



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201726738 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：105136601

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 10 日

(51)Int. Cl. : *C07K16/28 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*
A61K47/48 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2015/11/10 美國 62/253,371
 2015/11/11 美國 62/253,774

(71)申請人：麥迪紐有限責任公司(美國) MEDIMMUNE, LLC (US)
 美國

(72)發明人：波爾 納本度 PORE, NABENDU (US)；布魯克 馬丁 J 三世 BORROK, MARTIN J., III (US)；裘德瑞 帕莎 S CHOWDHURY, PARTHA S. (IN)；米其樂提 艾默 F MICHELOTTI, EMIL F. (US)；泰斯 大衛 A TICE, DAVID A. (US)；何林斯沃圖 羅伯特 E HOLLINGSWORTH, ROBERT E. (US)；張 建瑛 CHANG, CHIEN-YING (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：13 共 122 頁

(54)名稱

對 ASCT2 具專一性之結合分子及其用途

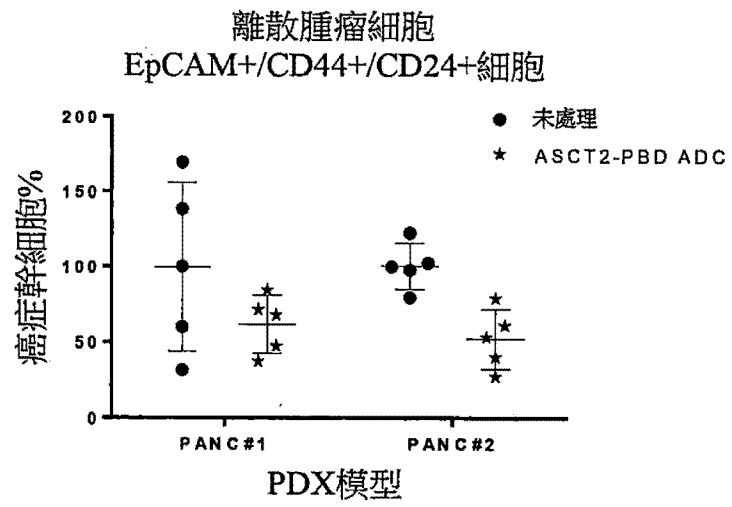
BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR ASCT2 AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供 ASCT2 結合分子，例如抗 ASCT2 抗體及其抗原結合片段。在某些態樣中，該等 ASCT2 結合分子共軛至細胞毒性藥物，例如 ASCT2 抗體-藥物共軛物(ADCs)。在某些態樣中，該等抗 ASCT2 抗體及其片段可為融合瘤源鼠類單株抗體，及其人類化型式。在某些態樣中，該等 ASCT2 結合分子專一性結合於表現 ASCT2 之細胞，且在一些情況下，內化至該等細胞中。此外，本發明提供用於診斷及治療 ASCT2 過度表現表徵之疾病或病症，例如某些類型的癌症。在一個特定實施例中，本發明提供使用 ASCT2 ADCs 來治療癌症之方法。

This disclosure provides ASCT2-binding molecules, e.g., anti-ASCT2 antibodies, and antigen-binding fragments thereof. In certain aspects, the ASCT2-binding molecules are conjugated to cytotoxic drugs, e.g., ASCT2 antibody-drug conjugates (ADCs). In certain aspects, the anti-ASCT2 antibodies and fragments thereof can be hybridoma-derived murine monoclonal antibodies, and humanized versions thereof. In certain aspects, the ASCT2-binding molecules bind specifically to cells expressing ASCT2, and in some instances, are internalized into the cells. In addition, this disclosure provides compositions and methods for diagnosing and treating diseases or disorders characterized by ASCT2 overexpression, e.g., certain types of cancer. In a particular embodiment, the disclosure provides methods for treating cancer using ASCT2 ADCs.

指定代表圖：



【圖1E】

201726738

【發明摘要】

【中文發明名稱】

對ASCT2具專一性之結合分子及其用途

【英文發明名稱】

BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR ASCT2 AND USES
THEREOF

【中文】

本發明提供ASCT2結合分子，例如抗ASCT2抗體及其抗原結合片段。在某些態樣中，該等ASCT2結合分子共軛至細胞毒性藥物，例如ASCT2抗體-藥物共軛物(ADCs)。在某些態樣中，該等抗ASCT2抗體及其片段可為融合瘤源鼠類單株抗體，及其人類化型式。在某些態樣中，該等ASCT2結合分子專一性結合於表現ASCT2之細胞，且在一些情況下，內化至該等細胞中。此外，本發明提供用於診斷及治療ASCT2過度表現表徵之疾病或病症，例如某些類型的癌症。在一個特定實施例中，本發明提供使用ASCT2 ADCs來治療癌症之方法。

【英文】

This disclosure provides ASCT2-binding molecules, *e.g.*, anti-ASCT2 antibodies, and antigen-binding fragments thereof. In certain aspects, the ASCT2-binding molecules are conjugated to cytotoxic drugs, *e.g.*, ASCT2 antibody-drug conjugates (ADCs). In certain aspects, the anti-ASCT2 antibodies and fragments thereof can be hybridoma-derived murine monoclonal antibodies, and humanized versions thereof. In certain aspects, the ASCT2-binding molecules bind

specifically to cells expressing ASCT2, and in some instances, are internalized into the cells. In addition, this disclosure provides compositions and methods for diagnosing and treating diseases or disorders characterized by ASCT2 overexpression, *e.g.*, certain types of cancer. In a particular embodiment, the disclosure provides methods for treating cancer using ASCT2 ADCs.

【指定代表圖】

圖1E

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

對ASCT2具專一性之結合分子及其用途

【英文發明名稱】

BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR ASCT2 AND USES
THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

溶質載體(SLC)家族包括編碼膜運輸蛋白、經組織成幾十個次次家族之超過300個基因。SLC1A次家族包括轉運系統ASC，其介導脊椎動物細胞中之鈉依賴性中性胺基酸轉運。丙胺酸、絲胺酸及半胱胺酸為ASC系統之較佳受質。已鑑別兩種次類型之ASC系統：ASC轉運體1 (ASCT1，亦稱為SLC1A4)及ASC轉運體2 (ASCT2，亦稱為SLC1A5)。

ASCT2為具有541個胺基酸的具八個跨膜結構域之多次跨膜蛋白。ASCT2之分子量視多種糖基化圖譜而在55 KD至75 KD範圍內變化。除運送L丙胺酸、L絲胺酸及L半胱胺酸之外，ASCT2亦運送L蘇胺酸及L麩醯胺酸。此外，ASCT2充當由D型猿猴逆轉錄病毒及C型病毒共用之細胞表面受體。

已在多種癌症中報告ASCT2之過度表現，包括結腸直腸癌、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、前列腺癌、肺癌、胰臟癌及血液癌(諸如，骨髓瘤及淋巴瘤)。ASCT2之過度表現(藉由免疫組織化學分析(IHC)來測定)在包括結腸直腸癌、前列腺癌、肺癌及胰臟癌之多種癌症中展示不佳的預後效果(K Kaira等人(2015) Histopathology； Shimizu等人(2014) BJC； D Witte

等人 (2002) *Anticancer Research* ; R Li 等人 (2003) *Anticancer Research*)。已報告，ASCT2為雷帕黴素(mTOR)信號傳導路徑之哺乳動物靶向的一種驅動子，且因此成為腫瘤生長之驅動因素(Nicklin P.等人 (2009) *Cell*)。

抗體-藥物共軛物(ADC)代表一種更加有效地治療癌症的有前景的新型療法性方法，同時藉由將抗體之專一性與細胞毒性小分子或毒素之效能合併來減少藥物相關毒性。ADC可包含細胞毒素，該細胞毒素可為已經化學修飾以含有連接子之小分子。連接子隨後用於將細胞毒素共軛至抗體或其抗原結合片段。當ADC結合至靶向陽性細胞之抗原表面時，細胞毒性被誘發、被內化並被轉運至溶酶體，其中，在可裂解連接子之蛋白分解(例如，藉由溶酶體中所發現之組織蛋白酶)之後，抑或當不可裂解連接子用於將細胞毒素附接至抗體時，經由抗體之蛋白分解降解之後，細胞毒素被釋放。細胞毒素隨後易位出溶酶體且進入細胞溶質，其中其可隨後結合至其標靶(取決於其作用機制)。通常，此等細胞毒素誘發細胞週期停滯，其隨後導致細胞凋亡。含有顯影劑之對應共軛物亦代表一種活體內或活體外偵測癌細胞之有前景的新方法。

本發明提供專一性結合於ASCT2之分子及此類分子之使用方法，例如，用於偵測ASCT2、用於向細胞傳遞異源試劑或用於治療表徵為ASCT2過度表現之病症或病症(例如，癌症)。本發明提供共軛至細胞毒性藥物之抗ASCT2抗體，諸如微管溶素衍生物(tubulysin derivative)或吡咯并苯并二氮呋(抗ASCT2-ADC)。本發明之抗體適用於治療表徵為ASCT2過度表現之疾病或病症(例如，癌症)。舉例而言，本發明人已顯示抗ASCT2 ADC在人類結腸直腸及頭頸癌之異種小鼠模型中造成腫瘤消退。

【發明內容】

本發明之一些主要態樣概述如下。其他態樣描述於本發明之[實施方式]、本發明之實例、圖式及申請專利範圍章節中。希望本發明各章節中之說明結合其他章節閱讀。此外，本發明各章節中所述之各種實施例可以各種不同方式組合，且希望所有此類組合屬於本發明範疇內。

本發明提供ASCT2結合分子，例如抗ASCT2抗體或其抗原結合片段，例如能夠結合至ASCT2之單株抗體。在一些態樣中，結合分子共軛至試劑，諸如細胞毒素。

在一些情況下，專一性結合於ASCT2之抗原決定基的經分離結合分子或其抗原結合片段作為抗體或其抗原結合片段而專一性結合至同一ASCT2抗原決定基，該抗體或其抗原結合片段包含17c10或1e8之重鏈可變域(VH)及輕鏈可變域(VL)。

在一些情況下，17c10之VH包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 5，且17c10之VL包含SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 6。

在一些情況下，1e8之VH包含SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7，且1e8之VL包含SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 8。

在一些情況下，專一性結合於ASCT2之經分離結合分子或其抗原結合片段包含抗體VL，其中該VL包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6及SEQ ID NO: 8。

在一些情況下，專一性結合於ASCT2之經分離結合分子或其抗原結合片段包含抗體VH，其中該VH包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO:

1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 7。

在一些情況下，專一性結合至ASCT2之經分離結合分子或其抗原結合片段共軛至選自由以下各者組成之群的試劑：抗微生物劑、治療劑、前藥、肽、蛋白、酶、脂質、生物反應調節劑、藥劑、淋巴激素、異源抗體或其片段、可偵測標記、聚乙二醇(PEG)以及兩種或多於兩種任何該等試劑之組合。

在一些情況下，專一性結合於ASCT2之經分離結合分子或其抗原結合片段共軛至細胞毒素。在某些實施例中，細胞毒素係選自由以下各者組成之群：AZ1508、SG3249及SG3315。

在一些情況下，結合分子或其片段包含抗體或其抗原結合片段。

在一些情況下，專一性結合於ASCT2之經分離抗體或其抗原結合片段包含VH及VL，其中VH及VL分別包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列：SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2；SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4；SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6；以及SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8。在一些情況下，VH包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5且VL包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6。在一些情況下，VH包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7且VL包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8。

在一些情況下，抗體或其抗原結合片段包含重鏈恆定區或其片段。在一些情況下，重鏈恆定區或其片段為IgG恆定區。在一些情況下，IgG恆定區包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9。在一些情況下，IgG恆定區為人類IgG1恆定域。

在一些情況下，抗體或其抗原結合片段包含選自由人類κ恆定區及人

類 λ 恆定區組成之群的輕鏈恆定區。

在一些情況下，抗體或其抗原結合片段為鼠類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多株抗體、重組抗體、多專一性抗體或其抗原結合片段。在一些情況下，抗原結合片段為Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv及sc(Fv)₂。

在一些情況下，抗體或其抗原結合片段可結合至人類ASCT2及食蟹獼猴(cyno) ASCT2。

在一些情況下，抗體或其抗原結合片段不專一性結合於人類ASCT1。

在一些情況下，抗體或其片段與選自由以下組成之群的藥劑共軛：抗微生物藥劑、治療劑、前藥、肽、蛋白質、酵素、脂質、生物反應調節劑、醫藥劑、淋巴激素、異源抗體或其片段、可偵測標記、PEG，以及兩種或多於兩種之任何該等之組合。

在一些情況下，抗體或其抗原結合片段共軛至細胞毒素。在某些實施例中，細胞毒素係選自由以下各者組成之群：AZ1508、SG3249及SG3315。

在一些情況下，本發明提供經分離聚核苷酸或包含編碼如本文所描述之結合分子或其片段之核酸的聚核苷酸的組合。在一些情況下，本發明提供經分離聚核苷酸或包含編碼如本文所描述之抗體或其抗原結合片段之核酸的多核苷酸的組合。

在一些情況下，本發明提供包含本文所述之聚核苷酸的載體。在一些情況下，包含編碼VH之核酸的聚核苷酸與包含編碼VL之核酸的聚核苷酸處於同一載體中。在一些情況下，包含編碼VH之核酸的聚核苷酸與包

含編碼VL之核酸的聚核苷酸處於不同載體中。

在一些情況下，本發明提供一種包含(i)如本文所描述之結合分子或其片段及(ii)載體之組合物。在一些情況下，本發明提供包含(i)如本文所述之抗體或其抗原結合片段及(ii)載體之組合物。在一些情況下，本發明提供一種包含(i)如本文所述之編碼抗體或其抗原結合片段之核酸及(ii)載體之組合物。在一些情況下，本發明提供一種包含(i)如本文所述之載體及(ii)載劑之組合物。在一些態樣中，載劑為醫藥學上可接受之載劑。

在一些情況下，本發明提供包含如本文所述之聚核苷酸的宿主細胞、如本文所述之載體或如本文所述之組合物。

在一些情況下，本發明提供用於產生如本文所述之結合分子或片段之方法，該方法包含(a)培養如本文所述之宿主細胞，及(b)分離結合分子或片段。在一些情況下，本發明提供一種用於產生如本文所述之抗體或抗原結合片段之方法，該方法包含(a)培養如本文所述之宿主細胞，及(b)分離抗體或抗原結合片段。

在一些情況下，本發明提供一種診斷試劑或套組，其包含如本文所述之結合分子或其片段，或如本文所述之抗體或其抗原結合片段。

在一些情況下，向ASCT2表現細胞傳遞試劑之方法包含：如本文所述，使細胞與共軛至試劑之結合分子或片段接觸；或如本文所述，使細胞與共軛至試劑之抗體或其抗原結合片段接觸，其中該試劑由該細胞內化。在一些情況下，藥劑可選自由以下組成之群：抗微生物藥劑、治療劑、前藥、肽、蛋白質、酶素、脂質、生物反應調節劑、醫藥劑、淋巴激素、異源抗體或其片段、可偵測標記、PEG，以及兩種或多於兩種之任何該等藥劑之組合。在一些情況下，藥劑可為細胞毒素。

在一些情況下，在ASCT2表現細胞中誘發死亡之方法包含：如本文所述，使細胞與共軛至細胞毒素之結合分子或片段接觸；或如本文所述，使細胞與共軛至細胞毒素之抗體或其抗原結合片段接觸，其中該細胞毒素由該細胞內化。在一較佳實施例中，細胞毒素係選自由以下各者組成之群：AZ1508、SG3249及SG3315。

在一些情況下，治療個體內表徵為ASCT2過度表現之疾病或病症(例如，癌症)的方法包含：向需要治療之個體投與有效量的如本文所述之結合分子或片段，或如本文所述之抗體或抗原結合片段，或如本文所述之組合物。

在一些情況下，治療表徵為ASCT2過度表現之疾病或病症(例如癌症)的方法包括橫跨實體腫瘤至血液腫瘤之大範圍的癌症。治療方法之有效性的此類寬範圍不常見，但相當出人意料。除跨越實體腫瘤及血液腫瘤展示之寬作用範圍以外，本文所述之本發明亦可用於測定癌症幹細胞(CSC)之存在的方法及涉及CSC之治療方法，其進一步支持本文所述之本發明的使用廣度及出人意料的作用。

在一些情況下，癌症選自由以下組成之群：結腸直腸癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌、胰臟癌、黑素瘤、子宮內膜癌及血液癌(急性骨髓白血病(AML)、多發性骨髓瘤(MM)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL))。另外，方法包含由靶向CSC組成的治療。較佳地，個體為人類個體。

在一些情況下，用於偵測樣品中ASCT2表現量的方法包含：(a)使該樣品與如本文所述之結合分子或片段，或如本文所述之抗體或抗原結合片段，或如本文所述之組合物接觸；及(b)偵測該樣品中該結合分子或其片段，或該抗體或其抗原結合片段與ASCT2之結合。在一些情況下，樣品

為細胞培養物。在一些情況下，樣品為經分離組織。在一些情況下，樣品來自個體，優先地人類個體。

【圖式簡單說明】

圖1A顯示表明相比於來自健康樣品之骨髓的來自AML和MM樣品之骨髓抽出物之高ASCT2表現的流動式細胞測量術分析之定量。

圖1B顯示CD34+/CD38+群體中之ASCT2之高表現，報導定義白血病幹細胞群體(LSC)之標記物。另外，在諸如CD34+CD38-、CD34+CD38+及CD34-CD38+群體之所有其他亞型中評估ASCT2之表現。

圖1C顯示來自MM樣品之漿細胞(PC；CD138+/CD19-)及幹細胞(SC；CD138-/CD19+)中之ASCT2表現。

圖1D顯示EpCAM+/CD24+/CD44+細胞群體中評估之ASCT2表現，報導胰臟CSC之標記物。流動式細胞測量術分析表明胰臟腫瘤中之CSC之高ASCT2表現。

圖1E顯示在用ASCT2-PBD ADC (抗體17c10共軛至SG3249)活體內處理後，胰臟腫瘤中之CSC (EpCAM+/CD24+/CD44+)群體之消融。

圖2顯示描繪純化人類抗ASCT2 IgG 1e8、3f7、5a2、9b3、10c3、16b8、17c10及17a10與經表現人類ASCT2之質體轉染之293F細胞之結合活性之倍數變化的圖示。

圖3A顯示相對於用陰性對照處理(未處理)；用初級抗ASCT2抗體1e8及17c10處理；用共軛至皂草素之抗ASCT2抗體處理；或用連接至皂草素之對照抗體(hIgG-皂草素)處理之表現ASCT2之293F細胞之未處理對照細胞的活力之相對活力之條形圖。

圖3B顯示經典地共軛至Sw48細胞中之微管溶素AZ1508之抗ASCT2 1E8、抗ASCT2 17C10及同型對照R347之細胞毒性之圖示。

圖4顯示描繪如藉由流動式細胞測量術評估的抗ASCT2抗體17c10及1e8與具有ASCT2表現之shRNA基因敲落的WiDr細胞或WiDr細胞之結合之條形圖。

圖5A顯示抗ASCT2抗體17c10及同型對照之內化動力學。

圖5B顯示如藉由細胞毒性殺死所量測之ASCT2-ADC（共軛至AZ1508之抗體17c10）之內化動力學。細胞經ASCT2-ADC（17c10-AZ1508）脈衝對應時段。此後，含有ADC之培養基經新鮮培養基替換且另外培育4天。藉由使用CTG套組量測細胞活力。劑量反應曲線標繪為未處理對照細胞之百分比。

圖6A至圖6H顯示產生於抗ASCT2抗體17c10及1e8，以及同型對照R347與表現ASCT2之細胞株之結合的流動式細胞測量術曲線圖。圖6A，人類癌細胞株Cal27；圖6B，人類癌細胞株FaDu；圖6C，人類癌細胞株SSC15；圖6D，人類癌細胞株WiDr；圖6E，穩定表現人類ASCT2之CHOK1細胞；圖6F，穩定表現cyno ASCT2之CHOK1細胞；圖6G，獼猴癌細胞株CynoMK1；及圖6H，模擬經轉染CHOK1細胞。

圖7A顯示抗ASCT2抗體17c10與SKMEL-2細胞之結合不由ASCT1 shRNA改變，而結合在ASCT2專一性shRNA基因敲落之後顯著減少。

圖7B顯示抗ASCT2抗體ADC（共軛至AZ1508之抗體17c10）之細胞毒性殺死在ASCT1 shRNA基因敲落之後不受影響，而在ASCT2 shRNA沉默之後觀測到細胞毒性殺死之顯著減少。來自所有shRNA基因敲落組之資料相對於未處理對照標準化。

圖8A及圖8B顯示共軛至微管溶素1508之抗ASCT2抗體17c10 (圖8A) 及1e8 (圖8B)相對於表現人類或cyno ASCT2蛋白質或無關受體的穩定CHO-K1細胞株之細胞毒性效應。

圖9A至圖9D顯示17c10親體抗體、17c10生殖系化抗體及R347同型對照抗體與表現人類ASCT2之穩定CHO-K1細胞株(圖9A)；表現cyno ASCT2之穩定CHO-K1細胞株(圖9B)；表現ASCT2之結腸直腸癌細胞WiDr (圖9C)；及模擬轉染對照細胞(圖9D)之結合的流動式細胞測量術曲線圖。

圖10A至圖10F顯示標準化為用抗ASCT2抗體17c10處理之癌細胞株之未處理對照細胞之活力的相對活力(%), 該抗體共軛至胰臟癌細胞(圖10A)、結腸癌細胞(圖10B)、肺癌細胞(圖10C)、HNSCC癌細胞(圖10D)、前列腺癌細胞(圖10E)及非ASCT2表現細胞株(圖10F)之微管溶素AZ1508及R347同型對照抗體(共軛至微管溶素AZ1508)。

圖11A顯示標準化為用共軛至SG3249之對照抗體與共軛至SG3249之抗ASCT2抗體17c10處理之細胞之活力的相對活力。

圖11B顯示標準化為用共軛至SG3315之對照抗體與共軛至SG3315之抗ASCT2抗體17c10處理之細胞之活力的相對活力。

圖12A、圖12B及圖12C顯示用共軛至微管溶素或PBD之抗ASCT2抗體17c10處理後之WiDr結腸直腸癌或原發性胰臟癌異種移植模型中之腫瘤體積之時程。圖12A，17c10抗體共軛至微管溶素1508；圖12B，抗ASCT2抗體17c10共軛至SG 3315；圖12C，抗ASCT2抗體17c10共軛至SG 3249。

圖13A顯示ASCT2-PBD ADC (抗體17c10共軛至SG3249)在播散性

TF1 α AML小鼠模型中之抗腫瘤功效。ADC及同型對照以Q1Wx4排程投與。每天監測發病率及死亡率。相比於未處理對照組，ADC之所有劑量(0.05、0.1、0.25及0.5 mg/kg)顯著提高存活期。Kaplan-Meier存活曲線中呈現之資料顯示各組內之個別動物之命運。

圖13B顯示ASCT2-PBD ADC (抗體17c10共軛至SG3249)在播散性MM.1S MM小鼠模型中之抗腫瘤功效。用ADC或同型對照處理之小鼠如圖13A中所述。每天監測發病率及死亡率。相比於未處理對照組(55.5天)，兩個ADC劑量(0.1及0.4 mg/kg)均顯著提高存活期(分別為117及123.5天)。Kaplan-Meier存活曲線中呈現之資料顯示各組內之個別動物之命運。

【實施方式】

本發明提供專一性結合於ASCT2之抗體及其抗原結合片段。在某些實施例中，抗體或抗原結合片段共軛至藥劑，優選地細胞毒素。編碼抗體及其抗原結合片段之聚核苷酸、含有聚核苷酸細節載體及表現抗體之宿主細胞包括在內。亦提供包含抗ASCT2抗體或其抗原結合片段之組合物，及製造抗ASCT2抗體及抗原結合片段之方法。另外提供使用新穎抗ASCT2抗體的方法，諸如在診斷應用中或治療藉由ASCT2過度表現表徵之疾病或病症，例如癌症之方法中。

為了使本發明可更易於理解，首先對某些術語進行定義。在整個實施方式中，闡述其他定義。

I. 定義

除非上下文另外明確指示，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)」包括複數個指示物。術語

「一(a/an)」以及術語「一或多個」及「至少一個」可在本文中可互換地使用。

此外，「及/或」視為特定揭示兩個指定特徵或組分中之每一者(在另一者存在或不存在下)。因此，如諸如「A及/或B」之片語中所用之術語「及/或」意欲包括A及B、A或B、A (單獨)及B (單獨)。同樣，如諸如「A、B及/或C」之片語中所用之術語「及/或」意欲包括A、B及C；A、B或C；A或B；A或C；B或C；A及 B；A及C；B及C；A (單獨)；B (單獨)；及C (單獨)。

每當以語言「包含」描述實施例時，包括以術語「由...組成」及/或「主要由...組成」描述的另外類似之實施例。

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有與本發明相關之一般技術者通常所理解相同之含義。舉例而言，*The Dictionary of Cell and Molecular Biology* (第5版 J.M. Lackie編, 2013)、*the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (第2版 R. Cammack 等人編, 2008)及*The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, P-S. Juo, (第2版 2002)可向熟習此項技術者提供本文所用之一些術語的一般定義。

單位、前綴及符號以其國際單位體系(Système International de Unites (SI))接受之形式表示。數值範圍包括界定該範圍之數字。除非另外指示，否則胺基酸序列以胺基至羧基取向自左向右書寫。本文所提供之標題不限制本發明之各種態樣或實施例，其可為參考說明書之總體性概述。因此，下文緊接著定義之術語由整個說明書更充分定義。

胺基酸在本文中可由其通常已知之三字母符號或由IUPAC-IUB生物

化學命名法委員會(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)所推薦之單字母符號來提及。類似地，核苷酸由其通常接受之單字母密碼來提及。

術語「ASCT2」係指系統ASC胺基酸轉運體2蛋白質及/或其活性片段。ASCT2為以Na⁺依賴性方式介導小型中性胺基酸，包括麩醯胺酸、丙胺酸及絲胺酸、半胱胺酸及蘇胺酸之轉運的跨膜蛋白。ASCT2之RNA、DNA及胺基酸序列為熟習此項技術者所知且可見於許多資料庫中，例如國家生物技術資訊中心(NCBI)之資料庫中。見於NCBI之此等序列之實例為具有GenBank寄存編號NM_005628及NP_005619之人類ASCT2序列；具有GenBank寄存號NM_001284054及NP-001270983之食蟹獼猴(*cynomolgus monkey/Macaca fascicularis*) ASCT2序列。

術語「抑制」、「阻斷」及「抑止」在本文中可互換使用且係指生物活性之任何統計學顯著性降低，包括活性完全阻斷。舉例而言，「抑制」可指生物活性或方法的約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%降低。

