



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I804499 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 06 月 11 日

(21) 申請案號：107121603

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 22 日

(51) Int. Cl. : *A61K47/68 (2017.01)* *A61K38/05 (2006.01)*
 A61K39/395 (2006.01) *C07K16/28 (2006.01)*
 A61K45/06 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2017/06/23 美國 62/524,382
 2017/06/23 美國 62/524,386
 2017/06/23 美國 62/524,388

(71) 申請人：美商維洛斯生物公司 (美國) VELOS BIO INC. (US)
 美國

(72) 發明人：蘭努帝 布莱恩 LANNUTTI, BRIAN (US)；傑森 卡堤 JESSEN, KATTI (US)；
 武 清莊 VO, THANH-TRANG (US)；瓦金斯 傑佛瑞 迪恩 WATKINS, JEFFRY
 DEAN (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

CN 103429618B WO 2016/11555A1
 WO 2017/072361A1

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：25 共 190 頁

(54) 名稱

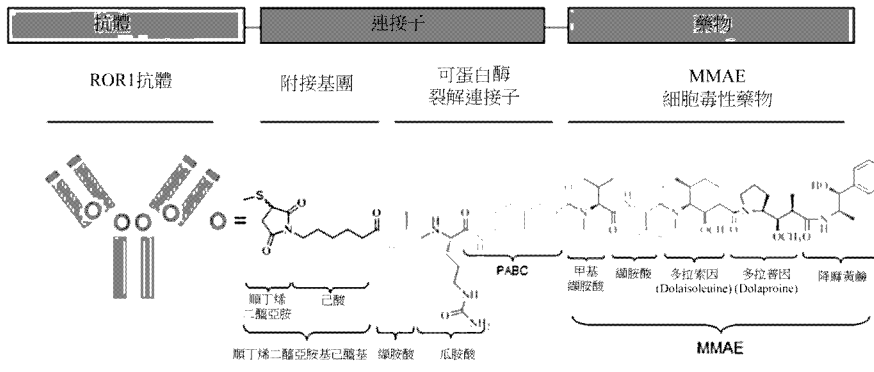
ROR1 抗體免疫接合物

(57) 摘要

本文提供一種免疫接合物，其包含抗 ROR1 抗體或其抗原片段及藥物部分體。此等免疫接合物適用於治療表現 ROR1 之癌症。

Provided herein are immunoconjugates comprising an anti-ROR1 antibody or an antigen-fragment thereof and a drug moiety. These immunoconjugates are useful for treating ROR1 expressing cancers.

指定代表圖：



【圖1】



I804499

【發明摘要】

【中文發明名稱】

ROR1 抗體免疫接合物

【英文發明名稱】

ROR1 ANTIBODY IMMUNOCONJUGATES

【中文】

本文提供一種免疫接合物，其包含抗ROR1抗體或其抗原片段片段及藥物部分體。此等免疫接合物適用於治療表現ROR1之癌症。

【英文】

Provided herein are immunoconjugates comprising an anti-ROR1 antibody or an antigen-fragment fragment thereof and a drug moiety. These immunoconjugates are useful for treating ROR1 expressing cancers.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

ROR1 抗體免疫接合物

【英文發明名稱】

ROR1 ANTIBODY IMMUNOCONJUGATES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 癌症係繼冠狀動脈疾病之後之人類死亡之第二大原因。受體酪胺酸激酶(Receptor tyrosine kinase, RTK)在致癌性轉型、生長及轉移瘤中起重要作用。RTK調節細胞分化、增殖、遷移、血管生成及存活。類受體酪胺酸激酶的孤兒受體1 (orphan receptor 1, ROR1)係進化保守的I型膜蛋白，其屬於ROR子族且具有含有類免疫球蛋白(Ig)的、捲曲的且三環的域的胞外域。ROR1-缺失型小鼠展現出各種骨骼及尿殖系統內之表現型缺陷以及分娩後生長遲緩。ROR1在胚胎發生期間且藉由各種不同癌症但不藉由正常分娩後組織表現，且可將其視為癌瘤胚胎表面抗原。功能資料表明ROR1可在非典型WNT傳信中起作用以促進惡性細胞之存活。

【0002】 ROR1表現及活化似乎與慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、乳癌、肺癌、胃癌及黑素瘤模型中之腫瘤侵襲性之特徵相關(Li等人, *PLoS One* 5(7):e11859 (2010) ; Gentile等人, *Cancer Res.* 71(8):3132-41 (2011) ; Zhang等人, *PLoS One* 7(3):e31127 (2012) ; Yamaguchi 等人, *Cancer Cell.* 21(3):348-61 (2012) ; Daneshmanesh等人, *Leukemia* 26(6):1348-55 (2012) ; Daneshmanesh等

人, *Leuk Lymphoma* 54(4):843-50 (2013) ; O'Connell 等人, *Cancer Discov.* 3(12):1378-93 (2013) ; Hojjat-Farsangi 等人, *PLoS One* 8(4):e61167 (2013) ; Hojjat-Farsangi 等人, *PLoS One* 8(10):e78339 (2013) ; Ida 等人, *Cancer Sci.* 107(2):155-61 (2016) ; 及 Janovska 等人, *Clin Cancer Res.* 22(2):459-69 (2016))。患者及細胞株中之升高的ROR1 表現量與參與上皮間質轉化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)之基因相關(Cui 等人, *Cancer Res.* 73(12):3649-60 (2013))。在患有CLL之患者中, 高ROR1 表現量與較短的無治療存活期及總存活期(overall survival, OS)相關聯(Cui 等人, *Blood* 128(25):2931-2940 (2016))。類似地, 在患有卵巢癌之患者中, 高ROR1 表現與較差臨床結果相關聯(Zhang 等人, *Sci Rep.* 4:5811 (2014))。

【0003】 考慮到ROR1在癌症中之作用, 需要靶向ROR1-陽性癌細胞之新穎且改良的療法。

【發明內容】

【0004】 本發明提供一種免疫接合物, 其具有式Ab-((L)m-(D))n, 其中: Ab為特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)的抗體或其抗原結合片段; L為連接子, 且m為0或1; D為細胞毒性藥物部分體; 且n為1至10之整數。

【0005】 細胞毒性藥物部分體可選自由以下組成之群: 例如, 抗微管蛋白劑、DNA烷基化劑、DNA交聯劑、DNA嵌入劑及RNA聚合酶II抑制劑。在一些實施例中, 細胞毒性藥物部分體選自由以下組成之群: 單甲基奧瑞他汀E (monomethyl auristatin E, MMAE)、阿那非德 (azonafide)、 α -瓢菌素、多卡黴素(duocarmycin) TM、吡咯并苯并二氮吡

(PBD)、PNU-159682及其醫藥學上可接受之鹽、酯及類似物。

【0006】 免疫接合物中之連接子可包含可裂解部分。其可在靶細胞內分裂。替代地，連接子不為可裂解的。連接子可為分支鏈或非分支鏈的。在一些實施例中，連接子包含選自以下之一或多個部分：纈胺酸-瓜胺酸(VC)、纈胺酸-丙胺酸(VA)、對胺基苯甲氧基羰基(PAB)、聚乙二醇(PEG)、二胺基丙酸(DPR)、Phe-C₄、C₂-Gly₃、C₆烷基、二甲基乙基胺(DMEA)及乙二胺(EDA)。在某些實施例中，連接子在連接子之丁二醯亞胺、羰基或環辛烯或三唑基處共價鍵結於抗體或抗原結合片段。

【0007】 在某些實施例中，免疫接合物中之抗體或片段藉由與選自由以下組成之群之部分體反應而共價鍵結於連接子：6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)-VC-PAB；6-MC-C₆；6-MC-PEG4-VC-PAB-DMEA；6-MC-PEG4-VA；6-MC-DPR-VC-PAB；6-MC-Phe-C₄-VC-PAB；6-MC-Phe-C₄-VC-PAB-DMEA；6-MC-C₂-Gly₃-EDA；二苯甲基環辛炔(DBCO)-(PEG2-VC-PAB)₂；DBCO-PEG4-VC-PAB-DMEA；及N-丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯-VC-PAB。如本文所用，VC代表纈胺酸-瓜胺酸二肽；VA代表纈胺酸-丙胺酸二肽；PEG代表聚乙二醇；PAB代表對胺基-苯甲氧基羰基；DMEA代表二甲基乙基胺；Phe代表苯甲基；且EDA代表乙二胺。

【0008】 本文中亦提供一種免疫接合物，其具有式Ab-((L)m-(D))n，其中Ab為特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1(ROR1)的抗體或其抗原結合片段；L為可裂解連接子，且m為0或1；D為奧瑞他汀(例如MMAE)；且n為1至10之整數。

【0009】 在本發明之免疫接合物中，連接子可包含，例如，共價鍵

結於抗體或抗原結合片段之雜環或羰基、共價鍵結於該雜環或羰基之間隔基團及共價鍵結於細胞毒性藥物部分體之酯、硫酯、醯胺、碳酸酯、硫代碳酸酯或胺基甲酸酯。在一些實施例中，間隔基團包含胺基酸、聚胺基酸或胺基苯甲基或其組合。在一些實施例中，本發明之免疫接合物中之連接子與抗體或片段上之半胱胺酸或離胺酸殘基形成共價鍵。

【0010】 本發明之免疫接合物之Ab (抗體或其片段)組分可結合於與分別包含SEQ ID NO:3及SEQ ID NO:4之重鏈及輕鏈之胺基酸序列抗體相同之ROR1抗原決定基。抗體或片段可包含SEQ ID NO:3中之重鏈互補決定區(complementarity-determining region, CDR) 1-3 (HCDR1-3)及SEQ ID NO:4中之輕鏈CDR1至3 (LCDR1至3)。在一些實施例中，抗體或片段包含SEQ ID NO:7至9之胺基酸序列且抗體之輕鏈包含SEQ ID NO:10至12之胺基酸序列。抗體或片段可為人類化的。抗體或片段可具有以下特性中之一或多者：a)輔助人類細胞中之ROR1內化；b)以小於100 nM (例如小於50、40、30、20或10 nM)之 K_D 結合於人類ROR1；及c)以500 nM或更小(例如400 nM或更小、300 nM或更小、200 nM或更小、或100 nM或更小)之 EC_{50} 活體外抑制ROR1⁺人類癌細胞之生長。

【0011】 在一些實施例中，免疫接合物中之抗體之重鏈可變域(V_H)及輕鏈可變域(V_L)分別包含以下之胺基酸序列：a) SEQ ID NO:5及6，b) SEQ ID NO:5及50；c) SEQ ID NO:48及6；或d) SEQ ID NO:48及50。抗體可包含人類IgG₁恆定區且視情況亦包含人類 κ 輕鏈恆定區。在其他實施例中，抗體之重鏈及輕鏈分別包含以下之胺基酸序列：a) SEQ ID NO:3及4；b) SEQ ID NO:3及49；c) SEQ ID NO:47及4；或d) SEQ ID NO:47及49。

【0012】 在一些實施例中，免疫接合物之Ab組分為Fab、F(ab)₂或scFv，例如Fab、F(ab)₂或scFv。

【0013】 本發明之特定實施例包括包含與細胞毒性藥物部分體接合之抗體的免疫接合物，其中抗體之V_H及V_L分別包含SEQ ID NO:5及6之胺基酸序列。此類免疫接合物之實例顯示於下文之表2及表3中，且包括抗體-藥物結合物(Antibody-Drug Conjugate, ADC)-A、E、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q及R。在其他實施例中，抗體之重鏈及輕鏈分別包含SEQ ID NO:3及4之胺基酸序列。

【0014】 在本發明之免疫接合物中，對於每抗體或片段而言之藥物部分體之數目或細胞毒性藥物部分體比抗體或片段之比率(DAR)可為1至10，例如，1至7、1至6、1至5、2至7、2至6或2至5。

【0015】 本發明亦提供醫藥組合物，其包含本發明之免疫接合物及醫藥學上可接受之賦形劑。醫藥組合物可另外包含選自由以下組成之群之其他治療劑：布魯頓氏酪胺酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)抑制劑、B細胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)抑制劑、雷帕黴素之哺乳動物靶(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制劑及磷酸肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)抑制劑。舉例而言，其他治療劑選自依魯替尼(ibrutinib)、阿卡拉布魯替尼(acalabrutinib)、維托拉斯(venetoclax)、依維莫司(everolimus)、賽泮替布(sapanisertib)及艾德昔布(idelalisib)。

【0016】 本發明亦提供一種用於為有需要之患者治療癌症的療法或方法，其包含向患者投與治療有效量之本發明之免疫接合物。癌症可為對於ROR1表現而言均一性或非均一性，且可為，例如，白血病、淋巴瘤或

實體腫瘤。在一些實施例中，癌症為慢性淋巴球性白血病(CLL)、T細胞白血病(T-cell leukemia, TCL)、套細胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)、彌漫性大B細胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多發性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、邊緣區淋巴瘤(marginal zone lymphoma, MZL)、小淋巴球性淋巴瘤(small lymphocytic lymphoma, SLL)或已經歷理查特氏(Richter's)轉型之非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)。在一些實施例中，癌症為非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、肝細胞癌、胰臟癌、骨肉瘤、頭頸癌、卵巢癌、乳癌或三陰性乳癌(triple negative breast cancer, TNBC)。

【0017】 本發明之療法或治療方法可另外包含向患者投與其他抗癌治療劑，其可為，例如，布魯頓氏酪胺酸激酶(BTK)抑制劑、B細胞淋巴瘤2 (Bcl-2)抑制劑、雷帕黴素之哺乳動物靶(mTOR)抑制劑及磷酸肌醇3激酶(PI3K)抑制劑。在一些實施例中，其他治療劑選自依魯替尼、阿卡拉布魯替尼、維托拉斯、依維莫司、賽泮替布及艾德昔布。

【0018】 在本發明療法或治療方法之某些實施例中，癌症為CLL、MCL或已經歷理查特氏轉型之NHL。

【0019】 本文中亦提供如本文中所描述之免疫接合物及醫藥組合物，其用於在本文中所描述之療法或治療方法中治療癌症。舉例而言，本發明提供一種用於為有需要之患者治療癌症的具有式Ab-((L)m-(D))n之免疫接合物，其中：Ab為特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)的抗體或其抗原結合片段；L為連接子，且m為0或1；D為細胞毒性藥物部分體；且n為1至10之整數。免疫接合物及治療之例示性實施例

在上文中描述且將在下文中進一步描述。

【0020】 本文中亦提供本文中之免疫接合物之用途，其用於製造用於為有需要之患者治療癌症的藥劑。舉例而言，本發明提供具有式Ab-((L)m-(D))n之免疫接合物之用途，其用於製造為有需要之患者治療癌症的藥劑，其中：Ab為特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)的抗體或其抗原結合片段；L為連接子，且m為0或1；D為細胞毒性藥物部分體；且n為1至10之整數。免疫接合物及治療之例示性實施例在上文中描述且將在下文中進一步描述。

【0021】 本發明亦提供一種製備免疫接合物之方法，其包含：提供特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)的抗體或其抗原結合片段；將抗體與選自由以下組成之群之細胞毒性藥物部分體接合：抗微管蛋白劑、DNA烷基化劑、DNA交聯劑、DNA嵌入劑及RNA聚合酶II抑制劑；其中抗體之重鏈包含SEQ ID NO:7至9之胺基酸序列，且抗體之輕鏈包含SEQ ID NO:10至12之胺基酸序列。免疫接合物之例示性實施例在上文中描述且將在下文中進一步描述。

【0022】 本文中亦提供包含本發明之免疫接合物之製品，諸如套組。

【圖式簡單說明】

【0023】 圖1為說明本發明之免疫接合物之非限制性實例的示意圖。

【0024】 圖2A及圖2B為說明各種濃度之Ab1及ADC-A與ROR1-陽性細胞Jeko-1 (2A)及MDA-MB-231 (2B)之結合的圖。Ab1及ADC-A之EC₅₀值顯示在各圖下方。未接合的Ab1與ADC-A之EC₅₀值之間之相似性

表明藥物結合對Ab1與靶細胞之結合具有最小影響。

【0025】 圖3A及圖3B為說明Ab1、4A5、ADC-A及ADC-T (3A)；及Ab1、ADC-A、D10及ADC-S (3B)與Jeko-1細胞之結合的圖。抗體及免疫接合物之EC₅₀值顯示在各圖下方。未接合的抗體與對應的ADC構築體之EC₅₀值之間之相似性表明藥物結合對抗體與靶細胞之結合具有最小影響。Ab1/ADC-A與D10/ADC-S之EC₅₀值之差值反映出，相比於D10，Ab1對ROR1之親和力更高。

【0026】 圖4A及圖4B為說明Ab1、ADC-A及ADC-B向Jeko-1細胞中之內化(4A)；及Ab1及ADC-A向MDA-MB-231細胞中之內化(4B)的圖。Ab1之連接子及有效負載之添加不對Ab1之結合或內化造成不利影響，如藉由ADC-A及ADC-B所表明。

【0027】 圖5為說明Ab1在MDA-MB-231細胞中之內化速率的圖。該圖顯示出一種最初快速且隨後較慢的細胞表面受體清除速率。

【0028】 圖6為說明在Ab1內化至Jeko-1細胞中期間之ROR1之細胞表面表現的圖。雖然Ab1快速內化，但細胞表面ROR1之定量顯示在頭10分鐘內有小降低幅，且後續測量表明ROR1表面表現恢復至初始量或略微更高量。

【0029】 圖7A至圖7C為說明在Ab1在Jeko-1細胞(7A)、MDA-MB-468細胞(7B)及MDA-MB-231細胞(7C)上內化之期間ROR1之細胞表面表現的圖。

【0030】 圖8A至圖8I為顯示在癌細胞株TMD-8 (8A)、HBL-1 (8B)、DOHH2 (8C)、MDA-MB-468 (8D)、Bt549 (8E)、TOV112D (8F)、JHOM1 (8G)、SKOvr3 (8H)及Mino (8I)中藉由本發明之免疫接合

物以及未接合的MMAE之ROR1結合的代表性IC₅₀曲線圖。

【0031】 圖9為說明在Jeko-1細胞中在經或不經100 µg/mL Ab1預處理之情況下藉由3 µg/mL、10 µg/mL或30 µg/mL之ADC-A之細胞增殖之抑制的圖。ADC-A以劑量依賴型方式抑制細胞增殖。細胞與Ab1之預培育減弱此活性，顯示ADC-A對細胞增殖之抑制活性由ADC-A與ROR1之結合介導。

【0032】 圖10為說明在用媒劑、10 mg/kg Ab1或1 mg/kg、2 mg/kg、或5 mg/kg ADC-A處理時在TCL1-ROR1慢性淋巴球性白血病小鼠模型中之白血病細胞腫瘤負荷之劑量依賴型抑制的圖。

【0033】 圖11為說明在用媒劑、5 mg/kg ADC-A或ADC-Q每四天一次(Q4D)靜脈內(IV)；每週一次(QW) 10 mg/kg Ab1 IV；或每天(QD) 20 mg/kg依魯替尼經口(PO)處理時在MCL異種移植模型中之腫瘤生長抑制的圖。ADC-A處理引起腫瘤消退。

【0034】 圖12為一對顯示在DLBCL-GCB異種移植小鼠模型中之ROR1表現(左圖)及在用對照組、10 mg/kg QW Ab1、50 mg/kg維托拉斯QD、Ab1+維托拉斯或5 mg/kg ADC-A QW處理時之腫瘤生長抑制(右圖)的圖。在所有經處理的動物中，ADC-A處理引起完全腫瘤消退。Ab1單獨、維托拉斯單獨及Ab1與維托拉斯之組合為低效的。

【0035】 圖13為一組顯示在耐化學療法理查特轉型異種移植小鼠模型中之ROR1表現(左圖)及在用媒劑、2.5或5 mg/kg ADC-A或10 mg/kg Ab1處理時之腫瘤生長之抑制(右圖)的圖。儘管僅20%至30%之腫瘤內細胞為ROR1-陽性的，使用5 mg/kg ADC-A觀測到完全且持續的腫瘤消退。

【0036】 圖14為說明在MDA-MB-231三陰性乳癌(TNBC)乳房脂肪

墊異種移植小鼠模型中在用媒劑、1或5 mg/kg ADC-A IV QW、1或5 mg/kg ADC-B IV QW或10 mg/kg Ab1 IV QW處理時之腫瘤生長抑制的圖。

【0037】圖15為說明在BR5011人類TNBC異種移植小鼠模型中在用媒劑、1或5 mg/kg ADC-A IV Q4D或10 mg/kg Ab1 IV QW處理時之腫瘤生長抑制的圖。儘管僅58%之腫瘤內細胞為ROR1-陽性，但使用5 mg/kg ADC-A觀測到完全且持續的消退，其中在最後一次給藥之後腫瘤消退保持至少28天。

【0038】圖16為說明在BR5015(低ROR1表現)人類TNBC異種移植小鼠模型中在用媒劑、1或5 mg/kg ADC-A IV Q4D或10 mg/kg Ab1 IV QW處理時之腫瘤生長抑制的圖。儘管僅58%之腫瘤內細胞為ROR1-陽性，但仍觀測到腫瘤消退。

【0039】圖17為說明在Jeko-1人類套細胞淋巴瘤異種移植小鼠模型中之腫瘤生長抑制的圖。用媒劑；1 mg/kg ADC-N、ADC-P或ADC-R；或5 mg/kg ADC-A、ADC-L、ADC-M、ADC-S或ADC-T處理小鼠。以Q4D IV投與媒劑及ADC構築體。在第11天中期分析時，在用ADC-A、ADC-L、ADC-M及ADC-S處理之動物中觀測到腫瘤消退；在用ADC-N、ADC-P、ADC-R及ADC-T處理之動物中觀測到腫瘤生長抑制，其中用ADC-N及ADC-P處理之動物開始顯示出腫瘤消退之跡象。

【0040】圖18A及圖18B為說明在各種細胞株中用ADC-A及BTK抑制劑依魯替尼(18A)或ACP-196/阿卡拉布魯替尼(18B)處理之組合指數的圖。ADC-A展現出與依魯替尼及ACP-196/阿卡拉布魯替尼對抑制細胞增殖的協同效應。

【0041】 圖19A及圖19B為說明在用ADC-A、依魯替尼(「Ib」)或ADC-A與依魯替尼之組合(19A)；或ADC-A、ACP-196/阿卡拉布魯替尼(「ACP196」或「196」)或ADC-A與ACP-196/阿卡拉布魯替尼之組合(19B)處理時之Jeko-1細胞增殖之抑制的圖。

【0042】 圖20A至圖20C為說明在各種細胞株中用ADC-A及Bcl-2抑制劑ABT-199/維托拉斯(「ABT199」)處理之組合指數(20A)；或在Jeko-1細胞(20B)或Mino細胞(20C)中用ADC-A與Bcl-2抑制劑Bcl-2i-1或Bcl-2i-2處理之組合指數的圖。ADC-A展現出與ABT-199對抑制MCL及DLBCL細胞增殖的協同效應。ADC-A亦展現出與其他Bcl-2抑制劑(Bcl-2i-1及Bcl-2i-2)對抑制Jeko-1細胞增殖的協同效應，且展現出與兩種抑制劑對抑制Mino細胞增殖的相加效應。

【0043】 圖21為說明在用ADC-A、ABT-199或ADC-A與ABT-199之組合處理時之Jeko-1細胞增殖之抑制的圖。

【0044】 圖22為說明在各種細胞株中用ADC-A及mTOR1/2抑制劑INK128/賽泮替布(「INK128」)處理之組合指數的圖。ADC-A展現出與INK 128對抑制MCL及DLBCL細胞增殖的協同效應。

【0045】 圖23為說明在用ADC-A、INK128或ADC-A與INK128之組合處理時之Jeko-1細胞增殖之抑制的圖。

【0046】 圖24為說明在各種細胞株中用ADC-A及PI3K抑制劑CAL-101/艾德昔布(「CAL101」)處理之組合指數的圖。ADC-A展現出與CAL101對抑制MCL及DLBCL細胞增殖的協同效應。

【0047】 圖25A及圖25B為說明在DLBCL-ABC細胞株TMD-8中(25A)或在DLBCL-GCB細胞株DOHH2中(25B)在用ADC-A、PI3K抑制

劑CAL-101/艾德昔布(「CAL101」或「101」)或ADC-A與CAL101之組合處理時之細胞增殖之抑制的圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0048】本申請案主張美國專利申請案62/524,382、62/524,386及62/524,388之優先權，以上所有均於2017年6月23日申請。此等優先申請案之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

序列表

【0049】本申請案含有序列表，該序列表已以ASCII格式、以電子方式提交且以全文引用之方式併入本文中。2018年6月21日建立的該ASCII複本命名為024651_TW002_SL.txt且大小為56,647個位元組。

【0050】本發明提供具有式 $Ab-((L)_m-(D))_n$ 之免疫接合物，其中Ab為特異性結合於ROR1蛋白的抗體或其抗原結合片段；L為連接子；D為對癌症具有治療活性的藥物部分體；m為0或1；且n為1至10之整數。在該式中，破折號「-」表示共價鍵或非共價鍵。抗體或片段包括但不限於，與抗體D10或Ab1競爭結合人類ROR1，或結合於與D10或Ab1相同之抗原決定基的抗體或抗體片段。藥物部分體包括但不限於，其他抗體或其抗原結合片段、多肽、小分子化合物、核酸分子，諸如短小干擾RNA分子或反義分子。本發明之免疫接合物可用於治療各種癌症，諸如ROR1-陽性癌症。

1. 免疫接合物

【0051】「抗體-藥物接合物」或「ADC」或「免疫接合物」係指在具有或不具有連接子之情況下共價或非共價鍵結於一或多個生物活性分

子的抗體分子或其抗原結合片段。本發明免疫接合物包含對人類ROR1有特異性且因此可充當用於向ROR1-陽性細胞傳遞所接合之有效負載的極佳靶向部分的抗體或其片段。在一些實施例中，本文中所提供之ROR1免疫接合物針對人類ROR1之平衡解離常數(K_D)為約1 μ M、100 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、2 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM、0.01 nM或0.001 nM或更小(例如 10^{-8} M或更小、 10^{-8} M至 10^{-13} M、或 10^{-9} M至 10^{-13} M)。 K_D 可藉由任何適合分析，諸如表面電漿子共振分析(例如使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000)量測。在某些實施例中，本發明之免疫接合物之 K_D 小於針對D10抗體之 K_D 。在某些實施例中，針對人類ROR1之本發明之免疫接合物之 K_D 小於約50、40、30、20或10 nM (例如40 nM)。在一些實施例中，本文中所提供之ROR1免疫接合物以約500、400、350、300或250 nM或更小(例如300 nM或更小)之 EC_{50} 活體外抑制ROR1⁺人類癌細胞之生長。如本文所用，當抗體以100 nM或更小，諸如小於10 nM或更小(例如1至5 nM)之 K_D 結合於抗原時稱其特異性地結合於抗原，如藉由例如表面電漿子共振或生物層干涉法(Bio-Layer Interferometry)所測定。

【0052】 在某些實施例中，本文中所提供之免疫接合物藉由ROR1-陽性細胞主要經由溶酶體/內體路徑內化。在特定實施例中，內化獨立於細胞表面上之ROR1表現量。

【0053】 免疫接合物中所使用之抗體或其片段、連接子及藥物部分體之實施例在下文中進一步詳細描述。

1.1. 抗體之類型及結構

【0054】 術語「抗體」在本文中最廣義地使用且包括多株抗體及單

株抗體，諸如完整抗體及其功能性(抗原結合)片段。該術語涵蓋免疫球蛋白之經基因工程改造及/或以其他方式修飾之形式，諸如胞內抗體、肽體、嵌合抗體、完全人類抗體、人類化抗體及異接合抗體、多特異性(例如雙特異性)抗體、雙功能抗體、三功能抗體及四功能抗體、串聯二-scFv及串聯三-scFv。除非另外規定，否則該術語涵蓋完整或全長抗體，包括任何類別或子類之抗體(例如IgG及其子類，諸如IgG₁、IgG₂、IgG₃及IgG₄；IgM；IgE；IgA；及IgD)，以及抗體片段。

【0055】 抗體可包括重鏈(或自其衍生之多肽序列)及輕鏈(或自其衍生之多肽序列)。術語「可變區」或「可變域」係指參與抗體與抗原之結合之抗體重鏈或輕鏈之域。天然抗體之重鏈及輕鏈之可變域(分別為V_H及V_L)通常具有相似結構，其中各域包含四個保守框架區及三個互補決定區。單個V_H或V_L域有時可能足以賦予抗體之全部或大部分抗原結合特異性。另外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原之抗體的V_H域或V_L域分別篩檢互補V_L域或V_H域之庫來分離。參見，例如Portolano等人，*J. Immunol.* 150:880-887 (1993)；Clarkson等人，*Nature* 352:624-628 (1991)。

【0056】 與「高變區」或「HVR」同義之術語「互補決定區」及「CDR」係指抗體可變域內之子區，其賦予針對抗體之抗原的抗體特異性及/或親和力。一般而言，在各重鏈可變域中存在三個CDR (HCDR1、HCDR2及HCDR3)，且在各輕鏈可變域中存在三個CDR (LCDR1、LCDR2及LCDR3)。「框架區」(「FR」)係指可變域之非CDR部分。一般而言，在各全長重鏈可變域中存在四個FR及在各全長輕鏈可變域中存在四個FR。給定CDR或FR之精確胺基酸序列邊界可容易地使用若干熟知方

案，包括由以下所描述之方案，中之任一者確定：Kabat等人，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)(「Kabat」編號方案)；Al-Lazikani等人，*JMB* 273,927-948 (1997)(「Chothia」編號方案)；MacCallum等人，*J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996)(「接觸」編號方案)；Lefranc等人，*Dev Comp Immunol.* 27(1):55-77 (2003)(「IMGT」編號方案)；及Honegger及Plückthun，*J Mol Biol*, 309(3):657-70 (2001)(「Aho」編號方案)。

【0057】 給定CDR或FR之邊界可視鑑別所用之方案而變化。舉例而言，Kabat方案係基於序列比對，而Chothia方案係基於結構資訊。Kabat及Chothia方案之編號均係基於最常見抗體區序列長度，具有由插入字母容納之插入，例如「30a」。兩種方案將某些插入及刪除(「插入刪除」)置於不同位置，產生不同編號。接觸方案係基於複合物晶體結構之分析且在多個方面與Chothia編號方案相似。除非另外指明，否則本文中所提及之抗體之CDR可根據Kabat、Chothia、IMGT及接觸方法中之任一者鑑別。

【0058】 全長抗體之抗原結合片段可用於製備本發明之免疫接合物。抗體片段之實例包括但不限於，Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；重組IgG (rIgG)片段；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv或sFv)；單域抗體(例如sdAb、sdFv、奈米抗體)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。在某些實施例中，片段為包含重鏈可變區及/或輕鏈可變區之單鏈抗體片段，諸如scFvs。

1.2 例示性ROR1抗體

【0059】 本發明之免疫接合物包含特異性結合於ROR1，例如人類ROR1的抗體或其抗原結合片段。抗體或片段結合於ROR1蛋白之胞外部

分，諸如ROR1蛋白之一或多個類免疫球蛋白(Ig)的、捲曲的且三環的域中的抗原決定基。在某些實施例中，ROR1結合抗體或片段結合於SEQ ID NO:1或2中所示之ROR1之胺基酸序列(不包括末端半胱胺酸，其為方便接合起見而添加)且可藉由ROR1⁺細胞內化；此類抗體之實例為鼠類抗體D10及99961。參見美國專利9,217,040及9,758,591，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在某些實施例中，抗體或片段與D10或99961競爭結合人類ROR1。用於本發明之免疫接合物中之例示性抗ROR1抗體之胺基酸序列顯示於下表1中，其中Ab1-Ab4為抗體99961之人類化變異體。

表1 例示性抗ROR1抗體之SEQ ID NO

Ab	HCDR1	HCDR2	HCDR3	VH	HC	LCDR1	LCDR2	LCDR3	VL	LC
99961	7	8	9	45	--	10	11	12	46	--
Ab1	7	8	9	5	3	10	11	12	6	4
Ab2	7	8	9	5	3	10	11	12	50	49
Ab3	7	8	9	48	47	10	11	12	6	4
Ab4	7	8	9	48	47	10	11	12	50	49
D10	27	28	29	25	--	30	31	32	26	--

【0060】 在一些實施例中，免疫接合物中之抗體或抗體片段特異性結合人類ROR1，且其重鏈及輕鏈分別包含：

a) SEQ ID NO:3中之重鏈CDR1至3 (HCDR1至3)胺基酸序列，及SEQ ID NO:4中之輕鏈CDR1至3 (LCDR1至3)胺基酸序列；

b) 分別包含SEQ ID NO:7至9之胺基酸序列的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:10至12之胺基酸序列的LCDR1至3；

c) SEQ ID NO:13至15中之HCDR1至3胺基酸序列，及SEQ ID NO:16至18中之LCDR1至3胺基酸序列；

d) 分別包含SEQ ID NO:27至29之胺基酸序列的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:30至32之胺基酸序列的LCDR1至3；

e) 分別包含SEQ ID NO:37至39之胺基酸序列的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:40至42之胺基酸序列的LCDR1至3；

f) 分別包含SEQ ID NO:5之殘基26-33、51-58及97-105的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:6之殘基27-32、50-52及89-97的LCDR1至3；

g) 分別包含SEQ ID NO:5之殘基26-32、52-57及99-105的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:6之殘基24-34、50-56及89-97的LCDR1至3；

h) 分別包含SEQ ID NO:5之殘基31-35、50-66及99-105的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:6之殘基24-34、50-56及89-97的LCDR1至3；

i) 分別包含SEQ ID NO:5之殘基26-32、52-57及99-105的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:6之殘基27-32、50-52及89-97的LCDR1至3；或

j) 分別包含SEQ ID NO:5之殘基31-35、52-57及99-105的HCDR1至3，及分別包含SEQ ID NO:6之殘基27-32、50-52及89-97的LCDR1至3。

在一些實施例中，抗體或片段為人類化的或嵌合有人類恆定區。在其他實施例中，抗體或片段可包含人類IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄恆定區，及視情況，人類κ恆定區。

【0061】 在某些實施例中，本發明之免疫接合物包含抗ROR1抗體或其抗原結合片段，其中抗體包含：

a) 包含與SEQ ID NO:5之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%（例如至少90%）一致之胺基酸序列的重鏈可變域或區(V_H)，及包含與SEQ ID NO:6之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%（例如至少90%）一致之胺基酸序列的輕鏈可變域或區(V_L)；

b) 分別包含SEQ ID NO:5及6之胺基酸序列的V_H及V_L；

c) 包含與SEQ ID NO:3之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%（例如至少90%）一致之胺基酸序列的重鏈(heavy chain，HC)，及包含與SEQ ID NO:4之胺基酸序列80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%（例如至少90%）一致之胺基酸序列的輕鏈(light chain，LC)；或

d) 分別包含SEQ ID NO:3及4之胺基酸序列的HC及LC。

【0062】 在某些實施例中，抗體之V_H及V_L分別包含以下序列之胺基酸序列：

a) SEQ ID NO:5及50；

b) SEQ ID NO:48及6；或

c) SEQ ID NO:48及50。

在一些實施例中，抗體或片段包含人類IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄恆定區，及視情況，人類κ恆定區。

【0063】 在某些實施例中，抗體之HC及LC分別包含以下序列之胺基酸序列：

a) SEQ ID NO:3及49；

b) SEQ ID NO:47及4；或

c) SEQ ID NO:47及49。

【0064】 在某些實施例中，本發明之免疫接合物包含衍生自鼠類抗體的抗體或其片段，其具有以下序列之V_H及V_L胺基酸序列：(i)分別SEQ ID NO:25及26；(ii)分別SEQ ID NO:35及36；或(iii)分別SEQ ID NO:45

及46。衍生自此等序列之抗體可為，例如，已人類化或接合至人類Fc區的抗體(例如嵌合的)。舉例而言，免疫接合物中之抗體或抗原結合片段包含：

a) 包含與SEQ ID NO:45之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的V_H，及包含與SEQ ID NO:46之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的V_L；

b) 包含SEQ ID NO:45之胺基酸序列的V_H，及包含SEQ ID NO:46之胺基酸序列的V_L；

c) 包含與SEQ ID NO: 25之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的V_H，及包含與SEQ ID NO:26之胺基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致之胺基酸序列的V_L；或

d) 包含SEQ ID NO:25之胺基酸序列的V_H，及包含SEQ ID NO:26之胺基酸序列的V_L。

【0065】 用於前述抗體之例示性編碼序列顯示於下表12中。舉例而言，免疫接合物中之抗體可包含：

a) 由(i) SEQ ID NO:21之核苷酸73-420或(ii) SEQ ID NO:23編碼之V_H；及由SEQ ID NO: 22或24編碼之V_L；

b) 由SEQ ID NO:52編碼之V_H，及由SEQ ID NO:54編碼之V_L；

c) 由SEQ ID NO:33編碼之V_H，及由SEQ ID NO:34編碼之V_L；

d) 由SEQ ID NO:19之核苷酸73-1,410編碼之HC，及由SEQ ID NO:20之核苷酸73-714編碼之LC；或

e) 由SEQ ID NO:51編碼之HC及由SEQ ID NO:53之核苷酸編碼之LC。

【0066】 在某些實施例中，本發明之免疫接合物包含抗ROR1抗體之抗原結合片段，其中抗原結合片段包含SEQ ID NO:64至68中之任一者之序列。在某些實施例中，抗原結合片段包含以下序列之V_H及V_L胺基酸序列：

- a) SEQ ID NO:5及6；
- b) SEQ ID NO:5及50；
- c) SEQ ID NO:48及6；
- d) SEQ ID NO:48及50；
- e) SEQ ID NO:45及46；或
- f) SEQ ID NO:25及26，

其中V_H胺基酸序列視情況連接於SEQ ID NO:62之胺基酸序列，及/或V_L胺基酸序列視情況連接於SEQ ID NO:63之胺基酸序列。

1.3 抗體序列比較

【0067】 相對於參考多肽序列之序列一致性百分比(%)係指在比對序列且必要時引入空位以實現最大序列一致性百分比之後，與參考序列中之胺基酸殘基一致之候選序列中之胺基酸殘基的百分率。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的之比對可以各種已知方式實現；例如，使用公開可獲得的電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR)。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式

ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech有限公司設計，且原始程式碼已在U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559申請用戶文檔，其中其註冊在美國版權註冊編號TXU510087下。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech有限公司，South San Francisco, California，或可自原始程式碼編譯。ALIGN-2程式經編譯可用於UNIX操作系統，包括數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不變化。

【0068】在其中採用ALIGN-2用於胺基酸序列比較之情況中，給定胺基酸序列A相對於給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%計算如下：100乘以分數X/Y，其中X為在序列比對程式ALIGN-2之A及B比對中由該程式評分為一致匹配之胺基酸殘基之數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基之總數目。應瞭解，在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不相等之情況下，A相對於B之胺基酸序列一致性%將不等於B相對於A之胺基酸序列一致性%。除非另外特定陳述，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%值係如前一段落中剛剛所述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

【0069】在一些實施例中，涵蓋本文所提供之抗體之胺基酸序列變異體。變異體通常不同於本文特定揭示之多肽，其不同之處可在於一或多個取代、刪除、添加及/或插入。此類變異體可天然存在或可以合成方式產生，例如藉由修飾本發明之以上多肽序列中之一或多個且評估如本文所述之多肽之一或多個生物活性，及/或使用多種已知技術中之任一者。舉例而言，可能需要改善抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由向編碼抗體之核苷酸序列中引入適當修飾或藉由肽合成來製備。此類修飾包括例如抗體胺基酸序列內的殘基刪除及/或插入

及/或取代。可進行刪除、插入及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。

【0070】 如本文所用，術語「實質上一致」係指當兩個或更多個序列針對最大對應在比較窗或指定區內進行比較及比對時，如使用比較算法所量測，具有一定百分率之相同序列單元(例如胺基酸殘基)。藉助於實例，若在特定區內序列單元約60%一致、約65%一致、約70%一致、約75%一致、約80%一致、約85%一致、約90%一致、約95%一致、約96%一致、約97%一致、約98%一致或約99%一致，則兩個或更多個序列可「實質上一致」。此類百分率描述兩個序列之間之「一致性百分比」。

1.4 ROR1抗體之製備及修飾

【0071】 用於本發明之免疫接合物的抗ROR1抗體可藉由使用人類ROR1或人類ROR1蛋白之片段對動物進行免疫接種來製備。以高親和力結合於免疫接種片段的抗體(例如以nM為單位或更低範圍之 K_D)可藉由使用諸如ELISA之常規方法篩檢。

【0072】 若抗體非人類抗體，則其可被人類化。「人類化」抗體係其中全部或基本上全部CDR胺基酸殘基衍生自非人類(例如小鼠或大鼠)抗體且全部或基本上全部FR胺基酸殘基衍生自人類FR的抗體。人類化抗體視情況可包括衍生自人類抗體之至少一部分之抗體恆定區。非人類抗體之「人類化形式」係指已經歷人類化(通常用以降低對人類之免疫原性)，同時保持親本非人類抗體之特異性及親和力之非人類抗體之變異體。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經對應的來自同源非人類抗體之殘基取代以恢復或改善所得抗體之抗原結合特異性及/或親和力。

【0073】 ROR1抗體或片段可在含有用於ROR1抗體或片段之編碼

序列的哺乳動物宿主細胞中以重組方式製造，其中編碼序列可操作地連接於適合於在宿主細胞中表現之轉錄調節元件。編碼序列可在一或多個載體上引入宿主細胞中。適用哺乳動物宿主細胞包括，尤其，中國倉鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、293自由式細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、嬰兒倉鼠腎(baby hamster kidney, BHK)細胞、非洲綠猴腎細胞(COS)、人類肝細胞癌細胞(例如Hep G2)及A549細胞。可基於其表現量選擇細胞株。可使用之其他細胞株包括昆蟲細胞株，諸如Sf9或Sf21細胞及酵母細胞株。

【0074】 在一些實施例中，親本ROR1抗體可藉由引入一或多個胺基酸取代工程改造以改善抗體之抗原結合，以降低免疫原性(例如去免疫接種；參見例如Jones等人, *Methods Mol Biol.* 525:405-23 (2009))，及/或改善抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 或補體依賴性細胞毒性 (complement-dependent cytotoxicity, CDC)。

【0075】 在一些實施例中，可在一或多個CDR內進行取代、插入或刪除，其中突變不實質上降低抗體與其抗原之結合。舉例而言，可在CDR中進行不實質上降低結合親和力之保守取代。

【0076】 可在CDR中進行改變(例如取代)以改善抗體親和力。參與抗原結合之CDR殘基可藉由使用，例如，丙胺酸掃描誘變或電腦建模來鑑別。尤其HCDR3及LCDR3常被作為目標。亦可使用抗原-抗體複合物之晶體結構鑑別抗體與其抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及其鄰近殘基可被作為用於突變之目標。可篩檢變異體以確定其是否獲得所需特性。亦可使用活體外親和力成熟(例如使用易錯PCR、鏈改組、CDR之隨機化或寡核

苷酸導向誘變)改善抗體親和力(參見例如Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001))。

【0077】 對抗體或抗體片段進行之胺基酸序列插入及刪除包括在一個或幾個殘基至含有一百個或更多個殘基之多肽的長度範圍內的胺基及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入及刪除。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端C端與酶(例如用於ADEPT)或增加抗體之血清半衰期之多肽之融合物。抗體分子之序列內插入變異體之實例包括在輕鏈中插入3個胺基酸。末端刪除之實例包括在輕鏈之末端經刪除7個或更少個胺基酸且在重鏈中經移除C端離胺酸的抗體。

【0078】 在一些實施例中，改變ROR1抗體以提高或降低其糖基化(例如藉由改變胺基酸序列以使得產生或移除一或多個糖基化位點)。可改變附接至抗體之Fc區的碳水化合物。來自哺乳動物細胞之天然抗體通常包含藉由N鍵附接至Fc區之CH₂域之Asn₂₉₇的分支鏈雙觸角寡糖(參見例如Wright等人, *TIBTECH* 15:26-32 (1997))。Asn₂₉₇係指位於Fc區中之位置297附近之天冬醯胺殘基(Fc區殘基之EU編號；參見例如Edelman等人 *PNAS* 63(1):78-85 (1969))。然而，由於抗體中之微小序列變化，Asn₂₉₇亦可位於位置297之上游或下游±3胺基酸附近，亦即位置294與位置300之間。寡糖可為各種碳水化合物中之任一者，例如附接至在雙觸角寡糖結構之主幹中之GlcNAc的甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖、唾液酸或岩藻糖。可進行抗體中之寡糖之修飾，例如，以產生具有某些改善特性之抗體變異體。抗體糖基化變異體可具有提高的ADCC及/或CDC功能。

【0079】 在一些實施例中，提供具有碳水化合物結構的抗體變異體，該碳水化合物結構無或具有減少含量之附接(直接地或間接地)至Fc區之岩藻糖。舉例而言，此類抗體中之岩藻糖之量可為1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖之量藉由計算Asn₂₉₇處之糖鏈內之岩藻糖相對於附接至Asn₂₉₇之所有糖結構之總和的平均量來確定(參見例如PCT專利公開案WO 2008/077546)。此類岩藻糖基化變異體可具有提高的ADCC功能(參見例如Okazaki等人, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); 及Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004))。細胞株(例如基因剔除細胞株)可用於產生去海藻糖基化抗體，例如缺失蛋白岩藻糖基化的Lec13 CHO細胞及 α -1,6-岩藻糖基轉移酶基因(FUT8)基因剔除CHO細胞(參見例如Ripka等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); Yamane-Ohnuki等人, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004); 及Kanda等人, *Biotechnol. Bioeng.* 94(4):680-688 (2006))。對於用於本發明免疫接合物之ROR1抗體或抗體片段，亦可製備如例如美國專利6,602,684中所描述之其他抗體糖基化變異體。

【0080】 在一些實施例中，可向ROR1抗體之Fc區引入一或多個胺基酸修飾以產生具有賦予抗體新特性之變異Fc區的ROR1抗體。變異Fc區可包含人類Fc區序列(例如人類IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄ Fc區)，其在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)。舉例而言，具有變異Fc區之ROR1抗體可具有一些但並非全部效應功能，使得其成為活體內抗體之半衰期很重要而某些效應功能(諸如補體及ADCC)為不必要的或有害的的應用的合乎需要的候選。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以證實CDC及/或ADCC活性之降低/消除。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合

分析以確保抗體缺乏FcγR結合(因此可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。評定所關注之分子之ADCC活性之活體外分析的非限制性實例描述於美國專利5,500,362及5,821,337中。替代地，可採用非放射性分析(例如ACTI™及CytoTox96®非放射性細胞毒性分析)。適用於此類分析之效應細胞包括外周血液單核細胞(blood mononuclear cell, PBMC)、單核球、巨噬細胞及天然殺手(natural killer, NK)細胞。

【0081】 抗體可具有增加的半衰期及改善的與新生Fc受體(FcRn)之結合(參見例如美國專利公開案2005/0014934)。此類抗體可包含其中具有改善Fc區與FcRn之結合之一或多個取代的Fc區，且包括在如下一或多個Fc區殘基上具有取代的彼等：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424及434，根據EU編號系統(參見例如美國專利7,371,826)。亦涵蓋Fc區變異體之其他實例(參見例如Duncan及Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利5,648,260及5,624,821；及PCT公開案WO 94/29351)。

