



(21)申請案號：108126606 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 26 日

(51)Int. Cl. : C07K16/44 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
A61K47/68 (2017.01) A61P35/00 (2006.01)
C07K16/46 (2006.01) C12N1/15 (2006.01)
C12N1/19 (2006.01) C12N1/21 (2006.01)
C12N5/10 (2006.01) C12N15/13 (2006.01)
C12N15/63 (2006.01) C12Q1/00 (2006.01)
G01N33/53 (2006.01) C07K17/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/07/27 日本 2018-140912

(71)申請人：日商第一三共股份有限公司 (日本) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
(JP)
日本

(72)發明人：相馬雅子 SOMA, MASAKO (JP) ； 久我洋 KUGA, HIROSHI (JP) ； 益田剛
MASUDA, TAKESHI (JP) ； 河村淳子 KAWAMURA, JUNKO (JP) ； 石橋裕美
ISHIBASHI, HIROMI (JP) ； 安田哲 YASUDA, SATORU (JP)

(74)代理人：王彥評；賴碧宏

(56)參考文獻：
期刊 Surinder Kaur et al, "Bioanalytical assay strategies for the development of antibody-drug conjugate biotherapeutics", Bioanalysis. 2013 Jan;5(2): 201-26.
期刊 Randall Dere et al, "PK assays for antibody-drug conjugates: case study with ado-trastuzumab emtansine", Bioanalysis. 2013 May; 5(9): 1025-40.

審查人員：余家嫻

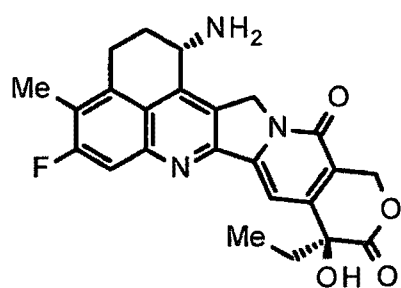
申請專利範圍項數：30 項 圖式數：41 共 171 頁

(54)名稱
辨識抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質

(57)摘要
一種辨識抗體-藥物結合物的藥物部位之蛋白質，該抗體-藥物結合物係透過連接子而鍵結下式所示之藥物與抗體；及一種定量之方法，其係使用該蛋白質來定量在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法；以及一種確認之方法，其係使用該蛋白質來確認在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的組織分布的方法。

I846717

TW I846717 B



I846717

【發明摘要】

【中文發明名稱】

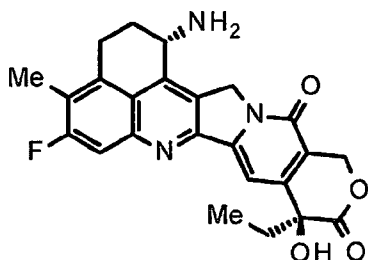
辨識抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質

【英文發明名稱】

PROTEIN RECOGNIZING DRUG PART OF ANTIBODY-
DRUG CONJUGATE

【中文】

一種辨識抗體-藥物結合物的藥物部位之蛋白質，該抗體-藥物結合物係透過連接子而鍵結下式所示之藥物與抗體；及一種定量之方法，其係使用該蛋白質來定量在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法；以及一種確認之方法，其係使用該蛋白質來確認在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的組織分布的方法。



【指定代表圖】

無。

【代表圖之符號簡單說明】

無。

【特徵化學式】

無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

辨識抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質

【英文發明名稱】

PROTEIN RECOGNIZING DRUG PART OF ANTIBODY-
DRUG CONJUGATE

【技術領域】

【0001】本發明關於一種會辨識以依喜替康(exatecan)的衍生物作為構成要素之抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質；及一種定量之方法，其係使用該蛋白質來定量在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法；以及一種確認之方法，其係使用該蛋白質來確認在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的組織分布的方法。

【先前技術】

【0002】使得具有細胞毒性的藥物鍵結在會鍵結於表現在癌細胞表面的抗原且能夠內化(Internalization)至細胞的抗體而成的抗體-藥物結合物(Antibody-Drug Conjugate; ADC)，是可期待藉由可將藥物選擇性地送達至癌細胞，使藥物累積在癌細胞內，而消滅癌細胞(非專利文獻 1～5)。

【0003】與低分子化合物與抗體同樣地，在抗體-藥物結合物之醫藥品的開發來說，藥物動力學試驗(PK 試驗)的實施是不可或缺的。這是因為在掌握了在動物中的 PK 試驗結果、藥理試驗結果及安全性試驗結果的相關性後，再進行在人類中的 PK 試驗，藉此能夠取得對於制定臨床試驗設計及考察在人類的有效

性及安全性是有用的資訊的緣故。

【0004】抗體-藥物結合物之 PK 試驗，基本上是進行：把投藥後的抗體-藥物結合物之血漿中濃度予以定量。作為用以定量抗體-藥物結合物之血漿中濃度的方法，可舉：ELISA 法。例如，能夠透過經由下述步驟而定量抗體-藥物結合物之血漿中濃度：(1)使抗體-藥物結合物接觸於已固相化有抗原的盤，而使複合物形成的步驟；(2)使得能夠辨識該抗體-藥物結合物且經以標記物(marker)所標記化的蛋白質，與該複合物接觸，使形成更進一步的複合物的步驟；接著(3)透過因酵素反應等所致之顯色、發光等而檢測該標記物的步驟。

【0005】惟，當使用了會辨識抗體-藥物結合物之抗體部位之蛋白質的情況，會算出不僅是保持有藥物之狀態的抗體-藥物結合物，且亦包含藥物為游離狀態之抗體-藥物結合物(即，實質上僅是有抗體部位之物)的血漿中濃度，而無法進行正確的定量。

【0006】已知：透過使用了會辨識抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質之 ELISA 法，來定量抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法(非專利文獻 6~11)。

【0007】作為抗體-藥物結合物之一，而已知：以抗體與為拓樸異構酶 I 抑制劑之依喜替康的衍生物作為構成要素之抗體-藥物結合物(專利文獻 1~7、非專利文獻 12~15)。由於具有優良的抗腫瘤效果與安全性，現在該等抗體-藥物結合物的臨床試驗正在進行中。

【0008】針對上述以依喜替康的衍生物作為構成要素之抗體-藥物結合物，尚未知悉：定量保持有藥物之狀態下的血漿中

濃度的方法。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0009】

[專利文獻 1]國際公開第 2014/057687 號

[專利文獻 2]國際公開第 2014/061277 號

[專利文獻 3]國際公開第 2015/098099 號

[專利文獻 4]國際公開第 2015/115091 號

[專利文獻 5]國際公開第 2015/146132 號

[專利文獻 6]國際公開第 2015/155976 號

[專利文獻 7]國際公開第 2015/155998 號

[非專利文獻]

[非專利文獻 1]Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

[非專利文獻 2]Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

[非專利文獻 3]Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

[非專利文獻 4]Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.

[非專利文獻 5]Howard A. et al., J Clin Oncol 29: 398-405.

[非專利文獻 6]Xie H. et al., J Pharmacol Exp Ther. (2004) 308(3), 1073-1082.

[非專利文獻 7]Sanderson RJ. et al., Clinical Cancer Research (2005) Vol.11, 843-852.

[非專利文獻 8]Stephan JP. et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1673-1683.

[非專利文獻 9]Stephan JP. et al., Bioanalysis (2011) 3(6), 677-700.

[非專利文獻 10]Kaur S. et al., Bioanalysis (2013) 5(2), 201-226.

[非專利文獻 11]Dere R. et al., Bioanalysis (2013) 5(9), 1025-1040.

[非專利文獻 12]Ogitani Y. et al., Clinical Cancer Research (2016) 22(20), 5097-5108.

[非專利文獻 13]Ogitani Y. et al., Cancer Science (2016) 107, 1039-1046.

[非專利文獻 14]Doi T, et al., Lancet Oncol 2017; 18: 1512-22.

[非專利文獻 15]Takegawa N, et al., Int. J. Cancer: 141, 1682-1689 (2017).

【發明內容】

[發明概要]

[發明欲解決之課題]

【0010】本發明課題在於提供一種會辨識以依喜替康的衍生物作為構成要素之抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質，及一種定量之方法，其係使用該蛋白質來定量在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法；以及一種確認之方法，其係使用該蛋白質來確認在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結

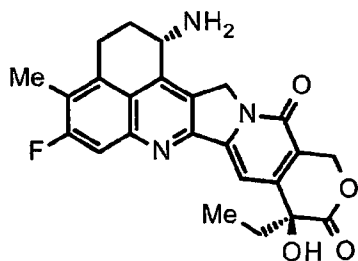
合物的組織分布的方法。

[用以解決課題之手段]

【0011】本發明人等為了解決上述課題進行了深入探討時，發現到：透過特定的免疫篩選(immunoscreening)所取得之蛋白質，會專一性地辨識以依喜替康的衍生物作為構成要素之抗體-藥物結合物的藥物部位。又，確立了一種定量之方法，其係使用該蛋白質之定量在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中之該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法；及一種確認之方法，其係使用該蛋白質之確認在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中之該抗體-藥物結合物的組織分布的方法。

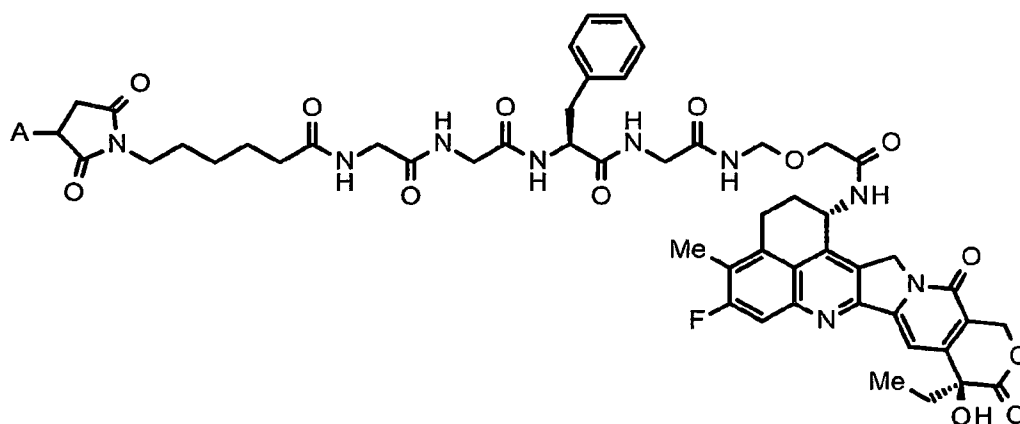
【0012】即，本發明提供以下[1]至[51]。

[1]一種蛋白質，其辨識抗體-藥物結合物的藥物部位，該抗體-藥物結合物係透過連接子而鍵結下式



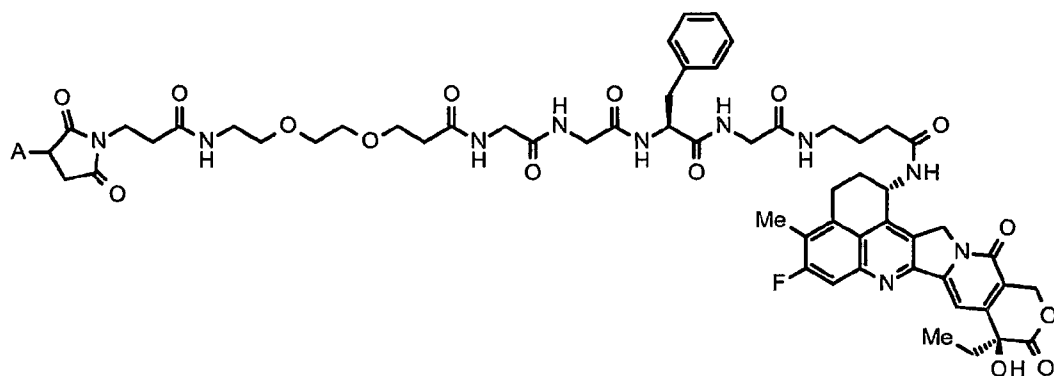
所示之藥物與抗體。

[2]如[1]之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的藥物連接子是下式所示：



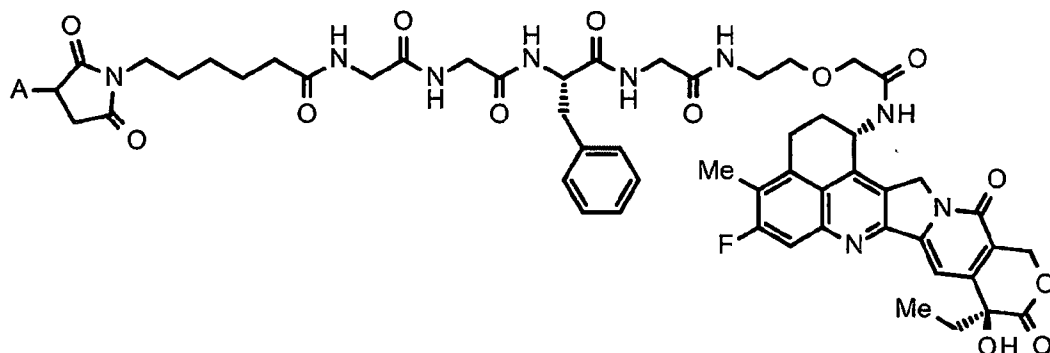
(式中，A 表示與抗體的鍵結位置，且該藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結)。

[3]如[1]之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的藥物連接子是下式所示：



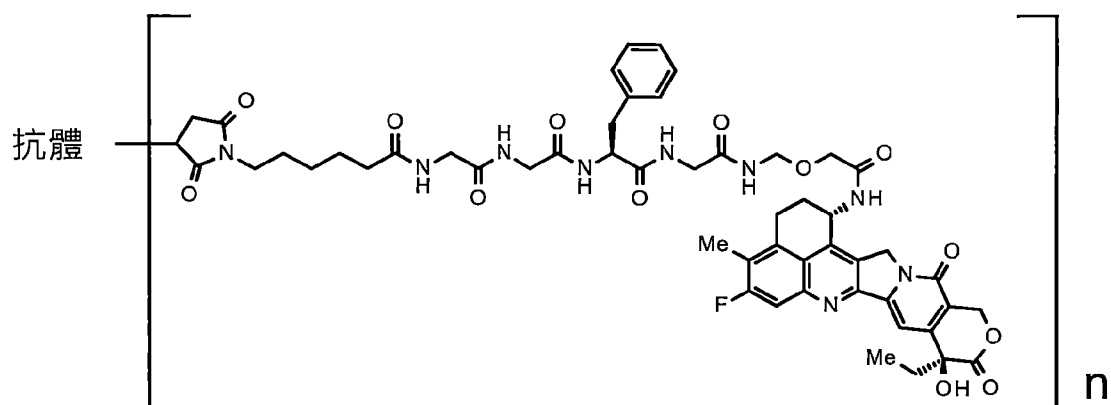
(式中，A 表示與抗體的鍵結位置，且該藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結)。

[4]如[1]之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的藥物連接子是下式所示：



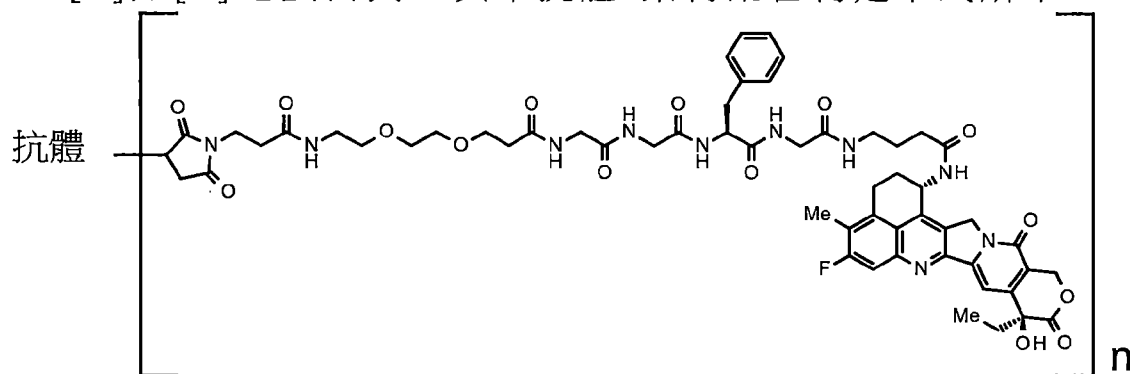
(式中，A 表示與抗體的鍵結位置，且該藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結)。

[5]如[1]之蛋白質，其中抗體-藥物結合物是下式所示：



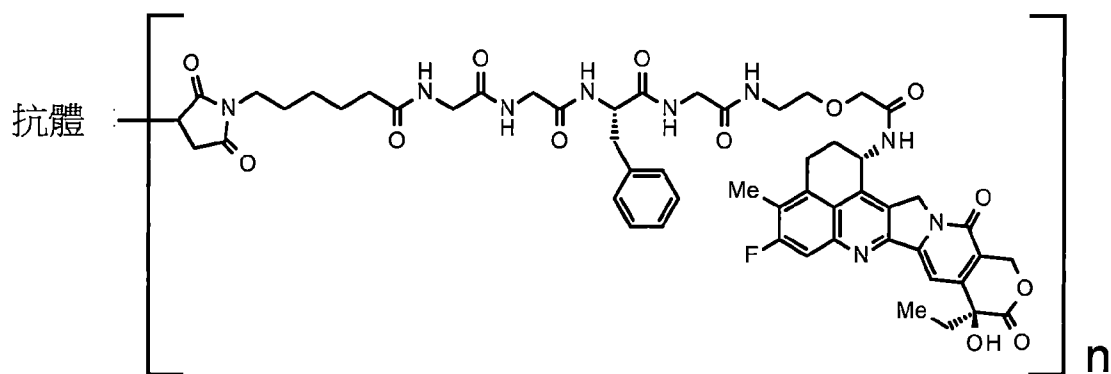
(式中，藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結， n 表示每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數)。

[6]如[1]之蛋白質，其中抗體-藥物結合物是下式所示：



(式中，藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結， n 表示每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數)。

[7]如[1]之蛋白質，其中抗體-藥物結合物為下式所示：



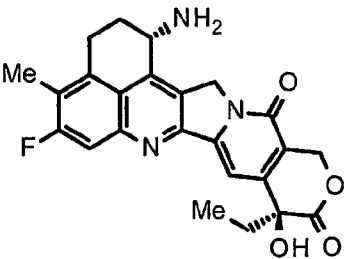
(式中，藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結， n 表示每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數)。

[8]如[1]至[7]中任一項之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數為 2 至 8 的範圍。

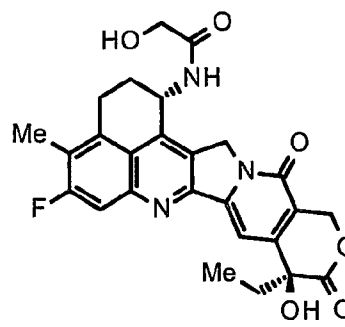
[9]如[1]至[8]中任一項之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中抗體為抗 HER2 抗體、抗 HER3 抗體、抗 TROP2 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 GPR20 抗體、或抗 CDH6 抗體。

[10]如[1]至[9]中任一項之蛋白質，其對於該抗體-藥物結合物的辨識性實質上不因在抗體-藥物結合物中的每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數的差異而不同。

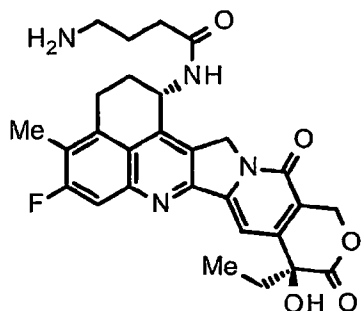
[11] 一種辨識下式所示之藥物之蛋白質，



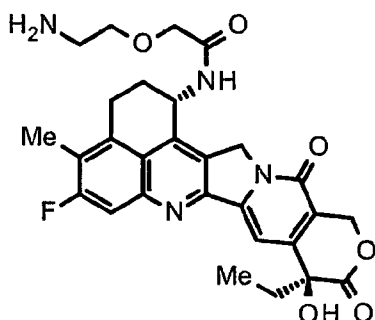
[12]一種辨識下式所示之藥物之蛋白質，



[13]一種辨識下式所示之藥物之蛋白質，



[14]一種辨識下式所示之藥物之蛋白質，



[15]如[1]至[14]中任一項之蛋白質，其特徵為抗體。

[16]如[15]之蛋白質，其特徵係

a)由下述重鏈以及輕鏈構成之抗體，

該重鏈包含由序列識別號 1 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 2 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，

該輕鏈包含由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3；

b)由下述重鏈以及輕鏈構成之抗體，

該重鏈包含由序列識別號 7 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 8 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，

該輕鏈包含由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3；

c)由下述重鏈以及輕鏈構成之抗體，

該重鏈包含由序列識別號 9 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 10 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，

該輕鏈包含由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3；或者，

d)由下述重鏈以及輕鏈構成之抗體，

該重鏈包含由序列識別號 11 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 12 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 13 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，

該輕鏈包含由序列識別號 14 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由 WAS 所示之三肽構成的 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3。

[17]如[16]之蛋白質，其特徵係由下述重鏈及輕鏈構成的抗體；其中該重鏈包含由序列識別號 15 中胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由序列識別號 16 中胺基酸編號 21 至 127 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區。

[18]如[17]之蛋白質，其特徵為小鼠抗體。

[19]如[17]之蛋白質，其特徵係由下述重鏈及輕鏈構成的抗體；其中該重鏈是由序列識別號 15 中胺基酸編號 20 至 477

記載的胺基酸序列構成，該輕鏈是由序列識別號 16 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成。

[20]如[17]之蛋白質，其特徵為嵌合抗體。

[21]如[17]之蛋白質，其特徵為免嵌合化抗體。

[22]如[17]之蛋白質，其特徵係由下述重鏈及輕鏈構成的抗體；其中該重鏈是由序列識別號 19 中胺基酸編號 20 至 464 記載的胺基酸序列構成，該輕鏈是由序列識別號 20 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成。

[23]如[15]之蛋白質，其特徵係如[19]或者[22]之抗體的重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體。

[24]如[15]之蛋白質，其特徵係由與如[19]或者[22]之抗體的胺基酸序列具有至少 95% 的同一性之胺基酸序列構成的抗體。

[25]如[15]之蛋白質，其特徵係由與如[19]或者[22]之抗體的胺基酸序列具有至少 99% 的同一性之胺基酸序列構成的抗體。

[26]如[15]之蛋白質，其特徵在於就對藥物的辨識性而言，是與如[19]或者[22]之抗體競爭的抗體。

[27]如[1]至[14]中任一項之蛋白質，其特徵係如[15]至[26]中任一項之抗體的抗原結合片段。

[28]如[27]之蛋白質，其中抗體的抗原結合片段是 Fab、F(ab')₂、Fab' 或者 Fv。

[29]一種定量之方法，其係使用如[1]至[28]中任一項之蛋白質，定量在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法。

[30]如[29]之方法，其特徵在於包含下述步驟：(1)使血漿中的抗體-藥物結合物接觸於已被固相化有抗體-藥物結合物之目標抗原的盤而使複合物形成的步驟；(2)使經以標記物(marker)所標記化之如[1]至[28]中任一項之蛋白質接觸，而使形成更進一步的複合物的步驟；接著(3)檢測該標記物的步驟。

[31]如[29]之方法，其特徵在於包含下述步驟：(1)使血漿中的抗體-藥物結合物接觸於已固相化有如[1]至[28]中任一項之蛋白質的盤，而使複合物形成的步驟；(2)使得能夠辨識該抗體-藥物結合物之抗體部位，且經以標記物所標記化的第二蛋白質接觸，使更進一步的複合物形成的步驟；接著(3)檢測該標記物的步驟。

[32]一種定量之方法，其係使用如[1]至[28]中任一項之蛋白質，定量在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，從該抗體-藥物結合物游離出的藥物的血漿中濃度的方法。

[33]如[32]之方法，其特徵在於包含下述步驟：(1)在經以標記物所標記化之競爭藥物的存在下，使血漿中從抗體-藥物結合物游離出的藥物接觸於已固相化有如[1]至[28]中任一項之蛋白質的盤，而使複合物形成的步驟；(2)檢測該標記物的步驟。

[34]一種確認之方法，其係使用如[1]至[28]中任一項之蛋白質，確認在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物的組織分布的方法。

[35]如[34]之方法，其特徵在於包含下述步驟：(1)使組織中的抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物與如[1]至[28]中任一項之蛋白質接觸而使複合物形成的步驟；

(2)使得能夠辨識如[1]至[28]中任一項之蛋白質，且經以標記物所標記化的第二蛋白質接觸，而使更進一步的複合物形成的步驟；接著(3)檢測該標記物的步驟。

[36]如[34]之方法，其特徵在於包含下述步驟：(1)使組織中的抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物，與經以標記物所標記化的如[1]至[28]中任一項之蛋白質接觸而使複合物形成的步驟；接著(2)檢測該標記物的步驟。

[37]如[30]、[31]、[33]、[35]或者[36]之方法，其中標記物為顯色試劑，且該標記物的檢測是透過感知該標記物的顯色而進行。

[38]如[30]、[31]、[33]、[35]或者[36]之方法，其中標記物為酵素，且該標記物的檢測是透過感知因該酵素與基質的反應而產生之發光或者顯色而進行。

[39]如[30]、[31]、[33]、[35]或者[36]之方法，其中標記物為發光物質，且該標記物的檢測是透過感知基於電化學反應的該標記物之發光而進行。

[40]一種聚核苷酸，其編碼如[1]至[28]中任一項之蛋白質。

[41]一種載體，其包含如[40]之聚核苷酸。

[42]一種形質轉換宿主細胞，其包含如[40]之聚核苷酸。

[43]一種形質轉換宿主細胞，其包含如[41]之載體。

[44]如[1]至[28]中任一項之蛋白質之製造方法，其包含下述步驟：培養如[42]或者[43]之宿主細胞的步驟；接著，從前述培養步驟所獲得之培養產物純化蛋白質的步驟。

[45]一種組成物，其包含如[1]至[28]中任一項之蛋白質。

[46]一種套組，包含如[1]至[28]中任一項之蛋白質，或者如[45]之組成物。

[47]如[46]之套組，其係用以定量在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物的血漿中濃度。

[48]如[46]之套組，其係用以確認在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物的組織分布。

[49]一種抗體，其係包含下述重鏈及輕鏈而成，該重鏈包含由序列識別號 15 中胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由序列識別號 16 中胺基酸編號 21 至 127 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區。

[50]如[49]之抗體，其係包含下述重鏈及輕鏈而成，該重鏈是由序列識別號 15 中胺基酸編號 20 至 477 記載的胺基酸序列構成，該輕鏈是由序列識別號 16 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成。

[51]如[49]之抗體，其係包含下述重鏈及輕鏈而成，該重鏈是由序列識別號 19 中胺基酸編號 20 至 464 記載的胺基酸序列構成，該輕鏈是由序列識別號 20 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成。

[發明之效果]

【0013】依據本發明，提供了：一種會辨識以依喜替康的衍生物作為構成要素之抗體-藥物結合物的藥物部位之蛋白質；及一種使用該蛋白質之在經投予上述之抗體-藥物結合物的哺乳動物中定量該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法及確認組織

分布的方法。

【圖式簡單說明】

【0014】

[圖 1]顯示小鼠抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列(序列識別號 15)。

[圖 2]顯示小鼠抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 16)。

[圖 3]顯示編碼小鼠抗體 1A3 重鏈可變區的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 17)。

[圖 4]顯示編碼小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 18)。

[圖 5]顯示兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列(序列識別號 19)。

[圖 6]顯示兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 20)。

[圖 7]顯示抗 HER2 抗體重鏈的胺基酸序列(序列識別號 21)。

[圖 8]顯示抗 HER2 抗體輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 22)。

[圖 9]顯示抗 HER3 抗體重鏈的胺基酸序列(序列識別號 23)。

[圖 10]顯示抗 HER3 抗體輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 24)。

[圖 11]顯示抗 TROP2 抗體重鏈的胺基酸序列(序列識別號 25)。

[圖 12]顯示抗 TROP2 抗體輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 26)。

[圖 13]顯示抗 B7-H3 抗體重鏈的胺基酸序列(序列識別號 27)。

[圖 14]顯示抗 B7-H3 抗體輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 28)。

[圖 15]顯示在以小鼠抗體 1A3 作為捕捉試劑(capture reagent)的情況下，HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)的校準曲線。

[圖 16]顯示在以小鼠抗體 8B2 作為捕捉試劑的情況下，HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)的校準曲線。

[圖 17]顯示在以小鼠抗體 11B1 作為捕捉試劑的情況下，HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)的校準曲線。

[圖 18]顯示在以小鼠抗體 1A3 作為檢測試劑的情況下，HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)的校準曲線。

[圖 19]顯示在以小鼠抗體 8B2 作為檢測試劑的情況下，HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)的校準曲線。

[圖 20]顯示在以小鼠抗體 11B1 作為檢測試劑的情況下，HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)的校準曲線。

[圖 21]顯示在以小鼠抗體 1A3 作為檢測試劑的情況下，

B7-H3-ADC(I)(DAR8) 及 B7-H3-ADC(I)(DAR4) 的校準曲線。

[圖 22]顯示在以小鼠抗體 8B2 作為檢測試劑的情況下，B7-H3-ADC(I)(DAR8) 及 B7-H3-ADC(I)(DAR4) 的校準曲線。

[圖 23]顯示在以小鼠抗體 11B1 作為檢測試劑的情況下，B7-H3-ADC(I)(DAR8) 及 B7-H3-ADC(I)(DAR4) 的校準曲線。

[圖 24]顯示用以測定 HER2-ADC(I)的小鼠血漿中濃度的校準曲線。

[圖 25]顯示用以測定 HER3-ADC(I)的猿血漿中濃度的校準曲線。

[圖 26]顯示用以測定 TROP2-ADC(I)的猿血漿中濃度的校準曲線。

[圖 27]顯示用以測定 B7-H3-ADC(I)的猿血漿中濃度的校準曲線。

[圖 28]顯示編碼人類輕鏈訊息序列及人類 κ 鏈恒定區的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 29)。

[圖 29]顯示編碼兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 30)。

[圖 30]顯示編碼兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 31)。

[圖 31]顯示抗 GPR20 抗體重鏈的胺基酸序列(序列識別號 32)。

[圖 32]顯示抗 GPR20 抗體輕鏈的胺基酸序列(序列識別號

33)。

[圖 33]顯示抗 CDH6 抗體重鏈的胺基酸序列(序列識別號 34)。

[圖 34]顯示抗 CDH6 抗體輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 35)。

[圖 35]顯示使用了兔嵌合化抗體 1A3 的免疫染色圖像。比較對已皮下移植過人類頭頸部癌細胞株 FaDu 的裸鼠投予了 TROP2-ADC(I)或者 Anti-TROP2 Ab 之情況的染色圖像。

[圖 36]顯示使用了兔嵌合化抗體 1A3 的免疫染色圖像。比較對已皮下移植過過度表現 GPR20 的人類胃腸道基質腫瘤 (Gastrointestinal stromal tumor)細胞株 GIST-T1/GPR20 的裸鼠投予了 GPR20-ADC(I)之情況，或者未投予之情況的染色圖像。

[圖 37]顯示使用了小鼠抗體 1A3 的免疫染色圖像。比較對已皮下移植過由透明細胞型腎細胞癌患者所採取之腫瘤組織的裸鼠，投予了 CDH6-ADC(I)之情況，或者未投予之情況的染色圖像。

[圖 38]顯示使用了小鼠抗體 1A3 的免疫染色圖像。比較對已皮下移植過由透明細胞型腎細胞癌患者所採取之腫瘤組織的裸鼠，投予 CDH6-ADC(I)，並預先將小鼠抗體 1A3 與化合物 (2)或者 SN-38 混合之後，使用於免疫染色之情況，或者，並非那樣的情況的染色圖像。

[圖 39]顯示用以測定 GPR20-ADC(I)的小鼠血漿中濃度的校準曲線。

[圖 40]顯示用以測定 HER2-ADC(I)的人類血清中濃度的

校準曲線。

[圖 41]顯示競爭抑制用化合物對於小鼠抗體 1A3 辨識 HER2-ADC(I)的抑制率。

【實施方式】

[用以實施發明的形態]

【0015】以下，針對用以實施本發明的合適形態進行說明。再者，於以下說明的實施形態是顯示本發明代表性實施形態之一例，而本發明的範圍並不因此而受到限縮解釋。

【0016】

1.定義

在本發明中，所謂「蛋白質」是與「胜肽」或者「多肽」同義。

【0017】本發明之蛋白質，合適地是抗體或者抗體的抗原結合片段，但只要是與抗體同樣地具有會辨識抗原之機能的蛋白質的話，為抗體及抗體的抗原結合片段以外的蛋白質(抗體替代物(antibody alternative))亦可。就抗體替代物而言，可舉例如：纖維接合素(Fibronectin)、蛋白質 A (ProteinA)、脂質載運蛋白(Lipocalin)、TrxA、A-domain、錨蛋白重複(Ankyrin repeat)、APPI、Ras-binding AF-6 等支架蛋白(Kasper Binz H. et al., Current Opinion in Biotechnology 2005, 16:459-469, Kasper Binz H. et al., Nature Biotechnology 23(10) 2005, 1257-1268, Skerra A., Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:295-304, Nygren P., FEBS Journal 275(2008) 2668-2676, Gronwall C. et al., Journal of Biotechnology 140(2009) 254-269)。

