



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202421652 A

(43) 公開日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：112135981

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 21 日

(51) Int. Cl. :

C07K16/18 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

C12N15/13 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2022/09/21

歐洲專利局

22196917.3

(71) 申請人：瑞士商艾爾瑟拉股份有限公司 (瑞士) ELTHERA AG (CH)

瑞士

德國國家癌症研究中心基金會 (德國) DEUTSCHES

KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES OEFFENTLICHEN RECHTS

(DE)

德國

(72) 發明人：斯朋 岡瑟 SPOHN, GUNTHER (DE)；施密特 安妮特 SCHMIDT, ANNETTE

(DE)；梅利 芙拉菲歐 MEHLI, FLAVIO (CH)；阿爾特沃特 彼得 ALTEVOGT,

PETER (DE)；盧特高 珊卓拉 LUETTGAU, SANDRA (DE)；莫德霍爾 傑哈德

MOLDENHAUER, GERHARD (DE)

(74) 代理人：陳長文；朱淑尹

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：20 共 226 頁

(54) 名稱

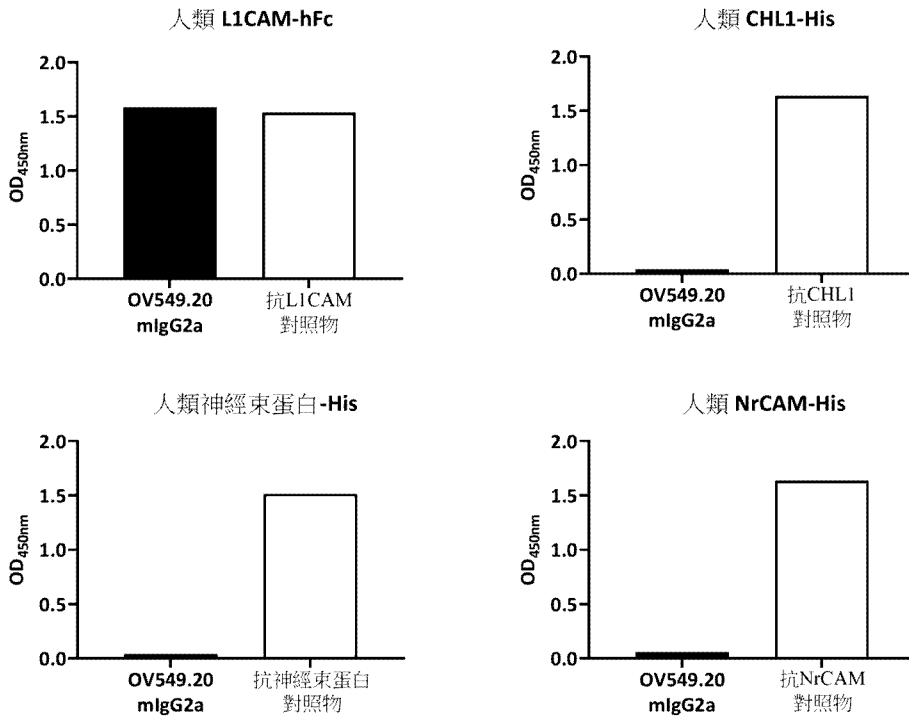
結合至 LICAM 之新穎結合分子

(57) 摘要

本發明係關於如申請專利範圍中指定之特异性結合至人類 LICAM 的抗體、相關核酸、宿主細胞與醫藥組合物，及相關方法及用途。

The present invention relates to an antibody that specifically binds to human LICAM as specified in the claims, related nucleic acids, host cells and pharmaceutical compositions and related methods and uses.

指定代表圖：



【圖3】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

結合至L1CAM之新穎結合分子

【英文發明名稱】

NOVEL BINDING MOLECULES BINDING TO L1CAM

【中文】

本發明係關於如申請專利範圍中指定之特異性結合至人類L1CAM的抗體、相關核酸、宿主細胞與醫藥組合物，及相關方法及用途。

【英文】

The present invention relates to an antibody that specifically binds to human L1CAM as specified in the claims, related nucleic acids, host cells and pharmaceutical compositions and related methods and uses.

【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

結合至L1CAM之新穎結合分子

【英文發明名稱】

NOVEL BINDING MOLECULES BINDING TO L1CAM

【技術領域】

【0001】 本發明係關於如申請專利範圍中指定之特異性結合至人類L1CAM的抗體、有關核酸、宿主細胞與醫藥組合物以及相關方法及用途。

【先前技術】

【0002】 單株抗體(mAb)已成為癌症療法之新型及重要支柱[1]。在過去二十年期間，分子生物學已提供方法來產生嵌合、人源化或全人類抗體以用於治療嚴重惡性疾病[2]。迄今為止，在歐洲及美國，許多抗體及抗體結合物經審批通過作為癌症治療劑營銷[3, 4]。其包含未經修飾之抗體、抗體-藥物結合物以及與放射性核種之結合物及雙特異性抗體[5]。然而，眾所周知，針對給定癌症抗原之mAb在其靶向癌細胞之能力方面可不同。

【0003】 在近期工作中，已表明L1CAM (神經細胞黏附分子L1，亦稱為L1)可為人類癌症之極佳目標分子。L1CAM為一種跨膜醣蛋白，通常藉由影響細胞黏附及細胞活動性而參與神經系統發育。L1CAM在許多人類癌症中過度表現，造成不良預後且加強細胞活動性、侵襲及轉移。

【0004】 WO 2008/151819揭示抗L1CAM抗體L1CAM mAb L1-9.3 (亦稱為mAb 9.3或L9.3)，其結合至L1CAM之第一Ig域內之抗原決定基。

來自異種移植[6]及人類L1CAM轉殖基因小鼠[7]模型之結果已表明，mAb 9.3可為癌症治療之有前景的工具。近期結果已表明此mAb在其IgG2a版本非常適合於活化免疫系統且募集免疫效應細胞，引起癌細胞之消除[6, 7]。

【0005】 WO 2016/050702揭示結合至L1CAM之結合分子，其能夠結合至由單株抗體L1-OV52.24識別之相同L1CAM抗原決定基，及/或其與單株抗體L1-OV52.24競爭結合至L1CAM。WO 2016/050702之結合分子已被證明相比於mAb 9.3具有改善之內化速率。據描述，L1CAM特異性抗體之結合將引起L1CAM內化，繼之引起目標分子再循環或降解[8]。內化為L1CAM與許多其他細胞表面分子相同之特徵。實際上，據描述，L1CAM內化為L1CAM介導之細胞黏附之傳訊及調節所需[9-11]。

【0006】 儘管有此等發現，但持續需要展現對人類癌細胞株表面上之L1CAM的高親和力特異性結合但不展示與塗佈盤之人類CHL1、NrCAM或神經束蛋白之任何反應性的抗體。此外，需要抑制癌細胞遷移及增殖、誘導腫瘤細胞之細胞溶解、抑制轉移形成及降低腫瘤負載以及腹水流體之發展的抗體。此外，提供改良疾病之一般臨床症狀的抗體將為有利的。最後，若此類抗體同時具有高構形及化學穩定性且展示轉譯後變異體之形成減少，則其通常將為有幫助的。

【0007】 儘管已部分地描述本發明抗體的一些特徵，參見[6]，但是本發明抗體本身或抗體之互補決定區(CDR)之序列從未公開或可用於公眾。

【0008】 特異性結合至人類L1CAM之本發明抗體解決所有上文所提及之問題且在生物技術研究、診斷或治療領域中出人意料地有利。

【發明內容】

【0009】 提供特異性結合至人類L1CAM之抗體。

【0010】 此外，提供編碼特異性結合至人類L1CAM之抗體整體或部分的核酸以及包含此類核酸之宿主細胞。

【0011】 亦提供包含此類抗體、核酸或宿主細胞之醫藥組合物。

【0012】 亦提供此類抗體、核酸、宿主細胞或醫藥組合物以用作藥劑或用作診斷劑或用於治療或預防過度增生性病徵、腫瘤疾病、與血管新生相關之病徵及/或與異常神經生成相關之病徵。

【圖式簡單說明】**【0013】**

圖1.圖1A展示藉由還原SDS-PAGE (十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳)對經純化OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1之分析。重鏈及兩種形式之輕鏈(醣化及非醣化)由箭頭指示。色帶第1至3號包含以下樣本：色帶1：分子量標記；色帶2：OV549.20小鼠IgG2a；色帶3：嵌合OV549.20人類IgG1。圖1B展示經DTT還原之嵌合OV549.20人類IgG1的質譜分析，展現對應於重鏈(50798.5 Da)及對應於醣化(25885.5 Da)及非醣化(23533.2 Da)輕鏈之峰的存在。

圖2展示在與嵌合OV549.20人類IgG1及次代經Alexa Fluor 488標記之山羊抗人類IgG抗體一起培育之後用基於影像之細胞計數器在JIMT-1、SKOV-3及Panc-1細胞上偵測到之螢光信號。嵌合人類IgG1同型對照抗體用於比較。

圖3展示在ELISA分析中OV549.20小鼠IgG2a與人類L1CAM之結合及其缺乏與L1家族之其他成員的交叉反應性。對人類L1CAM、CHL1、

NrCAM及神經束蛋白具有特異性之可商購抗體用作陽性對照物以證明所有抗原在ELISA盤上之成功固定及偵測系統之正確功能性。結合程度藉由在ELISA分析中評定450 nm波長下之光學密度(OD)來量化。

圖4展示嵌合OV549.20人類IgG1及賀癌平(Herceptin)在Panc-1胰臟癌細胞上之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)的劑量依賴性誘導。先前所描述之與L1CAM第一Ig域結合之抗體L9.3的人類IgG1嵌合版本同時經測試，但不在Panc-1細胞上誘導ADCC。所示為一式三份之平均值±標準差。值使用GraphPad Prism軟體擬合至4參數對數曲線。

圖5展示OV549.20小鼠IgG2a、OV52.24小鼠IgG2a及同型對照抗體對HCT116、SKOV3及Panc-1細胞增殖的影響，係採用Incucyte裝置藉由偵測匯合度所量測。添加OV549.20小鼠IgG2a減少全部三種細胞株之增殖，而OV52.24小鼠IgG2a及小鼠IgG2a同型對照物無影響。出示重覆組之平均值±標準差。

圖6表明嵌合OV549.20人類IgG1抑制HCT116細胞在塗佈纖維連接蛋白之盤上的遷移，而不相關的嵌合人類IgG1同型對照物對細胞遷移無影響。出示重覆組之平均值±標準差。

圖7.圖7A展示在小鼠卵巢癌之SKOV3異種移植模型中，OV549.20小鼠IgG2a對腹膜內腫瘤質量及腹水體積之抑制效應。腹膜內注射SKOV3細胞，且五天後用10 mg/kg OV549.20小鼠IgG2a (n=10)、10 mg/kg L9.3小鼠IgG2a或10 mg/kg之小鼠IgG2a同型對照物(n=10)治療小鼠。每週重複治療三次，持續總共六週，繼而分析腫瘤質量及腹膜腔中之腹水體積。圖7B展示第二SKOV3異種移植實驗之結果。腹膜內注射SKOV3細胞，且五天後用10 mg/kg OV549.20小鼠IgG2a (n=10)或媒劑(n=10)治療小鼠。

每週重複治療三次，持續總共六週，繼而分析腫瘤質量及腹膜腔中之腹水體積。

圖8展示在靜脈內MDA-MB-231-luc2小鼠異種移植模型中OV549.20小鼠IgG2a對形成轉移的抑制效應。小鼠(每組n=15)分別接受靜脈內注射(每週三次，持續五週) OV549.20小鼠IgG2a抗體(10 mg/kg)或媒劑。在第一次投與後三天，向所有動物靜脈內注射 5×10^5 個MDA-MB-231-luc2細胞。以規律的時間間隔記錄動物之體重且在注射細胞之後第7、14、21及30天進行全身冷光造影以監測胸部中器官之轉移性定殖。

圖9展示藉由還原SDS-PAGE對經純化人源化抗體變異體H1L1至H4L2之分析。為了比較，親本嵌合OV549.20人類IgG1抗體包括於分析中。重鏈(HC)及輕鏈(LC)藉由箭頭指示。在嵌合OV549.20人類IgG1之情況下，存在兩種形式之輕鏈，即醴化及非醴化形式。

圖10.圖10A展示在Tosoh TSKgel Butyl-NPR疏水性相互作用管柱上之嵌合OV549.20人類IgG1抗體及人源化變異體H1L1的分析。圖10B展示在40°C下在20 mM檸檬酸鈉pH 5.5中培育十二天之前(「非經脅迫之H1L1」)及之後(「在pH 5.5下經脅迫之H1L1」)在Tosoh TSKgel Butyl-NPR管柱上之人源化抗體變異體H1L1的分析。圖10C展示在40°C下在20 mM檸檬酸鈉pH 5.5中培育14天之前(「非經脅迫之AFF4」)及之後(「在pH 5.5下經脅迫之AFF4」)在Tosoh TSKgel Butyl-NPR管柱上之抗體變異體AFF4的分析。

圖11展示AFF4及嵌合人類IgG1同型對照抗體對HCT116、SKOV3及Panc-1細胞增殖之影響，如使用Incucyte裝置藉由匯合度偵測所量測。與同型對照抗體相比，添加AFF4減少所有三種細胞株之增殖。出示重覆組

之平均值±標準差。

圖12表明AFF4抑制經纖維連接蛋白塗佈之盤上的HCT116細胞之遷移，而嵌合人類IgG1同型對照抗體對細胞遷移無影響。出示重覆組之平均值±標準差。

圖13展示經由在PC03、Panc-1、希拉(Hela)及SKOV3癌細胞株上的AFF4介導之抗體依賴性細胞毒性所獲得之特異性溶解%。將癌細胞接種在xCelligence E盤上且使其沉降且附著至盤16-24小時。將來自三個不同供體之經活化天然殺手細胞(CD16低親和力：FF；中等親和力：V/F；高親和力：VV)各自以兩種不同效應細胞與目標(E:T)細胞比率(5:1或10:1)連同AFF4一起以1 µg/mL之最終濃度添加至癌細胞中。使用xCelligence RTCA Analyzer記錄歷經72小時之阻抗量測值且將資料轉化為特異性細胞溶解%。

圖14展示用於與AFF4-WT結合之四種連接子/酬載之結構。圖14A：VA-SG3199 (MP-PEG₈-VA-PABC-SG3199)，CAS 編號：1595275-62-9。IUPAC：[4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)丙醯基胺基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙醯基胺基]-3-甲基丁醯基]胺基]丙醯基]胺基]苯基]甲基 (6S,6aS)-3-[5-[[[(6aS)-2-甲氧基-8-甲基-11-側氧基-6a,7-二氫吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-3-基]氧基]戊氧基]-6-羥基-2-甲氧基-8-甲基-11-側氧基-6a,7-二氫-6H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋-5-甲酸酯]；圖14B：VC-MMAE (MC-VC-PABC-MMAE)，CAS 編號：646502-53-6。IUPAC：[4-[[[(2S)-5-(胺甲醯基胺基)-2-[[[(2S)-2-[6-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)己醯胺基]-3-甲基丁醯基]胺基]戊醯基]胺基]苯基]甲基 N-[(2S)-1-

[[[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]胺基]-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-甲胺基]-3-甲基-1-側氧基丁-2-基]胺基]-3-甲基-1-側氧基丁-2-基]-N-胺甲酸甲酯；圖14C：Gluc-MMAE (MC-β葡萄糖醛酸苷-MMAE)，CAS 編號：1703778-92-0。IUPAC：(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-[3-[6-(2,5-二側氧基吡咯-1-基)己醯胺基]丙醯基胺基]-4-[[[(2S)-1-[[[(2S)-1-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[[[(1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基]胺基]-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基]吡咯啉-1-基]-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基]-甲胺基]-3-甲基-1-側氧基丁-2-基]胺基]-3-甲基-1-側氧基丁-2-基]-甲基胺甲醯基]氧基甲基]苯氧基]-3,4,5-參羥基呔烷-2-甲酸；圖14D：磺酸基-SPDB-DM4，CAS 編號：1626359-59-8；IUPAC：4-[[5-[[[(2S)-1-[[[(1S,2R,3S,5S,6S,16E,18E,20R,21S)-11-氯-21-羥基-12,20-二甲氧基-2,5,9,16-四甲基-8,23-二側氧基-4,24-二氧雜-9,22-二氮雜四環并[19.3.1.110,14.03,5]二十六-10,12,14(26),16,18-五烯-6-基]氧基]-1-側氧基丙-2-基]-甲胺基]-2-甲基-5-側氧基戊-2-基]二硫基]-1-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基-1-側氧基丁烷-2-磺酸。

圖 15 展示使用基於影像之細胞計數器在與 AFF4-WT 及 Human Fabfluor-pH Red Antibody Labeling Dye 分別共培育 15 分鐘或 20 小時之後的 JIMT-1、OVCAR-3 及 MeWo 細胞上所偵測之螢光信號。嵌合人類 IgG1 同型對照抗體用於比較。與經同型對照物/Fabfluor 治療之細胞相比，20 小時後經 AFF4-WT/FabFluor 治療之細胞之螢光顯著增強表明 AFF4-WT 之有效吸收及溶酶體定位。

圖 16 展示四種 AFF4-WT-藥物結合物對三種不同癌細胞株的細胞毒性

效應。AFF4-WT-VC-MMAE、AFF4-WT-Gluc-MMAE、AFF4-WT-VA-SG3199及AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4的連續稀釋液一式兩份地分別與JIMT-1乳癌細胞、MeWo黑色素瘤細胞及OVCAR-3卵巢癌細胞一起培育6天。隨後藉由ATP量化評估細胞存活率，且將未經治療之細胞及在10 μ M多柔比星(Doxorubicin)存在下培育之細胞分別用作100%及0存活率%參考值，計算經AFF4-WT-藥物結合物治療之細胞的存活率%。所示為來自重覆組之個別值。平均值使用GraphPad Prism軟體擬合至4參數對數曲線。

圖17.圖17A展示在人類乳癌異種移植模型中四種AFF4-WT-藥物結合物在小鼠中之抗腫瘤效應。經腹膜內植入JIMT-1乳癌細胞且使腫瘤生長至大約100 mm^3 之平均尺寸。小鼠隨後接受單次靜脈內注射所指定AFF4-WT-藥物結合物或作為對照之媒劑，且隨時間推移監測腫瘤生長。圖17B展示在人類卵巢癌異種移植模型中四種AFF4-WT-藥物結合物在小鼠中之抗腫瘤效應。皮下植入OVCAR-3卵巢癌細胞且使腫瘤生長至大約140 mm^3 之平均尺寸。小鼠隨後接受第一次靜脈內注射所指定AFF4-WT-藥物結合物或作為對照之媒劑，繼之在14天之後接受第二次注射。以規則時間間隔監測腫瘤生長。圖17C展示在人類黑色素瘤異種移植模型中四種AFF4-WT-藥物結合物在小鼠中之抗腫瘤效應。皮下植入MeWo黑色素瘤細胞且使腫瘤生長至大約140 mm^3 。小鼠隨後接受單次靜脈內注射所指定AFF4-WT-藥物結合物或作為對照之媒劑，且以規則時間間隔監測腫瘤生長。

圖18展示在人類乳癌異種移植模型中不同劑量之AFF4-WT-VC-MMAE在小鼠中之抗腫瘤效應。經腹膜內植入JIMT-1乳癌細胞且使腫瘤

生長至大約 100 mm^3 之平均尺寸。小鼠隨後接受單次靜脈內注射指定劑量之AFF4-WT-VC-MMAE，且隨時間推移監測腫瘤生長。

圖19展示在人類卵巢癌之四個不同的L1CAM表現患者源異種移植(PDX)模型中使用AFF4-WT-VC-MMAE在小鼠中治療的抗腫瘤效應。皮下植入PDX腫瘤片段且使其生長至大約 $150\text{-}300 \text{ mm}^3$ 之平均尺寸。小鼠隨後分別每兩週接受一次靜脈內注射AFF4-WT-VC-MMAE或媒劑，且在長達60天內以規則時間間隔監測腫瘤生長。

圖20展示活體外AFF4-WT-VC-MMAE之旁觀者細胞毒性活性。在L1CAM高表現之JIMT-1細胞、L1CAM低表現之MDA-MB-468細胞上或在不存在細胞下分別預培育AFF4-WT-VC-MMAE之連續稀釋液4天。將來自此等預培育物之上清液四倍稀釋轉移至MDA-MB-468細胞中，隨後培育6天。隨後藉由ATP量化評估細胞存活率，且將未經治療之細胞及在 $10 \mu\text{M}$ 多柔比星存在下培育之細胞分別用作100%及0存活率%參考值，計算細胞存活率%。所示為重覆組之平均值與標準差。所指示之AFF4-WT-VC-MMAE濃度係指在MDA-MB468細胞上與上清液一起培育的最終濃度。平均值使用GraphPad Prism軟體擬合至4參數對數曲線。

【實施方式】

【0014】 本發明提供特異性結合至人類L1CAM之新穎抗體。

【0015】 與先前技術中之抗L1CAM抗體相比，特異性結合至人類L1CAM之新穎抗體展現有利特徵。

【0016】 例如，本發明之嵌合OV549.20人類IgG1抗體在Panc-1目標細胞上誘導穩固ADCC。與其相反，先前所描述之與L1CAM第一Ig域結合之抗體L9.3的人類IgG1嵌合版本不在Panc-1細胞上誘導任何ADCC

(參見實例2，圖4)。此外，添加本發明之抗體使得所有三種所測試之癌細胞株之增殖減少(參見實例2，圖5)。與其相反，WO 2016/050702之結合至L1CAM之結合分子對癌細胞株之增殖無影響(參見實例2，圖5)。此外，本發明之抗體降低人類SKOV3卵巢癌細胞之異種移植模型中小鼠中之腫瘤質量及腹水體積，而先前所描述之抗體L9.3不具有效應(參見實例3，圖7A)。

【0017】 本發明之抗體展現對人類癌細胞株表面上之L1CAM具有高結合親和力之特異性結合，但不展示與塗佈盤之人類CHL1、NrCAM或神經束蛋白的任何反應性。此外，本發明之抗體抑制多種不同癌細胞之遷移及增殖，誘導腫瘤細胞之細胞溶解，抑制轉移形成且降低腫瘤負載以及腹水流體之發展。此性質組合使抗體一般特別適於改良腫瘤疾病之臨床症狀。另外，本發明之抗體同時具有高構形及化學穩定性且展示減少轉譯後變異體之形成，這使得其尤其適用於大規模製造、臨床開發、臨床安全性及儲存。

【0018】 如本文所使用，術語「特異性結合至人類L1CAM之抗體 (antibody that specifically binds to human L1CAM)」意謂與天然存在之抗體具有結構相似性且能夠結合至人類L1CAM的任何多肽，其中結合特異性係藉由多肽之CDR確定。因此，「特異性結合至人類L1CAM之抗體」意欲關於結合至人類L1CAM的免疫球蛋白衍生之結構。

【0019】 L1CAM (亦稱為L1)為跨膜蛋白；其為200-220 kDa之神經元細胞黏附分子，L1蛋白家族成員，且參與軸突導引及細胞遷移，對難治性癌症有強大的意義。根據本發明之術語「人類L1CAM (human L1CAM)」較佳理解為人類L1CAM蛋白。人類L1CAM基因序列已分配基

因ID：3897。人類L1CAM蛋白之同功型1前驅物之Genbank條目為NP_000416。L1CAM亦稱為CD171。術語「人類L1CAM」描述已知基於此L1CAM基因藉由人類之任何細胞類型表現的任何形式之蛋白。

【0020】「特異性結合(Specific binding)」理解為結合分子與L1CAM之結合比與對照蛋白，諸如白蛋白之結合強至少50倍，較佳至少100倍，如例如藉由熟習此項技術者已知之方法，諸如基於表面電漿子共振動力學結合分析所確定。或者，亦可使用諸如西方墨點分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)或確定基於細胞計數器之分析中螢光信號之變化的方法。此類特異性結合可基於熟習此項技術者已知之抗體與其抗原之間的任何相互作用，諸如非共價鍵(例如凡得瓦爾力接觸(van der Waals contacts)、氫鍵形成或疏水性相互作用)。

【0021】術語「抗體(antibody)」一般描述與天然存在之抗體具有結構類似性之任何多肽，諸如屬於免疫球蛋白之蛋白家族的蛋白。術語「抗體」包括全長抗體、抗體之抗原結合片段及包含抗體VH區及/或VL區之分子。抗體包括單株抗體、以重組方式產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈Fv(scFv)、駱駝源抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫鍵鍵聯之Fv(dsFv)、抗特應(抗Id)抗體及以上中之任一者之抗原結合片段。抗體可為融合蛋白或結合物之一部分。例如，抗體可包含於嵌合抗原受體(CAR)中。抗體可為任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何同

型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何亞同型(例如IgG2a或IgG2b)之免疫球蛋白分子。各重鏈及各輕鏈可具有可變區及恆定區或其部分。在抗體含有重鏈恆定區或其部分之情況下，重鏈之恆定區可為五種類型之哺乳動物Ig重鏈中之一者： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。存在之重鏈之類型通常分別限定抗體之類別(同型)：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM抗體。類似地，輕鏈之恆定區可以為兩種類型之哺乳動物Ig輕鏈中之一者： κ 及 λ 。重鏈及輕鏈之可變區通常由許多蛋白序列之獨特合併構成，從而允許結合至特定抗原。術語「抗體」進一步包括域骨架，諸如親和體(affibody)、抗運載蛋白(anticalin)、阿非林(affilin)、阿特里體(atrimer)、設計錨蛋白重複蛋白(DARPin)、諸如阿德奈汀(adnectin)及辛替恩(centyrin)之FN3骨架、非諾莫(fynomer)、庫尼茨域(Kunitz domain)、前奈汀(pronectin)及奧博體(OBodies)。

【0022】 較佳地，本文所描述之抗體可為IgG抗體或其同型，諸如人類IgG1、人類IgG2或人類IgG4。

【0023】 較佳地，抗體為人源化單株抗體。或者，抗體可為嵌合抗體。或者，抗體可為人類抗體。例如，本文所描述之抗體為IgG1或IgG2抗體。

【0024】 一般而言，在全長完整抗體之情況下，各重鏈連接至輕鏈中之一者，藉此重鏈及輕鏈之可變區合併而形成兩個相同抗原結合位點中之一者，且其恆定區合併而形成抗體之恆定區。此外，一個重鏈及一個輕鏈之兩種構築體可經由其重鏈之恆定區連接，形成「Y」形分子，藉此兩個臂描繪抗原結合可變區且主幹描繪恆定區。

【0025】 根據本文中本發明之任一態樣的抗體可為完整抗體，意謂

其通常包含三個或四個恆定域之重鏈及一個恆定域之輕鏈以及各別可變域，藉此各域可包含不改變整個域結構之其他修飾，諸如突變、缺失或插入。

【0026】 一般而言，抗體之各重鏈可變區及各輕鏈可變區包含三個非連續排列之互補決定區(CDR)。

【0027】 如本文所使用，術語「CDR」或「互補決定區(complementarity determining region)」意謂在重鏈及輕鏈多肽之可變區內發現之非連續抗原組合位點。此等特定區域已由Kabat等人, *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) ([12])及Kabat等人, *Sequences of protein of immunological interest.* (1991)及由Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)以及由MacCallum等人, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) ([13]-[15])描述，其中當彼此比較時，定義包括胺基酸殘基之重疊或子集。給出涵蓋如上文所引用之參考文獻中之各者所定義之CDR的胺基酸殘基用於比較。較佳地，基於序列比較，術語「CDR」係由Kabat所定義之CDR。

【0028】 CDR通常分別為關於重鏈可變區及輕鏈可變區之已編號CDR1、CDR2及CDR3。因此，抗體之臂通常具有6個CDR，其共同形成抗原結合位點。一般而言，CDR通常各自為1至25個胺基酸長，較佳3至20個胺基酸長，諸如3至16個胺基酸長。抗體可包含一個、兩個或更多個臂，亦即一個、兩個或三個抗原結合位點。

【0029】 在一態樣中，本發明係關於特異性結合至人類L1CAM之抗體，其包含：

(a) 重鏈可變區(VH)互補決定區(CDR) 1，其包含胺基酸序列

GYSITSDYX₁WN (SEQ ID NO: 16)，其中：

X₁為A或T；

或含有序列(SEQ ID NO: 16)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(b) VH CDR2，其包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為F或Y，及

X₂為H或N；

或含有序列(SEQ ID NO: 17)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(c) VH CDR3，其包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為L或F，及

X₂為G、S或A；

或含有序列(SEQ ID NO: 18)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(d) 輕鏈可變區(VL) CDR1，其包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)；

或含有序列(SEQ ID NO: 4)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(e) VL CDR2，其包含胺基酸序列SASYRYX₁ (SEQ ID NO: 19)，其中：

X₁為T或I；

或含有序列(SEQ ID NO: 19)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；及

(f) VL CDR3，其包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)；

或含有序列(SEQ ID NO: 6)中之1、2或3個胺基酸交換的序列。

【0030】 在一態樣中，本發明係關於特異性結合至人類L1CAM之抗體，其包含：

(a) 重鏈可變區(VH)互補決定區(CDR) 1，其包含胺基酸序列GYSITSDYX₁WN (SEQ ID NO: 16)，其中：

X₁為A或T；

(b) VH CDR2，其包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為F或Y，及

X₂為H或N；

(c) VH CDR3，其包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為L或F，及

X₂為G、S或A；

(d) 輕鏈可變區(VL) CDR1，其包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)；

(e) VL CDR2，其包含胺基酸序列SASYRYX₁ (SEQ ID NO: 19)，其中：

X₁為T或I；及

(f) VL CDR3，其包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)。

【0031】 在此態樣中，給定SEQ ID NO:之變數「X₁」或「X₂」獨立於另一SEQ ID NO:之「X₁」或「X₂」。對於各SEQ ID NO:，「X₁」或「X₂」各自獨立地定義。在序列含有「X₁」及「X₂」的情況下，「X₁」

及「X₂」係彼此獨立地選擇。例如，SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)之X₁及X₂通常各自彼此獨立地且獨立於所提及之序列SEQ ID NO: 16 (VH CDR1)、SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)及SEQ ID NO: 19 (VL CDR2)之X₁與SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)之X₂的變異體選擇。例如，SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)之X₁及X₂通常各自彼此獨立地且獨立於所提及之序列SEQ ID NO: 16 (VH CDR1)、SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)及SEQ ID NO: 19 (VL CDR2)之X₁與SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)之X₂的變異體選擇。最後，例如，SEQ ID NO: 19 (VL CDR2)之X₁通常獨立於所提及之序列SEQ ID NO: 16 (VH CDR1)、SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)及SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)之X₁的變異體與所提及之序列SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)及SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)之X₂的變異體選擇。

【0032】 根據本發明之抗體的其餘區域，諸如可變重鏈及輕鏈的構架區，以及適用時重鏈之恆定域及輕鏈之恆定域可具有任何序列，例如熟習此項技術者已知之序列。

【0033】 本發明之抗體可進一步包含兩個相同重鏈及/或兩個相同輕鏈或僅包含不相同的重鏈及輕鏈。還可能分別包含上文所提及之CDR1至CDR3之特定集合的重鏈可變區及輕鏈可變區僅形成抗體之一個臂且抗體之第二(或又一)臂包含不同的重鏈可變區及輕鏈可變區。

【0034】 由於根據本發明之抗體可包含兩個或更多個重鏈可變區及兩個或更多個輕鏈可變區，故此外包含上文所提及之特異性重鏈CDR1至CDR3的重鏈可變區亦不必連接至包含上文所提及之特異性輕鏈CDR1至CDR3的輕鏈可變區。

【0035】 本發明之抗體可來源於哺乳動物，諸如來源於嚙齒動物，

例如來源於小鼠、兔或大鼠。本發明之抗體之各剩餘區，諸如構架區以及適用時重鏈之恆定域及輕鏈之恆定域，可包含一或多個不改變整個域結構之修飾，諸如突變，包括取代、缺失或插入。

【0036】 例如，本發明之抗體可在抗體之Fc域中包含1至10個突變(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變，包括其任何子範圍)，諸如取代、缺失及/或插入，尤其1至10個取代(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個取代，包括其任何子範圍)。各突變可獨立地引入Fc域之一個鏈中。或者，各突變可獨立地對稱地引入Fc域之兩條鏈中。

【0037】 例如，本發明之抗體可在抗體之CL域及/或CH1域中包含1至10個突變(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變，包括其任何子範圍)，諸如取代、缺失及/或插入，尤其1至10個取代(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個取代，包括其任何子範圍)。

【0038】 上文所提及之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3之例示性組合在各種抗體實例之情況下列舉於下表1中，其皆對應於根據本發明之一抗體。其中，抗體OV549.20表示根據本發明之抗體的鼠類實例。H1、H2、H3及H4為鼠類抗體OV549.20之人源化變異體之VH區的實例。AFF1至AFF10為根據本發明之抗體的實例，其已經進一步經受親和力成熟。其中，抗體「AFF4」之CDRH1、CDRH2及CDRH3之組合尤其較佳。以粗體突出顯示之序列係尤其較佳序列。

表1. 例示性抗L1CAM抗體之重鏈CDR序列¹

| 抗體 | CDRH1 (SEQ ID NO:) | CDRH2 (SEQ ID NO:) | CDRH3 (SEQ ID NO:) |
|---------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|
| OV549.20 (鼠類) | GYSITSDYAWN (1) | YISYSGSFSYHPSLKS (2) | SFSYGYGFAY (3) |
| H1, H2, H3, H4 (重鏈可變區) | GYSITSDYAWN (1) | YISYSGSFSYHPSLKS (2) | SFSYGYGFAY (3) |

| 抗體 | CDRH1 (SEQ ID NO:) | CDRH2 (SEQ ID NO:) | CDRH3 (SEQ ID NO:) |
|-------------------------------------|---|--|--|
| AFF1, AFF3, AFF7, AFF9 | GYSITSDYAWN (1) | | |
| AFF2, AFF4, AFF5, AFF6, AFF8, AFF10 | GYSITSDYTWN (9) | | |
| AFF1, AFF2, AFF6, AFF7, AFF8 | | YISYSGSFSYNPSLKS (10) | |
| AFF3, AFF4, AFF9 | | YISYSGSYSYNPSLKS (11) | |
| AFF5, AFF10 | | YISYSGSYSYHPSLKS (12) | |
| AFF5, AFF6 | | | SLSYGYGFAY (13) |
| AFF10 | | | SFSYGYGFAY (3) |
| AFF9 | | | SFSYAYGFAY (83) |
| AFF1, AFF2, AFF3, AFF4, AFF7, AFF8 | | | SFSYSYGFAY (14) |
| AFF4 | GYSITSDYTWN (9) | YISYSGSYSYNPSLKS (11) | SFSYSYGFAY (14) |
| 人源化最佳化抗體(如人類IgG1) | GYSITSDYTWN (9) | YISYSGSYSYNPSLKS (11) | SFSYSYGFAY (14) |
| 共同序列 | GYSITSDYX ₁ WN (16) X ₁ 為A或T 較佳地， X ₁ 為T | YISYSGSX ₁ SYX ₂ PSLKS (17) X ₁ 為F或Y X ₂ 為H或N 較佳地， X ₁ 為Y，及/或 X ₂ 為N | SX ₁ SYX ₂ YGFAY (18) X ₁ 為L或F， X ₂ 為G、S或A 較佳地， X ₁ 為F，及/或 X ₂ 為S |

¹表1中之CDR係根據Kabat確定。

【0039】 上文所提及之本發明之VL CDR1、VL CDR2及VL CDR3的例示性組合在表1中已提及之各種抗體實例的情況下列舉於下表2中。L1及L2為與鼠類抗體OV549.20相關之人源化抗體之輕鏈可變區的實例，其可進一步與表1之H1、H2、H3及H4之VH CDR1、VH CDR2及VH CDR3組中的任一者合併。抗體可包含如表1中所描繪之一種抗體之VH CDR及如表2中所描繪之相同或不同抗體之VL CDR，較佳如表2中所描繪之相同抗體的VL CDR。以粗體突出顯示之序列係尤其較佳序列。AFF1

至AFF10為根據本發明之抗體的實例，其已經進一步經受親和力成熟。其中，抗體「AFF4」之CDRL1、CDRL2及CDRL3之組合尤其較佳。

表2. 例示性抗L1CAM抗體之輕鏈CDR序列²

| 抗體 | CDRL1 (SEQ ID NO:) | CDRL2 (SEQ ID NO:) | CDRL3 (SEQ ID NO:) |
|---|------------------------|---|----------------------|
| OV549.20 (鼠類) | KASQDVSSAVA (4) | SASYRYT (5) | QQHYSTPWT (6) |
| L1, L2 (輕鏈可變區) [與H1至H4 VH區合併] | KASQDVSSAVA (4) | SASYRYT (5) | QQHYSTPWT (6) |
| AFF1, AFF2, AFF3, AFF4, AFF5, AFF6, AFF7, AFF8, AFF9, AFF10 | KASQDVSSAVA (4) | | QQHYSTPWT (6) |
| AFF1, AFF2, AFF3, AFF4, AFF5, AFF6, AFF9, AFF10 | | SASYRYT (5) | |
| AFF7, AFF8 | | SASYRYI (15) | |
| AFF4 | KASQDVSSAVA (4) | SASYRYT (5) | QQHYSTPWT (6) |
| 人源化最佳化抗體(如人類IgG1) | KASQDVSSAVA (4) | SASYRYT (5) | QQHYSTPWT (6) |
| 共同序列 | KASQDVSSAVA (4) | SASYRYX ₁ (19) X ₁ 為T或I較佳地，X ₁ 為T | QQHYSTPWT (6) |