術語「抗體」或「免疫球蛋白」在本文中可互換地使用。典型抗體包含藉由二硫鍵互連之至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈。每一重鏈包含重鏈可變區(本文縮寫為VH)及重鏈恆定區(在本文中縮寫為VH)及重鏈恆定區構成。重鏈恆定區包含三個域CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域C1。VH及VL區可進一步再分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，其中散置有更保守的區域，稱為構架區(FW)。各VH及VL由三個CDR及四個FW構成，自胺基端至羧基端依以下順序排列：FW1、CDR1、FW2、CDR2、

FW3、CDR3、FW4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白結合至宿主組織或因子，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)。本發明之例示性抗體包括融合瘤產生的鼠類單株抗體17c10及1e8；此等抗體之人類化、親和力最佳化、生殖系化及/或其他型式，及血清半衰期最佳化抗ASCT2 YTE抗體(例如K44VHa-N56Q、K44VHa6-N56Q或K2Ha-N56Q)。

術語「生殖系化」意謂抗體中特定位置之胺基酸突變回生殖系中之彼等胺基酸。

術語「抗體」可指一種免疫球蛋白分子，其經由免疫球蛋白分子之可變區內的至少一個抗原識別位點來識別且專一性結合至標靶，諸如蛋白質、多肽、肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂質或前述者之組合。如本文所用，術語「抗體」包含如本文所用，術語「抗體」涵蓋完整多株抗體、完整單株抗體、抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段)、單鏈Fv(scFv)突變體、多專一性抗體(諸如由至少兩種完整抗體產生之雙專一性抗體)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、包含抗體之抗原決定部分的融合蛋白，及包含抗原識別位點的任何其他經修飾之免疫球蛋白分子，只要該等抗體展現所需生物活性即可。抗體可基於免疫球蛋白重鏈恆定域身分(分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ)而為免疫球蛋白之五個主要類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，或其亞類(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)中的任一者。免疫球蛋白之不同類別具有不同且熟知之亞單元結構及三維組態。抗體可為裸抗體或與諸如毒素、放射性同位素等其他分子結合。

術語「ASCT2抗體」或「結合至ASCT2之抗體」或「抗ASCT2」係指能夠以足夠親和力結合ASCT2以使得抗體適用作靶向ASCT2之治療或診斷試劑的抗體。抗ASCT2抗體與無關的非ASCT2蛋白質之結合的程度小於抗體與ASCT2之結合的約10%，其如藉由放射免疫分析(RIA)、BIAcore® (使用重組ASCT2作為分析物且使用抗體作為配位體，或反之亦然)、KINEXA®或此項技術中已知之其他結合分析量測。在某些實施例中，結合至ASCT2之抗體的解離常數(K_D) $\leq 1\ \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\ \text{nM}$ 、 $\leq 10\ \text{nM}$ 、 $\leq 1\ \text{nM}$ 、 $\leq 0.1\ \text{nM}$ 、 $\leq 10\ \text{pM}$ 、 $\leq 1\ \text{pM}$ 或 $\leq 0.1\ \text{pM}$ 。

術語「抗原結合片段」係指完整抗體的一部分且指完整抗體的互補決定可變區。全長抗體之片段可為抗體之抗原結合片段。抗體片段之實例包括(但不限於)Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段、線性抗體、單鏈抗體(例如ScFv)及由抗體片段形成之多專一性抗體。

「單株抗體」(mAb)係指涉及單一抗原決定子或抗原決定基之高度專一性識別及結合的均質抗體。此與多株抗體形成對比，多株抗體典型地包括針對不同抗原決定子之不同抗體。術語「單株抗體」涵蓋完整及全長單株抗體以及抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)單鏈(scFv)突變體、包含抗體部分之融合蛋白及包含抗原識別位點之任何其他經修飾免疫球蛋白分子。此外，「單株抗體」係指以任何數目的方式產生的此類抗體，所述方式包括(但不限於)融合瘤、噬菌體選擇、重組表現及轉殖基因動物。

術語「人類化抗體」係指衍生自非人類(例如鼠類)免疫球蛋白之抗體，其已經工程改造以含有最少非人類(例如鼠類)序列。通常，人類化抗體為來自互補決定區(CDR)之殘基經具有所需專一性、親和力及能力的來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或倉鼠)之CDR之殘基置換的人類免疫

球蛋白(Jones等人, 1986, *Nature*, 321:522-525 ; Riechmann等人, 1988, *Nature*, 332:323-327 ; Verhoeyen等人, 1988, *Science*, 239:1534-1536) 。
在一些情況下, 人類免疫球蛋白之Fv構架區(FW)殘基經具有所需專一性、親和力及能力之非人類物種之抗體中的相應殘基置換。

人類化抗體可藉由Fv構架區及/或所置換之非人類殘基內之其他殘基之取代而進一步修飾, 以優化及最佳化抗體專一性、親和力及/或能力。一般而言, 人類化抗體將包含至少一個及典型為兩個或三個含有對應於非人類免疫球蛋白之所有或實質上所有CDR區的實質上所有可變域, 而所有或實質上所有FR區域為人類免疫球蛋白共同序列之彼等區域。人類化抗體亦可包含免疫球蛋白恆定區或域(Fc)(典型地為人類免疫球蛋白恆定區或域)之至少一部分。用於產生人類化抗體之方法的實例描述於美國專利第5,225,539號或第5,639,641號中。

「醫藥學上可接受之載劑」係指醫藥調配物中之除活性成分以外之對個體無毒的成分。醫藥學上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝液、賦形劑、穩定劑或防腐劑。如本文所用, 「醫藥學上可接受之載劑」包括生理學上相容之任何及全部溶劑、分散介質、包覆劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收/再吸收延遲劑及其類似物。

抗體之「可變區」係指單獨或呈組合形式之抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區。重鏈及輕鏈的可變區各由四個框架區(FW)組成, 此等四個框架區經三個互補決定區(亦稱為高變區)連接。各鏈中的CDR藉由FW區緊密地固持在一起, 且與來自其他鏈之CDR一起促進抗體之抗原結合位點的形成。確定CDR的技術至少有兩種:(1)基於交叉物種序列變化性之方法(亦即Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological*

Interest, (第5版, 1991, 美國國家衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda Md.)) ; 及(2)基於抗原-抗體複合物之結晶學研究之方法(Al-lazikani等人, (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948))。此外, 該兩種方法之組合有時用於此項技術中來確定CDR。

一般在提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基1-107及重鏈之殘基1-113)時使用「Kabat編號系統」(例如Kabat等人, Sequences of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

如Kabat之胺基酸位置編號係指Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 國家健康研究院公共健康服務部, Bethesda, Md. (1991)中之用於編譯抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用此編號系統, 實際線性胺基酸序列可含有對應於可變域之FW或CDR之縮短或插入的更少或額外胺基酸。舉例而言, 重鏈可變結構域可在H2之殘基52後包括單一胺基酸插入序列(根據Kabat, 殘基52a)且在重鏈FW殘基82之後包括插入之殘基(例如根據Kabat, 殘基82a、82b及82c等)。

所指定抗體之殘基之Kabat編號可藉由比將抗體序列與「標準」Kabat編號序列在同源區域來確定。而Chothia提及結構環之位置(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。使用Kabat編號規約進行編號時, Chothia CDR-H1環末端在H32與H34之間變化, 此視環的長度而定(此原因為Kabat編號方案將插入置於H35A及H35B; 若既不存在35A、亦不存在35B, 則環末端位於32; 若僅存在35A, 則環末端位於33; 若35A與35B均存在, 則環末端位於34)。AbM高變區代表Kabat CDR與Chothia

結構環之間的折衷，且用於Oxford Molecular的AbM抗體模型化軟體中。
下表1列出各系統中之包含抗體之可變區之胺基酸的位置。

表1

各系統中之胺基酸位置

區域	Kabat	AbM	Chothia
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1 ¹	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
HCDR1 ²	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

¹Kabat編號

²Chothia編號

免疫遺傳學(IMG T)亦為包括CDR之免疫球蛋白可變區提供一種編號系統。參見例如 Lefranc, M.P 等人, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003)。IMG T編號系統係基於超過5,000個序列之比對、結構資料及高變環之表徵且允許所有物種之可變及CDR區容易比較。根據IMG T編號方案，VH-CDR1處於位置26至35，VH-CDR2處於位置51至57，VH-CDR3處於位置93至102，VL-CDR1處於位置27至32，VL-CDR2處於位置50至52，且VL-CDR3處於位置89至97。

如整個說明書中所用，該等VH CDR序列對應於經典Kabat編號位置，亦即，Kabat VH-CDR1在位置31-35處，VH-CDR2為位置50-65，且VH-CDR3在位置95-102處。VL-CDR1、VL-CDR2及VL-CDR3亦對應於經典Kabat編號位置，亦即分別為位置24-34、50-56及89-97。

術語「人類抗體」意指在人體中產生之抗體或具有對應於使用此項技術中已知之任何技術製得的在人體中產生之抗體之胺基酸序列的抗體。人類抗體之此定義包括完整或全長抗體、其片段及/或包含至少一種人類重鏈及/或輕鏈多肽的抗體，例如包含鼠類輕鏈及人類重鏈多肽之抗體。

術語「嵌合抗體」係指其中免疫球蛋白分子之胺基酸序列來源於兩種或超過兩種物種的抗體。通常，輕鏈與重鏈之可變區對應於來源於具有所需專一性、親和力及能力之一種哺乳動物物種(例如小鼠、大鼠、兔等)之抗體的可變區，而恆定區與來源於另一物種(通常為人類)之抗體中之序列同源以避免在該物種中引發免疫反應。

術語「YTE」或「YTE突變體」係指IgG1 Fc中之突變，此突變引起與人類FcRn之結合增強且使具有此突變之抗體的血清半衰期延長。YTE突變體包含引入IgG1重鏈中之三種突變之組合：M252Y/S254T/T256E(EU編號，Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 美國國家健康研究院公共健康服務部, Washington, D.C.)。參見美國專利第7,658,921號，其以引用之方式併入本文中。已顯示YTE突變體相比於相同抗體之野生型型式提高抗體之血清半衰期大致四倍(Dall'Acqua等人, *J. Biol. Chem.* 281:23514-24 (2006)；Robbie等人, (2013) *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6147-6153)。亦參見美國專利第7,083,784號，該專利以全文引用的方式併入本文中。

「結合親和力」一般係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用之總和的強度。除非另外指明，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用的固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(K_D)表示。可藉由此項技術中已知之常用方法(包括本文所描述之彼等方法)來量測親和力。低親和力抗體一般緩慢結合抗原且傾向於容易分解，而高親和力抗體一般較快結合抗原且傾向於較長時間保持結合狀態。此項技術中已知多種量測結合親和力的方法，其中任一者可用於本發

明之目的。

除非另行說明，否則結合分子之效能通常表示為以ng/ml計之 IC_{50} 值。 IC_{50} 為抗體分子之中值抑制濃度。在功能分析中， IC_{50} 為使生物反應降低其最大值之50%的濃度。在配位體結合研究中， IC_{50} 為使受體結合減少最大專一性結合水準之50%的濃度。 IC_{50} 可藉由此項技術中已知之任何數目個方式計算。

相較於參考抗體，本發明之抗體或多肽的效能提高倍數可為至少約2倍、至少約4倍、至少約6倍、至少約8倍、至少約10倍、至少約20倍、至少約30倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍，或至少約180倍或更多倍。

除非另行說明，否則抗體之結合效能通常表示為以nM或pM計之 EC_{50} 值。 EC_{50} 為在指定暴露時間之後誘發基線與最大值之間的中值響應的藥物的濃度。 EC_{50} 可藉由此項技術中已知之任何數目的方法計算。

「治療抗體」為可向個體投與以治療或預防疾病或病況之抗體。

「個體」為需要診斷、預後或治療的任何個體，特定言之哺乳動物。哺乳動物個體包括人類、家養動物、農畜、競賽動物及動物園動物，例如人類、非人類靈長類動物、狗、貓、天竺鼠、兔、大鼠、小鼠、馬、牛等。

「治療」係指治癒診斷之病理學病況或病症、減緩其進展、減輕其症狀及/或中斷其進展之治療措施。因此，需要治療者包括已患病症者。在某些實施例中，若患者顯示例如與疾病或病症相關之症狀的完全、部分或短暫緩解或消除，則根據本文所提供之方法成功地「治療」個體之疾病。

或病症，例如癌症。

「預防」係指預防及/或減緩所靶向病理學病況或病症發展的預防性或防治性措施。因此，需要預防者包括傾向於患病或易患病者。在某些實施例中，若患者相比於尚未經受本發明之方法的患者短暫或永久地產生(例如)較少或較不嚴重的與疾病或病症相關之症狀，或與疾病或病症相關之症狀的較晚起始，則根據本文所提供之方法成功地預防疾病或病症。

術語「醫藥組合物」係指一種製劑，其呈允許活性成分之生物活性有效之形式，且其不含對組合物所投與之個體具有不可接受之毒性的其他組分。此類組合物可無菌，且可包含醫藥學上可接受之載劑，諸如生理鹽水。適合的醫藥組合物可包含以下中之一或多者：緩衝液(例如乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液)、表面活性劑(例如聚山梨醇酯)、穩定劑(例如人類白蛋白)、防腐劑(例如苯甲醇)，及增強生物可用性之吸收促進劑，及/或其他常規溶解或分散劑。

如本文所揭示之抗體的「有效量」為足以進行特定陳述目的之量。

「有效量」可憑經驗且以與陳述目的相關的常規方式確定。

「標記」係指直接或間接共軛至結合分子或抗體以產生「經標記」結合分子或抗體的可偵測化合物或組合物。標記本身可偵測(例如放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶標記之情況下，可催化受質化合物或組合物發生可偵測的化學變化。

術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用，係指任何長度之胺基酸之聚合物。聚合物可為線性或分枝聚合物，其可包含經修飾之胺基酸，且非胺基酸可間雜於其中。該等術語亦涵蓋已經天然修飾或藉由干預修飾之胺基酸聚合物；例如雙硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯

化、磷酸化，或任何其他操縱或修飾，諸如與標記組分結合。該定義亦包括例如含有胺基酸之一或多種類似物(包括例如非天然胺基酸等)之多肽，以及此項技術中已知之其他修飾。在某些實施例中，多肽可以單一鏈或連接鏈形式存在。

如本文所用之「聚核苷酸」可包括一或多種「核酸」、「核酸分子」或「核酸序列」，係指任何長度之核苷酸之聚合物，且包括DNA及RNA。聚核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基，及/或其類似物，或可藉由DNA或RNA聚合酶而併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包括經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。前述描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸，包括RNA及DNA。

術語「載體」意指構築體，其能夠傳遞，且在一些實施例中表現宿主細胞中之一或多個所關注的基因或序列。載體之實例包括(但不限於)病毒載體、裸DNA或RNA表現載體、質體、黏質體或噬菌體載體、與陽離子縮合劑結合之DNA或RNA表現載體、囊封於脂質體中之DNA或RNA表現載體，及某些真核細胞，諸如生產細胞。

「分離」之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為呈自然界中未發現之形式的多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物。分離之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物包括已在一定程度上純化，使得其不再呈自然界中所發現之形式的彼等物。在一些實施例中，分離之抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為實質上純的。

術語「一致」或「一致性」百分比在兩種或超過兩種核酸或多肽之上下文中係指，兩種或超過兩種序列或子序列當根據最大一致性比較及比對(必要時，引入空隙)時為相同的或具有指定百分比之相同核苷酸或胺基

酸殘基，不考慮任何保守性胺基酸取代作為序列一致性的一部分。一致性百分比可使用序列比較軟體或算法或藉由目視檢查來量測。此項技術中已知可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之比對的各種算法及軟體。

序列比對算法之一種此類非限制性實例為Karlin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2264-2268 (1990)中所述之算法，其如由Karlin等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877 (1993)改進，且併入至NBLAST及XBLAST程序(Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1991))中。在某些實施例中，可如Altschul等人, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)中所述使用空隙式BLAST。BLAST-2、WU-BLAST-2 (Altschul等人, *Methods in Enzymol.* 266:460-480 (1996))、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, CA) 或Megalign (DNASTAR)為可用以比對序列之其他公開可用的軟體程式。在某些實施例中，使用GCG套裝軟體中之GAP程式(例如使用NWSgapdna.CMP矩陣以及空隙權數40、50、60、70或90及長度權數1、2、3、4、5或6)測定兩個核苷酸序列之間的一致性百分比。在某些替代實施例中，併入尼德曼(Needleman)及翁施(Wunsch)算法(*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970))之GCG套裝軟體中之GAP程式可用於測定兩個胺基酸序列之間的百分比一致性(例如使用BLOSUM 62矩陣或PAM250矩陣，以及空隙權數16、14、12、10、8、6或4及長度權數1、2、3、4、5)。或者，在某些實施例中，使用Myers及Miller (*CABIOS* 4:11-17 (1989))之演算法測定核苷酸或胺基酸序列之間的百分比一致性。舉例而言，可使用ALIGN程式(2.0版)及使用具有殘基表、空隙長度罰分12及空隙罰分4之PAM120測定一致性百分比，熟習此項技術者可藉由特定比對軟體確定適用於最大比對的參數。在

某些實施例中，使用比對軟體的預設參數。

在某些實施例中，第一胺基酸序列相對於第二胺基酸序列之一致性百分比「X」係依 $100 \times (Y/Z)$ 計算，其中Y為第一與第二序列比對時依一致匹配所評估之胺基酸殘基數目(如藉由目視檢查或特定序列比對程式所比對)且Z為第二序列中的殘基總數。若第一序列之長度比第二序列長，則第一序列相對於第二序列之一致性百分比將高於第二序列相對於第一序列之一致性百分比。

「保守性胺基酸取代」為一個胺基酸殘基經具有類似側鏈之另一個胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基家族，包括鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 β 分支側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。舉例而言，用苯丙胺酸取代酪胺酸為保守性取代。在某些實施例中，本發明之結合分子、抗體及抗原結合片段之胺基酸序列中之保守取代不消除含有胺基酸序列之結合分子、抗體或抗原結合片段與結合分子、抗體或抗原結合片段所結合之抗原，亦即ASCT2的結合。鑑別不消除抗原結合之核苷酸及胺基酸保守取代的方法在此項技術中已熟知。參見例如Brummell等人, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi等人, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); Burks等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:.412-417 (1997)。

II. 抗ASCT2抗體及抗原結合片段

本發明提供抗ASCT2抗體及其抗原結合片段，其專一性結合ASCT2。人類及食蟹獼猴ASCT2之全長胺基酸(aa)及核苷酸(nt)序列在此項技術中已知，且可至少見於國家生物技術資訊中心(NCBI)資料庫。NCBI資料庫為在線可用的。在一些實施例中，本發明提供之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段為人類化抗體或人類抗體。在一些實施例中，抗ASCT2抗體共軛至細胞毒素，因此將其稱為抗ASTC2 ADC。

在一些實施例中，本發明之抗ASCT2抗體結合至細胞表面上之ASCT2且內化至細胞中。在一些實施例中，抗ASCT2抗體以約100 ng/ml至約1 μ g/ml、約100 ng/ml至約500 ng/ml、約100 ng/ml至約250 ng/ml、約250 ng/ml至約500 ng/ml、約350 ng/ml至約450 ng/ml、約500 ng/ml至約1 μ g/ml、約500 ng/ml至約750 ng/ml、約750 ng/ml至約850 ng/ml或約900 ng/ml至約1 μ g/ml的10分鐘處之IC₅₀內化至表現ASCT2之細胞中。在一些實施例中，抗ASCT2抗體以約100 ng/ml至約1 μ g/ml、約100 ng/ml至約500 ng/ml、約100 ng/ml至約250 ng/ml、約250 ng/ml至約500 ng/ml、約250 ng/ml至約350 ng/ml、約350 ng/ml至約450 ng/ml、約500 ng/ml至約1 μ g/ml、約500 ng/ml至約750 ng/ml、約750 ng/ml至約850 ng/ml或約900 ng/ml至約1 μ g/ml的30分鐘處之IC₅₀內化至表現ASCT2之細胞中。在一些實施例中，抗ASCT2抗體以約50 ng/ml至約500 ng/ml、約50 ng/ml至約100 ng/ml、約100 ng/ml至約200 ng/ml、約200 ng/ml至約300 ng/ml、約300 ng/ml至約400 ng/ml或約400 ng/ml至約500 ng/ml的120分鐘處之IC₅₀內化至表現ASCT2之細胞中。在一些實施例中，抗ASCT2抗體以約5 ng/ml至約250 ng/ml、約10 ng/ml至約25 ng/ml、約25 ng/ml至約50 ng/ml、約50 ng/ml至約100 ng/ml、約100 ng/ml至約150

ng/ml、約150 ng/ml至約200 ng/ml或約200 ng/ml至約250 ng/ml的8小時處之IC₅₀內化至表現ASCT2之細胞中。在一些情況下，共軛至細胞毒素之抗ASCT2抗體為抗ASCT2 ADC。

在某些態樣中，本發明提供包含三個重鏈互補決定區(HCDR)及三個輕鏈互補決定區(LCDR)之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段。在某些態樣中，HCDR1具有選自SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 16之胺基酸序列；HCDR2具有選自SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 17之胺基酸序列；HCDR3具有選自SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO: 18之胺基酸序列；LCDR1具有選自SEQ ID NO: 13及SEQ ID NO: 19之胺基酸序列；LCDR2具有選自SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20及SEQ ID NO: 24之胺基酸序列；LCDR3具有選自SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 25之胺基酸序列。如本文所提供，VH包含SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 5之胺基酸序列；且VL包含SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。在一些態樣中，抗ASCT2抗體包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列之VH及SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之VL。視情況，抗ASCT2抗體包含SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之VH，及SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之VL。在一些實施例中，抗ASCT2抗體包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列之VH及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列之VL。

另外，本發明提供專一性結合於包含VH及VL之ASCT2的經分離之抗體或其抗原結合片段，其中VH及VL分別含有分別與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2；SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4；SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6；或SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8至少70%、

75%、80%、85%、90%、95%或100%一致之胺基酸序列。

在一個態樣中，本發明提供包含VH胺基酸序列SEQ ID NO: 5及VL胺基酸序列SEQ ID NO: 6之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段。在一個態樣中，本發明提供包含VH胺基酸序列SEQ ID NO: 7及VL胺基酸序列SEQ ID NO: 8之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段。

如本文所述之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可例如為鼠類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多株抗體、重組抗體、多專一性抗體或其任何組合。抗ASCT2抗體抗原結合片段可為Fv片段、Fab片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、dsFv片段、scFv片段或sc(Fv)₂片段。

在一個態樣中，本發明提供可跨越物種結合至ASCT2分子之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段，例如抗體或片段可結合至小鼠ASCT2、大鼠ASCT2、兔ASCT2、人類ASCT2及/或食蟹獼猴ASCT2。舉例而言，抗體或片段可結合至人類ASCT2及食蟹獼猴ASCT2。在另一實例中，抗體或片段亦可結合至小鼠ASCT2。

在本文提供之某些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可專一性結合於ASCT2，例如人類ASCT2及食蟹獼猴ASCT2，但不專一性結合於人類ASCT1。

除VH及VL以外，如本文所述之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段亦可包括重鏈恆定區或其片段。在某些態樣中，重鏈恆定區為人類重鏈恆定區，例如人類IgG恆定區，例如人類IgG1恆定區。在一些實施例中，尤其在抗體或其抗原結合片段共軛至藥劑，諸如細胞毒性劑之情況下，半胱胺酸殘基插入於IgG1之CH₂區中之胺基酸S239與V240之間。此半胱胺酸稱為「239插入物」或「239i」。

在某些態樣中，重鏈恆定區或其片段，例如人類IgG恆定區或其片段可包括一或多個相對於野生型IgG恆定域之胺基酸取代，其中經修飾IgG之半衰期相比於具有野生型IgG恆定域之IgG的半衰期增加。舉例而言，IgG恆定域可含有位置251至257、285至290、308至314、385至389及428至436之胺基酸殘基的一或多個胺基酸取代，其中胺基酸位置編號係根據如Kabat中所列之EU索引進行。在某些態樣中，IgG恆定域可含有以下一或多者：Kabat位置252之胺基酸經酪胺酸(Y)、苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)或蘇胺酸(T)取代；Kabat位置254之胺基酸經蘇胺酸(T)取代；Kabat位置256之胺基酸經絲胺酸(S)、精胺酸(R)、麩醯胺酸(Q)、麩胺酸(E)、天冬胺酸(D)或蘇胺酸(T)取代；Kabat位置257之胺基酸經白胺酸(L)取代；Kabat位置309之胺基酸經脯胺酸(P)取代；Kabat位置311之胺基酸經絲胺酸(S)取代；Kabat位置428之胺基酸經蘇胺酸(T)、白胺酸(L)、苯丙胺酸(F)或絲胺酸(S)取代；Kabat位置433之胺基酸經精胺酸(R)、絲胺酸(S)、異白胺酸(I)、脯胺酸(P)或麩醯胺酸(Q)取代；或Kabat位置434之胺基酸經色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)、絲胺酸(S)、組胺酸(H)、苯丙胺酸(F)或酪胺酸取代。更具體而言，相對於野生型人類IgG恆定域，IgG恆定域可含有胺基酸取代，包括Kabat位置252之胺基酸經酪胺酸(Y)取代、Kabat位置254之胺基酸經蘇胺酸(T)取代，及Kabat位置256之胺基酸經麩胺酸(E)取代。本發明提供抗ASCT2抗體或其抗原結合片段，其中重鏈為人類IgG1 YTE突變體。

除VH及VL之外，本文所提供之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段(例如如上文所述)亦可視情況包括重鏈恆定區或其片段、輕鏈恆定區或其片段。在某些態樣中，輕鏈恆定區為 κ 、 λ 輕鏈恆定區，例如人類 κ 恆定區或

人類 λ 恆定區。

如上文所提及，VH及/或VL胺基酸序列可例如與本文所闡述之序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致，及/或包含1、2、3、4、5或更多個相對於本文所闡述之序列之取代，例如保守取代。具有與VH區或VL區具有一定百分比相似性，或具有一或多個取代，例如保守取代之VH及VL區的ASCT2抗體可藉由編碼本文所述之VH及/或VL區之核酸分子的突變誘發(例如定點或PCR介導之突變誘發)，接著為經編碼之改變的抗體結合至ASCT2之測試及任選地使用本文所述之功能分析之保留功能的測試而獲得。

抗體針對抗原的親和力或親合力可以實驗方式，使用此項技術中熟知的任何適合方法測定，例如流式細胞術、酶聯免疫吸附分析(ELISA)，或放射免疫分析(RIA)，或動力學(例如KINEXA®或BIACORE™分析)。可容易使用直接結合分析以及競爭性結合分析形式。(參見例如Berzofsky等人，Antibody-Antigen Interactions, Fundamental Immunology, Paul, W. E.編., Raven Press: New York, N.Y. (1984)；Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)；及本文所述之方法)。若在不同條件(例如鹽濃度、pH、溫度)下量測，則特定抗體-抗原相互作用之所量測之親和力可變化。因此，親和力及其他抗原結合參數(例如 K_D 或 K_d 、 $K_{\text{合}}$ 、 $K_{\text{離}}$)之量測係在抗體及抗原之標準化溶液，及標準化緩衝液(如此項技術中已知)中進行。

