I872044

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I872044 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：109103363 (22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 02 月 04 日

(51)Int. Cl.： ***C07K16/18 (2006.01)*** ***C07K16/28 (2006.01)***
A61K39/395 (2006.01) ***A61K47/68 (2017.01)***
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/05 美國 62/801,590
2019/03/27 美國 62/824,923
2019/07/29 美國 62/879,660
2019/08/02 美國 62/882,016
2019/11/12 美國 62/934,424

(71)申請人：美商思進公司 (美國) SEAGEN INC. (US)
美國

(72)發明人：桑德爾 沙斯蒂 SANDALL, SHARSTI (US)；威斯坦朵夫 洛里 WESTENDORF, LORI (US)；路易斯 提摩太 LEWIS, TIMOTHY (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 107530422A WO 2004/050867A1

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：68 項 圖式數：36 共 213 頁

(54)名稱

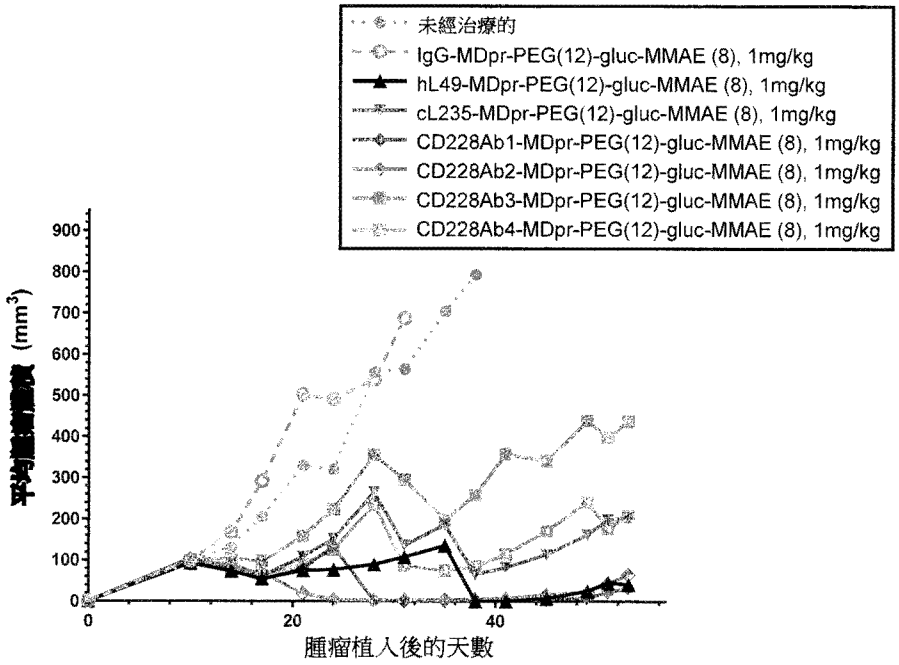
抗ＣＤ２２８抗體及抗體－藥物共軛體

(57)摘要

所提供者為新穎之抗 CD228 抗體和抗體-藥物共軛體，以及使用該等抗 CD228 抗體和抗體-藥物共軛體以治療癌症之方法。

Provided are novel anti-CD228 antibodies and antibody-drug conjugates and methods of using such anti-CD228 antibodies and antibody-drug conjugates to treat cancer.

指定代表圖：


未經治療的
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
cL235-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab1-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab2-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab3-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab4-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
腫瘤植入後的天數

【第 30A 圖】

I872044

公告本

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗CD228抗體及抗體－藥物共軛體

【英文發明名稱】

ANTI-CD228 ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

【中文】

所提供者為新穎之抗CD228抗體和抗體-藥物共軛體，以及使用該等抗CD228抗體和抗體-藥物共軛體以治療癌症之方法。

【英文】

Provided are novel anti-CD228 antibodies and antibody-drug conjugates and methods of using such anti-CD228 antibodies and antibody-drug conjugates to treat cancer.

【指定代表圖】第(30A)圖。
【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗ＣＤ２２８抗體及抗體－藥物共軛體

【英文發明名稱】

ANTI-CD228 ANTIBODIES AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

【技術領域】

相關申請案之交叉參考資料

【0001】本申請案主張下列美國臨時申請案之優先權：2019年2月5日提交之62/801,590、2019年3月27日提交之62/824,923、2019年7月29日提交之62/879,660、2019年8月2日提交之62/882016和2019年11月12日提交之62/934,424，這些申請案之全部內容以引用方式併入本文。

ASCII文本文件上提交序列表

【0002】在ASCII文本文件上提交之下列全部內容以引用方式併入本文：該序列表之電腦可讀取形式(CRF)(檔案名：761682001340SEQLIST.TXT，記錄之日期：2020年1月21日，大小：28 KB)。

【0003】本發明關於新型抗CD228抗體和抗體-藥物共軛體，以及使用該等抗CD228抗體和抗體-藥物共軛體以治療癌症之方法。

【先前技術】

【0004】CD228(亦稱為黑色素轉鐵蛋白(melanotransferrin)、MELTF、p97和MF12)為糖基磷脂醯肌醇錨定之糖蛋白且最先被鑑定為大小為97 kDa之惡性黑色素瘤細胞的細胞表面標記。CD228在大部分臨床黑色素瘤分離株中過度表現，且亦可在許多人類癌瘤中觀察到。現已證明，CD228表現在多種癌症中。CD228屬於鐵結合蛋白之轉鐵蛋白家族。

【0005】黑色素瘤(亦稱為惡性黑色素瘤)為從黑色素細胞發展而來之癌症類型，該黑色素細胞為一種含色素之細胞。黑色素瘤為最危險的皮膚癌類型。2015年中有310萬人患有活躍性疾病(active disease)和黑色素瘤，導致59,800人死亡。手術對於早期黑色素瘤可能有效，但可能不是已轉移到遠處器官之疾病的治療選擇。擴散之黑色素瘤通常會先擴散到該區域中之淋巴結，然後再擴散到其他地方。藉由手術切除淋巴結來改善生存狀況的嘗試與許多併發症有關，但無整體生存益處。免疫療法、化療和放射療法均已使用，但時常無法治愈，特別是在晚期黑色素瘤方面。當有遠處轉移時，該癌症通常被認為是無法治癒的。第IV期疾病之五年存活率為15至20%。因此，有需要改善用於黑色素瘤之治療方法。

【0006】本文所引用之所有參考文獻，包括專利申請案、專利公開和科學文獻之全部內容均以引用方式併入本

文，如同各個別參考文獻被具體且單獨地指明以引用方式併入本文。

【發明內容】

【0007】本文提供經分離之抗CD228抗體或其抗原結合片段，該抗CD228抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：

(i)包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的CDR-H1；

(ii)包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的CDR-H2；和

(iii)包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的CDR-H3；且

其中該輕鏈可變區包含：

(i)包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的CDR-L1；

(ii)包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR-L2；和

(iii)包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的CDR-L3。於一些實施態樣中，該抗體為人化的。

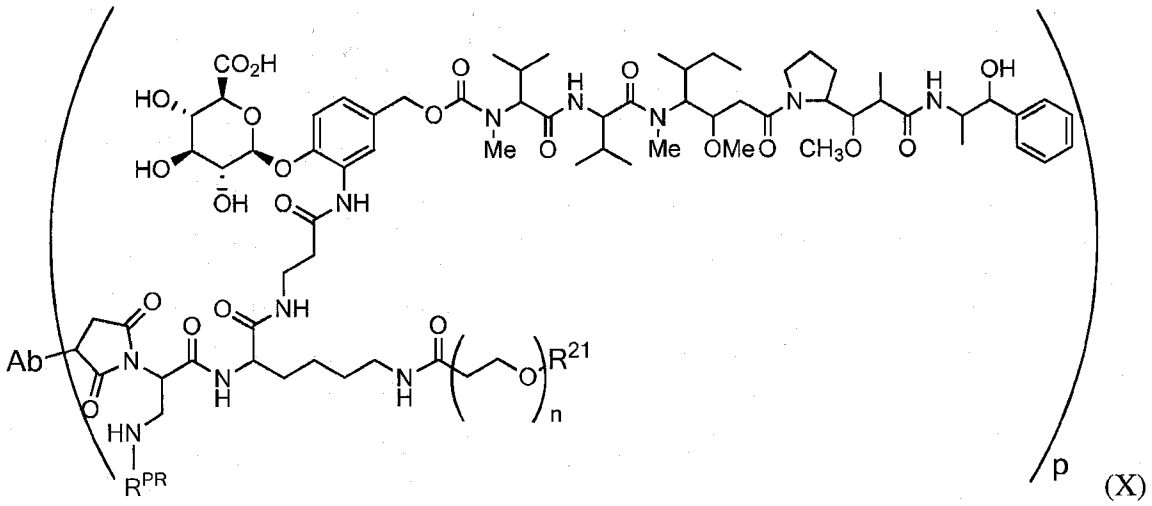
【0008】本文亦提供人化之抗CD228抗體或其抗原結合片段，該抗CD228抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7具有至少90%同一性之胺基酸序列，其先決條件為位置H27被D佔據、位置H30被T佔據、位置H47被Y佔據、位置H71被R佔據且位置H78被Y佔據，該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8具有至少90%同一性之胺基酸序列，其先決條件為位置L2被F佔據、位置L36被Y佔據且位置L46被L佔據。於一些實施態樣中，位置L28被D佔據。

【0009】本文亦提供人化之抗CD228抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO：7之三個Kabat CDR，其中位置H27被D佔據、位置H30被T佔據、位置H47被Y佔據、位置H71被R佔據且位置H78被Y佔據，而該輕鏈可變區包含SEQ ID NO：8之三個Kabat CDR，其中位置L2被F佔據、位置L36被Y佔據且位置L46被L佔據。

【0010】於本文之任何實施態樣的某些實施態樣中，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少95%序列同一性之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少95%序列同一性之胺基酸序列。於本文之任何實施態樣的某些實施態樣中，該重鏈可變區包含SEQ ID NO：7之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO：8之胺基酸序列。於本文之任何實施態樣的某些實施態樣中，該抗體或抗原結合片段為抗原結合片段。於本文之任何實施態樣的某些實施態樣中，該抗體或抗原結合片段為全長抗體。

【0011】本文亦提供抗體-藥物共軛體，其包含與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合之本文所提供的抗體或抗原結合片段。於一些實施態樣中，該連接子為MDpr-PEG(12)-gluc連接子。於本文之任何實施態樣的某些實施態樣中，該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為單甲基澳瑞他汀(monomethyl auristatin)。於一些實施態樣中，該單甲基澳瑞他汀為單甲基澳瑞他汀E(MMAE)。於本文之任何實施

態樣的某些實施態樣中，該連接子與單甲基澳瑞他汀E連接形成具有下列結構之抗體-藥物共軛體：



(X)

其中Ab為抗體hL49，n為12，R^{PR}為氫，R^{21}為CH_3，且p表示1至16之數字。於本文之任何實施態樣的某些實施態樣中，該抗體-藥物共軛體為hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE。

【0012】本文亦提供編碼本文所描述之抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區之核酸。本文亦提供包含本文所提供之核酸的載體。本文亦提供包含本文所提供之核酸的宿主細胞。

【0013】本文亦提供產生本文所提供之抗CD228抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包含在適合用於產生抗CD228抗體或其抗原結合片段之條件下培養本文所提供之宿主細胞。

【0014】本文亦提供產生本文所提供之抗CD228抗體-藥物共軛體之方法，該方法包含在適合用於產生抗CD228

抗體之條件下培養本文所提供之宿主細胞；分離出從該宿主細胞所產生之抗CD228抗體；以及將該抗CD228抗體與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

【0015】本文亦提供治療個體之癌症的方法，該方法包含對該個體投予本文所提供之抗體或抗原結合片段或本文所提供之抗體-藥物共軛體。於一些實施態樣中，該癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、胰臟癌、間皮瘤、結腸直腸癌、肺癌、甲狀腺癌、乳癌、膽管癌、食道癌和頭頸癌。於一些實施態樣中，該個體為人。

【0016】本文亦提供套組，該套組包含：(a)本文所提供之抗體或抗原結合片段或本文所提供之抗體-藥物共軛體；及(b)根據本文所提供之方法使用抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體的說明書。

【0017】本文亦提供醫藥組成物，該醫藥組成物包含本文所提供之抗體或抗原結合片段或本文所提供之抗體-藥物共軛體和一或多種選自由下列所組成之群組的作用劑：生理學上可接受之載體、稀釋劑、賦形劑和佐劑。

【圖式簡單說明】

【0018】本專利案或申請文件包含至少一張彩色附圖。帶有彩色附圖之本專利或專利申請出版物之複本將根據要求及支付必要費用時由公司提供。

【0019】[第1圖]顯示藉由IHC對黑色素瘤癌症患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。

【0020】[第2圖]顯示藉由IHC對間皮瘤癌症患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。

【0021】[第3圖]顯示藉由IHC對結腸直腸癌患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。

【0022】[第4圖]顯示藉由IHC對乳癌患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。上圖顯示藉由IHC對三陰性乳癌患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。下圖顯示藉由IHC對Her2-HR+乳癌患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。

【0023】[第5圖]顯示藉由IHC對胰臟癌患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。

【0024】[第6圖]顯示藉由IHC對非小細胞肺癌患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。上圖顯示藉由IHC對鱗狀NSCLC癌症患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。下圖顯示藉由IHC對腺癌NSCLC癌症患者樣品進行之CD228蛋白表現之分析。

【0025】[第7圖]顯示藉由IHC和藉由癌症基因體圖譜報告之各種腫瘤類型之RNA水準進行測定時，CD228表現為陽性之患者樣品之百分比的比較。

【0026】[第8圖]顯示親本小鼠抗CD228單株抗體之重鏈可變區胺基酸序列(稱為Mu L49vH(SEQ ID NO：21))與人受體序列(稱為Hu IGHV4-59/HJ4(SEQ ID NO：23))和L49抗體之人化版本(稱為hvHA(SEQ ID NO：7)、hvHB(SEQ ID NO：24)和hvHC(SEQ ID NO：25))的比對。該

CDR位置係使用Kabat和IMGT編號方案定名。

【0027】[第9圖]顯示L49抗體之重鏈可變區胺基酸序列之人化版本(稱為hvHA(SEQ ID NO：7)、hvHB(SEQ ID NO：24)和hvHC(SEQ ID NO：25))的比對。該CDR位置係使用Kabat和IMGT編號方案定名。

【0028】[第10圖]顯示親本小鼠抗CD228單株抗體之輕鏈可變區胺基酸序列(稱為Mu L49 vL(SEQ ID NO：31))與人受體序列(稱為Hu IGKV2-30/KJ4(SEQ ID NO：32))和L49抗體之人化版本(稱為hvLA(SEQ ID NO：33)、hvLB(SEQ ID NO：34)和hvLC(SEQ ID NO：35))的比對。該CDR位置係使用Kabat和IMGT編號方案定名。

【0029】[第11圖]顯示L49抗體之人化版本之輕鏈可變區胺基酸序列(稱為hvLA(SEQ ID NO：33)、hvLB(SEQ ID NO：34)和hvLC(SEQ ID NO：35))的比對。該CDR位置係使用Kabat和IMGT編號方案定名。

【0030】[第12A至12F圖]顯示重組人化抗CD228抗體、親本小鼠抗體(稱為mL49)和嵌合抗體(cL49ec)之競爭結合研究的結果。

【0031】[第13圖]顯示重組人化抗CD228抗體之飽和結合研究的結果。

【0032】[第14A至14C圖]顯示使用hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(4)和hL49-MP-gluc-MMAE(8)處理之A2058、A375和Colo-853細胞株中隨時間推移之存活細胞的百分比。

【0033】[第15圖]顯示未經治療之小鼠和使用3 mg/kg hL49-HALC、hL49-HALC-澳瑞他汀T(8)、hL49-HALC-親脂性MMAF(8)、hL49-HALC-微管溶素M(8)和hL49-HALC-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的A2058腫瘤體積。

【0034】[第16圖]顯示未經治療之小鼠和使用6 mg/kg IgG-MDpr-gluc-MMAE(2)、6 mg/kg hL49ec-MDpr-gluc-MMAE(2)、3 mg/kg hL49ec-MDpr-gluc-MMAE(2)、1 mg/kg hL49ec-MDpr-gluc-MMAE(2)、3 mg/kg IgG-MDpr-gluc-MMAE(4)、3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(4)和3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的A2058腫瘤體積。

【0035】[第17圖]顯示未經治療之小鼠和使用1 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、3 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、1 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)和3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的A2058腫瘤體積。

【0036】[第18圖]顯示未經治療之小鼠和使用1 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、3 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、1 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)和3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的Colo-853腫瘤體積。

【0037】[第19圖]顯示未經治療之小鼠和使用3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)、3 mg/kg IgG-微管溶

素M(8)、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-微管溶素M(8)、或1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的A2058腫瘤體積。

【0038】[第20圖]顯示未經治療之小鼠和使用3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)、3 mg/kg IgG-微管溶素M(8)、0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-微管溶素M(8)、或0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的SK-MEL-5腫瘤體積。

【0039】[第21圖]顯示未經治療之小鼠和使用1 mg/kg或3 mg/kg hL49-微管溶素M(8)、或1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的IGR-37腫瘤體積。

【0040】[第22圖]顯示未經治療之小鼠和使用0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)、或3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的Colo-853腫瘤體積。

【0041】[第23圖]顯示未經治療之小鼠和使用1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的LU0697鱗狀NSCL PDX模型腫瘤體積。

【0042】[第24圖]顯示未經治療之小鼠和使用1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移

的LU0697腺癌NSCL PDX模型腫瘤體積。

【0043】[第25圖]顯示未經治療之小鼠和使用0.5 mg/kg或1 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或0.5 mg/kg或1 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的MDA-MB-231 TNBC腫瘤體積。

【0044】[第26圖]顯示未經治療之小鼠和使用3 mg/kg IgGhL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移的HPAF-II腫瘤體積。

【0045】[第27圖]顯示在22個不同的小鼠三陰性乳癌PDX模型中回應使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)進行之治療的腫瘤體積百分比變化。

【0046】[第28A至28B圖]顯示單獨或與MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE共軛結合之hL49和另一CD228抗體，cL235在二名患者中之%特異性細胞溶解(ADCC活性)。

【0047】[第29A圖]顯示裸鼠中ADC隨時間變化之血漿濃度。[第29B圖]顯示大鼠中ADC隨時間推移之血漿濃度。

【0048】[第30A圖]顯示未經治療之小鼠和使用各種不同CD228抗體治療之小鼠隨時間推移之A2058腫瘤體積。[第30B圖]顯示在各治療條件下，隨時間推移腫瘤增加＜4倍之動物的百分比。

【0049】[第31A至31B圖]顯示共軛體在A375和Colo-853細胞中隨時間推移之裂解速率。

【0050】[第32圖]顯示細胞表面上之CD228隨時間推移補充，此係利用經標記之抗體脈衝或連續處理細胞，藉由比較該以螢光標記之hL49抗體處理的細胞中之共軛體隨時間推移的裂解率來證明。

【0051】[第33A至33B圖]顯示在有或無抑制蛋白質合成之環己亞醯胺(cycloheximide)之存在下，與經螢光標示之hL49抗體一起培育之細胞中每一細胞隨時間推移之平均螢光強度。

【0052】[第34A至34F圖]顯示在pH值4至7.4之範圍內各種抗CD228抗體與CD228之結合。

【0053】[第35A至35B圖]顯示具有類似之結合親和力的抗體內含和分解代謝藥物的能力。

【0054】[第36A至36B圖]顯示單次劑量之hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)在源自患者之腫瘤(PDX)模型中具有抗腫瘤活性。

【實施方式】

詳細說明

I. 定義

【0055】為了讓本發明可以更容易地被理解，首先定義某些術語。除非本文另有明確規定，如本申請案中所使用之下列各術語應具有下文中提供之含義。另外之定義闡述於本申請案之全文中。

【0056】本文中所使用之術語“和/或”應被理解為具

體揭示該二種被具體指定之特性或組分的每一特性或組分，加上或不加上另一特性或組分。因此，本文中，諸如“A和/或B”之短語中所使用的術語“和/或”意圖包括“A和B”、“A或B”、“A”(單獨)及“B(單獨)”。同樣地，諸如“A、B和/或C”之短語中所使用的術語“和/或”意圖包含下列態樣中之各個態樣：A、B和C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A和C；A和B；B和C；A(單獨)；B(單獨)；及C(單獨)。

【0057】應理解的是，本文所描述之本發明的態樣和實施態樣包括“包含態樣和實施態樣”、“由態樣和實施態樣組成”和“基本上由態樣和實施態樣組成”。

【0058】除非另有定義，本文所使用之所有技術和科學術語具有與本揭示內容相關之技藝中的一般技術人士所通常理解的相同含義。例如Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press；The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press；和the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press提供技術人士本揭示內容中所使用之許多術語的通用詞典。

【0059】單位、前綴和符號係以其國際單位系統(SI)接受之形式表示。數值範圍包括定義該範圍之數字。本文提供之標題並非用來限制本揭示內容之各種態樣，本揭示內容之各種態樣可經由整體參考專利說明書來獲得。因

此，下文中定義之術語可藉由參考本專利說明書之全文被更完整地定義。

【0060】本文中，術語“CD228”、“p97”、“黑素轉鐵蛋白”、“MELTF”和“MF12”可互換使用，且除非另有說明，否則其包括人CD228之任何變體、同功型(isoform)和物種同系物，這些通常係由經CD228基因轉染之細胞表現或表現在經CD228基因轉染之細胞上。

【0061】術語“免疫球蛋白”係指一類結構上相關之糖蛋白，該糖蛋白係由二對多肽鏈(一對低分子量輕(L)鏈和一對重(H)鏈)所組成，全部四條鏈均藉由二硫鍵相互連接。免疫球蛋白之結構已被充分表徵。參見，例如Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N .Y. (1989))。簡單地說，每條重鏈通常係由重鏈可變區(本文中縮寫為V_H或VH)和重鏈恆定區(C_H或CH)所組成。該重鏈恆定區通常由三個結構域C_H1、C_H2和C_H3所組成。該重鏈通常在所謂的“鉸鏈區”中經由二硫鍵相互連接。每條輕鏈通常係由輕鏈可變區(本文中縮寫為V_L或VL)和輕鏈恆定區(C_L或CL)所組成。該輕鏈恆定區通常係由一個結構域C_L所組成。該CL可為κ(kappa)或λ(lambda)同型。本文中，術語“恆定結構域”和“恆定區”可互換使用。免疫球蛋白可源自任何常知之同型，包括，但不限於IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG亞類亦為本技藝中之技術人員所周知，包括，但不限於人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。“同型(Isotype)”係指由重鏈恆定區基因編碼

之抗體類別或亞類(例如IgM或IgG1)。

【0062】術語“可變區”或“可變結構域”係指涉及抗體與抗原結合之抗體重鏈或輕鏈之結構域。天然抗體之重鏈和輕鏈的可變區(分別為V_H和V_L)可進一步細分為具有高可變性之區域(或高可變區，其在序列和/或結構界定之環型中可能為高度變異的)，亦稱為互補決定區(CDR)，在該互補決定區之間穿插著更為保守的區域，稱為框架區(FR)。已知術語“互補決定區”和“CDR”(與“高可變區”或“HVR”同義)在本技藝中係指抗體可變區內之胺基酸的非連續序列，其賦予抗原特異性和/或結合親和力。一般而言，每個重鏈可變區內有三個CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)，每個輕鏈可變區內有三個CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。本技藝中已知“框架區”和“FR”係指該重鏈和輕鏈之可變區的非CDR部分。一般而言，每個全長重鏈可變區中有四個FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4)，而每個全長輕鏈可變區中有四個FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。在各V_H和V_L內，三個CDR和四個FR通常按以下順序從胺基端排列到羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(亦參見Chothia and Lesk *J. Mot. Biol.*, 195, 901-917 (1987))。

【0063】在本發明之背景下，術語“抗體”(Ab)係指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子之片段或其任一者之衍生物，抗體具有在典型之生理條件下與抗原特異結合之能力，且半衰期較長，諸如至少約30分鐘、至少約45分鐘、

至少約一小時(h)、至少約二小時、至少約四小時、至少約八小時、至少約12小時(h)、約24小時或更久、約48小時或更久、約三、四、五、六、七或更多天，等，或任何其他相關之功能上定義的期間(諸如足以誘導、促進、增強和/或調控與抗體與抗原結合相關之生理反應的時間和/或足以使抗體恢復效應子活性之時間)。該免疫球蛋白分子之重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原交互作用之結合結構域。該抗體(Ab)之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括該免疫系統之各種不同的細胞(諸如效應細胞)和補體系統之組分(諸如C1q，補體活化之經典途徑中的第一組分)。抗體亦可為雙特異性抗體、雙抗體、多特異性抗體或類似分子。

【0064】如本文所使用之術語“單株抗體”係指以單一之一級胺基酸序列重組產生的抗體分子製劑。單株抗體組成物顯示出對特定表位之單一結合特異性和親和力。因此，術語“人單株抗體”係指顯示單一結合特異性之抗體，其具有源自人種系免疫球蛋白序列之可變區和恆定區。人單株抗體可由雜交瘤產生，該雜交瘤包括從轉基因或轉染色體非人動物(諸如轉基因小鼠)獲得，與人永生化細胞融合之B細胞，其具有包含人重鏈轉基因和輕鏈轉基因之基因組。

【0065】“經分離之抗體”係指基本上不含具有不同抗原特異性之其他抗體的抗體(例如與CD228特異結合之經分離的抗體基本上不含有與CD228以外之抗原特異結合的抗

體)。然而，與CD228特異結合之經分離的抗體可與其他抗原(諸如來自不同物種之CD228分子)產生交叉反應。再者，經分離之抗體可基本上不含有其他細胞物質和/或化學物質。於一實施態樣中，經分離之抗體包括與另一作用劑(例如小分子藥物)連接之抗體共軛體。於一些實施態樣中，經分離之抗CD228抗體包括抗CD228抗體與小分子藥物(例如MMAE或MMAF)之共軛體。

【0066】“人抗體”(HuMAb)係指其可變區中之FR和CDR均源自人種系免疫球蛋白序列的抗體。此外，若該抗體含有恆定區，則該恆定區亦源自人種系免疫球蛋白序列。本揭示內容之人抗體可包括非由人種系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由玻管內之隨機或定點誘變或藉由體內之體細胞突變引入的突變)。然而，如本文所使用之術語“人抗體”並不意圖包括其中源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之種系的CDR序列已被移植在人框架序列上的抗體。術語“人抗體”和“全人抗體”在使用上同義。

【0067】如本文所使用之術語“人化抗體”係指經基因工程處理之非人抗體，其包含人抗體恆定結構域和經修飾以含有與人類可變結構域具有高度序列同源性的非人可變結構域。此可藉由將六個非人抗體互補決定區(CDR)(其一起形成抗原結合位點)移植到同源人受體框架區(FR)上來實現(參見WO92/22653和EP0629240)。為了完全重新構建該親本抗體之結合親和力和特異性，可能需要將來自親本抗體(即，該非人抗體)的框架殘基取代入人框架區(反向突

變)。構造同源性塑模可協助鑑定框架區中對該抗體之結合特性很重要的胺基酸殘基。因此，人化抗體可包含非人CDR序列，主要為人框架區(其可選擇地包含一或多個非人胺基酸序列之胺基酸反向突變)和全人恆定區。可選擇地，可施加另外之胺基酸修飾(不一定是反向突變)以取得具有較佳特性(諸如親和力和生化性質)之人化抗體。

【0068】如本文所使用之術語“嵌合抗體”係指其中該可變區係源自非人物種(例如源自囓齒動物)且該恆定區係源自不同物種(諸如人)的抗體。嵌合抗體可藉由抗體工程處理產生。“抗體工程處理”為用於不同種類之抗體修飾的通用術語且為技術熟習人士所周知之方法。尤其是，嵌合抗體可藉由使用標準DNA技術(如Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15中所描述者)產生。因此，該嵌合抗體可為經遺傳或酶催化性工程處理之重組抗體。產生嵌合抗體之方法係在技術熟習人士之知識範圍內，因此，根據本發明之嵌合抗體可藉由本文所描述者以外的其他方法產生。用於治療應用之嵌合單株抗體的研發用來降低抗體之免疫原性。它們通常可含有特異於所欲抗原之非人(例如鼠)可變區，以及人恆定抗體重鏈和輕鏈結構域。在嵌合抗體之背景下使用之術語“可變區”或“可變結構域”係指包含該免疫球蛋白之重鏈和輕鏈二者的CDR和框架區的區域。

【0069】“抗-抗原抗體”係指與抗原結合之抗體。例

如，抗CD228抗體為與抗原CD228結合之抗體。

【0070】抗體之“抗原結合部分”或“抗原結合片段”係指抗體中保留與抗原特異結合之能力的一或多個片段，該抗原可與整個抗體結合。抗體片段(例如抗原結合片段)之實例包括，但不限於Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；以及從抗體片段形成之多特異性抗體。木瓜蛋白酶分解抗體產生二個相同的抗原結合片段，稱為“Fab”片段，每個片段各具有一個單一抗原結合位點和殘留之“Fc”片段(其名稱反映其易於結晶化之能力)。胃蛋白酶處理產生$F(ab')_2$片段，其具有二個抗原結合位點且仍然能夠交聯抗原。

【0071】相對於參考多肽序列之“序列同一性百分比(%)”的定義為在比對序列且必要時引入間隙以取得最大序列同一性百分比，且不將任何保守性取代視為序列同一性之一部分時，候選序列中與該參考多肽序列中之胺基酸殘基相一致的胺基酸殘基之百分比。為了測定胺基酸序列同一性百分比的比對可以本技藝之技術範圍內的各種不同方式進行，例如，使用可公開取得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。本技藝之技術熟習人士可決定用於比對序列之合適參數，包括在所比較之全長序列上取得最大比對所需的任何演算法。例如，指定胺基酸序列A對、與、或針對於指定胺基酸序列B之%序列同一性(或者，其可表述為指定胺基酸序列A對、與、或針對於指定胺基酸序列B具有或包含某些%

序列同一性)的計算如下：

100乘以分數X/Y

其中X為在A和B之程式比對中被評分為序列匹配相一致之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中之胺基酸殘基的總數。可理解的是，其中該胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A相對於B之%序列同一性將不等於B相對於A之%序列同一性。

【0072】如本文所使用者，在抗體與預定之抗原結合的背景下，術語“結合(bindind、binds)”或“特異結合”之結合親和力通常相當於K_D約10^{-6}M或更低(例如約10^{-7}M或更低，諸如約10^{-8}M或更低，諸如約10^{-9}M或更低、約10^{-10}M或更低、或約10^{-11}M或甚至更低)，該結合親和力係藉由，例如生物膜干涉技術(BioLayer Interferometry) (BLI)，在Octet HTX儀器中，使用抗體作為配體及使用抗原作為分析物測定，且其中該抗體與該預定抗原之結合親和力的K_D值相當於該抗體與除了該預定抗原或密切相關之抗原以外的非特異性抗原(例如BSA酪蛋白)結合時之K_D值降低至少10倍，諸如低至少100倍，例如低至少1000倍，諸如低至少10,000倍，例如低至少100,000倍。結合之K_D降低的量取決於該抗體之K_D，因此，當該抗體之K_D非常低時，則與該抗原結合之K_D可能較與非特異性抗原結合之K_D降低至少10,000倍之量(即，該抗體為高度特異性的)。

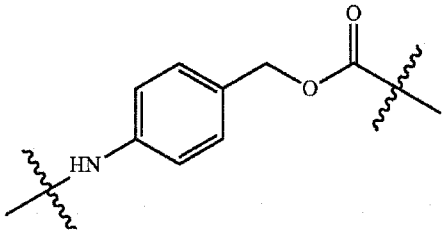
【0073】如本文所使用之術語“K_D”(M)係指特定抗體-抗原交互作用之解離平衡常數。如本文所使用之親和力與

K_D為逆相關，即，較高之親和力意圖指較低之K_D，且較低之親和力意圖指較高之K_D。

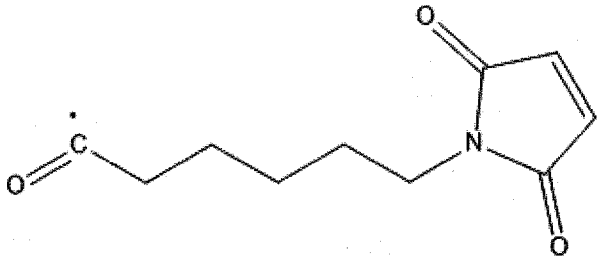
【0074】術語“ADC”係指抗體-藥物共軛體，其在本發明之背景下係指抗CD228抗體，該CD228抗體與如本申請案所描述之藥物部分(例如MMAE或MMAF)偶聯。

【0075】縮寫“vc”和“val-cit”係指二肽纈胺酸-瓜胺酸。

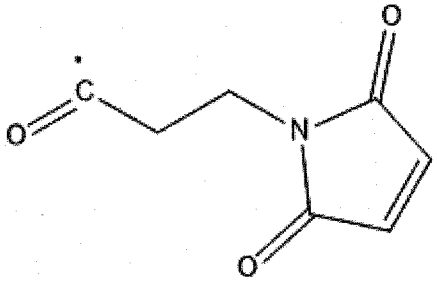
【0076】縮寫“PAB”係指自降解型間隔子：



【0077】縮寫“ MC”係指延伸子馬來醯亞胺基己醯基：



【0078】縮寫“MP”係指延伸子馬來醯亞胺基丙醯基：



【0079】“癌症”係指其特徵為體內異常細胞不受控制地生長的一大群各種不同之疾病。“癌”或“癌組織”可包括腫瘤。不受控制的細胞分裂和生長導致惡性腫瘤的形成，該惡性腫瘤侵入鄰近組織且亦可透過淋巴系統或血液轉移到身體的遠處。轉移後，該遠端腫瘤可被說是“源自”該轉移前的腫瘤。

【0080】術語“抗體依賴性細胞介導之細胞毒性”或ADCC為誘導細胞死亡之機制，其取決於抗體包被之靶細胞與具有溶細胞活性之免疫細胞(亦稱為效應細胞)的交互作用。該等效應細胞包括天然殺手細胞、單核細胞/巨噬細胞和嗜中性粒細胞。效應細胞附接於Ig之Fc效應結構域，該Ig經由其抗原結合位點與靶細胞結合。抗體包被之靶細胞的死亡係由效應細胞活性所導致。

【0081】術語“抗體依賴性細胞吞噬作用”或ADCP係指抗體包被之細胞被與Ig之Fc效應子結構域結合之細胞吞噬免疫細胞(例如巨噬細胞、嗜中性粒細胞和樹突細胞)全部或部分內含的過程。

【0082】術語“補體依賴性細胞毒性”或CDC係指誘導細胞死亡之機制，其中與標靶結合之抗體的Fc效應子結構域活化一系列之酶催化反應，最終導致在靶細胞膜上形成孔。通常，抗原-抗體複合物(諸如在抗體包被之靶細胞上者)結合並活化補體組分C1q，該補體組分C1q繼而活化該補體級聯反應，導致靶細胞死亡。補體活化亦可導致補體組分沉積在靶細胞表面上，而藉由與白血球上之補體受體

(例如CR3)結合來促進ADCC。

【0083】“細胞生長抑制作用”係指抑制細胞增殖。“細胞生長抑制劑”係指對細胞具有細胞生長抑制作用，從而抑制細胞之特定亞群生長和/或擴增的作用劑。細胞生長抑制劑可與抗體共軛結合或與抗體組合投予。

【0084】個體之“治療”或“療法”係指在個體上執行之任何類型的干預或過程，或對個體投予活性劑以逆轉、減輕、改善、抑制、減緩或預防與疾病相關之症狀、併發症、病況或生化指標之發作、進展、發展、嚴重性或復發。於一些實施態樣中，該疾病為癌症。

【0085】“個體”包括任何人類或非人類動物。術語“非人類動物”包括，但不限於脊椎動物，諸如非人類之靈長類動物、羊、狗和齧齒動物，諸如小鼠、大鼠和天竺鼠。於一些實施態樣中，該個體為人。術語“個體”和“患者”及“個人”在本文中可互換使用。

【0086】藥物或治療劑之“有效量”或“治療有效量”或“治療有效劑量”為當單獨使用或與另一治療劑組合時可防止個體疾病發作或促進疾病消退之任何藥物量，疾病消退之跡證為疾病症狀之嚴重性降低、疾病無症狀期之頻率和持續時間增加，或防止由於疾病折磨所致之損害或殘疾。治療劑促進疾病消退之能力可使用技術熟習之從業人員已知的各種不同方法評估，諸如在臨床試驗期間的人類個體中、在預測人體中之效力的動物模型系統中、或藉由在玻管內分析中分析該作用劑之活性進行評估。

【0087】舉例而言，在治療腫瘤方面，相對於未經治療之個體(例如一或多個未經治療之個體)，治療有效量之抗癌劑抑制經治療之個體(例如一或多個經治療之個體)中的細胞生長或腫瘤生長至少約10%，至少約20%，至少約30%，至少約40%，至少約50%，至少約60%，至少約70%，或至少約80%，至少約90%，至少約95%，至少約96 %，至少約97 %，至少約98 %，或至少約99 %。於一些實施態樣中，相對於未經治療之個體(例如一或多個未經治療之個體)，治療有效量之抗癌劑抑制經治療之個體(例如一或多個經治療之個體)中100%之細胞生長或腫瘤生長。

【0088】本揭示內容之其他實施態樣中可觀察到腫瘤消退且持續至少約20天、至少約30天、至少約40天、至少約50天或至少約60天。

【0089】治療有效量之藥物(例如抗CD228抗體-藥物共軛體)包括“預防有效量”，其為當單獨投予或與抗癌劑組合投予給處於發展出癌症風險之個體(例如具有惡性病前症狀之個體)或罹患復發之癌症的個體時可抑制該癌症發展或復發的任何藥物量。於一些實施態樣中，該預防有效量完全防止該癌症發展或復發。“抑制”癌症發展或復發係指降低癌症發展或復發之可能性，或完全防止癌症發展或復發。

【0090】如本文中所使用之“低於藥用劑量”係指治療化合物(例如抗CD228抗體-藥物共軛體)的劑量低於當單獨

投予該治療化合物以治療過度增生性疾病(例如癌症)時所使用之通常劑量或典型劑量。

【0091】“免疫相關反應模式”係指經常在使用免疫治療劑治療之癌症患者中觀察到的臨床反應模式，該免疫治療劑藉由誘導癌症特異性免疫反應或藉由修飾天然免疫過程來產生抗腫瘤作用。該反應模式之特徵在於隨著最初之腫瘤荷載增加或出現新病變後出現有益的治療效果，該最初之腫瘤荷載增加或出現新病變在傳統化療劑之評估中將被歸類為疾病進展，且將成為藥物失靈的同義詞。因此，免疫治療劑之正確評估可能需要長期監測這些治療劑對標靶疾病的效果。

【0092】舉例而言，“抗癌劑”促進個體之癌症消退。於一些實施態樣中，治療有效量之藥物促進癌症消退至消除該癌症之程度。“促進癌症消退”係指投予有效量之藥物(單獨或與抗癌劑組合)而導致腫瘤生長或尺寸減少、腫瘤壞死、至少一種疾病症狀之嚴重性降低、無疾病症狀期的頻率和持續時間增加、或防止由於疾病折折磨而導致的障礙或失能。另外，關於治療之術語“有效”和“效力”包括藥理效力和生理安全性。藥理效力係指該藥物促進患者癌症消退之能力。生理安全性係指由於投予該藥物所導致之在細胞、器官和/或生物體層級的毒性或其他不利之生理作用(不良作用)的程度。

【0093】“持續反應”係指在停止治療後在減少腫瘤生長上之持續作用。例如，該腫瘤大小可保持與投予階段開

始時之大小相同或較小。於一些實施態樣中，該持續反應的持續時間至少與治療期間相同，或比治療期間長至少1.5、2.0、2.5或3倍。

【0094】如本文所使用之“完全反應(complete response)”或“CR”係指所有標靶病變消失。“部分反應(partial response)”或“PR”係指參照基線SLD時，標靶病變之最長直徑(SLD)的總和至少減少30%；而“穩定疾病”或“SD”係指參照自治療開始之最小SLD時，標靶病變縮小之程度既不足以符合PR標準，亦未增加至足以符合PD標準。

【0095】如本文所使用之“無惡化存活期”或“PFS”係指治療期間和之後的時間長度，在該期間內所治療之疾病(例如癌症)沒有惡化。無惡化存活期可包括患者經歷完全反應或部分反應的時間總量，以及患者經歷穩定疾病的時間總量。

【0096】如本文所使用之“總緩解率”或“ORR”係指完全反應(CR)率和部分反應(PR)率的總和。

【0097】如本文所使用之“總體存活”或“OS”係指一組個體在特定期間之後可能存活之個體的百分比。

【0098】短語“醫藥上可接受的”表示該物質或組成物必須與包含配製劑之其他成分和/或使用其治療之哺乳動物在化學上和/或毒理學上相容。

【0099】本文所用之短語“醫藥上可接受之鹽”係指本發明化合物之醫藥上可接受的有機或無機鹽。示例性鹽類

包括，但不限於硫酸鹽、檸檬酸鹽、醋酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、單寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、富馬酸鹽、葡糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、糖質酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽(methanesulfonate) “mesylate”、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對-甲苯磺酸鹽、雙羥萘酸鹽(即，4,4'-伸甲基-雙-(2-羥基-3-萘酸鹽)類、鹼金屬(例如鈉和鉀)鹽類、鹼土金屬(例如鎂)鹽類和銨鹽類。醫藥上可接受之鹽可能涉及包含另一分子，諸如醋酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。相對離子可為任何能穩定該親本化合物上之電荷的有機或無機部分。再者，醫藥上可接受之鹽在其結構中可具有一個以上之帶電原子。其中多個帶電原子為該醫藥上可接受之鹽的一部分的實例可具有多個相對離子。因此，醫藥上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子和/或一或多個相對離子。

【0100】“投予(administrating或administration)”係指使用本技藝之技術熟習人士已知之各種不同方法和遞送系統的其中任一者將治療劑物理引入個體。用於該抗CD228抗體-藥物共軛體之示例性投予途徑包括經由靜脈內、肌肉內、皮下、腹膜內、脊柱或其他腸胃道外途徑投予，例如注射或輸注投予(例如靜脈內輸注)。如本文所使用之短語“腸胃道外投予”係指除腸內和局部投予以外的投予模

式，通常係經由注射且包括，但不限於靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、淋巴內、病變內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、透過氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下腔、脊柱內、硬膜外和胸骨內注射和輸注，以及體內電穿孔。治療劑可經由非腸胃道外途徑或口服投予。其他非腸胃道外途徑包括局部、表皮或黏膜投予途徑，例如鼻內、陰道內、直腸、舌下或局部投予。投予亦可，例如執行一次、多次和/或在一或多個延長之期間內執行。

【0101】本文中術語“基線”或“基線值”可互換使用以指在投予療法(例如本文所描述之抗CD228抗體-藥物共軛體)之前或在開始投予療法時對症狀的測量或表徵。該基線值可與參考值比較以測定本文所考慮之與CD228相關之疾病(例如癌症)的症狀之減輕或改善。本文中互換使用之術語“參考”或“參考值”可指在投予療法(例如，如所描述之抗CD228抗體-藥物共軛體)後對症狀之測量或表徵。該參考值可在劑量方案或治療週期期間，或在該劑量方案或治療週期完成時測量一或多次。“參考值”可為絕對值；相對值；具有上限和/或下限之數值；數值範圍；平均值(average)；中值；算術平均值(mean)；或與基線值比較之數值。

【0102】類似地，“基線值”可為絕對值；相對值；具有上限和/或下限之數值；數值範圍；平均值(average)；中值；算術平均值(mean)；或與參考值比較之數值。該參考值和/或基線值可從一個個體、二個不同個體或一群個

體(例如具有二個、三個、四個、五個或更多個個體之群組)獲得。

【0103】如本文所使用之術語“單一療法”係指該抗CD228抗體-藥物共軛體為在治療週期期間投予個體之唯一抗癌劑。然而，可對該個體投予其他治療劑。例如，可在該單一療法期間對罹患癌症之個體投予抗炎劑或其他試劑以治療與癌症相關之症狀，但不治療潛在之癌症本身，該與癌症相關之症狀包括，例如炎症、疼痛、體重減輕和全身不適。

【0104】如本文所使用之“不良事件”(AE)為與使用藥物治療相關之任何不利的且通常為意外的或不欲有之體徵(包括異常的實驗室檢查結果)、症狀或疾病。藥物治療可能具有一或多種相關AE，且每一AE可能具有相同或不同程度之嚴重性。提及能夠“改變不良事件”之方法係指可減少與使用不同治療方案相關之一或多種AE的發生率和/或嚴重性的治療方案。

【0105】如本文所使用之“嚴重不良事件”或“SAE”為符合下列其中一項標準之不良事件：

- 為致命性或威脅生命的(在嚴重不良事件之定義中所使用之“威脅生命的”係指患者在該事件發生時處於死亡之風險中的事件；它不是指假設若事件更為嚴重時可能導致死亡之事件)。
- 導致持續或嚴重之殘疾/喪失能力
- 構成先天性異常/出生缺陷

- 為醫學上重大的，即，定義為危害該患者或可能需要醫學或外科干預以防止上述結果其中一者之事件。在決定不良事件是否為“醫學上重大的”時，必須進行醫學和科學判斷
- 必須住院或延長現有之住院時間，但以下情況除外：1)與病情之任何惡化無關的常規治療或對潛在疾病之監測；2)對與所研究之適應症無關且自簽署知情同意書以來未惡化之既往病情的選擇性或預先計劃之治療；及3)社會原因和在患者之總體狀況沒有任何惡化之情況下的臨時護理。

【0106】應理解的是，可供選擇之事物(例如“或”)的使用係指該可供選擇之事物的其中一者、二者或其任意組合。應理解的是，如本文所使用之不定冠詞“一(a或an)”係指任何詳述或列舉之組分的“一或多者”。

【0107】術語“約”或“基本上由...組成”係指在某特定數值或組成之可接受的誤差範圍內之數值或組成，該誤差範圍係由本技藝之一般技術人士所測定且將部分取決於該數值或組成是如何測量或測定的，即，該測量系統之侷限性。例如，根據本技藝之做法，“約”或“基本上由...組成”可指在1個標準差之內或大於1個標準差。或者，“約”或“基本上由...組成”可指高達20%之範圍。此外，特別是關於生物系統或過程，該等術語可指高達一個數量級或高達數值之5倍。除非另有說明，否則當在本申請書和申請專利範圍中提供特定數值或組成時，“約”或“基本上由...組

成”之含義應假定為在該特定值或組成之可接受的誤差範圍內。

【0108】本文中提及“約”為某數值或參數時包括(並描述)針對該數值或參數本身之實施態樣。例如關於“約X”之描述涵蓋且描述“X”。

【0109】應理解的是，除非另有說明，否則如本文所描述之任何濃度範圍、百分比範圍、比率範圍或整數範圍包括在該列舉之範圍內的任何整數值，且當適當時，包括其分數(諸如整數的十分之一和百分之一)。

【0110】本揭示內容之各種不同態樣進一步詳細描述於下列章節中。

Ⅱ. 概要

【0111】本發明提供與CD228特異結合之抗體。本發明部分基於發現靶向CD228之抗體-藥物共軛體(包括聚乙二醇化之MMAE抗體-藥物共軛體)在殺死CD228+表現細胞上特別有效。CD228已被證明表現在各種不同之癌症中，包括黑色素瘤、甲狀腺癌、肺癌、肝癌、胰臟癌、頭頸癌、胃癌、結腸直腸癌、泌尿上皮癌、乳癌和子宮頸癌。

Ⅲ. 靶分子

【0112】除非另外指明，否則CD228係指人CD228。示例性之人蛋白質序列被指派為UniProt ID NO. P08582。

IV. 本發明之抗體

【0113】本發明提供源自小鼠抗體L49之抗體，諸如人化抗體。L49為針對CD228之小鼠免疫球蛋白G1(IgG1)單株抗體，其係衍生自以肺癌和黑色素瘤細胞株免疫化之BALB/c小鼠(Siemers et al., 1997, Bioconjug. Chem. 8:510-9)。

【0114】小鼠L49抗體之人化形式的結合親和力(即，解離常數K_D)較佳為在小鼠抗體L49對人CD228之結合親和力的五倍或二倍之內。人化L49抗體如同其衍生來源之小鼠抗體般與人CD228特異結合。這些抗體可同時以其天然形式和重組表現之形式(例如來自中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或人類胚胎腎(HEK)細胞)與CD228結合。較佳之人化L49抗體具有與L49相同或更大(即，大至超過測量誤差範圍)之與人CD228結合的親和力(例如1.1至5倍、1.1至3倍、1.5至3倍、1.7至2.3倍或1.7至2.1倍之親和力或約為L49之親和力的二倍)。較佳之人化L49抗體所結合之人CD228的表位與小鼠L49所結合者相同和/或與小鼠L49競爭與人CD228結合。