²表2中之CDR係根據Kabat確定。

【0040】較佳地，SEQ ID NO: 16 (VH CDR1)中之X₁為T；及/或SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)中之X₁為Y及/或SEQ ID NO: 17 (VH CDR2)中之X₂為N；及/或SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)中之X₁為F及/或SEQ ID NO: 18 (VH CDR3)中之X₂為S；及/或SEQ ID NO: 19 (VL CDR1)中之X₁為T。

【0041】在一較佳實施例中，本發明係關於特異性結合至本發明之

人類L1CAM之抗體，其中：

(a) VH CDR1包含胺基酸序列GYSITSDYTWN (SEQ ID NO: 9)或含有序列(SEQ ID NO: 9)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；及/或

(b) VH CDR2包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為Y，及/或

X₂為N；

或含有序列(SEQ ID NO: 17)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

及/或

(c) VH CDR3包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為F，及/或

X₂為S；

或含有序列(SEQ ID NO: 18)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

及/或

(d) VL CDR2包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)；

或含有序列(SEQ ID NO: 5)中之1、2或3個胺基酸交換的序列。

【0042】 在一較佳實施例中，本發明係關於特異性結合至本發明之人類L1CAM之抗體，其中：

(a) VH CDR1包含胺基酸序列GYSITSDYTWN (SEQ ID NO: 9)；及/或

(b) VH CDR2包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為Y，及/或

X₂為N；

及/或

(c) VH CDR3 包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為F，及/或

X₂為S；

及/或

(d) VL CDR2 包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)。

【0043】 在一更佳實施例中，本文所描述之本發明之特異性結合至人類L1CAM的抗體包含：

(a) 重鏈可變區(VH)，其包含有包含胺基酸序列GYSITSDYTNW (SEQ ID NO: 9)或含有序列(SEQ ID NO: 9)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VH CDR1、包含胺基酸序列YISYSGSYSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)或含有序列(SEQ ID NO: 11)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VH CDR2，及包含胺基酸序列SFSYSYGFAY (SEQ ID NO: 14)或含有序列(SEQ ID NO: 14)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VH CDR3；及

(b) 輕鏈可變區(VL)，其包含有包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)或含有序列(SEQ ID NO: 4)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VL CDR1、包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)或含有序列(SEQ ID NO: 5)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VL CDR2，及包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)或含有序列(SEQ ID NO: 6)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VL CDR3。

【0044】 在一更佳實施例中，本文所描述之本發明之特異性結合至人類L1CAM的抗體包含：

(a) 重鏈可變區(VH)，其包含有包含胺基酸序列GYSITSDYTNW (SEQ ID NO: 9)的VH CDR1、包含胺基酸序列YISYSGSYSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)的VH CDR2，及包含胺基酸序列SFSYSYGFAY (SEQ ID NO: 14)的VH CDR3；及

(b) 輕鏈可變區(VL)，其包含有包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)的VL CDR1、包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)的VL CDR2，及包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)的VL CDR3。

【0045】 除上文所提及之特定CDR以外，本發明之抗體的重鏈可變區及/或輕鏈可變區亦可包含一或多個下文所提及之特定構架區。

【0046】 本發明之抗體可包含來自任何物種之構架序列。較佳地，其包含小鼠及/或人類構架序列或其雜種。例如，構架序列可各自為人類的，其中視情況存在非人類位置，諸如1至10個(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個，包括其任何子範圍)非人類位置。

【0047】 如本文所使用，術語「構架(FR)胺基酸殘基(framework (FR) amino acid residues)」係指免疫球蛋白鏈之構架區中之彼等胺基酸。如本文所使用，術語「構架區(framework region)」或「FR區(FR region)」包括作為可變區之一部分但不為CDR之一部分的胺基酸殘基(例如使用Kabat之CDR定義)。構架區通常藉由支援抗體結構(且不與抗原接觸)或藉由直接接觸抗原來支援抗體與抗原之結合。術語「抗原(antigen)」描述可由對該抗原具有特異性之抗體結合的任何分子或分子結

構。

【0048】 用於產生具有如上文所提及之CDR序列之單株抗體的方法為此項技術中已知，且包括將編碼CDR之核酸序列引入至編碼所需構架序列之適合表現載體中。下文描述其他方法。

【0049】 重鏈可變區之適合構架區為例如SEQ ID NO: 64-72。詳言之，本發明之抗體之重鏈可變區可包含一至四個選自SEQ ID NO: 64-72之群的構架區。較佳地，本發明之抗體之重鏈可變區包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO: 64-72之群的構架區，更佳四個選自SEQ ID NO: 64-72之群的構架區。

【0050】 遵循針對CDR之Kabat編號系統，藉由Kabat確定VH CDR且構架區為圍繞可變區中之CDR的胺基酸殘基，格式為FR1、CDRH1、FR2、CDRH2、FR3、CDRH3及FR4。

【0051】 因此，重鏈可變區之FR1可獨立地選自SEQ ID NO: 64或65，重鏈可變區之FR2可獨立地選自SEQ ID NO: 66-69，重鏈可變區之FR3可獨立地選自SEQ ID NO: 70或72，及/或重鏈可變區之FR4可為SEQ ID NO: 71。

【0052】 輕鏈可變區之適合構架區為例如SEQ ID NO: 73-82。本發明之抗體之輕鏈可變區可包含一至四個選自SEQ ID NO: 73-82之群的構架區。較佳地，本發明之抗體之輕鏈可變區包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO: 73-82之群的構架區，更佳四個選自SEQ ID NO: 73-82之群的構架區。

【0053】 類似地，遵循針對CDR之Kabat編號系統，藉由Kabat確定VL CDR且構架區為圍繞可變區中之CDR的胺基酸殘基，格式為FR1、

CDRL1、FR2、CDRL2、FR3、CDRL3及FR4。

【0054】 因此，輕鏈可變區之FR1可獨立地選自SEQ ID NO: 76、80或82，輕鏈可變區之FR2可獨立地選自SEQ ID NO: 73或77，輕鏈可變區之FR3可獨立地選自SEQ ID NO: 74、78或81，及/或輕鏈可變區之FR4可獨立地選自SEQ ID NO: 75或79。

【0055】 此外，重鏈可變區之FR1至FR4可獨立地選自輕鏈可變區之FR1至FR4，且輕鏈可變區之FR1至FR4可獨立地選自重鏈可變區之FR1至FR4。

【0056】 下表3及表4提供分別進一步包含SEQ ID NO: 64-72作為重鏈可變區之構架區FR1至FR4及SEQ ID NO: 73-82作為輕鏈可變區之構架區FR1至FR4的本發明抗體之實例。其中，抗體OV549.20表示根據本發明之抗體的鼠類實例。H1、H2、H3及H4為鼠類抗體OV549.20之人源化變異體之VH區的實例。L1及L2為鼠類抗體OV549.20之人源化變異體之VL區的實例。AFF1至AFF10為根據本發明之抗體的實例，其已經進一步經受親和力成熟。

【0057】 較佳地，VH構架區FR1至FR4之組選自下表3中針對特異性抗體提供之組。較佳地，VL構架區FR1至FR4之組選自下表4中針對特異性抗體提供之組。較佳地，VH構架區FR1至FR4之組選自下表3中針對特異性抗體提供之組且VL構架區FR1至FR4之組選自下表4中針對相同特異性抗體提供之組。

表3. 例示性抗L1CAM抗體之VH構架(FR)序列³

| 抗體 | VH FR1 (SEQ ID NO:) | VH FR2 (SEQ ID NO:) | VH FR3 (SEQ ID NO:) | VH FR4 (SEQ ID NO:) |
|--|---------------------------------------|-------------------------|--|------------------------|
| H1-H4 AFF1-AFF10 人源化最佳化抗 體(如人類IgG1) | QVQLQESGPGL VKPSQTLSTCT VT (64) | | RVTISRDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR (70) | |
| OV549.20 | DVQLQESGPGL VKPSQSLSTCT VT (65) | | RISITRDTSKN QFFLQLSSVTT EDTATYYCAR (72) | |
| H1, AFF1-AFF10 人源化最佳化抗 體(如人類IgG1) | | WIRQFPGKG LEWMG (66) | | |
| H2 | | WIRQFPGNG LEWIG (67) | | |
| H3 | | WIRQFPGNG LEWMG (68) | | |
| H4, OV549.20 | | WIRQFPGNK VEWMG (69) | | |
| H1-H4, AFF1- AFF10 人源化最佳化抗 體(如人類IgG1) OV549.20 | | | | WGQGTLVV VSS (71) |

³表3中所描述之VH構架區係基於Kabat編號系統針對CDR之邊界確定。換言之，VH CDR係藉由Kabat確定且構架區為可變區中之CDR周圍的胺基酸殘基，格式為FR1、CDRH1、FR2、CDRH2、FR3、CDRH3及FR4。

表4. 例示性抗L1CAM抗體之VL構架(FR)序列⁴

| 抗體 | VL FR1 (SEQ ID NO:) | VL FR2 (SEQ ID NO:) | VL FR3 (SEQ ID NO:) | VL FR4 (SEQ ID NO:) |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|---|------------------------|
| OV549.20 | DIVMTQSHKF MSTSVGDRV NITC (82) | WYQQKPGQ SPKLLIY (73) | GVPDHFTGSG SGTDFTFTISS VQAEDLAVYY C (74) | FGGGTKLEIK (75) |
| L1 AFF1-AFF10 人源化最佳化抗 體(如人類IgG1) | DIQMTQSPSS LSASVGDRV ITC (76) | WYQQKPGK APKLLIY (77) | GVPDRFSGSG SGTDFTFTISSL QPEDFATYYC (78) | FGGGTKVEIK (79) |
| L2 | DIVMTQSPSS LSASVGDRV ITC (80) | WYQQKPGQ SPKLLIY (73) | GVPDRFSGSG SGTDFTFTISSL QPEDFATYYC (81) | FGGGTKLEIK (75) |

⁴表4中所描述之VL構架區係基於Kabat編號系統針對CDR之邊界確定。換言之，VL CDR係藉由Kabat確定且構架區為可變區中之CDR周圍的胺基酸殘基，格式為FR1、CDRL1、FR2、CDRL2、FR3、CDRL3及FR4。

【0058】 根據本發明之抗體可進一步包含重鏈可變區序列，該重鏈可變區序列包含SEQ ID NO: 23-34中之任一者之重鏈可變區序列的構架區，及/或進一步包含輕鏈可變區序列，該輕鏈可變區序列包含SEQ ID NO: 20-22中之任一者之輕鏈可變區序列的構架區。

【0059】 在另一較佳實施例中，特異性結合至本發明之人類L1CAM的抗體進一步包含重鏈可變區序列，該重鏈可變區序列包含SEQ ID NO: 23-34中之任一者之重鏈可變區序列的構架區，及/或進一步包含輕鏈可變區序列，該輕鏈可變區序列包含SEQ ID NO: 20-22中之任一者之輕鏈可變區序列的構架區。

【0060】 根據本發明之抗體亦可包含有包含選自由SEQ ID NO: 23-34組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區序列，及/或包含有包含選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。在此情況下，重鏈可變區可獨立地選自所選輕鏈可變區且輕鏈可變區可獨立地選自所選重鏈可變區。

【0061】 因此，抗體之重鏈可變區中之一者可選自由SEQ ID NO: 23-34組成之群，而第二重鏈可變區之序列可不選自此群。

【0062】 此外，根據一實施例之抗體的輕鏈可變區中之一者可選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群，而第二輕鏈可變區之序列可不選自此群。

【0063】 此外，當根據本發明之抗體包含有包含選自由SEQ ID NO:

23-34組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區序列且包含有包含選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區序列時，此等序列可未必為包含兩個或更多個臂之抗體之同一臂的一部分，而是亦可分配至不同臂。

【0064】 本文進一步針對所有實施例揭示重鏈可變區序列、輕鏈可變區序列、互補決定區、輕鏈序列及重鏈序列「包含」各別指定序列或「由其組成」。

【0065】 根據本發明之抗體可進一步包含一個或兩個包含獨立地選自由SEQ ID NO: 23-34組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含一個或兩個包含獨立地選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0066】 在一較佳實施例中，特異性結合至本發明之人類L1CAM的抗體包含有包含選自由SEQ ID NO: 23-34組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區序列，及/或包含有包含選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0067】 在一較佳實施例中，特異性結合至本發明之人類L1CAM的抗體包含具有選自由SEQ ID NO: 23-34組成之群之胺基酸序列的重鏈可變區序列，及/或包含具有選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0068】 重鏈可變區及輕鏈可變區之序列的例示性組合在下表5中給出。其中提及之抗體名稱係關於在上文表1至表4的情況下提到及解釋的彼等者。以粗體突出顯示之序列係尤其較佳序列。

【0069】 較佳地，在本文中抗體的情況下，VH及/或VL序列具有如

下表5中所示之序列。

表5. 例示性抗L1CAM抗體之VH及VL序列⁵

| 抗體 | 重鏈可變區 | SEQ ID NO: | 輕鏈可變區 | SEQ ID NO: |
|----|---|------------|---|------------|
| H1 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWRQFP GKGLEWMGYISYSG SFSYHPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARS FSYGYGFAYWGQG TLVTVSS | 23 | [在實例中與L1或L2合併] | |
| H2 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWRQFP GNGLEWIGYISYSG SFSYHPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARS FSYGYGFAYWGQG TLVTVSS | 24 | [在實例中與L1或L2合併] | |
| H3 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWRQFP GNGLEWMGYISYS GSFSYHPSLKSRVTI SRDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR SFSYGYGFAYWGQG GTLVTVSS | 25 | [在實例中與L1或L2合併] | |
| H4 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWRQFP GNKVEWMGYISYS GSFSYHPSLKSRVTI SRDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR SFSYGYGFAYWGQG GTLVTVSS | 26 | [在實例中與L1或L2合併] | |
| L1 | [在實例中與H1、 H2、H3或H4合併] | | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWF GGGTKVEIK | 20 |
| L2 | [在實例中與H1、 | | DIVMTQSPSSLSAS | 22 |

| 抗體 | 重鏈可變區 | SEQ ID NO: | 輕鏈可變區 | SEQ ID NO: |
|------|---|------------|---|------------|
| | H2、H3或H4合併] | | VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG QSPKLLIYSASYRYT GVPDRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKLEIK | |
| AFF1 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWIWIRQFP GKGLEWMGYISYSG SFSYNPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARS FSYSYGFAYWGQG TLVTVSS | 27 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| AFF2 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYTWNWIWIRQFPG KGLEWMGYISYSGS FSYNPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARSE SYSYGFAYWGQGT LVTVSS | 28 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| AFF3 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWIWIRQFP GKGLEWMGYISYSG SYSYNPSLKSRVTIS RDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARS FSYSYGFAYWGQG TLVTVSS | 29 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| AFF4 | QVQLQESGPGLVK PSQTLSLTCTVTGY SITSDYTWNWIWIRQF PGKGLEWMGYISYS GSYSYNPSLKSRVT ISRDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCA RFSYSYGFAYWG QGTLVTVSS | 30 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| AFF5 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYTWNWIWIRQFPG KGLEWMGYISYSGS YSYHPSLKSRVTISR DTSKNQFSLKLSSV | 31 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA | 20 |

| 抗體 | 重鏈可變區 | SEQ ID NO: | 輕鏈可變區 | SEQ ID NO: |
|-------|--|------------|--|------------|
| | TAADTAVYYCARS SYGYGFAYWGQGT LTVSS | | TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | |
| AFF6 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYTWNWIRQFPG KGLEWMGYISYSGS FSYNPSLKSRTISR DTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARS SYGYGFAYWGQGT LTVSS | 32 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| AFF7 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWIRQFP KGLEWMGYISYSG SFSYNPSLKSRTISR RDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARS FSYSYGFAYWGQGT TLTVSS | 27 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYI GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 21 |
| AFF8 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYTWNWIRQFPG KGLEWMGYISYSGS FSYNPSLKSRTISR DTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARSE SYSYGFAYWGQGT LTVSS | 28 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYI GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 21 |
| AFF9 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYAWNWIRQFP KGLEWMGYISYSG SYSYNPSLKSRTISR RDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARS FSYAYGFAYWGQGT TLTVSS | 33 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| AFF10 | QVQLQESGPGLVKP SQTLSLTCTVTGYSI TSDYTWNWIRQFPG KGLEWMGYISYSGS YSYHPSLKSRTISR DTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARSE SYGYGFAYWGQGT LTVSS | 34 | DIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCKASQD VSSAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGT DFTFTISLQPEDFA TYYCQQHYSTPWTF GGGTKVEIK | 20 |
| 人源化最 | QVQLQESGPGLVK | 30 | DIQMTQSPSSLSAS | 20 |

| 抗體 | 重鏈可變區 | SEQ ID NO: | 輕鏈可變區 | SEQ ID NO: |
|-----------------------|--|------------|--|------------|
| 佳化抗體 (如人類 IgG1) | <u>PSQTL</u> <u>SLTCTVTGY</u> <u>SITSDYTWNWIRQF</u> <u>PGKGLEWMGYISYS</u> <u>GSYSYNPSLKSRVT</u> <u>ISRDTSKNQFSLKL</u> <u>SSVTAADTAVYYCA</u> <u>RSFSYSYGFAYWG</u> <u>QGTLVTVSS</u> | | <u>VGDRVTITCKASQD</u> <u>VSSAVAWYQQKPG</u> <u>KAPKLLIYSASYRYT</u> <u>GVPSRFSGSGSGT</u> <u>DFTFTISLQPEDFA</u> <u>TYYCQQHYSTPWF</u> <u>GGGTKVEIK</u> | |

⁵在表5中，CDR加下劃線示出。表5中之CDR係根據Kabat確定。

【0070】 在另一較佳實施例中，抗體包含本文中稱為AFF1至AFF10之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF1之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF2之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF3之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF4之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF5之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF6之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF7之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF8之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF9之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。因此，較佳地，抗體包含本文中稱為AFF10之抗體的至少一個VH區及至少一個VL區。VH及VL區之序列示於上表5中。

【0071】 使用AFF4尤其較佳。AFF4之VH區具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列，且AFF4之VL區具有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列。

【0072】 因此，抗體可包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變

區序列。因此，抗體亦可包含一或多個包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含一或多個包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0073】 此外，在抗體包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列且包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列的情況下，此等序列未必為包含兩個或更多個臂之抗體之同一臂的一部分，而是亦可分配至不同臂。

【0074】 在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0075】 此外，本發明之抗體可包含有包含選自SEQ ID NO: 35、84及37之群之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列。

【0076】 本發明之抗體可進一步包含有包含SEQ ID NO: 36及38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0077】 此外，本發明之抗體可包含一個或兩個包含獨立地選自SEQ ID NO: 35、84及37之群之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含一個或兩個包含獨立地選自SEQ ID NO: 36及38之群之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0078】 較佳地，抗體包含

(a)包含有包含SEQ ID NO: 35之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列；及/或

(b)包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列；及/或

(c)包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0079】 在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 37或84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 37或84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0080】 在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0081】 在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。在又一更佳實施例中，抗體包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0082】 在另一更佳實施例中，抗體由包含SEQ ID NO: 37或84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。在另一更佳實施例中，抗體由包含SEQ ID NO: 37或84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。

【0083】 在另一更佳實施例中，抗體由包含SEQ ID NO: 37之胺基

酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。在另一更佳實施例中，抗體由包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。

【0084】 在另一更佳實施例中，抗體由包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。在另一更佳實施例中，抗體由包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。

【0085】 在實例5中，製備及使用人源化最佳化抗體。在實例5中，提供人源化最佳化抗體「AFF4」，其為IgG型抗體，其中重鏈可變區序列由SEQ ID NO: 30之胺基酸序列組成且輕鏈可變區序列由連接至人類IgG1重鏈恆定區的SEQ ID NO: 20之胺基酸序列組成，其中在人類IgG1恆定區中具有G236A/S239D/A330L/I332E突變(EU編號)。抗體之重鏈由SEQ ID NO: 37之胺基酸序列組成且輕鏈序列由SEQ ID NO: 38之胺基酸序列組成。

【0086】 在實例中，亦製備且使用稱為「AFF4-WT」之人源化最佳化抗體。抗體「AFF4-WT」為IgG型抗體，其中重鏈可變區序列由SEQ ID NO: 30之胺基酸序列組成且輕鏈可變區序列由連接至野生型人類IgG1恆定區的SEQ ID NO: 20之胺基酸序列組成。AFF4-WT之重鏈由SEQ ID NO: 84之胺基酸序列組成且輕鏈序列由SEQ ID NO: 38之胺基酸序列組成。

【0087】 視情況，1、2或3個胺基酸可缺失於全長重鏈之C端處。已

知此類缺失不影響抗體之穩定性。此外，還可能使用包括Fc域之C端離胺酸的重鏈。視所用重組表現系統而定，Fc域之C端離胺酸可存在或不存在。

【0088】重鏈可變區及輕鏈可變區之序列的例示性組合於下表6中給出。其中提及之抗體名稱係關於在上文表1至表5的情況下提到及解釋的彼等者。

表6. 例示性抗L1CAM抗體之重鏈(HC)及輕鏈(LC)的序列⁶

| 抗體 | 重鏈 | SEQ ID NO: | 輕鏈 | SEQ ID NO: |
|--|---|------------|--|------------|
| OV549.20 (鼠類) | <u>DVQLQESG</u> <u>PGLVKPSQS</u> <u>L</u> <u>SLTCTVTG</u> <u>YSITSDYAW</u> <u>N</u> <u>WIRQFPG</u> <u>NKVEWMGYI</u> <u>S</u> <u>YSGSFSY</u> <u>HPSLKSRISIT</u> <u>R</u> <u>DTSKNQFF</u> <u>LQLSSVTTE</u> <u>D</u> <u>TATYYCAR</u> <u>SFSYGYGF</u> <u>A</u> <u>YWGQGTL</u> <u>VTVSSAKTT</u> <u>A</u> <u>PSVYPLA</u> <u>PVCGDTTGS</u> <u>S</u> <u>VTLGCLV</u> <u>KGYFPEPVTL</u> <u>T</u> <u>WNSGSL</u> <u>S</u> <u>SGVHTFPAV</u> <u>L</u> <u>QSDLYTL</u> <u>SSSVTVTSST</u> <u>W</u> <u>PSQSITC</u> <u>NVAHPASST</u> <u>K</u> <u>VDKKIEP</u> <u>RGPTIKPCPP</u> <u>C</u> <u>KCPAPNL</u> <u>LGGPSVFIFP</u> <u>P</u> <u>KIKDVL</u> <u>MISLSPIVTCVV</u> <u>V</u> <u>DVSEDDP</u> <u>DVQISWVFN</u> <u>N</u> <u>VEVHTA</u> <u>QTQTHREDYN</u> <u>S</u> <u>TLRVVSA</u> <u>LPIQHQDWM</u> <u>S</u> <u>GKEFKC</u> <u>KVNNKDLPAPI</u> <u>E</u> <u>RTISKPK</u> <u>G</u> <u>SVRAPQVYV</u> <u>L</u> <u>PPPEEEM</u> <u>TKKQVTLTC</u> <u>M</u> <u>VTD</u> <u>DFMPEDI</u> <u>YVEWTNN</u> <u>G</u> <u>KTELNY</u> <u>KNTEPVLDSD</u> <u>G</u> <u>SYFMYS</u> <u>KLRVEKKNWV</u> <u>E</u> <u>RNSYSC</u> <u>SVVHEGLHNH</u> <u>H</u> <u>TTKSF</u> <u>S</u> <u>RTPG</u> | 35 | <u>D</u> <u>IVMTQ</u> <u>SHKFM</u> <u>STSVGDR</u> <u>V</u> <u>NITCKA</u> <u>SQDVSSA</u> <u>VAWY</u> <u>Q</u> <u>QKPGQ</u> <u>SPKLLI</u> <u>YSASYR</u> <u>Y</u> <u>TGVPD</u> <u>HFTG</u> <u>SGSGTDF</u> <u>F</u> <u>TISSV</u> <u>QAEDL</u> <u>VYYCQQ</u> <u>H</u> <u>YSTPWT</u> <u>FGGGT</u> <u>KLEIKR</u> <u>A</u> <u>DAAPT</u> <u>VSIFPP</u> <u>SSEQLTS</u> <u>G</u> <u>ASVVC</u> <u>FLNNF</u> <u>YPKDIN</u> <u>V</u> <u>KWKID</u> <u>G</u> <u>SERQNG</u> <u>VLNS</u> <u>W</u> <u>TDQD</u> <u>SKD</u> <u>STYSMS</u> <u>SSTLT</u> <u>L</u> <u>TKDEY</u> <u>ERHNS</u> <u>YTCEATH</u> <u>K</u> <u>TSTSP</u> <u>IVKSF</u> <u>NRNEC</u> | 36 |
| 人源化最佳 化抗體 「AFF4」 (人類IgG1版 本；具有 G236A/S239 D/A330L/I3 32E突變 (EU編號)) | <u>Q</u> <u>VQLQES</u> <u>G</u> <u>PGLVKPSQT</u> <u>L</u> <u>SLTCTVT</u> <u>GYSITSDYT</u> <u>W</u> <u>N</u> <u>WIRQF</u> <u>PGKLE</u> <u>WMGYI</u> <u>S</u> <u>YSGSYS</u> <u>YNPSL</u> <u>KSRVTI</u> <u>S</u> <u>RDTSKN</u> <u>QFSL</u> <u>KLSSVTA</u> <u>A</u> <u>DAVYYC</u> <u>AR</u> <u>SFSYSYG</u> <u>F</u> <u>AYWGQ</u> <u>GLVT</u> <u>VSSAST</u> <u>K</u> <u>GPSVF</u> <u>PLAPSS</u> <u>KSTSG</u> <u>G</u> <u>TAA</u> <u>LGCLV</u> <u>KDYFPEP</u> <u>T</u> <u>VSWNS</u> <u>GAL</u> <u>TSGVHTFP</u> | 37 | <u>D</u> <u>IQMTQ</u> <u>SPSSL</u> <u>SASV</u> <u>GDR</u> <u>V</u> <u>TITCKA</u> <u>SQDVSSA</u> <u>VAWY</u> <u>Q</u> <u>QKPGK</u> <u>APKLLI</u> <u>YSASYRY</u> <u>I</u> <u>GVPSR</u> <u>FSGSG</u> <u>SGTDFTF</u> <u>T</u> <u>ISSLQ</u> <u>PEDFA</u> <u>TYCQQHY</u> <u>S</u> <u>TPWT</u> <u>FGGGT</u> <u>KVEIKRTV</u> <u>A</u> <u>APSVF</u> <u>IFPPS</u> <u>DEQLKSGT</u> <u>A</u> <u>SVVCL</u> <u>LNNF</u> <u>YPRE</u> <u>AKVQ</u> <u>W</u> <u>KVDN</u> <u>ALQ</u> <u>SGNSQ</u> <u>ESVT</u> <u>E</u> <u>QDSK</u> <u>D</u> <u>STYSL</u> <u>SSTLTLSK</u> | 38 |

| 抗體 | 重鏈 | SEQ ID NO: | 輕鏈 | SEQ ID NO: |
|---|---|------------|---|------------|
| | AVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLAGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKAL PLPEEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG | | ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC | |
| 人源化最佳 化抗體 「AFF4- WT」 (人類IgG1版 本；野生型 人類IgG1) | <i>QVQLQESGPGLVKPSQT</i> <i>LSLTCTVTGYSITSDYTW</i> <i>NWIRQFPGKLEWMGYI</i> <i>SYSGSYSYNPSLKS RVTI</i> <i>SRDTSKNQFSLKLSSVTA</i> <i>ADAVYYCARSEFSYSYG</i> <i>FAYWGQGLVTVSSAST</i> KGPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG | 84 | <i>DIQMTQSPSSLSASVGD</i> <i>VTITCKASQDVSSAVAWY</i> <i>QQKPGKAPKLLIYSASYRY</i> <i>TGVPSRFSGSGSGTDFTF</i> <i>TISSLQPEDFATYYCQQHY</i> <i>STPWTFGGGTKVEIKRTV</i> AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC | 38 |

⁶在表6中，CDR加下劃線示出。表6中之CDR係根據Kabat確定。各別可變結構域重鏈及輕鏈序列之FR1、FR2及FR3的序列以斜體示出。

【0089】 在又一更佳實施例中，抗體包含：

(a) 重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列；及

(b) 輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列。

【0090】較佳地，抗體包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列且包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。較佳地，抗體包含具有SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列且包含具有SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0091】抗體可進一步選自單株抗體、以重組方式產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈Fv (scFV)、駱駝源抗體、親和體、抗運輸蛋白、阿非林、阿特里體、設計錨蛋白重複蛋白、諸如阿德奈汀及辛替恩之FN3骨架、非諾莫、庫尼茨域、前奈汀及奧博體、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫鍵鍵聯之Fv (dsFv)、抗特應(抗Id)抗體及以上中之任一者之抗原結合片段，及/或其中抗體包含於嵌合抗原受體(CAR)中。

【0092】抗體可選自單株抗體。單株抗體為相同的單特異性抗體，因為其由一種類型之免疫細胞產生，該免疫細胞為單一母細胞之所有純系，例如由B淋巴球之單一純系產生；或具有相同胺基酸序列之抗體。

「單株抗體」及單株抗體之產生屬於目前先進技術。一般而言，單株抗體可例如根據已知的Winter & Milstein [17]之方法製備。製備單株抗體分泌性融合瘤之替代方案為，針對所關注多肽之單株抗體可藉由使用所關注多肽篩選重組組合免疫球蛋白庫(例如抗體噬菌體呈現庫)來鑑別及分離。用於生成及篩選噬菌體呈現庫之套組可商購(例如Pharmacia Recombinant

Phage Antibody System，目錄號：27-9400-01；及Stratagene SurfZAP Phage Display Kit，目錄號：240612)。另外，尤其適合用於產生及篩選抗體呈現庫之方法及試劑的實例可見於例如美國專利第5,223,409號；WO 92/18619；WO 91/17271；WO 92/20791；WO 92/15679；WO 93/01288；WO 92/01047；WO 92/09690；WO 90/02809；[19]-[22]中。

【0093】 抗體可進一步選自合成抗體。術語「合成抗體(synthetic antibody)」描述活體外完全產生而無任何動物牽涉之任何抗體。用於生成合成抗體之方法為熟習此項技術者所熟知，諸如重組蛋白產生。然而，雖然合成抗體係在活體外生成，但其仍可在動物或融合瘤細胞中活體內產生，諸如使用細胞株(諸如哺乳動物、昆蟲或細菌細胞株)。適合之方法為熟習此項技術者所熟知。

【0094】 抗體可進一步選自以重組方式產生之抗體。因而，術語「以重組方式產生之抗體(recombinantly produced antibodies)」包含使用基因重組生成之DNA分子在活體外產生的任何抗體。重組抗體產生可在動物或融合瘤細胞中使用細胞株(諸如哺乳動物、昆蟲或細菌細胞株)進行。重組產生抗體之方法為熟習此項技術者所熟知。例如，可將用於免疫特異性抗體重鏈及輕鏈之抗體基因選殖入高產率表現載體中，隨後將該等表現載體引入表現宿主(諸如細菌、酵母、昆蟲或哺乳動物細胞)中以產生重組抗體。

【0095】 抗體可進一步選自單價抗體、單特異性抗體及/或多特異性抗體，包括雙特異性抗體。

【0096】 抗體之價數描述每個抗體分子所存在之抗原結合位點之數目。因此，術語「單價抗體(monovalent antibodies)」描述具有一個針對

抗原、抗原決定基或細胞類型或組織之結合位點的任何抗體。二價抗體具有兩個針對抗原、抗原決定基或細胞類型或組織之結合位點。多價抗體具有多個，亦即兩個或更多個針對抗原、抗原決定基或細胞類型或組織之結合位點，諸如兩個、三個、四個或五個。

【0097】 抗體之特異性一般描述其識別單一抗原之抗原決定基及將其與其餘部分區分的能力。術語「單特異性抗體 (monospecific antibody)」描述對一種抗原、抗原決定基、細胞類型或組織具有特異性之任何抗體。例如，單株抗體係單特異性的，因為其利用其兩個抗原結合臂中之各者結合至僅一種抗原決定基。如本文所使用，術語「雙特異性抗體 (bispecific antibody)」在最廣泛意義上可理解為描述與兩種不同抗原決定基相互作用之抗體，諸如包含兩個對兩種不同抗原或替代地同一抗原上之兩種不同抗原決定基具有特異性之功能性抗原結合域的抗體。雙特異性抗體可衍生自兩種單株抗體。視情況，此兩種不同抗原決定基可位於相同抗原上，但其亦可位於兩種不同抗原上。雙特異性抗體可使用習知技術產生，特定方法包括以化學方式產生，或由雜種融合瘤及其他技術產生，包括但不限於提供與肽連接子(諸如G4S連接子)具有不同特異性之抗原結合區之分子(諸如scFv)的技術及杵-臼工程(knobs-into-holes engineering)。如本文所使用，術語「多特異性 (multispecific)」在最廣泛意義上可理解為描述與兩種或更多種不同類型之抗原決定基相互作用的抗體。視情況，此等抗原決定基可位於相同抗原上或兩種或更多種抗原上。例如，在一多特異性抗體上，兩個或更多個或三個或更多個功能性抗原結合域可存在且可對兩種或更多種或三種或更多種獨特抗原或獨特抗原決定基具有特異性。因此，雙特異性及多特異性抗體分別靶向兩種及更多種抗原或抗原決

定基。

【0098】 抗體可進一步為人類抗體、人源化抗體及/或嵌合抗體。嵌合抗體為一種物種之免疫球蛋白之至少一個區域藉由基因工程改造融合至另一物種之免疫球蛋白之另一區域以便降低抗體之免疫原性的抗體。例如，鼠類 V_L 及 V_H 區可融合至人類免疫球蛋白之其餘部分。特定類型之嵌合抗體為人源化抗體。人源化抗體係藉由合併編碼非人類抗體之CDR的DNA與產生人類抗體之DNA來產生。所得DNA構築體隨後可用於表現及產生通常不如非人類親本抗體或嵌合抗體具有免疫原性之抗體，因為僅CDR為非人類的。此外，抗體可為人類抗體，亦即抗體之核酸序列完全來源於人類。

【0099】 人類、人源化或嵌合抗體之用途較佳用於活體內應用，尤其人類抗體，例如用於活體內預防、治療或診斷。

【0100】 抗體可進一步選自免疫球蛋白。術語「免疫球蛋白 (immunoglobulin)」描述來自由免疫系統產生以中和體內異物之免疫球蛋白類別的任何蛋白。免疫球蛋白包含至少一個免疫球蛋白(Ig)域。

【0101】 抗體可進一步選自包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體，選自抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體及/或抗體輕鏈-抗體重鏈對。

【0102】 術語「包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體 (tetrameric antibodies comprising two heavy chain and two light chain molecules)」描述包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之任何抗體複合物。此等抗體可包含全長抗體之完整重鏈及/或輕鏈序列或僅包含其部分。四聚抗體可尤其係指包含藉由二硫鍵互連之兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈的蛋白，

其包含：(1)就重鏈而言，可變區及包含三個域 C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} 之重鏈恆定區；及(2)就輕鏈而言，輕鏈可變區及包含一個域 C_L 之輕鏈恆定區。關於術語「四聚抗體(tetrameric antibody)」，意謂具有天然存在之抗體之典型總體域結構(亦即包含具有三個或四個恆定域之重鏈及具有一個恆定域之輕鏈以及各別可變域)的任何抗體。如上文所描述，各域可包含不改變整個域結構之其他修飾，諸如突變，包括取代、缺失及/或插入。舉例而言，mAb OV549.20為四聚抗體。

【0103】 術語「抗體輕鏈單體(antibody light chain monomer)」描述僅包含輕鏈分子但不包含重鏈分子之任何抗體。因此，術語「抗體重鏈單體(antibody heavy chain monomer)」描述僅包含一個重鏈分子但不包含輕鏈分子之任何抗體。因此，術語「抗體輕鏈二聚體(antibody light chain dimer)」描述兩個輕鏈單體之複合物且術語「抗體重鏈二聚體(antibody heavy chain dimer)」描述兩個重鏈單體之複合物。術語「抗體輕鏈-抗體重鏈對(antibody light chain-antibody heavy chain pair)」描述包含輕鏈單體及重鏈單體對之任何複合物。

【0104】 抗體可進一步選自「單域抗體」。術語「單域抗體(single domain antibodies)」描述由單一單體可變抗體域，諸如輕鏈可變域(V_L)或重鏈可變域(V_H)組成之抗體片段。

【0105】 抗體可進一步選自「單鏈抗體」。術語「單鏈抗體(single chain antibodies)」描述單一多肽鏈之抗體片段。

【0106】 抗體可進一步選自胞內抗體及/或異結合抗體。術語「胞內抗體(intrabodies)」描述靶向細胞內之細胞內蛋白的任何抗體。用於在目標細胞中轉移胞內抗體以使得細胞內目標蛋白結合之方法為熟習此項技術

者所熟知，諸如目標細胞直接表現胞內抗體，如基因療法中所應用。「異結合抗體(Heteroconjugate antibodies)」為共價連接之不同特異性之兩種或更多種抗體(例如單株抗體、Fab或scFv)的複合物。

