



(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 I877240 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：109135915

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 10 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

C07H21/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/10/18 日本

2019-191560

(71)申請人：日商住友製藥股份有限公司(日本) SUMITOMO PHARMA CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：的野光洋 MATONO, MITSUHIRO (JP)；左海順 SAKAI, JUN (JP)；長井徹 NAGAI, TORU (JP)；田沼直樹 TANUMA, NAOKI (JP)；別克 理查德 BUICK, RICHARD (GB)

(74)代理人：賴經臣；宿希成

(56)參考文獻：

US 20120226119A1

WO 2013157105A1

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：5 共 71 頁

(54)名稱

人類化抗體或其抗原結合片段、此等之製造方法及用途

(57)摘要

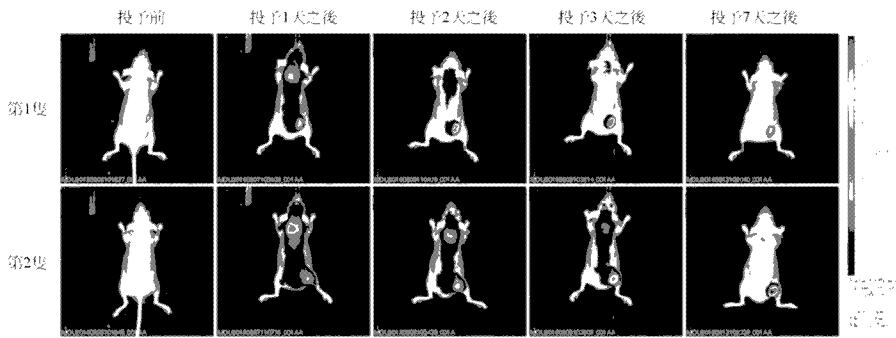
本發明之目的在於提供一種具有穩定之物性且腫瘤集聚性優異之具有與黏蛋白亞型 5AC 結合之能力之人類化抗體或其抗原結合片段。

本發明藉由提供一種人類化抗體或其抗原結合片段而解決上述課題，該人類化抗體具有包含序列編號 1~4 所示之胺基酸序列或其發生變異之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號 5~8 所示之胺基酸序列或其發生變異之胺基酸序列之輕鏈可變區，且具有與黏蛋白亞型 5AC 結合之能力。

An object of the present invention is to provide a humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof having mucin subtype 5AC binding ability, which has stable physical properties and excellent tumor accumulating properties.

The above problem is solved by providing a humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof, in which the humanized antibody comprises a heavy chain variable region comprising amino acid sequences represented by SEQ ID Nos.: 1 to 4 or their mutated amino acid sequences, and a light chain variable region comprising amino acid sequences represented by SEQ ID Nos.: 5 to 8 or their mutated amino acid sequences, and has mucin subtype 5AC binding ability.

指定代表圖：



【圖5】



I877240

【發明摘要】

【中文發明名稱】 人類化抗體或其抗原結合片段、此等之製造方法及用途

【英文發明名稱】 HUMANIZED ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, METHOD OF PRODUCING THE SAME, AND USE THEREOF

【中文】

本發明之目的在於提供一種具有穩定之物性且腫瘤集聚性優異之具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力之人類化抗體或其抗原結合片段。

本發明藉由提供一種人類化抗體或其抗原結合片段而解決上述課題，該人類化抗體具有包含序列編號1～4所示之胺基酸序列或其發生變異之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號5～8所示之胺基酸序列或其發生變異之胺基酸序列之輕鏈可變區，且具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力。

【英文】

An object of the present invention is to provide a humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof having mucin subtype 5AC binding ability, which has stable physical properties and excellent tumor accumulating properties.

The above problem is solved by providing a humanized antibody or an antigen-binding fragment thereof, in which the humanized

antibody comprises a heavy chain variable region comprising amino acid sequences represented by SEQ ID Nos.: 1 to 4 or their mutated amino acid sequences, and a light chain variable region comprising amino acid sequences represented by SEQ ID Nos.: 5 to 8 or their mutated amino acid sequences, and has mucin subtype 5AC binding ability.

【指定代表圖】 圖5

【代表圖之符號簡單說明】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 人類化抗體或其抗原結合片段、此等之製造方法及用途

【英文發明名稱】 HUMANIZED ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, METHOD OF PRODUCING THE SAME, AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種與黏蛋白亞型5AC(MUC5AC)特異性地結合之人類化抗體或其抗原結合片段、及其使用方法。

【先前技術】

【0002】 黏蛋白係由動物之上皮細胞等分泌之黏液之主要成分，且係大量地含有分子量100萬～1000萬之糖之糖蛋白。黏蛋白有由上皮細胞等產生之分泌型黏蛋白、及具有疏水性之膜貫通部位且以與細胞膜結合之狀態存在之膜結合型黏蛋白。已知黏蛋白之核心蛋白統稱為MUC，且編碼核心蛋白之基因至少有20種類。MUC5AC為其中之一種，屬於分泌型黏蛋白。

【0003】 MUC5AC於正常組織中表現於胃或氣管內，但報告了於胰臟癌之狀態下過度表現，除此以外，於甲狀腺癌、肝癌、大腸癌、胃癌、尿路上皮癌、乳癌、子宮頸癌、卵巢癌、子宮內膜癌、或膽管癌之狀態下亦報告了過度表現。關於針對MUC5AC之抗體，報告有：以人類胰臟癌細胞株SW1990藉由異種移植(xenograft)精製而成之胰臟癌黏蛋

白鰯分作為抗原製得之小鼠抗體、或以此為基礎製得之嵌合抗體(專利文獻1、2、非專利文獻1、2)、人類化抗體(專利文獻3)。

【0004】 近年來，盛行開發抗體藥物複合體，其係將具有抗腫瘤效果之藥物與具有針對癌細胞之靶向能力之抗體接合而成。例如，於假定使用抗體作為抗體藥物複合體用之遞送工具之情形時，由於需要將抗體進而提供於製造步驟(例如，接合步驟)，故存在於製造步驟中抗體發生改質或凝聚之顧慮。因此，對於製造所使用之抗體，要求相較於通常之抗體醫藥品而言，更加具有作為抗體穩定之物性。又，就另一觀點而言，於假定使用抗體作為抗體藥物複合體用之遞送工具之情形時，由於若具有非常高的殺細胞效果之藥物分佈於正常組織中，則會帶來非常大的副作用，故對於抗體藥物複合體所使用之抗體，要求相較於通常之抗體醫藥品而言，更加具有作為抗體穩定之物性、及對腫瘤組織之較高之集聚性。

【0005】 關於非專利文獻1、2中所揭示之嵌合抗體，於活體內(in vivo)確認出腫瘤集聚性，進而於胰臟癌患者中亦確認出腫瘤集聚性，但亦發現對肝臟或腎臟之集聚，因此為了將其應用於醫藥品而需要進而提高腫瘤集聚性。又，非專利文獻1、2中完全未揭示有關於抗體之物性(改質、凝聚性)之資訊。

【0006】 進而，對非專利文獻1、2中所揭示之嵌合抗體進行了各種物性之評價，結果可明確：當施加熱量時抗體容易發生改質、凝聚(改質中點溫度及凝聚開始溫度較低)，例如於假定使用其作為抗體藥物複合體用之遞送工具之情形時，實用性較低。於將抗體提供於其後之製造步驟

(例如接合步驟)之情形時，當然以儘量使用物性良好之抗體(不易引起改質、凝聚之抗體)者為佳。

【0007】 專利文獻3中揭示有人類化抗體，關於該人類化抗體，主要著眼於獲得對MUC5AC具有較高之結合活性之人類化抗體，而沒有任何關於抗體之穩定性之揭示、提示。進而，對專利文獻3中所揭示之人類化抗體進行了各種物性之評價，結果可明確：當施加熱量時抗體容易發生凝聚(凝聚開始溫度較低)，例如於假定使用其作為抗體藥物複合體用之遞送工具之情形時，實用性較低。關於抗體之改質或凝聚，由於認為存在會導致化合物之有效性降低或產生副作用之風險，故較理想為儘量避免。又，已知後述之改質中點溫度或凝聚開始溫度亦與於冷藏等狀態下長期之保存穩定性有關，且就製造步驟中以及保存過程中之穩定性之觀點而言，亦要求開發不易引起抗體之改質或凝聚且具有良好之物性之抗體。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0008】

專利文獻1：日本專利特開平7-203974號公報

專利文獻2：日本專利特開平11-5749號公報

專利文獻3：WO 2013/157102

[非專利文獻]

【0009】

非專利文獻1：日本臨床 64卷 增刊號1，2006，p274-278

非專利文獻2：Japanese Journal of Cancer Research，90，1179-1186，1999

【發明內容】

(發明所欲解決之問題)

【0010】 因此，本發明之課題在於提供一種具有穩定之物性，腫瘤集聚性優異，且具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力之人類化抗體或其抗原結合片段。更具體而言，本發明之課題在於提供一種當施加熱量時不易引起改質或凝聚且具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力之人類化抗體或其抗原結合片段，又，提供一種相較於正常組織而言對腫瘤組織之集聚性更高且具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力之人類化抗體或其抗原結合片段。

(解決問題之技術手段)

【0011】 本發明人等為了解決上述課題，進行了銳意研究，結果發現藉由以下之手段可解決該課題。

【0012】 即，本發明如下所述。

[1]

一種人類化抗體或其抗原結合片段，該人類化抗體係具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，且具有或包括：

重鏈可變區，其包含：

(1)序列編號1所示之胺基酸序列，與序列編號1所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號1所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之

胺基酸序列；

(2)序列編號2所示之胺基酸序列，與序列編號2所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號2所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；

(3)序列編號3所示之胺基酸序列，與序列編號3所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號3所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；或者

(4)序列編號4所示之胺基酸序列，與序列編號4所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號4所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其包含：

(5)序列編號5所示之胺基酸序列，與序列編號5所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號5所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；

(6)序列編號6所示之胺基酸序列，與序列編號6所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號6所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；

(7)序列編號7所示之胺基酸序列，與序列編號7所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號7所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；或者

(8)序列編號8所示之胺基酸序列，與序列編號8所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號8所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列。

【0013】 [2]

如[1]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其中，

上述重鏈可變區包含：

(1)序列編號1所示之胺基酸序列，與序列編號1所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號1所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；