【0115】如在動物模型或臨床試驗之培養中繁殖的癌細胞上所示，本發明之較佳抗體可抑制癌症(例如細胞之生長、轉移和/或對生物體之致死性)。動物模型可經由將表現CD228之人類腫瘤細胞株植入適當之免疫缺陷囓齒動物種系(例如無胸腺裸鼠或SCID小鼠)中形成。這些腫瘤細胞株可藉由皮下注射以實性瘤之形式建立或藉由靜脈注射

以彌散性腫瘤之形式建立在免疫缺陷的囓齒動物宿主中。

【0116】一旦在宿主內建立，這些腫瘤模型可依實施例中之描述應用以評估該抗CD228抗體或其共軛形式的治療效果。

【0117】通常，本揭示內容之抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體與CD228(例如人CD228)結合，並對惡性細胞(諸如癌細胞)發揮細胞抑制作用和細胞毒性作用。本揭示內容之抗CD228抗體較佳為單株抗體且可為多特異性，人、人化或嵌合抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現集合庫產生之片段，和上述任一者之CD228結合片段。於一些實施態樣中，本揭示內容之抗CD228抗體特異結合CD228。本揭示內容之抗體免疫球蛋白分子可為免疫球蛋白分子之任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亞類。

【0118】於本揭示內容之某些實施態樣中，該抗CD228抗體為如本文所描述之抗原結合片段(例如人抗原結合片段)且包括，但不限於Fab、Fab'和$F(ab')_2$、Fd、單鏈Fvs(scFv)、單鏈抗體、二硫鍵連接之Fvs(sdFv)和包含V_L或V_H結構域之片段。抗原結合片段，包括單鏈抗體，可包含單獨之可變區或與全部或部分之下列群體組合：鉸鏈區、CH1、CH2、CH3和CL結構域。本揭示內容亦包括抗原結合片段，該抗原結合片段包含可變區與鉸鏈區、CH1、CH2、CH3和CL結構域之任何組合。於一些實施態

樣中，該抗CD228抗體或其抗原結合片段為人、鼠(例如小鼠和大鼠)、驢、綿羊、兔、山羊、天竺鼠、駱駝科動物、馬或雞。

【0119】本揭示內容之抗CD228抗體可為單特異性、雙特異性、三特異性或較高之多特異性。多特異性抗體可對CD228之不同表位具有特異性，或者對CD228和異源蛋白都具有特異性。參見，例如PCT出版物WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt, *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:60 69；美國專利案編號4,474,893；4,714,681；4,925,648；5,573,920；5,601,819；Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547 1553。

【0120】本揭示內容之抗CD228抗體可就其包含之特定CDR來描述或具體指明。指定之CDR或FR的精確胺基酸序列邊界可使用多種眾所周知之方案中的任一者輕易地確定，包括下列文獻中所描述者：Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat"編號方案)；Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 ("Chothia"編號方案)；MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745." ("Contact"編號方案)；Lefranc MP *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig

superfamily V-like domains" Dev Comp Immunol, 2003 Jan；27(1):55-77 ("IMGT"編號方案)；Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8；309(3):657-70("Aho"編號方案)；和Martin *et al.*, "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, ("AbM"編號方案)。指定CDR之邊界可能根據所使用之鑑別方案而有所不同。於一些實施態樣中，指定抗體或其區域(例如其可變區)之"CDR"或"互補決定區"或個別之具體指定之CDR (例如CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)應被理解為涵蓋由任何前述方案定義之(或特定的)CDR。例如，當聲明特定之CDR(例如CDR-H3)含有指定之V_H或V_L區胺基酸序列中之對應CDR的胺基酸序列時，應理解的是，該等CDR具有如前述任何方案所定義之可變區內的對應CDR(例如CDR-H3)之序列。用於識別特定CDR之方案可被具體指定，諸如藉由Kabat、Chothia、AbM或IMGT方法定義之CDR。

【0121】本文所描述之抗CD228抗體和抗CD228抗體-藥物共軛體之CDR序列係根據如Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD中所描述之Kabat編號方案。

【0122】於一態樣中，本文提供抗CD228抗體，其包

含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含(i)包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的CDR-H1，(ii)包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的CDR-H2；和(iii)包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的CDR-H3；和/或其中該輕鏈可變區包含(i)包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的CDR-L1，(ii)包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR-L2，和(iii)包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的CDR-L3，其中該抗CD228抗體之CDR係藉由Kabat編號方案定義。

【0123】本文所描述之抗CD228抗體可包含任何合適之框架可變結構域序列，其先決條件為該抗體保留與CD228(例如人CD228)結合之能力。如本文所使用之重鏈框架區被定名為“HC-FR1-FR4”，而輕鏈框架區被定名為框架區被定名為“LC-FR1-FR4”。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體包含SEQ ID NO：9、10、11和12之重鏈可變結構域框架序列(分別為HC-FR1、HC-FR2、HC-FR3和HC-FR4)。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體包含SEQ ID NO：13、14、15和16之輕鏈可變結構域框架序列(分別為LC-FR1、LC-FR2、LC-FR3和LC-FR4)。

【0124】於本文所描述之抗CD228抗體的一些實施態樣中，該重鏈可變結構域包含下列胺基酸序列：

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLEYIGYISDSGITYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARRTLATYYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

，而該輕鏈可變結構域包含下列胺基酸序列：

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSDGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYRVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:8)。

【0125】於本文所描述之抗CD228抗體的一些實施態樣中，該重鏈CDR序列包含下列群體：

a) CDR-H1(SGYWN(SEQ ID NO：1))；

b) CDR-H2(YISDSGITYYNPSLKS(SEQ ID NO：2))；和

c) CDR-H3(RTLATYYAMDY(SEQ ID NO：3))。

【0126】於本文所描述之抗CD228抗體的一些實施態樣中，該重鏈FR序列包含下列群體：

a)HC-FR1(QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSIT (SEQ ID NO：9))；

b)HC-FR2(WIRQPPGKGLEYIG(SEQ ID NO：10))；

c)HC-FR3(RVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYC AR(SEQ ID NO：11))；和

d)HC-FR4(WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO：12))。

【0127】於本文所描述之抗CD228抗體的一些實施態樣中，該輕鏈CDR序列包含下列群體：

a) CDR-L1 (RASQSLVHSDGNTYLH (SEQ ID NO：4))；

b) CDR-L2 (RVSNRFS (SEQ ID NO：5))；和

c) CDR-L3 (SQSTHVPPT (SEQ ID NO：6))。

【0128】於本文所描述之抗CD228抗體的一些實施態樣中，該輕鏈FR序列包含下列群體：

a) LC-FR1 (DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISC (SEQ ID NO：13))；

b) LC-FR2 (WYQQRPGQSPRLLIY (SEQ ID NO：14))；

c) LC-FR3 (GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO：15))；和

d) LC-FR4 (FGQGTKLEIK (SEQ ID NO：16))

【0129】於一些實施態樣中，本文提供與CD228(例如人CD228)結合之抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體，其中該抗體或抗體-藥物共軛體包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該抗體包含：

(a)重鏈可變結構域，其包含：

(1)HC-FR1，其包含SEQ ID NO：9之胺基酸序列；

(2)CDR-H1，其包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列；

(3)HC-FR2，其包含SEQ ID NO：10之胺基酸序列；

(4)CDR-H2，其包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列；

(5)HC-FR3，其包含SEQ ID NO：11之胺基酸序列；

(6)CDR-H3，其包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列；和

(7)HC-FR4，其包含SEQ ID NO：12之胺基酸序列，

和/或

(b)輕鏈可變結構域，其包含：

(1)LC-FR1，其包含SEQ ID NO：13之胺基酸序列；

(2)CDR-L1，其包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列；

(3)LC-FR2，其包含SEQ ID NO：14之胺基酸序列；

(4)CDR-L2，其包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列；

(5)LC-FR3，其包含SEQ ID NO：15之胺基酸序列；

(6)CDR-L3，其包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列；和

(7)LC-FR4，其包含SEQ ID NO：16之胺基酸序列。

【0130】於一態樣中，本文提供抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體，其包含含有SEQ ID NO：7之胺基酸序列的重鏈可變結構域或包含含有SEQ ID NO：8之胺基酸序列的輕鏈可變結構域。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N-端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。於一態樣中，本文提供抗CD228抗體，其包含含有SEQ ID

NO：7之胺基酸序列的重鏈可變結構域且包含含有SEQ ID NO：8之胺基酸序列的輕鏈可變結構域。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N-端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。

【0131】於一些實施態樣中，本文提供抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體，其包含重鏈可變結構域，該重鏈可變結構域包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之胺基酸序列。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N-端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。於某些實施態樣中，包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之胺基酸序列的重鏈可變結構域含有相對於該參考序列之取代(例如保守性取代)、插入或缺失並保留與CD228(例如人CD228)結合之能力。於某些實施態樣中，SEQ ID NO：7中共有1至10個胺基酸被取代、插入和/或缺失。於某些實施態樣中，取代、插入或缺失(例如1、2、3、4或5個胺基酸)係發生在該CDR外之區域中(即，在FR中)。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體包含SEQ ID NO：7之重鏈可變結構域序列，包括該序列之轉譯後修飾。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N-端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。於一特定之實施態樣中，該重鏈可變結構域包含一、二或三

個選自下列群組之CDR：(a)包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的CDR-H1，(b) 包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的CDR-H2，和(c)包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的CDR-H3。

【0132】於一些實施態樣中，本文提供抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體，其包含輕鏈可變結構域，該輕鏈可變結構域包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之胺基酸序列。於某些實施態樣中，包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性之胺基酸序列的輕鏈可變結構域含有相對於該參考序列之取代(例如保守性取代)、插入或缺失並保留與CD228(例如人CD228)結合之能力。於某些實施態樣中，SEQ ID NO：8中共有1至10個胺基酸被取代、插入和/或缺失。於某些實施態樣中，取代、插入或缺失(例如1、2、3、4或5個胺基酸)係發生在該CDR外之區域中(即，在FR中)。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體包含SEQ ID NO：8之輕鏈可變結構域序列，包括該序列之轉譯後修飾。於一特定之實施態樣中，該輕鏈可變結構域包含一、二或三個選自下列群組之CDR：(a)包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的CDR-L1，(b) 包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR-L2，和(c)包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列

的CDR-L3。

【0133】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體包含如上文提供之任何實施態樣中的重鏈可變結構域和如上文提供之任何實施態樣中的輕鏈可變結構域。於一實施態樣中，該抗體包含SEQ ID NO：7之重鏈可變結構域序列和SEQ ID NO：8之輕鏈可變結構域序列，包括那些序列之轉譯後修飾。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N-端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。

【0134】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體包含：i) 包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的重鏈CDR1、包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的重鏈CDR2、包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的重鏈CDR3；和ii) 包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的輕鏈CDR1、包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的輕鏈CDR2和包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的輕鏈CDR3，其中該抗CD228抗體之CDR係藉由Kabat編號方案定義。

【0135】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體包含：i)與包含SEQ ID NO：7之胺基酸序列的重鏈可變區具有至少85%序列同一性的胺基酸序列；和(ii) 與包含SEQ ID NO：8之胺基酸序列的輕鏈可變區具有至少85%序列同一性的胺基酸序列。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N-端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。

【0136】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體或該抗CD228抗體-藥物共軛體之抗CD228抗體為單株抗體。

【0137】本發明之抗CD228抗體亦可就其與CD228(例如人CD228)之結合親和力來描述或具體指明。較佳之結合親和力包括其解離常數或K_D小於5×10^{-2}M、10^{-2}M、5×10^{-3}M、10^{-3}M、5×10^{-4}M、10^{-4}M、5×10^{-5}M、10^{-5}M、$5x10^{-6}$M、10^{-6}M、$5x10^{-7}$M、10^{-7}M、$5x10^{-8}$M、10^{-8}M、$5x10^{-9}$M、10^{-9}M、$5x10^{-10}$M、10^{-10}M、$5x10^{-11}$M、10^{-11}M、$5x10^{-12}$M、10^{-12}M、$5x10^{-13}$M、10^{-13}M、$5x10^{-14}$M、10^{-14}M、$5x10^{-15}$M或10^{-15M}。

【0138】於一些實施態樣中，本發明之抗CD228抗體的結合力為pH依賴性，從而使該抗體在整個pH梯度下顯示出差別結合。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體在pH約5.5至約pH 6.3之間顯示最大結合。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體在pH約5.6下顯示最大結合。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體在pH約6.3下顯示最大結合。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體在pH約5.1或更小下顯示最低的結合。

【0139】免疫球蛋白有五種類別：IgA、IGD、IgE、IgG和IgM，其分別具有被命名為α、δ、ε、γ和μ之重鏈。該γ和α類別被進一步分成亞類，例如人類表現下列亞類：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。IgG1抗體可以多種稱為同種異型之多態變體存在(在Jefferis and Lefranc 2009. *mAbs* Vol 1 Issue 4 1-7中審閱)，其中任一者均適合

用於本文的一些實施態樣中。人群中常見之同種異型變體為以字母a、f、n、z或其組合命名之變體。於本文之任何實施態樣中，該抗體可包含重鏈Fc區，該重鏈Fc區包含人IgG Fc區。於進一步之實施態樣中，該人IgG Fc區包含人IgG1。

【0140】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體和/或抗CD228抗體-藥物共軛體包含如上文提供之任何實施態樣中之重鏈可變結構域和如上文提供之任何實施態樣中的輕鏈可變結構域。於一實施態樣中，該抗體包含重鏈恆定區和輕鏈恆定區，該重鏈恆定區包含下列胺基酸序列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:17),

該輕鏈恆定區包含下列胺基酸序列：

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18)

，包括這些序列之轉譯後修飾。於另一實施態樣中，該抗體包含重鏈恆定區和輕鏈恆定區，該重鏈恆定區包含下列胺基酸序列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:19)

，該輕鏈恆定區包含下列胺基酸序列：

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18)

，包括這些序列之轉譯後修飾。SEQ ID NO：19在人IgG1同型之胺基酸位置239處包含絲胺酸轉換為半胱胺酸之取代。額外之半胱胺酸殘基的存在允許鏈間二硫鍵形成。該等鏈間二硫鍵的形成可引起位阻，從而降低Fc區-FcγR結合交互作用之親和力。該被引入IgG恆定區之Fc區或接近IgG恆定區之Fc區的半胱胺酸殘基亦可作為用於與治療劑共軛結合之位點(即，使用硫醇特異性試劑，諸如藥物之馬來醯亞胺衍生物與細胞毒性藥物偶聯)。治療劑之存在引起空間位阻，從而進一步降低Fc區-FcγR結合交互作用之親和力。在位置234、235、236和/或237其中任一處的其他取代會降低對Fcγ受體，特別是FcγRI受體之親和力(參見，例如US 6,624,821、US 5,624,821)。

【0141】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體或抗體-藥物共軛體之抗CD228抗體為人化抗體hL49 HALC。hL49 HALC包含SEQ ID NO：7之重鏈可變區序列和SEQ ID NO：8之輕鏈可變區序列。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N端麩胺醯胺經環化以形成焦麩胺酸。於一些實施態樣中，該抗CD228抗體或抗體-藥物共軛體之抗CD228抗體為人化抗體hL49。hL49包含含有SEQ ID NO：7之胺基酸序列的重鏈可變區、含有SEQ ID NO：8之胺基酸序列的輕鏈可變區、含有SEQ ID NO：17之胺基酸序列的

重鏈恆定區和含有SEQ ID NO：18之胺基酸序列的輕鏈恆定區。

【0142】該抗體亦包括經修飾之衍生物，即，經由將任何類型之分子與抗體共價連接進行修飾，從而使共價連接不會阻止該抗體與CD228結合或對HD細胞發揮細胞抑制或細胞毒性作用。例如，但不限於抗體衍生物，包括那些已藉由下列方式修飾之抗體：例如糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、藉由已知之保護/封閉基團衍生化、蛋白水解裂解、與細胞配體或其他蛋白質鏈接，等。可藉由已知技術進行許多化學修飾的其中任一種，該技術包括，但不限於特異性化學裂解、乙醯化、甲醯化、衣黴素(tunicamycin)之代謝合成，等。此外，該衍生物可包含一或多種非經典胺基酸。

人化抗體

【0143】人化抗體為經遺傳工程處理之抗體，其中該來自非人“供體”抗體之CDR被移植到人“受體”抗體序列中(參見，例如Queen, US 5,530,101和5,585,089；Winter, US 5,225,539；Carter, US 6,407,213；Adair, US 5,859,205；和Foote, US 6,881,557)。該受體抗體序列可為，例如成熟之人抗體序列、該等序列之複合物、人抗體序列之共有序列或種系區序列。在重鏈方面之較佳受體序列為種系V_H外顯子V_H1-2(在文獻中亦稱為HV1-2)(Shin et al, 1991, EMBO J. 10:3641-3645)，而在鉸鏈區(J_H)方面為外顯子J_H-6

(Mattila et al, 1995, Eur. J. Immunol. 25:2578-2582)。在輕鏈方面，較佳之受體序列為外顯子VK2-30(在文獻中亦稱為KV2-30)，而在鉸鏈區方面為外顯子JK-4(Hieter et al, 1982, J. Biol. Chem. 257:1516-1522)。因此，人化抗體為具有某些CDR或全部CDR係全部或基本上來自供體抗體，而可變區框架序列和恆定區(若存在的話)係全部或基本上來自來自人抗體序列。類似地，人化重鏈具有至少一個、二個且通常所有三個CDR係全部或基本上來自供體抗體，且重鏈可變區框架序列和重鏈恆定區(若存在的話)基本上來自人重鏈可變區框架和重鏈恆定區序列。類似地，人化輕鏈具有至少一個、二個且通常所有三個CDR係全部或基本上來自供體抗體輕鏈，且輕鏈可變區框架序列和輕鏈恆定區(若存在的話)基本上來自人輕鏈可變區框架和輕鏈恆定區序列。除了奈米抗體和dAb外，人化抗體包含人化重鏈和人化輕鏈。當各別CDR之間的對應殘基(如Kabat所定義)具有至少60%、85%、90%、95%或100%之同一性時，人化抗體中之CDR基本上係來自非人抗體中的對應CDR。當藉由Kabat定義之對應殘基之間具有至少85%、90%、95%或100%之同一性時，該抗體鏈之可變區框架序列或抗體鏈之恆定區基本上分別來自人可變區框架序列或人恆定區。

【0144】雖然人化抗體通常納入來自小鼠抗體的所有六個CDR(較佳為藉由Kabat定義)，其亦可使用較全部CDR數少(例如至少3、4或5個)之來自小鼠抗體的CDR製造(例

如：Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002；Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002；Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999；Tamura et al, Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000)。

【0145】基於胺基酸對CDR構象和/或與抗原結合之可能影響可從來自人類可變區框架殘基中選出某些胺基酸以用於取代。該等可能之影響的調查可藉由建模、檢查特定位置之胺基酸的特徵、或對特定胺基酸之取代或誘變效果的實證觀察來進行。

【0146】例如，當鼠科動物可變區框架殘基和選定之人可變區框架殘基彼此之間的胺基酸不同時，當合理預期該人類框架胺基酸具有下列情況時，其可被來自小鼠抗體之等效框架胺基酸取代：

(1) 與抗原直接非共價結合，

(2) 與CDR區相鄰，

(3) 在其他情況下，與CDR區交互作用(例如在CDR區之約6A之內)；或

(4) 介導重鏈與輕鏈之間的交互作用。

【0147】本發明之一態樣提供小鼠抗體L49之人化形式。該小鼠抗體L49之一種該等人化變體被定名為HALC。HALC包含含有SEQ ID NO：7之胺基酸序列的成熟重鏈可變區和含有SEQ ID NO：8之胺基酸序列的成熟輕鏈可變區。於一些實施態樣中，該重鏈可變結構域之N端麩胺醯

胺經環化以形成焦麩胺酸。本發明之人化抗體包括該HALC人化抗體之變體，其中該人化重鏈成熟可變區顯示出與SEQ ID NO：7具有至少90%、95%或99%同一性且該人化輕鏈成熟可變區顯示出與SEQ ID NO：8具有至少90%、95%或99%序列同一性。較佳地，於該等抗體中，HALC中的某些或全部回復突變被保留。換句話說，重鏈位置H27、H30、H47、H71和H78中至少1、2、3、4個或較佳地，全部5個位置分別被D、T、Y、R和Y佔據。同樣地，位置L36較佳為被Y佔據，且位置L46較佳為被L佔據。於一些實施態樣中，位置L2較佳為被F佔據。於一些實施態樣中，該等人化抗體之CDR區與小鼠供體抗體之CDR區相同或基本上相同。於一較佳之實施態樣中，該輕鏈CDR1位置L28被D佔據。該CDR區可藉由任何常規定義(例如Chothia)來定義，但較佳為藉由Kabat定義。於一實施態樣中，該人化抗體包含重鏈，該重鏈包含SEQ ID NO：7之3個CDR和與SEQ ID NO：7之可變區框架具有至少95%同一性之可變區框架。於另一實施態樣中，該人化抗體包含輕鏈，該輕鏈包含SEQ ID NO：8之3個CDR和與SEQ ID NO：8之可變區框架具有至少95%同一性之可變區框架。於進一步之實施態樣中，該人化抗體包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含SEQ ID NO：7之3個CDR和與SEQ ID NO：7之可變區框架具有至少95%同一性之可變區框架，該輕鏈包含SEQ ID NO：8之3個CDR和與SEQ ID NO：8之可變區框架具有至少95%同一性之可變區框架 。於一實施

態樣中，該人化抗體包含重鏈，該重鏈包含SEQ ID NO：7之3個CDR和與SEQ ID NO：7之可變區框架具有至少98%同一性之可變區框架。於另一實施態樣中，該人化抗體包含輕鏈，該輕鏈包含SEQ ID NO：8之3個CDR和與SEQ ID NO：8之可變區框架具有至少98%同一性之可變區框架。於進一步之實施態樣中，該人化抗體包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含SEQ ID NO：7之3個CDR和與SEQ ID NO：7之可變區框架具有至少98%同一性之可變區框架，該輕鏈包含SEQ ID NO：8之3個CDR和與SEQ ID NO：8之可變區框架具有至少98%同一性之可變區框架 。於一實施態樣中，該人化抗體包含重鏈，該重鏈包含SEQ ID NO：7之3個CDR和與SEQ ID NO：7之可變區框架具有至少99%同一性之可變區框架。於另一實施態樣中，該人化抗體包含輕鏈，該輕鏈包含SEQ ID NO：8之3個CDR和與SEQ ID NO：8之可變區框架具有至少99%同一性之可變區框架。於進一步之實施態樣中，該人化抗體包含重鏈和輕鏈，該重鏈包含SEQ ID NO：7之3個CDR和與SEQ ID NO：7之可變區框架具有至少99%同一性之可變區框架，該輕鏈包含SEQ ID NO：8之3個CDR和與SEQ ID NO：8之可變區框架具有至少99%同一性之可變區框架。

【0148】與小鼠抗體L49相比較，該人化抗體HALC在胺基酸位置L28處包含天門冬醯胺轉換為天門冬胺酸之取代(其係在輕鏈CDR1中)。該取代排除在人化L49變體HALB中觀察到之脫醯胺，且具有有限之異構化。於本文

所描述之任何抗體的一些實施態樣中，該輕鏈可變區缺乏在位置L28處之取代。於本文所描述之抗體的一些實施態樣中，該輕鏈可變區包含下列胺基酸序列：

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSNGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:20)。於一些實施態樣中，該人化抗體為HALB，其包含含有SEQ ID NO：7之重鏈可變區和含有SEQ ID NO：20之輕鏈可變區。

【0149】只要人化抗體顯示出與示例之HALC人化抗體間任何的不同，該等額外變化的一種可能性為在該可變區框架中之額外的回復突變。然而，該等額外之回復突變並非較佳的，因為它們通常不會改善親和力且引入更多小鼠殘基可能會增加免疫原性之風險。

【0150】另一種可能之變化為以來自人CDR序列之對應殘基(其通常來自用於設計該示例性人化抗體的人受體序列之CDR)取代該小鼠抗體之CDR中的某些殘基。在某些抗體中，僅需要部分CDR(即，結合所必要之CDR殘基的子集(稱為SDR))來保持人化抗體中之結合。不與抗原接觸且不在SDR中之CDR殘基可基於先前之研究(例如通常不需要CDR H2中之殘基H60至H65)，藉由分子建模和/或憑經驗，或依Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863 (2004)中之描述從位於Chothia高變環(Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987)外的Kabat CDR區鑑別出。在該等人化抗體中，在其中不缺乏一或多個供體CDR殘基的位置處或在整

個供體CDR均被省略的位置處，佔據該位置之胺基酸可為該受體抗體序列中佔據該對應位置(藉由Kabat編號)之胺基酸。用於CDR中之供體胺基酸的該等受體取代之數量包括反映競爭考量的平衡。該等取代可能有利於減少人化抗體中之小鼠胺基酸的數目，因此可降低潛在之免疫原性。然而，取代亦可引起親和力改變，較佳為避免親和力顯著降低。CDR中用於取代之位置和待取代之胺基酸亦可憑經驗選擇。

【0151】儘管不是較佳的，但可在，例如不與該CDR接觸之框架殘基中，或甚至在CDR內某些可能與CDR接觸之殘基胺基酸中製造其他胺基酸取代。通常，在變體人化序列中製造之替換相對於該被替換之HALC胺基酸而言為保守性的。較佳地，相對於HALC之替換(不論是否為保守性)對於人化mAb之結合親和力或效力(即，其與人CD228結合並抑制癌細胞生長之能力)沒有實質的影響。

【0152】變異體與HALC之重鏈和輕鏈成熟可變區序列的差異通常係由少數(例如，通常在該輕鏈成熟可變區、或重鏈成熟可變區、或在二者中均不超過1、2、3、5或10個)替換、刪除或插入造成。

恆定區之選擇

【0153】人化抗體之重鏈和輕鏈可變區可與至少一部分之人恆定區連接。恆定區之選擇部分取決於是否需要抗體依賴性細胞介導之細胞毒性、抗體依賴性細胞吞噬作用

和/或補體依賴性細胞毒性。例如，人同型IgG1和IgG3具有強補體依賴性細胞毒性，人同型IgG2具有弱補體依賴性細胞毒性，而人IgG4缺乏補體依賴性細胞毒性。人IgG1和IgG3亦誘導較人IgG2和IgG4所誘導者更強之由細胞介導的效應子功能。輕鏈恆定區可為λ或κ。抗體可以含有二條輕鏈和二條重鏈之四聚體形式表現、以分開之重鏈、輕鏈形式表現、以Fab、Fab'、F(ab')2和Fv形式表現，或以其中重鏈和輕鏈可變結構域係透過間隔子連接之單鏈抗體形式表現。

【0154】人類恆定區顯示出在不同個體之間具有同種異型變化和異同種異型變化，即，該恆定區在不同個體中之一或多個多態性位置處可能有所差異。異同種異型與同種異型的不同之處在於識別異同種異型之血清與一或多種其他同型的非多態性區域結合。

【0155】輕鏈和/或重鏈之胺基或羧基端的一或數個胺基酸(諸如該重鏈之C-端離胺酸)可能在一定比例或全部之分子中缺失或衍生而得。可在該恆定區中製造取代以減少或增加效應子功能，諸如補體介導之細胞毒性或ADCC(參見，例如Winter等人，美國專利案5,624,821號；Tso等人，美國專利案5,834,597號；和Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006)，或者，延長在人體中之半衰期(參見，例如Hinton et al., J.Biol.Chem.279：6213，2004)。

【0156】示例性取代包括在胺基酸位置234、235、

237、239、267、298、299、326、330或332處引入半胱胺酸殘基對天然胺基酸進行胺基酸取代，較佳為在人IgG1同型中之S239C突變(US 20100158909)。額外之半胱胺酸殘基的存在允許形成鏈間二硫鍵。該等鏈間二硫鍵的形成可引起空間位阻，從而降低Fc區-FcγR結合交互作用之親和力。在IgG恆定區之Fc區或接近IgG恆定區之Fc區引入半胱胺酸殘基亦可作為用於與治療劑共軛結合之位點(即，使用硫醇特異性試劑，諸如藥物之馬來醯亞胺衍生物與細胞毒性藥物偶聯)。治療劑之存在會引起空間位阻，從而進一步降低Fc區與FcyR結合交互作用之親和力。在位置234、235、236和/或237中任一位置處的其他取代均會降低對Fcy受體(尤其是FcyRI受體)之親和力(參見，例如US 6,624,821、US 5,624,821)。

【0157】抗體之活體內半衰期亦可影響其效應子功能。該抗體之半衰期可經增加或減少以修飾其治療活性。FcRn為結構上類似於第I類MHC抗原之受體，其與β2-微球蛋白非共價結合。FcRn調節IgG之分解代謝及其在組織之間的轉胞吞作用(Ghetie and Ward, 2000, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113)。IgG-FcRn交互作用係在pH 6.0(細胞內囊泡之pH)下發生，而非在pH 7.4(血液之pH)下發生；此交互作用使IgG能夠再循環回到循環中(Ghetie and Ward, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18:739-766；Ghetie and Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113)。人IgG1上涉及FcRn結合之區域

已被圖譜繪製定位(Shields et al, 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。在人IgG1之Pro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382或Asn434位置處的丙胺酸取代增強FcRn結合(Shields et al, 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。具有這些取代之IgG1分子具有較長之血清半衰期。因此，與未經修飾之IgG1相比較，這些經修飾之IgG1分子可能能夠在較長之期間內執行其效應子功能，並因此發揮其治療效力。用於增加與FcRn之結合的其他示例性取代包括位置250處之Gin和/或位置428處之Leu。EU編號用於恆定區中之所有位置。

【0158】與保守性Asn297共價連接之寡醣涉及IgG之Fc區與FcγR結合的能力(Lund et al, 1996, J. Immunol. 157: 4963-69；Wright and Morrison, 1997, Trends Biotechnol. 15:26-32)。將此IgG上之糖型經遺傳工程處理可顯著改善由IgG介導之ADCC。在此糖型加入平分N-乙醯葡糖修飾(Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies et al, 2001, Biotech. Bioeng. 74:288-94)或從此糖型移除岩藻糖(Shields et al, 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-40；Shinkawa et al, 2003, J. Biol. Chem. 278:6591-604; Niwa et al/., 2004, Cancer Res. 64:2127-33)為二種改善IgG Fc與FcyR之間的結合，從而增強由Ig介導之ADCC活性的IgG Fc工程處理之實例。於一些實施態樣中，本文所描述之抗CD228抗體或該抗體-藥物共軛體之抗CD228抗體具有附接於該恆定區之保守性Asn297殘基的聚醣，其中該恆定區中

之胺基酸殘基的編號係根據Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中描述之EU索引。於一些實施態樣中，該聚醣為雙觸角的。於一些實施態樣中，該聚醣為核心岩藻糖基化的。於一些實施態樣中，該聚醣具有零個終端半乳糖殘基。於一些實施態樣中，該聚醣為雙觸角的且為核心岩藻糖基化的。於一些實施態樣中，該聚醣為雙觸角的且具有零個終端半乳糖殘基。於一些實施態樣中，該聚醣為核心岩藻糖基化的且具有零個終端半乳糖殘基。於一些實施態樣中，該聚醣為雙觸角的、核心岩藻糖基化的且具有零個半乳糖殘基。於一些實施態樣中，本文所描述之抗CD228抗體或抗體-藥物共軛體之抗CD228抗體群中，該恆定區中之保守性Asn297殘基(其中該恆定區中之胺基酸殘基的編號係根據Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中描述之EU索引)主要被雙觸角、核心岩藻糖基化且具有零個終端半乳糖殘基之聚醣佔據。

【0159】系統性取代接觸溶劑之人IgG1 Fc區之胺基酸已產生具有改變之FcγR結合親和力的IgG變體(Shields et al, 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604)。當與親本IgG1相比較時，涉及Thr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334或Ser298/Glu333 Lys334轉變為Ala之取代的這些變

體之子集顯示出對FcγR之結合親和力和ADCC活性增加(Shields et al, 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604；Okazaki et al, 2004, J. Mol. Biol. 336:1239-49)。

【0160】抗體之補體固定活性(C1q結合和CDC活性二者)可藉由在Lys326和Glu333處之取代來改善(Idusogie et al., 2001 , J. Immunol. 166:2571-2575)。人IgG2骨架上之相同取代可將與Clq結合不良且補體活化活性嚴重不足之抗體同型轉變為既能與Clq結合又能介導CDC的同型(Idusogie et al, 2001, J. Immunol. 166:2571-75)。數種其他方法亦已被用來改善抗體之補體固定活性。例如，將IgM之具有18個胺基酸之羧基端尾片移植到IgG之羧基端可大為增強其CDC活性。這甚至可使用IgG4觀察到，該IgG4通常不具有可檢測之CDC活性(Smith et al, 1995, J. Immunol. 154:2226-36)。同樣地，以Cys取代位於靠近IgG1重鏈之羧基端的Ser444可誘導IgG1之尾-至-尾二聚體化，從而使CDC活性較單體IgG1增加200倍(Shopes et al, 1992, J. Immunol. 148:2918-22)。另外，對Clq具有特異性之雙特異性雙抗體構建體亦賦予CDC活性(Kontermann et a/., 1997, Nat. Biotech. 15:629-31)。

【0161】補體活性可藉由將重鏈之胺基酸殘基318、320和322中至少一者突變為具有不同側鏈之殘基(諸如Ala)來降低。取代該三種殘基其中任一者之其他烷基取代的非離子殘基，諸如Gly、He、Leu或Val，或芳香族非極性殘基，如Phe、Tyr、Trp和Pro亦會降低或消除Clq結合。

Ser、Thr、Cys和Met可用於殘基320和322，但不可用於318來降低或消除Clq結合活性。

【0162】以極性殘基取代318(Glu)殘基可修飾，但不能消除Clq結合活性。以Ala取代殘基297(Asn)導致去除細胞溶解活性，但僅略微降低對Clq之親和力(約減弱三倍)。此種改變破壞對補體活化而言必要之糖基化位點和碳水化合物之存在。在該位點之任何其他取代亦破壞該糖基化位點。下列突變及彼等之任何組合亦降低C1q結合：D270A、K322A、P329A和P31 IS(參見WO 06/036291)。

【0163】提及人恆定區時係包括具有任何天然同種異型或任何佔據天然同種異型中之多態性位置之殘基排列的恆定區。再者，相對於天然人恆定區(諸如上文中所指明者)，可存在多達1、2、5或10個突變以減少Fcγ受體結合或增加與FcRN結合。

【0164】於一些實施態樣中，本文所描述之抗CD228和/或抗CD228抗體-藥物共軛體抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含SEQ ID NO：17之胺基酸序列。於一些實施態樣中，本文所描述之抗CD228和/或抗CD228抗體-藥物共軛體抗體包含輕鏈恆定區，該輕鏈恆定區包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。於一些實施態樣中，本文所描述之抗CD228和/或抗CD228抗體-藥物共軛體抗體包含重鏈恆定區和輕鏈恆定區，該重鏈恆定區包含SEQ ID NO：17之胺基酸序列，該輕鏈恆定區包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。本文所描述之抗CD228和/或抗CD228抗體-藥物

共軛體抗體包含重鏈恆定區，該重鏈恆定區包含SEQ ID NO：19之胺基酸序列。於一些實施態樣中，本文所描述之抗CD228和/或抗CD228抗體-藥物共軛體抗體包含重鏈恆定區和輕鏈恆定區，該重鏈恆定區包含SEQ ID NO：19之胺基酸序列，該輕鏈恆定區包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。

V. 重組抗體之表現

【0165】人化抗體通常係藉由重組表現產生。重組多核苷酸構建體通常包括與該抗體鏈之編碼序列可操作地連接之表現控制序列，包括天然關聯或異源啟動子區。較佳地，該表現控制序列為能夠轉化或轉染真核宿主細胞之在載體中的真核啟動子系統。一旦將該載體併入適當之宿主中，將該宿主維持在適合該核苷酸序列高度表現的條件下，並收集和純化該交叉反應抗體。

【0166】哺乳動物細胞為用於表現編碼免疫球蛋白或其片段之核苷酸節段的較佳宿主。參見Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)。本技藝已研發多種能夠分泌完整異源蛋白質之合適的宿主細胞株，包括CHO細胞株(例如DG44)、多種不同COS細胞株、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞和非抗體產製骨髓瘤，包括Sp2/0和NS0。較佳地，該細胞為非人類細胞。這些細胞之表現載體可包括表現控制序列，諸如複製起點、啟動子、增強子(Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986))、及必要

之處理信息位點，諸如核醣體結合位點、RNA剪接位點、聚腺苷酸化位點和轉錄終止子序列。較佳之表現控制序列為源自內源性基因、巨細胞病毒、SV40、腺病毒、牛乳頭瘤病毒，等之啟動子。參見Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)。

【0167】一旦表現後，可將抗體根據本技藝之標準程序純化，包括HPLC純化、柱色層分析術、凝膠電泳，等(一般而言，參見Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982))。

VI. 核酸

【0168】本發明進一步提供編碼上述任何人化重鏈和輕鏈的核酸。通常，該核酸亦編碼與成熟重鏈和輕鏈融合之信號肽。核酸上之編碼序列可與調控序列(諸如啟動子、增強子、核醣體結合位點、轉錄終止信號，等)可操作地連接以確保該編碼序列之表現。編碼重鏈和輕鏈之核酸可以經分離之形式存在，或可被選殖入一或多個載體中。該核酸可藉由，例如固態合成或進行重疊寡核苷酸之PCR來合成。編碼重鏈和輕鏈之核酸可連接成一個連續核酸，例如在表現載體內或可分開，例如各自被選殖入其本身之表現載體中。

【0169】於一些態樣中，本文亦提供編碼如本文所描述之抗CD228抗體或其抗原結合片段的核酸。本文進一步提供包含該編碼如本文所描述之抗CD228抗體或其抗原結

合片段之核酸的載體。本文進一步提供表現編碼如本文所描述之抗CD228抗體或其抗原結合片段的核酸之宿主細胞。本文進一步提供包含載體之宿主細胞，該載體包含編碼如本文所描述之抗CD228抗體或其抗原結合片段的核酸。

【0170】本文所描述之抗CD228抗體可藉由眾所周知之重組技術製備，該重組技術係利用眾所周知之表現載體系統和宿主細胞。於一實施態樣中，該抗體係在CHO細胞中，利用如下列文獻中所揭示之GS表現載體系統製備：De la Cruz Edmunds *et al.*, 2006, *Molecular Biotechnology* 34:79-190、EP216846、美國專利案5,981,216號、WO 87/04462、EP323997、美國專利案5,591,639號、美國專利案5,658,759號、EP338841、美國專利案5,879,936號和美國專利案5,891,693號。

【0171】本文所描述之單株抗CD228抗體可，例如藉由首先由Kohler *et al.*, *Nature*, 256, 495 (1975)描述之雜交瘤方法產生，或可藉由重組DNA方法產生。亦可使用，例如Clackson *et al.*, *Nature*, 352, 624-628 (1991)和Marks *et al.*, *JMol, Biol.*, 222(3):581-597 (1991)中描述之技術從噬菌抗體集合庫分離。單株抗體可從任何合適之來源獲得。因此，例如單株抗體可從雜交瘤取得，該雜交瘤係從鼠脾臟B細胞製備，該鼠脾臟B細胞係從以所欲抗原(例如為在表面表現該抗原之細胞形式或為編碼所欲抗原之核酸的形式)免疫化之小鼠取得。單株抗體亦可從源自免疫化之人

類或非人類哺乳動物(諸如大鼠、狗、靈長類，等)的抗體表現細胞的雜交瘤取得。

VII. 抗體-藥物共軛體

【0172】抗CD228抗體可與細胞毒性或細胞生長抑制部分(包括其醫藥上相容之鹽)共軛結合以形成抗體藥物共軛體(ADC)。特別適合與抗體共軛結合之部分為細胞毒性劑(例如化療劑)、前藥轉化酶、放射性同位素或化合物、或毒素(這些部分統稱為治療劑)。例如，抗CD288抗體可與細胞毒性劑(諸如化療劑)或毒素(例如細胞生長抑制劑或殺細胞劑，諸如雞母珠毒素(abrin)、蓖麻毒蛋白A、假單胞菌外毒素或白喉毒素)共軛結合。

【0173】抗CD228抗體可與前藥轉化酶共軛結合。該前藥轉化酶可利用已知方法與抗體重組融合至或以化學方式與抗體共軛結合。示例性前藥轉化酶為羧肽酶G2、β-葡糖醛酸酶、青黴素-V-醯胺酶、青黴素-G-醯胺酶、β-內醯胺酶、β-葡糖苷酶、硝基還原酶和羧肽酶A。

【0174】用於將治療劑與蛋白質(特別是抗體)共軛結合之技術眾所周知。(參見，例如Arnon et al, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"，在Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985)中；Hellstrom et al, "Antibodies For Drug Delivery," 在Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed.

1987)中；Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," 在Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985)中；"Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," 在Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985)中；和Thorpe et al, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58。亦參見，例如PCT出版物WO 89/12624。

【0175】治療劑可以能降低其活性之方式共軛結合，除非其從該抗體上裂解下來(例如藉由水解、藉由抗體降解或藉由裂解劑)。該等治療劑係使用可裂解之連接子與抗體連接，該可裂解之連接子在表現CD228之癌細胞的細胞內環境中對裂解敏感，但基本上對細胞外環境不敏感，從而使得當該共軛體被表現CD228之癌細胞內含時，從該抗體上裂解出來(例如，在胞內體中，或，例如在溶酶體環境中或在胞膜窖(caveolae)環境中憑藉pH敏感性或蛋白酶敏感性)。

【0176】通常，該ADC在治療劑和抗CD228抗體之間包含一個連接子區。如上述，通常，該連接子在細胞內條件下可裂解，從而使得該連接子裂解時，該治療劑從抗體釋入細胞內環境(例如在溶酶體或胞內體或胞膜窖內)中。該連接子可為，例如被細胞內肽酶或蛋白酶(包括溶酶體或胞內體蛋白酶)裂解之肽基連接子。通常，該肽基連接

子之長度為至少二個胺基酸或至少三個胺基酸。裂解劑可包括組織蛋白酶B和D，以及纖溶酶(參見，例如Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123)。最典型的為可被存在於表現CD228之細胞中的酶裂解之肽基連接子。例如，可使用可被硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶-B裂解之肽基連接子(例如，包含Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly肽之連接子(SEQ ID NO：30))，該硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶-B高度表現於癌組織中。其他該等連接子描述於，例如美國專利案6,214,345號中。於特定之實施態樣中，可被細胞內蛋白酶裂解之肽基連接子包含Val-Cit連接子或Phe-Lys二肽(參見，例如美國專利案6,214,345號，其描述使用Val-Cit連接子合成阿黴素)。使用細胞內蛋白水解釋出該治療劑的一個優點為當共軛結合時該作用劑通常被減毒且該共軛體之血清穩定性通常高。

【0177】該可裂解之連接子可為pH敏感性，即，在某些pH值下對水解敏感。通常，該pH敏感性連接子在酸性條件下為可水解的。例如，可使用在溶酶體中可水解之酸不穩定性連接子(例如腙(hydrazone)、縮胺脲、硫代縮胺脲、順式-烏頭醯胺、原酸酯、乙縮醛、縮酮，等)。(參見，例如美國專利案5,122,368；5,824,805；5,622,929號；Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123；Neville et al, 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661)。該等連接子在中性pH條件(諸如血液中者)下相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0(近似該溶酶體之pH)下則不穩

定。於某些實施態樣中，該可水解之連接子為硫醚連接子(諸如，例如經由醯基脲鍵與該治療劑連接之硫醚(參見，例如美國專利案5,622,929號))。

【0178】其他連接子可在還原條件下裂解(例如二硫化物連接子)。二硫化物連接子包括那些可使用下列群組形成者：SATA(N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯硫代醋酸酯)、SPDP(N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀醯亞胺基-氧羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫基)甲苯)、SPDB和SMPT。{參見，例如Thorpe et al, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931；Wawrzynczak et al, In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987。亦參見美國專利案4,880,935號)}。

【0179】該連接子亦可為丙二酸化物連接子(Johnson et al, 1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、馬來醯亞胺基苯甲醯連接子(Lau et al, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)或3'-N-醯胺類似物(Lau et al, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)。該連接子亦可為丙二酸化物連接子(Johnson et al, 1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、馬來醯亞胺基苯甲醯連接子(Lau et al, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)或3'-N-醯胺類似物(Lau et al, 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)。

【0180】該連接子亦可為不可裂解之連接子，諸如直

接附接至該治療劑(例如藥物)之馬來醯亞胺基-伸烷基連接子或馬來醯亞胺-芳基連接子。活性藥物連接子係藉由該抗體之降解釋出。

【0181】通常，該連接子基本上對細胞外環境不敏感意味著當該ADC存在於細胞外環境中(例如在血漿中)時，該ADC樣品中被裂解之連接子不超過約20%，通常不超過約15%，更常為不超過約10%，且甚至更常為不超過約5%，不超過約3%或不超過約1%。

【0182】連接子是否實質上對細胞外環境不敏感可藉由下列方式測定：例如，將(a)ADC(該“ADC樣品”)和(b)等莫耳量之未共軛結合之抗體或治療劑(“對照樣品”)獨立與血漿培育一段預定期間(例如2、4、8、16或24小時)，然後將存在於該ADC樣品中之未共軛結合之抗體或治療劑之量與存在於對照樣品中之量相比較，例如藉由高效液相色層分析術測量。

【0183】該連接子亦可促進細胞性內含。當與該治療劑共軛結合(即，在如本文所描述之ADC或ADC衍生物之連接子-治療劑部分的環境中)時，該連接子可促進細胞內含。或者，當與該治療劑和抗CD228抗體二者共軛結合時(即，在如本文所描述之ADC的環境中)，該連接子可促進細胞內含。

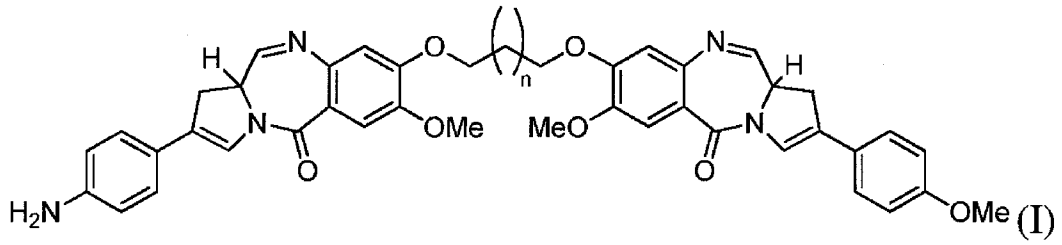
【0184】該抗CD228抗體可經由該抗體之雜原子與連接子共軛結合。這些雜原子可以其天然狀態存在於抗體中或可被引入該抗體中。於一些態樣中，該抗CD228抗體將

經由離胺酸殘基之氮原子與該連接子共軛結合。於其他態樣中，該抗CD228抗體將經由半胱胺酸殘基之硫原子與該連接子共軛結合。該半胱胺酸殘基可為天然存在的，或為經工程改造進入抗體中者。經由離胺酸和半胱胺酸殘基將連接子和藥物連接子與抗體共軛結合之方法為本技藝所已知。

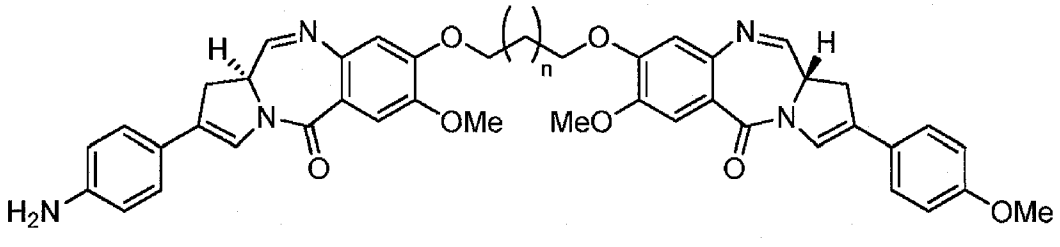
【0185】示例性抗體-藥物共軛體包括基於澳瑞他汀之抗體-藥物共軛體(即，該藥物組分為澳瑞他汀藥物)。澳瑞他汀與微管蛋白結合，已被證明會干擾微管動力學，及核分裂和細胞分裂，並具有抗癌活性。通常，該基於澳瑞他汀之抗體-藥物共軛體在澳瑞他汀藥物和抗CD228抗體之間包含連接子。該連接子可為，例如可裂解之連接子(例如肽基連接子、碳水化合物連接子)或不可裂解之連接子(例如藉由抗體降解釋出之連接子)。澳瑞他汀包括澳瑞他汀T、MMAF和MMAE。示例性澳瑞他汀之合成和結構描述於美國公開案第7,659,241、7,498,298、2009-0111756、2009-0018086和7,968,687號中，各篇之全部內容以引用方式併入本文並用於所有目的。