【0107】 抗體可進一步選自駱駝源抗體、親和體、抗運載蛋白、阿非林、阿特里體、設計錨蛋白重複蛋白、諸如阿德奈汀及辛替恩之FN3骨架、非諾莫、庫尼茨域、前奈汀及奧博體，及/或抗特應(抗Id)抗體。術語「駱駝源抗體(camelid antibody)」描述具有衍生自哺乳動物之駱駝科(諸如駱馬、駱駝及羊駝)之抗體結構的任何抗體，諸如缺乏任何輕鏈且由兩個相同重鏈組成之抗體。術語「親和體(affibody)」描述能夠以高親和力結合大量抗原之任何抗體模擬蛋白。例如，親和體可基於蛋白之免疫球蛋白結合域，諸如來自金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之蛋白A的Z域。其他實例為熟習此項技術者所熟知。抗運載蛋白、阿非林、阿特里體、設計錨蛋白重複蛋白、諸如阿德奈汀及辛替恩之FN3骨架、非諾莫、庫尼茨域、前奈汀及奧博體為此項技術中已知且可根據本發明使用的其他骨架。骨架例如描述於[16]中。術語「抗特應(抗Id)抗體(anti-idiotypic (anti-Id) antibodies)」描述能夠結合至另一抗體之個體基因型的任何抗體。

【0108】 抗體之「抗原結合片段(antigen-binding fragment)」為抗體之片段，其較佳地展現與衍生出該片段之完整抗體基本上相同的功能及特異性。用木瓜酶進行之有限蛋白分解消化通常將Ig原型裂解成三個片段。各自含有一個完整L鏈及約一半H鏈之兩個相同胺基端片段為抗原結合片段(Fab)。尺寸類似但含有兩個重鏈之羧基端一半及其鏈間二硫鍵的第三片段為可結晶片段(Fc)。Fc含有碳水化合物、補體結合及FcR-結合位

點。有限胃蛋白酶消化產生含有Fab片及鉸鏈區，包括H-H鏈間二硫鍵的單一F(ab')₂片段。F(ab')₂對於抗原結合為二價。F(ab')₂之二硫鍵可裂解以獲得Fab'。此外，重鏈及輕鏈之可變區可融合在一起以形成單鏈可變片段(scFv)。

【0109】 因為第一代之全尺寸化抗體可存在一些問題，所以許多第二代抗體可僅包含抗體之片段。可變域(Fv)為具有由一個V_L及一個V_H組成之完整抗原結合域的最小片段。僅具有結合域之此類片段可藉由酶促方法或表現相關基因片段，例如在細菌及真核細胞中產生。可使用不同方法，例如Fv片段單獨或包含包括Fv及第一恆定域之「Y」之上部臂中之一者的Fab片段。當僅使用可變片段時，此等片段通常藉由在兩條鏈之間引入多肽連接而穩定化，促使產生單鏈Fv (scFv)。或者，可使用二硫鍵鍵聯Fv (dsFv)片段。片段之結合域可與任何恆定域合併以產生全長抗體或可與其他蛋白及多肽融合。

【0110】 較佳重組抗體片段為單鏈Fv (scFv)片段。一般而言，其對其抗原具有高親和力且可在多種宿主中表現。此等及其他性質使得scFv片段不僅適用於藥品中，且亦具有生物技術應用之潛力。如上文所詳述，在scFv片段中V_H域及V_L域由親水性及柔性肽連接子接合，此提高表現及摺疊效率。通常使用約15個胺基酸之連接子，其中最經常使用(Gly₄Ser)₃連接子。視所用連接子而定，scFv分子可容易以蛋白分解方式降解。隨著基因工程改造技術之發展，此等侷限性可實際上藉由聚焦於功能及穩定性之改良的研究來克服。實例為生成經二硫化物穩定化(或二硫鍵鍵聯)之Fv片段，其中V_H-V_L二聚體藉由鏈間二硫鍵穩定化。在V_L與V_H域之間的界面處引入半胱胺酸，形成二硫橋鍵，將兩個域連接在一起。

【0111】 scFv可複合成二聚體(雙功能抗體)、三聚體(三功能抗體)或較大聚集體，諸如串聯雙體(TandAbs)及柔性體(Flexibodies)。

【0112】 具有兩個結合域之抗體可例如經由使用簡單多肽連接將兩個scFv結合(scFv)₂或經由兩個單體之二聚(雙功能抗體)產生。最簡單設計為具有兩個功能性抗原結合域之雙功能抗體。

【0113】 此外，已開發出包含重鏈之四個可變域及輕鏈之四個可變域的抗體型式。此等抗體之實例包括串聯雙體及柔性體(Affimed Therapeutics AG，海德堡，德國)。歸因於其四結合域，與僅包含兩個結合域之抗體型式，諸如雙功能抗體相比，串聯雙體通常展示更佳結合性質。柔性體為scFv與雙功能抗體多聚體基元之合併，從而產生具有高度可撓性之多價分子以用於接合在細胞表面上彼此相距非常遠的兩個分子。

【0114】 抗體亦可選自上文所提及之分子中之任一者的抗原結合片段。如上文所規定，抗體之「抗原結合片段(antigen-binding fragment)」為抗體之片段，其展現與衍生出該片段之完整抗體基本上相同的抗原結合活性及特異性。抗原結合片段通常理解為包含全長抗體之至少一個抗原結合片段的多肽。一般而言，抗原結合片段至少由重鏈之可變域及輕鏈之可變域組成，其以兩個域共同能夠結合至特定抗原之方式排列。

【0115】 此外，包括但不限於Fv、scFv、雙功能抗體分子或域抗體(Domantis)的單株抗體之某些結合分子或抗原結合片段可藉由併入二硫橋鍵以使V_H及V_L域對齊來穩定化。

【0116】 抗體可進一步包含於與其他免疫球蛋白分子或其片段(諸如其他抗體)或非免疫球蛋白分子之複合物中。例如，抗體可與其他相同抗體形成同源多聚體。較佳地，抗體包含於嵌合抗原受體(CAR)中。術語

「CAR」描述通常在T細胞上之任何受體蛋白，其已經特定設計以允許T細胞靶向特定抗原。製備CAR之方法為熟習此項技術者所熟知。

【0117】 在又一更佳實施例中，抗體選自單株抗體、以重組方式產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈Fv (scFV)、駱駝源抗體、親和體、抗運載蛋白、阿非林、阿特里體、設計錨蛋白重複蛋白、諸如阿德奈汀及辛替恩之FN3骨架、非諾莫、庫尼茨域、前奈汀及奧博體、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫鍵鍵聯之Fv (dsFv)、抗特應(抗Id)抗體及以上中之任一者之抗原結合片段，及/或其中抗體包含於嵌合抗原受體(CAR)中。

【0118】 在另外又一更佳實施例中，抗體選自單株抗體、以重組方式產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈Fv (scFV)、駱駝源抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫鍵鍵聯之Fv (dsFv)、抗特應(抗Id)抗體及以上中任一者之抗原結合片段，及/或其中抗體包含於嵌合抗原受體(CAR)中。

【0119】 此外，抗體可包含重鏈及/或輕鏈的恆定區。重鏈恆定區可選自人類免疫球蛋白之群，其選自IgA、IgD、IgE、IgG或IgM，包括此等同型之任何子類。較佳地，重鏈恆定區選自由IgG及IgA組成之人類免

疫球蛋白之群，更佳地重鏈恆定區選自由IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2組成之人類免疫球蛋白之群。因為抗體可依重組方式表現及產生，所以抗體亦可包含重鏈之兩個不同恆定區，例如一個IgG1及一個IgG2重鏈，或來自不同物種之重鏈。然而，重鏈較佳來自相同物種。此外，抗體可包含IgG κ 或IgG λ 輕鏈恆定區。較佳地，輕鏈恆定區選自由IgG κ 及IgG λ 組成之人類免疫球蛋白之群。

【0120】 在又一更佳實施例中，抗體包含重鏈及/或輕鏈的恆定區，較佳其中重鏈恆定區選自由IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2組成之人類免疫球蛋白之群，及/或其中輕鏈恆定區選自由IgG κ 及IgG λ 組成之人類免疫球蛋白之群。

【0121】 在又一更佳實施例中，抗體包含重鏈恆定區，其中重鏈恆定區選自由IgG1、IgG2、IgG3及IgG4組成之人類免疫球蛋白之群。

【0122】 在一較佳實施例中，抗體包含重鏈恆定區，其中重鏈恆定區為人類IgG1恆定區。

【0123】 重鏈恆定區可進一步為野生型人類IgG重鏈恆定區之變異體，較佳其中變異型人類IgG重鏈恆定區結合至人類Fc γ 受體中之一或多者。一般而言，Fc受體為促進免疫系統的某些細胞之表面蛋白。存在若干類別之Fc受體，其尤其可藉由與其相互作用之抗體類型區分。因此，術語「Fc γ 受體(Fc gamma receptor)」描述具有IgG恆定區之Fc受體結合抗體。Fc γ 受體之類別進一步包含若干子類，諸如Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB、Fc γ RIIIA或Fc γ RIIIB，其結構及對IgG及不同IgG子類之親和力一般不同。較佳地，本發明之抗體之變異型人類IgG重鏈恆定區結合至選自由Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA組成之群的人類Fc γ 受體中之一或多

者。亦較佳地，變異型人類IgG重鏈恆定區結合至選自由Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA組成之群的人類Fc γ 受體中之一或多者，具有比野生型人類IgG重鏈恆定區結合至人類Fc γ 受體更高的親和力。「以更高親和力結合(Binding with higher affinity)」意謂根據本發明之抗體與選自由Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA組成之群的人類Fc γ 受體中之一或多者的結合比野生型人類IgG重鏈恆定區與人類Fc γ 受體之結合強至少2倍、較佳至少3倍，如藉由例如熟習此項技術者已知之方法，諸如西方墨點分析、ELISA或表面電漿子共振所確定。

【0124】 在又一更佳實施例中，重鏈恆定區為野生型人類IgG重鏈恆定區之變異體，較佳地其中變異型人類IgG重鏈恆定區以比野生型人類IgG重鏈恆定區結合至人類Fc γ 受體更高的親和力結合至選自由Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA組成之群的人類Fc γ 受體中之一或多者。

【0125】 在另一態樣中，本發明係關於與本發明之抗體一樣特異性結合至人類L1CAM之相同抗原決定基及/或與本發明之抗體競爭結合至人類L1CAM的抗體，較佳其中抗原決定基係在人類L1CAM之纖維連接蛋白III型域1-3 (FN III 1-3)內。

【0126】 上文針對本發明之抗體所指明的所有特徵視為亦關於本發明之其他態樣之抗體。

【0127】 抗體與本發明之抗體一樣可特異性結合至人類L1CAM的相同抗原決定基。

【0128】 術語「抗原決定基(epitope)」描述由抗體或相關結合分子識別之抗原之一部分。例如，抗原決定基為抗體所結合之抗原的特異性片。抗原決定基可為構形抗原決定基或線性抗原決定基。構形抗原決定基

通常由抗原胺基酸序列之不連續區段構成。此等抗原決定基係基於抗原之3D表面特徵及形狀或三級結構與互補位(抗體上之結合位點)相互作用。構形抗原決定基之比例未知。線性抗原決定基為通常由抗體經由其胺基酸序列或一級結構識別之抗原決定基。

【0129】 已顯示L1-OV549.20結合至且識別L1CAM之纖維連接蛋白III型域1-3 (FN III 1-3)內的抗原決定基[6]。用於確定由結合分子結合及識別之抗原決定基的方法描述於先前技術中。可藉由構築攜載獨特Ig域之一系列L1CAM-Fc蛋白來確定已識別之抗原決定基。對於精細映射，可使用重組經V5標記之L1CAM片段，如例如[23]中所描述。重組蛋白可用於ELISA或西方墨點分析中以用於抗原決定基映射。一般而言，用於確定既定抗體之抗原決定基的方法為此項技術中已知且包括製備既定所關注區域之合成線性肽及隨後測試抗體是否結合至該等肽(參見[24])。或者，可產生覆蓋所關注區域之不同重組蛋白且針對抗體結合測試[25]。

【0130】 或者或另外，抗體與本發明之抗體競爭結合至人類L1CAM，較佳其中抗原決定基在人類L1CAM之纖維連接蛋白III型域1-3 (FN III 1-3)內。

【0131】 抗體之競爭結合通常可藉由熟習此項技術者已知之分析法，諸如競爭性結合分析來加以確定。競爭性結合分析通常基於抗體-抗原相互作用，其中相較於不同競爭性抗體的量，抗體上之抗原結合位點的數目有限。例如，競爭性結合分析可具有免疫分析之形式。

【0132】 人類L1CAM蛋白通常包含六個免疫球蛋白域(Ig I至Ig VI)之N端細胞外部分，繼之為五個纖維連接蛋白III型域(FN III 1-5)、跨膜螺旋及小C端細胞內域。較佳地，抗原決定基在人類L1CAM之纖維連接蛋

白III型域1-3 (FN III 1-3)內。

【0133】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(i) 在L1CAM之纖維連接蛋白III型域1-3 (FN III 1-3)內結合至人類L1CAM。

【0134】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(ii) 以20 nM或更低、10 nM或更低、或1 nM或更低之親和力(KD)結合至人類L1CAM。

【0135】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(iii) 以20 nM或更低、10 nM或更低、或1 nM或更低之親和力(KD)結合至食蟹獼猴L1CAM。

【0136】 用於確定抗體之結合親和力的方法為熟習此項技術者所熟知且例示性地亦在上文抗體特異性結合之情況下描述。例如，可使用採用Biacore®裝置之表面電漿子共振。例如，親和力(KD)係在室溫下確定。例如，結合親和力可如以下實例2中所描述確定。

【0137】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(iv) 活體外抑制腫瘤細胞在塗佈纖維連接蛋白之表面上之遷移。

【0138】 用於確定活體外腫瘤細胞在經纖維連接蛋白塗佈之表面上之遷移的方法為熟習此項技術者所熟知。例如，經螢光標記之腫瘤細胞可接種於經纖維連接蛋白塗佈之孔的邊緣上。48小時後，可確定腫瘤細胞向孔中心的遷移。較佳地，當本發明之態樣中之任一者的抗體應用於腫瘤細胞時，活體外此等腫瘤細胞在經纖維連接蛋白塗佈之表面上的遷移受抑制。

【0139】 在此情況下，遷移之抑制意謂當態樣中之任一者的抗體應

用於腫瘤細胞時，與活體外經同型對照抗體治療之相同細胞類型的腫瘤細胞在經纖維連接蛋白塗佈之表面上的遷移相比，48小時後活體外此等腫瘤細胞在經纖維連接蛋白塗佈之表面上的遷移減少至少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%、至少95%或至少99%。

【0140】此外，本發明之抗體用於抑制HCT116腫瘤細胞之癌細胞遷移的半最大抑制濃度(IC₅₀)可為 1×10^{-4} M至 1×10^{-8} M且較佳 1×10^{-4} M至 1×10^{-7} M。視情況，本發明之抗體用於抑制HCT116腫瘤細胞之癌細胞遷移的半最大抑制濃度(IC₅₀)亦可為 2×10^{-5} M至 1×10^{-6} M，較佳 2×10^{-5} M至 4×10^{-6} M。較佳地，腫瘤細胞為HCT116腫瘤細胞。

【0141】較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(v) 活體外抑制SKOV-3、Panc-1及/或HCT-116腫瘤細胞之增殖。

【0142】用於確定活體外SKOV-3、Panc-1及/或HCT-116腫瘤細胞之增殖的方法為熟習此項技術者所熟知。例如，此類增殖分析可用於確定隨時間推移之細胞數目、細胞分裂之數目、代謝活性或DNA合成。較佳地，藉由經由顯微鏡裝置隨時間推移偵測細胞匯合度來監測腫瘤細胞增殖，諸如確定(例如藉由計數)隨時間推移之細胞數目，例如在24小時、48小時、72小時或96小時之後。

【0143】在此情況下，活體外增殖之抑制意謂當本發明之態樣中之任一者的抗體應用於腫瘤細胞時，與經同型對照抗體治療之相同細胞類型的腫瘤細胞活體外增殖相比，在24小時、48小時、72小時或96小時之後，此等腫瘤細胞之增殖減少至少10%、至少20%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少

65%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。

【0144】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(vi) 抑制小鼠SKOV-3ip異種移植模型中之原發腫瘤生長。

【0145】 用於確定小鼠SKOV-3ip異種移植模型中之原發腫瘤生長的方法已為熟習此項技術者所熟知。例如，在SKOV-3ip異種移植模型中，可將 5×10^6 個SKOV3腫瘤細胞(腹膜內)注射至NMRI-nu/nu小鼠中。在5天之後，小鼠可隨機分到不同組且可開始治療。抗L1CAM抗體或對照抗體可以10 mg/kg之劑量經6週之時間段腹膜內每週注射三次。在處死小鼠後，即刻可評估治療功效，比較治療組與對照組之間的腫瘤重量及腹水體積。

【0146】 在此情況下，小鼠模型中原發腫瘤生長之抑制理解為當本發明之態樣中之任一者的抗體應用於腫瘤小鼠模型時，與經同型對照抗體或媒劑治療之相同模型中的腫瘤生長相比，在符合指標要求之時間點的腫瘤生長減少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%。

【0147】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(vii) 減少小鼠MDA-MB-231異種移植模型中之轉移形成。

【0148】 MDA-MB-231為來源於乳癌之轉移位點的高度侵襲性模型細胞株。用於確定MDA-MB-231異種移植模型中之轉移形成的方法為熟習此項技術者熟知。例如，表現MDA-MB-231-luc2螢光素酶之乳癌細胞可注射至小鼠之尾部靜脈中(例如，每隻小鼠約 5×10^5 個細胞)。小鼠可進一步使用根據本發明之抗體(諸如OV549.20)或媒劑(對照物)治療，例如從

MDA-MB-231-luc2注射前3天開始每週三次以10 mg/kg之劑量。可每7天進行螢光素酶活性之活體內造影且在經對照物及抗體治療之細胞中比較以監測肺及他內臟器官中轉移之形成。

【0149】 在此情況下，小鼠MDA-MB-231異種移植模型中轉移形成之減少理解為當本發明之態樣中之任一者的抗體應用於經MDA-MB-231-luc2注射之小鼠時，與經對照媒劑治療之相同模型中的轉移形成相比，在20至30天暴露於MDA-MB231-luc2細胞後之轉移形成減少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少94%、至少95%或至少99%。

【0150】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(viii) 展現活體外ADCC活性及/或活體外結合至FcγRIIIa受體。

【0151】 術語「抗體依賴性細胞毒性(Antibody dependent cellular cytotoxicity ; ADCC)」描述已結合且從而由特異性抗體標記之目標細胞因此藉由免疫系統之效應細胞(諸如自然殺手(NK)細胞)溶解的機制。較佳地，本發明之抗體展現活體外ADCC活性，亦即在活體外分析中其能夠在結合至目標細胞時調節ADCC免疫反應。此類活體外分析為熟習此項技術者所熟知。例如，適合之分析使用能夠誘導由抗體結合之目標細胞之溶解的效應細胞，諸如NK細胞，該等抗體以不同效應細胞:目標(E:T)細胞比率應用。在此情況下，最終分析可例如使用即時細胞分析裝置進行。

【0152】 或者或與展現ADCC活性組合，本發明之態樣中之任一者的抗體較佳活體外結合至FcγRIIIa受體。可用於確定本發明之抗體與活體外FcγRIIIa受體之間結合的適合之抗體與受體活體外結合分析為熟習此項技術者所熟知且例如描述於上文特異性結合之情況中。例如，可使用西方

墨點分析、ELISA或表面電漿子共振。

【0153】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(ix) 展現活體外FcRn結合。

【0154】 新生兒Fc受體(FcRn)為能夠結合例如IgG之Fc受體蛋白，且通常由例如內皮細胞表現，其中其支援血清IgG及白蛋白之再循環。可用於確定本發明之抗體與活體外FcRn之間結合的適合之抗體與受體活體外結合分析為熟習此項技術者所熟知或例如描述於上文特異性結合之情況中。

【0155】 較佳地，本發明之態樣中之任一者的抗體

(x) 活體外與人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白不交叉反應。

【0156】 L1CAM屬於蛋白之L1家族，其總共包含四種不同L1樣蛋白，均為細胞黏附分子(CAM)及免疫球蛋白超家族之成員。除L1CAM以外，L1家族之三個其他成員與L1CAM (CHL1)、神經元細胞黏附分子(NrCAM)及神經束蛋白緊密同源。

【0157】 活體外與人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白「不交叉反應」的態樣中之任一者的抗體理解為活體外結合至人類L1CAM但實質上不結合至人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白中之任一者的抗體。在一個實施例中，在活體外與人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白不交叉反應的本發明之態樣中之任一者的抗體展示與人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白之僅極低或非特異性結合，結合親和力之 K_D 值為 1×10^{-7} M或更高或 1×10^{-6} M或更高(直至結合親和力不再可偵測)。在一個實施例中，結合親和力係藉由標準結合

分析，諸如ELISA分析(如在實例中)或表面電漿子共振技術確定。例如，結合親和力係在室溫下確定。用於確定本發明之態樣中之任一者的抗體與CHL1、NrCAM及/或神經束蛋白之結合的其他適合方法為熟習此項技術者所熟知。例如，可使用諸如西方墨點分析或確定基於細胞計數器之分析中螢光信號之變化的方法。

【0158】 在又一更佳實施例中，本文所描述之本發明之任一態樣中之抗體：

(i) 在L1CAM之纖維連接蛋白III型域1-3 (FN III 1-3)內結合至人類L1CAM，及/或

(ii) 以20 nM或更低、10 nM或更低、或1 nM或更低之親和力(K_D)結合至人類L1CAM，及/或

(iii) 以20 nM或更低、10 nM或更低、或1 nM或更低之親和力(K_D)結合至食蟹獼猴L1CAM，及/或

(iv) 活體外抑制腫瘤細胞在塗佈纖維連接蛋白之表面上之遷移，及/或

(v) 活體外抑制SKOV-3、Panc-1及/或HCT-116腫瘤細胞之增殖；及/或

(vi) 抑制小鼠SKOV-3ip異種移植模型中之原發腫瘤生長，及/或

(vii) 減少小鼠MDA-MB-231異種移植模型中之轉移形成，及/或

(viii) 展現活體外ADCC活性及/或活體外結合至FcγRIIIa受體，及/或

(ix) 展現活體外FcRn結合，及/或

(x) 活體外與人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白不交

又反應。

【0159】此外，根據本發明之任一態樣的抗體可為人源化。較佳地，根據本發明之抗體係部分或完全人源化。使抗體人源化之方法為熟習此項技術者所熟知，例如藉由將本發明之抗體之CDR序列引入到人類抗體之序列中。視情況，另外，可將一或多個非人類位置，諸如1、2、3、4、5或6個，諸如至多10個非人類位置再引入到人類構架序列中。

【0160】較佳地，根據本發明之任一態樣的抗體係人源化。

【0161】在本發明之態樣中之任一者的另一較佳實施例中，抗體為多特異性或雙特異性抗體及/或為人源化抗體。

【0162】用於產生抗體，諸如本發明之抗體的方法為熟習此項技術者所熟知。例如，抗體可藉由製備融合瘤細胞來產生。產生融合瘤細胞之方法以及藉助於融合瘤細胞產生抗體之方法為熟習此項技術者熟知。一般而言，向小鼠注射所需抗原且在數天或數週之後殺死以便分離分泌針對所需抗原之抗體的脾臟細胞。一般而言，此等抗體分泌脾臟細胞與永生非分泌骨髓瘤細胞之融合產生融合瘤細胞。隨後通常對此等融合瘤細胞進行篩選且選擇產生所要抗體之融合瘤。隨後可在活體內或活體外培養所選融合瘤且可分離所需抗體。較佳地，本文中之抗體以重組方式在適合的宿主細胞中產生。編碼所關注抗體之DNA可置放於表現載體中，隨後轉染至宿主細胞，諸如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如來自CHO GS System™ (Lonza)之CHO細胞)或在其他情況下不生產免疫球蛋白之骨髓瘤細胞中，以獲得抗體之合成。

【0163】

抗體結合物/抗體-藥物結合物(ADC)

本發明之態樣中之任一者的抗體可另外連接至一或多個化學部分以便形成抗體結合物。例如，抗體可藉由熟習此項技術者已知之任何化學結合，諸如離子結合及/或共價鍵及/或藉由任何適合之分子間結合，諸如氫鍵及/或凡得瓦爾力連接至此類一或多個化學部分。

【0164】 此外，本發明之態樣中之任一者之抗體可連接至的化學部分可為適用於應用於熟習此項技術者已知之抗體結合物中的任何化學部分或物質。例如，抗體可連接至治療活性物質，較佳連接至化學治療化合物、細胞毒性化合物、細胞生長抑制化合物、細胞介素、奈米粒子、放射性同位素及/或溶瘤病毒。

【0165】 術語「治療活性物質(therapeutically active substance)」描述任何具有生物活性的物質，亦即在生物體中引起效應之物質。當用於醫藥藥物中時，治療活性物質例如負責藥品之活性。用於確定物質對生物體之效應的方法為熟習此項技術者所熟知。

【0166】 術語「化學治療化合物(chemotherapeutic compound)」描述可作為如熟習此項技術者已知之標準化化學療法方案之一部分用於癌症治療的任何物質。

【0167】 術語「細胞毒性化合物(cytotoxic compound)」描述例如藉由引起細胞凋亡或壞死對細胞具有毒性之任何物質。細胞之適合實例為熟習此項技術者已知，諸如免疫細胞。化合物之細胞毒性可藉由熟習此項技術者已知之常見細胞毒性分析量測。細胞毒性劑之實例包括例如以下之小分子毒素或酶活性毒素：細菌(諸如白喉毒素、假單胞菌內毒素及外毒素、葡萄球菌腸毒素A)、真菌(例如 α -帚麴菌素(α -sarcin)、侷限麴菌素(restrictocin))或植物(例如相思子毒素(abrin)、蓖麻毒素(ricin)、莫迪素

(modeccin)、槲寄生素(viscumin)、美洲商陸抗病毒蛋白、皂草素(saporin)、白樹素(gelonin)、苦瓜蛋白(momoridin)、天花粉蛋白(trichosanthin)、大麥毒素、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹(dianthin)蛋白、美洲商陸(Phytolacca americana)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(Momordica charantia)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crotonin)、肥皂草(saponaria officinalis)抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素(phenomycin)、新黴素(neomycin)及單端孢黴烯(tricothecenes)；有絲分裂抑制劑；或DNA損傷劑。

【0168】術語「細胞生長抑制化合物(cytostatic compound)」描述能夠抑制細胞生長之任何物質。化合物抑制細胞生長之能力可藉由熟習此項技術者已知之常見細胞生長分析來量測。

【0169】適合之化學治療化合物包括烷基化劑、烷基磺酸鹽、吡嘧、伸乙亞胺及甲基三聚氰胺、多聚乙醯(acelogenin)、喜樹鹼、苔蘚蟲素、奧司他汀(ostatin)、卡利他汀(callystatin)、CC-1065、念珠藻素(cryptophycin)、尾海兔素、倍癌黴素(duocarmycin)、艾榴塞洛素(eleutherobin)、水鬼蕉鹼(pancratistatin)、匍枝珊瑚醇(sarcodictyln)、海綿抑素(spongistatin)、氮芥、抗生素、烯二炔抗生素、達內黴素(dynemicin)、雙膦酸鹽、埃斯培拉黴素(esperamicin)、色素蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素(aciacinomysins)、放線菌素(actinomycin)、安麴黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸、博來黴素(bleomycin)、放線菌素C、卡拉黴素(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素D、佐柔比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氨基-5-側氧基-L-正白胺

酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins)、黴酚酸(niycophenolie acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamyein)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozoein)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物、厄洛替尼(erlotinib)、維莫非尼(vemurafenib)、厄瑞佐替尼(erizotinib)、索拉非尼(sorafenib)、依魯替尼(ibrutinib)、恩雜魯胺(enzaiutamide)、葉酸類似物、嘌呤類似物、雄激素、抗腎上腺素、葉酸補充劑，諸如亞葉酸、乙醯葡二內酯(acegiatone)、醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)、胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)、恩尿嘧啶(emluracil)、安吡啶(anisacrine)、貝斯布西(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、依達曲塞(edatraxate)、地磷醯胺(defofamine)、秋水仙胺(demecolcine)、地吡醯(diaziquone)、依氟鳥胺酸(elfornithine)、依利醋鉍(elliptinium acetate)、埃博黴素(epothilone)、依託格魯(etoglucid)、硝酸鎂、羥基脲、蘑菇多糖、氯尼達明(lonidainine)、類美登素(maytansinoids)、米托胍脲(mitoguazone)、米托蒽醯(mitoxantrone)、莫吡坦(mopidannioi)、二胺硝吡啶(nitraerine)、噴司他丁(pentostatin)、蛋氨酸芥(phenamet)、吡柔比星(pirarobicin)、洛索蒽醯(iosoxantrone)、鬼臼酸(podophyllinic acid)、2-乙醯肼、丙卡巴肼(procarbazine)、PSK®多醣複合物、丙亞胺(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofuran)；鍺螺胺

(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及蛇形菌素(anguidine)；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴吡(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannoniustine)；二溴甘露醇(miiobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派(thiotepa)；類紫杉醇、苯丁酸氮芥；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯嘌呤；胺甲喋呤；鉑類似物、長春鹼；鉑；依託泊苷(etoposide)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼；長春瑞濱(vinorelbine)；諾達魯胺(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素(daunomycin)；胺基喋呤(aminopterin)；希羅達(xeloda)；伊班膦酸；伊立替康(irinotecan)；拓樸異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine)；維他命A酸類；卡培他濱(capecitabine)；康普瑞汀(combretastatin)；甲醯四氫葉酸(leucovorin)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；及以上中之任一者的醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0170】 術語「細胞介素(cytokine)」描述具有影響細胞生長及/或細胞分化之能力的物質。適合之細胞介素為熟習此項技術者所熟知，諸如干擾素、介白素、菌落刺激因子、腫瘤壞死因子或趨化介素。用於量測細胞生長或細胞分化之方法為熟習此項技術者所熟知。適合之細胞介素包括例如IL-2、G-CSF、GM-CSF及TNF- α 。

【0171】 術語「奈米粒子(nanoparticle)」描述直徑為1至100 nm之任何粒子。用於確定粒子直徑之方法亦為熟習此項技術者所熟知。

【0172】術語「放射性同位素(radioisotope)」描述為天然元素或人工元素之不穩定或介穩定同位素的任何物質。適合之放射性同位素較佳亦適用於人體或動物體之治療。適合之放射性同位素包括³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac及¹⁸⁶Re。

【0173】術語「溶瘤病毒(oncolytic virus)」描述較佳靶向癌細胞，例如通常藉由瘤崩解導致此等癌細胞之感染及殺死的任何病毒。適合之溶瘤病毒係例如經基因調適之單純疱疹病毒、腺病毒、痘瘡病毒、水泡性口炎病毒、脊髓灰白質炎病毒、呼腸孤病毒、塞尼卡病毒(senecavirus)、ECHO病毒、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、馬拉巴病毒(maraba virus)及/或柯薩奇病毒(Coxsackievirus)。

【0174】替代地或以其組合形式，抗體可連接至較佳選自放射性同位素、化學發光化合物、螢光化合物、染料或酶之診斷化合物。

【0175】術語「診斷化合物(diagnostic compound)」描述適用於人體或動物體診斷方法中的任何物質。例如，診斷化合物可在諸如螢光造影或光譜學之各種分析方法中用於染色組織、細胞或其他材料。例如，診斷化合物可用於特異性染色癌細胞。其他診斷應用為熟習此項技術者所熟知。

【0176】術語「化學發光化合物(chemoluminescent compound)」描述能夠因化學反應而發射光的任何物質。用於偵測化學發光之方法及裝置為熟習此項技術者所熟知。

【0177】術語「螢光化合物(fluorescent compound)」描述回應於光激發而再發光之任何物質。通常，此類物質亦稱為螢光團。適合之螢光化

合物可例如為酶或探針之基質。用於偵測螢光之方法及裝置為熟習此項技術者所熟知。螢光化合物包括例如反應性及經結合探針，例如胺基香豆素(Aminocoumarin)、螢光素及Texas紅、Alexa Fluor染料、Cy染料及DyLight染料。

【0178】 術語「染料(dye)」描述由於吸收並非所有波長之可見光而有色且能夠以化學方式結合至目標分子的任何物質。藉此其可用於標記及顯現通常無色之目標分子。

【0179】 術語「酶(enzyme)」描述能夠催化化學反應之任何蛋白。適合之酶為此項技術中已知且包括山葵過氧化酶(HRP)。

【0180】 在本發明之任一態樣之另一較佳實施例中，抗體：

(a) 連接至治療活性物質，

較佳地連接至

化學治療化合物，

細胞毒性化合物，

細胞生長抑制化合物，

細胞介素，

奈米粒子，

放射性同位素，及/或

溶瘤病毒，

及/或

(b) 連接至診斷化合物，其較佳選自放射性同位素、化學發光化合物、螢光化合物、染料或酶。

【0181】 較佳的是，(a)中之治療活性物質及/或(b)中之診斷化合物

選自放射性同位素、化學治療化合物、細胞毒性化合物及/或細胞生長抑制化合物。

【0182】此外，本發明之抗體可共價連接至(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑。

【0183】術語「共價連接(covalently linked)」描述包含共用原子之間電子對的任何化學鍵結。此類共價鍵之實例為可裂解鍵(諸如二硫鍵、基於胺之鍵或肽鍵)或不可裂解鍵(諸如硫醚鍵)。較佳地，共價鍵在應用於身體且在其中循環時穩定且僅在目標細胞內或當到達目標組織時變得可裂解。連接子可為可裂解連接子或可為不可裂解連接子。

【0184】術語「螯合劑(chelator)」描述包含兩個或更多個自由電子對且因此能夠與金屬離子形成兩個或更多個配位鍵的任何物質。螯合劑可為有機化合物(諸如乙二胺四乙酸(EDTA)、1,4,8,11-四氮雜環十四烷-1,4,8,11-四乙酸(TETA)或1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA))。例如，根據任一態樣之抗體可連接至螯合劑，該螯合劑進一步連接至放射性同位素，諸如能夠實現活體內抗體分佈之敏感及定量分子正電子發射斷層攝影術(PET)及單光子發射電腦斷層攝影術(SPECT)造影的正電子及 γ 發射放射性金屬。在另一實例中，根據任一態樣之抗體可連接至進一步連接至放射性同位素之螯合劑，從而允許在體內所關注位置(例如在腫瘤位置處)直接遞送靶向放射性同位素。

【0185】此外，本發明之抗體可經由連接子共價連接至(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑。經由連接子連接至治療活性物質或其螯合劑的本發明之此類抗體在本文中亦稱作「抗體-藥物結合物」、「抗體結合物」、「抗體藥物結合物」或「ADC」。

【0186】在本文中之「抗體-藥物結合物」、「抗體結合物」、「抗體藥物結合物」或「ADC」的情況下，亦將抗體部分(antibody moiety)稱作「抗體部分(antibody portion)」。

【0187】術語「連接子(linker)」描述適用於將本發明之抗體連接至(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑的任何分子，其中連接子較佳經由共價鍵連接至本發明之抗體及/或(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑。

【0188】較佳地，當應用於身體且在其中循環時，連接子在本發明之抗體與(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑之間提供穩定連接，且僅在目標細胞內或當到達目標組織時變得可裂解。例如，連接子可為具有2至50個胺基酸之長度的肽，諸如二肽；或有機化合物，諸如4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)。

【0189】較佳的是，抗體視情況經由連接子共價連接至(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑。

【0190】連接子可包括一種結合組分或可包括多種組分。

【0191】例如，連接子可包括間隔基，其為延伸藥物鏈以避免例如屏蔽抗體之活性位點或改良ADC之溶解度的部分。連接子之組分的其他實例包括延伸子單元及胺基酸單元。

【0192】兩種方法通常用於將藥物結合至抗體：通過酶不可裂解之順丁烯二醯亞胺基或簡單且可裂解之二硫化物連接子來烷基化經還原之鏈間半胱胺酸二硫化物，及藉由可裂解之線性胺基酸來醯化離胺酸。

【0193】在一個態樣中，連接子使抗體共價連接至治療活性物質。

這同樣適用於診斷化合物。使用具有用於結合至抗體及治療活性物質或診斷化合物之反應性官能基的连接子製備ADC。例如，抗體之半胱胺酸硫醇或胺，例如N端或胺基酸側鏈，諸如離胺酸可與连接子之官能基形成鍵。

【0194】 在一個實施例中，连接子具有能夠與抗體上存在之自由半胱胺酸反應形成共價鍵的官能基。非限制性例示性此類反應性官能基包括順丁烯二醯亞胺、鹵乙醯胺、 α -鹵乙醯基、活化酯(諸如丁二醯亞胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯)、酸酐、酸氯化物、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。

【0195】 在一些實施例中，连接子具有能夠使抗體上存在之親電子基團反應的官能基。例示性此類親電子基包括但不限於醛及酮羰基。在一些實施例中，连接子之反應性官能基之雜原子可與抗體上之親電子基反應且形成與抗體單元之共價鍵。非限制性例示性此類反應性官能基包括但不限於醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡巴肼、肼甲酸酯及芳基醯肼。

