



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I725037 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：105120426

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 29 日

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

A61K31/4745(2006.01)

A61K47/50 (2017.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/06/29 日本

2015-129692

(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：野口滋 NOGUCHI, SHIGERU (JP)；櫻井健 SAKURAI, KEN (JP)；岡薦大祐
OKAJIMA, DAISUKE (JP)

(74)代理人：丁國隆；黃政誠

(56)參考文獻：

WO 2011/157741A2

WO 2014/006124A1

WO 2014/100762A1

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：47 項 圖式數：25 共 141 頁

(54)名稱

抗體-藥物結合物之選擇的製造方法、抗體-藥物結合物組成物及醫藥組成物

(57)摘要

一種製造方法以及一種抗體-藥物結合物組成物，該製造方法係抗體-藥物結合物組成物之製造方法，其特徵為包含(i)於緩衝液中，使抗體與還原劑反應，而將鏈間雙硫鍵還原的步驟；及(ii)對(i)所獲得之具有硫醇基的抗體，使藥物連結物中間體反應的步驟，而(i)之步驟的反應溫度為-10~10℃，所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數為 3.5~4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇基有 4 個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為 50%以上；而該抗體-藥物結合物組成物，其平均藥物結合數為 3.5~4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇基有 4 個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為 50%以上。

I725037

發明摘要

※ 申請案號： 105120426

※ 申請日： 105年6月29日

※IPC 分類： A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抗體-藥物結合物之選擇的製造方法、抗體-藥物結合物組成物及醫藥組成物

SELECTIVE MANUFACTURING METHOD OF ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, ANTIBODY-DRUG CONJUGATE COMPOSITION, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

【中文】

一種製造方法以及一種抗體-藥物結合物組成物，該製造方法係抗體-藥物結合物組成物之製造方法，其特徵為包含

(i)於緩衝液中，使抗體與還原劑反應，而將鏈間雙硫鍵還原的步驟；及

(ii)對(i)所獲得之具有硫醇基的抗體，使藥物連結物中間體反應的步驟，而(i)之步驟的反應溫度為 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數為 $3.5\sim 4.5$ ，於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上；而該抗體-藥物結合物組成物，其平均藥物結合數為 $3.5\sim 4.5$ ，於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上。

【英文】

無。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗體-藥物結合物之選擇的製造方法、抗體-藥物結合物組成物及醫藥組成物

SELECTIVE MANUFACTURING METHOD OF ANTIBODY-DRUG CONJUGATE, ANTIBODY-DRUG CONJUGATE COMPOSITION, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

【技術領域】

【0001】本發明係關於藥物之結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物之製造方法、及藥物之結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物。

【先前技術】

【0002】使具有細胞毒性的藥物與於癌細胞表面表現且可於細胞中內在化的抗原結合的抗體結合的抗體-藥物結合物 (Antibody-Drug Conjugate; ADC; 以下，亦稱為「ADC」)，因可選擇性地將藥物送達至癌細胞，而可期待使藥物蓄積於癌細胞內、使癌細胞死亡 (參照非專利文獻1~3)。就抗體-藥物結合物而言，已知使為喜樹鹼 (camptothecin) 衍生物的依喜替康 (exatecan) 結合於抗B7-H3抗體的抗體-藥物結合物等 (專利文獻1)。

【0003】抗體中由於有4個鏈間雙硫鍵存在，且較其他之雙硫鍵更容易接近溶媒，而容易被還原，且可作為與抗體-藥物結合物中之藥物 (或藥物連結物) 的結合部位。藉由將抗體之鏈間雙硫鍵還原，使於生成的硫醇基結合藥物，而製作每1抗體有2~8個藥物結合的抗體-藥物結

合物。又，已知有一旦將抗體之鏈間雙硫鍵完全地還原，將使生成的鏈間硫醇基之一部份再氧化而回復為雙硫鍵，使藥物結合於殘餘的鏈間硫醇基，藉此而選擇性地製作於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物的方法(專利文獻2)。然而，選擇性地製作於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物的方法則未知。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1]國際公開 WO2014/057687小冊

[專利文獻2]國際公開 WO2005/084390小冊

[非專利文獻]

【0005】

[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.

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0006】每1抗體分子有8個藥物結合的抗體-藥物結合物即使抗腫瘤效果優異，亦有於副作用或毒性等之安全性面產生問題的情形。因此爲了於維持治療有效性的

同時，減少副作用或毒性，有使用平均藥物結合數少於8的抗體-藥物結合物的情形。平均藥物結合數少於8的抗體-藥物結合物係例如，可進行控制每1抗體分子的藥物量使反應等而獲得，但其反應產物係藥物結合數為2、4、6及8之抗體-藥物結合物的組成物。因此，即使是平均藥物結合數相同的抗體-藥物結合物組成物，若各藥物結合數之分布相異，則有治療有效性及毒性亦相異的可能性。即，於平均藥物結合數為4之抗體-藥物結合物組成物中，藥物結合數為0及8之抗體-藥物結合物的含有率為高的情形，若與藥物結合數為4之抗體-藥物結合物的含有率為高的情形比較，則治療有效性降低，且毒性亦可能強烈表現。又，即使為相同藥物結合數之抗體-藥物結合物，也可能由於藥物的結合位置的不同，而治療有效性及毒性相異。因此，於抗體-藥物結合物組成物之製造中，係冀求藥物的結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物之製造方法。

[解決課題之手段]

【0007】本發明者們為了解決上述課題而專一檢討的結果，發現以較簡便的操作來製造藥物的結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物的方法。即，發現藉由於緩衝液中，在 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，將抗體使用還原劑還原，對所獲得之具有硫醇基的抗體，使與藥物連結物中間體反應，而可製造平均藥物結合數為 $3.5\sim 4.5$ ，於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上之抗體-藥物結合物組成物。再者，

發現本發明之抗體-藥物結合物組成物較歷來之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物(平均藥物結合數為3.5~4.5,於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為35%以下的抗體-藥物結合物組成物)更具有優異的安全性,遂而完成本發明。

【0008】即本案發明係關於：

(1)

一種製造方法,其係抗體-藥物結合物組成物之製造方法,其特徵為包含

(i)於緩衝液中,使抗體與還原劑反應,而將鏈間雙硫鍵還原的步驟;及

(ii)對(i)所獲得之具有硫醇基的抗體,使藥物連結物中間體反應的步驟,

而(i)之步驟的反應溫度為-10~10℃,所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數為3.5~4.5,於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上。

(2)

如(1)記載之製造方法,其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數為4.0~4.1。

(3)

如(1)或(2)記載之製造方法,其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50~90%的範圍。

(4)

如(3)記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～80%的範圍。

(5)

如(4)記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～70%的範圍。

(6)

如(5)記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～60%的範圍。

(7)

如(1)～(6)中任一項記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為5%以下。

(8)

如(7)記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為1%以下。

(9)

如(1)～(8)中任一項記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合，於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為5%以下。

(10)

如(1)~(8)中任一項記載之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合，於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為1%以下。

(11)

如(1)~(10)中任一項記載之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $-5\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。

(12)

如(11)記載之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $-3\sim 3^{\circ}\text{C}$ 。

(13)

如(12)記載之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ 。

(14)

如(13)記載之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 。

(15)

如(1)~(14)中任一項記載之製造方法，其中(ii)之步驟之反應溫度為 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ 。

(16)

如(1)~(15)中任一項記載之製造方法，其中還原劑係以每抗體一分子2~3莫耳當量來使用。

(17)

如(1)~(16)中任一項記載之製造方法，其中還原劑為參(2-羧基乙基)膦或其鹽。

(18)

如(17)記載之製造方法，其中參(2-羧基乙基)膦之鹽為參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽。

(19)

如(1)～(18)中任一項記載之製造方法，其中緩衝液為組胺酸緩衝液。

(20)

如(1)～(19)中任一項記載之製造方法，其中緩衝液係包含螯合劑。

(21)

如(20)記載之製造方法，其中螯合劑為伸乙二胺四乙酸。

(22)

如(1)～(21)中任一項記載之製造方法，其中抗體為抗 TROP2 抗體、抗 CD98 抗體、抗 B7-H3 抗體、或抗 HER2 抗體。

(23)

如(22)記載之製造方法，其中抗體為抗 TROP2 抗體。

(24)

如(22)記載之製造方法，其中抗體為抗 CD98 抗體。

(25)

如(22)記載之製造方法，其中抗體為抗 B7-H3 抗體。

(26)

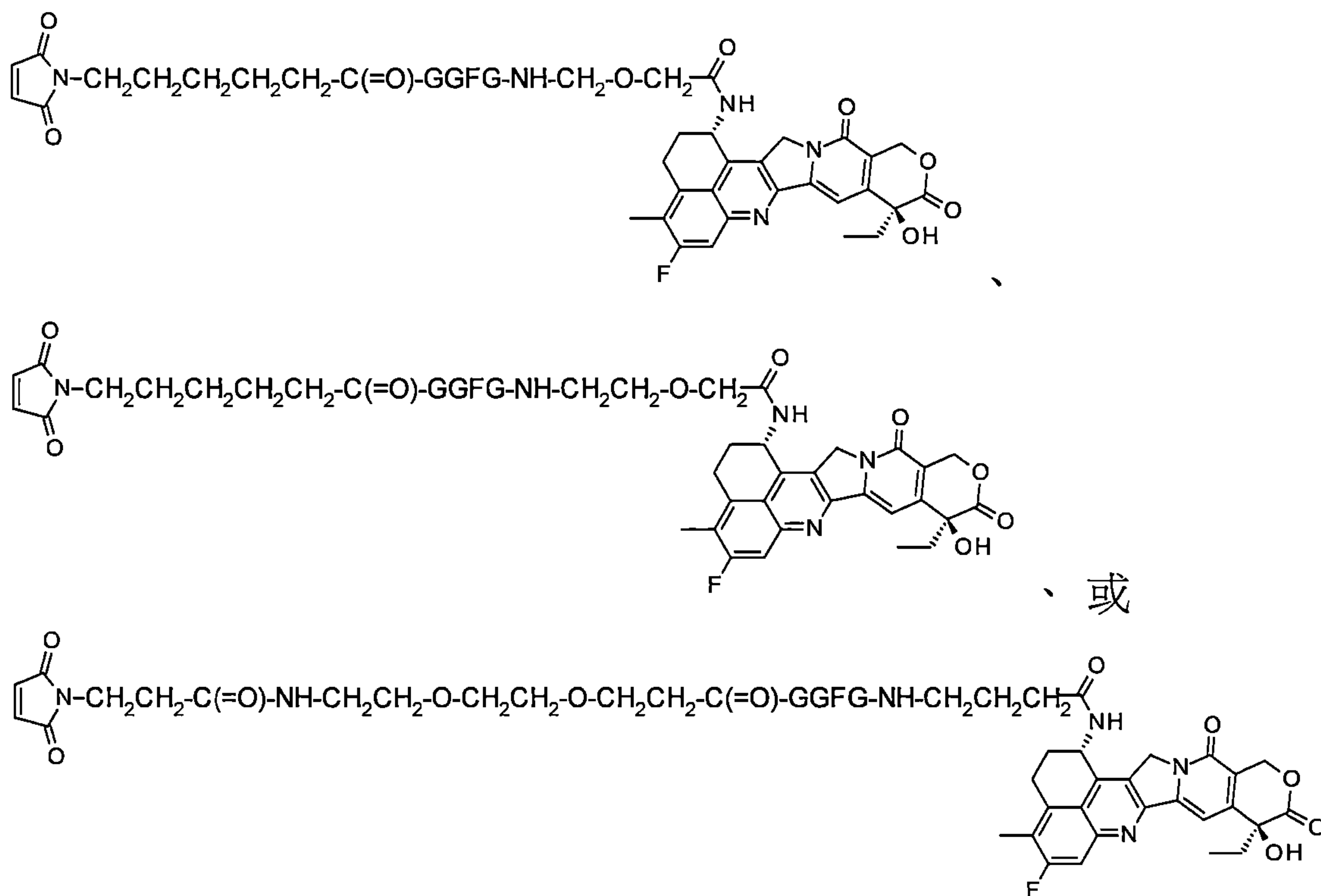
如(22)記載之製造方法，其中抗體為抗 HER2 抗體。

(27)

如(1)~(26)中任一項記載之製造方法，其中藥物連結物中間體為具有N-取代順丁烯二醯亞胺基。

(28)

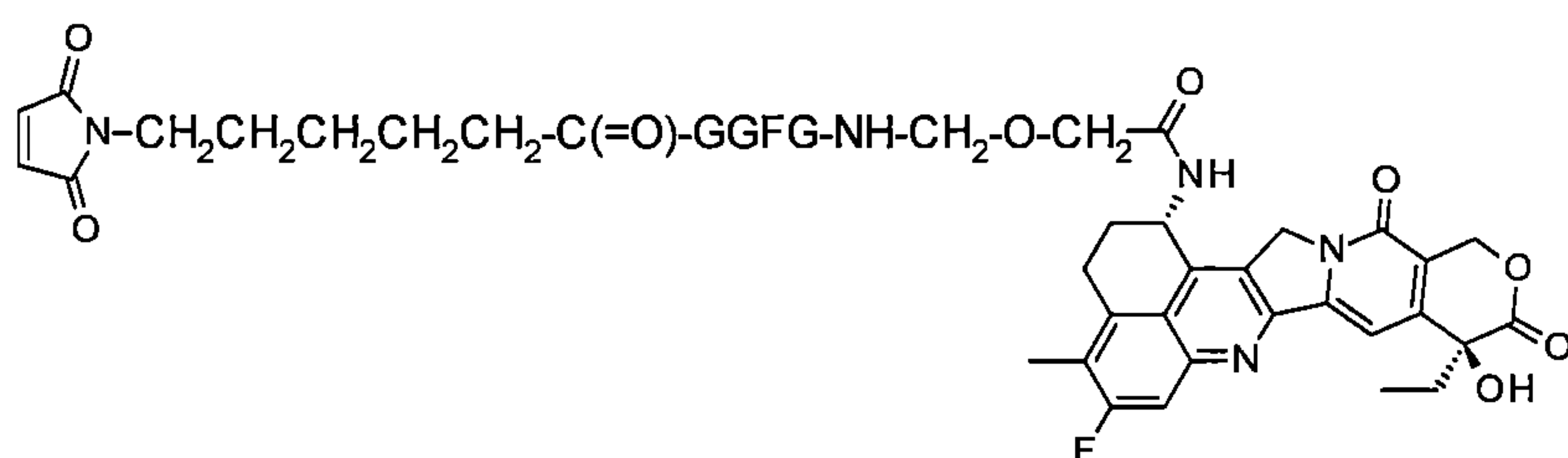
如(27)記載之製造方法，其中藥物連結物中間體為



(其中，式中之 -GGFG- 表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

(29)

如(28)記載之製造方法，其中藥物連結物中間體為



(其中，式中之 -GGFG- 表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

(30)

一種抗體-藥物結合物組成物，其係藉由如(1)～(29)中任一項記載之製造方法所製造。

(31)

一種抗體-藥物結合物組成物，其平均藥物結合數為3.5～4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上。

(32)

如(31)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中平均藥物結合數為4.0～4.1。

(33)

如(31)或(32)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～90%的範圍。

(34)

如(33)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～80%的範圍。

(35)

如(34)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～70%的範圍。

(36)

如(35)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～60%的範圍。

(37)

如(31)～(36)中任一項記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為5%以下。

(38)

如(37)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為1%以下。

(39)

如(31)～(38)中任一項記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合，於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為5%以下。

(40)

如(39)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合，於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為1%以下。

(41)

如(31)～(40)中任一項記載之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗TROP2抗體、抗CD98抗體、抗B7-H3抗體、或抗HER2抗體。

(42)

如(41)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗TROP2抗體。

(43)

如(41)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗CD98抗體。

(44)

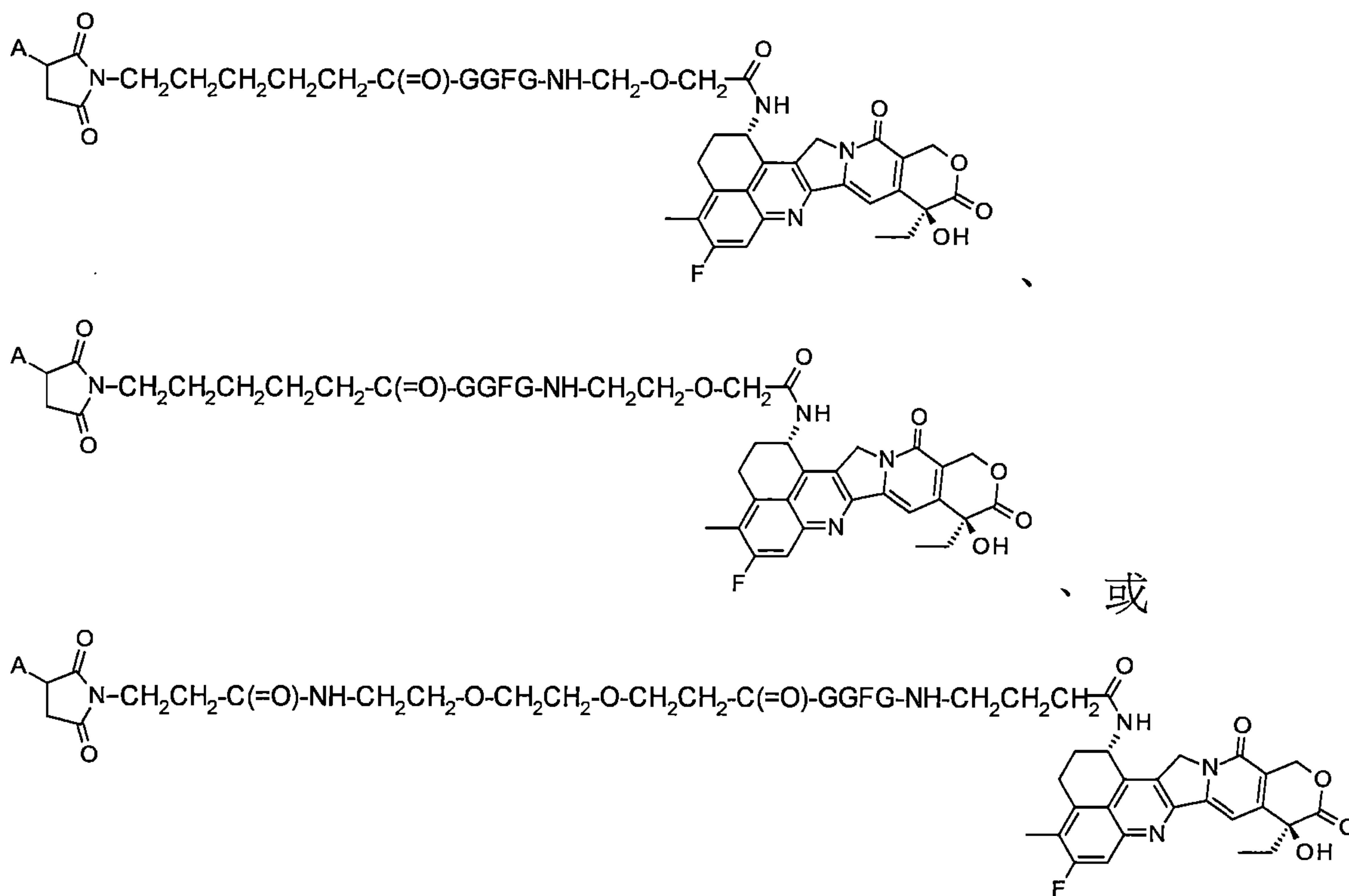
如(41)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗B7-H3抗體。

(45)

如(41)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗HER2抗體。

(46)

如(31)~(45)中任一項記載之抗體-藥物結合物組成物，其中藥物連結物為

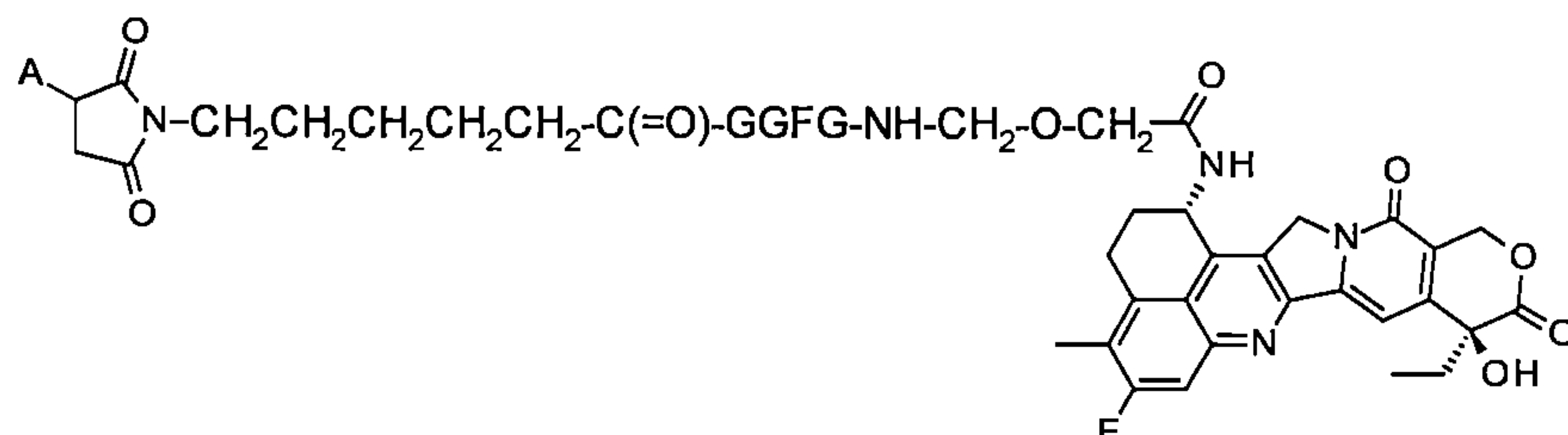


(其中，式中之A表示與抗體之結合位置，-GGFG-表

示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

(47)

如(46)記載之抗體-藥物結合物組成物，其中藥物連結物為



(其中，式中之A表示與抗體之結合位置，-GGFG-表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

(48)

一種醫藥組成物，其含有如(30)~(47)中任一項記載之抗體-藥物結合物組成物。

(49)

如(48)記載之醫藥組成物，其係用於腫瘤及/或癌之治療。

(50)

如(49)記載之醫藥組成物，其係用於肺癌、腎癌、尿道上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多型性神經膠母細胞瘤(glioblastoma multiforme)、卵巢癌、胰臟癌、乳癌、黑色素癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、子宮體癌、頭頸部癌、食道癌、膽管癌、甲狀腺癌、淋巴瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、及/或多發性骨髓瘤之治療。

(51)

一種腫瘤及/或癌之治療方法，其特徵為投予如(30)～(47)中任一項記載之抗體-藥物結合物組成物。

(52)

如(51)記載之治療方法，其係肺癌、腎癌、尿道上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多型性神經膠母細胞瘤、卵巢癌、胰臟癌、乳癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、子宮體癌、頭頸部癌、食道癌、膽管癌、甲狀腺癌、淋巴瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、及/或多發性骨髓瘤之治療方法。

(53)

一種製造方法，係具有硫醇基之抗體的製造方法，其包含於緩衝液中，使抗體與還原劑反應，而將鏈間雙硫鍵還原的步驟，

其特徵為反應溫度為 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，

所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造平均藥物結合數為 $3.5\sim 4.5$ ，且於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上的抗體-藥物結合物組成物。

(54)

如(53)記載之製造方法，其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造平均藥物結合數為 $4.0\sim 4.1$ 的抗體-藥物結合物組成物。

(55)

如(53)或(54)記載之製造方法，其中所製造之具有硫

醇基的抗體係用於製造於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～90%的範圍的抗體-藥物結合物。

(56)

如(55)記載之製造方法，其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～80%的範圍的抗體-藥物結合物組成物。

(57)

如(56)記載之製造方法，其中所製造的具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～70%的範圍的抗體-藥物結合物組成物。

(58)

如(57)記載之製造方法，其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50～60%的範圍的抗體-藥物結合物組成物。

(59)如(53)～(58)中任一項記載之製造方法，其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為5%以下的抗體-藥物結合物組成物。

(60)

如(59)記載之製造方法其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物

結合的抗體-藥物結合物之含有率爲1%以下的抗體-藥物結合物組成物。

(61)

如(53)～(60)中任一項記載之製造方法，其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合，且於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率爲5%以下的抗體-藥物結合物組成物。

(62)

如(61)記載之製造方法，其中所製造之具有硫醇基的抗體係用於製造於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合，且於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率爲1%以下的抗體-藥物結合物組成物。

(63)

如(53)～(62)中任一項記載之製造方法，其中反應溫度爲 $-5\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。

(64)

如(63)記載之製造方法，其中反應溫度爲 $-3\sim 3^{\circ}\text{C}$ 。

(65)

如(64)記載之製造方法，其中反應溫度爲 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ 。

(66)

如(65)記載之製造方法，其中反應溫度爲 $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 。

(67)

如(53)～(66)中任一項記載之製造方法，其中還原劑

係以抗體每一分子2~3莫耳當量來使用。

(68)

如(53)~(67)中任一項記載之製造方法，其中還原劑為參(2-羧基乙基)膦或其鹽。

(69)

如(68)記載之製造方法，其中參(2-羧基乙基)膦之鹽為參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽。

(70)

如(53)~(69)中任一項記載之製造方法，其中緩衝液為組胺酸緩衝液。

(71)

如(53)~(70)中任一項記載之製造方法，其中緩衝液包含螯合劑。

(72)

如(71)記載之製造方法，其中螯合劑為伸乙二胺四乙酸。

(73)

如(53)~(72)中任一項記載之製造方法，其中抗體為抗TROP2抗體、抗CD98抗體、抗B7-H3抗體、或抗HER2抗體。

(74)

如(73)記載之製造方法，其中抗體為抗TROP2抗體。

(75)

如(73)記載之製造方法，其中抗體為抗CD98抗體。

(76)

如(73)記載之製造方法，其中抗體為抗B7-H3抗體。
(77)

如(73)記載之製造方法，其中抗體為抗HER2抗體。
[發明之效果]

【0009】依據本發明，可提供藥物之結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物之製造方法、及藥物之結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物。本發明之抗體-藥物結合物組成物係安全性優異，且有用於作為腫瘤及/或癌之治療用之醫藥。又，因可獲得被集約為一定之藥物結合數及結合位置的抗體-藥物結合物組成物，故於品質管理的點亦為優異而較佳。

【圖式簡單說明】

【0010】

[第1圖]呈示人類化抗TROP2抗體重鏈(hTINA1-H1)之核苷酸序列及胺基酸序列的圖。

[第2圖]呈示人類化抗TROP2抗體輕鏈(hTINA1-L1)之核苷酸序列及胺基酸序列的圖。

[第3圖]呈示人類化抗CD98抗體重鏈(h23M-H1)之核苷酸序列及胺基酸序列的圖。

[第4圖]呈示人類化抗CD98抗體輕鏈(h23M-L1)之核苷酸序列及胺基酸序列的圖。

[第5圖]呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)ADC組成物之各鏈波峰面積比(%)的圖表。

[第6圖]呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗

TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)ADC 組成物之各藥物結合數的分布(%)的圖表。

[第 7 圖] 呈示藉由本發明之方法所製的人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)ADC 組成物之各鏈波峰面積比(%)的圖表。

[第 8 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)ADC 組成物之各藥物結合數的分布(%)的圖表。

[第 9 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物之各鏈波峰面積比(%)的圖表。

[第 10 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物之各藥物結合數的分布(%)的圖表。

[第 11 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物之各鏈波峰面積比(%)的圖表。

[第 12 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物之各藥物結合數的分布(%)的圖表。

[第 13 圖] 呈示人類化抗 B7-H3 抗體重鏈 (M30-H1)之胺基酸序列的圖。

[第 14 圖] 呈示人類化抗 B7-H3 抗體輕鏈 (M30-L4)之胺基酸序列的圖。

[第 15 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗

B7-H3 抗體 (M30-H1-L4)ADC 組成物之各鏈波峰面積比 (%) 的圖表。

[第 16 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4)ADC 組成物之各藥物結合數的分布 (%) 的圖表。

[第 17 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4)ADC 組成物之各鏈波峰面積比 (%) 的圖表。

[第 18 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4)ADC 組成物之各藥物結合數的分布 (%) 的圖表。

[第 19 圖] 呈示人類化抗 HER2 抗體重鏈之胺基酸序列的圖。

[第 20 圖] 呈示人類化抗 HER2 抗體輕鏈之胺基酸序列的圖。

[第 21 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗 HER2 抗體 ADC 組成物之各鏈波峰面積比 (%) 的圖表。

[第 22 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗 HER2 抗體 ADC 組成物之各藥物結合數的分布 (%) 的圖表。

[第 23 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 HER2 抗體 ADC 組成物之各鏈波峰面積比 (%) 的圖表。

[第 24 圖] 呈示藉由本發明之方法所製作的人類化抗 HER2 抗體 ADC 組成物之各藥物結合數的分布 (%) 的圖表。

[第 25 圖] 呈示藉由歷來之方法所製作的人類化抗 TROP2 抗體 ADC 組成物、及藉由本發明之方法所製作的

人類化抗 TROP2 抗體 ADC 組成物之腫瘤增殖抑制效果的圖表。

【實施方式】

[實施發明之形態]

【0011】於本說明書中，「癌」與「腫瘤」係以相同意義被使用。

【0012】於本說明書中，「基因」不僅為 DNA，亦包含其 mRNA、cDNA 及其 cRNA。

【0013】於本說明書中，「核苷酸」係以與核酸相同意義被使用，包含 DNA、RNA、探針、寡核苷酸及引子。

【0014】於本說明書中，「多肽」與「蛋白質」係以相同意義被使用。

【0015】於本說明書中，「細胞」係包含動物個體內之細胞、培養細胞。

【0016】於本說明書中，「鏈間雙硫鍵」係指抗體中的 2 個重鏈之間的雙硫鍵(重鏈-重鏈間雙硫鍵)、或重鏈與輕鏈之間的雙硫鍵(重鏈-輕鏈間雙硫鍵)。

【0017】於本說明書中，「鏈間硫醇基」係指藉由抗體之鏈間雙硫鍵的還原所獲得的硫醇基。

【0018】於本說明書中，「重鏈-重鏈間硫醇基」係指藉由抗體之重鏈-重鏈間雙硫鍵之還原所獲得的硫醇基。

【0019】於本說明書中，「重鏈-輕鏈間硫醇基」係指藉由抗體之重鏈-輕鏈間雙硫鍵之還原所獲得的硫醇基。

【0020】於本說明書中，「腫瘤關聯抗原(TAA)」係指雖於正常細胞表現，亦於腫瘤細胞表現，但比較被限

定於腫瘤細胞的抗原。

【0021】於本說明書中，「腫瘤特異抗原(TSA)」係指腫瘤細胞特有的抗原。

【0022】於本說明書中，「TROP2」係與TROP2蛋白質以相同意義被使用。

【0023】於本說明書中，「CD98」係與CD98蛋白質以相同意義被使用。CD98係因包含重鏈與輕鏈，而「CD98重鏈」及「CD98輕鏈」各自與CD98重鏈蛋白質及CD98輕鏈蛋白質以相同意義被使用。再者，於本說明書中，「CD98」若未特別明記，則能夠與「CD98重鏈」及「CD98輕鏈」、或「CD98重鏈」或「CD98輕鏈」之任一者相互地變換使用。

【0024】於本說明書中，「抗TROP2抗體」係指可結合於TROP2的抗體。

【0025】於本說明書中，「抗CD98抗體」係指可結合於CD98的抗體。

【0026】於本說明書中，「抗B7-H3抗體」係指可結合於B7-H3的抗體。

【0027】於本說明書中，「抗HER2抗體」係指可結合於HER2的抗體。

【0028】於本說明書中，「細胞傷害」係指以某種形式帶來細胞病理的變化，不僅指直接的外傷，亦指DNA的切斷、或鹼基的二聚體形成、染色體之切斷、細胞分裂裝置之損傷、各種酵素活性的降低等各種細胞之構造或機能上的損傷。

【0029】於本說明書中，「細胞傷害活性」係指引起上述細胞傷害。

【0030】於本說明書中，「抗體依存性細胞傷害活性」係指抗體依存性細胞毒性(「antibody dependent cellular cytotoxicity(ADCC)活性」)，意味NK細胞之透過抗體而傷害腫瘤細胞等標的細胞的作用活性。

【0031】於本說明書中，「補體依存性細胞傷害作用活性」係指補體依存性細胞毒性「complement dependent cytotoxicity(CDC)活性」，意味補體之透過抗體而傷害腫瘤細胞等標的細胞的作用活性。

【0032】於本說明書中，「抗原決定位(epitope)」係意味特定之抗體所結合的抗原之部分胜肽或部分立體構造。為抗原之部分胜肽的抗原決定位，係可藉由免疫分析法等本項技術領域中具通常技術者已知的方法，例如以下之方法而決定。首先，製作抗原之各式各樣的部分構造。於部分構造之製作上，可使用周知之寡肽合成技術。例如，使用本項技術領域中具通常技術者周知之基因重組技術，製作由抗原的C末端或N末端以適當長度依序變短的一連串多肽後，在檢討對於彼等的抗體反應性，並決定大略的辨識部位後，合成更短的胜肽而檢討與彼等之胜肽的反應性，藉此而可決定抗原決定位。又，為特定之抗體所結合的抗原之部分立體構造的抗原決定位，係可藉由以X射線構造解析來特定與前述抗體鄰接的抗原之胺基酸殘基而決定。

【0033】於本說明書中，「結合於同一抗原決定位的

抗體」係意味結合於共通抗原決定位的相異抗體。若第二抗體結合於第一抗體所結合的部分胜肽或部分立體構造，則可判定第一抗體與第二抗體係結合於同一抗原決定位。又，藉由確認第二抗體對於第一抗體之對抗原的結合為競合(即，第二抗體會妨礙第一抗體與抗原之結合)，而即使未決定具體的抗原決定位之序列或構造，亦可判定第一抗體與第二抗體會結合於同一抗原決定位。再者，第一抗體與第二抗體結合於同一抗原決定位，且第一抗體具有抗腫瘤活性等之特殊效果的情形，可期待第二抗體亦具有相同之活性。

【0034】於本說明書中，「CDR」係指互補性決定區(CDR: Complementarity determining region)。已知於抗體分子之重鏈及輕鏈各自有3處的CDR。CDR亦稱為超可變區(hypervariable domain)，於抗體之重鏈及輕鏈的可變區內，係一次構造的變異性特別高的部位，於重鏈及輕鏈之多肽鏈的一次構造上，各自分離於3處。於本說明書，關於抗體之CDR，係將重鏈之CDR自重鏈胺基酸序列之N末端側標記為CDRH1、CDRH2、CDRH3，將輕鏈之CDR自輕鏈胺基酸序列之N末端側標記為CDRL1、CDRL2、CDRL3。此等之部位係於立體構造上相互接近，而決定對所結合之抗原的特異性

【0035】於本說明書中，「數個」係表示2~10個。較佳為2~9個，更佳為2~8個，更佳為2~7個，更佳為2~6個，更佳為2~5個，更佳為2~4個，更佳為2~3個，又更佳為2個。

【0036】於本說明書中，「抗體-藥物結合物組成物」係意味以任意比率包含有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物、有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物、有6個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物、有8個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物、及沒有藥物連結物結合的抗體的組成物。於本說明書中，「抗體-藥物結合物組成物」亦稱為「ADC組成物」。

【0037】於本說明書中，「平均藥物結合數」亦稱為藥物抗體比(Drug-to-Antibody Ratio(DAR))，意味抗體-藥物結合物組成物中之對於抗體1分子所結合的藥物之平均數。

【0038】於本說明書中，「含有率」係意味抗體-藥物結合物組成物中之具有特定之藥物結合數及結合位置的抗體-藥物結合物之含有率(以抗體作為基準的莫耳%)。

【0039】於本說明書中，「同一性」與「相同性」係以相同意義被使用。

【0040】1. 抗體

本發明所使用的抗體係可抗目的抗原，例如，腫瘤特異抗原(TAA)或腫瘤關連抗原(TSA)而被產生。該抗體具有可辨識腫瘤細胞的特性、可與該腫瘤細胞結合的特性、及被併入該腫瘤細胞內而內在化的特性。

【0041】目的抗原係若為與腫瘤細胞關連的抗原，則未特別限定，但可列舉例如B7-H3、CD3、CD30、CD33、CD37、CD56、CD98、DR5、EGFR、EPHA2、FGFR2、FGFR4、FOLR1(葉酸受體1(Folate Receptor 1))、HER2

、HER3、TROP2、VEGF等。

【0042】本發明所使用的抗體係可以例如WO2009/091048、WO2011/027808、或WO2012/133572記載之方法而獲得。即，將非人類動物以目的抗原免疫，自免疫成立後之動物採取淋巴液、淋巴組織、血球試料或來自骨髓的細胞，而選擇與目的抗原特異性結合的非人類動物之漿細胞及/或漿母細胞(plasmoblast)。可自所獲得的漿細胞及/或漿母細胞採取抗目的抗原的抗體基因，鑑定其鹼基序列，而基於鑑定的基因之鹼基序列獲得上述抗體或抗體之片段。所取得的抗體藉由試驗對於目的抗原之結合性，而可篩選出能夠適用於人類疾病的抗體。