(3)序列編號3所示之胺基酸序列，與序列編號3所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號3所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；或者

(4)序列編號4所示之胺基酸序列，與序列編號4所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號4所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之

胺基酸序列。

【0014】 [3]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：

重鏈可變區，其包含：(1)序列編號1所示之胺基酸序列，與序列編號1所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號1所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其包含：(7)序列編號7所示之胺基酸序列，與序列編號7所示之胺基酸序列具有90%以上或95%以上之序列同一性之胺基酸序列，或者於序列編號7所示之胺基酸序列中缺失、置換或附加有10個以下或5個以下之胺基酸之胺基酸序列。

【0015】 [4]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：

重鏈可變區，其包含序列編號1所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號5所示之胺基酸序列。

【0016】 [5]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：

重鏈可變區，其包含序列編號1所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號6所示之胺基酸序列。

【0017】 [6]

如[1]至[3]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：

重鏈可變區，其包含序列編號1所示之胺基酸序列；及輕鏈可

變區，其包含序列編號7所示之胺基酸序列。

【0018】 [7]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號1所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號8所示之胺基酸序列。

【0019】 [8]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號3所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號5所示之胺基酸序列。

【0020】 [9]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號3所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號6所示之胺基酸序列。

【0021】 [10]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號3所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號7所示之胺基酸序列。

【0022】 [11]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號3所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號8所示之胺基酸序列。

【0023】 [12]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號4所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號5所示之胺基酸序列。

【0024】 [13]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號4所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號6所示之胺基酸序列。

【0025】 [14]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號4所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號7所示之胺基酸序列。

【0026】 [15]

如[1]或[2]所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有或包括：重鏈可變區，其包含序列編號4所示之胺基酸序列；及輕鏈可變區，其包含序列編號8所示之胺基酸序列。

【0027】 [16]

如[1]至[15]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其中，上述抗體或抗原結合片段係單離抗體或單離抗原結合片段。

【0028】 [17]

如[1]至[16]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段，其中，上述抗體係多株抗體或單株抗體。

【0029】 [18]

如[1]至[17]中任一項所記載之人類化抗體，其中，上述抗體之最頻出粒徑(Pk1 Mode Dia.)為20 nm以下、15 nm以下、12 nm以下、11 nm以下或10 nm以下。

【0030】 [19]

如[1]至[18]中任一項所記載之人類化抗體，其中，上述抗體之改質中點溫度(T_{m1})為50℃以上、55℃以上、56℃以上、57℃以上、58℃以上、59℃以上或60℃以上。

【0031】 [20]

如[1]至[19]中任一項所記載之人類化抗體，其中，上述抗體之凝聚開始溫度(T_{agg})為50℃以上、55℃以上、60℃以上、61℃以上、62℃以上、63℃以上、64℃以上或65℃以上。

【0032】 [21]

如[1]至[20]中任一項所記載之人類化抗體，其中，上述抗體對黏蛋白亞型5AC之活體外結合活性係與嵌合抗體為相同程度或其以上。

【0033】 [22]

如[1]至[21]中任一項所記載之人類化抗體，其中，於投予上述抗體7天之後，相對於對肝臟組織之集聚性，對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組織之集聚性為10倍以上、11倍以上、12倍以上、13倍以上、14倍以上、15倍以上、16倍以上、17倍以上、18倍以上、19倍以上或20倍以上。

【0034】 [23]

如[1]至[22]中任一項所記載之人類化抗體，其中，於投予上述抗體7天之後，相對於對腎臟組織之集聚性，對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組

織之集聚性為10倍以上、11倍以上、12倍以上、13倍以上、14倍以上、15倍以上、16倍以上或17倍以上。

【0035】 [24]

一種組成物，其包含[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段。

【0036】 [25]

一種醫藥組成物，其包含[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段、及藥學上所容許之載體。

【0037】 [26]

一種用於對黏蛋白亞型5AC過度表現之癌進行治療之醫藥組成物，其包含[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段、及藥學上所容許之載體。

【0038】 [27]

如[26]所記載之醫藥組成物，其中，上述癌係胰臟癌、甲狀腺癌、肝癌、大腸癌、胃癌、尿路上皮癌、乳癌、子宮頸癌、卵巢癌、子宮內膜癌、或膽管癌。

【0039】 [28]

如[27]所記載之醫藥組成物，其中，上述癌係胰臟癌。

【0040】 [29]

一種抗體-藥劑連結體，其係於[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段連結有診斷及/或治療所使用之藥劑。

【0041】 [30]

如[29]所記載之抗體-藥劑連結體，其中，上述藥劑係毒素、螢光標記用物質、核酸醫藥、病毒載體、奈米粒子、低分子藥劑或細胞激素。

【0042】 [31]

如[29]或[30]所記載之抗體-藥劑連結體，其中，上述人類化抗體或抗原結合片段與藥劑係藉由連接子連結。

【0043】 [32]

如[31]所記載之抗體-藥劑連結體，其中，上述連接子係自PEG(Polyethylene glycol，聚乙二醇)連接子、馬來醯亞胺連接子、PAS化(PASylation)連接子、HES化(HESylation)連接子、雙(磺基琥珀醯亞胺基)辛二酸酯連接子、核酸連接子、肽連接子、矽烷連接子、多糖連接子、屬於溫度感受性或照射(IR、近IR、UV)感受性鍵之連接子、屬於pH感受性鍵之連接子、水解性連接子、以及利用對共價鍵、醯胺鍵、碳-碳多重鍵之加成、對疊氮炔烴之惠斯根(Huisgen)環加成、狄耳士-阿德爾反應、雙硫鍵、麥可加成、矽烷鍵、胺基甲酸乙酯、環氧化物之親核開環反應、非羥醛-羰化學作用、及1,3-偶極加成反應或者甲苯磺醯基化等環化加成反應製得之連接子所組成之群組選擇之1個至數個之連接子。

【0044】 [33]

一種醫藥組成物，其包含[29]至[32]中任一項所記載之抗體-藥劑連結體、及藥學上所容許之載體。

【0045】 [34]

一種核酸，其編碼[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體。

【0046】 [35]

一種表現載體，其包含[34]所記載之核酸。

【0047】 [36]

一種宿主細胞，其包含[35]所記載之表現載體。

【0048】 [37]

一種人類化抗體或其抗原結合片段之製造方法，其係製造[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段之方法，且包括：

(1)將編碼上述人類化抗體或其抗原結合片段之核酸插入至表現載體中之步驟；

(2)藉由包含上述核酸之表現載體向宿主細胞導入上述核酸之步驟；

(3)對包含上述表現載體之宿主細胞進行培養之步驟；及

(4)藉由利用層析法進行精製而將上述人類化抗體或其抗原結合片段自上述宿主細胞之培養上清液單離之步驟。

【0049】 [38]

一種[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製造[24]所記載之組成物、[25]至[28]及[33]中任一項所記載之醫藥組成物、或[29]至[32]中任一項所記載之抗體-藥劑連結體。

【0050】 [39]

一種對細胞或組織中之黏蛋白亞型5AC之表現量進行評價之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]之任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)使上述細胞或組織與上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段接觸之步驟；及

(3)測定與上述細胞或組織結合之上述標記之量，藉此對於該細胞或組織中表現之黏蛋白亞型5AC之表現量進行評價之步驟。

【0051】 [40]

一種黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之治療藥，其含有包含[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段、或者[29]至[32]中任一項所記載之抗體-藥劑連結體、及藥學上所容許之載體之醫藥組成物之有效量。

【0052】 [41]

如[40]所記載之癌之治療藥，其使癌細胞之數量減少及/或使腫瘤之大小縮小。

【0053】 [42]

一種測定對象中之黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之體積之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)使對象之組織及正常之組織與上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段接觸之步驟；

(3)測定上述對象之組織及正常之組織中之上述標記之量之步驟；及

(4)將上述對象之組織中所測得之上述標記之量、與上述正常之組織

中所測得之上述標記之量之基準量進行比較，且上述對象之組織中所測得之量多於上述基準量之部分係作為癌組織而測定其體積之步驟。

【0054】 [43]

一種診斷對象是否罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)使對象之細胞或組織、及正常之細胞或組織與上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段接觸之步驟；

(3)測定上述對象之細胞或組織、及上述正常之細胞或組織中之上述標記之量之步驟；及

(4)將上述對象之細胞或組織中所測得之上述標記之量、與上述正常之細胞或組織中所測得之上述標記之量之基準量進行比較，於上述對象之細胞或組織中所測得之量顯著地多於上述基準量之情形時，診斷為上述對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之步驟。

【0055】 [44]

如[42]或[43]所記載之方法，其中，於活體外進行上述接觸之步驟。

【0056】 [45]

一種測定對象中之黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之體積之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附

上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)於被投予了上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之上述對象之組織中檢測上述標記之步驟；及

(3)測定於上述(2)之步驟中確認出附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之集聚之部分之體積之步驟。

【0057】 [46]

一種診斷對象是否罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)於被投予了上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之上述對象之組織中檢測上述標記之步驟；及

(3)當於上述(2)之步驟中於上述對象之組織中確認出附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之集聚時，診斷為上述對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之步驟。

【0058】 [47]

如[45]或[46]所記載之方法，其中，於活體外進行上述檢測步驟。

【0059】 [48]

一種治療黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之方法，其包括：將包含[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段及藥學上所容許

之載體之醫藥組成物之有效量投予至罹患癌之對象。

【0060】 [49]

如[48]所記載之方法，其使癌細胞之數量減少及/或使腫瘤之大小縮小。

【0061】 [50]

一種診斷對象是否罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)自上述對象及健康對象採集細胞或組織之步驟；

(3)使上述細胞或組織與上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段接觸之步驟；

(4)測定上述細胞或組織中之上述標記之量之步驟；及

(5)當自上述對象採集之上述細胞或組織中所測得之上述標記之量顯著地多於自上述健康對象採集之上述細胞或組織中所測得之上述標記之量時，診斷為上述對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之步驟。

【0062】 [51]

一種診斷對象是否罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之方法，其包括：

(1)對[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結

合片段之步驟；

(2)向上述對象投予上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(3)於上述對象之組織中檢測上述標記之步驟；及

(4)當於上述(3)之步驟中於上述對象之組織中確認出附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之集聚時，診斷為上述對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之步驟。

【0063】 [52]