【0196】 適合之连接子包括例如可裂解及不可裂解连接子。连接子可為促進藥物釋放之「可裂解连接子」。非限制性例示性可裂解连接子包括酸不穩定连接子(例如包含脞)、蛋白酶敏感性(例如肽酶敏感性)连接子、醣苷酶敏感性(例如葡萄糖醛酸苷酶敏感性)连接子、光不穩定连接子或含有二硫化物之连接子。可裂解连接子通常在細胞內條件下容易裂解。適合之可裂解连接子包括例如可由細胞內蛋白酶，諸如溶酶體蛋白酶或內體蛋白酶裂解之肽连接子。在例示性實施例中，连接子可為二肽连接子，諸如纈胺酸-瓜胺酸(val-cit或「VC」)、苯丙胺酸-離胺酸(phe-lys)或纈胺酸-丙胺酸(val-ala或「VA」)连接子。

【0197】 例如，可使用PEG₈-VA連接子，如ADC結合物與特司林之實例中所示。

【0198】 例如，連接子可含有用於連接至抗體之順丁烯二醯亞胺基、PEG₈連接子，及結合至治療活性物質之可裂解val-ala部分。例如，治療活性物質為吡咯并苯并二氮呋(PBD)，諸如SG3199；類美登素，諸如DM4；或奧瑞他汀，諸如MMAE。

【0199】 例如，連接子可含有結合至治療活性物質之可裂解β葡萄糖醛酸苷部分，諸如實例中之MC-β葡萄糖醛酸苷。例如，治療活性物質為PDB，諸如SG3199；類美登素，諸如DM4；或奧瑞他汀，諸如MMAE。

【0200】 例如，連接子可含有結合至治療活性物質的可裂解val-cit(「VC」)部分，諸如實例中之MC-VC-PABC。例如，治療活性物質為PDB，諸如SG3199；類美登素，諸如DM4；或奧瑞他汀，諸如MMAE。

【0201】 例如，連接子可含有結合至治療活性物質的可裂解磺酸基-SPDB部分，諸如實例中之磺酸基-SPDB。例如，治療活性物質為PDB，諸如SG3199；類美登素，諸如DM4；或奧瑞他汀，諸如MMAE。

【0202】 連接子較佳為以治療有效之充足方式在細胞外穩定。在輸送或遞送至細胞中之前，ADC較佳為穩定的且保持完好，亦即抗體保持與藥物部分結合。在目標細胞外部穩定之連接子一旦在細胞內部可以一定有效速率裂解。因此，有效連接子將：**(i)**維持抗體之特異性結合性質；**(ii)**允許遞送治療活性物質，例如細胞內遞送；及**(iii)**維持治療活性物質之治療效果，例如細胞毒性效應。

【0203】 在一個實施例中，連接子在細胞內條件下可裂解，使得連

接子在細胞內環境中之裂解充分釋放來自抗體之藥物得以治療有效。在一些實施例中，可裂解連接子為pH敏感的，亦即在某些pH值下對水解敏感。通常，pH敏感性連接子可在酸性條件下水解。例如，可使用在溶酶體中可水解之酸不穩定連接子(例如，脞、半卡巴脞、硫半卡巴脞、順式烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或類似物)。此類連接子在中性pH條件下，諸如血液中之pH值條件下相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0 (近似溶酶體之pH)下不穩定。在某些實施例中，可水解連接子為含脞連接子。

【0204】 在其他實施例中，連接子在還原條件下可裂解(例如，二硫化物連接子)。此項技術中已知多種二硫化物連接子，包括例如可使用SATA (N-丁二醯亞胺基-5-乙醯基硫基乙酸酯)、SPDP (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT (N-丁二醯亞胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)甲苯)形成之彼等二硫化物連接子。

【0205】 在一些實施例中，連接子可藉由細胞內環境中(例如在溶酶體或胞內體或胞膜窖內)存在之裂解劑，例如酶來裂解。連接子可為例如由細胞內肽酶或蛋白酶，包括但不限於溶酶體或胞內體蛋白酶裂解之肽基連接子。在一些實施例中，肽基連接子為至少兩個胺基酸長或至少三個胺基酸長。裂解劑可包括組織蛋白酶B及D以及纖維蛋白溶酶，已知其皆可使二肽藥物衍生物水解，從而使活性藥物釋放於目標細胞內部。最典型的為可由存在於表現L1CAM之細胞中之酶裂解的肽基連接子。在一特定實施例中，可藉由細胞內蛋白酶裂解之肽基連接子為val-cit連接子或val-ala連接子。使用細胞內蛋白水解釋放治療劑之一個優點為治療劑在結合時通常減少且結合物之血清穩定性通常較高。

【0206】 在其他實施例中，連接子為丙二酸酯連接子、順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基連接子或3'-N-醯胺類似物。

【0207】 在另外其他實施例中，連接子單元不可裂解且藥物例如藉由抗體降解來釋放。

【0208】 在一些實施例中，連接子為實質上親水性連接子(例如 PEG₈、PEG₄-Mal及磺酸基-SPDB)。親水性連接子可用於降低藥物可通過MDR (多重抗藥性)或功能上類似之轉運體自抗性癌細胞泵送出之程度，或用於改良ADC之藥物動力學性質。

【0209】 在其他實施例中，在裂解時，連接子用以直接地或間接地抑制細胞生長及/或細胞增殖。例如，在一些實施例中，連接子在裂解時可充當嵌入劑，藉此抑制大分子生物合成(例如DNA複製、RNA轉錄及/或蛋白合成)。

【0210】 在其他實施例中，連接子經設計以促進通過連接子-藥物及/或僅藥物擴散至相鄰細胞之旁觀者殺死(相鄰細胞之殺死)。在其他實施例中，連接子促進細胞內化。

【0211】 空間位阻二硫化物之存在可增加特定二硫鍵之穩定性，從而增強ADC之效能。因此，在一個實施例中，連接子包括空間位阻二硫化物鍵。空間位阻二硫化物係指存在於特定分子環境內之二硫鍵，其中該環境表徵為特定空間配置或原子之定向，通常在同一分子或化合物內，其防止或至少部分抑制二硫鍵之減少。因此，靠近二硫鍵之龐大(或空間位阻)化學部分及/或龐大胺基酸側鏈之存在防止或至少部分地抑制二硫鍵發生將導致二硫鍵之減少的可能性相互作用。

【0212】 在本發明之任一態樣之一較佳實施例中，抗體：

(a) 連接至治療活性物質，

較佳地連接至

化學治療化合物，

細胞毒性化合物，

細胞生長抑制化合物，

細胞介素，

奈米粒子，

放射性同位素，或

溶瘤病毒，

及/或

(b) 連接至診斷化合物，其較佳選自放射性同位素、化學發光化合物、螢光化合物、染料或酶。

【0213】 在一較佳實施例中，其中(a)中之治療活性物質及/或(b)中之診斷化合物選自放射性同位素、化學治療化合物、細胞毒性化合物及/或細胞生長抑制化合物，及/或其中抗體視情況經由連接子共價連接至(a)中之治療活性物質或其螯合劑或(b)中之診斷化合物或其螯合劑。

【0214】 較佳地，根據本發明之任一態樣的抗體可進一步連接至一或多個分子以便形成抗體結合物，尤其連接至治療活性物質及/或診斷化合物。

【0215】 本發明之任一態樣的較佳實施例亦適用於本文中之抗體結合物。

【0216】 因此，較佳地，抗體結合物之抗體部分包含：

(a) 重鏈可變區(VH)，其包含有包含胺基酸序列GYSITSDYTWN

(SEQ ID NO: 9)的VH CDR1、包含胺基酸序列YISYSGSYSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)的VH CDR2，及包含胺基酸序列SFSYSYGFAY (SEQ ID NO: 14)的VH CDR3；及

(b) 輕鏈可變區(VL)，其包含有包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)的VL CDR1、包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)的VL CDR2，及包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)的VL CDR3。

【0217】 因此，較佳地，抗體結合物之抗體部分包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列或由其組成的重鏈可變區序列及/或包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列或由其組成的輕鏈可變區序列。此外，較佳地，抗體結合物之抗體部分包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列或由其組成的重鏈可變區序列及包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列或由其組成的輕鏈可變區序列。

【0218】 較佳地，抗體結合物之抗體部分包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。在又一更佳實施例中，抗體結合物之抗體部分包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0219】 在另一更佳實施例中，抗體結合物之抗體部分由包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。在另一更佳實施例中，抗體結合物之抗體部分由包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。

【0220】較佳地，抗體結合物之抗體部分包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。在又一更佳實施例中，抗體結合物之抗體部分包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0221】在另一更佳實施例中，抗體結合物之抗體部分由包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。在另一更佳實施例中，抗體結合物之抗體部分由包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列組成。

【0222】在一個較佳實施例中，任一態樣之抗體經由連接子連接至至少一種治療活性物質。此類化合物亦稱為「抗體-藥物結合物」、「抗體結合物」、「抗體藥物結合物」或「ADC」。

【0223】本文所描述之本發明之抗體可與藥物部分結合以形成抗L1CAM抗體藥物結合物(ADC)。抗體-藥物結合物(ADC)可提高抗體治療疾病，例如癌症之治療功效，因為ADC能夠將一或多個治療活性物質部分選擇性遞送至目標組織或細胞，例如表現L1CAM之腫瘤或表現L1CAM之細胞。因此，在某些實施例中，本發明提供用於治療用途，例如治療癌症之抗L1CAM ADC。

【0224】術語「治療活性物質」、「治療活性物質部分」、「藥物」、「藥劑」及「藥物部分」在本文中可互換使用。

【0225】術語「連接」及「結合」在本文中亦可互換使用且指示抗體與部分共價連接。

【0226】 在一些實施例中，經由連接子連接至至少一種治療活性物質的本發明之ADC或抗體具有下式(式I)：



其中Ab為本文所描述之本發明之任一態樣的抗體，且(L-D)為連接子-藥物部分。連接子-藥物部分係由以下構成：L-，其為連接子；及-D，其為具有例如針對目標細胞，例如表現L1CAM之細胞之生長抑制、細胞毒性或其他治療活性的治療活性物質部分(或藥物部分)；且n為1至20之整數。在一些實施例中，n在1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、1至2範圍內，或為1。

【0227】 可用於ADC中之治療活性物質，亦即可與本發明之抗體結合之治療活性物質的實例包括有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、基因療法載體、烷基化劑、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼劑、化學保護劑、激素劑、糖皮質激素、光敏性治療劑、寡核苷酸、放射性同位素、放射增敏劑、拓樸異構酶抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑及其組合。

【0228】 在一個實施例中，治療活性物質選自由以下組成之群：DNA損傷劑、抗凋亡劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、用於基因療法之核酸、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼劑、化學保護劑、激素劑、抗激素劑、皮質類固醇、光敏性治療劑、寡核苷酸、放射性同位素、放射增敏劑、拓樸異構酶抑制劑及酪胺酸激酶抑制劑。

【0229】

有絲分裂抑制劑

在一個實施例中，本發明之抗體可與一或多種有絲分裂抑制劑結合以形成ADC用於治療過度增生性病徵、腫瘤疾病、與血管新生相關之病

症及/或與異常神經生成相關之病症。如本文所使用，術語「有絲分裂抑制劑(mitotic inhibitor)」係指阻斷有絲分裂或細胞分裂之細胞毒性劑及/或治療劑，其為對癌細胞尤其重要之生物方法。有絲分裂抑制劑經常藉由影響微管聚合(例如抑制微管聚合)或微管解聚合(例如使微管細胞骨架穩定以對抗解聚合)來干擾微管從而避免細胞分裂。因此，在一個實施例中，本發明之抗體結合至藉由抑制微管蛋白聚合來干擾微管形成的一或多種有絲分裂抑制劑。在另一實施例中，本發明之抗體結合至使微管細胞骨架穩定免於解聚合的一或多種有絲分裂抑制劑。在一個實施例中，用於本發明之ADC的有絲分裂抑制劑為易莎平(Ixempra) (伊沙匹隆(ixabepilone))。可用於本發明之ADC中之有絲分裂抑制劑的實例提供於下文中。奧瑞他汀及類美登素包括於有絲分裂抑制劑之類中，其進一步描述於下文中。

【0230】

尾海兔素

本發明之抗體可與至少一種尾海兔素結合以形成ADC。尾海兔素為自印度洋海野兔龍骨海鹿(*Dolabella auricularia*)分離的短肽化合物。尾海兔素之實例包括尾海兔素10及尾海兔素15。尾海兔素15，一種來源於龍骨海鹿的七次單元酯肽，為結構上與獲自同一生物體之五次單元肽的抗微管蛋白劑尾海兔素10相關的強效抗有絲分裂劑。奧瑞他汀為尾海兔素10之合成衍生物。

【0231】

奧瑞他汀

本發明之抗體可與至少一種奧瑞他汀結合。奧瑞他汀表示一般已展

示藉由干擾微管動力學及GTP水解藉此抑制細胞分裂而具有抗癌活性的尾海兔素類似物之群。例如，奧瑞他汀E為海洋天然產物尾海兔素10之合成類似物，一種藉由與抗癌藥物長春新鹼一樣結合於微管蛋白上之相同位點來抑制微管蛋白聚合的化合物。尾海兔素10、奧瑞他汀PE及奧瑞他汀E為具有四種胺基酸(其中三種為尾海兔素類化合物特有)的線性肽。有絲分裂抑制劑之奧瑞他汀子類的例示性實施例包括但不限於單甲基奧瑞他汀D (MMAD或奧瑞他汀D衍生物)、單甲基奧瑞他汀E (MMAE或奧瑞他汀E衍生物)、單甲基奧瑞他汀F (MMAF或奧瑞他汀F衍生物)、奧瑞他汀F苯二胺(AFP)、奧瑞他汀EB (AEB)、奧瑞他汀EFP (AEFP)及5-苯甲醯基戊酸-AE酯(AEVB)。

【0232】 在一個實施例中，本發明之抗體與至少一個MMAE (單甲基奧瑞他汀E)結合。單甲基奧瑞他汀E (MMAE)藉由阻斷微管蛋白之聚合來抑制細胞分裂。由於其毒性，其自身亦不可用作藥物。在近期癌症治療發展中，其與識別癌細胞中表現之特異性標記且將MMAE導向癌細胞的抗體連接。在一個實施例中，連接MMAE至本發明之抗體的連接子在細胞外液(亦即在細胞外部的介質或環境)中穩定，但一旦ADC結合至特定癌細胞抗原且進入癌細胞便藉由組織蛋白酶裂解，從而釋放毒性MMAE且活化強效抗有絲分裂機制。在一個實施例中，連接MMAE至本發明之抗體的連接子在細胞外液(亦即在細胞外部的介質或環境)中穩定，但一旦ADC結合至特定癌細胞抗原且進入癌細胞便藉由葡萄糖醛酸苷酶裂解，從而釋放毒性MMAE且活化強效抗有絲分裂機制。

【0233】

類美登素

本發明之抗體可與至少一種類美登素結合以形成ADC。類美登素為最初自高等植物科衛矛科(Celastraceae)、鼠李科(Rhamnaceae)及大戟科(Euphorbiaceae)之成員以及蘚綱之一些物種分離的強效抗腫瘤劑。證據表明類美登素藉由抑制微管蛋白質微管蛋白從而防止微管形成之聚合來抑制有絲分裂。已表明在使用細胞培養模型之活體外及使用實驗室動物系統之活體內，類美登素抑制腫瘤細胞生長。此外，類美登素之細胞毒性比習知化學治療劑，諸如胺甲喋呤、佐柔比星及長春新鹼高1,000倍。類美登素包括例如美登素、美登醇及美登醇之C-3酯。

【0234】 用於本發明之ADC的適合之類美登素可分離自天然來源、合成產生或半合成產生。此外，類美登素可以任何適合方式修飾，只要足夠細胞毒性保留於最終結合分子中即可。就此而言，類美登素不具有抗體可連接的適合官能基。連接部分理想地用於將類美登素連接至抗體以形成結合物，且描述於實例中。

【0235】 類美登素之代表性實例包括但不限於DM1 (N2'-去乙醯基-N2'-(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素，亦稱作藥物類美登素1)；DM2、DM3 (N2'-去乙醯基-N2'-(4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素)、DM4 ((4-甲基-4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素)，及美登醇(合成類美登素類似物)。

【0236】 在本發明之一個實施例中，本發明抗體與至少一個DM1結合。在一個實施例中，本發明之抗體與至少一個DM2結合。在一個實施例中，本發明之抗體與至少一個DM3結合。在一個實施例中，本發明之抗體與至少一個DM4結合。

【0237】

抗腫瘤抗生素

本發明抗體可與一或多種抗腫瘤抗生素結合。如本文所使用，術語「抗腫瘤抗生素(antitumor antibiotic)」意謂藉由干擾DNA阻斷細胞生長且由微生物製得之抗贅生性藥物。通常，抗腫瘤抗生素分解DNA鏈，抑或減緩或阻止DNA合成。可包括於ADC中之抗腫瘤抗生素的實例包括但不限於放線菌素(例如吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呋)、蒽環黴素(anthracycline)、卡奇黴素(calicheamicins)及倍癌黴素。除前述以外，可使用之額外抗腫瘤抗生素包括博萊黴素、絲裂黴素及普卡黴素(plicamycin)(亦稱為光神黴素(mithramycin))。

【0238】

免疫調節劑

在一個實施例中，本發明之抗體可與至少一種免疫調節劑結合。如本文所使用，術語「免疫調節劑(immunomodulating agent)」係指可刺激或調節免疫反應之藥劑。在一個實施例中，免疫調節劑為增強個體之免疫反應的免疫刺激劑。在另一實施例中，免疫調節劑為阻止或降低個體之免疫反應的免疫抑制劑。免疫調節劑可調節骨髓細胞(單核球、巨噬細胞、樹突細胞、巨核細胞及粒細胞)或淋巴細胞(T細胞、B細胞及自然殺手(NK)細胞)及其任何其他分化細胞。代表性實例包括但不限於卡介苗(bacillus calmette- Guerin；BCG)及左旋咪唑(levamisole)(爾吉咪唑(Ergamisol))。可用於ADC中之免疫調節劑的其他實例包括但不限於癌症疫苗及細胞介素。

【0239】

烷基化劑

本發明之抗體可與一或多種烷基化劑結合。烷基化劑為將烷基連接

至DNA的一類抗贅生化化合物。可用於ADC中之烷基化劑的實例包括但不限於烷基磺酸鹽、伸乙亞胺、甲胺衍生物、環氧化物、氮芥、亞硝基脲、三吡及肼。

【0240】

DNA損傷劑

在一個實施例中，本發明之抗體可與一或多種DNA損傷劑結合。如本文所使用，術語「DNA損傷劑(DNA damaging agent)」係指能夠損傷DNA且為一般熟習此項技術者所熟知的藥劑。DNA損傷劑包括DNA烷基化劑。DNA損傷劑亦包括吡啶并-苯并二氮呋(IGN)。

【0241】 在一個實施例中，DNA損傷劑亦可包括吡咯并苯并二氮呋(PBD)或吡啶并苯并二氮呋(PDD) [26, 27]。

【0242】 例如，可使用SG3199或VA-SG3199 (特司林)。SG3199為抗體-藥物結合物(ADC)酬載特司林之吡咯并苯并二氮呋(PBD)二聚體彈頭組分。

【0243】

抗血管生成劑

在一個實施例中，本文所描述之本發明之抗體與至少一種抗血管生成劑結合。抗血管生成劑抑制新的血管之生長。抗血管生成劑以各種方法發揮其作用。在一些實施例中，此等藥劑干涉生長因子到達其目標之能力。例如，血管內皮生長因子(VEGF)係涉及藉由結合至細胞表面上之特定受體而啟動血管生成之主要蛋白中的一種。因此，防止VEGF與其同源受體相互作用的某些抗血管生成劑防止VEGF啟動血管生成。在其他實施例中，此等藥劑干擾細胞內信號傳導級聯。例如，一旦細胞表面上的特定

受體已經觸發，則其他化學信號之級聯啟動以促進血管之生長。因此，已知促進有助於例如細胞增殖之細胞內信號傳導級聯的某些酶類，例如一些酪胺酸激酶係癌症治療的目標。在其他實施例中，此等藥劑干涉細胞間信號傳導級聯。然而，在其他實施例中，此等藥劑使得活化並促進細胞生長的特定目標失能或直接干涉血管細胞之生長。已在超過300種具有大量直接及間接抑制效應之物質中發現血管生成抑制性質。可用於ADC中之抗血管生成劑的代表性實例包括但不限於血管抑制素、ABX EGF、C1-1033、PKI-166、EGF疫苗、EKB-569、GW2016、ICR-62、EMD 55900、CP358、PD153035、AG1478、IMC-C225 (愛必妥(Erbitux))、ZD1839 (易瑞沙(Iressa))、OSI-774、厄洛替尼(特羅凱(tarceva))、抑制蛋白(arrestin)、內皮抑制素(endostatin)、BAY 12-9566及氟尿嘧啶(fluorouracil)或多柔比星、血管能抑制素(canstatin)、羧基胺咪唑(carboxyamidotriazole)及與太平洋紫杉醇之組合物、EMD121974、S-24、維他欣(vitaxin)、二甲基咕噸酮乙酸、IM862、介白素-12、介白素-2、NM-3、HuMV833、PTK787、RhuMab、安吉酶(angiozyme) (核糖核酸酶)、IMC-1C11、新伐司他(Neovastat)、瑪瑞司他(marimstat)、普馬司他(prinomastat)、BMS-275291、COL-3、MM1270、SU101、SU6668、SU11248、SU5416、太平洋紫杉醇之組合物、與吉西他濱及順鉑之組合物、及與伊立替康及順鉑之組合物以及與放射物之組合物、替康蘭(tecogalan)、替莫唑胺(temozolomide)及PEG干擾素 α 2b、四硫鉬酸鹽、TNP-470、沙立度胺(thalidomide)、CC-5013及與克癌易(taxotere)之組合物、腫瘤抑制素(tumstatin)、2-甲氧基雌二醇、VEGF捕獲劑、mTOR抑制劑(德佛莫司(deforolimus)、依維莫司(everolimus) (阿飛尼妥

(Afinitor) , Novartis Pharmaceutical Corporation) 及替西羅莫司 (temsirolimus) (馱瑞塞爾(Torisel) , Pfizer, Inc.))、酪胺酸激酶抑制劑(例如厄洛替尼(特羅凱 , Genentech, Inc.)、伊馬替尼(imatinib) (格列衛(Gleevec) , Novartis Pharmaceutical Corporation)、吉非替尼(gefitinib) (易瑞沙 , AstraZeneca Pharmaceuticals)、達沙替尼(dasatinib) (施達塞(Sprycel) , Bristol-Myers Squibb)、舒尼替尼(sunitinib) (索坦(Sutent) , Pfizer, Inc.)、尼洛替尼(nilotinib) (達希納(Tasigna) , Novartis Pharmaceutical Corporation)、拉帕替尼(lapatinib) (泰克布(Tykerb) , GlaxoSmithKline Pharmaceuticals)、索拉非尼(多吉美(Nexavar) , Bayer 及Onyx)、磷酸肌醇3-激酶(PI3K))。

【0244】

抗代謝物

本發明之抗體可與至少一種抗代謝物結合。抗代謝物為極類似於細胞內之普通物質的化學療法治療之類型。當細胞將抗代謝物併入細胞代謝時，對於細胞結果係負面的，例如，細胞將不能分裂。抗代謝物根據其干涉之物質而分類。可用於ADC中之抗代謝物的實例包括但不限於葉酸拮抗劑(例如胺甲喋呤)、嘧啶拮抗劑(例如5-氟尿嘧啶、氟尿昔(Foxuridine)、阿糖胞昔(Cytarabine)、卡培他濱及吉西他濱)、嘌呤拮抗劑(例如6-巯嘌呤及6-硫鳥嘌呤)及腺昔去胺酶抑制劑(例如克拉屈濱(Cladribine)、氟達拉賓(Fludarabine)、奈拉濱(Nelarabine)及噴司他丁)。

【0245】

含硼劑

本發明之抗體可與至少一種含硼劑結合。含硼劑包含干涉細胞增殖的一類癌症治療化合物。含硼劑之代表性實例包括但不限於硼藻毒素(borophycin)及硼替佐米(bortezomib)。

【0246】

化學保護劑

本發明之抗體可與至少一種化學保護劑結合。

【0247】 化學保護劑係幫助保護身體免受化學療法之特異性毒性效應的一類化合物。化學保護劑可與各種化學療法一起投與以便保護健康細胞免受化學療法藥物之毒性效應，同時允許藉由所投與之化學治療劑治療癌細胞。代表性化學保護劑包括但不限於胺磷汀(amifostine)，其用於降低與累積劑量之順鉑、右雷佐生(dexrazoxane)相關的腎臟毒性，用於治療由投與蔥環黴素引起之外滲，及用於治療由投與抗腫瘤抗生素多柔比星引起之心臟相關併發症；及美司納(mesna) (美斯奈(Mesnex)， Bristol-Myers Squibb)，其與異環磷醯胺一起用於預防化學療法治療期間之出血性膀胱炎。

【0248】

光敏性治療劑

本發明之抗體可與至少一種光敏性治療劑結合。光敏性治療劑包括可經部署以在經治療細胞暴露於特定波長之電磁輻射時將其殺死的化合物。治療上相關化合物吸收穿透組織之波長的電磁輻射。在較佳實施例中，化合物以無毒形式投與，一旦充分活化，其能夠產生對細胞或組織有毒的光化學效應。在其他較佳實施例中，此等化合物由癌組織保留並容易自正常組織清除。非限制性實例包括各種顯色劑及染料。

【0249】 在一較佳實施例中，有絲分裂抑制劑選自類美登素及奧瑞他汀。

【0250】 類美登素DM4及奧瑞他汀MMAE在實例中成功用於本發明之ADC中。

【0251】 在另一較佳實施例中，DNA損傷劑選自吡咯并苯并二氮吡(PBD)及吡啶并苯并二氮吡(PDD)。

【0252】 在實例中，DNA損傷劑VA-SG3199 (特司林)成功用於本發明之ADC中。

【0253】 在另一較佳實施例中，連接子為不可裂解連接子。

【0254】 在另一較佳實施例中，連接子為可裂解連接子。

【0255】 在又另一較佳實施例中，治療活性物質選自單甲基奧瑞他汀E (MMAE)、(4-甲基-4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)及VA-SG3199 (特司林)。

【0256】 如上文所描述，本文所描述之本發明之抗體中之任一者均可用於ADC。

【0257】 在實例中，包含AFF4-WT抗體之ADC經製備且證明在活體外及/或活體內腫瘤模型中有效。

【0258】 因此，尤其較佳提供包含有包含以下之抗體的ADC：AFF4抗體之CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及/或CDRL3序列；AFF4或AFF4-WT抗體之VH及/或VL域序列；及/或AFF4或AFF4-WT抗體之重鏈及/或輕鏈序列。

【0259】 較佳地，提供經由連接子連接至至少一種治療活性物質的本發明之抗體或ADC，其包含AFF4抗體之CDRH1、CDRH2、CDRH3、

CDRL1、CDRL2及/或CDRL3序列或AFF4抗體之VH及/或VL域序列，且其中該抗體進一步包含人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4恆定區。

【0260】 在經由連接子連接至至少一種治療活性物質的本發明之抗體或本發明之ADC的一個實施例中，抗體進一步包含人類IgG1恆定區。

【0261】 例如，人類IgG恆定區可為野生型人類IgG恆定區。或者，人類IgG恆定區可為在恆定區中含有1至10個突變(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變，包括其任何子範圍)，諸如取代、缺失及/或插入，尤其1至10個取代(包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個取代，包括其任何子範圍)之野生型人類IgG恆定區。

【0262】 各突變可獨立地引入Fc域之一個鏈中。或者，各突變可獨立地對稱地引入恆定區域之兩條鏈中。

【0263】 在一個較佳實施例中，經由連接子連接至至少一種治療活性物質之抗體或ADC包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0264】 在一個較佳實施例中，經由連接子連接至至少一種治療活性物質之抗體或ADC包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列且包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【0265】 在一個較佳實施例中，經由連接子連接至至少一種治療活性物質之抗體或ADC包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0266】 在一個較佳實施例中，經由連接子連接至至少一種治療活性物質之抗體或ADC包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成

的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【0267】

核酸、載體及宿主細胞

術語「核酸(nucleic acid)」描述熟習此項技術者已知之任何形式的去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或人工核酸。

【0268】 編碼本文所描述之抗體的核苷酸序列及此等抗體之經修飾之版本可使用此項技術中熟知之方法確定，亦即以使得生成編碼抗體之核酸的方式組裝已知編碼特定胺基酸之核苷酸密碼子。此類編碼抗體之聚核苷酸可由化學合成之寡核苷酸組裝，簡言之，此涉及合成含有編碼抗體之序列之部分的重疊寡核苷酸、黏著及接合此等寡核苷酸，且隨後藉由PCR擴增經接合之寡核苷酸。

【0269】 當含有編碼特定抗體之核酸的純系不可用，但抗體分子之序列已知時，編碼免疫球蛋白之核酸可以化學方式合成或藉由使用可與序列之3'及5'端雜合的合成引子進行PCR擴增或藉由使用鑑別例如來自編碼該抗體之cDNA庫之cDNA純系的對特定基因序列具有特異性之寡核苷酸探針進行選殖而從適合來源獲得(例如，抗體cDNA庫或自表現該抗體之任何組織或細胞，諸如經選擇以表現本文所描述之抗體的融合瘤細胞生成之cDNA庫，或自該等組織或細胞分離之核酸，較佳地聚A+ RNA)。隨後，可使用此項技術中熟知之任何方法將藉由PCR生成之經擴增之核酸選殖至可複製選殖載體中。

【0270】 編碼本文所描述之本發明之抗體的DNA可使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合至編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸

探針)容易地分離及定序。融合瘤細胞可用作此類DNA之來源。DNA一經分離，即可置放於表現載體中，隨後轉染至宿主細胞，諸如大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞(例如來自CHO GS System™ (Lonza)之CHO細胞)或在其他情況下不生產免疫球蛋白之骨髓瘤細胞中，以在重組宿主細胞中獲得抗體之合成。

【0271】 為了生成全抗體，包括VH或VL核苷酸序列、限制位點及保護限制位點之側接序列的PCR引子可用於擴增scFv純系或其他純系中之VH或VL序列。利用熟習此項技術者已知之選殖技術，可將經PCR擴增之VH域選殖至表現重鏈恆定區，例如人類IgG1恆定區、人類IgG4恆定區、人類IgG2恆定區或人類IgG3恆定區之載體中，且可將經PCR擴增之VL域選殖至表現輕鏈恆定區，例如人類κ或λ恆定區之載體中。在某些實施例中，用於表現VH或VL域之載體包含啟動子、分泌信號、可變區之選殖位點、恆定域及選擇標記，諸如新黴素。VH及VL域亦可選殖至一個表現必需恆定區之載體中。隨後，使用熟習此項技術者已知的技術，將重鏈轉化載體及輕鏈轉化載體共轉染至細胞株中以生成表現全長抗體，例如IgG之穩定或短暫細胞株。或者，表現重鏈或輕鏈之載體可轉染至各別細胞中且抗體可在回收之後組裝。此外，或者，編碼本發明之抗體的核酸可使用用於表現之單一載體來表現。此類載體可將本發明之抗體編碼為單一分子，諸如scFv，或可編碼兩種或兩種以上多肽，其可組裝至本發明之抗體。

【0272】 DNA亦可例如藉由將鼠類序列取代為人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列，或藉由將全部或一部分用於非免疫球蛋白多肽之編碼序列共價接合至免疫球蛋白編碼序列來修飾。

【0273】 可變區之定點或高密度突變誘發或其他突變誘發方法可用

於使單株抗體之特異性、親和力等最佳化。尤其，親和力成熟策略及鏈改組策略[28]為此項技術中已知且可用於生成高親和力人類抗體。

【0274】 在另一態樣中，本發明亦關於核酸，其

(i) 編碼根據本發明之任一態樣特異性結合至人類L1CAM的抗體，及/或

(ii) 編碼根據本發明之任一態樣特異性結合至人類L1CAM之抗體的至少一個VH或HC及/或VL或LC，及/或

(iii) 編碼根據SEQ ID NO: 30及/或根據SEQ ID NO: 20之序列，及/或

(iv) 包含編碼根據本發明之任一態樣特異性結合至人類L1CAM之抗體的互補決定區序列之序列。

【0275】 在此情況下，適用時，上文針對本發明之任一態樣之抗體所描述的所有特徵亦適用於本發明之核酸，諸如與此核酸編碼之抗體有關的特徵或諸如抗體之特異性結合。

【0276】 較佳地，核酸為載體之一部分。

【0277】 一般而言，載體(亦表現載體)為用於將所需核酸序列，諸如基因引入目標細胞中，從而引起由核酸序列編碼之蛋白，例如嵌合抗原受體、抗體或結合分子之轉錄及轉譯的質體。因此，表現載體一般包含調節序列，諸如啟動子及強化子區域，以及聚腺苷酸化位點，以便導引核酸序列在表現載體上之高效轉錄。表現載體可進一步包含額外必需或有用區域，諸如用於在真核細胞或原核細胞中選擇之可選標記、用於純化所得蛋白之純化標籤、多選殖位點或複製起點。

【0278】 通常，表現載體可為病毒或非病毒載體。一般而言，可使

用各種病毒載體，諸如反轉錄病毒載體，例如慢病毒或腺病毒載體，或質體。

【0279】 較佳的是，核酸為載體之一部分。

【0280】 包含本發明之核酸的此類載體可進一步引入宿主細胞中。

【0281】 用於將此類載體引入宿主細胞中之方法為熟習此項技術者所熟知，諸如任何已知轉染方法，例如任何非病毒轉染方法(例如基於化學、非化學或基於粒子)或任何基於病毒之轉染方法。適合方法之實例為基於磷酸鈣沉澱、脂質體轉染、陽離子聚合物、Fugene、樹枝狀聚合物、奈米粒子、顯微注射、細胞擠壓、電穿孔、粒子槍(亦稱為基因槍)、磁體輔助轉染、光學轉染、原生質體融合、黑斑羚感染(impalafection)、流體動力遞送、聲致穿孔、基於轉鐵蛋白之感染、抗體介導之轉染或基於病毒之轉染(例如基於腺病毒或慢病毒載體)的轉染方法。

【0282】 在另一態樣中，本發明係關於包含根據本發明之核酸的宿主細胞。

【0283】 適合之宿主細胞為熟習此項技術者所熟知，諸如哺乳動物細胞(諸如人類、小鼠、大鼠或倉鼠細胞)、昆蟲細胞、細菌細胞或酵母細胞。此類宿主細胞可包含本發明之核酸，例如整合於其基因體中或整合於載體中。用於將此類核酸引入宿主細胞中之方法於上文描述且另外為熟習此項技術者所熟知。

【0284】

包含本發明之抗體的組合物

在另一態樣中，本發明係關於包含本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞及視情況選用之一或多種醫藥學上可接受之載劑

的醫藥組合物。

【0285】 醫藥組合物中之抗體、核酸或宿主細胞的含量不受限制，只要其適用於治療或預防即可，但較佳地每總組合物含有0.0000001-10重量%。

【0286】 此外，本文所描述之抗體、核酸或宿主細胞較佳用於一或多種醫藥學上可接受之載劑中。

【0287】 術語「載劑(carrier)」描述諸如藉由連續或經觸發釋放或藉由允許抗體、核酸或宿主細胞之膜滲透來改良抗體、核酸或宿主細胞向人體或動物體投與之選擇性、有效性及/或安全性的任何分子。

【0288】 當載劑對人體或動物體不具有任何或非實質上不良非所要效應時，其進一步被視為醫藥學上可接受的，例如其被視為一般安全、無毒性及/或不引起非所要之生物副反應。適合的醫藥學上可接受之載劑為熟習此項技術者所熟知。載劑之選擇可視活性劑之投與途徑及濃度而定且載劑可呈凍乾組合物或水溶液形式。一般而言，適量醫藥學上可接受之鹽用於載劑中以使組合物等張。載劑之實例包括但不限於生理鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。較佳地，可接受之賦形劑、載劑或穩定劑在所用劑量及濃度下無毒，包括緩衝劑，諸如檸檬酸鹽、磷酸鹽及其他有機酸；形成鹽之相對離子，例如鈉及鉀；低分子量(<10個胺基酸殘基)多肽；蛋白，例如血清白蛋白或明膠；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如組胺酸、麩醯胺酸、離胺酸、天冬醯胺、精胺酸或甘胺酸；碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；單醣；雙醣；其他糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；螯合劑，例如EDTA；非離子界面活性劑，例如吐溫、普朗尼克(Pluronic)或聚乙二醇；抗氧化劑，包

括甲硫胺酸、抗壞血酸及生育酚；及/或防腐劑，例如十八烷基二甲基苯甲基氯化銨；氯化六羥四級銨；苯紮氯銨、苜索氯銨；酚、丁醇或苜醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚。適合之載劑及其調配物更詳細地描述於Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版, 1985, Mack Publishing Co.中。

【0289】

治療及診斷用途及應用

在另一態樣中，本發明係關於本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞、或本發明之醫藥組合物，其用作藥劑或用作診斷劑。

【0290】術語「藥劑(medicament)」為適用於治癒、治療或預防疾病之物質。類似地，術語「診斷劑(diagnostic agent)」為適用於診斷疾病，亦即確定人體或動物體是否具有特定疾病或病況的物質。

【0291】在另一態樣中，本發明係關於本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞、或本發明之醫藥組合物，其用於治療或預防過度增生性病變、腫瘤疾病、與血管新生相關之病變及/或與異常神經生成相關之病變。

