



(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 202300172 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 01 日

- (21) 申請案號：111109842 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 03 月 17 日
- (51) Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/40 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01) *A61K47/68 (2017.01)*
A61K47/64 (2017.01)
- (30) 優先權：2021/03/18 美國 63/162,635
 2022/01/21 美國 63/301,574
- (71) 申請人：美商思進公司 (美國) SEAGEN INC. (US)
 美國
- (72) 發明人：里康 海克托 德 杰西 RINCON, HECTOR DE JESUS (MX)；安德森 薩拉罕
 安 里歐爾丹 ANDERSON, SARAH ANN RIORDAN (US)；使瑾爾 艾琳 瑪
 格瑞特 SCHERER, ERIN MARGARET (US)；威斯頓朵芙 羅里 WESTENDORF,
 LORI (US)；賓德曼 諾雅 BINDMAN, NOAH (US)；奧克利 尼可 OKELEY,
 NICOLE (US)；森特 彼得 SENTER, PETER (US)；艾瓦史地 帝芙雅 AWASTHI,
 DIVYA (IN)
- (74) 代理人：陳長文
- 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：55 項 圖式數：31 共 250 頁

(54) 名稱

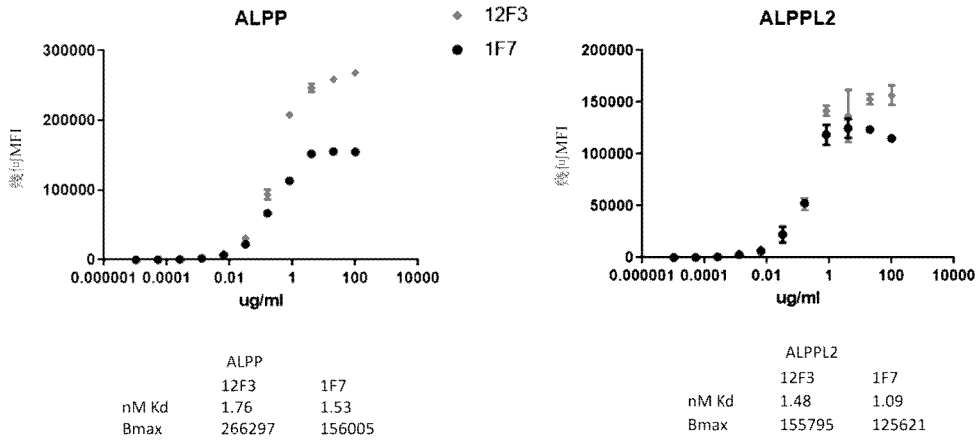
抗 ALPP/ALPPL2 抗體及抗體藥物結合物

(57) 摘要

本發明提供結合 ALPP 及/或 ALPPL2 之抗原結合蛋白，例如抗體及其片段。亦提供編碼該等抗原結合蛋白之核酸以及可用於製備該等抗原結合蛋白之載體及細胞。該等抗原結合蛋白可用於多種方法，包括卵巢癌之治療。

Antigen binding proteins such as antibodies and fragments thereof that bind ALPP and/or ALPPL2 are provided. Nucleic acids encoding such antigen binding proteins and vectors and cells useful in preparing such antigen binding proteins are also provided. The antigen binding proteins are useful in a variety of methods, including the treatment of ovarian cancer.

指定代表圖：



【圖4】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗ALPP/ALPPL2抗體及抗體藥物結合物

【英文發明名稱】

ANTI-ALPP/ALPPL2 ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG
CONJUGATES

【中文】

本發明提供結合ALPP及/或ALPPL2之抗原結合蛋白，例如抗體及其片段。亦提供編碼該等抗原結合蛋白之核酸以及可用於製備該等抗原結合蛋白之載體及細胞。該等抗原結合蛋白可用於多種方法，包括卵巢癌之治療。

【英文】

Antigen binding proteins such as antibodies and fragments thereof that bind ALPP and/or ALPPL2 are provided. Nucleic acids encoding such antigen binding proteins and vectors and cells useful in preparing such antigen binding proteins are also provided. The antigen binding proteins are useful in a variety of methods, including the treatment of ovarian cancer.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗ALPP/ALPPL2抗體及抗體藥物結合物

【英文發明名稱】

ANTI-ALPP/ALPPL2 ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG
CONJUGATES

【技術領域】

【0001】本發明係關於新穎抗ALPP/ALPPL2抗體及抗體藥物結合物，以及使用該等抗ALPP/ALPPL2抗體及抗體藥物結合物治療癌症之方法。

【先前技術】

【0002】ALPP (亦稱為胎盤鹼性磷酸酶)及ALPPL2 (亦稱為胎盤樣2鹼性磷酸酶)係在胎盤中大量表現之同種同源基因。ALPP及ALPPL2係參與自細胞外間隙之ATP循環之膜結合蛋白。ALPP在多種癌症中上調，該等癌症包括卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌、膀胱癌及胃癌。ALPPL2亦在多種癌症中上調，該等癌症包括卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌、膀胱癌、胃癌及睪丸癌。卵巢癌係第五大最常見的婦科惡性病，且需要對該疾病改進之治療。

【0003】本文引用之所有參考文獻(包括專利申請案、專利出版物及科學文獻)皆係全文以引用方式併入本文中，如同每個個別參考文獻具體地及個別地指示欲以引用方式併入一般。

【發明內容】

【0004】本文提供抗ALPP抗體及針對ALPP之抗體藥物結合物

(ADC)，以及抗ALPPL2抗體及針對ALPPL2之ADC。本文亦提供可結合ALPP及ALPPL2之抗體(抗ALPP/ALPPL2抗體)以及針對ALPP及ALPPL2兩者之ADC (針對ALPP/ALPPL2之ADC)。本文亦提供使用針對抗ALPP/ALPPL2之抗體及ADC治療表現ALPP及/或ALPPL2之病症(包括癌症)之方法。在一些實施例中，抗ALPP/ALPPL2抗體包含SEQ ID NO: 56、57及58之重鏈CDR序列及SEQ ID NO: 63、64及65之輕鏈CDR序列，如藉由Kabat編號所測定。在一些實施例中，抗ALPP/ALPPL2抗體包含SEQ ID NO: 60、61及62之重鏈CDR序列及SEQ ID NO: 66、67及68之輕鏈CDR序列、如藉由IMGT編號所測定。

【圖式簡單說明】

【0005】圖1顯示使用對COV644及NCI-H1651腫瘤細胞具有或不具有旁觀者活性之酬載之作為ADC之ALPP/ALPPL2特異性抗體之細胞毒性評估。

【0006】圖2A至圖2C顯示在使用無旁觀者活性之酬載對作為ADC之頂級ALPP/ALPPL2特異性抗體進行細胞毒性評估時，細胞系CAOV3、COV644及NCI-H1651之剩餘存活率。

【0007】圖3顯示ALPP/ALPPL2特異性抗體之結合親和性。

【0008】圖4顯示藉由流式細胞術之抗體1F7及12F3與表現ALPP及ALPPL2兩者之HEK293細胞之完全結合特性。

【0009】圖5顯示h12F3可變重鏈變體與人類重受體序列IGHV3-49/HJ4之序列比對。

【0010】圖6顯示h12F3可變重鏈變體之可變結構域比對。

【0011】圖7顯示h12F3可變輕鏈變體與人類 κ 受體序列IGKV1-

33/KJ2之序列比對。

【0012】圖8顯示h12F3輕鏈變體之可變結構域比對。

【0013】圖9顯示有活力的CAOV3細胞之百分比。圖左側顯示含有具有不同重鏈之人類化F輕鏈變體之ADC之劑量-反應曲線之存活率百分比。圖右側顯示含有具有不同輕鏈變體之人類化D重鏈之ADC的存活率。

【0014】圖10顯示具有mp-dLAE-MMAE(4)藥物連接體之人類化變體之間之活體外功效相關性。

【0015】圖11顯示h12F3 HGLF ADC在活體外對3D球體之細胞毒性特性。此圖顯示h12F3 HGLF及HFLD變體兩者與ALPP及ALPPL2 Fc融合物之動力學結合曲線及值。

【0016】圖12顯示不同抗體濃度下h12F3 HGLF之內化動力學。

【0017】圖13顯示h12F3 HGLF及HFLD變體與ALPP及ALPPL2 Fc融合物之動力學結合曲線及值。

【0018】圖14顯示在pH 7.4及pH 6下h12F3 HGLF及HFLD與ALPP及ALPPL2 fc融合物之動力學結合曲線及值。

【0019】圖15顯示在CAOV3小鼠模型中h12F3 HGLF-dLAE-MMAE及HFLD-dLAE-MMAE之活體內抗腫瘤活性。

【0020】圖 16 顯示在 NCI-N87 小鼠模型中 h12F3 HGLF-dLAE-MMAE及HFLD-dLAE-MMAE之活體內抗腫瘤活性。

【0021】圖 17 顯示在 NCI-N87 小鼠模型中 h12F3 HFLD-dLAE-MMAE及HFLD-vc-MMAE之活體內抗腫瘤活性。

【0022】圖18顯示在H1651小鼠模型中h12F3 HFLD-dLAE-MMAE及HFLD-vc-MMAE之活體內抗腫瘤活性。

【0023】圖 19 顯示在用與 vc-MMAE 及 dLAE-MMAE 結合之 h12F3 ADC 治療時七種異種移植物模型間之 % 腫瘤體積變化。

【0024】圖 20 顯示 NCI-N87 胃模型中藉由 h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE 或 h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE 結合物與其各別同型 ADC 對照相比之活體內抗腫瘤活性。

【0025】圖 21 顯示 NCI-N87 胃模型中藉由 h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE 或 h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE 結合物與其各別同型 ADC 對照相比之活體內抗腫瘤活性。

【0026】圖 22 顯示四種異種移植物腫瘤模型(包括胰臟(HPAC)、胃(NCI-N87)、卵巢(CAOV3)及肺(SNU-2535))間藉由 h12F3-HGLF mc-vc-MMAE 及 mp-dLAE-MMAE 之腫瘤生長抑制的概述。平均非靶 ADC 以虛線顯示。

【0027】圖 23 顯示用 h12F3-HDLF-mc-vc-MMAE 治療之卵巢患者源異種移植物之抗腫瘤活性。A) 顯示 12 個異種移植物間之腫瘤生長抑制之概述，而 B) 及 C) 顯示與未治療同類群組相比，兩個結合物治療之模型之實例。

【0028】圖 24 顯示 h12F3 HGLF 及 HFLD 對人類 ALPP 及猴直向同源物之結合親和性。

【0029】圖 25 顯示 h12F3 HGLF 至嵌合大鼠/人類表現 ALPP 之 HEK293 細胞之表位定位。

【0030】圖 26 顯示示出 h12F3、h12F3-HGLF-mc-vc-MMAE、h12F3-mp-dLAE-MMAE 或陽性對照 mAb (按行變化) 與人類 Fc 受體 (按列變化) 之結合之感測圖。平衡解離常數列於各感測圖之右上角。

【0031】圖 27 顯示在存在 h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE結合物下，將Na₂[⁵¹Cr]O₄ (Cr-51)標記之細胞與NK細胞一起培育後，藉由鉻釋放分析測定之LoVo細胞之細胞裂解。

【0032】圖 28 顯示與陽性(功能阻斷型抗CD47抗體)或同性對照相比，在存在h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE結合物下，與LoVo細胞一起培育之巨噬細胞之吞噬活性。

【0033】圖 29 顯示h12F3 HGLF抗體及ADC對發光報導基因之FcγRIII介導之活化。

【0034】圖30顯示h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE結合物在兩種不同濃度下對參與免疫原性細胞死亡之兩種信號路徑之活化。

【0035】圖 31 顯示與游離MMAE細胞毒素相比，用1 mg/ml或10 mg/ml之h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE結合物處理24h或48h之LoVo細胞在培養基中ATP之釋放。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0036】本申請案主張於2021年3月18日提出申請之美國臨時申請案第63/162,635號及於2022年1月21日提出申請之美國臨時申請案第63/301,574號之權益，該等申請案之每一者出於所有目的係全文以引用方式併入本文中。

【0037】本文所用各章節標題僅出於組織目的，而不能理解為限制

所述標的物。

【0038】本文所述或參考之技術及程序通常已經充分瞭解且通常由熟習此項技術者使用習用方法採用，例如，闡述於以下文獻中之廣泛利用之方法：Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第4版(2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y.；Current Protocols In Molecular Biology (F. M. Ausubel等人編輯, (2003))；系列METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.)；PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson、B. D. Hames及G. R. Taylor編輯 (1995))；Greenfield編輯(2013) *Antibodies, A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press；Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編輯, 1984)；Methods in Molecular Biology, Humana Press；Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis編輯, 1998) Academic Press；Animal Cell Culture (R. I. Freshney), 編輯, 1987)；Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather及P. E. Roberts, 1998) Plenum Press；Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle、J. B. Griffiths及D. G. Newell編輯, 1993-8) J. Wiley and Sons；Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir及C. C. Blackwell編輯)；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller及M. P. Calos編輯, 1987)；PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人編輯, 1994)；Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan等人編輯, 1991)；Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)；Immunobiology (C. A. Janeway及P. Travers, 1997)；Antibodies (P. Finch, 1997)；Antibodies: A Practical Approach

(D. Catty. 編輯, IRL Press, 1988-1989) ; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd 及 C. Dean 編輯, Oxford University Press, 2000) ; Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow 及 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; The Antibodies (M. Zanetti 及 J. D. Capra 編輯, Harwood Academic Publishers, 1995) ; Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等人編輯, J.B. Lippincott Company, 1993) ; 及其更新之版本。此段落中之上述文獻中之每一者皆係全文以引用方式併入本文中。

I. 定義

【0039】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本揭示內容所屬領域技術者之通常理解相同之含義。舉例而言，the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press ; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第5版, 2013, Academic Press ; 及 the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 第2版, 2006, Oxford University Press 提供本揭示內容中使用之許多術語之通用詞典。

【0040】 除非上下文另有要求或明確指出，否則單數術語應包括複數，且複數術語應包括單數。

【0041】 應理解，本文所述之本發明之態樣及實施例包括「包含」態樣及實施例、「由態樣及實施例組成」及/或「基本上由態樣及實施例組成」。

【0042】 除非另外指示，否則如本文所用之單數形式「一」(「a」、「an」)及「該」應理解為指任何列舉或枚舉之組分中之「一或

多個」。

【0043】術語「及/或」在本文中使用时應被視為兩個指定之特徵或組分中之每一者之特定揭示內容，具有或不具有另一特徵或組分。因此，本文諸如「A及/或B」等之片語中使用之術語「及/或」意欲包括「A及B」、「A或B」、「A」(單獨)及「B」(單獨)。同樣，諸如「A、B及/或C」等片語中使用之術語「及/或」意欲包括以下態樣中之每一者：A、B及C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A及C；A及B；B及C；A (單獨)；B (單獨)；及C (單獨)。

【0044】術語「約」係指如熟習此項技術者所測定之在特定值或組成之可接受誤差範圍內之值或組成，其將部分取決於如何量測或測定該值或組成，即量測系統之限制。如熟習此項技術者所理解，本文在提及「約」一值或參數時包括(並闡述)針對該值或參數本身之實施例。舉例而言，「關於X」之說明包括「X」之說明。

【0045】如本文所述，除非另外指示，否則任何濃度範圍、百分比範圍、比率範圍或整數範圍應理解為包括所述範圍內之任何整數值，以及在適當時包括其分數(例如整數之十分之一及百分之一)。

【0046】當本文使用商標名時，除非上下文另外指示，否則在提及商標名時亦指產品調配物、學名藥及商標名產品之活性醫藥成分。

【0047】術語「ALPP」、「鹼性磷酸酶」、「鹼性磷酸酶，胎盤」、「ALP酶」或「PLAP」在本文中可互換使用，且除非另外規定，否則包括人類ALPP之任何天然存在之變體(例如剪接變體、等位基因變體)、同種型及脊椎動物物種同系物。該術語涵蓋「全長」、未處理之ALPP以及由細胞內處理產生之任何形式之ALPP。實例性人類ALPP之胺

基酸序列提供於Uniprot ID: P05187或RefSeq ID: NM_001632中。成熟人類ALPP蛋白之一個具體實例之胺基酸序列如SEQ ID NO: 2中所示。

【0048】術語「ALPPL2」、「鹼性磷酸酶，胎盤樣2」或「鹼性磷酸酶，生殖細胞」在本文中可互換使用，且除非另外規定，否則包括人類ALPPL2之任何天然存在之變體(例如剪接變體、等位基因變體)、同種型及脊椎動物物種同系物。該術語涵蓋「全長」、未處理之ALPPL2以及由細胞內處理產生之任何形式之ALPPL2。實例性人類ALPPL2之胺基酸序列提供於Uniprot ID: P10696或RefSeq ID: NM_031313中。成熟人類ALPPL2蛋白之一個具體實例之胺基酸序列如SEQ ID NO: 4中所示。

【0049】如本文所用之「抗原結合蛋白」(「ABP」)意指結合指定靶抗原而非結合指定抗原之天然存在之同源配體或該(等)配體之片段的任何蛋白。在本發明之申請案中，指定之靶抗原係ALPP及/或ALPPL2或ALPP及/或ALPPL2之片段。「抗原結合蛋白」包括包含至少一個抗原結合區或結構域(例如，本文定義之至少一個超變區(HVR)或互補決定區(CDR))之蛋白。在一些實施例中，抗原結合蛋白包含支架，例如多肽或多種多肽，如本文所述，一或多個(例如，1個、2個、3個、4個、5個或6個) HVR或CDR嵌入及/或接合至該支架中。在一些抗原結合蛋白中，HVR或CDR嵌入「框架」區，其定向HVR或CDR，從而實現CDR之適當抗原結合性質。對於一些抗原結合蛋白，支架係來自抗體或其片段之免疫球蛋白重鏈及/或輕鏈。支架之額外實例包括(但不限於)人類纖連蛋白(例如，人類纖連蛋白III之第10個細胞外結構域)、新製癌菌素(neocarzinostatin) CBM4-2、衍生自脂質運載蛋白之抗運載蛋白、設計之錨蛋白重複結構域(DARPin)、蛋白-A結構域(蛋白Z)、Kunitz結構域、

Im9、TPR 蛋白、鋅指結構域、pVIII、GC4、運鐵蛋白、SPA 之 B-結構域、Sac7d、A-結構域、Fyn 激酶之 SH3 結構域及 C-型凝集素樣結構域(例如，參見 Gebauer 及 Skerra (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255；Binz 等人 (2005) *Nat. Biotech.* 23:1257-1268；及 Yu 等人 (2017) *Annu Rev Anal Chem* 10:293-320，其各自係全文以引用方式併入本文中)。因此，抗原結合蛋白分別包括(但不限於)單株抗體、雙特異性抗體、微小抗體、結構域抗體(例如 Nanobodies®)、合成抗體(本文有時稱為「抗體模擬物」)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、抗體融合物以及各自之部分或片段。在一些情況下，抗原結合蛋白係完整抗體之功能片段(例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、結構域抗體或微小抗體)。肽體係抗原結合蛋白之另一實例。在一些實施例中，術語「抗原結合蛋白」包括衍生物，例如經化學修飾之抗原結合蛋白，例如與另一試劑(例如標記或細胞毒性或細胞抑制劑)接合之抗原結合蛋白(例如抗原結合蛋白結合物，例如抗體藥物結合物)。

【0050】如本文所用之抗原結合蛋白(例如抗體)之「抗原結合片段」(或簡稱為「片段」)或「抗原結合結構域」係指抗原結合蛋白(例如抗體)之一或多個片段，無論如何獲得或合成，其保留特異性結合至由完整抗原結合蛋白結合之抗原之能力。抗體片段之實例包括(但不限於)Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、雙特異性抗體、直鏈抗體、單鏈抗體分子(例如 scFv)及自抗體片段形成之多特異性抗體。「Fv」片段包括一個重鏈可變結構域及一個輕鏈可變結構域之非共價連接之二聚體。除了 Fv 片段之重鏈及輕鏈可變結構域之外，「Fab」片段亦包括輕鏈之恆定結構域及重鏈之第一恆定結構域(C_{H1})。「F(ab')₂」片段包括兩個藉由二硫鍵

在鉸鏈區附近接合之Fab片段。

【0051】術語「多肽」及「蛋白質」可互換使用，係指胺基酸殘基之聚合物，並不限於最小長度。胺基酸殘基之該等聚合物可含有天然或非天然胺基酸殘基，包括(但不限於)胺基酸殘基之二聚體、三聚體、肽、寡肽及多聚體。該定義涵蓋全長蛋白及其片段兩者。該術語亦包括多肽之表現後修飾，例如醣基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化及諸如此類。術語「多肽」亦係指包括對天然序列之修飾(例如缺失、添加及取代(本質上通常係保守的))之蛋白質，只要該蛋白質維持期望活性即可。術語「多肽」及「蛋白質」涵蓋ALPP及/或ALPPL2抗原結合蛋白，包括具有抗原結合蛋白之一或多個胺基酸之缺失、添加及/或取代之抗體、抗體片段或序列。

【0052】「天然序列」或「天然存在之」多肽包含具有與自然界中發現之多肽相同之胺基酸序列之多肽。因此，天然序列多肽可具有來自任何哺乳動物之天然存在之多肽之胺基酸序列。該天然序列多肽可自自然界中分離，或可藉由重組或合成方式產生。術語「天然序列」多肽具體涵蓋多肽之天然存在之截短或分泌形式(例如細胞外結構域序列)、多肽之天然存在之變體形式(例如，選擇式剪接形式)及天然存在之等位基因變體。

【0053】多肽「變體」意指在比對序列並引入空位(若必要)以獲得最大序列一致性百分比且不考慮任何保守取代作為序列一致性之一部分後，與天然或參考序列多肽具有至少約70%、80%或90%之胺基酸序列一致性的生物活性多肽(例如抗原結合蛋白或抗體)。該等變體包括(例如)其中在多肽之N-或C-末端添加或缺失一或多個胺基酸殘基之多肽。在一些實施例中，變體將具有至少約80%之胺基酸序列一致性。在一些實施例

中，變體將具有至少約90%之胺基酸序列一致性。在一些實施例中，變體與天然序列多肽將具有至少約95%之胺基酸序列一致性。

【0054】如本文所用，關於肽、多肽或抗原結合蛋白(例如抗體)序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」及「同源性」定義為在比對序列並引入空位(若必要)以獲得最大序列一致性百分比且不考慮任何保守取代作為序列一致性之一部分之後，候選序列中與特定肽或多肽序列中之胺基酸殘基相同之胺基酸殘基之百分比。出於測定胺基酸序列一致性百分比之目的，比對可以熟習此項技術者所熟知之各種方式來達成，例如使用可公開獲得之電腦軟體，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)軟體。彼等熟習此項技術者可測定用於量測比對之適當參數，包括在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需要之任何算法。舉例而言，給定胺基酸序列A對(to)、與(with)或針對(against)給定胺基酸序列B之序列一致性% (其可或者表述為給定胺基酸序列A對、與或針對給定胺基酸序列B具有或包含特定序列一致性%)計算如下：

$$100 \times \text{分數} X/Y$$

其中X係在A及B之該程序對比中評分為由序列相同匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y係B中之胺基酸殘基之總數。除非另有具體說明，否則本文使用之所有胺基酸序列一致性%值皆係根據該式使用ALIGN-2電腦程序計算。應瞭解，在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度之情況下，A對B之序列一致性%將不等於B對A之序列一致性%。

【0055】術語「前導序列」係指位於多肽之N-末端之胺基酸殘基之序列，其促進多肽自哺乳動物細胞中分泌。前導序列可在多肽自哺乳動物細胞輸出時解離，從而形成成熟蛋白。前導序列可為天然的或合成的，且

其可與其所連接之蛋白質異源或同源。

【0056】術語「免疫球蛋白」係指一類結構相關之醣蛋白，其由兩對多肽鏈、一對輕(L)低分子量鏈及一對重(H)鏈組成，所有四個鏈皆藉由二硫鍵相互連接。免疫球蛋白之結構已經充分表徵。參見(例如) *Fundamental Immunology* (Paul, W. 編輯，第7版，Raven Press, N .Y. (2013))。簡言之，每條重鏈通常包括重鏈可變區(本文中縮寫為V_H或VH)及重鏈恆定區(C_H或CH)。重鏈恆定區通常包括三個結構域C_{H1}、C_{H2}及C_{H3}。重鏈通常經由所謂「鉸鏈區」中之二硫鍵相互連接。每條輕鏈通常包括輕鏈可變區(本文中縮寫為V_L或VL)及輕鏈恆定區(C_L或CL)。輕鏈恆定區通常包括一個結構域C_L。CL可為κ(卡帕(kappa))或λ(蘭布達(lambda))同型。術語「恆定結構域」及「恆定區」在本文中可互換使用。免疫球蛋白可源自任何已知之同型，包括但不限於IgA、分泌性IgA、IgG及IgM。IgG亞類亦係熟習此項技術者所熟知，且包括(但不限於)人類IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類別或亞類(例如IgM或IgG1)。

【0057】術語「抗體」以其最廣泛之意義使用，且具體地涵蓋(例如)單株抗體(包括全長或完整單株抗體)、具有多表位或單表位特異性之抗體、多株或單價抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體，只要其展現期望生物活性即可)、單鏈抗體及前述之片段，如下所述。抗體可為人類、人類化、嵌合之及/或親和成熟的，以及來自其他物種(例如小鼠及兔等)之抗體。因此，術語「抗體」包括(例如)免疫球蛋白類多肽內之B細胞之多肽產物，其能夠結合特定分子抗原且由兩對相同之多肽鏈構成，其中每對具有一條重鏈(約50-70 kDa)及一條輕鏈(約25

kDa)，每條鏈之每個胺基末端部分包括約100至約130個或更多個胺基酸之可變區，且每條鏈之每個羧基末端部分包括恆定區。參見(例如) **Antibody Engineering** (Borrebaeck 編輯，第2版，1995)；及 Kuby, **Immunology** (第3版，1997)。術語「抗體」亦包括(但不限於)合成抗體、重組產生之抗體、駱駝化抗體、細胞內抗體、抗個體遺傳型(抗Id)抗體以及上述中之任一者之功能片段(例如，抗原結合片段)，其係指抗體重鏈及/或輕鏈多肽中保留衍生該片段之抗體之一些或全部結合活性的一部分。功能片段(例如，抗原結合片段)之非限制性實例包括單鏈Fv (scFv)(例如，包括單特異性、雙特異性等)、Fab片段、F(ab')片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、二硫鍵連接之Fv (dsFv)、Fd片段、Fv片段、雙價抗體、三價抗體、四價抗體及微小抗體。具體而言，本文提供之抗體包括免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫活性部分，例如抗原結合結構域或含有與抗原(例如，抗體之一或多個CDR)結合之抗原結合位點之分子。該等抗體片段可參見(例如) Harlow 及 Lane, **Antibodies: A Laboratory Manual** (1989)；Mol. Biology and Biotechnology: A **Comprehensive Desk Reference** (Myers 編輯，1995)；Huston 等人，1993, Cell Biophysics 22:189-224；Plückthun 及 Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515；及Day, **Advanced Immunochemistry** (第2版，1990)。本文提供之抗體可為免疫球蛋白分子之任何類別(例如IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)或任何亞類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

【0058】如本文所用之術語「超變區」或「HVR」係指序列中超變之抗體可變結構域之每個區。HVR可形成結構明確之環(「超變環」)。通

常，天然四鏈抗體包含六個HVR；三個位於VH中(H1、H2、H3)，且三個位於VL中(L1、L2、L3)。在天然抗體中，H3及L3展示6個HVR之大部分多樣性，且相信尤其H3在賦予抗體微細特異性方面發揮獨特作用。參見(例如) Xu等人，*Immunity* 13:37-45 (2000)；Johnson及Wu，*Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo編輯，Human Press, Totowa, NJ, 2003)。事實上，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝科動物抗體在不存在輕鏈之情況下係功能性及穩定的。參見(例如) Hamers-Casterman等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

【0059】HVR通常包含來自超變環及/或來自「互補決定區」(CDR)之胺基酸殘基，CDR具有最高之序列可變性及/或參與抗原識別。多種界定給定CDR之邊界之方案為業內已知。舉例而言，Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且係最常用的(Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。而Chothia係指結構環之位置(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM CDR代表Kabat CDR與Chothia結構環之間之折衷，且由Oxford Molecular之AbM抗體建模軟體使用。「contact」CDR係基於對可用複雜晶體結構之分析。關於上述方案及其他編號慣例之額外詳情提供於以下參考文獻中：Al-Lazikani等人，(1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948 (「Chothia」編號方案)；MacCallum等人，(1996) *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), (「Contact」編號方案)；Lefranc M-P.等人，(2003) *Dev. Comp. Immunol.* 27:55-77 (「IMGT」編號方案)；及Honegger A.及Pluckthun

A. (2001) J. Mol/ Biol. 309:657-70, (AHo編號方案)。

【0060】 在一些實施例中，基於上述編號慣例之一，HVR區及相關序列與CDR區及相關序列相同。因此，實例性HVR及/或CDR之殘基概述於下表1中。

表1：不同CDR編號方案之概述

環	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
CDR-H1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
CDR-H2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
CDR-H3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
CDR-L1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
CDR-L2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
CDR-L3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

【0061】 在一些實施例中，HVR可包含如下經延伸HVR：VL中之24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)及89-97或89-96 (L3)以及VH中之26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2)及93-102、94-102或95-102 (H3)。對於該等定義中之每一者，根據Kabat等人(見上文)對可變結構域殘基進行編號。

【0062】 除非另外規定，否則術語給定抗體或其區(例如可變區)之「CDR」及「互補決定區」以及抗體或其區之個別CDR(例如「CDR-H1，CDR-H2」)應理解為涵蓋如由上述任何已知方案定義之互補決定區。在一些情況下，指定特定一或多種CDR之鑑別方案，例如如藉由IMGT、Kabat、AbM、Chothia或Contact法定義之CDR。在其他情況下，給出CDR之特定胺基酸序列。

【0063】 因此，在一些實施例中，抗原結合蛋白包含如由IMGT系統定義之CDR及/或HVR。在其他實施例中，抗原結合蛋白包含如由Kabat

系統定義之CDR或HVR。在其他實施例中，抗原結合蛋白包含如由AbM系統定義之CDR或HVR。在其他實施例中，抗原結合蛋白包含如由Chothia系統定義之CDR或HVR。在一些實施例中，抗原結合蛋白包含如圖5-8中鑑別或本文中別處所示之HVR及/或CDR殘基。

【0064】術語「可變區」或「可變結構域」係指涉及抗原結合蛋白(例如抗體)與抗原結合之抗原結合蛋白(例如抗體)重鏈或輕鏈之結構域。抗原結合蛋白(例如抗體)之重鏈及輕鏈(分別為VH及VL)之可變區或結構域可進一步細分為具有超變性之區(或超變區，其在結構上定義之環之序列及/或形式上可為超變的)，例如超變區(HVR)或互補決定區(CDR)，其中散佈有更保守之區，稱為框架區(FR)。一般而言，每個重鏈可變區中存在三個HVR (HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)或CDR (CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)，且每個輕鏈可變區中存在三個HVR (HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3)或CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。「框架區」及「FR」係為業內已知，係指重鏈及輕鏈之可變區之非HVR或非CDR部分。一般而言，每個全長重鏈可變區存在四個FR (FR-H1、FR-H2、FR-H3及FR-H4)，且每個全長輕鏈可變區中存在四個FR (FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4)。在每個VH及VL內，三個HVR或CDR及四個FR通常按以下順序自胺基末端至羧基末端佈置：在HVR之情形下，FR1、HVR1、FR2、HVR2、FR3、HVR3、FR4；或在CDR之情形下，FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (亦參見Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.*, 195, 901-917 (1987))。單一VH或VL結構域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原之抗體之VH或VL結構域來分離，以分別篩選互補VL或VH結構域之文庫。例如，參見

Portolano 等人，J. Immunol. 150:880-887 (1993)；Clarkson 等人，Nature 352:624-628 (1991)。

【0065】如本文所用術語「重鏈可變區」(VH)係指包含重鏈HVR-H1、FR-H2、HVR-H2、FR-H3及HVR-H3之區。舉例而言，重鏈可變區可包含重鏈CDR-H1、FR-H2、CDR-H2、FR-H3及CDR-H3。在一些實施例中，重鏈可變區亦包含FR-H1之至少一部分及/或FR-H4之至少一部分。

【0066】如本文所用術語「重鏈恆定區」係指包含至少三個重鏈恆定結構域C_{H1}、C_{H2}及C_{H3}之區。非限制性實例性重鏈恆定區包括 γ 、 δ 及 α 。非限制性實例性重鏈恆定區亦包括 ϵ 及 μ 。每個重鏈恆定區對應於一抗體同型。舉例而言，包含 γ 恆定區之抗體係IgG抗體，包含 δ 恆定區之抗體係IgD抗體，且包含 α 恆定區之抗體係IgA抗體。此外，包含 μ 恆定區之抗體係IgM抗體，且包含 ϵ 恆定區之抗體係IgE抗體。某些同類型可進一步細分為亞類。舉例而言，IgG抗體包括(但不限於) IgG1 (包含 γ_1 恆定區)、IgG2 (包含 γ_2 恆定區)、IgG3 (包含 γ_3 恆定區)及IgG4 (包含 γ_4 恆定區)抗體；IgA抗體包括(但不限於) IgA1 (包含 α_1 恆定區)及IgA2 (包含 α_2 恆定區)抗體；且IgM抗體包括(但不限於) IgM1及IgM2。

【0067】如本文所用術語「重鏈」(HC)係指至少包含重鏈可變區之多肽，其具有或不具有前導序列。在一些實施例中，重鏈包含重鏈恆定區之至少一部分。如本文所用術語「全長重鏈」係指包含重鏈可變區及重鏈恆定區之多肽，其具有或不具有前導序列。

【0068】如本文所用術語「輕鏈可變區」(VL)係指包含輕鏈HVR-L1、FR-L2、HVR-L2、FR-L3及HVR-L3之區。在一些實施例中，輕鏈

可變區包含輕鏈CDR-L1、FR-L2、CDR-L2、FR-L3及CDR-L3。在一些實施例中，輕鏈可變區亦包含FR-L1及/或FR-L4。

【0069】如本文所用術語「輕鏈恆定區」係指包含輕鏈恆定區C_L之區。非限制性實例性輕鏈恆定區包括λ及κ。

【0070】如本文所用術語「輕鏈」(LC)係指至少包含輕鏈可變區之多肽，其具有或不具有前導序列。在一些實施例中，輕鏈包含輕鏈恆定區之至少一部分。如本文所用術語「全長輕鏈」係指包含輕鏈可變區及輕鏈恆定區之多肽，其具有或不具有前導序列。

【0071】當提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時，通常使用「EU編號系統」或「EU索引」(例如，以下中報導之EU索引：Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。「如Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。除非本文中另有說明，否則提及抗體之恆定結構域中之殘基編號意指藉由EU編號系統進行之殘基編號。

【0072】術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體之群體獲得之抗體，亦即，除了可少量存在之可能之天然發生之突變之外，構成該群體之個別抗體係相同的。單株抗體具有高度特異性，其針對單一抗原位點。多株抗體製劑可包括針對不同決定簇(表位)之不同抗體，與之相反，每一單株抗體針對抗原上之單一決定簇。

【0073】如本文所用之「雙特異性」抗體係指對至少兩種不同抗原表位具有結合特異性之抗體。在一個實施例中，表位係來自相同抗原。在另一實施例中，表位係來自兩個不同抗原。製備雙特異性抗體之方法已為

業內所知。舉例而言，雙特異性抗體可以重組方式使用兩個免疫球蛋白重鏈/輕鏈對之共表現來產生。例如，參見Milstein等人，*Nature* 305:537-39 (1983)。或者，雙特異性抗體可使用化學連接來製備。例如，參見Brennan,等人，*Science* 229:81 (1985)。雙特異性抗體包括雙特異性抗體片段。例如，參見Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48 (1993), Gruber等人，*J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

【0074】「雙重可變結構域免疫球蛋白」或「DVD-Ig」係指多價及多特異性結合蛋白，如以下中所述：例如DiGiammarino等人，*Methods Mol. Biol.* 899:145-156, 2012；Jakob等人，*MABs* 5:358-363, 2013；及美國專利第7,612,181號、第8,258,268號、第8,586,714號、第8,716,450號、第8,722,855號、第8,735,546號及第8,822,645號，該等專利中之每一者之全文以引用方式併入。

【0075】「雙重親和性再靶向蛋白」或「DART」係雙特異性抗體之一種形式，其中來自一種抗體之重可變結構域與另一種抗體之輕可變結構域連接，且兩條鏈締合，且闡述於例如Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801, 2014中。

【0076】「雙特異性T細胞接合子或BiTE®」係兩個scFv片段之遺傳融合，從而產生串聯scFv分子，且闡述於例如Baeuerle等人，*Cancer Res.* 69: 4941-4944, 2009中。

【0077】如本文所用之「嵌合抗體」係指其中重鏈及/或輕鏈之一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之其餘部分源自不同來源或物種之抗體。在一些實施例中，嵌合抗體係指包含來自第一物種(例如小鼠、大鼠、食蟹猴等)之至少一個可變區及來自第二物種(例如人類、食蟹

猴等)之至少一個恆定區之抗體。在一些實施例中，嵌合抗體包含至少一個小鼠可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體包含至少一個食蟹猴可變區及至少一個人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體之所有可變區皆來自第一物種，且嵌合抗體之所有恆定區皆來自第二物種。