一種治療上述對象之癌之方法，其包括以下之步驟：向[50]或[51]所記載之方法中診斷為罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之對象，投予包含[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段及藥學上所容許之載體之醫藥組成物之有效量。

【0064】 [53]

一種用於治療及/或診斷黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之套組，其包含附有能夠使抗體或其抗原結合抗體片段檢測出之標記之[1]至[23]中任一項所記載之人類化抗體或其抗原結合片段。

(對照先前技術之功效)

【0065】 本發明人等為了解決課題進行了銳意研究，結果成功地發現了一種具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力且當施加熱量時亦不易引起改質、凝聚之人類化抗體，即發現了一種具有上述結合活性，並且改質中點溫度及凝聚開始溫度較高，相較於正常組織而言對腫瘤組織之集聚性非常高之人類化抗體，從而完成本發明。

【圖式簡單說明】**【0066】**

圖1係表示本發明之人類化抗體之重鏈可變區1~4(H01~H04)之胺基酸序列之圖。

圖2係表示本發明之人類化抗體之輕鏈可變區1~4(L01~L04)之胺基酸序列之圖。

圖3係表示專利文獻3之人類化抗體之重鏈可變區5~6(H05~H06)及輕鏈可變區5~7(L05~L07)之胺基酸序列之圖。

圖4係表示專利文獻1之嵌合抗體之重鏈可變區7(H07)及輕鏈可變區8(L08)之胺基酸序列之圖。

圖5係表示實施例3-1(抗體3)之經時性之活體內之腫瘤集聚性之照片。圖5之上段係第一隻小鼠之照片，下段係第2隻小鼠之照片。又，自左依序為投予前、投予1天之後、投予2天之後、投予3天之後、及投予7天之後之小鼠之照片。

【實施方式】**【0067】****(1)本發明之人類化抗體**

本發明提供一種具有特定之重鏈可變區與輕鏈可變區且具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力之人類化抗體或其抗原結合片段。本發明之人類化抗體之特徵在於，具有穩定之物性，且腫瘤集聚性優異。再者，本發明之人類化抗體進而除了特定之重鏈可變區與輕鏈可變區以外，可具有恰當之重鏈恆定區與輕鏈恆定區。

【0068】 本說明書中所謂「人類化抗體」，係指互補決定區(CDR)源自非人類，且CDR以外之重鏈可變區及/或輕鏈可變區之至少一部分變更為更加「類人類」、即與人類生殖系列可變序列更加類似之抗體。於抗體之重鏈與輕鏈各自之可變區中存在有互補決定區，自N末端側稱為互補決定區1(CDR1)、互補決定區2(CDR2)、互補決定區3(CDR3)。架構區係於可變區中與互補決定區相鄰之區域，自N末端側稱為架構區1(FR1)、架構區2(FR2)、架構區3(FR3)、架構區4(FR4)。

【0069】 本說明書中所謂「抗原結合片段」，係指包含本發明之人類化抗體之一部分之抗體片段，且具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力者。只要具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，則構成抗原結合片段之多肽中所含有之胺基酸之數並無特別限定。

【0070】 圖1表示本發明之重鏈可變區之胺基酸序列。圖1之重鏈可變區1(H01)、重鏈可變區2(H02)、重鏈可變區3(H03)、及重鏈可變區4(H04)分別相當於本說明書隨附之序列表之序列編號1～4。圖1中，附有底線之部位係CDR部位。

【0071】 圖2表示本發明之輕鏈可變區之胺基酸序列。圖2之輕鏈可變區1(L01)、輕鏈可變區2(L02)、輕鏈可變區3(L03)、及輕鏈可變區4(L04)分別相當於本說明書隨附之序列表之序列編號5～8。圖2中，附有底線之部位係CDR部位。

【0072】 換言之，本發明之人類化抗體之重鏈可變區係包含序列編號1至序列編號4中任一編號所示之胺基酸序列，且輕鏈可變區係包含序列編號5至序列編號8中任一編號所示之胺基酸序列。即，本發明之人類

化抗體係包含上述中所述之4個重鏈可變區(H01～H04)與4個輕鏈可變區(L01～L04)之組合。

【0073】 本發明之4個重鏈可變區(H01～H04)與4個輕鏈可變區(L01～L04)係藉由下述方式獲得者：以嵌合抗體為基礎，使黏蛋白亞型5AC特異性抗體之可變區人類化，且以改善抗體之熱穩定性、凝聚性、腫瘤集聚性之方式進行設計。再者，不變更需要與抗原結合之CDR部位。再者，本說明書中之所謂「嵌合抗體」，只要沒有特別記載，則係指專利文獻1中所揭示之嵌合抗體。

【0074】 本發明中，較佳之人類化抗體係重鏈可變區為H01、H03、或H04，且輕鏈可變區為L01～L04中任一者之人類化抗體。

【0075】 本發明中，最佳之人類化抗體係重鏈可變區為H01，且輕鏈可變區為L03之人類化抗體。

【0076】 然而，本發明之人類化抗體之重鏈可變區並不限定於由序列編號1至序列編號4所示之胺基酸序列所規定者，亦包括保持功能之變異體。即，包含與序列編號1至序列編號4所示之胺基酸序列具有90%以上、較佳為95%以上、進而較佳為98%以上、最佳為99%以上之序列同一性之胺基酸序列之發生變異之重鏈可變區，只要當與本發明之輕鏈可變區進行組合時具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，則該重鏈可變區亦包含於本發明之重鏈可變區。

【0077】 本說明書中所謂胺基酸序列之同一性，係指作為對象之2個蛋白質間之胺基酸序列之同一性，其由使用該技術領域中公知之數學演算法製得之胺基酸序列之最佳比對中表現一致之胺基酸殘基之比例

(%)來表示。胺基酸序列之同一性可由視覺檢查及數學計算來決定，可使用本領域技術人員周知之同源性檢索程式(例如：BLAST、FASTA)或序列比對程式(例如：ClustalW)、或者遺傳資訊處理軟體(例如：GENETYX[註冊商標])等算出。本說明書中之胺基酸序列之同一性，具體而言，可使用日本DNA資料庫(DDBJ，DNA DataBank of Japan)之網頁中所揭示之系統解析程式ClustalW(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>)，於初始設定之條件(Version2.1，Alignment type：slow，DNA Weight Matrix：Gonnet，GAP OPEN：10，GAP EXTENSION：0.1)下求出。

【0078】 除此以外，作為本發明之人類化抗體之重鏈可變區，係包含於序列編號1至序列編號4所示之胺基酸序列中缺失、置換、或附加有10個以下、較佳為8個以下、進而較佳為5個以下、最佳為3個以下之胺基酸之胺基酸序列之發生變異之重鏈可變區，只要當與本發明之輕鏈可變區組合時具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，則該重鏈可變區亦包含於本發明之重鏈可變區。

【0079】 本發明之人類化抗體之輕鏈可變區並不限定於序列編號5至序列編號8所示之胺基酸序列，亦包括保持功能之變異體。即，包含與序列編號5至序列編號8所示之胺基酸序列具有90%以上、較佳為95%以上、進而較佳為98%以上、最佳為99%以上之序列同一性之胺基酸序列之發生變異之輕鏈可變區，只要當與本發明之重鏈可變區組合時具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，則該輕鏈可變區亦包含於本發明之輕鏈可變區。

【0080】 除此以外，作為本發明之人類化抗體之輕鏈可變區，係包含於序列編號5至序列編號8所示之胺基酸序列中缺失、置換、或附加有10個以下、較佳為8個以下、進而較佳為5個以下、最佳為3個以下之胺基酸之胺基酸序列之發生變異之輕鏈可變區，只要當與本發明之重鏈可變區組合時具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，則該輕鏈可變區亦包含於本發明之輕鏈可變區。

【0081】 本發明之人類化抗體或抗原結合片段亦可為單離抗體或單離抗原結合片段。即，本發明之人類化抗體係例如自導入有編碼本發明之人類化抗體或抗原結合片段之核酸之宿主細胞之培養上清液單離而成者。關於此類核酸或宿主細胞，將於後文進行詳細說明。

【0082】 又，本發明之人類化抗體可為多株抗體或單株抗體。

【0083】 進而，本發明之人類化抗體之物性較穩定而不易引起凝聚。本發明之人類化抗體之最頻出粒徑為較小之值，具體而言為20 nm以下、15 nm以下、12 nm以下、11 nm以下或10 nm以下。於抗體發生凝聚之情形時，較多地檢測出粒徑超過100 nm者。本說明書中所謂最頻出粒徑，係指當測定本發明之人類化抗體之粒度分佈時，最頻繁地檢測出之粒度之大小。

【0084】 本發明之人類化抗體之特徵之一在於，當施加熱量時不易引起改質。具體而言，本發明之人類化抗體之改質中點溫度為50℃以上、55℃以上、56℃以上、57℃以上、58℃以上、59℃以上或60℃以上。若對本發明之人類化抗體進行加熱使抗體改質，則存在於抗體內之胺基酸之螢光光譜之峰值重心偏移，本說明書中所謂改質中點溫度，係指該峰

值重心之偏移之中點之溫度(通常狀態與改質狀態為1：1時之溫度)。

【0085】 本發明之人類化抗體之特徵之一在於，當施加熱量時不易引起凝聚。具體而言，本發明之人類化抗體之凝聚開始溫度(Tag_g)為50℃以上、55℃以上、60℃以上、61℃以上、62℃以上、63℃以上、64℃以上或65℃以上。若對本發明之人類化抗體進行加熱使抗體凝聚，則測定靜態光散射時之散射強度變強，本說明書中所謂凝聚開始溫度，係指散射光開始變強時之溫度。再者，下述之實施例中，於266 nm下測定散射光。

【0086】 進而，本發明之人類化抗體之特徵在於，對黏蛋白亞型5AC之活體外結合活性較高。具體而言，本發明之人類化抗體對黏蛋白亞型5AC之活體外結合活性係與專利文獻1中所揭示之嵌合抗體為相同程度或其以上。此處，所謂「相同程度」，可指相同，亦可指存在大約2.0倍以下、1.9倍以下、1.8倍以下、1.7倍以下、1.6倍以下、1.5倍以下、1.4倍以下、1.3倍以下、1.2倍以下或1.1倍以下、且大約1.0倍以上、0.9倍以上、0.8倍以上、0.7倍以上、0.6倍以上或0.5倍以上之差異。

