



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I874314 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：108113285

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 16 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/28 (2006.01)** **A61K39/395 (2006.01)**
 A61K31/28 (2006.01) **C07K16/30 (2006.01)**
 C07K16/32 (2006.01) **C07K16/44 (2006.01)**
 A61K47/68 (2017.01) **A61P35/00 (2006.01)**

(30)優先權：2018/04/16 美國 62/658,468

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士

(72)發明人：克雷恩 克里斯俊 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；優瑪那 帕伯羅 UMANA, PABLO (CR)；哈斯 亞歷山大 HAAS, ALEXANDER (DE)；偉瑟 芭芭拉 WEISER, BARBARA (DE)；利普斯梅爾 弗洛里安 LIPSMEIER, FLORIAN (DE)；喬治絲 蓋 GEORGES, GUY (BE)；芬 舍貝斯俊 FENN, SEBASTIAN (DE)；莫嫩肯 喬治 MOELLEKEN, JOERG (DE)；波爾曼 菲力克斯 BORMANN, FELIX (DE)；馬茲蓋柯 丹妮拉 MATSCHEKO, DANIELA (DE)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201726720A CA 2943299A1
 US 2018/0057544A1 WO 2016/130539A2

期刊 Paul J.Yazaki, et al., "A series of anti-CEA/anti-DOTA bispecific antibody formats evaluated for pre-targeting: comparison of tumor uptake and blood clearance", Protein Engineering, Design & Selection, Vol. 26, No. 3, 無, 21 November 2012, Pages 187-193

期刊 Sarah Cheal, et al., "Comparative efficacy and toxicity of 177Lu- vs 90Y-theranostic anti-HER2/anti-DOTA(metal) pretargeted radioimmunotherapy (anti-HER2 DOTA-PRIT) of HER2-expressing breast cancer xenografts with curative intent", The Journal of Nuclear Medicine, Vol.58, Issue supplement 1, 無, 1 May 2017, Pages 54

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：30 項 圖式數：62 共 472 頁

(54)名稱

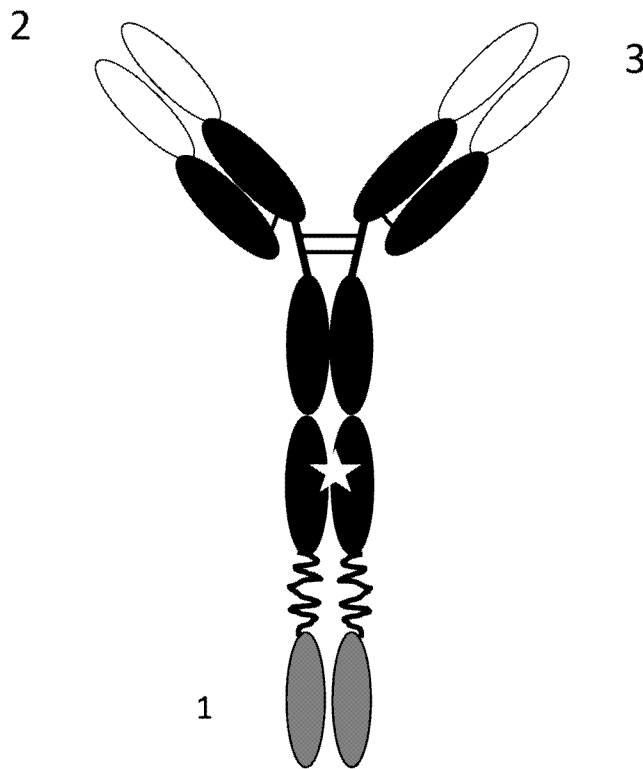
螯合型放射核種之抗體

(57)摘要

本申請案係關於特異性結合於螯合型放射核種之抗體，包括雙特異性抗體。其進一步關於此類雙特異性抗體用於諸如放射免疫成像及放射免疫療法之應用中的用途。其另外關於可用於此類方法之清除劑及組合物。

The present application relates to antibodies which bind specifically to chelated radionuclides, including bispecific antibodies. It further relates to the use of such bispecific antibodies in applications such as radioimmunoimaging and radioimmunotherapy. It additionally relates to clearing agents and compositions useful in such methods.

指定代表圖：



【圖1】



I874314

【發明摘要】

【中文發明名稱】

螯合型放射核種之抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES FOR CHELATED RADIONUCLIDES

【中文】

本申請案係關於特異性結合於螯合型放射核種之抗體，包括雙特異性抗體。其進一步關於此類雙特異性抗體用於諸如放射免疫成像及放射免疫療法之應用中的用途。其另外關於可用於此類方法之清除劑及組合物。

【英文】

The present application relates to antibodies which bind specifically to chelated radionuclides, including bispecific antibodies. It further relates to the use of such bispecific antibodies in applications such as radioimmunoimaging and radioimmunotherapy. It additionally relates to clearing agents and compositions useful in such methods.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

螯合型放射核種之抗體

【英文發明名稱】

ANTIBODIES FOR CHELATED RADIONUCLIDES

【技術領域】

【0001】 本申請案係關於特異性結合於螯合型放射核種之抗體，包括雙特異性抗體。其進一步關於此類雙特異性抗體用於諸如放射免疫成像及放射免疫療法之應用中的用途。其另外關於可用於此類方法之清除劑及組合物。

【先前技術】

【0002】 已研發出使藥物靶向癌細胞之單株抗體。藉由將毒性劑與結合於腫瘤相關抗原之抗體結合，可更特異性地殺死腫瘤，且對周圍組織之損傷較小。

【0003】 在預靶向放射免疫療法(PRIT)中，利用一方面對腫瘤相關抗原具有親和力且另一方面對放射性標記化合物具有親和力的抗體構築體。在第一步中，投與抗體且定位在腫瘤內。隨後，投與放射性標記化合物。因為放射性標記化合物小，所以其可迅速遞送至腫瘤且快速清除，此減少腫瘤外之輻射暴露(Goldenberg等人 *Theranostics* 2012, 2(5), 523-540)。除直接殺死細胞作用之外，PRIT亦可充當免疫原性細胞死亡之誘導劑，及癌症免疫療法及內源性疫苗接種方法之潛在組合搭配物。類似程序亦可用於成像。預靶向可利用使用抗生物素蛋白-生物素之雙特異性抗體或系統，不過後者具有抗生物素蛋白/抗生蛋白鏈菌素為免疫原性的缺

點。

【0004】 用於PRIT中之放射核種通常呈負載有所關注之放射核種之螯合物的形式。

【0005】 Su等人(Nucl Med Biol 2005 32:741-747)評估具有mAb-抗生蛋白鏈菌素及DOTA-生物素之抗體預靶向系統。發現放射性標記之 ^{212}Pb -DOTA-生物素不穩定，其中超過30%之游離 ^{212}Bi (^{212}Pb 之衰變產物)自 ^{212}Pb -DOTA釋放。

【0006】 WO2010/099536描述一種能夠結合鉍、鐳及釷之DOTA錯合物之雙特異性抗體。然而，DOTA不穩定結合所有放射核種，且可展現緩慢錯合物形成速率(Yong及Brechtel, Dalton Trans. 2001年6月21日；40(23)6068-6076)。螯合物無法穩定結合放射核種在增加毒性的同時亦可造成輻射遞送至腫瘤減少的風險。

【發明內容】

【0007】 本發明提供結合於包含DOTAM及鉛(Pb)之金屬螯合物的抗體。DOTAM能夠以穩定方式螯合Pb以形成Pb[DOTAM]錯合物。

【0008】 本發明之抗體結合於包含DOTAM及Pb之螯合物，其中Pb可為穩定(非放射性)同位素或放射性同位素。鉛之放射性同位素可用於諸如放射免疫成像及放射免疫療法之應用中。

【0009】 較佳地，本發明之抗體對Pb-DOTAM螯合物具有在pM至fM範圍內之極其高親和力。

【0010】 抗體另外結合於由DOTAM螯合之鉍(Bi)。 ^{212}Pb 為 ^{212}Bi 之母放射核種且可充當 ^{212}Bi 之活體內產生劑。抗體結合螯合Bi以及螯合Pb之能力增加其在諸如放射免疫療法之應用中的效用，其中Bi同位素作為來

自Pb同位素之衰變產物產生。在一些實施例中，抗體可以在pM至fM範圍內之極高親和力結合於Bi-DOTAM螯合物與Pb-DOTAM螯合物。

【0011】此外，與諸如Cu-DOTAM螯合物之其他螯合物-金屬錯合物相比，本發明之抗體視情況或較佳對Bi-DOTAM螯合物及Pb-DOTAM螯合物具有選擇性。

【0012】在一個實施例中，本發明提供一種包含對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點的抗體，其中該抗原結合位點包含包括至少一個、兩個或三個重鏈CDR序列之重鏈，其中：

a)重鏈CDR1包含胺基酸序列GFSLSTYSMS (SEQ ID NO: 1)；

b)重鏈CDR2包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)；

c)重鏈CDR3包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)；

及/或其中該抗原結合位點包含包括至少一個、兩個或三個輕鏈CDR序列之輕鏈，其中：

d)輕鏈CDR1包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)；

e)輕鏈CDR2包含胺基酸序列QASKLAS (SEQ ID NO: 5)；

f)輕鏈CDR3包含胺基酸序列LGGYDDESPTYG (SEQ ID NO: 6)。

【0013】在一些實施例中，抗原結合位點包含如上所定義之輕鏈與重鏈。

【0014】在另一實施例中，本發明提供一種包含對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點的抗體，其中該抗原結合位點至少包含：

a)包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)之重鏈

CDR2或在SEQ ID NO: 2中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Phe50、Asp56及/或Tyr58，且視情況亦不包括Gly52及/或Arg54；

b)包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)之重鏈CDR3或在SEQ ID NO: 3中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Glu95、Arg96、Asp97、Pro98，且視情況亦不包括Ala100C、Tyr100D及/或Pro100E及/或視情況亦不包括Tyr99；

c)包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)之輕鏈CDR1或在SEQ ID NO: 4中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Tyr28及Asp32；

d)包含胺基酸序列LGGYDDESDTYG (SEQ ID NO: 6)之輕鏈CDR3或在SEQ ID NO: 6中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Gly91、Tyr92、Asp93、Thr95c及Tyr96；

殘基編號係根據Kabat。

【0015】 在一些實施例中，抗體另外包括視情況以下之重鏈CDR1及輕鏈CDR2：

i)包含胺基酸序列GFSLSTYSMS (SEQ ID NO: 1)之重鏈CDR1或在SEQ ID NO: 1中具有至多1、2或3個取代之其變異體；

ii)包含胺基酸序列QASKLAS (SEQ ID NO: 5)之輕鏈CDR2或在SEQ ID NO: 5中具有至少1、2或3個取代之其變異體；視情況不包括Gln50。

【0016】 在與如上所闡述之包含CDR之序列的變異體有關的本發明之任何實施例中，蛋白質可在如上文所闡述之殘基中的一或多個中不變。

【0017】 在一些實施例中，根據本發明之抗體結合於螯合型放射核

種之與本文所揭示之抗體所結合相同之抗原決定基或重疊之抗原決定基。

【0018】 在一些實施例中，抗體結合於與Fab PRIT-0213或PRIT-0214結合之抗原決定基相同的抗原決定基或重疊的抗原決定基。舉例而言，抗體可結合於與以下各者所結合之抗原決定基相同的抗原決定基或重疊的抗原決定基：

i)具有包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變域及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈可變域的抗體；或

i)具有包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可變域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變域的抗體。

【0019】 在一個實施例中，抗原結合位點包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下之CDR：

a)包含胺基酸序列GFSLSTYSMS (SEQ ID NO: 1)之重鏈CDR1；

b)包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)之重鏈CDR2；

c)包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)之重鏈CDR3；

d)包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)之輕鏈CDR1；

e)包含胺基酸序列QASKLAS (SEQ ID NO: 5)之輕鏈CDR2；

f)包含胺基酸序列LGGYDDESPTYG (SEQ ID NO: 6)之輕鏈CDR3。

【0020】 視情況，上述任一態樣中之抗體為人類、嵌合或人類化抗體。

【0021】 視情況，抗原結合位點可包括包含選自由SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 9組成之群之胺基酸序列的重鏈可變域，或包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0022】 視情況，抗原結合位點可包括包含選自由SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 10組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變域，或包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0023】 視情況，對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點可包括包含選自由SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9組成之群之胺基酸序列的重鏈可變域或如上所定義之其變異體，及包含選自由SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變域或如上所定義之其變異體。舉例而言，對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點可包括包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變域或其變異體，及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的輕鏈可變域或其變異體。在另一實施例中，其可包括包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可變域或其變異體及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變域或其變異體。

【0024】 抗體可呈任何格式，包括全抗體及抗體片段。抗體可為單特異性的。呈此形式，抗體可用於例如分選及純化方案，例如以分開成功放射性標記之部分。

【0025】 在一些態樣中，特異性結合於Pb-DOTAM螯合物之抗體與細胞結合劑/靶向部分偶合以產生靶向劑。此類試劑適用於例如預靶向放射免疫療法或預靶向放射免疫成像。

【0026】 偶合較佳可藉由表現為融合多肽或蛋白。融合可為直接的或經由連接子。融合多肽或蛋白可重組產生，避免對結合化學之任何需求。

【0027】 在一些實施例中，靶向部分(包含標靶之抗原結合位點)為抗體或其片段。亦即，在一些實施例中，上述抗體可呈多特異性(例如雙特異性)抗體形式，如以下進一步論述。

【0028】 在另一態樣中，本發明進一步關於適合於使Pb-DOTAM螯合物靶向標靶細胞之多特異性抗體/抗體複合物。

【0029】 因此，在另一態樣中，本發明涉及一種雙特異性或多特異性抗體，其特異性結合Pb-DOTAM螯合物與標靶抗原，例如在標靶細胞之表面上表現之抗原。雙特異性抗體包含至少一個對DOTAM螯合的鉛具有特異性之抗原結合位點及至少一個針對標靶抗原之抗原結合位點。

【0030】 在一些實施例中，對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點可根據上述實施例中之任一者。

【0031】 標靶抗原可為如本文中進一步論述之任何抗原，例如任何腫瘤特異性抗原。在一些實施例中，其可為由諸如原核生物或病毒之病原體表現的蛋白質或多肽。

【0032】 在一些實施例中，腫瘤相關抗原可為CEA (癌胚抗原)。亦即，在一些實施例中，雙特異性抗體可包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CEA具有特異性之抗原結合位點。CEA在本發明之上下文中係有利的，因為其內化相對緩慢，且因此在初始處理之後高百分比之雙特異性抗體將保持在細胞表面上可用，用於與放射核種結合。其他低內化標靶/腫瘤相關抗原亦可為較佳且在本文中描

述。可用於本發明之腫瘤相關抗原之其他實例包括CD20或HER2。

【0033】 在一些實施例中，在標靶抗原為CEA之情況下，對CEA具有特異性之抗原結合位點可包括包含至少一個、兩個或三個重鏈CDR之重鏈，其中：

d)重鏈CDR1包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；

e)重鏈CDR2包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；

f)重鏈CDR3包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；

及/或對CEA具有特異性之抗原結合位點可包括包含至少一個、兩個或三個輕鏈CDR之輕鏈，其中：

a)輕鏈CDR1包含胺基酸序列SEQ ID NO: 14；

b)輕鏈CDR2包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15；

c)輕鏈CDR3包含胺基酸序列SEQ ID NO: 16。

【0034】 在一些實施例中，CEA的抗原結合位點可包含選自以下的CDR中的至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個(亦即，所有)：

a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之重鏈CDR1；

b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之重鏈CDR2；

c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之重鏈CDR3；

d)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之輕鏈CDR1；

e)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之輕鏈CDR2；

f)包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之輕鏈CDR3。

【0035】 在一些實施例中，CEA的抗原結合位點可包括包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之重鏈可變域，或包含與SEQ ID NO: 17至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺

基酸序列的其變異體。

【0036】 視情況，抗原結合位點可包括包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之輕鏈可變域，或包含與SEQ ID NO: 18至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0037】 視情況，對CEA具有特異性之抗原結合位點可包括包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之重鏈可變域或其變異體，及包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之輕鏈可變域或其變異體。

【0038】 雙特異性抗體或多特異性抗體之多種可能格式為此項技術中已知，包括本文中進一步描述之格式。本發明之抗體可採納此等格式中之任一者。舉例而言，在一些實施例中，雙特異性抗體可為二價、三價或四價。

【0039】 本發明之抗體包括Fc區可為較佳。在放射免疫療法及放射成像之情況下Fc區之存在具有益處，例如延長蛋白質之循環半衰期及/或使腫瘤吸收比在較小片段下觀測到之腫瘤吸收高。

【0040】 在一些實施例中，在存在Fc區下，較佳地，Fc區進行工程改造以減小效應子功能。此可包括Fc區殘基234、235、238、265、269、270、297、327及/或329中之一或多個，例如234、235及/或329中之一或多個的取代。在一些實施例中，Fc區可進行工程改造以包括Pro 329至Gly、Leu 234至Ala及/或Leu 235至Ala之取代(根據EU索引編號)。

【0041】 已知包括Fc結構域之多特異性抗體之多種格式。

【0042】 在一個實施例中，雙特異性或多特異性抗體可包含：i) Fc結構域；ii)包含對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點的至少

一個Fab、交叉Fab、Fv、scFab或scFv片段或單域抗體(VHH)；及iii)包含對標靶抗原具有特異性之抗原結合位點的至少一個Fab、交叉Fab、Fv、scFab或scFv片段或單域抗體(VHH)。

【0043】 在一些實施例中，雙特異性或多特異性抗體針對標靶抗原(例如腫瘤相關抗原)為多價，例如二價可為較佳。此具有增加親合力之益處。

【0044】 在一些實施例中，雙特異性或多特異性抗體針對Pb-DOTAM為單價可為較佳。此降低使用清除劑時形成高分子量複合物之風險(參見以下進一步論述)。

【0045】 因此，在一些實施例中，抗體可為三價：亦即，針對標靶抗原二價且針對Pb-DOTAM單價。

【0046】 在一種示例性格式中，雙特異性或多特異性抗體可包括包含第一及第二抗體重鏈及第一及第二抗體輕鏈之全長抗體(例如IgG)，其中第一重鏈及第一輕鏈組裝形成第一抗原之抗原結合位點，且其中第二重鏈及第二輕鏈組裝形成第二抗原之抗原結合位點。視情況，其他抗原結合部分可例如經由多肽連接子與第一及/或第二重鏈之N端或C端融合，以提高針對一個或兩個抗原之價數。舉例而言，針對第一抗原之其他抗原結合部分可與重鏈分子中的一或兩者之N端融合。

【0047】 在另一例示性格式中，雙特異性或多特異性抗體可包括包含針對第一抗原之抗原結合位點(例如針對第一抗原可為二價)的全長抗體(例如IgG)，且進一步包含至少一個對第二抗原具有特異性之抗原結合部分。在各種實施例中，抗原結合部分可為Fab片段、交叉Fab分子、scFab、Fv分子、scFv或單域抗體(VHH)，或可為第二全長抗體之一部

分。舉例而言，抗體可包括包含針對第一抗原之抗原結合位點的全長抗體，且進一步包含至少第二重鏈可變域及第二輕鏈可變域，該第二重鏈可變域與第二輕鏈可變域一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。第一或第二抗原為Pb-DOTAM螯合物，且另一抗原為標靶抗原。

【0048】 在本文中之格式之一些實施例中，第二抗原為Pb-DOTAM螯合物且第一抗原為標靶，例如腫瘤相關抗原(在一些實施例中，為CEA、CD20或ERBB2)。

【0049】 在另一例示性格式中，雙特異性或多特異性抗體可包括包含針對第一抗原之抗原結合位點(例如針對可為二價)的全長抗體，其中重鏈中之一者之N端或C端經由多肽連接子連接於第一多肽且其中第一多肽與第二多肽締合，形成包含針對第二抗原之結合位點的Fab或交叉Fab。舉例而言，此格式可包含：

i)由VH結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VL及CL結構域組成之第二多肽締合；或

ii)由VL結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合；或

iii)由VH結構域及CL結構域組成之第一多肽，其與由VL及CH1結構域組成之第二多肽締合；

使得該第一多肽及該第二多肽一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。

【0050】 在一些實施例中，融合可在全長抗體之重鏈中之一者的N端。

【0051】 在另一特定實施例中，抗體可為雙特異性抗體，其包含：

a)全長抗體，其特異性結合第一抗原且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

b)多肽，其由以下組成：

i)抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)；

其中該多肽經由肽連接子以VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；

c)多肽，其由以下組成：

i)抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)，或

iii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

且其中(b)下之肽之抗體重鏈可變域及(c)下之肽之抗體輕鏈可變域一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。

【0052】 在此格式中，第一或第二抗原可為Pb-DOTAM螯合物。另一抗原為標靶抗原，例如腫瘤相關抗原。

【0053】 在一些實施例中，第二抗原為Pb-DOTAM螯合物且第一抗原為標靶，例如腫瘤相關抗原(在一些實施例中，為CEA、CD20或ERBB2)。

【0054】 上述抗體可為三價。在另一可能實施例中，其他抗原結合部分可進行融合以增加針對一個或兩個抗原之價數，如本文中進一步論

述。

【0055】視情況該連接子(及如本文所論述之任何連接子)可為具有至少5個胺基酸，較佳25個與50個之間的胺基酸之肽。連接子可為剛性連接子或可撓性連接子。在一些實施例中，其為可撓性的，包含Thr、Ser、Gly及/或Ala殘基或由Thr、Ser、Gly及/或Ala殘基組成。舉例而言，其可包含Gly及Ser殘基或由Gly及Ser殘基組成。在一些實施例中，其可具有重複基元，諸如(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n，其中n為例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些實施例中，連接子可為或可包含序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26)。可使用其他連接子且可藉由技術人員鑑別。

【0056】此抗體格式之另外細節提供於以全文引用的方式併入本文中之WO2010/115589 A1 (Roche Glycart AG)中。

【0057】視情況，

i)在a)下之全長抗體之第一輕鏈的恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在a)下之第一重鏈之恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代；或

ii)在b)下之第二輕鏈之恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H) (根據Kabat編號)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在b)下之第二重鏈之恆定域CH1中，位置處147之胺基酸或位置213之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D) (根據Kabat EU索引編號)取代。

【0058】 在一個實施例中，本發明之雙特異性抗體可具有如上文所述之三價結構，且可包含：

a)全長抗體，其特異性結合CEA且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

其中重鏈與SEQ ID NO: 22或23之胺基酸1-450 (包括胺基酸1及450，使用連續編號)(亦即，連接子前的序列部分)至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

且其中輕鏈與SEQ ID NO 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；及/或

b)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 7之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)與SEQ ID NO: 7之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)與SEQ ID NO: 7之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域；

其中該多肽經由肽連接子以VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；及/或

c)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

其中(b)下之肽的抗體重鏈可變域及(c)下之肽的抗體輕鏈可變域一起形成針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點。

【0059】 在一個實例中，根據EU索引編號，全長抗體之重鏈中之一條包含所謂「杵突變」(T366W及視情況S354C或Y349C之一，較佳S354C)且另一條包含所謂「臼突變」(T366S、L368A及Y407V及視情況Y349C或S354C，較佳Y349C)(參見例如Carter, P.等人, Immunotechnol. 2 (1996) 73)。

【0060】 在一些實施例中，(a)下之兩條抗體重鏈包含：i)與SEQ ID NO: 23之胺基酸1-450 (包括胺基酸1及450，使用連續編號)(亦即，連接子前的序列)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置349具有C、在位置366具有S、在位置368具有A及在位置407具有V (EU編號)的第一抗體重鏈；以及

ii)與SEQ ID NO: 22之胺基酸1-450 (包括胺基酸1及450，使用連續

編號)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置354具有C及在位置366具有W (EU編號)的第二抗體重鏈。

【0061】 本文中提及之「固定」殘基為CH3中之「杵-白」突變或為與另一條重鏈之CH3上的對應殘基配對以利於所需分子形成之其他殘基，諸如形成二硫橋之殘基。另一條重鏈上可存在之可能殘基可來源於表2之序列(例如序列19及20或22及23)。舉例而言，在一個實施例中，若第一抗體重鏈在位置349具有C，則第二抗體重鏈在位置354具有C。

【0062】 視情況，連接子如上所述。

【0063】 在另一實施例中，本發明之雙特異性抗體可具有如上文所述之三價結構，且可包含：

a)全長抗體，其特異性結合CEA且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

其中重鏈與SEQ ID NO: 19或20之胺基酸1-450 (包括胺基酸1及450，且基於連續編號：亦即連接子前之序列)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

且其中輕鏈與SEQ ID NO: 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

b)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 9之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)與SEQ ID NO: 9之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)與SEQ ID NO: 9之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域；

其中該多肽經由肽連接子以VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；

c)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 10之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)與SEQ ID NO: 10之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)與SEQ ID NO: 10之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)，

其中該多肽經由肽連接子以VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

且其中(b)下之肽的抗體重鏈可變域及(c)下之肽的抗體輕鏈可變域一起形成針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點。

【0064】 如上所述，在以上實施例中之任一者中，根據EU索引編號，全長抗體之重鏈中之一條可包含所謂「杵突變」(T366W及視情況

S354C或Y349C之一，較佳S354C)且另一條包含所謂「白突變」)(T366S、L368A及Y407V及視情況Y349C或S354C，較佳Y349C)(參見例如Carter, P.等人, Immunotechnol. 2 (1996) 73)。

【0065】 在一個實施例中，(a)下之兩條抗體重鏈可包含：i)與SEQ ID NO: 22之胺基酸1-450之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置354具有C且在位置366具有W (EU編號)的第一抗體重鏈；以及

ii)與SEQ ID NO: 23之胺基酸1-450之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置349具有C、在位置366具有S、在位置368具有A且在位置407具有V (EU編號)的第二抗體重鏈。

【0066】 視情況，連接子如上所述。

【0067】 在另一實施例中，雙特異性抗體包含：

i)具有與SEQ ID NO: 22之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的第一重鏈，

ii)與SEQ ID NO: 23之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的第二重鏈，

iii)與SEQ ID NO: 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之兩條抗體輕鏈。

【0068】 在另一實施例中，雙特異性抗體為在本文中稱作PRIT-0213之分子，其包含：

i)具有SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之第一重鏈；

- ii)具有SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之第二重鏈；以及
- iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0069】 在另一實施例中，雙特異性抗體包含：

- i)具有與SEQ ID NO: 19之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的第一重鏈，
- ii)與SEQ ID NO: 20之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之第二重鏈，
- iii)與SEQ ID NO: 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之兩條抗體輕鏈。

【0070】 在另一實施例中，雙特異性抗體為在本文中稱作PRIT-0214之分子，其包含：

- i)具有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之第一重鏈；
- ii)具有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之第二重鏈；以及
- iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0071】 在一個實施例中，本發明之雙特異性抗體可具有如上文所述之三價結構，且可包含：

a)全長抗體，其特異性結合ERBB2且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

其中重鏈與SEQ ID NO: 36或37之胺基酸1-449 (包括胺基酸1及449，使用連續編號)(亦即，連接子前的序列部分)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；
且其中輕鏈與SEQ ID NO 38之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；及/或

b)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 7或9 (在一些實施例中，較佳7)之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)與SEQ ID NO: 7或9 (在一些實施例中，較佳7)之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)與SEQ ID NO: 7或9 (在一些實施例中，較佳7)之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中該多肽經由肽連接子以VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；及/或

c)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 8或10 (在一些實施例中，較佳8)之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)與SEQ ID NO: 8或10 (在一些實施例中，較佳8)之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)與SEQ ID NO: 8或10 (在一些實施例中，較佳8)之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

其中(b)下之肽的抗體重鏈可變域及(c)下之肽的抗體輕鏈可變域一起形成針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點。

【0072】 在一個實例中，根據EU索引編號，全長抗體之重鏈中之一條包含所謂「杵突變」(T366W及視情況S354C或Y349C之一，較佳S354C)且另一條包含所謂「臼突變」(T366S、L368A及Y407V及視情況S354C或Y349C，較佳Y349C)(參見例如Carter, P.等人, Immunotechnol. 2 (1996) 73)。

【0073】 在一些實施例中，(a)下之兩條抗體重鏈包含：i)與SEQ ID NO: 37之胺基酸1-449 (包括胺基酸1及449，使用連續編號)(亦即，連接子前的序列)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置349具有C、在位置366具有S、在位置368具有A及在位置407具有V (EU編號)的第一抗體重鏈；以及

ii)與SEQ ID NO: 36之胺基酸1-449 (包括胺基酸1及449，使用連續編號)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置354具有C及在位置366具有W (EU編號)的第二抗體重鏈。

【0074】 視情況，連接子如上所述。

【0075】 在另一實施例中，雙特異性抗體包含：

i)具有與SEQ ID NO: 36之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的第一重鏈，

ii)與SEQ ID NO: 37之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的第二重鏈，

iii)與SEQ ID NO: 38之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的兩條抗體輕鏈。

【0076】 在另一實施例中，雙特異性抗體為在本文中稱作P1AD9827之分子，其包含：

i)具有SEQ ID NO: 36之胺基酸序列之第一重鏈；

ii)具有SEQ ID NO: 37之胺基酸序列之第二重鏈；以及

iii)具有SEQ ID NO: 38之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0077】 在另一實施例中，本發明之雙特異性抗體可具有如上文所述之三價結構，且可包含：

a)全長抗體，其特異性結合CD20且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

其中重鏈與SEQ ID NO: 47或48之胺基酸1-448 (包括胺基酸1及448，使用連續編號)(亦即，連接子前的序列部分)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

且其中輕鏈與SEQ ID NO 49之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；及/或

b)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 7或9 (在一些實施例中，較佳7)之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)與SEQ ID NO: 7或9 (在一些實施例中，較佳7)之重鏈可變域至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)，

iii)與SEQ ID NO: 7或9 (在一些實施例中，較佳7)之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)，

其中該多肽經由肽連接子以VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；及/或

c)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 8或10 (在一些實施例中，較佳8)之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)與SEQ ID NO: 8或10 (在一些實施例中，較佳8)之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域；或iii)；或與SEQ ID NO: 8或10 (在一些實施例中，較佳8)之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域；

其中該多肽經由肽連接子以VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

其中(b)下之肽的抗體重鏈可變域及(c)下之肽的抗體輕鏈可變域一起形成針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點。

【0078】 在一個實例中，根據EU索引編號，全長抗體之重鏈中之一條包含所謂「杵突變」(T366W及視情況S354C或Y349C之一，較佳

S354C)且另一條包含所謂「白突變」)(T366S、L368A及Y407V及視情況Y349C或S354C，較佳Y349C)(參見例如Carter, P.等人, Immunotechnol. 2 (1996) 73)。

【0079】 在一些實施例中，(a)下之兩條抗體重鏈包含：i)與SEQ ID NO: 48之胺基酸1-448 (包括胺基酸1及448，使用連續編號)(亦即，連接子前的序列)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置349具有C、在位置366具有S、在位置368具有A及在位置407具有V (EU編號)的第一抗體重鏈；以及

ii)與SEQ ID NO: 47之胺基酸1-448 (包括胺基酸1及448，使用連續編號)之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致且在位置354具有C及在位置366具有W (EU編號)的第二抗體重鏈。

【0080】 視情況，連接子如上所述。

【0081】 在另一實施例中，雙特異性抗體包含：

i)具有與SEQ ID NO: 47之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的第一重鏈，

ii)與SEQ ID NO: 48之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的第二重鏈，

iii)與SEQ ID NO: 49之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的兩條抗體輕鏈。

【0082】 在另一實施例中，雙特異性抗體為在本文中稱作P1AD9826之分子，其包含

- i)具有SEQ ID NO: 47之胺基酸序列之第一重鏈；
- ii)具有SEQ ID NO: 48之胺基酸序列之第二重鏈；以及
- iii)具有SEQ ID NO: 49之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0083】 在另一態樣中，本發明係關於編碼本文所述之任一抗體之多核苷酸或一組多核苷酸。在其他實施例中，本發明係關於包含該多核苷酸或該等多核苷酸之載體或一組表現載體，視情況表現載體。在其他目標中，本發明係關於包含本發明之載體的原核或真核宿主細胞。另外，提供一種產生抗體之方法，其包含培養宿主細胞，從而產生該抗體。

【0084】 如本文所述之雙特異性或多特異性抗體可用於多種應用，包括治療及診斷應用，諸如預靶向放射免疫療法及預靶向放射免疫成像。

【0085】 因此，在另一態樣中，本發明係關於如本文所述之任何雙特異性或多特異性抗體，其用於預靶向放射成像。在此類實施例中，螯合Pb較佳為²⁰³Pb。

【0086】 使放射性同位素靶向組織或器官以進行成像之方法可包含：

i)向個體投與如本文所述之多特異性或雙特異性抗體，其中該抗體結合於標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；以及

ii)隨後向該個體投與與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種，其中與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種結合於定位至標靶細胞之表面的抗體。

【0087】 視情況，在步驟(i)與(ii)之間，投與清除劑，其中該清除劑結合於對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點。清除劑阻斷針對Pb-DOTAM之抗原結合位點，防止循環抗體結合於螯合型Pb放射核

種。或者或另外，清除劑可增加抗體自體內清除之速率。或者「清除劑」可稱作「阻斷劑」：在以下論述中此等術語可彼此取代。

【0088】 清除劑可包含金屬離子與DOTAM或其功能變異體之錯合物，其中該錯合物由針對Pb-DOTAM之抗原結合位點識別。較佳地，金屬離子為穩定同位素或基本上穩定同位素。「穩定同位素」意謂不進行放射性衰變之同位素。「基本上穩定同位素」意謂進行放射性衰變，但半衰期非常長，使得使用安全之同位素。較佳地，該金屬離子係選自Pb、Ca及Bi之離子。舉例而言，清除劑可包含Pb之穩定同位素與DOTAM或其功能變異體錯合、Ca與DOTAM或其功能變異體錯合或²⁰⁹Bi (半衰期為 1.9×10^{19} 年之基本上穩定同位素)與DOTAM或其功能變異體錯合。Pb可為天然存在之鉛，其為穩定(非放射性)同位素²⁰⁴Pb、²⁰⁶Pb、²⁰⁷Pb及²⁰⁸Pb之混合物。

【0089】 DOTAM或其功能變異體結合於清除部分。此部分例如藉助於其尺寸及/或高流體動力學半徑，使清除劑低吸收至腫瘤中。以下進一步論述合適清除部分。在一些實施例中，清除劑可包含與聚葡萄糖或其衍生物結合之DOTAM或其功能變異體。

【0090】 在成像方法之另一實施例中，多特異性或雙特異性抗體在投與時可結合於螯合型Pb放射核種。

【0091】 視情況，在任何實施例中，該方法可進一步包含：

iii)使與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種所位於的組織或器官成像。

【0092】 在一些實施例中，標靶抗原可為腫瘤特異性抗原且成像可為使腫瘤成像之方法。

【0093】 在另一態樣中，本發明係關於如本文所述之抗體，其用於預靶向放射免疫療法之方法中。在此類實施例中，螯合型Pb較佳為 ^{212}Pb 。

【0094】 使放射性同位素靶向組織或器官以用於療法之方法可包含：

i)向個體投與如本文所述之多特異性或雙特異性抗體，其中該抗體結合於標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；以及

ii)隨後投與與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種，其中與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種結合於定位至細胞之表面的抗體。

【0095】 視情況，如上所述，在步驟(i)與(ii)之間，投與清除劑。

【0096】 在一些實施例中，標靶抗原為腫瘤相關抗原且方法為治療癌症之方法。在其他實施例中，標靶抗原可為與感染相關之抗原，例如由原核生物或病毒感染細胞表現之蛋白質。

【0097】 在一些實施例中，本文所述之抗體可作為組合療法之一部分投與。舉例而言，其可與一或多種放射增敏劑及/或化學治療劑組合投與：放射增敏劑或化學治療劑及抗體可同時或以任一次序相繼投與。

【0098】 本文所述之放射成像及放射免疫療法之方法可視情況例如藉由例如呈混合物形式投與抗體及 ^{203}Pb -DOTAM及 ^{212}Pb -DOTAM兩者而組合。

【0099】 本發明亦進一步關於醫藥組合物，其包含本發明之抗體及醫藥學上可接受之賦形劑。

【0100】 在其他實施例中，本發明係關於一種套組，其包含本發明

之抗體及以下中之一者、兩者、三者、四者或所有：

- i)醫藥學上可接受之賦形劑；
- ii)由DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種；
- iii)如本文所述之清除劑；
- iv)一或多種其他化學治療劑；及/或
- v)一或多種放射增敏劑。

【0101】 在本發明之另一態樣中，本發明者已研發出一種新穎清除劑。此類清除劑可用於如本文所述之診斷、成像或治療方法之任一者中。

【0102】 在一個態樣中，本發明係關於一種清除劑，其包含聚葡萄糖或其衍生物，其結合於選自DOTAM及DOTAM之功能變異體的螯合物，其中該螯合物與Pb、Zn、Ca或Bi形成錯合物。清除劑通常包括螯合金屬離子，諸如Pb、Zn、Ca或Bi離子。

【0103】 清除劑可包含與DOTAM或DOTAM之功能變異體偶合的胺基聚葡萄糖。舉例而言，清除劑可包含經異硫氰酸酯偶合與胺基聚葡萄糖偶合之DOTAM (例如，可藉由使胺基聚葡萄糖與*p*-SCN-Bn-TCMC反應而獲得之化合物)。

【0104】 使用清除劑之一種潛在困難係其可能進入腫瘤，不利地影響隨後放射性配位體之結合。

【0105】 本發明者已進一步發現，當使用基於聚葡萄糖之清除劑時，可實現自血液良好清除，以及清除劑低滲透至腫瘤中，該基於聚葡萄糖之清除劑具有i)高平均分子量及ii)經受分子量截止，使得低於某一尺寸之片段除去。

【0106】 因此，較佳清除劑可為如下清除劑，其中i)清除劑中聚葡

萄糖或其衍生物之平均分子量為200-800 kDa，視情況超過300、350、400或450 kDa，且視情況少於700、650、600或550 kDa，視情況約500 kDa；及ii)已移除小於指定分子量截止值之聚葡萄糖、聚葡萄糖衍生物或清除劑，其中分子量截止值為50 kDa或更大、100 kDa或更大或200 kDa或更大，視情況在50 kDa-250 kDa或50 kDa-200 kDa、視情況100 kDa-200 kDa及視情況約100 kDa、150 kDa或200 kDa範圍內。

【0107】 在另一態樣中，本發明係關於製備清除劑之方法，及清除劑用於放射免疫療法或放射免疫成像之方法的用途。

【0108】 以下進一步論述本發明之此等及其他態樣。

【圖式簡單說明】

【0109】 圖1展示可能雙特異性抗體格式之示意圖。此格式包含針對一種標靶(A)之兩個抗原結合位點及針對第二標靶(B)之一個抗原結合位點(2:1格式)。

【0110】 圖2展示與Pb-DOTAM之複合物中PRIT-0213之結構。

【0111】 圖3展示關於根據Kabat編號的與Pb-DOTAM之複合物中PRIT-0213之相互作用位點的視圖。

【0112】 圖4展示在注射放射性標記之DOTAM之後24小時²¹²Pb之分佈(%ID/g ± SD, n = 3)。PRIT-0206、PRIT-0207、PRIT-0208及PRIT-0165靶向T84.66，而PRIT-0186、PRIT-0187及PRIT-0156靶向CH1A1A。PRIT-0175為非CEA結合對照。

【0113】 圖5展示在注射預先結合放射性標記之DOTAM的PRIT抗體之後96小時²⁰³Pb之分佈，表示為數/分鐘(CPM) (CPM ± SD, n = 3)。PRIT-0205、PRIT-0206、PRIT-0207、PRIT-0208及PRIT-0209為完全人

類化構築體，而PRIT-0165及PRIT-0175分別為陽性及陰性對照。

【0114】圖6展示在注射液預先結合放射性標記之DOTAM的PRIT抗體之後多個時間點BxPC3腫瘤及血液中 ^{203}Pb -DOTAM-bsAb之累積/清除率，表示為 $\text{CPM} \pm \text{SD}$ ($n = 3$)。PRIT-0206為PRIT-0165之完全人類化型式；PRIT-0175為非CEA結合對照。

【0115】圖7展示在MKN45腫瘤負載小鼠中在注射 ^{212}Pb 標記之清除劑之後2小時所選組織中之放射性分佈($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n=3$)。

【0116】圖8展示在MKN45腫瘤負載小鼠中在注射 ^{212}Pb 標記之清除劑之後24小時在所選組織及尿液中之放射性分佈($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n=3$)。

【0117】圖9展示在MKN45腫瘤負載小鼠中在注射 ^{212}Pb 標記之清除劑之後24小時在所選組織及尿液中逐個器官之放射性分佈($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n=3$)。

【0118】圖10展示在無腫瘤小鼠中在注射 ^{203}Pb 標記之清除劑之後1週在所選組織中之放射性分佈($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n=3$)。

【0119】圖11展示在無腫瘤小鼠中在注射 ^{203}Pb 標記之清除劑之後1週在所選組織中逐個器官之放射性分佈($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n=3$)。

【0120】圖12展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後4小時在血液中之放射性含量($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n = 3$)。條紋柱表示無CA對照(無清除劑)，所有候選試劑與之進行比較。星號標記統計顯著性水準，由較低(*)至較高(***)。

【0121】圖13展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液中之平均放射性含量($\% \text{ID/g} \pm \text{SD}$ ， $n = 3$)。條紋柱表示無CA對照(無清除劑)，所有候選試劑與之進行比較。

【0122】 圖14展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液及腫瘤中之放射性含量($\%ID/g \pm SD$, $n = 3$)。

【0123】 圖15展示使用30或100 μg 雙特異性抗體及10-100 μg 清除劑，利用100或30 kDa過濾截止值，或不使用清除劑(PBS)，在注射放射性標記之DOTAM之後24小時 ^{212}Pb 之分佈($\%ID/g \pm SD$, $n = 3$)。

【0124】 圖16展示在增加量之清除劑(0-100 μg)下對血液及腫瘤中 ^{212}Pb 之放射性濃度的作用。使用100 μg PRIT-0165預先靶向腫瘤，4天後用100 kDa截止值滲濾之Dex500或PBS。在清除劑之後2小時投與 ^{212}Pb -DOTAM。符號表示在放射性注射之後24小時的 $\%ID/g$ ，且線表示腫瘤資料之線性回歸。

【0125】 圖17展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈($\%ID/g \pm SD$, $n = 3$)。黑灰色及黑色條柱表示無CA陽性對照(無清除劑)，所有候選試劑與之進行比較。

【0126】 圖18展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液及腫瘤中之 ^{212}Pb 含量及對應之腫瘤與血液比率($\%ID/g \pm SD$, $n = 3$)。黑灰色及黑色條柱表示無CA陽性對照(無清除劑)，所有候選試劑與之進行比較。

【0127】 圖19展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時的腫瘤與血液比率，其隨清除劑(CA)量(PJRD08-46)及TCMC飽和度(9、20、39或84:1)而變。虛線表示相應資料之線性回歸($R^2 = 0.82$)及非線性曲線擬合($R^2 = 0.74$)。

【0128】 圖20展示在注射放射性標記之DOTAM之後24小時 ^{212}Pb 之分佈($\%ID/g \pm SD$, $n = 3$)。具有白色及灰色背景之條柱分別表示T84.66及CH1A1A之靶向；黑色條柱表示未結合CEA之對照。

【0129】圖21展示對於BxPC3模型中之治療循環1及2，在注射²¹²Pb-DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g ± SEM, n = 3)。

【0130】圖22展示在BxPC3模型中在CEA-PRIT之後第A-G組(n=8)中之平均體重。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0131】圖23顯示在BxPC3模型中CEA-PRIT之後第A-G組(n = 8)之平均體重變化，表示為初始體重百分比。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0132】圖24展示在BxPC3模型中第A-G組(n=8)之腫瘤生長平均值+標準誤差。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0133】圖25展示在BxPC3模型中第A-G組之個別腫瘤生長曲線。豎點線指示投與²¹²Pb-DOTAM。

【0134】圖26展示說明BxPC3模型中第A-G組(n=8)中之存活的卡普蘭-邁耶曲線(Kaplan-Meier curve)。豎點線指示投與²¹²Pb-DOTAM。

【0135】圖27展示對於LS174T模型中之治療循環1及2，在注射²¹²Pb-DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g ± SD, n = 3)。

【0136】圖28展示在LS174T模型中在CEA-PRIT之後第A-G組(n=8)中之平均體重。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0137】圖29展示在LS174T模型中在CEA-PRIT之後第A-G組

(n=8)中之平均體重變化，表示為初始體重百分比。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0138】圖30展示在LS174T模型中第A-G組(n=8)之腫瘤生長平均值+標準誤差。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0139】圖31展示在LS174T模型中第A-G組之個別腫瘤生長曲線。豎點線指示投與²¹²Pb-DOTAM。

【0140】圖32展示說明LS174T模型中第A-G組(n=8)中之存活的卡普蘭-邁耶曲線。豎點線指示投與²¹²Pb-DOTAM。

【0141】圖33展示在注射²¹²Pb-DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g ± SD, n = 3)。灰色條柱表示在注射多種量之Dex500-(50%)清除劑(CA)之後的組織累積；黑色條柱表示無CA對照(無清除劑)。

【0142】圖34展示在注射²¹²Pb-DOTAM之後24小時在血液及腫瘤中之²¹²Pb含量(%ID/g ± SD, n = 3)及對應之腫瘤與血液比率。灰色條柱表示在注射多種量之Dex500-(50%)清除劑(CA)之後的組織累積；黑色條柱表示無CA對照(無清除劑)。

【0143】圖35展示在注射²¹²Pb-DOTAM之後4小時在血液中之放射性含量(%ID/g ± SD, n = 3)。

【0144】圖36展示一種抗體(PRIT-0165)與MKN-45細胞之結合，使用二次偵測(右圖，Alexa 488)或DOTAM FITC(左圖，FITC-A)進行偵測。

【0145】圖37展示雙特異性抗體之可能格式，使用CEA作為示例性

標靶抗原。亦可使用其他標靶抗原。

【0146】 圖38展示P1AD8927與KPL-4細胞之結合以顯示Her2結合能力：使用人類IgG特異性二級抗體偵測抗體。

【0147】 圖39展示P1AD8927與KPL-4細胞之結合以顯示DOTAM結合能力：使用Pb-DOTAM-FITC進行同型校正的偵測。

【0148】 圖40展示P1AD8926與Raji細胞之結合以顯示CD20結合能力：使用人類IgG特異性二級抗體偵測抗體。

【0149】 圖41展示P1AD8926與Raji細胞之結合以顯示DOTAM結合能力：使用Pb-DOTAM-FITC進行同型校正的偵測。

【0150】 圖42展示方案103之研究概述，其評估SCID小鼠中皮下BxPC3腫瘤之CEA-PRIT (h=小時，d=天，w=週)。

【0151】 圖43：圖A在兩種治療循環之後所收集之組織中 ^{212}Pb 之平均累積，表示為% ID/g \pm SD (n=3)。圖B展示各小鼠之 ^{212}Pb 之個別腫瘤吸收，以及安樂死時之對應腫瘤體積(mm³)。

【0152】 圖44展示在BxPC3模型中第A-G組(n=10)之平均腫瘤生長曲線+標準誤差。曲線截短在n<5。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM (30或10 μCi)。

【0153】 圖45展示在BxPC3模型中第A-G組之個別腫瘤生長曲線(n=10)。豎點線指示 ^{212}Pb -DOTAM (30或10 μCi)之投與。

【0154】 圖46展示說明BxPC3模型中第A-G組(n=10)中之存活的卡普蘭-邁耶曲線。豎點線指示 ^{212}Pb -DOTAM (30或10 μCi)之投與。

【0155】 圖47展示在BxPC3模型中在CEA PRIT之後第A-G組(n=10)中之平均體重。曲線截短在n<5。豎點線指示根據研究設計，一些

組或所有組投與²¹²Pb-DOTAM。

【0156】圖48展示負載皮下BxPC3腫瘤之SCID小鼠中²⁰³Pb-BsAb (20 μ Ci, 100 μ g)之分佈。向小鼠注射20 μ Ci預先結合之²⁰³Pb-DOTAM-CEA-DOTAM或²⁰³Pb-DOTAM-DIG-DOTAM (陰性對照)，接著在注射之後第1天、第4天、第7天或第10天收穫器官，以評估所收集組織中之累積放射性(% ID/g \pm SD, n = 5)。

【0157】圖49展示在注射20 μ Ci/100 μ g預先結合之²⁰³Pb-DOTAM-CEA-DOTAM或²⁰³Pb-DOTAM-DIG-DOTAM (陰性對照)之後1-10天皮下BxPC3腫瘤中²⁰³Pb-BsAb之累積(% ID/g \pm SD, n = 5)。

【0158】圖50展示負載皮下BxPC3腫瘤之SCID小鼠中²¹²Pb之分佈。向小鼠注射CEA-DOTAM BsAb及CA，接著在放射性注射之後5分鐘至48小時投與²¹²Pb-DOTAM (% ID/g \pm SD, n = 5)。*尿液及糞便中隨著時間推移，亦即包括先前值之各時間點之累積²¹²Pb含量。尿液中之估計% ID/g係基於1/5 (10 mL)的來自5隻小鼠之彙集之尿液/清洗溶液(50 mL)。

【0159】圖51展示方案131之研究概述，該方案評估在載有皮下BxPC3腫瘤之SCID小鼠中，使用用5種不同金屬Zn、Gd、Cu、Ca或Pb中之任一者淬滅的CEA-DOTAM BsAb、Pb-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA及²¹²Pb-DOTAM，在PRIT之後²¹²Pb之活體內分佈(d=天，h=小時)。

【0160】圖52展示在注射CEA-DOTAM預先靶向之²¹²Pb-DOTAM之後2小時負載腫瘤之SCID小鼠中²¹²Pb之分佈(% ID/g \pm SD, n = 4)。

【0161】圖53展示在注射用不同金屬淬滅之²¹²Pb-DOTAM之後2小時負載腫瘤之SCID小鼠之所選正常組織中²¹²Pb之分佈(% ID/g)。

【0162】圖54展示在注射CD20-DOTAM BsAb或陰性對照DIG-

DOTAM預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時負載腫瘤之SCID小鼠中 ^{212}Pb 之分佈(% ID/g \pm SD, n = 3)。

【0163】圖55展示在注射HER2-DOTAM BsAb或陰性對照DIG-DOTAM預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時負載腫瘤之SCID小鼠中 ^{212}Pb 之分佈(% ID/g \pm SD, n = 3)。

【0164】圖56展示方案154之研究概述，該方案評估在載有皮下HPAF-II腫瘤之SCID小鼠中，在使用多種BsAb構築體之CEA-PRIT之後 ^{212}Pb -DOTAM之生物分佈(h=小時，d=天)。

【0165】圖57展示在注射陰性對照DIG-DOTAM、標準CEA-DOTAM BsAb或替代BsAb構築體中之一者預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM之後6小時負載腫瘤之SCID小鼠中 ^{212}Pb 之分佈(% ID/g \pm SD, n = 3)。

【0166】圖58展示在注射陰性對照DIG-DOTAM、標準CEA-DOTAM BsAb或替代BsAb構築體中之一者預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM之後6小時 ^{212}Pb 之血液含量及腫瘤累積(% ID/g \pm SD, n = 3)。

【0167】圖59展示方案162之實驗時程。在載有皮下WSU-DLCL2腫瘤之SCID小鼠中使用CD20-DOTAM BsAb、Ca-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA及 ^{212}Pb -DOTAM進行CD20-PRIT；在載有皮下WSU-DLCL2腫瘤之SCID小鼠中使用 ^{212}Pb -DOTAM預先結合之CD20-DOTAM BsAb (^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM)進行1步RIT。

【0168】圖60展示在注射CD20-DOTAM預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM或預先結合之 ^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM之後24小時負載腫瘤之SCID小鼠中 ^{212}Pb 之分佈。器官及組織中之放射性含量表示為平均% ID/g及標準偏差(SD；n=3)。

【0169】 圖61展示第A-G組之平均WSU-DLCL2皮下腫瘤生長，表現為 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ ($n = 10$)。

【0170】 圖62展示在多種治療之後小鼠體重之平均改變，表示為初始體重 $\% \pm \text{SEM}$ 。點線指示 ^{212}Pb 或抗體注射，視治療方案而定。

【實施方式】

定義

【0171】 出於本文之目的，「接受體人類構架」為包含來源於如以下所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架的輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10個或更少、9個或更少、8個或更少、7個或更少、6個或更少、5個或更少、4個或更少、3個或更少或2個或更少。在一些實施例中，VL接受體人類構架與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列在序列上一致。

【0172】 「親和力」係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和的強度。除非另外指明，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。可藉由此項技術中已知之常見方法(包括本文所述之方法)量測親和力。用於量測結合親和力之特定說明性及示例性實施例描述於下文中。

【0173】 「親和力成熟」抗體係指相較於在一或多個高變區(HVR)

中不具有一或多個變化之親本抗體，具有此類變化之抗體，此等變化使抗體對抗原之親和力得到改良。

【0174】 術語「抗Pb-DOTAM抗體」、「結合於Pb-DOTAM之抗體」、「結合於Pb-DOTAM螯合物之抗體」及同等術語係指能夠以足夠親和力結合Pb-DOTAM螯合物之抗體，其親和力使得該抗體可用於分選及/或純化方案中分離Pb-DOTAM標記部分，及/或使得該抗體能夠將Pb-DOTAM定位至抗體位點，例如以使Pb-DOTAM靶向細胞。術語「抗標靶抗體」及「結合於標靶之抗體」係指能夠以足夠親和力結合標靶之抗體，其親和力使得該抗體適用於涉及抗體定位至例如在細胞表面上表現之標靶治療及/或診斷應用。在一個實施例中，例如藉由放射免疫分析(RIA)，抗體與不相關部分及/或不相關標靶蛋白之結合程度小於抗體與Pb-DOTAM或標靶之結合的約10%。在某些實施例中，抗體對Pb-DOTAM及/或標靶之解離常數(Kd) $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更少、例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M 、例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。

【0175】 術語「抗體」在本文中以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段，只要抗體片段展現所需抗原結合活性即可。

【0176】 「抗體片段」係指不同於完整抗體，包含完整抗體之一部分，結合完整抗體所結合之抗原的分子。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0177】 與參考抗體「結合於相同抗原決定基之抗體」係指以下抗

體，其在競爭分析法中阻斷參考抗體與其抗原之結合達50%或更多，且反之，參考抗體在競爭分析法中阻斷該抗體與其抗原之結合達50%或更多。本文提供一種示例性競爭分析法。

【0178】 術語「嵌合」抗體係指重鏈及/或輕鏈之一部分來源於特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分來源於不同來源或物種之抗體。

【0179】 抗體之「類別」係指其重鏈所具有之恆定域或恆定區的類型。抗體存在五種主要類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且其中若干者可進一步分成亞類(同型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0180】 如本文所用，術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞之物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同位素(例如²²⁵Ac、²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、²¹³Bi、³²P、²¹²Pb及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、阿德力黴素(adriamicin)、長春花生物鹼(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊昔(etoposide))、小紅莓(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C (mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他插入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，諸如溶核酶；抗生素；毒素，諸如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體；以及以下所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。

【0181】 「效應子功能」係指可歸因於抗體之Fc區之生物活性，其

因抗體同型而異。抗體效應子功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細胞活化。

【0182】藥劑，例如醫藥調配物之「有效量」係指在所需劑量及時段下有效實現所需治療或預防結果之量。

【0183】在本文中，術語「Fc區」用於定義含有至少一部分恆定區之免疫球蛋白重鏈之C端區。該術語包括天然序列Fc區及變異Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基端。然而，Fc區之C端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另外說明，否則Fc區或恆定區中之胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統，亦稱為EU索引，如以下中所描述：Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991。

【0184】「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基外的可變域殘基。可變域之FR一般由四個FR結構域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列一般在VH (或VL)中按以下順序出現：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0185】術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用，係指結構實質上類似於天然抗體結構或具有含有如本文所定義之Fc區之重鏈的抗體。舉例而言，全長抗體可為IgG。

【0186】術語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之子代。宿主細胞包括「轉型體」及「轉型細胞」，其包括初級轉型細胞及自其衍生之子

代(不考慮繼代次數)。子代之核酸含量可與親本細胞不完全相同，而是可能含有突變。本文包括如針對原始轉型細胞進行篩選或選擇，具有相同功能或生物活性之突變子代。

【0187】 「人類抗體」為胺基酸序列與由人類或人類細胞產生或來源於利用人類抗體譜系或其他人類抗體編碼序列之非人類來源之抗體的胺基酸序列相對應的抗體。人類抗體之此定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

【0188】 「人類共同構架」為表示一系列人類免疫球蛋白VL或VH構架序列中最常出現之胺基酸殘基的構架。通常，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。一般而言，序列亞群為Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, NIH公開案91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷中之亞群。在一個實施例中，關於VL，亞群為如Kabat等人, 上文中之亞群κI。在一個實施例中，對於VH，亞群為如Kabat等人, 上文中之亞群III。

【0189】 「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變結構域之實質上全部，其中HVR (例如CDR)之全部或實質上全部對應於非人類抗體，且FR之全部或實質上全部對應於人類抗體。人類化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區之至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

【0190】 如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中序列高變(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成結構上定義環(「高變

環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原觸點」)之各個區域。一般而言，抗體包含六個HVR：三個在VH (H1、H2、H3)中，且三個在VL (L1、L2、L3)中。示例性HVR包括：

(a)出現在胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處之高變環(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))；

(b)出現在胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處之CDR (Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

(c)出現在胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處之抗原觸點(MacCallum等人 *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))；及

(d)(a)、(b)及/或(c)之組合，包括HVR胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

【0191】 代替以上，如本文所述之CDR-H1之序列可自Kabat26延伸至Kabat35。

【0192】 在一個實施例中，HVR或CDR殘基包含表2中或本說明書中其他地方鑑別的HVR或CDR殘基。

【0193】 除非另外指示，否則在本文中，根據Kabat等人，上文對可變域中之HVR/CDR殘基及其他殘基(例如FR殘基)進行編號。

【0194】 「免疫結合物」係抗體與一或多個異源分子，包括(但不限

於)細胞毒性劑之結合物。

【0195】 「個體(individual)」或「個體(subject)」係哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家養動物(例如牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、家兔及嚙齒動物(例如小鼠及大鼠)。在某些實施例中，該個體為人類。

【0196】 如本文所述之分子可「經分離」。「經分離」抗體為已與其天然環境之組分分離之抗體。在一些實施例中，如藉由例如電泳(例如 SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電泳)或層析(例如離子交換或逆相 HPLC)所測定，抗體純化至大於95%或99%之純度。關於抗體純度評估方法之綜述，參見例如Flatman等人, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

【0197】 術語「核酸分子」或「多核苷酸」包括含核苷酸聚合物之任何化合物及/或物質。各核苷酸由鹼基、特別嘌呤或嘧啶鹼基(亦即胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(亦即去氧核糖或核糖)及磷酸酯基構成。通常，核酸分子係用鹼基序列描述，由此該等鹼基表示核酸分子之一級結構(線性結構)。鹼基序列通常係自5'至3'表示。在本文中，術語核酸分子涵蓋去氧核糖核酸(DNA)，包括例如互補DNA (cDNA)及基因組DNA；核糖核酸(RNA)，特別是信使RNA (mRNA)；DNA或RNA之合成形式；及包含兩個或兩個以上此等分子之混合聚合物。核酸分子可以為線性或環形的。此外，術語核酸分子包括有義股及反義股，以及單股及雙股形式。另外，本文中描述之核酸分子可以含有天然存在或非天然存在之核苷酸。非天然存在之核苷酸之實例包括帶有衍生化糖或磷酸酯主鏈鍵聯或化學修飾之殘基的經修飾核苷酸鹼基。核酸分子亦涵蓋適用作載體以在活體外及/或活體內，例如在宿主或患者中直

接表現本發明抗體的DNA及RNA分子。此類DNA (例如cDNA)或RNA (例如mRNA)載體可為未修飾或經修飾的。舉例而言，mRNA可經化學修飾以增強RNA載體之穩定性及/或增加編碼分子之表現，由此可將mRNA注射至受試者體內以在活體內產生抗體(參見例如Stadler等人, Nature Medicine 2017, 2017年6月12日線上公開, doi:10.1038/nm.4356或EP 2 101 823 B1)。

【0198】 「經分離核酸」係指已與其天然環境之組分分離之核酸分子。經分離核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置。

【0199】 「編碼抗體之經分離核酸」係指編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之一或多種核酸分子，包括單一載體或分開載體中之此類核酸分子及存在於宿主細胞中之一或多個位置處之此類核酸分子。

【0200】 如本文所用，術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體之群體獲得的抗體，亦即除了可能變異抗體，例如含有天然存在之突變或在單株抗體製劑產生期間出現的突變，構成該群體之個別抗體一致及/或結合相同抗原決定基，此類變異體一般少量存在。相比於通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵係自實質上均質之抗體群體獲得，且不應視為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可藉由多種技術製得，包括(但不限於)融合瘤方法、重組DNA方法、噬菌體呈現方法及利用含有所有或部分人類免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物的方法，此類方法及其他製備單株抗體之例示性方法在本文中描述。

【0201】 「裸抗體」係指未與異源部分(例如細胞毒性部分)或放射性標記結合之抗體。裸抗體可存在於醫藥調配物中。

【0202】 「天然抗體」係指具有不同結構之天然存在之免疫球蛋白分子。舉例而言，天然IgG抗體為約150,000道爾頓(dalton)之雜四聚體醣蛋白，其由經二硫鍵鍵結之兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈構成。自N端至C端，各重鏈具有可變區(VH)，亦稱為可變重鏈域或重鏈可變域，接著為三個恆定域(CH1、CH2及CH3)。類似地，自N端至C端，各輕鏈具有可變區(VL)，亦稱為可變輕鏈域或輕鏈可變域，接著為恆定輕鏈(CL)域。抗體之輕鏈可基於其恆定域之胺基酸序列歸為兩種類型中之一種，稱為 κ 及 λ 。

【0203】 術語「藥品說明書」用以指通常包括於治療性產品之商業包裝中的說明書，其含有關於與使用此類治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、組合療法、禁忌症及/或警告的資訊。

【0204】 相對於參考多肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對參考多肽序列與候選序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，且在不將保守性取代視為序列一致性之一部分之情況下，候選序列中與參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分比。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的進行的比對可以用在此項技術之技能範圍內的各種方式達成，例如使用公開可用之電腦軟體，如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長內達成最大比對所需的任何算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式由

Genentech, Inc. 撰寫，且原始程式碼已在U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559申請用戶文檔，其在U.S. Copyright Office以美國版權註冊第TXU510087號註冊。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可自原始程式碼編寫。ALIGN-2程式應經編寫可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變化。

【0205】 在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，既定胺基酸序列A相對於、與或針對既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性% (或者其可表述為，既定胺基酸序列A具有或包含相對於、與或針對既定胺基酸序列B的一定胺基酸序列一致性%)如下計算：

100乘以分數X/Y

其中X為在A與B之比對程式中藉由序列比對程程式ALIGN-2評分為一致匹配之胺基酸殘基數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%與B相對於A之胺基酸序列一致性%將不相等。除非另外特定陳述，否則本文所使用之所有胺基酸序列一致性%值如剛剛前段中所描述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

【0206】 術語「醫藥調配物」係指所呈形式允許其中所含活性成分之生物活性有效發揮，且不含對調配物將投與之個體具有不可接受毒性之其他組分的製劑。

【0207】 「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分外之對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

【0208】如本文所用，「治療(treatment)」(及其語法變化形式，諸如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指試圖改變所治療個體之自然病程的臨床介入且可出於防治目的或在臨床病理學之病程期間進行。所需治療作用包括(但不限於)預防疾病發生或復發、緩解症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理性結果、預防癌轉移、減緩疾病進展速率、改善或緩和疾病病況及緩解或改良預後。在一些實施例中，本發明之抗體用於延遲疾病發生或減慢疾病進展。

【0209】術語「可變區」或「可變域」係指涉及抗體與抗原之結合之抗體重鏈或輕鏈結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)可變域一般具有類似結構，其中各結構域均包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。(參見例如Kindt等人 *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91頁 (2007).)單一VH或VL結構域可足以賦予抗原結合特異性。此外，可使用來自結合抗原之抗體的VH或VL結構域分離結合特定抗原之抗體以分別篩選互補VL或VH結構域之文庫。參見例如Portolano等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

【0210】如本文所用，術語「載體」係指一種核酸分子，其能夠傳送其所連接之另一核酸。該術語包括呈自我複製核酸結構之載體以及併入已引入其之宿主細胞之基因組中的載體。某些載體能夠引導其可操作地連接之核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

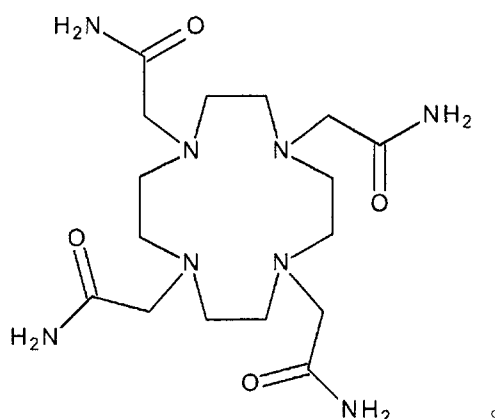
【0211】如本文所用，術語「Pb」或「鉛」包括其離子，例如Pb(II)。因此，熟習此項技術之讀者瞭解例如術語鉛、Pb、²¹²Pb或²⁰³Pb意欲涵蓋該元素之離子形式，尤其Pb(II)。在本發明之多種態樣中，Pb可

為放射性同位素(例如當用於放射免疫療法或放射免疫成像之方法中時)或可為穩定的非放射性同位素(例如如在清除劑之情況下可為較佳)。

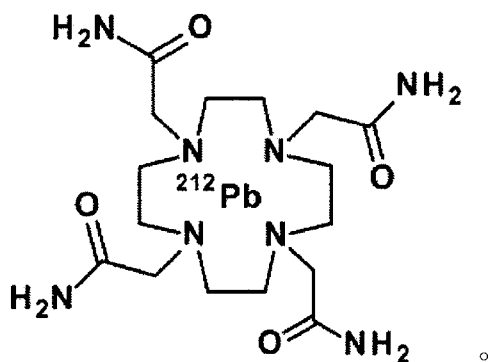
【0212】 「DOTAM」具有化學名稱：

1,4,7,10-肆(胺甲醯基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷

其為下式化合物：

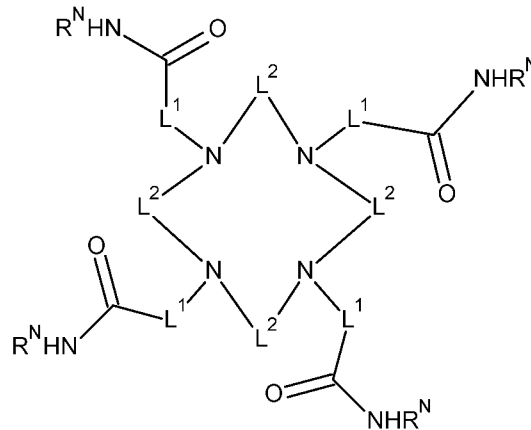


【0213】 ²¹²Pb-DOTAM具有以下結構：



【0214】 在某些態樣及實施例中，本發明亦可利用併入金屬離子的DOTAM之功能變異體或衍生物。DOTAM之合適變異體/衍生物具有在一定有限程度上與DOTAM之結構不同的結構且保留發揮功能之能力(亦即保留足夠活性以用於達成本文所述之一或多個目的)。在此等態樣及實施例中，DOTAM或DOTAM之功能變異體/衍生物可為WO 2010/099536中所揭示之活性變異體之一。

【0215】 合適功能變異體/衍生物可為下式化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽；其中

R^N 為 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 鹵烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} -烷基、 C_{1-7} 雜芳基及 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} -烷基；其中 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 鹵烷基、 C_{2-6} 烯基及 C_{2-6} 炔基各視情況經 1、2、3 或 4 個獨立選擇之 R^w 基團取代；且其中該 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} -烷基、 C_{1-7} 雜芳基及 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} -烷基各視情況經 1、2、3 或 4 個獨立選擇之 R^x 基團取代；

L^1 獨立地為 C_{1-6} 伸烷基、 C_{1-6} 伸烯基或 C_{1-6} 伸炔基，各視情況經 1、2 或 3 個獨立選擇之 R^1 基團取代；

L^2 為 C_{2-4} 直鏈伸烷基，其視情況經獨立選擇之 R^1 基團取代；且其視情況經 1、2、3 或 4 個獨立地選自 C_{1-4} 烷基及或 C_{1-4} 鹵烷基之基團取代；

R^1 獨立地選自 D^1 - D^2 - D^3 、鹵素、氰基、硝基、羥基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 鹵烷氧基、 C_{1-6} 烷基硫基、 C_{1-6} 烷基亞磺基、 C_{1-6} 烷基磺基、胺基、 C_{1-6} 烷基胺基、二 C_{1-6} 烷基胺基、 C_{1-4} 烷基羰基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、 C_{1-6} 烷基羰基胺基、二 C_{1-6} 烷基羰基胺基、 C_{1-6} 烷氧基羰基胺基、 C_{1-6}

烷氧基羰基-(C₁₋₆烷基)胺基、胺甲醯基、C₁₋₆烷基胺甲醯基及二C₁₋₆烷基胺甲醯基；

各D¹獨立地選自C₆₋₁₀芳基-C₁₋₄烷基、C₁₋₉雜芳基-C₁₋₄烷基、C₃₋₁₀環烷基-C₁₋₄烷基、C₂₋₉雜環烷基-C₁₋₄烷基、C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸烯基及C₁₋₈伸炔基；其中該C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸烯基及C₁₋₈伸炔基視情況經1、2、3或4個獨立選擇之R⁴基團取代；且其中該C₆₋₁₀芳基-C₁₋₄烷基、C₁₋₉雜芳基-C₁₋₄烷基、C₃₋₁₀環烷基-C₁₋₄烷基、C₂₋₉雜環烷基-C₁₋₄烷基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之R⁵基團取代；

各D²獨立地不存在或為C₁₋₂₀直鏈伸烷基，其中該C₁₋₂₀直鏈伸烷基之1至6個非相鄰亞甲基各視情況經獨立選擇之-D⁴-部分置換，其限制條件為該C₁₋₂₀直鏈伸烷基為中之至少一個亞甲基單元不視情況經-D⁴-部分置換；其中該C₁₋₂₀直鏈伸烷基視情況經一或多個獨立地選自之基團取代：鹵素、氰基、硝基、羥基、C₁₋₄烷基、C₁₋₄鹵烷基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄鹵烷氧基、胺基、C₁₋₄烷基胺基、二C₁₋₄烷基胺基、C₁₋₄烷基羰基、羧基、C₁₋₄烷氧基羰基、C₁₋₄烷基羰基胺基、二C₁₋₄烷基羰基胺基、C₁₋₄烷氧基羰基胺基、C₁₋₄烷氧基羰基-(C₁₋₄烷基)胺基、胺甲醯基、C₁₋₄烷基胺甲醯基及二C₁₋₄烷基胺甲醯基；

各D³獨立地選自H、鹵素、氰基、硝基、羥基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆鹵烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₄環烷基、C₃₋₁₄環烷基-C₁₋₄烷基、C₂₋₁₄雜環烷基、C₂₋₁₄雜環烷基-C₁₋₄烷基、C₆₋₁₄芳基、C₆₋₁₄芳基-C₁₋₄烷基、C₁₋₁₃雜芳基、C₁₋₁₃雜芳基-C₁₋₄烷基；其中該C₁₋₆烷基、C₁₋₆鹵烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之R⁶基團取代；且其中該C₃₋₁₄環烷基、C₃₋₁₄環烷基-C₁₋₄烷基、C₂₋₁₄雜環烷基、C₂₋₁₄雜環烷基-C₁₋₄烷

基、C₆₋₁₄芳基、C₆₋₁₄芳基-C₁₋₄烷基、C₁₋₁₃雜芳基、C₁₋₁₃雜芳基-C₁₋₄烷基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之R⁷基團取代；

各D⁴獨立地選自-O-、-S-、-NR^aC(=O)-、-NR^aC(=S)-、-NR^bC(=O)NR^c-、-NR^bC(=S)NR^c-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-S(=O)NR^a-、-C(=O)-、-C(=S)-、-C(=O)O-、-OC(=O)NR^a-、-OC(=S)NR^a-、-NR^a-、-NR^bS(=O)NR^c-及NR^bS(=O)₂NR^o-；

各R⁴及R⁶獨立地選自鹵素、氰基、硝基、羥基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄鹵烷氧基、C₁₋₄烷基硫基、C₁₋₄烷基亞磺醯基、C₁₋₄烷基磺醯基、胺基、C₁₋₄烷基胺基、二C₁₋₄烷基胺基、C₁₋₄烷基羰基、羧基、C₁₋₄烷氧基羰基、C₁₋₄烷基羰基胺基、二C₁₋₄烷基羰基胺基、C₁₋₄烷氧基羰基胺基、C₁₋₄烷氧基羰基-(C₁₋₄烷基)胺基、胺甲醯基、C₁₋₄烷基胺甲醯基及二C₁₋₄烷基胺甲醯基；

各R⁵獨立地選自鹵素、氰基、氰酸酯、異硫氰酸酯、硝基、羥基、C₁₋₄烷基、C₂₋₄烯基、C₂₋₄炔基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄鹵烷氧基、C₁₋₄烷基硫基、C₁₋₄烷基亞磺醯基、C₁₋₄烷基磺醯基、胺基、C₁₋₄烷基胺基、二C₁₋₄烷基胺基、C₁₋₄烷基羰基、羧基、C₁₋₄烷氧基羰基、C₁₋₄烷基羰基胺基、二C₁₋₄烷基羰基胺基、C₁₋₄烷氧基羰基胺基、C₁₋₄烷氧基羰基-(C₁₋₄烷基)胺基、胺甲醯基、C₁₋₄烷基胺甲醯基及二C₁₋₄烷基胺甲醯基；

各R⁷獨立地選自鹵素、氰基、硝基、羥基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₇環烷基、C₃₋₇環烷基-C₁₋₄烷基、C₂₋₇雜環烷基、C₂₋₇雜環烷基-C₁₋₄烷基、苯基、苯基-C₁₋₄烷基、C₁₋₇雜芳基、C₁₋₇雜芳基-C₁₋₄烷基、-OR^o、-SR^o、-S(=O)R^p、-S(=O)₂R^p、-S(=O)NR^sR^t、-C(=O)R^p、-C(=O)OR^p、-C(=O)NR^sR^t、-OC(=O)R^p、-OC(=O)NR^sR^t、-NR^sR^t、-NR^qC(=O)R^r、-NR^qC(=O)OR^r、NR^qC(=O)NR^r、-NR^qS(=O)₂R^r及-

$\text{NR}^p\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^s\text{R}^t$ ；其中該 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之 R' 基團取代；且其中該 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} 烷基、 C_{1-7} 雜芳基、 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} 烷基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之 R'' 基團取代；

各 R^a 、 R^b 及 R^c 獨立地選自 H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 鹵烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} 烷基、 C_{1-7} 雜芳基、 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} 烷基；其中該 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 鹵烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之 R^w 基團取代；且其中該 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} 烷基、 C_{1-7} 雜芳基、 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} 烷基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之 R^x 基團取代；