【0186】其他示例性抗體-藥物共軛體包括美登木素抗體-藥物共軛體(即，該藥物組分為美登木素藥物)和苯二氮雜草(benzodiazepine)抗體藥物共軛體(即，該藥物組分為苯二氮雜草(例如吡咯並[1,4]苯二氮雜草二聚體(PBD二聚體)、吲哚啉並苯二氮雜草二聚體和噁唑烷並苯二氮雜草二聚體))。

【0187】於一些實施態樣中，用於本發明之PBD二聚體係由式I表示。較佳之PBD二聚體的立體化學為如式Ia所示者：



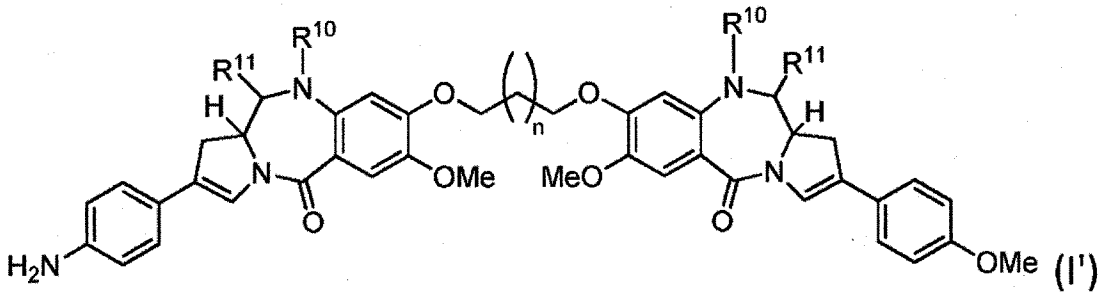
(I)

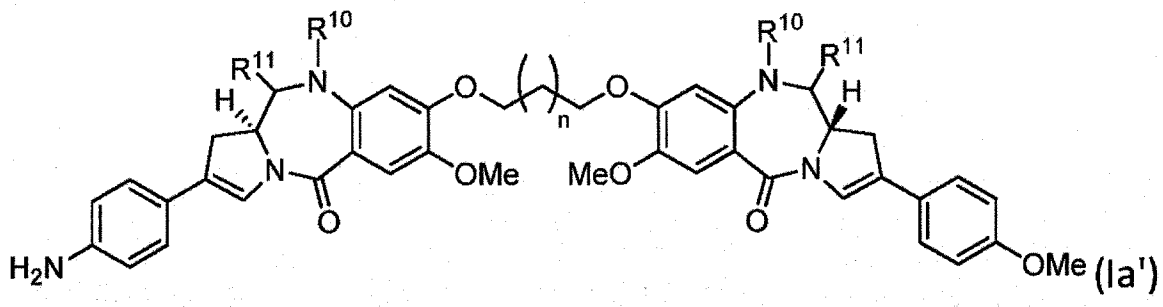


(Ia)

或製藥用鹽、溶劑化物或該鹽之溶劑化物；其中下標n為1或3。

【0188】式(I)和(Ia)之溶劑化物之形成通常係經由在一或二個PBD單體之亞胺官能基上加水或醇溶劑以形成甲醇胺和/或甲醇胺醚來進行。例如，在N10-C11位置處，可如下列式I'和Ia'所示存在亞胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺醚(NH-CH(OMe))：





其中：

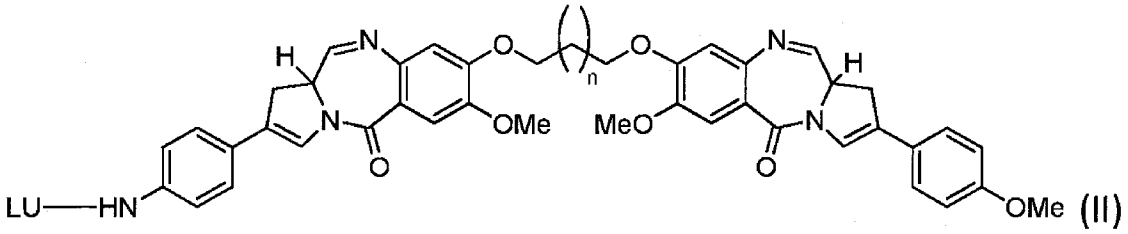
(a)R^{10}為H，且R^{11}為OH或OR^{A}，其中R^{A}為飽和之C_{1-4}烷基(較佳為甲基)；或者

(b)R^{10}和R^{11}在與其鍵結之氮和碳原子之間形成氮碳雙鍵；或者

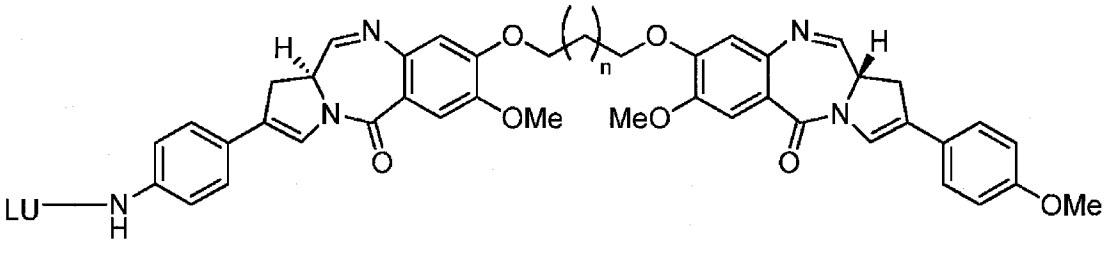
(c)R^{10}其中一者為H，且R^{11}為OH或OR^{A}，其中R^{A}為飽和之C_{1-4}烷基(較佳為甲基)；而另一R^{10}和R^{11}在與其鍵結之氮和碳原子之間形成氮碳雙鍵。

【0189】式I或Ia之PBD二聚體(或其製藥用鹽、溶劑化物或其鹽之溶劑化物)通常經由連接子單位，LU連接至抗體。該連接子單位係用於在標靶部位(例如癌細胞內)釋出式I或Ia(或其製藥用鹽、溶劑化物或其鹽之溶劑化物)之PBD二聚體。用於本發明之PBD藥物-連接子化合物係由下列式II表示(較佳之立體化學如第IIa圖所示)，其中LU為連

接子單元。該連接子單元可為，例如可裂解之肽連接子單元(例如包含纈胺酸-丙胺酸肽之連接子)或可裂解之二硫化物連接子單元：



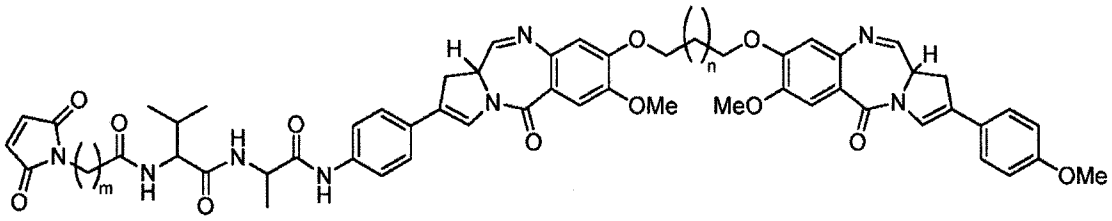
(II)



(IIa)

或其製藥用鹽、溶劑化物或其鹽之溶劑化物；其中下標n為1或3。

【0190】用於本發明之較佳的PBD藥物-連接子化合物係由下列式III表示：

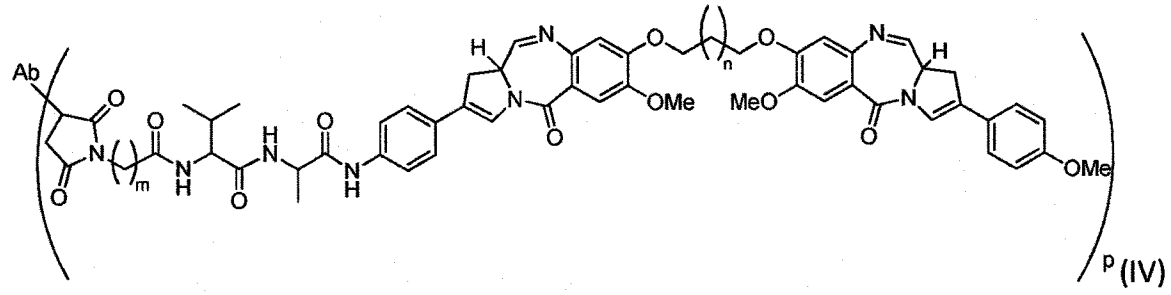


(III)

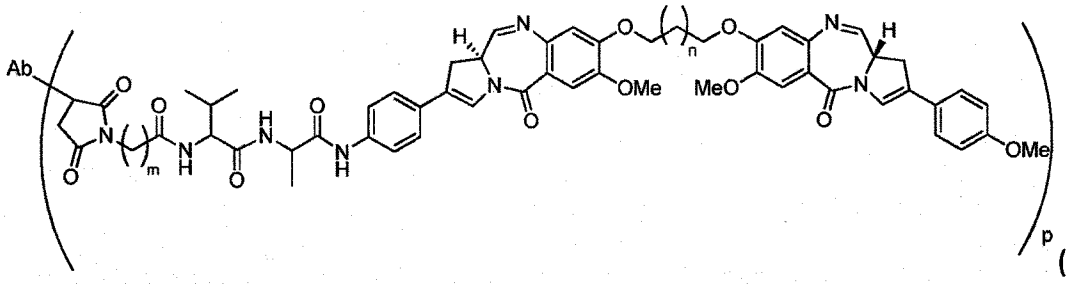
或為製藥用鹽、溶劑化物或其鹽之溶劑化物；其中下標n為1或3且下標m為2至5之整數。

【0191】PBD藥物連接子與抗CD228抗體共軛結合以產生靶向CD228之抗體-藥物共軛體。例如，該抗體可與式

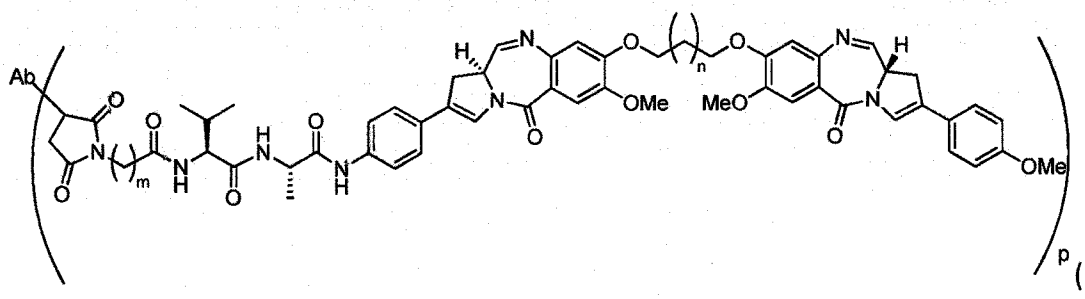
II或式III之藥物連接子共軛結合。示例性靶向C2248之抗體-藥物共軛體顯示於下列式IV、IVa和IVb中：



(IV)



(IVa)

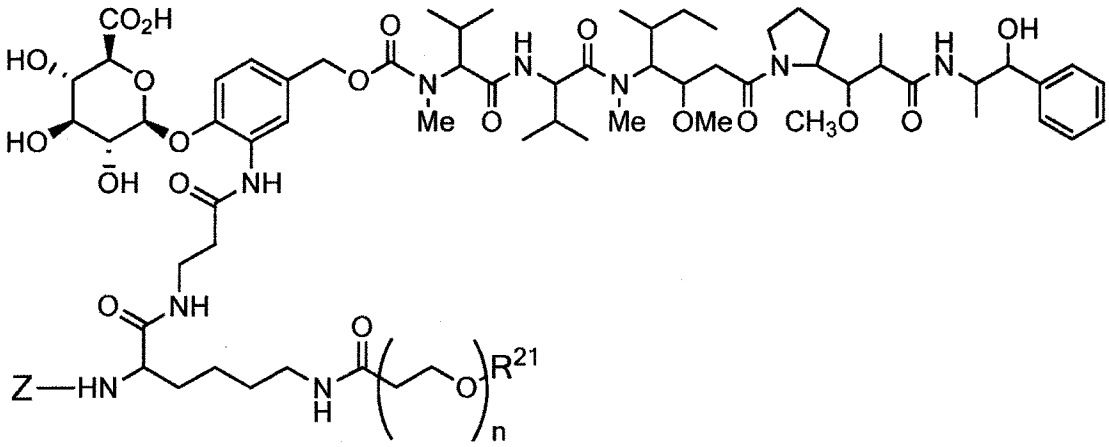


(IVb)

或為製藥用鹽、溶劑化物或其鹽之溶劑化物；其中下標n為1或3；下標m為2至5之整數；且下標p為1至4。

【0192】示例性藥物連接子包括MMAE藥物連接子。本發明者已發現：與非PEG化之對照組相比較，將聚乙二醇聚合物作為側鏈併入可裂解之β-葡糖醛酸苷MMAE藥物連接子中可在異種移植模型中提供具有降低之血漿清除率和增加之抗腫瘤活性的抗體藥物共軛體。因此，用於附接於本發明之抗體的特別有利之藥物連接子為如下列式V所

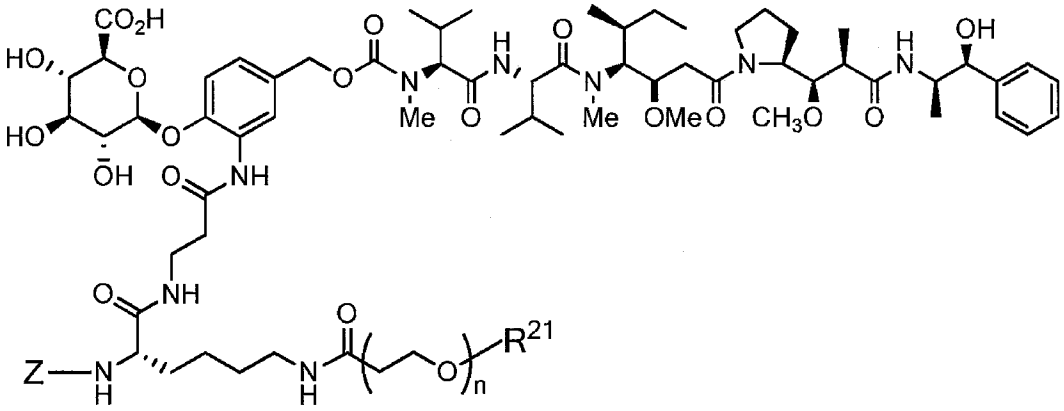
示者：



(V)

或其醫藥上可接受之鹽。

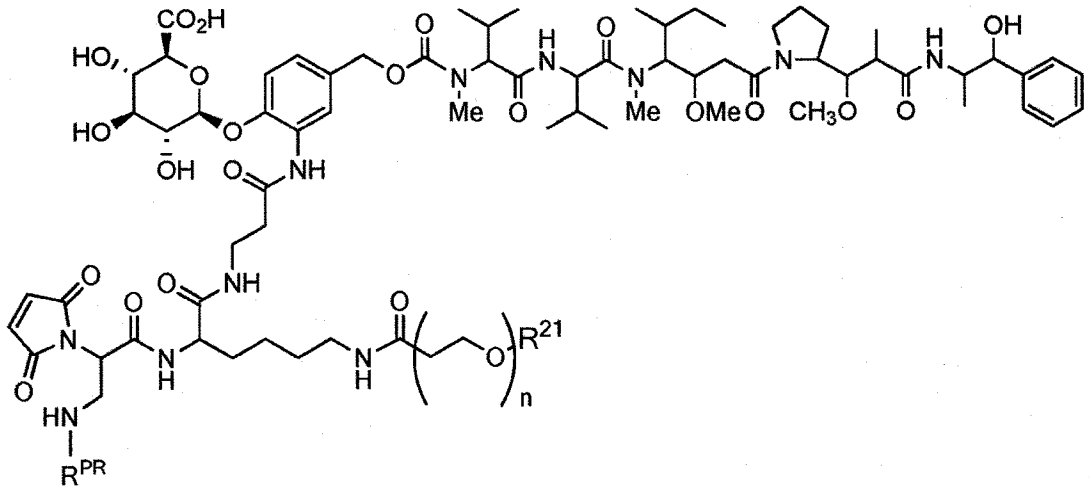
【0193】該等藥物連接子之較佳立體化學顯示於下列式Va中：



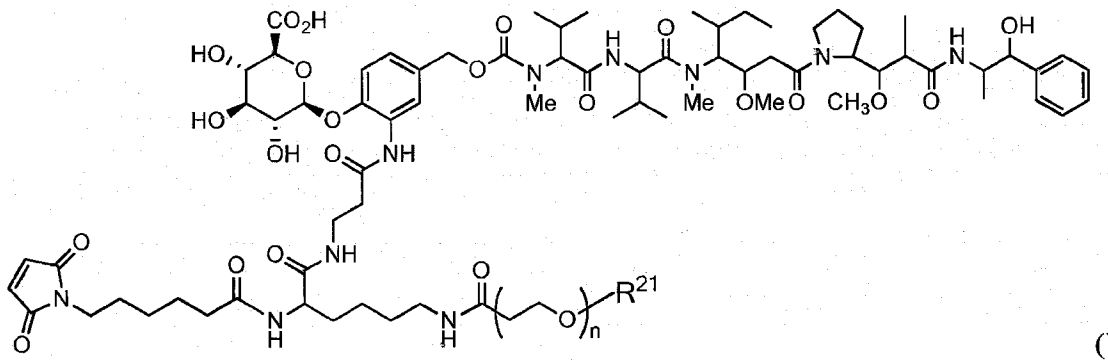
(Va)

或其醫藥上可接受之鹽，其中在式V和Va方面，Z代表有機部分，其具有能與該抗體上之官能基反應的反應部位以與該抗體形成共價連接，n係在8至36之範圍內且最佳為8至14(最佳為12)，R^{21}為用於聚乙二醇部分之封端單元(較佳為$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$)。

【0194】較佳之Z部分為含有馬來醯亞胺之部分。特佳之Z部分顯示於下列藥物連接子中：



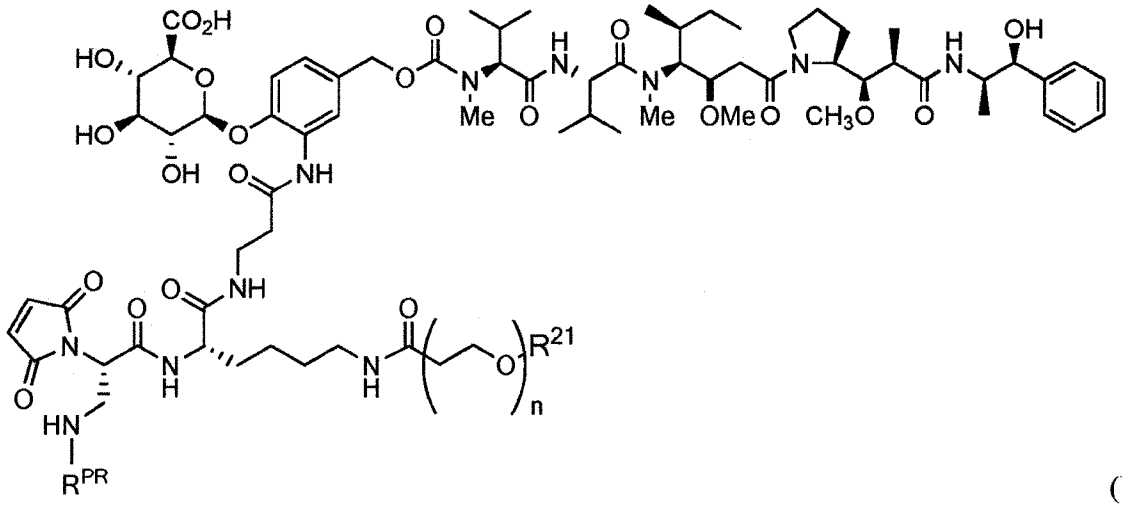
(VI)



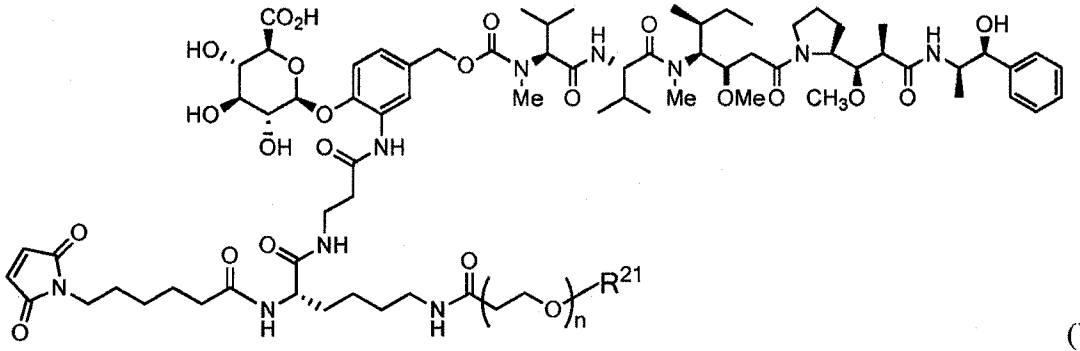
(VII)

或其醫藥上可接受之鹽。

【0195】該等藥物-連接子之較佳立體化學顯示於下：



(VIa)



(VIIa)

或其醫藥上可接受之鹽，其中在式VI、VIa、VII和VIIa方面，n係在8至36之範圍內且最佳為8至14(最佳為12)，R^{PR}為氫或保護基(例如酸不穩定性保護基，例如BOC)，R^{21}為用於聚乙二醇部分之封端單元(較佳為$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$)。

【0196】如上述，R^{PR}可為氫或保護基。如本文所使用之保護基係指選擇性地暫時或永久阻斷多官能化合物中之反應部位的基團。當保護基在使分子他處所需之化學轉化反應生效所必要之反應條件下和在該新形成之分子純化(當需要時)之期間能夠防止或避免不欲有之副反應或過早丟失保護基，且可在不會不利地影響該新形成之分子的結構或立體化學完整性的條件下被除去，則該保護基為合適之保護基。合適之胺保護基包括酸不穩定性氮保護基，包括由Isidro-Llobel et al. "Amino acid-protecting groups" Chem. Rev. (2009) 109: 2455-2504所提供者。通常，酸不穩定性氮保護基將一級或二級胺基團轉化成其對應之胺基甲酸酯，且包括第三丁基、烯丙基和胺基甲酸苄酯。

【0197】如上述，R^{21}為用於聚乙二醇部分之封端單

元。本技藝之技術熟習人士將可理解，聚乙二醇單元可以多種有機部分來封端，通常係使用那些相對非反應性者。烷基和經取代之烷基團為較佳者。

【0198】通常，每一抗體可連接1至16個藥物連接子。

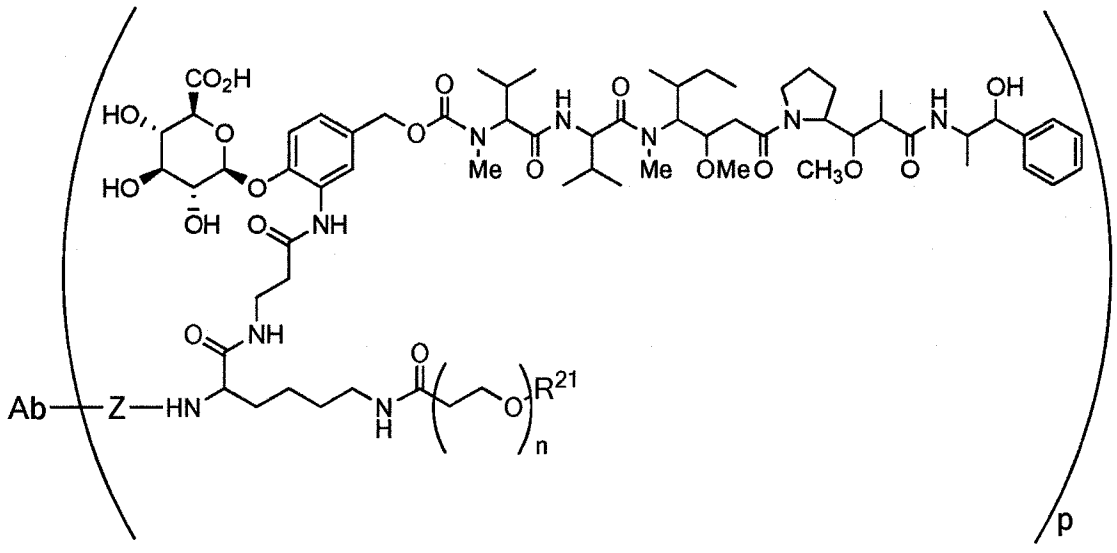
【0199】關於靶向CD228之抗體-藥物共軛體，下標p代表藥物荷載，且(根據上下文)可代表附接於個別抗體分子之藥物連接子分子的分子數，因此其為整數值，或者可代表示平均藥物荷載，因此可為整數或非整數值，但通常為非整數值。平均藥物荷載代表群體中每一抗體之藥物連接子分子的平均數目。通常，但並非總是如此，當吾人提及抗體(例如單株抗體)時，係指抗體分子之群體。於包含抗體-藥物共軛體分子群體之組成物中，該平均藥物荷載為重要的質量屬性，因其決定可遞送至靶細胞之藥物量。該組成物中未經共軛結合之抗體分子的百分比包括在該平均藥物荷載值中。

【0200】於本發明之較佳態樣中，當提及包含抗體-藥物共軛體化合物之群體的組成物時，該平均藥物荷載量為1至約16，較佳為約2至約14，更佳為約2至約10。在PBD抗體藥物共軛體(諸如本文所示例者)方面，特佳之平均藥物荷載量為約2。於一些態樣中，該抗體-藥物共軛體化合物之群體中之個別抗體分子的實際藥物荷載量為1至4、1至3或1至2，主要藥物荷載量為2。於較佳之態樣中，該平均藥物荷載量2係經由位點特異性共軛結合技術取得

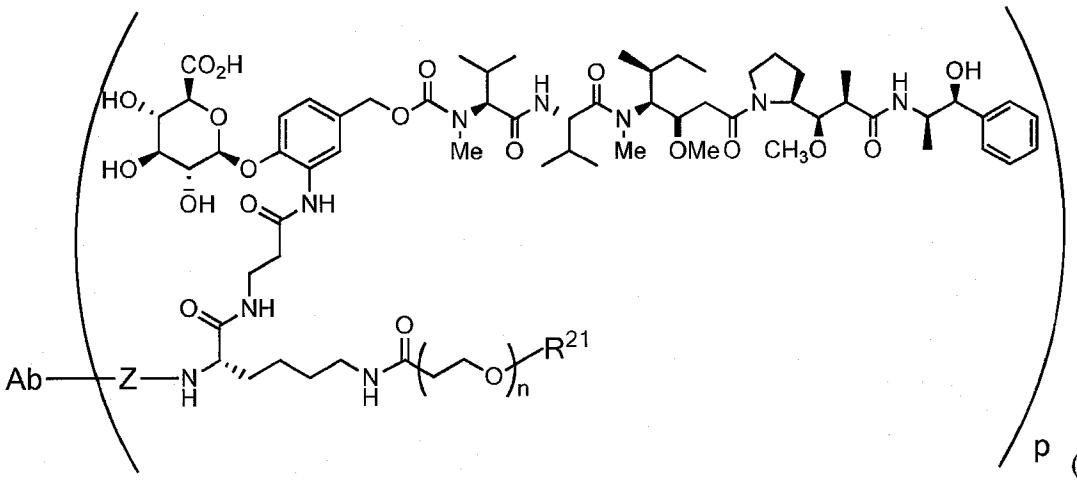
(例如引入該抗體中之經工程處理的半胱胺酸被包含在位置239處(根據EU索引編號系統))。

【0201】在MMAE PEG化之ADC(諸如本文所示例者)方面，特佳之平均藥物荷載量為約8。於示例之實施態樣中，該藥物連接子與該經還原之鏈間二硫化物的半胱胺酸殘基共軛結合。於一些態樣中，該抗體-藥物共軛體化合物之群體中的個別抗體分子之實際藥物荷載量為1至10(或6至10、或6至8)，主要之藥物荷載量為8。例如，除了該鏈間二硫化物之外，若藥物連接子與被引入之半胱胺酸殘基(諸如在位置239處半胱胺酸(根據EU索引編號系統))共軛結合，則可取得較高之藥物荷載量。

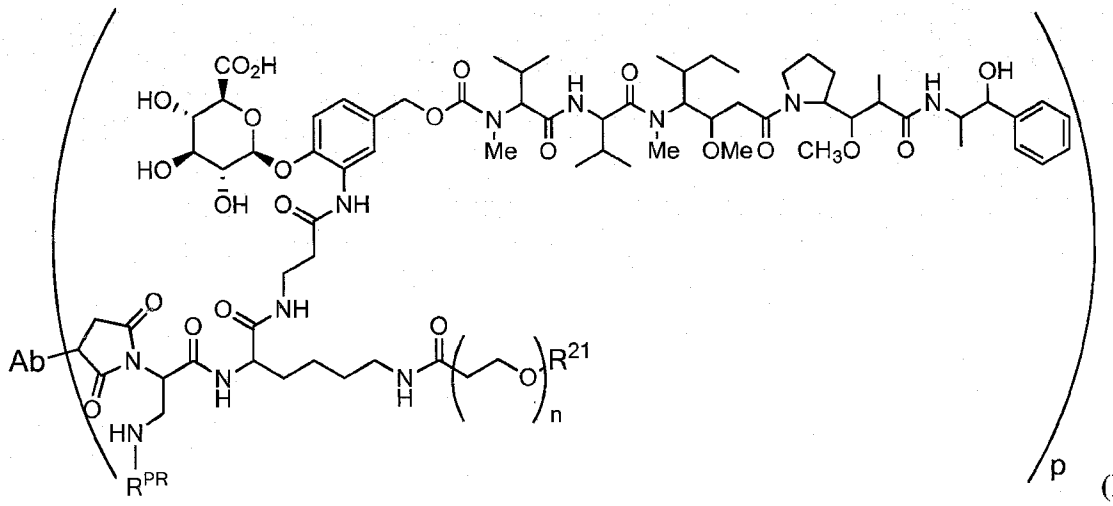
【0202】示例性ADC包括顯示於下列式中者：



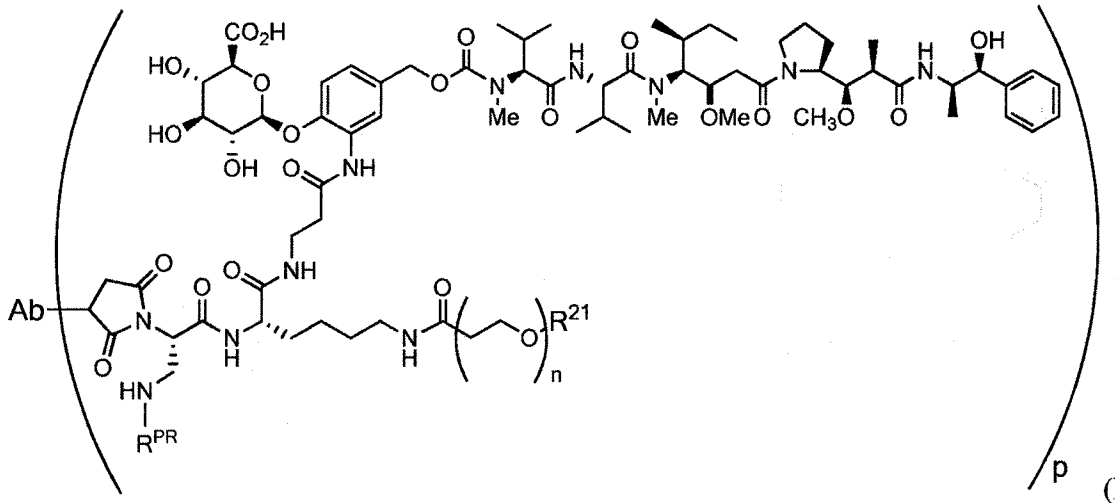
(IX)



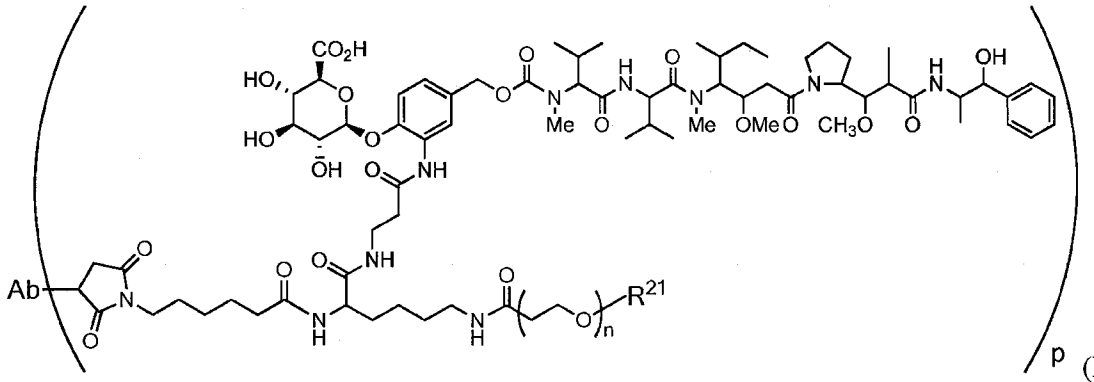
(IXa)



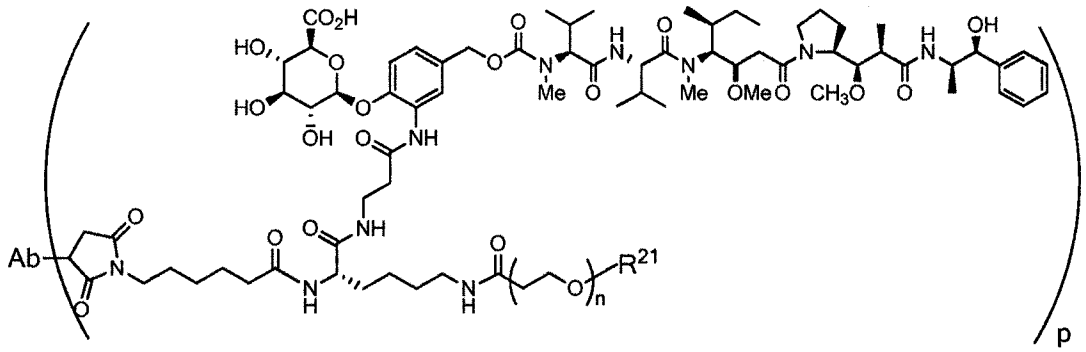
(X)



(Xa)



(XI)



(XIa)

或其醫藥上可接受之鹽，其中n係在8至36之範圍內且最佳為8至14(最佳為12)，R^{PR}為氫或保護基(例如酸不穩定性保護基，例如BOC)，R^{21}為聚乙二醇部分之封端單元(較佳為$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$)，Ab代表抗CD228抗體且當提及個別抗體分子時，p代表1至16，較佳為1至14、6至12、

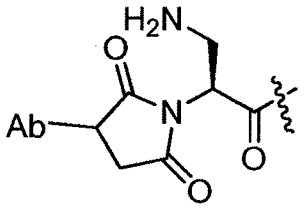
6至10、或8至10之整數，或當提及抗體分子群時，係指約4、或約6至約14，較佳為約8之平均藥物荷載量。

【0203】如上述，藥物連接子之PEG(聚乙二醇)部分可在8至36之範圍內，然而，現已發現具有12個環氧乙烷單元之PEG為特佳者。現已發現較長之PEG鏈可導致較慢清除，然而較短之PEG鏈可導致降低之活性。因此，在上述所有實施態中，下標n較佳為8至14、8至12、10至12或10至14且最佳為12。

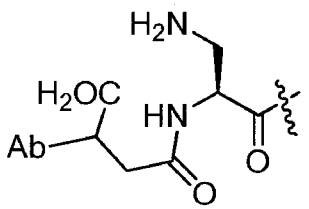
【0204】多分散PEG、單分散PEG和離散之PEG可用於製備本發明之PEG化的抗體藥物共軛體。多分散PEG為大小和分子量異質混合物，而單分散PEG通常係從異質混合物純化，因此提供單一鏈長和分子量。較佳之PEG單元為離散之PEG，其為逐步合成而非經由聚合化過程合成之化合物。離散之PEG提供具有限定和具體指定之鏈長的單一分子。如同下標“p”，當指抗體-藥物共軛體之群體時，下標“n”之數值可為平均數且可為整數或非整數。

【0205】於較佳之實施態樣中，該抗體與藥物連接子之共價連接係透過該抗體之巯基官能基與藥物連接子之馬來醯亞胺官能基交互作用以形成硫基取代之琥珀醯亞胺完成。該巯基官能基可存在於處於配體之天然狀態的配體單元上，例如在天然產生之殘基中(鏈間二硫化物殘基)，或可經由化學修飾、或生物工程處理、或二者之組合被引入該配體中。可理解的是，抗體取代之琥珀醯亞胺可以水解形式存在。例如，於較佳之實施態樣中，ADC係由琥珀醯

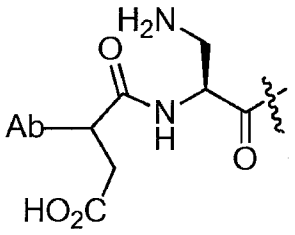
亞胺部分組成，當與抗體結合時，其係由下列結構表示：



或者，ADC係由其對應之酸-醯胺部分組成，當與抗體結合時，其係由下列結構表示：



或



。

該波浪線表明與該藥物連接子之其餘部分的鍵聯。

【0206】與抗CD228抗體共軛結合之有用細胞毒性劑類別包括，例如抗微管蛋白劑、DNA小溝結合劑、DNA複製抑制劑、化療法敏化劑，等。細胞毒性劑之其他示例性類別包括蒽環類、澳瑞他汀、喜樹鹼、杜卡黴素(duocarmycin)、依托泊苷、美登木素生物鹼和長春花生物鹼。一些示例性細胞毒性劑包括澳瑞他汀(例如澳瑞他汀T、澳瑞他汀E、AFP、單甲基澳瑞他汀F(MMAF)、親脂性單甲基澳瑞他汀F、單甲基澳瑞他汀E(MMAE))、DNA小溝結合劑(例如烯二炔和雷昔托普辛(lexitropsin))、倍癌黴素、紫杉烷類(例如太平洋紫杉醇和多西紫杉醇)、長春花生物鹼、煙醯胺磷酸核糖基轉移酶抑制劑(NAMPTi)、微管溶素M、阿黴素、嗎啉代阿黴素和氰基嗎啉代阿黴素。

【0207】該細胞毒性劑可為化學治療劑，諸如，例如阿黴素、太平洋紫杉醇、美法崙、長春花生物鹼、胺甲蝶呤、絲裂黴素C或依托泊苷。該藥劑亦可為CC-1065類似物、加利車黴素、美登素、多拉司他汀10(dolastatin10)之類似物、根黃素(rhizoxin)或水螅毒素(palytoxin)。

【0208】該細胞毒性劑亦可為澳瑞他汀。該澳瑞他汀可為澳瑞他汀E衍生物，例如在澳瑞他汀E和酮酸之間形成的酯。例如，澳瑞他汀E可與對乙醯苯甲酸或苯甲醯戊酸反應以分別產生AEB和AEVB。其他典型之澳瑞他汀包括澳瑞他汀T、AFP、MMAF和MMAE。各種澳瑞他汀之合成和結構描述於，例如US 2005-0238649和US2006-0074008中。

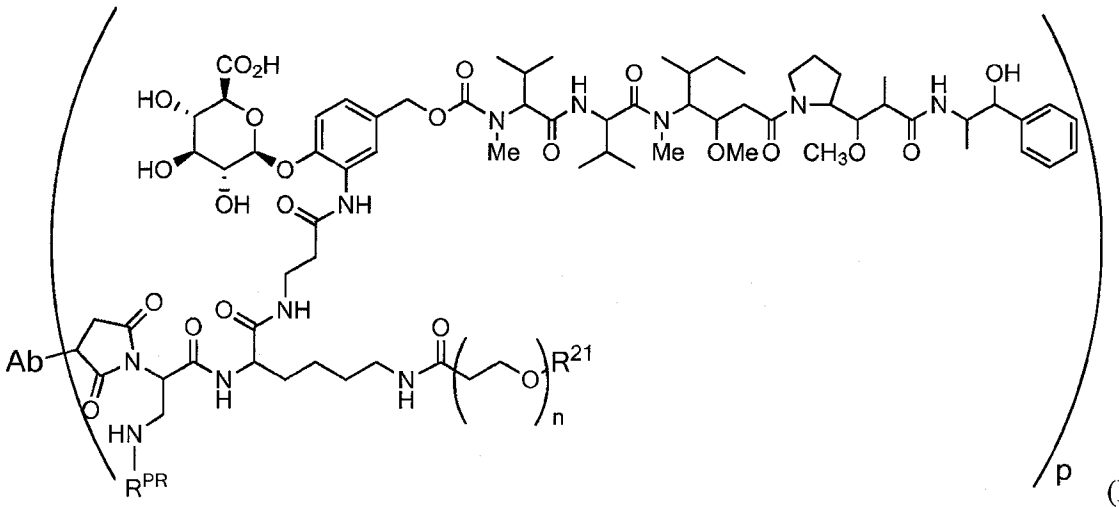
【0209】該細胞毒性劑可為DNA小溝結合劑。(參見，例如美國專利案6,130,237號)。例如，該小溝結合劑可為CBI化合物或烯二炔(例如加利車黴素)。

【0210】該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑可為抗微管蛋白劑。抗微管蛋白劑之實例包括紫杉烷類(例如Taxol®(太平洋紫杉醇)、Taxotere®(多西他賽(docetaxel))、T67(Tularik)、長春花烷類化合物(例如長春新鹼、長春鹼、長春地辛和長春瑞濱)及澳瑞他汀(例如澳瑞他汀E、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB)。示例性澳瑞他汀顯示於下列式III至XIII中。其他合適之抗微管蛋白劑包括，例如漿果赤黴素(baccatin)衍生物、紫杉烷類似物(例如埃坡黴素A和B)、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙素和秋水仙胺

(colcimid)、雌莫司汀(estramustine)、隱花素(cryptophysin)、西馬多丁(cemadotin)、美登木素(maytansinoid)、考布他汀(combretastatin)、圓皮海綿內酯(discodermoide)和艾榴塞洛素(eleuthrobin)。

【0211】該細胞毒性劑可為美登木素，另一群抗微管蛋白劑(例如DM1、DM2、DM3、DM4)。例如美登木素可為美登素或含有美登素之藥物連接子，諸如DM-1或DM-4 (ImmunoGen, Inc.; see also Chari et al., 1992, Cancer Res.)。

【0212】於一些實施態樣中，本發明之抗CD228抗體係經由MDpr-PEG(12)-gluc連接子與單甲基澳瑞他汀E共軛結合，形成具有下列結構之抗體-藥物共軛體：



(X)

或其醫藥上可接受之鹽，其中n係在8至36之範圍內，最佳的是範圍在8至14(最佳為12)，R^{PR}為氫或保護基(例如酸不穩定性保護基，例如BOC)，R^{21}為用於聚乙二醇部分之封端單元(較佳為$-CH_3$或$-CH_2CH_2CO_2H$)，Ab代表抗

CD228抗體且當提及個別抗體分子時，p代表1至16，較佳為1至14、6至12、6至10或8至10之整數，或當提及抗體分子之群體時係指約4、或約6至約14，較佳為約8之平均藥物荷載量。於一些實施態樣中，該抗CD228為hL49且該所產生之抗體-藥物共軛體為hL49-Mdpr-PEG(12)-gluc-MMAE。hL49-Mdpr-PEG(12)-gluc-MMAE亦稱為hL49-5088。術語hL49-5088(8)係指hL49-5088，每一抗體之平均藥物荷載量為約8個藥物連接子。

VIII. 治療應用

【0213】本發明之抗體(單獨或為其抗CD228抗體-藥物共軛體)可用於治療個體之癌症。某些該等癌症顯示在蛋白質(例如藉由使用該示例性抗體其中一者進行之免疫分析)或mRNA層級測得可檢測之CD228量。某些該等癌症顯示出相對於相同類型之非癌組織(較佳為來自同一患者)，CD228的量升高。儘管可以治療較高或較低之量，但癌細胞上之適於治療的示例性CD228量為每一細胞5000至500,000個CD228分子。可選擇地，在進行治療之前測量癌症中之CD228的量。於一些實施態樣中，該個體先前已使用一或多種治療劑治療且對該治療沒有反應，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。於一些實施態樣中，該個體先前已使用一或多種治療劑治療且在治療後復發，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。於一些實施態樣

中，該個體先前已使用一或多種治療劑治療且在治療期間曾經歷疾病進展，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。於一些實施態樣中，該癌症為末期癌症。於一些實施態樣中，該末期癌症為第3期或第4期癌症。於一些實施態樣中，該末期癌症為轉移性癌症。於一些實施態樣中，該癌症為復發之癌症。於一些實施態樣中，該個體接受針對該癌症之標準護理療法的先前治療且該先前治療失敗。於一些實施態樣中，該個體為人。

【0214】與CD228表現相關且適合該治療之癌症實例包括黑色素瘤和其他癌瘤，包括胰臟癌、肺癌(諸如非小細胞肺癌)、甲狀腺癌、食道癌、頭頸癌、乳癌(諸如三陰性乳癌)、結腸直腸癌、間皮瘤和膽管癌。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之黑色素瘤的方法中。於一些實施態樣中，該黑色素瘤為皮膚黑色素瘤。於一些實施態樣中，該皮膚黑色素瘤係選自由下列所組成之群組：淺表性擴散黑色素瘤、結節性黑色素瘤、肢端小痣斑性黑色素瘤(acral lentiginous melanoma)、小痣性惡性黑色素瘤(lentigo maligna melanoma)和結締組織增生性黑色素瘤(desmoplastic melanoma)。於一些實施態樣中，該皮膚黑色素瘤為淺表性擴散黑色素瘤。於一些實施態樣中，該皮膚黑色素瘤為結節性黑色素瘤。於一些實施態樣中，該皮膚黑色素瘤為肢端小痣斑性黑色素瘤。於一些實施態樣中，該肢端小痣

斑性黑色素瘤為舌下黑色素瘤。於一些實施態樣中，該皮膚黑色素瘤為小痣性惡性黑色素瘤。於一些實施態樣中，該皮膚黑色素瘤為結締組織增生性黑色素瘤。於一些實施態樣中，該個體接受具有針對皮膚黑色素瘤之PD-1或PD-L1抑制劑的先前療法。於一些實施態樣中，該個體接受具有PD-1抑制劑之先前療法。於一些實施態樣中，該PD-1抑制劑係選自由下列所組成之群組：尼伏單抗(nivolumab)(OPDIVO®，BMS-936558或MDX-1106)、派姆單抗(pembrolizumab)(KEYTRUDA®，MK-3475)、吡咯珠單抗(pidilizumab)(CT-011)和西米普利單抗(cemiplimab)(REGN2810)。於一些實施態樣中，該個體接受具有PD-L1抑制劑之先前療法。於一些實施態樣中，該PD-L1抑制劑係選自由下列所組成之群組：阿妥珠單抗(atezolizumab)(TECENTRIQ®，MPDL3280A)、阿伐單抗(avelumab)(BAVENCIO®)、德瓦魯單抗(durvalumab)和BMS-936559。於一些實施態樣中，該黑色素瘤為皮下黑色素瘤。於一些實施態樣中，該皮下黑色素瘤為眼黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。於一些實施態樣中，該黑色素瘤為非皮膚黑色素瘤。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之胰臟癌的方法中。於一些實施態樣中，該胰臟癌為外分泌癌或神經內分泌癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為外分泌癌。於一些實施態樣中，該外分泌胰臟癌係選自由下列所組成之群組：胰臟腺癌、腺泡細胞癌(acinar cell carcinoma)、囊腺癌、胰臟母細胞瘤

(pancreatoblastoma)、腺鱗癌、戒環細胞癌(signet ring carcinoma)、肝樣癌、膠狀癌、未分化癌和胰臟黏液囊性贅瘤。於一些實施態樣中，該個體接受一或多種用於外分泌胰臟癌之先前治療防線。於一些實施態樣中，該個體接受一種用於外分泌胰臟癌之先前治療防線。於一些實施態樣中，該個體接受一種以上之用於外分泌胰臟癌的先前治療防線。於一些實施態樣中，該胰臟癌為胰臟腺癌。於一些實施態樣中，該胰臟腺癌為胰臟導管腺癌。於一些實施態樣中該胰臟癌為腺泡細胞癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為囊腺癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為胰臟母細胞瘤。於一些實施態樣中，該胰臟癌為腺鱗癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為戒環癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為類肝癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為膠狀癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為未分化癌。於一些實施態樣中，該胰臟癌為胰臟黏液囊性贅瘤。於一些實施態樣中，該胰臟癌為神經內分泌癌。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之肺癌的方法中。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之非小細胞肺癌的方法中。於一些實施態樣中，該非小細胞肺癌具有表皮生長因子受體(EGFR)之突變形式。於一些實施態樣中，該非小細胞肺癌具有野生型EGFR。於一些實施態樣中，該個體已經接受用於非小細胞肺癌之基於鉑之療法的先前治療。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法係選自由下列所組成之群組：卡鉑

