(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112566942 A
(43)申请公布日 2021.03.26

(21)申请号 201980049551.8

(22)申请日 2019.07.24

(30)优先权数据
2018-139633 2018.07.25 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2019/028949 2019.07.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/022363 JA 2020.01.30

(71)申请人 第一三共株式会社
地址 日本东京都

(72)发明人 山口达也 樱谷宪司

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 甘霖 梅黎

(51)Int.Cl.
C07K 16/32(2006.01)
A61K 9/08(2006.01)
A61K 47/18(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61K 47/26(2006.01)
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)

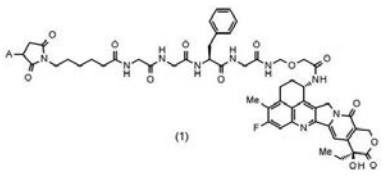
权利要求书7页 说明书65页
序列表15页 附图5页

(54)发明名称

用于制造抗体-药物缀合物的有效方法

(57)摘要

本发明为:用于生产抗体-药物缀合物的方法,在所述抗体-药物缀合物中,由式(1)(其中A表示与抗体的连接位置)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合,其中该方法特征在于:(i)用还原剂还原抗体的步骤;(ii)使药物-接头中间产物与步骤(i)中还原的抗体反应的步骤;(iii)加入具有硫醇基的试剂,并与步骤(ii)中保留的药物-接头中间产物反应的步骤;和(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液,通过超滤去除药物-接头中间产物衍生的副产物的步骤;以及用于生产含有抗体-药物缀合物的药物组合物的方法。



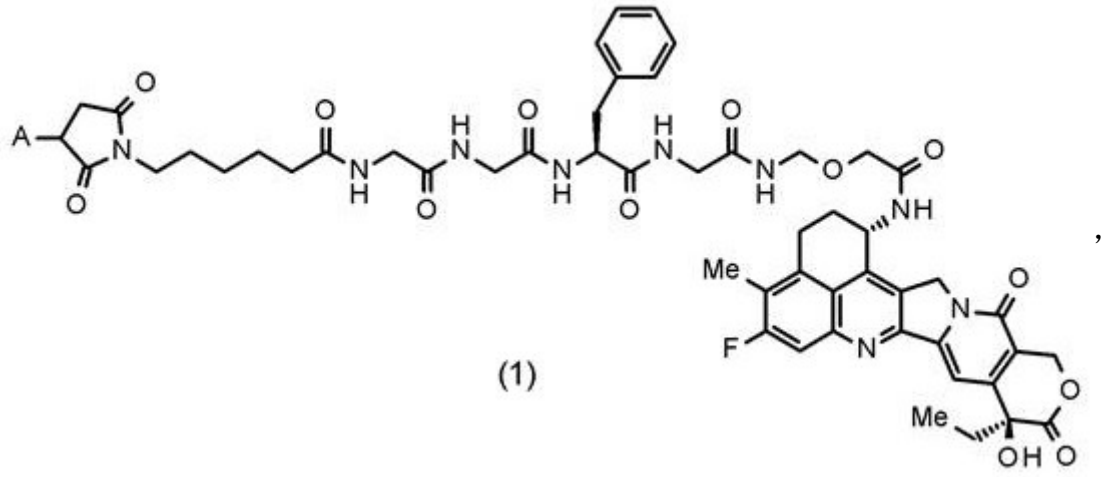
(1)

CN 112566942 A

1.一种用于生产抗体-药物缀合物的方法,其中

由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合

[化学1]



(1)

,

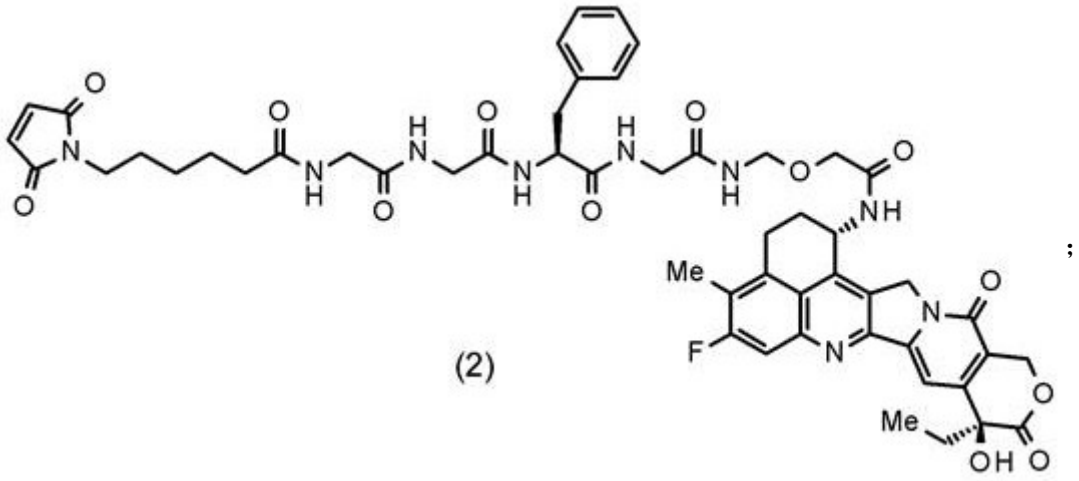
其中A表示与抗体的连接位置,

其中所述方法包括以下步骤:

(i)用还原剂还原抗体;

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学2]



(2)

;

(iii)加入具有硫醇基的试剂,以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应;然后

(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液,通过超滤去除其中步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物、以及其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物。

2.根据权利要求1的生产方法,其中步骤(i)中使用的所述还原剂是三(2-羧乙基)膦或其盐。

3.根据权利要求1的生产方法,其中步骤(i)中使用的所述还原剂是三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

4.根据权利要求1至3中任一项的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

5.根据权利要求4的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将所述缓冲溶液的pH调整至6至8。

6.根据权利要求4或5的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

7.根据权利要求1至6中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

8.根据权利要求7的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

9.根据权利要求4至8中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的所述缓冲溶液含有表面活性剂。

10.根据权利要求9的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

11.根据权利要求9的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

12.根据权利要求1至11中任一项的生产方法,其中步骤(iii)中使用的所述具有硫醇基的试剂是N-乙酰半胱氨酸。

13.根据权利要求1至12中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的所述缓冲溶液的pH为约5。

14.根据权利要求1至13中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

15.根据权利要求1至14中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的所述盐的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

16.根据权利要求1至14中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的所述盐的浓度为约0.5重量%。

17.根据权利要求1至16中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的所述盐是氯化钠。

18.根据权利要求1至17中任一项的生产方法,其包括在步骤(iv)之后的步骤:

(v)通过使用缓冲溶液的超滤来去除由强酸和强碱组成的所述盐。

19.根据权利要求18的生产方法,其中步骤(v)中使用的所述缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

20.根据权利要求18的生产方法,其中步骤(v)中使用的所述缓冲溶液的pH为约5。

21.根据权利要求18至20中任一项的生产方法,其中步骤(v)中使用的所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

22.根据权利要求1至21中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

23.根据权利要求1至21中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

24.根据权利要求1至23中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER2抗体。

25.根据权利要求24的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

26.根据权利要求24的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基

酸序列组成。

27.根据权利要求1至23中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER3抗体。

28.根据权利要求27的生产方法,其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

29.根据权利要求28的生产方法,其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

30.根据权利要求1至23中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

31.根据权利要求30的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

32.根据权利要求31的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

33.根据权利要求1至23中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

34.根据权利要求33的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

35.根据权利要求34的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

36.根据权利要求1至35中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

37.根据权利要求36的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

38.一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据权利要求1至37中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

39.根据权利要求38的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

40.根据权利要求38或39的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

41.根据权利要求38或39的生产方法,其中所述赋形剂是海藻糖。

42.一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法,其通过经由根据权利要求38至41中任一项的生产方法,来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物,然后

执行以下步骤

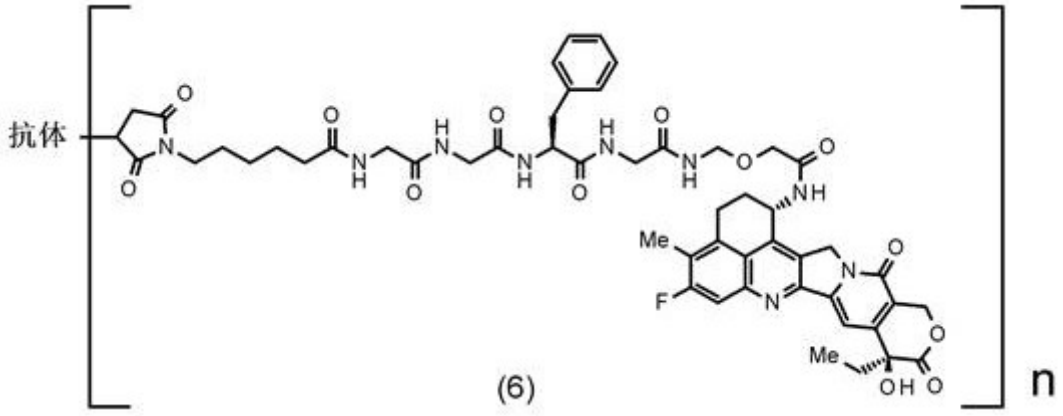
(x)将表面活性剂加入所述药物组合物中。

43.根据权利要求42的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

44.根据权利要求42的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

45.一种用于生产由式(6)表示的抗体-药物缀合物的方法，

[化学3]



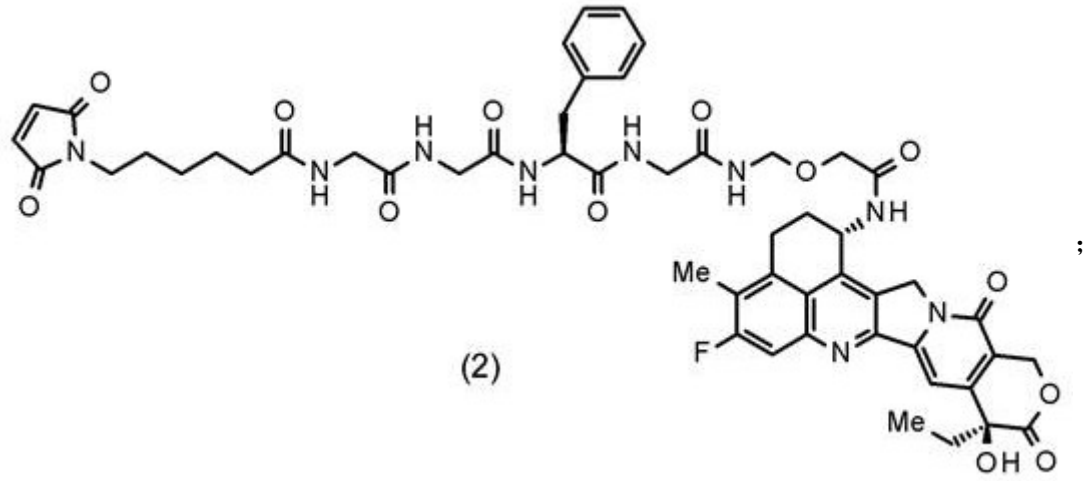
其中药物-接头经由硫醚键与抗体缀合，并且n表示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数，

其中所述方法包括以下步骤：

(i)用三(2-羧乙基)膦盐酸盐还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学4]

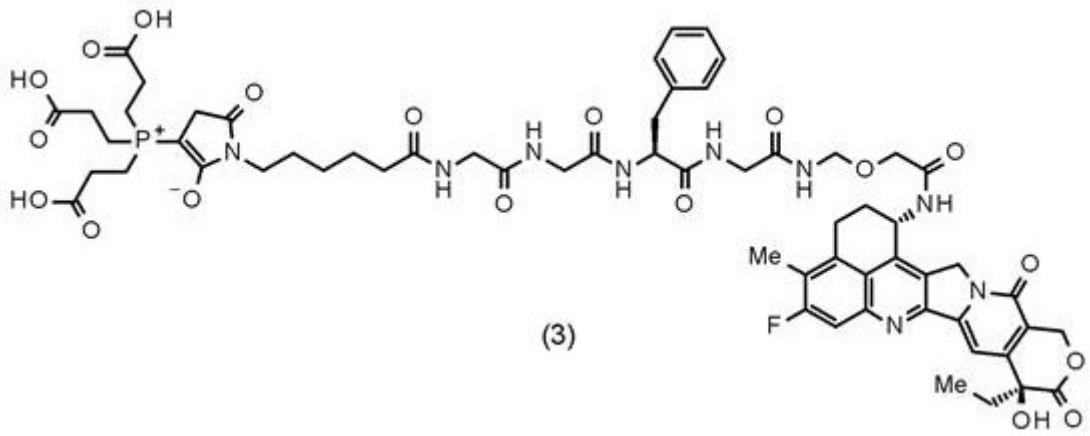


;

(iii)加入N-乙酰半胱氨酸，以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应；然后

(iv)通过使用含有氯化钠的组氨酸缓冲溶液的超滤，来去除由式(3)表示的化合物

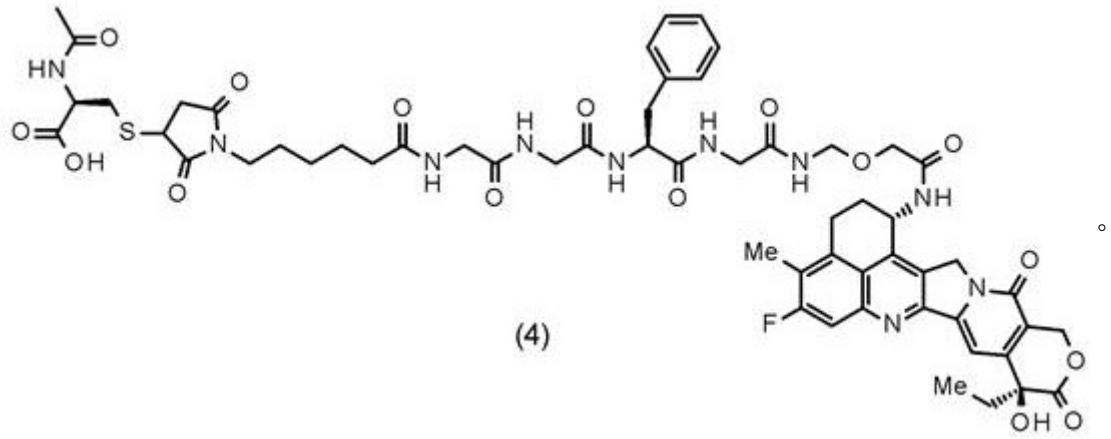
[化学5]



(3)

以及由式(4)表示的化合物

[化学6]



(4)

。

46.根据权利要求45的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

47.根据权利要求46的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将所述缓冲溶液的pH调整至6至8。

48.根据权利要求46或47的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

49.根据权利要求45至48中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

50.根据权利要求49的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

51.根据权利要求45至50中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的所述缓冲溶液含有表面活性剂。

52.根据权利要求51的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

53.根据权利要求51的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

54.根据权利要求45至53中任一项的生产方法,其中所述步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

55.根据权利要求45至54中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

56.根据权利要求45至54中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为约0.5重量%。

57.根据权利要求45至56中任一项的生产方法,其包括在步骤(iv)之后的步骤:

(v)通过使用组氨酸缓冲溶液的超滤来去除氯化钠。

58.根据权利要求57的生产方法，其中步骤(v)中使用的所述缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

59.根据权利要求57的生产方法，其中步骤(v)中使用的所述缓冲溶液的pH为约5。

60.根据权利要求45至59中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

61.根据权利要求45至59中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

62.根据权利要求45至61中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER2抗体。

63.根据权利要求62的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

64.根据权利要求62的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

65.根据权利要求45至61中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER3抗体。

66.根据权利要求65的生产方法，其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

67.根据权利要求66的生产方法，其中所述抗HER3抗体在所述重链的羧基末端处缺少赖氨酸残基。

68.根据权利要求45至61中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗GPR20抗体。

69.根据权利要求68的生产方法，其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

70.根据权利要求69的生产方法，其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

71.根据权利要求45至61中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗CDH6抗体。

72.根据权利要求71的生产方法，其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

73.根据权利要求72的生产方法，其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

74.根据权利要求45至73中任一项的生产方法，其不包括涉及色谱的纯化步骤。

75.根据权利要求74的生产方法，其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

76.一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法，其通过经由根据权利要求45至75中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物，然后

执行选自以下的至少一个步骤：

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中；

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

77.根据权利要求76的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

78.根据权利要求76或77的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

79.根据权利要求76或77的生产方法,其中所述赋形剂是海藻糖。

80.一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法,其通过经由根据权利要求76至79中任一项的生产方法,来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物,然后

执行以下步骤

(x)将表面活性剂加入所述药物组合物中。

81.根据权利要求80的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

82.根据权利要求80的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

用于制造抗体-药物缀合物的有效方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生产抗体-药物缀合物的方法,其减少了聚集物的生成,并且包括用于有效去除副产物的纯化步骤,以及用于生产含有抗体-药物缀合物的药物组合物的方法。

背景技术

[0002] 具有与抗体缀合的含有细胞毒性的药物的抗体-药物缀合物(ADC),可以将药物选择性地递送至癌细胞,所述抗体与癌细胞的表面上表达的抗原结合并且还能够细胞内在化,并且因此预期导致药物在癌细胞内的累积并杀死癌细胞(非专利文献1至5)。

[0003] 专利文献1至9中的实施例描述了用于生产抗体-药物缀合物的方法。这些生产方法各自包括涉及色谱的纯化步骤,所述色谱例如疏水色谱和凝胶过滤色谱。

[0004] 作为一种此类抗体-药物缀合物,包含抗体和依沙替康的衍生物作为其组分的抗体-药物缀合物是已知的,所述依沙替康是拓扑异构酶I抑制剂(专利文献10至14,非专利文献6至9)。由于这些抗体-药物缀合物发挥特别优异的抗肿瘤效应并且安全,因此它们目前处于临床研究中。

[0005] 专利文献10至14描述了作为用于生产上述抗体-药物缀合物的方法、用于将抗体和药物-接头中间产物缀合的方法,以及用于纯化所获得的抗体-药物缀合物的方法。

[0006] 专利文献11至13中的实施例公开了上述抗体-药物缀合物通过用含山梨糖醇的乙酸盐缓冲溶液的超滤进行纯化。专利文献14公开了上述抗体-药物缀合物,可以通过用乙酸盐缓冲溶液、组氨酸缓冲溶液或磷酸盐缓冲溶液的超滤进行纯化。然而,仍需要开发用于生产抗体-药物缀合物的工业上更好的方法。

[0007] 引用列表

专利文献

专利文献1:国际公开号2002/098883

专利文献2:国际公开号2005/037992

专利文献3:国际公开号2005/084390

专利文献4:国际公开号2006/086733

专利文献5:国际公开号2007/024536

专利文献6:国际公开号2010/141566

专利文献7:国际公开号2011/039724

专利文献8:国际公开号2012/135517

专利文献9:国际公开号2015/104359

专利文献10:国际公开号2014/057687

专利文献11:国际公开号2015/098099

专利文献12:国际公开号2015/115091

专利文献13:国际公开号2015/155998

专利文献14:国际公开号2017/002776

非专利文献

非专利文献1:Ducry,L.等人,Bioconjugate Chem.(2010)21,5-13.

非专利文献2:Alley,S. C.等人,Current Opinion in Chemical Biology(2010)14,529-537.

非专利文献3:Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther.(2004)4,1445-1452.

非专利文献4:Senter P. D.等人,Nature Biotechnology(2012)30 631-637.

非专利文献5:Howard A.等人,J Clin Oncol 29:398-405.

非专利文献6:Ogitani Y.等人,Clinical Cancer Research(2016)22(20),5097-5108.

非专利文献7:Ogitani Y.等人,Cancer Science(2016)107,1039-1046.

非专利文献8:Doi T等人,Lancet Oncol 2017;18:1512-22.

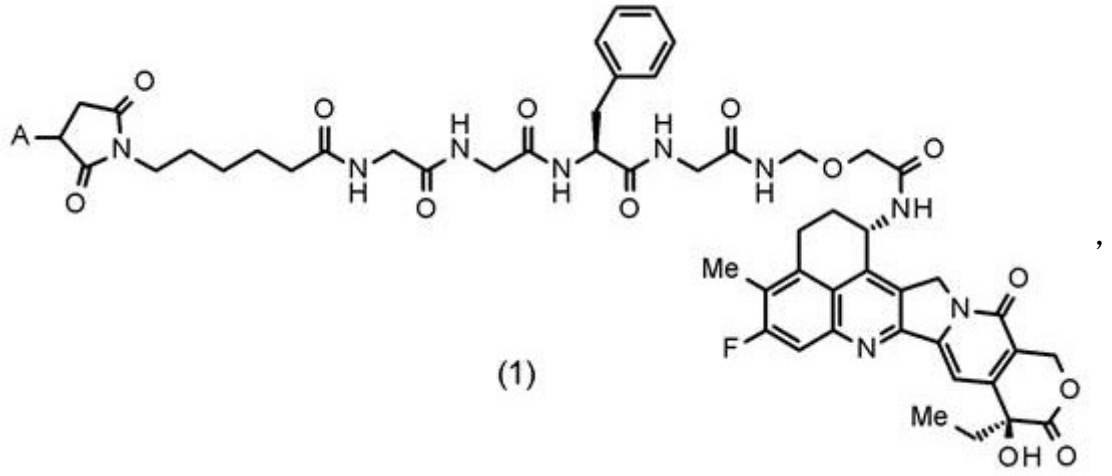
非专利文献9:Takegawa N等人,Int. J. Cancer:141,1682-1689(2017)。

[0008] 发明概述

技术问题

根据本发明的生产方法的抗体-药物缀合物是这样的抗体-药物缀合物,其中由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合

[化学1]



(1)

,

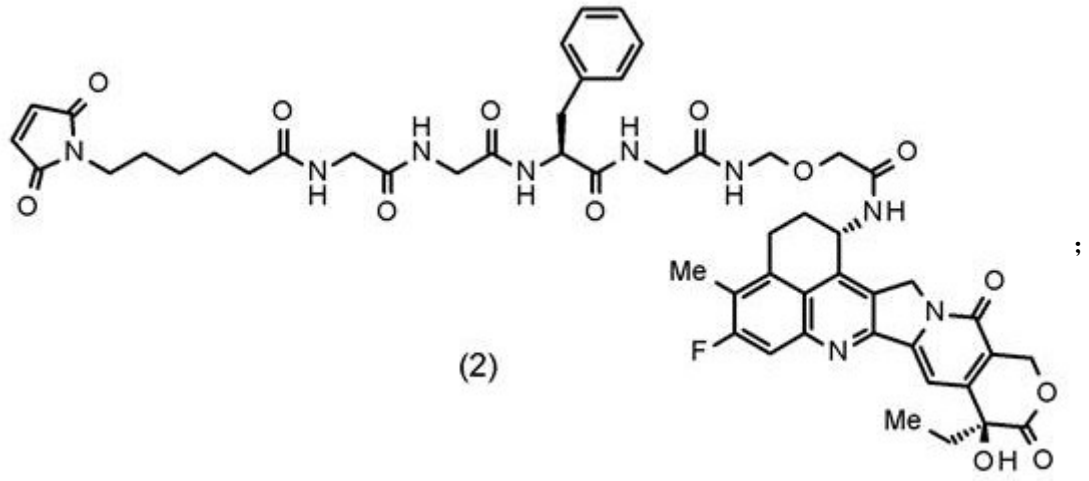
其中A表示与抗体的连接位置。

[0009] 用于产生此类抗体-药物缀合物的方法的实例包括包含以下步骤的方法:

(i)用还原剂还原抗体;

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学2]



(2)

;

然后

(iii)加入具有硫醇基的试剂,以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应。

[0010] 为了生产抗体-药物缀合物,特别是每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内的抗体-药物缀合物,需要大量由式(2)表示的化合物,并且这可以导致生成大量由式(2)表示的化合物衍生的副产物。在抗体-药物缀合物的生产中需要抑制聚集物的生成,并且在考虑抗体部分和药物-接头部分各自独特的物理特性时,需要检查反应/纯化条件。

[0011] 本发明的目的是提供用于生产抗体-药物缀合物的工业上极佳的方法,其包括用于有效地去除由式(2)表示的化合物衍生的副产物的纯化步骤,并且抑制聚集物的生成。本发明的另一个目的是建立用于生产含有抗体-药物缀合物的药物组合物的工业上极佳的方法。