【0292】術語「治療(treating)」描述相對於疾病或病況而改善人體或動物體之健康狀況的任何形式。此可包含症狀減輕、減緩進展、輕微改善，以及完全治癒人體或動物體之疾病或病況。類似地，術語「預防(preventing)」描述使人體或動物體保持健康狀況免於罹患疾病或病況。

【0293】術語「過度增生性病變(hyperproliferative disorder)」描述與過度增生性細胞(諸如一般腫瘤、癌症及贅生性組織，以及癌前及非

贅生性或非惡性過度增生性病變)，亦即展示異常高速率細胞增殖之細胞有關的任何疾病或病況。實例為非惡性(亦非贅生性)、癌前或惡性腫瘤。癌前及非贅生性或非惡性過度增生性病變的實例為例如骨髓發育不良病變；原位子宮頸癌；家族性腸息肉病，諸如加德納症候群(Gardner syndrome)；口腔白斑病；組織細胞增生症；癍痕瘤；血管瘤；過度增生性動脈狹窄、發炎性關節炎；過度角化症、鱗屑性丘疹包括關節炎，及過度增生性皮膚病變，諸如慢性發炎性皮膚病(例如牛皮癬)，以及病毒誘導之過度增生性疾病，諸如疣及EBV誘導之疾病(亦即感染性單核白血球增多症)、疤痕形成，及其類似病變。

【0294】術語「腫瘤疾病(tumor disease)」描述與腫瘤(亦稱為贅瘤)有關之任何疾病或病況，其可為非惡性(亦非贅生性)、癌前或惡性的。

【0295】在實施例中，腫瘤疾病選自卵巢癌、乳癌、子宮內膜癌、黑色素瘤及神經母細胞瘤。

【0296】在一實施例中，本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞、或本發明之醫藥組合物用於治療或預防表現L1CAM之過度增生性病變、表現L1CAM之腫瘤疾病、與血管新生相關之表現L1CAM之病變及/或與異常神經生成相關之表現L1CAM之病變。

【0297】「表現L1CAM之過度增生性病變(L1CAM expressing hyperproliferative disorder)」理解為其中過度增生性細胞之至少一部分在細胞表面上表現人類L1CAM的過度增生性病變。

【0298】「表現L1CAM之腫瘤疾病(L1CAM expressing tumor disease)」理解為其中腫瘤細胞之至少一部分在細胞表面上表現人類

L1CAM的腫瘤疾病。

【0299】 在實施例中，表現L1CAM之腫瘤疾病選自表現L1CAM之卵巢癌、表現L1CAM之乳癌、表現L1CAM之子宮內膜癌、表現L1CAM之黑色素瘤及表現L1CAM之神經母細胞瘤。

【0300】 「與血管新生相關之表現L1CAM之病症(L1CAM expressing disorder associated with neoangiogenesis)」理解為其中參與血管新生之細胞之至少一部分在細胞表面上表現人類L1CAM的與血管新生有關之病症。

【0301】 「與異常神經生成相關之表現L1CAM之病症(L1CAM expressing disorder associated with aberrant neurogenesis)」理解為其中參與異常神經生成之細胞之至少一部分在細胞表面上表現人類L1CAM的與異常神經生成相關之病症。

【0302】 在另一較佳實施例中，經由連接子連接至至少一種治療活性物質的任一態樣之抗體(亦稱為「抗體-藥物結合物」、「抗體結合物」、「抗體藥物結合物」或「ADC」)用於藉由展現細胞毒性旁觀者效應來治療或預防過度增生性病變、腫瘤疾病、與血管新生相關之病症、與異常神經生成相關之病症、表現L1CAM之過度增生性病變、表現L1CAM之腫瘤疾病、與血管新生相關之表現L1CAM之病症、與異常神經生成相關之表現L1CAM之病症。在實施例中，連接子為可剝離襯墊。

【0303】 細胞毒性旁觀者效理解為如下效應，其中具有此類旁觀者效應之ADC以釋放一系列可自由擴散至鄰近細胞的細胞毒性酬載之方式由抗原陽性癌細胞吸收及處理，且因此能夠獨立於其抗原表現來殺死彼等細胞。因而，此類ADC非常適合於治療具有異質L1CAM目標表現之腫

瘤。在實施例中，連接子為可剝離襯墊。用於確定細胞毒性旁觀者效應之方法為此項技術中已知。特定言之，可使用如實例8中所描述之分析。

【0304】 「約(About)」理解為意指指示值 $\pm 10\%$ 。

【0305】 與血管新生相關之病症描述與過度增生性組織中之血管形成有關的任何疾病或病況，諸如非惡性(亦非贅生性)、癌前或惡性腫瘤及癌症。

【0306】 與異常神經生成相關之病症描述與神經幹細胞產生神經系統之異常細胞(諸如異常神經元)，諸如異常(海馬)神經生成有關的任何疾病或病況。

【0307】 在另一態樣中，本發明係關於本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞、或本發明之醫藥組合物，其用於診斷過度增生性病況、腫瘤疾病、與血管新生相關之病症及/或與異常神經生成相關之病症。

【0308】 在另一態樣中，本發明係關於本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞、或本發明之醫藥組合物作為診斷劑的活體外用途，尤其用於診斷過度增生性病況、腫瘤疾病、與血管新生相關之病症及/或與異常神經生成相關之病症。

【0309】 在另一態樣中，本發明係關於治療或預防過度增生性病況、腫瘤疾病、與血管新生相關之病症及/或與異常神經生成相關之病症之方法，包含向有需要之患者投與醫藥學上有效量之本發明之抗體、或本發明之核酸、或本發明之宿主細胞、或本發明之醫藥組合物。

【0310】 如本文所使用，在向個體投與療法之情況下，術語「醫藥學上有效量(pharmaceutically effective amount)」係指達成所需預防或治

療效果的療法之量。

【0311】 適合之量及劑量可由熟習此項技術者確定。例如，本文所描述之抗體或醫藥組合物可以約0.001 mg/kg、0.01 mg/kg、0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg、6 mg/kg或約10 mg/kg向個體投與(例如經由靜脈內注射)。

【0312】 因此，本發明之抗體、核酸或宿主細胞之投與係指熟習此項技術者已知的任何藥物投與途徑，諸如靜脈內、腹膜內、皮下、經口、鼻內或舌下投與。適合之給藥方案亦為熟習此項技術者所熟知。較佳地，本發明之抗體、核酸或宿主細胞係以醫藥學上有效量，亦即以在投與本發明之抗體、核酸或宿主細胞的體內引起生物反應的劑量或濃度投與。

【0313】 在此情況下，適用時，上文針對本發明之任何態樣之抗體所描述的所有特徵亦適用於本發明之其他態樣，諸如與抗體結合物、核酸、宿主細胞或醫藥組合物有關的特徵。

【0314】 一般而言，本發明不限於本文所描述之特定方法、方案及試劑，因為其可變化。此外，本文所使用之術語僅出於描述特定實施例之目的且並不意欲限制本發明之範圍。除非上下文另外明確規定，否則如本文及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。類似地，應包括性地而非排他地解譯字組「包含(comprise)」、「含有(contain)」及「涵蓋(encompass)」。

【0315】 除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語及任何字首語具有與本發明領域中之一般熟習此項技術者通常所理解的相同含義。儘管可在如本文所呈現之實踐中使用與本文所描述之方法及材料類似或等效的任何方法及材料，但本文描述特定方法及材料。

【0316】 本發明藉由以下圖式及實例進一步說明，但是應理解，除非另外具體指示，否則該等圖式及實例僅出於說明目的而包括在內且不意欲限制本發明之範圍。

【0317】

參考文獻

1. Galluzzi L 等人: Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 1(1):28-37 (2012)

2. Presta LG: Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 20(4):460-470 (2008)

3. Reichert JM: Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 2012, 4(3):413-415 (2012)

4. Reichert JM: Antibodies to watch in 2014: mid-year update. *mAbs* 6(4):799-802 (2014)

5. Reichert JM: Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs* 3(1):76-99 (2011)

6. Wolterink S 等人: Therapeutic antibodies to human L1CAM: functional characterization and application in a mouse model for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 70(6):2504-2515 (2010)

7. Doberstein K 等人: Antibody therapy to human L1CAM in a transgenic mouse model blocks local tumor growth but induces EMT. *Int. J. Cancer* 136(5):E326-339 (2015)

8. Novak-Hofer I 等人: Internalization and degradation of monoclonal antibody chCE7 by human neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer* 57(3):427-

432 (1994)

9. Schaefer AW等人: Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* 274(53):37965-37973 (1999)

10. Long KE等人: The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276(2):1285-1290 (2001)

11. Schaefer AW等人: L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J. Cell Biol.* 157(7):1223-1232 (2002)

12. Kabat等人: Unusual distributions of amino acids in complementarity-determining (hypervariable) segments of heavy and light chains of immunoglobulins and their possible roles in specificity of antibody-combining sites. *J. Biol. Chem.* 252(19), 6609-6616 (1977)

13. Kabat等人: Sequences of proteins of immunological interest. (1991)

14. Chothia and Lesk AM: Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. , *J. Mol. Biol.* 196(4):901-917 (1987)

15. MacCallum等人: Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J. Mol. Biol.* 262(5):732-745 (1996)

16. Vazquez-Lombardi R.等人: Challenges and opportunities for non-antibody scaffold drugs. *Drug Discovery Today*, 20(10):1271-1283 (2015)

17. Winter, G. and Milstein, C.: Man-made antibodies. *Nature*, 349: 293-299 (1999)
18. Smith P等人: Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109(16):6181-6186 (2012)
19. Fuchs等人: Targeting recombinant antibodies to the surface of *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991)
20. Hay 等人 : Bacteriophage cloning and *Escherichia coli* expression of a human IgM Fab. *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992)
21. Huse等人: Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 246:1275-1281 (1989)
22. Griffiths等人: Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12:725-734 (1993)
23. Gouveia 等人 : Production and purification of functional truncated soluble forms of human recombinant L1 cell adhesion glycoprotein from *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Protein Expr. Purif.* 52: 182-193 (2007)
24. Epitope Mapping, A practical approach, 248 (Practical Approach Series); Oxford University Press, Editors: Olwyn Westwood and Frank Hay (2001)
25. Oleszewski, M.等人: Characterization of the L1CAM-neurocan

binding site. Implications for L1CAM-L1CAM homophilic binding. J.Biol.Chem. 275: 34478-34485 (2000).

26. Veillard N. 等人: Pyridinobenzodiazepines (PDDs): A new class of sequence-selective DNA mono-alkylating ADC payloads with low hydrophobicity. Cancer Res 78 (13_Supplement): 736. (2018)

27. Stefano J.E., 等人: Micro- and Mid-Scale Maleimide-Based Conjugation of Cytotoxic Drugs to Antibody Hinge Region Thiols for Tumor Targeting. In: Ducry L. (eds) Antibody-Drug Conjugates. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1045. Humana Press, Totowa, NJ. (2013)

28. Marks J.D. 等人: By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. Biotechnology 10:779-783 (1992)

【0318】

實例

實例1

生成單株抗體OV549.20及重組表現為小鼠IgG2a及人類IgG1嵌合抗體

使用融合瘤技術使用SKOV3ip人類卵巢癌細胞作為免疫原生成小鼠抗體OV549.20。

【0319】 將編碼OV549.20之重鏈及輕鏈可變域的DNA序列框內選殖至分別編碼小鼠IgG2a或人類IgG1之重鏈及輕鏈恆定域的表現載體中。對於鼠類抗體，抗體構築體之整個重鏈及輕鏈的所得蛋白序列顯示為SEQ ID NO: 35及SEQ ID NO: 36。嵌合抗體具有相同可變區，但含有人類

IgG1恆定域。在低內毒素條件下純化分別編碼抗體之重鏈及輕鏈的質體且暫時共轉染至中國倉鼠卵巢(CHO) K1細胞中。使細胞在化學成分確定之無動物組分的培養基中生長，且藉由離心及隨後經0.2 μm 過濾器過濾來收穫含有重組抗體之上清液。藉由親和力層析使用蛋白A管柱(MabSelect SuRe, GE Healthcare)純化抗體且儲存於含有100 mM精胺酸之磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS)中。

【0320】經純化OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1抗體之還原SDS-PAGE分析(圖1A)揭示，對於兩種抗體而言，在大約50 kDa處存在條帶，在大約25 kDa處存在模糊條帶，以及在大約30 kDa處存在額外強烈條帶。嵌合OV549.20人類IgG1之質譜分析(圖1B)確認存在重鏈(50798.5 Da)及輕鏈(23533.2 Da)之所預測分子質量，且偵測到25885.5 Da之額外質量，其遠超出其所預測輕鏈的量。所預測輕鏈質量與額外質量之間的分子量之差值為2352.3 Da，與在輕鏈序列內發生之N-醯基化反應一致，表明額外質量對應於輕鏈之醯化變異體。實際上，序列分析表明OV549.20輕鏈(SEQ ID NO: 36)之可變區內存在正準N-醯基化模體(Asn-Ile-Thr)。

【0321】

實例2

OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1之活體外藥理學

人類及食蟹獼猴L1CAM之細胞外域之表現

為了確定OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1之目標結合親和力，首先選殖、表現及純化人類L1CAM及食蟹獼猴L1CAM之細胞外部分的重組版本。為此目的，合成編碼人類L1CAM (Uniprot登錄號

P32004)之胺基酸20至1120的DNA序列及編碼食蟹獼猴L1CAM (NCBI登錄號XP_005594994)之胺基酸20至1120的對應序列且選殖至真核表現載體中。對應重組表現產物經設計以包括用於分泌至細胞上清液中之N端前導肽及用於後續親和力純化之C端六聚組胺酸標籤。在低內毒素條件下純化質體DNA且用於短暫轉染人類胚腎(HEK)細胞。使經轉染之HEK細胞在1L表現培養物中生長且藉由離心收穫上清液。藉由蛋白A親和力層析自上清液純化重組蛋白且儲存於pH為7.4之PBS中，直至進一步分析。

【0322】

確定OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1對人類及食蟹獼猴L1CAM之動力學結合常數

藉由表面電漿子共振使用Biacore T200儀器確定OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1對人類及食蟹獼猴L1CAM之單價動力學結合常數。經由抗體片段可結晶(Fc)區在CM5蛋白A晶片(GE Healthcare)上捕獲抗體且使用10 mM 4-(2-羥基乙基)-1-哌吡啶乙磺酸(HEPES)、150 mM NaCl、3 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)、0.05 %吐溫20作為操作緩衝液，將可溶性經His標記之人類或食蟹獼猴L1CAM分別作為分析物以範圍為1.25 nM至20 nM的5種不同濃度注射。將偵測到之共振單位(感測器圖譜)擬合至1:1朗格繆爾結合模型(Langmuir binding model)且計算締合(k_a)及解離(k_d)速率常數以及親和力常數(K_D)。表7表明OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1以類似親和力結合至人類及食蟹獼猴L1CAM。

表7：OV549.20小鼠IgG2a及嵌合OV549.20人類IgG1對人類及食蟹獼猴L1CAM的結合親和力

| 抗體 | 人類L1CAM | 食蟹獼猴L1CAM |
|----|---------|-----------|
|----|---------|-----------|

| | k_a ($M^{-1} \times s^{-1}$) | k_d (s^{-1}) | K_D (nM) | k_a ($M^{-1} \times s^{-1}$) | k_d (s^{-1}) | K_D (nM) |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------|------------|----------------------------------|-----------------------|------------|
| OV549.20 小鼠 IgG2a | 8.99×10^4 | 8.03×10^{-4} | 8.9 | 9.32×10^4 | 1.07×10^{-3} | 11.5 |
| 嵌合OV549.20 人類IgG1 | 8.18×10^4 | 6.39×10^{-4} | 7.8 | 7.50×10^4 | 1.02×10^{-3} | 13.5 |

【0323】

嵌合OV549.20人類IgG1與表現L1CAM之人類癌細胞株的結合

在含有10%胎牛血清(FCS)之達爾伯克氏改質伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium ; DMEM)中培養乳癌細胞株JIMT-1及胰臟癌細胞株Panc-1。在含有10% FCS之麥考伊氏5a培養基(McCoy's 5a medium)中培養卵巢癌細胞株SKOV3。藉由使細胞與Accutase®細胞剝離溶液(每個T75細胞培養燒瓶5 mL)一起培育10分鐘將細胞自組織培養盤剝離，用PBS洗滌一次，且在4°C下用2 μ g/ml嵌合OV549.20人類IgG1或2 μ g/ml之不相關嵌合人類IgG1同型對照抗體培育1小時。隨後以5 μ g/ml之濃度添加經Alexa Fluor 488標記之AffiniPure山羊抗人類IgG抗體(Jackson Immuno Research)且在4°C下持續培育1小時。最後，在37°C下將細胞與10 μ g/ml Hoechst-33342溶液(ChemoMetec)一起培育15分鐘，且使用475 nm之激發波長及處於560 nm \pm 35 nm下之發射過濾器在基於影像細胞之細胞計數器(Nucleocounter NC-3000，ChemoMetec)上分析。每種條件共分析4,000至11,000個細胞且將偵測到之螢光強度繪製為半對數量表上之直方圖。

【0324】 圖2表明與同型對照抗體相比，用嵌合OV549.20人類IgG1培育JIMT-1、Panc-1及SKOV3細胞引起螢光信號之強烈變化，證明嵌合OV549.20人類IgG1與此等人類癌細胞株之表面上的L1CAM特異性結合。

【0325】

確定與L1CAM同源物NrCAM、CHL1、神經束蛋白之交叉反應性

在直接ELISA中測試OV549.20小鼠IgG2a結合至黏附分子之L1家族之其他成員，亦即L1之緊密同源物(CHL1)、神經束蛋白及神經元細胞黏附分子(NrCAM)的能力。將重組人類L1CAM-人類Fc及人類NrCAM-人類Fc融合蛋白以及人類CHL1及神經束蛋白之重組經六聚組胺酸標記之版本分別於50 mM碳酸鹽緩衝液pH 9.6中以1 µg/mL之濃度添加至ELISA盤中(每孔100 µL)。在4°C下將盤培育隔夜，用PBS/0.05%吐溫洗滌5次，且藉由每孔添加200 µL的PBS/0.05%吐溫/1%牛血清白蛋白(BSA)進行阻斷。隨後自10 µg/mL之最大濃度開始，於PBS/0.05%吐溫/1% BSA中將OV549.20小鼠IgG2a以1:3連續稀釋。作為陽性對照，製備用於針對L1CAM (純系UJ127.11, NovusBio)、人類NrCAM (純系308000, Creative Diagnostics)、人類CHL1 (純系6E6E4, Sino Biological)及人類神經束蛋白(純系727030, R&D systems)之商用小鼠抗體的相同稀釋系列。用PBS/0.05%吐溫洗滌盤5次，且將抗體稀釋系列添加至盤，每孔100 µL。在室溫下培育1小時之後，再次洗滌盤且每孔添加100 µL經山葵過氧化酶結合之多株山羊抗小鼠抗體(於PBS/0.05%吐溫/1% BSA中1:1000稀釋)。在室溫下再培育1小時之後，再次洗滌盤，且每孔添加100 µL的TMB (3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)基質用於偵測。在室溫下培育8分鐘之後，藉由每孔添加50 µL 0.16 M H₂SO₄停止反應，且在微量盤讀取器中確定450 nm下之吸收。

【0326】 圖3展示在不同ELISA分析中在1 µg/mL抗體濃度下獲得之OD值。對人類L1CAM、CHL1、NrCAM及神經束蛋白具有特異性之對照抗體展示與其各別目標抗原之強力結合，證明所有抗原成功固定在ELISA

盤上且偵測系統功能正常。OV549.20小鼠IgG2a展示與塗佈盤之人類L1CAM的強力結合，但未與塗佈盤之人類CEHL1、NrCAM或神經束蛋白展示出任何反應性。

(032/1)

嵌合OV549.20人類IgG1誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)

用Cr⁵¹標記在細胞表面上表現L1CAM及Her2之Panc-1人類胰臟癌細胞，且在室溫下將其與8種不同濃度之嵌合OV549.20人類IgG1抗體一起預培育20分鐘。賀癆平用作陽性對照物且並行測試結合至L1CAM第一Ig域之抗L1CAM抗體L9.3 (WO 2008/151819)的嵌合人類IgG1版本。隨後以20:1之效應細胞與目標細胞比率將人類CD16 (158V別式)轉殖基因T細胞作為效應細胞進行添加，且在37°C下在5% CO₂之潮濕氛圍中持續培育4小時。在培育之後，將細胞離心，且將25 μl之上清液轉移Lumaplate (Perkin Elmer)中。藉由上清液γ計數量測目標細胞溶解，且在偵測器正規化之後以經校正每分鐘計數(CCPM)表示。藉由對在培養基中不存在效應細胞及抗體下所培育之Panc-1細胞的上清液進行γ計數來確定自發性溶解。藉由對經添加0.15% Triton X-100溶解之Panc-1細胞的上清液進行γ計數來確定最大溶解。根據下式計算特異性溶解之百分比：

$$\text{特異性溶解\%} = \left(\frac{\text{CCPM}_{\text{Ab}} - \text{CCPM}_{\text{SI}}}{\text{CCPM}_{\text{Max}} - \text{CCPM}_{\text{SI}}} \right) \times 100$$

其中CCPM_{Ab}為含有Panc-1細胞、效應細胞及抗體之孔的計數，CCPM_{SI}為不存在效應細胞及抗體下僅含有Panc-1細胞之孔的計數，且CCPM_{max}為用Triton X-100溶解之Panc-1細胞之孔的計數。在將特異性溶解值擬合至4參數對數曲線之後，計算最大溶解(E_{max})以及半最大溶解(EC₅₀)值。

【0328】 圖4表明嵌合OV549.20人類IgG1在Panc-1細胞上誘導穩固ADCC。該抗體誘導Panc-1細胞之特異性溶解呈劑量依賴性增加，其中 E_{max} 為36.8%且 EC_{50} 為0.82 $\mu\text{g/mL}$ 。陽性對照抗體賀癌平介導Panc-1細胞之溶解，其中 E_{max} 為30.1%且 EC_{50} 為0.45 $\mu\text{g/mL}$ 。先前所描述之與L1CAM第一Ig域結合之抗體L9.3的嵌合人類IgG1版本在Panc-1細胞上不誘導任何ADCC。

【0329】

OV549.20小鼠IgG2a抑制癌細胞增殖

將HCT116大腸直腸癌細胞(於補充有0.5% FBS之DMEM:哈姆氏F12 (Ham's F12)中)、Panc-1胰臟癌細胞(於補充有4.5 g/L葡萄糖、麩醯胺酸及0.5% FBS之DMEM中)及SKOV3卵巢癌細胞(於補充有1.5 mM麩醯胺酸、2.2 g/L碳酸氫鈉及0.5% FBS之麥考伊氏5a中)在10-15%匯合度下與媒劑單獨或在50 $\mu\text{g/mL}$ OV549.20小鼠IgG2a抗體、50 $\mu\text{g/mL}$ 之小鼠IgG2a同型對照抗體或先前已描述抗體OV52.24 (WO2016050702)之小鼠IgG2a版本存在下接種於384孔盤上。藉由顯微匯合度偵測使用Incucyte裝置在96小時內以規則時間間隔監測癌細胞增殖。

【0330】 圖5表明小鼠IgG2a同型對照抗體及OV52.24小鼠IgG2a抗體對任一癌細胞株之增殖無影響，而添加OV549.20小鼠IgG2a抗體引起所有三種癌細胞株之增殖減少。截至96小時，在與僅用媒劑治療之細胞相比時，添加OV549.20小鼠IgG2a已引起匯合度降低，HCT116細胞自45.7%降低至37.3%，SKOV3細胞自21.7%降低至14.2%，且Panc-1細胞，自69.7%降低至43.3%。

【0331】

嵌合OV549.20人類IgG1抑制癌細胞遷移

將HCT116大腸直腸癌細胞培養於補充有10% FCS之DMEM中，用Accutase®細胞剝離溶液(Capricorn)收穫，且以 4×10^4 個細胞/100 μ L之密度接種至預塗有纖維連接蛋白之ORIS-96孔盤(AMS-bio)的含塞子之孔中。在二十四小時之後，移出塞子插件，且將培養基更換為120 μ L新鮮生長培養基。隨後，分別將30 μ l之嵌合OV549.20人類IgG1或嵌合人類IgG1同型對照的5 \times 濃縮連續稀釋系列添加至細胞中。分析盤中抗體之最終濃度在 4×10^{-5} M至 1.2×10^{-8} M範圍內。作為未受限遷移之陽性對照，在無任何抗體存在下培育細胞。作為陰性對照，藉由保持每個盤之八個孔中的塞子來限制遷移。48小時後，將培養基用補充有2 μ g/ml Calcein-AM之75 μ L無酚紅DMEM (Life Technologies)取代。在37 $^{\circ}$ C下培育細胞15分鐘且藉由螢光微量盤讀取器(Fluostar, BMG)使用異硫氰酸螢光素(FITC)設置(激發：485 nm/發射：520 nm)偵測插件界定區域中之螢光細胞。陽性對照(移除塞子，未添加抗體)之中位值設定為100% (高對照)且陰性對照(未移除塞子)之中位值設定為0% (低對照)。原始資料相對於對照轉化為細胞遷移%且使用底部限制為0及頂部限制為100而擬合至4參數對數曲線，斜率可變化。

【0332】 圖6表明添加嵌合人類IgG1同型對照抗體對HCT116細胞之遷移具有可忽略的效應，而添加嵌合OV549.20人類IgG1抗體引起特異性、劑量依賴性遷移抑制。嵌合OV549.20人類IgG1之半最大抑制濃度(IC₅₀)經計算為 4.2×10^{-6} M。

【0333】

實例3

OV549.20小鼠IgG2a之活體內藥理學*SKOV3 卵巢癌異種移植模型中原發腫瘤生長之抑制*

在SKOV3卵巢癌異種移植模型中探究OV549.20小鼠IgG2a抑制原發腫瘤生長的能力。在含有10% FCS及1 mM麩醯胺酸之DMEM中培養SKOV3卵巢癌細胞。在60-70%匯合度下，用含0.05%胰蛋白酶及0.02% EDTA之PBS收穫細胞且腹膜內注射至30隻雌性NMRI: nu/nu小鼠(每個小鼠 5×10^6 個細胞)中。5天後，將小鼠分成三組，每組10隻動物，每組分別以10 mg/kg接受腹膜內注射OV549.20小鼠IgG2a抗體、L9.3小鼠IgG2a (WO 2008/151819)或小鼠IgG2a同型對照抗體。在6週之時段內每週重複治療3次，其後處死動物且測定SKOV3腫瘤重量以及腹膜腔中之腹水體積。

【0334】 圖7A表明相比於經同型治療之對照組，用OV549.20小鼠IgG2a抗體治療使得平均腫瘤質量減少29%。此外，與經同型治療之對照動物相比，在OV549.20小鼠IgG2a治療之動物中腹水流體之發展降低88%。相比之下，用L9.3小鼠IgG2a治療未引起腫瘤質量減少及僅引起腹水流體少量減少。

【0335】 在第二實驗中，向20名雌性NMRI: nu/nu小鼠腹膜內注射SKOV3細胞(每隻小鼠 $5 \cdot 10^6$ 個細胞)。注射之後的第五天，將小鼠分成兩組，每組10隻小鼠，且分別腹膜內注射OV549.20小鼠IgG2a (10 mg/kg)或媒劑。每週重複治療三次，總共6週，隨後分析腫瘤重量及腹膜腔中之腹水體積。

【0336】 圖7B表明相比於媒劑治療組，用OV549.20小鼠IgG2a治療引起中值腫瘤負荷減少35%且引起腹水體積減少75%。

【0337】***MDA-MB-231 乳癌異種移植模型中轉移形成之抑制***

在人類MDA-MB-231-luc2轉移性乳癌細胞之小鼠異種移植模型中測試OV549.20小鼠IgG2a抑制轉移形成之能力。在此模型中，靜脈內投與之MDA-MB-231-luc2細胞轉移至小鼠之肺中，其中其可在投與發光基質之後藉由全身冷光偵測。

【0338】 分別向雌性胸腺裸-Foxn1 nu小鼠(n=15隻/組)每週三次靜脈內注射OV549.20小鼠IgG2a抗體(10 mg/kg)或媒劑對照物，持續五週。在第一次投與後的第三天，向所有動物靜脈內注射 5×10^5 個MDA-MB-231-luc2細胞。每天記錄臨床症狀及體重，且在細胞注射之後的第7、14、21及30天，對所有動物進行活體內全身冷光造影。為此目的，經由腹膜內注射向動物投與D-螢光素(150 mg/kg)且10分鐘後在異氟醚麻醉下造影。擷取影像且在胸部區域中量測冷光信號(總通量，單位為p/s)。

【0339】 圖8表明用OV549.20小鼠IgG2a治療強有力地抑制轉移形成，如由全身冷光信號所確定。在第30天，相比於媒劑對照物，經OV549.20小鼠IgG2a治療之小鼠中的總通量信號減少94.8%。儘管媒劑對照動物在第20天之後展示體重之強烈且持續降低，但經OV549.20小鼠IgG2a治療之小鼠在實驗過程中未展示任何可偵測之體重減輕。因而，用OV549.20小鼠IgG2a治療強效抑制轉移形成且改善疾病之臨床症狀。

【0340】**實例4****OV549.20之人源化*****電腦模擬移植OV549.20之CDR於人類構架上***

基於OV549.20 Fv之計算建模，人類VH序列IGHV4 30 4 01被鑑別為OV549.20之重鏈CDR的最適當受體構架。將OV549.20之VH CDR (SEQ ID NO: 1、2及3；參見表1)以電腦模擬方式移植於IGHV4 30 4 01上，且同時將IGHV4 30 4 01之人類構架中之某些位置回復突變成相應小鼠殘基，只要認為此適合於避免新接觸或維持經模型化OV549.20 Fv內之現有接觸。以此方式，生成OV549.20之重鏈可變區的四種人源化變異體，包括不同數目之回復突變構架殘基(H1-H4，SEQ ID NO 23、24、25、26)。

【0341】 同時，人類VL序列IGKV1 39 01被鑑別為OV549.20之輕鏈CDR的最適合人類受體構架。將OV549.20之VL CDR (SEQ ID NO: 4、5及6；參見表2)以電腦模擬方式移植於IGKV1 39 01上，且同時將一系列人類殘基至相應小鼠殘基的回復突變引入人類構架中，只要認為此為維持結構及功能完整性所必需的。另外，推定N-醣基化位點(Asn-Ile-Thr)突變成無法支援此類醣基化反應之序列(Thr-Ile-Thr)，其在CHO細胞中表現時很可能導致輕鏈醣基化，在SDS-PAGE及MS中可偵測為質量位移(參見圖1)。生成OV549.20輕鏈可變域之四種不同人源化變異體，其各自攜帶經突變N-醣基化位點及不同數目之回復突變構架殘基。其中，進一步使用人源化輕鏈可變域L1及L2 (L1：SEQ ID NO: 20，L2：SEQ ID NO: 22)。

【0342】

OV549.20之人源化變異體的表現及純化

編碼四個不同人源化重鏈可變域(H1-H4)之DNA序列各自框內融合至編碼人類IgG1恆定域之DNA序列且用於生成全長人源化IgG1重鏈之表現構築體。類似地，編碼兩個輕鏈可變域(L1及L2)之DNA序列各自框內

融合於編碼輕鏈恆定域之序列且用於生成兩個全長人源化 κ 輕鏈之表現構築體。將四個重鏈表現質體中之各者用兩個輕鏈表現質體中之任一者短暫共轉染至CHO細胞中，引起8種不同全長人源化IgG1抗體變異體(H1L1至H4L2)之表現。使細胞在化學成分確定之無動物組分的培養基中生長，且藉由離心及隨後通過0.2 μm 過濾器過濾來收穫含有重組抗體之上清液。藉由親和力層析使用蛋白A管柱(MabSelect SuRe, GE Healthcare)純化抗體且儲存於含有100 mM精胺酸之PBS中。

【0343】

OV549.20之人源化變異體的生物物理學特徵化

藉由還原SDS-PAGE分析所有八種人源化抗體且與親本嵌合OV549.20人類IgG1比較。圖9表明所有人源化抗體展示對應於重鏈大約50 kDa之單條帶及對應於輕鏈大約25 kDa之單條帶。與親本嵌合OV549.20人類IgG1抗體相比，在人源化抗體中之任一者中均未在30 kDa處偵測到可能表示輕鏈之醮化變異體的額外顯著條帶。

【0344】 藉由差示掃描螢光測定法使用Sypro Orange分析人源化抗體之構形穩定性。如表8中所示，所有人源化抗體變異體在大約70°C下展示第一熔點(T_{m1})，這與親本嵌合OV549.20人類IgG1抗體類似。第二熔點(T_{m2})視抗體變異體之各別重鏈而定且在所有情況下高於83.8°C，表明所有人源化抗體變異體構形穩定性高。

表8：OV549.20之人源化變異體相比於親本嵌合OV549.20人類IgG1及利妥昔單抗(Rituximab)的第一及第二熔點

| 抗體 | 熔點(°C) | |
|------|----------|----------|
| | T_{m1} | T_{m2} |
| H1L1 | 70.1 | 86.4 |
| H1L2 | 70.1 | 86.6 |
| H2L1 | 70.0 | 90.0 |

| | | |
|------------------|------|------|
| H2L2 | 70.0 | 90.2 |
| H3L1 | 70.2 | 88.8 |
| H3L2 | 70.0 | 88.7 |
| H4L1 | 70.0 | 83.9 |
| H4L2 | 70.1 | 83.8 |
| 嵌合OV549.20人類IgG1 | 70.1 | 86.7 |
| 利妥昔單抗 | 69.7 | 75.3 |

【0345】藉由表面電漿子共振使用Biacore T200儀器確定八種人源化抗體變異體針對人類L1CAM之單價動力學結合常數。抗體經由其Fc區在C1蛋白A晶片(GE Healthcare)上捕獲，且使用10 mM HEPES/150 mM NaCl/3 mM EDTA/0.05 %吐溫20作為操作緩衝劑，將可溶性經His標記之人類L1CAM作為分析物以3種不同濃度(10、20及40 nM)注射。將偵測到之共振單位(感測器圖譜)擬合至1:1朗格繆爾結合模型且計算締合(k_a)及解離(k_d)速率常數以及親和力常數(K_D)。表9表明所有人源化抗體變異體以高親和力結合至人類L1CAM且展現類似動力學結合常數。

表9：OV549.20之人源化變異體之單價動力學結合常數

| 抗體 | 動力學結合常數(人類L1CAM) | | |
|------|----------------------------------|-----------------------|------------|
| | k_a ($M^{-1} \times s^{-1}$) | k_d (s^{-1}) | K_D (nM) |
| H1L1 | 1.77×10^5 | 7.90×10^{-4} | 4.5 |
| H1L2 | 1.44×10^5 | 8.72×10^{-4} | 6.1 |
| H2L1 | 1.70×10^5 | 7.51×10^{-4} | 4.4 |
| H2L2 | 1.44×10^5 | 8.67×10^{-4} | 6.0 |
| H3L1 | 1.68×10^5 | 8.58×10^{-4} | 5.1 |
| H3L2 | 1.31×10^5 | 8.87×10^{-4} | 6.8 |
| H4L1 | 1.79×10^5 | 8.47×10^{-4} | 4.7 |
| H4L2 | 1.37×10^5 | 8.59×10^{-4} | 6.3 |

【0346】藉由疏水性相互作用層析在Tosoh TSKgel Butyl-NPR管柱上分析所有人源化抗體變異體，且與親本嵌合OV549.20人類IgG1比較。圖10A中之例示性層析圖展示親本嵌合抗體OV549.20人類IgG1展現主峰且在主峰之後展現額外次峰/肩部，表明製備物內存在轉譯後變異體。人源化變異體H1L1展現相同峰圖案，然而相較於親本嵌合抗體，額外峰出

人意料地顯著減少，表明轉譯後變異體的存在減少。所有人源化抗體變異體之HIC層析圖之峰整合(表10)展示所有變異體均具有類似減小之次峰面積，表明所有人類構架變異體上之移植相較於親本嵌合抗體減少轉譯後變異體之形成。

表10：疏水性相互作用層析中之OV549.20之人源化變異體的相對峰面積

| 抗體 | HIC中的相對峰面積(%) | |
|------------------|---------------|------|
| | 峰1 | 峰2 |
| 嵌合OV549.20人類IgG1 | 65.3 | 34.2 |
| H1L1 | 82.0 | 15.8 |
| H1L2 | 81.8 | 16.4 |
| H2L1 | 85.2 | 13.1 |
| H2L2 | 83.8 | 14.8 |
| H3L1 | 82.3 | 16.0 |
| H3L2 | 81.9 | 16.5 |
| H4L1 | 80.8 | 17.3 |
| H4L2 | 79.1 | 19.1 |

【0347】 藉由使人源化抗體變異體H1L1暴露於高溫及低pH脅迫詳細探究在疏水性相互作用層析中偵測到之轉譯後變異體的性質。如圖10B中所示，在40°C下在20 mM檸檬酸鈉pH 5.5中培育H1L1十二天使第二次峰之量級明顯增加且引起顯著第三峰之出現。此表明優先發生在低pH值下之轉譯後修飾反應，諸如異構化反應或類似反應係疏水性相互作用層析中偵測到之異質性的來源。實際上，用AccuMAP™ Low pH Protein Digestion Kit蛋白分解消化非經脅迫及經pH脅迫之H1L1，繼之逆相液相層析質譜分析及MS-MS分析對應於H1L1之重鏈胺基酸1至39的肽揭示低pH脅迫導致位於胺基酸31與34之間的位置處質量減輕18 Da。此類修飾與位置32處之天冬胺酸殘基處的異構化反應一致，這導致水分子之損失(-18 Da)及穩定丁二醯亞胺中間物之形成。

