 23 所提供之劑量投予 PBS 載劑、大鼠-人嵌合性抗切口 3 抗體 ch75-hIgG1 及人化抗切口 1 抗體 hu438 VH1.1/VL1.8。各處理組有 8 隻動物，平均腫瘤質量($\pm$ SEM)係經計算並與對照 PBS 載劑組比較。基於變異數分析(ANOVA)之 P 值係經計算，以決定觀察到之抗切口治療相較於對照 PBS 之生長抑制的統計顯著性，使用 Excel

內建之統計功能。藥物處理相較於載劑處理小鼠之生長抑制百分比(%)之值係自試驗最後一天的測量值計算，並以下式計算： $100 * \{1 - [(處理第 14 天 - 處理第 0 天) / (對照第 14 天 - 對照第 0 天)]\}$ 。

該資料顯示抗切口 1 人化抗體 hu438 VH1.1/VL1.8 抑制 57%之腫瘤生長，未共軛之大鼠-人嵌合性抗切口 3 抗體 ch75-hIgG1 相較於 PBS 載劑處理腫瘤不抑制腫瘤生長。另外，資料顯示表 20、21 及 22 報告之由 ch75 抗體產製之切口 3 ADC 於 HCC2429 異種移植觀察到之腫瘤生長抑制不是因為傳訊抑制。

表 23. 抑制性抗切口 3 及抗切口 1 抗體於 HCC2429 肺異種移植之作用。

	HCC2429 肺異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)				
	對照	ch75-hIgG1 (抗切口 3)	P-值 (ch75 ch75-hIgG1 vs. PBS)	hu438 VH1.1/VL1.8 (抗切口 1)	P-值 (hu438 VH1.1/VL1.8 vs. PBS)
第0天	110±7	110±5	0.54	112±11	0.504757
第3天	218±24	211±24	0.39	173±26	0.036706
第5天	397±41	356±41	0.22	254±36	0.001177
第7天	665±61	574±59	0.19	311±60	0.000001
第10天	1267±139	1054±104	0.19	518±92	0.000001
第12天	1615±187	1441±139	0.34	701±132	0.000006
第14天	1985±234	1821±175	0.42	909±172	0.000048

C. MDA-MB-468 乳癌異種移植

類似之活體內實驗係如上述以 MDA-MB-468 乳癌細胞系進行。MDA-MB-468 細胞被歸類為三陰性乳癌 (TNBC)基底樣亞型，因為它們不表現雌激素受體、助孕素受體及人表皮生長因子受體 2 (HER2) (Lehmann, BD, et al, *J Clin Invest.*2011;121(7):2750–2767)。為了產製異種

移植物，SCID 無毛遠交系(SHO)母鼠於乳腺脂肪墊原位植入含 50%基質膠(BD Biosciences)之 10×10^6 MDA-MB-468 細胞。當腫瘤到達 250 至 450 mm³ 之體積時，該腫瘤被分期以確保在不同處理組之間的腫瘤大小之一致性。該 MDA-MB-468 乳癌模型經靜脈投藥每四天四次，按表 24 及 25 所提供之劑量投予 PBS 載劑、人化抗切口 3 ADC 及對照 huNeg-8.8 ADC。圖 13A 及 13B 顯示來自表 24 中具有 vc0101 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 與對照 huNeg-8.8 ADC 及 PBS 載劑之比較資料。圖 14A 及 14B 顯示來自表 25 中具有 vc6780 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 與對照 huNeg-8.8 ADC 及 PBS 載劑之比較資料。

該資料顯示抗切口 3 ADC hu28-vc0101、hu28-vc6780、hu75-vc0101 及 hu75-vc6780 以劑量依賴性方式抑制 MDA-MB-468 乳癌異種移植腫瘤之生長。另外，該資料顯示具有 vc0101 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 在 1 及 3 mg/kg 之劑量時以及具有 vc6780 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 在 1、3 及 10 mg/kg 之劑量時相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。另外，該資料顯示 1 mg/kg 劑量之具有 vc0101 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 比 3 mg/kg 劑量之具有 vc6780 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 更有效。

表 24. 抗切口 3-vc0101 ADC 於 MDA-MB-468 乳癌異種移植之療效。

	MDA-MB-468 乳癌異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)									
	PBS	hu28-vc0101			hu75-vc0101			huNeg-8.8-vc0101		
劑量 mg/kg	0	3	1	0.3	3	1	0.3	3	1	0.3
第0天	343 ±12	347 ±15	348 ±22	336 ±19	347 ±20	347 ±22	348 ±21	334 ±23	346 ±16	344 ±19
第4天	441 ±24	359 ±24	439 ±21	403 ±28	444 ±28	410 ±32	439 ±31	424 ±29	447 ±32	442 ±19
第7天	469 ±32	326 ±27	415 ±25	395 ±38	338 ±20	383 ±33	435 ±27	411 ±26	449 ±20	438 ±23
第11天	495 ±28	227 ±27	372 ±34	412 ±42	277 ±22	373 ±33	504 ±38	439 ±36	538 ±23	496 ±37
第14天	581 ±35	147 ±20	314 ±27	488 ±45	181 ±19	350 ±40	507 ±30	445 ±29	592 ±47	560 ±36
第18天	639 ±43	77 ±10	261 ±33	497 ±55	90 ±12	296 ±33	587 ±44	479 ±42	619 ±42	578 ±36
第21天	638 ±46	16 ±8	219 ±41	509 ±60	60 ±9	260 ±49	590 ±55	481 ±34	676 ±46	627 ±30
第26天	707 ±41	0 ±0	253 ±61	590 ±66	16 ±10	267 ±59	652 ±64	548 ±41	793 ±54	671 ±56
第29天	749 ±59	0 ±0	238 ±64	-	8 ±8	261 ±62	675 ±63	-	819 ±73	669 ±37
第32天	812 ±80	0 ±0	266 ±67	-	7 ±7	264 ±67	738 ±70	-	913 ±72	758 ±44
第35天	891 ±79	0 ±0	271 ±73	-	0 ±0	326 ±86	821 ±69	-	1023 ±96	848 ±58
第39天	892 ±84	0 ±0	310 ±88	-	0 ±0	324 ±81	864 ±74	-	-	884 ±64
第42天	1037 ±104	0 ±0	349 ±95	-	0 ±0	381 ±94	997 ±84	-	-	1002 ±55
第47天	1173 ±134	0 ±0	394 ±123	-	0 ±0	442 ±69	-	-	-	1145 ±78
第50天	-	0 ±0	377 ±118	-	0 ±0	484 ±89	-	-	-	1120 ±67
第53天	-	0 ±0	414 ±127	-	0 ±0	452 ±78	-	-	-	1229 ±100
第56天	-	0 ±0	470 ±128	-	0 ±0	535 ±93	-	-	-	1314 ±120
第60天	-	0 ±0	532 ±140	-	0 ±0	603 ±98	-	-	-	-
第63天	-	0 ±0	509 ±117	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第67天	-	0 ±0	611 ±148	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第70天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第76天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第83天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第90天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第97天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第103天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第110天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第118天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-
第125天	-	0 ±0	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-

表 25. 抗切口 3-vc6780 ADC 於 MDA-MB-468 乳癌異種移植之療效。

	MDA-MB-468 乳癌異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)									
	PBS	hu28-vc6780			hu75-vc6780			huNeg-8.8-vc6780		
劑量 mg/kg	0	10	3	1	10	3	1	10	3	1
第0天	342 ±9	335 ±9	342 ±18	342 ±16	343 ±10	344 ±11	340 ±14	339 ±18	341 ±12	346 ±16
第4天	466 ±20	395 ±19	394 ±33	462 ±22	418 ±15	406 ±22	423 ±27	432 ±45	457 ±23	466 ±29
第7天	481 ±17	350 ±19	399 ±24	452 ±30	370 ±18	378 ±21	434 ±29	449 ±45	529 ±24	528 ±25
第11天	611 ±44	248 ±26	380 ±25	512 ±35	302 ±21	403 ±21	471 ±39	504 ±38	599 ±23	621 ±43
第14天	610 ±19	154 ±23	401 ±30	507 ±38	228 ±19	370 ±28	470 ±44	503 ±64	622 ±31	639 ±48
第19天	707 ±34	65 ±17	438 ±39	538 ±47	112 ±23	339 ±19	536 ±49	437 ±54	697 ±36	713 ±48
第22天	-	25 ±16	414 ±41	551 ±48	52 ±21	360 ±17	552 ±44	415 ±54	719 ±40	-
第25天	-	26 ±19	491 ±37	575 ±55	63 ±25	381 ±23	597 ±48	421 ±76	773 ±39	-
第28天	-	15 ±15	497 ±68	654 ±74	64 ±26	443 ±33	660 ±53	451 ±84	808 ±58	-
第32天	-	0 ±0	524 ±69	653 ±82	71 ±31	437 ±28	634 ±74	456 ±94	-	-
第35天	-	0 ±0	-	734 ±89	85 ±38	495 ±33	742 ±80	541 ±108	-	-
第40天	-	0 ±0	-	761 ±99	125 ±44	535 ±41	794 ±87	563 ±109	-	-
第43天	-	0 ±0	-	816 ±122	134 ±42	619 ±47	832 ±82	581 ±120	-	-
第46天	-	0 ±0	-	859 ±126	143 ±42	636 ±38	868 ±99	617 ±116	-	-
第49天	-	0 ±0	-	948 ±178	159 ±44	723 ±71	996 ±109	733 ±129	-	-
第53天	-	0 ±0	-	1008 ±192	201 ±63	795 ±67	-	758 ±163	-	-
第56天	-	0 ±0	-	-	211 ±63	819 ±77	-	-	-	-
第60天	-	0 ±0	-	-	240 ±63	976 ±115	-	-	-	-
第63天	-	0 ±0	-	-	201 ±57	-	-	-	-	-
第67天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第70天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第76天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第83天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第90天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第96天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第103天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第111天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第118天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-
第124天	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-	-

表26. 劑量5mg/kg之大鼠 - 人嵌合性抗切口3ADC於MDA-MB-468乳癌異種移植之療效。

天	PBS	ch75- mc3377	ch75- me0131	ch75-MALPEG6 C2-0131	ch75- mc0131	huNeg8.8- mc0131	huNeg8.8- mc3377	huNeg8.8- me0131
-1	303 ±10	304 ±19	303 ±18	308 ±22	305 ±14	306 ±14	302 ±15	306 ±21
2	344 ±14	315 ±26	348 ±21	375 ±16	354 ±7	340 ±16	363 ±25	343 ±26
5	360 ±17	339 ±25	339 ±16	325 ±23	346 ±14	349 ±19	366 ±19	349 ±31
8	439 ±28	340 ±20	352 ±21	346 ±27	368 ±15	437 ±35	431 ±25	421 ±36
12	533 ±41	337 ±22	311 ±26	312 ±31	350 ±18	492 ±27	449 ±30	486 ±41
15	542 ±40	304 ±23	291 ±22	271 ±18	322 ±22	543 ±42	484 ±48	523 ±35
19	608 ±46	234 ±20	228 ±25	204 ±19	283 ±25	552 ±37	516 ±26	542 ±45
22	644 ±34	240 ±20	210 ±26	156 ±21	261 ±22	602 ±38	561 ±38	586 ±47
26	707 ±58	256 ±22	169 ±14	127 ±14	252 ±25	615 ±65	604 ±54	664 ±81
29	785 ±72	278 ±33	191 ±18	119 ±16	285 ±27	701 ±58	641 ±42	695 ±57
33	822 ±78	320 ±45	203 ±23	133 ±22	315 ±31	755 ±80	737 ±57	759 ±66
36	840 ±87	308 ±53	220 ±18	119 ±20	320 ±30	798 ±55	865 ±54	788 ±81
40	894 ±80	346 ±51	276 ±39	143 ±20	367 ±41	882 ±90	946 ±69	853 ±77
44	1040 ±104	373 ±49	312 ±34	162 ±29	421 ±29	1050 ±109	1055 ±54	1002 ±82
48	1174 ±146	459 ±69	362 ±58	193 ±31	455 ±42	1138 ±131	1148 ±36	1066 ±92
51	1266 ±144	539 ±83	418 ±49	237 ±31	563 ±48	1301 ±127	1368 ±57	1164 ±98
54	1244 ±155	543 ±80	422 ±45	220 ±37	592 ±52	1288 ±134	1321 ±56	1206 ±139
57	1366 ±161	607 ±100	474 ±85	260 ±36	665 ±56	1380 ±151	1530 ±23	1143 ±117
61	1492 ±129	659 ±100	497 ±80	275 ±36	690 ±52	1380 ±149	1607 ±39	-
64	-	718 ±117	519 ±93	363 ±45	758 ±64	1420 ±160	1580 ±47	-
68	-	-	636 ±117	369 ±48	-	1552 ±198	1550 ±71	-
71	-	-	706 ±102	377 ±65	-	-	-	-
78	-	-	906 ±137	511 ±74	-	-	-	-

表27. 劑量5mg/kg之大鼠 - 人嵌合性抗切口3ADC於MDA-MB-468乳癌異種移植之療效。

MDA-MB-468 乳癌異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)														
天	PBS	ch28- mc0131	ch28- mc3377	ch28- me0131	ch28- MALPEG6 C2-0131	ch75- mc0131	ch28- vc0101	ch28- vc6780	ch75- vc0101	ch75- vc6780	huNeg8.8- mc0131	huNeg8.8- mc3377	huNeg8.8- vc0101	huNeg8.8- vc6780
-1	308 ±11	314 ±12	313 ±20	314 ±15	311 ±22	307 ±19	313 ±22	309 ±20	312 ±7	308 ±8	313 ±21	310 ±15	312 ±18	312 ±19
4	396 ±20	358 ±19	321 ±20	329 ±19	331 ±26	337 ±16	303 ±21	325 ±18	328 ±21	341 ±17	353 ±27	333 ±19	327 ±27	375 ±17
8	414 ±25	315 ±18	297 ±17	306 ±14	295 ±25	315 ±24	241 ±24	303 ±21	297 ±23	323 ±21	384 ±33	391 ±26	349 ±22	383 ±16
11	452 ±31	262 ±15	237 ±15	256 ±12	238 ±22	324 ±22	149 ±17	249 ±25	219 ±16	306 ±25	422 ±33	408 ±31	350 ±35	420 ±20
18	578 ±48	143 ±11	121 ±10	173 ±21	115 ±9	257 ±28	38 ±8	143 ±18	108 ±12	257 ±35	496 ±45	479 ±40	310 ±35	486 ±19
21	615 ±46	107 ±9	119 ±10	145 ±19	68 ±6	214 ±27	24 ±7	14 ±21	70 ±10	232 ±43	499 ±47	569 ±49	275 ±66	548 ±39
28	729 ±89	113 ±16	132 ±15	95 ±18	26 ±10	171 ±24	14 ±7	168 ±25	37 ±11	258 ±50	584 ±51	638 ±72	251 ±66	616 ±28
35	835 ±87	131 ±25	191 ±20	127 ±19	15 ±8	206 ±29	7 ±5	176 ±33	26 ±18	340 ±58	662 ±64	758 ±101	279 ±58	730 ±57
39	968 ±103	179 ±37	234 ±19	148 ±33	32 ±12	267 ±36	0 ±0	229 ±41	13 ±9	400 ±74	702 ±56	882 ±110	361 ±99	860 ±65
42	1004 ±112	168 ±35	256 ±22	174 ±37	32 ±13	255 ±38	0 ±0	242 ±41	10 ±8	420 ±72	753 ±75	945 ±123	362 ±90	888 ±49
46	1140 ±126	191 ±43	290 ±27	188 ±48	44 ±16	293 ±35	0 ±0	243 ±41	11 ±8	442 ±77	834 ±96	1016 ±148	377 ±101	965 ±102
49	1211 ±92	233 ±56	333 ±33	207 ±45	37 ±17	334 ±46	0 ±0	295 ±52	7 ±7	495 ±86	896 ±90	1114 ±150	439 ±115	1038 ±128
57	1402 ±112	298 ±67	447 ±37	272 ±59	72 ±28	400 ±53	0 ±0	369 ±65	13 ±13	652 ±110	1093 ±106	1356 ±189	448 ±90	1275 ±143
60	-	328 ±69	513 ±42	335 ±67	69 ±28	472 ±59	0 ±0	373 ±76	25 ±16	688 ±118	1108 ±97	1296 ±158	582 ±157	-
63	-	320 ±70	516 ±44	354 ±67	67 ±29	498 ±58	0 ±0	415 ±76	21 ±14	709 ±114	1092 ±113	1376 ±137	579 ±148	-
67	-	379 ±85	538 ±49	371 ±77	85 ±37	563 ±63	0 ±0	462 ±94	21 ±15	798 ±136	1203 ±121	-	655 ±165	-
74	-	434 ±96	682 ±57	382 ±47	114 ±47	-	0 ±0	499 ±91	42 ±27	928 ±143	-	-	-	-
77	-	470 ±113	-	423 ±42	122 ±51	-	0 ±0	-	45 ±26	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	177 ±72	-	0 ±0	-	67 ±37	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	162 ±75	-	0 ±0	-	55 ±37	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-
126	-	-	-	-	-	-	0 ±0	-	-	-	-	-	-	-