【0087】 進而，本發明之人類化抗體由於對黏蛋白亞型5AC具有較高之結合活性，故當向生物體投予時，於活體內對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組織顯示較高之集聚性。本說明書中所謂「對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組織之集聚性」，係指相較於正常之組織而言，本發明之人類化抗體對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組織表現出好幾倍之集聚。

【0088】 於投予本發明之人類化抗體7天之後，相對於對肝臟組織之集聚性而言，對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組織之集聚性為10倍以

上、11倍以上、12倍以上、13倍以上、14倍以上、15倍以上、16倍以上或17倍以上、18倍以上、19倍以上或20倍以上。又，於投予本發明之人類化抗體7天之後，相對於對腎臟組織之集聚性而言，對黏蛋白亞型5AC表現之腫瘤組織之集聚性為10倍以上、11倍以上、12倍以上、13倍以上、14倍以上、15倍以上、16倍以上或17倍以上。

【0089】

(2)包含本發明之人類化抗體之組成物

本發明提供一種包含(1)中所述之本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之組成物。包含本發明之人類化抗體之組成物對於黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之治療及/或診斷而言有用。

【0090】 即，本發明係一種包含本發明之人類化抗體、及藥學上所容許之載體之醫藥組成物。本發明之人類化抗體或其抗原結合片段係與黏蛋白亞型5AC特異性地結合，從而抑制黏蛋白亞型5AC表現之癌細胞之增殖。因此，本發明之醫藥組成物對於黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之治療而言有用。

【0091】 作為本發明之治療對象之癌之例，可列舉：胰臟癌、甲狀腺癌、肝癌、大腸癌、胃癌、尿路上皮癌、乳癌、子宮頸癌、卵巢癌、或子宮內膜癌，尤其可高效率地治療胰臟癌。

【0092】 作為本發明之治療對象之癌之例，亦可列舉膽管癌。

【0093】 又，數次報告了黏蛋白亞型5AC係CA19-9之抗原載體(PLoS ONE(December 2011, Volume6, Issue12, e29180, p1-10))。因此，作為本發明之治療對象之癌之例，亦可列舉：CA19-9過度表現之

膽道癌、子宮體癌、肺癌、或食道癌，可高效率地治療該等癌。

【0094】 本發明之醫藥組成物之劑型並無特別限定，例如可製成：錠劑、散劑、顆粒劑、懸浮劑、乳劑、或膠囊劑等經口劑；或者注射劑、栓劑、外用液劑等非經口劑。本發明中所使用之藥學上所容許之載體可為本技術領域中所使用之通常者，本領域技術人員可考慮到劑型與投予路徑適當地進行選擇。

【0095】 本發明中所使用之藥學上所容許之載體，於錠劑等經口劑之情形時，例如可使用：賦形劑、結合劑、潤滑劑、界面活性劑、稀釋劑、保存劑、穩定化劑、矯味劑、保濕劑、防腐劑、或抗氧化劑等，可依慣例製備製劑。此時，本領域技術人員根據技術常識，任意地自例如界面活性劑、稀釋劑、保存劑、穩定化劑、矯味劑、保濕劑、防腐劑、抗氧化劑選擇適當者。

【0096】 於非經口投予之情形時，具代表性之劑型係注射劑。本發明中所使用之藥學上所容許之載體，於注射劑之情形時，可使用例如：生理食鹽水或林格氏液等水溶性溶劑、或者植物油或脂肪酸酯等非水溶性溶劑，可將其溶解於上述溶劑中而進行製備。此時，可任意地添加例如等張化劑、溶解助劑、穩定化劑、防腐劑、懸浮化劑、或乳化劑等來製備製劑。

【0097】

(3)於本發明之人類化抗體連結有藥劑之抗體-藥劑連結體

本發明提供一種於(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段連結有診斷及/或治療所使用之藥劑之抗體-藥劑連結體。作為該藥劑之具體

例，可列舉：毒素、螢光標記用物質、核酸醫藥、病毒載體、奈米粒子、低分子藥劑或細胞激素。本發明之人類化抗體或其抗原結合片段由於與黏蛋白亞型5AC結合，故藉由製成與藥劑之連結體，從而可有助於診斷或治療黏蛋白亞型5AC過度表現之癌。

【0098】 於上述藥劑係能夠使本發明之抗體檢測出之標記、例如螢光標記用物質之情形時，可使用本發明之抗體與該標記之結合體作為用於檢測黏蛋白亞型5AC之工具。例如，於向生物體投予與螢光標記用物質結合之本發明之抗體之後，基於標記可檢測出黏蛋白亞型5AC過度表現之器官，從而可有助於癌之診斷。又，即便不向生物體投予，藉由使自生物體採集到之組織或細胞、與結合有螢光標記用物質之本發明之抗體於活體外接觸，亦可檢測出該組織或細胞中黏蛋白亞型5AC之表現。關於使用本發明之抗體診斷癌之方法，將於後文進行詳細說明。

【0099】 作為與本發明之抗體結合之螢光標記用物質，例如可列舉：螢光蛋白質或螢光色素等，但並不受該等限定。作為螢光蛋白質之具體例，可列舉：綠色螢光蛋白質、紅色螢光蛋白質、黃色螢光蛋白質，但並不受該等限定。作為螢光色素之具體例，可列舉：螢光素、羅丹明、Cydyne、Alexa Fluor(註冊商標)、HiLyte FluorTM、藻紅素(PE)或別藻藍蛋白(APC)，但並不受該等限定。

【0100】 於上述藥劑係治療藥之情形時，藉由製成連結體，從而可製得同時具有該治療藥與本發明之人類化抗體之效果之藥劑。藉由使本發明之人類化抗體與例如具有抗癌作用之毒素、核酸醫藥、病毒載體、奈米粒子、低分子藥劑、或細胞激素連結，從而可謀求藥效之協同增強。

【0101】 本說明書中所使用之所謂「毒素」，係指包括「細胞毒素」或「細胞毒性劑」之概念，且表示對於細胞之生長及增殖有害，且可以減少、阻礙、或破壞細胞或惡性腫瘤之方式發揮作用之任意藥劑。作為具體例，可列舉：蓖麻毒蛋白、皂草素、白喉毒素及假單胞菌毒素等，但並不受該等限定。

【0102】 本說明書中所使用之所謂「核酸醫藥」，係指以天然型核苷酸或化學修飾型核苷酸作為基本骨架之藥物，且表示未經由基因表現而是可直接作用於生物體之任意藥劑。作為具體例，可列舉：siRNA、miRNA、反義核酸、誘餌(Decoy)核酸、適體、CpG寡核苷酸，但並不受該等限定。

【0103】 本說明書中所使用之所謂「病毒載體」，係指具有以下之能力之任意載體：藉由基因操作向欠缺複製及增殖能力之病毒、或保持了一部分複製、增殖能力之病毒組入外來基因，從而將目標之基因有效率地導入至細胞中並表現。作為具體例，可列舉：腺病毒、腺相關病毒、逆轉錄病毒、慢病毒、仙台病毒、疱疹單純型病毒，但並不受該等限定。

【0104】 本說明書中所使用之所謂「奈米粒子」，係指可將藥物輸送至既定之細胞或組織之任意奈米尺寸之遞送載體。作為具體例，可列舉：核糖體、奈米微胞、PLGA奈米粒子，但並不受該等限定。

【0105】 本說明書中所使用之所謂「低分子藥劑」，係指包括「細胞毒性劑」、「化學療法劑」、「靶向化抗癌劑」或「免疫治療劑」之概念，且表示可用於處置癌等細胞增殖障礙之任意藥劑。作為具體例，可列舉：MMAE、MMAF、DM-1、DM-4、5-氟尿嘧啶、多柔比星

(Doxorubicin)、愛萊諾迪肯(Irinotecan)或卡奇黴素(Calicheamicin)等，但並不受該等限定。

【0106】 本說明書中所使用之所謂「細胞激素」，係指利用由細胞分泌之低分子蛋白質參與細胞間相互作用，會對周圍之細胞造成影響之任意生理活性物質。作為具體例，可列舉：TNF- α 、干擾素- α 、干擾素- β 、或干擾素- γ 、介白素-2等，但並不受該等限定。

【0107】 進而，調配該抗體-藥劑連結體與藥學上可容許之載體，可製成用於治療黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之醫藥組成物、或黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之治療藥。此類醫藥組成物與治療藥之實施態樣係如(2)之醫藥組成物之項中所述。此類醫藥組成物或治療藥可使癌細胞之數量減少及/或使腫瘤之大小縮小。

【0108】 本發明之較佳之態樣中，上述人類化抗體或抗原結合片段與藥劑係藉由連接子連結。此處所使用之連接子較佳為可於高效率且穩定之條件下使本發明之抗體與藥劑連結者。作為本發明中可使用之連接子之具體例，上述連接子可列舉：PEG連接子、馬來醯亞胺連接子、PAS化(PASylation)連接子、HES化(HESylation)連接子、雙(磺基琥珀醯亞胺基)辛二酸酯連接子、核酸連接子、肽連接子、矽烷連接子、多糖連接子、屬於溫度感受性或照射(IR、近IR、UV)感受性鍵之連接子、屬於pH感受性鍵之連接子、水解性連接子、以及利用對共價鍵、醯胺鍵、碳-碳多重鍵之加成、對疊氮炔烴之惠斯根環加成、狄耳士-阿德爾反應、雙硫鍵、麥可加成、矽烷鍵、胺基甲酸乙酯、環氧化物之親核開環反應、非羥醛-羰化學作用、及1,3-偶極加成反應或甲苯磺醯基化等環化加成反應

製得之連接子，但並不受該等限定。

【0109】

(4)編碼本發明之人類化抗體之核酸、包含該核酸之載體、包含該載體之宿主細胞

本發明提供一種編碼(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段之核酸。由於本發明之人類化抗體之重鏈可變區與輕鏈可變區之胺基酸序列揭示於序列編號1至序列編號8中，故本領域技術人員可獲得編碼具有該等胺基酸序列之人類化抗體之核酸。如後所述，於意圖使用宿主細胞使本發明之人類化抗體表現之情形時，對其進行編碼之核酸之密碼子較佳為選擇最適合於上述宿主中表現者。