【0348】

實例5

人源化抗體之親和力改良及生物物理學性質及效應功能之最佳化

選擇人源化抗體H1L1作為進一步最佳化目標親和力、生物物理學性質及效應功能之基礎。構築三個不同scFv噬菌體呈現庫，其中使用簡併寡核苷酸導引之PCR突變誘發方法對H1L1之重鏈及輕鏈之CDR中的所選胺基酸位置進行隨機選擇。在各種類型之選擇性壓力下，在對重組人類L1CAM淘選四輪之後，隨機選擇總共470個純系，且使用親本噬菌體作為對照，對經人類L1CAM塗佈之盤進行單株噬菌體ELISA。選擇在ELISA中具有強增強結合信號之六十二個純系且進行DNA定序。鑑別出二十個獨特序列，其中13個以可溶scFv格式表現且再次在人類L1CAM塗佈之盤上經受ELISA。在13個所測試scFv中之11個中偵測到與親本scFv相比之結合增加。基於高結合純系之序列，隨後設計除輕鏈可變域SEQ ID NO: 20之外的八個不同的經修飾重鏈可變域(SEQ ID NO: 27-34)及一個經修飾輕鏈可變域(SEQ ID NO: 21)。合併重鏈及輕鏈變異體，產生10種不同重鏈及輕鏈組合，且構築相應全長人類IgG1抗體之各別表現質體。為提高抗體的FcR介導之效應功能，亦即其誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力，將四種突變(G236A/S239D/A330L/I332E，EU編號)引入到重鏈之CH2域中。已描述此等突變選擇性地增強Fc域對活化Fc γ 受體之親和力[18]。如實例4種所描述，所得全長抗體AFF1至AFF10經表現及純化且經受詳細生物物理學及活體外藥理學分析。

【0349】 除以4種不同濃度(5、10、20及40 nM)注射可溶性經His標記之人類L1CAM以外，如實例4中所描述，使用Biacore T200儀器藉由表面電漿子共振確定針對人類L1CAM之單價動力學結合常數。表11表明相

較於親本抗體H1L1，所有經突變變異體展現改良之與人類L1CAM的結合，在所有情況下親和力常數(K_D)均在亞奈莫耳範圍內。

表11：其他經突變人源化抗體(AFF1-AFF10)之結合親和力

| 抗體 | VH突變 | VL突變 | 動力學結合常數(人類L1CAM) | | |
|-------|----------------------|------|----------------------------------|-----------------------|------------|
| | | | k_a ($M^{-1} \times s^{-1}$) | k_d (s^{-1}) | K_D (nM) |
| AFF1 | H61N G103S | - | 2.90×10^5 | 1.04×10^{-4} | 0.36 |
| AFF2 | A34T H61N G103S | - | 4.11×10^5 | 1.26×10^{-4} | 0.31 |
| AFF3 | F58Y H61N G103S | - | 2.99×10^5 | 6.52×10^{-5} | 0.22 |
| AFF4 | A34T F58Y H61N G103S | - | 4.16×10^5 | 8.45×10^{-5} | 0.20 |
| AFF5 | A34T F58Y F100L | - | 3.49×10^5 | 2.52×10^{-4} | 0.72 |
| AFF6 | A34T H61N F100L | - | 3.45×10^5 | 3.37×10^{-4} | 0.98 |
| AFF7 | H61N G103S | T56I | 2.73×10^5 | 8.83×10^{-5} | 0.32 |
| AFF8 | A34T H61N G103S | T56I | 3.83×10^5 | 1.16×10^{-4} | 0.30 |
| AFF9 | F58Y H61N G103A | - | 2.58×10^5 | 9.28×10^{-5} | 0.36 |
| AFF10 | A34T F58Y | - | 2.55×10^5 | 2.51×10^{-4} | 0.99 |

【0350】 藉由在Tosoh TSKgel Butyl-NPR管柱上進行疏水性相互作用層析分析抗體AFF1至AFF10之化學穩定性且與親本抗體H1L1比較。出人意料地，與H1L1相比，抗體變異體中無一者在疏水性相互作用管柱上展現第二峰且對於所有變異體，主峰後面積(表12)均非常低，表明來源於位置32處之天冬胺酸異構化的轉譯後變異體不存在或以極低量存在於抗體變異體AFF1至AFF10中。

【0351】 表12表明在疏水性相互作用層析中，親本抗體H1L1暴露於高溫及低pH脅迫(在40°C下在20 mM檸檬酸鈉緩衝液pH 5.5中14天)引起主峰後面積的顯著增加(19.5%至76.2%)。對於抗體變異體AFF1至AFF10，此增加顯著降低，表明引入之突變在位置32處很大程度上抑制異構化反應。經脅迫及非經脅迫抗體變異體AFF4之例示性層析圖示於圖10C中。

表12：抗體AFF1至AFF10相比於H1L1之化學穩定性

| 抗體 | 非經脅迫之樣本 | | 經脅迫之樣本(pH 5.5) | |
|----|---------|----------|----------------|----------|
| | 主峰面積(%) | 主峰後面積(%) | 主峰面積(%) | 主峰後面積(%) |
| | | | | |

| | | | | |
|-------|------|------|------|------|
| H1L1 | 79.4 | 19.5 | 23.8 | 76.2 |
| AFF1 | 97.3 | 2.6 | 82.3 | 16.6 |
| AFF2 | 97.6 | 1.5 | 88.4 | 10.4 |
| AFF3 | 97.2 | 2.5 | 84.5 | 15.0 |
| AFF4 | 97.4 | 1.7 | 87.8 | 11.1 |
| AFF5 | 98.4 | 1.0 | 83.9 | 15.3 |
| AFF6 | 98.5 | 1.1 | 84.8 | 14.6 |
| AFF7 | 96.3 | 2.5 | 84.5 | 14.4 |
| AFF8 | 97.7 | 1.7 | 88.4 | 10.6 |
| AFF9 | 96.3 | 3.1 | 76.5 | 22.5 |
| AFF10 | 97.7 | 1.9 | 85.1 | 14.2 |

【0352】

實例6

人源化最佳化抗體AFF4之活體外藥理學

癌細胞增殖之抑制

如實例2中所描述培養HCT116、Panc-1及SKOV3且在50 µg/mL AFF4或50 µg/mL之嵌合人類IgG1同型對照抗體存在下以10-15%匯合度接種於384孔盤上。藉由顯微匯合度偵測使用Incucyte裝置在120小時內以規則時間間隔監測癌細胞增殖。

【0353】圖11表明與同型對照抗體相比，添加AFF4抗體引起所有三種細胞株之增殖減少。截至96小時，當與用同型對照抗體治療之細胞相比時，添加AFF4已引起匯合度降低，HCT116細胞自55.3%降低至38.9%，SKOV3細胞自68.6%降低至44.4%，且Panc-1細胞自67.4%降低至42.7%。

【0354】

癌細胞遷移之抑制

將HCT116大腸直腸癌細胞培養於補充有10% FCS之DMEM中，用Accutase®細胞剝離溶液(Capricorn)收穫，且以 4×10^4 個細胞/100 µL之密度接種至預塗有纖維連接蛋白之ORIS-96孔盤(AMS-bio)的含塞子之孔

中。在二十四小時之後，移出塞子插件，且將培養基更換為80 μ L新鮮生長培養基。隨後，分別將20 μ l之AFF4或嵌合人類IgG1同型對照的5 \times 濃縮連續稀釋系列添加至細胞中。分析盤中抗體之最終濃度在 4×10^{-5} M至 1.2×10^{-8} M範圍內。作為未受限遷移之陽性對照，在無任何抗體存在下培育細胞。作為陰性對照，藉由保持每個盤之八個孔中的塞子來限制遷移。48小時後，將培養基用補充有2 μ g/ml Calcein-AM之75 μ L無酚紅DMEM (Life Technologies)取代。在37 $^{\circ}$ C下培育細胞15分鐘且藉由螢光微量盤讀取器(Fluostar, BMG)使用FITC設置(激發：485 nm/發射：520 nm)偵測插件界定區域中之螢光細胞。陽性對照(移除塞子，未添加抗體)之中位值設定為100% (高對照)且陰性對照(未移除塞子)之中位值設定為0% (低對照)。原始資料相對於對照轉化為細胞遷移%且使用底部限制為0及頂部限制為100而擬合至4參數對數曲線，斜率可變化。

【0355】 圖12表明添加AFF4抗體引起特異性、劑量依賴性抑制遷移。AFF4之半最大抑制濃度(IC₅₀)經計算為約 1.1×10^{-5} M。

【0356】

*AFF4*在SKOV3、Panc-1、希拉及PC03癌細胞株上誘導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)

在表現L1CAM之癌細胞株SKOV3、Panc-1、希拉及PC03上探究AFF4誘導抗體依賴性細胞毒性的能力。在第一步中，藉由流式細胞分析技術評定不同細胞株表面上之L1CAM表現量。使各細胞株在連續培養下生長且在繼代之後的2至4天使用。在分析之前，使用非酶促細胞解離緩衝液自培養瓶表面剝離目標細胞，以限制表面表現之L1CAM的裂解。使用藻紅素(PE)標記之抗人類L1CAM抗體(純系L1-OV198.5, BioLegend)或

經PE標記之小鼠IgG2a (κ) (純系MOPC-173, BioLegend)作為各別同型對照抗體對細胞染色。在Quanteon流式細胞計數器上獲取已染色細胞且使用NovoExpress軟體分析。計算經評定之各細胞株(一式三份)的中值螢光強度(MFI)值且平均值列於表13中。為了量化表現量，計算相對於同型對照抗體，使用抗L1CAM抗體所獲得之MFI值的倍數增加。所有細胞株均在其表面上表現L1CAM，其中SKOV3及希拉展示最高表現量，且Panc-1及PC03分別展示中度及低表現量。

表13：如藉由流式細胞分析技術使用經PE標記之抗L1CAM抗體所確定之不同細胞株表面上的L1CAM表現

| 細胞株 | 同型對照抗體 MFI | 抗L1CAM抗體 MFI | MFI之倍數增加(抗 L1CAM對比同型) |
|--------|--------------------|--------------------|--------------------------|
| SKOV3 | 8.68×10^3 | 1.50×10^6 | 173 |
| 希拉 | 9.14×10^3 | 1.22×10^6 | 133 |
| Panc-1 | 1.31×10^4 | 1.83×10^5 | 14 |
| PC-03 | 9.42×10^3 | 4.64×10^4 | 5 |

【0357】 為了評定ADCC，使用NK細胞分離套組(Miltenyi Biotech)，自三個不同供體之低溫保藏周邊血液單核細胞(PBMC)分離初代自然殺手(NK)細胞。供體中之一者對於CD16 (Fc γ RIIIA)高親和力對偶基因V158為同型接合，一者對於CD16低親和力對偶基因F158為同型接合，而第三者為異型接合，攜載高親和力及低親和力對偶基因(V/F158)。檢查富集之NK細胞之純度(CD45+細胞群內>80% CD3-CD56+細胞)且在NK92培養基+IL-2 (3 ng/mL)中在 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 1\%$ CO₂下培育 21 ± 1 小時。同時，將預溫熱之細胞培養基添加至xCelligence E-plate 96 (Agilent)之孔中(50 μL /孔)，且分別添加SKOV3、希拉、Panc-1及PC-03細胞之懸浮液(100 μL /孔)，且使其在室溫下沉降至孔底部持續1小時。隨後將E-Plate轉移至xCelligence Real Time Cell Analyzer (RTCA)且在 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 1\%$

CO₂下培育16-24小時以允許細胞附著及增殖。持續量測阻抗隔夜以監測細胞增殖。次日，在補充有3 ng/mL IL-2之NK92培養基中將AFF4稀釋至4 µg/mL之濃度。同時，收穫NK細胞，計數且再懸浮於相同培養基中。自RTCA Analyzer移除E-plate，抽吸培養基(50 µL/孔)，且添加預稀釋之AFF4 (50 µL/孔)及NK細胞(50 µL/孔)。以對應於5:1或10:1之最終效應細胞:目標(E:T)細胞比率之密度添加NK細胞。E-plate中之AFF4之最終濃度為1 µg/mL。將盤轉移至RTCA Analyzer中且重新開始阻抗量測以監測效應細胞介導之目標細胞的殺死。獲取資料72小時且隨後用xCelligence Immunotherapy Software 1.0分析。將由RTCA Analyzer記錄之細胞指數資料相對於添加效應細胞之前的最後時間點正規化。藉由相對於僅含有目標細胞及效應細胞之孔，比較自含有目標細胞、效應細胞及治療劑之孔獲得的正規化細胞指數，將正規化細胞指數轉化為特異性細胞溶解%。藉由xCELLigence RTCA軟體使用下式計算特異性細胞溶解%：

$$\text{特異性細胞溶解}_{st} \% = \left(\frac{1 - NCI_{st}}{NCI_{Rt}} \right) \times 100$$

其中NCI_{st}為樣本之正規化細胞指數，且NCI_{Rt}為匹配參考孔(僅含有目標細胞及效應細胞之孔)之正規化細胞指數的平均值。

【0358】圖13表明來自所有三個供體之AFF4活化效應細胞且在所有測試細胞株上誘導特異性細胞溶解。在L1CAM高表現希拉細胞株上觀測到最高細胞毒性水平，在大多數情況下達到100%。特異性細胞溶解程度在10:1之更高E:T比率下總體更高，且與供體細胞製備物中存在之效應細胞的各別CD16 (FcγRIIIA)親和力相關。觀測到在FcγRIIIA V158同型接合(V/V)供體中之最高活性、FcγRIIIA V/F158異種接合(V/F)供體中之中等活性，及FcγRIIIA F158同型接合(F/F)供體中之最低活性。在後一

供體中，觀測到不同細胞株之細胞表面L1CAM表現與特異性細胞溶解程度之間的最佳相關性，其中在希拉及SKOV3細胞上觀測到最高溶解度，Panc-1細胞上為中間溶解度及PC03細胞上為最低溶解度。

【0359】

實例7

AFF4-WT抗體藥物結合物之產生及生物物理學特徵化

對於與細胞毒性酬載之結合，使用AFF4之一版本，其含有野生型人類IgG1恆定域且因此不攜帶存在於AFF4之CH2域中的四種突變(G236A/S239D/A330L/I332E)。AFF4之此人類IgG1野生型版本被命名為AFF4-WT。

【0360】

AFF4-WT與VA-SG3199 (MP-PEG₈-VA-PABC-SG3199，特司林)之結合

製備含有AFF4-WT於PBS/100 mM精胺酸中之溶液以藉由添加5% v/v之0.5 M Tris-HCl/25 mM EDTA pH 8.5還原，且隨後在30°C下用1.25莫耳當量之TCEP (參(2-羧基乙基)膦，自於水中之1 mM原液添加)培育2小時以達成平均大約2個自由硫醇。隨後，藉由添加5莫耳當量之MP-PEG₈-VA-PABC-SG3199 (圖14A)，使部分還原之AFF4-WT抗體結合。將MP-PEG₈-VA-PABC-SG3199自於DMA (N,N-二甲基乙醯胺)中之10 mM原液添加，添加額外DMA以在結合反應期間達成5% v/v。在室溫下培育2小時之後，在室溫下用5莫耳當量之N-乙醯基-半胱胺酸(自於水中之10 mM原液添加)中止反應30分鐘，且隨後去鹽及藉由通過Sephadex G-25管柱而相對於25 mM組胺酸/0.2 M蔗糖，pH 6.0經緩衝液交換。為了完全移除自由毒素及其他低分子量添加劑，藉由使用具有30 kDa分子量截留之PES (聚醚

颯)離心濃縮器(Vivaspin)進行連續透濾，使AFF4-WT-VA-SG3199結合物經歷8次25 mM組胺酸/0.2 M蔗糖pH 6.0之緩衝液交換。將聚山梨醇酯20自1% w/v原液添加至0.02% w/v之最終濃度，且使用0.22 μm PVDF (聚偏二氟乙烯)膜(Millipore Durapore)無菌過濾結合物。在-80°C下冷凍AFF4-WT-VA-SG3199之等分試樣。

【0361】

*AFF4-WT*與*VC-MMAE (MC-VC-PABC-MMAE, 維多汀(vedotin))*及*Gluc-MMAE (MC- β 葡萄糖醛酸苷-MMAE)*之結合

製備含有AFF4-WT於PBS/100 mM精胺酸中之溶液以用於藉由添加5% v/v之0.5 M Tris-HCl/25 mM EDTA pH 8.5還原，且隨後在30°C下用2.5莫耳當量之TCEP (自於水中之1 mM原液添加)培育2小時以達成平均大約4個自由硫醇。隨後，分別藉由添加10莫耳當量之MC-VC-PABC-MMAE (圖14B)或MC- β 葡萄糖醛酸苷-MMAE (圖14C)，使部分還原之AFF4-WT抗體結合。將MC-VC-PABC-MMAE及MC- β 葡萄糖醛酸苷-MMAE自於DMA中之10 mM原液添加，添加額外DMA以在結合反應期間獲得5% v/v。在室溫下培育1小時之後，在室溫下用5莫耳當量之N-乙醯基-半胱胺酸(自於水中之10 mM原液添加)中止反應30分鐘，且隨後去鹽及藉由通過Sephadex G-25管柱而相對於25 mM組胺酸/0.2 M蔗糖，pH 6.0經緩衝液交換。為了完全移除自由毒素及其他低分子量添加劑，藉由使用具有30 kDa分子量截留之PES離心濃縮器(Vivaspin)進行連續透濾，使AFF4-WT-VC-MMAE及AFF4-WT-Gluc-MMAE結合物經歷8次25 mM組胺酸/0.2 M蔗糖pH 6.0之緩衝液交換。將聚山梨醇酯20自1% w/v原液添加至0.02% w/v之最終濃度，且使用0.22 μm PVDF膜(Millipore Durapore)無

菌過濾結合物。在-80℃下冷凍AFF4-WT-VC-MMAE及AFF4-WT-Gluc-MMAE之等分試樣。

【0362】

AFF4-WT與磺酸基-SPDB-DM4之結合

將AFF4-WT (於PBS/100 mM精胺酸中)施加至蛋白A管柱，該蛋白A管柱已用0.1 M NaOH消毒且用PBS pH 7.4平衡。在用20管柱體積之PBS pH 7.4進行徹底洗滌步驟(以移除一級胺精胺酸)之後，藉由添加0.1 M檸檬酸鈉pH 3.0溶離已結合AFF4-WT。使已溶離抗體立即去鹽且藉由通過Sephadex G25管柱而至50 mM磷酸鈉/150 mM NaCl/2 mM EDTA pH 8.0中經緩衝液交換。隨後使用具有30 kDa分子量截留之PES離心濃縮器(Vivaspin)將AFF4-WT濃縮至5 mg/ml。隨後藉由添加7莫耳當量之磺酸基-SPDB-DM4 (圖14D)而使所製備之抗體結合。將磺酸基-SPDB-DM4自於DMA中之10 mM原液添加，添加額外DMA以在結合反應期間達成5% v/v。在室溫下培育4小時之後，將額外1莫耳當量之磺酸基-SPDB-DM4添加至反應物中且持續培育隔夜。隨後藉由添加1% v/v 0.5 M Tris pH 8.5中止結合反應，且去鹽及藉由通過Sephadex G25管柱而至25 mM組胺酸/0.2 M蔗糖pH 6.0中經緩衝液交換。為了完全移除自由毒素及其他低分子量添加劑，藉由使用具有30 kDa分子量截留之PES離心濃縮器(Vivaspin)進行連續透濾，使AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4經歷10次25 mM組胺酸/0.2 M蔗糖pH 6.0之緩衝液交換。將聚山梨醇酯20自1% w/v原液添加至0.02% w/v之最終濃度，且使用0.22 μm PVDF膜(Millipore Express)無菌過濾結合物。在-80℃下冷凍且儲存AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4之等分試樣。

【0363】

AFF4-WT-藥物結合物之生物物理學特徵化

分析所有AFF4-WT-藥物結合物之蛋白濃度及單體含量(藉由計算在尺寸排阻層析中處於214 nm時之曲線下面積)、其內毒素含量(藉由變形細胞溶菌液分析)及其自由藥物濃度(藉由逆相層析法)。藉由疏水性相互作用層析確定半胱胺酸結合物(AFF4-WT-VC-MMAE、AFF4-WT-Gluc-MMAE、AFF4-WT-VA-SG3199)之藥物與抗體比率，而藉由尺寸排阻層析通過比較處於252 nm (DM4之最大吸光度)及280 nm (抗體之最大吸光度)時所獲得之曲線下面積確定離胺酸結合物(AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4)之藥物與抗體比率。基本上如實例4中所描述，藉由表面電漿子共振確定不同AFF4-WT-藥物結合物對人類L1CAM之單價動力學結合常數。結果概述於表14中。

表14：AFF4-WT-藥物結合物之生物物理學特徵化

| 結合物 | AFF4-WT-VA-SG3199 | AFF4-WT-VC-MMAE | AFF4-WT-Gluc-MMAE | AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4 |
|------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|----------------------|
| 蛋白濃度(mg/mL) | 3.3 | 3.2 | 3.3 | 3.2 |
| 單體% | 98.9 | 99.5 | 99.5 | 99.0 |
| 藥物與抗體比率 | 1.8 | 3.8 | 3.9 | 3.7 |
| 自由藥物% | 1 | 0.5 | 0.3 | 0.6 |
| 內毒素含量(EU/mg) | 0.6 | 0.28 | 0.32 | 0.16 |
| 人類L1CAM結合K _D (nM) | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.16 |

【0364】

實例8

AFF4-WT抗體藥物結合物之藥理學特徵化

AFF4-WT 當與*JIMT-1* 乳癌、*OVCAR-3* 卵巢癌及*MeWo* 黑色素瘤細胞表面上之*L1CAM* 結合時的內化及溶酶體定位

為發揮其細胞毒性效應，抗體藥物結合物需要結合至癌細胞之溶酶體隔室且有效內化至其中，其中其由特異性蛋白酶處理且釋放其細胞毒性

酬載。為了測試AFF4-WT之內化能力且追蹤其細胞內定位，使用Human Fabfluor-pH Red Antibody Labeling Dye，一種抗人類IgG (Fc特異性) Fab片段，其與pH敏感性染料結合，該染料在中性pH下具有極小螢光但在低pH值下變得高度螢光。在結合至AFF4-WT時，Fabfluor標記試劑變得與AFF4-WT共內化且指示抗體是否已達至溶酶體路徑之低pH環境。

【0365】 使用表現L1CAM之JIMT-1乳癌、OVCAR-3卵巢癌及MeWo黑素瘤細胞確定AFF4-WT之溶酶體攝取。為此目的，以20,000個細胞/孔(4×10^5 個細胞/毫升，50 μ L/孔)之密度將細胞接種於96孔細胞培養盤中。接種JIMT-1細胞於EMEM/10% FCS中，OVCAR-3細胞於RPMI1640/10% FCS中，及MeWo細胞於EMEM/10% FCS中。在37°C/5% CO₂下培育大約5小時之後，將AFF4-WT或嵌合人類IgG1同型對照抗體分別與Incucyte® Human Fabfluor-pH Red Antibody Labeling Dye (Sartorius目錄號：4722)混合且在RPMI164/10% FCS中稀釋至各自2 μ g/mL之濃度(抗體與標記染料之莫耳比為1:3)。在37°C下培育15分鐘之後，將50 μ L/孔之混合物添加至各細胞株中，分別得到1 μ g/mL之抗體及標記染料的最終孔中濃度。

【0366】 分別持續培育15分鐘或20小時。其後，用PBS洗滌附著細胞且隨後用Accutase®細胞剝離溶液(Capricorn)處理5分鐘，繼之使用630 nm之激發波長及處於740 nm \pm 60 nm之發射濾光器對基於影像之細胞計數器(Nucleocounter NC-3000，ChemoMetec)分析。

【0367】 圖15表明與經嵌合人類IgG1同型對照抗體治療之細胞相比，在20小時之後，經AFF4-WT治療之JIMT-1、OVCAR-3及MeWo細胞之螢光很大程度上增加，表明AFF4-WT已由所有細胞株有效內化且已達

至溶酶體隔室。

【0368】

活體外在表現LICAM之細胞株上的細胞毒性

隨後在基於活體外細胞之殺死分析中測試不同AFF4-WT-藥物結合物誘導細胞毒性之能力。使用與上文針對內化分析所描述的相同培養基，將JIMT-1、OVCAR-3及MeWo細胞分別以2,250、2,100及2,000個細胞/孔以90 μ L之總容積接種到白色96孔培養盤中。使細胞附著6.5至7.5小時，繼之添加10 μ L/孔之已在RPMI/10% FCS中連續稀釋之AFF4-WT-藥物結合物。分析中之結合物的最終濃度在100 nM至1.3 pM範圍內(AFF4-WT-VA-SG3199為0.05 pM)。作為100%殺死之陽性對照，以10 μ M之最終濃度添加多柔比星至單獨孔。在37°C/5% CO₂下培育分析盤6天且根據製造商說明書，藉由ATP量化使用CellTiter Glo2.0 (Promega)及冷光量測來評估細胞存活率。將冷光讀數轉化為存活率%值，且將僅具有細胞之孔及具有在10 μ M多柔比星存在下培育之細胞的孔分別用作100%及0存活率%參考值。使用GraphPad Prism將在不同AFF4-WT-藥物結合物濃度下所獲得之存活率%值擬合至4參數對數曲線且用於計算不同結合物之各別IC₅₀濃度。

【0369】 圖 16 表明 AFF4-WT-VC-MMAE、AFF4-WT-Gluc-MMAE、AFF4-WT-VA-SG3199及AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4均誘導JIMT-1、OVCAR-3及MeWo細胞之劑量依賴性殺死。各別IC₅₀值概述於下表15中。

表15： AFF4-WT結合物對不同癌細胞株之細胞毒性¹⁵

| | JIMT-1 | OVCAR-3 | MeWo |
|-----------------|--------|---------|-------|
| AFF4-WT-VC-MMAE | 0.041 | 0.025 | 0.245 |

| | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|
| AFF4-WT-Gluc-MMAE | 0.013 | 0.010 | 0.021 |
| AFF4-WT-VA-SG3199 | 0.008 | 0.002 | 0.006 |
| AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4 | 0.568 | 0.899 | 0.880 |

¹⁵數目指示以nM為單位之IC₅₀值。

【0370】

活體內腫瘤生長之抑制

在人類癌細胞株JIMT-1、OVCAR-3及MeWo之小鼠異種移植模型中確定AFF4-WT藥物結合物之活體內功效。

【0371】 將JIMT-1乳癌細胞(5×10^6 個細胞於100 μ L PBS中)注射至雌性無胸腺裸(Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu})小鼠之左側乳房脂肪墊中。用測徑規量測腫瘤，且使用下式計算腫瘤體積(TV)： $TV = (W^2 \times L)/2$ (L=長度，W=腫瘤之垂直長度，L>W)。

【0372】 當腫瘤達到100至150 mm³之平均體積時，將小鼠隨機分為5個不同組。四組(各組n=6)接受單次靜脈內注射AFF4-WT-VC-MMAE (5 mg/kg)、AFF4-WT-Gluc-MMAE (5 mg/kg)、AFF4-WT-VA-SG3199 (1 mg/kg)、AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4 (5 mg/kg)，而第五組(n=8)接受媒劑作為對照。注射之後，每週量測腫瘤體積兩次。

【0373】 如圖17A中所示，用AFF4-WT藥物結合物中之任一者單次治療誘導強烈的抗腫瘤反應。在分別用AFF4-WT-VC-MMAE及AFF4-WT-Gluc-MMAE治療之小鼠中觀測到腫瘤消退，同時在用AFF4-WT-VA-SG3199或AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4治療之小鼠中觀測到腫瘤生長停滯。

【0374】 將OVCAR-3卵巢癌細胞(1×10^7 個細胞於基質膠中)皮下注射至雌性Jan:NMRI-nu/nu小鼠中。如上文所描述用測徑規量測腫瘤且計

算腫瘤體積。一旦腫瘤達到大約 0.14 cm^3 之平均體積後，將小鼠隨機分為5組($n=5$)且開始治療。各組相隔兩週接受兩次靜脈內注射AFF4-WT-VC-MMAE (5 mg/kg)、AFF4-WT-Gluc-MMAE (5 mg/kg)、AFF4-WT-VA-SG3199 (1 mg/kg)、AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4 (5 mg/kg)或媒劑作為對照。隨機分組之後，每週量測腫瘤體積兩次。

【0375】 圖17B表明在OVCAR-3異種移植模型中所有AFF4-WT-藥物結合物均誘導抗腫瘤反應。用AFF4-WT-VC-MMAE、AFF4-WT-Gluc-MMAE或AFF4-WT-VA-SG3199治療誘導腫瘤生長停滯，同時用AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4治療腫瘤生長相較於媒劑對照組減緩。

【0376】 將MeWo黑色素瘤細胞(1×10^7 個細胞於基質膠中)皮下注射至雌性Jan:NMRI-nu/nu小鼠中。如上文所描述用測徑規測定腫瘤體積。當腫瘤達到大約 0.14 cm^3 之平均體積時，將小鼠隨機分為5組($n=5$)且用單次靜脈內注射AFF4-WT-VC-MMAE (5 mg/kg)、AFF4-WT-Gluc-MMAE (5 mg/kg)、AFF4-WT-VA-SG3199 (1 mg/kg)、AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4 (5 mg/kg)或媒劑作為對照治療。在治療之後每週量測腫瘤體積兩次。

【0377】 圖17C表明用所有所測試之AFF4-WT-藥物結合物均觀測到抗腫瘤反應。用AFF4-WT-VC-MMAE或AFF4-WT-Gluc-MMAE治療誘導腫瘤生長停滯，同時用AFF4-WT-VA-SG3199或AFF4-WT-磺酸基-SPDB-DM4治療引起腫瘤生長減緩。

【0378】

JIMT-1 乳癌異種移植模型中不同劑量之AFF4-WT-VC-MMAE的功效

將JIMT-1乳癌細胞(5×10^6 個細胞於 $100\text{ }\mu\text{L}$ PBS中)注射至雌性無胸腺

AFF4-WT-VC-MMAE 在表現*L1CAM*之細胞株上的活體外細胞毒性及與*L1CAM*表現量的相關性

將一系列之25種卵巢癌、子宮內膜癌、乳癌、黑色素瘤及神經母細胞瘤細胞株以所要求之密度以90 μL 細胞培養基之總體積接種至白色96孔細胞培養盤之孔中。針對各細胞株單獨地確定接種密度及細胞培養基，以獲得最佳化分析窗口。使細胞附著大約6小時，繼之添加10 μL /孔之已在RPMI/10% FCS中連續稀釋之*AFF4-WT-VC-MMAE*。分析中之*AFF4-WT-VC-MMAE*的最終濃度在100 nM至1.3 pM範圍內。作為100%殺死之陽性對照，以10 μM 之最終濃度添加多柔比星至單獨孔。在37°C/5% CO_2 下培育分析盤5-12天且根據製造商說明書，藉由ATP量化使用CellTiter Glo2.0 (Promega)及冷光量測來評估細胞存活率。如上文所詳述，將在不同*AFF4-WT-VC-MMAE*濃度下所獲得之冷光讀數轉化為存活率%值，且使用GraphPad Prism擬合於4參數對數曲線。針對各個別細胞株導出 IC_{50} 濃度。

【0383】 同時，確定在各癌細胞株之細胞表面上表現之*L1CAM*分子的大致數目。為此目的，首先使用經四種不同密度之藻紅素(PE)分子(BD Biosciences)標記之Quantibrite珠粒建立校準線。將珠粒再懸浮於500 μL PBS中，且將30 μL 之此懸浮液裝載於NC-Slide A2 (ChemoMetec)上，且使用基於影像之細胞計數器(Nucleocounter, ChemoMetec)分析。綠色光源(LED530)及500 ms之暴露時間用於分析。在選通四種珠粒群體之單一珠粒之後，確定平均螢光強度(MFI)且相對於每珠粒之PE分子的各別數目標繪。使用GraphPad Prism，使用以下方程式將線性回歸曲線擬合於資料：

| 細胞株 | 癌症類型 | L1CAM表現(分子/細胞) | | | AFF4-WT-VC-MMAE之細胞毒性效能(IC ₅₀ ，單位為pM) | | |
|------------|--------|----------------|-------|----|---|-------|----|
| | | 平均值 | SD | n | 平均值 | SD | n |
| FU-OV-1 | 卵巢癌 | 168'071 | 27702 | 4 | 141 | 44 | 3 |
| JHOS-2 | 卵巢癌 | 117'667 | 8083 | 3 | 175 | 30 | 2 |
| JIMT-1 | 乳癌 | 94'673 | 24969 | 12 | 34 | 16 | 10 |
| OVCAR-3 | 卵巢癌 | 85'571 | 37921 | 4 | 33 | 7 | 3 |
| Caov-3 | 卵巢癌 | 83'653 | 29825 | 6 | 275 | 99 | 3 |
| HEC-251 | 子宮內膜癌 | 78'216 | 6217 | 3 | 55 | 20 | 3 |
| HEC-108 | 子宮內膜癌 | 68'342 | 13419 | 3 | 456 | 473 | 2 |
| OVSAHO | 卵巢癌 | 66'750 | 11081 | 4 | 69 | 67 | 7 |
| HEC-1B | 子宮內膜癌 | 59'450 | 14806 | 6 | 68 | 10 | 3 |
| EFO-27 | 卵巢癌 | 51'850 | 7438 | 4 | 382 | 310 | 5 |
| HHUA | 子宮內膜癌 | 51'267 | 6045 | 3 | 28 | 19 | 3 |
| MeWo | 黑色素瘤 | 38'150 | 1768 | 2 | 962 | 698 | 3 |
| MFE-280 | 子宮內膜癌 | 26'941 | 24809 | 7 | 38'897 | 11617 | 3 |
| OVKATE | 卵巢癌 | 26'337 | 10539 | 3 | 382 | 11 | 2 |
| SKOV-6 | 卵巢癌 | 22'465 | 10379 | 7 | 15'053 | 11540 | 3 |
| SNGM | 子宮內膜癌 | 15'179 | 3892 | 3 | 1'905 | 672 | 2 |
| IMR32 | 神經母細胞瘤 | 12'467 | 2335 | 3 | 428 | 160 | 3 |
| SK-BR-3 | 乳癌 | 9'029 | 6550 | 3 | 1'693 | 579 | 3 |
| JHOS-4 | 卵巢癌 | 1'500 | 368 | 2 | 10'100 | 990 | 2 |
| MDA-MB-231 | 乳癌 | 1'305 | - | 1 | 91'630 | - | 1 |
| MDA-MB-468 | 乳癌 | 469 | 821 | 2 | 91'630 | - | 1 |
| JHUEM-1 | 子宮內膜癌 | 347 | 255 | 2 | 21'550 | 5303 | 2 |
| HEC-1A | 子宮內膜癌 | 12 | 123 | 2 | 36'885 | 2666 | 2 |
| MDAH-2774 | 卵巢癌 | 0 | 55 | 3 | 32'550 | 2051 | 2 |
| HEC-50B | 子宮內膜癌 | 0 | 168 | 2 | 27'000 | 424 | 2 |

¹⁶SD：標準差，n：獨立量測值之數目

【0385】 AFF4-WT-VC-MMAE在大部分之所測試細胞株上誘導有效細胞毒性效應。如表16中所示，AFF4-WT-VC-MMAE之細胞毒性效能與各別細胞株之細胞表面上的L1CAM分子之數目緊密相關。具有高L1CAM表現之細胞株對AFF4-WT-VC-MMAE誘導之細胞毒性效應最敏感(=低IC₅₀)，而具有較低或不存在L1CAM表現的細胞株較不敏感(高IC₅₀)。

【0386】

*AFF4-WT-VC-MMAE*之旁觀者細胞毒性

在人類腫瘤內，L1CAM表現可非均勻地發生，其中一些癌細胞表現高L1CAM量且其他細胞表現較低量或完全不表現L1CAM。由於AFF4-WT-VC-MMAE之效能與L1CAM表現量相關(參見表16)，因此產生具有異質L1CAM表現的腫瘤是否可由AFF4-WT-VC-MMAE有效靶向的問題。因此探究AFF4-WT-VC-MMAE是否展現所謂的細胞毒性旁觀者效應。具有此類旁觀者效應之ADC以釋放可自由擴散至鄰近細胞之細胞毒性酬載之形式的方式由抗原陽性癌細胞吸收及處理，且因此具有獨立於其抗原表現而殺死彼等細胞之能力。因此，此類ADC非常適合於治療具有異質目標表現之腫瘤。

【0387】 為了評估AFF4-WT-VC-MMAE之旁觀者活性，分別各以 5×10^4 個細胞/孔之密度於400 μ L RPMI/10% FCS中之總體積將L1CAM高表現之JIMT-1乳癌細胞及L1CAM低表現之MDA-MB-468最佳癌細胞(參見表16)接種到24孔細胞培養盤之6孔中。六個額外孔僅用400 μ L RPMI/10% FCS填充。在37°C/5% CO₂下培育5小時之後，將AFF4-WT-VC-MMAE在RPMI/10% FCS中連續稀釋，且將9.8 μ L/孔之連續稀釋液添加至已接種之孔及添加至僅含有細胞培養基之孔中。分析中之AFF4-WT-VC-MMAE的濃度在100 nM至10 pM範圍內。接種JIMT-1之孔、接種MDA-MB-468之孔及僅含有細胞培養基之孔中之各者的一個孔保持未經治療作為對照。在37°C/5% CO₂下培育盤4天。