【0082】 在一些實施例中，可能需要產生半胱胺酸工程改造的抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在一些實施例中，經取代之殘基存在於抗體之可接入位點處。反應性巰基可位於用於接合諸如藥物部分體或連接子藥物部分體之其他部分的位點，以產生免疫接合物。以下殘基中之任何一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S400 (EU編號)。

【0083】 本文所提供之抗體可經進一步修飾以包括非蛋白質部分。適用於抗體之衍生作用之部分包括但不限於水溶性聚合物。如本文所用，

術語「聚合物」係指由重複子單元構成的分子；此類分子包括但不限於多肽、多核苷酸或多醣或聚伸烷基二醇。水溶性聚合物之非限制性實例為聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧基甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙醇醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(N-乙烯吡咯啉酮)-聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙醇醇及其混合物。聚乙醇醇丙醛因其在水中之穩定性而可能在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或非分支鏈的。附接至抗體之聚合物的數目可變化，且若附接兩個或更多個聚合物，則聚合物可為相同或不同分子。

1.5 細胞毒性藥物部分體

【0084】本發明之免疫接合物包含與一或多個細胞毒性劑，諸如化學治療劑、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物源之蛋白毒素、酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素接合之抗ROR1抗體或其抗原結合片段。細胞毒性劑可藉由共價鍵結於抗體之胺基酸殘基的连接子與抗ROR1抗體或片段接合。可以在免疫接合物中充當細胞毒性部分的許多藥物獨立地毒性太大而無法用於癌症治療，且因此藉由抗體或抗體片段特異性地靶向癌細胞更有效。

【0085】術語「細胞毒性藥物部分體」或「細胞毒性劑」係指會引起細胞損害、紊亂或死亡的化合物。可用作ROR1免疫接合物之部分之細胞毒性藥物部分體之實例包括但不限於：NCA1、奧瑞他汀、奧瑞斯他汀E、DNA小溝結合劑、DNA小溝烷基化劑、烯二炔、萊希菌素(lexitropsin)、多卡黴素、紫杉烷、嘌呤黴素、海兔毒素(dolastatin)、類

美登素(maytansinoid)、長春花生物鹼、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、類紫杉醇(例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)及太平洋紫杉醇衍生物(TAXOL®，Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE® (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)以及多西他賽(docetaxel)及多西他賽衍生物)、CC-1065、SN-38、拓朴替康(topotecan)、N-嗎啉基-小紅莓(doxorubicin)、根瘤菌素、氰基-N-嗎啉基-小紅莓、海兔毒素-10、棘黴素(echinomycin)、康布他汀(combretastatin)、卡里奇黴素(chalicheamicin)、美登素(maytansine)、DM-1、紡錘菌素(netropsin)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)(例如依託泊苷(etoposide)及替尼泊苷(teniposide))、巴卡丁(baccatin)及其衍生物、抗微管蛋白劑、念珠藻素(cryptophysin)、考布他汀(combretastatin)、長春新鹼(vincristine)、長春新鹼硫酸鹽、長春鹼(vinblastine)、長春地辛(vindesine)、長春瑞賓(vinorelbine)、VP-16、喜樹鹼(camptothecin)、埃坡黴素(epothilone) A、埃坡黴素B、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙鹼(colchicines)、秋水醯胺(colcimid)、雌莫司汀(estramustine)、西馬多丁(cemadotin)、迪斯德莫來(discodermolide)、軟珊瑚醇(eleutherobin)、甲基二(氯乙基)胺(mechlorethamine)、環磷醯胺、美法侖(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、鏈脲菌素(streptozocin)、氯脲黴素(chlorozotocin)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、雙氯乙基甲胺(chlormethine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、哌泊溴烷(pipobroman)、三伸乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三伸乙基硫代磷胺、白消安(busulfan)、達卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、阿糖胞苷(ytarabine)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(cytosine

arabinoside)、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷、6-硫鳥嘌呤、6-巯嘌呤、噴司他汀(pentostatin)、甲胺喋呤、10-丙炔基-5,8-二去氫葉酸酯、5,8-二去氫四氫葉酸、甲醯四氫葉酸(leucovorin)、氟達拉賓磷酸鹽(fludarabine phosphate)、噴司他汀(pentostatine)、吉西他濱(gemcitabine)、Ara-C、去氧助間型黴素(deoxycoformycin)、絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素-C)、L-天冬醯胺酶、硫唑嘌呤、布喹那(brequinar)、抗生素(例如蒽環黴素(anthracycline)、慶大黴素(gentamicin)、頭孢噻吩(cefalotin)、萬古黴素(vancomycin)、特拉萬星(telavancin)、達托黴素(daptomycin)、阿奇黴素(azithromycin)、紅黴素(erythromycin)、羅紅黴素(rocithromycin)、呋喃唑酮(furazolidone)、阿莫西林(amoxicillin)、安比西林(ampicillin)、卡本西林(carbenicillin)、氟氯西林(flucloxacillin)、二甲氧苯青黴素(methicillin)、青黴素(penicillin)、環丙沙星(ciprofloxacin)、莫西沙星(moxifloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、多西環素(doxycycline)、二甲胺四環素(minocycline)、土黴素(oxytetracycline)、四環素(tetracycline)、鏈黴素(streptomycin)、利福布汀(rifabutin)、乙胺丁醇(ethambutol)及利福昔明(rifaximin))、烯二炔抗生素(例如卡奇黴素(calicheamicin)、卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 Ω II及達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A)、抗病毒藥物(例如阿巴卡韋(abacavir)、阿昔洛韋(acyclovir)、阿普林津(ampligen)、西多福韋(cidofovir)、地拉韋定(delavirdine)、地達諾新(didanosine)、依法韋侖(efavirenz)、因提弗(entecavir)、麟乙醇(fosfonet)、更昔洛韋(ganciclovir)、伊巴他濱(ibacitabine)、依木諾維(immunovir)、碘苷(idoxuridine)、肌苷(inosine)、洛匹那韋(lopinavir)、美替沙脞

(methisazone)、多吉美(nexavir)、奈韋拉平(nevirapine)、奧司他韋(oseltamivir)、噴昔洛韋(penciclovir)、司他夫定(stavudine)、曲氟尿苷(trifluridine)、特魯瓦達(truvada)、伐昔洛韋(valaciclovir)及紮那米韋(zanamivir)、鹽酸道諾黴素(daunorubicin hydrochloride)、道諾瑞辛(daunorubicin)、紅比黴素(rubidomycin)、柔紅黴素(cerubidine)、艾達黴素(idarubicin)、小紅莓、表柔比星(epirubicin)及N-嗎啉基衍生物、吩噁嗪酮雙環肽(phenoxizone biscyclopeptide)(例如放線菌素(dactinomycin))、鹼性糖肽(例如博萊黴素(bleomycin))、蔥醌糖苷(例如普卡黴素(plicamycin)及光神黴素(mithramycin))、蔥二酮(例如米托蔥醌(mitoxantrone))、氮丙啶吡咯并吡啶二酮(azirinopyrrolo indoledione)(例如絲裂黴素(mitomycin))、巨環免疫抑制劑(例如環孢靈(cyclosporine)、FK-506、他克莫司(tacrolimus)、普樂可復(prograf)及雷帕黴素(rapamycin))、諾維本(navelbene)、CPT-11、阿那曲唑(anastrozole)、來曲唑(letrozole)、卡培他濱(capecitabine)、瑞洛薩芬(reloxafine)、著洛薩芬(droloxafine)、別秋水仙鹼(allocolchicine)、軟海綿素(Halichondrin) B、秋水仙鹼(colchicine)及秋水仙鹼衍生物、根瘤菌素(rhizoxin)、硫代秋水仙鹼、三苯甲基半胱胺酸(trityl cysterin)、硫酸長春鹼、羥脲、N-甲基胍、表葉毒素(epidophyllotoxin)、丙卡巴胍(procarbazine)、米托蔥醌(mitoxantrone)、甲醯四氫葉酸及替加氟(tegafur)。「紫杉烷」包括太平洋紫杉醇，以及任何活性紫杉醇衍生物或前藥。化學治療劑，諸如埃羅替尼(erlotinib)(TARCEVA®，Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(bortezomib)(VELCADE®，Millenium Pharm.)、氟維司群(fulvestrant)(FASLODEX®，AstraZeneca)、舒尼替尼

(sunitinib)(Sutent® , Pfizer) 、 來 曲 唑 (letrozole)(FEMARA® , Novartis) 、 甲 磺 酸 伊 馬 替 尼 (imatinib mesylate)(GLEEVEC® , Novartis) 、 PTK787/ZK 222584 (Novartis) 、 奧 沙 利 鉑 (oxaliplatin)(Eloxatin® , Sanofi) 、 甲 醯 四 氫 葉 酸 、 拉 帕 替 尼 (lapatinib)(TYKERB® , GSK572016 , GlaxoSmithKline) 、 洛 那 法 尼 (lonafarnib)(SCH 66336) 、 索 拉 非 尼 (sorafenib)(BAY43-9006 , Bayer Labs.) 及 吉 非 替 尼 (gefitinib)(IRESSA® , AstraZeneca) 、 AG1478 、 AG1571 (SU 5271 ; Sugen) 、 烷 基 化 劑 ， 諸 如 噻 替 派 (thiotepa) 及 環 磷 醯 胺 (CYTOXAN®) ； 磺 酸 烷 基 酯 ， 諸 如 白 消 安 、 英 丙 舒 凡 (improsulfan) 及 哌 泊 舒 凡 (piposulfan) ； 抗 葉 酸 劑 抗 腫 瘤 物 ， 諸 如 培 美 曲 塞 (pemetrexed)(ALIMTA® Eli Lilly) ； 氮 丙 啶 ， 諸 如 苯 唑 多 巴 (benzodopa) 、 卡 波 醌 (carboquone) 、 米 特 多 巴 (meturedopa) 及 尤 利 多 巴 (uredopa) ； 伸 乙 亞 胺 及 甲 基 三 聚 氰 胺 ， 包 括 六 甲 蜜 胺 、 三 伸 乙 基 蜜 胺 、 三 伸 乙 基 磷 醯 胺 、 三 伸 乙 基 硫 代 磷 醯 胺 及 三 羥 甲 基 三 聚 氰 胺 ； 多 聚 乙 醯 (諸 如 布 拉 他 辛 (bullatacin) 及 布 拉 他 辛 酮 (bullatacinone)) ； 喜 樹 鹼 (包 括 合 成 類 似 物 拓 朴 替 康) ； 苔 蘚 抑 素 (bryostatin) ； 卡 利 他 汀 (callystatin) ； CC-1065 (包 括 其 合 成 類 似 物 阿 多 來 新 (adozelesin) 、 卡 折 來 新 (carzelesin) 及 (bizelesin)) ； 念 珠 藻 素 (cryptophycin)(諸 如 念 珠 藻 素 1 及 念 珠 藻 素 8) ； 海 兔 毒 素 ； 多 卡 黴 素 (包 括 其 合 成 類 似 物 KW-2189 及 CB1-TM1) ； 軟 珊 瑚 醇 ； 盤 克 斯 塔 叮 (pancratistatin) ； 沙 考 地 汀 (sarcodictyin) ； 海 綿 抑 素 (spongistatin) ； 氮 芥 (nitrogen mustard) ， 諸 如 苯 丁 酸 氮 芥 、 蔡 氮 芥 、 氯 磷 醯 胺 、 雌 莫 司 汀 、 異 環 磷 醯 胺 、 甲 基 二 (氯 乙 基) 胺 、 甲 基 二 (氯 乙 基) 胺 氧 化 物 鹽 酸 鹽 、 美 法 侖 、 新 恩 比 興 (novembichin) 、 膽 固 醇 對 苯 乙 酸 氮 芥

(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥；亞硝基脲，諸如卡莫司汀、氟脲黴素、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine;)；雙膦酸鹽，諸如氟屈膦酸鹽；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白發色團及相關色素蛋白烯二炔抗生素發色團，阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素、安麩黴素(anthracycline)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素、放線菌素C、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(ADRIAMYCIN®)(包括N-嗎啉基-小紅莓、氟基-N-嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓及去氧小紅莓)、表柔比星、依索比星(esorubicin)、艾達黴素、麻西羅黴素(marcellomycin)、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-FU；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；

雄激素，諸如卡魯甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇、美雄烷、甾內酯；抗腎上腺素，諸如胺麩精(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；乙醯葡醛酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；亞胺醯(diaziqune)；艾福米辛(elformithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃坡黴素；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；脛脲；磨菇多糖；氯尼達明(lonidainine)；類美登素，諸如美登素及安絲菌素(ansamitocins)；米托胍脞；米托蔥醯；莫比達摩(mopidanmol)；二胺硝吡啶(nitraerine)；噴司他汀；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蔥醯(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素；西佐喃(sizofuran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯；2,2',2''-三氯三乙胺；新月毒素(trichothecenes)(尤其T-2毒素、弗納庫林(verracurin) A、桿孢菌素(roridin) A及胺癸叮(anguidine)；尿烷；長春地辛；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；加西托星(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇，例如太平洋紫杉醇(TAXOL®，Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™不含克列莫佛(Cremophor)白蛋白、太平洋紫杉醇之奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners,

Schaumberg , III.) 及 TAXOTERE® 多西他賽 (Rhone-Poulenc Rorer , Antony , 法國(France)) ; 苯丁酸氮芥 ; GEMZAR® 吉西他濱 ; 6-硫鳥嘌呤 ; 巯嘌呤 ; 甲胺喋呤 ; 鉑類似物 , 諸如順鉑及卡鉑 ; 長春鹼 ; 鉑 ; 依託泊苷 (VP-16) ; 米托蒽醌 ; NAVELBINE® 長春瑞賓 ; 諾凡特龍 (novantrone) ; 替尼泊苷 ; 依達曲沙(edatrexate) ; 道諾黴素 ; 胺基喋呤 ; 截瘤達(xeloda) ; 伊班膦酸鹽 ; 拓樸異構酶抑制劑RFS 2000 ; 二氟甲基鳥胺酸(DMFO) ; 類視黃素 , 諸如視黃酸 ; 及以上各項中之任一者之醫藥學上可接受之鹽、酯、酸前藥或衍生物。

【0086】 在一些實施例中 , 適合用於ROR1免疫接合物之細胞毒性劑為

a) 抗微管蛋白劑(例如奧瑞他汀或海兔毒素 , 諸如奧瑞斯他汀E、單甲基奧瑞他汀E (MMAE)或單甲基奧瑞他汀F (MMAF)、二甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉索因(dolaisoleuine)-多拉普因(dolaproine)-苯丙胺酸-對苯二胺 (AFP) 、 5- 苯甲醯基戊酸-奧瑞斯他汀E酯(AEVB) 、 AEB 、 類美登素 (maytansinoid) 、 安絲菌素 (ansamitocin) 、 美登素 / 恩他新 (emtansine)(DM1) 或 拉夫坦辛 (ravtansine)/ 索拉夫坦辛 (soravtansine)(DM4)) ,

b) DNA烷基化劑或DNA小溝烷基化劑(例如多卡黴素) ,

c) DNA交聯劑(例如吡咯并苯并二氮呋(PBD)) ,

d) DNA嵌入劑(例如PNU-159682) ,

e) DNA小溝結合劑(例如CC-1065) , 或

f) RNA聚合酶II抑制劑(例如瓢菌素 , 諸如 α -瓢菌素)。

如本文所用 , 術語「嵌入劑」係指可以插入至分子之分子內空間或

分子之間之分子間空間中的化學物質。藉助於實例，DNA嵌入劑可為嵌入至DNA雙螺旋之堆疊鹼基中的分子。

【0087】 在一些實施例中，ROR1免疫接合物中所使用之細胞毒性劑選自由以下組成之群：烯二炔、萊希菌素、多卡黴素、紫杉醇、嘌呤黴素、鬼臼毒素、巴卡丁衍生物、念珠藻素、考布瑞他汀(combrestatin)、海兔毒素、類美登素、長春花生物鹼、太平洋紫杉醇、多西他賽、安絲菌素、CC-1065、SN-38、拓朴替康、N-嗎啉基-小紅莓、根瘤菌素、氰基-N-嗎啉基-小紅莓、海兔毒素-10、棘黴素、康布他汀、卡里奇黴素、長春新鹼、長春鹼、長春地辛、長春瑞賓、VP-16、喜樹鹼、埃坡黴素A、埃坡黴素B、諾考達啞、秋水仙鹼、秋水醯胺、雌莫司汀、西馬多丁、迪斯德莫來美登素、軟珊瑚醇及紡錘菌素。

【0088】 在一些實施例中，免疫接合物中之細胞毒性藥物部分體為前藥。如本文所用，術語「前藥」或「醫藥學上可接受之前藥」係指活體內或活體外轉化為親本藥物且相對無毒性的藥劑。亦即，可向個體投與免疫接合物而不會引起任何不合需要的生物效應或與其中所含有之組合物之任何組分以有害方式相互作用。前藥通常係藥物前驅體，其在向個體投與及後續吸收之後經由一些過程，諸如藉由代謝路徑轉化而轉化為具有活性或更具活性的物質。一些前藥具有存在於前藥上之使前藥活性較小及/或賦予藥物溶解性或某些其他特性的化學基團。一旦化學基團自前藥裂解及/或經修飾，便產生活性藥物。前藥可在體內經由酶促或非酶促反應轉化為活性藥物。前藥可提供相對於其親本藥物而言改善的生理化學特性，諸如藥物之更好的溶解性、提高的傳遞特徵(例如靶向特定細胞、組織、器官或配位體)及提高的治療價值。此類前藥之效益可包括但不限於：(i)相

比於親本藥物而言易於投與；(ii)在親本無法做到之情況中前藥可藉由經口投與而生物可用；及(iii)相比於親本藥物，前藥在醫藥組合物中可具有改善的溶解性。前藥包括藥物之藥理學非活性或活性較小的衍生物。前藥可經設計為經由操控藥物之特性，諸如生理化學、生物醫藥或藥物動力學特性，以調節達到所需作用部位藥物或生物活性分子之量。

【0089】 在一些實施例中，免疫接合物中對於抗體而言之藥物部分體之平均數目(亦即，藥物比抗體比率或DAR)為1；或至少2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、6、7、8、9或10。用於量測DAR之例示性方法在下文實施例中描述。

1.6 連接子

【0090】 在本發明之免疫接合物之某些實施例中，抗體可與細胞毒性劑直接接合或可經由連接子接合。適合連接子包括例如可裂解及不可裂解連接子。在一些實施例中，連接子係可裂解連接子。可裂解連接子係指包含可裂解部分且通常在胞內條件下容易發生裂解的連接子。適合可裂解連接子包括，例如，可藉由胞內蛋白酶(諸如溶酶體蛋白酶或內體蛋白酶)裂解之肽連接子及可酸裂解連接子。在例示性實施例中，連接子可為二肽，諸如纈胺酸-瓜胺酸(val-cit或VC)或苯丙胺酸-離胺酸(phe-lys)連接子。連接子亦可為三肽或具有四個或更多個胺基酸殘基之多肽。其他適合連接子包括可在pH小於5.5下水解之連接子，諸如脲連接子。其他適合可裂解連接子包括二硫化物連接子。在一些實施例中，連接子為非聚合連接子。在一些情況下，連接子為非肽連接子或不含有胺基酸殘基的連接子。

【0091】 在一些實施例中，連接子包括C₁-C₆烷基(例如C₅、C₄、C₃、C₂或C₁烷基)。如本文所用之術語「烷基」係指僅由碳原子及氫原子組成之直鏈或分支鏈烴鏈基團，其不含不飽和度。C₁-C_x包括C₁-C₂、C₁-C₃、……C₁-C_x，其中x為整數。C₁-C_x係指指定基團中之碳原子數目。在一些實施例中，烷基包含一至八個碳原子(C₁₋₈烷基)。在一些實施例中，烷基包含二至六個碳原子(C₂₋₆烷基)。

【0092】 如本文所用，在化學反應之前連接免疫接合物之Ab (抗體或片段)及D (有效負載)組分的連接子亦稱作「連接子前驅體」。ADC技術中之技術人員而言，根據本文所揭示之特定化學實體之反應性能力將顯而易知其在最終免疫接合物產物中是連接子前驅體還是連接子組分。

【0093】 在一些實施例中，免疫接合物之Ab與D組分之間之鍵可經由組分與同型雙官能連接子之反應形成。例示性同型雙官能連接子包括但不限於：Lomant氏試劑二硫雙(丁二醯亞胺基丙酸酯) DSP、3'3'-二硫雙(磺基丁二醯亞胺基丙酸酯)(DTSSP)、二丁二醯亞胺基辛二酸酯(DSS)、雙(磺基丁二醯亞胺基)辛二酸酯(BS)、二丁二醯亞胺基酒石酸酯(DST)、二磺基丁二醯亞胺基酒石酸酯(磺基DST)、伸乙基糖基雙(丁二醯亞胺基丁二酸酯)(EGS)、二丁二醯亞胺基戊二酸酯(DSG)、N,N'-二丁二醯亞胺基碳酸酯(DSC)、己二醯亞胺酸二甲酯(DMA)、庚二亞胺酸二甲酯(DMP)、辛二亞胺酸二甲酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫雙丙亞胺酸酯(DTBP)、1,4-二3'-(2'-吡啶基二硫)丙醯胺基)丁烷(DPDPB)、雙順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、含芳鹵化合物(DFDNB)(諸如，例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯)、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜(DFDNPS)、雙[β-(4-疊氮水楊基胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇

二縮水甘油醚、己二酸二醯肼、碳醯肼、鄰甲苯胺、3,3'-二甲基聯苯胺、聯苯胺、 α,α' -對二胺基二苯基、二碘-對二甲苯磺酸、N,N'-仲乙基-雙(碘乙醯胺)及N,N'-六亞甲基-雙(碘乙醯胺)。

【0094】 在一些實施例中，免疫接合物之Ab與D組分之間之鍵可經由組分與異型雙官能連接子之反應形成。例示性異型雙官能連接子包括但不限於：胺反應性及巰基交聯劑，諸如N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(sPDP)、長鏈N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(LC-sPDP)、水溶性長鏈N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(磺基-LC-sPDP)、丁二醯亞胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯(sMPT)、磺基丁二醯亞胺基-6-[α -甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯甲醯胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、磺基丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯(MBs)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基丁二醯亞胺酯(磺基-MBs)、N-丁二醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(sIAB)、磺基丁二醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(磺基-sIAB)、丁二醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基丁二醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ -順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)丁二醯亞胺酯(GMBs)、N-(γ -順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)磺基丁二醯亞胺酯(磺基-GMBs)、丁二醯亞胺基6-((碘乙醯基)胺基)己酸酯(sIAX)、丁二醯亞胺基6-[6-(((碘乙醯基)胺基)己醯基)胺基]己酸酯(sIAXX)、丁二醯亞胺基4-(((碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-甲酸酯(sIAC)、丁二醯亞胺基6-(((4-碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-羰基)胺基)

己酸酯(sIACX)、對硝苯基碘乙酸酯(NPIA)；羰基反應性及巰基反應性交聯劑，諸如4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸醯肼(MPBH)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-醯肼-8 (M₂C₂H)、3-(2-吡啶基二硫基)丙醯基醯肼(PDPH)；胺反應性及光反應性交聯劑，諸如N-羥基丁二醯亞胺基-4-疊氮水楊酸(NHs-AsA)、N-羥基磺基丁二醯亞胺基-4-疊氮水楊酸(磺基-NHs-AsA)、磺基丁二醯亞胺基-(4-疊氮水楊基胺基)己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基丁二醯亞胺基-2-(對疊氮水楊基胺基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羥基丁二醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(HsAB)、N-羥基磺基丁二醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-丁二醯亞胺基-6-(4'-疊氮-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(sANPAH)、磺基丁二醯亞胺基-6-(4'-疊氮-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-疊氮-2-硝基苯甲醯氧基丁二醯亞胺(ANB-NOs)、磺基丁二醯亞胺基-2-(間疊氮-鄰硝基苯甲醯胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAND)、N-丁二醯亞胺基-4(4-疊氮苯基)-1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、N-磺基丁二醯亞胺基(4-疊氮苯基)-1,3'-二硫丙酸酯(磺基-sADP)、磺基丁二醯亞胺基4-(對疊氮苯基)丁酸酯(磺基-sAPB)、磺基丁二醯亞胺基2-(7-疊氮-4-甲基香豆素-3-乙醯胺)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAED)、磺基丁二醯亞胺基7-疊氮-4-甲基香豆素-3-乙酸酯(磺基-sAMCA)、對硝苯基重氮丙酮酸酯(pNPDP)、對硝苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、巰基反應性及光反應性交聯劑，諸如1-(對疊氮水楊基胺基)-4-(碘乙醯胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(對疊氮水楊基胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺(APDP)、二苯基酮-4-碘乙醯胺、二苯基酮-4-順丁烯二醯亞胺羰基反應性及光反應性交聯劑，諸如對疊氮基苯甲醯基醯肼(ABH)；羧酸酯反應性及光反應性交聯劑，諸如4-(對疊氮水楊基胺基)丁

胺(AsBA)；及精胺酸反應性及光反應性交聯劑，諸如對疊氮苯基乙二醛(APG)。

【0095】 在一些實施例中，免疫接合物之Ab與D組分之間之鍵可經由組分與具有反應性官能基之連接子之反應形成，連接子可包含，例如，對存在於結合部分上之親電子基團具反應性的親核性基團。例示性親電子基團包括羰基基團，諸如醛、酮、羧酸、酯、醯胺、烯酮、醯基鹵化物及酸酐。在特定實施例中，反應性官能基為醛。例示性親核基團包括醯肼、肟、胺基、肼、縮胺基硫脲、肼羧酸酯及芳基醯肼。

【0096】 在一些實施例中，連接子/有效負載與抗體或片段之接合可經由與順丁烯二醯亞胺基團(其亦可稱為順丁烯二醯亞胺間隔子)之反應形成。在某些實施例中，順丁烯二醯亞胺基團為順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)；因此，連接子/有效負載經由抗體或片段上之殘基與連接子前驅體中之mc基之間之反應與抗體或片段接合。在一些實施例中，如本文中所描述，順丁烯二醯亞胺基團包含順丁烯二醯亞胺基甲基，諸如丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)或磺基丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)。

【0097】 在一些實施例中，順丁烯二醯亞胺基為自穩定順丁烯二醯亞胺。在一些實施例中，自穩定順丁烯二醯亞胺使用二胺基丙酸(DPR)鄰近順丁烯二醯亞胺併入基礎胺基以提供硫代丁二醯亞胺環水解之分子內催化，從而降低順丁烯二醯亞胺經由逆邁克爾(Michael)反應發生消除反應之能力。在一些實施例中，自穩定順丁烯二醯亞胺為在Lyon等人, *Nat. Biotechnol.* 32(10):1059-1062 (2014)中所描述之順丁烯二醯亞胺基。在某些實施例中，連接子前驅體包含自穩定順丁烯二醯亞胺。在某些實施例

中，連接子前驅體為自穩定順丁烯二醯亞胺。

【0098】 在一些實施例中，連接子可包括肽部分。在一些實施例中，肽部分包含至少2、3、4、5、6、7、8或更多個胺基酸殘基。在一些實施例中，肽部分為可裂解的(例如以酶促方式或化學方式)。在一些實施例中，肽部分為不可裂解的。在一些實施例中，肽部分包含Val-Cit (纈胺酸-瓜胺酸)、Gly-Gly-Phe-Gly (SEQ ID NO:55)、Phe-Lys、Val-Lys、Gly-Phe-Lys、Phe-Phe-Lys、Ala-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Arg、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:56)或Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:57)。在某些實施例中，連接子包含Val-Cit (VC)。在某些實施例中，連接子為Val-Cit (VC)。

【0099】 在一些實施例中，連接子可包括苯甲酸或苯甲氧基基團或其衍生物。舉例而言，連接子可包含對胺基-苯甲酸(PABA)。在一些實施例中，連接子包括對胺基-苯甲氧基羰基(PAB)基團。在一些實施例中，連接子包含 γ -胺基-丁酸(GABA)。

【0100】 在一些實施例中，免疫接合物之Ab與D組分之間之鍵可經由組分與包含以任何組合之順丁烯二醯亞胺基團、肽部分及/或苯甲酸(例如PABA)或苯甲氧基羰基基團的連接子的反應形成。在某些實施例中，順丁烯二醯亞胺基團為順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)。在某些實施例中，肽基團為Val-Cit (VC)。在某些實施例中，連接子包含Val-Cit-PABA基團。在某些實施例中，連接子與抗體或片段之接合可由mc-Val-Cit-PABA基團形成。在某些實施例中，連接子與抗體或片段之接合可由mc-Val-Cit基團形成。在某些實施例中，抗體或片段與藥物部分體之間之鍵可由mc-Val-Cit-PAB基團形成。

【0101】 在一些實施例中，連接子為自分解型連接子或自消除型連接子(例如環化自消除型連接子)。在一些實施例中，連接子可為美國專利9,089,614或PCT公開案WO 2015/038426中所描述之連接子。

【0102】 在一些實施例中，連接子為樹狀類型連接子。在某些實施例中，樹狀類型連接子包含分支化多官能連接部分。樹狀連接子可以具有兩個或更多個支鏈。在某些實施例中，樹狀類型連接子用於增加藥物部分體比抗體或片段之莫耳比。在某些實施例中，樹狀類型連接子包含PAMAM樹狀體。

【0103】 在一些實施例中，連接子為無痕跡連接子或在裂解之後不留下連接部分(例如原子或連接基團)的連接子。例示性無痕跡連接子包括但不限於：鍺連接子、矽連接子、硫連接子、硒連接子、氮連接子、磷連接子、硼連接子、鉻連接子及苯基醯肼連接子。在一些實施例中，連接子為如Hejesen等人, *Org Biomol Chem* 11(15):2493-2497 (2013)中所描述之無痕跡芳基-三氮烯連接子。在一些實施例中，連接子為Blaney等人, *Chem. Rev.* 102:2607-2024 (2002)中所描述之無痕跡連接子。在一些實施例中，連接子為如美國專利6,821,783中所描述之無痕跡連接子。

【0104】 在一些實施例中，連接子包含在連接子與接合部分(例如本文中所述之ADC-A、B、C、E、F及H至T中之任一者)之間之鍵結部位施加位阻之官能基。在一些實施例中，位阻為二硫鍵周圍的位阻。展現位阻之例示性連接子可例如異型雙官能連接子(例如如本文中所描述之)。在一些實施例中，展現位阻之連接子包含SMCC及SPDB。

【0105】 在一些實施例中，連接子為可酸裂解連接子。在一些實施例中，可酸裂解連接子包含胺鍵，其容易發生水解裂解。在一些實施例

中，可酸裂解連接子包含硫代順丁烯醯胺酸連接子。在一些實施例中，可酸裂解連接子為如Castaneda等人, *Chem. Commun.* 49:8187-8189 (2013) 中所描述之硫代順丁烯醯胺酸連接子。

【0106】 在一些實施例中，連接子為美國專利 6,884,869；7,498,298；8,288,352；8,609,105及8,697,688中之任一者；美國專利公開案 2014/0127239；2013/028919；2014/286970；2013/0309256；2015/037360及2014/0294851中之任一者；或PCT公開案 WO 2015/057699；WO 2014/080251；WO 2014/197854；WO 2014/145090及WO 2014/177042中之任一者中所描述的連接子。

【0107】 適合用於本發明之免疫接合物之連接子可包括，例如，具有高胞外穩定性之可胞內裂解的連接子。在某些實施例中，連接子包含允許連接子附接至本文中所描述之任何抗體或片段的官能基(例如順丁烯二醯亞胺衍生物)。在某些實施例中，連接子(或前驅體)包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(MP)、纈胺酸-瓜胺酸(VC)、丙胺酸-苯丙胺酸(AP)、對胺基苯甲氧基羰基(PAB)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)、N-丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-丁二醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)、6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(MC-VC)、6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)、N-丁二醯亞胺基-1-甲酸酯-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(SC-VC-PAB)、6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-聚乙二醇-纈胺酸-瓜胺酸(MC-PEG4-VC)、6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-聚乙二醇-纈胺酸-丙胺酸(MC-PEG4-VA)或MC-PEG8-VC-PAB。在一些實施例中，接合反應之前

之連接子(也稱為連接子前驅體)為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)或N-丁二醯亞胺基-1-甲酸酯-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(SC-VC-PAB)。在一些實施例中，連接子為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)連接子。在一些實施例中，連接子為順丁烯二醯亞胺基丙醯基(MP)連接子。在一些實施例中，連接子為纈胺酸-瓜胺酸(VC)連接子。在一些實施例中，連接子為丙胺酸-苯丙胺酸(AP)連接子。在一些實施例中，連接子為對胺基苯甲氧基羰基(PAB)連接子。在一些實施例中，連接子為N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)連接子。在一些實施例中，連接子為N-丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)連接子。在一些實施例中，連接子為N-丁二醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)連接子。在一些實施例中，連接子為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(MC-VC)連接子。在一些實施例中，連接子為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)連接子。在一些實施例中，連接子為N-丁二醯亞胺基-1-甲酸酯-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(SC-VC-PAB)連接子。在一些實施例中，連接子另外包含連接子與細胞毒性部分之間間隔子。在一些實施例中，間隔子為雜原子。在一些實施例中，間隔子為烷基鏈。在一些實施例中，間隔子為包含一或多個雜原子的烷基鏈。在一些實施例中，間隔子為羰基。在一些實施例中，連接子為同型雙官能連接子或異型雙官能連接子。

【0108】 在一些實施例中，本文中所描述之連接子可在天然存在胺基酸殘基，諸如離胺酸或還原型半胱胺酸處附接至本文中所描述之抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，連接子可藉助於炔/疊氮化物「點擊」

反應、羰基縮合、邁克爾型加成及Mizoroki-Heck取代附接至非天然胺基酸(例如疊氮苯丙胺酸、對乙醯基苯丙胺酸或對疊氮甲基苯丙胺酸)。其他連接位點可以基因方式添加且可包含允許連接子之酶促加成的多肽基元。此類多肽基元可包含，例如麩醯胺酸標籤(例如LLQGA (SEQ ID NO:58))、醛標籤(例如C_xP_xR、其中x為任何胺基酸)、轉肽酶基元(例如LP_xTG (SEQ ID NO:59，其中x為任何胺基酸)、NPQTN (SEQ ID NO:60))，或BirA標籤(例如GFEIDKVWYDLDA (SEQ ID NO:61))。使連接子附接至麩醯胺酸標籤可藉由使用細菌轉麩醯胺酸酶來達成。使連接子附接至醛標籤藉由使用甲醯基甘胺酸生成酶(FGE)來達成，該酶氧化共同序列之半胱胺酸殘基，形成醛；此醛可與連接子上之胺氧基反應以形成穩定脞。使連接子附接至轉肽酶基元可藉由使用C端LP_xTG序列(SEQ ID NO:59)或NPQTN序列(SEQ ID NO:60)、裂解TG或TN鍵且輔助(經由硫醯基酶-蘇胺酸中間體)蘇胺酸上之輸入蛋白 α 胺之親核攻擊的細菌轉肽酶來達成。攻擊殘基可為連接子之甘胺酸二聚體或三聚體或添加至連接子。使連接子附接至轉肽酶基元或BirA標籤可藉由使用生物素連接酶來達成。在某些實施例中，連接子不附接在離胺酸殘基處。在某些實施例中，連接子僅附接至半胱胺酸殘基。在某些實施例中，已藉由將輕鏈及/或重鏈上之一或多個非半胱胺酸殘基轉化為半胱胺酸使半胱胺酸殘基經工程改造至抗體中。在某些實施例中，半胱胺酸轉化不干擾抗原結合。在某些實施例中，藉由基因改造使硒半胱胺酸併入至抗體中。參見例如Sochaj等人, *Biotechnology Advances* 33:775-784 (2015)。

【0109】 在一些實施例中，連接子藉由化學連接過程與抗ROR1抗體或片段接合。在一些實施例中，連接子藉由自然連接與抗ROR1抗體或

片段接合。在一些實施例中，該接合如以下中所描述：Dawson等人, *Science* 266:776-779 (1994)；Dawson等人, *J. Am. Chem. Soc.* 119:4325-4329 (1997)；Hackeng等人, *PNAS* 96:10068-10073 (1999)；或Wu等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45:4116-4125 (2006)。在一些實施例中，該接合如美國專利8,936,910中所描述。在一些實施例中，連接子經由自然連接化學而位點特異性或非位點特異性地與抗ROR1抗體或片段接合。

【0110】 在一些實施例中，連接子藉由定點方法利用「無痕跡」偶合技術(Philochem)與抗ROR1抗體或抗原結合片段接合。在一些實施例中，「無痕跡」偶合技術利用結合部分上之N端1,2-胺基硫醇基團，其隨後與含有醛基之抗體或其片段接合。參見例如Casi等人, *JACS* 134(13):5887-5892 (2012)。在一些實施例中，連接子藉由定點方法利用併入至結合部分中之非天然胺基酸與抗ROR1抗體或片段接合。在一些實施例中，非天然胺基酸包含對乙醯基苯丙胺酸(pAcPhe)。在一些實施例中，pAcPhe之酮基選擇性偶合至烷氧基胺衍生之接合部分以形成脞鍵。參見例如Axup等人, *PNAS* 109(40):16101-16106 (2012)。

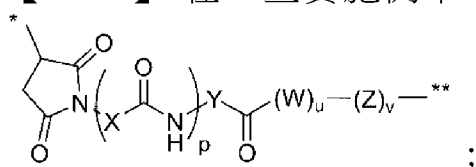
【0111】 在一些實施例中，連接子藉由以定點方法利用酶催化過程接合於抗ROR1抗體之sis，而與抗ROR1抗體或抗原結合片段接合。在一些實施例中，定點方法利用SMARTag™技術(Redwood)。在一些實施例中，SMARTag™技術包含：藉由甲醯基甘胺酸生成酶(FGE)在醛標籤之存在下經由氧化過程自半胱胺酸生成甲醯基甘胺酸(FGly)殘基，及後續經由肼基-Pictet-Spengler (HIPS)連接來接合FGly與烷基肼官能化胺基酸分子。參見例如Wu等人, *PNAS* 106(9):3000-3005 (2009)及Agarwal等人, *PNAS* 110(1):46-51 (2013)。

【0112】 在一些實施例中，酶催化過程包含微生物轉麩醯胺酸酶 (mTG)。在某些實施例中，連接子藉由利用微生物轉麩醯胺酸酶催化過程與抗ROR1抗體或片段接合。在一些實施例中，mTG催化識別序列內之麩醯胺酸之醯胺側鏈與官能化胺基酸分子之一級胺之間之共價鍵之形成。在一些實施例中，mTG由茂源鏈黴菌(*Streptomyces mobaraensis*)製備。參見例如Strop等人, *Chemistry and Biology* 20(2):161-167 (2013)。在一些實施例中，連接子藉由基於碳水化合物之化學反應與抗ROR1抗體或片段接合。在基於碳水化合物之接合之策略中，第一步通常為引入新生物正交官能基以輔助抗體與藥物之接合。可用於向碳水化合物部分上引入生物正交官能基以用於生物接合(糖基接合)的策略包括但不限於：聚糖之化學氧化；聚糖之酶促及化學酶促修飾；及碳水化合物部分之代謝工程改造。化學方法可使用過碘酸鈉(NaIO₄)氧化例如半乳糖或唾液酸之順式乙二醇基團來生成醛，其隨後可與醯肼或一級胺官能化分子偶合，產生經酸標記之脎或與胺氧基偶合形成脎。酶促及化學酶促方法使用神經胺糖酸苷酶 (Neu)及半乳糖氧化酶(Gal Oxi)將糖殘基處理為甲酸醛官能基。使用β1,4-半乳糖苷基轉移酶(Gal T)/α2,6-唾液酸基轉移酶(Sial T)連續處理抗體可以產生均勻唾液酸化抗體。所得抗體隨後可經選擇性氧化成對應的醛官能基，且若使用唾液酸衍生物，則此等抗體可用作選擇性生物正交把手(handle)。類似地，可用β-半乳糖(Gal)及突變Gal T處理抗體，以介導生物正交疊氮或酮半乳糖之附接，以產生具有非天然官能基之均勻G2聚糖模式。另一種方法係製備可併入至抗體之聚糖中之非典型硫基-岩藻糖衍生物，其提供生物正交糖給細胞，產生展現硫醇官能基之表現抗體。

【0113】 連接子可依多種方式與本發明之抗ROR1抗體及抗原結合

片段接合。通常連接子及細胞毒性部分在附接至抗體之前已合成及接合。連接子-藥物結合物附接至抗體之一個方法涉及：用二硫蘇糖醇(DTT)或三(2-羧基乙基)膦(TCEP)還原暴露在溶劑中之二硫化物，接著用含順丁烯二醯亞胺的連接子-藥物部分體(例如6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB))修飾所得硫醇。天然抗體含有4個鏈間二硫鍵及12個鏈內二硫鍵以及不成對的半胱胺酸。因此，經以此方式修飾之抗體，每個抗體可包含超過一個連接子-藥物部分體。在某些實施例中，本文中所描述之免疫接合物包含至少1、2、3、4、5、6、7或8、9或10個連接子/藥物部分體。在某些實施例中，本文中所描述之免疫接合物包含1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、1至2個連接子/藥物部分體，或1個連接子/藥物部分體。在其中連接子為分支鏈且可各自附接至多個藥物部分體之情況下，藥物部分體比抗體之比率將高於使用非分支鏈連接子之情況。

【0114】 在一些實施例中，連接子具有下式：

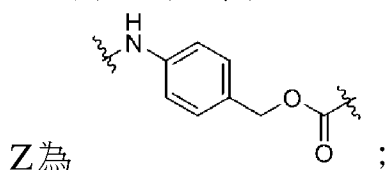


其中

X為C₂₋₈烷基；

Y為-(CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂-；

W為胺基酸單元；



Z為

n為0或1；

p為0或1；

q為0至12之整數；

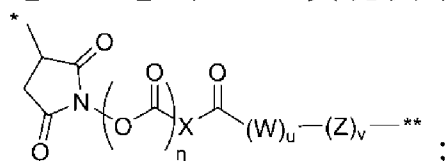
u為0至5之整數；且

v為0或1；其中**表示與藥物部分體(D)之連接點；且

*表示與抗體或片段(Ab)之連接點。

【0115】 在一些實施例中，p為0。在一些實施例中，p為1。在一些實施例中，p為1且X為 $-(CH_2)_2-$ 。在一些實施例中，p為1且X為 $-(CH_2)_3-$ 。在一些實施例中，p為1且X為 $-(CH_2)_4-$ 。在一些實施例中，p為1且X為 $-(CH_2)_5-$ 。在一些實施例中，p為1且X為 $-(CH_2)_6-$ 。在一些實施例中，q為1至12之整數。在一些實施例中，q為4至12之整數。在一些實施例中，q為4至8之整數。在一些實施例中，q為0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12。在一些實施例中，W為包含天然存在胺基酸殘基以及微量胺基酸及非天然產生胺基酸類似物的胺基酸單元。在一些實施例中，W選自：丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、脯胺酸、受乙醯基或甲醯基保護或不受保護的離胺酸、精胺酸、受甲苄磺醯基或硝基保護或不受保護的精胺酸、組氨酸、鳥胺酸、受乙醯基或甲醯基保護的鳥胺酸及瓜胺酸。在一些實施例中，u為1、2、3、4或5。在一些實施例中，u為0。在一些實施例中，v為0。在一些實施例中，v為1。

【0116】 在一些實施例中，連接子具有下式：

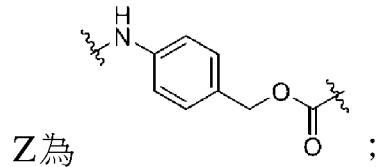


其中

X為C₂₋₈烷基；

Y為-(CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂-；

W為胺基酸單元；



n為0或1；

p為0或1；

q為0至12之整數；

u為0至5之整數；且

v為0或1；其中**表示與藥物部分體(D)之連接點；且

*表示與抗體或片段(Ab)之連接點。

【0117】 在一些實施例中，n為0。在一些實施例中，n為1。在一些實施例中，X為-(CH₂)₂-。在一些實施例中，X為-(CH₂)₃-。在一些實施例中，X為-(CH₂)₄-。在一些實施例中，X為-(CH₂)₅-。在一些實施例中，X為-(CH₂)₆-。在一些實施例中，W為包含天然存在胺基酸殘基以及微量胺基酸及非天然產生胺基酸類似物的胺基酸單元。在一些實施例中，W選自：丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、脯胺酸、受乙醯基或甲醯基保護或不受保護的離胺酸、精胺酸、受甲苄磺醯基或硝基保護或不受保護的精胺酸、組氨酸、鳥胺酸、受乙醯基或甲醯基保護的鳥胺酸及瓜胺酸。在一些實施例中，w為1、2、3、4或5。在一些實施例中，w為0。在一些實施例中，v為0。在一些實施例中，v為1。

【0118】 在一些實施例中，免疫接合物視情況另外包含內體裂解部

分。在一些情況下，內體裂解部分為細胞隔室釋放組分，諸如能夠自此項技術中已知之任何細胞隔室(諸如：胞內體、溶酶體、內質網(endoplasmic reticulum, ER)、高基氏體(Golgi apparatus)、微管、過氧化體或其他囊泡體與細胞)釋放的化合物。在一些情況下，內體裂解部分包含內體裂解多肽、內體裂解聚合物、內體裂解脂質或內體裂解小分子。在一些情況下，內體裂解部分包含內體裂解多肽。在其他情況下，內體裂解部分包含內體裂解聚合物。在一些實施例中，本文中所描述之內體裂解聚合物為pH反應性內體裂解聚合物。pH反應性聚合物包含根據環境之pH而增加大小(膨脹)或收縮之聚合物。聚丙烯酸及殼聚糖為pH反應性聚合物之實例。在一些實施例中，本文中所描述之內體裂解聚合物為膜破壞性聚合物。在一些情況下，膜破壞性聚合物包含陽離子聚合物、中性或疏水性聚合物或陰離子聚合物。在一些實施例中，膜破壞性聚合物為親水性聚合物。在一些實施例中，聚(烷基丙烯酸)包括聚(丙基丙烯酸)(polyPAA)、聚(甲基丙烯酸)(PMAA)、聚(乙基丙烯酸)(PEAA)及聚(丙基丙烯酸)(PPAA)。在一些實施例中，本文中所描述之聚(烷基丙烯酸)可為Jones等人, *Biochemistry Journal* 372:65-75 (2003)中所描述之聚(烷基丙烯酸)。在一些實施例中，pH反應性膜破壞性聚合物包含聚(丙烯酸丁酯-甲基丙烯酸)。參見例如 Bulmus 等人, *Journal of Controlled Release* 93:105-120 (2003)；及 Yessine 等人, *Biochimica et Biophysica Acta* 1613:28-38 (2003)。在一些實施例中，pH反應性膜破壞性聚合物包含聚(苯乙烯-交替-順丁烯二酸酐)。參見例如 Henry 等人, *Biomacromolecules* 7:2407-2414 (2006)。在一些實施例中，pH反應性膜破壞性聚合物包含吡啶基二硫化物丙烯酸酯(PDSA)聚合物，諸如聚(MAA-PDSA)、聚(EAA-