(carboplatin)、順鉑、奧沙利鉑(oxaliplatin)、奈達鉑(nedaplatin)、四硝酸三鉑(triplatin tetranitrate)、菲蔥鉑(phenanthriplatin)、吡鉑(picoplatin)和沙鉑(satraplatin)。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為卡鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為順鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為奧沙利鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為奈達鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為四硝酸三鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為菲蔥鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為吡鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為沙鉑。於一些實施態樣中，該個體接受具有PD-1或PD-L1抑制劑之用於非小細胞肺癌的先前療法。於一些實施態樣中，該個體接受具有PD-1抑制劑之先前療法。於一些實施態樣中，該PD-1抑制劑係選自由下列所組成之群組：尼伏單抗(OPDIVO®，BMS-936558或MDX-1106)、派姆單抗(KEYTRUDA®，MK-3475)、吡咯珠單抗(CT-011)和西米普利單抗(REGN2810)。於一些實施態樣中，該個體接受具有PD-L1抑制劑之先前療法。於一些實施態樣中，該PD-L1抑制劑係選自由下列所組成之群組：阿妥珠單抗(TECENTRIQ®，MPDL3280A)、阿伐單抗(BAVENCIO®)、德瓦魯單抗和BMS-936559。於一些實施態樣中，該個體已接受用於非小細胞肺癌之具有基於鉑之療法和PD-1或PD-L1抑制劑的先前療法。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之甲狀腺癌的方法中。於一些實

施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之食道癌的方法中。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之頭頸癌的方法中。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之乳癌的方法中。於一些實施態樣中，該乳癌係選自由下列所組成之群組：HER2陽性乳癌、HER2陰性乳癌、雌激素受體(ER)陽性乳癌、ER陰性乳癌、助孕酮受體(PR)陽性乳癌、PR陰性乳癌和三陰性乳癌。於一些實施態樣中，該乳癌為HER2陽性乳癌。於一些實施態樣中，該乳癌為HER2陰性乳癌。於一些實施態樣中，該個體接受一或多種用於HER2陰性乳癌之先前治療防線。於一些實施態樣中，該一或多種先前治療防線包含使用紫杉烷類藥物之治療。於一些實施態樣中，該紫杉烷係選自由下列所組成之群組：太平洋紫杉醇、多西紫杉醇和卡巴他賽(cabazitaxel)。於一些實施態樣中，該紫杉烷為太平洋紫杉醇。於一些實施態樣中，該紫杉烷為多西紫杉醇。於一些實施態樣中，該紫杉烷為卡巴他賽。於一些實施態樣中，該患有HER2陰性乳癌之個體為激素受體陽性。於一些實施態樣中，該患有HER2陰性、激素受體陽性之乳癌的個體接受使用CDK4/6抑制劑之先前療法。於一些實施態樣中，該患有HER2陰性，激素受體陽性之乳癌的個體接受使用激素導向療法之先前療法。於一些實施態樣中，該乳癌為ER陽性乳癌。於一些實施態樣中，該乳癌為ER陰性乳癌。於一些實施態樣中，該乳癌為PR陽性乳癌。於

一些實施態樣中，該乳癌為PR陰性乳癌。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之三陰性乳癌的方法中。三陰性乳癌為缺乏可檢測之雌激素和助孕酮受體且缺乏HER2/neu過度表現之癌症的技藝術語。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之結腸直腸癌的方法中。於一些實施態樣中，該結腸直腸癌係選自由下列所組成之群組：結腸直腸腺癌、胃腸道基質瘤、原發性結腸直腸淋巴瘤、胃腸道類癌(carcinoid tumor)和平滑肌肉瘤(leiomyosarcoma)。於一些實施態樣中，該結腸直腸癌為結腸直腸腺癌。於一些實施態樣中，該結腸直腸癌為胃腸道基質瘤。於一些實施態樣中，該結腸直腸癌為原發性結腸直腸淋巴瘤。於一些實施態樣中，該結腸直腸癌為胃腸道類癌。於一些實施態樣中，該結腸直腸癌為平滑肌肉瘤。於一些實施態樣中，該個體接受二或更多種用於該結腸直腸癌之先前治療防線。於一些實施態樣中，該個體接受二種用於該結腸直腸癌之先前治療防線。於一些實施態樣中，該個體接受二種以上之用於該結腸直腸癌之先前治療防線。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療個體之間皮瘤的方法中。於一些實施態樣中，該間皮瘤係選自由下列所組成之群組：胸膜間皮瘤、腹膜間皮瘤、心包間皮瘤和睾丸間皮瘤。於一些實施態樣中，該間皮瘤為胸膜間皮瘤。於一些實施態樣中，該個體已接受用於胸膜間皮瘤之使用基於鉑之療法的先前治療。於一些實施態樣中，該基

於鉑之療法係選自由下列所組成之群組：卡鉑、順鉑、奧沙利鉑、奈達鉑、四硝酸三鉑、菲蒽鉑、吡鉑和沙鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為卡鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為順鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為奧沙利鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為奈達鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為四硝酸三鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為菲蒽鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為吡鉑。於一些實施態樣中，該基於鉑之療法為沙鉑。於一些實施態樣中，該個體接受用於胸膜間皮瘤之具有培美曲塞的先前治療。於一些實施態樣中，該間皮瘤為腹膜間皮瘤。於一些實施態樣中，該間皮瘤為心包間皮瘤。於一些實施態樣中，該間皮瘤為睪丸間皮瘤。於一些實施態樣中，本發明之抗體或抗體-藥物共軛體係用於治療膽管癌的方法中。該治療可應用於患有這類原發性或轉移性腫瘤的患者。該治療亦可應用於常規治療難以治療之患者，或對該等治療反應後再復發之患者。於一些實施態樣中，該個體為人。

【0215】本發明之抗體，諸如人化抗體(單獨或為其共軛體之形式)係以有效方案(意指可使至少一種癌症徵兆或症狀延遲發作、嚴重程度減輕、抑制進一步惡化和/或改善的劑量、投予途徑和投予頻率)投予。若患者已罹患癌症，則該方案可稱為治療有效方案。若患者係處於相對於普通人群升高之罹癌風險，但尚未出現症狀，則該方案可稱為預防有效方案。在某些情況下，可相對於病史對照

或同一位患者之以往經驗，在個別患者中觀察治療或預防功效。在其他情況下，可在治療之患者群的臨床前或臨床試驗中相對於未經治療之患者的對照群證明治療或預防效力。

【0216】單株抗體之示例性劑量為0.1 mg/kg至50 mg/kg(患者體重)，更通常為1 mg/kg至30 mg/kg、1 mg/kg至20 mg/kg、1 mg/kg至15 mg/kg、1 mg/kg至12 mg/kg、或1 mg/kg至10 mg/kg、1、或2 mg/kg至30 mg/kg、2 mg/kg至20 mg/kg、2 mg/kg至15 mg/kg、2 mg/kg至12 mg/kg、或2 mg/kg至10 mg/kg、或3 mg/kg至30 mg/kg、3 mg/kg至20 mg/kg、3 mg/kg至15 mg/kg、3 mg/kg至12 mg/kg、或3 mg/kg至10 mg/kg(患者體重)。單株抗體或其抗體藥物共軛體之示例劑量為1 mg/kg至7.5 mg/kg、或2 mg/kg至7.5 mg/kg、或3 mg/kg至7.5 mg/kg(個體體重)，或0.1至20或0.5至5 mg/kg體重(例如0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10 mg/kg)或為10至1500或200至1500 mg之固定劑量。在一些方法中，對患者投予至少1.5 mg/kg、至少2 mg/kg或至少3 mg/kg之劑量，每三週投予一次或更多。該劑量取決於投予頻率、患者狀況和對先前治療之反應(若有的話)、該治療為預防性還是治療性的，以及該疾病為急性或慢性，以及其他因素。

【0217】投予可為腸胃道外、靜脈內、口服、皮下、動脈內、顱內、鞘內、腹膜內、局部、鼻內或肌肉內投予。投予亦可直接定位在腫瘤內。較佳為藉由靜脈內或皮

下投予進入全身循環。靜脈內投予可，例如藉由，在諸如30至90分鐘之期間內輸注或藉由單次大劑量注射來進行。

【0218】投予頻率取決於該抗體或共軛體在循環中之半衰期、患者之狀況和投予途徑，以及其他因素。該頻率可為每天、每週、每月、每季或不定期，以回應患者狀況之變化或所治療之癌症的進展。在連續之治療過程中，靜脈內投予之示例性頻率為每週二次至每季一次，儘管亦可能更頻繁或較不頻繁地給藥。在連續之治療過程中，其他靜脈內投予之示例性頻率係介於每週一次或每四週三次之間，儘管亦可能更頻繁或較不頻繁地給藥。在皮下投予方面，示例性給藥頻率為每天至每月一次，儘管亦可能更頻繁或較不頻繁地給藥。

【0219】投予之劑量數取決於該癌症之性質(例如，是否出現急性或慢性症狀)和該疾病對該治療之反應。對急性疾病或慢性疾病之急性加重而言通常1至10個劑量即足夠。有時單次推注劑量(可選擇地為分割形式)即足夠用於急性病症或慢性病症之急性加重。對於復發之急性病症或急性加重可重複進行治療。對於慢性病症可定期投予抗體，例如每週、隔週、每月、每季、每六個月投予一次，持續至少1、5或10年，或該患者之壽命。

【0220】用於腸胃道外投予之醫藥組成物較佳為無菌的且基本上為等滲的，且係在GMP條件下製造。醫藥組成物可以單位劑型(即，用於單次投予之劑量)提供。醫藥組成物可使用一或多種生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形

劑或佐劑配製。該配製係取決於所選擇之投予途徑。在注射方面，可將抗體配製在水溶液中，較佳為在生理相容之緩衝液，諸如漢克氏液、林格氏液或生理鹽水或醋酸鹽緩衝液中(以減少注射部位之不適感)。該溶液可含有配製劑，諸如懸浮劑、穩定劑和/或分散劑。或者，該抗體可為用於在使用前以合適之載劑(例如無菌之無熱原水)重構成的凍乾形式。液體配製劑中之抗體濃度可為，例如1至100 mg/ml，諸如10 mg/ml。

【0221】使用本發明之抗體的治療可與化療、放射治療、幹細胞治療、手術、其他針對該正在接受治療之病症的有效治療組合。可與本文所描述之抗CD228抗體和抗體-藥物共軛體一起投予之有用的其他試劑類別包括，例如針對其他表現在癌細胞上之受體的抗體、抗微管蛋白劑(例如澳瑞他汀)、DNA小溝結合劑、DNA複製抑制劑、烷基化劑(例如鉑複合物，諸如順鉑、單(鉑)、雙(鉑)和三核鉑複合物和卡鉑)、蒽環類藥物、抗生素、抗葉酸劑、抗代謝物、化療增敏劑、倍癌黴素、依托泊苷、氟化嘧啶、離子載體、促排卵素(lexitropsin)、亞硝基脲、鉑帝爾(platinol)、預形成化合物、嘌呤抗代謝物、嘌呤黴素、放射療法增敏劑、類固醇、紫杉烷類、拓撲異構酶抑制劑、長春花生物鹼，等。

【0222】相較於不具有抗CD228抗體(單獨或為共軛體形式)之相同治療(例如化療)，使用可選擇地與上述任何其他藥劑或方案組合之抗CD228抗體或抗體-藥物共軛體(單

獨或為共軛體形式)進行治療可使具有腫瘤(例如黑色素瘤、胰臟癌、非小細胞肺癌、甲狀腺癌、頭頸癌、三陰性乳癌、結腸直腸癌、間皮瘤、膽管癌)之患者，尤其是復發或難治性患者的無惡化存活期中位數或總生存期增加至少30%或40%，但較佳為50%、60%至70%、或甚至100%或更久。另外，或者，相較於不具有抗CD228抗體(單獨或為共軛體形式)之相同治療(例如化療)，包括抗CD228抗體(單獨或為共軛體形式)之治療(例如標準化療)可使具有腫瘤之患者的完全反應率、部分反應率或客觀緩解率(完全+部分)增加至少30%或40%，但較佳為50%、60%至70%、或甚至100%。

【0223】通常，在臨床試驗(例如第II期、第II/III期或第III期試驗)中，相對於接受單獨之標準療法(或加安慰劑)的對照組患者，上述之使用標準療法加抗CD228抗體(單獨或為共軛體形式)治療之患者的無惡化存活期中位數和/或反應率的增加具有統計學意義，例如在p = 0.05或0.01或甚至0.001之水準下。完全和部分反應率係藉由癌症臨床試驗中常用之客觀標準(例如美國國家癌症研究所和/或食品藥物管理局所列出或接受之標準)測定。

IX. 製品和套組

【0224】於另一態樣中，提供包含本文所描述之抗CD228抗體或抗CD228抗體-藥物共軛體之製品或套組。該製品或套組可進一步包含在本發明之方法中使用本文所描

述之抗CD228抗體或抗CD228抗體-藥物共軛體的說明書。因此，於某些實施態樣中，該製品或套組包含用於在治療個體癌症(例如黑色素瘤和其他癌瘤，包括胰臟癌、非小細胞肺癌、甲狀腺癌、頭頸癌、乳癌，諸如三陰性乳癌、結腸直腸癌、間皮瘤或膽管癌)之方法中使用本文所描述之抗CD228抗體或抗CD228抗體-藥物共軛體的說明書，該治療個體癌症之方法包含對該個體投予有效量之本文所描述的抗CD228抗體或抗CD228抗體-藥物共軛體。於一些實施態樣中，該癌症為黑色素瘤。於一些實施態樣中，該癌症為胰臟癌。於一些實施態樣中，該癌症為非小細胞肺癌。於一些實施態樣中，該癌症為甲狀腺癌。於一些實施態樣中，該癌症為頭頸癌。於一些實施態樣中，該癌症為乳癌。於一些實施態樣中，該乳癌為三陰性乳癌。於一些實施態樣中，該癌症為結腸直腸癌。於一些實施態樣中，該癌症為間皮瘤。於一些實施態樣中，該癌症為膽管癌。於一些實施態樣中，該個體為人。

【0225】該製品或套組可進一步包含容器。合適之容器包括，例如瓶子、小瓶(例如雙隔室小瓶)、注射器(諸如單隔室或雙隔室注射器)和試管。於一些實施態樣中，該容器為小瓶。該容器可從各不同材料，諸如玻璃或塑料形成。該容器持有該配製劑。

【0226】該製品或套組可進一步包含在該容器上或與該容器聯結之標籤或仿單，該標籤或仿單可表明用於重構成和/或使用該配製劑之指示。該標籤或仿單可進一步表

明該配製劑可用於或意圖用於皮下、靜脈內(例如靜脈內輸注)或其他投予模式，以用於治療個體之癌症(例如黑色素瘤和其他癌瘤，包括胰臟癌、非小細胞肺癌、甲狀腺癌、頭頸癌、乳癌，諸如三陰性乳癌、結腸直腸癌、間皮瘤或膽管癌)。該持有該配製劑之容器可為單次使用之小瓶或多次使用之小瓶(其允許重複投予該重構成之配製劑)。該製品或套組可進一步包含第二容器，該第二容器包含合適之稀釋劑。該製品或套組可進一步包含其他從商業、治療和用戶立場來看理想之材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器和具有使用說明之仿單。

【0227】本文之製品或套組可選擇地進一步包含含有第二藥物的容器，其中該抗CD228抗體或抗CD228抗體-藥物共軛體為第一藥物，且該製品或套組進一步包含在該標籤或仿單上之用法說明，該用法說明係用於指示使用有效量之第二藥物來治療該個體。於一些實施態樣中，該第二藥物係用於消除或降低一或多種不良事件之嚴重性。

【0228】於一些實施態樣中，該抗CD228抗體或抗CD228抗體-藥物共軛體係以凍乾粉末之形式存在於該容器中。於一些實施態樣中，該凍乾粉末係在表明該活性劑之量的密閉容器(諸如小瓶、安瓿或小藥囊)中。當經由注射投予藥物時，具有注射用之無菌水或生理鹽水的安瓿瓶可，例如可選擇地以該套組之一部分的形式提供，從而可在投予之前將成分混合。若需要時，該等套組可進一步包括一或多種各種不同常規製藥組分，諸如，例如具有一或

多種醫藥上可接受之載劑的容器、另外的容器，等，本技藝之技熟習人士將可輕明白者。該套組中亦可包括印刷之說明書(無論為仿單或標籤之形式)，該說明書指明欲投予之組分的量、投予指南和/或用於混合組分之指南。

X. 其他應用

【0229】在臨床診斷或治療或研究之背景下，本文所描述之抗CD228抗體(諸如人化抗CD228抗體)可用於檢測CD228。CD228在癌症上之表現提供該癌症適合使用本發明之抗體治療的指示。該抗體亦可以用於實驗室研究之研究試劑的形式出售，以檢測帶有CD228之細胞及其對各種刺激的反應。在該等用途中，可使用螢光分子、自旋標示之分子、酶或放射性同位素標記單株抗體，並可以具有所有執行CD228分析之必要試劑的套組形式提供。本文所描述之抗體可用於檢測CD228蛋白表現並測定該癌症是否適合使用CD228ADC治療。例如，hL49(HALC)可用於檢測黑色素瘤細胞、胰臟癌細胞、非小細胞肺癌細胞、甲狀腺癌細胞和頭頸部癌細胞上之CD228表現。該抗體亦可用於純化CD228，例如藉由親和力色層分析術。

【0230】上文或下文中引用之所有專利檔案、網站、其他出版物、登錄號，等的全部內容均以引用方式併入本文以用於所有目的，其程度如同各個別項目被具體且單獨地指明以引用方式併入。若序列之不同版本與不同時間之登錄號有關，則意指與本申請案之有效提交日期時之登錄

號相關的版本。有效提交日期意指涉及該登錄編號之優先權申請的實際提交日期或提交日期中之較早的日期(若適用的話)。同樣地，若出版物、網站，等之不同版本在不同時間發佈，除非另有說明，否則係指本申請案之有效提交日期內最近發佈的版本。除非另外具體指明，否則本發明之任何特性、步驟、元件、實施態樣或態樣可與其他任一者組合使用。雖然為了清楚和理解的目的，本發明已藉由圖解和實例詳細描述，顯而易見的是，可在所附之申請專利範圍內進行某些改變和修飾。

XI. 可變結構域序列

【0231】在下列各可變區序列方面，根據Kabat編號方案之CDR係以下方劃線標示，而根據IMGT編號方案之CDR係以粗體和斜體標示。

【0232】鼠L49 vH

EVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVT***GDSITSGY***WNWIRKFPGNKLEYMGY***ISDSGIT***YYNPSLKSRISITRDTSKNQYYLQLNFVTAEDTATYNC***ARRTLATYYAMDY***WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:21)

【0233】Mu IGHV3-8 vH

EVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSVT***GDSITSGY***WNWIRKFPGNKLEYMGY***ISYSGST***YYNPSLKSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCAR (SEQ ID NO:22)

【0234】Hu IGHV4-59/HJ4

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS***GGSISSYY***WSWIRQPPGKGLEWIGY***IYYSGST***NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:23)

【0235】hvHA

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS***GDSITSGY***WNWIRQPPGKGLEYIGY***ISDSGIT***YYNP
SLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYC***ARRTLATYYAMDY***WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:7)

【0236】hvHB

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS***GDSITSGY***WNWIRQFPGKGLEYMGY***ISDSGIT***YYN
PSLKSRITISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYC***ARRTLATYYAMDY***WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:24)

【0237】hvHC

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS***GDSITSGY***WNWIRQFPGKGLEYMGY***ISDSGIT***YYN
PSLKSRITISRDTSKNQYSLKLSFVTAADTAVYNC***ARRTLATYYAMDY***WGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:25)

【0238】Mu L49 vL

DFVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRAS***QSLVHSNGNTY***LHWYLQKPGQSPKLLIY***RVS***NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC***SQSTHVPPT***FGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:26)

【0239】Mu IGKV1-110 vL

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS***QSLVHSNGNTY***LHWYLQKPGQSPKLLIY***KVS***NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVP (SEQ ID NO:27)

【0240】Hv IGKV2-30/KJ2

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSS***QSLVYSDGNTY***LNWFQQRPGQSPRRLIY***KVS***NRD
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO:28)

【0241】hvLA

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRAS***QSLVHSNGNTY***LHWFQQRPGQSPRRLIY***RVS***NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC***SQSTHVPPT***FGQGTKLEIK (SEQ ID
NO:29)

【0242】hvLB

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRAS***QSLVHSNGNTY***LHWYQQRPGQSPRLLIY***RVS***NRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC***SQSTHVPPT***FGQGTKLEIK (SEQ ID
NO:20)

【0243】hvLC

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRAS***QSLVHSDGNTY***LHWYQQRPGQSPRLLIY***RVS***NRF**S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC***SQSTHVPPT***FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:8)。

XII. 示例性實施態樣

【0244】本文提供之實施態樣如下：

1. 一種經分離之抗CD228抗體或其抗原結合片段，該抗CD228抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：

(i)包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的CDR-H1；

(ii)包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的CDR-H2；和

(iii)包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的CDR-H3；且

其中該輕鏈可變區包含：

(i)包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的CDR-L1；

(ii)包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR-L2；和

(iii)包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的CDR-L3。

2. 如實施態樣1之抗體或抗原結合片段，其中該抗體為人化的。

3. 一種人化之抗CD228抗體或其抗原結合片段，該抗CD228抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7具有至少90%同一性之胺基酸序列，其先決條件為位置H27被D佔據、位置H30被T佔據、位置H47被Y佔據、位置H71被R佔據且位置H78被Y佔據，該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8具有至少90%同一性之胺基酸序列，其先決條件為位置L2被F

佔據、位置L36被Y佔據且位置L46被L佔據。

4. 如實施態樣3之抗體或抗原結合片段，進一步之先決條件為位置L28被D佔據。

5. 一種人化之抗CD228抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，該重鏈可變區包含SEQ ID NO：7之三個Kabat CDR，其中位置H27被D佔據、位置H30被T佔據、位置H47被Y佔據、位置H71被R佔據且位置H78被Y佔據，該輕鏈可變區包含SEQ ID NO：8之三個Kabat CDR，其中位置L2被F佔據、位置L36被Y佔據且位置L46被L佔據。

6. 如實施態樣1至5中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少95%序列同一性之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少95%序列同一性之胺基酸序列。

7. 如實施態樣1至5中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少98%序列同一性之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少98%序列同一性之胺基酸序列。

8. 如實施態樣1至5中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少99%序列同一性之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少99%序列同一性

之胺基酸序列。

9. 如實施態樣1至5中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含SEQ ID NO：7之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO：8之胺基酸序列。

10. 如實施態樣1至9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為抗原結合片段。

11. 如實施態樣10之抗體或抗原結合片段，其中該抗原結合片段係選自由下列所組成之群組：Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab'-SH、Fv、雙抗體、線性抗體和單鏈抗體片段。。

12. 如實施態樣1至9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為全長抗體。

13. 如實施態樣12之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區係與重鏈恆定區融合且該輕鏈可變區係與輕鏈恆定區融合。

14. 如實施態樣13之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區為IgG1同型之重鏈恆定區。

15. 如實施態樣13或14之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：17之胺基酸序列且該輕鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。

16. 如實施態樣13或14之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區為天然人類恆定區之突變形式，其具有相對於天然人類恆定區而言降低之與Fcγ受體的結合。

17. 如實施態樣13或14之抗體或抗原結合片段，其中

該重鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：19 (S239C)之胺基酸序列且該輕鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。

18. 一種抗體-藥物共軛體，其包含與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合之如實施態樣1至17中任一項之抗體或抗原結合片段。

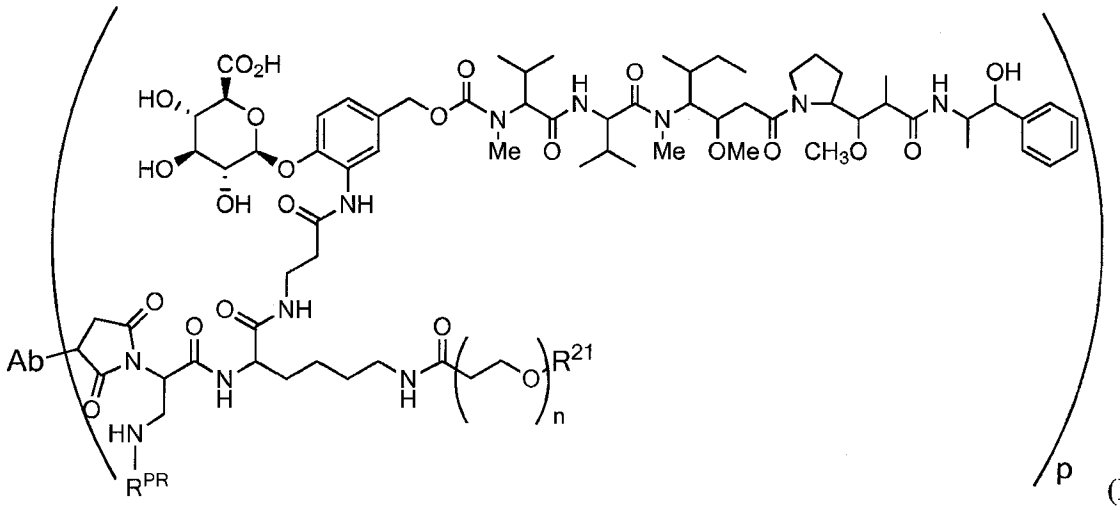
19. 如實施態樣18之抗體-藥物共軛體，其中該抗體或抗原結合片段經由連接子與該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

20. 如實施態樣19之抗體-藥物共軛體，其中該連接子為MDpr-PEG(12)-gluc連接子。

21. 如實施態樣18至20中任一項之抗體-藥物共軛體，其中該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為單甲基澳瑞他汀。

22. 如實施態樣21之抗體-藥物共軛體，其中該單甲基澳瑞他汀為單甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

23. 如實施態樣22之抗體-藥物共軛體，其中該連接子與單甲基澳瑞他汀E連接形成具有以下結構之抗體-藥物共軛體：



(X)

其中Ab為抗體hL49，n為12，R^{PR}為氫，R^{21}為CH_3，且p表示1至16之數字。

24. 如實施態樣23之抗體-藥物共軛體，其中在該抗體-藥物共軛體之群體中p之平均值為約8。

25. 如實施態樣18至24中任一項之抗體-藥物共軛體，其中該抗體-藥物共軛體為hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE。

26. 一種核酸，其編碼如實施態樣1至17中任一項所定義之重鏈可變區和/或輕鏈可變區。

27. 一種載體，其包含如實施態樣26之核酸。

28. 如實施態樣27之載體，其中該載體為表現載體。

29. 一種宿主細胞，其包含如實施態樣26之核酸。

30. 如實施態樣29之宿主細胞，其中該宿主細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

31. 一種產生抗CD228抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包含在適合用於產生抗CD228抗體或其抗原結

合片段之條件下培養如實施態樣29或30之宿主細胞。

32. 如實施態樣31之方法，其進一步包含將該由宿主細胞產生之抗CD228抗體或其抗原結合片段分離出。

33. 一種產生抗CD228抗體-藥物共軛體之方法，該方法包含在適合用於產生抗CD228抗體之條件下培養如實施態樣29或30之宿主細胞；分離出從該宿主細胞所產生之抗CD228抗體；以及將該抗CD228抗體與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

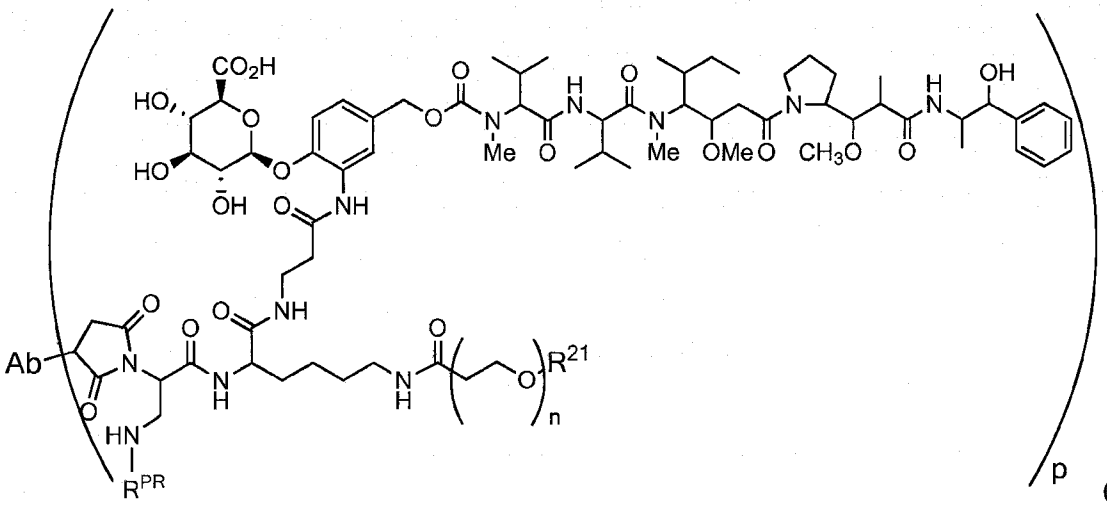
34. 如實施態樣33之方法，其中該抗CD228抗體經由連接子與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

35. 如實施態樣34之方法，其中該連接子為MDpr-PEG(12)-gluc連接子。

36. 如實施態樣33至35中任一項之方法，其中該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為單甲基澳瑞他汀。

37. 如實施態樣36之方法，其中該單甲基澳瑞他汀為單甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

38. 如實施態樣37之方法，其中該連接子與單甲基澳瑞他汀E連接形成具有以下結構之抗體-藥物共軛體：



(X)

其中Ab為抗體hL49，n為12，R^{PR}為氫，R^{21}為CH_3，且p表示1至16之數字。

39. 如實施態樣38之方法，其中在該抗體-藥物共軛體之群體中p之平均值為約8。

40. 如實施態樣33至39中任一項之方法，其中該抗體-藥物共軛體為hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE。

41. 一種治療個體的癌症之方法，該方法包含對該個體投予如實施態樣1至17中任一項之抗體或抗原結合片段或如實施態樣18至25中任一項之抗體-藥物共軛體。

42. 如實施態樣41之方法，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且對該治療沒有反應，其中該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

43. 如實施態樣41之方法，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且在該治療後復發，其中該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

44. 如實施態樣41之方法，其中該個體先前已接受一

或多種治療劑治療且在治療過程中經歷疾病進展，其中該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

45. 如實施態樣41至44中任一項之方法，其中該癌症為末期癌症。

46. 如實施態樣45之方法，其中該末期癌症為第3期或第4期癌症。

47. 如實施態樣45或46之方法，其中該末期癌症為轉移性癌症。

48. 如實施態樣41至47中任一項之方法，其中該癌症為復發性癌症。

49. 如實施態樣41至48中任一項之方法，其中該癌症為不可切除的。

50. 如實施態樣41至49中任一項之方法，其中該個體接受針對該癌症之標準護理療法的先前治療且該先前治療失敗。

51. 如實施態樣41至50中任一項之方法，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、胰臟癌、間皮瘤、結腸直腸癌、肺癌、甲狀腺癌、乳癌、膽管癌、食道癌和頭頸癌。

52. 如實施態樣51之方法，其中該癌症為黑色素瘤。

53. 如實施態樣52之方法，其中該黑色素瘤為皮膚黑色素瘤。

54. 如實施態樣53之方法，其中該皮膚黑色素瘤係選

自由下列所組成之群組：淺表性擴散黑色素瘤、結節性黑色素瘤、肢端小痣斑性黑色素瘤、小痣性惡性黑色素瘤(lentigo maligna melanoma)和結締組織增生性黑色素瘤(desmoplastic melanoma)。

55. 如實施態樣54之方法，其中該肢端小痣斑性黑色素瘤為舌下黑色素瘤。

56. 如實施態樣53至55中任一項之方法，其中該個體接受使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

57. 如實施態樣56之方法，其中該個體先前接受使用PD-1之抑制劑的先前療法。

58. 如實施態樣52之方法，其中該黑色素瘤為皮下黑色素瘤。

59. 如實施態樣58之方法，其中該皮下黑色素瘤為眼黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。

60. 如實施態樣52之方法，其中該黑色素瘤為非皮膚黑色素瘤。

61. 如實施態樣51之方法，其中該癌症為間皮瘤。

62. 如實施態樣61之方法，其中該間皮瘤係選自由下列所組成之群組：胸膜間皮瘤、腹膜間皮瘤、心包間皮瘤和睪丸間皮瘤。

63. 如實施態樣62之方法，其中該間皮瘤為胸膜間皮瘤。

64. 如實施態樣63之方法，其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前療法。

65. 如實施態樣64之方法，其中該基於鉑之療法為順鉑。

66. 如實施態樣63至65中任一項之方法，其中該個體接受使用培美曲塞(pemetrexed)之先前療法。

67. 如實施態樣51之方法，其中該肺癌為非小細胞肺癌。

68. 如實施態樣67之方法，其中該非小細胞肺癌具有表皮生長因子受體(EGFR)之突變形式。

69. 如實施態樣67之方法，其中該非小細胞肺癌具有野生型EGFR。

70. 如實施態樣69之方法，其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前療法。

71. 如實施態樣69或70之方法，其中該個體接受使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

72. 如實施態樣71之方法，其中該個體接受使用PD-1之抑制劑的先前療法。

73. 如實施態樣51之方法，其中該乳癌係選自由下列所組成之群組：HER2陽性乳癌、HER2陰性乳癌、雌激素受體(ER)陽性乳癌、ER陰性乳癌、助孕酮受體(PR)陽性乳癌、PR陰性乳癌和三陰性乳癌。

74. 如實施態樣73之方法，其中該乳癌為HER2陰性乳癌。

75. 如實施態樣74之方法，其中該個體接受一或多種用於HER2陰性乳癌之先前治療防線。

76. 如實施態樣75之方法，其中該一或多種先前治療防線包含使用紫杉烷類藥物之治療。

77. 如實施態樣75或76之方法，其中該個體為激素受體陽性。

78. 如實施態樣77之方法，其中該個體接受使用CDK4/6抑制劑之先前療法。

79. 如實施態樣77或78之方法，其中該個體接受使用激素導向療法之先前療法。

80. 如實施態樣51之方法，其中該結腸直腸癌係選自由下列所組成之群組：結腸直腸腺癌、胃腸道基質瘤、原發性結腸直腸淋巴瘤、胃腸道類癌和平滑肌肉瘤。

81. 如實施態樣80之方法，其中該個體接受二或更多種用於該結腸直腸癌之先前治療防線。

82. 如實施態樣51之方法，其中該胰臟癌為外分泌癌或神經內分泌癌。

83. 如實施態樣82之方法，其中該外分泌癌係選自由下列所組成之群組：胰臟腺癌、腺泡細胞癌、囊腺癌、胰臟母細胞瘤、腺鱗癌、戒環細胞癌、肝樣癌、膠狀癌、未分化癌和胰臟黏液囊性贅瘤。

84. 如實施態樣83之方法，其中該胰臟腺癌為胰臟導管腺癌。

85. 如實施態樣83或84之方法，其中該個體接受用於胰臟癌之一或多種先前治療防線。

86. 如實施態樣41至85中任一項之方法，其中該抗體

或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體係在醫藥組成物中，該醫藥組成物包含該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體及醫藥上可接受之載劑。

87. 如實施態樣41至86中任一項之方法，其中該個體為人。

88. 一種套組，其包含：

(a)如實施態樣1至17中任一項之抗體或抗原結合片段或如實施態樣18至25中任一項之抗體-藥物共軛體；和

(b)如實施態樣41至87中任一項之方法的抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體的使用說明書。

89. 一種醫藥組成物，其包含如實施態樣1至17中任一項之抗體或抗原結合片段或如實施態樣18至25中任一項之抗體-藥物共軛體和一或多種選自由下列所組成之群組的作用劑：生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑和佐劑。

90. 如實施態樣1至17中任一項之抗體或抗原結合片段或如實施態樣18至25中任一項之抗體-藥物共軛體，其係用於治療個體之癌症。

91. 如實施態樣90之抗體或抗原結合片段，其中該個體先前已使用一或多種治療劑治療且未對該治療反應，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

92. 如實施態樣90之抗體或抗原結合片段，其中該個

體先前已使用一或多種治療劑治療且在治療後復發，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

93. 如實施態樣90之抗體或抗原結合片段，其中該個體先前已使用一或多種治療劑治療且在治療過程中經歷疾病進展，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

94. 如實施態樣90至93中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該癌症為末期癌症。

95. 如實施態樣94之抗體或抗原結合片段，其中該末期癌症為第3期或第4期癌症。

96. 如實施態樣94或95之抗體或抗原結合片段，其中該末期癌症為轉移性癌症。

97. 如實施態樣90至96中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該癌症為復發性癌症。

98. 如實施態樣90至97中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該癌症為不可切除的。

99. 如實施態樣90至98中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受針對該癌症之標準護理療法的先前治療且該先前治療失敗。

100. 如實施態樣90至99中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、胰臟癌、間皮瘤、結腸直腸癌、肺癌、甲狀腺癌、乳癌、膽管癌、食道癌和頭頸癌。

101. 如實施態樣100之抗體或抗原結合片段，其中該癌症係黑色素瘤。

102. 如實施態樣101之抗體或抗原結合片段，其中該黑色素瘤為皮膚黑色素瘤。

103. 如實施態樣102之抗體或抗原結合片段，其中該皮膚黑色素瘤係選自由下列所組成之群組：淺表性擴散黑色素瘤、結節性黑色素瘤、肢端小痣斑性黑色素瘤、小痣性惡性黑色素瘤和結締組織增生性黑色素瘤。

104. 如實施態樣103之抗體或抗原結合片段，其中該肢端小痣斑性黑色素瘤為舌下黑色素瘤。

105. 如實施態樣102至104中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

106. 如實施態樣105之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受使用PD-1之抑制劑的先前療法。

107. 如實施態樣101之抗體或抗原結合片段，其中該黑色素瘤為皮下黑色素瘤。

108. 如實施態樣107之抗體或抗原結合片段，其中該皮下黑色素瘤為眼黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。

109. 如實施態樣101之抗體或抗原結合片段，其中該黑色素瘤為非皮膚黑色素瘤。

110. 如實施態樣100之抗體或抗原結合片段，其中該癌症為間皮瘤。

111. 如實施態樣110之抗體或抗原結合片段，其中該

間皮瘤係選自由下列所組成之群組：胸膜間皮瘤、腹膜間皮瘤、心包間皮瘤和睪丸間皮瘤。

112. 如實施態樣111之抗體或抗原結合片段，其中該間皮瘤為胸膜間皮瘤。

113. 如實施態樣112之抗體或抗原結合片段，其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前療法。

114. 如實施態樣113之抗體或抗原結合片段，其中該基於鉑的療法為順鉑。

115. 如實施態樣112至114中任一項之方法，其中該個體接受使用培美曲塞之先前療法。

116. 如實施態樣100之抗體或抗原結合片段，其中該肺癌為非小細胞肺癌。

117. 如實施態樣116之抗體或抗原結合片段，其中該非小細胞肺癌具有表皮生長因子受體(EGFR)之突變形式。

118. 如實施態樣116之抗體或抗原結合片段，其中該非小細胞肺癌具有野生型EGFR。

119. 如實施態樣118之抗體或抗原結合片段，其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前療法。

120. 如實施態樣118或119之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

121. 如實施態樣120之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受使用PD-1之抑制劑的先前療法。

122. 如實施態樣100之抗體或抗原結合片段，其中該乳癌係選自由下列所組成之群組：HER2陽性乳癌、HER2

陰性乳癌、雌激素受體(ER)陽性乳癌、ER陰性乳癌、助孕酮受體(PR)陽性乳癌、PR陰性乳癌和三陰性乳癌。

123. 如實施態樣122之抗體或抗原結合片段，其中該乳癌為HER2陰性乳癌。

124. 如實施態樣123之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受一或多種用於HER2陰性乳癌之先前治療防線。

125. 如實施態樣124之抗體或抗原結合片段，其中該一或多種先前治療防線包含使用紫杉烷類藥物之治療。

126. 如實施態樣124或125之抗體或抗原結合片段，其中該個體為激素受體陽性。

127. 如實施態樣126之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受使用CDK4/6抑制劑之先前療法。

128. 如實施態樣126或127之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受使用激素導向療法之先前療法。

129. 如實施態樣128之抗體或抗原結合片段，其中該結腸直腸癌係選自由下列所組成之群組：結腸直腸腺癌、胃腸道基質瘤、原發性結腸直腸淋巴瘤、胃腸道類癌和平滑肌肉瘤。

130. 如實施態樣129之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受二或更多種用於該結腸直腸癌之先前治療防線。

131. 如實施態樣100之抗體或抗原結合片段，其中該胰臟癌為外分泌癌或神經內分泌癌。

132. 如實施態樣131之抗體或抗原結合片段，其中該外分泌癌係選自由下列所組成之群組：胰臟腺癌、腺泡細

胞癌、囊腺癌、胰臟母細胞瘤、腺鱗癌、戒環細胞癌、肝樣癌、膠狀癌、未分化癌和胰臟黏液囊性贅瘤。

133. 如實施態樣132之抗體或抗原結合片段，其中該胰臟腺癌為胰臟導管腺癌。

134. 如實施態樣132或133之抗體或抗原結合片段，其中該個體接受用於胰臟癌之一或多種先前治療防線。

135. 如實施態樣90至134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或抗體-藥物共軛體係在醫藥組成物中，該醫藥組成物包含該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體及醫藥上可接受之載劑。

136. 如實施態樣90至135中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該個體為人。

137. 一種如實施態樣1至17中任一項之抗體或抗原結合片段或實施態樣18至25中任一項之抗體-藥物共軛體於製備用於治療個體之癌症的藥物中之用途。

138. 如實施態樣137之用途，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且對該治療沒有反應，其中該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

139. 如實施態樣137之用途，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且在該治療後復發，其中該一或多種治療劑不是抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

140. 如實施態樣137之用途，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且在治療過程中經歷疾病進展，其中

該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

141. 如實施態樣137至140中之任一項之用途，其中該癌症為末期癌症。

142. 如實施態樣141之用途，其中該末期癌症為第3期或第4期癌症。

143. 如實施態樣141或142之方法，其中該末期癌症為轉移性癌症。

144. 如實施態樣137至143中任一項之用途，其中該癌症為復發性癌症。

145. 如實施態樣137至144中任一項之用途，其中該癌症為不可切除的。

146. 如實施態樣137至145中任一項之用途，其中該個體接受針對該癌症之標準護理療法的先前治療且該先前治療失敗。

147. 如實施態樣137至146中任一項之用途，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、胰臟癌、間皮瘤、結腸直腸癌、肺癌、甲狀腺癌、乳癌、膽管癌、食道癌和頭頸癌。

148. 如實施態樣147之用途，其中該癌症為黑色素瘤。

149. 如實施態樣148之用途，其中該黑色素瘤為皮膚黑色素瘤。

150. 如實施態樣149之用途，其中該皮膚黑色素瘤係

選自由下列所組成之群組：淺表性擴散黑色素瘤、結節性黑色素瘤、肢端小痣斑性黑色素瘤、小痣性惡性黑色素瘤和結締組織增生性黑色素瘤。

151. 如實施態樣150之用途，其中該肢端小痣斑性黑色素瘤為舌下黑色素瘤。

152. 如實施態樣149至151中任一項之用途，其中該個體接受使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

153. 如實施態樣152之用途，其中該個體接受使用PD-1之抑制劑的先前療法。

154. 如實施態樣148之用途，其中該黑色素瘤為皮下黑色素瘤。

155. 如實施態樣154之用途，其中該皮下黑色素瘤為眼黑色素瘤或黏膜黑色素瘤。

156. 如實施態樣148之用途，其中該黑色素瘤為非皮膚黑色素瘤。

157. 如實施態樣147之用途，其中該癌症為間皮瘤。

158. 如實施態樣157之用途，其中該間皮瘤係選自由下列所組成之群組：胸膜間皮瘤、腹膜間皮瘤、心包間皮瘤和睪丸間皮瘤。

159. 如實施態樣158之用途，其中該間皮瘤為胸膜間皮瘤。

160. 如實施態樣159之用途，其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前療法。

161. 如實施態樣160之用途，其中該基於鉑之療法為

順鉑。

162. 如實施態樣158至161中任一項之用途，其中該個體接受使用培美曲塞之先前療法。

163. 如實施態樣147之用途，其中該肺癌為非小細胞肺癌。

164. 如實施態樣163之用途，其中該非小細胞肺癌具有表皮生長因子受體(EGFR)之突變形式。

165. 如實施態樣163之用途，其中該非小細胞肺癌具有野生型EGFR。

166. 如實施態樣165之用途，其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前療法。

167. 如實施態樣165或166之用途，其中該個體接受使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

168. 如實施態樣167之用途，其中該個體接受使用PD-1之抑制劑的先前療法。

169. 如實施態樣147之用途，其中該乳癌係選自由下列所組成之群組：HER2陽性乳癌、HER2陰性乳癌、雌激素受體(ER)陽性乳癌、ER陰性乳癌、助孕酮受體(PR)陽性乳癌、PR陰性乳癌和三陰性乳癌。

170. 如實施態樣169之用途，其中該乳癌為HER2陰性乳癌。

171. 如實施態樣170之用途，其中該個體接受一或多種用於HER2陰性乳癌之先前治療防線。

172. 如實施態樣171之用途，其中該一或多種先前治

療防線包含使用紫杉烷類藥物之治療。

173. 如實施態樣171或172之用途，其中該個體為激素受體陽性。

174. 如實施態樣173之用途，其中該個體接受使用CDK4/6抑制劑之先前療法。

175. 如實施態樣173或174之用途，其中該個體接受使用激素導向療法之先前療法。

176. 如實施態樣147之用途，其中該結腸直腸癌係選自由下列所組成之群組：結腸直腸腺癌、胃腸道基質瘤、原發性結腸直腸淋巴瘤、胃腸道類癌和平滑肌肉瘤。

177. 如實施態樣176之用途，其中該個體接受二或更多種用於該結腸直腸癌之先前治療防線。

178. 如實施態樣147之用途，其中該胰臟癌為外分泌癌或神經內分泌癌。

179. 如實施態樣178之用途，其中該外分泌癌係選自由下列所組成之群組：胰臟腺癌、腺泡細胞癌、囊腺癌、胰臟母細胞瘤、腺鱗癌、戒環細胞癌、肝樣癌、膠狀癌、未分化癌和胰臟黏液囊性贅瘤。

180. 如實施態樣179之用途，其中該胰臟腺癌為胰臟導管腺癌。

181. 如實施態樣179或180之用途，其中該個體接受用於胰臟癌之一或多種先前治療防線。

182. 如實施態樣137至181 中任一項之用途，其中該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體係在醫藥組成物

中，該醫藥組成物包含該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體及醫藥上可接受之載劑。

183. 如實施態樣137至182中任一項之用途，其中該個體為人。

【0245】藉由參考下列實施例將可更充分地理解本發明。然而，它們不應被解釋為限制本發明之範圍。應理解的是，本文所描述之實施例和實施態樣僅用於說明之目的，且鑑於彼等之各種不同的修飾或變化將建議給本技藝之技熟習人士並將包含在本申請案之精神和權限及所附之發明申請專利範圍內。

實施例

實施例1：癌細胞株中之CD288表現

【0246】依製造商(DAKO A/S，丹麥Glostrup)之描述使用鼠CD228單株抗體作為一級抗體，進行DAKO QiFiKiT流式細胞儀間接分析並使用Attune NxT流式細胞儀評估來定量各種癌細胞株之細胞表面上的CD228複本數。所產生之每一細胞表現之CD228分子的數目顯示於表1中。

表1：各種不同之細胞株之每一細胞的CD228分子

細胞株	每一細胞之 CD228 分子數
A2058	51,000
RPMI-7951	0
PRMI-7951 + CD228	400,000
SK-MEL-5	134,000
SK-MEL-28	450,000

Colo853	92,000
IGR37	24,000
A375	16,000
HPAF-II	34,000
COLO818	21,0000
H3677	40,000
IGR39	6,200
MALME3M	149,754
SH4	106,000
SK-MEL-2	264,197
SK-MEL-24	151,000
SK-MEL-3	26,000
WM115	1,000
WM266.4	46,700
JL-1	185,708
NCI-H2452	908,219
NCI-H2052	334,559
MSTO211h	9,416
SW1463	18,683
SW1116	59,064
SW48	16,776
SW480	11,197
SK-CO-1	104,398
T84	28,486
Colo205	4,084
HCT15	3,701
HCT116	40,466
LoVo	7,441
LS174T	667
Cal851	175,893
HCC70	91,994
HCC1937	16,467
HCC1143	115,430
MDA-MB-231	174,640
BT-474	968
SK-BR-3	1,722
HT1080	35,224
Capan1	19,250
A549	18,799
CorL23	47,446
Calu-1	59,000
Sk-Mes-1	18,000