【0388】 隨後以1500個細胞/孔之密度以75 μ L RPMI/10% FCS之總體積接種L1CAM低表現之MDA-MB468細胞至白色96孔細胞培養盤之孔中，隨後在37°C/5% CO₂下培育4小時。

【0389】 將來自已培育4天之24孔盤之所有孔的上清液轉移至無菌試管中且在2000相對離心力下離心10分鐘。將上清液轉移至新的無菌試管，且隨後將25 μL 之各上清液添加至已接種MDA-MB-468細胞。作為陰性對照，將新鮮RPMI/10% FCS培養基添加至三個孔，且作為最大生長抑制之陽性對照，以10 μM 之最終濃度將多柔比星添加至三個孔。添加上清液、培養基及多柔比星之後，將盤在37°C/5% CO_2 下培育6天。隨後根據製造商說明書藉由ATP量化使用CellTiter Glo2.0 (Promega)及冷光量測評定細胞存活率。如上文所詳述，將冷光讀數轉化為存活率%值，且使用GraphPad Prism擬合至4參數對數曲線。

【0390】 圖20展示在與來自JIMT-1之上清液一起培育之後的MDA-MB-468或已與AFF4-WT-VC-MMAE之連續稀釋液一起預培育的MDA-MB-468細胞之存活率%。作為對照，亦展示藉由在無細胞存在下(僅細胞培養基)預培育之AFF4-WT-VC-MMAE的相同連續稀釋液所獲得的存活率%。與MDA-MB-468對AFF4-WT-VC-MMAE之實際上不敏感性(表16)一致，當AFF4-WT-VC-MMAE在L1CAM低表現之MDA-MB-468細胞上或無細胞存在下預培育時，僅觀察到邊際細胞毒性效應($\text{IC}_{50} > 5 \text{ nM}$)。與此對比，在L1CAM高表現之JIMT-1細胞上預培育的AFF4-WT-VC-MMAE對MDA-MB-468細胞展示顯著更強的細胞毒性效應，其中 IC_{50} 值為大約500 μM 。此結果強有力地表明L1CAM高表現之JIMT-1細胞對AFF4-WT-VC-MMAE的吸收及處理產生自由MMAE毒素，其被釋放至上清液中，在其中其可發揮其細胞毒性作用。因此，資料支援AFF4-WT-VC-MMAE展現旁觀者細胞毒活性之概念。在具有異質L1CAM表現量的腫瘤之情況下，AFF4-WT-VC-MMAE的此活性可確保不僅殺死L1CAM高表現之腫

瘤細胞，而且高效消除鄰近的表現較低的腫瘤細胞，且達成良好的總體抗腫瘤反應。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="C259366SEQA.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-12-
20">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>WO</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
    <FilingDate></FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>E72936PC</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>EP</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>22196917.3</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-09-21</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">瑞士商艾爾瑟拉股份有限公司[ELTHERA
AG]</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>ELTHERA AG</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">結合至LICAM之新穎結合分子</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>84</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>CDRH1</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
        <INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q2">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYSITSDYAWN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q3">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YISYSGSFSYHPSLKS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q5">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH3</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q6">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SFSYGYGFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q7">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRL1</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KASQDVSSAVA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q9">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRL2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q10">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SASYRYT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>

```

```
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q11">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CDRL3</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q12">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQHYSTPWT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 8" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q13">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH1</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDSeq_sequence>GYSITSDYTWN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q15">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q16">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>YISYSGSFSYNPSLKS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
```

```
<INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q17">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>CDRH2</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q18">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YISYSGSYSYNPSLKS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q19">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>CDRH2</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q20">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YISYSGSYSYHPSLKS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q21">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>CDRH3</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q22">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SLSYGYGFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q23">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH3</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q24">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SFSYSYGFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q25">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRL2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q26">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SASYRYI</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q27">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH1</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q28">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>MISC_FEATURE - X is A or T</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q29">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GYSITSDYXWN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q31">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>MISC_FEATURE - X is F or Y</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>11</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q32">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>MISC_FEATURE - X is H or N</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q33">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YISYSGSXSXYXPSLKS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q34">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>CDRH3</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>2</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q35">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>MISC_FEATURE - X is L or F</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>5</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q36">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>MISC_FEATURE - X is G, S or A</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q37">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SXSXYGFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRL2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>SITE</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q39">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>MISC_FEATURE - X is T or I</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q40">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SASYRYX</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q41">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Light chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRF
SGSGSGTDFFTISSLQPEDFATYYCQHYSTPWTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q43">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Light chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYIGVPSRF
SGSGSGTDFFTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 22" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q45">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Light chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q46">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRF
SGSGSGTDFFTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 23" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q47">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q48">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGKGLEWMGYISYSGSFSYHP
    SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 24" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>

```

```

<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q49">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPNGLEWIGYISYSGSFSYHP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q51">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q52">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPNGLEWMGYISYSGSFSYHP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q53">

```

```

    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q54">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKVEWMGYISYSGSFSYHP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q55">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```



```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q58">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSFSYNP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYSYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q59">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q60">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPKGLEWMGYISYSGSYSNP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYSYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q61">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q62">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSYSYNP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYSYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q63">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q64">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
```

```

<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSYSYHP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSLSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q65">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q66">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSFSYNP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSLSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<SequenceData sequenceIDNumber=" 33" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q67">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q68">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPKGLEWMGYISYSGSYSNP
  SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYAYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 34" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q69">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>Heavy chain variable region</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q70">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSYSYHP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYGYGFAYWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q71">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Heavy chain</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q72">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKVEWMGYISYSGSFSYHP
SLKSRISITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCARSFSYGYGFAYWGQGLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSV
TLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPT
IKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIKPKIKDVLMIKSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTL
RVVSALPIQHQQWMSGKEFKCKVNNKDLPAIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG</INSDSeq_sequ
ence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q73">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Light chain</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q74">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDHF
TGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPQSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK
DINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK</INSDSeq_
q_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q75">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Heavy chain</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q76">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSYSNP
SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYSYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKHTHTCPPCPAPELAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPEEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequ
ence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q77">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Light chain</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q78">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRF
SGSGSGTDFFTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 39" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 40" >
  <INSDSeq>

```

```
<INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 41" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 42" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 43" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 44" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 45" >
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 46" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 47" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 48" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 49" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber=" 50" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 51" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 52" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 53" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 54" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 55" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 56" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 57" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 58" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 59" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 60" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 61" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 62" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 63" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length/>
    <INSDSeq_moltype/>
    <INSDSeq_division/>
    <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 64" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q79">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>VH FR1</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q80">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="65">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier id="q81">
  <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>VH FR1</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q82">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q83">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VH FR2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q84">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>WIRQFPGKGLEWMG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q85">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VH FR2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>

```

```

<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q86">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>WIRQFPGNGLEWIG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q87">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VH FR2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q88">

```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>WIRQFPGNGLEWMG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 69" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q89">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>VH FR2</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q90">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>WIRQFPGNKVEWMG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier id="q91">
<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>VH FR3</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q92">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier id="q93">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>VH FR4</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q94">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>WGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q95">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>VH FR3</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q96">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RISITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCAR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q97">
```

```

    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>VL FR2</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q98">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>WYQQKPGQSPKLLIY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="74">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q99">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VL FR3</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q100">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVPDHFTGSGSGTDFTFITISSVQAEDLAVYYC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q101">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VL FR4</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q102">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>FGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q103">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VL FR1</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q104">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q105">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VL FR2</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q106">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    <INSDSeq_sequence>WYQQKPGKAPKLLIY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="78">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q107">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VL FR3</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q108">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GVPSRFSGSGGTDFFTISSLQPEDFATYYC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="79">
  <INSDSeq>

```

```
<INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q109">
        <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>VL FR4</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q110">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>FGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 80" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
```

```

<INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q111">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>VL FR1</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q112">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPSSLSASVGRVTITC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="81">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>32</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q113">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>VL FR3</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..32</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q114">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVPDRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDFATYYC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="82">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q115">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>VL FR1</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q116">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITC</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="83">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q117">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>CDRH3</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q118">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SFSYAYGFAY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="84">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q119">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYTWNWIRQFPKGLEWMGYISYSGSYSYNP
    SLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSFSYSGYGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
    ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
    DKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
    RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
    WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequ
ence>

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】**【請求項1】**

一種特異性結合至人類L1CAM之抗體，其包含：

(a) 重鏈可變區(VH)互補決定區(CDR) 1，其包含胺基酸序列 GYSITSDYX₁WN (SEQ ID NO: 16)，其中：

X₁為A或T；

或含有序列(SEQ ID NO: 16)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(b) VH CDR2，其包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為F或Y，及

X₂為H或N；

或含有序列(SEQ ID NO: 17)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(c) VH CDR3，其包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為L或F，及

X₂為G、S或A；

或含有序列(SEQ ID NO: 18)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(d) 輕鏈可變區(VL) CDR1，其包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)；

或含有序列(SEQ ID NO: 4)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

(e) VL CDR2，其包含胺基酸序列SASYRYX₁ (SEQ ID NO: 19)，其中：

X₁為T或I；

或含有序列(SEQ ID NO: 19)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；

及

(f) VL CDR3，其包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)；

或含有序列(SEQ ID NO: 6)中之1、2或3個胺基酸交換的序列。

【請求項2】

一種特異性結合至人類L1CAM之抗體，其包含：

(a) 重鏈可變區(VH)互補決定區(CDR) 1，其包含胺基酸序列GYSITSDYX₁WN (SEQ ID NO: 16)，其中：

X₁為A或T；

(b) VH CDR2，其包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為F或Y，及

X₂為H或N；

(c) VH CDR3，其包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為L或F，及

X₂為G、S或A；

(d) 輕鏈可變區(VL) CDR1，其包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)；

(e) VL CDR2，其包含胺基酸序列SASYRYX₁ (SEQ ID NO: 19)，其中：

X₁為T或I；及

(f) VL CDR3，其包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)。

【請求項3】

如請求項1或2之特異性結合至人類L1CAM之抗體，其中：

(a) 該VH CDR1包含胺基酸序列GYSITSDYTN (SEQ ID NO: 9) 或含有序列(SEQ ID NO: 9)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；及/或

(b) 該VH CDR2包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為Y，及/或

X₂為N；

或含有序列(SEQ ID NO: 17)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；及/或

(c) 該VH CDR3包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為F，及/或

X₂為S；

或含有序列(SEQ ID NO: 18)中之1、2或3個胺基酸交換的序列；及/或

(d) 該VL CDR2包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)；

或含有序列(SEQ ID NO: 5)中之1、2或3個胺基酸交換的序列。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之特異性結合至人類L1CAM之抗體，其中：

(a) 該VH CDR1包含胺基酸序列GYSITSDYTN (SEQ ID NO:

9)；及/或

(b) 該VH CDR2包含胺基酸序列YISYSGSX₁SYX₂PSLKS (SEQ ID NO: 17)，其中

X₁為Y，及/或

X₂為N；

及/或

(c) 該VH CDR3包含胺基酸序列SX₁SYX₂YGFAY (SEQ ID NO: 18)，其中：

X₁為F，及/或

X₂為S；

及/或

(d) 該VL CDR2包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之特異性結合至人類L1CAM之抗體，其包含：

(a) 重鏈可變區(VH)，其包含有包含胺基酸序列GYSITSDYTNW (SEQ ID NO: 9)或含有序列(SEQ ID NO: 9)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VH CDR1、包含胺基酸序列YISYSGSYSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)或含有序列(SEQ ID NO: 11)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VH CDR2，及包含胺基酸序列SFSYSYGFAY (SEQ ID NO: 14)或含有序列(SEQ ID NO: 14)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VH CDR3；及

(b) 輕鏈可變區(VL)，其包含有包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)或含有序列(SEQ ID NO: 4)中之1、2或3個胺基酸交換之

序列的VL CDR1、包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)或含有序列(SEQ ID NO: 5)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VL CDR2，及包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)或含有序列(SEQ ID NO: 6)中之1、2或3個胺基酸交換之序列的VL CDR3。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之特異性結合至人類L1CAM之抗體，其包含：

(a) 重鏈可變區(VH)，其包含有包含胺基酸序列GYSITSDYTWN (SEQ ID NO: 9)的VH CDR1、包含胺基酸序列YISYSGSYSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)的VH CDR2，及包含胺基酸序列SFSYSYGFAY (SEQ ID NO: 14)的VH CDR3；及

(b) 輕鏈可變區(VL)，其包含有包含胺基酸序列KASQDVSSAVA (SEQ ID NO: 4)的VL CDR1、包含胺基酸序列SASYRYT (SEQ ID NO: 5)的VL CDR2，及包含胺基酸序列QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 6)的VL CDR3。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之抗體，其中該抗體進一步包含重鏈可變區序列，該重鏈可變區序列包含SEQ ID NO: 23-34中之任一者之重鏈可變區序列的構架區，及/或進一步包含輕鏈可變區序列，該輕鏈可變區序列包含SEQ ID NO: 20-22中之任一者之輕鏈可變區序列的構架區。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之抗體，其中該抗體包含重鏈可變區序列，該重鏈可變區序列包含選自由SEQ ID NO: 23-34組成之群之胺基酸序列，

及/或包含輕鏈可變區序列，該輕鏈可變區序列包含選自由SEQ ID NO: 20-22組成之群之胺基酸序列。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之抗體，其中該抗體包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之抗體，其中該抗體包含有包含SEQ ID NO: 37或84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之抗體，其包含：

- (a)重鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列；及
- (b)輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之抗體，其中該抗體選自單株抗體、以重組方式產生之抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(包括雙特異性抗體)、人類抗體、人源化抗體、嵌合抗體、免疫球蛋白、合成抗體、包含兩個重鏈及兩個輕鏈分子之四聚抗體、抗體輕鏈單體、抗體重鏈單體、抗體輕鏈二聚體、抗體重鏈二聚體、抗體輕鏈-抗體重鏈對、胞內抗體、異結合抗體、單域抗體、單價抗體、單鏈抗體或單鏈Fv (scFV)、駱駝源抗體、親和體(affibody)、抗運載蛋白(anticalin)、阿非林(affilin)、阿特里體(atrimer)、設計錨蛋白重複蛋白(DARPin)、諸如阿德奈汀(adnectin)及辛

替恩 (centyrin) 之 FN3 骨架、非諾莫 (fynomer)、庫尼茨域 (Kunitz domain)、前奈汀 (pronectin) 及奧博體 (OBodies)、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、二硫鍵鍵聯之 Fv (dsFv)、抗特應 (抗 Id) 抗體及以上中任一者之抗原結合片段，及/或其中該抗體包含於嵌合抗原受體 (CAR) 中。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之抗體，其進一步包含重鏈恆定區及/或輕鏈恆定區，較佳其中該重鏈恆定區選自由 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2 組成之人類免疫球蛋白之群，及/或其中該輕鏈恆定區選自由 IgG κ 及 IgG λ 組成之人類免疫球蛋白之群。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之抗體，其中該重鏈恆定區為野生型人類 IgG 重鏈恆定區之變異體，較佳地其中該變異型人類 IgG 重鏈恆定區結合至選自由 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA 組成之群的人類 Fc γ 受體中之一或多者，具有比該野生型人類 IgG 重鏈恆定區結合至該等人類 Fc γ 受體更高的親和力。

【請求項15】

一種抗體，其與如請求項1至14中任一項之抗體一樣結合至人類 L1CAM 之相同抗原決定基及/或與請求項1至14中任一項之抗體競爭結合至人類 L1CAM，較佳地其中該抗原決定基在人類 L1CAM 之纖維連接蛋白 III 型域 1-3 (FN III 1-3) 內。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之抗體，其中該抗體

(i) 在 L1CAM 之纖維連接蛋白 III 型域 1-3 (FN III 1-3) 內結合至人

類L1CAM，及/或

(ii) 以20 nM或更低、10 nM或更低、或1 nM或更低之親和力(K_D)

結合至人類L1CAM，及/或

(iii) 以20 nM或更低、10 nM或更低、或1 nM或更低之親和力(K_D)

結合至食蟹獼猴L1CAM，及/或

(iv) 活體外抑制腫瘤細胞在塗佈纖維連接蛋白之表面上之遷移，及/

或

(v) 活體外抑制SKOV-3、Panc-1及/或HCT-116腫瘤細胞之增殖；

及/或

(vi) 抑制SKOV-3ip異種移植模型中之原發腫瘤生長，及/或

(vii) 減少小鼠異種移植模型MDA-MB231中之轉移形成，及/或

(viii) 展現活體外ADCC活性及/或活體外結合至FcγRIIIa受體；及/

或

(ix) 展現活體外FcRn結合，及/或

(x) 活體外不與人類CHL1、人類NrCAM及/或人類神經束蛋白交

叉反應。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之抗體，其中該抗體為多特異性或雙特異性抗體，及/或為人源化抗體。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之抗體，其中該抗體

(a) 連接至治療活性物質，

較佳地連接至

化學治療化合物，
細胞毒性化合物，
細胞生長抑制化合物，
細胞介素，
奈米粒子，
放射性同位素，及/或
溶瘤病毒，
及/或

(b) 連接至診斷化合物，其較佳選自放射性同位素、化學發光化合物、螢光化合物、染料或酶。

【請求項19】

如請求項18之抗體，其中(a)中之該治療活性物質及/或(b)中之該診斷化合物選自放射性同位素、化學治療化合物、細胞毒性化合物及/或細胞生長抑制化合物，及/或其中該抗體視情況經由連接子共價連接至(a)中之該治療活性物質或其螯合劑或(b)中之該診斷化合物或其螯合劑。

【請求項20】

如請求項1至17中任一項之抗體，其中該抗體經由連接子連接至至少一種治療活性物質。

【請求項21】

如請求項18至20中任一項之抗體，其中該治療活性物質選自由以下組成之群：DNA損傷劑、抗凋亡劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、免疫調節劑、用於基因療法之核酸、抗血管生成劑、抗代謝物、含硼劑、化學保護劑、激素劑、抗激素劑、皮質類固醇、光敏性治療劑、寡核苷

酸、放射性同位素、放射增敏劑、拓樸異構酶抑制劑及酪胺酸激酶抑制劑。

【請求項22】

如請求項21之抗體，其中該有絲分裂抑制劑選自類美登素(maytansinoid)及奧瑞他汀(auristatin)。

【請求項23】

如請求項21之抗體，其中該DNA損傷劑選自吡咯并苯并二氮吡(PBD)及吡啶并苯并二氮吡(PDD)。

【請求項24】

如請求項18至23中任一項之抗體，其中該連接子為不可裂解的連接子。

【請求項25】

如請求項18至23中任一項之抗體，其中該連接子為可裂解的連接子。

【請求項26】

如請求項18至25中任一項之抗體，其中該治療活性物質選自單甲基奧瑞他汀E (MMAE)、(4-甲基-4-巯基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)及VA-SG3199 (特司林(tesirine))。

【請求項27】

如請求項18至26中任一項之抗體，其中

- (a) 該抗體包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區序列及/或包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或
- (b) 該抗體包含有包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列的重鏈可變區

序列且包含有包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列的輕鏈可變區序列；或

(c) 該抗體包含有包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列；或

(d) 該抗體包含有包含SEQ ID NO: 84之胺基酸序列或由其組成的重鏈序列及/或包含SEQ ID NO: 38之胺基酸序列或由其組成的輕鏈序列。

【請求項28】

一種核酸：

(i) 編碼如請求項1至27中任一項之抗體，及/或

(ii) 編碼如請求項1至27中任一項之抗體之至少一個VH或HC及/或VL或LC，及/或

(iii) 編碼根據SEQ ID NO: 30及/或根據SEQ ID NO: 20之序列，及/或

(iv) 包含編碼如請求項1至27中任一項之抗體之互補決定區序列的序列，

較佳地其中該核酸為載體之一部分。

【請求項29】

一種宿主細胞，其包含如請求項28之核酸。

【請求項30】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至27中任一項之抗體、或如請求項28之核酸、或如請求項29之宿主細胞，及視情況選用之一或多種醫藥學上可接受之載劑。

【請求項31】

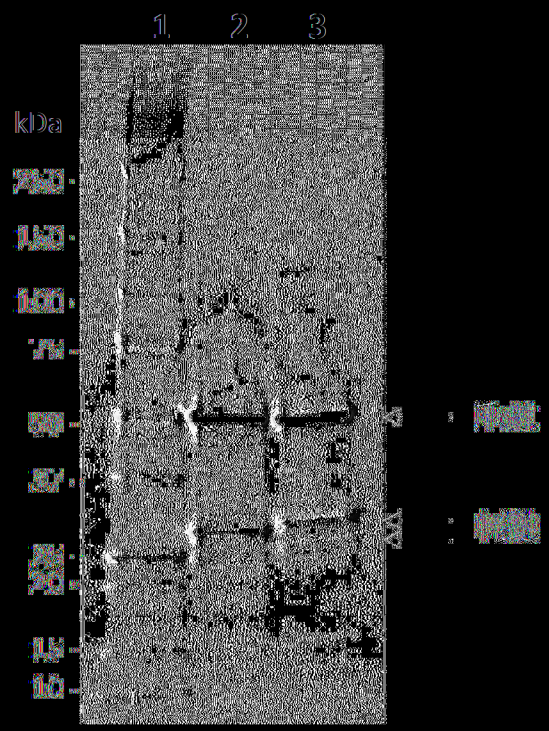
如請求項1至27中任一項之抗體、或如請求項28之核酸、或如請求項29之宿主細胞，或如請求項30之醫藥組合物，其係用作藥劑或用作診斷劑。

【請求項32】

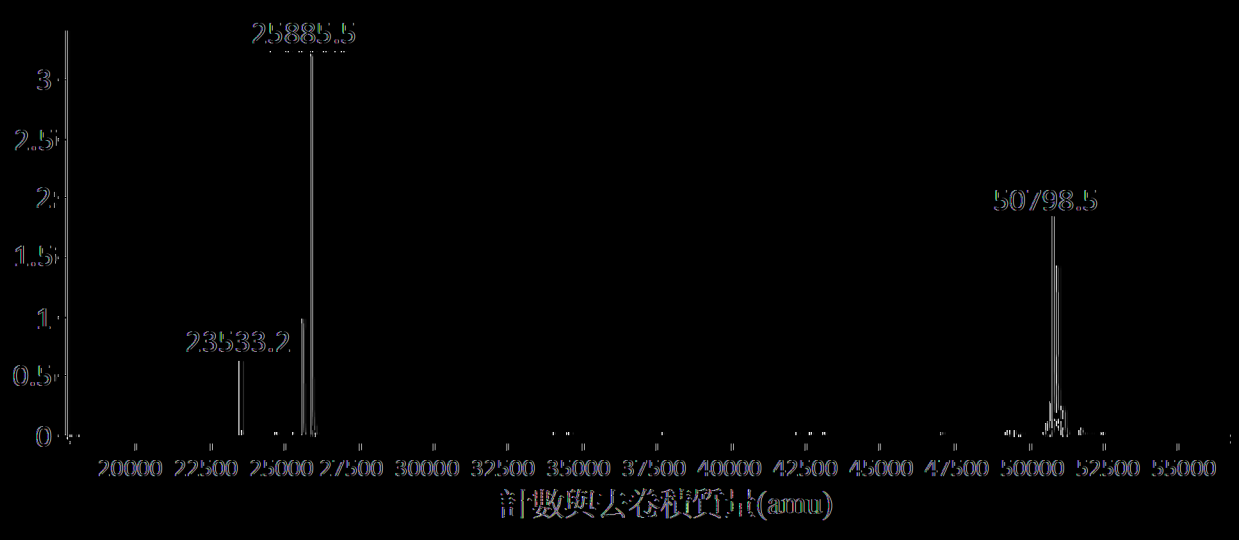
如請求項1至27中任一項之抗體、或如請求項28之核酸、或如請求項29之宿主細胞，或如請求項30之醫藥組合物，其用於治療或預防過度增生性病徵、腫瘤疾病、與血管新生相關之病徵及/或與異常神經生成相關之病徵。

(發明圖式)

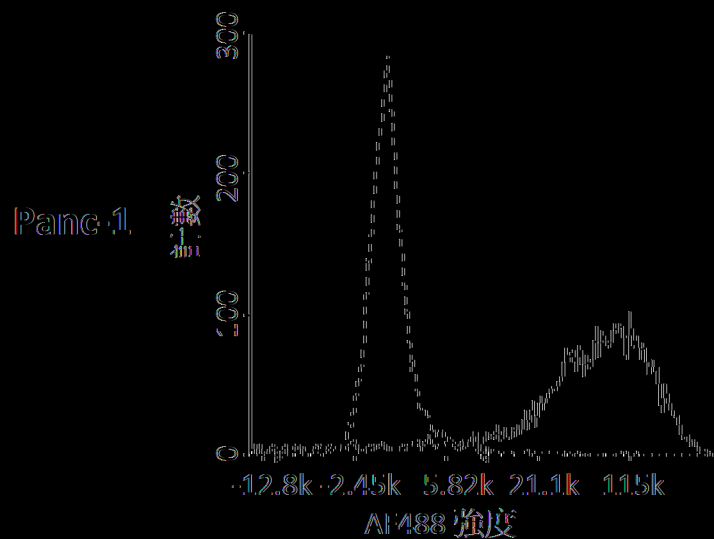
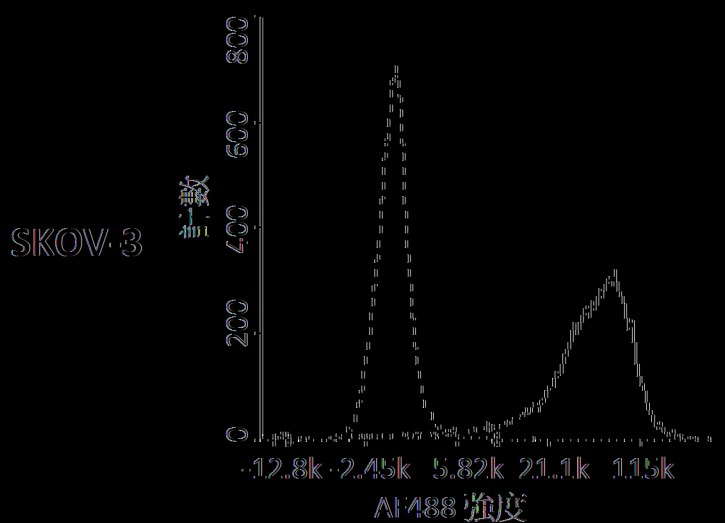
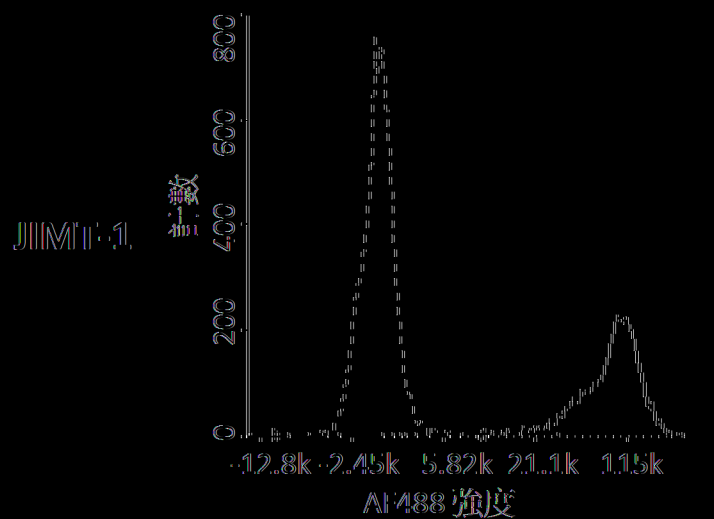
A



B

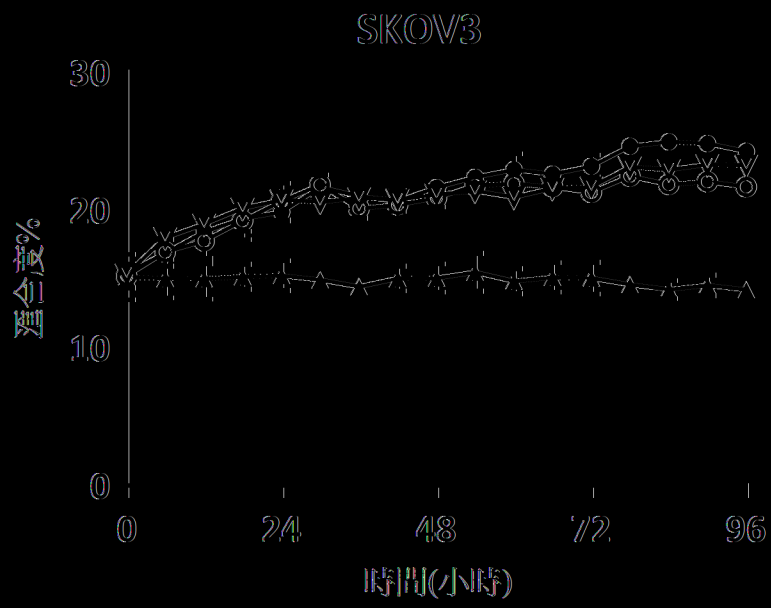
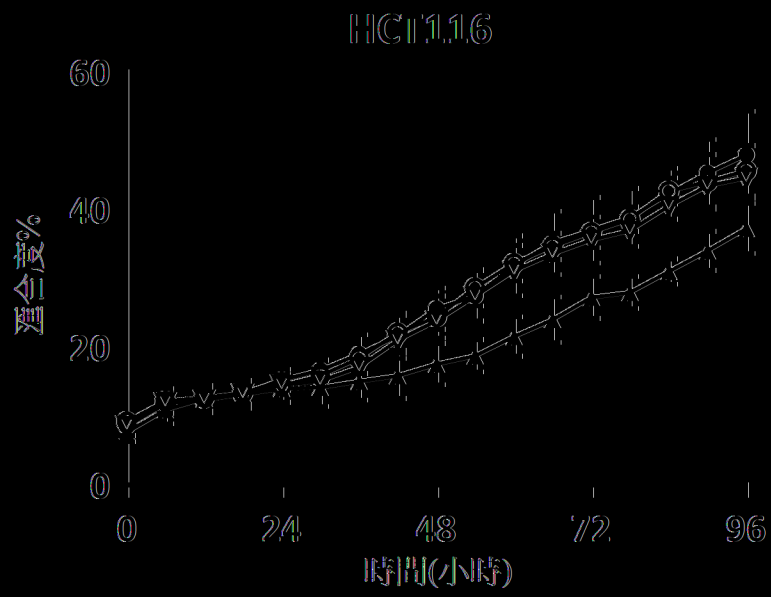


(圖1)



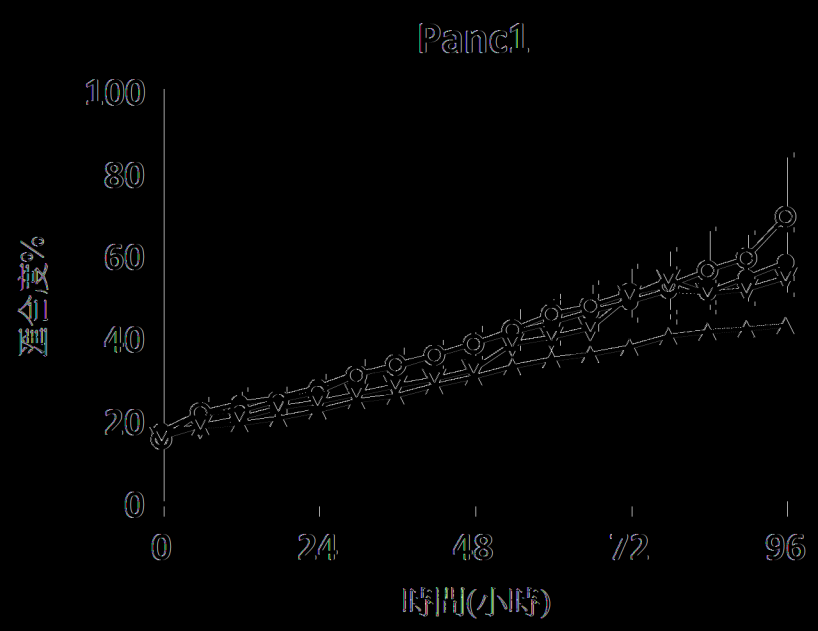
..... 嵌合人類IgG1同型對照物
- - - 嵌合OV549.20人類IgG1

|(同2)|



- 媒劑
- 小鼠 IgG2a 同種對照物
- ▽ OV52.24 小鼠 IgG2a
- △ OV549.20 小鼠 IgG2a

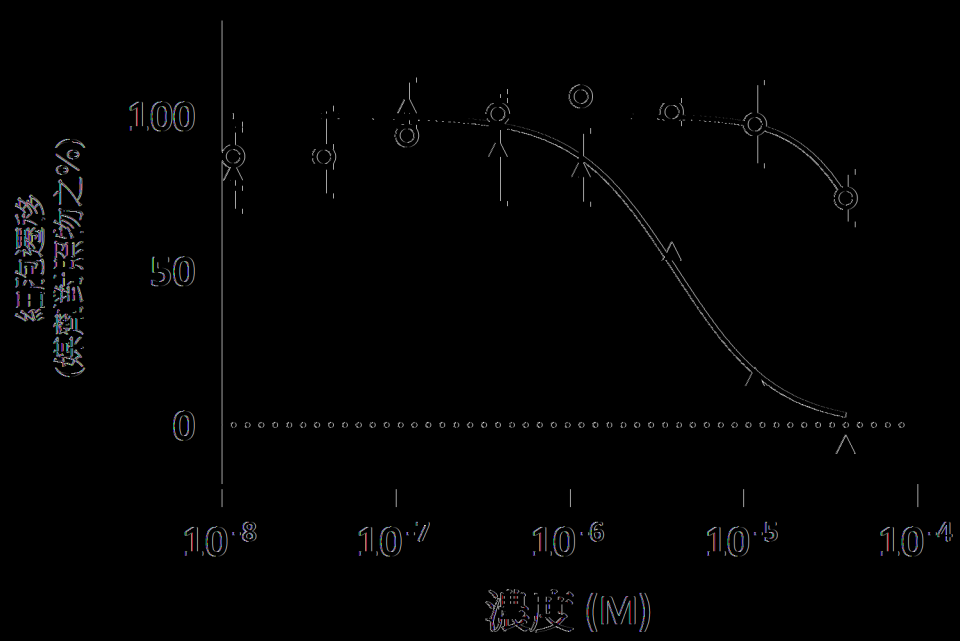
(圖5)



- 媒介
- 小鼠 IgG2a 同型墨劑物
- ▽ OV52.24 小鼠 IgG2a
- △ OV549.20 小鼠 IgG2a

(圖5) (續)