在一些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可以如藉由流動式細胞測量術所量測的低於約500 nM、低於約350 nM、低於約250 nM、低於約150 nM、低於約100 nM、低於約75 nM、低於約60 nM、低於約

50 nM、低於約40 nM、低於約30 nM、低於約20 nM、低於約15 nM、低於約10 nM、低於約5 nM、低於約1 nM、低於約500 pM、低於約350 pM、低於約250 pM、低於約150 pM、低於約100 pM、低於約75 pM、低於約60 pM、低於約50 pM、低於約40 pM、低於約30 pM、低於約20 pM、低於約15 pM、低於約10 pM或低於約5 pM之IC₅₀結合至表現ASCT2之細胞。

III.與抗ASCT2抗體及其抗原結合片段結合至相同抗原決定基之結合分子

在某些實施例中，本發明提供與本文所述之抗ASCT2抗體結合至相同抗原決定基之抗ASCT2抗體。術語「抗原決定基」係指能夠結合至本發明抗體的靶蛋白決定子。抗原決定基通常由化學活性表面分子族群(諸如胺基酸或糖側鏈)組成，且通常具有特定三維結構特徵，以及荷質比特徵。區分構形及非構形抗原決定基，以便於在變性溶劑存在下，與前者之結合喪失而與後者之結合不喪失。此類抗體可基於其在標準ASCT2結合或活性分析中與抗體(諸如本文所述之抗體)交叉競爭(例如以統計顯著方式競爭性地抑制結合)的能力來鑑別。

因此，在一個實施例中，本發明提供抗ASCT2抗體及其抗原結合片段，例如單株抗體，其與本發明之另一抗ASCT2抗體或其抗原結合片段，諸如本文所揭示之鼠類單株抗體17c10或1e8或人類化變異體，競爭結合至ASCT2。測試抗體抑制例如17c10或1e8之結合能力證明測試抗體可與該抗體競爭結合至ASCT2；根據非限制性理論，此抗體可與其競爭之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段結合至ASCT2上之相同或相關(例如結構上相似或空間上鄰近)抗原決定基。在一個實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段與例如鼠類單株抗體17c10或1e8結合至ASCT2上之相同

抗原決定基。

IV. 製備抗ASCT2抗體及抗原結合片段

單株抗ASCT2抗體可使用融合瘤方法，諸如Kohler及Milstein, *Nature* 256:495 (1975)描述之方法製備。使用融合瘤方法，如上述使小鼠、倉鼠或其他適當宿主動物免疫以引發淋巴細胞產生將專一性結合於免疫抗原之抗體。淋巴細胞亦可在活體外免疫。免疫接種之後，將淋巴細胞分離且使用例如聚乙二醇將其與適合骨髓瘤細胞株融合以形成融合瘤細胞，接著可經選擇而與未融合之淋巴細胞及骨髓瘤細胞分離。接著可將藉由免疫沈澱、免疫墨點法或活體外結合分析，例如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附分析(ELISA)所測定之產生專一性針對所選抗原之單株抗體的融合瘤在活體外培養中使用標準方法(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986)或在動物活體內作為腹水腫瘤增殖。單株抗體可隨後使用已知方法從培養基或腹水流體純化。

或者，抗ASCT2單株抗體亦可使用重組DNA方法，如美國專利第4,816,567號中所述產生。自成熟B細胞或融合瘤細胞中分離編碼單株抗體的聚核苷酸，諸如使用專一性擴增編碼該抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸引子之RT-PCR來分離，且使用習知程序測定其序列。接著將編碼該重鏈及輕鏈之經分離之聚核苷酸選殖至適合表現載體中，當其轉染至宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞(不另外產生免疫球蛋白))時，該宿主細胞產生單株抗體。另外，所需物種之重組抗ASCT2單株抗體或其抗原結合片段可自表現所需物種之CDRs的噬菌體呈現庫分離，如McCafferty等人, *Nature* 348:552-554 (1990)；Clackson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991)；及Marks等人, *J.*

Mol. Biol. 222:581-597 (1991)中所述。

編碼抗ASCT2抗體或其抗原結合片段的聚核苷酸可使用重組DNA技術、以多種不同方式進一步修飾，以產生替代抗體。在一些實施例中，可用輕鏈及重鏈之恆定域(例如小鼠單株抗體之輕鏈及重鏈恆定域)取代(1)例如人類抗體之彼等區域以產生嵌合抗體或(2)非免疫球蛋白多肽以產生融合抗體。在一些實施例中，截短或移除恆定區以產生單株抗體之所需抗體片段。可變區之定點或高密度突變誘發可用於使單株抗體之專一性、親和力等最佳化。

在某些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段為人類抗體或其抗原結合片段。人類抗體可使用此項技術中已知之各種技術直接製備。可產生經活體外免疫或自產生針對靶抗原之抗體之經免疫個體中分離的不朽化人類B淋巴細胞。參見例如Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁 (1985)；Boemer等人, *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991)；美國專利5,750,373。

另外，抗ASCT2人類抗體或其抗原結合片段可選自噬菌體庫，其中該噬菌體庫表現人類抗體，如例如Vaughan等人, *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996)；Sheets等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6157-6162 (1998)；Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991)；及Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)中所描述。產生及使用抗體噬菌體庫之技術亦描述於美國專利第 5,969,108 、 6,172,197 、 5,885,793 、 6,521,404 ； 6,544,731 ； 6,555,313 ； 6,582,915 ； 6,593,081 ； 6,300,064 ； 6,653,068 ； 6,706,484 ； 及7,264,963號；以及Rothe等人, *J. Molec. Biol.* 376:1182-1200 (2008)中，其中之每一者以全文引用的方式併入本文中。

親和力成熟策略及鏈改組策略在此項技術中已知且可用於產生高親和力人類抗體或其抗原結合片段。參見以全文引用的方式併入本文中之Marks等人, *BioTechnology* 10:779-783 (1992)。

在一些實施例中，抗ASCT2單株抗體可為人類化抗體。亦可使用對非人類或人類抗體進行工程改造、人類化或重塑的方法且在此項技術中已熟知。人類化、重塑或類似地工程改造之抗體可具有一或多個來自例如(但不限於)小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物或其他哺乳動物之非人類來源的胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基經通常稱為「輸入」殘基之殘基置換，該等殘基通常取自已知人類序列之「輸入」可變域、恆定域或其他域。如此項技術中所知，此類輸入序列可用於降低免疫原性或減少、增強或修改結合、親和力、結合速率、解離速率、親合力、專一性、半衰期或任何其他適合特徵。一般而言，CDR殘基直接且最實質上與影響ASCT2結合有關。從而維持非人類或人類CDR序列的一部分或全部，而可變區及恆定區之非人類序列可經人類或其他胺基酸置換。

抗體視情況亦可為經人類化、重塑、工程改造的抗體或人類抗體，其經工程改造而保持針對抗原ASCT2的高親和力及其他有利生物特性。為實現此目標，人類化(或人類)或工程改造之抗ASCT2抗體及重修表面抗體可視情況藉由使用親本、工程改造及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念人類化及工程改造產物的方法製備。三維免疫球蛋白模型通常可獲得，且為熟習此項技術者所熟悉。可利用說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。檢查此等顯示可分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中的可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原(諸如ASCT2)之能力的殘基。以此方式，可自共同序列及導入

序列選擇FW殘基且組合以便達成所要抗體特徵，諸如對靶抗原之親和力增加。

本發明之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段之人類化、重塑或工程改造可使用任何已知方法進行，諸如(但不限於)Jones等人, *Nature* 321:522 (1986)；Riechmann等人, *Nature* 332:323 (1988)；Verhoeyen等人, *Science* 239:1534 (1988)；Sims等人, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993)；Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)；Carter等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)；Presta等人, *J. Immunol.* 151:2623 (1993)；美國專利第5,639,641、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567、7,557,189、7,538,195及7,342,110號；國際申請案第PCT/US98/16280、PCT/US96/18978、PCT/US91/09630、PCT/US91/05939、PCT/US94/01234、PCT/GB89/01334、PCT/GB91/01134、PCT/GB92/01755；國際專利申請公開案第WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430；及歐洲專利公開案第EP 229246號；其各自以全文引用的方式併入本文中，包括其中所引用之參考文獻。

抗ASCT2人類化抗體及其抗原結合片段亦可於含有人類免疫球蛋白基因座的轉殖基因小鼠中產生，該等轉殖基因小鼠能夠在免疫接種後、在缺乏內源性免疫球蛋白產生的情況下產生人類抗體之完全譜系。此方法描述於美國專利第5,545,807號、第5,545,806號、第5,569,825號、第5,625,126號、第5,633,425號及第5,661,016號中。

在某些實施例中，提供抗ASCT2抗體片段。已知用於產生抗體片段的多種技術。傳統地，此等片段經由完整抗體之蛋白水解消化衍生，如例如由Morimoto等人, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 24:107-117 (1993)及Brennan等人, *Science* 229:81 (1985)所描述。在某些實施例中，抗ASCT2抗體片段係以重組方式產生。Fab、Fv及scFv抗體片段可均在大腸桿菌或其他宿主細胞中表現且自其中分泌，因此允許產生大量此等片段。此類抗ASCT2抗體片段亦可自上文所論述之抗體噬菌體庫分離。抗ASCT2抗體片段亦可為線性抗體，如美國專利第5,641,870號中所述。抗體片段之其他產生技術對於熟習此項技術者而言將為顯而易見的。

根據本發明，可調適用於產生專一性針對ASCT2之單鏈抗體的技術。參見例如美國專利第4,946,778號)。另外，方法可調試用於構築Fab表現庫以允許快速及有效識別對於ASCT2具有所需專一性之單株Fab片段，或其衍生物、片段、類似物或同源物。參見例如Huse等人, *Science* 246:1275-1281 (1989)。抗體片段可藉由此項技術中已知之技術產生，包括(但不限於)：由抗體分子之胃蛋白酶消化產生之F(ab')₂片段；由減少F(ab')₂片段之二硫橋鍵產生之Fab片段；由用番木瓜蛋白酶及還原劑處理抗體分子產生之Fab片段；或Fv片段。

在某些態樣中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可經修飾以便延長其血清半衰期。此可例如藉由使抗體或抗體片段中之適當區域突變，將救助受體結合抗原決定基併入抗體或抗體片段中，或藉由將抗原決定基併入隨後在末端或中間(例如藉由DNA或肽合成)與抗體或抗體片段稠合之肽標籤中，或藉由YTE突變來實現。增加抗體或其抗原結合片段之血清半衰期的其他方法，例如共軛至異源分子(諸如PEG)為此項技術中已知的。

如本文所提供之經修飾之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可包含使得抗體或多肽與ASCT2結合的任何類型之可變區。就此而言，可變區可包含或來源於任何類型的哺乳動物，其經誘導可建立體液性反應且產生針對所需抗原的免疫球蛋白。因而，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段之可變區可來源於例如人類、鼠類、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴、獼猴等)或狼。在一些實施例中，經修飾之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段的可變區與恆定區為人類。在其他實施例中，相容性抗體(通常來源於非人類來源)之可變區可經工程改造或經特定定製以改良結合特性或降低分子的免疫原性。就此而言，適用於本發明的可變區可經人類化或經由包含所輸入胺基酸序列而以其他方式改變。

在某些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段之重鏈與輕鏈中的可變域係藉由一或多個CDR之至少部分置換及/或藉由部分構架區置換及序列變化來改變。雖然CDR可來源於類別或甚至子類與構架區所來源之抗體相同的抗體，但可設想CDR將來源於不同類別的抗體且在某些實施例中來源於不同物種的抗體。無需用來自供者可變區的全部CDR置換所有CDR以將一個可變域的抗原結合能力轉移至另一者。實情為，僅需轉移為維持抗原結合位點活性所必需的彼等殘基。鑒於美國專利第5,585,089、5,693,761及5,693,762中所闡述之解釋，進行常規實驗以獲得具有減少之免疫原性的功能性抗體將充分地在熟習此項技術者之能力內。

不論可變區的改變，熟習此項技術者將瞭解，本發明之經修飾之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段將包含抗體(例如全長抗體或其抗原結合片段)，其中一或多個恆定區域的至少一部分已缺失或以其他方式改變以便提供所需的生物化學特徵，諸如相較於免疫原性大致相同之包含原生或未

改變恆定區的抗體，腫瘤局域化增強或血清半衰期縮短。在一些實施例中，經修飾之抗體之恆定區將包含人類恆定區。對與本發明相容之恆定區的修飾包含一或多個域中之一或多個胺基酸的添加、缺失或取代。亦即，本文所揭示之經修飾之抗體可包含對三個重鏈恆定域(CH1、CH2或CH3)中之一或多者及/或輕鏈恆定域(CL)的改變或修飾。在一些實施例中，涵蓋其中一或多個域部分缺失或完全缺失的經修飾之恆定區。在一些實施例中，經修飾之抗體包含其中整個CH2域已移除的域缺失構築體或變異體(Δ CH2構築體)。在一些實施例中，省去的恆定區域可經短胺基酸間隔子(例如10個殘基)置換，從而提供通常由缺失恆定區所賦予的一些分子柔性。

此項技術中已知恆定區除其組態之外，亦介導若干效應功能。舉例而言，抗體經由Fc區結合至細胞，其中抗體Fc區上的Fc受體位點結合至細胞上的Fc受體(FcR)。對不同類別抗體具專一性的Fc受體存在多種，包括IgG (γ 受體)、IgE (η 受體)、IgA (α 受體)及IgM (μ 受體)。抗體結合至細胞表面上的Fc受體觸發多種重要且不同的生物反應，包括抗體所塗顆粒之吞噬及摧毀、免疫複合體之清除、殺手細胞對抗體所塗靶細胞之溶解(稱為抗體依賴性細胞介導之細胞毒性，或ADCC)、發炎性介體之釋放、免疫球蛋白產生之胎盤轉移及控制。

在某些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段提供改變的效應功能，效應功能改變又影響所投與之抗體或其抗原結合片段的生物學概況。舉例而言，恆定區域之缺失或不活化(經由點突變或其他方式)可減少循環中之經修飾之抗體與Fc受體的結合。在其他情況下，其可為，符合本發明的恆定區修飾緩和補體結合且從而縮短血清半衰期且減少所結合細胞

毒素的非專一性結合。然而恆定區之其他修飾可用於消除二硫鍵聯或寡醣部分，從而因抗原專一性或抗體柔性增強而局域化增強。類似地，根據本發明修飾恆定區容易使用熟習此項技術者之範圍內熟知的生物化學或分子工程技術達成。

在某些實施例中，作為抗體或其抗原結合片段的ASCT2結合分子不具有或多種效應功能。舉例而言，在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段不具有抗體依賴性細胞之細胞毒性(ADCC)活性且/或不具有補體依賴性細胞毒性(CDC)活性。在某些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段不結合至Fc受體及/或補體因子。在某些實施例中，抗體或其抗原結合片段不具有效應功能。

在某些實施例中，抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可經工程改造以使CH3域與相應經修飾之抗體或其片段之鉸鏈區直接融合。在其他構築體中，可將肽間隔子插入鉸鏈區與經修飾之CH2及/或CH3域之間。舉例而言，可表現其中CH2域已缺失且剩餘CH3域(經修飾或未經修飾)經5至20個胺基酸間隔子與鉸鏈區連接的相容性構築體。可添加此類間隔子，例如以確保恆定域之調控元件保持自由且可接近或鉸鏈區保持柔性。在一些情況下，胺基酸間隔子可證實具有免疫原性且誘發針對構築體的非所需免疫反應。因此，在某些實施例中，添加至構築體中之任何間隔子相對而言可具有非免疫原性，或甚至完全省去，以便維持經修飾之抗體之所需生物化學品質。

除完整恆定區域之缺失之外，本文所提供之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可藉由恆定區中之少數或甚至單個胺基酸之部分缺失或取代而經修飾。舉例而言，CH2域之選定區域中單個胺基酸之突變可足以實質上減

少Fc結合且從而增強腫瘤局域化。類似地，控制效應功能(例如補體C1q結合)的一或多個一或多個恆定區域可完全或部分地缺失。恆定區之此類部分缺失可改良抗體或其抗原結合片段之所選特徵(例如血清半衰期)，同時使與個體恆定區域相關之其他所需功能完整。此外，所揭示抗ASCT2抗體及其抗原結合片段之恆定區可經由增強所得構築體之概況之一或多個胺基酸的突變或取代而經修飾。就此而言，有可能破壞由保守結合位點(例如Fc結合)提供之活性，同時基本上維持經修飾抗體或其抗原結合片段之組態及免疫原性概況。某些實施例可包含一或多個胺基酸添加至恆定區中以增強所需特徵，諸如減少或增強效應功能或提供更多細胞毒素或碳水化合物連接。在此等實施例中，可能需要插入或複製來源於所選恆定區域的特定序列。

本發明進一步包含本文中所述之與鼠類、嵌合、人類化或人類抗ASCT2抗體或其抗原結合片段實質上同源的變異體及等效物。此等物可含有例如保守性取代突變，亦即一或多個胺基酸經相似胺基酸取代。舉例而言，保守性取代係指一個胺基酸經相同通用類別內之另一胺基酸取代，例如一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸取代、一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸取代，或一個中性胺基酸經另一中性胺基酸取代。保守胺基酸取代之意圖在此項技術中眾所周知。

抗ASCT2抗體或其抗原結合片段可進一步加以修飾以含有通常不為蛋白質之一部分的其他化學部分。彼等衍生化部分可改良蛋白質之溶解性、生物學半衰期或吸收。該等部分亦可減少或消除蛋白質及其類似物之任何所需副作用。彼等部分之概述可見於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第22版, Lloyd V. Allen, Jr.編 (2012)中。

V. 抗ASCT2抗體共軛物

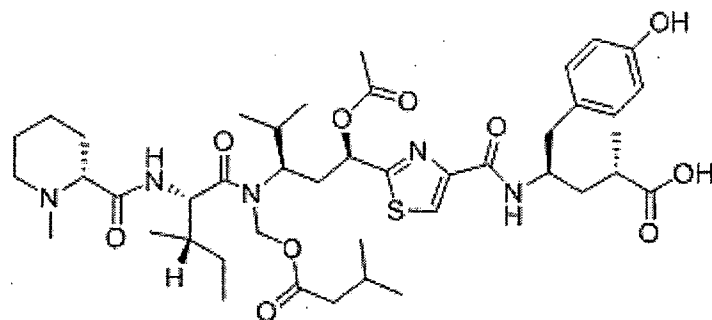
本發明另外提供共軛至異源藥劑的如上文所述之抗ASCT2抗體或其片段。出於本發明之目的，「共軛」意指經由共價或離子鍵連接。在某些態樣中，藥劑可為抗微在某些態樣中，藥劑可為抗微生物藥劑、治療劑、前藥、肽、蛋白質、酵素、脂質、生物反應調節劑、醫藥劑、淋巴激素、異源抗體或其片段、可偵測標記、PEG，或兩種或超過兩種任何該等藥劑之組合。在一些實施例中，此類ASCT2結合分子為ASCT2-ADC。

因此，本發明亦提供包含本文所揭示之抗ASCT2抗體，進一步包含至少一種細胞毒性劑之ADC。在一些態樣中，ADC進一步包含至少一種視情況存在之間隔基。在一些態樣中，至少一個間隔基為肽間隔基。在一些態樣中，至少一種間隔基為非肽間隔基。

細胞毒性劑或細胞毒素可為抑制或阻止細胞之功能及/或造成細胞破壞(細胞死亡)，及/或發揮抗贅生/抗增生作用的此項技術中已知之任何分子。已知多種類別之細胞毒性劑在ADC分子中具有潛在效用。此等包括(但不限於)瓢菌素、奧瑞他汀(auristatin)、道諾黴素、小紅莓、倍癌黴素、海兔毒素、烯二炔、萊克希托普森(lexitropsin)、紫杉烷、嘌呤黴素、類美登素、長春花生物鹼、微管溶素(tubulysin)及吡咯并苯并二氮呋(PBD)。此類細胞毒性劑之實例為AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奧瑞他汀E(auristatin E)、太平洋紫杉醇、多烯紫杉醇、CC-1065、SN-38、拓朴替康(topotecan)、N-嗎啉基-小紅莓、根瘤菌素、氰基嗎啉基-小紅莓、海兔毒素-10、棘黴素、考布他汀(combretastatin)、卡里奇黴素(chalicheamicin)、美登素、DM-1、長春鹼、甲胺嘌呤及紡錘菌素，及其衍生物及類似物。關於適用於ADC之細胞毒素的額外揭示內

容可見於例如以全文引用之方式併入本文中之國際專利申請公開案第WO 2015/155345及WO 2015/157592號中。

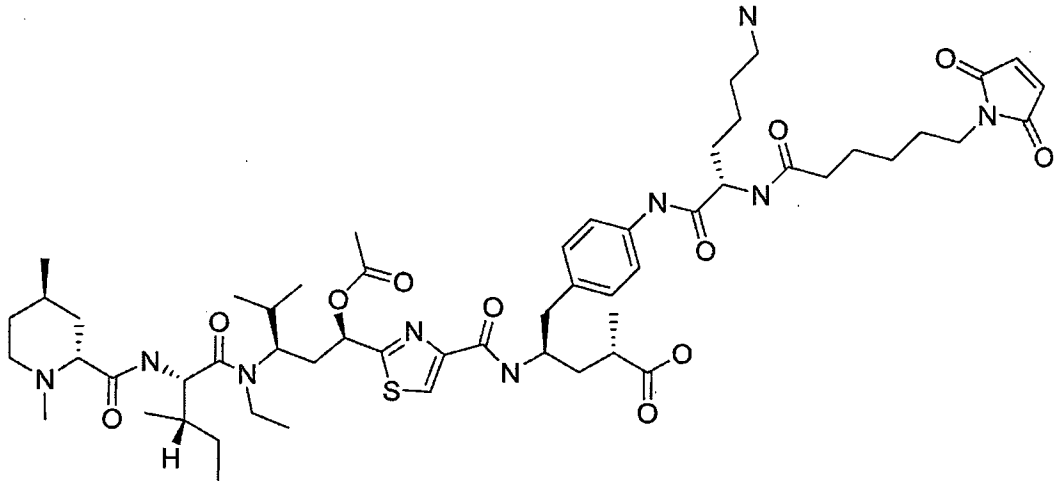
在一個實施例中，細胞毒性劑為微管溶素(tubulysin)或微管溶素衍生物。微管溶素A具有以下化學結構：



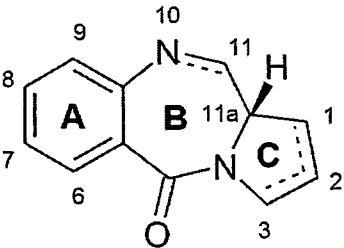
微管溶素為自黏液性細菌物種分離之一類天然產物之成員(Sasse等人, *J. Antibiot.* 53:879-885 (2000))。作為細胞骨架相互作用藥劑，微管溶素為抑制微管蛋白聚合且導致細胞週期停滯及細胞凋亡之有絲分裂毒物(Steinmetz等人, *Chem. Int. Ed.* 43:4888-4892 (2004)；Khalil等人, *Chem. Biochem.* 7:678-683 (2006)；Kaur等人, *Biochem. J.* 396: 235-242 (2006))。如本文所用，術語「微管溶素」總體上且個別地係指天然存在之微管溶素及微管溶素之類似物及衍生物。微管溶素之說明性實例揭示於例如以引用的方式併入本文中之WO2004005326A2、WO2012019123A1、WO2009134279A1、WO2009055562A1、WO2004005327A1、US7776841、US7754885、US20100240701、US7816377、US20110021568及US20110263650中。應瞭解此類衍生物包括例如微管溶素前藥或包括一或多個保護或保護基團、一或多個連接部分之微管溶素。

在某些態樣中，微管溶素為微管溶素1508，其在本文中亦稱為「AZ1508」且更詳細地描述於以引用的方式併入本文中之WO

2015157594中，具有以下結構：



在另一實施例中，細胞毒性劑可為吡咯并苯并二氮呋(PBD)或PBD衍生物。PBD易位至原子核，在其中交聯DNA，防止有絲分裂期間的複製，藉由誘發單鏈斷裂損壞DNA，且隨後導致細胞凋亡。一些PBD具有識別及結合至DNA之特定序列的能力；較佳序列為PuGPu。PBD具有以下通式結構：

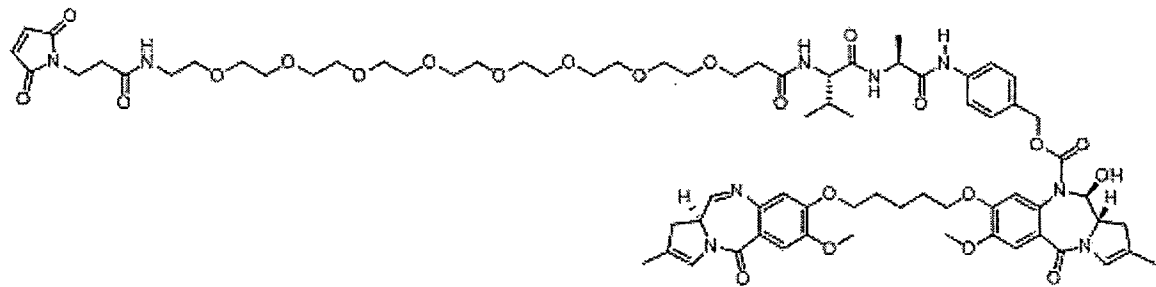


PBD在取代基之數目、類型與位置方面，在其芳族A環與吡咯并C環方面及在C環之飽和度方面不同。在B環中在N10-C11位置處存在亞胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲醚(NH-CH(OMe))，其為引起烷基化DNA之親電子中心。所有已知天然產物在對掌性C11a位置處均具有(S)組態，當由C環朝向A環檢視時該(S)組態為其提供右旋扭轉。此給予其適當的具有B形式DNA的小溝之等螺旋性的三維形狀，在結合位點處產生適貼配合(Kohn, *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, 第3-11頁(1975)；Hurley及Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-

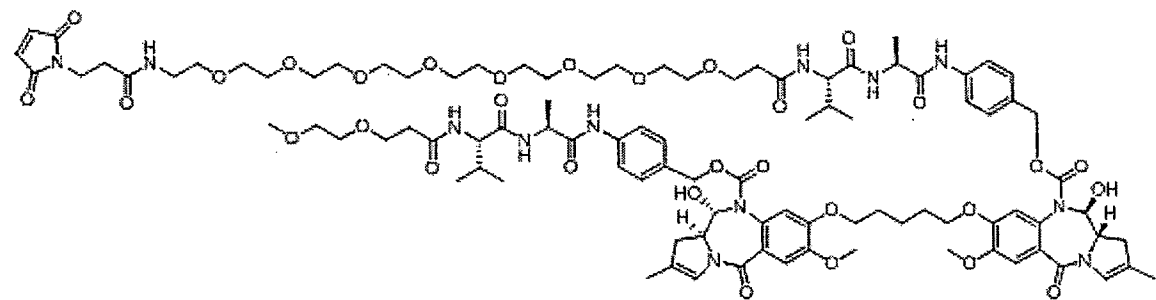
237(1986))。其在小溝中形成加合物之能力使其能夠干擾DNA加工，因此將其用作抗腫瘤劑。