【0018】在本發明中，所謂「抗體」表示具有會辨識特定抗原之機能的糖蛋白質。就抗體的具體例而言，可舉：多株抗體、單株抗體、嵌合抗體、兔源化抗體 (rabbitized antibody)、人源化抗體、及人類抗體等。

【0019】在本發明中，有時將「抗原」用於「免疫原」的含意中。

【0020】在本發明中，所謂「抗體的抗原結合片段」是意指保持有會辨識抗原之機能的抗體部分片段，與「抗體的機能性片段」同義。就抗體的抗原結合片段而言，可舉例如：Fab、F(ab')₂、scFv、Fab'、單鏈免疫球蛋白 (single strand immunoglobulin) 等，但並非被限定於該等。這樣的抗體的機能性片段，在能夠透過將抗體的全長分子以木瓜酶 (papain)、胃蛋白酶 (pepsin) 等酵素進行處理所獲得者之外，亦可為使用重組基因而在適當的宿主細胞所產生的重組蛋白質。

【0021】所謂本發明之蛋白質會「辨識」抗原，是意指本發明之蛋白質因分子間力 (靜電交互作用、凡得瓦力、氫鍵等) 而與抗原結合。本發明之蛋白質會「辨識」抗原是，例如，能夠透過檢測各種因免疫化學的手法產生的訊息而確認。

【0022】所謂本發明之蛋白質對於抗原的「辨識性」不同，是意指本發明之蛋白質對於抗原的鍵結的強度或性質實質上不同。本發明之蛋白質對於抗原的「辨識性」是否不同，例如，是能夠透過比較因各種免疫化學的手法產生的訊息的強度，或者透過比較表示抗原的濃度與訊息的強度之相關性的校準曲線而確認。

【0023】所謂本發明之蛋白質進行辨識的「部位」是意指

本發明之蛋白質進行辨識的對象中之特定的部分結構。亦有將本發明之蛋白質進行辨識的對象稱為「抗原」，並將本發明之蛋白質進行辨識之特定的部位稱為「表位(epitope)」。

【0024】已知在抗體的重鏈及輕鏈來說，分別有三處的互補決定區(CDR：Complementarity determining region)。互補決定區亦被稱為超變異區(hypervariable domain)，是在抗體的重鏈及輕鏈的可變區內，且是一級結構的變異性特別高的部位，在重鏈及輕鏈之多肽鏈的一級結構上，通常分別分離為三處。在本發明來說，就抗體的互補決定區而言，是將重鏈的互補決定區自重鏈胺基酸序列的胺基末端側起標記為 CDRH1、CDRH2、CDRH3，並將輕鏈的互補決定區自輕鏈胺基酸序列之胺基末端側起標記為 CDRL1、CDRL2、CDRL3。該等部位在立體結構上彼此接近，決定對抗原的專一性。

【0025】在本發明中，所謂「基因」意指包含編碼蛋白質之胺基酸的核苷酸序列之核苷酸或其互補鏈，例如，為含有編碼蛋白質之胺基酸的核苷酸序列之核苷酸或是其互補鏈的聚核苷酸、寡核苷酸、DNA、mRNA、cDNA、cRNA 等是包含於「基因」的含意中。這樣的基因是單股、雙股或是三股以上的核苷酸，且 DNA 鏈與 RNA 鏈的聯合體(association)、在單股核苷酸鏈上混合存在核糖核苷酸(RNA)與去氧核糖核苷酸(DNA)者以及包含那樣之核苷酸鏈的雙股或是三股以上的核苷酸亦包含於「基因」的含意中。

【0026】在本發明中，「核苷酸」與「核酸」為同義，例如：DNA、RNA、探針、寡核苷酸、聚核苷酸、引子等亦包含於「核苷酸」的含意中。這樣的核苷酸是由單股、雙股或是三

股以上構成的核苷酸，且 DNA 鏈與 RNA 鏈的聯合體、在單股核苷酸鏈上混合存在核糖核苷酸(RNA)與去氧核糖核苷酸(DNA)者及包含那樣的核苷酸鏈之雙股或是三股以上的聯合體亦包含於「核苷酸」的含意中。

【0027】在本發明中，於「細胞」來說，亦包含源自動物個體的各種細胞、繼代培養細胞、初代培養細胞、細胞株、重組細胞及微生物等。

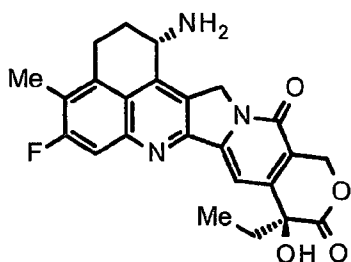
【0028】

2. 抗體-藥物結合物

在本發明中，所謂「抗體-藥物結合物」意指抗體與藥物是透過連接子而鍵結之鍵結體。

【0029】在本發明中，所謂「藥物連接子」意指抗體-藥物結合物之中，由連接子及藥物構成的部分結構。

【0030】本發明之蛋白質特徵是在於辨識
下式



所示之藥物(以下稱為「化合物(1)」)、與抗體透過連接子而鍵結之抗體-藥物結合物(以下稱為「本發明涉及的抗體-藥物結合物」)的藥物部位。

【0031】化合物(1)是被稱為依喜替康(IUPAC 名：
(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氫-9-羥基-4-

甲基-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮 ((1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-1,2,3,9,12,15-hexahydro-9-hydroxy-4-methyl-10H,13H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13-dione)；(亦可表示為化學名稱：(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮 ((1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione))) 的抗腫瘤藥，已知具有拓撲異構酶 I 抑制活性。

【0032】再者，本發明之蛋白質亦能夠辨識化合物(1)本身。

【0033】在本發明涉及的抗體-藥物結合物中之抗體無特別限制，可舉例如：抗 HER2 抗體、抗 HER3 抗體、抗 TROP2 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 CD3 抗體、抗 CD30 抗體、抗 CD33 抗體、抗 CD37 抗體、抗 CD56 抗體、抗 CD98 抗體、抗 DR5 抗體、抗 EGFR 抗體、抗 EPHA2 抗體、抗 FGFR2 抗體、抗 FGFR4 抗體、抗 FOLR1 抗體、抗 VEGF 抗體、抗 CD20 抗體、抗 CD22 抗體、抗 CD70 抗體、抗 PSMA 抗體、抗 CEA 抗體、抗間皮素(Mesothelin)抗體、抗 A33 抗體、抗 CanAg 抗體、抗 Cripto 抗體、抗 G250 抗體、抗 MUC1 抗體、抗 GPNMB 抗體、抗整合素(Integrin)抗體、抗肌腱蛋白-C(Tenascin-C)抗體、抗 SLC44A4 抗體、抗 GPR20 抗體、及抗 CDH6 抗體；合適地可舉：抗 HER2 抗體、抗 HER3 抗體、

抗 TROP2 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 GPR20 抗體、及抗 CDH6 抗體。

【0034】在本發明中，所謂「抗 HER2 抗體」是會專一性地鍵結至 HER2(人類表皮生長因子受體第 2 型(Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2)； ErbB-2)，較佳表示具有會因與 HER2 鍵結而內化至 HER2 表現細胞之活性的抗體。

【0035】就抗 HER2 抗體而言，可舉例如：曲妥珠單抗(Trastuzumab)(美國專利第 5821337 號)、帕妥珠單抗(Pertuzumab)(國際公開第 01/00245 號)，合適地可舉：曲妥珠單抗。

【0036】在本發明中，所謂「抗 HER3 抗體」是會專一性地鍵結於 HER3(人類表皮生長因子受體第 3 型(Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 3)； ErbB-3)，較佳表示具有會因與 HER3 鍵結而內化至 HER3 表現細胞之活性的抗體。

【0037】就抗 HER3 抗體而言，可舉例如：帕曲妥單抗(Patritumab； U3-1287)、U1-59(國際公開第 2007/077028 號)、MM-121(絲里班圖單抗(Seribantumab))、國際公開 2008/100624 號記載之抗 ERBB3 抗體、RG-7116(倫雪珠單抗(Lumretuzumab))、及 LJM-716(依根妥單抗(Elgemtumab))，合適地可舉：帕曲妥單抗、及 U1-59。

【0038】在本發明中，所謂「抗 TROP2 抗體」是會專一性地鍵結於 TROP2(TACSTD2：腫瘤關聯鈣訊息傳遞因子 2(Tumor-associated calcium signal transducer 2)；EGP-

1)，較佳表示具有會因與 TROP2 鍵結而內化至 TROP2 表現細胞之活性的抗體。

【0039】就抗 TROP2 抗體而言，可舉例如：hTINA1-H1L1(國際公開第 2015/098099 號)。

【0040】在本發明中，所謂「抗 B7-H3 抗體」是會專一性地鍵結於 B7-H3(B 細胞抗原 # 7 同源物(B cell antigen # 7 homolog) 3； PD-L3； CD276)，較佳表示具有會因與 B7-H3 鍵結而內化至 B7-H3 表現細胞之活性的抗體。

【0041】就抗 B7-H3 抗體而言，可舉例如：M30-H1-L4(國際公開第 2014/057687 號)。

【0042】在本發明中，所謂「抗 GPR20 抗體」是會專一性地鍵結於 GPR20(G 蛋白耦合受體 20(G Protein-coupled receptor 20))，較佳表示具有會因與 GPR20 鍵結而內化至 GPR20 表現細胞之活性的抗體。

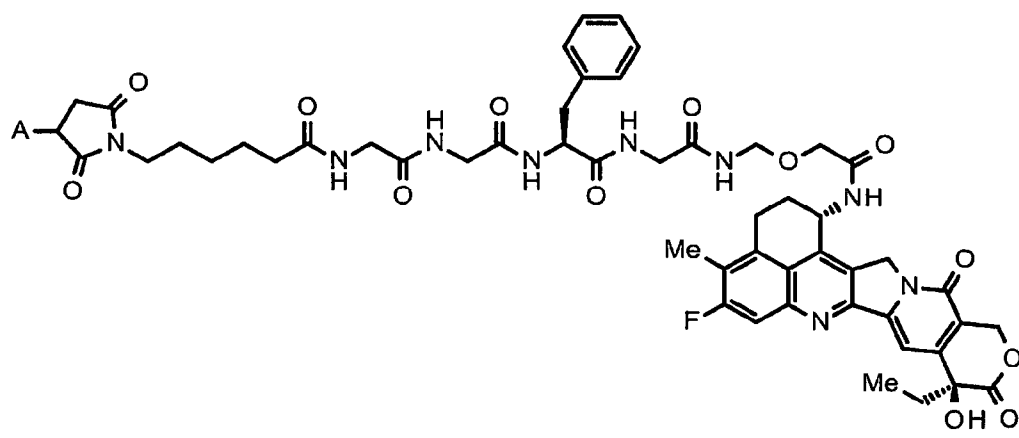
【0043】就抗 GPR20 抗體而言，可舉例如：h046-H4e/L7(國際公開第 2018/135501 號)。

【0044】在本發明中，所謂「抗 CDH6 抗體」是會專一性地鍵結於 CDH6(黏附蛋白-6(Cadherin-6))，較佳表示具有會因與 CDH6 鍵結而內化至 CDH6 表現細胞之活性的抗體。

【0045】就抗 CDH6 抗體而言，可舉例如：H01L02(國際公開第 2018/212136 號)。

【0046】本發明之蛋白質，合適地是特徵係在於會專一性地辨識：

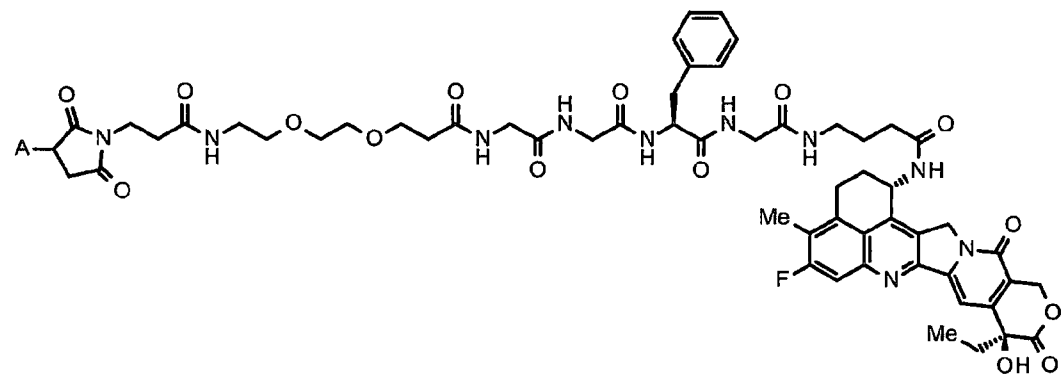
具有下式



所示之藥物連接子之抗體-藥物結合物(以下稱為「抗體-藥物結合物(I)」)的藥物部位

(式中，A 表示與抗體的鍵結位置，且該藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結)、

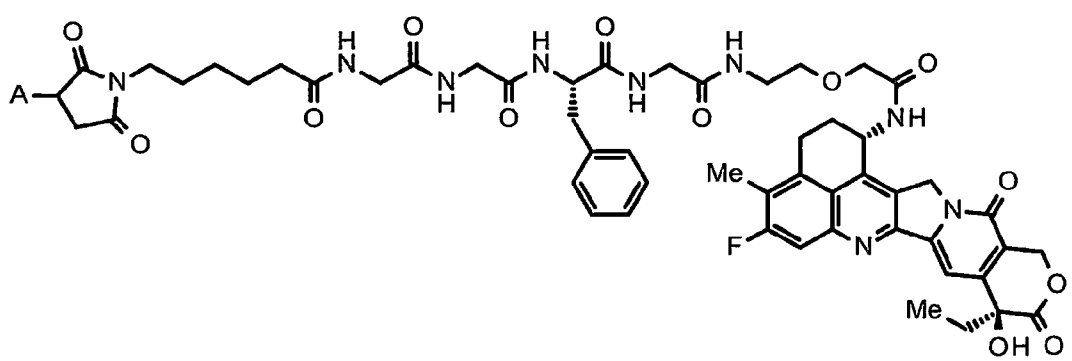
具有下式



所示之藥物連接子之抗體-藥物結合物(以下稱為「抗體-藥物結合物(II)」)的藥物部位

(式中，A 表示與抗體的鍵結位置，且該藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結)、或

具有下式



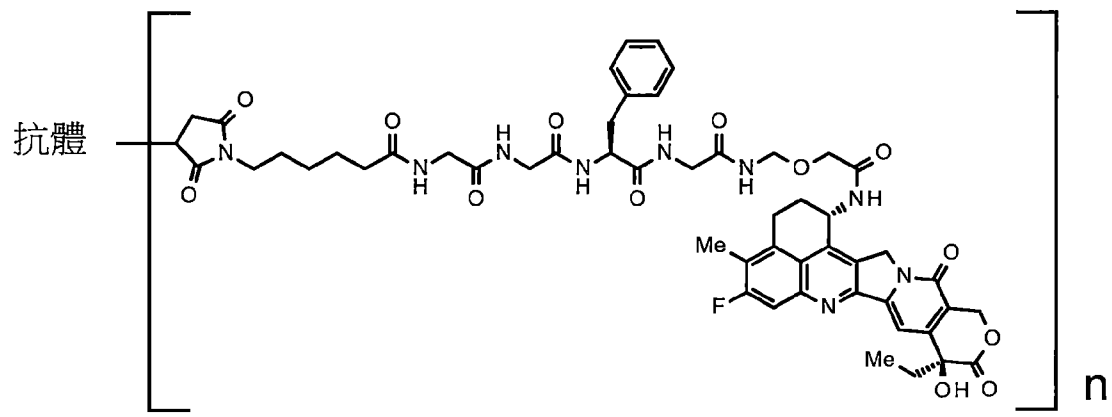
所示之藥物連接子之抗體-藥物結合物(以下，稱為「抗體-藥物結合物(III)」)的藥物部位

(式中，A 表示與抗體的鍵結位置，且該藥物連接子是透過硫醚鍵與抗體鍵結)。

【0047】 抗體-藥物結合物(I)～(III)的藥物連接子是鍵結於在抗體的鏈間的雙硫鍵部位(2 處的重鏈-重鏈間，及 2 處的重鏈-輕鏈間)產生的硫醇基(換言之，半胱胺酸殘基的硫原子)。

【0048】 本發明之蛋白質，更合適地，特徵係在於會專一性地辨識抗體-藥物結合物(I)的藥物部位。

【0049】 抗體-藥物結合物(I)亦能以下式表示。

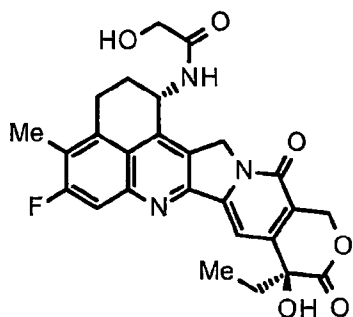


【0050】 於此處，藥物連接子是藉由硫醚鍵而與抗體鍵結。又，n 是與所謂的平均藥物鍵結數(DAR；Drug-to-

Antibody Ratio)同義，表示每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數。

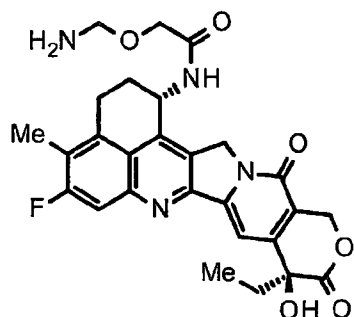
【0051】再者，本發明涉及的抗體-藥物結合物之抗體每一分子的平均藥物鍵結數的算出，例如，能夠透過下述方法進行：藉由測定在 280nm 及 370nm 這二波長中抗體-藥物結合物與其結合作用前驅物的 UV 吸光度而算出的方法(UV 法)，或者透過 HPLC 測定來定量經以還原劑處理抗體-藥物結合物所獲得之各斷片(fragment)並算出的方法(HPLC 法)。

【0052】抗體-藥物結合物(I)是在轉移至癌細胞內之後，連接子部分被剪切，而游離下式



所示之化合物(以下稱為「化合物(2)」)。

【0053】化合物(2)被認為是藉由剪切本發明所使用之抗體-藥物結合物的連接子部分而產生之下式

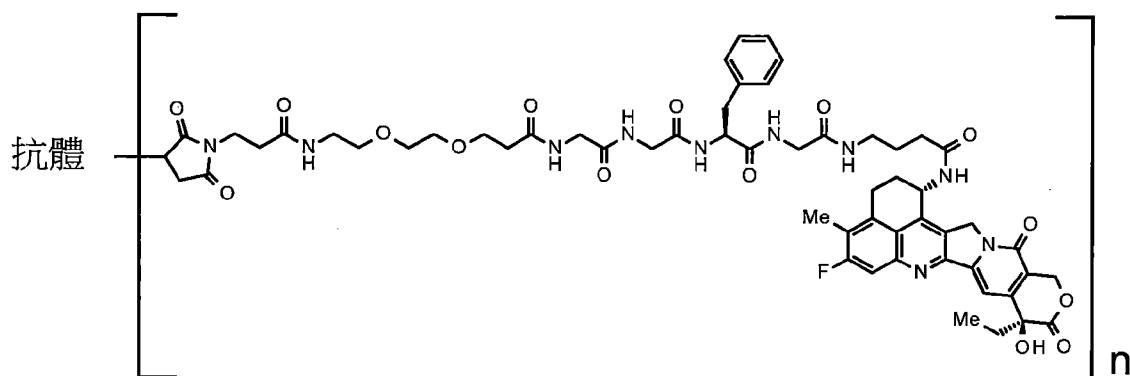


所示之化合物(以下稱為「化合物(3)」)的胺縮醛(aminol)結構進行分解，藉此而產生。

【0054】化合物(2)被認為是抗體-藥物結合物(I)的抗腫瘤活性之本體，已被確認具有拓樸異構酶 I 抑制作用(Ogitani Y. et al., Clinical Cancer Research, 2016, Oct 15;22(20):5097-5108, Epub 2016 Mar 29)。

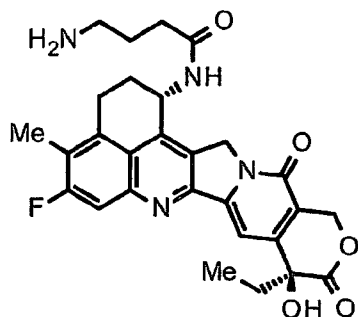
【0055】再者，本發明之蛋白質亦能夠辨識從抗體-藥物結合物(I)游離出的化合物(2)本身。

【0056】抗體-藥物結合物(II)亦能以下式表示。



【0057】於此處，藥物連接子是透過硫醚鍵而與抗體鏈結。又， n 與 DAR 同義，表示每一抗體的藥物連接子的平均鏈結數。

【0058】抗體-藥物結合物(II)是在轉移至癌細胞內之後，
連接子部分被剪切，而游離下式

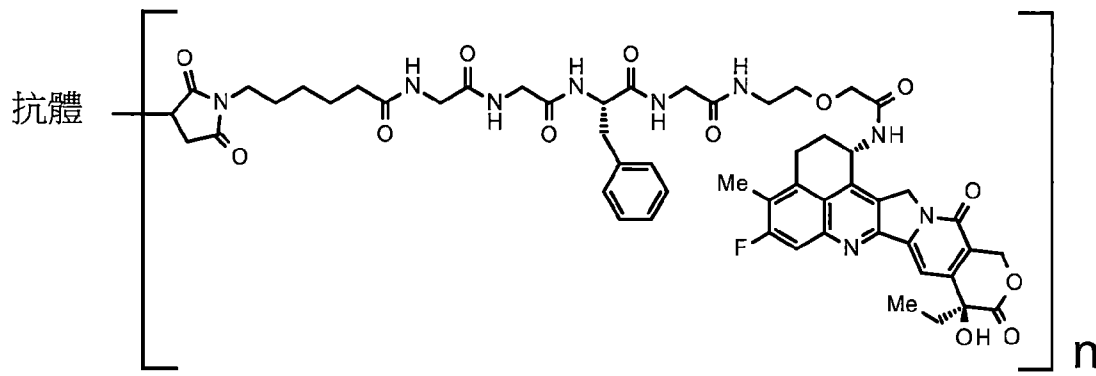


所示之化合物(以下稱為「化合物(4)」)。

【0059】再者，本發明之蛋白質亦能夠辨識從抗體-藥物結

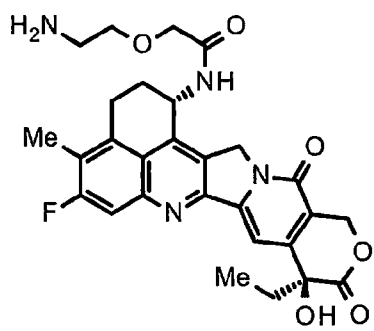
合物(II)游離出的化合物(4)本身。

【0060】 抗體-藥物結合物(III)亦能以下式表示。



【0061】 於此處，藥物連接子是透過硫醚鍵而與抗體鍵結。又，n 是與 DAR 同義，表示每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數。

【0062】 抗體-藥物結合物(III)是在轉移至癌細胞內之後，連接子部分被剪切，而游離下式



所示之化合物(以下稱為「化合物(5)」)。

【0063】 再者，本發明之蛋白質亦能夠辨識從抗體-藥物結合物(III)游離出的化合物(5)本身。

【0064】 在本發明中，所謂「抗 HER2 抗體-藥物結合物」是表示在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的抗體為抗 HER2 抗體的抗體-藥物結合物。

【0065】 抗 HER2 抗體合適地是：包含由序列識別號 21 中

胺基酸編號 1 至 449 記載的胺基酸序列構成之重鏈及由序列識別號 22 中胺基酸編號 1 至 214 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體；或者是包含由序列識別號 21 記載的胺基酸序列構成之重鏈及由序列識別號 22 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體。

【0066】抗 HER2 抗體-藥物結合物之每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數，合適地是從 2 至 8，更合適地是從 3 至 8，進一步更合適地是從 7 至 8，進一步更合適地是從 7.5 至 8，進一步更合適地是約 8。

【0067】抗 HER2 抗體-藥物結合物能夠參考國際公開第 2015/115091 號等的記載而製造。

【0068】在本發明中，所謂「抗 HER3 抗體-藥物結合物」是表示在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的抗體是抗 HER3 抗體的抗體-藥物結合物。

【0069】抗 HER3 抗體合適地是含有下述重鏈、以及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 23 中胺基酸編號 26 至 35 記載的胺基酸序列構成的 CDRH1、由序列識別號 23 中胺基酸編號 50 至 65 記載的胺基酸序列構成的 CDRH2、及由序列識別號 23 中胺基酸編號 98 至 106 記載的胺基酸序列構成的 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 24 中胺基酸編號 24 至 39 記載的胺基酸序列構成的 CDRL1、由序列識別號 24 中胺基酸編號 56 至 62 記載的胺基酸序列構成的 CDRL2、及由序列識別號 24 中胺基酸編號 95 至 103 記載的胺基酸序列構成的 CDRL3；

更合適地是包含下述重鏈及輕鏈之抗體：該重鏈包含由序列識別號 23 中胺基酸編號 1 至 117 記載的胺基酸序列構成的重

鏈可變區；該輕鏈包含由在該序列識別號 24 中胺基酸編號 1 至 113 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區；

進一步更合適地是：包含由序列識別號 23 記載的胺基酸序列構成之重鏈、及由序列識別號 24 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體；或者是該抗體之重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體。

【0070】抗 HER3 抗體-藥物結合物之每一抗體的藥物連接子的平均鏈結數，合適地是從 2 至 8，更合適地是從 3 至 8，進一步更合適地是從 7 至 8，進一步更合適地是從 7.5 至 8，進一步更合適地是約 8。

【0071】抗 HER3 抗體-藥物結合物是能夠參考國際公開第 2015/155998 號等的記載而製造。

【0072】在本發明中，所謂「抗 TROP2 抗體-藥物結合物」是表示在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的抗體為抗 TROP2 抗體的抗體-藥物結合物。

【0073】抗 TROP2 抗體，合適地是包含下述重鏈以及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 25 中胺基酸編號 50 至 54 記載的胺基酸序列構成的 CDRH1、由序列識別號 25 中胺基酸編號 69 至 85 記載的胺基酸序列構成的 CDRH2、及由序列識別號 25 中胺基酸編號 118 至 129 記載的胺基酸序列構成的 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 26 中胺基酸編號 44 至 54 記載的胺基酸序列構成的 CDRL1、由序列識別號 26 中胺基酸編號 70 至 76 記載的胺基酸序列構成的 CDRL2、及由序列識別號 26 中胺基酸編號 109 至 117 記載的胺基酸序列構成的 CDRL3；

更合適地是包含下述重鏈及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 25 中胺基酸編號 20 至 140 記載的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由序列識別號 26 中胺基酸編號 21 至 129 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區；

進一步更合適地是：包含由序列識別號 25 中胺基酸編號 20 至 470 記載的胺基酸序列構成之重鏈、及由序列識別號 26 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體；或者，該抗體的重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體。

【0074】抗 TROP2 抗體-藥物結合物之每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數，合適地是從 2 至 8，更合適地是從 3 至 5，進一步更合適地是從 3.5 至 4.5，進一步更合適地是約 4。

【0075】抗 TROP2 抗體-藥物結合物能夠參考國際公開第 2015/098099 號等的記載而製造。

【0076】在本發明中，所謂「抗 B7-H3 抗體-藥物結合物」是表示在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的抗體為抗 B7-H3 抗體的抗體-藥物結合物。

【0077】抗 B7-H3 抗體，合適地是包含下述重鏈以及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 27 中胺基酸編號 50 至 54 記載的胺基酸序列構成的 CDRH1、由序列識別號 27 中胺基酸編號 69 至 85 記載的胺基酸序列構成的 CDRH2、及由序列識別號 27 中胺基酸編號 118 至 130 記載的胺基酸序列構成的 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 28 中胺基酸編號 44 至 53 記載的胺基酸序列構成的 CDRL1、由序列識別號 28 中胺基酸編號 69 至 75 記載的胺基酸序列構成的 CDRL2、及由序列識別號 28 中胺基酸編號 108 至 116 記載的胺基酸序列構成的

CDRL3；

更合適地是包含下述重鏈、及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 27 中胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由序列識別號 28 中胺基酸編號 21 至 128 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區；

進一步更合適地是：包含由序列識別號 27 中胺基酸編號 20 至 471 記載的胺基酸序列構成之重鏈、及由序列識別號 28 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體；或者，該抗體的重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體。

【0078】抗 B7-H3 抗體-藥物結合物之每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數，合適地是從 2 至 8，更合適地是從 3 至 5，進一步更合適地是從 3.5 至 4.5，進一步更合適地是約 4。

【0079】抗 B7-H3 抗體-藥物結合物能夠參考國際公開第 2014/057687 號等的記載而製造。

【0080】在本發明中，所謂「抗 GPR20 抗體-藥物結合物」是表示在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的抗體為抗 GPR20 抗體的抗體-藥物結合物。

【0081】抗 GPR20 抗體，合適地是包含下述重鏈、以及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 32 中胺基酸編號 45 至 54 記載的胺基酸序列構成的 CDRH1、由序列識別號 32 中胺基酸編號 69 至 78 記載的胺基酸序列構成的 CDRH2、及由序列識別號 32 中胺基酸編號 118 至 131 記載的胺基酸序列構成的 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 33 中胺基酸編號 44 至 54 記載的胺基酸序列構成的 CDRL1、由序列識別號 33 中胺基酸編號 70 至 76 記載的胺基酸序列構成的 CDRL2、及由序列識別

號 33 中胺基酸編號 109 至 117 記載的胺基酸序列構成的 CDRL3；

更合適地是包含下述重鏈及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 32 中胺基酸編號 20 至 142 記載的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由序列識別號 33 中胺基酸編號 21 至 129 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區；

進一步更合適地是：包含由序列識別號 32 中胺基酸編號 20 至 472 記載的胺基酸序列構成之重鏈、及由序列識別號 33 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體；或者，該抗體的重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體。

【0082】抗 GPR20 抗體-藥物結合物之每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數，合適地是從 2 至 8，更合適地是從 3 至 8，進一步更合適地是從 7 至 8，進一步更合適地是從 7.5 至 8，進一步更合適地是約 8。

【0083】抗 GPR20 抗體-藥物結合物是能夠參考國際公開第 2018/135501 號等的記載而製造。

【0084】在本發明中，所謂「抗 CDH6 抗體-藥物結合物」是表示在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的抗體為抗 CDH6 抗體的抗體-藥物結合物。

【0085】抗 CDH6 抗體合適地是包含下述重鏈以及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 34 中胺基酸編號 45 至 54 記載的胺基酸序列構成的 CDRH1、由序列識別號 34 中胺基酸編號 69 至 78 記載的胺基酸序列構成的 CDRH2、及由序列識別號 34 中胺基酸編號 118 至 130 記載的胺基酸序列構成的 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 35 中胺基酸編號 44 至 54 記載的胺基

酸序列構成的 CDRL1、由序列識別號 35 中胺基酸編號 70 至 76 記載的胺基酸序列構成的 CDRL2、及由序列識別號 35 中胺基酸編號 109 至 116 記載的胺基酸序列構成的 CDRL3；

更合適地是包含下述重鏈及輕鏈的抗體：該重鏈包含由序列識別號 34 中胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由序列識別號 35 中胺基酸編號 21 至 128 記載的胺基酸序列構成的輕鏈可變區；

進一步更合適地是：包含由序列識別號 34 中胺基酸編號 20 至 471 記載的胺基酸序列構成之重鏈、及由序列識別號 35 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成之輕鏈而成之抗體；或者，該抗體的重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體。

【0086】抗 CDH6 抗體-藥物結合物之每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數，合適地是從 2 至 8，更合適地是從 3 至 8，進一步更合適地是從 7 至 8，進一步更合適地是從 7.5 至 8，進一步更合適地是約 8。

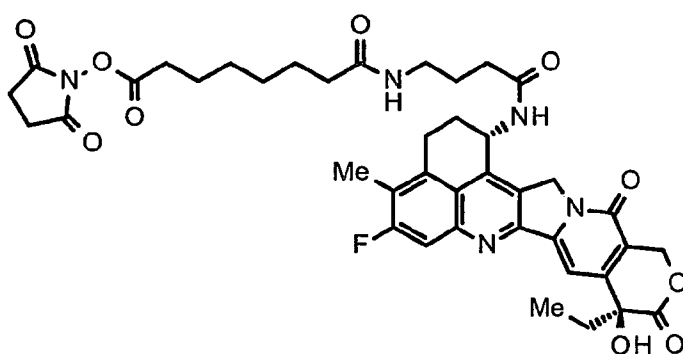
【0087】抗 CDH6 抗體-藥物結合物能夠參考國際公開第 2018/212136 號等的記載而製造。

【0088】

3. 本發明之蛋白質的製造

本發明之蛋白質合適地能夠以抗體(以下稱為「本發明之抗體」)的形式取得。本發明之抗體是能夠藉由下述而獲得：將化合物(1)或其衍生物與載體蛋白透過連接子而鍵結之抗原蛋白質對動物進行免疫，採取在活體內所產生的抗體並進行純化。