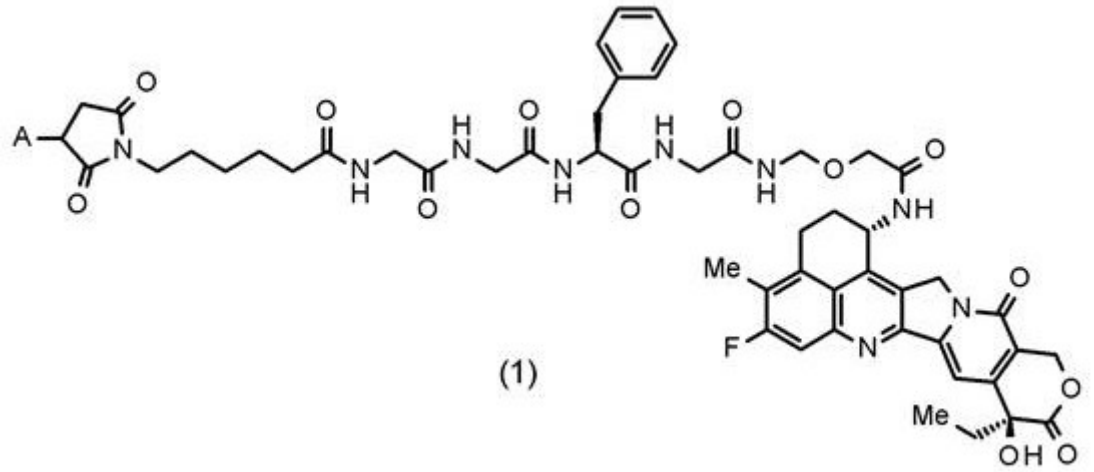
[0012] 问题的解决方案

作为为了解决上述问题进行深入研究的结果,本发明人发现在纯化抗体-药物缀合物的步骤中,用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液,通过超滤可以有效地去除由式(2)表示的化合物衍生的副产物。另外,本发明人已经发现在生产抗体-药物缀合物和纯化抗体-药物缀合物的步骤中,可以抑制聚集物的生成的反应/纯化条件。这些发现成功地提供了用于生产含有抗体-药物缀合物的药物组合物的工业上极佳的方法。

[0013] 因此,本发明提供了下述[1]至[410]。

[0014] [1]一种用于生产抗体-药物缀合物的方法,其中

由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合[化学3]



(1)

,

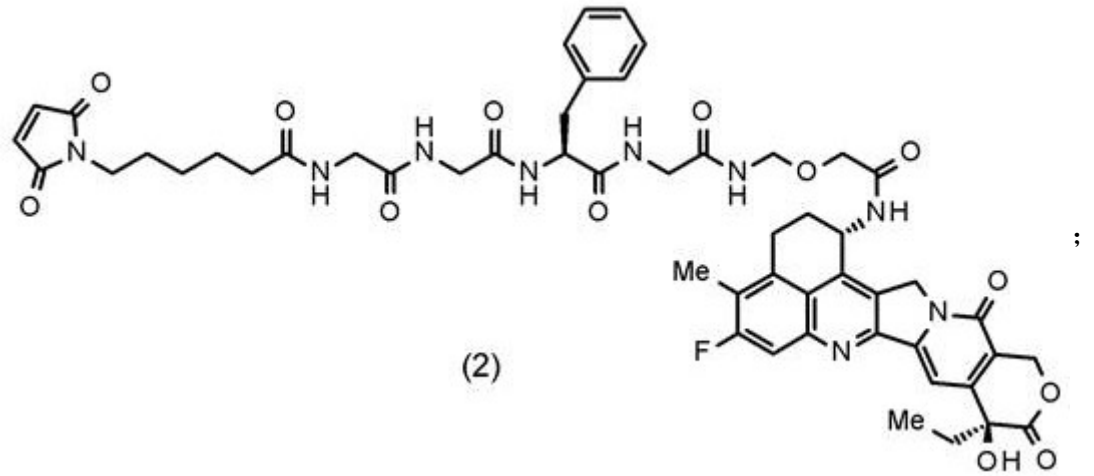
其中A表示与抗体的连接位置，

其中所述方法包括以下步骤：

(i)用还原剂还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学4]



(2)

;

(iii)加入具有硫醇基的试剂，以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应；然后

(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液，通过超滤去除其中步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物、以及其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物。

[0015] [2]根据[1]的生产方法，其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦或其盐。

[0016] [3]根据[1]的生产方法，其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

[0017] [4]根据[1]至[3]中任一项的生产方法，其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0018] [5]根据[4]的生产方法，其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液，将缓冲溶液的pH调整至6至8。

[0019] [6]根据[4]或[5]的生产方法，其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0020] [7]根据[1]至[6]中任一项的生产方法，其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0021] [8]根据[7]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0022] [9]根据[4]至[8]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0023] [10]根据[9]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0024] [11]根据[9]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0025] [12]根据[1]至[11]中任一项的生产方法,其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂是N-乙酰半胱氨酸。

[0026] [13]根据[1]至[12]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0027] [14]根据[1]至[12]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0028] [15]根据[1]至[12]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0029] [16]根据[1]至[12]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0030] [17]根据[1]至[12]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0031] [18]根据[1]至[17]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0032] [19]根据[1]至[18]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0033] [20]根据[1]至[18]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为约0.5重量%。

[0034] [21]根据[1]至[18]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0035] [22]根据[1]至[18]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为0.5重量%。

[0036] [23]根据[1]至[22]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐是氯化钠。

[0037] [24]根据[1]至[23]中任一项的生产方法,其包括在步骤(iv)之后的步骤:

(v)通过使用缓冲溶液的超滤来去除由强酸和强碱组成的盐。

[0038] [25]根据[24]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0039] [26]根据[24]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0040] [27]根据[24]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0041] [28]根据[24]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0042] [29]根据[24]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0043] [30]根据[24]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0044] [31]根据[24]至[30]中任一项的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0045] [32]根据[1]至[31]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0046] [33]根据[1]至[31]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0047] [34]根据[1]至[33]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0048] [35]根据[34]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0049] [36]根据[34]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0050] [37]根据[1]至[33]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0051] [38]根据[37]的生产方法,其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0052] [39]根据[38]的生产方法,其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0053] [40]根据[1]至[33]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0054] [41]根据[40]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[42]根据[41]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0055] [43]根据[1]至[33]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0056] [44]根据[43]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0057] [45]根据[44]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0058] [46]根据[1]至[45]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0059] [47]根据[46]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0060] [48]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[1]至[47]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0061] [49]根据[48]的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0062] [50]根据[48]或[49]的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

[0063] [51]根据[48]或[49]的生产方法,其中所述赋形剂是海藻糖。

[0064] [52]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[48]至[51]中任一项的生产方法,来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物,然后

执行以下步骤

(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

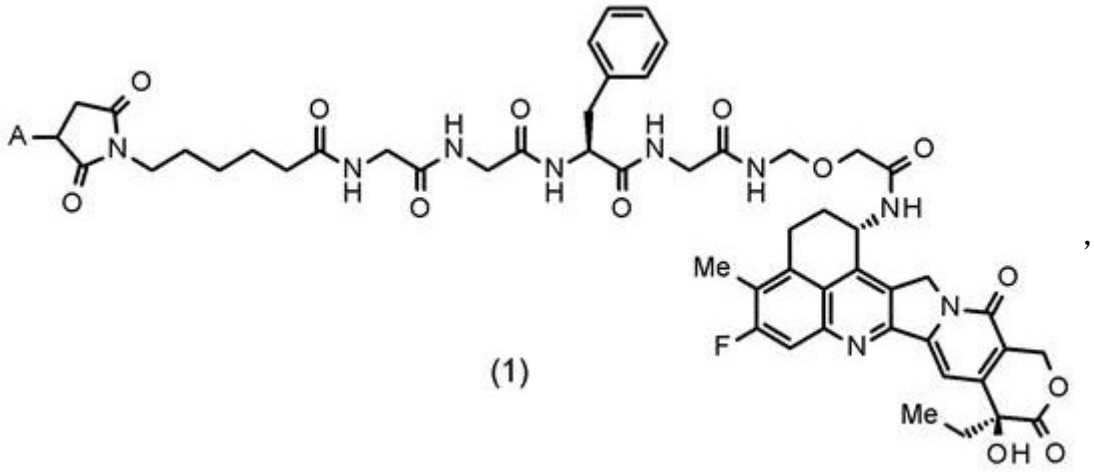
[0065] [53]根据[52]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0066] [54]根据[52]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0067] [55]一种用于生产抗体-药物缀合物的方法,其中

由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合

[化学5]



(1)

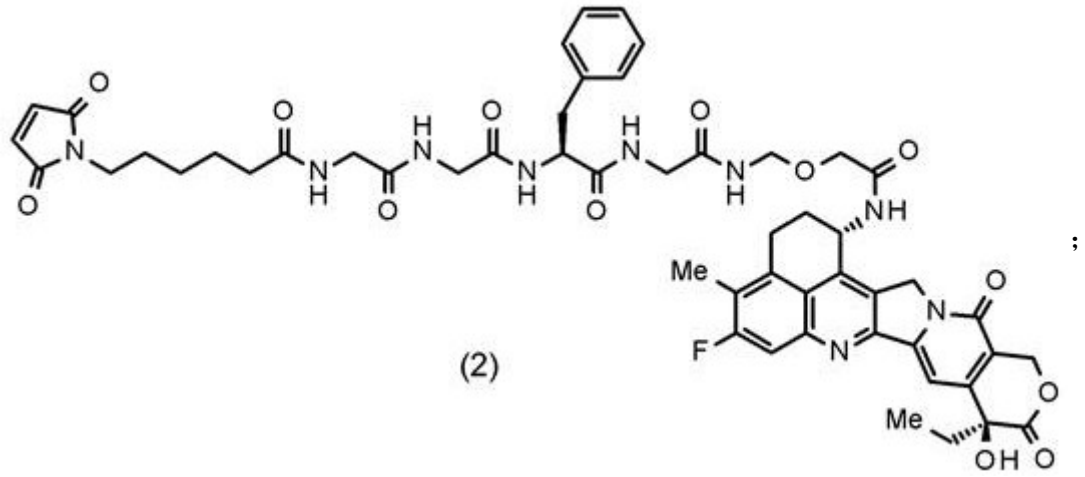
其中A表示与抗体的连接位置,

其中所述方法包括以下步骤:

(i)用三(2-羧乙基)膦盐酸盐还原抗体;

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学6]



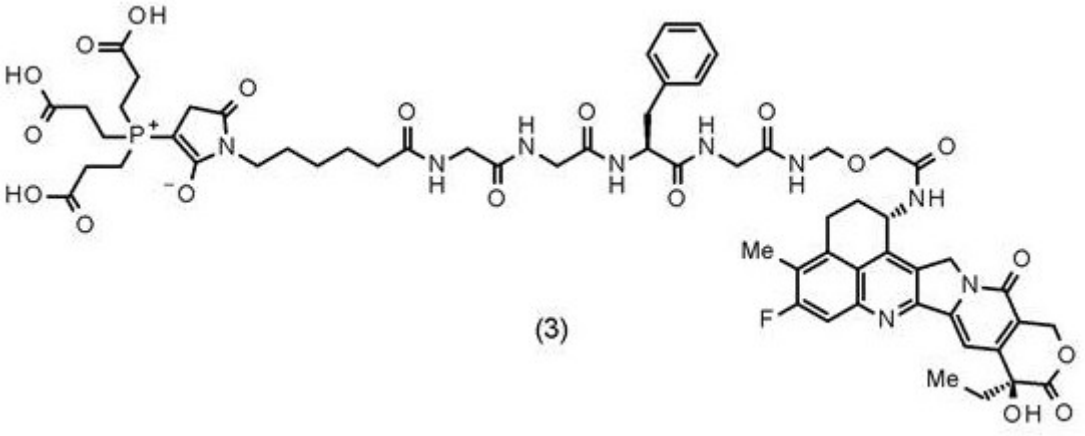
(2)

;

(iii)加入N-乙酰半胱氨酸,以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应;然后

(iv)通过使用含有氯化钠的组氨酸缓冲溶液的超滤,来去除由式(3)表示的化合物

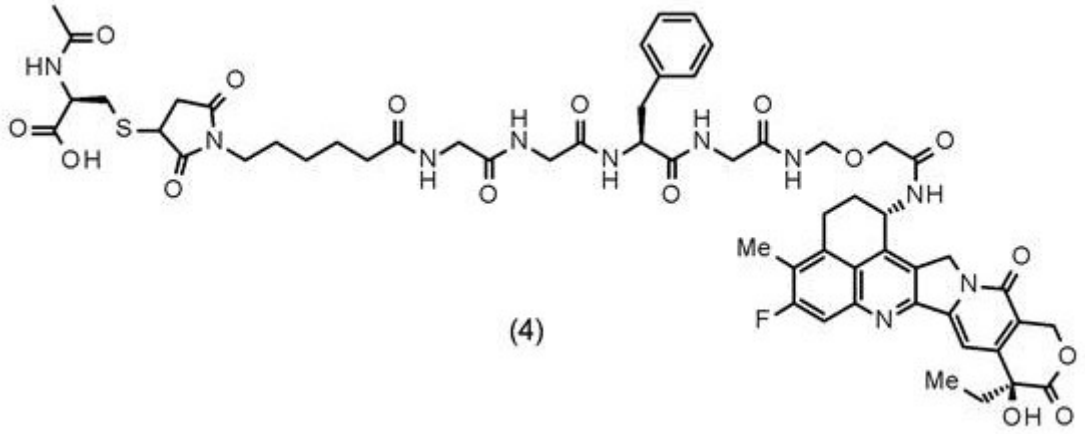
[化学7]



(3)

以及由式(4)表示的化合物

[化学8]



(4)

。

[0068] [56]根据[55]的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0069] [57]根据[56]的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将缓冲溶液的pH

调整至6至8。

[0070] [58]根据[56]或[57]的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0071] [59]根据[55]至[58]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0072] [60]根据[59]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0073] [61]根据[56]至[60]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0074] [62]根据[61]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0075] [63]根据[61]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0076] [64]根据[55]至[63]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0077] [65]根据[55]至[63]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0078] [66]根据[55]至[63]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0079] [67]根据[55]至[63]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0080] [68]根据[55]至[63]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0081] [69]根据[55]至[68]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0082] [70]根据[55]至[68]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为约0.5重量%。

[0083] [71]根据[55]至[68]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0084] [72]根据[55]至[68]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为0.5重量%。

[0085] [73]根据[55]至[72]中任一项的生产方法,其包括在步骤(iv)之后的步骤:

(v)通过使用组氨酸缓冲溶液的超滤来去除氯化钠。

[0086] [74]根据[73]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0087] [75]根据[73]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0088] [76]根据[73]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0089] [77]根据[73]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0090] [78]根据[73]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0091] [79]根据[73]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0092] [80]根据[55]至[79]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0093] [81]根据[55]至[79]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0094] [82]根据[55]至[81]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0095] [83]根据[82]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0096] [84]根据[82]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0097] [85]根据[55]至[81]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0098] [86]根据[85]的生产方法,其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0099] [87]根据[86]的生产方法,其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0100] [88]根据[55]至[81]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0101] [89]根据[88]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0102] [90]根据[89]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0103] [91]根据[55]至[81]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0104] [92]根据[91]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0105] [93]根据[92]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0106] [94]根据[55]至[93]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0107] [95]根据[94]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0108] [96]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[55]至[95]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0109] [97]根据[96]的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0110] [98]根据[96]或[97]的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

[0111] [99]根据[96]或[97]的生产方法，其中所述赋形剂是海藻糖。

[0112] [100]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法，其通过经由根据[96]至[99]中任一项的生产方法，来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物，然后

执行以下步骤

(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

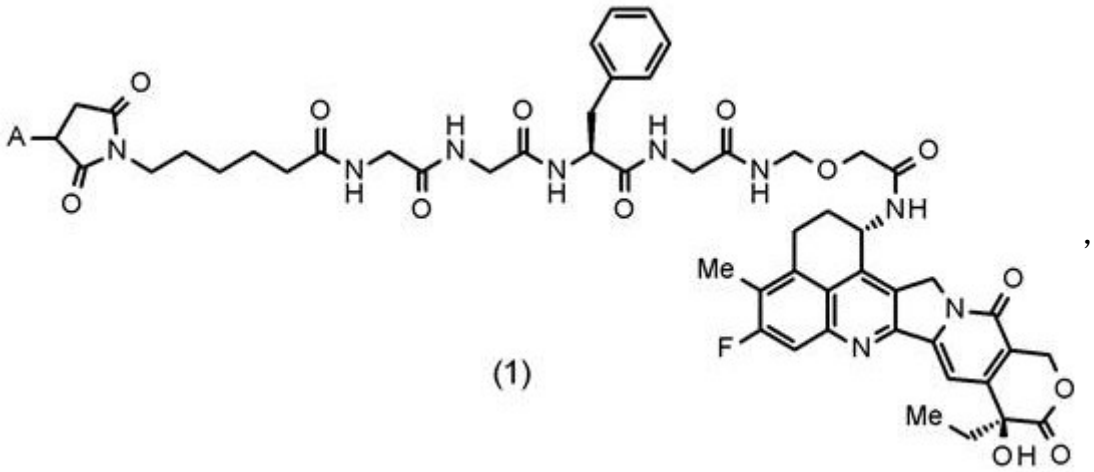
[0113] [101]根据[100]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0114] [102]根据[100]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0115] [103]一种用于生产抗体-药物缀合物的方法，其中

由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合

[化学9]



(1)

,

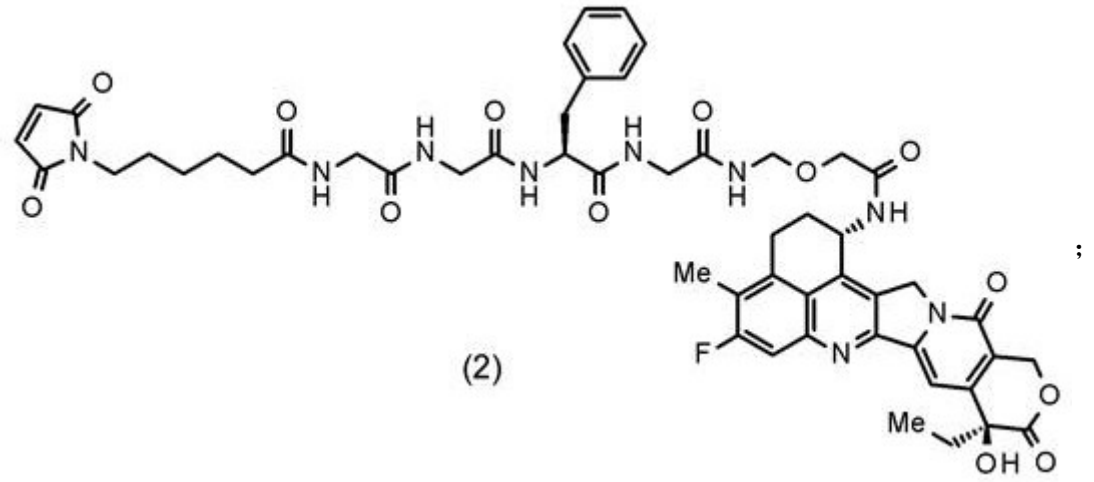
其中A表示与抗体的连接位置，

通过经由以下步骤获得含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液：

(i)用还原剂还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学10]



(2)

;

然后

(iii)加入具有硫醇基的试剂，和

通过以下步骤纯化含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液：

(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液，通过超滤去除其中步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物、以及其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物。

[0116] [104]根据[103]的生产方法，其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦或其盐。

[0117] [105]根据[103]的生产方法，其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

[0118] [106]根据[103]至[105]中任一项的生产方法，其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0119] [107]根据[106]的生产方法，其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液，将缓冲溶液的pH调整至6至8。

[0120] [108]根据[106]或[107]的生产方法，其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0121] [109]根据[103]至[108]中任一项的生产方法，其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0122] [110]根据[109]的生产方法，其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0123] [111]根据[106]至[110]中任一项的生产方法，其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0124] [112]根据[111]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0125] [113]根据[111]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0126] [114]根据[103]至[113]中任一项的生产方法，其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂是N-乙酰半胱氨酸。

[0127] [115]根据[103]至[114]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0128] [116]根据[103]至[114]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0129] [117]根据[103]至[114]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0130] [118]根据[103]至[114]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0131] [119]根据[103]至[114]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0132] [120]根据[103]至[119]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0133] [121]根据[103]至[120]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0134] [122]根据[103]至[120]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为约0.5重量%。

[0135] [123]根据[103]至[120]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓

冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0136] [124]根据[103]至[120]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为0.5重量%。

[0137] [125]根据[103]至[124]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐是氯化钠。

[0138] [126]根据[103]至[125]中任一项的生产方法，其包括在步骤(iv)之后的步骤：

(v)通过使用缓冲溶液的超滤来去除由强酸和强碱组成的盐。

[0139] [127]根据[126]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0140] [128]根据[126]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0141] [129]根据[126]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0142] [130]根据[126]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0143] [131]根据[126]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0144] [132]根据[126]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0145] [133]根据[126]至[132]中任一项的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0146] [134]根据[103]至[133]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0147] [135]根据[103]至[133]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0148] [136]根据[103]至[135]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0149] [137]根据[136]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0150] [138]根据[136]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0151] [139]根据[103]至[135]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0152] [140]根据[139]的生产方法，其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0153] [141]根据[140]的生产方法，其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0154] [142]根据[103]至[135]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0155] [143]根据[142]的生产方法，其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体，所

述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0156] [144]根据[143]的生产方法，其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0157] [145]根据[103]至[135]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0158] [146]根据[145]的生产方法，其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0159] [147]根据[146]的生产方法，其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0160] [148]根据[103]至[147]中任一项的生产方法，其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0161] [149]根据[148]的生产方法，其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0162] [150]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法，其通过经由根据[103]至[149]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物，然后

执行选自以下的至少一个步骤：

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中；

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩；和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH；并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0163] [151]根据[150]的生产方法，其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0164] [152]根据[150]或[151]的生产方法，其中所述赋形剂是蔗糖。

[0165] [153]根据[150]或[151]的生产方法，其中所述赋形剂是海藻糖。

[0166] [154]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法，其通过经由根据[150]至[153]中任一项的生产方法，来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物，然后

执行以下步骤

(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

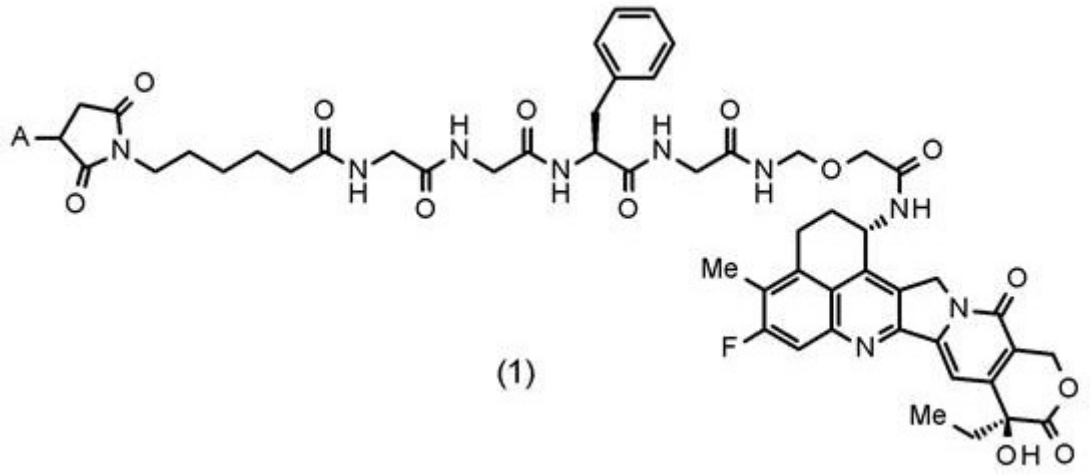
[0167] [155]根据[154]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0168] [156]根据[154]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0169] [157]一种用于生产抗体-药物缀合物的方法，其中

由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合

[化学11]



(1)

，

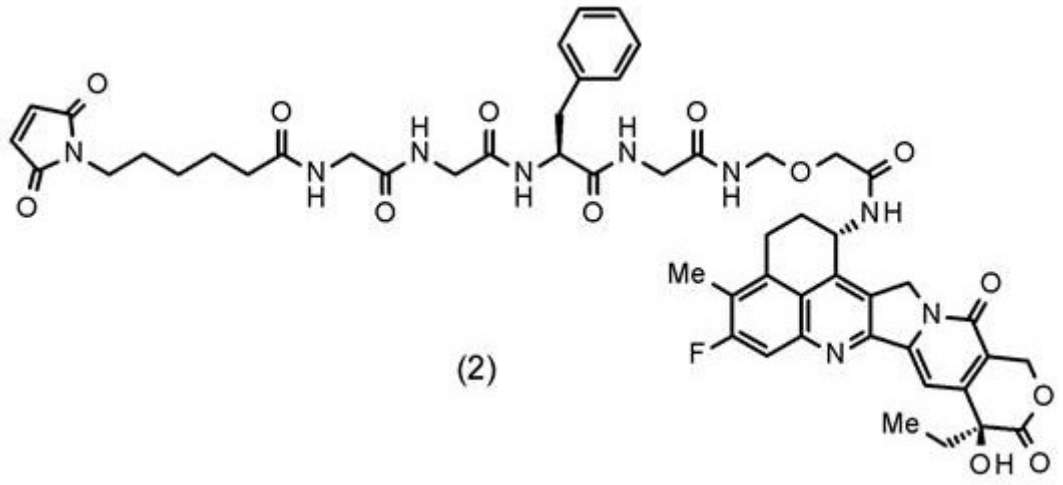
其中A表示与抗体的连接位置，

通过经由以下步骤获得含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液：

(i)用三(2-羧乙基)膦盐酸盐还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学12]