第一PBD抗腫瘤抗生素安麴黴素發現於1965年(Leimgruber等人, *J. Am. Chem. Soc.* 87:5793-5795 (1965) ; Leimgruber等人, *J. Am. Chem. Soc.* 87:5791-5793 (1965))。此後，已報告多種天然存在之PBD，且已研發超過10種各種類似物的合成途徑(Thurston等人, *Chem. Rev.* 1994:433-465 (1994) ; Antonow, D.及Thurston, D.E., *Chem. Rev.* 111:2815-2864 (2011))。家族成員包括赤黴素(abbeymycin)(Hochlowski等人, *J. Antibiotics* 40:145-148 (1987))、芝加黴素(chicamycin)(Konishi等人, *J. Antibiotics* 37:200-206 (1984))、DC-81 (J日本專利 58-180 487 ; Thurston等人, *Chem. Brit.* 26:767-772 (1990) ; Bose等人, *Tetrahedron* 48:751-758 (1992))、混胺茴黴素(mazethramycin)(Kuminoto等人, *J. Antibiotics* 33:665-667 (1980))、新茴黴素(neothramycin)A及B (Takeuchi等人, *J. Antibiotics* 29:93-96 (1976))、坡咯黴素(porothramycin)(Tsunakawa等人, *J. Antibiotics* 41:1366-1373 (1988))、普咯黴素(prothracarcin)(Shimizu等人, *J. Antibiotics* 29:2492-2503 (1982) ; Langley及Thurston, *J. Org. Chem.* 52:91-97 (1987))、西巴黴素(sibanomicin)(DC-102)(Hara等人, *J. Antibiotics* 41:702-704 (1988) ; Itoh等人, *J. Antibiotics* 41:1281-1284 (1988))、西伯利亞黴素(sibiromycin)(Leber等人, *J. Am. Chem. Soc.* 110:2992-2993 (1988))及托馬黴素(tomamycin) (Arima等人, *J. Antibiotics* 25:437-444 (1972))。包含其之PBDs及ADCs亦描述於國際專利申請公開案第WO 2015/155345及WO 2015/157592號中，彼等以全文引用之方式併入本文中。

在某些態樣中，PBD為PBD 3249，其在本文中亦稱為「SG3249」且更詳細地描述於以引用的方式併入本文中之WO 2014/057074中，具有以下結構：



在某些態樣中，PBD為PBD 3315，其在本文中亦稱為「SG3315」且更詳細地描述於以引用的方式併入本文中之WO 2015/052322中，具有以下結構：



本文所揭示之抗ASCT2抗體及其抗原片段可使用定點或非定點共軛方法共軛至異源藥劑。在一些態樣中，ADC包含一個、兩個、三個、四個或大於四個治療部分。在一些態樣中，所有治療部分均相同。

抗體或其抗原結合片段之常規共軛策略依賴於將有效負載經由離胺酸或半胱胺酸無規共軛至抗體或片段。因此，在一些態樣中，抗體或其抗原結合片段無規共軛至藥劑，例如藉由抗體或片段之部分還原，接著與具有或不具有附接之連接子部分的所需藥劑反應。抗體或片段可使用DTT或類似還原劑還原。具有或不具有附接之連接子部分的藥劑可隨後在DMSO存在下以莫耳過量添加至還原之抗體或片段。在共軛之後，可添加過量游離半胱胺酸以淬滅未反應的藥劑。反應混合物可接著經純化且緩衝交換至

PBS中。

在其他態樣中，使用反應性胺基酸殘基在特定位置使治療部分定點結合於抗體產生具有均一化學計量之均質ADC製劑。定點共軛可經由半胱胺酸殘基或非天然胺基酸。在一個實施例中，細胞毒性劑或顯影劑經由至少一個半胱胺酸殘基共軛至抗體或其抗原結合片段。在一些態樣中，各治療部分在Fc區中之特定Kabat位置化學共軛至胺基酸之側鏈。在一些實施例中，細胞毒性劑或顯影劑經由位置239、248、254、273、279、282、284、286、287、289、297、298、312、324、326、330、335、337、339、350、355、356、359、360、361、375、383、384、389、398、400、413、415、418、422、440、441、442、443及446中之至少一者之半胱胺酸取代共軛至抗體或其抗原結合片段，其中編號對應於Kabat中之EU指數。在一些態樣中，特定Kabat位置為239、442或兩者。在一些態樣中，特定位置為Kabat位置442、Kabat位置239與240之間的胺基酸插入或兩者。在一些態樣中，藥劑經由硫醇-順丁烯二醯亞胺鍵共軛至抗體或其抗原結合片段。在一些態樣中，胺基酸側鏈為硫氫基側鏈。

在一個實施例中，ASCT2結合分子，例如ASCT2-ADC、抗ASCT2抗體或其抗原結合片段將細胞毒性有效負載傳遞至ASCT2表現細胞且抑制或抑止增殖至少10%、或至少20%、或至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%或約100%。可使用此項技術所公認之技術分析細胞增殖，該等技術量測細胞分裂速率，及/或進行細胞分裂之細胞群體內之細胞分率，及/或細胞因終末分化或細胞死亡(例如併入胸苷)而自細胞群體損失之速率。

VI. 編碼ASCT2結合分子的聚核苷酸及其表現

本發明提供包含核酸序列的聚核苷酸，該等核酸序列編碼專一性結合ASCT2的多肽或其抗原結合片段。舉例而言，本發明提供包含核酸序列的聚核苷酸，該核酸序列編碼抗ASCT2抗體或編碼此類抗體之抗原結合片段。本發明之聚核苷酸可呈RNA形式或呈DNA形式。DNA包括cDNA、基因組DNA及合成DNA；且可為雙股或單股，且若單股，則可為編碼股或非編碼(反義)股。

在某些實施例中，聚核苷酸可經分離。在某些實施例中，聚核苷酸可為實質上純的。在某些實施例中，聚核苷酸可為cDNA或衍生自cDNA。在某些實施例中，聚核苷酸可以重組方式產生。在某些實施例中，聚核苷酸可包含用於成熟多肽的編碼序列，該成熟多肽與聚核苷酸在同一閱讀框架內融合，從而有助於例如宿主細胞表現及分泌多肽(例如前導序列充當用於控制多肽自細胞輸送的分泌序列)。具有前導序列之多肽為前蛋白且可具有藉由宿主細胞裂解以形成多肽之成熟形式的前導序列。聚核苷酸亦可編碼ASCT2結合前蛋白，該前蛋白為具有額外5'胺基酸殘基的成熟蛋白質。

本發明另外提供包含編碼抗體VH之核酸的經分離聚核苷酸，其中VH包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 7。

此外，本發明提供包含編碼抗體VL之核酸的經分離聚核苷酸，其中VL包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6及SEQ ID NO: 8。

在某些實施例中，本發明提供包含編碼抗體VH之核酸的經分離聚核苷酸，其中VH包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 1至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列，及編碼抗體VL之核酸，其中VL包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 2至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，本發明提供包含編碼抗體VH之核酸的經分離聚核苷酸，其中VH包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 3至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列，及編碼抗體VL之核酸，其中VL包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 4至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，本發明提供包含編碼抗體VH之核酸的經分離聚核苷酸，其中VH包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 5至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列，及編碼抗體VL之核酸，其中VL包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 6至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列。在某些實施例中，本發明提供包含編碼抗體VH之核酸的經分離聚核苷酸，其中VH包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 7至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列，及編碼抗體VL之核酸，其中VL包含與參考胺基酸序列SEQ ID NO: 8至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致的胺基酸序列。

在某些態樣中，包含由如上文所述之聚核苷酸編碼之VH或VL的抗體或其抗原結合片段可專一性結合於ASCT2，例如人類或食蟹獼猴ASCT2。在某些情況下，此類抗體或其抗原結合片段可與包含17c10或1e8之VH及VL之抗體或其抗原結合片段專一性結合於相同抗原決定基。

在某些態樣中，本發明提供編碼專一性結合於ASCT2之結合分子，例如抗體或其抗原結合片段的聚核苷酸或聚核苷酸組合。

進一步提供包含如上文所述之聚核苷酸的載體。適合載體描述於本文中且已為一般技術者所知。

在某些態樣中，本發明提供組合物，例如醫藥組合物，其包含如上文所述之聚核苷酸或載體，視情況進一步包含一或多種載劑、稀釋劑、賦形劑或其他添加劑。

在如上文所述的聚核苷酸組合物中，包含編碼VH之核酸的聚核苷酸及包含編碼VL之核酸的聚核苷酸可存在於單個載體中，或可位於各別載體上。因此，本發明提供一或多個包含上述聚核苷酸組合物的載體。

本發明另外提供包含如上文提供之聚核苷酸、聚核苷酸組合物或載體之宿主細胞，其中宿主細胞可在一些情況下表現專一性結合於ASCT2之抗體或其抗原結合片段。此宿主細胞可在產生如本文所提供之抗體或其抗原結合片段的方法中使用，其中該方法包括(a)培養宿主細胞及(b)將宿主細胞所表現的抗體或其抗原結合片段分離。

在某些實施例中，聚核苷酸包含用於成熟ASCT2結合多肽之編碼序列，例如抗ASCT2抗體或其抗原結合片段，其在相同閱讀框架中融合至允許(例如)經編碼多肽之純化的標記物序列。舉例而言，標記物序列可在細菌主體的情況下為由pQE-9載體供應之六組胺酸標籤以提供融合至標記物之成熟多肽的純化，或標記物序列可在使用哺乳動物主體(例如COS-7細胞)時為衍生自流感血球凝集素蛋白之血球凝集素(HA)。

亦提供聚核苷酸變異體。聚核苷酸變異體可含有編碼區、非編碼區或兩者中之改變。在一些實施例中，聚核苷酸變異體含有產生靜默取代、

添加或缺失，但不改變所編碼多肽之特性或活性的變化。在一些實施例中，核苷酸變異體係藉由因基因密碼簡併所引起之靜默取代而產生。聚核苷酸變異體可出於多種原因產生，例如使特定宿主之密碼子表現最佳化(將人類mRNA中之密碼子改變成對於諸如大腸桿菌之細菌宿主為較佳的密碼子)。亦提供包含本文所述之聚核苷酸的載體及細胞。

在一些實施例中，編碼ASCT2結合分子之DNA序列可藉由使用寡核苷酸合成器之化學合成構築。此類寡核苷酸可基於所需多肽之胺基酸序列且選擇在將產生所關注之重組多肽之宿主細胞中有利的彼等密碼子來設計。標準方法可應用於合成編碼相關分離多肽中分離之聚核苷酸序列。舉例而言，完整胺基酸序列可用於構築回復轉譯之基因。此外，可合成含有編碼特定分離多肽之核苷酸序列的DNA寡聚物。舉例而言，可合成編碼所需多肽之各部分的若干小寡核苷酸且接著接合。個別寡核苷酸通常含有用於互補性組裝之5'或3'突出端。

一經組裝(藉由合成、定點突變誘發或其他方法)，可將編碼所關注之特定分離多肽的聚核苷酸序列插入表現載體中且可操作地連接至適用於在所需宿主中表現蛋白質之表現控制序列。正確組裝可例如依據核苷酸測序、限制酶圖譜及/或生物活性多肽在適合宿主中之表現來證實。為了達成所轉染基因在宿主中之高表現量，基因可操作地連接至或與所選表現宿主中具有功能性之轉錄及轉譯表現控制序列結合。

在某些實施例中，使用重組表現載體擴增及表現編碼抗ASCT2抗體或其抗原結合片段的DNA。重組表現載體為可複製的DNA構築體，其具有編碼抗ASCT2抗體或/及其抗原結合片段之多肽鏈的合成或cDNA源性DNA片段，該等合成或cDNA源DNA片段可操作地連接至來源於哺乳動

物、微生物、病毒或昆蟲基因的適合轉錄或轉譯調控元件。轉錄單元通常包含以下之組裝體：(1)基因元件或在基因表現時具有調節作用的元件，例如轉錄啟動子或增強子；(2)轉錄成mRNA且轉譯成蛋白質的結構或編碼序列；及(3)適當的轉錄及轉譯起始及終止序列，如本文中詳細所述。此類調控元件可包括控制轉錄的操縱序列。可另外併入通常由複製起點賦予之在宿主中複製之能力及促進識別轉型體之選擇基因。DNA區域當其在功能上彼此相關時可操作地連接。舉例而言，若信號肽(分泌前導序列)之DNA表現為參與多肽分泌之前驅物，則其可操作地連接於多肽之DNA；若啟動子控制編碼序列之轉錄，則其可操作地連接於該序列；或若核糖體結合位點經定位從而允許轉譯，則其可操作地連接於編碼序列。欲用於酵母表現系統中之結構元件包括能夠使宿主細胞達成細胞外分泌所轉譯蛋白質的前導序列。或者，在不使用前導或輸送序列表現重組蛋白質的情況下，該蛋白質可包括N末端甲硫胺酸殘基。此殘基可視情況隨後自所表現之重組蛋白質裂解而得到最終產物。

表現控制序列及表現載體之選擇將視宿主之選擇而定。可使用多種表現宿主/載體組合。適用於真核宿主之表現載體包括例如包含來自SV40、牛乳頭狀瘤病毒、腺病毒及巨細胞病毒之表現控制序列的載體。適用於細菌宿主之表現載體包括已知之細菌質體，諸如來自大腸桿菌之質體，包括pCR 1、pBR322、pMB9及其衍生物；更寬宿主範圍質體，諸如M13；及絲狀單股DNA噬菌體。

在適當啟動子的控制下，表現ASCT2結合分子之適合宿主細胞包括原核生物、酵母菌、昆蟲或高等真核細胞。原核生物包括革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物，例如大腸桿菌(*E. coli*)或桿菌(*bacilli*)。高等真核細胞包

括如本文所述之已確立之哺乳動物來源細胞株。亦可採用無細胞轉譯系統。關於蛋白質產生方法(包括抗體產生)的其他資訊可見於例如美國專利公開案第2008/0187954號、美國專利第6,413,746號及第6,660,501號以及國際專利公開案第WO 04009823號中，其各以全文引用的方式併入本文中。

各種哺乳動物或昆蟲細胞培養系統亦可有利地用於表現重組ASCT2結合分子。可在哺乳動物細胞中進行重組蛋白質之表現，因為此類蛋白質一般正確摺疊、適當修飾且完全具有功能。適合哺乳動物宿主細胞株之實例包括HEK-293及HEK-293T、Gluzman, *Cell* 23:175 (1981)描述之猴腎細胞之COS-7細胞株及其他細胞株，包括例如L細胞、C127、3T3、中國倉鼠卵巢(CHO)、HeLa及BHK細胞株。哺乳動物表現載體可包含非轉錄元件，諸如複製起點、連接至待表現基因之適合啟動子及增強子，以及其他5'或3'側接非轉錄序列，以及5'或3'末轉譯序列，諸如必需的核糖體結合位點、聚腺苷酸化位點、拼接供體及受體位點，以及轉錄終止序列。用於在昆蟲細胞中產生異源蛋白質的桿狀病毒系統回顧於Luckow及Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988)中。

經轉型宿主所產生的ASCT2結合分子可根據任何適合方法純化。此類標準方法包括層析(例如離子交換、親和性及篩分管柱層析法)、離心、差異溶解性或用於蛋白質純化的任何其他標準技術。諸如六組胺酸、麥芽糖結合域、流感包膜序列及麩胱甘肽-S-轉移酶之親和力標籤可附接於蛋白質以允許藉由通過適當親和力管柱容易地純化。經分離之蛋白質亦可使用諸如蛋白分解、核磁共振及x射線結晶學之技術進行物理表徵。

舉例而言，來自分泌重組蛋白質至培養基中之系統的上清液可首先

使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超過濾單元)濃縮。在濃縮步驟後，濃縮物可施加於適合純化基質。或者，可使用陰離子交換樹脂，例如具有側接二乙胺基乙基(DEAE)基團之基質或受質。基質可為丙烯醯胺、瓊脂糖、聚葡萄糖、纖維素或常用於純化蛋白質之其他類型。或者，可採用陽離子交換步驟。適合陽離子交換劑包括包含磺丙基或羧甲基之各種不溶基質。最後，採用疏水性RP-HPLC介質，例如具有側接甲基或其他脂族基之矽膠的一或多個逆相高效液相層析(RP-HPLC)步驟可用於對ASCT2結合分子進一步純化。亦可採用各種組合的一些或所有以上純化步驟以提供均質重組蛋白質。

細菌培養物中產生之重組ASCT2結合分子可例如藉由自細胞集結粒之初始萃取，後跟一或多個濃縮、鹽析、水性離子交換或尺寸排外層析步驟分離。可採用高效液相層析(HPLC)進行最終純化步驟。在重組蛋白質表現中所採用之微生物細胞可藉由任何適宜方法，包括凍融循環、音波處理、機械破壞或使用細胞溶解劑來破壞。

此項技術中已知用於純化抗體及其他蛋白質的方法亦包括例如美國專利公開案第2008/0312425號、第2008/0177048號及第2009/0187005號中所述之彼等方法，各案以全文引用的方式併入本文中。

VII. 醫藥組合物及投藥方法

製備及向有需要之個體投與本文提供之ASCT2結合分子之方法已為熟習此項技術者所熟知或易於由其確定。ASCT2結合分子之投與途徑可例如為經口、非經腸、藉由吸入或局部。如本文所用之術語非經腸包括例如靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、經直腸或經陰道投藥。儘管所有此等投藥形式明確涵蓋於本發明之範疇內，然而投藥形式之另一實例

為注射溶液，尤其用於靜脈內或動脈內注射或點滴的注射溶液。通常，適合之醫藥組合物可包含緩衝液(例如乙酸鹽、磷酸鹽或檸檬酸鹽緩衝液)、界面活性劑(例如聚山梨醇酯)、視情況存在之穩定劑(例如人類白蛋白)等。在本文中之教示相容的其他方法中，本文提供之ASCT2結合分子可直接傳遞至不良細胞群體之位點，進而增加患病組織向治療劑之暴露。在一個實施例中，直接投與呼吸道，例如吸入或鼻內投藥。

如本文所論述，本文提供之ASCT2結合分子可以對於活體內治療藉由ASCT2過度表現表徵之疾病或病症，諸如結腸直腸癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌、胰臟癌、黑素瘤、子宮內膜癌、血液癌(AML、MM、DLBCL)及包含CSC之癌症醫藥學上有效的量投與。就此而言，應瞭解所揭示之結合分子可經調配以便促進投藥及促進活性劑穩定性。根據本發明之醫藥組合物可包含醫藥學上可接受之無毒無菌載劑，諸如生理鹽水、無毒性緩衝液、防腐劑及類似物。出於本申請案之目的，ASCT2結合分子之醫藥學有效量意指足以達成有效結合至目標及達成例如改善疾病或病況之症狀或偵測物質或細胞之益處的量。用於本文所揭示之治療方法的適合調配物描述於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第22版, Lloyd V. Allen, Jr.編 (2012)中。

本文所提供之某些醫藥組合物可以可接受劑型經口投與，包括例如膠囊、錠劑、水性懸浮液或溶液。某些醫藥組合物亦可藉由鼻氣溶膠或吸入投與。此類組合物可使用苯甲醇或其他適合防腐劑、增強生物可用性之吸收促進劑及/或其他習知溶解或分散劑、於生理鹽水中製備成溶液。

可與載體材料組合以產生單一劑型之ASCT2結合分子的量將視治療之個體及特定投與模式而變化。組合物可以單次劑量、多次劑量投與，或

以輸注方式投與已確立之時段。亦可調節給藥方案以提供最佳所需反應。

在跟上本發明之範疇中，ASCT2結合分子可根據上述治療方法以足以產生治療效應的量向人類或其他動物投與。本文提供之ASCT2結合分子可以藉由根據已知技術組合本發明之ASCT2結合分子與習知醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑製備之習知劑型向此人類或其他動物投與。醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑之形式及特徵可依據與其合併之活性成分的量、投藥途徑及其他熟知變數來確定。亦可使用包含一或多種本發明之ASCT2結合分子之物質，例如ASCT2-ADC、抗ASCT2抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物之混合液。

「治療有效劑量或量」或「有效量」預期為在投與時，對於患有待治療之疾病或病況之患者之治療引起陽性治療反應之ASCT2結合分子的量。

治療ASCT2過度表現之疾病或病症，諸如某些癌症的本發明之組合物之治療有效劑量視許多不同因素，包括投與方式、目標位點、患者生理狀態、患者為人類或動物及投與之其他藥物而變化。通常，患者為人類，但亦可治療非人類哺乳動物，包括轉殖基因哺乳動物。治療劑量可使用熟習此項技術者已知之常規方法來滴定以使安全性及功效最佳化。

待投與之至少一種ASCT2結合分子的量易於由一般熟習此項技術者鑒於本發明在無不當實驗的情況下測定。影響至少一種ASCT2結合分子之投與模式及對應量的因素包括(但不限於)疾病嚴重程度、疾病病史及經歷療法之個體的年齡、身高、體重、健康及身體狀況。類似地，待投與之ASCT2結合分子的量將取決於投與模式及個體是否將經歷單次劑量或多次劑量的此藥劑。

本發明亦提供ASCT2結合分子，例如ASCT2-ADC、抗ASCT2抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物用於治療藉由ASCT2過度表現表徵之疾病或病症，例如結腸直腸癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌、胰臟癌或血液癌之用途。

本發明亦提供ASCT2結合分子，例如ASCT2-ADC、抗ASCT2抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物在製造用於治療藉由ASCT2過度表現表徵之疾病或病症，例如結腸直腸癌、HNSCC、前列腺癌、肺癌、胰臟癌或血液癌之藥物中之用途。

VIII. 診斷

本發明另外提供在診斷藉由ASCT2過度表現表徵之疾病，諸如某些癌症期間適用之診斷方法，其涉及量測來自個體之細胞或組織中之ASCT2之表現量及比較量測之表現量與正常細胞或組織中之標準ASCT2表現，借此相比於標準之表現量之增加指示可藉由本文提供之ASCT2結合分子治療之病症。

本文提供之ASCT2結合分子可用於使用熟習此項技術者已知的經典免疫組織化學方法分析生物樣品中之ASCT2蛋白含量。參見Jalkanen等人, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)；Jalkanen等人, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985)。適用於偵測ASCT2蛋白表現之其他基於抗體之方法包括免疫檢定，諸如ELISA、免疫沈澱或西方墨點法。

「分析ASCT2多肽之表現量」預期為直接(例如藉由確定或估算絕對蛋白質含量)或相對(例如藉由與第二生物樣品中之疾病相關之多肽含量比較)定性或定量量測或估算第一生物樣品中ASCT2多肽之含量。可量測或估算第一生物樣品中之ASCT2多肽表現量且與標準ASCT2多肽含量比

較，標準係獲自獲自未患病症之個體的第二生物樣品或依據得自未患病症之個體群體之平均含量來確定。如此項技術中瞭解，一旦已知「標準」ASCT2多肽含量，其可重複用作比較標準。

「生物樣品」意欲為自個體、細胞株、組織培養物或可能表現ASCT2之細胞的其他來源獲得之任何生物樣品。用於自哺乳動物獲得組織生檢及體液之方法為此項技術中所熟知。

IX. 包含ASCT2結合分子之套組

本發明另外提供包含本文所述之ASCT2結合分子且可用以進行本文所描述之方法的套組。在某些實施例中，套組在一或多個容器中包含至少一種經純化之抗ASCT2抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，套組包含一或多個容器中之至少一種經純化ASCT2-ADC。在一些實施例中，套組含有必需及/或足以進行偵測分析之所有組分，包括所有對照、進行分析之說明書及用於分析及呈現結果之任何所需軟體。熟習此項技術者將易於認識到所揭示之ASCT2結合分子可易於併入至在此項技術中熟知之已確立套組格式中的一者中。

X. 免疫分析

本文提供之ASCT2結合分子可用於關於藉由此項技術中已知之任何方法之免疫專一性結合的分析中。可使用的免疫分析包括(但不限於)使用諸如西方墨點法、RIA、ELISA、ELISPOT、「夾心」免疫分析、免疫沈澱分析、沈澱素反應、凝膠擴散沈澱素反應、免疫擴散分析、凝集分析、補體固定分析、免疫放射分析、螢光免疫分析及蛋白A免疫分析之技術的競爭性及非競爭性分析系統。此等分析為常規的且在此項技術中已熟知。參見例如Ausubel等人編, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*

(John Wiley & Sons, Inc., NY) 第1卷，其以全文引用的方式併入本文中。

本文提供之ASCT2結合分子可如在免疫螢光、免疫電子顯微術或非免疫分析中組織學地用於例如ASCT2或其保守變異體或肽片段之原位偵測。原位偵測可藉由自患者移除組織學樣本，且將其塗覆於標記之ASCT2結合分子，例如藉由將標記之ASCT2結合分子上覆於生物樣品塗覆而實現。經由使用此類程序，可不僅確定ASCT2或保守變異體或肽片段之存在，亦可確定其在檢驗組織中之分佈。使用本發明，一般技術者容易覺得多種組織學方法(諸如染色程序)中之任一者均可進行修改以達成此類原位偵測。

可根據熟知方法測定給定批次之ASCT2結合分子之結合活性。熟習此項技術者將能夠藉由使用常規實驗確定每次測定之操作及最佳分析條件。

適合於測定經分離ASCT2結合分子之結合特徵的方法及試劑為此項技術中已知及/或可商購的。針對此類動力學分析所設計之設備及軟體可商購(例如BIAcore®、BIAevaluation®軟體，GE Healthcare；KINEXA®軟體，Sapidyne Instruments)。

除非另外指明，否則使用細胞生物學、細胞培養、分子生物學、轉殖基因生物學、微生物學、重組DNA及免疫學之習知技術實施本發明，此等習知技術屬於此項技術之技能範圍內。此類技術於文獻中充分解釋。參見例如 Sambrook 等人編 (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Sambrook等人編 (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs

Harbor Laboratory, NY) ; D. N. Glover編, (1985) DNA Cloning, 第I及II卷 ; Gait編(1984) Oligonucleotide Synthesis ; Mullis等人美國專利第4,683,195號 ; Hames及Higgins編(1984) Nucleic Acid Hybridization ; Hames及Higgins編(1984) Transcription And Translation ; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986) ; Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.) ; Miller及Calos編(1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory) ; Wu等人編, Methods In Enzymology, 第154及155卷 ; Mayer及Walker編(1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London) ; Weir及Blackwell編, (1986) Handbook Of Experimental Immunology, 第I-IV卷 ; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986) ; 及Ausubel等人(1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) 。

抗體工程改造之通用原理闡述在Borrebaeck編(1995) Antibody Engineering (第2版; Oxford Univ. Press)中。蛋白質工程改造之通用原理闡述在Rickwood等人編(1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)中。抗體及抗體-半抗原結合之通用原理闡述在 : Nisonoff (1984) Molecular Immunology (第2版 ; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.) ; 及Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and