NCIH226	843,430
NCIH441	79,460
CORL105	236,804
92-1	7,879
Mel202	12,527
MP46	14,733
MP41	23,074
MP65	51,397
MM28	108,400

實施例2：CD228表現之免疫組織化學分析

【0247】從商業來源取得腫瘤組織陣列。從US Biomax Inc購得經福馬林固定和石蠟包埋(FFPE)的腫瘤組織。所有樣品均在Bond-Max™自動染色機(Leica)上處理。

【0248】使用Bond™Dewax溶液(Leica，目錄編號AR9222)在72℃下將玻璃載玻片上切片之FFPE玻片進行脫石蠟處理並再水化。使用基於EDTA之Bond™表位修復溶液2(Leica，目錄編號AR9640)在95至100℃下進行抗原修復20分鐘，再與主要抗CD228抗體(Sigma；目錄編號HPA004880)一起培育。使用同型匹配之兔IgG1作為背景染色之陰性對照組。在自動化IHC染色方面，我們使用Refine DAB套組或基於鹼性磷酸酶之檢測套組：Bond™ Polymer AP紅色檢測套組(Leica，目錄編號DS9305)。將載玻片與濃度為1μg/ml之針對兔子CD228 mAb的兔子單株初級抗體一起培育45分鐘並初步阻斷蛋白質30分鐘(DAKO目錄編號X0909)。形成發色團後，使用蘇木精將切片複染再蓋上蓋玻片。由病理學家對載玻片進行評估和評分，並使用Zeiss Axiovert 200M顯微鏡(Carl Zeiss公司，紐約

Thornwood)拍攝圖像。

【0249】第1圖顯示黑色素瘤癌症患者樣品中之高度CD228表現，其提供使用CD228 ADC治療這些腫瘤的有力依據。

【0250】第2圖顯示間皮瘤癌症患者樣品中之高度CD228表現，其提供使用CD228 ADC治療這些腫瘤的有力依據。

【0251】第3圖顯示結腸直腸癌患者樣品中之高度CD228表現，其提供使用CD228 ADC治療這些腫瘤的有力依據。

【0252】第4圖顯示三陰性(HR-、PgR-、Her2-)乳癌患者樣品(上圖)和Her2-HR+乳癌患者樣品(下圖)中之高度CD228表現，其提供使用CD228 ADC治療這些腫瘤的有力依據。

【0253】第5圖顯示胰臟癌患者樣品中之高度CD228表現，其提供使用CD228 ADC治療這些腫瘤的有力依據。

【0254】第6圖顯示鱗狀非小細胞肺癌患者樣品(上圖)和腺癌非小細胞肺癌患者樣品(下圖)中之高度CD228表現，其提供使用CD228 ADC治療這些腫瘤的有力依據。

【0255】將免疫組織化學實驗之總結與由癌症基因組圖譜報告之各種腫瘤類型的CD228 RNA水準相比較。我們經由將黑色素瘤之IHC患病率應用於TCGA來測定CD228 RNA陽性之閾值。從第7圖中可以看出，大多數腫瘤類型在RNA表現和免疫組織化學之間具有密切相關性，但

HER2-/HR+乳癌除外。TNBC=三陰性乳癌。NSCLC=非小細胞肺癌。Adeno=腺癌。Squamous=鱗狀細胞癌。TCGA=癌症基因組圖譜。

實施例3：抗CD228抗體藥物共軛體

【0256】經由連接子MDpr-PEG(12)-gluc將各種抗CD228抗體與藥物MMAE共軛結合，從而使每一抗體之平均藥物荷載量為約8。該共軛結合方法描述於美國公開案第2018/0092984號中。將腫瘤細胞與CD228抗體藥物共軛體(ADC)在37℃下一起培育96至144小時。使用人IgG ADC作陰性對照組。根據製造商之說明書使用Cell Titer Glo測量細胞存活力。在Fusion HT螢光分析儀(Perkin Elmer，麻薩諸塞州沃爾瑟姆)上測量螢光信號。將該數據對未經處理之細胞標準化，並使用Graph Pad軟體計算x50值。結果以IC_{50}記錄在表2中，IC_{50}為與經載劑處理之細胞(對照組=100%)相比較時，使存活力降低50%所需之化合物濃度。嵌合型L49(cL49)和鼠(mL49)ADC優於所有其他抗CD228 ADC，尤其是在具有較低CD228表現之細胞株中。

表 2：抗 CD228 抗體-藥物共軛體針對各種不同癌細胞之 IC_{50}

抗體	藥物連接子	藥物荷載量	黑色素瘤細胞株 (每一細胞之 CD228 分子數目)				
			A2058 (51,000)	RPMI-7951 (0)	RPMI-7951 +p97 (400,000)	SK-MEL-5 (134,000)	SK-MEL-28 (450,000)
mL49	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	12	>1000	3	5	3
cL49	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	5	>1000	2	2	2
mL235	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	780	>1000	17	305	114
Santa Cruz (#271633)	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
R&D (#893416)	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	444	>1000	4	55	6
Biolegend (#363101)	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	718	>1000	2	100	7
hIgG	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

實施例4：小鼠L49抗體之人化

【0257】使用小鼠抗體mL49(Siemers et al., 1997, Bioconjug. Chem. 8:510-9)作為人化之起始點或供體抗體。合適之人受體序列為由用於重鏈之hIGHV4-59和hIGHJ4和用於輕鏈之hIGKV2-30和hIGKJ2所提供的基因組序列。當根據Kabat編號方案定義CDR時，人受體序列顯示出與可變區框架中之供體序列具有70%(重鏈)和84%(輕鏈)同一性。

【0258】當根據Kabat編號方案定義CDR時，比對該供體序列可鑑定出人受體框架序列在重鏈中之26個位置處

和輕鏈中之13個位置處與供體框架序列不同且由於直接接觸抗原而可能影響抗體結合、影響CDR之構象或影響重鏈和輕鏈之間的裝填。在不同排列之特定位置處納入反向突變來製作三條人化重鏈(HA、HB和HC)和三條人化輕鏈(LA、LB和LC)。參見第8至11圖和表3至6中。

表 3：hL49 重鏈變體中之人化突變

vH 變體	外顯子受體 序列	鼠供體框架 殘基	人受體 CDR 殘基
hvHA	IGHV4-59/HJ4	H27, H30, H47, H71, H78	無
hvHB	IGHV4-59/HJ4	H27, H30, H40, H47, H48, H67, H71, H78	無
hvHC	IGHV4-59/HJ4	H27, H30, H40, H47, H48, H67, H71, H78, H82B, H91	無

表 4：hL49 重鏈變體中之特定的鼠框架突變

變體	27	30	40	47	48	67	71	78	82B	91	% 人
hvHA	D	T		Y			R	Y			88.8
hvHB	D	T	F	Y	M	I	R	Y			85.7
hvHC	D	T	F	Y	M	I	R	Y	F	N	83.7

表 5：hL49κ 輕鏈變體中之人化突變

vK 變體	外顯子受體 序列	鼠供體框架 殘基	人受體 CDR 殘基
hvLA	IGKV2-30/KJ2	L2	無
hvLB	IGKV2-30/KJ2	L2, L36, L46	無
hvLC	IGKV2-30/KJ2	L2, L36, L46	L28

表 6：hL49κ 輕鏈變體中之特定的鼠框架突變

變體	2	36	46	% 人
hvLA	F			91.0
hvLB	F	Y	L	89.0
hvLC	F	Y	L	90.0

【0259】然後，表現代表這些人化重鏈和輕鏈之每一排列(9種可能性)的人化抗體。然後，在如表7所示之溫度和pH條件下培育1週後，使用肽圖譜分析在hL49 HALB (Asn(N)-天門冬醯胺脫醯胺之可能性)和hL49 HALC (Asp(D)-天門冬胺酸異構化之可能性)之L2肽中發現之不穩定的化學修飾以比較該抗體。hL49 HALC(N28D)排除在hL49 HALB中觀察到之脫醯胺作用且異構化程度有限。總體L2肽修飾率從13%下降到2%。

表7：**人化抗CD228抗體之肽圖譜分析**

hL49 ec	溫度 (°C)	pH	% 未經修飾之 L2 肽	% 脫醯胺化之 Asn 33	%異構化之 Asp 33	% Asn/Asp 33 琥珀醯亞胺	% Asn/Asp 33 夾	% 全部經修飾之 L2 肽
HALB	4	7.4	88.9	6.7	NA	3.5	1.0	11.1
	37	7.4	87.2	8.3	NA	3.5	0.9	12.8
	37	6.5	86.7	9.1	NA	3.6	0.6	13.3
	37	4.4	87.1	8.7	NA	3.5	0.6	12.9
HALC	4	7.4	98.0	NA	0.2	1.5	0.1	2.0
	37	7.4	98.1	NA	0.2	1.5	0.0	1.9
	37	6.5	98.0	NA	0.3	1.7	0.1	2.0
	37	4.4	97.9	NA	0.3	1.8	0.1	2.1

【0260】藉由競爭性結合分析測定每一產生之抗體的結合曲線。簡單地說，將穩定表現人CD228之$1x10^5$ RPMI-7951細胞等分在置於冰上之v型底96孔盤的每個孔中。將細胞與5 nM AlexaFluor-647(AF)標記之親本鼠CD228 mAb和濃度遞增(從0.06nM至1000nM)之未經標記的人化CD228 mAb一起培育1小時，該人化CD228 mAb具有各種人化輕鏈LA-LB與人化重鏈HA-HC之組合。將細胞沉澱成小丸並使用PBS/BSA洗滌3次。將細胞沉澱成小丸並重新懸浮於125μL之PBS/BSA中。藉由流式細胞術分析螢光，使用飽

和之螢光信號的百分比來測定經結合之標記的鼠CD228mAb之百分比。重組人抗CD228抗體之結合曲線顯示於第12A至12F圖中。

【0261】然後藉由飽和結合分析測定每一所產生之抗體的K_D。簡單地說，將$1x10^5$個穩定表現人CD228之RPMI-7951細胞等分在v型底96孔盤的每個孔中。將濃度為0.05pM至340nM之各CD228抗體加入其中，並在冰上培育60分鐘。將細胞沉澱成小丸並以PBS/BSA洗滌3次，再加入10ug/ml之PE標記的抗人IgG山羊二級抗體，並在冰上再培育60分鐘。將細胞沉澱成小丸並以PBS/BSA洗滌3次，再重新懸浮於125μL PBS/BSA中。藉由流式細胞術分析螢光，使用飽和螢光信號之百分比測定結合百分比，隨後計算表觀K_D。重組人抗CD228抗體之結合曲線顯示於第13圖中，表8中顯示cL49ec(在輕鏈恆定區中具有S239C突變之嵌合L49)、hL49 HALA G1、hL49 HALB G1和hL49 HALC G1之K_D。選擇稱為“HALC”、“hL49”或“hL49-HALC”之抗體(其包含重鏈“HA”和輕鏈“LC”)來用於所有其他實驗。

表8：人化抗CD228抗體之K_D

	cL49ec	hL49 HALA G1	hL49 HALB G1	hL49 HALC G1
K_D (nM)	5.8	5.3	7.8	4.0

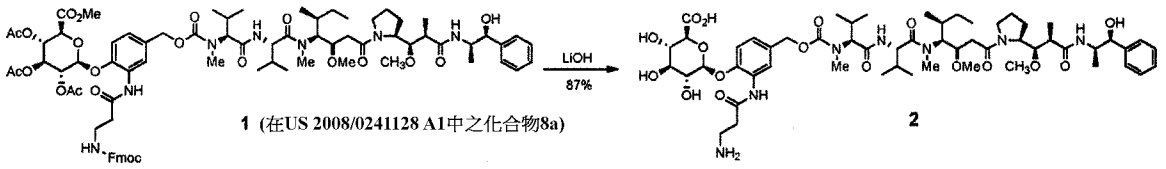
實施例5：具有各種不同藥物連接子之hL49-HALC抗體藥物共軛體

A.抗體藥物共軛結合

【0262】將hL49-HALC與8個荷載之MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE、澳瑞他汀T、微管溶素(Tubulysin)M或親脂性MMAF、2個荷載之MC-VC-MMAE或MDpr-gluc-MMAE或2-個荷載之PBD共軛結合。該共軛結合方法描述於美國版物2018/0092984號中。所有市售之無水溶劑均直接使用無需進一步純化。PEG試劑係從Quanta BioDesign(俄亥俄州鮑威爾)獲得。分析型薄層色層分析術係在矽膠60 F254鋁板(EMD Chemicals，紐澤西州Gibbstown)上進行。在Chromatotron儀器(Harris Research，加州Palo Alto)上進行徑向色層分析。在Biotage Isolera One快速純化系統(Charlotte，北卡羅來納州)上進行管柱色層分析術。在配置Varian ProStar 330 PDA檢測器之Varian ProStar 210溶劑輸送系統上進行分析型HPLC。樣品係從C12 Phenomenex Synergi 2.0×150 mm，4μm，80Å逆相管柱洗提出。該酸性流動相係由乙腈和水組成，乙腈和水均含有0.05%三氟醋酸或0.1%甲酸(每種化合物均有標明)。在注射後1分鐘，以在11分鐘內線性梯度從5%至95%之酸性乙腈洗提該化合物，接著使用等強度之95%乙腈洗提15分鐘(流速=1.0 mL/min)。在二種不同的系統上進行LC-MS。LC-MS系統1係由ZMD微質譜儀所組成，該ZMD微質譜儀連接配備C12 Phenomenex Synergi 2.0×150 mm，4μm，80Å逆相色層管柱的HP Agilent 1100 HPLC儀器。該酸性洗提液係由在10分鐘內線性梯度從5%至95%之在0.1%甲酸水溶液中的乙腈組成，接著再使用等強度之95%乙腈洗提5分鐘(流速=0.4

mL/min)。LC-MS系統2係由Waters Xevo G2 Tof質譜儀所組成，該Waters Xevo G2 Tof質譜儀連接配備Waters 2996光電二極管陣列檢測器之Waters 2695分離模組；該管柱、流動相、梯度和流速與LC-MS系統1相同。在Waters SQ質量檢測器上進行UPLC-MS，該Waters SQ質量檢測器連接配備Acquity UPLC BEH C18 2.1×50mm，1.7μm逆相管柱之Acquity Ultra Performance LC。該酸性流動相(0.1%甲酸)係由3%乙腈/97%水至100%乙腈之梯度(流速=0.5 mL/min)所組成。在Varian ProStar 210溶劑輸送系統上進行製備型HPLC，該Varian ProStar 210溶劑輸送系統配置Varian ProStar 330 PDA檢測器。使用在水中之0.1%甲酸(溶劑A)和在乙腈中之0.1%甲酸(溶劑B)作為洗提液，將產物在C12 Phenomenex Synergi 10.0×250 mm，4μm，80Å逆相管柱上純化。該純化方法係由下列溶劑A至溶劑B之梯度組成：0至5分鐘，90：10；5至80分鐘，90：10至10：90；然後等強度之10：90，5分鐘。流速為4.6 mL/min，並在254 nm處監測。計劃3和4中之化合物的製備型HPLC係在二個流動相中使用0.1%三氟醋酸取代0.1%甲酸來進行。

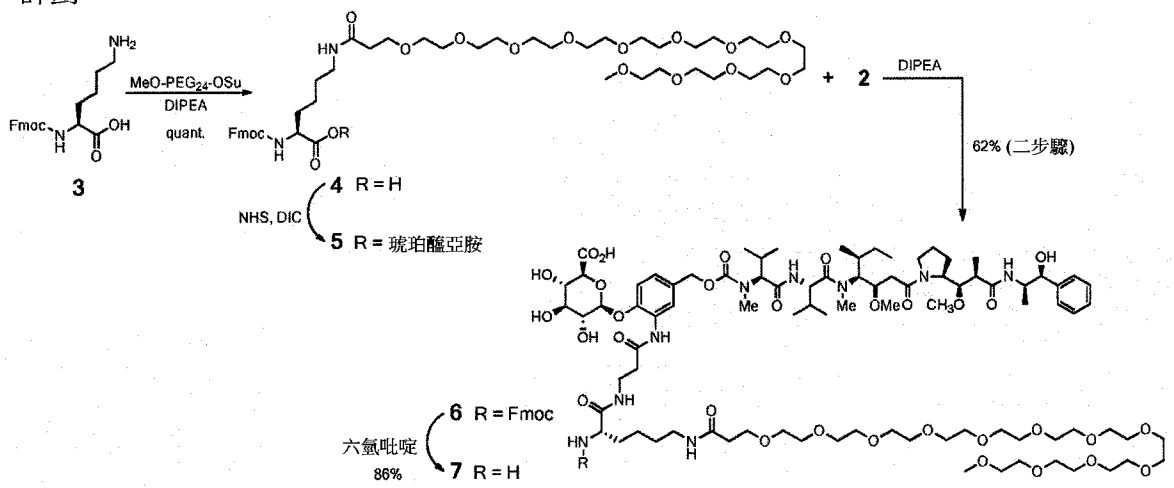
計劃 1



【0263】**(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-胺基丙醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-**

((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-合氧基丙基)吡咯啶-1-基)-2-合氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三合氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮雜十四烷基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-吡喃-2-羧酸(2)：在含有已知(在US 2008/0241128 A1中為化合物8a)之葡糖醛酸苷-MMAE中間體2(40mg，26.8μmol)的燒瓶中添加0.9 mL 甲醇和0.9 mL四氫呋喃。然後，將該溶液在冰浴中冷卻並將在0.9mL水中之為溶液形式的氫氧化鋰一水合物(6.8mg，161μmol)逐滴加入。然後，將反應物在冰上攪拌1.5小時，此時LC/MS顯示完全轉化為產物。然後，加入冰醋酸(9.2μL，161μmol)並將該反應物濃縮至乾燥。製備型HPLC提供為油狀殘質之完全去保護的葡糖醛酸苷-MMAE連接子中間體3(26 mg，87%)。分析型HPLC(0.1%甲酸)：t_R 9.3分鐘。LC-MS系統1：t_R 11.10分鐘，m/z (ES$^+$) 實測值 1130.48$(M+H)^+$，m/z(ES$^-$) 實測值 1128.63$(M-H)^-$。

計劃 2



【0264】**(S)-44-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-38-合氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧雜-39-氮雜四十五-45-酸(4)**：在含有N_α-Fmoc-離胺酸3(59 mg，161μmol)之燒瓶中加入2.9 mL無水二氯甲烷，接著加入甲氧基-PEG12-OSu(100 mg，146μmol)。然後添加DIPEA(127μL，730μmol)並將該反應物在氮氣，室溫下攪拌，然後進行TLC和LC/MS。2小時後，LC/MS顯示轉化為產物。將反應溶液在二氯甲烷中稀釋並藉由矽膠色層分析法純化。以二氯甲烷加逐漸增量之甲醇(0%至20%)洗提該固定相以提供該所需產物4(153 mg，112%)。UPLC-MS：t_R 1.77min，m/z(ES^+)實測值939.58$(M+H)^+$。

【0265】**(S)-2,5-二合氧基吡咯啶-1-基44-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-38-合氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二烷基氧雜-39-氮雜四十五-45-酸酯(5)**：在燒瓶中裝填N_α-Fmoc-離胺酸(PEG12)-OH 4(153mg，163μmol)和1.6 mL無水四氫呋喃。加入N-羥基琥珀醯亞胺(28mg，245μmol)，再加入二異丙基碳二亞胺(38μL，245μmol)。將反應物在氮氣下密封並攪拌過夜。將粗反應物在二氯甲烷中稀釋，並以二氯甲烷加上逐漸增量之甲醇(0%至10%)洗提，在矽膠上純化，以提供所需之經活化的酯5(155mg)。該物質可直接使用，不需進一步表徵。UPLC-MS：t_R 1.92min，m/z(ES^+)實測值1036.48$(M+H)^+$。

【0266】**(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-38,45-二合氧基-2,5,8,11,14,17,20,**

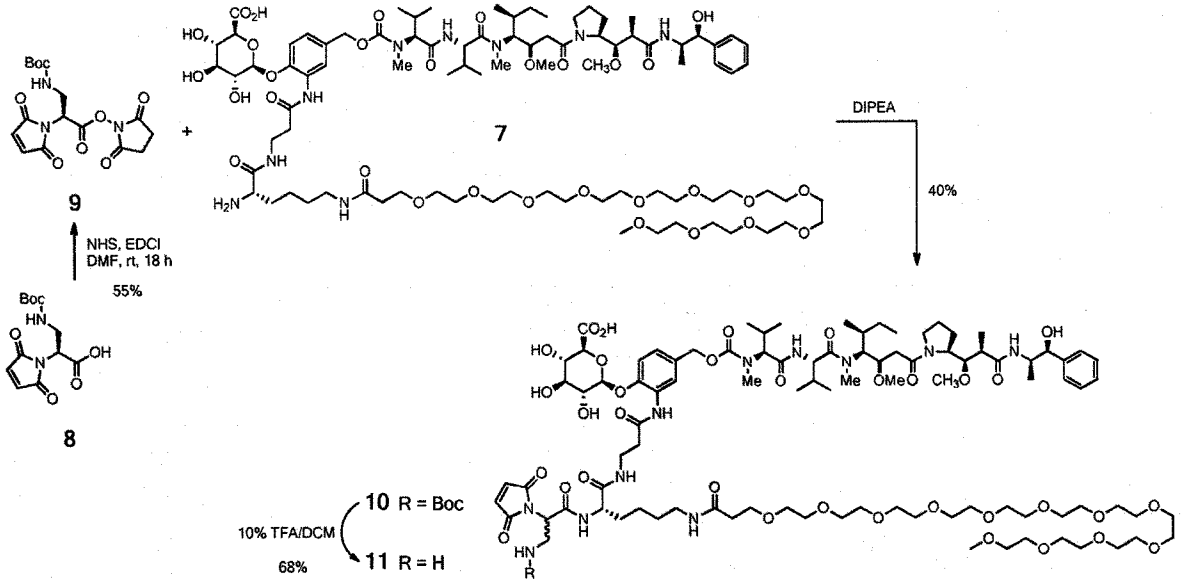
23,26,29,32,35-十二氧雜-39,46-二氮雜四十九醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-合氧基丙基)吡咯啶-1-基)-2-合氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三合氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮雜十四烷基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-吡喃-2-羧酸(6)：將經去保護之葡糖醛酸苷-MMAE連接子中間體2(92 mg，81μmol)溶解在無水二甲基甲醯胺(1.6 mL)中並添加至含有Nα-Fmoc-離胺酸(PEG12)-OSu 5(101 mg，97μmol)之燒瓶中。然後，加入二異丙基乙胺(70μL，405μmol)，再將反應物在氮氣，室溫下攪拌。4.5小時後，LC-MS顯示出轉化成產物。藉由製備型HPLC純化產物以提供為油狀殘質之Fmoc-Lys(PEG12)-葡糖醛酸苷-MMAE中間體6(111mg，經過二個步驟後為62%)。UPLC-MS：t_R 2.01min，m/z(ES^+)實測值2050.92$(M+H)^+$。

【0267】**(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-胺基-38,45-二合氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧雜-39,46-二氮雜四十九醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-合氧基丙基)吡咯啶-1-基)-2-合氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三合氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮雜十四烷基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-吡喃-2-羧酸(7)**：將Fmoc-Lys(PEG12)-葡糖醛酸苷-MMAE中間體6(111 mg，54μmol)溶

解於2.2 mL無水二甲基甲醯胺中，再添加0.5 mL六氫吡啶。將反應物在氮氣下攪拌3小時，然後濃縮至乾燥。將該產物藉由製備型HPLC純化以提供為油狀殘質之H-Lys(PEG12)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間體7(85mg，86%)。UPLC-MS：t_R 1.50min，m/z(ES^+)實測值1829.31$(M+H)^+$。

【0268】**(S)-2,5-二合氧基吡咯啶-1-基3-((第三丁氧羰基)胺基)-2-(2,5-二合氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙酸酯(9)**：將(S)-N_α-馬來醯亞胺基-N_β-Boc-二胺基丙酸8(*Nature Biotechnology*, 2014, 32, 1059-1062)(400 mg，1.4 mmol)溶解於7mL無水二甲基甲醯胺中。加入N-羥基琥珀醯亞胺(178mg，1.5mmol)，再加入1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳二亞胺(298mg，1.5mmol)。將反應物在室溫，氮氣下攪拌3小時。透過在120mL水中稀釋來達成加水處理。然後，以60 mL醋酸乙酯將水層萃取3次。然後以鹽水洗滌該合併之有機層，在硫酸鈉上乾燥並濃縮至乾。藉由快速管柱色層分析法純化該產物，使用己烷：醋酸乙酯之洗提混合物(50:50至0：100)提供(S)-N_α-馬來醯亞胺-N_β-Boc-二胺基丙酸NHS酯[MDpr(Boc)-OSu] 9(297mg，55%)。LC-MS系統1：t_R 12.23min，m/z(ES^+)實測值282.0599(M+H-Boc基團)$^+$。LC-MS系統2：t_R 11.30分鐘，m/z(ES^+)實測值2580.2515$(M+H)^+$。

計劃 3



【0269】**(2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((S)-3-((第三丁氧羰基)胺基)-2-(2,5-二合氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-38,45-二合氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧雜-39,46-二氮雜四十九醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-合氧基丙基)吡咯啶-1-基)-2-合氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三合氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮雜十四烷基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-吡喃-2-羧酸(10)**：將MDpr(Boc)-OSu 9(20 mg，53μmol)溶解在2.2 mL無水二甲基甲醯胺中，再將其加入含有H-Lys(PEG12)-葡糖醛酸苷-MMAE連接子中間體7(86 mg，44μmol)的燒瓶中。然後加入二異丙基乙胺(15μL，88μmol)，然後將該反應物在氮氣，室溫下攪拌2.5h。以15μL冰醋酸將該反應物淬滅，並藉由製備型HPLC純化以產生MDpr(Boc)-

Lys(PEG12)-葡糖醛酸苷-MMAE中間體10(37mg，40%)，此為非對映異構體混合物。該非對映異構體可藉由手性色層分析法分離。UPLC-MS：t_R 1.84min，m/z(ES^+)實測值2095.44$(M+H)^+$。

【0270】**(2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-胺基-2-(2,5-二合氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-38,45-二合氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧雜-39,46-二氮雜四十九醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-合氧基丙基)吡咯啶-1-基)-2-合氧乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三合氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮雜十四烷基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-吡喃-2-羧酸(11)**：將含有MDpr(Boc)-Lys(PEG12)-葡糖醛酸苷-MMAE中間體10(34mg，16umol)之燒瓶在氮氣下，冰浴中冷卻至0℃。將在二氯甲烷(0.8mL)中之10%三氟醋酸的溶液逐滴加入其中。然後，將反應物在0℃下攪拌2h，此時LC-MS顯示出完成Boc去保護。然後將該反應物濃縮成粗殘質，並藉由製備型HPLC純化以提供MDpr-Lys(PEG12)-葡糖醛酸苷-MMAE連接子11(22mg，68%)。UPLC-MS：t_R 1.50 min，m/z(ES^+)實測值1995.18$(M+H)^+$。

【0271】使用本技藝已知之方法將化合物11經由其鏈間硫醇與抗CD228抗體共軛結合，平均藥物荷載量為每一抗體8個藥物(參見，例如美國專利案第7,659,241號)。

B. hL49-HALC ADC在玻管內之細胞毒性

【0272】將腫瘤細胞與各抗體藥物共軛體(ADC)在37℃下一起培育96至144小時。使用非結合(稱為h00或IgG)ADC作為陰性對照。根據製造商之說明使用Cell Titer Glo測量細胞存活力。在Fusion HT螢光分析儀(Perkin Elmer，麻薩諸塞州沃爾瑟姆)上測量螢光信號。將該數據對未經處理之細胞標準化，並使用Graph Pad軟體計算x50值。結果以IC_{50}記錄在表9中，IC_{50}為與經載劑處理之細胞(對照組= 100%)相比較時，使存活力降低50%所需之化合物濃度。在CD228表現在16,000至450,000之範圍內的細胞株小組中，hL49 ADC取得個位數ng/ml IC_{50}。

表9：抗CD228抗體-藥物共軛體針對各種不同癌細胞之IC_{50}

抗體	藥物連接子	藥物荷載量	黑色素瘤細胞株(每一細胞之CD228分子數目)					
			SKMEL28 (450,000)	SKMEL5 (134,000)	Colo853 (92,000)	A2058 (51,000)	IGR37 (24,000)	A375 (16,000)
hL49-HALC	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	2.8	2.5	3.7	7.3	13.7	14.9
hL49-HALC	澳瑞他汀	8	0.4	0.2	0.7	0.5	1.3	0.5
hL49-HALC	微管溶素	8	3	0.4	2	1	16	2
hL49-HALC	親脂性MMAF	8	0.3	0.05	0.2	0.3	2.0	0.7
hL49-HALC	PBD	2	32	14	68	5	52	12
hL49-HALC	MC-VC-MMAE	4	5.9	3.9	8.5	1823	223	1556
hL49-HALC	MDpr-gluc-MMAE	4	1.4	1.8	2.0	7.5	14.7	11.5

【0273】在類似之實驗中，在使用各種不同濃度之

hL49處理後測定活細胞之百分比，該hL49係與具有不同量之MMAE的不同藥物連接子共軛結合。使用為各種不同之抗體-藥物共軛體(ADC)濃度的hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(8)處理A2058細胞後所產生之存活細胞的百分比顯示於第14A圖中。該8-荷載MP-gluc-MMAE在玻管內優於該4-荷載MP-gluc-MMAE和該MC-val-cit-PAB-MMAE藥物連接子。儘管含有相等量之相同藥物(MMAE)，但該4-荷載MP-gluc-MMAE在玻管內優於MC-val-cit-PAB-MMAE藥物連接子。

【0274】使用為各種不同之抗體-藥物共軛體(ADC)濃度的hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(8)處理A375細胞後所產生之存活細胞的百分比顯示於第14B圖中。該8-荷載MP-gluc-MMAE在玻管內優於該4-荷載MP-gluc-MMAE和該MC-val-cit-PAB-MMAE藥物連接子。儘管含有相等量之相同藥物(MMAE)，但該4-荷載MP-gluc-MMAE在玻管內優於MC-val-cit-PAB-MMAE藥物連接子。

【0275】使用為各種不同之抗體-藥物共軛體(ADC)濃度的hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(4)、hL49-MP-gluc-MMAE(8)處理Colo-853細胞後所產生之存活細胞的百分比顯示於第14C圖中。該8-荷載MP-gluc-MMAE在玻管內優於該4-荷載MP-gluc-MMAE和該MC-val-cit-PAB-MMAE藥物連接子。

C. 具有各種不同之藥物連接子之抗CD228 ADC的體內活性

【0276】在裸(nu/nu)鼠(7至8隻動物/組)中植入5×10^6個在25%基質膠(matrigel)中培養的A2058腫瘤細胞。當腫瘤達到100 mm^3時，開始給予1 mg/kg、3 mg/kg或6 mg/kg之測試的ADC劑量(q4d x 4腹膜內注射)。使用卡尺監測腫瘤體積，並在腫瘤體積達到～800至1000 mm^3時對動物實施安樂死。持續繪製各組之平均腫瘤體積圖，直到一或多隻動物被安樂死。所有動物程序均在實驗動物照護和使用委員會所批准之規程下，在國際實驗動物管理評鑑及認證協會認可的機構中執行。

【0277】未經治療之小鼠和以3 mg/kg hL49、hL49-澳瑞他汀T(8)、hL49-親脂性MMAF(8)、hL49-微管溶素M(8)和hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生之腫瘤體積顯示於第15圖中。儘管玻管內效力優越，澳瑞他汀T和親脂性MMAF ADC在體內之活性較hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)低。

【0278】未經治療之小鼠和以6 mg/kg IgG-MDpr-gluc-MMAE(2)、6 mg/kg hL49ec-MDpr-gluc-MMAE(2)、3 mg/kg hL49ec-MDpr-gluc-MMAE(2)、1 mg/kg hL49ec-MDpr-gluc-MMAE(2)、3 mg/kg IgG-MDpr-gluc-MMAE(4)、3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(4)和3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生之腫瘤

體積顯示於第16圖中。該具有PEG之8-荷載MMAE在體內優於該具有PEG之2-荷載或4-荷載MMAE。

【0279】未經治療之小鼠和以1 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、3 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、1 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)和3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生之腫瘤體積顯示於第17圖中。該3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)在體內優於1 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)或任一濃度之hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)。

【0280】未經治療之小鼠和以1 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、3 mg/kg hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)、1 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)和3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生之腫瘤體積顯示於第18圖中。3 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)在體內優於1 mg/kg hL49-MDpr-gluc-MMAE(8)或任一濃度之hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4)。

實施例6：具有微管溶素M和MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE之ADC的體內比較

【0281】與微管溶素M或MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE共軛結合之hL49顯示出在對抗A2058細胞方面優於其他ADC，因此選擇這些ADC進行不同劑量和不同腫瘤細胞類型的進一步評估。

【0282】在裸(nu/nu)鼠(7至8隻動物/組)中植入在25%

基質膠中培養之2.5×10^5個A2058、1×10^6個SK-MEL-5、1×10^5個IGR-37、1×10^6個Colo-853或$1x10^6$個HPAF-II腫瘤細胞。在NOD/SCID/gc KO(NSG)小鼠中植入$5x10^5$個培養之MDA-MB-231腫瘤細胞。在PDX模型方面，在NOD/SCID小鼠中生長LU0697鱗狀NSCLC模型，在BALB/c裸鼠(3隻動物/組)中生長LU5200腺癌NSCLC模型。當腫瘤達到約$100mm^3$時開始給予0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg之測試ADC劑量(單次腹膜內注射)。使用卡尺監測腫瘤體積，且在腫瘤體積達到～1000^3mm時對動物實施安樂死。在PDX研究方面，無論腫瘤大小如何均在最終劑量後28天終止研究。持續繪製各組之平均腫瘤體積圖，直到一或多隻動物被安樂死。所有動物程序均在實驗動物照護和使用委員會所批准之規程下，在國際實驗動物管理評鑑及認證協會認可的機構中執行。

【0283】未經治療之小鼠和以3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)、3 mg/kg IgG-微管溶素M(8)、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-微管溶素M(8)或1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生之A2058腫瘤體積顯示於第19圖中。3 mg/kg之hL49-微管溶素M和hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE具有類似之完全反應(CR)率，但1 mg/kg之hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE較優。

【0284】未經治療之小鼠和以3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)、3 mg/kg IgG-微管溶素M(8)、0.3

mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-微管溶素M(8)或0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生之SK-MEL-5腫瘤體積顯示於第20圖中。在SK-MEL-5腫瘤方面，hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE優於hL49-微管溶素M。

【0285】未經治療之小鼠和以1 mg/kg或3 mg/kg hL49-微管溶素M(8)、或1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生的IGR-37腫瘤體積顯示於第21圖中。在IGR-37腫瘤方面，hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE優於hL49-微管溶素M。

【0286】未經治療之小鼠和以0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生的Colo-853腫瘤體積顯示於第22圖中。Colo-853腫瘤對使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE之治療有反應。

【0287】未經治療之小鼠和以1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生的LU0697鱗狀NSCLC PDX模型腫瘤體積顯示於第23圖中。LU0697鱗狀NSCL PDX模型腫瘤對使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE之治療有反應。

【0288】未經治療之小鼠和以1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生的

LU0697腺癌NSCLC PDX模型腫瘤體積顯示於第24圖中。LU0697腺癌NSCL PDX模型腫瘤對使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE之治療有反應。

【0289】未經治療之小鼠和以0.5 mg/kg或1 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)、或0.5 mg/kg或1 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生的MDA-MB-231 TNBC腫瘤體積顯示於第25圖中。MDA-MB-231 TNBC腫瘤對使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE之治療有反應。

【0290】未經治療之小鼠和以3 mg/kg IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)或0.3 mg/kg、1 mg/kg或3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療之小鼠隨時間推移所產生的HPAF-II腫瘤體積顯示於第26圖中。HPAF-II腫瘤對使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE之治療有反應。

實施例7：三陰性乳癌小鼠臨床試驗

【0291】在22個不同的三陰性乳癌PDX模型中評估腫瘤體積對使用hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)進行之治療反應的百分比變化。在NCr或裸鼠中植入憑經驗決定之用於每個模型的腫瘤細胞數量。當腫瘤達到約150至300 mm^3時，開始給予3 mg/kg hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)劑量。使用卡尺監測腫瘤體積。在最佳反應時或給予hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)劑量後7天計算每隻小鼠之腫瘤體積的變化百分比並顯示於第27圖中。使用

hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療可達到60%反應率，其中31%之動物達到部分反應，29%之動物達到完全反應。所有動物程序均在實驗動物照護和使用委員會所批准之規程下，在國際實驗動物管理評鑑及認證協會認可的機構中執行。

實施例7-1：源自患者之各種表現CD228之癌症的異種移植模型

【0292】依實施例7中之描述進行另外的實驗以評估hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)在各種不同之表現CD228之癌症中抑制腫瘤生長的能力。藉由從60名人類患者(三陰性乳癌(TNBC)=22名患者，間皮瘤=3名患者和非小細胞肺癌(NSCLC)=35名患者)中分離出腫瘤並依實施例7中之描述將該腫瘤植入免疫缺陷小鼠中來產生源自患者的異種移植模型。植入後，以單劑量之hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療小鼠。在以hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)治療後48小時從小鼠抽取血液，並用於藥代動力學評估。腫瘤生長抑制百分比(TGI百分比(%))和從基線開始到最佳反應之腫瘤體積變化百分比(百分比變化Tvol(%))的評估分別顯示於第36A圖和第36B圖中。從圖中可知，投予之單劑量的hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)在各種不同之腫瘤模型中均具有抗腫瘤活性。

實施例8：在玻管內評估抗體效應子功能

【0293】使用標準^{51}Cr釋出分析測量抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)活性。簡單地說，以100μCi $Na^{51}CrO_4$標記該腫瘤細胞，洗滌之並將其與測試之ADC預先培育，再添加效應細胞(天然殺手細胞，NK)。非黏附性外周血單核細胞(PBMC)製備NK($CD16^+CD56^+$細胞，該非黏附性外周血單核細胞(PBMC)係使用免疫磁珠(EasySep，StemCell Technologies，加拿大卑詩省溫哥華市)，從正常FcγRIIIA158V/V供體(Lifeblood，田納西州Memphis)取得。以效應子對靶細胞比例為10：1之比例將活NK細胞添加到靶細胞中。使用人IgG1κ(Ancell，明尼蘇達州Bayport)作為本分析中之陰性對照組。培育4小時後，收集上清液並在Luma盤上乾燥過夜。然後，使用TopCount微量盤閃爍和發光計數器(Perkin Elmer，麻薩諸塞州Waltham)檢測從溶解之細胞發射的γ射線。第28A至28B圖中顯示來自二名患者之%特異性細胞溶解(ADCC活性)。與hL49mAb相比較，hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(hL49-5088)具有降低之ADCC活性。

實施例9：在小鼠和大鼠中之藥物動力學評估

【0294】經由靜脈內途徑對裸鼠投予hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE或cL235-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE，並經由靜脈內途徑對Sprague-Dawley大鼠投予hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE。使用Tab ELISA和作為捕獲抗

體之抗人抗體隨時間推移測量ADC之血漿濃度。結果顯示於第29A圖(小鼠)和第29B圖(大鼠)中。所得之PK參數顯示於表10(小鼠)和表11(大鼠)中。

表10：小鼠中之hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE的藥物動力學(PK)參數

AUC_{inf}/劑量	C_{max}/劑量	T_{max}	半衰期
(day*kg*μg/mL/mg)	(kg*μg/mL/mg)	(day)	(day)
41	8.8	0.25	4.7
50	8.1	1.0	4.4
63	13.3	0.25	5.1

表11：大鼠中之hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE的藥物動力學(PK)參數

hL49-5088(8)			
AUC_{inf}/劑量	C_{max}/劑量	T_{max}	半衰期
(day*kg*μg/mL/mg)	(kg*μg/mL/mg)	(day)	(day)
41	8.8	0.25	4.7
50	8.1	1.0	4.4
63	13.3	0.25	5.1

實施例10：其他抗CD228抗體

【0295】將其他抗CD228抗體與MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE共軛結合。不像表2中測試之市售抗體(Santa Cruz目錄#271633，R&D目錄#893416和Biolegend目錄#363101)，這些其他抗CD228抗體(定名為cL235(參見Rolland Y., Pigment Cell Melanoma Res 2009, 22:86-98)和Ab1-9)之結合親和力與hL49之結合親和力相似。

A. 玻管內細胞毒性

【0296】將腫瘤細胞與CD228抗體藥物共軛體(ADC)

在37℃下培育96至144小時。使用非結合型(h00-5088(8))ADC作為陰性對照組。根據製造商之說明使用Cell Titer Glo測量細胞存活力。在Fusion HT螢光分析儀(Perkin Elmer，麻薩諸塞州沃爾瑟姆)上測量螢光信號。將該數據對未經處理之細胞標準化，並使用Graph Pad軟體計算x50值。結果以IC_{50}記錄在表12中，IC_{50}為與經載劑處理之細胞(對照組=100%)相比較時，使存活力降低50%所需之化合物濃度。表13中顯示在最高劑量下剩餘之存活細胞百分比。

表12：針對各種不同之癌細胞的抗CD228抗體-藥物共軛體之IC_{50}

細胞株	# CD228	hL49	cL235	Ab1	Ab2	Ab3	Ab4	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8	Ab9
A2058	51K	2	277	38	10	54	9	47	786	62	1142	297
A375	16K	9	>2000	233	>2000	>2000	>2000	179	>2000	144	547	203
Colo853	92K	1	32	10	2	5	1	11	28	11	1	0.4
IGR37	24K	8	>2000	325	>2000	837	1694	350	>2000	322	1448	1738
SKMel5	134K	1	71	5	2	3	2	5	17	6	32	2
SKMel28	450K	2	13	3	2	2	2	5	7	4	8	1

表13：在用於各種不同之癌細胞之抗CD228抗體-藥物共軛體的最高劑量下剩餘之存活細胞百分比

細胞株	# CD228	hL49	cL235	Ab 1	Ab 2	Ab 3	Ab 4	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8	Ab9
A2058	51,000	4	26	7	31	15	27	9	34	19	40	40
A375	16,000	13	62	25	59	62	65	29	54	25	22	22
Colo853	92,000	24	33	19	31	26	35	25	39	29	20	21
IGR37	24,000	14	65	22	59	39	53	29	51	35	43	46
SKMel5	134,000	13	16	11	22	18	21	12	18	14	9	16
SKMel28	450,000	28	21	24	24	24	24	21	24	22	27	31

B. 其他抗CD228 ADC之活體內活性

【0297】在裸(nu/nu)鼠(6隻動物/組)中植入在25%基質膠中培養之1×10^6個A375、1×10^5個IGR37或2.5×10^5個

A2058腫瘤細胞。當腫瘤達到100 mm^3時，開始給予1 mg/kg(A2058)或3 mg/kg之測試的ADC劑量(單次腹膜內注射劑量)。使用卡尺監測腫瘤體積並在腫瘤體積達到～800 mm^3時對動物實施安樂死。持續繪製各組之平均腫瘤體積圖，直到一或多隻動物被安樂死。所有動物程序均在實驗動物照護和使用委員會所批准之規程下，在國際實驗動物管理評鑑及認證協會認可的機構中執行。

【0298】未經治療之小鼠和以各種不同之抗體治療的小鼠隨時間推移所產生之A2058腫瘤體積顯示於第30A圖中。第30B圖顯示在各治療條件下隨著時間推移腫瘤增加＜4倍之動物的百分比。表14中顯示每一ADC和每一細胞株之完全反應(CR)的數目和腫瘤四倍時間的中位數。

表 14：對其他抗 CD228 ADC 的體內反應

	A375		IGR37		A2058	
抗體	CRs	腫瘤四倍之時間的中位數	CRs	腫瘤四倍之時間的中位數	CRs	腫瘤四倍之時間的中位數
未治療的	0/6	25 天	0/6	24 天	0/6	27 天
h00	0/6	34 天	1/6	40 天	0/6	22 天
hL49	3/6	-	1/6	51 天	3/6	-
cL235	0/6	42 天	0/6	45 天	0/6	50 天
CD228Ab1	5/6	-	2/6	-	4/6	-
CD228Ab2	2/6	50 天	0/6	38 天	2/6	-
CD228Ab3	2/6	45 天	1/6	49 天	0/6	34 天
CD228Ab4	3/6	-	1/6	55 天	0/6	-

實施例11：連接子裂解和CD228轉換

【0299】使用螢光分析調查隨時間推移之共軛體裂解速率。該螢光部分AF647或是直接連接該8個天然半胱胺

酸或是經由葡糖醛酸苷連接子與該抗CD228抗體hL49共軛結合。此外，經由離胺酸殘基添加淬滅劑(Tide Quencher 5WS琥珀醯亞胺酯(TQ5WS))，使得每一抗體約有4個。當該淬滅劑和AF647均附接於該抗體時，螢光被淬滅。AF647從該抗體裂解出或抗體降解均導致AF647分子從該淬滅劑釋出，使螢光隨後增加。在A375(第31A圖)和Colo-853(第31B圖)二種細胞中，AF647經由葡糖醛酸苷連接子與抗體共軛結合可導致螢光活性較AF647與抗體直接共軛結合時更快速增加。

【0300】使用與vcQF01共軛結合之hL49抗體來處理A375細胞，該vcQF01係由經由Val-Cit-PAB連接子與Cy5螢光團連接之TQ5WS組成，抗體與分子之比率為每一抗體約2分子。類似於先前章節中所描述之試劑，當抗體上之Cy5完整時，其保持淬滅狀態且將僅在從TQ5WS淬滅劑裂解出後才發出螢光。然後，加入2 μg/ml之hL49-vcQF01並令其與細胞結合。在脈衝處理方面，在30分鐘後洗滌經標記之hL49抗體以去除未結合之經標記的hL49抗體。為了以經標記之hL49抗體連續處理，未將未結合之經標記的hL49抗體從細胞中洗掉。如第32圖所示，該脈衝處理導致Cy5信號快速平穩，而連續暴露於經標記之hL49導致該Cy5螢光團之信號穩定增加。這表明將額外之CD228在24小時內添加到細胞表面，其可再與該經標記之hL49抗體結合，進入該細胞內部並裂解以釋出Cy5。在進一步之實驗中，藉由比較在有和無環己醯亞胺存在下每一細胞隨時間推移之

螢光強度來研究蛋白質合成對CD228與經螢光標記之hL49抗體結合的影響。使用環己醯亞胺(CHX)來抑制蛋白質合成。在環己醯亞胺之存在下，Colo-853(第33A圖)和A375(第33B圖)細胞中之螢光信號隨時間推移而增加，但較未使用環己醯亞胺處理之細胞減少。這表明CD228再循環回到細胞表面，即使是沒有蛋白質合成時。這些實驗共同表明CD228被回收且補充到細胞表面，這有助於抗體-藥物共軛體之活性。

實施例12：pH依賴性ADC之結合

【0301】在pH 4至7.5下使用標準ELISA方案評估各種不同之抗CD228 ADC與CD228結合之能力。簡單地說，將100 ng之人CD228(R & D Systems Custom02；批號DCWR021505A)或BSA(Sigma；目錄編號A7030-100G)在PBS中稀釋並添加至每一孔中，在4℃下過夜。然後，以PBS-T(EMD Millipore；目錄編號5245651EA)將盤洗滌3次。洗滌後，以在PBS-T中之3%(w/v)BSA將盤在室溫下阻斷1小時。然後，去除過量之阻斷緩衝液，並將一級抗體加入稀釋緩衝液(0.15M檸檬酸鹽-磷酸鹽緩衝液，pH 4.0-7.5)中做3倍稀釋，抗體之起始濃度為60 nM。在室溫下培育1小時後，將盤洗滌3次，然後與在PBS-T(添加1%BSA)中之二級抗體(與山羊抗人IgG Fc特異性HRP共軛結合，Jackson ImmunoResearch代碼＃109-035-098)一起培育。在室溫下培育30分鐘後，將盤洗滌3次。然後在每個孔中添

加100 μl TMB受質(Life Technologies；目錄＃002023)。在室溫下培育10分鐘後，在每個孔中添加100 μl H_2SO_4以終止反應，使用透明之盤密封物覆蓋盤並在Envision上，在450 nM讀取數值。hL49、cL235、CD228Ab1、CD228Ab2和CD228Ab3、CD228Ab4之pH依賴性結合顯示於第34A至34F圖中。所得之各ADC的E_{50}顯示於表15中。hL49為在跨pH梯度上顯示出差異結合的唯一ADC。

表15：各ADC之EC_{50}(以nM計)

	hL49	cL235	CD228Ab1	CD228Ab2	CD228Ab3	CD228Ab4
pH 4	-	0.809	0.404	0.188	2.887	0.158
pH 4.55	-	0.727	0.295	0.158	0.194	0.150
pH 5.1	-	0.756	0.285	0.146	0.123	0.209
pH 5.6	21.820	0.740	0.254	0.196	0.162	0.223
pH 5.9	5.307	0.838	0.243	0.186	0.161	0.235
pH 6.3	2.963	0.749	0.285	0.202	0.166	0.217
pH 6.66	1.542	0.757	0.221	0.146	0.152	0.161
pH 7.1	1.099	0.724	0.238	0.140	0.196	0.170
pH 7.4	0.856	0.767	0.359	0.110	0.294	0.093
pH 7.5	1.178	0.694	0.294	0.169	0.415	0.148

實施例13：ADC之內含和分解代謝

【0302】評估各種不同之其他抗CD228抗體內含和分解代謝該螢光部分AF647之能力。使用與QF01共軛結合之抗CD228抗體來處理A375細胞，該QF01係由經由葡糖醛酸苷連接子(gluc)與Cy5螢光團連接之淬滅劑Tide Quencher 5WS琥珀醯亞胺酯(TQ5WS)組成，抗體與分子之比率為每一抗體約2個分子。當抗體上之Cy5完整時，其保持淬滅狀

態且將僅在從TQ5WS淬滅劑裂解出後才發出螢光。30分鐘後，洗滌經標記之抗CD228抗體以去除未結合之經標記的抗CD228抗體。這些抗CD228抗體的結合親和力與hL49相似。將腫瘤細胞與抗CD228抗體一起培育並進行成像分析以測定每一細胞隨時間推移之螢光強度(第35A圖)。使用與MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)共軛結合之hL49或其他抗CD228抗體進行類似之實驗。24小時後，測量各ADC之細胞內藥物濃度(第35B圖)。這些實驗證明儘管具有相似之結合親和力，某些抗體(諸如hL49)較其他抗體內含更快且更大程度地遞送藥物。這表明hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)可較其他ADC更有效地將藥物遞送至腫瘤細胞。

【序列表】

<110> 美商西雅圖遺傳學股份有限公司(Seattle Genetics, Inc.)