(2)

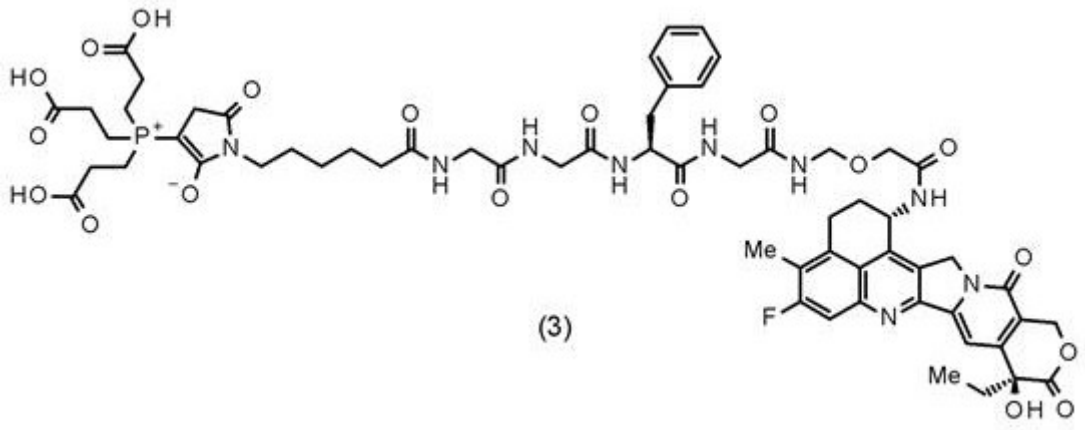
；然后

(iii)加入N-乙酰半胱氨酸，和

通过以下步骤纯化含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液：

(iv)通过使用含有氯化钠的组氨酸缓冲溶液的超滤，来去除由式(3)表示的化合物

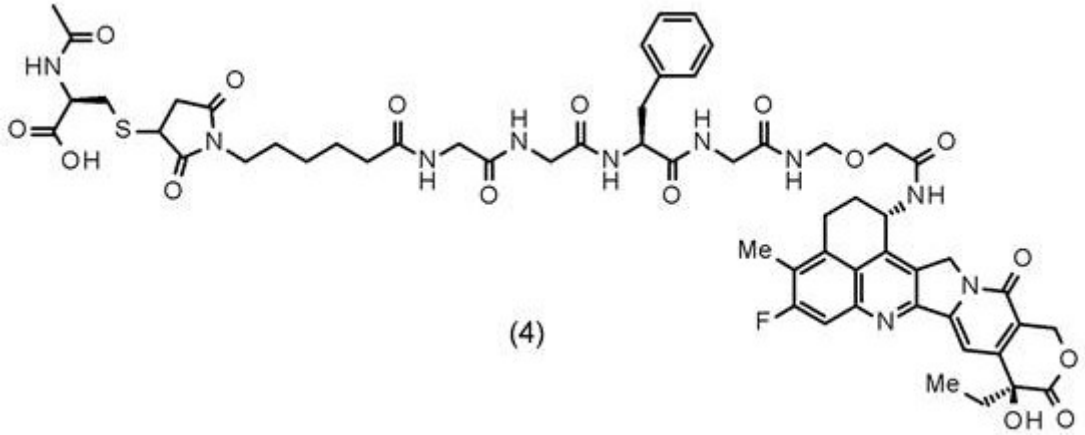
[化学13]



(3)

以及由式(4)表示的化合物

[化学14]



(4)

。

[0170] [158]根据[157]的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0171] [159]根据[158]的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将缓冲溶液的pH调整至6至8。

[0172] [160]根据[158]或[159]的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0173] [161]根据[157]至[160]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0174] [162]根据[161]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0175] [163]根据[158]至[162]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0176] [164]根据[163]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0177] [165]根据[163]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0178] [166]根据[157]至[165]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0179] [167]根据[157]至[165]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0180] [168]根据[157]至[165]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0181] [169]根据[157]至[165]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液

的pH在4.9至5.1的范围内。

[0182] [170]根据[157]至[165]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0183] [171]根据[157]至[170]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0184] [172]根据[157]至[170]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为约0.5重量%。

[0185] [173]根据[157]至[170]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0186] [174]根据[157]至[170]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为0.5重量%。

[0187] [175]根据[157]至[174]中任一项的生产方法，其包括在步骤(iv)之后的步骤：(v)通过使用组氨酸缓冲溶液的超滤来去除氯化钠。

[0188] [176]根据[175]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0189] [177]根据[175]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0190] [178]根据[175]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0191] [179]根据[175]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0192] [180]根据[175]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0193] [181]根据[175]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0194] [182]根据[157]至[181]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0195] [183]根据[157]至[181]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0196] [184]根据[157]至[183]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0197] [185]根据[184]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0198] [186]根据[184]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0199] [187]根据[157]至[183]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0200] [188]根据[187]的生产方法，其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0201] [189]根据[188]的生产方法，其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖

氨酸残基。

[0202] [190]根据[157]至[183]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0203] [191]根据[190]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0204] [192]根据[191]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0205] [193]根据[157]至[183]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0206] [194]根据[193]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0207] [195]根据[194]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0208] [196]根据[157]至[195]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0209] [197]根据[196]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0210] [198]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[157]至[197]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0211] [199]根据[198]的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0212] [200]根据[198]或[199]的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

[0213] [201]根据[198]或[199]的生产方法,其中所述赋形剂是海藻糖。

[0214] [202]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[198]至[201]中任一项的生产方法,来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物,然后

执行以下步骤

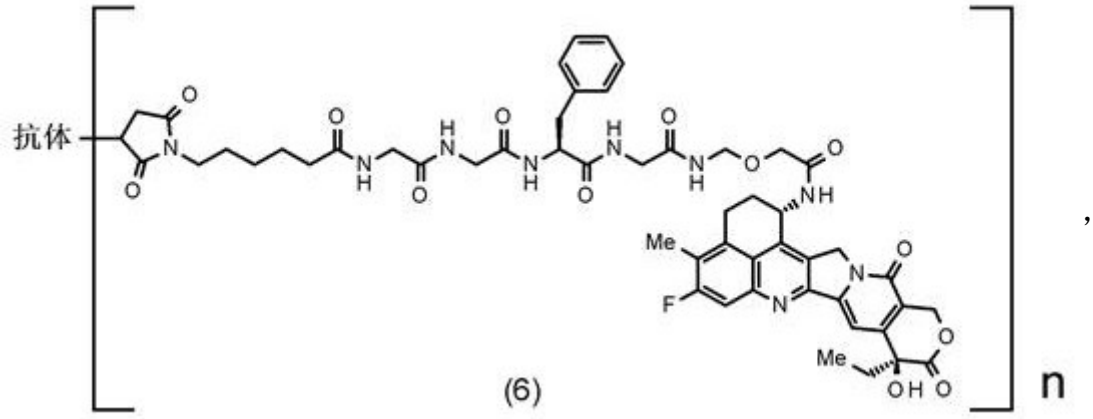
(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

[0215] [203]根据[202]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0216] [204]根据[202]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0217] [205]一种用于生产由式(6)表示的抗体-药物缀合物的方法

[化学15]



,

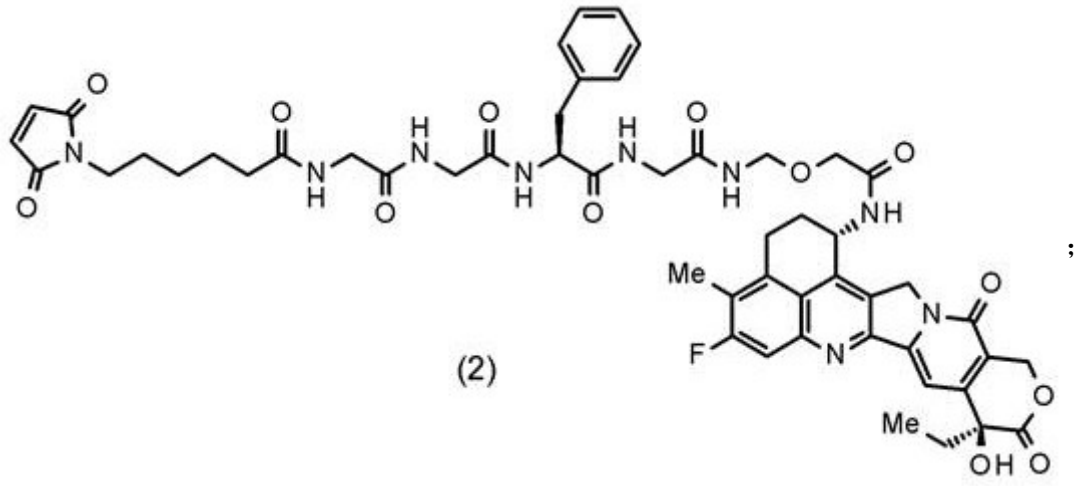
其中药物-接头经由硫醚键与抗体缀合,并且n表示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数,

其中所述方法包括以下步骤:

(i)用还原剂还原抗体;

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学16]



;

(iii)加入具有硫醇基的试剂,以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应;然后

(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液,通过超滤去除其中步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物、以及其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物。

[0218] [206]根据[205]的生产方法,其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦或其盐。

[0219] [207]根据[205]的生产方法,其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

[0220] [208]根据[205]至[207]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0221] [209]根据[208]的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将缓冲溶液的pH调整至6至8。

[0222] [210]根据[208]或[209]的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0223] [211]根据[205]至[210]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0224] [212]根据[211]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0225] [213]根据[208]至[212]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0226] [214]根据[213]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0227] [215]根据[213]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0228] [216]根据[205]至[215]中任一项的生产方法,其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂是N-乙酰半胱氨酸。

[0229] [217]根据[205]至[216]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0230] [218]根据[205]至[216]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0231] [219]根据[205]至[216]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0232] [220]根据[205]至[216]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0233] [221]根据[205]至[216]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0234] [222]根据[205]至[221]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0235] [223]根据[205]至[222]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0236] [224]根据[205]至[222]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为约0.5重量%。

[0237] [225]根据[205]至[222]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0238] [226]根据[205]至[222]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为0.5重量%。

[0239] [227]根据[205]至[226]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐是氯化钠。

[0240] [228]根据[205]至[227]中任一项的生产方法,其包括在步骤(iv)之后的步骤:(v)通过使用缓冲溶液的超滤来去除由强酸和强碱组成的盐。

[0241] [229]根据[228]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0242] [230]根据[228]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0243] [231]根据[228]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的

范围内。

[0244] [232]根据[228]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0245] [233]根据[228]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0246] [234]根据[228]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0247] [235]根据[228]至[234]中任一项的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0248] [236]根据[205]至[235]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0249] [237]根据[205]至[235]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0250] [238]根据[205]至[237]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0251] [239]根据[238]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0252] [240]根据[238]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0253] [241]根据[205]至[237]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0254] [242]根据[241]的生产方法,其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0255] [243]根据[242]的生产方法,其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0256] [244]根据[205]至[237]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0257] [245]根据[244]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0258] [246]根据[245]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0259] [247]根据[205]至[237]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0260] [248]根据[247]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0261] [249]根据[248]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0262] [250]根据[205]至[249]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0263] [251]根据[250]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、

疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0264] [252]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法，其通过经由根据[205]至[251]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物，然后

执行选自以下的至少一个步骤：

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中；

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩；和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH；并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0265] [253]根据[252]的生产方法，其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0266] [254]根据[251]或[252]的生产方法，其中所述赋形剂是蔗糖。

[0267] [255]根据[251]或[252]的生产方法，其中所述赋形剂是海藻糖。

[0268] [256]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法，其通过经由根据[252]至[255]中任一项的生产方法，来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物，然后

执行以下步骤

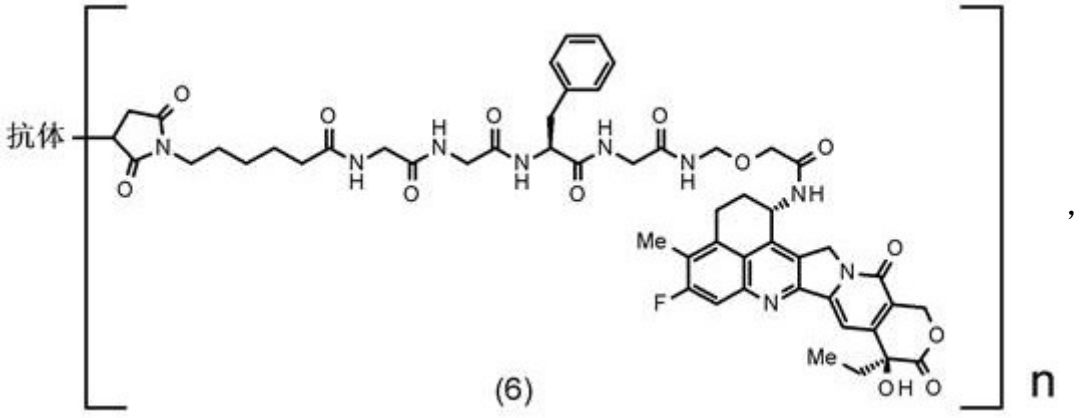
(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

[0269] [257]根据[256]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0270] [258]根据[256]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0271] [259]一种用于生产由式(6)表示的抗体-药物缀合物的方法

[化学17]



，

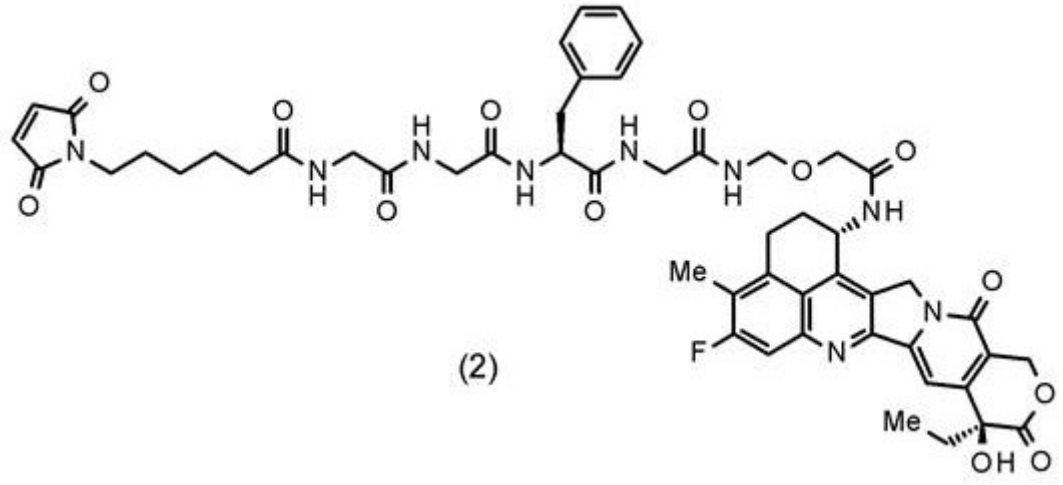
其中药物-接头经由硫醚键与抗体缀合，并且n表示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数，

其中所述方法包括以下步骤：

(i)用三(2-羧乙基)膦盐酸盐还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学18]



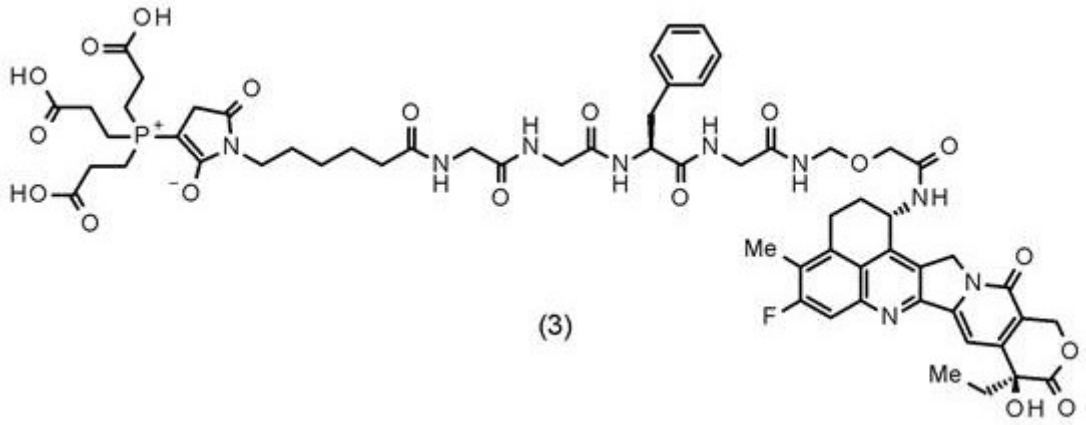
(2)

;

(iii)加入N-乙酰半胱氨酸,以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应;然后

(iv)通过使用含有氯化钠的组氨酸缓冲溶液的超滤,来去除由式(3)表示的化合物

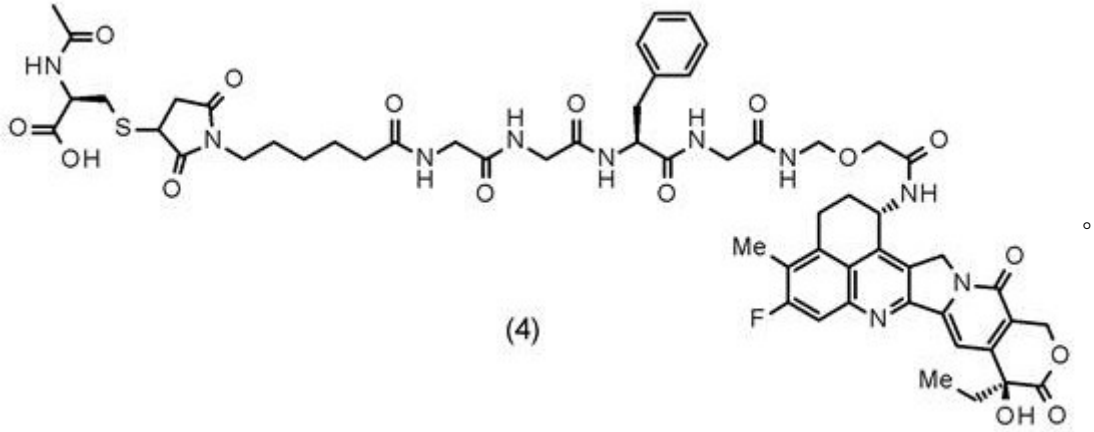
[化学19]



(3)

以及由式(4)表示的化合物

[化学20]



(4)

。

[0272] [260]根据[259]的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0273] [261]根据[260]的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将缓冲溶液的

pH调整至6至8。

[0274] [262]根据[260]或[261]的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0275] [263]根据[259]至[262]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0276] [264]根据[263]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0277] [265]根据[260]至[264]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0278] [266]根据[265]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0279] [267]根据[265]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0280] [268]根据[259]至[267]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0281] [269]根据[259]至[267]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0282] [270]根据[259]至[267]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0283] [271]根据[259]至[267]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0284] [272]根据[259]至[267]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0285] [273]根据[259]至[272]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0286] [274]根据[259]至[272]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为约0.5重量%。

[0287] [275]根据[259]至[272]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0288] [276]根据[259]至[272]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为0.5重量%。

[0289] [277]根据[259]至[276]中任一项的生产方法,其包括在步骤(iv)之后的步骤:(v)通过使用组氨酸缓冲溶液的超滤来去除氯化钠。

[0290] [278]根据[277]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0291] [279]根据[277]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0292] [280]根据[277]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0293] [281]根据[277]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0294] [282]根据[277]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0295] [283]根据[277]的生产方法,其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0296] [284]根据[259]至[283]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0297] [285]根据[259]至[283]中任一项的生产方法,其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0298] [286]根据[259]至[285]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0299] [287]根据[286]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0300] [288]根据[286]的生产方法,其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0301] [289]根据[259]至[285]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0302] [290]根据[289]的生产方法,其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0303] [291]根据[290]的生产方法,其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0304] [292]根据[259]至[285]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0305] [293]根据[292]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0306] [294]根据[293]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0307] [295]根据[259]至[285]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0308] [296]根据[295]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0309] [297]根据[296]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0310] [298]根据[259]至[297]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0311] [299]根据[298]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0312] [300]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[259]至[299]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0313] [301]根据[300]的生产方法，其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0314] [302]根据[300]或[301]的生产方法，其中所述赋形剂是蔗糖。

[0315] [303]根据[300]或[301]的生产方法，其中所述赋形剂是海藻糖。

[0316] [304]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法，其通过经由根据[300]至[303]中任一项的生产方法，来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物，然后

执行以下步骤

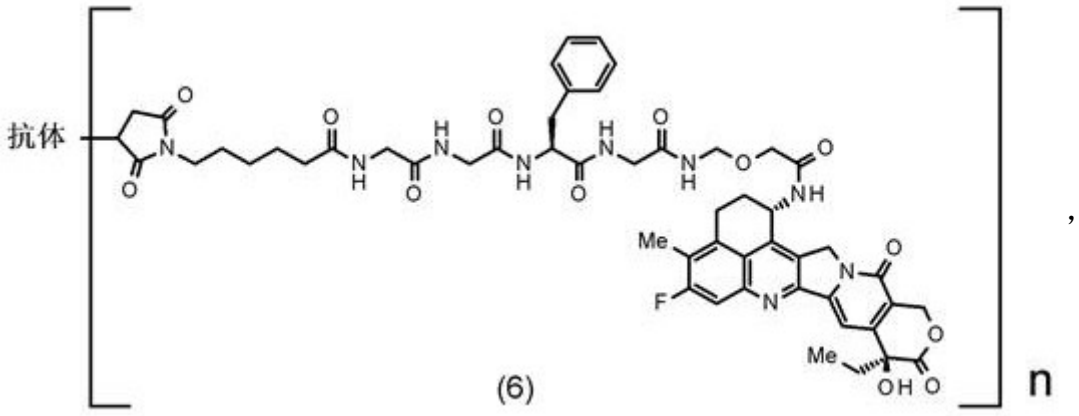
(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

[0317] [305]根据[304]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0318] [306]根据[304]的生产方法，其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0319] [307]一种用于生产由式(6)表示的抗体-药物缀合物的方法

[化学21]



(6)

，

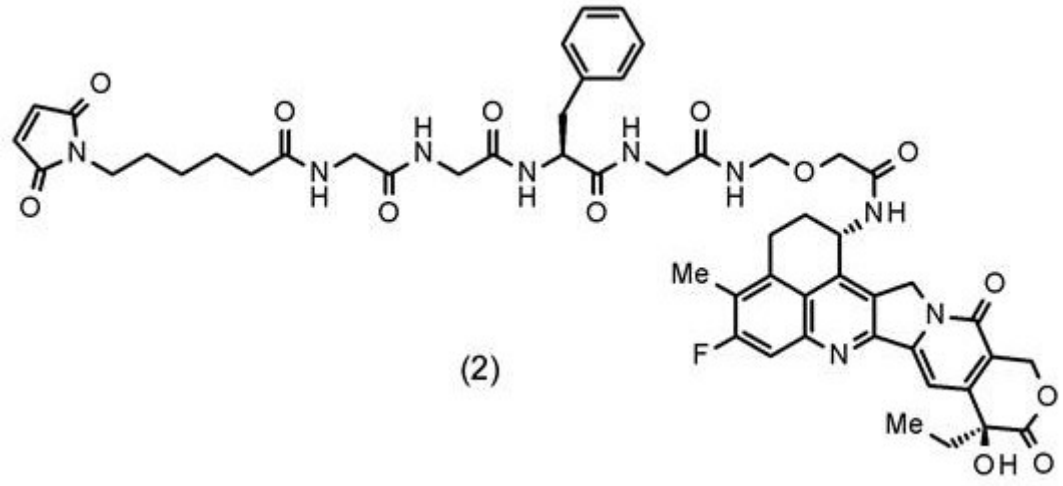
其中药物-接头经由硫醚键与抗体缀合，并且n表示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数，

其中所述方法包括以下步骤：

(i)用还原剂还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学22]



(2)

；然后

(iii)加入具有硫醇基的试剂,以获得含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液,和

通过以下步骤纯化含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液:

(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液,通过超滤去除其中步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物、以及其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物。

[0320] [308]根据[307]的生产方法,其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦或其盐。

[0321] [309]根据[307]的生产方法,其中步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

[0322] [310]根据[307]至[309]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0323] [311]根据[310]的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将缓冲溶液的pH调整至6至8。

[0324] [312]根据[310]或[311]的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0325] [313]根据[307]至[312]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0326] [314]根据[313]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0327] [315]根据[310]至[314]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0328] [316]根据[315]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0329] [317]根据[315]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0330] [318]根据[307]至[317]中任一项的生产方法,其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂是N-乙酰半胱氨酸。