Hall, New York, N.Y.)中。另外，一般遵循此項技術中已知且不特定描述之免疫學標準方法，如在Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York；Stites等人編(1994) Basic and Clinical Immunology (第8版；Appleton & Lange, Norwalk, Conn.)及Mishell及Shiigi(編)(1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY)。

闡述免疫學之一般原理之標準參考著作包括Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York；Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY)；Kennett等人編, (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY)；Campbell (1984) 「Monoclonal Antibody Technology」, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burden等人編 (Elsevier, Amsterdam)；Goldsby等人編, (2000) Kuby Immunology (第4版；H. Freeman & Co.)；Roitt等人(2001) Immunology (第6版；London: Mosby)；Abbas等人(2005) Cellular and Molecular Immunology (第5版；Elsevier Health Sciences Division)；Kontermann及Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag)；Sambrook及Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press)；Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003)；Harlow及Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press)；Dieffenbach 及 Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)。

本發明中所引用之所有參考文獻特此以全文引用之方式併入。另外，用於本文中所引用或提及之任何產品的任何製造商之說明書或目錄以引用的方式併入。以引用的方式併入至此文本中之文獻或其中之任何教示內容可用於本發明的實踐。以引用的方式併入至此文本中之文獻不承認為先前技術。

XI. 實施例

實施例1.一種抗體或其抗原結合片段，其專一性結合於中性胺基酸轉運體2 (ASCT2)之抗原決定基，其中抗體或抗原結合片段與包含重鏈可變區(VH)之三個重鏈互補決定區(HCDR)及輕鏈可變區(VL)之三個輕鏈互補決定區(LCDR)之抗體或其抗原結合片段專一性結合於相同ASCT2抗原決定基；其中HCDR1之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO:10中，HCDR2之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 22中；HCDR3之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 23中；LCDR1之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 13中；LCDR2之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 24中；且LCDR3之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 25中。

實施例2.如實施例1之抗體或抗原結合片段，其中抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之HCDR1；SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之HCDR2；SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之HCDR3；SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之LCDR1；SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之LCDR2；及SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之LCDR3。

實施例3.如實施例1或實施例2中任一項之抗體或抗原結合片段，其

中VH包含選自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，且其中VL包含選自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列。

實施例4.如實施例1至3中任一項之抗體或抗原結合片段，其中VH包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列且VL包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。

實施例5.如實施例1至3中任一項之抗體或抗原結合片段，其中VH包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7且VL包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8。

實施例6.如實施例1至5中任一項之抗體或抗原結合片段，其中IgG恆定區在位置239之絲胺酸(S)與位置240之V之間包含半胱胺酸(C)插入物。

實施例7.如實施例6之抗體或抗原結合片段，其中抗體包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈。

實施例8.如實施例1至7中任一項之抗體或抗原結合片段，其中在抗體結合至細胞表面上之ASCT2後，抗體內化至細胞中。

實施例9.如實施例1至8中任一項之抗體或抗原結合片段，其包含選自由人類 κ 恆定區及人類 λ 恆定區組成之群的輕鏈恆定區。

實施例10.如實施例9之抗體或抗原結合片段，其中抗體包含SEQ ID NO: 26之人類 κ 恆定區。

實施例11.如實施例1至10中任一項之抗體或抗原結合片段，其進一步共軛至選自由以下組成之群的細胞毒素：抗微生物劑、治療劑、前藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物反應調節劑、藥劑、淋巴激素、異源抗體、異源抗體片段、可偵測標記、聚乙二醇(PEG)、放射性同位素及任何該等細胞毒素中之兩者或大於兩者之組合。

實施例12.如實施例11之抗體或抗原結合片段，其共軛至細胞毒素。

實施例13.如實施例12之抗體或抗原結合片段，其中細胞毒素選自微管溶素衍生物及吡咯并苯并二氮呋。

實施例14.如實施例13之抗體或抗原結合片段，其中微管溶素衍生物為微管溶素AZ1508。

實施例15.如實施例13之抗體或抗原結合片段，其中吡咯并苯并二氮呋選自SG3315及SG3249。

實施例16.如實施例15之抗體或抗原結合片段，其中吡咯并苯并二氮呋為SG3315。

實施例16A.如實施例15之抗體或抗原結合片段，其中吡咯并苯并二氮呋為SG3249。

實施例17.如實施例1至16中任一項之抗體或抗原結合片段，其中抗體結合至人類ASCT2及食蟹獼猴ASCT2。

實施例18.如實施例1至17中任一項之抗體或抗原結合片段，其中抗體不專一性結合至人類ASCT1。

實施例19.一種醫藥組合物，其包含如實施例1至18中任一項之抗體或抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。

實施例20.一種聚核苷酸或聚核苷酸組合，其編碼如實施例1至19中任一項之抗體或其抗原結合片段。

實施例21.一種載體，其包含如實施例20之聚核苷酸或聚核苷酸組合。

實施例22.一種宿主細胞，其包含如請求項20之聚核苷酸或聚核苷酸組合或如實施例21之載體。

實施例23.一種抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段

包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之HCDR1；SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之HCDR2；SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之HCDR3；SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之LCDR1；SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之LCDR2；及SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之LCDR3，且其中抗體或抗原結合片段共軛至細胞毒素。

實施例23A.一種抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之HCDR1；SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之HCDR2；SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之HCDR3；SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之LCDR1；SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之LCDR2；及SEQ ID NO: 25之胺基酸序列之LCDR3，且其中抗體或抗原結合片段共軛至細胞毒素。

實施例24.如實施例23之抗體或其抗原結合片段，其中抗體或抗原結合片段包含含胺基酸序列SEQ ID NO: 7之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8之VL域。

實施例24A.如實施例23之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含含胺基酸序列SEQ ID NO: 5之VH域及包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之VL域。

實施例25.如實施例23或實施例24之抗體或抗原結合片段，其中細胞毒素選自由以下組成之群：抗微生物劑、治療劑、前藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物反應調節劑、藥劑、淋巴激素、異源抗體、異源抗體片段、可偵測標記、聚乙二醇(PEG)、放射性同位素及任何該等細胞毒素中之兩者或大於兩者之組合。

實施例26.如實施例23或實施例24之抗體或抗原結合片段，其中細胞

毒素選自微管溶素衍生物及吡咯并苯并二氮呋。

實施例27.如實施例26之抗體或抗原結合片段，其中微管溶素衍生物為微管溶素AZ1508。

實施例28.如實施例26之抗體或抗原結合片段，其中吡咯并苯并二氮呋選自SG3315及SG3249。

實施例29.如實施例28之抗體或抗原結合片段，其中吡咯并苯并二氮呋為SG3315。

實施例29A.如實施例28之抗體或抗原結合片段，其中吡咯并苯并二氮呋為SG3249。

實施例30.一種醫藥組合物，其包含如實施例23至29之抗體或抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。

實施例31.一種製造抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包含培養實施例22之宿主細胞；及分離該抗體或抗原結合片段。

實施例32.一種診斷試劑，其包含如實施例1至18或23至29中任一項之抗體或抗原結合片段。

實施例33.一種套組，其包含如實施例1至18或23至29中任一項之抗體或抗原結合片段，或如實施例19或30之組合物。

實施例34.一種將藥劑傳遞至ASCT2表現細胞之方法，該方法包含使細胞與如實施例23至29中任一項之抗體或抗原結合片段接觸，其中該藥劑經細胞內化。

實施例35.一種誘發ASCT2表現細胞之死亡之方法，該方法包含使細胞與如實施例23至29中任一項之抗體或抗原結合片段接觸，其中共軛至細胞毒素之抗體誘發ASCT2表現細胞之死亡。

實施例36.一種治療個體中藉由ASCT2之過度表現表徵之癌症的方法，該方法包含向需要治療之個體投與有效量的如實施例1至18或23至29中任一項之抗體或抗原結合片段，或如實施例19或實施例30之組合物。

實施例37.如實施例36之方法，其中該癌症選自由以下組成之群：結腸直腸癌、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、前列腺癌、肺癌、胰臟癌、黑素瘤、子宮內膜癌及血液癌(AML、MM、DLBCL)。

實施例37A如實施例36之方法，其中該癌症包含CSC。

實施例38.如實施例37之方法，其中血液癌選自急性淋巴母細胞白血病(ALL)；急性骨髓性白血病(AML)；慢性淋巴球性白血病(CLL)；慢性骨髓性白血病(CML)；急性單核細胞性白血病(AMoL)；霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin' lymphomas)；非霍奇金氏淋巴瘤；及多發性骨髓瘤。

實施例39.一種偵測樣品中之ASCT2表現量之方法，該方法包含：使樣品與如實施例1至18或23至29中任一項之抗體或其抗原結合片段，或如實施例19或實施例30之組合物接觸，及偵測該抗體或其抗原結合片段與樣品中之ASCT2之結合。

實施例40.如實施例39之方法，其中樣品為細胞培養物。

實施例41.如實施例39之方法，其中樣品為經分離組織。

實施例42.如實施例39之方法，其中樣品來自人類。

實施例43.一種ASCT2抗體-藥物共軛物(ASCT2-ADC)，其包含含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之LCDR2、SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之LCDR3及微管溶素AZ1508之抗體或其抗原結合片

段。

實施例44.一種ASCT2-ADC，其包含含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之LCDR2、SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之LCDR3及PBD SG3249之抗體或其抗原結合片段。

實施例45.一種ASCT2-ADC，其包含含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 12之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 13之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 14之胺基酸序列之LCDR2、SEQ ID NO: 15之胺基酸序列之LCDR3及微管溶素，以及PBD SG3315之抗體或其抗原結合片段。

實施例46.一種ASCT2-ADC，其包含含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之LCDR2、SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之LCDR3及微管溶素AZ1508之抗體或其抗原結合片段。

實施例47.一種ASCT2-ADC，其包含含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之LCDR2、SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之LCDR3及PBD SG3249之抗體或其抗原結合片段。

實施例48.一種ASCT2-ADC，其包含含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 18

之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之LCDR2、SEQ ID NO:21之胺基酸序列之LCDR3及PBD SG3315之抗體或其抗原結合片段。

實例

提供以下實例作為說明，而非作為限制。

本發明之實施例可參考以下非限制性實例來進一步定義，該等非限制性實例詳細描述本發明之某些抗體的製備及使用本發明之抗體的方法。熟習此項技術者將顯而易知，在不悖離本發明之範疇的情況下，可對材料及方法作出許多修改。

實例1.人類正常及癌症組織中之ASCT2表現

藉由IHC分析之正常及腫瘤組織中之ASCT2蛋白表現

為了評估ASCT2之蛋白質表現，在來自正常人類及人類腫瘤甲醛固定組織之切片中進行IHC。在用檸檬酸鹽緩衝液(pH=6.0)之抗原修復處理後，遵循製造商的方案，用抗ASCT2兔多株抗體(EMD Millipore, Billerica, MA；目錄號ABN73)測試組織。使用HT29細胞株作為陽性對照，且使用初生人類肝細胞作為陰性對照進行方案最佳化。

在正常組織中，未在肝臟、心臟、肺細胞、腎小球及大腦上觀測到ASCT2之染色。

人類腫瘤中之ASCT2表現

藉由跨越各種癌組織之IHC評估ASCT2表現。在實體腫瘤，包括結腸癌、肺鱗狀細胞癌、頭頸癌及前列腺癌組織中，及血液癌(諸如AML、MM及DLBCL)中觀測到強膜性ASCT2表現。另外，在卵巢子宮內膜癌組織及黑素瘤組織中觀測到高ASCT2表現。下表2提供人類癌症組織中之

ASCT2表現之概述。

表2

人類腫瘤中之ASCT2表現

	總計	平均*	低	中等	高	陽性核心	陽性率(%)
肺NSCLC SCC	5	0	1	1	3	5	100
肺NSCLC腺癌	5	3	0	2	0	2	40
肺NSCLC未分化癌	2	1	0	0	1	1	50
乳腺浸潤性導管癌	10	8	1	1	0	2	20
乳腺浸潤性小葉癌	2	2	0	0	0	0	0
卵巢漿液性及漿液性 -乳頭狀腺癌	8	5	1	1	1	3	38
卵巢子宮內膜癌	4	1	0	0	3	3	75
結腸癌	11	0	1	3	7	11	100
黑素瘤(癌轉移)	11	4	2	2	3	7	64
前列腺癌	12	0	0	1	11	12	100
頭頸癌	10	0	1	2	7	10	100
MM	15	0	0	0	15	15	100
AML	16	0	4	0	12	16	100
DLBCL	128	6	20	32	70	122	95.3

在來自AML及MM之癌症幹細胞中觀測到ASCT2表現。藉由使用與螢光團Alexa 647共軛之ASCT2抗體17c10之流動式細胞測量術評估癌症幹細胞中之ASCT2。AML及MM患者中之ASCT2之表現基本上高於正常骨髓中之表現(如圖1A中所述)。藉由使用流動式細胞測量術分選不同亞群，諸如CD38⁺、CD38⁻、CD34⁺；CD34⁻；CD38⁺及CD34⁺；及CD38⁻及CD34⁻，細胞經分離且其幹細胞特性進一步藉由對各亞群進行細胞群落分析而表徵。吾人發現僅CD38⁺、CD34⁺細胞形成集落，其另外證實文獻中所述之發現(Lapidot T等人, Nature 1994; 367(6464):645-8；Bonnet D等人 Nat Med 1997; 3(7):730-7.)。在上文所述之所有亞群中評估ASCT2表現。圖1B描述白血病幹細胞群體，即AML患者樣品之CD38⁺、CD34⁺群體中之高ASCT2表現。同樣，如圖1C中所述，ASCT2表現亦在AML中之整個或非白血病幹細胞群體中較高。此外，亦在MM腫瘤之CD138⁺，

CD19⁻(漿細胞)及CD138⁻，CD19⁺(幹細胞)細胞中評估ASCT2表現。圖1C中之直方圖表明相比於MM之幹細胞的漿細胞中之高ASCT2表現。資料支持相比於來自正常供體之骨髓，在來自AML及MM患者樣品之骨髓中觀測到ASCT2表現。此外，ASCT2高度過表現於AML患者樣品之白血病幹細胞(LSC)(CD34⁺/CD38⁺)中。此外，亦定義為MM漿細胞之CD138⁺、CD19⁻細胞顯示相比於幹細胞群體(CD138⁻、CD19⁺)的ASCT2之較高表現。

亦在來自胰臟腫瘤之癌症幹細胞中觀測到ASCT2表現。用膠原蛋白III消化胰臟實體腫瘤碎片且製得單細胞懸浮液。離散細胞用針對細胞表面蛋白之抗體EpCAM、CD44、CD24及更早描述之ASCT2抗體染色。胰臟癌幹細胞之細胞表面蛋白簽名已充分表徵。EpCAM⁺ CD44⁺ CD24⁺細胞定義為胰臟腫瘤中之癌症幹細胞(Li, C等人 Cancer Res. 2007;67:1030-1037)。CSC群體(EpCAM⁺、CD44⁺、CD24⁺)中之ASCT2表現之實例描述於圖1D中。使用此相同策略，在用ASCT2-PBD ADC或同型對照ADC之單次劑量處理後在胰臟腫瘤之癌症幹細胞群體中評估ASCT2表現。圖1E表明ASCT2-PBD ADC消融癌症幹細胞群體。本文中之資料表明靶向ASCT2不僅在實體腫瘤中，且亦將在血液癌及癌症幹細胞中有效。

實例2.產生抗ASCT2抗體

免疫接種及融合瘤產生

由含有人類ASCT2基因之質體的DNA免疫接種(Chowdhury等人, J. Immunol. Methods 249:147, 2001)產生針對ASCT2之抗體。用於人類ASCT2之基因選殖至表現質體pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)中。八週齡VelocImmune II小鼠(Regeneron, Tarrytown, NY)在尾巴基部每隔

一週皮內注射100 µg ASCT2表現質體(1 mg/mL，在PBS中)。在第一次注射之後第28天開始以2週時間間隔收集測試出血，且藉由流動式細胞測量術分析ASCT2專一性抗體。測試出血之連續稀釋液與表現ASCT2或無關細胞表面蛋白質之293F細胞一起培育。在第56及70天，殺死具有最高特定效價的小鼠。來自淋巴結及脾臟之淋巴球經分離，且在聚乙二醇(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)融合方法之後以1:1比率與骨髓瘤細胞株P3x/63Ag8.653融合。在含有次黃嘌呤-胺基喋呤-胸苷(HAT)之融合瘤生長培養基中選擇融合細胞。

流動式細胞測量術篩選分析

評估融合瘤上清液與表現ASCT2之HEK 293F細胞的結合。經由流動式細胞測量術發現專一性地結合於表現ASCT2之HEK 293F細胞之上清液藉由用一組表現ASCT2之癌細胞株進行流動式細胞測量術染色而進一步確認ASCT2專一性結合。最後，確認之上清液轉化成人類IgG1以用於另外的結合評估。

人類抗ASCT2 IgG mAb及Fab之選殖及表現

藉由限制稀釋法次選殖融合瘤。藉由如關於親體融合瘤在上文所述之流動式細胞測量術對於ASCT2專一性抗體篩選蛋白A親和力純化IgG次純系之上清液。使用Dynabeads mRNA Direct Kit (Invitrogen)分離次選殖融合瘤之mRNA。使用SuperScript III逆轉錄酶(Invitrogen)及隨機六聚體引物合成cDNA之第一股。藉由使用一組Novagen® 簡併Ig-引物(EMD Millipore, 目錄號69830)之PCR擴增人類Ig VL及VH基因。PCR擴增之VL及VH產物選殖至質體pCR2.1-TOPO (Invitrogen)中且經定序。來自各融合瘤之VH及VL基因藉由PCR再擴增，添加選殖至人類IgGκ pOE載體

中之限制酶位點，其中VL在與人類 κ -融合之BssHII/BsiWI位點選殖，且VH在與人類IgG-1重鏈恆定區(或用於產生Fab之CH1區)融合之BsrGI/SalI位點選殖。所得pOE質體藉由DNA定序驗證。

抗ASCT2抗體在Hek293F (Invitrogen)或CHO-G22細胞中暫時表現。對於Hek293F細胞中之表現，根據製造商之方案使用293fectin™ (茵維特羅根；目錄號12347-019)進行轉染。在FreeStyle™ 293表現培養基(Invitrogen；目錄號12338-018)中培養細胞，且培養體積在轉染後三天及六天加倍。培養經轉染Hek293F細胞總共十一天。對於CHO-G22細胞中之表現，使用25 kDa線性聚乙烯亞胺(Polysciences, Warrington, PA)，使用製造商之方案轉染細胞。在CD CHO培養基(Invitrogen)中培養細胞，且每隔一天饋入自產的進料。培養經轉染CHO-G22細胞總共十二天。

在藉由蛋白A層析分離全長人類IgG之後，經由流動式細胞測量術再評估結合。圖2描繪顯示相比於模擬經轉染細胞，經分離人類IgG 1e8、3f7、5a2、9b3、10c3、16b8、17c10及17a10與表現人類ASCT2之細胞之結合之倍數變化的條形圖。如圖中所見，發現若干全長人類IgG保留ASCT2結合活性。

實例3.作為抗體-藥物共軛物(ADC)之ASCT2結合抗體

評估ASCT2結合抗體之ADC介導之細胞毒性

為了證實親體抗體之內化，及預測其是否可傳遞細胞毒性有效負載，根據製造商之說明書在Hum-ZAP抗體內化分析(Advanced Targeting Systems, San Diego, CA)中測試親體抗體。簡言之，ASCT2陽性WiDr細胞以組織培養物處理之96孔板之每孔1,000個細胞之密度平鋪於培養基中且使其在37°C下/5% CO₂下黏附隔夜。為了製備測試物品，各親體抗體與

共軛於核糖體不活化蛋白質皂草素之二級抗體(山羊抗人類IgG)一起在室溫下培育30分鐘以形成二級共軛物。接著製備此二級共軛物之連續稀釋液且添加至含有細胞之孔。

在37°C /5% CO₂下培育72小時後，CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay (Promega, Madison, WI)用於測定相對細胞毒性。簡言之，將CellTiter-Glo®試劑添加至各孔且使其在室溫下在輕度震盪下培育10分鐘。使用Perkin Elmer EnVision®光度計在560 nm處讀取各樣品之吸光度。用親體抗體1E8或17C10，化學連接至皂草素之抗ASCT2抗體(hIgG-皂草素)，或化學連接至皂草素之同型對照處理之細胞之相對增殖速率(%)係相比於未處理對照細胞之相對活力。如圖3A中所示，相比於用皂草素共軛之抗體處理之彼等細胞，相對細胞增殖速率在用不化學連接至皂草素之抗ASCT2抗體處理之細胞中較低。

藉由微管溶素有效負載評估經典地共軛之抗ASCT2抗體之ADC介導之細胞毒性

為了證實藉由共軛至微管溶素有效負載之抗ASCT2抗體的ADC介導之殺死，先導抗體1E8及17C10直接與微管溶素類別之毒素共軛，且對於ASCT2陽性結腸癌細胞測試藉由共軛抗體之細胞毒性殺死。簡言之，SW48細胞以組織培養物處理之96孔板之每孔1,000個細胞之密度平鋪於培養基中且其實在37°C /5% CO₂下黏附隔夜。為了製備測試物品，與微管溶素有效負載共軛之各抗體(ASCT2先導抗體1E8及17C10，及同型對照)經連續稀釋且添加至各別孔。在37°C /5% CO₂下培育72小時後，CellTiter-Glo® Luminescent Viability Assay用於如上文所述地測定相對細胞毒性。

藉由下式計算細胞活力%：經處理樣品之平均發光/對照樣品之平均發光)x100。以GraphPad Prism軟體使用邏輯非線性回歸分析測定IC₅₀值。圖3B顯示經典地共軛至微管溶素AZ1508之抗ASCT2 1 E8、抗ASCT2 17C10及同型對照R347之細胞毒性之圖示。該圖顯示兩種抗ASCT2抗體具有類似細胞毒性。計算之IC₅₀值顯示於下表3中。

表3

藉由經典地共軛至微管溶素之ASCT2先導抗體之ADC介導之細胞毒性殺死

抗體純系	17c10	1e8	R347
IC ₅₀ (ng/ml)	45.98	34.83	NA

用於定點共軛之半胱胺酸突變之選殖

標準重疊PCR方法用於在抗ASCT2抗體1E8及17C10之CH2區中之胺基酸S239與V240之間引入半胱胺酸殘基。稱為「239插入」或「239i」之此半胱胺酸將充當抗ASCT2 ADC抗體製備中之細胞毒性藥物的共軛位點。含有Maia插入之重鏈主鏈之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 9中。含有引入之半胱胺酸之抗體共軛至微管溶素有效負載(微管溶素AZ1508)或吡咯并苯并二氮呋(PBD)有效負載(SG3249或SG3315)，基本上如下所述。

含順丁烯二醯亞胺藥物之共軛

評估ADC有效負載之所有化合物(AZ1508、SG3249、SG3315)含有易於共軛至抗體之硫醇殘基的连接子及順丁烯二醯亞胺基團，形成硫醇-順丁烯二醯亞胺鍵。包含順丁烯二醯亞胺基團之細胞毒素(例如微管溶素1508)可共軛至工程改造為本發明之抗ASCT2抗體的特定半胱胺酸殘基(例如17c10、1e8)。或者或視情況，可使用經典共軛方法將細胞毒性劑附接

於所述抗體。將細胞毒素共軛至抗體上之天然離胺酸及半胱胺酸殘基之方法在此項技術中已熟知。以下提供定點(在工程改造之半胱胺酸殘基)及經典共軛(在天然半胱胺酸殘基)之代表性方法。

代表性定點抗體-藥物共軛方法包括以下步驟：(a)開封可衍生胺基酸(例如半胱胺酸)之尺寸鏈，(b)氧化，(c)共軛有效負載(例如細胞毒性劑，諸如微管溶素1508)，及(d)藉由移除共軛試劑及非反應有效負載而拋光。舉例而言，可藉由在具有1 mM乙二胺四乙酸(EDTA)之1× PBS中調配抗體來進行與經工程改造之半胱胺酸的共軛。使用輕度還原，藉由每一抗體添加四十當量參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽且在37°C下培育三小時產生游離硫醇。在具有1× PBS之1 mM EDTA中之三次連續滲析用於移除參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽。或者，去鹽管柱可用於移除參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽。藉由添加約20當量脫氫松香酸(dhAA)且在室溫下培育約四小時而允許再形成抗體鏈間雙硫鍵。

在用於共軛之製備中，將二甲亞砷添加至抗ASCT2抗體以達到百分之十v/v。添加含8或12當量微管溶素1508有效負載(分別對於2T及4T藥物負載)之二甲亞砷，且在室溫下培育混合物約1小時。或者，培育可在4°C下進行約16小時。藉由每有效負載(亦即32或48)添加約4莫耳當量N-乙酰基半胱胺酸(NAC)使反應淬滅。遵循製造商的建議，藉由使用陶瓷羥磷灰石自共軛抗體移除游離有效負載。必要時，最終產物可經受緩衝液交換。為了證實純度及與重鏈之共軛，共軛抗體可藉由此項技術中已知之任何方法分析。在一些情況下，非還原及還原SDS-PAGE可用於證實純度及與重鏈之共軛。

藥物隨機共軛至天然半胱胺酸殘基之ADC係藉由部分還原抗體，接

著與所需連接子-藥物反應而製備。濃度為5 mg/mL之抗體藉由添加3莫耳當量pH 8.0之DTT，接著在約37°C下培育約2小時而部分還原。還原反應物接著在冰水中冷卻且移除過量DTT，例如經由過濾。接著以約1:10之連接子-藥物/硫醇莫耳比添加連接子-藥物。共軛反應係在約10% v/v DMSO存在下進行。在共軛之後，添加過量游離半胱胺酸(連接子-藥物之約2倍莫耳比)以淬滅未反應的連接子-藥物以產生半胱胺酸-連接子-藥物加合物。反應混合物經純化(例如藉由疏水相互作用層析)，且經受緩衝液交換至PBS中。使用諸如疏水相互作用層析法及經還原之逆相層析法之標準方法確定載藥量分佈。

實例4. ASCT2結合mAb及ADC之表徵

結腸直腸癌細胞中之ASCT2抗體之ASCT2專一性結合

為了確定某些融合瘤純系之結合是否對ASCT2抗原具有專一性，在ASCT2表現之shRNA基因敲落之後評估結合。簡言之，藉由表現ASCT2 shRNA或非靶shRNA(NTshRNA)之慢病毒轉導WiDr細胞。在感染後72小時評估兩個抗ASCT2融合瘤純系17c10及1e8之結合。如圖4中所見，ASCT2表現之基因敲落顯著消融各別純系之結合，且進一步確認ASCT2 mAb 17c10及1e8之抗原專一性結合。