【0043】又，亦可按照周知之方法(例如，Kohler and Milstein, Nature(1975)256, p.495-497、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y.(1980))，藉由使產生抗目的抗原之抗體的抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合而建立融合瘤，獲得單株抗體。此種方法之具體例係被記載於WO2009/048072(2009年4月16日公開)及WO2010/117011(2010年10月14日公開)。

【0044】本發明所使用的抗體中亦包含以使對人類的異種抗原性降低等為目的而人為性地改變的基因重組型抗體，例如嵌合(Chimeric)抗體、人類化(Humanized)抗體、人類抗體等。此等之抗體可使用已知方法來製造。

【0045】就嵌合抗體而言，可列舉抗體之可變區與恆定區彼此為異種的抗體，例如將來自小鼠或大鼠的抗體

的可變區與來自人類的恆定區接合的嵌合抗體(參照 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984))。

【0046】就人類化抗體而言，可列舉僅將CDR併入來自人類之抗體的抗體(Nature(1986)321, p.522-525參照)、藉由CDR移植法而於CDR之序列以外也移植一部分之框架的胺基酸殘基於人類抗體的抗體(國際公開第WO90/07861號小冊)。

【0047】就本發明之較佳抗體而言，可列舉抗TROP2抗體、抗CD98抗體、抗B7-H3抗體、或抗HER2抗體。

【0048】就人類化抗TROP2抗體之實例而言，可列舉包含由下列(1)、(2)及(3)之任一者所構成的重鏈可變區之重鏈，以及包含由下列(4)、(5)及(6)之任一者所構成的輕鏈可變區之輕鏈的任意之組合：(1)包含序列識別號2之第20～140號之胺基酸殘基的胺基酸序列；(2)對於上述(1)之胺基酸序列，具有至少95%以上之相同性的胺基酸序列；(3)於上述(1)之胺基酸序列有1或數個之胺基酸缺失、取代或添加的胺基酸序列；(4)包含序列識別號4之第21～129號之胺基酸殘基的胺基酸序列；(5)對於上述(4)之胺基酸序列，具有至少95%以上之相同性的胺基酸序列；(6)於上述(4)之胺基酸序列有1或數個之胺基酸缺失、取代或添加的胺基酸序列。

【0049】就上述重鏈及輕鏈之適合的組合抗體而言，可列舉由以下重鏈及輕鏈所構成的抗體(hTINA1-H1L1)：由包含序列識別號2之第20～470號的胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈；由包含序列識別號4之第21

～234號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

【0050】就人類化抗TROP2抗體而言，只要保持序列表之由序列識別號5所示的胺基酸序列所構成的CDRH1(TAGMQ)、由序列識別號6所示的胺基酸序列所構成的CDRH2(WINTHSGVPKYAEDFKG)、由序列識別號7所示的胺基酸序列所構成的CDRH3(SGFGSSYWYFDV)、由序列表之序列識別號8所示的胺基酸序列所構成的CDRL1(KASQDVSTAVA)、由序列識別號9所示的胺基酸序列所構成的CDRL2(SASYRYT)、及由序列識別號10所示的胺基酸序列所構成的CDRL3(QQHYITPLT)，並未限定於特定之人類化抗體。

【0051】就人類化抗CD98抗體之例而言，可列舉包含由下列(1)、(2)及(3)之任一者所構成的重鏈可變區之重鏈，以及包含由下列(4)、(5)及(6)之任一者所構成的輕鏈可變區之輕鏈的任意之組合：(1)包含序列識別號12之第20～135號之胺基酸殘基的胺基酸序列；(2)對上述(1)之胺基酸序列，具有至少95%以上之同一性的胺基酸序列；(3)於上述(1)之胺基酸序列有1或數個之胺基酸缺失、取代或添加的胺基酸序列；(4)包含序列識別號14之第21～135號之胺基酸殘基的胺基酸序列；(5)對上述(4)之胺基酸序列，具有至少95%以上之同一性的胺基酸序列；(6)於上述(4)之胺基酸序列有1或數個之胺基酸缺失、取代或添加的胺基酸序列。

【0052】就上述重鏈及輕鏈之適合的組合抗體而言，可列舉由以下重鏈及輕鏈所構成的抗體(hM23-H1L1)：由

包含序列識別號12之第20～465號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈；由包含序列識別號14之第21～240號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

【0053】就人類化抗CD98抗體而言，只要保持由序列識別號15所示的胺基酸序列所構成的CDRH1(NYLIE)、由序列識別號16所示的胺基酸序列所構成的CDRH2(VINPGSGVTNYNEKFKG)、由序列識別號17所示的胺基酸序列所構成的CDRH3(AEAWFAY)、由序列表之序列識別號18所示的胺基酸序列所構成的CDRL1(KSSQSLLYSSNQKNYLA)、由序列識別號19所示的胺基酸序列所構成的CDRL2(WASTRES)、及由序列識別號20所示的胺基酸序列所構成的CDRL3(QRYYGYPWT)，並未限定於特定之人類化抗體。

【0054】就人類化抗B7-H3抗體之例而言，可列舉包含由下列(1)、(2)及(3)之任一者所構成的重鏈可變區之重鏈，以及包含由下列(4)、(5)及(6)之任一者所構成的輕鏈可變區之輕鏈的任意之組合：(1)包含序列識別號25之第20～141號之胺基酸殘基的胺基酸序列；(2)對上述(1)之胺基酸序列，具有至少95%以上之同一性的胺基酸序列；(3)於上述(1)之胺基酸序列有1或數個之胺基酸缺失、取代或添加的胺基酸序列；(4)包含序列識別號26之第21～128號之胺基酸殘基的胺基酸序列；(5)對上述(4)之胺基酸序列，具有至少95%以上之同一性的胺基酸序列；(6)於上述(4)之胺基酸序列有1或數個之胺基酸缺失、取代或添加的胺基酸序列。

【0055】就上述重鏈及輕鏈之適合的組合的抗體而言，可列舉由以下重鏈及輕鏈所構成的抗體(M30-H1-L4)：由包含序列識別號25之第20～471號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈、及由包含序列識別號26之第21～233號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

【0056】就人類化抗B7-H3抗體而言，只要保持由序列識別號27所示的胺基酸序列所構成的CDRH1(NYVMH)、由序列識別號28所示的胺基酸序列所構成的CDRH2(YINPYNDDVKYNEKFKG)、由序列識別號29所示的胺基酸序列所構成的CDRH3(WGYYSPLYFYFDY)、由序列表之序列識別號30所示的胺基酸序列所構成的CDRL1(RASSRLIYMH)、由序列識別號31所示的胺基酸序列所構成的CDRL2(ATSNLAS)、及由序列識別號32所示的胺基酸序列所構成的CDRL3(QQWNSNPPT)，並未限定於特定之人類化抗體。

【0057】就人類化抗HER2抗體之例而言，可列舉由以下重鏈、及輕鏈所構成的抗體(曲妥珠單抗(trastuzumab)；美國專利第5821337號)：由包含序列識別號33之第1～449號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈；由包含序列識別號34之第1～214號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

【0058】再者，將各CDR中之1～3個胺基酸殘基取代為其他胺基酸殘基的CDR改質人類化抗體，只要具有對腫瘤細胞的結合活性，亦包含於本發明所使用的抗體。

【0059】就本發明所使用的抗體而言，可進一步列舉

人類抗體。人類抗體可藉由使用具有含人類抗體之重鏈及輕鏈的基因之人類染色體片段的人類抗體產生小鼠的方法(參照 Tomizuka, K. et. al., Nature Genetics(1997)16, p.133-143 ; Kuroiwa, Y. et. al., Nucl. Acids Res.(1998)26, p.3447-3448 ; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology : Basic and Applied Aspects vol.10, p.69-73(Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000)97, p.722-727等)而取得。

【0060】又，亦已知取得來自由人類抗體庫所篩選的噬菌體展示之人類抗體的方法(參照 Wormstone, I.M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002)43(7), p.2301-2308 ; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002), 1(2), p.189-203 ; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology(2002)109(3), p.427-431等)。

【0061】例如，可使用將人類抗體的可變區作為單鏈抗體(scFv)而使其於噬菌體表面表現，選擇與抗原結合之噬菌體的噬菌體展示法(Nature Biotechnology(2005), 23, (9), p.1105-1116)。可藉由解析以與抗原結合所選擇之噬菌體的基因，而決定編碼與抗原結合的人類抗體之可變區的DNA序列。若解明與抗原結合的scFv之DNA序列，則可藉由製作具有該序列的表現載體，並導入適當的宿主使其表現，而取得人類抗體(WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO

95/01438、WO95/15388、Annu. Rev. Immunol(1994)12, p.433-455、Nature Biotechnology(2005)23(9), p.1105-1116)。

【0062】上述之抗體，係可評價對目的抗原的結合性而選出適合的抗體。抗體與抗原之解離常數係可使用以表面電漿共振 (SPR)作為檢測原理的 Biacore T200(GE Healthcare Bioscience公司)來測量。例如，可藉由使對於作為配位體 (ligand)而固相化的抗原設定為適當濃度的抗體與分析物進行反應，測量其結合及解離，而獲得結合速度常數 k_{a1} 、解離速度常數 k_{d1} 及解離常數 (KD； $KD=k_{d1}/k_{a1}$)。對目的抗原的結合性評價並未限定於 Biacore T200之使用，亦能夠藉由以表面電漿共振 (SPR)作為檢測原理的機器、以結合平衡除外法 (Kinetic Exclusion Assay)作為檢測原理的 KinExA(Sapidyne Instruments 公司)、以生物薄層干涉法 (Bio-Layer Interferometry)作為檢測原理的 BLItz系統(Pall公司)或 ELISA(酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay))法等。

【0063】於細胞內在化的活性係可使用下列方法來確認：(1)使用結合於治療抗體的二次抗體(螢光標識)而以螢光顯微鏡將被併入細胞內的抗體加以可視化的分析 Cell Death and Differentiation(2008) 15, 751-761)、(2)使用結合於治療抗體的二次抗體(螢光標識)而測量被併入細胞內的螢光量的試驗(Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004)、或(3)使用結合於

治療抗體的免疫毒素，而使用所謂若被併入細胞內則毒素被放出而抑制細胞增殖的 Mab-ZAP 分析 (BioTechniques 28 : 162-165, January 2000)。就免疫毒素而言，亦可使用白喉毒素的觸媒區與 Protein G 之重組複合蛋白質。

【0064】就比較抗體之性質之際的其他指標之一例而言，可列舉抗體之安定性。差示掃描量熱法 (DSC) 係可快速、或正確地測量可成為蛋白質的相對構造安定性之優良指標的熱變性中點 (T_m) 的方法。可藉由使用 DSC 來測量 T_m 值，並比較其值，而比較熱安定性的不同。已知抗體之保存安定性係顯示與抗體之熱安定性有某程度的相關 (Lori Burton, et. al., Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p.265-273)，可將熱安定性作為指標而篩選出適合的抗體。就用以篩選抗體之其他指標而言，可列舉適當的宿主細胞中之產量高、及在水溶液中的凝集性低。例如由於產量最高的抗體並不一定顯示最高熱安定性，故有必要基於以上所述的指標作綜合地判斷，來選擇最適於對人類投予的抗體。

【0065】又，能夠藉由調節與抗體結合的糖鏈修飾，而增強抗體依存性細胞毒性。就抗體之糖鏈修飾的調節技術而言，已知 WO99/54342、WO2000/61739、WO2002/31140 等，但並未限定於此等。

【0066】將抗體基因一旦單離之後，於導入至適當宿主而製作抗體的情形，可使用適當的宿主與表現載體之組合。就抗體基因之具體例而言，可列舉將編碼本說明

書所記載的抗體之重鏈序列的基因、及編碼輕鏈序列的基因組合者。於將宿主細胞轉形之際，重鏈序列基因與輕鏈序列基因能夠被插入同一表現載體，亦能夠被插入至各別之表現載體。使用真核細胞作為宿主的情形，可使用動物細胞、植物細胞、真核微生物。就動物細胞而言，可列舉哺乳類細胞，例如為猴之細胞的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)或中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞、ATCC CCL-61)之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，使用原核細胞的情形，可列舉大腸菌、枯草菌。於此等之細胞藉由轉形而導入作為目的的抗體基因，藉由將經轉形的細胞於活體外培養，而可獲得抗體。於以上之培養法中，會有因抗體序列而產量不同的情形，能夠自具有同等結合活性的抗體之中以產量作為指標而選出作為醫藥之生產為容易者。

【0067】並無作為本發明所使用的抗體之同型(isotype)的限制，可列舉例如IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1、IgA2)、IgD或IgE等，但較佳為IgG或IgM，更佳為IgG1、IgG2或IgG3。

【0068】作為抗體之機能，一般而言可列舉抗原結合活性、中和抗原活性的活性、增強抗原活性的活性、抗體依存性細胞毒性、補體依存性細胞毒性、補體依存性細胞性細胞毒性、及內在化能力。

【0069】再者，本發明所使用的抗體亦可為對至少2種類之相異抗原具有特異性的多特異性抗體。通常此種分子係會與2種類之抗原結合者(即，雙特異性抗體(bispecific antibody))，但本發明中的「多特異性抗體」係包含對其以上(例如3種類)之抗原具有特異性的抗體。

【0070】本發明所使用的抗體亦可為與上述之抗體之重鏈及/或輕鏈比較，具有80%~99%的同一性(或相同性)的抗體。能夠藉由將顯示與上述之重鏈胺基酸序列及輕鏈胺基酸序列為高相同性的序列加以組合，而選擇具有與上述之各抗體同等之抗原結合能力、內在化能力的抗體。此種相同性一般而言為80%以上之相同性，較佳為90%以上之相同性相同性，更佳為95%以上之相同性，最佳為99%以上之相同性。又，亦能夠藉由將於重鏈及/或輕鏈之胺基酸序列有1~數個之胺基酸殘基取代、缺失及/或添加的胺基酸序列加以組合，而選擇具有與上述之各抗體具有同等之各種作用的抗體。取代、缺失及/或添加的胺基酸殘基數係一般而言為10個胺基酸殘基以下，較佳為9個胺基酸殘基以下，更佳為8個胺基酸殘基以下，更佳為7個胺基酸殘基以下，更佳為6個胺基酸殘基以下，更佳為5個胺基酸殘基以下，更佳為4個胺基酸殘基以下，更佳為3個胺基酸殘基以下，更佳為2個胺基酸殘基以下，最佳為1個胺基酸殘基。

【0071】又，已知於哺乳類培養細胞所生產的抗體之重鏈之羧基末端的離胺酸殘基會缺失(Journal of Chromatography A, 705: 129-134(1995))，又，已知相同

爲重鏈羧基末端之甘胺酸、離胺酸之2個胺基酸殘基會缺失，而新位於羧基末端的脯胺酸殘基會被醯胺化 (Analytical Biochemistry, 360 : 75-83(2007))。然而，此等之重鏈序列的缺失及修飾並不會對抗體之抗原結合能力及效應子 (effector) 機能 (補體的活性化或抗體依存性細胞毒殺作用等) 發生影響。所以，本發明亦包含受到該修飾的抗體，可列舉於重鏈羧基末端中有1或2個之胺基酸缺失的缺失體、及經醯胺化的該缺失體 (例如，羧基末端部位之脯胺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機能，則與本發明有關的抗體之重鏈之羧基末端的缺失體並未限定於上述之種類。構成與本發明有關的抗體的2條重鏈可爲選自包含完全長度及上述之缺失體之群組的重鏈之任一種，亦可爲將任二種組合者。各缺失體的量比雖會受產生與本發明有關的抗體的哺乳類培養細胞之種類及培養條件所影響，但就與本發明有關的抗體之主成分而言，可列舉於2條重鏈雙方，羧基末端之1個胺基酸殘基有缺失的情形。

【0072】二種類之胺基酸序列間的相同性係可藉由使用 Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), 「Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs」, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) 之默認參數 (default parameter) 來決定。Blast algorithm 亦可藉由於網際網路存取

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast來使用。又，藉由上述之 Blast algorithm，而計算同一性 (Identity(或 Identities))及正確性 (Positivity(或 Positivities))之 2 種類之百分比的值。前者係於應謀求同一性的二種類之胺基酸序列之間胺基酸殘基一致的情形之值，後者係亦考慮化學構造類似的胺基酸殘基之數值。於本說明書中，係將胺基酸殘基一致的情形的同一性 (Identity) 之值當作是相同性之值。

【0073】所獲得的抗體可純化至均一。抗體之分離、純化係使用於通常之蛋白質所使用的分離、純化方法即可。例如若適宜選擇、組合管柱層析、過濾器過濾、超過率、鹽析、透析、調製用聚丙烯醯胺膠體電泳、等電點電泳等，就可將抗體分離、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))，但未限定於此等。

【0074】就層析而言，可列舉親和性層析、離子交換層析、疏水性層析、膠體過濾層析、逆相層析、吸附層析等。

【0075】此等之層析可使用 HPLC、FPLC 等之液體層析來進行。

【0076】就於親和性層析使用的管柱而言，可列舉 Protein A 管柱、Protein G 管柱。

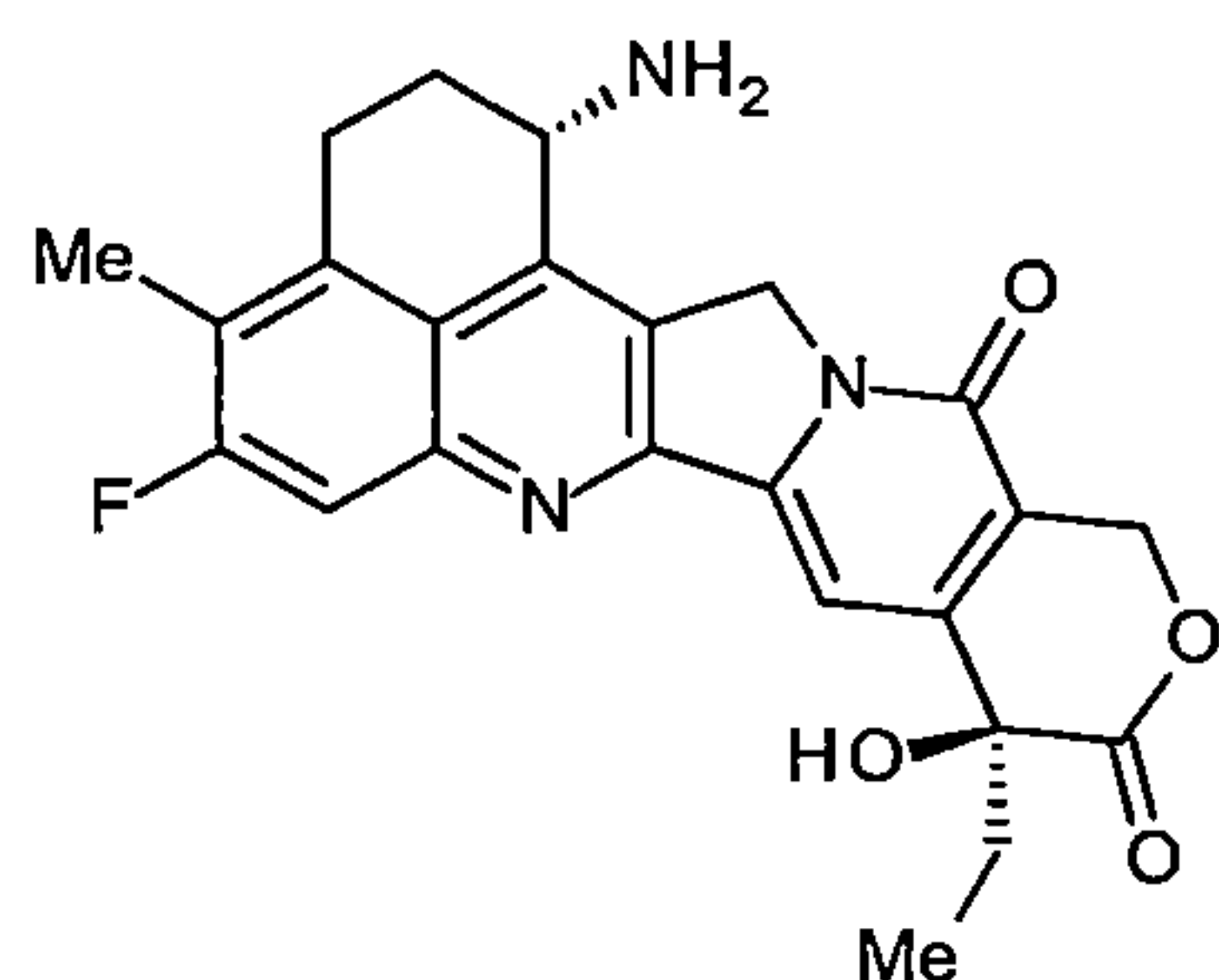
【0077】2.藥物

本發明所使用的藥物為具有抗腫瘤效果的化合物，只要是具有可與連結物構造結合的取代基、部分構造者，則無特別限制。藥物係連結物的一部分或全部於腫瘤細胞內被切斷而抗腫瘤性化合物部分被游離而表現抗腫瘤效果。若連結物於與藥物的結合部分被切斷，則抗腫瘤性化合物會以原本的構造被游離，而發揮其原本的抗腫瘤效果。雖使藥物藉由特定構造之連結物部分與抗體結合，但於本說明書，有時亦將包含此藥物與連結物部分的藥物連結物稱為藥物。

【0078】就抗腫瘤性化合物而言，可列舉例如，卡奇黴素(calicheamicin)、阿黴素(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、絲裂黴素C(mitomycin C)、博來黴素(bleomycin)、環胞苷(cyclocytidine)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、順鉑(cisplatin)或其衍生物、奧里斯他汀(auristatin)或其衍生物、美坦生(maytansine)或其衍生物、塔克素(taxol)或其衍生物、喜樹鹼或其衍生物等，較佳為依喜替康或單甲基奧里斯他汀E。

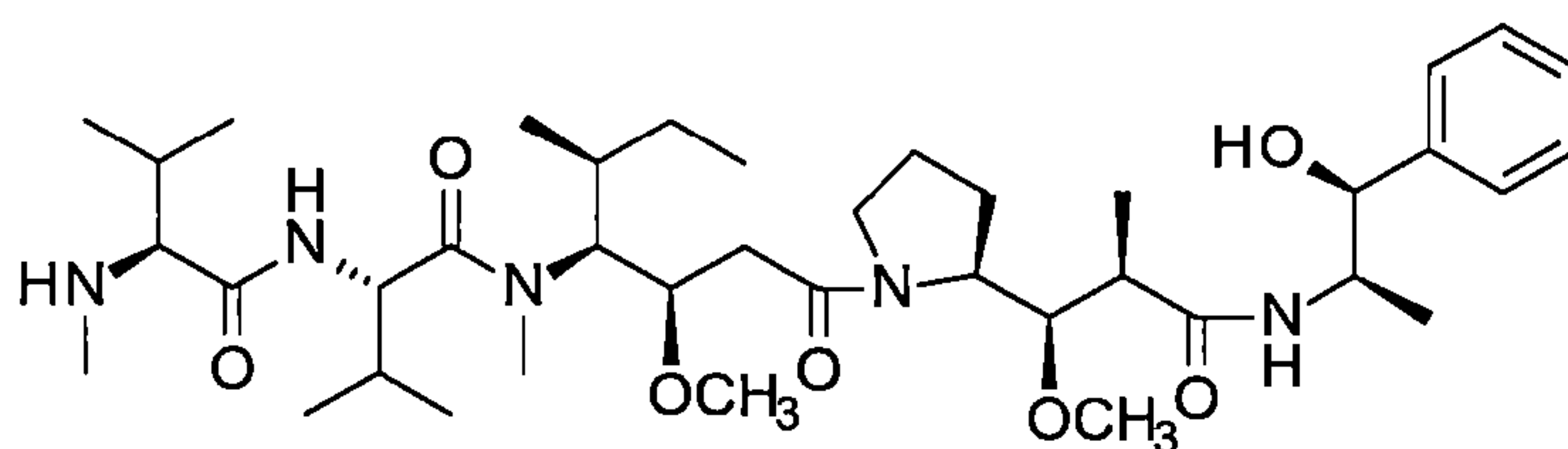
【0079】為喜樹鹼衍生物的依喜替康((1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]呸喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)係下式所表示的化合物。

【0080】



【0081】單甲基奧里斯他汀E((2R,3R)-N-[(1R,2S)-1-甲基-2-羥基-2-苯基乙基]-2-甲基-3-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-4-[(N-甲基-L-Val-L-Val)-(甲基)胺基]-5-甲基庚醯基]-2-吡咯啶基]-3-甲氧基丙醯胺)係下式所表示的化合物。

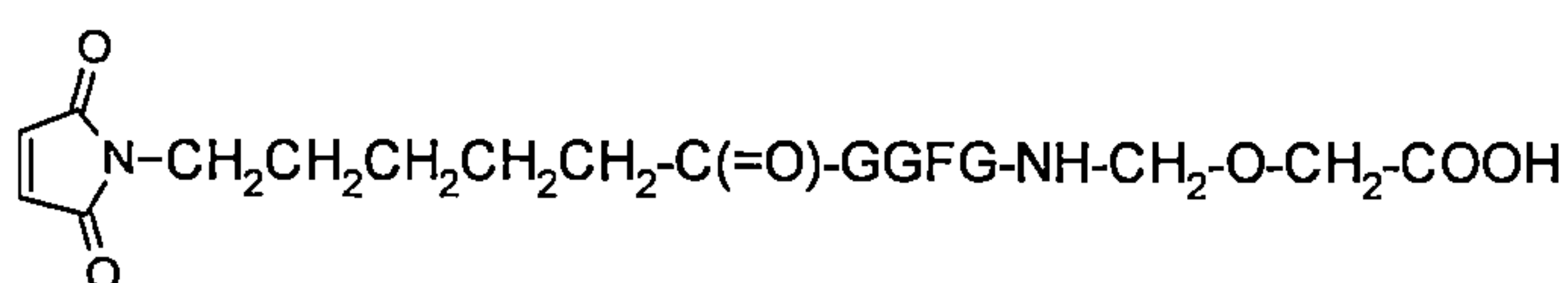
【0082】

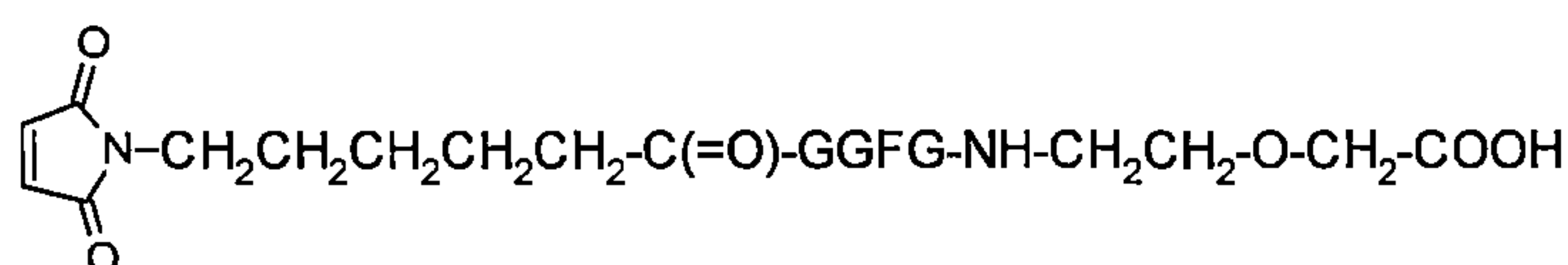


【0083】3.連結物

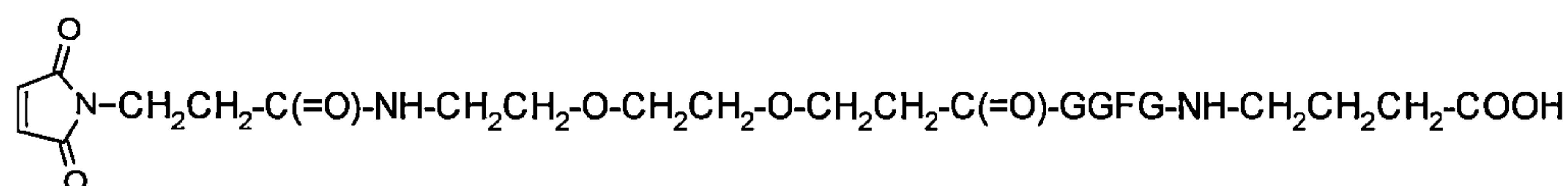
本發明所使用的藥物係介隔連結物而能與抗體結合。本發明所使用的連結物係較佳為具有N-取代順丁烯二醯亞胺基。連結物可列舉開裂型連結物及非開裂型連結物。就開裂型連結物而言，可列舉例如，藉由溶酶體(lysosome)蛋白酶、胞內體(endosome)蛋白酶等之細胞內蛋白酶而開裂的胜肽連結物。

【0084】本發明所使用的連結物係較佳為由下列任一者所誘導的構造：

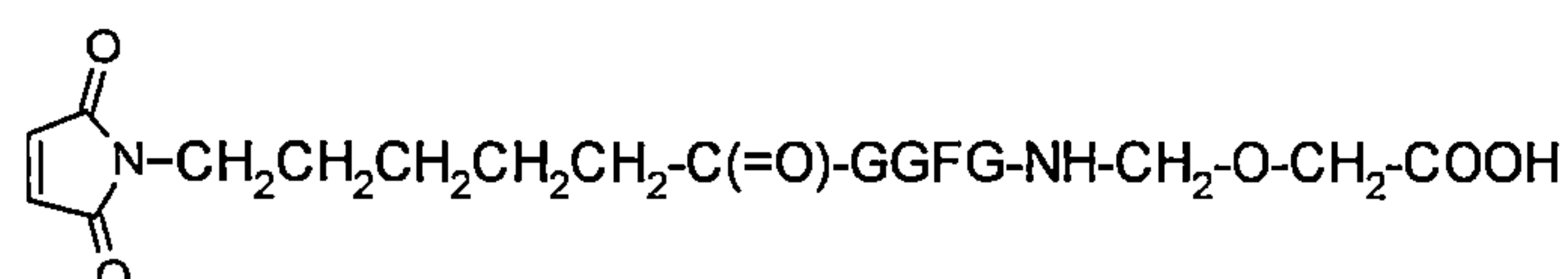




、或



【0085】更佳為由



所誘導的構造。

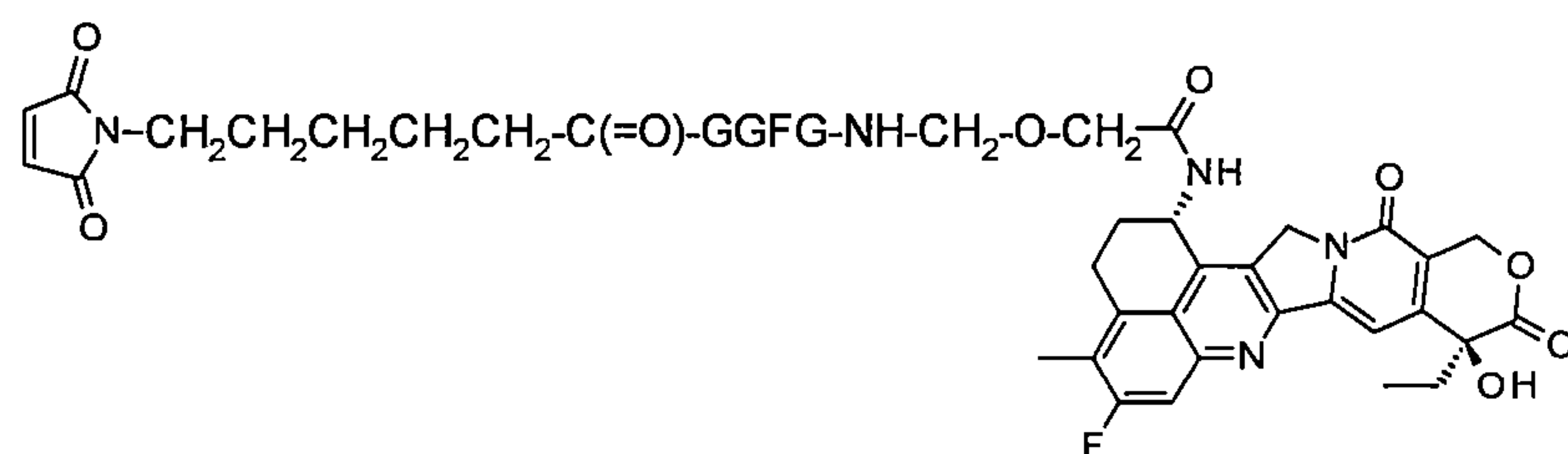
【0086】「GGFG」係包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基。

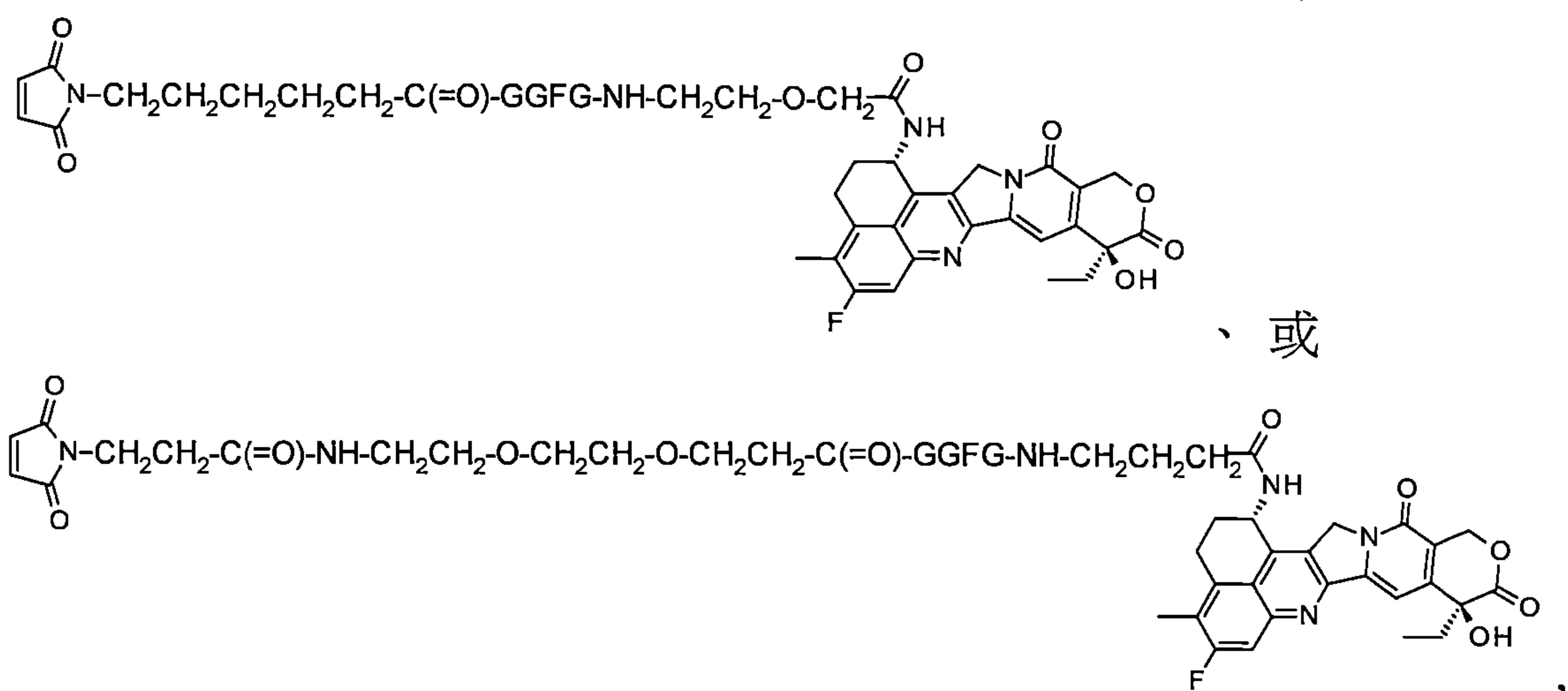
【0087】本發明所使用的連結物係可以按照例如 WO2014/057687 之實施例 58 記載的方法而調製。

【0088】4. 藥物連結物中間體

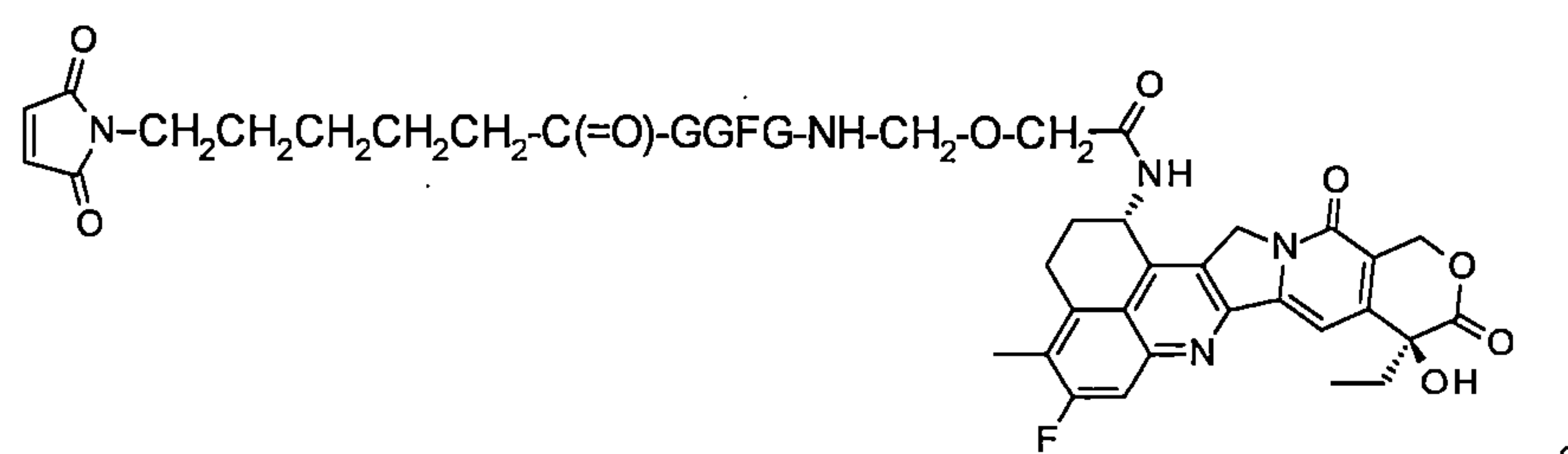
本發明所使用的藥物連結物中間體係可藉由使用縮合劑等，使上述連結物化合物之羧基與抗腫瘤化合物之胺基反應而製造。