【0089】上述之抗原蛋白質，例如能夠使用將載體蛋白附加至下式



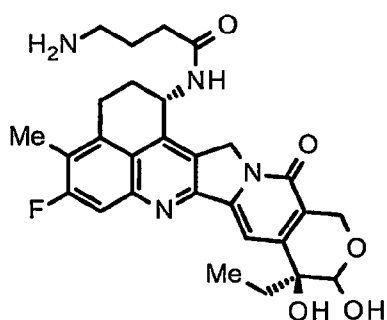
所示之化合物(以下稱為「化合物(6)」)而成之物。

【0090】就載體蛋白而言，即使是如低分子化合物及胜肽般之小的抗原，只要是能夠誘發免疫反應般的蛋白質的話，未被特別限定，例如可使用：牛甲狀腺球蛋白、及牛血清白蛋白(BSA)、及鑰孔帽貝血藍素(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)。

【0091】所獲得之抗血清能夠藉由使用了陽性對照及陰性對照之 ELISA 法，而挑選具有所期望之性質者。

【0092】就陽性對照而言，可舉例如：化合物(1)、化合物(2)、化合物(6)，可挑選可觀察到由該等的陽性對照所致之高的抑制(inhibition)效果的抗血清。

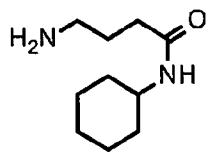
【0093】再者，已知：化合物(1)具有的内酯環，在酸性水性溶劑中(例如 pH3 左右)平衡偏向閉環體，在鹼性水性溶劑中(例如 pH10 左右)則平衡偏向開環體；但從挑選與内酯環的開閉無關而會辨識化合物(1)之基本骨架本身之抗體的觀點來看，内酯環經還原過的化合物，例如下式



所示之化合物(以下稱為「化合物(7)」)亦能夠作為陽性對照使用；能夠挑選可觀察到由此陽性對照所致之高的抑制效果的抗血清。惟，從挑選會同程度地辨識化合物(1)與化合物(7)之抗體的觀點來看，對化合物(7)的辨識性相較化合物(1)是特別高的抗體較佳是除外。

【0094】進一步，本發明涉及的抗體-藥物結合物(合適地是抗體-藥物結合物(I)、(II)、及(III))亦能夠作為陽性對照使用，能夠挑選可觀察到由該等陽性對照所致之高的抑制效果的抗血清。

【0095】另一方面，從要把會辨識從化合物(1)的基本骨架脫離的部分之抗體除外的觀點來看，例如，能夠使用由連接子附近之部分結構的，環己烷環構成的化合物之式



所示之化合物(以下稱為「化合物(8)」)作為陰性對照。

能夠把可觀察到因該陰性對照所致之高的抑制效果的抗血清除外。

【0096】透過選殖如以上般進行而挑選出之抗血清，而能夠取得會產生本發明之抗體的細胞。

【0097】接著，能夠按照公知的方法(例如，Kohler and Milstein, Nature(1975)256,p.495-497，Kennet,R.ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press,N.Y.(1980))，藉由使得會產生本發明之抗體之細胞與骨髓瘤細胞(myeloma cell)融合而建立融合瘤，而獲得單株抗體。這般之方法的具體例，被記載於國際公開第 WO09/48072 號小冊(2009 年 4 月 16 日公開)及第 WO10/117011 號(2010 年 10 月 14 日公開)小冊。

【0098】所獲得之抗體可進行純化至均勻。抗體的分離、純化是使用通常在蛋白質所使用之分離、純化方法即可。例如適宜選擇、組合：管柱層析、過濾器過濾、超過濾、鹽析、透析、製備用聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電聚焦電泳(isoelectric focusing electrophoresis)等的話，能夠將抗體予以分離、純化 (Strategies for Protein Purification and Characterization:A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996)，Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))，但並非被限定於該等。

【0099】就層析法而言可舉：親和力層析法、離子交換層析法、疏水性層析法、凝膠過濾層析法、逆相層析法、吸附層析法等。該等層析法能夠使用 HPLC 或 FPLC 等液體層析法而進行。就使用於親和力層析法的管柱而言，可舉：蛋白質 A(Protein A)管柱、蛋白質 G(Protein G)管柱。例如作為蛋白質 A(Protein A)管柱，可舉：Hyper D、POROS、

Sepharose F.F.(Pharmacia)等。又，亦能夠使用已固定化有抗原的載體，利用對於抗原的鍵結性而純化抗體。

【0100】進一步，本發明之抗體，合適地特徵是在於：對於該抗體-藥物結合物的辨識性實質上不會因在本發明涉及的抗體-藥物結合物中的每一抗體的藥物連接子的平均鍵結數(DAR)的差異而不同。是具有這樣的性質之抗體一事，例如，是可將對於高 DAR(DAR8)之抗體-藥物結合物的校準曲線，與對低 DAR(DAR4)之抗體-藥物結合物的校準曲線進行比較，實質上無差異，藉此而確認。

【0101】就如此進行所取得之本發明之抗體的實例而言，可舉：小鼠抗體 1A3。小鼠抗體 1A3 之重鏈可變區的胺基酸序列是顯示在序列識別號 15 中胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列，編碼其之核苷酸序列是顯示在序列識別號 17 中核苷酸編號 58 至 423 記載的核苷酸序列。小鼠抗體 1A3 之輕鏈可變區的胺基酸序列是顯示在序列識別號 16 中胺基酸編號 21 至 127 記載的胺基酸序列，編碼其之核苷酸序列是顯示在序列識別號 18 中核苷酸編號 61 至 381 記載的核苷酸序列。

【0102】本發明之抗體，是保持源自小鼠抗體 1A3 之 6 種全部的 CDR 序列，且是會專一性地辨識本發明涉及的抗體-藥物結合物之藥物部位的抗體即可。CDR 序列的確定來說，已知數種方法，可舉例如：Abm 的定義、Chothia 的定義、Kabat 的定義、及 Imgt(註冊商標)(The international ImMunoGeneTics information system(註冊商標))的定義。本發明之抗體的 CDR 序列可為透過任一方法所定義者。

【0103】依 Abm 的定義的話，本發明之抗體的重鏈可變區

是保有由序列識別號 1 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(GFTFSDYGMV)、由序列識別號 2 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(YISSGSSAIY)、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(PPRYDVYSAWFAY)，本發明之抗體的輕鏈可變區是保有由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(KASQDVGSAAVV)、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2(WASTRHT)、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0104】依 Chothia 的定義的話，本發明之抗體的重鏈可變區是保有由序列識別號 7 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(GFTFSDY)、由序列識別號 8 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(SSGSSA)、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(PPRYDVYSAWFAY)，本發明之抗體的輕鏈可變區是保有由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(KASQDVGSAAVV)、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2(WASTRHT)、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0105】依 Kabat 的定義的話，本發明之抗體的重鏈可變區是保有由序列識別號 9 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(DYGMV)、由序列識別號 10 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(YISSGSSAIYYADTVKG)、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(PPRYDVYSAWFAY)，本發明之抗體的輕鏈可變區是保有由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(KASQDVGSAAVV)、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2(WASTRHT)、及由序列識別號 6 所示之

胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0106】依 *Imgt*(註冊商標)的定義的話，本發明之抗體的重鏈可變區是保有由序列識別號 11 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(GFTFSDYG)、由序列識別號 12 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(ISSGSSAI)、及由序列識別號 13 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(ARPPRYDVYSAWFAY)，本發明之抗體的輕鏈可變區是保有由序列識別號 14 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(QDVGSA)，由 WAS(色胺酸-丙胺酸-絲胺酸)所示之三肽構成的 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0107】在本發明之抗體來說，在上述的單株抗體之外，亦包含：以降低異種抗原性等為目標而經人為改變之基因重組型抗體，例如：嵌合(Chimeric)抗體、人源化(Humanized)抗體、或者兔源化(Rabbit type)抗體、小鼠源化抗體等。該等抗體能夠使用已知的方法而製造。

【0108】就嵌合抗體而言，可舉：抗體的可變區與恒定區互為異種之抗體，例如：把源自小鼠或者大鼠之抗體的可變區接合至源自人類的恒定區而成的嵌合抗體(參照 *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*,81,6851-6855,(1984))。又，就其它的例而言，可舉：把源自小鼠或者大鼠之抗體的可變區接合至源自兔的恒定區而成的嵌合抗體(兔嵌合化抗體)。

【0109】就兔嵌合化抗體更具體的例而言，可舉由包含下述重鏈以及輕鏈構成的抗體(兔嵌合化抗體 1A3)：該重鏈是由包含源自小鼠抗體 1A3 的重鏈可變區與兔抗體重鏈的恒定區構成，該輕鏈是由包含源自小鼠抗體 1A3 抗體的輕鏈可變區與兔

抗體輕鏈的恒定區構成。兔嵌合化抗體 1A3 的重鏈是由序列識別號 19 中胺基酸編號 20 至 464 記載的胺基酸序列構成，兔嵌合化抗體 1A3 的輕鏈是由序列識別號 20 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成。

【0110】多使用小鼠作為癌症研究的非臨床動物模型，當使用了小鼠抗體的情況，為了避免與內源性小鼠 IgG 的競爭，使用方法變得會受到限定。於是，透過使用兔嵌合化抗體，將源自小鼠之樣品、源自人類之樣品兩者在同一平台下變得能夠比較評價，對於轉譯研究(translational research)可變得有用。

【0111】就人源化抗體而言，可舉：僅將互補決定區(CDR;complementarity determining region)組入至源自人類之抗體而成的抗體(參照 Nature(1986)321,p.522-525)、在 CDR 的序列之外亦將一部分的框架的胺基酸殘基移植至人類抗體而成的抗體(國際公開第 WO90/07861 號小冊)。就兔源化抗體而言，可舉：僅將互補決定區(CDR;complementarity determining region)組入至源自兔之抗體而成的抗體、在 CDR 的序列之外亦將一部分的框架的胺基酸殘基移植至兔抗體而成的抗體。

【0112】再者，已知在哺乳類培養細胞所生產之抗體的重鏈的羧基末端的離胺酸殘基缺失(Journal of Chromatography A,705:129-134(1995))，又，同樣地已知重鏈羧基末端的甘胺酸、離胺酸這 2 個胺基酸殘基缺失，且新位於羧基末端的脯胺酸殘基被醯胺化 (Analytical Biochemistry,360:75-83(2007))。惟該等重鏈序列的缺失及修飾，不會對抗體的抗原

結合能力及效應子功能(effector function)(補體的活化及抗體依賴性細胞毒殺作用等)造成影響。因此，在本發明來說亦包含經受該修飾的抗體，可舉：在重鏈羧基末端中 1 或者 2 個胺基酸經缺失的缺失體、及經醯胺化的該缺失體(例如，羧基末端部位的脯氨酸殘基經醯胺化的重鏈)等。惟，只要保有抗原結合能力及效應子功能，本發明涉及的抗體重鏈之羧基末端的缺失體並不被限定於上述的種類。構成本發明涉及的抗體的 2 條的重鏈，可為選擇自於由完全長及上述之缺失體構成之群組的重鏈的任一種，亦可為組合任二種而得者。各缺失體的量比雖可能受到產生本發明涉及的抗體之哺乳類培養細胞的種類及培養條件的影響，但就本發明涉及的抗體之主成分而言，可舉：在 2 條重鏈雙方羧基末端的 1 個胺基酸殘基是缺失的情況。

【0113】本發明之抗體，是維持著本發明之抗體的性質的話，亦可為由帶有與小鼠抗體 1A3 或者兔嵌合化抗體 1A3 的胺基酸序列至少 95% 的同一性(合適地是至少 99% 的同一性)的胺基酸序列構成的抗體。

【0114】二種類的胺基酸序列間的同性能夠透過使用 Blast(Nucl. Acids Res., 25, p.3389-3402(1997))的預設參數(default parameter)而確定。Blast 亦可透過利用網際網路存取 www.ncbi.nlm.nih.gov/blast 而使用。

【0115】又，針對對於在本發明涉及的抗體-藥物結合物中之藥物部位的辨識性，本發明之抗體亦可是會與小鼠抗體 1A3 或者兔嵌合化抗體 1A3 競爭的抗體。

【0116】透過以上方法所獲得之抗體，能夠針對對於在本發明涉及的抗體-藥物結合物中之藥物部位的辨識性進行評價，

並選出合適的抗體。就比較抗體的性質之際之另外之指標的一例而言，可舉：抗體的穩定性。示差掃描熱析儀(DSC)是能夠快速又正確地測定會是蛋白之相對結構穩定性之良好指標的熱變性中點(T_m)的方法。使用 DSC 來測定 T_m 值，比較該值，藉此可比較熱穩定性的差異。已知抗體的保存穩定性與抗體的熱穩定性顯示某種程度的相關性 (Lori Burton, et. al., *Pharmaceutical Development and Technology*(2007) 12, p.265-273)，以熱穩定性作為指標，能夠選出合適的抗體。就用以選出抗體的其它指標而言，可舉：在適切的宿主細胞中產量高、及在水溶液中的凝聚性低。例如，產量最高的抗體並不一定會顯示最高的熱穩定性，因此需要基於以上敘述的指標進行綜合性地判斷而選出最適合的抗體。

【0117】又，亦已知使用適切的連接子來連結抗體的重鏈及輕鏈的全長序列，來取得單鏈免疫球蛋白(single chain immunoglobulin)的方法 (Lee, H-S, et al., *Molecular Immunology*(1999) 36, p.61-71, Shirmann, T. et al., *mAbs*(2010), 2,(1) p.1-4)。這樣的單鏈免疫球蛋白透過進行二聚體化，能夠保持與原來為四聚體的抗體類似的結構與活性。又，本發明之抗體亦可為具有單一的重鏈可變區且不具有輕鏈序列的抗體。這樣的抗體被稱為單域抗體(single domain antibody: sdAb)或者奈米抗體(nanobody)，已被報告實際上在駱駝或者駱馬被觀察到，保持有抗原結合能力 (Muyldemans S. et al., *Protein Eng.* (1994) 7(9), 1129-35, Hamers-Casterman C. et al., *Nature*(1993) 363(6428) 446-8)。上述之抗體亦可解釋為本發明中之抗體的抗原結合性片段的一

種。

【0118】在暫時將抗體基因單離後，導入至適當的宿主而製作抗體的情況來說，能夠使用適當的宿主與表現載體的組合。就抗體基因的具體例而言，可舉：組合了於本說明書所記載之編碼抗體之重鏈序列的基因，及編碼輕鏈序列的基因而成者。在將宿主細胞進行形質轉換之際來說，重鏈序列基因與輕鏈序列基因是能夠被插入至同一表現載體，又亦可能被插入至各別的表演載體。當使用真核細胞作為宿主的情況，可使用：動物細胞、植物細胞、真核微生物。就動物細胞而言，(1)哺乳類細胞，可舉例如：為猿的細胞之 COS 細胞(Gluzman, Y. Cell(1981) 23, p.175-182, ATCC CRL-1650)、小鼠纖維母細胞 NIH3T3(ATCC No.CRL-1658)及中國倉鼠卵巢細胞(CHO 細胞, ATCC CCL-61)的二氫葉酸還原酵素缺損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, p.4126-4220)。又，當使用原核細胞的情況，可舉例如：大腸菌、枯草菌。透過形質轉換將把為目標的抗體基因導入至該等細胞，透過在體外(in vitro)培養被形質轉換過的細胞可獲得抗體。在以上的培養法來說，有因抗體的序列而產量不同的情況，能夠從帶有同等之鍵結活性的抗體之中以產量為指標挑選作為醫藥的生產是容易者。

【0119】本發明之抗體就同型(isotype)來說沒有限制，可舉例如：IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1、IgA2)、IgD 或者是 IgE 等，可較佳列舉：IgG 或者 IgM，進一步可較佳列舉：IgG1 或者 IgG2。

【0120】又，本發明之抗體亦可為具有抗體之抗原結合部

的抗體之抗原結合性片段或者其修飾物。或利用木瓜酶、胃蛋白酶等蛋白質分解酵素處理抗體，或者是透過基因工程手法來改變抗體基因，而使在適當的培養細胞中表現，而能夠獲得該抗體的片段。在這樣的抗體片段之中，能夠把保持有抗體全長分子所帶有之機能全部或者一部分的片段稱為抗體的抗原結合性片段。

【0121】例如，就抗體的片段而言，可舉： Fab 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、或者利用適當的连接子使重鏈及輕鏈的 Fv 連結而成的單鏈 $Fv(scFv)$ 、雙體抗體(diabody；diabodies)、線狀抗體、及由抗體片段所形成之多專一性抗體等。又，作為在還原條件下處理過 $F(ab')_2$ 而成的抗體之可變區的一價片段的 Fab' 亦包含於抗體的片段。

【0122】進一步，本發明之抗體亦可為對於至少 2 種類不同抗原具有專一性的多專一性抗體。通常這樣的分子是會鍵結於 2 種類的抗原者(即，雙專一性抗體(bispecific antibody))，本發明中之「多專一性抗體」是包含對於其以上(例如，3 種類)的抗原具有專一性的抗體。

【0123】本發明之多專一性抗體可為由全長構成的抗體，或者那樣的抗體的片段(例如， $F(ab')_2$ 雙專一性抗體)。雙專一性抗體亦能夠使 2 種類抗體的重鏈與輕鏈(HL 對)鍵結而製作，而透過使得會產生不同單株抗體的融合瘤融合而製作會產生雙專一性抗體之融合細胞亦可製作 (Millstein et al., Nature(1983) 305, p.537-539)。

【0124】本發明之抗體可為單鏈抗體(亦記載為 $scFv$)。單鏈抗體可透過利用多肽的连接子來連結抗體的重鏈可變區與輕

鏈可變區而獲得 (Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113 (Rosenberg 及 Moore 編、Springer Verlag, New York, p.269-315 (1994)、*Nature Biotechnology* (2005), 23, p.1126-1136)。又，亦能夠把利用多肽連接子使 2 個 scFv 鏈結所製作之 BiscFv 片段作為雙專一性抗體使用。

【0125】製作單鏈抗體的方法是本技術領域所周知(參照例如：美國專利第 4,946,778 號、美國專利第 5,260,203 號、美國專利第 5,091,513 號、美國專利第 5,455,030 號等)。在此 scFv 中，重鏈可變區與輕鏈可變區是透過不會作出結合物般的連接子所連結，較佳為透過多肽連接子所連結 (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988), 85, p.5879-5883)。在 scFv 中之重鏈可變區及輕鏈可變區可源自同一抗體，亦可源自各別的抗體。就連結可變區的多肽連接子而言，例如可使用由 12~19 殘基構成的任意的單鏈胜肽。

【0126】編碼 scFv 的 DNA 是可透過下述而獲得：把編碼前述抗體的重鏈或者重鏈可變區之 DNA 及編碼輕鏈或者輕鏈可變區之 DNA 中，編碼該等序列之中全部或者所期望的胺基酸序列的 DNA 部分作為模板，並使用規定其兩端的引子對而透過 PCR 法進行擴增，接著，進一步把編碼多肽連接子部分的 DNA、及以使得其兩端分別與重鏈、輕鏈連結的方式規定的引子對予以組合，而進行擴增。

【0127】又，若編碼 scFv 的 DNA 一旦被製作，則可按照常法獲得含有該等的表現載體，及由該表現載體被形質轉換過的宿主，又，透過使用其之宿主，可按照常法獲得 scFv。該等

抗體片段能夠與前述同樣地進行而取得基因並使表現，並透過宿主而使之產生。

【0128】本發明之抗體亦可為進行大量化而提高了對抗原的親和性者。就進行大量化的抗體而言，可為1種類的抗體，亦可為會辨識同一抗原的多個表位的多個抗體。就將抗體進行大量化的方法而言，可舉：IgG CH3 結構域與2個 scFv 的鍵結、與鏈霉親和素(streptavidin)的鍵結、螺旋-轉角-螺旋模體(helix-turn-helix motif)的導入等。

【0129】本發明之抗體亦可為多株抗體，其係胺基酸序列不同的多種類之抗體的混合物。就多株抗體之一例而言，可舉：CDR 不同之多種類抗體的混合物。就那樣的多株抗體而言，可使用：將產生不同抗體之細胞的混合物予以培養，並從該培養物所純化出的抗體(參照 WO2004/061104 號)。

【0130】亦能夠使用與聚乙二醇(PEG)等各種分子鍵結的抗體作為抗體的修飾物。

【0131】本發明之抗體，進一步亦可是該等抗體與其它的藥劑形成了結合物者(免疫結合物(Immunoconjugate)))。就這樣的抗體之例而言，可舉：該抗體與放射性物質或具有藥理作用之化合物鍵結著之物(Nature Biotechnology(2005) 23, p.1137-1146)。

【0132】

4.本發明之蛋白質的使用

本發明之蛋白質是能夠利用於 ELISA(酵素連結免疫吸附分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay))法、ECL(電致化學發光(Electrochemi luminescence))法、RIA(放射免疫

測定法(Radio Immunoassay))法、ELISPOT(酶聯免疫斑點法(Enzyme-Linked ImmunoSpot))法、斑點雜交(dot blotting)法、歐氏二重擴散(Ouchterlony)法、CIE(對流免疫電泳(Counterimmunoelectrophoresis))法、CLIA(化學發光免疫檢定(Chemiluminescent immuno assay))、及FCM(流動式細胞測量術(Flow Cytometry))等檢測方法，以及免疫組織化學(immunohistochemistry：IHC)法，合適地能夠利用於ELISA法、ECL法、以及IHC法。

【0133】就ELISA法及ECL法而言，例如，能夠利用於來定量在經投予本發明之抗體-藥物結合物的哺乳動物(就本發明中「哺乳動物」而言，可舉例如：人類、小鼠、大鼠、猿、兔等，但只要是哺乳動物未被限定於該等)中，該抗體-藥物結合物的血漿中濃度的方法。

【0134】具體地包含下述步驟：(1)使血漿中的抗體-藥物結合物接觸於已固相化有抗體-藥物結合物之目標抗原的盤而使複合物形成的步驟；(2)使經以標記物所標記化的，本發明之蛋白質接觸，而使更進一步的複合物形成的步驟；接著(3)檢測該標記物的步驟。

【0135】又，亦可包含下述步驟：(1)使血漿中的抗體-藥物結合物接觸於已固相化有本發明之蛋白質的盤而使複合物形成的步驟；(2)使能夠辨識該抗體-藥物結合物之抗體部位，且經以標記物所標記化的第二蛋白質接觸，而使更進一步的複合物形成的步驟；接著(3)檢測該標記物的步驟。

【0136】又，ELISA法及ECL法亦是能夠利用於，定量在經投予本發明之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，從該抗體-

藥物結合物游離出的藥物(例如：化合物(1)、化合物(2)、化合物(4)、及化合物(5))的血漿中濃度的方法。

【0137】具體地是包含下述步驟：(1)在經以標記物所標記化之競爭藥物的存在下，使血漿中之從抗體-藥物結合物游離出的藥物接觸於已固相化有本發明之蛋白質的盤，而使複合物形成的步驟；(2)檢測該標記物的步驟。

【0138】就 IHC 法而言，例如能夠利用於定量在經投予本發明之抗體-藥物結合物的哺乳動物中，該抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物的組織分布的方法。

【0139】具體地是包含下述步驟：(1)使組織中之抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物與本發明之蛋白質接觸而使複合物形成的步驟；(2)使能夠辨識本發明之蛋白質，且經以標記物所標記化的第二蛋白質接觸，而使更進一步的複合物形成的步驟；接著(3)檢測該標記物的步驟。

【0140】又，亦可包含下述步驟：(1)使組織中之抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物，與經以標記物所標記化的本發明之蛋白質接觸，而使複合物形成的步驟，接著(2)檢測該標記物的步驟。

【0141】再者，在本發明中所謂「標記物」意指會生成可檢測之訊息的，或者會對於其它的基質進行引導使生成可檢測的信號的，任意物質。就這樣的標記物而言，可舉例如：螢光物質、酵素、酵素片段、酵素基質(enzyme substrate)、酵素抑制劑、輔酶、觸媒、染料、發光物質、增感劑、及放射性物質。

【0142】在本發明中，所謂「經以標記物所標記化的」意

指標記物是直接或者透過任意的部分結構(例如連接子)而鍵結著。由生物素與親和素(avidin)(或者鏈霉親和素)的相互作用所致之鍵結亦包含於此。

【0143】為了將本發明之蛋白質以標記物進行標記化，例如，使得以標記物作為構成要素之試劑(具活性酯基者)，與本發明之蛋白質的離胺酸殘基反應而使醯胺鍵形成的話即可，但未被限定於此。

【0144】當標記物為螢光物質的情況，該標記物的檢測是可透過感知該標記物的螢光而進行。

【0145】就這樣的螢光物質而言，可舉例如：DyLight(註冊商標)350、DyLight(註冊商標)405、DyLight(註冊商標)488、DyLight(註冊商標)550、DyLight(註冊商標)594、DyLight(註冊商標)633、DyLight(註冊商標)650、DyLight(註冊商標)680、DyLight(註冊商標)747、DyLight(註冊商標)755、DyLight(註冊商標)800、Alexa Fluor(註冊商標)350、Alexa Fluor(註冊商標)405、Alexa Fluor(註冊商標)488、Alexa Fluor(註冊商標)532、Alexa Fluor(註冊商標)546、Alexa Fluor(註冊商標)555、Alexa Fluor(註冊商標)568、Alexa Fluor(註冊商標)594、Alexa Fluor(註冊商標)647、Alexa Fluor(註冊商標)680、Alexa Fluor(註冊商標)750、BODIPY(註冊商標)FL、香豆素(Coumarin)、Cy(註冊商標)3、Cy(註冊商標)5、Cy(註冊商標)、螢光黃(Fluorescein)(FITC)、俄勒岡綠(Oregon Green)(註冊商標)、太平藍(Pacific Blue)、太平綠(Pacific Green)、太平橙(Pacific Orange)、四甲基玫瑰紅

(Tetramethylrhodamine)(TRITC)、德州紅(Texas Red)(註冊商標)。

【0146】又，如 Qdot(註冊商標)525、Qdot(註冊商標)565、Qdot(註冊商標)605、Qdot(註冊商標)655、Qdot(註冊商標)705、及 Qdot(註冊商標)800 般之奈米晶體、及如異藻藍蛋白(Allophycocyanin)(APC)、R-藻紅素(R-Phycoerythrin)(R-PE)、青色螢光蛋白(cyan fluorescent protein)(CFP)、綠螢光蛋白(Green Fluorescent Protein)(GFP)、及紅螢光蛋白(Red Fluorescent Protein)(RFP)般之螢光蛋白質亦能夠作為螢光物質使用。

【0147】當標記物為酵素的情況，該標記物的檢測是可透過感知因該酵素與基質的反應而產生之發光或者顯色而進行。

【0148】就這樣的酵素而言，可舉例如：過氧化酶(例如，山葵過氧化酶；HRP等)，此情況，就酵素的基質而言，可舉例如：TMB(3,3',5,5'-四甲基聯苯胺)、DAB(3,3'-二胺基聯苯胺四鹽酸鹽)、OPD(鄰苯二胺)，及 ABTS(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)。

【0149】又，就其它的酵素而言，可舉：鹼性磷酸酶，此情況，就酵素的基質而言，可舉例如：BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸酯)、及 PNPP(p-硝基苯基磷酸酯)。

【0150】又，其它的酵素就而言，可舉：螢光素酶，此情況，就酵素的基質就而言，可舉例如：螢光素(Luciferin)、及腔腸素(Coelenterazine)類。

【0151】進一步，就其它的酵素而言，可舉： β -半乳糖苷酶，此情況，就酵素的基質而言，可舉例如：鄰硝基苯 β -D-半

乳哌喃糖苷(ONPG)。

【0152】當標記物為發光物質的情況，該標記物的檢測是可透過感知基於電化學反應之該標記物的發光而進行。

【0153】就這樣的發光物質而言，可舉例如：釕錯合物，合適地可舉：釕-吡啶錯合物，更合適地可舉：釕(II)參(聯吡啶)錯合物(ruthenium(II)tris(bipyridyl) complexes)。

【0154】上述的電化學反應，例如能夠在三丙胺(TPA)的共存下進行。具體地是透過電極反應使產生 TPA 陽離子自由基與 3 價的釕錯合物之後，TPA 陽離子自由基立刻失去氫離子，成為帶有強力還原作用之 TPA 自由基，而透過此與 3 價之釕錯合物進行反應而產生發光。

【0155】當標記物為放射性物質的情況，該標記物的檢測是可透過感知該標記物發出的放射線而進行。

【0156】就這樣的放射性物質而言，可舉例如：氚(^3H)、碳-14(^{14}C)、氮-15(^{15}N)、硫-35(^{35}S)、釷-90(^{90}Y)、鎝-99(^{99}Tc)、銦-111(^{111}In)、碘-125(^{125}I)、及碘-131(^{131}I)等。

【0157】藉由使含有 pH 緩衝劑、滲透壓調節劑、鹽類、穩定化劑、防腐劑、顯色劑、增感劑、抗凝聚劑等，本發明之蛋白質能夠作為組成物(以下稱為「本發明之組成物」。)使用。

【0158】本發明之蛋白質(或者本發明之組成物)，可作為與用以進行檢測所使用之材料及試劑組合而成的套組(以下稱為「本發明之套組」。)使用。試劑是可因應該等的穩定性，在同一或者別個的容器中以液體或者被冷凍乾燥的狀態被提供。於

本發明之套組中所提供之試劑的量及比例，可被選擇以對特定的用途提供最適合的結果。在本發明之套組來說，在本發明之蛋白質(或者本發明之組成物)以外，例如，可包含：用以利用標記物進行標記的試劑、酵素的基質、阻斷試劑、聚合物試劑、抗原修復液、校正液(calibrator)、稀釋用緩衝液、洗淨用緩衝液、固相化用緩衝液、固相化抗體、檢測用抗體、及微量多孔盤(Microtiter plate)等。又，亦可包含用以使用本發明之套組的說明手冊等。使用本套組，變得能夠確認抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物游離出的藥物的組織分布，及定量血漿中濃度等。

[實施例]

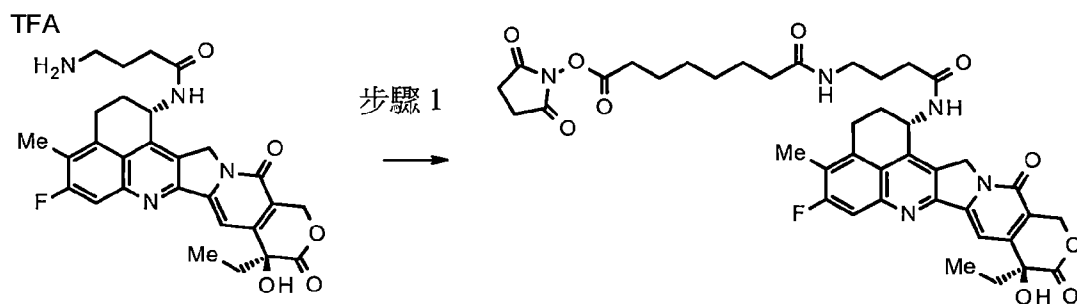
【0159】以下，透過實施例更具體地說明本發明，但本發明並非被限定於該等，該等無論如何不被限縮解釋。再者，在下述實施例中關於基因操作的各操作只要沒有特別指明，或是透過記載於「分子選殖(Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E.F.及 Maniatis, T.著，由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 於 1989 年出刊)的方法進行，或者，當使用市售之試劑或套組的情況，按照市售品的說明手冊進行了使用。又，在本說明書中，未特別記載的試劑、溶劑及起始材料是可自市售之供給源容易地取得。

【0160】

[實施例 1]化合物的合成

i) 8-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-N-(4-{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-

1-基]胺基}-4-側氧基丁基)-8-側氧基辛醯胺(化合物(6))的合成

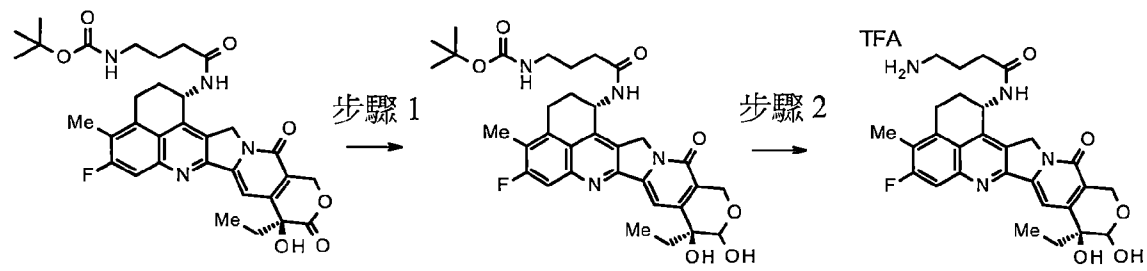


【0161】於 4-胺基-N-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羥基-4-甲基-10,13-二側氧基-2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]丁醯胺(0.032g, 0.050mmol)(利用記載於國際公開第 2014/057687 號之實施例 1 步驟 2 所獲得之化合物)的 N,N-二甲基甲醯胺(0.5mL)溶液中，添加三乙胺(7 μ L, 0.050mmol)、辛二酸二(N-琥珀醯亞胺基)(20.4mg, 0.055mmol)，並在室溫下攪拌了 20 分鐘。將溶劑進行減壓餾去，並把所獲得之殘留物利用矽膠(silica gel)管柱層析[氯仿~氯仿：甲醇=9：1(v/v)]進行純化，獲得了呈淡黃色固體的標題化合物(16.0mg, 41%)。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87(3H, t, J=7.6Hz), 1.18-1.37(4H, m), 1.40-1.50(2H, m), 1.54-1.64(2H, m), 1.65-1.74(2H, m), 1.78-1.93(2H, m), 2.02(2H, t, J=7.6Hz), 2.09-2.20(4H, m), 2.40(3H, s), 2.60-2.68(2H, m), 2.80(4H, s), 3.00-3.08(2H, m), 3.13-3.21(2H, m), 5.19(2H, dd, J=32.0, 18.0Hz), 5.37-5.47(2H, m), 5.53-5.60(1H, m), 6.52(1H, s), 7.30(1H, s), 7.74-7.82(2H, m), 8.44(1H, d, J=8.5Hz).