【0078】如本文所用術語「人類化抗體」係指遺傳工程化非人類抗體，其含有人類抗體恆定結構域及經修飾以含有與人類可變結構域高程度序列同源性之非人類可變結構域。此可藉由將六個非人類抗體互補決定區(CDR)移植至同源人類受體框架區(FR)上來實現(參見WO92/22653及EP0629240)。為了完全重構親代抗體之結合親和性及特異性，可能需要將來自親代抗體(即非人類抗體)之框架殘基取代成人類框架區(反向突變)。結構同源性建模可有助於鑑別框架區中對抗體之結合性質重要之胺基酸殘基。因此，人類化抗體可包含非人類CDR序列，主要係視情況包含一或多個相對於非人類胺基酸序列之胺基酸反向突變之人類框架區、及完全人類恆定區。視情況，可應用不一定係反向突變之額外胺基酸修飾，以獲得具有較佳特徵(例如親和性及生物化學性質)之人類化抗體。

【0079】如本文所用之「人類抗體」係指人類中產生之抗體、包含人類免疫球蛋白基因之非人類動物中產生之抗體(例如XenoMouse[®])、及使用活體外方法(例如噬菌體展示)選擇之抗體，其中抗體譜係基於人類免疫球蛋白序列。「人類抗體」係具有可變區之抗體，其中FR及CDR二者皆源自人類種系免疫球蛋白序列。另外，若抗體含有恆定區，則恆定區亦係源自人類種系免疫球蛋白序列。本揭示內容之人類抗體可包括不由人類種系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，藉由活體外隨機或位點特

異性誘變或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。然而，如本文所用術語「人類抗體」並不欲包括源自另一哺乳動物物種(例如小鼠)種系之CDR序列已移植至人類框架序列上之抗體。術語「人類抗體」及「完全人類抗體」同義使用。

【0080】 出於本文目的，「受體人類框架」係包含源自人類免疫球蛋白框架或人類共有框架之輕鏈可變結構域(VL)框架或重鏈可變結構域(VH)框架之胺基酸序列之框架，如下文所定義。源自人類免疫球蛋白框架或人類共有框架之受體人類框架可包含其相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小或2或更小。在一些實施例中，VL受體人類框架之序列與VL人類免疫球蛋白框架序列或人類共有框架序列相同。

【0081】 「親和性成熟化」抗體係指與不具有改變之親代抗體相比，在一或多個超變區(HVR)中具有一或多個改變之抗體，該等改變可改良抗體對抗原之親和性。在一些實例中，親和性成熟化抗體係指與不具有改變之親代抗體相比，在一或多個互補決定區(CDR)中具有一或多個改變之抗體，該等改變可改良抗體對抗原之親和性。

【0082】 術語「衍生物」係指包括除胺基酸(或核酸)之插入、缺失或取代之外之化學修飾之分子(例如，抗原結合蛋白，例如抗體或其片段)。在某些實施例中，衍生物包含共價修飾，包括(但不限於)與聚合物、脂質或其他有機或無機部分之化學鍵合。在某些實施例中，特定抗原結合蛋白之衍生物可比未經化學修飾之抗原結合蛋白具有更長之循環半衰期。在某些實施例中，衍生物可對期望細胞、組織及/或器官具有改良之

靶向能力。在一些實施例中，抗原結合蛋白之衍生物經共價修飾以包括一或多種聚合物，包括(但不限於)單甲氧基-聚乙二醇、聚葡萄糖、纖維素或其他基於碳水化合物之聚合物、聚-(N-乙基吡咯啉酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/環氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)及聚乙炔醇、以及該等聚合物之混合物。例如，參見美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號及第4,179,337號。

【0083】如本文所用術語「表位」係指抗原上之位點(例如，ALPP或ALPPL2)，靶向該抗原之抗原結合蛋白(例如，抗體或其片段)與該位點結合。表位通常由諸如胺基酸、多肽、糖側鏈、磷醯基或磺醯基等分子之化學活性表面分組組成，並具有特定三維結構特徵及特定電荷特徵。表位可由藉由三級摺疊並置之抗原之鄰接或非鄰接胺基酸形成。在暴露於變性溶劑時，通常保留自鄰接胺基酸形成之表位，而在用變性溶劑處理時，通常損失藉由三級摺疊形成之表位。在某些實施例中，表位可包括(但不限於)至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個呈獨特空間排列之胺基酸。在一些實施例中，表位係指3-5、4-6或8-10個呈獨特空間構形之胺基酸。在其他實施例中，表位之長度小於20個胺基酸、小於15個胺基酸或小於12個胺基酸，長度小於10個胺基酸或小於8個胺基酸。在一實施例中，本發明之抗ALPP/ALPPL2抗體之表位包含SEQ ID NO: 73及/或SEQ ID NO: 74。表位可包含直接參與結合之胺基酸殘基(亦稱為表位之免疫顯性組分)及不直接參與結合之其他胺基酸殘基，包括由抗原結合分子有效阻斷或覆蓋之胺基酸殘基(即，胺基酸在抗原結合分子之足跡內)。確定表位空間構形之方法包括(例如) x射線晶體學、二維核磁共振及HDX-MS

(例如，參見 *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第66卷, G.E. Morris編輯(1996))。一旦確定抗原之期望表位，可使用已確立之技術產生針對該表位結合之抗原結合蛋白(例如抗體或其片段)。然後可在競爭分析中篩選所得抗原結合蛋白，以鑑別結合相同或重疊表位之抗原結合蛋白。WO 03/48731中闡述了基於交叉競爭研究對抗體進行分倉之方法。

【0084】「非線性表位」或「構形表位」包含抗原蛋白內之非鄰接多肽、胺基酸及/或糖，對該表位具有特異性之抗體與其結合。

【0085】「線性表位」包含抗原蛋白內之鄰接多肽、胺基酸及/或糖，對該表位具有特異性之抗原結合蛋白(例如抗體或其片段)與其結合。

【0086】術語「競爭」當在競爭相同表位之抗原結合蛋白(例如抗體或其片段)之上下文中使用時，意指抗原結合蛋白之間之競爭，如藉由其中所測試之抗原結合蛋白(例如抗體或其片段)(例如測試抗體)防止或抑制(部分或完全)參考抗原結合蛋白(例如參考抗體)與共同抗原(例如ALPP或ALPPL2或其片段)之特異性結合之分析所確定。多種類型之競爭性結合分析可用於確定一種抗原結合蛋白是否與另一種抗原結合蛋白競爭，包括各種無標記生物感測器方法，例如表面電漿共振(SPR)分析(例如，參見 Abdiche, 等人，2009, *Anal. Biochem.* 386:172-180；Abdiche 等人，2012, *J. Immunol Methods* 382:101-116；及 Abdiche 等人，2014 *PLoS One* 9:e92451)。可使用之其他分析包括：固相直接或間接放射免疫分析(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析(EIA)、夾心競爭分析(例如，參見 Stahli 等人，1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253)；固相直接生物素-親和素 EIA(例如，參見 Kirkland 等人，1986, *J. Immunol.* 137:3614-

3619)固相直接標記之分析、固相直接標記之夾心分析(例如，參見Harlow及Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)；使用I-125標記之固相直接標記RIA (例如，參見Morel等人，1988, *Mol. Immunol.* 25:7-15)；固相直接生物素-親和素EIA(例如，參見Cheung等人，1990, *Virology* 176:546-552)；直接標記之RIA (Moldenhauer等人，1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)。通常，測試抗原結合蛋白過量存在(例如，至少2倍、5倍、10倍、20倍或100倍)。通常，當競爭性抗原結合蛋白過量存在時，其將抑制參考抗原結合蛋白與共同抗原之特異性結合至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。在其中每一抗原結合蛋白(例如，抗體或其片段)可檢測地抑制另一種抗原結合蛋白與其同源表位之結合之情況下，無論抑制程度係相同的、更大或更小，抗原結合蛋白稱為彼此「交叉競爭」其各別表位之結合或彼此「交叉阻斷」。通常，使用上文針對競爭研究所述之條件及方法進行此類交叉競爭研究，且每種方法之阻斷程度為至少30%、至少40%或至少50%。本文實例中闡述了鑑別競爭抗原結合蛋白之額外方法及關於方法之詳情。

【0087】「親和性」係指分子(例如，抗體)之單一結合位點與其結合配偶體(例如，抗原)之間之非共價相互作用之強度總和。分子X對於其配偶體Y之親和性通常可由解離常數(K_d)表示。親和性可藉由業內已知之常用方法(包括本文所述之彼等)來量測。

【0088】「親和性成熟化」抗體係指與不具有改變之親代抗體相比，在一或多個超變區(HVR)中具有一或多個改變之抗體，該等改變可改良抗體對抗原之親和性。在一些實例中，親和性成熟抗體係指與不具有改

變之親代抗體相比，在一或多個互補決定區(CDR)中具有一或多個改變之抗體，該等改變可改良抗體對抗原之親和性。

【0089】如本文所用術語「特異性結合」、「結合(binding)」或簡稱「結合(binds)」或其他相關術語在抗原結合蛋白與其靶抗原結合之上下文中意指抗原結合蛋白基本上展現與非靶分子之背景結合。然而，特異性結合靶抗原(例如ALPP及/或ALPPL2)之抗原結合蛋白可與來自不同物種之ALPP及/或ALPPL2蛋白交叉反應。通常，當解離常數(K_D)係 10^{-7} M或更小(例如約 10^{-8} M或更小、例如約 10^{-9} M或更小、約 10^{-10} M或更小、約 10^{-11} M或更小或約 10^{-12} 或甚至更小)(如經由使用抗體作為配體及抗原作為分析物之表面電漿共振(SPR)技術(例如BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden)所量測)時，ALPP/ALPPL2抗原結合蛋白特異性結合人類ALPP及/或ALPPL2。

【0090】如本文所用術語「 K_D 」(M)係指特定抗原結合蛋白-抗原相互作用(例如抗體-抗原相互作用)之解離平衡常數。如本文所用之親和性及 K_D 反向相關，使得較高親和性欲指較低 K_D ，而較低親和性欲指較高 K_D 。

【0091】「抗體藥物結合物」或簡稱「ADC」係指與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑結合之抗體。抗體藥物結合物通常與細胞表面上之靶抗原(例如，ALPP及/或ALPPL2)結合，之後抗體藥物結合物內化至釋放藥物之細胞中。

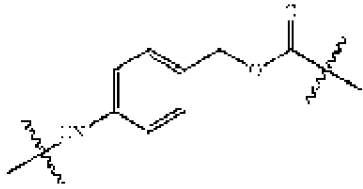
【0092】縮寫「vc」及「val-cit」係指二肽纈胺酸-瓜胺酸。

【0093】縮寫LAE係指三肽連接體白胺酸-丙胺酸-麩胺酸。簡稱dLAE係指三肽連接體D-白胺酸-丙胺酸-麩胺酸，其中三肽連接體中之白

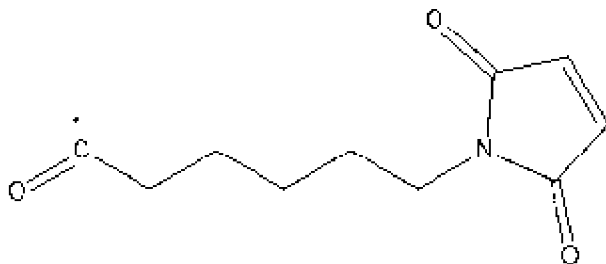
胺酸呈D-構形。

【0094】縮寫VKG係指三肽連接體纈胺酸-離胺酸-甘胺酸。

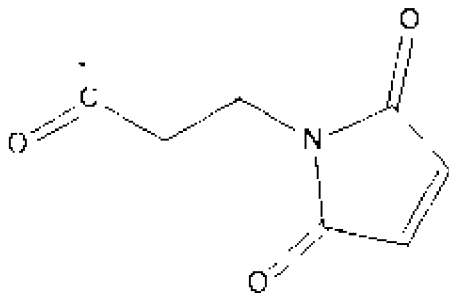
【0095】縮寫「PABC」係指自消性間隔體：



【0096】縮寫「mc」係指延伸體馬來醯亞胺基己醯基：



【0097】縮寫「mp」係指延伸體馬來醯亞胺基丙醯基：



【0098】如本文所用之「PEG單元」係包括重複伸乙基-氧基亞單元(PEG或PEG亞單元)之有機部分，且可為多分散的、單分散的或離散的(即，具有離散數量之伸乙基-氧基亞單元)。多分散PEG係不同大小及分子量之非均質混合物，而單分散PEG通常自非均質混合物中純化，且因此提供單鏈長度及分子量。較佳PEG單元包括離散PEG，即以逐步方式而非經由聚合過程合成之化合物。離散PEG提供具有定義及指定鏈長之單分子。

【0099】本文提供之PEG單元包含一或多個聚乙二醇鏈，各自包括一或多個彼此共價連接之伸乙基氧基。聚乙二醇鏈可例如以線性、具支鏈或星形構形連接在一起。通常，在納入喜樹鹼結合物中之前，至少一個聚乙二醇鏈在一端用經親電基團取代之烷基部分衍生，以共價連接至亞甲基胺基甲酸酯單元之胺基甲酸酯氮(即代表R之情況)。通常，每個聚乙二醇鏈中不參與共價連接至連接體單元之其餘部分之末端伸乙基氧基經PEG封端單元修飾，該單元通常為視情況經取代之烷基，例如-CH₃、CH₂CH₃或CH₂CH₂CO₂H。較佳PEG單元具有單一聚乙二醇鏈，其具有2-24個-CH₂CH₂O-亞單元，該等亞單元共價串聯並在一端經PEG封端單元封端。

【0100】「細胞毒性效應」係指靶細胞之耗竭、消除及/或殺死。

【0101】「細胞毒性劑」係指對細胞具有細胞毒性效應之試劑。

【0102】「細胞生長抑制效應」係指對細胞增殖之抑制。

【0103】「細胞生長抑制劑」係指對細胞具有細胞生長抑制效應、藉此抑制細胞之特定亞組之生長及/或擴增的試劑。細胞生長抑制劑可與抗體結合或與抗體組合投與。

【0104】術語「Fc區」在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈之含有恆定區之至少一部分的C末端區。該術語包括天然序列Fc區及變體Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或自Pro230延伸至重鏈之羧基末端。然而，可存在或可不存在Fc區之C-末端離胺酸(Lys447)。除非在本文中另外說明，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統(亦稱為EU索引)，如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991中所述。

【0105】「功能性Fc區」具有天然序列Fc區之「效應物功能」。實例性「效應物功能」包括Fc受體結合；C1q結合；補體依賴性細胞毒性(CDC)；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)；下調細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)等。此類效應物功能通常要求Fc區與結合結構域(例如抗體可變結構域)組合，並可使用各種分析進行評估。

【0106】「天然序列Fc區」包含與自然界中發現之Fc區之胺基酸序列相同之胺基酸序列。天然序列人類Fc區包括天然序列人類IgG1 Fc區(非A及A同種異型)；天然序列人類IgG2 Fc區；天然序列人類IgG3 Fc區；及天然序列人類IgG4 Fc區及其天然存在之變體。

【0107】「變體Fc區」包含由於至少一個胺基酸修飾與天然序列Fc區不同之胺基酸序列。

【0108】「Fc受體」或「FcR」闡述與抗體之Fc區結合之受體。在一些實施例中，Fc γ R係天然人類FcR。在一些實施例中，FcR係結合IgG抗體(γ 受體)者，且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞類之受體，包括彼等受體之等位基因變體及或者剪接形式。Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA(「活化受體」)及Fc γ RIIB(「抑制受體」)，二者具有類似胺基酸序列，主要在其胞質結構域上有所不同。活化受體Fc γ RIIA在其胞質結構域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基序(ITAM)。抑制受體Fc γ RIIB在其胞質結構域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基序(ITIM)。(例如，參見Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR綜述於以下中：例如Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，*J. Lab. Clin. Med.*

126:330-41 (1995)。本文中之術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括將在未來鑑別之彼等。術語「Fc受體」或「FcR」亦包括新生受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))及免疫球蛋白之穩態調節。量測與FcRn結合之方法係已知的(例如，參見Ghetie及Ward., *Immunol.Today* 18(12):592-598 (1997)；Ghetie等人，*Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997)；Hinton等人，*J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)；WO 2004/92219 (Hinton等人)。

【0109】「效應物功能」係指可歸因於抗體之Fc區之生物活性，其隨抗體同型而變化。抗體效應物功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)；下調細胞表面受體(例如B細胞受體)；及B細胞活化。此類功能可能受到以下影響：例如，Fc效應物結構域與具有吞噬或溶解活性之免疫細胞上之Fc受體之結合、或Fc效應物結構域與補體系統之組分之結合。通常，由Fc結合細胞或補體組分介導之效應會導致CD33靶向細胞之抑制及/或耗竭。抗體之Fc區可招募表現Fc受體(FcR)之細胞，並將其與抗體塗覆之靶細胞並置。表現IgG之表面FcR (包括FcγRIII (CD16)、FcγRII (CD32)及FcγRIII (CD64))之細胞可用作破壞IgG塗覆之細胞之效應細胞。該等效應細胞包括單核球、巨噬細胞、天然殺手(NK)細胞、嗜中性球及嗜酸性球。IgG對FcγR之接合活化抗體依賴性細胞毒性(ADCC)或抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)。ADCC係由CD16⁺效應細胞經由分泌膜成孔蛋白及蛋白酶介導，而吞噬作用係由CD32⁺及CD64⁺效應細胞介導(例如，參見*Fundamental Immunology*, 第4

版, Paul編輯, Lippincott-Raven, N.Y., 1997, 第3、17及30章; Uchida等人, 2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop等人, 2001, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe等人, 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207。

【0110】「人類效應細胞」係表現一或多個FcR並實施效應物功能之白血球。在某些實施例中, 細胞至少表現FcγRIII並實施ADCC效應物功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括外周血單核細胞(PBMC)、天然殺手(NK)細胞、單核球、細胞毒性T細胞及嗜中性球。效應細胞可自天然來源、例如自血液中分離。

【0111】「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指細胞毒性之機制, 其中與靶細胞之細胞表面上之抗原結合之抗體之Fc區與某些細胞毒性效應細胞(例如NK細胞、嗜中性球及巨噬細胞)上存在之Fc受體(FcR)相互作用。此相互作用使該等細胞毒性效應細胞能夠隨後用細胞毒素殺死靶細胞。用於介導ADCC之原代細胞(NK細胞)僅表現FcγRIII, 而單核球表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)之第464頁之表3中。為了評估感興趣之分子之ADCC活性, 實施活體外ADCC分析, 如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或美國專利第6,737,056 (Presta)號中所述之分析。用於該等分析之可用效應細胞包括PBMC及NK細胞。感興趣之分子之ADCC活性亦可在活體內、例如在動物模型(諸如揭示於Clynes等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998)中之動物模型)中評價。具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或減少之ADCC活性之額外多肽變體(具有變體Fc區之多肽)闡述於例如美國專利第7,923,538號及

美國專利第7,994,290號中。

【0112】「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下靶細胞之溶解。經典補體途徑之活化係藉由補體系統之第一組分(C1q)與抗體(屬適當亞類)之Fc區結合而啟動，抗體與靶細胞上之其同源抗原結合。此種結合活化了一系列酶促反應，從而最終在靶細胞膜上形成孔且隨後細胞死亡。補體之活化亦可導致補體組分沈積在靶細胞表面，其藉由結合白血球上之補體受體(例如CR3)促進ADCC效應。為評估補體活化，可實施CDC分析，例如如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所述。具有改變之Fc區胺基酸序列之多肽變體及增加或減少之C1q結合能力(多肽，例如具有變體Fc區之抗體)闡述於例如美國專利第6,194,551 B1號、美國專利第7,923,538號、美國專利第7,994,290號及WO 1999/51642。亦參見例如Idusogie等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

【0113】術語「抗體依賴性細胞吞噬作用」或簡稱「ADCP」係指抗體塗覆之細胞藉由與Ig之Fc區結合之吞噬免疫細胞(例如巨噬細胞、嗜中性球及樹突細胞)全部或部分內化之過程。

【0114】具有「改變之」FcR結合親和性或ADCC活性之多肽變體(例如抗體)係與親代多肽或包含天然序列Fc區之多肽相比具有增強或減弱之FcR結合活性及/或ADCC活性者。「展示與FcR之結合增加」之多肽變體以比親代多肽更好之親和性結合至少一個FcR。「展示與FcR之結合降低」之多肽變體以比親代多肽更低之親和性結合至少一個FcR。在一些實施例中，展示與FcR之結合降低之該等變體可具有很少或沒有明顯之與FcR之結合，例如，與天然序列IgG Fc區相比，與FcR之結合為0-20%。

【0115】術語「核酸分子」、「核酸」及「多核苷酸」在本文中可互換使用，且係指任何長度之核苷酸之聚合物。核苷酸之該等聚合物可含有天然及/或非天然核苷酸，且包括(但不限於) DNA、RNA及PNA。「核酸序列」係指構成核酸分子或多核苷酸之核苷酸之線性序列。

【0116】術語「載體」意指用於將核酸分子轉移至宿主細胞中之任何分子或實體(例如核酸、質體、噬菌體或病毒)。載體通常包括經工程化以含有一或多種選殖之多核苷酸之核酸分子，該多核苷酸編碼可在宿主細胞中增殖之一或多種感興趣之多肽。載體之實例包括(但不限於)質體、病毒載體及表現載體，例如重組表現載體。載體可包括以下元件中之一或多者：複製起點、一或多個調節感興趣之多肽表現之調節序列(例如啟動子及/或增強子)、及/或一或多個可選標記物基因。該術語包括作為自我複製核酸分子之載體以及納入引入該核酸分子之宿主細胞之基因體中之載體。

【0117】術語「表現載體」係指適於轉變宿主細胞並可用於在宿主細胞中表現感興趣之多肽之載體。

【0118】術語「宿主細胞」或「宿主細胞系」在本文中可互換使用，且係指可為或已經為載體或分離之多核苷酸之受體的細胞或細胞群體。宿主細胞可為原核細胞或真核細胞。實例性真核細胞包括哺乳動物細胞，例如靈長類動物或非靈長類動物細胞；真菌細胞，例如酵母；植物細胞；及昆蟲細胞。非限制性實例性哺乳動物細胞包括(但不限於) NSO細胞、PER.C6[®]細胞(Crucell)及293及CHO細胞及其衍生物，例如分別為293-6E及DG44細胞。該等術語不僅係指原始細胞，亦係指該細胞之後代。由於例如突變或環境影響，某些修飾可在接續世代中發生。該等術語亦涵蓋該後代，只要細胞具有與原始細胞相同之功能或生物活性即可。

【0119】術語「控制序列」係指克影響與其接合之編碼序列之表現及處理之多核苷酸序列。該等控制序列之性質可取決於宿主生物體。在特定實施例中，原核生物之控制序列可包括啟動子、核糖體結合位點及轉錄終止序列。真核生物之控制序列可包括(例如)包含轉錄因子之一個或複數個識別位點之啟動子、轉錄增強子序列及轉錄終止序列。「控制序列」可包括前導序列及/或融合配偶體序列。

【0120】如本文所用，「可操作連接」意指該術語所應用之組分處於允許其在適宜條件下實施其固有功能之關係。舉例而言，與蛋白質編碼序列「可操作連接」之載體中之控制序列與其連接，使得在與控制序列之轉錄活性相容之條件下實現蛋白質編碼序列之表現。在兩個編碼序列可操作連接之情形下，該片語意指兩個DNA片段或編碼序列接合，使得由兩個片段編碼之胺基酸序列保持在框架內。

【0121】術語「轉染」意指細胞攝取外來或外源DNA，且當外源DNA引入細胞膜內時，細胞已經「轉染」。許多轉染技術在業內係眾所周知的，並揭示於本文中。例如，參見Graham等人，1973, *Virology* 52:456；Sambrook等人，2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 見上文；Davis等人，1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier；Chu等人，1981, *Gene* 13:197。該等技術可用於將一或多個外源DNA部分引入適宜宿主細胞中。

【0122】術語「轉變」係指細胞之遺傳特徵之變化，且細胞當經修飾以含有新DNA或RNA時，該係細胞經轉變。舉例而言，在經由轉染、轉導或其他技術引入新遺傳物質而使細胞自其天然狀態經遺傳修飾之情況下，細胞經轉變。轉染或轉導後，轉變之DNA可藉由物理整合至細胞之

染色體中而與細胞之DNA重組，或者可作為游離型元件瞬時維持而不複製，或者可作為質體獨立複製。當轉變之DNA隨細胞分裂複製時，認為細胞已經「穩定轉變」。

【0123】如本文所用術語「經分離」係指已與至少一些通常在自然界中發現或產生之組分分離之分子。舉例而言，當多肽與產生該多肽之細胞之至少一些組分分離時，該多肽稱為「經分離」。在多肽在表現後由細胞分泌之情況下，將含有多肽之上清液與產生該多肽之細胞物理分離被認為係「分離」該多肽。類似地，當多核苷酸並非自然界中通常發現其之較大多核苷酸(例如，在DNA多核苷酸之情形下，基因體DNA或線粒體DNA)之一部分，或與產生其之細胞之至少一些組分分離時，如在RNA多核苷酸之情形下，則該多核苷酸稱為「經分離」。因此，宿主細胞內載體中所含之DNA多核苷酸可稱為「經分離」。

【0124】術語「個體(individual)」、「個體(subject)」或患者在本文中可互換使用，係指動物，例如哺乳動物。在一些實施例中，提供治療哺乳動物之方法，該等哺乳動物包括(但不限於)人類、齧齒類動物、猿猴、貓、犬、馬、牛、豬、綿羊、山羊、哺乳動物實驗室動物、哺乳動物農場動物、哺乳動物比賽用動物及哺乳動物寵物。在一些情況下，「個體(individual)」或「個體(subject)」係人類。在一些實例中，「個體(individual)」或「個體(subject)」係指需要治療疾病或病症之「個體(individual)」或「個體(subject)」(例如，人類)。

【0125】如本文所用之「疾病」或「病症」係指需要治療之病況。

【0126】如本文所用之「癌症」及「腫瘤」係可互換之術語，係指動物中任何異常之細胞或組織生長或增殖。如本文所用術語「癌症」及

「腫瘤」涵蓋實體癌及血液學/淋巴癌，且亦涵蓋惡性、癌前及良性生長，例如發育不良。實體腫瘤係通常不含囊腫或液體區域之組織之異常生長或塊。癌症之實例包括(但不限於)癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定之非限制性實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、腦垂體癌、食道癌、星形細胞瘤、軟組織肉瘤、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀細胞癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰臟癌、膠質母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer, renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、腦癌、子宮內膜癌、睪丸癌、膽管癌、膽囊癌、胃癌、黑色素瘤及各種類型之頭頸癌。

【0127】「腫瘤負荷(Tumor burden)」亦稱「腫瘤負荷(tumor load)」，係指分佈於整個體內之腫瘤物質之總量。腫瘤負荷係指整個體內(包括淋巴結及骨髓)之癌細胞之總數目或腫瘤之總大小。腫瘤負荷可藉由業內已知之多種方法測定，例如藉由在腫瘤自個體移除後(例如)使用卡尺、或在體內時使用成像技術(例如超音波、骨掃描、電腦斷層攝影(CT)或磁共振成像(MRI)掃描)量測腫瘤之尺寸。

【0128】術語「轉移性癌症」及「轉移性疾病」意指已自起源部位擴散至身體之另一部分，例如擴散至局部淋巴結或擴散至遠處部位之癌症。

【0129】術語「晚期癌症」、「局部晚期癌症」、「晚期疾病」及「局部晚期疾病」係指已經延伸穿過相關組織被膜之癌症。對於患有局部晚期疾病之患者，通常不建議進行手術，且與患有臨床局部(器官侷限)癌

症之患者相比，該等患者具有實質上較不有利之結果。

【0130】如本文所用，「治療」係獲得有益或期望臨床結果之方法。如本文所用之「治療」涵蓋哺乳動物(包括人類)之疾病之治療劑之任何投與或施加。有益或期望臨床結果包括(但不限於)以下之任何一或多者：緩和一或多種症狀、減輕疾病之程度、防止或延遲疾病之擴散(例如，轉移，例如轉移至肺或轉移至淋巴結)、防止或延遲疾病之復發、延遲或減緩疾病之進展、改善疾病狀態、抑制疾病或疾病之進展、抑制或減緩疾病或其進展、停止其發展以及緩解(無論係部分或全部)。「治療」亦涵蓋減少增殖性疾病之病理後果。

【0131】在癌症之上下文中，術語「治療」包括以下中之任何一者或全部：抑制癌細胞之生長、抑制癌細胞之複製、減少癌細胞之數量、降低癌細胞浸潤至外周器官之速率、降低腫瘤轉移之速率或程度、減輕總腫瘤負荷、及改善與癌症相關之一或多種症狀。

【0132】在自體免疫疾病之上下文中，術語「治療」包括以下中之任一者或全部：防止與自體免疫疾病狀態相關之細胞之複製，該等細胞包括(但不限於)能夠產生自體免疫性抗體之細胞；減輕自身免疫性抗體負荷及改善自體免疫疾病之一或多種症狀。

【0133】在傳染病之上下文中，術語「治療」包括以下中之任一者或全部：防止引起傳染病之病原體之生長、繁殖或複製以及改善傳染病之一或多種症狀。

【0134】術語「抑制」(「inhibition」或「inhibit」)係指任何表型特性之減少或停止，或係指該特性之發生率、程度或可能性之減少或停止。「降低」或「抑制」係指與參考相比，減少、降低或阻止活性、功能

及/或量。在某些實施例中，「降低」或「抑制」意指導致總體減少20%或更大之能力。在另一實施例中，「減少」或「抑制」意指導致總體減少50%或更大之能力。在另一實施例中，「減少」或「抑制」係指導致總體減少75%、85%、90%、95%或更大之能力。

【0135】如本文所用之「參考」係指用於比較目的之任何樣品、標準品或含量。參考可自健康及/或非患病樣品獲得。在一些實例中，參考可自未處理之樣品獲得。在一些實例中，參考係自標的個體之未患病或未處理之樣品獲得。在一些實例中，參考係自不為個體或患者之一或多個健康個體獲得。

【0136】如本文所用之「延遲疾病之發展」意指延緩、阻礙、減緩、延緩、穩定、抑制及/或延期疾病(例如癌症)之發展。此延遲之時間長短不同，取決於疾病史及/或所治療之個體。對熟習此項技術者顯而易見的是，足夠或顯著之延遲實際上可涵蓋預防，因為個體不發展疾病。舉例而言，可延遲晚期癌症(例如轉移之發展)。

【0137】如本文所用之「預防」包括提供關於可能易患疾病但尚未診斷患有疾病之個體中疾病之發生或復發之預防。

【0138】如本文所用之「抑制」功能或活性係指當與除感興趣之條件或參數之外之其他相同條件相比時，或替代地與另一條件相比時，降低功能或活性。舉例而言，與在不存在抗體下腫瘤之生長速率相比，抑制腫瘤生長之抗體降低腫瘤之生長速率。

【0139】藥物或治療劑之「有效量」或「治療有效量」或「治療有效劑量」係當單獨使用或與另一治療劑組合使用時提供治療效應之藥物或治療劑之任何量，該治療效應例如保護個體免於疾病發作或促進疾病消

退，如藉由疾病症狀之嚴重程度之降低、疾病無症狀期之頻率及持續時間之增加、或由於疾病痛苦導致之損傷或失能之預防來證明。治療劑促進疾病消退之能力可使用熟練從業者已知之多種方法、例如在臨床試驗期間在人類個體中、在預測於人類中之效能之動物模型系統中、或藉由在活體外分析中分析試劑之活性來評價。

【0140】 作為腫瘤之治療之實例，在一些實施例中，治療有效量之抗癌劑在經治療之個體(例如一或多個經治療之個體)中相對於未經治療之個體(例如一或多個未經治療之個體)抑制細胞生長或腫瘤生長至少約10%、至少約20%、至少約30%、至少約40%、至少約50%、至少約60%、至少約70%、或至少約80%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%。在一些實施例中，治療有效量之抗癌劑在經治療之個體(例如一或多個經治療之個體)中相對於未經治療之個體(例如一或多個未經治療之個體)抑制細胞生長或腫瘤生長100%。在本揭示內容之其他實施例中，可觀察到腫瘤消退並持續至少約20天、至少約30天、至少約40天、至少約50天或至少約60天之時段。

【0141】 藥物之治療有效量包括「預防有效量」，其係當單獨或與抗癌劑組合投與給處於發展癌症之風險下之個體(例如，具有癌前病況之個體)或遭受癌症復發之個體時，抑制癌症之發展或復發之藥物之任何量。在一些實施例中，預防有效量完全防止癌症之發展或復發。「抑制」癌症之發展或復發意指降低癌症發展或復發之可能性、或完全防止癌症之發展或復發。

【0142】 如本文所用之「亞治療劑量」意指低於當單獨投與用於治療過度增殖性疾病(例如，癌症)時之治療化合物之常見或典型劑量的治療

化合物之劑量。

【0143】「投與」(Administering或administration)係指使用熟習此項技術者已知之各種方法及遞送系統中之任一者將治療劑物理引入個體。實例性投與途徑包括靜脈內、肌內、皮下、腹膜內、脊柱或其他非經腸投與途徑，例如藉由注射或輸注(例如，靜脈內輸注)。亦可實施例如一次、複數次投與及/或經一或多個延長時段實施投與。

【0144】如本文所用術語「單一療法」意指本發明之抗ALPP/ALPPL2抗體或ADC係在治療週期期間投與個體之唯一抗癌劑。然而，亦可向個體投與其他治療劑。舉例而言，投與給患有癌症之個體以治療與癌症相關之症狀而非潛在癌症本身(包括例如發炎、疼痛、體重減輕及全身不適)之抗炎劑或其他藥劑可在單一療法期間投與。

【0145】「與一或多種其他治療劑組合」之投與包括以任何順序同時(並行)及連續或依序投與。

【0146】術語「並行」在本文中用於指投與兩種或更多種治療劑，其中投與之至少部分在時間上重疊，或其中一種治療劑之投與相對於另一治療劑之投與在短時間段內。舉例而言，同時或以不超過約60分鐘、例如不超過約30分鐘、15分鐘、10分鐘、5分鐘或1分鐘中之任一者之時間間隔，投與兩種或更多種治療劑。

【0147】術語「依序」在本文中用於指投與兩種或更多種治療劑，其中一或多種試劑之投與在中斷一或多種其他試劑之投與之後繼續。舉例而言，兩種或更多種治療劑之投與係以超過約15分鐘、例如約20分鐘、30分鐘、40分鐘、50分鐘或60分鐘、1天、2天、3天、1週、2週或1個月或更長中之任一者之時間間隔投與。

【0148】術語「化學治療劑」係指有效抑制腫瘤生長之所有化合物。化學治療劑之非限制性實例包括烷基化劑(例如，氮芥、次乙亞胺化合物及烷基磺酸鹽)；抗代謝物(例如，葉酸、嘌呤或嘧啶拮抗劑)；有絲分裂抑制劑(例如抗微管蛋白劑，例如長春花生物鹼(vinca alkaloid)、奧裡斯他汀(auristatin)及鬼臼毒素之衍生物)；細胞毒性抗生素；損害或干擾DNA表現或複製之化合物(例如DNA小溝黏合劑)；及生長因子受體拮抗劑、及細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。

【0149】片語「醫藥上可接受之」指示物質或組合物在化學上及/或毒理學上與構成調配物之其他成分及/或用其治療之個體相容。

【0150】術語「醫藥調配物」及「醫藥組合物」係指一種製劑，其呈允許活性成分之生物活性有效之形式，且其不含對將投與該調配物之個體具有不可接受毒性的額外組分。該等調配物可為無菌的。

【0151】「醫藥上可接受之載劑」係指無毒之固體、半固體或液體填充劑、稀釋劑、囊封材料、調配物助劑或業內中習用之用於與治療劑一起使用之載劑，其一起構成用於投與給個體之「醫藥組合物」。醫藥上可接受之載劑在所採用之劑量及濃度下對接受者無毒，且與調配物之其他成分相容。醫藥上可接受之載劑適於所採用之調配物。

【0152】如本文所用片語「醫藥上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥上可接受之有機或無機鹽。實例性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸酸鹽、乳酸鹽、柳酸鹽、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、鞣酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、富馬酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、蔗糖酸鹽、

甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽(methanesulfonate)「甲磺酸鹽(mesylate)」、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽、雙羥萘酸鹽(即4,4'-亞甲基-雙-(2-羥基-3-萘甲酸))鹽、鹼金屬(例如鈉及鉀)鹽、鹼土金屬(例如鎂)鹽及銨鹽。醫藥上可接受之鹽可涉及包括另一分子，例如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。相對離子可為穩定母體化合物上之電荷的任一有機或無機部分。另外，醫藥上可接受之鹽可在其結構中具有一個以上帶電原子。其中多個帶電原子係醫藥上可接受之鹽之部分之情況可具有多個相對離子。因此，醫藥上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

【0153】以下部分中進一步詳細闡述本揭示內容之各個態樣。

II.概述

【0154】本發明提供在殺死ALPP+表現細胞方面特別有效之抗體藥物結合物，其包括與vcMMAE (本文中有時稱為mc-vc-PABC-MMAE或mc-vc-MMAE) 或 dLAE-MMAE (本文中有時稱為 mp-dLAE-PABC-MMAE或mp-dLAE-MMAE)結合之抗ALPP抗體。本發明亦提供在殺死ALPPL2+表現細胞方面特別有效之抗體藥物結合物，其包括與vcMMAE或dLAE-MMAE結合之抗ALPPL2抗體。在較佳實施例中，本發明提供在殺死ALPP+及ALPPL2+表現細胞二者方面特別有效之抗體，其結合與vcMMAE或dLAE-MMAE結合之ALPP及ALPPL2二者(抗ALPP/ALPPL2抗體)。已顯示ALPP及ALPPL2二者在多種癌症(包括卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌、睪丸癌及胃癌)中表現。