<120> 抗 CD228 抗體及抗體-藥物共軛體

<140> TW 109103363
<141> 2020-02-04

<150> US 62/801,590
<151> 2019-02-05

<150> US 62/824,923
<151> 2019-03-27

<150> US 62/879,660
<151> 2019-07-29

<150> US 62/882,016
<151> 2019-08-02

<150> US 62/934,424
<151> 2019-11-12

<160> 35

<170> 用於 Windows 4.0 版之 FastSEQ

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 1
Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 2
Tyr Ile Ser Asp Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 3
Arg Thr Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 5
Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 6
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 7
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Asp Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr 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 Arg Thr Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 8
Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 9
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr
20 25 30

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 10
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 11
Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 12
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

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

<220>
<223> 合成建構體

<400> 13
Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 14
Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 15
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 15
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 16
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 17
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 17
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 18

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

<210> 19
<211> 329
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 19
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro 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 Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

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

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 21
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Asp Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Leu Asn Phe Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Asn Cys Ala
85 90 95
Arg Arg Thr Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 97
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 22
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
65 70 75 80

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

<210> 23
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr 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 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Asp Ser Gly Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr 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 Arg Thr Leu Ala Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 25
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly

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

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 26
Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 27
<211> 100
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 27
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro
100

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 29
Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 30
Gly Phe Leu Gly
1

<210> 31
<211> 113
<212> PRT
<213> 家鼠

<400> 31
Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 32
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95
Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 33
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 33
Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 34
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

<400> 34
Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 35
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成建構體

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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種經分離之抗CD228抗體或其抗原結合片段，該抗CD228抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中該重鏈可變區包含：

(i)包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的CDR-H1；

(ii)包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的CDR-H2；和

(iii)包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的CDR-H3；且

其中該輕鏈可變區包含：

(i)包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的CDR-L1；

(ii)包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR-L2；和

(iii)包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的CDR-L3。

【請求項2】如請求項1之抗體或抗原結合片段，其中該抗體為人化的。

【請求項3】一種人化之抗CD228抗體或其抗原結合片段，該抗CD228抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，

該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7具有至少90%同一性之胺基酸序列，惟該重鏈可變區包含：

包含SEQ ID NO：1之胺基酸序列的CDR-H1；

包含SEQ ID NO：2之胺基酸序列的CDR-H2；和

包含SEQ ID NO：3之胺基酸序列的CDR-H3；且

位置H27被D佔據、位置H30被T佔據、位置H47被Y佔據、位置H71被R佔據且位置H78被Y佔據，其中胺基酸位置係根據Kabat；以及

該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8具有至少90%同一性之胺基酸序列，惟該輕鏈可變區包含：

包含SEQ ID NO：4之胺基酸序列的CDR-L1；

包含SEQ ID NO：5之胺基酸序列的CDR-L2；和

包含SEQ ID NO：6之胺基酸序列的CDR-L3；且

位置L2被F佔據、位置L36被Y佔據且位置L46被L佔據，其中胺基酸位置係根據Kabat。

【請求項4】如請求項3之抗體或抗原結合片段，惟其進一步位置L28被D佔據，其中胺基酸位置係根據Kabat。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含與SEQ ID NO：7之胺基酸序列具有至少95%序列同一性之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO：8之胺基酸序列具有至少95%序列同一性之胺基酸序列。

【請求項6】如請求項1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區包含SEQ ID NO：7之胺基酸序列且該輕鏈可變區包含SEQ ID NO：8之胺基酸序列。

【請求項7】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為抗原結合片段。

【請求項8】如請求項7之抗體或抗原結合片段，其中該抗原結合片段係選自由下列所組成之群組：Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fab'-SH、Fv、雙抗體、線性抗體和單鏈抗體片段。

【請求項9】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為全長抗體。

【請求項10】如請求項9之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈可變區係與重鏈恆定區融合且該輕鏈可變區係與輕鏈恆定區融合。

【請求項11】如請求項10之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區為IgG1同型之重鏈恆定區。

【請求項12】如請求項10或11之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：17之胺基酸序列且該輕鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。

【請求項13】如請求項10或11之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區為天然人類恆定區之突變形式，其具有相對於天然人類恆定區而言降低之與Fcγ受體的結合。

【請求項14】如請求項10或11之抗體或抗原結合片段，其中該重鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：19(S239C)之胺基酸序列且該輕鏈恆定區具有包含SEQ ID NO：18之胺基酸序列。

【請求項15】一種抗體-藥物共軛體，其包含與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合之如請求項1至14中任一項之抗體或抗原結合片段。

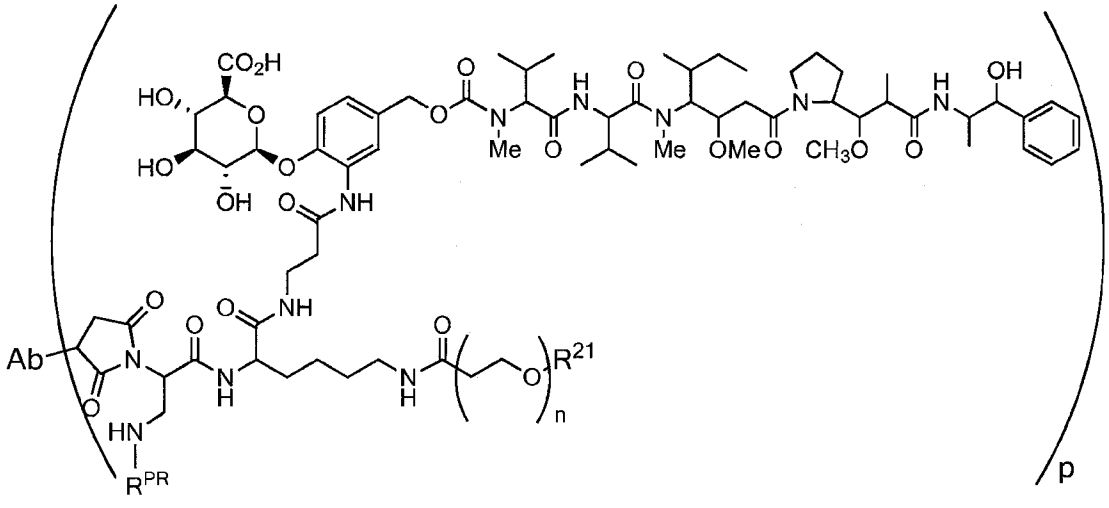
【請求項16】如請求項15之抗體-藥物共軛體，其中該抗體或抗原結合片段經由連接子與該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

【請求項17】如請求項16之抗體-藥物共軛體，其中該連接子為MDpr-PEG(12)-gluc連接子。

【請求項18】如請求項15至17中任一項之抗體-藥物共軛體，其中該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為單甲基澳瑞他汀(monomethyl auristatin)。

【請求項19】如請求項18之抗體-藥物共軛體，其中該單甲基澳瑞他汀為單甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

【請求項20】如請求項19之抗體-藥物共軛體，其中該連接子與單甲基澳瑞他汀E連接形成具有以下結構之抗體-藥物共軛體：



(X)

其中Ab為抗體hL49，n為12，R^{PR}為氫，R^{21}為CH_3，且p表示1至16之數字。

【請求項21】如請求項20之抗體-藥物共軛體，其中在該抗體-藥物共軛體之群體中p之平均值為約8。

【請求項22】如請求項15之抗體-藥物共軛體，其中該抗體-藥物共軛體為hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE。

【請求項23】一種核酸，其編碼如請求項1至14中任

一項所定義之重鏈可變區和/或輕鏈可變區。

【請求項24】一種載體，其包含如請求項23之核酸。

【請求項25】如請求項24之載體，其中該載體為表現載體。

【請求項26】一種宿主細胞，其包含如請求項23之核酸。

【請求項27】如請求項26之宿主細胞，其中該宿主細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

【請求項28】一種產生抗CD228抗體或其抗原結合片段之方法，該方法包含在適合用於產生抗CD228抗體或其抗原結合片段之條件下培養如請求項26或27之宿主細胞。

【請求項29】如請求項28之方法，其進一步包含將該由宿主細胞產生之抗CD228抗體或其抗原結合片段分離出。

【請求項30】一種產生抗CD228抗體-藥物共軛體之方法，該方法包含在適合用於產生抗CD228抗體之條件下培養如請求項26或27之宿主細胞；分離出從該宿主細胞所產生之抗CD228抗體；以及將該抗CD228抗體與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

【請求項31】如請求項30之方法，其中該抗-CD228抗體經由連接子與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛結合。

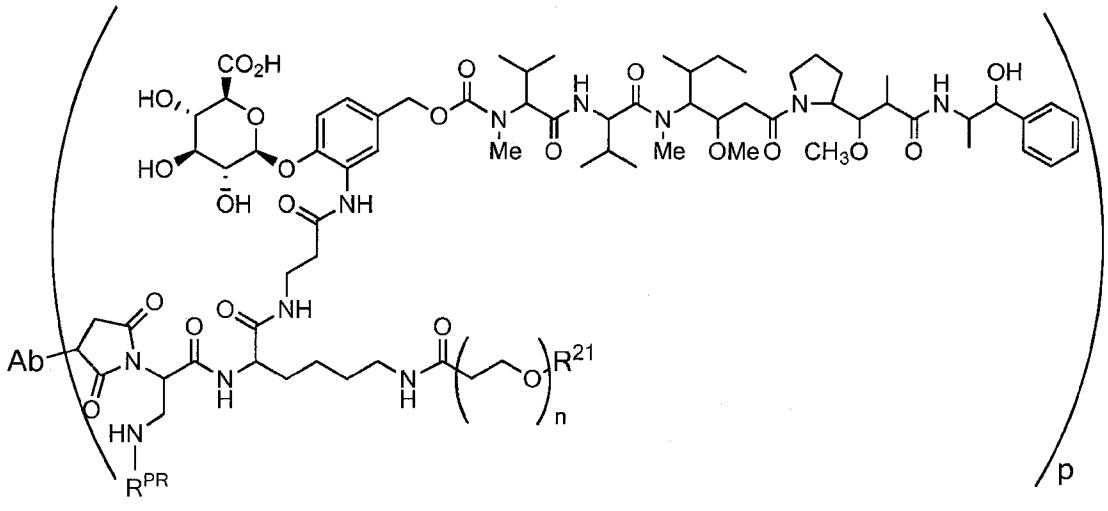
【請求項32】如請求項31之方法，其中該連接子為MDpr-PEG(12)-gluc連接子。

【請求項33】如請求項30至32中任一項之方法，其中

該細胞毒性劑或細胞生長抑制劑為單甲基澳瑞他汀。

【請求項34】如請求項33之方法，其中該單甲基澳瑞他汀為單甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

【請求項35】如請求項34之方法，其中該連接子與單甲基澳瑞他汀E連接形成具有以下結構之抗體-藥物共軛體：



(X)

其中Ab為抗體hL49，n為12，R^{PR}為氫，R^{21}為CH_3，且p表示1至16之數字。

【請求項36】如請求項35之方法，其中在該抗體-藥物共軛體之群體中p之平均值為約8。

【請求項37】如請求項30之方法，其中該抗體-藥物共軛體為hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE。

【請求項38】一種如請求項1至14中任一項之抗體或抗原結合片段或如請求項15至22中任一項之抗體-藥物共軛體之用途，其係用於製造供治療個體的癌症之藥物。

【請求項39】如請求項38之用途，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且對該治療沒有反應，其中該一

或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

【請求項40】如請求項38之用途，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且在該治療後復發，其中該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

【請求項41】如請求項38之用途，其中該個體先前已接受一或多種治療劑治療且在治療過程中經歷疾病進展，其中該一或多種治療劑不是該抗體、抗原結合片段或抗體-藥物共軛體。

【請求項42】如請求項38之用途，其中該癌症為末期癌症。

【請求項43】如請求項42之用途，其中該末期癌症為(i)第3期或第4期癌症及/或(ii)轉移性癌症。

【請求項44】如請求項38之用途，其中該癌症為(i)復發性癌症及/或(ii)不可切除的。

【請求項45】如請求項38之用途，其中該個體接受針對該癌症之標準護理療法的先前治療且該先前治療失敗。

【請求項46】如請求項38之用途，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、胰臟癌、間皮瘤(mesothelioma)、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、甲狀腺癌、膽管癌、食道癌、和頭頸癌。

【請求項47】如請求項46之用途，其中：

(i) 該黑色素瘤係皮膚黑色素瘤、皮下黑色素瘤、或

非皮膚黑色素瘤；

(ii) 該胰臟癌為外分泌癌或神經內分泌癌；

(iii) 該間皮瘤係胸膜間皮瘤、腹膜間皮瘤、心包間皮瘤、或睪丸間皮瘤；

(iv) 該結腸直腸癌係結腸直腸腺癌、胃腸道基質瘤、原發性結腸直腸淋巴瘤、胃腸道類癌(carcinoid tumor)、或平滑肌肉瘤(leiomyosarcoma)；

(v) 該肺癌為非小細胞肺癌；且

(vi) 該乳癌係HER2陽性乳癌、HER2陰性乳癌、雌激素受體(ER)陽性乳癌、ER陰性乳癌、助孕酮受體(PR)陽性乳癌、PR陰性乳癌、或三陰性乳癌。

【請求項48】如請求項47之用途，其中該皮膚黑色素瘤係選自由下列所組成之群組：淺表性擴散黑色素瘤、結節性黑色素瘤、肢端小痣斑性黑色素瘤(acral lentiginous melanoma)、小痣性惡性黑色素瘤(lentigo maligna melanoma)和結締組織增生性黑色素瘤(desmoplastic melanoma)。

【請求項49】如請求項48之用途，其中該肢端小痣斑性黑色素瘤為舌下黑色素瘤。

【請求項50】如請求項48之用途，其中該個體接受用於皮膚黑色素瘤的使用PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

【請求項51】如請求項47之用途，其中該間皮瘤為胸膜間皮瘤，且其中該個體已接受使用基於鉑之療法的先前

療法。

【請求項52】如請求項51之用途，其中該基於鉑之療法為順鉑。

【請求項53】如請求項51之用途，其中該個體接受使用培美曲塞(pemetrexed)之先前療法。

【請求項54】如請求項47之用途，其中該非小細胞肺癌具有表皮生長因子受體(EGFR)之突變形式。

【請求項55】如請求項54之用途，其中該非小細胞肺癌具有野生型EGFR。

【請求項56】如請求項55之用途，其中該個體已接受用於該非小細胞肺癌的使用基於鉑之療法及/或PD-1或PD-L1之抑制劑的先前療法。

【請求項57】如請求項47之用途，其中該乳癌為HER2陰性乳癌，且其中該個體接受一或多種用於HER2陰性乳癌之先前治療防線(prior line of therapy)。

【請求項58】如請求項57之用途，其中該一或多種先前治療防線包含使用紫杉烷類之治療。

【請求項59】如請求項57之用途，其中該個體為激素受體陽性。

【請求項60】如請求項59之用途，其中該個體接受使用CDK4/6抑制劑之先前療法及/或該個體接受使用激素導向療法之先前療法。

【請求項61】如請求項46之用途，其中該個體接受用於該結腸直腸癌之二或更多種先前治療防線。

【請求項62】如請求項47之用途，其中該外分泌癌係選自由下列所組成之群組：胰臟腺癌、腺泡細胞癌(acinar cell carcinoma)、囊腺癌、胰臟母細胞瘤(pancreatoblastoma)、腺鱗癌、戒環細胞癌(signet ring carcinoma)、肝樣癌、膠狀癌、未分化癌和胰臟黏液囊性贅瘤。

【請求項63】如請求項46之用途，其中該個體接受用於胰臟癌之一或多種先前治療防線。

【請求項64】如請求項38之用途，其中該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體係在醫藥組成物中，該醫藥組成物包含該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體及醫藥上可接受之載劑。

【請求項65】如請求項38之用途，其中該個體為人。

【請求項66】一種套組，其包含：

(a)如請求項1至14中任一項之抗體或抗原結合片段或如請求項15至22中任一項之抗體-藥物共軛體；和

(b)使用該抗體或抗原結合片段或抗體-藥物共軛體於治療個體的癌症的方法之使用說明書。

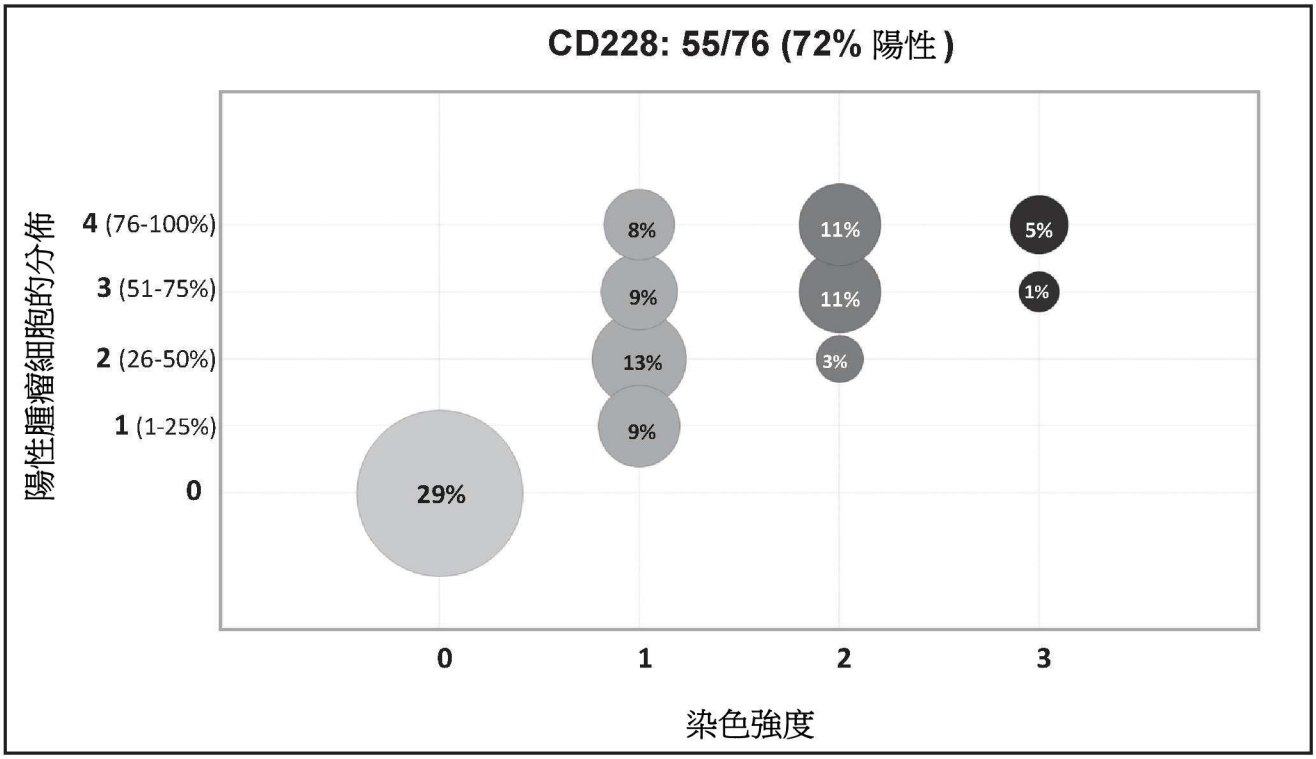
【請求項67】一種醫藥組成物，其包含如請求項1至14中任一項之抗體或抗原結合片段或如請求項15至22中任一項之抗體-藥物共軛體和一或多種選自由下列所組成之群組的作用劑：生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑和佐劑。

【請求項68】一種如請求項67之醫藥組成物之用途，

其係用於製造供治療個體的癌症之藥物。

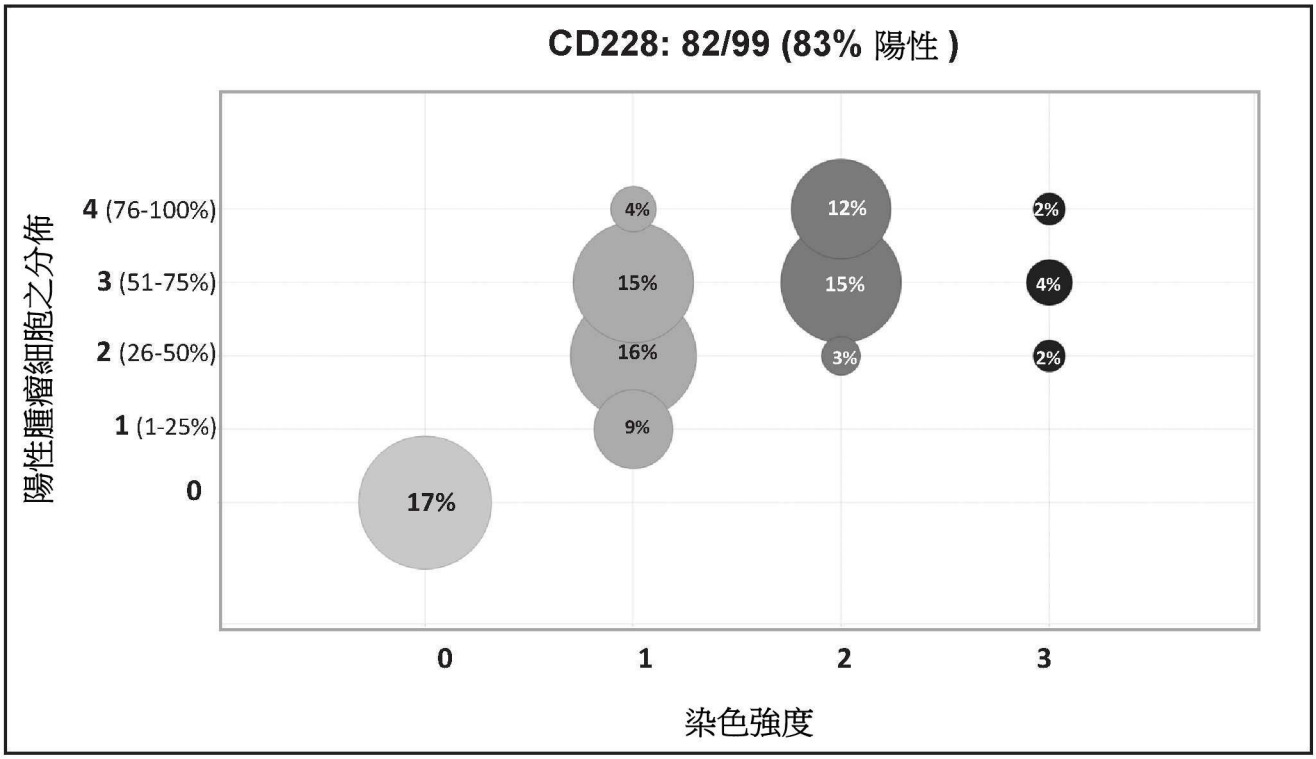
【發明圖式】

黑色素瘤癌症患者中之高CD228表現



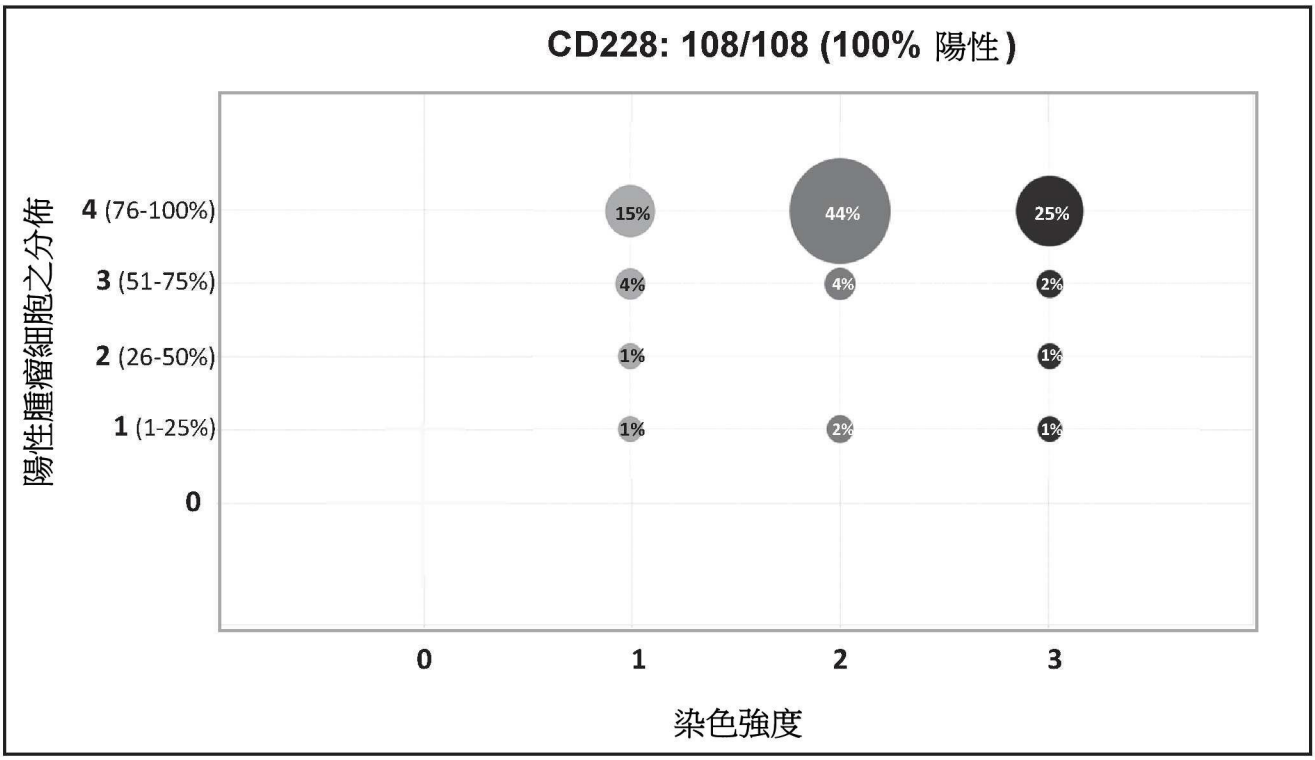
【第 1 圖】

間皮瘤癌症患者中之高CD228表現



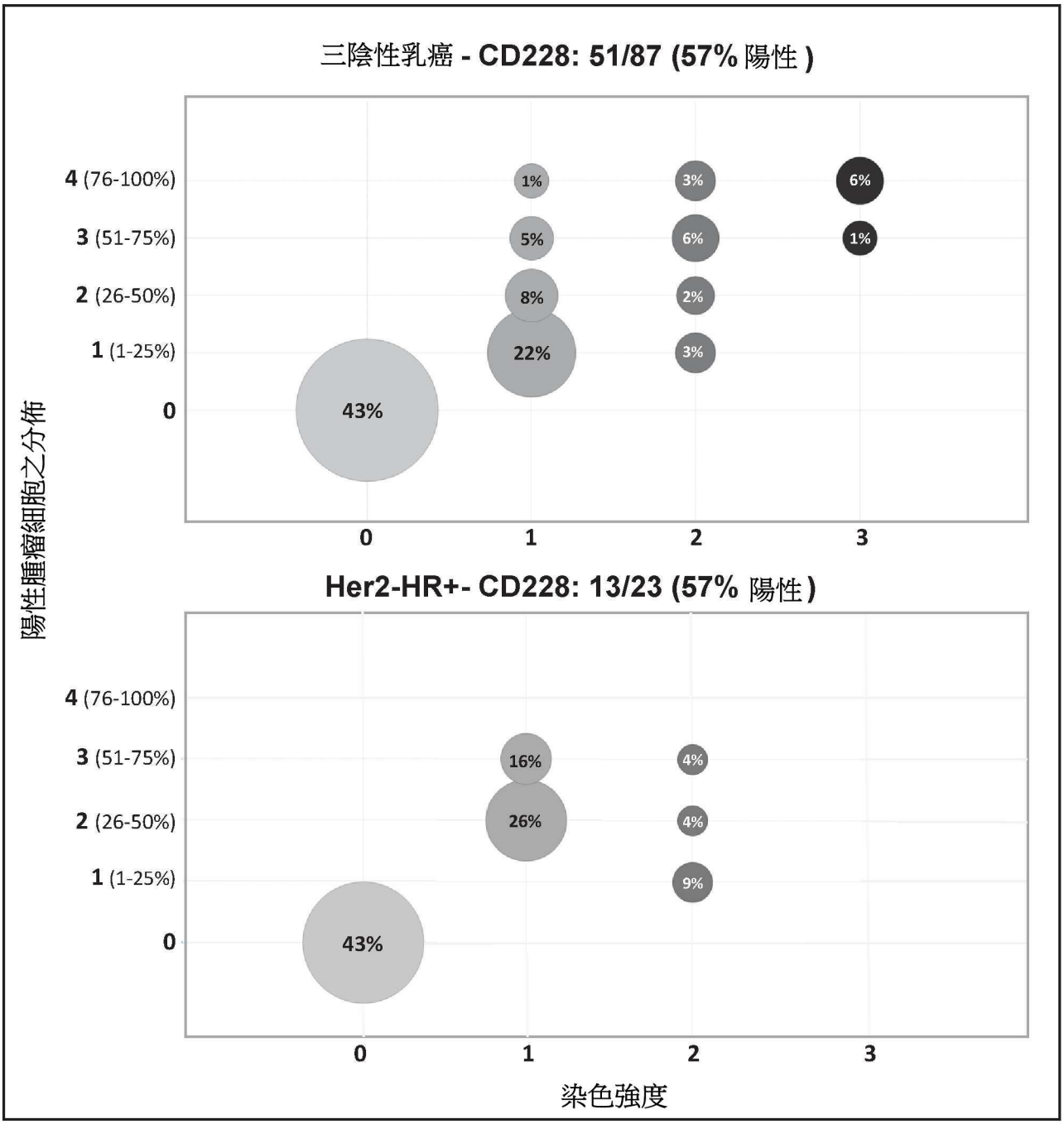
【第 2 圖】

結腸直腸癌症患者中之高CD228表現



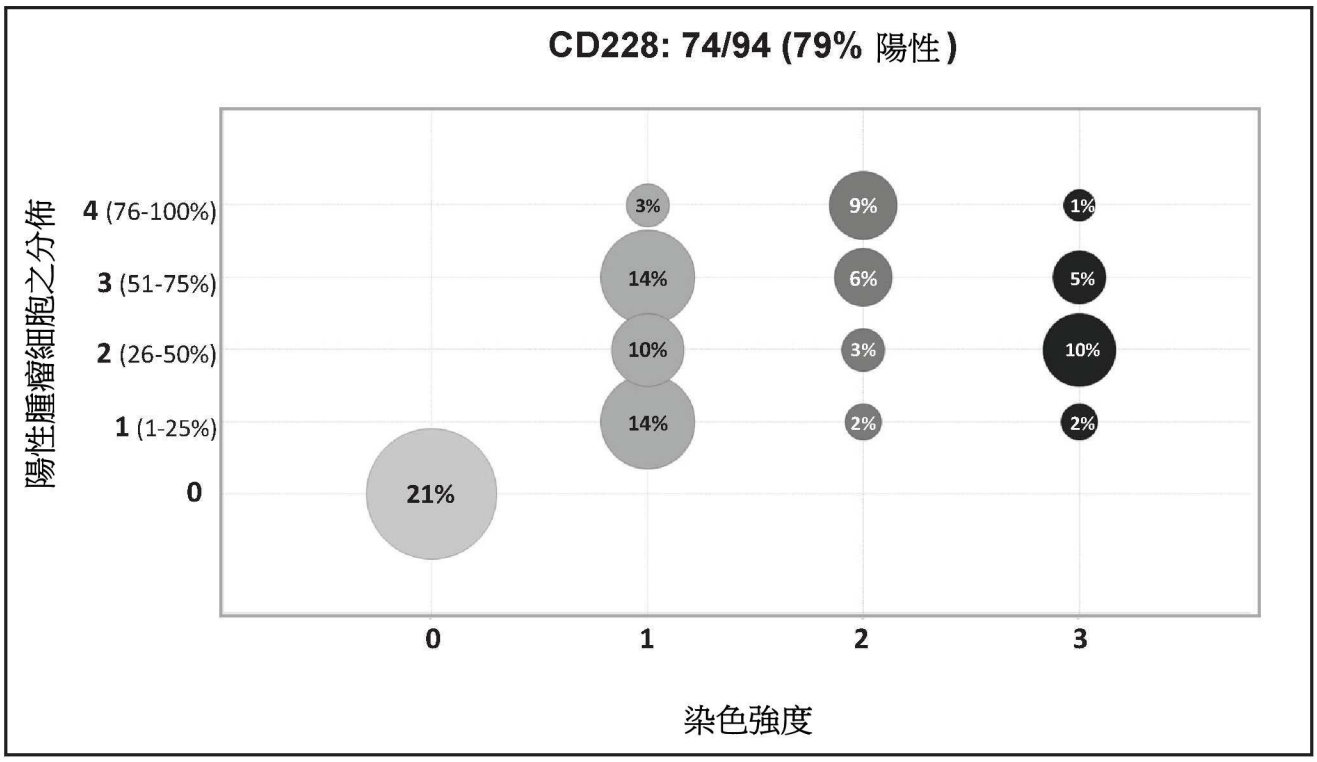
【第 3 圖】

乳癌患者中之高CD228表現



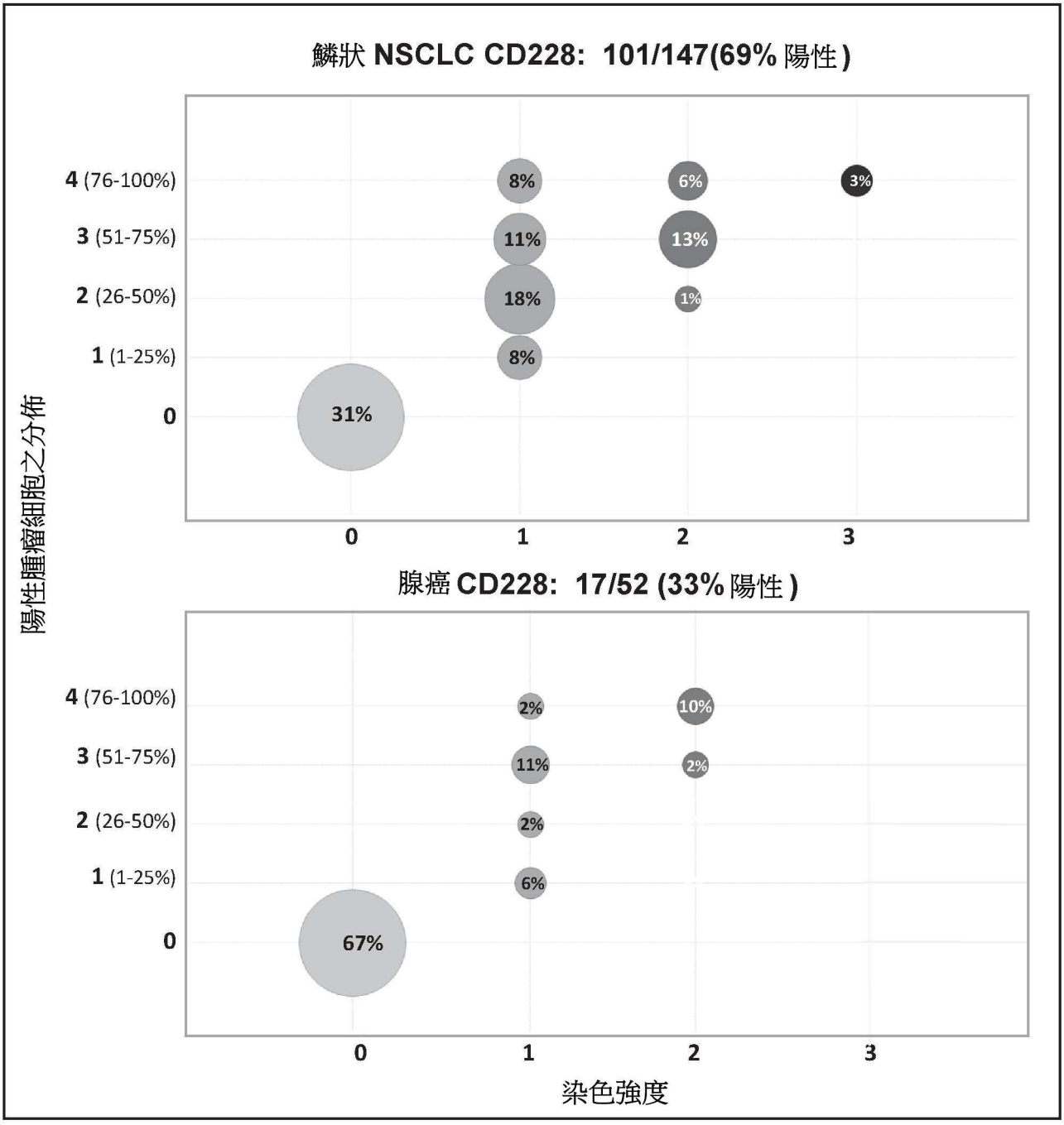
【第 4 圖】

胰臟癌患者中之高CD228表現

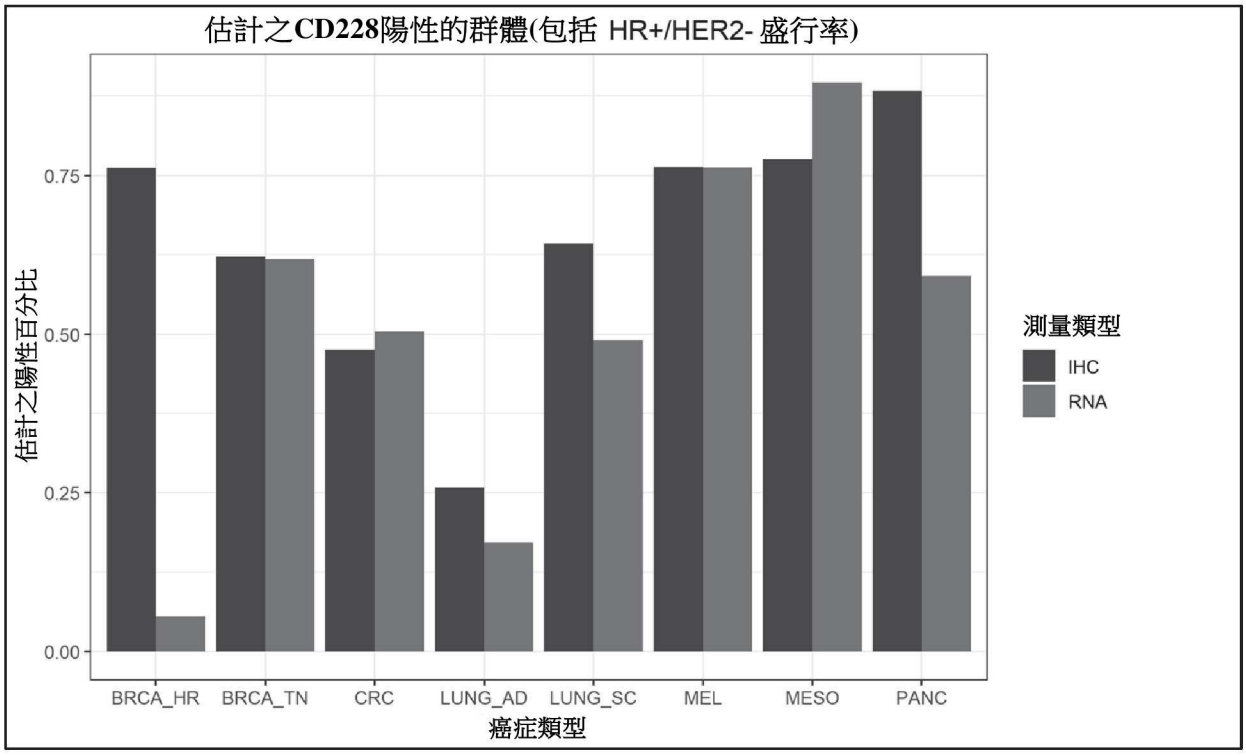


【第 5 圖】

非小細胞肺癌患者中之高CD228表現



【第 6 圖】


估計之CD228陽性的群體(包括 HR+/HER2- 盛行率)
估計之陽性百分比
0.75
0.50
0.25
0.00
BRCA_HR
BRCA_TN
CRC
LUNG_AD
LUNG_SC
MEL
MESO
PANC
癌症類型
測量類型
IHC
RNA

【第 7 圖】

hL49重鏈變體與人受體序列，IGHV4-59/HJ4之比對

```
                         10        20        30        40        50        60        70
                 ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Mu L49 vH        E........S.....Q......S.T.D..T.G..N...KF..NK..YM...SD..I.Y........IS.T
Hu IGHV4-59/HJ4  QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTIS
hvHA             ..........................D..T.G..N...........Y....SD..I.Y............
hvHB             ..........................D..T.G..N....F......YM...SD..I.Y........I...
hvHC             ..........................D..T.G..N....F......YM...SD..I.Y........I...
Kabat CDRs                                     *****               ****************
IMGT CDRs                                 ++++++++                  +++++++

                         80           90       100          110
                 ....|....|.......|....|....|....|.......|....|...
Mu L49 vH        R......YY.Q.NF...E...T.N...RTLATYYAM.......S.....
Hu IGHV4-59/HJ4  VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR-------YFDYWGQGTLVTVSS
hvHA             R......Y...................RTLATYYAM............
hvHB             R......Y...................RTLATYYAM............
hvHC             R......Y.....F.........N...RTLATYYAM............
Kabat CDRs                                   ***********
IMGT CDRs                                 +++++++++++++
```

【第 8 圖】

hL49重鏈變體之比對

```
                      10        20        30        40        50        60        70
            ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
hvHA        QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLEYIGYISDSGITYYNPSLKSRVTIS
hvHB        ......................................F.......M..................I...
hvHC        ......................................F.......M..................I...
Kabat CDRs                                  *****               ****************
IMGT CDRs                              ++++++++                  +++++++

                      80           90       100          110
            ....|....|.......|....|....|....|.......|....|...
hvHA        RDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCARRTLATYYAMDYWGQGTLVTVSS
hvHB        ..................................................
hvHC        .............F.........N..........................
Kabat CDRs                              ***********
IMGT CDRs                              +++++++++++++
```

【第 9 圖】

hL49輕鏈變體與人受體序列，IGKV2-30/KJ2之比對

```
                          10        20             30        40        50        60
                  ....|....|....|....|....|.........|....|....|....|....|....|....|....|
Mu L49 vL         .F....T......S..DQ......A.....H.N.....H.YL.K.....KL...R....F..........
Hu IGKV2-30/KJ2   DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGS
hvLA              .F......................A.....H.N.....H...............R....F..........
hvLB              .F......................A.....H.N.....H.Y.........L...R....F..........
hvLC              .F......................A.....H.......H.Y.........L...R....F..........
Kabat CDRs                                ****************               *******
IMGT CDRs                                    ++++++++++++                 +++

                      70        80        90       100
                  ....|....|....|....|....|....|....|....|...
Mu L49 vL         ................L...F.S.S..V.P...G........
Hu IGKV2-30/KJ2   GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKR
hvLA              ......................S.S..V.P............
hvLB              ......................S.S..V.P............
hvLC              ......................S.S..V.P............
Kabat CDRs                                *********
IMGT CDRs                                 +++++++++
```

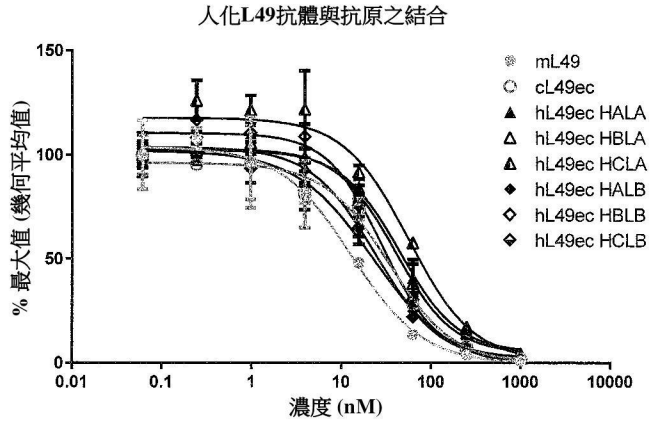
【第 10 圖】

hL49輕鏈變體之比對

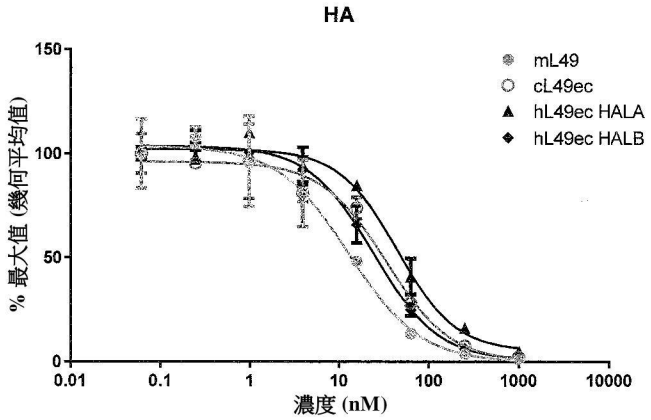
```
                        10        20             30        40        50        60
                ....|....|....|....|....|.........|....|....|....|....|....|....|....|
hvLA            DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSNGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYRVSNRFSGVPDRFSGS
hvLB            ......................................Y.........L...................
hvLC            ...............................D.......Y.........L...................
Kabat CDRs                                ****************               *******
IMGT CDRs                                    ++++++++++++                 +++

                    70        80        90       100
                ....|....|....|....|....|....|....|....|...
hvLA            GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIKR
hvLB            ........................................
hvLC            ........................................
Kabat CDRs                                *********
IMGT CDRs                                 +++++++++
```