【0110】 再者，(1)中所述之發生變異之重鏈可變區可藉由下述方式製作：對編碼序列編號1～4所示之重鏈可變區之核酸實施例如屬於周知技術之部位特異性變異誘發(例如：參照Nucleic Acid Research，Vol.10，N0.20，p.6487-6500，1982；藉由引用將其全部內容援引至本說明書中)。發生變異之輕鏈可變區亦同樣地可藉由下述方式製作：對編碼序列編號5～8所示之輕鏈可變區之核酸實施例如部位特異性變異誘發。

【0111】 並且，可製作組入有此類核酸之表現載體。載體中，除了包含編碼本發明之人類化抗體之核酸以外，亦可任意地包含：用於提高轉譯效率之科扎克共有(Kozak)序列、當被導入至宿主時促進本發明之人類化抗體於培養基中分泌之訊號序列、及啟動子序列等。本發明中可使用之載體可選自本技術領域中通常使用者，較佳為質體載體、尤其是

下述之實施例中所使用之pcDNA3.4。

【0112】 進而，本發明提供一種包含上述之表現載體之宿主細胞。如此獲得之宿主細胞由於包含編碼(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段之核酸，故可於下述之(5)中所述之人類化抗體之製造方法中使用。作為向細胞內導入基因之方法，可使用本技術領域中習知以來所使用之方法，例如：磷酸鈣法、電穿孔法、脂轉染法、DEAE-葡聚糖法之對於本領域技術人員而言公知之方法。如下述之實施例中所進行般，尤其較佳為使用脂轉染法之導入方法。

【0113】 再者，使用於上述目的之宿主細胞亦可使用於本技術領域中自習知以來所使用者。作為此類宿主細胞之例，可列舉：CHO細胞、293細胞、大腸桿菌、畢赤(Pichia)酵母、Sf9細胞等。再者，現在亦市售有用於使作為目標之蛋白質表現之表現系統之套組，下述之實施例中所使用之ExpiCHO System(Thermo Fisher Scientific公司)因迅速且確實地使目標蛋白質表現而特佳。

【0114】

(5)本發明之人類化抗體之製造方法

本發明亦提供一種(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段之製造方法。該製造方法包括：將編碼上述(4)中所述之本發明之人類化抗體或其抗原結合片段之核酸插入至表現載體中，藉由包含該核酸之表現載體向宿主細胞導入該核酸，培養導入有核酸之宿主細胞，並自其培養上清液，藉由層析法等精製手段獲得本發明之人類化抗體。

【0115】 藉由培養宿主細胞而於培養上清液中分泌出本發明之人

類化抗體或其抗原結合片段，係較簡便且較佳，因此如(4)之項中所述，較理想為以宿主細胞有效率地於培養上清液中分泌出本發明之抗體之方式，進行載體之設計與宿主細胞之選擇。

【0116】 自培養上清液，使用層析法等精製手段，可獲得本發明之人類化抗體或其抗原結合片段。作為層析法之手段，可使用本技術領域中已知之各種手段，如：親和層析法、離子交換層析法、尺寸排除層析法等。特佳為下述之實施例中所使用之利用蛋白質A管柱之親和層析法。

【0117】

(6)治療癌之方法

本發明提供一種使用(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段、或者抗體-藥劑連結體治療癌之方法。即，藉由向罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之對象投予包含本發明之人類化抗體或其抗原結合片段及藥學上所容許之載體之醫藥組成物之有效量，從而可治療癌。本發明之人類化抗體或其抗原結合片段、或者抗體-藥劑連結體由於與黏蛋白亞型5AC結合，從而抑制黏蛋白亞型5AC過度表現之癌細胞之增殖，故可期待用於治療癌。此處進行投予之醫藥組成物之劑型或投予路徑係如(2)之醫藥組成物之項中所述。

【0118】 本發明中進行治療之癌，可列舉：胰臟癌、甲狀腺癌、肝癌、大腸癌、胃癌、尿路上皮癌、乳癌、子宮頸癌、卵巢癌、或子宮內膜癌，尤其可高效率地治療胰臟癌。

【0119】 作為本發明中進行治療之癌之例，亦可列舉：膽管癌。

【0120】 又，數次報告了黏蛋白亞型5AC係CA19-9之抗原載體

(PLoS ONE(December 2011, Volume6, Issue12, e29180, p1-10))。

因此，作為本發明中進行治療之癌之例，亦可列舉：CA19-9過度表現之膽道癌、子宮體癌、肺癌、或食道癌，可高效率地治療該等癌。

【0121】 此處所謂「對象」，係指人類；或者小鼠、大鼠、猴子、豚鼠、黑猩猩、綿羊、山羊、狗、貓、豬、牛或馬等動物，較佳為人類，但並無特別限定。

【0122】 此處所謂「有效量」，係指對於對象而言可獲得有效治療癌之效果之量。應向對象投予之有效量係根據對象之種類、對象之體重、投予之劑型(錠劑、注射劑等)及路徑(經口投予、非經口投予等)、及癌之重症程度等而有所不同。醫師或獸醫師可考慮到該等因素而決定適當之有效量。

【0123】 藉由投予本發明之人類化抗體或其抗原結合片段、或者抗體-藥劑連結體治療癌，從而使癌細胞之數量減少及/或使腫瘤之大小縮小。

【0124】

(7)診斷癌之方法

本發明提供一種使用(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段、或者抗體-藥劑連結體診斷癌之方法。

【0125】 作為一態樣，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段、或者抗體-藥劑連結體附上能夠使其檢測出之標記，自對象及健康對象採集細胞或組織，使採集到之細胞或組織與附有標記之本發明之人類化抗體接觸，測定採集到之細胞或組織中之標記之量，將結合於自對象採集

到之細胞或組織之標記抗體之量、與結合於自健康對象採集到之細胞或組織之標記抗體之量進行比較，藉此可進行癌之診斷。於自對象採集到之細胞或組織中所檢測出之標記之量多於自健康對象採集到之細胞或組織中所檢測出之標記之量之情形時，可診斷為該對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌。

【0126】 此處所謂「健康對象」，係指不同於本發明中欲診斷癌之對象，而是明確未罹患癌之健康個體。此類健康對象中，黏蛋白亞型5AC未過度表現，可用作對照組。

【0127】 此處所謂「標記」，係指與本發明之人類化抗體或其抗原結合片段結合而使其能夠檢測出之任意者。作為標記之具體例，可列舉：螢光標記用物質。

【0128】 作為另一態樣，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，使對象之細胞或組織、及健康對象之細胞或組織與附有標記之本發明之人類化抗體或其抗原結合片段接觸，測定對象之細胞或組織、及健康對象之細胞或組織中之標記之量，將於對象之細胞或上述組織中所測得之標記之量、與健康對象之細胞或組織中所測得之標記之量之基準量進行比較。於對象之組織或細胞中所測得之量顯著地多於基準量之情形時，可診斷為該對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌。

【0129】 此處所謂「基準量」，係指於健康對象所測得之標記之量，且表示非癌個體中黏蛋白亞型5AC之表現量與非特異性地結合於細胞或集聚於組織之標記之量之合計。因此，欲診斷癌之對象所測得之標記之

量多於基準量係提示黏蛋白亞型5AC過度表現，因此於此類情形時可診斷為對象罹患癌。又，該方法中，對象之細胞或組織與附有標記之本發明之抗體之接觸可於使用自對象取出之細胞或組織之活體外之態樣下進行。又，對象之細胞或組織與附有標記之本發明之抗體之接觸亦可於未自對象取出細胞或組織而是於活體內之態樣下進行。

【0130】 作為另一態樣，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，自對象採集細胞或組織，使採集到之細胞或組織與附有標記之本發明之人類化抗體接觸，測定採集到之細胞或組織中之標記之量，將結合於自對象採集到之細胞或組織之標記抗體之量、與結合於正常之細胞或組織之標記抗體之量進行比較，藉此進行癌之診斷。於自對象採集到之細胞或組織中所檢測出之標記之量多於正常之細胞或組織中所檢測出之標記之量之情形時，可診斷為該細胞或組織罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌。

【0131】 此處所謂「正常之細胞或組織」，係指自本發明中欲診斷癌之對象或健康對象採集到之預先診斷為正常之細胞或組織之細胞或組織。此類正常之細胞或組織中，黏蛋白亞型5AC未過度表現，可用作對照組。

【0132】 作為另一態樣，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，向對象投予附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段，於對象之組織中檢測該標記，檢測附有標記之抗體之集聚，藉此可進行癌之診斷。當於對象之組織中確認到附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之集聚時，診斷為該對象罹患黏蛋白亞型5AC過度表

現之癌。該方法中，組織之標記之檢測可使用自對象取出之組織於活體外之態樣下進行。又，對象中之組織之標記之檢測亦可於未自對象取出組織而是於活體內之態樣下進行。

【0133】 作為另一態樣，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，於被投予了附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之對象之組織中檢測標記。當於上述對象之組織中確認到附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之集聚時，可診斷為對象罹患癌。

【0134】 於利用上述中所述之方法診斷為罹患黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之情形時，可向該對象投予包含(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段及藥學上所容許之載體之醫藥組成物，進行癌之治療。

【0135】 此處，作為標記之具體例，可列舉利用螢光標記用物質之標記，但只要可檢測出本發明之人類化抗體或其抗原結合片段，則並無特別限定。又，抗體與標記之結合亦可經由(3)之抗體-藥劑連結體之項中所述之連接子進行。

【0136】

(8)測定癌之體積之方法

本發明提供一種使用(1)中所述之人類化抗體或其抗原結合片段，測定對象中之黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之體積之方法。本說明書中所謂癌之體積，係指對象之組織中由癌化之細胞所構成之部分之體積，且係指除了由未癌化之正常之細胞所構成之部分之體積以外者。

【0137】 作為一態樣，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，使對象之組織及健康對象之組織與附有標記

之人類化抗體或其抗原結合片段接觸，測定對象之組織及健康對象之組織中之標記之量。將於對象之組織中所測得之標記之量之、與於健康對象之組織中所測得之標記之量之基準量進行比較，將於對象中所測得之量多於基準量之部分作為癌組織而測定其體積，藉此可測定癌之體積。

【0138】 此處所謂「基準量」，係指於健康對象中所測得之標記之量，且表示非癌個體中黏蛋白亞型5AC之表現量、與非特異性地結合於細胞或集聚於組織之標記之量之合計。因此，於對象之組織中顯示多於基準量之標記之量之部分可判斷為癌組織，藉由測定該部分之體積可求出癌之體積。