【0155】本文提供結合ALPP/ALPPL2之抗原結合蛋白(ABP)，包括其抗原結合片段(例如，抗體及其抗原結合片段)。在一些實施例中，抗原

結合蛋白及片段包含特異性結合至ALPP (包括結合至人類ALPP) (例如，SEQ ID NO: 2)之抗原結合結構域。在一些實施例中，抗原結合蛋白及片段包含特異性結合至ALPPL2 (包括結合至人類ALPPL2) (例如，SEQ ID NO: 4)之抗原結合結構域。在一些實施例中，抗原結合蛋白及片段包含特異性結合ALPP及ALPPL2二者、包括結合至人類ALPP (例如，SEQ ID NO: 2)及人類ALPPL2 (例如SEQ ID NO: 4)之抗原結合結構域。

III. 抗ALPP/ALPPL2抗原結合蛋白，包括片段

【0156】 本文提供多種抗原結合蛋白，且下文將對其進行更詳細闡述。本文揭示之抗原結合蛋白通常包含支架，例如一或多種多肽，一或多個(例如，1個、2個、3個、4個、5個或6個)超變區(HVR)或互補決定區(CDR)嵌入、接枝及/或接合至該支架中。在一些抗原結合蛋白中，HVR或CDR嵌入、接枝或接合至「框架」區中，該「框架」區對HVR或CDR進行定向，使得實現HVR或CDR之適當抗原結合性質。在一些實施例中，抗原結合蛋白包含一或多個VH及/或VL結構域。

【0157】 在一些抗原結合蛋白中，HVR或CDR序列嵌入、接枝或接合於(或至)蛋白支架或其他生物相容性聚合物中。在一些實施例中，抗原結合蛋白係抗體，或衍生自抗體。因此，所提供之抗原結合蛋白包括(但不限於)單株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)、微小抗體、結構域抗體、合成抗體(本文中有時稱為「抗體模擬物」)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、抗體融合物、抗體結合物以及上述中之每一者之部分或片段。本文提供之作為片段之抗原結合蛋白之實例包括(但不限於) Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv及結構域抗體。

【0158】 在一些實施例中，抗原結合蛋白以小於10 nM、5 nM、2

nM、1 nM、500 pM、250 pM、200 pM、150 pM、130 pM、100 pM、50 pM、25 pM、10 pM或1 pM之親和性(例如 K_D)結合至ALPP。在一些實施例中，ABP以介於1 pM-10 nM、1 pM-5 nM、1 pM – 1 nM、100 – 200 pM、100 – 150 pM、或120-140 pM之間之親和性結合至ALPP。在一些實施例中，根據實例中所述之分析測定對ALPP之結合親和性。在一些實施例中，抗原結合蛋白以小於10 nM、5 nM、2 nM、1 nM、500 pM、250 pM、100 pM、50 pM、44 pM、25 pM、10 pM或1 pM之親和性(例如 K_D)結合至ALPPL2。在一些實施例中，ABP以介於0.1 pM-5 nM、0.1 pM-1 nM、1 pM-1 nM、1-100 pM、1-75 pM、10-75 pM、10-50 pM、或30-50 pM之間之親和性結合至ALPPL2。在一些實施例中，根據實例中所述之分析測定對ALPPL2之結合親和性。

A. 實例性抗原結合蛋白，包括片段

【0159】 在一個實施例中，本發明之抗原結合蛋白包括本文實例中所述之抗體12F3。在一些實施例中，本發明之抗原結合蛋白包括鼠類、嵌合、人類化及/或人類12F3抗體。

【0160】 在實施例中，如本文揭示之抗原結合蛋白包含CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3，其分別包含SEQ ID NO: 56-58或60-62之胺基酸序列；以及CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其分別包含SEQ ID NO: 63-65或68-70之胺基酸序列。在另一實施例中，如本文揭示之抗原結合蛋白包含CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3，其分別包含SEQ ID NO: 56-58之胺基酸序列；以及CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其分別包含SEQ ID NO: 63-65之胺基酸序列，其中CDR係藉由Kabat確定。在另一實施例中，如本文揭示之抗原結合蛋白包含CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3，其分別包

含SEQ ID NO: 60-62之胺基酸序列；以及CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3，其分別包含SEQ ID NO: 68-70之胺基酸序列，其中CDR係藉由IMGT確定。

【0161】在另一實施例中，本文揭示之抗原結合蛋白包含含有SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之VH及包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之VL。

【0162】在另一實施例中，如本文揭示之抗原結合蛋白包含含有SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之HC及包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之LC。

【0163】在其他實施例中，提供之抗原結合蛋白包括或衍生自下述抗體之CDR、可變重鏈、可變輕鏈、重鏈及/或輕鏈中之一或多者。

【0164】在另一實施例中，ABP包含(a) VH結構域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個VH CDR序列，其中VH CDR序列選自(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 56或SEQ ID NO: 60之CDR-H1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 57或SEQ ID NO: 61之CDR-H2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 62之CDR-H3，及(b) VL結構域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個VL CDR序列，其中VL CDR序列選自(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 63或SEQ ID NO: 68之CDR-L1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 64或SEQ ID NO: 69之CDR-L2；及(iii) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 65或SEQ ID NO: 70之CDR-L3，條件係在其中ABP包含多個CDR之實施例中，每個CDR選自不同組。

【0165】在另一實施例中，ABP包含(a) VH結構域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個VH CDR序列，其中VH CDR序列選自(i)包含胺

基酸序列SEQ ID NO: 56之CDR-H1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 57之CDR-H2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 58之CDR-H3，及(b) VL結構域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個VL CDR序列，其中VL CDR序列選自(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 63之CDR-L1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 64之CDR-L2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 65之CDR-L3，其中CDR係藉由Kabat確定，且條件係在其中ABP包含多個CDR之實施例中，每個CDR選自不同組。

【0166】 在另一實施例中，ABP包含(a) VH結構域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個VH CDR序列，其中VH CDR序列選自(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 60之CDR-H1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 61之CDR-H2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 62之CDR-H3，及(b) VL結構域，其包含至少一個、至少兩個或全部三個VL CDR序列，其中VL CDR序列選自(i)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 68之CDR-L1；(ii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 69之CDR-L2；及(iii)包含胺基酸序列SEQ ID NO: 70之CDR-L3，其中CDR係藉由IMGT確定，且條件係在其中ABP包含多個CDR之實施例中，每個CDR選自不同組。

【0167】 在另一實施例中，ABP包含(a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 56或SEQ ID NO: 60之CDR-H1；(b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 57或SEQ ID NO: 61之CDR-H2；及(c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 62之CDR-H3，(d) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 63或SEQ ID NO: 68之CDR-L1，(e) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 64或SEQ ID NO: 69之CDR-L2；及(f) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 65或SEQ ID NO: 70之CDR-L3。

【0168】在另一實施例中，ABP包含(a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 56之CDR-H1；(b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 57之CDR-H2；及(c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 58之CDR-H3，(d) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 63之CDR-L1，(e) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 64之CDR-L2；及(f) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 65之CDR-L3；其中CDR係藉由Kabat確定。

【0169】在另一實施例中，ABP包含(a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 60之CDR-H1；(b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 61之CDR-H2；及(c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 62之CDR-H3，(d) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 68之CDR-L1，(e) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 69之CDR-L2；及(f) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 70之CDR-L3；其中CDR係藉由IMGT確定。

【0170】某些ABP包含含有CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3之VH，其中VH之CDR相對於相應CDR參考序列共同具有至多1、2、3、4或5個胺基酸變化，且其中CDR-H1參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 56或SEQ ID NO: 60，CDR-H2參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 57或SEQ ID NO: 61，且CDR-H3參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 62。在該等實施例中，胺基酸變化通常係插入、缺失及/或取代。在該等實施例中之一些中，胺基酸變化之集合數係1-3；在其他實施例中，胺基酸變化之集合數係1或2。在某些前述實施例中，變化係保守胺基酸取代。

【0171】在其他實施例中，ABP包括含有CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3之VL，其中VL之CDR相對於相應CDR參考序列共同具有至多

1、2、3、4或5個胺基酸改變，且其中CDR-L1參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 63或SEQ ID NO: 68，CDR-L2參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 64或SEQ ID NO: 69，且CDR-L3參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 65或SEQ ID NO: 70。在該等實施例中，胺基酸變化通常係插入、缺失及/或取代。在該等實施例中之一些中，胺基酸變化之集合數係1-3；在其他實施例中，胺基酸變化之集合數係1或2。在某些前述實施例中，變化係保守胺基酸取代。

【0172】 在另一實施例中，ABP包含(a)包含CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3之VH，其中VH之CDR相對於相應CDR參考序列共同具有至多1、2、3、4或5個胺基酸變化，且其中CDR-H1參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 56或SEQ ID NO: 60，CDR-H2參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 57或SEQ ID NO: 61，且CDR-H3參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 62，以及(b)包含CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3之VL，其中VL之CDR相對於相應CDR參考序列共同具有至多1、2、3、4或5個胺基酸變化，且其中CDR-L1參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 63或SEQ ID NO: 68，CDR-L2參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 64或SEQ ID NO: 69，且CDR-L3參考序列具有胺基酸序列SEQ ID NO: 65或SEQ ID NO: 70。在該等實施例中，胺基酸變化通常係插入、缺失及/或取代。在該等實施例中之一些中，胺基酸變化之集合數係1-3；在其他實施例中，胺基酸變化之集合數係1或2。在某些前述實施例中，變化係保守胺基酸取代。

【0173】 在另一實施例中，ABP包含VH結構域，其中VH結構域序列與選自SEQ ID NO:9-16中任一者之胺基酸序列具有至少80%、85%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，前提係ABP保留結合至ALPP及/或ALPPL2之能力。在某些實施例中，該ABP含有相對於參考序列(即SEQ ID NO: 9-16中之一者)之取代(例如保守性取代)、插入及/或缺失，條件係該ABP保留結合至ALPP及/或ALPPL2之能力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 9-16中之任一者中已取代、插入及/或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸。在一些實施例中，VH序列中已取代、插入及/或缺失1-5或1-3個胺基酸。在該等實施例中之某些中，該等取代、插入或缺失發生在CDR之外之區(即，在FR中)。

【0174】 在另一實施例中，ABP包含VL結構域，其中VL結構域序列與選自SEQ ID NO:22-33中任一者之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，前提係ABP保留結合至ALPP及/或ALPPL2之能力。在某些實施例中，該ABP含有相對於參考序列(即SEQ ID NO: 22-33中之一者)之取代(例如保守性取代)、插入及/或缺失，條件係該ABP保留結合至ALPP及/或ALPPL2之能力。在某些實施例中，SEQ ID NO: 22-33中之任一者中已取代、插入及/或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個胺基酸。在一些實施例中，VL序列中已取代、插入及/或缺失1-5或1-3個胺基酸。在該等實施例中之某些中，該等取代、插入或缺失發生在CDR之外之區(即，在FR中)。

【0175】 在另一實施例中，ABP包含(a) VH結構域，其中VH結構域序列與選自SEQ ID NO: 9-16中任一者之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序

列一致性，及(b) VL結構域，其中VL結構域序列與選自SEQ ID NO: 22-33中任一者之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，前提係ABP保留結合至ALPP及/或ALPPL2之能力。

【0176】 在另一實施例中，ABP包含(a) VH結構域，其中VH結構域序列與胺基酸序列SEQ ID NO: 15具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，以及(b) VL結構域，其中VL結構域序列與胺基酸序列SEQ ID NO: 30具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性，前提係ABP保留結合至ALPP及/或ALPPL2之能力。

【0177】 上述實施例中之任一者中之抗原結合蛋白可為呈任何形式之抗體。因此，上述實施例中之任一者中所述之抗原結合蛋白可為(例如)單株抗體、多特異性抗體、人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體、以及上述中任一者之ALPP結合片段，例如單鏈抗體、Fab片段、F(ab')片段或由Fab表現文庫產生之片段。抗體可為任何免疫球蛋白同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞類。

【0178】 在某些實施例中，具有本文所述之CDR及/或可變結構域序列之ABP係抗原結合片段(例如人類抗原結合片段)，且包括(但不限於)Fab、Fab'及F(ab')₂、Fd、單鏈Fvs (scFv)、單鏈抗體、二硫鍵連接之Fvs (sdFv)及包含VL結構域或VH結構域之片段。抗原結合片段(包括單鏈抗體)可包含單獨或與以下之全部或一部分組合之可變區：鉸鏈區、CH1、CH2、CH3及CL結構域。本揭示內容中亦包括抗原結合片段，其

包含可變區與鉸鏈區、CH1、CH2、CH3及CL結構域之任何組合。

【0179】ABP可為單特異性、雙特異性、三特異性或更大多特異性的。多特異性抗體可對ALPP及/或ALPPL2之不同表位具有特異性，或可對ALPP及/或ALPPL2二者以及對異源蛋白皆具有特異性。例如，參見PCT公開案WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt等人，1991, *J. Immunol.* 147:60-69；美國專利第4,474,893號、第4,714,681號、第4,925,648號、第5,573,920號、第5,601,819號；及Kostelny等人，1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553。

【0180】在本文所述之實施例中之任一者中，在輕鏈及/或重鏈之胺基或羧基末端之一個或若干胺基酸(例如，1個、2個、3個或4個)(例如重鏈之C-末端離胺酸)在組合物中之一些或所有分子中可丟失或經衍生化。該修飾之一個具體實例係ABP，其中重鏈之羧基末端離胺酸丟失(例如，作為轉譯後修飾之一部分)。此外，應理解，本文所述之序列中之任一者包括在細胞培養物(例如CHO細胞培養物)中表現ABP期間對指定序列之轉譯後修飾。

B. 嵌合抗原結合蛋白

【0181】在某些實施例中，本文提供之抗原結合蛋白係嵌合抗體。在一些實施例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如，源自小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物(例如猴子)之可變區)及人類恆定區。在又一實例中，嵌合抗體係類別或亞類已自親代抗體發生變化之「類別轉換」抗體。某些嵌合抗體闡述於以下中：例如美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

【0182】非限制性實例性嵌合抗體包括包含如本文所述之重鏈及/或輕鏈可變區中之任一者之嵌合抗體。額外非限制性實例性嵌合抗體包括包含如本文提供之重鏈HVR序列(例如，CDR)或其部分及/或輕鏈HVR序列(例如，CDR)之嵌合抗體。

C. 人類化抗原結合蛋白

【0183】在某些實施例中，ABP係結合ALPP及/或ALPPL2之人類化抗體。通常，將非人類抗體人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留親代非人類抗體之特異性及親和性。人類化抗體係遺傳工程化抗體，其中將來自非人類「供體」抗體之HVR(例如CDR)或其部分接枝至人類「受體」抗體序列中(例如，參見Queen, US 5,530,101及5,585,089；Winter, US 5,225,539；Carter, US 6,407,213；Adair, US 5,859,205；及Foote, US 6,881,557)。

【0184】受體抗體序列可為(例如)成熟人類抗體序列、該等序列之複合物、人類抗體序列之共有序列或種系區序列。可根據可變區框架中與供體序列之高度序列一致性來選擇人受體序列，以匹配受體及供體HVR或CDR之間之規範形式以及其他準則。因此，人類化抗體係具有完全或實質上來自供體抗體之HVR或CDR以及完全或實質上來自人類抗體序列之可變區框架序列及恆定區(若存在)之抗體。類似地，人類化重鏈通常具有完全或實質上來自供體抗體重鏈之全部三個HVR或CDR、以及實質上來自人類重鏈可變區框架及恆定區序列之重鏈可變區框架序列及重鏈恆定區(若存在)。同樣，人類化輕鏈通常具有完全或實質上來自供體抗體輕鏈之全部三個CDR、以及實質上來自人類輕鏈可變區框架及恆定區序列之輕鏈可變區框架序列及輕鏈恆定區(若存在)。當各別HVR或CDR之間至少

80%、85%、90%、95%或100%之相應殘基(如藉由Kabat定義)相同時，人類化抗體中之HVR或CDR實質上來自非人類抗體中之相應HVR或CDR。當藉由Kabat定義之相應殘基之至少80%、85%、90%、95%或100%相同時，抗體鏈之可變區框架序列或抗體鏈之恆定區實質上分別來自人類可變區框架序列或人類恆定區。

【0185】 儘管人類化抗體通常納入來自小鼠抗體之所有六個HVR(例如CDR，較佳如Kabat定義)，但其亦可用來自小鼠抗體之非所有HVR或CDR(例如，至少3、4或5個HVR或CDR)製備(例如Pascalis等人，*J. Immunol.* 169:3076, 2002；Vajdos等人，*Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002；Iwahashi等人，*Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999；及Tamura等人，*Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000)。

【0186】 來自人類可變區框架殘基之某些胺基酸可基於其對HVR(例如，CDR)構形及/或與抗原之結合之可能影響而選擇用於取代。I對該等可能影響之研究係藉由建模、檢查特定位置處胺基酸之特徵、或對特定胺基酸之取代或誘變之效應進行經驗觀察來進行。

【0187】 舉例而言，當鼠類可變區框架殘基與選擇之人類可變區框架殘基之間之胺基酸不同時，人類框架胺基酸可經來自小鼠抗體的等價構架胺基酸取代，此時合理地預計胺基酸：

- (1) 非共價直接結合抗原，
- (2) 毗鄰HVR或CDR區，
- (3) 以其他方式與HVR或CDR區(例如在該區之約6 Å內)相互作用；
- (4) 介導重鏈與輕鏈之間之相互作用，或
- (5) 係小鼠鏈之體細胞突變之結果。

(6) 係醣基化位點。

【0188】來自類別(1)-(3)之框架殘基有時或者稱為規範殘基及微調殘基。規範殘基係指定義決定CDR環之構形之供體CDR環之規範類別之框架殘基(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987), Thornton及Martin, *J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996)。微調殘基係指支持抗原結合環構形並在微調抗體與抗原之擬合方面起作用之一層框架殘基(Foote及Winter, 1992, *J Mol Bio.* 224, 487-499)。

【0189】人類化抗體及其製備方法綜述於(例如) Almagro及Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633中, 且進一步闡述於(例如)以下文獻中: Riechmann等人, (1988) *Nature* 332:323-329; Queen等人, (1989) *Proc.Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; 美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號; Kashmiri等人, (2005) *Methods* 36:25-34 (闡述特異性決定區(SDR)接枝); Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (闡述「表面重塑」); Dall'Acqua等人, (2005) *Methods* 36:43-60 (闡述「FR改組」); 及Osborn等人, (2005) *Methods* 36:61-68及Klimka等人, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (闡述FR改組之「引導選擇」方法)。

【0190】可用於人類化之人類框架區包括(但不限於): 使用「最佳擬合」方法選擇之框架區(例如, 參見Sims等人 (1993) *J. Immunol.* 151 :2296); 源自輕鏈或重鏈可變區之特定亞組之人類抗體之共有序列的框架區(例如, 參見Carter等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; 及Presta等人 (1993) *J. Immunol*, 151:2623); 人類成熟(體細胞突變之)框架區或人類種系框架區(例如, 參見Almagro及Fransson, (2008)

Front. Biosci. 13:1619-1633)；及源自篩選FR文庫之框架區(例如，參見 Baca 等人，(1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 及 Rosok 等人，(1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618)。

【0191】非限制性實例性人類化抗體包括包含或源自如本文揭示之 CDR 及/或重鏈及/或輕鏈可變區中之任一者之人類化抗體。該等抗體之具體實例包括小鼠抗體 12F3 之人類化形式。小鼠抗體 12F3 之一種這該人類化變體命名為 HGLF，其包含含有 SEQ ID NO: 15 之胺基酸序列之成熟重鏈可變區及包含 SEQ ID NO: 30 之胺基酸序列之成熟輕鏈可變區。本發明之人類化抗體包括 HGLF 人類化抗體之變體，其中人類化重鏈成熟可變區顯示與 SEQ ID NO: 15 具有至少 90%、95% 或 99% 之一致性，且人類化輕鏈成熟可變區顯示與 SEQ ID NO: 30 具有至少 90%、95% 或 99% 之序列一致性。較佳地，在該等抗體中，保留 HGLF 中之一些或所有回復突變。換言之，至少 1、2、3、4、5、6 或較佳所有 7 個重鏈位置 H30、H37、H48、H49、H73、H78 及 H93 分別由 T、V、L、A、N、L 及 A 佔據。同樣，至少 1、2、3、4 或較佳所有 4 個輕鏈位置 L2、L38、L49 及 L69 分別由 T、Y、H 及 R 佔據。HGLF 在實例中有更詳細地闡述，且其序列如圖 5-8 所示。

D. 實例性抗體恆定區

【0192】對於其中 ABP 係抗體之彼等實施例，本文所述抗體之重鏈及輕鏈可變區可與人類恆定區之至少一部分連接。在一些實施例中，人類重鏈恆定區係選自 IgA、IgG 及 IgD 之同型。在一些實施例中，人類輕鏈恆定區係選自 κ 及 λ 之同型。在一些實施例中，本文所述之抗體包含人類 IgG 恆定區。在一些實施例中，本文所述之抗體包含人類 IgG4 重鏈恆定區。

在該等實施例中之一些中，本文所述之抗體包含人類IgG4恆定區中之S228P突變。在一些實施例中，本文所述之抗體包含人類IgG4恆定區及人類κ輕鏈。

【0193】在整個本說明書及申請專利範圍中，除非明確說明或熟習此項技術者已知，免疫球蛋白重鏈中殘基之編號係EU索引之編號，如Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)，其以引用方式明確併入本文中。「如Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。

【0194】人類恆定區在不同個體之間顯示異型變化及同族同種異型變化，亦即不同個體在一或多個多形體位置上之恆定區可不同。同族同種異型與同種異型之不同之處在於，識別同族同種異型之血清與一或多種其他同型之非多形體區結合。在提及人類恆定區時包括具有任何天然同種異型或在天然同種異型中佔據多形體位置之殘基之任何排列的恆定區。此外，相對於天然人類恆定區，可存在高達1、2、5或10個突變，例如上文指示之彼等，以減少Fc γ 受體結合或增加與FcRn之結合。

【0195】在一些實施例中，輕鏈及/或重鏈之胺基或羧基末端之一個或若干胺基酸(例如重鏈之C-末端離胺酸)可缺失或在一定比例或全部分子中衍生化。

【0196】恆定區之選擇部分取決於是否期望抗體依賴性細胞介導之細胞毒性、抗體依賴性細胞吞噬作用及/或補體依賴性細胞毒性。舉例而言，人類同位素IgG1及IgG3具有強補體依賴性細胞毒性，人類同型IgG2具有弱補體依賴性細胞毒性，且人類IgG4缺乏補體依賴性細胞毒性。人

類IgG1及IgG3亦比人類IgG2及IgG4誘導更強之細胞介導之效應物功能。輕鏈恆定區可為 λ 或 κ 。

【0197】 此外，如下文更詳細闡述，可在恆定區進行取代以減少或增加效應物功能，例如補體介導之細胞毒性或ADCC（例如，參見Winter等人，美國專利第5,624,821號；Tso等人，美國專利第5,834,597號；及Lazar等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006），或延長在人類中之半衰期（例如，參見Hinton等人，J. Biol. Chem. 279:6213, 2004）。

E. 變體

【0198】 本文提供之抗原結合蛋白亦包括本文提供之抗原結合蛋白之胺基酸序列變體。舉例而言，可製備具有改良之結合親和性及/或抗體之其他生物學性質之變體。抗原結合蛋白之胺基酸序列變體可藉由向編碼抗原結合蛋白之核苷酸序列中引入適當修飾或藉由肽合成來製備。該等修飾包括（例如）抗原結合蛋白之胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以獲得最終構築體，條件係最終構築體具有期望特性，例如抗原結合。

1. 取代、插入及缺失變體

【0199】 在一些實施例中，抗原結合蛋白係變體，因為其相對於如本文所述之抗原結合蛋白具有一或多個胺基酸取代、缺失及/或插入。在某些該等實施例中，變體具有一或多個胺基酸取代。在其他該等實施例中，取代係保守胺基酸取代。

【0200】 胺基酸取代可包括（但不限於）多肽中之一個胺基酸經另一胺基酸置換。保守胺基酸取代可涵蓋非天然存在之胺基酸殘基，其通常藉

由化學肽合成而非藉由在生物系統中合成來引入。基於常見側鏈性質，可將天然存在之殘基分為以下類別：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族殘基：Trp、Tyr、Phe。

【0201】用於取代誘變之感興趣之位點包括CDR及FR。保守取代顯示於下表2之「較佳取代」標題下。更多實質性變化提供於表2之「實例性取代」標題下，且如下文參照胺基酸側鏈類別進一步闡述。可將胺基酸取代引入感興趣之抗體及經篩選具有期望活性之產物中，該期望活性係(例如)保留/改良之抗原結合、降低之免疫原性或改良之ADCC或CDC。

表2

初始殘基	實例性取代	較佳取代
Ala	Val；Leu；Ile	Val
Arg	Lys；Gln；Asn	Lys
Asn	Gln；His；Asp；Lys；Arg	Gln
Asp	Glu；Asn	Glu
Cys	Ser；Ala	Ser
Gln	Asn；Glu	Asn
Glu	Asp；Gln	Asp
Gly	Pro；Ala	Ala
His	Asn；Gln；Lys；Arg	Arg
Ile	Leu；Val；Met；Ala；Phe；正白胺酸	Leu
Leu	正白胺酸；Ile；Val；Met；Ala；Phe	Ile

Lys	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr ; Ala ; Cys	Thr
Thr	Val ; Ser	Ser
Trp	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

【0202】非保守取代涉及將該等類別中之一者之成員交換為另一類別。

【0203】在改變抗原結合蛋白(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)之胺基酸序列中，在一些實施例中，可考慮胺基酸之親水性指數。每一胺基酸已基於其疏水性及電荷特徵分配有親水性指數，如下：異白胺酸(+4.5)；纈胺酸(+4.2)；白胺酸(+3.8)；苯丙胺酸(+2.8)；半胱胺酸/胱胺酸(+2.5)；甲硫胺酸(+1.9)；丙胺酸(+1.8)；甘胺酸(-0.4)；蘇胺酸(-0.7)；絲胺酸(-0.8)；色胺酸(-0.9)；酪胺酸(-1.3)；脯胺酸(-1.6)；組胺酸(-3.2)；麩胺酸鹽(-3.5)；麩醯胺酸(-3.5)；天冬胺酸鹽(-3.5)；天冬醯胺(-3.5)；離胺酸(-3.9)；及精胺酸(-4.5)。

【0204】業內瞭解親水性胺基酸指數在賦予蛋白質相互作用之生物功能中之重要性。Kyte等人，1982, *J. Mol. Biol.*, 157:105-131。已知某些胺基酸可取代具有相似親水性指數或評分之其他胺基酸，且仍保留相似生物活性。在基於親水性指數進行改變時，在某些實施例中，包括親水性指數在 ± 2 內之胺基酸之取代。在某些實施例中，包括在 ± 1 內之彼等，在某些實施例中，包括在 ± 0.5 內之彼等。

【0205】業內亦瞭解，可基於親水性有效地進行類似胺基酸之取代，特別是在由此產生之生物功能性蛋白質或肽(例如抗體)意欲用於免疫學實施例之情況下，如在本情況中。在某些實施例中，蛋白質之最大局部平均親水性(如由其毗鄰胺基酸之親水性決定)與其免疫原性及抗原性相關，即與蛋白質之生物學性質相關。

【0206】已為該等胺基酸殘基分配以下親水性值：精胺酸(+3.0)；離胺酸(+3.0 ±1)；天冬胺酸鹽(+3.0 ±1)；麩胺酸鹽(+3.0 ±1)；絲胺酸(+0.3)；天冬醯胺(+0.2)；麩醯胺酸(+0.2)；甘胺酸(0)；蘇胺酸(-0.4)；脯胺酸(-0.5 ±1)；丙胺酸(-0.5)；組胺酸(-0.5)；半胱胺酸(-1.0)；甲硫胺酸(-1.3)；纈胺酸(-1.5)；白胺酸(-1.8)；異白胺酸(-1.8)；酪胺酸(-2.3)；苯丙胺酸(-2.5)及色胺酸(-3.4)。在基於相似親水性值進行改變時，在某些實施例中，包括親水性值在± 2內之胺基酸之取代，在某些實施例中，包括在± 1內之彼等，在某些實施例中，包括在± 0.5內之彼等。亦可基於親水性自一級胺基酸序列鑑別表位。該等區亦稱為「表位核心區」。

【0207】可在CDR中進行改變(例如，取代)，例如，以該抗體親和性。該等改變可在CDR「熱點」(即，由在體細胞成熟過程期間以高頻率經歷突變之密碼子編碼的殘基)(例如，參見Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))及/或接觸抗原之殘基中進行，其中測試所得變體VH或VL之結合親和性。藉由自二級文庫構築及重新選擇來達成親和性成熟已闡述於(例如) Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編輯, Human Press, Totowa, N.J., (2001))中。在親和性成熟之一些實施例中，藉由各種方法(例如，易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸引導之誘變)中之任一者將多樣性引入選擇用於成熟之可變基因

中。隨後建立二級文庫。隨後篩選文庫以鑑別具有期望親和性之任一抗體變體。另一種引入多樣性之方法涉及CDR引導方法，其中將若干CDR殘基(例如，一次4-6個殘基)隨機化。抗原結合中所涉及之CDR殘基可使用(例如)丙胺酸掃描誘變或建模特定鑑別。具體而言，通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

【0208】在某些實施例中，取代、插入或缺失可發生於一或多個CDR內，只要該等改變不會實質上降低抗體結合抗原之能力即可。例如，可對CDR作出不會實質上降低結合親和性之保守改變(例如，如本文所提供之保守取代)。該等改變可在例如接觸CDR中之殘基之抗原外部。在上文所提供變體VH及VL序列之某些實施例中，每一CDR未經改變，或含有不超過一個、兩個或三個胺基酸取代。

【0209】用於鑑別抗體上可靶向用於誘變之殘基或區的有用方法稱為「丙胺酸掃描誘變」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085中所述。在此方法中，鑑別殘基或靶殘基組(例如，帶電殘基，例如arg、asp、his、lys及glu)，並由中性或帶負電之胺基酸(例如，丙胺酸或多丙胺酸)置換以確定是否影響抗體與抗原之相互作用。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。另一選擇為或另外，抗原-抗體複合體之晶體結構以鑑別抗體與抗原間之接觸點。可靶向該等接觸殘基及相鄰殘基作為取代候選物或將其消除。可篩選變體以確定其是否含有期望性質。

【0210】胺基酸序列插入包括胺基-及/或羧基末端融合物(長度在一個殘基至含有上百或更多殘基之多肽範圍內)、以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫胺醯基殘基之抗

體。抗體分子之其他插入變體包括抗體之N末端或C末端與酶(例如用於ADEPT)或延長抗體之血清半衰期之多肽之融合物。

2. 具有經修飾之Fc區之變體

【0211】具有降低效應物功能之抗體包括具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者的取代之彼等(美國專利第6,737,056號)。該等Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或更多者處具有取代之Fc突變體，包括在殘基265及297處經丙胺酸取代之所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

【0212】在某些實施例中，製備具有改良或減小之與FcR之結合之抗體變體。(例如，參見美國專利第6,737,056號、WO 2004/056312及Shields等人，*J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001))。在一些實施例中，抗體變體包含具有一或多個改良ADCC之胺基酸取代之Fc區，例如在Fc區之位置298、333及/或334(殘基之EU編號)處之取代。舉例而言，人類IgG1 Fc區之暴露於溶劑之胺基酸之系統取代產生具有改變之FcγR結合親和性之IgG變體(Shields等人，2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604)。當與親代IgG1比較時，包括在Thr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334或Ser298/Glu333/Lys334處對Ala之取代之變體之亞組展現對FcγR之結合親和性及ADCC活性皆增加(Shields等人，2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604；Okazaki等人，2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49)。

【0213】在一些實施例中，在Fc區進行改變以改變(即，改良或減少)C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，例如，如美國專利第6,194,551號、WO 99/51642及Idusogie等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)中所述。例如，抗體之補體結合活性(C1q結合及CDC活性二

者)可藉由在Lys326及Glu333處之取代來改良(Idsogie等人, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-2575)。人類IgG2主鏈上之相同取代可將與C1q結合不良且補體活化活性嚴重缺乏之抗體同型轉化為既能結合C1q亦能介導CDC之抗體同型(Idsogie等人, 2001, *J. Immunol.* 166:2571-75)。亦應用若干其他方法來改良抗體之補體結合活性。舉例而言, 將IgM之18-胺基酸羧基末端尾片接枝至IgG之羧基末端大大增強其CDC活性。甚至利用IgG4亦觀察到此種情況, IgG4通常沒有可檢測到之CDC活性(Smith等人, 1995, *J. Immunol.* 154:2226-36)。此外, 用Cys取代位於IgG1重鏈之羧基末端附近之Ser444誘導IgG1之尾對尾二聚化, 其中CDC活性比單體IgG1增加200倍(Shopes等人, 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22)。另外, 對C1q具有特異性之雙特異性雙價抗體構築體亦賦予CDC活性(Kontermann等人, 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31)。

【0214】可藉由將重鏈之胺基酸殘基318、320及322中之至少一者突變為具有不同側鏈之殘基(例如Ala)來降低補體活性。其他烷基取代之非離子殘基(例如Gly、Ile、Leu或Val)、或芳香族非極性殘基(例如Phe、Tyr、Trp及Pro)代替該三個殘基中任一者亦會減少或消除C1q結合。Ser、Thr、Cys及Met可在殘基320及322、而非殘基318處使用, 以減少或消除C1q結合活性。由極性殘基置換318 (Glu)殘基可改變但不消除C1q結合活性。用Ala置換殘基297 (Asn)會導致去除裂解活性, 但僅會略微降低(約弱三倍)對C1q之親和性。此改變破壞醣基化位點及補體活化所需之碳水化合物之存在。該位點之任何其他取代亦會破壞醣基化位點。以下突變及其任何組合亦會減少C1q結合: D270A、K322A、P329A及P311S(參見WO 06/036291)。

【0215】可增加或減少如本文提供之抗體之半衰期以改變其治療活性。FcRn係在結構上類似於與 $\beta 2$ -微球蛋白非共價締合之MHC I類抗原之受體。FcRn調控IgG之分解代謝及其跨組織胞吞轉送作用(Ghetie及Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766 ; Ghetie及Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113)。IgG-FcRn相互作用在pH 6.0 (細胞內囊泡之pH)下發生，但在pH 7.4 (血液之pH)下不發生；此相互作用使得IgG能夠再循環回循環中(Ghetie及Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 ; Ghetie及Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113)。人類IgG₁上參與FcRn結合之區已經繪製(Shields等人，2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604)。人類IgG₁之位置Pro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382或Asn434之丙胺酸取代增強FcRn結合(Shields等人，2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604)。具有該等取代之IgG₁分子具有更長之血清半衰期。因此，與未修飾之IgG₁相比，該等經修飾之IgG₁分子可能能夠在更長之時間段內實施其效應物功能，且因此發揮其治療效能。增加與FcRn結合之其他實例性取代包括位置250之Gln及/或位置428之Leu。其他研究已顯示，可藉由在一或多個以下Fc區殘基處引入一或多個取代來改良Fc區與FcRn之結合：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如Fc區殘基434之取代(例如，參見美國專利第7,371,826號；及US 7,361,740)。

3. 具有經修飾之醣基化之抗體變體

【0216】在某些實施例中，如本文提供之抗體包括一或多個修飾，以便增加或減少抗體之醣基化程度。抗體醣基化位點之添加或缺失可藉由

改變胺基酸序列使得產生或去除一或多個醣基化位點來方便地完成。

【0217】在抗體包含Fc區之情況下，其所連接之碳水化合物可經改變。由哺乳動物細胞產生之天然抗體通常包含具支鏈、二分枝寡糖，其通常藉由N-鏈接連接至Fc區之CH2結構域的Asn297。例如，參見Wright等人，TIBTECH 15:26-32 (1997)。該寡糖可包括多種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸以及連接至二分枝寡糖結構之「主幹」中之GlcNAc的岩藻糖。

【0218】將此糖型工程化於IgG上可顯著改良IgG介導之ADCC。向此糖型添加平分型N-乙醯基葡萄糖胺修飾(Umana等人，1999, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180；Davies等人，2001, *Biotech. Bioeng.* 74:288-94)或自此糖型去除岩藻糖(Shields等人，2002, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40；Shinkawa等人，2003, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604；Niwa等人，2004, *Cancer Res.* 64:2127-33)係IgG Fc工程化之兩個實例，其改良IgG Fc與FcγR之間之結合，藉此增強Ig介導之ADCC活性。包括該等取代或工程化之抗體包括在本文提供之一些實施例中。

【0219】在某些實施例中，提供具有缺少連接(直接或間接)至Fc區之岩藻糖之碳水化合物結構的抗體。舉例而言，該抗體中岩藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。藉由計算相對於連接至Asn 297之所有糖結構(例如複合物、雜合體及高甘露糖結構)之總和Asn297處糖鏈內岩藻糖之平均量來測定岩藻糖的量，如藉由MALDI-TOF質譜所量測，如(例如) WO 2008/077546中所述。Asn297係指位於Fc區中大約位置297處之天冬醯胺殘基(Fc區殘基之Eu編號)；然而，因抗體中具有微小序列變化，故Asn297亦可位於位置297上游或下游之大約± 3個胺

基酸處，亦即，介於位置294與300之間。該等岩藻醣基化變體可具有改良之ADCC功能。例如，參見美國專利公開案第US 2003/0157108號 (Presta, L.)；US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo有限公司)。與「去岩藻醣基化」或「缺乏岩藻糖」抗體變體相關之出版物之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki等人，*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。能產生去岩藻醣基化抗體之細胞系之實例包括缺乏蛋白質岩藻醣基化之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1，Adams等人，尤其在實例11中)及基因敲除細胞系，例如 α -1,6-岩藻糖基轉移酶基因FUT8敲除CHO細胞(例如，參見Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)；Kanda, Y.等人 *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及WO2003/085107)。