該 MDA-MB-468 乳癌模型亦經靜脈投藥每四天四次，按表 26 及 27 所提供之 5mg/kg 之劑量投予 PBS 載劑、大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 及對照 huNeg-8.8 ADC。該資料顯示具有不可切割(mc)及可切割(vc)連接子與各種載荷藥物組合之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 抑制 MDA-MB-468 乳癌異種移植之生長。另外，該資料顯示大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。另外，該資料顯示具有 vc0101 連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 比其他測試之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 更為有效。

該 MDA-MB-468 乳癌模型係用於檢測 hu28-vc0101 於活體內之作用機轉。hu28-vc0101 之藥效動力學係於細胞層面藉由染色 ADC 處理之異種移植中之有絲分裂標記磷酸化組蛋白 H3 看見。在細胞週期之有絲分裂期間，染色質內之組蛋白 H3 的 Ser-10 殘基係經磷酸化（以下稱為「pHH3」）。

荷有 MDA-MB-468 乳癌異種移植之小鼠係經靜脈給予單一 3 mg/kg 劑量之抗切口 3 ADC hu28-vc0101、huNeg-8.8-vc0101（對照 ADC）或 PBS。三個異種移植係於 6、24 及 96 小時後收集，並經標準免疫組織化學處理。5 微米厚之經福馬林固定、石蠟包埋之組織切片係於二甲苯替代劑中脫蠟，利用梯度醇復水化至蒸餾水。為了要暴露出抗原性部位，組織切片於壓力鍋(Retrieve; Electron Microscopy Sciences)中之 10mM 檸檬酸鹽緩衝液

pH 6.0 (Labvision)中加熱，冷卻至室溫。內源性過氧化酶活性係以 3%過氧化氫失活 15 分鐘。非專一性蛋白交互反應藉由與 UV 阻斷劑(Labvision)培養 10 分鐘封閉。組織切片係與抗 pHH3 抗體培養 1 小時，利用 Signalstain Boost 試劑(8114, Cell Signaling Technologies)檢測 30 分鐘，並以 DAB+ (DAKO)發色 5 分鐘。所有切片皆以蘇木精 QS (Vector Laboratories)對比染色，以自來水沖洗，用梯度醇脫水，於二甲苯替代劑中透明化，並以 Permount 封片膠 (FisherChemicals, Fair Lawn, NJ)封片。

經免疫組織化學染色之切片藉由影像分析評估。切片係利用 Hamamatsu NanoZoomer 自動化切片掃描儀以 20 倍成像。一經數位化後，該虛擬切片利用 Definiens Tissue Studio 軟體分析。各異種移植切片按區分段，根據細胞性及形態學分類。各細胞核係於異種移植之存活區域內被識別，陽性係利用各細胞核之平均棕色色原體強度測定。資料以 pHH3 陽性百分比(%)呈現，利用下式計算：

$$\left(\frac{\text{pHH3 陽性細胞核之數量 (存活區域)}}{\text{細胞核總數量 (存活區域)}} \right) * 100$$
。決定各治療組及時間點相對於 PBS 對照組於 24 小時時間點之統計顯著性，利用 Graph Pad Prism 使用雙尾 T 檢定測定。

利用微管抑制劑如 hu28-vc0101 產製之 ADC 被預期可使增生性細胞停止在染色質內之組蛋白 H3 的 Ser-10 殘基被磷酸化之細胞週期之有絲分裂期。在 ADC 處理之異種移植物中累積 pHH3 染色顯示癌細胞被停止於有絲分

裂。表 28 包含抗切口 3 hu28-vc0101 及 huNeg-8.8-vc0101（對照 ADC）處理之 MDA-MB-468 異種移植及未處理之 MDA-MB-468 異種移植中 pHH3 染色細胞之百分比。該資料顯示 hu28-vc0101（但非對照 huNeg8.8-vc0101）相較於 PBS 對照組，導致 pHH3 染色細胞核之百分比於處理後 24 及 96 小時之 MDA-MD-468 癌細胞中呈現統計顯著之 2 倍增加。該資料顯示抗切口 3 hu28-vc0101 抑制活體內腫瘤生長，至少部分是藉由使細胞停止於細胞週期之有絲分裂期，因而抑制增生。

表 28. pHH3 染色細胞核於切口 3 ADC 處理之 MDA-MB-468 乳癌異種移植中之百分比 (n.d.=未測定)

	6 小時		24 小時		96 小時	
	% pHH3	p- 值	% pHH3	p- 值	% pHH3	p- 值
PBS	n.d.	n.d.	2.62	n.d.	n.d.	n.d.
hu28-vc0101	2.54	0.84	5.37	0.0046	5.19	0.0003
huNeg8.8-vc0101	2.74	0.78	3.67	0.1025	3.01	0.0730

D. N87 胃癌異種移植

類似之活體內實驗係如上述以 N87 胃癌細胞系進行。爲了產製異種移植物，母裸鼠(Nu/Nu)係經 8×10^6 N87 細胞於 50%基質膠(BD Biosciences)之皮下植入。當腫瘤到達 250 至 450 mm³ 之體積時，該腫瘤被分期以確保在不同處理組之間的腫瘤大小之一致性。該 N87 胃癌模型經靜脈投藥每四天四次，按表 29 及 30 所提供之劑量投予 PBS 載劑、人化抗切口 3 ADC、對照 huNeg-8.8 ADC 及順鉑

(cisplatin)。該資料顯示抗切口 3 ADC hu28-vc0101、hu28-vc6780、hu75-vc0101 及 hu75-vc6780 以劑量依賴性方式抑制 N87 胃癌異種移植腫瘤之生長。另外，該資料顯示具有 vc0101 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 在 1、3 及 5 mg/kg 之劑量時以及具有 vc6780 連接子-載荷藥物之抗切口 3 ADC 在 3 及 10 mg/kg 之劑量時相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。到第 133 天，該 hu28-vc0101 之 5 mg/kg 劑量組的 9 隻動物中有 6 隻無腫瘤，hu75-vc0101 組的 9 隻動物中的 4 隻以及對照 huNeg8-8-vc0101 組的 8 隻動物中的 1 隻無腫瘤。另外，該資料顯示 vc0101 連接子-載荷藥物之 ADC 一般來說比順鉑標準照顧療法及 vc6780 連接子-載荷藥物之 ADC 更有效。

表 29. 抗切口 3-vc0101 ADC 於 N87 胃癌異種移植之療效。

	N87 胃癌異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)										
	PBS	hu28-vc0101			hu75-vc0101			huNeg-8.8-vc0101			順鉑
劑量 mg/kg	0	1	3	5	1	3	5	1	3	5	5
第0天	327 ±11	321 ±21	326 ±13	321 ±8	321 ±9	324 ±19	320 ±11	327 ±18	324 ±11	321 ±16	328 ±20
第4天	526 ±19	369 ±18	339 ±11	344 ±14	392 ±15	362 ±35	315 ±15	437 ±34	478 ±19	423 ±32	414 ±27
第7天	706 ±27	429 ±43	302 ±10	272 ±7	417 ±25	303 ±21	246 ±12	584 ±54	625 ±34	512 ±34	520 ±26
第11天	854 ±36	304 ±30	182 ±14	152 ±13	331 ±21	174 ±14	156 ±10	702 ±60	716 ±53	501 ±38	501 ±29
第14天	887 ±45	282 ±25	191 ±5	155 ±13	305 ±17	172 ±10	151 ±7	822 ±65	823 ±42	549 ±37	637 ±31
第18天	1045 ±68	263 ±24	161 ±7	138 ±11	267 ±17	151 ±10	128 ±6	823 ±73	789 ±33	491 ±51	-
第21天	1072 ±76	227 ±23	123 ±15	110 ±9	218 ±23	130 ±5	115 ±7	857 ±78	785 ±35	413 ±50	-
第26天	1303 ±140	205 ±32	108 ±16	69 ±16	185 ±24	92 ±14	82 ±10	895 ±126	825 ±62	343 ±63	-
第29天	1276 ±139	180 ±30	99 ±14	50 ±13	211 ±37	104 ±16	75 ±12	957 ±126	879 ±72	411 ±89	-
第33天	1480 ±183	211 ±43	106 ±17	43 ±14	251 ±53	91 ±18	73 ±12	988 ±180	966 ±98	411 ±89	-
第36天	-	215 ±42	122 ±22	52 ±16	272 ±59	86 ±18	85 ±9	884 ±143	1023 ±106	481 ±86	-
第39天	-	261 ±54	128 ±23	45 ±14	304 ±72	59 ±16	72 ±13	937 ±167	1142 ±121	535 ±128	-
第42天	-	283 ±52	149 ±25	34 ±15	314 ±73	81 ±22	74 ±13	1008 ±179	1240 ±143	596 ±119	-
第47天	-	262 ±64	105 ±19	25 ±14	334 ±95	80 ±25	36 ±8	1061 ±210	1380 ±153	621 ±137	-
第53天	-	302 ±75	104 ±30	29 ±16	393 ±115	86 ±24	69 ±13	-	-	757 ±189	-
第62天	-	415 ±111	116 ±47	33 ±18	463 ±155	106 ±35	50 ±15	-	-	690 ±122	-
第70天	-	521 ±135	139 ±54	58 ±30	658 ±241	148 ±54	76 ±22	-	-	852 ±150	-
第78天	-	622 ±169	172 ±69	67 ±40	531 ±152	161 ±60	90 ±25	-	-	937 ±168	-
第84天	-	709 ±200	149 ±73	85 ±49	602 ±185	200 ±76	96 ±37	-	-	1178 ±222	-
第91天	-	848 ±236	178 ±94	104 ±63	732 ±246	225 ±92	109 ±46	-	-	-	-
第99天	-	-	214 ±108	118 ±72	-	170 ±75	130 ±53	-	-	-	-
第103天	-	-	123 ±43	135 ±90	-	184 ±82	142 ±62	-	-	-	-
第112天	-	-	126 ±50	166 ±105	-	222 ±108	174 ±75	-	-	-	-
第120天	-	-	128 ±44	226 ±140	-	240 ±116	221 ±103	-	-	-	-
第133天	-	-	175 ±74	258 ±157	-	-	295 ±139	-	-	-	-

表 30. 抗切口 3-vc6780 ADC 於 N87 胃癌異種移植之療效。

	N87 胃癌異種移植之腫瘤體積 (mm³ ± SEM)								
	PBS	hu28-vc6780			hu75-vc6780			huNeg8.8-vc6780	
劑量 mg/kg	0	10	3	1	10	3	1	10	3
第0天	345 ±14	350 ±14	349 ±10	348 ±13	349 ±8	351 ±20	357 ±14	356 ±20	344 ±14
第4天	600 ±16	434 ±24	552 ±24	560 ±26	468 ±18	545 ±37	546 ±35	581 ±60	537 ±36
第8天	675 ±20	379 ±12	545 ±37	592 ±44	351 ±24	511 ±31	563 ±55	605 ±67	670 ±45
第11天	763 ±54	315 ±18	511 ±25	617 ±48	316 ±25	544 ±43	582 ±56	636 ±79	706 ±38
第14天	886 ±72	292 ±24	564 ±29	782 ±60	269 ±27	558 ±36	667 ±68	717 ±118	917 ±36
第18天	997 ±93	199 ±18	479 ±29	797 ±88	224 ±26	494 ±41	638 ±80	665 ±112	958 ±57
第21天	1041 ±107	194 ±20	499 ±34	839 ±93	192 ±19	534 ±41	709 ±103	637 ±119	1002 ±59
第25天	1151 ±144	181 ±21	588 ±40	878 ±105	227 ±32	628 ±58	750 ±122	647 ±134	1075 ±82
第28天	1200 ±155	204 ±16	672 ±48	904 ±123	244 ±35	645 ±57	763 ±145	674 ±146	1148 ±77
第33天	1481 ±206	196 ±27	786 ±65	1043 ±152	267 ±52	730 ±66	991 ±239	733 ±195	1290 ±128
第36天	-	189 ±37	827 ±69	1108 ±185	300 ±64	850 ±74	-	817 ±222	1265 ±111
第39天	-	228 ±44	847 ±77	1204 ±209	323 ±69	881 ±88	-	880 ±247	1429 ±121
第42天	-	257 ±60	959 ±81	-	350 ±78	1020 ±99	-	797 ±244	-
第46天	-	253 ±59	1018 ±94	-	380 ±78	1097 ±129	-	874 ±267	-
第50天	-	253 ±67	1111 ±95	-	415 ±77	1162 ±134	-	-	-
第56天	-	298 ±85	1279 ±108	-	504 ±111	1331 ±187	-	-	-
第63天	-	345 ±93	1368 ±133	-	581 ±121	-	-	-	-
第70天	-	376 ±117	1483 ±154	-	726 ±163	-	-	-	-
第77天	-	388 ±123	-	-	797 ±184	-	-	-	-
第84天	-	463 ±149	-	-	995 ±239	-	-	-	-
第91天	-	523 ±171	-	-	-	-	-	-	-
第98天	-	701 ±251	-	-	-	-	-	-	-