抗ASCT2非共軛抗體之內化動力學

抗體在與靶抗原結合時的內化為達成所需ADC效應之先決條件。因此，檢查ASCT2抗體之內化特徵。WiDr細胞與共軛至Alexa 488之抗ASCT2抗體17c10 (17c10-Alexa 488)一起培育各種時段。細胞接著經洗滌且在具有或不具有抗-Alexa 488抗體的情況下在冰上培育45分鐘以淬滅細胞表面信號。總信號及淬滅信號(表示內化抗體)之螢光強度係藉由流動

式細胞測量術分析量測。如圖5A中所見，相比於不顯示內化之同型對照抗體，抗ASCT2抗體17c10顯示增加之內化。

藉由細胞毒性殺死量測之ASCT2-ADC (17c10AZ1508)之內化動力學

細胞經共軛至微管溶素AZ1508之抗ASCT2抗體(17C10-AZ1508)脈衝各種時段。此後，含ADC培養基經新鮮培養基替換且另外培育細胞4天。藉由使用CTG套組量測細胞活力。劑量反應曲線標繪為未處理對照細胞之百分比且代表性圖示顯示於圖5B中。如上文所述地計算IC₅₀值，且結果概述於下表4中。

表4

ASCT2-ADC (17c10AZ1508)之內化動力學

時間	IC ₅₀ (ng/ml)	
	17c10	1e8
10分鐘	410.9	963.6
30分鐘	295.5	819.6
120分鐘	100	317
8小時	29.04	110.9

親和力測定(17c10及1e8與ASCT2表現細胞株之結合)

表現ASCT2之人類、獼猴及CHO源性細胞株用於評估ASCT2專一性抗體之結合親和力及交叉反應性。藉由滴定螢光團標記之抗體量測表觀親和力。代表性結果概述於下表6中，且顯示於圖6中。

圖6顯示產生於抗ASCT2抗體17c10及1e8，以及同型對照R347與表現ASCT2之細胞株之結合的流動式細胞測量術曲線圖。人類癌細胞株Cal27之結果顯示於圖6A中；人類癌細胞株FaDu之結果顯示於圖6B中；人類癌細胞株SSC15之結果顯示於圖6C中；人類癌細胞株WiDr之結果顯示於圖6D中；穩定表現人類ASCT2之CHOK1細胞之結果顯示於圖6E中；穩定表現cyno ASCT2之CHOK1細胞之結果顯示於圖6F中)；獼猴癌

細胞株CynoMK1之結果顯示於圖6G中；且模擬經轉染CHOK1細胞之結果顯示於圖6H中。結合至ASCT2表現細胞株之17c10及1e8之EC₅₀值指示於下表5中。

表5

結合至ASCT2表現細胞株之17c10及1e8的EC₅₀值

細胞株	17c10 EC ₅₀ (nM)	1E8 EC ₅₀ (nM)
Fadu	3.8	6.8
SSC15	3.6	8.8
WiDr	7.0	5.8
Cal27	2.8	13
Cyno MK1	6.7	14.8
HuASCT2-CHOK1	8.6	8.1
CynoASCT2-CHOK1	9.6	28.4

17c10抗體對於ASCT2抗原之專一性

抗ASCT2抗體17c10對於SLC1A家族之另一成員ASCT1 (SLC1A4)不具有親和力。如圖7A中所示之圖示中可見，ASCT1表現藉由shRNA之沉默不消融SKMEL-2細胞中之17c10之ASCT2專一性結合。shRNA之基因敲落效率藉由西方墨點分析進一步確認。此外，如圖7B中所示之圖示中可見，未在ASCT1表現藉由各別shRNA沉默之細胞之細胞毒性概況中觀測到變化。結果概括於表6中。

表6

17c10-ADC之ASCT2專一性結合及細胞毒性殺死

	NTshRNA	ASCT1-shRNA1	ASCT1- shRNA2	ASCT2-shRNA
IC ₅₀ (ng/ml)	14.34	7.59	4.96	205.4

ASCT2-ADC抗體與Cyno ASCT2之交叉反應性及細胞毒性

對於共軛至微管溶素AZ1508之抗ASCT2結合純系17c10及1e8評估與穩定表現於CHOK1細胞中之cyno ASCT2、穩定表現於CHOK1細胞中之人類ASCT2及表現於CHOK1細胞中之對照分子之結合。ASCT2抗體

17c10 (圖8A)及ASCT2抗體1e8 (圖8B)當共軛至微管溶素1508有效負載時，在表現人類及cyno ASCT2之CHOK1細胞中，但不在未經轉染之CHOK1或CHOK1-ABCB5中顯示強力細胞毒性活性。此等結果概述於下表7中。

表7

17c10-ADC之ASCT2專一性結合及細胞毒性殺死

	結合		細胞毒性	
	EC ₅₀ (nM)		IC ₅₀ (ng/ml)	
	17C10	1e8	17C10	1e8
HuASCT2	8.6	8.1	5.531	20.69
CynoASCT2	9.6	28.4	8.59	140.3

17c10之生殖系化

17c10之VH及VL域之胺基酸序列與VBASE資料庫中之已知人類生殖系序列比對，且藉由序列相似性鑑別最接近生殖系。對於VH域，此為IgVh4-34*01；對於VL域，其為IgKv1-5*03。對於17c10，生殖系化方法包括回復VH域中之1個構架殘基及VL域中之5個殘基。在VH域中，回復突變係在Kabat位置82a，其中蘇胺酸(T)回復為絲胺酸(S)。在VL域中，突變係在Kabat位置13、21、39、70及76，其中在Kabat位置13，蘇胺酸(T)回復為丙胺酸(A)；在Kabat位置21，白胺酸(L)回復為異白胺酸(I)；在Kabat位置39，天冬醯胺(N)回復為離胺酸(K)；在Kabat位置70，天冬胺酸(D)回復為麩胺酸(E)，且在Kabat位置76，蘇胺酸(T)回復為絲胺酸(S)。藉由合成VH及VL域與此等突變及使用限制消化及接合置換現有VH及VL而作出此等變化。生殖系化及初始(非生殖系化) 17c10均表示為IgG，且藉由流動式細胞測量術評估其與多個ASCT2表現細胞株之親和力。如圖9A至圖9D中所見，在生殖系化17c10或親體17c10與WiDr細胞，或與表現HuASCT2或CyASCT2之CHO細胞之結合中不存在差異。

實例5.各種癌症中藉由ASCT2-ADC之細胞毒性殺死

17c10抗體經由如上文所述之定點共軛位點與PBD (SG3315)或微管溶素(AZ1508)有效負載共軛。對於各資產，藥物-抗體比率(DAR)經估計為約2.0。使用來自各種適應症，諸如來自胰臟癌、結腸癌、肺癌、頭頸鱗癌(HNSCC)、前列腺癌及ASCT2陰性肺癌之癌細胞進行細胞毒性分析。如圖10A至圖10F中所示，共軛至AZ1508之17c10 ADC抗體比結合至微管溶素之對照抗體具有較高細胞毒性活性。共軛至SG3249或SG3315之抗ASCT2抗體17c10亦具有相比於結合至微管溶素AZ1508，或結合至PBD SG3249，或結合至SG3315之對照抗體較高的細胞毒性活性。顯示來自使用共軛至SG3249之17c10之細胞毒性分析之結果的圖示顯示於圖11A中，且顯示來自使用共軛至SG3315之17c10之細胞毒性分析之結果的圖示顯示於圖11B中。IC₅₀值概述於下表8中。

表8：

癌細胞增殖藉由ASCT2-ADC之抑制

適應症	細胞株	IC ₅₀ (ng/ml)		
		17c10-239i-AZ1508	17c10-239i-SG3315	17c10-239i-SG3249
Colon	SW48	3.5	0.2	0.1
Colon	HT29	2.5	2	1.8
Colon	WiDR	1.9	0.25	0.4
Colon	DLD1	17.1	11.5	10.3
Colon	HCT116	25.42	6.54	5.625
HNSCC	OE21	4.94	11.26	-
HNSCC	FADU	82.7	17.5	15.88
肺-SSC	H2170	4.1	3.7	3.5
肺-SCLC	H69	>1000	200	189.4
肺-SC	H2081	-	-	-
前列腺癌	22RV1	34.44	4.299	—
前列腺癌	DU145	408.4	568.7	—
前列腺癌	PC-3	13.43	21.94	—
胰臟癌	BXPC3	7.85	3.28	2.98
AML	HL60	47.41	—	9.796
AML	KG1	37.72	—	64.25

AML	MOLM-13	69.21	—	0.1001
AML	Mv4-11	75	—	0.0515
AML	Nomo-1	45	—	9.9
AML	TF-1A	5.57	—	0.17
伯基特氏癌	Raji	76.66	—	7.89
MM	H929	14.9	—	0.6966
MM	OPM-2	0.8	—	1.503

實例6.ASCT2-ADC抑制活體內腫瘤生長

所有活體內程序係根據AAALAC認可之設施中之機構指南進行且經醫學免疫有限責任公司機構動物護理及使用委員會(MedImmune, LLC Institutional Animal Care and Use Committee)批准。為了測試ASCT2-ADC抗體殺死腫瘤細胞之能力，WiDr (100 μ l/10⁶個細胞/小鼠)或原發性胰臟腫瘤(PDX)皮下接種至雌性3-5週齡裸小鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)之右側腹中。小鼠經飼養若干週以產生腫瘤；一旦腫瘤達到約150-200 mm³，小鼠經隨機分組且分配至處理組(10隻小鼠/組)。此後，小鼠經靜脈內注射不同劑量之抗ASCT2 ADC (17c10-Az1508或17c10-SG3315或17c10-SG3249)或同型對照藥物共軛之抗體。持續各別時段監測經處理異種移植小鼠之體重及腫瘤體積。使用下式計算腫瘤體積： $(最短直徑)^2 \times (最長直徑) \times 0.5$ ，且結果顯示於圖12A、圖12B及圖12C中。

另外，在表示表現改變水準之ASCT2的不同亞群之一組血液學惡性疾病模型中評估17c10-SG3249之活體內功效。ADC以0.4 mg/kg(或0.5 mg/kg)及0.1 mg/kg之劑量每週投與於播散腫瘤異種移植模型中，持續總共四個劑量。如圖13A及圖13B中所示，Kaplan-Meier曲線展示相比於未處理或同型ADC對照，17c10-SG3249群之存活益處顯著增加。在若干AML異種移植腫瘤模型中投與17c10-SG3249顯示相比於其他群(諸如SOC、未處理及同型對照ADC)之存活益處的實質性增加。在TF1a AML

模型中，17c10-SG3249展示相比於同型對照ADC(66天)之優良活性(中位存活期>205天)。類似地，17c10-SG3249在若干MM1.S多發性骨髓瘤(MM)模型中展示穩固腫瘤生長抑制及存活益處(中位存活期123.5天，相對於未處理對照之55.5天)。若干血液惡性病之17c10-SG3249結果概述於下表9中。

表9：血液中位存活期

模型	中位存活時間(天)						
	未處理	同型ADC	ASCT2-17C10-239i-SG3249				
			0.5mg/kg	0.4mg/kg	0.25mg/kg	0.1mg/kg	0.05mg/kg
TF1a	66	83	>205**		>205*	>205**	>205**
MM.1S	55.5	63		123.5***		117***	
RAJI	16	17*	49.5***			22***	19**
697	20.5	22	68***			46***	36***

來自未處理組之統計顯著性(對數秩(mantel-Cox)測試)-***=P<0.0001，**=P<0.001，*=P<0.01

實例7.化學部分共軛至抗ASCT2抗體以形成ADC

開發用於抗ASCT2 mAb之純化方法。簡言之，將收穫之細胞培養物流體提供至使用MAbSelect Sure樹脂(GE Healthcare)進行之蛋白A捕獲步驟以捕獲來自細胞培養物上清液之蛋白質，及移除方法及產物相關雜質。在300 cm/hr之線性流動速率下進行所有方法步驟。樹脂用50 mM Tris，pH 7.4平衡，且將條件培養基負載至管柱上以達到每公升樹脂30 g之負載挑戰。管柱用50 mM Tris，pH 7.4再平衡，且接著暴露於兩個經最佳化以減少雜質及減少存在於條件培養基中之過量輕鏈之洗滌步驟。第一洗滌步驟由50 mM Tris、500 mM氯化鈉，pH 7組成，且第二洗滌含有50 mM乙酸鈉、500 mM氯化鈉，pH 5.0。管柱接著用50 mM Tris，pH 7.4再平衡，且產物用25 mM乙酸鈉，pH 3.6溶離。自溶離峰之上升側上之0.5 OD至下降位點上之0.5 OD收集產物。在各純化循環之後，管柱用100 mM乙酸汽提，接著用50 mM Tris，pH 7.4再平衡，經0.1 N氫氧化鈉消

毒，且儲存在2% (v/v)苯甲醇、100 mM乙酸鈉，pH 5.0中。此步驟之典型產率為70-75%。

出於病毒不活化進行低pH處理。簡言之，藉由添加1 M乙酸將MAbSelect Sure產物調節至3.5之目標pH。在60分鐘之保持時間之後，溶液藉由添加1 M Tris中和至7.4之目標pH。產物隨後經過濾。

作為中間純化步驟，使用樹脂Capto Adhere樹脂(GE Healthcare)進行混合模式層析。以流通模式操作此管柱：管柱用50 mM Tris，pH 7.4平衡，且將中和之蛋白溶液負載至管柱上。雜質結合至樹脂，而產物回收於流通池中。典型步驟產率為80-84%。

使用陽離子交換樹脂HS 50 (POROS)進行拋光步驟。以結合溶離模式進行此步驟且用以進一步減少方法相關雜質。管柱用50 mM Tris，pH 7.4平衡，且將來自混合模式層析步驟之產物負載至管柱上。管柱隨後用50 mM Tris，pH 7.4，接著用50 mM Tris、150 mM氯化鈉，pH 7.4洗滌，且接著用50 mM Tris、400 mM氯化鈉，pH 7.4溶離。自溶離峰之上升側上之0.5 OD至下降側上之0.5 OD收集產物。在各純化循環之後，管柱使用50 mM Tris、500 mM氯化鈉，pH 7.4汽提，經1 N氫氧化鈉消毒，且儲存在0.1 N NaOH中。此步驟之典型產率為95-98%。

使用具有30 kDa分子量截止(MWCO)之Pellicon 3 Ultracel膜濃縮純化之mAb中間物且藉由透濾傳遞至調配物緩衝液(20 mM組胺酸，240 mM蔗糖，pH 6.0)中。最終蛋白質濃度為約20 mg/ml。必要時，蛋白質冷凍儲存於-80℃下直至共軛。下表10概括單株抗體純化方法期間之產物品質。

表10

經抗ASCT2抗體下游方法之方法純度

方法步驟	藉由HP SEC之單體純度	HCP (ng/mg)	DNA (ng/mg)
MAb Select Sure	98.0 %	2698	0.14
Capto Adhere	99.0%	45	0.0004
HS50	99.2 %	27	0.002

抗ASCT2抗體與微管溶素AZ1508之共軛

藉由微管溶素(AZ1508)經由順丁烯二醯亞胺化學反應定點共軛至兩個游離的工程改造半胱胺酸殘基而製備抗體-藥物共軛物。

將純化mAb中間物解凍，且藉由添加1 M Tris 鹼將pH調節至pH 7.0。用20 mM組胺酸緩衝液，pH 7.0將蛋白溶液稀釋至7.5 mg/ml之最終濃度，且添加EDTA以達到1 mM之最終濃度。將蛋白質傳遞至適合反應容器，且將溫度調節至37℃。還原劑參(2-羧乙基)膦(TCEP)以TCEP:mAb=30:1之莫耳比自新製備的50 mM儲備溶液添加。溶液在輕度攪拌下在37℃下培育3小時。在此培育時間之後，藉由相對於20 mM組胺酸/1 mM EDTA緩衝液，pH 7.0之透析或透濾移除還原劑。經由0.22 μm 過濾器過濾回收產物。對於氧化，蛋白溶液與去氫抗壞血酸(DHA)在10:1(DHA:mAb)之莫耳比下一起培育。在22-25℃下在輕度攪拌下(在50 rpm混合速度下)進行培育4小時。此後，自含10 mM儲備溶液之DMSO以8:1有效負載:mAb之莫耳比添加微管溶素有效負載(AZ1508)。逐滴添加額外DMSO以達到10% (v/v)之最終濃度。在22-25℃下在輕度攪拌下培育混合物1小時以允許形成抗體-藥物共軛物。接著藉由以5:1之NAC:微管溶素之莫耳比自100 mM儲備溶液添加N-乙醯半胱胺酸(NAC)而淬滅反應。

為了移除蛋白質片段聚集體及過量游離微管溶素有效負載，使用I型陶瓷經磷灰石(HT)(Biorad)進行共軛後純化。管柱以結合-溶離模式在180 cm/hr之線性流動速率下操作。向淬滅之抗體-藥物共軛物混合物中添

加磷酸鈉以達到10 mM之最終濃度(來自300 mM儲備溶液)。CHT管柱用300 mM磷酸鈉，pH 6.5預平衡，且用10 mM磷酸鈉，pH 6.5平衡。將抗體-藥物共軛物混合物負載至20 g/L之負載挑戰，且管柱用10 mM磷酸鈉，pH 6.5再平衡。在線性梯度下經10管柱體積對於含1 M氯化鈉之10 mM磷酸鈉，pH 6.5進行溶離。溶離峰經分餾，且餾份藉由HP SEC分析。彙集含有單體純度>95%之共軛蛋白質的餾份。在各純化循環之後，管柱用300 mM磷酸鈉，pH 6.5汽提，經1 N氫氧化鈉消毒，且儲存在0.1 N氫氧化鈉中。

彙集之抗體藥物共軛物(ADC)經濃縮且藉由使用具有30 kDa MWCO之再生纖維素或PES膜之切向流過濾交換至最終調配物緩衝液中。賦形劑PS80自10%儲備溶液外加。最終ADC濃度為20 mM組胺酸、240 mM蔗糖、0.02% PS80，pH 6.0中之5 mg/ml。在此等條件下，產生之ADC顯示<12%非共軛重鏈、75至82%單共軛重鏈及1.8-1.9之藥物與抗體比率。

抗ASCT2抗體與吡咯并苯并二氮呋(PBD) SG3249之共軛

藉由PBD (SG3249)與兩個游離的工程改造半胱胺酸殘基經由順丁烯二醯亞胺化學反應之定點共軛製備抗體-藥物共軛物。製程步驟與關於上文概述之微管溶素共軛所論述相同，但精確的條件不同。

將純化mAb中間物解凍，且藉由添加1 M Tris 鹼將pH調節至pH 7.0。PBD共軛物之還原、氧化及共軛步驟在20 mg/ml之蛋白質濃度下在20 mM組胺酸、1 mM EDTA，pH 7.0中進行。將蛋白質傳遞至適合反應容器，且將溫度調節至37°C。還原劑二硫蘇糖醇(DTT)自新製備的50 mM儲備溶液以DTT:mAb=30:1之莫耳比添加。溶液在輕度攪拌下在37°C下培育1小時。在此培育時間之後，藉由相對於20 mM組胺酸/1 mM EDTA緩

衝液，pH 7.0之透析或透濾移除還原劑。經由0.22 μm 過濾器過濾回收產物。對於氧化，蛋白溶液與去氫抗壞血酸(DHA)在10:1(DHA:mAb)之莫耳比下一起培育。在22-25 $^{\circ}\text{C}$ 下在輕度攪拌下(在50 rpm混合速度下)進行培育1小時。此後，PBD有效負載(SG3249)自含10 mM儲備溶液之DMSO以8.5:1之有效負載:mAb之莫耳比添加。不想此反應添加額外DMSO，由DHA及有效負載添加所致之有效DMSO濃度為約11.4%。在22-25 $^{\circ}\text{C}$ 下在輕度攪拌下培育混合物1小時以允許形成抗體-藥物共軛物。接著藉由以4:1之NAC:PBD之莫耳比自100 mM儲備溶液添加N-乙醯半胱胺酸(NAC)而淬滅反應。

為了移除蛋白質片段聚集體及過量游離PBD有效負載，使用I型陶瓷經磷灰石(HT)(BioRad)進行共軛後純化。管柱以結合-溶離模式在180 cm/hr之線性流動速率下操作。淬滅抗體-藥物反應混合物之pH藉由添加1 M Tris鹼調節至pH 7.0。HT管柱用300 mM磷酸鈉，pH 6.5預平衡，且用10 mM磷酸鈉，pH 6.5平衡。抗體-藥物共軛物混合物負載至20 g/L之負載挑戰，且管柱用10 mM磷酸鈉，pH 6.5再平衡。結合蛋白質接著用10 mM磷酸鈉、25 mM辛酸鈉，pH 6.5洗滌以移除過量游離藥物，接著用10 mM磷酸鈉，pH 6.5再平衡。經10管柱體積在含0.3至1 M氯化鈉之10 mM磷酸鈉，pH 6.5之線性梯度下進行溶離。溶離峰經分餾，且所有餾份藉由HP SEC分析。彙集含有單體純度>95%之共軛蛋白質的餾份。在各純化循環之後，管柱用2 M氯化鈉汽提，經1 N氫氧化鈉消毒，且儲存在0.1 N氫氧化鈉中。

ADC經濃縮且藉由使用具有30 kDa MWCO之再生纖維素或PES膜之切向流過濾交換至最終調配物緩衝液中。賦形劑PS80自10%儲備溶液外

加。最終ADC濃度為20 mM組胺酸、240 mM蔗糖、0.02% PS80，pH 6.0
中之5 mg/ml。

胺基酸序列：

原始17c10 VH；SEQ ID NO: 1

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIIHSGGAN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARGQGKNWHYDYFDYWGGQT
LVTVSSA

原始17c10 VL；SEQ ID NO: 2

DIQMTQSPSTLSTSVGDRVTLTCRASQSIRSWLAWYQQNPGKAPKLLIYKASILKIGVPS
RFSGSGSGTDFTLTITSLQPDDFATYYCQQYYYSRFTFGQGTKVEIK

原始1e8 VH；SEQ ID NO: 3

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIPQPPGKGVEWIGEINHSGSTN
YNPSLKSRVTISSDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCARGQGKNWNYDYFDYWGGQT
LVTVSSA

原始1e8 VL；SEQ ID NO: 4

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTLTCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLKSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYSFRTFGQGTKVEIK

生殖系化17c10 VH；SEQ ID NO: 5

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIIHSGGAN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGQGKNWHYDYFDYWGGQT
LVTVSSA

生殖系化17c10 VL；SEQ ID NO: 6

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASILKIGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYYSRFTFGQGTKVEIK

生殖系化1e8 VH；SEQ ID NO: 7

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIIHSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGQGKNWNYDYFDYWGGQT
LVTVSSA

生殖系化1e8 VL；SEQ ID NO: 8

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLKSGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYSFRTFGQGTKVEIK

Maia重鏈主鏈(半胱胺酸插入加框及粗體)；SEQ ID NO: 9

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
S**[C]**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

17c10生殖系化HCDR1 (Kabat編號) SEQ ID NO: 10

GYYSWS

17c10生殖系化HCDR2 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 11

EIHHS GGANYNPSLKS

17c10生殖系化HCDR3 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 12

GQGKNWHYDYFDY

17c10生殖系化LCDR1 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 13

RASQSIRSWLA

17c10生殖系化LCDR2 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 14

KASILKI

17c10生殖系化LCDR3 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 15

QYYYSRT

1e8生殖系化HCDR1 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 16

GYYSWS

1e8生殖系化HCDR2 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 17

EIHHS GSTNYPNPSLKS

1e8生殖系化HCDR3 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 18

GQGKNWNYDYFDY

1e8生殖系化LCDR1 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 19

RASQSIRSWLA

1e8生殖系化LCDR2 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 20

KASSLKS

1e8生殖系化LCDR3 (Kabat編號) ; SEQ ID NO: 21

QQYYSFSRT

共同HCDR2；SEQ ID NO: 22

EIHHSGX1X2NYNPSLKS；其中X1為S或G，且X2為A或T

共同HCDR3；SEQ ID NO: 23

GQGKNWX1YDYFDY；其中X1為H或N

共同LCDR2；SEQ ID NO: 24

KASX1LKX2；其中X1為I或S且X2為I或S

共同LCDR3；SEQ ID NO: 25

QQYYSX1SRT；其中X1為Y或F

人類κ輕鏈；SEQ ID NO: 26

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

對特定實施例之前述說明將因此充分地揭露本發明之一般性質：在不脫離本發明之一般概念的情況下，其他人可藉由應用此項技術之技能範圍內之知識、根據各種應用而容易修改及/或調適此等特定實施例，而無需進行不當實驗。因此，基於本文中所呈現之教示及導引，此等調適及修改意欲在所揭示之實施例之等效者的涵義及範圍內。應理解，本文中之措辭或術語係出於描述而非限制之目的，使得本說明書之術語或措辭待由熟習此項技術者按照該等教示及該指導進行解譯。本發明藉由以下申請專利範圍進一步描述。

【補充序列表】

<110> 美商麥迪紐有限責任公司

<120> 對ASCT2具專一性之結合分子及其用途

<130> ASCT2-100-TW-NP

<140> TW 105136601

<141> 2016-11-10

<150> 62/253,774

<151> 2015-11-11

<150> 62/253,371

<151> 2015-11-10

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 1

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

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

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

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

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

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 2

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg
85 90 95

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

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 3

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Pro Gln Pro Pro Gly Lys Gly Val Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Ser Arg
85 90 95

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

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

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

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

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 6
Asp Ile Gln 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 Gln Ser Ile Arg Ser Trp
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg
85 90 95

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

<210> 7
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 7

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

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

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

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 8

Asp Ile Gln 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 Gln Ser Ile Arg Ser Trp
20 25 30

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Ser Arg
85 90 95

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

<210> 9
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 9
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
1 5 10 15

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
35 40 45

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 10
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 11
Glu Ile His His Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 12
Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 13
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 14
Lys Ala Ser Ile Leu Lys Ile
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 15
Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg Thr
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 16
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 17
<211> 16
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 17

Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 18

Gly Gln Gly Lys Asn Trp Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 20

Lys Ala Ser Ser Leu Lys Ser
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 21

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Ser Arg Thr
1 5

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser或Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Ala或Thr

<400> 22
 Glu Ile His His Ser Gly Xaa Xaa Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> His或Asn

<400> 23
 Gly Gln Gly Lys Asn Trp Xaa Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ile或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ile或Ser

<400> 24
 Lys Ala Ser Xaa Leu Lys Xaa

1

5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Tyr或Phe

<400> 25
Gln Gln Tyr Tyr Ser Xaa Ser Arg Thr
1 5

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26
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> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成6×His標籤

<400> 27

His His His His His His
1 5

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種抗體或其抗原結合片段，其專一性結合於中性胺基酸轉運體2 (ASCT2)之抗原決定基，其中該抗體或抗原結合片段包含重鏈可變區(VH)之三個重鏈互補決定區(HCDR)及輕鏈可變區(VL)之三個輕鏈互補決定區(LCDR)，其中該抗體或其抗原結合片段包含SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 16之胺基酸序列之HCDR1、SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 17之胺基酸序列之HCDR2、SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 18之胺基酸序列之HCDR3、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之LCDR1、SEQ ID NO: 14或SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之LCDR2及SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之LCDR3。