各 R^o 、 R^p 、 R^q 、 R^r 、 R^s 及 R^t 獨立地選自 H 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 鹵烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} 烷基、 C_{1-7} 雜芳基、 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} 烷基；其中該 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 鹵烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之 R^y 基團取代；且其中該 C_{3-7} 環烷基、 C_{3-7} 環烷基- C_{1-4} 烷基、 C_{2-7} 雜環烷基、 C_{2-7} 雜環烷基- C_{1-4} 烷基、苯基、苯基- C_{1-4} 烷基、 C_{1-7} 雜芳基、 C_{1-7} 雜芳基- C_{1-4} 烷基各視情況經1、2、3或4個獨立選擇之 R^z 基團取代；

各 R' 、 R^w 及 R^y 獨立地選自羥基、氰基、硝基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 鹵烷氧基、胺基、 C_{1-4} 烷基胺基及二 C_{1-4} 烷基胺基；且

各 R'' 、 R^x 及 R^z 獨立地選自羥基、鹵素、氰基、硝基、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4}

鹵烷基、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄鹵烷氧基、胺基、C₁₋₄烷基胺基及二C₁₋₄烷基胺基；

其限制條件為不超出視情況經取代之部分中各原子之價數。

【0216】適當地，上式之功能變異體/衍生物對本發明之抗體之親和力與DOTAM相當或超過DOTAM，且對Pb之結合強度與DOTAM相當或超過DOTAM（「親和力」如藉由解離常數如上所述來量測）。舉例而言，功能性/變異體衍生物與本發明之抗體或/Pb的解離常數可為DOTAM與相同抗體/Pb之解離常數的1.1倍或更少、1.2倍或更少、1.3倍或更少、1.4倍或更少、1.5倍或更少或2倍或更少。

【0217】各R^N可為H、C₁₋₆烷基或C₁₋₆鹵烷基；較佳H、C₁₋₄烷基或C₁₋₄鹵烷基。更佳，各R^N為H。

【0218】對於DOTAM變異體，較佳地，1個、2個、3個或最佳每個L²為C₂伸烷基。有利地，DOTAM之C₂伸烷基變異體可對Pb具有尤其高之親和力。L²之視情況選用之取代基可為R¹、C₁₋₄烷基或C₁₋₄鹵烷基。適當地，L²之視情況選用之取代基可為C₁₋₄烷基或C₁₋₄鹵烷基。

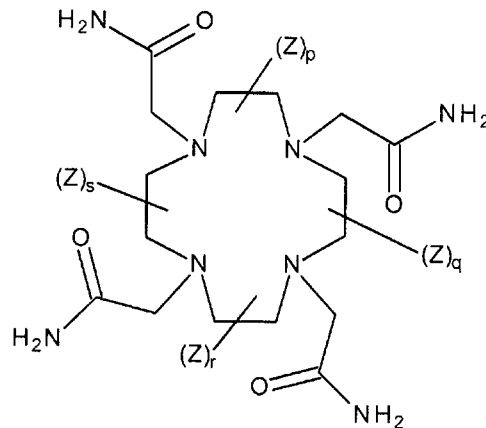
【0219】視情況，各L²可為未經取代之C₂伸烷基-CH₂CH₂-。

【0220】各L¹較佳為C₁₋₄伸烷基，更佳為C₁伸烷基，諸如-CH₂-。

【0221】功能變異體/衍生物亦可包括DOTAM或如上所述之化合物與一或多種其他部分，例如小分子、多肽或碳水化合物的結合物。此附接可經由巨環骨架中之一個碳進行。小分子可為例如染料(諸如Alexa 647或Alexa 488)、生物素或生物素部分。多肽可為例如寡肽，例如治療性肽或多肽，諸如抗體。例示性碳水化合物包括聚葡萄糖、直鏈或分支鏈聚合物或共聚物(例如聚伸烷基、聚(伸乙基-離胺酸)、聚甲基丙烯酸酯、聚胺基

酸、多醣或寡醣、樹枝狀聚合物)。

【0222】 DOTAM之功能變異體/衍生物可為下式化合物：



其中各Z獨立地為如上所定義之 R^1 ；p、q、r及s為0、1或2；且 $p+q+r+s$ 為1或更大。較佳地，p、q、r及s為0或1及/或 $p+q+r+s$ 為1。舉例而言，化合物可具有 $p+q+r+s=1$ ，其中Z為對SCN-苯甲基部分，此類化合物可購自Macrocyclics, Inc. (Plano, Texas)。

組合物及方法

抗體

【0223】 在一個態樣中，本發明部分地基於特異性結合於Pb-DOTAM (亦即，包含DOTAM與Pb錯合之螯合物，在本文中亦稱為「Pb-DOTAM螯合物」)之抗體的提供。

【0224】 在某些實施例中，特異性結合於Pb-DOTAM之抗體可具有以下特性中之一或多者：

- 特異性結合於Pb-DOTAM及Bi-DOTAM；
- 與諸如Cu-DOTAM之其他螯合金屬相比對Pb-DOTAM具選擇性；
- 以極高親和力結合於Pb-DOTAM；
- 結合於Pb-DOTAM上與本文所述之抗體，例如PRIT-0213或PRIT-0214所結合相同之抗原決定基，及/或具有與該抗體相同之接觸殘基。

【0225】 Pb之放射性同位素可用於診斷及療法之方法中。可用於本發明中之鉛之特定放射性同位素包括 ^{212}Pb 及 ^{203}Pb 。鉛之穩定同位素亦可用於清除劑中，例如 ^{204}Pb 、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb 或 ^{208}Pb 。Pb可為天然存在之鉛，其為穩定(非放射性)同位素 ^{204}Pb 、 ^{206}Pb 、 ^{207}Pb 及 ^{208}Pb 之混合物。

【0226】 因為短路徑長度與高線性能量傳遞之組合，作為 α -粒子發射體之放射核種能夠比 β -發射體更特定地殺死腫瘤細胞，且對周圍組織之損傷更小。 212 為 α -粒子發射體，但其半衰期短妨礙其直接使用。 ^{212}Pb 為 ^{212}Bi 之母放射核種且可充當 ^{212}Bi 之活體內產生劑，藉此有效地克服 ^{212}Bi 之短半衰期(Yong及Brechtel, Dalton Trans. 2001年6月21日；40(23)6068-6076)。

【0227】 ^{203}Pb 適用作成像同位素。因此，結合於 ^{203}Pb -DOTAM之抗體可用於放射免疫成像(RII)。

【0228】 一般而言，放射性金屬呈螯合形式使用。在本發明之態樣中，DOTAM用作螯合物。DOTAM為Pb(II)之穩定螯合物(Yong及Brechtel, Dalton Trans. 2001年6月21日；40(23)6068-6076；Chappell等人 Nuclear Medicine and Biology, 第27卷, 第93-100頁, 2000)。因此，DOTAM特別適於與如上文所論述之鉛同位素，諸如 ^{212}Pb 及 ^{203}Pb 結合使用。

【0229】 如上文所論述，根據本發明之抗體結合於Pb-DOTAM。在一些實施例中，較佳地，抗體以100 pM、50 pM、20 pM、10 pM、5 pM、1 pM或更少，例如0.9 pM或更少、0.8 pM或更少、0.7 pM或更少、0.6 pM或更少或0.5 pM或更少之結合親和力的Kd值結合Pb-DOTAM。

【0230】 抗體另外結合於由DOTAM螯合之Bi。在一些實施例中，

較佳地，抗體以1 nM、500 pM、200 pM、100 pM、50 pM、10 pM或更少，例如9 pM、8 pM、7 pM、6 pM、5 pM或更少之結合親和力的Kd值結合Bi-DOTAM (亦即，包含DOTAM與鉍錯合之螯合物，本文中亦稱為「Bi-DOTAM螯合物」)。

【0231】 在一些實施例中，抗體可以類似親和力結合於Bi-DOTAM及Pb-DOTAM。舉例而言，較佳地，對Bi-DOTAM/Pb-DOTAM之親和力之比率，例如Kd值之比率，在0.1-10，例如1-10之範圍內。

【0232】 下文提供根據本發明之例示性抗體(PRIT-0213)之樣品親和力值：

CEA-DOTAM BsAb之金屬-DOTAM螯合物親和力

抗原	KD [pM]	95% CI[pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Bi-DOTAM	5.7	4.6-6.2
Cu-DOTAM	122000	60000 - 206000

【0233】 藉由KinExA平衡量測來確定親和力。

【0234】 此外，與諸如Cu-DOTAM之其他螯合金屬相比，本發明之抗體較佳對Bi-DOTAM及/或Pb-DOTAM具選擇性。舉例而言，對Pb-DOTAM/Cu-DOTAM之親和力之比率，例如Kd值之比率，可為至少100,000。

【0235】 在一些實施例中，較佳地，抗體結合於Pb-DOTAM及/或Bi-DOTAM的親和力(例如親和力之Kd值)等於或大於如下雙特異性抗體(本文中稱為PRIT-0213)，所述雙特異性抗體具有：

i)具有SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之第一重鏈；

- ii)具有SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之第二重鏈；以及
- iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0236】 在一些實施例中，較佳地，抗體結合於DOTAM螯合之Pb及/或DOTAM螯合之Bi的親和力(例如親和力之KD值)等於或大於如下雙特異性抗體(本文中稱為PRIT-0214)，所述雙特異性抗體具有：

- i)具有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之第一重鏈；
- ii)具有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之第二重鏈；以及
- iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0237】 在一些實施例中，根據本發明之抗體結合於螯合型放射核種之與本文所揭示之抗體所結合相同之抗原決定基或重疊之抗原決定基。

【0238】 在一些實施例中，抗體結合於Pb-DOTAM螯合物(Pb-DOTAM)之與如下Fab PRIT-0213所結合相同之抗原決定基或重疊之抗原決定基：

- i)具有SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之第一重鏈；
- ii)具有SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之第二重鏈；以及
- iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0239】 可確定由既定抗體結合之螯合型放射核種(例如Pb-DOTAM)之抗原決定基，且此可與由本文所揭示之抗體(例如Fab PRIT-0213)結合的螯合型放射核種之抗原決定基相比。

【0240】 本發明在實例14描述基於在1.40Å解析度下測定Fab PRIT-0213與Pb-DOTAM之複合物的晶體結構和使用蛋白質界面表面及組件(PISA)程式(Krissinel及Henrick, J Mol Biol (2007) 372(3):774-97)分析此結構，對Fab PRIT-0213與Pb-DOTAM之間的結合相互作用之表徵。

【0241】 在一些實施例中，例如如藉由抗體與Pb-DOTAM之複合物之結構的PISA分析所測定，根據本發明之抗體可顯示關於與Pb-DOTAM之以下位點中之一或多者的相互作用：在氮雜環十二烷環(例如四環十二烷環)下方之與氮雜環十二烷環之邊對面、N6、N7、N8、N5及/或C12。在一些實施例中，抗體可顯示與關於Pb-DOTAM之以下位點中之一或多者的相互作用：N7、N8、與氮雜環十二烷環之邊對面、四環十二烷環及/或N6。

【0242】 在一些實施例中，例如如藉由抗體與Pb-DOTAM之複合物之結構的PISA分析所測定，抗體可顯示與關於Pb-DOTAM之以下相互作用中之一或多者：與氮雜環十二烷環之邊對面的非極性相互作用、與N8之極性相互作用、與N7之氫鍵、與N8之氫鍵、與N5之極性相互作用、與C12之非極性相互作用、與N7之極性相互作用、與N6之極性(氫)鍵及/或與四環十二烷環之非極性相互作用。

【0243】 在一些實施例中，例如如藉由抗體與Pb-DOTAM之複合物之結構的PISA分析所測定，抗體可顯示與關於Pb-DOTAM之以下相互作用中之一或多者：抗體重鏈CDR3之一或多個殘基與N7之間的氫鍵、抗體重鏈CDR3之一或多個殘基與N8之間的氫鍵、抗體重鏈CDR2之一或多個殘基與氮雜環十二烷環之邊對面的非極性相互作用、抗體輕鏈CDR3與四環十二烷環之間的非極性相互作用及/或抗體輕鏈CDR1與N6之間的非極性相互作用。

【0244】 在其他實施例中，抗體可享有與本文所述相同之接觸殘基：例如此等殘基可不變。此等殘基可包括以下：

a)重鏈CDR2中：Phe50、Asp56及/或Tyr58，以及視情況Gly52及/或

Arg 54 ;

b)重鏈CDR3中：Glu95、Arg96、Asp97、Pro98、Tyr99、Ala100C及/或Tyr100D以及視情況Pro100E；

c)輕鏈CDR1中：Tyr28及/或Asp32；

d)輕鏈CDR3中：Gly91、Tyr92、Asp93、Thr95c及/或Tyr96；

e)輕鏈CDR2中：視情況Gln50。

【0245】 上問論述根據本發明之抗體之某些態樣及實施例。以下論述根據本發明之其他合適態樣及實施例。在所有實施例中，抗體保留結合Pb-DOTAM且較佳亦結合Bi-DOTAM，更佳具有如上文所論述之親和力及/或選擇性的能力。

【0246】 在一個實施例中，本發明可提供一種抗Pb-DOTAM抗體，其包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下之CDR：(a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3。

【0247】 在一個實施例中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下之VH CDR序列：(a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3。在一個實施例中，抗體包括包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3。在另一實施例中，抗體包括包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3及包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3。在另一實施例中，抗體包括包含SEQ

ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3、包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3及包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2。在另一實施例中，抗體包括包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3、包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3、包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2及包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1。在另一實施例中，抗體包括(a)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3。

【0248】 在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下之VL CDR序列：(a)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3。在一個實施例中，抗體包括(a)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3。

【0249】 在另一態樣中，本發明之抗體包括：(a)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自(i)包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3的VH CDR序列；以及(b)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自(i)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-L2及(c)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3的VL CDR序列。

【0250】 在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包括：(a)包含

SEQ ID NO:1之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO:3之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1；(e)(ii)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3。

【0251】 在一些實施例中，抗體可包含分別與SEQ ID NO: 1-6之胺基酸序列相比具有取代，例如1、2或3個取代之CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2及/或CDR-L3中之一或多者。較佳地，此等取代不發生在如上文所述之不變位置。

【0252】 舉例而言，在一些實施例中，CDR-H2可包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)或在SEQ ID NO: 2中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Phe50、Asp56及/或Tyr58，且視情況亦不包括Gly52及/或Arg54，所有均根據Kabat編號。

【0253】 在一些實施例中，CDR-H2可在如下文所示之一或多個位置經取代。此處及隨後取代表中，取代係基於生殖系殘基(帶下劃線)或經理論上在空間上配合且在結晶譜系中在位點處存在的胺基酸取代。在一些實施例中，如上文所提及之殘基可固定且其他殘基可根據下表經取代；在其他實施例中，任何殘基之取代可根據下表進行。

WolfGuy	Kabat	AA	取代
251	50	F	<u>Y</u> 、 <u>H</u>
252	51	I	
253	52	G	
254	53	S	<u>A</u> 、 <u>G</u> 、 <u>T</u> 、 <u>I</u> 、 <u>N</u>
288	54	R	<u>A</u> 、 <u>D</u> 、 <u>G</u> 、 <u>N</u> 、 <u>S</u> 、 <u>T</u> 、 <u>F</u> 、 <u>Y</u>
289	55	G	<u>D</u> 、 <u>S</u> 、 <u>Y</u> 、 <u>T</u> 、 <u>A</u> 、 <u>N</u> 、 <u>R</u> 、 <u>V</u>
290	56	D	
291	57	T	<u>K</u> 、 <u>I</u> 、 <u>A</u> 、 <u>P</u> 、 <u>S</u>
292	58	Y	<u>F</u> 、 <u>W</u> 、 <u>H</u>
293	59	Y	<u>N</u> 、 <u>F</u> 、 <u>H</u> 、 <u>L</u> 、 <u>S</u>

294	60	A	<u>G</u> 、 <u>N</u> 、 <u>S</u> 、 <u>T</u>
295	61	S	<u>A</u> 、 <u>G</u> 、 <u>N</u> 、 <u>Q</u> 、 <u>T</u>
296	62	W	<u>K</u> 、 <u>P</u> 、 <u>S</u> 、A、T、D、N、R、Q
297	63	A	<u>F</u> 、 <u>L</u> 、 <u>V</u> 、M、I
298	64	K	<u>N</u> 、 <u>Q</u> 、R、E
299	65	G	<u>S</u> 、 <u>T</u> 、D、N、A

【0254】視情況，CDR-H3可包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)，或在SEQ ID NO: 3中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Glu95、Arg96、Asp97、Pro98，且視情況亦不包括Ala100C、Tyr100D及/或Pro100E及/或視情況亦不包括Tyr99。舉例而言，在一些實施例中，取代不包括Glu95、Arg96、Asp97、Pro98、Tyr99、Ala100C及Tyr100D。

【0255】在某些實施例中，CDR-H3可在如下文所示之一或多個位置經取代。在一些實施例中，如上文所提及之殘基可固定且其他殘基可根據下表經取代；在其他實施例中，任何殘基之取代可根據下表進行。

WolfGuy	Kabat	AA	取代
351	95	E	
352	96	R	K、E
353	97	D	
354	98	P	
355	99	Y	F、G、S、T、D
356	100	G	
392	100A	G	
393	100B	G	
394	100C	A	S、T
395	100D	Y	F
396	100E	P	
397	100F	P	
398	101	H	A、T、V、D
399	102	L	Y、V、I、H、F

【0256】視情況，CDR-L1可包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)或在SEQ ID NO: 4中具有至多1、2或3個取代之其變異

體，其中此等取代不包括Tyr28及/或Asp32 (Kabat編號)。

【0257】 在某些實施例中，CDR-L1可在如下文所示之一或多個位置經取代。再次，在一些實施例中，如上文所提及之殘基可固定且其他殘基可根據下表經取代：在其他實施例中，任何殘基之取代可根據下表進行。

WolfGuy	Kabat	AA	取代
551	24	Q	<u>R</u> 、 <u>K</u>
552	25	S	<u>A</u> 、 <u>G</u>
554	26	S	<u>T</u>
555	27	H	<u>Q</u> 、 <u>S</u> 、R、K
556	27A	S	Q
557	27B	V	<u>I</u> 、 <u>D</u> 、 <u>N</u>
561	28	Y	F
562	29	S	T、 <u>V</u>
571	30	D	<u>R</u> 、 <u>S</u> 、 <u>N</u> 、 <u>G</u>
572	31	N	K
597	32	D	
598	33	L	<u>I</u> 、 <u>V</u> 、 <u>M</u>
599	34	A	<u>S</u>

【0258】 視情況，CDR-L3可包含胺基酸序列LGGYDDESDTYG (SEQ ID NO:6)或在SEQ ID NO: 6中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Gly91、Tyr92、Asp93、Thr95c及/或Tyr96 (Kabat)。

【0259】 在某些實施例中，CDR-L3可在如下文所示之以下位置經取代。(因為大部分殘基暴露於溶劑且不接觸抗原，所以可設想許多取代)。再次，在一些實施例中，如上文所提及之殘基可固定且其他殘基可根據下表經取代：在其他實施例中，任何殘基之取代可根據下表進行。

WolfGuy	Kabat	AA	取代
751	89	L	A、V、Q
752	90	G	A
753	91	G	

754	92	Y	A、D、E、F、G、H、I、K、L、N、 Q、R、S、T、V
755	93	D	A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、 Q、R、S、T、V、W、Y
756	94	D	A、E、F、G、H、I、K、L、M、N、 Q、R、S、T、V、W、Y
794	95	E	A、D、F、G、H、I、K、L、M、N、 Q、R、S、T、V、W、Y
795	95A	S	A、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、 R、T、V、W、Y
796	95B	D	A、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、 S、T、V、W、Y
797	95C	T	S
798	96	Y	F、H、R
799	97	G	A、E、I、K、L、M、N、Q、S、T、V

【0260】 抗體可進一步包含視情況分別具有SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 5之序列之CDR-H1及CDR-L2，或相對於SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 5具有至多1、2或3個取代，視情況保守取代之其變異體

【0261】 在以上實施例中之任一種中，抗Pb-DOTAM抗體可人類化。在一個實施例中，抗Pb-DOTAM抗體包含如以上任一實施例中之CDR，且進一步包含接受者人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架序列。在另一實施例中，抗Pb-DOTAM抗體包含如以上任一實施例中之CDR，且進一步包含來源於vk 1 39及/或vh 2 26之構架區。對於vk 1 39，在一些實施例中，可無回復突變。對於vh 2 26，生殖系Ala49殘基可回復突變成Gly49。

【0262】 視情況，抗原結合位點可包括包含選自由SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO 9組成之群之胺基酸序列的重鏈可變域(VH)或包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。在某些實施例

中，相對於參考序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗體保留與Pb-DOTAM結合之能力，較佳具有如上所述之親和力。VH序列可保留如上所述之不變殘基。在某些實施例中，SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO 9中總共1至10個胺基酸取代、插入或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在CDR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，抗體包含SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9中之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VH包含一個、兩個或三個選自以下之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列之CDR-H3。

【0263】 在另一態樣中，提供一種抗Pb-DOTAM抗體，其中該抗體包含具有與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，相對於參考序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗體保留與Pb-DOTAM結合之能力，較佳具有如上所述之親和力。VL序列可保留如上文所述之不變殘基。在某些實施例中，SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO 10中總共1至10個胺基酸取代、插入或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在CDR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，抗Pb-DOTAM抗體包含SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10中之VL序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VL包含一個、兩個或三個選自以

下之CDR：(a)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之CDR-L3。

【0264】在另一個態樣中，提供一種抗-Pb-DOTAM抗體，其中該抗體包含如以上提供之任一實施例中之VH及如以上提供之任一實施例中之VL。在一個實施例中，抗體包含分別SEQ ID NO:7及SEQ ID NO:8中之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。在另一實施例中，抗體包含分別SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10中之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

【0265】在本發明之另一態樣中，根據以上實施例中之任一者之抗體為單株抗體，包括嵌合抗體、人類化抗體或人類抗體。在一個實施例中，抗體為抗體片段，例如Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或F(ab')₂片段。抗體片段包括(但不限於) Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv及scFv片段以及下文描述之其他片段。關於某些抗體片段之綜述，參見Hudson等人 *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。關於scFv片段之綜述，參見例如Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編輯, (Springer-Verlag, New York), 第269-315頁 (1994)；亦參見WO 93/16185；及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。關於包含救助受體結合抗原決定基殘基及具有延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段的論述，參見美國專利第5,869,046號。

【0266】雙功能抗體為其中兩個抗原結合位點可為二價或雙特異性之抗體片段。參見例如EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

90: 6444-6448 (1993)。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

【0267】 單域抗體為包含抗體之重鏈可變域全部或一部分或輕鏈可變域全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見例如美國專利第6,248,516 B1號)。

【0268】 抗體片段可藉由多種技術製成，所述技術包括(但不限於)完整抗體之蛋白水解消化以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生，如本文所述。

【0269】 在另一實施例中，抗體為全長抗體，例如完整IgG或如本文中所定義之其他抗體類別或同型。

靶向劑

【0270】 在一些態樣中，特異性結合於DOTAM螯合之Pb之抗體與細胞結合劑/靶向部分偶合以產生靶向劑。視情況，特異性結合於DOTAM螯合之Pb之抗體可為根據任一上述實施例之抗體。

【0271】 偶合較佳可藉由表現為融合多肽或蛋白。融合可為直接的或經由連接子。融合多肽或蛋白可重組產生，避免對結合化學之任何需求。視情況該連接子可為具有至少5個胺基酸、較佳25個與50個之間的胺基酸的肽。連接子可為剛性連接子或可撓性連接子。在一些實施例中，其為可撓性的，包含Thr、Ser、Gly及/或Ala殘基或由Thr、Ser、Gly及/或Ala殘基組成。舉例而言，其可包含Gly及Ser殘基或由Gly及Ser殘基組成。在一些實施例中，其可具有重複基元，諸如(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n，其中n為例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些實施例

中，連接子可為或可包含序列GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 26)。可使用其他連接子且可藉由技術人員鑑別。

【0272】 因此，提供一種多特異性(例如雙特異性)抗體複合物，其特異性結合於Pb-DOTAM螯合物與另一標靶抗原，例如標靶細胞之表面上存在的抗原。

【0273】 就本發明係關於治療方法及用於治療方法中之產品而言，其可適用於任何可藉由靶向患者患病細胞之細胞毒活性治療的症狀。治療較佳為腫瘤或癌症(例如胰臟、乳房或前列腺癌)之治療。然而，本發明之適用性不限於腫瘤及癌症。舉例而言，治療亦可為病毒感染之治療。已針對多種病毒感染，諸如HIV、狂犬病及EBV，研究針對在感染細胞之表面上表現之病毒抗原的免疫毒素。Cai及Berger 2011 *Antiviral Research* 90(3):143-50使用含有PE38的免疫毒素靶向殺死感染卡波西氏肉瘤相關之疱疹病毒的細胞。另外，Resimmune® (A-dmDT390-bisFv(UCHT1))選擇性地殺死人類惡性T細胞且暫時耗盡正常T細胞，且視為能夠治療T細胞驅動之自體免疫疾病，諸如多發性硬化症及移植物抗宿主病以及用其進行臨床試驗之T細胞血癌。

【0274】 因此，合適標靶抗原可包括癌細胞抗原、尤其人類癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原。

【0275】 本文所述之靶向抗體經設計以經由細胞表面抗原結合於患病細胞，諸如腫瘤細胞。抗原通常為過度表現或在異常時間表現之正常細胞表面抗原。理想地，標靶抗原僅僅在患病細胞(諸如腫瘤細胞)上表現，然而，實際上很少觀測到此。因此，通常基於患病組織與健康組織之間的差別表現選擇標靶抗原。

【0276】 因此，靶向抗體可特異性結合於任何合適之細胞表面標記物。特定靶向部分及/或細胞表面標記物之選擇可視待靶向之特定細胞群體而選擇。細胞表面標記物為此項技術中已知的(參見例如Mufson等人, *Front. Biosci.*, 11:337-43 (2006); Frankel等人, *Clin. Cancer Res.*, 6:326-334 (2000); 及Kreitman等人, *AAPS Journal*, 8(3): E532-E551 (2006))且可為例如蛋白質或碳水化合物。在本發明之一實施例中，靶向部分(細胞結合劑)為特異性結合於細胞表面上之受體的配位體。例示性配位體包括(但不限於)血管內皮生長因子(VEGF)、Fas、TNF相關之細胞凋亡誘導配位體(TRAIL)、細胞介素(例如IL-2、IL-15、IL-4、IL-13)、淋巴激素、激素及生長因子(例如轉型生長因子(TGF α)、神經元生長因子、表皮生長因子)。

【0277】 細胞表面標記物可為例如腫瘤相關抗原。

【0278】 如本文所用，術語「腫瘤相關抗原」或「腫瘤特異性抗原」係指僅僅或主要由腫瘤細胞及/或癌細胞表現或過度表現，使得抗原與腫瘤及/或癌症相關聯的任何分子(例如蛋白質、肽、脂質、碳水化合物等)。腫瘤相關抗原可另外由正常、非腫瘤或非癌細胞表現。然而，在該種狀況下，正常、非腫瘤或非癌細胞表現腫瘤相關抗原不如腫瘤或癌細胞表現穩固。在此方面，與正常、非腫瘤或非癌細胞表現該抗原相比，腫瘤或癌細胞可過度表現該抗原或以顯著高水準表現該抗原。另外，腫瘤相關抗原可另外由發育或成熟之不同狀態之細胞表現。舉例而言，腫瘤相關抗原可另外由胚胎或胎兒階段之細胞表現，該等細胞通常在成年宿主中未發現。或者，腫瘤相關抗原可另外由幹細胞或前驅細胞表現，該等細胞通常在成年宿主中未發現。

【0279】 腫瘤相關抗原可為由任何癌症或腫瘤，包括本文所述之癌症及腫瘤之任何細胞表現之抗原。腫瘤相關抗原可為僅僅一種類型癌症或腫瘤之腫瘤相關抗原，使得該腫瘤相關抗原與僅僅一種類型癌症或腫瘤相關聯或表徵該種類型癌症或腫瘤。或者，腫瘤相關抗原可為超過一種類型之癌症或腫瘤的腫瘤相關抗原(例如可為特徵性的)。舉例而言，腫瘤相關抗原可由乳癌細胞與前列腺癌細胞表現，且正常、非腫瘤或非癌細胞不表現。

【0280】 細胞結合劑可特異性結合之例示性腫瘤相關抗原包括(但不限於)黏蛋白1 (MUC1；腫瘤相關之上皮黏蛋白)、優先表現之黑色素瘤抗原(PRAME)、癌胚抗原(CEA)、前列腺特異性膜抗原(PSMA)、PSCA、EpCAM、Trop2、顆粒球-巨噬細胞群落刺激因子受體(GM-CSFR)、CD56、人類表皮生長因子受體2 (HER2/neu) (亦稱為erbB-2)、CDS、CD7、酪胺酸酶相關蛋白(TRP) I及TRP2。在一較佳實施例中，靶向部分(細胞結合劑)特異性結合之細胞表面標記物係選自由以下組成之群：分化簇(CD) 19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD30、CD33 (唾液酸結合Ig樣凝集素3、骨髓細胞表面抗原)、CD79b、CD123 (介白素3受體 α)、運鐵蛋白受體、EGF受體、間皮素、鈣黏素、Lewis Y、磷脂肌醇蛋白聚醣-3、FAP (纖維母細胞活化蛋白 α)、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、CA9 = CAIX (碳酸酐酶IX)、L1 CAM (神經細胞黏附分子L 1)、內皮唾酸蛋白、HER3 (表皮生長因子受體家族成員3之活化構形)、Alk1/BMP9複合物(退行性淋巴瘤激酶1/骨成形性蛋白9)、TPBG = 5T4 (滋養層糖蛋白)、ROR1 (受體酪胺酸激酶樣表面抗原)、HER1 (表皮生長因子受體之活化構形)及CLL1 (C型凝集素結構域家族12成員A)。間皮素在例如卵巢癌、間皮瘤、

非小細胞肺癌、肺腺癌、輸卵管癌、頭頸癌、子宮頸癌及胰臟癌中表現。CD22在例如毛細胞白血病、慢性淋巴球性白血病(CLL)、前淋巴球性白血病(PLL)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)及急性淋巴性白血病(ALL)。CD25在例如白血病及淋巴瘤，包括毛細胞白血病及霍奇金氏淋巴瘤中表現。Lewis Y抗原在例如膀胱癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、食道癌、胃癌、肺癌及胰臟癌中表現。CD33在例如急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓單核細胞性白血病(CML)及骨髓增生病中表現。

【0281】 在本發明之一實施例中，靶向部分為特異性結合於標靶，例如腫瘤相關抗原之抗體(包括抗體片段)。在此類實施例中，藥劑可稱為雙特異性或多特異性抗體。

【0282】 特異性結合腫瘤相關抗原之例示性抗體包括(但不限於)針對運鐵蛋白受體之抗體(例如HB21及其變異體)、針對CD22之抗體(例如RFB4及其變異體)、針對CD25之抗體(例如抗Tac及其變異體)、針對間皮素之抗體(例如SS 1、MORAb-009、SS、HN1、HN2、MN、MB及其變異體)及針對Lewis Y抗原之抗體(例如B3及其變異體)。在此方面，靶向部分(細胞結合劑)可為選自由B3、RFB4、SS、SS1、MN、MB、HN1、HN2、HB21及MORAb-009組成之群的抗體及其抗原結合部分。適用於本發明之嵌合分子中的其他例示性靶向部分揭示於例如以下各者中：美國專利5,242,824 (抗運鐵蛋白受體)；5,846,535 (抗CD25)；5,889,157 (抗Lewis Y)；5,981,726 (抗Lewis Y)；5,990,296 (抗Lewis Y)；7,081,518 (抗間皮素)；7,355,012 (抗CD22及抗CD25)；7,368,110 (抗間皮素)；7,470,775 (抗CD30)；7,521,054 (抗CD25)；及7,541,034 (抗CD22)；美

國專利申請公開案2007/0189962 (抗CD22)；Frankel等人, Clin. Cancer Res., 6: 326-334 (2000), 及Kreitman等人, AAPS Journal, 8(3): E532-E551 (2006), 各以引用的方式併入本文中。

【0283】 已培養靶向包括以下各者之特異性腫瘤相關抗原之抗體：Cripto、CD30、CD19、CD33、糖蛋白NMB、CanAg、Her2 (ErbB2/Neu)、CD56 (NCAM)、CD22 (Siglec2)、CD33 (Siglec3)、CD79、CD138、PSCA、PSMA (前列腺特異性膜抗原)、BCMA、CD20、CD70、E-選擇蛋白、EphB2、黑素轉鐵蛋白、Muc16及TMEFF2。

【0284】 在本發明之一些實施例中，較佳地，腫瘤相關抗原為癌胚抗原(CEA)。CEA可具有人類CEA、尤其癌胚抗原相關之細胞黏附分子5 (CEACAM5)之胺基酸序列，其展示在UniProt (www.uniprot.org)寄存編號P06731 (版本 119)或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004354.2中。已培養針對CEA之抗體，包括T84.66及其人類化及嵌合型式，諸如如WO2016/075278 A1及/或WO2017/055389中所述之T84.66-LCHA、CH1A1a、如WO2011/034660中所述之抗CEA抗體及如下表2中所述之CEA hMN-14 (亦參見US 6 676 924及US 5 874 540)。

【0285】 CEA在本發明之上下文中係有利的，因為其內化相對緩慢，且因此在初始處理之後高百分比之抗體將保持在細胞表面上可用，用於與放射核種結合。其他低內化標靶/腫瘤相關抗原亦可較佳。舉例而言，在一些實施例中，腫瘤相關抗原可為CD20或HER2。GenBank寄存編號：NP_001005862、NP_004439、XP_005257196及XP_005257197揭示Her2蛋白質序列，如藉由GenBank在2013年10月4日所提供；且

SwissProt資料庫條目P11836揭示CD20序列。在其他實施例中，標靶可為EGP-1 (上皮糖蛋白-1，亦稱為滋養層-2)、結腸特異性抗原-p (CSAp)或胰臟黏蛋白MUC1。參見例如Goldenberg等人2012 (Theranostics 2(5))，其以引用之方式併入本文中。此參考文獻亦描述抗體，諸如結合於CSAp之 μ -9 (亦參見Sharkey等人Cancer Res. 2003 ; 63: 354-63)、結合於MUC1之hPAM4 (亦參見Gold等人Cancer Res. 2008: 68: 4819-26)、結合於CD20之維妥珠單抗(valtuzumab) (亦參見Sharkey等人 Cancer Res. 2008 ; 68: 5282-90)及結合於EGP-1之hRS7 (亦參見Cubas等人 Biochim Biophys Acta 2009 ; 1796: 309-14)。此等或其抗原結合部分中之任一者可適用於本發明，亦即可併入至本文所述之抗體中。

多特異性抗體

【0286】 如上所論述，在某些實施例中，本文所提供之抗體為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。雙特異性抗體為對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。雙特異性抗體可製備為全長抗體或抗體片段。

【0287】 近來已開發出各種重組抗體格式，例如藉由例如IgG抗體格式與單鏈結構域之融合形成的四價雙特異性抗體(參見例如Coloma, M.J.等人, Nature Biotech 15 (1997) 159-163 ; WO 2001/077342 ; 及Morrison, S.L., Nature Biotech 25 (2007) 1233-1234)。

【0288】 亦已開發出其中不再保留抗體核心結構(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)之若干其他新格式，諸如雙功能抗體、三功能抗體或四功能抗體、微型抗體、若干單鏈格式(scFv、Bis-scFv)，其能夠結合兩種或更多種抗原(Holliger, P.等人, Nature Biotech 23 (2005) 1126-1136 ; Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14 ; Shen, J.等人, Journal of

Immunological Methods 318 (2007) 65-74 ; Wu, C.等人, Nature Biotech. 25 (2007) 1290-1297)。

【0289】 所有此類格式使用連接子將抗體核心(IgA、IgD、IgE、IgG或IgM)與另一結合蛋白(例如scFv)或將例如兩個Fab片段或scFv融合(Fischer, N., Leger, O., Pathobiology 74 (2007) 3-14)。必須記住，藉由維持與天然存在之抗體的高度相似性，可能想要保留經由Fc受體結合介導之效應子功能，諸如補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

【0290】 在WO 2007/024715中，報導雙可變域免疫球蛋白為經工程改造之多價及多特異性結合蛋白。US 6,897,044中報導製備生物活性抗體二聚體之方法。US 7,129,330中報導具有至少四個經肽連接子彼此連接之可變域的多價FV抗體構築體。US 2005/0079170中報導二聚及多聚抗原結合結構。US 6,511,663中報導包含三個或四個藉由連接結構彼此共價結合之Fab片段的三價或四價單特異性抗原結合蛋白，該蛋白質並非天然免疫球蛋白。在WO 2006/020258中報導可有效表現於原核及真核細胞中且適用於治療及診斷方法中的四價雙特異性抗體。US 2005/0163 782中報導一種將經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體與未經至少一個鏈間雙硫鍵連接之二聚體自包含該兩種多肽二聚體之混合物分離或較佳合成的方法。US 5,959,083中報導雙特異性四價受體。WO 2001/077342中報導經工程改造之具有三個或更多個功能性抗原結合位點之抗體。

【0291】 WO 1997/001580中報導多特異性及多價抗原結合多肽。WO 1992/004053報導通常自結合於相同抗原決定子之IgG類單株抗體製備的均結合物藉由合成交聯共價連接。WO 1991/06305中報導對抗原具有

高親合力之寡聚單株抗體，藉此分泌通常為IgG類之寡聚物，其具有締合在一起的兩個或兩個以上免疫球蛋白單體，從而形成四價或六價IgG分子。US 6,350,860中報導源自綿羊之抗體及經工程改造之抗體構築體，其可用於治療其中干擾素 γ 活性致病之疾病。在US 2005/0100543中報導可靶向構築體，其為雙特異性抗體之多價載劑，亦即可靶向構築體之各分子可充當兩種或更多種雙特異性抗體之載劑。WO 1995/009917中報導基因工程改造之雙特異性四價抗體。在WO 2007/109254中，報導由穩定scFv組成或包含穩定scFv之穩定結合分子。

【0292】 亦可提供呈不對稱形式之多特異性抗體，其在具有相同抗原特異性之一或多個結合臂中具有結構域交叉，亦即交換VH/VL結構域(參見例如WO 2009/080252及WO 2015/150447)、CH1/CL結構域(參見例如WO 2009/080253)或完整Fab臂(參見例如WO 2009/080251、WO 2016/016299，亦參見Schaefer等人, PNAS, 108 (2011) 1187-1191, 及Klein等人, MAbs 8 (2016) 1010-20)。在一個態樣中，多特異性抗體包含交叉Fab片段。術語「交叉Fab片段」或「xFab片段」或「交叉型Fab片段」係指其中重鏈及輕鏈之可變區或恆定區交換之Fab片段。交叉Fab片段包含由輕鏈可變區(VL)及重鏈恆定區1 (CH1)構成的多肽鏈以及由重鏈可變區(VH)及輕鏈恆定區(CL)構成的多肽鏈。不對稱Fab臂亦可藉由將帶電或不帶電胺基酸突變引入結構域界面中以導引正確Fab配對來進行工程改造。參見例如WO 2016/172485。

【0293】 以上格式中之任一者可用於根據本發明之多特異性抗體。

【0294】 在一種例示性格式中，雙特異性抗體為「三聚體」，例如如WO214/180754中所述。此係指包含三個融合多肽之三聚抗原結合分

子，各融合多肽包含至少一個與來源於人類軟骨基質蛋白(CMP)之三聚結構域融合的抗原結合部分，其中該三聚結構域能夠介導三聚抗原結合分子之穩定締合。抗原結合部分可為例如Fab分子、交叉Fab分子、scFab、Fv分子、scFv或單域抗體(VHH)。在一些實施例中，融合蛋白各包含兩個(第一及第二)抗原結合部分，例如其中第一抗原結合部分與該三聚結構域之N端胺基酸融合且第二抗原結合部分與該三聚結構域之C端胺基酸融合，均視情況經由肽連接子。在此格式中，第一或第二抗原結合部分可結合Pb-DOTAM螯合物。另一者將結合標靶抗原，例如腫瘤相關抗原。與C端融合之三個抗原結合分子各可對相同抗原具有特異性；與N端融合之三個抗原結合分子各可對另一抗原具有特異性。

【0295】 其中適用之CMP三聚結構域來源於如下文所示之人類軟骨蛋白質，且在一實施例中，包含與以下所示之三聚結構域之序列至少95%一致且最佳至少98%一致的序列。在一個實施例中，該三聚結構域包含該三聚結構域之序列。

人類軟骨蛋白質之序列(496aa)

```
MRVLSGTSLM LCSLLLLLQA LCSPGLAPQS RGHLCRTRPT DLVFVVDSSR
SVRPVEFEKV KVFLSQVIES LDVGNATRV GMVNYASTVK QEFSLRAHVS
KAALLQAVRR IQPLSTGTMT GLAIQFAITK AFGDAEGGRS RSPDISKVVI
VVTDGRPQDS VQDV SARARA SGVELFAIGV GSVDKATLRQ IASEPQDEHV
DYVESYSVIE KLSRKFQEAF CVVSDLCATG DHDCEQVCIS SPGSYTCACH
EGFTLNSDGK TCNVCSGGGG SSATDLVFLI DGSKSVR PEN FELVKKFISQ
IVDTLDVSDK LAQVGLVQYS SSVRQEFPLG RFHTKKDIKA AVRNM SYMEK
GTMTGAALKY LIDNSFTVSS GARPGAQKVG IVFTDGRSQD YINDAAKKAK
DLGFKMFAVG VGNAVEDEL R EIASEPVAEH YFYTADF KTI NQIGKKLQKK
ICVEEDPCAC ESLVKFQAKV EGLLQALTRK LEAVSKRLAI LENTVV
```

三聚結構域之例示性序列(39aa)

```
CACESLVKFKQ AKVEGLLQAL TRKLEAVSKR LAILENTVV
```

【0296】 另一例示性格式包括包含第一及第二抗體重鏈及第一及第

二抗體輕鏈之全長抗體(例如IgG)，其中該第一重鏈與該第一輕鏈組裝形成針對該第一抗原之抗原結合位點，且其中該第二重鏈與該第二輕鏈組裝形成針對該第二抗原之抗原結合位點。

【0297】 可例如藉由使用杵臼突變及/或如以下進一步論述之其他修飾幫助雜二聚體重鏈正確組裝。

【0298】 可藉由使用交叉mab技術幫助輕鏈與其相應重鏈正確組裝。在此方法中，第一重鏈及第一輕鏈，或第二重鏈及第二輕鏈，可組裝形成交叉Fab片段(而其他組裝形成習知Fab)。因此，在一個實施例中，第一重鏈可包含VL結構域代替VH結構域(例如VL-CH1-鉸鏈-CH2-CH3)，且第一輕鏈可包含交換VL結構域之VH結構域(例如VH-CL)，或第一重鏈可包含CL結構域代替HC1結構域(例如VH-CL-鉸鏈-CH2-CH3)且第一輕鏈可包含CH1結構域代替CL結構域(例如VL-CH1)。在此實施例中，第二重鏈及第二輕鏈具有習知域結構(例如分別VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3及VL-CL)。在一替代實施例中，第二重鏈可包含VL結構域代替VH結構域(例如VL-CH1-鉸鏈-CH2-CH3)且第二輕鏈可包含交換VL結構域之VH結構域(例如VH-CL)，或第二重鏈可包含CL結構域代替HC1結構域(例如VH-CL-鉸鏈-CH2-CH3)且第二輕鏈可包含CH1結構域代替CL結構域(例如VL-CH1)。在此實施例中，第一重鏈及第一輕鏈具有習知域結構。

【0299】 在一些實施例中，或者或另外，可藉由使用電荷修飾，如下進一步論述，將輕鏈與其相應重鏈正確組裝。

【0300】 一種此類抗體在圖37中顯示為P1AE1768。此處，第二重鏈包含CL結構域代替HC1結構域(例如VH-CL-鉸鏈-CH2-CH3)且第二輕鏈包含CH1結構域代替CL結構域(例如VL-CH1)；第一重鏈及第一輕鏈具有

習知域結構。具有習知結構之Fab包含電荷修飾。因此，在一個實施例中，本發明之抗體包含分別SEQ ID NO: 59及58之第一及第二重鏈及分別SEQ ID NO: 57及60之第一及第二輕鏈。

【0301】 在以上格式之一些實施例中，格式可為二價。在另一可能實施例中，其他抗原結合部分可與例如第一及/或第二重鏈融合以提高一個或兩個抗原之價數。舉例而言，針對第一抗原之其他抗原結合部分可與重鏈分子中的一或兩者之N端融合。抗體對第一抗原(例如腫瘤相關抗原)可為多價，例如二價，且對第二抗原(例如DOTAM螯合之Pb)為單價。

【0302】 其他抗原結合部分可例如為例如包含第一抗原(例如腫瘤相關抗原之抗原結合位點)之scFab。scFab包含VH及CH1結構域，該VH及CH1結構域經由多肽連接子連接於VL及CL結構域，以便表現為單鏈。換言之，scFab包含Fd與輕鏈之間的多肽連接子。

【0303】 在另一實施例中，其他抗原結合部分為Fab或交叉Fab。舉例而言，重鏈中之一者之N端或C端可經由多肽連接子連接於由VH結構域及CH1結構域組成之第一多肽，第一多肽與由VL及CL結構域組成之第二多肽締合形成Fab。在另一實施例中，重鏈中之一者之N端或C端可經由多肽連接子連接於由VL結構域及CH1結構域組成之第一多肽，第一多肽與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合。在另一實施例中，重鏈中之一者之N端或C端可經由多肽連接子連接於由VH結構域及CL結構域組成之第一多肽，第一多肽與由VL及CH1結構域組成之第二多肽締合。

【0304】 在此格式中，較佳地，具有相同抗原特異性之結合臂藉由與相同輕鏈締合而形成。因此，第一抗原之抗原結合部分/臂可為交叉Fab，且第二抗原之抗原結合部分/臂可為習知Fab。或者，第一抗原之抗

原結合部分/臂可為習知Fab，且第二抗原之抗原結合部分/臂可為交叉Fab。

【0305】格式亦可併入電荷修飾，如以下進一步論述。

【0306】在此格式之一個實施例中，提供一種多價抗體，其包含：包含第一及第二抗體重鏈及第一及第二抗體輕鏈之全長抗體，其中該第一重鏈及該第一輕鏈組裝形成包含針對第一抗原(例如腫瘤特異性抗原，例如CEA)之抗原結合位點的Fab，且其中該第二重鏈及第二輕鏈組裝形成包含針對第二抗原(例如DOTAM螯合之Pb)之抗原結合位點的交叉Fab(例如第二重鏈具有VL結構域代替VH結構域，且第二輕鏈具有VH結構域代替VL結構域)；

且其中該第一或第二抗體重鏈經由連接子與包含CH1及VH結構域之多肽融合，且該第一多肽與包含CL及VL之第二多肽組裝，使得該第一多肽及該第二多肽組裝形成包含針對該第一抗原之抗原結合位點的Fab。

【0307】融合可在全長抗體之重鏈中之一條，視情況第二重鏈的N端。

【0308】視情況亦可使用電荷修飾。舉例而言，包含針對第一抗原之抗原結合位點的Fab可包含如下文所論述之電荷修飾之取代。

【0309】此類格式之一實例為圖37中所示之P1AE1769。因此，在一個實施例中，本發明之抗體包含分別SEQ ID NO:64及63之第一及第二重鏈及SEQ ID NO:62及61之第一及第二輕鏈。

【0310】另一例示性格式包括包含針對第一抗原之抗原結合位點(例如針對第一抗原可為二價)連接於針對第二抗原之抗原結合部分的全長抗體。

【0311】 舉例而言，針對第二抗原之抗原結合部分可為包含針對第二抗原(例如Pb-DOTAM螯合物)之抗原結合位點的scFab。在一些實施例中，scFab可與全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合，例如在CH3域之C端。可例如藉由使用杵臼突變及/或如以下進一步論述之其他修飾幫助雜二聚體重鏈正確組裝。一種此類抗體在圖37中例示為P1AE1770。因此，在一個實施例中，本發明之抗體包含SEQ ID NO: 66及67之重鏈及SEQ ID NO: 65之輕鏈。

【0312】 另一例示性格式包括包含針對第一抗原之抗原結合位點(例如針對第一抗原可為二價)的全長抗體，其中重鏈中之一條的N端或C端經由多肽連接子連接於第一多肽且其中第一多肽與第二多肽締合形成包含針對第二抗原之結合位點的Fab或交叉Fab。舉例而言，此格式可包含：

i)由VH結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VL及CL結構域組成之第二多肽締合；或

ii)由VL結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合；或

iii)由VH結構域及CL結構域組成之第一多肽，其與由VL及CH1結構域組成之第二多肽締合；

使得該第一多肽及該第二多肽一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。

【0313】 可例如藉由使用杵臼突變及/或如以下進一步論述之其他修飾，包括電荷修飾來幫助雜二聚體重鏈正確組裝。舉例而言，全長抗體之Fab結構域可包括電荷修飾。

【0314】 在一個實施例中，第一多肽經由多肽連接子連接於重鏈中

之一條的C端，例如在其CH3域之C端。第一多肽可包含N端VL結構域及C端CH1結構域。因此，具有融合之重鏈自N端至C端可包含VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL-CH1。輕鏈可包含VH-CL。全長抗體之Fab可包括電荷修飾之取代。一種此類實施例在圖37中顯示為P1AE1767。因此，在一個實施例中，本發明之抗體包含SEQ ID NO: 63及64之重鏈及SEQ ID NO: 61及62之輕鏈。

【0315】 在另一實施例中，第一多肽經由多肽連接子連接於重鏈之VH結構域之N端。第一多肽可包含N端VL結構域及C端CH1結構域。因此，具有融合之重鏈自N端至C端可包含VL-CH1-連接子-VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3。輕鏈可包含VH-CL。

【0316】 在另一例示性格式中，抗體可包含特異性結合第一抗原且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成之全長抗體，其中每條重鏈之C端與特異性結合第二抗原之抗原結合部分融合。

【0317】 在一個實施例中，第一抗原為標靶，例如腫瘤特異性抗原，且第二抗原為Pb-DOTAM螯合物，但此等亦可顛倒。

【0318】 在另一例示性格式中，抗體可為雙特異性抗體，其包含：

a)全長抗體，其特異性結合第一抗原且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

b)多肽，其由以下組成：

i)抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)；

其中該多肽經由肽連接子以該VH結構域之N端與該全長抗體之兩條

重鏈中之一條的C端融合；

c)多肽，其由以下組成：

i)抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以該VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

且其中(b)下之肽之抗體重鏈可變域(VL)與(c)下之肽之抗體輕鏈可變域一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。

【0319】 在此格式中，若第一多肽如b(i)中闡述，則第二多肽如c(i)中闡述；若第一多肽如b(ii)中闡述，則第二多肽如c(ii)中闡述；且若第一多肽如b(iii)中闡述，則第二多肽如c(iii)中闡述。例如在全長抗體之Fab中亦可使用電荷修飾之取代。

【0320】 在此格式中，第一或第二抗原可為DOTAM螯合之Pb。另一抗原可為標靶，例如腫瘤相關抗原，例如CEA、CD20或ERBB2。在一些實施例中，第二抗原為DOTAM螯合之Pb且第一抗原為標靶。

【0321】 上述抗體可為三價。在另一可能實施例中，其他抗原結合部分可融合以增加針對一個或兩個抗原之價數。舉例而言，針對第一抗原之其他抗原結合部分可與全長抗體之重鏈中之任一條或兩條的羧基端融合(例如腫瘤相關抗原)，例如使得抗體針對第一抗原具有價數4(其中其與兩條重鏈之羧基端融合)且針對第二抗原具有價數1。

【0322】 其中(b)之抗體由VH結構域組成且(c)之抗體由VL結構域組成的以上格式之實例為PRIT-213及PRIT214。其中(b)由VH結構域及CL

結構域組成且(c)由VL結構域及CH1結構域組成之以上格式之一實例為P1AE1766，如圖37中所示。因此，在一個實施例中，本發明之抗體包含分別SEQ ID NO: 51及52之第一及第二重鏈及SEQ ID NO: 50之輕鏈。

【0323】 視情況，用於本發明之多特異性抗體的格式可為如以全文引用的方式併入本文中之WO2010/115589 A1中所述之該格式(Roche Glycart AG)。

【0324】 WO2010/115589描述結構之視情況穩定化，藉此(b)下之多肽之抗體重鏈可變區(VH)及(c)下之多肽之抗體輕鏈可變域(VL)經由鏈間二硫橋鍵，例如藉由在以下位置之間引入二硫鍵來連接及穩定化：

i)重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100，

ii)重鏈可變域位置105至輕鏈可變域位置43，或

iii)重鏈可變域位置101至輕鏈可變域位置100 (始終根據Kabat EU索引編號)。

【0325】 WO2010/115589亦描述根據本發明之該全長抗體之CH3域可藉由「杵臼突變」技術改變，此項技術以若干實例詳細描述於例如以下各者中：WO 96/027011；Ridgway, J.B.等人, Protein Eng 9 (1996) 617-621；以及Merchant, A.M.等人, Nat Biotechnol 16 (1998) 677-681。

【0326】 因此，在一些實施例中，該三價雙特異性抗體進一步特徵在於：全長抗體之一條重鏈之CH3域與全長抗體之另一條重鏈之CH3域各在包含抗體CH3域之間的初始界面的界面處相遇；其中該界面經改變以促進三價雙特異性抗體之形成，其中該改變之特徵在於：

a)一條重鏈之CH3域改變，

使得在初始界面內，一條重鏈之CH3域遇到三價雙特異性抗體中另

一條重鏈之CH3域的初始界面，

胺基酸殘基經具有較大側鏈體積之胺基酸殘基置換，從而在一條重鏈之CH3域之界面內產生突起，該突起可定位於另一條重鏈之CH3域之界面內的空腔中

且

b)另一條重鏈之CH3域改變，

使得在三價雙特異性抗體內遇到第一CH3域之初始界面的第二CH3域之初始界面內，胺基酸殘基經具有較小側鏈體積之胺基酸殘基置換，從而在第二CH3域之界面內產生空腔，第一CH3域之界面內的突起可定位於該空腔內。

較佳地，具有較大側鏈體積之該胺基酸殘基可視情況選自由精胺酸(R)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)組成之群。具有較小側鏈體積之該胺基酸殘基可視情況選自由丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)組成之群。

【0327】 視情況，在一些實施例中，藉由引入半胱胺酸(C)作為各CH3域之對應位置中的胺基酸，使得兩個CH3域之間的可形成二硫橋鍵，對兩個CH3域進行進一步改變。

【0328】 如WO2010/115589 A1中所述之雙特異性三價抗體格式的此等及其他細節可用於本發明中。

【0329】 如本文所用，術語「全長抗體」表示由兩條「全長抗體重鏈」及兩條「全長抗體輕鏈」組成之抗體。「全長抗體重鏈」可為在N端至C端方向上由抗體重鏈可變域(VH)、抗體恆定重鏈域1 (CH1)、抗體鉸鏈區(HR)、抗體重鏈恆定域2 (CH2)及抗體重鏈恆定域3 (CH3) (縮寫為

VH-CH1-HR-CH2-CH3)以及在子類別IgE之抗體的情況下可選的抗體重鏈恆定域4 (CH4)組成的多肽。較佳地，「全長抗體重鏈」為在N端至C端方向上由VH、CH1、HR、CH2及CH3組成的多肽。並不意欲提及「全長」排除交叉Mab形成之可能性，因此，重鏈可具有交換成VL結構域之VH域，或交換成CL結構域之CH1結構域。「全長抗體輕鏈」為在N端至C端方向上由抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL) (縮寫為VL-CL)組成的多肽。或者，在交叉Mab之情況下，VL結構域可交換此VH域或CL結構域可交換成CH1結構域。抗體輕鏈恆定域(CL)可為 κ 或 λ 。兩條全長抗體鏈經由CL結構域與CH1結構域之間的及全長抗體重鏈之鉸鏈區之間的多肽間二硫鍵連接在一起。典型全長抗體之實例為天然抗體，如IgG (例如IgG 1及IgG2)、IgM、IgA、IgD及IgE。根據本發明之全長抗體可來自單一物種，例如人類，或其可為嵌合或人類化抗體。如本文所述之全長抗體包含各由一對VH及VL形成之兩個抗原結合位點。該全長抗體之重鏈或輕鏈的C端表示該重鏈或輕鏈的C端處之最末胺基酸。

【0330】 b)下之多肽之抗體重鏈可變域(VH)的N端及c)下之多肽之抗體輕鏈可變域(VL)表示VH或VL結構域之N端處之最末胺基酸。

【0331】 在上述任一格式中，第一抗原可為腫瘤相關抗原且第二抗原可為Pb-DOTAM (但在一些實施例中，此等亦可顛倒)。

【0332】 在上述任一格式中，可藉由對重鏈序列之修飾幫助重鏈雜二聚體正確組裝。在一個實施例中，使用杵-臼技術。可改變兩個CH3域之相互作用表面以增加含有此兩個CH3域之兩條重鏈的雜二聚。(兩條重鏈之)兩個CH3域中之各者可為「杵」，而另一者為「臼」。舉例來說，根據EU索引編號，一個包含所謂的「杵突變」(T366W及視情況S354C或

Y349C之一，較佳S354C)，且另一個包含所謂的「白突變」(T366S、L368A及Y407V及視情況Y349C或S354C，較佳Y349C)(參見例如Carter, P.等人, Immunotechnol. 2 (1996) 73)。

【0333】 或者或另外，二硫橋鍵之引入可用於穩定化雜二聚體 (Merchant, A.M.等人, Nature Biotech 16 (1998) 677-681； Atwell, S.等人, J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35)及增加產率。實例包括在以下位置之間引入二硫鍵：

i)重鏈可變域位置44至輕鏈可變域位置100，

ii)重鏈可變域位置105至輕鏈可變域位置43，或

iii)重鏈可變域位置101至輕鏈可變域位置100 (始終根據Kabat EU索引編號)。

電荷修飾

【0334】 本發明之多特異性抗體可在其中包含的Fab分子中包含胺基酸取代，該等胺基酸取代尤其有效地減少輕鏈與不匹配重鏈之錯配(本斯-瓊斯型副產物(Bence-Jones-type side product))，此錯配可在基於Fab的在結合臂之一個(或在包含超過兩個抗原結合Fab分子之分子之情況下，更多個)中具有VH/VL交換的雙特異性/多特異性抗原結合分子的產生中出現(亦參見PCT公開案第WO 2015/150447號，尤其其中之實例，以全文引用的方式併入本文中)。所需多特異性抗體與不希望之副產物、尤其在結合臂之一中存在的本斯-瓊斯型副產物相比的比率可藉由在Fab分子之CH1及CL結構域中的特定胺基酸位置處引入具有相反電荷之帶電胺基酸(有時在本文中稱作「電荷修飾」)來改良。

【0335】 因此，在一些實施例中，包含Fab分子之本發明之抗體包

含至少一個具有包含如本文所述之電荷修飾之重鏈恆定域CH1結構域及包含如本文所述之電荷修飾之輕鏈恆定CL結構域的Fab。

【0336】 在本發明之抗體(諸如圖37中例如示為P1AE1766、P1AE1767、P1AE1768、P1AE1769)中所包含的習知Fab分子中或在本發明之抗體中所包含的交叉型Fab分子中(但不在兩者中)進行電荷修飾。在特定實施例中，在本發明之抗體中所包含的習知Fab分子(其在特定實施例中特異性結合於標靶細胞抗原)中進行電荷修飾。

【0337】 因此，在一些實施例中，本發明之抗體包含a)結合於第一抗原(例如腫瘤相關抗原)之第一抗原結合部分及b)結合於第二抗原(例如Dotam-Pb)之第二結合部分，其中雙特異性抗原結合分子之第一及第二抗原結合部分皆為Fab分子，且抗原結合部分中之一者(在一些實施例中，尤其第二抗原結合部分)為交叉Fab片段，Fab分子中之一者包括包含如本文所述之電荷修飾CH1結構域及包含如本文所述之電荷修飾之CL結構域。較佳地，包含電荷修飾之Fab為習知(非交叉)Fab，例如在一些實施例中，為結合於第一抗原之抗原結合部分。

【0338】 根據本發明的抗體可以進一步包含特異性結合於第一抗原之第三Fab分子。在特定實施例中，該第三Fab分子與a)下之第一Fab分子相同。在此等實施例中，可在第一Fab分子及第三Fab分子中之每一者的恆定域CL及恆定域CH1中進行根據以下實施例之胺基酸取代(電荷修飾)。或者，可在b)下之第二Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中進行根據以下實施例之胺基酸取代，但不在第一Fab分子及第三Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中不進行此等取代。

【0339】 在一些實施例中，在包括包含電荷修飾之輕鏈恆定域CL及

包含電荷修飾之重鏈恆定域CH1的Fab分子中，輕鏈恆定域CL中之電荷修飾在位置124及視情況位置123 (根據Kabat編號)，且重鏈恆定域CH1中之電荷修飾在位置147及/或213 (根據Kabat編號)。

【0340】 在一些實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)取代)，且

在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸及/或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0341】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat編號)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸或位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0342】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)(根據Kabat編號)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且在重鏈恆定域CH1中，位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0343】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)(根據Kabat編號)，且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0344】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域中，位置124處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)取代(根據Kabat編號)(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，且位置123處之胺基酸獨立地經離胺酸(K)、精胺酸(R)或組胺酸(H)(根據Kabat EU索引編號)取代(在一個較佳實施例中，獨立地經離胺酸(K)或精胺酸(R)取代)，

且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代且位置213處之胺基酸獨立地經麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0345】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)(根據Kabat編號)取代且位置123處之胺基酸經精胺酸(R)(根據Kabat編號)取代，

且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)(根據Kabat EU索引編號)取代且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0346】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)(根據Kabat編號)取代且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)(根據Kabat編號)取代，

且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)(根據Kabat EU索引編號)取代且位置213處之胺基酸經麩胺酸(E)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0347】 在另一實施例中，在輕鏈恆定域CL中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)(根據Kabat編號)取代且位置123處之胺基酸經精胺酸(R)(根據Kabat編號)取代，

且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)(根據Kabat EU索引編號)取代且位置213處之胺基酸經天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0348】在另一實施例中，在輕鏈恆定域中，位置124處之胺基酸經離胺酸(K)(根據Kabat編號)取代且位置123處之胺基酸經離胺酸(K)(根據Kabat編號)取代，

且在重鏈恆定域CH1中，位置147處之胺基酸經麩胺酸(E)(根據Kabat EU索引編號)取代且位置213處之胺基酸經天冬胺酸(D)(根據Kabat EU索引編號)取代。

【0349】在一個實施例中，抗體包含特異性結合於第一抗原之第一重鏈及第一輕鏈及特異性結合於第二抗原之第二重鏈及第二輕鏈，其中

a)第一輕鏈之恆定域CL及第一重鏈之恆定域CH1包含本文所述之電荷變異取代；且

b)第二輕鏈及第二重鏈之輕鏈恆定域CL及重鏈恆定域CH1彼此進行置換(因此形成交叉Fab)。此類配置之一實例顯示為P1AE1768。

【0350】在一個實施例中，抗體包含

全長抗體，其特異性結合第一抗原且由兩條重鏈及兩條輕鏈組成，其中該全長抗體之兩個重鏈恆定域CH1及兩個輕鏈恆定域CL包含如本文所述之電荷修飾；及

scFab，其包含經由多肽連接子連接於VL及CL結構域之VH及CH1結構域(VH-CH1-連接子-VL-CL)，其中scFab與重鏈中之一條之N端融合，且其中scFab形成針對第二抗原之抗原結合位點。此類配置之一實例為P1AE1770。

【0351】 在另一實施例中，多特異性抗體包括包含針對第一抗原之抗原結合位點(例如其對第一抗原可為二價)之全長抗體，其中全長抗體之兩個重鏈恆定域CH1及兩個輕鏈恆定域CL包含如本文所述之電荷修飾，

且其中重鏈中之一條之C端(例如其CH3結構域之C端)經由多肽連接子連接於第一多肽且其中第一多肽與第二多肽締合形成包含針對第二抗原之結合位點的交叉Fab。

【0352】 第一多肽可包含N端VL結構域及C端CH1結構域。因此，具有融合之重鏈自N端至C端可包含VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL-CH1。輕鏈可包含VH-CL。此類配置之一實例為P1AE1767。

【0353】 在另一實施例中，抗體可為雙特異性抗體，其包含：

a)全長抗體，其特異性結合第一抗原且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成，其中重鏈之CH1結構域及輕鏈之CL結構域包含如本文所述之電荷修飾；

b)多肽，其由以下組成：

i)抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)；

其中該多肽經由肽連接子以該VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；

c)多肽，其由以下組成：

i)抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以該VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

且其中(b)下之肽之抗體重鏈可變域及(c)下之肽之抗體輕鏈可變域一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。此類配置之實例為PRIT-213及p1AE1766。

【0354】 在一些實施例中，本發明之抗體包含：a)結合於第一抗原之第一抗原結合部分；b)結合於第二抗原之第二抗原結合部分；及c)結合於第一抗原之第三抗原結合部分，其中抗體之第一、第二及第三抗原結合部分均為Fab分子，且在抗原結合部分中之一者(尤其第二抗原結合部分)中，分別Fab輕鏈及Fab重鏈之可變域VL及VH彼此置換，其中

i)在第一Fab分子及第三Fab分子中之每一者之恆定域CL及恆定域CH1中進行根據上述實施例之胺基酸取代，但在b)下之第二Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中未進行取代；或

ii)在b)下之第二Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中進行根據上述實施例之胺基酸取代，但在第一Fab分子及第三Fab分子之恆定域CL及恆定域CH1中未進行取代。在一些實施例中，在習知(非交換) Fab中存在電荷修飾；因此，舉例而言，在第二抗原結合部分為交叉Fab下，選擇方案(i)為較佳。

【0355】 在一個特定實施例中，本發明之多價抗體包含

包含第一及第二抗體重鏈及第一及第二抗體輕鏈之全長抗體，其中該第一重鏈及該第一輕鏈組裝形成包含針對第一抗原(例如腫瘤特異性抗原，例如CEA)之抗原結合位點的Fab，且其中該第二重鏈及第二輕鏈組裝形成包含針對第二抗原(例如DOTAM螯合之Pb)之抗原結合位點的交叉

Fab (例如第二重鏈具有VL結構域代替VH結構域，且第二輕鏈具有VH結構域代替VL結構域)；

且其中該第一或第二抗體重鏈經由連接子與包含CH1及VH結構域之多肽融合，且該第一多肽與包含CL及VL之第二多肽組裝，使得該第一多肽及該第二多肽組裝形成包含針對該第一抗原之抗原結合位點的Fab，

其中第一重鏈之CH1結構域及第一輕鏈之CL結構域包含如本文所述之電荷修飾。

【0356】 第一多肽之CH1結構域及第二多肽之CL結構域亦可包含如本文所述之電荷修飾。

【0357】 融合可在全長抗體之重鏈中之一條，視情況第二重鏈的N端。此類配置之一實例為P1AE1769。

結合於Pb-DOTAM及CEA之多特異性抗體

【0358】 在一些實施例中，較佳地，本發明之抗體為結合於Pb-DOTAM與CEA之多特異性，例如雙特異性抗體。因此，其包含針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點及針對CEA之抗原結合位點。在此類實施例中，對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點可根據本文所述之任一實施例。格式可為本文所述之格式中之任一者。

【0359】 視情況，對於單價結合而言，結合於CEA之抗原結合位點可以1 nM或更少、500 pM或更少、200 pM或更少或100 pM或更少之Kd值結合。

【0360】 視情況，結合於CEA之抗原結合位點可包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之

CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR-L3。

【0361】 視情況，結合於CEA之抗原結合位點可包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VH CDR序列：(a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-H3。在一個實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的CDR-H3。在另一實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-H3及包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR-L3。在另一實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的CDR-H3、包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的CDR-L3及包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的CDR-H2。在另一實施例中，抗體包含：(a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-H3。

【0362】 視情況，結合於CEA之抗原結合位點包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VL CDR序列：(a)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR-L3。在一個實施例中，抗體包含：(a)包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO:15之胺基酸序列之CDR-L3。

【0363】 視情況，結合於CEA之抗原結合位點包含：(a)包含至少一

個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VH CDR序列之VH結構域：(i)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的CDR-H3；及(b)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VL CDR序列之VL結構域：(i)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之CDR-L2及(c)包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR-L3。

【0364】 在另一態樣中，結合於CEA之抗原結合位點包含：(a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含選自SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的CDR-L3。

【0365】 在任一以上實施例中，多特異性抗體可人類化。在一個實施例中，抗CEA抗原結合位點包含如任一以上實施例中之CDR且進一步包含人類接受體構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

【0366】 在另一實施例中，結合於CEA之抗原結合位點包含具有與SEQ ID NO: 17之胺基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗原結合位點保留結合於CEA之能力，較佳具有如上文所述之親和力。在某些實施例中，SEQ ID NO:

17中總共1至10個胺基酸已取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，結合於CEA之抗原結合位點包含SEQ ID NO: 17中之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VH包含一個、兩個或三個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之CDR-H1、(b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之CDR-H2及(c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之CDR-H3。

【0367】 在另一實施例中，結合於CEA之抗原結合位點包含具有與SEQ ID NO: 18之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗原結合位點保留結合於CEA之能力，較佳具有上述親和力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 18中總共1至10個胺基酸已取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，針對CEA之抗原結合位點包含SEQ ID NO: 18中之VL序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VL包含一個、兩個或三個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之CDR-L3。

【0368】 在另一實施例中，結合於CEA之抗原結合位點包含如以上提供之任一實施例中之VH及如以上提供之任一實施例中之VL。在一個實

施例中，抗體包含分別SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18中之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

【0369】 在一些實施例中，多特異性抗體可結合於與本文所提供之PRIT-0213或PRIT-0214抗體所結合相同之CEA-抗原決定基。

結合於Pb-DOTAM及ERBB2之多特異性抗體

【0370】 在一些實施例中，較佳地，本發明之抗體為結合於Pb-DOTAM與ERBB2之多特異性，例如雙特異性抗體。因此，其包含針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點及針對ERBB2之抗原結合位點。在此類實施例中，對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點可根據本文所述之任一實施例。格式可為本文所述之格式中之任一者。

【0371】 視情況，對於單價結合而言，結合於ERBB2之抗原結合位點可以1 nM或更少、500 pM或更少、200 pM或更少或100 pM或更少之Kd值結合。

【0372】 視情況，結合於ERBB2之抗原結合位點可包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。

【0373】 視情況，結合於ERBB2之抗原結合位點可包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VH CDR序列：(a)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3。在一個

實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的CDR-H3。在另一實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3及包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。在另一實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的CDR-H3、包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列的CDR-L3及包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列的CDR-H2。在另一實施例中，抗體包含：(a)包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列的CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列的CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO:30之胺基酸序列的CDR-H3。

【0374】 視情況，結合於ERBB2之抗原結合位點包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VL CDR序列：(a)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。在一個實施例中，抗體包括(a)包含SEQ ID NO:31之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO:32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO:33之胺基酸序列之CDR-L3。

【0375】 視情況，結合於ERBB2之抗原結合位點包含：(a)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VH CDR序列之VH結構域：(i)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的CDR-H3；及(b)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VL CDR序列之VL結構域：(i)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2及(c)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。

【0376】 在另一態樣中，結合於ERBB2之抗原結合位點包含：(a) 包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含選自SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。

【0377】 在任一以上實施例中，多特異性抗體可人類化。在一個實施例中，抗ERBB2抗原結合位點包含如任一以上實施例中之CDR且進一步包含人類接受體構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

【0378】 在另一實施例中，結合於ERBB2之抗原結合位點包含具有與SEQ ID NO: 34之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗原結合位點保留結合於ERBB2之能力，較佳具有上述親和力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 34中總共1至10個胺基酸已取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，結合於ERBB2之抗原結合位點包含SEQ ID NO: 34中之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VH包含一個、兩個或三個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1、(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2及(c)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3。

【0379】 在另一實施例中，結合於ERBB2之抗原結合位點包含具有與SEQ ID NO: 35之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗原結合位點保留結合於ERBB2之能力，較佳具有上述親和力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 35中總共1至10個胺基酸已取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，針對CEA之抗原結合位點包含SEQ ID NO: 35中之VL序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VL包含一個、兩個或三個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。

【0380】 在另一實施例中，結合於ERBB2之抗原結合位點包含如以上提供之任一實施例中之VH及如以上提供之任一實施例中之VL。在一個實施例中，抗體包含分別SEQ ID NO:34及SEQ ID NO:35中之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

【0381】 在一些實施例中，多特異性抗體可結合於與本文所提供之P1AD9827抗體所結合相同之ERBB2-抗原決定基。

結合於Pb-DOTAM及CD20之多特異性抗體

【0382】 在一些實施例中，較佳地，本發明之抗體為結合於Pb-DOTAM與CD20之多特異性，例如雙特異性抗體。因此，其包含針對Pb-

DOTAM螯合物之抗原結合位點及針對CD20之抗原結合位點。在此類實施例中，對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點可根據本文所述之任一實施例。格式可為本文所述之格式中之任一者。

【0383】 視情況，對於單價結合而言，結合於CD20之抗原結合位點可以1 nM或更少、500 pM或更少、200 pM或更少或100 pM或更少之Kd值結合。

【0384】 視情況，結合於CD20之抗原結合位點可包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。

【0385】 視情況，結合於CD20之抗原結合位點可包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VH CDR序列：(a)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2；以及(c)包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3。在一個實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO:41之胺基酸序列的CDR-H3。在另一實施例中，該抗體包含：包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3及包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。在另一實施例中，抗體包含：包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的CDR-H3、包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的CDR-L3及包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列的CDR-H2。在另一實施例中，抗體包含：(a)包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列的CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO:40之胺基酸序列的CDR-H2；以及(c)包含

SEQ ID NO:41之胺基酸序列的CDR-H3。

【0386】 視情況，結合於CD20之抗原結合位點包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VL CDR序列：(a)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。在一個實施例中，抗體包括(a)包含SEQ ID NO:42之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO:43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO:44之胺基酸序列之CDR-L3。

【0387】 視情況，結合於CD20之抗原結合位點包含：(a)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VH CDR序列之VH結構域：(i)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1、(ii)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2及(iii)包含選自SEQ ID NO: 41之胺基酸序列的CDR-H3；及(b)包含至少一個、至少兩個或所有三個選自以下各者之VL CDR序列之VL結構域：(i)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1、(ii)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2及(c)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。

【0388】 在另一態樣中，結合於CD20之抗原結合位點包含：(a)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含選自SEQ ID NO: 44之胺基酸序列的CDR-L3。

【0389】 在任一以上實施例中，多特異性抗體可人類化。在一個實

施例中，抗CD20抗原結合位點包含如任一以上實施例中之CDR且進一步包含人類接受體構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。

【0390】 在另一實施例中，結合於CD20之抗原結合位點包含具有與SEQ ID NO: 45之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重鏈可變域(VH)序列。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VH序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗原結合位點保留結合於CD20之能力，較佳具有上述親和力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 45中總共1至10個胺基酸已取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，結合於CD20之抗原結合位點包含SEQ ID NO: 45中之VH序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VH包含一個、兩個或三個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1、(b)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2及(c)包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3。