【0220】 進一步提供含有二等分寡糖之其他抗體，例如，其中連接至抗體之Fc區之二分枝寡糖由GlcNAc二等分。該等抗體變體可具有降低之岩藻醣基化及/或改良之ADCC功能。該等抗體之實例闡述於(例如)WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)、美國專利第6,602,684號(Umana等人)及US 2005/0123546 (Umana等人)中。亦提供在連接至Fc區之寡糖中

具有至少一個半乳糖殘基的抗體。該等抗體變體可具有改良之CDC功能。此等抗體變體闡述於(例如) WO 1997/30087 (Patel 等人)、WO 1998/58964 (Raju, S.)及WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

4. 半胱胺酸工程化抗體變體

【0221】在一些實施例中，如本文提供之抗體變體包括天然胺基酸對人類IgG1同型中胺基酸位置234、235、237、239、267、298、299、326、330或332處之半胱胺酸殘基之取代，較佳S239C突變(恆定區之取代係根據EU索引)。額外半胱胺酸殘基之存在允許形成鏈間二硫鍵。該鏈間二硫鍵形成可導致立體阻礙，藉此降低Fc區-FcγR結合相互作用之親和性。在IgG恆定區之Fc區中或附近引入之半胱胺酸殘基亦可用作與治療劑結合之位點(例如，使用硫醇特異性試劑(例如藥物之馬來醯亞胺衍生物)偶合細胞毒性藥物)。治療藥物之存在會導致立體阻礙，藉此進一步降低Fc區-FcγR結合相互作用之親和性。位置234、235、236及/或237中之任一者處其他取代降低對Fcγ受體、具體而言FcγRI受體之親和性(例如，參見US 6,624,821、US 5,624,821)。

【0222】在其他半胱胺酸工程化抗體變體中，一或多個反應性硫醇基團位於抗體之可及位點，且可用於結合抗體與其他部分，例如藥物部分或連接體-藥物部分，以產生免疫結合物，如本文進一步所述。在某些實施例中，以下殘基中之任一者或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)、重鏈之A118 (EU編號)及重鏈Fc區之5400 (EU編號)。半胱胺酸工程化抗體之產生闡述於例如美國專利第7,521,541號中。

5. 實例性Fc變體

【0223】提供之某些ABP包括對恆定區之以下修飾。

F. 競爭抗原結合蛋白

【0224】本文提供之抗原結合蛋白包括與上述例示之ABP或片段中之一者競爭特異性結合ALPP及/或ALPPL2之彼等(例如，SEQ ID NO: 2之人類ALPP及/或SEQ ID NO: 4之人類ALPPL2)。在該等實施例中之一些中，測試及參考ABP彼此交叉競爭。該等ABP可結合與本文所述抗原結合蛋白中之一者相同之表位，或結合重疊表位。在一實施例中，該等ABP結合具有SEQ ID NO: 73及/或SEQ ID NO: 74之胺基酸序列之表位。包括與例示之ABP競爭之片段在內之ABP預計顯示相似功能性質(例如，一或多種上述活性)。

【0225】在一些實施例中，提供之ABP包括與具有以下之抗體競爭之彼等：(a)針對與SEQ ID NO: 56-58或60-62及63-65或68-70中相同之抗體列出之所有6個CDR；(b)針對與SEQ ID NO:15及30中相同之抗體列出之VH及VL；或(c)針對與SEQ ID NO:40及50中相同之抗體指定之輕鏈及重鏈。

G. 結合相同表位之抗原結合蛋白

【0226】在另一實施例中，提供之抗原結合蛋白包括與本文所述之ABP中之任一者結合相同表位之彼等。有多種技術可用於鑑別結合與本文所述之一或多種ABP相同之表位之ABP。該等方法包括(例如)本文所述之競爭分析、肽片段之篩選、基於MS之蛋白質足跡分析、丙胺酸或麩醯胺酸掃描方法，以及經由提供表位之原子解析度之抗原:抗原結合蛋白複合物之晶體之x射線分析。

【0227】一種確定由特異性抗體結合之表位或表位區(「表位區」係包含表位或與表位重疊之區)之方法包括評價ABP與包含ALPP及/或

ALPPL2之片段(例如非變性或變性片段)之肽之結合。可製備包括ALPP及/或ALPPL2 (例如, 人類ALPP及/或人類ALPPL2)之序列之一系列重疊肽並例如在直接ELISA、競爭性ELISA (其中評價肽防止抗體與結合至微量滴定板孔之ALPP及/或ALPPL2結合之能力)中、或在晶片上篩選結合。此類肽篩選方法可能無法檢測某些不連續之功能性表位, 即涉及沿著ALPP及/或ALPPL2多肽鏈之一級序列不連續之胺基酸殘基之功能性表位。

【0228】 在其他實施例中, 含有與抗體接觸或被抗體掩埋之殘基之區可藉由突變ALPP及/或ALPPL2中之特定殘基並確定ABP是否可結合突變或變體ALPP及/或ALPPL2蛋白來鑑別。藉由進行許多個別突變, 可鑑別在結合中起直接作用之殘基或與抗體足夠接近之殘基, 使得突變可影響抗原結合蛋白與抗原之間之結合。根據該等胺基酸之知識, 可闡明抗原中含有與ABP接觸或被抗體覆蓋之殘基之結構域或區。該結構域可包括ABP之結合表位。該等掃描技術之一般方法包括用精胺酸及/或麩胺酸殘基(通常係個別地)取代野生型多肽中之胺基酸。該兩個胺基酸通常用於該等掃描技術, 此乃因其帶電荷且體積龐大, 且因此具有破壞引入突變之ALPP及/或ALPPL2之區中之ABP與ALPP及/或ALPPL2之間之結合的潛能。野生型抗原中存在之精胺酸經麩胺酸置換。獲得多種該等個別突變體, 並分析收集之結合結果以確定何種殘基影響結合(例如, 參見Nanevicz, T.等人, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270:37, 21619-21625及Zupnick, A.等人, 2006, *J. Biol. Chem.*, 281:29, 20464-20473)。

【0229】 鑑別表位之替代方法係藉由基於MS之蛋白質足跡分析, 例如氫/氘交換質譜(HDX-MS)及蛋白質快速光化學氧化(FPOP)。執行HDX-MS之方法闡述於以下中: 例如, Wei等人 (2014) *Drug Discovery Today*

19:95。實施FPOP之方法闡述於(例如) Hambley及Gross (2005) J. American Soc. Mass Spectrometry 16:2057中。

【0230】由ABP結合之表位亦可藉由結構方法測定，該等結構方法例如X射線晶體結構測定、分子建模及核磁共振(NMR)光譜，包括當游離時及與ABP以複合物形式結合時抗原中之不穩定醯胺氫之H-D交換速率之NMR測定(例如，參見Zinn-Justin等人(1992) Biochemistry 31, 11335-11347；及Zinn-Justin等人(1993) Biochemistry 32, 6884-6891)。

【0231】X射線結晶學分析可使用業內已知之任何方法來完成。結晶方法之實例闡述於以下中：例如，Giege等人 (1994) Acta Crystallogr. D50:339-350；及McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1-23)。該等結晶方法包括微批量(例如Chayen (1997) Structure 5:1269-1274)、懸滴氣相擴散(例如McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251:6300-6303)、接種及透析。一旦形成，ABP:抗原晶體本身可使用眾所周知之X射線繞射技術進行研究，且可使用電腦軟體(例如X-PLOR)進行精製(Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.；例如，參見Blundell及Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114及115, H. W. Wyckoff等人編輯，Academic Press；美國專利申請公開案第2004/0014194號)、及BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60；Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter及Sweet編輯；Roversi等人 (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323)。

【0232】在一些實施例中，ABP結合連續表位。在較佳實施例中，ABP結合具有SEQ ID NO: 73及/或SEQ ID NO: 74之胺基酸序列之表位。

H. 其他實例性格式

【0233】 抗原結合蛋白(例如，抗體或其抗原結合片段)可為單一多肽，或可包括兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個(相同或不同)多肽。在其中抗體或其抗原結合片段係單一多肽之一些實施例中，抗體或抗原結合片段可包括單一抗原結合結構域或兩個抗原結合結構域。在其中抗體或抗原結合片段係單一多肽且包括兩個抗原結合結構域之一些實施例中，第一及第二抗原結合結構域可彼此相同或不同(且可特異性結合相同或不同之抗原或表位)。

【0234】 本文所述之抗原結合蛋白之不同部分可以各種構形排列，以獲得額外抗原結合蛋白。舉例而言，在其中抗體或抗原結合片段係單一多肽之一些實施例中，第一抗原結合結構域及第二抗原結合結構域(若存在)可各自獨立地選自以下之群：V_H結構域、V_{HH}結構域、V_{NAR}結構域及scFv。在其中抗體或抗原結合片段係單一多肽之一些實施例中，抗體或抗原結合片段可為BiTE®、(scFv)₂、奈米抗體、奈米抗體-HSA、DART、TandAb、sc雙價抗體、sc雙價抗體-CH3、scFv-CH-CL-scFv、HSAbody、sc雙價抗體-HAS、串聯-scFv、Adnectin、DARPin、纖維蛋白及DEP結合物。當抗體或抗原結合片段係單一多肽時，可使用之抗原結合結構域之額外實例為業內已知

【0235】 V_{HH}結構域係可在駱駝科動物中發現之單一單體可變抗體結構域。V_{NAR}結構域係可在軟骨魚類中發現之單一單體可變抗體結構域。V_{HH}結構域及V_{NAR}結構域之非限制性態樣闡述於以下中：例如，Cromie等人，*Curr. Top. Med. Chem.* 15:2543-2557, 2016；De Genst等人，*Dev. Comp. Immunol.* 30:187-198, 2006；De Meyer等人，*Trends Biotechnol.* 32:263-270, 2014；Kijanka等人，*Nanomedicine* 10:161-174,

2015 ; Kovaleva等人, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14:1527-1539, 2014 ; Krah等人, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38:21-28, 2016 ; Mujic-Delic等人, *Trends Pharmacol. Sci.* 35:247-255, 2014 ; Muyltermans, *J. Biotechnol.* 74:277-302, 2001 ; Muyltermans等人, *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001 ; Muyltermans, *Ann. Rev. Biochem.* 82:775-797, 2013 ; Rahbarizadeh等人, *Immunol. Invest.* 40:299-338, 2011 ; Van Audenhove等人, *EBioMedicine* 8:40-48, 2016 ; Van Bockstaele等人, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212-1224, 2009 ; Vincke等人, *Methods Mol. Biol.* 911:15-26, 2012 ; 及 Wesolowski等人, *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157-174, 2009 。

【0236】 在其中抗體或抗原結合片段係單一多肽且包括兩個抗原結合結構域之一些實施例中，第一抗原結合結構域及第二抗原結合結構域可二者皆係VHH結構域，或者至少一個抗原結合結構域可為VHH結構域。在其中抗體或抗原結合片段係單一多肽且包括兩個抗原結合結構域之一些實施例中，第一抗原結合結構域及第二抗原結合結構域二者皆係V_{NAR}結構域，或者至少一個抗原結合結構域係V_{NAR}結構域。在其中抗體或抗原結合結構域係單一多肽之一些實施例中，第一抗原結合結構域係scFv結構域。在其中抗體或抗原結合片段係單一多肽且包括兩個抗原結合結構域之一些實施例中，第一抗原結合結構域及第二抗原結合結構域可二者皆係scFv結構域，或者至少一個抗原結合結構域可為scFv結構域。

【0237】 在一些實施例中，抗體或抗原結合片段可包括兩種或更多種多肽(例如，兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種或十種多肽)。在其中抗體或抗原結合片段包括兩種或更多種多肽之一些實施

例中，兩種或更多種多肽中之兩種、三種、四種、五種或六種多肽可為相同的。

【0238】 在其中抗體或抗原結合片段包括兩種或更多種多肽(例如，兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、九種或十種多肽)之一些實施例中，抗體或抗原結合片段之兩種或更多種多肽可組裝(例如，非共價組裝)以形成一或多個抗原結合結構域，例如抗體之抗原結合片段(例如，本文所述抗體之抗原結合片段中之任一者)、VHH-scAb、VHH-Fab、雙重scFab、F(ab')₂、雙價抗體、crossMab、DAF (二合一)、DAF (四合一)、DutaMab、DT-IgG、杵-臼常見輕鏈、杵-臼組裝、電荷對、Fab臂交換、SEED體、LUZ-Y、Fcab、κλ-體、正交Fab、DVD-IgG、IgG(H)-scFv、scFv-(H)IgG、IgG(L)-scFv、scFv-(L)IgG、IgG(L、H)-Fv、IgG(H)-V、V(H)-IgG、IgG(L)-V、V(L)-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、Zy體、DVI-IgG、雙價抗體-CH3、三倍體、微抗體、微小抗體、TriBi微小抗體、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、F(ab')₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四價HCAb、sc雙價抗體-Fc、雙價抗體-Fc、串聯scFv-Fc、VHH-Fc、串聯VHH-Fc、VHH-Fc KIH、Fab-VHH-Fc、內抗體、塢及鎖、ImmTAC、IgG-IgG結合物、Cov-X-體、scFv1-PEG-scFv2、Adnectin、DARPin、纖維連蛋白及DEP結合物。例如，參見Spiess等人，*Mol. Immunol.* 67:95-106, 2015，其全文併入本文中，用於闡述該等要素。

【0239】 在一些實施例中，抗原結合蛋白係基於非免疫球蛋白支架。例如本文所述之結合結構域(例如HVR或CDR)可插入或移植至其中之其他支架之實例包括(但不限於)人類纖維連蛋白(例如，人類纖維連蛋白III之

第10個細胞外結構域)、新製癌菌素CBM4-2、衍生自脂質運載蛋白之抗運載蛋白、設計之錨蛋白重複結構域(DARPin)s)、蛋白-A結構域(蛋白Z)、Kunitz結構域、Im9、TPR蛋白、鋅指結構域、pVIII、GC4、運鐵蛋白、SPA之B-結構域、Sac7d、A-結構域、Fyn激酶之SH3結構域及C型凝集素樣結構域(例如,參見Gebauer及Skerra (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255; Binz等人 (2005) *Nat. Biotech.* 23:1257-1268; 及Yu等人 (2017) *Annu Rev Anal Chem* 10:293-320, 其各自係全文以引用方式併入本文中)。

IV. 抗原結合蛋白表現及產生

A. 編碼抗原結合蛋白之核酸分子

【0240】亦提供編碼本文所述抗原結合蛋白或其部分之核酸分子。該等核酸包括例如: 1)編碼抗原結合蛋白(例如,抗體或其片段)、或其衍生物或變體之彼等; 2)編碼重鏈及/或輕鏈、VH及/或VL結構域、或位於可變結構域內之1個或多個HVR或CDR (例如, 1、2或全部3個VH HVR或CDR或1、2或全部3個VH HVR或CDR)之多核苷酸; 3)足以用作雜交探針、PCR引子或測序引子以鑑別、分析、突變或擴增該等編碼多核苷酸之多核苷酸; 4)用於抑制該等編碼多核苷酸之表現之反義核酸, 及5)前述之互補序列。核酸可為任何長度。其長度可為例如5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750或1,000個或更多個核苷酸, 及/或可包含一或多個額外序列, 例如調節序列, 及/或可為更大核酸(例如載體)之一部分。核酸可為單鏈的或雙鏈的。

【0241】核酸分子可以完整細胞、細胞溶解物或部分純化或實質上

純之形式存在。當藉由標準技術實施純化以清除其他細胞組分或其他污染物(例如其他細胞核酸(例如其他染色體DNA，例如連接至自然界中之經分離DNA之染色體DNA)或蛋白質)時，核酸係「經分離」或「實質上純的」，該等標準技術包括鹼/SDS處理、CsCl顯帶、管柱層析、限制酶、瓊脂糖凝膠電泳及業內熟知之其他方法。參見F. Ausubel等人編輯(1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本文所述之核酸可為例如DNA或RNA且可含或可不含內含子序列。在某些實施例中，核酸係cDNA分子。

【0242】 在一實施例中，編碼本文提供之抗體之VH序列之核酸分子包含SEQ ID NO: 71。在另一實施例中，編碼本文提供之抗體之VL序列之核酸分子包含SEQ ID NO: 72。在另一實施例中，編碼本文提供之抗體之VH及VL序列之核酸分子分別包含SEQ ID NO: 71及SEQ ID NO: 72。

【0243】 因此，提供包含編碼ABP (例如抗ALPP/ALPPL2抗體)之一或多個鏈之多核苷酸之核酸分子。在一些實施例中，核酸分子包含編碼ABP (例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)之重鏈或輕鏈之多核苷酸。在一些實施例中，核酸分子包含編碼ABP (例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)之重鏈之多核苷酸序列及編碼輕鏈之多核苷酸序列。在一些實施例中，第一核酸分子包含編碼重鏈之第一多核苷酸序列，且第二核酸分子包含編碼輕鏈之第二多核苷酸序列。

【0244】 在一個實施例中，核酸分子包含編碼本文提供之抗體中之一者之VH之多核苷酸。在另一實施例中，核酸包含編碼本文提供之抗體中之一者之VL之多核苷酸。在另一實施例中，核酸編碼本文提供之抗體中之一者之VH及VL二者。在某些實施例中，核酸分子包含編碼SEQ ID

NO: 15或SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之多核苷酸。

【0245】在具體實施例中，核酸編碼一或多種上述胺基酸序列(例如，本文揭示之重鏈及/或輕鏈胺基酸序列、或VH及/或VL胺基酸序列)之變體，其中變體具有至多25個胺基酸修飾，例如至多20個，例如至多15、14、13、12或11個胺基酸修飾，例如10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸修飾，例如缺失或插入，較佳為取代，例如保守取代。

【0246】亦提供與上文所提及之序列中之任一者具有至少80%、85%、90% (例如，95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性之核酸分子。因此，例如，在某些實施例中，核酸包含編碼本文揭示之抗原結合蛋白中之一者之重鏈及/或輕鏈序列或VH及/或VL序列之核苷酸序列。

【0247】一旦獲得編碼VH及VL區段之核酸，即可藉由標準重組DNA技術進一步操縱該等核酸，以(例如)將可變區基因轉化成全長抗體鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。在該等操縱中，編碼VL或VH之核酸可操作地連接至編碼另一多肽(例如抗體恆定區或撓性連接體)之另一核酸。

【0248】可藉由將編碼VH之核酸可操作地連接至編碼重鏈恆定區(鉸鏈、CH1、CH2及/或CH3)之另一核酸分子，將編碼VH區之經分離核酸轉化成全長重鏈基因。人類重鏈恆定區基因之序列為業內已知(例如，參見Kabat, E. A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開案第91-3242號)且涵蓋該等區之核酸片段可藉由標準PCR擴增來獲得。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，例如IgG1區。對於Fab片段重鏈基因，編碼VH之核酸可操作地連接至僅編碼重鏈CH1恆定區之另一核酸分子。

【0249】可藉由將編碼VL之核酸分子可操作地連接至編碼輕鏈恆定區CL之另一核酸分子，將編碼VL區之經分離核酸分子轉化成全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人類輕鏈恆定區基因之序列為業內已知(例如，參見Kabat, E. A. 等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 公開案第91-3242號)且涵蓋該等區之核酸片段可藉由標準PCR擴增來獲得。輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區。

【0250】為產生scFv基因，將編碼VH及VL之核酸片段可操作地連接至編碼撓性連接體(例如編碼胺基酸序列(Gly₄-Ser)₃)之另一片段，使得VH及VL序列可表現為鄰接單鏈蛋白，其中VL及VH區藉由撓性連接體接合(例如，參見Bird等人(1988) *Science* 242:423-426；Huston等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883；McCafferty等人，(1990) *Nature* 348:552-554)。

【0251】在另一態樣中，亦提供適用作檢測核酸序列之引子或雜交探針之核酸分子。核酸分子可僅包含編碼全長多肽之核酸序列之一部分，例如，可用作探針或引子之片段或編碼多肽之活性部分(例如，ALPP及/或ALPPL2結合部分)之片段。

【0252】基於核酸之序列之探針可用於檢測核酸或相似之核酸，例如編碼多肽之轉錄本。探針可包括標記基團，例如放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子。該等探針可用於鑑別表現多肽之細胞。

【0253】亦提供載體，包括表現載體，其包含編碼ABP之一或多種組分(例如VH及/或VL；及輕鏈及/或重鏈)之一或多種核酸。表現載體可包括(但不限於)影響或控制轉錄、轉譯且若存在內含子則影響與其可操作

連接之編碼區之RNA剪接的序列。原核生物中表現所必需之核酸序列包括啟動子、視情況操作序列、核糖體結合位點及可能之其他序列。已知真核細胞利用啟動子、增強子、及終止及聚腺苷酸化信號。

【0254】表現載體亦可包括與感興趣之編碼序列可操作地連接之分泌信號肽序列，使得表現之多肽可由重組宿主細胞分泌，以便在需要時更容易地自細胞中分離感興趣之多肽。

【0255】本發明之表現及選殖載體通常含有由宿主生物體識別並與編碼多肽之分子可操作地連接之啟動子。由多種潛在宿主細胞識別之大量啟動子已眾所周知。藉由限制性酶切自源DNA中除去啟動子並將期望啟動子序列插入載體中，將適宜啟動子可操作地連接至編碼例如本發明之抗體及抗原結合片段之重鏈、輕鏈或其他組分之DNA。適於與酵母菌宿主一起使用之啟動子亦在業內眾所周知。酵母菌增強子有利地與酵母菌啟動子一起使用。適於與哺乳動物宿主細胞一起使用之啟動子已眾所周知且包括(但不限於)自諸如以下等病毒之基因體獲得之彼等：多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(例如，腺病毒血清型2、8或9)、牛乳頭瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒、逆轉錄病毒、B型肝炎病毒且猿猴病毒40 (SV40)。其他適宜哺乳動物啟動子包括異源哺乳動物啟動子，例如，熱休克啟動子及肌動蛋白啟動子。

【0256】可利用之額外特異性啟動子包括(但不限於)：SV40早期啟動子(Benoist及Chambon，1981, *Nature* 290:304-310)；CMV啟動子(Thorsen等人，1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663)；含於勞斯肉瘤(Rous sarcoma)病毒之3'長端重複序列中的啟動子(Yamamoto等人，1980, *Cell* 22:787-797)；疱疹胸苷激酶啟動子(Wagner等人，1981, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1444-1445)；金屬硫蛋白基因之啟動子及調控序列(Prinster等人，1982, Nature 296:39-42)；及諸如 β -內醯胺酶啟動子等原核啟動子(Villa-Kamaroff等人，1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731)；或tac啟動子(DeBoer等人，1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25)。

【0257】在某些實施例中，可將編碼ABP之不同組分之核酸插入相同表現載體中。例如，可將編碼抗ALPP/ALPPL2抗體輕鏈或可變區之核酸選殖至與編碼抗ALPP/ALPPL2抗體重鏈或可變區之核酸相同之載體中。在該等實施例中，兩種核酸可由內部核糖體進入位點(IRES)並在單個啟動子之控制下分離，使得輕鏈及重鏈自相同mRNA轉錄本表現。或者，兩種核酸可在兩個單獨啟動子之控制下，使得輕鏈及重鏈由兩個單獨mRNA轉錄本表現。在一些實施例中，將編碼抗ALPP/ALPPL2抗體輕鏈或可變區之核酸選殖至一個表現載體中，並將編碼抗ALPP/ALPPL2抗體重鏈或可變區之核酸選殖至第二表現載體中。在該等實施例中，宿主細胞可與兩種表現載體共轉染以產生本發明之完整抗體或抗原結合片段。

B · 宿主細胞

【0258】在構築載體並將編碼本文所述之ABP之組分之一或多種核酸分子插入一或多種載體之適當位點後，可將完成之載體插入適宜宿主細胞中用於擴增及/或多肽表現。

【0259】因此，在另一態樣中，亦提供包含如本文所述之核酸分子或載體之宿主細胞。在各個實施例中，ABP重鏈及/或抗輕鏈可在原核細胞(例如細菌細胞)中、或在真核細胞(例如真菌細胞(如酵母)、植物細胞、昆蟲細胞及哺乳動物細胞)中表現。適當宿主細胞之選擇取決於各種因

素，例如期望表現程度、活性所期望或所需要之多肽修飾(例如醮基化或磷酸化)及摺疊成生物活性分子之容易性。

【0260】將一或多種核酸引入期望宿主細胞可藉由任何方法完成，該方法包括(但不限於)磷酸鈣轉染、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、陽離子脂質介導之轉染、電穿孔、轉導、感染等。非限制性實例性方法闡述於(例如) Sambrook等人，*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第3版，Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)中。根據任何適宜方法，核酸可在期望宿主細胞中瞬時或穩定地轉染。

【0261】實例性原核宿主細胞包括真細菌，例如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體、例如腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)、例如埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如、埃希氏大腸桿菌)、腸桿菌屬(*Enterobacter*)、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門桿菌屬(*Salmonella*)(例如、鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌屬(*Serratia*)(例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))及志賀桿菌屬(*Shigella*)；以及桿菌屬(*Bacillus*)(例如枯草桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*))、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)。

【0262】酵母亦可用作宿主細胞，包括(但不限於)釀酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S. pombe*)；或乳酸克魯維酵母(*K. lactis*)。

【0263】多種哺乳動物細胞系可用作宿主，且包括(但不限於)可自 American Type Culture Collection (ATCC)獲得之永生化細胞系，包括(但不限於)中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括CHOK1細胞(ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44，以中國倉鼠卵巢細胞 λ -DHFR (CHO, Urlaub等人，

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980)；由SV40轉變之猴腎CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎系(經亞選殖以在懸浮培養物中生長之293或293細胞(Graham等人, J. Gen Virol. 36: 59, 1977)；幼小倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；小鼠賽特利細胞(sertoli cell) (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251, 1980)；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞瘤細胞(Hep G2, HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51)；TM細胞(Mather等人, Annals N.Y Acad. Sci. 383: 44-68, 1982)；MRC 5細胞或FS4細胞；哺乳動物骨髓瘤細胞及許多其他細胞系。

【0264】一旦製備適宜宿主細胞，其可用於表現期望ABP。因此，在另一態樣中，亦提供用於產生如本文所述之ABP之方法。通常，該等方法包含在允許表現如由一或多種表現載體編碼之ABP之條件下，在培養基中培養包含如本文所述之一或多種表現載體之宿主細胞；及自培養基回收ABP。

【0265】在一些實施例中，在無細胞之系統中產生ABP。非限制性實例性無細胞之系統闡述於以下中：例如Sitaraman等人, Methods Mol. Biol. 498: 229-44 (2009)；Spirin, Trends Biotechnol. 22: 538-45 (2004)；Endo等人, Biotechnol. Adv. 21: 695-713 (2003)。

V. 抗原結合蛋白結合物

【0266】本文提供之ABP可與細胞毒性或細胞生長抑制部分(包括其

醫藥上相容之鹽)結合以形成結合物，例如抗體藥物結合物(ADC)。尤其適合與ABP (例如，抗體)係結合之部分細胞毒性劑(例如化學治療劑)、前藥轉化酶、放射性同位素或化合物或毒素(該等部分統稱為治療劑)。舉例而言，ABP(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)可與細胞毒性劑(例如化學治療劑或毒素(例如，細胞生長抑制劑或殺細胞劑(例如，相思子素、蓖麻毒蛋白A、假單胞菌屬外毒素或白喉毒素)))結合。有用之細胞毒性劑類別之實例包括(例如) DNA小溝結合劑、DNA烷基化劑及微管蛋白抑制劑。實例性細胞毒性劑包括(例如)奧裡斯他汀(auristatin)、喜樹鹼(camptothecin)、卡奇黴素(calicheamicin)、倍癌黴素(duocarmycin)、依託泊苷(etoposide)、類美登素(maytansinoid) (例如DM1、DM2、DM3、DM4)、紫杉烷(taxane)、苯并二氮呋(例如吡咯并[1,4]苯并二氮呋、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉并苯并二氮呋)及長春花生物鹼(vinca alkaloid)。

【0267】在一個實施例中，將ABP (例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)與前藥轉化酶結合。可使用已知方法將前藥轉化酶與抗體重組融合或與其化學結合。實例性前藥轉化酶係羧胺酶G2、 β -葡萄糖醛酸苷酶、青黴素-V-醯胺酶、青黴素-G-醯胺酶、 β -內醯胺酶、 β -葡萄糖苷酶、硝基還原酶及羧胺酶A。

【0268】用於將治療劑與蛋白質且特定而言與抗體結合之技術係眾所周知的。(例如，參見Alley等人，*Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14:1-9；Senter, *Cancer J.*, 2008, 14(3):154-169)。治療劑可以降低其活性之方式結合，除非其自抗體裂解(例如，藉由水解、藉由蛋白水解降解或藉由裂解劑)。在一些態樣中，治療劑係用可裂解連接體

與抗體連接，該可裂解連接體對在表現ALPP之癌細胞之細胞內環境中之裂解敏感，但對細胞外環境實質上不敏感，使得當結合物由表現ALPP之癌細胞內化時(例如，在胞內體中或例如藉助pH敏感性或蛋白酶敏感性，在溶酶體環境中或在胞膜窖環境中)，結合物自抗體裂解。在一些態樣中，治療劑亦可用不可裂解之連接體與抗體連接。

【0269】通常，ADC在治療劑及抗ABP(例如抗ALPP/ALPPL2抗體)之間包含連接體區。連接體通常在細胞內條件下係可裂解的，使得連接體之裂解自細胞內環境(例如，在溶酶體或胞內體或胞膜窖內)中之抗體釋放治療劑。連接體可為例如由細胞內肽酶或蛋白酶(包括溶酶體或胞內體蛋白酶)裂解之肽基連接體。裂解劑可包括細胞自溶酶B及D以及胞漿素(例如，參見Dubowchik及Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999)。最典型的是可由存在於表現ALPP之細胞中之酶裂解的肽基連接體。舉例而言，可使用可由在癌組織中高度表現之硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶-B裂解之肽基連接體(例如，包含Phe-Leu或Val-Cit肽之連接體)。

【0270】可裂解連接體可為pH敏感的，亦即在某些pH值下對水解敏感。通常，pH敏感性連接體可在酸性條件下水解。舉例而言，可使用可在溶酶體中水解之酸不穩定連接體(例如，脞、半卡脞、硫半卡脞、順烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或諸如此類)。(例如，參見美國專利第5,122,368號、第5,824,805號、第5,622,929號；Dubowchik及Walker, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123, 1999；Neville等人，*Biol. Chem.* 264:14653-14661, 1989)。該等連接體在中性pH條件(例如血液中之彼等)下相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0(溶酶體之近似pH)下不穩定。

【0271】其他連接體可在還原條件下裂解(例如二硫鍵連接體)。二

硫鍵連接體包括使用SATA (N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯硫代乙酸酯)、SPDP (N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB (N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT (N-琥珀醯亞胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)甲苯)、SPDB及SMPT形成之彼等。(例如，參見Thorpe等人，*Cancer Res.*47:5924-5931, 1987；Wawrzynczak等人，In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel編輯，Oxford U. Press, 1987。亦參見美國專利第4,880,935號)。

【0272】連接體亦可為丙二酸酯連接體(Johnson等人，*Anticancer Res.*15:1387-93, 1995)、馬來醯亞胺基苯甲醯基連接體(Lau等人，*Bioorg-Med-Chem.*3:1299-1304, 1995)或3'-N-醯胺類似物(Lau等人，*Bioorg-Med-Chem.* 3:1305-12, 1995)。

【0273】在其他實施例中，連接體係不可裂解之連接體，例如直接連接至治療劑並藉由抗體之蛋白水解降解被釋放之馬來醯亞胺基-伸烷基-或馬來醯亞胺-芳基連接體。

【0274】通常，連接體對細胞外環境實質上不敏感，此意味著當ADC存在於細胞外環境中(例如，在血漿中)時，ADC樣品中不超過約20%、通常不超過約15%、更通常不超過約10%、且甚至更通常不超過約5%、不超過約3%或不超過約1%之連接體裂解。連接體是否對細胞外環境實質上不敏感可藉由以下來確定：例如將(a) ADC (「ADC樣品」)及(b)等莫耳量之非結合抗體或治療劑(「對照樣品」)與血漿獨立地培育預定時間段(例如2、4、8、16或24小時)且然後比較ADC樣品中存在之非結合抗體或治療劑之量與對照樣品中存在之非結合抗體或治療劑之量(例如藉

由高效液相層析所量測)。

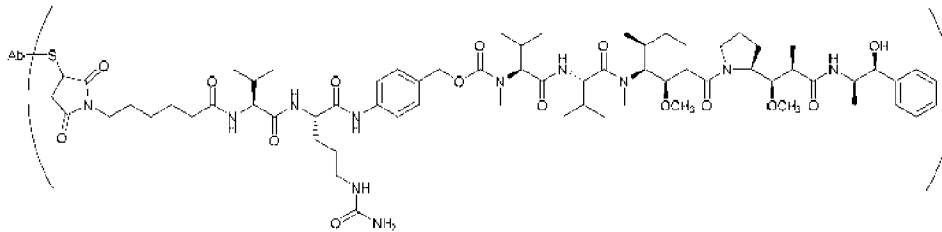
【0275】 連接體亦可促進細胞內化。當與治療劑結合時(即，在如本文所述之ADC或ADC衍生物之連接體-治療劑部分之環境中)，連接體可促進細胞內化。或者，當與治療劑及抗原結合蛋白(例如抗ALPP/ALPPL2抗體)二者結合時(即，在如本文所述之ADC之環境中)，連接體可促進細胞內化。

【0276】 實例性抗體藥物結合物包括基於奧裡斯他汀(auristatin)之抗體藥物結合物，此意味著藥物組分係奧裡斯他汀藥物。奧裡斯他汀結合微管蛋白，已顯示其干擾微管動力學及核及細胞分裂，並具有抗癌活性。通常，基於奧裡斯他汀之抗體藥物結合物包含在奧裡斯他汀藥物及ABP(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)之間之連接體。連接體可為例如可裂解之連接體(例如肽基連接體)或不可切割之連接體(例如藉由抗體之降解釋放之連接體)。奧裡斯他汀可為奧裡斯他汀E或其衍生物。奧裡斯他汀可為(例如)奧裡斯他汀E與酮酸之間形成之酯。舉例而言，可使奧裡斯他汀E與對乙醯基苯甲酸或苯甲醯戊酸反應以分別產生AEB及AEVB。其他典型奧裡斯他汀包括MMAF及MMAE。實例性奧裡斯他汀之合成及結構闡述於美國公開案第7,659,241號、第7,498,298號、第2009-0111756號、第2009-0018086號及第7,968,687號中，每一公開案出於所有目的全文以引用方式併入本文中。

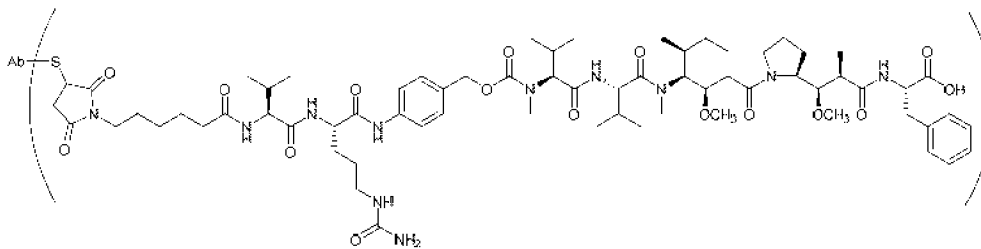
【0277】 實例性基於奧裡斯他汀之抗體藥物結合物包括mc-vc-PABC-MMAE(在本文中亦稱為vcMMAE或1006)、mc-vc-PABC-MMAF、mc-MMAF、及mp-dLAE-PABC-MMAE(在本文中亦稱為dLAE-MMAE或mp-dLAE-MMAE或7092)、如下文所述之抗體藥物結合

物，其中Ab係ABP（例如如本文所述之抗ALPP/ALPPL2抗體）且val-cit (vc)表示纈胺酸-瓜胺酸二肽，且dLAE表示D-白胺酸-丙胺酸-麩胺酸三肽：

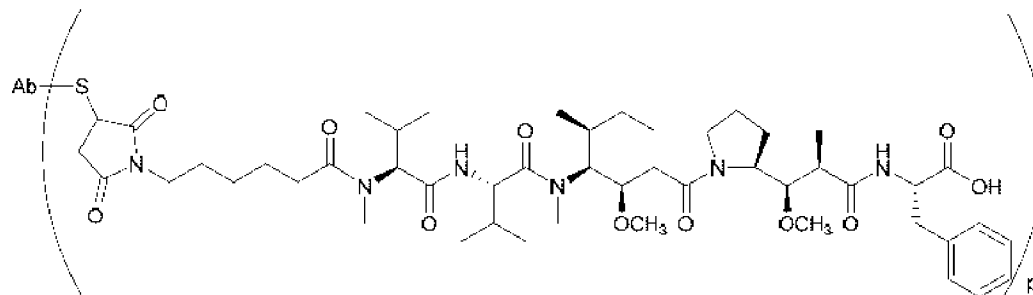
【0278】三肽：



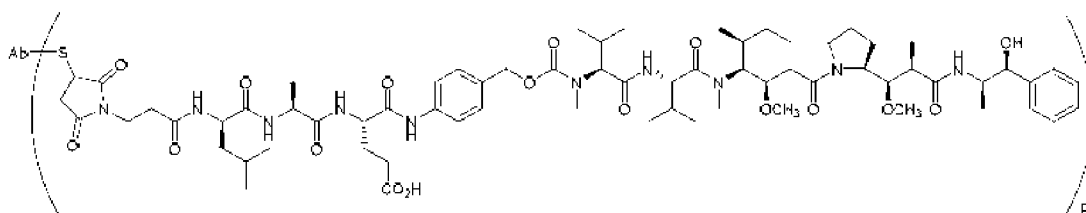
mc-vc-PABC-MMAE



mc-vc-PABC-MMAF



mc-MMAF



mp-dLAE-PABC-MMAE

或其醫藥上可接受之鹽。載藥量由p表示，即每個抗體之藥物-連接體部分之數目。根據上下文，p可表示抗體之組合物中每個抗體之藥物-連

接體部分之平均數，亦稱為平均載藥量。 p 之範圍為1至20且較佳為1至12或1至8。在一些較佳實施例中，當 p 表示平均載藥量時， p 之範圍為約2至約5。在一些實施例中， p 為約2、約3、約4或約5。製劑中每個抗體之平均藥物數量可藉由習用方法(例如質譜術、HIC、ELISA分析及HPLC)表徵。在一些態樣中，ABP(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)經由抗體之半胱胺酸殘基連接至藥物-連接體。在一些實施例中，在一些實施例中，半胱胺酸殘基係工程化至抗體中之殘基。在其他態樣中，半胱胺酸殘基係鏈間二硫鍵半胱胺酸殘基。

VI. 治療應用

A. 治療疾病之方法

【0279】 在另一態樣中，提供治療與表現ALPP及/或ALPPL2之細胞相關之病症(例如癌症)之方法。相對於與感興趣之病症不相關之細胞，該等細胞可表現或可不表現升高含量之ALPP及/或ALPPL2。因此，某些實施例涉及本文所述之ABP(例如抗ALPP/ALPPL2抗體)作為裸抗體或作為結合物(例如抗體藥物結合物)治療個體(例如患有癌症之個體)之用途。在該等實施例中之一些中，該方法包含將有效量之ABP(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)或結合物(例如，抗ALPP/ALPPL2 ADC)或包含該ABP或結合物之組合物投與給有需要之個體。在某些實例性實施例中，該方法包含治療細胞、組織、器官、動物或患者之癌症。最通常，治療方法包含治療人類之癌症。在一些實施例中，治療包括單一療法。在其他方法中，抗原結合蛋白作為與一或多種其他治療劑、手術及/或輻射之組合療法之一部分投與。

【0280】 癌症中之陽性治療效應可藉由多種方式量測(例如，參見W.