【0089】本發明之方法所使用的藥物連結物中間體係若為被提供於與抗體之鏈間硫醇基的反應的化合物則未特別被限定，但較佳為具有 N-取代順丁烯二醯亞胺基的化合物，更佳為





【0090】又更佳為



【0091】本發明所使用的藥物連結物中間體係可按照例如，WO2014/057687之實施例58、實施例43及實施例14記載的方法來調製。

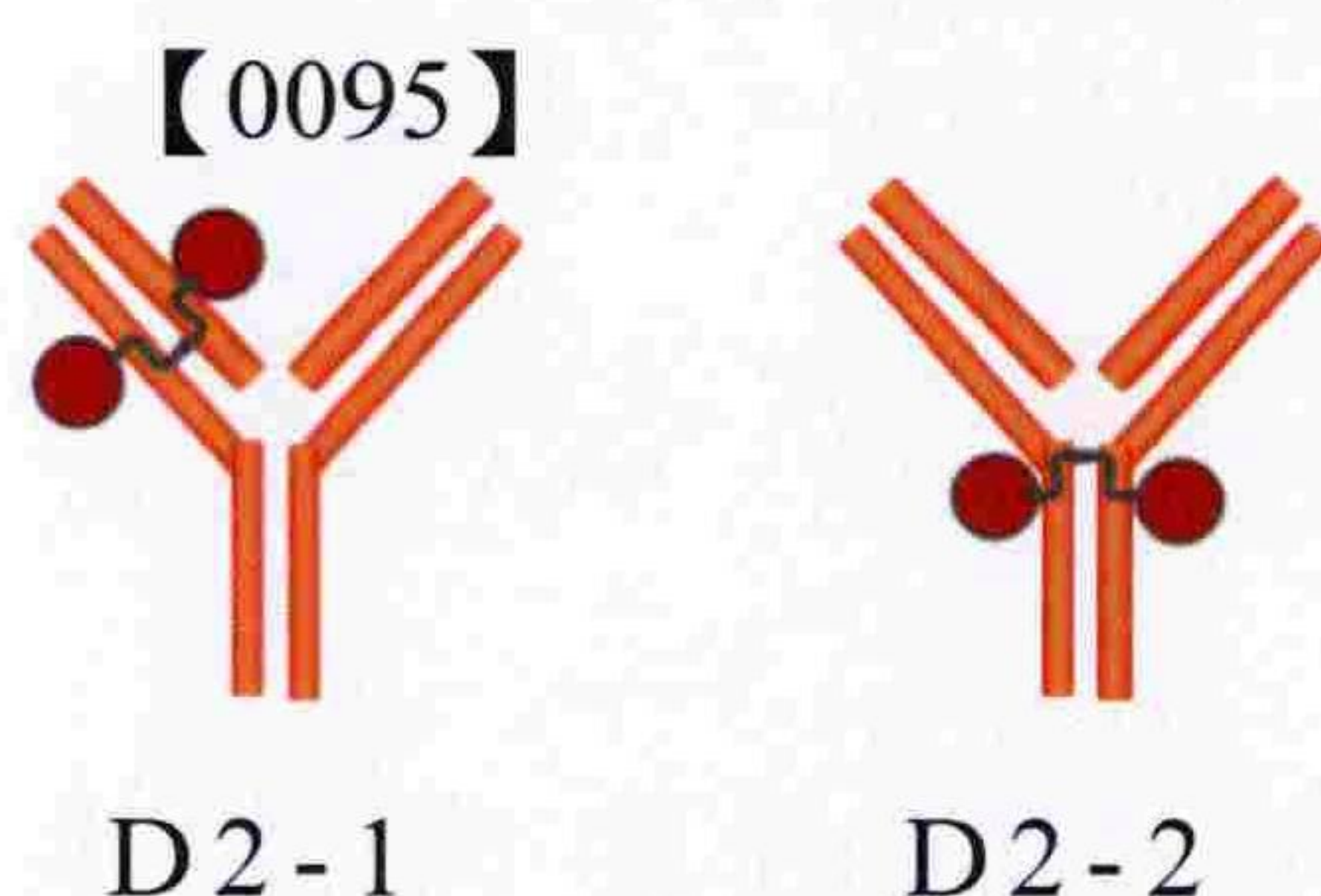
【0092】又，若為具有N-取代順丁烯二醯亞胺基的藥物連結物中間體，則可藉由使與因抗體之鏈間雙硫鍵的還原所生成的鏈間硫醇基反應，而使抗體與藥物介隔連結物而結合。因此，就藥物連結物中間體而言，較佳為具有N-取代順丁烯二醯亞胺基的化合物，但未被限定於此，只要具有會進行與抗體之鏈間硫醇基的反應的官能基，就可適用於本發明之製造方法。

【0093】5. 抗體-藥物結合物

於抗體-藥物結合物中，藥物對抗體1分子的結合數係影響其有效性、安全性的重要因子。由於抗體中有4

個鏈間雙硫鍵存在，且雙硫鍵係由2個硫醇基所構成，所以藥物對抗體1分子的結合數係成為2個、4個、6個、或8個。

【0094】就每1抗體分子有2個藥物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D2」)而言，係有於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D2-1」)、及於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D2-2」)存在。

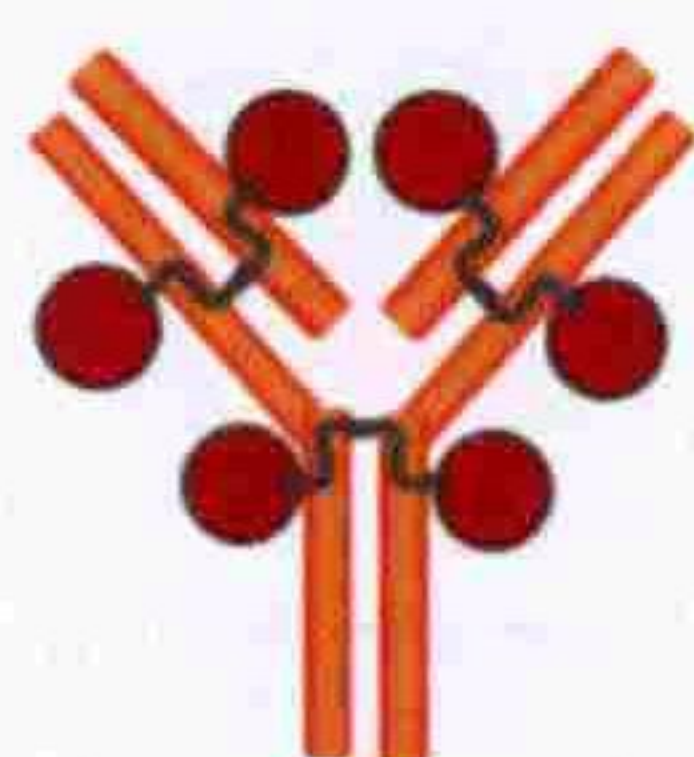


【0096】就每1抗體分子有4個藥物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D4」)而言，係有於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D4-1」)、於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D4-2」)、及於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合且於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D4-3」)存在。

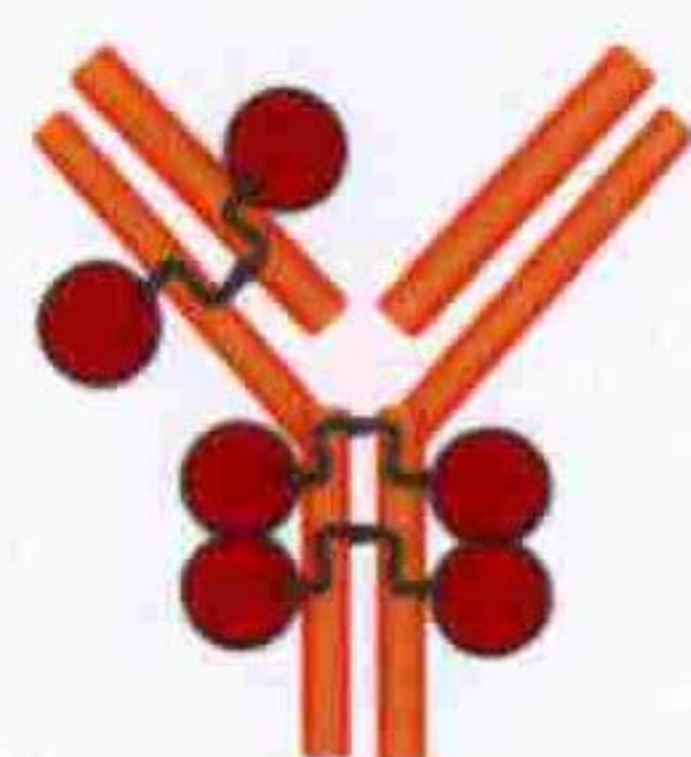


【0098】就每1抗體分子有6個藥物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D6」)而言，係有於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合且於重鏈-重鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D6-1」)、及於重鏈-輕鏈間硫醇基有2個藥物連結物結合且於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D6-2」)存在。

【0099】



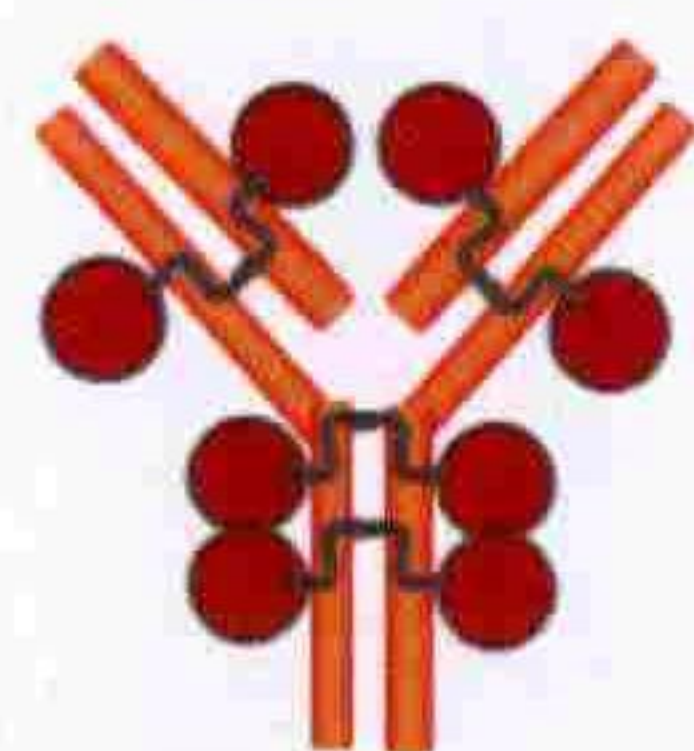
D6-1



D6-2

【0100】就每1抗體分子有8個藥物結合的抗體-藥物結合物(以下，亦稱為「D8」)而言，係有於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合且於重鏈-重鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物存在。

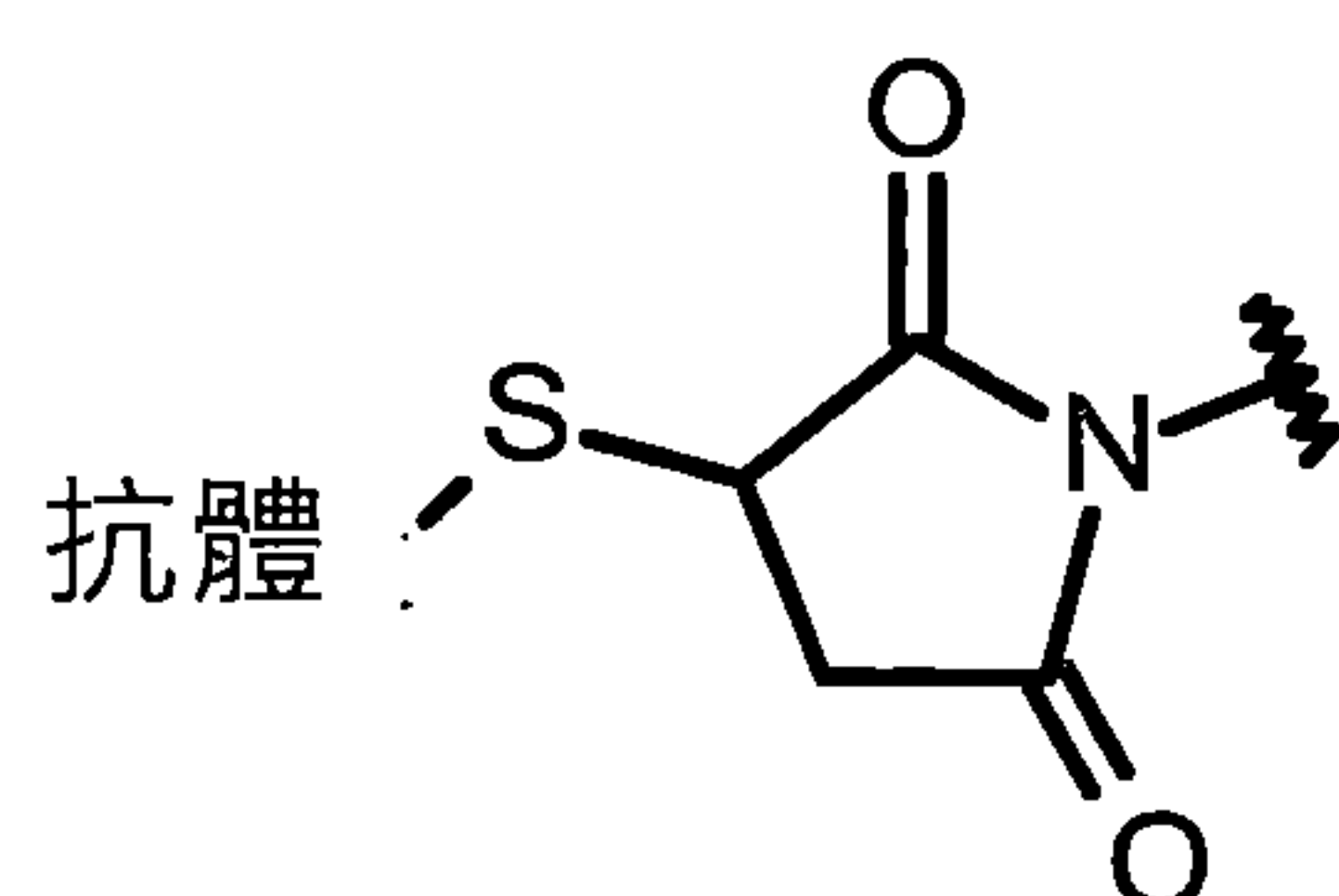
【0101】



D8

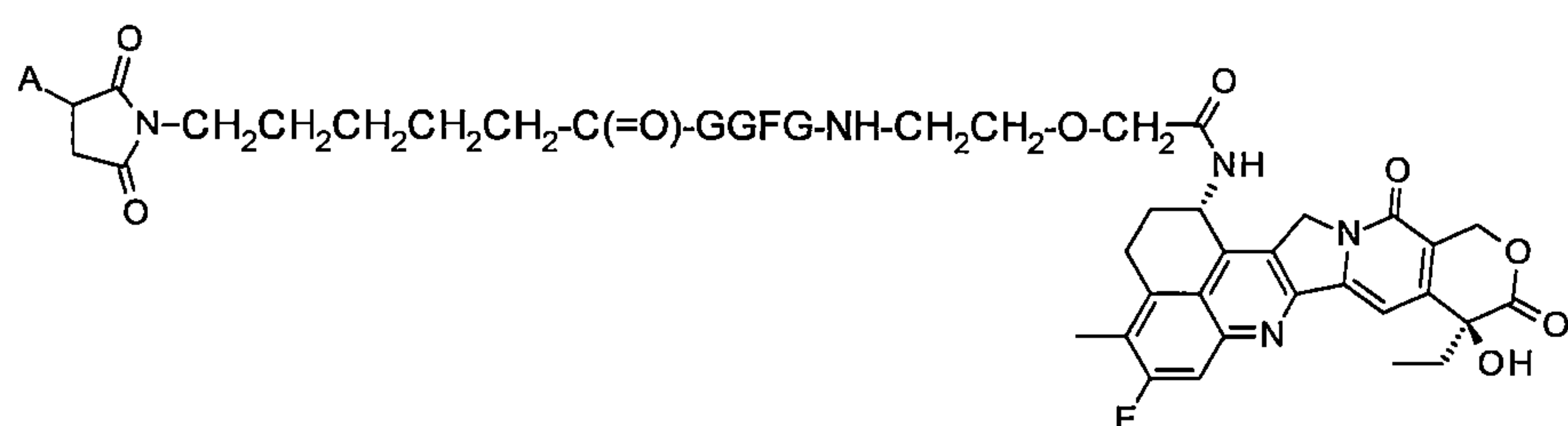
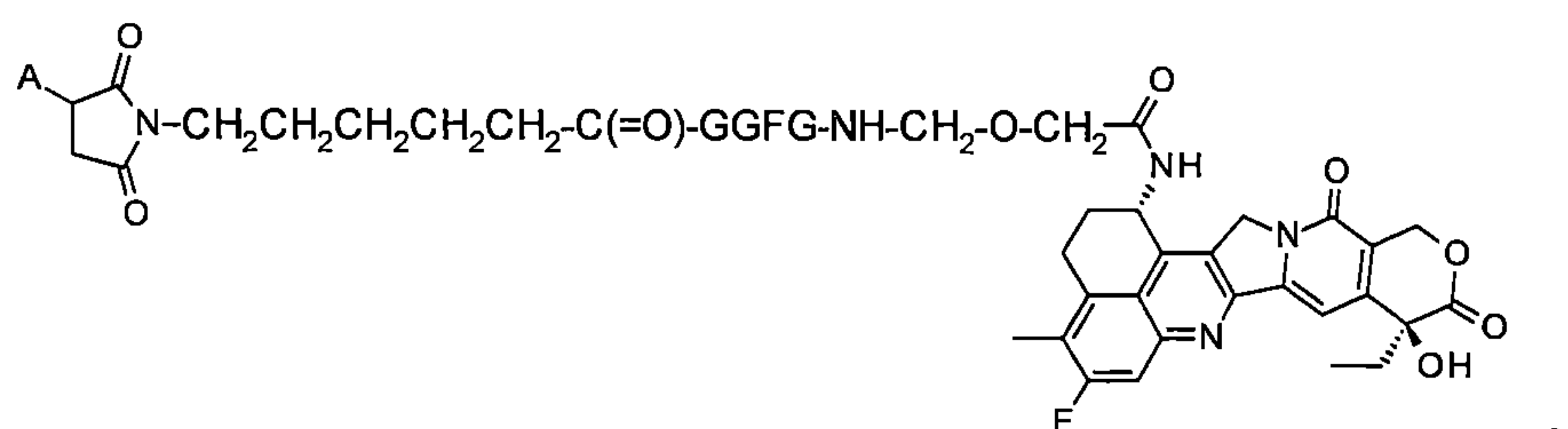
【0102】抗體之鏈間硫醇基係例如，與藥物連結物中間體之N-取代順丁烯二醯亞胺基的3位，形成硫醚而鍵結。即，抗體與藥物連結物之結合部分係例如，下式所示者：

【0103】

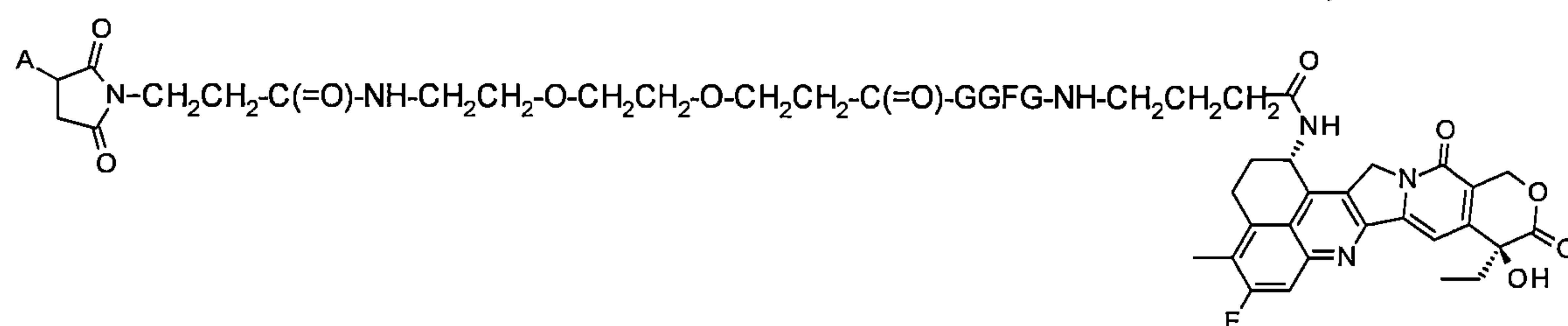


(式中，「抗體-S-」係來自抗體)。

【0104】就藥物連結物而言，較佳為

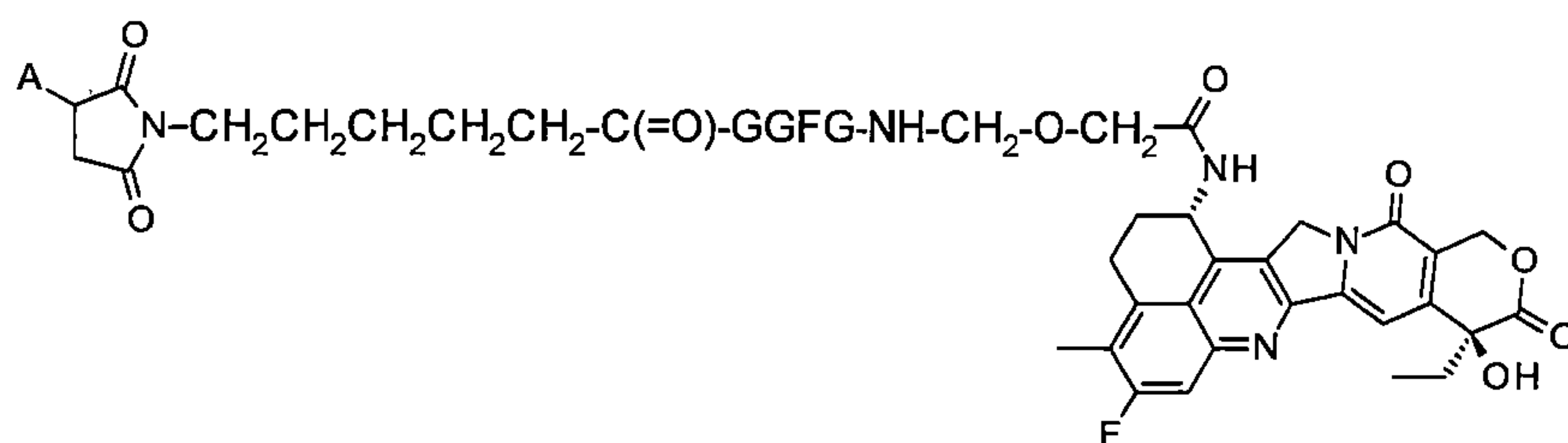


、或



(其中，式中之 A 表示與抗體之結合位置)，更佳為

【0105】



(其中，式中之 A 係表示與抗體之結合位置)。

【0106】抗體-藥物結合物之製造係以藥物之結合數

被控制的方式，規定使進行反應的原料・試藥的使用量等之反應條件而實施，但與低分子化合物之化學反應不同，通常會獲得不同數目的藥物結合的混合物。藥物對抗體1分子之結合數為平均值，即，被特定、標記為平均藥物結合數。

【0107】本發明之製造方法係製造藥物結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物的方法，係包含：選擇性將抗體之重鏈-輕鏈間雙硫鍵還原而變換為硫醇基的第一步驟；藉由使藥物連結物中間體對具有硫醇基的抗體反應，而製造藥物結合數及結合位置被控制的抗體-藥物結合物組成物的第二步驟。以下詳細說明各步驟。

【0108】(第一步驟)抗體之還原

具有硫醇基的抗體可藉由使抗體於緩衝液中、 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ 與還原劑反應而製造。

【0109】就反應溫度而言，較佳為 $-5\sim 5^{\circ}\text{C}$ ，更佳為 $-3\sim 3^{\circ}\text{C}$ ，又更佳為 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ ，又更佳為 $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 。

【0110】還原劑之量係每1抗體分子為 $1\sim 4$ 莫耳當量，較佳為 $2\sim 3$ 莫耳當量。

【0111】就還原劑而言，可使用例如，參(2-羧基乙基)膦或其鹽、二硫蘇糖醇、2-巯基乙醇等，較佳為參(2-羧基乙基)膦或其鹽，更佳為參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽。

【0112】就緩衝液而言，可使用組胺酸緩衝液、磷酸緩衝液、硼酸緩衝液、乙酸緩衝液、HEPES(4-(2-羥基乙基)-1-哌咍乙烷磺酸)緩衝液等，較佳為組胺酸緩衝液。

【0113】緩衝液較佳為包含螯合劑。就螯合劑而言，

可使用例如伸乙二胺四乙酸(以下，亦稱為「EDTA」)或二伸乙三胺五乙酸等，較佳為伸乙二胺四乙酸。此等以1～20mM之濃度使用即可。

【0114】就反應時間而言，較佳為1～15小時，更佳為3～10小時，又更佳為5～7小時。

【0115】就反應時之pH而言，為pH5～9，較佳為pH6～8，更佳為pH6.8～7.2。

【0116】(第二步驟)抗體與藥物連結物中間體之結合可藉由使藥物連結物中間體對第一步驟所獲得之具有硫醇基的抗體反應，而製造抗體-藥物結合物組成物。就使用的藥物連結物中間體之量而言，每1抗體分子為2～10莫耳當量，較佳為4～6莫耳當量。

【0117】具體而言，於含有第一步驟所獲得之具有硫醇基的抗體之緩衝液中，添加使藥物連結物中間體溶解的溶液而使反應即可。

【0118】就使藥物連結物中間體溶解的溶媒而言，可使用50%丙酮水溶液、80%乙醇水溶液、80%甲醇水溶液、80%異丙醇水溶液、80%二甲基亞砷水溶液、二甲基亞砷(DMSO)、二甲基甲醯胺(DMF)、二甲基乙醯胺(DMA)、N-甲基-2-吡咯啉酮(NMP)等之有機溶媒，較佳為50%丙酮水溶液或80%二甲基亞砷水溶液。

【0119】使藥物連結物中間體溶解的有機溶媒溶液，係於含有具有硫醇基的抗體之緩衝液中添加1～20%v/v而使反應即可。

【0120】就反應溫度而言，較佳為-10～10℃，更佳為

-5 ~ 5℃，又更佳為 0 ~ 2℃。

【0121】就反應時間而言，較佳為 0.5 ~ 2 小時。

【0122】結合反應係藉由利用含有硫醇基的試藥使未反應之藥物連結物中間體之反應性失活而可終止。

【0123】就含有硫醇基的試藥而言，可使用例如，半胱胺酸或 N-乙醯基-L-半胱胺酸。更具體而言，可藉由相對於使用的藥物連結物中間體，添加 1 ~ 2 莫耳當量之 N-乙醯基-L-半胱胺酸，於室溫使反應 10 ~ 30 分鐘，而使反應結束。

【0124】就結合物之反應後的純化而言，係使用市售之超過濾膜等而可純化。可一邊添加乙酸緩衝液、組胺酸緩衝液、磷酸緩衝液等，一邊使用超過濾膜將低分子部分去除。超過濾膜係適當者即可，但可為 1kDa ~ 100kDa，較佳為 30kDa 之超過濾膜。

【0125】6. 抗體-藥物結合物組成物之鑑定

所製造的抗體-藥物結合物組成物係可藉由以下之操作而進行濃縮、緩衝液交換、純化、抗體濃度及平均藥物結合數之測定，並進行抗體-藥物結合物組成物之鑑定。

【0126】(1) 抗體或抗體-藥物結合物水溶液之濃縮

可於 Amicon Ultra(50,000 MWCO、Millipore Corporation)之容器內置入抗體或抗體-藥物結合物溶液，以使用離心機(Allegra X-15R、Beckman Coulter, Inc.)的離心操作(於 2000G ~ 3800G 離心 5 ~ 20 分鐘)，而將抗體或抗體-藥物結合物溶液濃縮。

【0127】(2)抗體之濃度測定

可使用UV測定器(Nanodrop 1000、Thermo Fisher Scientific Inc.)，按照製造商規定的方法，而進行抗體濃度之測定。此時，對各抗體使用相異的280nm吸光係數($1.3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1} \sim 1.8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

【0128】(3)抗體之緩衝液交換

將使用Sephadex G-25擔體的NAP-25管柱(目錄編號17-0852-02、GE Healthcare Japan Corporation)，按照製造商規定的方法，以含氯化鈉(137mM)及伸乙二胺四乙酸(5mM)的磷酸緩衝液(10mM、pH6.0；於本說明書有稱為「PBS6.0/EDTA」的情形)平衡化。對此NAP-25管柱每一根，放置抗體水溶液2.5mL後，分取以PBS6.0/EDTA3.5mL溶出的劃分(3.5mL)。可於將此劃分以與上述(1)相同的方法濃縮，並以與上述(2)同樣之方法進行抗體濃度的測定之後，使用PBS6.0/EDTA而調整抗體濃度。

【0129】(4)抗體-藥物結合物組成物之純化

以含山梨糖醇(5%)的乙酸緩衝液(10mM、pH5.5；於本說明書有稱為「ABS」的情形)，將NAP-25管柱平衡化。於此NAP-25管柱，置入抗體-藥物結合物反應水溶液(2.5mL)，以製造商規定之量的緩衝液來溶出，以分取抗體劃份。將此分取劃份再置入NAP-25管柱，重複進行以緩衝液使溶出的膠體過濾純化操作共計2至3次，以獲得除去未結合的藥物連結物中間體、低分子化合物(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽、N-乙醯基-L-半胱胺酸及二甲基亞

礪)的抗體-藥物結合物組成物。

【0130】(5)抗體-藥物結合物組成物之利用疏水管柱層析的分離法

(5-1)HPLC測定方法

以下述之測定條件進行HPLC分析。

HPLC系統：島津科學HPLC系統

檢測器：紫外吸光度計(測定波長：280nm)

管柱：TSKgel Butyl-NPR(4.6×100mm、2.5μm; TOSOH股份有限公司)

管柱溫度：30℃

移動相A：含1.5M硫酸銨的25mM磷酸緩衝液(pH7.0)水溶液

移動相B：含75%之25mM磷酸緩衝液(pH7.0)及25%之異丙醇的混合溶液

梯度程式：20%-60%(0分鐘-20分鐘)、20%-80%(20-20.1分鐘)、80%-80%(20.1-23分鐘)、80%-20%(23分鐘-23.1分鐘)、20%-20%(23.1分鐘-40分鐘)

樣品注入量：2μL

【0131】(5-2) 數據解析

本數據由於係依管柱的特性，自藥物結合數低的抗體-藥物結合物依序藉由鹽濃度的差而被溶出，藉由測量各個的面積值，而可推定藥物結合數之分布。其波峰係按照溶出順序成為D0(藥物連結物未結合的抗體)、D2、D4-1、D4-2、D6、D8，可把握其分布狀況。

【0132】利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物

結合物組成物中的藥物結合數為4的抗體-藥物結合物之含有率係50%以上。

【0133】利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物中的D4-1之含有率係50%以上、或50～90%、50～80%、50～70%、或50～60%之範圍。

【0134】利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物中的D4-2之含有率係較佳為5%以下，更佳為1%以下。

【0135】利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物中的D4-3之含有率係較佳為5%以下，更佳為1%以下。

【0136】(6)抗體-藥物結合物組成物中的抗體濃度及平均藥物結合數之測定(UV法)

抗體-藥物結合物組成物中的結合藥物濃度係可藉由測定抗體-藥物結合物水溶液之280nm及370nm之二波長中的UV吸光度後，進行下述之計算而算出。

【0137】因某波長中的全吸光度相等於系統內存在的全部吸收化學物種之吸光度之和〔吸光度之加成性〕，而若假設於抗體與藥物之結合前後，於抗體及藥物之莫耳吸光係數無變化，則抗體-藥物結合物中的抗體濃度及藥物濃度係如下述之關係式所示。

【0138】

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \varepsilon_{D,280} C_D + \varepsilon_{A,280} C_A \quad \text{式(1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \varepsilon_{D,370} C_D + \varepsilon_{A,370} C_A \quad \text{式(2)}$$

此處， A_{280} 表示280nm中的抗體-藥物結合物水溶液

之吸光度， A_{370} 表示370nm中的抗體-藥物結合物水溶液之吸光度， $A_{A,280}$ 表示280nm中的抗體之吸光度， $A_{A,370}$ 表示370nm中的抗體之吸光度， $A_{D,280}$ 表示280nm中的結合物前驅物之吸光度， $A_{D,370}$ 表示370nm中的結合物前驅物之吸光度， $\epsilon_{A,280}$ 表示280nm中的抗體之莫耳吸光係數， $\epsilon_{A,370}$ 表示370nm中的抗體之莫耳吸光係數， $\epsilon_{D,280}$ 表示280nm中的結合物前驅物之莫耳吸光係數， $\epsilon_{D,370}$ 表示370nm中的結合物前驅物之莫耳吸光係數， C_A 表示抗體-藥物結合物組成物中的抗體濃度， C_D 表示抗體-藥物結合物組成物中的藥物濃度。

【0139】此處， $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 、 $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 係使用事先準備的值(自計算推定值或化合物之UV測定所獲得的實測值)。例如， $\epsilon_{A,280}$ 可自抗體之胺基酸序列，藉由已知之計算方法(Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423)推定。 $\epsilon_{A,370}$ 係通常為零。 $\epsilon_{D,280}$ 及 $\epsilon_{D,370}$ 可藉由測定使使用的結合物前驅物溶解為某莫耳濃度的溶液之吸光度，藉由朗伯-比爾定律(Lambert-Beer law)(吸光度=莫耳濃度×莫耳吸光係數×胞光徑長)而獲得。可藉由測定抗體-藥物結合物水溶液之 A_{280} 及 A_{370} ，將此等之值帶入式(1)及式(2)，解出連立方程式，而求得 C_A 及 C_D 。可藉由進一步將 C_D 除 C_A 而求得每1抗體之平均藥物結合數。

【0140】(7)抗體-藥物結合物組成物中的抗體每一分子之平均藥物結合數之測定(RPC法)

抗體-藥物結合物組成物中的抗體每一分子的平均藥物結合數係除了前述之UV法，亦可藉由使用以下之逆

層層析(Reversed Phase Chromatography(RPC))法的高速液體層析(HPLC)分析而求得。

【0141】(7-1)HPLC分析用樣品之調製(抗體-藥物結合物之還原)

將抗體-藥物結合物溶液(約1mg/mL、60 μ L)與二硫蘇糖醇(DTT)水溶液(100mM、15 μ L)混合。將藉由於37 $^{\circ}$ C保溫混合物30分鐘而切斷抗體-藥物結合物之鏈間雙硫鍵的樣品用於HPLC分析。

【0142】(7-2)HPLC分析

以下述之測定條件進行HPLC分析。

HPLC系統：Agilent 1290 HPLC系統(Agilent Technologies)

檢測器：紫外吸光度計(測定波長：280nm)

管柱：PLRP-S(2.1 $\times$ 50mm、8 μ m、1000Å；Agilent Technologies、P/N PL1912-1802)