表31. 劑量5mg/kg之大鼠 - 人嵌合性抗切口3ADC於N87胃癌異種移植之療效。

N87 胃癌異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)									
天	PBS	ch28- mc0131	ch28-vc0101	ch28-vc6780	ch75- vc0101	ch75- vc6780	huNeg8.8- vc0101	huNeg8.8- vc6780	huNeg8.8- vc6780
-1	388 ±16	391 ±11	394 ±16	388 ±17	391 ±8	385 ±18	394 ±18	393 ±16	393 ±16
3	815 ±48	669 ±35	558 ±20	484 ±72	596 ±38	631 ±31	722 ±60	711 ±31	711 ±31
6	907 ±56	583 ±41	488 ±48	522 ±41	611 ±27	672 ±40	745 ±76	733 ±43	733 ±43
11	1335 ±67	623 ±50	313 ±26	416 ±48	437 ±29	568 ±74	858 ±112	1019 ±46	1019 ±46
14	1260 ±85	452 ±48	208 ±21	297 ±52	275 ±18	447 ±87	771 ±124	988 ±86	988 ±86
18	1393 ±101	468 ±55	183 ±20	285 ±65	228 ±17	419 ±91	727 ±167	997 ±88	997 ±88
21	1701 ±117	528 ±61	189 ±25	314 ±44	221 ±28	462 ±121	775 ±180	1202 ±156	1202 ±156
25	-	531 ±72	194 ±30	305 ±84	224 ±44	430 ±131	579 ±112	1151 ±119	1151 ±119
28	-	579 ±78	173 ±26	291 ±88	230 ±56	427 ±133	570 ±133	1247 ±137	1247 ±137
31	-	597 ±75	176 ±32	349 ±110	256 ±62	458 ±148	646 ±148	1310 ±160	1310 ±160
35	-	671 ±89	214 ±45	380 ±121	326 ±72	490 ±177	685 ±163	1465 ±237	1465 ±237
39	-	762 ±98	256 ±53	406 ±133	416 ±109	514 ±190	791 ±186	-	-
42	-	894 ±118	279 ±55	470 ±217	497 ±123	611 ±230	892 ±15%	-	-
46	-	873 ±115	279 ±58	493 ±158	549 ±158	603 ±225	912 ±248	-	-
50	-	1020 ±149	341 ±80	573 ±179	630 ±187	806 ±285	-	-	-
55	-	1055 ±153	374 ±83	560 ±174	715 ±207	600 ±238	-	-	-
62	-	1193 ±207	379 ±85	653 ±204	806 ±253	649 ±254	-	-	-
69	-	-	490 ±106	773 ±254	-	788 ±313	-	-	-
77	-	-	534 ±126	720 ±269	-	-	-	-	-
83	-	-	627 ±156	-	-	-	-	-	-
90	-	-	813 ±197	-	-	-	-	-	-
95	-	-	903 ±207	-	-	-	-	-	-
101	-	-	901 ±213	-	-	-	-	-	-

表32. 劑量5mg/kg之大鼠 - 人嵌合性抗切口3ADC於N87胃癌異種移植之療效。

天	N87 胃癌異種移植之腫瘤體積 (mm ³ ± SEM)				
	PBS	ch28-mc0131	ch28-m(H2O)c-0131	ch75-mc0131	ch75-m(H2O)c-0131
-1	372 ±8	371 ±18	371 ±17	364 ±12	373 ±15
4	589 ±28	473 ±41	469 ±41	461 ±34	497 ±34
7	706 ±56	479 ±39	446 ±34	466 ±28	484 ±35
11	837 ±71	442 ±37	391 ±29	468 ±33	414 ±28
14	959 ±98	395 ±43	303 ±24	430 ±33	337 ±20
18	1069 ±106	328 ±36	231 ±27	424 ±41	279 ±14
21	1252 ±123	337 ±48	232 ±28	448 ±42	268 ±13
25	1230 ±112	324 ±55	230 ±38	422 ±45	271 ±11
28	1352 ±132	363 ±62	256 ±41	487 ±52	266 ±17
32	-	381 ±66	255 ±49	530 ±56	298 ±22
35	-	419 ±85	283 ±52	541 ±56	307 ±21
39	-	453 ±87	315 ±65	570 ±55	358 ±23
42	-	522 ±108	347 ±71	619 ±66	388 ±34
46	-	559 ±119	381 ±87	629 ±68	432 ±41
49	-	637 ±139	418 ±96	697 ±87	447 ±48
53	-	681 ±149	441 ±107	755 ±91	484 ±52
56	-	713 ±167	479 ±113	753 ±90	512 ±55
63	-	783 ±192	542 ±139	869 ±112	563 ±70
70	-	847 ±219	535 ±148	827 ±107	579 ±86
77	-	1081 ±273	726 ±191	1041 ±139	788 ±110
84	-	-	855 ±230	1172 ±165	872 ±131
91	-	-	722 ±194	1332 ±194	1015 ±169
98	-	-	757 ±204	-	1125 ±198

該 N87 胃癌模型亦經靜脈投藥每四天四次，按表 31 所提供之 5mg/kg 劑量投予 PBS 載劑、大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 及對照 huNeg-8.8 ADC。該資料顯示具有不可切割(mc)及可切割(vc)連接子與各種載荷藥物組合之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 抑制 N87 胃癌異種移植之生長。另外，該資料顯示大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 相較於對照 huNeg8.8-ADC 更有效地抑制腫瘤生長。另外，該資料顯示具有 vc0101 連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 比其他測試之抗切口 3 ADC 更為有效。

該 N87 胃癌模型亦經靜脈投藥每四天四次，按表 32 所提供之 5mg/kg 之劑量投予 PBS 載劑及大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC ch28-mc0131、ch75-mc0131、ch28-m(H₂O)c-0131 及 ch75-m(H₂O)c-0131。該資料顯示具有 mc0131 及 m(H₂O)c-0131 連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 抑制 N87 胃癌異種移植之生長。另外，該資料顯示具有 m(H₂O)c-0131 連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 比具有 mc0131 連接子-載荷藥物之大鼠-人嵌合性抗切口 3 ADC 更為有效。

E. OVCAR3 卵巢異種移植

類似之活體內實驗係如上述以 OVCAR3 卵巢癌細胞系進行。為了產製異種移植物，SCID 無毛遠交系(SHO)母鼠係經 5×10^6 OVCAR3 細胞於 50% 基質膠 (BD Biosciences)之皮下植入。當腫瘤到達 120 至 290 mm³ 之

體積時，該腫瘤被分期以確保在不同處理組之間的腫瘤大小之一致性。該 OVCAR3 模型係經靜脈投藥每四天四次，按表 33 所提供之劑量投予 PBS 載劑、人化抗切口 3 ADC hu28-vc0101 及對照 ADC huNeg-8.8-vc0101；並經腹腔內投藥每七天四次投予太平洋紫杉醇 (paclitaxel) (30 mg/kg 一天二次) 及每七天八次投予卡鉑 (carboplatin)。圖 15 及表 33 顯示 hu28-vc0101 以劑量依賴方式抑制 OVCAR3 卵巢異種移植之生長。另外，該資料顯示 hu28-vc0101 相較於對照 huNeg8.8-vc0101 及卡鉑標準照顧化學療法更有效地抑制腫瘤生長。另外，該資料顯示以 3 mg/kg 每四天四次投予之 hu28-vc0101 和以 60 mg/kg 每七天四次投予 (此為 SHO 小鼠之 paclitaxel 最大耐受劑量) 之 paclitaxel 具有類似效力。

表 33. 抗切口 3 ADC hu28-vc0101 於 OVCAR3 卵巢異種移植之療效。

	OVCAR3 卵巢異種移植之腫瘤體積 (mm3 ± S.E.M.)							
	PBS	hu28-vc0101			huNeg8.8-vc0101		卡鉑	太平洋紫杉醇
劑量 mg/kg	0	0.3	1	3	1	3	20	60
第0天	170 ±14	168 ±18	169 ±20	169 ±18	171 ±21	168 ±14	167 ±13	169 ±13
第3天	255 ±18	291 ±29	255 ±31	253 ±35	261 ±36	286 ±18	242 ±20	225 ±29
第6天	277 ±25	302 ±35	226 ±33	180 ±19	267 ±38	287 ±30	246 ±17	139 ±13
第11天	378 ±18	394 ±40	216 ±35	113 ±9	369 ±68	329 ±27	311 ±25	85 ±8
第14天	501 ±33	510 ±50	242 ±39	104 ±9	467 ±75	437 ±23	426 ±27	84 ±7
第18天	578 ±43	601 ±57	212 ±38	72 ±9	516 ±101	431 ±26	473 ±29	61 ±5
第21天	693 ±48	685 ±83	190 ±38	57 ±6	587 ±123	407 ±26	475 ±26	50 ±4
第25天	806 ±59	767 ±84	216 ±52	49 ±5	638 ±131	447 ±27	552 ±25	41 ±2
第28天	912 ±71	841 ±112	282 ±69	47 ±6	772 ±171	518 ±35	640 ±26	44 ±4
第31天	970 ±68	926 ±118	292 ±74	48 ±4	854 ±176	564 ±48	692 ±28	43 ±3
第34天	1105 ±83	1038 ±148	350 ±95	48 ±6	1002 ±216	665 ±41	811 ±44	50 ±3
第38天	1166 ±83	1191 ±156	497 ±124	49 ±4	903 ±88	751 ±56	869 ±44	55 ±6
第41天	1285 ±89	1254 ±188	559 ±137	40 ±6	979 ±95	786 ±56	906 ±44	38 ±3
第45天	1616 ±126	1486 ±203	750 ±160	39 ±3	1109 ±115	904 ±67	1009 ±62	39 ±3
第49天	1836 ±142	1479 ±236	781 ±178	33 ±4	1289 ±129	994 ±95	1149 ±52	40 ±4
第53天			934 ±200	34 ±3	1486 ±138	1127 ±129	1290 ±65	40 ±5
第56天			991 ±201	30 ±2	1481 ±131	1224 ±141	1370 ±70	39 ±4
第59天			1149 ±228	33 ±4	1739 ±182	1325 ±163	1514 ±81	37 ±3
第63天			1421 ±328	35 ±3		1510 ±258	1783 ±128	42 ±4
第67天				32 ±3			1844 ±112	33 ±2
第70天				33 ±5				28 ±2
第74天				41 ±8				32 ±2
第77天				50 ±10				31 ±3
第80天				56 ±15				31 ±2
第83天				63 ±16				38 ±4
第87天				87 ±26				28 ±1
第90天				84 ±26				32 ±2
第94天				137 ±49				30 ±2
第97天				129 ±47				31 ±3
第102天				153 ±55				26 ±2
第105天				176 ±66				31 ±2
第108天				232 ±93				28 ±3
第111天				271 ±102				26 ±2
第115天				323 ±134				31 ±3
第118天				318 ±137				26 ±4
第122天				399 ±176				31 ±4

實施例 17

產製半胱胺酸突變物以用於定點共軛

在先前實施例中描述之抗切口 3 ADC 係經由習用、非特定之連接子-載荷藥物與標靶抗體之半胱胺酸胺基酸殘基共軛產製。進行定點共軛連接子-載荷藥物至抗體可利於均質藥物載荷且避免可能改變抗原結合性或藥物動力學性質之 ADC 亞群，此可能見於若干由習用共軛方法產製之 ADC。一項該種定點共軛策略係經設計以在該標靶抗體之胺基酸序列的特定位點導入半胱胺酸殘基。在重鏈恆定區及輕鏈恆定區的一些胺基酸位置係經識別（如國際公開號 WO/2013/093809 所述），以半胱胺酸殘基取代 hu28 抗體中之特定胺基酸位置。

定點半胱胺酸取代係經建構至 Fc 多肽或人 IgG1 重鏈恆定結構域(Cy)之位置 L443 及 K392（以下稱為 L443C 及 K392C）。定點半胱胺酸取代係經建構至人 kappa (κ)輕鏈恆定結構域(C κ)多肽之位置 K183（以下稱為 κ K183C）。半胱胺酸突變體之 CDR 維持與親代野生型 hu28 之 CDR 相同。圖 16A 及 16B 提供具有所述之定點半胱胺酸取代之 hu28 抗體的胺基酸及核苷酸序列。在該 hu28 抗體中之半胱胺酸取代導致產製下列抗體：hu28-(L443C)、hu28-(L443C/K392C)及 hu28-(L443C/ κ K183C)。所有半胱胺酸突變係藉由定點突變形成建構，如國際專利公開號 WO/2013/093809 所述。這些突變抗體之表現建構體系於定點嵌入(SSI)表現載體(Lonza)中產製以於 CHO 細

胞穩定表現。建立表現該半胱胺酸突變抗體之經轉染之 CHO 細胞的穩定池，並產製條件培養基。採用標準蛋白 A 親和性純化然後進行大小排除層析，以自條件培養基純化抗切口 3 半胱胺酸突變抗體，如先前實施例所述。

實施例 18

特徵化半胱胺酸突變體

在以細胞為基底之 ELISA 中，篩選未共軛之半胱胺酸突變人化抗切口 3 抗體與切口 3 表現性細胞系之細胞表面結合活性，如先前實施例所述。表 34 顯示自細胞表面切口 3 結合 ELISA 計算得到未共軛半胱胺酸突變體 hu28-(L443C)、hu28-(L443/K382) 及 hu28-(L443/κK183C) 之 EC_{50} (nM) 值。該資料顯示半胱胺酸突變抗體在結合 U2OS/hNotch3、HCC2429 及 OVCAR3 細胞之細胞表面上所表現的全長人切口 3 方面，具有類似親代野生型 hu28 抗體之 EC_{50} 值。另外，該資料顯示以半胱胺酸胺基酸取代至人化 hu28 抗體之重鏈或重鏈及輕鏈二者的恆定區不會影響或改變它們的結合特性。陰性對照之 huNeg8.8 抗體不與測試之任何細胞系結合。缺乏結合(LB)之對照抗體的 EC_{50} 值如所示不會產生。

表 34. 未共軛之半胱胺酸突變抗切口 3 抗體之 EC₅₀(nM)值。

抗體	EC ₅₀ (nM Ab/ml)			
	U2OS/hNotch3		HCC2429	OVCAR3
hu28 VH1.0/VL1.0	0.3	0.26	0.10	0.46
hu28-(L443C)	0.28	0.30	0.08	0.20
hu28-(L443C/κK183C)	0.38	0.27	0.11	0.20
hu28-(L443C/K392C)	0.31	0.29	0.11	0.31
huNeg8.8	LB	-	LB	LB

實施例 19

半胱胺酸突變 ADC 之活體外細胞毒性試驗

順丁烯二醯亞胺官能化連接子-載荷藥物與該抗切口 3 hu28 半胱胺酸突變抗體之共軛，係經由以 100 倍莫耳過量之三(2-羧基乙基)膦(TCEP)於 100 mM 之 4-(2-羥基乙基)-1-哌嗪乙磺酸緩衝液(HEPES) pH 7.0 及 1 mM 二伸乙三胺五乙酸(DTPA)中於 37 °C 完全還原抗體 2 小時，然後去鹽以除去多餘 TCEP 達成。該經還原之抗體於 2mM 去氫抗壞血酸(DHA)、100 mM HEPES pH 7.0 及 1mM DTPA 中於 4 °C 培養 16 小時以重新形成鏈間雙硫鍵。在去鹽後，該 vc0101 連接子-載荷藥物被添加至該反應混合物，該連接子-載荷藥物／抗體之莫耳比約為 7，在 15%體積比之二甲基乙醯胺(DMA)存在時於 25°C 再反應 1 小時。經過 1 小時之培養期後，6 倍過量之 L-Cys 被添加以淬熄任何未反應之連接子-載荷藥物。該反應混合物係於磷酸緩衝鹽水(PBS) pH 7.4、4°C 中隔夜透析，並經由 SEC (AKTA explorer 蛋白質純化儀，Superdex 200) 純化。該 ADC 接著利用 SEC 分析純度，以疏水交互作用層析(HIC)及液體

層析電噴灑離子化串聯質譜(LC-ESI MS)計算藥物-抗體比（載荷量）。蛋白濃度係經由 UV 分光光度計測定。其他共軛技術係於國際專利公開號 WO/2013/093809 中描述。

此過程產製抗切口 3 半胱胺酸突變 ADC：hu28-(L443C)-vc0101 及 hu28-(L443C/κK183C)-vc0101。抗切口 3 半胱胺酸突變 ADC 之活性係於內源性表現切口 3 蛋白之細胞系：HCC2429（肺癌）及 OVCAR3（卵巢癌）檢測，使用如前實施例所述之 MTS 細胞存活試劑。