[0331] [319]根据[307]至[318]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0332] [320]根据[307]至[318]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0333] [321]根据[307]至[318]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0334] [322]根据[307]至[318]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0335] [323]根据[307]至[318]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0336] [324]根据[307]至[323]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0337] [325]根据[307]至[324]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0338] [326]根据[307]至[324]中任一项的生产方法,其中相对于步骤(iv)中使用的缓

冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为约0.5重量%。

[0339] [327]根据[307]至[324]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0340] [328]根据[307]至[324]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐的浓度为0.5重量%。

[0341] [329]根据[307]至[328]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的由强酸和强碱组成的盐是氯化钠。

[0342] [330]根据[307]至[329]中任一项的生产方法，其包括在步骤(iv)之后的步骤：(v)通过使用缓冲溶液的超滤来去除由强酸和强碱组成的盐。

[0343] [331]根据[330]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0344] [332]根据[330]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0345] [333]根据[330]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0346] [334]根据[330]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0347] [335]根据[330]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0348] [336]根据[330]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0349] [337]根据[330]至[336]中任一项的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0350] [338]根据[307]至[337]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0351] [339]根据[307]至[337]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0352] [340]根据[307]至[339]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0353] [341]根据[340]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0354] [342]根据[340]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0355] [343]根据[307]至[339]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0356] [344]根据[343]的生产方法，其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0357] [345]根据[344]的生产方法，其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0358] [346]根据[307]至[339]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0359] [347]根据[346]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0360] [348]根据[347]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0361] [349]根据[307]至[339]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0362] [350]根据[349]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0363] [351]根据[350]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0364] [352]根据[307]至[351]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0365] [353]根据[352]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0366] [354]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[307]至[353]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0367] [355]根据[354]的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0368] [356]根据[354]或[355]的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

[0369] [357]根据[354]或[355]的生产方法,其中所述赋形剂是海藻糖。

[0370] [358]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[354]至[357]中任一项的生产方法,来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物,然后

执行以下步骤

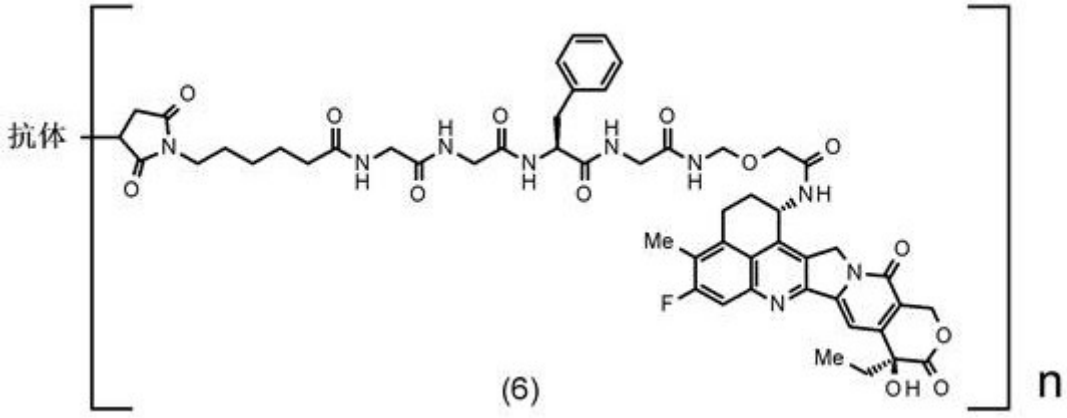
(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

[0371] [359]根据[358]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0372] [360]根据[358]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0373] [361]一种用于生产由式(6)表示的抗体-药物缀合物的方法

[化学23]



(6)

，

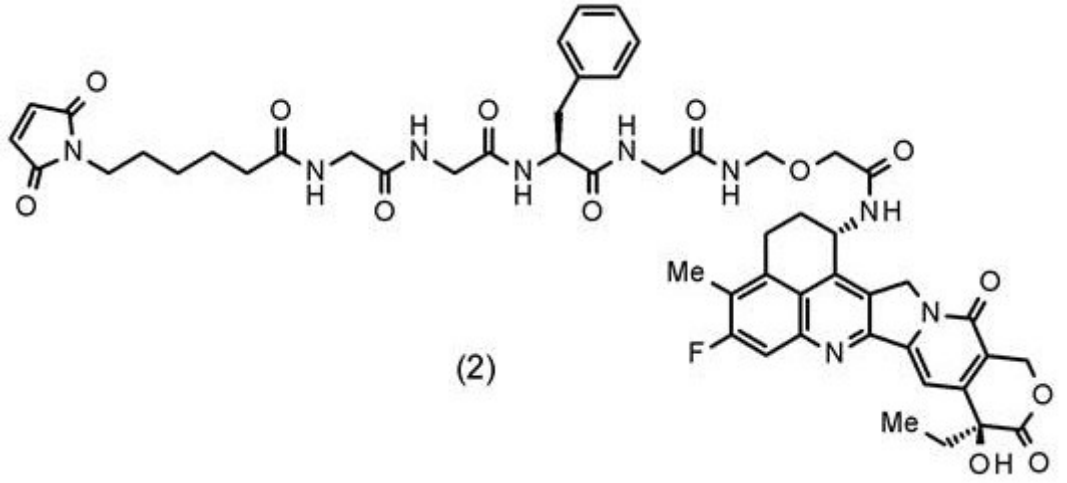
其中药物-接头经由硫醚键与抗体缀合，并且n表示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数，

其中所述方法包括以下步骤：

(i)用三(2-羧乙基)膦盐酸盐还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学24]



(2)

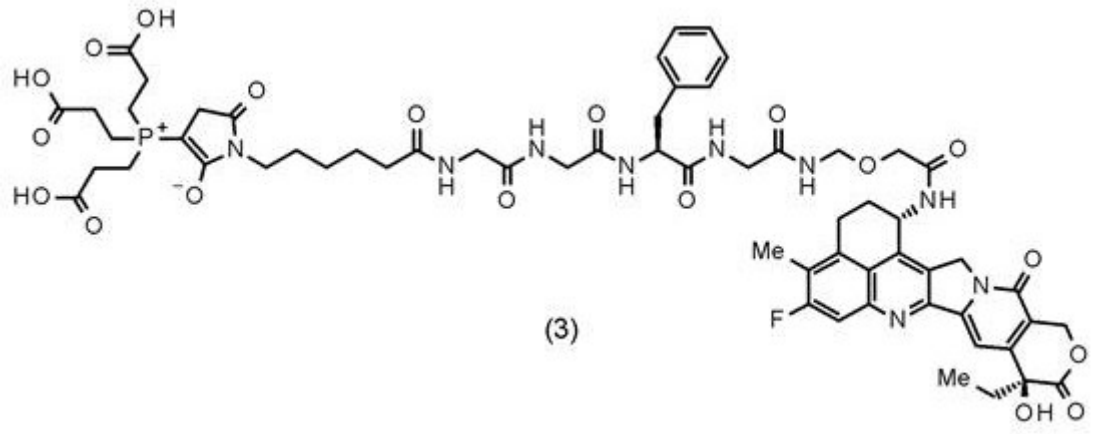
；然后

(iii)加入N-乙酰半胱氨酸，以获得含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液，和

通过以下步骤纯化含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液：

(iv)通过使用含有氯化钠的组氨酸缓冲溶液的超滤，来去除由式(3)表示的化合物

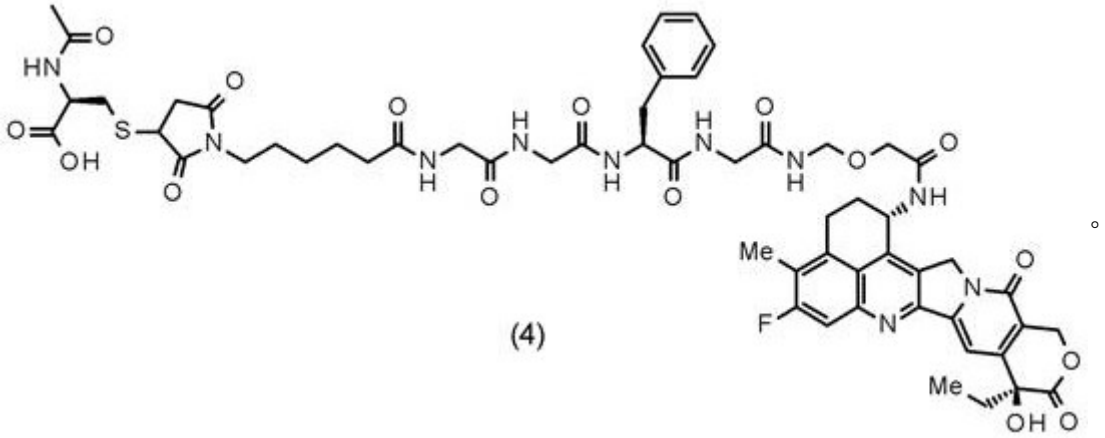
[化学25]



(3)

以及由式(4)表示的化合物

[化学26]



(4)

。

[0374] [362]根据[361]的生产方法,其中步骤(i)在缓冲溶液中执行。

[0375] [363]根据[362]的生产方法,其中通过使用磷酸氢二钠的水溶液,将缓冲溶液的pH调整至6至8。

[0376] [364]根据[362]或[363]的生产方法,其中所述缓冲溶液是乙酸盐缓冲溶液。

[0377] [365]根据[361]至[364]中任一项的生产方法,其中步骤(i)在螯合剂的存在下执行。

[0378] [366]根据[365]的生产方法,其中所述螯合剂是乙二胺四乙酸。

[0379] [367]根据[362]至[366]中任一项的生产方法,其中步骤(i)中使用的缓冲溶液含有表面活性剂。

[0380] [368]根据[367]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0381] [369]根据[367]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0382] [370]根据[361]至[369]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0383] [371]根据[361]至[369]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0384] [372]根据[361]至[369]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0385] [373]根据[361]至[369]中任一项的生产方法,其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液

的pH在4.9至5.1的范围内。

[0386] [374]根据[361]至[369]中任一项的生产方法，其中步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0387] [375]根据[361]至[374]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.2重量%至1重量%的范围内。

[0388] [376]根据[361]至[374]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为约0.5重量%。

[0389] [377]根据[361]至[374]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度在0.4重量%至0.6重量%的范围内。

[0390] [378]根据[361]至[374]中任一项的生产方法，其中相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液，步骤(iv)中使用的氯化钠的浓度为0.5重量%。

[0391] [379]根据[361]至[378]中任一项的生产方法，其包括在步骤(iv)之后的步骤：(v)通过使用组氨酸缓冲溶液的超滤来去除氯化钠。

[0392] [380]根据[379]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4至6的范围内。

[0393] [381]根据[379]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为约5。

[0394] [382]根据[379]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.7至5.3的范围内。

[0395] [383]根据[379]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.8至5.2的范围内。

[0396] [384]根据[379]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH在4.9至5.1的范围内。

[0397] [385]根据[379]的生产方法，其中步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH为5.0。

[0398] [386]根据[361]至[385]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内。

[0399] [387]根据[361]至[385]中任一项的生产方法，其中所述抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7.5至8的范围内。

[0400] [388]根据[361]至[387]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER2抗体。

[0401] [389]根据[388]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成。

[0402] [390]根据[388]的生产方法，其中所述抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0403] [391]根据[361]至[387]中任一项的生产方法，其中所述抗体是抗HER3抗体。

[0404] [392]根据[391]的生产方法，其中所述抗HER3抗体是包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成。

[0405] [393]根据[392]的生产方法，其中所述抗HER3抗体缺少在重链的羧基末端处的赖

氨酸残基。

[0406] [394]根据[361]至[387]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗GPR20抗体。

[0407] [395]根据[394]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成。

[0408] [396]根据[395]的生产方法,其中所述抗GPR20抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0409] [397]根据[361]至[387]中任一项的生产方法,其中所述抗体是抗CDH6抗体。

[0410] [398]根据[397]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成。

[0411] [399]根据[398]的生产方法,其中所述抗CDH6抗体缺少在重链的羧基末端处的赖氨酸残基。

[0412] [400]根据[361]至[399]中任一项的生产方法,其不包括涉及色谱的纯化步骤。

[0413] [401]根据[400]的生产方法,其中所述色谱是选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种。

[0414] [402]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[361]至[401]中任一项的生产方法来生产抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0415] [403]根据[402]的生产方法,其中所述缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液。

[0416] [404]根据[401]或[402]的生产方法,其中所述赋形剂是蔗糖。

[0417] [405]根据[401]或[402]的生产方法,其中所述赋形剂是海藻糖。

[0418] [406]一种用于生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物的方法,其通过经由根据[402]至[405]中任一项的生产方法,来生产含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液和赋形剂的药物组合物,然后

执行以下步骤

(x)将表面活性剂加入药物组合物中。

[0419] [407]根据[406]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0420] [408]根据[406]的生产方法,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯20。

[0421] [409]一种抗体-药物缀合物,其通过根据[1]至[47]、[55]至[95]、[103]至[149]、[157]至[197]、[205]至[251]、[259]至[299]、[307]至[353]以及[361]至[401]中任一项的生产方法来生产。

[0422] [410]一种药物组合物,其通过根据[48]至[54]、[96]至[102]、[150]至[156]、[198]至[204]、[252]至[258]、[300]至[306]、[354]至[360]以及[402]至[408]中任一项的生产方法来生产。

[0423] 发明的有利效果

本发明可以提供用于生产抗体-药物缀合物的方法，其包括用于有效地去除由式(2)表示的化合物衍生的副产物的纯化步骤，并且抑制聚集物生成。另外，本发明可以提供用于生产含有抗体-药物缀合物的药物组合物的工业上极佳的方法。

[0424] 附图简述

[图1]图1是显示了当用组氨酸缓冲溶液(pH 5.0)、或含0.5%氯化钠的组氨酸缓冲溶液(pH 5.0)执行超滤时，化合物(3)和化合物(4)含量的图解。

[0425] [图2]图2是显示了当用组氨酸缓冲溶液(pH 5.0或pH 5.8)、或含0.4%氯化钠的组氨酸缓冲溶液(pH 5.0或pH 5.8)执行超滤时，聚集物含量的图解。

[0426] [图3]图3是显示了抗HER2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的图解。

[0427] [图4]图4是显示了抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的图解。

[0428] [图5]图5是显示了抗HER3抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)的图解。

[0429] [图6]图6是显示了抗HER3抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)的图解。

[0430] [图7]图7是显示了抗GPR20抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)的图解。

[0431] [图8]图8是显示了抗GPR20抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)的图解。

[0432] [图9]图9是显示了抗CDH6抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)的图解。

[0433] [图10]图10是显示了抗CDH6抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)的图解。

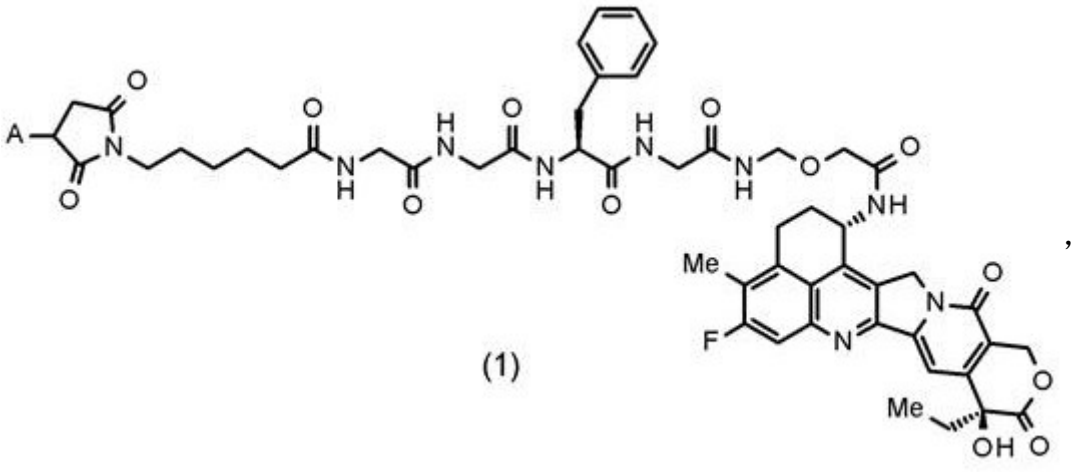
[0434] 实施方案的描述

下文参考附图描述了用于进行本发明的优选模式。下文描述的实施方案仅给出用于说明本发明的典型实施方案的一个实例，并不预期限制本发明的范围。

[0435] 1. 抗体-药物缀合物

通过本发明生产的抗体-药物缀合物是这样的抗体-药物缀合物，其中由式(1)表示的药物-接头经由硫醚键与抗体缀合

[化学27]



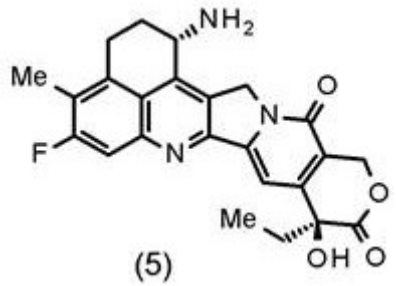
其中A表示与抗体的连接位置。

[0436] 在本发明中，抗体-药物缀合物中由接头和药物组成的部分结构称为“药物-接头”。药物-接头与在抗体中的链间二硫键位点(重链之间的两个位点、以及重链与轻链之间的两个位点)处形成的硫醇基(换言之，半胱氨酸残基的硫原子)连接。

[0437] 通过本发明生产的抗体-药物缀合物的药物-接头包括依沙替康作为组分，所述依

沙替康是拓扑异构酶I抑制剂。依沙替康是由式(5)表示的、具有抗肿瘤效应的喜树碱衍生物：

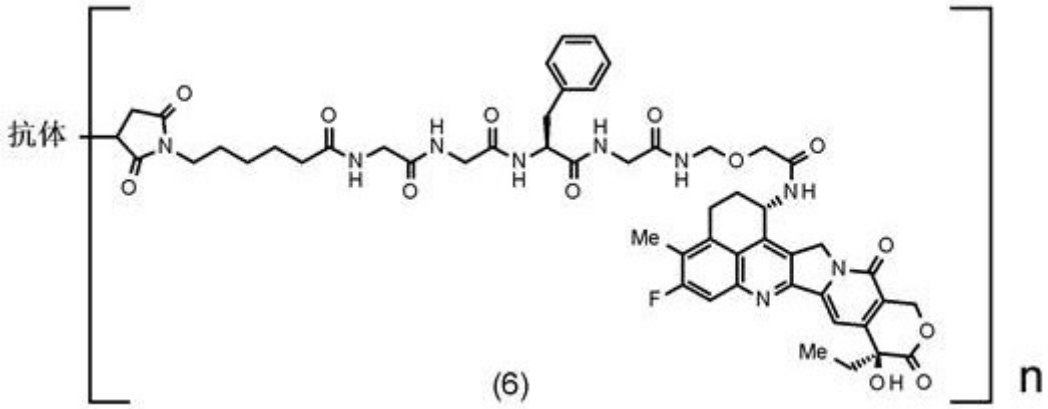
[化学28]



(5)

通过本发明生产的抗体-药物缀合物也可以由式(6)表示：

[化学29]

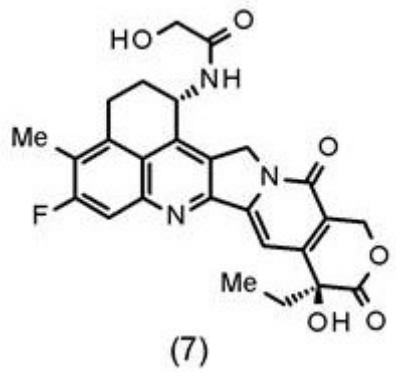


(6)

其中所述药物-接头经由硫醚键与抗体缀合。n的含义与所谓的缀合药物分子的平均数(DAR;药物/抗体比)相同,并且指示每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数。

[0438] 在迁移到癌细胞内之后,通过本发明生产的抗体-药物缀合物释放由式(7)表示的化合物：

[化学30]

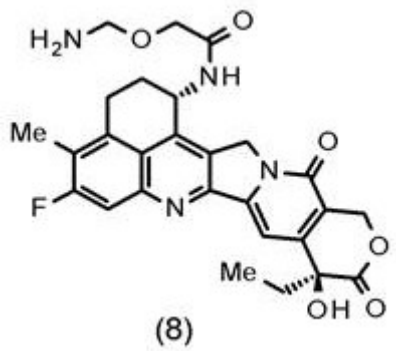


(7)

推断由式(7)表示的化合物是通过本发明生产的抗体-药物缀合物的抗肿瘤活性的原始来源,并且已确认具有拓扑异构酶I抑制效应(Ogitani Y.等人,Clinical Cancer Research,2016,Oct 15;22(20):5097-5108,Epub 2016年3月29日)。

[0439] 推断由式(7)表示的化合物通过由式(8)表示的化合物的缩胺醛结构分解而形成：

[化学31]



(8)

推测其通过在由本发明生产的抗体-药物缀合物的接头部分处的切割而形成。

[0440] 还已知通过本发明生产的抗体-药物缀合物具有旁观者效应(Ogitani Y.等人，Cancer Science(2016)107,1039-1046)。旁观者效应通过这样的过程而发挥，使得通过本发明生产的抗体-药物缀合物在表达靶的癌细胞中内在化，并且释放的由式(7)表示的化合物，并然后还对癌细胞发挥抗肿瘤作用，所述癌细胞存在于附近并且不表达靶。

[0441] 2．用于生产抗体-药物缀合物的抗体

用于生产本发明的抗体-药物缀合物的抗体可以衍生自任何物种，并且优选衍生自人、大鼠、小鼠或兔的抗体。在其中抗体衍生自除人物种外的物种的情况下，它优选使用众所周知的技术进行嵌合或人源化。本发明的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体，并且优选是单克隆抗体。

[0442] 用于生产本发明的抗体-药物缀合物的抗体是优选具有能够靶向癌细胞的特征的抗体，并且优选是具有例如识别癌细胞的特性、与癌细胞结合的特性、在癌细胞中掺入且内在化的特性、和/或针对癌细胞的杀细胞活性的抗体。

[0443] 抗体针对癌细胞的结合活性可以使用流式细胞术加以确认。抗体内在化到癌细胞内可以使用以下加以确认：(1)使用与治疗性抗体结合的二抗(荧光标记的)，在荧光显微镜下显现掺入细胞中的抗体的测定(Cell Death and Differentiation(2008)15,751-761)，(2)使用与治疗性抗体结合的二抗(荧光标记的)，测量掺入细胞中的荧光强度的测定(Molecular Biology of the Cell，第15卷，5268-5282，2004年12月)，或(3)使用与治疗性抗体结合的免疫毒素的Mab-ZAP测定，其中毒素在掺入细胞内之后释放，以抑制细胞生长(Bio Techniques 28:162-165，2000年1月)。作为免疫毒素，可以使用白喉毒素催化结构域和蛋白G的重组复合蛋白质。

[0444] 抗体的抗肿瘤活性可以通过确定针对细胞生长的抑制活性在体外加以确认。例如，培养过表达关于该抗体的靶蛋白的癌细胞系，并且将该抗体以不同的浓度加入培养系统内，以确定针对灶形成、集落形成和球状体生长的抑制活性。抗肿瘤活性可以例如通过以下在体内加以确认：将抗体施用于具有高度表达靶蛋白的移植癌细胞系的裸鼠，并且确定癌细胞中的变化。

[0445] 由于在抗体-药物缀合物中缀合的化合物发挥抗肿瘤效应，因此抗体本身应该具有抗肿瘤效应是优选但不是必需的。为了特异性和选择性地发挥抗肿瘤化合物针对癌细胞的细胞毒性活性的目的，抗体应该具有被内在化以迁移到癌细胞内的特性是重要以及优选的。

[0446] 可以通过本领域已知的程序获得用于生产本发明的抗体-药物缀合物的抗体。例

如,可以使用本领域通常进行的方法获得本发明的抗体,所述方法涉及用抗原多肽免疫动物,并且收集且纯化在体内产生的抗体。抗原的起源并不限于人,并且可以用衍生自非人动物如小鼠、大鼠等等的抗原来免疫动物。在这种情况下,可以测试与获得的异源抗原结合的抗体与人抗原的交叉反应性,以筛选适用于人疾病的抗体。

[0447] 可替代地,根据本领域已知的方法,使产生针对抗原的抗体的抗体生产细胞与骨髓瘤细胞融合(例如,Kohler和Milstein,Nature(1975)256,第495-497页;以及Kennet,R编辑,Monoclonal Antibodies,第365-367页,Plenum Press,N.Y.(1980)),以建立从而可以由其获得单克隆抗体的杂交瘤。

[0448] 可以通过对宿主细胞进行遗传改造,以产生编码抗原蛋白的基因来获得抗原。具体地,制备允许表达抗原基因的载体,并且将其转移至宿主细胞,使得该基因被表达。因此表达的抗原可以进行纯化。也可以通过用上述遗传改造的抗原表达细胞或表达抗原的细胞系,免疫动物的方法来获得抗体。