【0391】 在另一實施例中，結合於CD20之抗原結合位點包含具有與SEQ ID NO: 46之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的輕鏈可變域(VL)。在某些實施例中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之VL序列相對於參考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失，但包含該序列之抗原結合位點保留結合於CD20之能力，較佳具有上述親和力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 46

中總共1至10個胺基酸已取代、插入及/或缺失。在某些實施例中，取代、插入或缺失發生在HVR外之區域中(亦即，FR中)。視情況，針對CD20之抗原結合位點包含SEQ ID NO: 46中之VL序列，包括該序列之轉譯後修飾。在一特定實施例中，VL包含一個、兩個或三個選自以下各者之CDR：(a)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1；(b)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(c)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。

【0392】 在另一實施例中，結合於CD20之抗原結合位點包含如以上提供之任一實施例中之VH及如以上提供之任一實施例中之VL。在一個實施例中，抗體包含分別SEQ ID NO:45及SEQ ID NO:46中之VH及VL序列，包括彼等序列之轉譯後修飾。

【0393】 在一些實施例中，多特異性抗體可結合於與本文所提供之P1AD9826抗體所結合相同之CD20-抗原決定基。

抗體變異體

【0394】 在某些實施例中，涵蓋本文所提供之抗體之胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要提高抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由向編碼抗體之核苷酸序列中引入適當修飾或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體胺基酸序列內的殘基缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。

取代、插入及缺失變異體

【0395】 在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變異體。所關注之取代型突變誘發位點包括HVR (CDR)及FR。保守取代以

標題「較佳取代」展示於表1中。更多實質性變化提供於表1中標題「例示性取代」下，且如下文關於胺基酸側鏈類別進一步描述。胺基酸取代可引入至所關注之抗體中，且針對所需活性進行篩選之產物，例如保持/改良抗原結合、減少免疫原性或改善ADCC或CDC。

表1

初始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

【0396】 胺基酸可根據共有側鏈特性進行分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；

(5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0397】非保守取代將引起此等類別中之一者之成員換成另一個類別。

【0398】一種類型之取代型變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選用於進一步研究之所得變異體相對於親本抗體將在某些生物特性方面具有修飾(例如改善)(例如親和力提高、免疫原性降低)及/或將實質上保留親本抗體之某些生物特性。一種例示性取代型變異體為親和力成熟抗體，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術(諸如本文所描述之技術)便利地產生。簡言之，使一或多個HVR殘基突變且在噬菌體上呈現變異抗體且針對特定生物活性(例如結合親和力)進行篩選。

【0399】變化(例如取代)可於HVR中進行以例如提高抗體親和力。可以在HVR「熱點」，亦即由在體細胞成熟過程期間經受高頻突變之密碼子編碼的殘基(參見例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))及/或接觸抗原之殘基中進行此類改變，其中測試所得變異VH或VL之結合親和力。藉由構築及自二級文庫再選擇進行親和力成熟已描述例如於Hoogenboom等人 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編輯, Human Press, Totowa, NJ, (2001).)中。在親和力成熟之一些實施例中，藉由多種方法(例如易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸引導之突變誘發)中之任一者將多樣性引入選用於成熟之可變基因中。隨後產生二級文庫。隨後篩選該文庫以鑑別具有所需親和力之任何抗體變異體。另一種引入多樣性之方法涉及將若干HVR殘基(例如，一次4個至6個殘基)

隨機分組之HVR引導方法。參與抗原結合之HVR殘基可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或模型化來特定鑑別。常常尤其以CDR-H3及CDR-L3為目標。

【0400】 在某些實施例中，取代、插入或缺失可發生在一或多個HVR內，只要此類改變不實質上降低抗體結合抗原之能力即可。舉例而言，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守改變(例如如本文所提供之保守取代)。此類改變例如可在接觸HVR中之殘基之抗原之外。在以上提供之變異VH及VL序列之某些實施例中，各HVR未改變或含有不超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

【0401】 一種適用於鑑別可靶向用於突變誘發之抗體之殘基或區域的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如由Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在此方法中，鑑別標靶殘基之殘基或組(例如帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以確定抗體與抗原之相互作用是否受影響。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構用於鑑別抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之標靶或排除在取代候選物之外。可篩選變異體以確定其是否含有所需特性。

【0402】 胺基酸序列插入包括在一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽長度範圍內的胺基及/或羧基端融合物，以及具有單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與酶(例如對於ADEPT而言)或延長抗體之血清半衰期之多肽的融合物。

糖基化變異體

【0403】 在某些實施例中，本文所提供之抗體經改變以提高或降低抗體糖基化之程度。向抗體中添加糖基化位點或使抗體缺失糖基化位點宜藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點來實現。

【0404】 在抗體包含Fc區之情況下，可改變連接於其上之碳水化合物。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含分支鏈雙觸角寡醣，其一般藉由N鍵連接於Fc區之CH2域的Asn297。參見例如Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸，以及附接於雙觸寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc的岩藻糖。在一些實施例中，可對本發明抗體中之寡醣進行修飾以便形成具有某些改良特性之抗體變異體。

【0405】 在一個實施例中，提供具有缺乏附接(直接或間接)於Fc區之岩藻糖之碳水化合物結構的抗體變異體。舉例而言，此類抗體中之岩藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖之量藉由計算相對於如藉由MALDI-TOF質譜分析量測之附接於Asn 297之所有糖結構(例如複合、雜交及高甘露糖結構)的總和，糖鏈內Asn297處之岩藻糖之平均量來確定，如例如WO 2008/077546中所描述。Asn297係指Fc區中位於約位置297處的天冬醯胺殘基(Fc區殘基之Eu編號)；然而，由於抗體中有少量序列變異，故Asn297亦可位於位置297上游或下游約±3個胺基酸處，亦即位置294與位置300之間。此類岩藻糖基化變異體可具有改善之ADCC功能。參見例如美國專利公開案第US 2003/0157108 (Presta, L.)號；第US 2004/0093621號(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。關於「去岩藻糖基化」或「缺乏岩藻糖」抗體變異體之公開案之實例包括：

US 2003/0157108 ; WO 2000/61739 ; WO 2001/29246 ; US
 2003/0115614 ; US 2002/0164328 ; US 2004/0093621 ; US
 2004/0132140 ; US 2004/0110704 ; US 2004/0110282 ; US
 2004/0109865 ; WO 2003/085119 ; WO 2003/084570 ; WO
 2005/035586 ; WO 2005/035778 ; WO2005/053742 ; WO2002/031140 ;
 Okazaki等人 *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004) ; Yamane-Ohnuki等人
Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) 。能夠產生去岩藻糖基化抗體之細胞株的
 實例包括缺乏蛋白質岩藻糖基化的Lec13 CHO細胞(Ripka等人 *Arch.*
Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986) ; 美國專利申請案第US
 2003/0157108 A1號, Presta, L ; 及WO 2004/056312 A1, Adams等人, 尤
 其實例11)及基因剔除細胞株, 諸如 α -1,6-岩藻糖基轉移酶基因(FUT8)基
 因剔除CHO細胞(參見例如Yamane-Ohnuki等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614
 (2004) ; Kanda, Y.等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006) ; 及
 WO2003/085107) 。

【0406】 抗體變異體進一步具備平分寡醣, 例如其中附接於抗體之
 Fc區的雙觸角寡醣藉由GlcNAc平分。此類抗體變異體可具有減少之岩藻
 糖基化及/或改善之ADCC功能。此類抗體變異體之實例描述於例如WO
 2003/011878 (Jean-Mairet等人) ; 美國專利第6,602,684號 (Umana等
 人) ; 以及US 2005/0123546 (Umana等人) 。亦提供寡醣中之至少一個半
 乳糖殘基與Fc區附接之抗體變異體。此類抗體變異體可具有改善之CDC
 功能。此類抗體變異體描述於例如WO 1997/30087 (Patel等人) ; WO
 1998/58964 (Raju, S.) ; 及WO 1999/22764 (Raju, S.) 。

【0407】 較佳地, 抗體經修飾以降低糖基化程度。在一些實施例

中，抗體可無糖基化或去糖基化。抗體可包括N297處之取代，例如N297D/A。

Fc區變異體

【0408】 在某些實施例中，一或多個胺基酸修飾可引入本文所提供之抗體之Fc區中，藉此產生Fc區變異體。Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)之人類Fc區序列(例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

【0409】 在某些實施例中，本發明涵蓋具有減少之效應子功能，例如減少或消除的CDC、ADCC及/或FcγR結合的抗體變異體。在某些態樣中，本發明涵蓋擁有一些但並非所有效應子功能之抗體變異體，該等效應子功能使其成為抗體在活體內之半衰期至關重要且某些效應子功能(諸如補體依賴性細胞毒性(CDC)及抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC))不必要或有害之應用的所需候選。

【0410】 可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以確認CDC及/或ADCC活性之降低/消除。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合分析以確保抗體缺乏FcγR結合(因此可能缺乏ADCC活性)。用於介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)之第464頁之表3中。評估所關注分子之ADCC活性之活體外分析的非限制性實例描述於以下中：美國專利第5,500,362號(參見例如Hellstrom, I.等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))及Hellstrom, I等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；第5,821,337號(參見Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361

(1987))。或者，可採用非放射性分析方法(參見例如用於流動式細胞量測術之ACTI™非放射性細胞毒性分析(CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及CytoTox 96®非放射性細胞毒性分析(Promega, Madison, WI))。適用於此類分析之效應細胞包括外周血單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可例如在動物模型中，諸如Clynes等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型中活體內評估所關注分子之ADCC活性。亦可進行C1q結合分析以證實抗體不能結合C1q且因此缺乏CDC活性。參見例如WO 2006/029879及WO 2005/100402中之C1q及C3c結合ELISA。為評估補體活化，可進行CDC分析(參見例如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S.等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003)；及Cragg, M.S.及M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法測定FcRn結合及活體內清除率/半衰期(參見例如Petkova, S.B.等人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)；WO 2013/120929 A1)。

【0411】 具有減少之效應子功能之抗體包括具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多個殘基之取代，例如P329G的抗體(美國專利第6,737,056號)。此類Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或多於兩者處具有取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

【0412】 在某些態樣中，抗體變異體包含具有一或多個減少FcγR結合之胺基酸取代，例如在Fc區之位置234及235處之取代的Fc區(殘基進行EU編號)。在一個態樣中，該等取代為L234A及L235A (LALA)。在某些

態樣中，抗體變異體進一步在來源於人類IgG1 Fc區之Fc區中包含D265A及/或P329G。在一個態樣中，該等取代為來源於人類IgG1 Fc區之Fc區中的L234A、L235A及P329G (LALA-PG)。(參見例如WO 2012/130831)。在另一態樣中，該等取代為來源於人類IgG1 Fc區之Fc區中的L234A、L235A及D265A (LALA-DA)。

【0413】 在其他實施例中，可使用具有減少之效應子功能的IgG亞型，諸如IgG4或IgG2。

【0414】 描述具有提高或降低之與FcR之結合的某些抗體變異體。(參見例如美國專利第6,737,056號；WO 2004/056312及Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

【0415】 在一些實施例中，在Fc區中進行改變(亦即，提高或減少，較佳減少)C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)的改變，例如如下所述：美國專利第6,194,551號、WO 99/51642及Idusogie等人 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

【0416】 在一些實施例中，FcRn結合可減少，例如以使半衰期更短。在其他實施例中，FcRn之結合可為正常的。舉例而言，在一些實施例中，正常FcRn結合可用於涉及清除劑之方法中。

【0417】 在某些態樣中，抗體變異體包含具有一或多個減少FcRn結合之胺基酸取代，例如在Fc區之位置253及/或310及/或435處之取代的Fc區(殘基進行EU編號)。在某些態樣中，抗體變異體包含在位置253、310及435處具有胺基酸取代之Fc區。在一個態樣中，該等取代為來源於人類IgG1 Fc區之Fc區中的I253A、H310A及H435A。參見例如Grevys, A.等人, *J. Immunol.* 194 (2015) 5497-5508。

【0418】 在某些態樣中，抗體變異體包含具有一或多個減少FcRn結合之胺基酸取代，例如在Fc區之位置310及/或433及/或436處之取代的Fc區(殘基進行EU編號)。在某些態樣中，抗體變異體包含在位置310、433及436處具有胺基酸取代之Fc區。在一個態樣中，該等取代為來源於人類IgG1 Fc區之Fc區中的H310A、H433A及Y436A。(參見例如WO 2014/177460 A1)。舉例而言，在一些實施例中，可使用正常FcRn結合。

【0419】 關於Fc區變異體之其他實例，亦參見Duncan及Winter, Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351。

【0420】 如本文所報導之抗體之重鏈的C端可為以胺基酸殘基PGK結束之完整C端。重鏈之C末端可為縮短C端，其中已移除一或兩個C端胺基酸殘基。在一個較佳態樣中，重鏈之C端為以PG結束之縮短C端。

【0421】 在如本文所報導之全部態樣中之一個態樣中，如本文所規定之包含包括C端CH3結構域之重鏈的抗體包含C端甘胺酸殘基(G446，胺基酸位置根據EU索引編號)。如本文所用之術語「全長抗體」或「全長重鏈」仍明確涵蓋此。

抗體衍生物

【0422】 在某些實施例中，本文所提供之抗體可進一步進行修飾以含有此項技術中已知且容易利用的其他非蛋白性部分。適合於抗體衍生化之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄

糖或聚(n-乙炔吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如丙三醇)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其在水中之穩定性而可能在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支的。與抗體附接之聚合物的數目可變化，且若連接超過一個聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改善抗體之具體特性或功能，抗體衍生物是否將用於指定病症下之療法等考慮因素來確定。

【0423】 在另一實施例中，提供抗體與可藉由暴露於放射線而選擇性地加熱之非蛋白質部分的結合物。在一個實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。放射線可具有任何波長，且包括(但不限於)不損害普通細胞但將非蛋白質部分加熱至殺死抗體-非蛋白質部分近側之細胞之溫度的波長。

重組方法及組合物

【0424】 可使用(例如)如美國專利第4,816,567號中所描述之重組方法及組合物來產生抗體。在一個實施例中，提供編碼本文所述之抗體之分離核酸。此類核酸可編碼包含抗體之VL之胺基酸序列及/或包含抗體之VH之胺基酸序列(例如抗體之輕鏈及/或重鏈)。在另一實施例中，提供包含此類核酸之一或多個載體(例如表現載體)。在另一實施例中，提供包含此類核酸之宿主細胞。在一個此類實施例中，宿主細胞包含(例如，已經以下各者轉型)：(1)包含編碼包含抗體之VL胺基酸序列及包含抗體之VH胺基酸序列之核酸的載體；或(2)包含編碼包含抗體之VL胺基酸序列之核酸的第一載體，及包含編碼包含抗體之VH胺基酸序列之核酸的第二載

體。

【0425】在多特異性抗體之情況下，可提供編碼特定抗體格式之重鏈及輕鏈組分中之每一者的核酸。亦提供包含此類核酸之載體或載體集合。

【0426】在一個實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴細胞(例如Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，提供一種製造根據本發明之抗體的方法，其中該方法包含在適合於表現該抗體之條件下培養如上所提供之包含編碼抗體之核酸的宿主細胞，且視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該抗體。

【0427】為重組產生抗體，分離例如如上所述之編碼抗體之核酸且插入至一或多個載體中以便在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此類核酸容易分離且使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)測序。

【0428】適合於選殖或表現編碼抗體之載體之宿主細胞包括本文所述之原核或真核細胞。舉例而言，抗體可於細菌中產生，在不需要糖基化及Fc效應子功能時尤其如此。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見例如美國專利第5,648,237號、第5,789,199號及第5,840,523號。(亦參見Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷 (B.K.C. Lo編輯, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254頁，描述大腸桿菌中抗體片段之表現。) 在表現之後，抗體可以可溶性溶離份自細菌細胞糊狀物分離且其可進一步經純化。

【0429】除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為抗體編碼載體之適合選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人類化」，從而

使得所產生之抗體具有部分或完全人類糖基化模式的真菌及酵母菌株。參見Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), 及Li等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。

【0430】用於表現糖基化抗體之適合宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

【0431】植物細胞培養物亦可用作宿主。參見例如美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(描述用於在轉殖基因植物中產生抗體之PLANTIBODIES™技術)。

【0432】脊椎動物細胞亦可用作宿主。舉例而言，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為適用的。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7)；人類胚腎細胞株(如例如在Graham等人, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)中所述之293或293細胞)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠睪丸支持細胞(mouse sertoli cell) (如例如在Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)中所述之TM4細胞)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；如例如在Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)中所述之TRI細胞；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如Y0、NS0及Sp2/0。關於適於產生抗體之某些哺乳動物宿主細胞株的評述，參見例如Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷 (B.K.C. Lo編輯, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268頁(2003)。

分析

【0433】可藉由此項技術中已知之各種分析，針對物理/化學特性及/或生物活性鑑別、篩選或表徵本文所提供之抗體。

結合分析及其他分析

【0434】在一個態樣中，例如藉由已知方法，諸如ELISA、西方墨點法等，測試本發明抗體之抗原結合活性。

【0435】在另一態樣中，可使用競爭分析來鑑別與例如PRIT-0213或PRIT-0214競爭結合於Pb-DOTAM或CEA之抗體。在某些實施例中，此類競爭性抗體結合PRIT-0213或PRIT-0214所結合之相同抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。用於對抗體所結合之抗原決定基進行定位的詳細例示性方法提供於Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」, *Methods in Molecular Biology*第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。

【0436】在例示性競爭分析中，在包含結合於抗原之第一標記抗體(例如PRIT-0213及PRIT-0214)及測試與第一抗體競爭結合於抗原之能力的第二未標記抗體之溶液中培育固定抗原。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照，在包含第一標記抗體但無第二未標記抗體之溶液中培育固定抗原。在允許第一抗體與抗原結合之條件下培育之後，移除過量的未結合之抗體，且量測與固定抗原締合的標記之量。若測試樣品中與固定抗原締合之標記之量相對於對照樣品中實質上降低，則表明第二抗體與第一

抗體競爭結合於抗原。參見Harlow及Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

抗體親和力

【0437】 在某些實施例中，本文所提供之抗體具有1 nM或更少、500 pM或更少、200 pM或更少、100 pM或更少、50 pM或更少、20 pM或更少、10 pM或更少、5 pM或更少或1 pM或更少或如本文中另外陳述之解離常數(Kd)。

【0438】 在一個實施例中，藉由放射性標記抗原結合分析(RIA)量測Kd。在一個實施例中，用所關注之抗體之Fab型式及其抗原進行RIA。舉例而言，Fab對抗原之溶液結合親和力藉由在一系列滴定未標記抗原存在下用最低濃度之(¹²⁵I)標記抗原使Fab平衡，接著用抗Fab抗體塗佈之盤捕捉結合抗原來量測(參見例如Chen等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999))。為確定分析條件，將MICROTITER®多孔盤(Thermo Scientific)用50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 µg/ml捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)塗佈隔夜，且隨後在室溫(約23°C)下用PBS中之2% (w/v)牛血清白蛋白阻斷二至五小時。在非吸附盤(Nunc #269620)中，100 pM或26 pM [¹²⁵I]-抗原與所關注之Fab之連續稀釋液混合(例如與Presta等人, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)中抗VEGF抗體Fab-12之評定相一致)。接著將所關注之Fab培育隔夜；然而，培育可持續較長時間段(例如約65小時)以保證達到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉盤中且在室溫下培育(例如一小時)。隨後移除溶液且用含0.1%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20®)之PBS洗滌盤八次。當盤乾燥時，添加150微升/孔之閃爍體(MICROSCINT-20™；

Packard)，且在TOPCOUNT™ γ 計數器(Packard)上對盤計數十分鐘。選擇產生小於或等於20%最大結合之各Fab的濃度用於競爭性結合分析。

【0439】 根據另一實施例，使用BIACORE®表面電漿子共振分析來量測Kd。舉例而言，使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，在25°C下用固定抗原CM5晶片以約10個反應單位(RU)進行分析。在一個實施例中，根據供應商之說明書，用N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)來活化羧基甲基化聚葡萄糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore, Inc.)。抗原用10 mM乙酸鈉pH 4.8稀釋至5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，隨後在5微升/分鐘之流動速率下注射以獲得大約10個反應單元(RU)之偶合蛋白質。在抗原注射後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。關於動力學量測，在25°C下以大約25 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射Fab於含0.05%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20™)界面活性劑之PBS (PBST)中之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。使用簡單的一比一朗格繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIACORE®評估軟體3.2版)，藉由同時擬合結合及解離感測圖譜來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(Kd)係依比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 計算。參見例如Chen等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若藉由以上表面電漿子共振分析測得締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則締合速率可藉由使用螢光淬滅技術測定，該技術在如光譜儀(諸如具有攪拌式光析槽之止流裝備型分光光度計(Aviv Instruments)或8000-系列SLM-AMINCO™分光光度計(ThermoSpectronic))中所量測之增加濃度之抗原存在下，在25°C下量測PBS中之20 nM抗-抗原抗體(Fab形式) (pH 7.2)之螢光發射強度(激發= 295 nm；發射= 340 nm，16 nm帶通)之增加或減

少。

【0440】在另一實施例中， K_d 使用SET(溶液平衡滴定)分析來量測。根據此分析，測試抗體通常以恆定濃度施加且與測試抗原之連續稀釋液混合。在進行培育以建立平衡之後，游離抗體部分捕捉在經抗原塗佈之表面上且用標記/標記之抗物種抗體，一般使用電化學發光偵測(例如如Haenel等人Analytical Biochemistry 339 (2005) 182-184中所述)。

【0441】舉例而言，在一個實施例中，將384孔抗生蛋白鏈菌素盤(Nunc, Microcoat #11974998001)與25微升/孔抗原-生物素-異構體混合物在濃度為20 ng/ml之PBS-緩衝液中在4°C下培育隔夜。為用游離抗原使抗體樣品平衡，將0.01 nM-1 nM抗體用相關抗原以濃度為2500 nM、500 nM或100 nM抗原起始，以1:3、1:2或1:1.7稀釋步驟滴定。將樣品在密封REMP儲存聚丙烯微孔盤(Brooks)中在4°C下培育隔夜。在隔夜培育之後，將抗生蛋白鏈菌素盤用每孔90 μ l PBST洗滌3次。將15 μ l來自平衡盤的各樣品轉移至分析盤且在室溫下培育15分鐘，接著用PBST緩衝液進行3 \times 90 μ l洗滌步驟。藉由添加25 μ l山羊抗人類IgG抗體-POD結合物(Jackson, 109-036-088, OSEP中1:4000)，接著用PBST緩衝液進行6 \times 90 μ l洗滌步驟來進行偵測。將25 μ l TMB受質(Roche Diagnostics GmbH, 目錄號: 11835033001)添加至各孔。在Safire2讀數器(Tecan)上在370/492 nm下進行量測。

【0442】在另一實施例中，使用KinExA (動力學排除)分析來量測 K_d 。根據此分析，抗原通常滴定至恆定濃度之抗體結合位點中，使樣品平衡，且然後經由流槽迅速抽吸，其中游離抗體結合位點捕捉在抗原塗佈之珠粒上，同時抗原飽和之抗體複合物洗掉。然後珠粒捕捉之抗體用標記

之抗物種抗體偵測，例如螢光標記(Bee等人PloS One, 2012 ; 7(4): e36261)。舉例而言，在一個實施例中，在室溫(RT)下，使用PBS pH 7.4作為操作緩衝液進行KinExA實驗。樣品在補充有1 mg/ml BSA之操作緩衝液(「樣品緩衝液」)中準備。使用0.25 ml/min之流動速率。用抗原，以100 pM起始，藉由兩倍連續稀釋(0.049 pM-100 pM之濃度範圍)，滴定恆定量之具有5 pM結合位點濃度之抗體。不具有抗原之抗體之一種樣品充當100%信號(亦即無抑制)。將抗原-抗體複合物在室溫下培育至少24小時以允許達到平衡。然後在5 ml體積下經由KinExA系統中抗原偶合之珠粒之管柱抽吸平衡混合物，允許未結合抗體由珠粒捕獲而不擾亂該溶液之平衡狀態。使用樣品緩衝液中250 ng/ml Dylight 650[®]結合之抗人類Fc片段特異性二級抗體偵測捕捉抗體。對於所有平衡實驗，各樣品一式兩份量測。KD係使用KinExA軟體(4.0.11版)內所含之單點同質結合模型，使用「標準分析」法，由數據之非線性回歸分析獲得。

治療方法及組合物

【0443】 如上文所論述，根據本發明之多特異性抗體適合於希望遞送放射核種至標靶之任何治療。因此，本發明提供一種靶向抗體，諸如如本文所述之多特異性或雙特異性抗體，其用於治療方法中。更特定言之，提供一種如本文所述之靶向抗體(例如多特異性或雙特異性抗體)，其用於預靶向放射免疫療法之方法中。在此類實施例中，螯合型Pb較佳為²¹²Pb。

【0444】 如上所指出，可治療可藉由靶向患者之患病細胞之細胞毒活性治療的任何症狀。較佳治療腫瘤或癌症。然而，本發明之適用性不限於腫瘤及癌症。舉例而言，亦可治療病毒感染，或例如原核生物之另一病

原性生物體感染。視情況，亦可靶向T細胞以治療T細胞驅動之自體免疫性疾病或T細胞血癌。因此，待治療之病狀可包括病毒感染，諸如HIV、狂犬病、EBV及卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)相關之疱疹病毒，及自體免疫疾病，諸如多發性硬化症及移植物抗宿主病藥物。

【0445】如本文所用，術語「癌症」包括實體與血液科癌症，諸如淋巴瘤、淋巴球性白血病、肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭或頸部之癌症、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病(Hodgkin's Disease)、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞癌、膽道癌、中樞神經系統(CNS)腫瘤、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、脊膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤(Ewings sarcoma)，包括以上癌症中之任一者的難治型式，或以上癌症中之一或多者之組合。

【0446】使放射性同位素靶向組織或器官以用於療法之方法可包含：

i)向個體投與如本文所述之多特異性或雙特異性抗體，其中該抗體結合於標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；以及

ii)隨後向個體投與與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種，其中與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種結合於定位於細胞表面之

抗體。

【0447】 視情況，在步驟(i)與(ii)之間，投與清除劑/阻斷劑。清除劑/阻斷劑可結合於對Pb-DOTAM具有特異性之抗原結合位點且阻斷螯合型放射核種的後續結合。清除劑可包含與金屬離子螯合且結合於清除部分的DOTAM或其功能變異體。

【0448】 合適清除部分之實例可包括增加分子尺寸及/或流體動力學半徑，阻礙分子接近腫瘤之能力，不干擾分子結合於循環中之抗體之能力的部分。例示性部分包括親水性聚合物。部分可為例如聚葡萄糖、糊精、PEG、聚唾液酸(PSA)、玻尿酸、羥基乙基澱粉(HES)或聚(2-乙基2-噁唑啉)(PEOZ)之聚合物或共聚物。在其他實施例中，部分可為非結構化肽或蛋白質，諸如XTEN多肽(非結構化親水性蛋白質聚合物)、高胺基酸聚合物(HAP)、脯胺酸-丙胺酸-絲胺酸聚合物(PAS)、彈性蛋白樣肽(ELP)或明膠樣蛋白(GLK)。聚合物之合適分子量可在例如至少50 kDa範圍內，例如50 kDa至2000 kDa之間。舉例而言，分子量可為200-800 kDa，視情況超過300、350、400或450 kDa，且視情況小於700、650、600或550 kDa，視情況約500 kDa。

【0449】 在一些實施例中，清除劑可為結合於聚葡萄糖或其衍生物的DOTAM或其功能變異體(與金屬離子螯合)，例如如下文進一步描述。

【0450】 在一些實施例中，抗體與清除劑之重量比可在1:1、2:1、3:1或4:1至多達20:1、15:1、10:1、8:1、6:1或5:1範圍內，例如在1:1至20:1、1:1至10:1、2:1至8:1或2:1至6:1範圍內。

【0451】 在一些實施例中，清除劑可在用多特異性抗體治療之後約數小時或數天投與。在一些實施例中，較佳地，清除劑在多特異性抗體之

後至少2、4、6、8、10、12、16、18、22或24小時，或至少1、2、3、4、5、6或7天投與。在一些實施例中，較佳地，清除劑在抗體之後不超過14天，例如不超過10、9、8、7、6、5、4、3或2天投與。

【0452】視情況，清除劑在多特異性抗體之後4與10天、4與7天、2與7天或2至4天之間的時間內投與。

【0453】在一些實施例中，Pb放射核種在清除劑之後約數分鐘、數小時或數天投與。在一些實施例中，較佳地，Pb放射核種在清除劑之後至少30分鐘，且視情況在投與清除劑的48小時、24小時、8小時或4小時內投與。在一些實施例中，Pb放射核種可在清除劑投與之後當日投與。

【0454】在一些實施例中，本文所述之抗體可作為組合療法之一部分投與。舉例而言，其可與一或多種化學治療劑組合投與；化學治療劑及抗體可同時或以任一次序相繼投與。

【0455】在一些實施例中，或者或另外，本文所述之抗體可與放射增敏劑組合投與。放射增敏劑及抗體可同時或以任一次序相繼投與。

醫藥調配物

【0456】如本文所述之抗Pb-DOTAM抗體，例如多特異性或雙特異性抗體之醫藥調配物藉由將具有所需純度之此類抗體與一或多種視情況選用之醫藥學上可接受之載劑混合來製備(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版, Osol, A.編輯(1980))，呈凍乾調配物或水溶液形式。醫藥學上可接受之載劑一般在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒性，且包括(但不限於)：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨；苜索氯銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；對

經基苯甲酸烷基酯，諸如對經基苯甲酸甲酯或對經基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；以及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合物，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如聚乙二醇(PEG)。本文中之例示性醫藥學上可接受之載劑進一步包括間質藥物分散劑，諸如可溶性中性活性玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP)，例如人類可溶性PH-20玻尿酸酶糖蛋白，諸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些例示性sHASEGP及使用方法，包括rHuPH20，描述於美國專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種其他葡萄糖胺聚糖酶(諸如軟骨素酶)組合。

【0457】 例示性凍乾抗體調配物描述於美國專利第6,267,958號中。水性抗體調配物包括美國專利第6,171,586號及WO2006/044908中所述之彼等調配物，後者之調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

【0458】 本文之調配物亦可含有超過一種為所治療之特定適應症所必需之活性成分，較佳為具有不會對彼此產生不利影響之補充性活性的活性成分。舉例而言，可能需要進一步提供如上文所論述之化學治療劑及/或放射增敏劑。此類活性成分宜以有效達成預期目的之量的組合存在。

【0459】 活性成分可包覆於微膠囊中，例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合法所製備之微膠囊，例如分別為經基甲基纖維素或明膠微膠囊及聚

(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；包覆於膠態藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中或巨乳液中。此類技術揭示於*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版, Osol, A.編輯 (1980) 中。

【0460】 可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物之半滲透基質，該等基質呈成形製品形式，例如薄膜或微膠囊。

【0461】 用於活體內投與之調配物通常為無菌的。無菌性容易藉由例如用無菌過濾膜過濾來實現。

用於診斷及偵測之方法及組合物

【0462】 本發明進一步提供標靶抗體，例如如本文所述之多特異性抗體，其用於在個體上進行之診斷方法中。該診斷方法可為預先靶向放射免疫成像之方法，例如以診斷疑似患有增生性病變或感染性疾病之個體。在此類實施例中，螯合Pb較佳為 ^{203}Pb 。

【0463】 使放射性同位素靶向組織或器官以進行成像之方法可包含：

i)向個體投與如本文所述之多特異性或雙特異性抗體，其中該抗體結合於標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；以及

ii)隨後向該個體投與與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種，其中與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種結合於定位在標靶細胞之表面的抗體。

【0464】 在另一實施例中，如本文所述之多特異性或雙特異性抗體在投與時可與螯合型Pb放射核種結合。

【0465】視情況，該方法可進一步包含：

iii)使其中與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種所位於或預期位於的組織或器官成像。

【0466】在另一實施例中，本發明之方法可包含使個體之組織或器官成像，其中該個體先前已投與：

i)如本文所述之多特異性或雙特異性抗體，其中該抗體結合於標靶抗原且定位至表現標靶抗原之細胞之表面；以及

ii)向該個體投與與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種，其中與DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種結合於定位至細胞之表面的抗體。

【0467】視情況，在步驟(i)與(ii)之間，投與清除劑/阻斷劑。清除劑、清除劑投與方案及抗體與清除劑之重量比可如上所述。

【0468】標靶抗原可為如本文所論述之任何標靶抗原。在一些實施例中，標靶抗原可為如上文所論述之腫瘤特異性抗原，且成像可為使腫瘤或腫瘤成像之方法。該個體可已知或疑似患有腫瘤。

【0469】舉例而言，該方法可為使患有或疑似患有以下各者之個體中的腫瘤成像的方法：肺癌、非小細胞肺(NSCL)癌、細支氣管肺泡細胞肺癌、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭或頸部之癌症、皮膚或眼內黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、結腸癌、乳癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、子宮頸癌、陰道癌、外陰癌、霍奇金氏病、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、前列腺癌、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、間皮瘤、肝細胞

癌、膽道癌、中樞神經系統(CNS)腫瘤、脊髓軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經鞘瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、脊膜瘤、鱗狀細胞癌、垂體腺瘤及尤文氏肉瘤，包括以上癌症中之任一者的難治型式，或以上癌症中之一或多者之組合。

清除劑

【0470】 在本發明之另一態樣中，本發明者已研發出一種新穎清除劑。此類清除劑可用於如本文所述之診斷、成像或治療方法之任一者中。

【0471】 在一個態樣中，本發明係關於一種基於聚葡萄糖之清除劑，其結合於M-DOTAM或其功能變異體之包含聚葡萄糖或其衍生物。

【0472】 在一些實施例中，清除劑可為下式化合物：

聚葡萄糖-(連接子-(M-DOTAM))_x

其中

聚葡萄糖為聚葡萄糖或其衍生物；

連接子為連接部分；

M-DOTAM為併有金屬離子之DOTAM或其功能變異體；以及

$x \geq 1$ 。

【0473】 在一些實施例中，連接部分可為或包含選自以下之一或多種二價官能基：脲基(-NH-C(O)-NH-)、經取代之脲基(-NR^x-C(O)-NR^x-，其中一個或兩個R^x基團不為H)、硫脲基(-NH-C(S)-NH-)、經取代之硫脲基(-NR^x-C(S)-NR^x-，其中一個或兩個R^x基團不為H)、醯胺基(-C(O)-NH-)、經取代之醯胺基(-C(O)-NR^x-，其中R^x不為H)、硫代醯胺基(-C(S)-NH-)、經取代之硫代醯胺基(-C(S)-NR^x-，其中R^x不為H)、三唑基或經取代之三唑。在此等實施例中，連接部分可視情況包含一或多種其他

二價官能基，諸如伸烷基、伸芳基、伸雜芳基、伸芳烷基及伸雜芳烷基。取代基 R^X 不受特別限制。在特定實施例中， R^X 在存在時係選自由C1-C6烷基、C5-C12芳基、C5-C12雜芳基及鹵基組成之群。

【0474】 在特定實施例中，連接部分可為或包含一或多種選自以下之二價官能基：脲基、硫脲基、醯胺基、硫代醯胺基或三唑基。

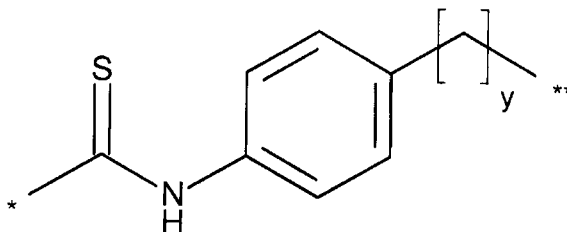
【0475】 在一較佳實施例中，連接部分包含二價硫脲官能基或二價硫代醯胺官能基。

【0476】 在一些實施例中，連接部分包含二價硫脲官能基及視情況經取代之伸芳基。在一些實施例中，連接部分包含二價硫脲官能基、視情況經取代之伸芳基及視情況經取代之伸烷基。在特定實施例中，連接部分包含經由氮原子之一共價鍵結於視情況經取代之伸芳基的二價硫脲官能基。在其他實施例中，連接部分包含經由氮原子之一共價鍵結於視情況經取代之伸芳基的二價硫脲官能基且視情況經取代之伸芳基共價鍵結於視情況經取代之伸烷基。在較佳實施例中，伸芳基未經取代。在特定實施例中，伸芳基為伸苯基。在較佳實施例中，伸烷基未經取代。在特定實施例中，伸烷基為C1-C6伸烷基。在尤其較佳實施例中，伸烷基係選自亞甲基及伸乙基。當存在於連接部分中時，伸芳基及伸烷基可未經取代。在特定實施例中，連接部分由經由氮原子之一共價鍵結於伸芳基的二價硫脲官能基組成且伸芳基共價鍵結於伸烷基。

【0477】 在一些實施例中，連接部分包含二價硫代醯胺官能基及視情況經取代之伸芳基。在一些實施例中，連接部分包含二價硫代醯胺官能基、視情況經取代之伸芳基及視情況經取代之伸烷基。在特定實施例中，連接部分包含經由氮原子之一共價鍵結於視情況經取代之伸芳基的二價硫

代醯胺官能基。在其他實施例中，連接部分包含經由氮原子之一共價鍵結於視情況經取代之伸芳基的二價硫代醯胺官能基且視情況經取代之伸芳基共價鍵結於視情況經取代之伸烷基。在較佳實施例中，伸芳基未經取代。在特定實施例中，伸芳基為伸苯基。在較佳實施例中，伸烷基未經取代。在特定實施例中，伸烷基為C1-C6伸烷基。在尤其較佳實施例中，伸烷基係選自亞甲基及伸乙基。當存在於連接部分中時，伸芳基及伸烷基可未經取代。在特定實施例中，連接部分由經由氮原子之一共價鍵結於伸芳基的二價硫代醯胺官能基組成且伸芳基共價鍵結於伸烷基。

【0478】 在一些實施例中，連接部分可為或包含下式基團：



其中y為1至6 (較佳1或2)，*表示附接於聚葡萄糖或其衍生物之附接點，且**表示附接於DOTAM或其功能變異體之環原子的附接點。

【0479】 在一些實施例中，連接部分可由胺(較佳一級胺)與異氰酸酯或異硫氰酸酯結合而形成。此類結合分別形成二價脲官能基及硫脲官能基。在異氰酸酯為反應物之一的此類實施例中，適當時連接部分可視為包含二價脲官能基或二價醯胺官能基。在異硫氰酸酯為反應物之一的此類實施例中，適當時連接部分可視為包含二價硫脲官能基或二價硫代醯胺官能基。

【0480】 較佳地，x超過1，從而使得各聚葡萄糖具有每分子超過1個M-DOTAM或其功能變異體的平均值。舉例而言，x可為2個或更多個、5個或更多個、10個或更多個、15個或更多個、20個或更多個、25個或更

多個、30個或更多個、35個或更多個、40個或更多個或較佳50個或更多個。本發明者已發現可使用經多個M-DOTAM基團標記之聚葡萄糖提高清除。

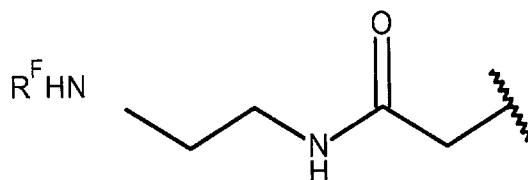
【0481】 DOTAM或其功能變異體可併有僅僅一個連接子，以預聚葡萄糖交聯。

【0482】 可用於清除劑中之聚葡萄糖之衍生物包括胺基聚葡萄糖，其中聚葡萄糖經一或多個胺取代。其中聚葡萄糖之一或多個羥基經胺基取代之羧基甲基醯胺基取代的胺基聚葡萄糖特別適用。此類化合物可藉由用羧基甲基(例如，藉由與氯乙酸反應)修飾聚葡萄糖，且然後進一步與視情況經取代之二胺(較佳烷基二胺，諸如 α,ω -烷二胺，例如乙二胺)反應而產生。

【0483】 胺基為連接子提供附接點。至少30%之可利用胺基可經DOTAM或其功能變異體取代，較佳至少40%、更佳至少50%。

【0484】 較佳地，呈上式之「聚葡萄糖」為胺基聚葡萄糖，對應於經一或多個羧基甲基取代之聚葡萄糖，羧基甲基自身經乙二胺取代。

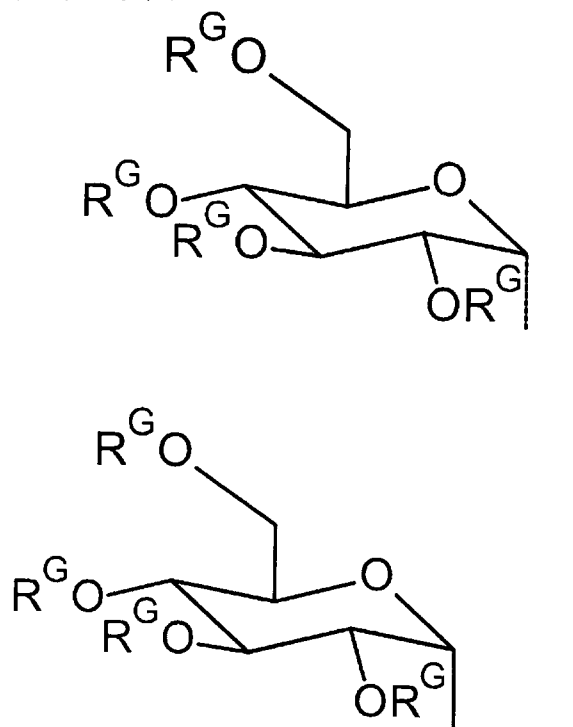
【0485】 聚葡萄糖可經式-CH₂C(=O)NH(CH₂)_fNHR^F之一或多個基團取代，其中R^F表示氫或連接至DOTAM之連接子，且f為1-6，最佳地為2。舉例而言，該等基團可具有下式：



其中波浪線指示與聚葡萄糖上氧之附接點。

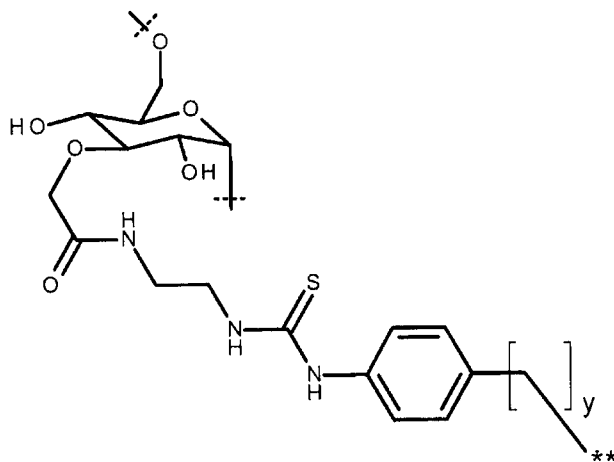
【0486】 胺基聚葡萄糖可具有主要 $\alpha(1,6)$ 連接之吡喃糖基重複單元的骨架，視情況具有例如經由 $\alpha(1,2)$ 、 $\alpha(1,3)$ 或 $\alpha(1,4)$ 糖苷鍵連接之其他

哌喃葡萄糖基單元之分支鏈。至少一些羥基經如上文所論述的經胺基取代之羧基甲基醯胺基(尤其式-CH₂C(=O)NHCH₂CH₂NHR^F之基團)取代。換言之，胺基聚葡萄糖可包含下式單元：



其中各R^G為H、經胺基取代之羧基甲基醯胺基((諸如-CH₂C(=O)NHCH₂CH₂NHR^F)或連至另一哌喃葡萄糖基單元之鏈，主要經由α(1,6)-鍵且其中虛線指示鍵結至相鄰單元。

【0487】清除劑可包括一或多個下式單元：



其中**表示附接於DOTAM或其功能變異體的附接點，且y如上所定

義。

【0488】 聚葡萄糖之衍生物可包括經選自胺基酸或除葡萄糖外之醣的一或多個基團修飾的聚葡萄糖或胺基聚葡萄糖。舉例而言，聚葡萄糖可經一或多個麩胺酸或聚麩胺酸單元，包括Glu、(Glu)₂、(Glu)₃或(Glu)₄修飾(例如封端)。或者或另外，聚葡萄糖可經除葡萄糖外之醣，諸如N-乙醯基半乳胺糖(GalNAc)或由此類醣形成之多醣，諸如三-GalNAc修飾(例如封端)。

【0489】 在一些實施例中，聚葡萄糖組分之分子量可為至少50 kDa，例如50 kDa至2000 kDa之間。舉例而言，分子量可為200-800 kDa，視情況超過300、350、400或450 kDa，且視情況小於700、650、600或550 kDa，視情況約500 kDa。

【0490】 較佳地，呈聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物之葡萄糖單元數目之百分比的胺基數目(葡萄糖單元之胺基「飽和度」)可為至少0.5%、至少1%、至少2%、至少5%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%。在一些實施例中，較佳地，聚葡萄糖之胺基飽和度為至少或約1%或10%，例如1%-10%。

【0491】 較佳地，呈聚葡萄糖衍生物之胺基單元數目之百分比的DOTAM基團數目(胺基聚葡萄糖組分之DOTAM「飽和度」)可為至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%。在一些實施例中，較佳地，聚葡萄糖衍生物之可利用胺基之DOTAM飽和度為至少或約40%或50%，例如40%-60%。

【0492】 使用清除劑之一種潛在困難為其可能進入腫瘤，且結合於腫瘤相關抗體不利地影響隨後放射性配位體之結合。

【0493】 本發明者已進一步發現，當使用基於聚葡萄糖之清除劑時，可實現自血液良好清除，以及清除劑低滲透至腫瘤中，該基於聚葡萄糖之清除劑具有i)高平均分子量及ii)經受分子量截止，使得低於某一尺寸之片段除去。截止可在結合步驟前應用於聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物；及/或在結合後應用於清除劑；及/或在與金屬錯合之後應用於清除劑。

【0494】 因此，可用於本發明之清除劑可為包含聚葡萄糖或其衍生物(例如如上所定義，較佳胺基聚葡萄糖)結合於金屬螯合物的基於聚葡萄糖之清除劑，其中i)聚葡萄糖或其衍生物之平均分子量較佳為200-800 kDa，視情況超過300、350、400或450 kDa，且視情況小於700、650、600或550 kDa，視情況約500 kDa；及ii)已除去小於分子量截止值之聚葡萄糖、聚葡萄糖衍生物或清除劑，其中分子量截止值為50 kDa或更高、100 kDa或更高或200 kDa或更高，視情況在50 kDa-250 kDa或50 kDa-200 kDa，視情況100 kDa-200 kDa範圍內，視情況大約100 kDa或150 kDa或200 kDa。(為避免疑問，應注意若陳述截止值為50 kDa或更高，則此意謂截止值可為50 kDa或超過50 kDa之任何值，但其仍為除去小於截止值之聚葡萄糖、聚葡萄糖衍生物或清除劑)。

【0495】 作為清除劑之重量百分比，具有低於截止值之分子量的物種之量可為例如5 wt.%或更少、4 wt.%或更少、3 wt.%或更少、2 wt.%或更少、1 wt.%或更少、0.5 wt.%或更少、0.4 wt.%或更少、0.3 wt.%或更少、0.2 wt.%或更少、0.1 wt.%或更少或0.01 wt.%或更少。較佳地，清除劑基本上不含具有低於截止值之分子量的物種。

【0496】 分子量截止可藉由過濾，例如藉由透濾、超濾、切向流過濾或橫流過濾來達成。較佳地，進行至少2個過濾步驟，視情況至少3個。「平均分子量」意謂如藉由SEC-MALS分析所測定之重量平均分子量。

【0497】 應瞭解，當併入DOTAM或其功能變異體中時，金屬將呈金屬離子存在，且氧化態將視具體元素而變化。因此，熟習此項技術之讀者瞭解例如術語鉛、Pb或²⁰⁶Pb意欲涵蓋該元素之離子形式，尤其Pb(II)。

【0498】 清除劑中存在之金屬可為鉛之穩定(非放射性)同位素，或另一金屬離子之穩定或基本上穩定同位素，其限制條件為抗體以高親和力識別金屬離子-DOTAM錯合物。舉例而言，其他合適金屬可為Zn (Zn²⁺)、Ca (Ca²⁺)或²⁰⁹Bi (Bi²⁺)，後者為放射性，但因其半衰期極長故視為實際上穩定。

【0499】 在另一態樣中，本發明係關於一種製備清除劑之方法，其包含使聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物結合於DOTAM或其功能變異體或衍生物，其中該方法包括在DOTAM或其功能變異體結合於聚葡萄糖之前及/或之後用Pb或如上所述之另一金屬離子[例如Pb(II)]螯合DOTAM。

【0500】 在另一態樣中，本發明係關於一種製備清除劑之方法，其包含：

藉由DOTAM或其功能變異體或衍生物結合於聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物形成結合物；

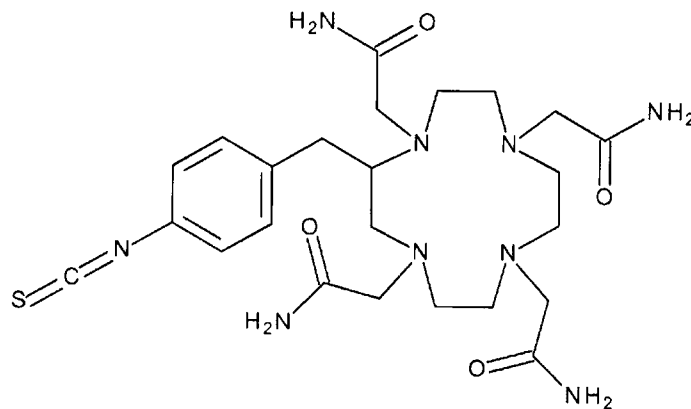
其中在結合前聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物進行過濾步驟以除去低於例如50 kDa或更高、100 kDa或更高或200 kDa或更高，視情況在50 kDa-250 kDa或50 kDa-200 kDa、視情況100 kDa-200 kDa範圍內之分子量截止值/臨限值的物種，例如低於100 kDa、150 Kda或200 kDa的物種，或

其中

該方法進一步包含使結合物進行過濾步驟以除去低於例如50 kDa或更高、100 kDa或更高或200 kDa或更高，視情況在50 kDa-250 kDa或50 kDa-200 kDa、視情況100 kDa-200 kDa範圍內之分子量截止值/臨限值的物種，例如低於100 kDa、150 Kda或200 kDa的物種。

【0501】 如上所述，本發明者已發現應用分子量截止值來除去低於某一尺寸之片段係有益的。過濾方法可為例如透濾。熟習此項技術之讀者瞭解「除去低於分子量截止值/臨限值的物種」中的詞語「除去」與「數目降低」同義，且視所採用之特定過濾方法而定，一些殘餘低分子量物種可留存。作為清除劑之重量百分比，具有低於截止值之分子量的物種之量可為例如5 wt.%或更少、4 wt.%或更少、3 wt.%或更少、2 wt.%或更少、1 wt.%或更少、0.5 wt.%或更少、0.4 wt.%或更少、0.3 wt.%或更少、0.2 wt.%或更少、0.1 wt.%或更少或0.01 wt.%或更少。較佳地，在過濾之後清除劑基本上不含具有低於截止值/臨限值的分子量的物種。

【0502】 DOTAM功能變異體或衍生物可如上所定義，其中R¹基團中之至少一個充當連接部分。舉例而言，合適(連接子-(M-DOTAM))基團可藉由使下式化合物與如上所述之胺基聚葡萄糖反應而形成：



【0503】 此化合物之合成描述於Chappell等人 Nuclear Medicine

and Biology, 第27卷, 第93-100頁, 2000, 且DOTAM衍生物可購自 Macrocyclics, Inc. (Plano, Texas)。

【0504】 DOTAM或其功能變異體可過量添加, 從而使得各聚葡萄糖衍生物具有超過1個DOTAM之平均值。各聚葡萄糖上DOTAM或其功能變異體之平均數目可大於1, 例如2個或更多個、3個或更多個、4個或更多個、5個或更多個、10個或更多個、15個或更多個、20個或更多個、25個或更多個、30個或更多個、35個或更多個、40個或更多個、50個或更多個、100個或更多個或較佳40個或更多個。本發明者已發現可使用結合於多個M-DOTAM基團之聚葡萄糖提高清除。

【0505】 較佳地, 聚葡萄糖具有200-800 kDa, 視情況超過300、350、400或450 kDa且視情況小於700、650、600或550 kDa, 視情況約500kDa之平均分子量。

【0506】 製備清除劑之方法亦可包含螯合步驟, 涉及用金屬離子螯合DOTAM或其功能變異體。金屬離子可為非放射性同位素, 例如Pb、Ca、Zn之非放射性同位素或實際上穩定同位素, 諸如²⁰⁹Bi。

【0507】 在DOTAM或其功能變異體結合於聚葡萄糖之前及/或在DOTAM或其功能變異體結合於聚葡萄糖之後但視情況在過濾步驟之前進行螯合步驟。DOTAM或其功能變異體對金屬離子之螯合對於確保雙特異性抗體適當結合於清除劑, 例如確保DOTAM或其功能變異體採用正確構形以與抗體嚙合而言為必需的。

【0508】 當該方法包含螯合步驟時, 該方法較佳亦涉及除去未結合金屬之隨後步驟。此可藉由添加其他螯合物來達成, 該螯合物隨後可在過濾步驟期間與聚葡萄糖結合之DOTAM或其功能變異體分離。其他螯合物

優先不同於DOTAM或其功能變異體。較佳地，其他螯合物具有比聚葡萄糖-螯合物結合物低的分子量，以便於基於尺寸之分離。舉例而言，其他螯合物可為聚胺基羧酸，諸如乙二胺四乙酸(EDTA)或其鹽。

【0509】 較佳地，製備清除劑之方法包括：

i)藉由DOTAM或其功能變異體或衍生物結合於聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物形成結合物；

ii)視情況從步驟(i)之產物除去低分子量物種；

iii)用金屬離子，例如Pb、Bi、Zn或Ca之離子螯合該結合物；

iv)添加另一螯合物以螯合未結合之金屬離子；以及

v)進行過濾步驟以除去低於分子量截止值/臨限值之物種。

DOTAM螯合型Pb放射核種

【0510】 用DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種可用於如本文所述之診斷、成像或治療之任一方法中。應瞭解，當用於此類方法中時，用DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種包含於組合物中。在一個特定實施例中，該組合物包含由DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種及未與Pb放射核種螯合之DOTAM或其功能變異體。因此，在另一態樣中，本發明係關於此類組合物，及/或用於本文所述之成像或治療之任一方法中的此類組合物。如此類方法中提及之與DOTAM螯合之Pb放射核種可呈如本文所述之組合物形式。

【0511】 未與Pb放射核種螯合之DOTAM或其功能變異體可為未螯合之DOTAM或其功能變異體。當在活體內使用時，未螯合之DOTAM或其功能變異體可與來自環境之金屬離子，例如與鈣離子形成錯合物。與DOTAM或其功能變異體螯合之此類鈣離子為藥理學上非活性的，且可阻

斷與DOTAM或其變異體螯合之藥理學上活性Pb放射核種結合腫瘤中之標靶，且因此可降低治療功效，及/或成像及診斷之標準化吸收值。

【0512】本發明者發現藉由在所界定條件下淬滅未螯合DOTAM或其功能變異體，可增加螯合型Pb放射核種之活體內調配物的控制，及/或可避免或減少醫藥活性螯合物與醫藥學上非活性螯合物之間的潛在競爭。因此，在一些實施例中，未與Pb放射核種螯合之DOTAM或其功能變異體為與非放射性金屬離子螯合之DOTAM或功能變異體。

【0513】在一些實施例，螯合型Pb放射核種為 ^{212}Pb 。在一些實施例中，螯合型Pb放射核種為 ^{203}Pb 。

【0514】應瞭解，當併入DOTAM或其功能變異體中時，Pb放射核種將呈金屬離子存在，且氧化態將視具體元素而變化。因此，熟習此項技術之讀者瞭解例如術語鉛、Pb或 ^{206}Pb 意欲涵蓋該元素之離子形式，尤其Pb(II)。

【0515】組合物中存在的非放射性金屬可為鉛之穩定(非放射性)同位素或另一金屬離子之穩定或基本上穩定同位素。舉例而言，其他合適金屬可為Gd (Gd $^{2+}$)、Cu (Cu $^{2+}$)、Zn (Zn $^{2+}$)、Ca (Ca $^{2+}$)或 ^{209}Bi (Bi $^{2+}$)，後者為放射性，但因其半衰期極長故視為實際上穩定。在一些實施例中，金屬為Ca或Cu。在一些實施例中，金屬為Ca。

【0516】DOTAM功能變異體或衍生物可如上所定義。

【0517】在另一態樣中，本發明係關於一種製備包含經DOTAM或其功能變異體螯合之Pb放射核種之組合物的方法，其包含：

- i)提供Pb放射核種，
- ii)用DOTAM或其功能變異體螯合Pb放射核種，

iii)用非放射性金屬離子螯合未螯合之DOTAM或其功能變異體。

【0518】 步驟iii)中未螯合之DOTAM或其功能變異體為在步驟ii)中未與Pb放射核種螯合之DOTAM或其功能變異體。

【0519】 非放射性金屬離子可為Pb、Ca、Zn、Gd或Cu之離子。在一些實施例中，金屬離子為Ca或Cu之離子。在一些實施例中，金屬離子為Ca之離子，尤其Ca²⁺。

【0520】 在一些實施例中，在步驟ii)之後剩餘的未螯合之DOTAM或其功能變異體為添加至Pb放射核種之DOTAM或其功能變異體之至少90 mol%、至少95 mol%、至少99 mol%。在一個特定實施例中，在步驟ii)之後剩餘的未螯合之DOTAM或其功能變異體為至少99 mol%。

【0521】 在一些實施例中，在步驟iii)之後剩餘的未螯合之DOTAM或其功能變異體小於添加至Pb放射核種之DOTAM或其功能變異體的5 mol%、小於2 mol%、小於1 mol%、小於0.1 mol%、小於0.01 mol%。在一個特定實施例中，在步驟iii)之後剩餘的未螯合之DOTAM或其功能變異體小於1 mol%、小於0.1 mol%、小於0.01 mol%。

【0522】 在步驟a)中提供之Pb放射核種可藉由將衰變成所關注之Pb放射核種的放射性材料置放於產生劑中來產生，其中該放射性材料結合於固體材料。舉例而言，在產生²¹²Pb中此類放射性材料可為²²⁴Pu。然後在水溶液中自產生劑萃取所關注之放射核種，其可含有放射及化學雜質。含有所關注之Pb放射核種及雜質之水溶液經由液相管柱層析法純化。液相管柱層析法可為萃取層析法或分配層析法。萃取或分配層析法係基於有待在有機相或萃取劑與水相之間分離的要素的分佈，其中萃取劑結合於惰性載體且與其形成固定相，而水相表示移動相。

【0523】 萃取層析法可使用固定相，其包括具有直鏈或分支鏈之冠醚及尤其環己基或苯甲基經一或多個C[至C]2烷基取代之二環己烷并-18-冠-6或二苯并-18-冠-6作為萃取劑，在不可與水混溶之有機稀釋劑，通常長烴鏈醇、換言之C_x鏈及上述中的溶液中。

【0524】 詳言之，可使用固定相，其包含4,4'(5')-二-er-丁基環己烷并-18-冠-6作為萃取劑，較佳在辛-1-醇中稀釋。此類固定相具有選擇性保留含有1.5至2.5莫耳/公升強酸之水溶液中存在的超過99% ²¹²Pb的益處，該水溶液通常與用於自鐳-224產生劑萃取²¹²Pb的水溶液類型相對應。此類型固定相例如用於瓶子中且亦包裝在用於層析之來自公司TRISKEM International之商業名稱為「Pb樹脂」的備用管柱或濾筒中。

【0525】 或者，包含所需放射核種及雜質之溶液亦可用離子交換層析法，例如陽離子交換層析法純化。

【0526】 一種產生及純化²¹²Pb之方法描述於WO2013174949中。

序列

【0527】如本文中所提及之某些序列提供於下表中。

表2

SEQ ID NO	描述	序列
1	重鏈CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-213	gfslstysms
2	重鏈CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-213	figsrgdtyyaswakg
3	重鏈CDR3 <Pb-Dota m> PRIT-213	erdpygggaypphl
4	輕鏈CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-213	qsshsvysdndla
5	輕鏈CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-213	qasklas
6	輕鏈CDR3 <Pb-Dotam> PRIT-213	lgyddesdyg
7	<Pb-Dotam> PRIT-213之重鏈可變域1	vtlkesgpvl vkpteltlt ctvsgfslst ysmswirqpp gkalewlgfi gsgdtyyas wakgrltisk dtsksqvvt mtnmdpvdta tyycarerdp ygggaypphl wrgtlvtvs s
8	輕鏈可變域<Pb-Dotam> PRIT-213	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawayqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
9	重鏈可變域 <Pb-Dotam> PRIT-214	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wrgtlvtvs s
10	輕鏈可變域<Pb-Dotam> PRIT-214	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawayqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k

11	重鏈CDR1 <CEA>	GFNIKDTYMH
12	重鏈CDR2 <CEA>	RIDPANGNSKYVPKFQG
13	重鏈CDR3 <CEA>	FGYYVSDYAMAY
14	輕鏈CDR1 <CEA>	RAGESVDIFGVGFLH
15	輕鏈CDR2 <CEA>	RASNRAT
16	輕鏈CDR3 <CEA>	QQTNEDPYT
17	重鏈可變域<CEA> 84.66	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANG NSKY VPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGLVT VSS
18	輕鏈可變域<CEA> 84.66	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRAT GIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIK
19	雙特异性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-214 VH_84.66之重鏈1	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfgrvti tadtststay melsslr sed tavyycapfg 101 yvvsdyamay wgqglvtvs sastkpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swngaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvytlppcrd eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgggggs gggsgggggs vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygflslt 501 ysmwirqpp gkglewigfi gsgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk

		551 lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wrgtltvts s
20	雙特異性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-214 VL_84.66之重鏈2	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqrvti tadtststay melsslr sed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swngaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvctlppsr d eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsgggggs gggsgggggs iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k
21	輕鏈 <CEA> 84.66	1 eivltqspat lslspgerat lscragesvd ifgvglhwy qqkpgqaprl 51 liyrasnrat giparfsgsg sgtdfiltis slepedfavy ycqqtnedpy 101 tfgggtklei krtvaapsvf ifppsdeqlk sgtasvcll nnfyreakv 151 qwkvdnalqs gnsqesvteq dskdstysls stltlkady ekhkvyacev 201 thqglsspvt ksfnrgec
22	雙特異性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-213 VH_84.66 之重鏈1→ 杵	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqrvti tadtststay melsslr sed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swngaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep

		<p>351 qvylppcrd eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsggggs gggsggggs vtlkesgpvl vkpteltlt ctvsqfslst 501 ysmswirqpp gkalewlgfi gsrqdytyas wakgrltisk dtsksqvvt 551 mtnmdpvdta tyycarerdp ygggaypphl wrgtlvtvs s</p>
23	<p>雙特異性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-213 VL_84.66 之重鏈2→ 白</p>	<p>1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqrvti tadtststay melsslr sed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swngaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakqpprep 351 qvctlppsr d eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsggggs gggsggggs iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdy gfgggtkvei k</p>
24	<p>雙特異性<CEA/Pb-Dotam>兔Dotam _84.66之重鏈1</p>	<p>1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqrvti tadtststay melsslr sed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swngaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvsvl tvlhqdwlng keyckvsnk algapiekti skakqpprep 351 qvctlppsr d eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp</p>

		<p>401 vldsdgsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsggggs gggsggggs avltqtpspv spavggvti scqsshsvys 501 dndlwyqqk lqppklliy qasklasgvs srfsgsgsgt qfltisgvq 551 sddaatyycl ggyddesdy gfgggevuvv k</p>
25	雙特異性四價<CEA/Pb-Dotam>兔 Dotam_84.66之重鏈2	<p>1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg 101 yvvsdyamay wgqgtlvts sastkgpsvf plapssksts ggtaalclv 151 kdyfpepvtv swngaltsg vhtfpavlqs sglylssvv tpssslgtq 201 tyicvnhkp sntkvdkkve pkscdkthc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtevvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakqprep 351 qvytlppcrd eltknqvlw clvkgfypsd iavewesngq pennyktpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 gggsggggs gggsggggs qsveesggrl vtpgtpllt ctvsgfslst 501 ymswvrqap gkglewigfi gsrtdtyyas wakgrftvsr tttvdlkit 551 spttedaty fcarerdpvg ggaypphlwg pgtlvvss</p>
26	連接子	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
27	Immunomedics hNM14	<p>1 evqlvesggg vvqprslrl scsasgfdft tywmswvrqa pgkglewige 51 ihpdsstiny apslkdrfti srdnakntlf lqmdslrped tgvyfcasly 101 fgfpwfaywg qgtpvtvssa stkgpsvfpl apsskstsgg taalgclvkd 151 yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg lyslssvvtv pssslgtqy 201 icvnhkpsn tkvdkkvepk scdkthtcpp cpapeaaggp svflfppkpk 251 dtlmisrtpv vtevvvdvsh edpevkfnwy vdgvevhnak tkpreeqyns 301 tyrvsvltv lhqdwlngke ykckvsnkal gapiektisk akqpprepqv 351 ytlppcrdel tknqvlwcl vkgfydia vewesngqpe nnyktppvl</p>

		<p>401 dsdgsfflys kltvdksrwq qgnvfscsvm healnhytq kslslspggg 451 ggsggggsgg ggsggggsqs veesggrlvt pgtplltct vsqfslstys 501 mswvrqapgk glewigfigs rgdtyyaswa kgrftvsrts ttvdlkitsp 551 ttedtatyfc arerdpyggg aypphlwpgg tlvtvss</p> <p>1 evqlvesggg vvqprslrl scsasgfdft tywmswvrqa pgkglewige 51 ihpdsstiny apslkdrfti srdnakntlf lqmdslrped tgvyfcasly 101 fgfpwfaywg qgtpvtvssa stkgpsvfpl apsskstsgg taalgclvkd 151 yfpepvtvsw nsgaltsgvh tfpavlqssg lyslssvvtv pssslgtqty 201 icnvnhkpsn tkvdckvepk scdkthtcpp cpapeaaggp svflfppkpk 251 dtlmisrtpv vtcvvvdvsh edpevkfnwy vdgvevhnak tkpreeqyns 301 tyrvsvltv lhqdwlngke ykckvsnkak gapiektisk akqgprepqv 351 ctlppsrdel tknqvslsca vkgfypsdiawewesngqpe nnykttppvl 401 dsdgsfflvs kltvdksrwq qgnvfscsvm healnhytq kslslspggg 451 ggsggggsgg ggsggggsav ltqtpspvsp avggvtvise qsshsvysdn 501 dlawyqqklg qppklliyqa sklasgvssr fsgsgsgtqf tltisgvqsd 551 daatyyclgg yddesdygf gggtvsvvk</p> <p>1 diqltqspss lsasvgdrvt itckasqdvq tsvawyqqkp gkapklliyw 51 tstrhtgvps rfsrgsgtd fttisslqp ediatyycqq yslyrsfggq 101 tkveikrtva apsvfifpps deqlksqtas vvcllnnfyp reakvqwkvd 151 nalqsgnsqe svteqdsksd tyslsslsl skadyekhhkv yacevthqgl 201 sspvtksfnr gec</p>
28	重鏈CDR1 <ERBB2>	DTYIH

29	重鏈CDR2 <ERBB2>	RIYPTNGYTRYADSVKGG
30	重鏈CDR3 <ERBB2>	WGGDGFYAMDY
31	輕鏈CDR1 <ERBB2>	RASQDVNTAVA
32	輕鏈CDR2 <ERBB2>	SASFLYS
33	輕鏈CDR3 <ERBB2>	QQHYTTPPT
34	重鏈可變域<ERBB2>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSS
35	輕鏈可變域<ERBB2>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
36	雙特异性三價ERbB2/Pb-Dotam (P1AD9827)之重鏈1 (杵)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGG GGSVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTY YASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRG TLVTVSS
37	雙特异性三價ERbB2/Pb-Dotam (P1AD9827)重鏈2 (臼)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

		PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESPTYGFGGGTKVEIK
38	輕鏈<ErbB2> (P1AD9827)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
39	重鏈CDR1 <CD20>	YSWIN
40	重鏈CDR2 <CD20>	RIFPGDGD TDYNGKFKG
41	重鏈CDR3 <CD20>	NVFDGYWLVY
42	輕鏈CDR1 <CD20>	RSSKLLHSNGITYLY
43	輕鏈CDR2 <CD20>	QMSNLVS
44	輕鏈CDR3 <CD20>	AQNLELPYT
45	重鏈可變域<CD20>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGL VTVSS
46	輕鏈可變域<CD20>	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK
47	雙特異性三價CD20/Pb-Dotam (P1AD9826)之重鏈1 (杵)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP

		EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGG GSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYY ASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGT LVTVSS
48	雙特異性三價CD20/Pb-Dotam (P1AD9826)之重鏈2 (白)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGG SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHVSYSNDLAWYQQKPKGAPKLLIYQASKLASG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCLGGYDDESPTYGFGGGTKVEIK
49	輕鏈<CD20> (P1AD9826)	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSKLLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
50	P1AE1766 >CEA 輕鏈RK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGV SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SD RK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

51	具有DOTAM VL / CH1之PIAE1766 CEA 重鏈	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSIQMTQSPSSLSASVGRVITTCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQAS KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESPTYGFGGGTKVEIKSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC</p>
52	具有DOTAM VH / CK之PIAE1766 CEA 重鏈	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGG GGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGD TYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWG RGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

53	具有VH / CK之P1AE1767 >DOTAM 「LC」	VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYAS WAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	P1AE1767 CEA 輕鏈RK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGV SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	具有DOTAM VL / CH1之P1AE1767 CEA重鏈(杵)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGG SGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQAS KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDDESPTYGFGGGTKVEIKSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
56	P1AE1767 CEA重鏈(白)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC

		PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	P1AE1768 >CEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGV SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
58	具有VL/CH1之P1AE1768 > DOTAM重鏈 (白)	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	P1AE1768 CEA 重鏈(杵)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	P1AE1768	VTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYAS

	DOTAM 「LC」 VH/CK	WAKGRLTISKDTSKTSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
61	具有VH/CK之P1AE1769 DOTAM 「LC」	VTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYAS WAKGRLTISKDTSKTSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	P1AE1769 CEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGV SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	具有CEA VH/CH1/DOTAM VL/CH1 之P1AE1769 CEA HC(白)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGG GGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLY LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
64	P1AE1769 CEA HC (杵)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVTFITDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ

		GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	P1AE1770 CEA LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
66	具有DOTAM scFab之P1AE1770 CEA HC : DOTAM VL/Ck/連接子 /VH CH1 (杵)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGG SGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQAS KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLGGYDDESPTYGFGGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQP PGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKQVVLTMNMDPVDATYYCARE RDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

		PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSC
67	P1AE1770 CEA HC (ㄟ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTG EATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0528】 本文引用的所有專利及科學文獻之揭示內容以全文引用的方式明確併入本文中。

【0529】 現參考特定實例進一步描述本發明。應瞭解，考慮到上文提供之一般描述，可實施各種其他實施例。

實例

實例1：免疫接種之描述

兔之免疫接種

【0530】 2種對映異構體Pb-DOTAM-烷基-PEG₄-KLH溶離份(*MS2-DOTAM KLH溶離份1*及*MS2-DOTAM KLH溶離份2*)之1:1混合物用於紐西蘭白兔或如WO 2000/46251、WO 2002/12437、WO 2005/007696、WO 2006/047367、US 2007/0033661及WO 2008/027986中報導之包含人類免疫球蛋白之轉殖基因兔的免疫接種。各兔經500 µg用完全弗氏佐劑 (complete Freund's adjuvant) 乳化之免疫原混合物免疫接種，在第0天，藉由皮內施加且在第7天、第14天、第28天、第56天，藉由交替肌肉內及皮下施加各500 µg。隨後，兔接受每月500 µg之皮下免疫接種，且在免疫接種之後7天獲取少量血液樣品以測定血清力價。在免疫接種第三個月期間及第九個月期間(在免疫接種之後5-7天)獲取較大血液樣品(估計總血量之10%)，且分離外周單核細胞，其用作B細胞選殖過程中抗原特異性B細胞之來源(實例2)。

血清力價之測定(ELISA)

【0531】 將2個對映異構體Pb-DOTAM溶離份(PJRD05.133F1或PJRD05.133F2)中之每一者於PBS中以1 µg/ml固定在96孔NUNC Maxisorp盤上，100微升/孔，接著：用200微升/孔含2% Crotein C之PBS

阻斷盤；一式兩份地塗覆抗血清於含0.5% Crotein C之PBS中之連續稀釋液，100微升/孔；用HRP結合之驢抗兔IgG抗體(Jackson Immunoresearch/Dianova 711-036-152；1/16 000)及抗生蛋白鏈菌素-HRP偵測；各在含0.5% Crotein C之PBS中稀釋，100微升/孔。對於所有步驟，將盤在37°C下培育1小時。在所有步驟之間，將盤用含0.05% Tween 20之PBS洗滌3次。藉由以100微升/孔添加BM Blue POD可溶性受質(Roche)顯現信號；且藉由以100微升/孔添加1 M HCl停止。在450 nm下，以690 nm作為參考，讀出吸光度。將力價定義為產生半最大信號的抗血清之稀釋度。

實例2：來自兔之B細胞選殖

分離兔外周血單核細胞(PBMC)

【0532】由經免疫接種之兔取得血液樣品。用1x PBS (PAA, Pasching, Austria)將含EDTA之全血稀釋兩倍，隨後使用哺乳動物淋巴細胞(Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada)根據製造商之說明書來進行密度離心。用1× PBS將PBMC洗滌兩次。

EL-4 B5培養基

【0533】使用補充有10% FCS (Hyclone, Logan, UT, USA)、2 mM 麩醯胺酸、1%青黴素/鏈黴素溶液(PAA, Pasching, Austria)、2 mM丙酮酸鈉、10 mM HEPES (PAN Biotech, Aidenbach, Germany)及0.05 mM β-巰基乙醇(Gibco, Paisley, Scotland)之RPMI 1640 (Pan Biotech, Aidenbach, Germany)。

盤之塗佈

【0534】在4°C下將無菌細胞培養6孔盤用碳酸鹽緩衝液(0.1 M碳酸

氫鈉、34 mM碳酸氫二鈉，pH 9.55)中2 µg/ml KLH塗佈隔夜。在使用之前將盤在無菌PBS中洗滌三次。在室溫下將抗生蛋白鏈菌素塗佈之無菌6孔盤(Microcoat, Bernried, Germany)用生物素化TCMC-Pb-dPEC3-生物素異構體A (1 µg/ml)及B (1 µg/ml)於PBS中之1+1對映異構體混合物塗佈3小時。在淘選步驟前，將此6孔盤用無菌PBS洗滌三次。

巨噬細胞/單核球之耗盡

【0535】 將PBMC接種在KLH塗佈之無菌6孔盤上以經由非特異性黏附耗盡巨噬細胞及單核球且移除結合於KLH之細胞。各孔最多填充4 ml培養基及多達 6×10^6 來自經免疫接種之兔的PBMC，且使其在37°C及5% CO₂下結合1小時。上清液中之細胞(外周血淋巴細胞(PBL))用於抗原淘選步驟。