管柱溫度：80 $^{\circ}$ C

移動相A：0.04%三氟乙酸(TFA)水溶液

移動相B：含0.04%TFA的乙腈溶液

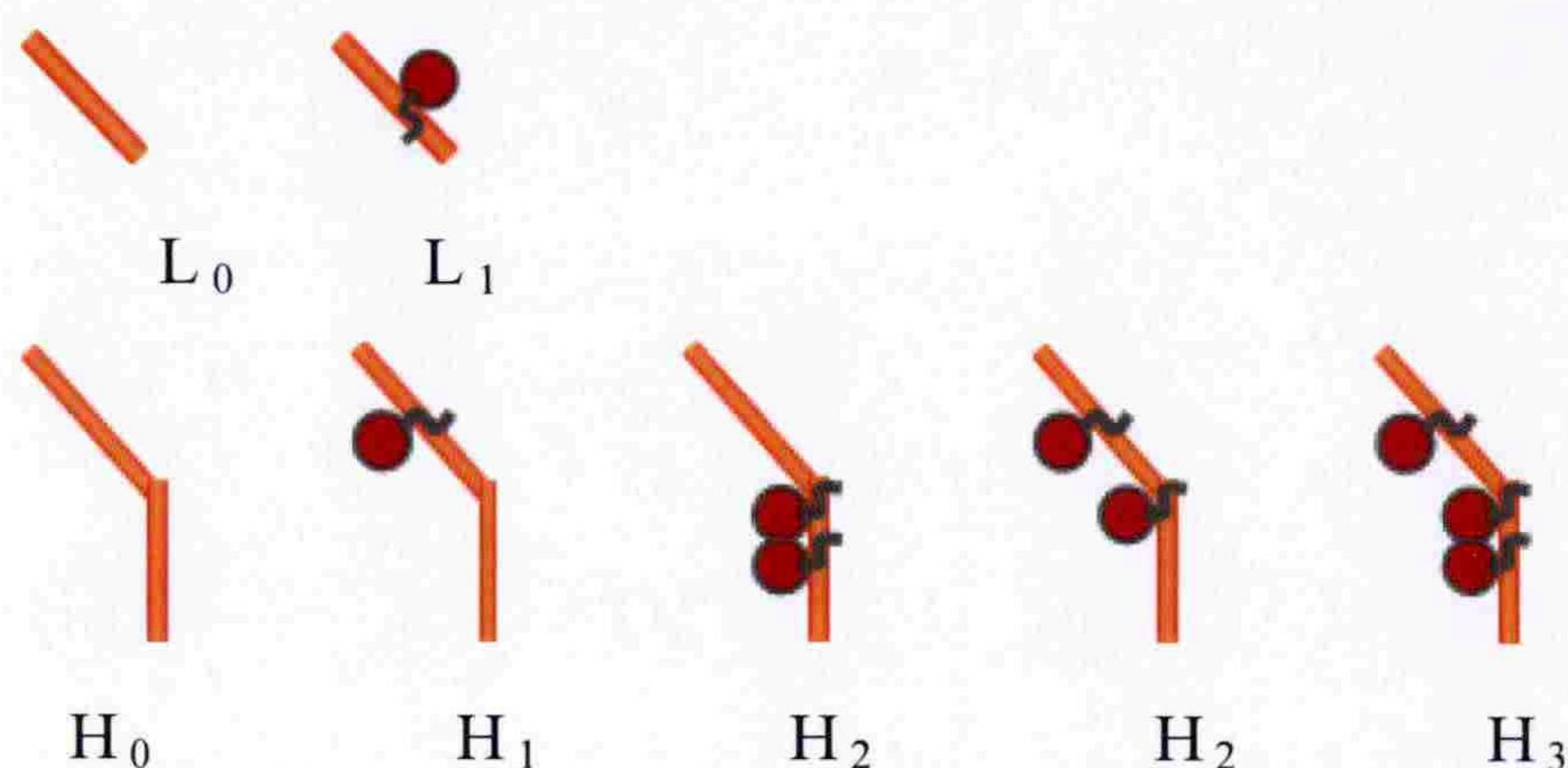
梯度程式：29%-36%(0分鐘-12.5分鐘)、36%-42%(12.5-15分鐘)、42%-29%(15分鐘-15.1分鐘)、29%-29%(15.1分鐘-25分鐘)

樣品注入量：15 μ L

【0143】(7-3)數據解析

(7-3-1)相對於藥物未結合的抗體之輕鏈(L₀)及重鏈(H₀)，藥物結合的輕鏈(有一個藥物結合的輕鏈：L₁)及重

鏈(有一個藥物結合的重鏈： H_1 、有二個藥物結合的重鏈： H_2 、有三個藥物結合的重鏈： H_3)，係與結合的藥物數成比例地疏水性增加且保持時間變大，因此以 L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 之順序被溶出。可藉由 L_0 及 H_0 之保持時間比較，而將檢出波峰分配為 L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 之任一者。



【0144】(7-3-2) 因於藥物連接物有UV吸收，而因應藥物連接物之結合數，使用輕鏈、重鏈及藥物連接物之莫耳吸光係數，按照下式進行波峰面積值之補正。

輕鏈波峰面積補正值(L_i)

=波峰面積

$$\times \frac{\text{輕鏈之莫耳吸光係數}}{\text{輕鏈之莫耳吸光係數} + \text{藥物結合數} \times \text{藥物連接物之莫耳吸光係數}}$$

重鏈波峰面積補正值(H_i)

=波峰面積

$$\times \frac{\text{重鏈之莫耳吸光係數}}{\text{重鏈之莫耳吸光係數} + \text{藥物結合數} \times \text{藥物連接物之莫耳吸光係數}}$$

此處，各抗體中的輕鏈及重鏈之莫耳吸光係數(280nm)係可使用藉由已知之計算方法(Protein Science,

1995, vol.4, 2411-2423)自各抗體之輕鏈及重鏈之胺基酸序列所推定的值。又，藥物連結物之莫耳吸光係數(280nm)係可使用以巯基乙醇或N-乙醯基半胱胺酸使各藥物連結物中間體反應，而將N-取代順丁烯二醯亞胺基變換為琥珀醯亞胺硫醚之化合物的實測之莫耳吸光係數(280nm)。

【0145】(7-3-3)按照下式計算相對於波峰面積補正值合計之各鏈波峰面積比(%)。

$$\text{輕鏈波峰面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0}+A_{L1}} \times 100$$

$$\text{重鏈波峰面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0}+A_{H1}+A_{H2}+A_{H3}} \times 100$$

A_{Li} , A_{Hi} : L_i , H_i 各個之波峰面積補正值

若有 L_1 及 H_1 優先地產生，則可推定為重鏈-輕鏈間雙硫鍵被選擇性地還原者，若有 L_0 及 H_2 優先地產生，則可推定為重鏈-重鏈間雙硫鍵被選擇性地還原者。

【0146】(7-3-4)按照下式計算抗體-藥物結合物組成物中的平均藥物結合數。

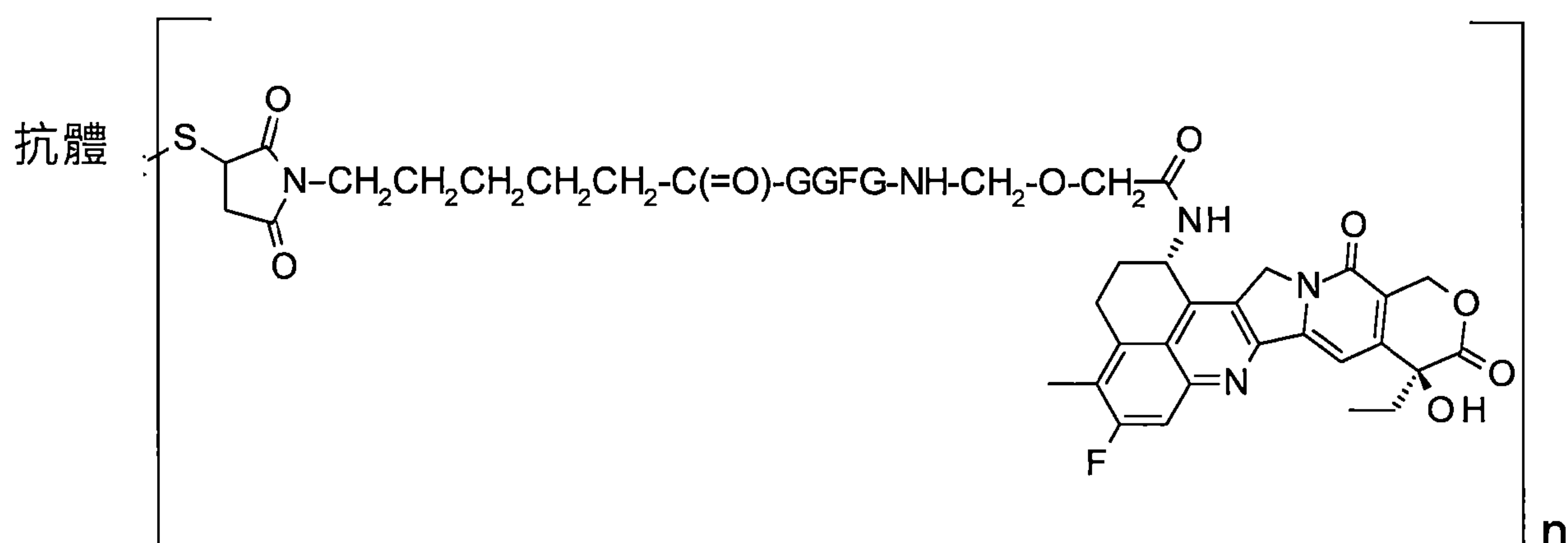
$$\text{平均藥物結合數} = (L_0\text{波峰面積比} \times 0 + L_1\text{波峰面積比} \times 1 + H_0\text{波峰面積比} \times 0 + H_1\text{波峰面積比} \times 1 + H_2\text{波峰面積比} \times 2 + H_3\text{波峰面積比} \times 3) / 100 \times 2$$

【0147】利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數係較佳為 3.5 ~ 4.5，更佳為 4.0 ~ 4.1。

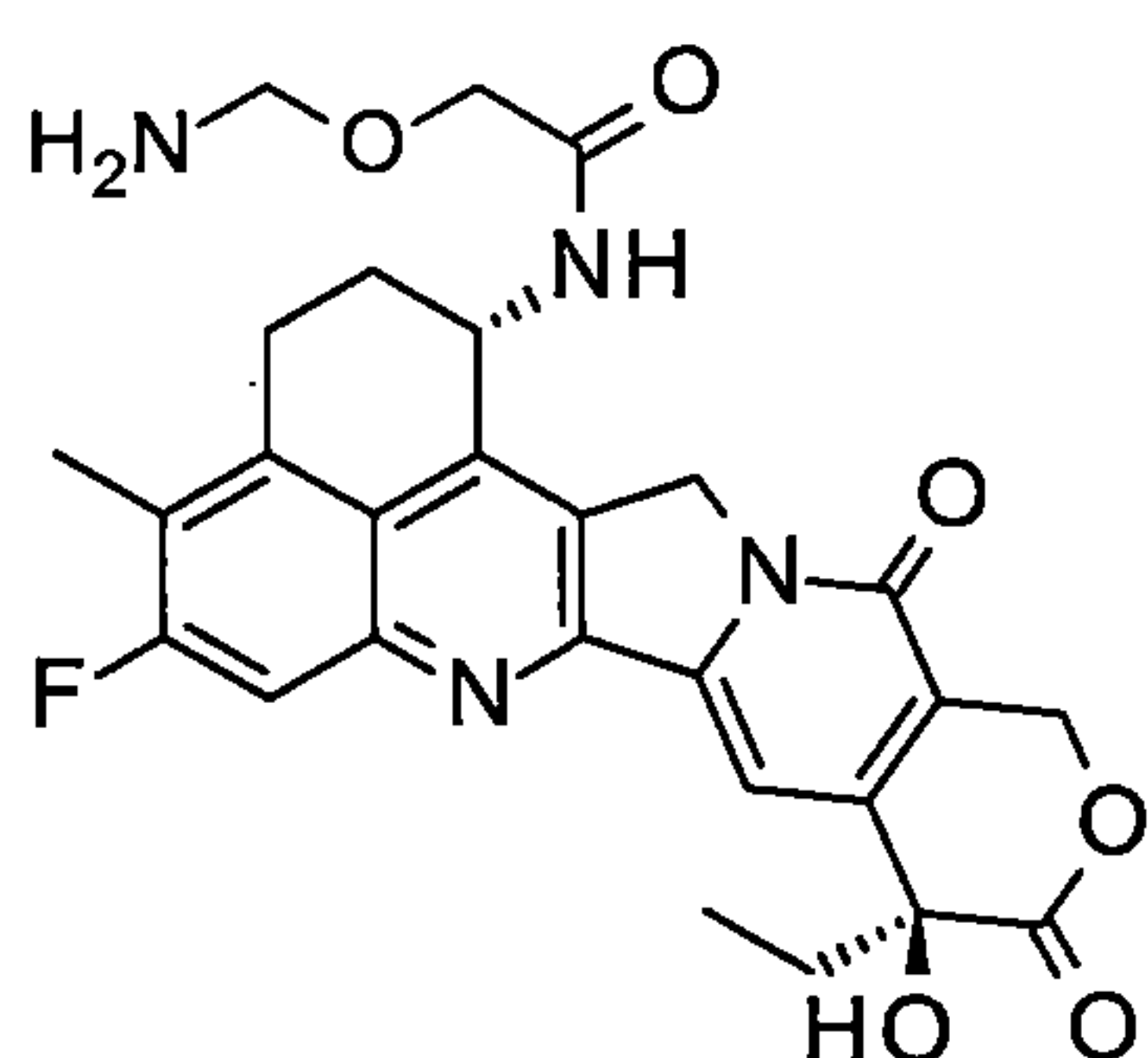
【0148】 7.含有抗體-藥物結合物組成物的醫藥

利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物係於移動至腫瘤細胞內後，連結物部分被切斷，而藥物於腫瘤細胞內被游離。

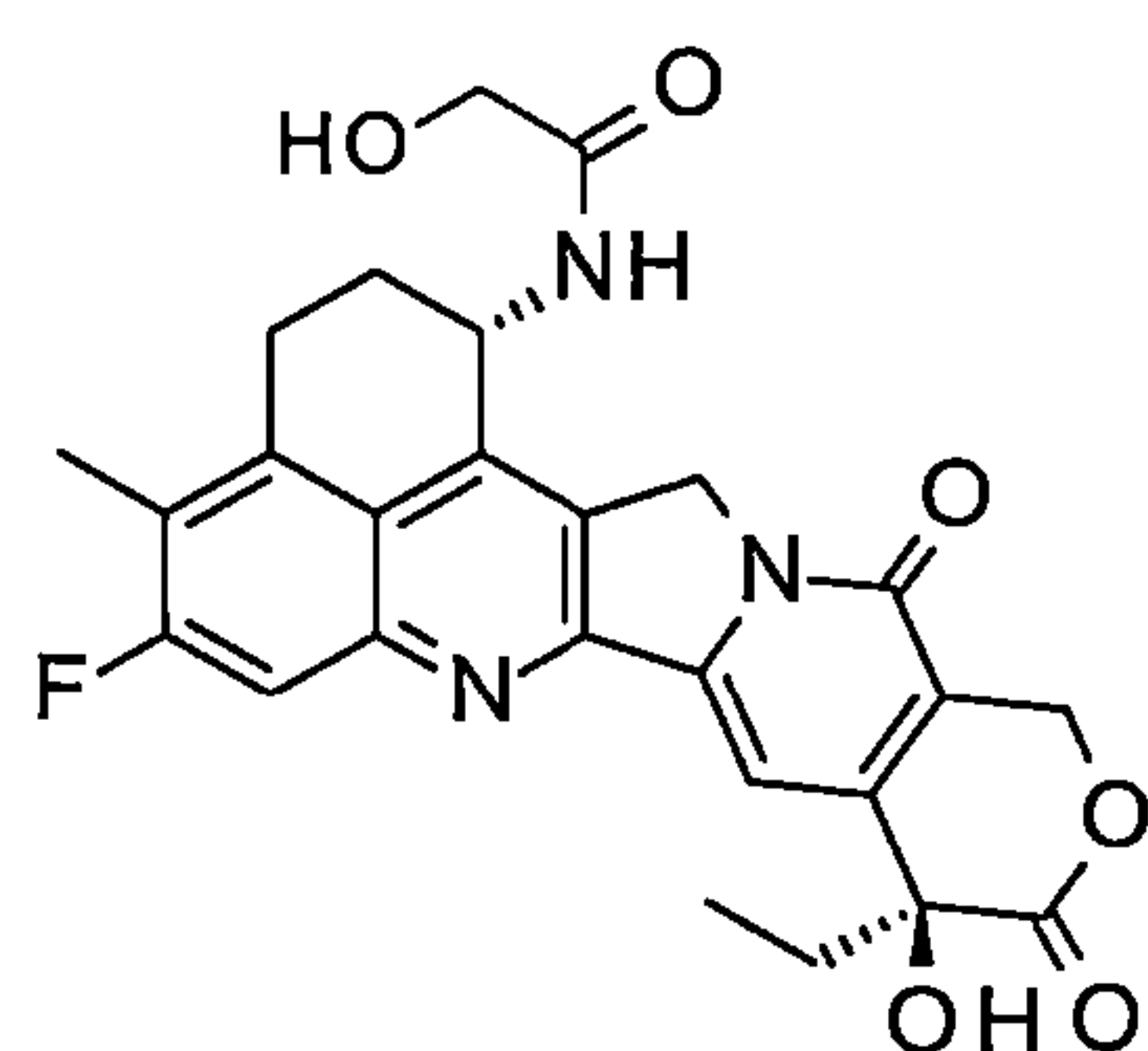
【0149】 於下式所表示的抗體-藥物結合物之情形



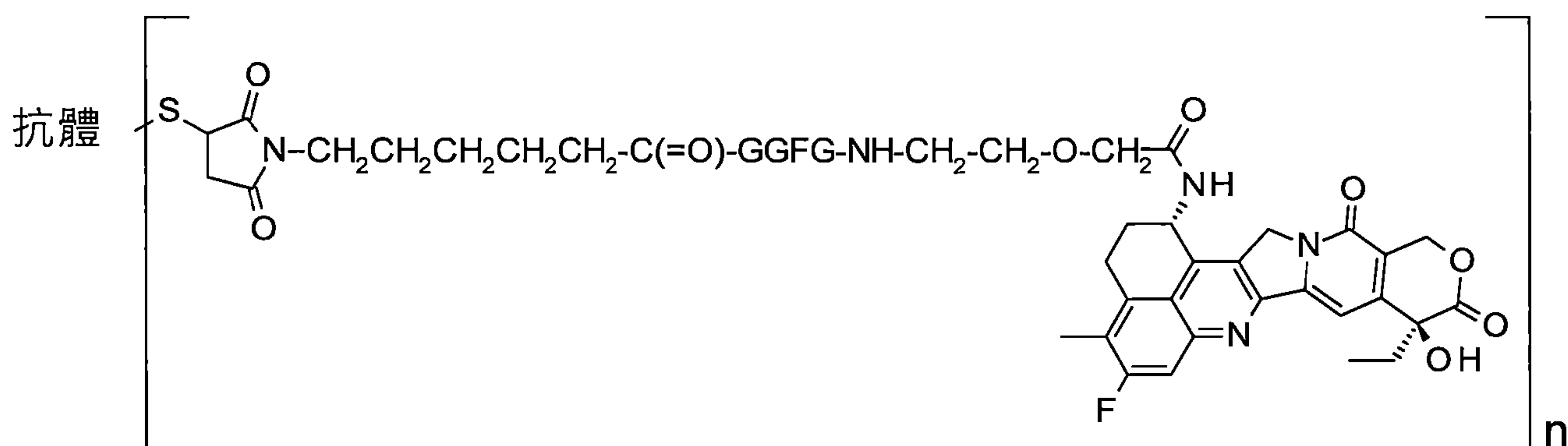
，下式所表示的化合物被游離。



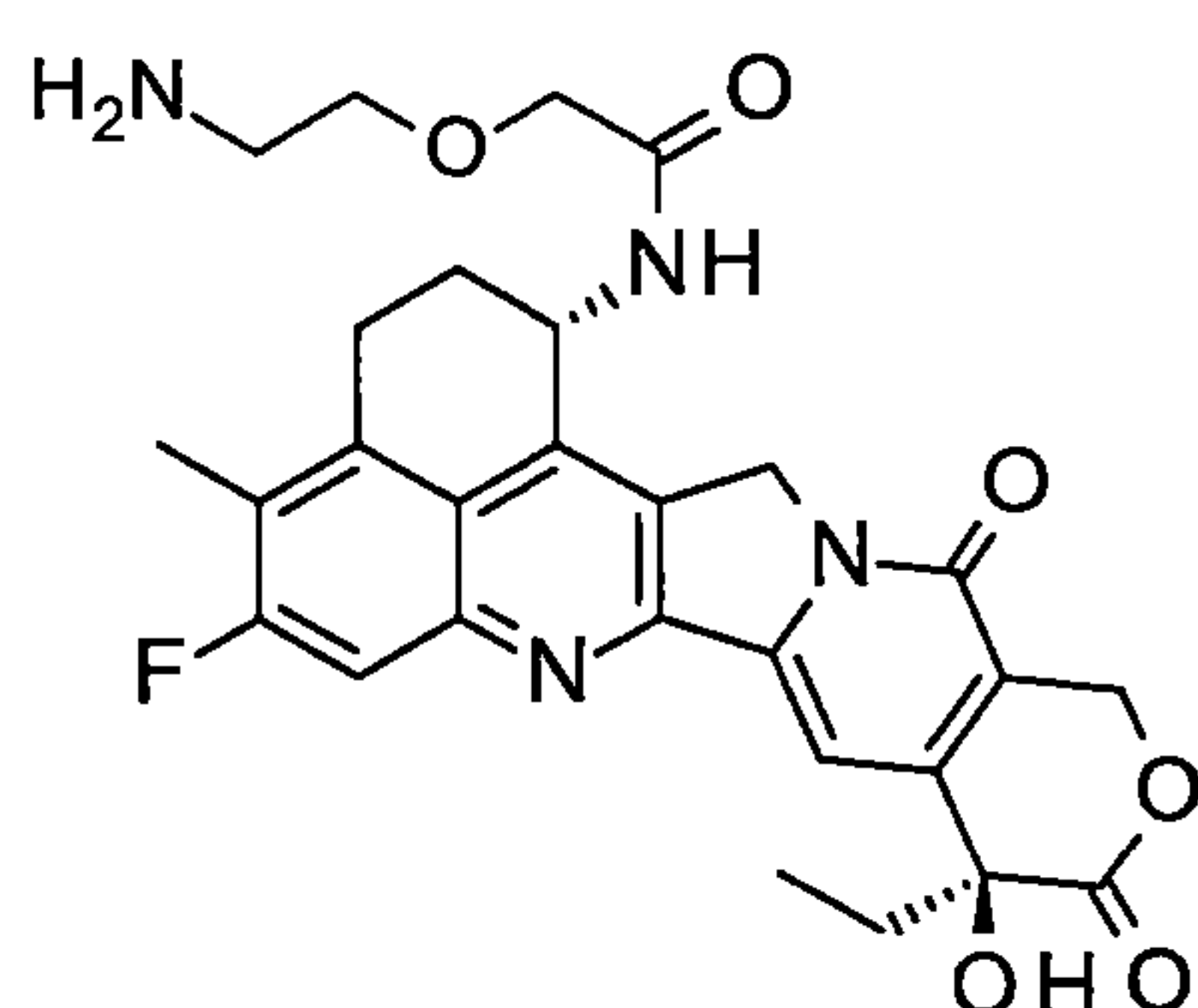
【0150】 又，該化合物由於具有不安定的胺縮醛 (aminal)構造，而會進一步被水解，生成下式所表示的化合物。



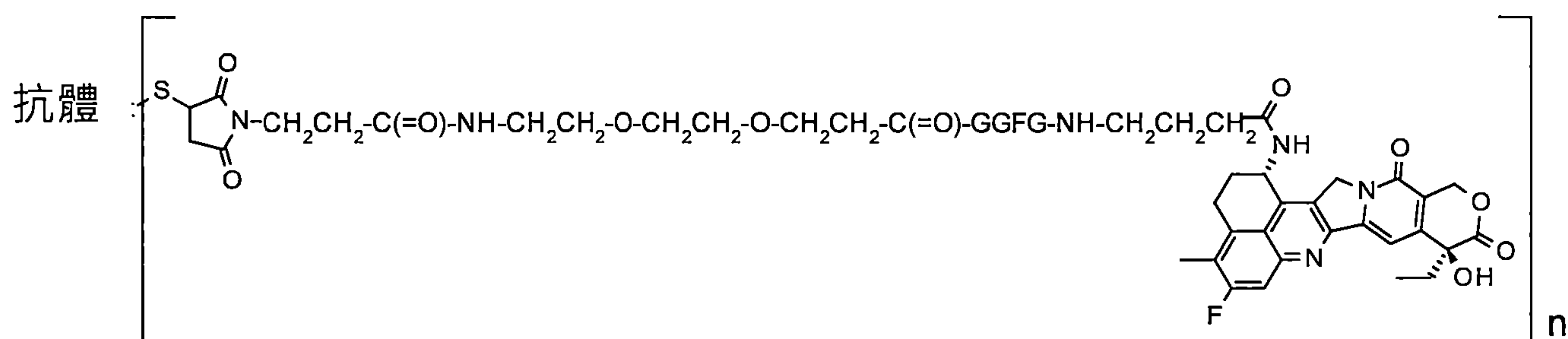
於生成下式所表示的抗體-藥物結合物之情形



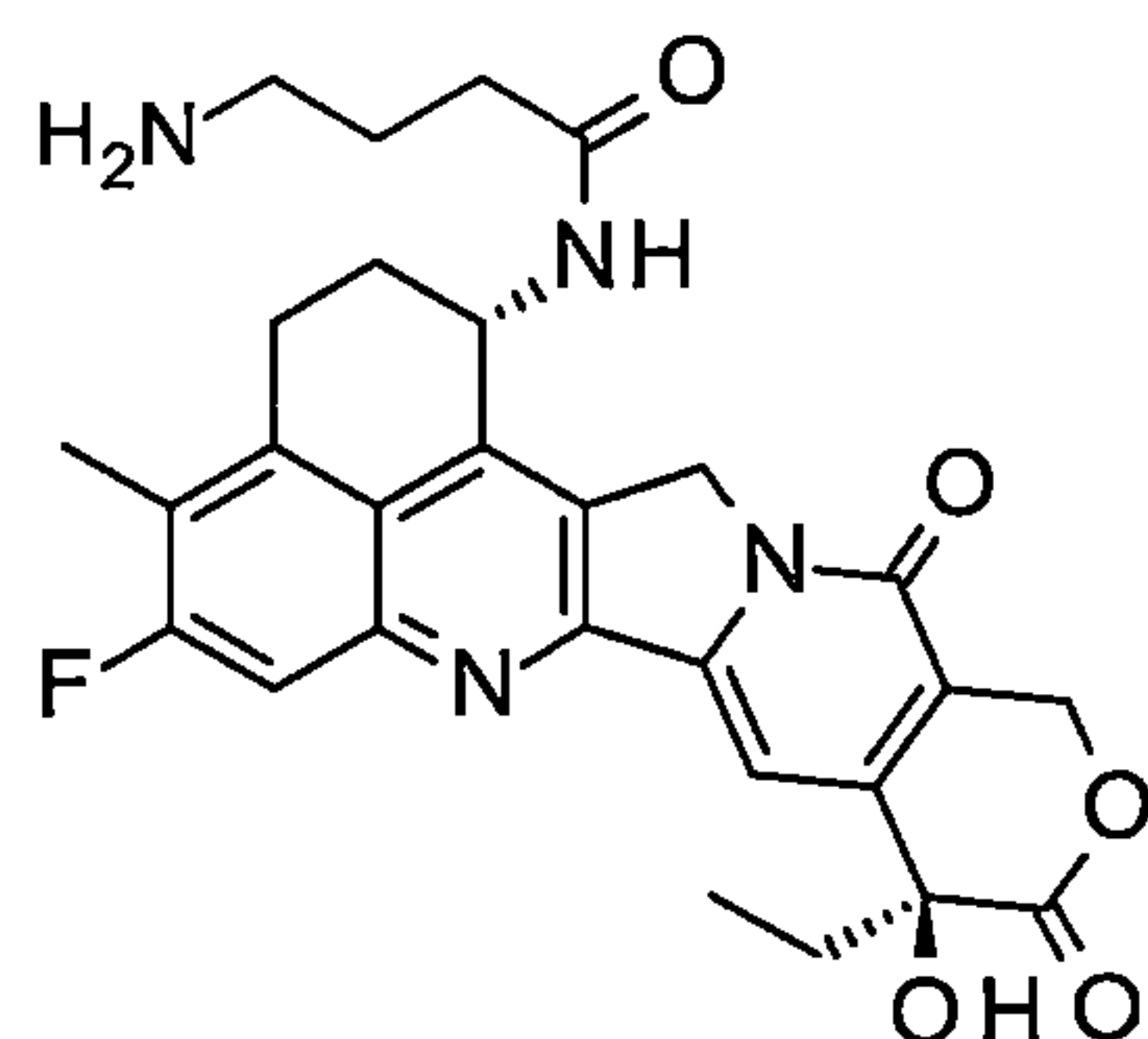
下式所表示的化合物被游離。



於下式所表示的抗體-藥物結合物之情形



下式所表示的化合物被游離。



【0151】利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物因顯示對癌細胞的細胞傷害活性，故可使用作為用於

抗癌的治療及/或預防之醫藥組成物的有效成分。

【0152】亦即利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物，係可選擇而使用作為癌治療之主要治療法的化學療法用之藥劑，而作為其結果，可使癌細胞之成長延遲、抑制增殖、進而破壞癌細胞。藉由此等，而可達成於癌患者解除癌所致的症狀、QOL之改善，保持癌患者之生命而達成治療效果。即使未達到癌細胞之破壞的情形，亦可藉由癌細胞之增殖之抑制或控制，而可一邊於癌患者達成更高的QOL，並達成更長期之生存。

【0153】於此種藥物療法中之藥物單獨的使用之外，於輔助療法中亦可作為與其他療法組合的藥劑來使用，可與外科手術、或放射線療法、荷爾蒙療法等組合。再者，亦可作為新輔助療法(neoadjuvant therapy)中的藥物療法之藥劑來使用。

【0154】如以上的治療性使用之外，亦可期待抑制微細的轉移癌細胞之增殖，甚至是破壞的效果。可期待例如，於轉移過程，抑制並破壞體液中之癌細胞的效果、或對於剛著床於任一組織之微細的癌細胞的抑制、破壞等之效果。因此，尤其可期待於外科性地去除癌後之癌轉移的抑制、預防效果。

【0155】利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物對於患者來說，除了作為全身療法而全身性投予之外，可於癌組織局部投予而期待治療效果。

【0156】就癌之種類而言，可列舉肺癌、腎癌、尿道上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多形性神經膠質母細胞瘤

、卵巢癌、胰癌、乳癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、子宮體癌、頭頸部癌、食道癌、胆道癌、甲狀腺癌、淋巴瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、多發性骨髓瘤等，但未限定於此等。

【0157】利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物可使用作為用於治療自體免疫疾病之醫藥組成物、或用於抑制對移植的排斥反應之醫藥組成物的有效成分。

【0158】含有利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物的醫藥組成物，於被投予至哺乳動物(例如，人類、馬、牛、豬等，較佳為人類)的情形，可全身性或局部性被投予，較佳為以非經口被投予。

【0159】作為非經口之投予路徑，可列舉皮內、肌肉內、腹腔內、靜脈內及皮下的路徑，但未限定於此等。就投予方法而言，可列舉例如，注入、團式注射(bolus injection)等，但較佳為注入。

【0160】本發明之醫藥組成物係應因投予方法來選擇適當的形態，並藉由通常使用的各種製劑之調製法而可調製。例如，可將利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物、與記載於 E.W.Martin 之「Remington's Pharmaceutical Sciences」等之經滅菌的液體(例如，包含水及油(石油、動物、植物、或合成起源之油(例如，花生油、大豆油、礦物油、芝麻油等)))、食鹽水溶液、右旋糖水溶液、甘油水溶液等之溶劑、濕潤劑、乳化劑、pH緩衝化劑等之添加劑等混合而調製本發明之醫藥組

成物。

【0161】本發明之醫藥組成物亦可含有可溶化劑、用以緩和注射部位的疼痛之局部麻醉劑(例如，利卡多因(lignocaine))等。本發明之醫藥組成物亦可以將有效成分與溶劑等置入各別容器的態樣而被供給。又，本發明之醫藥組成物係藉由注入而被投予的情形，亦可以例如含有有效成分及滅菌的製藥等級的水或食鹽水的注入瓶被投予。本發明之醫藥組成物係藉由注射而被投予的情形，亦可於投予前將有效成分與注射用滅菌水或食鹽水混合而被投予。

【0162】本發明之醫藥組成物亦可含有抗體-藥物結合物組成物及至少一種之其以外之癌治療劑。利用本發明所獲得的抗體-藥物結合物組成物亦可與其他癌治療劑一起投予，可藉此而使抗癌效果增強。以此種目的所使用的其他抗癌劑亦可與抗體-藥物結合物組成物同時地、各別地、或連續被投予至個體，亦可變換各自之投予間隔而投予。就此種癌治療劑而言，可列舉卡鉑(carboplatin)、順鉑(cisplatin)、吉西他濱(gemcitabine)、愛萊諾迪肯(irinotecan(CPT-11))、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、蕾莎瓦(sorafenib)、長春鹼(vinblastine)、國際公開第WO2003/038043號小冊所記載的藥劑，再者可列舉LH-RH類似物(亮丙瑞林(leuprorelin)、戈舍瑞林(goserelin)等)、磷酸雌二醇氮芥(estramustine phosphate)、雌激素(estrogen)拮抗藥(他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)等)、芳香環轉化

酵素 (aromatase) 阻礙劑 (阿那曲唑 (anastrozole)、利妥唑 (letrozole)、依西美坦 (exemestane) 等) 等，但只要具有抗腫瘤活性的藥劑即可，並未限定於此等。

【0163】本發明之醫藥組成物亦可被提供來作為冷凍乾燥製劑或液狀製劑。於被提供來作為冷凍乾燥製劑的情形，亦可為含有此領域所使用的適當之製劑添加物的製劑。又於液狀製劑中亦同樣地，可為含有此領域所使用的適當之製劑添加物的製劑。

【0164】本發明之醫藥組成物的組成及有效成分的濃度亦依投予方法而變化，但本發明之醫藥組成物所含的抗體-藥物結合物組成物，係於抗體-藥物結合物對抗原的親和性，即對抗原的解離常數 (K_d 值) 之點，親和性越高 (K_d 值越低)，則越是即使少量之投予量亦可使藥效發揮。據此，於抗體-藥物結合物之投予量之決定時，亦可基於抗體-藥物結合物與抗原之親和性的狀況來設定投予量。於將利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物對人類投予之際，例如，將約 0.001 ~ 100 mg/kg 以 1 次或是 1 ~ 180 日 1 次之間隔複數次投予即可。

【0165】藉由以下所示實施例而具體說明本發明，但本發明並未限定於此等例。又，此等在任何的意義上皆未被限定地解釋。又，於本說明書中，未特別記載之試藥、溶劑及起始材料係可自市售之供給源容易地取得。

[實施例]

【0166】(實施例 1) 人類化抗 TROP2 抗體表現載體之構築及抗體之生產

(i)人類化抗 TROP2 抗體重鏈 (hTINA1-H1) 表現載體之構築

合成 DNA 片段 (GENEART 公司人工基因合成服務)，該 DNA 片段包含序列表之序列識別號 2 所示的人類化抗 TROP2 抗體重鏈 (hTINA1-H1) 之核苷酸序列之核苷酸編號 36 ~ 437 所示的編碼人類化抗 TROP2 抗體重鏈 (hTINA1-H1) 之可變區的 DNA 序列。將合成的 DNA 片段作為模板，以 KOD-Plus-(TOYOBO 公司) 及下述之引子組將包含編碼人類化抗 TROP2 抗體重鏈 (hTINA1-H1) 之可變區的 DNA 序列的 DNA 片段放大，於將嵌合及人類化抗體 IgG1 型重鏈表現載體 pCMA-G1 以限制酶 B1pI 切斷處，使用 In-Fusion HD PCR 選殖套組 (CLONTECH 公司) 插入，藉此而構築人類化抗 TROP2 抗體重鏈 (hTINA1-H1) 表現載體。將獲得的表現載體命名為「pCMA-G1/hTINA1-H1」。

【0167】 引子組

5'-agctcccagatgggtgctgagc-3' (序列識別號 21：引子 EG-Inf-F)

5'-gggcccttggtggaggctgagc-3' (序列識別號 22：引子 EG1-Inf-R)

【0168】 (ii) 人類化抗 TROP2 抗體輕鏈 (hTINA1-L1) 表現載體之構築

合成 DNA 片段 (GENEART 公司人工基因合成服務)，該 DNA 片段包含序列表之序列識別號 4 所示的人類化抗 TROP2 抗體輕鏈 (hTINA1-L1) 之核苷酸序列之核苷酸編號 38 ~ 402 所示的編碼人類化抗 TROP2 抗體輕鏈

(hTINA1-L1)之可變區的DNA序列。將合成的DNA片段作為模板，以KOD-Plus-(TOYOBO公司)及下述之引子組，將含編碼人類化抗TROP2抗體輕鏈(hTINA1-L1)之可變區的DNA序列的DNA片段放大，於將嵌合及人類化抗體輕鏈表現載體pCMA-LK以限制酶BsiWI切斷處，使用In-Fusion HD PCR選殖套組(CLONTECH公司)插入，藉此而構築人類化抗TROP2抗體輕鏈(hTINA1-L1)表現載體。將獲得的表現載體命名為「pCMA-LK/hTINA1-L1」。

【0169】引子組

5'-ctgtggatctccggcgcggtacggc-3'(序列識別號23:引子CM-LKF)

5'-ggagggggcgggccaccgtacg-3'(序列識別號24:引子KCL-Inf-R)