[0449] 用于生产本发明的抗体-药物缀合物的抗体优选是通过目的为降低对人的异源抗原性的人工修饰而获得的重组抗体,例如嵌合抗体或人源化抗体,或者优选是仅具有衍生自人的抗体的基因序列的抗体,即人抗体。这些抗体可以使用已知方法来产生。

[0450] 作为嵌合抗体,可以例示的是其中抗体可变区和恒定区衍生自不同物种的抗体,例如,其中小鼠或大鼠衍生的抗体可变区与人衍生的抗体恒定区连接的嵌合抗体(Proc. Natl. Acad. Sci. USA,81,6851-6855,(1984))。

[0451] 作为人源化抗体,可以例示的是通过仅将异源抗体的互补决定区(CDR)整合到人衍生的抗体内而获得的抗体(Nature(1986)321,第522-525页),以及通过CDR移植方法(WO 90/07861),通过将异源抗体的构架以及异源抗体的CDR序列的氨基酸残基的部分移植到人抗体而获得的抗体,以及使用基因转换诱变策略(美国专利号5821337)进行人源化的抗体。

[0452] 作为人抗体,可以例示的是通过使用具有人染色体片段的人抗体产生小鼠而生成的抗体,所述人染色体片段包括人抗体的重链和轻链的基因(参见Tomizuka,K.等人,Nature Genetics(1997)16,第133-143页;Kuroiwa,Y.等人,Nucl. Acids Res.(1998)26,第3447-3448页;Yoshida,H.等人,Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects第10卷,第69-73页(Kitagawa,Y.,Matsuda,T.和Iijima,S.编辑),Kluwer Academic Publishers,1999;Tomizuka,K.等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000)97,第722-727页等)。作为替代方案,可以例示的是通过噬菌体展示获得的抗体,所述抗体选自人抗体文库(参见Wormstone,I. M.等人,Investigative Ophthalmology & Visual Science.(2002)43(7),第2301-2308页;Carmen,S.等人,Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002),1(2),第189-203页;Siriwardena,D.等人,Ophthalmology(2002)109(3),第427-431页等)。

[0453] 在本发明中,还包括的是用于生产本发明的抗体-药物缀合物的抗体的修饰变体。修饰的变体指通过使根据本发明的抗体经受化学修饰或生物学修饰而获得的变体。化学修饰的变体的实例包括:包含化学部分与氨基酸骨架的键合的变体,包含化学部分与N-联或O-联碳水化合物链的键合的变体等。生物修饰的变体的实例包括:通过翻译后修饰(例如N-联或O-联糖基化、N-末端或C-末端加工、脱酰胺化、天冬氨酸的异构化或甲硫氨酸的氧化)获得的变体,以及其中通过在原核宿主细胞中表达,已将甲硫氨酸残基加入N末端的变体。

进一步地，这样标记以便使得能够检测或分离根据本发明的抗体或抗原的抗体，例如酶标记的抗体、荧光标记的抗体和亲和标记的抗体也包括在修饰变体的含义中。根据本发明的此类抗体的修饰变体可用于改善抗体的稳定性和血液滞留，减少其抗原性，检测或分离抗体或抗原等等。

[0454] 进一步地，通过调节与根据本发明的抗体连接的聚糖的修饰(糖基化、去岩藻糖基化等)，能够增强抗体依赖性细胞毒性活性。作为用于调节抗体的聚糖修饰的技术，已知WO 99/54342、WO 00/61739、WO 02/31140等。然而，该技术并不限于此。在根据本发明的抗体中，还包括的是其中调节聚糖的修饰的抗体。

[0455] 已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失(Journal of Chromatography A,705:129-134(1995))，并且还已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体重链的羧基末端处的两个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸)被缺失，并且新近定位于羧基末端处的脯氨酸残基被酰胺化(Analytical Biochemistry,360:75-83(2007))。然而，重链序列的此类缺失和修饰并不影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能(补体的活化、抗体依赖性细胞的细胞毒性等)。因此，在根据本发明的抗体中，还包括的是经受此类修饰的抗体和抗体的功能片段，以及其中在重链的羧基末端处已缺失一个或两个氨基酸的缺失变体，通过缺失变体的酰胺化获得的变体(例如，其中羧基末端脯氨酸残基已被酰胺化的重链)等等。在根据本发明的抗体重链的羧基末端处具有缺失的缺失变体类型并不限于上述变体，只要抗原结合亲和力和效应子功能得到保留。构成根据本发明的抗体的两条重链可以是选自全长重链和上述缺失变体的一种类型，或者可以是选自其中两种类型的组合。每种缺失变体的量的比率可以受培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件的影响，所述哺乳动物细胞产生根据本发明的抗体。然而，可以优选例示的是这样的抗体，其中在根据本发明的抗体的两条重链中已缺失在羧基末端处的一个氨基酸残基。

[0456] 作为根据本发明的抗体的同种型，例如，可以例示的是IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)，并且可以优选例示的是IgG1或IgG2。

[0457] 适用于产生本发明的抗体-药物缀合物的抗体的实例可以包括但不特别限于抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗CD3抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD37抗体、抗CD56抗体、抗CD98抗体、抗DR5抗体、抗EGFR抗体、抗EPHA2抗体、抗FGFR2抗体、抗FGFR4抗体、抗FOLR1抗体、抗VEGF抗体、抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD70抗体、抗PSMA抗体、抗CEA抗体、抗间皮素抗体、抗A33抗体、抗CanAg抗体、抗Cripto抗体、抗G250抗体、抗MUC1抗体、抗GPNMB抗体、抗整联蛋白抗体、抗肌腱蛋白-C抗体、抗SLC44A4抗体、抗GPR20抗体和抗CDH6抗体。此外，可以优选例示的是抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗TROP2抗体、抗B7-H3抗体、抗GPR20抗体和抗CDH6抗体，并且可以更优选地例示的是抗HER2抗体、抗HER3抗体、抗GPR20抗体和抗CDH6抗体。

[0458] 在本发明中，术语“抗HER2抗体”指这样的抗体，其与HER2(人表皮生长因子受体2型;ErbB-2)特异性结合，并且优选具有通过与HER2结合而在HER2表达细胞中内在化的活性。

[0459] 抗HER2抗体的实例包括曲妥珠单抗(美国专利号5821337)和帕妥珠单抗(国际公开号WO 01/00245)，并且可以优选例示的是曲妥珠单抗。

[0460] 在本发明中，术语“抗HER3抗体”指这样的抗体，其与HER3(人表皮生长因子受体3

型;ErbB-3)特异性结合,并且优选具有通过与HER3结合而在HER3表达细胞中内在化的活性。

[0461] 抗HER3抗体的实例包括patritumab(U3-1287)、U1-59(国际公开号WO 2007/077028)、MM-121(seribantumab)、国际公开号WO 2008/100624中描述的抗ERBB3抗体、RG-7116(鲁妥珠单抗(lumretuzumab))和LJM-716(依更妥单抗(elgemtumab)),并且可以优选例示的是patritumab和U1-59。

[0462] 在本发明中,术语"抗TROP2抗体"指这样的抗体,其与TROP2(TACSTD2:肿瘤相关钙信号转导因子2;EGP-1)特异性结合,并且优选具有通过与TROP2结合而在TROP2表达细胞中内在化的活性。

[0463] 抗TROP2抗体的实例包括hTINA1-H1L1(国际公开号WO 2015/098099)。

[0464] 在本发明中,术语"抗B7-H3抗体"指这样的抗体,其与B7-H3(B细胞抗原#7同系物3;PD-L3;CD276)特异性结合,并且优选具有通过与B7-H3结合而在B7-H3表达细胞中内在化的活性。

[0465] 抗B7-H3抗体的实例包括M30-H1-L4(国际公开号WO 2014/057687)。

[0466] 在本发明中,术语"抗GPR20抗体"指这样的抗体,其与GPR20(G蛋白偶联受体20)特异性结合,并且优选具有通过与GPR20结合而在GPR20表达细胞中内在化的活性。

[0467] 抗GPR20抗体的实例包括h046-H4e/L7(国际公开号WO 2018/135501)。

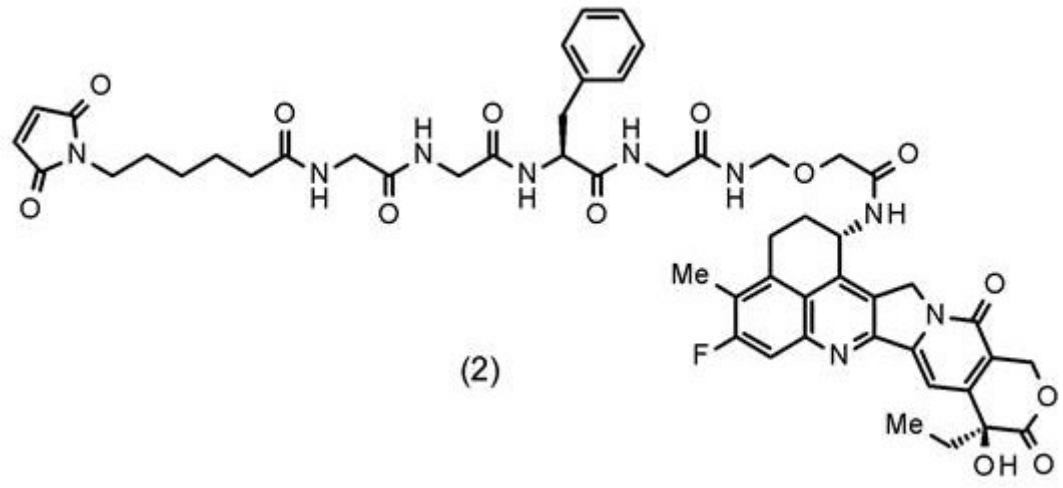
[0468] 在本发明中,术语"抗CDH6抗体"指这样的抗体,其与CDH6(钙粘蛋白-6)特异性结合,并且优选具有通过与CDH6结合而在CDH6表达细胞中内在化的活性。

[0469] 抗CDH6抗体的实例包括H01L02(国际公开号WO 2018/212136)。

[0470] 3. 用于生产抗体-药物缀合物的药物-接头中间产物

用于生产本发明的抗体-药物缀合物的药物-接头中间产物是由式(2)表示的化合物。

[0471] [化学32]



(2)

由式(2)表示的化合物可以参考国际公开号WO 2014/057687、国际公开号WO 2015/098099、国际公开号WO 2015/115091、国际公开号WO 2015/155998、国际公开号WO 2019/044947等等中的描述来生产。

[0472] 4. 抗体和药物-接头中间产物的缀合

在本发明中用于生产抗体-药物缀合物的方法中，抗体和药物-接头中间产物的缀合包括以下步骤：

(i)用还原剂还原抗体；

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应；和

(iii)加入具有硫醇基的试剂，以与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应。

[0473] 步骤(i)中使用的还原剂并无特别限制，只要它能够还原抗体的链间二硫键，并且例如，可以使用三(2-羧乙基)膦或其盐、二硫苏糖醇或2-巯基乙醇，可以优选使用三(2-羧乙基)膦或其盐，并且可以更优选使用三(2-羧乙基)膦盐酸盐。

[0474] 步骤(i)中每个抗体分子使用的还原剂的当量(在下文中，“当量”在本发明中指摩尔当量)，可以根据待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数、以及抗体的类型适当地加以选择。

[0475] 例如，在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER2抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成，或者包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下，每个抗体分子可以优选使用4.1至5.1当量，更优选4.4至4.8当量，甚至更优选约4.6当量的还原剂。在此处，短语“约4.6当量”优选指4.5至4.7当量，并且更优选指4.6当量。

[0476] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER3抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，每个抗体分子可以优选使用5.5至6.5当量，更优选5.8至6.2当量，甚至更优选约6当量的还原剂。在此处，短语“约6当量”优选指5.9至6.1当量，并且更优选指6.0当量。

[0477] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗GPR20抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，每个抗体分子可以优选使用4.3至5.3当量，更优选4.6至5当量，甚至更优选约4.8当量的还原剂。在此处，短语“约4.8当量”优选指4.7至4.9当量，并且更优选指4.8当量。

[0478] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗CDH6抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，每个抗体分子可以优选使用4.3至5.3当量，更优选4.6至5当量，甚至更优选约4.8当量的还原剂。在此处，短语“约4.8当量”优选指4.7至4.9当量，并且更优选指4.8当量。

[0479] 步骤(i)可以优选在缓冲溶液中执行。

[0480] 步骤(i)中使用的缓冲溶液的pH优选是6至8,更优选6.5至7.5,甚至更优选6.9至7.4,并且甚至更优选7.0至7.3。

[0481] 步骤(i)中使用的缓冲溶液并无特别限制,只要它可以用于还原抗体的链间二硫键,并且例如,可以使用乙酸盐缓冲溶液、组氨酸缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)(在下文中,也称为"PIPES")缓冲溶液、或4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(在下文中,也称为"HEPES")缓冲溶液。

[0482] 例如,在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗HER2抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成,或者包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下,可以优选使用其pH调整为6至8的乙酸盐缓冲溶液,可以更优选使用其pH通过使用磷酸氢二钠的水溶液调整为6至8的乙酸盐缓冲溶液,可以甚至更优选使用其pH通过使用磷酸氢二钠的水溶液调整为6.8至7.8的乙酸盐缓冲溶液,并且可以甚至更优选使用其pH通过使用磷酸氢二钠的水溶液调整为7.3的乙酸盐缓冲溶液。在此处,短语"约7.3"优选指7.1至7.5的范围,更优选指7.2至7.4的范围,并且甚至更优选指7.3。

[0483] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗HER3抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成,或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下,可以优选使用其pH调整为6至8的乙酸盐缓冲溶液,可以更优选使用其pH通过使用磷酸氢二钠的水溶液调整为6至8的乙酸盐缓冲溶液,可以甚至更优选使用其pH通过使用磷酸氢二钠的水溶液调整为6.5至7.5的乙酸盐缓冲溶液,并且可以甚至更优选使用其pH通过使用磷酸氢二钠的水溶液调整为7的乙酸盐缓冲溶液。在此处,短语"约7"优选指6.8至7.2的范围,更优选指6.9至7.1的范围,并且甚至更优选指7.0。

[0484] 此类缓冲溶液的使用可以使聚集物的生成降到最低。步骤(i)中使用的缓冲溶液可以含有衍生自抗体生产的缓冲溶液。

[0485] 步骤(i)优选在螯合剂的存在下执行。螯合剂并无特别限制,只要它可以用于还原抗体的链间二硫键,并且例如,可以使用乙二胺四乙酸(在下文中,也称为"EDTA")、二亚乙基三胺五乙酸或乙二醇醚二胺四乙酸,并且可以优选使用乙二胺四乙酸。

[0486] 优选地,每个抗体分子可以使用1至20当量的螯合剂,每个抗体分子可以更优选使用3至8当量的螯合剂,每个抗体分子可以甚至更优选使用4至6当量的螯合剂,并且每个抗体分子可以甚至更优选使用5当量的螯合剂。

[0487] 步骤(i)中使用的缓冲溶液可以含有表面活性剂。本发明中的术语"表面活性剂"指这样的物质,其具有亲水基团和疏水基团,并且可以用作药物制剂的组分之一。此类表面活性剂的实例包括聚山梨酸酯(包括聚山梨酸酯80(Tween 80)、聚山梨酸酯20(Tween 20)和聚山梨酸酯60(Tween 60))、聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)二醇、聚氧乙烯氢化蓖麻油60、

聚氧乙烯蓖麻油和月桂基硫酸钠，并且可以更优选例示的是聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。

[0488] 在步骤中使用的缓冲溶液(i)中包括表面活性剂或从其中排除表面活性剂，可以根据待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数、以及抗体的类型适当地加以选择。

[0489] 例如，在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER2抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成，或者包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下，步骤(i)中使用的缓冲溶液优选不含表面活性剂。

[0490] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER3抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，步骤(i)中使用的缓冲溶液可以优选含有聚山梨醇酯20。

[0491] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗GPR20抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，步骤(i)中使用的缓冲溶液可以优选含有聚山梨醇酯80。

[0492] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗CDH6抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，步骤(i)中使用的缓冲溶液可以优选含有聚山梨醇酯80。

[0493] 步骤(i)可以优选在25至50℃的内部温度下执行。

[0494] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER2抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成，或者包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下，步骤(i)可以优选在30至40℃的内部温度下执行，并且可以更优选在约35℃的内部温度下执行。在此处，短语“约35℃”优选指33℃至37℃，更优选指34℃至36℃，并且甚至更优选指35℃。

[0495] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7

至8的范围内，并且该抗体是抗HER3抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，步骤(i)可以优选在30至40℃的内部温度下执行，并且可以更优选在约35℃的内部温度下执行。在此处，短语“约35℃”优选指33℃至37℃，更优选指34℃至36℃，并且甚至更优选指35℃。

[0496] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗GPR20抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，步骤(i)可以优选在25至35℃的内部温度下执行，并且可以更优选在约30℃的内部温度下执行。在此处，短语“约30℃”优选指28℃至32℃，更优选指29℃至31℃，并且甚至更优选指30℃。

[0497] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗CDH6抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，步骤(i)可以优选在25至35℃的内部温度下执行，并且可以更优选在约30℃的内部温度下执行。在此处，短语“约30℃”优选指28℃至32℃，更优选指29℃至31℃，并且甚至更优选指30℃。

[0498] 步骤(i)的反应时间优选是1至4小时。

[0499] 步骤(ii)中每个抗体分子使用的由式(2)表示的化合物的当量，可以根据待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数、以及抗体的类型适当地加以选择。

[0500] 例如，在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER2抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成，或者包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下，每个抗体分子可以优选使用8至10当量，更优选8.2至9.2当量，甚至更优选约8.7当量的由式(2)表示的化合物。在此处，短语“约8.7当量”优选指8.5至8.9当量，更优选指8.6至8.8当量，并且甚至更优选指8.7当量。

[0501] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗HER3抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成，所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，每个抗体分子可以优选使用8至10当量，更优选9至10当量，甚至更优选约9.5当量的由式(2)表示的化合物。在此处，短语“约9.5当量”优选指9.3至9.7当量，更优选指9.4至9.6当量，并且甚至更优选指9.5当量。

[0502] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7

至8的范围内，并且该抗体是抗GPR20抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，每个抗体分子可以优选使用8至10当量，更优选8.3至9.3当量，甚至更优选约8.8当量的由式(2)表示的化合物。在此处，短语“约8.8当量”优选指8.6至9.0当量，更优选指8.7至8.9当量，并且甚至更优选指8.8当量。

[0503] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内，并且该抗体是抗CDH6抗体(优选地，包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下，每个抗体分子可以优选使用8至10当量，更优选8.6至9.6当量，甚至更优选约9.1当量的由式(2)表示的化合物。在此处，短语“约9.1当量”优选指8.9至9.3当量，更优选指9.0至9.2当量，并且甚至更优选指9.1当量。

[0504] 处于溶解于溶剂中的状态的由式(2)表示的化合物可以优选加入步骤(i)中获得的反应溶液中。溶剂并无特别限制，只要它可以用于与抗体的结合反应中，并且可以优选使用二甲基亚砜、二甲基亚砜的水溶液、丙酮或丙酮的水溶液，并且可以更优选使用二甲基亚砜的水溶液，并且可以甚至更优选使用二甲基亚砜的80%水溶液。进一步地，这些溶剂中的任一种都可以优选与其中包含的乙酸一起使用。优选地，每个抗体分子可以使用9至10当量的乙酸。

[0505] 步骤(ii)可以优选在5至25℃的内部温度下执行，更优选在10至20℃的内部温度下执行，并且甚至更优选在约15℃的内部温度下执行。在此处，短语“约15℃”优选指13℃至17℃，更优选指14℃至16℃，并且甚至更优选指15℃。

[0506] 步骤(ii)的反应时间优选是0.5至2小时。

[0507] 具有硫醇基的试剂可以在步骤(iii)中与步骤(ii)中由式(2)表示的残留化合物反应。换言之，具有硫醇基的试剂可以用于步骤(iii)中，以猝灭由式(2)表示的化合物的过量部分。

[0508] 步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂并无特别限制，只要它可以与由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基反应，并且例如，可以使用N-乙酰半胱氨酸或半胱氨酸，并且可以优选使用N-乙酰半胱氨酸。

[0509] 在步骤(iii)中，每个抗体分子可以优选使用10至50当量的具有硫醇基的试剂，并且可以更优选使用10至30当量的具有硫醇基的试剂。

[0510] 步骤(iii)可以优选在5至25℃的内部温度下执行，更优选在10至20℃的内部温度下执行，并且甚至更优选在约15℃的内部温度下执行。在此处，短语“约15℃”优选指13℃至17℃，更优选指14℃至16℃，并且甚至更优选指15℃。

[0511] 步骤(iii)的反应时间优选是0.5至2小时。

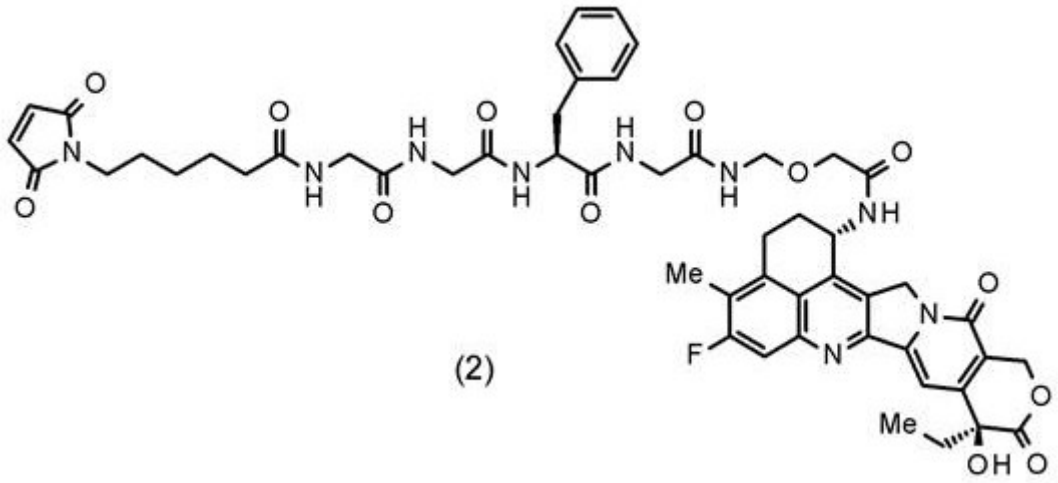
[0512] 5．抗体-药物缀合物的纯化

用于生产本发明中的抗体-药物缀合物的方法的特征在于，通过经由以下步骤获得含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液：

(i)用还原剂还原抗体;

(ii)使由式(2)表示的化合物与步骤(i)中还原的抗体反应

[化学33]



(2)

;然后

(iii)加入具有硫醇基的试剂,

并且通过以下步骤纯化含有抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物的溶液:

(iv)通过使用含有由强酸和强碱组成的盐的缓冲溶液,通过超滤去除其中步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物、以及其中步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物。

[0513] 在本发明中的短语"抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物",指紧在执行步骤(i)至(iii)之后处于未纯化状态的抗体-药物缀合物、或处于通过除色谱外的操作(例如,除超滤外的简单过滤)部分纯化的状态中的抗体-药物缀合物。除超滤外的简单过滤的实例包括微量过滤(用膜滤器的过滤)。

[0514] "抗体-药物缀合物的未纯化产物或粗产物"可以是其pH这样调整的产物,使得在步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH可以达到合适的pH。此类pH调整可以优选地用乙酸的水溶液执行,并且可以更优选用10%的乙酸水溶液执行。

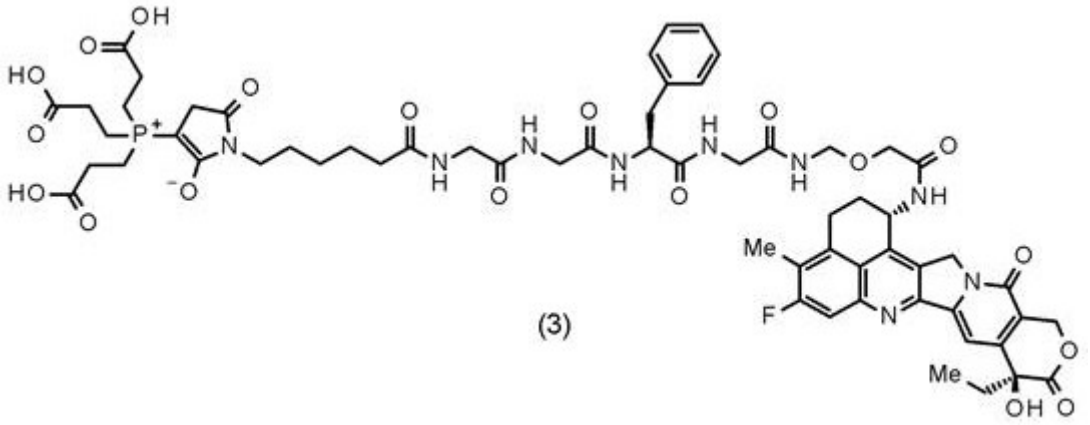
[0515] 在本发明中的术语"超滤"指通过经由孔径为约0.001 μm至约0.05 μm的膜(超滤膜)过滤,将大溶质分子和小溶质分子分开或将溶质分子和溶剂分子分开的纯化方法。一般而言,超滤膜具有在1 kDa至1000 kDa范围内的截留分子量(MWCO)。MWCO一般定义为这样的球形溶质的分子量,使得90%的球形溶质分子被膜保留。本发明中的超滤可以优选通过使用MWCO为1 kDa至100 kDa的超滤膜来执行,并且更优选通过使用MWCO为30 kDa的超滤膜来执行。超滤膜的材料的实例包括再生纤维素、乙酸纤维素、芳香族聚酰胺、聚乙烯醇、聚砜、聚醚砜、聚偏二氟乙烯、聚乙烯、聚丙烯腈、尼龙和陶瓷。本发明中的超滤可以优选通过使用其材料为再生纤维素的超滤膜来执行,尽管该材料并不限于此。用于本发明中的超滤膜的实例可以包括Pellicon(R)XL Cassette Ultracel(R)(由Merck KGaA生产)、Pellicon(R)2 Ultracel(R)(由Merck KGaA生产)、以及Pellicon(R)3 Ultracel(R)(由Merck KGaA生产)。超滤可以指狭义上的通过压力控制或离心来强制过滤的方法。在另一方面,通过被动扩散