B細胞富集在含Pb之TCMC對映異構體上

【0536】 將塗有TCMC-Pb-dPEC3-生物素異構體A與B之對映異構體混合物的6孔盤用每4 ml培養基多達 6×10^6 PBL接種，且使其在37°C及5% CO₂結合下1小時。藉由用1×PBS仔細洗滌該等孔1-3次來移除非黏附細胞。在37°C及5% CO₂下藉由胰蛋白酶使殘餘黏性細胞分離，持續10分鐘。用EL-4 B5培養基停止胰蛋白酶作用。將細胞保持在冰上直至免疫螢光染色。

免疫螢光染色及流動式細胞測量術

【0537】 抗IgG FITC (AbD Serotec, Düsseldorf, Germany)用於進行單細胞分類。為進行表面染色，將來自耗盡及富集步驟之細胞與抗IgG抗體FITC抗體在PBS中一起培育且在黑暗中在4°C下培育45分鐘。在染色之後，用冰冷PBS洗滌PBMC兩次。最後，使PBMC再懸浮於冰冷的PBS

中且立即進行FACS分析。在FACS分析之前，添加濃度為5 µg/ml之碘化丙錠(BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)以區分死細胞與活細胞。

【0538】 配備有電腦之Becton Dickinson FACS Aria及FACSDiva軟體(BD Biosciences, USA)用於單細胞分類。

B細胞培養

【0539】 藉由Lightwood等人(J Immunol Methods, 2006, 316: 133-143)培養兔B細胞。簡言之，在培育箱中，在37°C下於96孔盤中將單次分選之兔B細胞與200微升/孔含有Pansorbin細胞(1:100000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Deutschland)、5%兔胸腺細胞上清液(MicroCoat, Bernried, Germany)及經 γ 照射之鼠類EL-4B5胸腺瘤細胞(5×10^5 個細胞/孔)之EL-4 B5培養基一起培育7天。移出B細胞培養之上清液進行篩選，且立即收穫殘留細胞並在-80°C下於100 µl RLT緩衝液(Qiagen, Hilden, Germany)中冷凍。

實例3：兔抗體之表現

V-結構域之PCR擴增

【0540】 使用NucleoSpin 8/96 RNA套組(Macherey&Nagel ; 740709.4, 740698)，根據製造商之方案由B細胞溶解產物(再懸浮於RLT緩衝液-Qiagen目錄號79216中)製備總RNA。用60 µl不含RNA酶之水溶解RNA。根據製造商之說明書，使用Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen ; 18080-400)及寡聚dT引子，使用6 µl RNA藉由逆轉錄酶反應產生cDNA。所有步驟均在Hamilton ML Star系統上進行。利用AccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040)，在50 µl之最終容積中，重鏈使用引子rbHC.up及rbHC.do，且輕鏈使用引子rbLC.up及

rbLC.do，使用4 μ l cDNA來擴增免疫球蛋白重鏈及輕鏈可變區(VH及VL)(表3)。所有正向引子均對信號肽(分別VH及VL之信號肽)具有特異性，而反向引子對恆定區(分別VH及VL之恆定區)具有特異性。RbVH+RbVL之PCR條件如下：在94°C下熱起動5分鐘；進行35個在94°C下20s、在70°C下20s、在68°C下45s之循環，且在68°C下最終延長7分鐘。

表3

rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLC.up	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLC.do	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

【0541】 在50 μ l PCR溶液中取8 μ l裝載於48 E-Gel 2% (Invitrogen G8008-02)上。根據製造商之方案，使用NucleoSpin Extract II套組 (Macherey&Nagel；740609250)清潔陽性PCR反應，且在50 μ l溶離緩衝液中將其溶離。所有清潔步驟均在Hamilton ML Starlet系統上進行。

兔單株二價抗體之重組表現

【0542】 針對兔單株二價抗體之重組表現，藉由懸垂選殖法 (overhang cloning method) (RS Haun等人, Biotechniques (1992) 13, 515-518；MZ Li等人, Nature Methods (2007) 4, 251-256)將編碼VH或VL之PCR產物以cDNA形式選殖至表現載體中。表現載體含有由以下各者組成之表現卡匣：包括內含子A之5' CMV啟動子，及3' BGH聚腺苷醯化序列。除表現卡匣之外，質體含有pUC18衍生之複製起點及為大腸桿菌中

之質體擴增賦予安比西林抗性的 β -內醯胺酶基因。使用基礎質體之三種變異體：一種質體含有經設計以接納VH區之兔IgG恆定區，而其他兩種質體含有兔或人類 κ LC恆定區以接納VL區。藉由PCR，使用重疊引子來擴增編碼 κ 或 γ 恆定區及VL/VH插入序列的線性化表現質體。經純化之PCR產物與T4 DNA-聚合酶一起培育，產生單股懸垂物。藉由添加dCTP停止反應。在下一步驟中，將質體及插入物合併且與recA一起培育，其誘發位點特異性重組。將重組質體轉型至大腸桿菌中。次日，選取生長菌落，且藉由質體製備、限制分析及DNA測序來測試恰當的重組質體。為表現抗體，藉由使用239-Free轉染劑(Novagen)，根據試劑供應商所建議之程序，將經分離之HC及LC質體短暫共轉染至2 ml (96孔盤) FreeStyle HEK293-F細胞(Invitrogen R790-07)中。在1週之後收穫上清液且遞送進行純化。

實例4：兔單株抗體之選擇

【0543】 下表展示多種單株二價兔抗體之特性。選擇PRIT-0128作為主要候選抗體的原因在於其與螯合Pb及Bi的結合相當，與其他螯合金屬之結合減少，且具有高親和力(<100 pM)。

【0544】 如下所述進行SET (溶液平衡滴定)分析。

【0545】 分析盤之製備：將384孔抗生蛋白鏈菌素盤(Nunc，Microcoat #11974998001)與25微升/孔DOTAM-生物素-異構體混合物在濃度為20 ng/ml之PBS-緩衝液中在4°C下培育隔夜。

【0546】 使抗DOTAM抗體樣品與游離DOTAM-金屬螯合物(Pb、Bi、Ca、Cu、Zn、Mg、Fe)達成平衡：0.01 nM-1 nM抗體用相關DOTAM-金屬螯合物以在2500 nM、500 nM或100 nM DOTAM-金屬螯合

物之濃度下起始的1:3、1:2或1:1.7稀釋步驟滴定。將樣品在密封REMP儲存聚丙稀微孔盤(Brooks)中在4°C下培育隔夜。

【0547】 在隔夜培育之後，將抗生蛋白鏈菌素盤用每孔90 µl PBST洗滌3次。將15 µl來自平衡盤之各樣品轉移至分析盤且在室溫下培育15分鐘，接著用PBST緩衝液進行3×90 µl洗滌步驟。藉由添加25 µl山羊抗人類IgG抗體-POD結合物(Jackson, 109-036-088, OSEP中1:4000)進行偵測，接著用PBST緩衝液進行6×90 µl洗滌步驟。將25 µl TMB受質(Roche Diagnostics GmbH, 目錄號：11835033001)添加至各孔。在Safire2 reader (Tecan)上在370/492 nm下進行量測。

材料：

1. DOTAM-生物素-異構體混合物：

以下組分之混合物濃度 = 20 ng/ml

- Pb-Dotam-Bn-生物素/TCMC-Pb-dPEG3-生物素，異構體A
- Pb-Dotam-Bn-生物素/TCMC-Pb-dPEG3-生物素，異構體B
- Pb-Dotam-烷基-生物素異構體A
- Pb-Dotam-烷基-生物素異構體B

2. PBS：DPBS，PAN，P04-36500

3. BSA：Roche，10735086001

4. Tween 20：Polysorbat 20 (usb，#20605，500 ml)

5. PBST：10×，Roche，#11666789001/0.1% Tween 20

6. OSEP：PBS (10×，Roche，# 11666789001)/0.5% BSA (牛血清白蛋白第V部分，不含脂肪酸，Roche, # 10735086001)/0.05% Tween 20

表4

名稱	物種	KD [SET-滴定]			
		Pb	Bi	Ca	Zn
PRIT-0135	WTRa	0.000	0.000	0.001	0.285
PRIT-0129	WTRa	0.001	0.024	0.013	9.251
PRIT-0128	WTRa	0.002	0.003	0.003	8.152
PRIT-0132	WTRa	0.002	0.046	0.002	0.217
PRIT-0134	WTRa	0.002	0.059	0.003	0.443
PRIT-0136	WTRa	0.004	0.029	0.014	131.926
PRIT-0127	WTRa	0.014	0.092	0.015	222.339
PRIT-0107	TgRa	1.1	51.0	48.0	>1000

WTRa：野生型兔；TgRa：轉殖基因兔

實例5：分子生物學

重組DNA技術

【0548】如Sambrook, J.等人, *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所描述，使用標準方法來操控DNA。根據製造商之說明書使用分子生物試劑。

基因及寡核苷酸合成

【0549】藉由在Geneart GmbH (Regensburg, Germany)化學合成來製備所需基因區段。將合成基因片段選殖至大腸桿菌質體中以進行繁殖/擴增。藉由DNA測序檢驗次選殖基因片段之DNA序列。或者，藉由黏接化學合成之寡核苷酸或經由PCR組裝短合成DNA片段。藉由metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)製備相應寡核苷酸。

蛋白質測定

【0550】藉由使用基於多肽之胺基酸序列計算的莫耳消光係數，確定280 nm下之光密度(OD)來確定經純化之多肽的蛋白質濃度。

用於重組表現抗體重鏈或輕鏈之質體的產生

【0551】 藉由短暫轉染人類胚腎細胞(HEK 293)表現所需蛋白質。為表現所需基因/蛋白質(例如全長抗體重鏈、全長抗體輕鏈或含有其他結構域之全長抗體重鏈(例如在C端含有免疫球蛋白重鏈或輕鏈可變域)，使用包含以下功能元件之轉錄單元：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列(SS)，
- 待表現之基因/蛋白質，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0552】 除包括待表現之所需基因的表現單元/卡匣之外，基礎/標準哺乳動物表現質體亦含有：來自載體pUC18之複製起點，其允許在大腸桿菌中複製此質體；及 β -內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌以安比西林抗性。

a)抗體重鏈之表現質體

【0553】 藉由將編碼各由G4Sx4連接子分離之相應序列元件(可變重鏈或可變輕鏈)的DNA片段與人類IgG分子之CH3結構域之C端融合，組裝包括包含完整及功能性抗體重鏈之C端融合基因的抗體重鏈編碼基因，接著組裝其他抗體可變重鏈或可變輕鏈結構域(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VH或VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL)。使用杆-白技術表現在兩個CH3域之C端分別負載一個VH及一個VL結構域的重組抗體分子。

【0554】 除具有C端VH或VL結構域表現卡匣之抗體重鏈片段之

外，用於在HEK293細胞中短暫表現具有C端VH或VL結構域之抗體重鏈之表現質體亦包含：來自載體pUC18之複製起點，其允許在大腸桿菌中複製此質體；及 β -內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌以安比西林抗性。具有C端VH或VL結構域融合基因之抗體重鏈片段的轉錄單元包含以下功能元件：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 抗體重鏈(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VH或VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL)編碼核酸，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0555】 編碼表2中提及之所有重鏈多肽/蛋白質之表現質體根據如前所述之方法來構築。

b)抗體輕鏈之表現質體

【0556】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。

【0557】 除抗體輕鏈片段之外，用於短暫表現抗體輕鏈之表現質體亦包含：來自載體pUC18之複製起點，其允許在大腸桿菌中複製此質體；及 β -內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌以安比西林抗性。抗體輕鏈片段之轉錄單元包含以下功能元件：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，

- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 抗體輕鏈(VL-CL)編碼核酸，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0558】 編碼表2中提及之所有輕鏈多肽/蛋白質之表現質體根據如前所述之方法來構築。

【0559】 圖1中描繪所用格式之示意圖。星星係指PGLALA取代；1係指DOTAM結合劑，且2及3係指抗標靶(此處為CEA)結合劑。

實例6：PRIT分子之短暫表現

抗體分子之短暫表現

【0560】 在F17培養基(Invitrogen Corp.)中培養之短暫轉染之HEK293細胞(源自人類胚腎細胞株293)中產生抗體分子。為進行轉染，使用「293-Free」轉染劑(Novagen)。如上所述之相應抗體重鏈及輕鏈分子自個別表現質體表現。如製造商之說明書中所規定進行轉染。在轉染三天至七天(3-7天)之後，收穫含有免疫球蛋白之細胞培養上清液。將上清液儲存於降低溫度(例如-80°C)下，直至純化。

【0561】 關於人類免疫球蛋白在例如HEK293細胞中之重組表現之一般資訊提供於以下中：Meissner, P.等人, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203。

實例7：蛋白質之純化

【0562】 將收穫之細胞培養物上清液以5 ml/min之流動速率施加在填充有5 ml蛋白A樹脂(Mab Select Sure)之管柱(1.1 cm直徑，5 cm長度)上。在用20 ml PBS緩衝液洗滌之後，抗體用25 ml檸檬酸鈉pH 3.0溶離。

【0563】 接著用1 M Tris pH 9.0將溶離液調節至pH 5.0且在4°C下培育隔夜。

【0564】 在10000×g下離心10分鐘且經0.2 μm過濾器過濾之後，接著將濾液施加於在含有20 mM組氨酸、140 mM NaCl之緩衝液(pH 6.0)中預先平衡之Superdex 200管柱(2.6 cm直徑，60 cm長度)上進行尺寸排阻層析且用相同緩衝液溶離。

【0565】 收集含有純化抗體之主要溶離峰且分析最終純度。

材料-表5

	供應商	原液濃度 [mg/mL]	身分編號	貨號
RS-CEA_II2v	內部	10.5	R06895882	GMP-batch 1
Chrome Pure人類IgG	Jackson Immuno Research	12.0	009-000-003	116598
Pb-DOTAM-FITC	Macrocyclics	1.0	FRRD04-37	
山羊<hu IgG(H+L)> - AlexaFluor 488	Invitrogen	2.0	A11013	1173476
無Mg及Ca之PBS	PAN Biotech		P04-36500	4780114
FKS Gibco	Gibco		10500-064	07Q1416K
5 ml圓底管(FACS管)	BD Falcon		352054	1094065
96孔V形底PP盤	Costar		3357	10113004

實例8：FACS

【0566】 使用胰蛋白酶自培養瓶分離MKN-45細胞且使用Casy細胞計數器計數。在4°C下粒化之後，使300 g細胞再懸浮於FACS緩衝液(中含2.5% FCS之PBS)中，調節至2.0E+06個細胞/毫升，分配至96孔V形底PP盤(25微升/孔 = 5.0E+04Zellen/孔)。

-使用DOTAM-FITC進行FACS染色

【0567】 初級CEA特異性抗體在FACS緩衝液中調節至40 μg/mL，產生10 μg/mL之最終濃度。RS-CEA-II2v用作參考。經FITC標記之Pb-

DOTAM及初級抗體以等莫耳比率使用。將其混合並在室溫下培育10分鐘，以使抗體與Pb-DOTAM結合。隨後，將20 μ l且在4°C下培育1小時。製備之混合物添加至25 μ l細胞懸浮液 接著細胞在FACS緩衝液中洗滌兩次且再懸浮於70微升/孔FACS緩衝液中以使用FACS Canto (BD, Pharmingen)進行量測。

-使用<人類 κ >進行FACS染色

【0568】 初級CEA特異性抗體在FACS緩衝液中調節至20 μ g/mL，產生10 μ g/mL之最終濃度。RS-CEA-II2v用作參考。取20 μ l添加至25 μ l細胞懸浮液中且在4°C下培育1小時。接著在FACS緩衝液中洗滌細胞兩次。在洗滌之後，使細胞再懸浮於50 μ L含有二級抗體(<huIgG>-Alexa488，c=10 μ g/mL)之FACS-緩衝液中，在4°C下培育1小時。接著細胞在FACS緩衝液中洗滌兩次且再懸浮於70微升/孔FACS緩衝液中以使用FACS Canto (BD, Pharmingen)進行量測。

【0569】 圖36中描繪展示一種抗體(PRIT-0165)與MKN-45細胞結合之一實例，使用二次偵測(右圖，Alexa 488)或DOTAM FITC(左圖，FITC -A)偵測。

實例9：人類化：

【0570】 為在DOTAM結合劑PRIT-0128之人類化期間鑑別合適人類接受體構架，使用兩種方法之組合。一方面，經典方法係藉由搜索與親本抗體具有高度序列同源性之接受體構架且隨後將CDR區移植至此接受體構架上進行。基於對結合劑之結構完整性的影響判斷所鑑別之構架與親本抗體各胺基酸差異，且適當時引入回復至親本序列之回復突變。

【0571】 另一方面，內部研發之電腦模擬工具用於預測人類化型式

之VH及VL結構域對彼此之取向(參見WO2016/062734)。針對CDR在所有可能人類生殖系組合上之虛擬移植進行此。結果與親本結合劑之VH-VL結構域取向相比，以選擇幾何形狀上與起始抗體接近之構架組合。

【0572】 在每種情況下將親本抗體之以下CDR區移植至接受體構架(根據Kabat編號)上：

VH_CDR1：31-35

VH_CDR2：50-65

VH_CDR3：95-102

VL_CDR1：24-34

VL_CDR2：50-56

VL_CDR3：89-97

【0573】 人類化變異體以DOTAM結合劑與靶向腫瘤之IgG之Fc的C端融合的VH/VL F_v融合物(分別無CH1及C_k)之最終格式產生。呈最終格式之親本(非人類化)DOTAM結合劑PRIT-0128來源分子稱為PRIT-0156。

【0574】 歸因於在VH/VL預測方面之適合性及構架之穩定性增加，亦包括赫賽汀(Herceptin)構架。對於所有VH人類化變異體，使用人類J元件hJH2。對於所有VK人類化變異體，使用人類J元件hJK4。

【0575】 HC4為PRIT-128移植在人類生殖系IGHV3-30-02上，進行一個回復突變kabat A49G。

【0576】 為得到可變重鏈HC5，將CDR移植在人類生殖系hVH_2_26上，其中A49G為回復突變且缺失第一個胺基酸以反映初始兔N端。

【0577】 移植在赫賽汀V區(來源於人類生殖系hVH3_66)上，變異

體HC7之特徵在於接受體構架中之幾個修飾：N端E缺失、A49G、A71R及S93A。

【0578】對於HC10，將PRIT-128之CDR移植在人類生殖系IGHV4_34_01上。

【0579】此處，N端經修飾，以V2開始，以反映以Q2開始之初始兔抗體。另外，針對Kabat命名法，G29F及F31L視為回復突變，以及構架3中之V71R及F78V。

【0580】對於輕鏈LC1，CDR移植在人類生殖系IGKV1_39_01上，無任何回復突變。起始選為I2，以反映以A2開始之初始兔Ab。

【0581】藉由CDR移植在人類生殖系hVK1_5上來獲得輕鏈變異體LC3。D1缺失且I2A回復突變視為新的N端。作為額外回復突變，考慮K42Q及A43P。

【0582】並未產生人類化矩陣之全部可能組合，但基於如VH/VL預測及既定組合之序列風險的考慮因素，選擇一系列所界定之組合。

【0583】人類化之目標為獲得在對DOTAM之親和力方面損失不超過10倍且若可能，顯示穩定性增加之人類化結合劑。此由若干結合劑實現，該等結合劑對DOTAM之親和力相當或甚至更佳，以及如藉由約10-15°C之DLS所量測，熱穩定性增加。參見下表7及8。

實例10：基於溶液平衡之kd測定

【0584】為根據對Pb-DOTAM之親和力篩選較大量之人類化候選物，使用溶液平衡滴定(SET)。

【0585】表6詳述基於SET的對所選人類化DOTAM結合劑針對Pb-DOTAM之親和力的測定。表6中之所有抗體均為與CEA二價結合且與Pb-

Dotam單價結合(2:1格式，參見圖1)之雙特異性抗體：

表6

分子名稱	人類化HC/LC組合	SET Pb-DOTAM (pM)
PRIT-0187-0002	HC10 LC1	0.03
PRIT-0193-0002	HC5 LC3	0.36
PRIT-0195-0004	HC10 LC3	0.40
PRIT-0156-0004	親本分子	0.43
PRIT-0182-0002	HC8 LC7	5.54
PRIT-0189-0002	HC7 LC2	5.81
PRIT-0185-0002	HC 2 LC1	5.87
PRIT-0192-0002	HC2 LC3	8.04
PRIT-0183-0004	HC2 LC2	8.11
PRIT-0197-0002	HC7 LC1	8.69
PRIT-0198-0002	HC7 LC3	9.09
PRIT-0182-0004	HC8 LC7	17.14
PRIT-0183-0002	HC2 LC2	22.45
PRIT-0180-0004	HC9 LC6	26.10
PRIT-0190-0002	HC9 LC2	33.83
PRIT-0194-0002	HC8 LC3	34.63
PRIT-0199-0002	HC9 LC1	43.91
PRIT-0180-0002	HC9 LC6	47.70
PRIT-0188-0002	HC4 LC2	54.34
PRIT-0178-0004	HC1 LC6	60.06
PRIT-0179-0004	HC4 LC6	64.92
PRIT-0181-0002	HC4 LC7	65.11
PRIT-0179-0002	HC4 LC6	65.81
PRIT-0178-0002	HC1 LC6	66.68
PRIT-0187-0004	HC10 LC1	78.09
PRIT-0184-0002	HC1 LC1	80.56
PRIT-0200-0002	HC9 LC3	83.24
PRIT-0191-0002	HC1 LC3	111.10

實例11：基於Kinexa之kd測定

【0586】關於親和力測定之更詳細分析及正交方法，使用Kinexa。

儀器與材料

【0587】 使用來自Sapidyne Instruments (Boise, ID)之具有自動進樣器的KinExA 3200儀器。聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)珠粒購自Sapidyne，而PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)、BSA (牛血清白蛋白第5部分)及抗DOTAM抗體在內部製備(Roche)。Dylight650®結合之親和力純化之山羊抗人類IgG-Fc片段交叉吸附抗體購自Bethyl Laboratories (Montgomery, TX)。生物素化之Pb-DOTAM抗原(Pb-DOTAM-烷基-生物素異構體A及B、Pb-DOTAM-Bn-生物素/TCMC-Pb-dPEG3-生物素、異構體A及B)及未生物素化Pb-DOTAM獲自AREVA Med (Bethesda, MD)。

抗原塗佈之珠粒的製備

【0588】 PMMA珠粒根據關於生物素化分子之KinExA手冊方案(Sapidyne)塗佈。簡言之，首先，每小瓶(200 mg)用於吸附塗佈之珠粒添加含10 µg生物素-BSA (Thermo Scientific)之1 ml PBS (pH 7.4)。在室溫下旋轉2小時之後，移除上清液且用1 ml PBS洗滌珠粒5次。其次，將1 ml含100 µg NeutrAvidin生物素結合蛋白(Thermo Scientific)的含有10 mg/ml BSA之PBS添加至珠粒且在室溫下再培育2小時以使NeutrAvidin與珠粒偶合，且為隨後生物素化蛋白質之結合提供其他生物素結合位點。接著將經NeutrAvidin塗佈之珠粒用1 ml PBS沖洗5次。最終，珠粒用含200 ng/ml生物素化Pb-DOTAM-異構體混合物(各異構體50 ng)之PBS塗佈且在室溫下再培育2小時。接著珠粒再懸浮於30 ml PBS中且立即使用。

KinExA平衡分析

【0589】 所有KinExA實驗在室溫(RT)下使用PBS pH 7.4作為操作緩衝液進行。樣品在補充有1 mg/ml BSA之操作緩衝液(「樣品緩衝液」)中準備。使用0.25 ml/min之流動速率。藉由以100 pM開始，進行兩倍連

續稀釋(濃度範圍為0.049 pM-100 pM)，用Pb-DOTAM抗原滴定恆定量之具有5 pM結合位點濃度之抗DOTAM抗體。不具有抗原之抗體之一種樣品充當100%信號(亦即無抑制)。將抗原-抗體複合物在室溫下培育至少24小時以允許達到平衡。然後在5 ml體積下經由KinExA系統中Pb-DOTAM偶合之珠粒之管柱抽吸平衡混合物，允許未結合抗體由珠粒捕獲而不擾亂該溶液之平衡狀態。使用樣品緩衝液中250 ng/ml Dylight 650[®]結合之抗人類Fc片段特異性二級抗體偵測捕捉抗體。對於所有平衡實驗，各樣品一式兩份量測。

【0590】 KD係使用KinExA軟體(4.0.11版)內所含之單點同質結合模型，使用「標準分析」法，由數據之非線性回歸分析獲得。該軟體計算KD且藉由將數據點擬合成理論KD曲線來確定95%信賴區間。95%信賴區間(Sapidyne TechNote TN207R0)以KD低及KD高給出。

【0591】 下文提供如藉由Kinexa所測定之PRIT-213之親和力值的其他實例。PRIT-0213為與PRIT-0186相同之分子，除了另一CEA結合VH/VL，參見表8。

PRIT-213

CEA-DOTAM BsAb之金屬-DOTAM螯合物親和力

抗原	KD [pM]	95% CI [pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Bi-DOTAM	5.7	4.6-6.2
Cu-DOTAM	122000	60000 - 206000

其他值如下文所示：

TheraPS Name	抗原	KD [pM]	95%信賴區間[pM]
PRIT-0213-0005	Ca - DOTAM	0.95	0.43 - 1.7*
PRIT-0214-0005		0.52	0.34 - 0.74
PRIT-0213-0005	Bi - DOTAM	5.7	4.6 - 6.2*

PRIT-0214-0005		6.0	5.5 - 6.4
PRIT-0213-0005	Cu - DOTAM	122000	60000 - 206000*°
PRIT-0214-0005		38000	19000 - 63000*°

*寬信賴區間，指示量測之 K_D 不精確

°分析不完全優化用於nM親和力

實例12：人類化PRIT分子之熱穩定性量測

方法及數據分析

【0592】 將呈最終格式之人類化PRIT分子之不同變異體(在20 mM 組胺酸、140 mM NaCl pH 6.0中)在相同緩衝液中稀釋至1 mg/ml。將30 μ l各樣品轉移至384孔盤過濾裝置(以及作為參考之抗HER3抗體)中。在1,000 g下離心1分鐘之後，孔用10 μ l石蠟油覆蓋。將盤再次離心(1,000 g 1 min)，且轉移至DLS盤式讀數器(Dyna Pro PlateReader-II, Wyatt)中。在25°C下開始，溫度以0.05°C/分鐘之速度增加至79.9°C。使用Dynamics軟體(7.0版)記錄散射光。

【0593】 數據轉移至Excel (Microsoft)，藉由樣品及溫度分選且使用軟體插件建立熔融曲線。其中自基線出現明顯偏差時之溫度定義為「聚集開始」且熔融曲線之拐點為「熔融溫度」。

結果 - 表7

樣品	聚集開始(°C)	熔融溫度(°C)
Her 3	63 \pm 1	67.5 \pm 1
PRIT-0156 (具有兔DOTAM結合劑之親本分子)	45 \pm 1	51 \pm 1
PRIT 205	51 \pm 1	51.5 \pm 1
PRIT 206	51 \pm 1	58.1 \pm 1
PRIT 207	49 \pm 1	58.1 \pm 1
PRIT 208	54 \pm 1	57.7 \pm 1
PRIT 209	54 \pm 1	57.7 \pm 1
PRIT-0213	54 \pm 1	57.7 \pm 1

實例13：候選物之選擇

【0594】 PRIT-0156為包含兔DOTAM結合劑PRIT-0128與CEA結合劑CH1A1A組合的2:1抗體。PRIT-0178至PRIT-0204為呈與相同CEA結合劑之相同格式的人類化變異體。PRIT-0205至PRIT-0221在DOTAM結合部分中對應於PRIT-0178至PRIT-0204人類化變異體，但CEA結合劑變成T84.66。

【0595】 下表比較多種PRIT分子之特性。較佳化合物為PRIT-213及PRIT-214。

抗體	CEA結合劑	Dotam結合劑	格式
PRIT-0218	無	WT	兔抗體
PRIT-0156	CH1A1A	PRIT-0218	具有PRIT 0128 dotam結合劑之2:1抗體
PRIT-0186	CH1A1A	HC5/LC1 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0213	T84.86	HC5/LC1 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/LC1 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0214	T84.86	HC10/LC1 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0206	T84.86	HC5/LC3 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0216	T84.86	HC5/LC3 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0217	T84.86	HC5/LC3 (人類化PRIT-0218)	2:1格式
PRIT-0208	T84.86	HC7/LC1 (人類化PRIT-0218)	2:1格式

	CEA BiCEAnder	DOTAM結 合劑	SET PbDOTAM [pM]	Kinexa PbDOTAM [pM]	產量 [mg/l]	T Agg 266nm	人類性		生物分佈
PRIT-0156	CH1A1A	野生型兔	0.01	0.25	25	45	---	---	Ok
PRIT-0186	CH1A1A	HC5 / LC1	0.4	0.92	38	50	HC 58%	LC 57%	Ok
PRIT-0213	T84.66	HC5/LC1	0.4	0.84	4.0	54	HC 58%	LC 57%	Ok
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/ LC1	0.03	0.99	17.8	57	HC 40%	LC 57%	Ok
PRIT-0214	T84.66	HC10/LC1	0.03	0.84	6.0	55	HC 40%	LC 57%	Ok
PRIT-0206	T84.66	HC5/LC3	0.36	1.0	1.32	50	HC 58%	LC 55%	Ok
PRIT-0216	T84.66	HC5/LC3	---	51	7.0	50	HC 58%	LC 55%	Ok
PRIT-0217	T84.66	HC5/LC3	---	3	10.0	54	HC 58%	LC 55%	Ok
PRIT-0208	T84.66	HC7/LC1	8.7	8.3	7.6	59	HC 51%	LC 57%	Ok

(a)表8：候選物之選擇

序列

HC5:

VTLKESGPVLVKPTETLLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYASWAKRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGI
VTVSS

LC1:

SIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCQSSHVSYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK

LC3: aqmtqspstl sasvgdrvti tcqsshsvys

501 dndlawayqqk pgqppklliy qasklasgvp srfsgsgsgt eftltisslq

551 pddfattyyl ggyddesdy gfgggtkvei k

HC7: vqlvesgggl vqpgslrls caasgfslst

501 ysmswvrqap gkglewvigi gsrqdttyas wakgrftisr dtskntaylq

551 mnsraedta vyycarerdp ygggaypphl wrgtltvts s

HC10: vqlqqwagl lkpsetlslt cavygfslst

501 ysmswirqpp gkglewigfi gsrqdttyas wakgrvtisr dtsknqvslk

551 lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wrgtltvts s

T84.66 VH 1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr

51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg

101 yyvsdyamay wqgltvts s

T84.66 VL:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRTGIPA

RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEPDTFGQGTKLEIK

CH1A1A VH:

qvqlvqsgae vkkpgasvkv sckasgyft efgmnwvrqa pgqglewmgr

51 intktgeaty veefkgrvtf tdtststay melrsrsdd tavyycarwd

101 fayyveamdy wqggtvtvs s

CHIA1A VL:

1 diqmtqspss lsasvgrvt itckasaavg tyvawyqqkp gkaplliys

51 asyrkrvps rfsrgsgtd filtisslp edfatyychq yytyp|ftfg

101 qgtkleik

實例14：Fab P1AA1227 Pb-DOTAM複合物之結晶、數據收集及結構測定

【0596】 為形成複合物，將來源於PRIT-0213中人類化VH/VL之Fab (稱為P1AA1227)在26 mg/ml下與Pb-DOTAM粉末以1:4.2之莫耳比混合。在4°C下培育2小時之後，在沉滴式蒸汽擴散裝備中在21°C下使用JCSG+篩(Qiagen, Hilden)進行初始結晶試驗。晶體在5天內自0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 M BIS-TRIS pH 5.5、25 %w/v PEG3350出現。直接自篩選盤收穫晶體，不進行任何進一步的優化步驟。

【0597】 *資料收集及結構測定*. 對於資料收集，將晶體在含有10%乙二醇之沈澱溶液中於100K下急驟冷凍。在Swiss Light Source (Villigen, Switzerland)之射束線X10SA下使用PILATUS 6M偵測器在1.0000 Å之波長下收集繞射資料。用XDS (Kabsch, W. Acta Cryst. D66, 133-144 (2010))處理資料，且用SADABS (BRUKER)進行按比例調整。複合物之晶體屬於具有晶胞軸之空間群C2， $a= 135.63 \text{ \AA}$ ， $b= 56.42 \text{ \AA}$ ， $c= 64.52 \text{ \AA}$ 且 $\beta=108.36^\circ$ ，且繞射至1.40Å之解析度。藉由用PHASER (McCoy, A.J, Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Storoni, L.C., 及 Read, R.J. J. Appl. Cryst. 40, 658-674 (2007))進行分子置換，使用內部Fab結構之座標作為搜索模型，來確定結構。差異電子密度圖用於置放Pb-DOTAM及根據序列差異藉由實際空間精修來改變胺基酸。結構用來自CCP4套件(Collaborative Computational Project, Number 4 Acta Cryst. D50, 760-763 (1994).)及BUSTER (Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O.S., Vonrhein, C., Womack, T.O . (2011). Buster 2.9.5版 Cambridge,

United Kingdom : Global Phasing Ltd.)之程式精修。人工重建用COOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G.及Cowtan, K. Acta Cryst D66, 486-501 (2010))進行。

【0598】 資料收集及精修統計資料概述於表9中。

【0599】 所有圖形呈現均用PYMOL (The Pymol Molecular Graphics System, 1.7.4.版 Schrödinger, LLC.)準備。

表9-Fab P1AA1227-Pb-DOTAM複合物之資料收集及精修統計資料

P1AA1227-Pb-DOTAM	
資料收集	
空間群	C2
晶胞尺寸	
<i>a, b, c</i> (Å)	135.63, 56.42, 64.52
α, β, γ (°)	90, 108.36, 90
解析度(Å)	1.40
R_{sym} 或 R_{merge}	0.041
$I/\delta I$	10.3 (0.94)
完整度(%)	94.4 (86.1)
冗餘度	3.37 (3.33)
精修	
解析度(Å)	48.9 - 1.40
反射數目	81631
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	19.21/22.38
原子數目	
蛋白質	3342
水	523
Pb-Dotam	29
<i>B</i> -因子	
蛋白質	14.81
水	37.46
Pb-Dotam	21.09
R.m.s. 偏差	
鍵長 (Å)	0.011
鍵角(°)	1.57

*圓括號中之值係針對最高解析度外殼。

Fab P1AA1227與Pb-Dotam之複合物的結構

【0600】 為表徵Pb-Dotam與Fab P1AA1227之相互作用細節，在1.40Å之解析度下確定複合物之晶體結構。該結構顯示，Fab P1AA1227主要藉助於輕鏈之CDR1及CDR3且藉由重鏈之CDR2及CDR3而結合於Pb-DOTAM。

【0601】 使用程式PISA對結合界面之分析顯示Fab P1AA1227經由3個氫鍵、極性相互作用及凡得瓦接觸(van der Waals contact)與Pb-DOTAM相互作用之模式。Pb-DOTAM結合在由重鏈及輕鏈形成之袋形物中。此袋形物具有在一側上敞開之盒形。袋形物之側壁及底部促進非極性相互作用，而在壁邊緣，極性相互作用占主導。在重鏈之CDR3殘基Glu95及Asp97與DOTAM胺甲醯基氮原子N7及N8之間形成側鏈氫鍵。經由Arg96之主鏈羰基原子與DOTAM之原子N7建立另一氫鍵。複合物經由重鏈CDR2 Phe50及Tyr58側鏈之非極性相互作用進一步穩定，該等側鏈對氮雜環十二烷環呈邊對面進行取向。輕鏈主要提供袋形物之「底部」，其中CDR3殘基Gly91-Tyr96提供與四環十二烷環之非極性接觸。Asp32與DOTAM之胺甲醯基氮原子N6形成氫鍵(根據Kabat編號)。

【0602】 圖2展示P1AA1227與Pb-DOTAM之複合物的結構。

【0603】 圖3展示關於相互作用位點之視圖。

【0604】 基於程式PISA之分析，下表展示重鏈互補位殘基。

表10

重鏈殘基 (Kabat編號)	相互作用類型	Pb-DOTAM
Phe50	非極性	對氮雜環十二烷環呈邊對面
Asp56	極性	N8

Tyr58	非極性	對氮雜環十二烷環呈邊對面
Glu95	H鍵	N7
Arg96	H鍵(mc羰基)	N7
Asp97	H鍵	N8
Pro98	邊-面	在Pb-Dotam上方，距離4Å
Tyr99	極性(但距離為6Å)	N5
Ala100C	非極性	C12
Tyr100D	極性(mc原子)	N7

【0605】基於程式PISA之分析，下表展示輕鏈互補位殘基。

表11

輕鏈殘基(Kabat編號)	相互作用類型	Pb-DOTAM
Tyr28	非極性	對氮雜環十二烷環呈邊對面
Asp32	極性，H鍵	N6
Gly91	非極性	氮雜環十二烷環下方
Tyr92	非極性	氮雜環十二烷環下方
Asp93	非極性	氮雜環十二烷環下方
Thr95C	非極性	氮雜環十二烷環下方
Tyr96	非極性	對氮雜環十二烷環呈邊對面

【0606】在以下序列中互補位殘基亦加下劃線：

> **P1AA1227_HC**

VTLKESGPVLVKPTETLTLLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKS
QVVLMTNMDPVDATATYYCAREERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEFVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

> **P1AA1227_LC**

SIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKOSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

實例15：活體內生物分佈及功效：材料與方法

以下實例之術語表

BD	生物分佈
bsAb	雙特異性抗體
CA	清除劑
CEA	癌胚抗原
Dex500	聚葡萄糖500-TCMC-Pb
Dex[n]	聚葡萄糖[n]-TCMC-Pb
DOTAM	1,4,7,10-肆(胺甲醯基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷
H&E	蘇木精及伊紅
ID	注射劑量
ELISA	酶聯結免疫吸附分析法
i.p.	腹膜內
i.v.	靜脈內
MIRD	醫用內照射劑量
MW	分子量
NBF	中性緩衝福馬林
OCT	最佳切割溫度
OS	總存活期
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
p.i.	注射後
PK	藥物動力學
PRIT	預靶向放射免疫療法
RBE	相對生物有效性
RT	室溫
PSCA	前列腺幹細胞抗原
s.c.	皮下
SCID	嚴重合併性免疫缺失
SD	標準偏差
SOPF	無特異性及機會性病原體
SPF	無特異性病原體
TA	標靶抗原
TCMC	1,4,7,10-肆(胺甲醯基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷
TGI	腫瘤生長抑制
TR	腫瘤消退

方案之材料與方法

通則

【0607】 所有實驗方案均由地方當局(Comité Régional d'Ethique

de l'Expérimentation Animale du Limousin (CREEAL), Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne) 審查及批准。根據倫理準則，雌性嚴重合併性免疫缺失(SCID)小鼠(Charles River)維持在無特異性病原體之條件下，每天光/暗循環(12 h/12 h)。在到達之後第一週期間不進行操作，以使動物適應新環境。每天監測所有小鼠，以評定身體症狀及整體健康。

【0608】經由測徑規量測來估計腫瘤體積，根據下式計算： $體積 = 0.5 \times 長度 \times 寬度^2$ 。結束時，使用眶後放血，自靜脈竇收集血液，接著收穫其他組織用於放射性量測及/或組織學分析，如方案所指定。記載意外或異常狀況。

【0609】使用GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.)及JMP 8 (SAS Institute Inc.)進行統計分析。

試劑

【0610】雙特異性抗體由Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research Penzberg (Penzberg, Germany)提供且儲存於-80°C下直至注射之日。接著將其解凍且在標準媒劑緩衝液(20 mM組胺酸/組胺酸鹽酸鹽、140 mM NaCl；pH 6.0)中稀釋。

雙特異性抗體

化合物	標靶	方案	供應商
PRIT-0155	PSCA	83、87	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0156	CH1A1A	80、91	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0165	T84.66	80、85、90、91、95	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0175	地高辛	80、91、93	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0186	CH1A1A	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0187	CH1A1A	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0205	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0206	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0207	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ

PRIT-0208	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0209	T84.66	80	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0213 = CEA-PRIT	T84.66	93、105、106	Roche Pharma Research PZ
PRIT-0214	T84.66	93	Roche Pharma Research PZ

【0611】清除試劑由Macrocylics (Plano, TX, USA)提供。其儲存於-80°C下，直至注射之日，此時將其解凍且在PBS中稀釋至所需濃度。

清除劑

化合物	TCMC 取代	方案	供應商
Dex500-TriGalNAc 3:1†	81-1	44	Macrocylics
Dex500-TriGalNAc 9:1†	101-1	44、70	Macrocylics
Dex20	14-1	83、85、87	Macrocylics
Dex20†	16-1	70	Macrocylics
Dex70	8-1	83、85、87	Macrocylics
Dex70†	10-1	44、70	Macrocylics
Dex70-TriGalNAc†		70	Macrocylics
Dex250	19-1	83、87	Macrocylics
Dex250†	24-1	44、70	Macrocylics
Dex500†*		70	Macrocylics
Dex500*	84-1	80、83、85、87、90、91	Macrocylics
CDex500-(Glu)3*	95-1	83、87	Macrocylics
CDex500-(Glu)2*	84-1	83、87	Macrocylics
CDex500-(Glu)4*	78-1	83、85、87	Macrocylics
Dex500-M(Glu)2*	11-1	83、85、87	Macrocylics
Dex20-M(Glu)2	2-1	83、87	Macrocylics
Dex500-(10%)**	9-1	95	Macrocylics
Dex500-(20%)**	20-1	95	Macrocylics
Dex500-(40%)**	39-1	95	Macrocylics
Dex500-(100%)**	84-1	90、95	Macrocylics
Dex500-(50%)**	47-1	105、106	Macrocylics

†無Pb淬滅；*30 kDa過濾截止值；**100 kDa過濾截止值

【0612】用於放射性標記之DOTAM螯合物由Macrocylics提供且在放射性標記之前維持在-20°C下。隨後，由AREVA Med (Razès, France)用鉛-203 (^{203}Pb)或鉛-212 (^{212}Pb)標記。向小鼠靜脈內(i.v.)注射100 μL 相應Pb-DOTAM溶液，用PBS稀釋以獲得所需Pb劑量/放射性濃

度。使用與雙特異性抗體預先結合之²⁰³Pb-DOTAM，而²¹²Pb-DOTAM在PRIT及清除劑之後投與。使用2470 WIZARD²自動 γ 計數器(PerkinElmer)進行放射性量測。

放射性標記之螯合物

化合物	調配緩衝液	供應商
²¹² Pb-DOTAM	PBS	Macrocyclics, AREVA Med
²⁰³ Pb-DOTAM	PBS	Macrocyclics, AREVA Med

【0613】 BxPC3為天然表現CEA之人類初級胰腺癌細胞株。將BxPC3細胞在富集10%胎牛血清及1% GlutaMAX (Gibco, 參考號35050-061)之RPMI-1640培養基(Gibco, 參考號42401-018)中培養。LS174T為天然表現CEA之人類初級胰腺癌細胞株。將LS174T細胞在富集10%胎牛血清之DMEM培養基(Gibco, 參考號42430-082)中培養。MKN45為天然表現CEA之人類胃腺癌細胞株。將MKN45細胞在富集20%胎牛血清之RPMI-1640培養基(Gibco, 參考號42401-018)中培養。藉由將與Corning® Matrigel®基底膜基質(生長因子減少；目錄號354230) 1:1混合之細胞於RPMI或DMEM培養基中皮下注射至右側腹中，來建立實體異種移植植物。

細胞株

細胞株	每隻小鼠之細胞	注射體積	供應商
BxPC3	5×10 ⁶	100 μ L	ECACC*
LS174T	1×10 ⁶	100 μ L	ATCC**
MKN45	0.5×10 ⁶	100 μ L	DSMZ ***

*European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK)

**American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

***Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany)

實例16：多種靶向CEA之雙特異性抗體之預先靶向(方案80 (a、b、c))

【0614】 此研究旨在評估小鼠中在用多種靶向CEA之雙特異性抗體預先靶向之後胰腺癌異種移植植物中之Pb累積，以優化方案且選擇大合適候

選物來過渡至臨床試驗。實驗分成三個分開方案，以i) 80b、ii) 80c及iii) 80a次序進行。方案80b評估與 ^{203}Pb -DOTAM預先結合之五種完全人類化雙特異性抗體構築體的腫瘤吸收。方案80c評估與 ^{203}Pb -DOTAM預先結合之雙特異性抗體構築體在注射之後的三個不同時間點的腫瘤吸收，以優化預先靶向方案中PRIT注射與CA/螯合物注射之間的時間安排。最終，方案80a使用靶向T84.66或CH1A1A之五種完全人類化雙特異性抗體構築體評估標準預先靶向背景下的 ^{212}Pb -DOTAM的腫瘤吸收。

研究設計，方案80a

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-02-10	S.c.注射* BxPC3細胞
6	2016-02-15	I.v.注射* PRIT bsAb
9	2016-02-18	I.v.注射* CA
9	2016-02-18	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
9	2016-02-18	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM
10	2016-02-19	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μL

研究設計，方案80b

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-01-13	S.c.注射* BxPC3細胞
6	2016-01-18	溶離 ^{203}Pb -DOTAM且與PRIT bsAb預先結合
6	2016-01-18	I.v.注射* ^{203}Pb -DOTAM-bsAb
10	2016-01-22	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μL

研究設計，方案80c

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-01-20	S.c.注射* BxPC3細胞
6	2016-01-25	溶離 ^{203}Pb -DOTAM且與PRIT bsAb預先結合
6	2016-01-25	I.v.注射* ^{203}Pb -DOTAM-bsAb
7	2016-01-26	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數
9	2016-01-28	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數
13	2016-02-01	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μL

【0615】 向各小鼠(6-7週齡)皮下注射(s.c.)含BxPC3細胞(第30代)之100 μL RPMI/基質膠至右側腹中。注射腫瘤細胞五天之後，根據160-170 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組中。將抗體稀釋至30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 之最終濃度，且隨後靜脈內投與單獨(80a)或與 ^{203}Pb -DOTAM (80b、80c)預先結合的抗體。PRIT-0165及PRIT-0156用作分別靶向T84.66及CH1A1A之陽性CEA結合對照。PRIT-0175用作非CEA結合對照。

【0616】 在方案80a中，在雙特異性抗體之後三天靜脈內注射濃度為30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 之清除劑，然後兩小時後注射 ^{212}Pb -DOTAM。

研究組，方案80a (n_{tot} = 24)

組	A	B	C	D	E	F	G	H
bsAb	PRIT-0206	PRIT-0207	PRIT-0208	PRIT-0165	PRIT-0186	PRIT-0187	PRIT-0156	PRIT-0175
				*			**	***
bsAb劑量 (μg)	30	30	30	30	30	30	30	30
CA	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500
CA劑量 (μg)	30	30	30	30	30	30	30	30
螯合物	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM
Pb放射性 (μCi)	13	13	13	13	13	13	13	13
n	3	3	3	3	3	3	3	3

*陽性對照(T84.66)；**陽性對照(CH1A1A)；***陰性對照

研究組，方案80b (n_{tot} = 21)

組	A	B	C	D	E	F	G
bsAb	PRIT-0205	PRIT-0206	PRIT-0207	PRIT-0208	PRIT-0209	PRIT-0165	PRIT-0175
						*	**
bsAb劑量(μg)	30	30	30	30	30	30	30
CA	—	—	—	—	—	—	—
CA劑量(μg)	—	—	—	—	—	—	—
預先結合之螯合物	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM
Pb放射性(μCi)	4	4	4	4	4	4	4
n	3	3	3	3	3	3	3

*陽性對照(T84.66)；**陰性對照

研究組，方案80c (n_{tot} = 27)

組	A	B	C
bsAb	PRIT-0206	PRIT-0165	PRIT-0175
		*	**
bsAb劑量(μg)	30	30	30
CA	—	—	—
CA劑量(μg)	—	—	—
預先結合之螯合物	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM	²⁰³ Pb-DOTAM
Pb放射性 (μCi)	1-2	1-2	1-2
屍檢時間點 (h p.i.)	24、72、168	24、72、168	24、72、168
n	9	9	9
(每個時間點)	(3)	(3)	(3)

*陽性對照(T84.66)；**陰性對照

【0617】 出於生物分佈之目的，在24 h (80a)、96 h (80b)或24、72或168 h (80c)之後處死小鼠。在方案80a中，自所有小鼠，收穫：血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、心臟、肌肉及腫瘤。在方案80b及80c中，自所有小鼠，收穫：血液、膀胱、小腸、結腸、脾臟、胰臟、腎臟、肝臟、肺、心臟、股骨、肌肉及腫瘤。將所收集之樣品稱重且置於塑膠管中以直接量測放射性。接著計算每公克組織注射劑量百分比(%ID/g)，包括針對放射性衰變及背景之校正。

結果，80a

【0618】 所有結合CEA之雙特異性抗體均引起²¹²Pb-DOTAM之特異性腫瘤靶向，在注射DOTAM之後24小時正常組織中很少或沒有吸收。對於PRIT-0206、PRIT-0207及PRIT-0208，平均腫瘤吸收 ± SD分別為8.62 ± 1.05、7.30 ± 3.84及7.75 ± 2.61 %ID/g，其中其對應的結合T84.66之陽性對照PRIT-0165為9.13 ± 1.82 %ID/g。CH1A1A結合劑PRIT-0186及PRIT-0187引起17.44 ± 1.39及16.50 ± 3.25 %ID/g之腫瘤值，其陽性對照

PRIT-0156為 18.98 ± 1.89 %ID/g。未結合CEA之PRIT-0175在腫瘤中引起 0.41 ± 0.42 %ID/g。

【0619】總體而言，靶向CH1A1A之雙特異性抗體引起的腫瘤吸收比靶向T84.66之雙特異性抗體顯著更高(未配對t檢驗， $p < 0.0001$)；與陰性對照相比，CH1A1A與T84.66均引起顯著更高之吸收(單向ANOVA， $p < 0.0001$)。結果展示於圖4中。

結果，80b

【0620】雖然與陽性對照PRIT-0165相比，完全人類化型式之%ID/g略低，但所有預先結合之結合CEA之雙特異性抗體均實現腫瘤之特異性靶向。未結合CEA之對照引起相對可忽略之腫瘤累積。

【0621】總體而言，在此預先結合實驗設置下計算之%ID/g達到比對應PRIT方案高大約十倍的水準；然而，輸出數據反映 γ 計數器放射性量測，且未發現計算誤差。重要地，腫瘤與正常組織比率保持在預期範圍內。具體地說，PRIT-0205之腫瘤血液比率(\pm SD， $n=3$)為 6.76 ± 2.95 ，PRIT-0206為 7.56 ± 2.27 ，PRIT-0207為 9.33 ± 0.91 ，PRIT-0208為 10.77 ± 0.84 ，PRIT-0209為 11.71 ± 0.84 ，PRIT-0165為 10.78 ± 0.88 ，且PRIT-0175為 0.85 ± 0.12 。結果展示於圖5中。

結果，80c

兩種結合CEA之抗體均引起與陰性對照相比顯著之腫瘤累積。統計分析顯示對於研究時間點中之任一者，使用PRIT-0206或PRIT-0165之腫瘤靶向之間無顯著差異，對於研究抗體中之任一者，在第3天與第7天之間均無任何顯著差異(雙向ANOVA， $p < 0.05$)。類似於方案80b，計算之%ID/g值總體上為高的；然而，腫瘤血液比率保持在預期範圍內。在第1

天與第3天之間未看到腫瘤血液比率之顯著差異，但對於PRIT-0165及PRIT-0206，等待7天顯著增加PRIT-0213比率(雙向ANOVA， $p < 0.05$)。

結果展示於圖6中。

在注射之後多個時間點 ^{203}Pb -DOTAM-bsAb之腫瘤血液比率(\pm SD； $n=3$)。

注射後天數	PRIT-0206	PRIT-0165	PRIT-0175
1	4.48 \pm 0.38	4.28 \pm 1.31	0.84 \pm 0.22
3	8.73 \pm 4.07	7.13 \pm 0.33	0.75 \pm 0.30
7	29.67 \pm 10.52	17.87 \pm 12.15	0.76 \pm 0.25

概述及結論

【0622】 靶向T84.66或CH1A1A之所有完全人類化雙特異性抗體均引起放射性在BxPC3腫瘤中顯著累積，與其相應陽性對照相當。

【0623】 雖然在第3天與第7天之間腫瘤中 ^{203}Pb -DOTAM-bsAb之%ID/g未顯著不同，但歸因於血液放射性降低，隨後時間點提高對應腫瘤血液比率。

實例17：清除劑之生物分佈(方案44)

【0624】 此研究之目標為闡明具有不同特性(例如分子骨架、尺寸及電荷)之一系列清除劑之生物分佈及更具體而言，其在腫瘤中之存在及/或累積。此受到關注，因為清除劑可能進入腫瘤中，結合於腫瘤結合之抗體及/或使其離開腫瘤，不利地影響隨後放射性配位體之結合。

研究設計，方案44

研究天數	日期	實驗程序
1	2015-03	I.v.注射* ^{212}Pb 標記之CA
1	2015-03	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數(2 h p.i.)
2	2015-03	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數(24 h p.i.)

*注射體積100 μL

研究設計，方案44 ($n_{\text{tot}} = 24$)

組	CA†	CA劑量 (μg)	^{212}Pb 放射性 (μCi)	時間點 (h p.i.)	n
---	-----	---------------------------	---	-----------------	---

A	Dex70	30	5	2	3
B	Dex250	30	5	2	3
C	Dex500-TriGalNAc 3:1	30	5	2	3
D	Dex500-TriGalNAc 9:1	30	5	2	3
E	Dex70	30	5	24	3
F	Dex250	30	5	24	3
G	Dex500-TriGalNAc 3:1	30	5	24	3
H	Dex500-TriGalNAc 9:1	30	5	24	3

†在²¹²Pb標記之前無Pb淬滅之所有清除劑

【0625】 將30 μg Dex70、Dex250及TriGalNAc修飾之清除劑用5 μCi ²¹²Pb淬滅且在PBS中稀釋，以獲得每100 μL總體積30 μg，用於靜脈內注射。

【0626】 在注射²¹²Pb-CA之後2小時或24小時處死小鼠並進行屍檢。收集血液、膀胱、心臟、肺、肝臟、脾臟、腎臟、腸(十二指腸、空腸、迴腸)、結腸、胰臟、胃、卵巢、腦、具有骨髓之股骨及腫瘤，稱重，且量測放射性含量，且隨後計算%ID及%ID/g。另外，在24小時時間點將尿液取樣。

結果，44

【0627】 所有清除劑自血流迅速清除，在注射2小時之後主要累積在肝臟及結腸中。在注射24小時之後在肝臟中發現約50%注射之²¹²Pb，如逐個器官(%ID)放射性分佈所顯示。TriGalNAc修飾之清除劑亦在一定程度上累積在脾臟中，此由存在TriGalNAc分子所解釋。一般而言，在24小時之後幾乎在尿液中未發現放射性。然而，最小清除劑(Dex70)排泄比預期慢。

【0628】 圖7展示在MKN45腫瘤負載小鼠中在注射²¹²Pb標記之清除劑之後2小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g ± SD, n=3)。

【0629】 圖8展示在MKN45腫瘤負載小鼠中在注射²¹²Pb標記之清除

劑之後24小時在所選組織及尿液中之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n=3)。

【0630】圖9展示在MKN45腫瘤負載小鼠中在注射²¹²Pb標記之清除劑之後24小時在所選組織及尿液中逐個器官之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n=3)。

概述及結論

【0631】以每隻小鼠30 μ g之劑量進行投與，放射性標記之CA中無一者引起²¹²Pb之腫瘤吸收。與未經修飾之Dex70及Dex250清除劑相比，Dex500經TriGalNac修飾無益處。

實例18：清除劑之長期生物分佈(方案70)

【0632】此研究比較六種不同清除劑之長期生物分佈。活體內追蹤經由用²⁰³Pb放射性標記來進行。

研究設計，方案70

研究天數	日期	實驗程序
1	2015-09	I.v.注射* ²⁰³ Pb標記之CA
8	2015-09	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μ L

研究組，方案70 (n_{tot} = 18)

組	CA†	CA劑量 (μ g)	²⁰³ Pb放射性 (μ Ci)	n
A	Dex500	30	50	3
B	Dex500-TriGalNac 9:1	30	50	3
C	Dex250	30	50	3
D	Dex70	30	50	3
E	Dex70-TriGalNac	30	50	3
F	Dex20	30	50	3

†在²⁰³Pb標記之前無Pb淬滅之所有清除劑

結果，70

【0633】圖10展示在無腫瘤小鼠中在注射²⁰³Pb標記之清除劑之後1

週在所選組織中之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n=3)。

【0634】圖11展示在無腫瘤小鼠中在注射²⁰³Pb標記之清除劑之後1週在所選組織中逐個器官之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n=3)。

實例19：血液中之清除劑(方案83及87)

【0635】此部分涵蓋兩個研究，其中第一個研究包括根據血液中之滯留時間，比較九種不同的基於聚葡萄糖之清除劑與PBS的初始篩選。目標為鑑別有望用於未來預先靶向實驗之候選物，允許重複治療間隔三週。假設為長時間殘留在循環中之清除劑與投與之雙特異性抗體結合，有效地阻斷隨後注射之放射性標記之DOTAM的結合。清除試劑根據尺寸、電荷及1,4,7,10-肆(胺甲醯基甲基)-1,4,7,10-四氮雜環十二烷(TCMC)負荷而變化。

【0636】第二個研究根據抗體清除效率評估九種清除劑。實驗經設計為在無腫瘤小鼠中之標準單次注射PRIT方案，其評估血液中²¹²Pb-DOTAM之滯留，作為投與CA之後滯留之bsAb的指標。

研究設計，方案83

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-01-19	I.v.注射* PRIT bsAb
2	2016-01-20	I.v.注射* CA或PBS
24	2016-02-11	I.v.注射* PRIT bsAb
25	2016-02-12	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
25	2016-02-12	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
25	2016-02-12	安樂死及抽血 + γ 計數

*注射體積100 μ L

研究設計，方案87

研究天數	日期	實驗程序
6	2016-02-29	I.v.注射* PRIT bsAb
9	2016-03-01	I.v.注射* CA或PBS
9	2016-03-01	溶離 ²¹² Pb-DOTAM

9	2016-03-01	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM
10	2016-03-02	安樂死及抽血 + γ 計數

*注射體積100 μL

方案83及87中之研究組 ($n_{\text{tot}} = 30/\text{方案}$)

組	bsAb	bsAb劑量(μg)	CA	CA劑量 83/87 (μg)	螯合物	Pb放射性 (μCi)	n
A	PRIT-0155	30	Dex20	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
B	PRIT-0155	30	Dex70	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
C	PRIT-0155	30	Dex250	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
D	PRIT-0155	30	Dex500	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
J	PRIT-0155	30	CDex500-(Glu)3	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
K	PRIT-0155	30	CDex500-(Glu)2	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
L	PRIT-0155	30	CDex500-(Glu)4	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
M	PRIT-0155	30	Dex500-M(Glu)2	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
N	PRIT-0155	30	Dex20-M(Glu)2	30/60	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3
O	PRIT-0155	30	—	0/0	^{212}Pb -DOTAM	10	3/3

【0637】 在第一次PRIT注射時，小鼠為7-9週齡。研究中之所有小鼠均無腫瘤；因此，任何結合DOTAM之雙特異性抗體可用於達成篩選目的。在PRIT-0155之後一天靜脈內投與清除劑，在PBS中稀釋至30 (方案83)或60 (方案87) $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 之最終濃度。第O組接受PBS代替清除劑。第A-D組中之化合物係基於20、70、250或500 kDa之聚葡萄糖尺寸，其中變化TCMC取代。第J-N組中之化合物係基於具有變化電荷(Glu)之封端(亦即用過量胺中和)聚葡萄糖-500 (CDex)，或具有單一Glu型式之(M(Glu))聚葡萄糖-500及聚葡萄糖-20。具有-(Glu)4、-(Glu)3及-(Glu)2之封端聚葡萄糖分別對應於極陰性、陰性及中性淨電荷；單一型式-M(Glu)2對應於陰性至微陽性淨電荷。

結果，83

【0638】 血液中放射性含量(%ID/g)之組平均值顯著不同於PBS對

照組(41.1 ± 1.4 %ID/g)，表明在投與三週之後清除劑滯留在循環中。三種化合物未與對照顯著不同：封端Dex500-(Glu)4、Dex500-單-(Glu)2及Dex20-單-(Glu)3；其他在變化程度上不同。

【0639】圖12展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後4小時在血液中之放射性含量(%ID/g \pm SD, n = 3)。條紋柱表示無CA對照，所有候選試劑與之進行比較。星號標記統計顯著性水準，由較低(*)至較高(***)。

結果，87

【0640】所測試之清除劑一般效能良好，一種例外：Dex500-M(Glu)2，其突出，其中在24小時之後 8.07 ± 0.61 %ID/g殘留在血液中。

【0641】圖13展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液中之平均放射性含量(%ID/g \pm SD, n = 3)。條紋柱表示無CA對照，所有候選試劑與之進行比較。

概述及結論

【0642】根據自我清除率，所篩選之試劑總體上效能良好，且實現抗體自循環中清除。在CA注射之間間隔三週之重複治療證明可行，不會對 ^{212}Pb -DOTAM結合於雙特異性抗體構成危險。另外，使用大部分測試之化合物，在注射CA之後2小時內清除雙特異性抗體。

實例20：清除劑之腫瘤滲透(方案85)

【0643】清除劑之腫瘤滲透係PRIT方案中之潛在問題，因為滲透之結合DOTAM之CA片段將與 ^{212}Pb -DOTAM競爭結合於抗體預先靶向之腫瘤細胞。在此研究中，就 ^{212}Pb -DOTAM與腫瘤之締合的抑制而言，比較六種不同清除劑。基於基線CA篩選(方案83)之結果選擇候選物，以評估i) 聚葡萄糖尺寸及ii) 分子電荷對腫瘤相關之放射性的影響。

研究設計，方案85

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-02-17	I.v.注射* BxPC3細胞
6	2016-02-22	I.v.注射* PRIT bsAb
9	2016-02-25	I.v.注射* CA或PBS
9	2016-02-25	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
9	2016-02-25	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
10	2016-02-26	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μ L方案85中之研究組 ($n_{tot} = 18$)

組	bsAb	bsAb劑量 (μ g)	CA	CA劑 量(μ g)	螯合物	Pb放射 性 (μ Ci)	n
A	PRIT-0165	30	Dex20	30	²¹² Pb-DOTAM	10	3
B	PRIT-0165	30	Dex70	30	²¹² Pb-DOTAM	10	3
D	PRIT-0165	30	Dex500	30	²¹² Pb-DOTAM	10	3
E	PRIT-0165	30	CDex500-(Glu)4	30	²¹² Pb-DOTAM	10	3
F	PRIT-0165	30	Dex500-M(Glu)2	30	²¹² Pb-DOTAM	10	3
G	PRIT-0165	30	—	0	²¹² Pb-DOTAM	10	3

【0644】向每隻小鼠(7週齡)皮下注射100 μ L RPMI/Matrigel中BxPC3細胞(第33代)至右側腹中。在注射腫瘤細胞五天之後，利用200 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0645】清除劑係基於20、70或500 kDa之聚葡萄糖尺寸，其中變化TCMC取代。CDex500-(Glu)4係基於封端(亦即藉由過量胺中和)之具有負淨電荷之聚葡萄糖-500 (CDex)；Dex500-M(Glu)2具有單一型式Glu (M(Glu))及中性至微正淨電荷。在PRIT-0165之後三天，所有均靜脈內投與，30 μ g/100 μ L。第G組接受PBS代替清除劑。

【0646】在注射²¹²Pb-DOTAM之後24小時處死小鼠。收集血液及腫瘤，且其相應%ID /g由樣品重量及放射性含量計算。

結果，85

【0647】 候選物中之三種顯示極少或無腫瘤吸收：Dex20 (0.26 ± 0.03 %ID/g)、Dex70 (4.06 ± 2.06 %ID/g)及CDex500-(Glu)4 (2.98 ± 0.73 %ID/g)，表明大量CA滲透至腫瘤中。相比之下，Dex500-M(Glu)2在腫瘤(69.39 ± 9.70 %ID/g)與血液(20.68 ± 1.22 %ID/g)中均引起高放射性，水準類似於PBS對照 (腫瘤及血液中分別 59.02 ± 15.53 及 27.92 ± 2.38 %ID/g)，此可解釋為bsAb清除失敗。Dex500顯示腫瘤中放射性大量累積 (20.78 ± 3.76 %ID/g)，表明幾乎無腫瘤滲透，而血液清除率基本上完成 (0.17 ± 0.01 %ID/g)。儘管如此，無CA對照中實現之腫瘤吸收表明一定程度之低分子量(MW)DOTAM-聚葡萄糖片段亦存在於該Dex500批次中。

【0648】 圖14展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液及腫瘤中之放射性含量(%ID/g \pm SD, n = 3)。

概述及結論

【0649】 此實驗證實低分子量CA物種之存在可實質上干擾 ^{212}Pb -DOTAM之腫瘤累積的概念。亦證明任何CA批次中存在之寬分子量範圍之分子，無論指定尺寸如何。由此，指定CA尺寸愈大，引入可滲透腫瘤之低分子量片段之風險愈低。然而，甚至對於Dex500，亦揭露一定程度滲透，由與無CA對照相比較腫瘤吸收之差異所指示。因此，未來此溶液應使用較高分子量截止值透濾，以儘可能地移除此等干擾片段。決定將Dex500之分子量截止值自30 kDa提高至100 kDa。

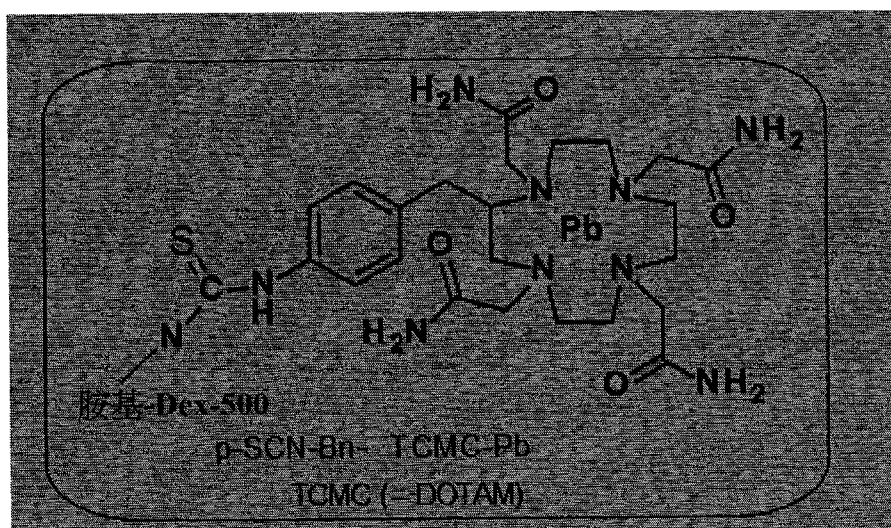
實例21：Dex500之清除劑製造方法

【0650】 使胺基聚葡萄糖(20.0 g)溶於0.1 M Na_2CO_3 之 H_2O 溶液(400 mL)與0.1 M NaHCO_3 之 H_2O 溶液(400 mL)的混合物中。在獲得無色澄清溶液之後，在攪拌下添加p-SCN-Bn-DOTAM.4HCl (S-2-(4-異硫氰酸

基苯甲基)-1,4,7,10-四氮雜-1,4,7,10-四(2-胺甲醯基甲基)環十二烷四鹽酸鹽(2.03 g)。將所得微混濁溶液在室溫下攪拌4小時，接著通過加入2 M HCl將反應混合物中和至pH 6-7。藉由具有100 kDa截止值之切向流過濾(Sartorius Hydrosart, Slice 200 100kDa 0.02 m²，穩定之基於纖維素之膜，Ultrafiltration Cassette)來純化所得溶液，以移除低分子量雜質。將所得溶液在減壓下凍乾，得到17.9 g所需中間物。

【0651】使16.1 g由凍乾獲得之固體溶於0.1 M AcOH之H₂O溶液(60 mL)與0.1 M NaOAc·3H₂O (540 mL)的混合物中。向無色澄清溶液加入固體狀Pb(OAc)₂·3H₂O (744 mg)。將無色澄清溶液攪拌60分鐘，接著加入二甲酚橙溶液(1%於H₂O中，250 μL)。紫色表明溶液中存在游離Pb(II)。加入EDTA溶液(0.01 M水溶液)，直至觀察到顏色變成黃色(65.2 mL)。藉由具有100 kDa截止值之切向流過濾(Sartorius Hydrosart, Slice 200 100kDa 0.02 m²，穩定之基於纖維素之膜，Ultrafiltration Cassette)來純化所得溶液，以移除低分子量雜質。將所得溶液在減壓下凍乾，得到14.0 g所需清除劑。

【0652】所得清除劑經以下圖示的形式的多個Pb-DOTAM部分取代：



實例22：關於腫瘤累積之清除劑劑量(方案90)

【0653】 此研究旨在皮下腫瘤模型中研究清除劑劑量對腫瘤累積之影響，假設較高量的清除劑可引起清除劑較高度地滲透至腫瘤，從而藉由阻斷腫瘤結合之雙特異性抗體的DOTAM結合臂而減少標記螯合物的隨後吸收。然而，過低劑量將由於循環中結合DOTAM之雙特異性抗體的含量較高而引起腫瘤相關之放射性累積效率較低。

【0654】 此外，在經滲濾以利用30或100 kDa之截止值移除低分子量組分的清除劑批料之間進行比較，試圖減少DOTAM結合之聚葡萄糖片段的腫瘤滲透。

研究設計，方案90

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-03-21	S.c.注射* BxPC3細胞
6	2016-03-26	I.v.注射* PRIT bsAb
10	2016-03-30	I.v.注射* Dex500
10	2016-03-30	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
10	2016-03-30	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
11	2016-03-31	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μ L方案90中之研究組 ($n_{tot} = 24$)

組	A	B	C	D	E	F	G	H
bsAb	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165
bsAb劑量 (μ g)	100	100	100	100	30	30	30	100
CA	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 *	Dex500 **	0	0
CA劑量 (μ g)	10	25	50	100	30	30	0	0
螯合物	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM
Pb放射性 (μ Ci)	10	10	10	10	10	10	10	10
n	3	3	3	3	3	3	3	3

*100-kDa過濾截止值；**30-kDa過濾截止值

【0655】藉由皮下注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子；目錄號354230) 1:1混合之RPMI培養基中的BxPC3細胞(第30代)來建立實體異種移植物。向每隻小鼠(11週齡)皮下注射100 μ L RPMI/Matrigel中 5×10^6 個細胞至右側腹中。在注射腫瘤細胞五天之後，利用150 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0656】將PRIT-0165以每100 μ L 30或100 μ g之濃度i.v.注射，四天後以每100 μ L 10、25、30、50或100 μ g之濃度注射清除劑(第A-F組)。在CA之後兩小時注射 ^{212}Pb -DOTAM。在投與雙特異性抗體及放射性標記之螯合物之間第G及H組未接受清除劑。

【0657】出於生物分佈之目的，在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時，處死小鼠，且收集血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、肌肉、尾巴及腫瘤。將樣品稱重且量測放射性，且隨後計算各器官之%ID/g，包括針對衰變及背景進行校正。

結果，90

【0658】對於投與清除劑之所有組，正常組織中之 ^{212}Pb 累積為低的；對比之下，未接受清除劑之組顯示整體上顯著水準之放射性。

【0659】生物分佈資料證明改變清除劑(100 kDa截止值)之量的作用。個別腫瘤資料之線性回歸得到顯著斜率，此表明在減少量之Dex500下腫瘤吸收較高($p = 0.03$ ， $R^2 = 0.31$)。對血液中放射性含量之作用係極端的，自使用PBS之 31.5 ± 0.2 %ID/g至使用10 μ g Dex500之 1.6 ± 0.5 %ID/g。

【0660】兩組接受同等(1:1)比率之PRIT-0165及Dex500；100或30 μ g各試劑。兩組之間腫瘤中的所得%ID/g未顯著不同(未配對t檢驗， $p =$

0.726)。重要地，利用不同過濾截止值之同等量之Dex500之間的比較顯示，使用較高分子量截止值，腫瘤累積顯著增加： 54.9 ± 6.9 代替 32.5 ± 4.4 %ID/g (未配對t檢驗， $p = 0.009$)。

【0661】 圖15展示使用30或100 μg 雙特異性抗體及10-100 μg 清除劑，利用100或30 kDa過濾截止值，或不使用清除劑(PBS)，在注射放射性標記之DOTAM之後24小時 ^{212}Pb 之分佈(%ID/g \pm SD， $n = 3$)。

【0662】 圖16展示在增加量之清除劑(0-100 μg)下對血液及腫瘤中 ^{212}Pb 之放射性濃度的作用。使用100 μg PRIT-0165預先靶向腫瘤，4天後用100 kDa截止值滲濾之Dex500或PBS。在CA之後2小時投與 ^{212}Pb -DOTAM。符號表示在放射性注射之後24小時的%ID/g，且線表示腫瘤資料之線性回歸。

概述及結論

【0663】 該研究證明 ^{212}Pb 之腫瘤累積急劇增加，同時維持低水準之循環放射性。得出兩個重要發現：1)用100 kDa截止值滲濾顯著減少DOTAM結合之聚葡萄糖片段的腫瘤滲透；且2) CA與bsAb之比率對結果之影響超過絕對CA量。在投與100 μg 雙特異性抗體之後，使用10:1之抗體:CA比率，實現極佳之腫瘤血液比率。此外，推斷出使用基於Dex500之清除劑的所有未來研究應使用利用100 kDa截止值滲濾之試劑。

實例23：對腫瘤相關之放射性的影響(方案95)

【0664】 在此研究中，根據 ^{212}Pb -DOTAM與腫瘤締合之抑制，比較基於聚葡萄糖-500之九種不同清除劑。更具體而言，實驗根據i) TCMC飽和、ii)清除劑與抗體比率及iii)產生/純化方法，評定對腫瘤相關之放射性的影響。此外，在注射10或30 μCi ^{212}Pb -DOTAM之後，未預先靶向或無

CA下，比較腫瘤吸收，以評定在較低劑量下是否已實現腫瘤之放射性飽和。

研究設計，方案95

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-06-14	I.v.注射* BxPC3細胞
13	2016-06-26	I.v.注射* PRIT bsAb
16	2016-06-29	I.v.注射* CA或PBS
16	2016-06-29	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
16	2016-06-29	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
17	2016-06-30	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μ L

方案95中之研究組 ($n_{tot} = 27$)