【0170】(iii)人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)之生產

FreeStyle 293F細胞(Invitrogen公司)係按照手冊進行繼代、培養。將對數增殖期之 1.2×10^9 個之FreeStyle 293F細胞(Invitrogen公司)接種於3L Fernbach Erlenmeyer燒瓶(CORNING公司)，以FreeStyle293表現媒體(Invitrogen公司)稀釋而調製成 1.0×10^6 細胞/mL後，於37℃、8% CO₂保溫箱內，以90rpm震盪培養一小時。將聚乙亞胺(Polyscience #24765；3.6mg)溶解於Opti-Pro SFM(Invitrogen公司；20mL)，其次將使用PureLink HiPure Plasmid套組(Invitrogen公司)調製的輕鏈表現載體(0.8mg)及重鏈表現載體(0.4mg)添加於Opti-Pro

SFM(Invitrogen公司；20mL)。於聚乙亞胺/Opti-Pro SFM混合液(20mL)中，添加表現載體/Opti-Pro SFM混合液(20mL)而溫和地攪拌，並於進一步放置5分鐘後添加於FreeStyle 293F細胞中。將於37℃、8% CO₂保溫箱，以7日、90rpm震盪培養所獲得的培養上清液，以拋棄式膠囊過濾器(ADVANTEC #CCS-045-E1H)過濾。

【0171】將藉由pCMA-G1/hTINA1-H1與pCMA-LK/hTINA1-L1之組合所獲得的人類化抗TROP2抗體命名為「hTINA1-H1L1」。

【0172】(iv)人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)之純化

將來自(iii)獲得的培養上清液的抗體，以rProteinA親和性層析(4-6℃)及陶瓷氫氧磷灰石(室溫)之2階段步驟純化。rProteinA親和性層析純化後及陶瓷氫氧磷灰石純化後之緩衝液取代步驟係於4-6℃下實施。最初，將培養上清液施用於經PBS平衡化的MabSelect SuRe(GE Healthcare Bioscience公司製、HiTrap管柱)。於培養上清液全部置入管柱後，以管柱容量2倍以上之PBS將管柱洗淨。其次，以2M精胺酸鹽酸鹽溶液(pH4.0)溶出，收集含有抗體的劃分。將該劃分藉由透析(Thermo Scientific公司、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette)取代為PBS後，將以5mM磷酸鈉/50mM MES/pH7.0之緩衝液作5倍稀釋的抗體溶液，施用於經5mM NaPi/50mM MES/30mM NaCl/pH7.0之緩衝液平衡化的陶瓷氫氧磷灰石管柱(日本Bio-Rad、Bio-Scale CHTType-I Hydroxyapatite

Column)。實施氯化鈉所致的直線濃度梯度溶出，收集含抗體之劃分。將該劃分藉由透析(Thermo Scientific公司、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette)，而進行向HBSor(25mM 組胺酸/5%山梨糖醇、pH6.0)之液取代。最後，以Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN20(分級分子量UF10K，Sartorius公司，4℃)濃縮，將IgG濃度調製為20mg/mL以上作成純化樣品。

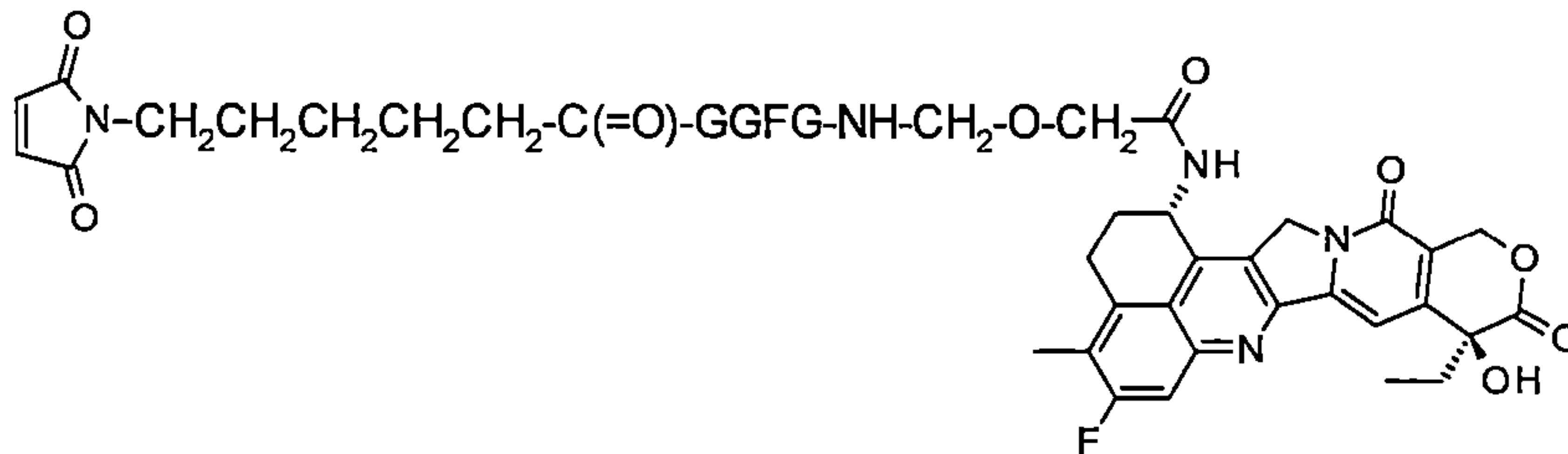
【0173】(v)人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)之緩衝液交換及濃度調整

將(iv)所製作的人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)，將使用Sephadex G-25擔體的NAP-25管柱(Cat. No. 17-0852-02、GE Healthcare Japan Corporation)，按照製造商規定之方法，以含氯化鈉(137mM)及伸乙基二胺四乙酸(5mM)的磷酸緩衝液(10mM、pH6.0；於本說明書有稱為「PBS6.0/EDTA」的情形)平衡化。對此NAP-25管柱每一根，放置抗體水溶液2.5mL後，分取以PBS6.0/EDTA3.5mL溶出的劃分(3.5mL)。將此劃分，於Amicon Ultra(50,000 MWCO、Millipore Corporation)之容器內置入抗體溶液，以使用離心機(Allegra X-15R、Beckman Coulter, Inc.)的離心操作(2000G~3800G，離心5~20分鐘)，將抗體溶液濃縮。使用UV測定器(Nanodrop 1000、Thermo Fisher Scientific Inc.)，按照製造商規定之方法，進行抗體濃度之測定。此時，於使用280nm吸光係數($1.54\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)而進行抗體濃度之測定後，使用PBS6.0/EDTA將抗體濃度調整為21.8mg/mL。

【0174】(實施例2)藥物連接物中間體之製作

將下式所表示的 N-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基]甘胺醯基甘胺醯基-L-苯基丙胺醯基-N-[(2-{[(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]哌喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-1-基]胺基}-2-側氧基乙氧基)甲基]甘胺酸醯胺，按照 WO2014/057687 之實施例 58 的方法來合成。

【0175】



【0176】(實施例3)人類化抗 TROP2 抗體 ADC 組成物之製作

(實施例3-1)利用以往之方法的人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1) ADC 組成物之製作

(i) 抗體之還原

將人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)(15mL；327mg 相當、濃度 21.8mg/mL；25mM 組胺酸緩衝液)置入玻璃反應容器，再添加 25mM 組胺酸緩衝液 (18mL、pH5.0)。於本反應液中，添加 0.5M EDTA 水溶液 (0.027mL；相對於抗體為 6 當量)後，添加 0.1g/mL 聚山梨醇酯 20 水溶液 (0.033mL；相對於抗體為 0.01%)後，添加 0.3M 磷酸氫二鈉水溶液，調整為 pH7.12。於 24℃ 攪拌下，添加

1.00mg/mL 參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽水溶液(1.58mL；相對於抗體一分子為2.45當量)，使內溫成為35～36℃的方式加熱3小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0177】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

將上述(i)所獲得的溶液冷卻，以內溫16～17℃、攪拌下，花費60分鐘添加實施例2所獲得的化合物之6.67mg/mL 50%丙酮水溶液(1.71mL；對於抗體一分子為5.2當量)，於相同溫度攪拌20分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加50mM N-乙醯基半胱胺酸水溶液(0.135mL；相對於抗體一分子為3當量)，再於相同溫度攪拌20分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用10%乙酸水溶液，調整為pH5.0。

【0178】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用Pellicon XL(日本Millipore股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加10mM組胺酸緩衝液(pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成為500mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)ADC組成物的溶液17.6mL。

【0179】(iv)特性評價

〔共通操作A〕抗體-藥物結合物組成物中的抗體每一分子之平均藥物結合數之測定

抗體-藥物結合物組成物中的抗體每一分子的平均藥物結合數係藉由使用以下方法的高速液體層析(HPLC)分析而求得。

【0180】 1.HPLC分析用樣品之調製(抗體-藥物結合物之還原)

將抗體-藥物結合物溶液(約1mg/mL、60 μ L)與二硫蘇糖醇(DTT)水溶液(100mM、15 μ L)混合。將於37 $^{\circ}$ C保溫混合物30分鐘以切斷抗體-藥物結合物之重鏈-輕鏈間及重鏈-重鏈間之雙硫鍵的樣品，用於HPLC分析。

【0181】 2.HPLC分析

以下述之測定條件進行HPLC分析。

HPLC系統：島津科學HPLC系統

檢測器：紫外吸光度計(測定波長：280nm)

管柱：PLRP-S(2.1 $\times$ 50mm、8 μ m、1000Å；Agilent Technologies)

管柱溫度：80 $^{\circ}$ C

移動相A：0.05%三氟乙酸(TFA)水溶液

移動相B：含0.04%TFA的乙腈溶液

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

樣品注入量：15 μ L

【0182】 4.數據解析

相對於無藥物結合的抗體之輕鏈(L_0)及重鏈(H_0)，藥物結合的輕鏈(有一個藥物結合的輕鏈： L_1)及重鏈(有一個藥物結合的重鏈： H_1 、有二個藥物結合的重鏈： H_2 、有三個藥物結合的重鏈： H_3)，係與結合的藥物數成比例地疏水性增加而保持時間變大，故以 L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、

H₂、H₃之順序被溶出。藉由L₀及H₀之保持時間比較，而將檢出波峰分配為L₀、L₁、H₀、H₁、H₂、H₃之任一者。

【0183】因於藥物連接物有UV吸收，而因應藥物連接物之結合數，使用輕鏈、重鏈及藥物連接物之莫耳吸光係數，按照下式進行波峰面積值之補正。

【0184】

輕鏈波峰面積補正值(L_i)

=波峰面積

$$\times \frac{\text{輕鏈之莫耳吸光係數}}{\text{輕鏈之莫耳吸光係數} + \text{藥物結合數} \times \text{藥物連接物之莫耳吸光係數}}$$

重鏈波峰面積補正值(H_i)

=波峰面積

$$\times \frac{\text{重鏈之莫耳吸光係數}}{\text{重鏈之莫耳吸光係數} + \text{藥物結合數} \times \text{藥物連接物之莫耳吸光係數}}$$

此處，各抗體中的輕鏈及重鏈之莫耳吸光係數(280nm)係使用藉由已知之計算方法(Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423)，自各抗體之輕鏈及重鏈之胺基酸序列所推定的值。人類化抗TROP2抗體(hTINA1-H1L1)之情形，按照其胺基酸序列，作為推定值而使用27640作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用83810作為重鏈之莫耳吸光係數。又，藥物連接物之莫耳吸光係數(280nm)係使用使各藥物連接物以巯基乙醇或N-乙醯基半胱胺酸反應，將N-取代順丁烯二醯亞胺基變換為琥珀醯亞胺硫醚的化合物之實測之莫耳吸光係數(280nm)。

【0185】按照下式計算相對於波峰面積補正值合計之

各鏈波峰面積比(%)。

【0186】

$$\text{輕鏈波峰面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{H0}+A_{H1}+A_{H2}+A_{H3}} \times 100$$

$$\text{重鏈波峰面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0}+A_{H1}+A_{H2}+A_{H3}} \times 100$$

A_{Li} , A_{Hi} : L_i , H_i 各個之波峰面積補正值

【0187】按照下式計算抗體-藥物結合物組成物中抗體每一分子之平均藥物結合數。

$$\text{【0188】平均藥物結合數} = (L_0 \text{波峰面積比} \times 0 + L_1 \text{波峰面積比} \times 1 + H_0 \text{波峰面積比} \times 0 + H_1 \text{波峰面積比} \times 1 + H_2 \text{波峰面積比} \times 2 + H_3 \text{波峰面積比} \times 3) / 100 \times 2$$

【0189】抗體濃度：16.49mg/mL、抗體產量：290mg(86%)、以共通操作A所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數(n)：4.4。將表示各鏈波峰面積比(%)的HPLC圖表示於第5圖。

【0190】〔共通操作B〕抗體—藥物結合物組成物之利用疏水管柱層析的分離法

1.HPLC測定方法

以下述之測定條件進行HPLC分析。

HPLC系統：島津科學HPLC系統

檢測器：紫外吸光度計(測定波長：280nm)

管柱：TSKgel Butyl-NPR(4.6×100mm、2.5μm; TOSOH股份有限公司)

管柱溫度：30℃

移動相 A：含 1.5 M 硫酸銨的 25 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 水溶液

移動相 B：含 75% 之 25 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 及 25% 之異丙基醇的混合溶液

梯度程式：20%-60%(0分鐘-20分鐘)、20%-80%(20-20.1分鐘)、80%-80%(20.1—23分鐘)、80%-20%(23分鐘-23.1分鐘)、20%-20%(23.1分鐘-40分鐘)

樣品注入量：2 μ L

【0191】2.數據解析

本數據，係因管柱的特性，而自藥物結合數低的抗體-藥物結合物依序藉由鹽濃度的差而被溶出，因此藉由測量各個面積值，而推定藥物結合數之分布。其波峰係依溶出順序成為 D0(藥物連接物未結合者)、D2、D4-1、D4-2、D6、D8，其分布狀況係 D0：4.8%、D2：16.8%、D4-1：24.6%、D4-2：13.1%、D6：24.8%、D8：12.6%(第 6 圖)。

【0192】(實施例 3-2)利用本發明之方法的人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)ADC 組成物之製作

(i) 抗體之還原

將人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)(22.9 mL：500 mg 相當、濃度 21.8 mg/mL；25 mM 組胺酸緩衝液)置入玻璃反應容器，再添加 25 mM 組胺酸緩衝液 (22 mL、pH 5.0)。於本反應液中，添加 0.5 M EDTA 水溶液 (0.0344 mL；相對於抗體為 5 當量)後，添加 0.1 g/mL 聚山梨醇酯 20 水溶液 (0.050 mL；相對於抗體為 0.01%)後，添加 0.3 M 磷酸氫二

鈉水溶液，調整為 pH7.12，並冷卻。攪拌下，以內溫 0～1℃，添加 1.00mg/mL 參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽水溶液 (2.54mL；相對於抗體一分子為 2.58當量)，以內溫 0～1℃ 攪拌添加 6小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0193】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

於上述(i)所獲得的溶液中，以內溫 0～2℃、攪拌下，花費 10分鐘添加實施例 2 所獲得的化合物之 6.03mg/mL 50%丙酮水溶液 (2.99mL；相對於抗體一分子為 5.1當量)，於相同溫度，攪拌 40分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加 50mM N-乙醯基半胱胺酸水溶液 (0.206 mL；相對於抗體一分子為 3當量)，再於相同溫度攪拌 10分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用 10%乙酸水溶液，而調整為 pH5.0。

【0194】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用 Pellicon XL(日本 Millipore 股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加 10mM 組胺酸緩衝液 (pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成為 700mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1)ADC 組成物的溶液 23.6mL。

【0195】(iv)特性評價

與實施例 3-1 之 (iv)所記載的共通操作 A 同樣地測定平均藥物結合數。於人類化抗 TROP2 抗體 (hTINA1-H1L1) 之情形，按照其胺基酸序列，作為推定值而使用 27640 作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用 83810 作為重鏈之莫耳吸

光係數。

【0196】抗體濃度：19.63 mg/mL、抗體產量：463 mg(92%)、以共通操作 A測定的抗體每一分子之平均藥物結合數(n)：4.1。將表示各鏈波峰面積比(%)的 HPLC層析示於第 7圖。

【0197】與實施例 3-1之(iv)所記載的共通操作 B同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係 D0：1.9%、D2：19.5%、D4-1：53.3%、D6：18.5%、D8：5.5%(第 8圖)。

【0198】(v)結果

利用以往之方法所製作的人類化抗 TROP2抗體 ADC組成物(實施例 3-1)之平均藥物結合數為 4.4，D4-1之含有率為 24.6%。另一方面，利用本發明之方法所製作的人類化抗 TROP2抗體 ADC組成物(實施例 3-2)之平均藥物結合數為 4.1，D4-1之含有率為 53.3%。

【0199】(實施例 4)人類化抗 CD98抗體表現載體之構築與抗體之生產

(i)人類化抗 CD98抗體重鏈(hM23-H1)表現載體之構築
合成 DNA片段(核苷酸編號 36～422)(GENEART公司人工基因合成服務)，該 DNA片段包含序列識別號 11所示的人類化抗 CD98抗體重鏈(hM23-H1)之核苷酸序列之核苷酸編號 58～405所示的編碼人類化抗 CD98抗體重鏈(hM23-H1)之可變區的 DNA序列。將合成的 DNA片段作為模板，以 KOD-Plus-(TOYOBO公司)及下述之引子組，將含編碼 hM23-H1之可變區的 DNA序列的 DNA片段放大，

於將嵌合及人類化抗體 IgG1 型重鏈表現載體 pCMA-G1 以限制酶 B1pI 切斷處，使用 In-Fusion HD PCR 選殖套組 (CLONTECH 公司) 插入，藉此而構築人類化抗 CD98 抗體重鏈 (hM23-H1) 表現載體。將獲得的表現載體命名為「pCMA-G1/hM23-H1」。

【0200】引子組

5'-AGCTCCCAGATGGGTGCTGAGC-3' (序列識別號 21：引子 EG-Inf-F)

5'-GGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGC-3' (序列識別號 22：引子 EG1-Inf-R)

【0201】(ii) 人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1) 表現載體之構築

合成 DNA 片段 (核苷酸編號 38 ~ 420) (GENEART 公司人工基因合成服務)，該 DNA 片段包含序列識別號 13 所示的人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1) 之核苷酸序列之核苷酸編號 61 ~ 405 所示的編碼人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1) 之可變區的 DNA 序列。將合成的 DNA 片段作為模板，以 KOD-Plus- (TOYOBO 公司) 及下述之引子組，將含編碼人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1) 之可變區的 DNA 序列的 DNA 片段放大，於將嵌合及人類化抗體輕鏈表現載體 pCMA-LK 以限制酶 BsiWI 切斷處，使用 In-Fusion HD PCR 選殖套組 (CLONTECH 公司) 插入，藉此而構築人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1) 表現載體。將獲得的表現載體命名為「pCMA-LK/hM23-L1」。

【0202】引子組

5'-CTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGC-3'(序列識別號 23：引子 CM-LKF)

5'-GGAGGGGGCGGCCACCGTACG-3'(序列識別號 24：引子 KCL-Inf-R)

【0203】(iii)人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)之生產

將人類化抗 CD98 抗體以與實施例 1 之 (iii)相同之方法生產。將藉由 pCMA-G1/hM23-H1 及 pCMA-LK/hM23-L1 之組合所取得的人類化抗 CD98 抗體命名為「hM23-H1L1」。

【0204】(iv)人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)之純化
自 (iii)所獲得的培養上清液，以與實施例 1 之 (iv)同樣之方法純化抗體。

【0205】(v)人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)之緩衝液交換及濃度調整

將 (iv)純化的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)，以與實施例 1 之 (v)同樣之方法作緩衝液交換及濃度調整。此時，於使用 280nm 吸光係數 ($1.65 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)來進行抗體濃度之測定之後，使用 PBS 6.0/EDTA 將抗體濃度調整為 40 mg/mL。

【0206】(實施例 5)人類化抗 CD98 抗體 ADC 組成物之製作

(實施例 5-1)利用以往之方法的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物之製作

(i)抗體之還原

將人類化抗CD98抗體(hM23-H1L1)(12mL：480mg相當、濃度40mg/mL；25mM組胺酸緩衝液)置入玻璃反應容器，再添加25mM組胺酸緩衝液(36mL、pH5.0)。於本反應液中，添加0.5M EDTA水溶液(CALBIOCHEM；0.0394mL；相對於抗體為6當量)後，添加0.1g/mL聚山梨醇酯20(日油股份有限公司)水溶液(0.048mL；相對於抗體為0.01%)後，添加0.3M磷酸氫二鈉水溶液，調整為pH7.10。於21℃攪拌下，添加1.00mg/mL 參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(Nacalai Tesque, Inc.)水溶液(2.17mL；相對於抗體一分子為2.31當量)，以內溫成為35～36℃的方式加熱3小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0207】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

將上述(i)所獲得的溶液冷卻，於內溫17～18℃、攪拌下，花費7分鐘添加實施例2所獲得的化合物之6.20mg/mL 50%丙酮水溶液(2.74mL；相對於抗體一分子為5.0當量)，於相同溫度、攪拌40分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加50mM N-乙醯基半胱胺酸(KISHIDA化學)水溶液(0.197mL；相對於抗體一分子為3當量)，進一步於相同溫度攪拌30分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用10%乙酸水溶液，調整為pH5.0。

【0208】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用Pellicon XL(日本Millipore股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加10mM組胺酸緩衝液(pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排

水量成爲 600mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物的溶液 21.6mL。

【0209】(iv)特性評價

與實施例 3-1 之 (iv) 所記載的共通操作 A 同樣地測定平均藥物結合數。人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1) 之情形，按照其胺基酸序列，作爲推定值而使用 41370 作爲輕鏈之莫耳吸光係數，使用 77810 作爲重鏈之莫耳吸光係數。

【0210】 抗體濃度：20.8mg/mL、抗體產量：449mg(91%)、以共通操作 A 所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數 (n)：4.0。將表示各鏈波峰面積比 (%) 的 HPLC 層析示於第 9 圖。

【0211】 與實施例 3-1 之 (iv) 所記載的共通操作 B 同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係 D0：4.2%、D2：24.2%、D4-1：27.8%、D4-2：13.3%、D6：20.8%、D8：7.6%(第 10 圖)。

【0212】 (實施例 5-2) 利用本發明之方法的人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)ADC 組成物之製作

(i) 抗體之還原

將人類化抗 CD98 抗體 (hM23-H1L1)(12.5mL：500mg 相當、濃度 40mg/mL；25mM 組胺酸緩衝液) 置入玻璃反應容器，進一步添加 25mM 組胺酸緩衝液 (27.5mL、pH5.0)。於本反應液中，添加 0.5M EDTA 水溶液 (CALBIOCHEM；0.041mL；相對於抗體爲 6 當量) 後，添加 0.1g/mL 聚山梨醇酯 20 (日油股份有限公司) 水溶液 (0.050mL；相對於

抗體爲0.01%)後，添加0.3M磷酸氫二鈉水溶液，調整爲pH7.10。將反應液冷卻，於內溫0～1℃攪拌下，添加1.00mg/mL 參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(Nacalai Tesque, Inc.)水溶液(2.75mL；相對於抗體一分子爲2.80當量)，使內溫成爲0～1℃的方式攪拌6小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0213】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

將上述(i)所獲得的溶液於內溫0.7-1.2℃、攪拌下，花費10分鐘添加實施例2所獲得的化合物之6.08mg/mL 50%丙酮水溶液(3.14mL；相對於抗體一分子爲5.4當量)，於相同溫度，攪拌50分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加50mM N-乙醯基半胱胺酸(KISHIDA化學)水溶液(0.205mL；相對於抗體一分子爲3當量)，再於相同溫度攪拌30分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用10%乙酸水溶液，調整爲pH5.0。

【0214】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用Pellicon XL(日本Millipore股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加10mM組胺酸緩衝液(pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成爲600mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗CD98抗體(hM23-H1L1)ADC組成物的溶液23.6mL。

【0215】(iv)特性評價

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作A同樣地測定平均藥物結合數。人類化抗CD98抗體(hM23-H1L1)之情

形，按照其胺基酸序列，作為推定值而使用41370作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用77810作為重鏈之莫耳吸光係數。

抗體濃度：19.91mg/mL、抗體產量：470mg(94%)、以共通操作A所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數(n)：4.1。將表示各鏈波峰面積比(%)的HPLC層析示於第11圖。

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作B同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係D0：2.2%、D2：18.1%、D4-1：51.0%、D6：20.6%、D8：7.6%(第12圖)。

【0216】(v)結果

藉由以往之方法所製作的人類化抗CD98抗體ADC組成物(實施例5-1)之平均藥物結合數為4.0，D4-1之含有率為27.8%。另一方面，藉由本發明之方法所製作的人類化抗CD98抗體ADC組成物(實施例5-2)之平均藥物結合數為4.1，D4-1之含有率為51.0%。

【0217】(實施例6)人類化抗B7-H3抗體ADC組成物之製作

(實施例6-1)利用以往之方法的人類化抗B7-H3抗體(M30-H1-L4)ADC組成物之製作

(i)抗體之還原

將人類化抗B7-H3抗體(M30-H1-L4)(按照WO2014/057687之參考例1之方法來製作，12.4mL：250mg相當、濃度20.1mg/mL；25mM檸檬酸緩衝液)置入玻璃反應容器，進一步添加25mM組胺酸緩衝液(18mL、pH7.5)。於本

反應液中，添加 0.5M EDTA 水溶液 (CALBIOCHEM；0.018mL；相對於抗體為 5 當量)後，添加 0.1g/mL 聚山梨醇酯 80 (日油股份有限公司) 水溶液 (0.013mL；相對於抗體為 0.01%) 後，添加 0.3M 磷酸氫二鈉水溶液，並調整為 pH7.02。於 35℃ 攪拌下，添加 1.00mg/mL 參 (2-羧基乙基) 膦鹽酸鹽 (Nacalai Tesque, Inc.) 水溶液 (1.05mL；相對於抗體一分子為 2.15 當量)，使內溫成為 35～36℃ 的方式，加熱 2 小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0218】(ii) 抗體與藥物連接物中間體之結合

將上述 (i) 所獲得的溶液冷卻，於內溫 15～16℃、攪拌下，花費 4 分鐘添加實施例 2 所獲得的化合物之 6.22mg/mL 50% 丙酮水溶液 (1.36mL；相對於抗體一分子為 4.8 當量)，於相同溫度，攪拌 20 分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加 50mM N-乙醯基半胱胺酸 (KISHIDA 化學) 水溶液 (0.102mL；相對於抗體一分子為 3 當量)，進一步於相同溫度攪拌 20 分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用 10% 乙酸水溶液，調整為 pH5.0。

【0219】(iii) 純化

將上述 (ii) 所獲得的溶液，使用 Pellicon XL (日本 Millipore 股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加 10mM 組胺酸緩衝液 (pH5.0) 一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成為 300mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4) ADC 組成物的溶液 13.1mL。

【0220】(iv)特性評價

與實施例 3-1 之 (iv) 所記載的共通操作 A 同樣地測定平均藥物結合數。人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4) 之情形、按照其胺基酸序列，作為推定值而使用 30160 作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用 87250 作為重鏈之莫耳吸光係數。

抗體濃度：18.4mg/mL、抗體產量：241mg(94%)、以共通操作 A 所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數 (n)：3.8。將表示各鏈波峰面積比 (%) 的 HPLC 層析示於第 15 圖。

與實施例 3-1 之 (iv) 所記載的共通操作 B 同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係 D0：6.5%、D2：30.5%、D4-1：27.9%、D4-2：12.3%、D6：17.7%、D8：4.9%(第 16 圖)。

【0221】(實施例 6-2) 利用本發明之方法的人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4) ADC 組成物之製作

(i) 抗體之還原

將人類化抗 B7-H3 抗體 (M30-H1-L4) (按照 WO2014/057687 之參考例 1 之方法而製作、27.1mL：500mg 相當、濃度 18.5mg/mL；10mM 組胺酸緩衝液) 置入玻璃反應容器，進一步添加 10mM 組胺酸水溶液 (25mL)。於本反應液中添加純化白糖 (MERCK；1.25g) 及 0.5M EDTA 水溶液 (CALBIOCHEM；0.041mL；相對於抗體為 6 當量) 後，添加 0.1g/mL 聚山梨醇酯 80 (日油股份有限公司) 水溶液 (0.050mL；相對於抗體為 0.01%) 後，添加 0.3M 磷酸氫二鈉水溶液，並調整為 pH7.08。將反應液冷卻，於內溫 0

～1℃攪拌下，添加1.00mg/mL 參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(Nacalai Tesque, Inc.)水溶液(2.08mL；相對於抗體一分子為2.13當量)，使內溫成為0～1℃的方式攪拌5.5小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0222】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

將上述(i)所獲得的溶液於內溫0～1℃、攪拌下，花費20分鐘添加實施例2所獲得的化合物之6.04mg/mL 50%丙酮水溶液(2.82mL；相對於抗體一分子為4.8當量)，於相同溫度，攪拌20分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加50mM N-乙醯基半胱胺酸(KISHIDA化學)水溶液(0.205mL；相對於抗體一分子為3當量)，再於相同溫度攪拌20分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用10%乙酸水溶液，調整為pH5.0。

【0223】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用Pellicon XL(日本Millipore股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加10mM組胺酸緩衝液(pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成為800mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗B7-H3抗體(M30-H1-L4)ADC組成物的溶液23.6mL。

【0224】(iv)特性評價

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作A同樣地測定平均藥物結合數。人類化抗B7-H3抗體(M30-H1-L4)之情形，按照其胺基酸序列，作為推定值而使用30160作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用87250作為重鏈之莫耳吸光係數。

抗體濃度：19.4mg/mL、抗體產量：455mg(89%)、以共通操作A所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數(n)：4.1。將表示各鏈波峰面積比(%)的HPLC層析示於第17圖。

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作B同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係D0：2.7%、D2：22.3%、D4-1：58.4%、D6：14.1%、D8：2.4%(第18圖)。

【0225】(v)結果

藉由以往之方法所製作的人類化抗B7-H3抗體ADC組成物(實施例6-1)之平均藥物結合數為3.8，D4-1之含有率為27.9%。另一方面，利用本發明之方法所製作的人類化抗B7-H3抗體ADC組成物(實施例6-2)之平均藥物結合數為4.1，D4-1之含有率為58.4%。

【0226】(實施例7)人類化抗HER2抗體ADC組成物之製作

(實施例7-1)利用以往之方法所致的人類化抗HER2抗體ADC組成物之製作

(i)抗體之還原

將人類化抗HER2抗體(曲妥珠單抗；美國專利第5821337號)(22.3mL：500mg相當、濃度22.4mg/mL；25mM組胺酸緩衝液)置入玻璃反應容器，進一步添加25mM組胺酸緩衝液(27mL、pH5.0)。於本反應液中，添加0.5M EDTA水溶液(0.034mL；相對於抗體為5當量)後，添加0.1g/mL聚山梨醇酯20水溶液(0.050mL；相對於抗體為

0.01%)後，添加0.3M磷酸氫二鈉水溶液，並調整為pH7.12。於22℃攪拌下，添加1.00mg/mL參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽水溶液(2.12mL；相對於抗體一分子為2.15當量)，使內溫成為22～25℃的方式攪拌3小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0227】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

將上述(i)所獲得的溶液冷卻，於內溫11～13℃、攪拌下，花費20分鐘添加實施例2所獲得的化合物之6.15mg/mL 50%丙酮水溶液(2.77mL；相對於抗體一分子為4.8當量)，於相同溫度，攪拌20分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加50mM N-乙醯基半胱胺酸水溶液(0.206mL；相對於抗體一分子為3當量)，進一步於相同溫度攪拌20分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用10%乙酸水溶液，調整為pH5.0。

【0228】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用Pellicon XL(日本Millipore股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加10mM組胺酸緩衝液(pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成為600mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗HER2抗體ADC組成物的溶液22.7mL。

【0229】(iv)特性評價

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作A同樣地測定平均藥物結合數。人類化抗HER2抗體(曲妥珠單抗)之情形，按照其胺基酸序列，作為推定值而使用26150作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用81290作為重鏈之莫耳吸光係數。

抗體濃度：20.39mg/mL、抗體產量：462mg(90%)、以共通操作A所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數(n)：3.9。將表示各鏈波峰面積比(%)的HPLC層析示於第21圖。

【0230】與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作B同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係D0：3.6%、D2：26.1%、D4-1：34.1%、D4-2：13.6%、D6：17.6%、D8：5.0%(第22圖)。

(實施例7-2)利用本發明之方法的人類化抗HER2抗體ADC組成物之製作

【0231】(i)抗體之還原

將人類化抗HER2抗體(曲妥珠單抗；美國專利第5821337號)(22.3mL：500mg相當、濃度22.4mg/mL；25mM組胺酸緩衝液)置入玻璃反應容器，進一步添加25mM組胺酸緩衝液(25mL、pH5.0)。於本反應液中，添加0.5MEDTA水溶液(0.034mL；相對於抗體為5當量)後，添加0.1g/mL聚山梨醇酯20水溶液(0.050ml；相對於抗體為0.01%)後，添加0.3M磷酸氫二鈉水溶液，並調整為pH7.13、冷卻。攪拌下，於內溫0～1℃，添加1.00mg/mL參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽水溶液(2.37mL；相對於抗體一分子為2.40當量)，於內溫0～1℃攪拌6小時，將抗體之鏈間雙硫鍵還原。

【0232】(ii)抗體與藥物連接物中間體之結合

於上述(i)獲得的溶液中，於內溫0～2℃、攪拌下，花費10分鐘添加實施例2所獲得的化合物之6.14mg/mL

50%丙酮水溶液(2.84mL；相對於抗體一分子為4.9當量)，於相同溫度，攪拌40分鐘，使藥物連接物中間體與抗體結合。其次，添加50mM N-乙醯基半胱胺酸水溶液(0.206 mL；相對於抗體一分子為3當量)，再於相同溫度攪拌50分鐘，使藥物連接物中間體之反應停止後，使用10%乙酸水溶液，而調整為pH5.0。

【0233】(iii)純化

將上述(ii)所獲得的溶液，使用Pellicon XL(日本Millipore股份有限公司、50cm²)，以管泵，一邊添加10mM組胺酸緩衝液(pH5.0)一邊使其循環，進行洗淨作業至排水量成為600mL，去除低分子。之後，進行濃縮，獲得含有人類化抗HER2抗體ADC組成物的溶液21.7mL。

【0234】(iv)特性評價

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作A同樣地測定平均藥物結合數。於人類化抗HER2抗體(曲妥珠單抗)之情形，按照其胺基酸序列，作為推定值而使用26150作為輕鏈之莫耳吸光係數，使用81290作為重鏈之莫耳吸光係數。

抗體濃度：21.2mg/mL、抗體產量：459mg(89%)、以共通操作A所測定的抗體每一分子之平均藥物結合數(n)：4.0。表示各鏈波峰面積比(%)的HPLC層析係示於第23圖。

與實施例3-1之(iv)所記載的共通操作B同樣地測定藥物結合數之面積值。藥物結合數之分布狀況係D0：2.8%、D2：23.8%、D4-1：55.2%、D6：15.0%、D8：3.3%(

第 24 圖)。

【0235】(v)結果

利用以往之方法所製作的人類化抗HER2抗體ADC組成物(實施例7-1)之平均藥物結合數為3.9，D4-1之含有率為34.1%。另一方面，利用本發明之方法所製作的人類化抗HER2抗體ADC組成物(實施例7-2)之平均藥物結合數為4.0，D4-1之含有率為55.2%。

【0236】(試驗例1)抗體-藥物結合物組成物之治療有效性

將小鼠：5-6週齡之雌BALB/c-nu/nu小鼠(日本Charles River股份有限公司)於實驗使用前，以SPF條件下馴化4-7日。對小鼠給餌經滅菌的固形飼料(FR-2，Funabashi Farms Co.，Ltd)，給予經滅菌的自來水(添加5-15ppm次亞氯酸鈉溶液而調製)。

測定、計算式：將腫瘤之長徑及短徑以電子式數位測徑器(CD-15C，Mitutoyo Corp.)於1週測定2次以上，計算腫瘤體積(mm³)。計算式係如以下所示。

【0237】腫瘤體積(mm³)=1/2×長徑(mm)×[短徑(mm)]²

【0238】將自ATCC購入的人類胰臟腺癌細胞株CFPAC-1 4×10⁶個細胞懸浮於生理食鹽水，皮下移植至雌BALB/c-nu/nu小鼠(第0日)，於第11日實施隨機分組。分組後，將利用以往之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物(實施例3-1)、及利用本發明之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物(實施例3-2)各自以0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg之各用量進行尾靜脈內投予

。抗體-藥物結合物組成物係全部以乙酸鹽緩衝的食鹽水 (Acetate-Buffered Saline(pH5.5))(Nacalai Tesque)稀釋，投予10mL/kg之液量。治療有效性係以可使腫瘤體積退縮的最小投予量(退化劑量(Regression dose))作為指標來判斷。利用以往之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物之退化劑量係1mg/kg，利用本發明之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物之退化劑量亦為1mg/kg(第19圖)。如此顯示，利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物係具有與利用以往之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物相同之治療有效性。

【0239】(試驗例2)抗體-藥物結合物組成物之安全性

將利用以往之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物(實施例3-1)、及利用本發明之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物(實施例3-2)各自對為跨物種的食蟹猴，以每3週1次的間隔共計投予3次。觀察至最終投予翌日，檢討重度毒性未表現的最大投予量(HNSTD)。就結果而言，利用以往之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物之HNSTD為10mg/kg，另一方面，利用本發明之方法所製作的人類化抗TROP2抗體ADC組成物之HNSTD為30mg/kg。如此顯示，利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物係較利用以往之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物具有更優異的安全性。