的过滤方法一般可以被称为“渗滤”。然而，使用超滤膜的任何方法都包括在本发明的“超滤”范围内。

[0516] 本发明中的术语“聚集物”指这样的细颗粒，其由蛋白质分子和任何其它组分的结合组成，并且可以在宽范围的pH和电导率下是稳定的。抗体-药物缀合物制剂中的聚集物形成可能具有医学上不期望的影响，例如，可能对该制剂待施用于其的患者造成免疫原性病症或静脉病症。相应地，在配制抗体-药物缀合物时需要抑制聚集物的形成。

[0517] 在步骤(i)中使用的还原剂是三(2-羧乙基)膦盐酸盐的情况下，在步骤(i)中使用的还原剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的是由式(3)表示的化合物。

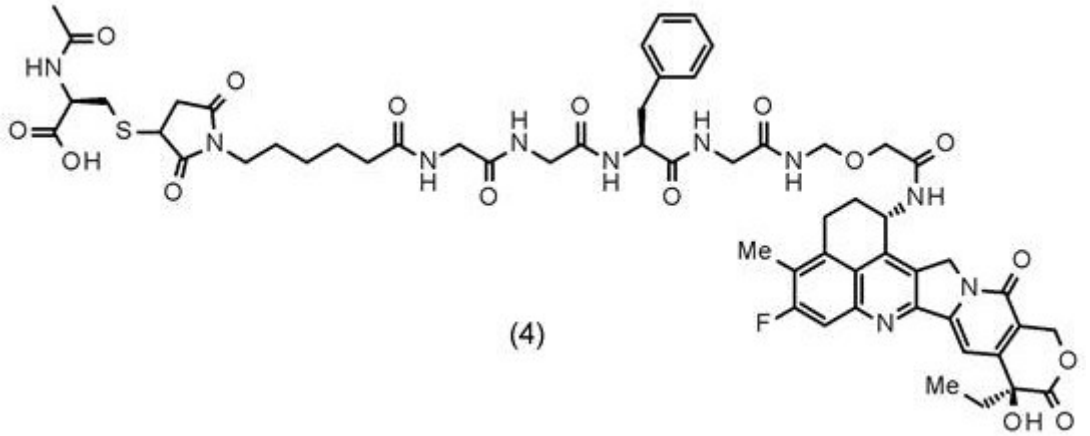
[0518] [化学34]



(3)

在步骤(iii)中使用的具有硫醇基的试剂是N-乙酰半胱氨酸的情况下，其中步骤(iii)中使用具有硫醇基的试剂加成至由式(2)表示的化合物的马来酰亚胺基产生的化合物是由式(4)表示的化合物。

[0519] [化学35]



(4)

通过步骤(iv)可以优选去除在步骤(iv)之前的由式(3)表示的化合物、以及由式(4)表示的化合物的97%，更优选98%，甚至更优选99%，甚至更优选100%。

[0520] 步骤(iv)中使用的缓冲溶液的pH为约5。在此处，“约5”优选是4.7至5.3的范围，更优选是4.8至5.2的范围，甚至更优选是4.9至5.1的范围，并且甚至更优选是5.0。通过在此类pH下的超滤可以抑制聚集物的生成。这个步骤后的聚集物的量优选是4%或更少，且更优选是2%或更少。原材料抗体中含有一定量的聚集物，并且这个步骤中的聚集物的量检测为包括其的总量。

[0521] 步骤(iv)中使用的缓冲溶液的实例包括:含有由强酸和强碱组成的盐的组氨酸缓冲溶液、含有由强酸和强碱组成的盐的乙酸盐缓冲溶液、以及含有由强酸和强碱组成的盐的磷酸盐缓冲溶液,并且可以优选例示的是含有由强酸和强碱组成的盐的组氨酸缓冲溶液。

[0522] 相对于步骤(iv)中使用的缓冲溶液,由强酸和强碱组成的盐的浓度优选是0.2至1重量%,更优选是0.3至0.9重量%,甚至更优选是0.3至0.8重量%,甚至更优选是0.4至0.7重量%,并且甚至更优选是约0.5重量%。在此处,"约0.5重量%"优选是0.4至0.6重量%,并且甚至更优选是0.5重量%。

[0523] 步骤(iv)中使用的缓冲溶液中包含的由强酸和强碱组成的盐并无特别限制,只要显示出本发明的有利效果,并且例如是选自氯化钠、氯化钾、硫酸钠和硫酸钾的至少一种盐,或者作为其中两种或更多种的组合的盐,且优选氯化钠。

[0524] 本发明的生产方法包括在步骤(iv)之后的步骤:(v)通过使用缓冲溶液的超滤来去除由强酸和强碱组成的盐。

[0525] 步骤(v)中使用的缓冲溶液的pH并无特别限制,只要显示出本发明的有利效果,并且例如在4至6的范围内,且优选约5。在此处,"约5"优选是4.7至5.3的范围,甚至更优选是4.8至5.2的范围,甚至更优选是4.9至5.1的范围,并且甚至更优选是5.0。

[0526] 步骤(v)中使用的缓冲溶液并无特别限制,只要显示出本发明的有利效果,并且优选使用组氨酸缓冲溶液。这种组氨酸缓冲溶液基本上不含由强酸和强碱组成的盐。

[0527] 上述方法可以通过超滤来去除由式(2)表示的化合物衍生的副产物,并且进一步使聚集物的生成降到最低,并且可以提供工业上优异的纯化方法,而无需通过色谱(例如,选自凝胶过滤色谱、离子交换色谱、疏水色谱和亲和色谱的至少一种)的纯化。

[0528] 6. 抗体-药物缀合物中的缀合药物分子的平均数的计算

所产生的抗体-药物缀合物的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数,可以例如通过以下进行确定:基于抗体-药物缀合物及其缀合前体在280 nm和370 nm的两个波长下的UV吸光度测量的计算方法(UV方法),或基于通过片段的HPLC测量定量的计算方法(HPLC方法),所述片段通过用还原剂处理抗体-药物缀合物而获得。

[0529] 可以参考国际公开号WO 2014/057687、国际公开号WO 2015/098099、国际公开号WO 2015/115091、国际公开号WO 2015/155998、国际公开号WO 2018/135501、国际公开号WO 2018/212136等等中的描述,来执行抗体-药物缀合物的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数计算。

[0530] HPLC方法可以例如以下述方式执行。

[0531] (1)用于HPLC分析的样品制备(抗体-药物缀合物的还原)

将抗体-药物缀合物溶液(约1 mg/mL,60 μL)与二硫苏糖醇(DTT)的水溶液(100 mM,15 μL)混合。在HPLC分析中使用这样的样品,其中抗体-药物缀合物的链间二硫键已通过使混合物在37℃下温育30分钟进行切割。

[0532] (2)HPLC分析

HPLC分析可以在根据抗体特征的测量条件下执行。

[0533] 例如,在抗体是抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组

成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)、或抗HER3抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成)的情况下,可以在下述测量条件下执行HPLC分析。

HPLC系统:Agilent 1290 HPLC系统(Agilent Technologies,Inc.)

检测器:紫外线吸收光度计(测量波长:280 nm)

柱:PLRP-S(2.1 × 50 mm,8 μm,1000埃;Agilent Technologies,Inc.,P/N PL1912-1802)

柱温:80℃

流动相A:含有0.04%三氟乙酸(TFA)的水溶液

流动相B:含有0.04% TFA的乙腈溶液

梯度程序:29%-36%(0-12.5分钟)、36%-42%(12.5-15分钟)、42%-29%(15-15.1分钟)、29%-29%(15.1-25分钟)

样品注射体积:15 μL。

[0534] 在抗体是抗GPR20抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成)、或抗CDH6抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成)的情况下,可以在下述测量条件下执行HPLC分析。

HPLC系统:Agilent 1290 HPLC系统(Agilent Technologies,Inc.)

检测器:紫外线吸收光度计(测量波长:280 nm)

柱:ACQUITY UPLC BEH Phenyl(2.1 × 50 mm,1.7 μm,130埃;Waters Corporation,P/N 186002884)

柱温:80℃

流动相A:含有0.10%三氟乙酸(TFA)和15% 2-丙醇的水溶液

流动相B:含有0.075% TFA和15% 2-丙醇的乙腈溶液

梯度程序:14%-36%(0-15分钟)、36%-80%(15-17分钟)、80%-14%(17-17.01分钟)、14%(17.01-25分钟)

样品注射体积:10 μL。

[0535] (3)数据分析

与非缀合抗体的轻链(L_0)和重链(H_0)相比,药物缀合的轻链(与一个药物分子连接的轻链:L_1)和重链(与一个药物分子连接的重链:H_1,与两个药物分子连接的重链:H_2,与三个药物分子连接的重链:H_3),显示出与缀合药物分子的数目成比例的更高疏水性,并且因此具有更长的保留时间。因此,这些链按L_0和L_1 或H_0、H_1、H_2和H_3的次序洗脱。通过与L_0和H_0的保留时间的比较,可以将检测峰分配给L_0、L_1、H_0、H_1、H_2和H_3中的任一个。

[0536] 由于药物-接头具有UV吸收,因此使用轻链或重链和药物-接头的摩尔吸光系数,根据下述表达式,响应缀合药物-接头分子的数目来校正峰面积值。

[数学1]

$$\text{轻链（Li）的峰面积的校正值} = \text{峰面积} \times \frac{\text{轻链的摩尔吸光系数}}{\text{轻链的摩尔吸光系数}+\text{缀合药物分子的数目}\times\text{药物-接头的摩尔吸光系数}}$$

[数学2]

$$\text{重链（Hi）的峰面积的校正值} = \text{峰面积} \times \frac{\text{重链的摩尔吸光系数}}{\text{重链的摩尔吸光系数}+\text{缀合药物分子的数目}\times\text{药物-接头的摩尔吸光系数}}$$

[0537] 在此处,关于每种抗体的轻链或重链的摩尔吸光系数(280 nm),可以使用通过已知的计算方法(Protein Science,1995,第4卷,2411-2423),由每种抗体的轻链或重链的氨基酸序列估计的值。

[0538] 例如,在抗体是抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)的情况下,摩尔吸光系数26150和摩尔吸光系数81290可以分别用作轻链和重链的估计值。

[0539] 在抗体是抗HER3抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成)的情况下,摩尔吸光系数34690和摩尔吸光系数95000可以分别用作轻链和重链的估计值。

[0540] 在抗体是抗GPR20抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成)的情况下,摩尔吸光系数26210和摩尔吸光系数68990可以分别用作轻链和重链的估计值。

[0541] 在抗体是抗CDH6抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成)的情况下,摩尔吸光系数31710和摩尔吸光系数79990可以分别用作轻链和重链的估计值。

[0542] 关于药物-接头的摩尔吸光系数(280 nm),可以使用化合物的测量摩尔吸光系数(280 nm),在所述化合物中,马来酰亚胺基通过每种药物-接头中间产物与巯基乙醇或N-乙酰半胱氨酸的反应而转换为琥珀酰亚胺硫醚。

[0543] 根据下述表达式,就峰面积的校正值的总和计算每条链的峰面积比(%)。

[数学3]

$$\text{轻链的峰面积比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{重链的峰面积比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li}, A_{Hi}: L_i, H_i 的分别峰面积的校正值

[0544] 根据下述表达式计算抗体-药物缀合物中的缀合药物分子的平均数。

缀合药物分子的平均数=(L_0峰面积比 × 0 + L_1峰面积比 × 1 + H_0峰面积比 × 0 + H_1峰面积比 × 1 + H_2峰面积比 × 2 + H_3峰面积比 × 3)/100 × 2。

[0545] 在本发明中,术语“抗HER2抗体-药物缀合物”指这样的抗体-药物缀合物,使得在本发明中产生的抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER2抗体。

[0546] 抗HER2抗体优选是包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成,或者包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0547] 在本发明中使用的抗HER2抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选是7至8,更优选是7.5至8,并且甚至更优选是约8。

[0548] 在本发明中,术语“抗HER3抗体-药物缀合物”指这样的抗体-药物缀合物,使得在本发明中产生的抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER3抗体。

[0549] 抗HER3抗体优选是包含重链和轻链的抗体,所述重链包含CDRH1、CDRH2和CDRH3,所述CDRH1由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基26至35组成、所述CDRH2由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基50至65组成、所述CDRH3由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基98至106组成,所述轻链包含CDRL1、CDRL2和CDRL3,所述CDRL1由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基24至39组成、所述CDRL2由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基56至62组成、所述CDRL3由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基95至103组成,

更优选包含重链和轻链的抗体,所述重链包含重链可变区,所述重链可变区由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:3的氨基酸残基1至117组成,所述轻链包含轻链可变区,所述轻链可变区由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:4的氨基酸残基1至113组成,

并且甚至更优选包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成,或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体。

[0550] 抗HER3抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选是7至8,更优选是7.5至8,并且甚至更优选是约8。

[0551] 在本发明中，术语“抗GPR20抗体-药物缀合物”指这样的抗体-药物缀合物，使得在本发明中产生的抗体-药物缀合物中的抗体是抗GPR20抗体。

[0552] 抗GPR20抗体优选是包含重链和轻链的抗体，所述重链包含CDRH1、CDRH2和CDRH3，所述CDRH1由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基45至54组成、所述CDRH2由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基69至78组成、所述CDRH3由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基118至131组成，所述轻链包含CDRL1、CDRL2和CDRL3，所述CDRL1由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基44至54组成、所述CDRL2由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基70至76组成、所述CDRL3由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基109至117组成，

更优选包含重链和轻链的抗体，所述重链包含重链可变区，所述重链可变区由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至142组成，所述轻链包含轻链可变区，所述轻链可变区由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至129组成，

并且甚至更优选包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体。

[0553] 抗GPR20抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选是2至8，更优选是3至8，甚至更优选是7至8，甚至更优选是7.5至8，并且甚至更优选是约8。

[0554] 在本发明中，术语“抗CDH6抗体-药物缀合物”指这样的抗体-药物缀合物，使得在本发明中产生的抗体-药物缀合物中的抗体是抗CDH6抗体。

[0555] 抗CDH6抗体优选是包含重链和轻链的抗体，所述重链包含CDRH1、CDRH2和CDRH3，所述CDRH1由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基45至54组成、所述CDRH12由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基69至78组成、所述CDRH3由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基118至130组成，所述轻链包含CDRL1、CDRL2和CDRL3，所述CDRL1由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基44至54组成、所述CDRL2由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基70至76组成、所述CDRL1由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基109至116组成，

更优选包含重链和轻链的抗体，所述重链包含重链可变区，所述重链可变区由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至141组成，所述轻链包含轻链可变区，所述轻链可变区由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至128组成，

并且甚至更优选包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成，或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体。

[0556] 抗CDH6抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选是2

至8,更优选是3至8,甚至更优选是7至8,甚至更优选是7.5至8,并且甚至更优选是约8。

[0557] 7. 药物组合物的生产

根据本发明的药物组合物是含有根据本发明的抗体-药物缀合物,缓冲溶液和赋形剂的药物组合物。

[0558] 药物组合物可以通过以下进行生产:通过上述方法生产(包括纯化)抗体-药物缀合物,然后

执行选自以下的至少一个步骤:

(vi)将缓冲溶液加入含有抗体-药物缀合物的溶液中;

(vii)使含有抗体-药物缀合物的溶液浓缩;和

(viii)将含有抗体-药物缀合物的溶液的pH调整至预定pH;并且还执行步骤

(ix)将赋形剂加入含有抗体-药物缀合物的溶液中。

[0559] 步骤(vi)中加入的缓冲溶液优选与步骤(v)中使用的缓冲溶液相同。因此,组氨酸缓冲溶液可以优选用作步骤(vi)中使用的缓冲溶液。

[0560] 在步骤(vi)中使用的缓冲溶液是组氨酸缓冲溶液的情况下,组氨酸的水溶液可以优选用于待在步骤(viii)中执行的pH调整。

[0561] 在本发明中的术语"赋形剂"指为了提供特异性大小或浓度而加入的物质,例如,为了改善药物模塑、处理和施用方便性方面的目的。赋形剂并无特别限制,只要显示出本发明的有利效果,并且其实例包括蔗糖、海藻糖和山梨糖醇。

[0562] 对于步骤(ix)中加入的赋形剂,可以优选使用蔗糖。

[0563] 优选地,根据本发明的药物组合物进一步含有表面活性剂。因此根据本发明的药物组合物更优选是含有抗体-药物缀合物、缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂的药物组合物。

[0564] 这种药物组合物可以通过执行包括上述步骤(ix),以及加入表面活性剂的另外后续步骤(x)的步骤进行生产。

[0565] 对于在步骤(x)中加入的表面活性剂,可以优选使用聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。

[0566] 药物组合物中的缓冲溶液、赋形剂、表面活性剂和抗体-药物缀合物的浓度,以及药物组合物的pH,可以根据待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数、以及抗体的类型适当地加以选择。

[0567] 例如,在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗HER2抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成,或者包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下,组氨酸缓冲溶液(优选地,25 mM组氨酸缓冲溶液)、蔗糖(优选地,9%蔗糖)、以及聚山梨醇酯80(优选地,0.03%聚山梨醇酯80),可以优选用于药物组合物中的缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂。在该情况下,药物组合物中的抗体-药物缀合物浓度优选是20 mg/mL,并且药物组合物的pH优选是5.5。

[0568] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗HER3抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过

SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成,或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下,组氨酸缓冲溶液(优选地,25 mM组氨酸缓冲溶液)、蔗糖(优选地,9%蔗糖)、以及聚山梨醇酯20(优选地,0.03%聚山梨醇酯20),可以优选用于药物组合物中的缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂。在该情况下,药物组合物中的抗体-药物缀合物浓度优选是20 mg/mL,并且药物组合物的pH优选是5.4。

[0569] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗GPR20抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成,或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下,组氨酸缓冲溶液(优选地,10 mM组氨酸缓冲溶液)、蔗糖(优选地,9%蔗糖)、以及聚山梨醇酯80(优选地,0.03%聚山梨醇酯80),可以优选用于药物组合物中的缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂。在该情况下,药物组合物中的抗体-药物缀合物浓度优选是20 mg/mL,并且药物组合物的pH优选是5.4。

[0570] 在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗CDH6抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成,或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下,组氨酸缓冲溶液(优选地,10 mM组氨酸缓冲溶液)、蔗糖(优选地,9%蔗糖)、以及聚山梨醇酯80(优选地,0.03%聚山梨醇酯80),可以优选用于药物组合物中的缓冲溶液、赋形剂和表面活性剂。在该情况下,药物组合物中的抗体-药物缀合物浓度优选是20 mg/mL,并且药物组合物的pH优选是5.4。

[0571] 8. 药物组合物的用途

可以预期本发明的药物组合物通过作为全身疗法施加于患者,并且另外通过局部施加于癌组织而发挥疗效。

[0572] 本发明的药物组合物可以优选用于哺乳动物,但更优选用于人。

[0573] 适用于施用本发明的药物组合物的施用途径的实例可以包括静脉内、皮内、皮下、肌内和腹膜内途径,并且静脉内途径是优选的。

[0574] 在本发明的药物组合物是水性注射剂的情况下,它可以优选用合适的稀释剂稀释,然后作为静脉内输注给予。关于稀释剂,可以例示的是右旋糖溶液、生理盐水等等,并且可以优选例示的是右旋糖溶液,并且可以更优选例示的是5%右旋糖溶液。

[0575] 在本发明的药物组合物是冻干注射剂的情况下,它可以优选溶解于注射用水中,随后可以将所需量用合适的稀释剂稀释,然后作为静脉内输注给予。关于稀释剂,可以例示的是右旋糖溶液、生理盐水等等,并且可以优选例示的是右旋糖溶液,并且可以更优选例示的是5%右旋糖溶液。

[0576] 当本发明的抗体-药物缀合物对于抗原具有更高的亲和力,即在关于抗原的解离常数(即Kd值)方面更高的亲和力(=更低的Kd值)时,即使在小剂量下,本发明的药物组合物也可以显示出药物效果。因此,本发明的药物组合物的剂量可以鉴于关于与抗原的亲和性的情况来确定。当将本发明的药物组合物施用于人时,例如需要一次施用、或以1至180天

的间隔以几份施用根据抗体-药物缀合物的约0.001至100 mg/kg(在此处,“mg/kg”指抗体-药物缀合物的剂量/kg的人体重),并且可以优选例示的是每三周一次施用0.8 mg/kg至8 mg/kg的方法。

[0577] 抗体-药物缀合物的剂量和施用间隔,可以根据待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数、以及抗体的类型适当地加以选择。例如,在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗HER2抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成,或者包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成)的情况下,可以优选例示的是每三周一次施用0.8 mg/kg、1.6 mg/kg、3.2 mg/kg、5.4 mg/kg、6.4 mg/kg、7.4 mg/kg或8 mg/kg抗体-药物缀合物的方法,可以更优选例示的是每三周一次施用5.4 mg/kg、6.4 mg/kg、7.4 mg/kg或8 mg/kg抗体-药物缀合物的方法,并且可以甚至更优选例示的是每三周一次施用5.4 mg/kg或6.4 mg/kg抗体-药物缀合物的方法。在待生产的抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数在7至8的范围内,并且该抗体是抗HER3抗体(优选地,包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成,或者其中在重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失的抗体变体)的情况下,可以优选例示的是每三周一次施用1.6 mg/kg、3.2 mg/kg、4.8 mg/kg、5.6 mg/kg、6.4 mg/kg、8.0 mg/kg、9.6 mg/kg或12.8 mg/kg抗体-药物缀合物的方法,并且可以更优选例示的是每三周一次施用4.8 mg/kg、5.6 mg/kg或6.4 mg/kg抗体-药物缀合物的方法。

[0578] 本发明的药物组合物可以用于治疗癌症,并且可以优选用于治疗选自以下的至少一种癌症:乳腺癌、胃癌(也称为胃腺癌)、结肠直肠癌(也称为结肠和直肠癌,并且包括结肠癌和直肠癌)、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食道癌、头颈癌(包括唾液腺癌和咽癌)、食管胃连接部腺癌、胆道癌(包括胆管癌)、佩吉特氏病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性成胶质细胞瘤、骨肉瘤和黑色素瘤。

[0579] 本发明的药物组合物可以选择性地用作药物疗法的试剂,所述药物疗法是用于治疗癌症的主要方法,并且结果,可以延迟癌细胞的发展、抑制其生长并进一步杀死癌细胞。这些效果可以允许癌症患者免于由癌症引起的症状,或者实现癌症患者的QOL中的改善,并且通过维持癌症患者的生命来达到疗效。即使本发明的药物组合物不能达到杀死癌细胞的目的,它也可以通过抑制或控制癌细胞的生长而实现癌症患者的较高QOL,同时实现长期存活。

[0580] 在此类药物疗法中,本发明的药物组合物可以单独用作试剂,并且另外,它可以与辅助疗法中的另外疗法组合用作试剂,并且可以与外科手术、放射疗法、激素疗法等等组合。此外,它也可以用作新辅助疗法中的药物疗法的试剂。

[0581] 除如上所述的治疗用途之外,例如,对于本发明的药物组合物,还可以预期预防效果,例如抑制小转移性癌细胞的生长并进一步杀死它们。例如,可以预期在转移过程中抑制