組	bsAb	bsAb劑量 (μ g)	CA	CA劑量 (μ g)	螯合物	Pb放射性 (μ Ci)	n
C	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	10	²¹² Pb-DOTAM	10	3
D	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	25	²¹² Pb-DOTAM	10	3
E	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	50	²¹² Pb-DOTAM	10	3
F	PRIT-0165	100	Dex500-(10%)	100	²¹² Pb-DOTAM	10	3
G	PRIT-0165	100	Dex500-(20%)	40	²¹² Pb-DOTAM	10	3
H	PRIT-0165	100	Dex500-(40%)	20	²¹² Pb-DOTAM	10	3
I	PRIT-0165	100	Dex500-(100%)	10	²¹² Pb-DOTAM	10	3
J	PRIT-0165	100	—	0	²¹² Pb-DOTAM	10	3
K	PRIT-0165	100	—	0	²¹² Pb-DOTAM	30	3

【0665】藉由皮下注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子；目錄號354230) 1:1混合之RPMI培養基中的BxPC3細胞(第20代)來建立實體異種移植物。向每隻小鼠(8週齡)皮下注射100 μ L RPMI/Matrigel中 5×10^6 個細胞至右側腹中。在注射腫瘤細胞十五天之後，利用210 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0666】靜脈內投與PRIT-0165 (100 μ g/100 μ L)，接著三天後投與基於聚葡萄糖-500之清除試劑(10-170 μ g/100 μ L)，改變TCMC取代(10-

100%)。第J及K組接受PBS代替清除劑。兩小時後，向小鼠靜脈內注射100 μ L相應 ^{212}Pb -DOTAM溶液(10或30 μCi)。

【0667】 在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時，處死小鼠且屍檢。收集血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、肌肉、尾巴及腫瘤，稱重且量測放射性含量，且隨後計算%ID/g。

結果，95

【0668】 生物分佈資料揭露在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時收集的組織中平均放射性含量(%ID/g \pm SD)的明顯趨勢，視所投與之量而定，在較低CA量下血液及正常組織中之 ^{212}Pb 濃度較高。此外，較高 ^{212}Pb 放射性引起腫瘤中 ^{212}Pb 累積較高，正常組織吸收中未相應增加。

【0669】 圖17展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n = 3)。深灰色及黑色條柱表示無CA之陽性對照，候選試劑與之進行比較。

【0670】 針對多重比較進行校正之單向ANOVA揭露，根據腫瘤與血液比率，僅僅Dex500-(40%) (76.79 \pm 33.28, p < 0.0001)及Dex500-(100%) (43.26 \pm 24.66, p = 0.0115)與10 μCi 陰性對照(2.26 \pm 0.25)差異顯著。在具有最高腫瘤與血液比率之清除試劑(Dex500-(40%))與先前標準(Dex500-(100%))之間察覺到之差異在統計上不顯著(未配對t檢驗, p = 0.2336)。

【0671】 圖18展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液及腫瘤中之 ^{212}Pb 含量及對應之腫瘤與血液比率(%ID/g \pm SD, n = 3)。深灰色及黑色條柱表示無CA之陽性對照，候選試劑與之進行比較。

【0672】 進行線性回歸及多項式(三次曲線)曲線擬合以分析增加清

除劑(Dex500-(10%))量及TCMC負荷(無CA, Dex500-(10%)、Dex500-(20%)、Dex500-(40%)、Dex500-(100%))對腫瘤與血液比率之影響。線性曲線之斜率係統計上顯著的($p < 0.0001$)，支持較大量之Dex500-(10%)增加腫瘤與血液比率，而對於注射之一定量之TCMC，基於100 μg Dex500-(10%)，指示在約60之TCMC與Dex500比率下最大。重要地，注意到此等結果不應自其上下文中得出，而得到關於試劑量或TCMC飽和之一般結論；其僅僅對所應用之背景有效。

【0673】圖19顯示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時隨CA量(PJRD08-46)及TCMC飽和(9-、20-、39-或84--1)而變的腫瘤與血液比率。虛線表示相應資料之線性回歸($R^2 = 0.82$)及非線性曲線擬合($R^2 = 0.74$)。

【0674】最終測試比較10 μCi 對30 μCi 之 ^{212}Pb -DOTAM，不注射抗體或清除劑。兩個研究組中血液中之含量類似，但30 μCi 比10 μCi 引起之腫瘤累積高： 107.74 ± 14.71 對比 72.38 ± 10.83 %ID/g (\pm SD, $n = 3$)。所得腫瘤與血液比率顯著不同：30 μCi 及10 μCi 分別為 3.20 ± 0.20 對比 2.26 ± 0.25 (未配對t檢驗, $p = 0.007$)。

概述及結論

【0675】最後，在投與 ^{212}Pb DOTAM之後24小時，每分子具有39個TCMC之20 μg Dex500 (Dex500-(40%))使得預先靶向之腫瘤中 ^{212}Pb 之累積非常高，且血液中之滯留較低。其為性能最佳之清除劑，與每分子具有84個TCMC之10 μg 先前標準CA Dex500 -(100%)並列。由於組內變化性相當大且樣品體積小，所以在兩種試劑之間，腫瘤與血液之比率的差異並非統計學上不同的，但平均值表明Dex500-(100%)可為有利的。此外，推斷30 μCi ^{212}Pb -DOTAM可產生比10 μCi 更高的腫瘤累積，即在較低劑量

下未達到飽和。

實例24：雙特異性抗體劑量對腫瘤累積之影響(方案91)

【0676】 此研究旨在皮下腫瘤模型中研究雙特異性抗體劑量對腫瘤累積之影響。假設較高量之雙特異性抗體可更容易地使腫瘤細胞上之可利用結合位點飽和，從而增加隨後標記螯合物之吸收。另一方面，過度增加劑量可由於循環中循環雙特異性抗體之水準較高而引起腫瘤相關之放射性累積效率較低。

研究設計，方案91

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-03-29	S.c.注射* BxPC3細胞
6	2016-04-03	I.v.注射* PRIT bsAb
10	2016-04-07	I.v.注射* Dex500
10	2016-04-07	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
10	2016-04-07	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
11	2016-04-08	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μ L方案91中之研究組 ($n_{tot} = 21$)

組	A	B	C	D	E	F	G
bsAb	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0165	PRIT-0156	PRIT-0156	PRIT-0156	PRIT-0175 *
bsAb劑量 (μ g)	30	100	200	30	100	200	100
CA	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500	Dex500
CA劑量(μ g)	3	10	20	3	10	20	10
螯合物	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM	²¹² Pb-DOTAM
Pb放射性(μ Ci)	10	10	10	10	10	10	10
n	3	3	3	3	3	3	3

*未結合CEA之對照

【0677】藉由皮下注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子；目錄號354230) 1:1混合之RPMI培養基中的BxPC3細胞(第34代)來建立實體異種移植物。向每隻小鼠(7-12週齡)皮下注射100 μL RPMI/Matrigel中 5×10^6 個細胞至右側腹中。在注射腫瘤細胞五天之後，利用220 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0678】向小鼠靜脈內投與濃度為30-200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 的結合CEA之雙特異性抗體PRIT-0165或PRIT-0156，或100 μg 未結合CEA之對照抗體PRIT-0175。在四天之後，向所有組靜脈內注射濃度為3、10或20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 之清除劑(所注射抗體之1/10)，兩小時後注射10 μCi ^{212}Pb -DOTAM。24小時後處死小鼠，且進行屍檢。收集血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、肌肉、尾巴及腫瘤。將樣品稱重且量測放射性，且計算各器官之%ID/g。

結果，91

【0679】與100 μg 未結合CEA之對照相比，使用100 μg 結合CEA之雙特異性抗體預先靶向引起 ^{212}Pb 顯著累積在腫瘤中(未配對t檢驗，分別與PRIT-0156及 PRIT-0165比較， $p=0.027$ 及 0.008)。對於任一結合CEA之構築體，當抗體劑量自30 μg 增加至200 μg 時，未看到腫瘤吸收之顯著差異。然而，對於劑量超過30 μg 之抗體，總放射性水準在大部分正常組織中略微升高。重要地，除100與200 μg PRIT-0156之間外，對於各劑量增加，血液中之%ID/g顯著增加(未配對t檢驗， $p<0.05$)。

【0680】圖20展示在注射放射性標記之DOTAM之後24小時 ^{212}Pb 之分佈(%ID/g \pm SD， $n = 3$)。具有白色及灰色背景之條柱分別表示T84.66及CH1A1A之靶向；黑色條柱表示未結合CEA之對照。

概述及結論

【0681】 所有三種抗體劑量水準(30、100及200 μg)引起兩種測試之雙特異性構築體在腫瘤內放射性高特異性吸收。在劑量增加下缺乏腫瘤累積之差異表明結合位點在較低劑量下已飽和，或在投與PRIT與注射清除劑之間的時間(四天)太短而不允許腫瘤進一步累積。正如所料，血液中之放射性水準隨劑量增加而增加，略微縮小治療之治療窗口。

實例25：CEA-PRIT之功效(方案93 (a、b))

【0682】 在此研究中，在兩個平行皮下腫瘤模型中評定使用兩種臨床bsAb候選物(PRIT-0213及PRIT-0214)的CEA-PRIT之功效：BxPC3及LS174T。在單循環及雙循環治療方案中，並列比較雙特異性抗體。

研究設計，方案93a (BxPC3)

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-04-13	I.v.注射* BxPC3細胞
13	2016-04-25	I.v.注射* PRIT bsAb
17	2016-04-29	I.v.注射* CA
17	2016-04-29	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
17	2016-04-29	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
18	2016-04-30	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數
41	2016-05-23	I.v.注射* PRIT bsAb
45	2016-05-24	I.v.注射* CA
45	2016-05-24	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
45	2016-05-24	I.v.注射* ²¹² Pb-DOTAM
46	2016-05-25	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μL

研究設計，方案93b (LS174T)

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-04-25	I.v.注射* LS174T細胞
5	2016-04-29	I.v.注射* PRIT bsAb
9	2016-05-03	I.v.注射* CA
9	2016-05-03	溶離 ²¹² Pb-DOTAM

9	2016-05-03	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM
10	2016-05-04	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數
33	2016-05-27	I.v.注射* PRIT bsAb
37	2016-05-31	I.v.注射* CA
37	2016-05-31	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
37	2016-05-31	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM
38	2016-06-01	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μL

【0683】 第A-G組表示進行追蹤以評定功效之治療小鼠，而第H-L組包含在最後注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時出於生物分佈之目的而處死的小鼠。

方案93a中之研究組 (BxPC3 ; $n_{\text{tot}} = 71$)

組	bsAb	bsAb劑量 (μg)	CA	CA劑量(μg)	螯合物	Pb放射性(μCi)	循環	n
A	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/10	2	8
B	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
C	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/10	2	8
D	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
E	PRIT-0175	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
F	—	0	—	0	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
G	—	0	—	0	—	0	2	8
H	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	3
I	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	3
J	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	3
K	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	3
L	PRIT-0175	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	3

方案93b中之研究組 (LS174T ; $n_{\text{tot}} = 71$)

組	bsAb	bsAb劑量 (μg)	CA	CA劑量(μg)	螯合物	Pb放射性(μCi)	循環	n
A	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	8
B	PRIT-0213	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8
C	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30	1	8
D	PRIT-0214	100	Dex500	25	^{212}Pb -DOTAM	30/30	2	8

E	PRIT-0175	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	8
F	—	0	—	0	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	8
G	—	0	—	0	—	0	2	8
H	PRIT-0213	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1	3
I	PRIT-0213	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	3
J	PRIT-0214	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1	3
K	PRIT-0214	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30/30	2	3
L	PRIT-0175	100	Dex500	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1	3

【0684】藉由皮下注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子；目錄號354230) 1:1混合之RPMI (BxPC3)或DMEM (LS174T)培養基中的細胞來建立實體異種移植物。

【0685】對於方案93a，向小鼠(7週齡)皮下注射100 μL RPMI/Matrigel中 5×10^6 個BxPC3細胞(第33代)至右側腹中。在注射腫瘤細胞十二天之後，利用235 mm³之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0686】對於方案93b，向小鼠(9週齡)皮下注射100 μL DMEM/Matrigel中 1×10^6 個LS174T細胞(第26代)至右側腹中。在注射腫瘤細胞三天之後，利用150 mm³之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0687】各治療循環以注射人類化bsAb (PRIT-0213、PRIT-0214或PRIT-0175)開始。在四天之後，投與清除劑(Dex500)，兩小時後投與²¹²Pb-DOTAM。為將治療循環1後放射性尿液/糞便之再吸入減至最少，在投與²¹²Pb-DOTAM之後4小時改變籠，接著在24 h p.i.再次改變。對於循環2，在投與²¹²Pb-DOTAM之後將小鼠置於具有格子地板之籠中4小時，接著轉移至具有標準草墊之新籠。然後所有籠在24 h p.i.改變，如循環1之後。

【0688】經由一週重複測徑規量測三次，追蹤小鼠中之腫瘤發展。若需要，則在預定量測之間隙進行額外測徑規量測。以相同方式重複

量測動物體重。腫瘤體積達到 3000 mm^3 之小鼠立即施以安樂死。出於倫理原因考慮施以安樂死之其他因素為體重損失、腫瘤狀態(例如破潰)及動物之概貌。若由於輻射誘發之毒性引起體重急劇減輕(集體或個別)，則自放射性注射之後五天開始，向所有動物提供濕食，直至所有個體充分恢復。

【0689】 在安樂死時自第A-G組收穫以下器官及組織：膀胱、卵巢、肝臟、脾臟、腎臟、股骨(包括骨髓)、結腸、空腸、胃及腫瘤。注意意外或反常情況且拍照。將組織立即置於10%中性緩衝福馬林(4°C)中，接著在5天之後轉移至PBS (4°C)。然後福馬林固定之樣品運往Roche Pharma Research and Early Development Early Development, Roche Innovation Center Basel，進行進一步加工及分析。

【0690】 在第一次及唯一一次注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時處死第H、J及L組中之小鼠且進行屍檢；在第二次注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時處死第I及K組且進行屍檢。收穫以下器官及組織：血液、膀胱、小腸、結腸、脾臟、胰臟、腎臟、肝臟、肺、心臟、股骨、肌肉、尾巴及腫瘤。將收集之樣品稱重且量測放射性，且隨後計算每公克組織之注射劑量百分比(%ID/g)，包括針對衰變及背景進行之校正。

結果，93a

【0691】 治療循環1後之結果與先前在此模型中實現之組織吸收非常對應，其中腫瘤累積高(PRIT-0213及PRIT-0214分別為 25.0 ± 9.7 及 $19.5 \pm 6.4\text{ \%ID/g}$)且正常組織中累積低。然而，循環2引起不同 ^{212}Pb 分佈概況，其中所有收集之組織中放射性含量增加。

【0692】 圖21展示對於BxPC3模型中之治療循環1及2，在注射

^{212}Pb -DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g \pm SEM, n = 3)。

【0693】 所有注射30 μCi ^{212}Pb -DOTAM之小鼠均經歷初始體重下降，在第一次放射性注射之後第10天有所減輕。可能由於放射性清除較慢且因此在相關循環-2生物分佈中觀察到正常組織中累積 ^{212}Pb ，第二次注射30 μCi 之組經歷更明顯之重量急劇減輕。未觀察到接受第二個10 μCi 循環之組有此類作用，在第二個循環之後重量減輕為適度的。

【0694】 圖22展示在BxPC3模型中在CEA-PRIT之後第A-G組(n=8)中之平均體重。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0695】 圖23顯示在BxPC3模型中CEA-PRIT之後第A-G組(n = 8)之平均體重變化，表示為初始體重百分比。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0696】 與基線相比較，至第14-19天，所有組之腫瘤體積加倍。第16天給與第一次 ^{212}Pb -DOTAM處理，然後PRIT-0213及PRIT-0214組中之腫瘤繼續生長約一週，接著體積顯示消退。雖然腫瘤未完全消退，但體積保持相對恆定在低水準下，直至第40-47天，此時與基線相比，其再一次達到雙倍體積。此時投與第二次30 μCi ^{212}Pb -DOTAM注射(第44天)，如前所論述，引起重量急劇減輕，隨後對在隨後一週內最受影響之小鼠施以安樂死。用10 μCi ^{212}Pb -DOTAM代替30 μCi ^{212}Pb -DOTAM給與第二次治療循環(第55天)之小鼠經歷更少輻射誘發之毒性。10 μCi 注射引起第二階段腫瘤消退，持續大約第58天與第75天之間。與僅僅 ^{212}Pb -DOTAM或PBS相比較，具有非特異性bsAb之PRIT引起顯著但有限之腫瘤生長抑

制。使用鄧尼特方法(Dunnet's method)進行平均值比較，揭露所有使用PRIT-0213及PRIT-0214之處理方案均產生同等處理與對照比率，自第23-26天及往後，與任一對照組相比，均顯著不同。

【0697】 在第47天，即仍然表示所有處理組之最後一日，與PBS相比較，組「PRIT-0213，30 + 10 μCi 」、「PRIT-0213，30 + 30 μCi 」、「PRIT-0214，30 + 10 μCi 」、「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」、「PRIT-0175，30 + 30 μCi 」及「僅僅DOTAM，30 + 30 μCi 」之腫瘤生長抑制(TGI)分別為87.3%、88.8%、84.1%、88.7%、57.5%及15.8%。媒劑對照組中之最後小鼠在第66天予以說明，此時以下剩餘三組之TGI分別為87.8%、84.5%及87.3%：「PRIT-0213，30 + 10 μCi 」、「PRIT-0214，30 + 10 μCi 」及「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」。總共六隻小鼠存活，直至實驗結束(第84天)：一隻來自組「PRIT-0213，30 + 10 μCi 」、三隻來自組「PRIT-0214，30 + 10 μCi 」及兩隻來自組「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」。

【0698】 圖24展示在BxPC3模型中第A-G組(n=8)之腫瘤生長平均值+標準誤差。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0699】 圖25展示在BxPC3模型中第A-G組之個別腫瘤生長曲線。豎點線指示投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0700】 圖26展示說明BxPC3模型中第A-G組(n=8)中之存活的卡普蘭-邁耶曲線。豎點線指示投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0701】 進行成對檢驗以說明在存活率方面哪些組顯著不同：對數秩檢驗(對較後存活事件施加更多權重)及威爾卡森檢驗(Wilcoxon test)(對

早期存活時間施加更多權重)，兩者均針對多個檢驗使用邦弗朗尼校正 (Bonferroni correction)。由於輻射誘發之毒性，「PRIT-0213，30 + 30 μCi 」效能等於或差於對照組。對應PRIT-0214處理實現略微更佳之結果，與PBS及非特異抗體相比，存活率提高。除彼此及「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」外，與所有組相比較，第二次循環中利用10 μCi ^{212}Pb -DOTAM之兩組顯著提高存活率。

成對對數秩檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑(PBS)	單獨DOTAM 30 + 30 μCi	PRIT-0175 30 + 30 μCi	PRIT-0213 30 + 10 μCi	PRIT-0213 30 + 30 μCi	PRIT-0214 30 + 10 μCi	PRIT-0214 30 + 30 μCi
媒劑(PBS)	1.0000	0.5271	0.9420	0.0002*	0.6178	0.0003*	0.0425*
單獨DOTAM 30 + 30 μCi	0.5271	1.0000	0.0032*	0.0001*	0.8474	<.0001*	0.0685
PRIT-0175 30 + 30 μCi	0.9420	0.0032*	1.0000	0.0001*	0.0007*	0.0001*	0.0001*
PRIT-0213 30 + 10 μCi	0.0002*	0.0001*	0.0001*	1.0000	<.0001*	0.6377	0.2894
PRIT-0213 30 + 30 μCi	0.6178	0.8474	0.0007*	<.0001*	1.0000	<.0001*	0.0302*
PRIT-0214 30 + 10 μCi	0.0003*	<.0001*	0.0001*	0.6377	<.0001*	1.0000	0.1392
PRIT-0214 30 + 30 μCi	0.0425*	0.0685	0.0001*	0.2894	0.0302*	0.1392	1.0000

成對威爾卡森檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑(PBS)	單獨DOTAM 30 + 30 μCi	PRIT-0175 30 + 30 μCi	PRIT-0213 30 + 10 μCi	PRIT-0213 30 + 30 μCi	PRIT-0214 30 + 10 μCi	PRIT-0214 30 + 30 μCi
媒劑(PBS)	1.0000	0.1439	0.6563	0.0004*	0.1290	0.0006*	0.0219*
單獨DOTAM 30 + 30 μCi	0.1439	1.0000	0.0042*	0.0004*	0.8704	0.0002*	0.0827
PRIT-0175 30 + 30 μCi	0.6563	0.0042*	1.0000	0.0002*	0.0008*	0.0002*	0.0002*
PRIT-0213 30 + 10 μCi	0.0004*	0.0004*	0.0002*	1.0000	0.0002*	0.7489	0.0790
PRIT-0213 30 + 30 μCi	0.1290	0.8704	0.0008*	0.0002*	1.0000	0.0002*	0.0648
PRIT-0214 30 + 10 μCi	0.0006*	0.0002*	0.0002*	0.7489	0.0002*	1.0000	0.0350*

成對威爾卡森檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑(PBS)	單獨DOTAM 30 + 30 μ Ci	PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 + 10 μ Ci	PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	PRIT-0214 30 + 10 μ Ci	PRIT-0214 30 + 30 μ Ci
PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	0.0219*	0.0827	0.0002*	0.0790	0.0648	0.0350*	1.0000

結果，93b

【0702】 兩種治療循環均引起高 ^{212}Pb 腫瘤累積及正常組織中低 ^{212}Pb 累積。PRIT-0213及PRIT-0214在循環1之後的腫瘤吸收分別為 30.9 ± 2.9 及 21.4 ± 1.9 %ID/g；在循環2之後對應數目為 33.2 ± 0.7 及 40.1 ± 6.5 %ID/g。

【0703】 圖27展示對於LS174T模型中之治療循環1及2，在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n = 3)。

【0704】 所有注射 ^{212}Pb -DOTAM之小鼠均經歷體重適度下降，在兩次30 μ Ci治療循環之後類似。然而，由於腫瘤狀態較差，故出於倫理原因，提前對許多動物施以安樂死。

【0705】 圖 28 展示在LS174T模型中在CEA-PRIT之後第A-G組(n=8)中之平均體重。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0706】 圖 29 展示在LS174T模型中在CEA-PRIT之後第A-G組(n=8)中之平均體重變化，表示為初始體重百分比。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0707】 在第8天給與第一次 ^{212}Pb -DOTAM處理。雖然與基線相比較，腫瘤未消退，但PRIT-0213及PRIT-0214組平均值保持相對恆定，增加極為緩慢。在第36天投與第二次30 μ Ci ^{212}Pb -DOTAM注射；然而，由

於對照組中腫瘤快速生長及所有組中先前論述之腫瘤狀態較差之問題，至此已對許多小鼠施以安樂死。雖然接受第二次30 μCi ^{212}Pb -DOTAM注射之小鼠恢復或保留其腫瘤對照，但腫瘤未完全消退。使用鄧尼特方法進行平均值比較，揭露自第14天開始，所有使用PRIT-0213及PRIT-0214之處理方案產生與PBS組相比，顯著不同之處理與對照比率。分別自第16天及第22天開始，PRIT-0175及DOTAM對照還與媒劑對照差別顯著。

【0708】 在第22天，即仍然表示所有處理組之最後一日，與PBS相比較，組「PRIT-0213，30 μCi 」、「PRIT-0213，30 + 30 μCi 」、「PRIT-0214，30 μCi 」、「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」、「PRIT-0175，30 + 30 μCi 」及「僅僅DOTAM，30 + 30 μCi 」之TGI分別為83.1%、88.8%、87.5%、91.0%、53.0%及64.7%。媒劑對照組中之最後小鼠在第30天予以說明，此時以下剩餘組之TGI分別為92.5%、89.5%、90.8%、92.6%及79.9%：「PRIT-0213，30 μCi 」、「PRIT-0213，30 + 30 μCi 」、「PRIT-0214，30 μCi 」、「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」及「PRIT-0175，30 + 30 μCi 」。兩隻小鼠存活直至實驗結束(第101天)，均來自組「PRIT-0214，30 + 30 μCi 」。

【0709】 圖30展示在LS174T模型中第A-G組(n=8)之腫瘤生長平均值+標準誤差。各組中曲線在第一例死亡處截斷。豎點線指示根據研究設計，一些組或所有組投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0710】 圖31展示在LS174T模型中第A-G組之個別腫瘤生長曲線。豎點線指示投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0711】 圖32展示說明LS174T模型中第A-G組(n=8)中之存活的卡普蘭-邁耶曲線。豎點線指示投與 ^{212}Pb -DOTAM。

【0712】 在邦弗朗尼校正下進行對數秩及威爾卡森檢驗，以說明在存活率方面哪些組顯著不同。關鍵發現為除「PRIT-0213，30 μ Ci」外，「PRIT-0214，30 + 30 μ Ci」顯著增加存活率。然而組「PRIT-0213，30 + 30 μ Ci」中之整體存活率未與「PRIT-0213，30 μ Ci」顯著不同，因此僅與「PRIT-0214，30 + 30 μ Ci」略微不同。

成對對數秩檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑 (PBS)	單獨DOTAM 30 + 30 μ Ci	PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 μ Ci	PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	PRIT-0214 30 μ Ci
媒劑(PBS)	1.0000	0.0034*	0.4728	0.0002*	<.0001*	<.0001*	0.0399*
單獨DOTAM 30 + 30 μ Ci	0.0034*	1.0000	0.0090*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0091*
PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	0.4728	0.0090*	1.0000	0.0051*	<.0001*	<.0001*	0.3974
PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	0.0002*	<.0001*	0.0051*	1.0000	0.9883	0.0353*	0.0357*
PRIT-0213 30 μ Ci	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.9883	1.0000	0.1428	0.0002*
PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0353*	0.1428	1.0000	<.0001*
PRIT-0214 30 μ Ci	0.0399*	0.0091*	0.3974	0.0357*	0.0002*	<.0001*	1.0000

成對威爾卡森檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑 (PBS)	單獨DOTAM 30 + 30 μ Ci	PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	PRIT-0213 30 μ Ci	PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	PRIT-0214 30 μ Ci
媒劑(PBS)	1.0000	0.0111*	0.8734	0.0005*	0.0002*	0.0002*	0.1330
單獨DOTAM 30 + 30 μ Ci	0.0111*	1.0000	0.0417*	0.0002*	0.0002*	0.0002*	0.0160*
PRIT-0175 30 + 30 μ Ci	0.8734	0.0417*	1.0000	0.0047*	0.0002*	0.0002*	0.3994
PRIT-0213 30 + 30 μ Ci	0.0005*	0.0002*	0.0047*	1.0000	0.5630	0.0193*	0.0541
PRIT-0213 30 μ Ci	0.0002*	0.0002*	0.0002*	0.5630	1.0000	0.1100	0.0004*
PRIT-0214 30 + 30 μ Ci	0.0002*	0.0002*	0.0002*	0.0193*	0.1100	1.0000	0.0002*
PRIT-0214 30 μ Ci	0.1330	0.0160*	0.3994	0.0541	0.0004*	0.0002*	1.0000

概述及結論

【0713】 使用兩種雙特異性抗體PRIT-0213及PRIT-0214中之任一種的CEA-PRIT在一或兩次治療循環下均對兩種研究之腫瘤模型引起顯著腫瘤生長抑制，且提高存活率。在BxPC3研究中意外之第二次循環²¹²Pb生物分佈及隨後輻射誘發之毒性後的故障排除工作推斷出此情況可能由未

確定之注射相關問題引起。應重複BxPC3功效研究以證實該問題並非處理方案所固有的。未來不應在LS174T模型中進行實驗，直至較差腫瘤狀態之問題得到解決。為提高第二治療循環之效率，縮短建議兩次循環之間的時間以避免腫瘤再生長。此外，添加第三次治療循環至方案亦可為一種選擇以進行進一步評估。

【0714】最終，對腫瘤生長背後之根本機制之研究非常受到關注，以闡明雖然生長明顯受到抑制，但為何腫瘤未完全消退，而是在一定時間量之後開始繼續生長。

實例26：清除劑劑量(方案105)

【0715】在此研究中，根據對 ^{212}Pb -DOTAM與預先靶向之腫瘤的締合的作用，評定在50% TCMC飽和下基於聚葡萄糖-500之清除劑之一系列劑量。

研究設計，方案105

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-08-30	I.v.注射* BxPC3細胞
13	2016-09-12	I.v.注射* PRIT bsAb
16	2016-09-15	I.v.注射* CA或PBS
16	2016-09-15	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
16	2016-09-15	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM
17	2016-09-16	安樂死及屍檢；組織之 γ 計數

*注射體積100 μL

方案105中之研究組($n_{\text{tot}} = 18$)

組	bsAb	bsAb劑量 (μg)	CA	CA劑 量(μg)	螯合物	Pb放射性 (μCi)	n
A	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	5	^{212}Pb -DOTAM	10	3
B	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	10	^{212}Pb -DOTAM	10	3
C	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	30	^{212}Pb -DOTAM	10	3
D	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	75	^{212}Pb -DOTAM	10	3
E	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	250	^{212}Pb -DOTAM	10	3
F	CEA-DOTAM	100	—	0	^{212}Pb -DOTAM	10	3

第 223 頁(發明說明書)

【0716】藉由皮下注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子；目錄號354230) 1:1混合之RPMI培養基中的BxPC3細胞(第26代)來建立實體異種移植體。向每隻小鼠(6週齡)皮下注射100 μ L RPMI/Matrigel中 5×10^6 個細胞至右側腹中。在注射腫瘤細胞十五天之後，利用 222 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0717】靜脈內投與CEA-PRIT (100 μ g/100 μ L)，三天後投與Dex500-(50%) (5-250 μ g/100 μ L)。第F組接受PBS代替清除劑。兩小時後，小鼠靜脈內注射100 μ L ^{212}Pb -DOTAM (10 μ Ci)。

【0718】在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時處死小鼠且屍檢。收集血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、肌肉、尾巴及腫瘤，稱重且量測放射性含量，且隨後計算%ID/g。

結果，105

【0719】對於所有CA劑量而言，除250 μ g外， ^{212}Pb 之腫瘤累積一般為高的。30、75及250 μ g之CA劑量的CEA-PRIT雙特異性抗體之血液清除率最有效。因此，30、75及250 μ g CA實現最高腫瘤與血液比率：分別為187.7、180.2及243.5。 ^{212}Pb 之對應腫瘤吸收為 91.8 ± 18.9 、 70.5 ± 11.1 及 35.2 ± 17.0 %ID/g (\pm SD, n=3)。

【0720】圖33展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在所選組織中之放射性分佈(%ID/g \pm SD, n = 3)。灰色條柱表示在注射多種量之Dex500-(50%) CA之後的組織累積；黑色條柱表示無CA之對照。

【0721】圖34展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時在血液及腫瘤中之 ^{212}Pb 含量(%ID/g \pm SD, n = 3)及對應之腫瘤與血液比率。灰色條柱表示在注射多種量之Dex500-(50%) CA之後的組織累積；黑色條柱表示無

CA之對照。

概述及結論

【0722】 基於在腫瘤內實現之 ^{212}Pb 累積、血液清除率及隨後腫瘤與血液比率，在BxPC3模型中30 μg 劑量之Dex500-(50%)似乎有利於CEA-PRIT。

實例27：基於聚葡萄糖-500之清除劑在血液中之滯留時間(方案106)

【0723】 在此研究中，根據在血液中之滯留時間，評定在50% TCMC飽和下基於聚葡萄糖-500之清除劑。旨在鑑別重複處理之合適時間範圍(1-4週)，確保循環中幾乎未殘留清除劑可與所投與之雙特異性抗體結合，從而有效地阻斷隨後注射之放射性標記之DOTAM的結合。

研究設計，方案106

研究天數	日期	實驗程序
1	2016-09-19	I.v.注射* PRIT bsAb
2	2016-09-12	I.v.注射* CA或PBS
9	2016-09-27	I.v.注射* PRIT bsAb (1週)
10	2016-09-28	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
10	2016-09-28	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM (1週)
10	2016-09-28	安樂死及抽血 + γ 計數 (1週)
16	2016-10-04	I.v.注射* PRIT bsAb (2週)
17	2016-10-05	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
17	2016-10-05	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM (2週)
17	2016-10-05	安樂死及抽血 + γ 計數 (2週)
23	2016-10-11	I.v.注射* PRIT bsAb (3週)
24	2016-10-12	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
24	2016-10-12	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM (3週)
24	2016-10-12	安樂死及抽血 + γ 計數 (3週)
30	2016-10-18	I.v.注射* PRIT bsAb (4週)
31	2016-10-19	溶離 ^{212}Pb -DOTAM
31	2016-10-19	I.v.注射* ^{212}Pb -DOTAM (4週)
31	2016-10-19	安樂死及抽血 + γ 計數 (4週)

*注射體積100 μL

方案106中之研究組 ($n_{\text{tot}} = 24$)

組	bsAb	bsAb劑量 (μg)	CA	CA劑量 (μg)	時間間隔 (週)	螯合物	Pb放射性 (μCi)	n
A	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	1	^{212}Pb -DOTAM	10	3
B	CEA-DOTAM	100	—	0	1	^{212}Pb -DOTAM	10	3
C	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	2	^{212}Pb -DOTAM	10	3
D	CEA-DOTAM	100	—	0	2	^{212}Pb -DOTAM	10	3
E	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	3	^{212}Pb -DOTAM	10	3
F	CEA-DOTAM	100	—	0	3	^{212}Pb -DOTAM	10	3
G	CEA-DOTAM	100	Dex500-(50%)	25	4	^{212}Pb -DOTAM	10	3
H	CEA-DOTAM	100	—	0	4	^{212}Pb -DOTAM	10	3

【0724】 向小鼠(9週齡)靜脈內投與CEA-PRIT (100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)，接著一日後投與Dex500-(50%) (25 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)。第B、D、F及H組接受PBS代替清除劑。在1、2、3或4週之後，向小鼠靜脈內再次注射CEA-PRIT (100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$)，接著一日後注射100 μL ^{212}Pb -DOTAM (10 μCi)。

【0725】 在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後4小時處死小鼠。在施以安樂死時收集血液，且將樣品稱重且量測放射性含量。隨後計算每公克血液之注射劑量百分比(%ID/g)，包括針對衰變及背景進行之校正。

結果，106

【0726】 對於任一研究時間點，在接受Dex500-(50%)或PBS之小鼠之間，平均放射性含量無統計上顯著差異(單向ANOVA，斯達克多重比較檢驗(Sidak's multiple comparisons test)， $p > 0.05$)。

【0727】 圖35展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後4小時在血液中之放射性含量(%ID/g \pm SD， $n = 3$)。

概述及結論

【0728】 結果顯示在最後Dex500-(50%)注射之後一週可開始重複

CEA-PRIT治療循環，不阻斷隨後投與之²¹²Pb-DOTAM與CEA-DOTAM bsAb之結合。

實例28：雙特異性抗體之其他格式

用於重組表現抗體重鏈或輕鏈之質體的產生

【0729】藉由短暫轉染人類胚腎細胞(HEK 293)表現所需蛋白質。為表現所需基因/蛋白質(例如全長抗體重鏈、全長抗體輕鏈或含有其他結構域之全長抗體重鏈(例如在C端含有免疫球蛋白重鏈或輕鏈可變域)，使用包含以下功能元件之轉錄單元：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列(SS)，
- 待表現之基因/蛋白質，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0730】除包括將表現之所需基因之表現單元/卡匣以外，基本/標準哺乳動物表現質體含有

允許在大腸桿菌中複製此質體之來自載體pUC18之複製起點，及在大腸桿菌中賦予安比西林抗性之 β -內醯胺酶基因。

P1AE1766

【0731】藉由將編碼各由G4Sx4連接子分離之相應序列元件的DNA片段與人類IgG分子之CH3結構域之C端融合，組裝包括包含完整及功能性抗體重鏈之C端融合基因的抗體重鏈編碼基因，接著組裝其他抗體VL-CH1或VH-C- κ 結構域(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL-CH1或VH-

CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VH-Ck)。使用杵-臼技術表現在兩個CH3域之C端分別負載一個VL-CH1及一個VH-Ck結構域的重組抗體分子。

【0732】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。

P1AE1768

【0733】 藉由使用杵-臼技術來組裝包含靶向CEA或DOTAM之完整及功能性抗體重鏈之抗體重鏈編碼基因。

【0734】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。使用CrossMab技術(CL及CH1結構域交換成臂中之一者)確保正確締合。

P1AE1769

【0735】 藉由將編碼VH-CH1結構域之DNA片段經由G4Sx4連接子與含有VL結構域交換VH結構域之人類IgG分子之VL結構域之N端融合，組裝融合基因(因此，製造編碼結構VH-CH1-連接子-VL-CH1-鉸鏈-CH2-CH3之融合基因)。使用杵-臼技術表現分別負載一個VH-CH1且在N端無融合之重組抗體分子。

【0736】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體VH-C κ 編碼基因。

【0737】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。

【0738】 使用CrossMab技術確保正確締合。

P1AE1767

【0739】 藉由將編碼各由G4Sx4連接子分離之相應序列元件的DNA

片段與人類IgG分子之CH3結構域之C端融合，組裝包括包含完整及功能性抗體重鏈之C端融合基因的抗體重鏈編碼基因，接著組裝其他抗體VL-CH1結構域(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL-CH1)。使用杵-臼技術表現在兩個CH3域之C端分別負載一個VL-CH1及無融合的重組抗體分子。

【0740】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體VH-C κ 編碼基因。

【0741】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。

【0742】 使用CrossMab技術確保正確締合。

P1AE1770

【0743】 藉由將編碼各由G4Sx4連接子分離之相應序列元件的DNA片段與人類IgG分子之CH3結構域之C端融合，組裝包括包含完整及功能性抗體重鏈之C端融合基因的抗體重鏈編碼基因，接著組裝其他抗體VL-C- κ -連接子-VH-CH1結構域(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL-C κ -連接子-VH-CH1)。使用杵-臼技術表現在兩個CH3域之C端分別負載一個單鏈Fab及無融合的重組抗體分子。

【0744】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。

抗體分子之短暫表現

【0745】 在F17培養基(Invitrogen Corp.)中培養之短暫轉染之HEK293細胞(源自人類胚腎細胞株293)中產生抗體分子。為進行轉染，使用「293-Free」轉染劑(Novagen)。如上所述之相應抗體重鏈及輕鏈分子

自個別表現質體表現。如製造商之說明書中所規定進行轉染。在轉染三天至七天(3-7天)之後，收穫含有免疫球蛋白之細胞培養上清液。將上清液儲存於降低溫度(例如-80°C)下，直至純化。

【0746】關於人類免疫球蛋白在例如HEK293細胞中之重組表現的總體資訊在以下中給出：Meissner, P.等人, *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2001) 197-203。

TapirID	表現體積	產量[mg]	單體含量(SEC)
PIAE1766	2 l	2.5	>98%
PIAE1767	2 l	2	>98%
PIAE1768	2 l	20	>95%
PIAE1769	2 l	2	>96%
PIAE1770	2 l	0.4	>96%

【0747】分子已藉由MabSelect Sure (親和層析)及接著Superdex 200 (尺寸排阻層析)來純化。

不同格式之DOTAM結合特性之Kinexa評定

【0748】為詳細分析親和力測定，使用Kinexa。

儀器與材料

【0749】使用來自Sapidyne Instruments (Boise, ID)之具有自動進樣器的KinExA 3200儀器。聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)珠粒購自Sapidyne，而PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)、BSA (牛血清白蛋白第5部分)及抗DOTAM抗體在內部製備(Roche)。Dylight650®結合之親和力純化之山羊抗人類IgG-Fc片段交叉吸附抗體購自Bethyl Laboratories (Montgomery, TX)。生物素化之Pb-DOTAM抗原(Pb-DOTAM-烷基-生物素異構體A及B、Pb-DOTAM-Bn-生物素/TCMC-Pb-dPEG3-生物素、異構體A及B)及未生物素化Pb-DOTAM獲自AREVA Med (Bethesda, MD)。

抗原塗佈之珠粒的製備

【0750】 PMMA珠粒根據關於生物素化分子之KinExA手冊方案(Sapidyne)塗佈。簡言之，首先，每小瓶(200 mg)用於吸附塗佈之珠粒添加含10 µg生物素-BSA (Thermo Scientific)之1 ml PBS (pH 7.4)。在室溫下旋轉2小時之後，移除上清液且用1 ml PBS洗滌珠粒5次。其次，將1 ml含100 µg NeutrAvidin生物素結合蛋白(Thermo Scientific)的含有10 mg/ml BSA之PBS添加至珠粒且在室溫下再培育2小時以使NeutrAvidin與珠粒偶合，且為隨後生物素化蛋白質之結合提供其他生物素結合位點。接著將經NeutrAvidin塗佈之珠粒用1 ml PBS沖洗5次。最終，珠粒用含200 ng/ml生物素化Pb-DOTAM-異構體混合物(各異構體50 ng)之PBS塗佈且在室溫下再培育2小時。接著珠粒再懸浮於30 ml PBS中且立即使用。

***KinExA* 平衡分析**

【0751】 所有KinExA實驗在室溫(RT)下使用PBS pH 7.4作為操作緩衝液進行。樣品在補充有1 mg/ml BSA之操作緩衝液(「樣品緩衝液」)中準備。使用0.25 ml/min之流動速率。藉由以100 pM開始，進行兩倍連續稀釋(濃度範圍為0.049 pM-100 pM)，用Pb-DOTAM抗原滴定恆定量之具有5 pM結合位點濃度之抗DOTAM抗體。不具有抗原之抗體之一種樣品充當100%信號(亦即無抑制)。將抗原-抗體複合物在室溫下培育至少24小時以允許達到平衡。然後在5 ml體積下經由KinExA系統中Pb-DOTAM偶合之珠粒之管柱抽吸平衡混合物，允許未結合抗體由珠粒捕獲而不擾亂該溶液之平衡狀態。使用樣品緩衝液中250 ng/ml Dylight 650©結合之抗人類Fc片段特異性二級抗體偵測捕捉抗體。對於所有平衡實驗，各樣品一式兩份量測。

【0752】 KD係使用KinExA軟體(4.0.11版)內所含之單點同質結合

模型，使用「標準分析」法，由數據之非線性回歸分析獲得。該軟體計算KD且藉由將數據點擬合成理論KD曲線來確定95%信賴區間。95%信賴區間(Sapidyne TechNote TN207R0)以KD低及KD高給出。

樣品	KD (pM)	信賴區間(pM)
P1AE1766	1.4	0.4-3
P1AE1767	1.0	0.8-1.4
P1AE1768	0.8	0.5-1.3
P1AE1769	0.9	0.4-1.5
P1AE1770	1.3	0.9-1.8
PRIT-213	1.0	0.6-1.5

【0753】 當信賴區間重疊時，所有構築體之KD可比較。

【0754】 不同格式之分子之序列：

視情況選用之電荷修飾以粗體字展示且加下劃線：EQ->RK或KK->EE

P1AE1766

>CEA輕鏈RK

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYVAVYQOKPKGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>具有DOTAM VL/CH1之CEA重鏈

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT^TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
GGGGSGGGSGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQOKPKGKAPKLLIYQASK
LASCVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCIGGYDDESDTYFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKEPKSC

> 具有DOTAM VH/CK之CEA重鏈

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT^TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLP^SSRDELTKNQVSLSCAVK
GYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
GGGGSGGGSGGGSGGGSVTLKESGTVLVKPTETLT^LTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRG
DTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSASVAAPSV
FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

P1AE1767

> 具有VH/CK之DOTAM 「LC」

VTLKESGPVLVKPTETITLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKS
QVVLMTMTNDPVDATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLL

NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

> CEA輕鏈RK

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGTYYVAVYQOKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK^{RL}LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 具有DOTAM VL/CHI之CEA重鏈

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT^TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^EKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI^SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI^SSKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQOKPGKAPKLLIYQASK
LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDES^DTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDK^KKVEPKSC

> CEA重鏈

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT^TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^EKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI^SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI^SSKAKGQPREPQVCTLP^PSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

P1AE1768

> CEA LC

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASAAVGTYYVAVYQOKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK^{RL}LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 具有VL/CHI之DOTAM重鏈

IQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQOKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
ISSLQPEDFATYYCLGGYDDES^DTYGFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
TVSWNSGALTS^GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^KKVEPKSCDKTHTCPP
PAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMI^SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI^SSKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV^FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> CEA重鏈

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

> DOTAM 「LC」 VH/CK

VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLLTISKDTSKS
QVVLMTNMDPVDATATYYCARFRDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSSASVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

P1AE1769

> 具有VH/CK之DOTAM 「LC」

VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLLTISKDTSKS
QVVLMTNMDPVDATATYYCARFRDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSSASVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

> CEA LC

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFRSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 具有CEA VH/CH1/DOTAM VL/CH1之CEA HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
GGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFRSG
SGSGTDFTLTSSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
PGK

> CEA HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

P1AE1770

> CEA LC

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASAAVGTYYVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFRSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

> 具有DOTAM scFab之CEA HC: DOTAM VL/Ck/連接子/VH CH1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGRVITITCQSSHVSVDNDLAWYQQKPKGKAPKLLIYQASK
LASGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCLGGYDDESDTYFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGVTLKESGFPVLVKPTEITLTLCTVSGFSL
TYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKQVVLMTNMDPVDATYYCARERDPYGGG
AYPPLHWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

> CEA HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
EDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNEKPSNTKVDEKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLCAVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
K

實例29：雙特異性抗體與Pb-DOTAM及CD20或Her2之結合

用於重組表現抗體重鏈或輕鏈之質體的產生

【0755】藉由短暫轉染人類胚腎細胞(HEK 293)表現所需蛋白質。為表現所需基因/蛋白質(例如全長抗體重鏈、全長抗體輕鏈或含有其他結構域之全長抗體重鏈(例如在C端含有免疫球蛋白重鏈或輕鏈可變域)，使用包含以下功能元件之轉錄單元：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列(SS)，
- 待表現之基因/蛋白質，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0756】除包括將表現之所需基因之表現單元/卡匣以外，基本/標準哺乳動物表現質體含有

允許在大腸桿菌中複製此質體之來自載體pUC18之複製起點，及

在大腸桿菌中賦予安比西林抗性之 β -內醯胺酶基因。

a) 抗體重鏈之表現質體

【0757】 藉由將編碼各由G4Sx4連接子分離之相應序列元件(可變重鏈或可變輕鏈)的DNA片段與人類IgG分子之CH3結構域之C端融合，組裝包括包含完整及功能性抗體重鏈之C端融合基因的抗體重鏈編碼基因，接著組裝其他抗體可變重鏈或可變輕鏈結構域(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VH或VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL)。使用杵-臼技術表現在兩個CH3域之C端分別負載一個VH及一個VL結構域的重組抗體分子。

【0758】 除具有C端VH或VL結構域表現卡匣之抗體重鏈片段之外，用於在HEK293細胞中短暫表現具有C端VH或VL結構域之抗體重鏈之表現質體亦包含：來自載體pUC18之複製起點，其允許在大腸桿菌中複製此質體；及 β -內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌以安比西林抗性。具有C端VH或VL結構域融合基因之抗體重鏈片段的轉錄單元包含以下功能元件：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 抗體重鏈(VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VH或VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3-連接子-VL)編碼核酸，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

【0759】 具有C端VH或VL結構域融合蛋白之成熟抗體重鏈片段之胺基酸序列為

P1AD9826 → CD20-DOTAM

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGGGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS
 TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT
 HTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG
 GSGGGGGSGGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGAPKLLIYQASKLAS
 GVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFAATYYCLGGYDDES DTYGFGGGTKVEIK
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGGGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKS
 TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPIAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKT
 HTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDEITKNQVSLWCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG
 GSGGGGGSGGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTY
 YASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSS

P1AD9827 → ERBB2-DOTAM

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS
 KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
 THTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
 GGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPKGAPKLLIYQASKLA
 SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFAATYYCLGGYDDES DTYGFGGGTKVEIK
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS
 KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
 THTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
 GGGSGGGGGSGGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDT
 YYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLTVTVSS

b) 抗體輕鏈之表現質體

【0760】 藉由將編碼相應序列元件之DNA片段融合來組裝包含完整及功能性抗體輕鏈之抗體輕鏈編碼基因。

【0761】除抗體輕鏈片段之外，用於短暫表現抗體輕鏈之表現質體亦包含：來自載體pUC18之複製起點，其允許在大腸桿菌中複製此質體；及β-內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌以安比西林抗性。抗體輕鏈片段之轉錄單元包含以下功能元件：

- 來自包括內含子A之人類巨細胞病毒(P-CMV)之即刻早期強化子及啟動子，
- 人類重鏈免疫球蛋白5'未轉譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 抗體輕鏈(VL-CL)編碼核酸，及
- 牛生長激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

P1AD9827 → ERBB2-DOTAM

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTIT
SSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVMFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSCNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

P1AD9826 → CD20-DOTAM

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTD
FTLKIISRVEAEDVGVYYCAQNLLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVMFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗體分子之短暫表現

【0762】在F17培養基(Invitrogen Corp.)中培養之短暫轉染之HEK293細胞(源自人類胚腎細胞株293)中產生抗體分子。為進行轉染，使用「293-Free」轉染劑(Novagen)。如上所述之相應抗體重鏈及輕鏈分子自個別表現質體表現。如製造商之說明書中所規定進行轉染。在轉染三天至七天(3-7天)之後，收穫含有免疫球蛋白之細胞培養上清液。將上清液儲存於降低溫度(例如-80°C)下，直至純化。

【0763】關於人類免疫球蛋白在例如HEK293細胞中之重組表現的

總體資訊在以下中給出：Meissner, P.等人, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203。

抗體分子P1AD8926及P1AD8927之純化

【0764】 PRIT分子已藉由MabSelect Sure (親和層析)及接著 Superdex 200 (尺寸排阻層析)來純化。

TapirID	表現體積	池濃度[mg/mL]	池量[mg]	單體含量	純度
P1AD8926	2 l	2.03	22	> 99%	> 95%
P1AD8927	2 l	2.07	69	> 99%	> 95%

質量分析：

【0765】 為證實PRIT分子之身分，使用ESI-MS。

TapirID	身分	純度	註釋
P1AD8926	證實	副產物A，A2C2 (小)	偵測到氧化
P1AD8927	證實	副產物A，A2C2 (小)	偵測到氧化

P1AD8927功能性之FACS分析

【0766】 為評估P1AD8927之功能性，在37°C下使用阿庫酶自培養容器分離KPL-4細胞10分鐘。隨後，細胞在PBS中洗滌兩次，且接種至96孔v形底盤中，達 4×10^6 個細胞/孔之最終密度。

【0767】 將抗體用Zenon<人類 IgG>A488預標記，以如圖38中所指示之濃度添加至細胞。隨後，將細胞在冰上培育1小時，且在PBS中洗滌兩次且再懸浮於200 μ l PBS/5% FCS中，以使用FACS canto量測FITC螢光。

【0768】 結果展示於圖38中。

【0769】 為評估抗體與DOTAM結合之能力，在結合於KPL-4細胞之後，洗滌細胞以移除未結合之抗體。隨後，添加Pb-DOTAM-FITC以偵測結合DOTAM之勝任細胞結合的抗體(圖39)。P1AD8927展示經同型校

正之劑量依賴性FITC信號。此實驗說明DOTAM結合在此抗體發揮功能。

P1AD8926功能性之FACS分析

【0770】 為評估P1AD8926之功能性，將Raji細胞在PBS中洗滌兩次，且接種至96孔v形底盤中，達 4×10^6 個細胞/孔之最終密度。

【0771】 將抗體用Zenon<人類 IgG>A488預標記，以如圖40中所指示之濃度添加至細胞。隨後，將細胞在冰上培育1小時，且在PBS中洗滌兩次且再懸浮於200 μ l PBS/5% FCS中，以使用FACS canto量測FITC螢光。

【0772】 為評估抗體與DOTAM結合之能力，在結合於Raji細胞之後，洗滌細胞以移除未結合之抗體。隨後，添加Pb-DOTAM-FITC以偵測結合DOTAM之勝任細胞結合的抗體(圖41)。P1AD8927展示經同型校正之劑量依賴性FITC信號。此實驗說明DOTAM結合在此抗體發揮功能。

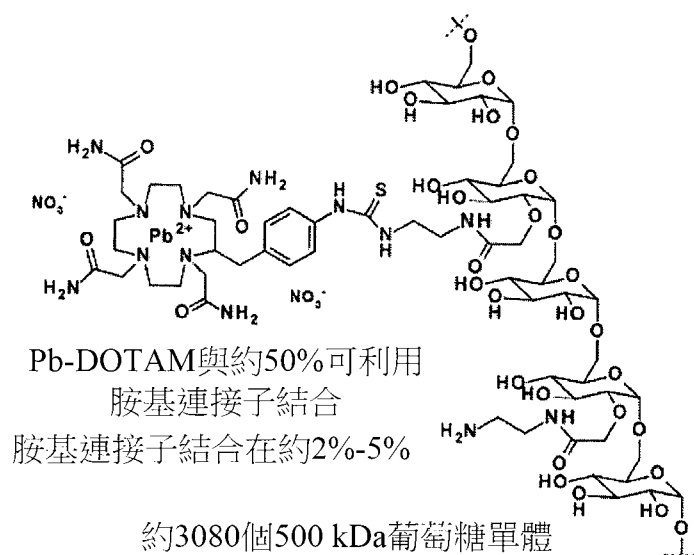
實例30：實例31至37之材料與方法

【0773】 此實例闡明用於實例31-37之研究之材料及方法。

三步PRIT (一次循環)

【0774】 步驟1：投與BsAb (靜脈內或腹膜內)：研究中所用之BsAb以高親和力結合Pb-DOTAM且例如經由CEA靶向腫瘤。

【0775】 步驟2：投與CA (靜脈內或腹膜內)：為允許 ^{212}Pb -DOTAM有效之腫瘤累積，循環BsAb需要在血液中使用阻斷 ^{212}Pb -DOTAM與未結合BsAb結合之CA中和，不滲透至腫瘤中，因此阻斷預先靶向之位點。一旦BsAb在腫瘤中累積至足夠程度，一般在4-10天之後，投與CA。基於平均分子量為500 kDa之胺基聚葡萄糖，DOTAM經由硫脲連接子結合於其，研發出Pb-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA，如下文所示。



【0776】 步驟3：投與²¹²Pb-DOTAM (靜脈內)：在最後步驟中，一般在CA注射之後24至48小時，進行放射性注射，允許²¹²Pb-DOTAM優先結合預先靶向之腫瘤位點，有效減少全身輻射暴露。

通用材料及方法

【0777】 實驗方案均由地方當局(Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale du Limousin (CREEAL), Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne)審查及批准。根據倫理準則，嚴重合併性免疫缺失(SCID)及CD1小鼠由Charles River提供且維持在無特異性及機會性病原體(SOPF)之條件下，每天光/暗循環(12 h/12 h)。研究121採用無特異性病原體(SPF)之條件，小鼠由Envigo提供。在到達之後頭5天期間不進行操作，使動物適應新環境。每日控制所有動物之臨床症狀且偵測副作用。

【0778】 藉由皮下(s.c.)注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子；目錄號354230) 1:1混合之細胞培養基中的表現CEA之腫瘤細胞來建立實體異種移植物。經由手動測徑規量測來估計腫瘤體積，根據下式計算： $體積 = 0.5 \times 長度 \times 寬度^2$ 。

【0779】為將放射性尿/屎之再吸入減至最少，在投與²¹²Pb-DOTAM之後將所有功效研究小鼠置於具有格子地板之籠中4小時，接著轉移至具有標準草墊之新籠。接著在注射後(p.i.) 24小時改變所有籠。對在放射性注射之後長達24小時，出於生物分佈之目的施以安樂死之小鼠，不進行此程序。

【0780】每週量測研究動物之體重(BW)至少3次，其中視健康狀況而定，根據需要進行其他量測。體重減輕超出初始BW25%或腫瘤體積達到3000 mm³之小鼠立即施以安樂死。出於倫理原因考慮施以安樂死之其他因素為腫瘤狀態(例如壞死區域、血液/液體滲出、自殘跡象)及動物之概貌(例如毛皮、姿勢、動作)。若體重急劇減輕(集體或個別)，則自放射性注射之後5天開始，向所有動物提供濕食，直至所有個體充分恢復。

【0781】結束時，使用眶後放血，自靜脈竇收集血液，接著收穫其他組織用於放射性量測及/或組織學分析，如方案所指定。記載意外或異常狀況。收集用於福馬林固定之組織立即置於10%中性緩衝福馬林(4°C)中，且然後在5天之後轉移至磷酸鹽緩衝鹽水(PBS；4°C)。將出於生物分佈之目的而收集的器官及組織稱重且使用2470 WIZARD²自動γ計數器(PerkinElmer)量測放射性，且隨後計算每公克組織之注射劑量百分比(% ID/g)，包括針對衰變及背景進行之校正。

【0782】使用GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.)及JMP 8 (SAS Institute Inc.)進行統計分析。基於平均腫瘤體積，使用下式，進行腫瘤生長抑制(TGI)之曲線分析：

$$TGI = 100 - \frac{V_{\text{治療},d} - V_{\text{治療},0}}{V_{\text{ref},d} - V_{\text{ref},0}} \times 100$$

其中d指示治療天數且0為基線值。媒劑(PBS)選為參考組。腫瘤消退

(TR)根據下式計算：

$$TR = \frac{V_{\text{治療}, 0} - V_{\text{治療}, d}}{V_{\text{治療}, 0}}$$

其中正值指示腫瘤消退，且低於-1之值指示超出雙倍基線值之生長。

【0783】 進行成對檢驗以說明在存活率方面哪些組顯著不同：對數秩檢驗(對較後存活事件施加更多權重)及威爾卡森檢驗(對早期存活時間施加更多權重)，兩者均針對多個檢驗使用邦弗朗尼校正。

測試化合物

【0784】 所述研究中利用之化合物呈現於以下標題為「雙特異性抗體」、「清除劑」及「放射性標記之螯合物」之表中。

【0785】 CEA-DOTAM (PRIT-0213)為靶向CEA之T84.66抗原決定基之完全人類化BsAb，而DIG-DOTAM (PRIT-0175)為用作陰性對照之未結合CEA之BsAb。P1AE1766、P1AE1767、P1AE1768、P1AE1769及P1AE1770為靶向CEA之CH1A1A抗原決定基之人類化CEA-DOTAM BsAb，如以上實例28中所述。抗體構築體儲存於-80°C下，直至注射之日，此時，將其解凍且在標準媒劑緩衝液(20 mM組胺酸、140 mM NaCl；pH 6.0)或0.9% NaCl中稀釋至其最終相應濃度，用於靜脈內(i.v.)或腹膜內(i.p.)投與。

【0786】 Ca-DOTAM-聚葡萄糖-500及Pb-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA儲存於-20°C下，直至注射之日，此時，將其解凍且在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中稀釋，用於靜脈內或腹膜內投與。

【0787】 用於放射性標記之DOTAM螯合物由Macrocyclics提供且在放射性標記之前維持在-20°C下。²¹²Pb-DOTAM藉由用DOTAM溶離自

鈷產生劑產生，且隨後在標記之後用Cu、Ca、Zn、Gd或Pb淬滅。²¹²Pb-DOTAM溶液用PBS或0.9% NaCl稀釋以獲得用於靜脈內注射之所需²¹²Pb放射性濃度。

【0788】媒劑對照組中之小鼠接受多次PBS注射代替BsAb、CA及²¹²Pb-DOTAM。

雙特異性抗體

化合物	標靶	方案
CEA-DOTAM (PRIT-0213)	T84.66	103、116、131、146、154
DIG-DOTAM (PRIT-0175)	地高辛	103、151、152、154
CD20-DOTAM (P1AD9826)	CD20	151、162
HER2-DOTAM (P1AD9827)	HER2	152
P1AE1766	CH1A1A	154
P1AE1767	CH1A1A	154
P1AE1768	CH1A1A	154
P1AE1769	CH1A1A	154
P1AE1770	CH1A1A	154

清除劑

化合物	方案
Pb-DOTAM-聚葡萄糖-500	103、116、131、
Ca-DOTAM-聚葡萄糖-500	146、151、152、154、162

放射性標記螯合物(供應商：Orano Med)

化合物	淬滅	方案
²¹² Pb-DOTAM	Cu	103、116、131
²¹² Pb-DOTAM	Ca	131、146、151、 152、154、162
²¹² Pb-DOTAM	Zn	131

²¹² Pb-DOTAM	Gd	131
²¹² Pb-DOTAM	Pb	131
²⁰³ Pb-DOTAM-CEA-DOTAM	Cu	121
²⁰³ Pb-DOTAM-DIG-DOTAM	Cu	121
²¹² Pb-DOTAM-CD20-DOTAM	Ca	162

腫瘤模型

【0789】 用於接種在小鼠中的所用腫瘤細胞株及注射量描述於下表「腫瘤細胞株」中。BxPC3為天然表現CEA之人類初級胰腺癌細胞株。BxPC3細胞在富集10%胎牛血清(GE Healthcare Hyclone SH30088.03)之RPMI-1640培養基、GlutaMAX™補充劑、HEPES (Gibco, 參考號72400-021)中培養。HPAF-II (CRL-1997)為天然表現CEA之人類胰腺癌細胞株。HPAF-II細胞在富集10%標準胎牛血清、1% GlutaMAX 100X、1% MEM NEAA (最低必需培養基非必需胺基酸) 100X (Gibco 11140-035)及1%丙酮酸鈉(100 mM; Gibco 11360-070)之EMEM培養基(Gibco 31095-029)中培養。WSU-DLCL2為天然表現CD20之人類B細胞淋巴瘤細胞株。WSU-DLCL2細胞在富集10%胎牛血清之RPMI-1640培養基(Gibco, 參考號72400-021)中培養。NCI-N87為天然表現HER2之胃癌細胞株。NCI-N87細胞在富集10%胎牛血清之RPMI-1640培養基(Gibco, 參考號72400-021)中培養。在研究第0天，藉由皮下注射在與Corning® Matrigel®基底膜基質(減少生長因子; 目錄號354230) 1:1混合之細胞培養基中的細胞至右側腹，在各SCID小鼠中建立實體異種移植物。

腫瘤細胞株

細胞株	每隻小鼠之細胞	注射體積	方案	供應商
BxPC3	5×10^6	100 μ L	103、116、121、131、146	ECACC*
HPAF-II (CRL-1997)	1×10^6	100 μ L	114、154	ATCC**
WSU-DLCL2	1.5×10^6	100 μ L	151、162	DSMZ***
NCI-N87	1.5×10^6	100 μ L	152	ATCC**

*European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK)

**American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

***Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany)

研究

實例31：CEA-PRIT在腫瘤模型中之功效(方案103)

【0790】 此研究評估使用CEA-DOTAM BsAb之CEA-PRIT治療小鼠中皮下BxPC3腫瘤之功效。該療法作為10或30 μ Ci 212 Pb-DOTAM之單一治療投與，或呈兩個放射性水準中之每一者的三次重複循環進行。利用，使用未結合CEA之對照抗體(DIG-DOTAM)、單獨CEA-DOTAM BsAb (無放射性)及無治療(PBS)進行比較。在第一次及第二次循環之後進行生物分佈，以證實 212 Pb-DOTAM靶向及清除，且根據TGI、TR及存活評估治療功效。整個研究中小心地監測小鼠以評估不同治療時程之耐受性。研究概述顯示於圖42中。

研究設計

【0791】 方案103之時程及設計展示於下表中。

方案103之時程

研究天數	實驗程序
0	皮下注射BxPC3細胞
20	靜脈內注射PRIT BsAb (第C-G組、第J-L組)
21	靜脈內注射PRIT BsAb (第A、B、H、I組)
24	靜脈內注射CA (第C-G組、第J-L組)
24	溶離 212 Pb-DOTAM

第 246 頁(發明說明書)

24	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM (第C-G組、第J-L組)
25	安樂死及收穫組織 + γ 計數(第J組)
25	靜脈內注射CA (第A、B、H、I組)
25	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
25	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM (第A、B、H、I組)
26	安樂死及收穫組織 + γ 計數(第H組)
34	靜脈內注射PRIT BsAb (第B、D-G、I、K、L組)
38	靜脈內注射CA (第B、D-G、I、K、L組)
38	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
38	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM (第B、D-G、I、K、L組)
39	安樂死及收穫組織 + γ 計數(第I、K、L組)
48	靜脈內注射PRIT BsAb (第B、D-G組)
52	靜脈內注射CA (第B、D-G組)
52	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
52	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM (第B、D-G組)

方案103中之研究組

組	n	BsAb	BsAb 劑量 (μ g)	Pb-DOTAM- 聚葡萄糖-500 劑量(μ g)	螯合物	²¹² Pb放 射性 (μ Ci)	循環
A	10	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	10	1
B	10	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	10	3
C	10	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1
D	10	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	30	3
E	10	CEA-DOTAM	100	0	—	0	3
F	10	DIG-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	30	3
G	10	—	0	0	—	0	3
H	3	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	10	1
I	3	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	10	2
J	3	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	30	1
K	3	CEA-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	30	2
L	3	DIG-DOTAM	100	25	²¹² Pb-DOTAM	30	2

【0792】在研究第0天，在各SCID小鼠中，藉由皮下注射在RPMI/Matrigel中之 5×10^6 個細胞(第24代)至右側腹，在各SCID小鼠中建立實體異種移植物。在注射腫瘤細胞二十天之後，利用 290 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0793】 出於邏輯原因，在2天過程期間開始治療，其中第C、D、E、F、G、J、K及L組在第一天注射BsAb或PBS，如上表中所述，接著第A、B、H及I組次日注射BsAb。四天後，注射CA，2小時後注射 ^{212}Pb -DOTAM或PBS。首先注射接受30或0 μCi 之組，接著次日注射接受10 μCi 之組。在放射性注射之間的2週下，第B、D、E、F、G、I、K及L組接受多次治療。同時開始所有重複治療循環(第二及第三)，亦即所有小鼠在相同天數接受BsAb或PBS注射，接著4天後注射CA及 ^{212}Pb -DOTAM或PBS。在安樂死時自第A-G組收穫以下器官及組織：膀胱、卵巢、肝臟、脾臟、腎臟、股骨(包括骨髓)、結腸、空腸、胃及腫瘤。

【0794】 在第一次及唯一一次注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時處死第H及J組中之小鼠且屍檢；在第二次注射 ^{212}Pb -DOTAM之後24小時處死第I、K及L組且屍檢。在安樂死時收穫血液、膀胱、小腸、結腸、脾臟、胰臟、腎臟、肝臟、肺、心臟、股骨、肌肉、尾巴及腫瘤以量測放射性。

結果

【0795】 注射後24小時 ^{212}Pb 在活體內之分佈顯示在皮下BxPC3腫瘤中高度吸收且在正常組織中低累積，如圖43中所見。由CEA-DOTAM預先靶向之腫瘤與由未結合CEA之BsAb DIG-DOTAM預先靶向之腫瘤之間的顯著差異證實治療之高度特異性。單向方差分析(ANOVA)與斯達克多重比較檢驗顯示在1次(50.3% ID/g)與2次(43.0% ID/g) 10- μCi 注射之間，或1次(37.6% ID/g)與2次(24.1% ID/g) 30- μCi 注射之間， ^{212}Pb 之平均腫瘤吸收均無顯著差異。同樣，投與10 μCi 之1次循環之及30 μCi 之1次循環之間無顯著差異($p>0.05$)。然而，與10 μCi 之2次循環相比較，在30 μCi 之2次循環之後腫瘤吸收顯著較低，與任一CEA-DOTAM治療相比較，在

用DIG-DOTAM預先靶向之腫瘤中30 μCi 之2次循環之後腫瘤吸收亦如此(2.9% ID/g)。圖43之B圖展示在多種治療組內，不同尺寸之腫瘤的% ID/g可比較。

【0796】 平均腫瘤發展及個別腫瘤生長曲線分別展示於圖44及圖45中。所有組至第20-24天腫瘤體積均加倍。第一次 ^{212}Pb -DOTAM治療在第24天給與，之後CEA-DOTAM組中之腫瘤繼續生長大約1週，然後開始縮小。腫瘤未完全消退，但多次治療組(B及D)之體積保持相對恆定，直至第52天最後一次治療。僅僅注射10或30 μCi 一次之小鼠中的腫瘤在第44天開始重新生長，不過接受較高放射性之小鼠具有略慢生長速率。與單獨CEA-DOTAM或媒劑相比較，具有DIG-DOTAM之非特異性PRIT引起統計學上顯著但有限之TGI。前面兩個對照組展示一致腫瘤發展。

【0797】 在第63天，亦即可基於方式分析所有治療組之最後一天，與無治療相比較，第A、B、C、D、E及F組之TGI分別為57.2%、89.8%、77.7%、96.6%、-6.2%及67.3%。在第74天考量媒劑對照組中之最後一隻小鼠，此時四個剩餘組A、B、C及D之TGI分別為48.5%、83.3%、63.5%及95.7%。在注射細胞之後第118天藉由對最後剩餘小鼠(第D組)施以安樂死而終止該研究。

【0798】 進行對數秩及威爾卡森檢驗，以說明在存活率方面哪些組顯著不同，結果展示在以下兩個表中。與三個對照組相比較，所有CEA-DOTAM PRIT方案顯著增加存活。與單個10 μCi 循環之後相比，3個10 μCi 循環之後總存活率略微更佳($p=0.0110$)，但3個10 μCi 循環與具有CEA-DOTAM預先靶向之任一30 μCi 方案之間無顯著差異。卡普蘭-邁耶存活曲線展示於圖46中。

成對對數秩檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑 (PBS)	單獨CEA- DOTAM	CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 1	CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 3	CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 1	CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 3	DIG-DOTAM 30 μ Ci \times 3
媒劑(PBS)	1.0000	0.3197	0.0005*	<.0001*	<.0001*	0.0043*	0.5588
單獨CEA- DOTAM	0.3197	1.0000	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0024*	0.8491
CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 1	0.0005*	<.0001*	1.0000	0.0110*	0.1114	0.1562	0.0002*
CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 3	<.0001*	<.0001*	0.0110*	1.0000	0.0980	0.8798	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 1	<.0001*	<.0001*	0.1114	0.0980	1.0000	0.3839	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 3	0.0043*	0.0024*	0.1562	0.8798	0.3839	1.0000	0.0034*
DIG-DOTAM 30 μ Ci \times 3	0.5588	0.8491	0.0002*	<.0001*	<.0001*	0.0034*	1.0000

成對威爾卡森檢驗(多檢驗水準 = 0.00238)

組	媒劑 (PBS)	單獨CEA- DOTAM	CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 1	CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 3	CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 1	CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 3	DIG-DOTAM 30 μ Ci \times 3
媒劑(PBS)	1.0000	0.3792	0.0009*	<.0001*	<.0001*	0.0255*	0.4931
單獨CEA- DOTAM	0.3792	1.0000	0.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0130*	1.0000
CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 1	0.0009*	0.0001*	1.0000	0.0033*	0.0370*	0.3590	0.0005*
CEA-DOTAM 10 μ Ci \times 3	<.0001*	<.0001*	0.0033*	1.0000	0.1007	0.5963	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 1	<.0001*	<.0001*	0.0370*	0.1007	1.0000	0.8797	<.0001*
CEA-DOTAM 30 μ Ci \times 3	0.0255*	0.0130*	0.3590	0.5963	0.8797	1.0000	0.0122*
DIG-DOTAM 30 μ Ci \times 3	0.4931	1.0000	0.0005*	<.0001*	<.0001*	0.0122*	1.0000

不良事件及毒性

【0799】 促成出於倫理原因處死小鼠之觀測到之不良事件可分選至兩組中：1)腫瘤狀態及2)輻射誘發之毒性。第一係指壞死及/或破潰腫瘤，促使小鼠「清潔」自身或其籠中同伴上的腫瘤區域。達到此階段之小鼠立即施以安樂死以避免痛苦。

【0800】 第二組不良事件包含輻射誘發之毒性之典型症狀，例如體

重減輕、腹瀉及嗜睡。圖47展示療法組中之體重發展。所有注射30 μCi ^{212}Pb -DOTAM之小鼠均經歷初始體重下降，在第一次放射性注射之後第8天緩解。投與多次30 μCi 注射之組(D及F)遭受更長期體重減輕。接受10 μCi 之組(A及B)中體重減輕係輕度的，甚至在多次注射下。因此，察覺接受10 μCi 與30 μCi ^{212}Pb -DOTAM之小鼠之間有明顯差異。甚至在重複10 μCi 治療之後，小鼠亦顯示大體上無不良毒性之主要跡象。用一次30 μCi 循環治療之小鼠表現出短暫重量減輕，但恢復。然而，第二次及第三次30 μCi 循環引起更大範圍的不良毒性，引起大量動物由於體重減輕與疼痛及/或不適之跡象的組合而處死。由此可推斷10 μCi 為施加條件下安全放射性水準，而30 μCi 接近最大耐受放射性。

結論

【0801】推斷在以單一療法方案給出下，利用10或30 μCi ^{212}Pb -DOTAM之重複CEA-PRIT使存活率及TGI顯著增加，但此背景下腫瘤既未完整根除，腫瘤控制亦未持續。為避免輻射誘發之毒性同時隨著時間推移維持腫瘤之控制，此等結果表明使用小於30 μCi 但超過10 μCi ^{212}Pb -DOTAM DOTAM

實例32：對用於CEA-PRIT之BsAb及CA注射之間適當時間之選擇(方案116及121)

【0802】方案116及121經設計以基於高度腫瘤吸收及均勻瘤內BsAb分佈，指導對用於CEA-PRIT之BsAb與CA注射之間適當時間之選擇。方案116評估BxPC3模型中在靜脈內注射之後第4天、第7天及第14天，與CEA表現相比較，由免疫螢光染色偵測之瘤內BsAb分佈。方案121評估BxPC3腫瘤中第1天、第4天、第7天及第10天之後直接用鉛-203

(^{203}Pb)標記之BsAb之累積。BsAb經Pb同位素 ^{203}Pb 標記(半衰期2.2天)，以能夠在比 ^{212}Pb (半衰期10.6小時)更長之時間段內追蹤發展。

研究設計

【0803】 方案116及121之時程及設計展示於以下四個表中。

方案116之時程

研究天數	實驗程序
0	皮下注射BxPC3細胞(第A、B、C、D、E組)
0*	皮下注射BxPC3細胞(第F、G組)
20	靜脈內注射PRIT BsAb (第A、B、C、D、E組)
18*	靜脈內注射PRIT BsAb (第F、G組)
24	靜脈內注射CA (第C組)
24	安樂死及屍檢(第A、B、C組；4 d p.i.)
22*	靜脈內注射CA及 ^{212}Pb -DOTAM (第F、G組)
27	安樂死及屍檢(第D組；7 d p.i.)
34	安樂死及屍檢(第E組；14 d p.i.)
32*	靜脈內注射PRIT BsAb (第F組)
36*	安樂死及屍檢(第F、G組)

方案116中之研究組

組	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (d)	CA (μg)	時間 (h)	^{212}Pb (μCi)	PRIT 循環	樣品時間 (d)
A	2	—	0	—	0	—	0	—	4
B	3	CEA-DOTAM	100	—	0	—	0	—	4
C	3	CEA-DOTAM	100	4	25	2	0	—	4
D	3	CEA-DOTAM	100	—	0	—	0	—	7
E	3	CEA-DOTAM	100	—	0	—	0	—	14
F	3	CEA-DOTAM	100	4	25	2	10	2	4*
G	3	CEA-DOTAM	100	4	25	2	10	1	4*

*在第二次BsAb注射之後的天數(在 ^{212}Pb -DOTAM之後1.5週開始)