表 35 顯示抗切口 3 半胱胺酸突變 ADC 處理之 IC₅₀ (ng Ab/mL) 值。該資料顯示 DAR=3.9 之 hu28-(L443C/κK183C)-vc0101 具有活性，和 DAR=3.9 之野生型 hu28-vc0101 ADC 具有類似效力，且兩者皆能誘導切口 3 表現性癌細胞系 HCC2429 及 OVCAR3 之細胞死亡。該資料進一步顯示 DAR=2 之單一半胱胺酸突變 hu28-(L443)-vc0101 及 DAR=4 之非靶向性對照 huNeg8.8 ADC 在測試之最高劑量時僅具最小活性。

表 35. 半胱胺酸突變人化抗切口 3 ADC 之 IC₅₀ (ng Ab/mL) 值。

ADC	DAR	IC ₅₀ (ng Ab/ml)					
		HCC2429			OVCAR3		
hu28-vc0101	3.9	124	463	145	404	1450	1173
hu28-(L443C)-vc0101	2	20308	16879	14324	13129	15840	12189
hu28-(L443C /κK183C)-vc0101	3.9	219	352	10	3020	3673	1250
huNeg8.8-vc0101	4.0	18850	13944	18302	9944	9826	7564

實施例 20

半胱胺酸突變 ADC 之活體內療效

類似之活體內實驗系如前實施例所述以抗切口 3 半胱胺酸突變 ADC 使用 OVCAR3 卵巢細胞系進行。該 OVCAR3 模型係經靜脈投藥每四天四次，按表 36 所提供之劑量投予 PBS 載劑、hu28-vc0101、抗 hu28-(L443C)-vc0101、hu28-(L443C/κK183C)-vc0101 及對照 huNeg-8.8 ADC。該資料顯示半胱胺酸二突變體 hu28-(L443C/κK183C)-vc0101 抑制 OVCAR3 卵巢異種移植之生長，該活性在 3 mg/kg 劑量時類似野生型 hu28-vc0101，但在 1 mg/kg 劑量時則較低。該資料進一步顯示 DAR=2 之半胱胺酸單突變體 hu28-(L443C)-vc0101 在活體內有效，但 1 mg/kg 及 3 mg/kg 兩種劑量相較於野生型 hu28-vc0101 及 hu28-(L443C/κK183C)-vc0101 的效力皆較低。該資料顯示藉由定點共軛產製之抗切口 3 半胱胺酸突變 ADC 能有效抑制活體內腫瘤生長。

表 36. 抗切口 3 半胱胺酸突變 ADC 於 OVCAR3 卵巢異種移植之活體內療效。

	OVCAR3 卵巢異種移植之腫瘤體積 (mm3 ± S.E.M.)								
	PBS	hu28-vc0101		hu28-(L443C)-vc0101		hu28-(L443C/κK183C)-vc0101		huNeg8.8-vc0101	
	0	1	3	1	3	1	3	1	3
第-2天	161 ±10	160 ±13	160 ±10	160 ±10	160 ±7	160 ±11	159 ±12	160 ±11	160 ±10
第2天	248 ±27	249 ±28	246 ±21	235 ±17	244 ±16	247 ±31	247 ±24	245 ±34	265 ±18
第6天	312 ±32	257 ±30	219 ±19	295 ±23	259 ±17	281 ±39	223 ±24	323 ±43	325 ±31
第9天	404 ±42	282 ±29	192 ±13	346 ±26	240 ±20	322 ±35	169 ±25	394 ±51	386 ±26
第12天	477 ±61	257 ±28	133 ±10	359 ±35	198 ±23	325 ±41	133 ±21	454 ±60	400 ±36
第15天	590 ±71	263 ±24	99 ±9	349 ±49	142 ±15	331 ±51	98 ±11	524 ±72	433 ±43
第19天	655 ±95	236 ±34	73 ±5	383 ±63	115 ±13	319 ±62	76 ±5	585 ±89	466 ±42
第22天	742 ±99	251 ±40	63 ±5	427 ±77	94 ±9	363 ±89	68 ±5	666 ±101	452 ±45
第26天	831 ±135	303 ±49	63 ±5	519 ±101	85 ±12	473 ±123	63 ±4	780 ±108	497 ±70
第29天	1008 ±171	396 ±69	56 ±4	624 ±118	97 ±14	583 ±167	54 ±3	834 ±124	555 ±80
第33天	1168 ±201	555 ±96	58 ±4	789 ±138	114 ±28	691 ±194	58 ±4	1007 ±155	695 ±88
第36天	1207 ±81	683 ±125	56 ±6	942 ±164	146 ±39	872 ±246	48 ±2	1152 ±155	782 ±93
第40天	1330 ±91	811 ±144	58 ±8	1046 ±191	205 ±56	1128 ±311	46 ±3	1328 ±220	872 ±131
第42天	1363 ±111	850 ±157	55 ±10	1130 ±190	246 ±71	955 ±247	51 ±5	1307 ±200	910 ±130
第47天	1656 ±98	1121 ±197	76 ±23	1493 ±243	378 ±103	1140 ±255	44 ±2	1470 ±223	1032 ±116
第50天	1661 ±95	1107 ±204	74 ±25		452 ±131	1152 ±248	40 ±2		1101 ±110
第54天	2005 ±140	1322 ±228	102 ±40		604 ±184	1463 ±317	48 ±4		1272 ±161
第57天		1286 ±235	117 ±51		826 ±264		43 ±4		1270 ±120
第61天			152 ±69		820 ±248		63 ±10		1610 ±160
第64天			182 ±88				55 ±9		
第68天			217 ±102				67 ±15		
第71天			242 ±120				73 ±20		
第75天			286 ±146				84 ±24		
第78天							107 ±32		
第82天							99 ±36		
第85天							119 ±50		
第89天							173 ±63		
第99天							328 ±130		
第111天							525 ±203		

序列表

<110> 輝瑞股份有限公司 (Pfizer Inc.)

<120> 抗切口3 (anti-notch3) 抗體及抗體-藥物共軛體

<130> PC71980

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 296

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<400> 1

Ala Pro Glu Val Ser Glu Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln
1 5 10 15

Ala Lys Arg Gly Asp Gln Arg Cys Asp Arg Glu Cys Asn Ser Pro Gly
20 25 30

Cys Gly Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Ser Val Gly Asp Pro Trp
35 40 45

Arg Gln Cys Glu Ala Leu Gln Cys Trp Arg Leu Phe Asn Asn Ser Arg
50 55 60

Cys Asp Pro Ala Cys Ser Ser Pro Ala Cys Leu Tyr Asp Asn Phe Asp
65 70 75 80

Cys His Ala Gly Gly Arg Glu Arg Thr Cys Asn Pro Val Tyr Glu Lys
85 90 95

Tyr Cys Ala Asp His Phe Ala Asp Gly Arg Cys Asp Gln Gly Cys Asn
100 105 110

Thr Glu Glu Cys Gly Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Ser Glu Val Pro
115 120 125

Ala Leu Leu Ala Arg Gly Val Leu Val Leu Thr Val Leu Leu Pro Pro
130 135 140

Glu Glu Leu Leu Arg Ser Ser Ala Asp Phe Leu Gln Arg Leu Ser Ala
145 150 155 160

Ile Leu Arg Thr Ser Leu Arg Phe Arg Leu Asp Ala His Gly Gln Ala
165 170 175

Met Val Phe Pro Tyr His Arg Pro Ser Pro Gly Ser Glu Pro Arg Ala
180 185 190

Arg Arg Glu Leu Ala Pro Glu Val Ile Gly Ser Val Val Met Leu Glu
195 200 205

Ile Asp Asn Arg Leu Cys Leu Gln Ser Pro Glu Asn Asp His Cys Phe
210 215 220

Pro Asp Ala Gln Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Gly Ala Leu Ser Ala Val
225 230 235 240

Glu Arg Leu Asp Phe Pro Tyr Pro Leu Arg Asp Val Arg Gly Glu Pro
245 250 255

Leu Glu Pro Pro Glu Pro Ser Val Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Gly Gly
275 280 285

Pro Pro His His His His His His
290 295

<210> 2
<211> 888
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 2
gcacccgagg tctcggagga gccgcggtgc ccgcgcgcgc cctgccaggc caagcgcggg 60
gaccagcgct gcgaccgcga gtgcaacagc ccaggctgcg gctgggacgg cggcgactgc 120
tcgctgagcg tgggcgaccc ctggcggcaa tgcgaggcgc tgcagtgtg gcgcctcttc 180
aacaacagcc gctgcgaccc cgcctgcagc tcgcccgcct gcctctacga caacttcgac 240
tgccacgccg gtggccgcga gcgcacttgc aaccgggtgt acgagaagta ctgcgccgac 300
cactttgccg acggccgctg cgaccagggc tgcaaacagg aggagtgcgg ctgggatggg 360
ctggattgtg ccagcgaggt gccggccctg ctggcccgcg gcgtgctggt gctcacagtg 420
ctgctgccgc cggaggagct actgcgttcc agcgccgact ttctgcagcg gctcagcgcc 480
atcctgcgca cctcgtctgc cticcgcctg gacgcgcacg gccaggccat ggtcttccct 540
taccaccggc ctagtcttgg ctccgaaccc cgggcccgtc gggagctggc ccccgaggtg 600
atcggctcgg tagtaatgct ggagattgac aaccggctct gcctgcagtc gcctgagaat 660
gatcactgct tcccgatgc ccagagcgcc gctgactacc tgggagcggt gtcagcggtg 720
gagcgccctg acttcccgtc cccactgcgg gacgtgcggg gggagccgct ggagcctcca 780
gaacccagcg tcccgggagg gggaagcgga ggcggactga acgacatctt cgaggctcag 840
aaaatcgaat ggcacgaagg tggcccacca catcatcatc atcatcac 888

<210> 3
<211> 296
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 3

Ala Pro Glu Val Pro Glu Glu Pro Arg Cys Pro Arg Ala Ala Cys Gln

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

<210> 4
<211> 888
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 4
gcccctgagg tccccgagga gccacggtgc ccgcgagcgg cttgccaggc caagcgaggg 60
gaccagaact gcgatcgtga gtgcaacacc ccaggctgtg gctgggatgg cggtgactgc 120
tcactgaacg tggacgaccc ctggaggcag tgtgaggcac tgcagtgtct gcgtctcttc 180
aacaacagcc ggtgtgaccc ggccctgcagc tciccagcct gcctctatga caactttgac 240
tgctactctg tggccgcga ccgcacctgc aaccctgttt atgagaagta ctgcgccgac 300
cactttgcag atggccgttg tgaccagggc tgcaacactg aggaatgcgg ctgggatggg 360
ctggactgtg ccagcgaggt cccggccctt ttggcccag gggttctggt cctcacagtt 420
cttctgcctc ctgaagagtt gctgcgtcc agtgccgact ttctgcagcg actcagcgct 480
attctgcgca cctcacatgc cttccgcttg gacgcacgtg gccaggccat ggtcttcccc 540
tatcaccggc caagccctgg ctctgaatcc cgggtccgtc gtgagctggg tcctgaggtg 600
atcggtcttg tggatgatgc ggagattgac aaccggctct gtctgcagtc agctgagaat 660
gaccactgct tcctgatgc ccagagtgt gctgactacc tgggagcctt gtcagcagtg 720
gagcgacttg atttcccata cccacttcgg gatgtgcgag gagagccgct ggaggcccca 780
gagcagagcg tgccaggagg ggggaagcggg ggcggactga acgacatctt cgaggctcag 840
aaaatcgaat ggcacgaagg tggcccacca catcatcatc atcatcac 888

<210> 5
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

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

100105110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 6
gagggtgcaac tgggtggagtc tggaggaggc ttagtgcagc ctggaaggtc cctgacactc 60
tccigtgtag cctctggatt cactttcagg gactatggaa tgacctggat tgcgccaggct 120
ccagggaagg ggcigacatg ggttgcatat attagtagtg gtagcaatta catctattat 180
gcagaagcgg tgaagggccg attcaccaic tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaagac actgccttgt attttgttac aagacgaggc 300
ccgtttgttt tggatgcctg gggtaagga gcctcagtca ctgtctcctc a 351

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile Asn Arg Tyr
20 25 30
Leu His Trp Phe Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Ala Asn Gly Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asn Thr Trp Pro Asp
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 8
<211> 320
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 8
gacatccaga tgacccagtc tccttcattc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
atcaactgca aagcaagtc gagtattaac aggtacttac actggtttca gcagaaactt 120
ggagaagctc ccaaactcct gatataataat gcaaacgggt tgcaaacggg catcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tggtagtgat ttcacactta ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagatgttg ccacatatit ctgcttgag cataatacgt ggccggacac gtttggcgct 300
gggaccaagc tggaaactgaa 320

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 9
Gln Val Lys Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Trp Val Thr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Arg Gly Glu Ile Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 10
caggtaaac tgctgcagtc tggggctgca ctggtagaac ctggagcctc tgtgaagatg 60
tcttgcaaag ctcttggtta tgcatcact gactactggg tgacctgggt gaagcagagt 120
catggaaaga gccttgagtg gattggggaa atttctccta acagtgggtg tactaacttc 180
aatgaaaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatccaccag cacagcctat 240
atggagctca gcagattgac atctgaggac tctgcaatct attactgtac aagaggggaa 300

atccgtttaca attggtttgc ttactggggc caaggcactc tggtcactgt ctctca 357

<210> 11
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 12

aacattgtga tgaccagtc tcccaaatcc atgtccatat cagtaggaga cagggtcacc 60
atgaactgca aggcagtc gaatgtgggt aataatatag cctggatatca acagaaacca 120
gggcagtctc ctaaactgtt gatctactat gcatctaacc ggtacactgg ggtccctgat 180
cgcttcacag gcggtggata tgggacagat ttactctca ccatcaatag tatgcaagct 240
gaagatgcag ccttttatta ctgtcagcgt ctttacaatt ctccattcac gttcggctca 300
gggacgaagt tggaaataaa g 321

<210> 13
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 13

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ala 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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 14
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagacgc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagg gactatggaa tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggcctat attagtagtg gtagcaatta catctattat 180
gcagaagcgg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacgaggc 300
ccgtttgttt tggatgcctg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 15

Asp Tyr Gly Met Thr
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr
1 5

<210> 17
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 17
gactatggaa tgacc 15

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

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 18
ggattcactt tcagggacta t 21

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 19

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ala Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 20

Ser Ser Gly Ser Asn Tyr
1 5

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 21
tatattagta gtggtagcaa ttacatctat tatgcagaag cggtgaaggg c 51

<210> 22
<211> 18

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 22
agtagtggtgta gcaattac 18

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 23
Arg Gly Pro Phe Val Leu Asp Ala
1 5

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

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 24
cgaggcccggt ttgttttgga tgcc 24

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 25
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 Ser Ile Asn Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 26
gacatccaga tgacccagtc tccatccicc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aagcaagtca gagtattaac aggtacttac actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaacgggt tgcaaacggg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtttgcag cataatacgt ggccggacac gtttggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 27
Lys Ala Ser Gln Ser Ile Asn Arg Tyr Leu His
1 5 10

<210> 28
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 28
aaagcaagtc agagtattaa cagg tactta cac 33

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 29
Asn Ala Asn Gly Leu Gln Thr
1 5

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

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 30
aatgcaaacg gttt gcaaac g 21

<210> 31
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 31

Leu Gln His Asn Thr Trp Pro Asp Thr
1 5

<210> 32
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 32
ttgcagcata atacgtggcc ggacacgttt

30

<210> 33
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 33

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ala 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

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

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

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

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

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 34
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tccigtgcag cctctggatt cactttcagg gactatggaa tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggcctat attagtagtg gtagcaatta catctattat 180
gcagaagcgg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacgaggc 300
ccgtttgttt tggatgcctg gggccaggga accctggta ccgtctctc agcgtcgacc 360
aaggggcccat cggctttccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccgctgtcc tacagtctc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720
ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ccccggt 1338