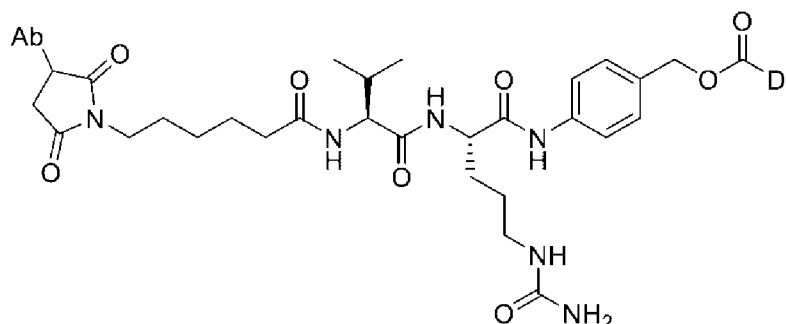
PDSA)、聚(PAA-PDSA)、聚(MAA-BA-PDSA)、聚(EAA-BA-PDSA)或聚(PAA-BA-PDSA)聚合物。參見例如 El-Sayed 等人, *Journal of Controlled Release* 104:417-427 (2005); 或 Flanary 等人, *Bioconjugate Chem.* 20:241-248 (2009)。在一些實施例中, 內體裂解部分為脂質(例如促融脂質)。在一些實施例中, 式(I) A-X-B-Y-C之分子進一步與內體裂解脂質(例如促融脂質)接合。例示性促融脂質包括: 1,2-二油醯基-sn-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、磷脂醯乙醇胺(POPE)、棕櫚醯油醯基磷脂醯膽鹼(POPC)、(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-醇(Di-Lin)、N-甲基(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊環-4-基)甲胺(DLink-DMA)及N-甲基-2-(2,2-二((9Z,12Z)-十八-9,12-二烯基)-1,3-二氧戊環-4-基)乙胺(XTC)。適用作內體裂解部分之例示性小分子包括但不限於: 奎寧、氯奎、羥基氯奎、胺酚喹(amodiaquins)(caroquines)、阿莫吡喹(amopyroquines)、伯胺喹(primaquines)、甲氟喹(mefloquines)、硫酸氯喹(nivaquines)、鹵甲丙二苯卓(halofantrines)、醌亞胺或其任何組合。

【0119】 如本文所用, 術語「鍵」係指由一個分子實體之官能基與另一分子實體之官能基之間的化學反應形成的鍵或化學部分。此類鍵可包括但不限於共價及非共價鍵, 同時此類化學部分可包括但不限於: 酯、碳酸酯、胺基甲酸酯、亞胺、磷酸酯、脞、縮醛、原酸酯、肽鍵及寡核苷酸鍵。水解穩定鍵意謂該鍵在水中在適用pH值下, 包括但不限於, 在生理條件下, 可在一段較長時間內(甚至可能無限期地)基本上穩定且不與水反應。水解不穩定或可降解鍵意謂該鍵在水中或在水溶液(包括例如血液)中可降解。酶促不穩定或可降解鍵意謂該鍵可由一或多種酶降解。僅藉助於實例, PEG及相關聚合物可包括聚合物分子之聚合物主鏈中或聚合物主鏈

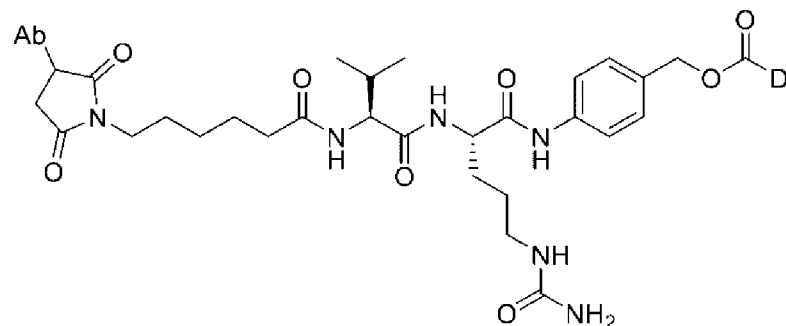
與一或多個末端官能基之間之連接基團中之可降解鍵。此類可降解鍵包括但不限於，由PEG羧酸或活化PEG羧酸與生物活性劑上之醇基之反應形成之酯鍵，其中此類酯基通常在生理條件下水解以釋放生物活性劑。其他水解可降解鍵包括但不限於：碳酸酯鍵；由胺與醛反應產生之亞胺鍵；藉由使醇與磷酸酯基反應形成之磷酸酯鍵；作為醯肼與醛之反應產物之脞鍵；作為醛與醇之反應產物之縮醛鍵；作為甲酸與醇之反應產物之原酸酯鍵；藉由包括但不限於聚合物(諸如PEG)末端之胺基與肽之羧基形成之肽鍵；及由包括但不限於聚合物末端之胺基磷酸酯基與寡核苷酸之5'羥基形成之寡核苷酸鍵。

1.7 例示性ROR1免疫接合物

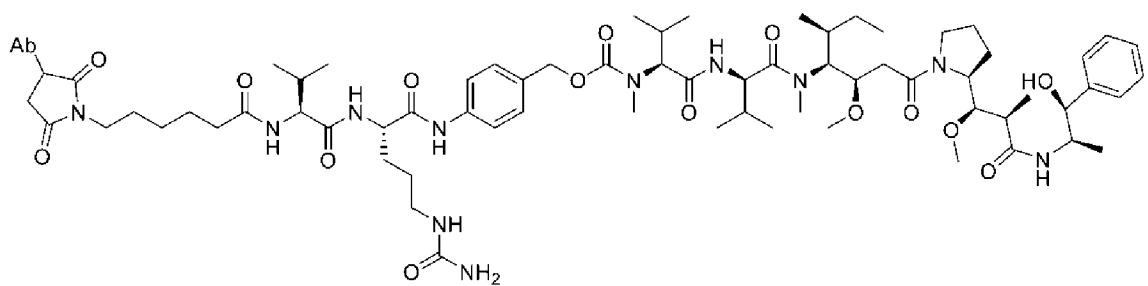
【0120】 在一些實施例中，本發明之ADC具有以下結構：



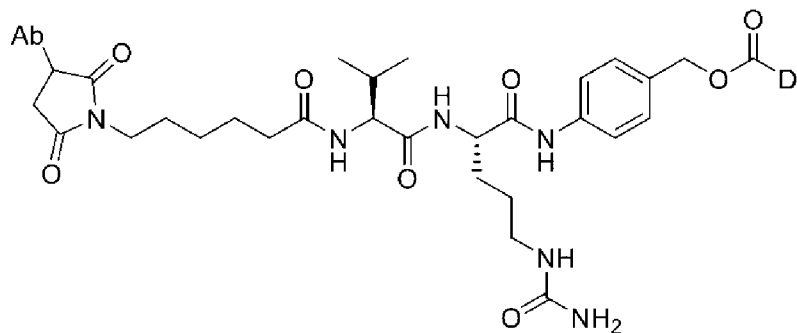
其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



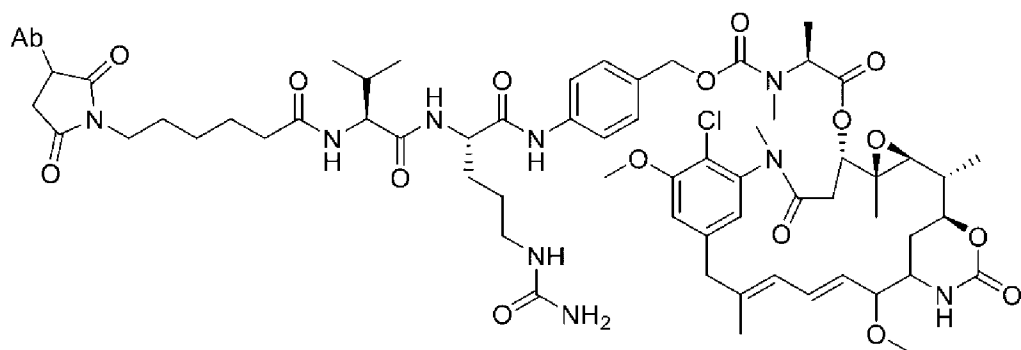
其中Ab為抗體且D為單甲基奧瑞他汀E (MMAE)。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



其中Ab為抗體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

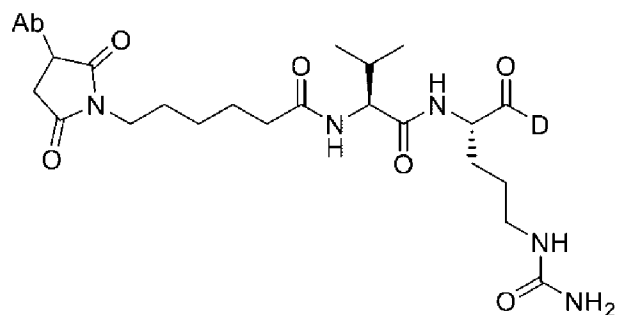


其中Ab為抗體且D為美登素(亦稱作DM1)。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

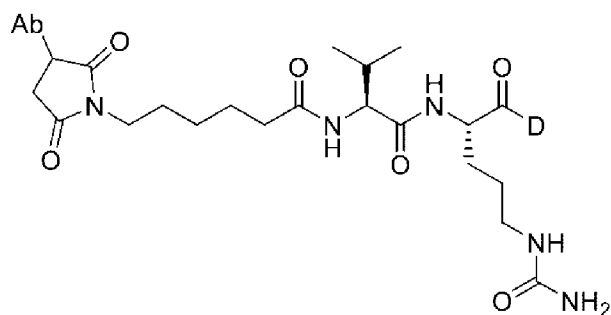


其中Ab為抗體。

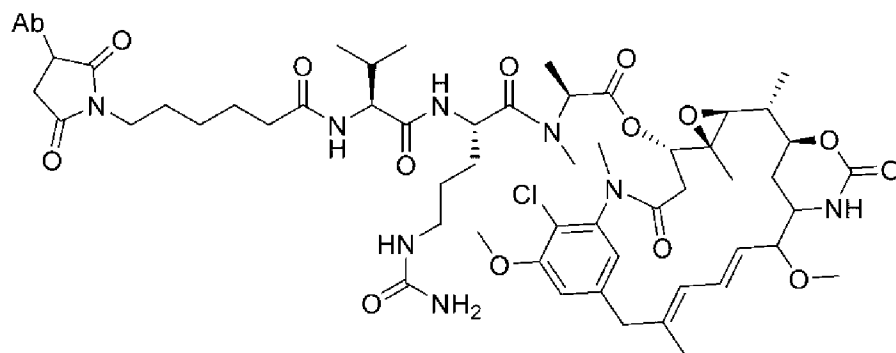
【0121】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：



其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

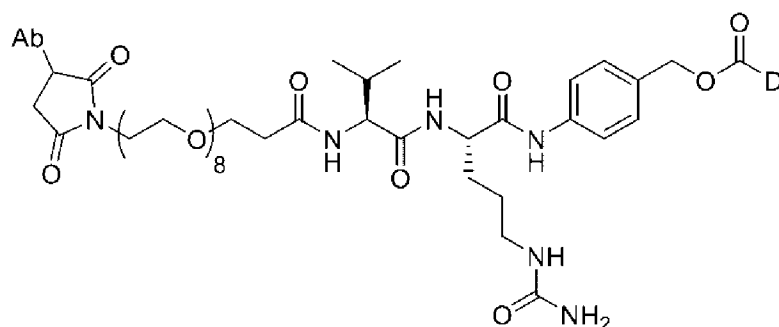


其中Ab為抗體且D美登素。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

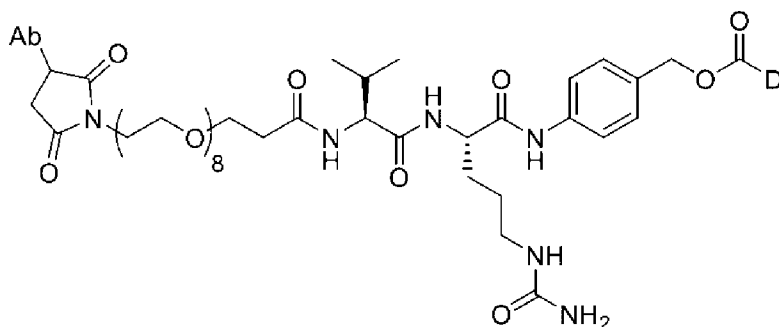


其中Ab為抗體。

【0122】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：

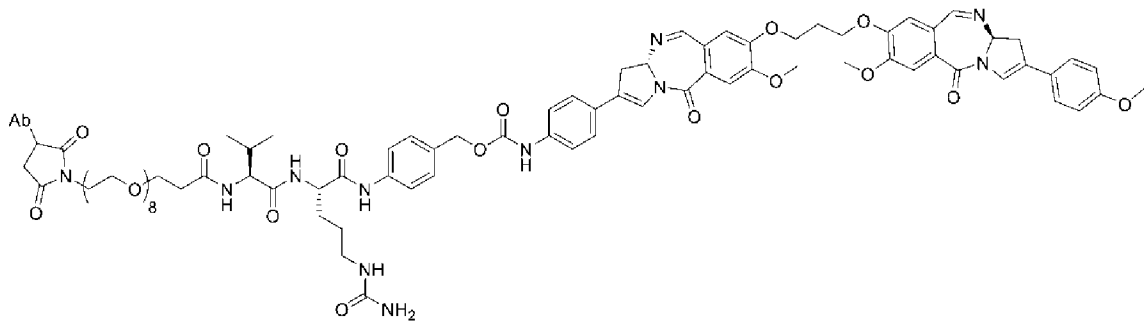


其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



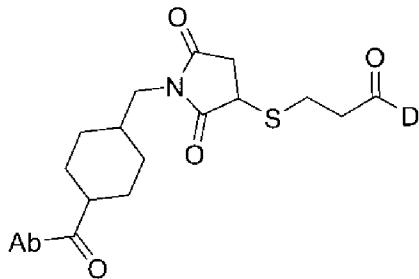
其中Ab為抗體且D為二聚吡咯并苯并二氮呋(PBD)。在一些實施例

中，ADC具有以下結構：

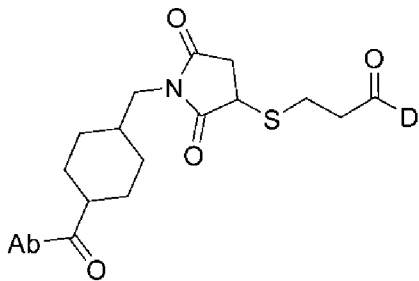


其中Ab為抗體。

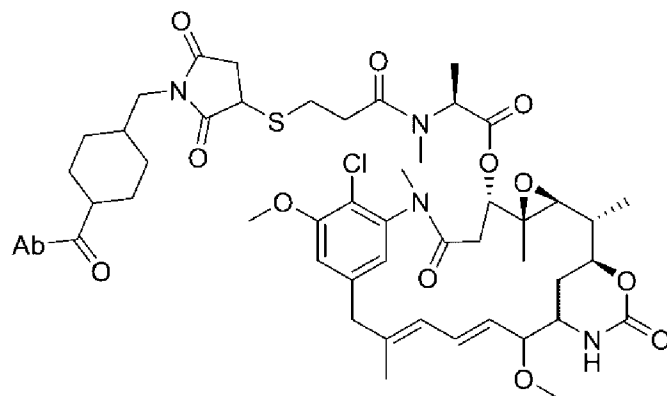
【0123】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：



其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

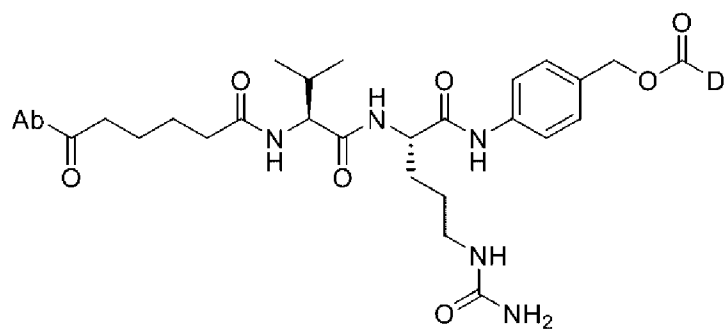


其中Ab為抗體且D為美登素。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

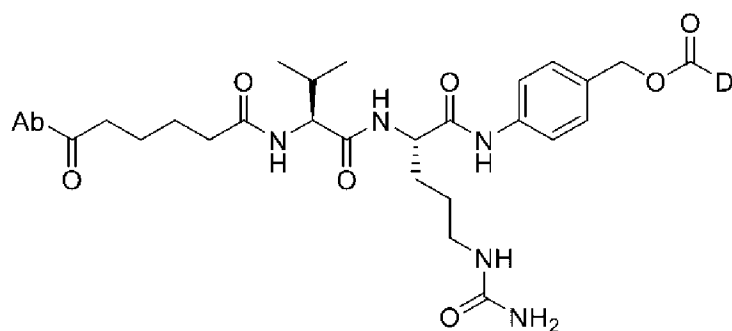


其中Ab為抗體。

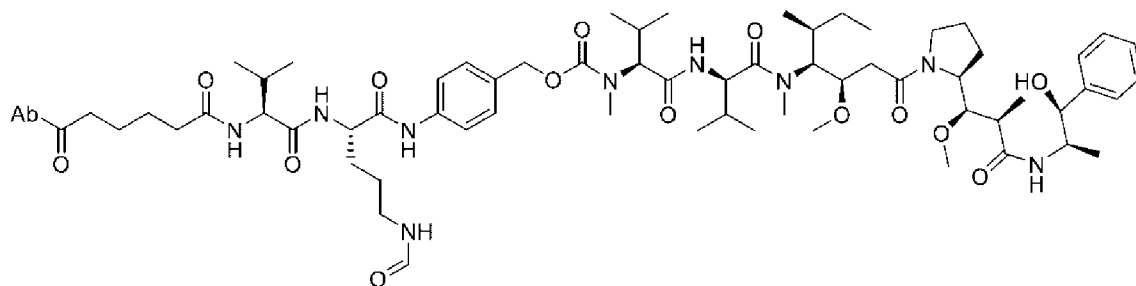
【0124】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：



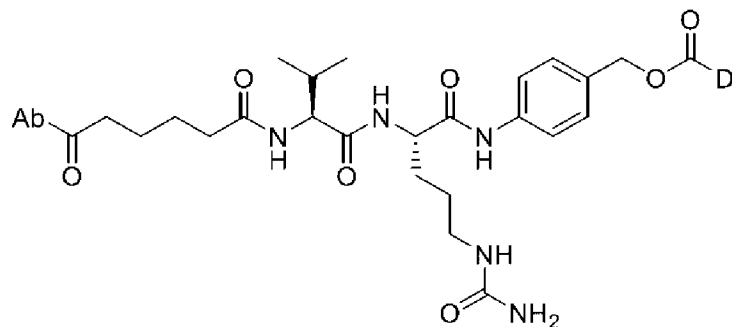
其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



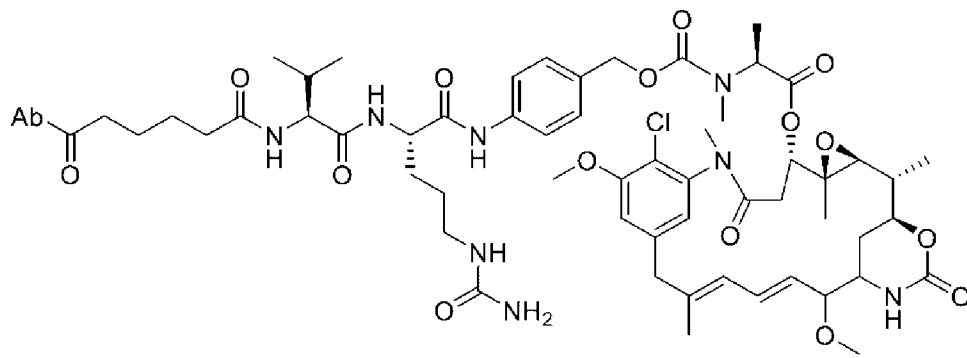
其中Ab為抗體且D為MMAE。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



其中Ab為抗體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

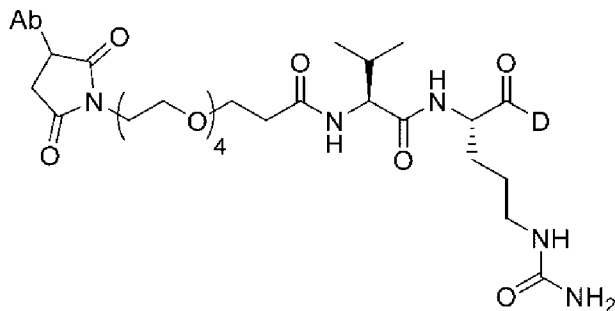


其中Ab為抗體且D為美登素。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



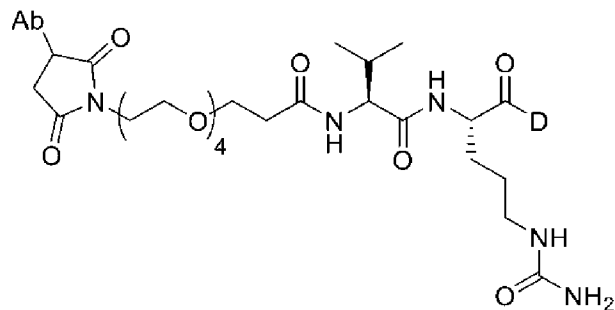
其中Ab為抗體。

【0125】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：



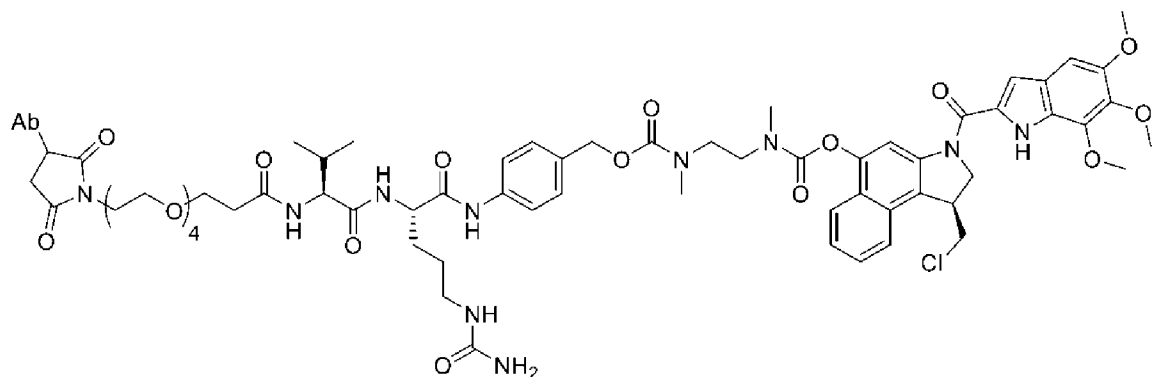
其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下

結構：



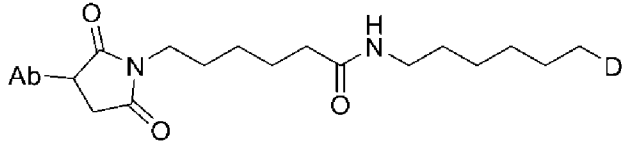
其中Ab為抗體且D為多卡黴素。在一些實施例中，ADC具有以下結

構：

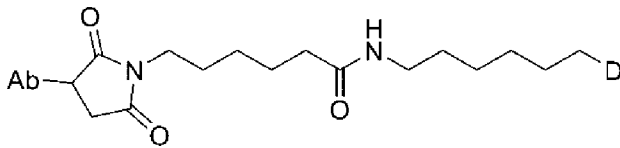


其中Ab為抗體。

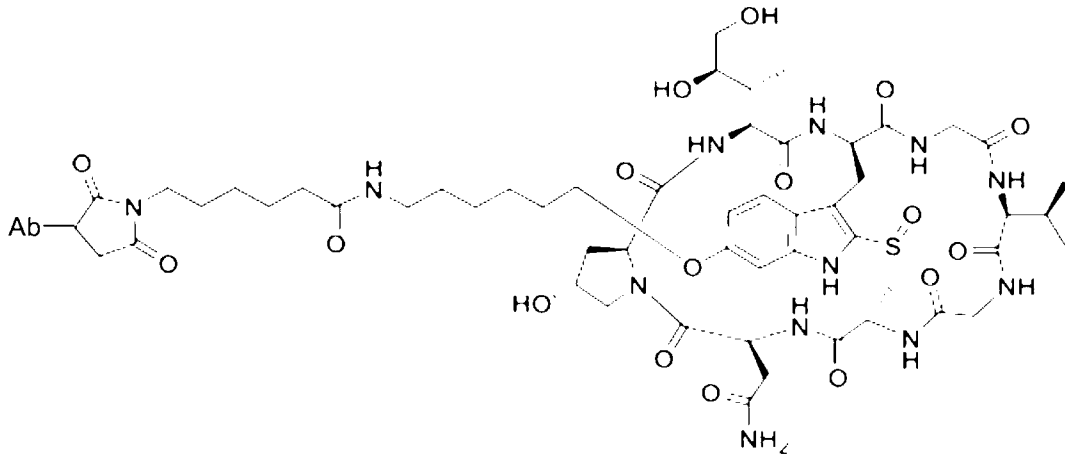
【0126】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：



其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下結構：

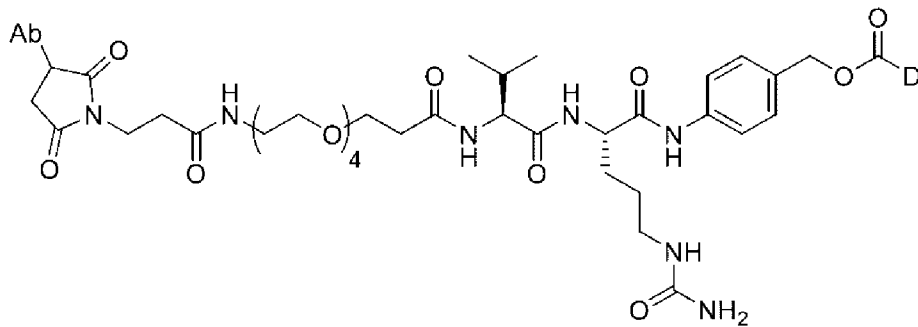


其中Ab為抗體且D為瓢菌素，諸如 α -瓢菌素。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



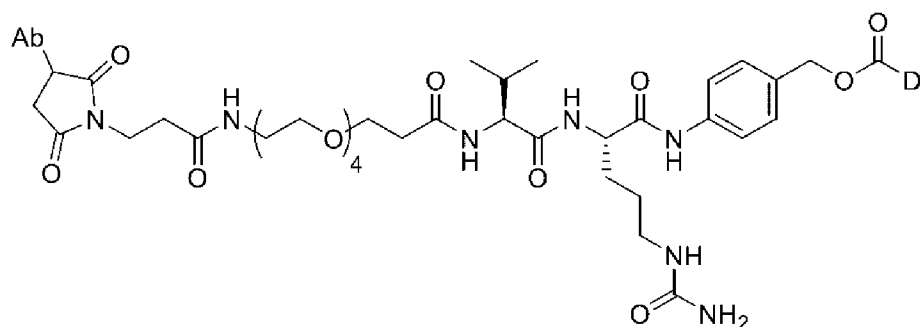
其中Ab為抗體。

【0127】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：



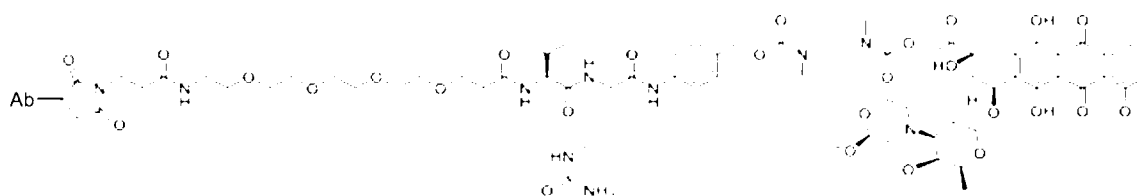
其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下

結構：



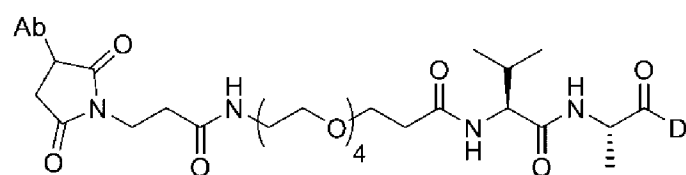
其中Ab為抗體且D為PNU159682。在一些實施例中，ADC具有以下

結構：



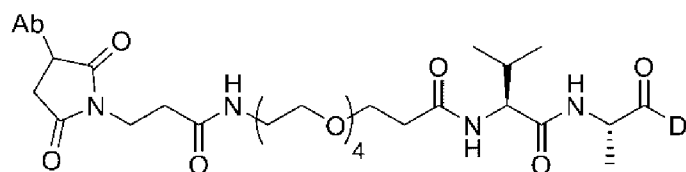
其中Ab為抗體。

【0128】 在一些實施例中，ADC具有以下結構：

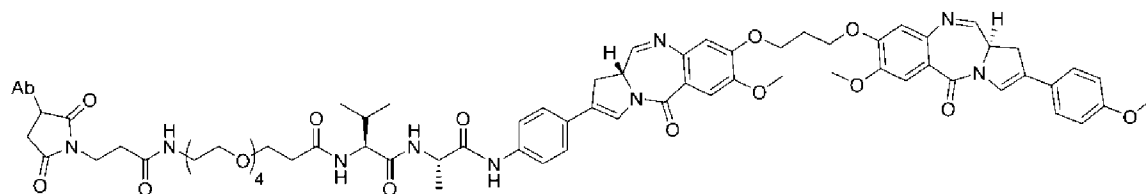


其中Ab為抗體且D為藥物部分體。在一些實施例中，ADC具有以下

結構：



其中Ab為抗體且D為PBD。在一些實施例中，ADC具有以下結構：



其中Ab為抗體。

【0129】 例示性本發明免疫接合物顯示於下表中：

第 60 頁(發明說明書)

表2 例示性免疫接合物

構築體ID	mAb	接合	連接子組分				有效負載
ADC-A	Ab1	MAL (mc)		VC	PAB		MMAE
ADC-E	Ab1	SC		VC	PAB		MMAE
ADC-B	Ab1	SMCC					DM1
ADC-C	Ab1	MAL		VC	PAB		DM1
ADC-F	Ab1	SC		VC	PAB		DM1
ADC-H	Ab1	MAL		VC	PAB		阿那非德
ADC-I	Ab1	MAL (mc)				C6	α -瓢菌素
ADC-J	Ab1	MAL	PEG4	VC	PAB	DMEA	多卡黴素 TM
ADC-K	Ab1	MAL	PEG4	VA			PBD
ADC-L	Ab1	MAL	DPR	VC	PAB		MMAE
ADC-M	Ab1	MAL	Phe-C4	VC	PAB		MMAE
ADC-N	Ab1	MAL	PEG4	VC	PAB	DMEA	PNU-159682
ADC-O	Ab1	MAL	C2-Gly3			EDA	PNU-159682
ADC-P	Ab1	MAL	Phe-C4	VC	PAB	DMEA	PNU-159682
ADC-Q [#]	Ab1*	DBCO	(PEG2	VC	PAB		MMAE)2
ADC-R	Ab1*	DBCO	PEG4	VC	PAB	DMEA	PNU-159682
ADC-S	D10	MAL		VC	PAB		MMAE
ADC-T	4A5	MAL		VC	PAB		MMAE

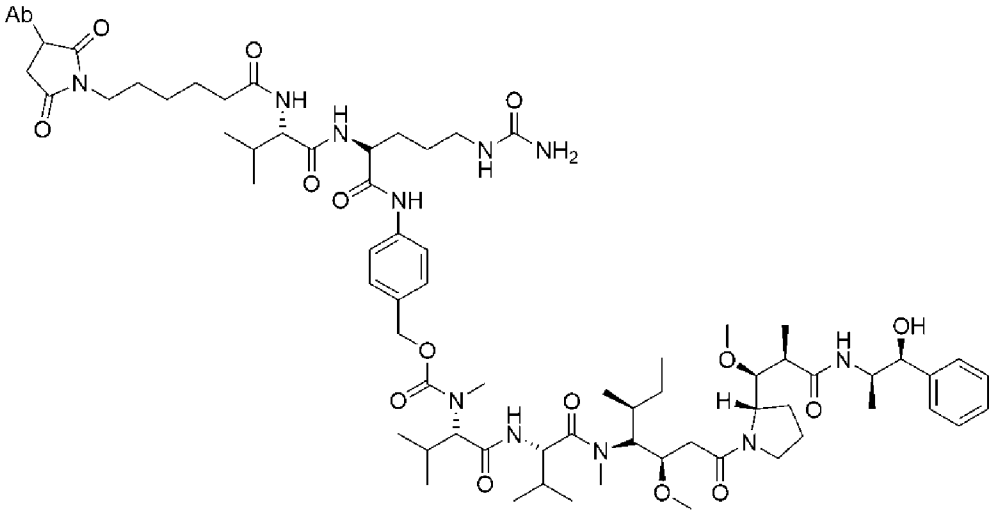
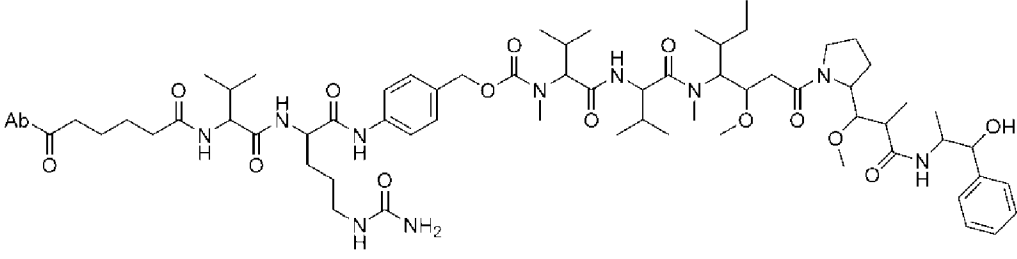
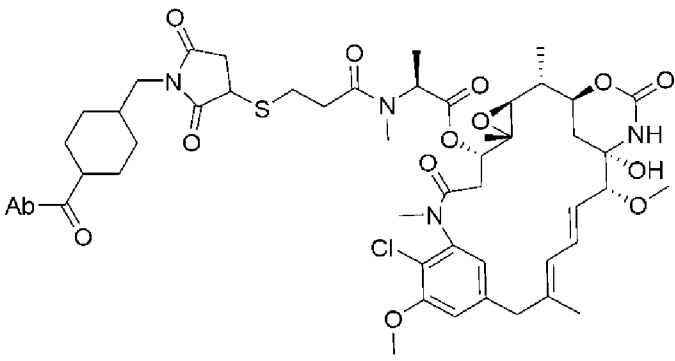
[#]分支鏈連接子-有效負載。

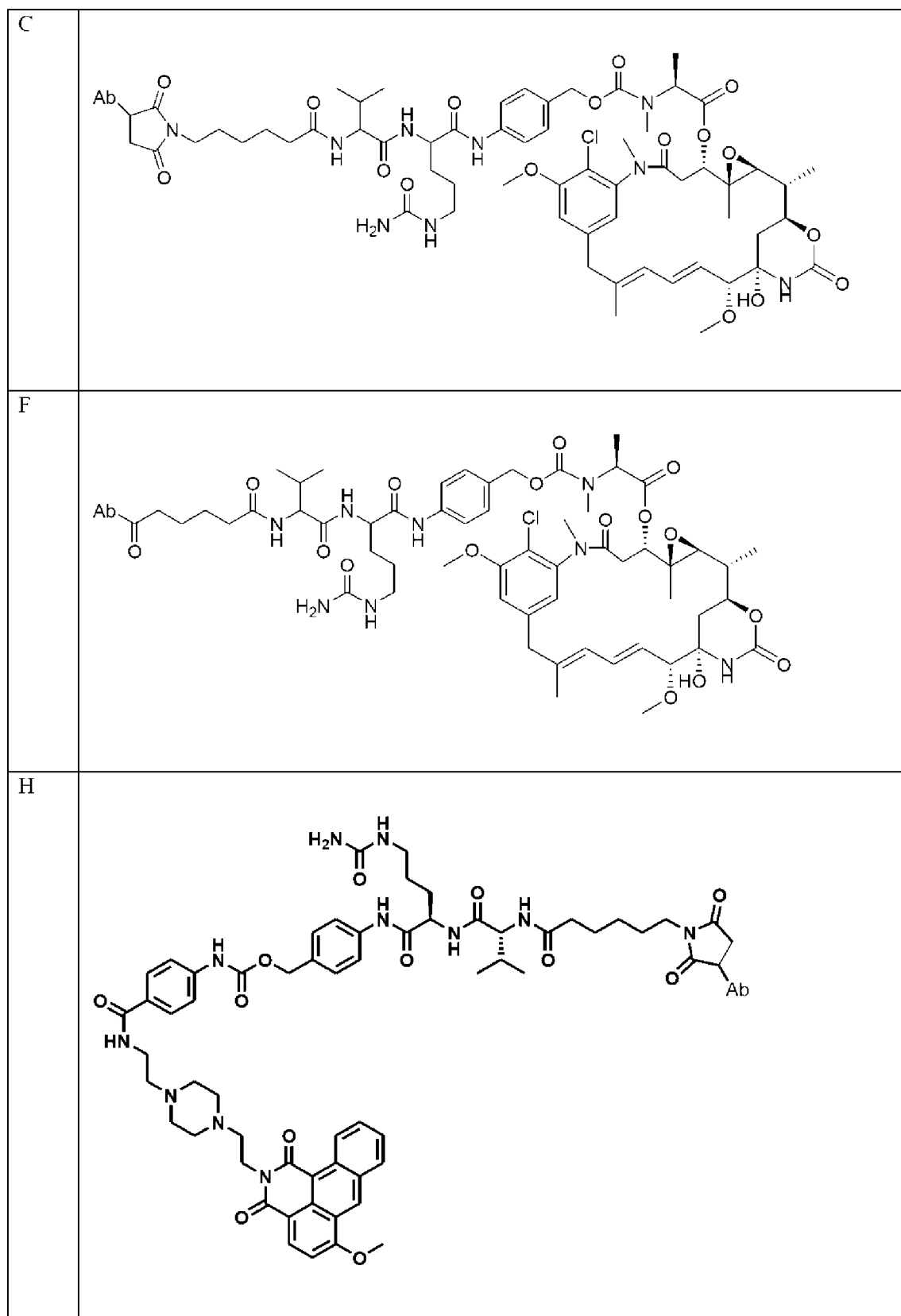
*使用微生物轉麩醯胺酸酶之定點接合。

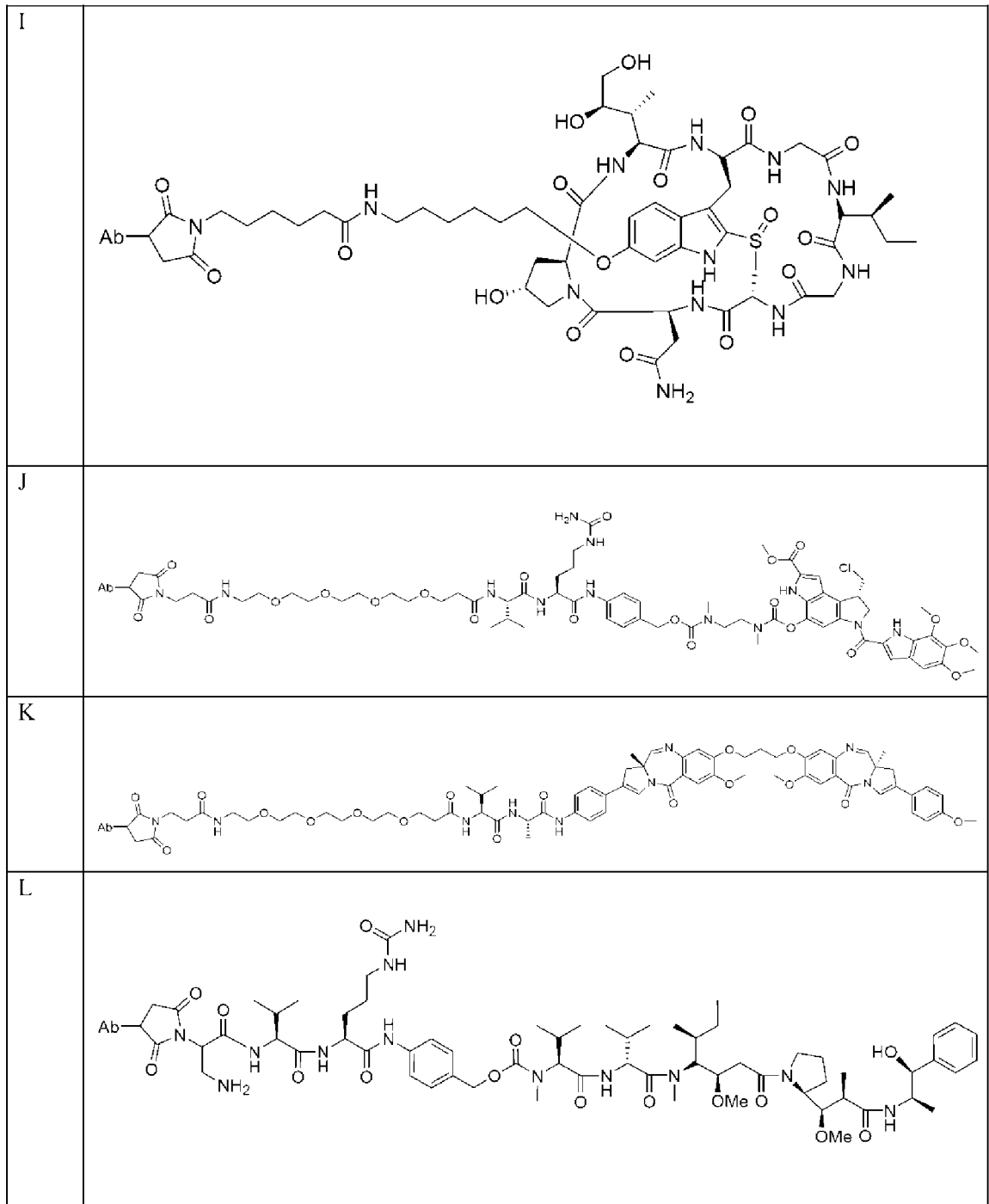
【0130】 在上表中，使用如下縮寫：順丁烯二醯亞胺化學性質(MAL)；順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)；丁二醯亞胺化學性質(SC)；丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯)(SMCC)；二苯甲基環辛炔(DBCO)；二胺基丙酸(DPR)；苯甲基(Phe)；聚乙二醇(PEG)；纈胺酸-瓜胺酸(VC)；纈胺酸-丙胺酸(VA)；對胺基-苯甲氧基羰基(自分解型部分)(PAB)；二甲基乙基胺(DMEA)；乙二胺(EDA)；單甲基奧瑞他汀E (MMAE)；N2'-去乙醯基-N2'-(3-巯基-側氧基丙基)美登素(DM1)；及吡咯并苯并二氮呿(PBD)，[1,2]二氮呿并[3,4-e]吡啶。對於ADC-Q及ADC-R，有效負載之定點接合可藉由使用微生物轉麩醯胺酸酶進行。