方案121之時程

研究天數	實驗程序
0	皮下注射BxPC3細胞
20	靜脈內注射 ^{203}Pb -DOTAM-BsAb
21	安樂死及屍檢(第A組；1 d p.i.)；組織 γ 計數
24	安樂死及屍檢(第B、E組；4 d p.i.)；組織 γ 計數

27	安樂死及屍檢(第C組；7 d p.i.)；組織 γ 計數
30	安樂死及屍檢(第D組；10 d p.i.)；組織 γ 計數

方案121中之研究組

組	n	^{203}Pb -BsAb	BsAb (μg)	時間 (d)	CA (μg)	時間 (h)	^{203}Pb (μCi)	樣品時 間(d)
A	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	1
B	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	4
C	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	7
D	5	CEA-DOTAM	100	—	0	—	20	10
E	5	DIG-DOTAM	100	—	0	—	20	4

【0804】經由皮下注射BxPC3細胞建立實體異種移植動物。在接種之後十九天，利用 227 mm^3 之平均腫瘤體積，將方案116中之小鼠分選至實驗組。在方案121中，在20天之後平均腫瘤體積為 203 mm^3 。

免疫螢光染色

【0805】方案116中之小鼠在安樂死之後進行屍檢，且收穫脾臟、腎臟、肝臟、肌肉及腫瘤。所收集之組織分成兩片：一片置於含有Tissue-Tek®最佳切割溫度(OCT)包埋化合物之冷凍模具，且置於乾冰上快速冷凍，且另一片固定在10%中性緩衝福馬林(NBF)中24小時，且接著轉移至PBS中進行儲存，直至石蠟包埋。OCT中之冷凍樣品維持在 -80°C 下，接著切片。使用下表中列出之試劑進行組織學染色。

方案116中組織學染色使用之試劑

化合物	貨號/參考號	濃度/稀釋	供應商
兔IgG抗人類CEA (純系T84.66)	P1AD5732	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Roche Glycart
山羊抗兔IgG (H+L)高度交叉吸附之二次抗體， Alexa Fluor 488	A11034	1/400	Fisher
山羊抗人類IgG (H+L)交叉吸附之二次抗體， Alexa Fluor 555	A21433	1/300	Fisher
阻斷血清(山羊)	G9023-10ML	5%	Sigma
Hoechst染劑	94403-1ML	1/1000	Sigma

CEA之染色

【0806】 使用Leica CM1850 UV冷凍切片機，將冷凍腫瘤切片成12 μm 切片，且載片儲存於 -20°C 下。在染色之前，載片在室溫(RT)下解凍1小時，且接著用PBS (1 \times ，pH 7.4)洗滌5分鐘，接著在冷丙酮(-20°C)中5分鐘，且再次用PBS洗滌5分鐘。載片經組織周圍之紙片乾燥，且使用疏水性筆(Dako；Agilent)在組織周圍劃圓圈。在室溫下在1小時期間用400 μL 阻斷血清(山羊)培育切片。移除阻斷血清且將200 μL 初級抗體(兔IgG抗人類CEA)添加至切片，接著在 4°C 下在暗室中培育隔夜。第2天，將切片用PBS洗滌兩次，歷時10分鐘，且添加400 μL 阻斷血清。在室溫下培育1小時之後，移除阻斷血清且將200 μL 二級抗體(Alexa Fluor 488標記之山羊抗兔IgG)及對比染色(Hoechst)添加至切片，接著在暗室中在室溫下培育2小時。接著將載片用PBS洗滌兩次，歷時10分鐘。最終，將螢光封固劑(Dako S3023；Agilent)及蓋玻片添加至載片，隨後空氣乾燥且儲存於黑暗中 -20°C 下。使用Zeiss Axio Scope.A1模組化顯微鏡分析染色載片。

CEA-DOTAM之染色

【0807】 儲存冷凍腫瘤切片且如以上針對CEA染色所述來加工，但以PBS代替初級抗體。二級抗體為經Alexa Fluor 555標記之山羊抗人類IgG。

H&E 染色

【0808】 使用Leica Autostainer XL自動化載片染色機進行來自方案116之冷凍腫瘤切片之蘇木精及伊紅(H&E)染色。

生物分佈

【0809】 出於生物分佈之目的處死方案121中之小鼠且在結束之前

經由暈後放血收集血液。另外，在安樂死之後收穫膀胱、小腸、結腸、脾臟、胰臟腎臟、胃、肝臟、肺、心臟、腦股骨、肌肉、皮膚、尾巴及腫瘤且量測放射性。

結果

免疫螢光染色-方案116

【0810】 未治療之對照顯示均一分佈於所收集之腫瘤中的高水準之CEA。正如所料，CEA-DOTAM BsAb之對照染色不產生信號。

【0811】 在注射後第4天、第7天及第14天自注射CEA-DOTAM BsAb之小鼠獲取腫瘤。在第4天，BsAb完全覆蓋組織內腫瘤細胞結節之邊界，但不全部滲透至較大結節中。此顯示為存在較暗之Hoechst染色區域，由亮紅色毗鄰細胞層包圍。7天之後，來自CEA-DOTAM染色之信號似乎更均勻分配，且存在具有暗內部區域之較少腫瘤細胞結構。一週後，亦即注射後14天，螢光信號之分佈保持類似於7天時間點，但總體上信號較低。

【0812】 來自投與整個PRIT循環，包括用 ^{212}Pb -DOTAM照射之兩組之腫瘤樣品顯示由輻射誘發之細胞死亡引起的壞死區域。發現包括細胞腫脹、細胞細節喪失(鬼影細胞)、一些非典型細胞核及間質纖維化潛在增加。來自在第一次BsAb注射之後2週接受第二劑CEA-DOTAM之第F組中之小鼠的腫瘤保持高度及均勻CEA表現，且第二次BsAb注射後4天CEA-DOTAM分佈類似於未照射腫瘤，亦即BsAb分佈於腫瘤之所有表現CEA之部分，但有限滲透至某些較大結構中，在影像上產生較暗區域。同時自第G組獲得對應對照樣品，其在初始PRIT循環之後未接受第二次BsAb注射。在此等腫瘤切片中，可能看到CEA-DOTAM染色之模糊信號，此指示

在注射之後18天一定量BsAb仍結合腫瘤。

生物分佈-方案121

【0813】圖48中顯示負載BxPC3腫瘤之SCID小鼠中之平均²⁰³Pb累積及清除。如自無CA下之抗體所預期，血液清除緩慢。在正常器官或組織中未揭露標記BsAb之意外吸收。圖49中展示隨著時間推移之腫瘤累積，在注射之後1天平均49% ID/g起始，分別在第4天、第7天及第10天增加至130、189及197 %ID/g。標記之陰性對照未引起腫瘤累積，其中在注射之後第4天3 %ID/g。

【0814】藉由單向方差分析(ANOVA)，使用斯達克多重比較檢驗，執行統計分析，以評估察覺到之不同時間點之腫瘤吸收差異是否顯著。根據該檢驗，僅僅在第1天與第7天以及第1天與第10天之間實現²⁰³Pb累積之顯著增加；其他時間點彼此未顯著不同。使用未配對t檢驗僅僅檢驗第4天對比第7天引起第7天統計學上顯著增加(p=0.0468)，而執行第7天對比第10天之對應檢驗則未引起(p=0.8316)。

結論

【0815】結果顯示在注射之後第4天與第7天之間腫瘤中²⁰³Pb-BsAb吸收總體上增加，但當延長時間間隔至10天時未進一步改善。在第7天之後，與第4天相比較，BsAb滲透至腫瘤中增加。在第14天時間點未看到益處，至此，總體上螢光信號似乎降低，未改善腫瘤內分佈。研究證明挑選7天之BsAb-CA時間間隔勝過4天。

實例33：生物分佈(用於估計腫瘤及正常組織吸收之放射性劑量的活體內²¹²Pb-DOTAM分佈資料)(方案146)

【0816】方案146經設計以提供載有皮下BxPC3腫瘤之SCID小鼠中

PRIT之後的活體內²¹²Pb-DOTAM分佈資料，用於估計腫瘤及正常組織吸收之放射性劑量。使用Ca淬滅²¹²Pb-DOTAM (參見實例34)。

【0817】藉由注射CEA-DOTAM BsAb預先靶向，7天後注射CA。在24小時之後，投與²¹²Pb-DOTAM。在放射性注射之後5分鐘至48小時之多個時間點，處死各組小鼠，且收穫血液及器官用於量測放射性。在所選時間點，藉由使用代謝籠，對排泄物取樣，以評估放射性化合物之分泌速率。最終經由確定之方法，使用所得時間-放射性曲線計算吸收劑量。

研究設計

【0818】方案146之時程及設計展示於以下兩個表中。

方案146之時程

研究天數	實驗程序
0	皮下注射BxPC3細胞
21	靜脈內注射PRIT BsAb
28	靜脈內注射CA
29	溶離 ²¹² Pb-DOTAM
29	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM
29	安樂死及屍檢(5 min-6 h p.i.)；組織γ計數
30	安樂死及屍檢(24 h p.i.)；組織γ計數
31	安樂死及屍檢(48 h p.i.)；組織γ計數

方案146中之研究組

組	n	BsAb (μg)	時間 (d)	CA (μg)	時間 (h)	²¹² Pb (μCi)	DOTAM 淬滅	取樣時間
A	5	100	7	25	24	20	Ca	5 min
B	5	100	7	25	24	20	Ca	30 min
C	5	100	7	25	24	20	Ca	2 h
D	5	100	7	25	24	20	Ca	6 h
E	5	100	7	25	24	20	Ca	24 h
F	5	100	7	25	24	20	Ca	48 h

【0819】藉由皮下注射BxPC3細胞至8週齡之SCID小鼠(Envigo)中

來建立實體異種移植物。在接種之後二十八天，利用 310 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。

【0820】 第E及F組中之小鼠個別地圈養(亦即每籠一隻小鼠)於格子地板代謝籠中。在放射性注射之後2、6及24小時自各籠收集尿液及糞便，且隨後量測個別樣品之放射性。在注射後24小時第F組中之小鼠轉移至常規籠型。

【0821】 在結束之前經由眶後放血自所有小鼠收集血液/血清。在安樂死之後，收穫以下其他器官及組織以量測放射性及計算% ID/g：膀胱、子宮、小腸、結腸、脾臟、胰臟、腎臟、胃、肝臟、肺、心臟、腦、股骨、皮膚、肌肉、腹部脂肪、尾巴及腫瘤。

輻射劑量測定

【0822】 按照來自醫用內輻射劑量(MIRD)委員會之手冊第21號(Bolch WE, Eckerman KF, Sgouros G, 及Thomas SR. J Nucl Med 2009; 50:477-484)中概述之式計算吸收劑量。形式上，標靶組織或區域 r_T 中之吸收劑量 $D(r_T)$ 計算為放射性之時間積分 $A(r_s, t)$ 乘以每單位放射性之吸收劑量速率 $S(r_T \leftarrow r_s)$ ，在所有源區域 r_s 上求和。假定藉由 ^{212}Pb 衰變鏈釋放之絕大部分能量來自 α 輻射且此外藉由 α 輻射高得多之生物有效性(如藉由相對生物有效性RBE表徵)，得出兩個近似法：

1. 能量由於 α 粒子之短程而局部吸收，此意謂僅僅考慮術語 $S(r_T \leftarrow r_T)$ ，且
2. 忽略來自 β 及 γ 輻射之影響。

【0823】 在 Δ_α 為由 α 衰變釋放之能量或更確切為 ^{212}Pb 之衰變鏈中由 α 衰變釋放之平均能量的總和(這裏以單位 $\text{J}/(\mu\text{Ci} \cdot \text{h})$ 表示)下，標靶組織或區

域 r_T 中之吸收劑量由下式計算：

$$D_{\alpha}(r_T) = \sum_{r_S} \int_0^{\infty} A(r_S, t) \cdot S(r_T \leftarrow r_S) \cdot dt = \Delta_{\alpha} \cdot \int_0^{\infty} \frac{A(r_T, t)}{M(r_T)} \cdot dt$$

【0824】 計算係基於時間 t 時複合(平均)衰變校正之放射性濃度，表示為 $[\%ID/g]_t$ 。在第一步中，此等變換成呈標靶組織 r_T 之每公斤組織重量之 μCi 的放射性濃度：

$$\frac{A(r_T, t)}{M(r_T)} = \frac{A_0[\mu Ci]}{100\%} \cdot e^{-\lambda t} \cdot [\%ID/g]_t \cdot 1000 \frac{g}{kg}$$

$A_0[\mu Ci]$ 為注射之放射性，且 λ 為 ^{212}Pb 之指數衰變速率， $0.0651 h^{-1}$ (對應於 10.6 小時半衰期)。

【0825】 在第二步中，針對各組織，放射性濃度隨著時間推移整合。在藥物動力學軟體 Phoenix WinNonlin 6.4 (Certara USA, Inc., 100 Overlook Center, Suite 101, Princeton, NJ 08540 USA) 中使用「線性對數梯形計算法」實現此。使用具有均勻權重之模型類型「血漿」。

【0826】 在最後一步中，吸收劑量藉由放射性濃度之時間積分乘以能量釋放來計算， $\Delta_{\alpha} = 170 \cdot 10^{-6} J/(\mu Ci \cdot h)$ 。另外，如 MIRD 手冊 第 22 號 (Sgouros G, Roeske JC, McDevitt MR 等人, J Nucl Med 2010; 51:311-328) 中所建議，使用 RBE 5 計算經 RBE 加權之吸收劑量。

結果

生物分佈

【0827】 圖 50 中顯示負載腫瘤之 SCID 小鼠中之平均 ^{212}Pb 累積及清除。放射性在腫瘤中高度累積，其中在注射之後 5 分鐘為 17% ID/g，至注射後 6 小時超過 40%，且保持在該水準下至少 48 小時。與無腫瘤條件相比較，正常組織中未發現重大差異。

吸收劑量

【0828】 針對方案146計算之平均吸收劑量(以Gy為單位)展示於表24中，兩者呈絕對值(RBE=1)及針對 α 發射體之較高細胞毒性校正(RBE=5)。對於SCID小鼠，平均重量為18.5 g；在20 μ Ci之注射 ^{212}Pb 活性下，此產生1.1 μ Ci/g體重之校正注射放射性。

【0829】 在腫瘤中達到大約20 Gy之吸收劑量，而除膀胱外，大部分正常組織中之吸收劑量保持遠低於2 Gy。膀胱中之 ^{212}Pb 含量在個別小鼠之間顯著不同，此表明此組織之可變性高。提供RBE校正之劑量以能夠與使用外部 γ 輻射之放射線療法比較，產生每20 μ Ci注射之 ^{212}Pb -DOTAM大約100 Gy之估計之腫瘤吸收劑量。

在注射20 μ Ci ^{212}Pb -DOTAM之後所收集之器官及組織的平均吸收劑量 (Gy)

器官/組織	方案146 預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM (負載腫瘤之SCID)	
	RBE = 1	RBE = 5
腹部脂肪	1.25	6.25
膀胱	6.53	32.64
血液	0.72	3.60
腦	0.04	0.19
結腸	0.43	2.17
股骨	0.27	1.33
心臟	0.33	1.63
腎臟	1.43	7.14
肝臟	0.22	1.09
肺	1.34	6.69
肌肉	0.29	1.47
胰臟	0.36	1.80
血清	1.64	8.20
皮膚	0.47	2.33
小腸	0.22	1.08
脾	0.27	1.36

胃	0.24	1.20
尾巴	0.54	2.69
子宮	0.61	3.04
腫瘤(BxPC3)	19.91	99.55

結論

【0830】 在腫瘤中達到大約20 Gy之吸收劑量，而大部分正常組織中之吸收劑量保持遠低於2 Gy。總體而言，該研究指示使用評估之PRIT方案無重大劑量限制性毒性風險。

實例34：未螯合DOTAM之淬滅(方案131)

【0831】 在自含鈾樹脂溶離之後 α 發射體 ^{212}Pb 與DOTAM螯合，產生藥理學上活性之 ^{212}Pb -DOTAM。在放射性標記之後，過量(>99%)游離之未螯合DOTAM保留在溶液中，容易捕捉來自環境之金屬離子。在注射至患者時，其將迅速結合於循環 Ca^{2+} ，形成藥理學上非活性Ca-DOTAM。雖然CEA-DOTAM BsAb經設計以優先結合Pb-DOTAM，但其亦將在可比較程度下與Ca-DOTAM形成穩定錯合物。因此，可在飽和條件下阻斷 ^{212}Pb -DOTAM至預先靶向之腫瘤位點，可能降低PRIT治療之功效。為避免潛在競爭，因此將淬滅步驟添加至 ^{212}Pb -DOTAM溶離過程，其中引入金屬離子(「X」)以在顯著較高之解離常數(Kd)下控制「X-DOTAM」之形成。如藉由KinExA (動力排除分析)平衡量測所測定，DOTAM結合劑對多種X-DOTAM螯合物之親和力展示在下表中。

CEA-DOTAM BsAb之金屬-DOTAM螯合物親和力

螯合物	Kd [pM]	95% CI [pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Cu-DOTAM	122 000	60 000-206 000
Zn-DOTAM	15 000	9 000-19 000

【0832】 淬滅之初始選擇為Cu，因此用淬滅之非競爭性Cu-DOTAM替換未螯合DOTAM，且使用此條件進行CEA-PRIT程式內之大量研究。然而，隨後發現Cu-DOTAM錯合物實際上在活體內不穩定，且進行研究以與替代淬滅離子相比較，評估其在人類及小鼠血清、血漿及血液中之穩定性。一方面，所選離子為具有類似親和力之Pb及Ca，且另一方面，為具有顯著較低之親和力的Zn及Cu。該研究證明如藉由注射後35分鐘自然Ca-DOTAM形成所量測，與Cu-DOTAM相比較，Zn-DOTAM在人類及小鼠血液中之穩定性顯著較高，在小鼠及人類血液中分別達到相對於最初注射之Cu-DOTAM的大約25%及30%，與Zn-DOTAM之0%及0%以及Pb-DOTAM之4%及4%相比較。

【0833】 方案131經設計以在活體內評估DOTAM淬滅候選金屬，在用CEA-DOTAM預先靶向及用Pb-DOTAM-聚葡萄糖-500清除之後比較其對腫瘤及正常組織之²¹²Pb-DOTAM累積之作用。與Cu並列評估Zn及Gd，其具有合理的活體外與DOTAM錯合之穩定性。另外，Ca及穩定Pb用作對照。研究概述展示於圖51中。

【0834】 方案131之時程及設計展示於以下兩個表中。

方案131之時程

研究天數	實驗程序
0	製備BxPC3細胞及填充注射器
0	皮下注射BxPC3細胞
18	靜脈內注射BsAb
25	靜脈內注射CA
26	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
26	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM
26	安樂死及收穫組織(2 h p.i.) + γ計數

方案131中之研究組

組	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (d)	CA (μg)	時間 (h)	^{212}Pb (μCi)	淬滅	BD (h p.i.)
A	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Zn	2
B	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Gd	2
C	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Cu	2
D	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Ca	2
E	4	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	Pb	2

【0835】藉由皮下注射BxPC3細胞至5-7週齡之SCID小鼠之右側腹中來建立實體異種移植物。在注射腫瘤細胞十八天之後，利用 200 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。在接種之後第26天注射 ^{212}Pb -DOTAM，此時平均腫瘤體積為 350 mm^3 。

【0836】抗體在 20 mM His/His-HCl 、 140 mM NaCl pH 6.0中稀釋至 $100\text{ }\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{L}$ 之最終濃度，以根據表「方案中之研究組131」及圖51靜脈內投與。在注射BsAb之後7天，使CA解凍且在PBS中稀釋至 $25\text{ }\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{L}$ 之最終濃度用於靜脈內投與。在另一24小時之後，靜脈內注射使用5種不同金屬中之任一者淬滅的 ^{212}Pb -DOTAM ($100\text{ }\mu\text{L}$ 0.9% NaCl中 $10\text{ }\mu\text{Ci}$)。

【0837】在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後2小時出於生物分佈之目的處死小鼠，且收穫以下組織及器官：血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、肌肉、尾巴及腫瘤。

結果

【0838】圖52中展示在注射 ^{212}Pb -DOTAM之後2小時所有收集組織中之平均 ^{212}Pb 累積及清除率。淬滅金屬中之任一者與Pb對照相比之間的平均% ID/g不存在統計上顯著差異(雙向ANOVA與鄧奈特多重比較檢驗)。圖53中展示腫瘤及所選正常組織之個別值。在用Zn及Gd淬滅之後，

與其他金屬相比較，觀測到脾臟及肌肉中 ^{212}Pb 含量之較大個別變化，不過不同治療組之間的平均% ID/g差異不顯著(單向ANOVA與圖基多重比較檢驗(Tukey's multiple comparisons test))。

結論

【0839】 方案131評估與Ca或Pb淬滅相比較，DOTAM之Zn、Gd或Cu淬滅對預先靶向之 ^{212}Pb -DOTAM之腫瘤及正常組織累積的作用。未觀測到 ^{212}Pb 腫瘤吸收之差異，此表明在施加之實驗條件下使用對照Ca及Pb不顯著阻斷預先靶向之結合位點。在用Zn及Gd淬滅之後觀測到脾臟及肌肉中之 ^{212}Pb 含量增加的變化，此表明與 ^{212}Pb -DOTAM競爭之金屬-DOTAM錯合物可有助於中和非靶向組織中未結合CA之CEA-DOTAM。用Cu淬滅產生與Ca淬滅可比較之結果，此進一步證實所指示之Cu-DOTAM在活體內之不穩定性。出於以下三個主要原因，最終選擇Ca用於淬滅DOTAM：與Cu淬滅相比， ^{212}Pb -DOTAM溶液之活體內調配物之控制增加；能夠增加未結合CA之BsAb之中和，減少 ^{212}Pb 之正常組織吸收中之可變性；以及能夠減少假設之「結合位點障壁」現象之作用，藉此由於在亞飽和條件下直接與容易接近之標靶結合，故對抗原具有高親和力之分子的滲透受限制。

實例35：用於PRIT之CD20-DOTAM及HER2-DOTAM之評估(方案151及152)

【0840】 方案151及152分別旨在評估小鼠中 ^{212}Pb -DOTAM與由完全人類化BsAbs CD20-DOTAM及HER2-DOTAM預先靶向之皮下腫瘤的結合。藉由以下來執行三步PRIT：注射抗體構築體，7天後注射Ca-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA，及24小時後最終注射 ^{212}Pb -DOTAM。在放射

性注射之後24小時處死小鼠，且收穫血液及器官用於放射性量測。

研究設計

【0841】 方案151及152之時程及設計展示於以下四個表中。

方案151之時程

研究天數	實驗程序
0	製備WSU-DLCL2細胞及填充注射器
0	皮下注射WSU-DLCL2細胞
5	靜脈內注射CD20-DOTAM BsAb
12	靜脈內注射CA (第A、B組)
12	收穫腫瘤及福馬林固定(第C、D組)
13	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
13	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM (第A、B組)
14	安樂死及收穫組織(24 h p.i.) + γ 計數(第A、B組)

方案151中之研究組

組	n	BsAb	BsAb (μ g)	時間 (d)	CA (μ g)	時間 (h)	²¹² Pb (μ Ci)	BD (h p.i.)
A	3	CD20-DOTAM	100	7	25	24	20	6
B	3	DIG-DOTAM	100	7	25	24	20	6
C	2	CD20-DOTAM	100	7	0	—	0	—
D	2	DIG-DOTAM	100	7	0	—	0	—
E	5	—	0	—	0	—	0	—

方案152之時程

研究天數	實驗程序
0	製備NCI-N87細胞及填充注射器
0	皮下注射NCI-N87細胞
14	靜脈內注射HER2-DOTAM BsAb
21	靜脈內注射CA (第A、B組)
21	收穫腫瘤及福馬林固定(第C、D組)
22	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
22	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM (第A、B組)
23	安樂死及收穫組織 (24 h p.i.) + γ 計數(第A、B組)

方案152中之研究組

組	n	BsAb	BsAb (μg)	時間 (d)	CA (μg)	時間 (h)	^{212}Pb (μCi)	BD (h p.i.)
A	3	HER2-DOTAM	100	7	25	24	20	6
B	3	DIG-DOTAM	100	7	25	24	20	6
C	2	HER2-DOTAM	100	7	0	—	0	—
D	2	DIG-DOTAM	100	7	0	—	0	—
E	5	—	0	—	0	—	0	—

【0842】 在方案151中，藉由皮下注射DMEM培養基中表現CD20之WSU-DLCL2人類B細胞淋巴瘤細胞至9週齡之SCID小鼠中來建立實體異種移植物。在注射腫瘤細胞四天之後，利用 105 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。在接種之後第13天注射 ^{212}Pb -DOTAM，此時平均腫瘤體積為 242 mm^3 。

【0843】 在方案152中，藉由皮下注射RPMI 1640培養基中表現HER2之NCI-N87人類胃癌細胞至10週齡之SCID小鼠中來建立異種移植物。在注射腫瘤細胞十四天之後，利用 74 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。在接種之後第22天注射 ^{212}Pb -DOTAM；第21天平均腫瘤體積為 61 mm^3 。

【0844】 在放射性注射之後24小時處死生物分佈小鼠。在結束之前，在感覺缺失下經由眶後放血收集血液。在安樂死之後所有小鼠進行屍檢，另外收集皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臟、胰臟、腎臟、肝臟、肺、心臟、股骨、肌肉、尾巴及腫瘤。

結果

生物分佈 - 方案151

【0845】 圖54中展示在注射之後24小時所有收集之組織中的平均 ^{212}Pb 含量。陰性對照BsAb DIG-DOTAM未在WSU-DLCL2腫瘤中累積放

射性($0.4 \pm 0.3\%$ ID/g)，而CD20-DOTAM BsAb產生 $25.0 \pm 3.7\%$ ID/g。除了膀胱($12.5 \pm 4.5\%$ ID/g)、腎臟($3.1 \pm 0.3\%$ ID/g)及肺($2.2 \pm 0.2\%$ ID/g)，在正常組織/器官中未見到顯著 ^{212}Pb 吸收。

生物分佈 - 方案152

【0846】圖55中展示在注射之後24小時所有收集之組織中的平均 ^{212}Pb 含量。陰性對照BsAb DIG-DOTAM未在NCI-N87腫瘤中累積放射性($0.8 \pm 0.4\%$ ID/g)，而HER2-DOTAM BsAb產生 $24.6 \pm 1.5\%$ ID/g。除了腎臟($1.6 \pm 0.1\%$ ID/g)及肺($1.4 \pm 0.2\%$ ID/g)中之值非常低，在正常組織/器官中未見到顯著 ^{212}Pb 吸收。

結論

【0847】使用針對CEA-PRIT研發出之三步預先靶向法，方案151及152之結果證明CD20-PRIT及HER2-PRIT之特異性靶向及活體內概念驗證。

實例36：其他格式之活體內分佈及腫瘤累積資料(方案154)

【0848】方案154旨在評估5種CEA-DOTAM BsAb構築體用於PRIT。其經設計以提供在負載皮下HPAF-II異種移植物之SCID小鼠中 ^{212}Pb -DOTAM之活體內分佈及腫瘤累積資料。藉由以下來執行三步PRIT：注射CEA-DOTAM構築體，7天後注射Ca-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA，及CA之後24小時後最終注射 ^{212}Pb -DOTAM。在放射性注射之後6小時處死小鼠，且收穫血液及器官用於放射性量測。利用PRIT，使用標準CEA-DOTAM BsAb及未結合CEA之BsAb，進行比較。研究概述展示於圖56中。

研究設計

【0849】 方案154之時程及設計展示於以下兩個表中。

方案154之時程

研究天數	實驗程序
0	製備HPAF-II細胞及填充注射器
0	皮下注射HPAF-II細胞
12	靜脈內注射BsAb
19	靜脈內注射CA
19	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
20	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM
20	安樂死及收穫組織 (6 h p.i.) + γ 計數

方案154中之研究組

組	n	BsAb	BsAb (μ g)	時間 (d)	CA (μ g)	時間 (h)	²¹² Pb (μ Ci)	BD (h p.i.)
A	3	DIG-DOTAM	100	7	25	24	10	6
B	3	CEA-DOTAM	100	7	25	24	10	6
C	3	P1AE1766	100	7	25	24	10	6
D	3	P1AE1767	100	7	25	24	10	6
E	3	P1AE1768	100	7	25	24	10	6
F	3	P1AE1769	100	7	25	24	10	6
G	3	P1AE1770	100	7	25	24	10	6

【0850】 藉由皮下注射HPAF-II細胞至9週齡之小鼠之右側腹中來建立實體異種移植物。在注射腫瘤細胞十一天之後，利用79 mm³之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。在接種之後第20天注射²¹²Pb-DOTAM，此時平均腫瘤體積為230 mm³。

【0851】 所有抗體均在20 mM His/His-HCl、140 mM NaCl pH 6.0中稀釋至100 μ g/100 μ L之最終濃度，以根據表「方案中之研究組154」及圖56靜脈內投與。在注射BsAb之後7天，使CA解凍且在PBS中稀釋至25 μ g/100 μ L之最終濃度用於靜脈內投與。另外24小時之後，靜脈內注射用Ca淬滅之²¹²Pb-DOTAM (100 μ L 0.9% NaCl中10 μ Ci)。

【0852】 在注射²¹²Pb-DOTAM之後6小時，出於生物分佈之目的，

處死小鼠，且收穫以下其他組織及器官：血液、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臟、胰臟、腎臟、肝臟、肺、心臟、股骨、肌肉、腦、尾巴及腫瘤。

結果

【0853】圖57中展示在注射之後6小時所有收集組織中之平均 ^{212}Pb 累積及清除率。圖58中較詳細地展示血液含量及腫瘤累積。陰性對照BsAb DIG-DOTAM未在腫瘤中累積放射性($1.4 \pm 0.1\%$ ID/g)，而標準CEA-DOTAM BsAb產生 $36.8 \pm 3.4\%$ ID/g。對於新穎構築體，對應數字為 $31.8 \pm 3.1\%$ ID/g (P1AE1766)、 $35.0 \pm 8.5\%$ ID/g (P1AE1767)、 $14.2 \pm 6.7\%$ ID/g (P1AE1768)、 $38.8 \pm 10.1\%$ ID/g (P1AE1769)及 $39.5 \pm 6.8\%$ ID/g (P1AE1770)。P1AE1768之顯著較低腫瘤累積可藉由此抗體構築體之CEA一價解釋。

【0854】對於此PRIT方案，除了膀胱，放射性達到一般在6 h p.i.時看見之水準，未在正常組織/器官中看見顯著 ^{212}Pb 吸收。

結論

【0855】該研究之結果證明用於三步PRIT之所有測試之CEA-DOTAM抗體構築體(P1AE1766、P1AE1767、P1AE1768、P1AE1769及P1AE1770)的活體內概念驗證。

實例37：CD20-PRIT功效(方案162)

【0856】此研究之目標為展示對針對以下替代標靶之CEA-PRIT研發出之治療方案的概念驗證：分化簇20 (CD20)。在負載皮下WSU-DLCL2腫瘤之小鼠中在3次CD20-PRIT循環之後評估治療功效。亦與以下進行比較：1步CD20-RIT，使用在注射之前與 ^{212}Pb -DOTAM一起預培育

之BsAb；利妥昔單抗(rituximab)，其為針對CD20之I型單株抗體及治療CD20+疾病之參考；以及GA101，其為亦針對CD20之II型單株抗體。
研究設計，方案162

研究天數	實驗程序
0	製備WSU-DLCL2細胞及填充注射器
0	皮下注射WSU-DLCL2細胞
7	腹膜內注射PRIT BsAb或組胺酸緩衝液(第A、B、C、E、H、I、J、K組)
14	腹膜內注射CA或組胺酸緩衝液(第A、B、C、H、I、J、K組)
15	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
15	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM-CD20-DOTAM (第D、L組)
15	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM或0.9% NaCl (第A、B、C、H、I、J、K組)
15	靜脈內注射GA101或利妥昔單抗(第F、G組)
16	安樂死及收穫組織(24 h p.i.) + γ 計數(第H、I、L組)
21	腹膜內注射PRIT BsAb或組胺酸緩衝液(第A、B、C、E、J、K組)
28	腹膜內注射CA或組胺酸緩衝液(第A、B、C、J、K組)
29	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
29	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM-CD20-DOTAM (第D組)
29	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM or 0.9% NaCl (第A、B、C、J、K組)
29	靜脈內注射GA101或利妥昔單抗(第F、G組)
30	安樂死及收穫組織 (24 h p.i.) + γ 計數(第J組)
35	腹膜內注射PRIT BsAb或組胺酸緩衝液(第A、B、C、E、K組)
42	腹膜內注射CA或組胺酸緩衝液(第A、B、C、K組)
43	溶離 ²¹² Pb-DOTAM及填充注射器
43	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM-CD20-DOTAM (第D組)
43	靜脈內注射 ²¹² Pb-DOTAM或0.9% NaCl (第A、B、C、K組)
43	靜脈內注射GA101或利妥昔單抗(第F、G組)
44	安樂死及收穫組織(24 h p.i.) + γ 計數(第K組)

方案162中之研究組 ($n_{tot} = 85$)

組	BsAb	每次循環之BsAb (μg)	每次循環之CA (μg)	每次循環之 ²¹² Pb-DOTAM (μCi)	治療循環(#)	n (小鼠)
A	—	0	0	0	3	10
B	DIG-DOTAM	100	25	20	3	10
C	CD20-DOTAM	100	25	20	3	10
D	²¹² Pb-DOTAM-CC20-DOTAM	20	0	10	3	10

E	CD20-DOTAM	100	0	0	3	10
F	GA101	600	0	0	3	10
G	利妥昔單抗	600	0	0	3	10
H	DIG-DOTAM	100	25	20	1	3
I	CD20-DOTAM	100	25	20	1	3
J	CD20-DOTAM	100	25	20	2	3
K	CD20-DOTAM	100	25	20	3	3
L	²¹² Pb-DOTAM-CEA-DOTAM	20	0	10	1	3

【0857】 根據圖59中所示之實驗時程處理動物。在8週齡之SCID小鼠中在研究第0天，藉由皮下注射 1.5×10^5 個細胞至右側腹中來建立實體WSU-DLCL2異種移植物。在注射腫瘤細胞七天之後，利用 144 mm^3 之平均腫瘤體積，將小鼠分選至實驗組。在接種之後第15天注射²¹²Pb-DOTAM；第14天平均腫瘤體積為 306 mm^3 。

【0858】 追蹤第A-G組中之小鼠以評估治療功效。對於PRIT，投與放射性為每次循環 $20 \text{ } \mu\text{Ci}$ ，而1步RIT之對應活性為 $10 \text{ } \mu\text{Ci}$ ，以避免在使用此方案之後由在血液及正常組織中較長滯留時間引起的急性輻射誘發之毒性。

【0859】 在第一次及唯一一次注射²¹²Pb-DOTAM或²¹²Pb-DOTAM-BsAb之後24小時處死第H、I及L組中之小鼠且屍檢；分別在第二次及第三次注射²¹²Pb-DOTAM之後24小時處死第J及K組且屍檢。自此等小鼠收穫以下器官及組織：血液、膀胱、脾臟、腎臟、肝臟、肺、肌肉、尾巴、皮膚及腫瘤。將收集之樣品稱重，且接著使用2470 WIZARD²自動 γ 計數器(PerkinElmer)量測放射性，且隨後計算每公克組織之注射劑量百分比(% ID/g)，包括針對衰變及背景進行之校正。

【0860】 對於PRIT，在 20 mM 組胺酸、 140 mM NaCl (pH 6.0)中稀釋CEA-DOTAM BsAb或DIG-DOTAM (陰性對照BsAb)至 $100 \text{ } \mu\text{g}/200$

μL 之最終濃度，用於腹膜內投與。在注射BsAb之後7天，腹膜內投與Ca-DOTAM-聚葡萄糖-500 CA (25 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$)，24小時後投與Ca淬滅之 ^{212}Pb -DOTAM (100 μL 中20 μCi)。

【0861】用1步RIT治療之小鼠接受預先結合之 ^{212}Pb -DOTAM-CD20-DOTAM，其藉由將 ^{212}Pb -DOTAM與CD20-DOTAM BsAb在 37°C 下一起培育10分鐘來製備，接著靜脈內注射(100 μL 0.9% NaCl中20 $\mu\text{Ci}/20 \mu\text{g}$ BsAb)。

【0862】用利妥昔單抗(MabThera®)或GA101 (奧比珠單抗(obinutuzumab))治療之小鼠靜脈內注射相應抗體，在20 mM組胺酸、140 mM NaCl (pH 6.0)中稀釋至200 μL 中600 μg 之最終濃度。針對PRIT及RIT治療組，在與放射性注射相同之日進行注射。

初步結果，162

【0863】在書寫此實例時該研究仍在進行中，但可相應地報導初步結果：

【0864】圖60中展示針對第一治療循環，在注射之後24小時所有收集之組織中的平均 ^{212}Pb 累積及清除。陰性PRIT對照未吸收(0.7% ID/g)在腫瘤中。CD20-PRIT及CD20-RIT兩者之腫瘤吸收均為22% ID/g。

【0865】圖61中展示所評估治療之平均腫瘤發育。未治療之媒劑組、DIG-DOTAM組及基於抗體之治療組中的腫瘤不斷地生長。相比之下，在第一治療循環之後CD20-RIT及CD20-PRIT組中之腫瘤的尺寸減小。

【0866】圖62中展示所有治療組中之體重發展。20 μCi ^{212}Pb -DOTAM之多次注射具有良好耐受性，但10 μCi 預先結合之 ^{212}Pb -

DOTAM-CD20-DOTAM引起體重顯著下降。

概述及結論

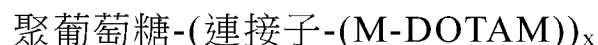
【0867】 該研究顯示CD20-PRIT之概念驗證，其表明腫瘤生長抑制與先前針對CEA-PRIT所證明相當。CD20-PRIT治療具有良好耐受性，而1步CD20-RIT治療並非如此。

本發明之額外實施例

【0868】 以下編號陳述代表本發明之某些額外態樣及實施例。

【0869】 1. 一種清除劑，其包含與選自DOTAM及DOTAM之功能變異體的螯合物結合的聚葡萄糖或其衍生物，其中該螯合物與金屬離子錯合。

【0870】 2. 段落1的清除劑，其為下式化合物：



其中

聚葡萄糖為聚葡萄糖或其衍生物；

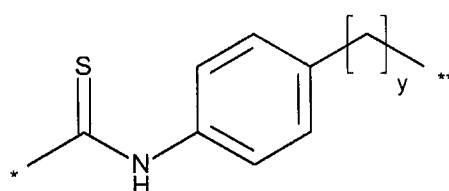
連接子為連接部分；

M-DOTAM為併有金屬離子之DOTAM或其功能變異體；以及

$x \geq 1$ 。

【0871】 3. 段落1的清除劑，其中x為20或更多、25或更多、30或更多、35或更多、40或更多或者50或更多。

【0872】 4. 段落2或段落3的清除劑，其中該連接部分為下式二價基團：



第 273 頁(發明說明書)

其中y為1至6，*表示與聚葡萄糖附接之附接點，且**表示與DOTAM或其功能變異體之環原子附接的附接點。

【0873】 5. 前述段落中任一段落的清除劑，其中該聚葡萄糖衍生物為胺基聚葡萄糖，視情況經一或多個選自胺基酸及除葡萄糖外之醴的基團取代。

【0874】 6. 前述段落中任一段落的清除劑，其中呈該聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物之葡萄糖單元數目之百分比的DOTAM基團之數目為至少1%、至少1.5%、至少2%、至少2.5%、至少3%、至少5%。

【0875】 7. 前述段落中任一段落的清除劑，其中該聚葡萄糖之平均分子量為200-800 kDa，視情況超過300、350、400或450 kDa，且視情況小於700、650、600或550 kDa，視情況約500 kDa。

【0876】 8. 段落7的清除劑，其中已移除小於分子量截止值之聚葡萄糖組分或清除劑，其中該分子量截止值為50 kDa或更大、100 kDa或更大或者200 kDa或更大。

【0877】 9. 段落8的清除劑，其中該分子量截止值在50 kDa-250 kDa或50 kDa-200 kDa，視情況100 kDa-200 kDa之範圍內且視情況約100 kDa、150 kDa或200 kDa。

【0878】 10. 段落7至段落9中任一段落的清除劑，其中該平均分子量為450 kDa-550 kDa，例如約500 kDa。

【0879】 11. 前述段落中任一段落的清除劑，其中該金屬離子為穩定同位素或基本上穩定之同位素。

【0880】 12. 前述段落中任一段落的清除劑，其中該金屬離子為Pb、Bi或Ca離子。

【0881】 13. 一種製備清除劑之方法，其包含：

使聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物與DOTAM或其功能變異體或衍生物結合，其中該方法包括在DOTAM與該聚葡萄糖結合之前及/或之後將DOTAM與金屬離子螯合。

【0882】 14. 段落13的方法，其中該金屬離子為穩定金屬離子或基本上穩定之金屬離子。

【0883】 15. 段落13或14的方法，其中該金屬離子為Pb、Bi或Ca離子。

【0884】 16. 段落13至15中任一段落的方法，其中在結合該聚葡萄糖或聚葡萄糖衍生物前進行過濾步驟以移除低於50 kDa或更大、100 kDa或更大或者200 kDa或更大的分子量截止值/臨限值的物種，及/或其中

該方法包含使該結合物進行過濾步驟以移除低於50 kDa或更大、100 kDa或更大或者200 kDa或更大的分子量截止值/臨限值的物種。

【0885】 17. 段落1至12中任一段落之清除劑，其用於放射免疫療法或放射免疫成像之方法中。

【0886】 18. 段落1至12中任一段落之清除劑，其用於預靶向放射成像之方法中，該方法包含：

i)向個體投與包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對標靶抗原具有特異性之抗原結合位點的多特異性或雙特異性抗體，其中在投與後該抗體結合於該標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；

ii)投與根據段落1至11中任一段落之清除劑，其中該清除劑能夠在針對該Pb-DOTAM螯合物之結合位點結合於該抗體，且增加清除率及/或阻

斷未定位至細胞表面之抗體的抗原結合位點；

該方法視情況進一步包含

iii)隨後投與包含DOTAM與Pb放射性同位素螯合之錯合物，其中該錯合物結合於定位至細胞表面之抗體；以及該方法視情況進一步包含

iv)使該螯合型放射核種所位於的組織或器官成像。

【0887】 19. 段落1至12中任一段落之清除劑，其用於預靶向放射免疫療法之方法中，該方法包含：

i)向該個體投與包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對標靶抗原具有特異性之抗原結合位點的多特異性或雙特異性抗體，其中在投與後該抗體結合於該標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；

ii)投與段落1至12中任一段落之清除劑，其中該清除劑能夠在針對該Pb-DOTAM螯合物之結合位點結合於該抗體，且增加抗體之清除率及/或阻斷未定位至細胞表面之抗體的抗原結合位點；

該方法視情況進一步包含

iii)隨後投與包含DOTAM與Pb放射性同位素螯合之錯合物，其中該錯合物結合於定位在細胞表面之抗體。

【0888】 20. 一種預靶向放射成像之方法，其包含：

i)向該個體投與包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對標靶抗原具有特異性之抗原結合位點的多特異性或雙特異性抗體，其中在投與後該抗體結合於該標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；

ii)投與段落1至12中任一段落之清除劑，其中該清除劑能夠在針對該

Pb-DOTAM螯合物之結合位點結合於該抗體，且增加清除率及/或阻斷未定位至細胞表面之抗體的抗原結合位點；視情況進一步包含

iii)隨後投與包含DOTAM或其功能變異體與Pb放射性同位素螯合之錯合物，其中該錯合物結合於定位至細胞表面之抗體；且視情況進一步包含

iv)使該螯合型放射核種所位於的組織或器官成像。

【0889】 21. 一種預靶向放射免疫療法之方法，該方法包含：

i)向該個體投與包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對標靶抗原具有特異性之抗原結合位點的多特異性或雙特異性抗體，其中在投與後該抗體結合於該標靶抗原且定位至表現該標靶抗原之細胞的表面；

ii)投與段落1至12中任一段落之清除劑，其中該清除劑能夠在針對該Pb-DOTAM螯合物之結合位點結合於該抗體，且增加抗體之清除率及/或阻斷未定位至細胞表面之抗體的抗原結合位點；視情況進一步包含

iii)隨後投與包含DOTAM或其功能變異體與Pb放射性同位素螯合之錯合物，其中該錯合物結合於定位於細胞表面之抗體。

【0890】 22. 根據段落18或19之使用之清除劑或根據段落20或21之方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點包含至少：

a)包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)之重鏈CDR2或在SEQ ID NO: 2中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Phe50、Asp56及Tyr58，且視情況亦不包括Gly52及/或Arg54；

b)包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)之重鏈CDR3或在SEQ ID NO: 3中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Glu95、Arg96、Asp97、Pro98，且視情況亦不包括Ala100C、Tyr100D及/或Pro100E及/或視情況亦不包括Tyr99；

c)包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)之輕鏈CDR1或在SEQ ID NO: 4中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Tyr28及Asp32；

d)包含胺基酸序列LGGYDDESDTYG (SEQ ID NO: 6)之輕鏈CDR3或在SEQ ID NO: 6中具有至多1、2或3個取代之其變異體，其中此等取代不包括Gly91、Tyr92、Asp93、Thr95c及Tyr96，

其中編號係根據Kabat。

【0891】 23. 根據段落22之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點進一步包含重鏈CDR1及輕鏈CDR2。

【0892】 24. 根據段落23之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點包含：

i)包含胺基酸序列GFSLSTYSMS (SEQ ID NO: 1)之重鏈CDR1或在SEQ ID NO: 1中具有至多1、2或3個取代，視情況保守取代之其變異體；及/或

ii)包含胺基酸序列QASKLAS (SEQ ID NO: 5)之輕鏈CDR2或在SEQ ID NO: 5中具有至少1、2或3個取代，視情況保守取代之其變異體。

【0893】 25. 根據段落18至24中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點包含至少一個、

兩個、三個、四個、五個或六個選自以下之CDR：

a)包含胺基酸序列GFSLSTYSMS (SEQ ID NO: 1)之重鏈CDR1；

b)包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)之重鏈
CDR2；

c)包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)之重鏈
CDR3；

d)包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)之輕鏈
CDR1；

e)包含胺基酸序列QASKLAS (SEQ ID NO: 5)之輕鏈CDR2；

f)包含胺基酸序列LGGYDDESPTYG (SEQ ID NO: 6)之輕鏈
CDR3。

【0894】 26. 根據段落18至25中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點結合於該Pb-DOTAM螯合物之與以下各者所結合相同的抗原決定基或重疊的抗原決定基：

i)具有包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之重鏈可變域及包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之輕鏈可變域的抗體；或

i)具有包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈可變域及包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之輕鏈可變域的抗體。

【0895】 27. 根據段落18至26中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點為人類、嵌合或人類化的。

【0896】 28. 根據段落18至27中任一段落之使用之清除劑或方法，

其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點包括包含選自由SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO 9組成之群之胺基酸序列的重鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0897】 29. 根據段落18至28中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對Pb-DOTAM具有特異性之抗原結合位點包括包含選自由SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO 10組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0898】 30. 根據段落18至29中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點包括包含SEQ ID No. 7之胺基酸序列之重鏈可變域及包含SEQ ID NO. 8之胺基酸序列之輕鏈可變域。

【0899】 31. 根據段落18至30中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點包括包含SEQ ID No. 9之胺基酸序列之重鏈可變域及包含SEQ ID NO. 10之胺基酸序列之輕鏈可變域。

【0900】 32. 根據段落18至30中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點以100 pM、50 pM、20 pM、10 pM、5 pM、1 pM或更少之Kd值結合於該Pb-DOTAM螯合物。

【0901】 33. 根據段落18至32中任一段落之使用之清除劑或方法，其中對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點結合於該Pb-

DOTAM螯合物及Bi-DOTAM螯合物，且其中Bi-DOTAM螯合物/Pb-DOTAM螯合物之Kd值之比率在0.1-10或1-10範圍內。

【0902】 34. 根據段落18至33中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該標靶抗原為腫瘤特異性抗原。

【0903】 35. 根據段落18至34中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該腫瘤特異性抗原係選自由CEA、HER2及CD20組成之群。

【0904】 36. 根據段落18至35中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該腫瘤特異性抗原為癌胚抗原(CEA)。

【0905】 37. 根據段落18至36中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CEA具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CEA具有特異性之抗原結合位點包括包含至少一個、兩個或三個重鏈CDR之重鏈，其中：

d)重鏈CDR1包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；

e)重鏈CDR2包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；

f)重鏈CDR3包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；

及/或該對CEA具有特異性之抗原結合位點包括包含至少一個、兩個或三個輕鏈CDR之輕鏈，其中：

a)輕鏈CDR1包含胺基酸序列SEQ ID NO: 14；

b)輕鏈CDR2包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15；

c)輕鏈CDR3包含胺基酸序列SEQ ID NO: 16。

【0906】 38. 根據段落37之使用之清除劑或方法，其中該針對CEA之抗原結合位點包含選自以下各者之CDR中之至少一個、兩個、三個、四

個、五個或六個(亦即，所有)：

- a)包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之重鏈CDR1；
- b)包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之重鏈CDR2；
- c)包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之重鏈CDR3；
- d)包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之輕鏈CDR1；
- e)包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之輕鏈CDR2；
- f)包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之輕鏈CDR3。

【0907】 39. 根據段落18至38中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CEA具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CEA具有特異性之抗原結合位點包含：

i)包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之重鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 17至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii)包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之輕鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 18至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0908】 40. 根據段落39之使用之清除劑或方法，其中該對CEA具有特異性之抗原結合位點包括包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之重鏈可變域及/或包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之輕鏈可變域。

【0909】 41. 根據段落18至35中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對ERBB2具有特異性之抗原結合位

點，且其中該對ERBB2具有特異性之抗原結合位點包含選自以下之至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個CDR：(a)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。

【0910】 42. 根據段落18至35或41中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對ERBB2具有特異性之抗原結合位點，且其中該對ERBB2具有特異性之抗原結合位點包含：

i)包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之重鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 34至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii)包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之輕鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 35至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0911】 43. 根據段落42之使用之清除劑或方法，其中該對ERBB2具有特異性之抗原結合位點包括包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列之重鏈可變域及/或包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列之輕鏈可變域。

【0912】 44. 根據段落18至35中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CD20具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CD20具有特異性之抗原結合位點包含選自以下之至少一個、

兩個、三個、四個、五個或六個CDR：(a)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。

【0913】 45. 根據段落18至35或44中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CD20具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CD20具有特異性之抗原結合位點包含：

i)包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列之重鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 45至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii)包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列之輕鏈可變域或包含與SEQ ID NO: 46至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的其變異體。

【0914】 46. 根據段落45之使用之清除劑或方法，其中該對CD20具有特異性之抗原結合位點包括包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列之重鏈可變域及/或包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列之輕鏈可變域。

【0915】 47. 根據段落18至46中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含Fc區。

【0916】 48. 根據段落47之使用之清除劑或方法，其中該Fc區經工程改造以降低效應子功能。

【0917】 49. 根據段落48之使用之清除劑或方法，其中該Fc區經殘

基234、235、238、265、269、270、297、327及/或329中之一或多者取代進行工程改造。

【0918】 50. 根據段落47至49中任一段落之使用之清除劑，其中該多特異性或雙特異性抗體包括包含第一及第二抗體重鏈及第一及第二抗體輕鏈之全長抗體，其中該第一重鏈與該第一輕鏈組裝形成針對該第一抗原之抗原結合位點，且其中該第二重鏈與該第二輕鏈組裝形成針對該第二抗原之抗原結合位點，

其中該第一抗原或該第二抗原為該Pb-DOTAM螯合物，且另一抗原為該標靶抗原。

【0919】 51. 根據段落50之使用之清除劑，其中該多特異性或雙特異性抗體進一步包含針對該第一抗原之其他抗原結合部分。

【0920】 52. 根據段落51之使用之清除劑，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

包含第一及第二抗體重鏈及第一及第二抗體輕鏈之全長抗體，其中該第一重鏈與該第一輕鏈組裝形成包含針對該第一抗原之抗原結合位點的Fab，且其中該第二重鏈與該第二輕鏈組裝形成針對該第二抗原之抗原結合位點的交叉Fab；

且其中該第一或第二抗體重鏈經由連接子與包含CH1及VH結構域之多肽融合，且該第一多肽與包含CL及VL之第二多肽組裝，使得該第一多肽及該第二多肽組裝形成包含針對該第一抗原之抗原結合位點的Fab。

【0921】 53. 根據段落52之使用之清除劑，其中該第二抗體重鏈之N端經由連接子與該第一多肽融合。

【0922】 54. 根據段落47至49中任一段落之使用之清除劑，其中該

多特異性或雙特異性抗體包含

i)包含針對第一抗原之抗原結合位點的全長抗體；以及

ii)至少第二重鏈可變域及第二輕鏈可變域，其一起形成針對第二抗原之抗原結合位點，其中該第一抗原或該第二抗原為該Pb-DOTAM螯合物，且另一抗原為該標靶抗原。

【0923】 55. 根據段落54之使用之清除劑，其中該多特異性或雙特異性抗體包括包含針對該第一抗原之抗原結合位點的全長抗體，其中該等重鏈中之一者的N端或C端經由多肽連接子連接於第一多肽，且其中該第一多肽與第二多肽締合形成包含針對該第二抗原之結合位點的Fab或交叉Fab。

【0924】 56. 根據段落55之使用之清除劑，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

i)由VH結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VL及CL結構域組成之第二多肽締合；或

ii)由VL結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合；或

iii)由VH結構域及CL結構域組成之第一多肽，其與由VL及CH1結構域組成之第二多肽締合；

使得該第一多肽及該第二多肽一起形成針對第二抗原之抗原結合位點。

【0925】 57. 根據段落56之使用之清除劑，其中該多特異性或雙特異性抗體包括包含針對該第一抗原之抗原結合位點的全長抗體，其中該等重鏈中之一者的C端經由多肽連接子連接於由VL結構域及CH1結構域組

成之第一多肽，該第一多肽與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合。

【0926】 58. 根據段落44之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

a)全長抗體，其特異性結合第一抗原且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

b)多肽，其由以下組成：

i)抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體恆定域(CH1)；或

iii)抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)；

其中該多肽經由肽連接子以該VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；

c)多肽，其由以下組成：

i)抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)，或

iii)抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以該VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

且其中(b)下之該肽之該抗體重鏈可變域及(c)下之該肽之該抗體輕鏈可變域一起形成針對第二抗原之抗原結合位點，

其中該第一抗原或該第二抗原為該Pb-DOTAM螯合物，且另一抗原為該標靶抗原。

【0927】 59. 根據段落50至58中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該第一抗原為該標靶抗原且該第二抗原為該Pb-DOTAM螯合物。

【0928】 60. 根據段落59之使用之清除劑或方法，其中該第一抗原為CEA。

【0929】 61. 根據段落60之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

a)全長抗體，其特異性結合CEA且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

其中該等重鏈與SEQ ID NO: 22或23之胺基酸1-450之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

且其中該等輕鏈與SEQ ID NO 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；及/或

b)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 7之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)與SEQ ID NO: 7之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)與SEQ ID NO: 7之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)；

其中該多肽經由肽連接子以VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；及/或

c)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)與SEQ ID NO: 8之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)，

其中該多肽經由肽連接子以該VL結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之另一條的C端融合；

其中(b)下之肽的抗體重鏈可變域及(c)下之肽的抗體輕鏈可變域一起形成針對Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點。

【0930】 62. 根據段落60之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

a)全長抗體，其特異性結合CEA且由兩條抗體重鏈及兩條抗體輕鏈組成；

其中該等重鏈與SEQ ID NO: 19或20之胺基酸1至450之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

且其中該等輕鏈與SEQ ID NO: 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致；

b)多肽，其由以下組成：

i)與SEQ ID NO: 9之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體重鏈可變域(VH)；或

ii)與SEQ ID NO: 9之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體重鏈恆定域(CH1)；或

iii)與SEQ ID NO: 9之重鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體重鏈可變域(VH)及抗體輕鏈恆定域(CL)；

其中該多肽經由肽連接子以該VH結構域之N端與該全長抗體之兩條重鏈中之一條的C端融合；

c)多肽，其由以下組成：

iii)與SEQ ID NO: 10之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的抗體輕鏈可變域(VL)；或

ii)與SEQ ID NO: 10之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體輕鏈恆定域(CL)；或

iii)與SEQ ID NO: 10之輕鏈可變域至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的該抗體輕鏈可變域(VL)及抗體重鏈恆定域(CH1)；

其中該多肽經由肽連接子以該VL結構域之N端與該全長抗體之兩條

重鏈中之另一條的C端融合；

且其中(b)下之該肽的該抗體重鏈可變域及(c)下之該肽的該抗體輕鏈可變域一起形成針對該Pb-DOTAM螯合物之抗原結合位點。

【0931】 63. 根據段落62之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

i)具有與SEQ ID NO: 22之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的第一重鏈，

ii)與SEQ ID NO: 23之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致的第二重鏈，

iii)與SEQ ID NO: 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之兩條抗體輕鏈。

【0932】 64. 根據段落62中任一段落之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

i)具有SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之第一重鏈；

ii)具有SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之第二重鏈；以及

iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【0933】 65. 根據段落62之使用之清除劑或方法，其中該多特異性或雙特異性抗體包含：

i)具有與SEQ ID NO: 19之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之胺基酸序列的第一重鏈，

ii)與SEQ ID NO: 20之重鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之第二重鏈，

iii)與SEQ ID NO: 21之輕鏈至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%一致之兩條抗體輕鏈。

【0934】 66. 根據段落62之使用之清除劑或方法，其中該多特异性或雙特异性抗體包含：

i)具有SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之第一重鏈；

ii)具有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之第二重鏈；以及

iii)具有SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之兩條抗體輕鏈。

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)

<120> 螯合型放射核種之抗體

<130> 007470503

<140> TW 108113285

<141> 2019-04-16

<150> US 62/658,468

<151> 2018-04-16

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-213

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Ser Met Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-213

<400> 2

Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

I874314

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈 CDR3 <Pb-Dot am> PRIT-213

<400> 3

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR1 <Pb-Dot am> PRIT-213

<400> 4

Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR2 <Pb-Dot am> PRIT-213

<400> 5

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR3 <Pb-Dot am> PRIT-213

<400> 6

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly

I874314

1 5 10

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> <Pb-Dot am> PRIT-213之重鏈可變域1

<400> 7

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

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

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

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

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

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

I874314

<220>

<223> 輕鏈可變域<Pb-Dotam> PRIT-213

<400> 8

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

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp Asn
20 25 30

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

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

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

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

Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變域<Pb-Dotam> PRIT-214

<400> 9

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

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

I874314

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

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

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

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

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域<Pb-Dotam> PRIT-214

<400> 10

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

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp Asn
20 25 30

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

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

I874314

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

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

Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR1 <CEA>

<400> 11

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met His
1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR2 <CEA>

<400> 12

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

I874314

<220>

<223> 重鏈CDR3 <CEA>

<400> 13

Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR1 <CEA>

<400> 14

Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His

1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR2 <CEA>

<400> 15

Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR3 <CEA>

<400> 16

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

I874314

<210> 17
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈可變域<CEA> 84.66

<400> 17

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域<CEA> 84.66

I874314

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 591

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特異性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-214 VH_84.66之重鏈1

<400> 19

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

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

I874314

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu
465 470 475 480

Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Phe
485 490 495

Ser Leu Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
500 505 510

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr
515 520 525

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys
530 535 540

Asn Gln Val Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
545 550 555 560

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr
565 570 575

Pro Pro His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 20
<211> 581
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 雙特异性三價<CEA/Pb-Dot am> PRIT-214 VL_84.66之重鏈2

<400> 20

I874314

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

I874314

195

200

205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
465 470 475 480

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His
485 490 495

Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
500 505 510

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly
515 520 525

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
530 535 540

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu
545 550 555 560

Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr
565 570 575

Lys Val Glu Ile Lys
580

<210> 21

I874314

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈<CEA> 84.66

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

I874314

165

170

175

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

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

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

<210> 22

<211> 591

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特异性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-213 VH_84.66之重鏈1 ->杵

<400> 22

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

I874314

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu
465 470 475 480

Val Lys Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
485 490 495

I874314

Ser Leu Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
500 505 510

Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr
515 520 525

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
530 535 540

Ser Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
545 550 555 560

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr
565 570 575

Pro Pro His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 23

<211> 581

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特異性三價<CEA/Pb-Dotam> PRIT-213 VL_84.66之重鏈2 ->白

<400> 23

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

I874314

260

265

270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

I874314

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
465 470 475 480

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His
485 490 495

Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
500 505 510

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly
515 520 525

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
530 535 540

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu
545 550 555 560

Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr
565 570 575

Lys Val Glu Ile Lys
580

<210> 24
<211> 581
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 雙特異性<CEA/Pb-Dot am>兔Dot am _84.66重鏈1

<400> 24

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

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

I874314

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly

I874314

225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val
465 470 475 480

Ser Pro Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser His
485 490 495

Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly
500 505 510

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly
515 520 525

Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu
530 535 540

Thr Ile Ser Gly Val Gln Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu
545 550 555 560

Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr
565 570 575

Glu Val Val Val Lys
580

<210> 25

<211> 589

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特异性四價<CEA/Pb-Dot am>兔Dot am_84.66之重鏈2

I874314

<400> 25

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 450 455 460

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu
 465 470 475 480

Val Thr Pro Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe
 485 490 495

Ser Leu Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 500 505 510

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr
 515 520 525

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Thr Ser Thr Thr
 530 535 540

Val Asp Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 545 550 555 560

Phe Cys Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro
 565 570 575

His Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 580 585

I874314

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 26

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

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 27
<211> 1379
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Immunomedics hNM14

<400> 27

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

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

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

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly 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 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp
355 360 365

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr
465 470 475 480

Pro Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
485 490 495

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510

Glu Trp Ile Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser
515 520 525

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp
530 535 540

Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
545 550 555 560

Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu
565 570 575

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Val Gln Leu Val
580 585 590

Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
595 600 605

Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr Trp Met Ser Trp Val
610 615 620

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile His Pro
625 630 635 640

Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys Asp Arg Phe Thr
645 650 655

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser
660 665 670

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Ser Leu Tyr Phe
675 680 685

I874314

Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val
690 695 700

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
705 710 715 720

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
725 730 735

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
740 745 750

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
755 760 765

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
770 775 780

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
785 790 795 800

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
805 810 815

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
820 825 830

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
835 840 845

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
850 855 860

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
865 870 875 880

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
885 890 895

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 900 905 910

Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 915 920 925

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 930 935 940

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
 945 950 955 960

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 965 970 975

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 980 985 990

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 995 1000 1005

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 1010 1015 1020

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
 1025 1030 1035

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1040 1045 1050

Gly Ser Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Pro Ala
 1055 1060 1065

Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser His Ser Val
 1070 1075 1080

I874314

Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln
1085 1090 1095

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly
1100 1105 1110

Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
1115 1120 1125

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
1130 1135 1140

Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly
1145 1150 1155

Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
1160 1165 1170

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
1175 1180 1185

Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala Trp Tyr Gln
1190 1195 1200

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser
1205 1210 1215

Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
1220 1225 1230

Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
1235 1240 1245

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser Phe
1250 1255 1260

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
1265 1270 1275

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 1280 1285 1290

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 1295 1300 1305

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 1310 1315 1320

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 1325 1330 1335

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 1340 1345 1350

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 1355 1360 1365

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1370 1375

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR1 <ERBB2>

<400> 28

Asp Thr Tyr Ile His

1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

I874314

<223> 重鏈CDR2 <ERBB2>

<400> 29

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

Gly

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR3 <ERBB2>

<400> 30

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR1 <ERBB2>

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR2 <ERBB2>

<400> 32

I874314

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR3 <ERBB2>

<400> 33

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 34

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變域<ERBB2>

<400> 34

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 Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

I874314

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變域<ERBB2>

<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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

<210> 36
<211> 590

I874314

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特异性三價ERbB2/Pb-Dotam (P1AD9827)之重鏈1 (杵)

<400> 36

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 Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

165

170

175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val
465 470 475 480

Lys Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser
485 490 495

Leu Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala
500 505 510

Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala
515 520 525

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser
530 535 540

Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr
545 550 555 560

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro

565

570

575

Pro His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

<210> 37

<211> 580

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特異性三價 ERbB2/Pb-Dot am (P1AD9827)之重鏈2 (白)

<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 Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 465 470 475 480

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His Ser
 485 490 495

Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 500 505 510

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
 515 520 525

I874314

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
530 535 540

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
545 550 555 560

Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys
565 570 575

Val Glu Ile Lys
580

<210> 38

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈<ErbB2> (P1AD9827)

<400> 38

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 Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

I874314

Thr Phe Gly Gln 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> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR1 <CD20>

<400> 39

Tyr Ser Trp Ile Asn
1 5

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR2 <CD20>

<400> 40

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR3 <CD20>

<400> 41

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
1 5 10

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR1 <CD20>

<400> 42

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR2 <CD20>

I874314

<400> 43

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR3 CD20>

<400> 44

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈可變域<CD20>

<400> 45

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

I874314

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈可變域<CD20>

<400> 46

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

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

I874314

<210> 47
<211> 589
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 雙特異性三價CD20/Pb-Dotam (P1AD9826)之重鏈1 (杵)

<400> 47

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val 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

I874314

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 Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

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

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

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

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

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly 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 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp

I874314

355

360

365

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys
465 470 475 480

Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
485 490 495

Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
500 505 510

Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser
515 520 525

Trp Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln
530 535 540

Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr
545 550 555 560

Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro
565 570 575

His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585

<210> 48

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 雙特異性三價CD20/Pb-Dotam (P1AD9826)之重鏈2 (白)

<400> 48

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val 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 Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
450 455 460

Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
465 470 475 480

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His Ser Val
485 490 495

Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
515 520 525

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
530 535 540

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly
545 550 555 560

Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
565 570 575

Glu Ile Lys

<210> 49

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈<CD20> (P1AD9826)

<400> 49

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 50

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1766 >CEA輕鏈RK

<400> 50

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
 115 120 125

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

I874314

<210> 51
<211> 687
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有DOTAM VL/CH1之P1AE1766 CEA重鏈

<400> 51

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
465 470 475 480

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
485 490 495

His Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
500 505 510

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
515 520 525

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
530 535 540

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

I874314

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly
565 570 575

Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
580 585 590

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
595 600 605

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
625 630 635 640

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
645 650 655

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
660 665 670

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680 685

<210> 52

<211> 699

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有DOTAM VH/CK之P1AE1766 CEA重鏈

<400> 52

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

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

I874314

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val
465 470 475 480

Leu Val Lys Pro Thr Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
485 490 495

Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
500 505 510

Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr
515 520 525

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser
530 535 540

Lys Ser Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr
545 550 555 560

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala
565 570 575

Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
580 585 590

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
595 600 605

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
610 615 620

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
625 630 635 640

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 645 650 655

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 660 665 670

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 675 680 685

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695

<210> 53

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有VH/CK之P1AE1767 >DOTAM 「LC」

<400> 53

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

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

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

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

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

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

I874314

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
130 135 140

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
145 150 155 160

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
165 170 175

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
180 185 190

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
195 200 205

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
210 215 220

Arg Gly Glu Cys
225

<210> 54

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1767 CEA輕鏈RK

<400> 54

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

I874314

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

I874314

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 55
<211> 687
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有DOTAM VL/CH1之P1AE1767 CEA重鏈(杵)

<400> 55

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 465 470 475 480

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
 485 490 495

His Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 500 505 510

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 515 520 525

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 530 535 540

I874314

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly
565 570 575

Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
580 585 590

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
595 600 605

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

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
625 630 635 640

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
645 650 655

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
660 665 670

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680 685

<210> 56

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1767 CEA重鏈(白)

<400> 56

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

I874314

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 57

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1768 >CEA LC

<400> 57

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

I874314

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 58
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有VL/CH1之P1AE1768> DOTAM重鏈(白)

<400> 58

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

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp Asn
20 25 30

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

I874314

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

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

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

Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser
100 105 110

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

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
 340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

I874314

<210> 59
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE1768 CEA重鏈(杵)

<400> 59

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 60

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1768 DOTAM 「LC」 VH/CK

<400> 60

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

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

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

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

I874314

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

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
130 135 140

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
145 150 155 160

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
165 170 175

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
180 185 190

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
195 200 205

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
210 215 220

Arg Gly Glu Cys
225

<210> 61

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

I874314

<220>

<223> 具有VH/CK之P1AE1769 DOTAM 「LC」

<400> 61

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

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

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

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

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

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
130 135 140

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
145 150 155 160

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
165 170 175

I874314

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
180 185 190

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
195 200 205

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
210 215 220

Arg Gly Glu Cys
225

<210> 62

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1769 CEA LC

<400> 62

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

I874314

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 63

<211> 678

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有CEA VH/CH1/DOTAM VL/CH1之P1AE1769 CEA HC (白)

<400> 63

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

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

I874314

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln
225 230 235 240

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
 245 250 255

Cys Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr
 260 265 270

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser
 275 280 285

Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 290 295 300

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 305 310 315 320

Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly
 325 330 335

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 340 345 350

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 355 360 365

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 385 390 395 400

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 405 410 415

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 420 425 430

I874314

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
435 440 445

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
450 455 460

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
465 470 475 480

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
485 490 495

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
500 505 510

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
515 520 525

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
530 535 540

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly
545 550 555 560

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
565 570 575

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
580 585 590

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
595 600 605

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
610 615 620

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
645 650 655

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
660 665 670

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
675

<210> 64

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1769 CEA HC (杵)

<400> 64

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 65
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AE1770 CEA LC

<400> 65

I874314

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser
115 120 125

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

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

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

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

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

I874314

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 66

<211> 945

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有DOTAM scFab: DOTAM VL/Ck/連接子/VH CH1之P1AE1770
CEA HC (杵)

<400> 66

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

I874314

130

135

140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
465 470 475 480

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser
485 490 495

His Ser Val Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
500 505 510

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
515 520 525

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

I874314

530

535

540

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly
565 570 575

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
580 585 590

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
595 600 605

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
610 615 620

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
625 630 635 640

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
645 650 655

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
660 665 670

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
675 680 685

Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
690 695 700

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
705 710 715 720

Gly Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
725 730 735

I874314

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
740 745 750

Ser Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
755 760 765

Gly Phe Ile Gly Ser Arg Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
770 775 780

Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
785 790 795 800

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
805 810 815

Arg Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp
820 825 830

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
835 840 845

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
850 855 860

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
885 890 895

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
900 905 910

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
915 920 925

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

I874314

930

935

940

Cys

945

<210> 67

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AE1770 CEA HC (白)

<400> 67

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

I874314

130

135

140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 68

<211> 496

<212> PRT

<213> 智人軟骨蛋白

<400> 68

Met Arg Val Leu Ser Gly Thr Ser Leu Met Leu Cys Ser Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala Leu Cys Ser Pro Gly Leu Ala Pro Gln Ser Arg Gly
20 25 30

His Leu Cys Arg Thr Arg Pro Thr Asp Leu Val Phe Val Val Asp Ser
35 40 45

Ser Arg Ser Val Arg Pro Val Glu Phe Glu Lys Val Lys Val Phe Leu
50 55 60

Ser Gln Val Ile Glu Ser Leu Asp Val Gly Pro Asn Ala Thr Arg Val
65 70 75 80

Gly Met Val Asn Tyr Ala Ser Thr Val Lys Gln Glu Phe Ser Leu Arg
85 90 95

Ala His Val Ser Lys Ala Ala Leu Leu Gln Ala Val Arg Arg Ile Gln
100 105 110

Pro Leu Ser Thr Gly Thr Met Thr Gly Leu Ala Ile Gln Phe Ala Ile
115 120 125

Thr Lys Ala Phe Gly Asp Ala Glu Gly Gly Arg Ser Arg Ser Pro Asp
130 135 140

Ile Ser Lys Val Val Ile Val Val Thr Asp Gly Arg Pro Gln Asp Ser
145 150 155 160

Val Gln Asp Val Ser Ala Arg Ala Arg Ala Ser Gly Val Glu Leu Phe
165 170 175

Ala Ile Gly Val Gly Ser Val Asp Lys Ala Thr Leu Arg Gln Ile Ala
180 185 190

Ser Glu Pro Gln Asp Glu His Val Asp Tyr Val Glu Ser Tyr Ser Val
195 200 205

Ile Glu Lys Leu Ser Arg Lys Phe Gln Glu Ala Phe Cys Val Val Ser
210 215 220

Asp Leu Cys Ala Thr Gly Asp His Asp Cys Glu Gln Val Cys Ile Ser
225 230 235 240

I874314

Ser Pro Gly Ser Tyr Thr Cys Ala Cys His Glu Gly Phe Thr Leu Asn
245 250 255

Ser Asp Gly Lys Thr Cys Asn Val Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
260 265 270

Ala Thr Asp Leu Val Phe Leu Ile Asp Gly Ser Lys Ser Val Arg Pro
275 280 285

Glu Asn Phe Glu Leu Val Lys Lys Phe Ile Ser Gln Ile Val Asp Thr
290 295 300

Leu Asp Val Ser Asp Lys Leu Ala Gln Val Gly Leu Val Gln Tyr Ser
305 310 315 320

Ser Ser Val Arg Gln Glu Phe Pro Leu Gly Arg Phe His Thr Lys Lys
325 330 335

Asp Ile Lys Ala Ala Val Arg Asn Met Ser Tyr Met Glu Lys Gly Thr
340 345 350

Met Thr Gly Ala Ala Leu Lys Tyr Leu Ile Asp Asn Ser Phe Thr Val
355 360 365

Ser Ser Gly Ala Arg Pro Gly Ala Gln Lys Val Gly Ile Val Phe Thr
370 375 380

Asp Gly Arg Ser Gln Asp Tyr Ile Asn Asp Ala Ala Lys Lys Ala Lys
385 390 395 400

Asp Leu Gly Phe Lys Met Phe Ala Val Gly Val Gly Asn Ala Val Glu
405 410 415

Asp Glu Leu Arg Glu Ile Ala Ser Glu Pro Val Ala Glu His Tyr Phe
420 425 430

Tyr Thr Ala Asp Phe Lys Thr Ile Asn Gln Ile Gly Lys Lys Leu Gln
435 440 445

Lys Lys Ile Cys Val Glu Glu Asp Pro Cys Ala Cys Glu Ser Leu Val
 450 455 460

Lys Phe Gln Ala Lys Val Glu Gly Leu Leu Gln Ala Leu Thr Arg Lys
 465 470 475 480

Leu Glu Ala Val Ser Lys Arg Leu Ala Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
 485 490 495

<210> 69

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 三聚結構域序列

<400> 69

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

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

Ile Leu Glu Asn Thr Val Val
 35

<210> 70

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> rbHC.up

<400> 70

aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc

37

<210> 71

<211> 21

I874314

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> <http://rbHCf.do>

<400> 71

ccattggtga ggggtgcccg a g

21

<210> 72

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> rbLC.up

<400> 72

aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc

34

<210> 73

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> <http://rbLC.do>

<400> 73

cagagtrctg ctgaggttgt aggtac

26

<210> 74

<211> 579

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Immunomedics hNM14

<400> 74

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

I874314

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 450 455 460

Gly Gly Gly Ser Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Pro
 465 470 475 480

Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser His Ser Val
 485 490 495

Tyr Ser Asp Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln Pro
 500 505 510

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Ser
 515 520 525

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile
 530 535 540

Ser Gly Val Gln Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly
 545 550 555 560

Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
 565 570 575

Val Val Lys

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LC1

I874314

<400> 75

Ser 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 Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp
20 25 30

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

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

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

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

Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 76

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LC3

<400> 76

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

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

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

Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 77

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HC7

<400> 77

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

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

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

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

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

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

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CH1A1A VH

<400> 78

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

I874314

<210> 79
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CH1A1A VL

<400> 79

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 Ala Ala Val Gly Thr Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg 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 His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 80
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P1AA1227_HC

<400> 80

I874314

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

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

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

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

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

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Glu Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Gly Ala Tyr Pro Pro His Leu Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

I874314

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

<210> 81

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P1AA1227_LC

<400> 81

Ser 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 Gln Ser Ser His Ser Val Tyr Ser Asp
20 25 30

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

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

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

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

Glu Ser Asp Thr Tyr Gly Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Immunomedics hNM14

<400> 82

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

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

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

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

I874314

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種抗體，其包含對DOTAM-鉛(Pb)螯合物具有特異性之抗原結合位點，其中該抗原結合位點至少包含：

a)重鏈CDR1，其包含胺基酸序列GFSLSTYSMS (SEQ ID NO: 1)；

b)重鏈CDR2，其包含胺基酸序列FIGSRGDTYYASWAKG (SEQ ID NO: 2)；

c)重鏈CDR3，其包含胺基酸序列ERDPYGGGAYPPHL (SEQ ID NO: 3)；

d)輕鏈CDR1，其包含胺基酸序列QSSHSVYSDNDLA (SEQ ID NO: 4)；

e)輕鏈CDR2，其包含胺基酸序列QASKLAS (SEQ ID NO: 5)；及

f)輕鏈CDR3，其包含胺基酸序列LGGYDDESPTYG (SEQ ID NO: 6)；

其中編號係根據Kabat。

【請求項2】

如請求項1之抗體，其為人類、嵌合或人類化抗體。

【請求項3】

如請求項1或2之抗體，其中

i) 該抗原結合位點包含重鏈可變域，該重鏈可變域包含選自由SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO 9組成之群之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 7或SEQ ID NO: 9具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii) 該抗原結合位點包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含選自由SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 10組成之群之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 10具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體。

【請求項4】

如請求項1或2之抗體，其中

i) 該抗原結合位點包含重鏈可變域及輕鏈可變域，該重鏈可變域包含SEQ ID NO. 7之胺基酸序列，且該輕鏈可變域包含SEQ ID NO.8之胺基酸序列；或

ii) 該抗原結合位點包含重鏈可變域及輕鏈可變域，該重鏈可變域包含SEQ ID NO. 9之胺基酸序列，且該輕鏈可變域包含SEQ ID NO.10之胺基酸序列。

【請求項5】

如請求項1或2之抗體，其中該抗原結合位點以100 pM、50 pM、20 pM、10 pM、5 pM、1 pM或更少之Kd值結合於該Pb-DOTAM螯合物。

【請求項6】

如請求項1或2之抗體，其中該抗原結合位點結合於該Pb-DOTAM螯合物且結合於Bi-DOTAM螯合物，且其中針對該Bi-DOTAM螯合物及/或該Pb-DOTAM螯合物之Kd值之比率在0.1-10或1-10範圍內。

【請求項7】

如請求項1或2之抗體，其為完全抗體，或為選自由Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙功能抗體、線抗體或單鏈抗體分子組成之群的抗體片段。

【請求項8】

如請求項1或2之抗體，其中該抗體與特異性結合於標靶抗原之部分(moiety)偶合。

【請求項9】

如請求項8之抗體，其中該標靶抗原為腫瘤特異性抗原。

【請求項10】

如請求項8之抗體，其為多特異性或雙特異性抗體。

【請求項11】

如請求項10之抗體，其中該腫瘤特異性抗原係選自由CEA、HER2及CD20組成之群。

【請求項12】

如請求項10之抗體，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CEA具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CEA具有特異性之抗原結合位點包含重鏈，其包含至少一個、兩個或三個選自以下之重鏈CDR：

a)重鏈CDR1，其包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；

b)重鏈CDR2，其包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；

c)重鏈CDR3，其包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；

及/或該對CEA具有特異性之抗原結合位點包含輕鏈，其包含至少一個、兩個或三個選自以下之輕鏈CDR：

d)輕鏈CDR1，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 14；

e)輕鏈CDR2，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15；

f)輕鏈CDR3，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 16。

【請求項13】

如請求項10之抗體，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對該Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CEA具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CEA具有特異性之抗原結合位點包含：

i)重鏈可變域，其包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 17具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii)輕鏈可變域，其包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 18具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體。

【請求項14】

如請求項10之抗體，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對HER2具有特異性之抗原結合位點，且其中該對HER2具有特異性之抗原結合位點包含選自以下之至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個CDR：(a)包含SEQ ID NO: 28之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 29之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 32之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 33之胺基酸序列之CDR-L3。

【請求項15】

如請求項10之抗體，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個

對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對HER2具有特異性之抗原結合位點，且其中該對HER2具有特異性之抗原結合位點包含：

i)重鏈可變域，其包含SEQ ID NO: 34之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 34具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii)輕鏈可變域，其包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 35具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體。

【請求項16】

如請求項10之抗體，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CD20具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CD20具有特異性之抗原結合位點包含選自以下之至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個CDR：(a)包含SEQ ID NO: 39之胺基酸序列之CDR-H1；(b)包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之CDR-H2；(c)包含SEQ ID NO: 41之胺基酸序列之CDR-H3；(d)包含SEQ ID NO: 42之胺基酸序列之CDR-L1；(e)包含SEQ ID NO: 43之胺基酸序列之CDR-L2；以及(f)包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列之CDR-L3。

【請求項17】

如請求項10之抗體，其中該多特異性或雙特異性抗體包含至少一個對Pb-DOTAM螯合物具有特異性之抗原結合位點及至少一個對CD20具有特異性之抗原結合位點，且其中該對CD20具有特異性之抗原結合位點包

含：

i)重鏈可變域，其包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 45具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體；及/或

ii)輕鏈可變域，其包含SEQ ID NO: 46之胺基酸序列或包含與SEQ ID NO: 46具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性之胺基酸序列的其變異體。

【請求項18】

如請求項10之抗體，其包含Fc區。

【請求項19】

如請求項18之抗體，其中該Fc區經工程改造以降低效應子功能。

【請求項20】

如請求項19之抗體，其中藉由將該Fc區之殘基234、235、238、265、269、270、297、327及/或329中之一或多者取代而將該Fc區經工程改造。

【請求項21】

如請求項18之抗體，其包含：

i)包含針對第一抗原之抗原結合位點的全長抗體；以及

ii)至少一個第二重鏈可變域及第二輕鏈可變域，其等一起形成針對第二抗原之抗原結合位點，

其中該第一抗原或該第二抗原為該Pb-DOTAM螯合物，且另一抗原為該標靶抗原。

【請求項22】

如請求項21之抗體，其中該第一抗原為該標靶抗原且該第二抗原為該Pb-DOTAM螯合物。

【請求項23】

如請求項21之抗體，其包含全長抗體，該全長抗體包含針對該第一抗原之抗原結合位點，其中該等重鏈中之一者的N端或C端經由多肽連接子連接於第一多肽，且其中該第一多肽與第二多肽締合形成包含針對該第二抗原之結合位點的Fab或交叉Fab。

【請求項24】

如請求項23之抗體，其包含：

i)由VH結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VL及CL結構域組成之第二多肽締合；或

ii)由VL結構域及CH1結構域組成之第一多肽，其與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合；或

iii)由VH結構域及CL結構域組成之第一多肽，其與由VL及CH1結構域組成之第二多肽締合；

使得該第一多肽及該第二多肽一起形成針對該第二抗原之抗原結合位點。

【請求項25】

如請求項24之抗體，其包含全長抗體，該全長抗體包含針對該第一抗原之抗原結合位點，其中該等重鏈中之一者的C端經由多肽連接子連接於由VL結構域及CH1結構域組成之第一多肽，該第一多肽與由VH及CL結構域組成之第二多肽締合。

【請求項26】

一種分離之多核苷酸或分離之多核苷酸集合，其編碼如請求項1至25中任一項之抗體。

【請求項27】

一種表現載體或表現載體集合，其包含如請求項26之多核苷酸或多核苷酸集合。

【請求項28】

一種原核或真核宿主細胞，其包含如請求項26之分離之多核苷酸或分離之多核苷酸集合。

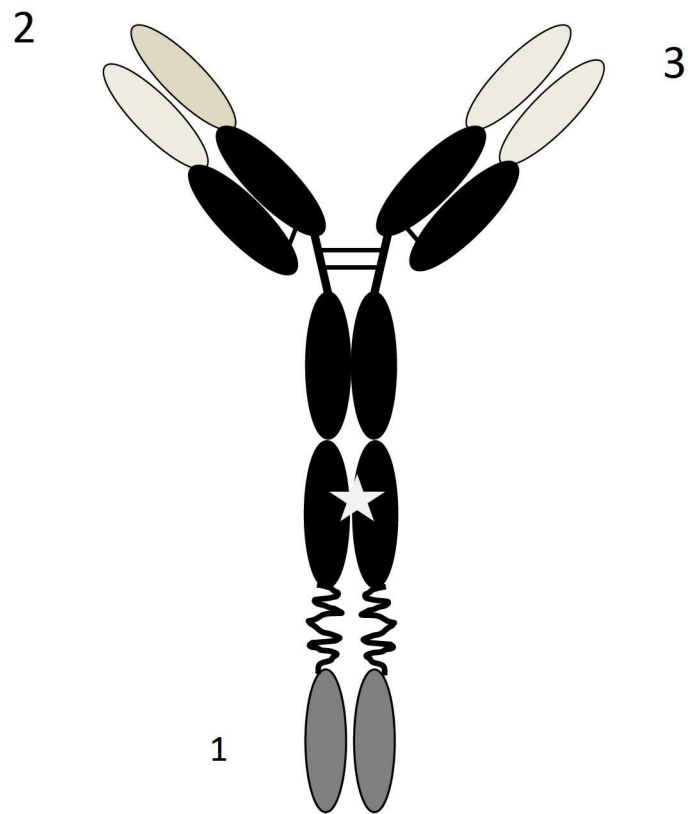
【請求項29】

如請求項28之原核或真核宿主細胞，其包含如請求項27之載體或載體集合。

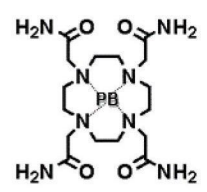
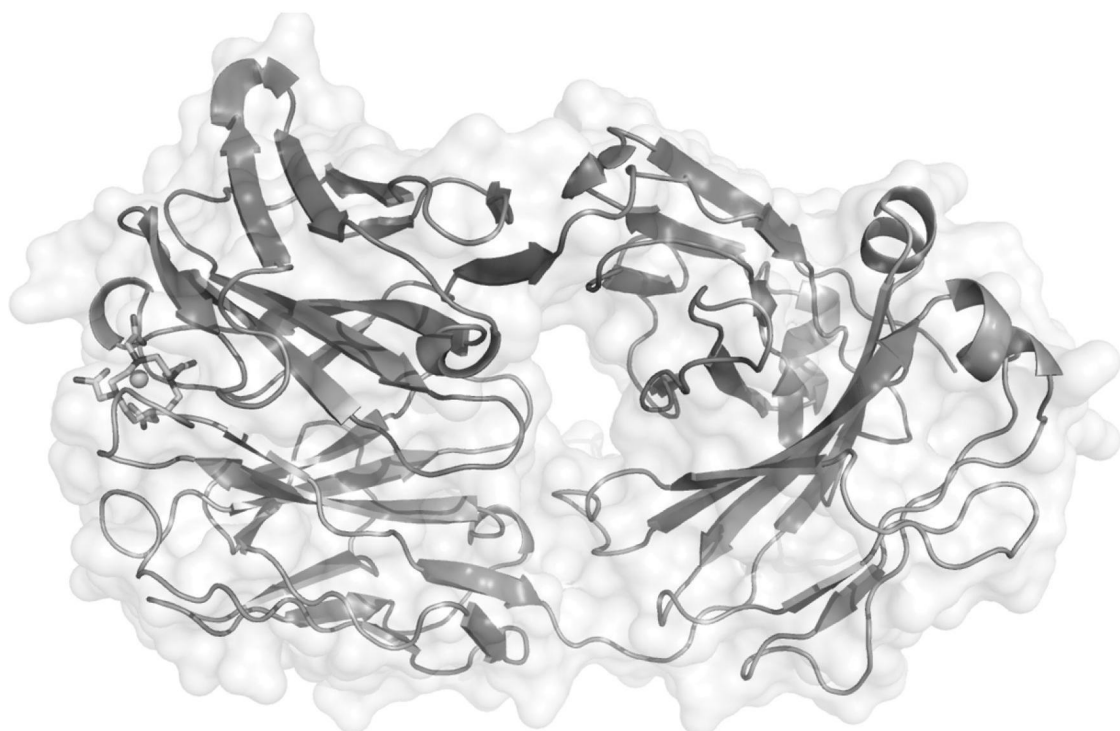
【請求項30】

一種產生如請求項1至25中任一項之抗體的方法，其包含自如請求項28或29之宿主細胞表現該抗體。

【發明圖式】

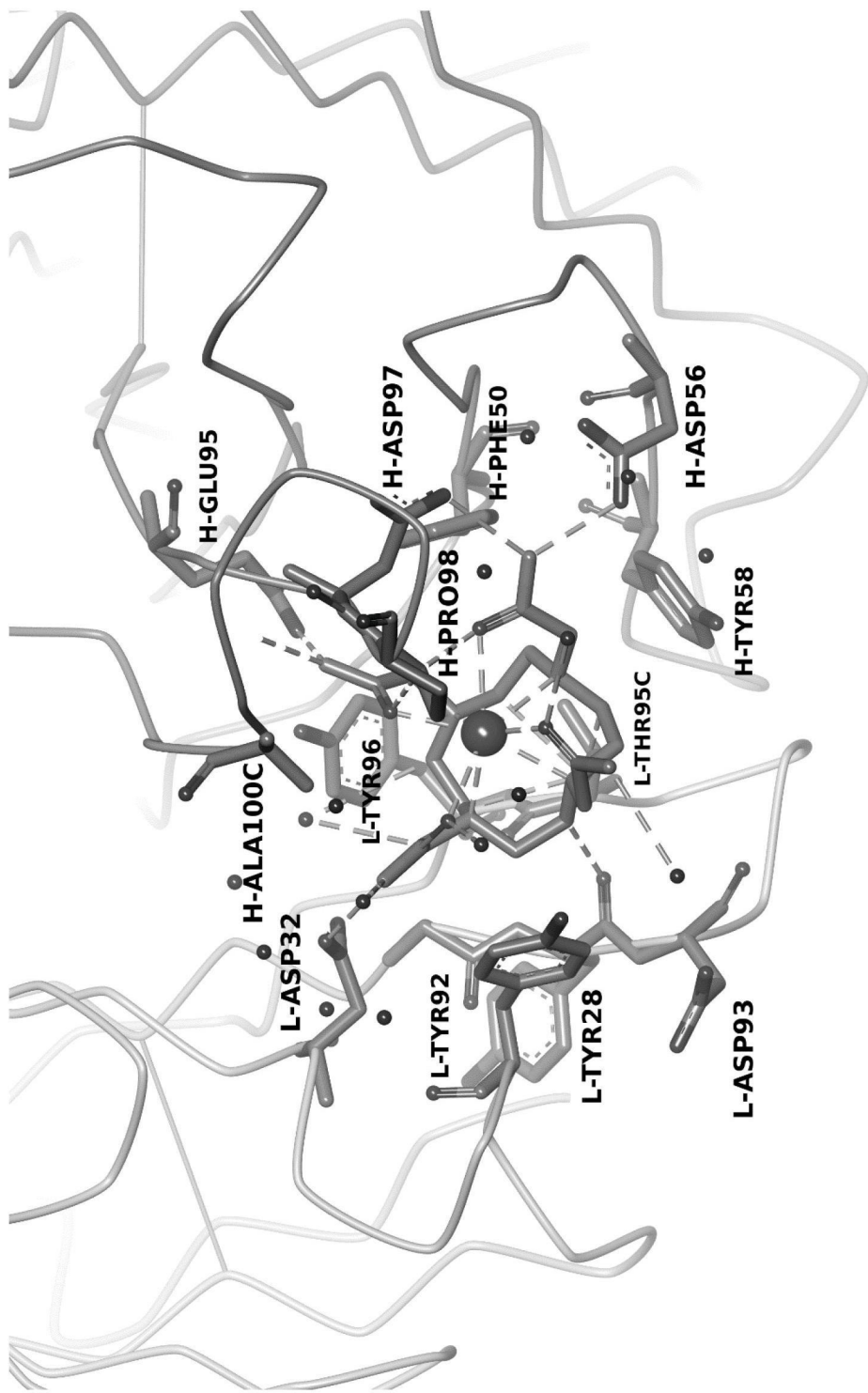


【圖1】



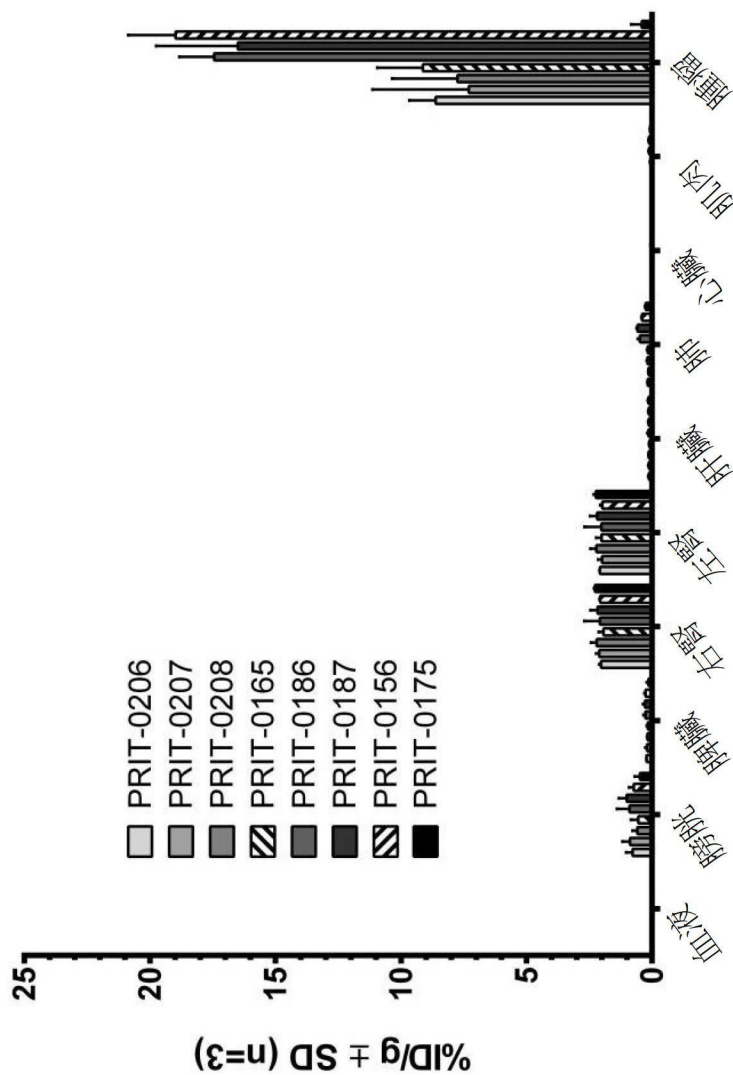
Fab PRIT-0213

【圖2】



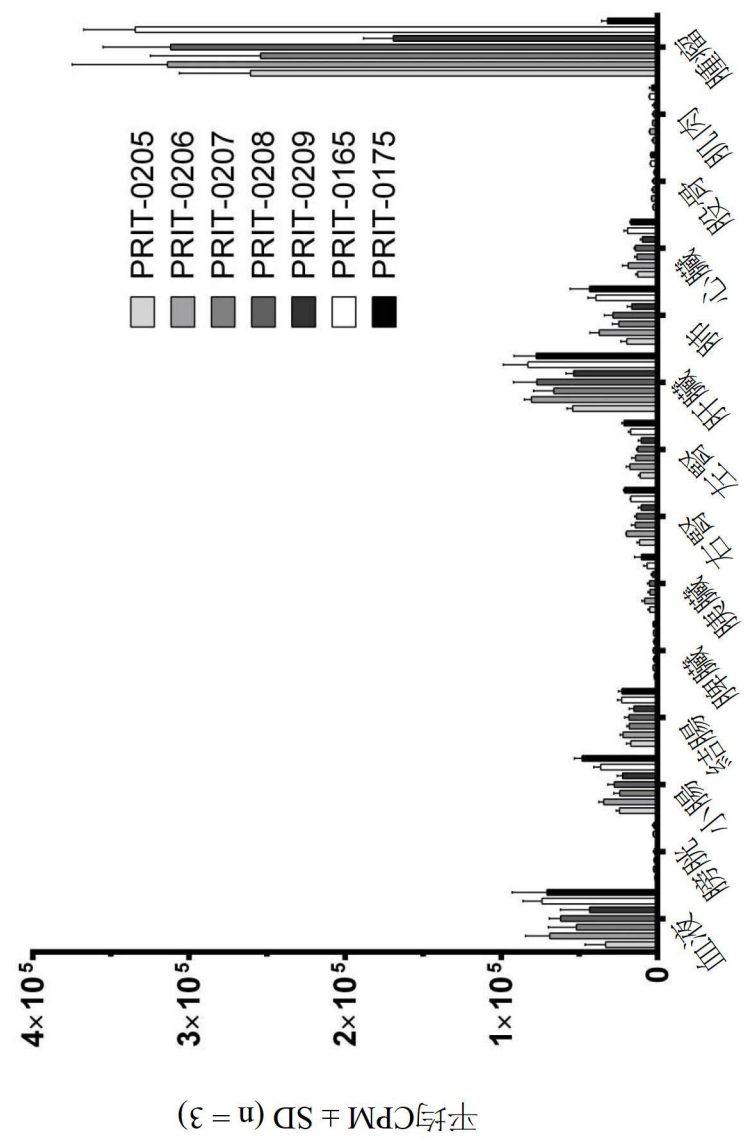
【圖3】

²¹²Pb-DOTAM生物分佈(皮下BxPC3模型)



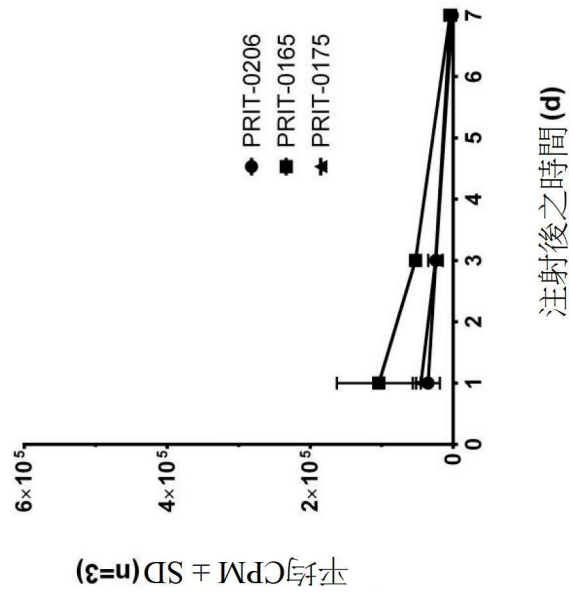
【圖4】

²⁰³Pb-DOTAM-bsAb生物分佈(皮下BxPC3模型)

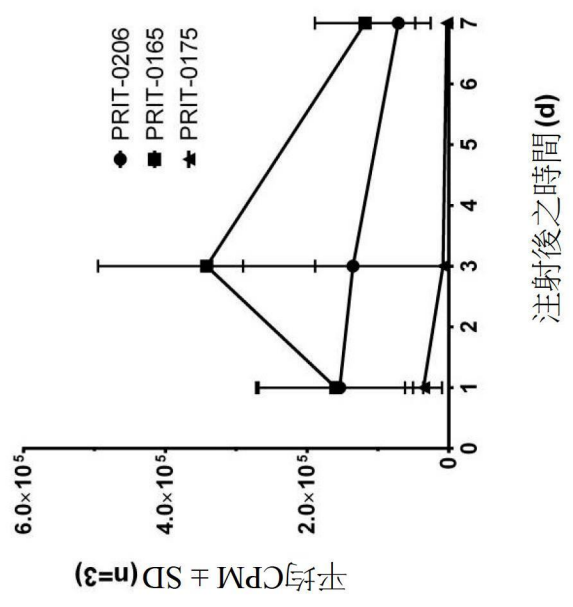


【圖5】

²⁰³Pb-DOTAM-bsAb之血液清除

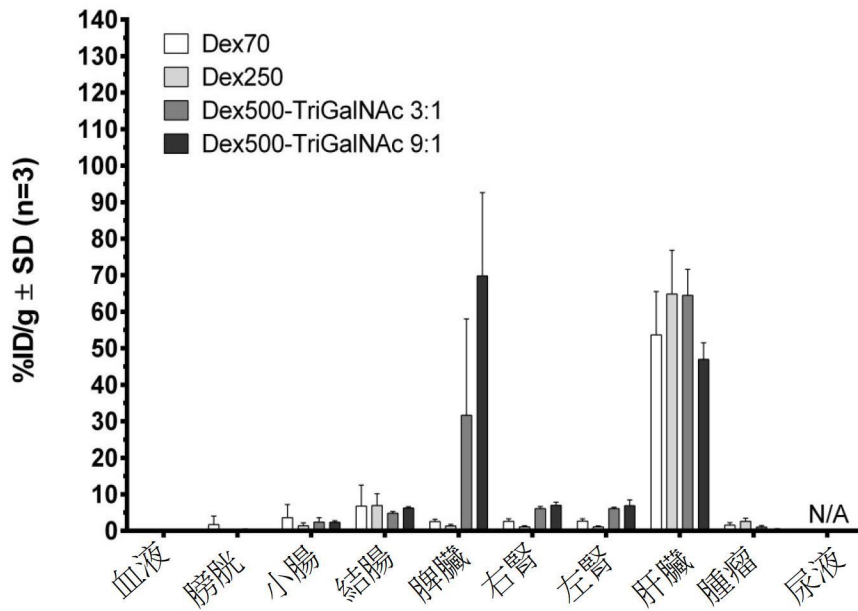


²⁰³Pb-DOTAM-bsAb之腫瘤累積



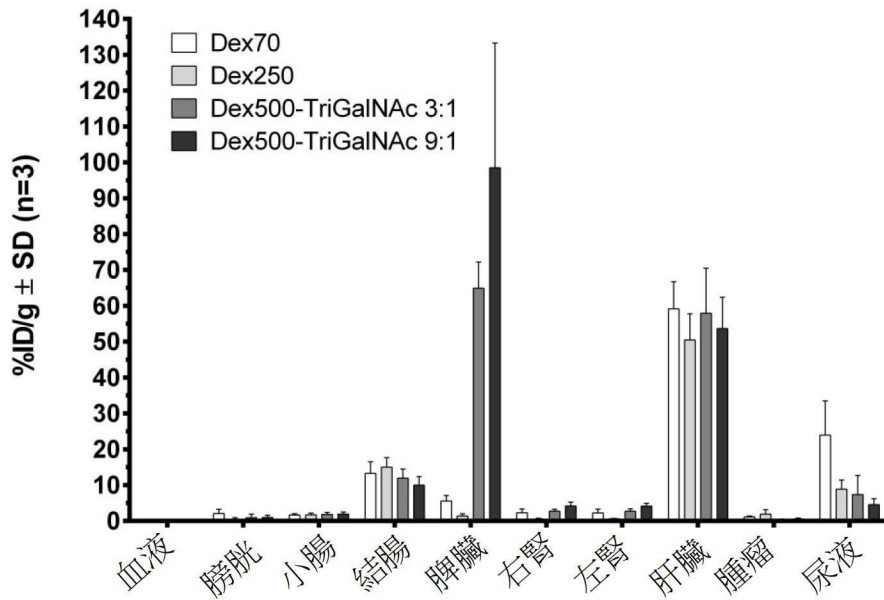
【圖6】

²¹²Pb-CA生物分佈(皮下MKN45模型) 2 h p.i.



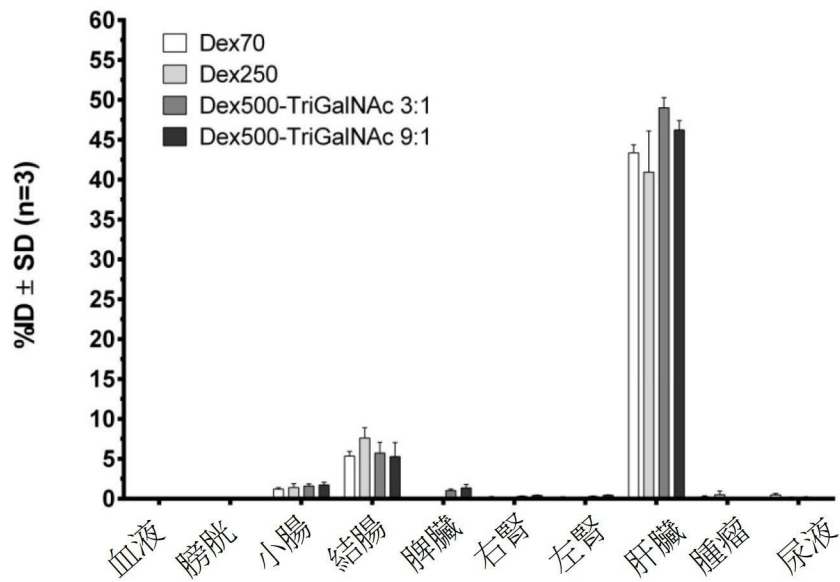
【圖7】

²¹²Pb-CA生物分佈(皮下MKN45模型) 24 h p.i.



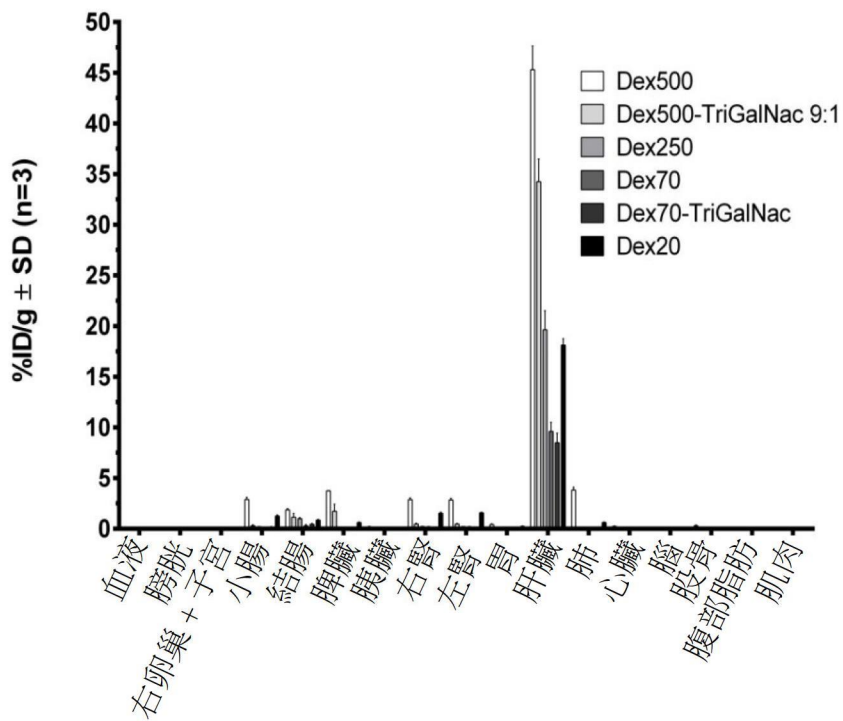
【圖8】

²¹²Pb-CA生物分佈(皮下MKN45模型) 24 h p.i.



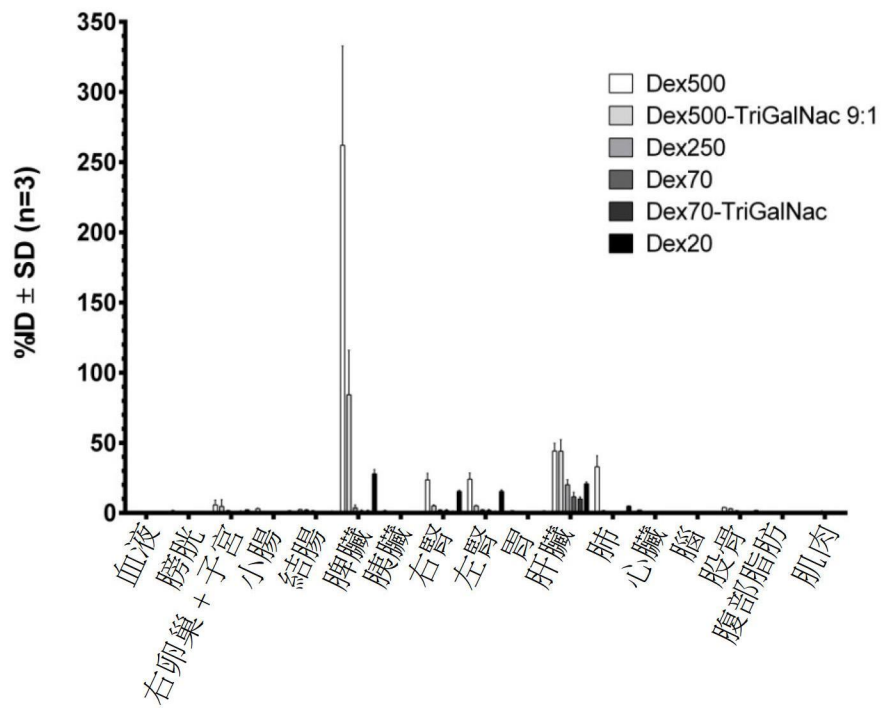
【圖9】

無腫瘤小鼠中²⁰³Pb-CA生物分佈，注射後1週



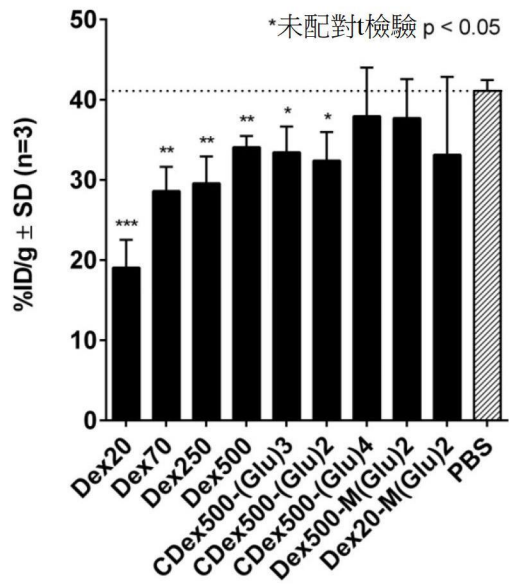
【圖10】

無腫瘤小鼠中²⁰³Pb-CA生物分佈，注射後1週



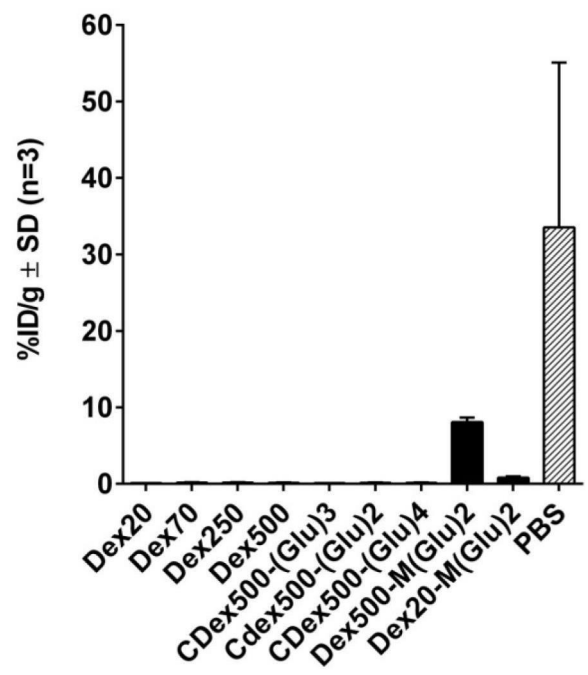
【圖11】

血液中之²¹²Pb-DOTAM含量，4 h p.i.



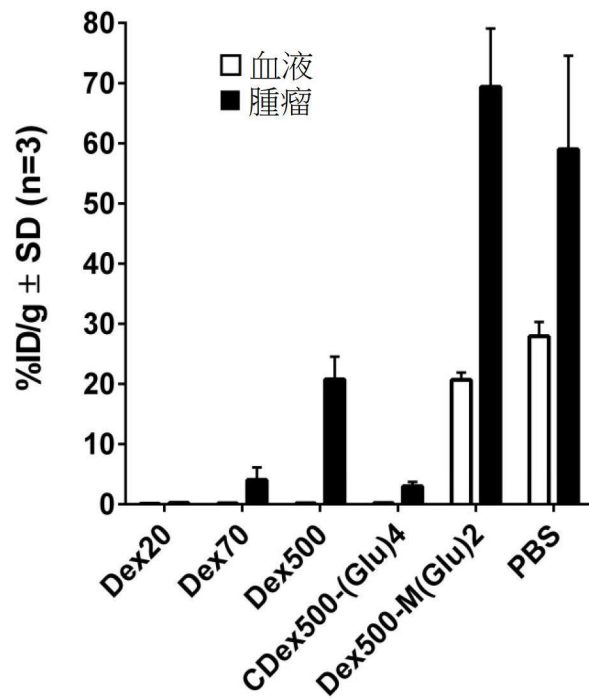
【圖12】

血液中之²¹²Pb-DOTAM含量，24 h p.i.



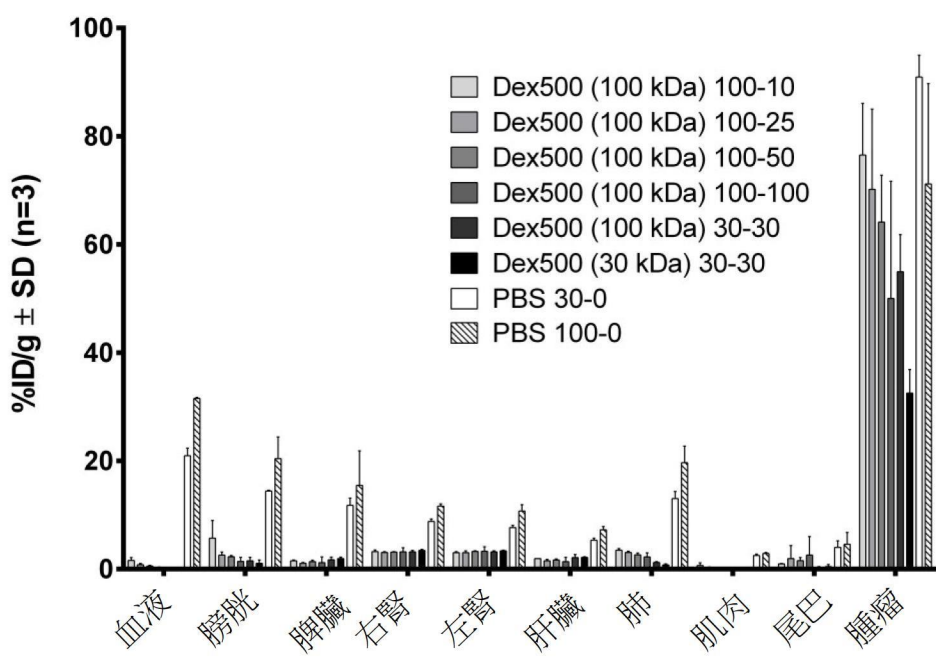
【圖13】

²¹²Pb-DOTAM腫瘤吸收(皮下BxPC3)



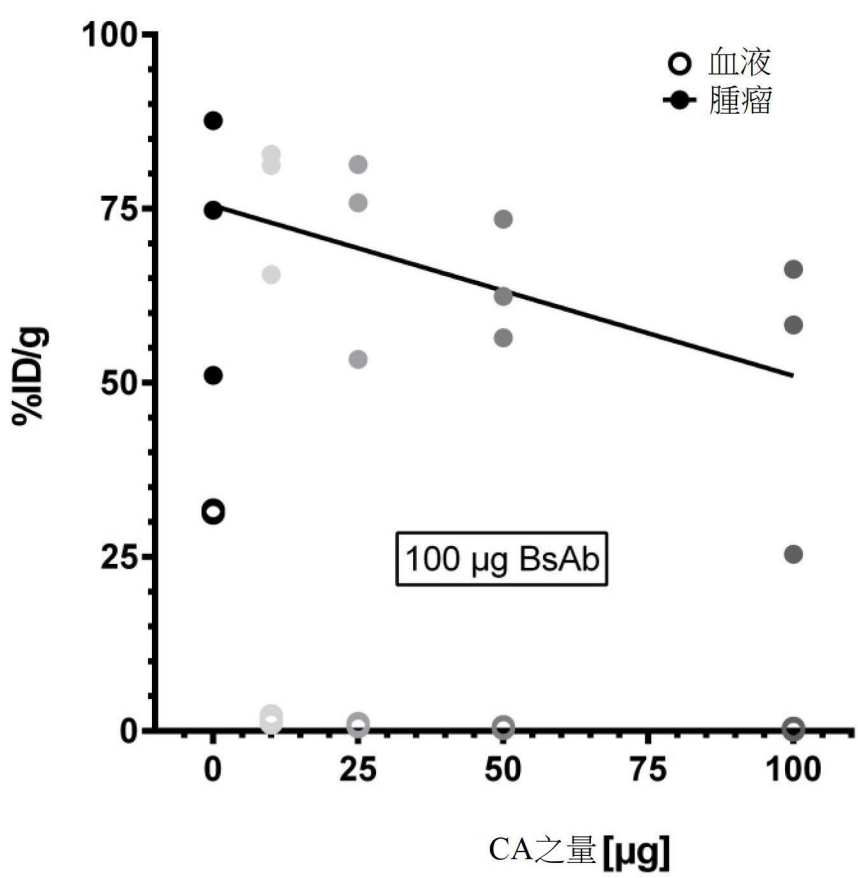
【圖14】

²¹²Pb-DOTAM生物分佈(皮下BxPC3模型)



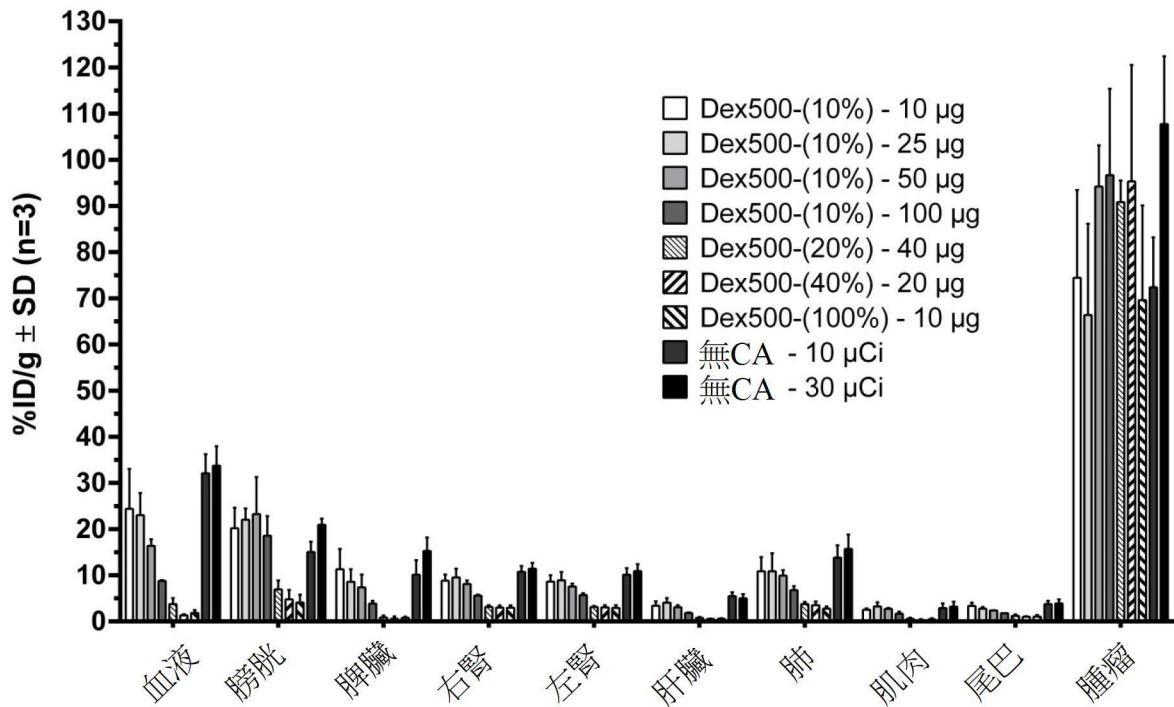
【圖15】

²¹²Pb-DOTAM生物分佈(皮下BxPC3模型)

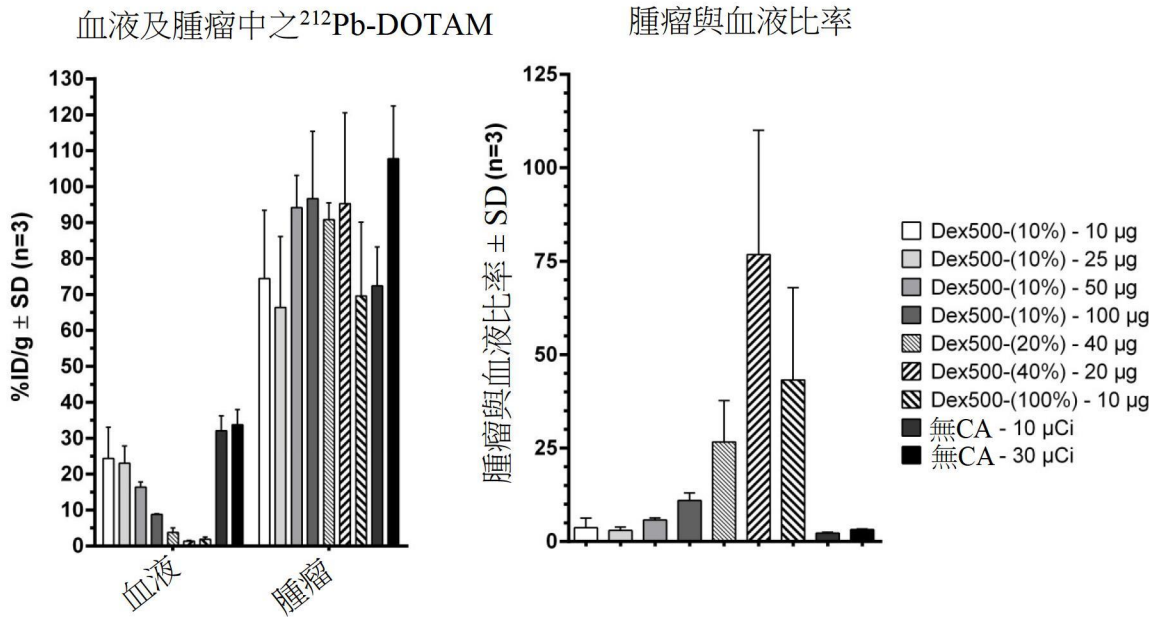


【圖16】

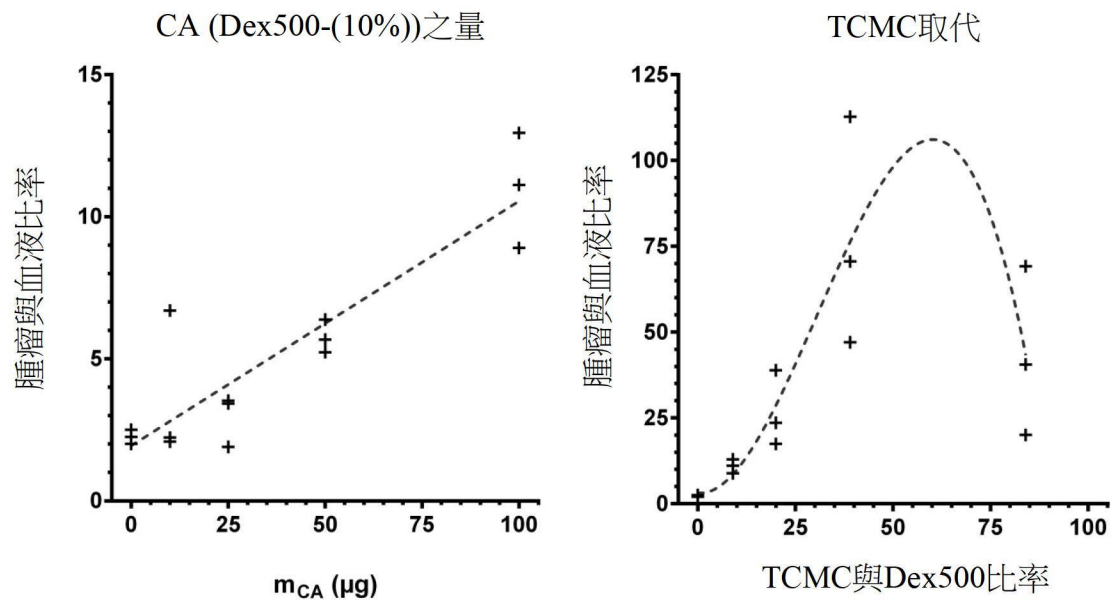
²¹²Pb-DOTAM生物分佈(皮下BxPC3模型)



【圖17】

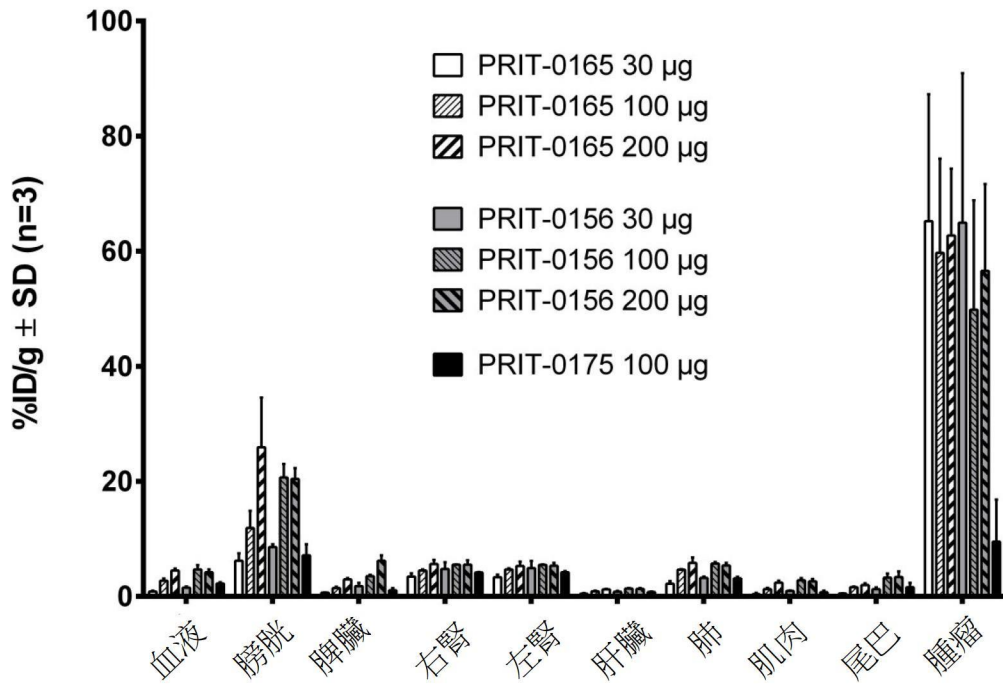


【圖18】



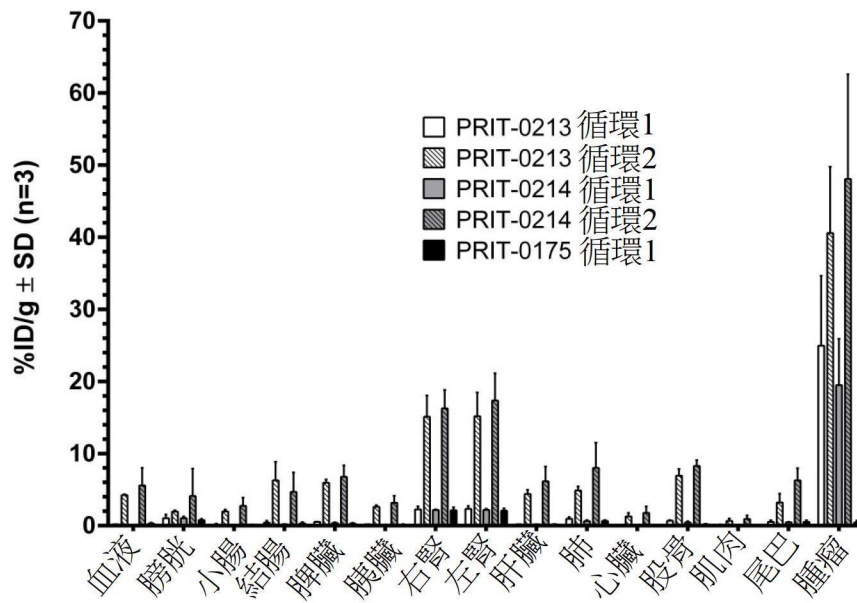
【圖19】

方案91：BxPC3中PRIT-0165-0156劑量遞增



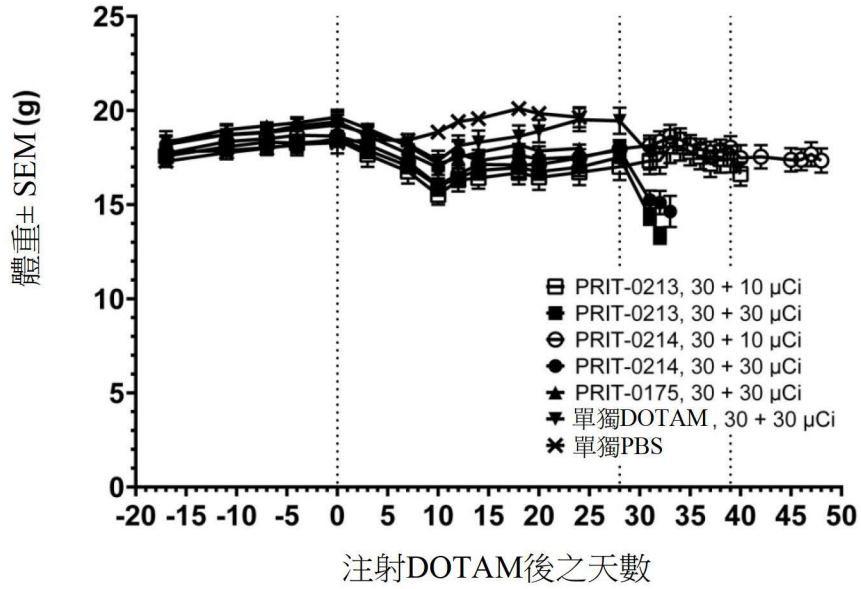
【圖20】

BxPC3模型中²¹²Pb-DOTAM之活體內分佈(24 h p.i.)



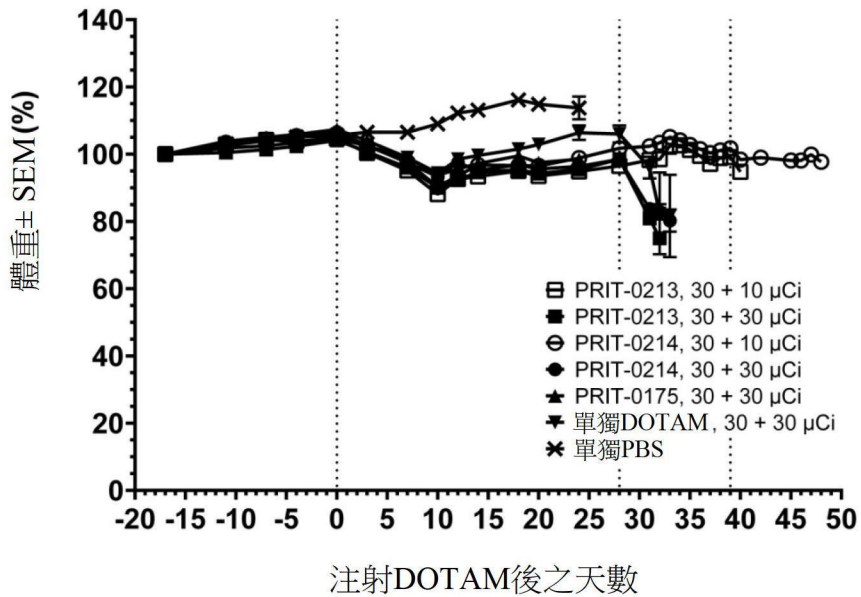
【圖21】

BxPC3模型中CEA-PRIT後之平均體重



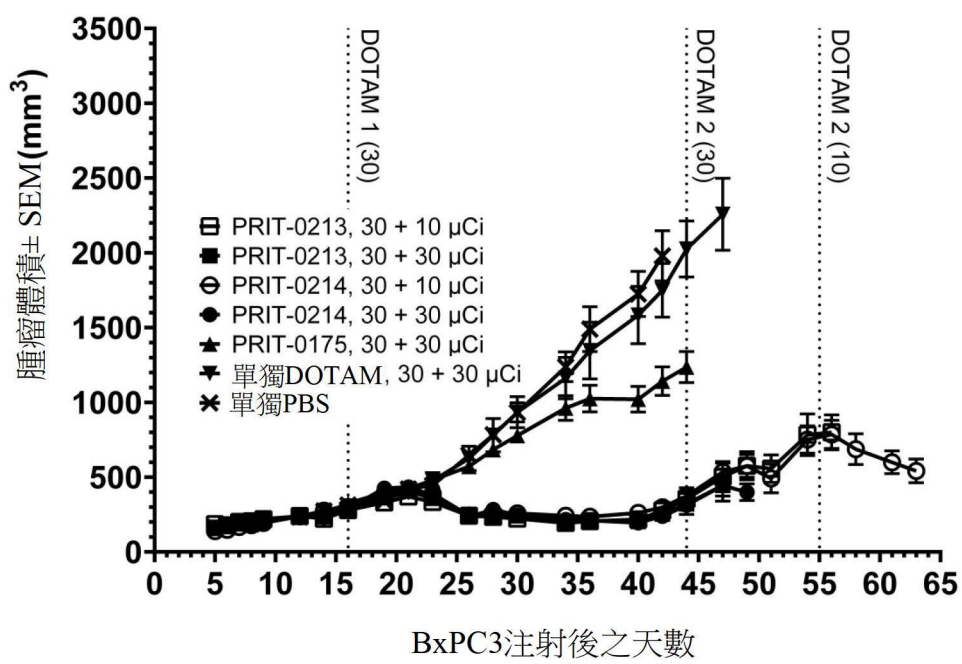
【圖22】

BxPC3模型中CEA-PRIT後之體重變化

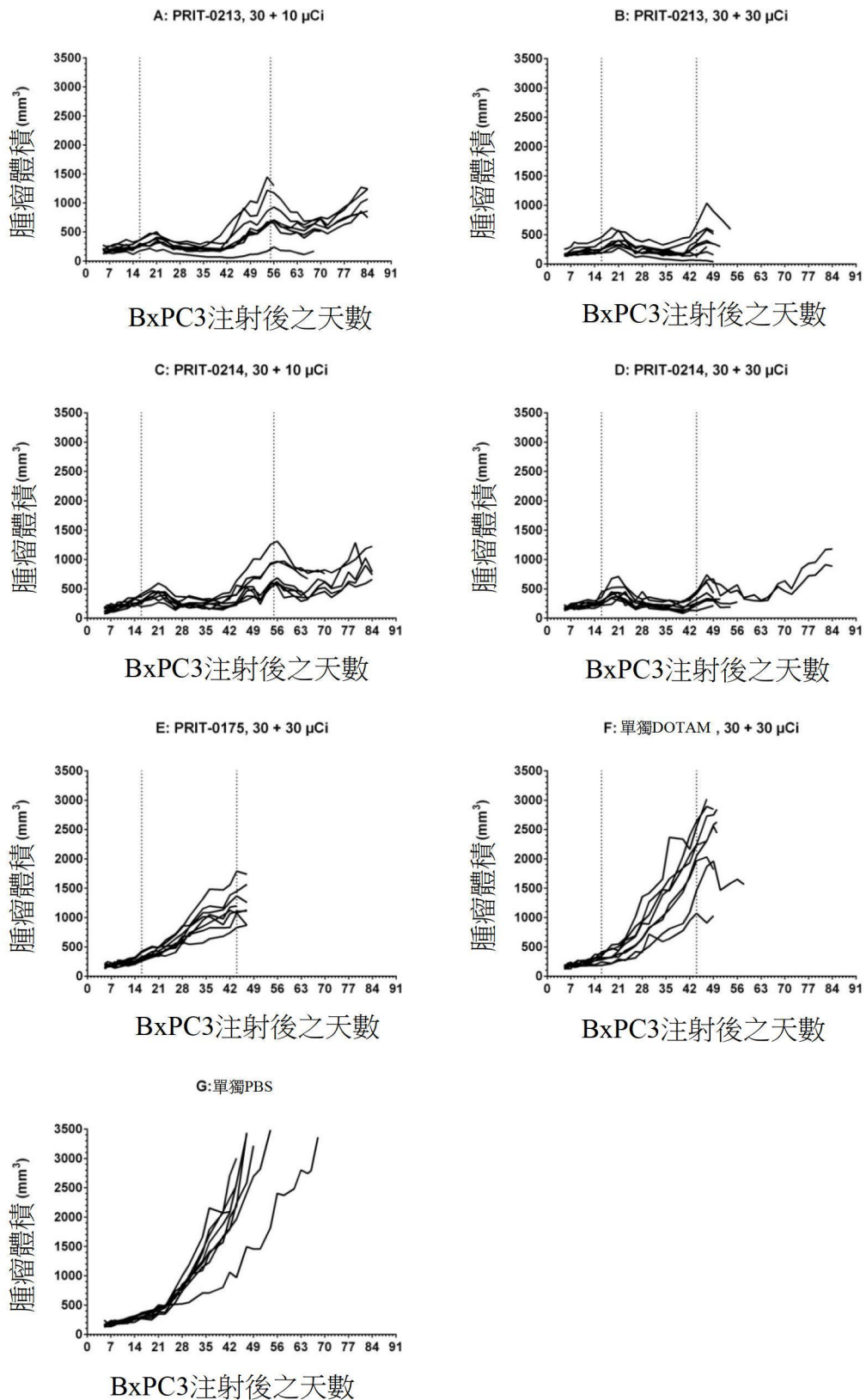


【圖23】

BxPC3中PRIT-0213-0214重複治療功效

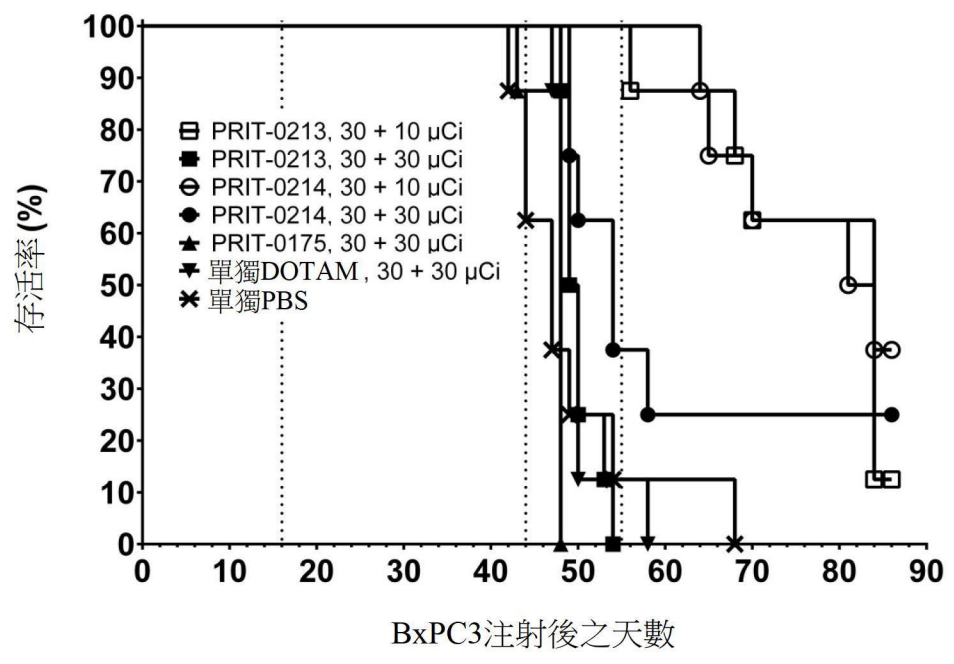


【圖24】



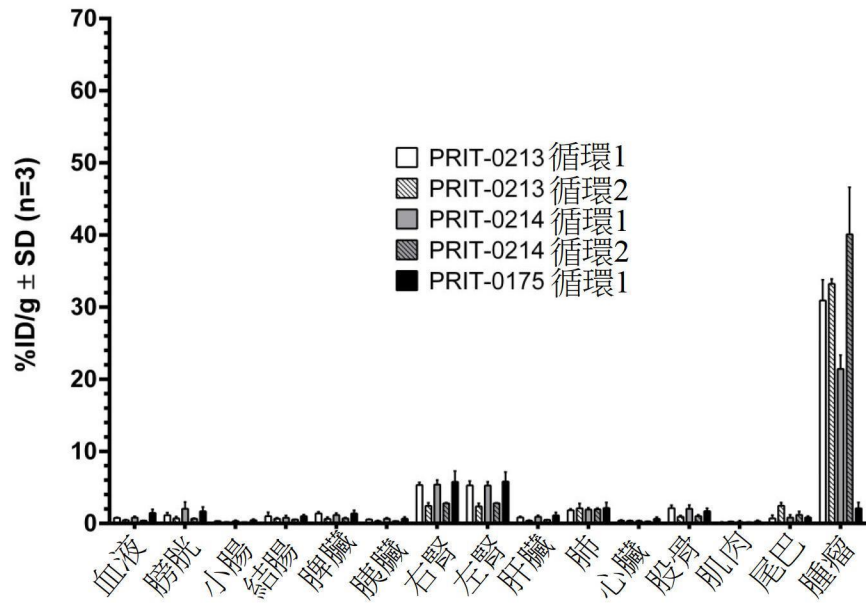
【圖25】

BxPC3中PRIT-0213-0214重複治療功效



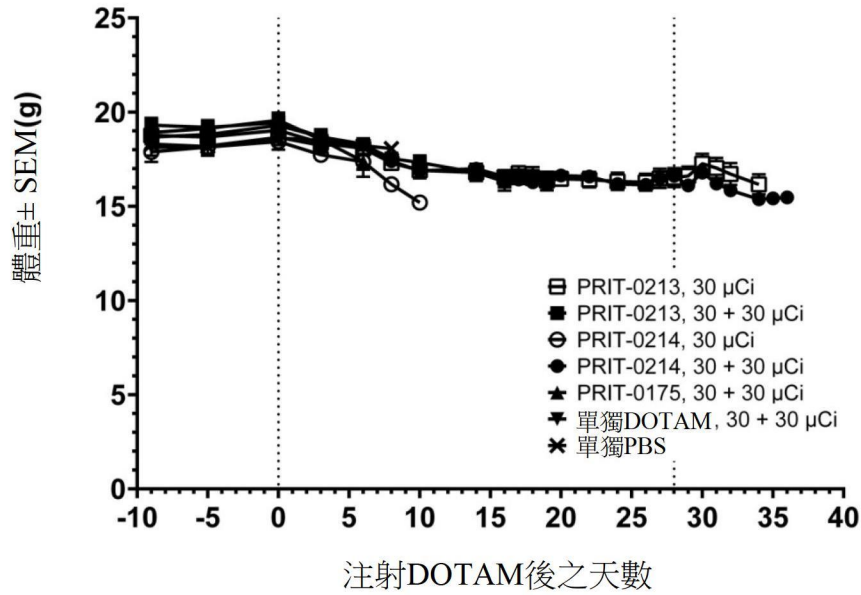
【圖26】

LS174T模型中²¹²Pb-DOTAM之活體內分佈(24 h p.i.)