MS(APCI)m/z : 774(M + H)⁺

【0162】 ii)4- 胺基 -N-[(1S,9S)-9- 乙基 -5- 氟 -9,10- 二羥基 -4- 甲基 -13- 側氧基 -2,3,9,10,13,15- 六氫 -1H,12H- 苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]丁醯胺 三氟乙酸鹽(化合物(7))的合成



【0163】

步驟 1 :

將三級丁基(4-{[(1S,9S)-9- 乙基 -5- 氟 -9- 羥基 -4- 甲基 -10,13- 二側氧基 -2,3,9,10,13,15- 六氫 -1H,12H- 苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4- 側氧基丁基)胺甲酸酯(0.092g , 0.148mmol)(利用記載於國際公開第 2014/057687 號之實施例 1 步驟 1 所獲得之化合物)溶解於甲醇(1.6mL), 進行了冰冷。添加硼氫化鈉(0.028g , 0.740mmol)並在冰冷下攪拌了 20 分鐘。利用甲醇(10mL)及氯仿(50mL)進行稀釋, 添加 10%檸檬酸水溶液, 並利用氯仿進行了萃取。將所獲得之有機層利用 10%檸檬酸水溶液、接著利用飽和食鹽水進行洗淨, 利用硫酸鈉進行乾燥, 並進行了過濾。將溶劑進行減壓餾去, 利用矽膠管柱層析-[氯仿 : 甲醇=100 : 0 ~ 95 : 5(v/v)]將所獲得之殘留物進行純化, 獲得了淺黃色固體的三級丁基(4-{[(1S,9S)-9- 乙基 -5- 氟 -9- 羥基 -4- 甲基 -13- 側氧基 -

2,3,9,10,13,15-六氫-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]呋喃并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-4-側氧基丁基)胺甲酸酯(0.078g, 85%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.89(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.31(9H, s), 1.62-1.73(4H, m), 2.08-2.18(4H, m), 2.39(3H, s), 2.91(2H, q, $J=6.5\text{Hz}$), 3.12-3.20(2H, m), 4.49(1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 4.61(1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 4.97(1H, s), 4.99(1H, d, $J=4.7\text{Hz}$), 5.10(2H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.21(2H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.54-5.58(1H, m), 6.74-6.82(2H, m), 7.33(1H, s), 7.78(1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 8.40(1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

【0164】

步驟 2：

將利用上述步驟 1 獲得之化合物(0.078g, 0.125mmol)添加二氯甲烷(2mL)，進行冰冷，添加三氟乙酸(2mL)並攪拌了 40 分鐘。將溶劑進行減壓餾去，利用矽膠管柱層析[氯仿~氯仿：甲醇：水=7：3：1(v/v/v)之分配有機層]將所獲得之殘留物進行了純化。把所獲得之固體溶解於甲醇，並濾取添加醚而生成出的沉澱，進行真空乾燥，獲得了黃色固體的標題化合物(0.045g, 56%)。

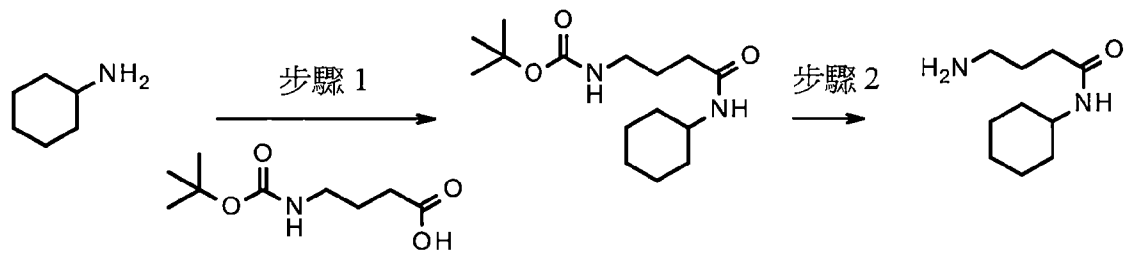
$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.89(3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.71(2H, q, $J=7.4\text{Hz}$), 1.80-1.88(2H, m), 2.09-2.19(2H, m), 2.27(2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 2.40(3H, s), 2.84(2H, t, $J=7.6\text{Hz}$), 3.13-3.20(2H, m), 4.50(1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 4.62(1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 4.97-

5.02(2H , m) , 5.09(1H , d , J=18.8Hz) , 5.21(1H , d , J=18.8Hz) , 5.55-5.59(1H , m) , 6.79(1H , d , J=4.7Hz) , 7.34(1H , s) , 7.64-7.75(3H , m) , 7.79(1H , d , J=11.3Hz) , 8.53(1H , d , J=8.6Hz).

MS(APCI)m/z : 523(M + H)⁺

【0165】

iii)4-胺基-N-環己基-丁醯胺鹽酸鹽(化合物(8))的合成



【0166】

步驟 1 :

將 4-(三級丁氧羰基胺基)丁酸(0.492g , 2.42mmol)溶解於二氯甲烷(15mL)及 N, N-二甲基甲醯胺(2mL) , 添加 N-羥基琥珀醯亞胺(0.279g , 2.42mmol) , 及 EDCI(1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride))(0.464g , 2.42mmol)並在室溫下攪拌了 30 分鐘。將該反應溶液滴加於環己胺(0.200g , 2.02mmol)的二氯甲烷溶液(2mL) , 並在室溫下攪拌了 20 分鐘。利用二氯甲烷稀釋反應液 , 添加 10%檸檬酸水溶液 , 並利用二氯甲烷進行了萃取。利用飽和重碳酸鈉水洗淨所獲得的有機層 , 利用硫酸鈉進行乾燥 , 並進行了過濾。將溶劑進行減壓餾去 , 利用矽膠管柱層析-[己烷 : 乙酸乙酯=50 : 50 ~ 25 : 75(v/v)]將所獲得的

殘留物進行純化，獲得了無色油狀的 N-[4-(環己基胺基)-4-側氧基-丁基]胺甲酸三級丁酯(0.308g，54%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz， CDCl_3) δ ：1.08-1.23(4H，m)，1.29-1.42(2H，m)，1.44(9H，s)，1.66-1.75(2H，m)，1.77-1.83(2H，m)，1.86-1.95(2H，m)，2.17(2H，t， $J=7.0\text{Hz}$)，3.11-3.21(2H，m)，3.69-3.82(1H，m)，4.75(1H，brs)，5.89(1H，brs)。

【0167】

步驟 2：

將利用上述步驟 1 獲得之化合物(0.200g，0.703mmol)溶解於乙酸乙酯(50mL)及二噁烷(10mL)。添加 4N 鹽酸二噁烷(10mL)並攪拌了 2 小時。濾取生成出的沉澱並進行真空乾燥，獲得了無色固體的標題化合物(0.098g，63%)。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz， DMSO-d_6) δ ：1.06-1.30(5H，m)，1.50-1.58(1H，m)，1.62-1.82(6H，m)，2.16(2H，t， $J=7.2\text{Hz}$)，2.69-2.79(2H，m)，3.45-3.58(1H，m)，4.73(1H，brs)，7.89(1H，d， $J=7.8\text{Hz}$)，7.96-8.10(2H，m)。

$\text{MS}(\text{APCI})m/z$ ：185($\text{M} + \text{H}$) $^+$

【0168】

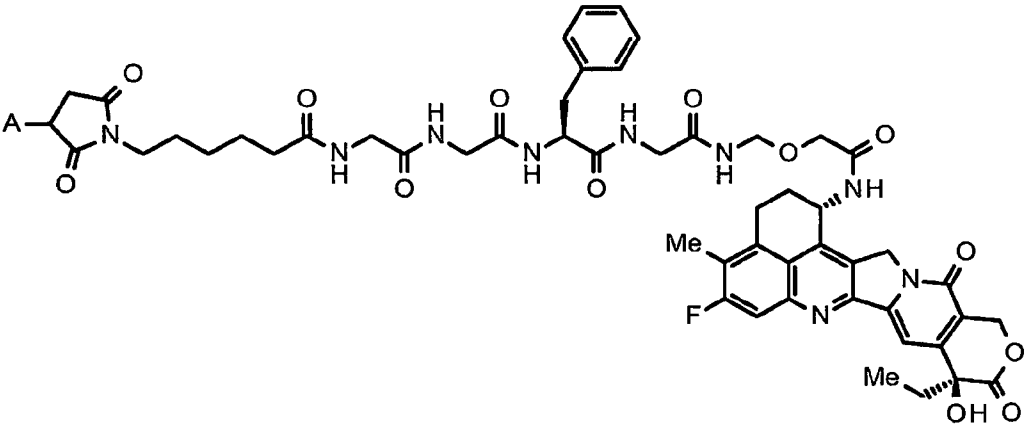
[實施例 2]抗體-藥物結合物之製造

【0169】

i)抗 B7-H3 抗體-藥物結合物之製造(1)

按照記載於國際公開第 2014/057687 號的製造方法，使用抗 B7-H3 抗體(包含：由序列識別號 27 中胺基酸編號 20 至 471

記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 28 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：下式

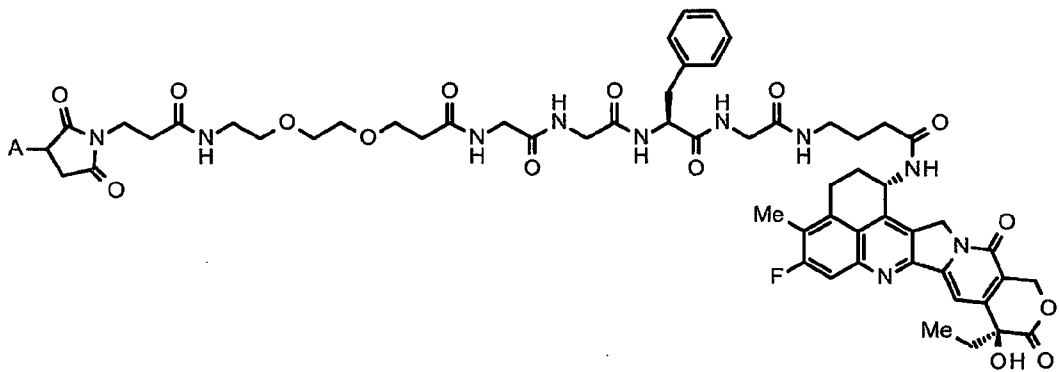


所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 B7-H3 抗體透過硫醚鍵而鍵結之抗 B7-H3 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「B7-H3-ADC(I)」)。

【0170】

ii) 抗 B7-H3 抗體-藥物結合物之製造(2)

按照記載於國際公開第 2014/057687 號的製造方法，使用抗 B7-H3 抗體(包含：由序列識別號 27 中胺基酸編號 20 至 471 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 28 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：下式

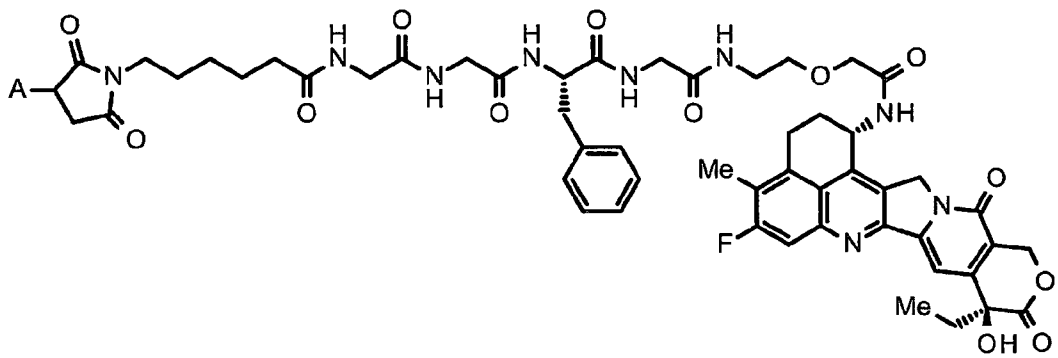


所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 B7-H3 抗體透過硫醚鍵而鍵結之抗 B7-H3 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「B7-H3-ADC(II)」)。

【0171】

iii)抗 B7-H3 抗體-藥物結合物之製造(3)

按照記載於國際公開第 2014/057687 號之製造方法，使用抗 B7-H3 抗體(包含：由序列識別號 27 中胺基酸編號 20 至 471 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 28 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：下式

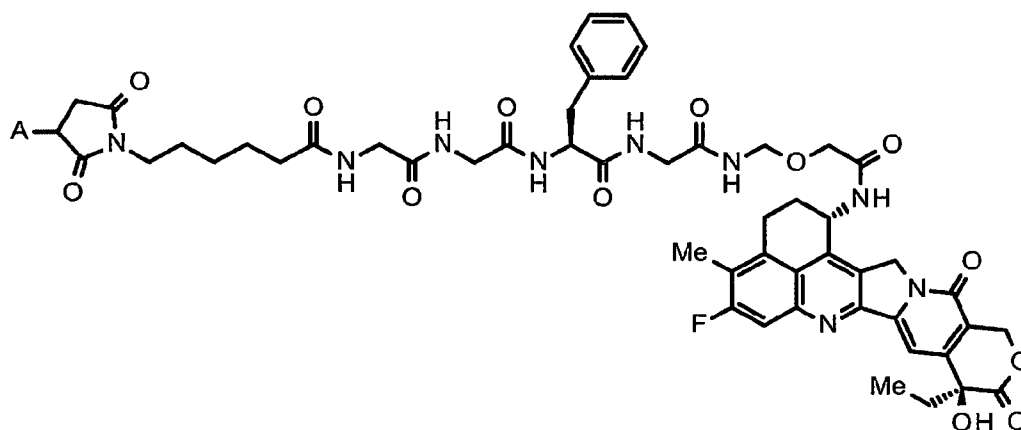


所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 B7-H3 抗體透過硫醚鍵而鍵結之抗 B7-H3 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「B7-H3-ADC(III)」)。

【0172】

iv) 抗 HER2 抗體-藥物結合物之製造(1)

按照記載於國際公開第 2015/115091 號的製造方法，使用抗 HER2 抗體(包含：由序列識別號 21 中胺基酸編號 1 至 449 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 22 中胺基酸編號 1 至 214 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：下式

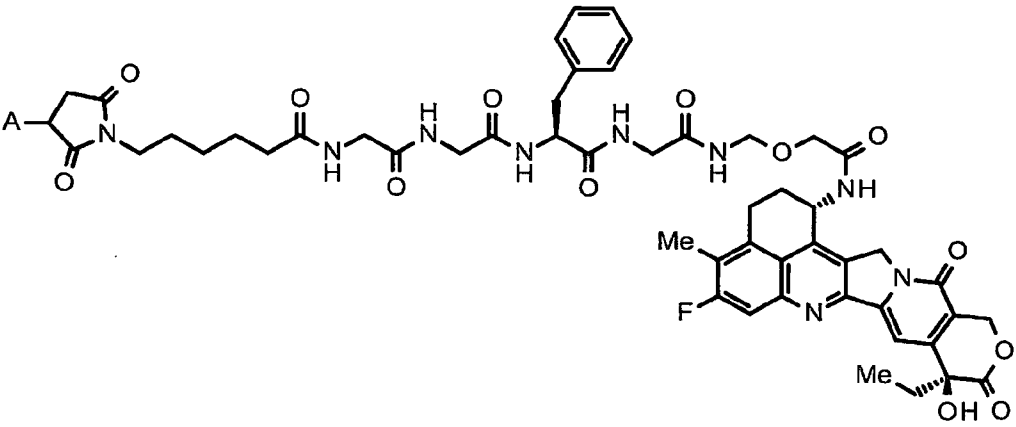


所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 HER2 抗體透過硫醚鍵而鍵結之抗 HER2 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「HER2-ADC(I)」)。

【0173】

v) 抗 HER3 抗體-藥物結合物之製造(1)

按照記載於國際公開第 2015/155998 號之製造方法，使用抗 HER3 抗體(包含：由序列識別號 23 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 24 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：下式

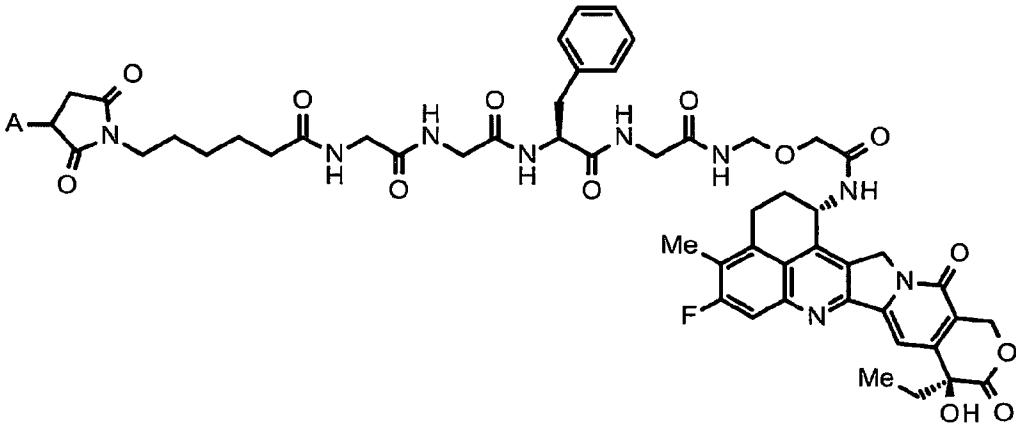


所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 HER3 抗體透過硫醚鍵而鍵結之抗 HER3 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「HER3-ADC(I)」)。

【0174】

vi)抗 TROP2 抗體-藥物結合物之製造(1)

按照記載於國際公開第 2015/098099 號之製造方法，使用抗 TROP2 抗體(包含：由序列識別號 25 中胺基酸編號 20 至 470 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 26 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而的抗體)，製造了：下式



所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 TROP2 抗體透過硫醚鍵而鍵結之抗 TROP2 抗體-藥物結合物

(在本發明中稱為「TROP2-ADC(I)」)。

【0175】

[實施例 3]製作單株抗體

i)抗原蛋白質的製備

【0176】

抗原蛋白質是使用了在化合物(6)附加了作為載體蛋白之牛甲狀腺球蛋白而成者(以下稱為「抗原蛋白質(1)」)及附加了BSA而成者(以下稱為「抗原蛋白質(2)」)。

【0177】

ii)免疫

在免疫來說使用了 BALB/cAnNCr1Cr1j(BALB/c)小鼠(4個體)及 B6D2F1/Cr1j(BDF1)小鼠(4個體)的雌性(日本查爾斯河股份有限公司)。對皮下及皮內進行投予：初次是投予混合了抗原蛋白質(1)與弗氏完全佐劑(Freund's Complete Adjuvant)(和光純藥公司製)者，第2次以後是投予混合了抗原蛋白質(1)與弗氏不完全佐劑(Freund's Incomplete Adjuvant)(和光純藥公司製)者。每7日進行投予合計4次。

【0178】

iii)抗血清的抗體力價評價

分別將免疫前及投予4次後之BALB/c小鼠(4個體)及BDF1小鼠(4個體)的血清從200倍稀釋至204800倍，確認了相對於陽性對照之抗原蛋白質(2)及B7-H3-ADC(II)、相對於陰性對照之BSA的抗體力價。將抗原蛋白質(2)、B7-H3-ADC(II)、及BSA固相化於ELISA用免疫盤(immunoplate)，使經稀釋過之免疫前及投予4次後的小鼠血清在37℃下反應了

30 分鐘。洗淨後，使結合有山葵過氧化酶的抗鼠 IgG(IgG)(抗鼠 IgG-HRP)在 37℃ 下反應 30 分鐘。洗淨後，添加鄰苯二胺二鹽酸鹽(o-phenylenediamine dihydrochloride)(OPD)溶液，於顯色停止後測定了 490nm 的吸光度。在全部的個體中確認到：相對於陽性對照的抗體力價是上升的。

【0179】

iv) 抑制型 ELISA(Inhibition ELISA)

將作為陽性對照之化合物(6)、化合物(7)及化合物(1)，作為陰性對照之化合物(8)添加至投予 4 次後的 BALB/c 小鼠(4 個體)及 BDF1 小鼠(4 個體)的血清，算出了相對於抗原蛋白質(2)的未吸收率。將經 50000 倍稀釋之小鼠的血清與已製備為 12.5、25、50、100 μ g/mL 之化合物(6)、化合物(8)、化合物(7)及化合物(1)進行混合，並在 4℃ 下使反應過一晚之後，添加於將抗原蛋白質(2)固相化過之 ELISA 用免疫盤，並在 37℃ 下使反應了 30 分鐘。洗淨後，使抗鼠 IgG-HRP 在 37℃ 下反應了 30 分鐘。洗淨後，添加 OPD 溶液，於顯色停止後測定了 490nm 的吸光度。透過以下式算出了未吸收率。

$$\text{未吸收率 (\%)} = (a/b) \times 100$$

a：陽性對照或者陰性對照之添加濃度 12.5 μ g/mL 的吸光度

b：陽性對照或者陰性對照無添加的吸光度

任一小鼠血清皆在陽性對照的化合物(6)及化合物(1)觀察到高的抑制效果，而依個體有在化合物(7)觀察到高的抑制效果。又，在陰性對照的化合物(8)來說，在任一血漿皆未觀察到高的抑制效果。其中，從具有在化合物(7)觀察到高的抑制效果且在

化合物(8)未觀察到高的抑制效果之血清的 BALB/c 小鼠及 BDF1 小鼠分別選擇 1 個個體，並採取淋巴結及脾臟而使用於製作融合瘤。

【0180】

v)製作融合瘤

利用 PEG 法將在 iv)選擇出之個體的淋巴結細胞及脾臟細胞，和小鼠骨髓瘤進行了細胞融合。使用出現之融合瘤的培養上清液來進行了產生抗體的融合瘤的篩選。

【0181】

vi)對於抗原蛋白質(2)的專一性鍵結評價

將抗原蛋白質(2)固相化於 ELISA 用免疫盤，並使 2 倍稀釋過的產生抗體之融合瘤上清液在 37℃ 下反應了 120 分鐘。洗淨後，使抗鼠 IgG-HRP 在 37℃ 下反應了 30 分鐘。洗淨後，添加 OPD 溶液，並於顯色停止後測定了 490nm 的吸光度。選擇了產生 OD 值顯示 0.2 以上的數值之培養上清液的融合瘤 11 株作為陽性。

【0182】

vii)交叉檢驗(cross check)

針對在 vi)中選擇出作為陽性的 11 株，使用化合物(6)、化合物(1)、B7-H3-ADC(II)、B7-H3-ADC(I)及 B7-H3-ADC(III)作為陽性對照，以及使用化合物(8)及化合物(7)作為反應性確認用化合物，實施了抑制型 ELISA(inhibition ELISA)。以使得最終濃度成為 25µg/mL 的方式將陽性對照及反應性確認用化合物添加至經 2 倍稀釋過之在 vi)中作為陽性選擇出之 11 株的培養上清液。在 4℃ 下使反應了一晚後，添加於

已固相化抗原蛋白質(2)之 ELISA 用免疫盤，並使在 37℃ 下反應了 30 分鐘。洗淨後，使抗鼠 IgG-HRP 在 37℃ 下反應了 30 分鐘。洗淨後，添加 OPD 溶液，並於顯色停止後測定了 490nm 的吸光度。選擇相對於抗原蛋白質(2)的反應性高，且觀察到由陽性對照所致之抑制效果的 8 株供至一次選殖。

【0183】

viii)一次選殖、一次篩選

利用極限稀釋法將在 vii)選擇出之 8 株進行了選殖。以使得成為 60 細胞/96 孔盤的方式將融合瘤進行播種，將小鼠胸腺細胞各添加 5×10^6 細胞/孔，並使用含有 10%FBS 的 TIL(股份有限公司免疫生物研究所)進行了培養。進行與 vii)同樣的抑制型 ELISA(inhibition ELISA)，選擇出被確認到專一性的 8 株 x6 的次選殖體(subclone)。

【0184】

ix)一次交叉檢驗

確認了在 viii)選擇出之 8 株 x6 的次選殖體對於 B7-H3-ADC(II)及 B7-H3-ADC(I)的反應性。利用固定化緩衝液(immobilized buffer)將 B7-H3 C1 結構域 LotB7 __OmJ1(B7-H3 C1 domain LotB7 __OmJ1)稀釋為 1μg/mL，並在 Maxi-Sorp 盤各添加 100μL 後，在 4℃ 下進行了一晚固相化。次日，除去盤的培養基，將含有 5%BSA 的 PBS 各添加 180μL，在室溫下靜置了 3 小時。利用含有 0.05%Tween20 的 PBS 進行 2 次洗淨後，將已製備為 0.1μg/mL 之 B7-H3-ADC(II)、及 B7-H3-ADC(I)各添加 100μL 後，在室溫下靜置了大約 1 小時。利用含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗淨 2 次後，

將從 900 μ g/mL 以公比 3 7 階段稀釋之融合瘤上清液各添加 50 μ L 後，在室溫下靜置了 1 小時。利用含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗淨 2 次後，將稀釋過 5000 倍之 Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc γ Fragment Specific (過氧化酶親和純化山羊抗小鼠 IgG, Fc γ 片段專一性)(Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC.)各添加 100 μ L，並在室溫下靜置了 1 小時。利用含有 0.05%Tween20 的 PBS 洗淨 3 次後，將 HRP 基質(OPD tablet)各添加 100 μ L 並進行顯色反應，將 1M HCl 各添加 100 μ L 而使顯色反應停止之後，利用 ARVO(PerkinElmer 公司)測定了 450nm 的吸光度。在 8 株 x6 的次選殖體全部中確認到對於 B7-H3-ADC(II)及 B7-H3-ADC(I)的反應性。其中，將反應性高的 4 株 x6 的次選殖體供至一次校準曲線確認。

【0185】

x)一次校準曲線確認

利用 ELISA 確認了在 ix)選擇出之 4 株 x6 的次選殖體對 B7-H3-ADC(I)(DAR7)與 B7-H3-ADC(I)(DAR5)的反應性。利用被覆緩衝液(Coating Buffer)將 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc γ fragment specific(Jackson Immuno Research Inc.)稀釋為 1 μ g/mL，並在 Maxi-Sorp 盤各添加 100 μ L 後，在 4 $^{\circ}$ C 下進行了一晚固相化。次日，除去盤的培養基，並在利用 PBS 洗淨後，將含有 10%BSA 的 PBS 各添加 100 μ L，在 37 $^{\circ}$ C 下靜置了 2.5 小時。除去盤的培養基，並利用含有 2%BSA、0.2%聚山梨醇酯(Polysorbate)20(以下，稱為「PS20」)的 PBS 將融合瘤 4 株 x6 的次選殖體稀釋為 10、25

及 100ng/mL，並在盤中各添加 100 μ L，在 37°C 下靜置了 1 小時。利用含有 0.05%PS20 的 PBS 洗淨 4 次後，利用含有 2%BSA、0.2%Tween20 的 PBS 將 B7-H3-ADC(I)(DAR7)及 B7-H3-ADC(I)(DAR5) 稀釋為 1、2.5、10、25、100、250ng/mL，並在盤中各添加 100 μ L，在 37°C 下靜置了 1 小時。把利用含有 0.05%PS20 的 PBS 洗淨 4 次後，利用含有 2%BSA、0.2%PS20 的 PBS 進行過 7500 倍稀釋的山羊抗人類 -HRP(Goat Anti-Human kappa-HRP)(Southern Biotechnology Associates, Inc.)各添加 100 μ L，並在室溫下靜置了 1 小時。利用含有 0.05%PS20 的 PBS 洗淨 4 次後，以 100 μ L/孔添加 TMB soluble reagent(ScyTek Laboratories)來進行顯色反應，並添加 100 μ L/孔之 TMB stop buffer(ScyTek Laboratories)來使顯色反應停止之後，利用 VersaMax(Molecular Devices 公司製)測定 450nm 的吸光度(參考(reference) 650nm)，透過以下式算出相對誤差，選擇出值小的選殖體。

$$\text{相對誤差(\%)} = \{ (\text{DAR7 的測定值}) / (\text{DAR5 的測定值}) - 1 \} \times 100$$

從其中，將 4 株 x2 的次選殖體供至二次選殖。

【0186】

xi) 二次選殖、篩選

進行在 x) 中選擇出之 4 株 x2 的次選殖體之二次選殖，透過在各選殖體從陽性孔之中選出 3 孔而選擇合計 24 選殖體，與 vi) 同樣地實施了相對於抗原蛋白質(2)之抗體力價的確認。進一步使用化合物(6)、化合物(1)、B7-H3-ADC(II)、B7-H3-

ADC(I)及 B7-H3-ADC(III)作為陽性對照，以及使用化合物(8)及化合物(7)作為反應性確認用化合物，與vii)同樣地實施了抑制型 ELISA(inhibition ELISA)。

【0187】

xii)二次校準曲線確認

在 xi)中選擇出之 24 選殖體中，與化合物(1)進行比較，針對除了對化合物(7)的反應性特別高之 6 選殖體外之 18 選殖體，利用 Gyrolab xP 工作站 (Gyrolab xP workstation)(GYROS PROTEIN Technologies)確認了對於 HER2-ADC(I)(DAR8)、HER2-ADC(I)(DAR4)、及 HER2-ADC(I)(DAR2)的反應性及校準曲線。捕捉試劑是使用 Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fcγ specific(生物素-SP-結合的親和純化山羊抗小鼠 IgG, Fcγ 專一性)(Jackson Immuno Research LABORATORIES,INC.)，利用含有 0.01%PS20 的 PBS 而製備為 172.5nM。細胞培養上清液是利用 Rxxip CCS(GYROS PROTEIN Technologies)而製備為 200ng/mL。HER2-ADC(I)(DAR8)、HER2-ADC(I)(DAR4)、及 HER2-ADC(I)(DAR2)皆是利用含有 0.01%PS20 的 PBS，從 1000ng/mL 以 4 倍公比 6 階段稀釋並製備。檢測試劑是使用：利用 Alexa Fluor(註冊商標)647 標籤套組 (labeling kit)(Thermo Fisher Scientific Inc.)將 Goat Anti Human kappa(Southern Biotechnology Associates, Inc.)予以標記過者，並利用 Rxxip F 製備為 10nM。把於上述製備出之試劑、細胞培養上清液及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，與

Gyrolab Bioaffy 200 一起組裝至 Gyrolab xP 工作站，並利用 4-Step(2xC)-A-D(wizard method)進行了測定。校準曲線是使用 Gyrolab 評估器軟體(Gyrolab Evaluator Software)以 4-參數邏輯模型(加權；效果(Response))進行迴歸。經評價之 18 選殖體皆不依賴 HER2-ADC(I)的 DAR，又，由於亦未觀察到株間的反應性的差異，而在同一株選擇 IgG 濃度高的 3 選殖體(1A3、8B2、11B1)，進行了少量生產。

【0188】

xiii)蛋白質 A 純化抗體的製備與交叉檢驗

針對在 xii)中選擇出之 3 選殖體(1A3、8B2、11B1)，利用無血清培養基(ASF104(N))進行轉瓶培養器培養，在回收培養上清液後利用 0.45 μ m 的過濾器進行過濾，並利用蛋白質 A 管柱進行純化。將經蛋白質 A 純化過之 3 選殖體從 5 μ g/Ml 以 2 倍公比已進行 10 階段稀釋的溶液 50 μ L，添加至經添加 50ng/孔/50 μ L 抗原蛋白質(2)並固相化之 ELISA 用免疫盤，並使在 37 $^{\circ}$ C 下反應了 30 分鐘。洗淨後，使抗鼠 IgG-HRP 在 37 $^{\circ}$ C 下反應了 30 分鐘。洗淨後，添加 OPD 溶液，於顯色停止後測定了 490nm 的吸光度。任一蛋白質 A 純化抗體皆顯示了與抗原蛋白質(2)的良好反應性。

【0189】

xiv)蛋白質 A 純化抗體的校準曲線確認

針對在 xiii)中經蛋白質 A 純化之 3 選殖體(1A3、8B2、11B1)，使用 Gyrolab xP 工作站來確認了對於 HER2-ADC(I)(DAR8)、及 HER2-ADC(I)(DAR4)，以及 B7-H3-ADC(I)(DAR8)、及 B7-H3-ADC(I)(DAR4)的反應性。