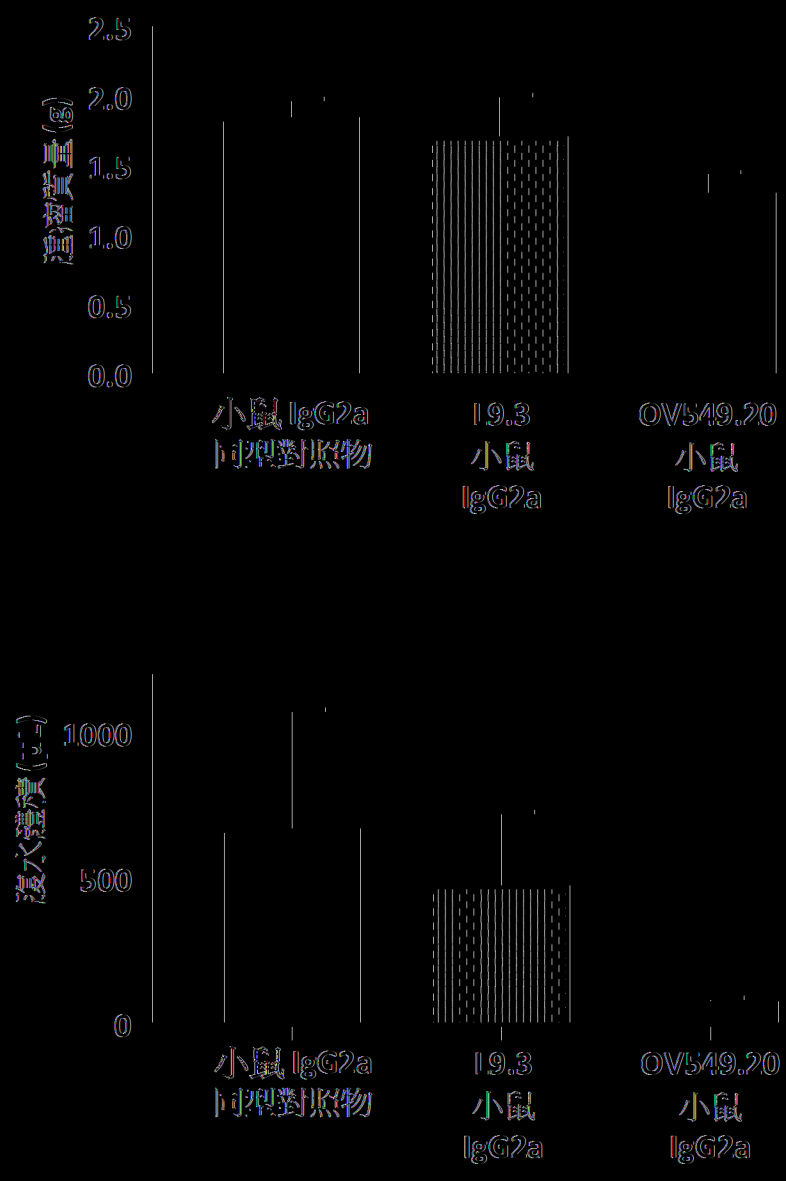
HCl1,1,6



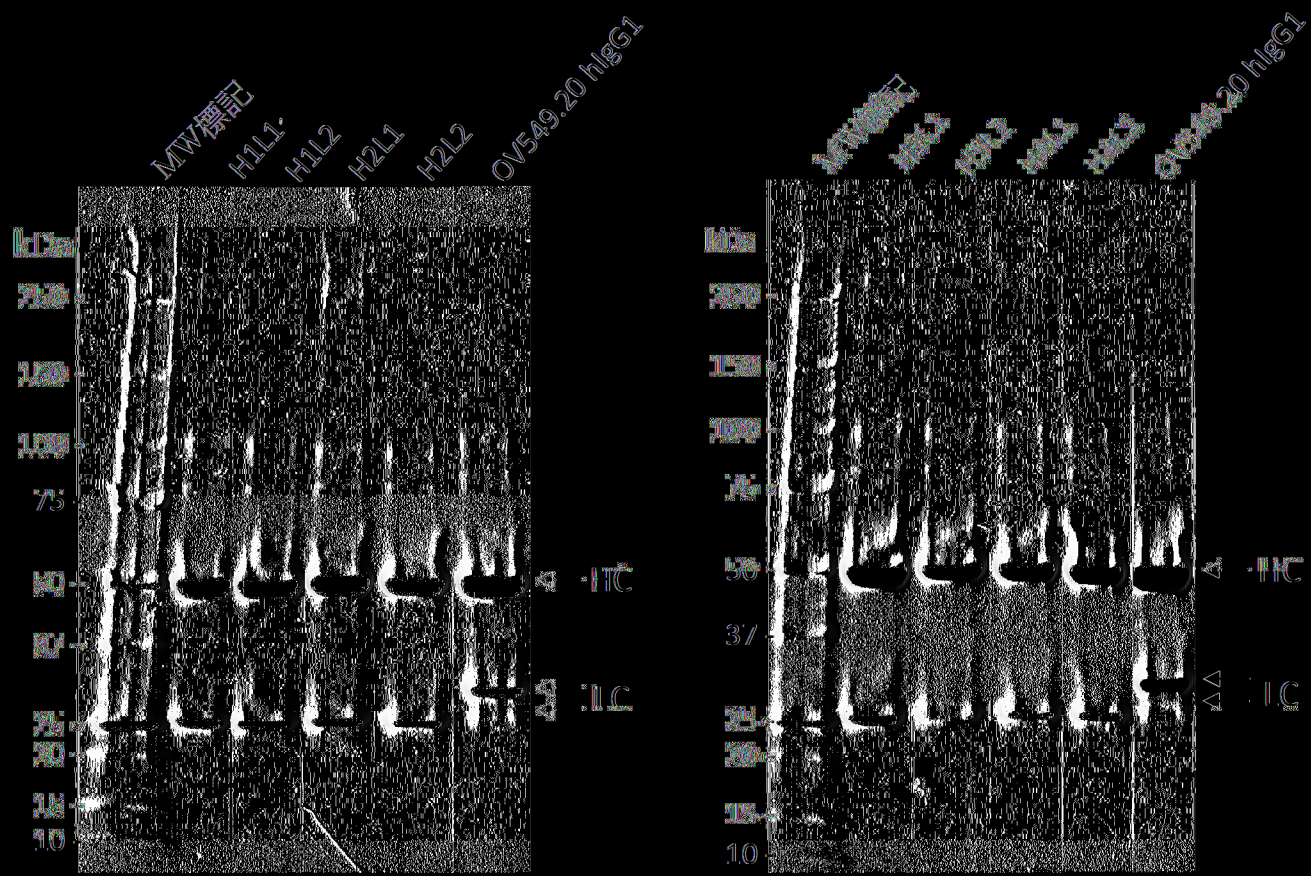
- · 嵌合人類IgG1中求得對照物
- ▲ · 嵌合OV549.20人類IgG1

【圖6】

A

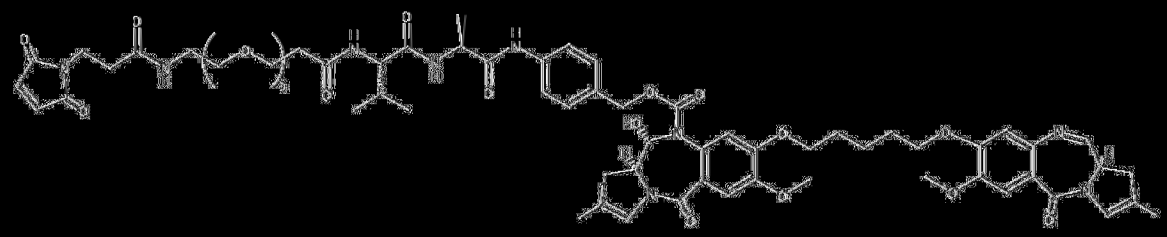


[(圖)]

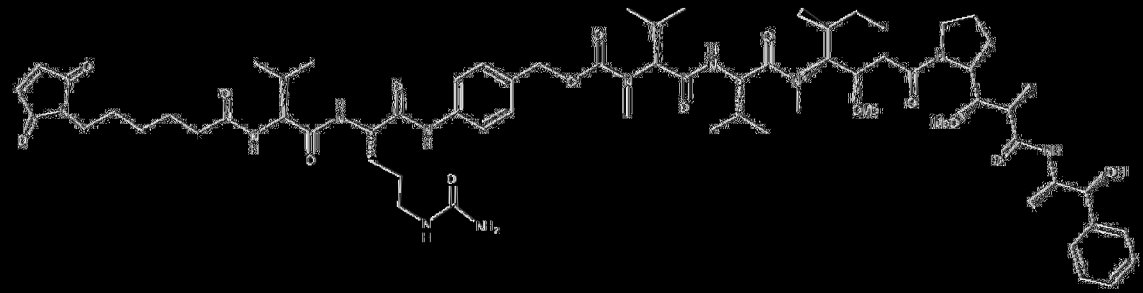


(149)

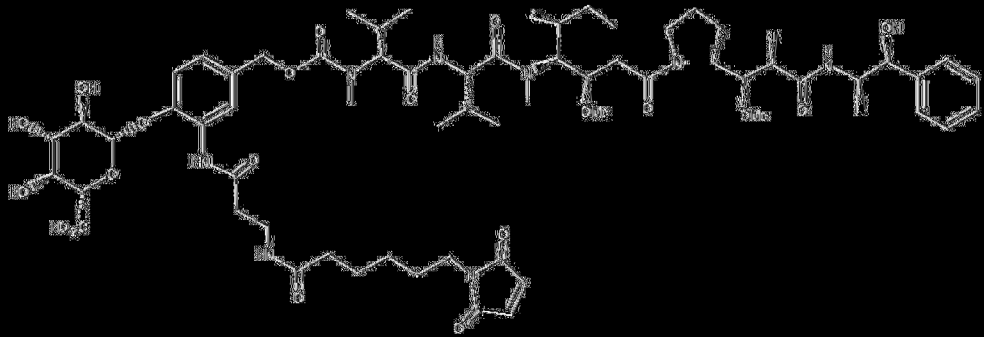
A



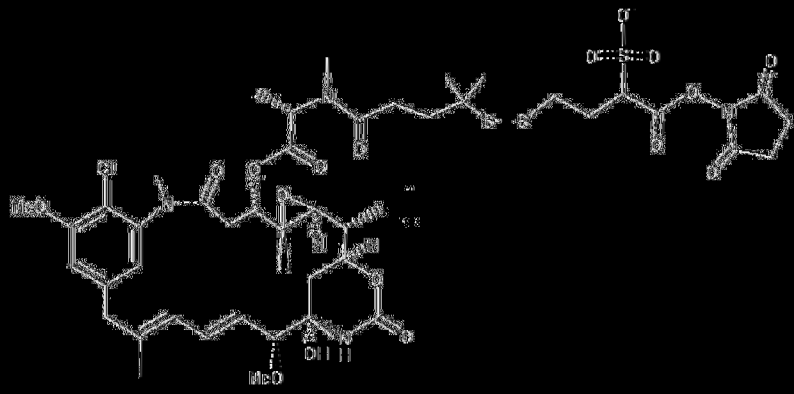
B



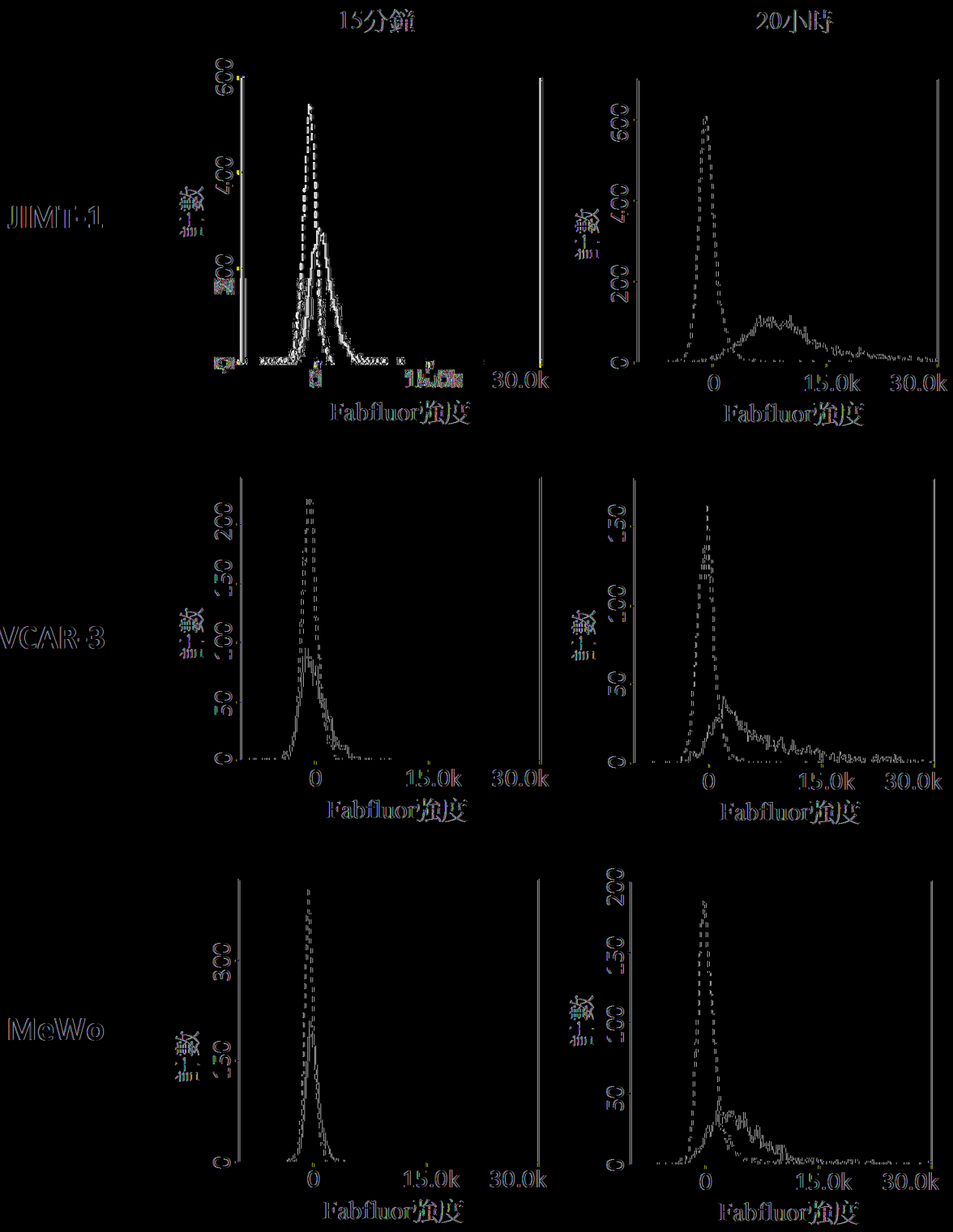
C



D

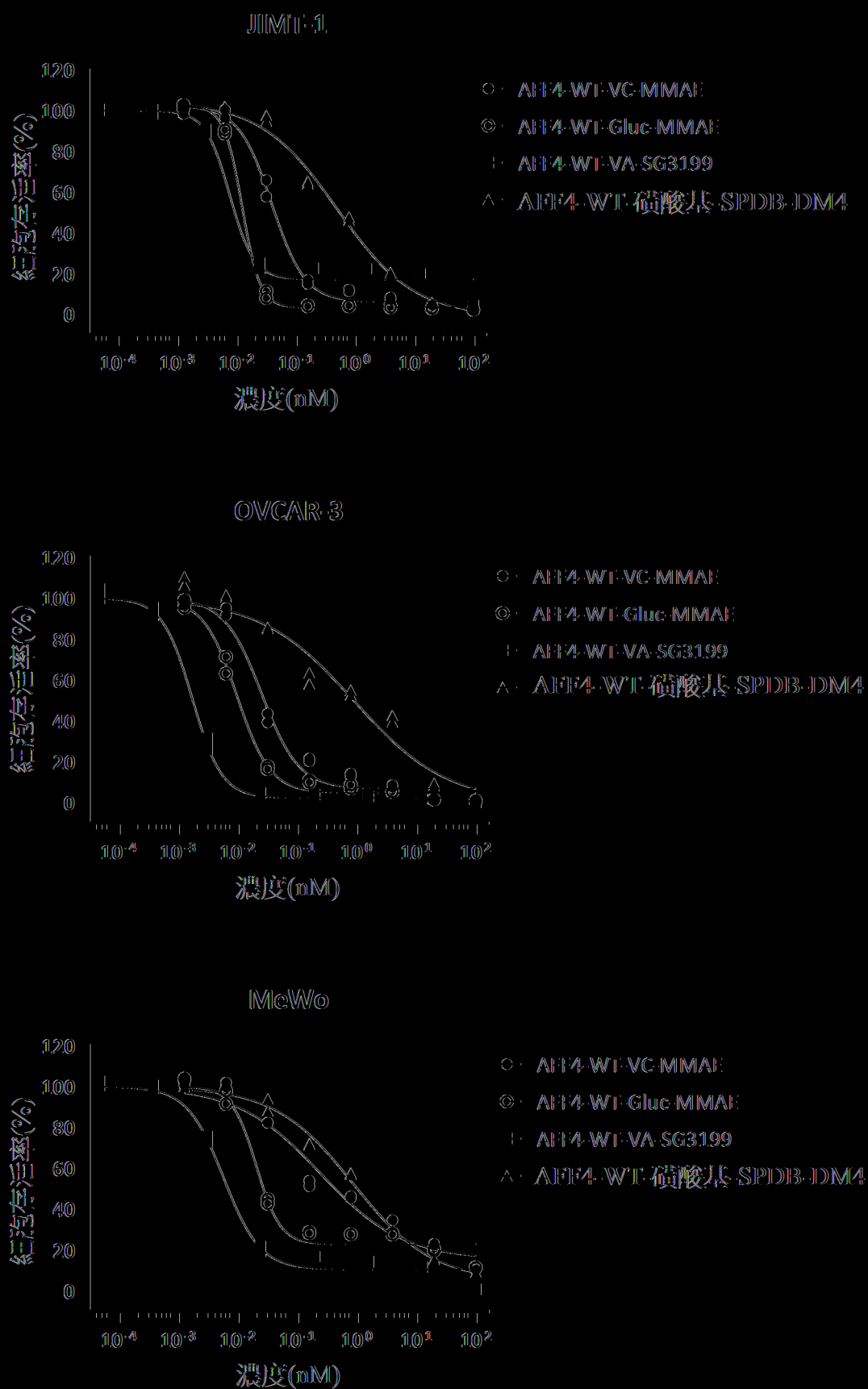


[(14)]

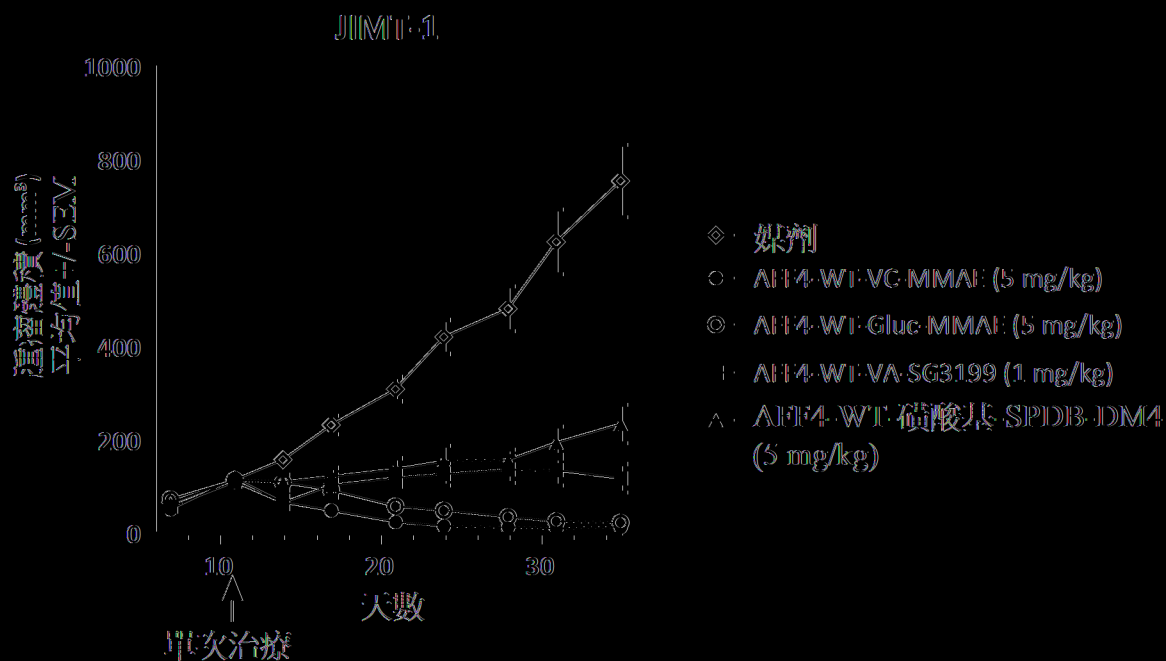


..... 嵌合人類IgG1对照物
 ———— Anti4-WT

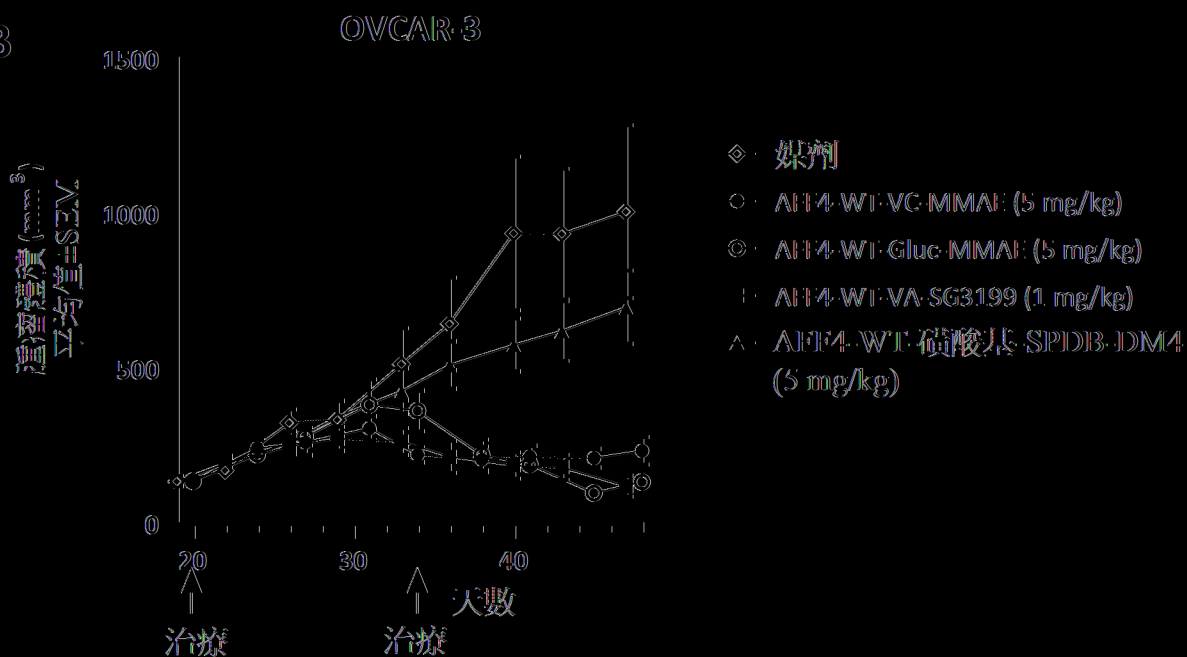
(圖15)



A

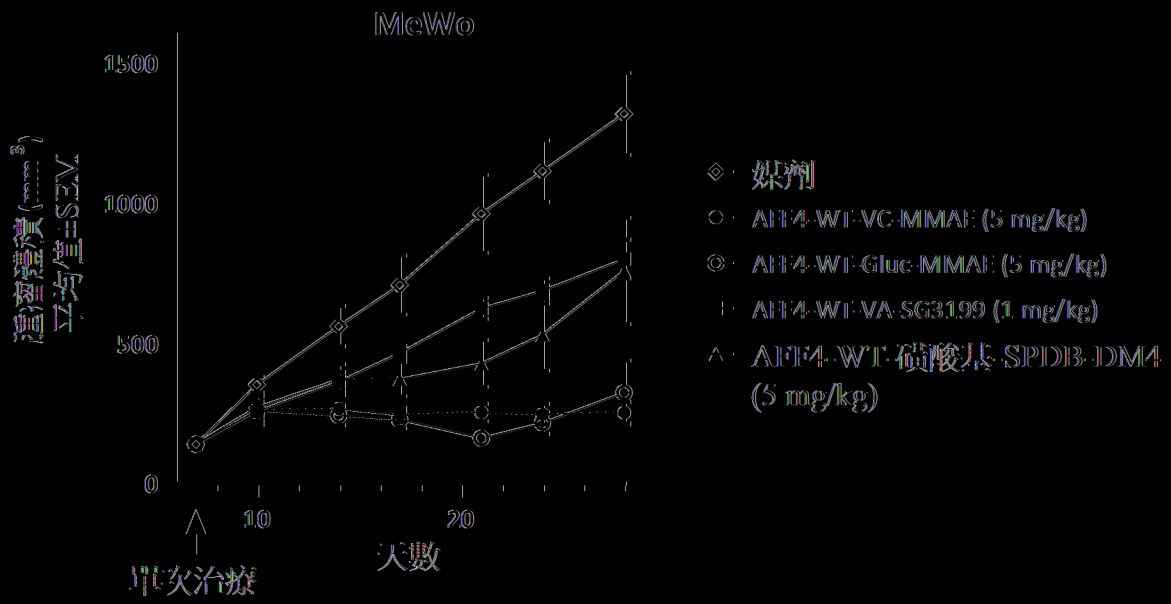


B

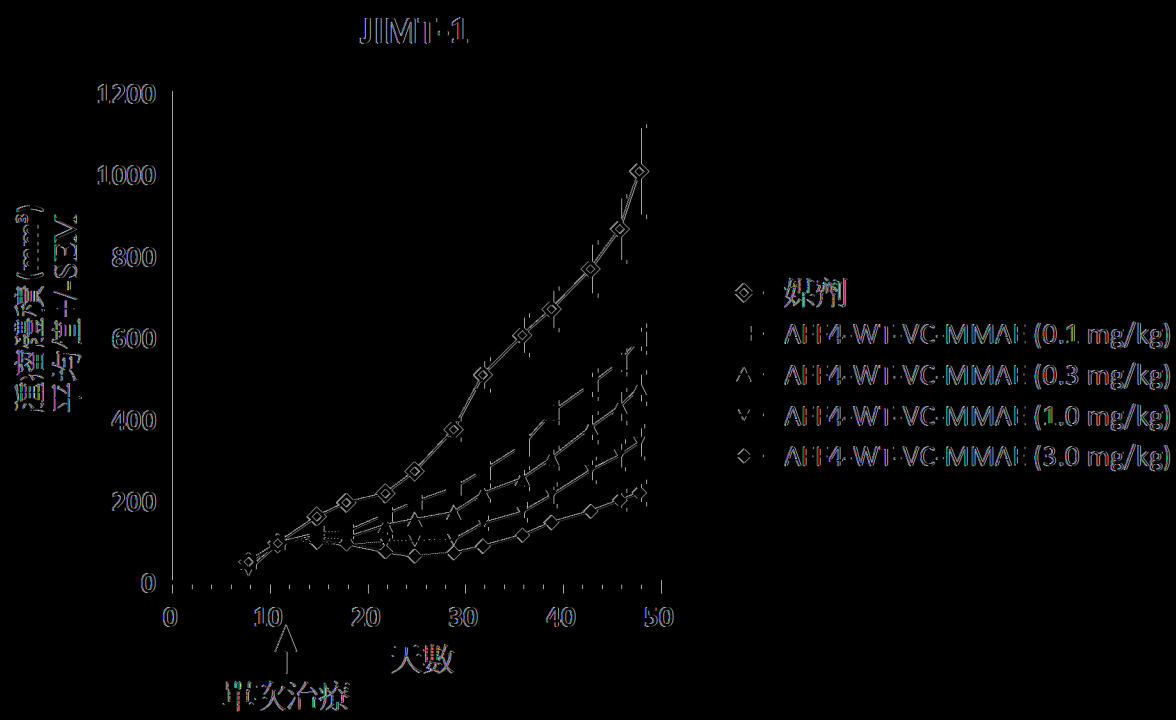


(圖17)

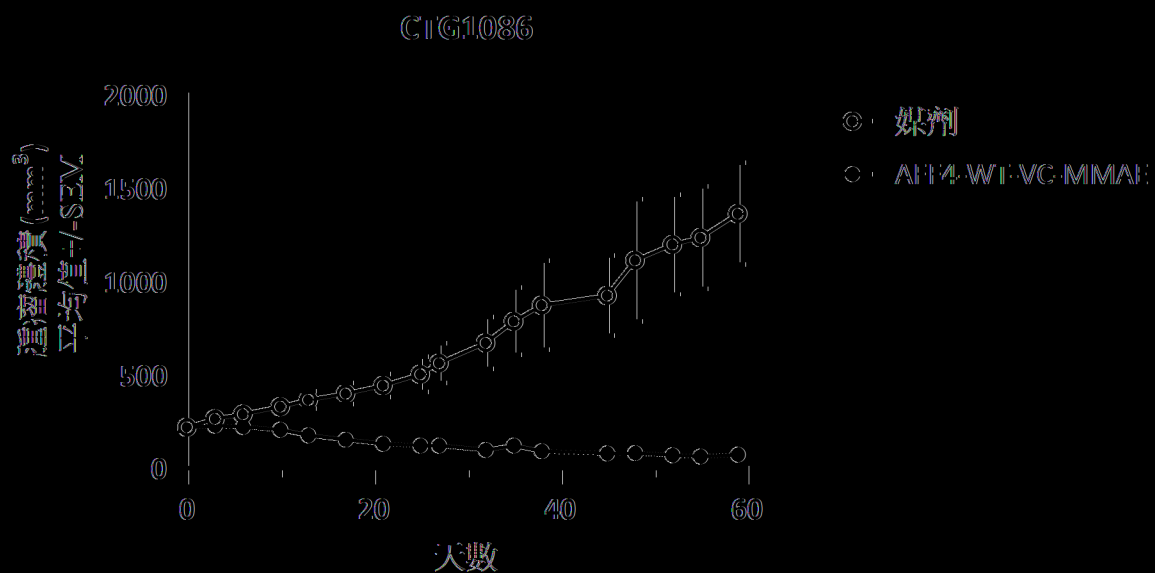
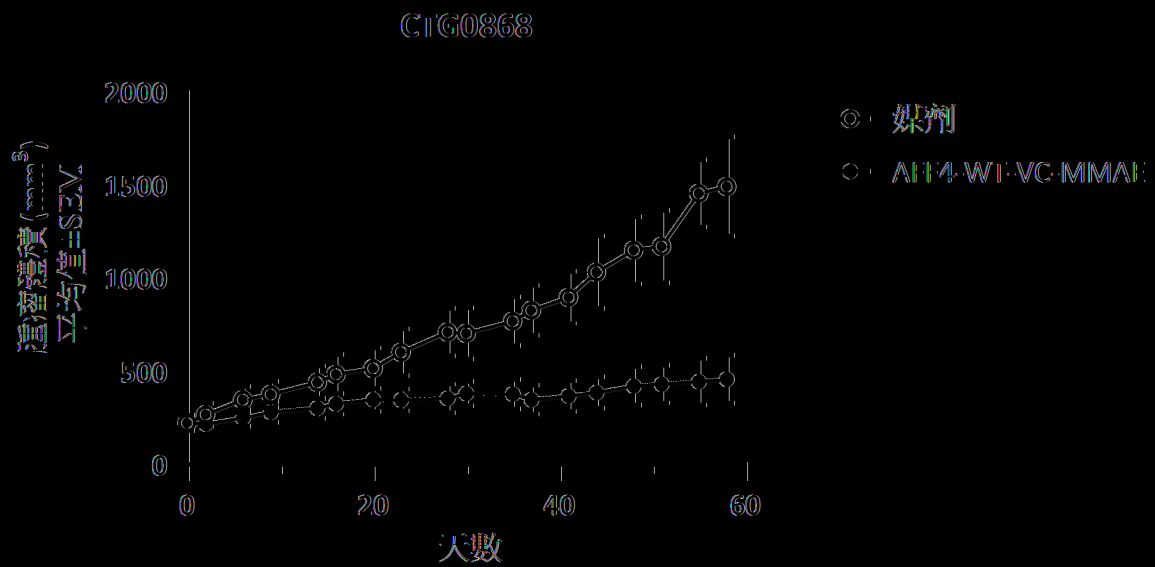
C



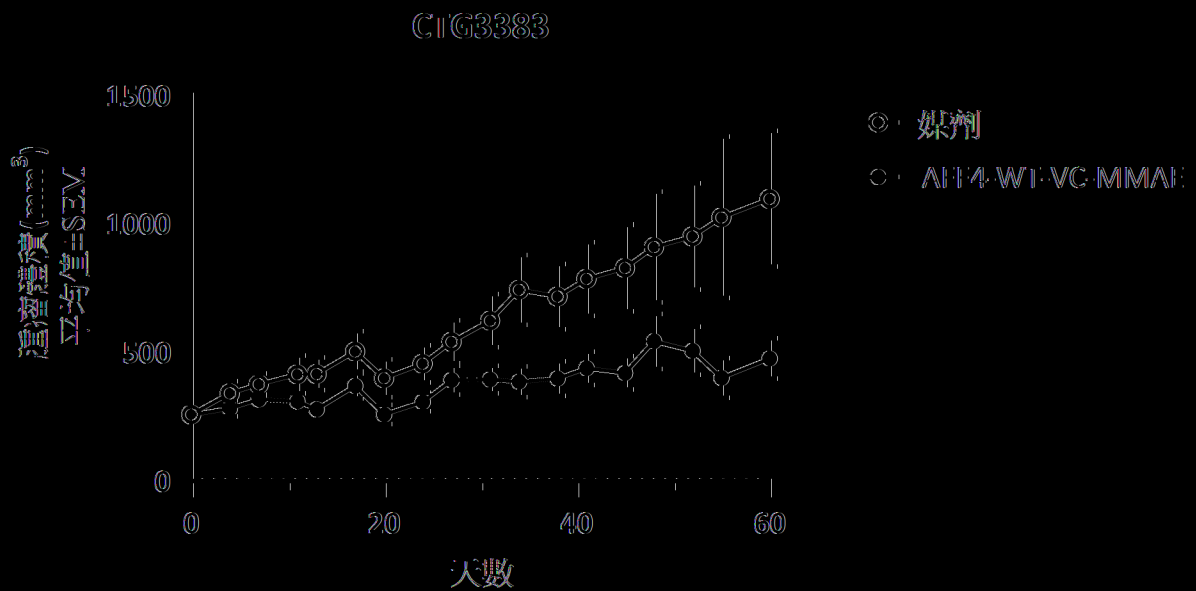
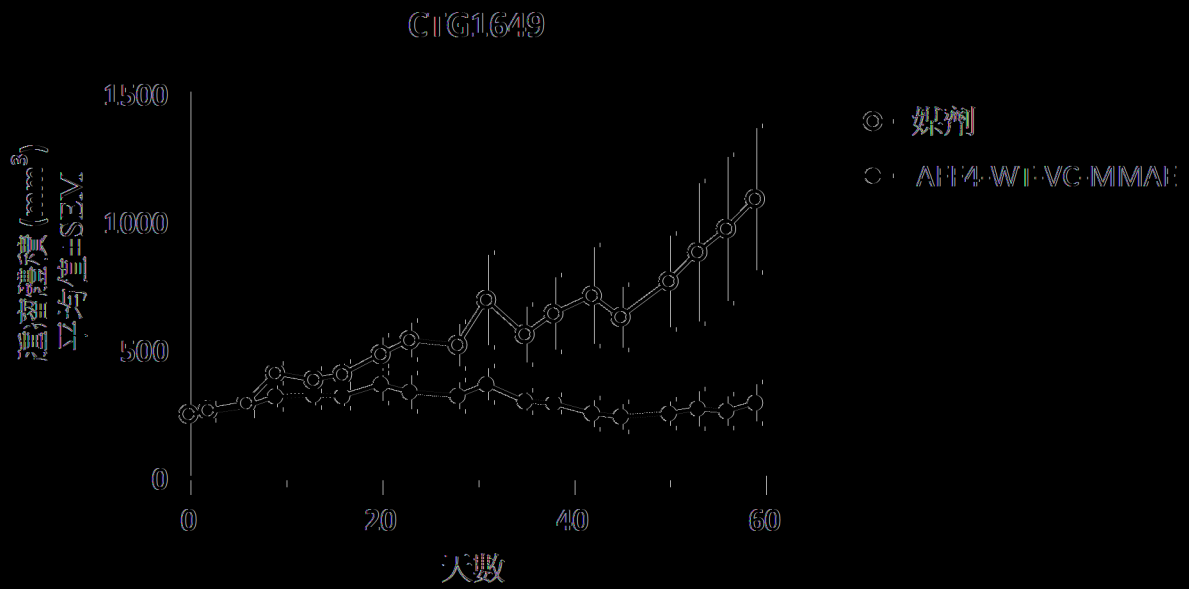
(圖17) (續)



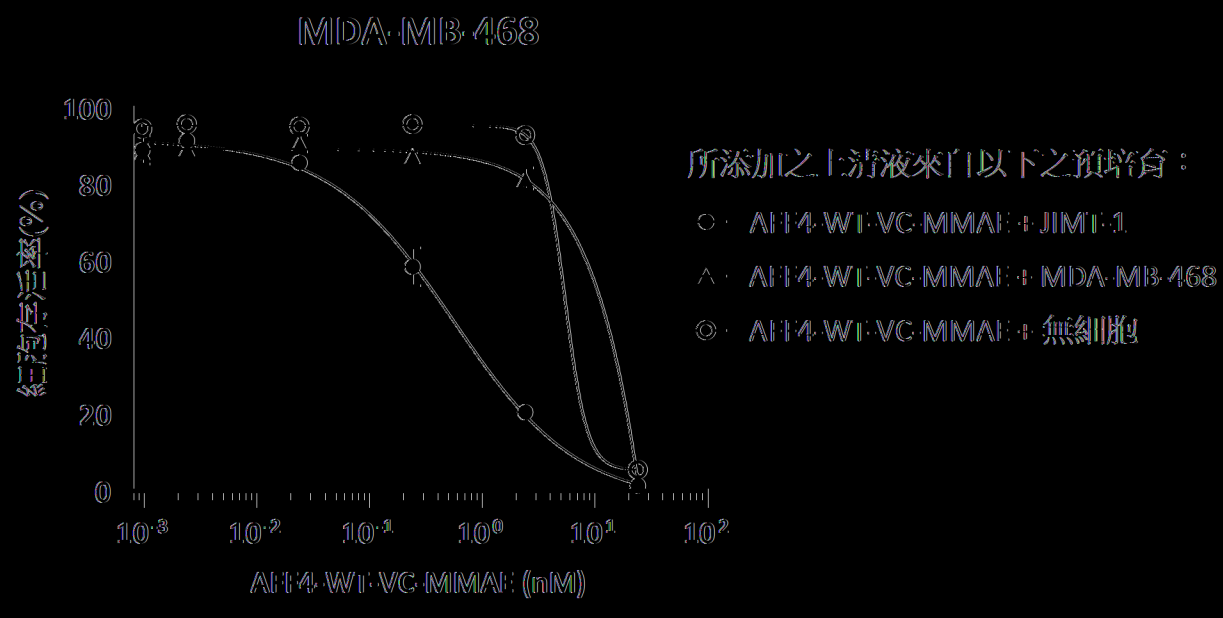
(圖18)



[(圖19)]



(圖19) (續)



|(14)|