A. Weber, J. Null. *Med.* 50:1S-10S (2009)；及Eisenhauer等人，*Eur. J Cancer* 45:228-247 (2009)。在一些實施例中，使用RECIST 1.1準則來評價對ABP或結合物治療之反應。在一些實施例中，藉由治療有效量實現之治療係以下中之任一者：抑制進一步之腫瘤生長、誘導腫瘤消退、部分反應(PR)、完全反應(CR)、無進展存活(PFS)、無疾病存活(DFS)、客觀反應(OR)或總體存活(OS)。在一些實施例中，治療延遲或防止轉移之發作。可使用各種方法監測治療進展。例如，抑制可導致腫瘤大小減小及/或腫瘤內代謝活性降低。舉例而言，該兩個參數結可藉由MRI或PET掃描進行量測。抑制亦可藉由生檢來監測，以確定壞死程度、腫瘤細胞死亡及腫瘤內血管供應之程度。有效治療癌症患者之本文所述療法之劑量方案可根據諸如患者之疾病狀態、年齡及體重以及療法在個體中引發抗癌反應之能力等因素而變化。儘管本發明之治療方法、藥劑及用途之實施例不可在每個個體中有效達成陽性治療效應，但在統計上顯著之數目之個體中應有效達成陽性治療效應，如藉由業內已知之任何統計測試(例如Student's測試、chi²-測試、根據Mann及Whitney之U-測試、Kruskal-Wallis測試(H-測試)、Jonckheere-Terpstra-測試及Wilcoxon-測試)所測定。

【0281】如本文所用之「RECIST 1.1反應準則」意指Eisenhauer等人，*Eur. J Cancer* 45:228-247 (2009)中所述之定義，若適當，基於所量測反應之背景用於靶損傷或非靶損傷。

【0282】有效量之ABP (例如抗ALPP/ALPPL2抗體)或ADC可以一次或多次投與、施加或一或多個劑量投與，且不限於特定調配物或投與途徑。通常，活性組分之治療有效量在0.1 mg/kg至100 mg/kg、例如1 mg/kg至100 mg/kg、1 mg/kg至10 mg/kg之範圍內。

【0283】 ABP (例如抗ALPP/ALPPL2抗體)之實例性劑量係(例如) 0.1 mg/kg至50 mg/kg患者體重、更通常1 mg/kg至30 mg/kg、1 mg/kg至20 mg/kg、1 mg/kg至15 mg/kg、1 mg/kg至12 mg/kg、或1 mg/kg至10 mg/kg、或2 mg/kg至30 mg/kg、2 mg/kg至20 mg/kg、2 mg/kg至15 mg/kg、2 mg/kg至12 mg/kg、或2 mg/kg至10 mg/kg、或3 mg/kg至30 mg/kg、3 mg/kg至20 mg/kg、3 mg/kg至15 mg/kg、3 mg/kg至12 mg/kg、或3 mg/kg至10 mg/kg。

【0284】 ABP (例如抗ALPP/ALPPL2抗體)之實例性劑量係(例如) 0.01 mg/kg至10 mg/kg、0.1 mg/kg至10 mg/kg、0.3 mg/kg至3 mg/kg、0.5 mg/kg至3 mg/kg、1 mg/kg至7.5 mg/kg、或2 mg/kg至7.5 mg/kg或3 mg/kg至7.5 mg/kg個體體重、或0.1-20、或0.5-5 mg/kg體重(例如0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10 mg/kg)或10-1500或200-1500 mg作為固定劑量。在一些方法中，投與患者至少1.5 mg/kg、至少2 mg/kg或至少3 mg/kg之劑量，每三週或更長時間投與一次。

【0285】 投與之劑量可根據已知因素而變化，該等因素例如特定試劑之藥效學特徵及其投與方式及途徑；接受者之年齡、健康狀況及體重；欲治療之疾病或適應症之類型及程度、症狀之性質及程度、並行治療之種類、治療之頻率及期望之效應。可將初始劑量增加至超過上限含量，以便快速達到期望血液含量或組織含量。或者，初始劑量可小於最佳劑量，且每日劑量可在療程期間中逐漸增加。

【0286】 投與頻率取決於ABP或ADC在循環中之半衰期、患者狀況及投與途徑等因素。頻率可為(例如)每日、每週、每月、每季度或以不規則之間隔響應於患者狀況之變化或所治療之癌症之進展。靜脈內投與之實

例性頻率係在連續療程內每週兩次及每季度一次之間，但亦可更頻繁或更不頻繁投用。靜脈內投與之其他實例性頻率係在連續療程內每週、每隔一週、每四週中之三週或每三週，但亦可更頻繁或更不頻繁投用。對於皮下投與，實例性投用頻率係每日至每月，但亦可更頻繁或更不頻繁投用。

【0287】 投與之劑量之數量取決於癌症之性質(例如，是否表現出急性或慢性症狀)以及病症對治療之反應。在一些態樣中，對於急性病症或慢性病症之急性惡化，1至10個劑量通常足矣。有時，單次濃注劑量(視情況以分開形式)對於急性病症或慢性病症之急性惡化足矣。對於急性病症之復發或急性惡化，可重複治療。對於慢性病症，抗體可以規則間隔、例如每週、每兩週、每月、每季度、每六個月投與一次，持續至少1年、5年或10年，或持續患者之生命。

【0288】 適於用本文提供之抗原結合蛋白治療之實例性癌症係在癌細胞或組織中具有ALPP及/或ALPPL2表現之癌症。可用ABP或其結合物治療之癌症之實例包括(但不限於)造血系統腫瘤、產生實體腫瘤之造血系統腫瘤、實體腫瘤、軟組織腫瘤及轉移性病灶。

【0289】 可治療之實例性實體腫瘤包括(但不限於)各種器官系統之惡惡性病，例如腺癌及癌，例如影響頭及頸(包括咽)、肺(小細胞肺癌(SCLC)或非小細胞肺癌(NSCLC))、乳房、胃腸道(例如口腔、食管、胃、肝、胰臟、小腸、結腸及直腸、肛管)、生殖器及泌尿生殖道(例如腎、尿道、膀胱、卵巢、子宮、子宮頸、子宮內膜、前列腺、睪丸)、皮膚(例如黑色素瘤)及諸如此類之彼等。在某些實施例中，實體腫瘤係NMDA受體陽性畸胎瘤。在其他實施例中，癌症選自乳癌、結腸癌、胰臟癌(例如胰臟神經內分泌腫瘤(PNET)或胰臟導管腺癌(PDAC))、胃癌、子

宮癌及卵巢癌。在一些實施例中，癌症係惡性睪丸生殖細胞瘤(GCT)或惡性卵巢GCT。在其他實施例中，癌症並非純畸胎瘤。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係轉移性的。在一些實施例中，實體腫瘤癌症不能藉由手術去除(不可切除)。

【0290】 在某些實施例中，癌症係與腹水相關之實體腫瘤。腹水係許多類型之癌症之症狀，且亦可由多種病況(晚期肝病)引起。可能導致腹水之癌症之類型包括(但不限於)乳癌、肺癌、大腸癌(結腸癌)、胃癌、胰臟癌、卵巢癌、子宮癌(子宮內膜癌)、腹膜癌及諸如此類。在一些實施例中，與腹水相關之實體腫瘤選自乳癌、結腸癌、胰臟癌、胃癌、子宮癌及卵巢癌。在一些實施例中，癌症與胸膜滲出液相關，例如肺癌。

【0291】 在特定實施例中，癌症係HGSOC，其中HGSOC在患者中先前之含鉑化學療法後之六個月內已進展或復發，且患者已接受一至三個先前抗癌療法線，包括至少一個含有貝伐珠單抗(bevacizumab)或貝伐珠單抗(bevacizumab)之生物類似劑之療法線。在其他實施例中，癌症係NSCLC，其中患者具有不可切除之局部晚期或轉移性NSCLC，且已接受基於鉑之療法及PD-L1抑制劑。在其他實施例中，癌症係胃癌，其中患者具有不可切除之局部晚期或轉移性胃癌且已接受先前之基於鉑及氟嘧啶之化學療法。

【0292】 在特定實施例中，癌症係卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌、膀胱癌或胃癌。

B. 組合療法

【0293】 本文所述之方法、抗原結合蛋白及結合物可與其他治療劑及/或形式組合使用。在該等組合治療方法中，在個體罹患病症之過程期

間，向個體遞送兩種(或更多種)不同治療，使得治療對患者之效應在一時間點重疊。在某係實施例中，一種治療之遞送在第二種治療開始遞送之前仍進行，以使得在投與方面存在重疊。這在本文中有時稱作「同時」或「並行遞送」。在其他實施例中，一種治療在另一種治療開始遞送之前結束遞送。在任一情形的一些實施例中，治療因組合投與而更為有效。舉例而言，與不存在第一次治療下投與第二次治療所觀察者相比，第二次治療更有效，例如，利用更少第二次治療觀察到等效效應，或第二次治療更大程度地減少症狀，或利用第一次治療觀察到類似情況。在一些實施例中，遞送使得症狀或與病症相關的其他參數的減輕程度比利用在不存在另一種治療的情況下遞送一種治療所觀察到的減輕程度更高。兩種治療之效應可部分累加、完全累加或超過累加(即協同反應)。遞送可使得當遞送第二治療時仍可檢測所遞送的第一治療的效應。

【0294】 在某些實施例中，本文提供之方法包括向個體投與如本文所述之ABP (例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)或ADC (例如，組合物或製劑)與一或多種額外療法(例如，手術、放射療法或投與另一治療製劑)之組合。舉例而言，在一些實施例中，將ABP與化學療法(例如細胞毒性劑)、靶向療法(例如針對癌症抗原之抗體)、血管生成抑制劑及/或免疫調節劑(例如免疫檢查點分子之抑制劑)組合。在其他實施例中，額外療法係抗發炎(例如，胺甲喋呤)或抗纖維變性劑。ABP (例如抗ALPP/ALPPL2抗體)或ADC與額外療法可同時或依序投與。

【0295】 在一些實施例中，可與ABP組合使用之實例性細胞毒性劑包括抗微管劑、拓撲異構酶抑制劑、抗代謝物、蛋白質合成及降解抑制劑、有絲分裂抑制劑、烷基化劑、鉑化劑、核酸合成抑制劑、組織蛋白去

乙醯酶抑制劑(HDAC抑制劑，例如，伏立諾他(vorinostat) (SAHA，MK0683)，恩替諾特(entinostat) (MS-275)、帕比司他(panobinostat) (LBH589)、曲古抑菌素A (trichostatin A，TSA)、莫賽替諾司他(mocetinostat) (MGCD0103)、貝林司他(belinostat) (PXD101)、羅米地辛(romidepsin) (FK228，酯肽))、DNA甲基轉移酶抑制劑、氮芥、亞硝基脲、次乙亞胺、磺酸烷基酯、三氮烯、葉酸類似物、核苷類似物、核糖核苷酸還原酶抑制劑、長春花生物鹼、紫杉烷、埃博黴素(epothilone)、嵌入劑、能夠干擾信號轉導路徑之試劑、促進細胞凋亡之試劑及輻射、或結合表面蛋白以遞送毒性試劑之抗體分子結合物。在一個實施例中，可與本文所述ABP一起投與之細胞毒性劑係基於鉑之試劑(例如順鉑(cisplatin))、環磷醯胺(cyclophosphamide)、達卡巴嗪(dacarbazine)、胺甲喋呤、氟尿嘧啶(flourouracil)、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱(capecitabine)、羥基脲(hydroxyurea)、托泊替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、氮胞苷(azacytidine)、伏立諾他、伊沙匹隆(ixabepilone)、硼替佐米(bortezomib)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)或多西他賽(docetaxel))、細胞鬆弛素B (cytochalasin B)、短桿菌素D (gramicidin D)、溴乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷、替尼泊苷(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春瑞濱(vinorelbine)、秋水仙鹼(colchicin)、蔥環(例如多柔比星(doxorubicin)或泛艾黴素(epirubicin))、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蔥醌(mitoxantrone)、光輝黴素(mithramycin)、放線菌素D (actinomycin D)、阿德力黴素(adriamycin)、1-去氫鞣固酮、糖皮質激

素、(普魯卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)、嘌呤黴素(puromycin)、蓖麻毒蛋白(ricin)或類美登素。

【0296】在一些實施例中，投與抗原結合蛋白作為化學治療方案之部分，例如CHOP（環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及普賴鬆(prednisone)）；CVP（環磷醯胺、長春新鹼及普賴鬆）；RCVP（利妥昔單抗(rituximab)+CVP）；RCHOP（利妥昔單抗+CHOP）；RCHP（利妥昔單抗、環磷醯胺、多柔比星及普賴鬆）；RICE（利妥昔單抗+異環磷醯胺(ifosamide)、卡鉑、依託泊苷)；RDHAP、(利妥昔單抗+地塞米鬆、阿糖胞苷、順鉑)；RESHAP（利妥昔單抗+依託泊苷、甲基普賴蘇濃、阿糖胞苷、順鉑)；R-BENDA（利妥昔單抗及苯達莫司汀(Bendamustine)）、RGDP（利妥昔單抗、吉西他濱、地塞米鬆、順鉑)。在實施例中，CHOP、CVP、RCVP、RCHOP、RCHP、RICE、RDHAP、RESHAP、R-BENDA及RGDP中之一者與如本文所述之抗原結合蛋白或結合物以組合療法投與。

【0297】在某些實施例中可與ABP組合之靶向療法之實例包括(但不限於)治療性抗體之使用。實例性抗體包括(但不限於)與腫瘤細胞上存在之細胞表面蛋白(例如Her2、CDC20、CDC33、黏蛋白樣糖蛋白)及表皮生長因子受體(EGFR)結合且視情況誘導對展示該等蛋白之腫瘤細胞之細胞生長抑制及/或細胞毒性效應之彼等抗體。實例性抗體亦包括可用於治療乳癌及其他形式癌症之HERCEPTIN®(曲妥珠單抗(trastuzumab))、以及可用於治療非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)及其他形式癌症之RITUXAN®(利妥昔單抗)、ZEVALIN®（替伊莫單抗(ibritumomab

tiuxetan))、GLEEVEC®及LYMPHOCIDE®(依帕珠單抗(epratuzumab))。其他實例性抗體包括帕尼單抗(panitumumab)(VECTIBIX®)、ERBITUX®(IMC-C225)；厄替諾利(ertinolib)(Iressa)；BEXXAR®(碘131托西莫單抗(tositumomab))；KDR(激酶結構域受體)抑制劑；抗VEGF抗體及拮抗劑(例如Avastin®、莫替沙尼(motesanib)及VEGAF-TRAP)；抗VEGF受體抗體及抗原結合區；抗Ang-1及Ang-2抗體及抗原結合區；Tie-2及其他Ang-1及Ang-2受體之抗體；Tie-2配體；針對Tie-2激酶抑制劑之抗體；Hif-1a之抑制劑及Campath®(阿倫單抗(Alemtuzumab))。在某些實施例中，癌症治療劑係選擇性誘導腫瘤細胞中細胞凋亡之多肽，包括(但不限於)TNF-相關多肽TRAIL。

【0298】在某些實施例中，如本文提供之抗原結合蛋白與一或多種減少血管生成之抗血管生成劑組合使用。該等試劑包括(但不限於)IL-8拮抗劑；Campath®、B-FGF；FGF拮抗劑；Tek拮抗劑(Cerretti等人，美國公開案第2003/0162712號；Cerretti等人，美國專利第6,413,932號，及Cerretti等人，美國專利第6,521,424號)；抗TWEAK劑(其包括(但不限於)抗體及抗原結合區)；可溶性TWEAK受體拮抗劑(Wiley，美國專利第6,727,225號)；用於拮抗整聯蛋白與其配體之結合之ADAM解聚蛋白結構域(Fanslow等人，美國公開案第2002/0042368號)；抗eph受體及抗ephrin抗體、抗原結合區或拮抗劑(美國專利第5,981,245號、第5,728,813號、第5,969,110號、第6,596,852號、第6,232,447號、第6,057,124號)；抗VEGF劑(例如特異性結合VEGF、或可溶性VEGF受體或其配體結合區之抗體或抗原結合區)，例如Avastin®或VEGF-TRAP™；及抗VEGF受體劑(例如與其特異性結合之抗體或抗原結合區)；EGFR抑制劑(例如與其特異

性結合之抗體或抗原結合區)，例如帕尼單抗、IRESSA® (吉非替尼(gefitinib))、TARCEVA® (厄洛替尼(erlotinib))；抗Ang-1及抗Ang-2劑(例如與其或其受體特異性結合之抗體或抗原結合區，例如Tie-2/TEK)；及抗Tie-2激酶抑制劑(例如特異性結合且抑制生長因子之活性之抗體或抗原結合區，例如肝細胞生長因子(HGF，亦稱為擴散因子)之拮抗劑，及特異性結合其受體「c-met」之抗體或抗原結合區)；抗PDGF-BB拮抗劑；PDGF-BB配體之抗體及抗原結合區；及PDGFR激酶抑制劑。

【0299】可與抗原結合蛋白組合使用之其他抗血管生成劑包括諸如MMP-2 (基質金屬蛋白酶2)抑制劑、MMP-9 (基質金屬蛋白酶9)抑制劑及COX-II (環加氧酶II)抑制劑等試劑。有用之COX-II抑制劑之實例包括CELEBREX® (塞來昔布(celecoxib))、伐地昔布(valdecoxib)及羅非昔布(rofecoxib)。

【0300】如本文所用之「免疫檢查點分子」係指免疫系統中上調信號之分子(刺激分子)及/或下調信號之分子(抑制分子)。許多癌症藉由抑制T細胞信號來逃避免疫系統。在某些實施例中可與ABP一起使用之實例性免疫檢查點分子包括(但不限於)程式性細胞死亡蛋白1 (PD-1)、程式化死亡-配體1 (PD-L1)、PD-L2、細胞毒性T淋巴球相關之蛋白4 (CTLA-4)、含結構域之T細胞免疫球蛋白及黏蛋白3 (TIM-3)、淋巴球活化基因3 (LAG-3)、癌胚抗原有關之細胞黏著分子1 (CEACAM-1)、CEACAM-5、T細胞活化之V-結構域Ig抑制劑(VISTA)、B及T淋巴球減弱劑(BTLA)、具有Ig及ITIM結構域之T細胞免疫受體(TIGIT)、白血球相關之免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、CD160、TGFR、腺苷2A受體(A2AR)、B7-H3 (亦稱為CD276)、B7-H4 (亦稱為VTCN1)、吡啶胺2,3-雙加氧酶(IDO)、

2B4、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)、OX40、4-1BB、4-1BBL、B7-H3、誘導型T細胞共刺激物(ICOS/ICOS-L)、CD27/CD70、糖皮質激素誘導之TNF受體(GITR)、CD47/信號調節蛋白 α (SIRP α)及吲哚胺-2,3-雙加氧酶(IDO)。

【0301】在某些實施例中可與ABP組合使用之免疫檢查點抑制劑之具體實例包括(但不限於)以下單株抗體：PD-1抑制劑，例如派姆單抗(pembrolizumab) (Keytruda®，Merck)及尼沃魯單抗(nivolumab) (Opdivo®，Bristol-Myers Squibb)；PD-L1抑制劑，例如阿替利珠單抗(atenzolizumab) (Tecentriq®，Genentech)、阿維魯單抗(avelumab) (Bavencio®，Pfizer)、德瓦魯單抗(durvalumab) (Imfinzi®，AstraZeneca)；及CTLA-1抑制劑，例如伊匹單抗(ipilimumab) (Yervoy®，Bristol-Myers Squibb)及曲美目單抗(tremelimumab) (AstraZeneca)。

VII. 診斷應用

【0302】在另一態樣中，如本文提供之ABP(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體或其片段)、多肽及核酸可用於檢測、診斷及監測與ALPP及/或ALPPL2相關之疾病、病症或病況之方法中。

【0303】在一些實施例中，該方法包含檢測自懷疑患有與ALPP及/或ALPPL2相關之病症之個體獲得之樣品中ALPP及/或ALPPL2之表現。在一些實施例中，檢測方法包含使樣品與如本文所述之抗體、多肽或多核苷酸接觸，並確定結合程度是否與參考或比較樣品之結合程度不同。在一些實施例中，該等方法可用於確定本文所述之抗體或多肽是否係對個體之適當治療。

【0304】舉例而言，在一個實施例中，使細胞或細胞/組織裂解物與抗ALPP/ALPPL2抗體接觸，並測定抗體與細胞或抗原之間之結合。當與相同組織類型之參考細胞相比，測試細胞顯示結合活性時，此可指示存在與ALPP及/或ALPPL2相關之疾病或病況。在一些實施例中，測試細胞來自人組織。

【0305】可使用業內已知用於檢測特異性抗體-抗原結合之各種方法。可根據本發明執行之實例性免疫分析包括螢光偏振免疫分析(FPIA)、螢光免疫分析(FIA)、酶免疫分析(EIA)、濁度抑制免疫分析(NIA)、酶聯免疫吸附分析(ELISA)及放射免疫分析(RIA)。

【0306】本文提供之診斷應用包括使用ABP(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體或其片段)來檢測ALPP及/或ALPPL2之表現以及配體與ALPP及/或ALPPL2之結合。對於診斷應用，ABP通常用可檢測之標記基團進行標記。適宜標記基團包括(但不限於)以下：放射性同位素或放射性核素(例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、螢光基團(例如，FITC、玫瑰紅(rhodamine)、鏷系磷光體)、酶基團(例如，辣根過氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶)、化學發光基團、生物素基、或由二級報導基因(例如，亮胺酸拉鍊對序列、二級抗體之結合位點、金屬結合結構域、表位標籤)識別之預定多肽表位。在一些實施例中，標記基團經由不同長度之間隔體臂與ABP偶聯，以減少潛在立體阻礙。業內已知且可使用標記蛋白質之各種方法。用於檢測ALPP及/或ALPPL2之存在之方法之實例包括免疫分析，例如上述之彼等。

【0307】在另一態樣中，ABP可用於鑑別表現ALPP及/或ALPPL2之一或多種細胞。在具體實施例中，用標記基團標記抗原結合蛋白，並檢測

標記之抗原結合蛋白與ALPP及/或ALPPL2之結合。在又一具體實施例中，活體內檢測抗原結合蛋白與ALPP及/或ALPPL2之結合。

【0308】抗原結合蛋白(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體或其片段)亦可使用業內熟知之技術在病理學中用作染色試劑。

VIII. 醫藥組合物及調配物

【0309】亦提供包含ABP (例如，抗ALPP/ALPPL2抗體或其片段)之醫藥組合物，且其可用於本文揭示之治療應用中之任一者中。在某些實施例中，醫藥組合物包含治療有效量之一種或複數種抗原結合蛋白以及醫藥上可接受之稀釋劑或載劑。在其他實施例中，醫藥組合物包含治療有效量之一種或複數種抗原結合蛋白、醫藥上可接受之稀釋劑、載劑、增溶劑、乳化劑、防腐劑及/或佐劑。在所採用之劑量及濃度下，可接受之調配材料對接受者係無毒的。醫藥組合物可調配為液體、冷凍或凍乾組合物。

【0310】在某些實施例中，醫藥組合物可含有用於改變、維持或保留(例如)組合物之pH、滲透性、黏度、澄清度、顏色、等滲性、氣味、無菌性、穩定性、溶解或釋放速率、吸收或滲透之調配材料。適宜調配材料包括(但不限於)胺基酸；抗微生物劑；抗氧化劑；緩衝劑；增積劑；螯合劑；複合劑；填充劑；碳水化合物，例如單醣或二醣；蛋白質；著色、矯味及稀釋劑；乳化劑；親水聚合物；低分子量多肽；成鹽相對離子(例如鈉)；防腐劑；溶劑(例如甘油、丙二醇或聚乙二醇)；糖醇；懸浮劑；表面活性劑或潤濕劑；穩定性增強劑；張力增強劑；遞送媒劑；及/或醫藥佐劑。可納入醫藥組合物中之適宜試劑之額外詳情及選擇提供於以下中：例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 第22版, (Lloyd V. Allen編輯) Pharmaceutical Press (2013)；Ansel等人，Pharmaceutical Dosage

Forms and Drug Delivery Systems, 第7版, Lippencott Williams and Wilkins (2004); 及Kibbe等人, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 第3版, Pharmaceutical Press (2000)。

【0311】根據例如預期投與途徑、遞送形式及期望劑量選擇醫藥組合物之組分。例如, 參見Remington's Pharmaceutical Sciences, 第22版, (Loyd V. Allen編輯) Pharmaceutical Press (2013)。選擇組合物以影響所揭示之抗原結合蛋白之物理狀態、穩定性、活體內釋放速率及活體內清除速率。醫藥組合物中之主要媒劑或載劑本質上可為水性之或非水性的。舉例而言, 適宜媒劑或載劑可為注射用水或生理鹽水溶液。在某些實施例中, 抗原結合蛋白組合物可藉由將具有期望純度之選擇之組合物與呈凍乾餅或水溶液形式之可選調配試劑混合來製備用於儲存。此外, 在某些實施例中, 可使用適當賦形劑將抗原結合蛋白調配為凍乾物。

【0312】醫藥組合物經調配以與其預期投與途徑相容。投與途徑之實例係靜脈內(IV)、真皮內、吸入、經皮、局部、經黏膜及直腸投與。抗原結合蛋白(例如抗體)之較佳投與途徑係IV輸注。在另一較佳實施例中, 製劑係藉由肌內或皮下注射來投與。

IX. 套組/製品

【0313】亦提供含有如本文所述ABP之套組。在一個實施例中, 該等套組包含一或多個包含抗原結合蛋白(例如, 抗ALPP/ALPPL2抗體)之容器、或單位劑型及/或製品。在一些實施例中, 提供單位劑量, 其中單位劑量含有預定量之包含抗原結合蛋白之組合物, 具有或不及具有一或多種額外試劑。在一些實施例中, 該單位劑量在用於注射之一次性使用預填充注射器中供應。在各個實施例中, 包含在單位劑量中之組合物可包含:

鹽水；緩衝劑、其他調配物組分，及/或在如本文所述之穩定及有效之pH範圍內經調配。或者，在一些實施例中，組合物以凍乾粉之形式提供，其可在添加適當液體(例如無菌水)時經重構。

【0314】如本文提供之一些套組進一步包含根據本文所述之方法中之任一者用於治療與ALPP及/或ALPPL2相關之疾病(例如卵巢癌)之說明書。套組可進一步包含如何選擇或鑑別適合治療之個體之說明。本發明套組中供應之說明書通常係標記或包裝插頁(例如，套組中包括之紙頁)上之書面說明書，但機讀說明書(例如，載於磁性或光學存儲盤上之說明書)亦係可接受的。在一些實施例中，套組進一步包含另一治療劑，例如上文所述之適於與抗原結合蛋白組合使用之彼等。

【0315】在另一態樣中，提供用於檢測樣品中ALPP及/或ALPPL2、或表現ALPP及/或ALPPL2之細胞之存在之套組。該等套組通常包含如本文所述之抗原結合蛋白及套組之使用說明書。

【0316】某些套組例如用於診斷癌症，且包含含有抗原結合蛋白(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)及一或多種用於檢測抗原結合蛋白與ALPP及/或ALPPL2之結合之試劑的容器。該等試劑可包括例如螢光標籤、酶標籤或其他可檢測標籤。試劑亦可包括二級或三級抗體或試劑，例如用於產生可經可視化之產物之酶促反應。在一個實施例中，診斷套組包含在適宜容器中之標記或未標記形式之一或多種抗原結合蛋白、用於間接分析之培育之試劑以及用於在該分析中檢測之受質或衍生劑，此取決於標記之性質。

【0317】本文提供之套組可用於原位檢測。利用該等套組之一些方法包含自患者取出組織學樣本，且然後將標記之抗原結合蛋白(例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)與生物樣品組合。利用該等方法，不僅可確定ALPP

或ALPP-片段及/或ALPPL2或ALPPL2-片段之存在，而且可確定該等肽在檢查之組織中之分佈(例如，在評價癌細胞擴散之背景下)。

【0318】 在另一態樣中，提供與抗原結合蛋白結合之抗個體遺傳型抗體(Id) (例如，抗ALPP/ALPPL2抗體)。Id抗體可藉由用所製備之抗Id之mAb免疫與抗ALPP/ALPPL2 mAb之來源相同之物種及遺傳類型之動物來製備。經免疫之動物通常可藉由產生該等個體遺傳型決定子之抗體(抗-Id抗體)來識別免疫抗體之個體遺傳型決定子並對其有反應。

【0319】 以下實例(包括所執行之實驗及所達成之結果)係僅出於闡釋目的而提供，且不應將其視為限制所附申請專利範圍之範圍。

X. 實例

實例1：ALPP/ALPPL2表現程度

【0320】 根據 American Type Culture Collection (ATCC) 或 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany (DMSZ)、Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)或如其他已知，將以下實例中闡述之細胞系維持在培養物中。

【0321】 使用鼠類ALPP mAb作為一級抗體及如製造商(DAKO A/S, Glostrup, Denmark)闡述之DAKO QiFiKit流式細胞術間接分析測定各種癌細胞系之細胞表面上之ALPP拷貝數之量化，並利用Attune NxT流式細胞計數器進行評估。每個細胞表現之ALPP分子之所得數量示於表3中。自Genentech細胞系RNA-seq數據獲得ALPP/ALPPL2 mRNA表現程度(參見Klijn C等人 Nat Biotechnol.2015年3月；33(3):306-12)。

表3：各種細胞系之每個細胞之ALPP/ALPPL2分子

細胞系	適應症	受體數量 (× 10 ³)	ALPP mRNA (TPM+1)	ALPPL2 mRNA (TPM+1)
HEP2	子宮頸	745	849	178
NCI-H1651	肺	500	165	665
RMUGS	卵巢	400	81	16
MKN1	胃	374	148	26
COV644	卵巢	200	121	26
NUGC3	胃	191	58	11
NCI-N87	胃	140	41	25
CAOV3	卵巢	60	12	3
CasKi	子宮頸	52	48	8
LoVo	結腸	50	10	6
647V	膀胱	33	0	0
ABC1	肺	31	25	6
HCC15	肺	0	0	0
NCI-H1869	肺	0	0	0

【0322】腫瘤組織陣列來自商業來源。冷凍或福馬林(formalin)固定及石蠟包埋(FFPE)組織購自US Biomax Inc。所有樣品皆係在Bond-Max™自動染色儀(Leica)上處理。

【0323】染色前，用丙酮將載玻片上切片之冷凍樣品固定10分鐘。將載玻片與一級抗ALPP/ALPPL2抗體(H17E2；Thermo；目錄號MA1-20245)一起培育。同型匹配之小鼠IgG1用作背景染色之陰性對照。對於自動化IHC染色，吾人使用精製DAB套組(Leica，目錄號DS9800)。將載玻片與針對抗ALPP之小鼠單株一級抗體以5 µg/ml培育45 min，與Peroxabolish (Biocare Medical目錄號PXA969M)試劑初步培育15 min，且與蛋白阻斷劑(DAKO目錄號X0909)初步培育20 min。在72°C下使用Bond™脫蠟溶液(Leica，目錄號AR9222)對載玻片上切片之FFPE載玻片進

行脫石蠟，且再水合。在95-100°C下使用基於EDTA之Bond™表位修復溶液2 (Leica, 目錄號AR9640) 實施抗原修復20 min，之後與一級抗ALPP/ALPPL2抗體(25C3單株Ab；內部開發之小鼠單株抗體)以1 µg/ml一起培育45分鐘。同型匹配之小鼠IgG2a用作背景染色之陰性對照。對於自動化IHC染色，吾人使用精製DAB套組(Leica, 目錄號DS9800)。將載玻片與針對ALPP mAb之小鼠單株抗體以1 µg/ml培育45 min，並進行初步20 min蛋白阻斷(DAKO目錄號X0909)。在色素原顯影後，將切片用蘇木素複染並蓋玻片。由病理學家對載玻片進行評估及評分，並使用Aperio載玻片掃描儀(Leica)採集影像。染色強度評分為0至+3，且頻率為四分位數(0-25、26-50、51-75及76-100)。如表4所示，在包括卵巢、睪丸及子宮內膜在內之多種實體腫瘤適應症中，發現ALPP/ALPPL2表現盛行率較高。約25%之肺腺癌、胃癌及膀胱癌樣品亦存在ALPP/ALPPL2表現。

表4

癌症	任何表現 [†]	高表現 ^{††}
卵巢 ¹	90%	70%
睪丸	80%	60%
子宮內膜	57%	41%
肺腺癌 (NSCLC)	80%*	25%
胃	30%	25%
膀胱 ²	59%	23%

¹ 鉑抗性

² 不可切除

[†] 基於任何頻率及強度之發生率

^{††} 基於評分2+之表現頻率，> 25%之陽性細胞

* 1+ 在具有非贅瘤組織之界面處觀察到之表現。

實例2：前導抗體選擇

結合及活體外細胞毒性

【0324】用重組全長ALPPL2免疫小鼠。將自產生ALPP抗體之小鼠之脾及淋巴結收穫之淋巴球與骨髓瘤細胞融合。在雜交瘤生長培養基中回收融合細胞過夜。回收後，將細胞旋轉，且然後置於半固體培養基中。培育雜交瘤並挑選產生IgG之雜交瘤純系。根據製造商之說明書，使用iQue在表現ALPP、ALPPL2、ALPI及ALPL之HEK293細胞系上篩選來自此雜交瘤活動之抗體。將與ALPP及ALPPL2、而非ALPI及ALPL具有交叉反應性之抗體評估為ADC。

【0325】將各種小鼠抗ALPP/ALPPL2單株小鼠抗體與10-12個負荷量之MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE或奧裡斯他汀T結合，其分別展現旁觀者活性或不展現旁觀者活性。結合方法闡述於美國公開案第2018/0092984號中。

【0326】將CAOV3 (ALPP)、COV644 (ALPP+)及NCI-H1651 (ALPPL2++ALPP+)腫瘤細胞與ALPP/ALPPL2抗體藥物結合物(ADC)在37°C下一起培育96小時。人類IgG ADC用作陰性對照。根據製造商之說明書，使用Cell Titer Glo量測細胞存活率。在Fusion HT螢光讀板儀(Perkin Elmer, Waltham, MA)上量測螢光信號。將數據針對未處理之細胞正規化，並使用Graph Pad軟體計算x50值。如圖1-2所示，Abs之亞組展現低x50值，兩個酬載皆表示高藥物遞送能力。

流式細胞術及飽和結合分析

【0327】使用表現食蟹猴ALPP、人類ALPP、ALPPL2、ALPI及ALPL之HEK293評估特異性及結合親和性。簡言之，將10萬個靶表現

HEK293細胞轉移至96孔板。藉由離心沈澱細胞，並將其重新懸浮於100 μ L PBS+2% w/v BSA中。阻斷後，將細胞與濃度範圍為8 pM至666 nM之未標記之單株抗ALPP/ALPPL2抗體重新懸浮於PBS + 2% w/v BSA中，並在冰上培育30分鐘。將細胞在PBS中洗滌兩次，且在冰上重新懸浮於R-PE標記之二級山羊抗人類或抗小鼠抗體(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)中30分鐘。藉由流式細胞術確認單株抗體對人類及食蟹猴ALPP及ALPPL2、而非此鹼性磷酸酶家族之其他成員之特異性。使用Attune NxT流式細胞計數器分析螢光，且使用飽和螢光信號百分比測定結合百分比且隨後計算表觀 K_D 。如圖3中所示，抗體1C7及12F3在頂級候選者中顯示最低之 K_D 。然而，儘管SG82-12F3及SG84-1F7對其靶顯示相似之親和性，但SG82-12F3顯示對ALPP之飽和程度高於SG84-1F7，如圖4中所示。最終，基於12F3抗體之優異ADC細胞毒性及對ALPP/ALPPL2之高親和性、以及具有與食蟹猴直向同源物保守之表位，選擇該12F3抗體用於人類化。