【第2項】

如請求項1之抗體或抗原結合片段，其中該VH包含選自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，且其中該VL包含選自SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列。

【第3項】

如請求項2之抗體或抗原結合片段，其中該VH包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列且該VL包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列。

【第4項】

如請求項2之抗體或抗原結合片段，其中該VH包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7且該VL包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含在位置239之絲胺酸(S)與位置240之纈胺酸(V)之間包含半胱胺酸(C)插入之IgG恆定區。

【第6項】

如請求項5之抗體或抗原結合片段，其中該抗體包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列之重鏈。

【第7項】

如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中在該抗體結合至細胞表面上之ASCT2時，該抗體內化至該細胞中。

【第8項】

如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其包含選自由人類 κ 恆定區及人類 λ 恆定區組成之群的輕鏈恆定區。

【第9項】

如請求項9之抗體或抗原結合片段，其中該抗體包含SEQ ID NO: 26之人類 κ 恆定區。

【第10項】

如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其進一步共軛至選自由以下組成之群的細胞毒素：抗微生物劑、治療劑、前藥、肽、蛋白質、酶、脂質、生物反應調節劑、藥劑、淋巴激素、異源抗體、異源抗體片段、可偵測標記、聚乙二醇(PEG)、放射性同位素，及任何該等細胞毒素中之兩者或大於兩者之組合。

【第11項】

如請求項10之抗體或抗原結合片段，其共軛至細胞毒素。

【第12項】

如請求項11之抗體或抗原結合片段，其中該細胞毒素選自微管溶素衍生物(tubulysin derivative)及吡咯并苯并二氮呋。

【第13項】

如請求項12之抗體或抗原結合片段，其中該微管溶素衍生物為微管溶素AZ1508。

【第14項】

如請求項12之抗體或抗原結合片段，其中該吡咯并苯并二氮呋選自SG3315及SG3249。

【第15項】

如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體結合至人類ASCT2及食蟹獼猴(cynomolgus monkey) ASCT2。

【第16項】

如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體不專一性結合於人類ASCT1。

【第17項】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至16中任一項之抗體或抗原結合片段及醫藥學上可接受之載劑。

【第18項】

一種聚核苷酸或聚核苷酸組合，其編碼如請求項1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【第19項】