【0190】捕捉試劑是使用：利用 EZ-Link NHS-LC-Biotin(Thermo Fisher Scientific Inc.)將蛋白質 A 純化後的 3 選殖體進行過生物素標記者，並利用含有 0.01%PS20 的 PBS 製備為 700nM。HER2-ADC(I)(DAR8) 與 HER2-ADC(I)(DAR4)是利用 Rexasip HN，任一者皆從 1000ng/mL 以 4 倍公比 6 階段地進行稀釋並製備。檢測試劑是使用利用 Alexa Fluor(註冊商標)647 標籤套組將 Goat Anti Human kappa(Southern Biotechnology Associates, Inc.)標記過之物，並利用 Rexasip F 製備為 10nM。把製備出之試劑及抗體-藥物結合物(校準曲線試料)置入 96 孔 PCR 盤，與 Gyrolab Bioaffy 200 一起組裝至 Gyrolab xP 工作站，並利用 200-3W-001-A(wizard method)進行了測定。校準曲線是使用 Gyrolab 評估器軟體以 4-參數邏輯模型(加權；效果)進行了迴歸。將選殖體 1A3 的校準曲線顯示於圖 15，選殖體 8B2 的校準曲線顯示於圖 16，選殖體 11B1 的校準曲線顯示於圖 17。針對任一選殖體皆顯示與 HER2-ADC(I)之間不依賴於 DAR 的反應性。

【0191】進一步作為捕捉試劑，使用利用 EZ-Link NHS-LC-Biotin 進行過生物素標記之人類 Her2/ErbB2 蛋白(Human Her2/ErbB2 Protein)(ACROBiosystems)、及同樣地進行過生物素標記之 B7-H3 C1 結構域(B7-H3 C1 domain)，並利用含有 0.01%PS20 的 PBS 製備為 700nM。針對 HER2-ADC(I)(DAR8)及 HER2-ADC(I)(DAR4)、以及 B7-H3-ADC(I)(DAR8)及 B7-H3-ADC(I)(DAR4) 是利用 Rexasip HN，任一者皆從 1000ng/ml 以 4 倍公比 6 階段地進

行稀釋並製備。檢測試劑是使用利用 DyLight650(註冊商標)標籤套組(Thermo Fisher Scientific Inc.)標記過的蛋白質 A 純化後的 3 選殖體(1A3、8B2、11B1)者，並利用 Rexas F 製備為 10nM。把製備出之試劑及抗體-藥物結合物的校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，與 Gyrolab Bioaffy 200 一起組裝至 Gyrolab xP 工作站，並利用 200-3W-001-A(wizard method)進行了測定。校準曲線是使用 Gyrolab 評估器軟體以 4-參數邏輯模型(加權；效果)進行了迴歸。針對與 HER2-ADC(I)的反應性，將選殖體 1A3 的校準曲線顯示於圖 18，選殖體 8B2 的校準曲線顯示於圖 19，選殖體 11B1 的校準曲線顯示於圖 20。又，針對與 B7-H3-ADC(I)的反應性，將選殖體 1A3 的校準曲線顯示於圖 21，選殖體 8B2 的校準曲線顯示於圖 22，選殖體 11B1 的校準曲線顯示於圖 23。針對任一選殖體皆是顯示與 HER2-ADC(I)及 B7-H3-ADC(I)之間不依賴於 DAR 的反應性。

【0192】由以上結果，確認到：針對任一選殖體皆是不依賴於 DAR 以及抗體部分的差異地顯示對於抗體-藥物結合物的反應性，並且在捕捉試劑與檢測試劑之任一方皆可使用。決定選擇此中訊息值最大的選殖體 1A3，並使用於本發明涉及的抗體-藥物結合物之檢測。

【0193】

xv)確定小鼠單株抗體的同型

在 xiv)取得之選殖體 1A3 涉及的小鼠單株抗體(以下稱為「小鼠抗體 1A3」)的同型，是透過 Mouse monoclonal isotyping test kit(AbD Serotec 公司製)所確定。其結果確

認到同型是 IgG2b， κ 鏈。

【0194】

xvi)單株抗體的基因選殖及 N 末端胺基酸序列分析

由產生小鼠抗體 1A3 的融合瘤，使用 TRIzol Reagent(LIFE TECHNOLOGIES)來製備了總 RAN(total RNA)。實施了經純化過之小鼠抗體 1A3 之 N 末端胺基酸序列分析(埃德曼降解法(edman degradation))。進一步，透過抗體基因選殖，分析了選殖體 1A3 的核苷酸序列。抗體基因選殖的結果，重鏈可變區、輕鏈可變區皆分別獲得 1 種類的序列，且確認到：經純化之小鼠抗體 1A3 之 N 末端胺基酸序列分析的結果與透過抗體基因選殖所獲得之選殖體 1A3 之核苷酸序列之 N 末端胺基酸序列是一致的。

【0195】將小鼠抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列記於序列識別號 15。序列識別號 15 中胺基酸編號 1 至 19 記載的胺基酸序列是表示訊息序列，胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列是表示重鏈可變區，胺基酸編號 142 至 477 記載的胺基酸序列是表示重鏈恒定區的胺基酸序列。

【0196】將小鼠抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列記於序列識別號 16。序列識別號 16 中胺基酸編號 1 至 20 記載的胺基酸序列是表示訊息序列，胺基酸編號 21 至 127 記載的胺基酸序列是表示輕鏈可變區，胺基酸編號 128 至 234 記載的胺基酸序列是表示輕鏈恒定區的胺基酸序列。

【0197】將編碼小鼠抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列的核苷酸序列記於序列識別號 17。序列識別號 17 中核苷酸編號 1 至 57 記載的核苷酸序列是表示訊息序列，核苷酸編號 58 至 423 記載

的核苷酸序列是編碼重鏈可變區的胺基酸序列。

【0198】將編碼小鼠抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列的核苷酸序列記於序列識別號 18。序列識別號 18 中核苷酸編號 1 至 60 記載的核苷酸序列表示訊息序列，核苷酸編號 61 至 459 記載的核苷酸序列是編碼重鏈可變區的胺基酸序列。

【0199】又，進行了 CDR 的分析。

【0200】根據 Abm 的定義，可判定：小鼠抗體 1A3 重鏈可變區是保有：由序列識別號 1 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(GFTFSDYGMV)、由序列識別號 2 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(YISSGSSAIY)、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(PPRYDVYSAWFAY)，小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區是保有：由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(KASQDVGS AVV)、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2(WASTRHT)、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0201】根據 Chothia 的定義，可判明：小鼠抗體 1A3 重鏈可變區是保有：由序列識別號 7 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(GFTFSDY)、由序列識別號 8 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(SSGSSA)、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(PPRYDVYSAWFAY)，小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區是保有：由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(KASQDVGS AVV)、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2(WASTRHT)、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0202】根據 Kabat 的定義，可判明：小鼠抗體 1A3 重鏈

可變區是保有：由序列識別號 9 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(DYGMV)、由序列識別號 10 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(YISSGSSAIYYADTVKG)、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(PPRYDVYSAWFAY)，小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區是保有：由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(KASQDVGSAAV)、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2(WASTRHT)、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0203】根據 Imgt(註冊商標)的定義，可判明：小鼠抗體 1A3 重鏈可變區是保有：由序列識別號 11 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1(GFTFSDYG)、由序列識別號 12 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2(ISSGSSAI)、及由序列識別號 13 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3(ARPPRYDVYSAWFAY)，小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區是保有：由序列識別號 14 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1(QDVGSA)、由 WAS(色胺酸-丙胺酸-絲胺酸)所示之三肽構成的 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3(QQYSSYPVT)。

【0204】

[實施例 4]非臨床試驗的血漿中濃度測定

使用在實施例 2 取得之小鼠抗體 1A3，構建了 HER2-ADC(I)的小鼠血漿中濃度、以及 HER3-ADC(I)、TROP2-ADC(I)、及 B7-H3-ADC(I)的猿血漿中濃度測定法。小鼠抗體 1A3 是可進行 DyLight650(註冊商標)或者 Alexa Fluor(註冊商標)647 標記作為檢測試劑而使用，使用任一方皆能夠測定本發明涉及的抗體-藥物結合物之血漿中濃度。進一步能夠不依賴

於 DAR 以及抗體部分的差異地作成校準曲線，能夠使用於本發明涉及的抗體-藥物結合物之血漿中濃度測定。

【0205】

i)HER2-ADC(I)

利用 Gyrolab xP 工作站來構建了 HER2-ADC(I)的小鼠血漿中濃度測定法。使用作為捕捉試劑之生物素化小鼠抗-(抗 HER2 Ab)個體遺傳型 Ab[Biotinylated Mouse Anti-(Anti-HER2 Ab) idiotype Ab](於此處，「(抗-HER2 Ab)」表示包含由序列識別號 21 中胺基酸編號 1 至 449 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 22 中胺基酸編號 1 至 214 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成之抗體)(13C1)(IBL)，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 來製備為 350 nM。校準曲線試料是進行製備使得利用 REXXIP HN 進行過 100 倍稀釋的小鼠血漿中 HER2-ADC(I)的濃度成為 0、0.150、0.200、0.600、1.60、4.00、16.0、40.0、100、140 μ g/mL。檢測試劑是使用經以 DyLight650(註冊商標)標籤套組將小鼠抗體 1A3 標籤化而得者，並利用 REXXIP F 製備為 10nM。將該等製備出之試劑及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，與 Gyrolab Bioaffy 200 一起組裝於 Gyrolab xP 工作站。測定 wizard 是使用了 200-3W-002-A(PMT1)。迴歸分析是使用 Gyrolab 評估器(Gyrolab Evaluator)3.3.9.175 以 5-參數邏輯模型進行。將校準曲線顯示於圖 24。

【0206】利用 Gyrolab xP 工作站來構建了總抗體(Total 抗體)(抗 HER2 抗體及 HER2-ADC(I))的小鼠血漿中濃度測定法。使用生物素化小鼠抗-(抗 HER2Ab)個體遺傳型

Ab[Biotinylated Mouse Anti-(Anti-HER2 Ab) idiotype Ab](13C1) (IBL)作為捕捉試劑，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 製備為 350 nM。校準曲線試料是進行製備使得利用 REXXIP HN 進行過 100 倍稀釋的小鼠血漿中 HER2-ADC(I)的濃度成為 0、0.150、0.200、0.600、1.60、4.00、16.0、40.0、100、140µg/mL。檢測試劑是利用 REXXIP F 將 Alexa Fluor(註冊商標)647 抗人類 IgG，Fcγ 抗體(Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.)製備為 10nM。將該等製備出之試劑及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，與 Gyrolab Bioaffy 200 一起組裝於 Gyrolab xP 工作站。測定 wizard 是使用了 200-3W-002-A(PMT1)。迴歸分析是使用 Gyrolab 評估器 3.3.9.175 來以 5-參數邏輯模型進行。

【0207】將濃度測定結果顯示於表 1。

【0208】[表 1]

時間(d)	平均血漿濃度(µg/mL)						
	0.00347	0.292	1	3	7	14	21
總Ab	66.9±4.9	41.3±1.4	27.9±1.4	24.3±2.3	17.0±1.2	10.7±0.5	6.66±1.19
HER2-ADC(I)	73.4±6.6	44.8±6.0	30.3±1.2	23.5±1.7	16.9±0.4	8.92±0.91	5.20±0.98

【0209】

ii)HER3-ADC(I)

利用 Gyrolab xP 工作站來構建 HER3-ADC(I)的猿血漿中濃度測定法，並取得了驗證。使用經以 EZ-連接硫代-NHS-LC-生物素 (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin)(Thermo Fisher Scientific Inc.)進行過生物素標記的 HER3(Recombinant Human ErbB-3/HER3 Protein，ACROBiosystems)作為捕捉試劑，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 製備為 700 nM。校準曲線試料是使用進行製備使得在猿血漿中 HER3-ADC(I)的

濃度成為 0、0.0750、0.100、0.250、0.750、2.25、6.75、20.0、38.0、48.0 μ g/mL 者，進一步利用含有聚山梨醇酯 20 的 PBS 及 Rxxip AN(GYROS PROTEIN Technologies)進行了 100 倍稀釋。檢測試劑是使用利用 Alexa Fluor(註冊商標)647 標籤套組將小鼠抗體 1A3 標籤化而得者，並利用 Rxxip F 製備為 10nM。將該等製備出之試劑及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，並組裝於 Gyrolab xP 工作站。測定 wizard 是使用了 200-3W-002-A(PMT5)。迴歸分析是使用 Gyrolab 評估器 3.3.7.171 並以 4-參數邏輯模型(權重：效果)進行。將校準曲線顯示於圖 25。

【0210】

iii)TROP2-ADC(I)

利用 Gyrolab xP 工作站構建 TROP2-ADC(I)的猿血漿中濃度測定法，取得了驗證。使用經以 EZ-連接硫代-NHS-LC-生物素(EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin)進行過生物素標記的新 hTrop2(Lot 編號 V35，第一三共(股))作為捕捉試劑，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 製備為 350nM。校準曲線試料是使用進行製備使得在猿血漿中 TROP2-ADC(I)的濃度成為 0、0.00750、0.0100、0.0250、0.0750、0.250、0.750、2.50、7.50、10.0 μ g/mL 者，進一步利用 Rxxip HN(GYROS PROTEIN Technologies)進行了 10 倍稀釋。檢測試劑是使用將小鼠抗體 1A3 利用 Alexa Fluor(註冊商標)647 標籤套組標籤化過者，並利用 Rxxip F 製備為 10nM。將該等製備出之試劑及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，並組裝至 Gyrolab xP 工作站。測定 wizard 是使用了 200-3W-002-A(PMT1)。迴歸分

析是使用 Gyrolab 評估器 3.3.7.171 以 4-參數邏輯模型(權重：效果)進行。將校準曲線顯示於圖 26。

【0211】

iv) B7-H3-ADC(I)

利用 Gyrolab xP 工作站構建 B7-H3-ADC(I)的猿血漿中濃度測定法，並取得了驗證。使用經以 EZ-連接硫代-NHS-LC-生物素 (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin)(Thermo Fisher Scientific Inc.)進行過生物素標記的 B7-H3 C1 結構域(B7-H3 C1 domain)(Lot 編號 B7__OmJ1，第一三共(股))作為捕捉試劑，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 製備為 700nM。校準曲線試料是使用進行製備使得在猿血漿中 B7-H3-ADC(I)的濃度成為 0、0.0750、0.100、0.250、0.750、2.25、6.75、20.0、38.0、48.0 μ g/mL 者，進一步利用含有聚山梨醇酯 20 的 PBS 及 REXXIP HN(GYROS PROTEIN Technologies)進行了 50 倍稀釋。檢測試劑是使用將小鼠抗體 1A3 以 Alexa Fluor(註冊商標)647 標籤套組進行過標籤化而得者，並利用 REXXIP F 製備為 10nM。將該等製備出之試劑及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，組裝至 Gyrolab xP 工作站。測定 wizard 是使用了 200-3W-001-A(PMT5)。迴歸分析是使用 Gyrolab 評估器 3.3.7.171 並以 4-參數邏輯模型(權重：效果)進行。將校準曲線顯示於圖 27。

【0212】

[實施例 5]使用了小鼠抗體 1A3 的免疫染色

i)確認使用了源自人類之皮下移植腫瘤的染色性

【0213】將源自人類之腫瘤皮下移植至高度免疫缺陷小鼠

(NOG 小鼠)。在投予本發明涉及的抗體-藥物結合物後，採取該腫瘤組織並製作石蠟包埋標本，探討小鼠抗體 1A3 的染色性。將由未投予本發明涉及的抗體-藥物結合物之 NOG 小鼠採取出之腫瘤組織作為陰性對照。脫石蠟及抗原修復是使用自動染色 Link 用預處理系統(Autostainer Link 用預處理系統)(PT Link：DAKO 公司製)、及抗原修復液(目標檢索溶液低 pH(Target Retrieval Solution Low pH)：DAKO 公司製)而實施。其後的染色作業是使用自動染色裝置(DAKO 自動染色機 Link48(DAKO Autostainer Link48)：DAKO 公司製)來實施。利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液(EnVision FLEX WASH BUFFER)(DAKO 公司製)洗淨之後，添加過氧化酶阻斷劑(Peroxidase Block) 3% H_2O_2 (DAKO 公司製)進行孵育(incubate)，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行洗淨。添加無血清的蛋白質阻斷劑(Protein Block serum free)(DAKO 公司製)，進行孵育，並利用鼓風(Air blow)除去液。利用 REAL 抗體稀釋劑(REAL Antibody Diluent)(DAKO 公司製)來稀釋小鼠抗體 1A3，並使反應。利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液洗淨後，添加 EnVision+系統- HRP 標記聚合物抗小鼠(EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse) # K4000(DAKO 公司製)，並進行了孵育後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了洗淨。

【0214】添加 DAKO Liquid DAB+ 基質色素原系統(Substrate Chromogen System)並進行了孵育之後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行洗淨。添加 EnVision FLEX 蘇木精(EnVision FLEX Hematoxylin)並進行了孵育之後，

利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液及離子交換水進行洗淨。

【0215】確認：小鼠抗體 1A3 對於經投予本發明涉及的抗體-藥物結合物之 NOG 小鼠顯示良好的染色性，且伴隨小鼠抗體 1A3 濃度的增加，染色強度會增加。又，確認：小鼠抗體 1A3 對於未投予本發明涉及的抗體-藥物結合物之 NOG 小鼠沒有顯示染色性。再者，已知由於 NOG 小鼠缺損 B 細胞，而未觀察到因源自小鼠的內源性 IgG 所致之背景染色(Ito M, et al. Blood 100(9):3175-3182, 2002)。

【0216】

ii) 確認小鼠抗體 1A3 的專一性

預先將小鼠抗體 1A3 與化合物(2)或者 SN-38 進行混合後，使用於免疫染色。混合比是基於分子量設為抗體 1A3：化合物(2)：SN-38=0.1：0.04：0.03。染色是利用與 i) 同樣的方法來實施。

【0217】確認：小鼠抗體 1A3 的染色性會因與化合物(2)的混合而消失。又，確認：小鼠抗體 1A3 的染色性不因與 SN-38 的混合而消失。

【0218】

[實施例 6] 製作兔嵌合化抗體

i) 設計小鼠抗體 1A3 的兔嵌合化抗體

【0219】小鼠抗體 1A3 的兔嵌合化抗體(以下稱為「兔嵌合化抗體 1A3」)如以下進行了設計。兔嵌合化抗體的序列是由 IMGT(註冊商標)參照兔的重鏈恒定區 IGHG*02 與兔的輕鏈恒定區 IGKC2*01，並連接至選殖體 1A3 之各個可變區而藉此設計。

【0220】將兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列記於序列識別號 19。序列識別號 19 中胺基酸編號 1 至 19 記載的胺基酸序列表示訊息序列，胺基酸編號 20 至 141 記載的胺基酸序列表示重鏈可變區，胺基酸編號 142 至 464 記載的胺基酸序列表示重鏈恒定區的胺基酸序列。

【0221】將兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列記於序列識別號 20。序列識別號 20 中胺基酸編號 1 至 20 記載的胺基酸序列表示訊息序列，胺基酸編號 21 至 127 記載的胺基酸序列表示輕鏈可變區，胺基酸編號 128 至 233 記載的胺基酸序列表示輕鏈恒定區的胺基酸序列。

【0222】

ii) 構建表現抗體的載體 pCMA-LK

使用 In-Fusion Advantage PCR 選殖套組(CLONTECH 公司)，將利用限制酶 XbaI 及 PmeI 消化質體 pcDNA3.3-TOPO/LacZ(Invitrogen 公司)而得之約 5.4kb 的斷片、與具有編碼人類輕鏈訊息序列及人類 κ 鏈恒定區的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 29)的 DNA 片段予以鍵結，而製作了 pcDNA3.3/LK。

【0223】從 pcDNA3.3/LK 除去新黴素表現單元，藉此構建了 pCMA-LK。

【0224】

iii) 構建表現兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的載體

合成出具有編碼兔嵌合化抗體 1A3 重鏈之胺基酸序列(序列識別號 19)的核苷酸序列(序列識別號 30)的 DNA 片段(GENEART 公司)。序列識別號 30 中核苷酸編號 26 至 82 記載

的核苷酸序列是表示訊息序列，核苷酸編號 83 至 448 記載的核苷酸序列是編碼重鏈可變區的胺基酸序列，核苷酸編號 449 至 1417 記載的核苷酸序列是編碼恒定區的胺基酸序列。

【0225】使用 In-Fusion HD PCR 選殖套組 (CLONTECH 公司)，將合成出之 DNA 片段、與利用 XbaI 及 PmeI 消化 pCMA-LK 而除掉編碼輕鏈訊息序列及人類 κ 鏈恒定區的胺基酸序列的核苷酸序列(序列識別號 29)的 DNA 片段予以鍵結，藉此構建了表現兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的載體。

【0226】

iv)構建兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈表現載體

合成了具有編碼兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列(序列識別號 20)之核苷酸序列(序列識別號 31)的 DNA 片段 (GENEART 公司)。序列識別號 31 中核苷酸編號 26 至 85 記載的核苷酸序列表示訊息序列，核苷酸編號 86 至 406 記載的核苷酸序列編碼輕鏈可變區的胺基酸序列，核苷酸編號 407 至 724 記載的核苷酸序列編碼恒定區的胺基酸序列。利用與 iii)同樣的方法來構建了表現兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的載體。

【0227】

v)生產兔嵌合化抗體 1A3

自由式(FreeStyle)293F 細胞(Invitrogen 公司)是按照手冊，進行了繼代、培養。將對數生長期之 2.4×10^9 個自由式 293F 細胞(Invitrogen 公司)播種於 Optimum Growth 5L 燒瓶(Optimum Growth 5L Flask)(Thomson 公司)，並利用自由式 293 表現培養基(FreeStyle293 expression medium)(Invitrogen 公司)進行稀釋而製備為 1.88×10^6 細胞

/mL。將 0.48mg 之兔嵌合化抗體 1A3 重鏈表現載體與 0.72mg 之兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈表現載體與 3.6mg 之聚乙炔亞胺(Polyethyleneimine)(Polyscience #24765)添加於 40mL 之 Opti-Pro SFM 培養基(Invitrogen 公司)並平穩地攪拌，在進一步放置 5 分鐘後添加至自由式 293F 細胞。在 37℃、8%CO₂ 孵育器中以 90rpm 振盪培養 4 小時後，添加 1200mL 之 EX-CELL VPRO 培養基(SAFC Biosciences 公司)、18mL 之 GlutaMAX I(GIBCO 公司)、及 60mL 之 Yeastolate Ultrafiltrate(GIBCO 公司)，並在 37℃、8%CO₂ 溫孵育器中以 90rpm 振盪培養 7 日，將所獲得之培養上清液利用一次性膠囊過濾器(Disposable Capsule Filter)(Advantec #CCS-045-E1H)進行過濾，藉此獲得了包含兔嵌合化抗體 1A3 的培養上清液。

【0228】

vi)純化兔嵌合化抗體 1A3

將在 v)所獲得之培養上清液利用 rProtein A 親和力層析法的 1 階段步驟進行了純化。將培養上清液上樣至被填充有經以 PBS 平衡化過之 MabSelectSuRe 的管柱(GE Healthcare Bioscience 公司製)之後，利用管柱容量 2 倍以上的 PBS 洗淨了管柱。接著利用 2M 精胺酸鹽酸鹽溶液(pH4.0)進行溶析，並收集了含有抗體的劃份。將該劃份透過透析(Thermo Scientific 公司，Slide-A-Lyzer 透析卡匣(Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette))進行了緩衝液取代為 PBS。利用離心式 UF 過濾裝置(Centrifugal UF Filter Device)VIVASPIN20(截斷分子量(molecular cutoff)UF10K，Sartorius 公司)將抗體濃

縮，並將 IgG 濃度製備為 2mg/mL 以上。最後利用 Minisart-Plus 過濾器 (Minisart-Plus filter) (Sartorius 公司) 進行過濾，獲得了兔嵌合化抗體 1A3 的純化樣品。

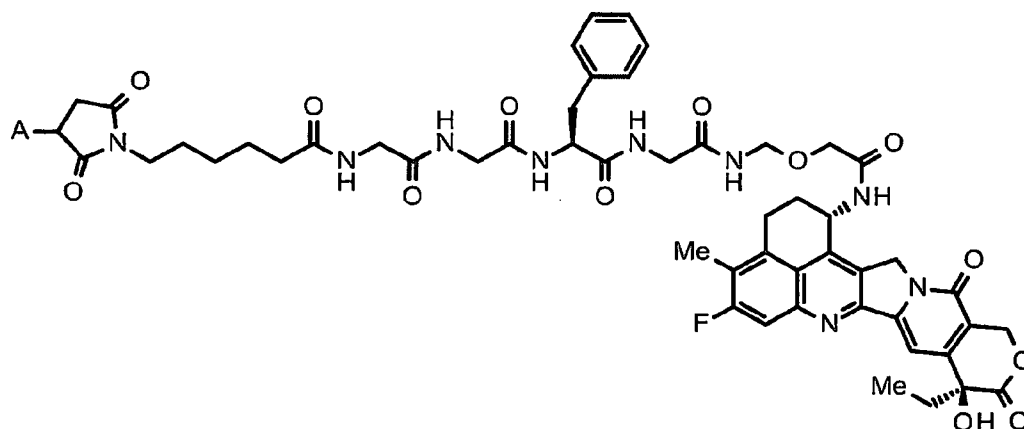
【0229】

[實施例 7] 製造抗體-藥物結合物

i) 抗 GPR20 抗體-藥物結合物之製造(1)

【0230】按照記載於國際公開第 2018/135501 號的製造方法，使用抗 GPR20 抗體(包含：由序列識別號 32 中胺基酸編號 20 至 472 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 33 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：

下式

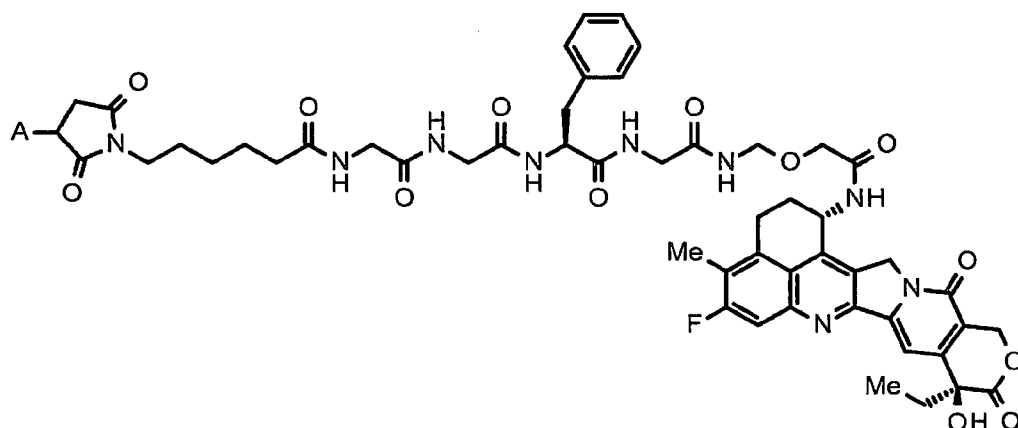


所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 GPR20 抗體透過硫醚鍵鍵結而成之抗 GPR20 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「GPR20-ADC(I)」)。

【0231】

ii) 抗 CDH6 抗體-藥物結合物之製造(1)

按照記載於國際公開第 2018/212136 號的製造方法，使用抗 CDH6 抗體(包含由序列識別號 34 中胺基酸編號 20 至 471 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 35 中胺基酸編號 21 至 233 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)，製造了：下式



所示之藥物連接子(式中，A 表示與抗體的鍵結位置)與抗 CDH6 抗體透過硫醚鍵而鍵結而成之抗 CDH6 抗體-藥物結合物(在本發明中稱為「CDH6-ADC(I)」)：。

【0232】

[實施例 8]使用了兔嵌合化抗體 1A3 的免疫染色

i)確認使用了源自人類之皮下移植腫瘤之投予 TROP2-ADC(I)後的染色性

【0233】將人類頭頸部癌細胞株 FaDu 皮下移植至免疫缺陷小鼠(裸鼠)。在投予 TROP2-ADC(I)後採取該腫瘤組織並製作石蠟包埋標本，探討了兔嵌合化抗體 1A3 的染色性。又，將由投予了抗 TROP2 抗體(包含：由序列識別號 25 中胺基酸編號 20 至 470 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 26 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗

體，以下稱為「抗 TROP2 Ab」。)之裸鼠採取出之腫瘤組織設為陰性對照。脫石蠟及抗原修復是使用自動染色 Link 用預處理系統(PT Link：DAKO 公司製)、抗原修復液(目標檢索溶液低 pH：DAKO 公司製)，在 97°C 下實施了 40 分鐘。其後的染色作業是使用自動染色裝置(DAKO 自動染色機 Link48：DAKO 公司製)在室溫下實施。利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液(DAKO 公司製)進行了 1 次洗淨後，添加 REAL 過氧化酶阻斷溶液(REAL Peroxidase-Blocking Solution)(DAKO 公司製)進行 5 分鐘孵育，並利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了 1 次洗淨。添加無血清的蛋白質阻斷劑(DAKO 公司製)，進行 30 分鐘孵育，利用鼓風(Air blow)除去液。利用 REAL 抗體稀釋劑(DAKO 公司製)將兔嵌合化抗體 1A3 稀釋為 0.1 μ g/mL，並使反應了 30 分鐘。利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液洗淨 3 次後，添加 EnVision+ 系統-HRP 標記聚合物抗兔(EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit)(DAKO 公司製)，進行了 30 分孵育後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了 2 次洗淨。

【0234】添加 DAKO Liquid DAB+Substrate Chromogen System 且孵育共計 10 分之後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了 1 次洗淨。添加 EnVision FLEX 蘇木精進行了 5 分鐘孵育後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液及離子交換水進行了共計 3 次洗淨。

【0235】於圖 35 顯示典型的染色圖像。兔嵌合化抗體 1A3 對經投予 TROP2-ADC(I)之動物的皮下腫瘤組織是會顯示良好的染色性，而另一方面，兔嵌合化抗體 1A3 對於經投予抗

TROP2 Ab 之動物的皮下腫瘤組織則未顯示出染色性。

【0236】

ii) 確認使用了源自人類之皮下移植腫瘤之投予 GPR20-ADC(I) 後的染色性

將過度表現 GPR20 的人類胃腸道基質腫瘤細胞株 GIST-T1/GPR20 皮下移植至免疫缺陷小鼠(裸鼠)。在投予 GPR20-ADC(I)後採取該腫瘤組織並製作石蠟包埋標本，探討了兔嵌合化抗體 1A3 的染色性。又，把由不投予 GPR20-ADC(I)的小鼠採取出之腫瘤組織設為陰性對照。以與 i)同樣的方法進行了染色。

【0237】 於圖 36 顯示典型的染色圖像。兔嵌合化抗體 1A3 對於投予 GPR20-ADC(I)之動物的皮下腫瘤組織是顯示良好染色性，而另一方面，兔嵌合化抗體 1A3 對於不投予 GPR20-ADC(I)之動物的皮下腫瘤組織未顯示出染色性。

【0238】

[實施例 9]使用了小鼠抗體 1A3 的免疫染色

i) 確認使用了源自人類之皮下移植腫瘤之投予 CDH6-ADC(I)後的染色性

【0239】 把由透明細胞型腎細胞癌患者所採取之腫瘤組織皮下移植至高度免疫缺陷小鼠(NOG 小鼠)。在投予 CDH6-ADC(I)後採取其腫瘤組織並製作石蠟包埋標本，探討了小鼠抗體 1A3 的染色性。又，把由未投予 CDH6-ADC(I)的 NOG 小鼠採取出的腫瘤組織設為陰性對照。脫石蠟及抗原修復是使用自動染色 Link 用預處理系統(PT Link：DAKO 公司製)、抗原修復液(目標檢索溶液低 pH：DAKO 公司製)，在 97℃下實施

了 40 分鐘。其後的染色作業是使用自動染色裝置(DAKO 自動染色機 Link48 : DAKO 公司製)並在室溫下實施。利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液(DAKO 公司製)進行了 1 次洗淨後，添加過氧化酶阻斷劑 3% H_2O_2 (DAKO 公司製)並進行 5 分鐘孵育，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了 1 次洗淨。添加無血清的蛋白質阻斷劑(DAKO 公司製)並進行 30 分鐘孵育，利用鼓風(Air blow)除去液。利用 REAL 抗體稀釋劑(DAKO 公司製)將小鼠抗體 1A3 稀釋為 $0.03\mu\text{g/mL} \sim 0.3\mu\text{g/mL}$ ，並使進行了 60 分鐘反應。利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液洗淨 3 次後，添加 EnVision+ 系統-HRP 標記聚合物抗小鼠(EnVision+ System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouse) #K4000(DAKO 公司製)，並進行了 30 分鐘孵育後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了 2 次洗淨。

【0240】添加 DAKO Liquid DAB+Substrate Chromogen System 並進行了共計 10 分鐘的孵育後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液進行了 1 次洗淨。添加 EnVision FLEX 蘇木精並進行了 5 分鐘孵育後，利用 EnVision FLEX 洗淨緩衝液及離子交換水進行了共計 3 次洗淨。

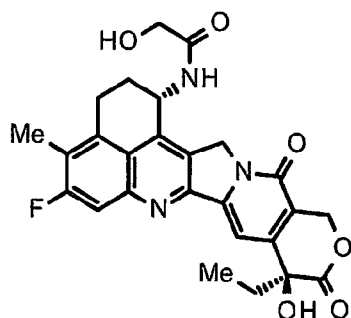
【0241】於圖 37 顯示典型的染色圖像。小鼠抗體 1A3 對於投予 CDH6-ADC(I)的動物是顯示良好的染色性，且伴隨小鼠抗體 1A3 濃度的增加染色強度會增加。另一方面，小鼠抗體 1A3 對於不投予 CDH6-ADC(I)的動物未顯示染色性。再者，由於 NOG 小鼠缺損 B 細胞，未觀察到由源自小鼠之內源性 IgG 所致之背景染色(Ito M, et al. Blood 100(9):3175-3182, 2002)。