實例3：人類化及結合研究

【0328】人類化抗體源自鼠類12F3抗體。製作8條人類化重鏈(HA-HH)及12條人類化輕鏈(L1-LI)，其在不同位置納入回復突變。在一些情況下，回復突變與鼠類種系匹配，在其他情形下，其不匹配(如在體細胞突變之情形)。將人類化重鏈及輕鏈配對。關於序列比對，參見圖5-8，且關於進行之特異性突變，參見表5-8。

表5：h12F3可變重(vH)鏈變體中之人類化突變

vH 變體	人類重受體 序列	鼠類供體框架殘基	人類受體 CDR殘基	二級人類V-基因受 體殘基(IGHV3-72)
hvHA	IGHV3- 49/HJ4	無	無	無
hvHB	IGHV3- 49/HJ4	H30、H73	無	無
hvHC	IGHV3- 49/HJ4	H30、H48、H49、 H73	無	無
hvHD	IGHV3- 49/HJ4	H30、H73、H78、 H93	無	無
hvHE	IGHV3- 49/HJ4	H30、H48、H49、 H73、H78、H93	無	無
hvHF	IGHV3- 49/HJ4	H30、H37、H48、 H49、H73、H78、 H93	無	無
hvHG	IGHV3- 49/HJ4	H30、H37、H48、 H49、H73、H78、 H93	H60	無
hvHH	IGHV3- 49/HJ4	H30、H37、H48、 H49、H73、H78、 H93	H60	H76、H77

表6：h12F3可變重鏈變體中之特異性鼠類框架突變

vH 變體	30	37	48	49	73	78	93	% 人類
hvHA								94.0
hvHB	T				N			92.0
hvHC	T		L	A	N			90.0
hvHD	T				N	L	A	90.0
hvHE	T		L	A	N	L	A	88.0

hvHF	T	V	L	A	N	L	A	88.0
hvHG	T	V	L	A	N	L	A	88.0
hvHH	T	V	L	A	N	L	A	87.0

表7：h12F3可變κ(vL)輕鏈變體中之人類化突變

vL變體	人類κ受體序列	鼠類供體框架殘基	人類受體CDR殘基	二級人類V-基因受體殘基(IGKV1D-43， <i>IGKV1-16</i>)
hvL1	IGKV1-33/KJ2	無	L24、L33、L34、L53、L55、L56	無
hvL2	IGKV1-33/KJ2	無	L24、L33、L34、L53、L56	L53、L56
hvL3	IGKV1-33/KJ2	無	L24、L33、L53	L53
hvLA	IGKV1-33/KJ2	無	無	無
hvLB	IGKV1-33/KJ2	L2、L49、L69	無	L71
hvLC	IGKV1-33/KJ2	L2	無	L71
hvLD	IGKV1-33/KJ2	L2	L24、L53	L53、L71
hvLE	IGKV1-33/KJ2	L2、L49、L69	L24、L53、L56	L53、L56、L71
hvLF	IGKV1-33/KJ2	L2、L38、L49、L69	L24、L33、L53、L56	L53、L56、L71
hvLG	IGKV1-33/KJ2	L2、L40、L49、L69	L24、L33、L53、L56	L53、L56、L71

h _v LH	IGKV1-33/KJ2	L2、L38、L40、L49、L69	無	L71
h _v LI	IGKV1-33/KJ2	L2、L38、L40、L49、L69	無	L36、L47、L71、L73

表8：h12F3可變κ輕鏈變體中之特異性鼠類框架突變

vL變體	2	38	40	49	69	% 人類
h _v L1						94.7
h _v L2						91.5
h _v L3						90.4
h _v LA						88.3
h _v LB	T			H	R	84.0
h _v LC	T					86.2
h _v LD	T					87.2
h _v LE	T			H	R	85.1
h _v LF	T	Y		H	R	85.1
h _v LG	T		T	H	R	85.1
h _v LH	T	Y	T	H	R	81.9
h _v LI	T	Y	T	H	R	78.7

【0329】命名為HAL1 (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vL1之輕鏈可變區的抗體)、HAL2 (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vL2之輕鏈可變區的抗體)、HAL3 (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vL3之輕鏈可變區的抗體)、HALA (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLA之輕鏈可變區的抗體)、HALB (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLB之輕鏈可變區的抗體)、HALC (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLC之輕鏈可變區的抗體)、HALD (具有命名為vHA之重鏈可變

區及命名為vLD之輕鏈可變區的抗體)、HALE (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLE之輕鏈可變區的抗體)、HALE (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLE之輕鏈可變區的抗體)、HALF (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLF之輕鏈可變區的抗體)、HALG (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLG之輕鏈可變區的抗體)、HALH (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLH之輕鏈可變區的抗體)及HALI (具有命名為vHA之重鏈可變區及命名為vLI之輕鏈可變區的抗體)之抗體可在本發明中用於代替HGLF抗體。類似地, 具有命名為vHA、vHB、vHC、vHD、vHE、vHF、vHG或vHH之重鏈可變區與命名為vL1、vL2、vL3、vLA、vLB、vLC、vLD、vLE、vLF、vLG、vLH或vLI之輕鏈可變區之任何排列的抗體可在本發明中用於代替HGLF抗體。關於vHA、vHB、vHC、vHD、vHE、vHF、vHG、vHH、vL1、vL2、vL3、vLA、vLB、vLB-Q、vLB-V、vLC、vLD、vLE、vLF、vLG、vLH及vLI序列, 參見圖5-8。

【0330】 未在功能分析中評估具有低品質、低表現產率或不利之序列之人類化抗體。使用流式細胞術估計人類化抗體對表現ALPPL2之細胞之表觀親和性。簡言之, 然後藉由飽和結合分析測定每一所得抗體之 K_D 。在96孔v形底板中, 以每孔 $1E5$ 個細胞等分穩定表現人類ALPPL2之HEK293細胞。以 0.2 nM 、 2 nM 及 20 nM 之濃度添加每一人類化ALPP/ALPPL2抗體且在冰上培育60分鐘。將細胞沈澱並用PBS/FBS洗滌2次, 之後添加 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 之APC標記之抗人類IgG小鼠二級抗體, 並在冰上再培育60分鐘。將細胞沈澱且用2倍PBS/FBS洗滌, 並重新懸浮於 $100\text{ }\mu\text{L}$ 2%多聚甲醛中。藉由流式細胞術分析螢光, 使用飽和螢光信號之百

分比來確定結合百分比，並隨後基於三種抗體濃度計算表觀 K_D 。將重組人類化抗ALPP/ALPPL2之表觀 K_D 與c12F3 (嵌合12F3 IgG1 k)進行比較，如表9中所示。

表9： HEK-ALPPL2細胞上藉由流式細胞術之hALPP-1抗體變體之結合(KD (nM))；NT = 未測試。

	L1	L2	L3	LA	LB	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI
HA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
HB	NT	NT	1.8	1.6	1.3	3.1	2.5	1.2	1.2	1.7	1.4	2.4
HC	NT	NT	3.3	2.9	1.8	3.9	2.7	1.5	1.7	2.2	2.4	2.1
HD	NT	NT	2.0	3.1	1.4	3.0	2.1	1.7	1.6	1.9	1.9	2.9
HE	NT	NT	3.1	3.7	1.5	4.6	~4	1.4	1.8	2.0	2.4	2.2
HF	NT	NT	1.1	1.2	1.1	1.8	0.7	1.3	1.4	1.3	1.4	1.5
HG	NT	NT	1.3	1.6	1.2	1.7	1.6	1.7	1.2	1.3	1.6	1.4
HH	NT	NT	1.2	2.0	1.0	1.7	1.6	1.5	1.7	1.3	1.3	1.9

實例4：h12F3結合及活體外細胞毒性

【0331】 使用hIGHV3-49/hIGHJ4重鏈可變區人類種系及hIGKV1-33/hIGKJ2或hIGKV1D-43/hIGKJ2或hIGKV1-16/hIGKJ2輕鏈可變區人類種系作為人類受體序列構築若干h12F3抗體。抗體在選擇欲突變回小鼠抗體或小鼠種系序列之胺基酸殘基方面有差異。

【0332】 如上文所提及，未在功能性分析中評估具有低品質、低表現或不利序列之人類化抗體。對於藥物遞送評估，將h12F3抗體之各種人類化型式與8個負荷量之MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE奧裡斯他汀T結合。在選擇潛在抗體先導時，對包括與4個負荷量之mc-vc-PABC-MMAE或mp-dLAE-PABC-MMAE或與8個負荷量之MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE結合之抗體之不同酬載實施額外細胞毒性評估。結合方法闡述於美國公開案

第2018/0092984號。對於mp-dLAE-PABC-MMAE連接體結合，抗體藥物結合物係如PCT/US2020/051648 (2020年9月18日提出申請)中所述使用本文所述之人類化抗ALPP/ALPPL2抗體來製備。對於與mp-dLAE-PABC-MMAE之抗體結合，根據US 2005/0238649之程序(其以引用方式明確併入本文中)，使用適當當量之TCEP (參(2-羧基乙基)膦)部分還原抗體。簡言之，將pH 7.4下具有2 mM DTPA之磷酸鹽緩衝鹽水中之抗體用2.1 eq TCEP處理且然後在37°C下培育約45分鐘。藉由使還原之抗體與化合物1反應並使用疏水相互作用層析以測定載量來檢查硫醇/Ab值。

【0333】 使用US 2005/0238649之方法(其以引用方式明確併入本文中)使基於三肽之奧裡斯他汀藥物-連接體mp-dLAE-PABC-MMAE化合物與部分還原之抗體結合。簡言之，將DMSO中之藥物-連接體化合物(mp-dLAE-PABC-MMME) (50%過量)與額外DMSO一起添加至具有EDTA之PBS中之還原抗體中，使總反應共溶劑為10-20%。在環境溫度下30分鐘後，向混合物中添加過量QuadraSil MPTM以淬滅所有未反應之馬來醯亞胺基團。然後純化所得ADC，且藉由使用Sephadex G25樹脂脫鹽，將緩衝液更換為PBS緩衝液中，並保持在-80°C，直至進一步使用。在280 nm下測定所得ADC組合物之蛋白質濃度。藉由疏水相互作用層析(HIC)測定結合物之藥物-抗體比率(DAR)。

【0334】 對於活體外細胞毒性分析，在ADC治療前24小時平鋪腫瘤細胞。用指示劑量之ADC處理細胞，並在37°C下培育96小時。在一些實驗中，包括非抗原結合ADC作為陰性對照。根據製造商之說明書，使用Cell Titer Glo (Promega Corporation, Madison, WI)量測細胞系之細胞存活率。在室溫下將細胞與Cell Titer Glo試劑一起培育30分鐘，並在

Envision 讀板儀(Perkin Elmer, Waltham, MA)上量測發光。如圖9中所示，含有輕鏈之F變體之h12F3抗體之人類化型式鑑別具有高藥物遞送能力之變體，尤其當與其他組合比較時。

【0335】基於細胞毒性功效及表觀親和性，進一步評估所選人類化抗體向腫瘤細胞遞送不同酬載之能力。如前所述，將具有高藥物遞送能力之人類化12F3抗體與4個負荷量之mc-vc-MMAE或mc-vc-PABC-MMAE或8個負荷量之MDpr-PEG(12)-gluc MMAE結合。

【0336】在37°C下將腫瘤細胞與每一ADC一起培育96-144小時。使用非結合(稱為h00或IgG) ADC作為陰性對照。根據製造商之說明書，使用Cell Titer Glo量測細胞存活率。在Fusion HT 螢光讀板儀(Perkin Elmer, Waltham, MA)上量測螢光信號。將數據針對未處理之細胞正規化，並使用Graph Pad軟體計算IC50值。結果在表10中報告為IC₅₀，即與媒劑處理之細胞(對照= 100%)相比，使存活率降低50%所需之化合物之濃度。h12F3 ADC在一組ALPP表現範圍為30,000至500,000之細胞系中達到單位數及兩位數之ng/ml IC₅₀值。

表 10：針對各種癌細胞之h12F3 HGLF抗體藥物結合物之IC50 (ng/ml)。結果報告IC50及終點時之剩餘存活率百分比。

細胞系	適應症	受體數量 (×10 ³)	dLAE- MMAE(4) IC50/存活率	vc- MMAE(4) IC50/存活率	MDpr- PEG(12)-gluc- MMAE(8) IC50/存活率			
Hep2	子宮頸	745	17	47	18	41	7	2
H1651	肺	500	24	0	12	0	6	0
RMUGS	卵巢	400	79	76	27	72	25	54
MKN1	胃	374	12	27	9	25	8	13

COV644	卵巢	200	31	70	19	61	18	30
NUGC3	胃	191	39	17	26	10	5	11
CAOV3p1	卵巢	60	90	72	30	67	18	16
CasKi	子宮頸	52	13	93	39	81	75	68
LoVo	結腸	50	6	33	5	27	4	13
647V	膀胱	33	>1000		286	79	82	88
ABC1	肺	31	3	83	>1000		7	38
HCC15	肺	0	>1000		>1000		>1000	

【0337】使用相同酬載(mp-dLAE-MMAE)之人類化變體之抗體藥物結合物之細胞毒性功效之比較係藉由繪製跨多個細胞系之IC50值來完成。12F3抗體之人類化變體在活體外顯示類似功效，如圖10中所示。

【0338】命名為HGLF (如SEQ ID NO:15中所述之重鏈可變區(vHG)及如SEQ ID NO:30中所述之輕鏈可變區(vLF))之抗體最終基於其(i)結合特徵、(ii)遞送藥物之能力及(iii)與其他變體相比之回復突變數量(參見表5-8)選擇作為前導人類化抗ALPP/ALPPL2抗體。

【0339】腫瘤癌細胞球體上HGLF ADC之評估如下實施：於37°C下在超低附著圓底96孔板(Corning, Corning, NY)中以2.5E4個細胞/孔，100 uL細胞，持續48h。此培育後，添加100 uL含2X ADC之培養基，且在37°C下培育120 h。在一些實驗中，包括非抗原結合ADC作為陰性對照。根據製造商之說明書，使用3D Cell Titer Glo (Promega Corporation, Madison, WI)量測細胞系之細胞存活率。在室溫下用3D Cell Titer Glo試劑將細胞培育30分鐘，且在Envision讀板儀(Perkin Elmer, Waltham, MA)上量測發光。結果報告為IC50，即與媒劑處理之細胞(對照= 100%)相比，使存活率降低最大一半所需之化合物之濃度。如圖11及表11中所示，與基於vcMMAE、mp-dLAE-MMAE及mdpr-gluc-MMAE之連接體結

合之h12F3 HGLF ADC在3D球體上展現高細胞毒性，功效與在2D培養物中相似。

表11：腫瘤細胞3D球體上h12F3 HGLF ADC之IC50 (ng/ml)值

細胞系	vc-MMAE(4)	dLAE-MMAE(4)	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE
RMUGS	1.6	1.1	1.0
NCI-N87	19.4	19.8	22.9

實例5：抗體內化

【0340】藉由自動化螢光顯微鏡術(IncuCyte S3, Essen Bioscience)對RMUGS、Hep2親代及Hep2 ALPP敲除細胞系實施內化實驗。將細胞接種於96孔平底透明黑色組織培養物處理之微板(Corning, Corning, NY)中，並在37°C下使其黏附過夜。根據製造商之方案，用IncuCyte FabFluor-pH Red抗體標記試劑(Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)標記h12F3 HGLF及非靶向對照抗體。以2倍最終分析濃度計算所需之測試抗體、FabFluor試劑及培養基之體積，且FabFluor試劑以1:3之莫耳比添加至抗體中。輕輕混合抗體及FabFluor，並在37°C下培育15分鐘，之後將抗體-FabFluor複合物添加至含有細胞之板之每一適當孔中。每孔之h12F3 HGLF及非結合對照抗體之最終濃度為250 ng/mL。將板佈置在IncuCyte S3 (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)中之微板托盤上，且使用黏附細胞-細胞方案獲取掃描結果。收集相位數據及紅色通道數據(獲取時間設定為400 ms)，每孔4個影像，最少每0.5-2小時採集一次，持續高達20小時，目鏡設定為10倍。使用IncuCyte軟體分析工具實施螢光信號強度之定量。利用無標記之細胞計數及手動影像選擇進行算法之預覽及訓練，對每種細胞系之分析進行精製及調整。在分析完成後，使用IncuCyte軟體對數據製

圖，其中圖形度量設定為針對非結合對照正規化之每個細胞的紅色平均強度物體平均值。如圖 12 中所示，在表現 ALPP 之細胞中內化 h12F3 HGLF，且內化係特異性的，此乃因 ALPP 敲除 HEP2 細胞不內化裸抗體。

實例 6：動力學結合及 pH 敏感性

【0341】藉由生物層干涉 (BLI) 在具有抗人類 Fab-CH1 第二代 (FAB2G) 生物感測器之 Octet Red 384 系統 (ForteBio) 上量測 pH 7.4、37°C 下之二價親和性。在 CHO 細胞中生成可溶性人類 ALPP-Fc 及 ALPPL2-Fc 融合二聚體蛋白以用作分析物。將抗體 h12F3 HGLF 及 HFLD 以 3 ug/mL 固定至生物感測器上 600 秒，之後將 6 種在 0.12 nM 至 125 nM 範圍內之濃度之滴定分析物 hALPP 及 hALPPL2 締合 600 秒，之後在動力學緩衝液 (1% 酪蛋白及 0.2% Tween20，於 1x PBS 中，pH 7.4) 中進行最後 50 分鐘解離步驟。在參考減去僅探針曲線後，利用 1:1 模型全域擬合數據， R_{max} 感測器未連接。利用濃度為 31.3 nM、7.8 nM、1.95 nM、0.49 nM 及 0.12 nM 之曲線擬合，h12F3 HGLF 與 hALPP 及 hALPPL2 之二價結合經量測分別為 $1.3E-10$ M (k_d 2.0E-05 1/s / k_a 1.5E5 1/Ms) 及 $4.4E-11$ M (k_d 7.1E-06 1/s / k_a 1.6E5 1/Ms)。與 HGLF 相比，HFLD 變體對 hALPP 及 hALPPL2 之親和性分別低 26.9 及 34 倍，如圖 13 中所示。

【0342】為評估 pH 敏感性，利用與 pH 7.4 實驗相同之 BLI 方法測定 pH 6.0、37°C 下之二價親和性。唯一區別係使用不同動力學緩衝液 (1% 酪蛋白及 0.2% Tween20，於磷酸鹽檸檬酸鹽中，pH 6.0)。使用利用濃度為 125 nM、31.3 nM、7.8 nM、1.95 nM、0.49 nM 及 0.12 nM 之曲線擬合之 800 秒解離，h12F3 HGLF 與 hALPP 及 hALPPL2 之二價結合經量測分別為 $6.8E-09$ M (k_d 5.9E-04 1/s / k_a 8.7E4 1/Ms) 及 $4.8E-9$ M (k_d 4.3E-04 1/s /

k_a 8.9E4 1/Ms)。如圖14中所示，相對於pH 7.4之親和性，hALPP Fc減少52倍且hALPPL2減少109倍。

實例7：活體內抗腫瘤活性

【0343】向NSG小鼠皮下接種 5×10^5 個CAOV3p1或 2.5×10^6 個NCI-H1651細胞。向裸小鼠皮下接種 1×10^7 個NCI-N87、 2×10^6 個RMUG-S、 1×10^7 個LoVo及 5×10^6 個HT-1376細胞。向每隻小鼠右腹側皮下接種0.1 ml具有基質膠之PBS (1:1)，如由製造商指定。利用測徑器監測腫瘤生長，且使用公式($0.5 \times [\text{長度} \times \text{寬度}^2]$)計算平均腫瘤體積。當平均腫瘤體積達到約100-200 mm³時，將小鼠隨機分成不同同類群組(包括未治療條件)，或腹膜內給予與mp-dLAE-MMAE或vcMMAE結合之h12F3 HGLF或HFLD，每四天四次(q4dx4)或每7天三次(q7dx3)。當腫瘤體積達到約800-1000 mm³時，對小鼠實施安樂死。% TGI定義為 $(1 - (\text{經治療腫瘤之平均體積}) / (\text{對照腫瘤之平均體積})) \times 100\%$ 。所有動物程序皆按照機構動物護理及使用委員會批准之方案在實驗室動物護理評價及認證協會認可之機構中實施。

【0344】圖15顯示卵巢腫瘤模型CAOV3之未治療小鼠及用3 mg/kg及5 mg/kg之h12F3 HGLF或HFLD-dLAE-MMAE治療之小鼠隨時間產生之腫瘤體積。圖16顯示胃腫瘤模型NCI-N87之未治療小鼠及用1 mg/kg及3 mg/kg之h12F3 HGLF或HFLD-dLAE-MMAE治療之小鼠隨時間產生之腫瘤體積。圖17顯示胃腫瘤模型NCI-N87之未治療小鼠及用3 mg/kg與vc-MMAE及dLAE-MMAE結合之h12F3 ADC治療之小鼠隨時間產生之腫瘤體積。ALPP ADC在活體內顯示相似抗腫瘤活性。

【0345】圖18顯示肺腫瘤模型NCI-H1651之未治療之小鼠及用3

mg/kg與vc-MMAE及dLAE-MMAE結合之h12F3 ADC治療之小鼠隨時間產生之腫瘤體積。ALPP ADC在活體內展現相似抗腫瘤活性。圖19顯示跨七種異種移植物模型產生之腫瘤生長抑制。條形圖概述治療組相對於對照之腫瘤體積變化%。比較係在3 mg/kg與vc-MMAE及dLAE-MMAE結合之h12F3-HFLD ADC下進行。非結合ADC對照之平均抗腫瘤活性以虛線顯示。

【0346】在另一組分析中，向NSG小鼠皮下接種 5×10^5 個CAOV3p1，向NCG小鼠皮下接種 5×10^6 個SNU-2535，向裸小鼠皮下接種 1×10^7 個NCI-N87，且向SCID小鼠皮下接種 1×10^7 個HPAC。向每隻小鼠右腹側皮下接種0.1 ml具有基質膠之PBS (1:1)，如由製造商指定。利用測徑器監測腫瘤生長，且使用公式($0.5 \times [\text{長度} \times \text{寬度}^2]$)計算平均腫瘤體積。當平均腫瘤體積達到約100-200 mm³時，將小鼠隨機分成不同同類群組(包括未治療條件)，或腹膜內給予與mp-dLAE-MMAE或mc-vc-MMAE結合之h12F3 HGLF，每4天四次(q4dx4)或每7天三次(q7dx3)。當腫瘤體積達到約2-3000 mm³時，對小鼠實施安樂死。% TGI定義為 $(1 - (\text{經治療腫瘤之平均體積}) / (\text{對照腫瘤之平均體積})) \times 100\%$ 。所有動物程序皆按照機構動物護理及使用委員會批准之方案在實驗室動物護理評價及認證協會認可之機構中實施。

【0347】圖20顯示胃腫瘤模型NCI-N87之未治療之小鼠及用1 mg/kg或3 mg/kg與vc-MMAE及dLAE-MMAE結合之h12F3 ADC治療之小鼠隨時間產生之腫瘤體積。ALPP ADC在活體內顯示相似抗腫瘤活性。

【0348】圖21顯示胰臟腫瘤模型HPAC之未治療之小鼠及用1 mg/kg或3 mg/kg與mc-vc-MMAE及mp-dLAE-MMAE結合之h12F3 ADC治療之

小鼠隨時間產生之腫瘤體積。ALPP ADC在活體內顯示相似抗腫瘤活性。圖22顯示跨四種異種移植物模型產生之腫瘤生長抑制。條形圖概述治療組相對於對照之腫瘤體積變化百分比。比較係在3 mg/kg與vc-MMAE及dLAE-MMAE結合之h12F3-HGLF ADC下進行。非結合ADC對照之平均抗腫瘤活性以虛線顯示。

【0349】在另一分析中，使用2+2實驗設計在裸小鼠中對12個患者源異種移植物實施抗腫瘤活性分析。簡言之，當足夠家畜動物之腫瘤達到1.0 – 1.5 cm³時，收穫腫瘤以重新植入研究前動物中。將研究前動物單側植入左腹側，腫瘤片段取自家畜動物。自特定傳代批次植入每隻動物，並記錄。當腫瘤達到150-300mm³之平均腫瘤體積時，按腫瘤體積將動物匹配成治療組或對照組用於投用，並在第0天起始投用。h12F3-mc-vc-MMAE結合物以5mg/kg (QWx3)投用，並與PBS治療之同類群組進行比較。每週兩次量測腫瘤體積。在研究達到終點當天進行最終腫瘤體積量測。在第0天開始，藉由數位卡尺每週兩次量測腫瘤尺寸，且記錄每一組之數據，包括個別及平均估計之腫瘤體積(平均TV ± SEM)；使用式(1)計算腫瘤體積：TV=寬度²×長度 × 0.52。在研究完成時，藉由式(2)使用初始(i)及最終(f)腫瘤量測，計算並報告每一治療組(T)相對於對照(C)之腫瘤生長抑制百分比(%TGI)值： $\%TGI = 1 - (Tf - Ti) / (Cf - Ci)$ 。如圖23中所示，h12F3-mc-vc-MMAE結合物SGN-ALPV在58% (7/12)之具有異質靶表現之PDX模型中顯示抗腫瘤活性。在所用劑量下，反應模型展現55%至 > 100%範圍之TGI。在化學療法預治療及初治患者之PDX模型中均觀察到抗腫瘤活性(圖23，B及C)。

實例8：交叉反應性及表位定位

【0350】為確認抗體與直向同源ALPP蛋白之交叉反應性，在HEK293細胞中轉染食蟹獼猴 (*macaca falsicularis*) ALPP基因(NHP ALPP)，且藉由流式細胞術篩選抗體。簡言之，然後藉由飽和結合分析測定每一所得抗體之KD。將穩定表現人類ALPPL或ALPPL2以及NHP ALPP之 1×10^5 個HEK293細胞等分於96孔v形底板之每孔中。添加濃度範圍為0.2 nM至20 nM之h12F3 HGLF及HFLD抗體，並在冰上培育60分鐘。將細胞沈澱且用PBS/BSA洗滌3次，之後添加10 ug/ml之APC標記之抗人類IgG山羊二級抗體，並在冰上再培育60分鐘。將細胞沈澱且用PBS/BSA洗滌3次且重新懸浮於125 μ L PBS/BSA中。藉由流式細胞術分析螢光，使用飽和螢光信號之百分比來確定結合百分比，並隨後計算表觀KD。兩種抗體之表觀 K_D 示於圖24中。重要的是，儘管抗體變體h12F3 HFLD展現對猴直向同源基因之親和性顯著降低，但HGLF變體對人類及猴胎盤鹼性磷酸酶二者顯示相似結合特性。

【0351】由於h12F3 HGLF不與大鼠ALPP/ALPPL2直向同源物交叉反應，故將人類ALPP區與大鼠ALPP之同源區進行交換。根據製造商之說明書，使用lipofectamine 3000 (1:1.5 DNA/lipofectamine比率)，將該等構築體瞬時轉染於 2×10^6 個細胞HEK293細胞中。藉由使用如上所述之流式細胞術，在轉染後48小時之嵌合大鼠/人類ALPP變體表現細胞上評估h12F3 HGLF結合表位。如圖25中所示，當含有aa L287-S339之人類ALPP區經大鼠ALPP序列置換時，h12F3 HGLF結合受損。

實例9：與Fc受體之抗體動力學結合

【0352】藉由與免疫細胞上之Fc受體相互作用驅動基於抗體之免疫反應。因此，為了確立h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或

h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE與Fc受體相互作用之能力，藉由生物層干涉(BLI)評價與hFcγRI、hFcγRIIa H131、hFcγRIIa R131、hFcγRIIIa F158、hFcγRIIIa V158及hscFcRN之結合動力學。將與單體Fc融合之生物素化avi標記之人類Fc受體(在Seagen設計並表現)加載至高精密度鏈黴抗生物素蛋白生物感測器(來自ForteBio)上，對除hFcγR1外之所有受體之反應約為0.4 nm，對hFcγR1之反應約為1.2 nm。在固定化緩衝液(0.1% BSA、0.02% Tween 20、1x PBS，pH 7.4)中完成初始基線，之後在動力學緩衝液(對於hFcγRI、IIa、IIIa及IIb相互作用，為1%酪蛋白、0.2% Tween 20、1x PBS，pH 7.4，且對於hscFcRN相互作用，為1% BSA + 0.2% Tween 20、磷酸鹽檸檬酸鹽，pH 6.0)中完成第二基線。滴定之h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE、h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE及陽性對照mAb樣品在動力學緩衝液中如下締合及解離：對於hFcγRI，分別為600 s及1000s；對於hFcγRIIa及hFcγRIIb，分別為10 s及50 s；對於hFcγRIIIa，分別為60 s及200 s；對於hscFcRN，分別為50 s及200 s。在30°C下在Octet HTX系統(ForteBio)上生成感測圖，並在參考減去負載抗原之0 nM分析物感測器後，用1:1動力學Langmuir等溫線模型(Rmax未鏈接)進行全域擬合。亦包括具有最高濃度之抗體及ADC (20 μM)且無固定Fc受體之陰性對照，以驗證分析物與鏈黴抗生物素蛋白感測器本身不存在非特異性結合。列出每一受體對鏈黴抗生物素蛋白感測器之具體負載濃度及時間以及滴定分析物之濃度(表12及表13)。總之，親代抗體及mc-vc-MMAE ADC結合所有人類Fc受體，如圖26中所示。對hFcγRI之親和性最高，在約1.3-2.2 nM範圍內，而對hFcRN之親和性第二高，約為10.6-13.9 nM。對hFcγRIIa及hFcγRIIIa變體之親和性在0.81 μM至7.3

μM 範圍內，且hFc γ R1Ib顯示在36 μM 至67 μM 範圍內之最弱親和性。與陽性對照mAb結果相比，h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE及h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE對所有人類Fc受體之親和性非常相似，且與親代抗體h12F3 HGLF相當。

表12： 鏈黴抗生物素蛋白感測器上之固定濃度及時間

hFc γ I hmFc AAG A avi生物素	(3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 400 s負載)
hFc γ R1Ia H131 hmFc AAG avi生物素	(0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 s負載)
hFc γ R1Ia R131 hmFc AAG avi生物素	(1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 s負載)
hFc γ R1IIa F158 hmFc AAG avi生物素	(4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 s負載)
hFc γ R1IIa V158 hmFc AAG avi生物素	(3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 s負載)
hFc γ R1Ib hmFc AAG avi生物素	(2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 s負載)
hscFcRN hmFc IHH A avi生物素	(7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 300 s負載)

表11： 分析物之濃度

h12F3 ¹ 及具有hFc γ RI之陽性對照mAb	66.7 、 22.2 、 7.4 、 2.47 、 0.82 、 0.27 nM
h12F3 ¹ 及具有hFc γ R1Ia 、 IIIa及Ib之陽性對照mAb	20 、 8.57 、 3.67 、 1.57 、 0.67 、 0.29 、 0.12 μM
h12F3 ¹ 及具有hFcRN之陽性對照mAb	500 、 184.2 、 67.9 、 25 、 9.21 、 3.39 、 1.25 nM

1.- 使用mc-vc-MMAE及mp-dLAE-MMAE，對於基於12F3 HGLF之結合物使用相同濃度

原代NK細胞之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)

【0353】為了確立h12F3 HGLF主鏈及衍生之結合物是否引發抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，在h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE存在下將表現ALPPL2之細胞與天然殺手(NK)細胞一起活體外培育。培育後，量測細胞溶解之百分比。簡言之，

效應細胞製備：分析前一天，在37°C水浴中快速解凍外周血單核細胞 (PBMC)。將細胞轉移至含有AIM-V培養基(Gibco，目錄號12055091)之50-mL管中，該培養基補充有5%熱不活化人類血清(Gemini Bio-products，目錄號100-512) (AIM-V/5% HIHS)。將細胞以1500 rpm離心10分鐘。將PBMC以20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之最終濃度重新懸浮於含有DNase I之AIM-V/5% HIHS (Sigma-Aldrich，目錄號D5025)(自1 mg/mL原液進行1:50稀釋)中，並在37°C下培育10至15分鐘。如上所述藉由離心沈澱細胞，並重新懸浮於AIM-V/5% HIHS中。對細胞進行計數並以 $2-4 \times 10^8$ 個細胞/燒瓶之濃度接種於T150燒瓶中，每個燒瓶25 mL。將細胞在37°C、5% CO₂、加濕培育器中不受干擾地培育過夜。次日，收集非黏附細胞，且用PBS劇烈沖洗燒瓶3次(7 mL)。將沖洗液與非黏附細胞組合，並藉由以1500 rpm離心7分鐘沈澱。將細胞以小體積重新懸浮以計數(2 mL)，並將細胞懸液在PBS + 2% FBS中調整至 5×10^7 個細胞/mL之濃度(如藉由EasySep方案所建議)。按照EasySep人類NK細胞富集套組(Stem Cell Technologies，目錄號19055)之說明書，藉由負向選擇分離NK細胞。然後將富集之效應細胞以 7.2×10^5 個細胞/mL之濃度懸浮於RPMI/1% FBS中(使得70 μL 含有約 5×10^4 個效應細胞)。靶細胞製備：收集表現ALPPL2之LoVo細胞並計數。接下來，取出 5×10^6 個細胞，且藉由離心沈澱。將細胞重新懸浮於100 μL FBS中。然後，向細胞中添加100 μL (約100 μCi) Cr-51 (Perkin Elmer Health Sciences, Inc., 目錄號NEZ030S)，並藉由輕柔拍打來混合。將細胞置於37°C、5% CO₂、加濕培育器中以標記1小時，並不時拍打試管以懸浮細胞。將細胞用RPMI/1% FBS洗滌3次。拍打試管以在洗滌之間使細胞糰粒變鬆。洗滌後，將細胞重新懸浮於10 mL

RPMI/1%FBS中並計數。然後，取出 7.2×10^5 個細胞，且懸浮於總體積為10 mL之分析培養基中，使得70 μ L相當於約 5×10^3 個靶細胞。ADC及抗體稀釋液之製備及板組裝：將抗體及ADC在分析培養基中以3倍濃度稀釋。檢測之抗體為h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE、或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE、CD71結合無岩藻醣基化抗體及同型對照。在即將添加Cr標記之靶細胞之前，將抗體添加至分析板中。另外，向分別代表總釋放及自發釋放對照之對照孔中添加70 μ L及140 μ L分析培養基來代替抗體。最後，混合靶細胞，並向96孔板之每一測試及對照孔中添加70 μ L。將靶與mAb在37°C、5% CO₂、加濕培育器中一起培育30分鐘。然後，向每一測試孔中添加70 μ L (5×10^4)效應細胞，同時向總釋放孔中添加70 μ L 3% Triton X-100並混合。將板返回至37°C、5% CO₂、加濕培育器中4小時。培育後，將35 μ L上清液轉移至Luma板。將Luma板乾燥過夜，然後用密封帶覆蓋，並在Perkin Elmer TopCount NXT微板閃爍計數器上讀取。分析係藉由如下計算比溶解%進行(用GraphPad Prism分析)：
比溶解% = [(測試cpm-背景cpm)÷(總cpm-背景cpm)] × 100。如圖27中所示，在h12F3 HGLF抗體以及h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE及h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE存在下，活體外介導NK細胞之細胞毒性。此活性與陽性對照相似，且由細胞上靶之存在介導，此乃因非結合抗體無法刺激效應細胞。

抗體依賴性細胞毒性

【0354】為了確定h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE是否展現ADCP活性，將表現ALPP/ALPPL2之抗體包被或ADC包被之螢光細胞與原代巨噬細胞共培

育，並用螢光流式細胞術量測吞噬作用。簡言之，根據製造商之說明書，用PKH26對LoVo腫瘤細胞進行螢光標記。用0.05%胰蛋白酶EDTA自培養皿中收穫細胞，並在1x PBS中洗滌一次。將細胞重新懸浮於PKH26紅色螢光細胞膜標記套組(Sigma-Aldrich，目錄號PKH26GL-1KT)中包括之1 mL稀釋劑C中。在單獨試管中，添加1 mL稀釋劑C + 4 μ L PKH26染料，並上下吸移以混合。將染色溶液轉移至重新懸浮之細胞中，且藉由上下吸移若干次快速混合。將細胞於室溫下培育5分鐘，且藉由添加2 mL FBS終止標記反應。將細胞用RPMI/10% FBS洗滌3次，且以 0.8×10^6 個細胞/mL之濃度重新懸浮於PBS中。將標記之靶細胞轉移至96孔U形底板，並使用以下步驟用測試抗體、ADC或同型對照抗體處理。在單獨96孔U形底板中，將PBS中10倍mAb、ADC及同型對照原液在PBS中以1:10連續稀釋，並將33 μ L/孔添加至U形底板中細胞之適當孔中。將板於室溫下培育30分鐘，離心，並用200 μ L/孔培養基(RPMI/10% FBS)洗滌一次。將細胞重新懸浮於330 μ L/孔培養基(RPMI/10% FBS)中。分析前一天，將2名健康供體之PBMC於37°C下在水浴中解凍，並轉移至RPMI/10% FBS (0.1-0.2 EU/mL)中。將每孔總計 0.7×10^6 個PBMC添加至48孔平底板中，並使其黏附過夜。吸出舊培養基(及非黏附細胞)，並更換為200 μ L新鮮培養基。接下來，將來自每一孔之100 μ L標記之、處理之靶細胞轉移至黏附之單核球/巨噬細胞平底板之相應孔中，一式三份，並將板在37°C下培育過夜16-18小時。藉由收集上清液、用1x PBS收集洗滌液及用1x Versene分離來收集48孔板中之所有細胞。使用以下步驟對巨噬細胞進行螢光標記：將靶細胞及巨噬細胞收集在U形底板中，離心，重新懸浮於含有人類Fc片段阻斷劑之50 μ L FACS染色緩衝液(1:20稀釋度)中，並在冰上培育30分鐘。