【0139】 進而，於另一態樣中，對本發明之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，於被投予了附有標記之抗體或其抗原結合片段之對象之組織中檢測標記，測定確認到附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之集聚之部分之體積，藉此可測定癌之體積。

【0140】 癌之體積之測定可如下述般算出：使用可檢測出螢光標記用物質等標記之機器，於對象中以影像之形式檢測出該標記，該影像中，根據檢測出標記之癌組織之大小，視需要使用適當之計算式算出。又，亦可藉由於自對象切除之試樣中摘除組織，直接測定檢測出標記之部分之體積，從而求出癌之體積。

【0141】 測定對象中之癌之體積對於該對象之癌之重症程度等之診斷而言有用。進而，當該對象接受治療時，為了判定治療之效果，測定對象中之癌之體積亦有用。

【0142】 以下，藉由實施例對本發明進而詳細地進行說明，但本發

明並不受該等實施例限定。

[實施例]

【0143】 以下，列出實施例與比較例，對本發明進而具體地進行說明，但本發明並不受該等限定。本實施例、比較例中之實驗方法、試驗方法係如下所述。

【0144】

實驗例1：各種抗體之製備

【0145】 將附加有訊號序列之各種可變區之胺基酸序列、及各種恆定區之胺基酸序列，一面考慮使其變為適合於CHO細胞中之表現之密碼子使用頻率，一面轉換為鹼基序列。於訊號序列之開始密碼子部位附加科扎克共有序列，於恆定區之C末端側附加終止密碼子。進而，於科扎克共有序列之上游與終止密碼子之下游附加限制酶部位，並使其可導入至哺乳類細胞表現用質體(pcDNA3.4)之表現用基因導入部位中。如此設計而成之各DNA片段係藉由化學合成製得。以變為目標之H鏈與目標之L鏈之方式，使用融合PCR使包含可變區之DNA片段、與包含恆定區之DNA片段連結。

【0146】 於對製得之各種抗體基因進行限制處理之後實施精製。同樣地，哺乳類細胞短暫性表現用質體(pcDNA3.4)亦同樣地於利用限制酶進行處理之後實施精製。將兩片段以適當之混合比進行混合而實施接合。將接合反應液與大腸桿菌DH5 α 勝任細胞混合而實施轉化。根據所產生之轉化子，自菌落PCR、單菌落隔離、小規模培養液提取質體，進行插入部分之鹼基序列決定，選拔出所設計之抗體基因總長以如設計般之序

列正確地插入至所要求之方向之質體(大腸桿菌克隆)。對選拔出之大腸桿菌克隆實施大規模培養，進行包括去除內毒素之步驟在內之質體提取、精製。對精製而成之質體測定260 nm之吸光度並算出濃度。

【0147】 使用ExpiCHO System(Thermo Fisher Scientific公司)，實施利用CHO細胞之短暫性表現。根據製得之各H鏈表現用質體與各L鏈表現用質體，以變為目標之組合之方式選擇1種H鏈、1種L鏈，利用脂轉染法進行轉染，並實施培養、進料。自實施轉染後7~13天之後，回收培養液。將經過離心分離及過濾器過濾之培養上清液添加至Protein A管柱中，利用通常之親和層析法(吸附後洗淨、利用酸性緩衝液之溶出、溶出液之中和)，對抗體進行精製。對精製而成之抗體測定280 nm之吸光度並算出濃度。

【0148】 使用上述中所述之方法，製得抗體1至抗體20。以下表示針對重鏈可變區與輕鏈可變區之組合所附有之抗體之編號。

抗體1：H01L01

抗體2：H01L02

抗體3：H01L03

抗體4：H01L04

抗體5：H02L01

抗體6：H02L02

抗體7：H02L03

抗體8：H02L04

抗體9：H03L01

抗體10：H03L02

抗體11：H03L03

抗體12：H03L04

抗體13：H04L01

抗體14：H04L02

抗體15：H04L03

抗體16：H04L04

抗體17：H05L05

抗體18：H06L06

抗體19：H05L07

抗體20：H07L08

【0149】 此處，H01、H02、H03、及H04分別係序列編號1、序列編號2、序列編號3、及序列編號4所示之重鏈可變區，L01、L02、L03、及L04分別係序列編號5、序列編號6、序列編號7、及序列編號8所示之輕鏈可變區。實施例1-1至1-16中所使用之本發明之抗體包含重鏈恆定區1與輕鏈恆定區1、及上述之抗體1至抗體16之重鏈可變區與輕鏈可變區之組合。

【0150】 另一方面，H05及H06係專利文獻3中所揭示之人類化抗體之重鏈可變區，L05、L06、及L07係專利文獻3中所揭示之人類化抗體之輕鏈可變區。比較例1-1至1-3中所使用之專利文獻3之人類化抗體係先前技術之人類化抗體，其包含重鏈恆定區1與輕鏈恆定區1、及上述之抗體17至抗體19之重鏈可變區與輕鏈可變區之組合。將H05與H06之胺基

酸序列示於序列編號9與序列編號10，將L05、L06、及L07之胺基酸序列示於序列編號11、序列編號12、及序列編號13。進而，將H05與H06、及L05～L07之胺基酸序列示於圖3。

【0151】 進而，H07係專利文獻1中所揭示之嵌合抗體之重鏈可變區，L08係專利文獻1中所揭示之嵌合抗體之輕鏈可變區。比較例1～4中所使用之嵌合抗體係先前技術之人類化抗體，其包含重鏈恆定區1與輕鏈恆定區1、及上述之抗體20之重鏈可變區與輕鏈可變區之組合。將H07之胺基酸序列示於序列編號14，將L08之胺基酸序列示於序列編號15。進而，將H07與L08之胺基酸序列示於圖4。

【0152】

試驗例1：抗體物性之評價

將製得之各種抗體以抗體濃度變為約1 mg/mL之方式利用150 mM 乙酸緩衝液(pH4.7)進行稀釋。其中，由於比較例1-2之抗體濃度為約0.5 mg/mL，故未進行稀釋，而是直接使用。對該等各種抗體溶液，使用屬於蛋白質物性評價裝置之UNcle(UNchained Labs股份有限公司製造)，求出改質中點溫度、凝聚開始溫度、粒度分佈。具體而言，改質中點溫度及凝聚開始溫度之測定中，將各種抗體自室溫附近以每1分鐘升溫1℃之方式升至75℃並保持30秒鐘，經時性地同時進行螢光光譜測定與靜態光散射測定。根據螢光光譜測定之結果，利用若抗體發生改質則抗體內在胺基酸之螢光光譜之峰值重心會偏移之現象，求出峰值重心之偏移之中點溫度、即改質中點溫度。又，根據靜態光散射測定之結果，利用若發生凝聚則散射強度變強之現象，求出266 nm之散射光開始變強時之溫

度、即凝聚開始溫度。粒度分佈係藉由於室溫附近之各種抗體之動態光散射測定而求出。

【0153】 對抗體1～20，依據試驗例1進行各種抗體之物性評價。將結果示於表1。如上所述，實施例1-1至1-16係本發明之人類化抗體，比較例1-1至1-3係專利文獻3之人類化抗體，比較例1-4係專利文獻1之嵌合抗體。

【0154】 [表1]

			改質中點溫度 (℃)	凝聚開始溫度 (℃)	最頻出粒徑 (nm)	
人類化抗體 (本發明)	實施例1-1	抗體1	59.7	66.4	10.6	
	實施例1-2	抗體2	60.2	70.0	9.9	
	實施例1-3	抗體3	59.4	67.8	9.9	
	實施例1-4	抗體4	58.8	64.8	9.9	
	實施例1-5	抗體5	59.6	68.1	10.7	
	實施例1-6	抗體6	59.6	66.6	9.8	
	實施例1-7	抗體7	59.5	69.6	9.8	
	實施例1-8	抗體8	59.3	68.5	9.9	
	實施例1-9	抗體9	59.1	65.8	9.9	
	實施例1-10	抗體10	59.6	68.7	10.6	
	實施例1-11	抗體11	59.1	68.2	10.7	
	實施例1-12	抗體12	59.3	65.5	11.5	
	實施例1-13	抗體13	58.5	69.8	9.9	
	實施例1-14	抗體14	63.5	64.3	10.6	
	實施例1-15	抗體15	59.8	67.3	10.6	
	實施例1-16	抗體16	59.5	70.4	9.9	
人類化抗體 (專利文獻3)	比較例1-1	抗體17	59.1	61.0	12.22	
	比較例1-2	抗體18	55.5	55.9	11.76	
	比較例1-3	抗體19	60.5	61.1	10.86	
嵌合抗體(專利文獻1)		比較例1-4	抗體20	49.5	45.4	203.15

【0155】 關於改質中點溫度，於嵌合抗體中較低為49.5℃，相對於此，於本發明之人類化抗體中較高為58.5℃～63.5℃，明確了本發明之人類化抗體相較於嵌合抗體而言具有更加穩定之物性。

【0156】 關於凝聚開始溫度，於嵌合抗體中最低為45.4℃，又，於專利文獻3之人類化抗體中屬中等程度為55.9～61.1℃，相對於此，於本

發明之人類化抗體中最高為 $64.3^{\circ}\text{C} \sim 70.4^{\circ}\text{C}$ ，明確了本發明之人類化抗體相較於嵌合抗體或專利文獻3之人類化抗體而言具有更加穩定之物性。

【0157】 關於粒徑，於嵌合抗體中為約203 nm，確認到明確之凝聚，而於本發明之人類化抗體中為約10 nm，明確了以單分散之粒子之形式穩定地存在。

【0158】 根據以上之結果，明確了本發明之人類化抗體相較於專利文獻1之嵌合抗體或專利文獻3之人類化抗體而言具有更加穩定之物性。即，於本發明之抗體之情形時，即便提供於進一步之製造步驟(例如與螢光標記用物質等結合之接合步驟)，亦可期待於不會引起凝聚等之情況下穩定地獲得目標之化合物。

【0159】

試驗例2：活體外結合活性之評價

於塗佈有各種抗原之96孔盤中加入各種抗體，並於室溫下放置1小時。將盤洗淨之後，加入封閉溶液，於室溫下放置30分鐘。將盤洗淨之後，加入HRP結合抗人類IgG，進而於室溫下放置1小時以上。將盤洗淨之後，加入顯色試劑(Bethyl Laboratories公司)，利用微盤讀取器(VersaMax，日本美谷分子儀器(股))測定顯色之程度。