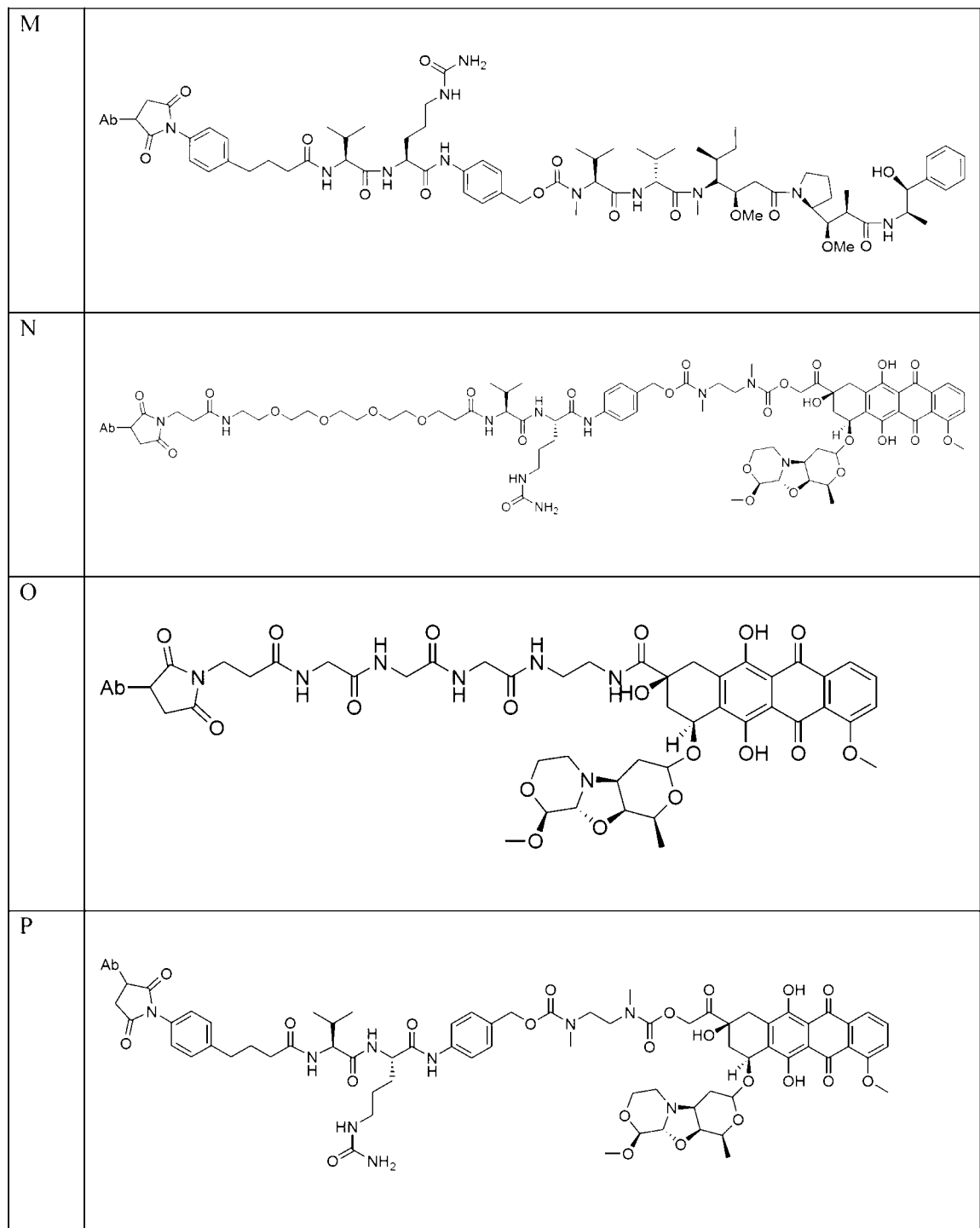
【0131】 表2中之免疫接合物之化學結構顯示在下表中：

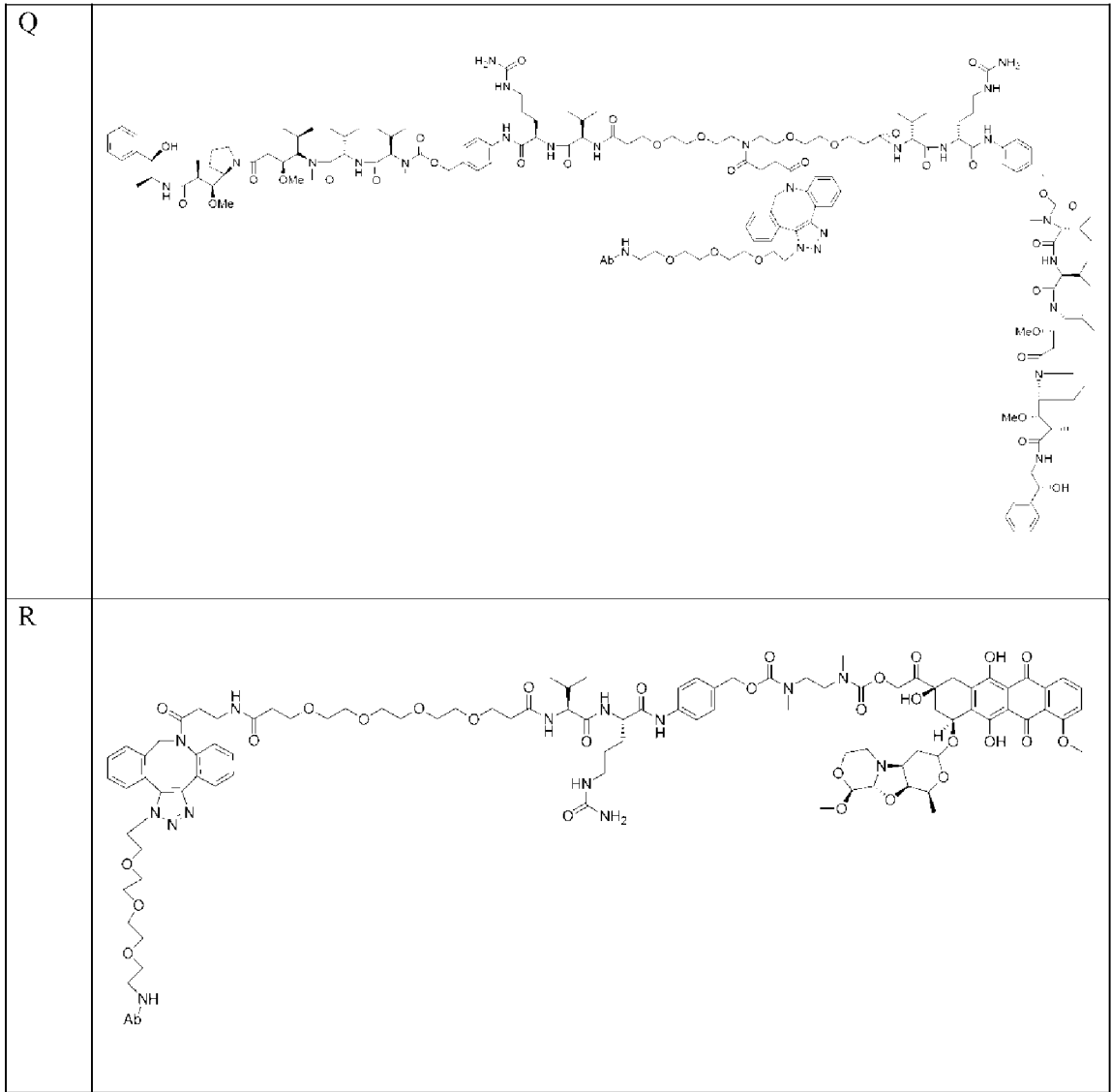
表3 例示性免疫接合物之化學結構

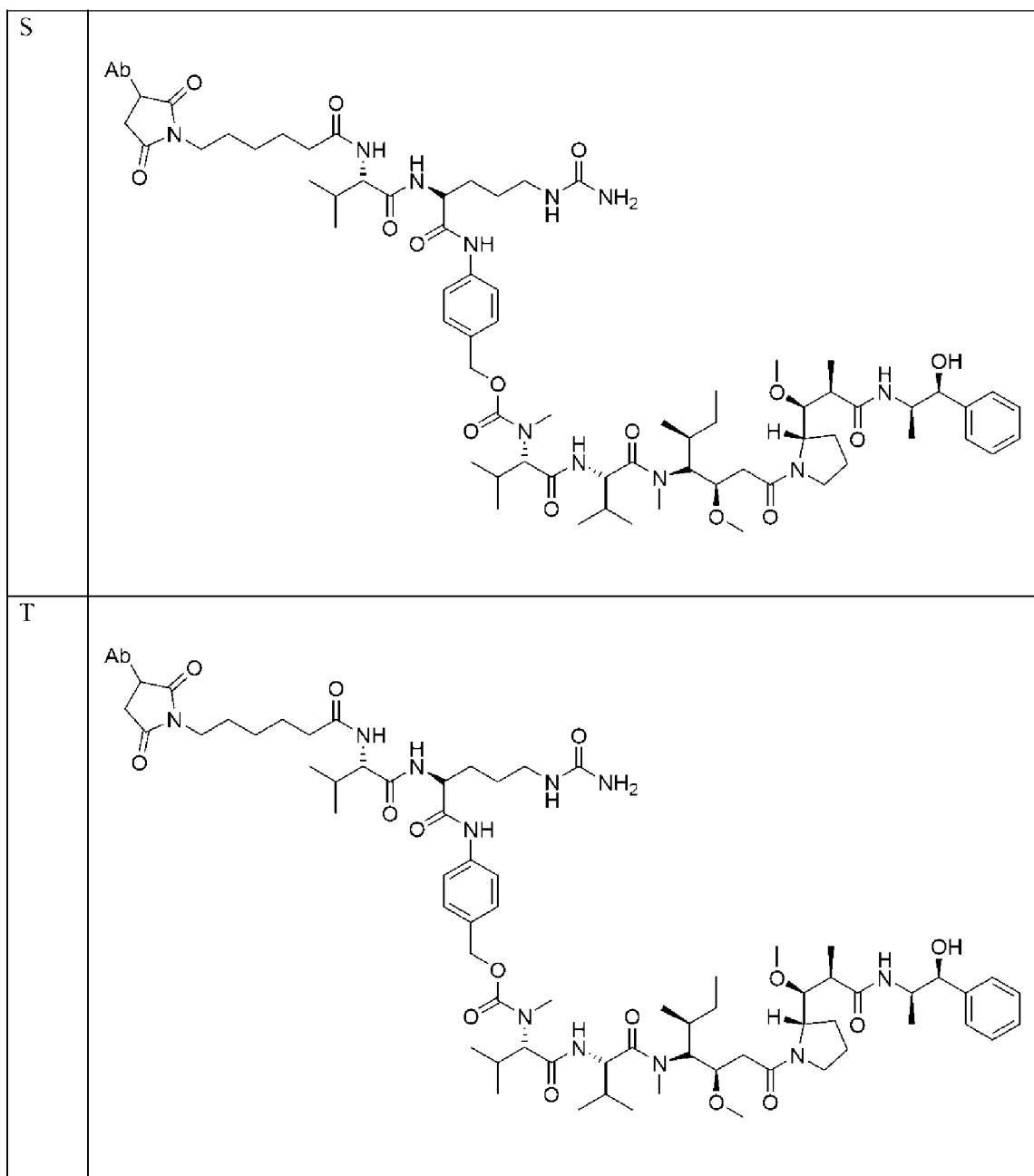
ADC	結構
A	
E	
B	







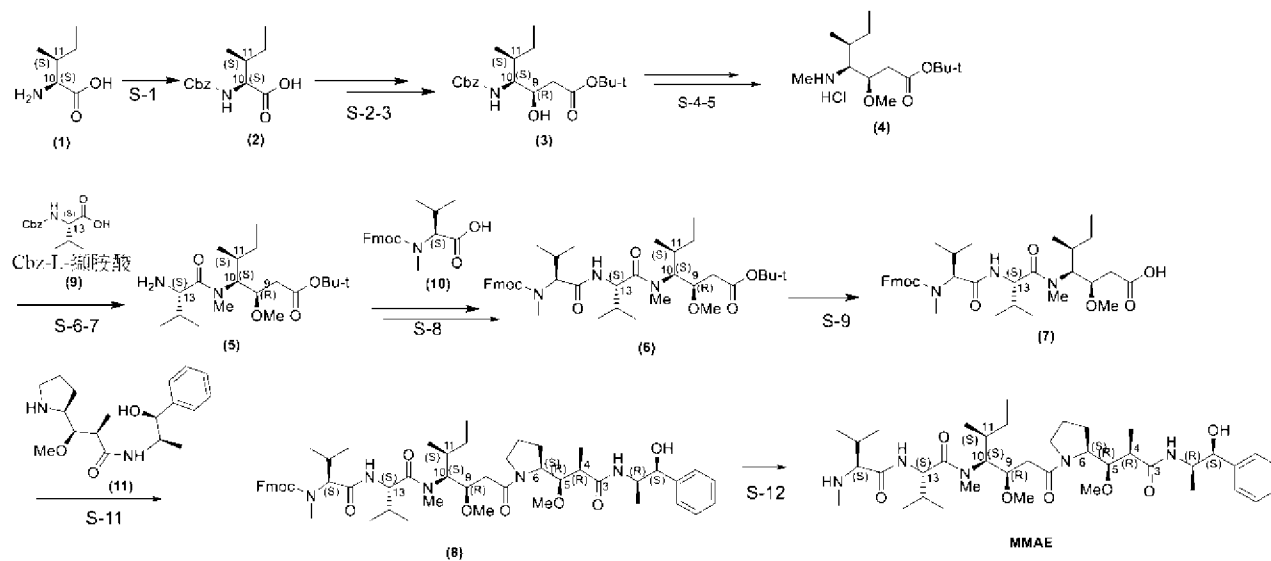




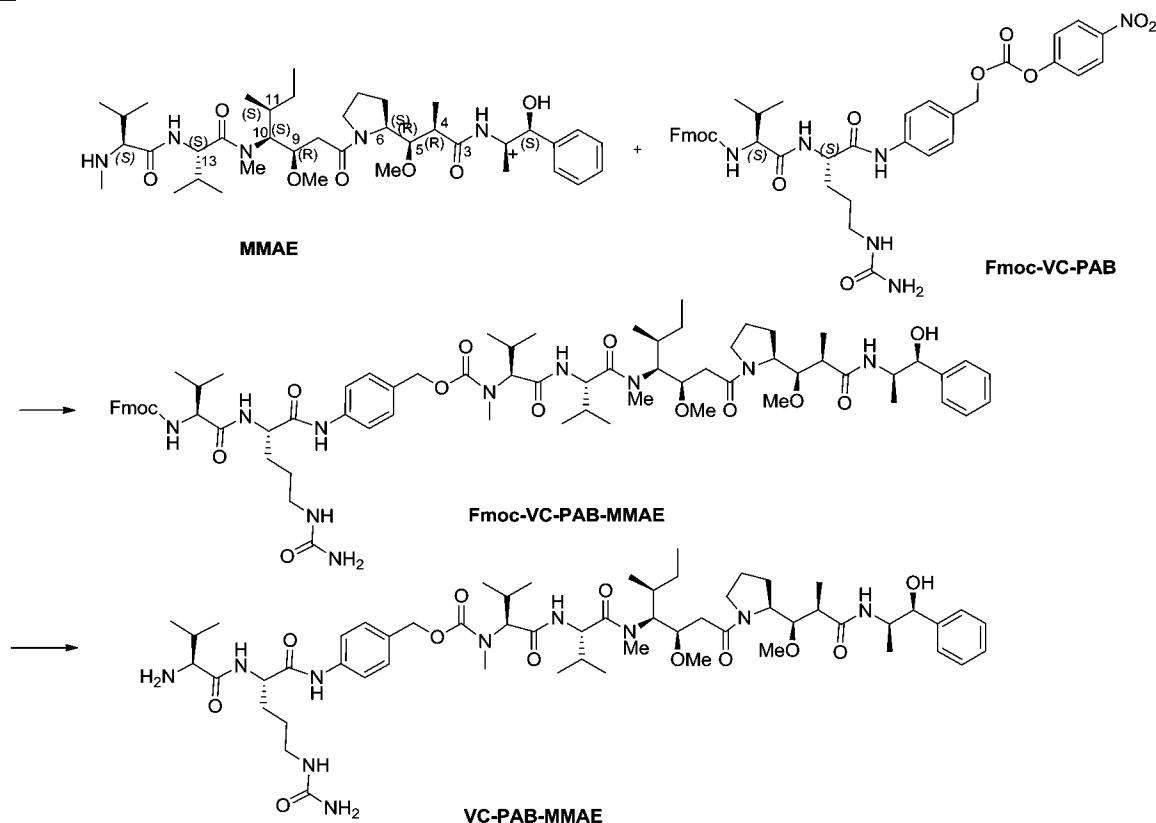
2. 免疫接合物之合成

【0132】 在一些實施例中，本文中所描述之免疫接合物如流程1及流程2中所示地製備。MMAE如流程1中所概述地由L-異白胺酸開始分12個步驟製備。如流程2中所示，流程1中所製備之MMAE與受FMOC保護的纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(VC-PAB)連接子之4-硝基苯基碳酸酯偶合。FMOC基團之去保護產生VC-PAB-MMAE連接子-MMAE構築體。

流程1



流程2



【0133】表3中所示之ADC之例示性合成方法在下文實例1中說明。

在ADC-A、C、H至P、S及T中，抗體經由半胱胺酸殘基共價鍵結於連接子/有效負載部分。在ADC-B、E及F中，抗體經由離胺酸殘基共價鍵結於連接子/有效負載部分(或對B而言共價鍵結於有效負載)。在ADC-Q及R

中，抗體經由麩醯胺酸殘基共價鍵結於連接子/有效負載。

3. 免疫接合物療法

【0134】本文中所述之免疫接合物適用於治療各種癌症。已顯示ROR1跨許多類型之腫瘤表現，包括淋巴瘤及實體腫瘤。大比例之人類癌症表現ROR1。舉例而言，Zhang等人展示其檢查之54%卵巢癌、57%結腸癌、77%肺癌、90%淋巴瘤、89%皮膚癌、83%胰臟癌、73%睪丸癌、43%膀胱癌、96%子宮癌、90%前列腺癌及83%腎上腺癌經抗ROR1抗體4A5中等至強度染色(Zhang等人, *Am J Pathol.* 181(6):1903-10 (2012))。Daneshmanesh等人相似地發現ROR1在CLL及毛細胞白血病(HCL)中之幾乎普遍表現及在其他淋巴癌症，諸如套細胞淋巴瘤(MCL)、彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)/邊緣區淋巴瘤(MZL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性骨髓性淋巴瘤(AML)及骨髓瘤中之不同程度之表現(Daneshmanesh等人, *Leuk Lymphoma* 54(4):843-50 (2013))。吾人之研究相似地顯示，顯著比例之患有肝細胞癌(hepatocellular cancer, HCC)或非小細胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)之患者為ROR1-陽性。ROR1之此廣泛腫瘤表現模式使得本發明之免疫接合物適用於治療多種血液癌症及實體腫瘤，諸如前述彼等。另外，已顯示在侵襲性癌症中ROR1表現增加且與不良預後相關；因此，本發明之免疫接合物尤其適合於治療侵襲性或晚期癌症。在一些實施例中，本發明之免疫接合物引起完全腫瘤消退。在特定實施例中，完全腫瘤消退可能在免疫接合物療法之最終給藥之後仍持續。

【0135】本發明之ROR1免疫接合物，諸如使用結合於SEQ ID NO:1或2中所述之ROR1抗原決定基之抗體(例如Ab1、Ab2、Ab3或Ab4)

製得的彼等能有效治療癌症，諸如ROR1表現為非均一性的實體腫瘤。其少至20%之細胞表現ROR1的腫瘤可有效地經ROR1免疫接合物治療；例如，腫瘤可具有20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多或70%或更多之其細胞表現ROR1。不希望受理論所束縛，預期本發明之ROR1免疫接合物可經由旁路毒性作用(亦即，自死亡腫瘤細胞釋放之有效負載對鄰近腫瘤細胞產生細胞毒性)，或藉由增強免疫系統之抗腫瘤免疫，或兩者，引起ROR1-陰性腫瘤細胞之細胞死亡。

【0136】 「治療(treat/treating/treatment)」係指一種緩解或消除生物病症及/或其伴隨症狀中之至少一者的方法。如本文所用，「緩解」疾病、病症或病狀意指減少疾病、病症或病狀之症狀之嚴重度及/或出現頻率。另外，本文中對「治療」之指代包括指代治癒性、緩解性及預防性治療。癌症之治療涵蓋抑制癌症生長(包括引起癌症消退)、抑制癌症進展或轉移、預防癌症復發或殘留疾病及/或延長患者之存活期。

【0137】 在一些實施例中，可藉由本文中所描述之免疫接合物治療之癌症為ROR1表現型癌症。ROR1表現型癌症可藉由任何適合確定基因表現或蛋白表現之方法，例如藉由組織學、流式細胞測量術、RT-PCR或RNA-Seq確定。用於測定之癌細胞可經由腫瘤生檢或經由採集循環腫瘤細胞獲得。在某些實施例中，若使用基於之抗體分析，諸如流式細胞測量術或免疫組織化學，則ROR1表現型癌症為任何具有顯示出抗ROR1抗體反應性比同型對照抗體大的細胞的癌症。在某些實施例中，若使用基於RNA之分析，則ROR1表現型癌症為顯示出相比於陰性對照細胞或不表現ROR1之癌症而言ROR1 RNA之含量升高的癌症。

【0138】 在某些實施例中，抗體及免疫接合物用於治療血液惡性

病。在某些實施例中，抗體及免疫接合物用於治療實體腫瘤。待治療之癌症可選自，例如淋巴瘤、小淋巴球性淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、邊緣細胞B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、彌漫性大B細胞淋巴瘤、已經歷理查特氏轉型之非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病、T細胞白血病、骨肉瘤、腎細胞癌、肝細胞癌、結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、上皮鱗狀細胞癌、黑素瘤、骨髓瘤、多發性骨髓瘤、胃癌、腦癌、肺癌、非小細胞肺癌、胰臟癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、睪丸癌、甲狀腺癌及頭頸癌。在某些實施例中，待治療之癌症可為難以用其他治療劑治療之癌症(例如三陰性乳癌)。

【0139】 在某些實施例中，用於治療本文中所描述之癌症之方法包含用本發明之免疫接合物治療及用或生物活性分子治療。生物活性分子之實例包括但不限於：肽、蛋白質、酶、小分子藥物、前藥、碳水化合物、顯像劑、脂質、核苷、放射性核素、寡核苷酸、毒素、細胞、抗生素、殺真菌劑、抗病毒劑、抗炎劑、抗腫瘤劑、心血管藥劑、抗焦慮藥劑、激素、生長因子、甾族藥劑、微生物衍生毒素及類似者。生物活性分子之其他實例為在上文標題「細胞毒性藥物部分體」下所列出之彼等。

【0140】 在某些實施例中，免疫接合物及其他治療劑或生物活性分子在同一時間，例如在同一調配物中，投與。在某些實施例中，其按相同或不同給藥時程分開地投與。在一些實施例中，其他治療劑為血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制劑、布魯頓氏酪胺酸激酶(BTK)抑制劑、哺乳動物雷帕黴素靶蛋白之抑制劑(mTOR)、磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制劑、Janus激酶/信號轉導子及轉錄(Jak/STAT)傳信抑制劑之活化劑、B細胞淋巴瘤2 (Bcl-2)抑制劑、脾酪胺酸激酶(spleen

tyrosine kinase, SYK) 抑制劑、微管抑制劑、上皮生長因子受體 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 抑制劑、聚ADP核糖聚合酶 (PARP) 抑制劑、退行性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, ALK) 抑制劑、DNA 修復抑制劑、DNA 交聯劑、核苷類似物或免疫調節劑。

【0141】 在一些實施例中，其他治療劑為

a) 抗體，諸如利妥昔單抗 (rituximab) (抗 CD20) 或貝伐單抗 (bevacizumab) (抗 VEGF)；

b) 布魯東氏酪胺酸激酶抑制劑，諸如阿卡拉布魯替尼 (acalabrutinib) 或依魯替尼 (ibrutinib)；

c) mTOR 抑制劑，諸如賽泮替布、依維莫司或 BEZ235；

d) PI3K 抑制劑，諸如艾德昔布或布帕昔布 (buparlisib)；

e) Jak/STAT 傳信抑制劑，諸如盧佐替尼 (ruxolitinib)；

f) Bcl-2 抑制劑，諸如 ABT-199/維托拉斯\Bcl-2i-1 或 Bcl-2i-2；

g) SYK 抑制劑，諸如福他替尼 (fostamatinib)；

h) 微管抑制劑，諸如太平洋紫杉醇或長春新鹼；

i) EGFR 抑制劑，諸如埃羅替尼；

j) PARP 抑制劑，諸如奧拉帕尼 (olaparib)；

k) ALK 抑制劑，諸如克卓替尼；

l) DNA 修復抑制劑，諸如卡鉑；

m) DNA 交聯劑，諸如奧沙利鉑/順鉑；

n) 核苷類似物，諸如吉西他濱；或

o) 免疫調節藥物 (IMiD)，諸如來那度胺 (lenalidomide) 或泊馬度胺 (pomalidomide)。

在特定實施例中，其他治療劑為維托拉斯。

【0142】 在某些實施例中本發明之免疫接合物及其他治療劑或生物活性分子組合使用來治療CLL、MCL或已經歷理查特氏轉型之非霍奇金氏淋巴瘤。在特定實施例中，其他治療劑或生物活性分子為例如依魯替尼、阿卡拉布魯替尼、維托拉斯、Bcl-2i-1、Bcl-2i-2、依維莫司、賽泮替布或艾德昔布。

【0143】 其他治療劑之其他實例為帕瑞替尼、布帕昔布、BEZ235、盧佐替尼、福他替尼、利妥昔單抗、來那度胺、泊馬度胺、太平洋紫杉醇、長春新鹼、埃羅替尼、克卓替尼、卡鉑、奧沙利鉑/順鉑、貝伐單抗及吉西他濱。

【0144】 在某些實施例中，本發明之免疫接合物與增強患者之免疫系統之免疫檢查點調節物組合使用。舉例而言，結合物與免疫檢查點抑制劑，諸如抗體或抗體衍生物、反義寡核苷酸、短小干擾RNA、適體或肽、靶向程序化死亡型配位體1 (PD-L1，亦稱為B7-H1、CD274)、程序化死亡1 (PD-1)、CTLA-4、PD-L2 (B7-DC、CD273)、LAG3、TIM3、2B4、A2aR、B7H1、B7H3、B7H4、BTLA、CD2、CD27、CD28、CD30、CD40、CD70、CD80、CD86、CD137、CD160、CD226、CD276、DR3、GAL9、GITR、HAVCR2、HVEM、IDO1、IDO2、ICOS (可誘導T細胞協同刺激因子)、KIR、LAIR1、LIGHT、MARCO (具有膠原結構之巨噬細胞受體)、PS (磷脂醯絲胺酸)、OX-40、SLAM、TIGHT、VISTA、VTCN1或其任何組合一起使用。

【0145】 應理解，可用於如本文中所述之治療方法中之本發明之免疫接合物可用於如本文中所述之治療中及/或可用於製造用於如本文

中所描述之治療的藥劑。本發明亦提供套組及製品，其包含如本文中所描述之本發明之免疫接合物。

4. 醫藥組合物

【0146】 在一些實施例中，本發明之免疫接合物可包含在另外包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑、載劑及稀釋劑的醫藥組合物中。舉例而言，本發明之抗體及免疫接合物可懸浮於無菌溶液(例如包含0.9% NaCl之溶液)中投與。在某些實施例中，溶液另外包含以下中之一或多者：緩衝液(例如乙酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸、丁二酸鹽、磷酸鹽、碳酸氫鹽及經基甲胺基甲烷(Tris)緩衝液)；界面活性劑(例如聚山梨醇酯80 (吐溫(Tween) 80)、聚山梨醇酯20 (吐溫20)及泊洛沙姆(poloxamer) 188)；多元醇/二醣/多醣(例如葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖及聚葡萄糖40)；胺基酸(例如甘胺酸及精胺酸)；抗氧化劑(例如抗壞血酸及甲硫胺酸)；及/或螯合劑(例如EDTA及EGTA)。亦涵蓋此等賦形劑之任何組合。在某些實施例中，本發明之免疫接合物在投與之前凍乾運送/儲存及復原。在某些實施例中，凍乾抗體或免疫接合物調配物包含增積劑，諸如甘露糖醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖及/或聚葡萄糖40。凍乾調配物可盛裝在小瓶，諸如玻璃小瓶中。當調配免疫接合物(無論其是否經復原)時，可將其緩衝在特定pH下，例如小於7.0 (諸如pH在4.5與6.5之間、4.5與6.0之間、4.5與5.5之間、4.5與5.0之間或5.0與6.0之間)。

【0147】 如本文所用，本發明之免疫接合物涵蓋結合物之醫藥學上可接受之鹽或酯。當多肽中所存在之酸性質子經金屬離子置換(舉例而言鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)；或與有機鹼配位時可形成醫藥學上可接受之鹽。此外，免疫接合物之鹽形式可使用起始材料或中間體之鹽

製備。本文中所描述之免疫接合物可藉由使本文中所描述之多肽之游離鹼形式與醫藥學上可接受之無機或有機酸反應製備為醫藥學上可接受之酸加成鹽(其為一種類型之醫藥學上可接受之鹽)。替代地，本文中所描述之免疫接合物可藉由使本文中所描述之多肽中之胺基酸之游離酸形式與醫藥學上可接受之無機或有機鹼反應製備為醫藥學上可接受之鹼加成鹽(其為一種類型之醫藥學上可接受之鹽)。

【0148】 醫藥學上可接受之鹽包括但不限於：(1)酸加成鹽，其由諸如以下之無機酸形成：鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及類似者；或其由諸如以下之有機酸形成：乙酸、丙酸、己酸、環戊丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、丁二酸、蘋果酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、3-(4-羥基苯甲醯基)苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羥基乙磺酸、苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲基雙環-[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸、葡糖庚酸、4,4'-亞甲基雙-(3-羥基-2-烯-1-羧酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、三級丁基乙酸、月桂基硫酸、葡糖酸、麩胺酸、羥基萘甲酸、水楊酸、硬脂酸、黏康酸及類似者；及(2)當親本化合物中所存在之酸性質子經金屬離子(例如鹼金屬離子、鹼土金屬離子或鋁離子)置換；或與有機鹼配位時形成的鹽。可接受之有機鹼包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、緩血酸胺、N-甲基葡糖胺及類似者。可接受之無機鹼包括氫氧化鋁、氫氧化鈣、氫氧化鉀、碳酸鈉、氫氧化鈉及類似者。醫藥學上可接受之鹽之對應相對離子可使用各種方法，包括但不限於離子交換層析法、離子層析法、毛細電泳法、感應耦合電漿、原子吸收光譜法、質譜分析或其任何組合來分析及鑑別。

【0149】 在一些實施例中，本發明之醫藥組合物包括多顆粒調配

物。在一些實施例中，醫藥組合物包括奈米粒子調配物。在一些實施例中，奈米粒子包含cMAP、環糊精及/或脂質。在一些情況下，奈米粒子包含固體脂質奈米粒子、聚合奈米粒子、自乳化型奈米粒子、脂質體、微乳液及/或膠束溶液。其他例示性奈米粒子包括但不限於：順磁奈米粒子、超順磁奈米粒子、金屬奈米粒子、富勒烯類材料、無機奈米管、樹狀體(諸如具有共價附接金屬螯合物)、奈米纖維、奈米角、奈米洋蔥(nano-onions)、奈米棒、奈米繩及/或量子點。在一些實施例中，奈米粒子為金屬奈米粒子，例如鈦、鈦、鈞、鉻、錳、鐵、鈷、鎳、銅、鋅、鈮、鋇、鋁、鈾、鈳、鈹、銀、鎘、鉛、鈹、鎢、錳、鐵、鉍、鉑、金、鈳、鋁、鎳、錫、鈦、鉛、鈹、鎂、鈣、鋇、鉍、鋰、鈉、鉀、硼、矽、磷、鍍、砷、銻及其組合、合金或氧化物之奈米粒子。

【0150】 可採用此項技術中認可之用於投與免疫接合物的任何方法。本發明之醫藥組合物通常適合於非經腸投與。如本文所用，醫藥組合物之「非經腸投與」包括特徵為個體之組織之物理突破及經由突破組織投與醫藥組合物，因此通常導致直接投藥至血流、肌肉或內部器官的任何投藥途徑。非經腸投藥因此包括但不限於藉由注射組合物、藉由經由手術切口施加組合物、藉由經由組織穿透性非手術傷口施加組合物及類似方式來投與醫藥組合物。特定言之，非經腸投與設想包括(但不限於)：皮下、腹膜內、肌內、胸骨內、靜脈內、動脈內、鞘內、心室內、尿道內、顱內、瘤內及滑膜內注射或輸注；及腎透析輸注技術。亦設想局部灌注。特定實施例包括靜脈內及皮下途徑。

5. 製品及套組

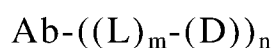
【0151】 本發明亦提供製品，例如套組，其包含含有本發明免疫接

合物之醫藥組合物，視情況其他生物活性分子(例如另一治療劑)及使用說明書的容器(例如單用途或多用途容器)。免疫接合物及其他生物活性分子可分開地封裝在適合包裝，諸如由非反應性玻璃或塑膠製得之小瓶或安瓿中。在某些實施例中，小瓶或安瓿容納包含免疫接合物或其他治療劑或生物活性分子的凍乾粉末。在某些實施例中小瓶或安瓿容納免疫接合物或生物活性分子之濃縮原料(例如2×、5×、10×或更多倍)。在某些實施例中，諸如套組之製品包括用於投與免疫接合物及/或生物活性分子之醫療裝置(例如注射器及針頭)；及/或適當稀釋劑(例如無菌水及標準生理鹽水)。本發明亦包括用於製造該等物品之方法。

6. 某些實施例

【0152】 在下文進一步說明本發明之某些實施例。

1. 一種具有下式之免疫接合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

i. Ab為結合ROR1蛋白之抗體或其抗原結合片段；

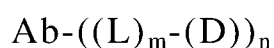
ii. L為連接子；

iii. D為選自以下之藥物部分體：抗微管蛋白劑、DNA烷基化劑、DNA交聯劑、DNA嵌入劑及RNA聚合酶II抑制劑；

iv. m為0或1；且

v. n為1至10之整數。

2. 一種具有下式之免疫接合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

i. Ab為結合ROR1蛋白之抗體或其抗原結合片段；

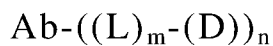
ii. L為可裂解連接子；

iii. D為選自以下之藥物部分體：抗微管蛋白劑、DNA烷基化劑、DNA交聯劑、DNA嵌入劑及RNA聚合酶II抑制劑；

iv. m為0或1；且

v. n為1至10之整數。

3. 一種具有下式之免疫接合物：



或其醫藥學上可接受之鹽，

其中：

i. Ab為結合ROR1蛋白之抗體或其抗原結合片段；

ii. L為連接子，其中連接子不附接於離胺酸胺基酸殘基；

iii. D為選自以下之藥物部分體：抗微管蛋白劑、DNA烷基化劑、DNA交聯劑、DNA嵌入劑及RNA聚合酶II抑制劑；

iv. m為0或1；且

v. n為1至10之整數。

4. 如實施例1至3中任一項之免疫接合物，其中D為抗微管蛋白劑。

5. 如實施例4之免疫接合物，其中抗微管蛋白劑包含奧瑞他汀、海兔毒素或其類似物。

6. 如實施例5之免疫接合物，其中奧瑞他汀或海兔毒素包含奧瑞斯他汀E、單甲基奧瑞他汀E (MMAE)或單甲基奧瑞他汀F (MMAF)、二甲基

纈胺酸-纈胺酸-多拉索因-多拉普因-苯丙胺酸-對苯二胺(AFP)、5-苯甲醯基戊酸-奧瑞斯他汀E酯(AEVB)或(AEB)。

7. 如實施例6之免疫接合物，其中奧瑞他汀包含單甲基奧瑞他汀E(MMAE)。

8. 如實施例4之免疫接合物，其中抗微管蛋白劑包含美登素、類美登素或其類似物。

9. 如實施例8之免疫接合物，其中類美登素包含安絲菌素、美登素/恩他新(DM1)或拉夫坦辛/索拉夫坦辛(DM4)。

10. 如實施例9之免疫接合物，其中類美登素包含美登素/恩他新(DM1)。

11. 如實施例9之免疫接合物，其中類美登素包含拉夫坦辛/索拉夫坦辛(DM4)。

12. 如實施例之免疫接合物，其中D為DNA烷基化劑。

13. 如實施例12之免疫接合物，其中DNA烷基化劑包含多卡黴素。

14. 如實施例1之免疫接合物，其中D為DNA交聯劑。

15. 如實施例14之免疫接合物，其中DNA交聯劑包含吡咯并苯并二氮呋(PBD)。

16. 如實施例1之免疫接合物，其中D為DNA嵌入劑。

17. 如實施例16之免疫接合物，其中DNA嵌入劑包含PNU-159682。

18. 如實施例1之免疫接合物，其中D為RNA聚合酶II抑制劑。

19. 如實施例18之免疫接合物，其中RNA聚合酶II抑制劑包含 α -瓢菌素。

20. 如實施例1之免疫接合物，其中D為共價連接之兩種不同藥物部

分體。

21. 如實施例20之免疫接合物，其中D為彼此共價連接之任何兩個或更多個DNA烷基化劑、交聯劑、DNA嵌入劑、RNA聚合酶II抑制劑或抗微管蛋白劑。

22. 如實施例1至21中任一項之免疫接合物，其中抗體或其抗原結合片段包含嵌合、人類化、經去免疫或人類抗體或其抗原結合片段。

23. 如實施例1至22中任一項之免疫接合物，其中抗體或抗原結合片段包含Fab、F(ab)₂或scFv。

24. 如實施例1至23中任一項之免疫接合物，其中該免疫接合物另外包含第二抗體或其抗原結合片段，其中該第二抗體或其抗原結合片段特異性結合於與該抗體或抗原結合片段不同的抗原決定基。

25. 如實施例1至24中任一項之免疫接合物，其中抗體或其抗原結合片段包含：

a. SEQ ID NO:7中所述之重鏈CDR1 (HCDR1)胺基酸序列、SEQ ID NO:8中所述之重鏈CDR2 (HCDR2)胺基酸序列、SEQ ID NO:9中所述之重鏈CDR3 (HCDR3)胺基酸序列、SEQ ID NO:10中所述之輕鏈CDR1 (LCDR1)胺基酸序列、SEQ ID NO:11中所述之輕鏈CDR2 (LCDR2)胺基酸序列及SEQ ID NO:12中所述之輕鏈CDR3 (LCDR3)胺基酸序列；

b. SEQ ID NO:27中所述之HCDR1胺基酸序列、SEQ ID NO:28中所述之HCDR2胺基酸序列、SEQ ID NO:29中所述之HCDR3胺基酸序列、SEQ ID NO:30中所述之LCDR1胺基酸序列、SEQ ID NO:31中所述之LCDR2胺基酸序列及SEQ ID NO:32中所述之LCDR3胺基酸序列；或

c. SEQ ID NO:37中所述之HCDR1胺基酸序列、SEQ ID NO:38中所

述之HCDR2胺基酸序列、SEQ ID NO: 39中所述之HCDR3胺基酸序列、SEQ ID NO:40中所述之LCDR1胺基酸序列、SEQ ID NO:41中所述之LCDR2胺基酸序列及SEQ ID NO:42中所述之LCDR3胺基酸序列。

26. 如實施例1至24中任一項之免疫接合物，其中抗體或其抗原結合片段包含：包含與SEQ ID NO:6中所述之胺基酸序列至少80%一致之胺基酸序列的重鏈可變區，及包含與SEQ ID NO:5中所述之胺基酸序列至少80%一致之胺基酸序列的輕鏈可變區。

27. 如實施例1至26中任一項之免疫接合物，其中抗體以小於約40 nM之 K_D 結合ROR1。

28. 如實施例1至26中任一項之免疫接合物，其中抗體以小於約1 nM之 K_D 結合ROR1。

29. 如實施例1至26中任一項之免疫接合物，其中抗體以大於抗體D10之親和力約10倍之親和力結合ROR1，其中抗體D10包含SEQ ID NO:25中所述之免疫球蛋白輕鏈胺基酸序列，及SEQ ID NO:26中所述之免疫球蛋白重鏈胺基酸序列。

30. 如實施例1至26中任一項之免疫接合物，其中抗體以大於抗體D10之親和力約50倍之親和力結合ROR1，其中抗體D10包含SEQ ID NO:25中所述之免疫球蛋白輕鏈胺基酸序列，及SEQ ID NO:26中所述之免疫球蛋白重鏈胺基酸序列。

31. 如實施例1至30中任一項之免疫接合物，其中L選自：可裂解連接子、不可裂解連接子、親水性連接子、促帶電連接子(procharged linker)及二甲酸類連接子。

32. 如實施例1至31中任一項之免疫接合物，其中L選自：6-順丁烯二

醯亞胺基己醯基(MC)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(MP)、纈胺酸-瓜胺酸(VC)、丙胺酸-苯丙胺酸(AP)、對胺基苯甲氧基羰基(PAB)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)、N-丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)、N-丁二醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)、6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(MC-VC)、6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)及N-丁二醯亞胺基-1-甲酸酯-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(SC-VC-PAB)。

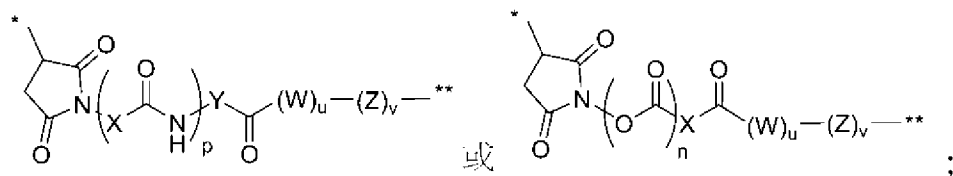
33. 如實施例1至31中任一項之免疫接合物，其中L為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)。

34. 如實施例1至31中任一項之免疫接合物，其中L為N-丁二醯亞胺基-1-甲酸酯-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(SC-VC-PAB)。

35. 如實施例1至31中任一項之免疫接合物，其中L為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(MC-VC)。

36. 如實施例1至31中任一項之免疫接合物，其中L為N-丁二醯亞胺基4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(SMCC)。

37. 如實施例1至31中任一項之免疫接合物，其中L為具有下式之連接子：

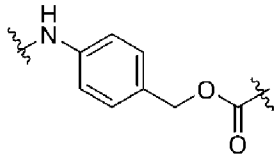


其中

X為C₂₋₈烷基；

Y為-(CH₂CH₂O)_qCH₂CH₂-；

W為胺基酸單元；



Z為

n為0或1；

p為0或1；

q為0至12之整數；

u為0至5之整數；且

v為0或1；其中**表示與D之連接點；且

*表示與Ab之連接點。

38. 如實施例37之免疫接合物，其中X為 $-(CH_2)_2-$ 。

39. 如實施例37之免疫接合物，其中X為 $-(CH_2)_3-$ 。

40. 如實施例37之免疫接合物，其中X為 $-(CH_2)_4-$ 。

41. 如實施例37之免疫接合物，其中X為 $-(CH_2)_5-$ 。

42. 如實施例37至41中任一項之免疫接合物，其中p為0。

43. 如實施例37至41中任一項之免疫接合物，其中p為1。

44. 如實施例37至43中任一項之免疫接合物，其中q為4至8之整數。

45. 如實施例37至43中任一項之免疫接合物，其中q為4。

46. 如實施例37至43中任一項之免疫接合物，其中q為8。

47. 如實施例37至46中任一項之免疫接合物，其中n為0。

48. 如實施例37至46中任一項之免疫接合物，其中n為1。

49. 如實施例37至48中任一項之免疫接合物，其中v為0。

50. 如實施例37至48中任一項之免疫接合物，其中v為1。

51. 如實施例37至50中任一項之免疫接合物，其中u為2至4之整數。

52. 如實施例37至51中任一項之免疫接合物，其中W選自：丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、脯胺酸、受乙醯基或甲醯基保護或不受保護的離胺酸、精胺酸、受甲苯磺醯基或硝基保護或不受保護的精胺酸、組氨酸、鳥胺酸、受乙醯基或甲醯基保護的鳥胺酸及瓜胺酸。

53. 如實施例37至52中任一項之免疫接合物，其中u為0。

54. 如實施例1至53中任一項之免疫接合物，另外包含處於L與D之間之間隔子。

55. 如實施例1至54中任一項之免疫接合物，其中免疫接合物另外包含至少一種其他具有式-(((L)_m-(D))_n)_x-之連接子-藥物部分體，其中：

L為連接子；

D為選自以下之藥物部分體：抗微管蛋白劑、DNA烷基化劑、DNA交聯劑、DNA嵌入劑或RNA聚合酶II抑制劑；

m為0或1；

n為1至10之整數；且

x為1至10之整數。

56. 一種醫藥組合物，其包含如實施例1至55中任一項之免疫接合物及醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑。

57. 如實施例56之醫藥組合物，其中醫藥組合物經調配用於靜脈內投與。

58. 如實施例56之醫藥組合物，其中醫藥組合物經調配用於皮下投與。

59. 一種治療癌症之方法，其包含向有需要之個人投與治療性劑量之

如實施例1至55中任一項之免疫接合物或如實施例56至58中任一項之醫藥組合物。

60. 一種如實施例1至55中任一項之免疫接合物或如實施例56至58中任一項之醫藥組合物之用途，其用於治療癌症。

61. 如實施例59之方法或如實施例60之用途，其中癌症表現ROR1。

62. 如實施例61之方法或用途，其中癌症選自：淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病、小淋巴球性淋巴瘤、邊緣細胞B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、腎細胞癌、結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、上皮鱗狀細胞癌、黑素瘤、骨髓瘤、胃癌、腦癌、肺癌、胰臟癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、睪丸癌、甲狀腺癌及頭頸癌。

63. 一種治療患有癌症之個人之方法，方法包含個人投與：

- a. 如實施例1至55中任一項之免疫接合物；及
- b. 其他治療劑。

64. 如實施例63之方法，其中其他治療劑包含：阿卡拉布魯替尼、艾德昔布、賽泮替布、帕瑞替尼、ABT-199、布帕昔布、依維莫司、BEZ235、盧佐替尼、福他替尼、利妥昔單抗、來那度胺、太平洋紫杉醇、長春新鹼、依魯替尼、埃羅替尼、克卓替尼、卡鉑、奧沙利鉑/順鉑、貝伐單抗或吉西他濱。

65. 如實施例63或64之方法，其中癌症表現ROR1。

66. 如實施例65之方法，其中癌症包含：淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病、小淋巴球性淋巴瘤、邊緣細胞B細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、腎細胞癌、結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、上皮鱗狀細胞癌、黑素瘤、骨髓瘤、胃癌、腦癌、肺癌、胰臟癌、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺

癌、睪丸癌、甲狀腺癌及頭頸癌。

67. 如實施例63至66中任一項之方法，其中向患有癌症之個人分開地投與免疫接合物與其他治療劑。

68. 一種醫藥組合物，其包含如實施例1至55中任一項中所描述之免疫接合物及如實施例64中所描述之其他治療劑。

69. 如實施例68之醫藥組合物，其用於如實施例63至67中之任一項之方法中。

70. 一種套組，其包含如實施例1至55中任一項中所描述之免疫接合物及如實施例64中所描述之其他治療劑，其中該免疫接合物及其他治療劑在適合封裝中。

71. 如實施例70之套組，其用於如實施例63至67中之任一項之方法中。

【0153】 除非上下文另有要求，否則在本說明書及申請專利範圍中，「包含 (comprise)」一詞及其變化形式(諸如「包含 (comprises/comprising)」)應以開放、包含性含義理解，亦即「包括但不限於」。除非上下文另外清晰指示，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個參考物。亦應注意除非內容明確指示，否則術語「或」通常以其包括「及/或」含義而採用。如本文所用之術語「約」係指在特定用法之情況內自所陳述之數值加或減10%、5%或1%的數值範圍。另外，本文中所提供之標題僅係為方便起見，而不解釋所主張之實施例之範疇或含義。

【0154】 本文中所提及之所有公開案和專利均以全文引用之方式併入本文中，以達成描述及揭示例如該等公開案中所描述之構築體及方法之

目的，該等構築體及方法可結合當前所描述之發明一起使用。本文中論述之公開案僅僅提供在本申請案之申請日之前的揭示內容。不應將本文中之任何內容理解為承認由於先前發明或因任何其他原因，本發明之本發明人無權先於此類揭示內容。

【0155】 除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語具有與本文中所描述之發明所屬之領域中一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。可使用類似或等效於本文中所描述之方法、裝置及材料的任何方法、裝置及材料來實踐或測試本文中所描述之發明。

實例

【0156】 以下實例說明本發明之代表性實施例且不意圖以任何方式限制。

實例1：例示性免疫接合物之合成

ADC-A、C及H至P中之Ab1半胱胺酸之接合

【0157】 以多個規模(2 mg、30 mg及350 mg)進行Ab1與MC-VC-PAB-MMAE (ADC-A)之接合，得到類似結果。對於最小規模，在37°C下之水浴中用2.50當量(eq)之於接合緩衝溶液中之三(2-羧基乙基)膦(TCEP，5 mM)處理2 mg Ab1 (於PBS中10 mg/mL，pH 6.5) 2小時。PBS緩衝液含有15.75 mM Na₂HPO₄、34.25 mM NaH₂PO₄、2 mM EDTA及50 mM NaCl，pH 6.5。隨後，將反應冷卻至4°C。接下來，添加7 eq 於N,N-二甲基乙醯胺(DMA)中之MC-VC-PAB-MMAE且將混合物置於4°C下另外1小時。藉由使用旋轉脫鹽管柱(40 kD，0.5 mL)用20 mM組胺酸，pH 5.5 (MMAE緩衝液)更換緩衝液。使用HIC-HPLC、SEC-HPLC、RP-HPLC及UV/Vis測定每抗體分子所連接之MMAE藥物分子之數目(DAR)且概述於

表4中。所有規模得到一致結果，視所使用之方法而定，DAR平均處於3.89至5.09範圍內。

表4 ADC-A之特徵化

規模 (mg)	聚集(%)	恢復(%)	D0* (%)	DAR			
				UV	SEC	HIC	RP
2	3.47	85.6	6.06	4.33	4.81	3.95	3.89
30	3.50	86.1	4.75	4.44	5.09	4.21	4.09
350	3.51	90.2	5.12	4.40	4.96	4.12	3.99