接下來，向每一孔中添加50 μ L稀釋於FACS染色緩衝液中之CD14-BV421及CD45-APC-Cy7抗體之1:50稀釋液，並在冰上在箔中培育30分鐘。將細胞離心，用2x FACS緩衝液洗滌，並重新懸浮在1x PBS中，用於隨後在Attune NxT流式細胞計數器上進行之流式細胞術分析。使用FlowJo分析CD14+/CD45細胞之YL1幾何平均值螢光(CD14+/CD45+細胞之MFI)，且然後將值導出至Excel並輸入至GraphPad Prism中用於進一步數據分析。吞噬作用報告為CD14 +細胞之MFI。如圖28中所示，h12F3 HGLF、h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE結合物之存在使得能夠以與陽性對照(抗CD47抗體)相似之動力學吞噬靶表現細胞。由於非結合抗體不引發任何細胞死亡，此活性取決於靶細胞上ALPPL2表現之存在。

【0355】在另一分析中，藉由使用來自Promega之代用的基於螢光素酶的介導之生物分析，量測Fc γ RIII依賴性抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。簡言之，將表現ALPP/ALPPL2之細胞置於96孔板上，且在存在增加量之分別與4或8個mc-vc-PABC-MMAE或MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE分子結合之裸h12F3抗體或h12F3 HGLF抗體下，與ADCC生物分析效應細胞(Promega)共培養。處理後24小時，根據製造方法將細胞與Bio-Glo (Promega)一起培育，並用Envision平臺量測發光。如圖29中所示，h12F3 HGLF能夠以類似於h12F3 HGLF ADC結合之mc-vc-PABC-MMAE之動力學活化報導基因細胞系中之Fc γ RIII信號傳導。與裸h12F3 HGLF相比，與8個MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE分子之結合降低ADCC活性。

實例10：免疫原性細胞死亡

免疫原性細胞死亡之信號路徑活化

為了確定 h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE 及 h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE 是否能活化 ICD 之標誌，用 ADC 處理表現 ALPP/ALPPL2 之細胞，並使用免疫印跡法確立 IRE 及 JNK 路徑之磷酸化狀態。簡言之，將 400 萬個 LOVO 細胞置於 10mL 完全生長培養基 (Ham 之 F-12K (Kaighn) 培養基 + 10% FBS) 中的 10cm TC 處理之皿中，並使其黏附過夜。用完全培養基中之 10nM MMAE 或 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE 或 h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE 處理細胞。然後將細胞在其處理之培養基中培育 48 或 96 小時。收集細胞，洗滌並重新懸浮於 500 μL 冷 PBS 中，且然後轉移到埃彭道夫管 (Eppendorf tube) 中。將樣品在 4 度下以 300 $\times\text{g}$ 旋轉 3 min。取出上清液，且將細胞重新懸浮於含有蛋白酶及磷酸酶之 RIPA 溶解緩衝液中。在冰上培育 5 min 後，將樣品在 4 度下以 17000 $\times\text{g}$ 旋轉 10 min，並收集上清液，且儲存在 -80 $^{\circ}$ 下。在 NuPAGE 4-12% bis-tris 凝膠中拆分定量樣品，並對於較小蛋白質在 MES 運行緩衝液中運行或對於較大蛋白質在 MOPS 中運行 (165v，持續 40 分鐘)。使用 iBlot2 (20v，持續 7 min) 將凝膠轉移至 PVDF 膜。在 DI 水中短暫沖洗膜，且然後在 4 度下置於阻斷緩衝液 (TBS + 0.1% tween-20 + 5% BSA) 中過夜。然後於室溫下將印跡與針對 IRE、JNK、p-IRE 或 p-JNK 之一級抗體在阻斷緩衝液中以 1:1000 稀釋度培育 2 小時。以 1:500 使用 p-ERK，並以相同方式培育。用 TBST (TBS + 0.1% Tween-20) 洗滌印跡 3 次。在阻斷緩衝液中以 1:10,000 稀釋度製備抗兔過氧化物酶二級抗體。於室溫下將印跡與二級抗體一起培育 1 小時。再次用 TBST 洗滌印跡 3 次。使用 SignalFire ECL 使印跡顯影，且在 Amersham 成像儀 600 上成像。然後剝離印跡並再探測 GAPDH 以作為加載

對照，並如上所述進行印跡。如圖30中所示，LoVo細胞與h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE或h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE一起培育會增加pIRE及pJNK之磷酸化程度，該等pIRE及pJNK在活化免疫原性細胞死亡過程中起關鍵作用。

【0356】 為了確立h12F3 HGLF ADC治療是否導致培養基中ATP之釋放，將600,000個LOVO細胞置於2mL完全生長培養基(Ham之F-12K (Kaighn)培養基+ 10% FBS)中之6孔TC處理之皿中，並使其黏附過夜。在完全培養基中製備10nM MMAE、1 µg/mL或10 µg/mL h12F3 HGLF mp-dLAE-MMAE或mc-vc-MMAE之溶液。然後將細胞在其處理之培養基中培育24、48或72小時。在每一終點，自每一孔(樣品)收集500uL上清液。在4度下將上清液以200xg旋轉1 min，以小心地去除所有細胞碎片。然後將3份50uL等分試樣(用於三份數據)之每一上清液置入黑色壁、透明底之96孔板中。然後向含有上清液之所有孔中添加50uL重構之Cell Titer Glo。蓋住板並避光。然後在Envision讀板儀讀取板。對所有樣品取三份數據之原始發光數據平均值。為了確定與未處理樣品相比之倍數變化，將實驗樣品之平均發光除以未處理樣品之平均值。如圖31中所示，h12F3 HGLF mp-dLAE-MMAE或mc-vc-MMAE結合物二者皆導致釋放ATP (免疫原性細胞死亡之標誌)。

實例11：藥物動力學

【0357】 在非人類靈長類動物中實施人類化h12F3 ADC之藥物動力學評估。以1 mg/kg投用包括h12F3 HGLF-vc-MMAE(4)及HGLF-dLAE-MMAE(4)之抗體藥物結合物一次，並在指定時間點收集血漿樣品。使用Gyrolab (Gyros Protein Technologies, Sweden) 1步通用總抗體(gTAb)分

析法分析食蟹猴之總 h12F3 HGLF-vc-MMAE(4) 及 HGLF-dLAE-MMAE(4) 血漿含量。簡言之，利用在彙集之食蟹猴 K2EDTA 血漿 (BioIVT) 中稀釋之投用檢品製備分析標準品及品質控制樣品(QC)。將檢品濃度超出分析之定量限值之研究樣品用藥物初治食蟹猴 K2EDTA 血漿稀釋至一定範圍。將標準品、QC 及研究樣品在 REXXIP HX 緩衝液 (Gyros Protein Technologies, Sweden) 中稀釋至 1:20 之最低需求之稀釋度 (MRD)。藉由在含 0.01% (v/v) tween-20 (PBST) 之 1x 磷酸鹽緩衝鹽水溶液中稀釋生物素化抗人類 κ 輕鏈 (Seagen) 及 AlexaFluor-647 抗人類 Fc γ (Jackson ImmunoResearch)，製備 30nM 等莫耳主混合溶液。將等體積之 MRD 標準品、QC 或研究樣品與主混合溶液混合。將所得溶液避光培育，且於室溫下振盪 1-2 小時。培育後，將溶液轉移至 96 孔 PCR 板中，並添加至 Gyrolab Bioaffy 1000 CD (Gyros Protein Technologies, Sweden) 中，其中使樣品通過 CD 內之鏈黴抗生物素蛋白親和性管柱。將管柱用 PBST 洗滌 4 次，並在 635nm 下在管柱上訊問相關螢光。使用 Gyrolab 評估器軟體將校準器之螢光反應擬合至 5 參數邏輯式回歸 (5-PL)。自各別擬合之標準曲線插入總 h12F3 HGLF-vcMMAE 及 HGLF-dLAE-MMAE QC 及研究樣品濃度，並用於藥物動力學評估。使用 Phoenix WinNonlin (8.2 版, Certara USA, Inc.) 藉由分室分析 (NCA) 視需要測定 PK 參數。測定了以下 PK 參數：至第 21 天之血漿濃度-時間曲線下面積 (AUC₀₋₂₁)、觀察到之最大血漿濃度 (C_{max})、終末半衰期、清除率 (Cl) 以及穩態下計算之分佈體積 (V_{ss})。使用線性梯形線性方法計算 AUC。針對血漿濃度-時間曲線報告半衰期、Cl 及 V_{ss}，該等血漿濃度-時間曲線具有 ≥ 0.8 之調整之 R² 及 $< 20\%$ 之外推之 AUC_{0-inf}。所得藥物動力學參數參見表 14，顯示 h12F3 HGLF 結

合物與 vcMMAE 及 mp-dLAE-MMAE 二者皆展示相似之抗體結合之 MMAE 藥物動力學特性，與非結合 ADC 對照相比，無靶介導之藥物處置之證據。

表14

h12F3 HGLF	vc-MMAE(4)	97.81	30.27	9.11
	dLAE-MMAE(4)	109.87	29.86	NR
非結合IgG1	vc-MMAE(4)	91.88	24.14	8.00
	dLAE-MMAE(4)	91.33	31.18	6.83

【0358】為了定量抗體結合之MMAE (acMMAE)，首先對血漿樣品進行免疫捕獲，以在2-8°C下分離ADC (MAbSelect, GE Healthcare) 1小時。使用木瓜酶消化緩衝液(20 mM KPO4，10 mM EDTA，20 mM半胱胺酸HCl)洗滌結合樣品，且然後向每一樣品中添加2mg/mL消化緩衝液中之木瓜酶。將樣品在37°C下培育4小時，以酶促方式釋放acMMAE。使用固相萃取來萃取所得釋放之acMMAE。然後使用與串聯質譜(Sciex 6500+ Triple Quad)偶聯之正相UPLC (Betasil, ThermoFisher)分析每一樣品。表15顯示使用h12F3 HGLF vc-MMAE及HGLF-dLAE-MMAE結合物之抗體結合MMAE之相似藥物動力學參數，HGLF-dLAE-MMAE結合物顯示延長之半衰期。

表15

h12F3 HGLF	vc-MMAE(4)	49.19	30.67	4.47
	dLAE-MMAE(4)	47.97	29.50	8.39

【0359】在食蟹猴中評估h12F3 HGLF ADC之耐受性，食蟹猴作為具有與人類及食蟹猴ALPP直向同源物具有相當之結合親和性之藥理學相關物種。雌性猴分別投與5 mg/kg之h12F3 HGLF-vc-MMAE(4)或5 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg及10 mg/kg之h12F3 HGLF-dLAE-MMAE(4)，每週一次持續四周(q1wx4)。毒理學評價包括體重、臨床觀察結果、血液學、凝血、血清化學及TK。在終末期(最後一個劑量後1週)及恢復期(最後一個劑量後4週)驗屍時，實施大體病理學檢查，並對組織進行組織病理學檢查。h12F3 HGLF-vc-MMAE(4)之最大耐受劑量為5 mg/kg，且h12F3 HGLF-dLAE-MMAE(4)之最大耐受劑量為9 mg/kg (表16)。經由血液學及解剖病理學評價針對兩種ADC檢測到與MMAE之藥理學一致之骨髓毒性，並將其視為劑量限制性毒性。肺中肺泡巨噬細胞累積之額外毒性、卵巢中次級及三級卵泡數量減少以及胸腺中淋巴耗竭亦經檢測。

表16

檢品	MTD (mg/kg)	劑量限制性毒性
h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE (4)	9 (q1wx4)	骨髓
h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE (4)	5 (q1wx4)	骨髓

以引用方式併入

【0360】本文引用之所有參考文獻(包括專利、專利申請案、科學論文、教科書及諸如此類)之全文以引用方式併入。

【序列表】

<110> 美商思進公司(Seagen Inc.)