【0160】 將如此對抗體與抗原之活體外結合活性進行了評價之結果示於表2～表4。表2與表3中，自移植有人類胰臟癌細胞株SW1990之帶癌樣本小鼠採集腫瘤塊，使該腫瘤塊均質化，使用離心分離後之上清液(粗提取抗原液)作為抗原，且表4中，使用自粗提取抗原液利用使用氯化銫之等密度離心法獲得之黏蛋白餾分作為抗原。

【0161】 對抗體1～20，依據試驗例2進行各種抗體之活體外結合活性之評價。將結果示於表2、表3、及表4。

【0162】 表2係表示抗體2～8相對於抗體1(實施例2-1)之活體外結合活性比，表3係表示抗體10～16相對於抗體9(實施例2-9)之活體外結合活性比，表4係表示抗體3、4、8、16～19相對於抗體20(比較例2-4)之活體外結合活性比。

【0163】 根據該等結果可知：本發明之人類化抗體係具有與屬於專利文獻1之嵌合抗體之比較例2-4相同程度之活體外結合活性能。一般而言，使嵌合抗體人類化多會導致對抗原之結合活性下降，但令人驚訝的是本發明之人類化抗體維持了與嵌合抗體相同程度之結合活性。又，可知：本發明之人類化抗體相較於專利文獻3之人類化抗體而言，具有同等以上之活體外結合活性能。

【0164】 [表2]

人類化抗體 (本發明)	實施例2-1	抗體1	1.00
	實施例2-2	抗體2	1.03
	實施例2-3	抗體3	0.99
	實施例2-4	抗體4	0.99
	實施例2-5	抗體5	0.60
	實施例2-6	抗體6	0.71
	實施例2-7	抗體7	0.65
	實施例2-8	抗體8	0.72

【0165】 [表3]

人類化抗體 (本發明)	實施例2-9	抗體9	1.00
	實施例2-10	抗體10	0.96
	實施例2-11	抗體11	1.25
	實施例2-12	抗體12	0.91
	實施例2-13	抗體13	0.90
	實施例2-14	抗體14	1.04
	實施例2-15	抗體15	1.36
	實施例2-16	抗體16	0.88

【0166】 [表4]

人類化抗體(本發明)	實施例2-3	抗體3	1.56
	實施例2-4	抗體4	0.97
	實施例2-8	抗體8	0.70
	實施例2-16	抗體16	1.09
人類化抗體(專利文獻3)	比較例2-1	抗體17	0.75
	比較例2-2	抗體18	0.13
	比較例2-3	抗體19	0.49
嵌合抗體(專利文獻1)	比較例2-4	抗體20	1.00

【0167】

試驗例3：活體內腫瘤集聚件之評價

將1×10⁷個人類胰腺癌細胞株SW1990皮下投予至Balb/c裸小鼠之側腹至背部之區域。於移植SW1990後13～16天之後，當腫瘤之大小變為大約100～200 mm²之時點下，自小鼠尾靜脈投予進行了螢光標記之各種抗體2 mg/kg(n=2)。使用CF(商標)Dye SE Protein Labeling Kits(Biotium公司製造)，對抗體進行螢光標記。腫瘤之體積係根據以下之計算式算出。

腫瘤之體積=(腫瘤之短徑²×腫瘤之長徑)/2

【0168】

(經時性腫瘤集聚性評價)

作為活體內腫瘤集聚性之經時性評價，於各種螢光標記抗體投予前、投予1天之後、2天之後、3天之後、7天之後，使用IVIS LuminaIII(Perkin Elmer公司)，對被投予了抗體之小鼠所發出之螢光進行拍攝。

【0169】

(最終時點之腫瘤集聚性評價)

又，於各種螢光標記抗體投予7天之後，摘除腫瘤、肝臟、腎臟，使用IVIS LuminaIII(Perkin Elmer公司)進行拍攝。使用解析用電腦(Living Image軟體)，對所拍攝之影像資料進行解析，獲取數值資料。算出於影像內指定之區域內之平均亮度($[p/s/cm^2/sr]/[\mu W/cm^2]$)作為數值。

【0170】 腫瘤集聚性係根據以下之計算式算出。此處，腫瘤集聚量係使用上述之式算出之腫瘤之區域內之平均亮度，肝臟與腎臟之集聚量係使用上述之式算出之肝臟之區域與腎臟之區域內之平均亮度。

腫瘤肝臟比 = 螢光標記抗體投予7天之後之腫瘤集聚量 / 螢光標記抗體投予7天之後之肝臟集聚量

腫瘤腎臟比 = 螢光標記抗體投予7天之後之腫瘤集聚量 / 螢光標記抗體投予7天之後之腎臟集聚量

【0171】 對抗體3、4、8、9、10、16～20，依據試驗例3進行各種抗體之活體內之腫瘤集聚性之評價。將結果示於表5與圖5。表5係表示各種抗體之活體內之腫瘤集聚性($n=2$ 之平均值)。

【0172】 [表5]

			腫瘤肝臟比	腫瘤腎臟比
人類化抗體(本發明)	實施例3-1	抗體3	23.5	16.8
	實施例3-2	抗體4	11.7	12.7
	實施例3-3	抗體8	14.8	17.7
	實施例3-4	抗體9	20.5	15.4
	實施例3-5	抗體10	17.5	14.9
	實施例3-6	抗體16	18.1	14.0
人類化抗體(專利文獻3)	比較例3-1	抗體17	14.1	9.4
	比較例3-2	抗體18	17.7	18.2
	比較例3-3	抗體19	15.3	14.3
嵌合抗體(專利文獻1)	比較例3-4	抗體20	6.0	7.0

【0173】 根據表5之結果，可明確：本發明之人類化抗體(抗體3、4、8、9、10、16)相較於專利文獻1之嵌合抗體(抗體20)而言，腫瘤肝臟比、腫瘤腎臟比更高，即獲得了腫瘤集聚性更高之人類化抗體。圖5中表示表5中腫瘤肝臟比最高之實施例3-1(抗體3)之經時性之集聚性。明確了集聚於小鼠背部之右下側之腫瘤處。

【0174】 如上所述，一般而言，由於使嵌合抗體人類化多會導致對抗原之結合活性下降，故活體內之腫瘤集聚性亦多會下降。然而，令人驚訝的是明確了本發明之人類化抗體具有遠高於嵌合抗體之腫瘤集聚性。

【0175】 於假定製造接合有具有非常高之殺細胞效果之藥物之抗體-藥劑連結體之情形時，作為其遞送工具之抗體(即本發明之人類化抗體)之腫瘤集聚性較高係表示存在不僅可提高抗腫瘤效果、亦可降低對正常組織之副作用之可能性，因此非常有用。

(產業上之可利用性)

【0176】 本發明中，提供一種具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力之

人類化抗體或其抗原結合片段。本發明之人類化抗體係具有與黏蛋白亞型5AC結合之能力，並且具有穩定之物性，腫瘤集聚性優異。因此，本發明之人類化抗體或其抗原結合片段對於治療及/或診斷黏蛋白亞型5AC過度表現之癌，進而對於製造用於治療及/或診斷黏蛋白亞型5AC過度表現之癌之抗體-藥劑連結體而言，極其有用。

【0177】 本申請案係以於日本提出申請之日本專利特願2019-191560(申請日：2019年10月18日)為基礎，且其內容全部包含於本說明書中。

序列表

<110> 大日本住友製藥股份有限公司(Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.)

<120> 人類化抗體或其抗原結合片段、此等之製造方法及用途

<130> 3631

<150> JP 2019-191560

<151> 2019-10-18

<160> 15

<170> PatentIn 第3.5版

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體之重鏈可變區1(H01)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Thr Arg His Leu Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之重鏈可變區2(H02)

<400> 2

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

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

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

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

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

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

Thr Arg His Leu Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之重鏈可變區3(H03)

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Thr Arg His Leu Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之重鏈可變區4(H04)

<400> 4

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg His Leu Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化抗體之輕鏈可變區1(L01)

<400> 5

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

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

Asp Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 6
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之輕鏈可變區2(L02)

<400> 6

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

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

Asp Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之輕鏈可變區3(L03)

<400> 7

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

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

Asp Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 8
<211> 111

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之輕鏈可變區4(L04)

<400> 8

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

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

Asp Phe Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之重鏈可變區5(H05)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Lys His Leu Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之重鏈可變區6(H06)

<400> 10

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

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

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

Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	Ser	Gly	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Phe	Pro	Asp	Ser	Val
50					55						60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	His	Leu	Asp	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
		100						105						110	
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
	115						120								
<210> 11															
<211> 111															
<212> PRT															
<213> 人工序列															
<220>															
<223> 人類化抗體之輕鏈可變區5(L05)															
<400> 11															
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1			5					10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Ser	Val	Thr	Thr	Ser
		20						25					30		
Asp	Phe	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro
	35						40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
50					55						60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser
65				70					75					80	

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之輕鏈可變區6(L06)

<400> 12

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asp Phe Ser Tyr Met His Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化抗體之輕鏈可變區7(L07)

<400> 13

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asp Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 14
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合抗體之重鏈可變區7(H07)

<400> 14

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

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

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

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

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

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

Thr Arg His Leu Asp Tyr Ala Asn Tyr Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合抗體之輕鏈可變區8(L08)

<400> 15

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

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

Asp Phe Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Leu Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種人類化抗體或其抗原結合片段，該人類化抗體係具有與黏蛋白亞型 5AC 結合之能力，且具有：

重鏈可變區，其包含：

(1)與序列編號 1 所示之胺基酸序列具有 95%以上之序列同一性之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其包含：

(7)與序列編號 7 所示之胺基酸序列具有 95%以上之序列同一性之胺基酸序列。

【請求項2】 一種人類化抗體或其抗原結合片段，該人類化抗體係具有與黏蛋白亞型 5AC 結合之能力，且具有：

重鏈可變區，其包含：

(1)與序列編號 1 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺基酸序列、

(3)與序列編號 3 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺基酸序列、或者

(4)與序列編號 4 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其包含：

(5)與序列編號 5 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺基酸序列、

(6)與序列編號 6 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺

基酸序列、

(7)與序列編號 7 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺基酸序列、或者

(8)與序列編號 8 所示之胺基酸序列具有 98%以上之序列同一性之胺基酸序列。

【請求項3】 如請求項 2 之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有：
重鏈可變區，其包含：