【0242】

ii) 確認小鼠抗體 1A3 的專一性

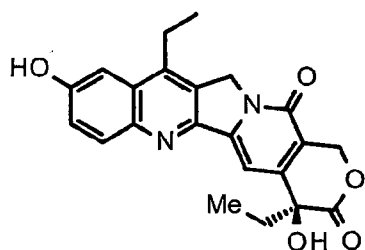
預先將小鼠抗體 1A3 與化合物(2)或者 SN-38 混合之後，使用於免疫染色。

【0243】再者，化合物(2)是下式



所示之化合物。

SN-38 是下式



所示之化合物。

【0244】混合比是基於分子量而設為小鼠抗體 1A3：化合物(2)：SN-38=0.1：0.04：0.03。染色是以與 i) 同樣的方法實施。

【0245】於圖 38 顯示典型的染色圖像。小鼠抗體 1A3 的染色性會因與化合物(2)的混合而消失，但小鼠抗體 1A3 的染色性在與 SN-38 的混合是不會消失。由此，顯示了：小鼠抗體 1A3 會專一性地辨識組織中的化合物(2)。

【0246】

[實施例 10]非臨床試驗的血漿中濃度測定

利用 Gyrolab xP 工作站 (GYROS PROTEIN Technologies)來構建了 GPR20-ADC(I)的小鼠血漿中濃度測定法。使用以標籤套組 (ChromaLink 生物素蛋白標記套組 (ChromaLink Biotin Protein Labeling Kit, Solulink))將小鼠抗體 1A3 進行生物素標籤化者作為捕捉試劑，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 製備為 700nM。校準曲線試料是利用 REXXIP AN(GYROS PROTEIN Technologies)將在小鼠血漿中以 GPR20-ADC(I)的濃度成為 0、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000、10000ng/mL 的方式調製所得者進行了 10 倍稀釋。檢測試劑是使用將小鼠抗-(抗 GPR20 Ab)(於此處，「(抗 GPR20 Ab)」表示包含：由序列識別號 32 中胺基酸編號 20 至 472 記載的胺基酸序列構成的重鏈及由序列識別號 33 中胺基酸編號 21 至 234 記載的胺基酸序列構成的輕鏈而成的抗體)個體遺傳型(idiotype) Ab(71C1)(IBL)利用 DyLight650(註冊商標)標籤套組進行過標籤化者，並利用 REXXIP F(GYROS PROTEIN Technologies)製備為 10nM。將該等製備出之試劑及校準曲線試料置入 96 孔 PCR 盤，組裝於 Gyrolab xP 工作站。使用 Bioaffy200，且 wizard 是利用 200-3W-002-A(PMT1)進行了測定。迴歸分析是使用 Gyrolab 評估器 3.3.9.175 並以 4-參數邏輯模型(權重：效果)進行。將校準曲線顯示於圖 39。

【0247】

[實施例 11]臨床試驗的血清中濃度測定

構建了使用了 ECL 之 HER2-ADC(I)的人類血清中濃度測定法。在將小鼠抗體 1A3 塗覆至高結合盤(High Bind plate)(Meso Scale Diagnostics,LLC:MSD)後，將盤進行了洗淨。將利用阻斷緩衝液(添加 BSA 之含 PS20 的 PBS)來阻斷後製備為 0、200、400、800、1600、3200、6400、12800、20000 及 25600ng/mL 的 HER2-ADC(I)，利用檢測稀釋液進行 1000 倍稀釋而作成了校準曲線試料。進一步，將以 EZ-連接硫代 -NHS-LC- 生物素 (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC Biotin)(Thermo Fisher Scientific Inc.)進行生物素標記的生物素化小鼠抗(抗 HER2)個體遺傳型 Ab[Biotinylated Mouse Anti-(Anti-HER2)idiotype Ab](13C1)(IBL)與磺基標籤鏈霉親和素(sulfo-tag streptavidin)(MSD)進行預孵育而製備出檢測溶液。在添加校準曲線試料後經孵育及洗淨過的盤中添加檢測溶液，使複合物形成。利用純化水將 4×Read Buffer T(MSD)進行 2 倍稀釋，並添加至洗淨後的盤並利用 MSD SECTOR Imager 6000(控制軟體(control software): MSD Discovery Workbench Version 3.0.18)進行了測定。迴歸分析是以 4-參數邏輯模型(權重: 1/效果²)進行。將校準曲線顯示於圖 40。

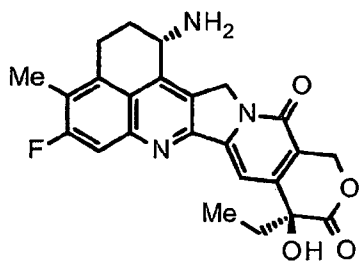
【0248】

[實施例 12]驗證小鼠抗體 1A3 所辨識之化學結構

使用 Gyrolab xP 工作站 (GYROS PROTEIN Technologies)來透過 HER2-ADC(I)的競爭抑制驗證了小鼠抗體 1A3 所辨識之化學結構。就競爭抑制用化合物而言，選定了化合物(1)、化合物(2)、化合物(7)、化合物(8)、化合物(9)、

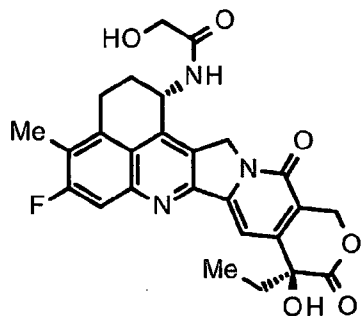
化合物(10)、化合物(11)、癌康定(Topotecan)、及魯比替康(Rubitecan)。

【0249】再者，化合物(1)是下式



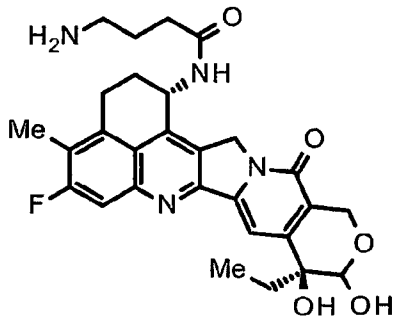
所示之化合物。

化合物(2)是下式



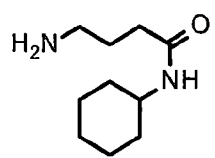
所示之化合物。

化合物(7)是下式



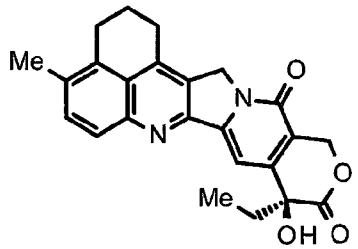
所示之化合物。

化合物(8)是下式



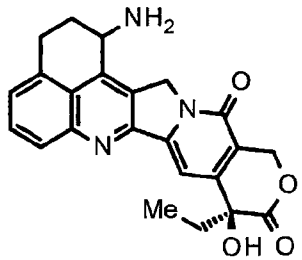
所示之化合物。

化合物(9)是下式



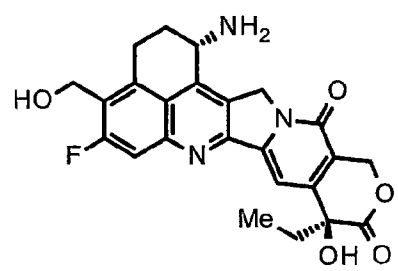
所示之化合物(Sugimori M. et al., J Med. Chem. 1994, 3033-3039)。

化合物(10)是下式



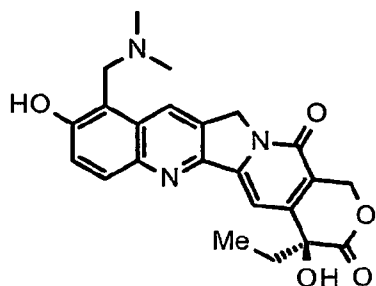
所示之化合物(美國專利第 5834476 號)。

化合物(11)是下式



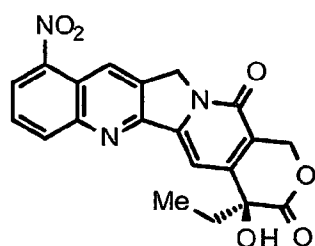
所示之化合物(Atsumi R. et al., Arzneimittel-Forschung 2001, 253-257)。

癌康定是下式



所示之化合物。

魯比替康是下式



所示之化合物。

【0250】使用以標籤套組(ChromaLink Biotin Protein LABELING Kit, Solulink)將小鼠抗體 1A3 進行生物素標籤化者作為捕捉試劑，並利用含有 0.1%PS20 的 PBS 製備為 700nM。將為競爭抑制用化合物之化合物(1)、化合物(2)、化合物(7)、化合物(8)、化合物(9)、化合物(10)、化合物(11)、癌康定、及魯比替康各自溶解於 DMSO 後，利用 10%或是 20%DMSO in Rexasip HN(GYROS PROTEIN Technologies)進行稀釋，在製備為 0、1 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 後，等量添加 700 nM 的小鼠抗體 1A3 溶液並進行混和，使在室溫・暗處下反應 1 小時以上。HER2-ADC(I)是利用 Rexasip HN 製備為 0、0.244、0.977、3.91、15.6、62.5、250、1000ng/mL。檢測試劑是使用將小鼠抗(抗 HER2 Ab)個體遺傳型 Ab[Mouse Anti-(Anti-HER2 Ab)idiotypic Ab](13C1)(IBL) 以

DyLight650(註冊商標)標籤套組進行過標籤化者，並利用 Rexasip F(GYROS PROTEIN Technologies)製備為 10nM。將上述溶液組裝至 Gyrolab xP 工作站，並使用 Gyrolab Bioaffy 200 以 200-3W-002-A(PMT5)進行了測定。迴歸分析是使用 Gyrolab 評估器 3.4.0.24 以 4-參數邏輯模型(權重：效果)進行。依每個競爭抑制用化合物的濃度製作 HER2-ADC(I)的校準曲線，算出將 HER2-ADC(I)濃度在 250ng/mL 時的效果與不添加化合物(濃度 0ng/mL)相比較所得之抑制率(%)。

【0251】將抑制率圖表顯示於圖 41。化合物(1)、化合物(2)、化合物(7)、及化合物(9)顯示了強的競爭抑制。另一方面，化合物(8)、化合物(10)、化合物(11)、癌康定、及魯比替康未顯示競爭抑制。由此結果顯示了：小鼠抗體 1A3 會專一性地辨識由化合物(1)的基本骨架構成且保持 4 位上之甲基的化學結構。

【0252】

[序列表之非關鍵詞文字(Sequence Listing Free Text)]

序列識別號 1：CDRH1

序列識別號 2：CDRH2

序列識別號 3：CDRH3

序列識別號 4：CDRL1

序列識別號 5：CDRL2

序列識別號 6：CDRL3

序列識別號 7：CDRH1

序列識別號 8：CDRH2

序列識別號 9：CDRH1

序列識別號 10 : CDRH2

序列識別號 11 : CDRH1

序列識別號 12 : CDRH2

序列識別號 13 : CDRH3

序列識別號 14 : CDRL1

序列識別號 15 : 小鼠抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列

序列識別號 16 : 小鼠抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 17 : 編碼小鼠抗體 1A3 重鏈可變區的胺基酸序列的核苷酸序列

序列識別號 18 : 編碼小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區的胺基酸序列的核苷酸序列

序列識別號 19 : 兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列

序列識別號 20 : 兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 21 : 抗 HER2 抗體重鏈的胺基酸序列

序列識別號 22 : 抗 HER2 抗體輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 23 : 抗 HER3 抗體重鏈的胺基酸序列

序列識別號 24 : 抗 HER3 抗體輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 25 : 抗 TROP2 抗體重鏈的胺基酸序列

序列識別號 26 : 抗 TROP2 抗體輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 27 : 抗 B7-H3 抗體重鏈的胺基酸序列

序列識別號 28 : 抗 B7-H3 抗體輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 29 : 編碼人類輕鏈訊息序列及人類 κ 鏈恒定區的胺基酸序列的核苷酸序列

序列識別號 30 : 編碼兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列的核苷酸序列

序列識別號 31：編碼兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列
的核苷酸序列

序列識別號 32：抗 GPR20 抗體重鏈的胺基酸序列

序列識別號 33：抗 GPR20 抗體輕鏈的胺基酸序列

序列識別號 34：抗 CDH6 抗體重鏈的胺基酸序列

序列識別號 35：抗 CDH6 抗體輕鏈的胺基酸序列

【符號說明】

無。

序列表

<110> 第一三共股份有限公司 (DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED)

<120> 辨識抗體-藥物結合物之藥物部位的蛋白質

<130> FP1911

<140> TW 108126606

<141> 2019-07-26

<150> JP2018-140912

<151> 2018-07-27

<160> 35

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Val
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile Tyr
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ser Ala Val Val

1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Val Thr
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Ser Ser Gly Ser Ser Ala
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

Asp Tyr Gly Met Val
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile
1 5

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Ala Arg Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Gln Asp Val Gly Ser Ala
1 5

<210> 15
<211> 477
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

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 Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Gly Met Val Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe
115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly Asp Thr Thr
145 150 155 160

Gly Ser Ser Val Thr Ser Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser
210 215 220

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro
225 230 235 240

Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys
245 250 255

His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
260 265 270

Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys
275 280 285

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
290 295 300

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
305 310 315 320

Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu
325 330 335

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
340 345 350

Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
355 360 365

Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro
370 375 380

Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val
385 390 395 400

Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His
405 410 415

Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
420 425 430

Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu
435 440 445

Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn
450 455 460

Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 16
<211> 234
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

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 Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Gly Ser Ala Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro
50 55 60

Asp Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly
85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
100 105 110

Ser Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115120125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
130135140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145150155160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
165170175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180185190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195200205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
210215220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225230

<210> 17
<211> 504
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 17

atggactcca ggctcaattt agttttcctt gtccttattt taaaagggtgt ccagtgtgag60

gtgaagctgg tggagtcctg gggaggctta gtgcagcctg gaggggtccg gaaactctcc120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtgac tacggaatgg tgtggattcg acaggctcca180

gggagggggc tggagtgggt tgcatacatt agtagtggca gtagtgccat ctactatgca240

gacacagtga aaggccgatt caccatctcc agagacaatc ccaagaacac cctgttcctg300

caaatgaaca gtctaaggtc tgaggactcg gccatgtatt totgtgcaag gccccccgt360

tatgatgttt actctgcctg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct420

gcagccaaaa caacaccccc atcagtctat ccactggccc ctgggtgtgg agatacaact480

ggttcctccg tgactctggg atgc504

<210> 18
<211> 459
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 18
atggagacac attctcaggt ctttgtatac atgttgctgt ggttgtctga tgttgaagga 60
gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat ctgtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt agtgotgtag tctggtatca acagaaacct 180
gggcactctc ctgacctact gatttactgg gcatccacco ggcacactgg agtccctgat 240
cgottcacag gcagtggatc tgggacagat ttcacgotca ccattggcaa tgtgcagtct 300
gaagacttgg cagattatit ctgtcagcaa tatagcagct atcctgtcac gttcggaggg 360
gggaccaagc tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtg 459

<210> 19
<211> 464
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 19

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

Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Pro Arg Tyr Asp Val Tyr Ser Ala Trp Phe
115 120 125

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gln Pro
130 135 140

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

Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg
180 185 190

Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala
210 215 220

His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr
225 230 235 240

Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
245 250 255

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro
275 280 285

Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala
290 295 300

Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Thr Leu Pro Ile Thr His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe
325 330 335

Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
340 345 350

Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met
355 360 365

Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys
370 375 380

Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys
385 390 395 400

Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser
420 425 430

Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 20
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成胜肽

<400> 20

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 Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp

354045

Val Gly Ser Ala Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro
505560

Asp Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65707580

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly
859095

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
100105110

Ser Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115120125

Asp Pro Val Ala Pro Ser Val Leu Leu Phe Pro Pro Ser Lys Glu Glu
130135140

Leu Thr Thr Gly Thr Ala Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Phe Tyr
145150155160

Pro Ser Asp Ile Thr Val Thr Trp Lys Val Asp Gly Thr Thr Gln Gln
165170175

Ser Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Ser Pro Glu Asp Asn Thr
180185190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Ser Leu Thr Ser Ala Gln Tyr Asn Ser
195200205

His Ser Val Tyr Thr Cys Glu Val Val Gln Gly Ser Ala Ser Pro Ile
210215220

Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
225230

<210> 21
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 HER2 抗體的重鏈

<400> 21

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

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

<210> 22
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 HER2 抗體的輕鏈

<400> 22

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

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> 23
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 HER3 抗體的重鏈

<400> 23

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

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

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> 24
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 HER3 抗體的輕鏈

<400> 24

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			
			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>	25
<211>	470
<212>	PRT
<213>	人工序列

〈220〉
〈223〉 抗 TROP2 抗體的重鏈

<400> 25

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln 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 Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp
115 120 125

Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 26
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗 TROP2 抗體的輕鏈

<400> 26

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 Asp
 35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr
 100 105 110

Ile Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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

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> 27
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 B7-H3 抗體的重鏈

<400> 27

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr 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

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

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> 28
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 B7-H3 抗體的輕鏈

<400> 28

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Arg
35 40 45

Leu Ile Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg

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

<210> 29
<211> 449
<212> DNA
<213> 智人

<400> 29
gcctccggac tctagagcca ccatggtgct gcagaccag gtgttcattt cctgtctgct 60
gtggatctcc ggcgcgtacg gcgatatcgt gatgattaaa cgtacgggtg cgcggccctc 120

ogtgttcato	ttccccccct	ccgacgagca	gctgaagtcc	ggcaccgcct	ccgtggtgtg	180
cctgctgaat	aactttctacc	ccagagaggc	caagggtgcag	tggaagggtg	acaacgccct	240
gcagtccggg	aactcccagg	agagcgtgac	cgagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	300
cctgagcagc	accctgacct	tgagcaaagc	cgactacgag	aagcacaagg	tgtacgcctg	360
cgagggtgacc	caccagggcc	tgagctcccc	cgtcaccaag	agcttcaaca	ggggggagtg	420
ttagggggccc	gtttaaacgg	gggaggcta				449

<210> 30
 <211> 1442
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

<400> 30	
ccagcctccg	gactctagag
ccaccatgaa	gcacctgtgg
ttctttctgc	tgctggtggc
60	
cgctcctaga	tggtgtgtgt
ctgaagttaa	gctggtggaa
tctggcggcg	gactggttca
120	
acctggcggc	tctagaaagc
tgagctgtgc	cgccagcggc
ttcaccttta	gcgattacgg
180	
catggtctgg	atccggcagg
ctcctggaag	aggccttgag
tggttcgcct	acatcagctc
240	
tggaagcagc	gccatctact
acgccgacac	cgtgaagggc
agattcacca	tcagccggga
300	
caaccccaag	aataccctgt
tcctgcagat	gaacagcctg
cggagcggag	actccgccat
360	
gtacttttgt	gcccggcctc
ctagatacga	cgtgtacago
gcttggtttg	cctactgggg
420	
ccagggcaca	ctggttacag
tttctgccgg	acagcccaag
gctccctccg	ttttccact
480	
ggctccctgc	tgtggcgata
cccctagctc	tacagtgaac
ctgggctgtc	tggtcaaggg
540	
ctatctgoot	gagcctgtga
cgtgacctg	gaatagoggc
accctgacca	acggcgtgcg
600	
gacatttctc	agcgtcagac
agagcagcgg	cctgtactct
ctgagcagcg	tggtgtctgt
660	
gaccagcagc	tctcagccag
tgacctgcaa	tgtggcccat
cctgccacca	acaccaaggt
720	
ggacaaaacc	gtggctccca
gcacctgtag	caagcccaca
tgtcctccac	ctgagctgct
780	
cggaggcccc	agcgtgttca
tctttccacc	taagcctaag
gacaccctga	tgatcagcag
840	
aaccctgaa	gtgacctgtg
tggtggtgga	cgtgtcccag
gatgatcccg	aggtgcagtt
900	
cacctgggtac	atcaacaacg
agcaagtgcg	gaccgccaga
cctcctctga	gagagcagca
960	
gttcaacagc	accatcagag
tggtgtccac	actgcccato
acacaccagg	attggctgcg
1020	

gggcaaagaa ttcaagtgca aggtgcacaa caaggccctg cctgctocta tcgagaaaac	1080
catcagcaag gccagaggcc agccactgga acccaaggtg tacacaatgg gccctccaag	1140
agaggaactg agcagcagat ccgtgtctct gacctgcatg atcaacggct tctaccccag	1200
cgacatcagc gtggaatggg agaagaatgg caaggccgag gacaactaca agacaacccc	1260
tgccgtgctg gatagcgacg gcagctactt cctgtacaac aagctgtccg tgccctaccag	1320
cgaatggcag cgggggagatg tgtttacctg cagcgtgatg cagcaggccc tgcacaacca	1380
ctacaccag aagtccatca gcagggtcccc aggcaaatga gtttaaacgg gggaggctaa	1440
ct	1442

<210> 31
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成核苷酸

<400> 31	
ccagcctccg gactctagag ccaccatggt tctgcagaca caggtgttca tcagcctgct	60
gctgtggatc tctggcgctt acggcgatat cgtgatgacc cagagccaca agttcatgag	120
caccagcgtg ggcgacagag tgtccatcac ctgtaaagcc agccaggatg tgggctctgc	180
cgctcgtgtg tatcagcaga agccaggcca ctctcctgac ctgctgatct actgggccag	240
caccagacat accggcgtgc ccgatagatt cacaggctct ggcagcggca ccgacttcac	300
actgacaatc ggcaacgtgc agagcgagga cctggccgat tacttctgcc agcagtacag	360
cagctacccc gtgacatttg gcggaggcac caagctggaa atcaagaggg atcccgtggc	420
tccctccgtg ctgctgtttc ctccaagcaa agaggaactg accaccggca ccgccaccat	480
tgtgtgtgtg gccacaagt tctaccccag cgacatcacc gtgacctgga aggtggacgg	540
cacaacacag cagagcggca tcgagaacag caagaccctt cagagccccg aggacaacac	600
atacagcctg agcagcacco tgagcctgac aagcggccag tacaatagcc acagcgtgta	660
cacatgcgag gtggtgcagg gaagcgctc tcctatcgtg cagtccttca acagaggcga	720
ctgctgagtt taaacggggg aggctaact	749

<210> 32
 <211> 472

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 GPR20 抗體的重鏈

<400> 32

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
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

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> 33
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 GPR20 抗體的輕鏈

<400> 33

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

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> 34
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 CDH6 抗體的重鏈

<400> 34

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

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

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> 35
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗 CDH6 抗體的輕鏈

<400> 35

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

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

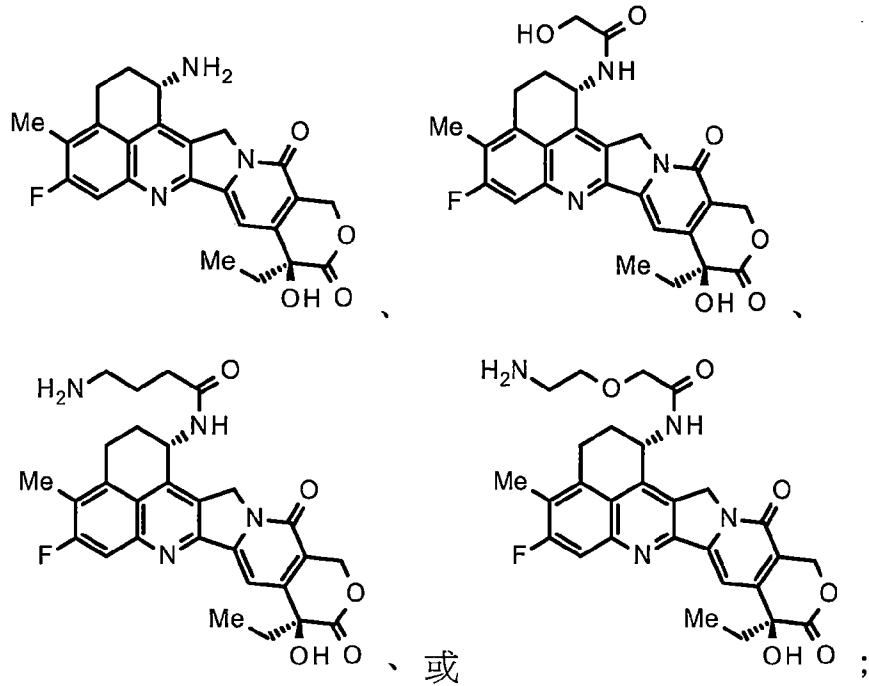
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

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

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種蛋白質，其辨識藥物本身或抗體-藥物結合物的藥物部位，其中藥物透過連接子與抗體結合，其中該藥物為下式所示：



其中該蛋白質為

a) 包含下述重鏈及輕鏈之抗體：該重鏈包含由序列識別號 1 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 2 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3；

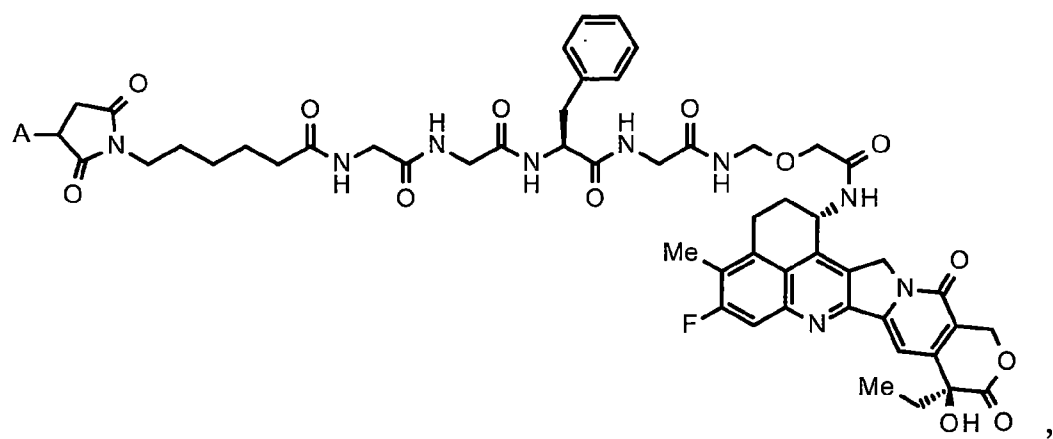
b) 包含下述重鏈及輕鏈之抗體：該重鏈包含由序列識別號 7 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 8 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號

3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3；

c)包含下述重鏈及輕鏈之抗體：該重鏈包含由序列識別號 9 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 10 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 3 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 4 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由序列識別號 5 所示之胺基酸序列構成之 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3；或者，

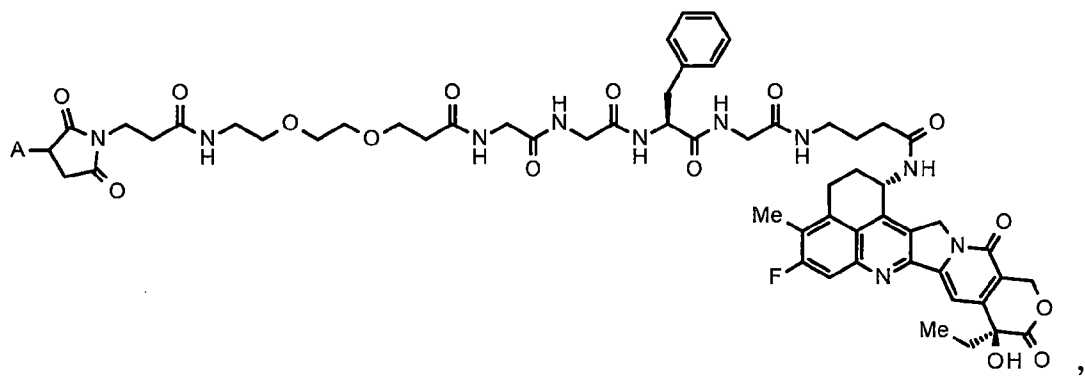
d)包含下述重鏈及輕鏈之抗體：該重鏈包含由序列識別號 11 所示之胺基酸序列構成之 CDRH1、由序列識別號 12 所示之胺基酸序列構成之 CDRH2、及由序列識別號 13 所示之胺基酸序列構成之 CDRH3，該輕鏈包含由序列識別號 14 所示之胺基酸序列構成之 CDRL1、由 WAS 所示之三肽構成的 CDRL2、及由序列識別號 6 所示之胺基酸序列構成之 CDRL3。

【第 2 項】如請求項 1 之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的藥物-連接子是下式所示：



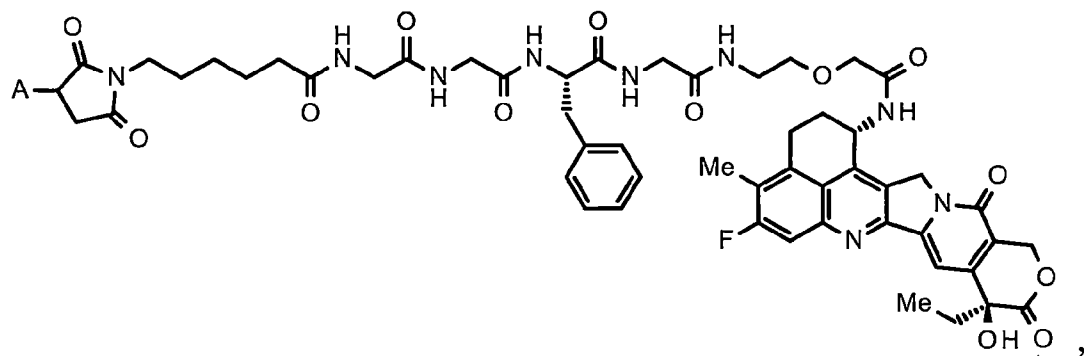
其中，A 表示與抗體的連結位置，且該藥物-連接子是透過硫醚鍵與抗體結合。

【第 3 項】如請求項 1 之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的藥物-連接子是下式所示：



其中，A 表示與抗體的連結位置，且該藥物-連接子是透過硫醚鍵與抗體結合。

【第 4 項】如請求項 1 之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的藥物-連接子是下式所示：



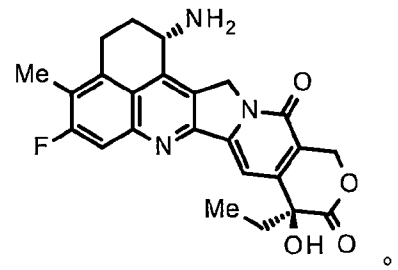
其中，A 表示與抗體的連結位置，且該藥物-連接子是透過硫醚鍵與抗體結合。

【第 5 項】如請求項 1 之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的每一抗體的藥物-連接子的平均結合數為 2 至 8 的範圍。

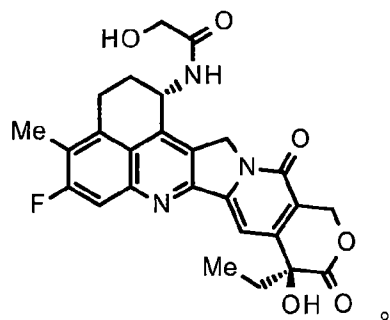
【第 6 項】如請求項 1 之蛋白質，其中在抗體-藥物結合物中的抗體為抗 HER2 抗體、抗 HER3 抗體、抗 TROP2 抗體、抗 B7-H3 抗體、抗 GPR20 抗體、或抗 CDH6 抗體。

【第 7 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該蛋白質對該抗體-藥物結合物的辨識性不因在抗體-藥物結合物中的每一抗體的藥物-連接子的平均結合數的任何差異而不同。

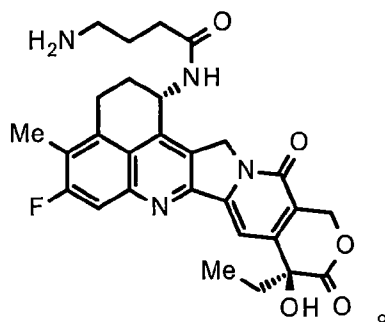
【第 8 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該藥物為下式所示：



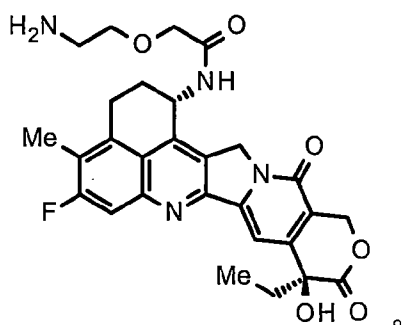
【第 9 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該藥物為下式所示：



【第 10 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該藥物為下式所示：



【第 11 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該藥物為下式所示：



【第 12 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該蛋白質係包含下述重鏈及輕鏈而成的抗體；該重鏈包含由由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 141 構成的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 127 構成的胺基酸序列構成的輕鏈可變區。

【第 13 項】如請求項 12 之蛋白質，其中該蛋白質為小鼠抗體。

【第 14 項】如請求項 12 之蛋白質，其中該蛋白質係包含下述重鏈及輕鏈而成的抗體；該重鏈包含由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 477 構成的胺基酸序列，該輕鏈包含由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 234 構成的胺基酸序列。