且杀死体液中的癌细胞的效果、或者例如在植入任何组织中之后立即抑制且杀死小癌细胞的效果。相应地，特别是在癌症的手术切除之后，可以预期癌转移的抑制或预防效果。

[0582] 本发明的药物组合物可以与其它癌症治疗剂组合施用。可以相应地增强抗肿瘤效应。用于此类目的的其它癌症治疗剂可以与本发明的药物组合物同时、分开或随后施用于个体，并且可以在改变各自的施用间隔的同时施用。此类癌症治疗剂并无限制，只要它具有抗肿瘤活性，并且其实例是选自以下的至少一种：伊立替康(CPT-11)、顺铂、卡铂、奥沙利铂、氟尿嘧啶(5-FU)、吉西他滨、卡培他滨、紫杉醇、多西他赛、多柔比星、表柔比星、环磷酰胺、丝裂霉素C、含替加氟/吉美拉西/奥替拉西的药物、西妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐珠单抗、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、含曲氟尿苷/替吡嘧啶的药物、吉非替尼、厄洛替尼、阿法替尼、氨甲蝶呤、培美曲塞、曲妥珠单抗emtansin、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、他莫昔芬、托瑞米芬、氟维司群、亮丙瑞林、戈舍瑞林、来曲唑、阿那曲唑和孕酮制剂。

实施例

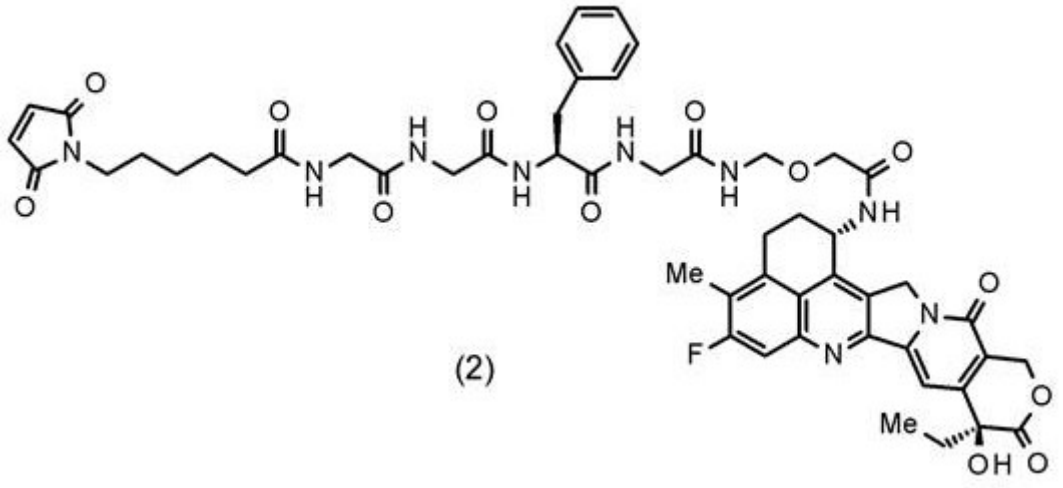
[0583] 参考下文显示的实施例更具体地描述本发明。然而，本发明并不限于这些。

[0584] [实施例1]缓冲溶液的检查

含有抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)的溶液，用各种缓冲溶液(10 mM乙酸盐缓冲溶液、10 mM磷酸盐缓冲溶液、或20 mM PIPES缓冲溶液)进行稀释，向其中加入0.5 mol/L的EDTA水溶液，然后向其中加入各种弱碱性水溶液(0.3 mol/L的磷酸氢二钠水溶液(在下文中，也称为“Na_2HPO_4水溶液”)、乙酸钠的饱和水溶液(在下文中，也称为“CH_3COONa水溶液”)、或0.5 mol/L的碳酸氢钠水溶液(在下文中，也称为“$NaHCO_3$水溶液”)，以将pH调整至7。在37℃搅拌下，加入4.8当量或4.9当量的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(在下文中，也称为“TCEP”)水溶液(1 mg/mL)/每个抗体分子，并且搅拌所得物，以还原抗体的链间二硫键。

[0585] 伴随在15℃或25℃的内部温度下的搅拌，向所获得的反应溶液中，加入溶解于80%的二甲亚砜水溶液中的9.2当量或9.8当量的由式(2)表示的化合物：

[化学36]

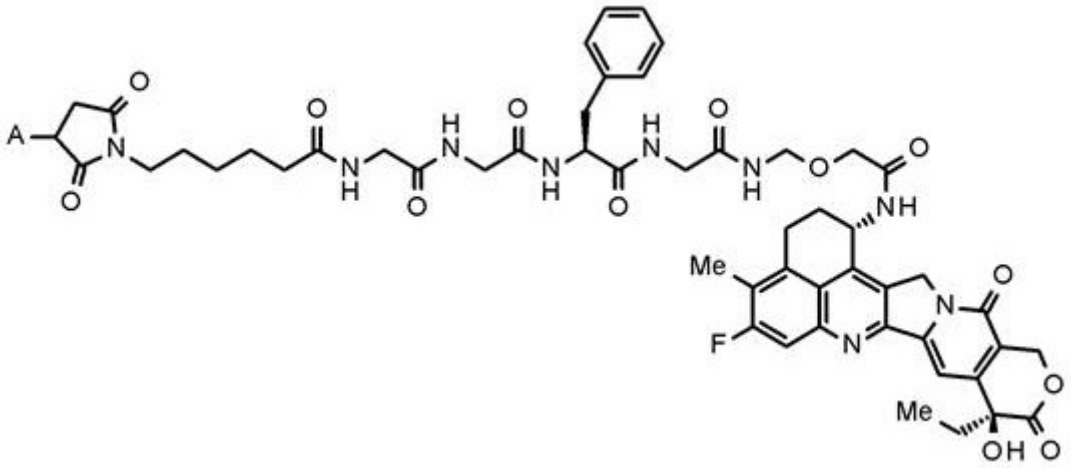


(2)

(也称为化合物(2))，以使化合物(2)与抗体结合。接下来，向其中加入50 mmol/L

的N-乙酰半胱氨酸水溶液，以猝灭化合物(2)的过量部分。这提供了抗HER2抗体-药物缀合物，其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合：

[化学37]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0586] 通过HPLC方法测量所获得的抗HER2抗体-药物缀合物的DAR。通过SEC测量聚集物含量。

[0587] 结果显示于表1中。

[0588] [表1]

缓冲液	pH 调整	还原步骤		缀合步骤		DAR	聚集物
		TCEP	内部温度	化合物（2）	内部温度		
乙酸盐缓冲溶液	Na_2HPO_4水溶液	4.8 当量	37°C	9.2 当量	15°C	7.89	0.66%
乙酸盐缓冲溶液	Na_2HPO_4水溶液	4.8 当量	37°C	9.2 当量	25°C	7.88	0.92%
磷酸盐缓冲溶液	Na_2HPO_4水溶液	4.8 当量	37°C	9.2 当量	15°C	7.89	1.54%
PIPES缓冲溶液	Na_2HPO_4水溶液	4.8 当量	37°C	9.2 当量	15°C	7.89	1.61%
乙酸盐缓冲溶液	CH_3COONa水溶液	4.9 当量	37°C	9.8 当量	15°C	7.80	1.13%
乙酸盐缓冲溶液	$NaHCO_3$水溶液	4.9 当量	37°C	9.8 当量	15°C	7.81	2.13%

[0589] 在表1的结果中，通过使用磷酸氢二钠的水溶液，使乙酸盐缓冲溶液经受pH调整的情况显示最低的聚集物含量。

[0590] [实施例2]超滤步骤(1)的检查

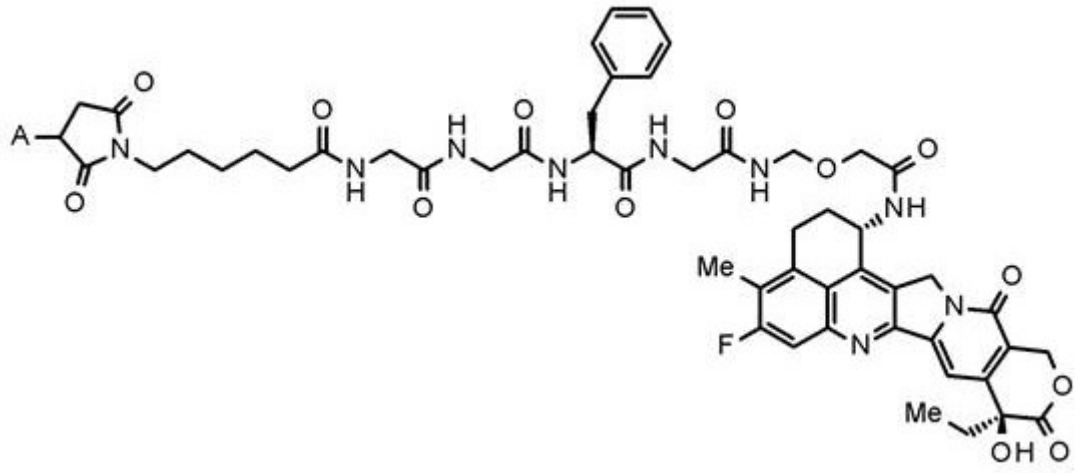
含有抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体，所述重链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成，所述轻链由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)的溶液，用10 mM乙酸盐缓冲溶液(pH 5.5)进行稀释，向其中加入0.5 mol/L的EDTA水溶液(每个抗体分子5当量)，然后向其中加入0.3 mol/L的磷酸氢二钠水溶液，以将pH调整至7.4。

[0591] 在35至39℃的搅拌下，加入0.010 mol/L的三(2-羧乙基)膦盐酸盐水溶液(每个抗

体分子6当量)，并且将所得物在35至39℃的内部温度下搅拌2.5小时，以还原抗体的链间二硫键。

[0592] 伴随在13至17℃的内部温度下的搅拌，向所获得的反应溶液中，加入溶解于80%的二甲亚砜水溶液中的化合物(2)(每个抗体分子12.5当量)，以使化合物(2)与抗体结合。接下来，向其中加入0.1 mol/L的N-乙酰半胱氨酸水溶液(每个抗体分子35当量)，将所得物在相同温度下进一步搅拌1小时，以猝灭化合物(2)的过量部分，然后使用10%的乙酸水溶液，将反应溶液的pH调整至5.0。这提供了含有抗HER2抗体-药物缀合物的反应溶液，其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合：

[化学38]

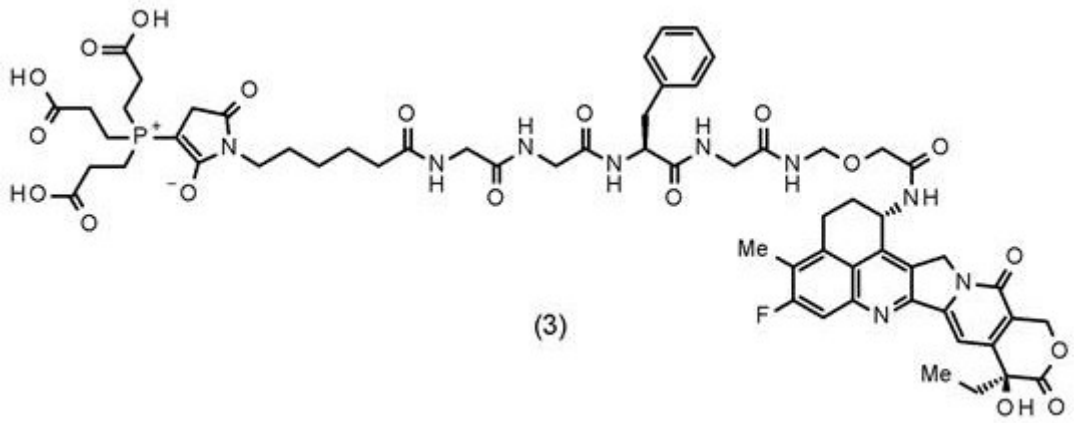


其中A表示与抗体的连接位置。

[0593] 用滚轮泵，使所获得的反应溶液循环通过超滤膜Pellicon(R)XL Cassette Ultracel(R)(由Merck KGaA生产)进行超滤，同时向其中加入26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0)、或含0.5%氯化钠的26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0)。使用的26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0)和含0.5%氯化钠的26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0)的量是所获得的反应溶液量的5倍、10倍或15倍。测量在超滤之后，基于抗体-药物缀合物的化合物(2)衍生的副产物含量。对于比较，测量没有超滤的化合物(2)衍生的副产物含量(在这种情况下，使用的缓冲溶液的量指示为0)。

[0594] 化合物(2)衍生的副产物的实例包括：其中三(2-羧乙基)膦加入化合物(2)的马来酰亚胺基中的化合物，即由式(3)表示的化合物：

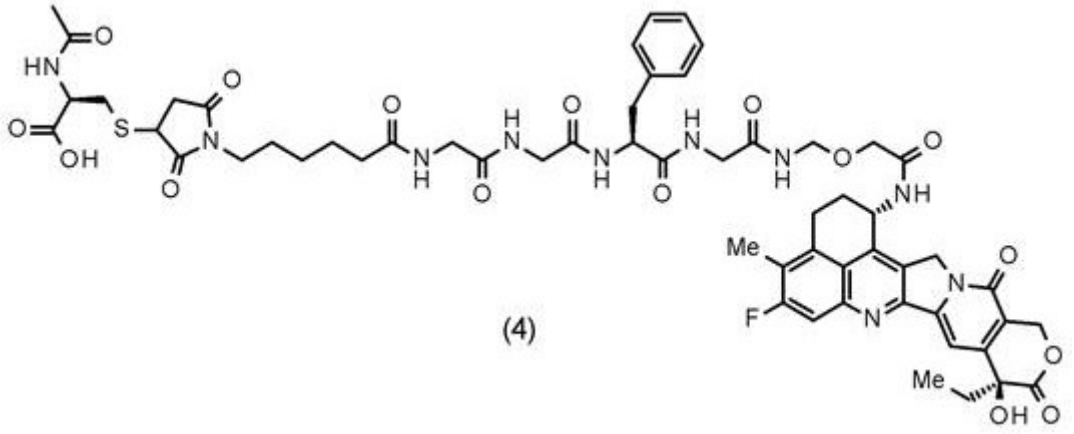
[化学39]



(3)

(也称为化合物(3)),以及其中N-乙酰半胱氨酸加入化合物(2)的马来酰亚胺基中的化合物,即由式(4)表示的化合物:

[化学40]



(4)

(也称为化合物(4))。在化合物(2)衍生的副产物含量的测量中,执行HPLC法,以确定基于抗体-药物缀合物的化合物(3)和化合物(4)含量。结果显示于表2和图1中。

[0595] [表2]

缓冲溶液的量/反应溶液的量	组氨酸缓冲溶液		含 0.5%氯化钠的组氨酸缓冲溶液	
	化合物（3）含量（%）	化合物（4）含量（%）	化合物（3）含量（%）	化合物（4）含量（%）
0	23.37	27.12	23.25	26.78
5	10.03	8.19	3.53	4.67
10	4.91	2.76	0.58	0.98
15	2.60	1.04	0.11	0.25

[0596] 表2中用相同的缓冲溶液量/反应溶液量的结果比较显示了,当使用含氯化钠的组氨酸缓冲溶液时的化合物(3)和化合物(4)含量,低于当使用组氨酸缓冲溶液时的化合物(3)和化合物(4)含量。

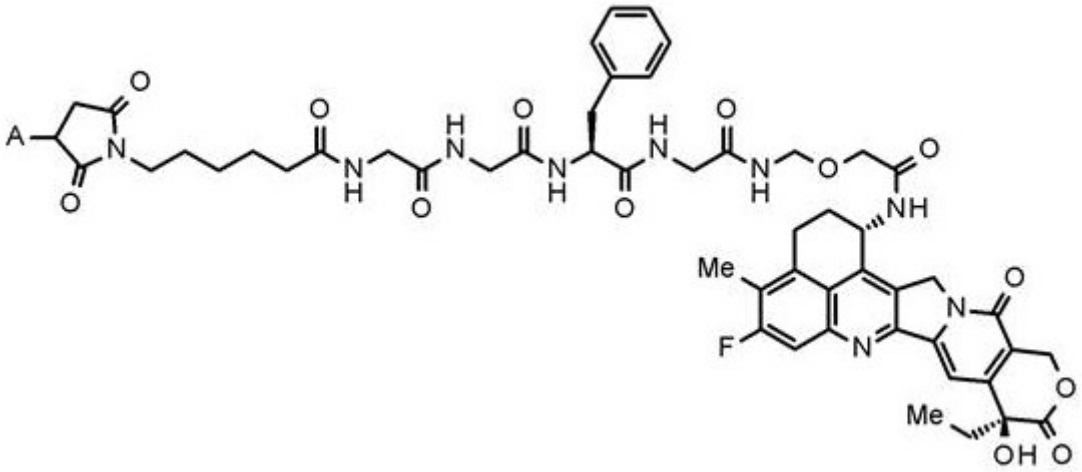
[0597] [实施例3]超滤步骤(2)的检查

含有抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)的溶液,用10 mM乙酸盐缓冲溶液进行稀释,

向其中加入0.5 mol/L的EDTA水溶液，然后向其中加入0.3 mol/L的磷酸氢二钠水溶液，以将pH调整至7.3。向其中加入1 mg/mL的三(2-羧乙基)膦盐酸盐水溶液，并且搅拌所得物，以还原抗体的链间二硫键。

[0598] 向所获得的反应溶液中，加入溶解于80%的二甲亚砜水溶液中的化合物(2)，以使化合物(2)与抗体结合。接下来，向其中加入50 mmol/L的N-乙酰半胱氨酸水溶液，以猝灭化合物(2)的过量部分。这提供了含有抗HER2抗体-药物缀合物的反应溶液，其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合：

[化学41]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0599] 用滚轮泵，使所获得的反应溶液循环通过Pellicon(R)XL Cassette Ultracel(R)(由Merck KGaA生产)进行超滤，同时向其中加入组氨酸缓冲溶液(pH 5.0或pH 5.8)、或含0.4%氯化钠的组氨酸缓冲溶液(pH 5.0或pH 5.8)。所使用的组氨酸缓冲溶液各自具有10.8 mM的浓度。所使用的组氨酸缓冲溶液(pH 5.0和pH 5.8)各自的量是所获得的反应溶液量的15倍。所使用的含0.4%氯化钠的组氨酸缓冲溶液(pH 5.0和pH 5.8)各自的量是所获得的反应溶液量的10倍。通过SEC测量在超滤之后的聚集物含量。对于比较，测量没有超滤的聚集物含量(在这种情况下，使用的缓冲溶液的量指示为0)。结果显示于表3和图2中。

[0600] [表3]

缓冲液	pH	缓冲溶液的量/反应溶液的量	聚集物含量
组氨酸缓冲溶液	5.8	0	1.36
		15	1.62
组氨酸缓冲溶液	5.0	0	1.36
		15	1.3
含 0.4%氯化钠的组氨酸缓冲溶液	5.8	0	1.49
		10	2.72
含 0.4%氯化钠的组氨酸缓冲溶液	5.0	0	1.39
		10	1.59

[0601] 表3中的结果显示了，在用pH 5.8的缓冲溶液执行超滤的情况下，当使用含氯化钠的组氨酸缓冲溶液时的聚集物含量，高于当使用组氨酸缓冲溶液时的聚集物含量.另一方面，在用pH 5.0的缓冲溶液执行超滤的情况下，当使用含氯化钠的组氨酸缓冲溶液时的聚

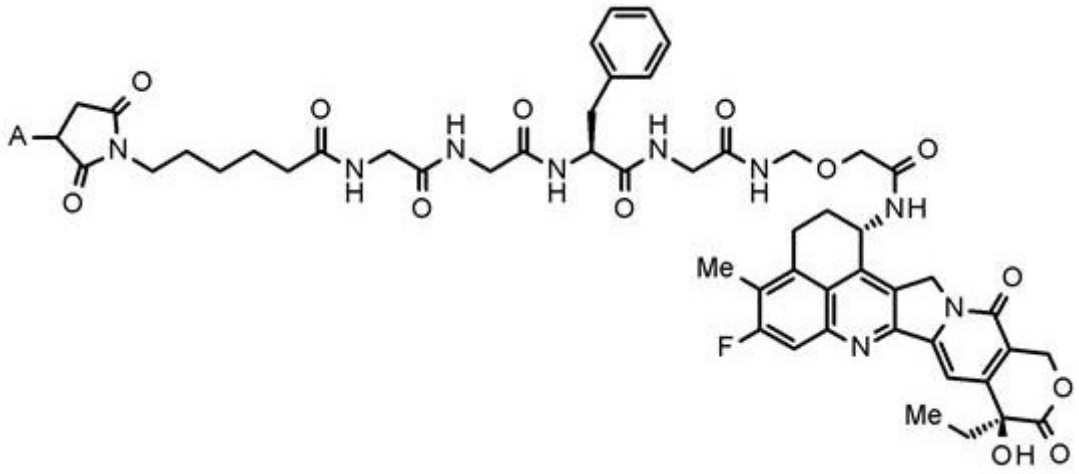
集物含量,与当使用组氨酸缓冲溶液时的聚集物含量相当。

[0602] [实施例4]含有抗HER2抗体-药物缀合物的药物组合物的生产(1)

含有抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)的溶液(溶液的重量:5.4 kg;对应于120 g抗体),置于玻璃反应容器中,并且进一步向其中加入0.01 mol/L乙酸盐缓冲溶液(4.3 L,pH 5.5)。向该溶液中,加入0.5 mol/L的EDTA水溶液(8.3 mL;每个抗体5当量),然后向其中加入0.3 mol/L的磷酸氢二钠水溶液,以将pH调整至7.3。在35至39℃的搅拌下,向其中加入0.010 mol/L的三(2-羧乙基)膦盐酸盐水溶液(390 mL;每个抗体分子4.7当量),并且将所得物在35℃至39℃的内部温度下搅拌2小时,以还原抗体的链间二硫键。

[0603] 使所获得的反应溶液冷却,并且经过20分钟,在13至17℃的内部温度的搅拌下,向其中加入溶解于80%的二甲亚砜水溶液(900 mL)中的化合物(2)(8.2 g;每个抗体分子9.7当量),并且将所得物在相同温度下搅拌1小时,以使化合物(2)与抗体结合。接下来,向其中加入0.1 mol/L的N-乙酰半胱氨酸水溶液(210 mL;每个抗体分子25当量),并且将所得物在相同温度下进一步搅拌1小时,以猝灭化合物(2)的过量部分,然后使用10%的乙酸水溶液,将pH调整至5.0。这提供了含有抗HER2抗体-药物缀合物的溶液,其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合:

[化学42]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0604] 用滚轮泵,使所获得的溶液循环通过Pellicon(R)2 Mini Cassette Ultracel(R)(由Merck KGaA生产,0.1 m^2)的三层膜进行超滤,同时向其中加入含0.5%氯化钠的26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除化合物(2)衍生的副产物。进一步地,使该溶液循环进行超滤,同时向其中加入26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除氯化钠。接下来,通过使用组氨酸的水溶液,将所得物的pH调整至5.5,并且进一步浓缩,以获得大约4 L的含有抗HER2抗体-药物缀合物的溶液。

[0605] 进一步地,从溶液中取出3.86 kg的一部分,向其中加入364 g蔗糖,以溶解在其中。此外,向其中加入含9%蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.5),以将蛋白质浓度调整至大约20 mg/mL,并且因此获得了含有抗HER2抗体-药物缀合物的药物组合物(5.7 kg)。药物组合物的蛋白质浓度、蛋白质产率和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数(n)分别为20.4 mg/

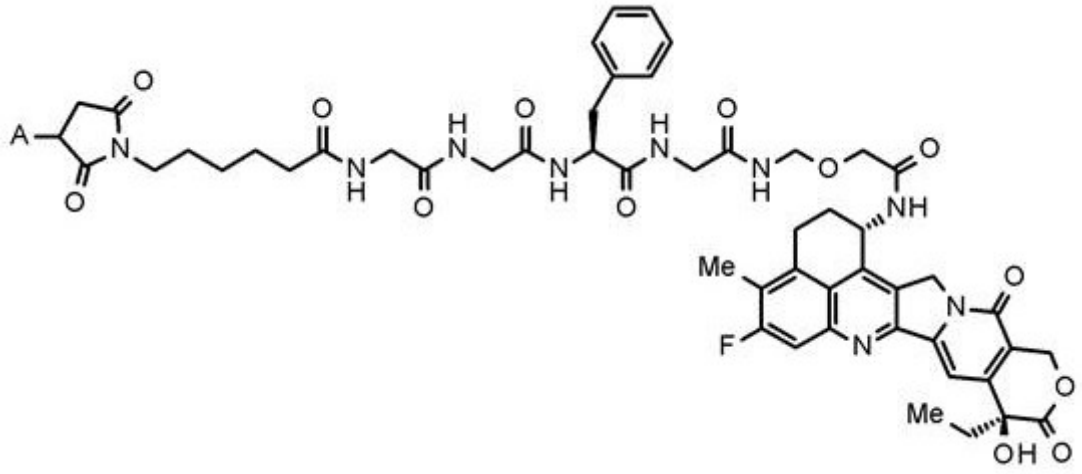
mL、112 g和7.7。

[0606] [实施例5]含有抗HER2抗体-药物缀合物的药物组合物的生产(2)