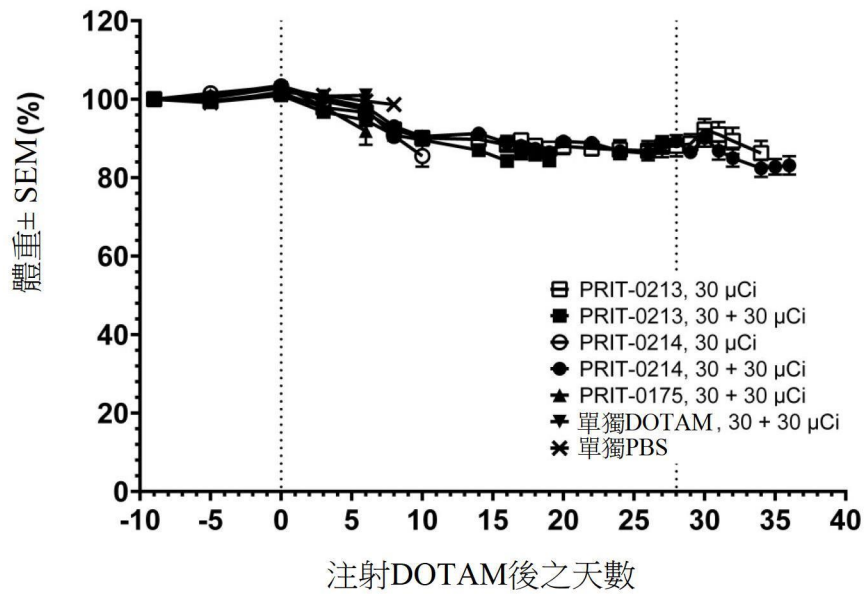
【圖27】

LS174T模型中CEA-PRIT後之平均體重



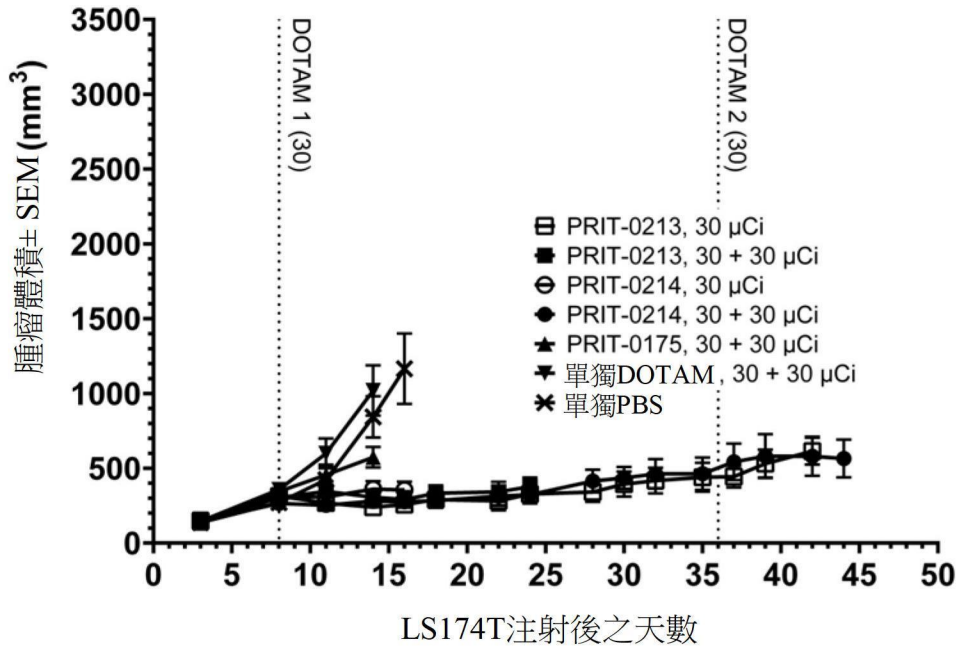
【圖28】

LS174T模型中CEA-PRIT後之體重變化

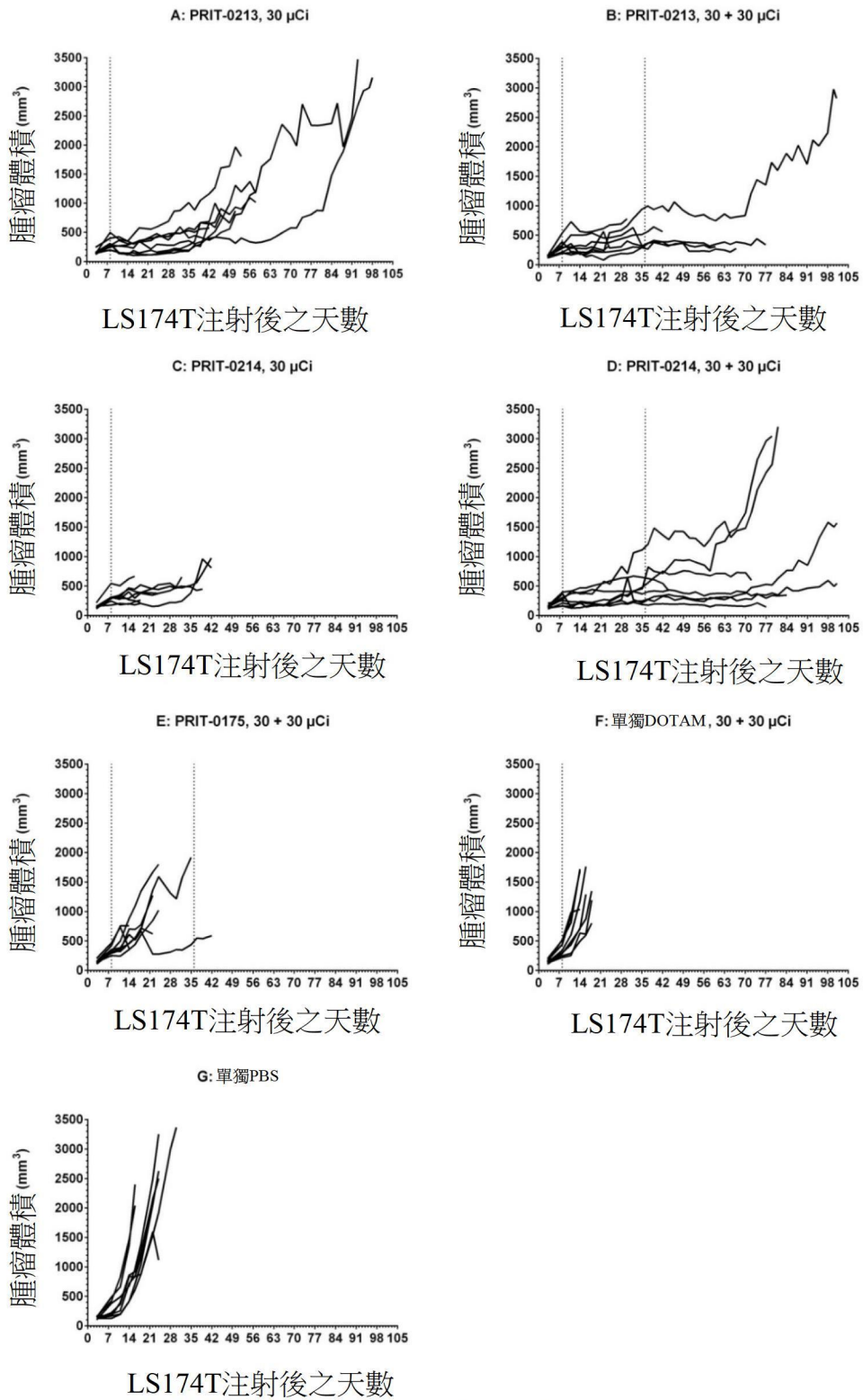


【圖29】

LS174T中PRIT-0213-0214重複治療功效

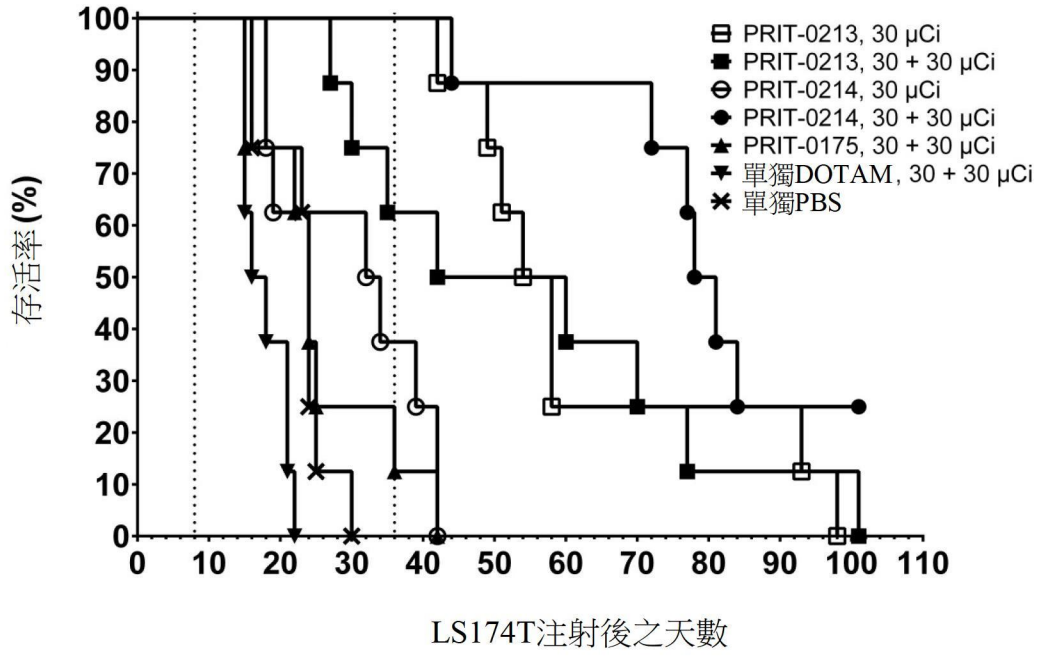


【圖30】



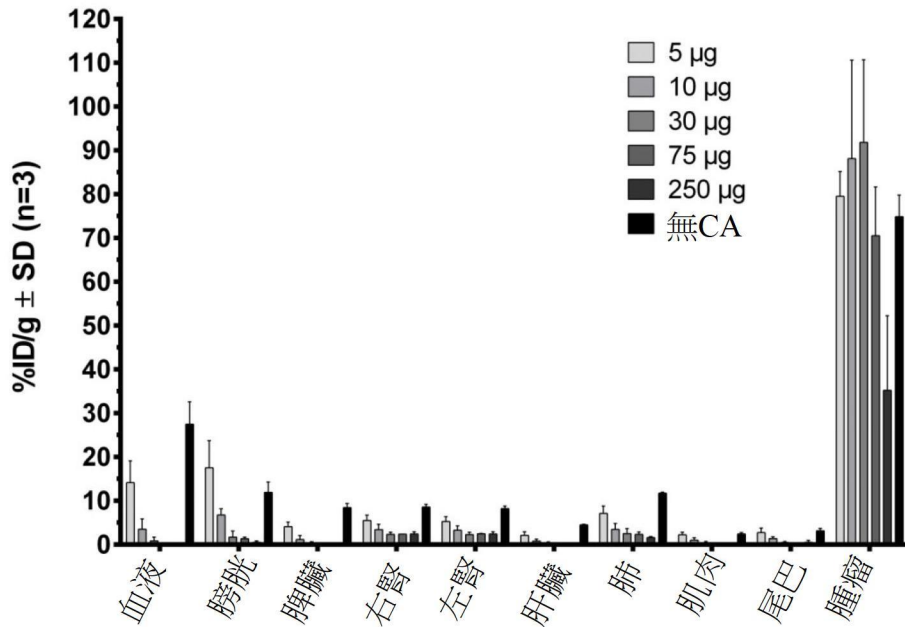
【圖31】

LS174T中PRIT-0213-0214重複治療功效



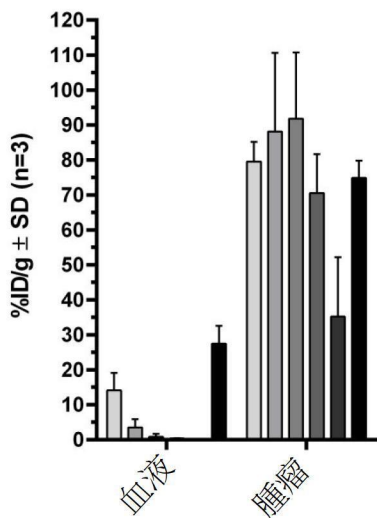
【圖32】

²¹²Pb-DOTAM生物分佈(皮下BxPC3模型)

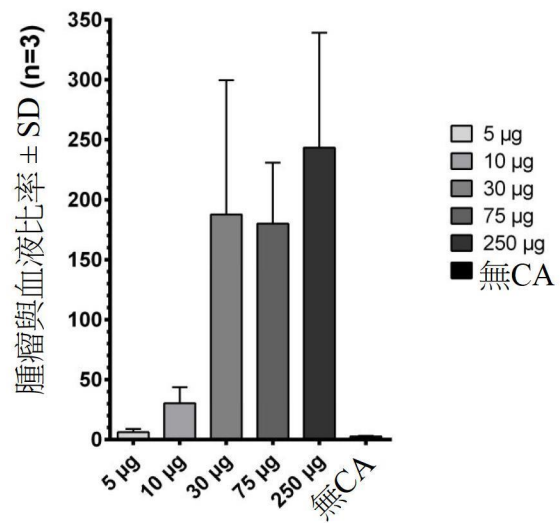


【圖33】

²¹²Pb-DOTAM生物分佈
(皮下BxPC3模型)

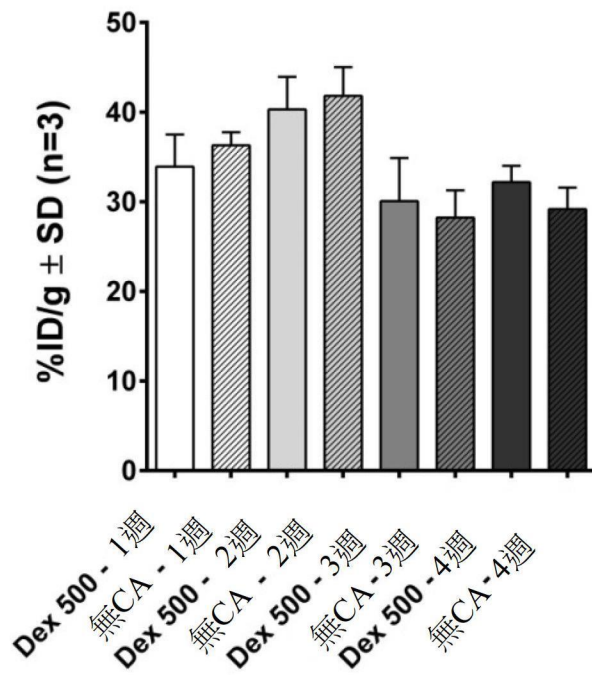


腫瘤與血液比率

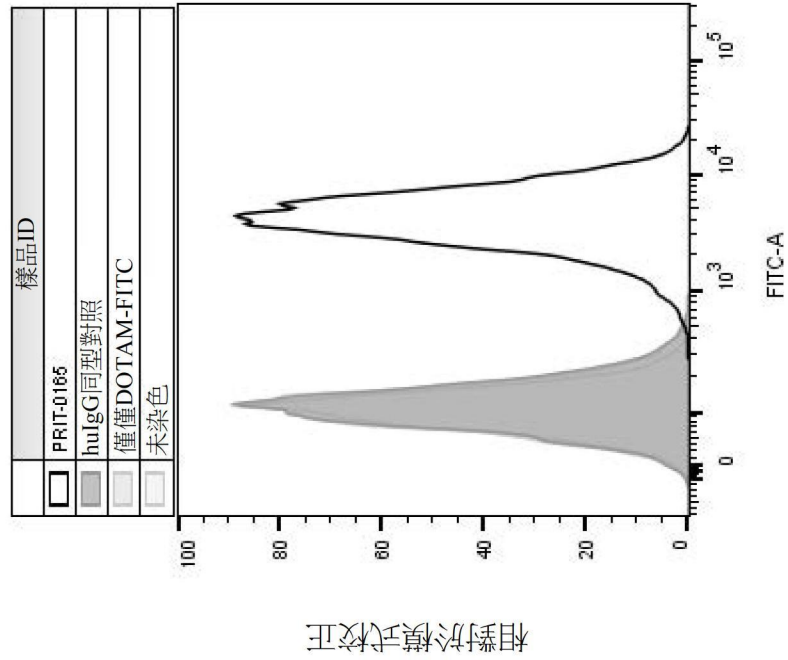
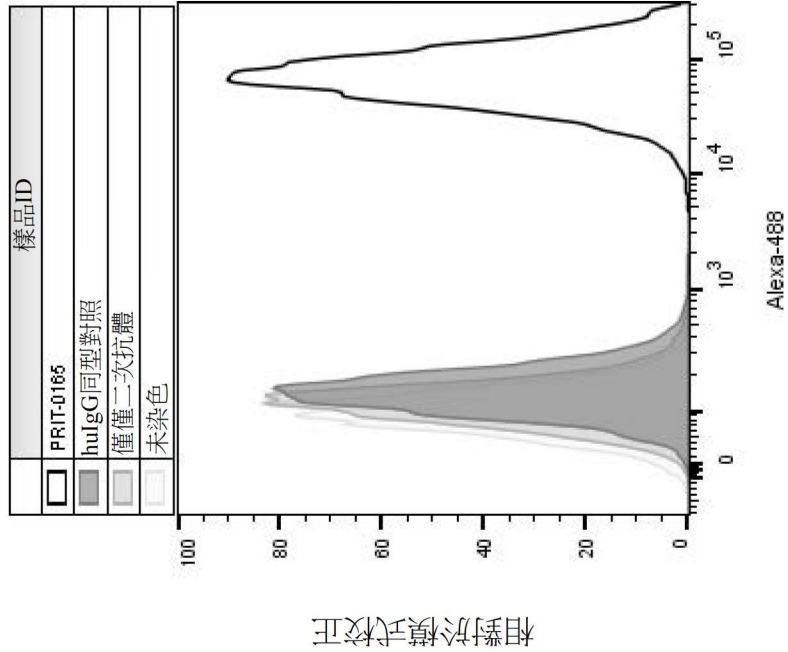


【圖34】

血液中之²¹²Pb-DOTAM含量，4 h p.i.

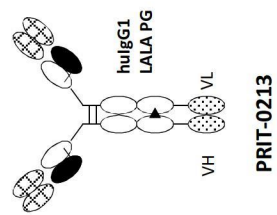


【圖35】

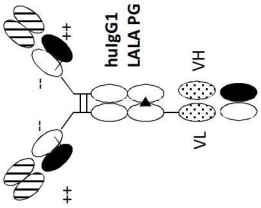


【圖36】

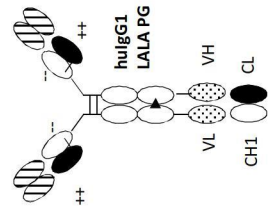
可能抗體格式



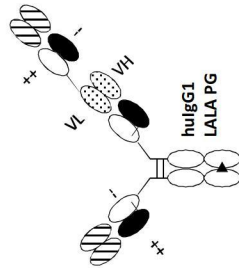
PRIT-0213



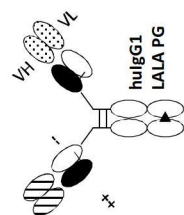
P1AE1767



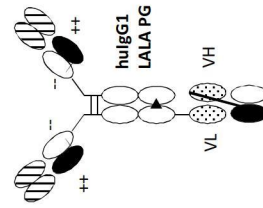
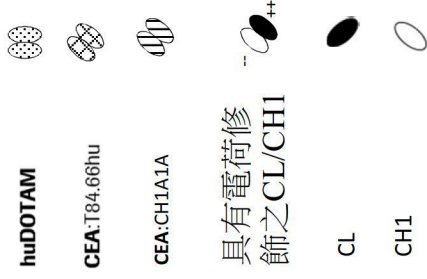
P1AE1766



P1AE1769

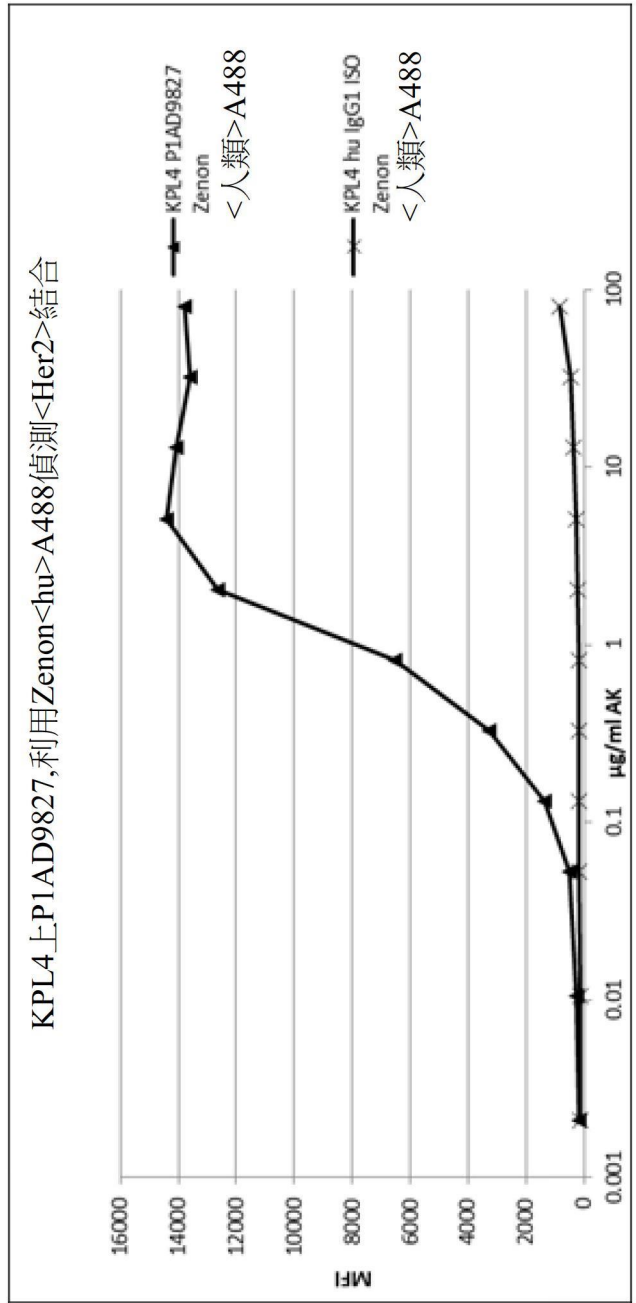


P1AE1768



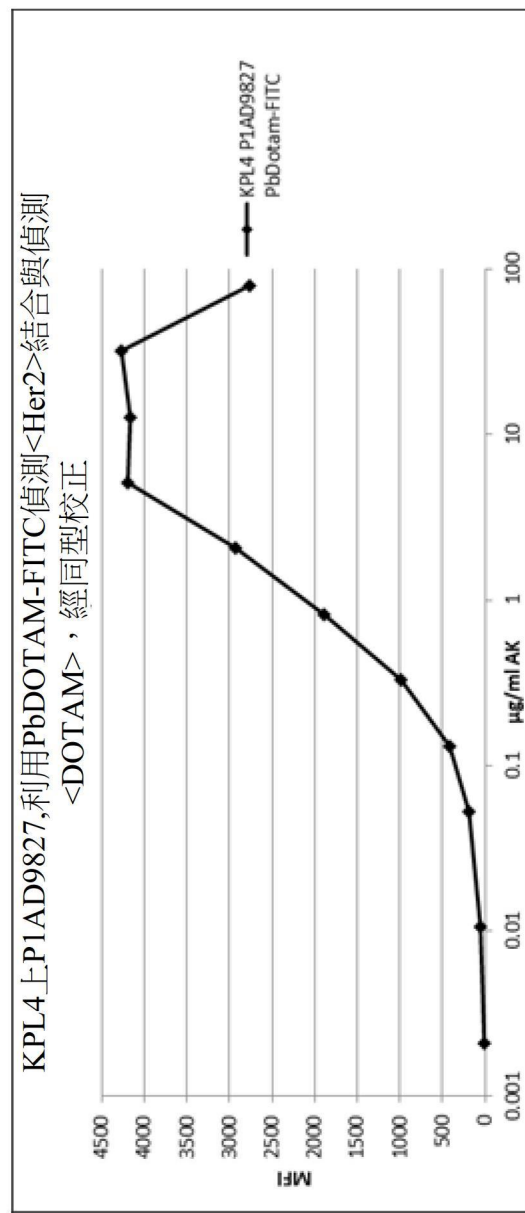
P1AE1770

【圖37】



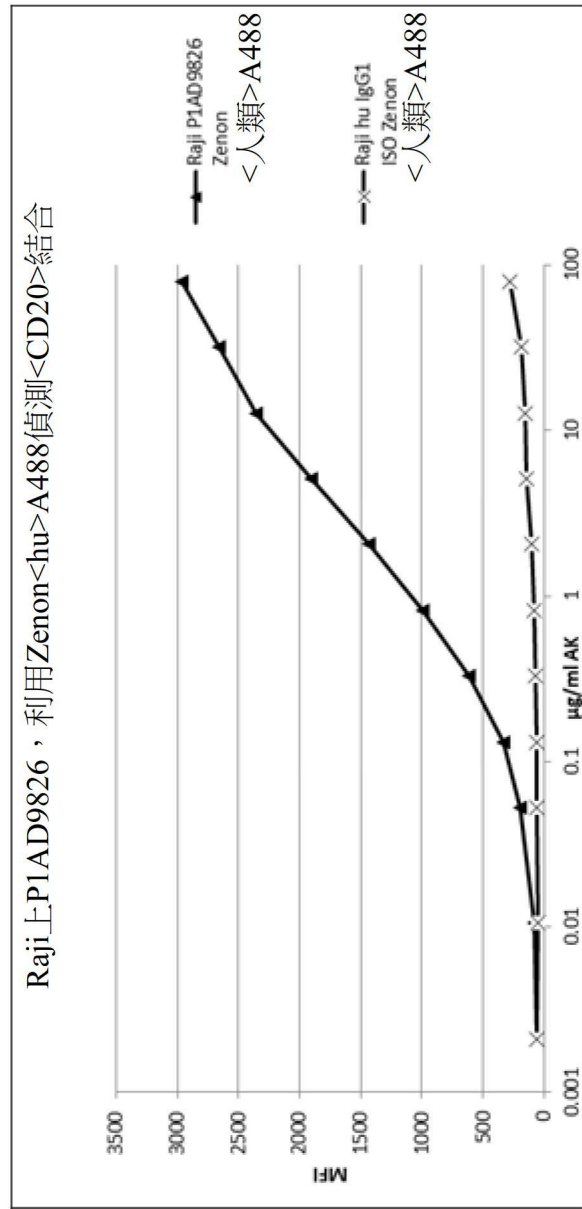
P1AD8927與KPL-4細胞之結合以證明Her2結合能力：使用人類IgG特異性二次抗體偵測抗體

【圖38】



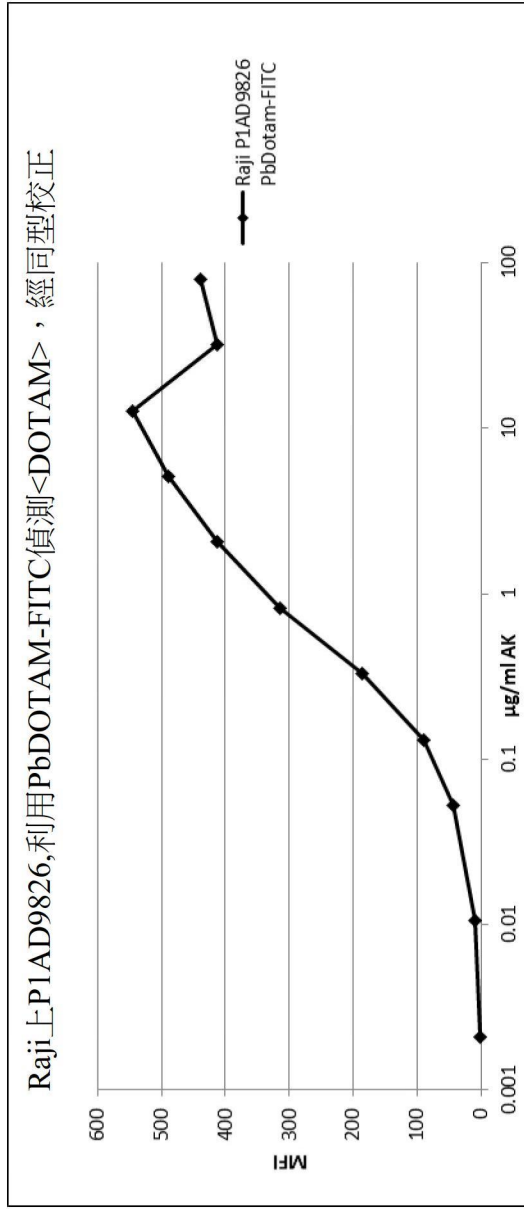
P1AD8927與KPL-4細胞之結合以證明DOTAM結合能力：使用Pb-DOTAM-FITC進行同型校正之偵測

【圖39】



P1AD8926與Raji細胞之結合以證明CD20結合能力：使用人類IgG特異性二次抗體偵測抗體

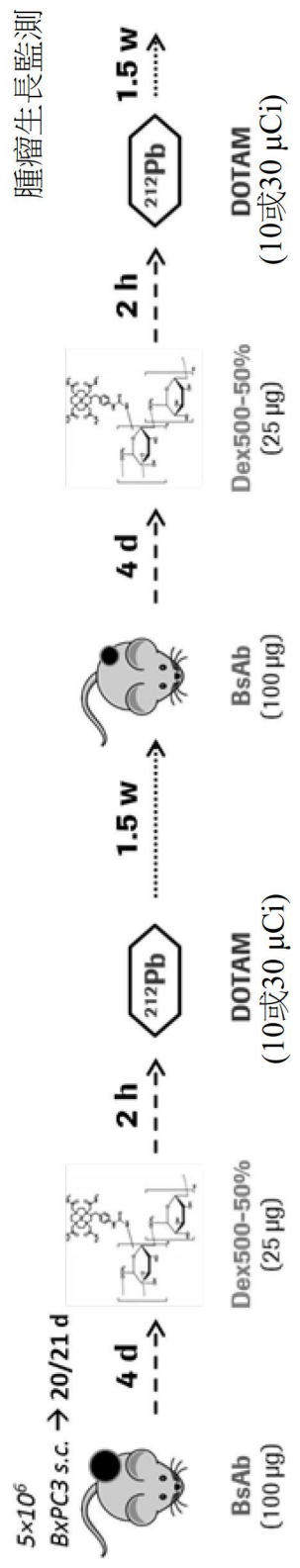
【圖40】



P1AD8926與Raji細胞之結合以證明DOTAM結合能力：使用Pb-DOTAM-FITC進行同型校正之偵測

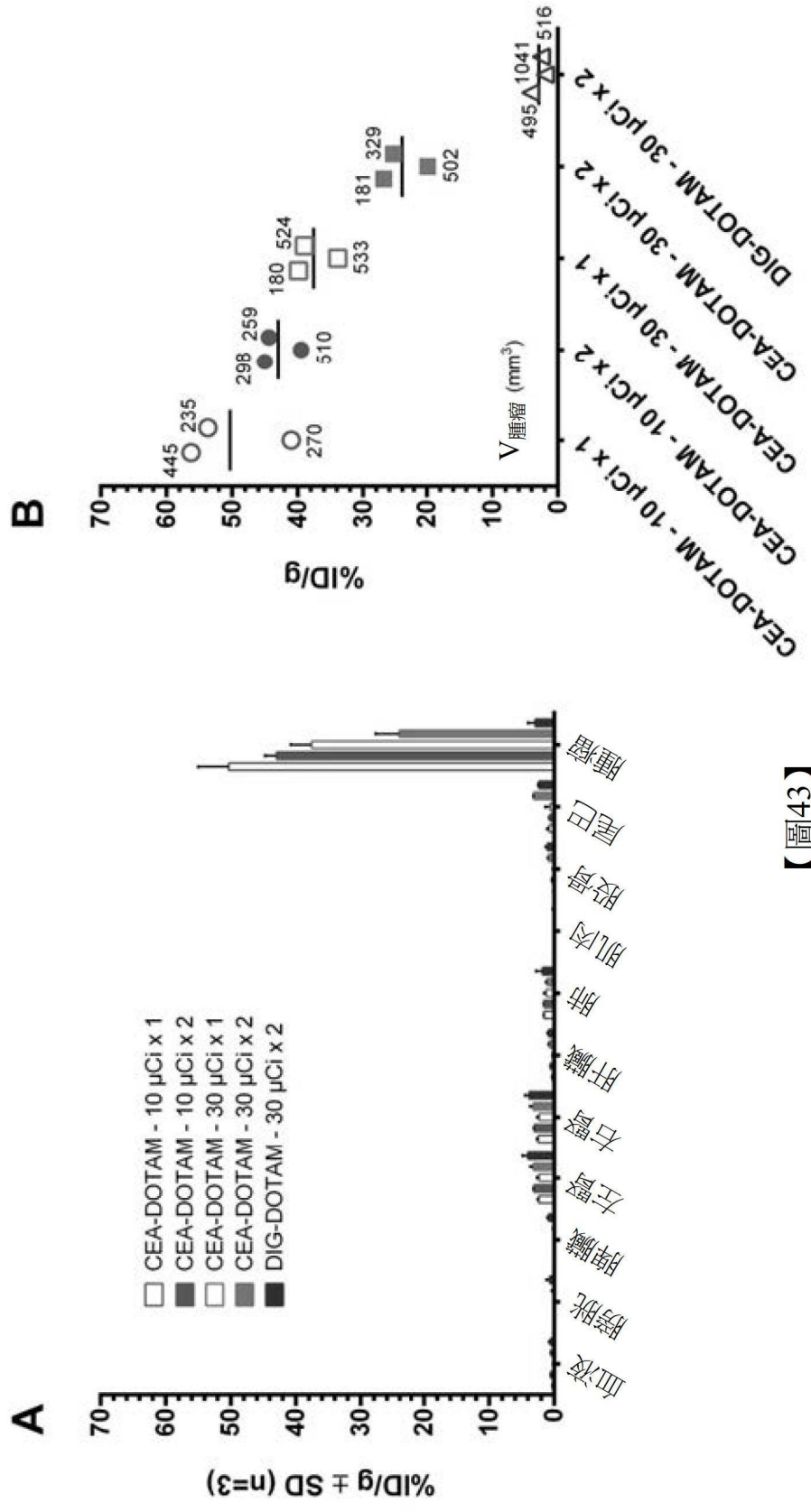
【圖41】

方案103之設計



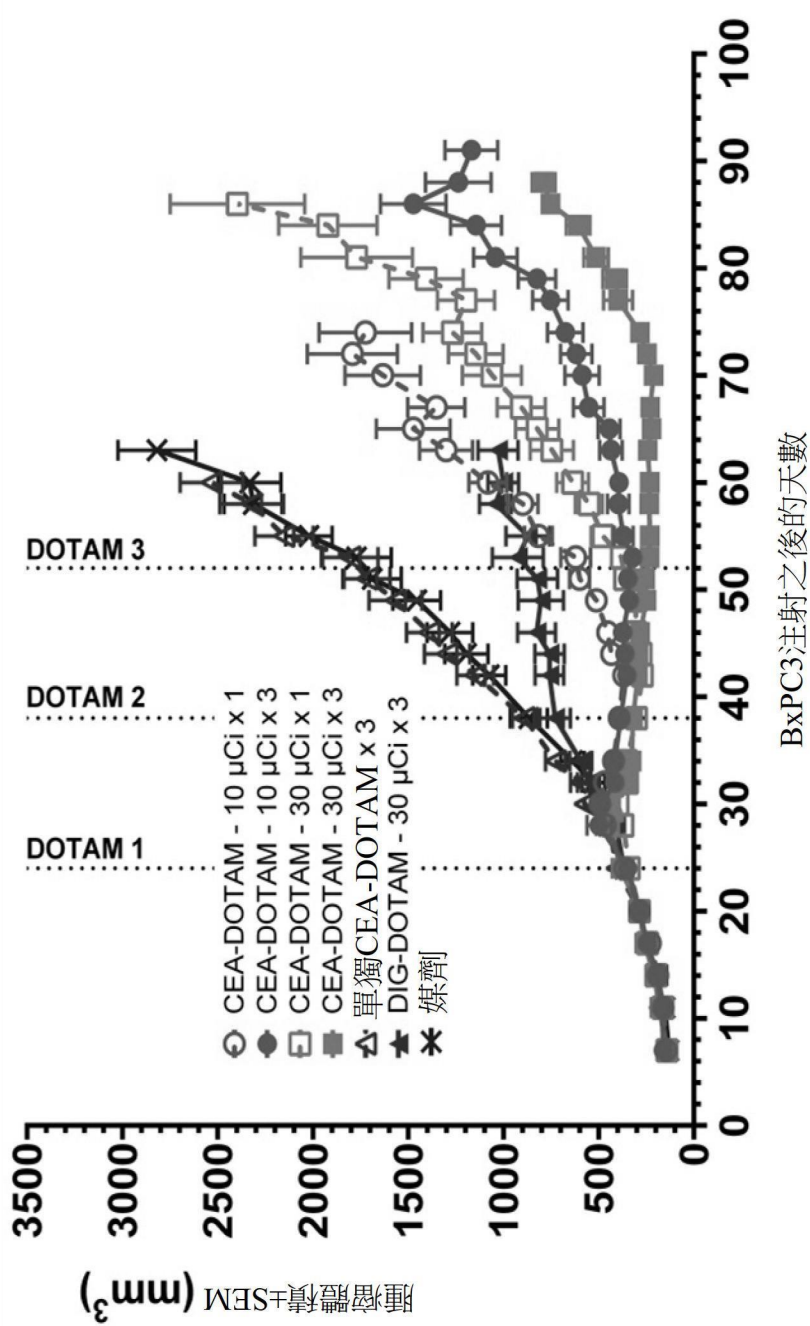
【圖42】

212Pb-DOTAM注射後24小時活體內放射性分佈(治療循環1及2)



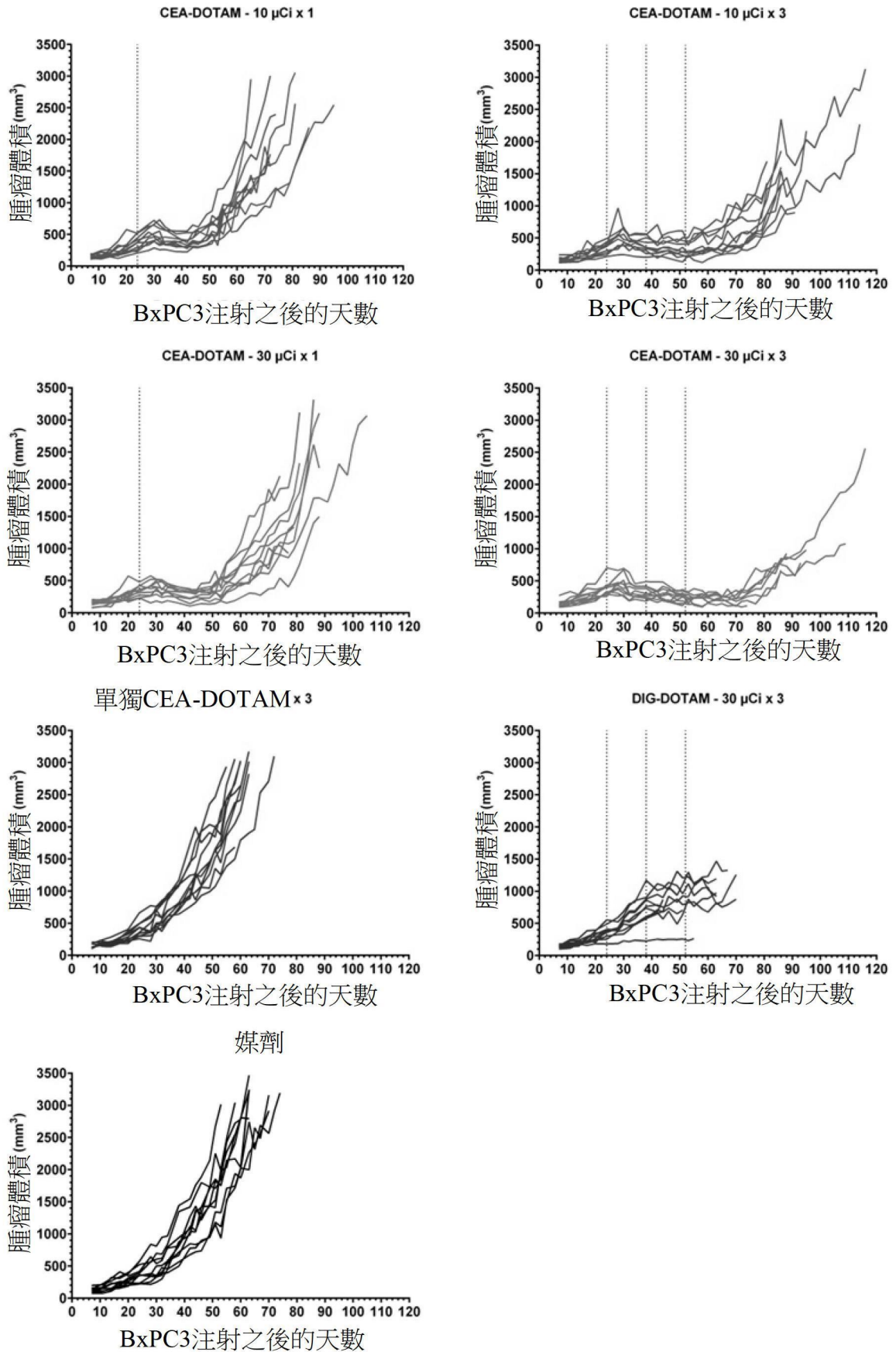
【圖43】

在BxPC3模型中在CEA PRIT之後的腫瘤發展



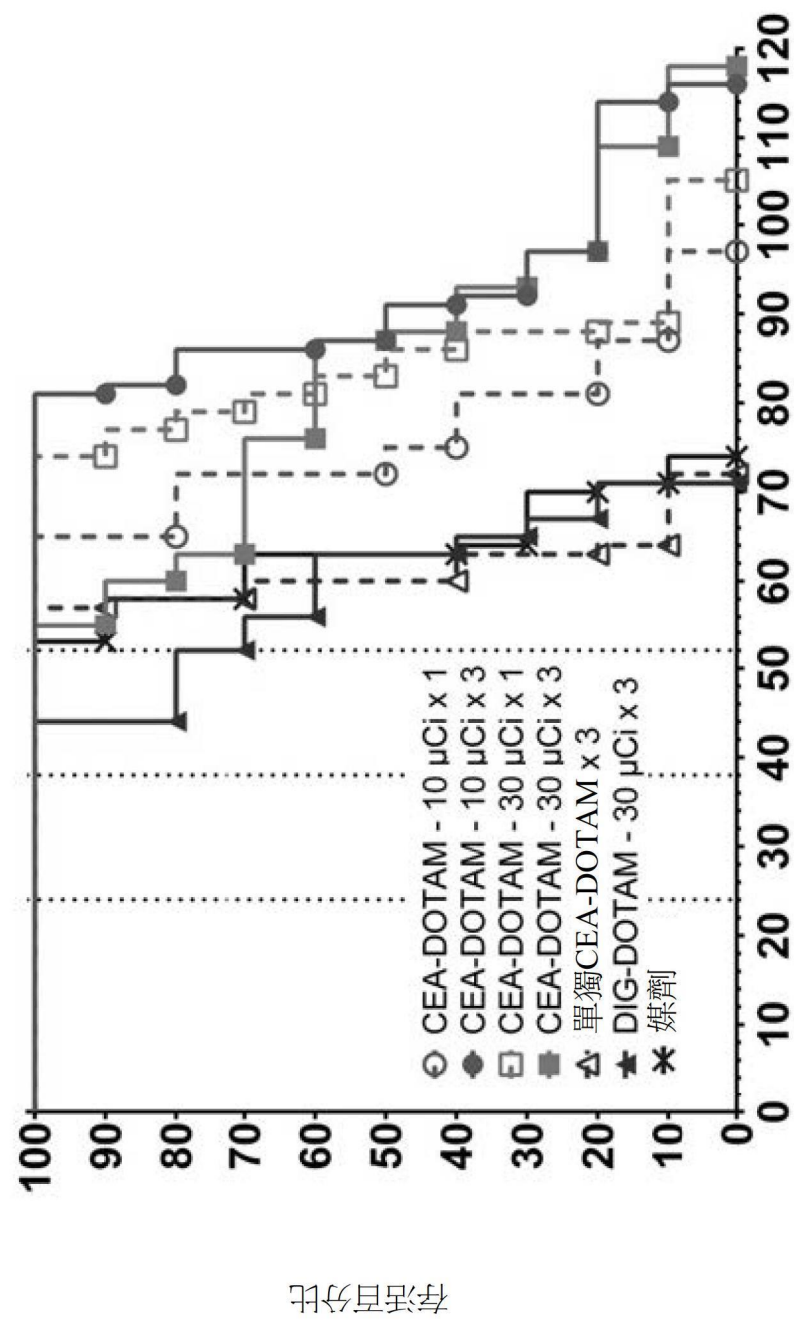
【圖44】

在BxPC3模型中在CEA PRIT之後的個別腫瘤生長曲線



【圖45】

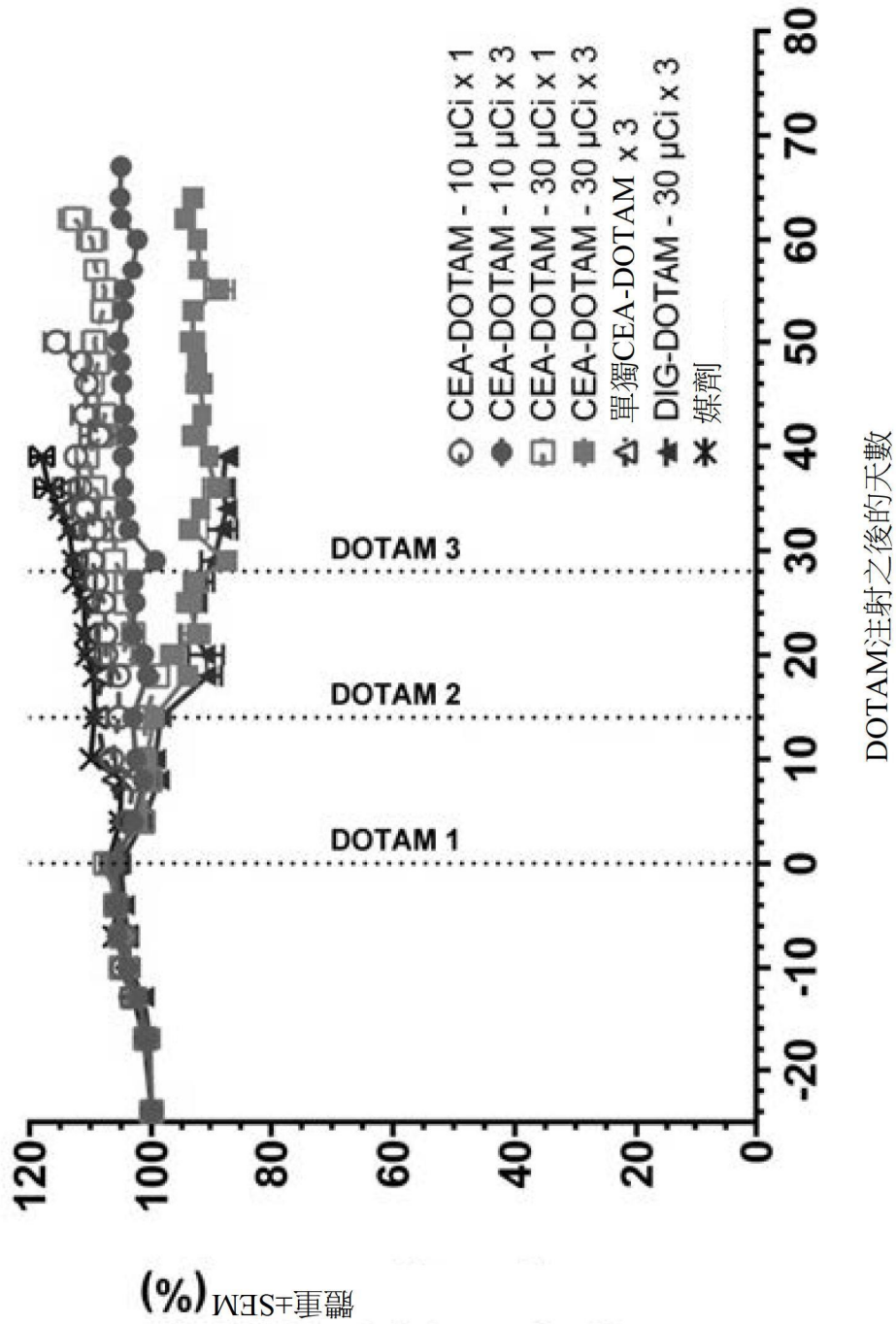
在BxPC3模型中在CEA PRIT之後的存活率



BxPC3注射之後的天數

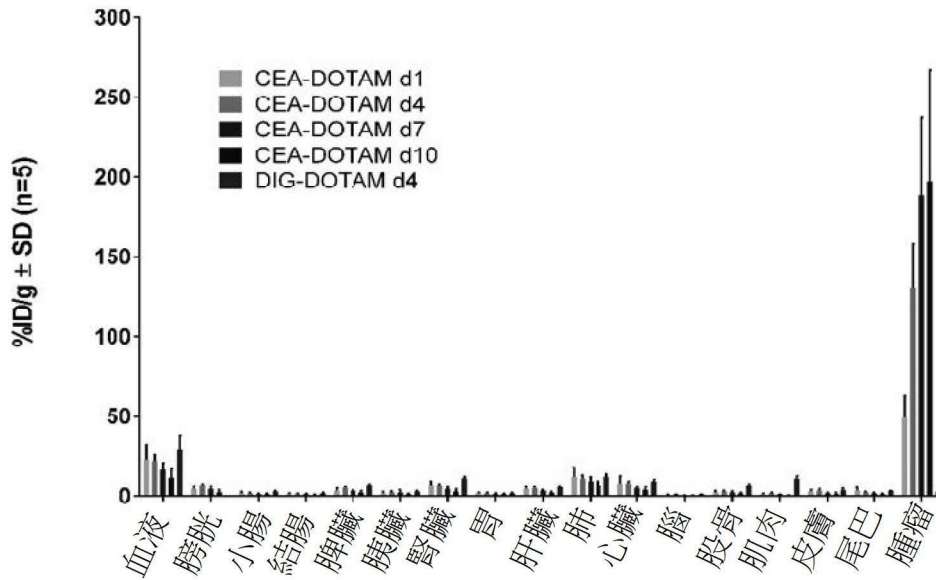
【圖46】

在BxPC3模型中在CEA PRIT之後的平均體重變化



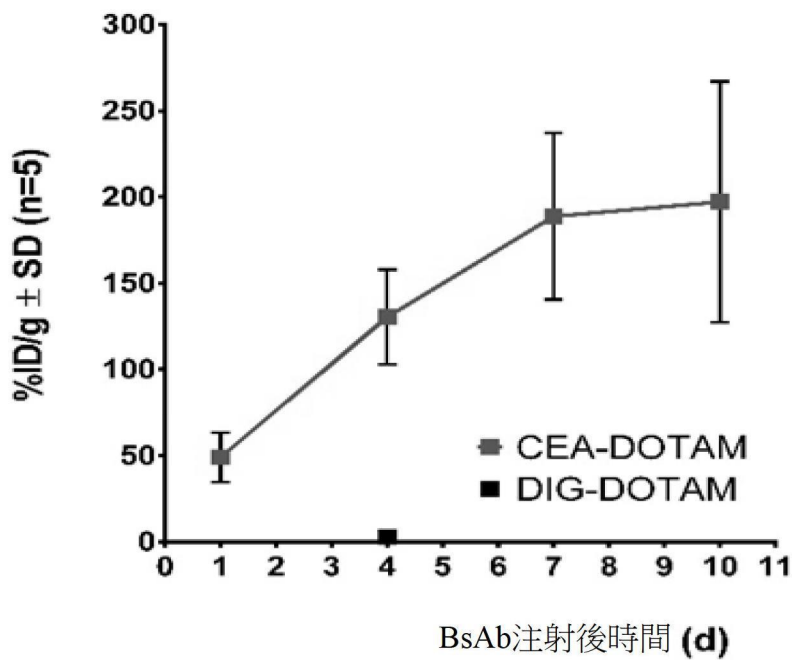
【圖47】

負載SC BxPC3腫瘤之SCID小鼠中²⁰³Pb-BsAb分佈



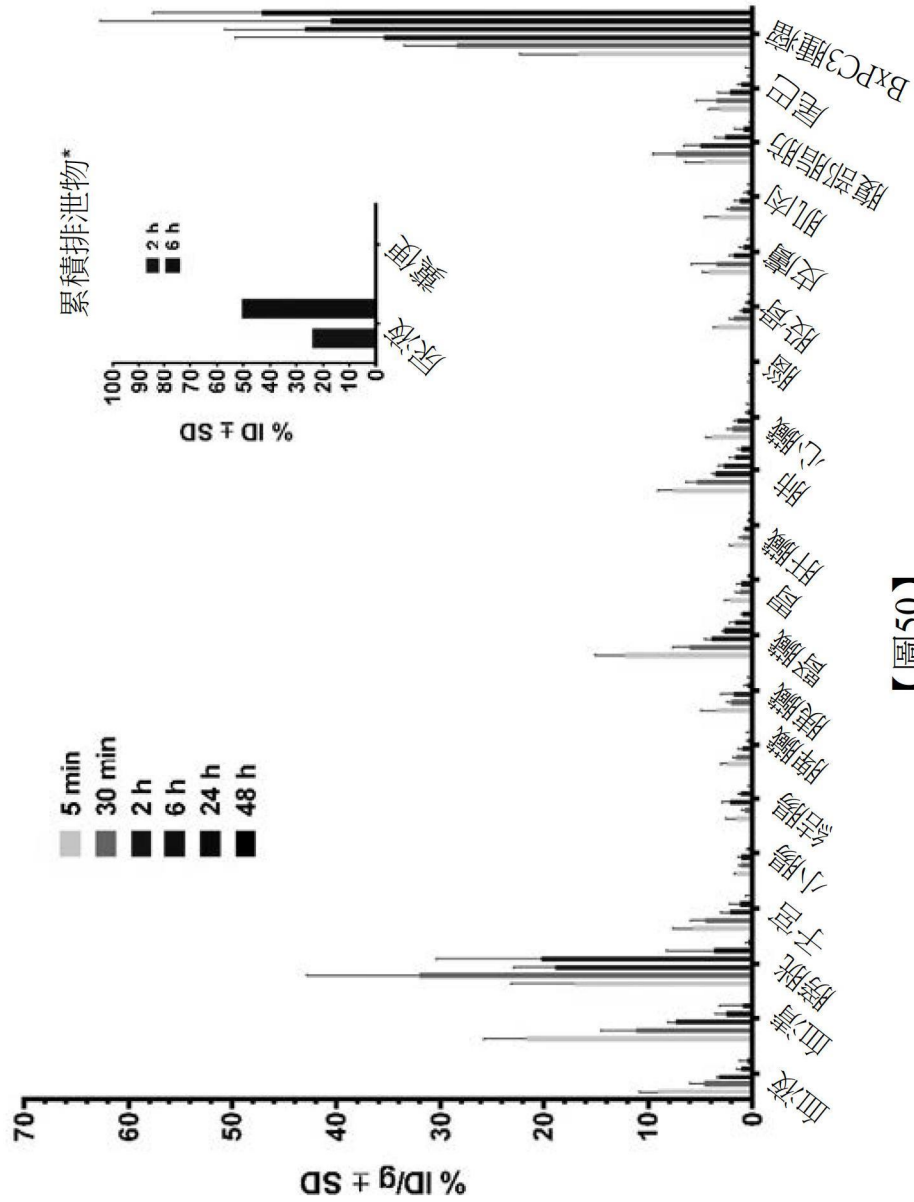
【圖48】

SCID小鼠中²⁰³Pb-BsAb BxPC3腫瘤累積



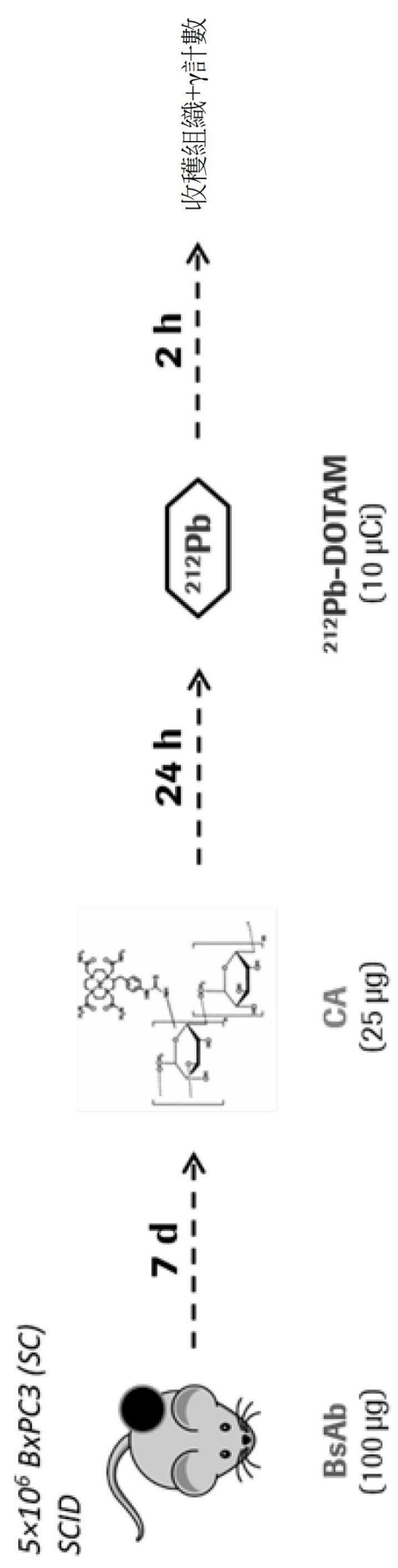
【圖49】

負載SC BxPC3腫瘤之SCID小鼠中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM的生物分佈



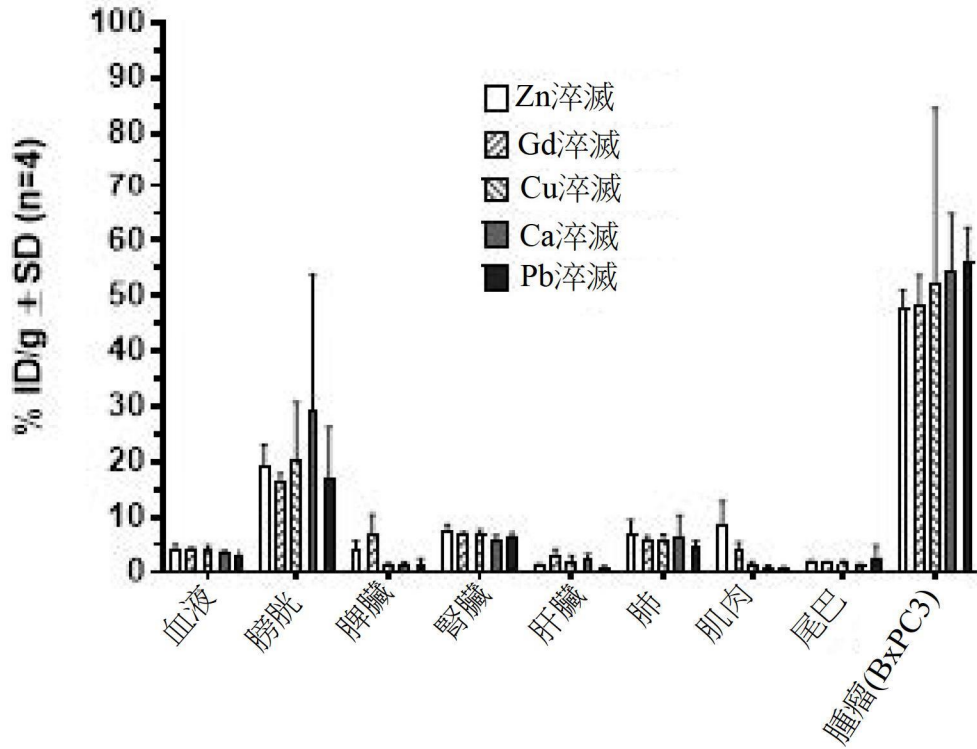
【圖50】

方案131之設計



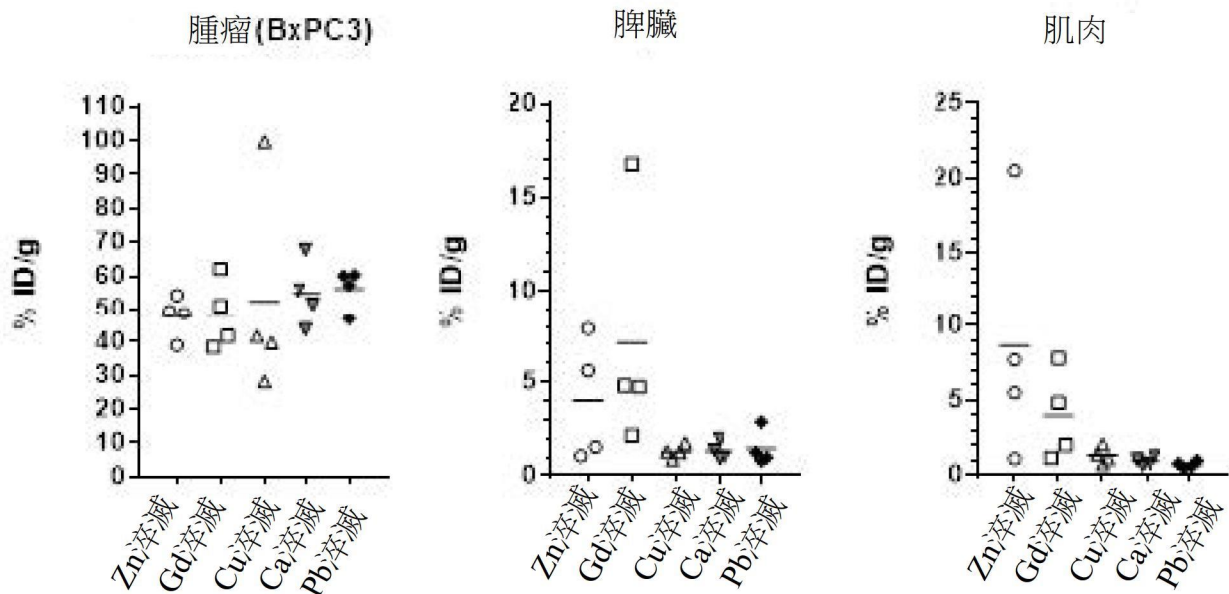
【圖51】

負載SC BxPC3腫瘤之SCID小鼠中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM的生物分佈(2 h p.i.)



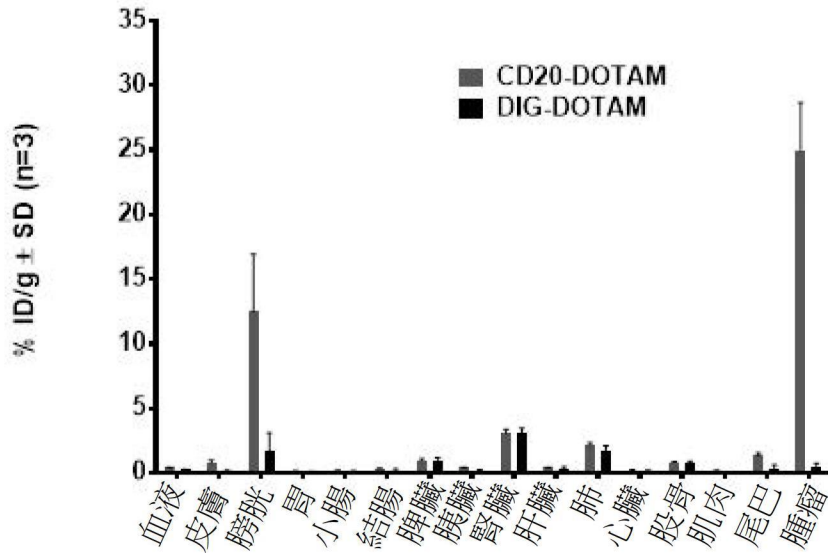
【圖52】

所選正常組織中²¹²Pb-DOTAM之分佈(2 h p.i.)



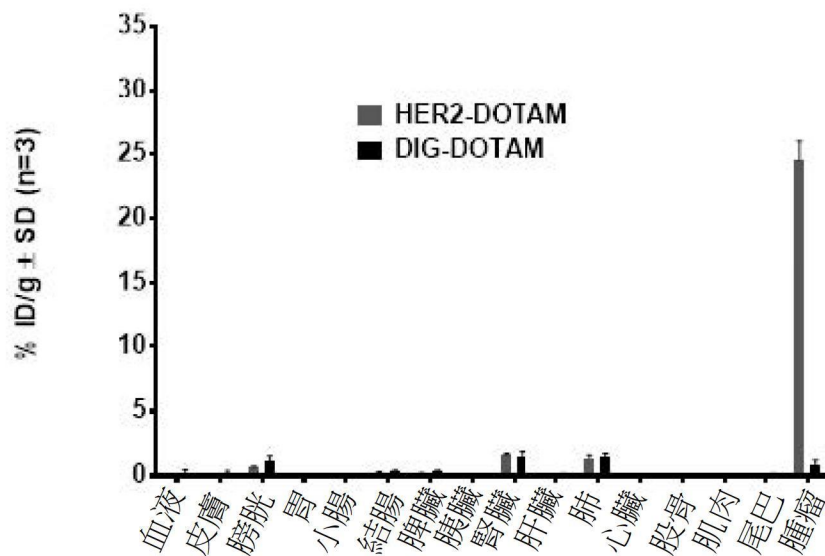
【圖53】

負載SC WSU-DLCL2腫瘤之SCID小鼠中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM的生物分佈(24 h p.i.)



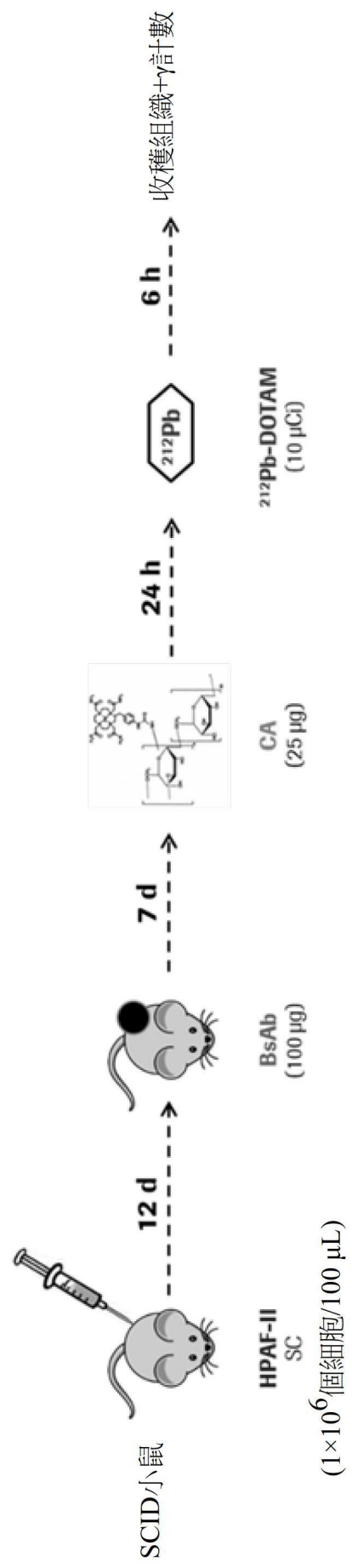
【圖54】

負載SC NCI-N87腫瘤之SCID小鼠中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM的生物分佈(24 h p.i.)



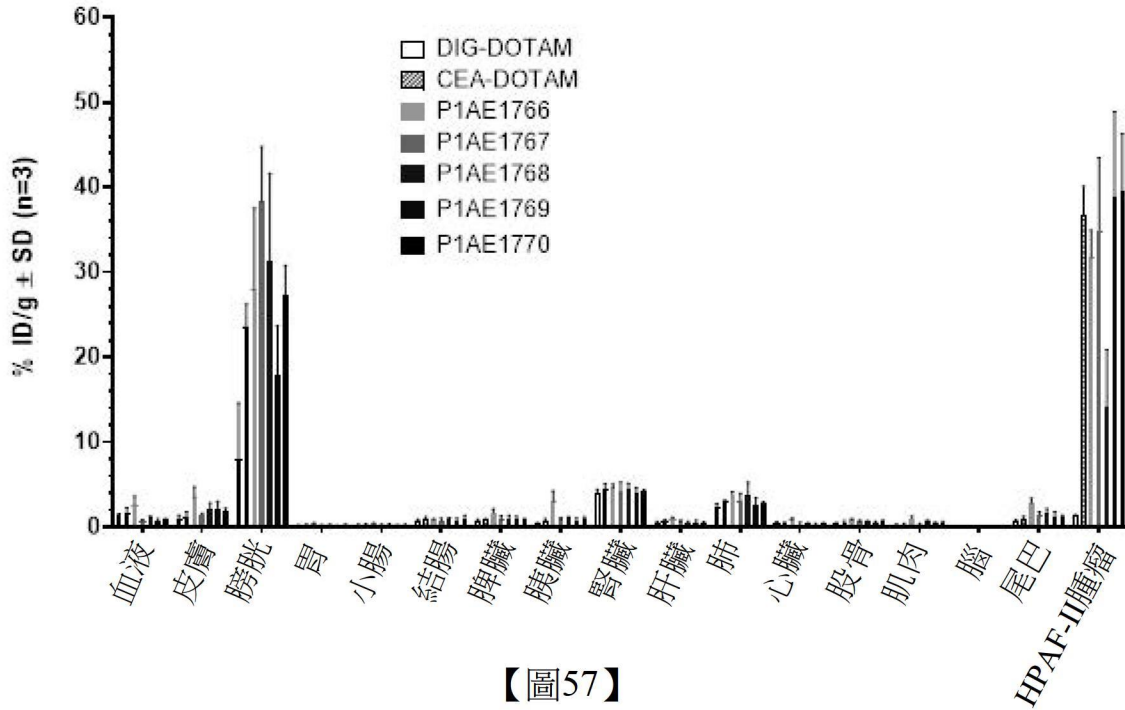
【圖55】

方案154之設計

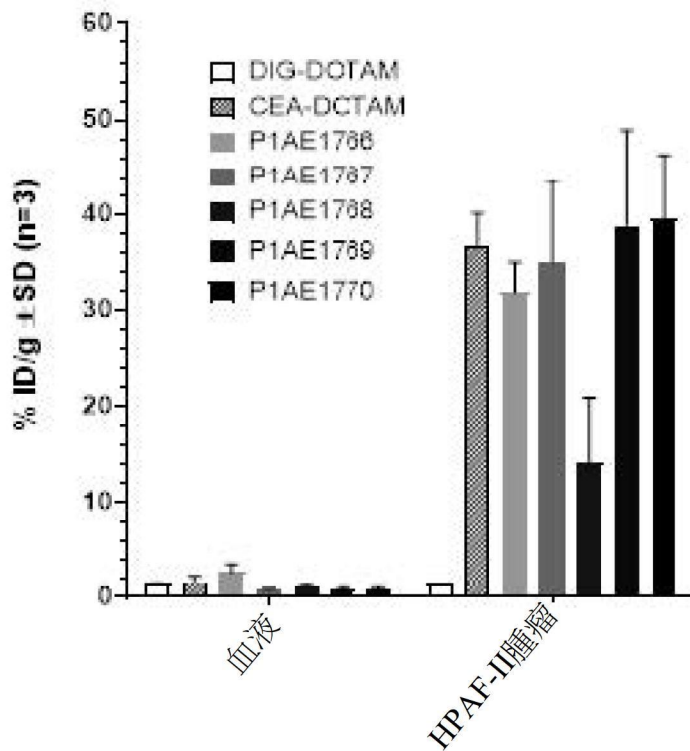


【圖56】

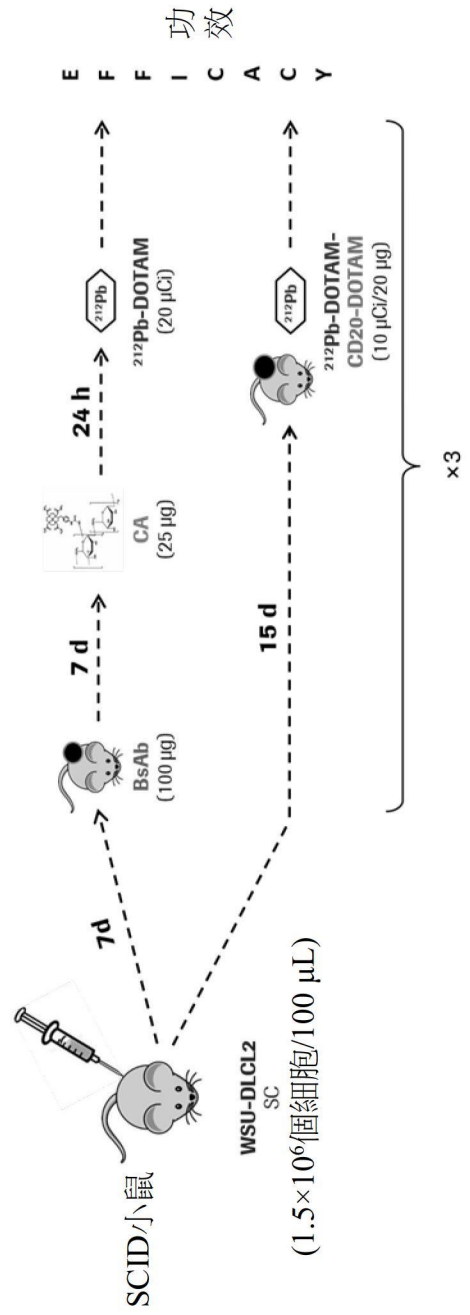
負載SC HPAF-II腫瘤之SCID小鼠中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM的生物分佈(6 h p.i.)



HPAF-II腫瘤中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM的累積

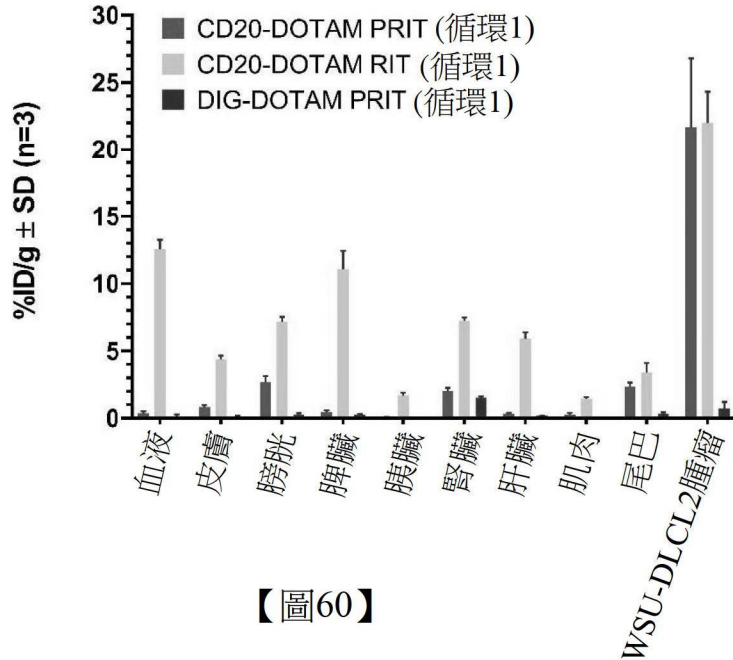


方案162之實驗時程



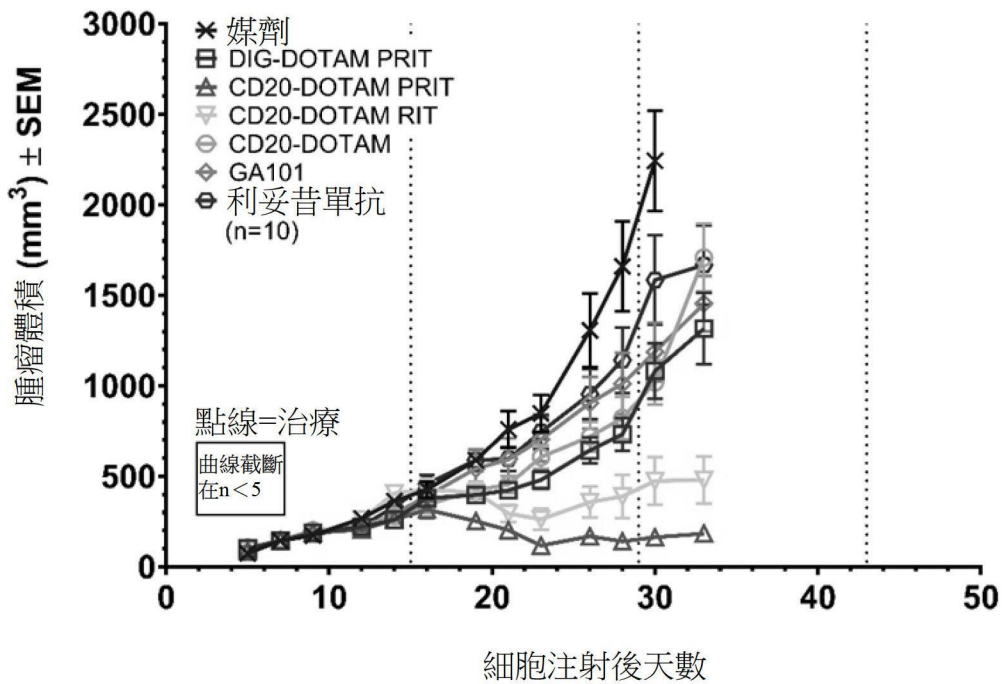
【圖59】

負載SC WSU-DLCL2腫瘤之SCID小鼠中預先靶向之²¹²Pb-DOTAM及²¹²Pb-DOTAM-CD20-DOTAM的生物分佈(24 h p.i.)



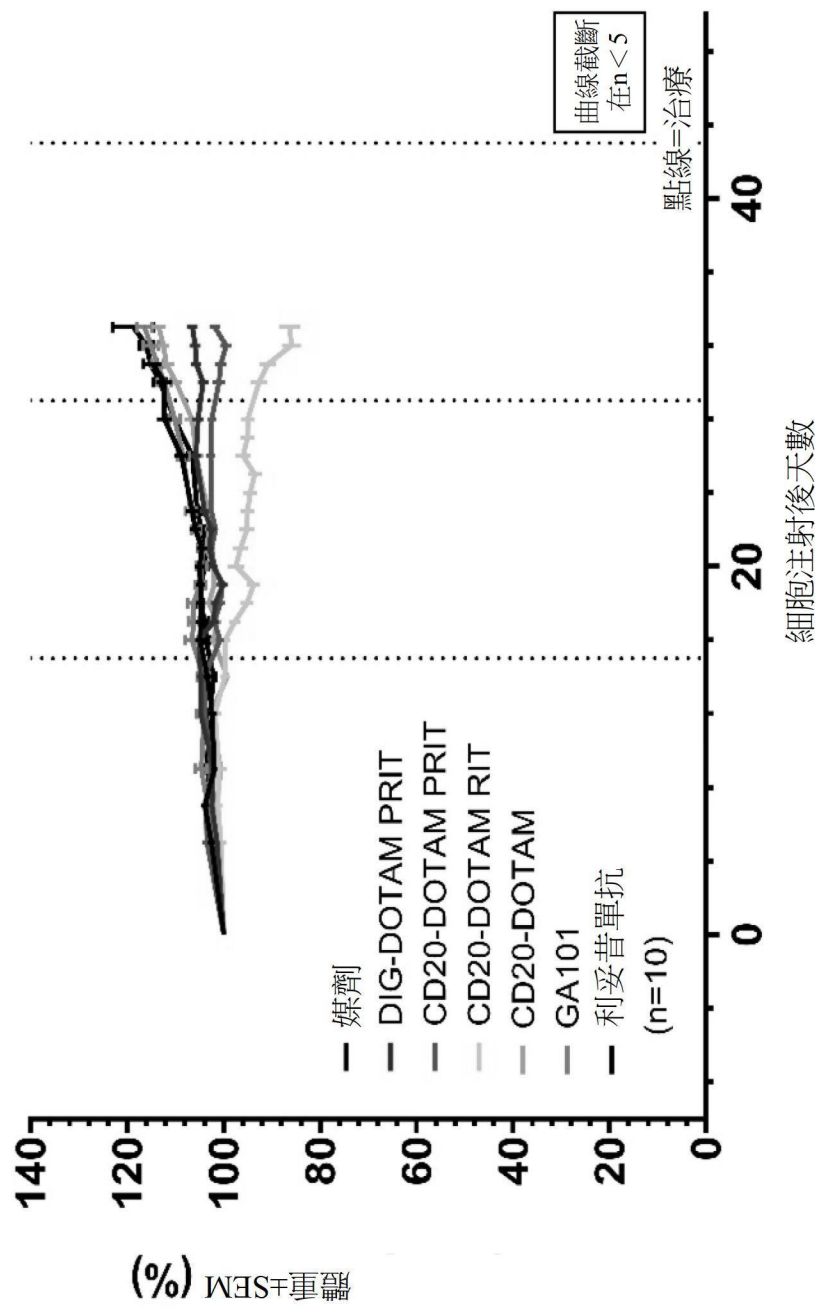
【圖60】

用靶向CD20之療法治療的SCID小鼠或陰性對照中平均SC WSU-DLCL2腫瘤體積



【圖61】

用靶向CD20之療法治療的SCID小鼠或陰性對照中平均體重發展



【圖62】