<210> 35
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 35
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 Ser Ile Asn Arg Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Asn Gly Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Trp Pro Asp 85 90 95		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val 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> 36 <211> 642 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 合成核苷酸序列		
<400> 36 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60 atcacttgca aagcaagtca gagtattaac aggtacttac actggtatca gcagaaacca 120 gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaacgggt tgcaaacggg ggtcccatca 180 aggttcagtg gcagtggaac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240 gaagattttg caacttacta ctgtttgcag cataatacgt ggccggacac gtttggcgga 300 gggaccaagg tggagatcaa acggaccgtg gccgtcctt ccgtgttcat cttccccctt 360 tccgacgagc agctgaagtc tggcaccgcc tctgtggtgt gtctgtgtaa caacttttac 420 ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggta gacaacgctc tgcagtcagg caactcccag 480 gagtctgtga ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtcctc taccctgacc 540 ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600 ctgtcctctc ctgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642		

<210> 37
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val 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

Ala Arg Gly Glu Ile Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 38
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactic 60
tcctgtgcag cctctgggta tgcattcact gactactgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccgaa atttctccta acagtgggtg tactaacttc 180
aatgaaaagt tcaagggccg attcaccatc tccgttgaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggggaa 300
atccgttaca attggtttgc ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 39
Asp Tyr Trp Met Thr

<210>	40
<211>	7
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 40

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr
1 5

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

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 41
gactactgga tgacc

15

<210>	42
<211>	21
<212>	DNA
<213>	人工序列

<223> 合成核苷酸序列

<400> 42
ggttatgcat tcactgacta c

21

<210>	43
<211>	17
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 43

Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210>	44
<211>	6
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 44

Ser Pro Asn Ser Gly Gly
1 5

$\langle 210 \rangle$	45
$\langle 211 \rangle$	51

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 45
gaaatttctc ctaacagtgg tggtaactaac ttcaatgaaa agttcaaggg c 51

<210> 46
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 46
tctcctaaca gtggtggt 18

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 47
Gly Glu Ile Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 48
ggggaaatcc gttacaattg gtttgcttac 30

<210> 49
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 49
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 Asn Val Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65707580

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Leu Tyr Asn Ser Pro Phe

859095

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100105

<210> 50<211> 321<212> DNA<213> 人工序列<220><223> 合成核苷酸序列<400> 50gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60atcacttgca aggccagtca gaatgtgggt aataatatag cctggtatca gcagaaacca 120gggaaagccc ctaagctcct gatctattat gcatctaacc ggtacactgg ggtcccatca 180aggttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240gaagattttg caacttacta ctgtcagcgt ctttacaatt ctccattcac gttcggcgga 300gggaccaagg tggagatcaa a 321<210> 51<211> 11<212> PRT<213> 人工序列<220><223> 合成肽序列<400> 51Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Asn Asn Ile Ala1 5 10<210> 52<211> 33<212> DNA<213> 人工序列<220><223> 合成核苷酸序列<400> 52aaggccagtc agaatgtggg taataatata gcc 33<210> 53<211> 7<212> PRT<213> 人工序列<220><223> 合成肽序列<400> 53Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr1 5<210> 54<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 54
tatgcatcta accggtacac t 21

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 55
Gln Arg Leu Tyr Asn Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 56
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 56
cagcgtcttt acaattctcc attcacgttc 30

<210> 57
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 57
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val 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
Ala Arg Gly Glu Ile Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu 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					
					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					
					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	Glu	Glu	Met	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					
					390					395					400					
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys					
				405					410											

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> 58
<211> 1344
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 58
gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tctctgtcag cctctgggta tgcattcact gactactgga tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggccgaa atttctccta acagtgggtg tactaacttc 180
aatgaaaagt tcaagggccg attcaccatc tccgttgaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggggaa 300
atccgttaca attggtttgc ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagcg 360
tcgaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctccc gacccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagti caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa gaaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggtgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1020
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggaggagatg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtcccc ggg 1344

<210> 59
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[illegible]

<210>	60
<211>	642
<212>	DNA
<213>	人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400>	60	
gacatccaga	tgaccacgctc	tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca	aggccagtc	aatgtgggt aataatatag cctggatatca gcagaaacca 120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctattat gcattctaacc ggtacactgg ggtcccatca 180
aggttcagtg	gcagtggaata	tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcagcgt ctttacaatt ctccattcac gttcggcgga 300
gggaccaagg	tggagatcaa	acggaccgtg gccgctcctt ccgtgttcatt cttccccctt 360

tccgacgagc agctgaagtc tggcaccgcc tctgtggtgt gtcgtctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgctc tgcagtcagg caactcccag 480
gagtcgtgta ccgagcagga ctccaaggac agcacctact cccgtgtctc taccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgagggtgac ccaccagggc 600
ctgtcctctc ctgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 61
<211> 446
<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 Thr Phe Arg Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ala 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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 62
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tgggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagg gactatggaa tgacctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggcctat attagtagtg gtagcaatta catctattat 180
gcagaagcgg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacgaggc 300
ccgtttgttt tggatgcctg gggccaggga accctggtca cgtctcctc agcgtcgacc 360
aaggggcccat cggctcttccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc cggctgttcc tacagtctc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttagacc caaatcttgt 660
gacaaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcggtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgggtca gcgtccctac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctcctgct ccccggt 1338

<210> 63
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 63

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 Ser Ile Asn Arg Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100105110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115120125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130135140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145150155160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165170175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Cys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180185190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195200205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64
<211> 642
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 64

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc60

atcacttgca aagcaagtca gagtattaac aggtacttac actggtatca gcagaaacca120

gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaacggtt tgcaaacggg ggtcccatca180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct240

gaagattttg caacttacta ctgtttgcag cataatacgt ggccggacac gtttggcgga300

gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca360

tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactccag480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg540

ctgagctcgc cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt642

<210> 65
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
151015

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ala 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

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

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

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

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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Cys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

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

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

<210> 66
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成核苷酸序列

<400> 66
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
tccigtgcag cctctggatt cactttcagg gactatggaa tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggcctat attagtagtg gtagcaatta catctattat 180
gcagaagcgg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacgaggc 300
ccgtttgttt tggatgccctg gggccaggga accctgggtca ccgtctctc agcgtcgacc 360
aaggggcccat cggctcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccg caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgtgta gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtica gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tactgcacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
ctctcctgct ccccggt 1338

<210> 67
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr 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
Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 68
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽序列

<400> 68

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

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

申請專利範圍

1.一種與切口 3 (Notch3)結合之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含：SEQ ID NO:37 所示之重鏈可變區(VH)胺基酸序列的 VH CDR1、VH CDR2 及 VH CDR3，及 SEQ ID NO:49 所示之輕鏈可變區(VL)胺基酸序列的 VL CDR1、VL CDR2 及 VL CDR3。

2.如申請專利範圍第 1 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO:39 或 40 之 VH CDR1；
- (b) 包含 SEQ ID NO:43 或 44 之 VH CDR2；
- (c) 包含 SEQ ID NO:47 之 VH CDR3；
- (d) 包含 SEQ ID NO:51 之 VL CDR1；
- (e) 包含 SEQ ID NO:53 之 VL CDR2；及
- (f) 包含 SEQ ID NO:55 之 VL CDR3。

3.如申請專利範圍第 1 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含與 SEQ ID NO:37 具有至少 90%一致性之重鏈可變區胺基酸序列或與 SEQ ID NO:49 具有至少 90%一致性之輕鏈可變區胺基酸序列。

4.如申請專利範圍第 3 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含 SEQ ID NO:37 之重鏈可變區胺基酸序列。

5.如申請專利範圍第 4 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含 SEQ ID NO:49 之輕鏈可變區胺基酸序列。

6.如申請專利範圍第 3 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含 SEQ ID NO:57 之重鏈胺基酸序列。

7.如申請專利範圍第 6 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其包含 SEQ ID NO:59 之輕鏈胺基酸序列。

8.如申請專利範圍第 1 項之經分離之抗體或彼之抗原結合片段，其與細胞毒性劑共軛。

9.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之抗體或彼之抗原結合片段及醫藥上可接受之載劑。

10.一種如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之抗體或如申請專利範圍第 9 項之醫藥組成物於製造供需要治療之病患治療與切口 3 表現有關之症狀的藥物之用途。

11.如申請專利範圍第 10 項之用途，其中該症狀係癌。

12.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該癌係實質腫瘤之癌。

13.如申請專利範圍第 12 項之用途，其中該實質腫瘤之癌係選自肺癌、乳癌、卵巢癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌、頭頸癌、膀胱癌、肝癌、皮膚癌及肉瘤。

14.如申請專利範圍第 11 項之用途，其中該癌係選自 T 細胞惡性病(T-cell malignancies)、多發性骨髓瘤、B 細胞惡性病(B-cell malignancies)及骨髓性惡性病(myeloid malignancies)之血癌。

15. 如申請專利範圍第 14 項之用途，其中該 T 細胞

惡性病係 T 細胞白血病；且該骨髓性惡性病係急性骨髓性白血病或慢性骨髓性白血病。

16. 如申請專利範圍第 15 項之用途，其中該 T 細胞白血病係 T 細胞急性淋巴胚細胞性白血病。

17. 如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之抗體或如申請專利範圍第 11 項之醫藥組成物，其係用於治療。

18. 一種如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之抗體於製造供治療的藥物之用途。

19. 如申請專利範圍第 18 項之用途，其中該用途係供治療切口 3 表現性癌。

20. 一種核酸，其編碼如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之抗體或彼之抗原結合片段。

21. 一種載體，其包含如申請專利範圍第 20 項之核酸。

22. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 21 項之載體。

23. 一種用於產製抗體之方法，其包含培養如申請專利範圍第 22 項之宿主細胞及自該培養回收該抗體。

24. 一種測定生物樣本中之切口 3 的量之方法，該方法包含下列步驟：

(a) 使來自疑似罹癌之個體的樣本與如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項之抗體或彼之抗原結合片段接觸；

(b) 測定該樣本中之細胞表面的切口 3 之量；及

(c) 比較該細胞表面的切口 3 之量與參考個體或標準

物之該量。

圖 式

圖 1

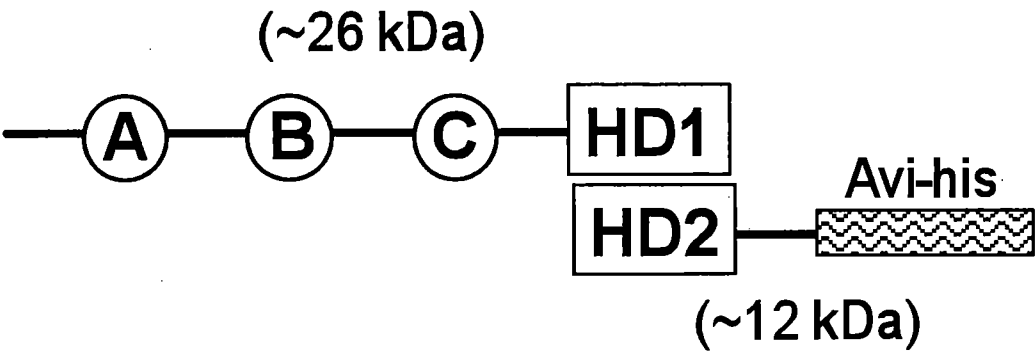


圖 2

SEQ ID NO: 1 人切口3 NRR重組蛋白胺基酸序列

APEVSEEP RCPRAACQAKRGDQRC DRECNSPGCGWDGGDCSLSVGDPWRQCEALQCWRLFNN SRC
DPACSSPACLYDNFDCHAGGRERTCNPVYEK YCADHFADGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLA
RGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRLDAHQQAMVFPYHRPSGSEPRARRELAPEVIGS
VVMLEIDNRLCLQSPENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLPEPSVPgggsgggIndi
feaqkiewheggpphhhhh

SEQ ID NO: 2 人切口3 NRR重組蛋白核苷酸序列

GCAACCCGAGGTCTCGGAGGAGCCGCGGTGCCGCGCGCGCCGCTGCCAGGCCAAGCGCGGGGACC
AGCGCTGCGACCGCGAGTGCAACAGCCAGGCTGCGGCTGGGACGGCGGCGACTGCTCGCTGAG
CGTGGGCGACCCCTGGCGGCAATGCGAGGCGCTGCAGTGCTGGCGCCTCTTCAACAACAGCCGCT
GCGACCCCGCCTGCAGCTCGCCCGCCTGCCTCTACGACAACTTCGACTGCCACGCCGGTGGCCGC
GAGCGCACTTGCAACCCGGTGTACGAGAAGTACTGCGCCGACCACTTTGCCGACGGCCGCTGCGA
CCAGGGCTGCAACACGAGGAGTGCGGCTGGGATGGGCTGGATTGTGCCAGCGAGGTGCCGGCC
CTGCTGGCCCGCGGCGTGCTGGTGCTCACAGTGCTGCTGCCGCCGAGGAGCTACTGCGTTCCAG
CGCCGACTTTCTGCAGCGGCTCAGCGCCATCCTGCGCACCTCGCTGCGCTTCCGCTGGACGCGC
ACGGCCAGGCCATGGTCTTCCCTTACCACCGGCCTAGTCTGGCTCCGAACCCCGGGCCCGTCGG
GAGCTGGCCCCCGAGGTGATCGGCTCGGTAGTAATGCTGGAGATTGACAACCGGCTCTGCCTGCA
GTCGCCTGAGAAATGATCACTGCTTCCCGATGCCAGAGCGCCGCTGACTACCTGGGAGCGTTGTC
AGCGGTGGAGCGCCTGGACTTCCCGTACCACTGCGGGACGTGCGGGGGGAGCCGCTGGAGCCT
CCAGAACCCAGCGTCCCGggagggggaagcggaggcgactgaacgacatcttcagggtcagaaaatcgaatggcacgaaggt
ggcccaccacatcatcatcatcatcac

SEQ ID NO: 3 小鼠切口3 NRR重組蛋白胺基酸序列

APEVPEEP RCPRAACQAKRGDQNC DRECNTPGCGWDGGDCSLNVDDPWRQCEALQCWRLFNN SRC
DPACSSPACLYDNFD CYSGGRDRTCNPVYEK YCADHFADGRCDQGCNTEECGWDGLDCASEVPALLA
RGVLVLT VLLPPEELLRSSADFLQRLSAILRTSLRFRLDARGQAMVFPYHRPSGESRVRRELGP EVIG
SVVMLEIDNRLCLQSAENDHCFPDAQSAADYLGALSAVERLDFPYPLRDVRGEPLAPEQSV PgggsgggI
ndifeaqkiewheggpphhhhh

SEQ ID NO: 4 小鼠切口3 NRR重組蛋白核苷酸序列

GCCCCGAGGTCCCCGAGGAGCCACGGTGCCGCGAGCGGCTTGCCAGGCCAAGCGAGGGGACC
AGAACTGCGATCGTGAGTGCAACACCCAGGCTGTGGCTGGGATGGCGGTGACTGCTCACTGAAC
GTGGACGACCCCTGGAGGCAGTGTGAGGCACTGCAGTGCTGGCGTCTCTTCAACAACAGCCGGTG
TGACCCGGCCTGCAGCTCTCCAGCCTGCCTCTATGACAACTTTGACTGCTACTCTGGTGGCCGCGA
CCGCACCTGCAACCTGTTTATGAGAAGTACTGCGCCGACCACTTTGCAGATGGCCGTTGTGACCA
GGGCTGCAACACTGAGGAATGCGGCTGGGATGGGCTGGACTGTGCCAGCGAGGTCCCGGCCCTTT
TGGCCCGAGGGTTCTGGTCCTCACAGTTCTTCTGCCTCCTGAAGAGTTGCTGCGCTCCAGTGCCG
ACTTTCTGCAGCGACTCAGCGCTATTCTGCGCACCTCACTGCGCTTCCGCTTGGACGCACGTGGCC
AGGCCATGGTCTTCCCTATCACCGGCCAAGCCCTGGCTCTGAATCCCGGGTCCGTCGTGAGCTGG
GTCCTGAGGTGATCGGCTCTGTGGTGATGCTGGAGATTGACAACCGGCTCTGTCTGCAGTCAGCTG
AGAATGACCACTGCTTCCCTGATGCCAGAGTGCTGCTGACTACCTGGGAGCCTTGTGAGCAGTGG
AGCGACTTGATTTCCCATACCACTTCGGGATGTGCGAGGAGAGCCGCTGGAGGCCCCAGAGCAGA
GCGTGCCAGgagggggaagcggaggcgactgaacgacatcttcagggtcagaaaatcgaatggcacgaaggtggcccaccacatca
tcatcatcatcac