<120> 抗ALPP/ALPPL2抗體及抗體藥物結合物

<130> 5620-00112PC

<150> US 63/162,635

<151> 2021-03-18

<150> US 63/301,574

<151> 2022-01-21

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1608

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

atgctggggc cctgcatgct gctgctgctg ctgctgctgg gcctgaggct acagctctcc      60
ctgggcatca tcccagttga ggaggagaac ccggacttct ggaaccgcga ggcagccgag      120
gccttgggtg ccgccaagaa gctgcagcct gcacagacag ccgccaagaa cctcatcctc      180
ttcttgggcg atgggatggg ggtgtctacg gtgacagctg ccaggatcct aaaagggcag      240
aagaaggaca aactggggcc tgagataccg ctggccatgg accgcttccc atatgtggct      300
ctgtccaaga catacaatgt agacaaacat gtgccagaca gtggagccac agccacggcc      360
tacctgtgcg ggggtcaaggg caacttccag accattggct tgagtgcagc cgcccgttt      420
aaccagtgea acacgacacg cggcaacgag gtcattctcc tgatgaatcg ggccaagaaa      480
gcaggggaagt cagtgggagt ggtaaccacc acacgagtgc agcacgcctc gccagccggc      540
acctacgecc acacggtgaa ccgcaactgg tactcggacg ccgacgtgcc tgccctccgcc      600
cgccaggagg ggtgccagga catcgtctacg cagctcatct ccaacatgga cattgacgtg      660
atcctaggtg gaggccgaaa gtacatgttt cgcattgggaa ccccagacce tgagtaccea      720
gatgactaca gccaaagggtg gaccaggctg gacgggaaga atctgggtgca ggaatggctg      780

```

gcgaagcgcc aggggtcccc gatatgtgg aaccgcactg agctcatgca ggcttccctg 840
 gacccgtctg tgaccatct catgggtctc tttgagcctg gagacatgaa atacgagatc 900
 caccgagact ccacactgga cccctccctg atggagatga cagaggctgc cctgcgcctg 960
 ctgagcagga acccccgcgg cttcttctc ttcgtggagg gtggtcgcat cgaccatggt 1020
 catcatgaaa gcagggctta ccgggcactg actgagacga tcatgttcga cgacgccatt 1080
 gagagggcgg gccagctcac cagcaggag gacacgctga gcctcgtcac tgccgaccac 1140
 tcccacgtct tctcttcgg aggctacccc ctgcgaggga gctccatctt cgggctggcc 1200
 cctggcaagg cccgggacag gaaggcctac acggctctcc tatacggaaa cggtcaggc 1260
 tatgtgctca aggacggcgc ccggccgat gttaccgaga gcgagagcgg gagccccgag 1320
 tatcggcagc agtcagcagt gcccctggac gaagagaccc acgcaggcga ggacgtggcg 1380
 gtgttcgcgc gcggcccgca ggcgcacctg gttcacggcg tgcaggagca gacctcata 1440
 gcgcacgtca tggccttcgc cgcctgctg gagccctaca ccgctgcga cctggcgcgc 1500
 ccccccgca ccaccgacgc cgcgcacccg gggcggtccg tggccccgc gttgttct 1560
 ctgctggccg ggacctgct gctgctggag acggcactg ctccctga 1608

<210> 2
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2

Met Leu Gly Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Gln Leu Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp
 20 25 30

Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu
 35 40 45

Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp
 50 55 60

Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln
65 70 75 80

Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe
85 90 95

Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro
100 105 110

Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn
115 120 125

Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn
130 135 140

Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys
145 150 155 160

Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala
165 170 175

Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser
180 185 190

Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile
195 200 205

Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly
210 215 220

Gly Arg Lys Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro
225 230 235 240

Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val
245 250 255

Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg

260

265

270

Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met
 275 280 285

Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser
 290 295 300

Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu
 305 310 315 320

Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg
 325 330 335

Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu
 340 345 350

Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser
 355 360 365

Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe
 370 375 380

Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala
 385 390 395 400

Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly
 405 410 415

Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr
 420 425 430

Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro
 435 440 445

Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg
 450 455 460

Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile
465 470 475 480

Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys
485 490 495

Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Arg
500 505 510

Ser Val Val Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu
515 520 525

Leu Glu Thr Ala Thr Ala Pro
530 535

<210> 3

<211> 1599

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

atgcaggggc cctgggtgct gctcctgctg ggcctgaggc tacagctctc cctgggcatc 60
atcccagttg aggaggagaa cccggacttc tggaaaccgcc aggcagccga ggccttgggt 120
gccccaaga agctgcagcc tgcacagaca gccccaaga acctcatcat cttcctgggt 180
gacgggatgg ggggtgtctac ggtgacagct gccaggatcc taaaaggga gaagaaggac 240
aaactggggc ctgagacctt cctggccatg gaccgcttcc cgtacgtggc tctgtccaag 300
acatacagtg tagacaagca tgtgccagac agtggagcca cagccacggc ctacctgtgc 360
gggtcaagg gcaacttcca gaccattggc ttgagtgcag ccgcccgtt taaccagtgc 420
aacacgacac gcggcaacga ggtcatctcc gtgatgaatc gggccaagaa agcaggaaag 480
tcagtgggag tggtaaccac cacacgggtg cagcatgcct cggcagccgg cgcctacgcc 540
cacacggtga accgcaactg gtactcggat gccgacgtgc ctgcctcggc ccgccaggag 600
gggtgccagg acatcggcac gcagctcatc tccaacatgg acattgatgt gatcctaggt 660
ggaggccgaa agtacatggt tcccatgggg accccagacc ctgagtacc agatgactac 720

agccaagggtg ggaccaggct ggacgggaag aatctggtgc aggatggct ggcgaagcac 780
 cagggtgccc ggtacgtgtg gaaccgcaact gagctcctgc aggttccct ggaccctct 840
 gtgaccatc tcatgggtct ctttgacct ggagacatga aatacgagat ccaccgagac 900
 tccacactgg accctccct gatggagatg acagaggctg cctgctcct gctgagcagg 960
 aacccccgcg gcttcttct cttcgtggag ggtggtcga tcgaccatgg tcatcatgaa 1020
 agcagggtt accggcact gactgagacg atcatgttcg acgacccat tgagaggcg 1080
 ggccagctca ccagcgagga ggacacgctg agcctcgtca ctgccacca ctcccacgtc 1140
 ttctccttcg gaggtaccc cctgcgaggg agctccatct tcgggtggc ccctggcaag 1200
 gccccggaca ggaaggccta cacggtcctc ctatacgaa acggtccagg ctatgtctc 1260
 aaggacggcg cccggccgga tgttacggag agcgagagcg ggagccccga gtatcggcag 1320
 cagtcagcag tgcccctgga cggagagacc cacgcaggcg aggacgtggc ggtgttcgcg 1380
 cgcggccccg aggcgcacct ggttcacggc gtgcaggagc agaccttcat agcgcacgtc 1440
 atggccttcg ccgcctgctt ggagccctac accgcctgcy acctggcgc ccgcgccggc 1500
 accaccgacg ccgcgcaccc ggggcccgtc gtggtccccg cgttcttcc tctgctggca 1560
 gggaccttgc tgctgctggg gacggcact gctccctga 1599

<210> 4
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 4

Met Gln Gly Pro Trp Val Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
 20 25 30

Arg Gln Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala
 35 40 45

Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly

50

55

60

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

Lys Leu Gly Pro Glu Thr Phe Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val
85 90 95

Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Ser Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly
100 105 110

Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr
115 120 125

Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg
130 135 140

Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys
145 150 155 160

Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala
165 170 175

Gly Ala Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp
180 185 190

Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln
195 200 205

Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys
210 215 220

Tyr Met Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr
225 230 235 240

Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp
245 250 255

Leu Ala Lys His Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu
 260 265 270

Leu Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe
 275 280 285

Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp
 290 295 300

Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ser Arg
 305 310 315 320

Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His
 325 330 335

Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met
 340 345 350

Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp
 355 360 365

Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly
 370 375 380

Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys
 385 390 395 400

Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro
 405 410 415

Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu
 420 425 430

Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Gly
 435 440 445

Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln

450

455

460

Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val
 465 470 475 480

Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala
 485 490 495

Pro Arg Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Pro Ser Val Val
 500 505 510

Pro Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Gly Thr
 515 520 525

Ala Thr Ala Pro
 530

<210> 5
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> mu 12F3 vH

<400> 5

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

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

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile

100

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu IGHV3-49.01/hIGHJ4.01

<400> 7

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

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

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

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Thr Ala
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 100

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu IGHV3-72.01

<400> 8

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

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

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg
 100

<210> 9

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vHA

<400> 9

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

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

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vHB

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vHC

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vHD

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vHE

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vHF

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vHG

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

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

Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vHH

<400> 16

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

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

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

Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala

50

55

60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mu 12F3 vL

<400> 17

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

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

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Tyr Thr

85

90

95

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

<210> 18

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mu IGKV19-93.01 - 最接近之鼠類種系V-基因

<400> 18

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

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

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu IGKV1-33.01/hIGKJ2.01

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu IGKV1D-43.01

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

<210> 21

<211> 95

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hu IGKV1-16.01

<400> 21

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

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vL1

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vL2

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr

20

25

30

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vL3

<400> 24

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

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

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

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

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

<211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vLB

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vLC

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vLD

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vLE

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

<210> 30
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vLF

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 vLG

<400> 31

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

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vLH

<400> 32

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

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

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

His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

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

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

<210> 33

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vLI

<400> 33

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 34
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 HA 重鏈

<400> 34

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

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

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

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

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Thr Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 35
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 HB 重鏈

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

245

250

255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 36

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 HC 重鏈

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Thr Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

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

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

340

345

350

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 37

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 HD 重鏈

<400> 37

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

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

Tyr Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

435

440

445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 38

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 HE 重鏈

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

130

135

140

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 39

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 HF 重鏈

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 40
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 HG 重鏈

<400> 40

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

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

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

Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

325

330

335

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 41

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 HH 重鏈

<400> 41

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20

25

30

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

Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

420

425

430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 42
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 L1 輕鏈

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

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

115

120

125

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 43

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 L2 輕鏈

<400> 43

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

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

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

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

50

55

60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 44

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 L3 輕鏈

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

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

<220>
 <223> h12F3 LA 輕鏈

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 46
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 LB 輕鏈

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

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

<220>
<223> h12F3 LC 輕鏈

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195

200

205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 48

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 LD 輕鏈

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130

135

140

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 49

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 LE 輕鏈

<400> 49

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

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

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

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

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

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Tyr Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 51

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 LG 輕鏈

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 52
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 LH 輕鏈

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 53
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> h12F3 LI 輕鏈

<400> 53

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 54

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hIgG1 重鏈恆定結構域

<400> 54

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 55

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hIgG κ 輕鏈恆定結構域

<400> 55

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 56

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HF, HG CDR 1, Kabat

<400> 56

Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 57

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HG CDR 2, Kabat

<400> 57

Leu Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HF, HG CDR 3, Kabat

<400> 58

Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HF CDR 2, Kabat

<400> 59

Leu Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 60

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HF, HG CDR 1, IMGT

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HF, HG CDR 2, IMGT

<400> 61

Ile Arg Asn Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Thr
1 5 10

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HF, HG CDR 3, IMGT

<400> 62

Ala Arg Ala Ser Phe Tyr Tyr Asp Gly Lys Val Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LF CDR 1, Kabat

<400> 63

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

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LF CDR 2, Kabat

<400> 64

Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LD, LF CDR 3, Kabat

<400> 65

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Tyr Thr
1 5

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LD CDR 1, Kabat

<400> 66

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

<210> 67
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LD CDR 2, Kabat

<400> 67

Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Pro

1 5

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LD, LF CDR 1, IMGT

<400> 68

Gln Asp Ile Asn Lys Tyr

1 5

<210> 69

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LD, LF CDR 2, IMGT

<400> 69

Tyr Thr Ser

1

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LD, LF CDR 3, IMGT

<400> 70

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Tyr Thr

1

5

<210> 71

<211> 369

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vHG 核酸序列

<400> 71

gaggtgcagc tgggtggagtc cggaggagga ctggtgcagc ccggtcgttc ttttaaggctg 60

agctgcacag ccagcggctt caccttcacc gactactaca tgtcttgggt gaggcaagct 120

cccggtaagg gactggagtg gctggcttta attcgtaca aggccaccgg ctacaccacc 180

gagtacaccg cctccgtgaa gggtcgttc accatctctc gtgacaacag caagtccatt 240

ttatatattac agatgaactc tttaaagacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgctcgt 300

gcctcctttt actacgacgg caaggtgctg gcctactggg gccaaaggtac ttttagtgacc 360

gtgtcctcc 369

<210> 72

<211> 319

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> h12F3 vLF 核酸序列

<400> 72

gacaccaga tgaccagtc cccttcctct ttatccgctt ccgtgggaga tcgtgtgacc 60

atcacttgtc aagcttccca agatatcaac aagtacctgg ctgtgtacca gtacaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatccactac acctcctctt tacagtccgg agtgccttct 180

cgtttctccg gctccggaag cggctcgtgac tacaccttca ccctctctc tttacagccc 240

gaggacatcg ctacctacta ctgtttacag tacgacaatt tatacacctt cggccaaggt 300

accaagctgg agatcaagc 319

<210> 73

<211> 43
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 表位--ALPP

<400> 73

Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp
 1 5 10 15

Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met
 20 25 30

Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser
 35 40

<210> 74
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> h12F3 表位-ALPPL2

<400> 74

Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp
 1 5 10 15

Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met
 20 25 30

Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ser
 35 40

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種結合ALPP及/或ALPPL2之抗原結合蛋白或其片段，該抗原結合蛋白或其片段包含以下6個CDR：

CDR-H1，其包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:60之胺基酸序列；

CDR-H2，其包含SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:61之胺基酸序列；

CDR-H3，其包含SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:62之胺基酸序列；

CDR-L1，其包含SEQ ID NO:63或SEQ ID NO:68之胺基酸序列；

CDR-L2，其包含SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:69之胺基酸序列；及

CDR-L3，其包含SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:70之胺基酸序列；

其中該等CDR係藉由Kabat或IMGT測定。

【請求項2】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包括包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列之CDR-H2；包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之CDR-H3；包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列之CDR-L1、包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之CDR-L2及包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列之CDR-L3；其中該等CDR係藉由Kabat測定。

【請求項3】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包括包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之CDR-H1；包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之CDR-H2；包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之CDR-H3；包含SEQ ID NO: 68之胺基酸序列之CDR-L1、包含SEQ ID NO: 69之胺基酸序列之CDR-L2及包含

SEQ ID NO: 70之胺基酸序列之CDR-L3；其中該等CDR係藉由IMGT測定。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之抗原結合蛋白或片段，其包含VH及VL，其中該VH與SEQ ID NO: 15之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%或99%胺基酸序列一致性，且其中該VL與SEQ ID NO: 30之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%或99%胺基酸序列一致性。

【請求項5】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包含VH及VL，其中該VH包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列。

【請求項6】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包含VH及VL，其中該VL包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列。

【請求項7】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包含VH及VL，其中該VH包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列，且該VL包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列。

【請求項8】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包括包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之重鏈(HC)。

【請求項9】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包括包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之輕鏈(LC)。

【請求項10】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其包括包含SEQ ID NO: 40之胺基酸序列之HC且包括包含SEQ ID NO: 50之胺基酸序列之LC。

【請求項11】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其中該抗原結合蛋白係單株抗體或其片段。

【請求項12】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其中該抗原結合蛋白係人類化抗體或其片段。

【請求項13】

如請求項1之抗原結合蛋白或片段，其中該片段係選自Fab、Fab'、Fv、scFv或(Fab')₂片段。

【請求項14】

一種抗體藥物結合物，其包含與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑結合之如請求項1至13中任一項之抗體或抗原結合片段。

【請求項15】

如請求項14之抗體藥物結合物，其中該抗體或抗原結合片段經由連接體與該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑結合。

【請求項16】

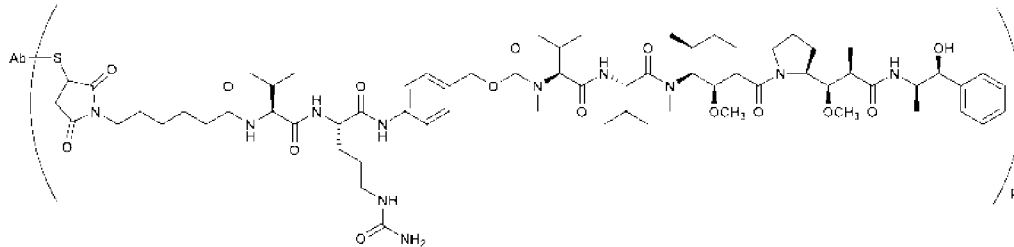
如請求項14至15中任一項之抗體藥物結合物，其中該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑係單甲基奧裡斯他汀(auristatin)。

【請求項17】

如請求項16之抗體藥物結合物，其中該單甲基奧裡斯他汀係單甲基

【請求項22】

如請求項14之抗體藥物結合物，其中該連接體連接至單甲基奧裡斯他汀E，從而形成具有以下結構之抗體藥物結合物：



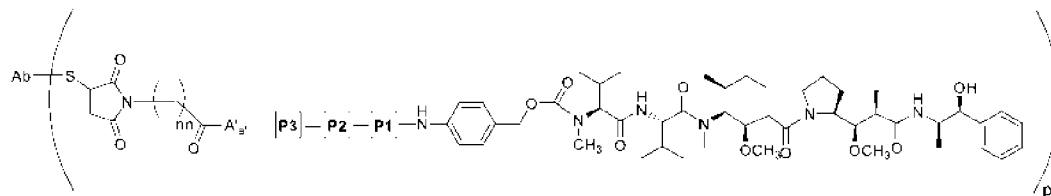
其中Ab係抗體h12F3且p表示1至16之數。

【請求項23】

如請求項22之抗體藥物結合物，其中該抗體藥物結合物之群體中之p之平均值係約4。

【請求項24】

如請求項14之抗體藥物結合物，其中該抗體藥物結合物係由以下結構表示：



或其醫藥上可接受之鹽，其中：

Ab係抗體h12F3且p表示1至12之數；

下標nn係1至5之數；

下標a'係0，且A'不存在；

P1、P2及P3各自係胺基酸，其中：

該等胺基酸P1、P2或P3中之第一者帶負電荷；

該等胺基酸P1、P2或P3中之第二者具有疏水性不大於白胺酸之疏水

性的脂肪族側鏈；且

該等胺基酸P1、P2或P3中之第三者具有低於白胺酸之疏水性之疏水性，

其中該等胺基酸P1、P2或P3中之第一者對應於P1、P2或P3中之任一者，該等胺基酸P1、P2或P3中之第二者對應於兩個剩餘胺基酸P1、P2或P3中之一者，且該等胺基酸P1、P2或P3中之第三者對應於最後剩餘胺基酸P1、P2或P3，

條件係-P3-P2-P1-不為-Glu-Val-Cit-或-Asp-Val-Cit-。

【請求項25】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中下標nn係2。

【請求項26】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中：

三肽之該P3胺基酸呈D-胺基酸構形；

該等P2及P1胺基酸中之一者具有疏水性低於白胺酸之疏水性之脂肪族側鏈；且

該等P2及P1胺基酸中之另一者帶負電荷。

【請求項27】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中該P3胺基酸係D-Leu或D-Ala。

【請求項28】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中該P3胺基酸係D-Leu或D-Ala，該P2胺基酸係Ala、Glu或Asp，且該P1胺基酸係Ala、Glu或Asp。

【請求項29】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中-P3-P2-P1-係-D-Leu-Ala-Asp-

、-D-Leu-Ala-Glu-、-D-Ala-Ala-Asp-或-D-Ala-Ala-Glu-。

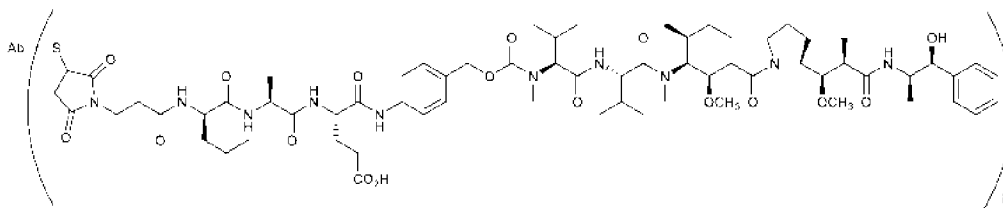
【請求項30】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中-P3-P2-P1-係-D-Leu-Ala-Glu-

。

【請求項31】

如請求項24之抗體藥物結合物，其中該抗體藥物結合物係由以下結構表示：



或其醫藥上可接受之鹽，

其中Ab係抗體h12F3且p表示1至12之數。

【請求項32】

一種分離之核酸，其編碼如請求項1至13中任一項之抗原結合蛋白或片段。

【請求項33】

一種載體，其包含如請求項32之核酸。

【請求項34】

一種宿主細胞，其包含如請求項33之載體。

【請求項35】

如請求項34之宿主細胞，其中該宿主細胞係CHO細胞。

【請求項36】

一種宿主細胞，其產生如請求項1至13中任一項之抗原結合蛋白或片段。

【請求項37】

一種製備抗原結合蛋白或其片段之方法，該方法包含在適於產生該抗原結合蛋白之條件下培養如請求項36之宿主細胞。

【請求項38】

如請求項37之方法，其進一步包含回收由該宿主細胞產生之該抗原結合蛋白或片段。

【請求項39】

如請求項37或38之方法，其中該宿主細胞係CHO細胞。

【請求項40】

一種抗原結合蛋白或其片段，其係藉由如請求項37至39中任一項之方法產生。

【請求項41】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至31或40中任一項之抗原結合蛋白或片段及醫藥上可接受之載劑。

【請求項42】

一種如請求項1至31或40中任一項之抗原結合蛋白或片段或如請求項41之醫藥組合物的用途，其用於製造用於治療個體中表現ALPP及/或ALPPL2之癌症之藥劑。

【請求項43】

如請求項42之用途，其中該癌症係卵巢癌、肺癌、子宮內膜癌、膀胱癌、胃癌或睪丸癌。

【請求項44】

如請求項43之用途，其中該癌症係卵巢癌。

該等胺基酸P1、P2或P3中之第三者具有低於白胺酸之疏水性之疏水性，

其中該等胺基酸P1、P2或P3中之第一者對應於P1、P2或P3中之任一者，該等胺基酸P1、P2或P3中之第二者對應於兩個剩餘胺基酸P1、P2或P3中之一者，且該等胺基酸P1、P2或P3中之第三者對應於最後剩餘胺基酸P1、P2或P3，

條件係-P3-P2-P1-不為-Glu-Val-Cit-或-Asp-Val-Cit-。

【請求項47】

如請求項46之抗體藥物結合物，其中下標nn係2。

【請求項48】

如請求項46或47之抗體藥物結合物，其中：

三肽之該P3胺基酸呈D-胺基酸構形；

該等P2及P1胺基酸中之一者具有疏水性低於白胺酸之疏水性之脂肪族側鏈；且

該等P2及P1胺基酸中之另一者帶負電荷。

【請求項49】

如請求項46之抗體藥物結合物，其中該P3胺基酸係D-Leu或D-Ala。

【請求項50】

如請求項46之抗體藥物結合物，其中該P3胺基酸係D-Leu或D-Ala，該P2胺基酸係Ala、Glu或Asp，且該P1胺基酸係Ala、Glu或Asp。

【請求項51】

如請求項46之抗體藥物結合物，其中-P3-P2-P1-係-D-Leu-Ala-Asp-、-D-Leu-Ala-Glu-、-D-Ala-Ala-Asp-或-D-Ala-Ala-Glu-。

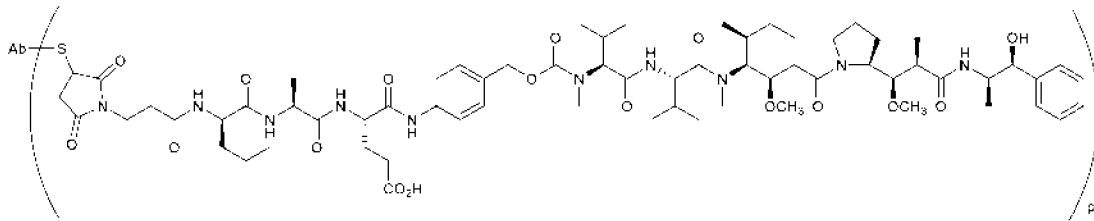
【請求項52】

如請求項46之抗體藥物結合物，其中-P3-P2-P1-係-D-Leu-Ala-Glu-

。

【請求項53】

如請求項46之抗體藥物結合物，其中該抗體藥物結合物係由以下結構表示：

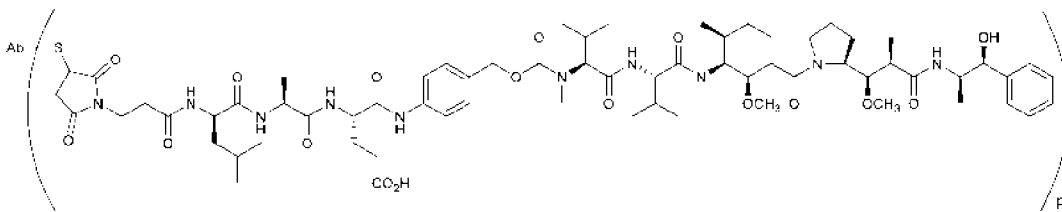


或其醫藥上可接受之鹽，

其中Ab係抗ALPP/ALPPL2抗體且p表示1至12之數。

【請求項54】

一種抗體藥物結合物，其包含與mp-dLAE-PABC-MMAE結合之分離之抗ALPP/ALPPL2抗體，其中該抗體具有包含SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列之輕鏈可變區，且其中該抗體藥物結合物具有以下結構：

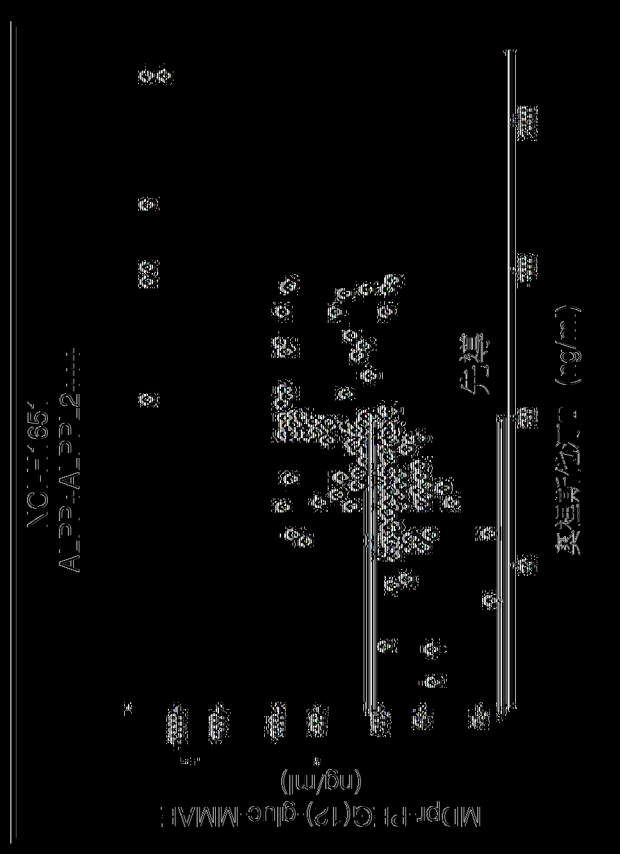
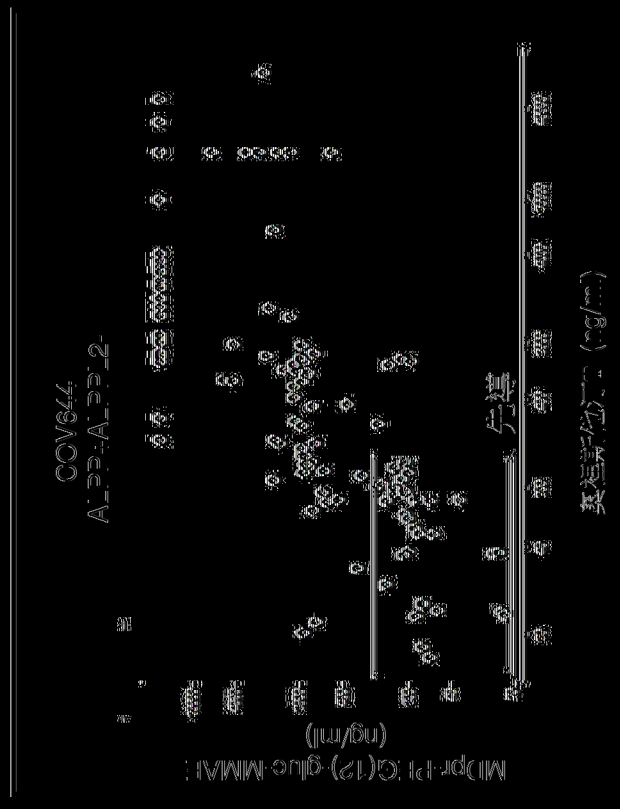


其中Ab係該抗體且p表示1至12之數。

【請求項55】

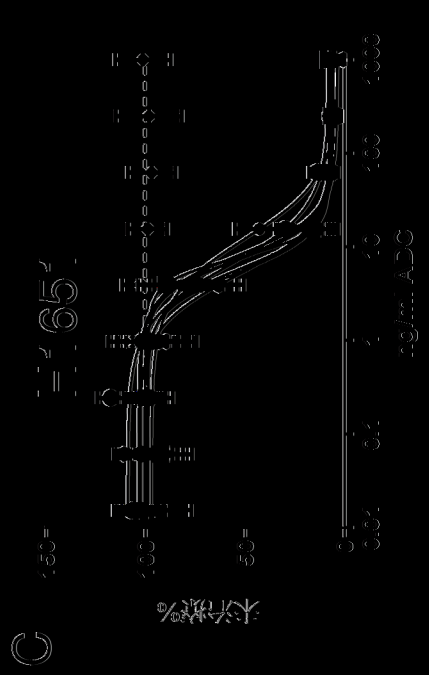
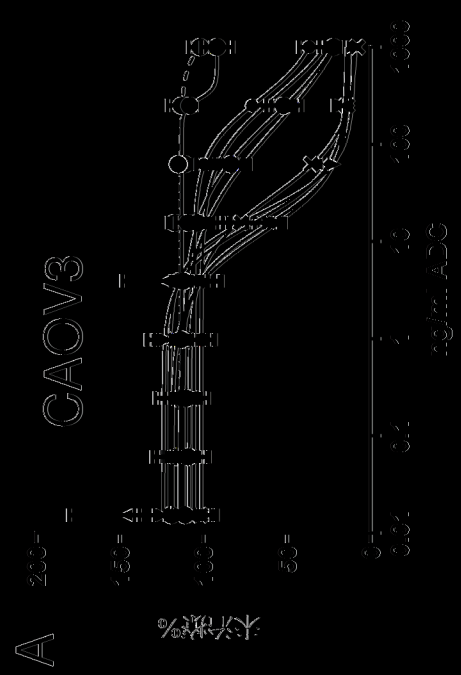
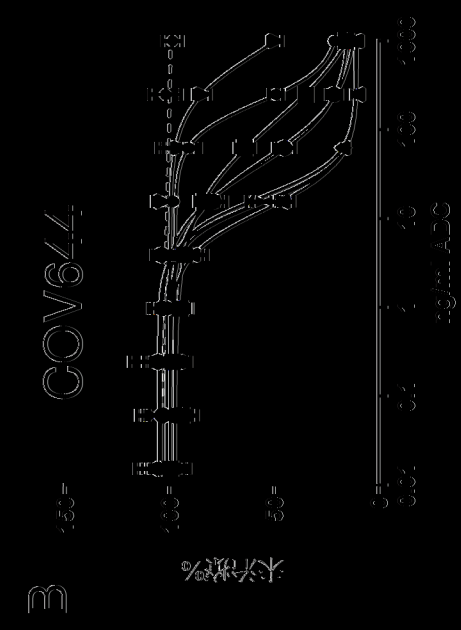
一種結合ALPP及/或ALPPL2之抗原結合蛋白或其片段，其能夠結合至包含SEQ ID NO: 73及/或SEQ ID NO: 74之肽之一或多種胺基酸。

(發明圖式)



(圖式)

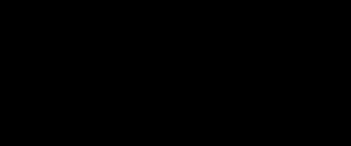
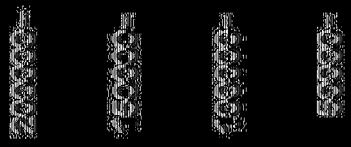
- SG82-6C: 2-4,830(1.0)
- SG82-6D: 1-4,830(1.0)
- △ SG82-1,3D: 2-4,830(1.0)
- ▽ SG82-1,2: 3-4,830(1.0)
- ◇ SG82-1,4: 9-4,830(1.0)
- SG82-1,7: 4-4,830(1.0)
- SG82-1,3B: 4,830(1.0)
- △ SG82-1,7: 4,830(1.0)
- ▽ SG84-1,3: 1-4,830(1.2)
- SG = 1.00-4,830(8)



【圖2】

ALP12

ALP3



幾何M.F.

幾何M.F.

ALP12

ALP3

n.V. Kc 1.27
 Bmax 1.09
 1.55795
 1.25621

n.V. Kc 1.57
 Bmax 1.53
 266297
 1.56005

n.V. Kc
 Bmax

n.V. Kc
 Bmax

[圖4]

圖 10 變態曲線

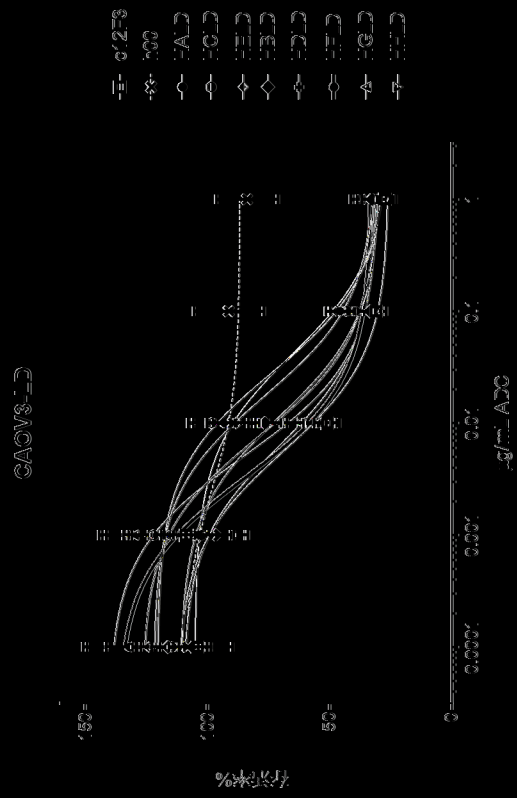
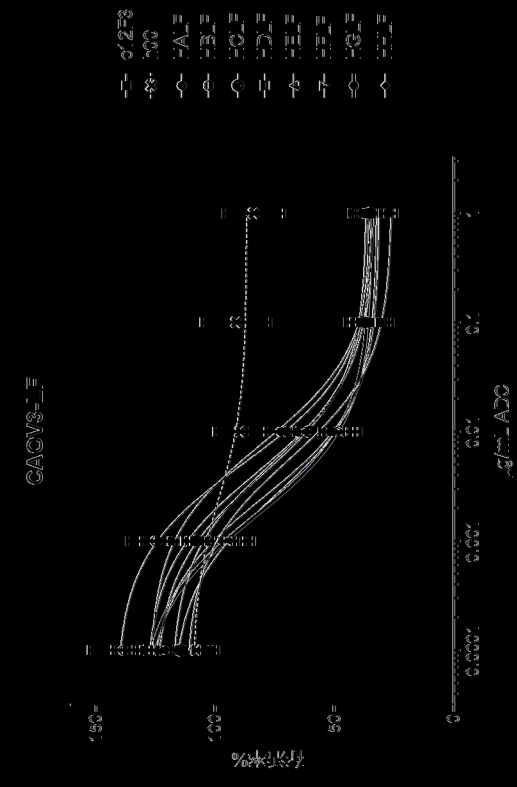


圖 11 變態曲線



(圖 9)

圖 23 A6 (平均2/3實驗)(液
據受體數量定大小)

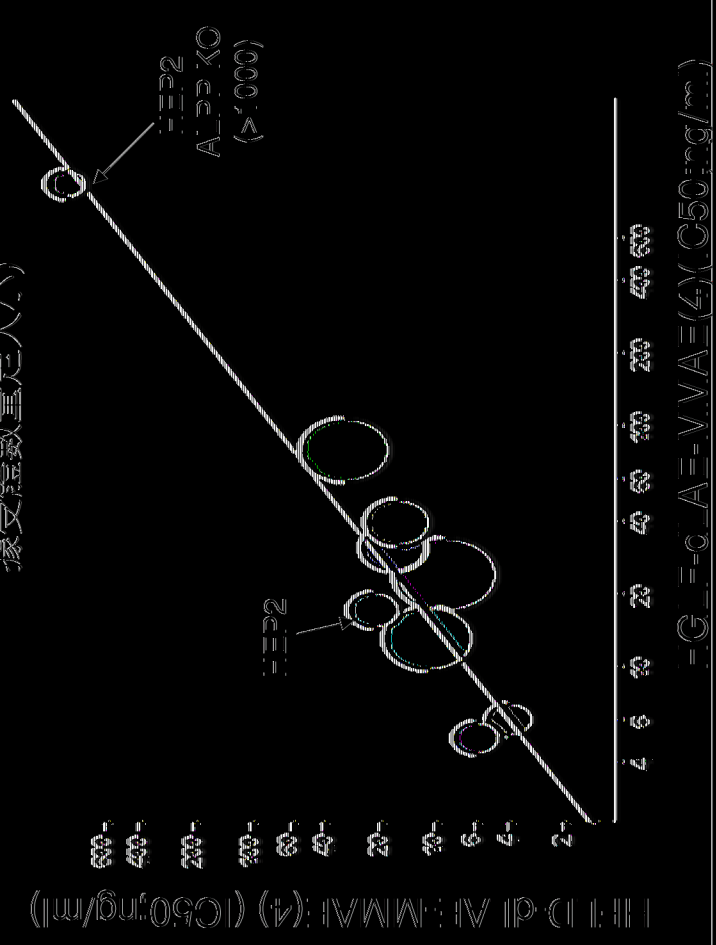
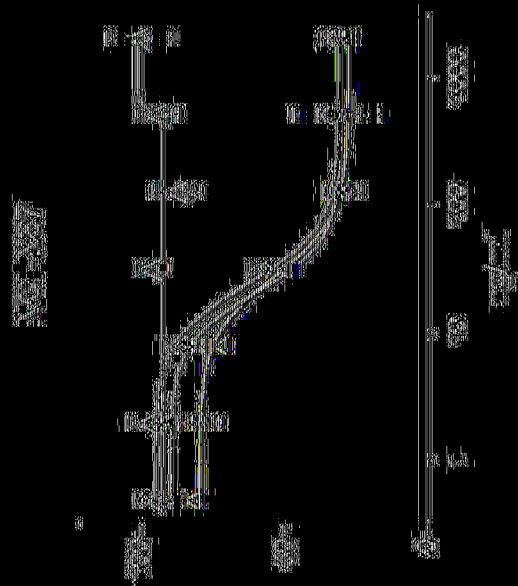
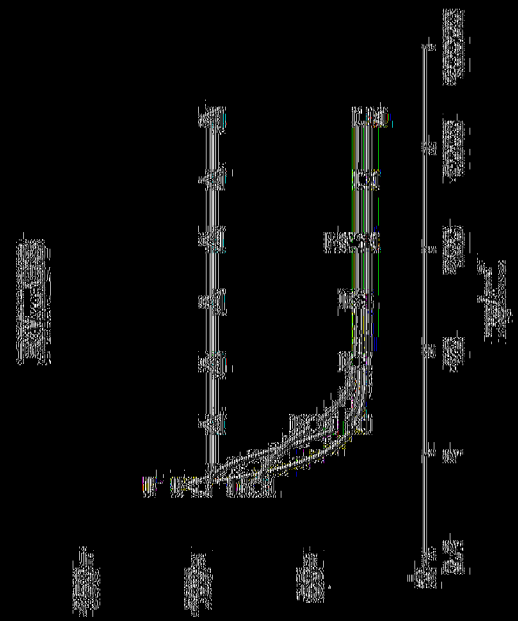


圖 23



系統分



系統分

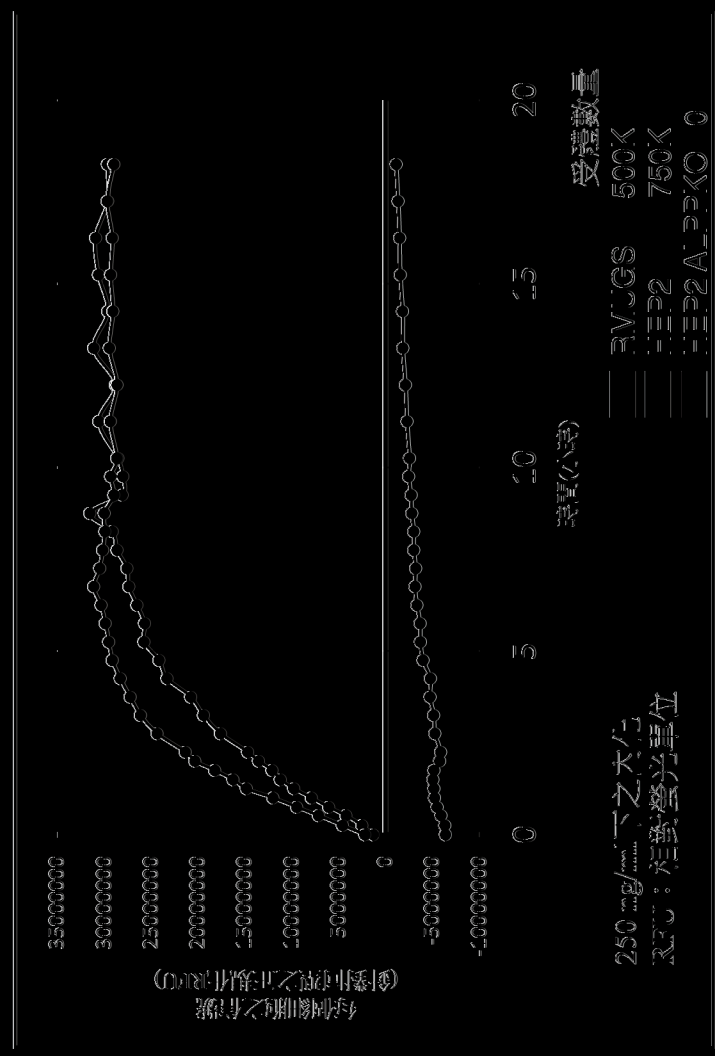
 系統分、GG、V、D、P、G、S、G-V、VAE(4) DC

 系統分、GG、V、D、P、G、S、G-V、VAE(4)

 系統分、GG、V、D、P、G、S、G-V、VAE(4)

 系統分、GG、V、D、P、G、S、G-V、VAE(4)

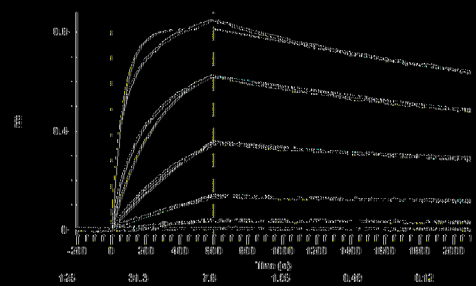
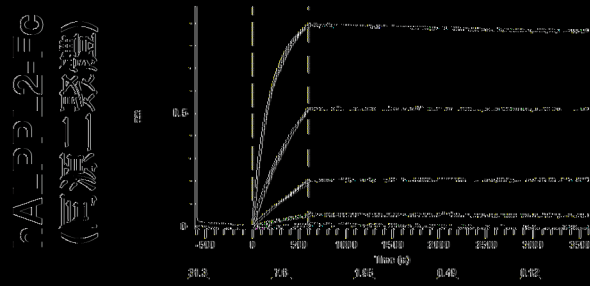
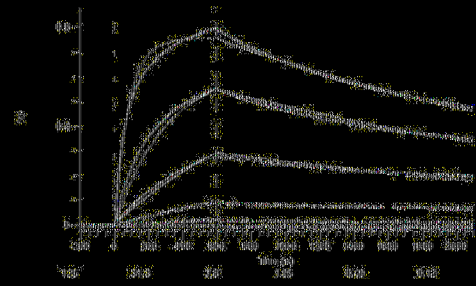
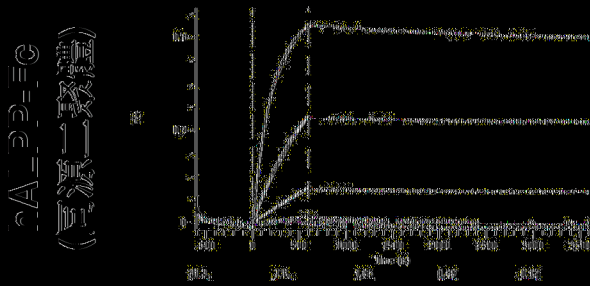
(圖 11)



【圖 2】

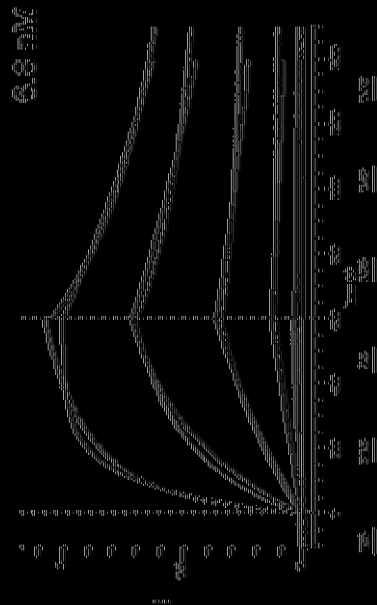
○ h12f3 HGF

○ h12f3 HFD

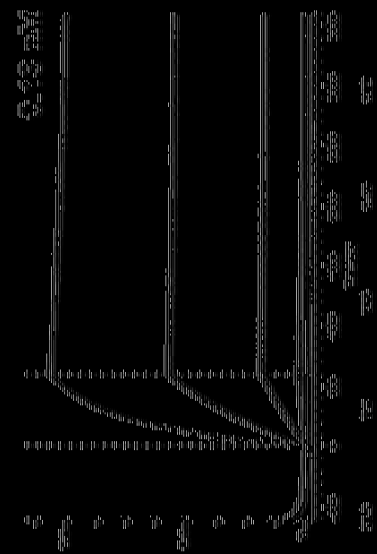
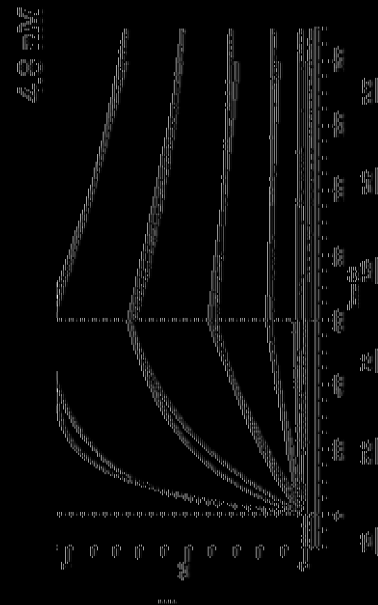


探針	分析物	MS/MS (m/z)	MS/MS (m/z)	MS/MS	MS/MS	MS/MS	MS/MS	MS/MS
h12f3 HGF	h12f3 HGF	100	100	100	100	100	100	100
h12f3 HFD	h12f3 HFD	100	100	100	100	100	100	100
h12f3 HGF	h12f3 HGF	100	100	100	100	100	100	100
h12f3 HFD	h12f3 HFD	100	100	100	100	100	100	100

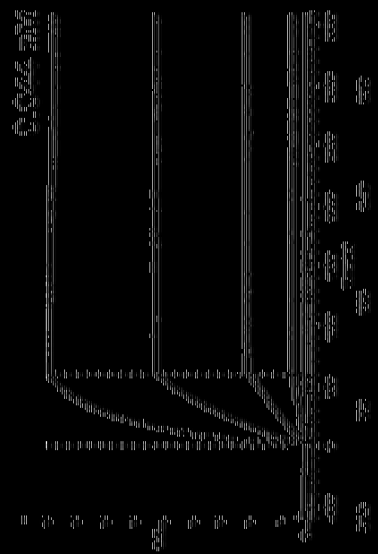
(圖13)



對於A₁2.2高1.1種



對於A₁2.2高3種

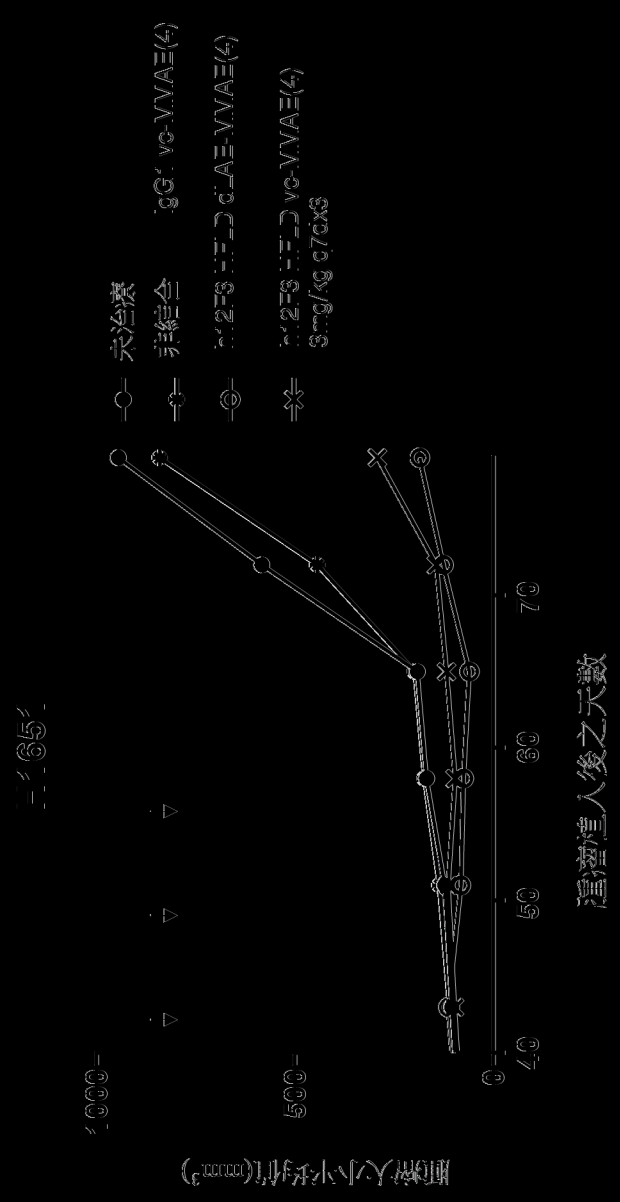


(請參見說明書)
0.8 nm

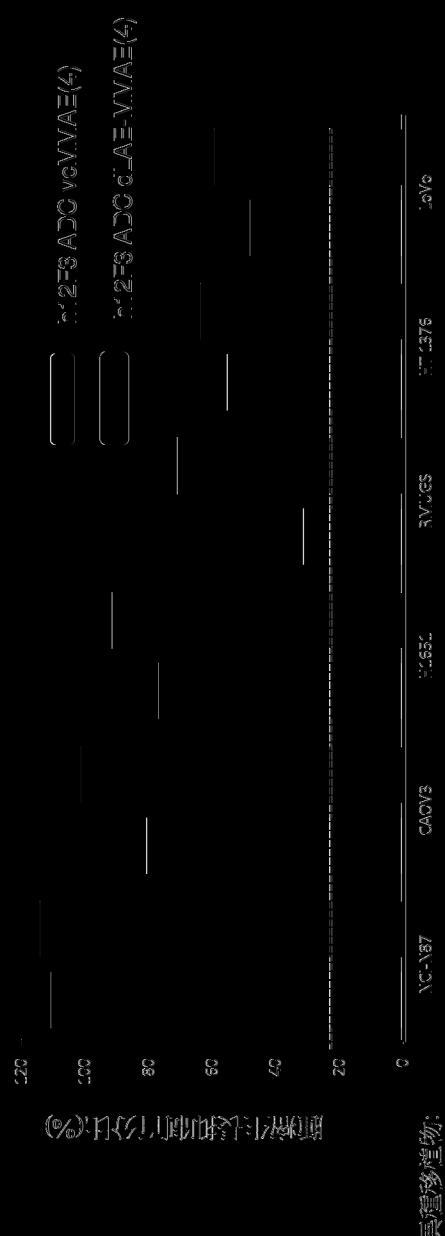
(請參見說明書)
4.8 nm

類別	分析物	0.8 nm						4.8 nm					
		K _s (eV)	k _e (/s)	k _e (/V.s)	K _s (eV)	k _e (/s)	k _e (/V.s)	K _s (eV)	k _e (/s)	k _e (/V.s)	K _s (eV)	k _e (/s)	k _e (/V.s)
0.2-0.8	CA ₁ 2.2-0 (二元數據)	0.13	2.0E+05	1.5E+05	9.9	5.9E+04	8.7E+04	32	5.7	30			
0.2-0.8	CA ₁ 2.2-0 (二元數據)	0.044	7.1E+05	1.8E+05	4.8	4.3E+04	8.9E+04	5.99	2.8	61			

[圖 11]

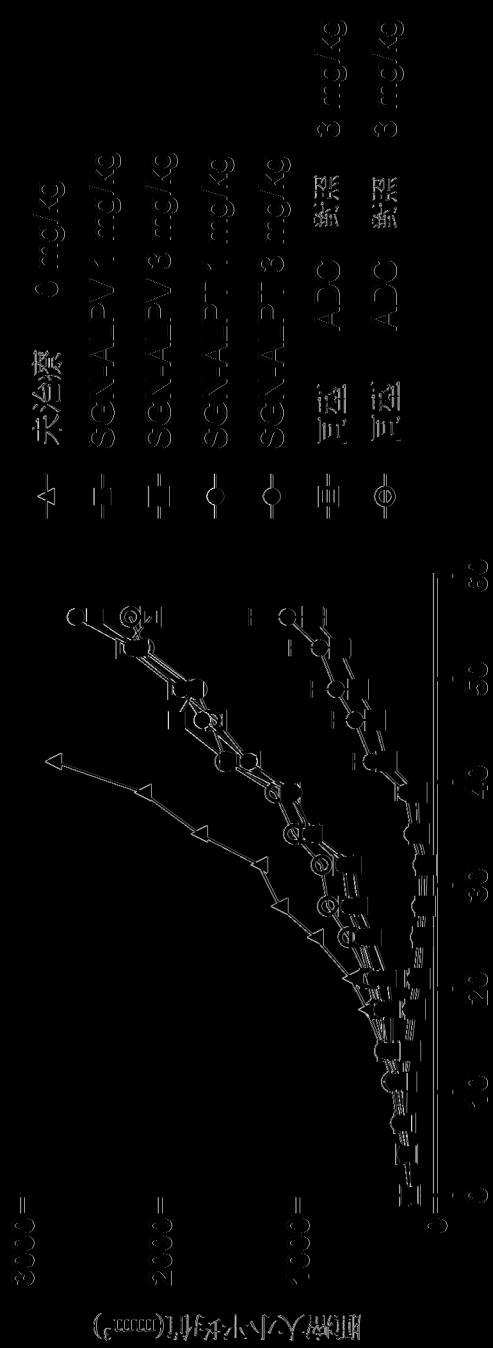


【圖 8】



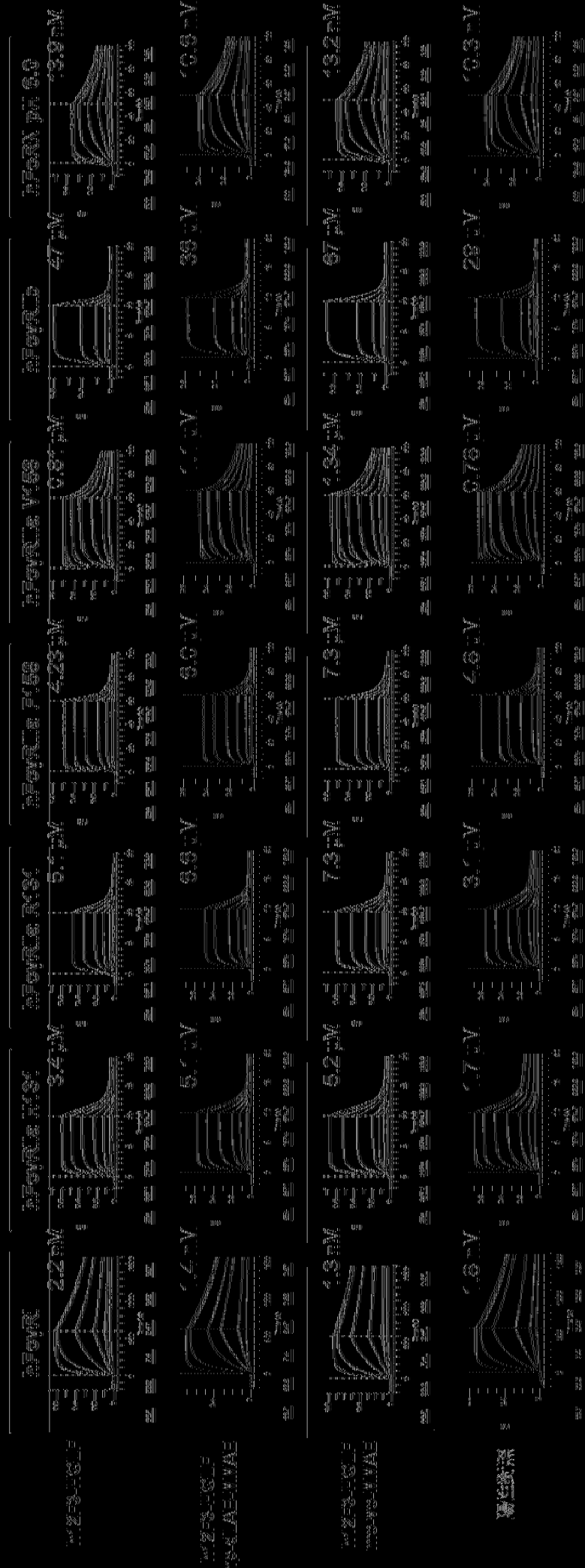
劑量：
3 mg/kg
時間表：每週三次或 qd x 4
DAR: 4
虛線：
平均非定向 ADC 活性

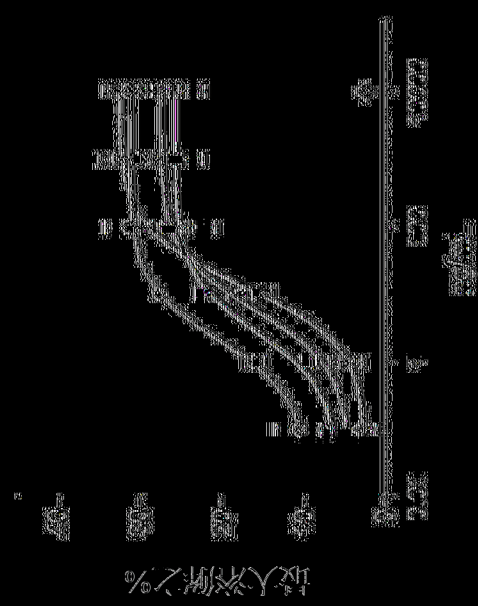
[圖 9]



第一劑量後之天數

(圖2.2)

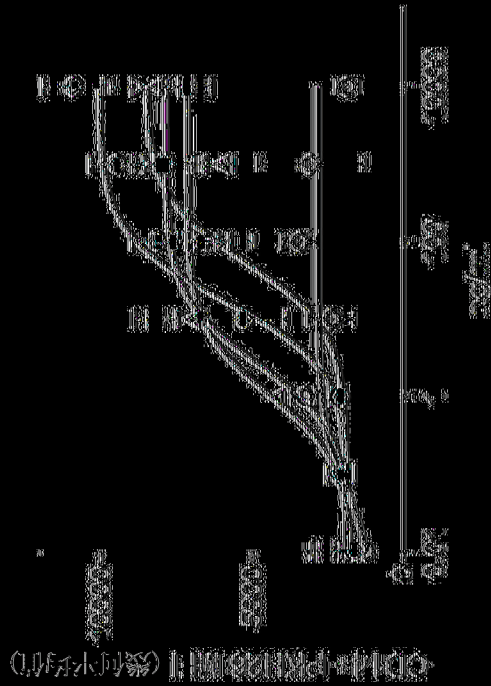




- 2=3 =G.E
- 2=3 =G.E=mc=VC-V.VA
- 2=3 =G.E=mc=VAE-V.VA
- 無岩藻糖基化CD7 (易性熱点)
- ggk (檢性熱点)

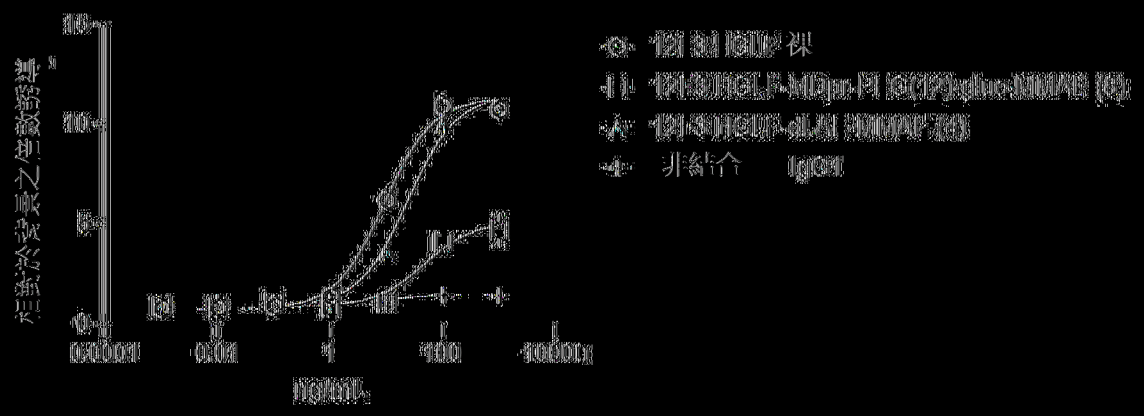
[頁27]

- 圖 23 = G₁ =
- 圖 24 = G₂ = mG-VG-VVAE
- 圖 25 = G₃ = mG-G₁A = VVAE
- 圖 26 (場型對照)
- 圖 27 (同型對照)



[圖28]

NCI-H1651



1 Top2



(圖29)