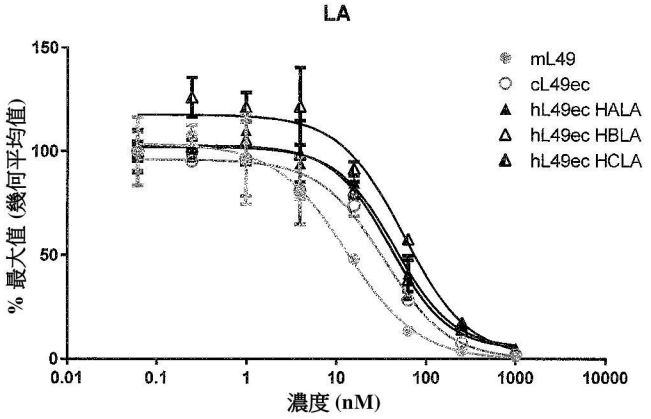
【第 11 圖】



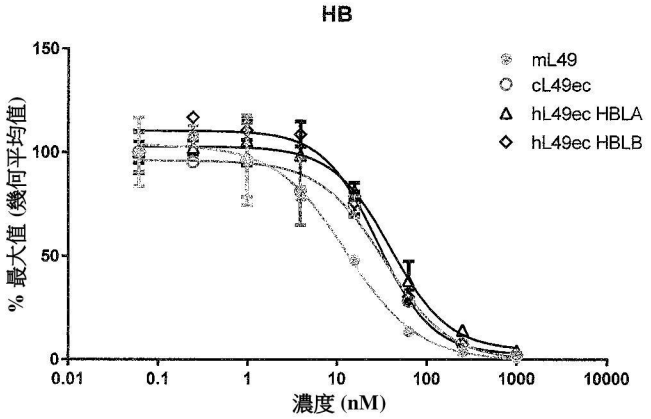
【第 12A 圖】



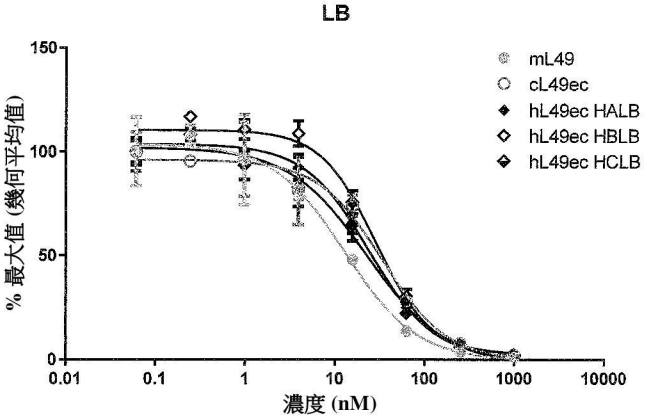
【第 12D 圖】



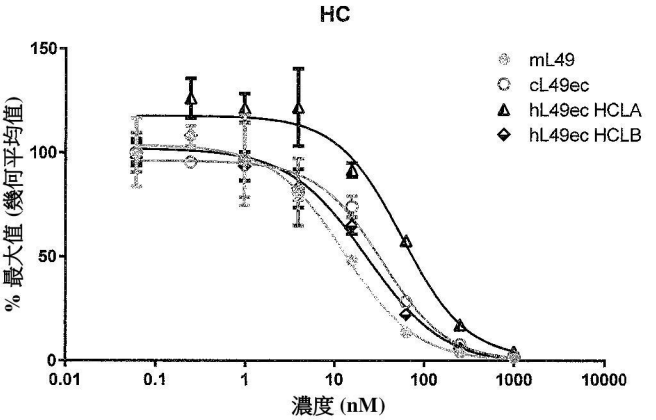
【第 12B 圖】



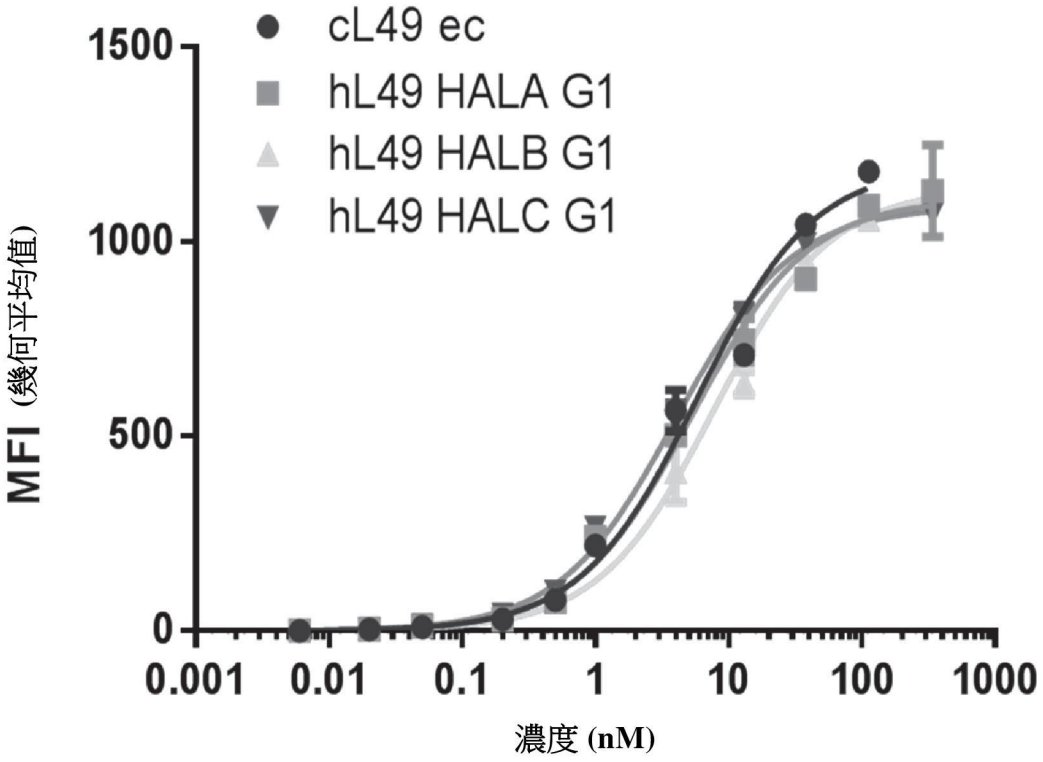
【第 12E 圖】



【第 12C 圖】

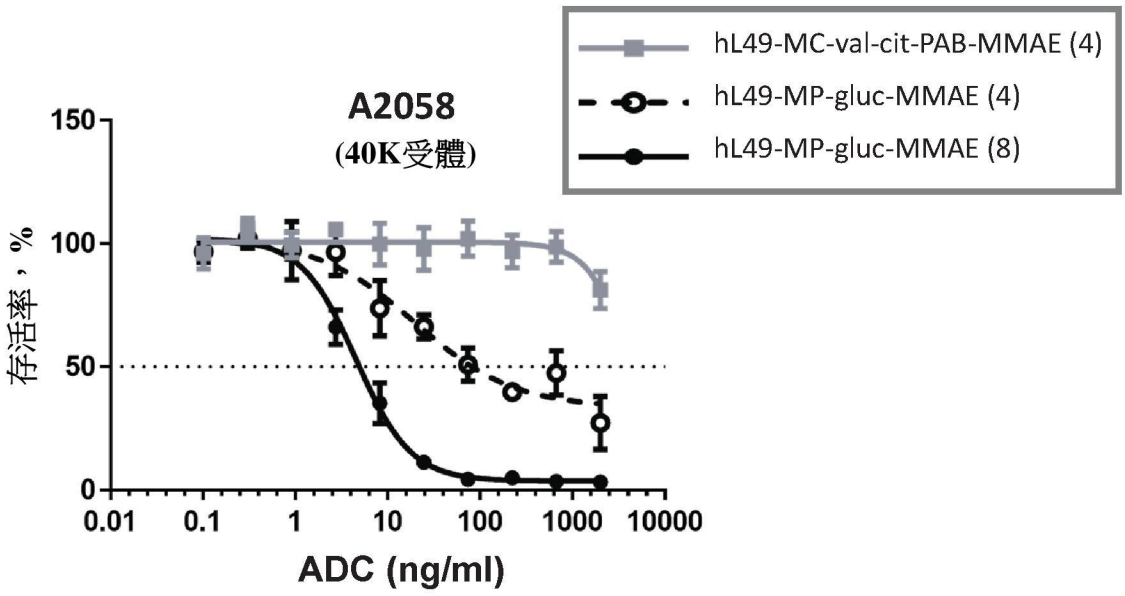


【第 12F 圖】

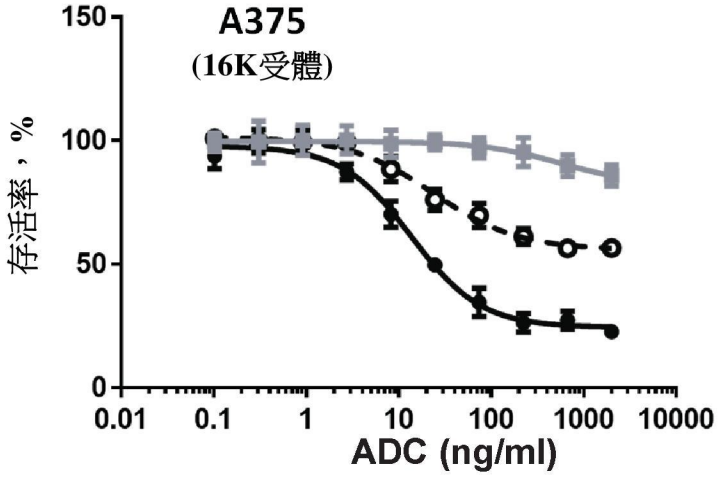


kD	cL49 ec	hL49 HALA G1	hL49 HALB G1	hL49 HALC G1
nM	5.8	5.3	7.8	4.0
ug/mL	0.9	0.8	1.2	0.6

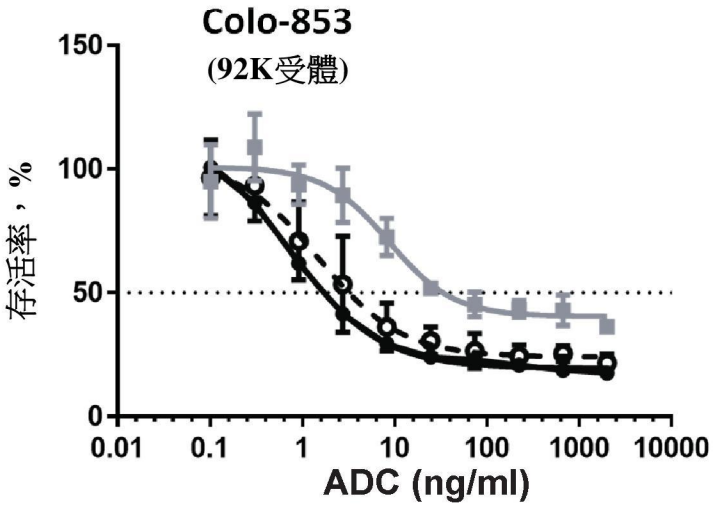
【第 13 圖】



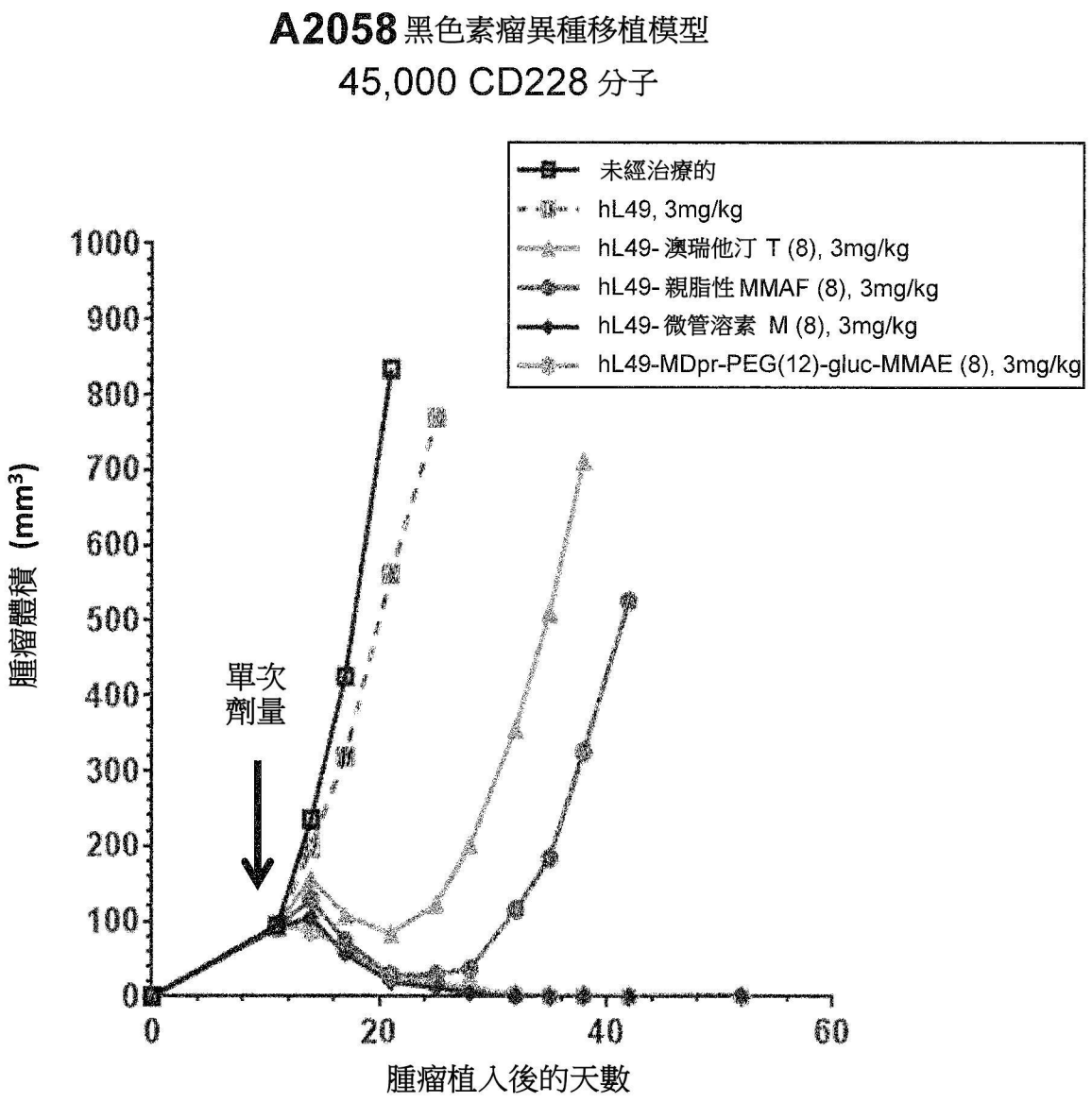
【第 14A 圖】



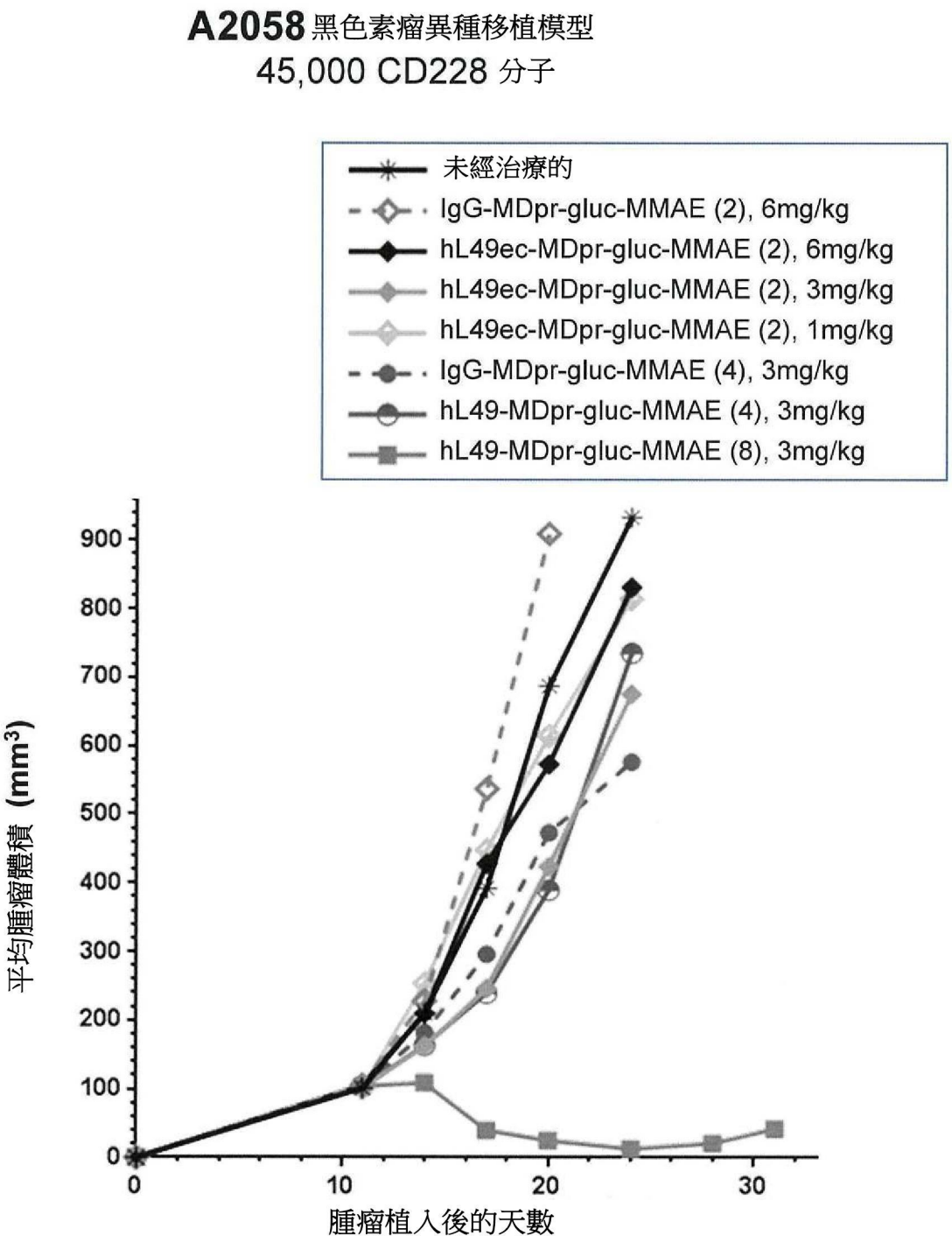
【第 14B 圖】



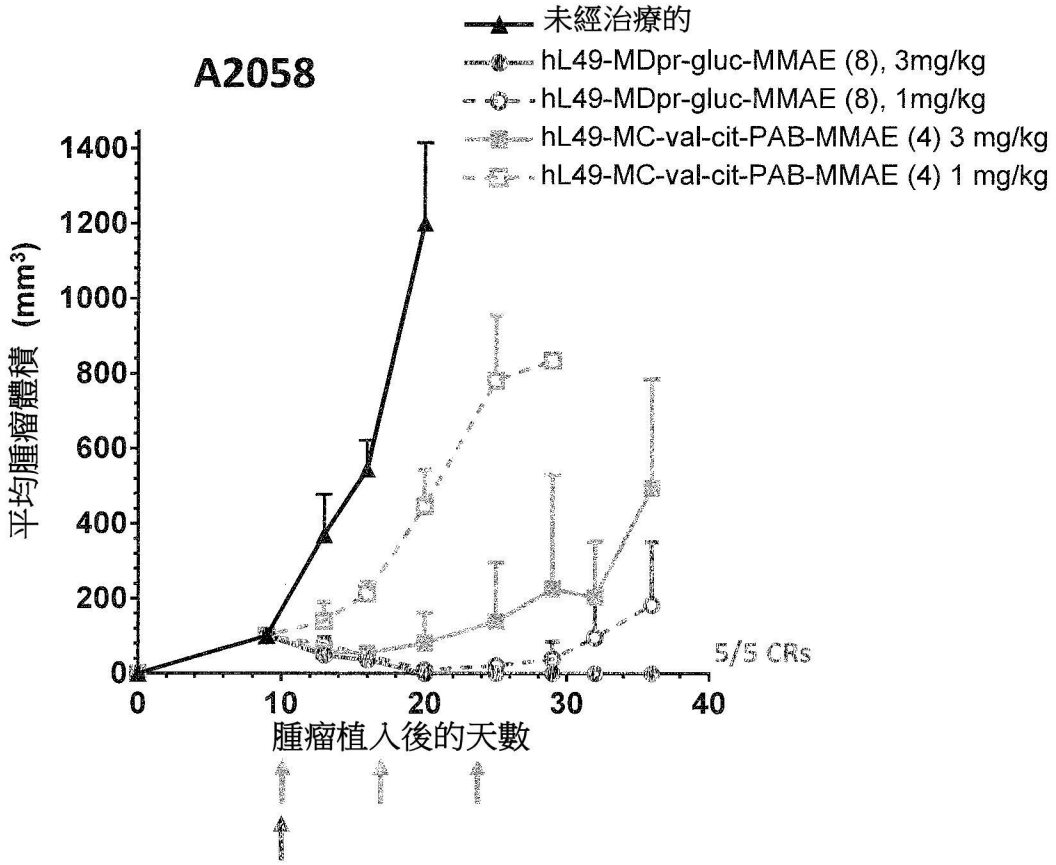
【第 14C 圖】


A2058 黑色素瘤異種移植模型
45,000 CD228 分子
未經治療的
hL49, 3mg/kg
hL49- 澳瑞他汀 T (8), 3mg/kg
hL49- 親脂性 MMAF (8), 3mg/kg
hL49- 微管溶素 M (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
20
40
60
腫瘤植入後的天數

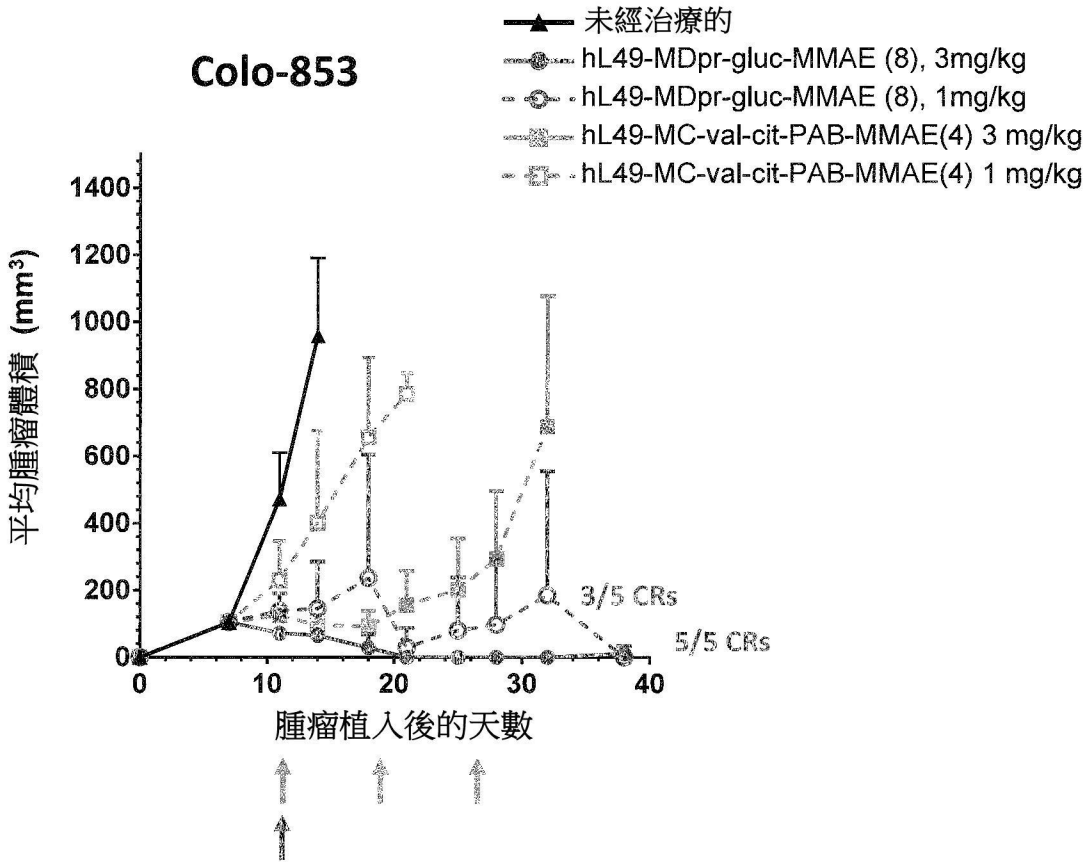
【第 15 圖】


A2058 黑色素瘤異種移植模型
45,000 CD228 分子
未經治療的
IgG-MDpr-gluc-MMAE (2), 6mg/kg
hL49ec-MDpr-gluc-MMAE (2), 6mg/kg
hL49ec-MDpr-gluc-MMAE (2), 3mg/kg
hL49ec-MDpr-gluc-MMAE (2), 1mg/kg
IgG-MDpr-gluc-MMAE (4), 3mg/kg
hL49-MDpr-gluc-MMAE (4), 3mg/kg
hL49-MDpr-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
平均腫瘤體積 (mm3)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
0
10
20
30
腫瘤植入後的天數

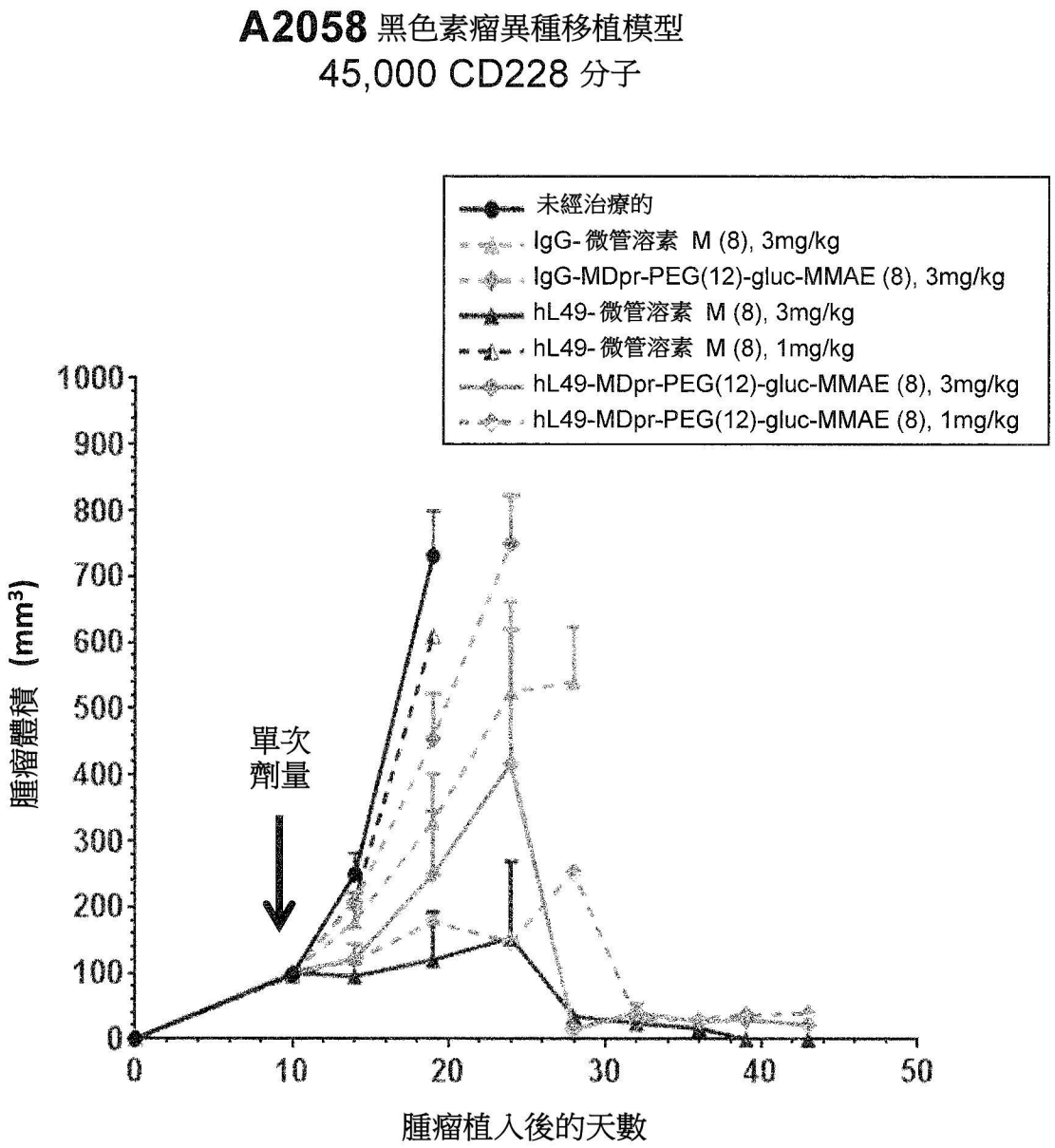
【第 16 圖】


未經治療的
hL49-MDpr-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE (4) 3 mg/kg
hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE (4) 1 mg/kg
A2058
平均腫瘤體積 (mm³)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5/5 CRs
0
10
20
30
40
腫瘤植入後的天數

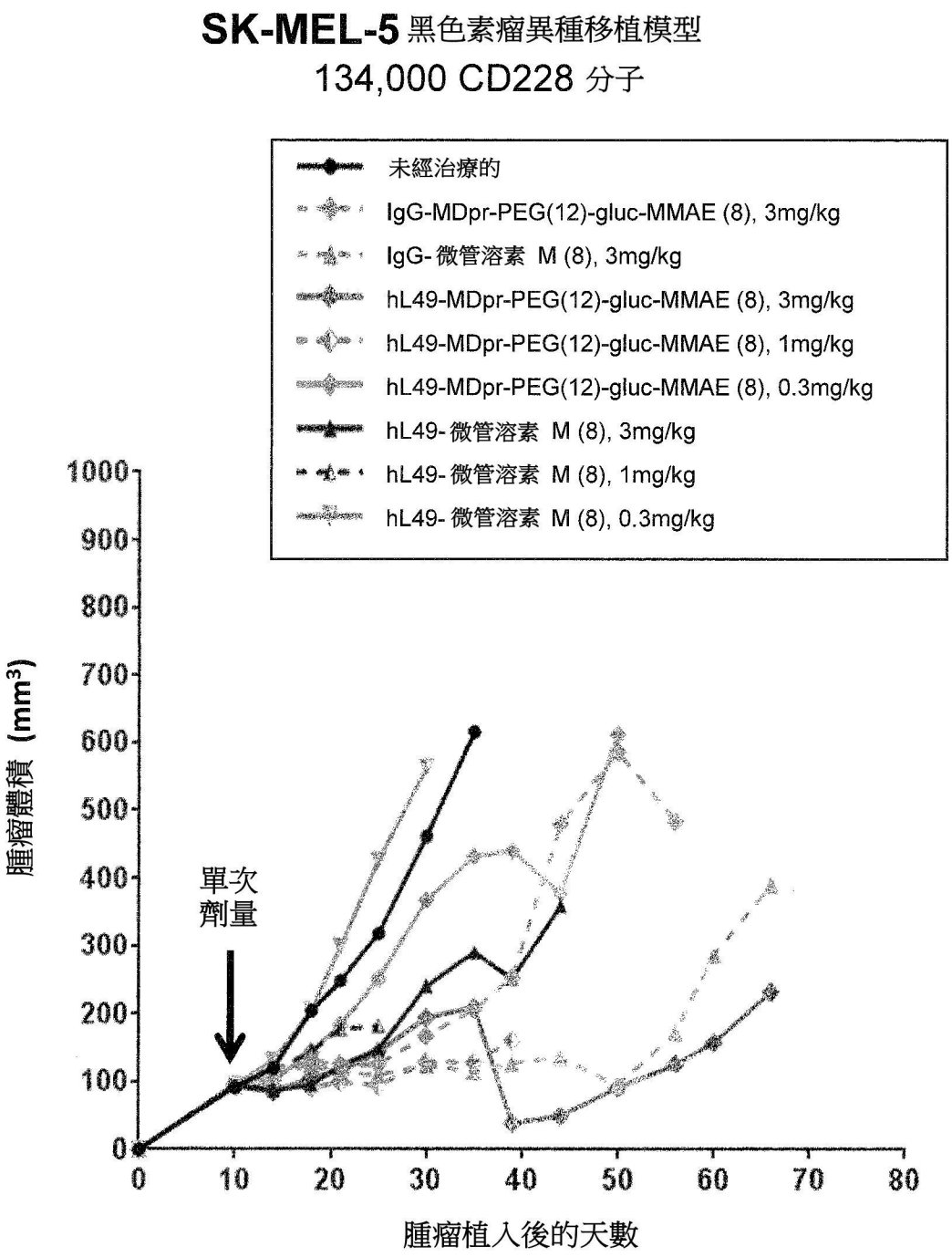
【第 17 圖】


Colo-853
未經治療的
hL49-MDpr-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4) 3 mg/kg
hL49-MC-val-cit-PAB-MMAE(4) 1 mg/kg
平均腫瘤體積 (mm³)
腫瘤植入後的天數
3/5 CRs
5/5 CRs
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0
10
20
30
40

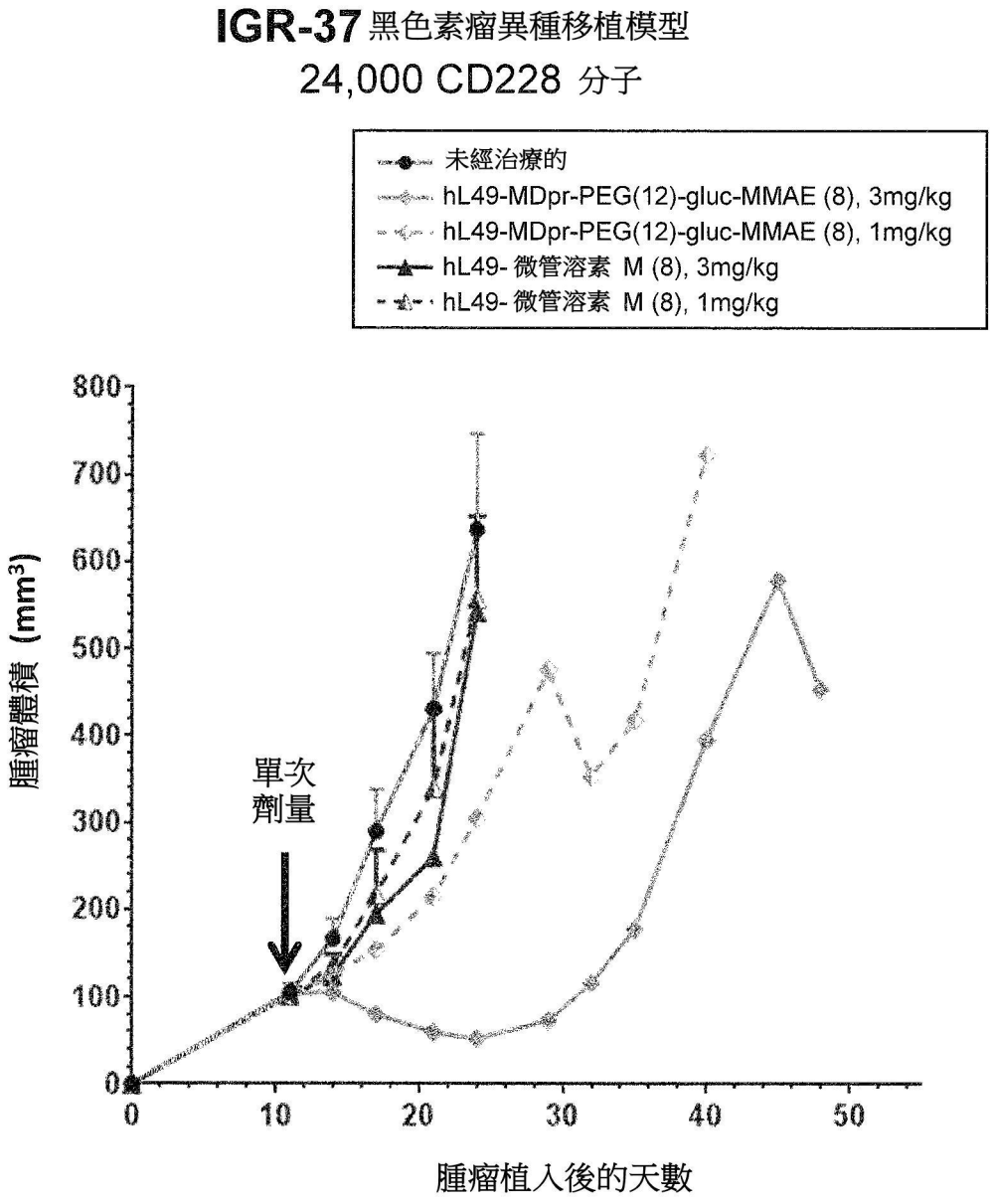
【第 18 圖】


A2058 黑色素瘤異種移植模型
45,000 CD228 分子
未經治療的
IgG-微管溶素 M (8), 3mg/kg
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-微管溶素 M (8), 3mg/kg
hL49-微管溶素 M (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
10
20
30
40
50
腫瘤植入後的天數

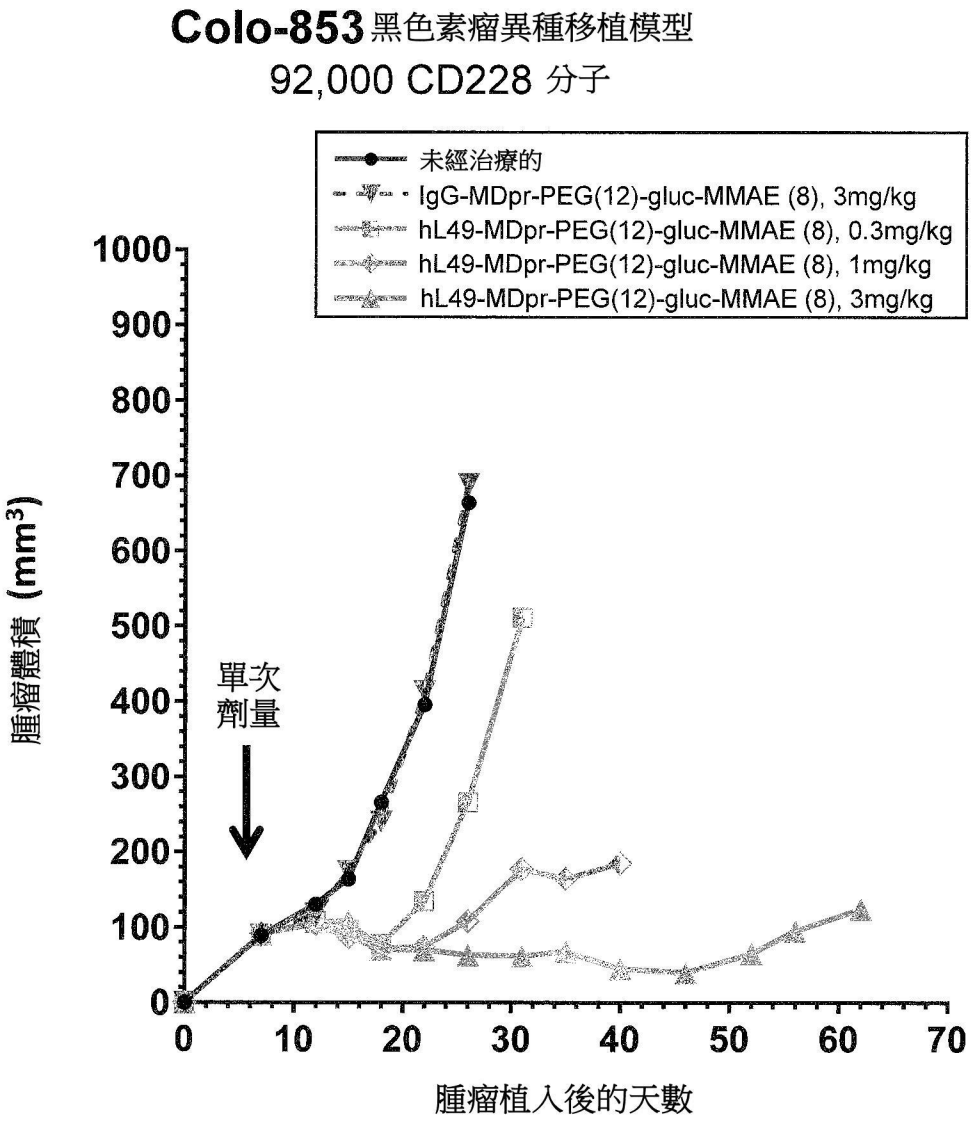
【第 19 圖】


SK-MEL-5 黑色素瘤異種移植模型
134,000 CD228 分子
未經治療的
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
IgG-微管溶素 M (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 0.3mg/kg
hL49-微管溶素 M (8), 3mg/kg
hL49-微管溶素 M (8), 1mg/kg
hL49-微管溶素 M (8), 0.3mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
10
20
30
40
50
60
70
80
腫瘤植入後的天數

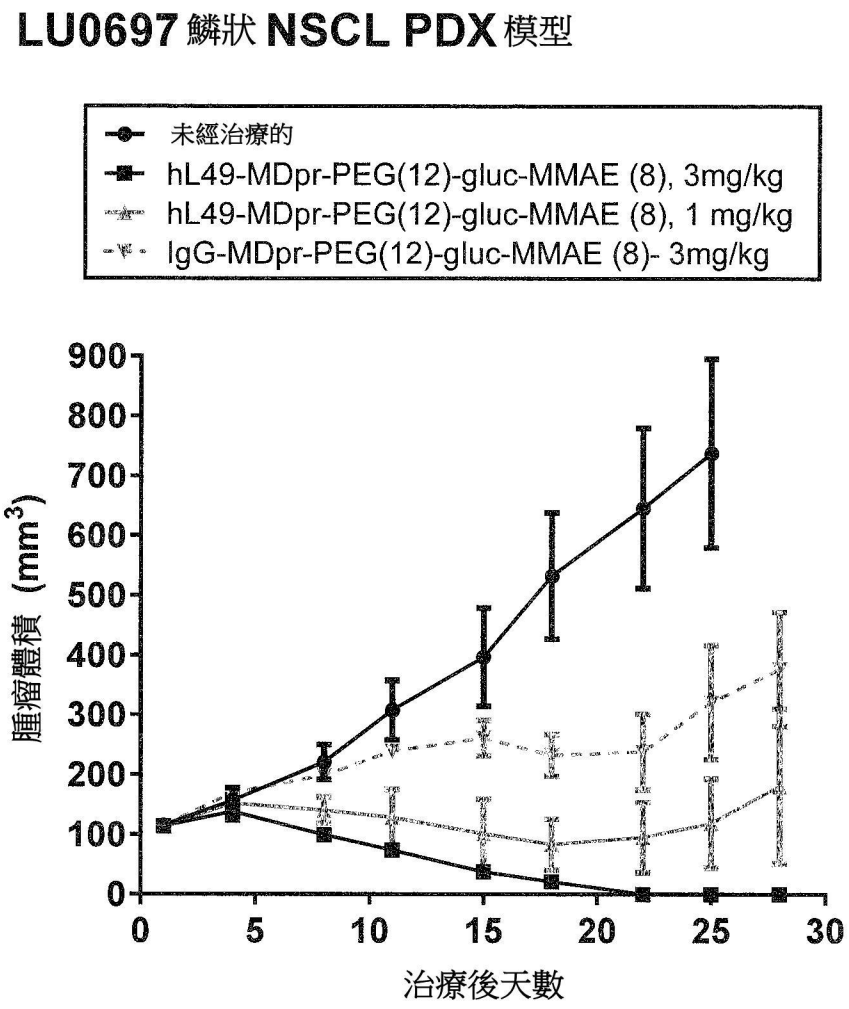
【第 20 圖】


IGR-37 黑色素瘤異種移植模型
24,000 CD228 分子
未經治療的
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49- 微管溶素 M (8), 3mg/kg
hL49- 微管溶素 M (8), 1mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
10
20
30
40
50
腫瘤植入後的天數

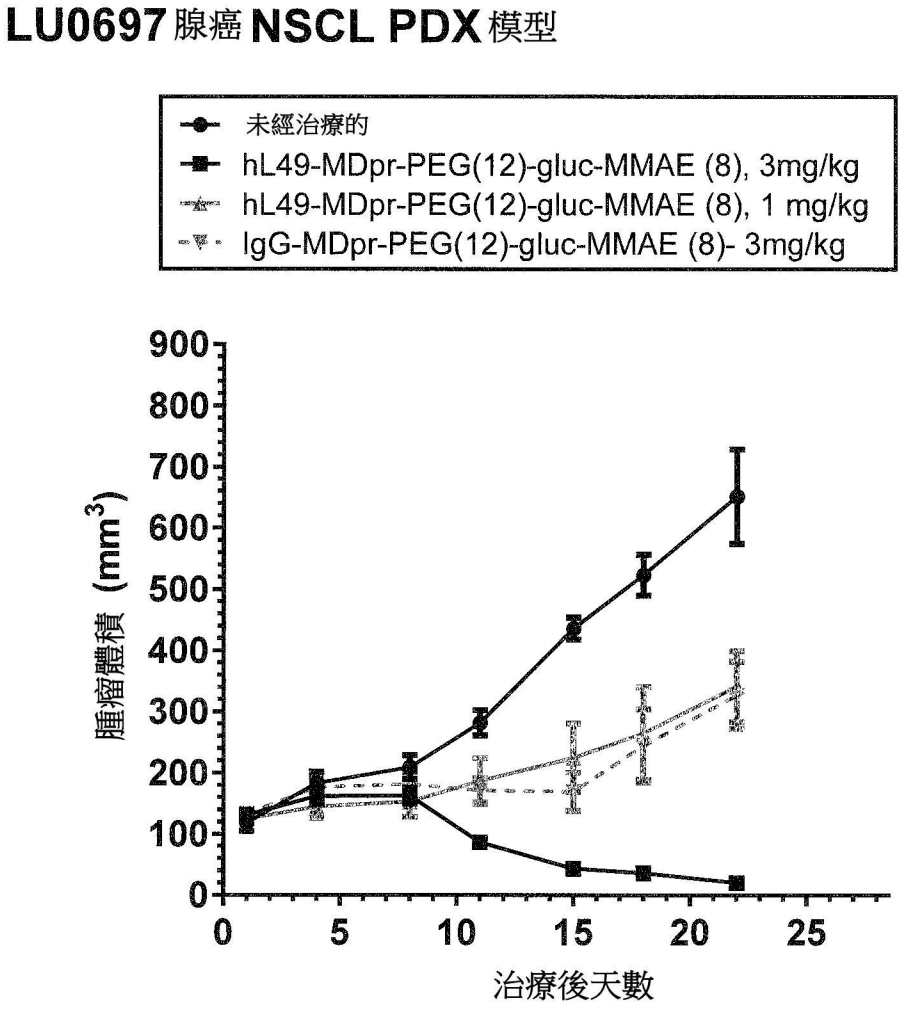
【第 21 圖】


Colo-853 黑色素瘤異種移植模型
92,000 CD228 分子
未經治療的
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 0.3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
10
20
30
40
50
60
70
腫瘤植入後的天數

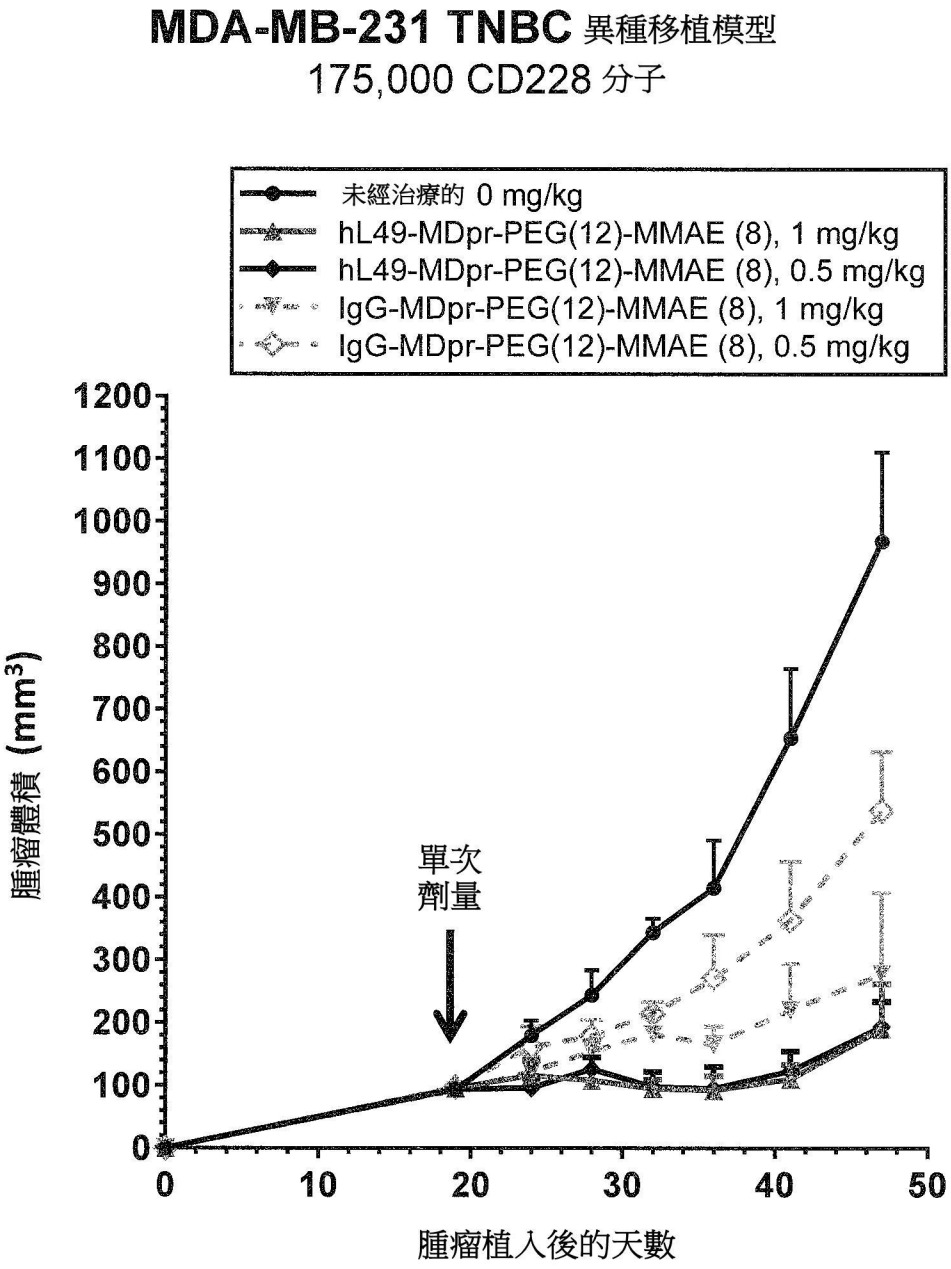
【第 22 圖】


LU0697 鱗狀 NSCL PDX 模型
未經治療的
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1 mg/kg
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)- 3mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
治療後天數