圖 3

SEQ ID NO: 5 r28 VH 胺基酸序列 (CDR畫底線)

EVQLVESGGGLVQPGRSLTSCVASGFTFRDYGMTWIRQAPGKGLTWVAYISSGSNYIYYAEAVKGRFTI
SRDNAKNTLYLQMTSLRSEDALYFCTRRGPFVLDAWGQGASVTVSS

SEQ ID NO: 6 r28 VH 核苷酸序列

GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGACACTCTCCTGT
GTAGCCTCTGGATTCACTTTCAGGGACTATGGAATGACCTGGATTGCGCAGGCTCCAGGGAAGGGG
CTGACATGGGTTGCATATATTAGTAGTGGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGACCACTCTGAGGTCTGA
AGACACTGCCTTGTATTTTGTACAAGACGAGGCCCGTTTGTGGATGCCTGGGGTCAAGGAGCT
TCAGTCACTGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 7 r28 VL 胺基酸序列 (CDR畫底線)

DIQMTQSPSFLSASVGDRTINCKASQSINRYLHWFAQKLGEAPKLLIYNANGLQTGIPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQSEDVATYFCLQHNTWPDTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 8 r28 VL 核苷酸序列

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCATTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACT
GCAAAGCAAGTCAGAGTATTAACAGGTACTTACACTGGTTTCAGCAGAACTTGGAGAAGCTCCCAA
ACTCCTGATATATAATGCAAACGGTTTGCAAACGGGCATCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCT
GGTACTGATTTCACTTACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGCTTGCA
GCATAATACGTGGCCGGACACGTTTGGCGCTGGGACCAAGCTGGAAGTCAA

SEQ ID NO: 9 r75 VH 胺基酸序列 (CDR畫底線)

QVKLLQSGAALVKPGASVKMSCKASGYAFTDYWVTWVKQSHGKSLEWIGEISPNSSGGTNFNEKFKGKA
TLTVDKSTSTAYMELSRLTSEDSAIYYCTRGEIRYNWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 10 r75 VH 核苷酸序列

CAGGTCAAGCTGCTGCAGTCTGGGGCTGCACTGGTGAAGCCTGGAGCCTCTGTGAAGATGTCTTGC
AAAGCTTCTGGTTATGCATTCAGTACTGAGTGGTGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAGCC
TTGAGTGGATTGGGGAAATTTCTCCTAACAGTGGTGGTACTAATTCAATGAAAAGTTCAAGGGCAA
GGCCACATTGACTGTAGACAAATCCACCAGCACAGCCTATATGGAGCTCAGCAGATTGACATCTGAG
GACTCTGCAATCTATTACTGTACAAGAGGGGAAATCCGTTACAATTGTTTGTCTTACTGGGGCCAAG
GCACTCTGGTCACTGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 11 r75 VL 胺基酸序列 (CDR畫底線)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGNIAWYQQKPGKAPKLLIYYASNRYTGVPSRFSGSGYGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQRLYNSPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 12 r75 VL 核苷酸序列

AACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAAATCCATGTCCATATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATGAACT
GCAAGGCCAGTCAGAAATGTGGGTAATAATATAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAA
ACTGTTGATCTACTATGCATCTAACCGGTACACTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCGGTGGATAT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAATAGTATGCAAGCTGAAGATGCAGCCTTTTATTACTGTCAGCG
TCTTTACAATTCTCCATTCACGTTCCGGCTCAGGGACGAAGTTGGAAATAAAG

圖 4A

SEQ ID NO: 13 hu28 VH 1.0 胺基酸序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMTWVRQAPGKGLEWVAYISSGSNYIYYAEAVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGPFVLDAWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 14 hu28 VH 1.0 核苷酸序列
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAAGGACTATGGAATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTGGCCTATATTAGTAGTGGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGC
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGAGGCCCGTTTGTGGATGCCTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 15 hu28 VH 1.0 CDR1 胺基酸序列-卡巴
DYGMT

SEQ ID NO: 16 hu28 VH 1.0 CDR1 胺基酸序列-柯西亞
GFTFRDY

SEQ ID NO: 17 hu28 VH 1.0 CDR1 核苷酸序列-卡巴
GACTATGGAATGACC

SEQ ID NO: 18 hu28 VH 1.0 CDR1 核苷酸序列-柯西亞
GGATTCACCTTCAGGGACTAT

SEQ ID NO: 19 hu28 VH 1.0 CDR2 胺基酸序列-卡巴
YISSGSNYIYYAEAVKG

SEQ ID NO: 20 hu28 VH 1.0 CDR2 胺基酸序列-柯西亞
SSGSNY

SEQ ID NO: 21 hu28 VH 1.0 CDR2 核苷酸序列-卡巴
TATATTAGTAGTGGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGC

SEQ ID NO: 22 hu28 VH 1.0 CDR2 核苷酸序列-柯西亞
AGTAGTGGTAGCAATTAC

SEQ ID NO: 23 hu28 VH 1.0 CDR3 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
RGPFVLDA

SEQ ID NO: 24 hu28 VH 1.0 CDR3 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
CGAGGCCCGTTTGTGGATGCC

圖 4B

SEQ ID NO: 25 hu28 VL 1.0 胺基酸序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSINRYLHWYQQKPGKAPKLLIYNANGLQTVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNTWPDTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 26 hu28 VL 1.0 核苷酸序列
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCAAAGCAAGTCAGAGTATTAACAGGTA CTTACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
GCTCCTGATCTATAATGCAAACGGTTTGCAAACGGGGTCCCATCAAGGTTCA GTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTTTGCA
GCATAATACGTGGCCGGACACGTTTGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

SEQ ID NO: 27 hu28 VL 1.0 CDR1 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
KASQSINRYLH

SEQ ID NO: 28 hu28 VL 1.0 CDR1 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
AAAGCAAGTCAGAGTATTAACAGGTA CTTACAC

SEQ ID NO: 29 hu28 VL 1.0 CDR2 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
NANGLQT

SEQ ID NO: 30 hu28 VL 1.0 CDR2 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
AATGCAAACGGTTTGCAAACG

SEQ ID NO: 31 hu28 VL 1.0 CDR3 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
LQHNTWPD

SEQ ID NO: 32 hu28 VL 1.0 CDR3 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
TTGCAGCATAATACGTGGCCGGACACGTTT

圖 4C

SEQ ID NO: 33 hu28 HC 1.0 胺基酸序列-人IgG1
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMTWVRQAPGKGLEWWAYISSGSNYIYYAEAVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGPFVLDAWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 34 hu28 HC 1.0 核苷酸序列
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGGGACTATGGAATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTGGCCTATATTAGTAGTGGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGC
CGATTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGAGGCCCGTTTGTGGATGCCTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTC
TTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGGAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCCTGTCCCCGGGT

SEQ ID NO: 35 hu28 LC 1.0 胺基酸序列-人κ
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSINRYLHWYQQKPGKAPKLLIYNANGLQTGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCLQHNTWPDFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

SEQ ID NO: 36 hu28 LC 1.0 核苷酸序列
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCAAAGCAAGTCAGAGTATTAACAGGTACTTACACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
GCTCCTGATCTATAATGCAAACGGTTTGCAAACGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTTTGCA
GCATAATACGTGGCCGGACACGTTTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
CGGACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTCTTCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACC
GCCTCTGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGAC
AACGCTCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC
TCCCTGTCTTACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAG
GTGACCCACCAGGGCCTGTCCTCTCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

圖 5A

SEQ ID NO: 37 hu75 VH 1.9 胺基酸序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTDYWMTWVRQAPGKGLEWVAEISPNSSGGTNFNEKFKGR
FTISVDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEIRYNWFAYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 38 hu75 VH 1.9 核苷酸序列
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGTTATGCATTCACTGACTACTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTGGCCGAAATTTCTCCTAACAGTGGTGGTACTAACTTCAATGAAAAGTTCAAGGGC
CGATTCACCATCTCCGTTGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGAAATCCGTTACAATTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO: 39 hu75 VH 1.9 CDR1 胺基酸序列-卡巴
DYWMT

SEQ ID NO: 40 hu75 VH 1.9 CDR1 胺基酸序列-柯西亞
GYAFTDY

SEQ ID NO: 41 hu75 VH 1.9 CDR1 核苷酸序列-卡巴
GACTACTGGATGACC

SEQ ID NO: 42 hu75 VH 1.9 CDR1 核苷酸序列-柯西亞
GGTTATGCATTCACTGACTAC

SEQ ID NO: 43 hu75 VH 1.9 CDR2 胺基酸序列-卡巴
EISPNSSGGTNFNEKFKG

SEQ ID NO: 44 hu75 VH 1.9 CDR2 胺基酸序列-柯西亞
SPNSGG

SEQ ID NO: 45 hu75 VH 1.9 CDR2 核苷酸序列-卡巴
GAAATTTCTCCTAACAGTGGTGGTACTAACTTCAATGAAAAGTTCAAGGGC

SEQ ID NO: 46 hu75 VH 1.9 CDR2 核苷酸序列-柯西亞
TCTCCTAACAGTGGTGGT

SEQ ID NO: 47 hu75 VH 1.9 CDR3 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
GEIRYNWFAY

SEQ ID NO: 48 hu75 VH 1.9 CDR3 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
GGGGAAATCCGTTACAATTGGTTTGCTTAC

圖 5B

SEQ ID NO: 49 hu75 VL 1.3 胺基酸序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNIAWYQQKPGKAPKLLIYYASNRYTGVPSTRFSGSGYGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQRLYNPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 50 hu75 VL 1.3 核苷酸序列
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATATAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTA
AGCTCCTGATCTATTATGCATCTAACCGGTACACTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATA
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGC
GTCTTTACAATTCTCCATTACGTTCTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

SEQ ID NO: 51 hu75 VL 1.3 CDR1 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
KASQNVGNIA

SEQ ID NO: 52 hu75 VL 1.3 CDR1 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
AAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAATAATATAGCC

SEQ ID NO: 53 hu75 VL 1.3 CDR2 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
YASNRYT

SEQ ID NO: 54 hu75 VL 1.3 CDR2 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
TATGCATCTAACCGGTACACT

SEQ ID NO: 55 hu75 VL 1.3 CDR3 胺基酸序列-卡巴及柯西亞
QRLYNPFT

SEQ ID NO: 56 hu75 VL 1.3 CDR3 核苷酸序列-卡巴及柯西亞
CAGCGTCTTTACAATTCTCCATTACGTTT

圖 5C

SEQ ID NO: 57 hu75 HC 1.9 胺基酸序列-人IgG1
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTDYWMTWVRQAPGKGLEWVAEISPNSSGGTNFNEKFKGR
FTISVDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEIRYNWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 58 hu75 HC 1.9 核苷酸序列
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGTTATGCATTCAGTACTACTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTGGCCGAAATTTCTCCTAACAGTGGTGGTACTAACTTCAATGAAAAGTTCAAGGGC
CGATTCACCATCTCCGTTGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGAAATCCGTTACAATTGGTTTGCTTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC
CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC
CGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTA
CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT
CTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
TCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTC
ACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGTCTGGAAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT

SEQ ID NO: 59 hu75 LC 1.3 胺基酸序列-人κ
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGNINIAWYQQKPKAPKLLIYYASNRYTGVPSRFSGSGYGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQRLYNPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGE

SEQ ID NO: 60 hu28 LC 1.3 核苷酸序列
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCAAGGCCAGTCAGAAATGTGGGTAATAATATAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTA
AGCTCCTGATCTATTATGCATCTAACCGGTACACTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATA
TGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGC
GTCTTTACAATTCTCATTACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGACCGTGGCCG
CTCCTTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGTGGTGTG
TCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAGGTGGACAACGCTCTGCAGTC
CGGCAACTCCAGGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCTAC
CCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGG
GCCTGTCTCTCTGTGACCAAGTCCTTCAACCGGGGCGAGTGC

圖 6

抗體	ch28	ch75
切口3 -NRR —A—B—C—hd1—hd2	2.06	1.72
切口1 -NRR —A—B—C—hd1—hd2	-	-
—A—B—C—hd1—hd2	-	-
—A—B—C—hd1—hd2	0.15	-
—A—B—C—hd1—hd2	0.54	2.37
—A—B—C—hd1—hd2	-	0.80
—A—B—C—hd1—hd2	-	-
—A—B—C—hd1—hd2	0.5	-
—A—B—C—hd1—hd2	-	-