(1)與序列編號 1 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列、

(3)與序列編號 3 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列、或者

(4)與序列編號 4 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其包含：

(5)與序列編號 5 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列、

(6)與序列編號 6 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列、

(7)與序列編號 7 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列、或者

(8)與序列編號 8 所示之胺基酸序列具有 99%以上之序列同一性之胺基酸序列。

【請求項4】 如請求項 2 之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有：
重鏈可變區，其包含：

- (1)序列編號 1 所示之胺基酸序列、
- (3)序列編號 3 所示之胺基酸序列、或者
- (4)序列編號 4 所示之胺基酸序列；及

輕鏈可變區，其包含：

- (5)序列編號 5 所示之胺基酸序列、
- (6)序列編號 6 所示之胺基酸序列、
- (7)序列編號 7 所示之胺基酸序列、或者
- (8)序列編號 8 所示之胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有包含序列編號 1 所示之胺基酸序列之重鏈可變區、及包含序列編號 7 所示之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【請求項6】 如請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，其係單株抗體。

【請求項7】 如請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有腫瘤集聚性及/或穩定之物性。

【請求項8】 如請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段，其具有穩定之物性。

【請求項9】 如請求項 8 之人類化抗體或其抗原結合片段，其中，上述穩定之物性係包含選自以下之 1 種以上，

- (1)改質中點溫度(T_m)為 50°C 以上；及

(2)凝聚開始溫度(Tagg)為 50℃ 以上。

【請求項10】 如請求項 1 之人類化抗體，其中，上述抗體對黏蛋白亞型 5AC 之活體外結合活性係與嵌合抗體為相同程度或其以上。

【請求項11】 一種組成物，其包含請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段。

【請求項12】 一種醫藥組成物，其包含請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段、及藥學上所容許之載體。

【請求項13】 一種用於治療黏蛋白亞型 5AC 過度表現之癌之醫藥組成物，其包含請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段、及藥學上所容許之載體。

【請求項14】 一種核酸，其編碼請求項 1 之人類化抗體。

【請求項15】 一種表現載體，其包含請求項 14 之核酸。

【請求項16】 一種宿主細胞，其包含請求項 15 之表現載體。

【請求項17】 一種人類化抗體或其抗原結合片段之製造方法，其係製造請求項 16 之宿主細胞中之人類化抗體或其抗原結合片段之方法，且包括：

(1)將編碼請求項 1 至 10 中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段之核酸插入至表現載體中之步驟；

(2)藉由包含上述核酸之表現載體向宿主細胞導入上述核酸之步驟；

(3)對包含上述表現載體之宿主細胞進行培養之步驟；及

(4)藉由利用層析法進行精製而將上述人類化抗體或其抗原結合片段自上述宿主細胞之培養上清液單離之步驟。

【請求項18】 一種於活體外對細胞或組織中之黏蛋白亞型 5AC 之表現量進行評價之方法，其包括：

(1)對請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段附上能夠使其檢測出之標記，從而獲得附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段之步驟；

(2)使上述細胞或組織與上述附有標記之人類化抗體或其抗原結合片段接觸之步驟；及

(3)測定與上述細胞或組織結合之上述標記之量，藉此對於該細胞或組織中表現之黏蛋白亞型 5AC 之表現量進行評價之步驟。

【請求項19】 一種黏蛋白亞型 5AC 過度表現之癌之治療藥，其含有包含請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段及藥學上所容許之載體之醫藥組成物之有效量。

【請求項20】 一種用於治療及/或診斷黏蛋白亞型 5AC 過度表現之癌之套組，其包含附有能夠使抗體或其抗原結合抗體片段檢測出之標記之請求項 1 之人類化抗體或其抗原結合片段。

【發明圖式】

[重鏈可變區1(H01)]
EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAAS GFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVST ISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTALYYC TRHLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[重鏈可變區2(H02)]
LVQLVES GGG VVRP GGS LRLSCAAS GFTFSNYGMSWIR
QAPGKGLEWVST ISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN AK
NSLYLQMNSLRAEDTALYYC TRHLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[重鏈可變區3(H03)]
LVQLVES GGG VVQP GRS LRLSCAAS GFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVAT ISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN SK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC TRHLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[重鏈可變區4(H04)]
EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAVS GFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVST ISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN SR
NTLYLQMNTLRAEDTAVYYC TRHLDYANYDAMDYWGQG
TPVTVSS

【圖1】

[輕鏈可變區1(L01)]
DIVMTQSPSSLASV GDRVTITC RASKSVTTSDFSYMH
WYQQKPGKAPKLLIYL ASNLESGVPSRFSSGSGTDFT
LTIS SLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[輕鏈可變區2(L02)]
DIVMTQSPSTLSASV GDRVTITC RASKSVTTSDFSYMH
WYQQKPGKAPKLLIYL ASNLESGVPSRFSSGSGTDFT
LTIS SLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGQGTKLEIK

[輕鏈可變區3(L03)]
DIQMTQSPSSLASV GDRVTITC RASKSVTTSDFSYMH
WYQQKPGKSPKLLIYL ASNLESGVPSRFSSGSGTDFS
LTIS SLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[輕鏈可變區4(L04)]
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK ASKSVTTSDFSYLH
WYQQKPGQP KLLIYL ASNLESGVPDRFSSGSGTDFT
LTIS SLQAEDVAVYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIK

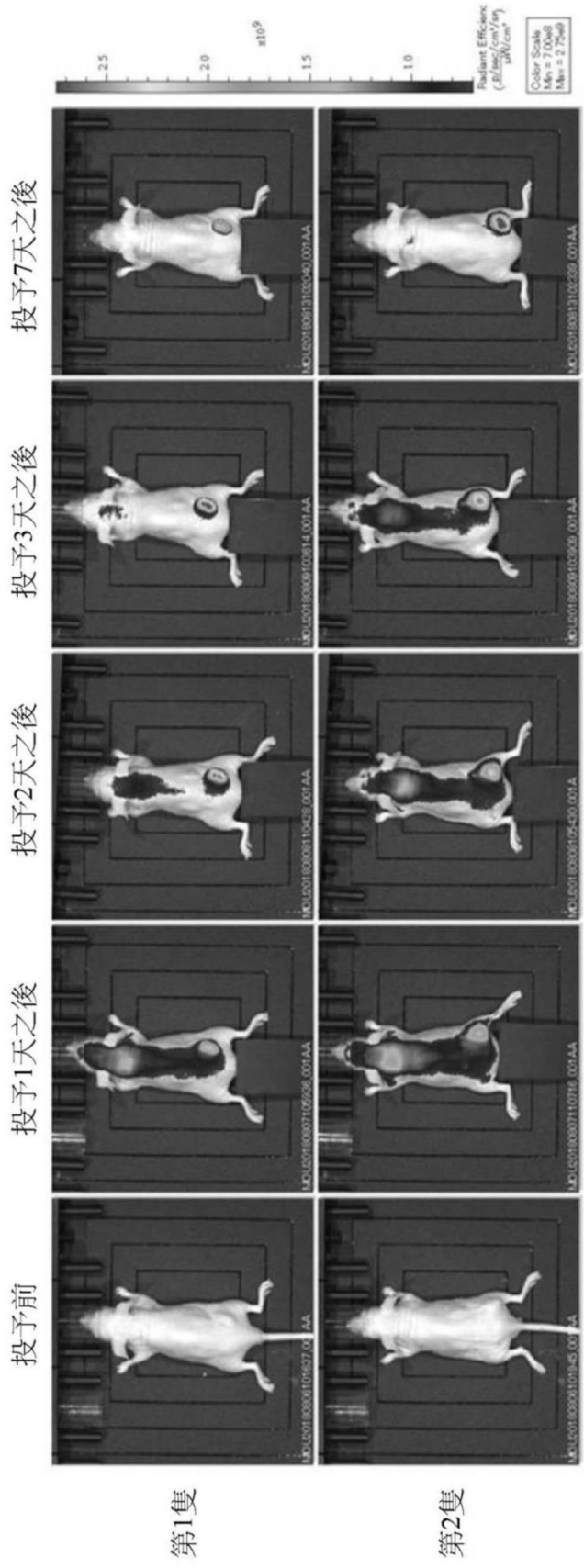
【圖2】

[重鏈可變區5(H05)]
EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y G M S W V R
Q A P G K G L E W V S T I S N S G R Y T Y F P D S V K G R F T I S R D N S K
N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K H L D Y A N Y D A M D Y W G Q G
T L V T V S S
[重鏈可變區6(H06)]
EVQLVES GGG L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y G M S W V R
Q A P G K G L E W V S T I S N S G R Y T Y F P D S V K G R F T I S R D N A K
N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R H L D Y A N Y D A M D Y W G Q G
T L V T V S S
[輕鏈可變區5(L05)]
D I Q M T Q S P S S L A V S L G D R V T I T C R A S K S V T T S D F S Y M H
W Y Q Q K P G L A P K L L I Y L A S N L E S G V P S R F S G S G S G T D F T
F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q H S R E F P W T F G Q G T K V E V K
[輕鏈可變區6(L06)]
D I V M T Q T P L S S P V T L G Q P A S I S C R A S K S V T T S D F S Y M H
W L Q Q R P G Q P P R L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G A G T D F T
L K I S R V E A E D V G V Y Y C Q H S R E F P W T F G Q G T K V E I K
[輕鏈可變區7(L07)]
D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C R A S K S V T T S D F S Y M H
W Y L Q K P G Q P P Q L L I Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S G T D F T
L K I S R V E A E D V G V Y Y C Q H S R E F P W T F G Q G T K V E I K

【圖3】

[重鏈可變區7(H07)]
EVKLVES GGG V L V K S G G S L K L S C A V S G F T F S N Y G M S W V R
Q T P E K R L E W V A T I S N S G R Y T Y F P D S V K G P F A I S R D N A K
N N L Y L Q M S S L R S A D T A L Y Y C T R H L D Y A N Y D A M D Y W G Q G
T S V T V S S
[輕鏈可變區8(L08)]
D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S K S V T T S D F S Y M H
W Y Q Q K P G Q P P K L L L Y L A S N L E S G V P D R F S G S G S G Y D F Y
L N I H P V E E D A A T Y Y C Q H S R E F P W T F G G G T K L E I K

【圖4】



【圖5】