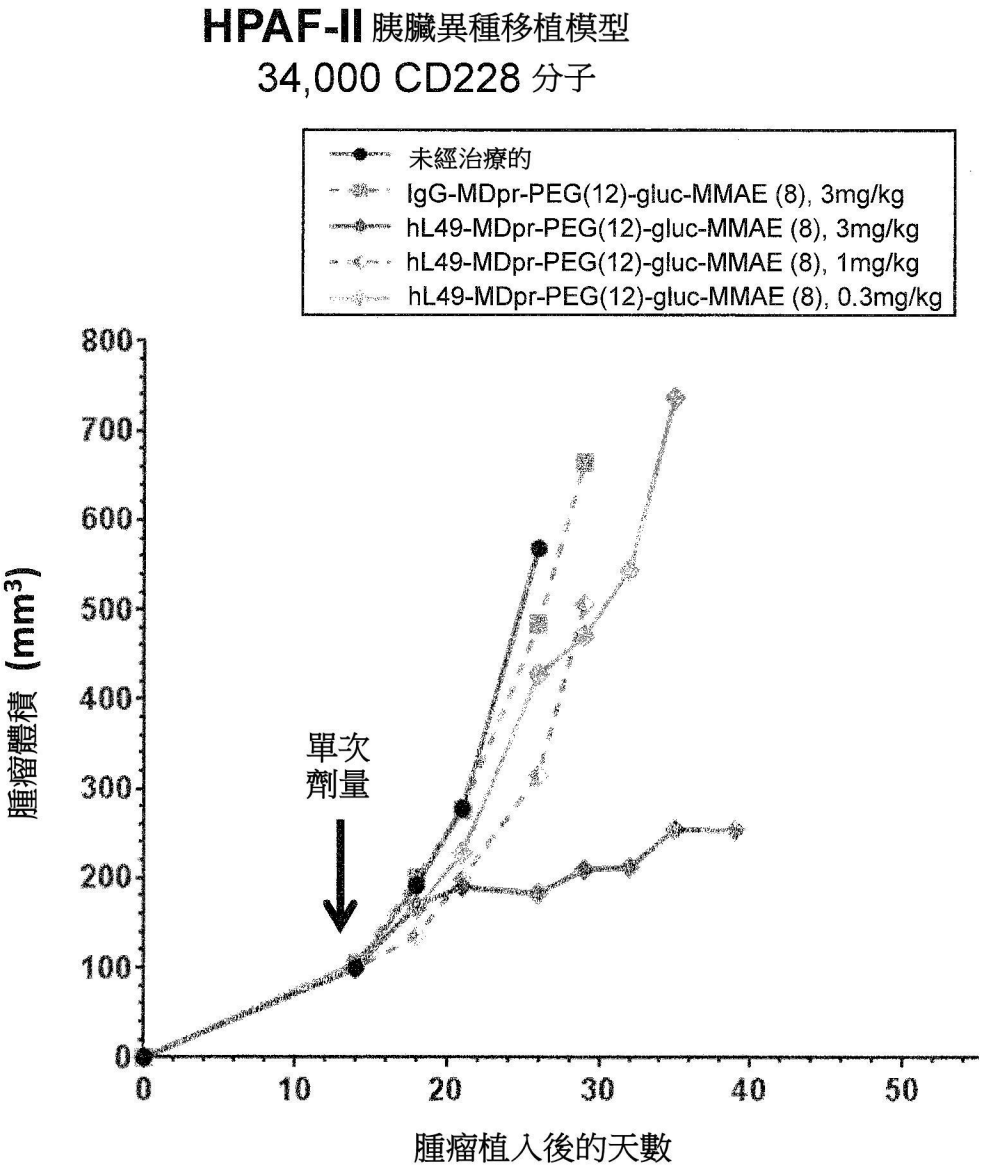
【第 23 圖】


LU0697腺癌NSCL PDX模型
未經治療的
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1 mg/kg
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)- 3mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
治療後天數

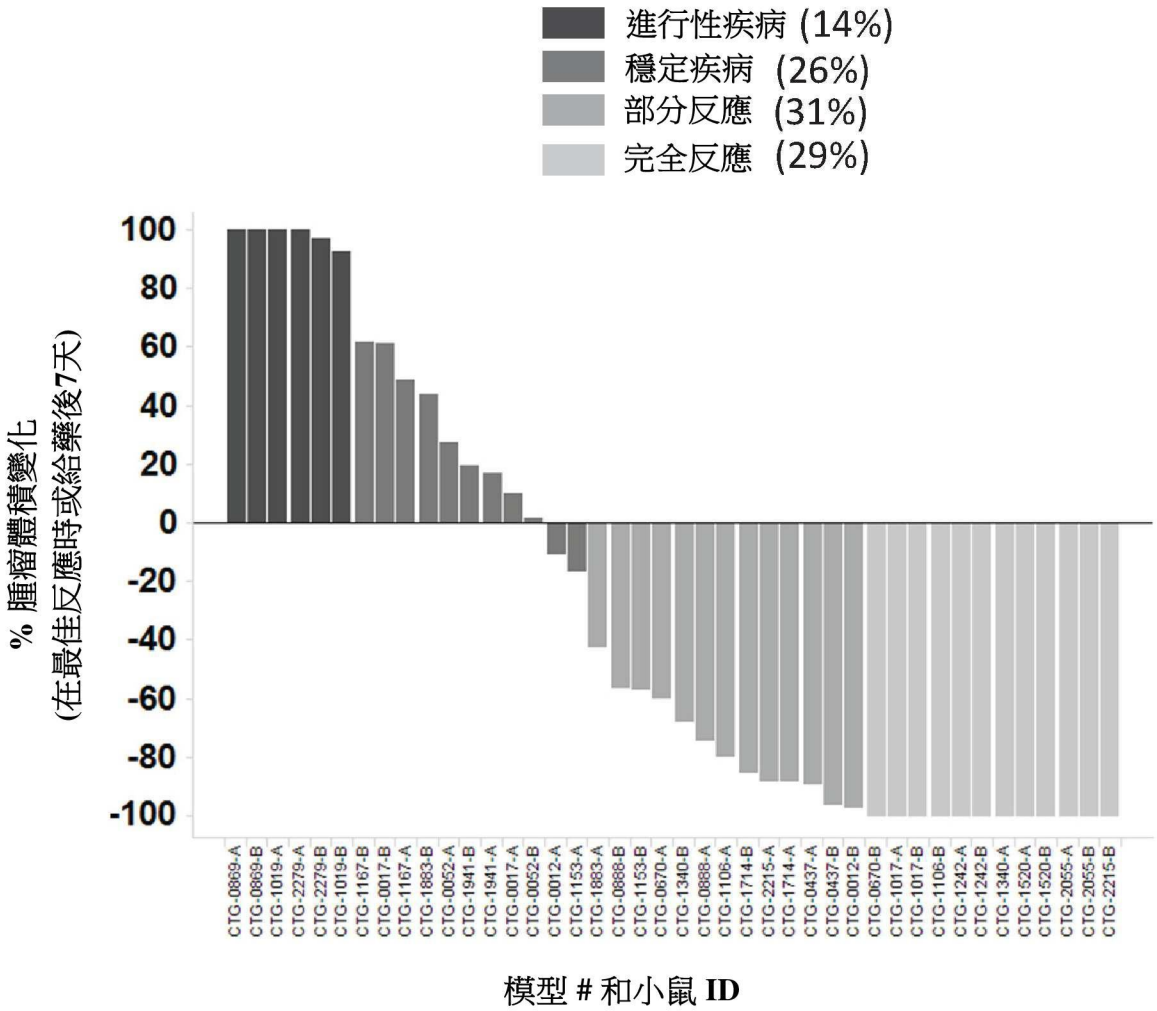
【第 24 圖】


MDA-MB-231 TNBC 異種移植模型
175,000 CD228 分子
未經治療的 0 mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-MMAE (8), 1 mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-MMAE (8), 0.5 mg/kg
IgG-MDpr-PEG(12)-MMAE (8), 1 mg/kg
IgG-MDpr-PEG(12)-MMAE (8), 0.5 mg/kg
腫瘤體積 (mm3)
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
10
20
30
40
50
腫瘤植入後的天數

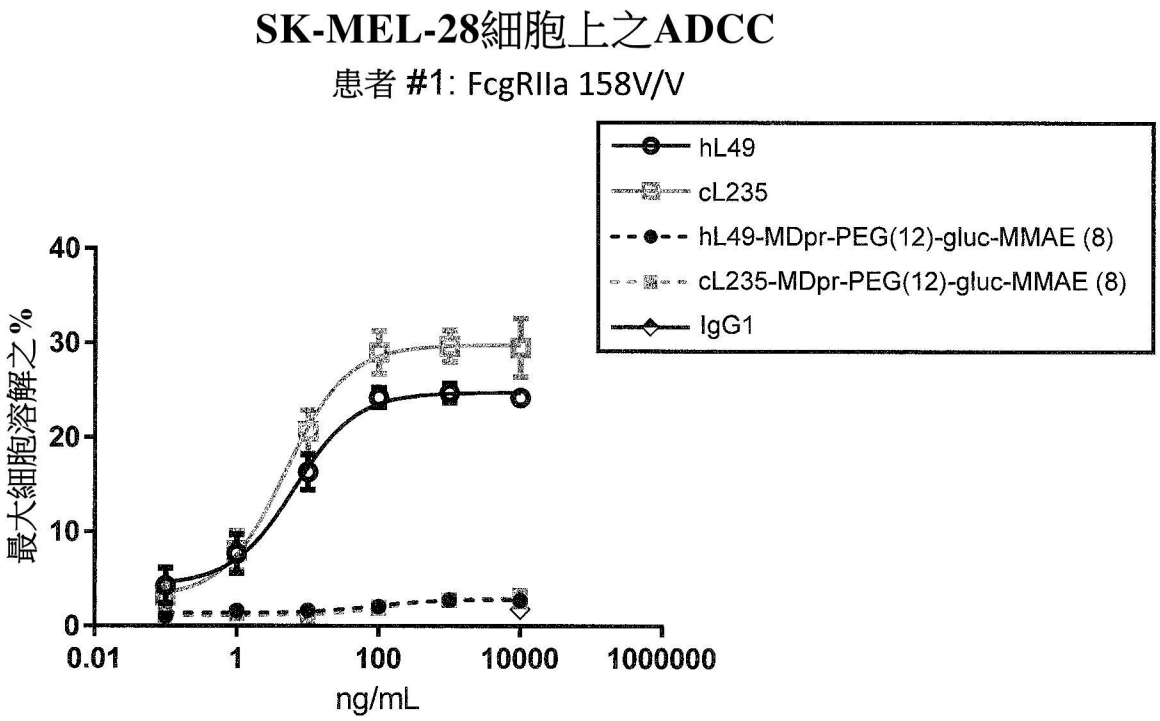
【第 25 圖】


HPAF-II 胰臟異種移植模型
34,000 CD228 分子
未經治療的
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 0.3mg/kg
腫瘤體積 (mm³)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
單次
劑量
0
10
20
30
40
50
腫瘤植入後的天數

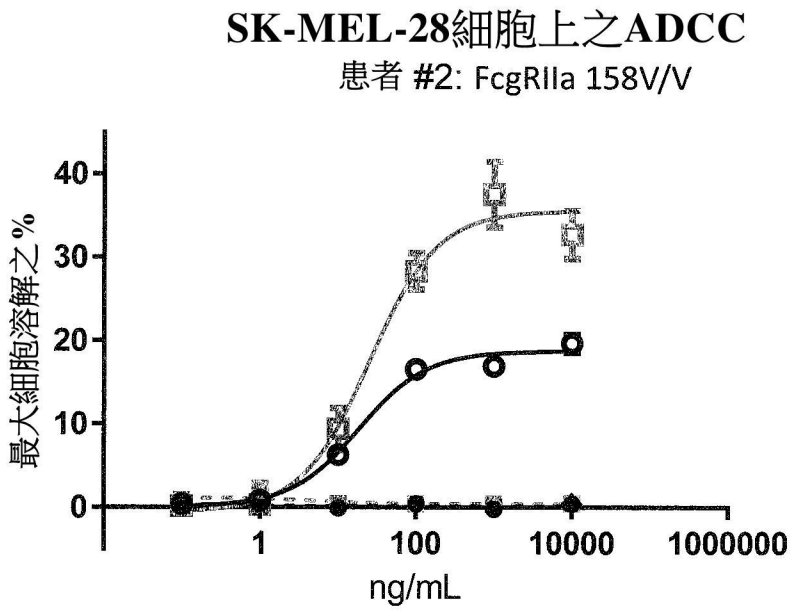
【第 26 圖】


進行性疾病 (14%)
穩定疾病 (26%)
部分反應 (31%)
完全反應 (29%)
% 腫瘤體積變化
(在最佳反應時或給藥後7天)
100
80
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
CTG-0869-A
CTG-0869-B
CTG-1019-A
CTG-2279-A
CTG-2279-B
CTG-1019-B
CTG-1167-B
CTG-0017-B
CTG-1167-A
CTG-1883-B
CTG-0052-A
CTG-1941-B
CTG-1941-A
CTG-0017-A
CTG-0052-B
CTG-0012-A
CTG-1153-A
CTG-1883-A
CTG-0888-B
CTG-1153-B
CTG-0670-A
CTG-1340-B
CTG-0888-A
CTG-1106-A
CTG-1714-B
CTG-2215-A
CTG-1714-A
CTG-0437-A
CTG-0437-B
CTG-0012-B
CTG-0670-B
CTG-1017-A
CTG-1017-B
CTG-1106-B
CTG-1242-A
CTG-1242-B
CTG-1340-A
CTG-1520-A
CTG-1520-B
CTG-2055-A
CTG-2055-B
CTG-2215-B
模型 # 和小鼠 ID

【第 27 圖】

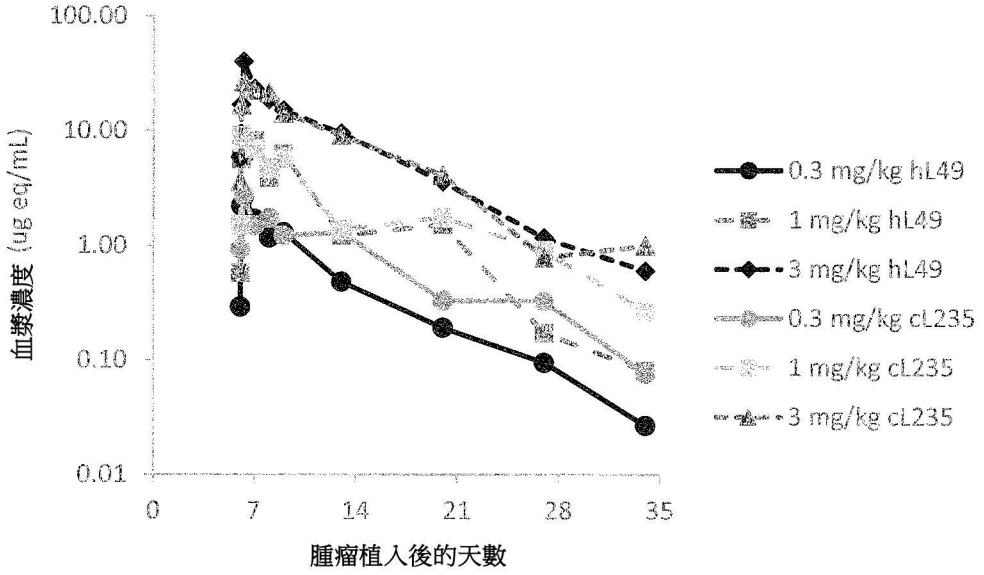

SK-MEL-28細胞上之ADCC
患者 #1: FcgRIIa 158V/V
hL49
cL235
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)
cL235-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)
IgG1
最大細胞溶解之 %
40
30
20
10
0
0.01
1
100
10000
1000000
ng/mL

【第 28A 圖】

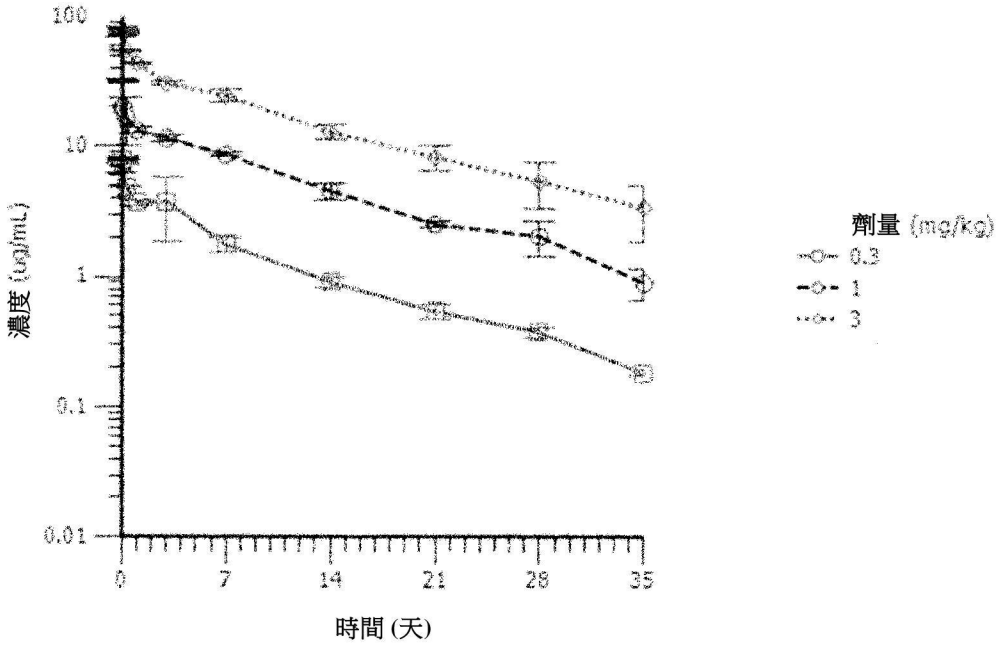

SK-MEL-28細胞上之ADCC
患者 #2: FcgRIIa 158V/V
最大細胞溶解之 %
40
30
20
10
0
1
100
10000
1000000
ng/mL

【第 28B 圖】

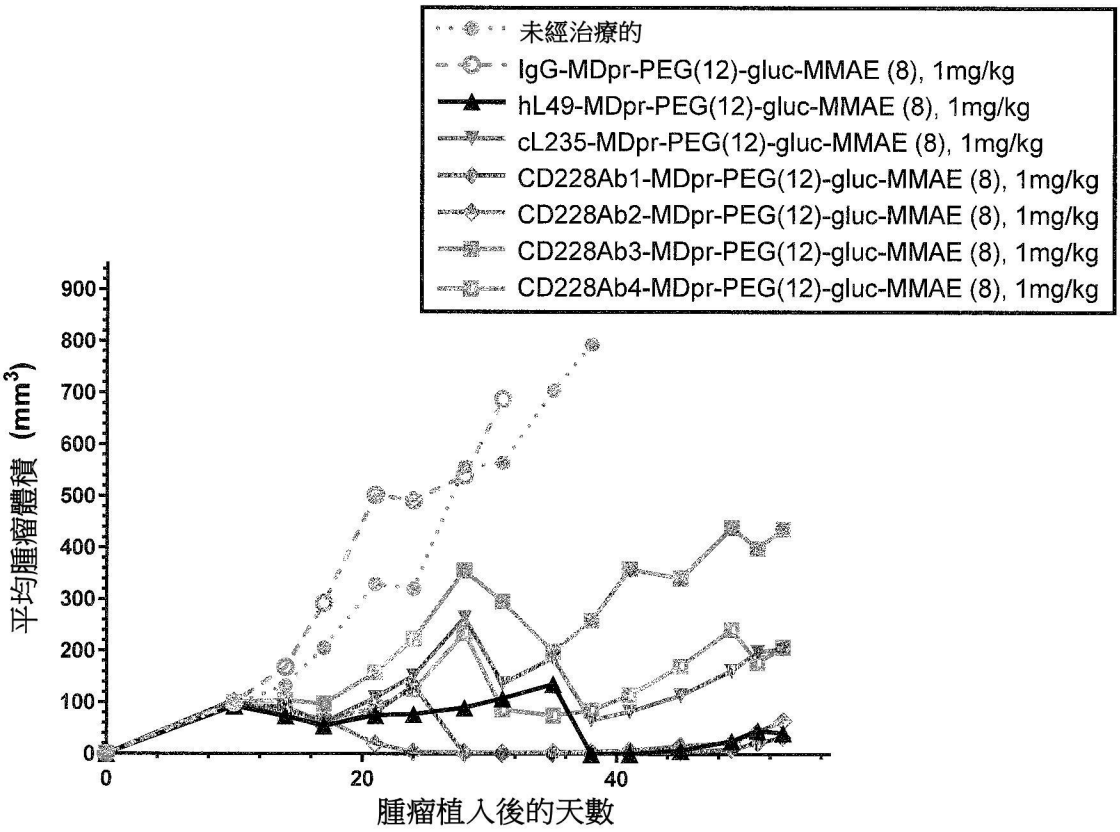
裸鼠中之hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)的PK



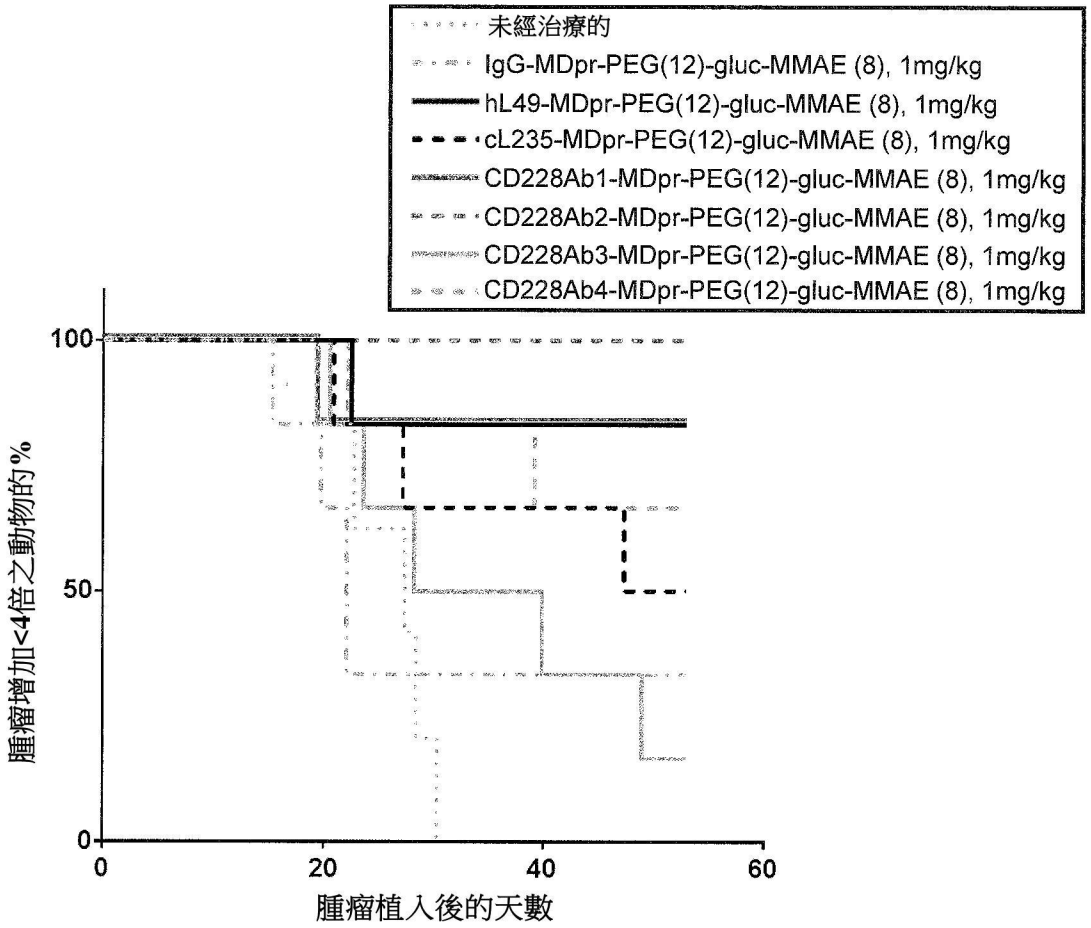
【第 29A 圖】



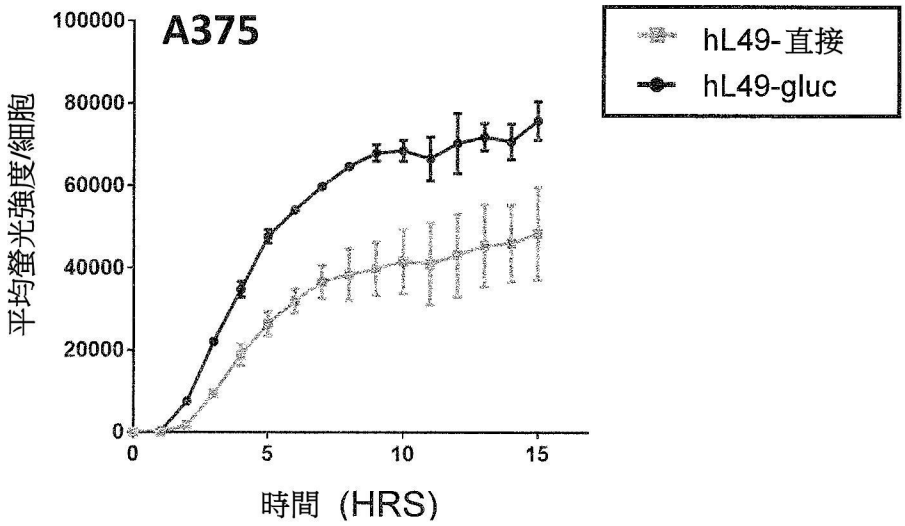
【第 29B 圖】


未經治療的
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
cL235-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab1-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab2-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab3-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab4-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
平均腫瘤體積 (mm3)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
腫瘤植入後的天數

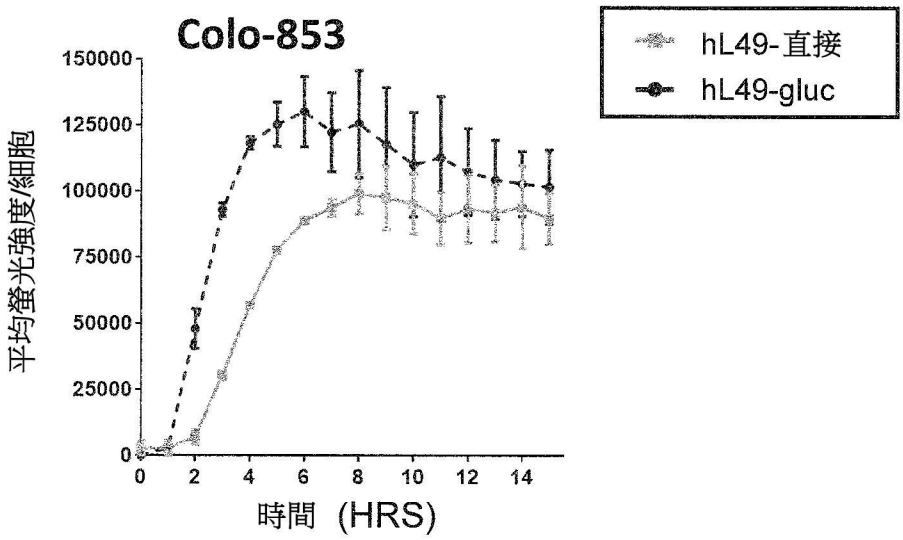
【第 30A 圖】


未經治療的
IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
cL235-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab1-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab2-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab3-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
CD228Ab4-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 1mg/kg
腫瘤增加<4倍之動物的%
100
50
0
0
20
40
60
腫瘤植入後的天數

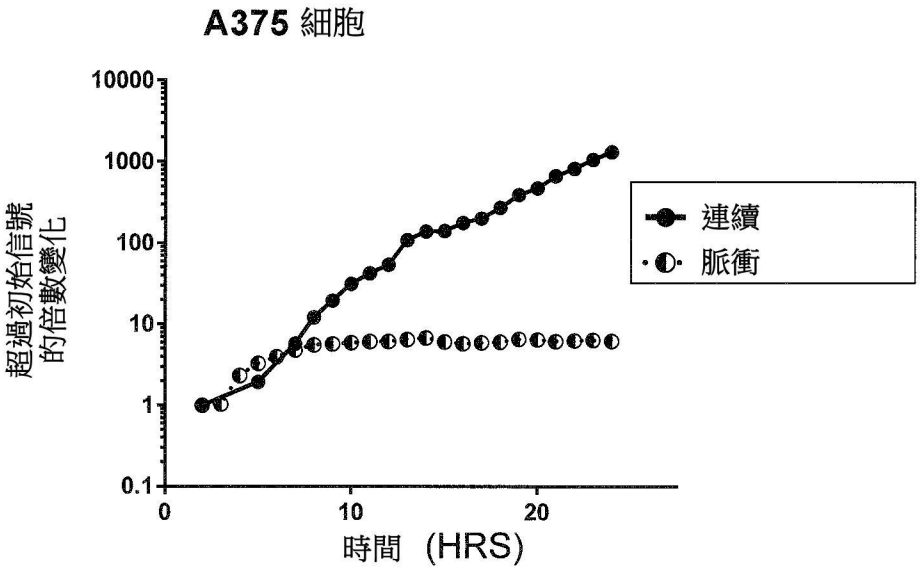
【第 30B 圖】


A375
hL49-直接
hL49-gluc
平均螢光強度/細胞
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
5
10
15
時間 (HRS)

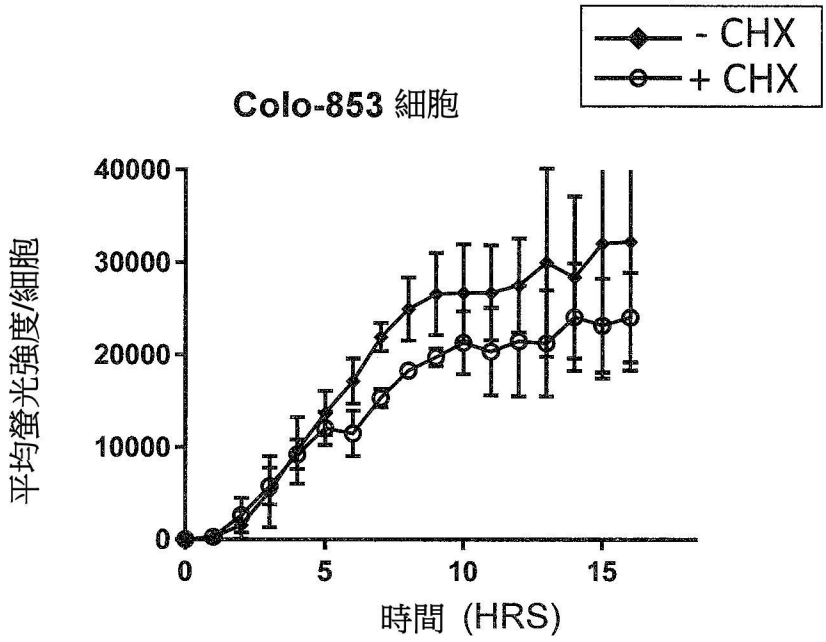
【第 31A 圖】


Colo-853
hL49-直接
hL49-gluc
平均螢光強度/細胞
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
時間 (HRS)

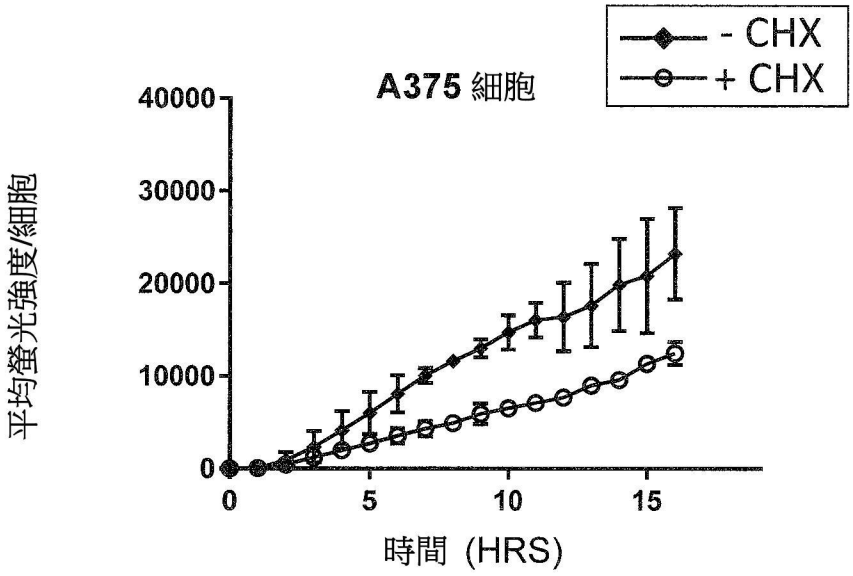
【第 31B 圖】



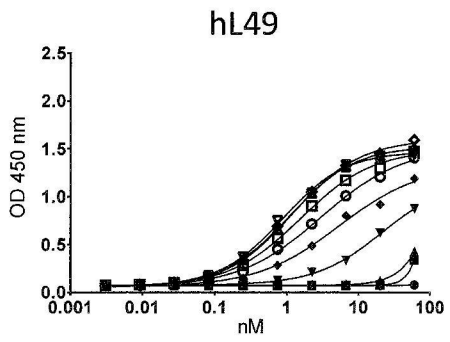
【第 32 圖】


- CHX
+ CHX
Colo-853 細胞
40000
30000
20000
10000
0
平均螢光強度/細胞
0
5
10
15
時間 (HRS)

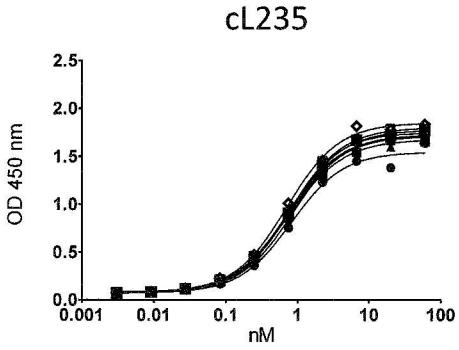
【第 33A 圖】


- CHX
+ CHX
A375 細胞
40000
30000
20000
10000
0
平均螢光強度/細胞
0
5
10
15
時間 (HRS)

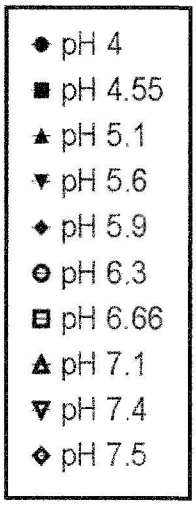
【第 33B 圖】

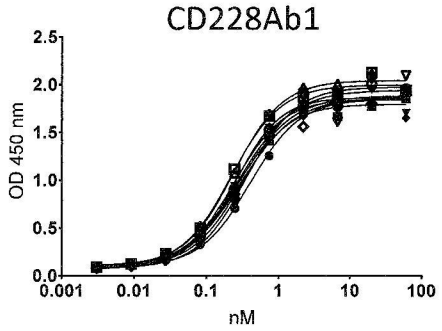


【第 34A 圖】

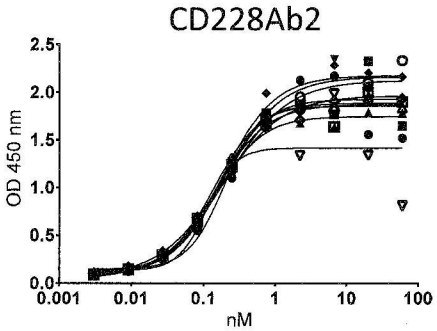


【第 34B 圖】

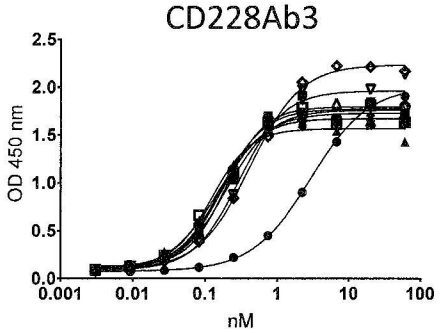




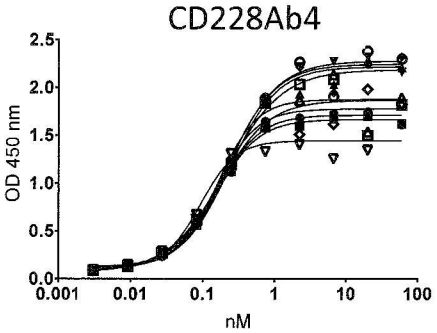
【第 34C 圖】



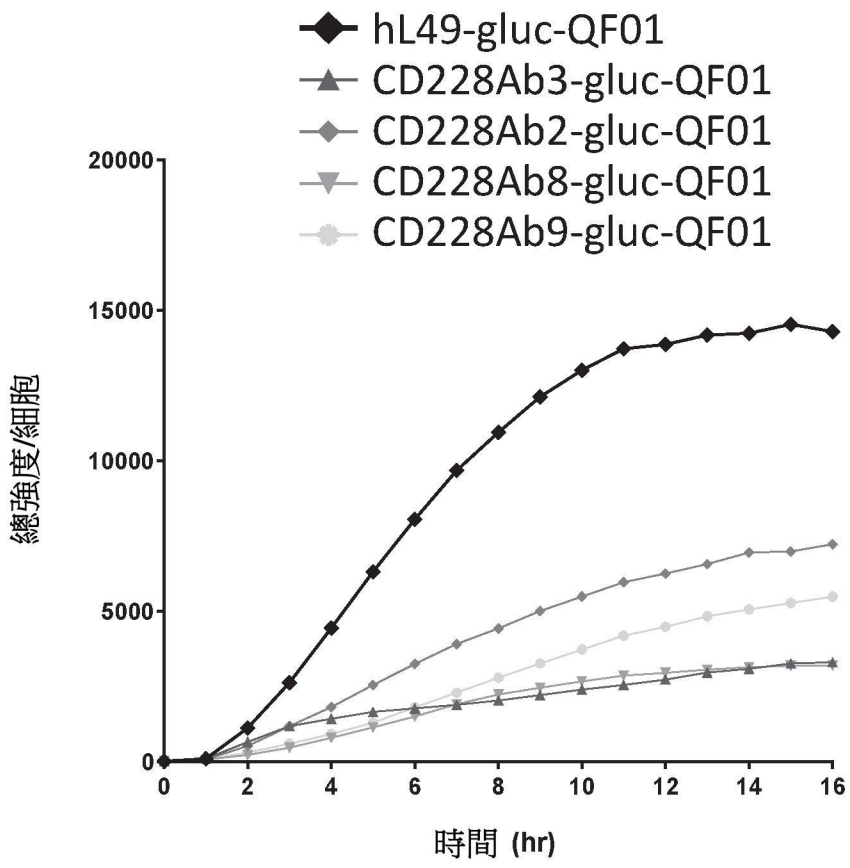
【第 34D 圖】



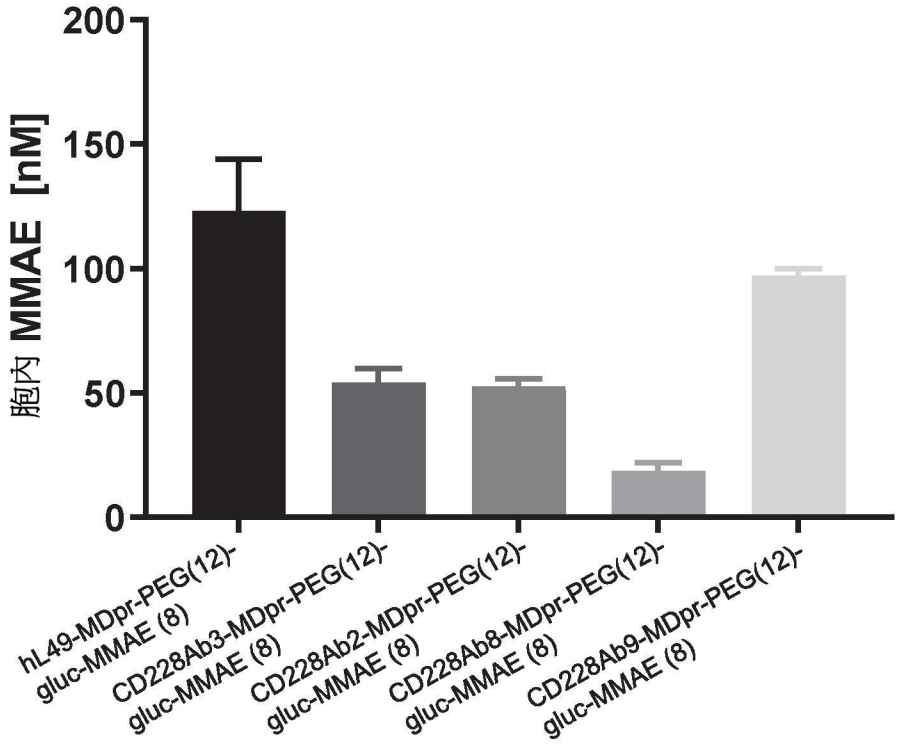
【第 34E 圖】



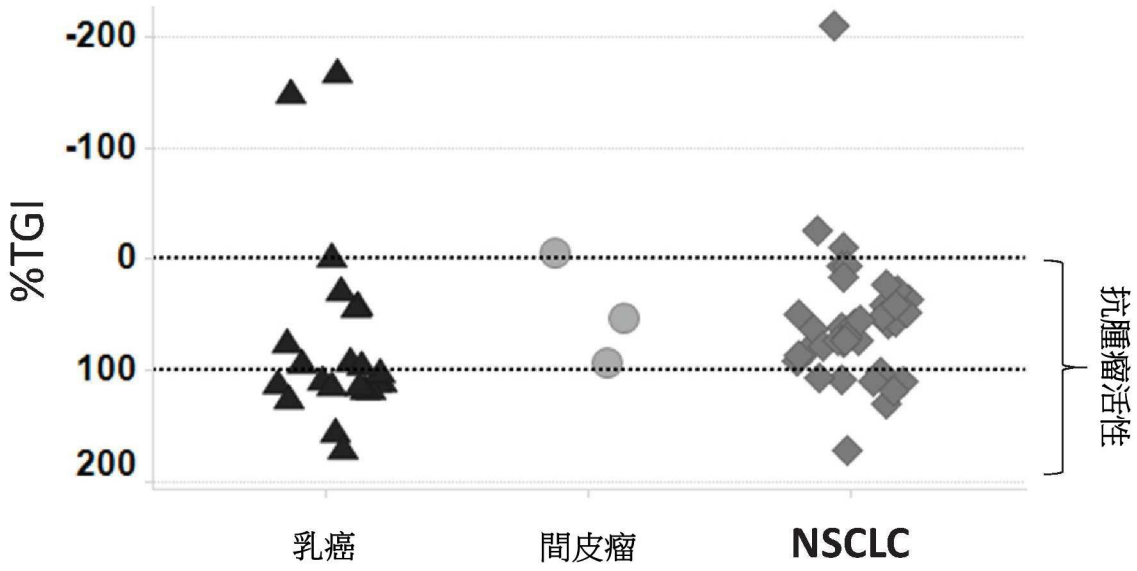
【第 34F 圖】


hL49-gluc-QF01
CD228Ab3-gluc-QF01
CD228Ab2-gluc-QF01
CD228Ab8-gluc-QF01
CD228Ab9-gluc-QF01
總強度/細胞
20000
15000
10000
5000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
時間 (hr)

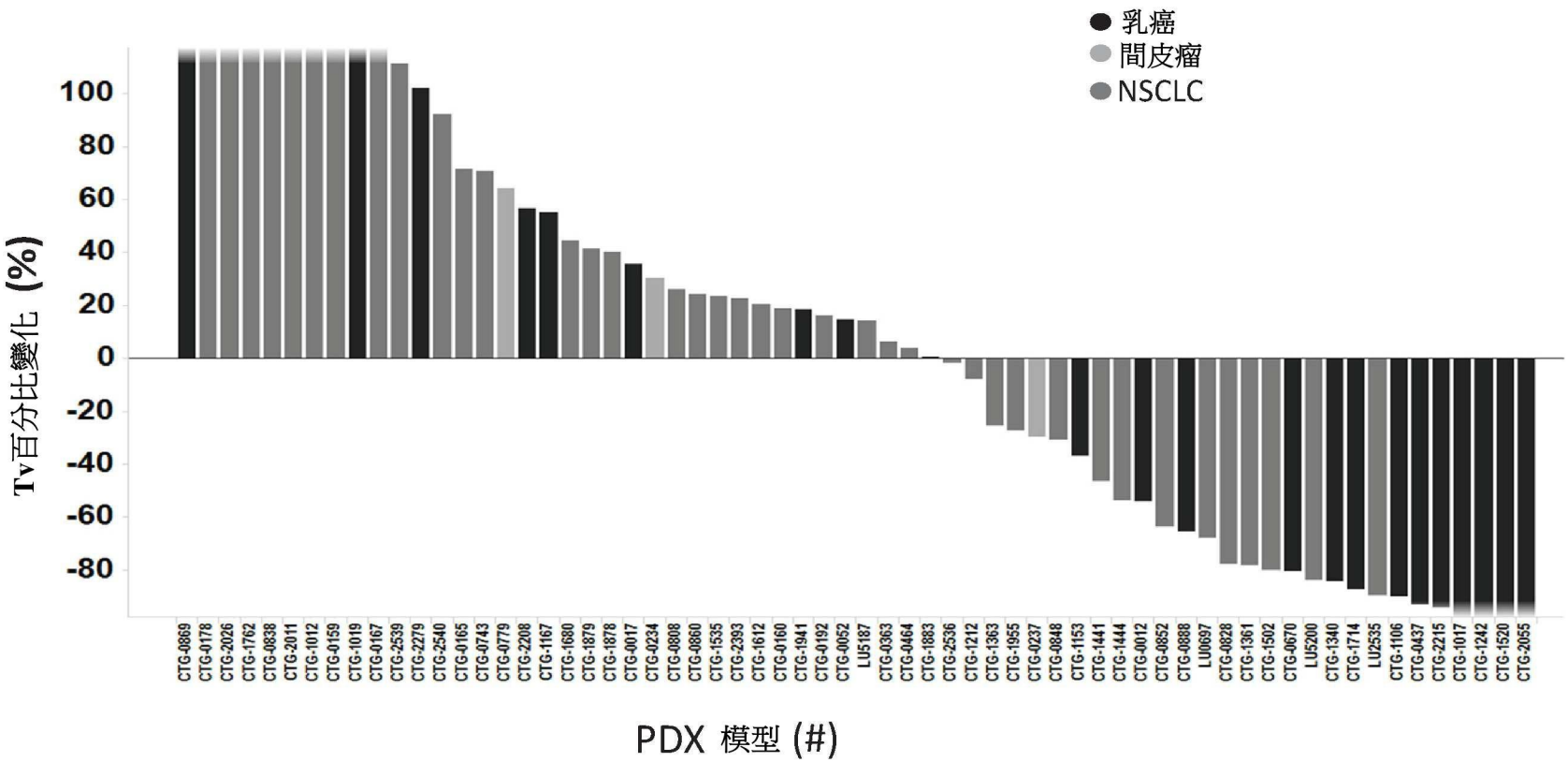
【第 35A 圖】


胞內 MMAE [nM]
200
150
100
50
0
hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)
CD228Ab3-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)
CD228Ab2-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)
CD228Ab8-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)
CD228Ab9-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8)

【第 35B 圖】



【第 36A 圖】



抗性標準	總體 (n=64)	TNBC (n=22)	NSCLC (n=39)
ORR (<-30%)	**36%**	**59%**	**26%**
SD (<20%)	20%	14%	23%
PD (>20%)	44%	27%	51%

【第 36B 圖】