【0240】(考察1)

由實施例3、4、6、及7之結果，平均藥物結合數係利用以往之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物及利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物皆為3.5～4.5。另一方面，於重鏈-輕鏈間硫醇有4個藥物連接物結合的抗體-藥物結合物之含有率係相對於利用以往之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物中為35%以下，於利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物中為50%以上。如此顯示，藉由使用本發明之製造方法，可選擇性地製造平均藥物結合數為3.5～4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇有4個藥物連接物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上的抗體-藥物結合物組成物。

【0241】(考察2)

由試驗例2之結果顯示，利用本發明之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物係較利用以往之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物具有更優異的安全性。

由以上顯示，本發明之抗體-藥物結合物組成物(平均藥物結合數為3.5～4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇有4個藥物連接物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上的抗體-藥物結合物組成物)係較利用以往之製造方法所製造的抗體-藥物結合物組成物(平均藥物結合數為3.5～4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇有4個藥物連接物結合的抗體-藥物結合物之含有率為35%以下的抗體-藥物結合物組成物)具有更優異的安全性。

[序列表非關鍵詞文字]

序列識別號 1:人類化抗 TROP2 抗體重鏈
(hTINA1-H1)之核苷酸序列

序列識別號 2:人類化抗 TROP2 抗體重鏈
(hTINA1-H1)之胺基酸序列

序列識別號 3:人類化抗 TROP2 抗體輕鏈
(hTINA1-L1)之核苷酸序列

序列識別號 4:人類化抗 TROP2 抗體輕鏈
(hTINA1-L1)之胺基酸序列

序列識別號 5:抗 TROP2 抗體 (TINA1)之 CDRH1 之胺
基酸序列

序列識別號 6:抗 TROP2 抗體 (TINA1)之 CDRH2 之胺
基酸序列

序列識別號 7:抗 TROP2 抗體 (TINA1)之 CDRH3 之胺
基酸序列

序列識別號 8:抗 TROP2 抗體 (TINA1)之 CDRL1 之胺
基酸序列

序列識別號 9:抗 TROP2 抗體 (TINA1)之 CDRL2 之胺
基酸序列

序列識別號 10:抗 TROP2 抗體 (TINA1)之 CDRL3 之胺
基酸序列

序列識別號 11:人類化抗 CD98 抗體重鏈 (hM23-H1)
之核苷酸序列

序列識別號 12:人類化抗 CD98 抗體重鏈 (hM23-H1)
之胺基酸序列

序列識別號 13:人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1)之

核苷酸序列

序列識別號 14:人類化抗 CD98 抗體輕鏈 (hM23-L1) 之
胺基酸序列

序列識別號 15:抗 CD98 抗體 (M23) 之 CDRH1 之胺基
酸序列

序列識別號 16:抗 CD98 抗體 (M23) 之 CDRH2 之胺基
酸序列

序列識別號 17:抗 CD98 抗體 (M23) 之 CDRH3 之胺基
酸序列

序列識別號 18:抗 CD98 抗體 (M23) 之 CDRL1 之胺基酸
序列

序列識別號 19:抗 CD98 抗體 (M23) 之 CDRL2 之胺基酸
序列

序列識別號 20:抗 CD98 抗體 (M23) 之 CDRL3 之胺基酸
序列

序列識別號 21:引子 EG-Inf-F 之核苷酸序列

序列識別號 22:引子 EG1-Inf-R 之核苷酸序列

序列識別號 23:引子 CM-LKF 之核苷酸序列

序列識別號 24:引子 KCL-Inf-R 之核苷酸序列

序列識別號 25:人類化抗 B7-H3 抗體重鏈 (M30-H1) 之
胺基酸序列

序列識別號 26:人類化抗 B7-H3 抗體輕鏈 (M30-L4) 之
胺基酸序列

序列識別號 27:抗 B7-H3 抗體 (M30) 之 CDRH1 之胺基
酸序列

序列識別號 28:抗 B7-H3 抗體 (M30) 之 CDRH2 之胺基酸序列

序列識別號 29:抗 B7-H3 抗體 (M30) 之 CDRH3 之胺基酸序列

序列識別號 30:抗 B7-H3 抗體 (M30) 之 CDRL1 之胺基酸序列

序列識別號 31:抗 B7-H3 抗體 (M30) 之 CDRL2 之胺基酸序列

序列識別號 32:抗 B7-H3 抗體 (M30) 之 CDRL3 之胺基酸序列

序列識別號 33:人類化抗 HER2 抗體重鏈之胺基酸序列

序列識別號 34:人類化抗 HER2 抗體輕鏈之胺基酸序列

【符號說明】

無。

序列表

<110> 第一三共股份有限公司
<120> 抗體-藥物結合物之選擇的製造方法
<130> FP1618
<150> JP2015-129692
<151> 2015-06-29
<160> 34
<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 1410
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hTINA1-H1

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1410)

<400>	1	
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg		48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp		
1 5 10 15		
gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa		96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
20 25 30		
cca ggc gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac acc ttt		144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe		
35 40 45		
acc acc gcc ggc atg cag tgg gtg cgc cag gct cct gga cag ggc ctg		192
Thr Thr Ala Gly Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu		
50 55 60		
gaa tgg atg ggc tgg atc aac acc cac agc ggc gtg ccc aaa tac gcc		240
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala		
65 70 75 80		
gag gac ttc aag ggc aga gtg acc atc agc gcc gac acc agc acc tcc		288
Glu Asp Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Thr Ser		
85 90 95		
aca gcc tac ctg cag ctg agc agc ctg aag tcc gag gac acc gcc gtg		336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val		
100 105 110		
tac tac tgc gcc aga agc ggc ttc ggc agc agc tac tgg tac ttc gac		384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp		

115							120					125					
gtg	tgg	ggc	cag	ggc	acc	ctc	gtg	acc	gtc	agc	tca	gcc	tcc	acc	aag		432
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
130							135					140					
ggc	cca	agc	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	agc	acc	tct	ggc		480
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
145							150					155					160
ggc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccc		528
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
165							170					175					
gtg	acc	gtg	agc	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	ggc	gtg	cac	acc		576
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		
180							185					190					
ttc	ccc	gct	gtc	ctg	cag	tcc	tca	gga	ctc	tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg		624
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val		
195							200					205					
gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc	cag	acc	tac	atc	tgc	aac		672
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn		
210							215					220					
gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg	gac	aag	aga	gtt	gag	ccc		720
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro		
225							230					235					240
aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccc	tgc	cca	gca	cct	gaa		768
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
245							250					255					
ctc	ctg	ggg	gga	ccc	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac		816
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
260							265					270					
acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac		864
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
275							280					285					
gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc		912
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
290							295					300					
gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccc	cgg	gag	gag	cag	tac	aac		960
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		
305							310					315					320
agc	acg	tac	cgg	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg		1008
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp		
325							330					335					
ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca		1056
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro		
340							345					350					
gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	gaa		1104

Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
		355					360					365				
cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	1152
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	
		370				375					380					
cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	1200
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
					390					395					400	
gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	acc	1248
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
				405					410					415		
acc	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	1296
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
			420					425					430			
ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	tgc	1344
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
		435					440					445				
tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	ctc	1392
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
	450					455					460					
tcc	ctg	tct	ccc	ggc	aaa											1410
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
	465				470											

<210> 2
<211> 470
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築物

<400> 2

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> 3
<211> 702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hTINA1-L1

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (702)

<400> 3
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc

Met 1	Val	Leu	Gln	Thr 5	Gln	Val	Phe	Ile	Ser 10	Leu	Leu	Leu	Trp	Ile 15	Ser	
ggc Gly	gcg Ala	tac Tyr	ggc Gly 20	gac Asp	atc Ile	cag Gln	atg Met	acc Thr 25	cag Gln	agc Ser	cct Pro	agc Ser 30	agc Ser	ctg Leu	agc Ser	96
gcc Ala	agc Ser	gtg Val 35	ggc Gly	gac Asp	aga Arg	gtg Val 40	acc Thr	atc Ile	aca Thr	tgc Cys	aag Lys	gcc Ala 45	agc Ser	cag Gln	gac Asp	144
gtg Val 50	tcc Ser	aca Thr	ggc Ala	gtg Val	gcc Ala	tgg Trp 55	tat Tyr	cag Gln	cag Gln	aag Lys	cct Pro 60	ggc Gly	aag Lys	ggc Ala	ccc Pro	192
aag Lys 65	ctg Leu	ctg Leu	atc Ile	tac Tyr	agc Ser 70	gcc Ala	agc Ser	tac Tyr	cgg Arg	tac Tyr 75	acc Thr	ggc Gly	gtg Val	ccc Pro	agc Ser 80	240
aga Arg	ttt Phe	tct Ser	ggc Gly	agc Ser 85	ggc Gly	tcc Ser	ggc Gly	acc Thr	gac Asp 90	ttc Phe	acc Thr	ctg Leu	aca Thr	atc Ile 95	agc Ser	288
agc Ser	ctg Leu	cag Gln	ccc Pro 100	gag Glu	gac Asp	ttc Phe	gcc Ala	gtg Val 105	tac Tyr	tac Tyr	tgc Cys	cag Gln	cag Gln	cac His	tac Tyr	336
atc Ile	acc Thr	ccc Pro 115	ctg Leu	acc Thr	ttt Phe	ggc Gly 120	cag Gln	ggc Gly	acc Thr	aag Lys	ctg Leu	gaa Glu 125	atc Ile	aag Lys	cgt Arg	384
acg Thr 130	gtg Val	ggc Ala	ggc Ala	ccc Pro	tcc Ser	gtg Val 135	ttc Phe	atc Ile	ttc Phe	ccc Pro	ccc Pro 140	tcc Ser	gac Asp	gag Glu	cag Gln	432
ctg Leu 145	aag Lys	tcc Ser	ggc Gly	acc Thr	ggc Ala 150	tcc Ser	gtg Val	gtg Val	tgc Cys	ctg Leu 155	ctg Leu	aat Asn	aac Asn	ttc Phe	tac Tyr 160	480
ccc Pro	aga Arg	gag Glu	ggc Ala	aag Lys 165	gtg Val	cag Gln	tgg Trp	aag Lys	gtg Val 170	gac Asp	aac Asn	ggc Ala	ctg Leu	cag Gln 175	tcc Ser	528
ggg Gly	aac Asn	tcc Ser	cag Gln	gag Glu	agc Ser	gtg Val	acc Thr	gag Glu 185	cag Gln	gac Asp	agc Ser	aag Lys	gac Asp 190	agc Ser	acc Thr	576
tac Tyr	agc Ser	ctg Leu	agc Ser	agc Ser	acc Thr	ctg Leu	acc Thr 200	ctg Leu	agc Ser	aaa Lys	gcc Ala	gac Asp 205	tac Tyr	gag Glu	aag Lys	624
cac His 210	aag Lys	gtg Val	tac Tyr	ggc Ala	tgc Cys	gag Glu 215	gtg Val	acc Thr	cac His	cag Gln	ggc Gly 220	ctg Leu	agc Ser	tcc Ser	ccc Pro	672
gtc Val 225	acc Thr	aag Lys	agc Ser	ttc Phe	aac Asn 230	agg Arg	ggg Gly	gag Glu	tgt Cys							702

<210> 4
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築物

<400> 4

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> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Thr Ala Gly Met Gln
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
1 5

<210> 11
<211> 1395
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> hM23-H1

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1395)

<400> 11
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg 48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

gtg ctg agc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gcc gaa gtg aag aaa 96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

cca ggc gcc agc gtg aag gtg tcc tgc aag gcc agc ggc tac gcc ttc 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45

agc aac tac ctg atc gag tgg gtg cgc cag gcc cct gga cag gga ctg 192
Ser Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

gaa tgg atg ggc gtg atc aac cct ggc agc ggc gtg acc aac tac aac 240
Glu Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

gag aag ttc aag ggc aga gtg acc atc acc gcc gac acc agc acc tcc 288
Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser

85					90					95						
acc Thr	gcc Ala	tac Tyr	atg Met 100	gaa Glu	ctg Leu	agc Ser	agc Ser	ctg Leu 105	cgg Arg	agc Ser	gag Glu	gac Asp	acc Thr 110	gcc Ala	gtg Val	336
tac Tyr	tat Tyr	tgt Cys 115	gcc Ala	aga Arg	gcc Ala	gag Glu	gct Ala 120	tgg Trp	ttt Phe	gcc Ala	tac Tyr	tgg Trp 125	ggc Gly	cag Gln	gga Gly	384
acc Thr	ctc Leu 130	gtg Val	acc Thr	gtc Val	agc Ser	tca Ser 135	gcc Ala	tcc Ser	acc Thr	aag Lys	ggc Gly 140	cca Pro	agc Ser	gtc Val	ttc Phe	432
ccc Pro 145	ctg Leu	gca Ala	ccc Pro	tcc Ser	tcc Ser 150	aag Lys	agc Ser	acc Thr	tct Ser	ggc Gly 155	ggc Gly	aca Thr	gcc Ala	gcc Ala	ctg Leu 160	480
ggc Gly	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aag Lys 165	gac Asp	tac Tyr	ttc Phe	ccc Pro	gaa Glu 170	ccc Pro	gtg Val	acc Thr	gtg Val	agc Ser 175	tgg Trp	528
aac Asn	tca Ser	ggc Gly	gcc Ala 180	ctg Leu	acc Thr	agc Ser	ggc Gly	gtg Val 185	cac His	acc Thr	ttc Phe	ccc Pro	gct Ala 190	gtc Val	ctg Leu	576
cag Gln	tcc Ser	tca Ser 195	gga Gly	ctc Leu	tac Tyr	tcc Ser	ctc Leu 200	agc Ser	agc Ser	gtg Val	gtg Val	acc Thr 205	gtg Val	ccc Pro	tcc Ser	624
agc Ser	agc Ser 210	ttg Leu	ggc Gly	acc Thr	cag Gln	acc Thr 215	tac Tyr	atc Ile	tgc Cys	aac Asn	gtg Val 220	aat Asn	cac His	aag Lys	ccc Pro	672
agc Ser 225	aac Asn	acc Thr	aag Lys	gtg Val	gac Asp 230	aag Lys	aga Arg	gtt Val	gag Glu	ccc Pro 235	aaa Lys	tct Ser	tgt Cys	gac Asp	aaa Lys 240	720
act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys	cca Pro 245	ccc Pro	tgc Cys	cca Pro	gca Ala	cct Pro 250	gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu	ggg Gly	gga Gly 255	ccc Pro	768
tca Ser	gtc Val	ttc Phe	ctc Leu 260	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro	aaa Lys	ccc Pro 265	aag Lys	gac Asp	acc Thr	ctc Leu	atg Met 270	atc Ile	tcc Ser	816
cgg Arg	acc Thr	cct Pro 275	gag Glu	gtc Val	aca Thr	tgc Cys	gtg Val 280	gtg Val	gtg Val	gac Asp	gtg Val	agc Ser 285	cac His	gaa Glu	gac Asp	864
cct Pro	gag Glu 290	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	aac Asn	tgg Trp 295	tac Tyr	gtg Val	gac Asp	ggc Gly	gtg Val 300	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn	912
gcc Ala 305	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccc Pro	cgg Arg 310	gag Glu	gag Glu	cag Gln	tac Tyr	aac Asn 315	agc Ser	acg Thr	tac Tyr	cgg Arg	gtg Val 320	960
gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	1008

Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
				325					330					335		
tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	1056
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
			340					345					350			
acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggc	cag	ccc	cgg	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	1104
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
		355					360					365				
ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	1152
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
	370					375					380					
tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	1200
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
385					390					395					400	
agc	aat	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acc	cct	ccc	gtg	ctg	1248
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
				405					410					415		
gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	1296
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
			420					425					430			
agc	agg	tgg	cag	cag	ggc	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	1344
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
		435					440					445				
gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acc	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccc	ggc	1392
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	450					455					460					
aaa																1395
Lys																
465																

- <210> 12
- <211> 465
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成構築物
- <400> 12

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	Ala	Phe	

35					40					45					
Ser	Asn	Tyr	Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Asn	Tyr	Asn
65					70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	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	Ala	Glu	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
		115					120					125			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
	130					135					140				
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
145					150					155					160
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
				165					170					175	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
			180					185					190		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
		195					200					205			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
	210					215					220				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
225					230					235					240
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
				245					250					255	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			260					265					270		

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

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

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

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

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

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

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
385 390 395 400

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
435 440 445

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

Lys
465

- <210> 13
- <211> 720
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> hM23-L1

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (720)

<400>	13	
atg gtg ctg cag acc cag gtg ttc atc tcc ctg ctg ctg tgg atc tcc		48
Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser		
1 5 10 15		
ggc gcg tac ggc gac atc gtg atg acc cag agc cct gac agc ctg gcc		96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala		
20 25 30		
gtg tct ctg gga gag aga gcc acc atc aac tgc aag agc agc cag agc		144
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser		
35 40 45		
ctg ctg tac tcc agc aac cag aag aac tac ctg gcc tgg tat cag cag		192
Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln		
50 55 60		
aag ccc ggc cag cct ccc aag ctg ctg atc tac tgg gcc agc acc aga		240
Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg		
65 70 75 80		
gaa agc ggc gtg ccc gat aga ttc agc ggc agc gga agc ggc acc gac		288
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
85 90 95		
ttc acc ctg aca atc agc tcc ctg cag gcc gag gac gtg gcc gtg tac		336
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr		
100 105 110		
tac tgc cag cgg tac tac ggc tac ccc tgg acc ttt ggc cag ggc acc		384
Tyr Cys Gln Arg Tyr Tyr Gly Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr		
115 120 125		
aag gtg gaa atc aag cgt acg gtg gcc gcc ccc tcc gtg ttc atc ttc		432
Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe		
130 135 140		
ccc ccc tcc gac gag cag ctg aag tcc ggc acc gcc tcc gtg gtg tgc		480
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys		
145 150 155 160		
ctg ctg aat aac ttc tac ccc aga gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg		528
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val		
165 170 175		
gac aac gcc ctg cag tcc ggg aac tcc cag gag agc gtg acc gag cag		576
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
180 185 190		
gac agc aag gac agc acc tac agc ctg agc agc acc ctg acc ctg agc		624
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser		
195 200 205		

aaa gcc gac tac gag aag cac aag gtg tac gcc tgc gag gtg acc cac
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

672

cag ggc ctg agc tcc ccc gtc acc aag agc ttc aac agg ggg gag tgt
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

720

<210> 14
<211> 240
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築物

<400> 14

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 Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Gln Arg Tyr Tyr Gly Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

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

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Ala Glu Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 18
<211> 17

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Gln Arg Tyr Tyr Gly Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 EG-Inf-F

<400> 21
agctcccaga tgggtgctga gc 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 EG1-Inf-R

<400> 22
gggcccttgg tggaggctga gc 22

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 CM-LKF

<400> 23
ctgtggatct ccggcgcgta cggc

24

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子 KCL-Inf-R

<400> 24
ggagggggcg gccaccgtac g

21

<210> 25
<211> 471
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30-H1

<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 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> 26
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M30-L4

<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 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 Leu Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg
65 70 75 80

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

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

Asn Pro Pro Thr 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

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 27

Asn Tyr Val Met His
1 5

<210> 28

<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 28

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 29

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Pro Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 30

Arg Ala Ser Ser Arg Leu Ile Tyr Met His
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 31

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 32

Gln Gln Trp Asn Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 33

<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 曲妥珠單抗之重鏈

<400> 33

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

445

<400> 34

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

申請專利範圍

1. 一種製造方法，其係抗體-藥物結合物組成物之製造方法，特徵為包含(i)於緩衝液中，使抗體與還原劑反應，而將鏈間雙硫鍵還原的步驟；及
(ii)對(i)所獲得之具有硫醇基的抗體，使與藥物連結物中間體反應的步驟；
而(i)之步驟的反應溫度為 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，
所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數為 $3.5\sim 4.5$ ，於重鏈-輕鏈間硫醇基有4個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為50%以上。
2. 如請求項1之製造方法，其中所製造的抗體-藥物結合物組成物之平均藥物結合數為 $4.0\sim 4.1$ 。
3. 如請求項1之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $-5\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。
4. 如請求項3之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $-3\sim 3^{\circ}\text{C}$ 。
5. 如請求項4之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $0\sim 2^{\circ}\text{C}$ 。
6. 如請求項5之製造方法，其中(i)之步驟之反應溫度為 $0\sim 1^{\circ}\text{C}$ 。
7. 如請求項1至6中任一項之製造方法，其中還原劑係以每抗體一分子 $2\sim 3$ 莫耳當量來使用。
8. 如請求項1至6中任一項之製造方法，其中還原劑為參(2-羧基乙基)膦或其鹽。
9. 如請求項8之製造方法，其中參(2-羧基乙基)膦之鹽為

參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽。

10.如請求項 1 至 6 中任一項之製造方法，其中緩衝液為組胺酸緩衝液。

11.如請求項 1 至 6 中任一項之製造方法，其中緩衝液包含螯合劑。

12.如請求項 11 之製造方法，其中螯合劑為伸乙二胺四乙酸。

13.如請求項 1 至 6 中任一項之製造方法，其中抗體為抗 TROP2 抗體、抗 CD98 抗體、抗 B7-H3 抗體、或抗 HER2 抗體。

14.如請求項 13 之製造方法，其中抗體為抗 TROP2 抗體。

15.如請求項 14 之製造方法，其中抗 TROP2 抗體為保持由序列識別號 5 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH1(TAGMQ)、由序列識別號 6 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH2(WINTHSGVPKYAEDFKG)、由序列識別號 7 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH3(SGFGSSYWYFDV)、由序列識別號 8 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL1(KASQDVSTAVA)、由序列識別號 9 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL2(SASYRYT)、及由序列識別號 10 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL3(QQHYITPLT)之抗體。

16.如請求項 14 之製造方法，其中抗 TROP2 抗體為由以下的重鏈及輕鏈所構成之抗體：由包含序列識別號 2 之第 20～470 號的胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈，及由包含序列識別號 4 之第 21～234 號之胺基

酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

17.如請求項 16 之製造方法，其中抗 TROP2 抗體的重鏈羧基末端之離胺酸殘基有缺失。

18.如請求項 13 之製造方法，其中抗體為抗 B7-H3 抗體。

19.如請求項 18 之製造方法，其中抗 B7-H3 抗體為保持由序列識別號 27 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH1(NYVMH)、由序列識別號 28 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH2(YINPYNDDVKYNEKFKG)、由序列識別號 29 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH3(WGYYGSPLYYFDY)、由序列識別號 30 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL1(RASSRLIYMH)、由序列識別號 31 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL2(ATSNLAS)、及由序列識別號 32 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL3(QQWNSNPPT)之抗體。

20.如請求項 18 之製造方法，其中抗 B7-H3 抗體為由以下的重鏈及輕鏈所構成之抗體：由包含序列識別號 25 之第 20～471 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈，及由包含序列識別號 26 之第 21～233 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

21.如請求項 20 之製造方法，其中抗 B7-H3 抗體的重鏈羧基末端之離胺酸殘基有缺失。

22.如請求項 13 之製造方法，其中抗體為抗 HER2 抗體。

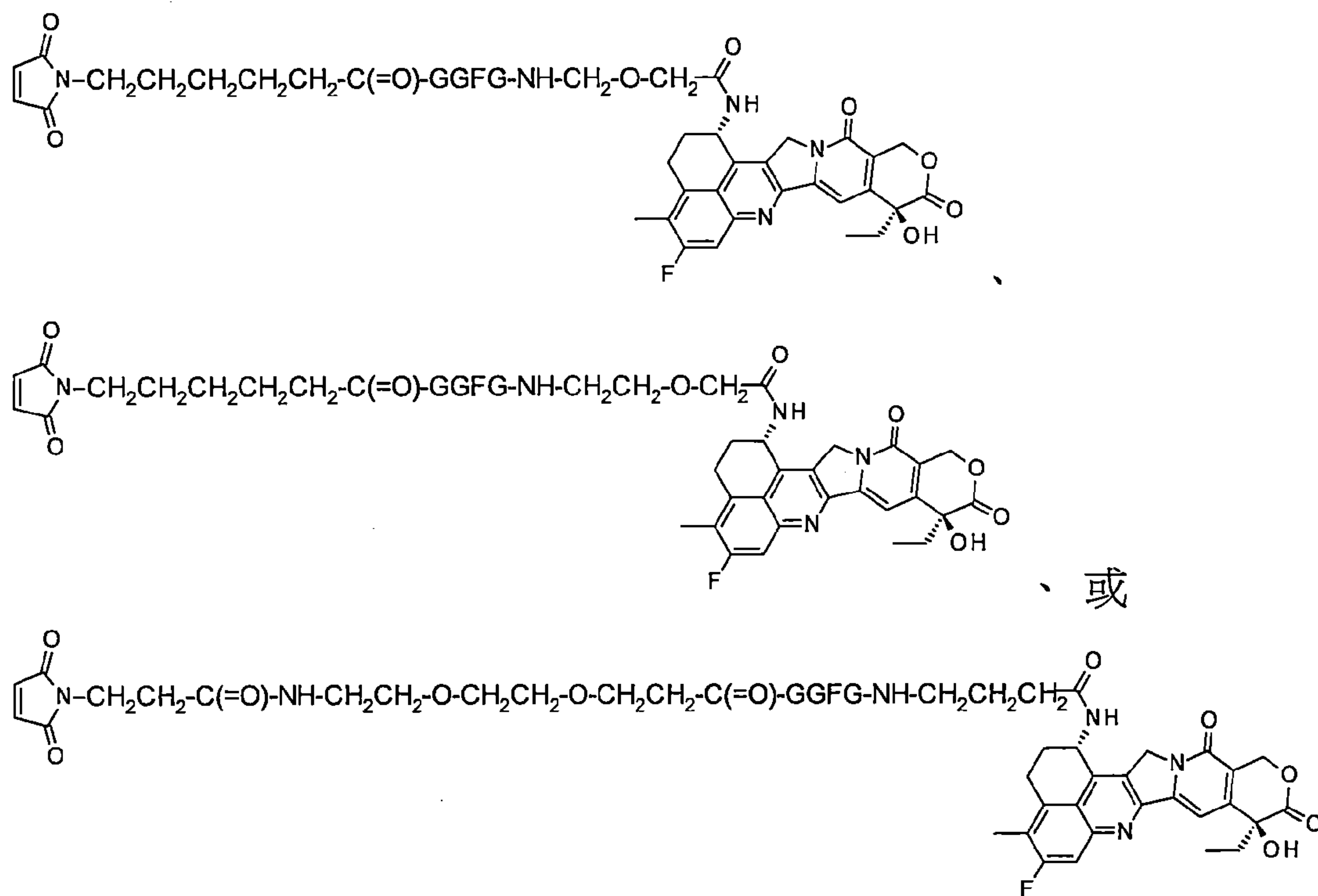
23.如請求項 22 之製造方法，其中抗 HER2 抗體為由以下的重鏈及輕鏈所構成之抗體：由序列識別號 33 之第 1～449 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈，

及由序列識別號 34 之第 1~214 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

24.如請求項 22 之製造方法，其中抗 HER2 抗體由序列識別號 33 所示之胺基酸序列所構成的重鏈及序列識別號 34 所示之胺基酸序列所構成的輕鏈所構成。

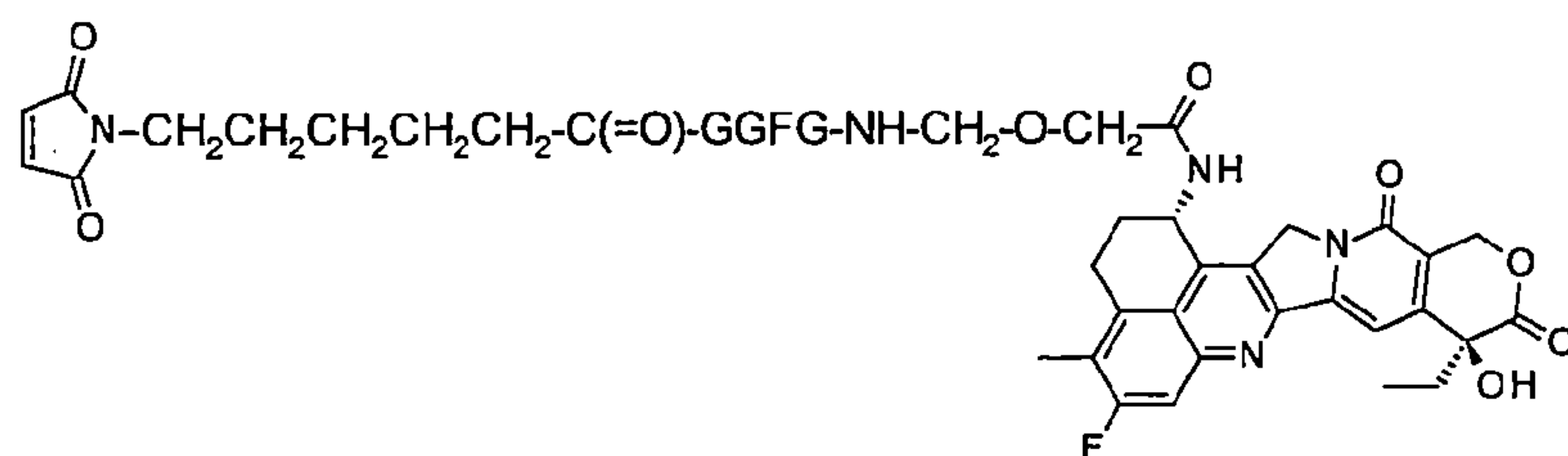
25.如請求項 1 至 6 中任一項之製造方法，其中藥物連結物中間體具有 N-取代順丁烯二醯亞胺基。

26.如請求項 25 之製造方法，其中藥物連結物中間體為



(其中，式中之 -GGFG- 表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

27.如請求項 26 之製造方法，其中藥物連結物中間體為



(其中，式中之 -GGFG- 表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

28. 一種抗體-藥物結合物組成物，其係藉由如請求項 1 至 27 中任一項之製造方法所製造。

29. 一種抗體-藥物結合物組成物，其平均藥物結合數為 3.5～4.5，於重鏈-輕鏈間硫醇基有 4 個藥物連結物結合的抗體-藥物結合物之含有率為 50% 以上。

30. 如請求項 29 之抗體-藥物結合物組成物，其中平均藥物結合數為 4.0～4.1。

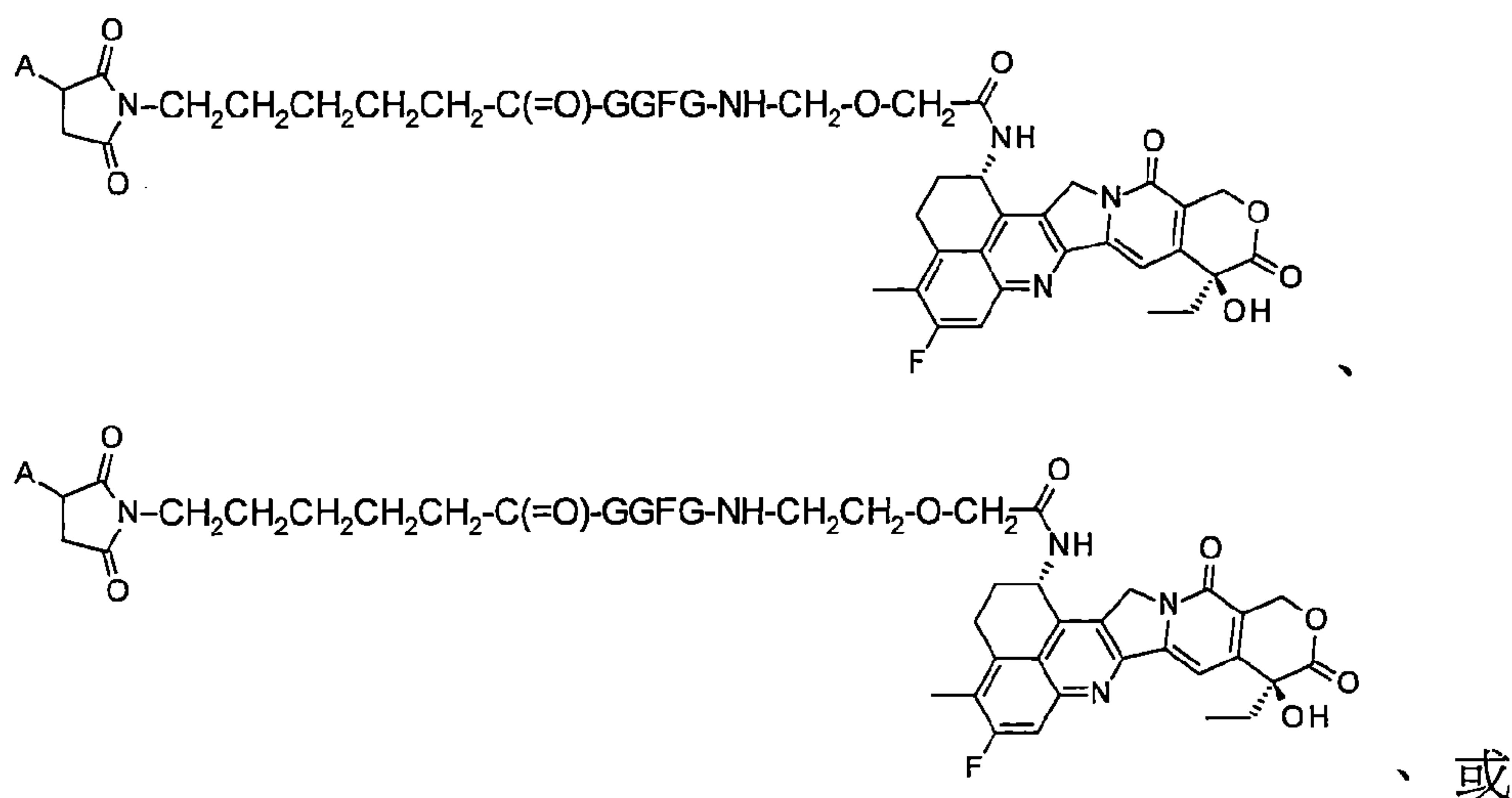
31. 如請求項 29 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗 TROP2 抗體、抗 CD98 抗體、抗 B7-H3 抗體、或抗 HER2 抗體。

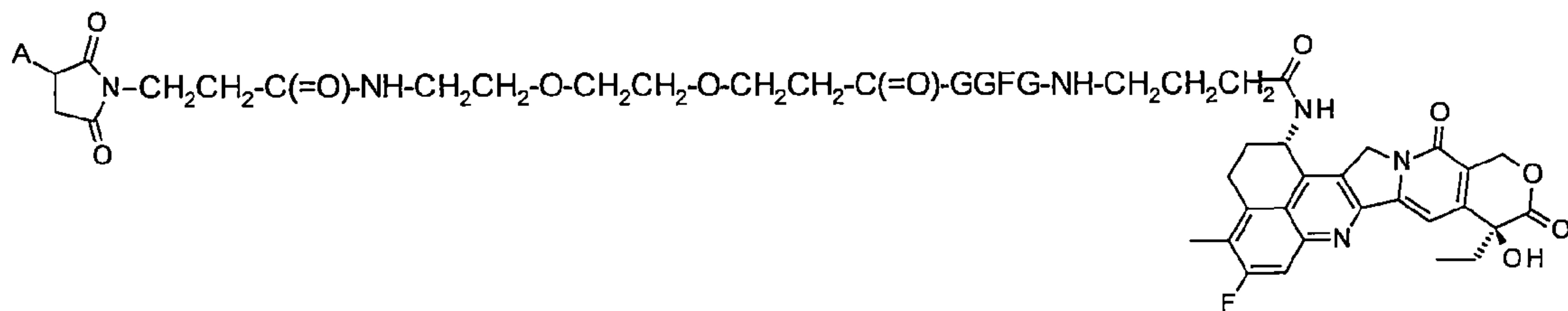
32. 如請求項 31 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗 TROP2 抗體。

33. 如請求項 32 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 TROP2 抗體為保持由序列識別號 5 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH1(TAGMQ)、由序列識別號 6 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH2(WINTHSGVPKYAEDFKG)、由序列識別號 7 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH3(SGFGSSYWYFDV)、由序列識別號 8 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL1(KASQDVSTAVA)、由序列識別號 9 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL2(SASYRYT)、及由序列識別號 10 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL3(QQHYITPLT)之抗體。

34. 如請求項 32 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 TROP2 抗體為由以下的重鏈及輕鏈所構成之抗體：由包含序列識別號 2 之第 20～470 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈，及由包含序列識別號 4 之第 21～234 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。
35. 如請求項 34 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 TROP2 抗體的重鏈羧基末端之離胺酸殘基有缺失。
36. 如請求項 31 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗 B7-H3 抗體。
37. 如請求項 36 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 B7-H3 抗體為保持由序列識別號 27 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH1(NYVMH)、由序列識別號 28 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH2(YINPYNDDVKYNEKFKG)、由序列識別號 29 所示的胺基酸序列所構成的 CDRH3(WGY YGSPLY YFDY)、由序列識別號 30 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL1(RASSRLIYMH)、由序列識別號 31 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL2(ATSNLAS)、及由序列識別號 32 所示的胺基酸序列所構成的 CDRL3(QQWNSNPPT)之抗體。
38. 如請求項 36 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 B7-H3 抗體為由以下的重鏈及輕鏈所構成之抗體：由包含序列識別號 25 之第 20～471 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈，及由包含序列識別號 26 之第 21～233 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。