* D0：未接合的抗體。

【0158】 其他連接子及有效負載(ADC-C及ADC-H至ADC-P)以類似方式與Ab1接合，且所得DAR概述於表5中。

表5 其他ADC構築體之平均DAR

構築體	DAR	方法
ADC-C	6.33	UV
	6.62	SEC
	3.97	HIC
	4.15	RP
	4.24	MS
ADC-H	1.98	UV
	1.93	SEC
ADC-I	4.1	SEC/UV
ADC-J	2.1	HIC
ADC-K	1.9	PLRP
ADC-L	3.9	HIC
ADC-M	4.1	HIC
ADC-N	4.1, 1.9	PLRP
ADC-O	1.8	SEC
ADC-P	1.9	PLRP

2. ADC-B、E及F中之Ab1離胺酸之接合

【0159】 將於PBS中之Ab1 (pH 6.5)與於DMA中之SC-VC-PAB-MMAE (ADC-E)或SC-VC-PAB-DM1 (ADC-F)組合且在22°C下置放在10 rpm下之旋轉平台上2至4小時。對於ADC-B，將於PBS中之Ab1 (pH 7.0)與SMCC-DM1組合且在22°C下置放在10 rpm下之旋轉平台上2至4小時。使用Amicon超過濾(50 kDa, 0.5mL)經由緩衝液更換移除未反應的有效負

載。將ADC-B更換為20 mM丁二酸(pH 5.0)。使用SEC-HPLC、MS及UV/Vis測定DAR值且概述於表6中。當以約11 eq使用連接子-有效負載時，在4小時培育之後DAR接近4.0。

表6 ADC-B、ADC-E及ADC-F之特徵化

構築體	規模 (mg)	聚集(%)	恢復(%)	D0 (%)	DAR		
					UV	SEC	MS
ADC-B	80	2.93	-	5.86	3.18	3.20	3.0
ADC-E	60	3.94	82.1	1.85	5.08	6.14	4.2
ADC-F	75	2.92	59.0	7.44	5.51	5.72	3.0

3. ADC-Q及R中之Ab1之定點接合

【0160】 使用定點接合技術合成ADC-Q及ADC-R (Dennler等人, *Bioconjugate Chemistry*, 25(3):569-578 (2014) 及美國專利公開案2016/0022833)。首先將Ab1藉由在37°C下與6 U/毫克蛋白質之N-糖苷酶F (PNGase F)一起培育隔夜來去糖基化。去糖基化的抗體藉由蛋白A層析來純化且經調配用於細菌轉麩醯胺酸酶修飾反應。接下來，將每麩醯胺酸10-40 eq之11-疊氮-3,6,9-三氧雜十一烷-1-胺(疊氮-PEG3-胺)添加至1至5 mg/ml之於PBS中之Ab1 (pH 7.4)中，且藉由添加2至6 U/mL之微生物轉麩醯胺酸酶開始反應且在37°C下培育隔夜。隨後，藉由蛋白A層析移除過量疊氮-PEG3-胺。最後，將50至200 μ M含有二苯甲基環辛炔(DBCO)的藥物有效負載(每疊氮基1.25至5 mol當量)添加至20 μ M經疊氮活化的Ab1中且在室溫下培育0.5至6小時，形成經由三唑部分連接之Ab1-有效負載結合物。移除過量含DBCO的有效負載。以此方式合成之ADC之特徵化顯示ADC-Q之DAR為4.4且ADC-R之DAR為2.1 (表7)。

表7 其他ADC構築體之平均DAR

構築體	DAR	方法
ADC-Q	4.4	HIC
ADC-R	2.1	PLRP

實例2：抗體及免疫接合物與ROR1-陽性細胞結合

【0161】 評估抗體Ab1及4A5以及衍生自彼等抗體之ADC構築體(ADC-A及ADC-T)與腫瘤細胞之結合。首先，測試Ab1與代表不同癌症類型之兩種ROR1-陽性人類腫瘤細胞株之結合。來自套細胞淋巴瘤之Jeko-1細胞株，為懸浮細胞株，而來自三陰性乳癌之MDA-MB-231細胞株為附著細胞株。細胞株具有不同ROR1表現量，其中Jeko-1細胞展示約13507個細胞表面複本且MDA-MB-231細胞展示約21015個細胞表面複本。Jeko-1 (ATCC目錄號CRL-3006)細胞株及MDA-MB-231 (ATCC目錄號CCL-227)細胞株購自美國菌種保藏中心(American Type Culture Collection)且根據ATCC建議保持。

【0162】 Jeko-1細胞(圖2A)或MDA-MB-231細胞(圖2B)與0 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL或1000 ng/mL之Ab1一起在冰上培育20分鐘。在洗除未結合抗體之後，將細胞與經藻紅素(PE)標記之二級抗人類IgG抗體再一起培育20分鐘。使用BDFACS Verse分析儀及FlowJo V10軟體來量測PE螢光之量。以最高濃度之PE信號用作最大結合信號來計算%最大結合。使用GraphPad Prism 7計算EC₅₀。受體結合分析結果為在Jeko-1細胞中EC₅₀值為13.6 ng/ml且在MDA-MB-231細胞中EC₅₀值為32.8 ng/ml。

【0163】 接下來，比較Ab1之結合性與ADC-A之結合性(圖2A及圖2B)。在Jeko-1細胞株及MDA-MB-231細胞株二者上比較結合性。ADC-A與Jeko-1細胞(圖2A，方塊)及MDA-MB-231細胞(圖2B，方塊)之結合性極類似與未接合的親本抗體Ab1之結合性(圖2A，17 ng/mL對比13.6 ng/mL，及圖2B，48.5 ng/mL對比32.8 ng/mL)。未接合的Ab1與ADC-A

之 EC_{50} 值之間之相似性表明藥物接合對Ab1與靶細胞之結合具有最小影響。

【0164】 比較Ab1之結合性與4A5 (一種抗體，其在ROR1上結合之抗原決定基不同於Ab1所結合之抗原決定基)之結合性(圖3A)。Ab1 ($EC_{50}=16.39$ ng/mL；圖3A，空心圓)結合Jeko-1細胞之親和力 (affinity/avidity)高於4A5 ($EC_{50}=120.6$ ng/mL；圖3A，空心方塊)。比較ADC構築體之結合性與對應的未接合的親本抗體之結合性(Ab1對比ADC-A且4A5對比ADC-T)。ADC-A以21.57 ng/mL之 EC_{50} 結合而ADC-T以192.7 ng/mL之 EC_{50} 結合。未接合的抗體與對應的ADC構築體之 EC_{50} 值之間之相似性再次表明藥物接合對抗體與靶細胞之結合具有最小影響。

【0165】 在不同實驗中，亦比較Ab1與Jeko-1細胞之結合性與D10 (一種結合在與Ab1相同之抗原決定基上的較低親和力抗體)之結合性(圖3B)。Ab1 ($EC_{50}=16.5$ ng/mL；圖3B，空心圓)結合Jeko-1細胞之親和力 (affinity/avidity)高於D10 ($EC_{50}=250$ ng/mL；圖3B，空心三角形)。此外，比較ADC構築體之結合性與對應的未接合的親本抗體之結合性(Ab1對比ADC-A且D10對比ADC-S)。ADC-A以22.1 ng/mL之 EC_{50} 結合(圖3B，實心圓)而ADC-S以150 ng/mL之 EC_{50} 結合(圖3B，實心三角形)。未接合的抗體與對應的ADC構築體之 EC_{50} 值之間之相似性再次表明藥物接合對抗體與靶細胞之結合具有最小影響。

【0166】 以類似方式，評估所有其他ADC構築體與ROR1-陽性細胞之結合。發現本文中所描述之所有構築體均結合ROR1-陽性細胞。

實例3：ROR1抗體及免疫接合物之內化

【0167】 使用多個方法測定抗體內化。在一種方法中，使用定量非

內化的細胞表面抗體之脈衝追蹤方法在15分鐘、30分鐘、60分鐘、120分鐘及240分鐘時使用流式細胞測量術來量測內化。在匯合之前生長且收集Jeko-1細胞，用冷PBS洗滌且以 1×10^7 再懸浮於冷FACS緩衝液(PBS+2% FBS-Fisher/Gibco目錄號16140071)中。將 1×10^6 細胞添加至微量離心機管或孔中。在飽和抗體濃度下對於Jeko-1細胞使用30 $\mu\text{g/ml}$ 且對於MDA-MB-231細胞使用100 $\mu\text{g/ml}$ 來測定細胞對Ab1及ADC構築體之內化。製備ADC構築體或Ab1之10 \times 儲備溶液(300 $\mu\text{g/ml}$ 用於與Jeko-1細胞一起使用或1 mg/ml用於與MDA-MB-231細胞一起使用)，且將10 μL 樣品或緩衝液對照組添加至以下中(對於各時間點添加額外管)：

- a) 未染色的
- b) 僅二級抗體
- c) 30 $\mu\text{g/ml}$ 之陰性對照hIgG mAb，時間0
- d) 30 $\mu\text{g/ml}$ 之陽性對照組ADC構築體或Ab1，時間0
- e) ADC構築體或Ab1，時間點1
- f) ADC構築體或Ab1，時間點2，等等。

【0168】將細胞及抗體在冰上培育20分鐘，以300 $\times\text{g}$ 旋轉4分鐘，用200 μL FACS緩衝液洗滌兩次，且再懸浮於100 μL FACS緩衝液中。如上文所指示，將樣品在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培育15分鐘、30分鐘、60分鐘、120分鐘及240分鐘。藉由將樣品轉移至冰上終止內化。如上文所描述地用於各測試物品給出抗體內化時間過程，之後使用經PE標記之二級抗體偵測殘留在細胞表面上之抗體。在250 $\times\text{g}$ 下旋轉細胞，用FACS緩衝液洗滌兩次，且再懸浮於100 μL FACS緩衝液中。將二級抗體(山羊抗人類IgG-PE，Fc- γ 特異性，eBiosciences，目錄號12-4998)在FACS緩衝液中 1:2000稀釋

(10×原料)且以10 μ L/管添加至適當管中。將細胞在冰上培育20分鐘，用FACS緩衝液洗滌兩次，且再懸浮於100 μ L固定緩衝液(於PBS中之4%多聚甲醛)中。隨後，進行FACS分析。定量中值螢光強度(median fluorescent intensity, MFI)且使用在各時間點存在之抗體或ADC之量與在時間=0時存在之量比較來確定受體內化之程度。虛線代表背景染色(僅二級抗體)。

【0169】 Ab1結合於Jeko-1 (圖4A)及MDA-MB-231 (圖4B)細胞兩者且經其快速內化。在MDA-MB-231之情況中在少於60分鐘內觀測到經結合的抗體內化80%至90%，或在Jeko-1之情況中在少於120分鐘內觀測到此結果。值得注意的是，對Ab1添加之連接子及有效負載未對結合或內化造成不利影響，如藉由ADC-A及ADC-B (圖4A，比較ADC-A及ADC-B與Ab1，及圖4B，比較ADC-A與Ab1)所顯示。

【0170】 以類似方式，使用Jeko-1細胞評估具有不同連接子及有效負載之其他ADC構築體之內化特徵。相比於Ab1，所有構築體展現類似內化動力學，與上文觀測結果一致，即所使用之連接子及有效負載不影響抗體特徵(資料未示出)。

【0171】 吾人亦利用識別與Ab1不同之抗原決定基但具有與ADC-A之連接子及有效負載化學性質一致之彼等的ROR1抗體(4A5)評估ADC構築體(ADC-T)的內化特性。ADC-T結合Jeko-1細胞但以較慢速率內化且程度比ADC-A小(資料未示出)。此等資料表明了抗體及其抗原決定基在決定ADC構築體之內化特性方面之重要性。

【0172】 亦使用習知免疫螢光染色方法及MDA-MB-231細胞表徵Ab1之內化。在此方法中，在細胞表面負載Ab1，且隨後將細胞固定且定

量表面Ab1。此外，滲透細胞之第二樣品且定量總Ab1 (表面及胞內)。在此方案中，使初級抗體在無二級抗體之情況下培育，排除二級抗體可能影響內化之可能性。觀測到表面染色。在滲透之後，觀測到Ab1之清晰且明顯的點狀胞內染色。另外，藉由利用溶酶體特異性追蹤器，顯示出內化的Ab1與溶酶體路徑共定位。此研究結果與主要藉由溶酶體/內體路徑進行之抗體內化之模式一致 最後，定量內化之速率。當使細胞連續暴露於Ab1時，初始速率約為平均速率之兩倍，且最終速率約為平均速率之一半(圖5)。此表示存在清除細胞表面受體之初始快速期，接著新表現在細胞表面上之結合及內化受體之較慢過程。新表現的細胞表面受體可自胞內儲存區再循環、表現及/或新合成。Ab1之共定位之程度及特徵與EGFR相似，在4小時之後基本上顯示溶酶體共定位。

實例4：細胞表面ROR1表現之量測

【0173】 使用脈衝追蹤方法(其在各個時間點(2分鐘、5分鐘、10分鐘、15分鐘、20分鐘、30分鐘、60分鐘、120分鐘及240分鐘)偵測非內化的細胞表面抗體)來量測抗體之內化。在此研究中，除量測非內化的細胞表面抗體以外，藉由(1)使用Ab1及二級抗體再染色或(2)藉由使用識別與Ab1之抗原決定基不同之抗原決定基的第二經標記的抗ROR1抗體來定量ROR1在細胞表面上之表現。

【0174】 對於第一方法，如實例3中所描述地進行Ab1在Jeko-1細胞上之內化(將一個樣品在各時間點進行處理以定量殘留在細胞表面上之抗體)。此外，在各時間點使用飽和含量之Ab1 (30 µg/mL)快速再染色第二樣品同時在冰上保持細胞。隨後，洗滌細胞且使用與內化量測所使用之相同的二級抗體定量表面抗體。如先前所示，Ab1被快速內化(圖6，方塊)。

相比之下，雖然細胞表面ROR1之定量最初顯示在頭10分鐘內有小幅降低，後續量測表示ROR1表面表現恢復至初始量或或略微更高量(圖6，圓)。此等資料與之ROR1向與抗體分離之細胞表面之再循環一致，或與ROR1經由從頭合成或胞內儲存區遷移之快速上調一致。使用Jeko-1 (圖7A)細胞、MDA-MB-468 (圖7B)細胞及MDA-MB-231 (圖7C)細胞重複此實驗，得到類似結果。

【0175】 測試量測細胞表面ROR1表現結合Ab1內化研究之替代方法。特定言之，在0、0.5小時、1小時、2小時及4小時時藉由直接使用結合與Ab1之抗原決定基不同之抗原決定基的經標記的抗ROR1抗體染色細胞來定量細胞表面ROR1表現。評估ROR1在經ADC-A、M、N及P處理之Jeko-1細胞上之表面表現。與使用前述方法得到之結果一致，雖然細胞經基於Ab1之ADC構築體處理，但ROR1表現保持或略微增加(資料未示出)。

【0176】 此等資料表明Ab1及其免疫接合物可藉由ROR1-陽性細胞有效地內化。另外，ROR1在細胞表面上之持續表現表明ROR1為用於經由本發明之ADC傳遞細胞毒性劑至癌細胞之極佳目標。

實例5：活體外免疫接合物之效力

【0177】 此實例分析具有不同細胞毒性部分及連接子化學性質之ADC-A、B、C、E及F免疫接合物。在細胞培養物中測試藉由此等結合物之ROR1結合以定義各個連接子-細胞毒性劑組合之效力。測試三種不同類型之癌細胞株：B-淋巴瘤細胞株TMD-8、HBL-1及DOHH2；三陰性乳癌細胞株HCC1187、MDA-MB-468、Bt549；及卵巢癌細胞株A2008、TOV112D、JHOM1及SKOvr3。

【0178】以對數期生長培養細胞且分配至96孔盤中。以處於 5×10^3 至 50×10^4 個細胞/孔之範圍內之略微不同的細胞密度接種各細胞株。在 37°C 且5% CO_2 下使用3倍連續稀釋之特定免疫接合物(10、3.33、1.11、0.37、0.12、0.041、0.014及0.0045 μM)一式兩份培育細胞72小時。處理之後，使用相等體積之CellTiter-Glo®試劑(Promega有限公司)在室溫下培育細胞15分鐘且藉由光度計確定活力。在GraphPad Prism中使用反曲劑量響應非線性回歸擬合生成曲線及 EC_{50} 值。來自此等實驗之資料概述於表8中。圖8A至圖8I顯示針對指定細胞株測試之所有五種免疫接合物之代表性 IC_{50} 曲線。

表8 活體外例示性免疫接合物之細胞毒性*

癌症類型	細胞株	ADC-A	ADC-B	ADC-C	ADC-E	ADC-F
B細胞淋巴瘤	TMD-8	122	50	>1000	94.3	>1000
	HBL-1	118	70.1	>1000	147	>1000
	DOHH2	129	78.3	>1000	89.6	>1000
三陰性乳癌	HCC1187	6.8	6.2	>1000		>1000
	MDA-MB-468	23.5	18.8	>1000	80.1	>1000
	Bt549	13.5	20.2	>1000	74.4	>1000
卵巢癌	A2008	125	49	>1000		>1000
	TOV112D	62.4	34.2	>1000	57.8	>1000
	JHOM1	15.6	24.3	>1000	32.9	>1000
	SKOvr3	62.6	78.7	>1000	200.6	>1000

*表示為以nM為單位之 IC_{50} 之資料。空細胞：不進行。

實例6：關於活體外免疫接合物之效力之其他資料

【0179】此實例展示關於各種ADC誘導各種癌細胞株之細胞死亡之效力的其他資料。如實例5中所描述地生長細胞且將其分配至96孔盤中。在 37°C 且5% CO_2 下使用3倍連續稀釋之特定免疫接合物(660、220、73.3、24.4、8.14、2.71、0.91及0.3 nM)一式兩份培育細胞72小時。在一些實驗中，使用免疫接合物培育細胞96小時而非72小時(值使用「*」突出顯示)。處理之後，如實例5中所描述地測定細胞活力。來自此等實驗之資

料概述於以下表9.1至表9.17中。藉由定量型流式細胞測量術評估細胞表面ROR1表現，且ROR1表現特徵化為MFI>30或MFI<30 (MFI：平均螢光強度)。資料表明，在本文中所描述之細胞死亡分析中，表現ROR1之有效負載敏感型癌細胞對多種所測試之ADC作出反應。雖然多種ADC反應性癌細胞之ROR1表現量高(MFI>30)，一些ROR1表現量較低(MFI<30)之細胞亦對某些ADC敏感。

【0180】 將衍生自處於前淋巴細胞轉型之B慢性淋巴球性白血病之MEC1細胞株使用編碼人類ROR1之表現載體或對照組載體轉染，且使用含有G418之選擇培養基產生穩定細胞株。在自無血清培養基轉移至完全生長培養基之後16小時時，相比於經對照組轉染的細胞，ROR1轉染的MEC1細胞具有顯著更大比例之細胞處於S/G2/M，意味著ROR1表現提高了正經歷細胞分裂之細胞之相對比例。與此一致，在自無血清培養基轉移之後≥48小時時，相比於同等地接種之MEC1細胞(其不表現ROR1)之培養物，ROR1⁺ MEC1細胞具有顯著更大數目之細胞。相對於經對照組載體轉染的MEC1細胞，在被製成表現ROR1之MEC1細胞中亦觀測到p-AKT及p-CREB之含量提高。

表9.1 活體外ADC-A之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-A 結合K _D (nM)	ADC-A EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)	ROR1表現
Mec-載體	CLL		558	0.5	MFI<30
Mec-ROR	CLL		208	0.6	MFI>30
Jeko-1	MCL	0.10	22.4*, 40.4*, 186.7	<0.0001	MFI>30
Mino	MCL		19.5, 27.7*	<0.0001	MFI>30
TMD-8	DLBCL		122*	<0.0001	MFI<30
HBL-1	DLBCL		118*	<0.0001	MFI>30
DOHH2	DLBCL		129, 48.3*	0.007	MFI>30
OCI-Ly18	DLBCL		95	0.003	MFI>30
U2932	DLBCL		176	0.006	MFI<30
OCI-Ly19	DLBCL		199		
WSU-DLCL	DLBCL		68	0.06	MFI>30
KMS-PE	MM		43.3, 89		

細胞株	癌症類型	ADC-A 結合K _D (nM)	ADC-A EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)	ROR1表現
RPMI-8229	MM		174		
OPM2	MM		123		
L363	MM		244		
NCI-H929	MM		179		
HCC1187	TNBC		2.3*, 6.8	<0.0001	MFI>30
HCC1806	TNBC		13.4*, 38.1	<0.0001	MFI>30
MDA-MB-468	TNBC		23.4, 21.7*, 82.5, 23.5*	<0.0001	MFI>30
MDA-MB-231	TNBC	0.32	58.4*, 106, 46.7*	<0.0001	MFI>30
Bt549	TNBC		13.5	0.047	MFI>30
Hs578T	TNBC		22.9	<0.0001	
DU4475	TNBC		248	2.5	MFI>30
HCC1937	TNBC		>1,000	>1,000	MFI>30
MCF-7	乳癌		198.4*, 289.0, >1000*	<0.0001	MFI<30
H1975	NSCLC		9.7	<0.0001	MFI>30
H460	NSCLC		61.5	<0.0001	MFI>30
A549	NSCLC		53.4	0.06	MFI>30
Hep-G2	HCC		>1,000	>1,000	
A4573	EWS		15.3	<0.0001	MFI>30
SKES	EWS		15.3	0.03	MFI>30
U2OS	OS		223	1.2	MFI>30
HOS	OS		126, 148	0.06	MFI>30
SAOS	OS		15.6, 26.3	0.05	MFI>30
FaDu	HN		>1,000	>1,000	
A2008	卵巢癌		125	0.03	
OvCar4	卵巢癌		283	24.2	MFI>30
TOV112D	卵巢癌		62.4	0.04	MFI>30
JHOM1	卵巢癌		15.6	0.01	MFI>30
SKOvr3	卵巢癌		62.6	0.01	MFI>30
ES2	卵巢癌		170	1.1	MFI>30
A2780	卵巢癌		64	0.08	MFI>30
Bx-PC3	胰臟癌		47.4	0.04	MFI>30
As-PC1	胰臟癌		>1,000	0.04	MFI>30
Ramos	伯基特氏		649.8	<0.0001	MFI<30

表9.2 活體外ADC-E之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-E EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	94.3	<0.0001
HBL-1	DLBCL	147	<0.0001
DOHH2	DLBCL	89.6	0.007
HCC1187	TNBC		<0.0001
MDA-MB-468	TNBC	80.1	<0.0001
Bt549	TNBC	74.4	0.047
A2008	卵巢癌		0.03
TOV112D	卵巢癌	57.8	0.04
JHOM1	卵巢癌	32.9	0.01
SKOvr3	卵巢癌	200.6	0.01

表9.3 活體外ADC-B之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-B EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	50	1.4
HBL-1	DLBCL	70.1	9.3
DOHH2	DLBCL	78.3	1.78
OCI-Ly18	DLBCL	40	
U2932	DLBCL	53.9	
OCI-Ly19	DLBCL	40	
WSU-DLCL	DLBCL	>1,000	
KMS-12PE	MM	72	
RPMI-8229	MM	91	
OPM2	MM	108	
L363	MM	177	
NCI-H929	MM	90	
HCC1187	TNBC	6.2,25.1	3.9
HCC1806	TNBC	23.1	
MDA-MB-468	TNBC	18.8, 70.1	15.2
MDA-MB-231	TNBC	67.5	
Bt549	TNBC	20.2	0.047
Hs578T	TNBC	11.7	
DU4475	TNBC	105	
HCC1937	TNBC	>1,000	
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌	>1,000	
A2008	卵巢癌	49	
OvCar4	卵巢癌	291	>1,000
TOV112D	卵巢癌	34.2	2.4
JHOM1	卵巢癌	24.3	0.01
SKOvr3	卵巢癌	78.7	9.1
ES2	卵巢癌	117	
A2780	卵巢癌	36	

表9.4 活體外ADC-C之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-C EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	>1,000	1.4
HBL-1	DLBCL	>1,000	9.3
DOHH2	DLBCL	>1,000	1.78
HCC1187	TNBC	>1,000	3.9
MDA-MB-468	TNBC	>1,000	15.2
Bt549	TNBC	>1,000	0.047
A2008	卵巢癌	>1,000	
TOV112D	卵巢癌	>1,000	2.4
JHOM1	卵巢癌	>1,000	0.01
SKOvr3	卵巢癌	>1,000	9.1

表9.5 活體外ADC-F之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-F EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
TMD-8	DLBCL	>1,000	1.4

細胞株	癌症類型	ADC-F EC ₅₀ (nM)	DM1 EC ₅₀ (nM)
HBL-1	DLBCL	>1,000	9.3
DOHH2	DLBCL	>1,000	1.78
HCC1187	TNBC	>1,000	3.9
MDA-MB-468	TNBC	>1,000	15.2
Bt549	TNBC	>1,000	0.047
A2008	卵巢癌	>1,000	
TOV112D	卵巢癌	>1,000	2.4
JHOM1	卵巢癌	>1,000	0.01
SKOvr3	卵巢癌	>1,000	9.1

表9.6 活體外ADC-H之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-H EC ₅₀ (nM)	阿那非德 EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	170	
MDA-MB-231	TNBC	>1,000	
A549	NSCLC	>1,000	>1,000
Hep-3B	HCC	>1,000	>1,000

表9.7 活體外ADC-I之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-I EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	>1000
DOHH2	DLBCL	>1000
KMS-PE	MM	266
MDA-MB-468	TNBC	>1000
MDA-MB-231	TNBC	>1000
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌	>1,000
A549	NSCLC	>1,000
Hep-G2	HCC	>1,000
U2OS	OS	>1,000
FaDu	HN	>1,000

表9.8 活體外ADC-J之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-J EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	59.35
DOHH2	DLBCL	5.975
KMS-PE	MM	362
MDA-MB-468	TNBC	146
MDA-MB-231	TNBC	>1000
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌	268
A549	NSCLC	>1,000
Hep-G2	HCC	>1,000
U2OS	OS	>1,000
FaDu	HN	658.5

表9.9 活體外ADC-K之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-K EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	761.5

細胞株	癌症類型	ADC-K EC ₅₀ (nM)
DOHH2	DLBCL	247
KMS-PE	MM	1,000
MDA-MB-468	TNBC	>1000
MDA-MB-231	TNBC	>1000
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌	363
A549	NSCLC	>1,000
Hep-G2	HCC	>1,000
U2OS	OS	>1,000
FaDu	HN	>1,000

表9.10 活體外ADC-L之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-L 結合K _D (nM)	ADC-L EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
Mec-載體	CLL		535	0.5
Mec-ROR	CLL		192	0.6
Jeko	MCL	0.15	81.1	<0.0001
Mino	MCL		20.5	<0.0001
MDA-MB-468	TNBC		141.5	<0.0001
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		232.5*	<0.0001

表9.11 活體外ADC-M之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-M 結合K _D (nM)	ADC-M EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
Mec-載體	CLL		569	0.5
Mec-ROR	CLL		170	0.6
Jeko	MCL	0.12	112.3	<0.0001
Mino	MCL		15.8	<0.0001
MDA-MB-468	TNBC		53.1	<0.0001
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		164.1	<0.0001

表9.12 活體外ADC-N之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-N 結合K _D (nM)	ADC-N EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
Mec-載體	CLL		772	
Mec-ROR	CLL		262	
Jeko	MCL	0.13	31.7, 20.3	
Mino	MCL		7.7	
DOHH2	DLBCL		3.8	
KMS-PE	MM		26.75	
MDA-MB-468	TNBC		4.1, 29.4	
MDA-MB-231	TNBC		71.	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		78.6	
H460	NSCLC		84.4	0.001
A549	NSCLC		30.7	
Hep-G2	HCC		20.8	
U2OS	OS		11.25	
FaDu	HN		27.05	

表9.13 活體外ADC-O之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-O 結合K _D (nM)	ADC-O EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
Mec-載體	CLL		296	
Mec-ROR	CLL		116	
Jeko	MCL	0.12	71.7	
Mino	MCL		28	
MDA-MB-468	TNBC		85.8	
MDA-MB-231	TNBC		782	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		12.65	
H460	NSCLC		365	0.002

表9.14 活體外ADC-P之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-P 結合K _D (nM)	ADC-P EC ₅₀ (nM)	PNU-159682 EC ₅₀ (nM)
Mec-載體	CLL		30.3	
Mec-ROR	CLL		10.4	
Jeko	MCL	0.11	2.4	
Mino	MCL		1.2	
MDA-MB-468	TNBC		10.4	
MDA-MB-231	TNBC		24.7	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		30.9	
H460	NSCLC		39.6	0.001

表9.15 ADC-Q活體外之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-Q 結合K _D (nM)	ADC-Q EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
Jeko	MCL	0.23	265*	<0.0001
Mino	MCL		139*	<0.0001
HCC1187	TNBC		5.3*	<0.0001
HCC1806	TNBC		56.1*	<0.0001
MDA-MB-468	TNBC		79.7*	<0.0001
MDA-MB-231	TNBC		167.8*	<0.0001
HCC1937	TNBC		>1,000*	>1,000
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		>1,000*	<0.0001
H1975	NSCLC		26.8*	<0.0001
H460	NSCLC		180.1*	<0.0001
Bx-PC3	胰臟癌		45.6*	0.04

表9.16 活體外ADC-R之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-R 結合K _D (nM)	ADC-R EC ₅₀ (nM)	PNU- 159682 EC ₅₀ (nM)
Mec-載體	CLL		183	
Mec-ROR	CLL		44.6	
Jeko	MCL	0.25	53.3	
Mino	MCL		15	
MDA-MB-468	TNBC		44.3	

細胞株	癌症類型	ADC-R 結合K _D (nM)	ADC-R EC ₅₀ (nM)	PNU- 159682 EC ₅₀ (nM)
MDA-MB-231	TNBC		203	0.005
MCF-7	ER+/PR+/HER2-乳癌		167*	
H460	NSCLC		191	0.001

表9.17 活體外ADC-S之細胞毒性

細胞株	癌症類型	ADC-S EC ₅₀ (nM)	MMAE EC ₅₀ (nM)
Mino	MCL	83.3	<0.0001

【0181】表中之資料表明，所測試之ADC有效針對具有不同ROR1表現量及對各種有效負載之靈敏度不同的各種癌細胞株。

實例7：例示性ADC之抗增殖作用之抗原依賴性

【0182】在此實例中所描述之研究評估所測試之ADC在其抗增殖作用方面對ROR1之依賴性。在建立實驗之前，以對數期生長培養Jeko-1細胞。對於競爭實驗，在37°C且5% CO₂下使用100 µg/ml之Ab1或媒劑對照組培育5×10⁴個細胞2小時。隨後，添加3 µg/ml、10 µg/ml及30 µg/ml之ADC-A，且在37°C且5% CO₂下將細胞培育另外72小時。各情況一式兩份進行測試。如實例5中所描述地測定細胞活力。

【0183】資料顯示ADC-A以劑量依賴型方式抑制細胞增殖(圖9，黑色條)。使用未接合的親本抗體Ab1預培育細胞在所有所測試之ADC-A濃度下抑制此抗增殖活性(圖9，灰色條)，顯示細胞殺滅係由ADC-A與其目標ROR1之結合介導。

實例8：活體內例示性免疫接合物之抗腫瘤活性

1. 在TCL1×ROR1 CLL小鼠模型中ADC-A之功效

【0184】已表明，ROR1與T細胞白血病1致癌基因(TCL1)相互作用且促進Em-TCL1轉殖基因小鼠之白血病生成，且用抗ROR1抗體處理會損害ROR1×TCL1白血病細胞之移植(Widhopf等人, PNAS 111: 793-798

(2014))。此研究評估在TCL1×ROR1 CLL小鼠模型中，相比於媒劑及未接合的Ab1，ADC-A之活性。在研究中，將ROR1×TCL1白血病細胞經由尾部靜脈注射移植至小鼠中，且將經注射之小鼠隨機分為五組，8隻小鼠/組。各組為媒劑對照組、10 mg/kg Ab1及1 mg/kg、2 mg/kg及5 mg/kg ADC-A。將每週小鼠IV給藥總共四次給藥。此研究之結果顯示於以下表10中。

2. 在MCL異種移植小鼠模型中ADC-A及ADC-Q之功效

【0185】 將Jeko-1 (MCL)細胞皮下移植至小鼠中，且將經移植之小鼠隨機分為五組，9隻小鼠/組。各組為媒劑對照組、10 mg/kg Ab1、20 mg/kg 依魯替尼、5 mg/kg ADC-A及5 mg/kg ADC-Q。將小鼠IV給藥q4d。此研究之結果顯示於以下表10中。

3. 在DLBCL-GCB PDX小鼠模型中ADC-A之功效

【0186】 將類生發中心B細胞的彌漫性大B細胞淋巴瘤(Germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL-GCB)細胞皮下移植至小鼠中，將經移植之小鼠隨機分為五組，6隻小鼠/組。各組為媒劑對照組、10 mg/kg Ab1、50 mg/kg 維托拉斯、10 mg/kg Ab1加50 mg/kg 維托拉斯及5 mg/kg ADC-A。qw IV投與Ab1及ADC-A且qd PO投與維托拉斯。此研究之結果顯示於以下表10中。

4. 在ROR1-陽性理查特症候群PDX小鼠模型中ADC-A之功效

【0187】 將NSG小鼠在兩側腹區域皮下注射於基質膠中之細胞懸浮液中之RS9373細胞(患者衍生之異種移植物或PDX)。當觀測到可觸知腫瘤(呈約50 mm³)時，將動物隨機分為三組，4隻小鼠/組。處理組為媒劑對照組、2.5 mg/kg ADC-A IV q4d及5 mg/kg ADC-A IV q4d。小鼠總共接

受3次處理，且在最後處理之後24小時時收集腫瘤。利用下式計算平均腫瘤生長抑制(tumor growth inhibition, TGI)：

$$TGI = \left[1 - \frac{(\bar{\chi}_{\text{處理(最終)}} - \bar{\chi}_{\text{處理(第1天)}})}{(\bar{\chi}_{\text{對照(最終)}} - \bar{\chi}_{\text{對照(第1天)}})} \right] \times 100\%$$

【0188】對於大多數腫瘤類型，在腫瘤內水準下觀測到非均一性ROR1表現。儘管如此，在ADC-A處理組中觀測到腫瘤消退。在理查特淋巴瘤之RS101 PDX模型中，20%至30%之細胞為ROR1-陽性，但觀測到完全且持續的消退(圖13)。此研究之結果顯示於以下表10中。

5. 在ROR1-陽性人類TNBC異種移植模型中ADC-A之功效

【0189】將NCR小鼠在乳房脂肪墊中皮下注射於基質膠中之細胞懸浮液中之MDA-MB-231細胞(ROR1-陽性人類三陰性乳癌(TNBC)細胞)。當觀測到可觸知腫瘤(呈約250 mm³)時，將動物隨機分為三個不同組，9隻小鼠/組：媒劑對照組、1 mg/kg ADC-A IV qw及5 mg/kg ADC-A IV qw。小鼠總共接受5次處理，且在最後處理之後24小時時收集腫瘤。利用上式計算平均腫瘤生長抑制(TGI)。此研究之結果顯示於以下表10中。

6. 在兩種ROR1-陽性人類TNBC PDX模型中ADC-A之功效

【0190】選擇呈現不同ROR1表現量之兩種PDX模型用於此研究。ROR1表現基於經由代表TNBC PDX模型之三核之組織微陣列之IHC的ROR1染色的水準。對於人類TNBC細胞BR5011及BR5015，如藉由%ROR1-陽性細胞所評估之平均ROR1表現量分別為58%及38%。

【0191】將NOD/SCID裸鼠在乳房脂肪墊中皮下注射BR5011細胞或BR5015細胞。當觀測到可觸知腫瘤(對於BR5011平均腫瘤體積為約150 mm³且對於BR5015為約250 mm³)時，將動物隨機分為三組。BR5011

PDX模型之各組為媒劑對照組、1 mg/kg ADC-A IV q4d及5 mg/kg ADC-A IV q4d。BR5015 PDX模型之各組為媒劑對照組、1 mg/kg ADC-A IV qw及5 mg/kg ADC-A IV qw。如上文所描述地計算平均TGI。

【0192】在ADC-A處理組中觀測到腫瘤抑制及/或消退。舉例而言，在BR5011 TNBC PDX模型(其在58%之癌細胞中顯示出ROR1表現)中，觀測到完全且持續的消退(圖15)。此研究之結果顯示於以下表10中。

7. 在Jeko-1人類MCL異種移植模型中ADC-A、L、M、N、P、R、S及T之功效

【0193】將Jeko-1 (MCL)細胞皮下移植至小鼠中。當腫瘤尺寸達到100 mm³時，將小鼠隨機分為九組，9隻小鼠/組。各組為媒劑對照組；1 mg/kg ADC-N、ADC-P或ADC-R；或5 mg/kg ADC-A、ADC-L、ADC-M、ADC-S或ADC-T。將小鼠IV給藥q4d。此研究之中期結果顯示於以下表10中。

表10 使用例示性免疫接合物之活體內研究之結果

研究	ADC	動物模型	持續時間	結果	圖
1	ADC-A	TCL1×ROR1白血病細胞	1月	ADC-A以劑量依賴型方式(1、2及5 mg/kg)抑制白血病細胞腫瘤負荷。	10
2	ADC-A ADC-Q	Jeko-1 MCL異種移植	3週	ADC-A引起腫瘤消退而ADC-Q引起腫瘤生長延遲。	11
3	ADC-A	DLBCL-GCB PDX	24天	ADC-A引起腫瘤消退(104%)，且在所有動物中完全消退。 Ab1 (未接合的)單獨、維托拉斯單獨或Ab1 (未接合的)+維托拉斯低效。	12
4	ADC-A	耐化學療法理查特轉型PDX模型	48天	20%至30%之腫瘤內細胞為ROR1-陽性，但觀測到完全且持續的消退。 ADC-A平均TGI：	13

研究	ADC	動物模型	持續時間	結果	圖
				在2.5 mg/kg下78%； 在5mg/kg下90%。	
5	ADC-A ADC-B	MDA-MB-231 異種 移植	47天	ADC-A平均TGI： 在1 mg/kg下56.4%； 在5mg/kg下94.2%。	14
6	ADC-A	人類 TNBC PDX 模 型，BR5011	56天給藥； 84天觀測 (5 mg/kg組)	58%之腫瘤內細胞為ROR1- 陽性，但在5 mg/kg ADC-A 下觀測到完全且持續的消 退。 ADC-A平均TGI： 在1 mg/kg下40.1%， 在5mg/kg下完全消退。 在最後給藥之後監測5 mg/kg 組28天，且在整個觀察期間 保持腫瘤消退。	15
		人 類 TNBC PDX, BR5015 (低ROR1表 現)	17天	ADC-A平均TGI： 在1 mg/kg下22%； 在5 mg/kg下75.6%。	
7	ADC-A ADC-L ADC-M ADC-N ADC-P ADC-R ADC-S ADC-T	Jeko-1 MCL 異種移 植	中期結果 11天	經ADC-A、ADC-L、ADC-M 及ADC-S處理之動物中觀測 到腫瘤消退，而在經ADC- N、ADC-P、ADC-R及ADC- T處理之動物中觀測到腫瘤 生長之抑制。	17

【0194】 在此活體內研究1至7顯示，儘管在腫瘤內ROR1表現為非均一性，且跨癌症類型ROR1表現量不同，但在各種癌症中用ADC-A處理引起腫瘤生長抑制且甚至持續、完全消退。舉例而言，在TNBC PDX模型(其在58%之癌細胞中顯示ROR1表現)中，在所有腫瘤中觀測到完全且持續的消退(圖15)。相似地，在理查特淋巴瘤之RS101 PDX模型中，20%至30%之細胞為ROR1-陽性，但在所有腫瘤中觀測到完全且持續的消退(圖13)。此等結果表明，抗ROR1免疫接合物根除癌症係藉由對結合的癌細胞具有細胞毒性且對腫瘤微環境中之鄰近癌細胞具有旁路毒性，或藉由上調

免疫系統之抗癌作用或藉由此等機制之組合。此發現很重要，因為其表示本發明之免疫接合物可用於治療具有腫瘤內非均一ROR1表現的腫瘤。

【0195】 本發明活體內研究亦顯示ADC-A能有效治療抗藥性癌症。吾人在依魯替尼(Jeko-1 MCL模型)或利妥昔單抗-CHOP免疫化學療法(理查特轉型模型)具有耐藥性之人類腫瘤異種移植物中觀測到消退。因為ROR1為晚期癌症之標記物且先前化學療法似乎增加ROR1表現，吾人之發現表明本發明之免疫接合物在治療晚期或侵襲性癌症方面的潛力。

8. ADC之進一步活體內評估

【0196】 ADC例如ADC-A、E、F、L、M、N、P、Q及R之活體內功效可使用Jeko-1細胞在ROR1-陽性、皮下、人類MCL異種移植模型中進一步評估。將動物q4d IV給藥劑、1 mg/kg ADC或5 mg/kg ADC。每2至3天量測腫瘤生長及體重。可進行本發明之ADC之藥物動力學分析以確定標準藥物動力學參數，諸如抗體C_{max}及半衰期。

實例9：組合療法

【0197】 檢查組合ADC-A與其他抗增殖劑之效果。初始研究聚焦於與BTK之抑制劑(依魯替尼，ACP-196/阿卡拉布魯替尼)、Bcl-2之抑制劑(ABT-199/維托拉斯)、mTOR之抑制劑(INK128)或PI3K之抑制劑(艾德昔布)組合之ADC-A之效果。其他研究檢查組合ADC-A與兩種其他Bcl-2抑制劑(稱為Bcl-2i-1及Bcl-2i-2)之效果。針對兩種不同DLBCL子類型：生發中心B細胞(GCB)及經活化的B細胞(activated B-cell, ABC)測試細胞株。使用半數效果分析測定對用組合有抗增殖劑之ADC-A處理之各種細胞株之增殖抑制之協同效應、拮抗效應或相加效應。使用Chou/Talalay等式確定組合指數(Combination Index, CI)。在72小時CellTiter-Glo®分析

中測定各化合物之 IC_{50} 。對於組合分析，以等莫耳比率使用藥物(亦即以其 IC_{50} 之比率)。使用CalcuSyn軟體(來自Biosoft)用於劑量作用分析。組合指數小於1.1表示治療為協同的；0.9至1.1表示治療為相加的；且大於1.1表示治療為拮抗的。

【0198】 ADC-A展現與兩種不同BTK抑制劑依魯替尼(圖18A)及ACP-196/阿卡拉布魯替尼(圖18B)之協同效應。使用阿卡拉布魯替尼且使用MCL細胞株協同效應更顯著。在MCL細胞株Jeko-1上ADC-A與依魯替尼及阿卡拉布魯替尼組合之代表性資料分別顯示在圖19A及圖19B中。

【0199】 ADC-A亦展現與Bcl-2抑制劑ABT-199/維托拉斯之協同效應(圖20A)。在MCL細胞株及DLBCL細胞株中協同效應均顯著。在Jeko-1(圖20B)細胞及Mino(圖20C)細胞(二者均為MCL細胞類型)上檢查與其他Bcl-2抑制劑：Bcl2i-1及Bcl2i-2組合之ADC-A之活性。在Jeko-1細胞上ADC-A展現與兩種抑制劑之協同效應且在Mino細胞上ADC-A展現與兩種抑制劑之相加效應。在Jeko-1上之與維托拉斯組合之ADC-A之代表性資料顯示於圖21中。

【0200】 ADC-A展現與mTOR1/2抑制劑INK128/賽泮替布之協同效應(圖22)。在MCL細胞株及DLBCL細胞株中均觀測到協同效應。在Jeko-1上之與賽泮替布組合之ADC-A之代表性資料顯示於圖23中。

【0201】 ADC-A展現與PI3K抑制劑CAL-101/艾德昔布之協同效應(圖24)。在MCL細胞株及DLBCL細胞株中均觀測到協同效應。在兩個子類型之DLBCL上顯示出協同效應之組合有艾德昔布的ADC-A的代表性資料顯示在圖25A(TMD細胞，DLBCL-ABC)及圖25B(DOHH2細胞，DLBCL-GCB)中。

實例10：組合療法之進一步評估

【0202】 ADC組合Bcl-2抑制劑之活體內功效可在ROR1-陽性人類MCL異種移植模型中使用Jeko-1細胞或在PDX模型中進一步評估。如下文在重複劑量研究中所概述地，以最大耐受及次佳劑量單獨及組合給藥ADC及Bcl-2抑制劑。每2至3天量測腫瘤生長及體重。

- ADC-A及Bcl-2抑制劑MTD給藥
 - 5 mg/kg ADC-A，IV，q4d
 - 100 mg/kg維托拉斯(ABT-199)，每週
- ADC-A及Bcl-2抑制劑次佳且組合給藥
 - 1 mg/kg ADC-A，IV，q4d
 - 2 mg/kg ADC-A，IV，q4d
 - 50 mg/kg ABT-199，PO，qd
 - 100 mg/kg ABT-199，PO，qd
 - 1 mg/kg ADC-A，IV，q4d+50 mg/kg ABT-199，PO，qd
 - 2 mg/kg ADC-A，IV，q4d+50 mg/kg ABT-199，PO，qd
 - 1 mg/kg ADC-A，IV，q4d+100 mg/kg ABT-199，PO，qd
 - 2 mg/kg ADC-A，IV，q4d+100 mg/kg ABT-199，PO，qd

【0203】 進行藥物動力學分析以確定標準藥物動力學參數，諸如抗體 C_{max} 及半衰期。

實例11：抗ROR1-MMAE免疫接合物之2期臨床研究

【0204】 以下描述一種抗ROR1-MMAE免疫接合物療法之前瞻性開放標記1b/2期臨床試驗之方案。

包涵指標：

- 東部腫瘤協作組織 (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) 效能狀態為0、1或2。
- 如醫療記錄中所記載之CLL/SLL或MCL之組織學診斷
- CLL/SLL或MCL先前已經治療且之後已復發或在先前療法期間已進展
- 存在可放射照相地量測之淋巴結病或結外淋巴惡性病(定義為存在 ≥ 1 非生檢、非照射病灶，測得其最長維度[LD] ≥ 2.0 cm且最長垂直維度[LPD] ≥ 1.0 cm，如藉由電腦斷層掃描[CT]或磁共振成像[MRI]所評估)。
- 由於疾病相關症狀、淋巴結病、內臟增大、結外器官涉及或進展性疾病而存在對療法之當前醫學需求。
- 在開始研究療法1週之前完成癌症治療之所有先前療法(包括手術、放射療法、化學療法、免疫療法或研究性療法)。
- 在開始研究療法之前任何先前抗腫瘤療法之所有急性毒性作用消退至1級(禿頭症[准許1或2級]或神經毒性[准許1或2級]除外或所選擇實驗室參數[准許1級或2級，例外情況如下文所述])。
- 充足骨髓功能：
 - a) 絕對嗜中性白血球計數(ANC) $\geq 1.0 \times 10^9/L$ (級別 ≤ 2)。 b) 血小板計數 $\geq 50 \times 10^9/L$ (級別 ≤ 2)。 b) 血紅蛋白 ≥ 8.0 g/dL (級別 ≤ 2)自任何先前輸注起保持 ≥ 1 週。
- 注意：若異常與骨髓涉及血液惡性病有關，則級別 ≥ 3 准許嗜中性球減少症、血小板減少症或貧血(如藉由自最後先前療法起得到之骨髓生檢/抽吸物所記載)。
- 充足肝特徵：