含有抗HER2抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至214组成)的溶液(溶液的重量:89 g;对应于2.0 g抗体),置于玻璃反应容器中,并且进一步向其中加入0.01 mol/L乙酸盐缓冲溶液(72 mL,pH 5.5)。向该溶液中,加入0.5 mol/L的EDTA水溶液(0.14 mL;每个抗体5当量),然后向其中加入0.3 mol/L的磷酸氢二钠水溶液,以将pH调整至7.3。在35至39℃的搅拌下,向其中加入0.010 mol/L的三(2-羧乙基)膦盐酸盐水溶液(6.3 mL;每个抗体分子4.6当量),并且将所得物在35℃至39℃的内部温度下搅拌2小时,以还原抗体的链间二硫键。

[0607] 使所获得的反应溶液冷却,并且在13至17℃的内部温度的搅拌下,向其中加入溶解于80%的二甲亚砜水溶液(13 mL)中的化合物(2)(140 mg;每个抗体分子9.6当量),并且将所得物在相同温度下搅拌1小时,以使化合物(2)与抗体结合。接下来,向其中加入0.1 mol/L的N-乙酰半胱氨酸水溶液(3.4 mL;每个抗体分子25当量),并且将所得物在相同温度下进一步搅拌40分钟,以猝灭化合物(2)的过量部分,然后使用10%的乙酸水溶液,将pH调整至5.0。这提供了含有抗HER2抗体-药物缀合物的溶液,其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合:

[化学43]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0608] 在将1 g氯化钠加入所获得的溶液中之后,用滚轮泵,使所获得的溶液循环通过Pellicon(R)XL Ultracel(R)(由Merck KGaA生产,50 cm^2)进行超滤,同时向其中加入含0.5%氯化钠的26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除化合物(2)衍生的副产物。进一步地,使该溶液循环进行超滤,同时向其中加入26 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除氯化钠。接下来,将所得物浓缩,同时通过使用组氨酸的水溶液,将pH调整至5.5,并且因此获得了大约65 g含有抗HER2抗体-药物缀合物的溶液(64.5 g,64.1 mL,蛋白质浓度:28.5 mg/mL,蛋白质产率:1.83 g)。

[0609] 进一步地,从溶液中取出64 g的一部分,向其中加入19 mL的含有7.7 g蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.5),并且此外,向其中加入含9%蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.5),以将蛋白质浓度调整至大约20 mg/mL,并且因此获得了含有抗HER2抗体-药物缀合物的药物组

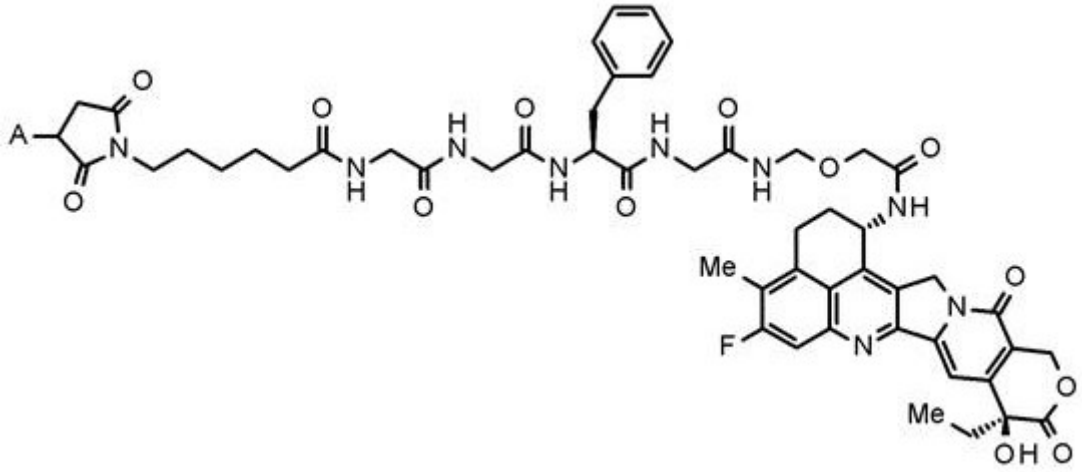
合物(93 g)。药物组合物的蛋白质浓度、蛋白质产率和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数(n)分别为20.3 mg/mL、1.8 g和7.8。

[0610] [实施例6]含有抗HER3抗体-药物缀合物的药物组合物的生产

含有抗HER3抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由通过SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成,所述轻链由通过SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成)的溶液(溶液的重量:43.95 kg;对应于3.00 kg抗体),置于400 L一次性使用的反应器中,向其中加入含有聚山梨酸酯20(60.0 g)的0.01 mol/L乙酸盐缓冲溶液(pH 5.5,255 kg),并且向其中进一步加入0.5 mol/L 的EDTA水溶液(224.5 g;每个抗体5当量)。向该溶液中,加入0.3 mol/L的磷酸氢二钠水溶液,以将pH调整至7.0。在33至37℃的搅拌下,向其中加入含有三(2-羧乙基)膦盐酸盐(35.1 g:每个抗体分子6.0当量)的水溶液(12.3 kg),并且将所得物在33至37℃的内部温度下搅拌2.5小时,以还原抗体的链间二硫键。

[0611] 使所获得的反应溶液冷却,并且经过50分钟,在12至17℃的内部温度的搅拌下,向其中加入溶解于含有10%乙酸水溶液(116.4 g)的80%二甲亚砜水溶液(21.1 kg)中的化合物(2)(200.5 g;每个抗体分子9.5当量),并且将所得物在相同温度下搅拌0.5小时,以使化合物(2)与抗体结合。接下来,向其中加入0.1 mol/L的N-乙酰半胱氨酸水溶液(3.11 kg;每个抗体分子15当量),并且将所得物在相同温度下进一步搅拌0.5小时,以猝灭化合物(2)的过量部分,然后使用10%的乙酸水溶液,将pH调整至5.0。这提供了含有抗HER3抗体-药物缀合物的溶液,其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER3抗体缀合:

[化学44]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0612] 用自动超滤仪器,使所获得的溶液循环通过Pellicon(R)2 Ultracel(R)(由Merck KGaA生产,2.5 m^2)的四层膜进行超滤,同时向其中加入含0.5%氯化钠的26.5 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除化合物(2)衍生的副产物。进一步地,使该溶液循环进行超滤,同时向其中加入26.5 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除氯化钠。接下来,将所得物浓缩,同时使用26.5 mM的组氨酸水溶液,将pH调整至5.4,并且因此获得了大约97.4 kg含有抗HER3抗体-药物缀合物的溶液(96.5 L,蛋白质浓度:30.5 mg/mL,蛋白质产率:2.94 kg)。

[0613] 进一步地,从溶液中取出48.6 kg的一部分,向其中加入含有6.29 kg蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.4,24.3 kg),并且此外,向其中加入含有聚山梨醇酯20(7.6 g)的含9%蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.4,4.25 kg),以将蛋白质浓度调整至大约20 mg/mL,并且因此

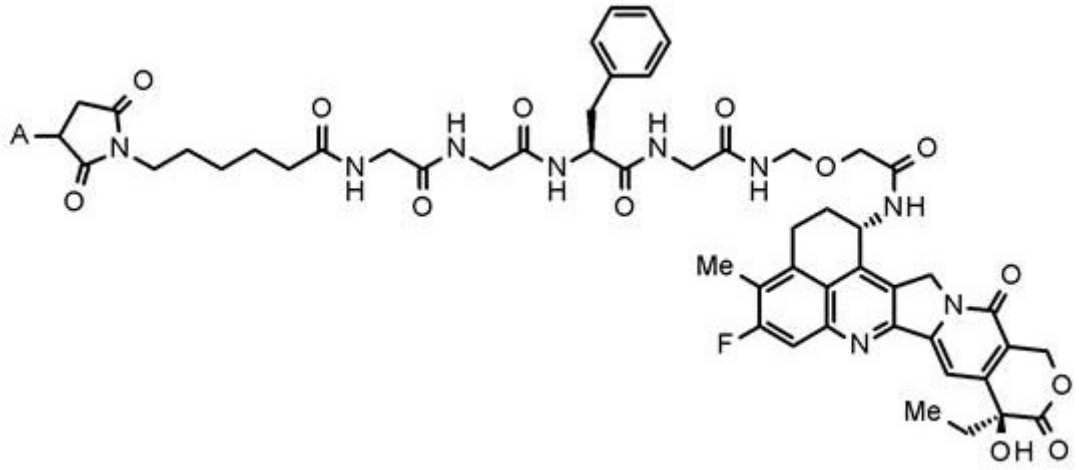
获得了含有抗HER3抗体-药物缀合物的药物组合物(77.1 kg)。药物组合物的蛋白质浓度、蛋白质产率和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数(n)分别为19.9 mg/mL、1.49 kg和7.6。

[0614] [实施例7]含有抗GPR20抗体-药物缀合物的药物组合物的生产

含有抗GPR20抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:5的氨基酸残基20至472组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:6的氨基酸残基21至234组成)的溶液(溶液的重量:24.2 kg;对应于0.94 kg抗体),置于200 L反应器中,进一步向其中加入含有聚山梨酸酯80(14.4 g)的26 mM组氨酸水溶液(57.6 kg)。将温度增加至30℃,向混合物中加入含有三(2-羧乙基)膦盐酸盐(9.06 g;每个抗体分子4.9当量)的水溶液(3.17 kg),并且将所得物在30℃的内部温度下搅拌3小时,以还原抗体的链间二硫键。

[0615] 使所获得的反应溶液冷却,并且经过55分钟,在15℃的内部温度的搅拌下,向其中加入溶解于含有乙酸(3.7 g)的80%二甲亚砜水溶液(7.26 kg)中的化合物(2)(63.5 g;每个抗体分子9.0当量),并且将所得物在相同温度下搅拌0.5小时,以使化合物(2)与抗体结合。接下来,向其中加入0.1 M的N-乙酰半胱氨酸水溶液(1.00 kg;每个抗体分子15当量),并且将所得物在相同温度下进一步搅拌0.5小时,以猝灭化合物(2)的过量部分,然后使用10%的乙酸水溶液,将pH调整至5.0。这提供了含有抗GPR20抗体-药物缀合物的溶液,其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗GPR20抗体缀合:

[化学45]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0616] 用超滤仪器,使所获得的溶液循环通过Pellicon(R)2 Ultracel(R)(由Merck KGaA生产,2.5 m^2)的两层膜进行超滤,同时向其中加入含0.5%氯化钠的11 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除化合物(2)衍生的副产物。进一步地,使该溶液循环进行超滤,同时向其中加入11 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除氯化钠。接下来,将所得物浓缩,同时使用11 mM的组氨酸水溶液,将pH调整至5.4,并且因此获得了大约含有抗GPR20抗体-药物缀合物的溶液(31.8 kg,蛋白质浓度:29.9 mg/mL,蛋白质产率:0.94 kg)。

[0617] 进一步地,向该溶液中,加入含有4.00 kg蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.4,14.9 kg),并且此外,向其中加入含有聚山梨醇酯80(4.5 g)的含9%蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.4,3.00 kg),以将蛋白质浓度调整至大约20 mg/mL,并且因此获得了含有抗GPR20抗体-

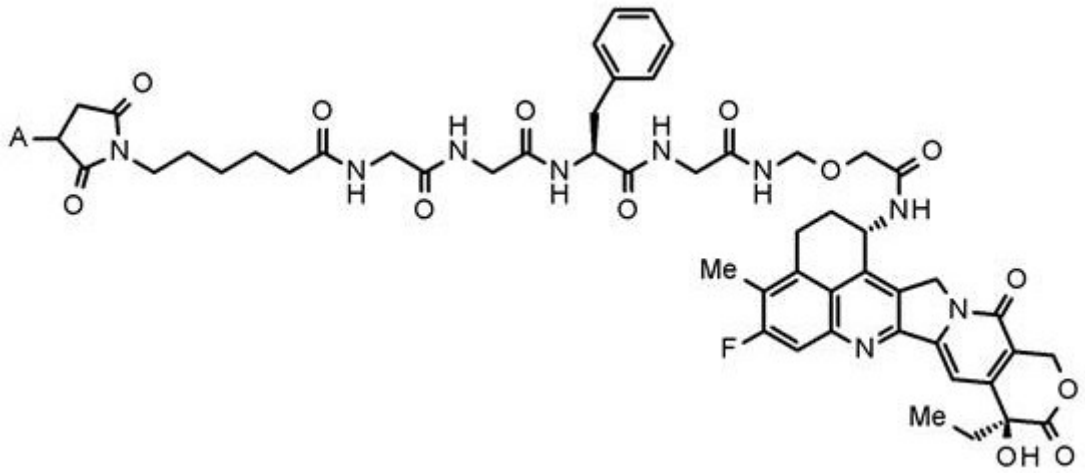
药物缀合物的药物组合物(49.3 kg)。药物组合物的蛋白质浓度、蛋白质产率和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数(n)分别为19.9 mg/mL、0.94 kg和7.8。

[0618] [实施例8]含有抗CDH6抗体-药物缀合物的药物组合物的生产

含有抗CDH6抗体(包含重链和轻链的抗体,所述重链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:7的氨基酸残基20至471组成,所述轻链由氨基酸序列组成,所述氨基酸序列由SEQ ID NO:8的氨基酸残基21至233组成)的溶液(溶液的重量:2.56 kg;对应于100 g抗体),置于14 L反应器中,向其中加入含有聚山梨酸酯80(1.50 g)的100 mM组氨酸水溶液(6.00 kg),并且向其中进一步加入0.5 M EDTA水溶液(7.54 g;每个抗体5当量)。将温度增加至30℃,向混合物中加入含有三(2-羧乙基)膦盐酸盐(945 mg;每个抗体分子4.8当量)的水溶液(330 g),并且将所得物在30℃的内部温度下搅拌3小时,以还原抗体的链间二硫键。

[0619] 使所获得的反应溶液冷却,并且经过41分钟,在15℃的内部温度的搅拌下,向其中加入溶解于含有10%乙酸水溶液(3.89 g)的80%二甲亚砜水溶液(687 g)中的化合物(2)(6.96 g;每个抗体分子9.1当量),并且将所得物在相同温度下搅拌0.4小时,以使化合物(2)与抗体结合。接下来,向其中加入0.1 M的N-乙酰半胱氨酸水溶液(103 g;每个抗体分子15当量),并且将所得物在相同温度下进一步搅拌0.6小时,以猝灭化合物(2)的过量部分,然后使用10%的乙酸水溶液,将pH调整至5.0。这提供了含有抗CDH6抗体-药物缀合物的溶液,其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗CDH6抗体缀合:

[化学46]



其中A表示与抗体的连接位置。

[0620] 用超滤仪器,使所获得的溶液循环通过Pellicon(R)2 Ultracel(R)(由Merck KGaA生产,0.5 m^2)的一层膜进行超滤,同时向其中加入含0.5%氯化钠的11 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除化合物(2)衍生的副产物。进一步地,使该溶液循环进行超滤,同时向其中加入11 mM组氨酸缓冲溶液(pH 5.0),以去除氯化钠。接下来,将所得物浓缩,同时使用11 mM的组氨酸水溶液,将pH调整至5.4,并且因此获得了大约含有抗CDH6抗体-药物缀合物的溶液(2.97 kg,蛋白质浓度:31.8 mg/mL,蛋白质产率:93.7 g)。

[0621] 进一步地,向该溶液中,加入含有蔗糖(401 g)的组氨酸缓冲溶液(pH 5.4,1.67 kg),并且此外,向其中加入含有聚山梨醇酯80(437 mg)的含9%蔗糖的组氨酸缓冲溶液(pH 5.4,276 g),以将蛋白质浓度调整至大约20 mg/mL,并且因此获得了含有抗CDH6抗体-药物

缀合物的药物组合物(4.81 kg)。药物组合物的蛋白质浓度、蛋白质产率和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数(n)分别为20.2 mg/mL,93.2 g和7.8。

[0622] 序列表的自由文本

SEQ ID NO:1 - 抗HER2抗体的重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:2 - 抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO:3 - 抗HER3抗体的重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:4 - 抗HER3抗体的轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO:5 - 抗GPR20抗体的重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:6 - 抗GPR20抗体的轻链的氨基酸序列

SEQ ID NO:7 - 抗CDH6抗体的重链的氨基酸序列

SEQ ID NO:8 - 抗CDH6抗体的轻链的氨基酸序列。

序列表

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> 用于制造抗体-药物缀合物的有效方法

<130> DSPCT-FP1910

<150> JP2018-139633
<151> 2018-07-25

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2抗体的重链

<400> 1

[0001]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
```

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

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
```

[0002]

```
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

[0003]

<210> 2
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER2抗体的轻链

<400> 2

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

[0004] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER3抗体的重链

<400> 3

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

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

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

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Glu 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 Asp Lys Trp Thr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

[0005]

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

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

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

[0006]

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗HER3抗体的轻链

<400> 4

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

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

Ser Ser Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
[0007] 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215 220

<210> 5
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗GPR20抗体的重链

<400> 5

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

[0008]

Lys Tyr Met Gly Phe Ile Asn Pro Gly Ser Gly His Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Thr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Gly Gly Phe Leu Arg Ile Ile Thr Lys
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

[0009]

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 6
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗GPR20抗体的轻链

[0010]

<400> 6

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Thr Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35 40 45

Val Ser Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gln Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Gly Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn

100 105 110

Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

[0011] His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 7
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CDH6抗体的重链

<400> 7

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

```
Thr Arg Asn Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50                  55                  60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Glu Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
                85                  90                  95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Val Tyr Gly Gly Phe Ala Gly Gly Tyr Phe
        115                 120                 125

Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
    130                 135                 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145                 150                 155                 160
```

[0012]

```
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
                165                 170                 175

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
    210                 215                 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225                 230                 235                 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
                245                 250                 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
            260                 265                 270
```

```
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
        275                 280                 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
    290                 295                 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305                 310                 315                 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                325                 330                 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
            340                 345                 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
        355                 360                 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
    370                 375                 380
```

[0013]

```
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385                 390                 395                 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
                405                 410                 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
            420                 425                 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
        435                 440                 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
    450                 455                 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 8
<211> 233
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 抗CDH6抗体的轻链

<400> 8

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

[0014] Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

Ser Gly Trp Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

195 200 205

[0015]

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

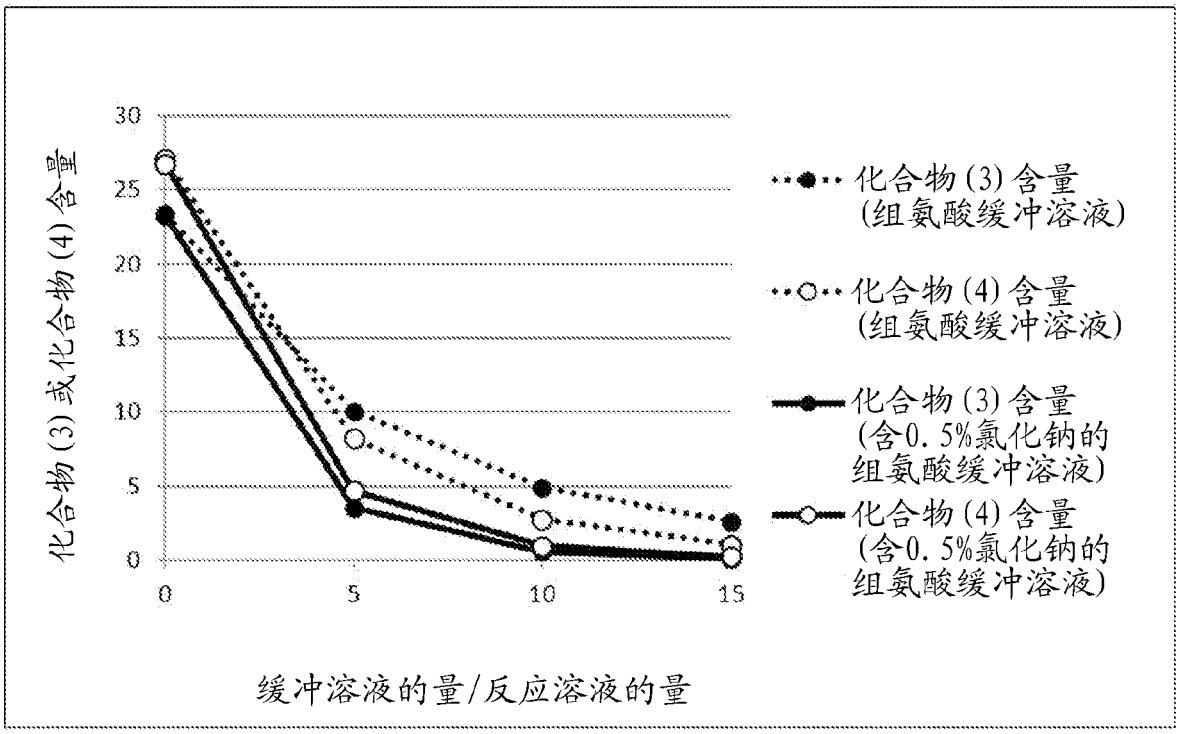

化合物(3)或化合物(4)含量
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
缓冲溶液的量/反应溶液的量
化合物(3)含量
(组氨酸缓冲溶液)
化合物(4)含量
(组氨酸缓冲溶液)
化合物(3)含量
(含0.5%氯化钠的
组氨酸缓冲溶液)
化合物(4)含量
(含0.5%氯化钠的
组氨酸缓冲溶液)

图 1

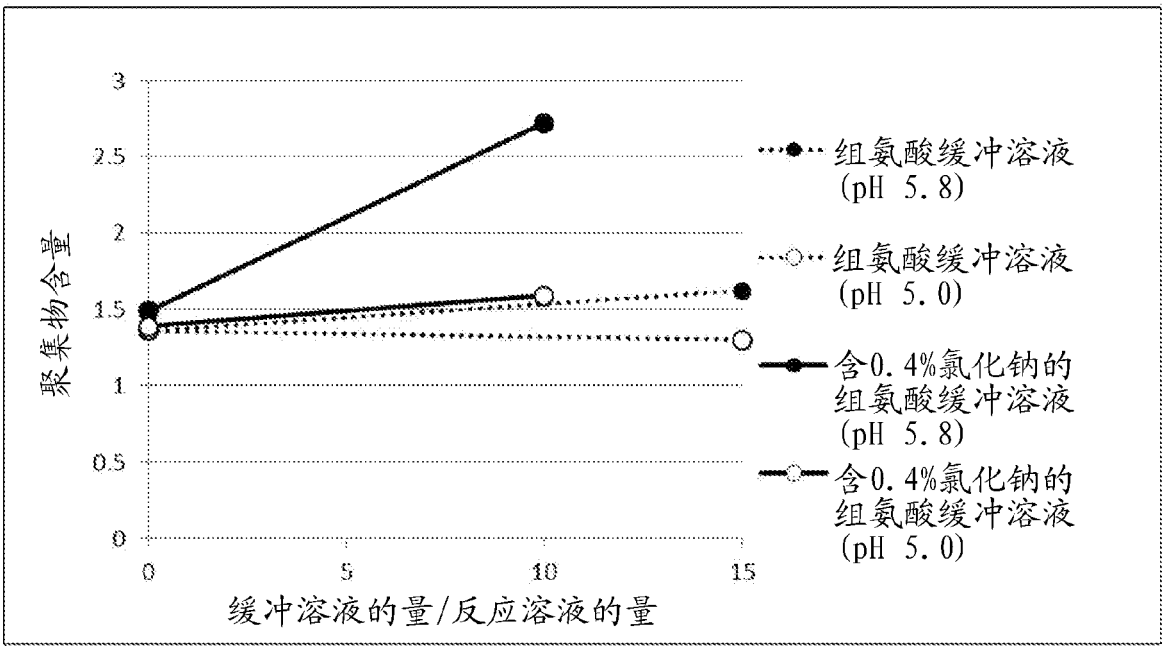

聚集物含量
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
缓冲溶液的量/反应溶液的量
组氨酸缓冲溶液
(pH 5.8)
组氨酸缓冲溶液
(pH 5.0)
含0.4%氯化钠的
组氨酸缓冲溶液
(pH 5.8)
含0.4%氯化钠的
组氨酸缓冲溶液
(pH 5.0)

图 2

SEQ ID NO: 1-抗HER2抗体的重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 3

SEQ ID NO: 2-抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 4

SEQ ID NO: 3-抗HER3抗体的重链的氨基酸序列

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR
QPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图 5

SEQ ID NO: 4-抗HER3抗体的轻链的氨基酸序列

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNY
LAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 6

SEQ ID NO: 5-抗GPR20抗体的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTSYYISWIRQAPGQGLKYMGFINPGSGH
TNYNEKFKGRVTITADKSSSTATMELSSLRSEDTAVYY
CARGAGGFLRIITKFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19)，可变区(20-142)，恒定区(143-472)

图 7

SEQ ID NO: 6-抗GPR20抗体的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDTQLTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASKSVSTYIHWYQQKPGKQPKLLIYSAGNLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYCQQINEL
PYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

信号序列(1-20)，可变区(21-129)，恒定区(130-234)

图 8

SEQ ID NO: 7-抗CDH6抗体的重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE
TEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19)，可变区(20-141)，恒定区(142-471)

图 9

SEQ ID NO: 8-抗CDH6抗体的轻链的氨基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQT
GVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSG
WAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

信号序列(1-20)，可变区(21-128)，恒定区(129-233)

图 10