【第 15 項】如請求項 12 之蛋白質，其中該蛋白質為嵌合抗體。

【第 16 項】如請求項 12 之蛋白質，其中該蛋白質為兔嵌合化抗體。

【第 17 項】如請求項 12 之蛋白質，其中該蛋白質係包含下述重鏈及輕鏈而成的抗體；該重鏈包含由序列識別號 19 中胺基酸殘基 20 至 464 構成的胺基酸序列，該輕鏈包含由序列識別號 20 中胺基酸殘基 21 至 233 構成的胺基酸序列。

【第 18 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該蛋白質係抗體的重鏈羧基末端的離胺酸殘基缺失的抗體，且其中該抗體包含：

包含由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 477 構成的胺基酸序列之重鏈、及包含由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 234 構成的胺基酸序列之輕鏈；或者

包含由序列識別號 19 中胺基酸殘基 20 至 464 構成的胺基酸序列之重鏈、及包含由序列識別號 20 中胺基酸殘基 21 至 233 構成的胺基酸序列之輕鏈。

【第 19 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該蛋白質係抗體，其由與包含如下重鏈及輕鏈之抗體的胺基酸序列具有至少 95% 的同一性之胺基酸序列構成：

該重鏈包含由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 477 構成的胺基酸序列、及該輕鏈包含由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 234 構成的胺基酸序列；或者

該重鏈包含由序列識別號 19 中胺基酸殘基 20 至 464 構成的胺基酸序列、及該輕鏈包含由序列識別號 20 中胺基酸殘基 21 至 233 構成的胺基酸序列。

【第 20 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該蛋白質係抗體，其由與包含如下重鏈及輕鏈之抗體的胺基酸序列具有至少 99% 的同一性之胺基酸序列構成：

該重鏈包含由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 477 構成的胺基酸序列、及該輕鏈包含由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 234 構成的胺基酸序列；或者

該重鏈包含由序列識別號 19 中胺基酸殘基 20 至 464 構成的胺基酸序列、及該輕鏈包含由序列識別號 20 中胺基酸殘基 21 至 233 構成的胺基酸序列。

【第 21 項】如請求項 1 之蛋白質，其中該蛋白質係抗體，其就對藥物的辨識性而言，與包含如下重鏈及輕鏈之抗體競爭：

該重鏈包含由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 477 構成的胺基酸序列、及該輕鏈包含由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 234 構成的胺基酸序列；或者

該重鏈包含由序列識別號 19 中胺基酸殘基 20 至 464 構成的胺基酸序列、及該輕鏈包含由序列識別號 20 中胺基酸殘基 21 至 233 構成的胺基酸序列。

【第 22 項】如請求項 1 至 11 中任一項之蛋白質，其中該蛋白質係 a) 抗體至 d) 抗體中任一者的抗原結合片段。

【第 23 項】如請求項 22 之蛋白質，其中抗體的抗原結合片段是 Fab、F(ab')₂、Fab' 或者 Fv。

【第 24 項】一種包含如請求項 1 至 23 中任一項之蛋白質之組成物。

【第 25 項】一種套組，其包含：如請求項 1 至 23 中任一項之蛋白質，或者包含如請求項 1 至 23 中任一項之蛋白質之組成物。

【第 26 項】如請求項 25 之套組，其係用以定量在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物釋放出的藥物的血漿中濃度。

【第 27 項】如請求項 25 之套組，其係用以確認在經投予抗體-藥物結合物的哺乳動物中，抗體-藥物結合物及/或從該抗體-藥物結合物釋放出的藥物的組織分布。

【第 28 項】一種抗體，其係包含下述重鏈及輕鏈而成，該重鏈包含由由序列識別號 15 中胺基酸殘基 20 至 141 構成的胺基酸序列構成的重鏈可變區，該輕鏈包含由由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 127 構成的胺基酸序列構成的輕鏈可變區。

【第 29 項】如請求項 28 之抗體，其係包含下述重鏈及輕鏈而成，該重鏈是由由序列識別號 15 中胺基酸殘基

20 至 477 構成的胺基酸序列構成，該輕鏈是由由序列識別號 16 中胺基酸殘基 21 至 234 構成的胺基酸序列構成。

【第 30 項】如請求項 28 之抗體，其係包含下述重鏈及輕鏈而成，該重鏈是由序列識別號 19 中胺基酸殘基 20 至 464 構成的胺基酸序列構成，該輕鏈是由由序列識別號 20 中胺基酸殘基 21 至 233 構成的胺基酸序列構成。

【發明圖式】

序列識別號 15：小鼠抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVKLVESGGGLVQPGGSRK
 LSCAASGFTFSDYGMVWIRQAPGRGLEWVAYISSGSSA
 IYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMNSLRSEDSAMYF
 CARPPRYDVYSAWFAYWGQGTLVTVSAAKTTPPSVYPL
 APGCGDTTGSSVTSGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSS
 VHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHP
 ASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEG
 GPSVFIFPPNIKDVLMLISLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVQ
 ISWVFNNEVHTAQTTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHGD
 WMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYT
 LPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTE
 ENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLNMKTSKWEKTDSEFSCN
 VRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

訊息序列（1－19）、重鏈可變區（20－141）、重鏈恒定區（142－477）

【圖1】

序列識別號 16：小鼠抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列

MVLQTQVFISLLLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVS
 ITCKASQDVGSVVWYQQKPGHSPDLLIYWASTRHTGVPD
 RFTGSGSGTDFTLTIGNVQSEDLADYFCQQYSSYPVTFGG
 GTKLEIKRADAAPTVSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY
 PKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLT
 LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

訊息序列（1－20）、輕鏈可變區（21－127）、輕鏈恒定區（128－234）

【圖2】

序列識別號 17：編碼小鼠抗體 1A3 重鏈可變區的胺基酸序列的核苷酸序列

```

a t g g a c t c c a g g c t c a a t t t a g t t t t c c t t g t c c t t a t
t t t a a a a g g t g t c c a g t g t G A G G T G A A G C T G G T G G A G T
C T G G G G G A G G C T T A G T G C A G C C T G G A G G G T C C C G G A A A
C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T T C A C T T T C A G T G A C T A
C G G A A T G G T G T G G A T T C G A C A G G C T C C A G G G A G G G G G C
T G G A G T G G G T T G C A T A C A T T A G T A G T G G C A G T A G T G C C
A T C T A C T A T G C A G A C A C A G T G A A A G G C C G A T T C A C C A T
C T C C A G A G A C A A T C C C A A G A A C A C C C T G T T C C T G C A A A
T G A A C A G T C T A A G G T C T G A G G A C T C G G C C A T G T A T T T C
T G T G C A A G G C C C C C C G T T A T G A T G T T T A C T C T G C C T G
G T T T G C T T A C T G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T
C T G C A g c c a a a a c a a c a c c c c c a t c a g t c t a t c c a c t g
g c c c c t g g g t g t g g a g a t a c a a c t g g t t c c t c c g t g a c
t c t g g g a t g c

```

訊息序列（1—57）、重鏈可變區（58—423）

【圖 3】

序列識別號 18：編碼小鼠抗體 1A3 輕鏈可變區的胺基酸序列的核苷酸序列

```

a t g g a g a c a c a t t c t c a g g t c t t t g t a t a c a t g t t g c t
g t g g t t g t c t g a t g t t g a a g g a G A C A T T G T G A T G A C C C
A G T C T C A C A A A T T C A T G T C C A C A T C T G T A G G A G A C A G G
G T C A G C A T C A C C T G C A A G G C C A G T C A G G A T G T G G G T A G
T G C T G T A G T C T G G T A T C A A C A G A A A C C T G G G C A C T C T C
C T G A C C T A C T G A T T T A C T G G G C A T C C A C C C G G C A C A C T
G G A G T C C C T G A T C G C T T C A C A G G C A G T G G A T C T G G G A C
A G A T T T C A C G C T C A C C A T T G G C A A T G T G C A G T C T G A A G
A C T T G G C A G A T T A T T T C T G T C A G C A A T A T A G C A G C T A T
C C T G T C A C G T T C G G A G G G G G G A C C A A G C T G G A A A T A A A
A c g g g c t g a t g c t g c a c c a a c t g t a t c c a t c t t c c c a c
c a t c c a g t g a g c a g t t a a c a t c t g g a g g t g c c t c a g t c
g t g

```

訊息序列（1—60）、輕鏈可變區（61—381）

【圖 4】

序列識別號 19：兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列

MKHLWFFLLVAAPRWVLSEVKLVESGGGLVQPGGSRKLS
CAASGFTFSDYGMVWIRQAPGRGLEWVAYISSGSSAIYYA
DTVKGRTISRDNPKNTLFLQMNSLRSEDSAMYFCARPPR
YDVYSAWFAYWGQGTLVTVSAGQPKAPSVFPLAPCCGDT
SSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQS
SGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPST
CSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVV
STLPITHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQP
LEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEK
NGKAEDNYKTTPAVLDSGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVF
TCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

訊息序列 (1-19)、重鏈可變區 (20-141)、重鏈恒定區 (142-464)

【圖 5】

序列識別號 20：兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVS
ITCKASQDVGSAAVVWYQKPGHSPDLLIYWASTRHTGVPD
RFTGSGSGTDFTLTIGNVQSEDLADYFCQQYSSYPVTFGG
GTKLEIKRDPVAPSVLLFPPSKEELTTGTATIVCVANKFY
PSDITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQSPEDNTYSLSSSTLS
L TSAQYN SHSVYTCEVVQGSASP IVQSFNRGDC

訊息序列 (1-20)、輕鏈可變區 (21-127)、輕鏈恒定區 (128-233)

【圖 6】

序列識別號 21：抗 HER2 抗體重鏈的胺基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【圖 7】

序列識別號 22：抗 HER2 抗體輕鏈的胺基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖 8】

序列識別號 23：抗 HER3 抗體重鏈的胺基酸序列

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR
 QPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKN
 QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【圖 9】

序列識別號 24：抗 HER3 抗體輕鏈的胺基酸序列

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNY
 LAWYQQNPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGKVEIKR
 TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【圖 10】

序列識別號 25：抗 TROP2 抗體重鏈的胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVK
 VSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQG LEWMGWINTHSGV
 PKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYY
 CARSGFGSSYWYFDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
 NHYTQKSLSLSPGK

訊息序列（1－19）、可變區（20－140）、恒定區（141－470）

【圖 11】

序列識別號 26：抗 TROP2 抗體輕鏈的胺基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
 VTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYT
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFAVYYCQQHYIT
 PLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC

訊息序列（1－20）、可變區（21－129）、恒定區（130－234）

【圖 12】

序列識別號 27：抗 B7-H3 抗體重鏈的胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVK
VSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDD
VKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARWGYYGSPLYYFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

訊息序列（1－19）、可變區（20－141）、恒定區（142－471）

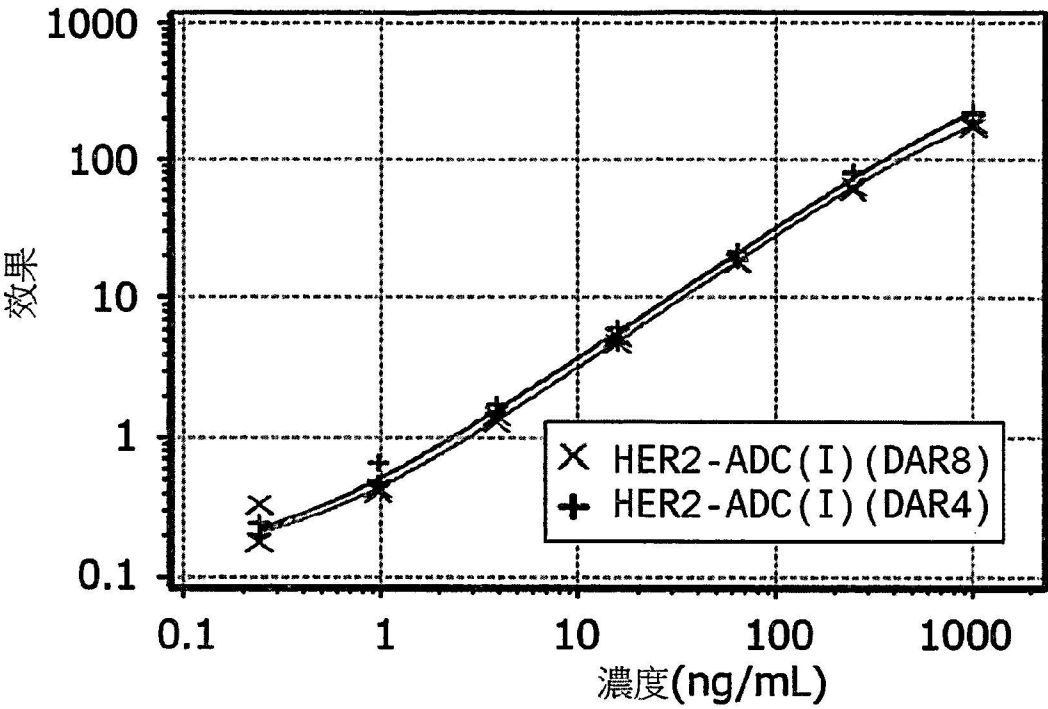
【圖 13】

序列識別號 28：抗 B7-H3 抗體輕鏈的胺基酸序列

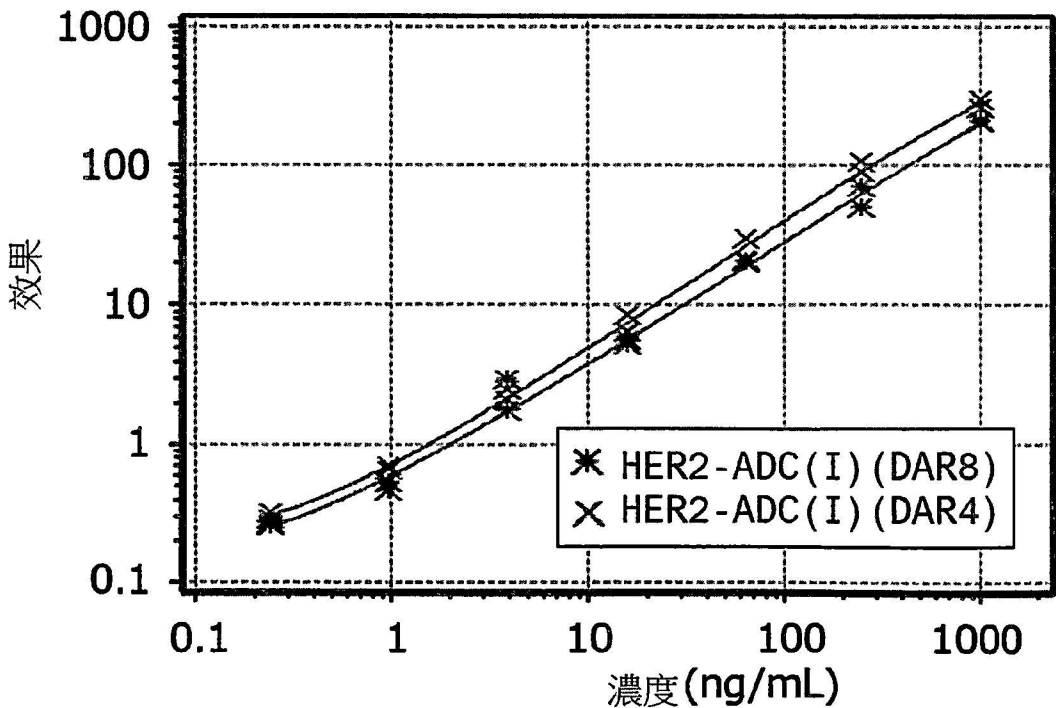
MVLQTQVFISLLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASSRLIYMHYQQKPGQAPRPLIYATSNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWNSNP
PTFGQGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