- 血清丙胺酸轉胺酶(ALT) $\leq 3 \times$ 正常值上限(ULN)(級別 ≤ 1)。
- 血清天冬胺酸轉胺酶(AST) $\leq 3 \times$ ULN (級別 ≤ 1)。
- 血清膽紅素 $\leq 1.5 \times$ ULN (級別 ≤ 1)。
- 充足腎功能：
 - a)估計的肌酐清除(eClCR) > 45 ml/分鐘(藉由Cockcroft-Gault公式計算eClCR)，或b)測得的肌酐清除 > 45 mL/分鐘(如使用24小時尿液收集評估)。
- 充足凝血特徵：
 - 凝血酶原時間(PT) $\leq 1.5 \times$ ULN (級別 ≤ 1)。
 - 活化部分凝血活酶時間(aPTT) $\leq 1.5 \times$ ULN (級別 ≤ 1)。
- 陰性病毒血清學：
 - 陰性人類免疫缺陷病毒(HIV)抗體。
 - 藉由定量聚合酶鏈反應(PCR)測試之陰性B型肝炎表面抗原(HBsAg)及陰性B型肝炎核(HBc)抗體或不可偵測之B型肝炎(HBV)去氧核糖核酸(DNA)。
 - 藉由定量PCR之陰性C型肝炎病毒(HCV)抗體或陰性HCV核糖核酸(RNA)。
- 對於有生育潛力之雌性個體，在開始研究療法之前，尿液或血清驗孕測試顯陰性。
- 在調查員之判斷下，當考慮當前疾病狀況、醫學病況及替代治療對個體之癌症之潛在利益及風險時，參與方案提供可接受之利益比風險比。
- 個體之意願及能力符合所安排之問診、藥物投與規劃、方案特定

實驗室測試、其他研究程序(包括所有骨髓生檢/抽吸及放射照相研究)及研究限制。

排除標準：

- 已知組織學向侵襲性淋巴瘤之轉型(亦即理查特轉型)。注意：不需要不存在或存在轉型之生檢記錄。
- 已知中樞神經系統惡性病。注意：僅在懷疑患有中樞神經系統惡性病之個體之情況下需要中樞神經系統顯影。
- 除以下以外之另一惡性病病史：充分治療之皮膚局部基細胞或鱗狀細胞癌；無疾病跡象之充分治療之原位癌；充分治療之乳頭狀非侵入性膀胱癌；已完全緩解 ≥ 2 年之其他癌症。
- 在開始研究療法之前3個月內顯著心血管疾病(例如心肌梗塞、動脈血栓栓塞、腦血管血栓栓塞)；需要療法之絞痛；症狀性周邊血管疾病；紐約心臟協會(New York Heart Association) 3或4類充血性心臟衰竭；或儘管有抗高血壓療法但不受控的 ≥ 3 級高血壓(舒張血壓 ≥ 100 mmHg或收縮血壓 ≥ 160 mmHg)。
- 顯著篩檢ECG異常，包括需要藥物治療之不穩定心律不整、心房震顫/顫動、左束支傳導阻滯、II型二級房室(AV)阻塞、三級AV阻塞、級別 ≥ 2 心搏徐緩或校正QT (QTc) > 450 毫秒(男性)或 > 470 毫秒(女性)。
- 可能干擾藥物吸收或解釋胃腸AE之胃腸疾病(例如，胃或腸旁路手術、胰臟酶功能不全、吸收障礙症候群、症狀性發炎性腸道疾病、慢性腹瀉疾病、腸道堵塞)。
- 由於活性消化性潰瘍疾病之進行中之出血風險；出血素質；或要求使用抗血小板藥物(例如阿司匹林(aspirin)、三氟醋鉀酸(triflusal)、克

羅匹多(clopidogrel)、普拉格雷(prasugrel)、替卡格雷(ticagrelor)、噻氯匹定(ticlopidine)、西洛他唑(cilostazol)、沃拉帕沙(vorapaxar)、二吡待摩(dipyridamole))系統性抗凝；或使用肝素、低分子量肝素或肝素部分(例如依諾肝素(enoxaparin)、達肝素(dalteparin)、方達珀魯(fondaparinux))或口服抗凝劑(例如阿派沙班(apixaban)、利伐沙班(rivaroxaban)、達比加群酯(dabigatran etexilate)、華法林(warfarin))。

注意：准許使用肝素或溶栓劑藥劑用於局部維持或清理中心靜脈導管。

- 在開始研究療法時存在進行中系統性細菌、真菌或病毒感染(包括上呼吸道感染)之跡象。注意：不排除具有皮膚或指甲之局部真菌感染個體之參與。

- 在經先前造血母細胞移植之個體，存在進行中移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)之跡象。

- 妊娠或哺乳。

- 在開始研究療法之前4週內經歷大手術。

- 先前實體器官移植。

- 在開始研究療法之前12週內先前抗ROR1療法。

- 進行中免疫抑制性療法，包括系統性或腸溶皮質類固醇。注意：在篩選時，個體可使用局部用或吸入用皮質類固醇。在研究療法期間，使用皮質類固醇作為輸注反應之防治應減至最少。然而，個體可視需要使用系統性、腸溶、局部或腸溶皮質類固醇用於治療引发病況。

主要結果量測：

- 1b期：建議給藥方案(Recommended dosing regimen, RDR)[時間範圍：自基線至52週]評估瑟吐珠單抗(cirmtuzumab)劑量-藥力學及藥

物動力學-藥力學關係及安全性。

• 2期：完全反應(CR)速率[時間範圍：自隨機化至所有研究個體停止治療或最終個體之累積之後72週]達成與預先確立的用於淋巴瘤之反應指標一致之CR之個體之比例(Cheson, J Clin Oncol. 32(27):3059-68 (2014))。

表11 例示性給藥方案

組	指定干預
針對ROR1-MMAE之1b期-劑量發現	每2週IV投與持續5次投與且隨後其後每4週投與
針對ROR1-MMAE之1b期-劑量擴展	每2週IV投與持續3次投與且隨後其後每4週投與
針對ROR1-MMAE之2期-安全性及功效評估	每2週IV投與持續3次投與且隨後其後每4週投與

【0205】劑量發現期將藉由在1.0、2.0及3.0 mg/kg下之平行劑量比較進行。

【0206】儘管已經在本文中展示且描述本發明之較佳實施例，但對熟習此項技術者而言很明顯此等實施例僅例示性提供。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現應能夠想到諸多變化、改變及替代。應理解，本文中所描述之本發明實施例之各種替代方案可用於實踐本發明。

【0207】本文中所描述之胺基酸序列及核苷酸序列列出在下表12中。

表12 序列表

SIN	描述	序列
1	人類 ROR1 片段	VATNGKEVVS STGVLFVKFG PC
2	人類 ROR1 片段	EVVSSTGVLF VKFGPC

SIN	描述	序列
3	Ab1 重鏈	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYC ARGWYYFDYWGHGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
4	Ab1 輕鏈	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRLLIYSG STLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDESPYTFGEGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
5	Ab1 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYC ARGWYYFDYWGHGTLVTVSS
6	Ab1 VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRLLIYSG STLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDESPYTFGEGT KVEIK
7	Ab1 HCDR1	GYAFTAYN
8	Ab1 HCDR2	FDPYDGG
9	Ab1 HCDR3	GWYYFDY
10	Ab1 LCDR1	KSISKY
11	Ab1 LCDR2	SGS
12	Ab1 LCDR3	QQHDESPY
13	Ab1 VH 片段	SGYAFTAYNIHWVRQ
14	Ab1 VH 片段	GSFDPYDGGSSYNQKF
15	Ab1 VH 片段	YYCARGWYYFDYWGHGTLVTVSS
16	Ab1 VL 片段	CRASKSISKYLAWY
17	Ab1 VL 片段	LLIYSGSTLQSG
18	Ab1 VL 片段	CQQHDESPYTFGEGTKVEIK
19	Ab1 重鏈編碼 序列	AAGCTTACCGCCACCATGGGCTGGAGCTGTATCATCCTCTTCCTGGTG GCGACCGCGACGGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTCCAGGAGTCCGG CCCCGGGCTTGTGAAGCCGTCACAAACCCTGTCCCTGACGTGCACGG TCTCCGGCTACGCCTTACGGCCTACAACATACATTGGGTCCGGCAGG CGCCGGGCCAGGGGCTGGAGTGGATGGGTTCCTTCGACCCGTACGAT GGCGGGAGCTCGTACAACCAGAAGTTCAAAGACCGCCTGACGATCTC

SIN	描述	序列
		CAAGGACACCTCGAAAAACCAGGTGCTCCTGACCATGACCAACATGG ACCCGGTGGACACGGCGACCTACTATTGCGCCCGCGGCTGGTACTAC TTCGACTACTGGGGCCACGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCCGCTTCG ACCAAGGGCCCCAGCGTCTTCCCGCTCGCGCCCTCCTCGAAGTCCACC TCGGGCGGCACTGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC GGAGCCGGTGACCGTCTCGTGGAACAGCGGGGCACTCACCTCCGGCG TGCACACCTTCCCGGCCGTGCTGCAGTCCTCGGGGCTGTATTCACTCA GCTCGGTGCTACCGTCCCCTCGTCGTCCCTCGGCACGCAGACGTACA TCTGCAACGTCAACCACAAGCCCTCGAACACCAAGGTGGACAAGAAG GTCGAGCCGAAGTCCTGCGATAAGACCCACACCTGCCCCCGTGGCC GGCCCCGAGCTCCTGGGCGGTCCGTCCGTGTTTCTTCCCGCCCAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACGCCGAGGTGACCTGCG TCGTTCGTGGACGTCTCCACGAGGATCCCGAGGTGAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGGGTGGAGGTCCACAACGCCAAGACAAAGCCGCGGG AAGAGCAGTACAACCTGACCTACCGCGTCGTCAGCGTGCTGACGGTC CTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAATGCAAGGTGTC CAACAAGGCCCTGCCCGCGCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCA AGGGACAGCCGCGCGAGCCGCAGGTCTACACGTGCCTCCCTCCCGG GACGAGCTCACGAAGAACCAGGTATCGCTCACCTGCCTCGTGAAGGG CTTCTACCCGAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAATAACAAAACCACGCCCGGTCCTCGACTCTGACGGG TCCTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCGCGGTGGCAG CAGGGGAACGTGTTCTCGTGCTCGGTTCATGCACGAGGCGTTGCACAA CCACTACACCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCGGGCAAGTGATAAT CTAGAGTCGGGGCGGCCGCGCC
20	Ab1 輕 鏈編碼 序列	AAGCTTACCGCCACCATGGGCTGGTCATGCATCATCCTGTTTCTGGTC GCCACCGCGACGGGGGTCCACAGTGATATCGTCATGACGCAGACGCC GCTGAGCCTCCCGGTGACGCCCGGCGAGCCCGCCAGCATCTCCTGCC GCGTTTCCAAGTCCATCTCGAAGTACCTGGCGTGGTATCAGCAGAAG CCCGGCCAGGCCCGCGCCTGCTCATCTACTCTGGTTCCACGCTCCAG TCGGGCATCCCGCCCCGGTTTCTCGGGTTCCGGGATACGGCACCGACTTC ACCCTGACCATCAACAACATCGAGAGCGAAGACGCGGCGTACTACTT CTGCCAGCAGCAGCAGAGTCCCCGTACACCTTCGGCGAGGGGACCA AGGTTCGAGATCAAGCGTACCGTCGCGGCACCGAGCGTCTTCATCTTC CCCCCGTCCGACGAGCAGCTCAAGTCTGGCACCGCCTCGGTGCTGTGT CTCCTGAACAACCTTCTACCCAGGGGAAGCCAAGGTCCAGTGGAAAGT GGACAACGCGCTGCAGTCCGGGAATAGCCAGGAGTCGGTGACGGAG CAGGACTCCAAGGACTCCACGTACTCGCTCTCGTCCACCCTGACCCTC TCCAAGGCGGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAGGTGAC GCACCAAGGCCTGTCTCCCCAGTGACCAAGTCGTTCAACCGCGGCG AGTGCTGATAATCTAGAGTCGGGGCGGCCGCGCC
21	Ab1 VH 編碼序 列1	AAGCTTACCGCCACCATGGGCTGGAGCTGTATCATCCTCTTCTGGTG GCGACCGCGACGGGTGTCCACTCCAGGTGCAGCTCCAGGAGTCCGG CCCCAGGCTTGTGAAGCCGTCACAAACCCTGTCCCTGACGTGCACGG TCTCCGGCTACGCCTTACGGCCTACAACATACATTGGGTCCGGCAGG CGCCGGGCCAGGGGCTGGAGTGGATGGGTTCCTTCGACCCGTACGAT GGCGGGAGCTCGTACAACCAGAAGTTCAAAGACCGCCTGACGATCTC CAAGGACACCTCGAAAAACCAGGTGCTCCTGACCATGACCAACATGG ACCCGGTGGACACGGCGACCTACTATTGCGCCCGCGGCTGGTACTAC TTCGACTACTGGGGCCACGGGACCCTGGTCACCGTGTCTTCC
22	Ab1 VL 編碼序 列1	GATATCGTCATGACGCAGACGCCGCTGAGCCTCCCGGTGACGCCCGG CGAGCCCGCCAGCATCTCCTGCCGCGCTTCCAAGTCCATCTCGAAGTA CCTGGCGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCGCGCCTGCTCA TCTACTCTGGTTCCACGCTCCAGTCGGGCATCCCGCCCCGGTTCTCGG GTTCGGGATACGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAACAACATCGAG

SIN	描述	序列
		AGCGAAGACGCGGCGTACTACTTCTGCCAGCAGCACGACGAGTCCCC GTACACCTTCGGCGAGGGGACCAAGGTTCGAGATCAAG
23	Ab1 VH 編碼序 列2	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACA GACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTATGCATTCACTGCCTA CAACATACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGA TGGGTTCTTTTGGATCCTTACGATGGTGGTAGTAGTTACAACCAGAAGT TCAAGGACAGACTCACCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAACCAGGTG GTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTATTA CTGTGCAAGAGGGTGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCACGGAACCC TGGTCACCGTCTCCTCA
24	Ab1 VL 編碼序 列2	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCCCGTCACCCCTGGA GAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATA TTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGGATCCCACCTCGATTCACTGG CAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAAT CTGAGGATGCTGCATATTACTTCTGTCAACAGCATGATGAATCCCCGT ACACGTTTCGGCGAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
25	D10 VH	QVQLKESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGKGLEWLG VIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSVLLKMTSLQTDAMYYCARR GSSYSMDYWGQGTSVIVSS
26	D10 VL	EIVLSQSPAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWYQQRSGTSPRPWIYEISK LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAIIYQCQWNYPLITFGSGTK LEIQ
27	D10 HCDR1	GFSLTSYG
28	D10 HCDR2	WAGGFT
29	D10 HCDR3	RGSSYSMDY
30	D10 LCDR1	SNVSYI
31	D10 LCDR2	EIS
32	D10 LCDR3	QQWNYPLI
33	D10 VH 編碼序 列	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACA GACTCTGTCCATCACTTGCCTGTCTCTGGGTTTTATTAACCAGTTAT GGTGTACTGTTGGGTTCCGACGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCT GGGAGTAATATGGGCTGGTGGATTACAAATTATAATTCGGCTCTCA AGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTCTC TTAAAAATGACCAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATGTACTACTG TGCCAGGAGAGGTAGTTCTTCTATGGACTATTGGGGTCAAGGAA CCTCAGTCACCGTCTCCTCA
34	D10 VL 編碼序 列	GAAATTGTGCTCTCTCAGTCTCCAGCCATCACAGCTGCATCTCTGGGC CAAAAGGTCACCATCACCTGCAGTGCCAGTTCAAATGTAAGTTACAT CCACTGGTACCAGCAGAGGTCAGGCACCTCCCCAGACCATGGATTT ATGAAATATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCAGTTCGCTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTG AAGATGCTGCCATTTATTATTGTCAGCAGTGGAATTATCCTCTTATCA CGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATACAA
35	4A5 VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQIPEKRLEWVA SISRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLMSSLRSEDAMYYCGRYD YDGYAMDYWGQGTSVTVSS

SIN	描述	序列
36	4A5 VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFRSGGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGG GTKLEMK
37	4A5 HCDR1	GFTFSSYA
38	4A5 HCDR2	ISRGGTT
39	4A5 HCDR3	YDYDGYIAMDY
40	4A5 LCDR1	PDINSY
41	4A5 LCDR2	RAN
42	4A5 LCDR3	LQYDEFPTY
43	4A5 VH 編碼序列	GAAGTGAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAG GGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACITTCAGTAGCT ATGCCATGTCTTGGGTTTCGCCAGATTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCATCCATTAGTCGTGGTGGTACCACCTACTATCCAGACAGTGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACATCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACT GTGGAAGATATGATTACGACGGGTACTATGCAATGGACTACTGGGGT CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
44	4A5 VL 編碼序列	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGA GAGAGAGTCACTATCACTTGAAGGCGAGTCCGGACATTAATAGCTA TTTAAGCTGGTCCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGA TCTATCGTGCAAACAGATTGGTTGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGT GCGGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAACAGCCTGGAG TATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAATTTCCG TACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATGAAAC
45	99961 VH	EIQLQQSGPVLVKPGASVKVSKASGYAFTAYNIHWVRQSHGKRLEWIG SFDPYDGGSSYNQKFKDKATLTVDKSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR GWY YFDY WGHGTTLTVSS
46	99961 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLA WYQEKPGKTNKLLIYSG STLQSGIPSRFRSGSGTDFTLTISSELEDFAMYYCQQHDESPYTFEGGT KLEIKR
47	Ab4 重 鏈	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGS FDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTATYYCAR GWY YFDY WGHGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
48	Ab4 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGS FDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTATYYCAR GWY YFDY WGHGTLVTVSS
49	Ab4 輕 鏈	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRASKSISKYLA WYQQKPGKAPKLLIYS GSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAA YYFCQQHDESPYTFGEG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG

SIN	描述	序列
		LSSPVTKSFNRGEC
50	Ab4 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYS GSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDESPYTFGEG TKVEIK
51	Ab4 重 鏈編碼 序列	CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGTCCCGGACTGGTCAAGCCGTCGCA GACGCTGTCCCTCACCTGCACCGTGTCTGGGCTACGCCTTCACCGCCTA CAACATCCACTGGATCCGTACGCCCCCTGGGAAGGGCCTCGAGTGGA TCGGCAGCTTCGACCCGTACGACGGCGGGTCGTCTACAACCAGAAG TTCAAGGACCGCCTCACCATCAGCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGT CGTCTCACCATGACCAACATGGACCCCGTGGACACCGCCACGTACT ACTGCGCGGGGGCTGGTACTACTTCGACTACTGGGGGCACGGCACC CTCGTCACGGTCTCGTCGGCGAGCACCAAGGGTCCGAGCGTCTTCCCC CTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCACCTCGGGGGGCACCGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGA ACTCCGGCGCCCTCACCAGCGGGGTCCACACCTTCCCGGCGGTCTGC AGTCATCCGGTCTCTACTCCTTGAGCTCAGTCGTACCGTCCCGAGCT CCTCCCTCGGAACGCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAGCCG TCCAACACCAAGGTGACAAAGAAGGTGGAGCCCAAATCGTGCGACA AGACCACACCTGCCCGCCGTGCCCGCCCCGGAAGTCTCGGCGGC CCCTCGGTGTTCTGTTCCCCCGAAGCCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGCACCCCGAGGTCACCTGCGTGGTGGTGGATGTCTCCACGA GGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGGGTCGAGGTGC ACAACGCCAAGACCAAGCCCCGAGAGGAACAGTATAACTCGACGTA CCGCGTGGTCAGCGTCTGACCGTGCTCCACCAGGACTGGCTGAACG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCC ATCGAGAAGACGATCTCAAGGCGAAGGGGCAGCCGCGCGAGCCGC AGGTCTACACCCTGCCGCCAGCCGGGACGAGCTCACGAAGAATCAG GTCTCGTCACTGCCTCGTCAAGGGTTTCTACCCGTCGGACATCGCG GTCGAATGGGAGTCAACGGTCAAGCCGAGAATAACTACAAGACGA CCCCGCCCGTCTGGACTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCGAAGC TGACGGTCAAGTCAAGTCAAGGCGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCGTGC TCGGTGATGCACGAGGCCCTCCACAACCCTACACACAGAAGAGCCT CTCGCTTTCGCCGGGCAAG
52	Ab4 VH 編碼序 列	CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGTCCCGGACTGGTCAAGCCGTCGCA GACGCTGTCCCTCACCTGCACCGTGTCTGGGCTACGCCTTCACCGCCTA CAACATCCACTGGATCCGTACGCCCCCTGGGAAGGGCCTCGAGTGGA TCGGCAGCTTCGACCCGTACGACGGCGGGTCGTCTACAACCAGAAG TTCAAGGACCGCCTCACCATCAGCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGT CGTCTCACCATGACCAACATGGACCCCGTGGACACCGCCACGTACT ACTGCGCGGGGGCTGGTACTACTTCGACTACTGGGGGCACGGCACC CTCGTCACGGTCTCGTCG
53	Ab4 輕 鏈編碼 序列	GACGTCGTGATGACCCAGTCGCCCTCTCCCTGCCGGTTACCCTGGGC CAGCCCGCCTCCATCAGCTGCCGTGCCTCCAAGTCCATTTCCAAGTAC CTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGAAGGCCCAAAGCTCCTCAT CTACTCCGGTCCACCCTCCAGAGCGGCATCCCCCCCCGCTTCAGCGG CTCCGGTACGGCACCGACTTCACCCTCACCATCAATAACATCGAGTC GGAGGACGCCGCTACTACTTCTGCCAGCAGCAGCAGCAATCGCCGT ACACCTTCGGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAGAGGACGGTCCG CGCGCCCTCCGTGTTTCTTCCCCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTC CGGGACCGCCTCCGTGTTTCTTCCCCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTC GGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGACAAACGCGCTCCAGTCCGGCAACT CCCAGGAGTCGGTGACCGAGCAGGACTCGAAGGACAGTACCTACTCG CTGAGCTCCACACTGACGCTCTCGAAGGCCGACTACGAGAAGCACAA GGTGTACGCATGCGAGGTGACCCACCAGGGGCTGAGCTCGCCGGTGA CTAAGTCGTTCAACAGGGGCGAATGC

SIN	描述	序列
54	Ab4 VL 編碼序列	GACGTCGTGATGACCCAGTCGCCCTCTCCCTGCCGGTTACCCTGGGC CAGCCCGCCTCCATCAGCTGCCGTGCCTCCAAGTCCATTTCCAAGTAC CTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGAAGGCCCAAAGCTCCTCAT CTACTCCGGCTCCACCCTCCAGAGCGGCATCCCCCCCCGCTTCAGCGG CTCCGGCTACGGCACCGACTTCACCCTACCATCAATAACATCGAGTC GGAGGACGCCGCGTACTACTTCTGCCAGCAGCACGACGAATCGCCGT ACACCTTCGGGGAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
55	連接肽 部分序列	GGFG
56	連接肽 部分序列	ALAL
57	連接肽 部分序列	GFLG
58	麩醯胺 酸標籤	LLQGA
59	轉肽酶 基元	LPxTG
60	轉肽酶 基元	NPQTN
61	BirA 標 籤	GFEIDKVWYDLDA
62	人類 CH ₁ 域 加上鉸 鏈區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSC
63	人類 κ 恆定域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
64	人類化 4A5 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASPDINSYLSWVQQRPGQSPRRL IYRANRLVDGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQYD EFPYTFGQGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSEV QLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGFTFSSYAMSWIRQSPRGLLEW GSISRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCGRYDYDGYAMDYWGQGLTVTVSS
65	Ab1 scFv	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRL LIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDES PYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEWM GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARGWYYFDYWGHTLVTVSS
66	Ab2 scFv	DVVMQTSPLSLPVTLGQPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPK LLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHD ESPYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQV QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEW MGSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDT

SIN	描述	序列
		ATYYCARGWYYFDYWGHGTLTVSS
67	Ab3 scFv	DIVMTQTPLSLPVTGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRL LIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHDES PYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQVQL QESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWIRQPPGKGLEWIGS FDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATY YCARGWYYFDYWGHGTLTVSS
68	Ab4 scFv	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPK LLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCQQHD ESPYTFGEGTKVEIKGGGGSGSTSGSGKPGSGEGSTKGGGGGSQV QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWIRQPPGKGLEWI GSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARGWYYFDYWGHGTLTVSS

*SIN : SEQ ID NO .

【序列表】

<110> 美商維洛斯生物公司

<120> ROR1抗體免疫接合物

<130> 024651.TW002

<140>

<141>

<150> 62/524,388

<151> 2017-06-23

<150> 62/524,386

<151> 2017-06-23

<150> 62/524,382

<151> 2017-06-23

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe
1 5 10 15

Val Lys Phe Gly Pro Cys
20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Cys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 446

<212> PRT

<213> 人.口序列

<220>

<223> 對人口序列之描述：合成多肽

<400> 3

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

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

Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
 Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Gln Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 214

<212> PRT

<213> 人口序列

<220>

<223> 對人口序列之描述：合成多肽

<400> 4

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 5
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽
 <400> 5
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 6
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 7
 Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 對人.1序列之描述：合成肽

<400> 8
Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser
1 5

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人.1序列

<220>
<223> 對人.1序列之描述：合成肽

<400> 9
Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> 人.1序列

<220>
<223> 對人.1序列之描述：合成肽

<400> 10
Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> 人.1序列

<220>
<223> 對人.1序列之描述：合成肽

<400> 11
Ser Gly Ser
1

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人.1序列

<220>
<223> 對人.1序列之描述：合成肽

<400> 12
Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
1 5

<210> 13
<211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 13
Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln
1 5 10 15

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 14
Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

<210> 15
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 15
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly
1 5 10 15

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
20

<210> 16
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 16
Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 17
Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly
1 5 10

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> 人, 口序列

<220>
<223> 對人, 口序列之描述: 合成肽

<400> 18
Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys
1 5 10 15

Val Glu Ile Lys
20

<210> 19
<211> 1438
<212> DNA
<213> 人, 口序列

<220>
<223> 對人, 口序列之描述: 合成多核苷酸

```

<400> 19
aagcttaccg ccaccatggg ctggagctgt atcatccctt tcttgggtggc gaccgogacg      60
ggtgtccact ccaggtgca gctccaggag tccggccccg ggcttgtgaa gccgtcacia      120
accctgtccc tgactgtcac ggtctccggc tacgccttca cggcctacaa catacattgg      180
gtccggcagg cggcgggcca ggggctggag tggatgggtt ccttcgaccg giacgatggc      240
gggagctcgt acaaccagaa gtccaagac cgcctgacga tctccaagga cacctcgaaa      300
aaccaggteg tctgaccat gaccaacatg gaccgggtgg acacggcgac ctactattgc      360
gcccggggtt ggtactactt cgactactgg ggccacggga cccigtctac cgtgtcttcc      420
gttcgacca agggccccag cgtcttcccg ctgcgcctt cctcgaagtc cacctcgggc      480
ggcactgccc ccttgggtg cctggtaag gaclacttcc cggagccggt gaccgtctcg      540
tggaacagcg gggcactcac ctccggcgtg cacaccttcc cggccgtgct gcagtctctg      600
gggtgtatt cactcagctc ggtcgtcacc gtcccctegt cgtcccctgg cacgcagacg      660
tacatctgca acgtaacca caagccctcg aacaccaagg tggacaagaa ggtcgagccg      720
aagtcctgcg ataagacca cacctgcccc ccgtgccccg cccccgagct cctgggcccgt      780
ccgtccggtt tctcttccc gcccaagccc aaggacacce tgatgatcag ccgcaagccc      840
gaggtgacct gcgtcgtcgt ggacgtctcc cagaggatc ccgaggtgaa gttcaactgg      900
tacgtggacg ggggtggaggt ccacaagcc aagacaaagc cgcgggaaga gcagtacaac      960
tegacctacc gcgtcgtcag cgtgctgacg gtccctcacc aggactggct gaacggcaag      1020

```

gagiacaat gcaaggigt caacaaggcc ctgcccgcgc ccatcgagaa gaccatctcc 1080
 aaggccaagg gacagccgcg cgagccgcag gtctacacgc tgcctccctc cggggacgag 1140
 ctcacgaaga accaggatc gctcacctgc ctctgaagg gcttctacc gagcgacatc 1200
 gccgtcgagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaaaaccac gcgcgcggtc 1260
 ctgcactctg acgggtccct ctctctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtgcgggtgg 1320
 cagcagggga acgtgtctc gtgctcggtc atgcacgagg cgttgcaaa ccactacacc 1380
 cagaagtcac tctccctgag cccgggcaag tgataatcta gagtcggggc ggcccggc 1438

<210> 20
 <211> 742
 <212> DNA
 <213> 人H序列

<220>
 <223> 對人H序列之描述：合成多核苷酸

<400> 20
 aagcttaccg ccaccatggg ctggctatgc atcatcctgt tcttggtcgc caccgcgacg 60
 ggggtccaca gtgatatcgt catgacgcag acgccctga gccctccggg gacgcccggc 120
 gageccgcca gcctctcttg ccgccttcc aagtcctct cgaagtacct ggcgtggtat 180
 cagcagaagc ccggccaggc cccgcgctg ctcatctact ctggttccac gtcccagtcg 240
 ggcctccgcg cccggttctc gggttcggga tacggcaccg acctcacct gaccatcaac 300
 aacatcgaga gccgaagcgc ggcgtactac ttctgccagc agcagacga gtccccttac 360
 acctccggcg aggggaccaa ggctcgagtc aagcgtaccg tcgcggcacc gagcgtcttc 420
 atcttcccc cgtccgacga gcagctcaag tctggcaccg cctcggctgt ctgtctctg 480
 acaacttct accccagggg agccaaggtc cagtggagg tggacaaccg gctgcagtcc 540
 gggaatagcc aggagtcggg gacggagcag gactccaagg actccacgta ctgcctctcg 600
 tccacctga cctctccaa ggcggactac gaaaagcaca aggtctaccg ctgagagtg 660
 acgcaccaag gctgtctct cccagtgacc aagtcgttca accgcggcga gtgctgataa 720
 tctagagtcg gggcggccgg cc 742

<210> 21
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> 人H序列

<220>
 <223> 對人H序列之描述：合成多核苷酸

<400> 21
 aagcttaccg ccaccatggg ctggagctgt atcatcctct tcttggctgc caccgcgacg 60
 ggtgtccact cccaggltca gctccaggag tccggccccg ggcttctgaa gcgctcaaa 120
 acctgtccc tgacgtgca ggtctccggc tacgcttca cggcctaaa catacattgg 180

giccggcagg cgcggggcca ggggctggag tggatgggtt ccttcgaccc gtacgatggc 240
 gggagctcgt acaaccagaa gtcaaaagac cgctgacga tctccaagga caccctgaaa 300
 aaccaggctg tctgaccat gaccaacatg gacccggigg acacggcgac ctactatigc 360
 gcccggggt ggtactacit cgaactctgg ggccacggga ccttggtcac cgtgtcttcc 420

<210> 22
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 22
 gatatcgtca tgacgcagac gccgctgagc ctcccgggtg cgcggggcga gcccgccagc 60
 atctcttccc gcgcttccaa gtccatctcg aagtacctgg cgtggtatca gcagaagccc 120
 gccagggccc cgcgcttctt catctactct ggttccagc tccagtcggg cctcccggcc 180
 cggttctcgg gtccgggata cggcaccgac ttaccctga ccatcaacaa cctcgagagc 240
 gaagacgcgg cgtactactt ctgccagcag cagcagagt ccccgctcac ctteggcgag 300
 gggaccaagg tcgagatcaa g 321

<210> 23
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 23
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggta tgcaatcact gcctacaaca tacactgggt gcgacaggcc 120
 ccctggacaag ggcttgagtg gatggggtct ttgatcctt acgatggigg tagtagttac 180
 aaccagaagt tcaaggacag aetcaaccat tccaaggaca cctccaaaaa ccaggiggtc 240
 cttaaatga ccaacatgga cctgtggac acagccactg attactgtgc aagagggtgg 300
 tactactttg actactgggg ccacggaacc ctggtcaccg tctctca 348

<210> 24
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 24
 gatattgiga tgaccagac tccactctcc ctgccctca cccctggaga gccggcctcc 60

```

atctcctgca gggcaagtaa gagecattagc aaatatttag ccigglacca gcagaaacct    120
ggccaggctc ccaggctcct catctattct ggatccactt tgcaatctgg gatcccacct    180
cgattcagtg gcagcgggta tggaacagat ttaccctca caattaataa calagaatct    240
gaggatgctg catattactt ctgtcaacag catgatgaat ccccgtaac gttcggcgag    300
gggaccaagg tggaaatcaa a                                             321

```

<210> 25
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽

```

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

```

<210> 26
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽

```

<400> 26
Glu Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Ser Leu Gly
1          5          10          15

```

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

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人口序列

<220>
 <223> 對人口序列之描述：合成肽

<400> 27
 Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
 1 5

<210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人口序列

<220>
 <223> 對人口序列之描述：合成肽

<400> 28
 Trp Ala Gly Gly Phe Thr
 1 5

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人口序列

<220>
 <223> 對人口序列之描述：合成肽

<400> 29
 Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr
 1 5

<210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人.口序列

<220>
 <223> 對人.口序列之描述：合成肽

<400> 30
 Ser Asn Val Ser Tyr Ile
 1 5

<210> 31
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人.口序列

<220>
 <223> 對人.口序列之描述：合成肽

<400> 31
 Glu Ile Ser
 1

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人.口序列

<220>
 <223> 對人.口序列之描述：合成肽

<400> 32
 Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile
 1 5

<210> 33
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人.口序列

<220>
 <223> 對人.口序列之描述：合成多核苷酸

<400> 33
 caggtagcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagac tctgtccatc 60
 acttgcactg tctctgggtt ttcattaacc agttatgggtg taacttggtt tgcaccacct 120
 ccaggaaagg gctctggagtg gctgggagta atatgggctg gtggattcac aaattataat 180
 teggtctca agtcagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttctctta 240
 aaaatgacca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag gagaggtagt 300
 tctattctta tggactattg gggctcaagga acctcagtc cgtctcctc a 351

<210> 34
 <211> 318

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 34

```

gaaat1gtgc tctctcagtc tccagccatc acagctgcat ctctgggcca aaaggteacc      60
atcacc1gca gtgccag1tc aaatgtaagt tacatccact ggtaccagca gagg1caggc      120
acctccccca gaccatggat ttatgaaata tccaaactgg ct1ctggagt cccag1tcgc      180
ttcag1ggca gtgggtctgg gaccct1tac tctctcaca tcagcagcat ggag1ctgaa      240
gatgct1gcca t1tattattg tcagcag1tg aattatcctc ttatcacgtt cggctcgggg      300
acaaag1tgg aaatacaa                                     318

```

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 35

```

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

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

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

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

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

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

Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100         105         110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 36

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

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 38

Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr
1 5

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 39
Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 40
Pro Asp Ile Asn Ser Tyr
1 5

<210> 41
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 41
Arg Ala Asn
1

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 42
Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 43
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 43
gaagtgaaac tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactic 60
tctctgtcag cctctggatt cactttcagt agctatgcca tgtcttgggt tcgccagatt 120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtcgtg gtggtaccac ctactatcca 180

gacagigtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacat cctgtaectg 240
 caaatgagca gtcigaggfc tgaggacaag gccatgtatt actgtggaag atatgattac 300
 gacgggtact atgcaatgga ctactggggt caaggaacct cagtcacctg ctctca 357

<210> 44
 <211> 322
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 44
 gacatcaaga tgacceagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcaattgca agggcagctc ggacattaat agctatttaa gctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagacctt gatctatcgt gcaaacagat tggttgatgg ggleccatca 180
 aggttcagtg gcggiggatc tgggcaagat tattctctca ccatcaacag cctggagtat 240
 gaagatatgg gaattatta ttgtctacag tatgatgaat ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaatgaa ac 322

<210> 45
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 46
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 46
Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 47
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 47
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

 <210> 48
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人入口序列

 <220>
 <223> 對人入口序列之描述：合成多肽

 <400> 48
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val
 65 70 75 80
 Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 49
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 49
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser 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 Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 50
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser 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 Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 51
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

<400> 51
caggtcacgc tgcaggagtc aggtcccgga ctggtaagc cgtcgcagac gctgtccctc 60
accitgcaccg tgtcgggcta cgccttcacc gcttacaaca tccactggat ccgtcagccc 120
cctgggaagg gcctcagatg gatcggcagc ttgcacctt acgacggcgg gtcgtcctac 180
aaccagaagt tcaaggaccg cctcaccatc agcaaggaca cctccaagaa ccaggtcgtc 240
ctcaccatga ccaacatgga ccccgtggac accgccacgt actactgcgc gcggggctgg 300
tactacttcg actactgggg gcacggcacc ctctcaccg tctcgtcggc gaggaccaag 360
ggtccgagcg tcttcccct ggccccctcc agcaagtcca cctcgggggg caccgccgcc 420

crgggtgcc tggcaagga ctacttcccc gagcccgta ccgtgagctg gaactecggc 480
 gccctacca ggggggtcca caacttcccc ggggtcctgc agtcatecgg tctctactcc 540
 ttgagctcag tegtaccgt cccgagctcc tccctcggaa cgcagacctc catctgcaac 600
 gtcaaccaca agccgtccaa caccaaggtc gacaagaagg tggagcccaa atcgtgcgac 660
 aagacceaca cctgcocgcc gtgcccgcgc ccggaactgc tggcgggccc ctccgtgttc 720
 ctgttcccc cgaagcccaa ggacaccctc atgatctccc gcacccccga ggtaacctgc 780
 ggggtgggg atgtctccca cggaggcccc gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggg 840
 gtcgaggtgc acaacgccaa gaccaagccc cgagaggaac agtataactc gacgtaccgc 900
 ggggtcagcg tccgtaccgt gctccaccag gactggctga accgcaagga gtacaagtgc 960
 aaggteagca acaaggccct gcccgccccc atcgagaaga cgtctccaa ggccgaagggg 1020
 cagccgcgcg agccgcaggt ctacaccctg cggcccagcc gggacgagct cacgaagaat 1080
 caggctctgc tcacctgcc tctcaagggt ttctaccctg cggacatcgc ggtcgaatgg 1140
 gagtgcagc gtcagcccca gaataactac aagacgacc cgcctcctt ggactcggac 1200
 ggcagctct tctgtactc gaagctgacg gtcgacaagt cgcctcggca gcaggccaac 1260
 gtcttctcgt gctcgggtgat gcacgagccc ctccacaacc actacacaca gaagagcctc 1320
 tcgctttcgc cgggcaag 1338

<210> 52
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人.口序列

<220>
 <223> 對人.口序列之描述：合成多核苷酸

<400> 52
 caggteacg tgcaggagtc aggtcccaga ctggtcaagc cgtcgcagac gctgtccctc 60
 acctgcaccg tgtcgggcta cgccttcacc gcctacaaca tccactggat ccgtcagccc 120
 cctgggaagg gccctcagtg gatcggcagc ttccaccctg acgacggcgg gtcgtctctc 180
 aaccagaagt tcaaggaccg cctcaccatc agcaaggaca cctccaagaa ccaggctcgtc 240
 ctcaaccatga ccaacatgga ccccgtggac accgccacgt actactgcgc gcggggctgg 300
 tactacttcg actactgggg gcaaggcaac ctctcaccg tctctctc 348

<210> 53
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> 人.口序列

<220>
 <223> 對人.口序列之描述：合成多核苷酸

<400> 53
 gacgtcgtga tgaccacgac gcccctctcc ctgcctgtra ccttgggcca gcccgcctcc 60


```

atcagctgcc gtgcctccaa gtccatttcc aagtacctgg cctggtacca gcagaagccg      120
gggaaggecc caaagctect catctactcc ggtccacccc tccagagcgg catccccccc      180
cgcttcageg gctccggcta cggcaccgac ttaccctca ccatcaataa catcgagtcg      240
gaggacgccg cgtactactt ctgccagcag caccagcaat cgccttacac ctccggggag      300
ggcaccaagg tggagatcaa gaggacggtc gccgcgccct cegtgttcat ctccccccc      360
tcggacgaac agctgaagtc cgggaccgcc tccgtcgtct gctcctcaa caactctac      420
ccgcgcgagg ccaaggtgca gtggaaggtc gacaacgcgc tccagtccgg caactcccag      480
gagtcggtga ccgagcagga ctccaaggac agtaacct cgtgagctc cacactgacg      540
ctctcaagg ccgactaega gaagcacaag gtgtacgat gcgaggtgac ccaccagggg      600
ctgagctcgc cgglgactaa gtcttcaac aggggcgaat gc                                642

```

<210> 54
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成多核苷酸

```

<400> 54
gacgtctgta tgaccagtc gccctctcc ctgccggtta cctgggcca gccgcctcc      60
atcagctgcc gtgcctccaa gtccatttcc aagtacctgg cctggtacca gcagaagccg      120
gggaaggecc caaagctect catctactcc ggtccacccc tccagagcgg catccccccc      180
cgcttcageg gctccggcta cggcaccgac ttaccctca ccatcaataa catcgagtcg      240
gaggacgccg cgtactactt ctgccagcag caccagcaat cgccttacac ctccggggag      300
ggcaccaagg tggagatcaa g                                321

```

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