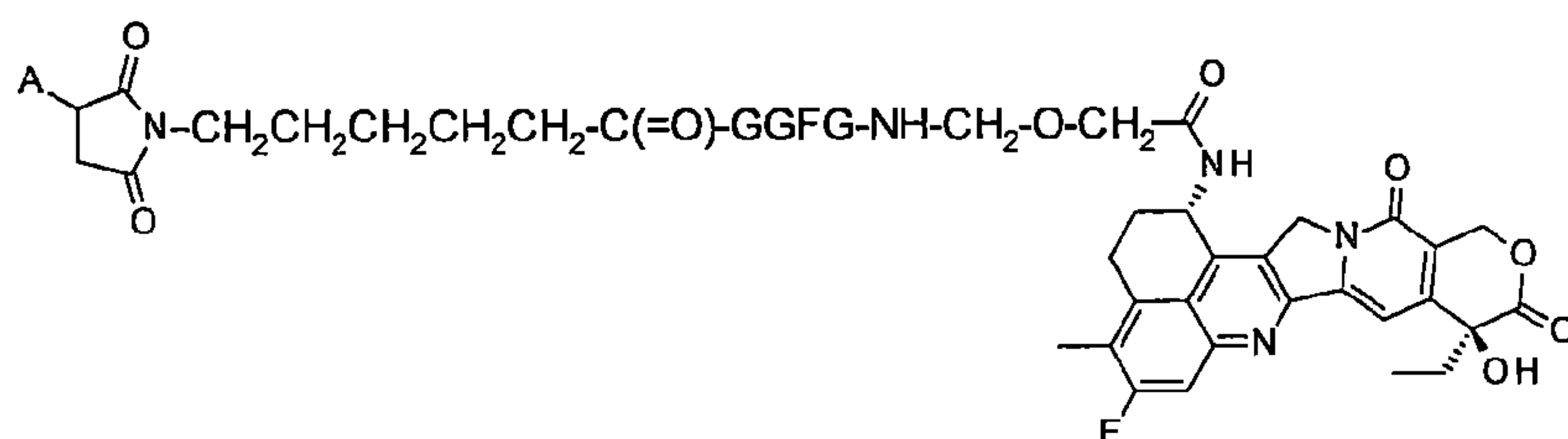
39. 如請求項 38 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 B7-H3 抗體的重鏈羧基末端之離胺酸殘基有缺失。
40. 如請求項 31 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗體為抗 HER2 抗體。
41. 如請求項 40 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 HER2 抗體為由以下的重鏈及輕鏈所構成之抗體：由序列識別號 33 之第 1~449 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的重鏈，及由序列識別號 34 之第 1~214 號之胺基酸殘基的胺基酸序列所構成的輕鏈。
42. 如請求項 40 之抗體-藥物結合物組成物，其中抗 HER2 抗體由序列識別號 33 所示之胺基酸序列所構成的重鏈及序列識別號 34 所示之胺基酸序列所構成的輕鏈所構成。
43. 如請求項 29 至 42 中任一項之抗體-藥物結合物組成物，其中藥物連結物為





(其中，式中之 A 表示與抗體的結合位置，-GGFG- 表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

44. 如請求項 43 之抗體-藥物結合物組成物，其中藥物連結物為



(其中，式中之 -GGFG- 表示包含甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸的四肽殘基)。

45. 一種醫藥組成物，其含有如請求項 28 至 44 中任一項之抗體-藥物結合物組成物。

46. 如請求項 45 之醫藥組成物，其係用於腫瘤及/或癌之治療。

47. 如請求項 46 之醫藥組成物，其係用於肺癌、腎癌、尿道上皮癌、大腸癌、前列腺癌、多型性神經膠母細胞瘤 (glioblastoma multiforme)、卵巢癌、胰臟癌、乳癌、黑色素癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、子宮體癌、頭頸部癌、食道癌、膽管癌、甲狀腺癌、淋巴瘤、急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、及/或多發性骨髓瘤之治療。

圖式

序列識別號 1：人類化抗 TROP2 抗體重鏈（hTINA1-H1）之核苷酸序列

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggt
gcagtctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacacct
ttaccaccgcccgcgtgagctgggtgcgccaggctcctggacagggcctggaatggatgggctggatcaac
acccacagcggcgtgccc aaatacgccgaggacttcaagggcagagtgaccatcagcgccgacaccagcac
ctccacagcctacctgcagctgagcagcctgaagtccgaggacaccgcccgtgtactactgcgccagaagcg
gcttcggcagcagctactggtacttcgacgtgtggggccagggcaccctcgtgaccgtcagctcagcctcc
accaagggcccaagcgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcgccacagccgcccctggg
ctgcctggtcaaggactacttccccgaaccctgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcg
tgcacaccttccccgctgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctcc
agcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagag
agttgagcccaaattcttgtagaaaaactcacacatgccaccctgccagcacctgaactcctggggggac
cctcagtccttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgc
gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca
taatgccaagacaaagccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcc
tgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatc
gagaaaaccatctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccggga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtgg
agtgggagagcaatggccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcc
ttcttcctctacagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgt
gatgcatgaggctctgcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccggcaaa

訊息序列（1-57）、可變區（58-420）、恆定區（421-1410）

序列識別號 2：人類化抗 TROP2 抗體重鏈（hTINA1-H1）之胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAA PRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWIN
THSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

訊息序列（1-19）、可變區（20-140）、恆定區（141-470）

第1圖

序列識別號 3：人類化抗 TROP2 抗體輕鏈（hTINA1-L1）之核苷酸序列

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtaacggcgacatccagat
gaccagagccctagcagcctgagcgccagcgtgggacagagtgaccatcacatgcaaggccagccagg
acgtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcctggcaaggcccccaagctgctgatctacagcgcc
agctaccgggtacaccggcggtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacttcaccctgacaat
cagcagcctgcagcccaggacttcgcccgtgtactactgccagcagcactacatccccccctgacctttg
gccagggcaccaagctggaaatcaagcgtacgggtggccgccccctccgtgttcatcttccccccctccgac
gagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttctaccccagagaggccaaggt
gcagtggaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtgaccgagcaggacagcaagg
acagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgagaagcacaaggtgtacgcc
tgcgaggtgacccaccagggcctgagctcccccgctaccaagagcttcaacaggggggagtggt

訊息序列（1-60）、可變區（61-387）、恆定區（388-702）

序列識別號 4：人類化抗 TROP2 抗體輕鏈（hTINA1-L1）之胺基酸序列

MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA
SYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

訊息序列（1-20）、可變區（21-129）、恆定區（130-234）

第2圖

序列識別號 11：人類化抗 CD98 抗體重鏈（hM23-H1）之核苷酸序列

atgaaacacctgtggttcttcctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccaggtgcagctggt
gcagtctggcgccgaagtgaagaaaccaggcgccagcgtgaaggtgtcctgcaaggccagcggctacgcct
tcagcaactacctgatcgagtgggtgcgccaggccccctggacagggactggaatggatgggcgtgatcaac
cctggcagcggcgtgaccaactacaacgagaagttcaagggcagagtgaccatcaccgccgacaccagcac
ctccaccgcctacatggaactgagcagcctgcggagcgaggacaccgcccgtgtactattgtgccagagccg
aggcttggtttgcctactggggccagggaaccctcgtgaccgtcagctcagcctccaccaagggcccaagc
gtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggcggcacagccgccctgggctgcctggtcaagga
ctacttccccgaaccctgaccgtgagctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttccccg
ctgtcctgcagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacc
cagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagcccaaatc
ttgtgacaaaactcacacatgcccaccctgcccagcacctgaactcctggggggaccctcagtcttctct
tccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg
agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaa
gccccgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggc
tgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaa
ccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg
gccagccccgagaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc
aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctct
gcacaaccactacaccagaagagcctctccctgtctcccggcaaa

訊息序列（1-57）、可變區（58-405）、恆定區（406-1395）

序列識別號 12：人類化抗 CD98 抗體重鏈（hM23-H1）之胺基酸序列

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSNYLIWVRQAPGQGLEWMGVIN
PGSGVTNYNEKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEAWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

訊息序列（1-19）、可變區（20-135）、恆定區（136-465）

第3圖

序列識別號 13：人類化抗 CD98 抗體輕鏈（hM23-L1）之核苷酸序列

atggtgctgcagacccaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtagggcgacatcgtgat
gaccagagccctgacagcctggccgtgtctctgggagagagagccaccatcaactgcaagagcagccaga
gcctgctgtactccagcaaccagaagaactacctggcctggtatcagcagaagcccggccagcctcccaag
ctgctgatctactgggcccagcaccagagaaagcggcgtgcccgatagattcagcggcagcggaagcggcac
cgacttcaccctgacaatcagctccctgcaggccgaggacgtggccgtgtactactgccagcggtactacg
gctacccctggacctttggccagggcaccaaggtggaaatcaagcgtagcgtggccgccccctccgtgttc
atcttccccccctccgacgagcagctgaagtccggcaccgcctccgtgggtgtgcctgctgaataacttcta
ccccagagaggccaaggtgcagtggaaaggtggacaacgccctgcagtccgggaactcccaggagagcgtga
ccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcctgagcagcaccctgaccctgagcaaagccgactacgag
aagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacccaccagggcctgagctcccccgtcaccaagagcttcaacag
gggggagtgt

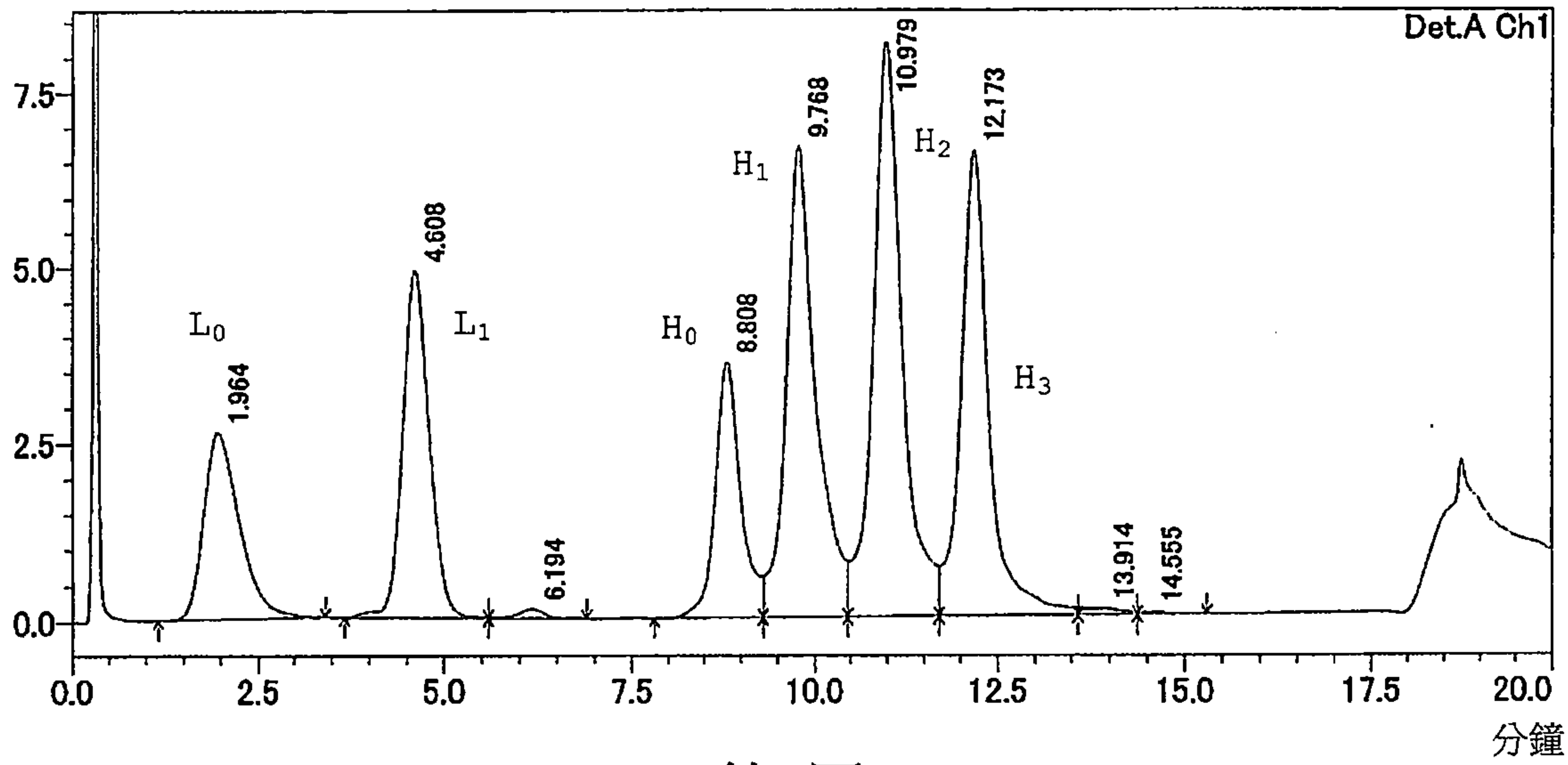
訊息序列（1-60）、可變區（61-405）、恆定區（406-720）

序列識別號 14：人類化抗 CD98 抗體輕鏈（hM23-L1）之胺基酸序列

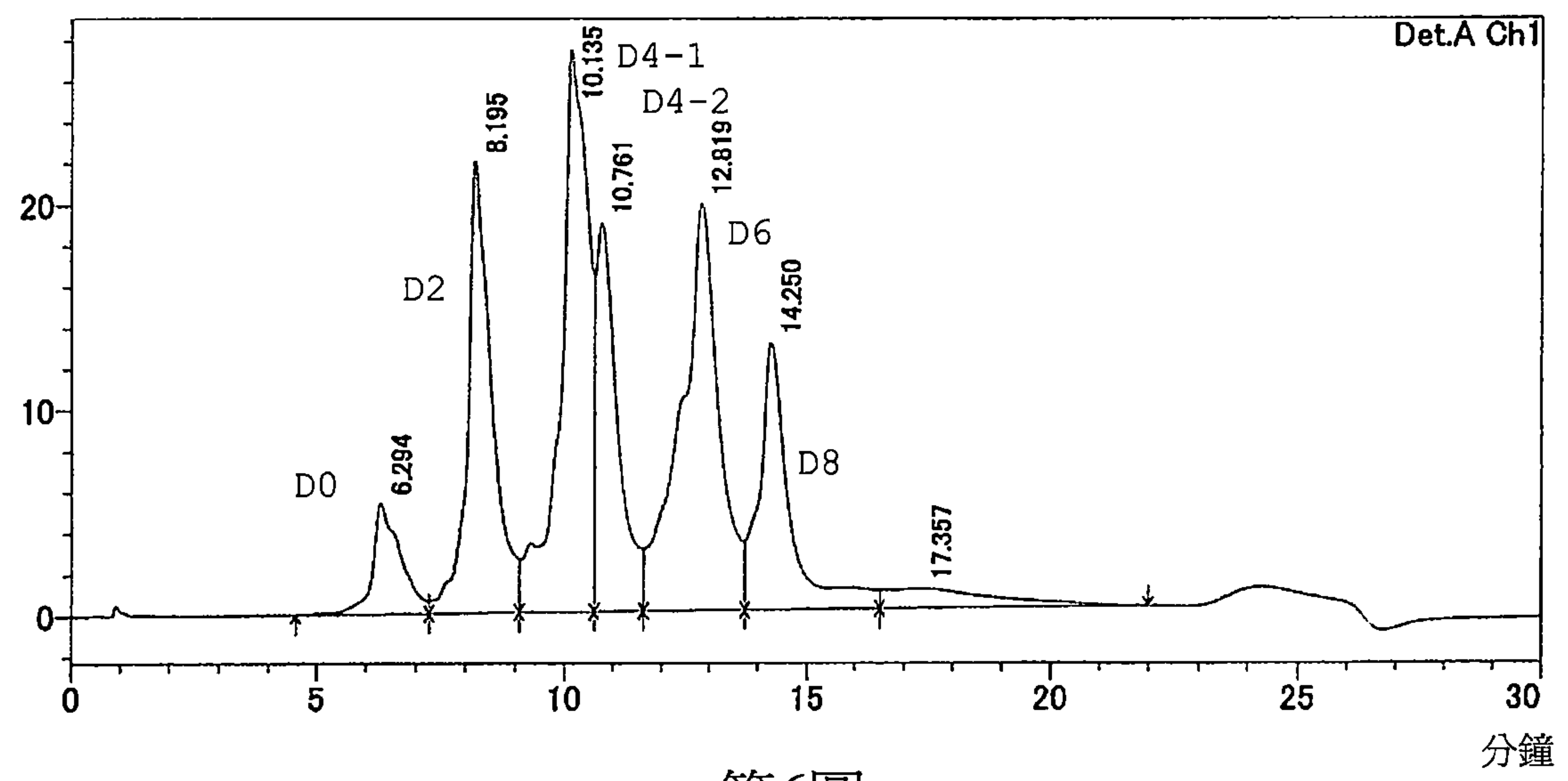
MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPK
LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQRYYGYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