圖 7

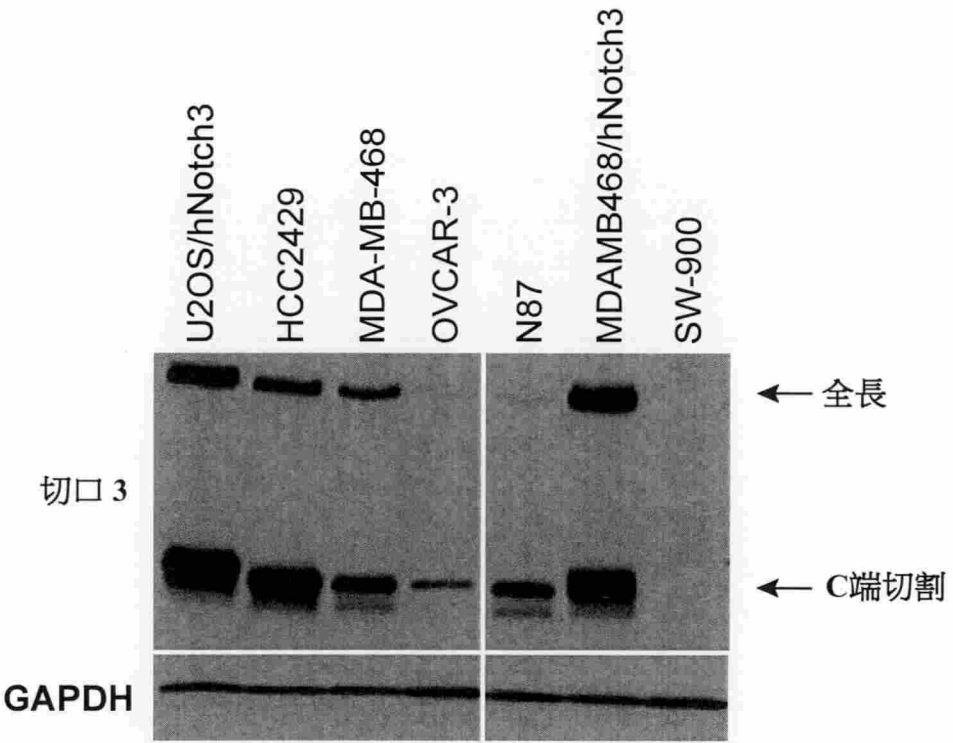


圖 8A

a) 0 小時



圖 8B

b) 5 小時

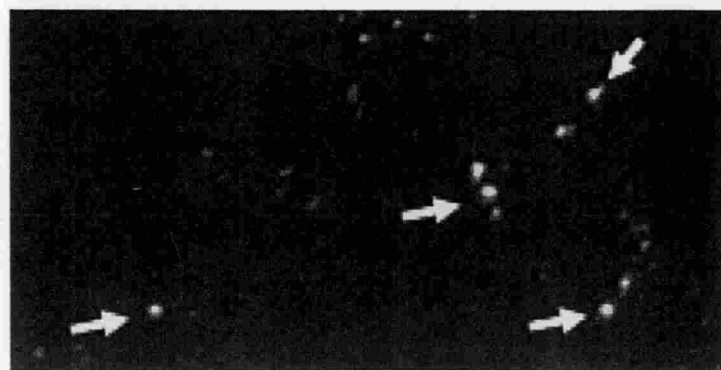


圖 8C

c) 0 小時



圖 8D

d) 8 小時

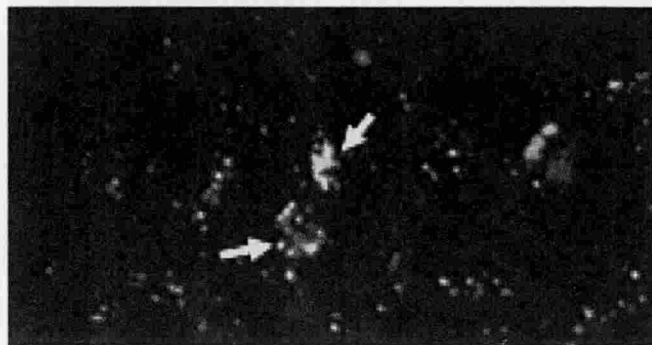
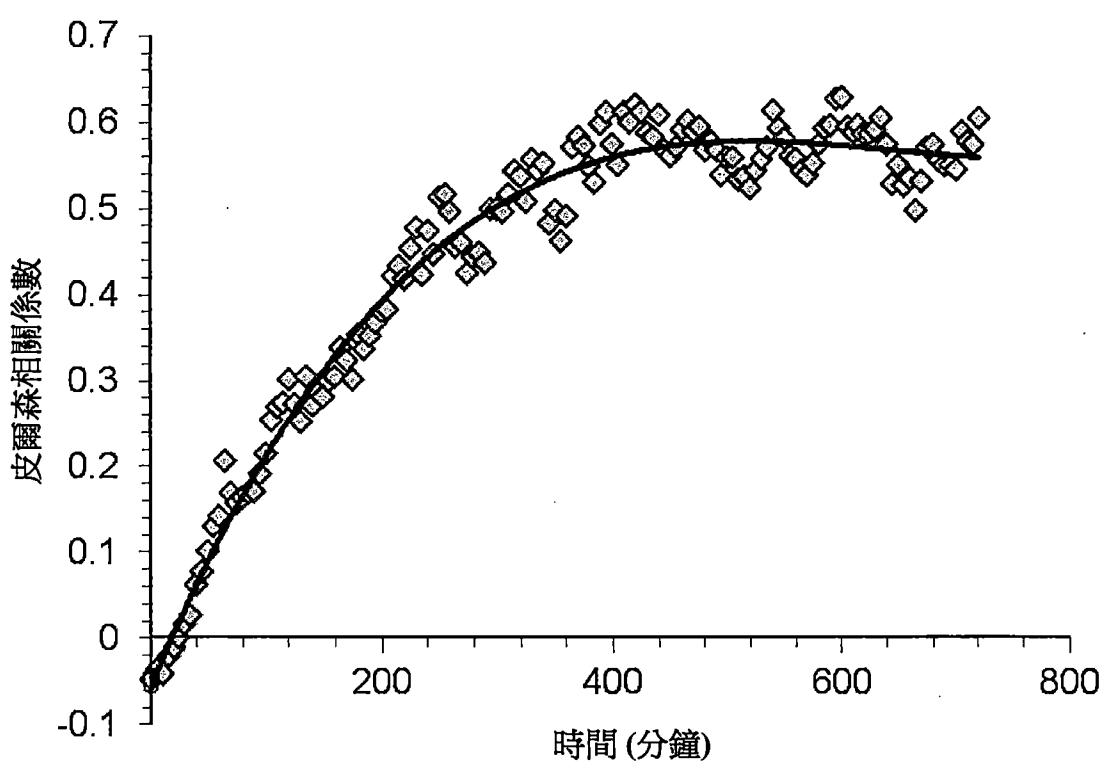