```

<400> 55
Gly Gly Phe Gly
1

```

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 56
Ala Leu Ala Leu
1

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 57
Gly Phe Leu Gly
1

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 58
Leu Leu Gln Gly Ala
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<223> 對未知序列之描述：轉肽酶基元

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 任何胺基酸

<400> 59
Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> 未知序列

<220>
<223> 對未知序列之描述：轉肽酶基元

<400> 60
Asn Pro Gln Thr Asn
1 5

<210> 61
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成肽

<400> 61
 Gly Phe Glu Ile Asp Lys Val Trp Tyr Asp Leu Asp Ala
 1 5 10

<210> 62
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 62
 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
 100

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 63
 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> 64

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 64

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 Pro Asp Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

130 135 140
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser
 145 150 155 160
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro
 165 170 175
 Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Ser Ile Ser Arg Gly Gly Thr Thr
 180 185 190
 Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 195 200 205
 Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 210 215 220
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Tyr Ala
 225 230 235 240
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

 <210> 65
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> 人口序列

 <220>
 <223> 對人口序列之描述：合成多肽

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

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 130 135 140

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 145 150 155 160

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 165 170 175

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly
 180 185 190

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

Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val
 210 215 220

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 225 230 235 240

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 66

<211> 251

<212> PRT

<213> 人口序列

<220>

<223> 對人口序列之描述：合成多肽

<400> 66

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser 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 Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
130 135 140

Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
145 150 155 160

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro
165 170 175

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly
180 185 190

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

Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val
210 215 220

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
225 230 235 240

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
245 250

<210> 67

<211> 251

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 對人工序列之描述：合成多肽

<400> 67

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
 Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 130 135 140
 Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 165 170 175
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly
 180 185 190
 Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
 195 200 205
 Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val
 210 215 220
 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 225 230 235 240
 Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 68

<211> 251

<212> PRT

<213> 人口序列

<220>

<223> 對人口序列之描述：合成多肽

<400> 68

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

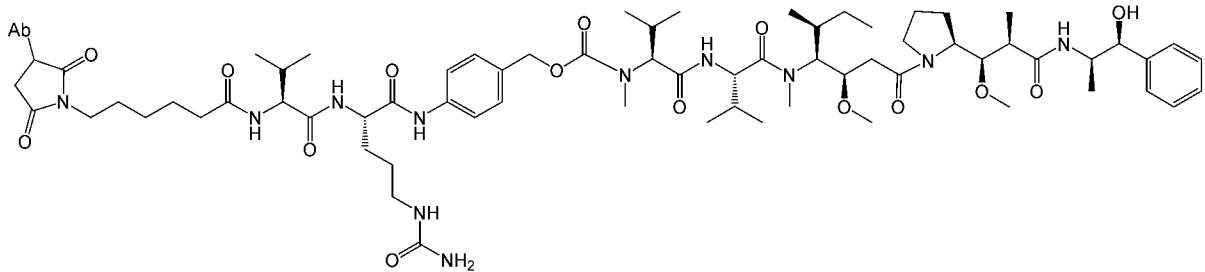
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
 85 90 95
Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 115 120 125
Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 130 135 140
Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
145 150 155 160
Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 165 170 175
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly
 180 185 190
Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp
 195 200 205
Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val
 210 215 220
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
225 230 235 240
Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種具有下式之免疫接合物：



(ADC-A)

其中Ab為抗體，其中該抗體之HCDR1、HCDR2及HCDR3分別包含SEQ ID NO:7、8及9之胺基酸序列，且該抗體之LCDR1、LCDR2及LCDR3分別包含SEQ ID NO:10、11及12之胺基酸序列。

【請求項2】

如請求項1之免疫接合物，其中該抗體之V_H及V_L分別包含SEQ ID NO:5及6之胺基酸序列。

【請求項3】

如請求項2之免疫接合物，其中該抗體之重鏈及輕鏈分別包含SEQ ID NO:3及4之胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1至3中任一項之免疫接合物，其中該細胞毒性藥物部分體相對於該抗體之比率為1至7。

【請求項5】

如請求項4之免疫接合物，其中該細胞毒性藥物部分體相對於該抗體之比率為至少3。

【請求項6】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至3中任一項之免疫接合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項7】

如請求項6之醫藥組合物，其另外包含選自由以下組成之群之其他治療劑：布魯頓氏(Bruton's)酪胺酸激酶(BTK)抑制劑、B細胞淋巴瘤2 (Bcl-2)抑制劑、雷帕黴素(rapamycin)之哺乳動物靶(mTOR)抑制劑、及磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制劑。