訊息序列（1－20）、可變區（21－128）、恒定區（129－233）

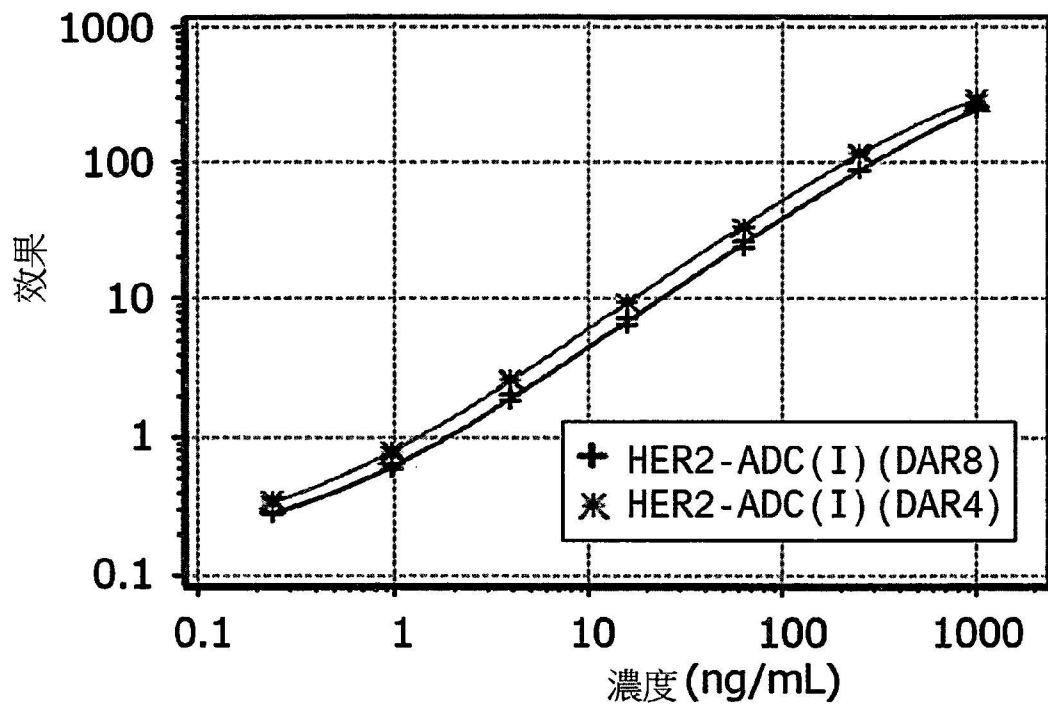
【圖 14】



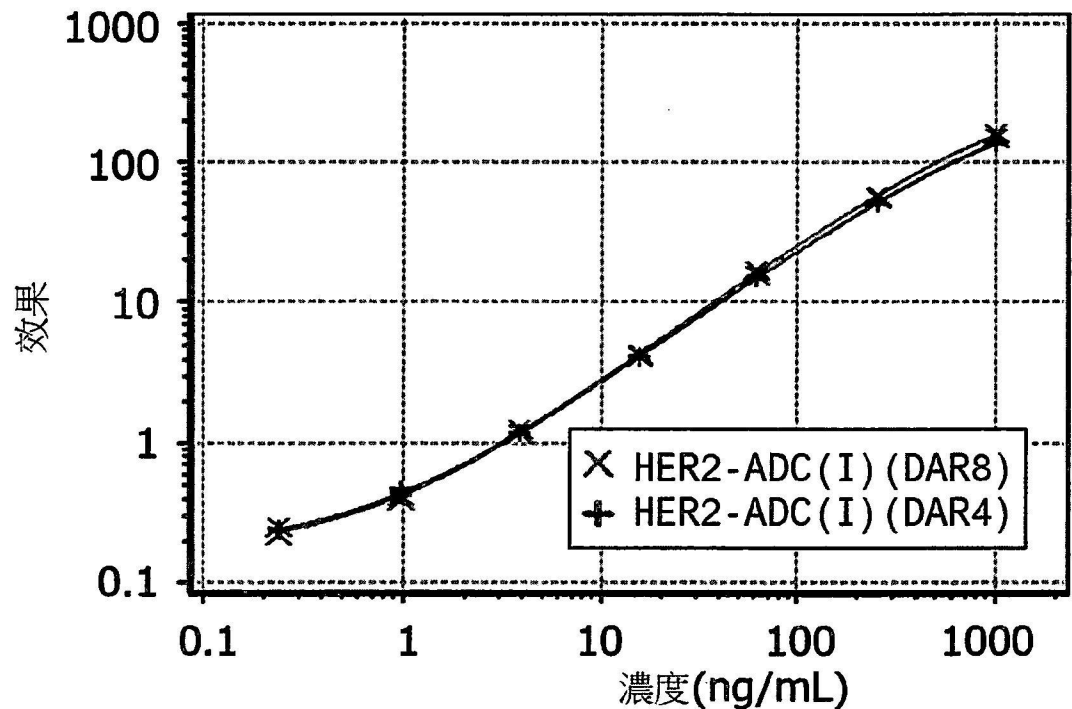
【圖 15】



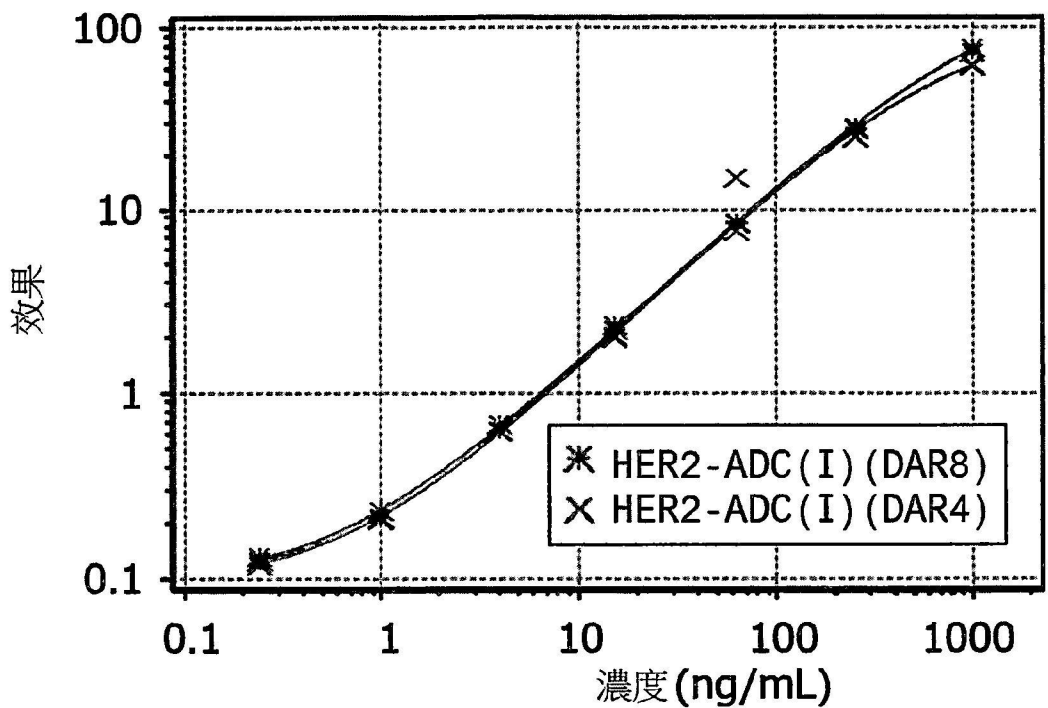
【圖 16】



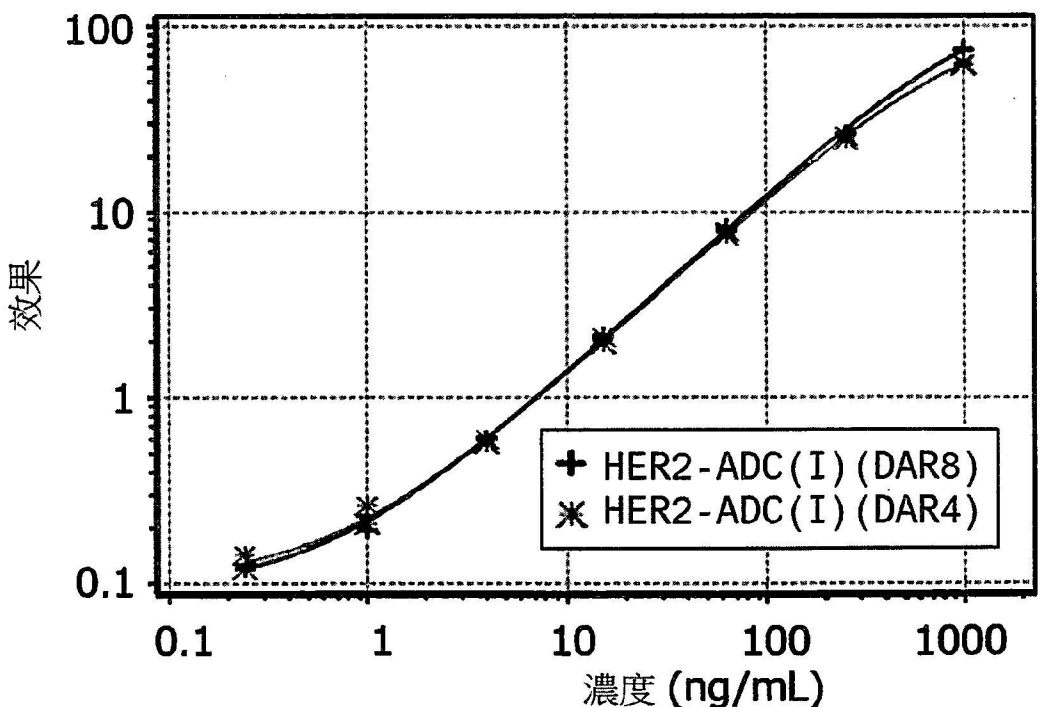
【圖 17】



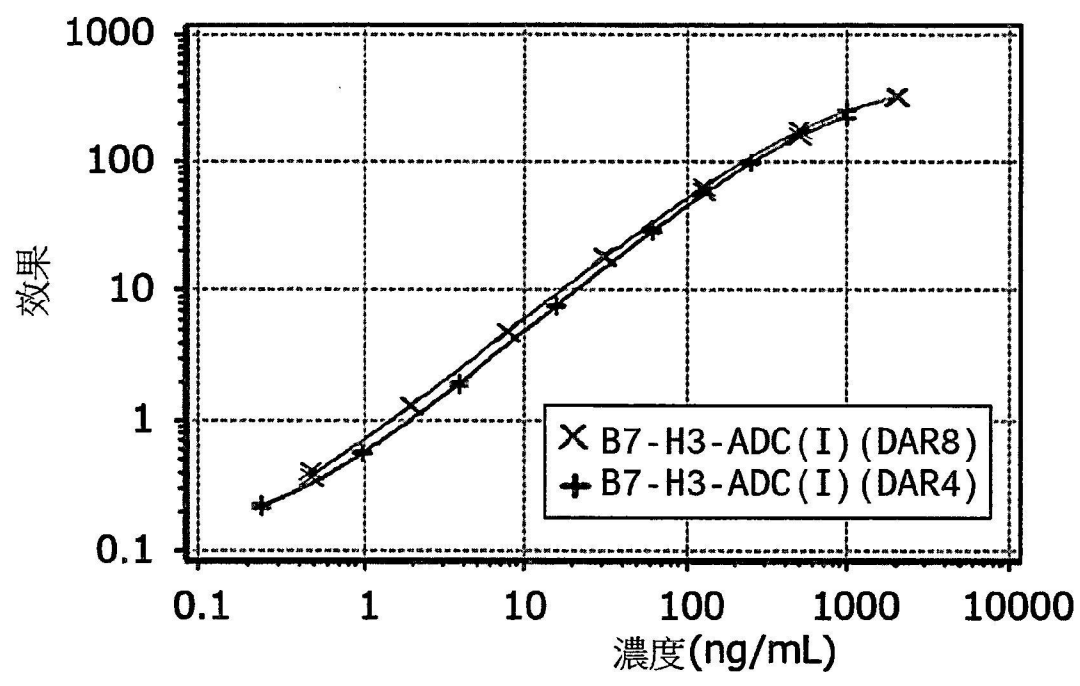
【圖 18】



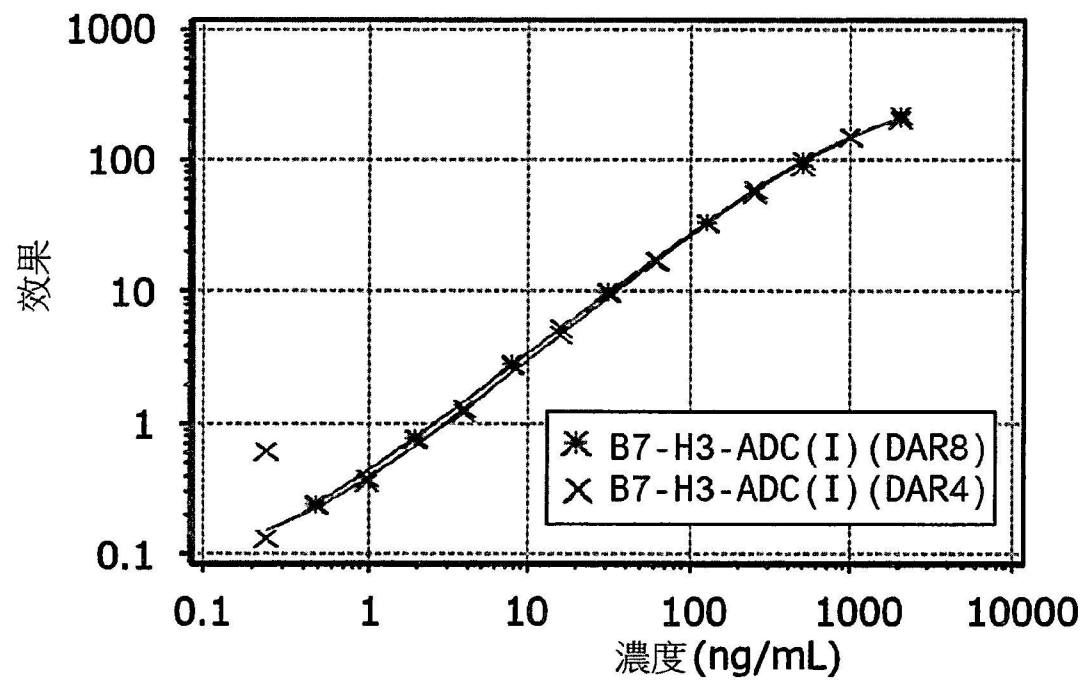
【圖 19】



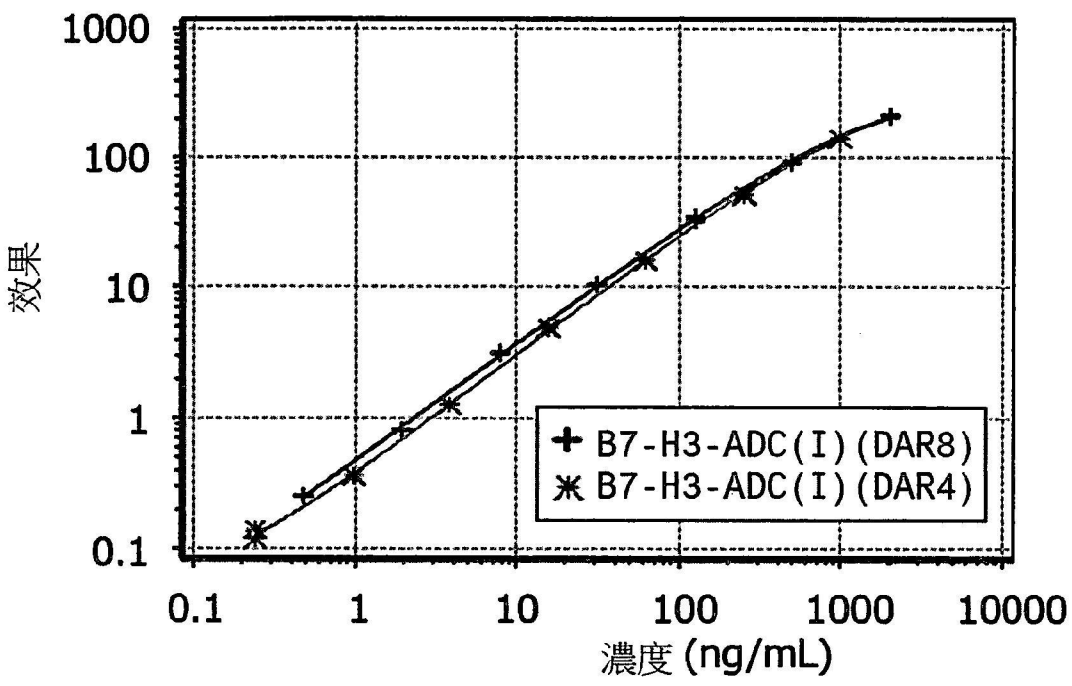
【圖 20】



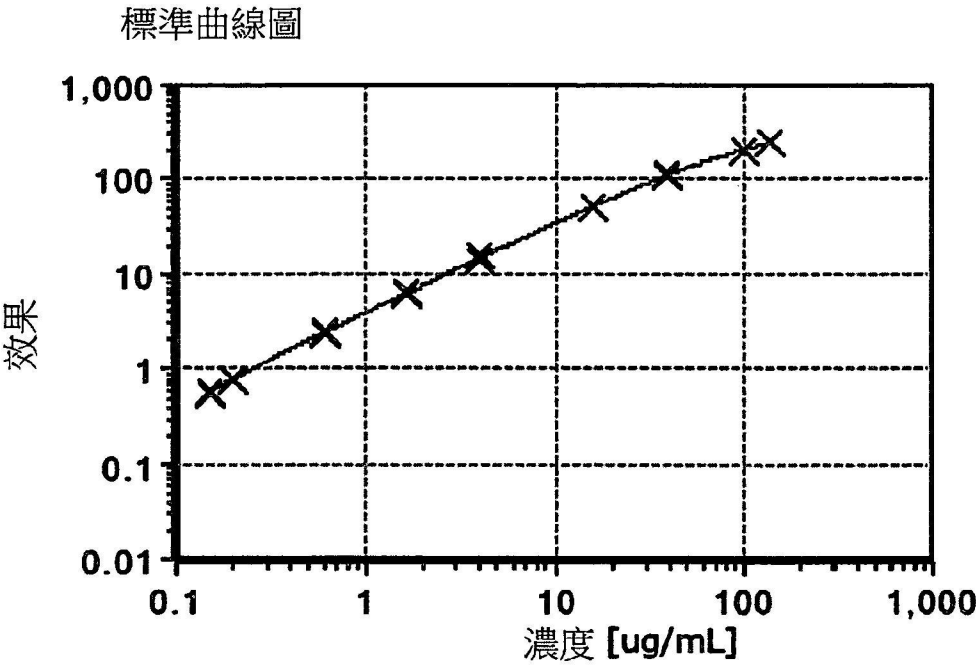
【圖 21】



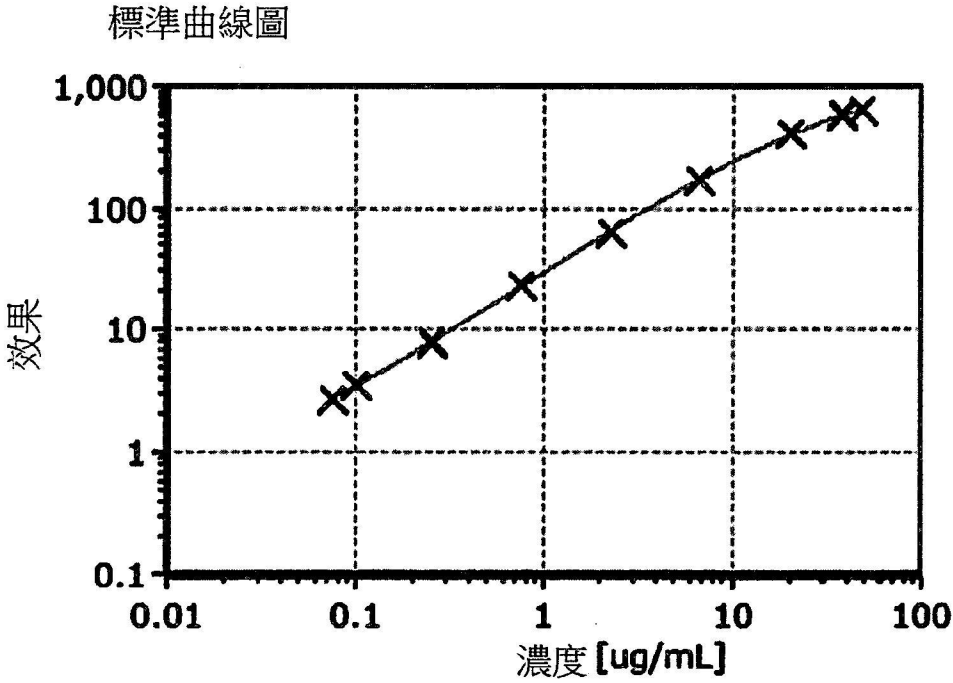
【圖 22】



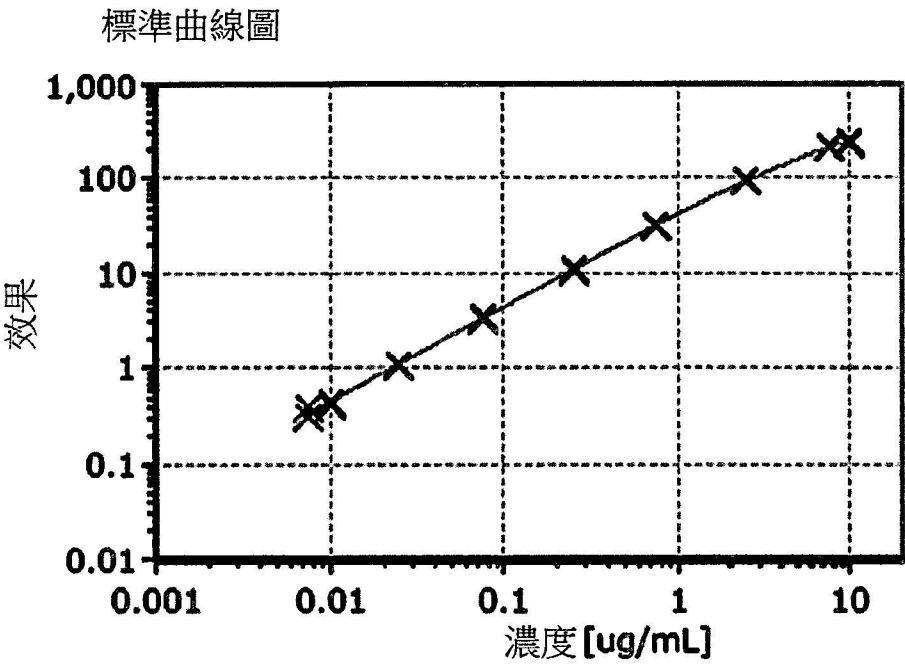
【圖23】



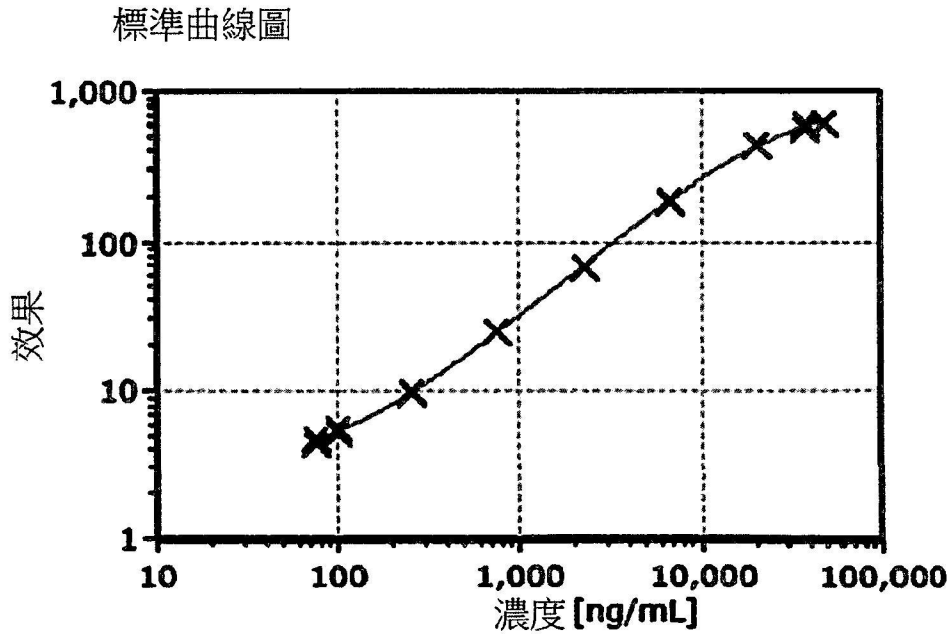
【圖 24】



【圖 25】



【圖 26】



【圖 27】

序列識別號 29：編碼人類輕鏈訊息序列及人類 κ 鏈恒定區的胺基酸序列的核苷酸序列

```
g c c t c c g g a c t c t a g a g c c a c c A T G G T G C T G C A G A C C C
A G G T G T T C A T C T C C C T G C T G C T G T G G A T C T C C G G C G C G
T A C G G C G A T A T C G T G A T G A T T A A A C G T A C G G T G G C C G C
C C C C T C C G T G T T C A T C T T C C C C C C C T C C G A C G A G C A G C
T G A A G T C C G G C A C C G C C T C C G T G G T G T G C C T G C T G A A T
A A C T T C T A C C C C A G A G A G G C C A A G G T G C A G T G G A A G G T
G G A C A A C G C C C T G C A G T C C G G G A A C T C C C A G G A G A G C G
T G A C C G A G C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T G
A G C A G C A C C C T G A C C C T G A G C A A A G C C G A C T A C G A G A A
G C A C A A G G T G T A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C A G G G C C
T G A G C T C C C C C G T C A C C A A G A G C T T C A A C A G G G G G G A G
T G T T A G g g g c c c g t t t a a a c g g g g g a g g c t a
```

訊息序列（23－82）、輕鏈恒定區（107－421）

【圖 28】

序列識別號 30：編碼兔嵌合化抗體 1A3 重鏈的胺基酸序列的核苷酸序列

```
ccagcctccggactctagagccaccATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCTAGATGGGTGCTGTCTGAAGTGAAGCTGTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTTCAACCTGGCGGCTCTAGAAAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTAGCGATTACGGCATGGTCTGGATCCGGCAGGCTCCTGGAAGAGGCCTTGAGTGGGTGCGCTACATCAGCTCTGGAAGCAGCGCCATCTACTACGCCGACACCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCCCAAGAATACCCTGTTCCCTGCAGATGAACAGCCTGCGGAGCGAGGACTCCGCCATGTACTTTTGTGCCCGGCCTCCTAGATACGACGTGTACAGCGCTTGTTTTGCCTACTGGGGCCA  
GGGCACACTGGTTACAGTTTCTGCCGGACAGCCCAAGGCTCCCTCCGTTTTTCCACTGGCTCCCTGCTGTGGCGATACCCCTAGCTCTACAGTGACCCTGGGCTGTCTGGTCAAGGGCTATCTGCCTGAGCCTGTGACCGTGACCTGGAATAGCGGCACCCTGACCAACGGCGTGCGGACATTTCTTAGCGTCAGACAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTGTCTGTGACCAGCAGCTCTCAGCCAGTGACCTGCAATGTGGCCCATCCTGCCACCAACACCAAGGTGGACAAAACCGTGGCTCCCAGCACCTGTAGCAGGCCACATGTCCCTCCACCTGAGCTGCTCGGAGGCCCCAGCGTGTTCATCTTTCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGATGATCCCGAGGTGCAGTTCACCTGGTACATCAACAACGAGCAAGTGCGGACCGCCAGACCTCCTCTGAGAGAGCAGCAGTTCAACAGCACCATCAGAGTGGTGTC  
CACACTGCCCATCACACACCAGGATTGGCTGCGGGGCAAAGAATTCAAGTGCAAGGTGCACAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAGAGGCCAGCCACTGGAACCCAAGGTGTACACAATGGGCCCTCCAAGAGAGGAACTGAGCAGCAGATCCGTGTCTCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCCAGCGACATCAGCGTGGAATGGGAGAAGAATGGCAAGGCCGAGGACAACCTACAAGACAACCCCTGCCGTGCTGGATAGCGACGGCAGCTACTTCCTGTACAACAAGCTGTCCGTGCCTACCAGCGAATGGCAGCGGGGAGATGTGTTTACCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCATCAGCAGGTCCCCAGGCCAAAtgagttttaaacgggggaggctaact
```

訊息序列 (26-82)、重鏈可變區 (83-448)、重鏈恒定區 (449-1417)

【圖 29】

序列識別號 31：編碼兔嵌合化抗體 1A3 輕鏈的胺基酸序列的核苷酸序列

```
ccagccctccggactctagagccaccATGGTTCTGCAGACACAGGTGT
TCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCTCTGGCGCCTACGGCGATATCGTG
ATGACCCAGAGCCACAAGTTTCATGAGCACCAGCGTGGGCGACAGAGT
GTCCATCACCTGTAAAGCCAGCCAGGATGTGGGCTCTGCCGTCGTGT
GGTATCAGCAGAAGCCAGGCCACTCTCCTGACCTGCTGATCTACTGG
GCCAGCACCAGACATACCGGCGTGCCCGATAGATTACAGGCTCTGG
CAGCGGCACCGACTTCACACTGACAATCGGCAACGTGCAGAGCGAGG
ACCTGGCCGATTACTTCTGCCAGCAGTACAGCAGCTACCCCGTGACA
TTTGCGGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCAAGAGGGATCCCGTGCTCC
CTCCGTGCTGCTGTTTCTCCTCCAAGCAAAGAGGAACTGACCACCGGCA
CCGCCACCATTTGTGTGTGTGGCCAACAAGTTCTACCCAGCGACATC
ACCGTGACCTGGAAGGTGGACGGCACAACACAGCAGAGCGGCATCGA
GAACAGCAAGACCCCTCAGAGCCCCGAGGACAACACATACAGCCTGA
GCAGCACCCCTGAGCCTGACAAGCGCCAGTACAATAGCCACAGCGTG
TACACATGCGAGGTGGTGCAGGGAAGCGCCTCTCCTATCGTGCAAGTC
CTTCAACAGAGGCGACTGCTgagttttaaacggggggaggctaact
```

訊息序列（26－85）、輕鏈可變區（86－406）、輕鏈恒定區（407－724）

【圖 30】

序列識別號 32：抗 GPR20 抗體重鏈的胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSC KASGYTFTSYYSWIRQAPGQGLKYMGF INPGSGH
TNYNEKFKGRVTITADKSSSTATMELSSLRSEDTAVYY
CARGAGGFLRIITKFDYWGGGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

訊息序列（1－19）、可變區（20－142）、恒定區（143－472）

【圖 31】

序列識別號 33：抗 GPR20 抗體輕鏈的胺基酸序列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDTQLTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASKSVSTYIHWYQQKPGKQPKLLIYSAGNLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYCQQINEL
PYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

訊息序列（1－20）、可變區（21－129）、恒定區（130－234）

【圖 32】

序列識別號 34：抗 CDH6 抗體重鏈的胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE
TEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARGVYGGFAGGYFDFWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

訊息序列 (1-19)、可變區 (20-141)、恒定區 (142-471)

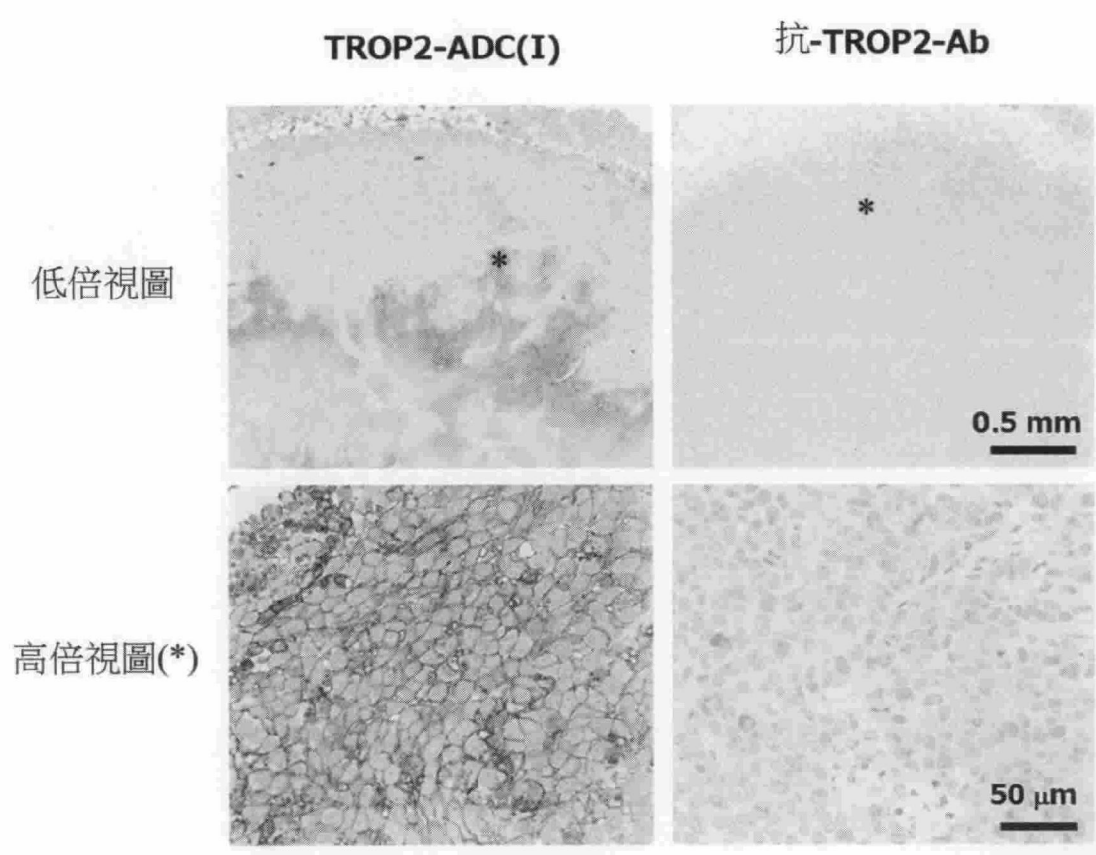
【圖 33】

序列識別號 35：抗 CDH6 抗體輕鏈的胺基酸序列

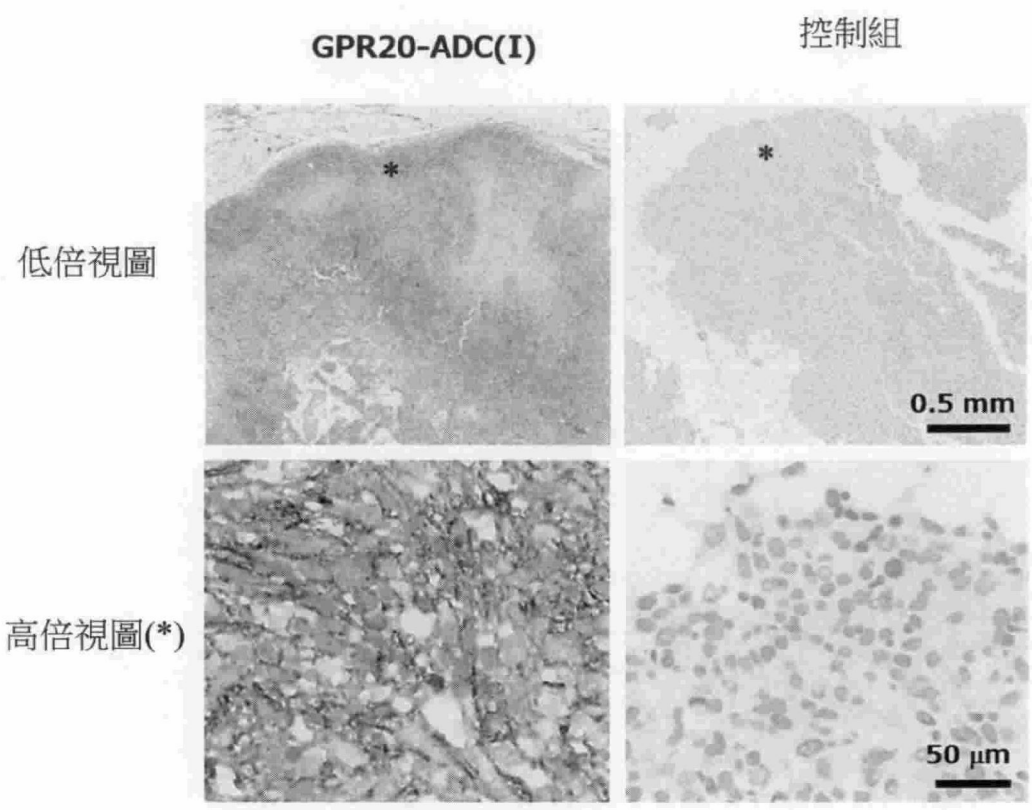
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQT
GVPSRFSGSGSGSDFTLTISSSLQPEDFATYFCQQYYSG
WAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

訊息序列 (1-20)、可變區 (21-128)、恒定區 (129-233)

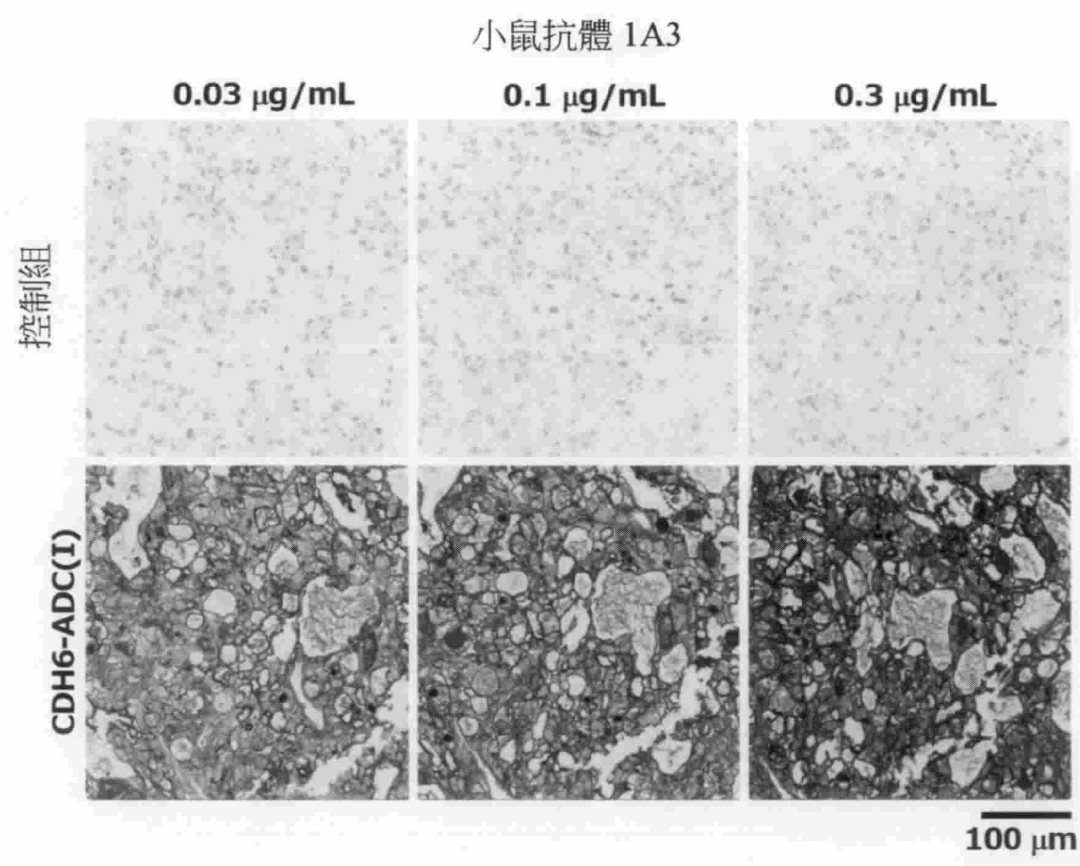
【圖 34】



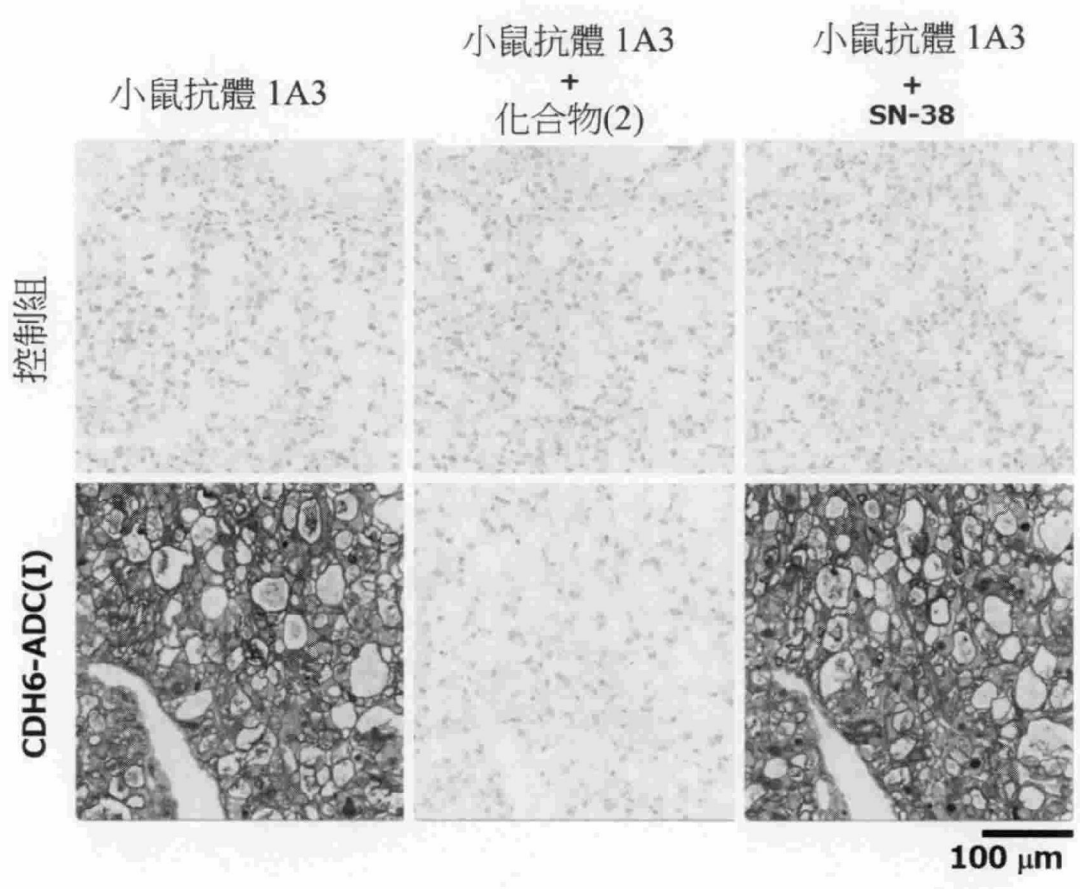
【圖35】



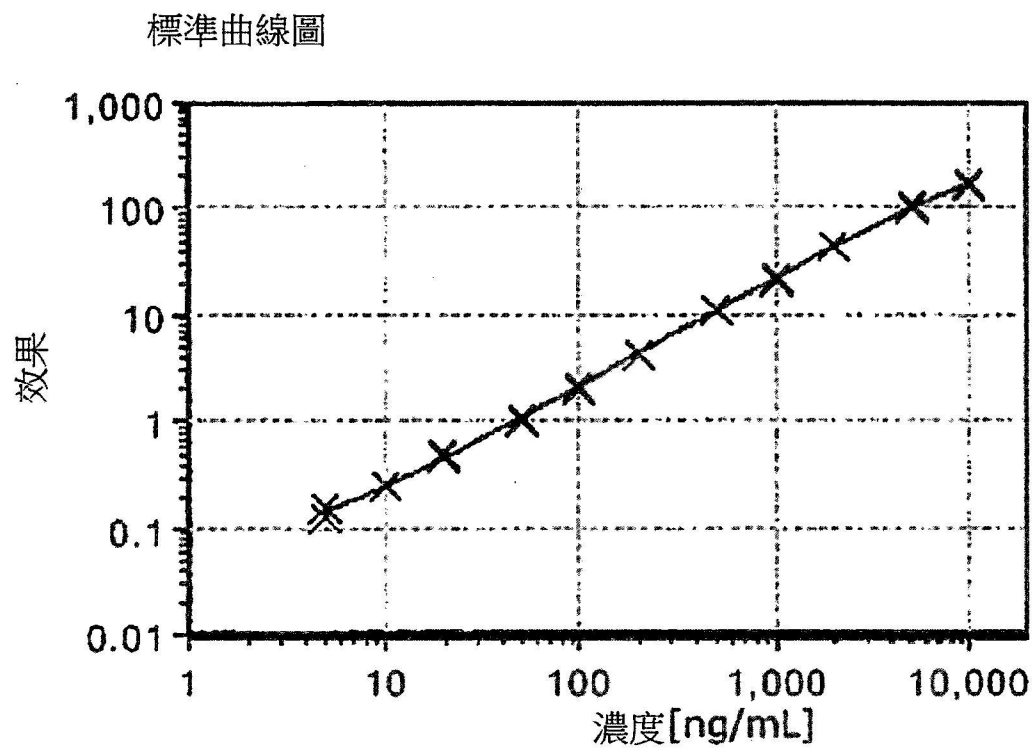
【圖 36】



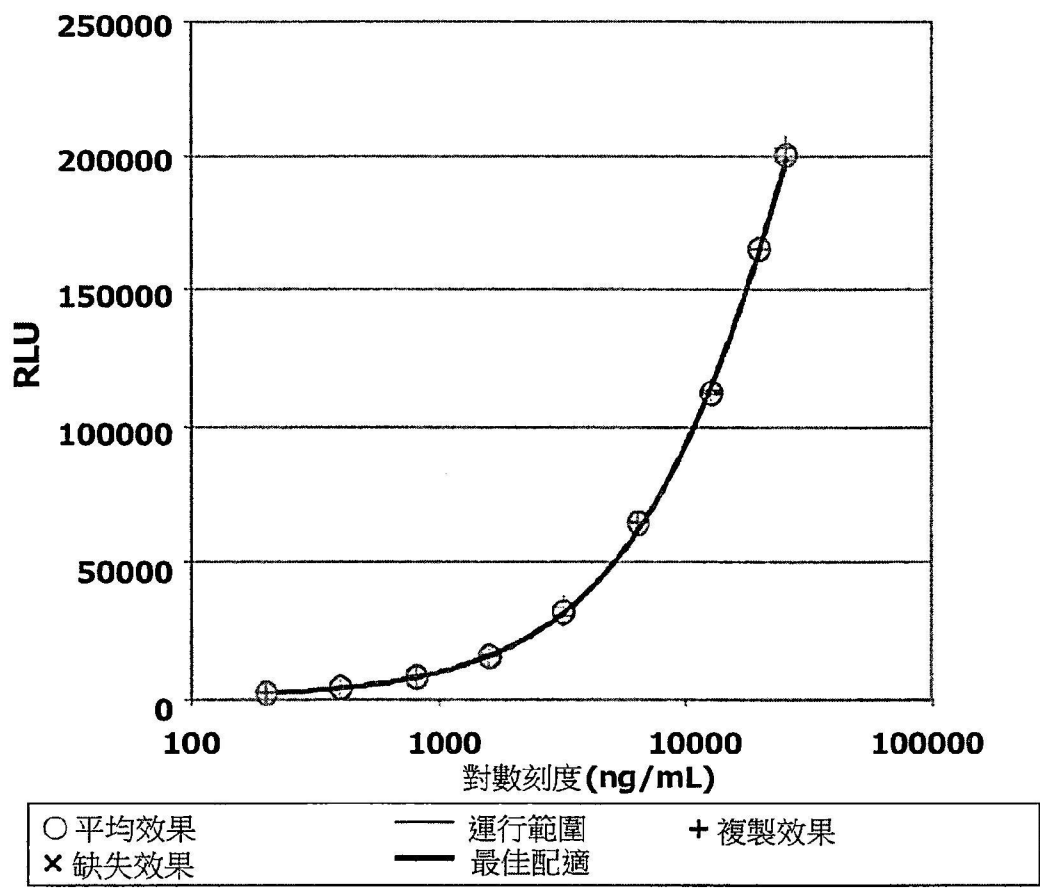
【圖 3 7】



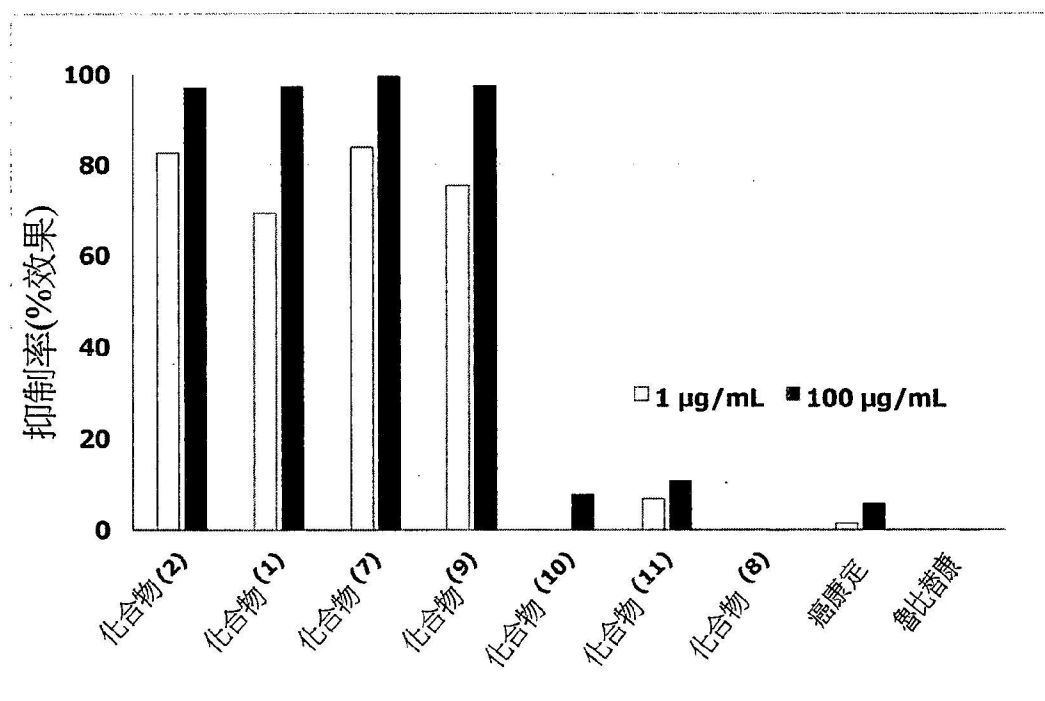
【圖 38】



【圖39】



【圖 40】



【圖 41】