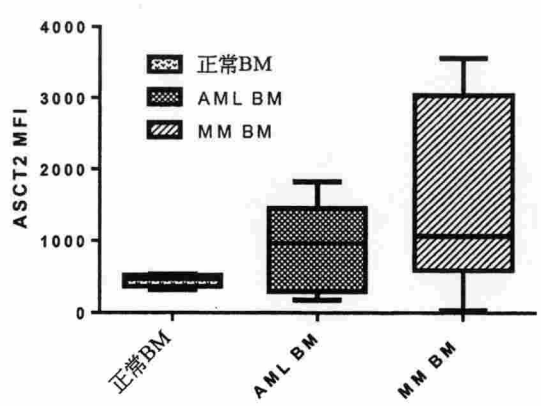
一種製造如請求項1至16中任一項之抗體或其抗原結合片段之方法，

其包含培養包含如請求項18之聚核苷酸的宿主。

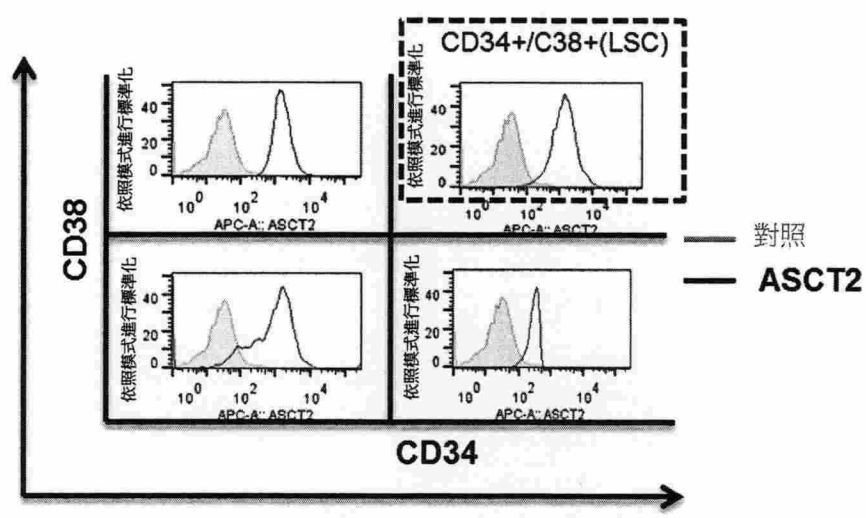
【第20項】

一種如請求項1至16中任一項之抗體或抗原結合片段或如請求項17之醫藥組合物之用途，其用於製造供治療ASCT2過度表現表徵的癌症之藥物。

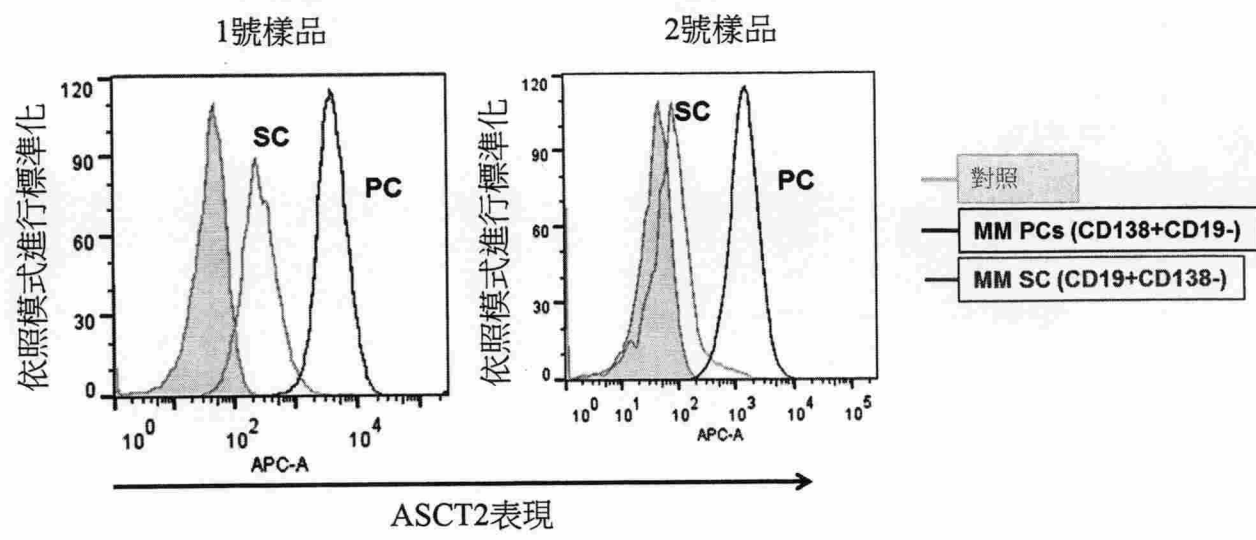
【發明圖式】



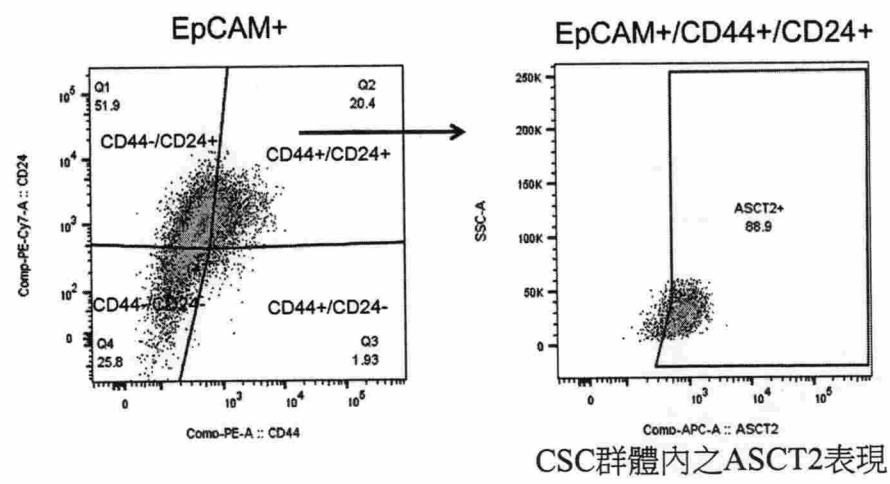
【圖1A】



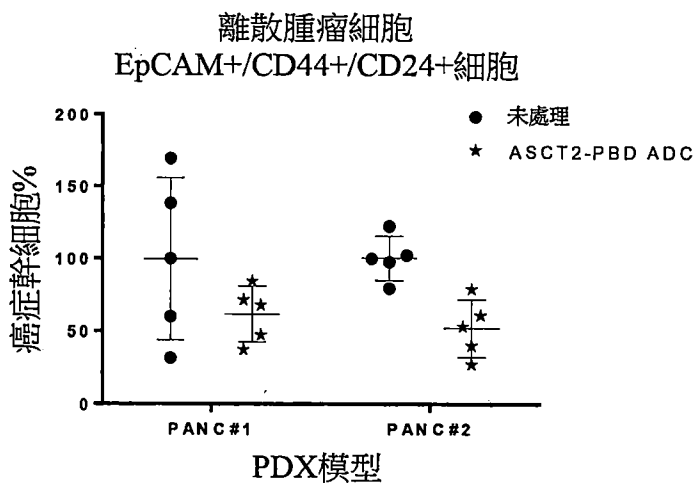
【圖1B】



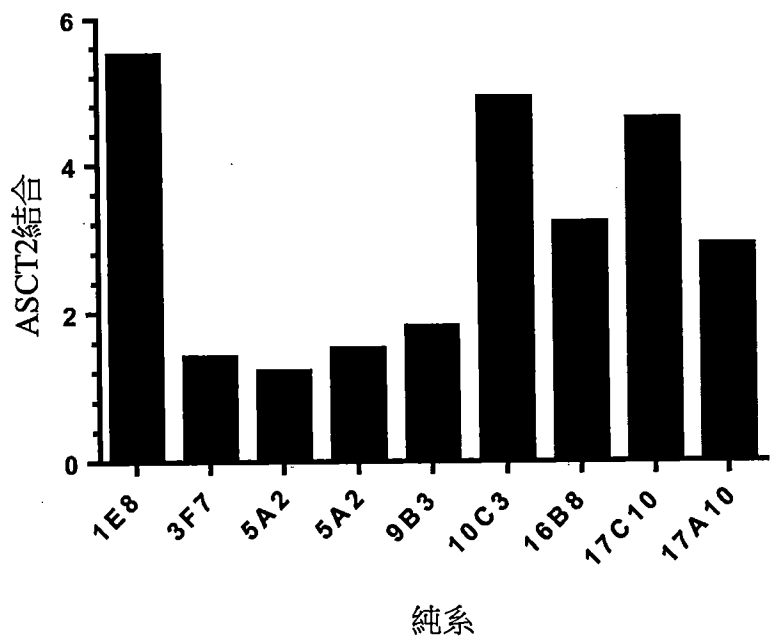
【圖1C】



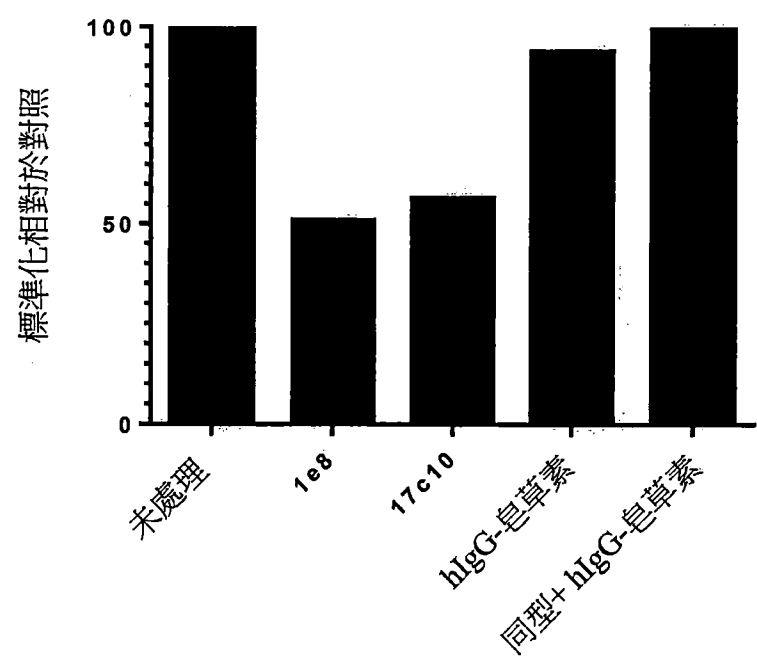
【圖1D】



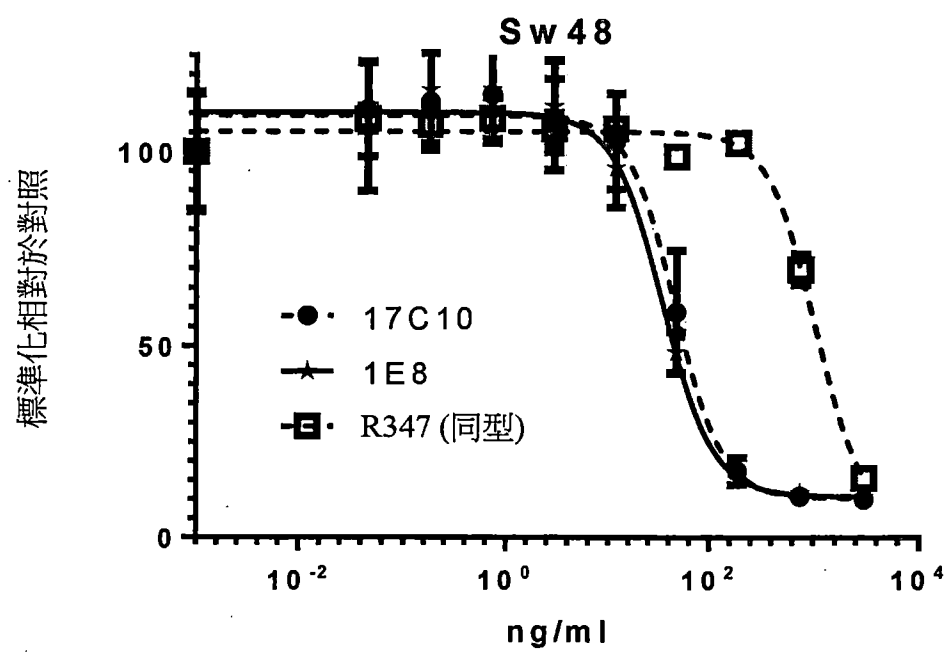
【圖1E】



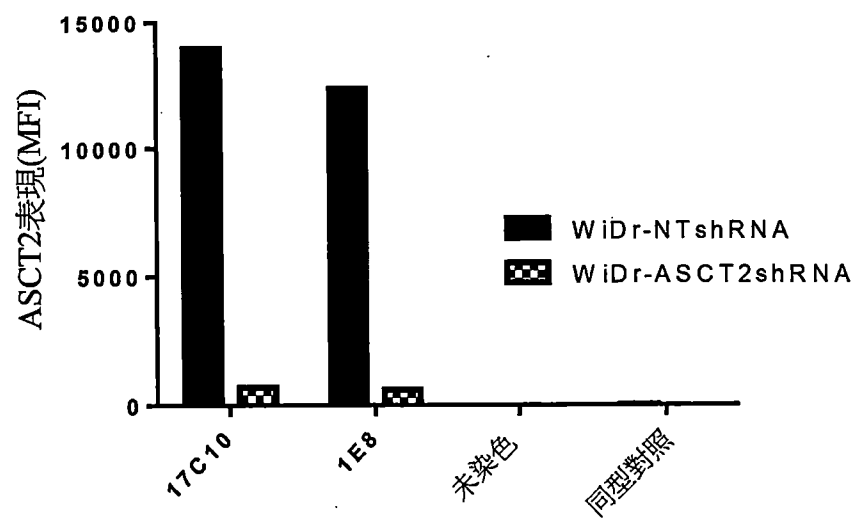
【圖2】



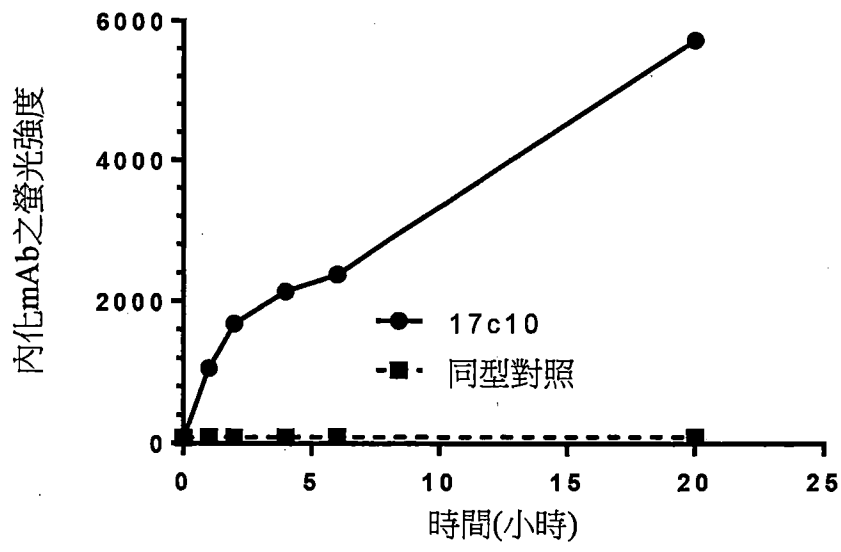
【圖3A】



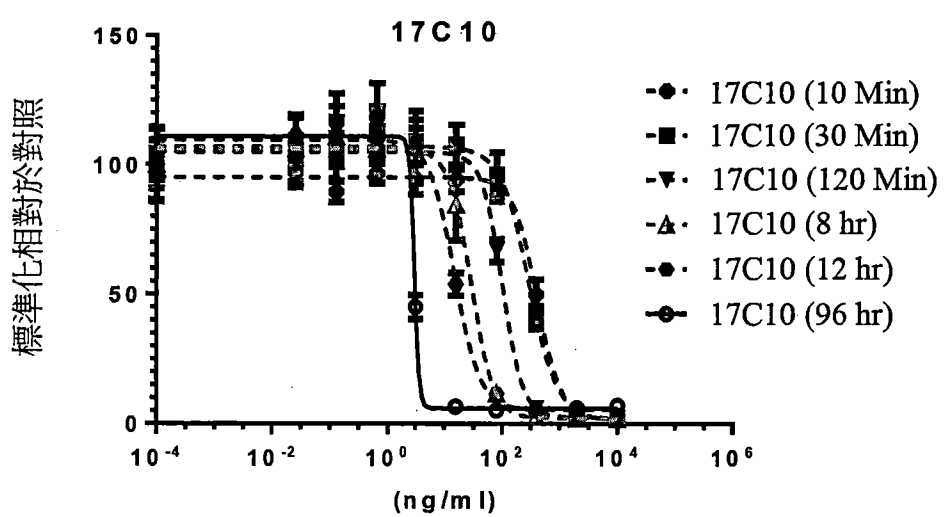
【圖3B】



【圖4】

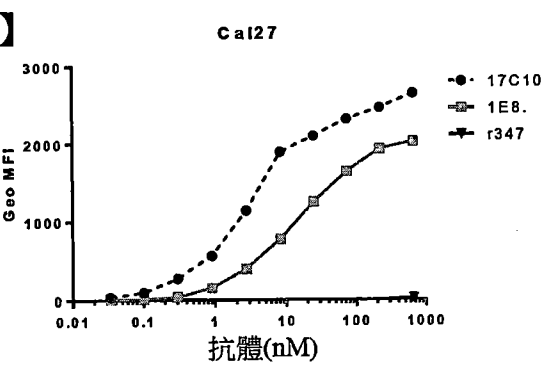


【圖5A】

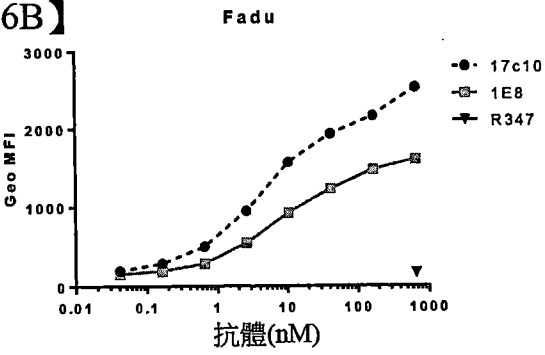


【圖5B】

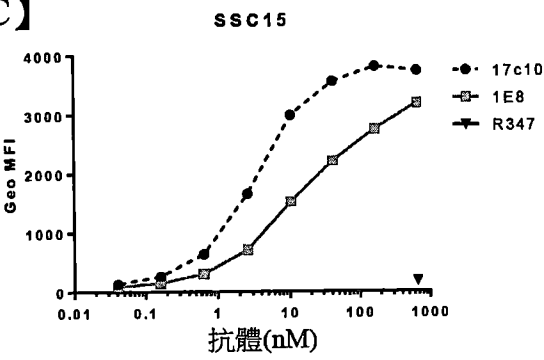
【圖6A】



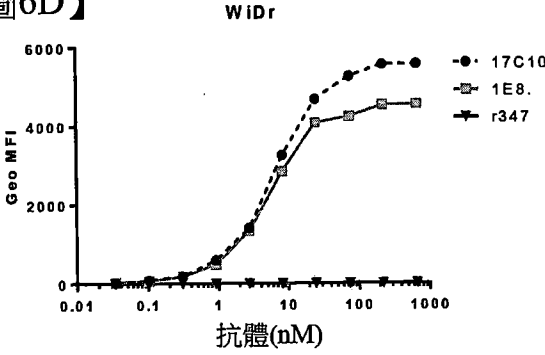
【圖6B】



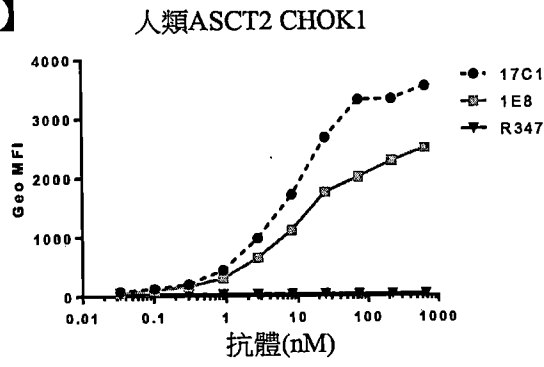
【圖6C】



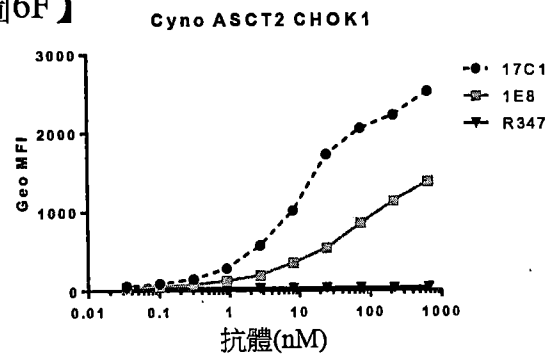
【圖6D】



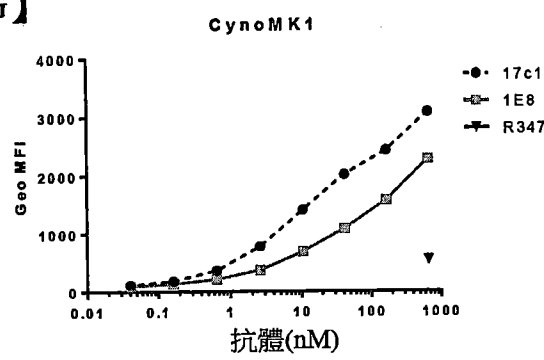
【圖6E】



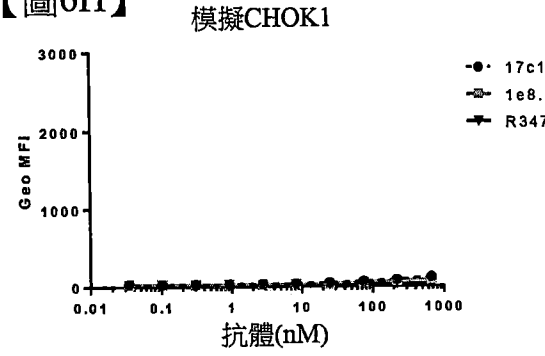
【圖6F】

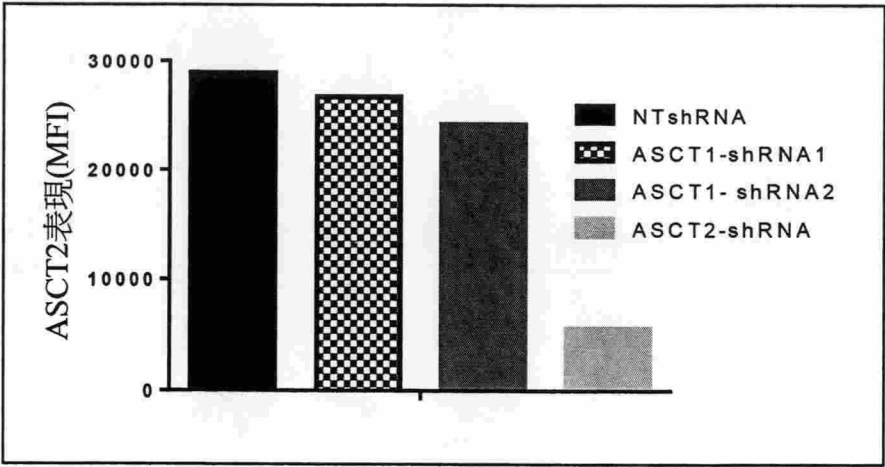


【圖6G】

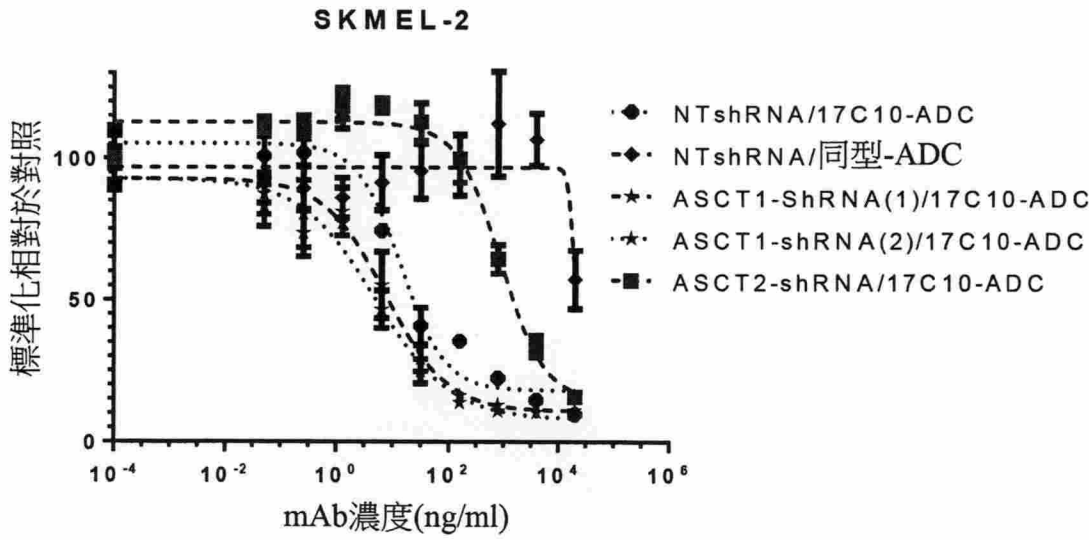


【圖6H】

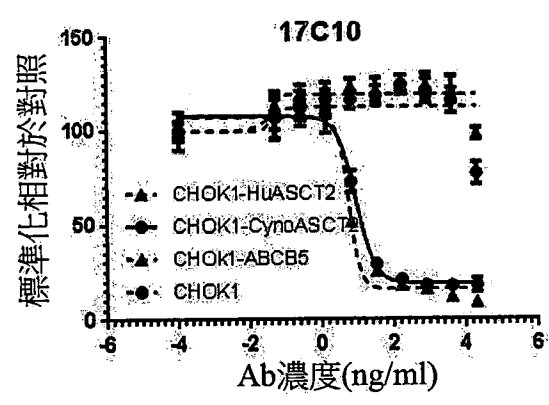




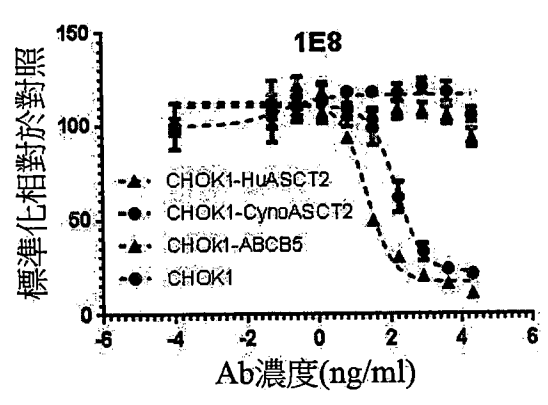
【圖7A】



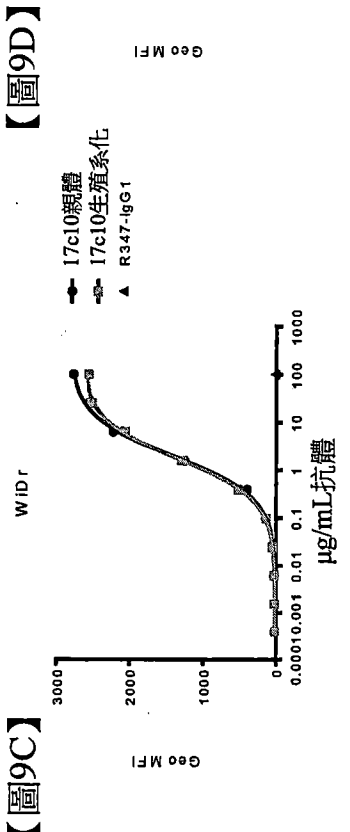
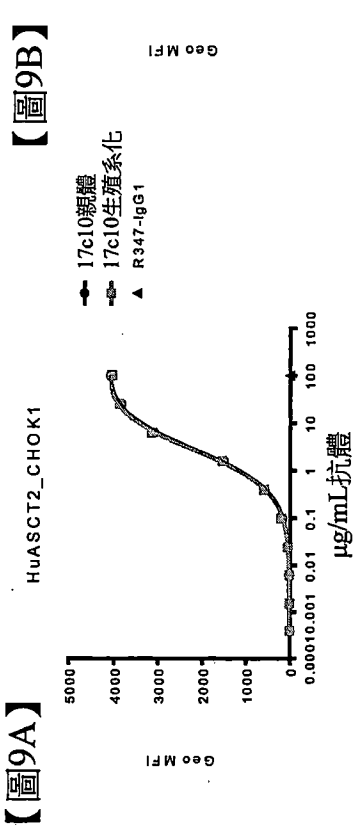
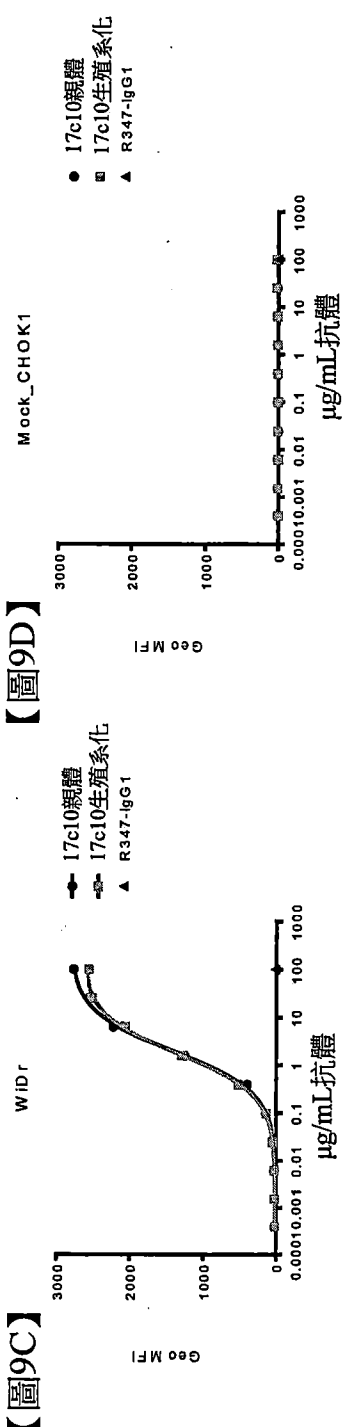
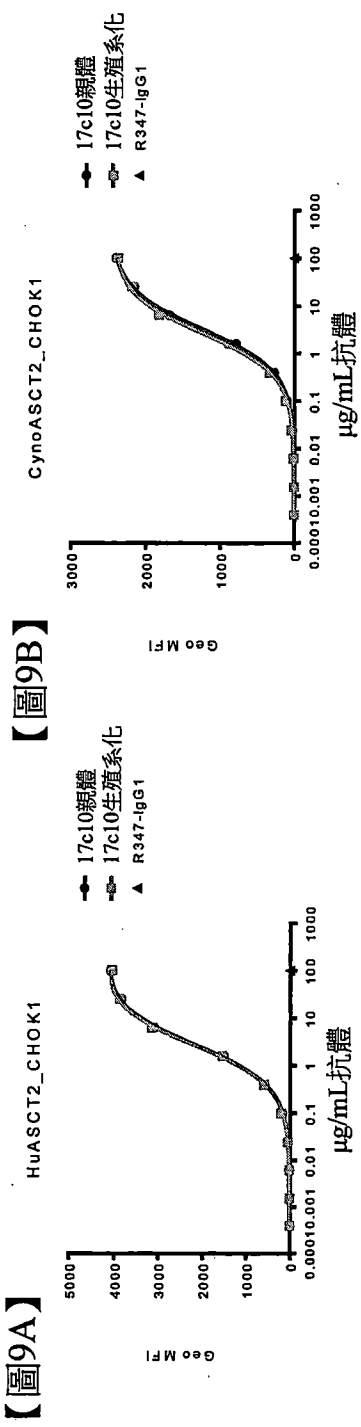
【圖7B】



【圖8A】

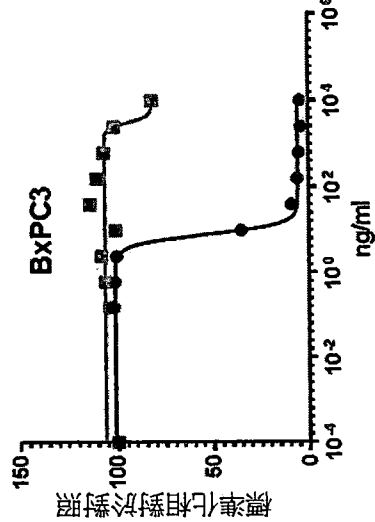


【圖8B】



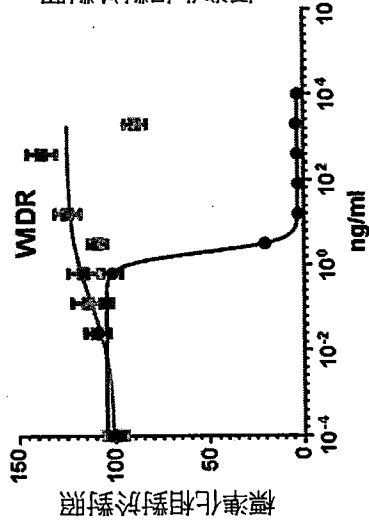
【圖10A】

胰臟癌



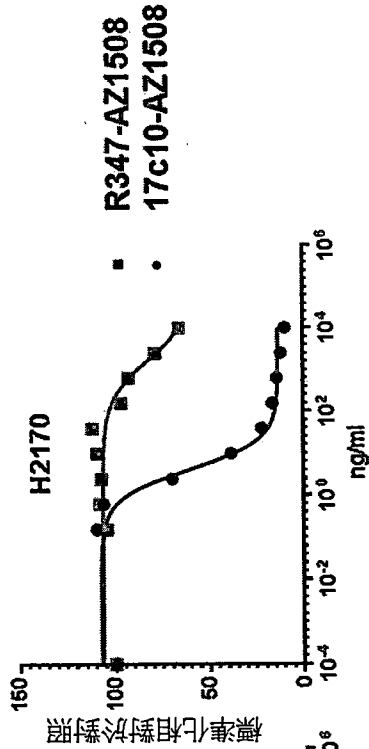
【圖10B】

結腸癌



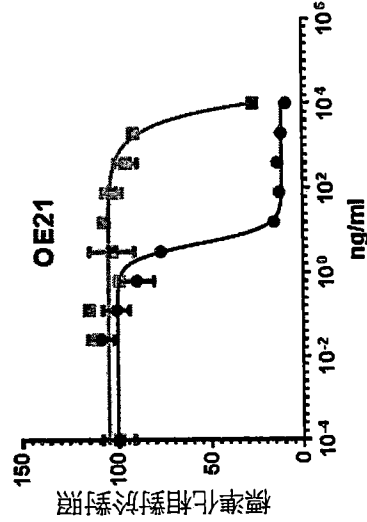
【圖10C】

肺癌



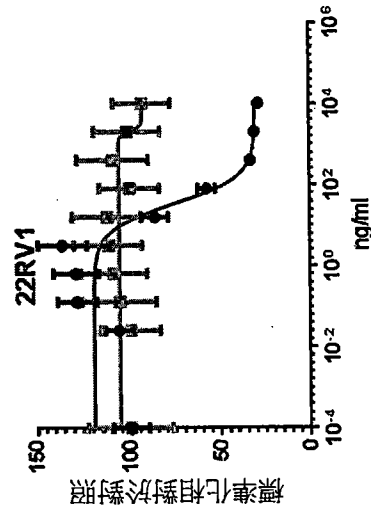
【圖10D】

HNSCC



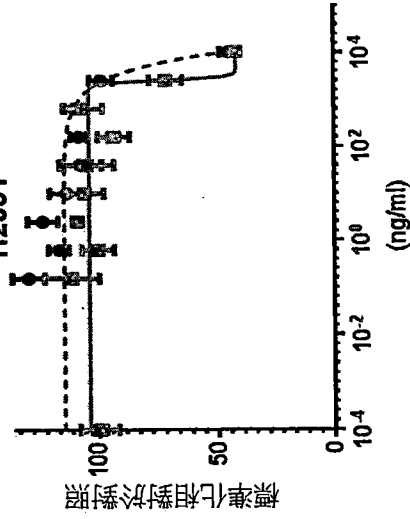
【圖10E】

前列腺癌

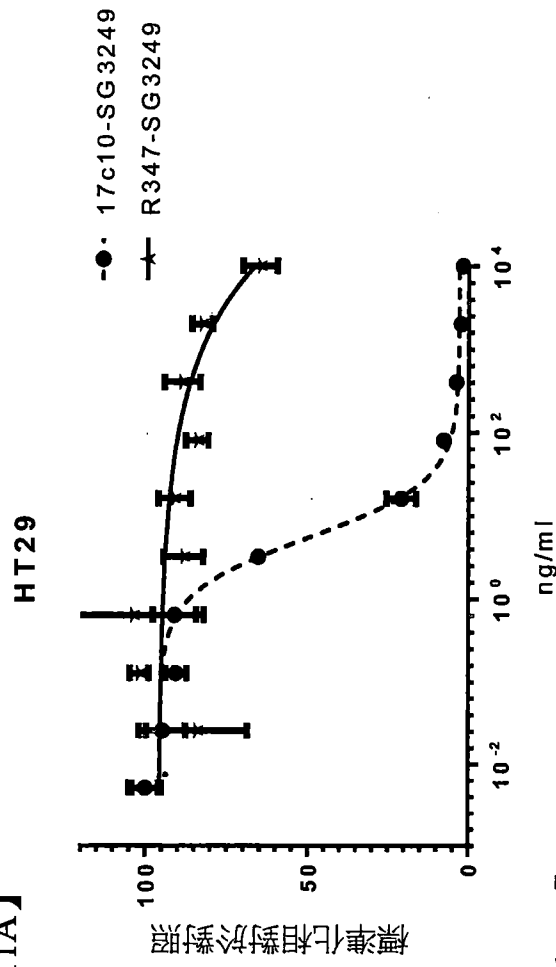


【圖10F】

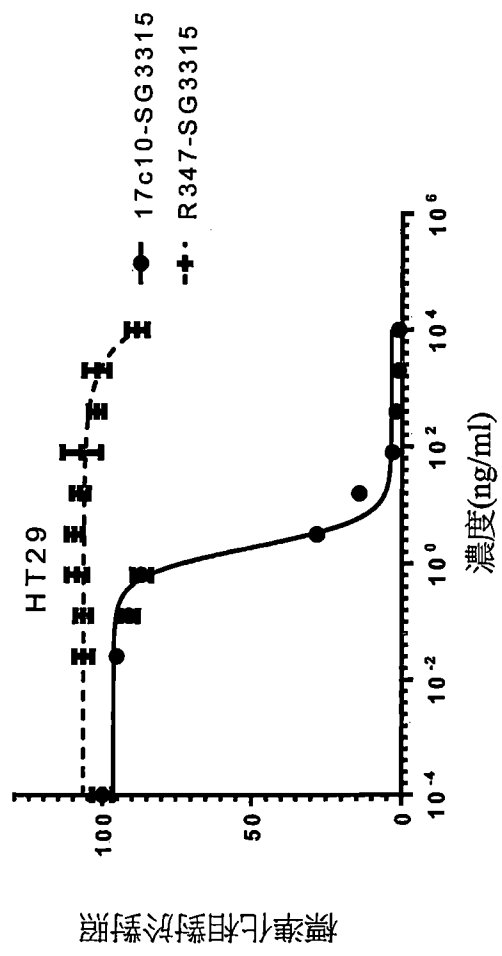
SCT2 (-)細胞株(肺)

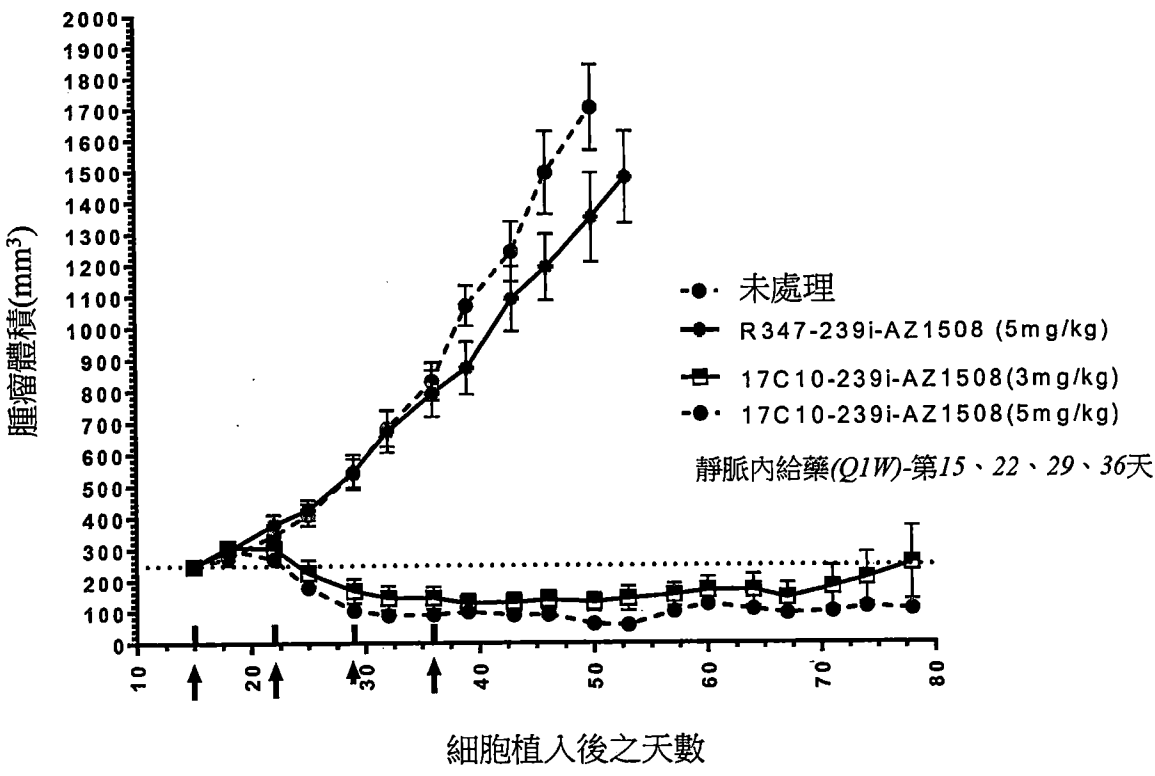


【圖11A】

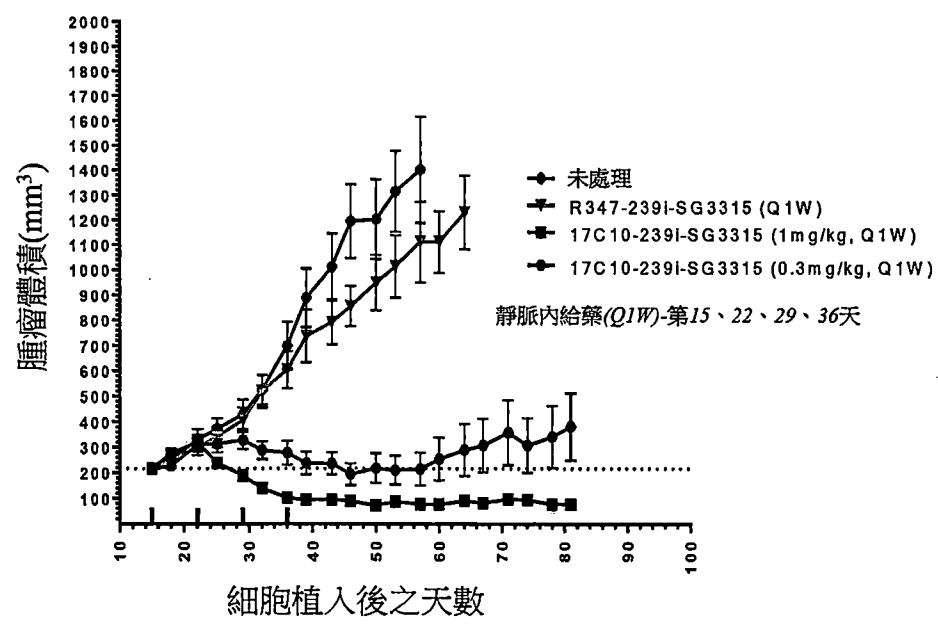


【圖11B】

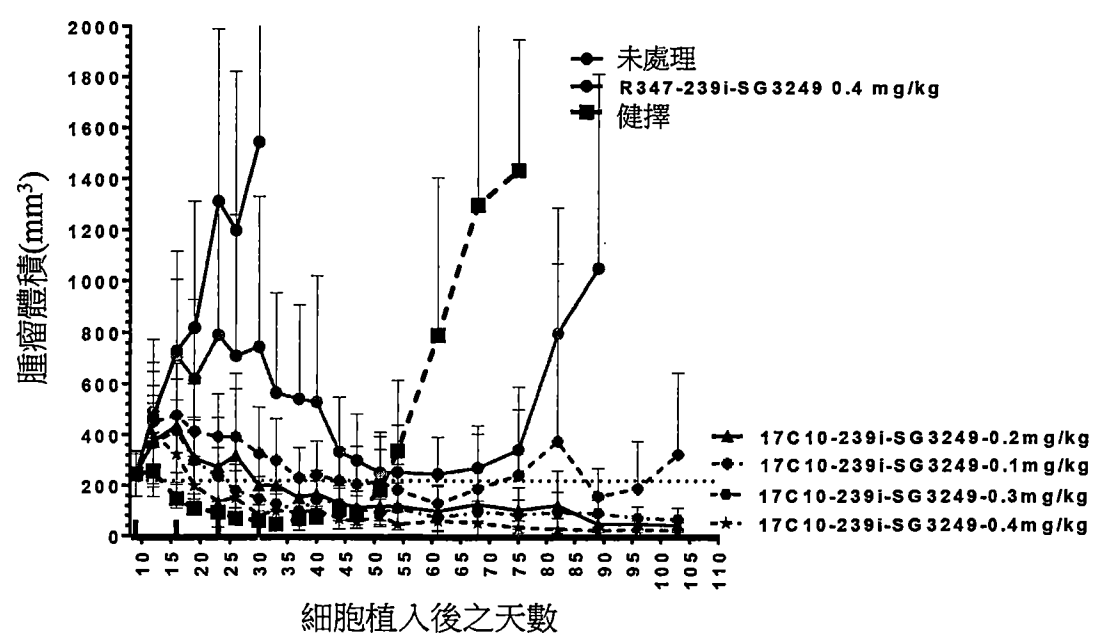




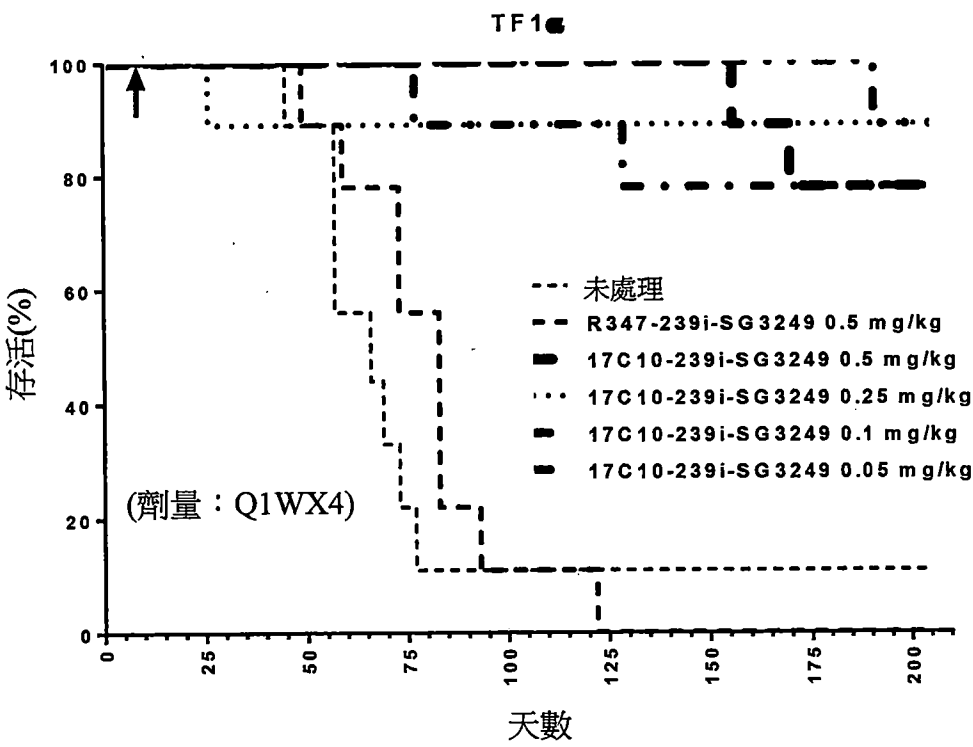
【圖12A】



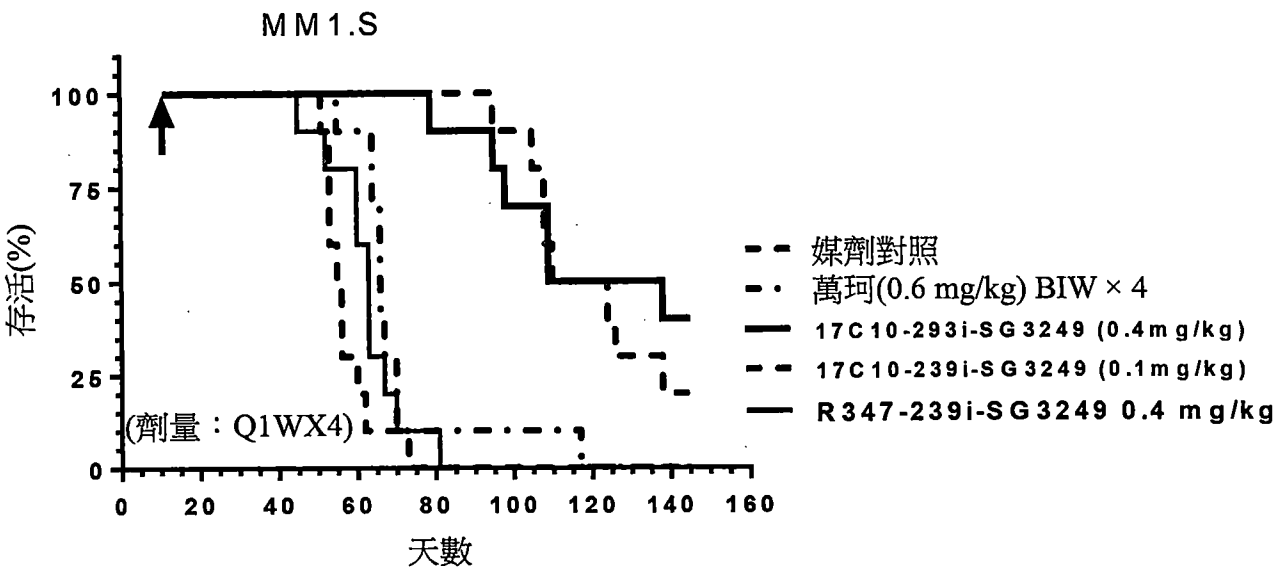
【圖12B】



【圖12C】



【圖13A】



【圖13B】