【請求項8】

一種如請求項1至3中任一項之免疫接合物之用途，其係用於製備於有需要之患者治療表現人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)之癌症之藥劑。

【請求項9】

一種製備如請求項1之免疫接合物之方法，其包含：

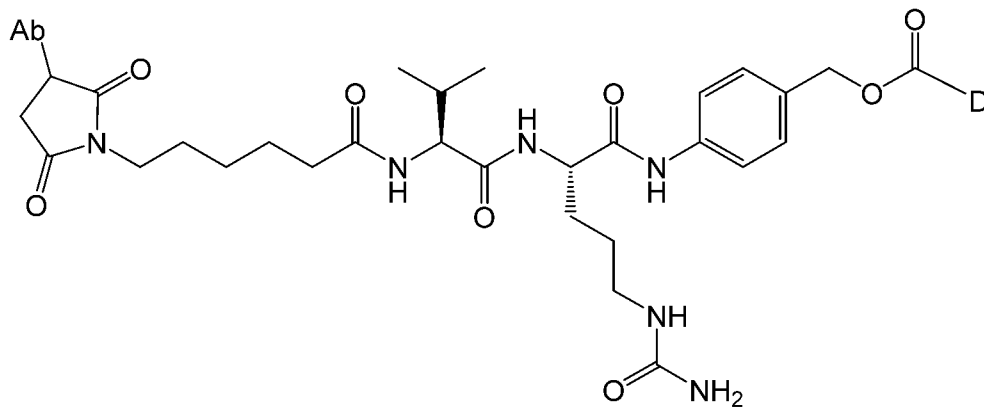
a.提供特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)之抗體；及

b.將該抗體與單甲基奧瑞他汀E (monomethyl auristatin E (MMAE))接合；

其中該抗體之HCDR1、HCDR2及HCDR3分別包含SEQ ID NO:7、8及9之胺基酸序列；且該抗體之LCDR1、LCDR2及LCDR3分別包含SEQ ID NO:10、11及12之胺基酸序列。

【請求項10】

一種具有下式之免疫接合物：



其中：

D為MMAE；且

Ab為抗體，其中該抗體之HCDR1、HCDR2及HCDR3分別包含SEQ ID NO:7、8及9之胺基酸序列，且該抗體之LCDR1、LCDR2及LCDR3分別包含SEQ ID NO:10、11及12之胺基酸序列。

【請求項11】

如請求項10之免疫接合物，其中該抗體之V_H及V_L分別包含SEQ ID NO:5及6之胺基酸序列。

【請求項12】

如請求項11之免疫接合物，其中該抗體之重鏈及輕鏈分別包含SEQ ID NO:3及4之胺基酸序列。

【請求項13】

如請求項10至12中任一項之免疫接合物，其中該細胞毒性藥物部分體相對於該抗體之比率為1至7。

【請求項14】

如請求項13之免疫接合物，其中該細胞毒性藥物部分體相對於該抗體之比率為至少3。

【請求項15】

一種醫藥組合物，其包含如請求項10至12中任一項之免疫接合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項16】

如請求項15之醫藥組合物，其另外包含選自由以下組成之群之其他治療劑：布魯頓氏(Bruton's)酪胺酸激酶(BTK)抑制劑、B細胞淋巴瘤2(Bcl-2)抑制劑、雷帕黴素(rapamycin)之哺乳動物靶(mTOR)抑制劑、及磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制劑。

【請求項17】

一種如請求項10至12中任一項之免疫接合物之用途，其係用於製備於有需要之患者治療表現人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)之癌症之藥劑。

【請求項18】

一種製備如請求項10之免疫接合物之方法，其包含：

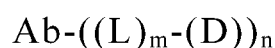
a.提供特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1 (ROR1)之抗體；及

b.將該抗體與單甲基奧瑞他汀E (monomethyl auristatin E (MMAE))接合；

其中該抗體之HCDR1、HCDR2及HCDR3分別包含SEQ ID NO:7、8及9之胺基酸序列，且該抗體之LCDR1、LCDR2及LCDR3分別包含SEQ ID NO:10、11及12之胺基酸序列。

【請求項19】

一種具有下式之免疫接合物：



其中：

Ab為結合ROR1蛋白之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體之HCDR1、HCDR2及HCDR3分別包含SEQ ID NO:7、8及9之胺基酸序列，且該抗體之LCDR1、LCDR2及LCDR3分別包含SEQ ID NO:10、11及12之胺基酸序列；

L為可裂解連接子，其為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苯甲氧基羰基(MC-VC-PAB)；

D為藥物部分體，其為MMAE；

m為1；且

n為1至10之整數。

【請求項20】

如請求項19之免疫接合物，其中該抗體之V_H及V_L分別包含SEQ ID NO:5及6之胺基酸序列。

【請求項21】

如請求項20之免疫接合物，其中該抗體之重鏈及輕鏈分別包含SEQ ID NO:3及4之胺基酸序列。

【請求項22】

如請求項19至21中任一項之免疫接合物，其中該細胞毒性藥物部分體相對該抗體之比率為1至7。

【請求項23】

如請求項22之免疫接合物，其中該細胞毒性藥物部分體相對於該抗體之比率為至少3。

【請求項24】

一種醫藥組合物，其包含如請求項19至21中任一項之免疫接合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項25】

如請求項24之醫藥組合物，其另外包含選自由以下組成之群之其他治療劑：布魯頓氏(Bruton's)酪胺酸激酶(BTK)抑制劑、B細胞淋巴瘤2(Bcl-2)抑制劑、雷帕黴素(rapamycin)之哺乳動物靶(mTOR)抑制劑、及磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制劑。

【請求項26】

一種如請求項19至21中任一項之免疫接合物之用途，其係用於製備於有需要之患者治療表現人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1(ROR1)之癌症之藥劑。

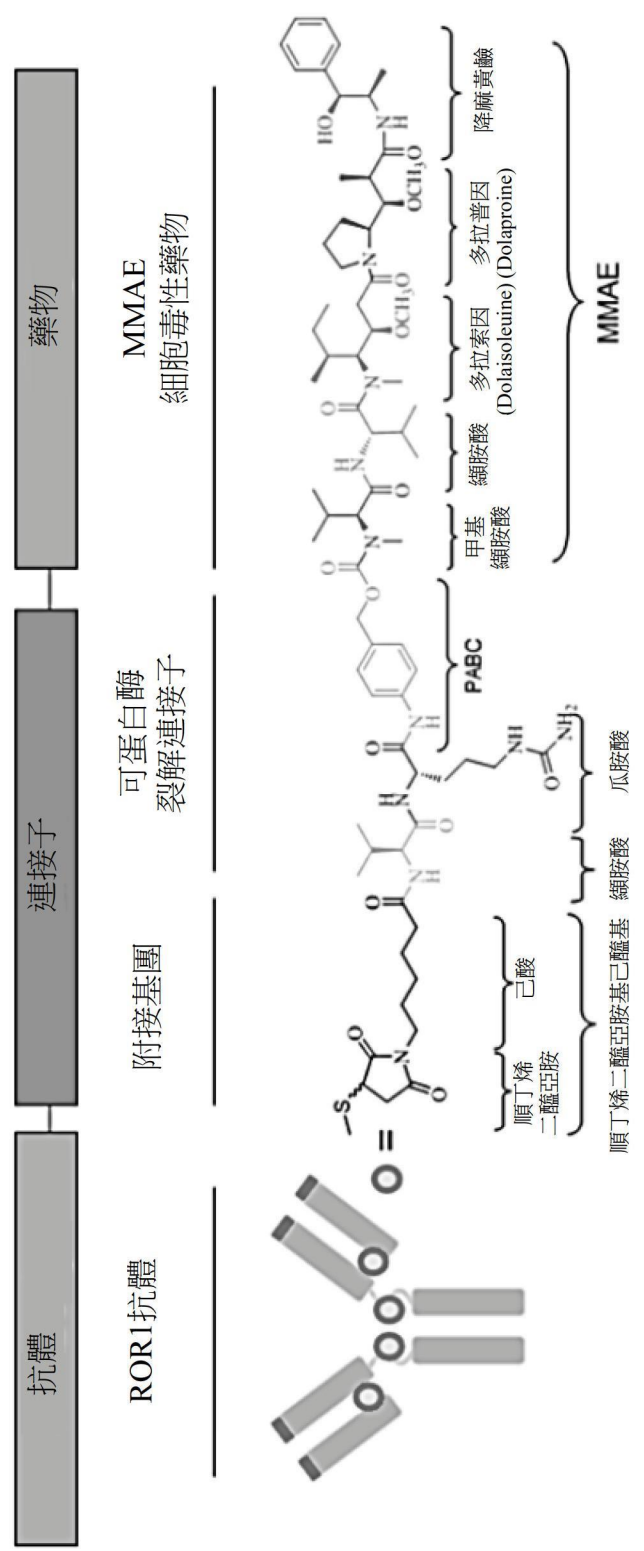
【請求項27】

一種製備如請求項19之免疫接合物之方法，其包含：

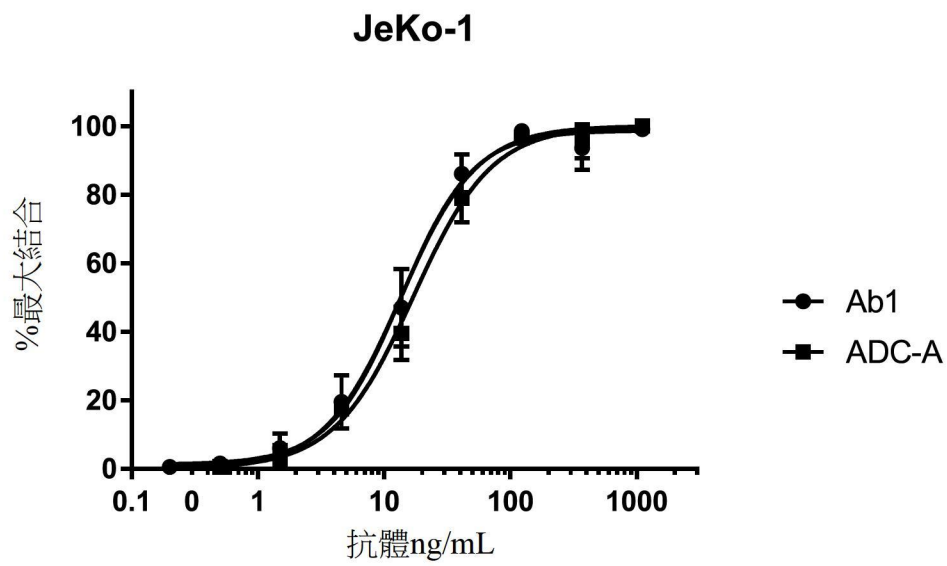
- a. 提供特異性結合於人類受體酪胺酸激酶樣孤兒受體1(ROR1)之抗體；及
- b. 將該抗體與單甲基奧瑞他汀E(monomethyl auristatin E (MMAE))接合；

其中該抗體之HCDR1、HCDR2及HCDR3分別包含SEQ ID NO:7、8及9之胺基酸序列，且該抗體之LCDR1、LCDR2及LCDR3分別包含SEQ ID NO:10、11及12之胺基酸序列。

【發明圖式】

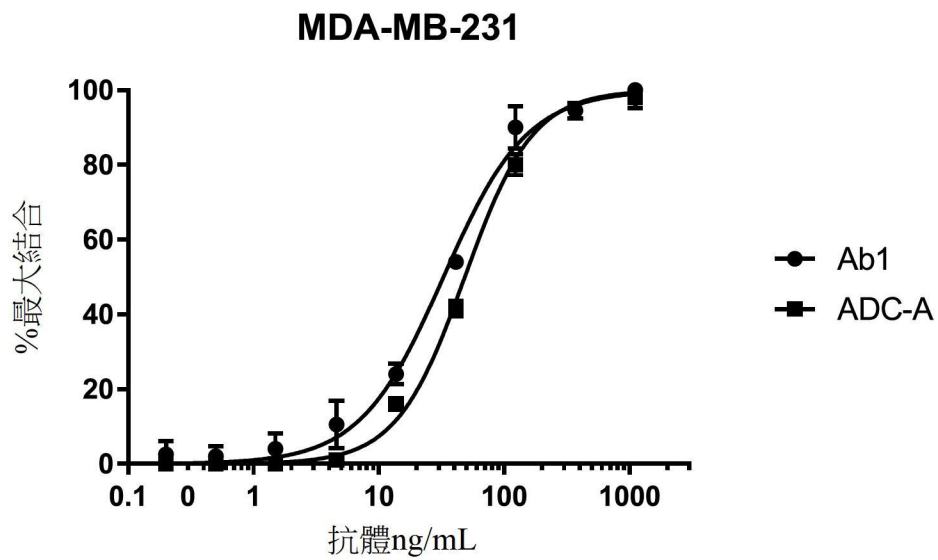


【圖1】



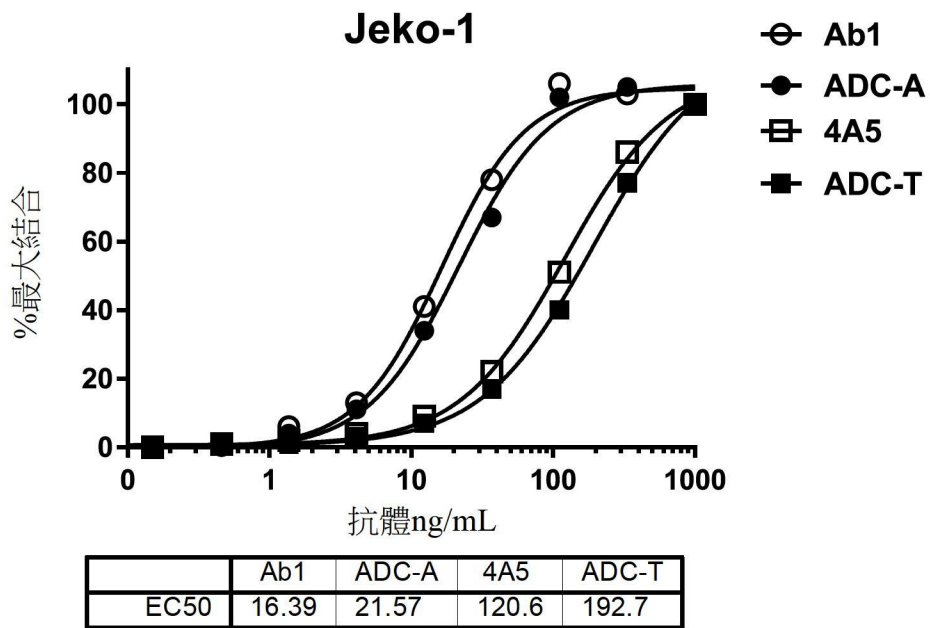
	Ab1	ADC-A
EC50	13.61	17.01

【圖2A】

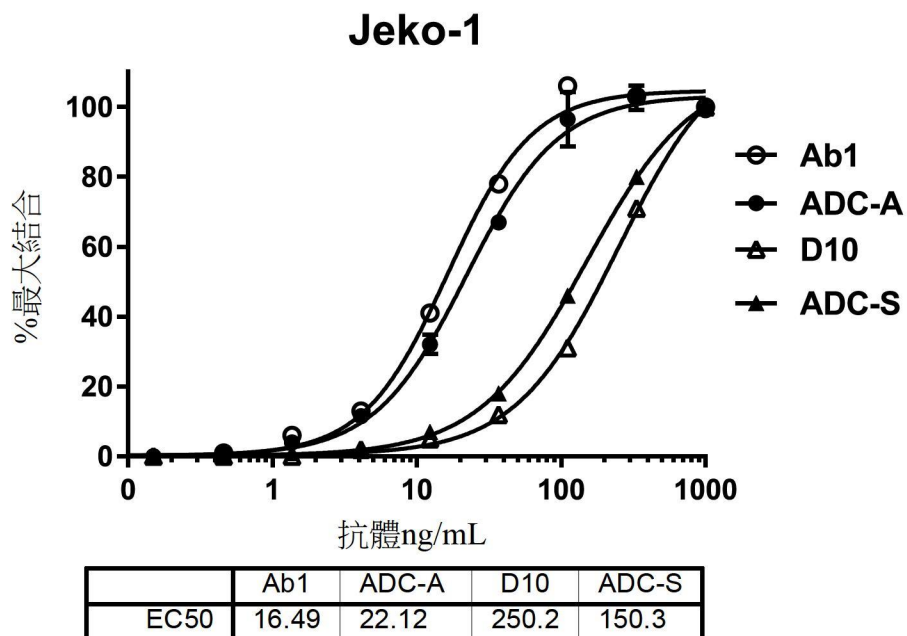


	Ab1	ADC-A
EC50	32.81	48.53

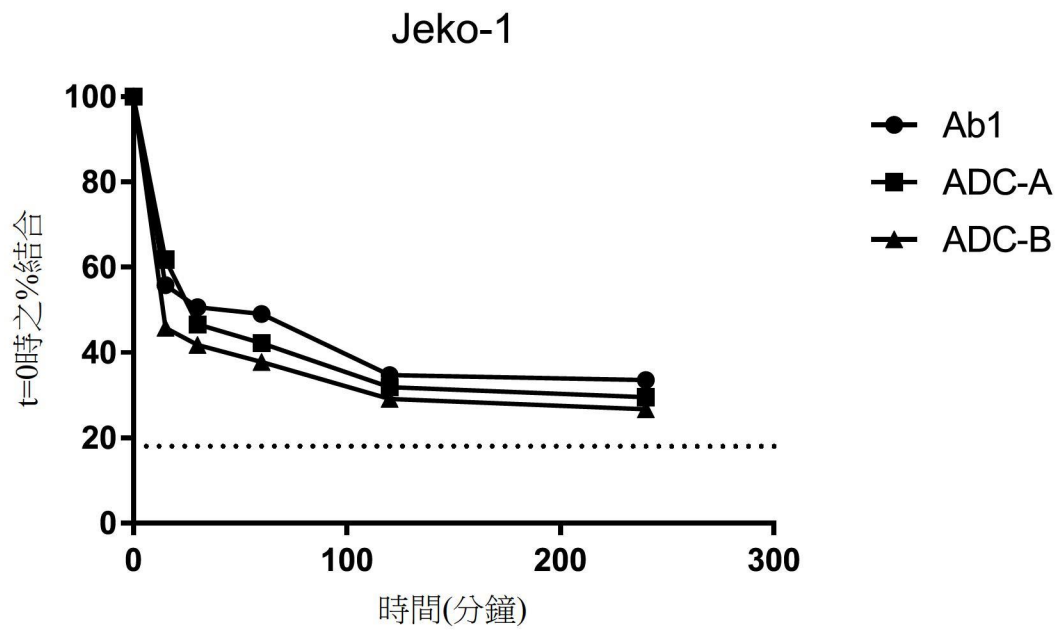
【圖2B】



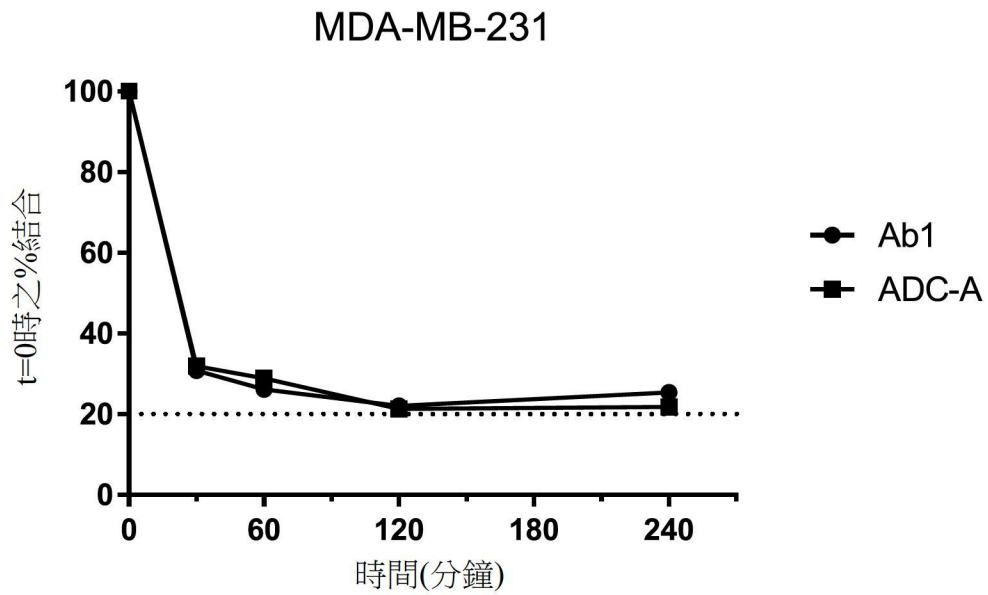
【圖3A】



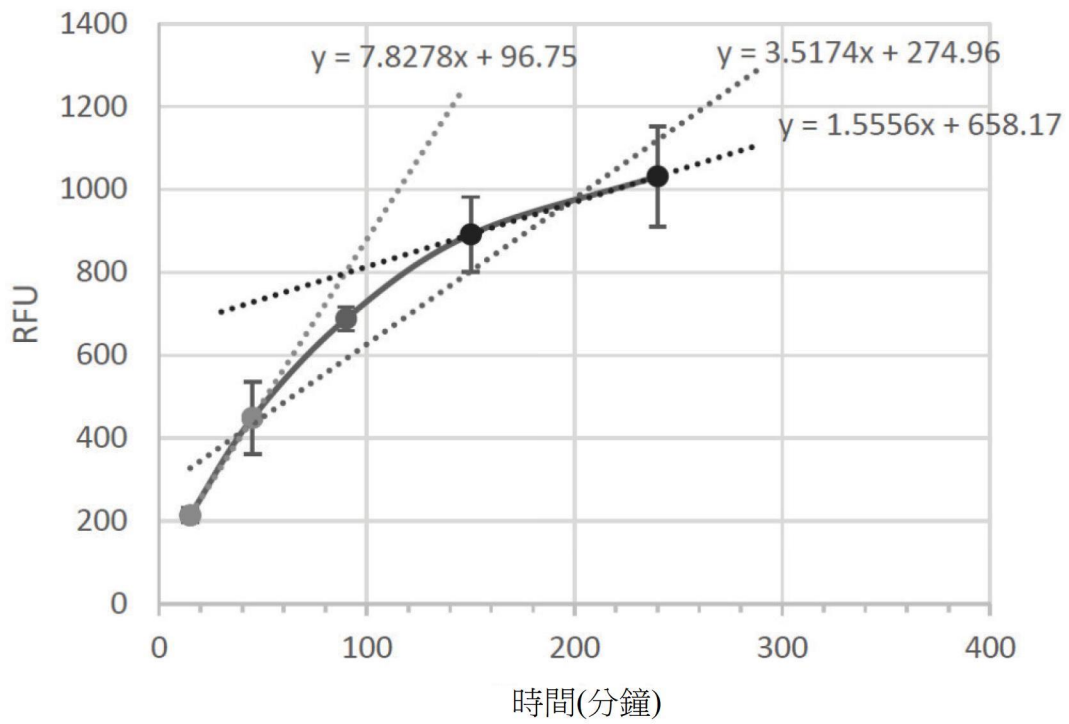
【圖3B】



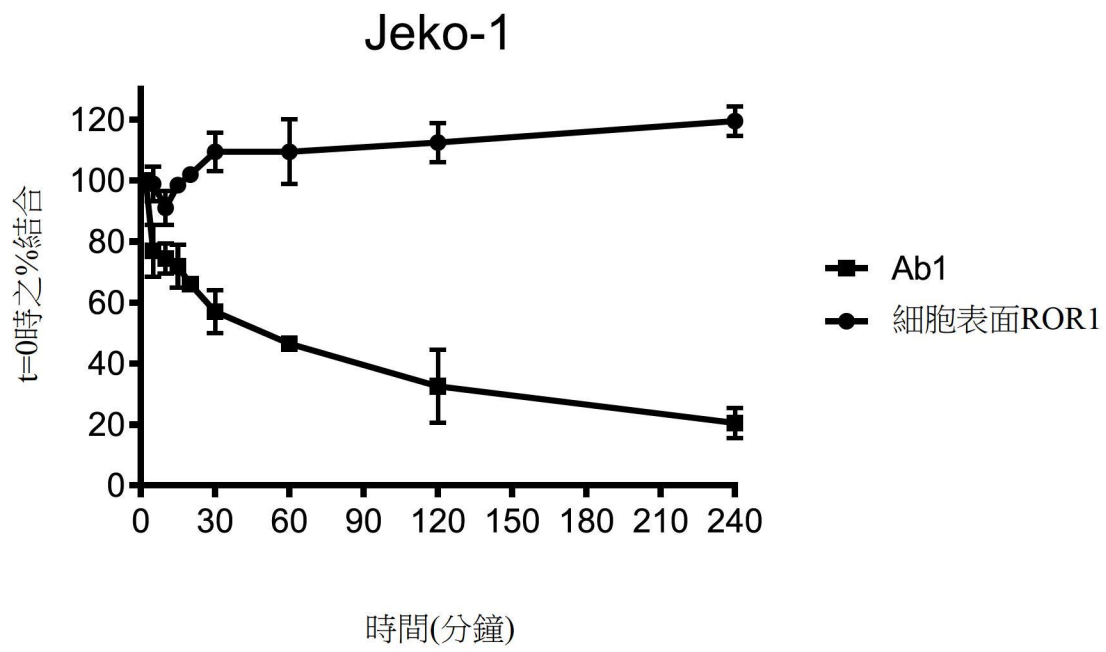
【圖4A】



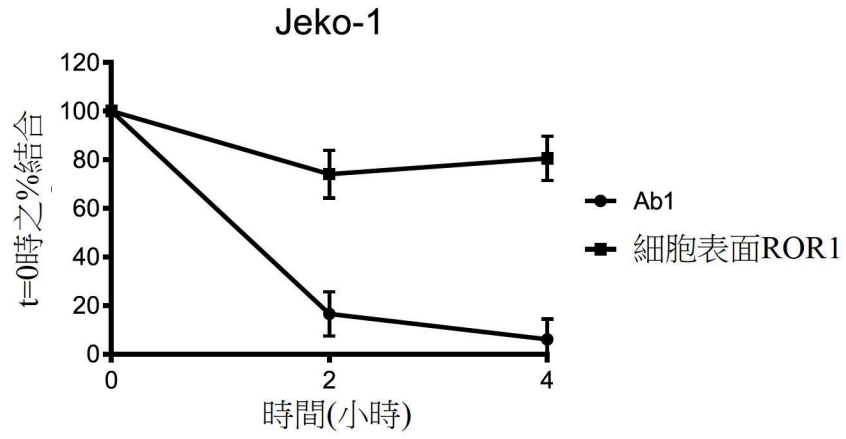
【圖4B】



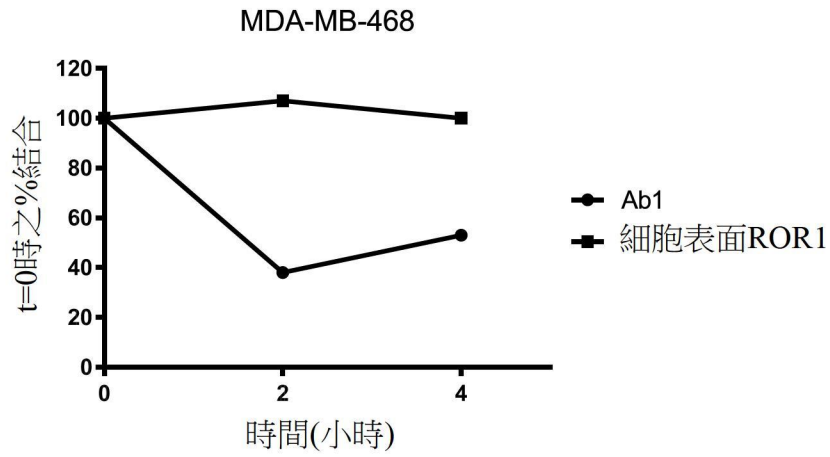
【圖5】



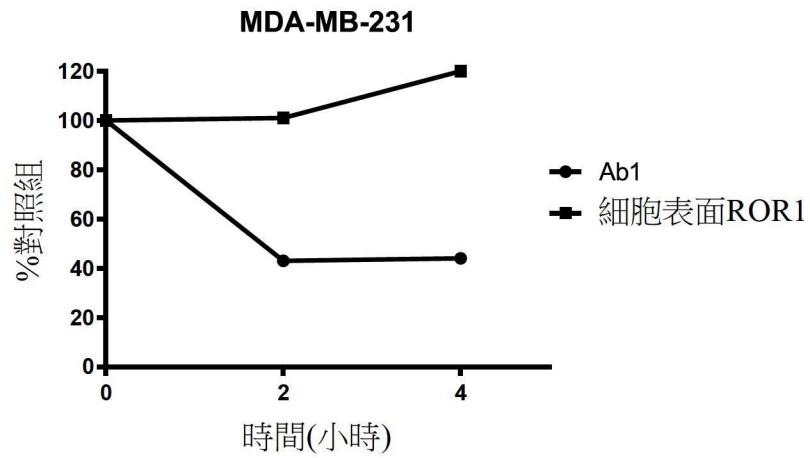
【圖6】



【圖7A】

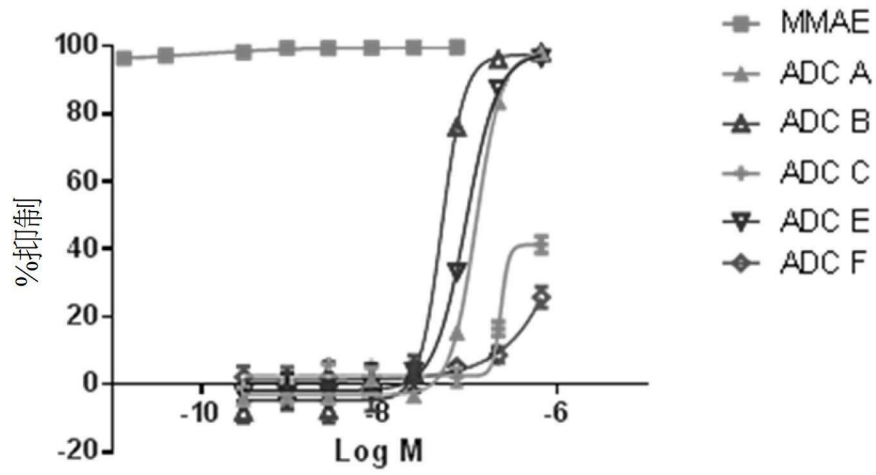


【圖7B】



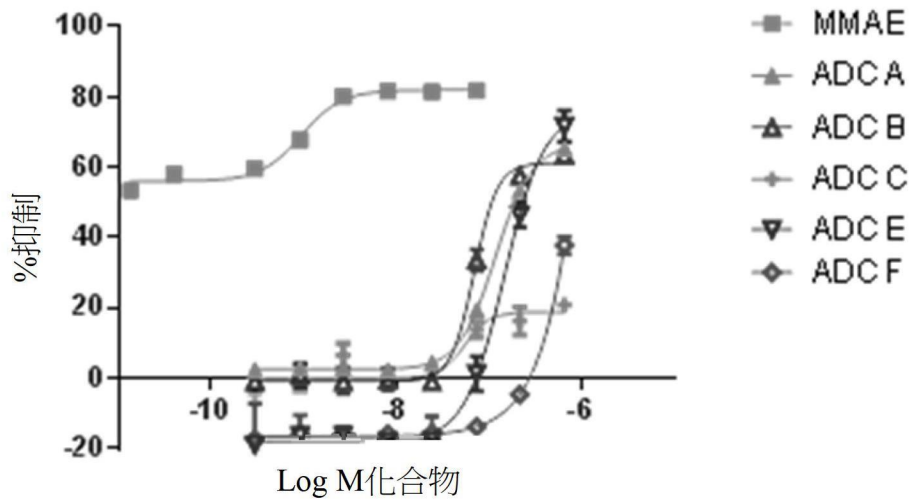
【圖7C】

TMD-8

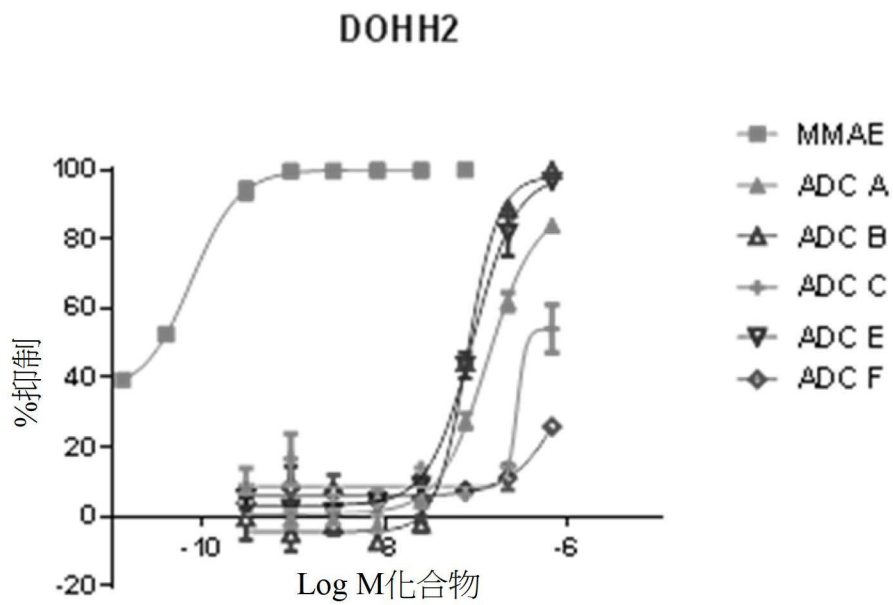


【圖8A】

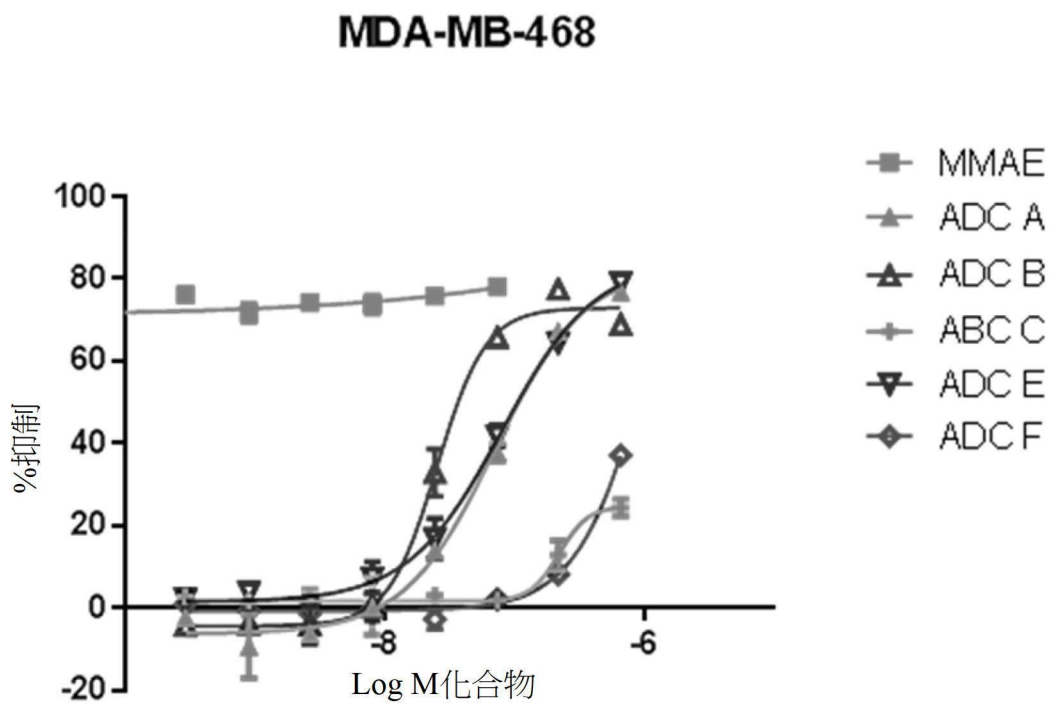
HBL-1



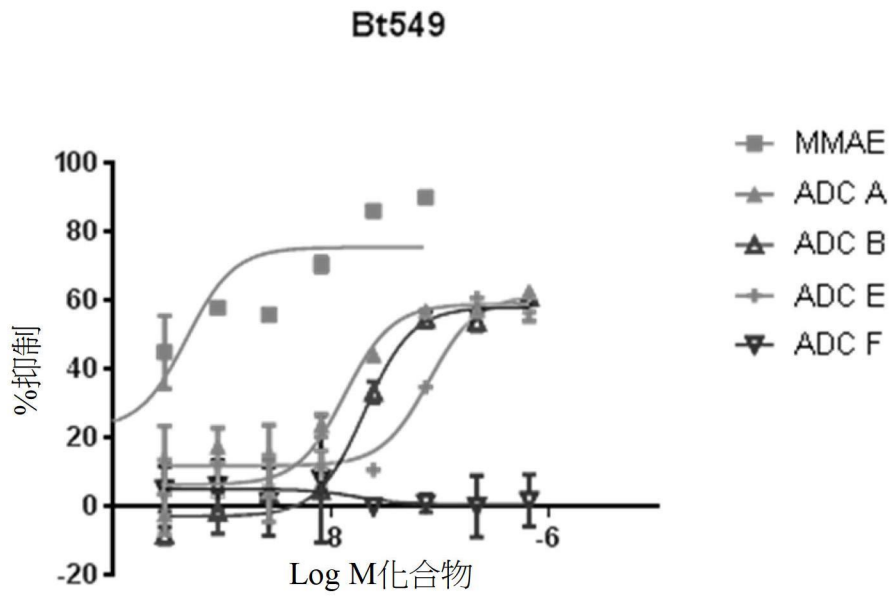
【圖8B】



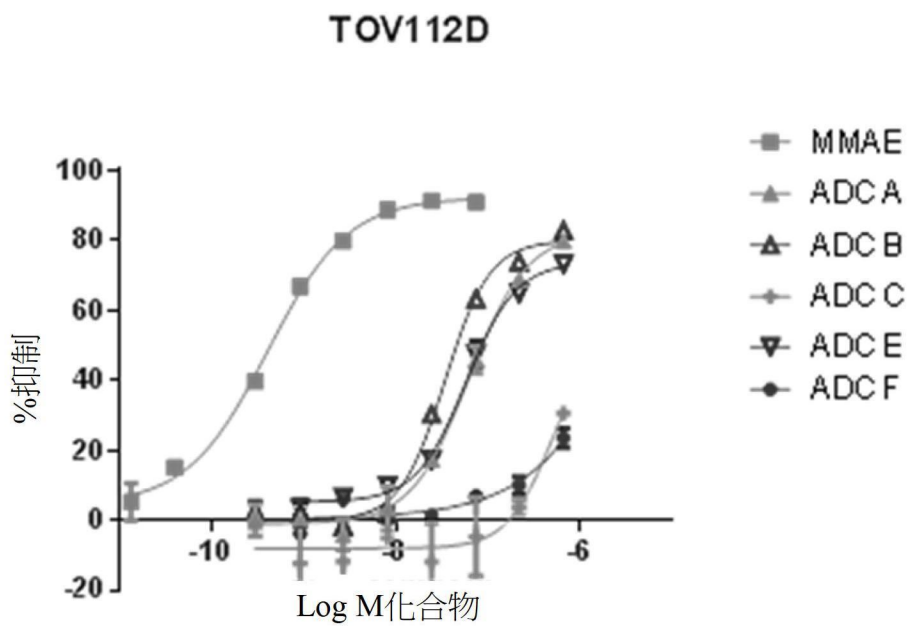
【圖8C】



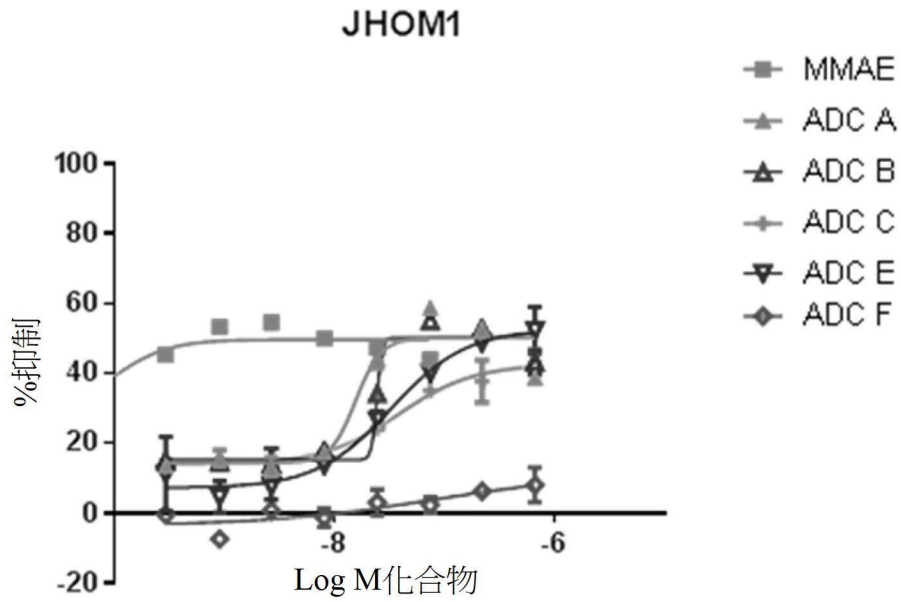
【圖8D】



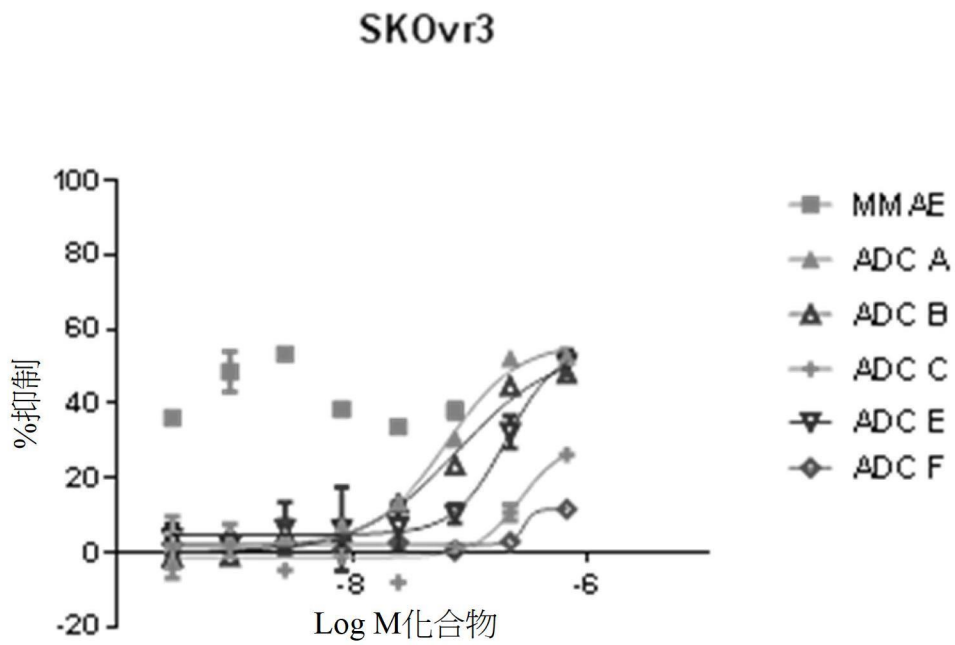
【圖8E】



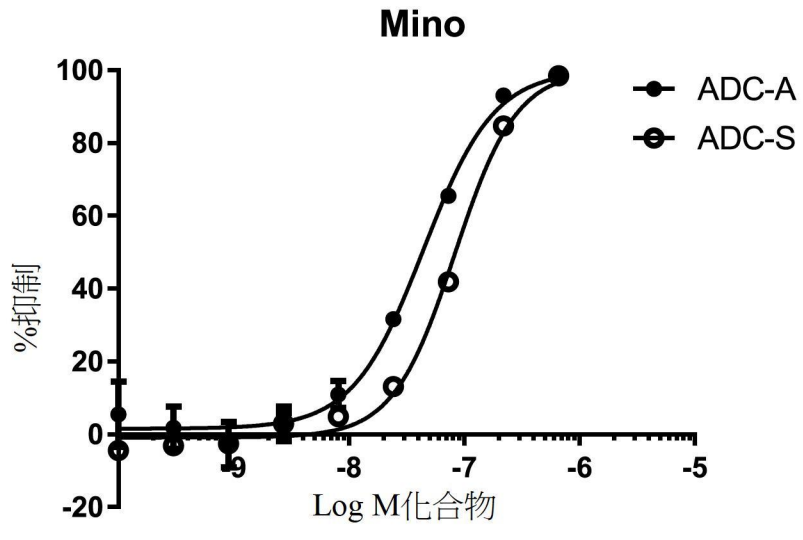
【圖8F】



【圖8G】

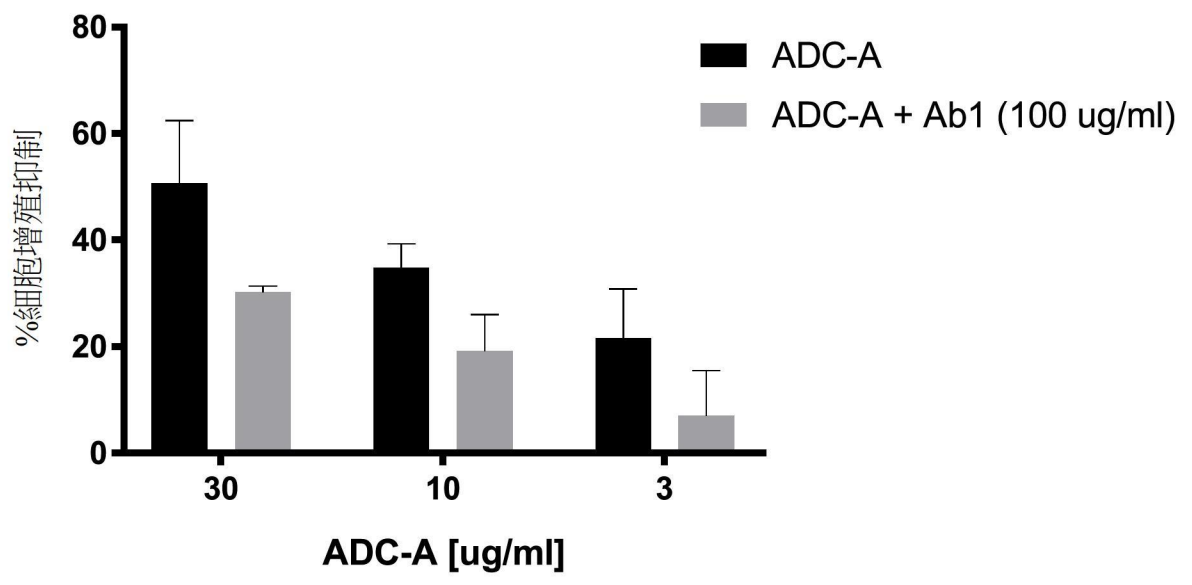


【圖8H】

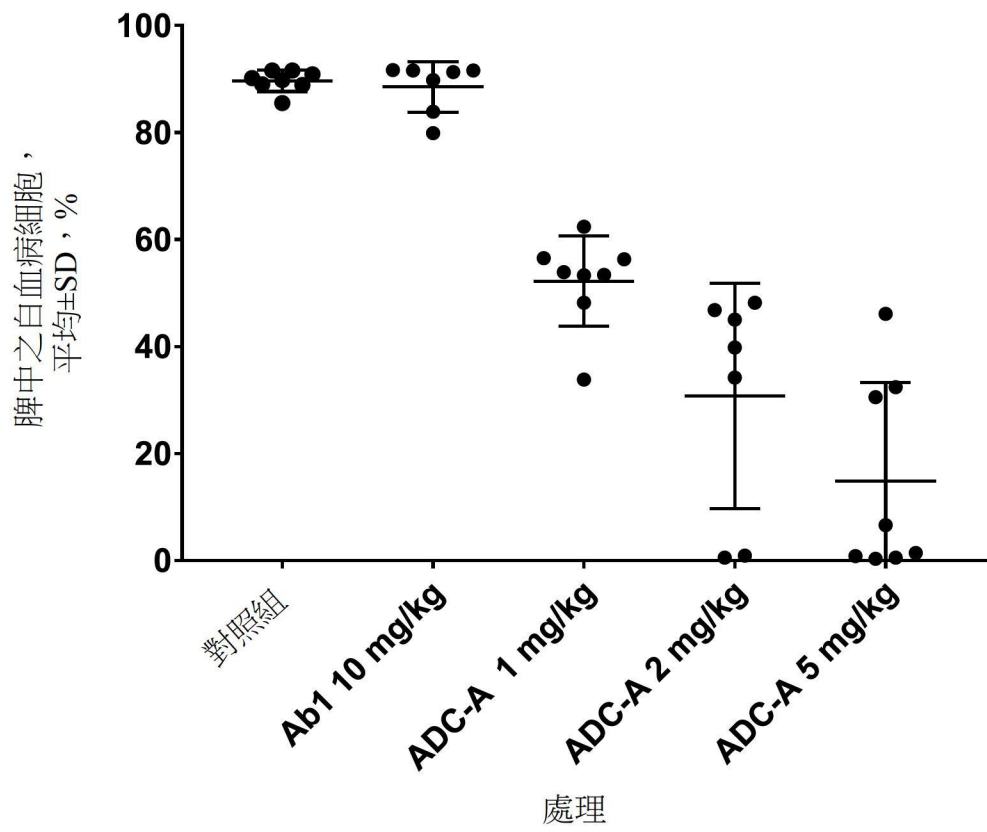


	ADC-A	ADC-S
IC50	4.462e-008	8.331e-008

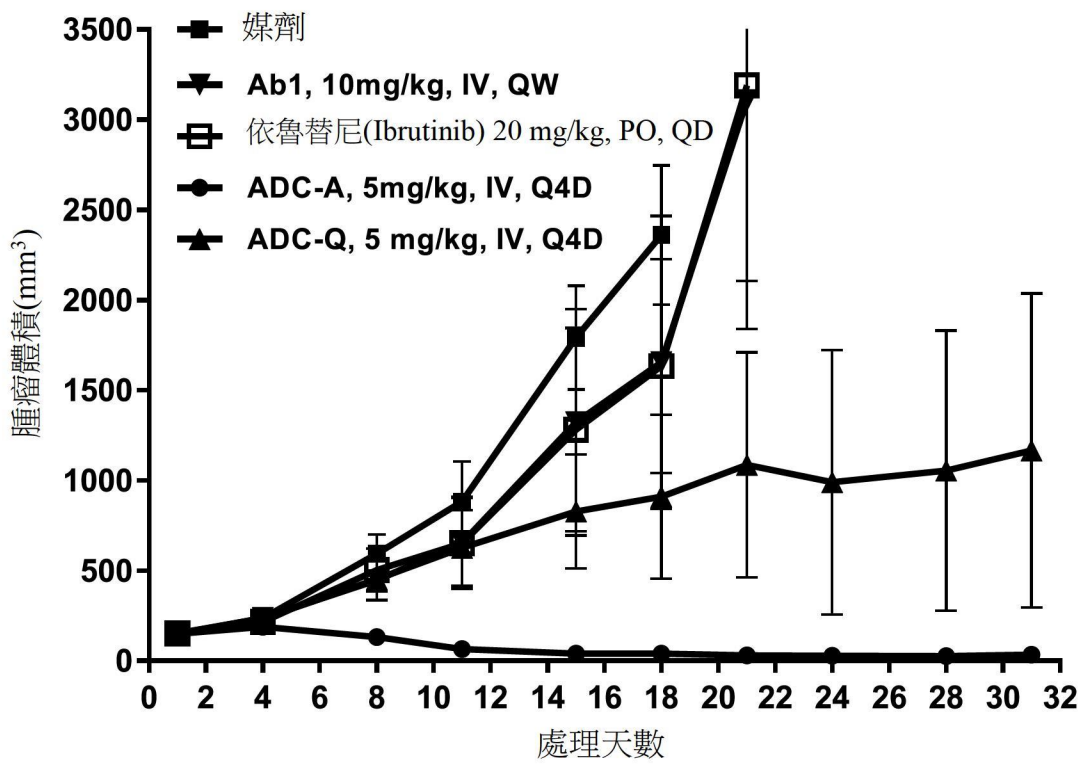
【圖8I】



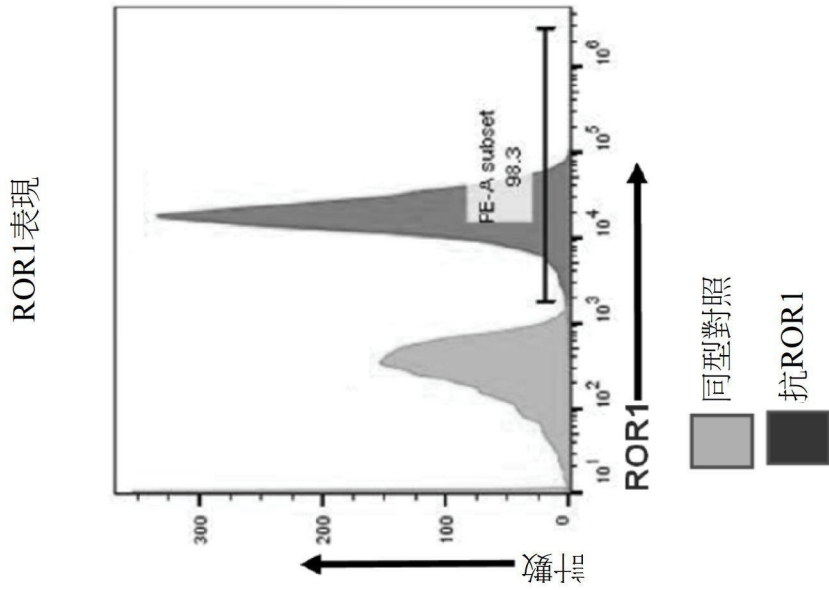
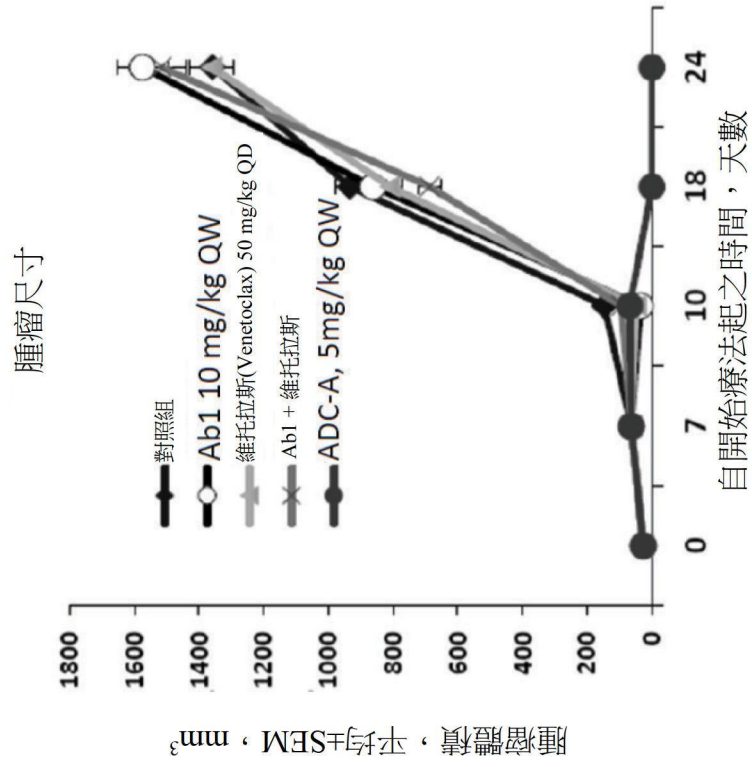
【圖9】



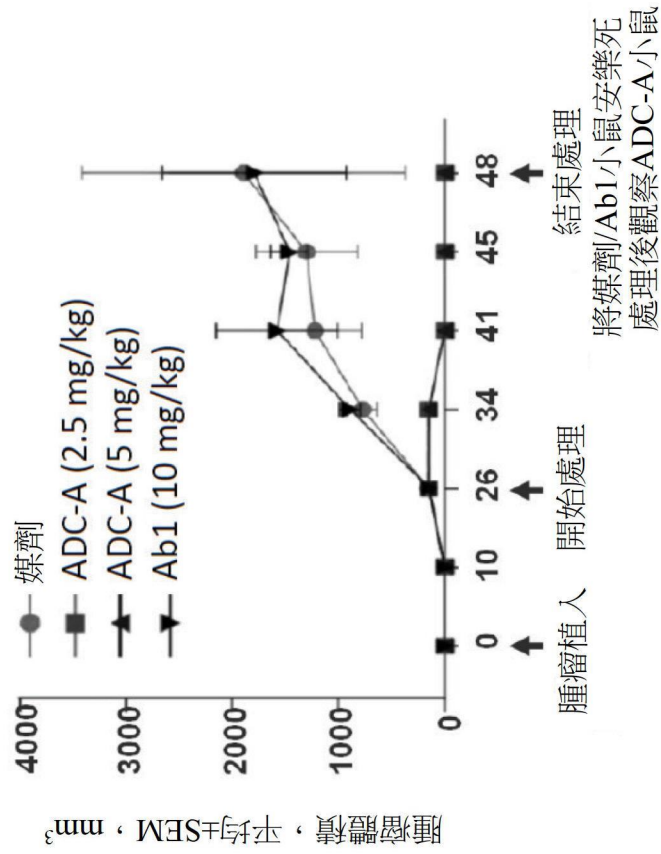
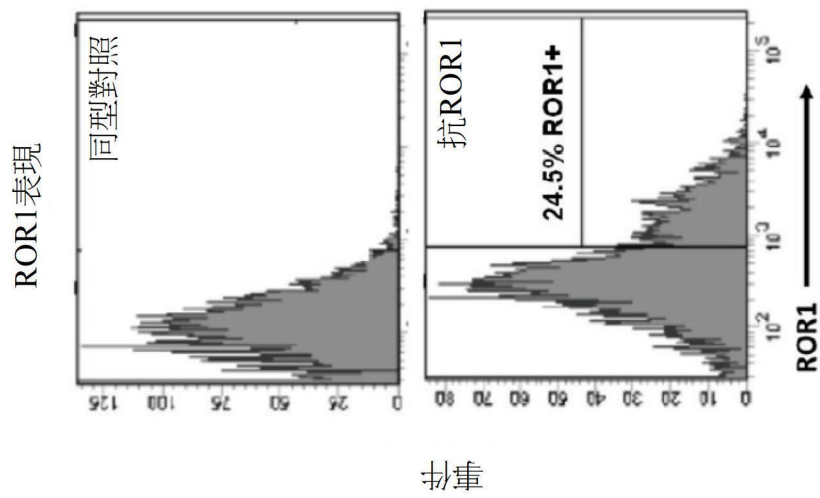
【圖10】



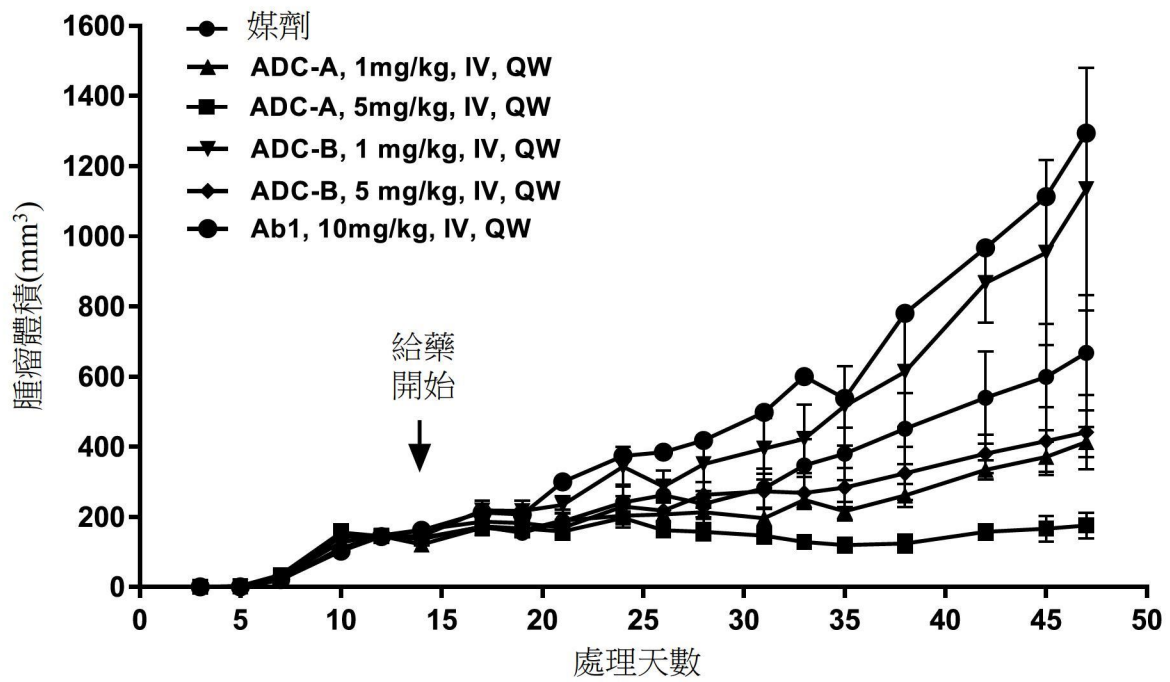
【圖11】



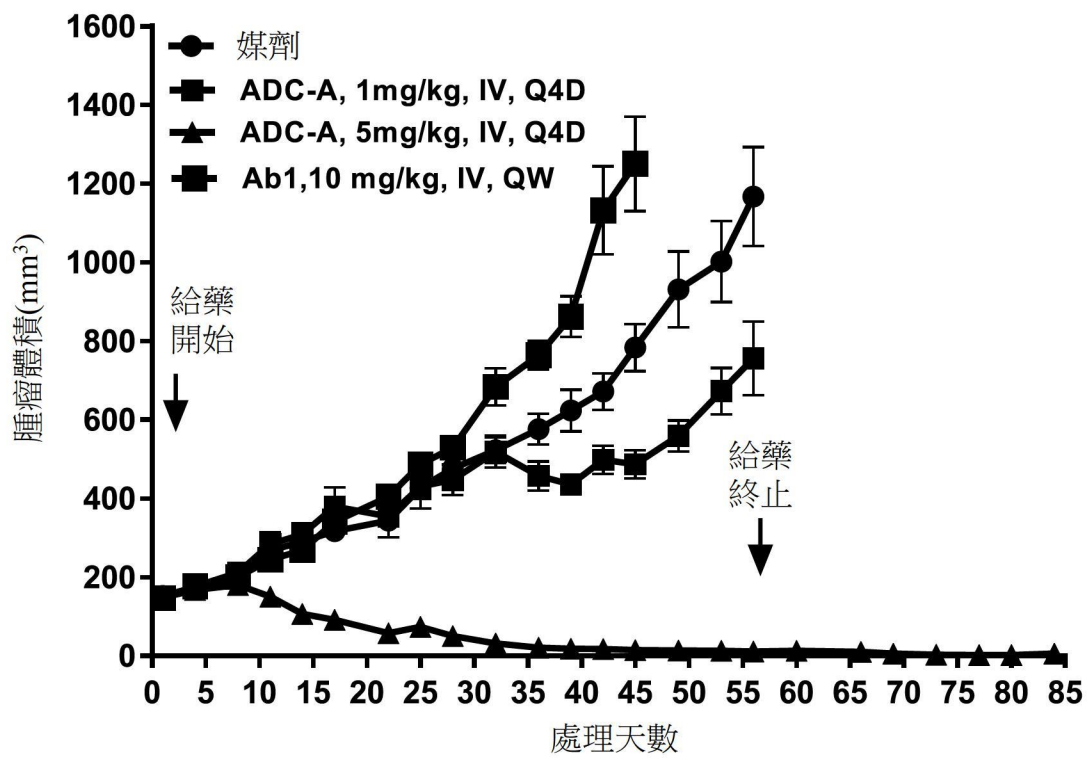
【圖12】



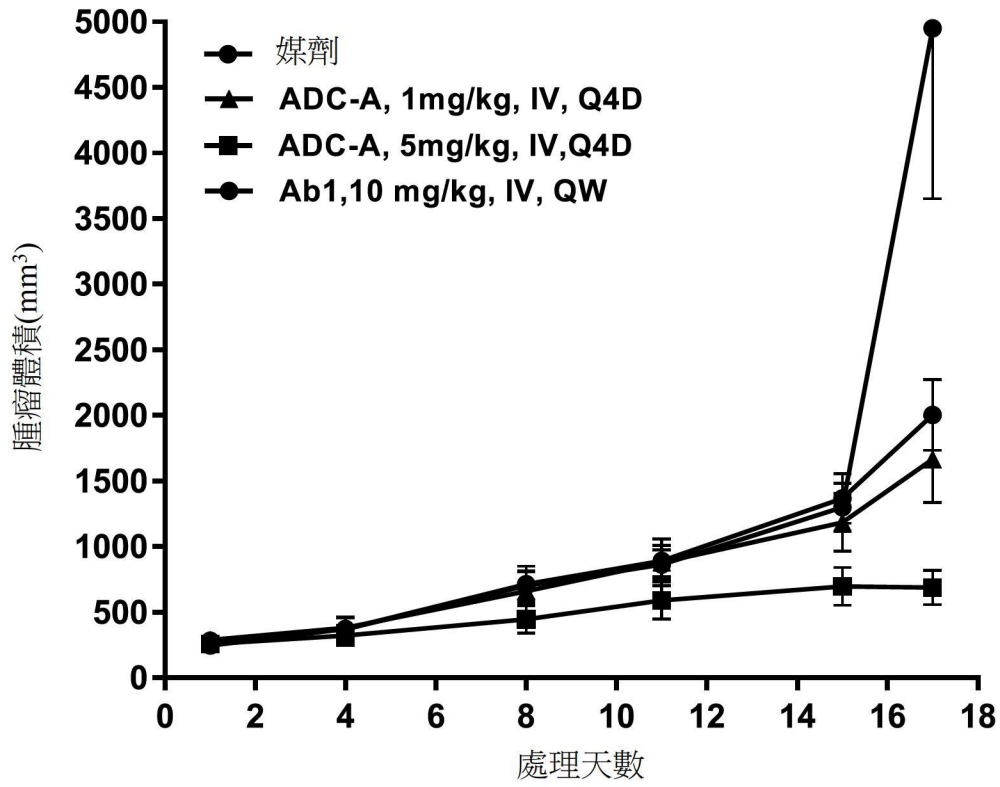
【圖13】



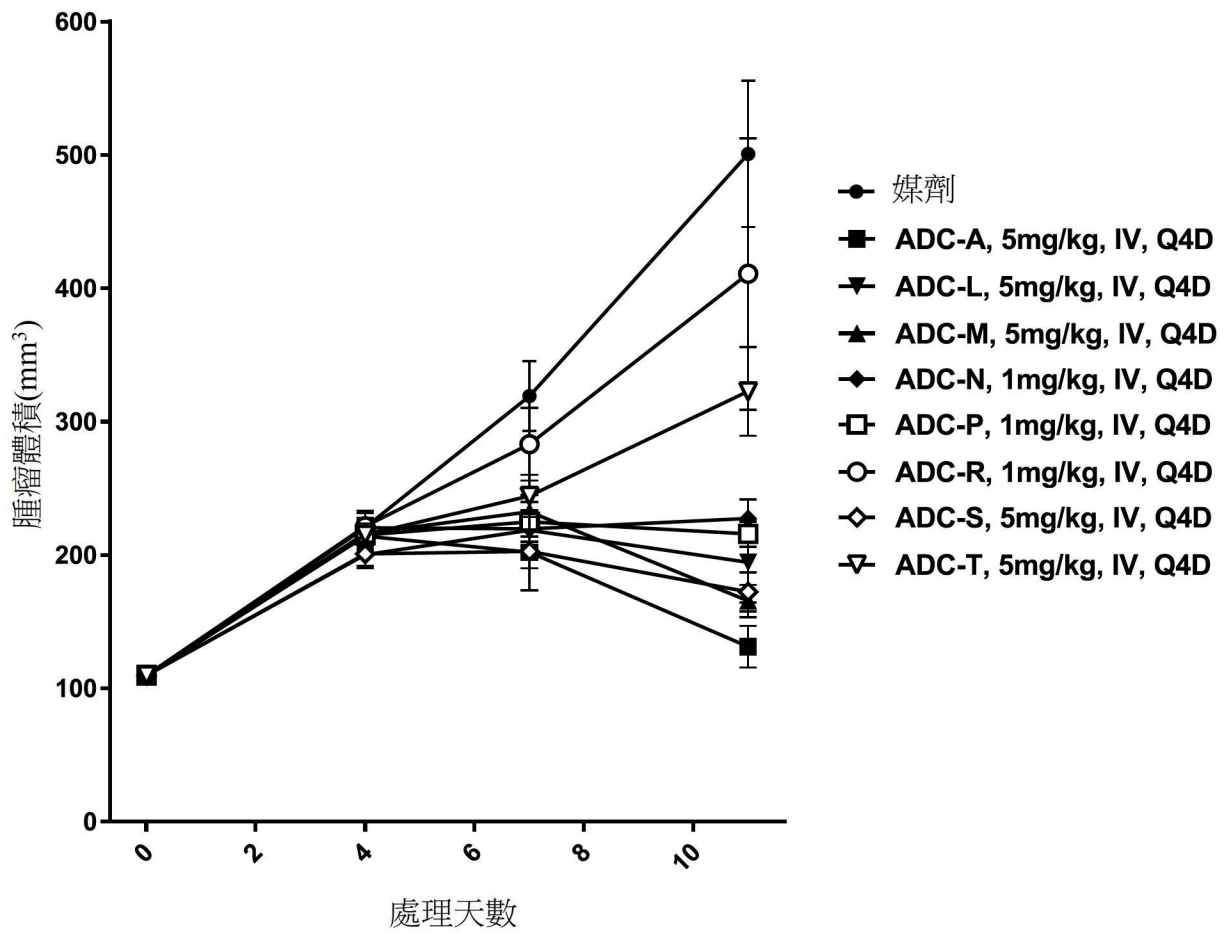
【圖14】



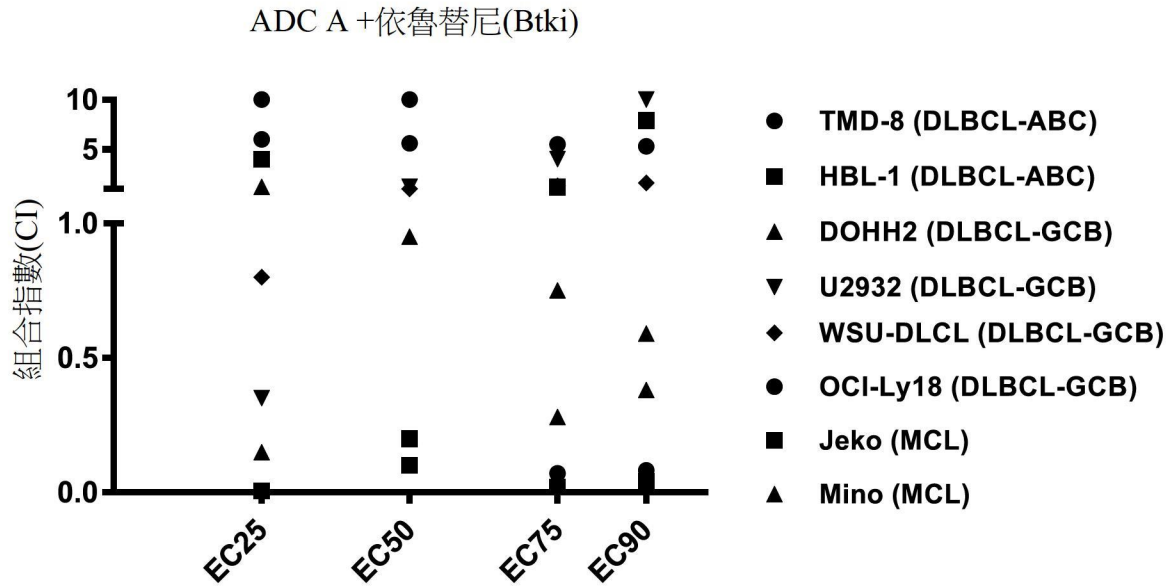
【圖15】



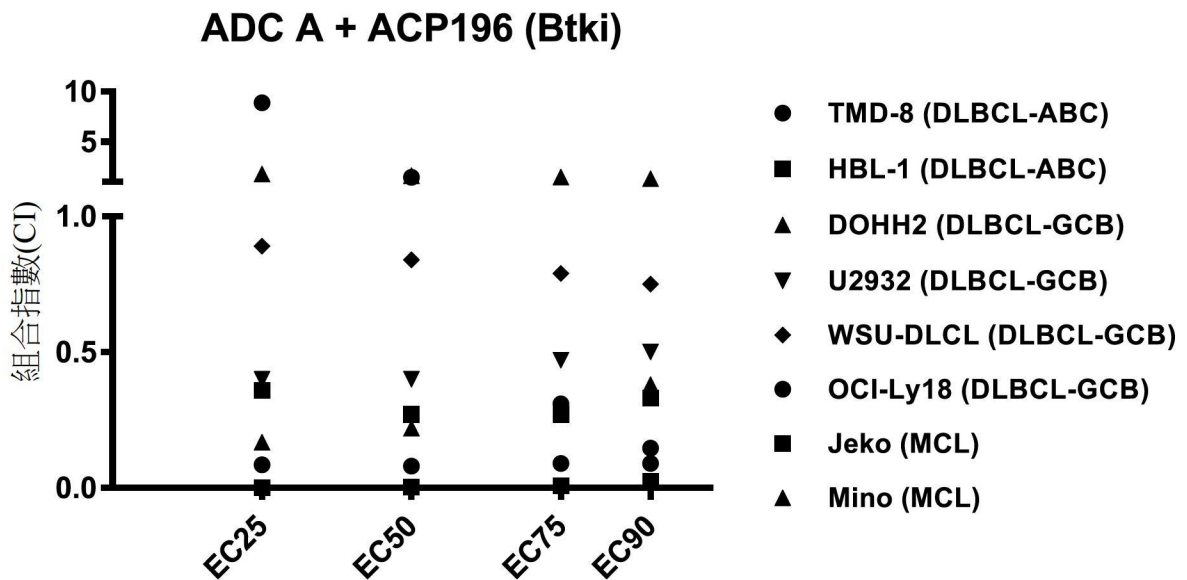
【圖16】



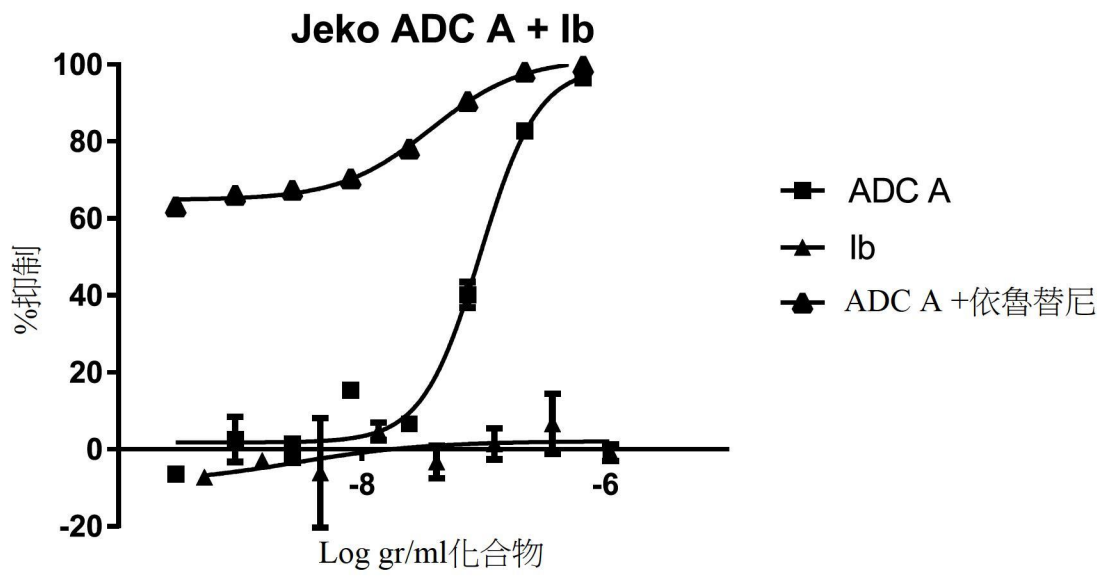
【圖17】



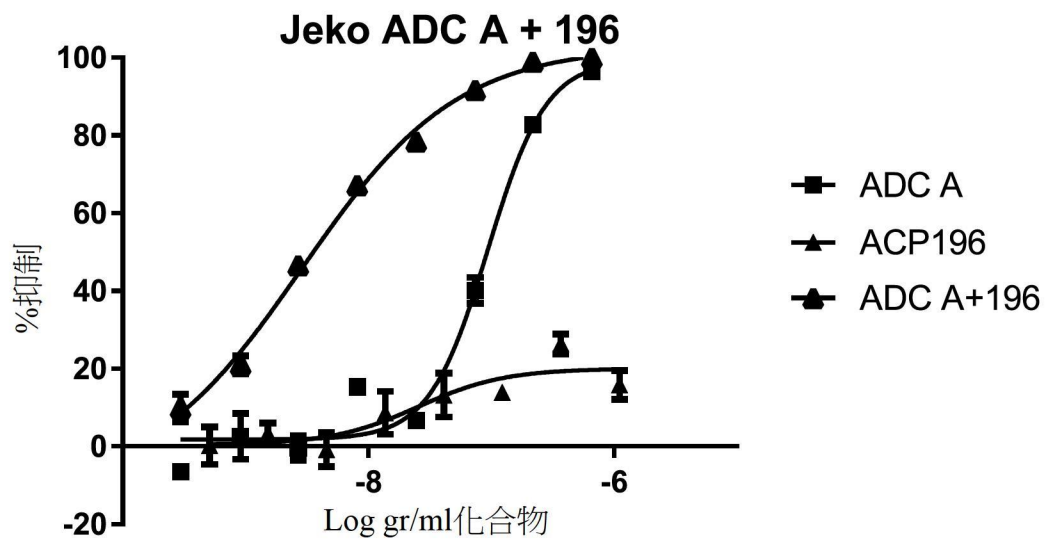
【圖18A】



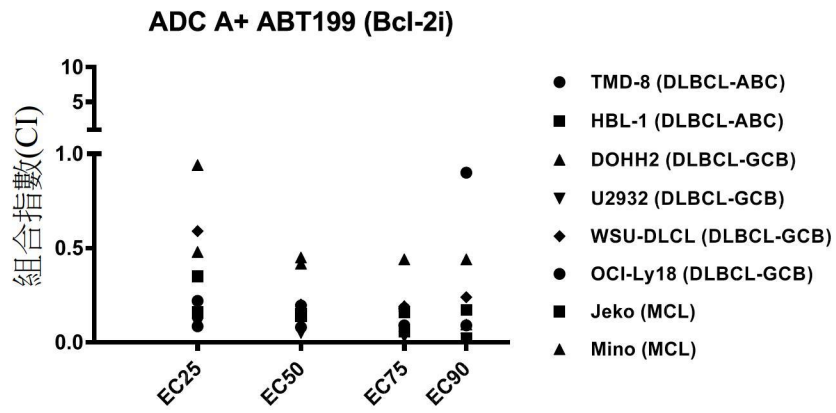
【圖18B】



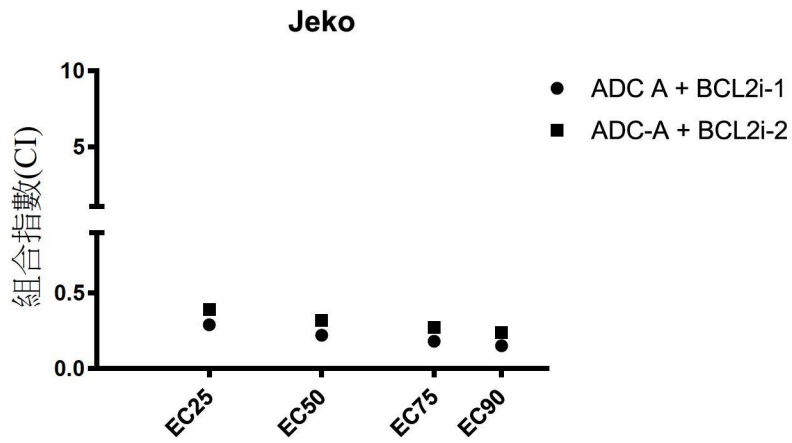
【圖19A】



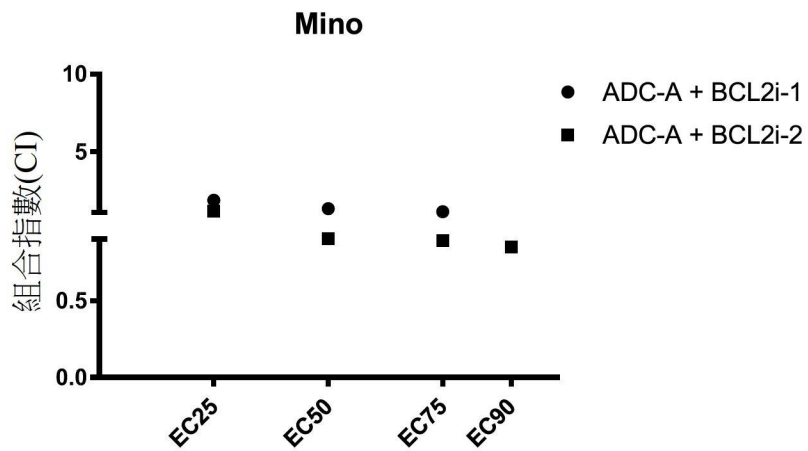
【圖19B】



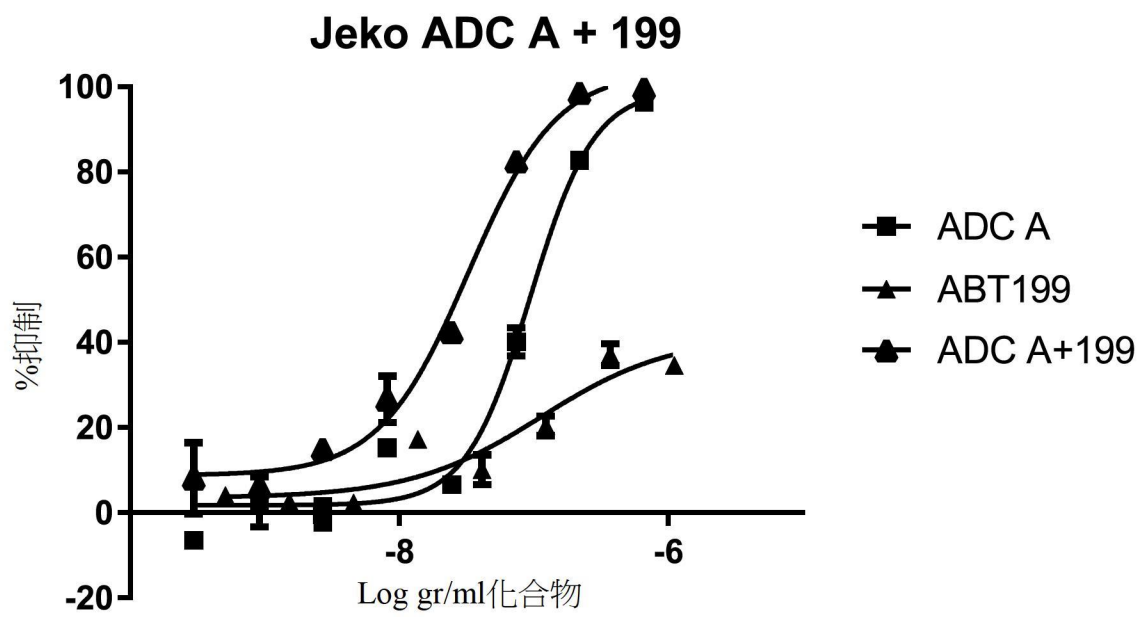
【圖20A】



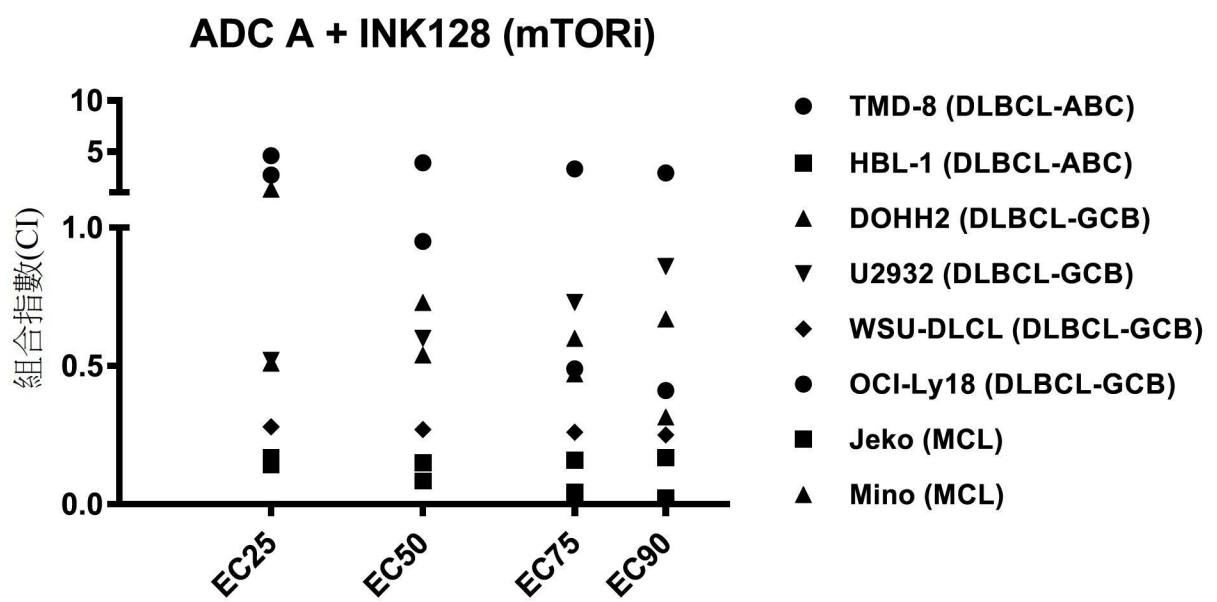
【圖20B】



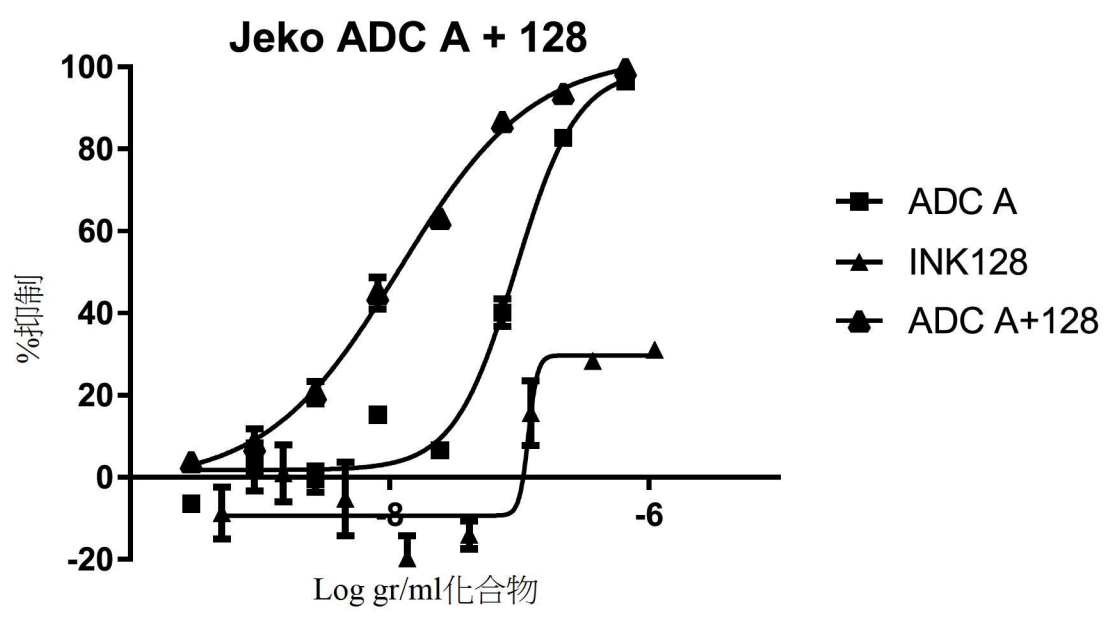
【圖20C】



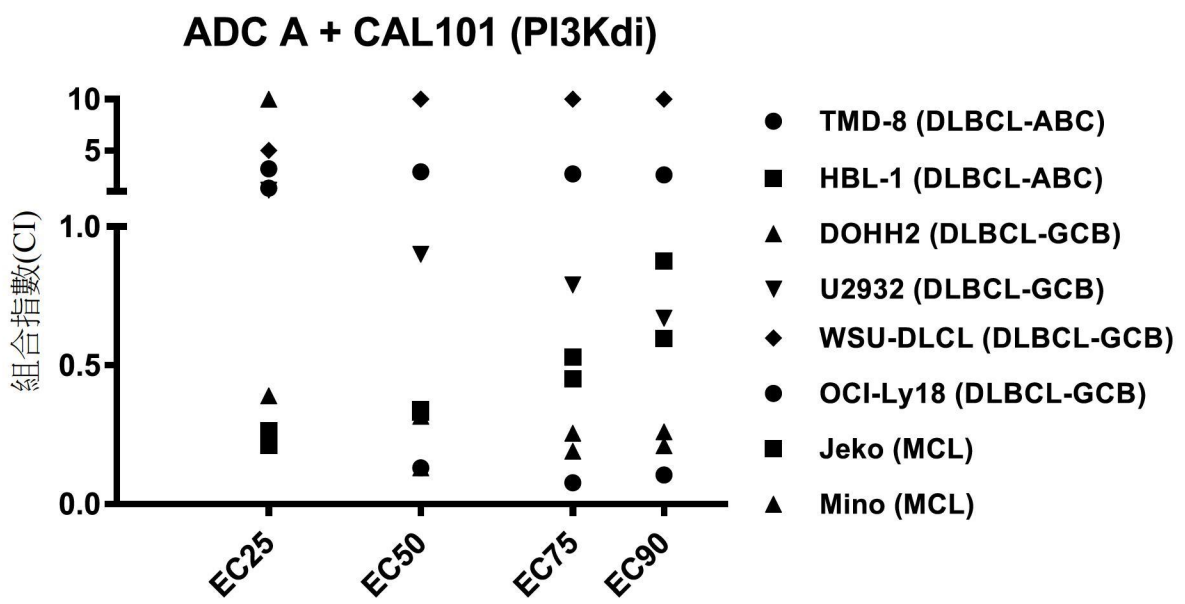
【圖21】



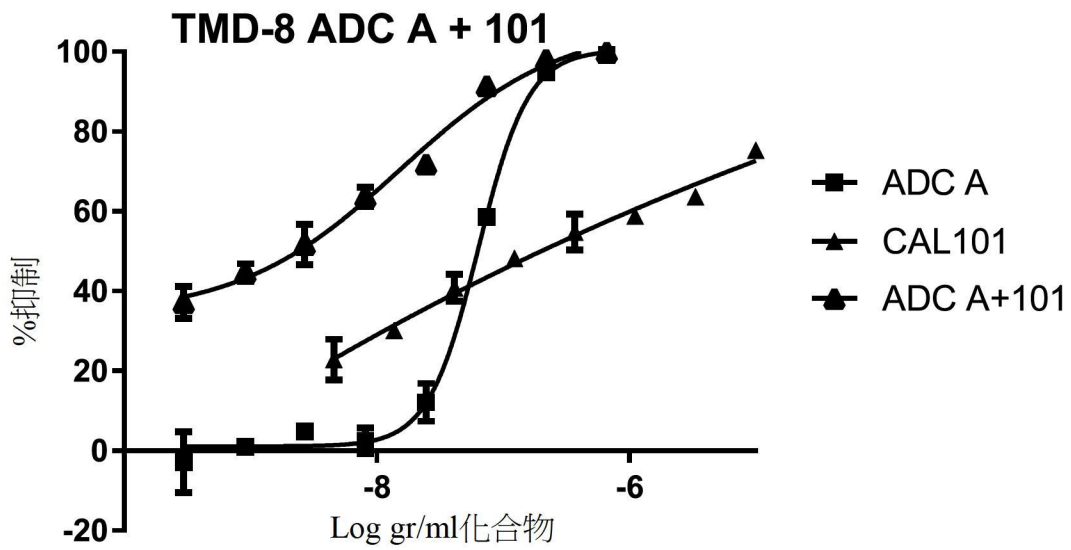
【圖22】



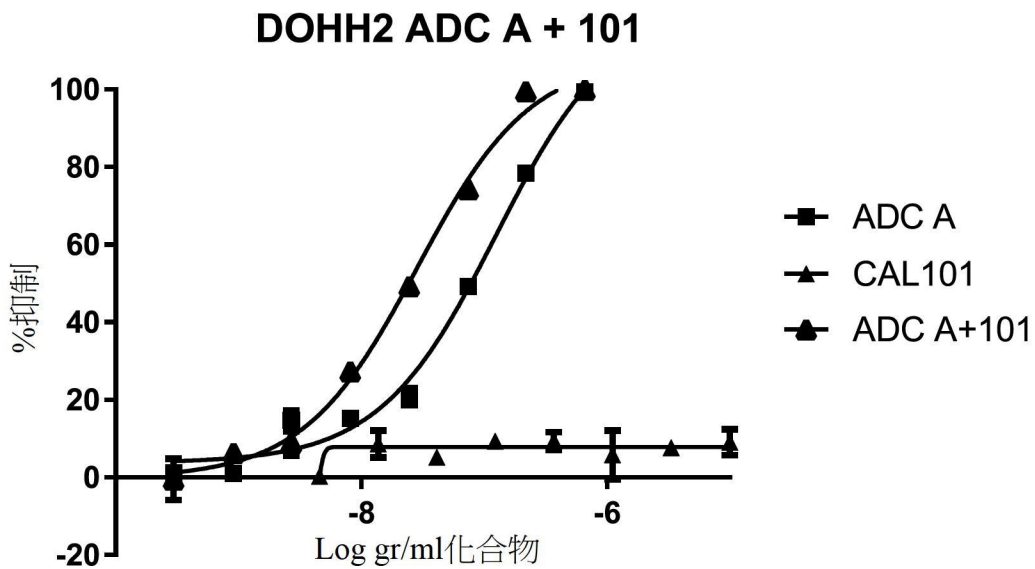
【圖23】



【圖24】



【圖25A】



【圖25B】