訊息序列（1-20）、可變區（21-135）、恆定區（136-240）

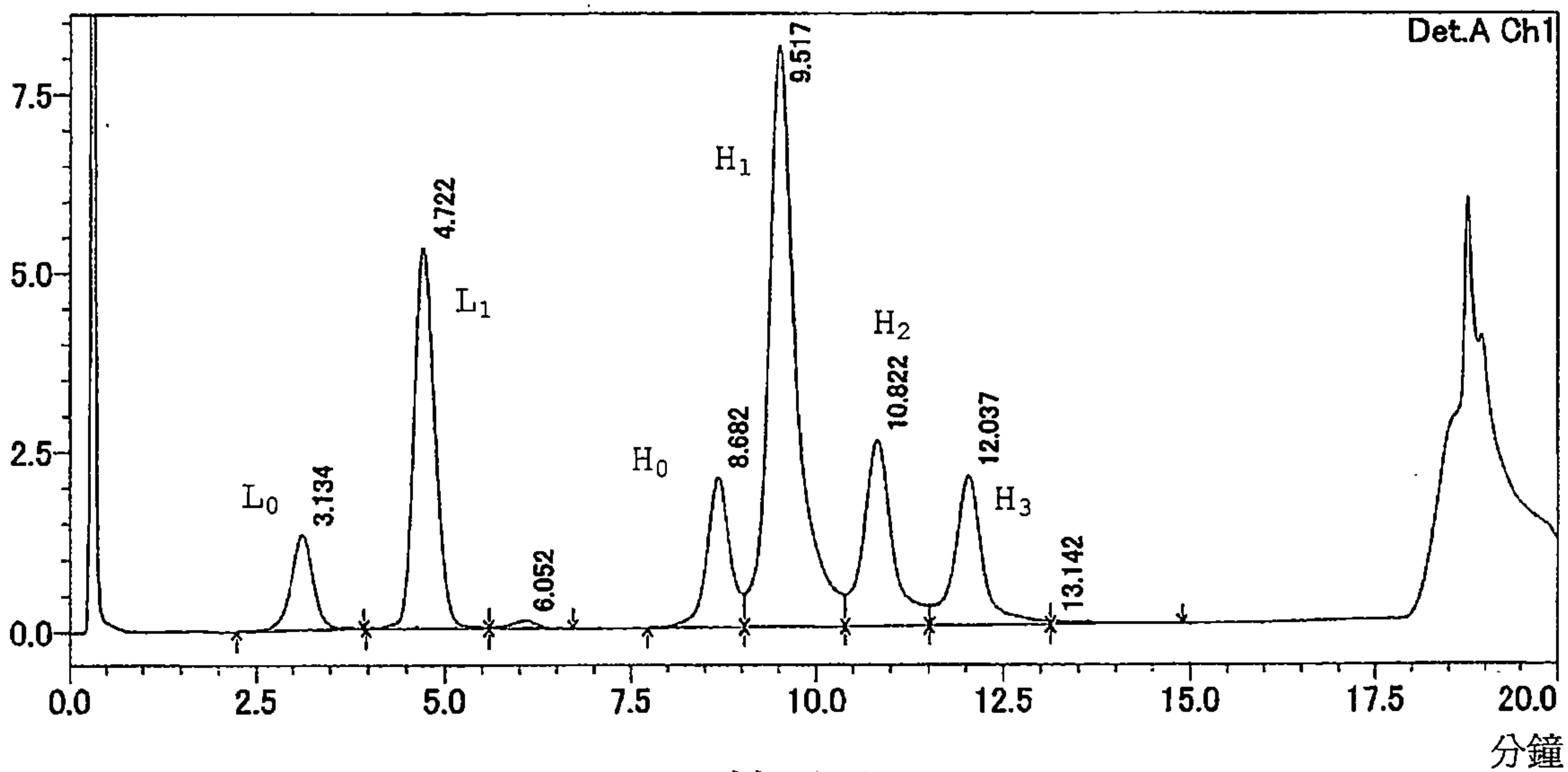
第4圖



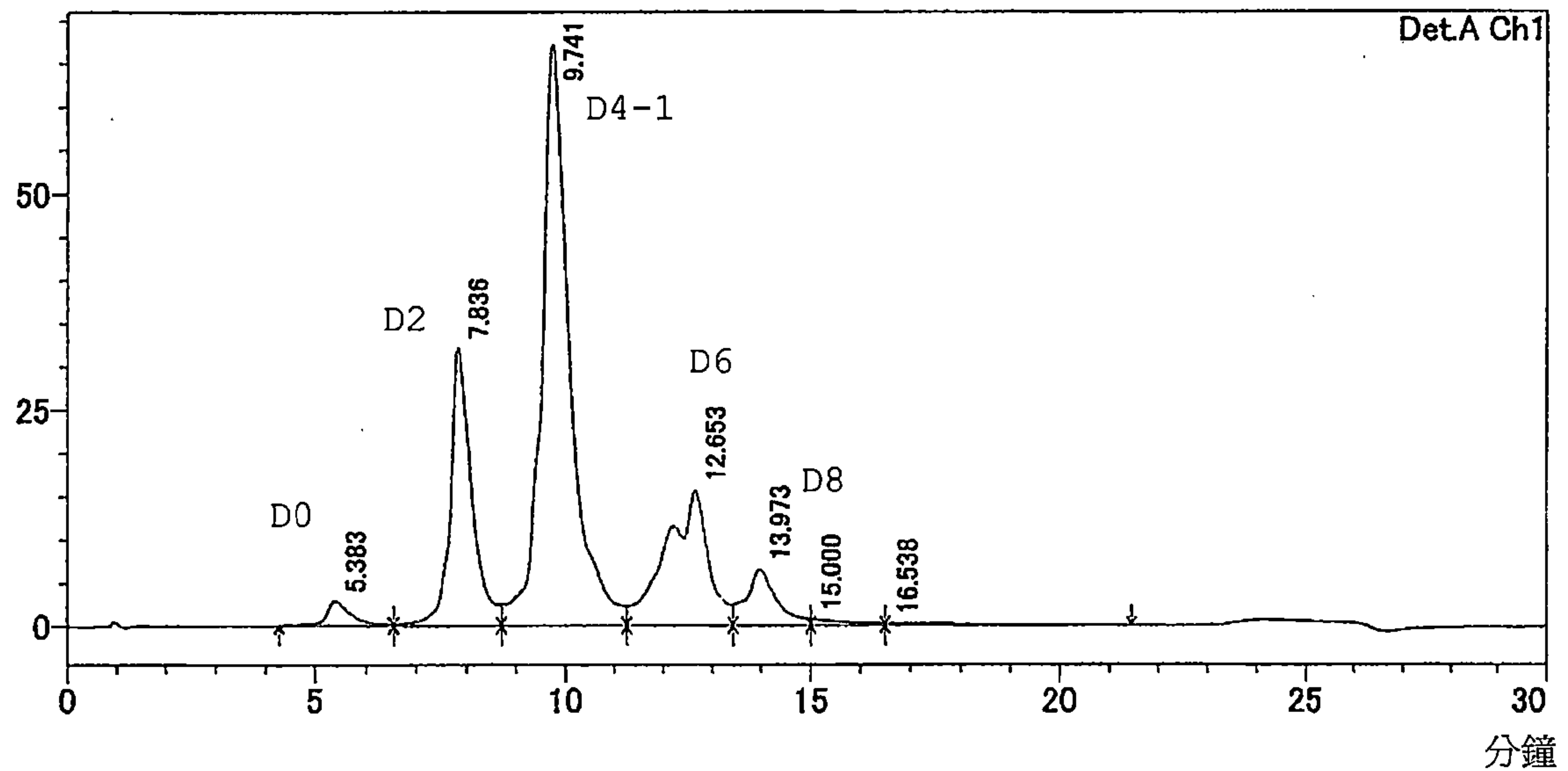
第5圖



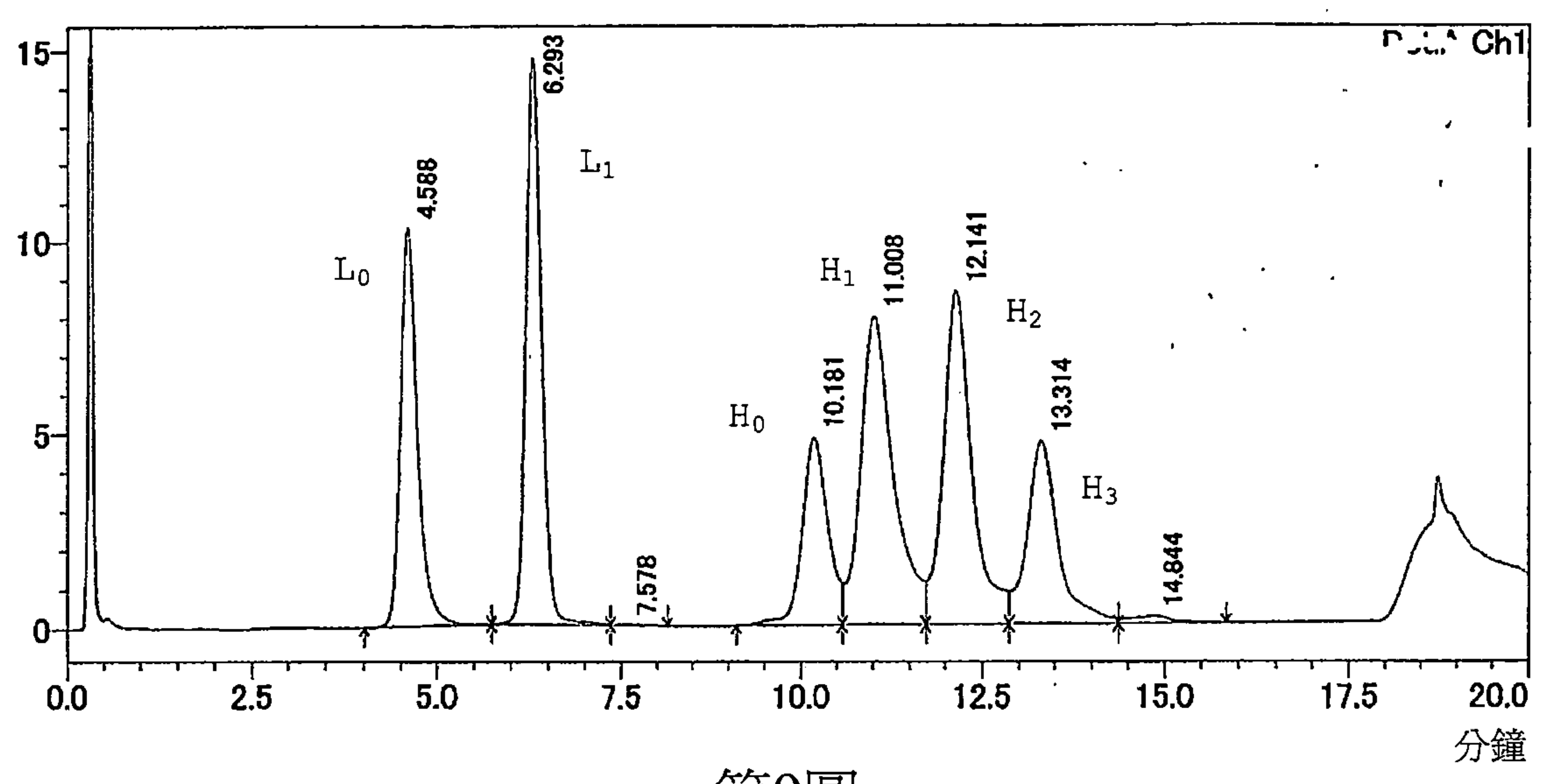
第6圖



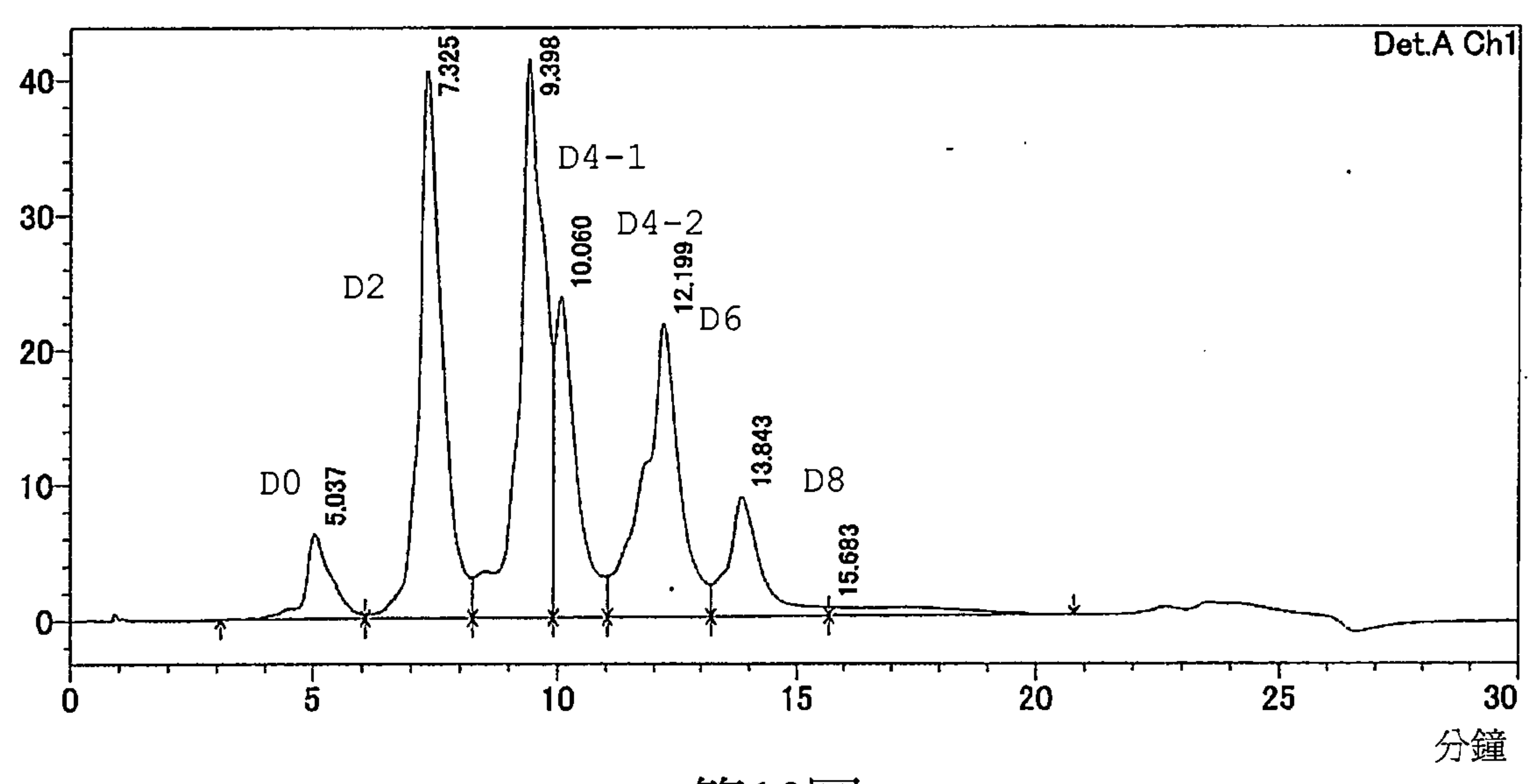
第7圖



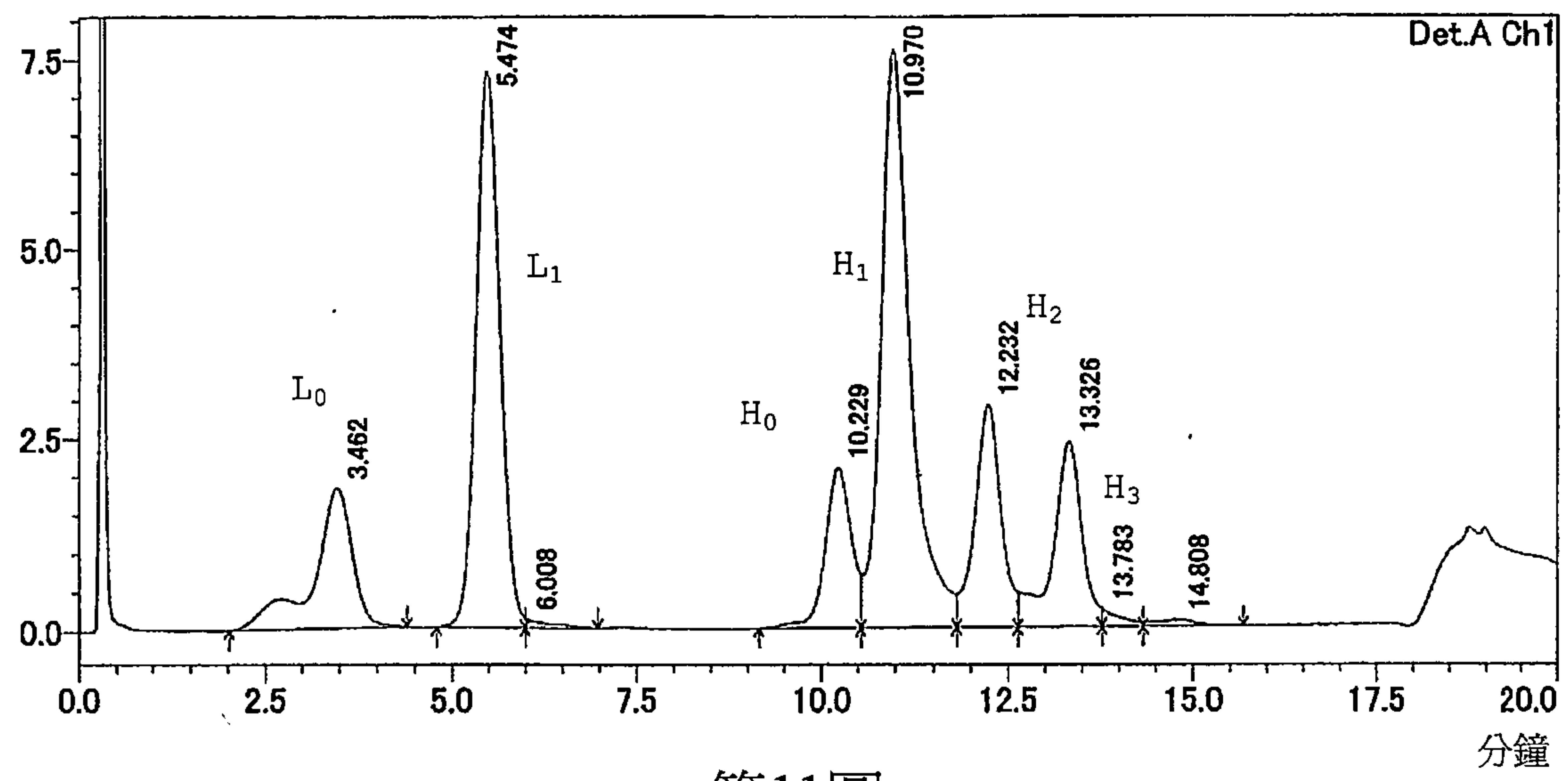
第8圖



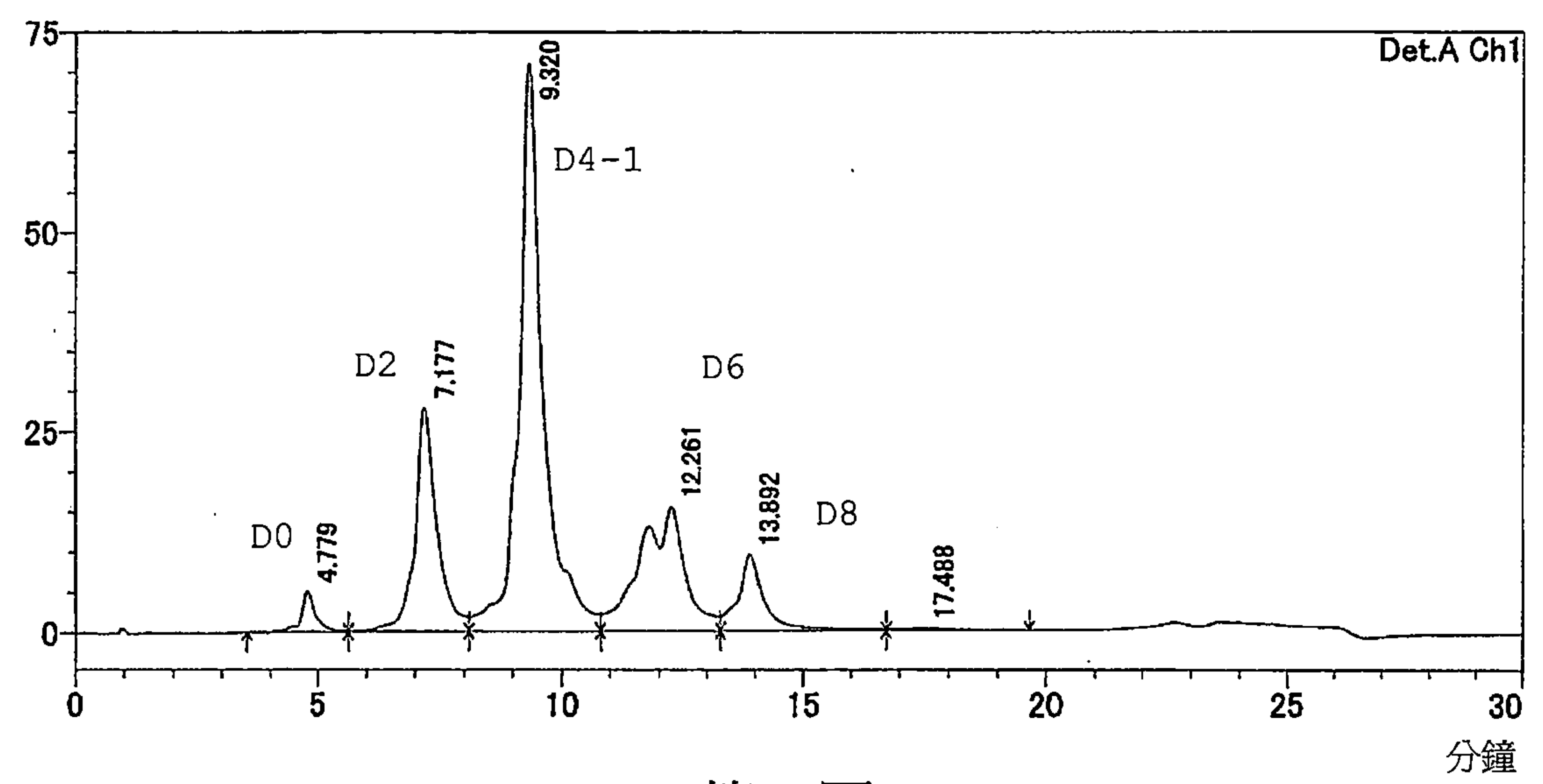
第9圖



第10圖



第11圖



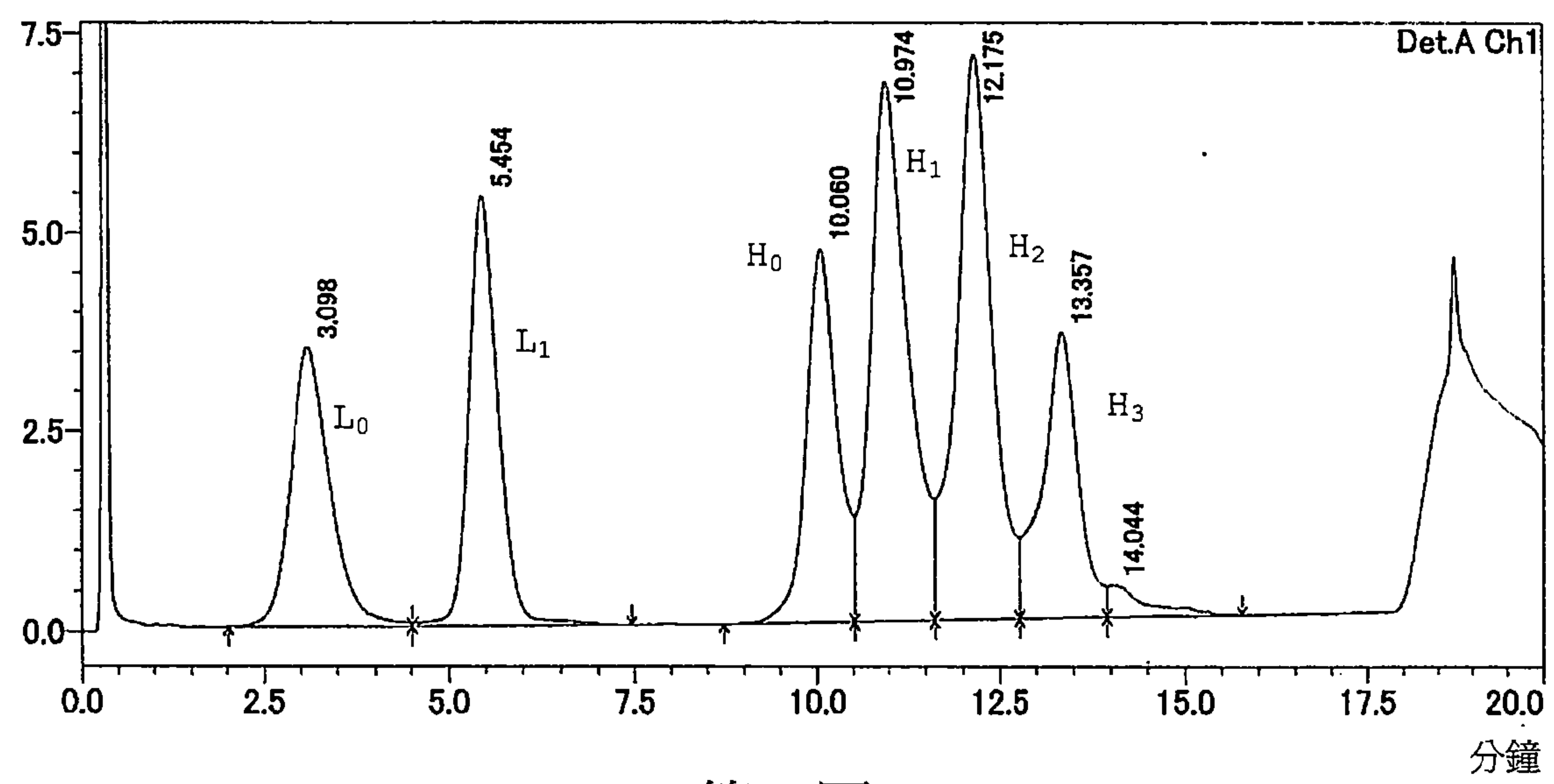
第12圖

序列識別號 25：人類化抗 B7-H3 抗體重鏈（M30-H1）之胺基酸序列
MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQGLEWMGYIN
PYNDDVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYYGSPLY YFDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
訊息序列（1-19）、可變區（20-141）、恆定區（142-471）

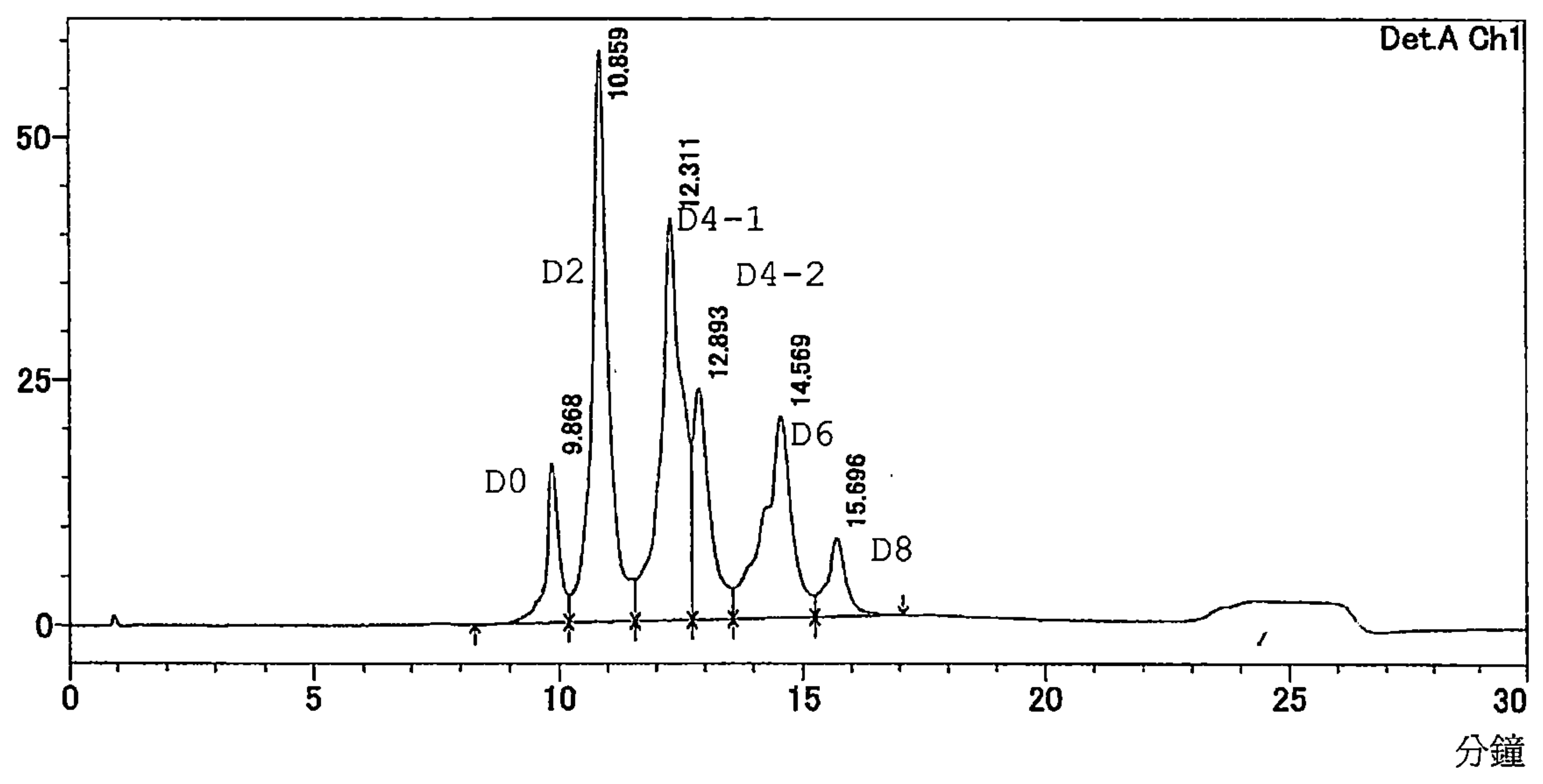
第13圖

序列識別號 26：人類化抗 B7-H3 抗體輕鏈（M30-L4）之胺基酸序列
MVLQTQVFISLLLLWISGAYGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATS
NLASGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
訊息序列（1-20）、可變區（21-128）、恆定區（129-233）

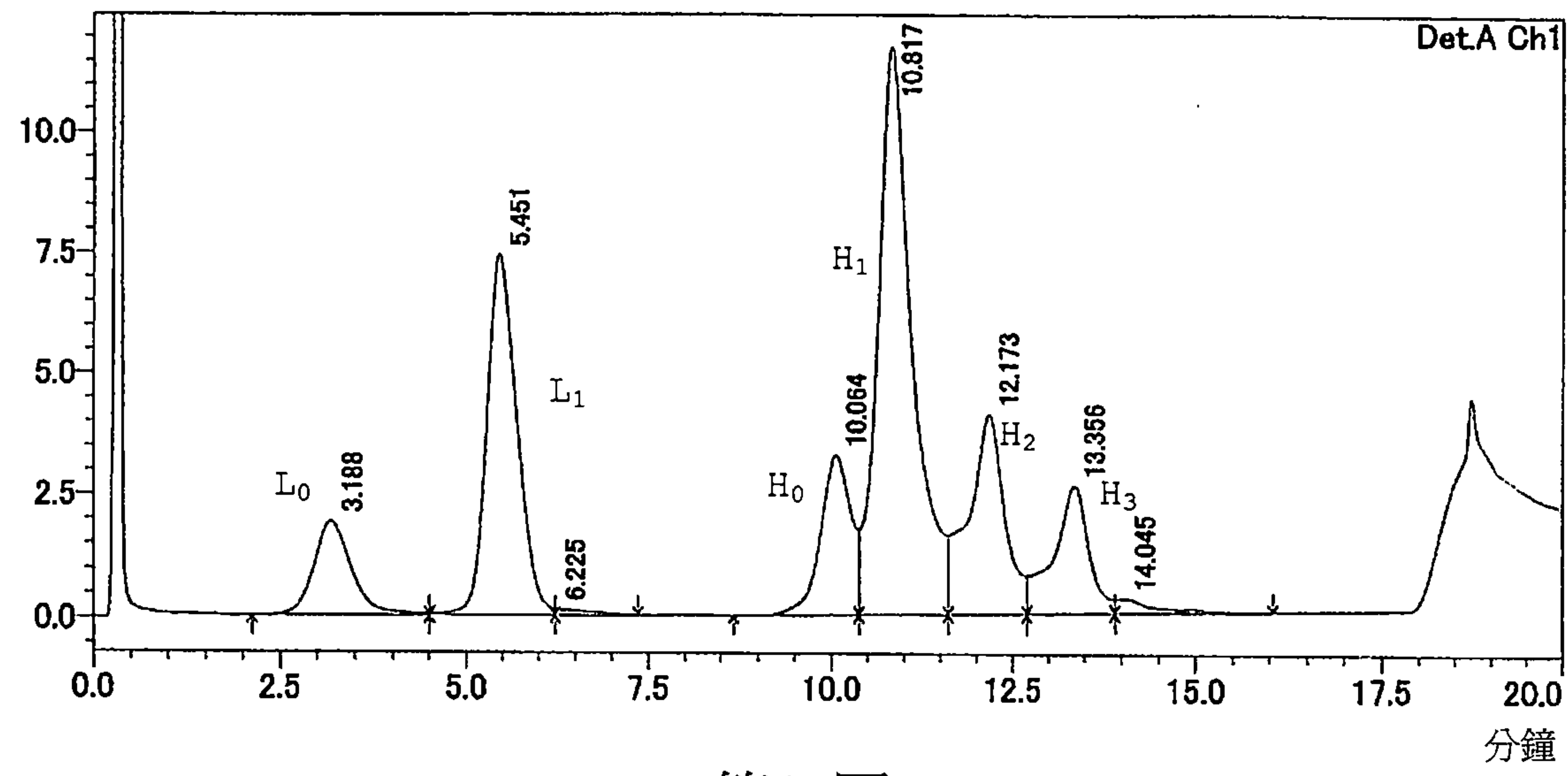
第14圖



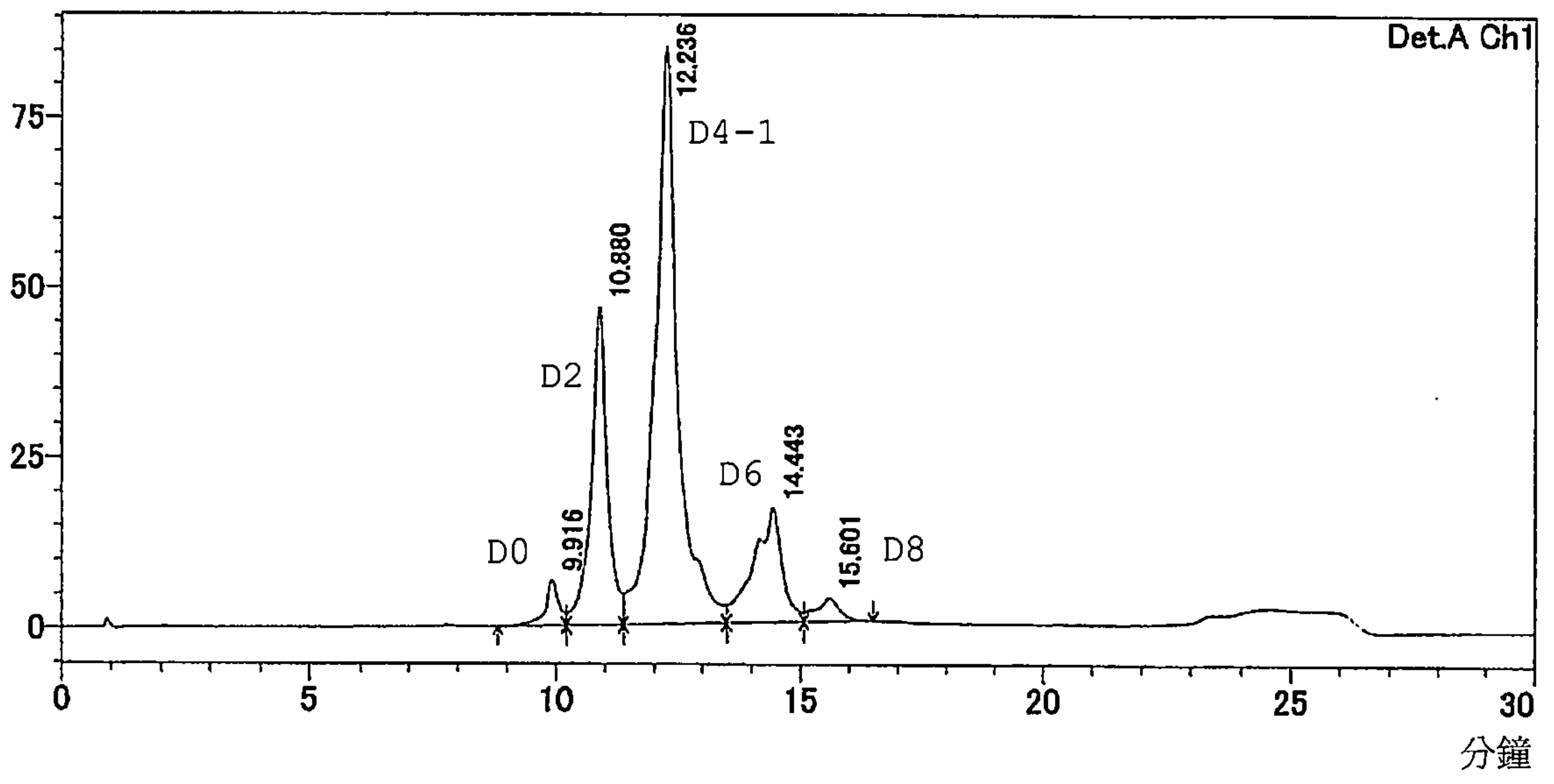
第15圖



第16圖



第17圖



第18圖

序列識別號 33：人類化抗 HER2 抗體重鏈之胺基酸序列

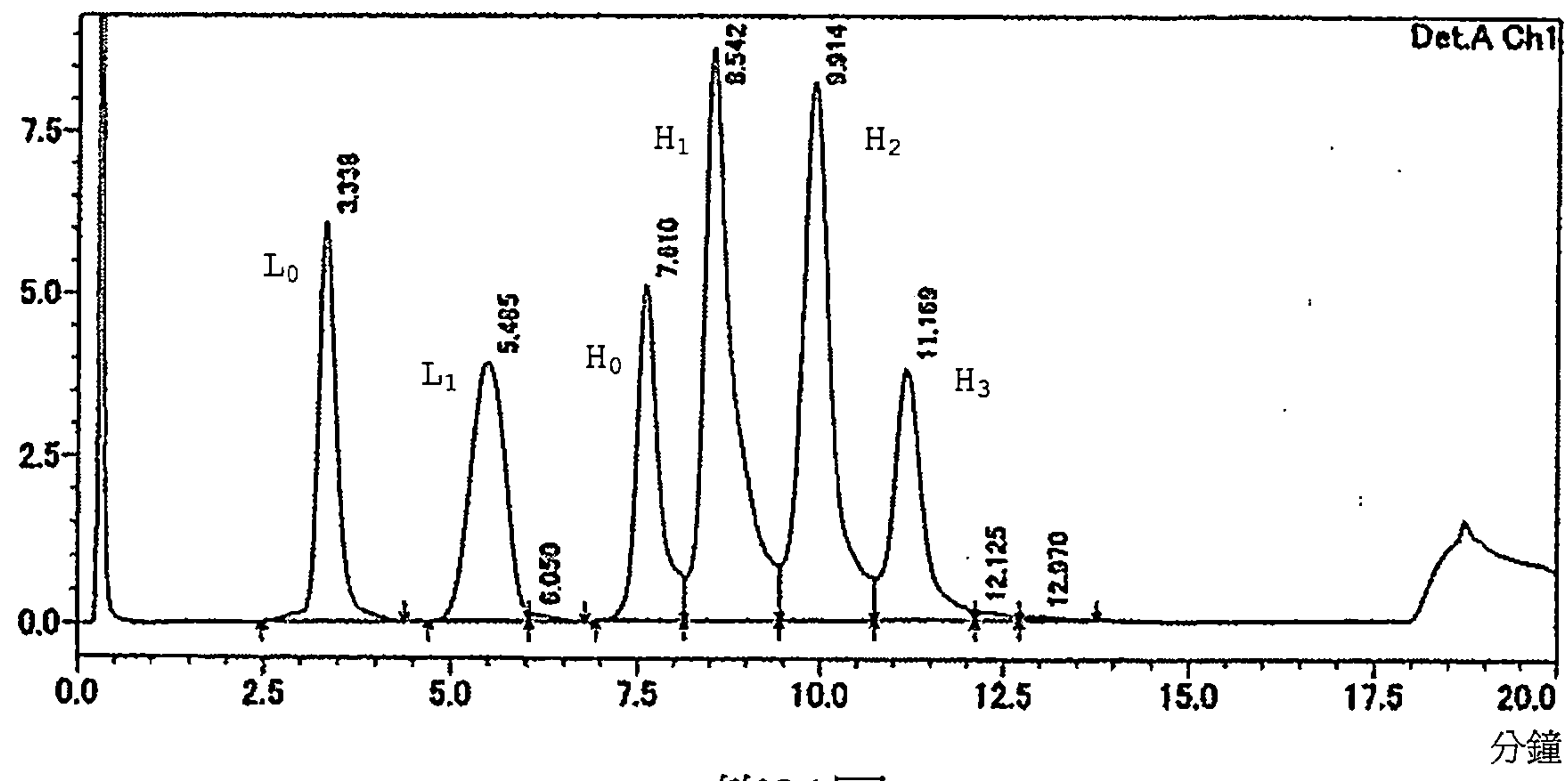
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS
ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

第19圖

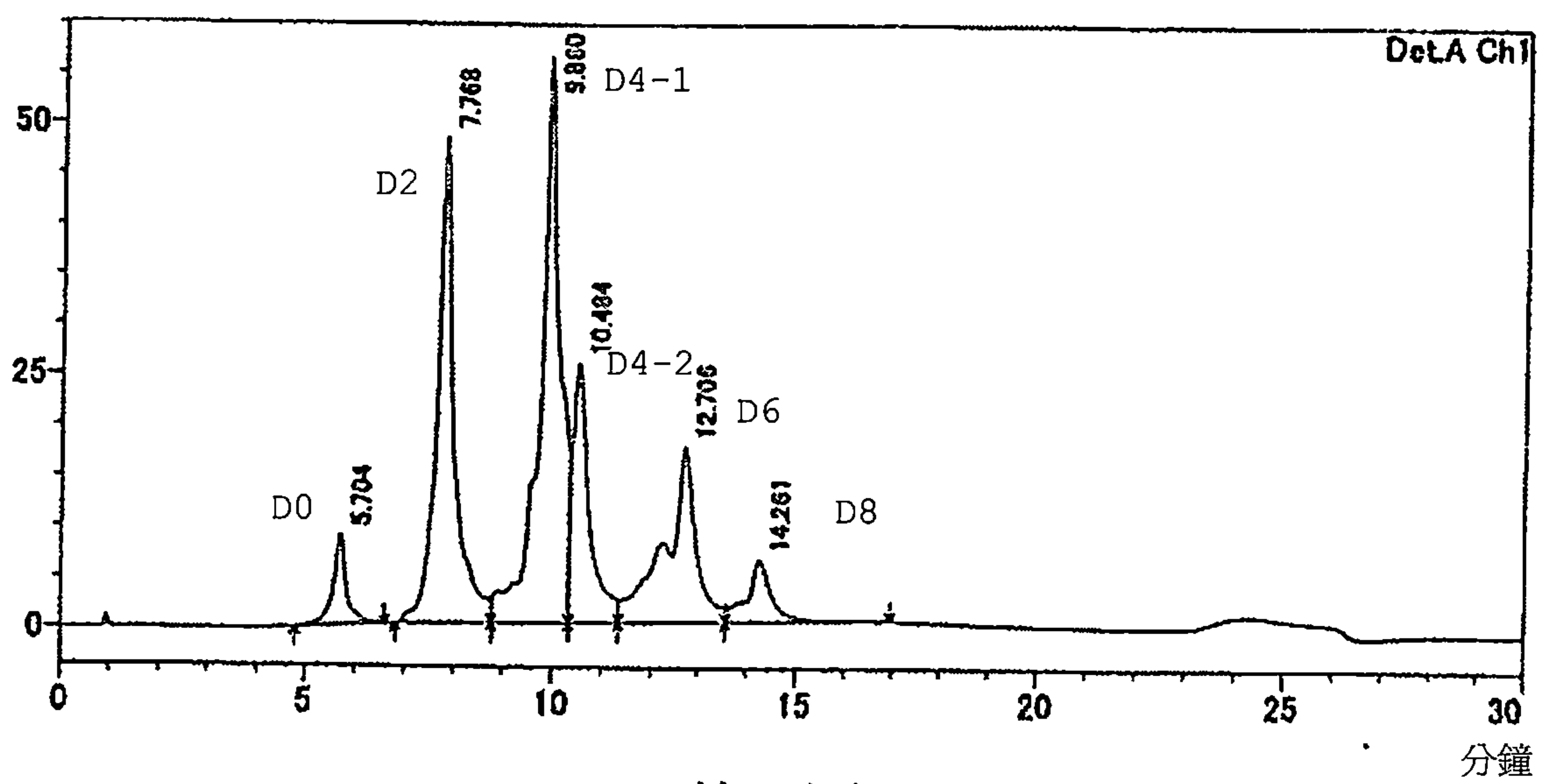
序列識別號 34：人類化抗 HER2 抗體輕鏈之胺基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLLYSGVPSRFSGSRSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

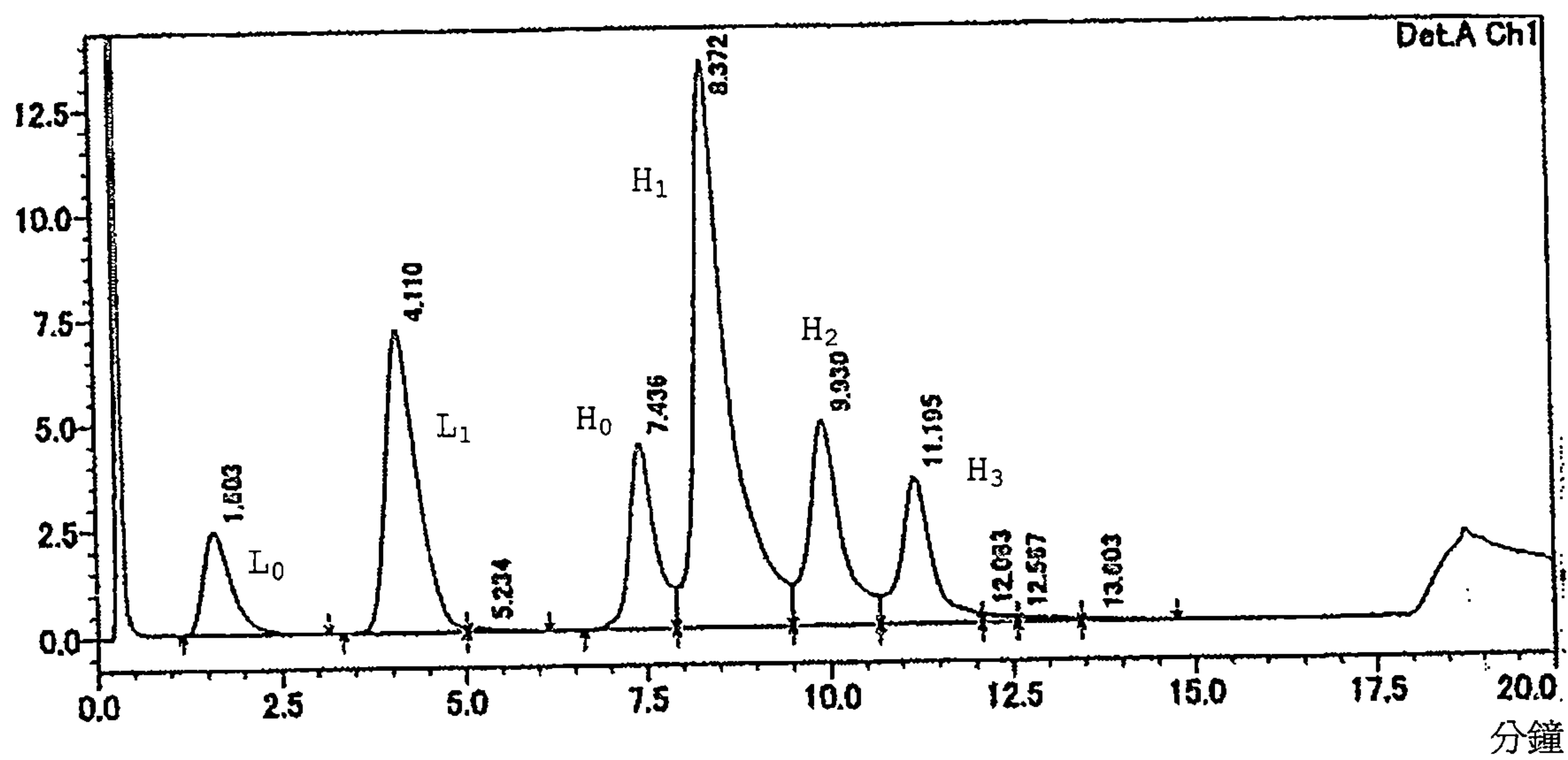
第20圖



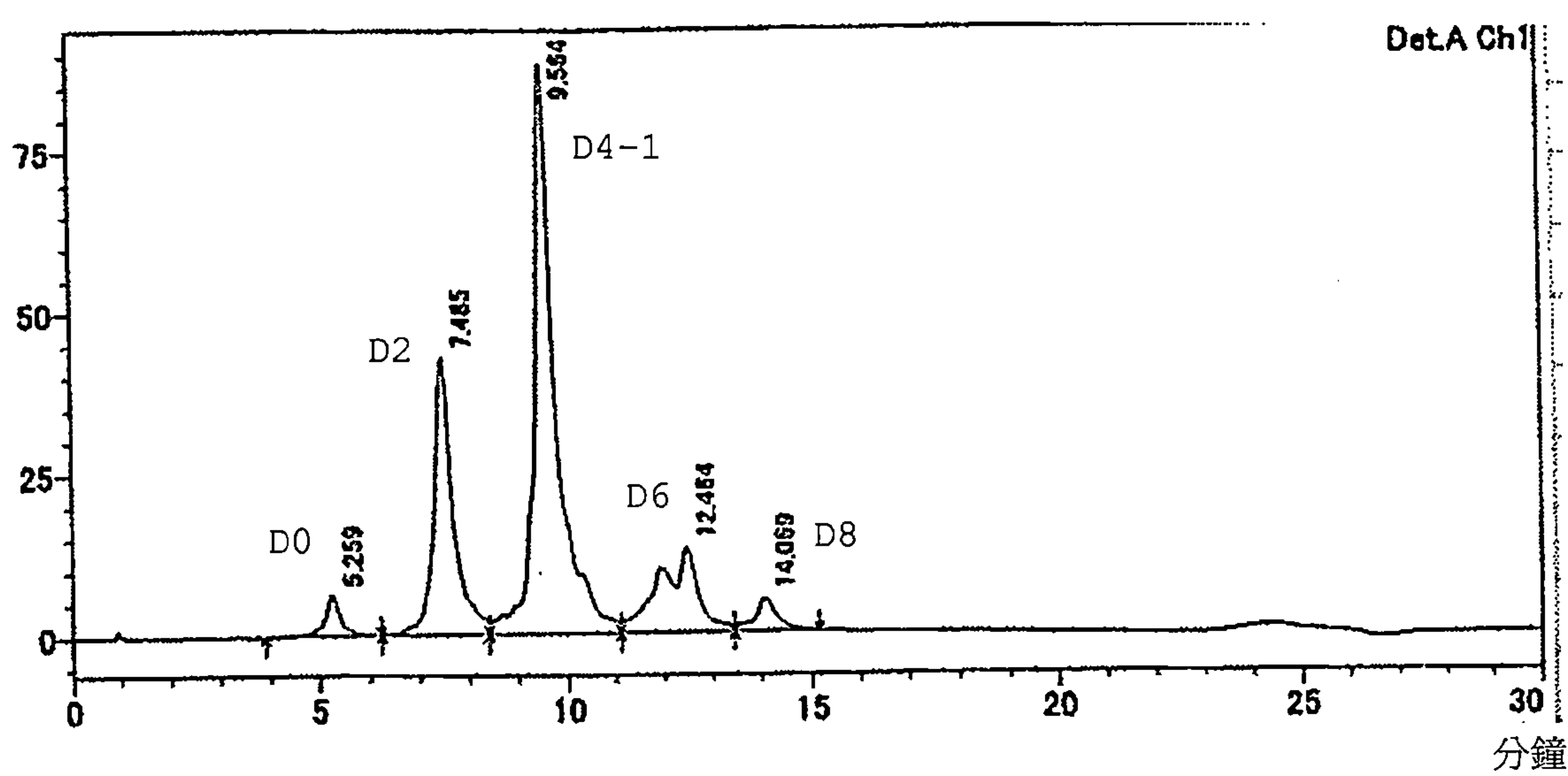
第21圖



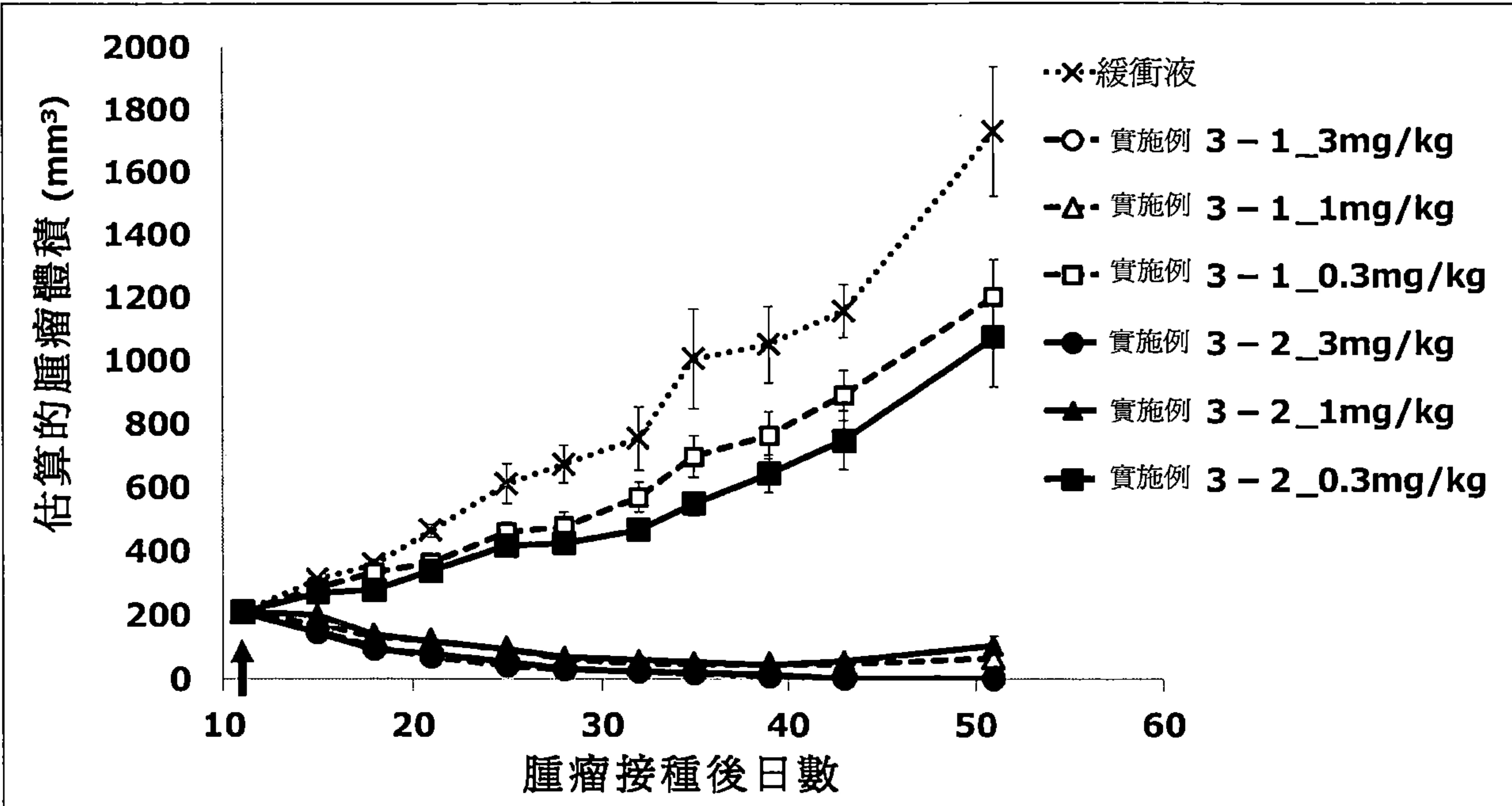
第22圖



第23圖



第24圖



第25圖