圖 8E



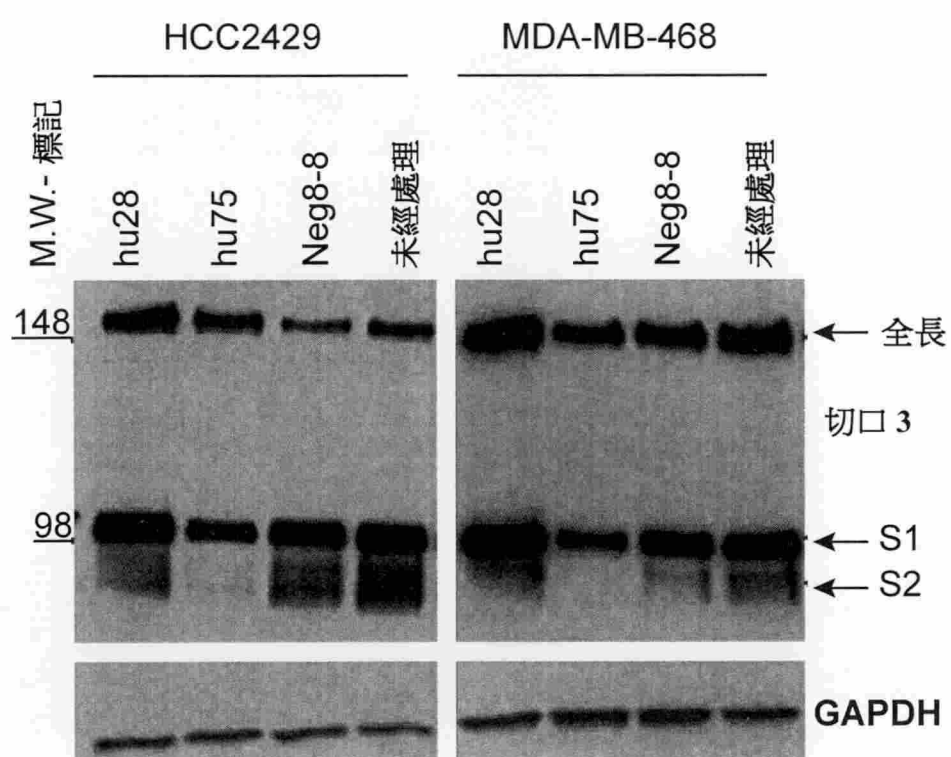


圖 10

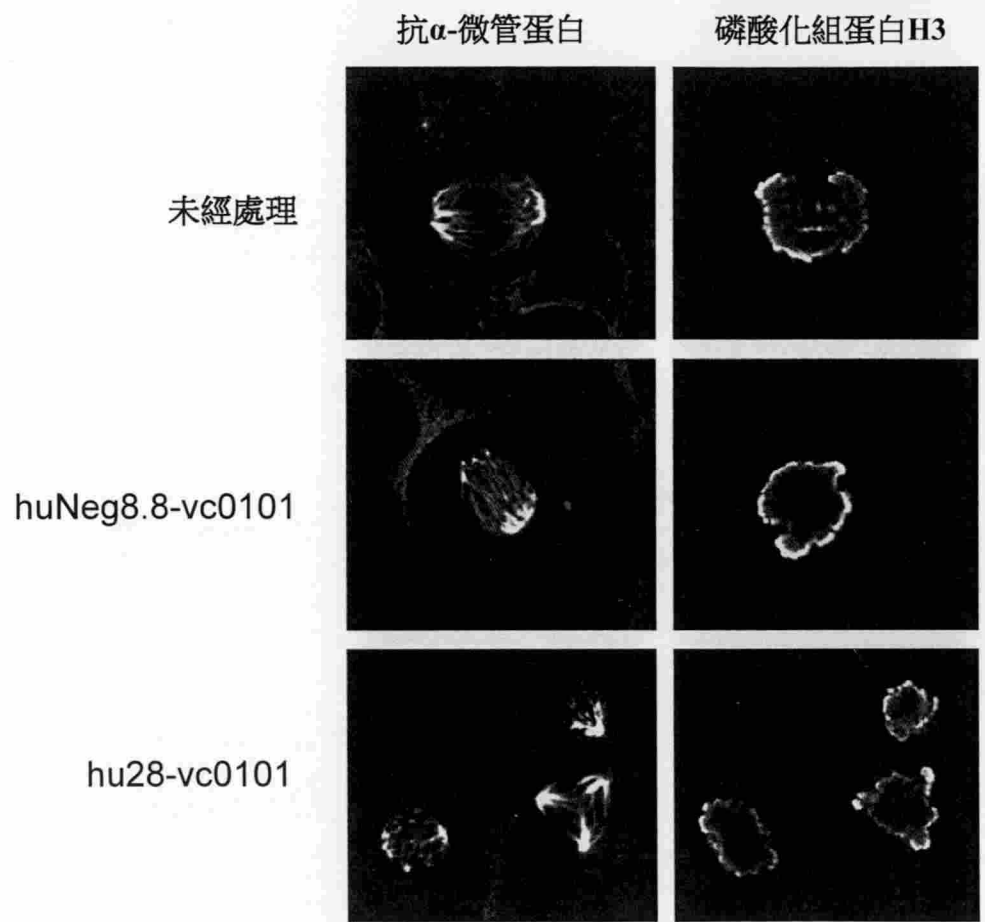


圖 11

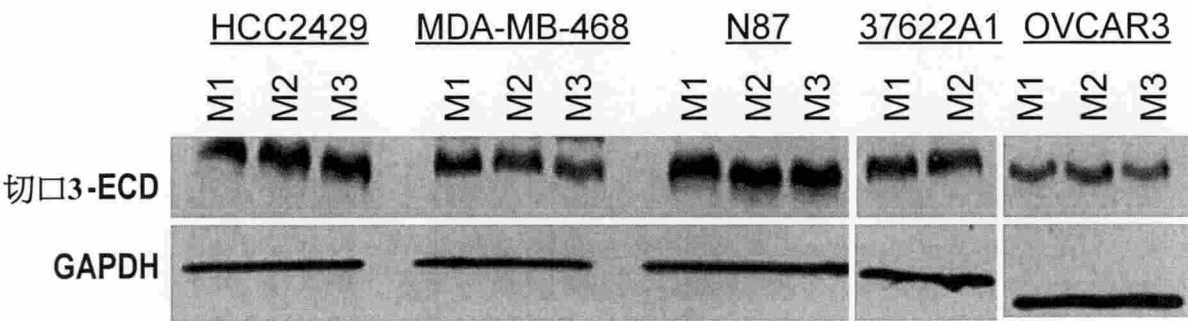


圖 12

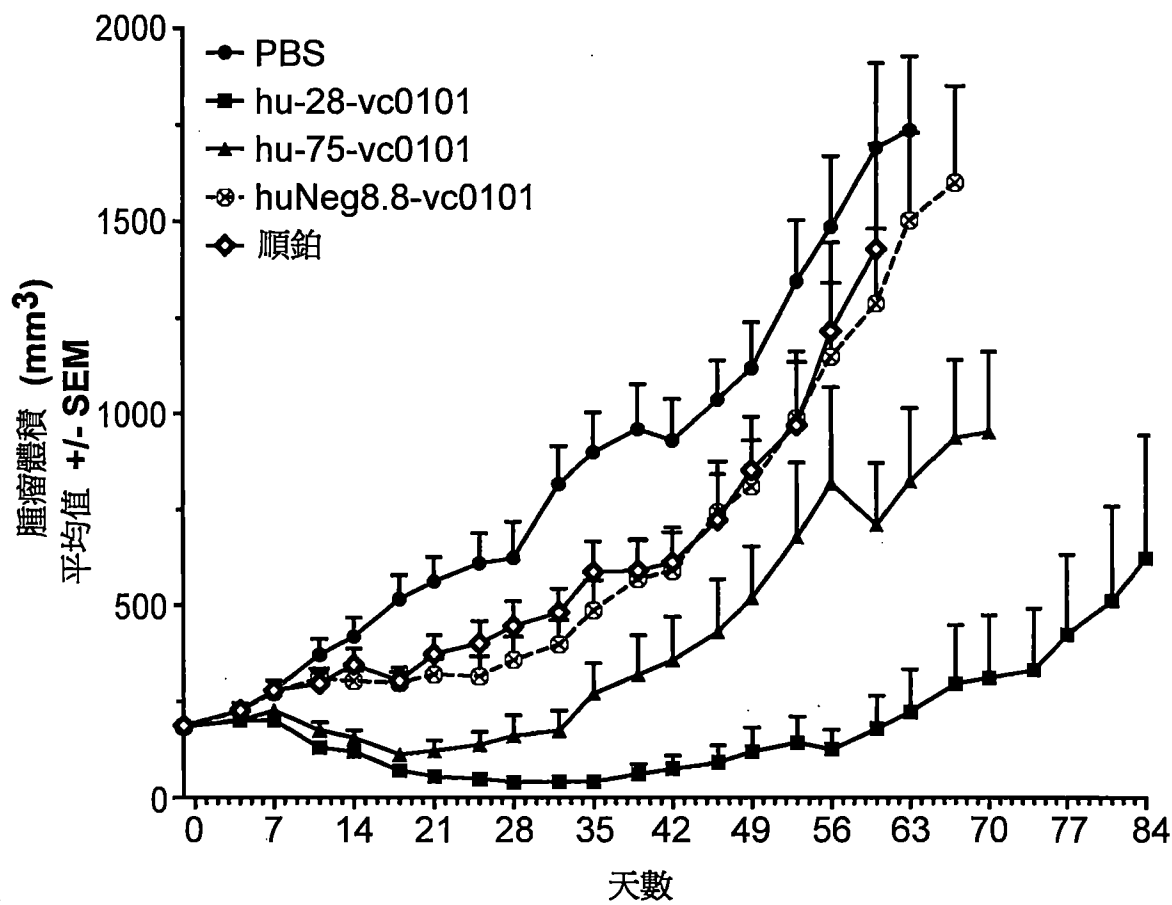


圖 13A

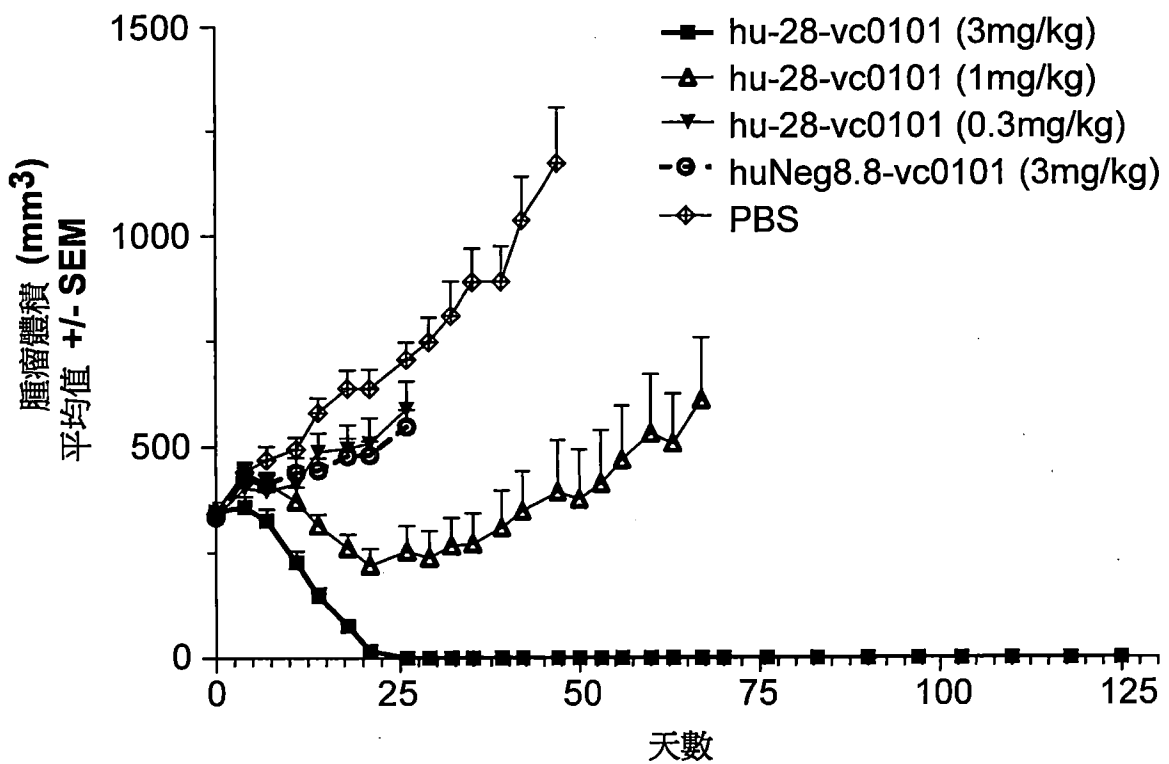


圖 13B

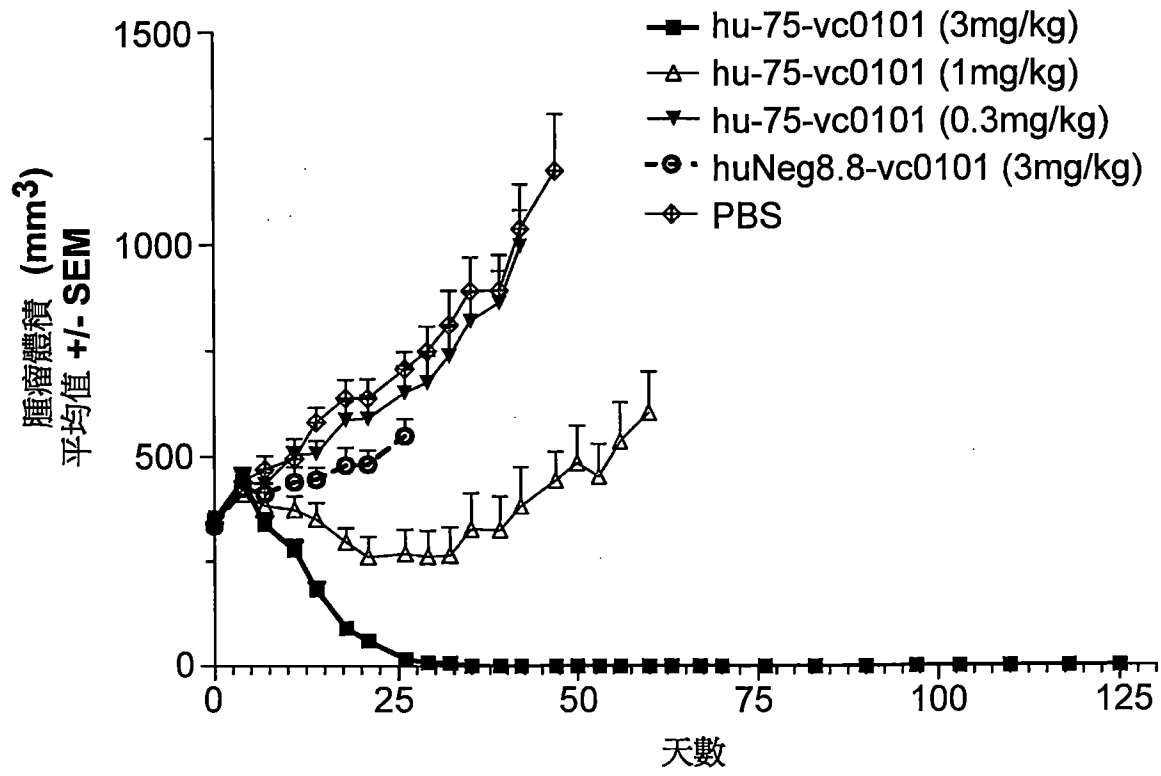


圖 14A

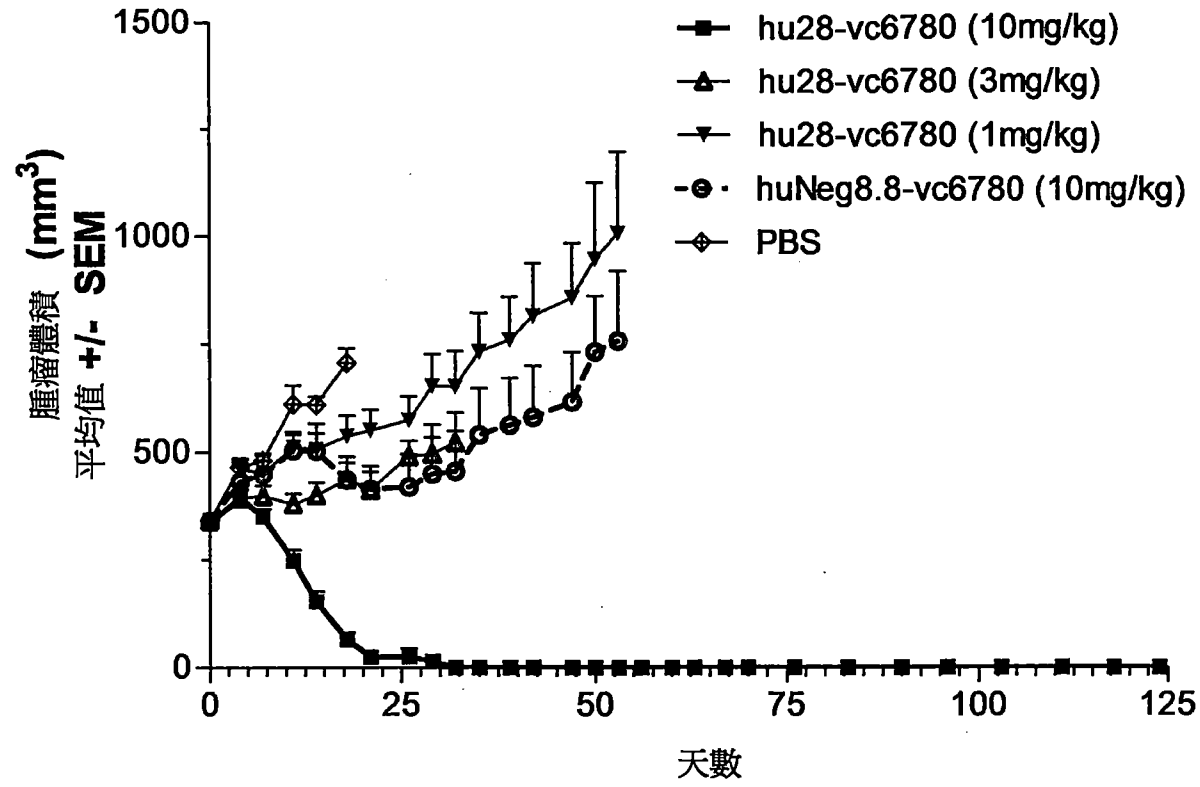


圖 14B

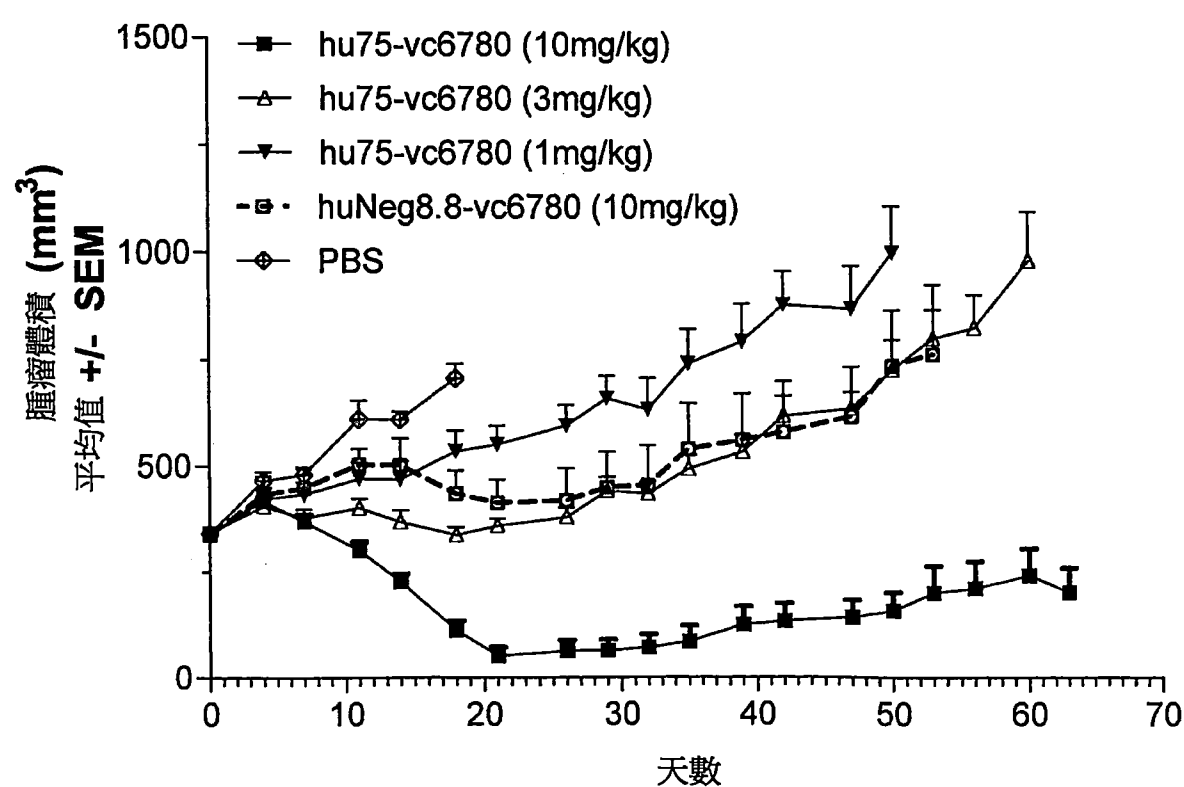


圖 15

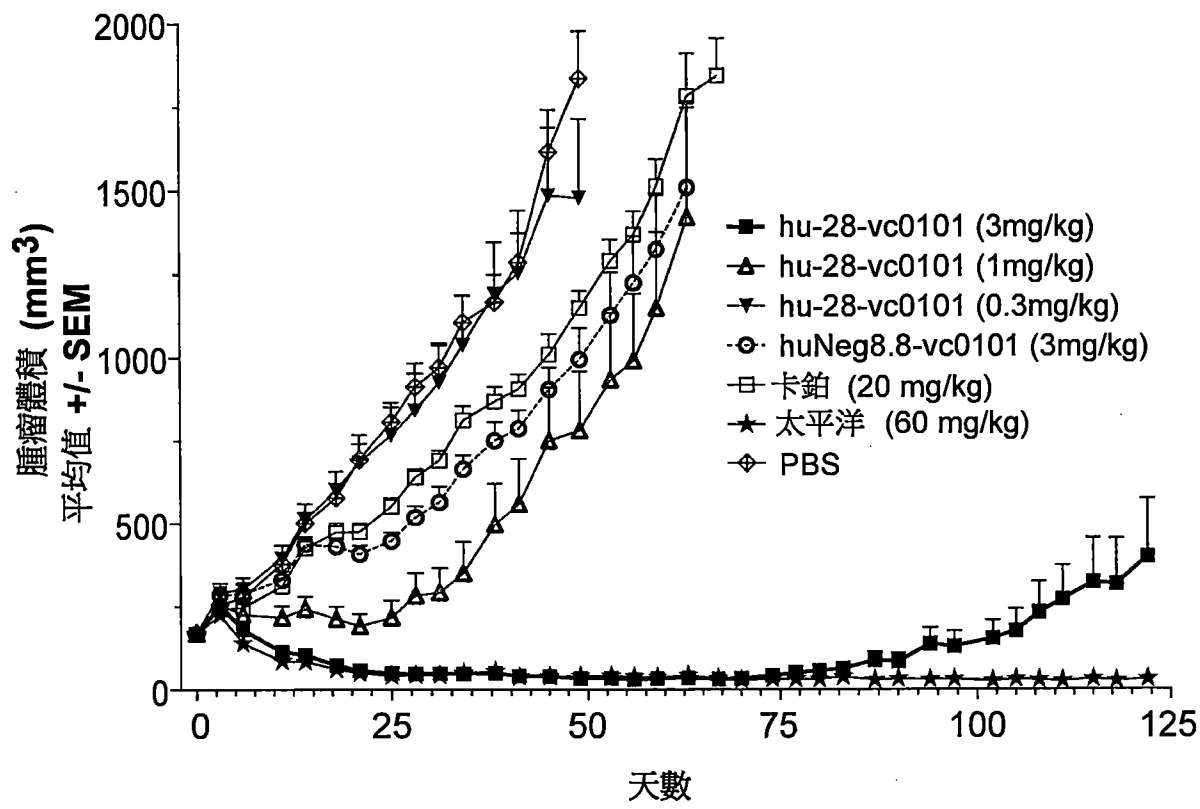


圖 16A

SEQ ID NO: 61 hu28 HC 1.0 L443C 胺基酸序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMTWVRQAPGKGLEWVAYISSGSNYIYYAEAVKGRF
TISRDNAKNSLYQMNSLRAEDTAVYYCARRGPFVLDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCSPG

SEQ ID NO: 62 hu28 HC 1.0 L443C 核苷酸序列
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGGGACTATGGAATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTGGCCTATATTAGTAGTGGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGC
CGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGAGGCCCGTTTGTGGATGCCTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACTCACACATGCCCAACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAGAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCTGCTCCCCGGGT

SEQ ID NO: 63 hu28 LC 1.0 κK183C 胺基酸序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSINRYLHWYQQKPGKAPKLLIYNANGLQTGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCLQHNTWPDFTGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSCADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID NO: 64 hu28 LC 1.0 κK183C 核苷酸序列
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTT
GCAAAGCAAGTCAGAGTATTAACAGGTACTTACACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
GCTCCTGATCTATAATGCAAACGGTTTGCAAACGGGGGTCCTCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCAACTTACTACTGTTTGCA
GCATAATACGTGGCCGGACACGTTTGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTG
CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC
TGACGCTGAGCTGCGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

圖 16B

SEQ ID NO: 65 hu28 HC 1.0 L443C/K392C 胺基酸序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRDYGMTWVRQAPGKGLEWVAYISSGSNYIYYAEAVKGRF
TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGPFVLDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYCTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCSPG

SEQ ID NO: 66 hu28 HC 1.0 L443C/K392C 核苷酸序列
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGGGACTATGGAATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGG
GCTGGAGTGGGTGGCCTATATTAGTAGTGGTAGCAATTACATCTATTATGCAGAAGCGGTGAAGGGC
CGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCG
AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGAGGCCCGTTTGTGGATGCCTGGGGCCAGGGAA
CCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA
AGAGCACTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTG
ACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTC
CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TCCCCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACTGCACCACGCCTC
CCGTGCTGGAAGTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC
AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
GCCTCTCCTGCTCCCCGGGT